

編號：CCMP95-RD-206

黃耆皂苷IV及丹參酮IIA對人類 肺癌細胞基因表現的影響

蘇進成

佛教慈濟綜合醫院

摘要

研究目的：肺癌是台灣地區癌症死亡原因的第一名。很多肺癌病人經常服用中藥黃耆和丹參來輔助治療，但其確切療效，至今仍不完全清楚。本研究希望利用分子醫學和生物晶片來探討黃耆皂苷IV及丹參酮IIA對肺癌細胞的影響。

方法：首先利用 MTT 方法檢測不同濃度的黃耆皂苷IV和丹參酮IIA，對肺癌細胞的細胞毒性。接著利用 FACS 檢測對肺癌細胞的細胞週期效應、粒腺體膜電位、活化氧族群及鈣離子釋放的影響。利用 Western blot 檢測引起細胞凋亡、轉移相關信號傳遞蛋白量的改變。利用生物晶片檢測作用在肺癌細胞株可能的靶標基因。最後利用動物實驗(in vivo)，檢測丹參酮IIA的肝腎毒性及對轉殖人類肺癌細胞(H146)小鼠的治療作用。

結果與討論：結果顯示黃耆皂苷IV在體外不能抑制人類肺癌細胞株的增殖及引發細胞凋亡，反而上調轉移相關基因的蛋白表現，利用生物晶片檢測，並沒有顯著的基因改變。丹參酮IIA在體外對於人類肺癌細胞株的增殖，確實有抑制作用，並且有濃度依存效應。也可增加釋放 ROS、降低 MMP 和增加 Ca²⁺ 釋放，引起 A549、H292、H661 細胞凋亡。本研究結果顯示可使肺癌細胞 A549 上調 Cox-2、VEGF、NF- κ Bp65、P53、Cyto- c 和 bax；下調 Bcl-2 和 P21 的蛋白表現。肺癌細胞 H292 上調 Cox-2、VEGF、NF- κ Bp65、P53、P21、Cyto- c 和 bax；下調 Bcl-2 的蛋白表現。肺癌細胞 H661 上調 VEGF、NF- κ Bp65、Bcl-2 和 P53；下調 Cox-2、Cyto- c、bax 和 P21 的蛋白表現。肺癌細胞 H146 明顯下調 NF- κ Bp65 蛋白的表現量。而丹參酮IIA作用在肺癌細胞株(A549, H292, H146)後，可上調 DNA damage

inducible transcript 3 及下調 CYCLIN B2 ， AURORA KINASE A ， KINESIN FAMILY MEMBER 14 和 KINESIN FAMILY MEMBER 20A 的基因表現。藉由動物實驗，證明丹參酮 II A 經由口服和腹腔注射的安全性很高。藉由腹腔注射治療，可減少荷肺癌細胞(H146)小鼠死亡，並且部份有療效。丹參酮 II A 將來是很有潛力的肺癌輔助治療藥物。

關鍵詞：黃耆皂苷IV，丹參酮 II A，肺癌，生物晶片

編號：CCMP95-RD- 206

Effects of Astragaloside IV and Tanshinone II A on Gene Expression in Human Lung Cancer Cells

Chin-Cheng Su
Buddhist Tzu Chi General Hospital

ABSTRACT

Purpose: Lung cancer is the leading cause of death related with cancer in Taiwan. Huang-qi and danshen were accessory treatment for those patients with lung cancer. Up to now the curative effect was not proved clearly. In present study, we try to investigate the molecular mechanisms and gene effects of Astragaloside IV and Tanshinone IIA for human lung cancer cells.

Method: The cytotoxicity of Astragaloside IV and Tanshinone IIA in lung cancer cells (A-549, NCI-H661, NCI-H292, NCI-H146, NCI-H1688) were determined by MTT assay. Analysis the change of cell cycle and MMP, R.O.S and Ca²⁺ released in lung cancer cells by Flow cytometry. Western blotting for examining the effect of Tanshinone IIA on the expressions of p53, p21, bcl-2, bax, cytochrome C, VEGF, NF- κ B, Cox-2 and β -actin in lung cancer cells. A-549, H292 and H146 were treated with Ast.IV and Tan IIA for 24hrs for micro arrays analysis. The hepatic and renal toxicity and the therapeutic effects of tanshinone IIA for human lung cancer cells H146 were tested in vivo.

Result and Discussion: The results showed that Astragaloside IV can not inhibit the proliferation of and induce apoptosis for lung cancer cell lines, but the protein expressions of cox-2, NF- κ Bp65 and MMP-2 were up- regulated. No definite gene expression change was detected by

micro-array when A549 and H146 were treated with Astragaloside IV for 24 hrs. The results showed that tanshinone IIA can inhibit the proliferation of lung cancer cell lines with dose dependent in vitro. Lung cancer cell lines were treated with various concentrations of tanshinone IIA for 48hrs then detected by FACS, the results showed that tanshinone IIA can induce apoptosis and decrease MMP, increase the release of ROS and Ca²⁺. The results also showed that lung cancer cells were treated with various concentrations of tanshinone IIA will change the protein expressions of cox-2, VEGF, NF- κ Bp65, p53, cyto-c, bax, bcl-2 and p21. Lung cancer cell were treated with tanshinone IIA for 24 hrs then detected by micro-array. The results showed the gene expression of DNA damage inducible transcript 3 was up-regulated ; the gene expression of CYCLIN B2 , AURORA KINASE A, KINESIN FAMILY MEMBER 14 and KINESIN FAMILY MEMBER 20A were down-regulated significantly(p-value <0.01). The results showed that Tanshinone IIA was given by oral or intra-peritoneum injection with high tolerability in vivo. Tanshinone IIA can decrease the SCID mice mortality rate and shrinkage in tumor weight in one of four SCID mice, developing tanshinone IIA as a cancer preventive or therapeutic agent is possible in future.

Keywords : Astragaloside IV, tanshinone IIA, lung cancer and bio-chip

壹、前言

中華民國行政院衛生署 93 年衛生統計公告，癌症是台灣地區十大死亡原因的首位，十大癌症死因統計結果，肺癌取代肝癌登上第一，所以對於肺癌的防治就格外受到重視。目前對肺癌的治療，外科方面，在胸腔外科醫學會的積極整合及訓練課程下，已達到相當的水準，和歐美等先進國家已經並駕齊驅。但是在民間，傳統中醫藥還是相當的根深地固，所以有很多肺癌病人，尤其是第三期或第四期的病人，在接受正規治療同時，往往會服用中藥，希望改善體質，提升生活品質，甚或奇蹟出現治癒肺癌。根據臨床接觸病患，得知黃耆和丹參是病人經常服用的藥物，所以希望藉由現代分子醫學的驗證，來探討傳統中醫藥黃耆和丹參在肺癌治療時所應扮演的角色及中醫藥在輔助治療或替代治療的價值。

丹參(danshen)是唇形科，鼠尾草屬(*Salvia miltiorrhiza*, Bunge) 植物丹參的乾燥根及根莖(圖 2.1)。丹參(*Radix, Salviae, Miltiorrhizae*) 性味:苦，微寒，入心、肝經。有祛瘀止痛，活血調經，除煩安神的作用。傳統醫學文獻記載丹參的藥性：“活血化瘀，養血寧心，寬胸止痛”及“活血行氣止痛，養血安神除煩”。古代有“一味丹參，功同四物”之說。是現代醫學最常研究的傳統草本藥物。經試驗有擴張冠狀血管、增加冠狀動脈血流量、改善心肌收縮力和降壓作用；還有鎮靜、鎮痛作用。臨床用於：腦血栓、冠心病心絞痛、心肌梗塞、血栓閉塞性脈管炎、急、慢性肝炎等。傳統中醫相信，丹參有活血化瘀功效，可預防血液鬱積廣泛應用於中風、和心肌梗塞等心血管疾病，對慢性肝病、慢性腎功能衰竭、腎炎等也有一定療效。丹參提取液的化學成分複雜，迄今丹參的有效成分尚待進一步探討和研究。目前已闡明成分結構的已有 50 多種，主要成分包括丹參酮 I、II A、II B、III (Tanshinone I、II A、II B、III)、隱丹參酮 (Cryptotanshinone)、異丹參酮 I、II、(Iso-tanshinone I、II)、丹參新酮、丹參醇及維生素 E 等(1)。丹參素 danshensu 是丹參水溶性組分中的一個重要成分，已有研究證明有保護心肌、抗動脈硬化等重要藥效，清除自由基和抗氧化是丹參素藥理作用的重要分子機制(2)。有很多研究報導指出丹參的有效成分丹參酮 II A (Tanshinone II A) 透過各種不同的分子機轉，可以誘導肝癌細胞凋亡(3-4)、肺癌細胞凋亡(5-6) 和乳癌細胞凋亡(7)，但多只是零星報導。

黃耆，臺灣地區則稱為「青耆」、「晉耆」，源自豆科植物膜莢黃耆 *A. membranaceus* Bunge 及內蒙黃耆 *A. mongholicus* Bunge 之

根，性甘，微溫，歸入脾、肺經，能固表，止汗，補氣升陽，利水消腫，有興奮神經，利尿，降壓，抗腎炎，並有保護肝臟，強壯，抗菌等作用(8)。現代藥理研究指出，黃耆主要含有蔗糖、葡萄糖醛酸、氨基酸、苦味素、膽鹼、甜菜鹼、葉酸、粘液質等物質及其他微量原素(trace element)，而 Astragaloside IV 常用來做為定量分析之標計(marker) (9)。有很多研究報導指出有免疫調節，抗病毒，抗腫瘤，降低血糖等作用 (10)。有報導指出可同時提升癌症病患在化學或放射治療後的白血球、紅血球和血小板，因而使病患提升免疫力，改善體質和生活品質，被認為是輔助化學療法的抗癌輔助劑(11)。實驗也證實黃耆能使人體血中 IgM、IgE 顯著增加，能促進動物體內抗體合成，增強免疫功能(12-13)。

所以我們在本計畫探討丹參酮 II A 和黃耆皂苷 IV 在體外對肺癌細胞增殖的影響和可能的分子機轉，並且進一步利用生物晶片來檢測可能的調控基因。在本研究計畫，對丹參酮 II A 的肝、腎毒性也進行動物實驗，及檢測丹參酮 II A 對人類肺癌細胞 NCI-H14 在動物體內是否有抑制作用？相信對日後臨床價值，一定可提供有效的參考資料。

貳、材料與方法

一、材料

1. 人類肺癌細胞株

人類肺癌細胞株(A-549;NCI-H661;NCI-H292;NCI-H146;NCI-H1688)購於新竹食品科學研究所(The Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan).

2. 丹參酮 II A(Tanshinone IIA)；黃耆皂苷 IV(Astragaloside IV)

由台北建宏公司採購，部份由德生堂有限公司購買，製作流程見表 2.1，表 2.2

3. 化學試劑

Trypan blue, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Tris-HCl, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Triton X-100, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Propidium iodide (PI), 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Leupeptin, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Ribonuclease-A, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
Sodium Deoxycholate, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
Sodium Orthovanadate, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
Aprotinin, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
Antipain, 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
TE buffer, 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
BAPTA, 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Potassium phosphates, 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Sodium chloride (NaCl), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Formaldehyde, 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Hydrochloric acid, 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Potassium chloride (KCl), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
Bovine serum albumin (BSA), 購自 Merck Co. (Darmstadt, Germany).
RPMI-1640 Medium, 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).
Penicillin-Streptomycin, 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).
Trypsin-EDTA, 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).
Fetal bovine serum (FBS), 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).
L-glutamine, 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).
Caspase-3 activity assay kit, 購自 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany).
10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
Tris (Tris(hydroxyl methyl)-amino methane), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BISTM 29:1), 購自 Amresco.

(St. Louis, MO, USA) .
APS (Ammonium persulfate), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
Tween 20, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
Glycine, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
SDS (Sodium dodecylsulfate) , 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
5X TBE buffer, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
TEMED (N,N,N',N' -Tetramethyl-ethylenediamine), 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
Agarose I, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
4X Protein loading dye, 購自 Amresco. (St. Louis, MO, USA).
Ethanol, 購自 TEDIA(Fairfield.OH, USA).
Methanol, 購自 TEDIA(Fairfield.OH, USA).
10X Blue Juice (Gel loading buffer), 購自 Invitrogen.
Glycerol, 購自 Scharlau Chemie (Barcelona ,SPAIN).
G-NOME DNA KIT, 購自 Bio inc.
ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit), 購自 Amersham.
BioMax Flim, 購自 Kodak.
顯影劑, 購自 Kodak.
定影劑, 購自 Kodak.
Protein assay-Dye reagent concentrate, 購自 Bio-Rad.
PRO-PREP protein extraction solution, 購自 iNtRON Biotechnology.
Protein maker, 購自 Femantas.
GelCode^R commassie blue, 購自 PIERCE.
RNeasy Mini kit, 購自 QIAGEN.
DNeasy Mini kit, 購自 QIAGEN.
Viability PI stain 染劑製備:Propidium iodide(PI)用 PBS 稀釋 5 倍, 即 PBS :PI= 4:1
Cell cycle PI stain 染劑製備: Propidium iodide (PI) : 5 mL;Triton X-100:5 mL;RNase:1.25 mL; PBS(1X):13.75 mL.
Lysis buffer (PH=8~10)配方: 5 M NaCl 100 mL;1M Tris-HCl 2 mL;0.5 M EDTA 40 mL;Triton X-100 2 mL;DDW 56 mL; Total:200mL.
Alkaline buffer(PH=13)配方:NaOH 12 gm; EDTA 0.3724 gm; DDW 1000 mL.

0.4M Tris buffer (以 HCl 調 pH=7.5) 配方: Tris 48.456 g; DDW 1000 ml (以 HCl 適量調至 PH=7.5) .

MMP 試劑: DioC6.

ROS 試劑: H₂DCFDA.

4. 一級抗體

Anti-NF- κ B (p65) (Ztmed. Laboratories. Inc.) 比例 1 : 500.

Anti- β -actin (MAB1501; Chemicon) 比例: 1 : 500.

Anti- MMP-2 (Upstate) 比例: 1: 500.

Anti- MMP-7 (Upstate) 比例: 1: 500.

Anti- MMP-9 (Upstate) 比例: 1: 500.

Anti- Cox -2 (Upstate) 比例: 1: 500.

Anti-caspase 3 (RB-1197-P0; NeoMarkers) 比例: 1:500.

Anti-p21 (MS-891-P0; NeoMarkers) 比例: 1 : 500.

Anti-p53 (MS-256-P0; NeoMarkers) 比例: 1 :500.

Anti-Cytochrome C (cat#pc323; Calbiochem) 比例 1 : 500.

Anti-Bcl-2 (N-19-sc-492 ; Santa Cruz Biotechnology, Inc) 比例: 1: 1000.

Anti-Bax (N-19-sc-492 ; Santa Cruz Biotechnology, Inc) 比例: 1 : 1000.

5. 二級抗體

Goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody (AP124P , 購自 Chemicon.

Goat anti-mouse IgG (FITC) fluorescein 5-isothiocyanate conjugated antibody , 購自 Chemicon.

Goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody , 購自 Chemicon.

二、實施方法及進行步驟

(一)、肺癌細胞株

(A-549;NCI-H661;NCI-H292;NCI-H146;NCI-H1688)在體外(In vitro) 是否有受黃耆皂苷IV、丹參酮 II A 的影響及找出其分子機轉。

1. 肺癌細胞株(A-549; NCI-H146; NCI-H661;NCI-H292; NCI-H1688)

人類肺癌細胞株(A-549;NCI-H661;NCI-H292;NCI-H146;NCI-H1688)

購於新竹食品科學研究所(The Food Industry Research and Development Institute ,Hsinchu, Taiwan). 肺癌細胞株(A-549;NCI-H661;NCI-H292;NCI-H146;NCI-H1688)先放入 75 cm³ 培養瓶, 養於含有 2% penicillin-streptomycin(10,000 U/ml penicillin 和 10,000 μg/ml streptomycin) 的 RPMI 1640 medium with 2 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, and 1.0 mM sodium pyruvate, 90%; fetal bovine serum, 10%. 購於 Sigma Chemicals Company, St. Louis. MO), 放入 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養。得大量細胞產生後, 將做下面實驗。(因為用了五種肺癌細胞株, 所以下面敘述以肺癌細胞表示)

2. 檢測不同濃度的黃耆皂苷IV、丹參酮 II A, 對肺癌細胞株細胞毒性(cytotoxicity)的影響。

先將培養的肺癌細胞, 用 PBS 洗清細胞, 用滅菌吸管吸收細胞, 離心後棄置上層液, 用 24 well plate, 每個 well 置入 5×10^3 細胞, 在細胞培養中, 分別有無加入不同濃度的黃耆皂苷IV(2.5, 5, 10, 20 and 30 μg/ml)、丹參酮 II A (1, 2, 3, 4 and 5 μg/ml), 一起在 37°C, 95% 空氣, 5% 二氧化碳下, 經過不同的時間(分別為 24, 48, 72 小時) 培養後, 收集細胞, 再染色, 死細胞因細胞膜通透性增加, 故錐蟲藍(Trypan blue)得以進入而使細胞呈藍色, 活細胞則沒有被錐蟲藍所染而呈白色。以倒立式顯微鏡觀察, 放大 100 倍, 利用細胞計數皿計算出活細胞數目及死亡細胞數目, 得知存活細胞的數目, 並可進一步算出細胞的死亡率或存活率。

3. 檢測不同濃度的丹參酮 II A, 對肺癌細胞細胞型態(cell morphology)和細胞核(nuclei)的影響。

用 24 well plate, 每個 well 置入 1×10^5 細胞, 在細胞培養中, 分別有無加入不同濃度的丹參酮 II A (0, 0.5, 1, 2 and 4 μg/ml), 一起在 37°C, 95% 空氣, 5% 二氧化碳下, 經過 24 小時培養後, 經過染色(Gimesa stain), 以位相差顯微鏡觀察並照相, 看細胞膜破壞的情形及細胞型態的改變。

4. 檢測不同濃度的丹參酮 II A, 對肺癌細胞的 DNA 破壞效應。

用 10 cm 的培養盤, 每個的 dish 置入 1×10^7 肺癌細胞(A549), 在細胞培養中, 分別有無加入不同濃度的丹參酮 II A (0, 2.5, 5 and

10 $\mu\text{g/ml}$)，一起在 37°C，95% 空氣，5% 二氧化碳下，經過 24 小時培養後收集細胞，再萃取 DNA 跑電泳膠(1.2% agarose gel)75 volt 1 小時。DNA 的抽取是利用 Genome DNA KIT 萃取，檢測 280/260 OD 值，首先將培養好的肺癌細胞用 trypsin 將細胞打下約 1×10^7 cells/well 細胞，收集，離心，再用 PBS 清洗、離心，完成後倒掉上層液，加入 cell suspension solution，混合完成後加 50 μL RNase，充分混合均勻再加入 100 μL cell lysis/denaturing solution，在 55°C 反應 15 分鐘後，再加入 25 μL protease mixture 混合，在 55°C 反應 60 分鐘後，加 500 μL Salt-Out mixture 輕輕混合均勻後置于 4°C 10 分鐘，再高速離心 10 分鐘，取上清液加入 TE buffere 和 100% ethanol 使 DNA 沉澱出，DNA 乾燥後用 1% agarose in TBE buffer (含 ethidium bromide) 利用 50mV 做電泳分析，後再以 UV 燈檢視，然後照相及觀察 DNA fragment 移動情形，看 DNA 的破壞情形。

用 10 cm 的培養盤，每個的 dish 置入 1×10^7 肺癌細胞(H661)，在細胞培養中，分別有無加入不同濃度的丹參酮 II A (0, 4, 8 and 16 $\mu\text{g/ml}$)，一起在 37°C，95% 空氣，5% 二氧化碳下，經過 24 小時培養後收集細胞，再萃取 DNA 跑電泳膠(1.2% agarose gel)75 volt 1 小時，後再以 UV 燈檢視，然後照相及觀察 DNA fragment 移動情形，看 DNA 的破壞情形。

5. 動物實驗(in vivo)，丹參酮 II A 的半數致死劑量(LD₅₀)或最大耐受量的檢測。

在動物實驗半數致死劑量(LD₅₀)的前導實驗，丹參酮 II A L. D 50 pretest (丹參酮 II A 溶在玉米油)，正常小鼠 12 隻分為三組，分別給丹參酮 II A (1 gm/Kg/day)、(2 gm/Kg/day) 和 (4 gm/Kg/day)，丹參酮 II A 溶在玉米油 (25 mg, 50 mg / 0.2 ml 和 100 mg / 0.4 ml) 灌胃(P.O)，每日一次，連續 5 個劑量，觀察有無小鼠死亡，以作為進行半數致死劑量(LD₅₀)的指標，並進行丹參酮 II A 的肝腎毒性評估，用頸椎脫位處死犧牲後，立即由心臟抽血檢測(結果見圖)。另外丹參酮 II A L. D 50 pretest (丹參酮 II A 溶在玉米油)，正常小鼠 15 隻分為三組分別給丹參酮 II A (80 mg/Kg/day) 和 (160 mg/Kg/day)，丹參酮 II A 溶在玉米油 (1.6 mg / 0.2 ml) 腹腔注射(I.P)，隔日一次，連續 10 個劑量，觀察有無小鼠死亡，以作為進行半數致死劑量(LD₅₀)的指標，並進行丹參酮 II A 的肝腎毒性評估，用二氧化碳犧牲後，立即由心臟抽血檢測(結果見圖)。

6. 動物實驗(in vivo)，丹參酮 II A 對轉殖人類肺癌細胞(H146)小鼠的治療作用

將已培養好的人類小細胞肺癌細胞NCI-H146棄培養瓶內培養基，加入0.25%胰蛋白酶數滴消化，將消化好的細胞吸入離心管內，600 rpm/min 離心 5 min，棄上清，加入不含小牛血清的RPMI1640培養基3 ml，吸管吹打混勻(取適量計數細胞)，再離心(600 rpm/min，5 min)，棄上清，按每隻裸小鼠皮下接種細胞數 $3 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml}$ ，再加入無血清RPMI1640培養基，供裸小鼠(SCID mice)皮下接種用。準備好的NCI-H146細胞懸液經苔盼藍染色活細胞數>95%，按每只0.2 ml NCI-H146細胞懸液注射於消毒後的裸小鼠背部右側皮下。

將3周齡，雄性，體重12~15 gm左右的裸小鼠(SCID mice) 30隻皮下接種人類肺癌細胞NCI-H146 $3 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml}$ ，然後每日觀察腫瘤的生長情形，等到接種後約30日，挑選腫瘤長到約1x1公分的裸小鼠(SCID mice)12隻，分為三組，分別腹腔注射給溶劑(玉米油)、丹參酮 II A (40 gm /每公斤體重/每天)、丹參酮 II A (80 gm /每公斤體重/每天)，0.2 ml/次，隔日腹腔注射一次，共給15次，然後用CO₂法處死小鼠，計算每隻裸鼠轉移瘤結節數，並分離腫瘤稱重，計算轉移抑制率。

7. 檢測不同濃度的黃耆皂苷IV、丹參酮 IIA，對肺癌細胞細胞週期(cell cycle)的效應。

用 24 well plate，每個 well 置入 5×10^5 肺癌細胞，在細胞培養中，分別有無加入不同濃度的黃耆皂苷IV(0, 10, 20, and 30 $\mu\text{g/ml}$)、丹參酮 IIA(0, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$)，一起在 37°C，95%空氣，5%二氧化碳下，經過 24, 48, 72 小時培養後收集細胞，先將 PBS 和 70%乙醇放於冰上冷卻，收集細胞後，用 PBS 清洗細胞，再用 Trypsin 處理肺癌細胞，離心後倒掉上層液，再用 PBS 來調整細胞濃度並清洗細胞兩次，經低速離心 5 分鐘 300Xg，吸除上清液留約 200 μL 的 PBS，使細胞均勻混合，接下來一面搖晃振盪一面加入 3 cc 70%乙醇以固定細胞，靜置于 -20°C 的冰箱中過夜，上機前先再以低速離心 5 分鐘 300Xg，吸除上清液再加入 PBS 清洗，盡量吸除上清液將細胞團塊打散，最後加入 1 mL 的 stain solution (final concentration of Triton 1% RNase 0.1 mg/mL & Propidium iodine 4 $\mu\text{g/mL}$)，在室溫下反應 30 分鐘並輕輕搖晃，反應完後在一小時內上流式細胞計數儀分析。利用流式細胞計數儀檢測 G0/G1, S, G2/M

phase 等細胞週期 DNA 量的變化，並利用電腦分析以測知不同濃度的黃耆皂苷IV、丹參酮 IIA，對肺癌細胞 DNA 增生有否抑制。

8. 利用生物晶片 (Microarray) 檢測黃耆皂苷IV、丹參酮 IIA 對肺癌細胞的細胞週期和轉移相關基因變化的影響

使用6 well的培養盤培養，將肺癌細胞，每well以 5×10^6 cells/3mL 的密度培養24小時後，分別給予黃耆皂苷IV或丹參酮 IIA(24 小時 I.C 50 的濃度)，分別培養24小時之後，收取細胞，用Trizol依據標準步驟提取細胞中的Total RNA，再用Qiagen Rneasy Mini Kit處理純化後，用 gel electrophoresis 和 UV spectrometry來檢測RNA的純度，依文獻報告(14, 15)，RNA的純度達到 A260/A280 ratio > 1.6 才送去做cDNA。我們委託賽亞基因公司做基因晶片及分析各相關基因的表達，方法參照文獻報告(16)。略述如下：將總量RNA做為模版進行反轉錄標記，並且將螢光核苷酸標記在cDNA上。而這些已螢光標記的cDNA探針與晶片之基因探針混合做雜交反應，若有互補性，將會和晶片上專一的基因雜交，而使cDNA探針附著在晶片基因上，cDNA探針的螢光會呈色，而且可被定量。經過雜交反應及清洗之晶片做影像掃描，然後利用軟體進行資料分析。

9. 利用西方墨點法(Western blot)檢測引起細胞凋亡相關信號傳遞蛋白量的改變，(包括 p53、p21、Bcl-2、Bax、cytochrome c、Caspase-3、MMPs、VEGF 和 NF- κ B 等)在肺癌細胞的表現有否受黃耆皂苷IV、丹參酮 IIA 的影響

肺癌細胞之肺癌細胞以每 well 1×10^7 cells 種植入 6 well plate 分別加入不同濃度的黃耆皂苷IV、丹參酮 IIA 後培養不同時間 6, 12 和 24 小時。收集細胞並離心後移除培養液，再利用 PBS 清洗。加入 $100 \mu\text{l}$ triple detergent buffer (50 mM Tris-Cl [pH8.0], 150mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A) 溶解細胞。將樣本均質化後，於冰上培養 20 分鐘，離心 1200g 10 分鐘。利用 Bradford assay 檢測懸浮液的蛋白質濃度。利用 12% SDS-polyacrylamide gels 將蛋白進行分析並轉印，用 polyvinylidene difluoride membranes，polyvinylidene difluoride membranes 利用 PBS 清洗三次 (內含 0.04 % Tween-20(PBST))，在室溫之下與 horseradish peroxidase

(HRP)-conjugated secondary antibody 於 5% 牛乳中進行結合 2 小時，而後利用 PBS 清洗並用 ELC detection system (Amersham Piscatway, NJ) 進行分析，ImageQuant image 加以定量。

10. 丹參酮 IIA 對肺癌細胞 MMP & ROS 的效應。

MMP :每支離心管所需的量是 $10\ \mu\text{L}$ MMP 試劑(DioC6)in $500\ \mu\text{L}$ 1 倍 PBS。ROS :每支離心管所需的量是 $1\ \mu\text{L}$ ROS 試劑(H_2DCFDA)in $500\ \mu\text{L}$ 1 倍 PBS。Blank :1-2 支，是不加試劑，只加 $500\ \mu\text{L}$ 1 倍 PBS 即可。細胞使用 12 well 的培養盤，每 well 以 1×10^5 - 2×10^5 的密度培養，作時間差，給予不同濃度丹參酮 IIA (24 小時 I.C 50 的濃度)，作用時間分別為 Control、6 h、12 h、24 h; MMP 的時間點分別為 control、6 h、12 h、24 h，等待培養時間到之後，依不同時間點收取細胞，離心後，倒掉上清液，打散，各加入 $500\ \mu\text{L}$ 試劑 (已含 PBS 和試劑)，加試劑時要避免光、 37°C 、30 min 之後再上機，用 ROS 軟體分析。先用 blank(紅色的 peak)把 peak 調在 10^0 - 10^1 之間再將 control (藍色的 peak)調在 10^1 - 10^2 之間，M1 gated 約 75%以上，sample 上機後，如果是分析 ROS (peak 往右是產生自由基，往左是抗氧化)，分析 MMP (peak 往右不產生 apoptosis，往左產生 apoptosis)

11. 丹參酮 IIA 對肺癌細胞 Ca^{2+} 的效應。

1. INDO1/AM，濃度是 $3\ \mu\text{g}/1\text{mL}$ ，stroe in -20°C 。2. 細胞使用 6 well 的培養盤，每 well 以 $5 \times 10^5/3\ \text{mL}$ 的密度培養 24 h 後，要有 1~2 well 當作 Blank，作時間差，每個時間點給予丹參酮 IIA (24 小時 I.C 50 的濃度)，作用時間分別為 Control、6 h、12 h、24 h，等待培養時間到之後，依不同時間點收取細胞，在避光下收取細胞，離心到第二次時，打散後每支加 Indol/AM 1 mL，而 Blank 加 1mL PBS 蓋上蓋子，移到 incubator 37°C 、5% CO_2 、40 min，每 10 min 拿出來上下搖動，再放回 incubator，離心 1500 rpm、5min，加入 2 mL PBS 離心 1500 rpm、5 min，倒去上清液，再加入 2 mL PBS 離心 1500 rpm、5min，倒去上清液，加 $500\ \mu\text{L}$ PBS，上機用 ROS 系統軟體分析

(三). 統計分析 (statistical analysis)

所有細胞增殖的相對比例資料，於此報告中以大於三次以上獨立

的實驗後，以平均值加減標準差(mean \pm SD)來表示。統計誤差以 Student's t-test，其 p 值設在 $p < 0.05$ 時有顯著意義。

參、結果

一. 不同濃度的黃耆皂苷 IV、丹參酮 II A，對肺癌細胞株(A-549; NCI-H661; NCI-H292; NCI-H146; NCI-H1688)細胞毒性(cytotoxicity)的影響。

首先從倒立式顯微鏡觀察並照相，發現隨著丹參酮 II A 濃度增加及共培養的時間增加，肺癌細胞株 A-549 活細胞的數目明顯減少，並且存活率也明顯下降。加入不同濃度(control, 1, 2, 3, 4 and 5 μ g/ml)的丹參酮 II A 經過 24 小時培養後，A-549 活細胞的比例分別為對照組的 85.94 \pm 0.35%，46.96 \pm 0.4%，21.27 \pm 0.12%，20.4 \pm 0.1%，17.97 \pm 0.15%，IC50 的濃度為 2 μ g/ml；經過 48 小時培養後，A-549 活細胞的比例分別為對照組的 54.95 \pm 0.86%，11.23 \pm 0.14%，5.14 \pm 0.12%，4.91 \pm 0.06%，4.18 \pm 0.06%，IC50 的濃度為 1.5 μ g/ml；經過 72 小時培養後，A-549 活細胞的比例分別為對照組的 43.7 \pm 6.59%，6.9 \pm 0.4%，4.44 \pm 0.12%，4.18 \pm 0.12%，4.13 \pm 0.00%，IC50 的濃度為 1 μ g/ml (結果見圖 3.1-3.5)。但是在加入黃耆皂苷 IV 時，肺癌細胞株 A-549 活細胞的數目和存活率則沒有明顯變化。加入不同濃度(control, 2.5, 5, 20 and 30 μ g/ml)的黃耆皂苷 IV 經過 24 小時培養後，A-549 活細胞的比例分別為對照組的 94.93 \pm 0.15%，88.88 \pm 0.1%，91.28 \pm 0.23%，91.86 \pm 0.15%，17.97 \pm 0.15%；經過 48 小時培養後，A-549 活細胞的比例分別為對照組的 95.48 \pm 1.53%，96.79 \pm 3.4%，95.07 \pm 1.97%，95.08 \pm 1.81%；經過 72 小時培養後，A-549 活細胞的比例分別為對照組的 93.94 \pm 4.61%，95.47 \pm 8.55%，93.73 \pm 5.63%，95.95 \pm 5.27%(結果見圖 3.6-3.10)。

肺癌細胞株 H-661 同樣也發現在丹參酮 II A 濃度增加及共培養的時間增加，肺癌細胞株 H-661 活細胞的數目明顯減少，並且存活率也明顯下降。加入不同濃度(control, 1, 2, 3, 4 and 5 μ g/ml)的丹參酮 II A 經過 24 小時培養後，H-661 活細胞的比例分別為對照組的 85.85 \pm 1.37%，74.71 \pm 0.57%，71.17 \pm 0.25%，67.88 \pm 0.1%，69.56 \pm 0.15%，IC50 的濃度為 8.21 μ g/ml；經過 48 小時培養後，H-661 活細胞的比例分別為對照組的 79.35 \pm 1.15%，50.38 \pm 0.72%，42.67 \pm 0.76%，38.31 \pm 0.67%，37.44 \pm 0.31%，IC50 的濃度為 2 μ g/ml；經過 72 小時培養後，

H-661 活細胞的比例分別為對照組的 $87.02 \pm 1.51\%$, $33.66 \pm 1.67\%$, $22.58 \pm 0.8\%$, $23.14 \pm 0.83\%$, $24.41 \pm 1.6\%$, IC₅₀ 的濃度為 $1.5 \mu\text{g/ml}$ (結果見圖 3.11-3.15)。但是在加入黃耆皂苷 IV 時, 肺癌細胞株 H-661 活細胞的數目和存活率則沒有明顯變化。加入不同濃度 (control, 2.5, 5, 10, 20 and $30 \mu\text{g/ml}$) 的黃耆皂苷 IV 經過 24 小時培養後, H-661 活細胞的比例分別為對照組的 $94.07 \pm 0.85\%$, $98.7 \pm 1.14\%$, $93.99 \pm 0.96\%$, $93.5 \pm 0.61\%$, $86.92 \pm 0.85\%$; 經過 48 小時培養後, H-661 活細胞的比例分別為對照組的 $102.36 \pm 5.53\%$, $102.41 \pm 5.57\%$, $99.76 \pm 5.67\%$, $98.95 \pm 3.35\%$, $101.14 \pm 1.62\%$; 經過 72 小時培養後, H-661 活細胞的比例分別為對照組的 $95.9 \pm 9.0\%$, $100.3 \pm 1.9\%$, $89.02 \pm 6.74\%$, $85.05 \pm 4.65\%$, $92.61 \pm 0.6\%$; (結果見圖 3.16-3.20)。

肺癌細胞株 H-292 同樣也發現在丹參酮 II A 濃度增加及共培養的時間增加, 肺癌細胞株 H-292 活細胞的數目明顯減少, 並且存活率也明顯下降。加入不同濃度 (control, 1, 2, 3, 4 and $5 \mu\text{g/ml}$) 的丹參酮 II A 經過 24 小時培養後, H-292 活細胞的比例分別為對照組的 $70.77 \pm 0.81\%$, $67.2 \pm 0.67\%$, $63.81 \pm 0.55\%$, $55.96 \pm 0.51\%$, $50.34 \pm 0.21\%$, IC₅₀ 的濃度為 $6 \mu\text{g/ml}$; 經過 48 小時培養後, H-292 活細胞的比例分別為對照組的 $59.45 \pm 0.76\%$, $50.41 \pm 0.8\%$, $42.61 \pm 0.95\%$, $38.94 \pm 0.53\%$, $34.35 \pm 0.7\%$, IC₅₀ 的濃度為 $2 \mu\text{g/ml}$; 經過 72 小時培養後, H-292 活細胞的比例分別為對照組的 $59.29 \pm 3.31\%$, $45.81 \pm 4.02\%$, $39.89 \pm 1.64\%$, $34.85 \pm 2.47\%$, $30.68 \pm 0.31\%$, IC₅₀ 的濃度為 $2 \mu\text{g/ml}$ (結果見圖 3.21-3.25)。但是在加入黃耆皂苷 IV 時, 肺癌細胞株 H-292 活細胞的數目和存活率則沒有明顯變化。加入不同濃度 (control, 2.5, 5, 10, 20 and $30 \mu\text{g/ml}$) 的黃耆皂苷 IV 經過 24 小時培養後, H-292 活細胞的比例分別為對照組的 $111.0 \pm 4.46\%$, $110.55 \pm 4.81\%$, $105.8 \pm 4.02\%$, $107.61 \pm 7.37\%$, $118.53 \pm 5.18\%$; 經過 48 小時培養後, H-292 活細胞的比例分別為對照組的 $98.6 \pm 0.46\%$, $103.66 \pm 2.27\%$, $97.35 \pm 0.56\%$, $93.63 \pm 1.16\%$, $91.38 \pm 0.4\%$; 經過 72 小時培養後, H-292 活細胞的比例分別為對照組的 $102.1 \pm 0.92\%$, $112.52 \pm 0.26\%$, $108.51 \pm 0.4\%$, $102.99 \pm 13.87\%$, $103.59 \pm 0.3\%$ (結果見圖 3.26-3.30)。

肺癌細胞株 H-146 同樣也被發現在丹參酮 II A 濃度增加及共培養的時間增加, 肺癌細胞株 H-146 活細胞的數目明顯減少, 並且存活率也明顯下降。加入不同濃度 (control, 0.5, 1, 2, 4 and $6 \mu\text{g/ml}$) 的丹參酮 II A 經過 24 小時培養後, H-146 活細胞的比例分別為對照組的 $58.97 \pm 0.53\%$, $41.59 \pm 0.25\%$, $33.57 \pm 0.2\%$, $23.64 \pm 0.1\%$, $24.17 \pm$

0.06%，IC₅₀ 的濃度為 0.82 $\mu\text{g/ml}$ ；經過 48 小時培養後，H-146 活細胞的比例分別為對照組的 81.22 \pm 1.05%，64.45 \pm 0.4%，42.56 \pm 1.12%，29.11 \pm 0.1%，28.11 \pm 0.06%，IC₅₀ 的濃度為 0.96 $\mu\text{g/ml}$ ；經過 72 小時培養後，H-146 活細胞的比例分別為對照組的 60.27 \pm 0.61%，22.32 \pm 0.46%，14.39 \pm 0.06%，8.67 \pm 0.17%，22.57 \pm 0.28%，IC₅₀ 的濃度為 0.69 $\mu\text{g/ml}$ ；(結果見圖 3.31-3.33)。因為在肺癌細胞株 A-549、H-661 和 H-292 加入黃耆皂苷 IV 時，活細胞的數目和存活率則沒有明顯變化，表示黃耆皂苷 IV 在體外並沒有抑制肺癌細胞的作用，所以就沒有再繼續做。

最後肺癌細胞株 H-1688 同樣也發現在丹參酮 II A 濃度增加及共培養的時間增加，肺癌細胞株 H-1688 活細胞的數目明顯減少，並且存活率也明顯下降。加入不同濃度(control, 1, 2, 4, 8 and 10 $\mu\text{g/ml}$)的丹參酮 II A 經過 24 小時培養後，H-1688 活細胞的比例分別為對照組的 97.38 \pm 2.66%，93.72 \pm 2.34%，96.96.57 \pm 1.28%，97.16 \pm 1.16%，88.09 \pm 0.85%；經過 48 小時培養後，H-1688 活細胞的比例分別為對照組的 64.73 \pm 0.82%，39.98 \pm 0.45%，37.83 \pm 0.74%，26.49 \pm 0.14%，20.16 \pm 0.23%；經過 72 小時培養後，H-1688 活細胞的比例分別為對照組的 44.72 \pm 0.88%，15.97 \pm 0.96%，9.23 \pm 0.93%，5.88 \pm 0.74%，4.74 \pm 0.6%，而不同的是 H-1688 在加入丹參酮 II A 共培養 24 小時後並沒有觀察到明顯的抑制作用，直到 48 小時後才出現對肺癌細胞株 H-1688 明顯的抑制作用，可能是由於肺癌細胞株 H-1688 生長相當緩慢有關係(結果見圖 3.34-3.38)。

由上述實驗結果，可證明丹參酮 II A 在體外對肺癌細胞株有明顯的抑制作用，是一項有潛力的治療肺癌的新藥。

二·檢測不同濃度的丹參酮 II A，對肺癌細胞細胞型態(cell morphology)和細胞核(nuclei)的影響。

以肺癌細胞 H-661 為例，經過 24 小時培養後，經過 Gimesa stain 染色，以位相差顯微鏡觀察並照相，看細胞膜破壞的情形及細胞核縮、濃染等型態的改變，表示丹參酮 II A 可引起肺癌細胞 H-661 凋亡(結果見圖 3.39)。

三·檢測不同濃度的丹參酮 II A，對肺癌細胞的 DNA 破壞效應。

肺癌細胞(A549)，分別有無加入不同濃度的丹參酮 II A (0, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$)，經過 24 小時培養後，再收集細胞萃取 DNA 跑膠(1.2% agarose gel)，做電泳分析，後再以 UV 燈檢視，然後照相

及觀察 DNA fragment 移動情形，看 DNA 的破壞情形，表示丹參酮 II A 可引起肺癌細胞 A-549 凋亡(結果見圖 3.40)。同樣情形，在肺癌細胞-H661，在細胞培養中，分別有無加入不同濃度的丹參酮 II A (0, 4, 8 and 16 μ g/ml)，一起在 37°C，95%空氣，5%二氧化碳下，經過 24 小時培養後收集細胞，再萃取 DNA 跑電泳膠(1.2% agarose gel)75 volt 1 小時，後再以 UV 燈檢視，然後照相及觀察 DNA fragment 移動情形，看 DNA 的破壞情形，表示丹參酮 II A 可引起肺癌細胞 H661 凋亡(結果見圖 3.41)。

四.動物實驗(in vivo)，丹參酮 II A 的半數致死劑量(LD₅₀)或最大耐受量的檢測。

在半數致死劑量(LD₅₀)的前導實驗，每日一次，連續5個劑量，觀察有無小鼠死亡。我們發現在整個實驗進行中，沒有任何一隻小鼠死亡，並且已用到小鼠灌胃能承受的的最大劑量(4 gm/Kg/day，0.2 ml/每10 公克體重，所以無法進行半數致死劑量(LD₅₀)的測試，表示是非常安全的藥物。用藥前及犧牲前量小鼠體重，結果也顯示不會引起小鼠體重減輕(結果見圖3.42)，在整個實驗並進行丹參酮 II A 的肝腎毒性評估，小鼠用頸椎脫位犧牲後，立即由心臟抽血檢測，雖然因抽不到足夠的血檢驗，由結果仍可發現口服丹參酮 II A 並沒有肝、腎毒性 (結果見表3.1)。另外丹參酮 II A 溶在玉米油(1.6 mg / 0.2 ml)，丹參酮 II A (80 mg/Kg/day)和 (160 mg/Kg/day)，腹腔注射 (I.P)，隔日一次，連續10個劑量，觀察沒有任何一隻小鼠死亡，表示是非常安全的藥物。用藥前及犧牲前量小鼠體重，結果顯示不會引起小鼠體重減輕，體重反有明顯增加(結果見圖3.43)，在整個實驗並進行丹參酮 II A 的肝腎毒性評估，小鼠用二氧化碳犧牲後，立即由心臟抽血檢測，由結果發現腹腔注射丹參酮 II A 並沒有肝、腎毒性 (結果見表3.2)。由此項結果可知丹參酮 II A 不論口服或注射皆很安全，是值得進一步開發的藥物。

五.動物實驗(in vivo)，丹參酮 II A 對轉殖人類肺癌細胞(H146)小鼠的治療作用

等到接種人類肺癌細胞(H146)後約30日，挑選腫瘤長到約1x1公分的荷瘤裸小鼠(SCID mice)12隻，分為三組，分別腹腔注射給溶劑(玉米油)、丹參酮 II A (40 gm /每公斤體重/每天)、丹參酮 II A (80 gm /每公斤體重/每天)，0.2 ml/次，隔日腹腔注射一次，共給15次，

然後每日觀察腫瘤的生長情形。然後用CO₂法處死荷瘤小鼠，計算每隻裸鼠轉移瘤結節數，並分離腫瘤稱重，計算轉移抑制率（結果見圖 3. 44, 3. 45, 3. 46）。由結果顯示，在體內試驗丹參酮 IIA 經腹腔注射，對荷人類肺癌細胞(H146)小鼠的體重(結果見圖3. 47)、外觀、皮毛的光澤及活動力並沒有不良影響。並且在治療到第十三次，對照組就有兩隻死亡，而實驗組僅在80 gm /每公斤體重/每天有一隻死亡，或許表示丹參酮 IIA 可延長荷人類肺癌細胞(H146)小鼠生存期。由於死亡小鼠皆被同籠小鼠啃食，所以無法經由解剖取出瘤體，但是每次注射皆有觀察，對照組同籠小鼠瘤體並沒有太大差異。在實驗組(40 gm /每公斤體重/每天)有一隻的腫瘤明顯縮小(見圖3. 46)，表示有1/4的比率會得到改善，但是整組的平均瘤重和對照組並沒有顯著差異(結果見圖3. 48)，可能治療的時間還不夠久，下次應可延長給藥治療期，或許可得到更好的成效。

六·檢測不同濃度的黃耆皂苷IV、丹參酮 IIA，對肺癌細胞細胞週期 (cell cycle)的效應。

不同濃度的丹參酮 IIA，對肺癌細胞 A549、H661 和 H292 處理 48 小時後，收集細胞，利用 FACS 檢測，經電腦資訊分析，結果發現隨著丹參酮 IIA 濃度的升高，明顯出現 subG1，表示丹參酮 IIA 在體外可明顯引起肺癌細胞 A549、H661 和 H292 凋亡(結果見圖 3. 49, 3. 50, 3. 51)。但是不同濃度的黃耆皂苷IV對肺癌細胞 A549 和 H661 處理 48 小時後，收集細胞，利用 FACS 檢測，經電腦資訊分析，結果發現隨著黃耆皂苷IV濃度的升高，並沒有出現 subG1，表示黃耆皂苷IV在體外對肺癌細胞 A549 和 H661 不會引起凋亡(結果見圖 3. 52, 3. 53)。

七·利用生物晶片 (Microarray) 檢測黃耆皂苷IV和丹參酮 IIA 對肺癌細胞基因變化的影響

將肺癌細胞，分別給予黃耆皂苷IV或丹參酮 IIA(24 小時I.C 50 的濃度)，培養24小時之後，收取細胞，用Trizol依據標準步驟提取細胞中的Total RNA，再用Qiagen Rneasy Mini Kit處理純化後，用 gel electrophoresis (見圖3. 62, 3. 63)和 UV spectrometry來檢測RNA的純度，RNA的純度達到 A260/A280 ratio > 1.6且RNA Integrity Number(RIN)>7.5，表示總RNA的品質及格(見圖3. 54~3. 61)，才送去基因公司做基因晶片及分析各相關基因的表達。經過雜交反應及清洗

之晶片做影像掃描，然後利用軟體進行資料分析。結果顯示黃芪皂苷 IV 對肺癌細胞 A549 作用 24 小時，能夠下調 157 種；明顯下調 119 種基因表現，上調 107 種；明顯上調 2 種基因表現。黃芪皂苷 IV 對肺癌細胞 H146 作用 24 小時，能夠下調 237 種；明顯下調 6 種基因表現，上調 142 種；明顯上調 100 種基因表現(見表 3.3)。丹參酮 II A 對肺癌細胞 A549 作用 24 小時，能夠下調 1720 種；明顯下調 820 種基因表現，上調 2828 種；明顯上調 663 種基因表現。丹參酮 II A 對肺癌細胞 H292 作用 24 小時，能夠下調 1666 種；明顯下調 196 種基因表現，上調 1969 種；明顯上調 223 種基因表現。丹參酮 II A 對肺癌細胞 H146 作用 24 小時，能夠下調 1480 種；明顯下調 42 種基因表現，上調 673 種；明顯上調 262 種基因表現(見表 3.4)。

在生物晶片原始結果出來後，我們將八片晶片編號為 p024,025,026,027,028,046,047,048 (見表 3.5)，用 R statistical package 將晶片結果圖標準化(見表 3.6)，再進一步分析肺癌細胞 A549、H292 和 H146 分別經不同濃度(5, 6. 和 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的丹參酮 II A 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。對照組為分別用不同濃度 DMSO (0.2, 0.24 和 0.1%) 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。結果用 LIMMA package of R 來計算兩組間的差異，P 值小於 0.01 視為有顯著差異。共有 73 個基因有顯著差異(見表 3.7, 3.8)。我們再經由生物資訊搜尋及分析最後得到結果，共有 6 個基因有顯著差異(見表 3.9)。主要和細胞週期、細胞核分裂和 DNA 損傷的調控有關。

八. 利用西方墨點法(Western blot)檢測引起細胞凋亡和轉移相關信號傳遞蛋白量(包括 p53、p21、Bcl-2、Bax、cytochrome c、Caspase-3、MMPs、VEGF 和 NF- κ B 等)在肺癌細胞的表現有否受黃耆皂苷 IV、丹參酮 IIA 的影響

肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)後分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時。收集細胞並離心後，抽取蛋白質進行電泳分析，ImageQuant image 加以定量，和引起細胞凋亡相關信號傳遞蛋白，包括 p53、p21、Bcl-2、Bax、cytochrome c 蛋白量的改變(結果見圖 3.64~3.68)和轉移相關蛋白量的表現，包括 NF- κ B、cox-2 和 VEGF (結果見圖 3.79~3.81)；肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)後分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時。收集細胞並離心後，抽取蛋白質進行電泳分析，ImageQuant image 加以定量，和引起細胞凋亡相關信號傳遞蛋白，包括 p53、p21、Bcl-2、Bax、cytochrome c 蛋白量的改變(結果見圖 3.69~3.73)和轉移相關蛋白量的表現，包括 NF-

κ B、cox-2 和 VEGF (結果見圖 3.82~3.84)；肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA($8 \mu\text{g/ml}$)後分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時。收集細胞並離心後，抽取蛋白質進行電泳分析，ImageQuant image 加以定量，和引起細胞凋亡相關信號傳遞蛋白，包括 p53、p21、Bcl-2、Bax、cytochrome c 蛋白質的改變(結果見圖 3.74~3.78) 和轉移相關蛋白質的表現，包括 NF- κ Bp65、cox-2 和 VEGF(結果見圖 3.85~3.87)。肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA($5 \mu\text{g/ml}$)後分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，可使上調 Cox-2、VEGF、NF- κ Bp65、P53、Cyto- c 和 bax；下調 Bcl-2 和 P21。肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA($6 \mu\text{g/ml}$)後分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，可使上調 Cox-2、VEGF、NF- κ Bp65、P53、P21、Cyto- c 和 bax；下調 Bcl-2。肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA($8 \mu\text{g/ml}$)後分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，可使上調 VEGF、NF- κ Bp65、Bcl-2 和 P53；下調 Cox-2、Cyto- c、bax 和 P21。

肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷 IV($10, 20, 30 \mu\text{g/ml}$)後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 VEGF、NF- κ Bp65、cox-2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白質的表現，結果發現可明顯上調 NF- κ Bp65、cox-2 和 MMP-2 蛋白質的表現(見圖 3.89, 3.90, 3.91)，對 VEGF 和 MMP-9 蛋白質的表現則不明顯(見圖 3.92, 3.93)。所以表示黃耆皂苷 IV 在體外可促進肺癌細胞腫瘤轉移相關基因蛋白質的表現，是否意味著黃耆皂苷 IV 在體外不但不能抑制肺癌細胞 A549 的增殖，反而會促進肺癌細胞 A549 轉移。

肺癌細胞 H146 加入不同濃度的丹參酮 IIA($1, 2, 5 \mu\text{g/ml}$)後，培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 NF- κ Bp65 蛋白質的表現，結果發現可明顯下調 NF- κ Bp65 蛋白的表現量，是否意味著丹參酮 IIA 在體外能抑制肺癌細胞 H146 的轉移(見圖 3.94)。

九. 丹參酮 IIA 對肺癌細胞 Ca^{2+} , MMP & ROS(Reactive oxygen species) 的效應。

丹參酮 IIA 作用於肺癌細胞 A549，在 12 小時的時間點，R. O. S 釋放增加 $67.62 \pm 5.67 \%$ (見表 3.10)，粒線體膜電位(MMP)明顯下降 $48.62 \pm 3.32 \%$ (見表 3.11)，而鈣離子的釋放則沒有明顯增加，直到 24 小時的時間點，鈣離子的釋放才增加 $21.21 \pm 3.01 \%$ (見表 3.12)。所以誘使肺癌細胞 A549 凋亡可能和下降 MMP 和增加 R. O. S 釋放較有關係(見圖 3.95, 3.96, 3.97)；丹參酮 IIA 作用於肺癌細胞 H292，在

12 小時的時間點，R. O. S 釋放增加 $68.68 \pm 4.77\%$ (見表 3.13)，粒線體膜電位(MMP)明顯下降 $57.65 \pm 6.02\%$ (見表 3.14)，而鈣離子的釋放為 $2.54 \pm 1.36\%$ ，則沒有明顯增加，直到 24 小時的時間點，鈣離子的釋放才增加為 $4.48 \pm 2.68\%$ (見表 3.15)。所以誘使肺癌細胞 H292 凋亡可能和下降 MMP 和增加 R. O. S 釋放較有關係(見圖 3.98, 3.99, 3.100)；丹參酮 IIA 作用於肺癌細胞 H661，在 6 小時的時間點，R. O. S 釋放增加為 $78.78 \pm 5.32\%$ (見表 3.16)，在 12 小時的時間點，粒線體膜電位(MMP)明顯下降 $45.36 \pm 3.87\%$ (見表 3.17)，R. O. S 釋放增加為 $85.32 \pm 6.33\%$ ，而鈣離子的釋放為 $5.21 \pm 3.14\%$ ，則沒有明顯增加，直到 24 小時的時間點，鈣離子的釋放才增加為 $8.99 \pm 4.10\%$ (見表 3.18)，而粒線體膜電位(MMP)明顯下降 $82.36 \pm 4.10\%$ ，R. O. S 釋放增加為 $91.36 \pm 8.14\%$ 。所以誘使肺癌細胞 H661 凋亡可能和下降 MMP 和增加 R. O. S 釋放較有關係(見圖 3.101, 3.102, 3.103)；丹參酮 II A 作用於肺癌細胞 H146，在 6 小時的時間點，R. O. S 釋放增加為 $18.32 \pm 3.25\%$ (見表 3.19)，在 12 小時的時間點，粒線體膜電位(MMP)明顯下降 $23.32 \pm 4.87\%$ ，R. O. S 釋放增加為 $58.62 \pm 4.78\%$ ，而鈣離子的釋放為 $2.87 \pm 2.69\%$ ，則沒有明顯增加，直到 24 小時的時間點，鈣離子的釋放才增加為 $18.32 \pm 5.12\%$ ，而粒線體膜電位(MMP)下降為 $44.33 \pm 5.10\%$ (見表 3.20)，R. O. S 釋放增加為 $87.66 \pm 2.14\%$ (見表 3.21)。所以誘使肺癌細胞 H146 凋亡可能和增加 R. O. S 釋放較有關係(見圖 3.104, 3.105, 3.106)。

肆、討論

因為在肺癌細胞株 A-549、H-661 和 H-292 加入黃耆皂苷IV時，活細胞的數目和存活率則沒有明顯變化，表示黃耆皂苷IV在體外並沒有抑制肺癌細胞的作用，黃耆皂苷IV在體外可促進肺癌細胞腫瘤轉移相關基因蛋白量的表現，是否意味著黃耆皂苷IV在體外不但不能抑制肺癌細胞 A549 的增殖，反而會促進肺癌細胞 A549 轉移。而在生物晶片方面結果分析，取 log 三倍皆沒有明顯差異的基因被偵測出來，表示黃耆皂苷IV在體外不能抑制肺癌細胞，所以就沒有再繼續做。中藥丹參在傳統皆用在活血祛瘀，調經止痛，除煩安神。少用在惡性腫瘤治療，所以丹參酮 II A 用在治療惡性腫瘤的研究並不多見，只有在

中國期刊網可見零星報導丹參酮 II A 對於肺癌細胞的增殖有抑制作用，而在本研究結果也發現，丹參酮 II A 在體外對於肺癌細胞的增殖，包含非小細胞肺癌 (A549、H292、H661) 和小細胞肺癌(H146、H1688)確實有抑制作用。並且有些肺癌細胞株，隨著丹參酮 II A 作用時間愈久和濃度愈高，抑制作用越強，表示有濃度依存效應和時間依存效應。有些肺癌細胞株，則只有濃度依存效應。利用流式細胞儀 (FACS)，透過細胞週期分析，得知丹參酮 II A 可引起非小細胞肺癌細胞株 (A549、H292、H661)出現 subG1，表示可引起細胞凋亡。而透過檢測丹參酮 II 對於肺癌細胞株(A549、H292、H661 和 H146)的活化氧族群(ROS)、粒腺體膜電位(MMP) 和 鈣離子 Ca^{+2} 的影響，可知釋放 ROS、降低 MMP 和增加 Ca^{+2} 釋放對於引起肺癌細胞株 (A549、H292、H661 和 H146)細胞凋亡，也是可能的分子機轉之一。而由生物晶片結果分析更得到寶貴的訊息，充分顯示可能影響的靶標基因，包括 CYCLIN B2，AURORA KINASE A，KINESIN FAMILY MEMBER 14，KINESIN FAMILY MEMBER 20A 和 DNA damage inducible transcript 3 等 5 項，而依文獻報導這些基因確實和抗癌都有關係，所以在體外實驗可看到丹參酮 II A 明顯抑制肺癌細胞株 (A549、H292、H661、H1688 和 H146)，但是在以西方墨點法檢測時，卻無法得到相符合的結果，如丹參酮 II A 作用於 H 661 時 bcl-2 反而上調，但是還是可見到有抑制作用，透過細胞週期分析，並且出現 subG1，引起凋亡，證明丹參酮 II A 的抗肺癌細胞株(A549、H292、H661、H1688 和 H146)可能是透過很多不同的機轉，而且不同的細胞株可能也不一樣。藉由動物實驗，本研究證明丹參酮 II A 經由口服和腹腔注射皆沒有肝腎毒性，並且不會影響小鼠的體重和外觀皮毛，口服到 4gm/kg/day 皆沒有造成死亡，所以安全性很高。初步動物實驗結果顯示，丹參酮 II A 藉由腹腔注射治療荷肺癌細胞(H146)小鼠，可減少小鼠死亡(40 mg/kg/day 組四隻小鼠沒有死亡，對照組四隻小鼠死亡兩隻)，並且有部份療效(40 mg/kg/day 組四隻小鼠中有一隻腫瘤明顯縮小)，所以將來是很有潛力的抗肺癌藥物。

伍、結論與建議

結果顯示黃耆皂苷 IV 在體外不但不能抑制人類肺癌細胞株的增殖，引發細胞凋亡，反而上調轉移相關基因 NF-KBp65、Cox-2 和

MMP-2 的蛋白表現，可能會促進肺癌細胞的轉移，所以在臨床使用時，對於肺癌病人可能不是一項好的選擇，需要再更多的評估。

在本研究結果也發現，丹參酮 II A 在體外對於人類肺癌細胞株的增殖，包含非小細胞肺癌 (A549、H292、H661) 和小細胞肺癌 (H146、H1688) 確實有抑制作用，並且有濃度依存效應和時間依存效應。丹參酮 II A 的抗肺癌細胞株 (A549、H292、H661、H1688 和 H146) 可能是透過很多不同的機轉，而且不同的細胞株可能也不一樣。丹參酮 II A 可引起非小細胞肺癌細胞株 (A549、H292、H661) 凋亡，也可增加釋放 ROS、降低 MMP 和增加 Ca²⁺ 釋放，而 CYCLIN B2，AURORA KINASE A，KINESIN FAMILY MEMBER 14，KINESIN FAMILY MEMBER 20A 和 DNA damage inducible transcript 3，可能是丹參酮 II A 在體外作用在肺癌細胞株的靶標基因，透過上調 DNA damage inducible transcript 3 及下調 CYCLIN B2，AURORA KINASE A，KINESIN FAMILY MEMBER 14 和 KINESIN FAMILY MEMBER 20A，達到抗癌的功效。本研究藉由動物實驗，證明丹參酮 II A 經由口服 (4gm/kg/day) 每天一次，連續 5 天，和腹腔注射 (160mg/kg/day) 兩天一次，連續 10 次，皆沒有造成死亡和出現肝腎毒性，並且不會影響小鼠的體重和外觀皮毛，所以安全性很高。在體內療效方面，初步結果顯示，丹參酮 II A 藉由腹腔注射治療荷肺癌細胞 (H146) 小鼠，可減少小鼠死亡，並且部份有療效。

丹參酮 II A 對肺癌細胞在體外有毒殺作用，在動物體內安全性高，對小細胞肺癌 H146 有部份療效，將來是很有潛力可開發成為肺癌輔助治療藥物。

誌謝

本研究計劃承蒙行政院衛生署中醫藥委員會 (計畫編號：CCMP95-RD-206) 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

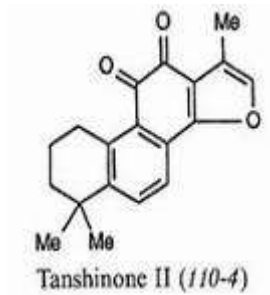
1. 郭濟賢. 丹參的研究與臨床應用. 北京: 中國醫藥科技出版社, 1992, 37~106.
2. 楊春欣. 丹參素的藥理研究進展. 中國藥理學通報, 1997, 13 (4) 298.

3. Tang Z, Tang Y, Fu L. Growth inhibition and apoptosis induction in human hepatoma cells by tanshinone II A. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2003; 23(2):166-8, 172.
4. Yuan SL, Wei YQ, Wang XJ, Xiao F, Li SF, Zhang J .Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2004 Jul 15; 10(14):2024-8.
5. Zhang P, Pei Y, Qi Y. Influence of blood-activating drugs on adhesion and invasion of cells in lung cancer patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1999 Feb; 19(2):103-5.
6. Liu MZ, Huang YS, Xiao WQ.No promoting effects of sodium tanshinone II-A sulfonate on growth and metastasis of Lewis carcinoma. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1991 Nov; 12(6):534-7.
7. Wang X, Wei Y, Yuan S, Liu G, Lu Y, Zhang J, Wang W. Potential anticancer activity of tanshinone IIA against human breast cancer. *Int J Cancer.* 2005 Sep 20; 116(5):799-807.
8. 黃瑞東：黃耆成分及藥理作用，生藥資訊(ROC) April. 4: 34-44, 1996.
9. Xia Q. Ma, Q. Shi, J. A. Duan, Tina T. X. Dong, Karl W. K. Tsim: Chemical analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4861-4866, 2002.
10. 賴榮祥：各種黃耆及其相關藥製劑之應用，生藥資訊(ROC) 4: 25-33,1996.
11. Zou YH, Liu XM. Effect of astragalus injection combined with chemotherapy on quality of life in patients with advanced non-small cell lung cancer .Jiangmen Central Hospital, in Chinese. 23:733-5, 2003.
12. Mao SP, Cheng KL, Zhou YF. Modulatory effect of Astragalus membranaceus on Th1/Th2 cytokine in patients with herpes simplex keratitis. [Article in Chinese] *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 24:121-123, 2004.
13. Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X, Tian Z. Traditional Chinese medicine Astragalus reverses predominance of Th2 cytokines and their up-stream transcript factors in lung cancer patients. *Oncol Rep.* 10:1507-12, 2003.

14. Germann A, Dihlmann S, Hergenbahn M, Von Knebel Doeberitz M, Koesters R: Expression profiling of CC531 colon carcinoma cells reveals similar regulation of beta-catenin target genes by both butyrate and aspirin. *Int J Cancer* 2003, 106:187-197.
15. Kindermann B, Doring F, Pfaffl M, Daniel H: Identification of Genes Responsive to Intracellular Zinc Depletion in the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT-29. *J Nutr* 2004;134: 57-62.
16. Marjan J van Erk, Eva Teuling, Yvonne CM Staal, Sylvie Huybers, Peter J van Bladeren, Jac MMJG Aarts and Ben van Ommen. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *J Carcinog.* 2004; 3:8:1-17.

柒、圖、表

圖 2.1 丹參的外觀及其分子結構 *Radix Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen)



Molecular Formula: C₁₉H₁₈O₃

M.W.:294.3

Melting point 233-234°C

www.mdidea.com/products/herbextract/danshen/data.html - 93k

表 2.1 丹參酮 IIA 提取流程

Flow Chart for Tanshinone IIA

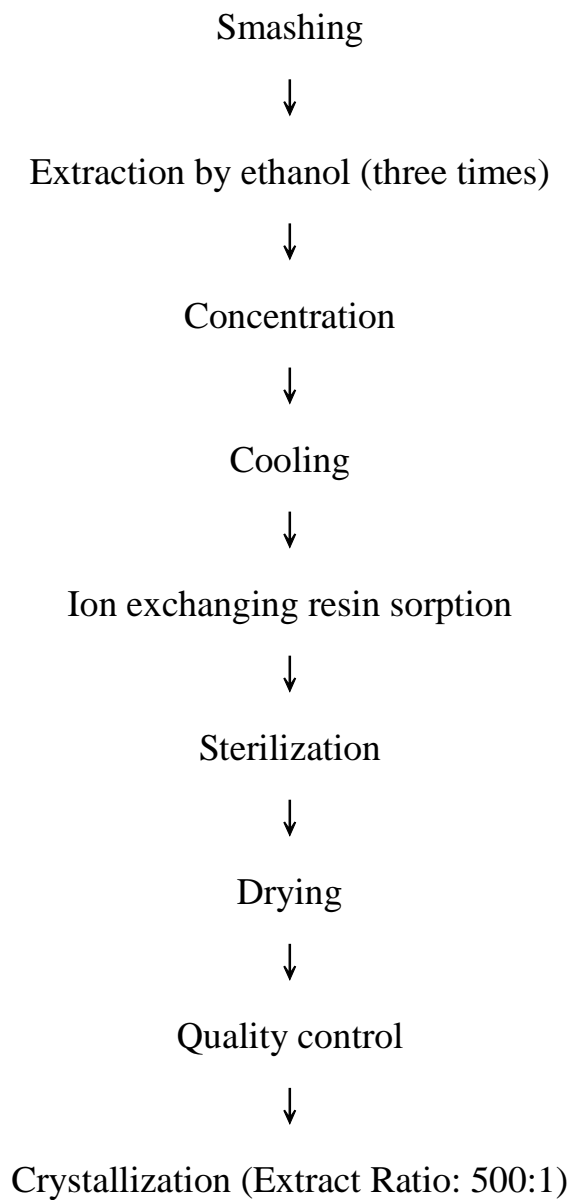


表 2.2 黃耆皂苷IV提取流程

Flow Chart for Astragaloside IV (AGIV 90%)

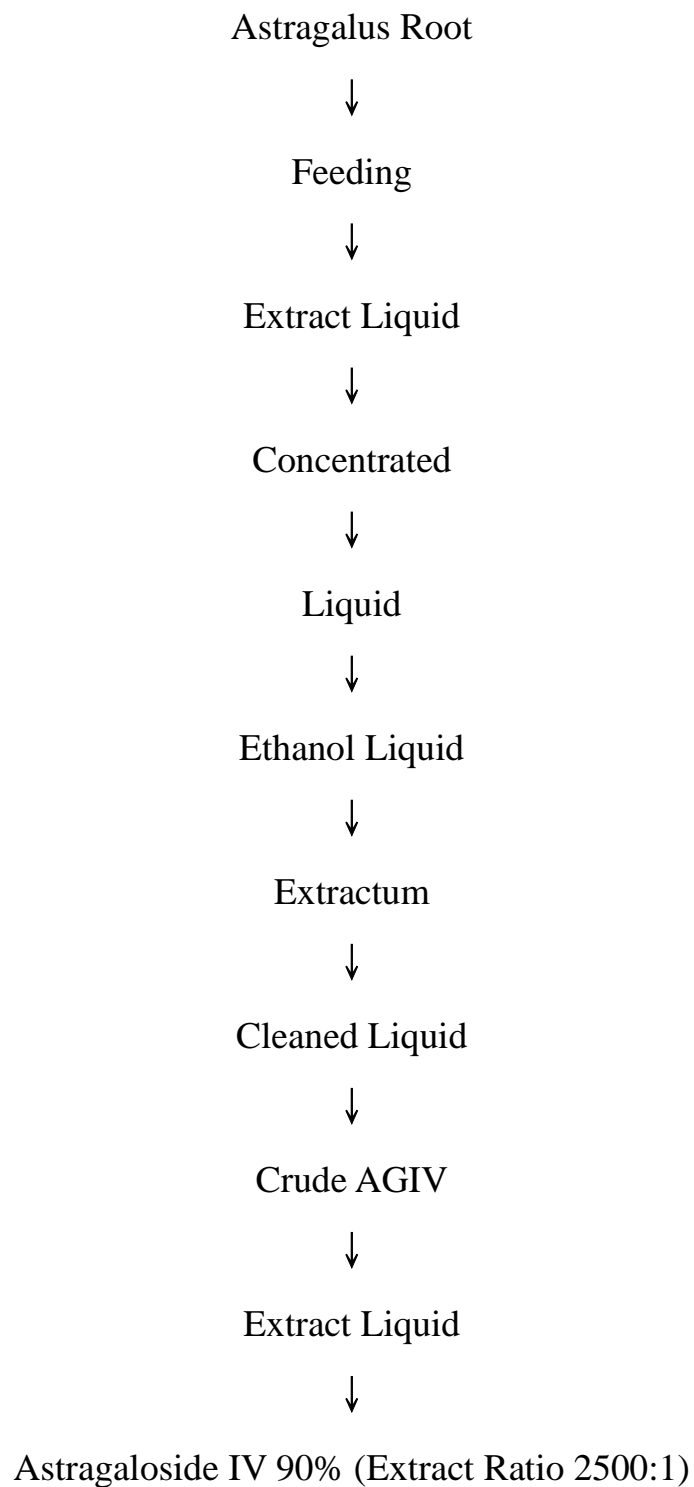


圖 3.1 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

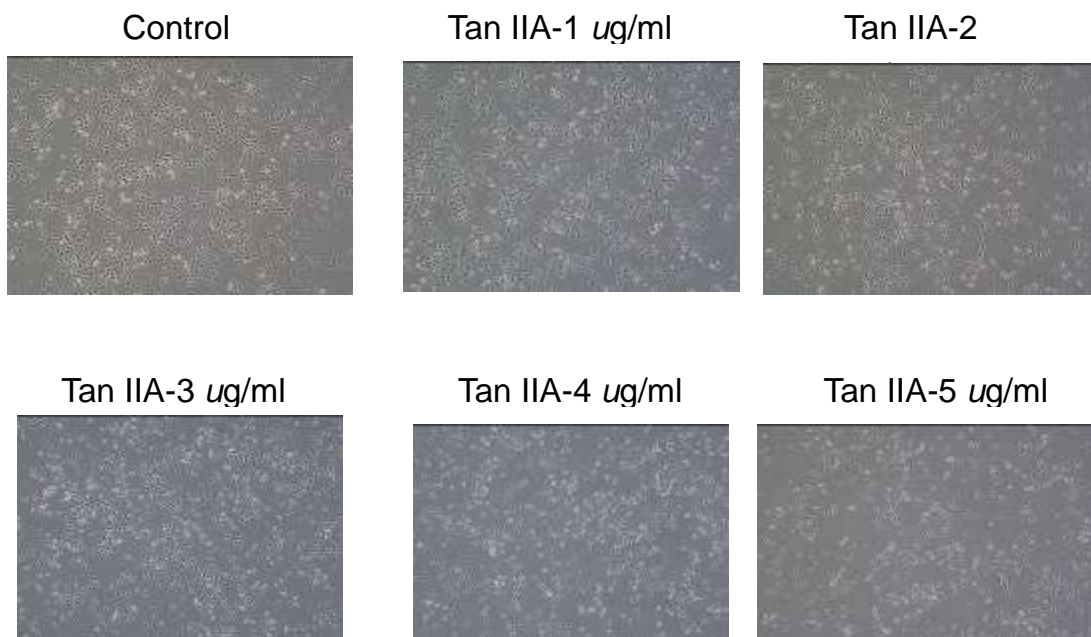


圖 3.2 不同濃度的丹參酮 II A 作用 48 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

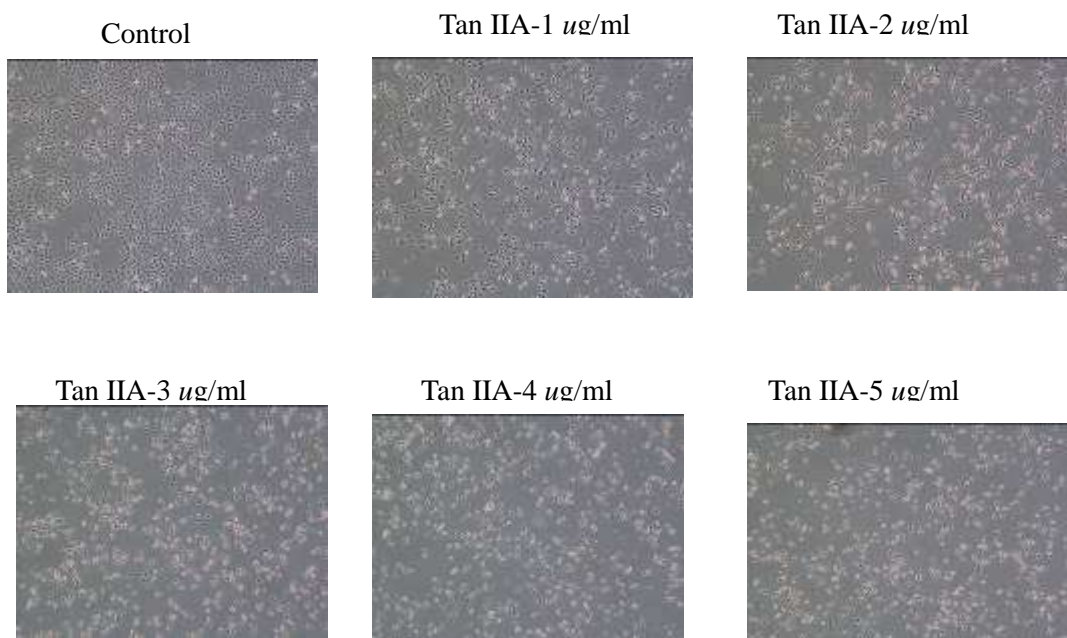


圖 3.3 不同濃度的丹參酮 II A 作用 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

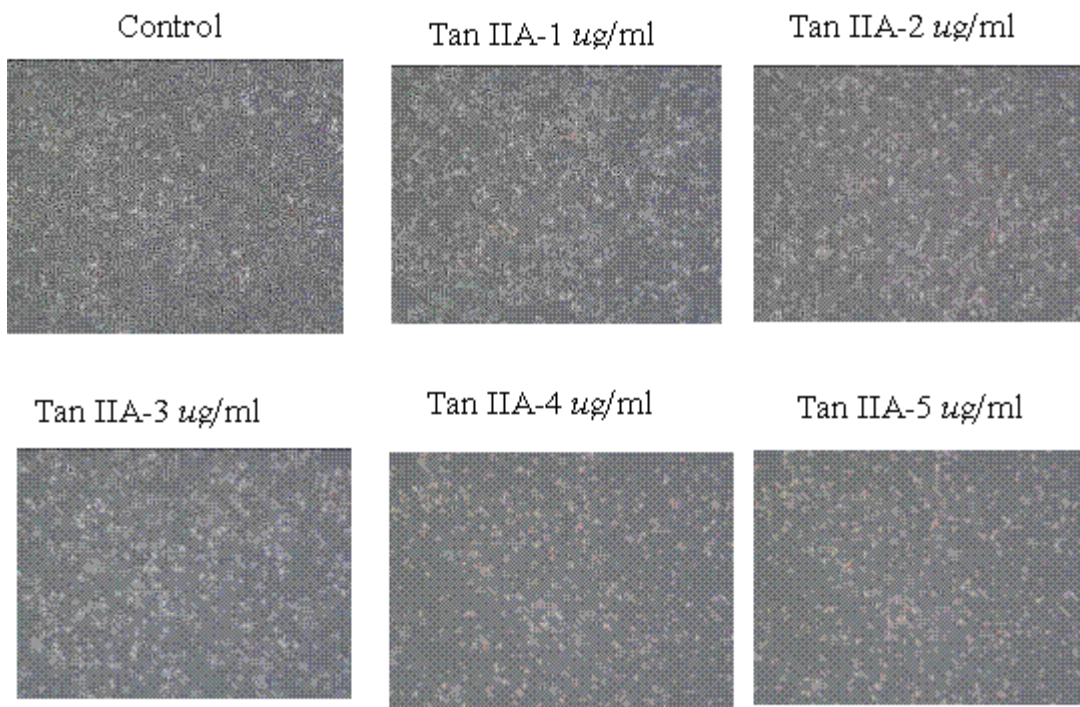


圖 3.4 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

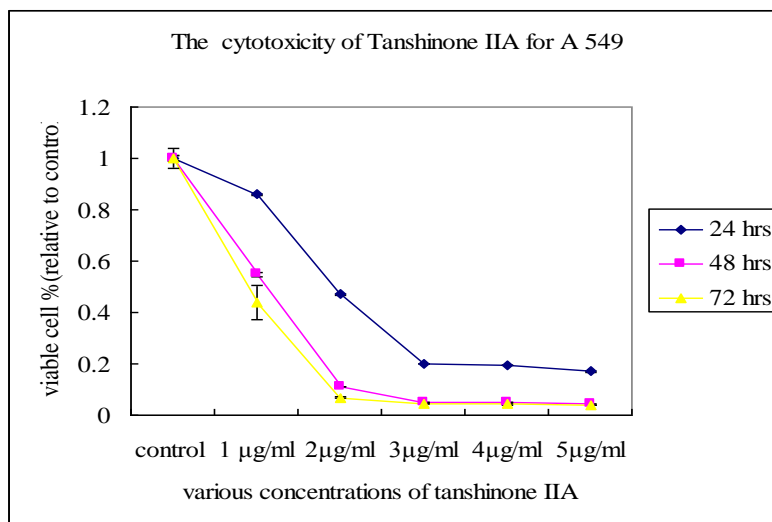


圖 3.5 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

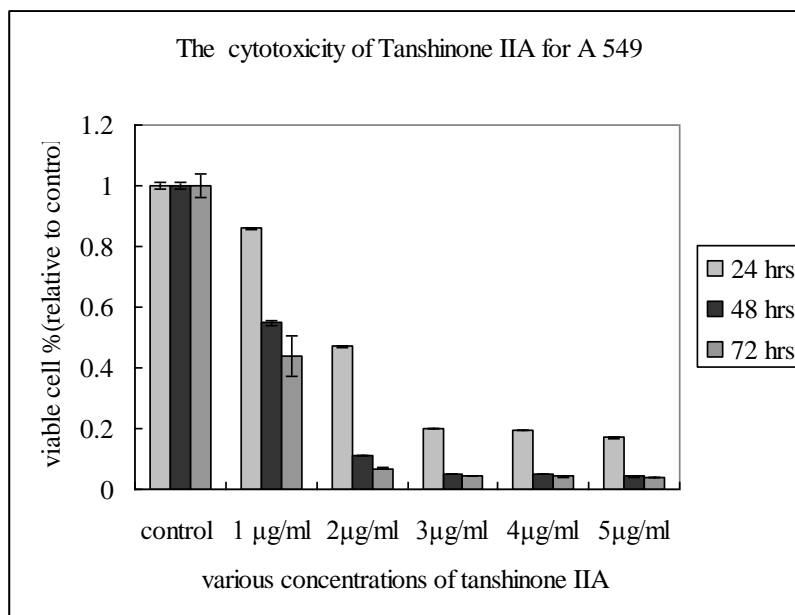


圖 3.6 不同濃度的黃耆皂苷 IV 作用 24 小時之後，評估黃耆皂苷 IV 對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

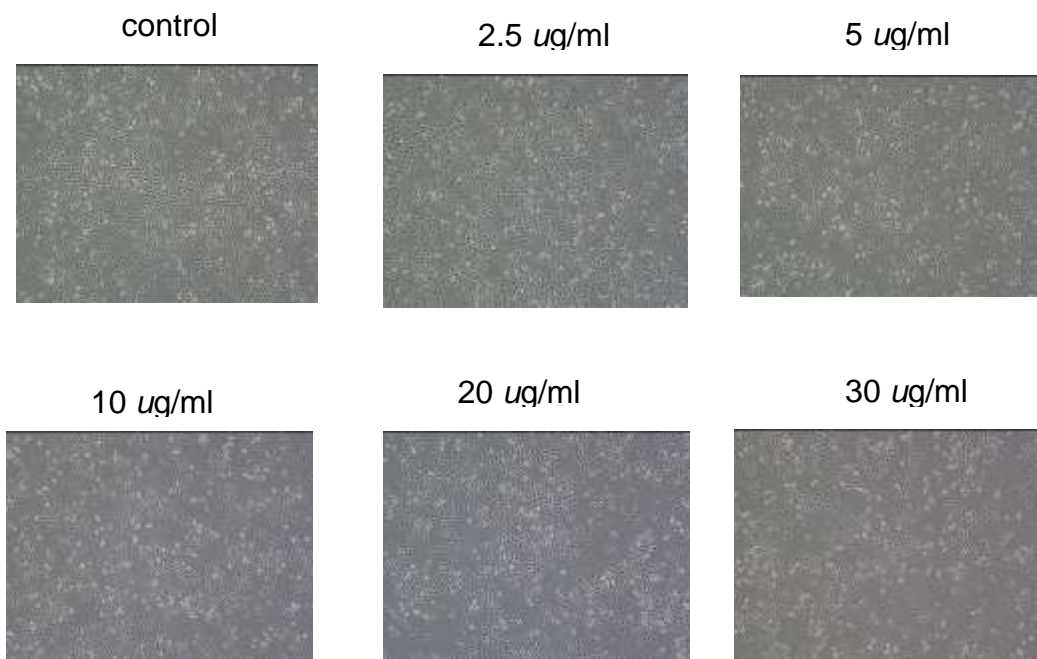


圖 3.7 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 48 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

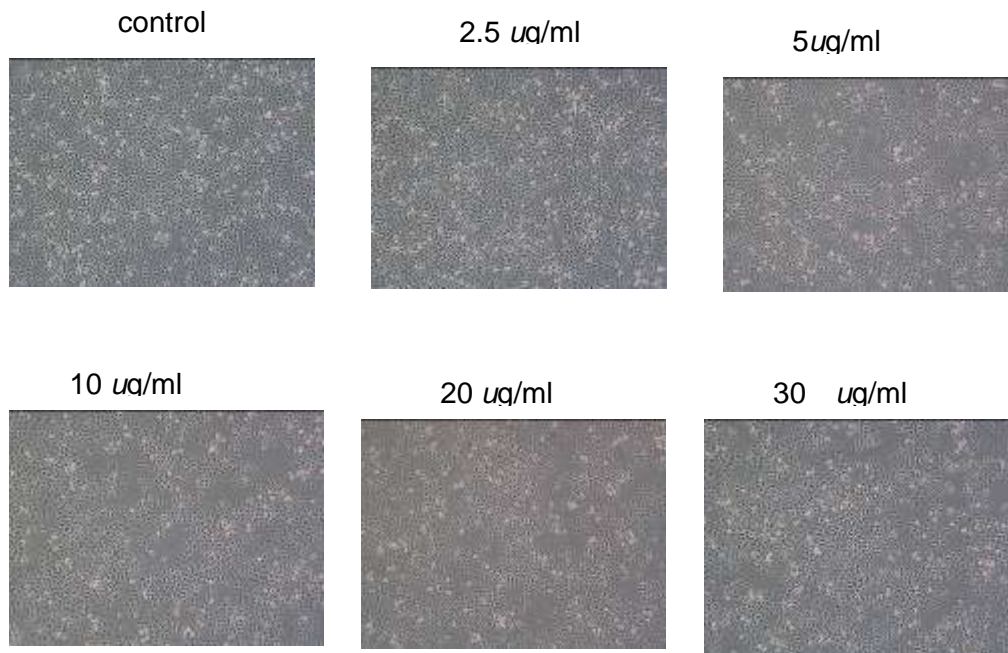


圖 3.8 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

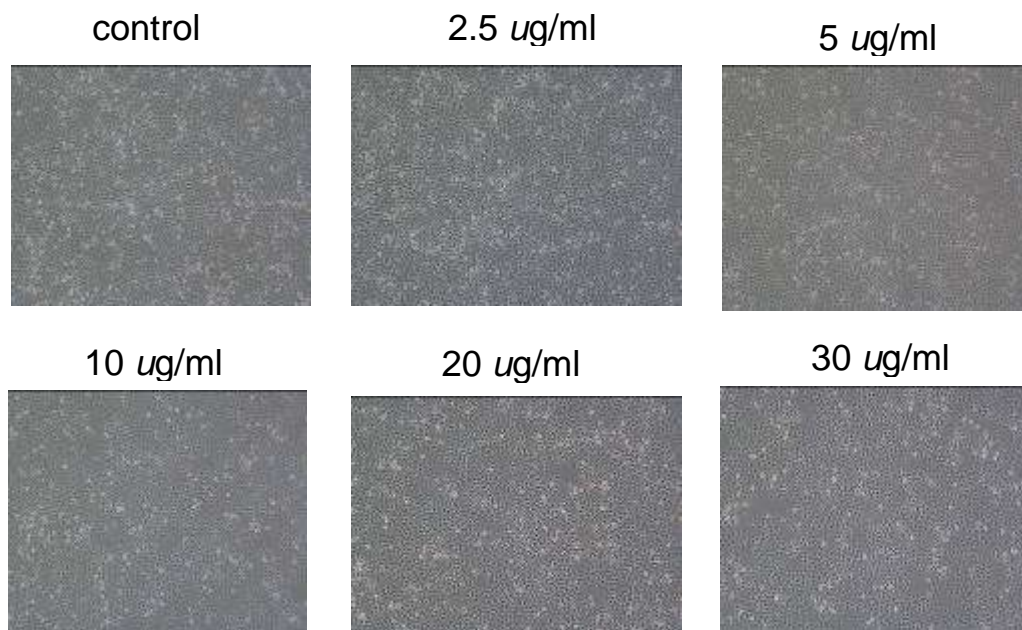


圖 3.9 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 24、48 和 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

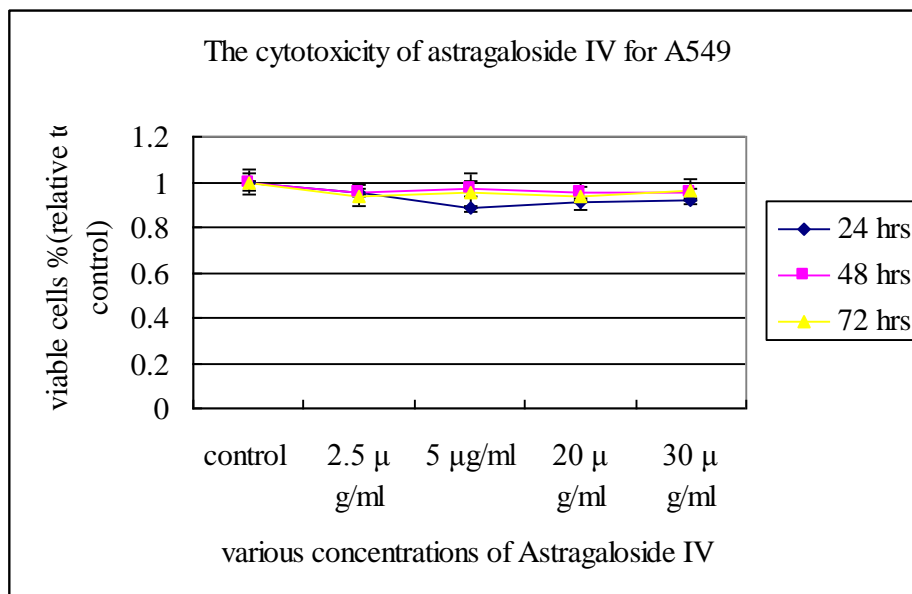


圖 3.10 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 24、48 和 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 A549 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

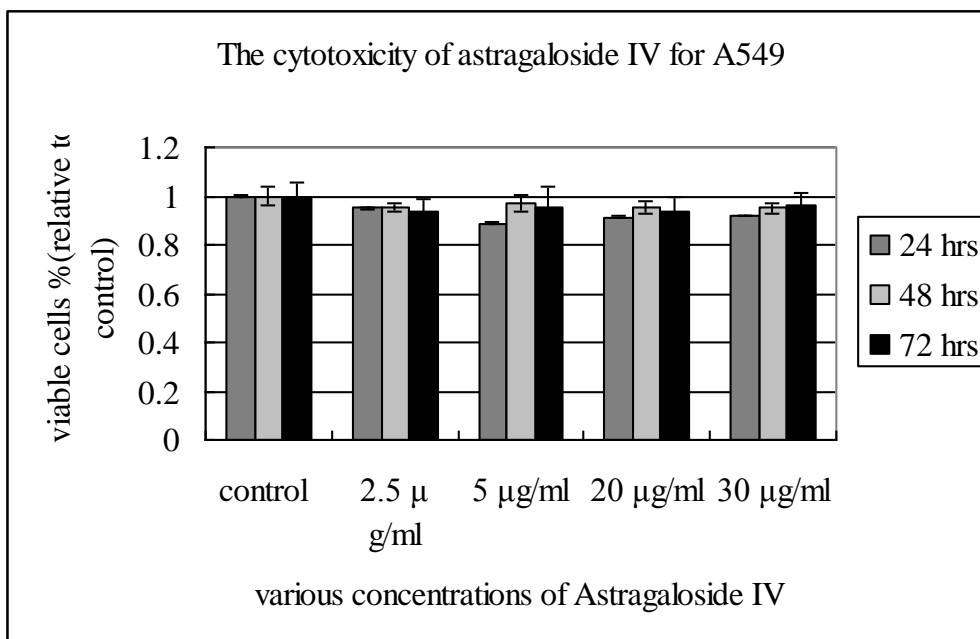


圖 3.11 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

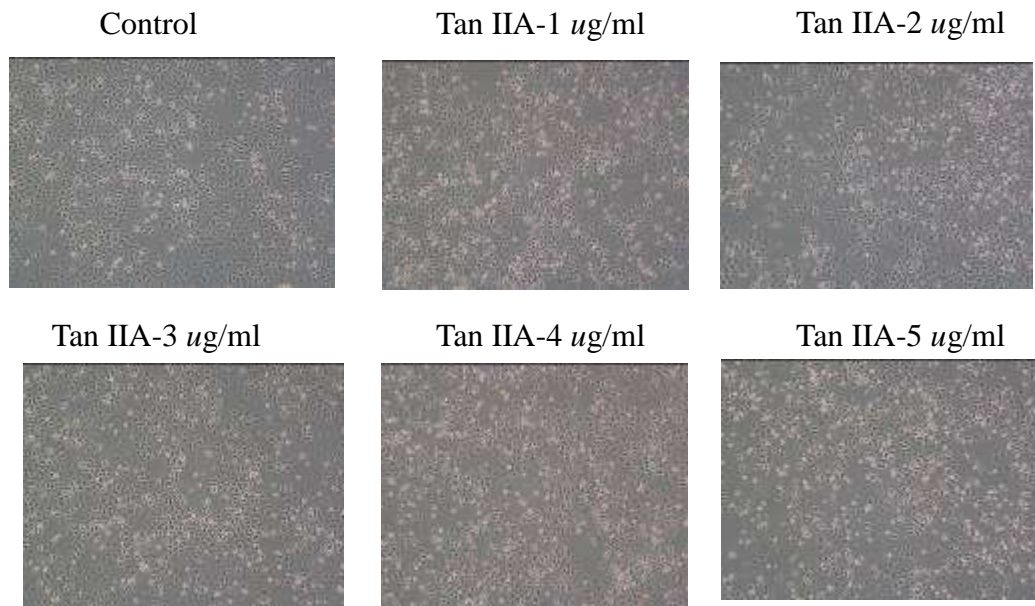


圖 3.12 不同濃度的丹參酮 II A 作用 48 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

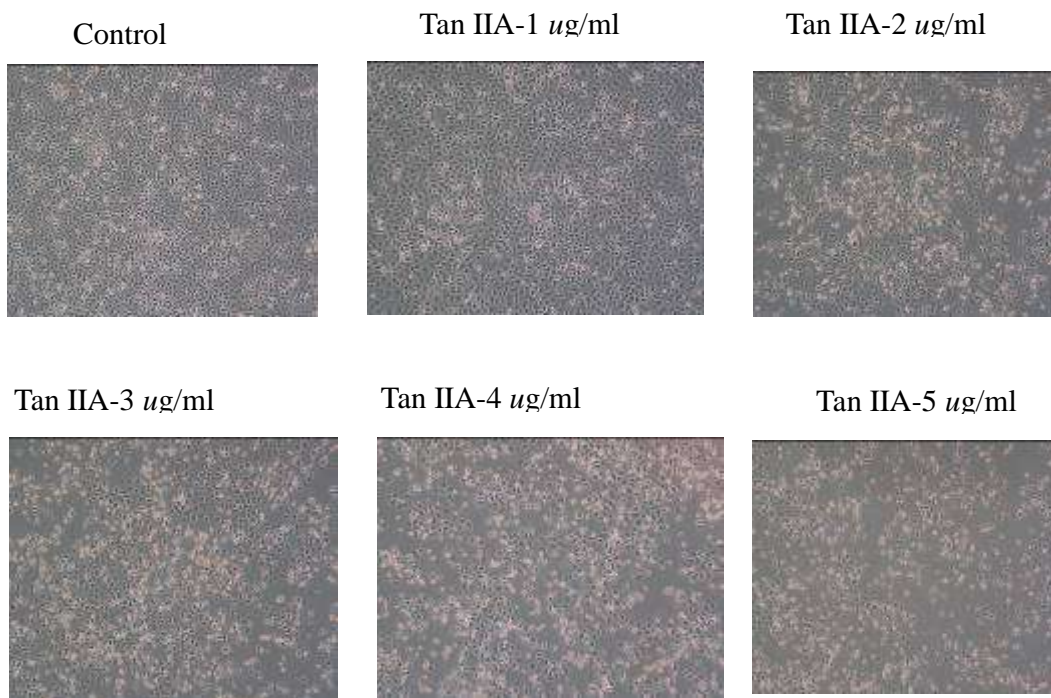


圖 3.13 不同濃度的丹參酮 II A 作用 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

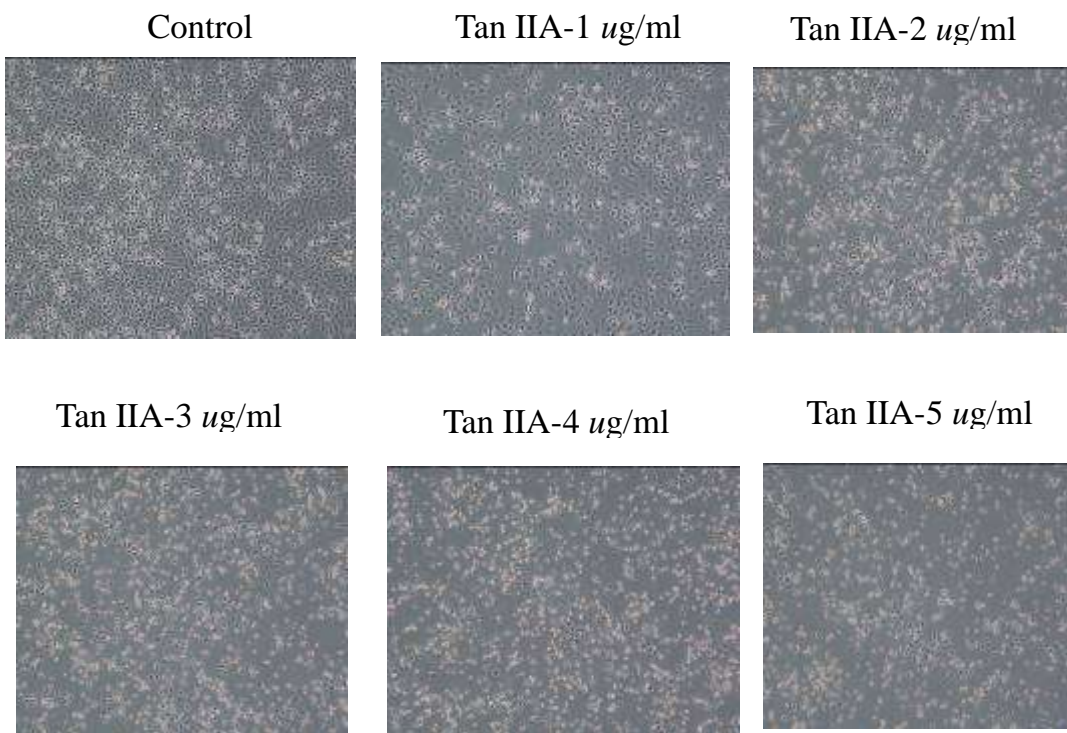


圖 3.14 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

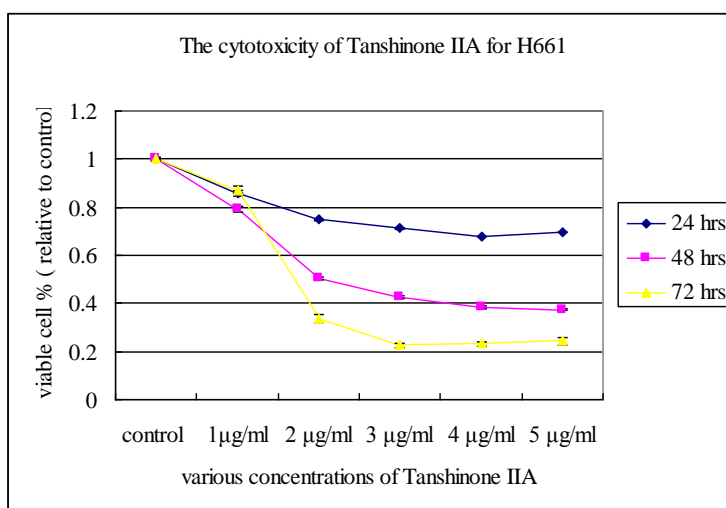


圖 3.15 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

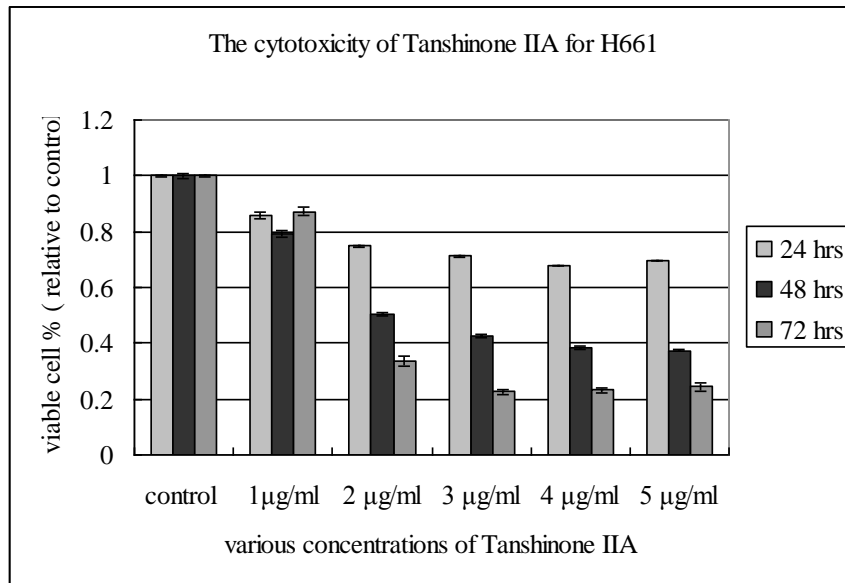


圖 3.16 不同濃度的黃耆皂苷 IV 作用 24 小時之後，評估黃耆皂苷 IV 對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

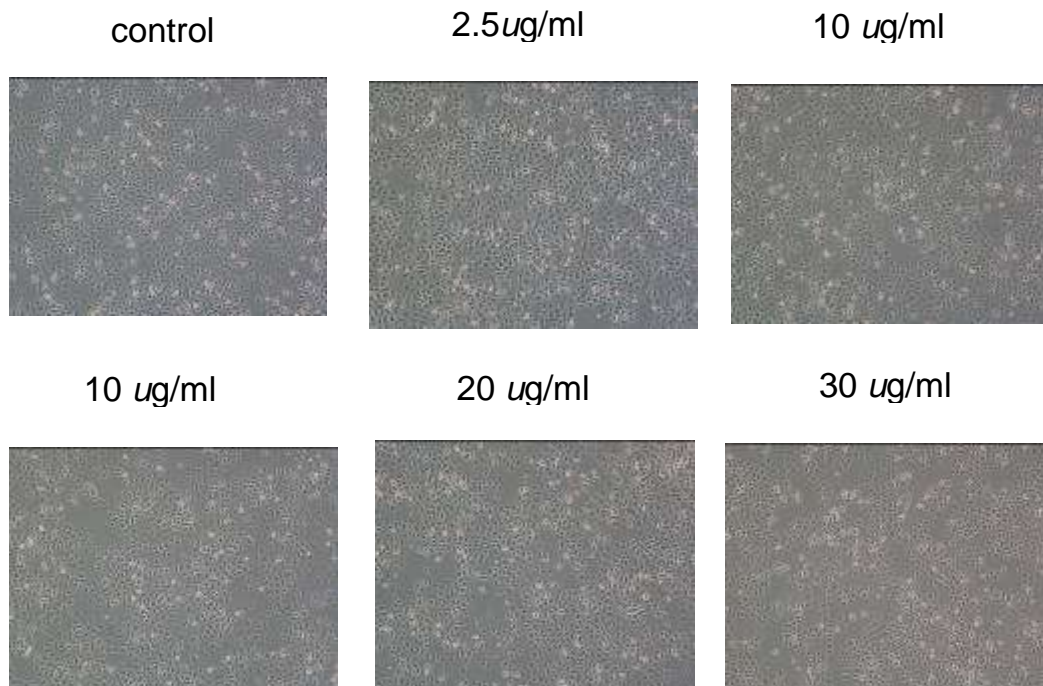


圖 3.17 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 48 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

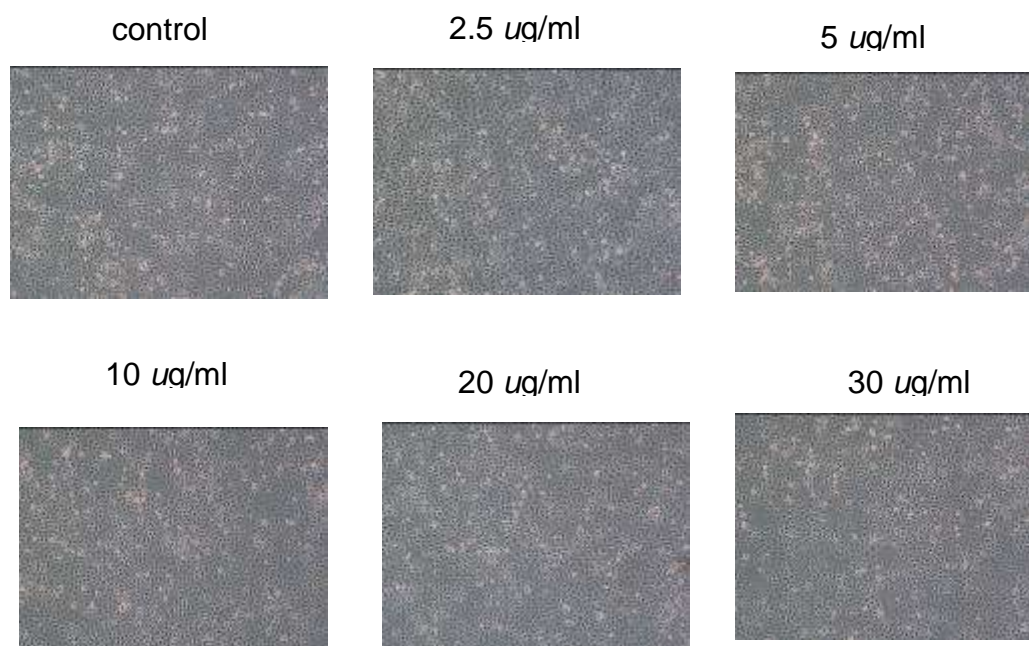


圖 3.18 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

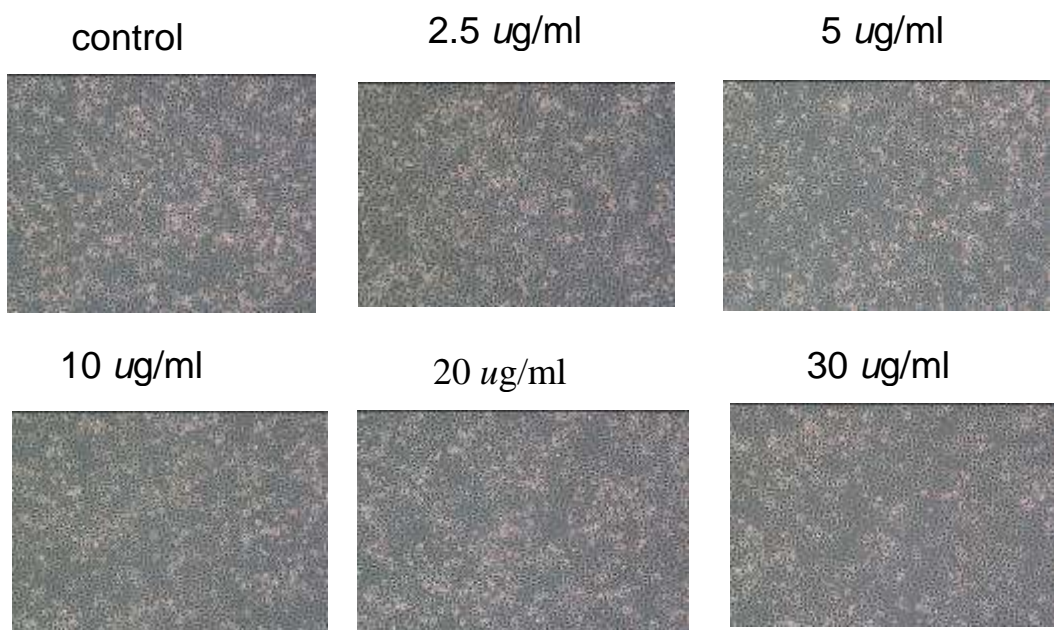


圖 3.19 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 24、48 和 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

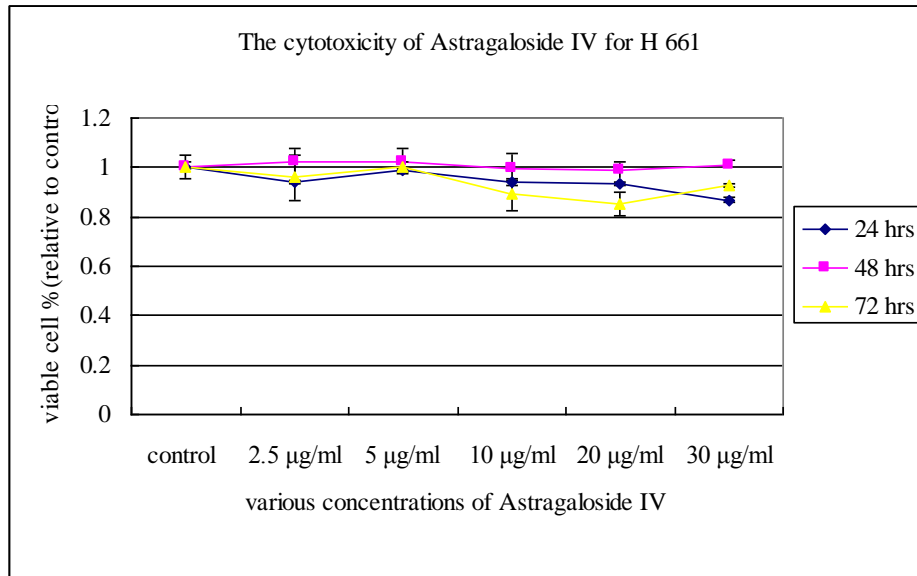


圖 3.20 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 24、48 和 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H661 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

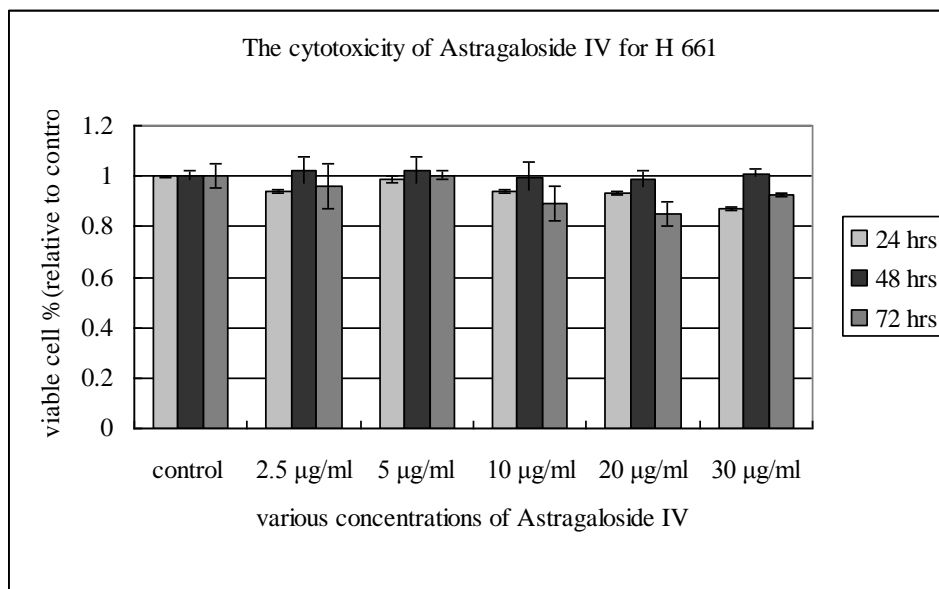


圖 3.21 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

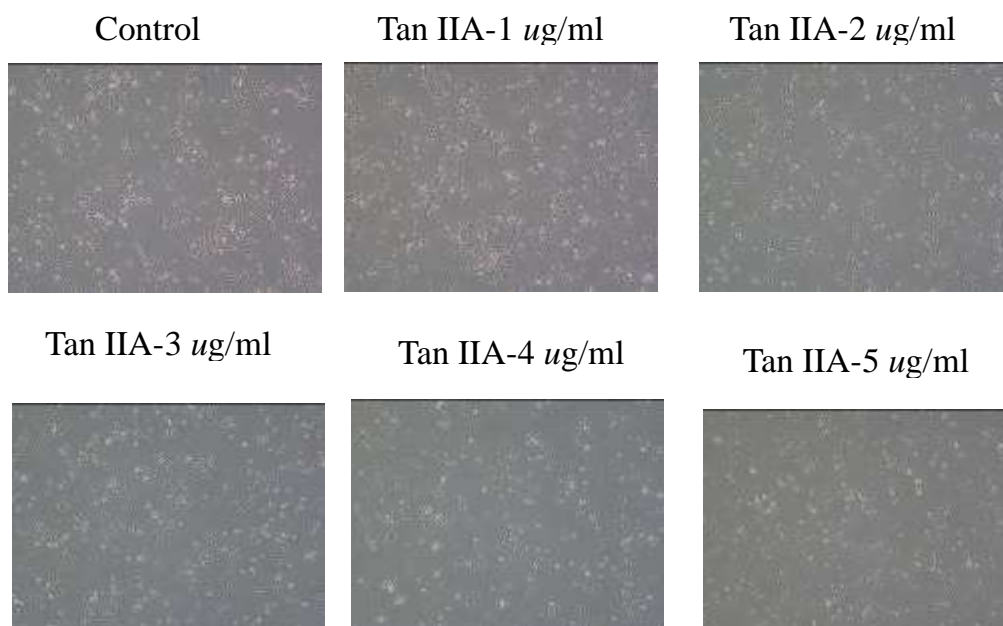


圖 3.22 不同濃度的丹參酮 II A 作用 48 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

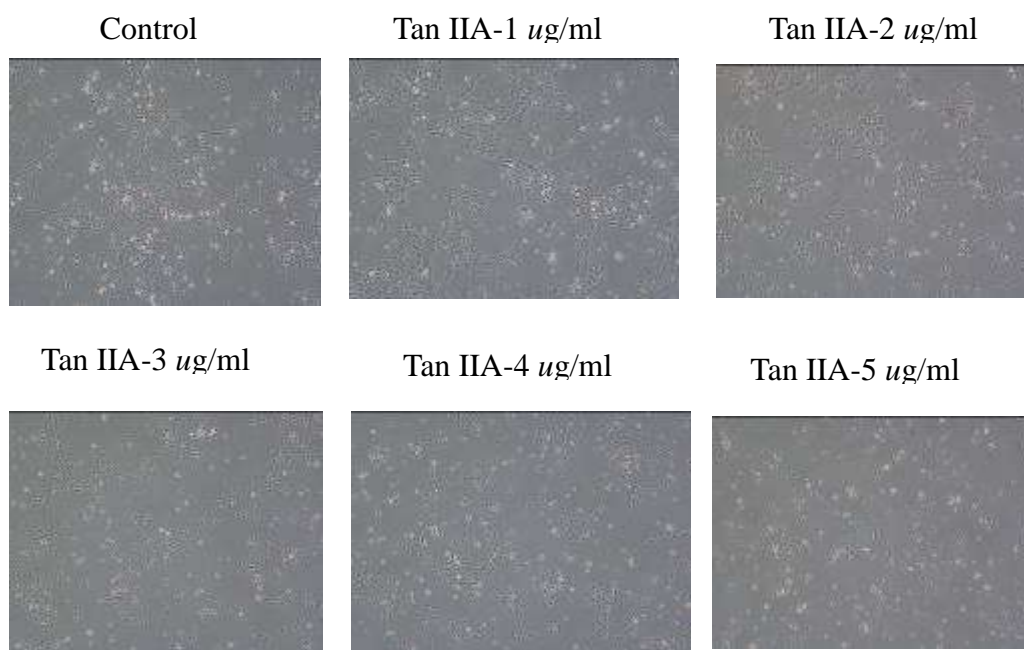


圖 3.23 不同濃度的丹參酮 II A 作用 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

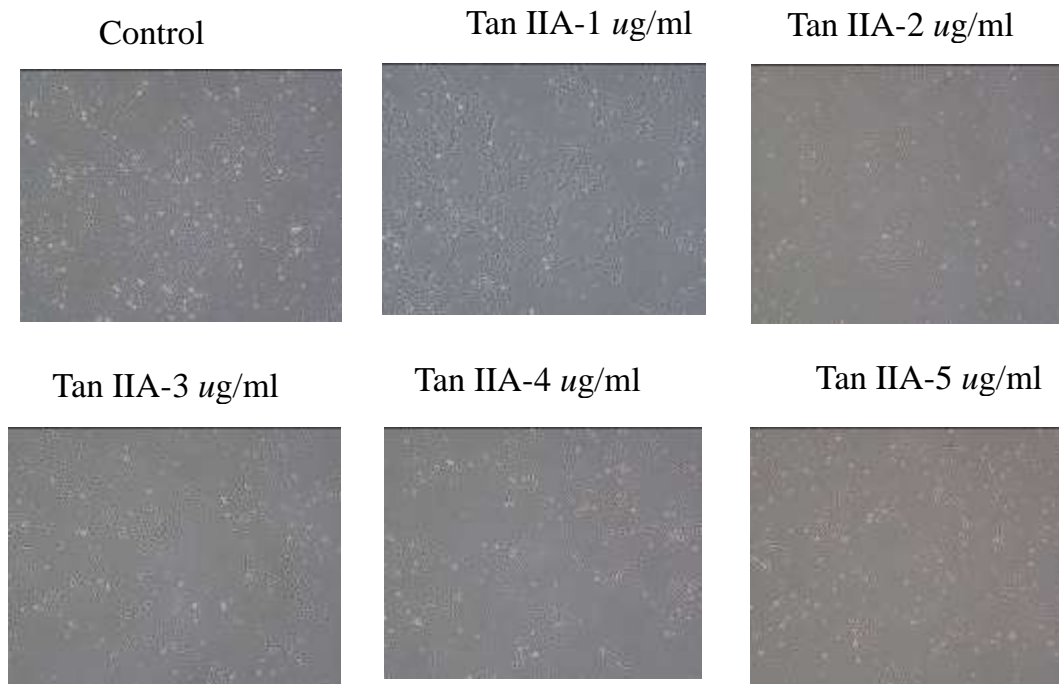


圖 3.24 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

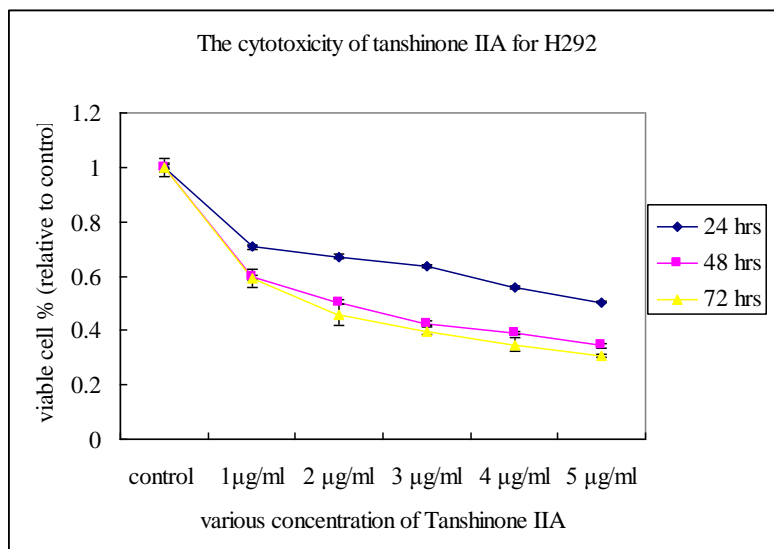


圖 3.25 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

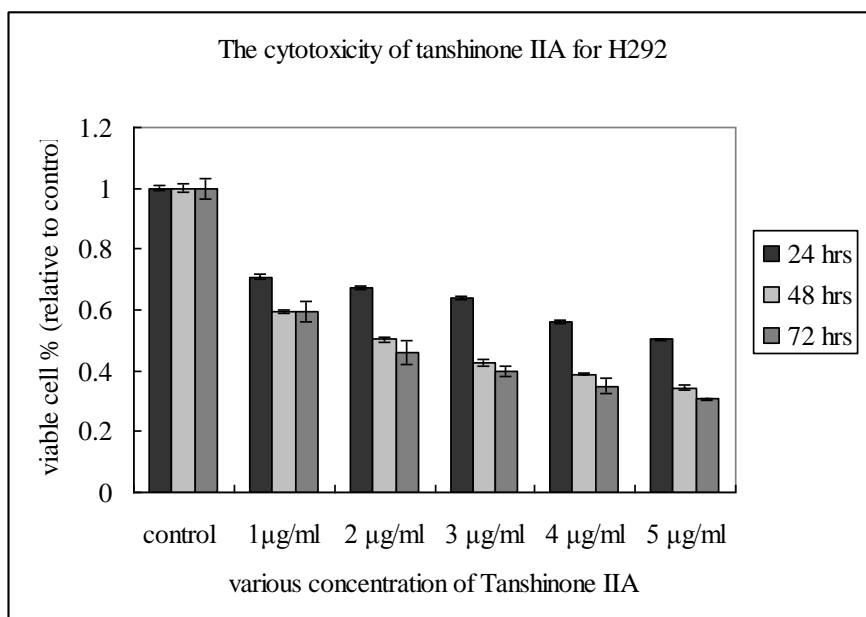


圖 3.26 不同濃度的黃耆皂苷 IV 作用 24 小時之後，評估黃耆皂苷 IV 對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

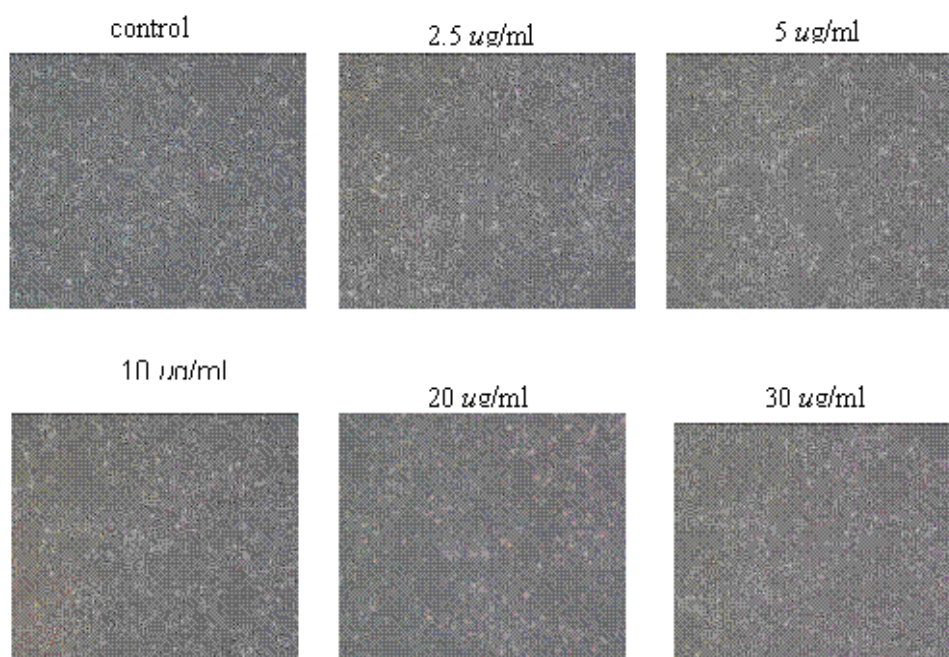


圖 3.27 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 48 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

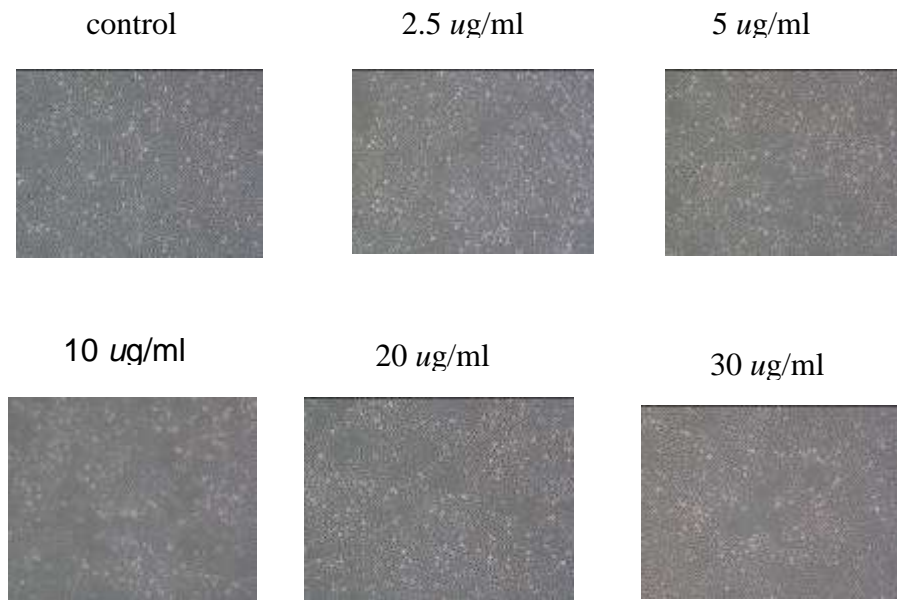


圖 3.28 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

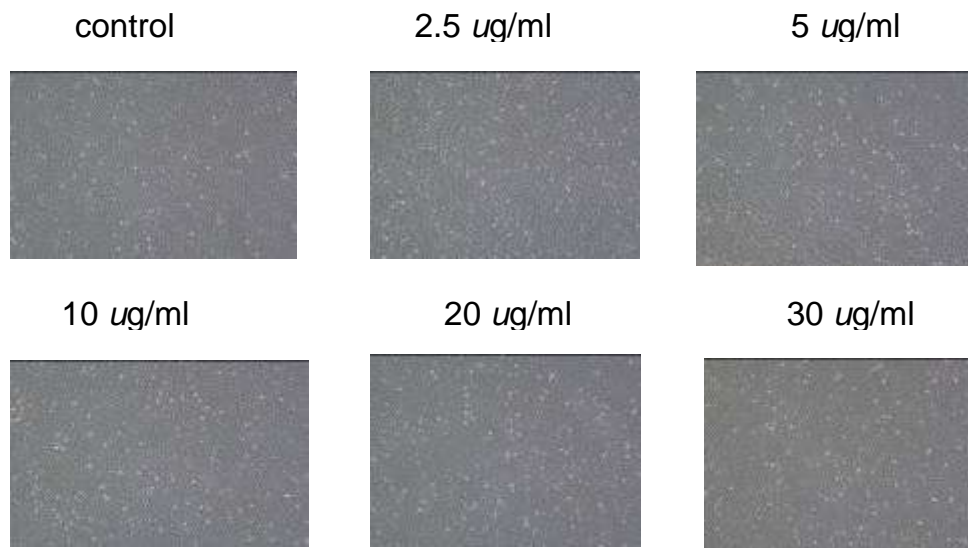


圖 3.29 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 24、48 和 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

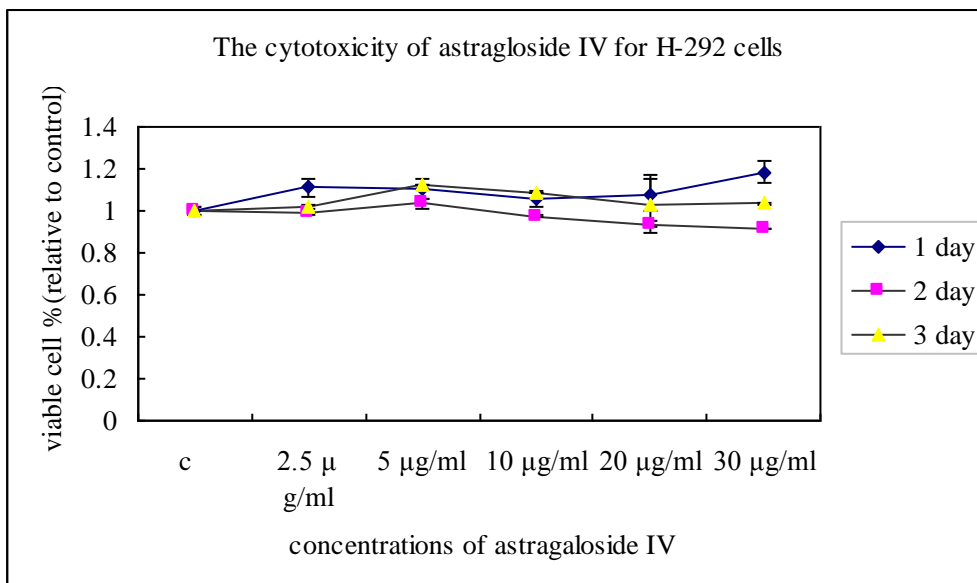


圖 3.30 不同濃度的黃耆皂苷IV作用 24、48 和 72 小時之後，評估黃耆皂苷IV對肺癌細胞株 H292 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

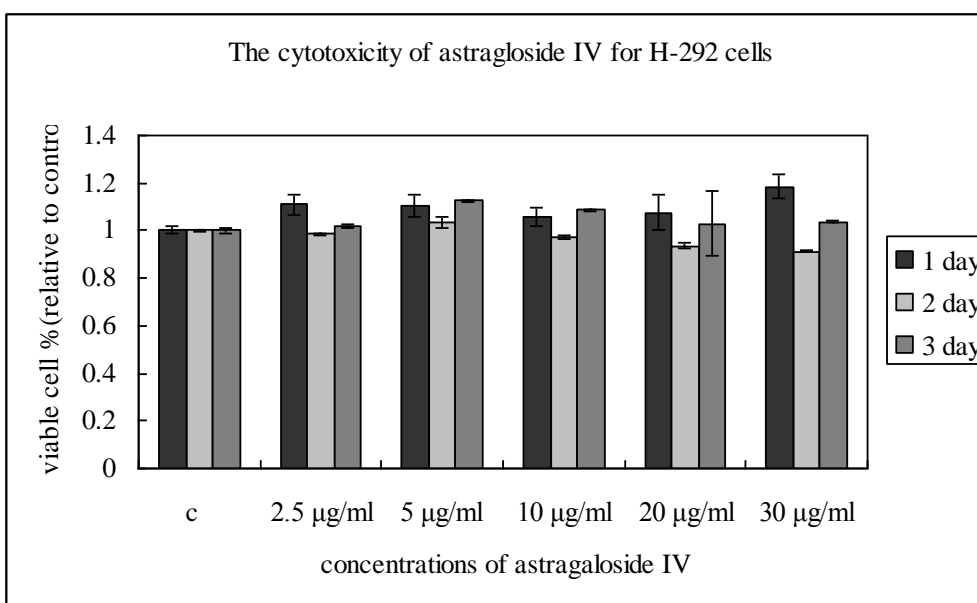


圖 3.31 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H146 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

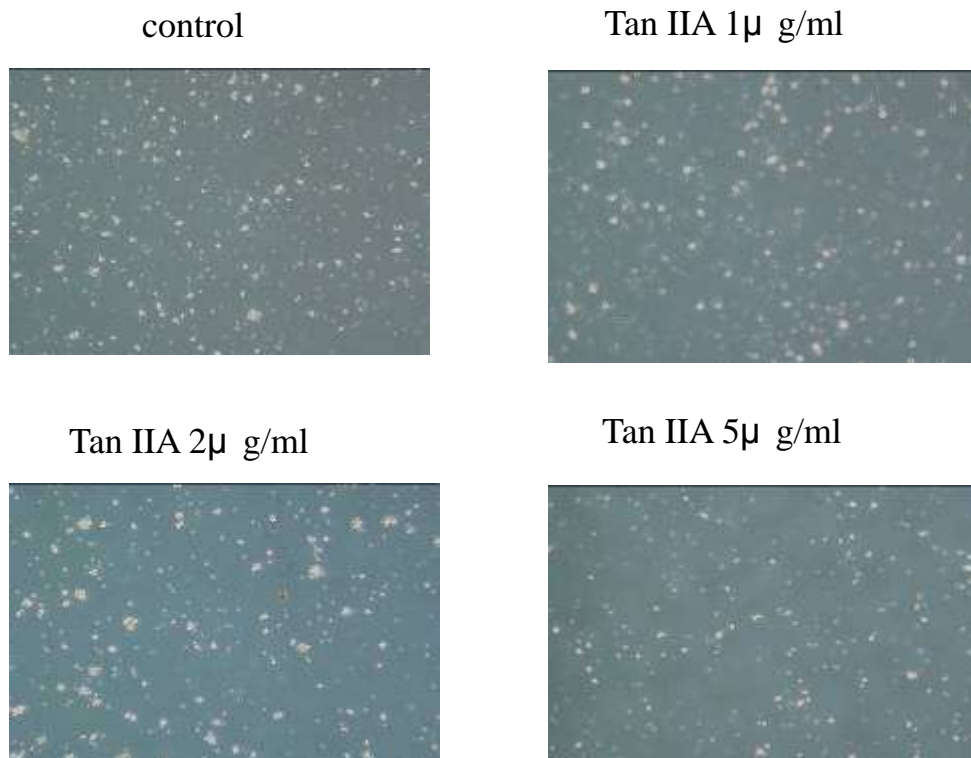


圖 3.32 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H146 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

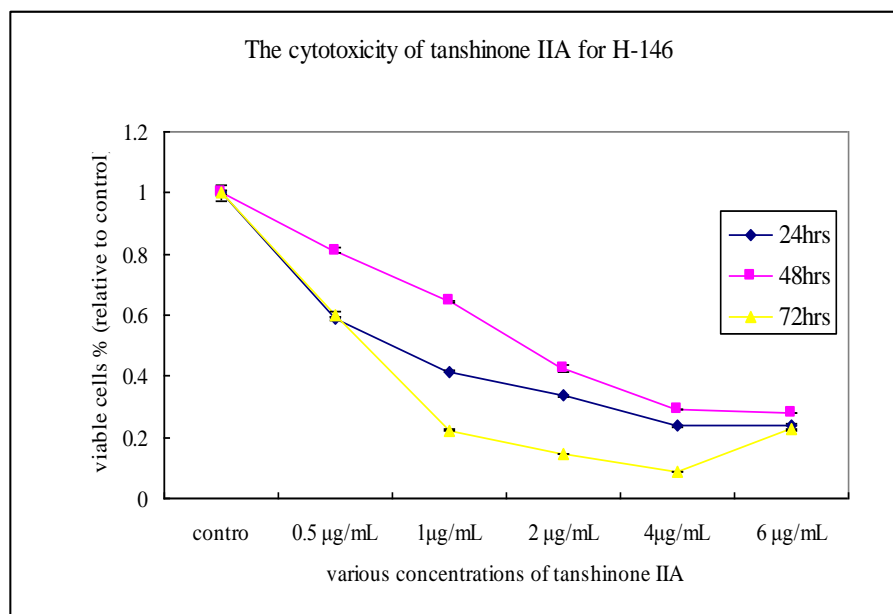


圖 3.33 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H146 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

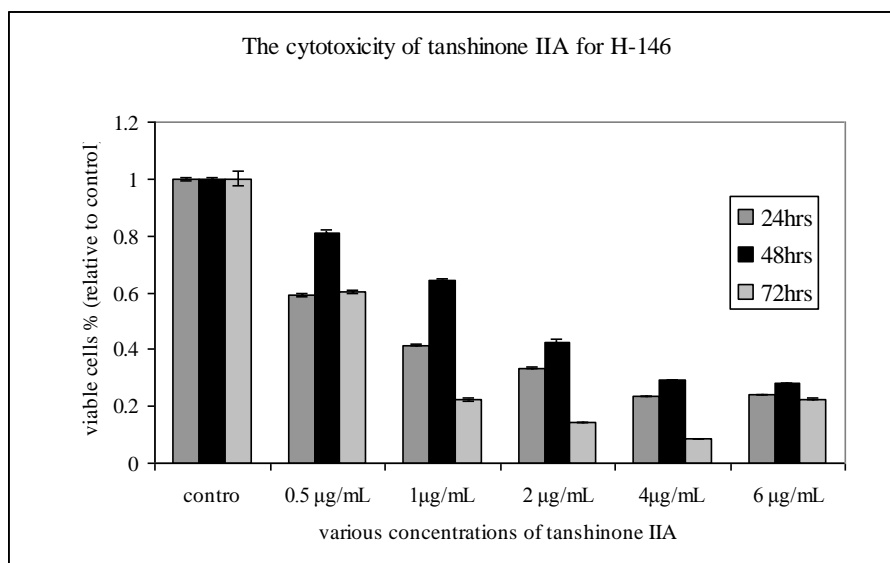


圖 3.34 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H1688 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

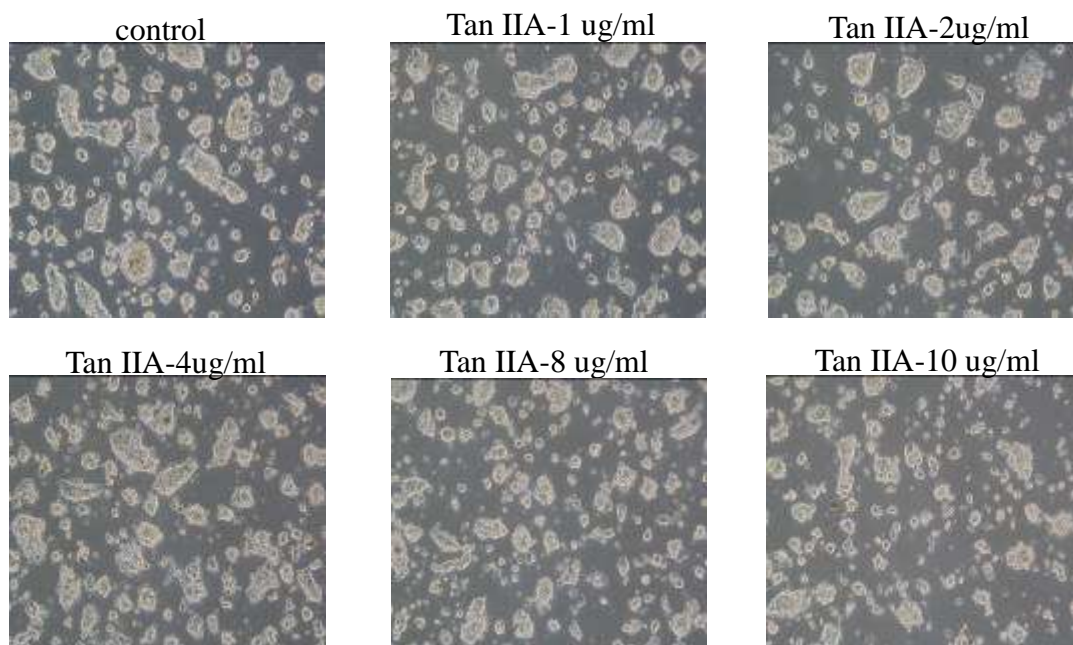


圖 3.35 不同濃度的丹參酮IIA 作用 48 小時之後，評估丹參酮IIA 對肺癌細胞株 H1688 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

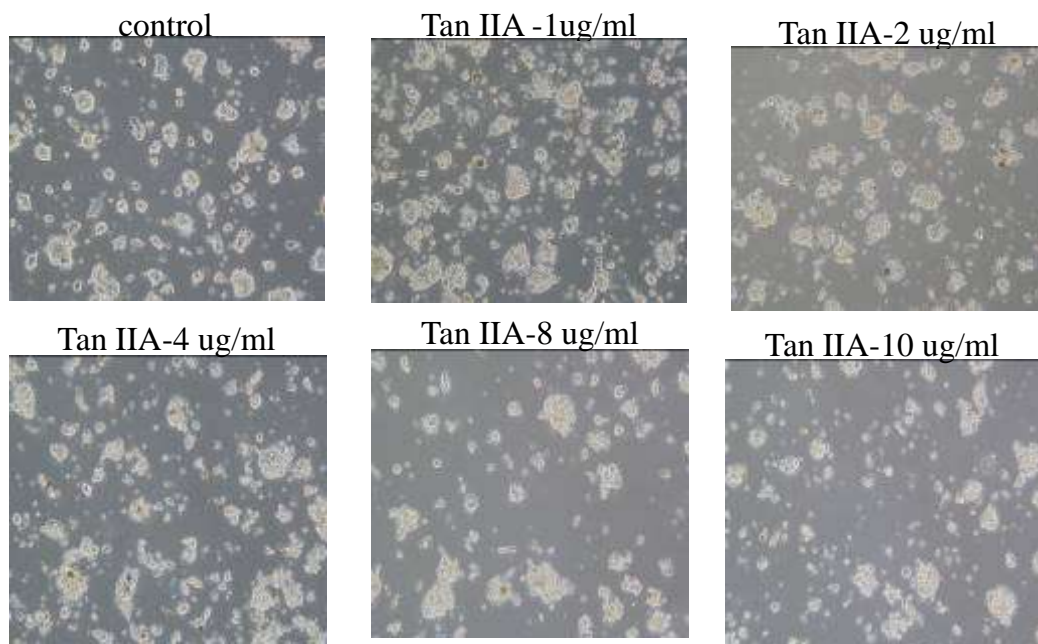


圖 3.36 不同濃度的丹參酮IIA 作用 72 小時之後，評估丹參酮IIA 對肺癌細胞株 H1688 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

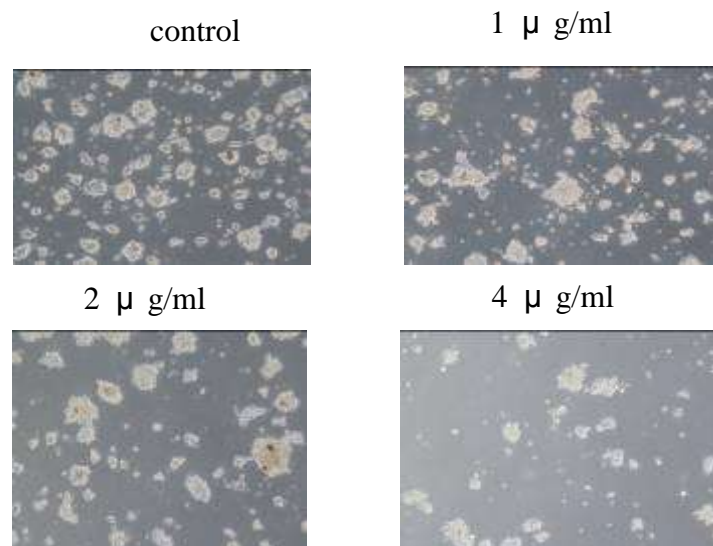


圖 3.37 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H688 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

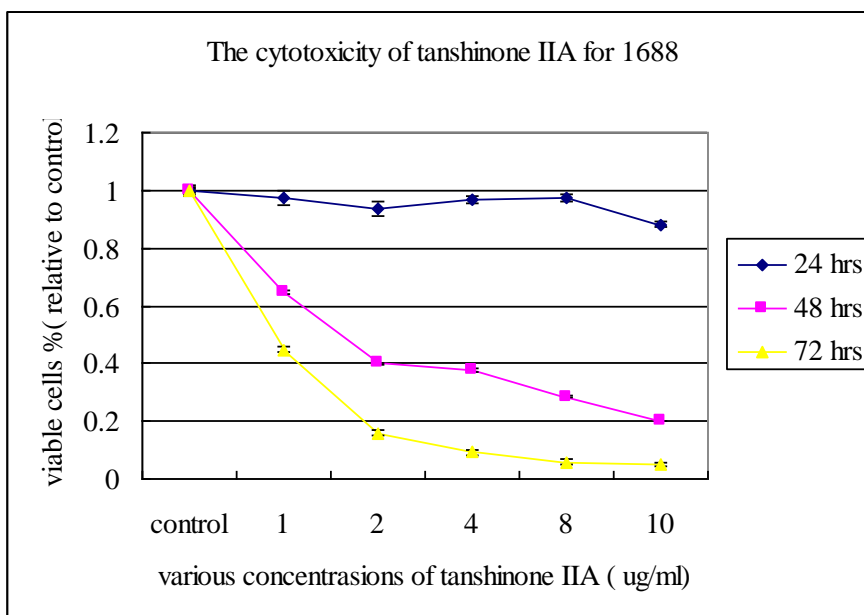


圖 3.38 不同濃度的丹參酮 II A 作用 24、48 和 72 小時之後，評估丹參酮 II A 對肺癌細胞株 H-1688 細胞毒性 (cytotoxicity) 的影響。

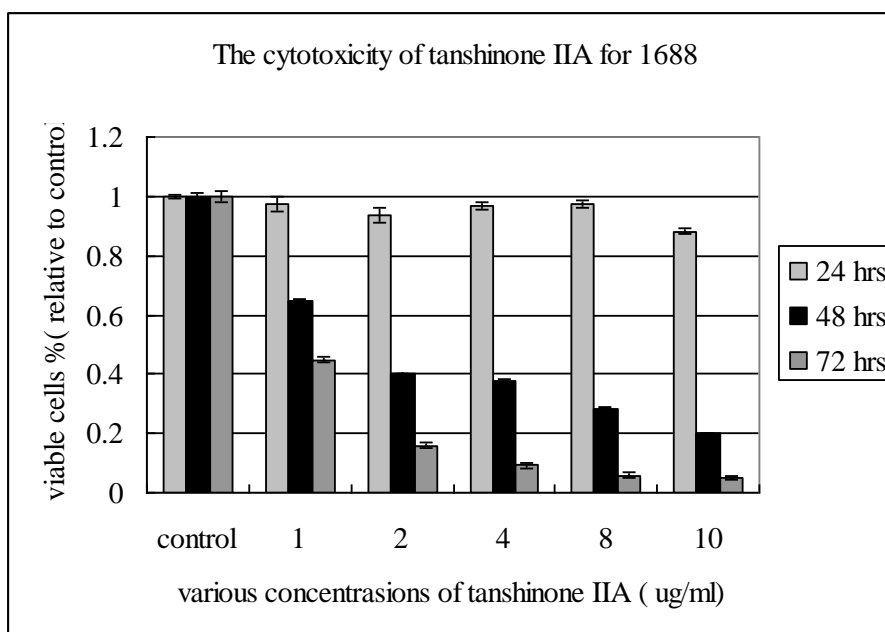


圖 3.39 利用 GIEMSA STAIN 檢測不同濃度的丹參酮 II A 處理 24 小時，對肺癌細胞(H661)細胞型態(cell morphology)和細胞核(nuclei)的影響

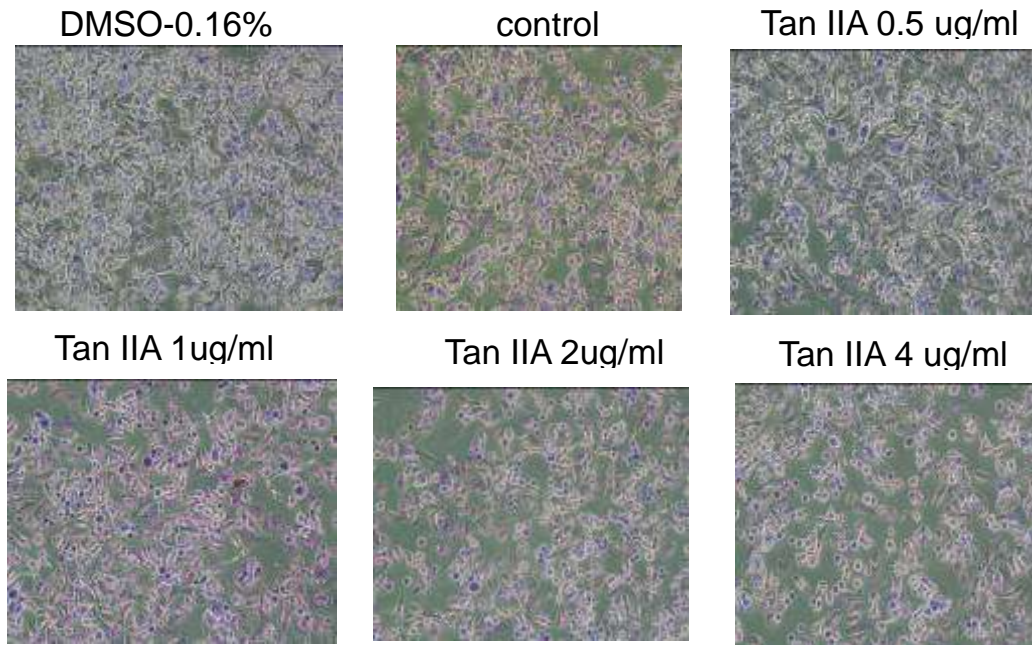


圖 3.40 不同濃度的丹參酮 II A 處理 24 小時，對肺癌細胞 A-549 的 DNA 破壞效應

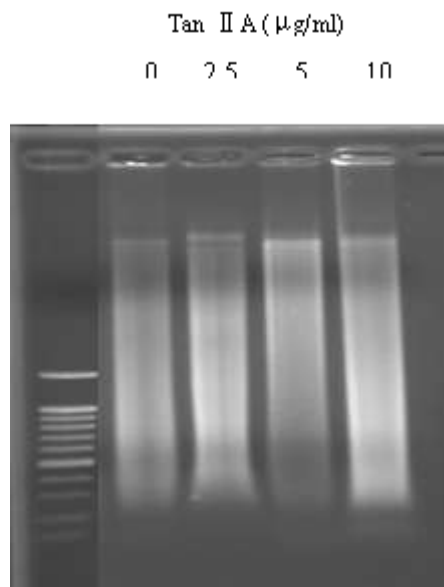


圖 3.41 不同濃度的丹參酮 II A 處理 24 小時，對肺癌細胞 H 661 的

DNA 破壞效應

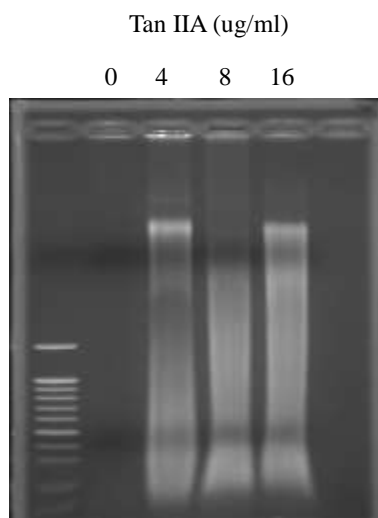


圖 3.42 丹參酮 II AL.D 50 前導試驗 (丹參酮 II A 溶在玉米油)正常小鼠分為三組，分別給 1gm/Kg/day、2 gm/Kg/day 和 4 gm/Kg/day (25 mg、50 mg /0.2ml 和 100 mg /0.4ml)灌胃(P.O)

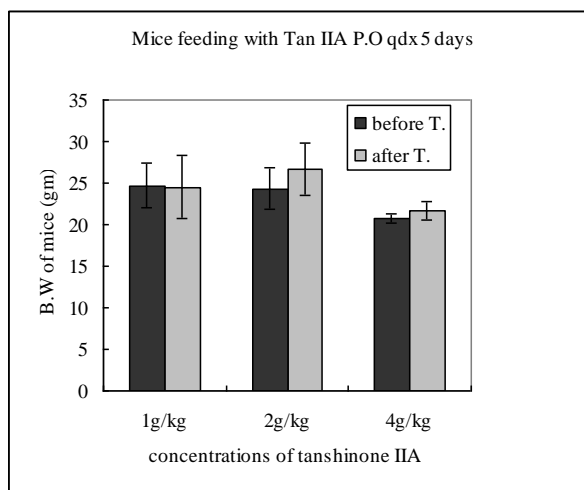


表 3.1 丹參酮 II A 灌胃(P.O)，每日一次，連續 5 個劑量，的肝腎毒

性評估，用頸椎脫位處死犧牲後，立即由心臟抽血檢測。

	44-87	101-214IU/L	18-31	0.48-1.1/mg/dl
丹參酮 II	ALT	AST	BUN	Cre
A 1g/kg	74 80	795 691	28	0.2
丹參酮 II	125	1995		
A 2g/kg	56	364	23	0.2
丹參酮 II	36	188	26	0.2
A 4g/kg	48	332	34	0.3

圖 3.43 丹參酮 II A L.D 50 前導試驗 (丹參酮 II A 溶在玉米油) 正常小鼠分為兩組分別給丹參酮 II A (80 mg/Kg/day) 和 (160 mg/Kg/day) 丹參酮 II A 溶在玉米油(1.6 mg / 0.2 ml) 腹腔注射 (I.P)

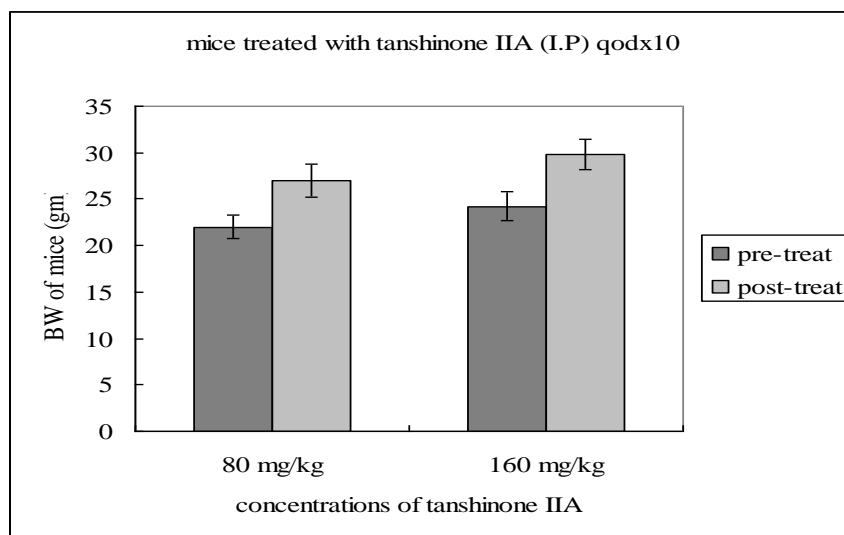


表 3.2 丹參酮 II A 腹腔注射(I.P)，隔日一次，連續 10 個劑量，的肝

腎毒性評估，用二氧化碳犧牲後，立即由心臟抽血檢測。

	101-214					0.48-1.1/mg/dl
	IU/L	44-87			18-31	
	AST	ALT	T-BIL	D-BIL	BUN	CRE
	91	47	0.2	0	23	0.2
	86	39	0.2	0	25	0.2
丹參酮 II A	237	80	0.2	0	27	0.2
(80 mg/Kg)	100	44	0.2	0	24	0.2
	207	160	0.2	0	23	0.2
	95	30	0.2	0.1	14	0.2
丹參酮 II A	241	52	0.2	0	13	0.2
(160	92	39	0.1	0	19	0.2
mg/Kg)	103	28	0.2	0	18	0.2
	437	60	0.1	0	18	0.2
對照組(不	79	54	0.3	0.1	24	0.2
做任何處	86	52	0.2	0	28	0.2
理)	59	32	0.2	0	29	0.2

圖 3.44 肺癌細胞株 H-146 3x10⁶/0.2 ml 轉殖在裸鼠(SCID mice)皮下，經一個月後腫瘤長到約 1 公分大小，然後開始給丹參酮

II A(溶在玉米油)，劑量分別為 40 gm/kg 和 80 mg/kg，腹腔注射，隔日一次，連續 15 次，對照組注射玉米油



Control (corn oil)



Tanshinone IIA 40 mg/kg



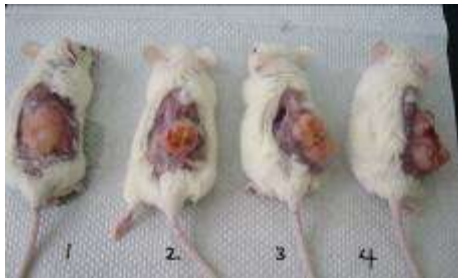
Tanshinone IIA 80 mg/kg

圖 3.45 肺癌細胞株 H-146 $3 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml}$ 轉殖在裸鼠(SCID mice)皮下，經一個月後腫瘤長到約 1 公分大小，然後開始給丹參酮

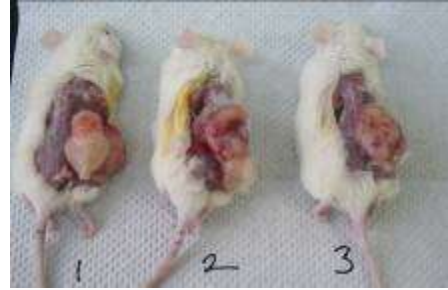
II A(溶在玉米油)，劑量分別為 40 gm/kg 和 80 mg/kg，腹腔注射，隔日一次，連續 15 次，對照組注射玉米油，然後將裸鼠犧牲(CO₂)。



Control (corn oil)



Tanshinone IIA 40 mg/kg



Tanshinone IIA 80 mg/kg

圖 3.46 肺癌細胞株 H-146 轉殖在裸鼠(SCID mice)皮下，經一個月後腫瘤長到約 1 公分大小，然後開始給丹參酮 II A(溶在玉米

油),劑量分別為 40 gm/kg 和 80 mg/kg,腹腔注射,隔日一次,連續 15 次,對照組注射玉米油,然後將裸鼠犧牲(CO₂),犧牲後取瘤秤瘤重。



Control (corn oil)
I.P



Tanshinone IIA (40 mg/kg)



Tanshinone IIA (80 mg/kg)
I.P

圖 3.47 肺癌細胞株 H-146 轉殖在裸鼠皮下,經一個月後腫瘤長到約 1 公分大小,然後開始給丹參酮 II A(溶在玉米油),劑量分別

為 40 gm/kg 和 80 mg/kg，對照組注射玉米油，腹腔注射，隔日一次，連續 15 次，然後將裸鼠犧牲(CO₂)，犧牲前秤體重。

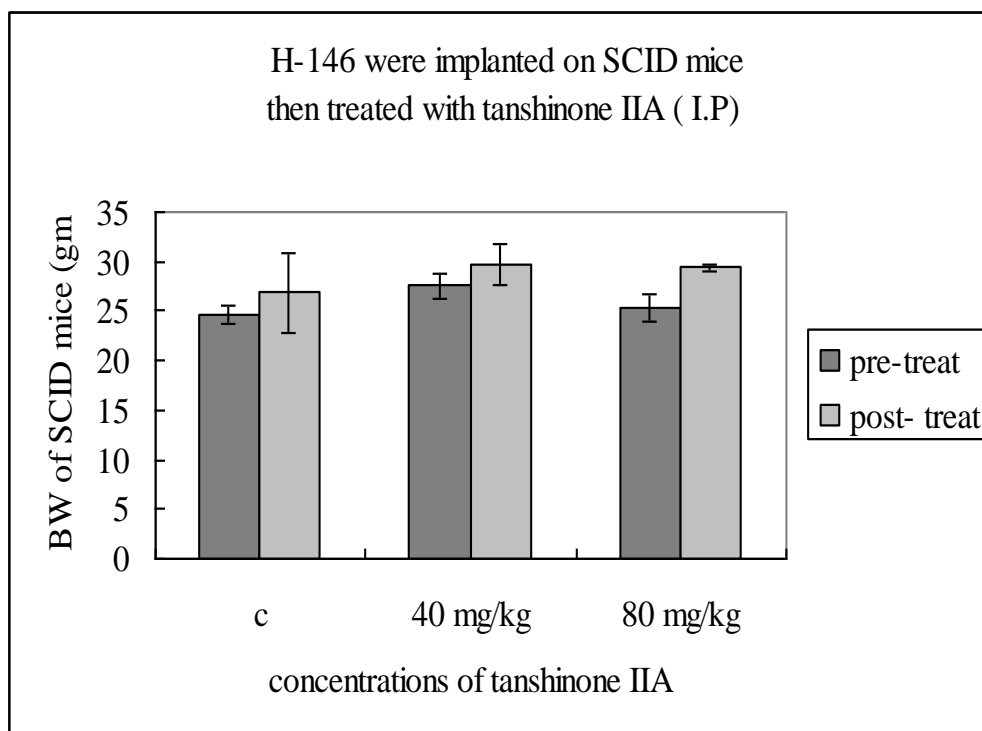


圖 3.48 肺癌細胞株 H146 轉殖在裸鼠皮下，經一個月後腫瘤長到約 1 公分大小，然後開始給丹參酮 II A(溶在玉米油)，劑量分別為

40 gm/kg 和 80 mg/kg，對照組注射玉米油，腹腔注射，隔日一次，連續 15 次，然後將裸鼠犧牲(CO₂)，犧牲後再取瘤體秤重。

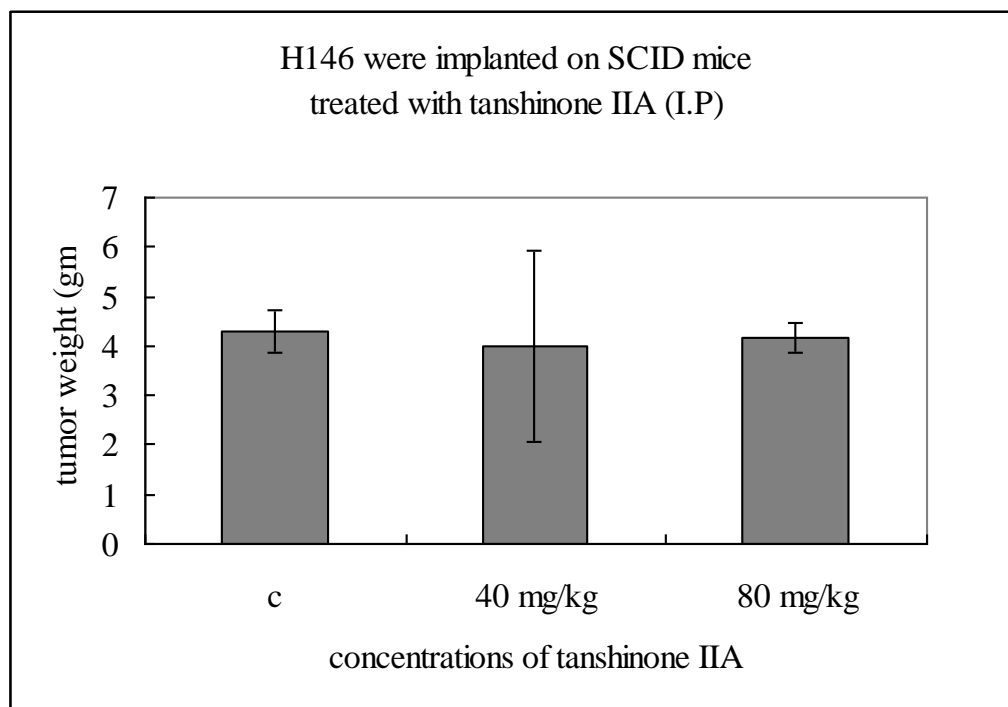


圖 3.49 利用 FACS 分析 A549 細胞經不同濃度丹參酮 II A 作用 48 小時之後，細胞週期的細胞比例變化

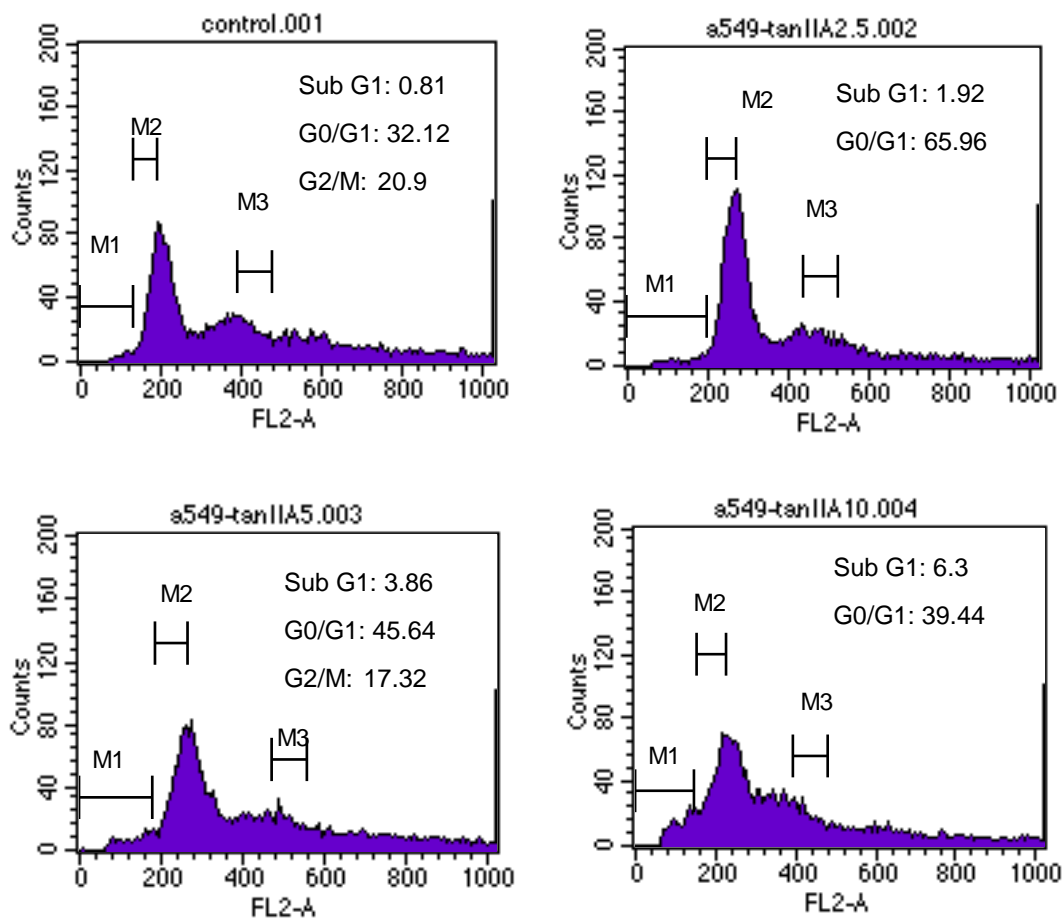


圖 3.50 利用 FACS 分析 H292 細胞經不同濃度丹參酮 II A 作用 48 小時之後，細胞週期的細胞比例變化

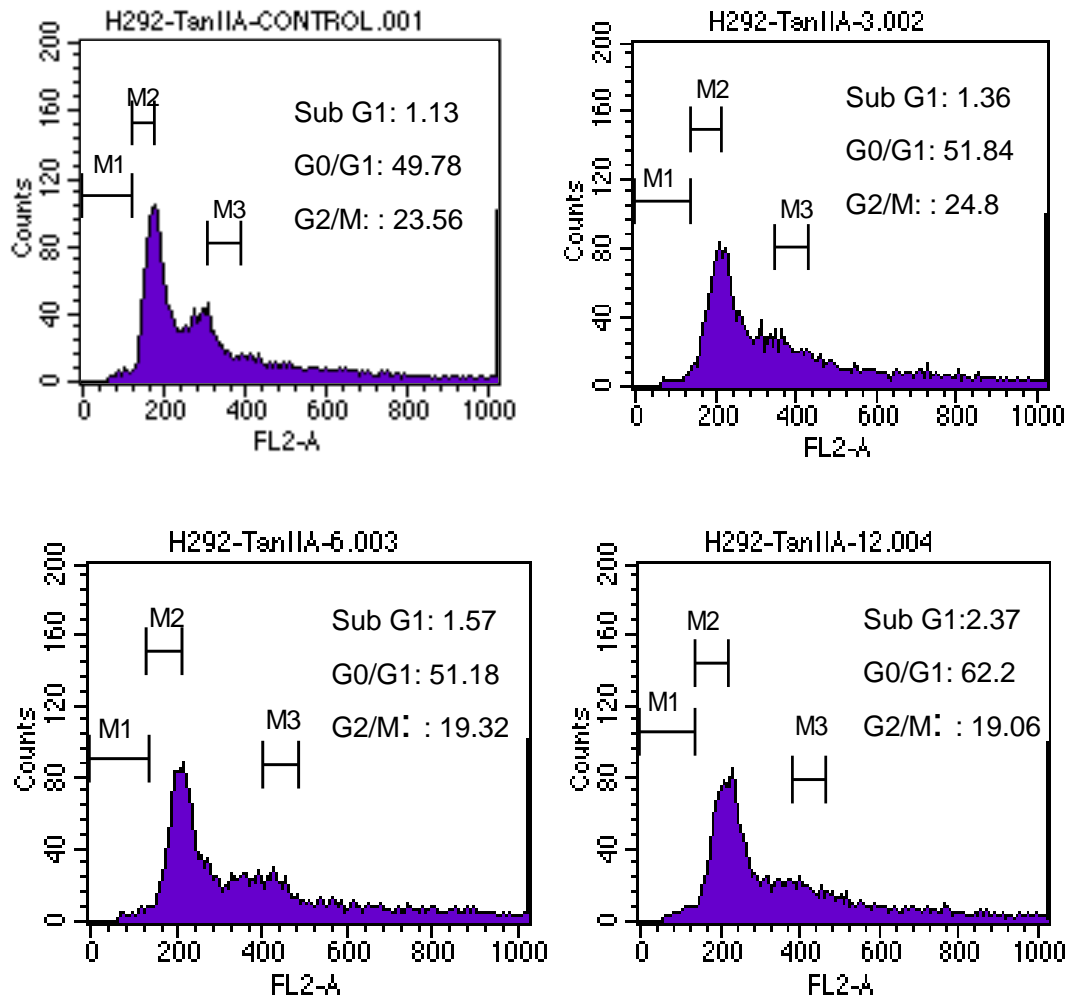


圖 3.51 利用 FACS 分析 H661 細胞經不同濃度丹參酮 II A 作用 48 小時之後，細胞週期的細胞比例變化

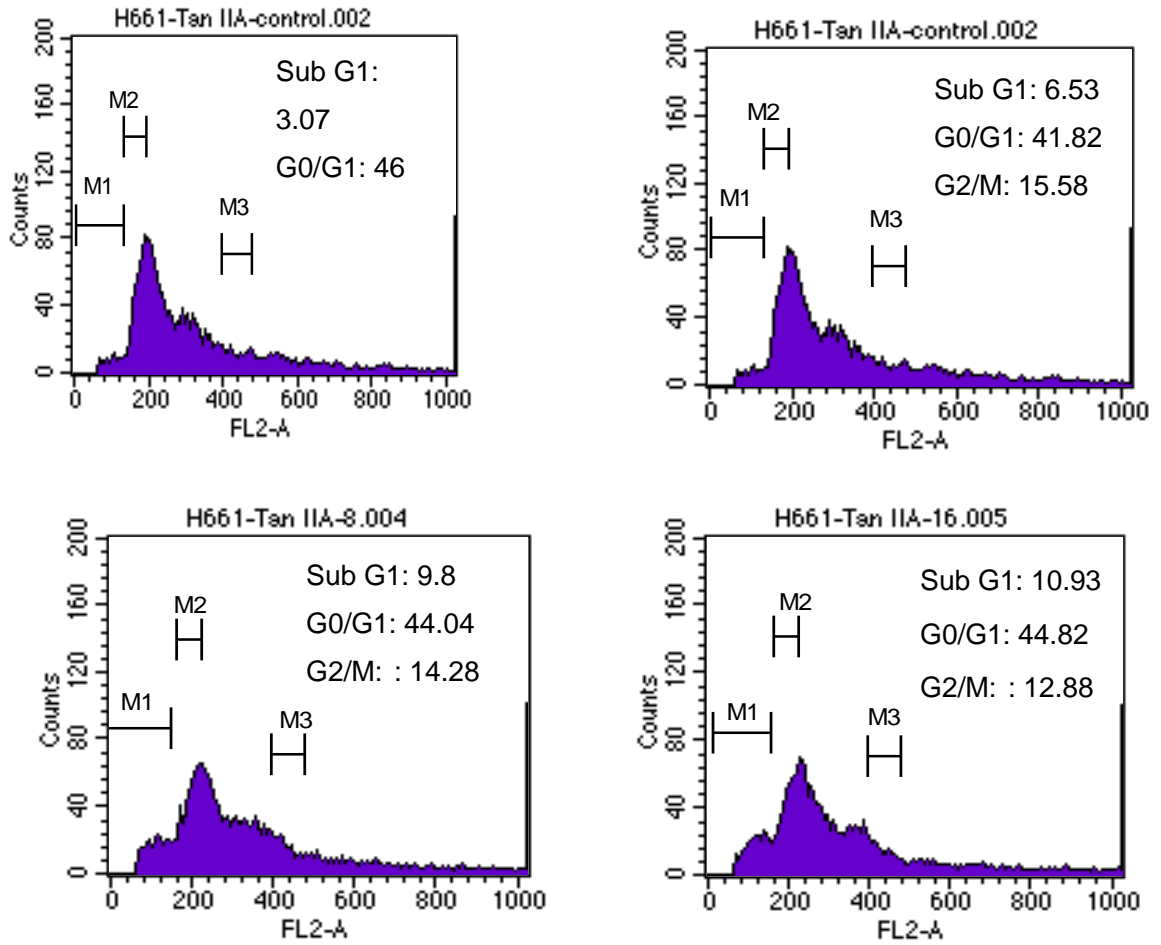


圖 3.52 利用 FACS 分析 A549 細胞經不同濃度黃耆皂苷IV作用 48 小時之後，細胞週期的細胞比例變化

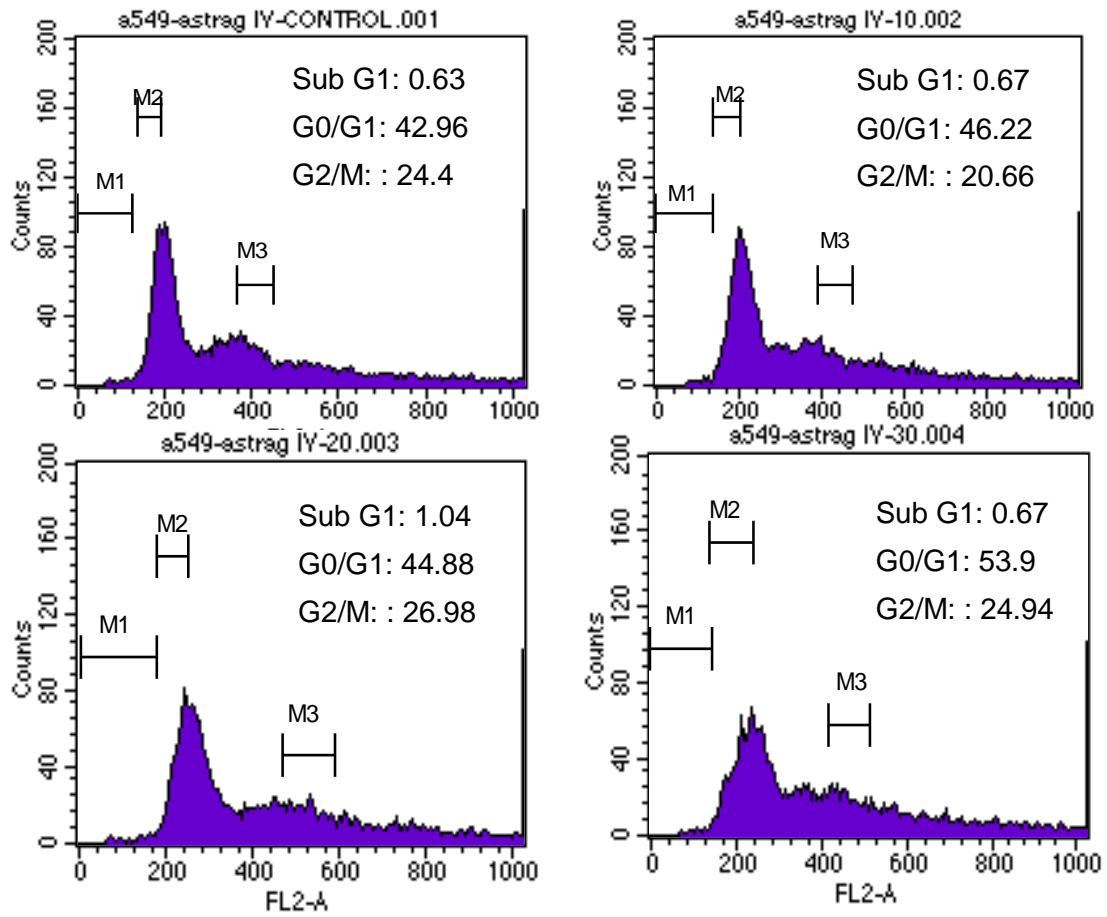


圖 3.53 利用 FACS 分析 H661 細胞經不同濃度黃耆皂苷IV作用 48 小時之後，細胞週期的細胞比例變化

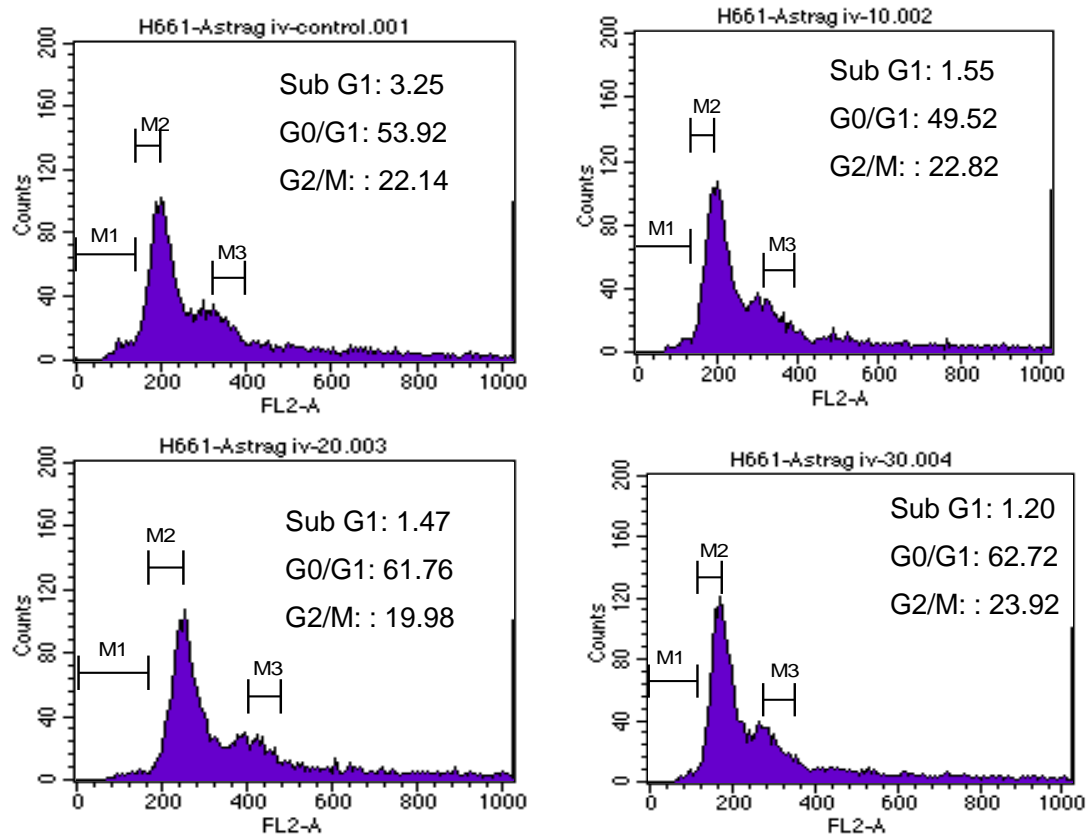


圖 3.54 肺癌細胞 A549 用 DMSO 0.2% 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析，作為對照組。RNA Quality test (A549 & DMSO)

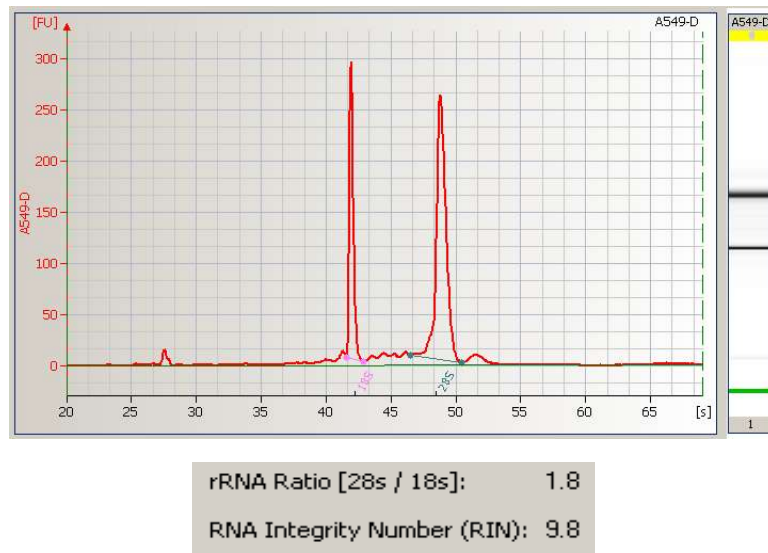


圖 3.55 肺癌細胞 A549 經丹參酮 II A ($5 \mu\text{g/ml}$)處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。RNA Quality test (A549&Tan IIA)

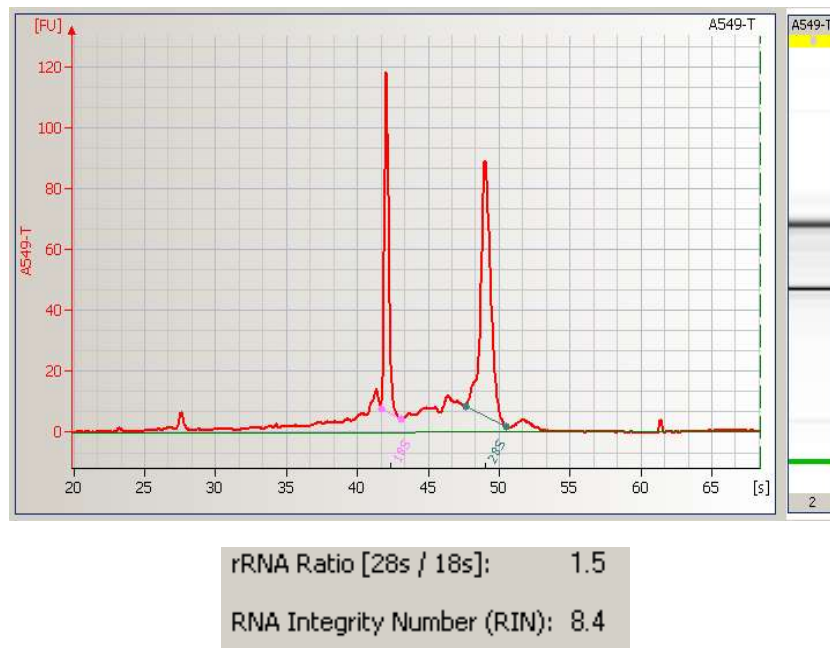


圖 3.56 肺癌細胞 A549 經黃耆皂苷 IV ($30 \mu\text{g/ml}$)處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。RNA Quality test(A549&Astrag)

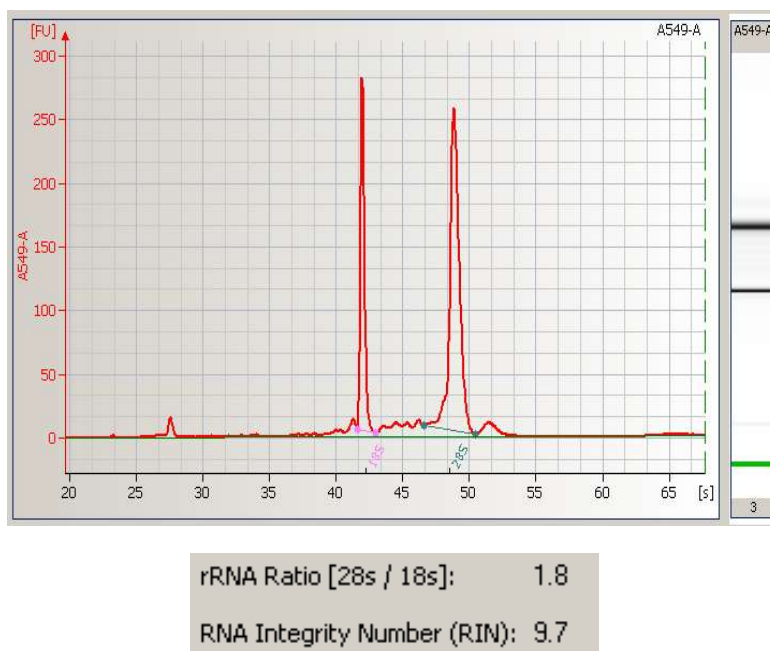


圖 3.57 肺癌細胞 H292 用 DMSO 0.24% 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析 RNA Quality test (H292 & DMSO)

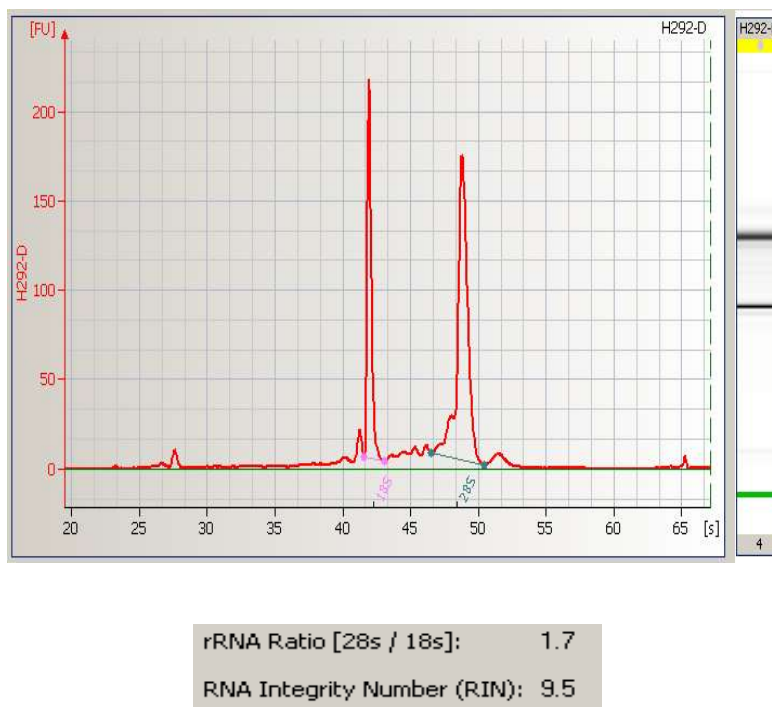
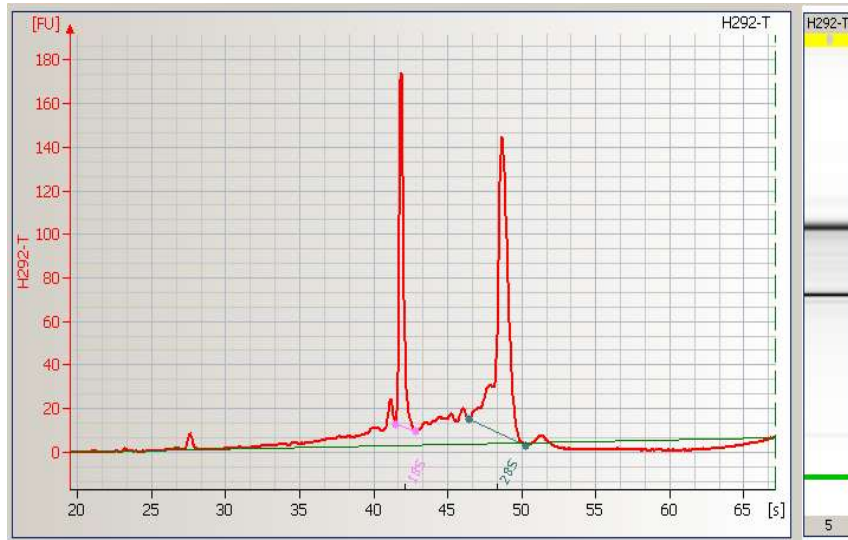


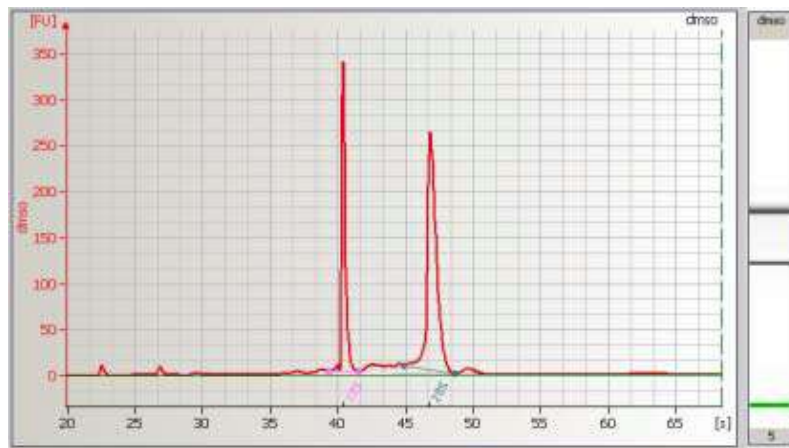
圖 3.58 肺癌細胞 H292 經丹參酮 II A (6 μ g/ml) 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。RNA Quality test(H292&Tan IIA)



rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8

RNA Integrity Number (RIN): 8.3

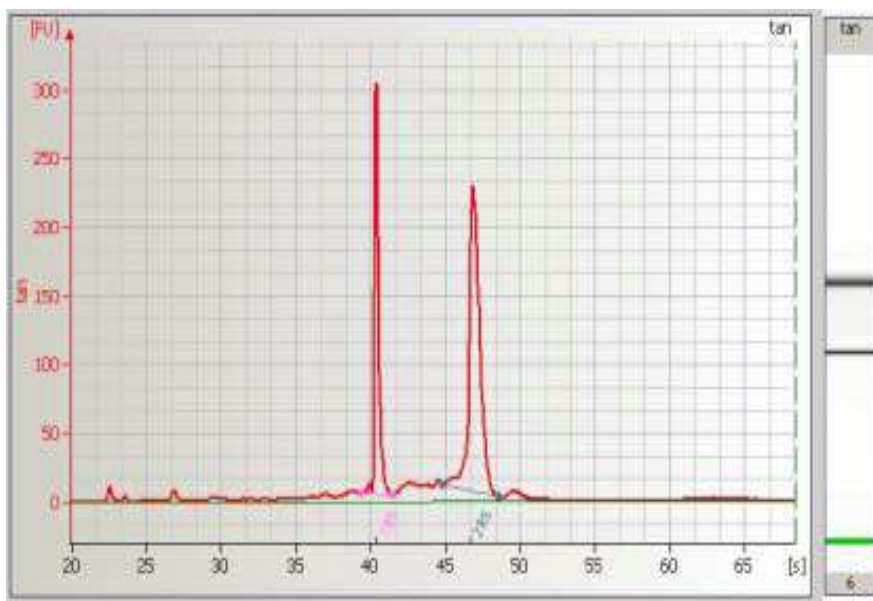
圖 3.59 肺小細胞肺癌 H146 用 DMSO 0.1% 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析，作為對照組。RNA Quality test (H146 & DMSO)



rRNA Ratio [28S/18S]: 1.6

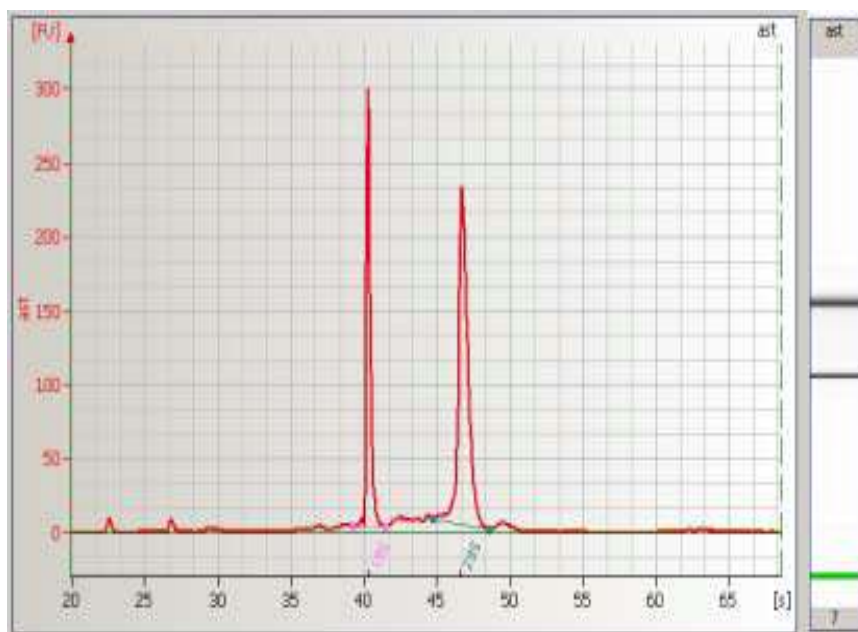
RNA Integrity Number(RIN):9.8

圖 3.60 肺小細胞肺癌 H146 經丹參酮 II A ($2 \mu\text{g/ml}$) 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。RNA Quality test(H146&Tan IIA)



rRNA Ratio [28S/18S]: 1.6
RNA Integrity Number(RIN):9.7

圖 3.61 肺小細胞肺癌 H146 經黃耆皂苷IV (30 μ g/ml)處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。RNA Quality test (146&Astrag)



rRNA Ratio [28S/18S]: 1.5
RNA Integrity Number(RIN):9.8

圖 3.62 肺癌細胞 A549 、H292 經 DMSO 、丹參酮 II A 、黃耆皂苷 IV 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。用電泳膠來

做 RNA 品質檢測。RNA Quality test



圖 3.63 肺小細胞肺癌 H146 經 DMSO 0.1%、丹參酮 II A (2 μ g/ml)、黃耆皂苷 IV (30 μ g/ml)處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。

用電泳膠來做 RNA 品質檢測。RNA Quality test

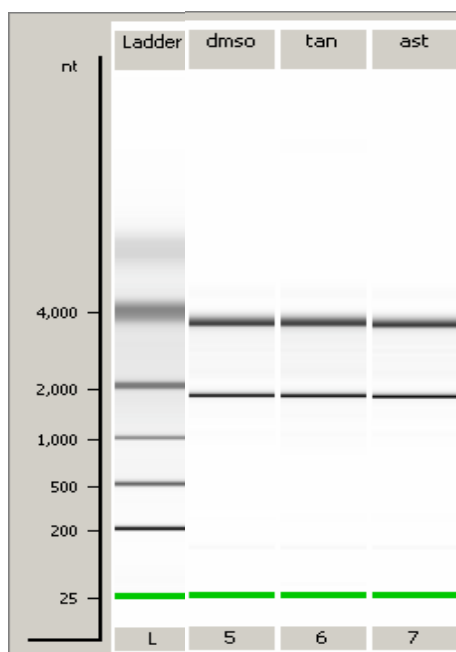


表 3.3 生物晶片初步結果發現

- 黃芪皂苷 IV 對肺癌細胞 A549 作用 24 小時，能夠

下調 157 種；明顯下調 119 種基因表現，
上調 107 種；明顯上調 2 種基因表現。

- 黃芪皂苷 IV 對肺癌細胞 H146 作用 24 小時，能夠下調 237 種；明顯下調 6 種基因表現，上調 142 種；明顯上調 100 種基因表現。

表 3.4 生物晶片初步結果發現

- 丹參酮 II A 對肺癌細胞 A549 作用 24 小時，能夠下調 1720 種；明顯下調 820 種基因表現，上調 2828 種；明顯上調 663 種基因表現。
- 丹參酮 II A 對肺癌細胞 H292 作用 24 小時，能夠下調 1666 種；明顯下調 196 種基因表現，上調 1969 種；明顯上調 223 種基因表現。
- 丹參酮 II A 對肺癌細胞 H146 作用 24 小時，能夠下調 1480 種；明顯下調 42 種基因表現，上調 673 種；明顯上調 262 種基因表現。

表 3.5 分析的資料來源

Data Sources of Analysis

Customer Sample Names	Chip ID
A549-DMSO 2 ul/ml	6S133P024 (P024)
A549-TanIIA 5 μ g/ml	6S133P025 (P025)
A549-Astragloside IV 30 μ g/ml	6S133P026 (P026)
H292-DMSO 2.4 ul/ml	6S133P027 (P027)
H292-TanIIA 6 μ g/ml	6S133P028 (P028)
H146-DMSO 0.1% (24hrs)	6S133P046 (P046)
H146-TanIIA 2 μ g/ml (24hrs)	6S133P047 (P047)
H146-Astrag IV 30 μ g/ml (24hrs)	6S133P048 (P048)

表 3.6 生物晶片分析結果再經過標準化步驟

Data Normalization

The eight chips, P024-P028 and P046-P048, were normalized with the

RMA algorithm using the R statistical package. Figure 1(a) showed the original log₂ intensity distribution of the chips. Figure 1(b) showed the normalized intensity distribution.

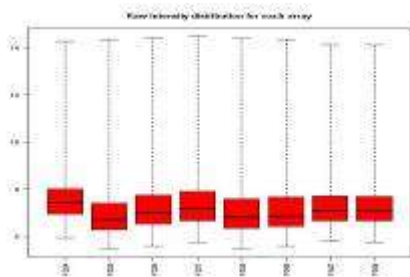


Figure 1(a)

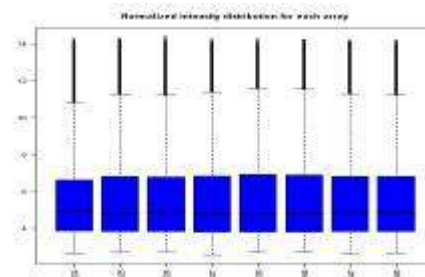


Figure 1(b)

表 3.7 肺癌細胞 A549、H292、H146 分別經不同濃度(5, 6.和 2 μ g/ml)的丹參酮 II A 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。對照組為分別用不同濃度 DMSO (0.2, 0.24 和 0.1%) 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。結果用 LIMMA package of R 來計算兩組間的差異，P 值小於 0.01 視為有顯著差異。共有 73 個基因有顯著差異。(1)

ID	t	P.Value
200779_at	6.7561	0.0004
231202_at	5.8576	0.0009
203249_at	5.6567	0.0011
213836_s_at	5.6311	0.0011
212028_at	-5.5419	0.0012
213671_s_at	5.4343	0.0013
207165_at	-5.3833	0.0014
225687_at	-5.2627	0.0016
223196_s_at	5.261	0.0016
209709_s_at	-5.2358	0.0016
212168_at	-5.1506	0.0018
209383_at	5.0295	0.002
208693_s_at	4.7565	0.0027
202402_s_at	4.7319	0.0028
212160_at	4.7289	0.0028
214804_at	-4.6678	0.003
204092_s_at	-4.6214	0.0031

223773_s_at	4.5768	0.0033
201291_s_at	-4.5448	0.0034
208079_s_at	-4.5045	0.0036
202705_at	-4.4275	0.0039
201475_x_at	4.3823	0.0041
208814_at	-4.344	0.0043
224763_at	4.3328	0.0043
233410_at	-4.3307	0.0043
220835_s_at	-4.2614	0.0047
223195_s_at	4.2611	0.0047
218755_at	-4.2046	0.005
231412_at	4.1372	0.0054
230748_at	4.1347	0.0054
212107_s_at	-4.13	0.0055
236641_at	-4.1149	0.0056
230165_at	-4.1132	0.0056
202847_at	4.0628	0.0059
202807_s_at	4.0599	0.0059
235588_at	-4.0359	0.0061
225278_at	4.0302	0.0061
218542_at	-4.0257	0.0062
1555627_s_at	-4.0192	0.0062

表 3.8 肺癌細胞 A549、H292、H146 分別經不同濃度(5, 6.和 2 μ g/ml) 的丹參酮 II A 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。對照組為分別用不同濃度 DMSO (0.2,0.24 和 0.1%)處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。結果用 LIMMA package of R 來計算兩組間的差異，P 值小於 0.01 視為有顯著差異。共有 73 個基因有顯著差異。(2)

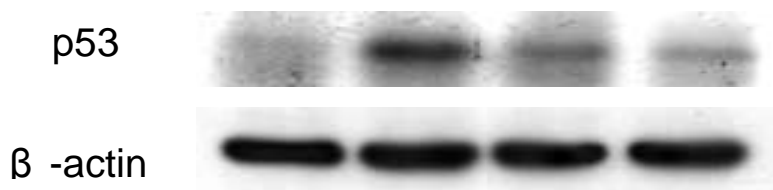
206364_at	-3.9794	0.0065
223229_at	-3.9638	0.0066
211789_s_at	3.9587	0.0067
209017_s_at	3.9562	0.0067
202533_s_at	-3.952	0.0067
222133_s_at	3.9499	0.0068
209714_s_at	-3.9432	0.0068
220755_s_at	3.9301	0.0069
219918_s_at	-3.9292	0.0069
240983_s_at	3.9113	0.0071
221323_at	3.9017	0.0072
218073_s_at	-3.8744	0.0074
221576_at	3.8599	0.0075
209629_s_at	-3.8542	0.0076
225113_at	-3.8465	0.0076
213364_s_at	3.8231	0.0079
229262_at	3.822	0.0079
202364_at	3.8022	0.0081
202870_s_at	-3.7887	0.0082
223785_at	-3.7777	0.0083
215509_s_at	-3.751	0.0086
212105_s_at	-3.7476	0.0086
209891_at	-3.7275	0.0088
205046_at	-3.7271	0.0088
235425_at	-3.7159	0.009
202424_at	3.6868	0.0093
202147_s_at	3.6819	0.0094
203764_at	-3.6718	0.0095
204382_at	3.6702	0.0095
210999_s_at	3.67	0.0095
200802_at	3.6666	0.0095
213599_at	-3.6515	0.0097
204970_s_at	3.6374	0.0099

表 3.9 肺癌細胞 A549、H292、H146 分別經不同濃度(5, 6和 2 μ g/ml) 的丹參酮IIA 處理 24 小時後，抽取 total RNA 送晶片分析。對照組為分別用不同濃度 DMSO (0.2, 0.24 和 0.1%)。結果用

LIMMA package of R 來計算兩組間的差異，P 值小於 0.01 視為有顯著差異。共有 73 個基因有顯著差異。再經由生物資訊搜尋及分析最後得到結果，共有 6 個基因有顯著差異。

Log >1：增加 2 倍；log <-1：減少 2 倍

Affy ID	Gene Symbol	Gene name	Gene Function	p-value	25vs24	28vs27	47vs46
↓ 204092_s_at	AURKA	aurora kinase a	CELL CYCLE, cellular localization	0.0031	-1.6133	-1.0178	-0.5890
↓ 208079_s_at	AURKA	aurora kinase a	CELL CYCLE, cellular localization	0.0036	-1.9161	-0.9911	-0.5964
↓ 202705_at	CCNB2	cyclin b2	CELL CYCLE	0.0039	-1.6408	-0.8423	-0.5118
↓ 218755_at	KIF20A	kinesin family member 20a	cellular localization	0.0050	-2.5645	-1.6126	-0.9054
↓ 236641_at	KIF14	kinesin family member 14	cellular localization	0.0056	-1.5280	-0.8870	-0.9487
↑ 209383_at	DDIT3	dna-damage-inducible transcript 3		0.0020	2.3592	1.6633	0.9791



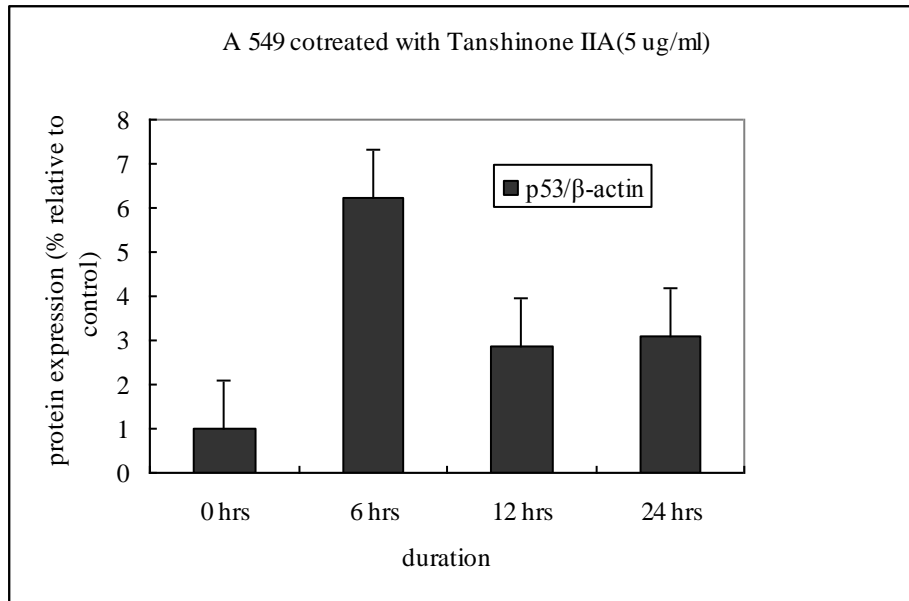


圖 3.64 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 p53 蛋白量的表現

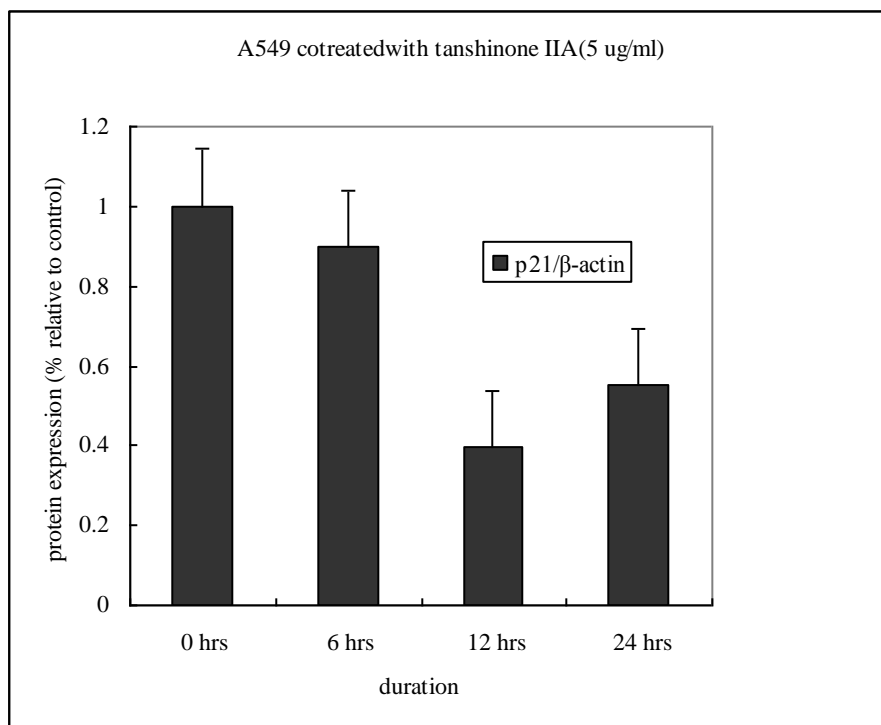


圖 3.65 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 II A (5 μ g/ml) 後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法 (Western blot) 檢測 p21 蛋白量的表現

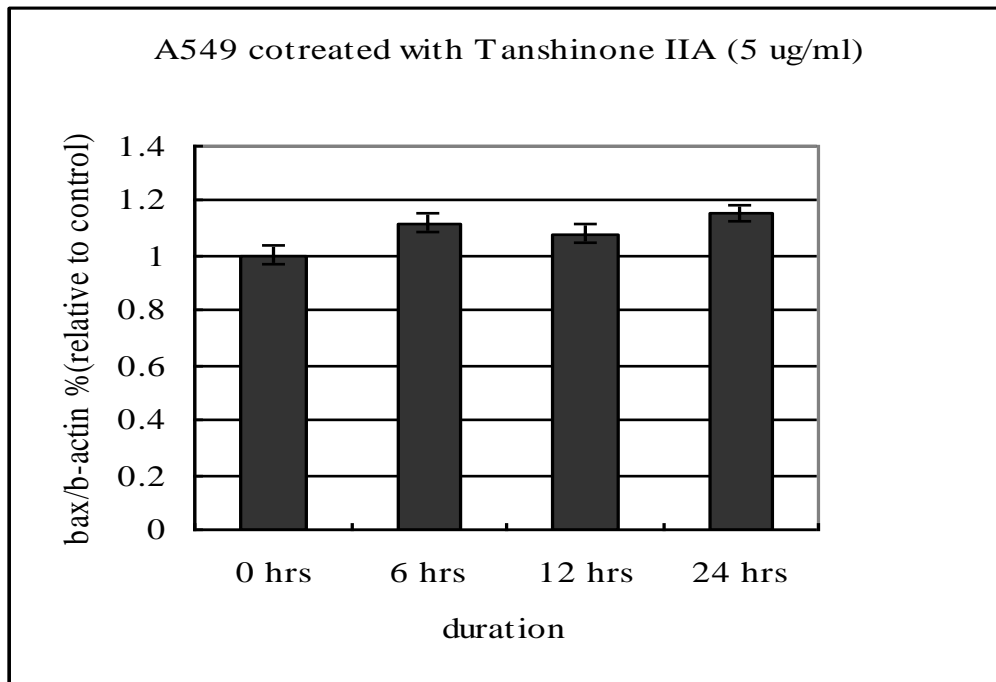
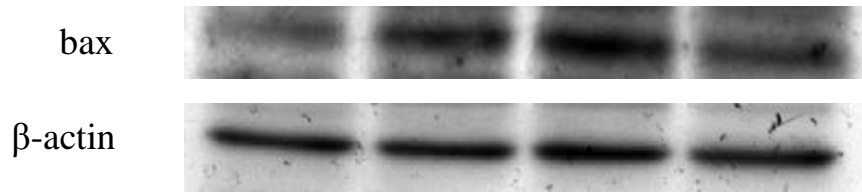


圖 3.66 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 bax 蛋白量的表現

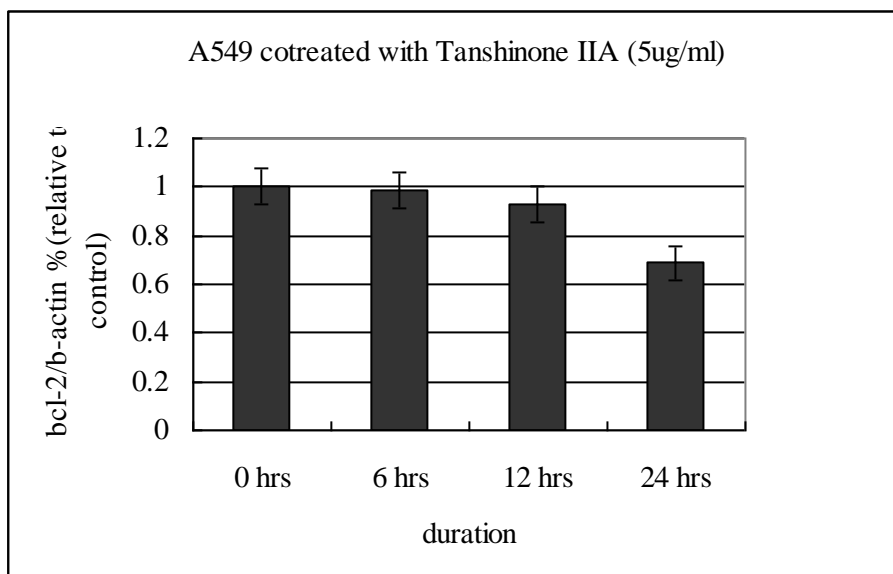
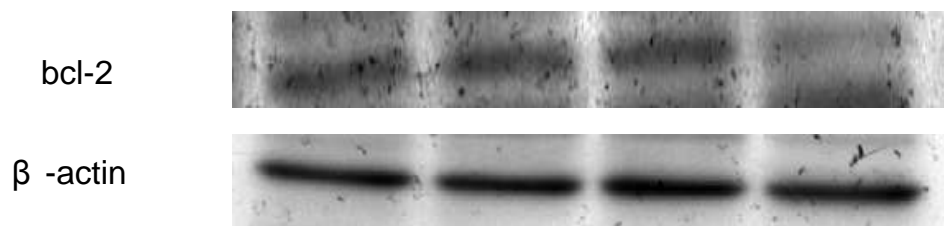


圖 3.67 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA($5 \mu\text{g/ml}$)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 bcl-2 蛋白量的表現

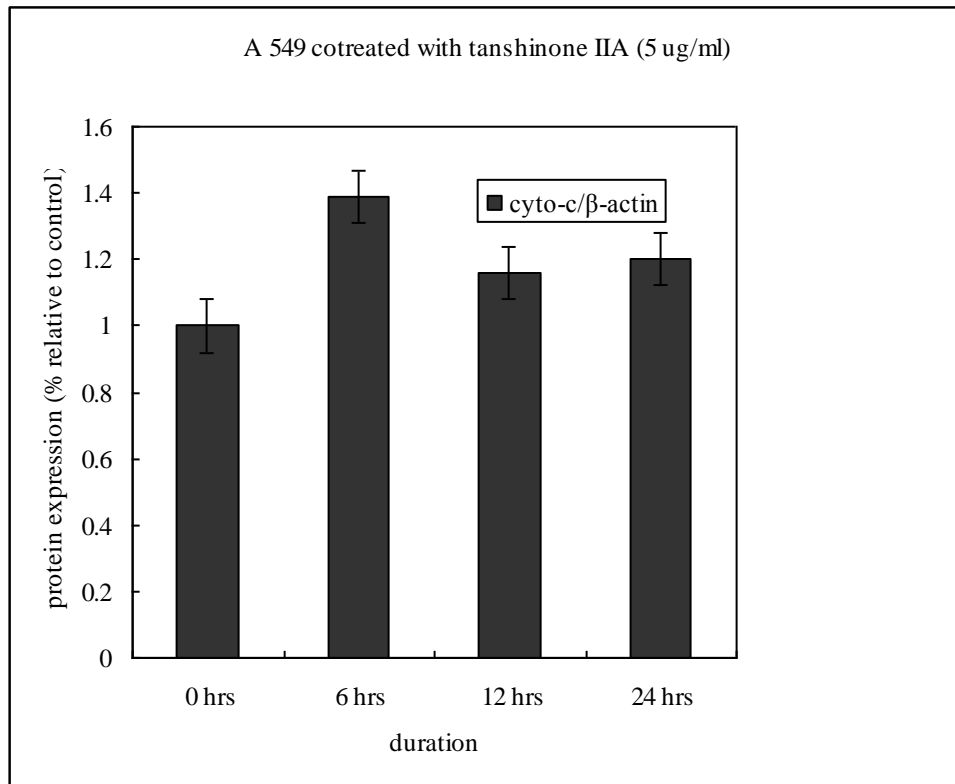
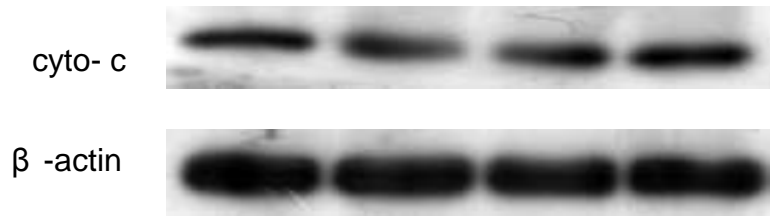


圖 3.68 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 cyto-c 蛋白量的表現

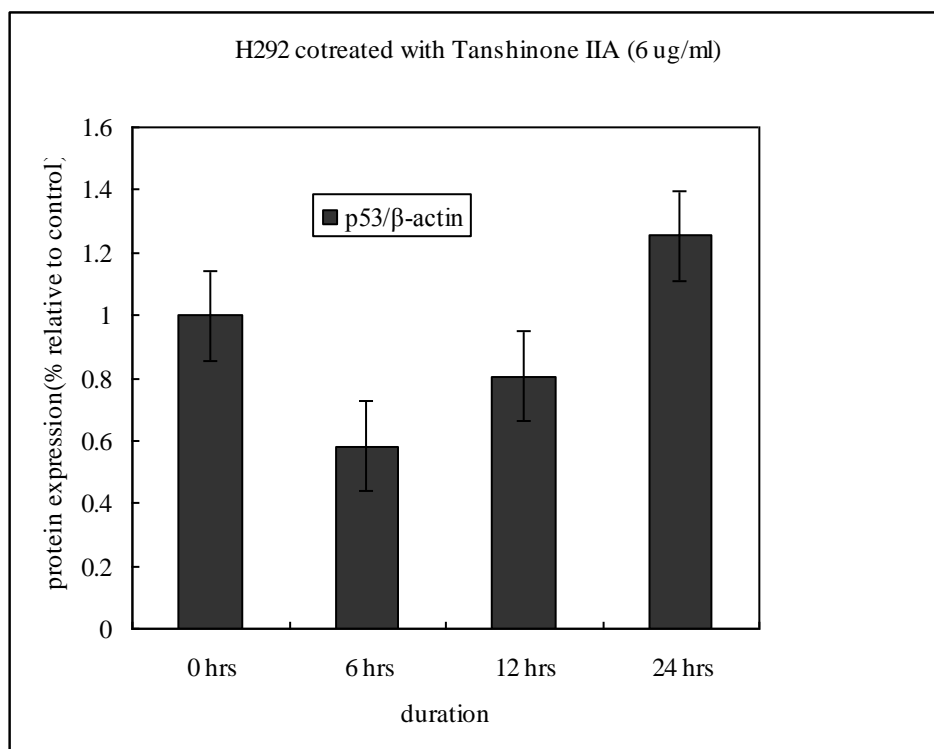


圖 3.69 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 p53 蛋白量的表現

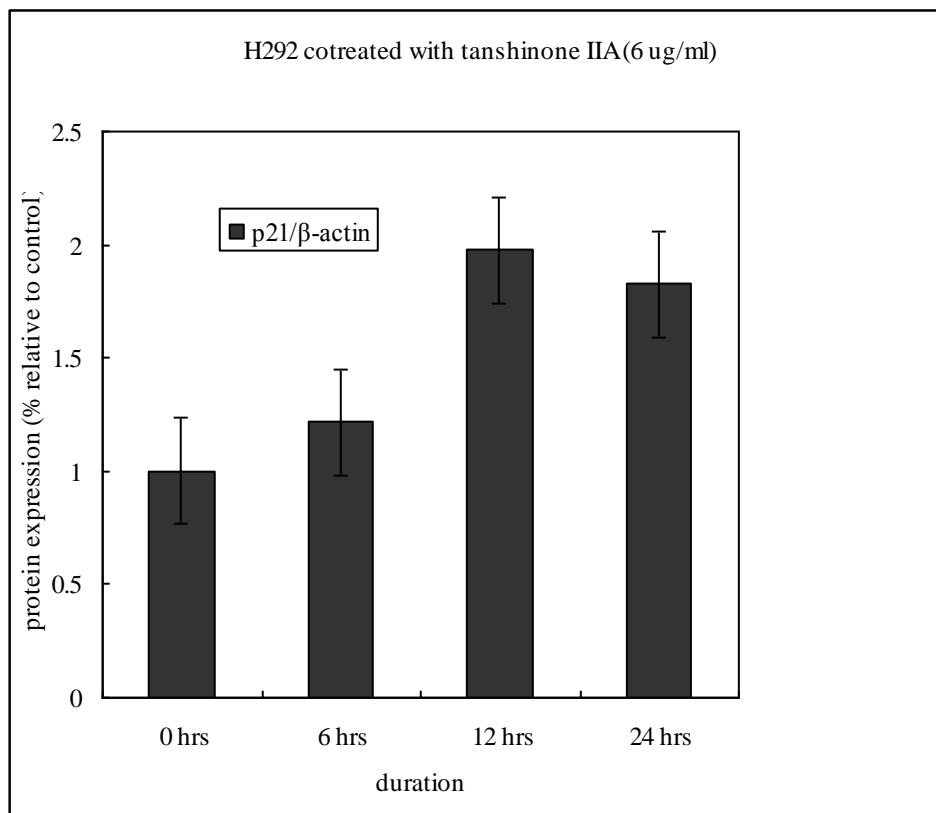
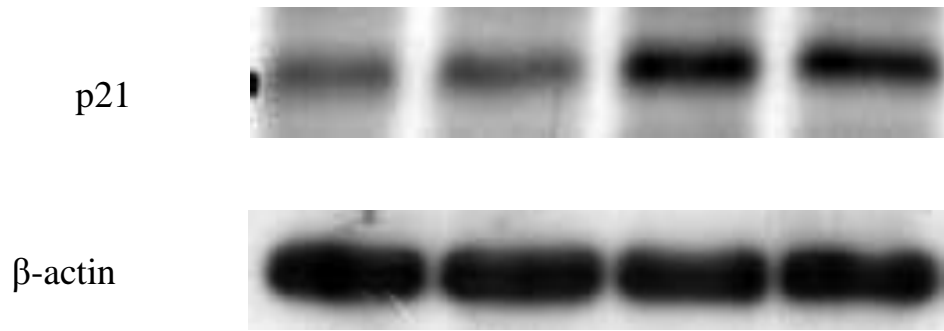


圖 3.70 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 p21 蛋白量的表現

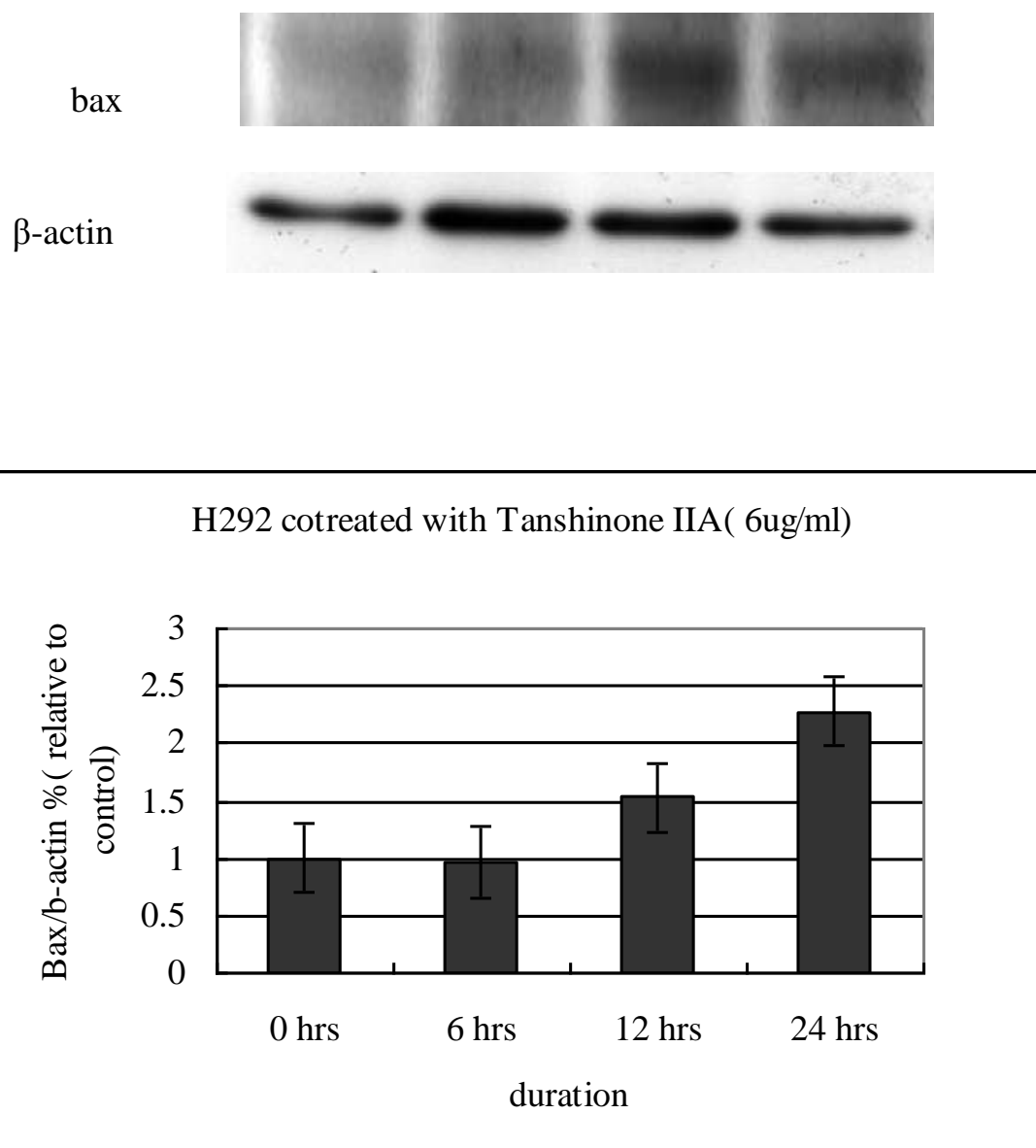


圖 3.71 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 bax 蛋白量的表現

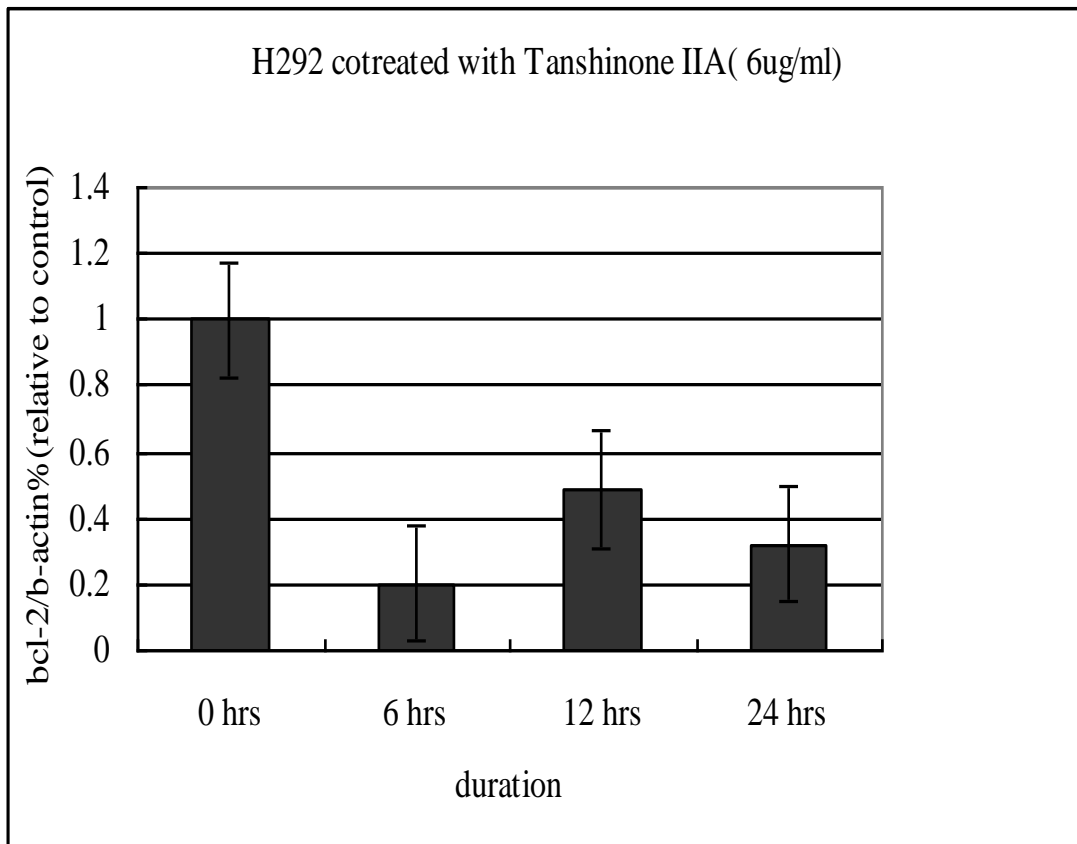
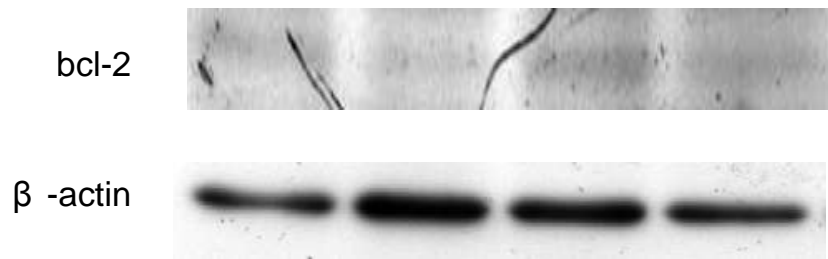


圖 3.72 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 bcl-2 蛋白量的表現

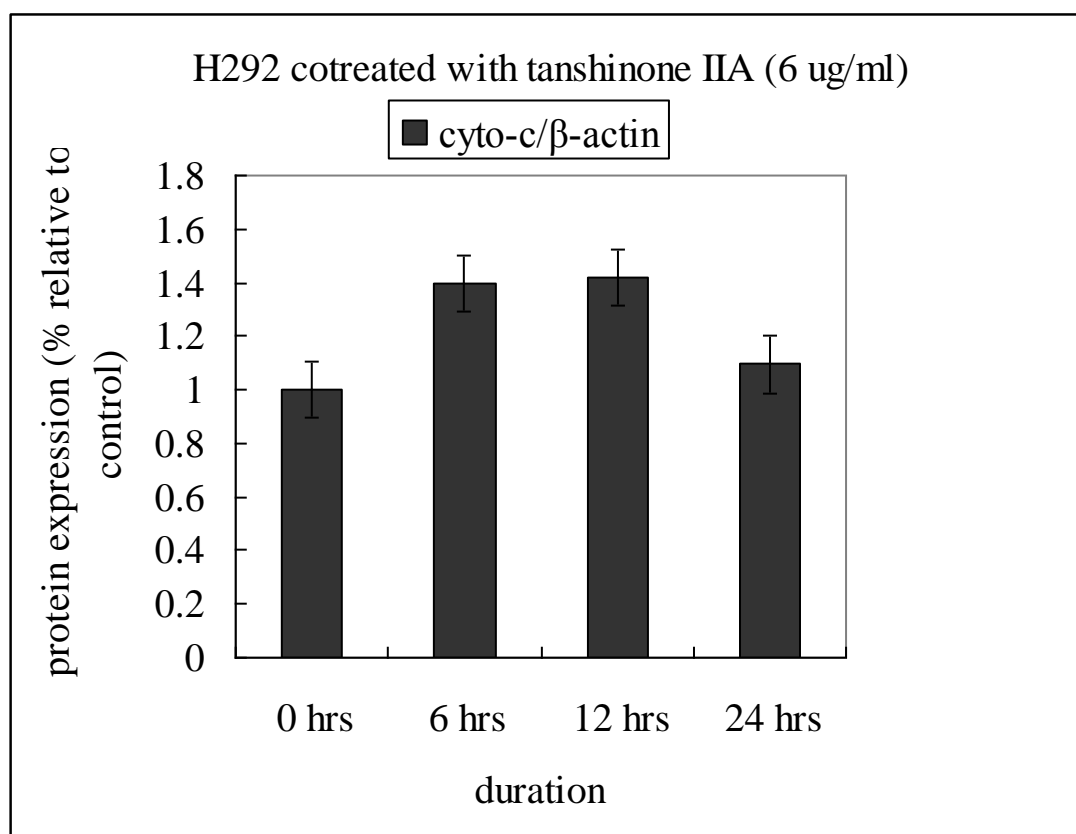
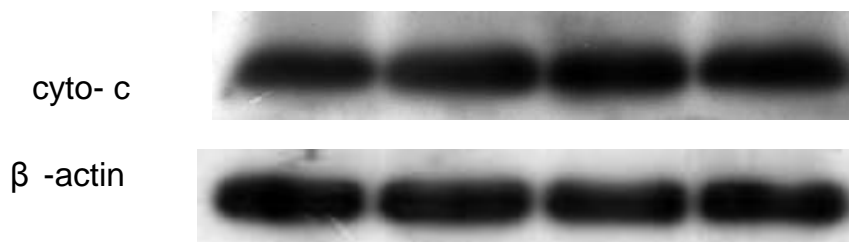


圖 3.73 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 cyto-c 蛋白量的表現

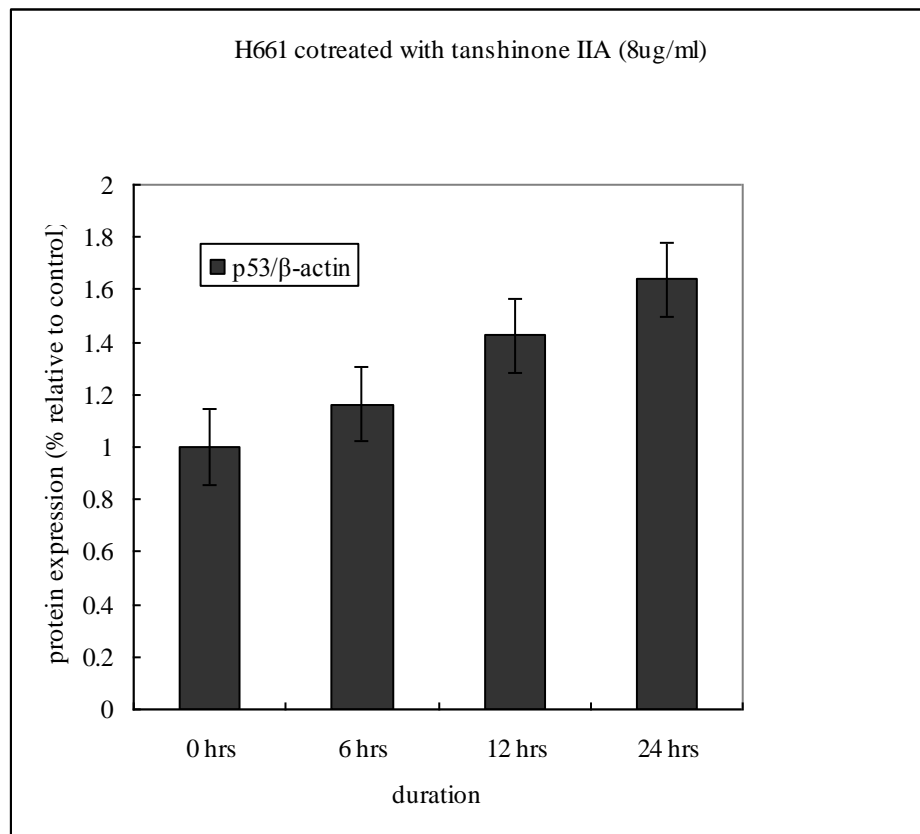


圖 3.74 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 p53 蛋白量的表現

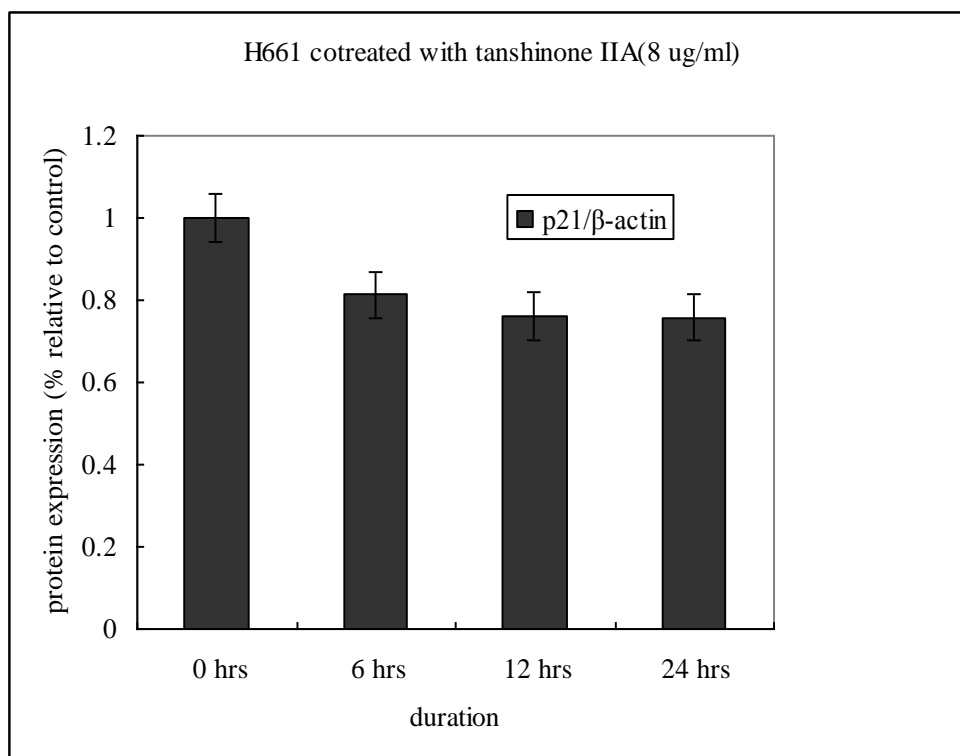
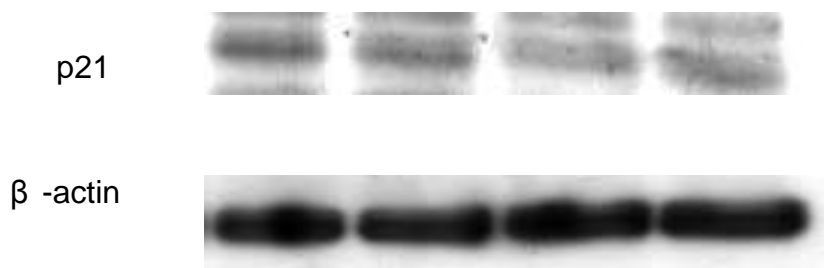


圖 3.75 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 p21 蛋白質量的表現

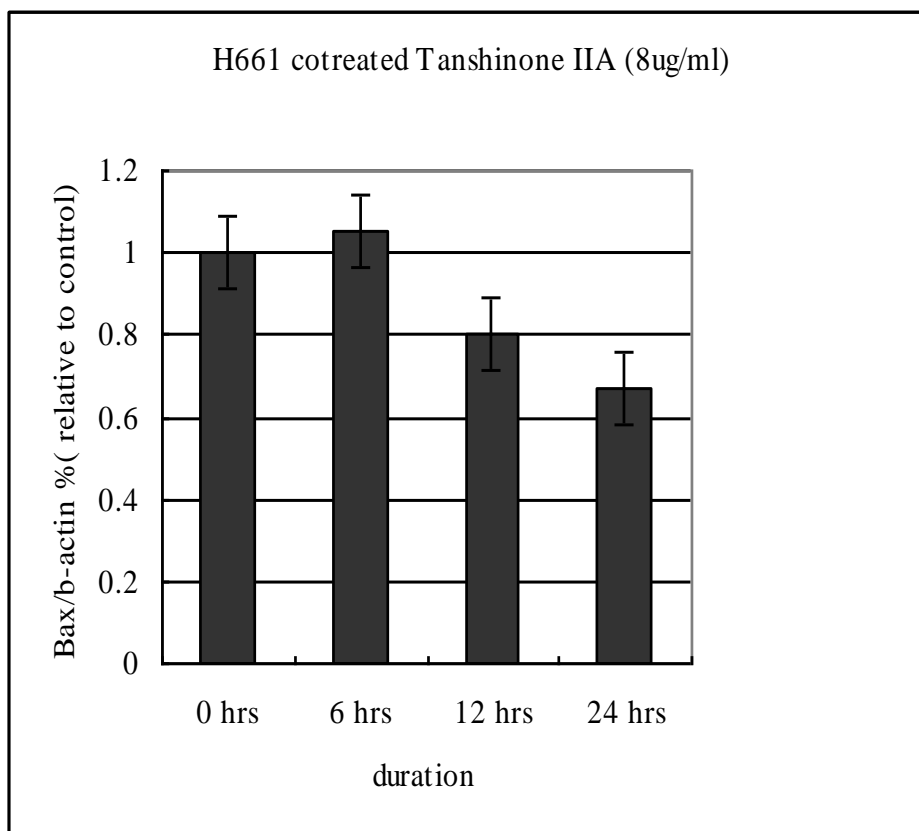
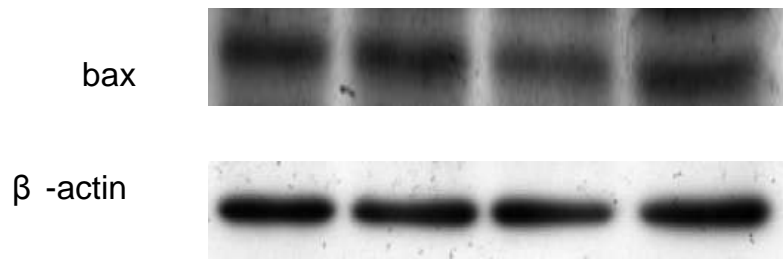


圖 3.76 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 bax 蛋白質量的表現

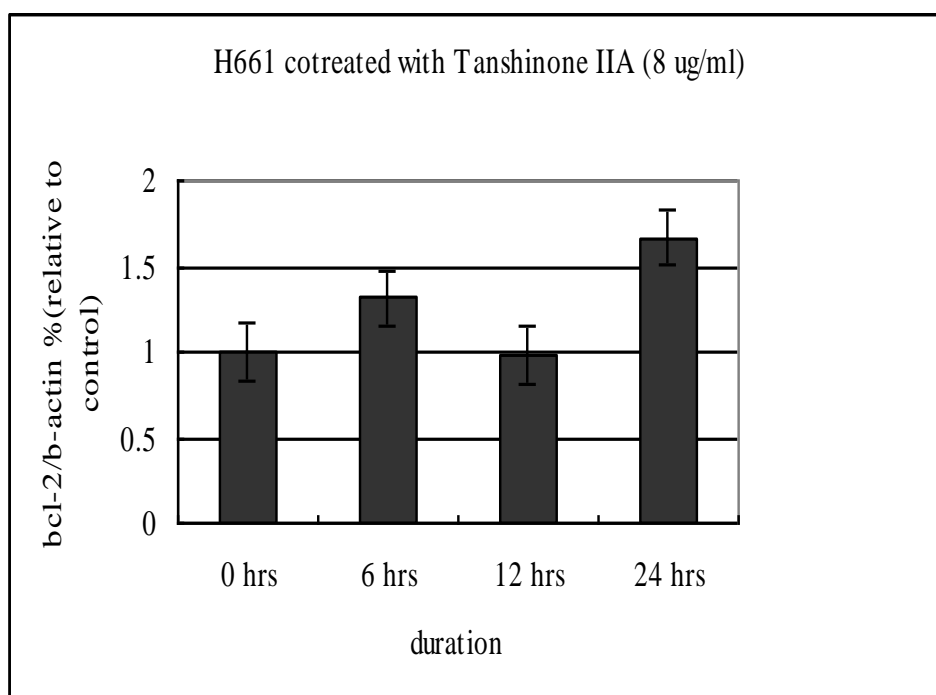
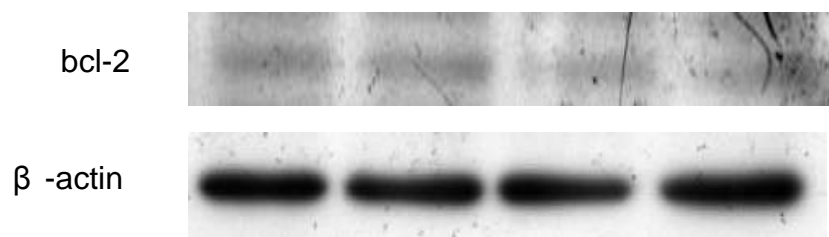


圖 3.77 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 bcl-2 蛋白量的表現

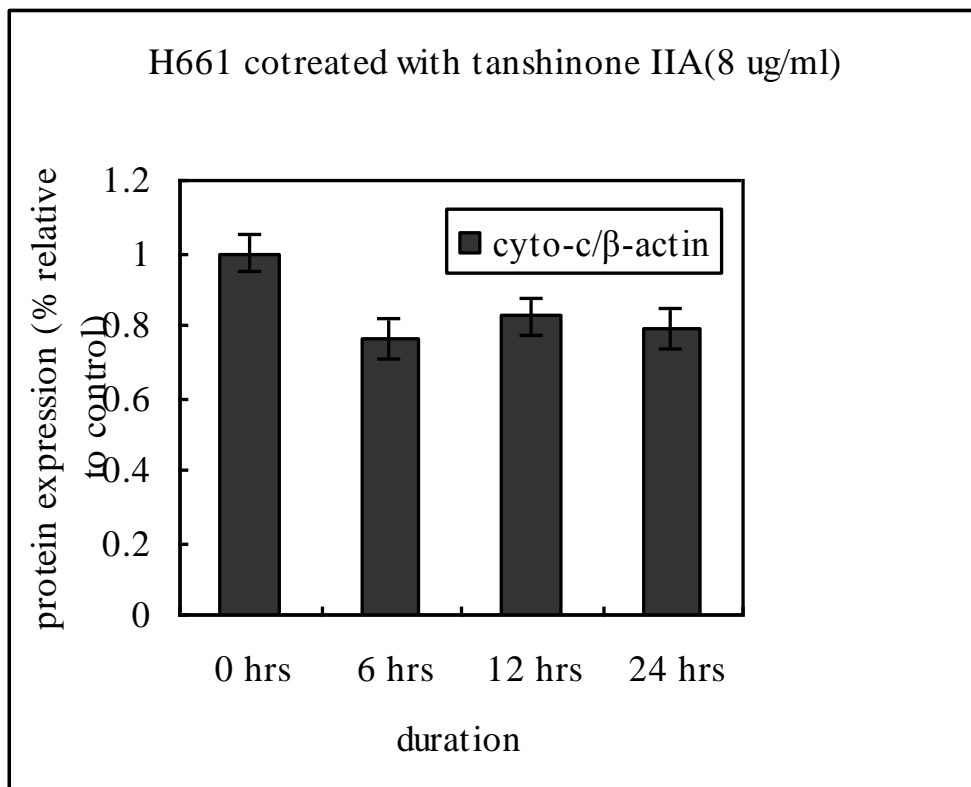
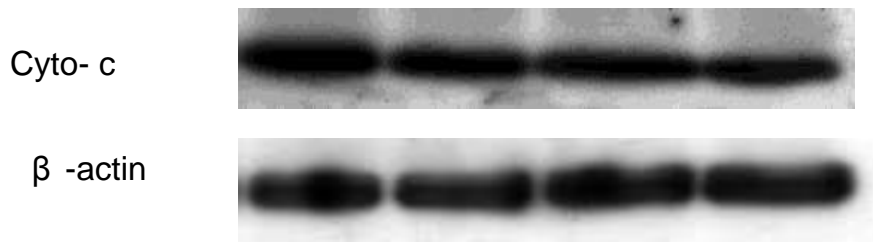


圖 3.78 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 Cyto-c 蛋白量的表現

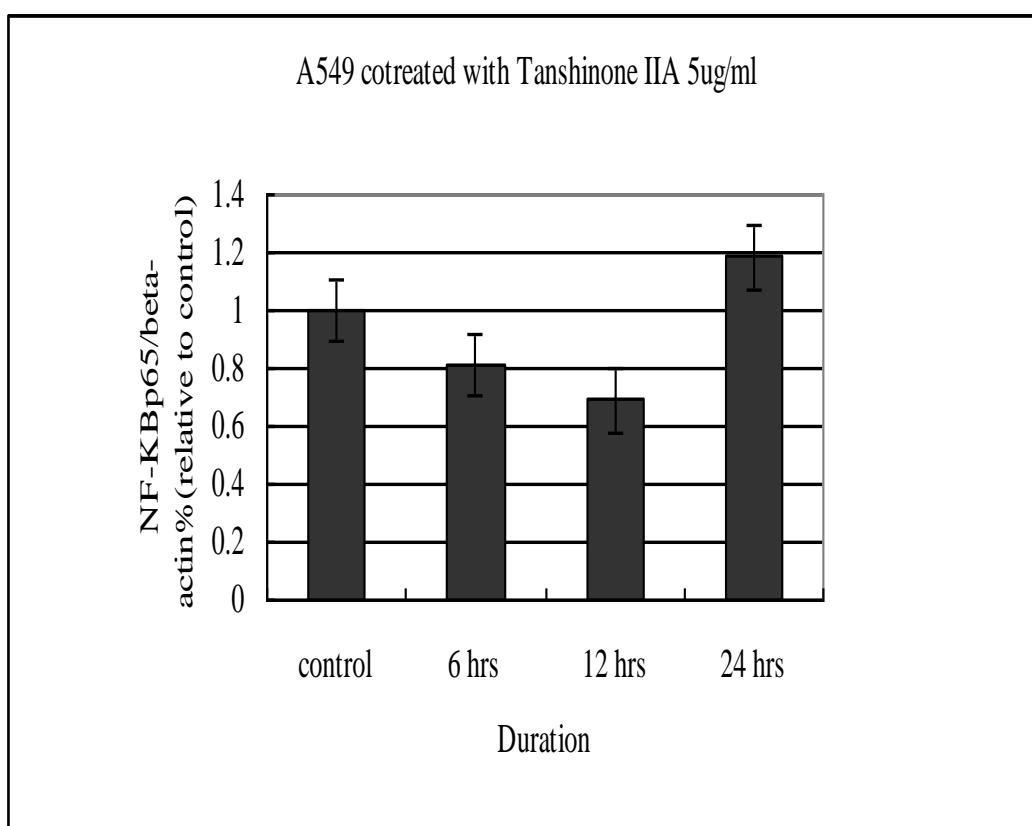
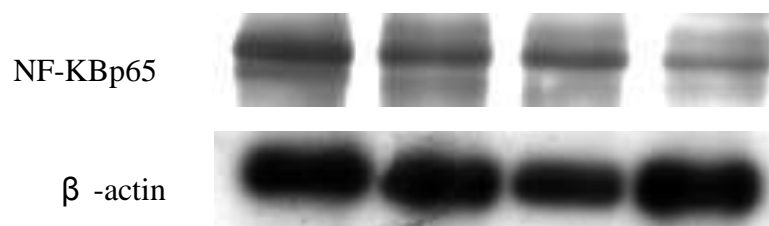


圖 3.79 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5μg/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 NF-κBp65 蛋白量的表現

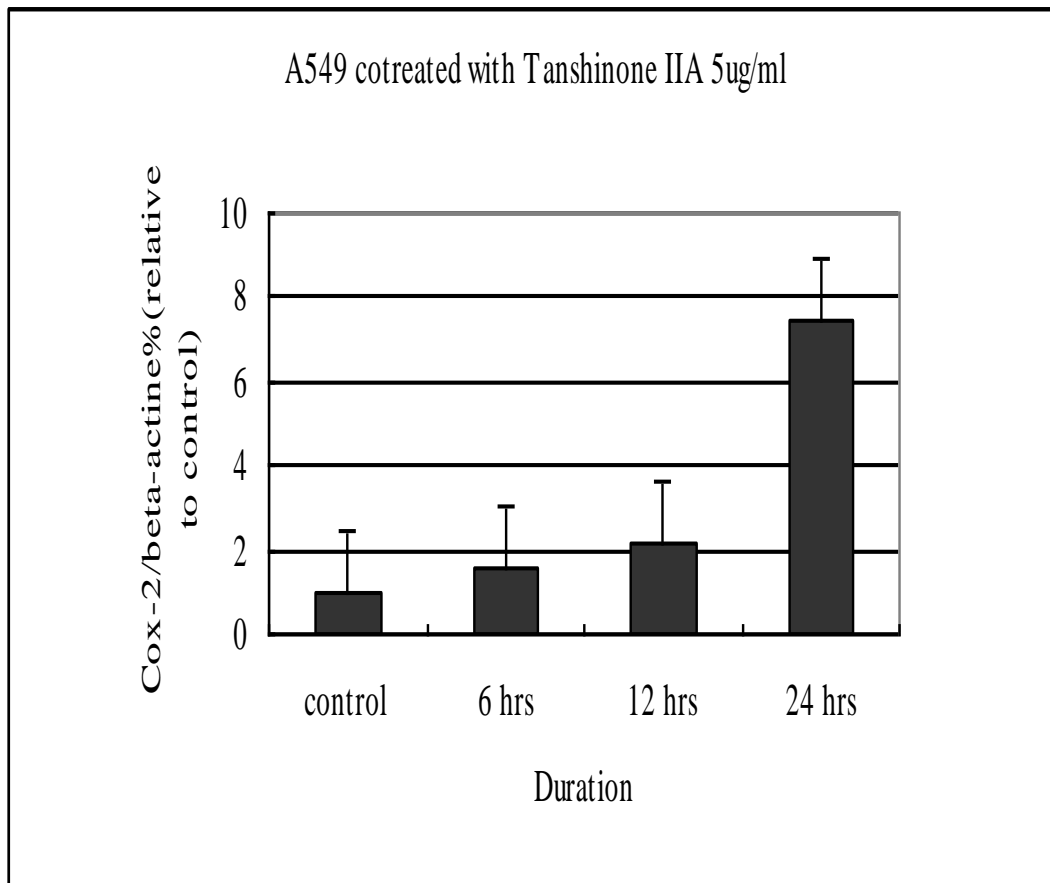
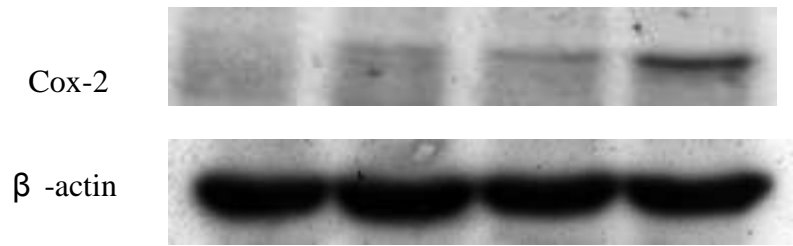


圖 3.80 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5µg/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 Cox-2 蛋白量的表現

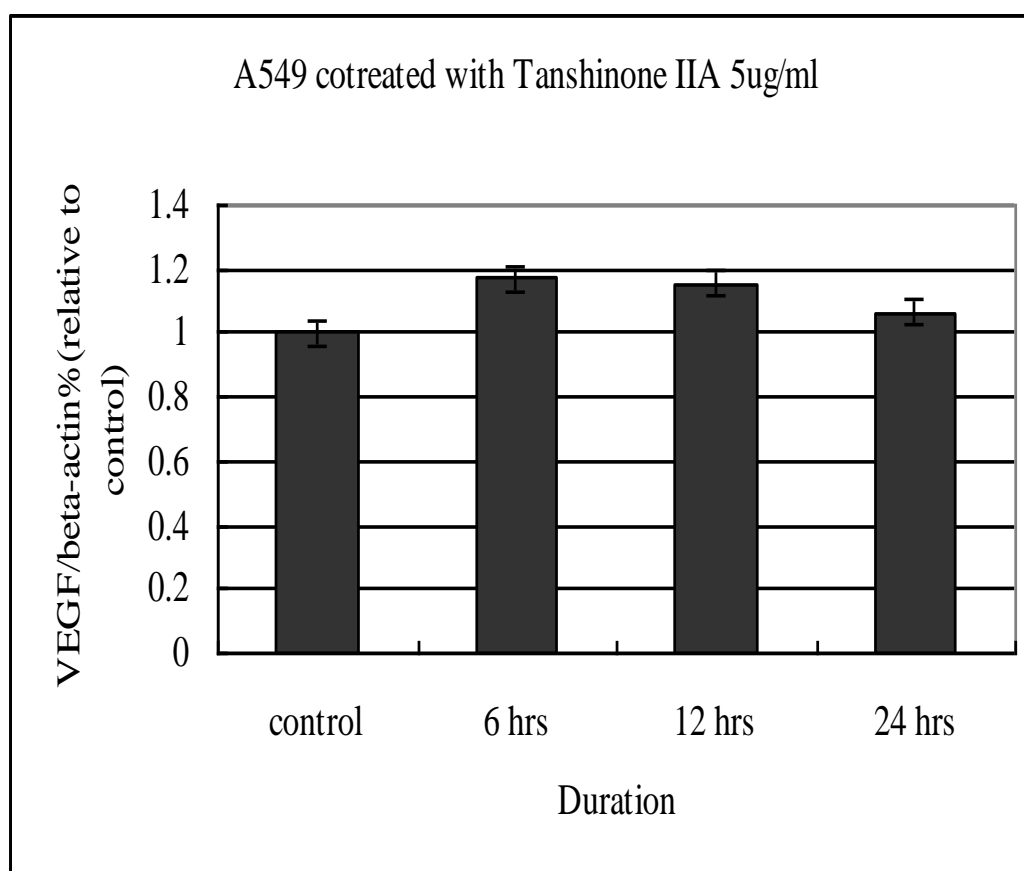
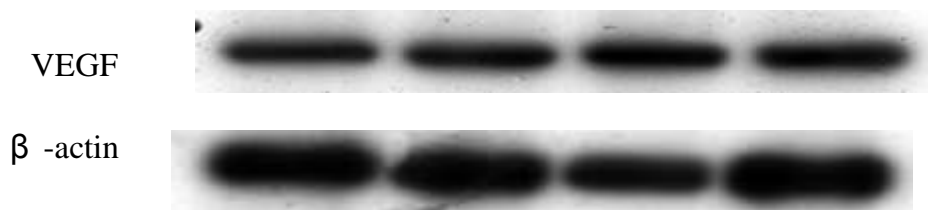


圖 3.81 肺癌細胞 A549 加入丹參酮 IIA(5 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 VEGF 蛋白量的表現

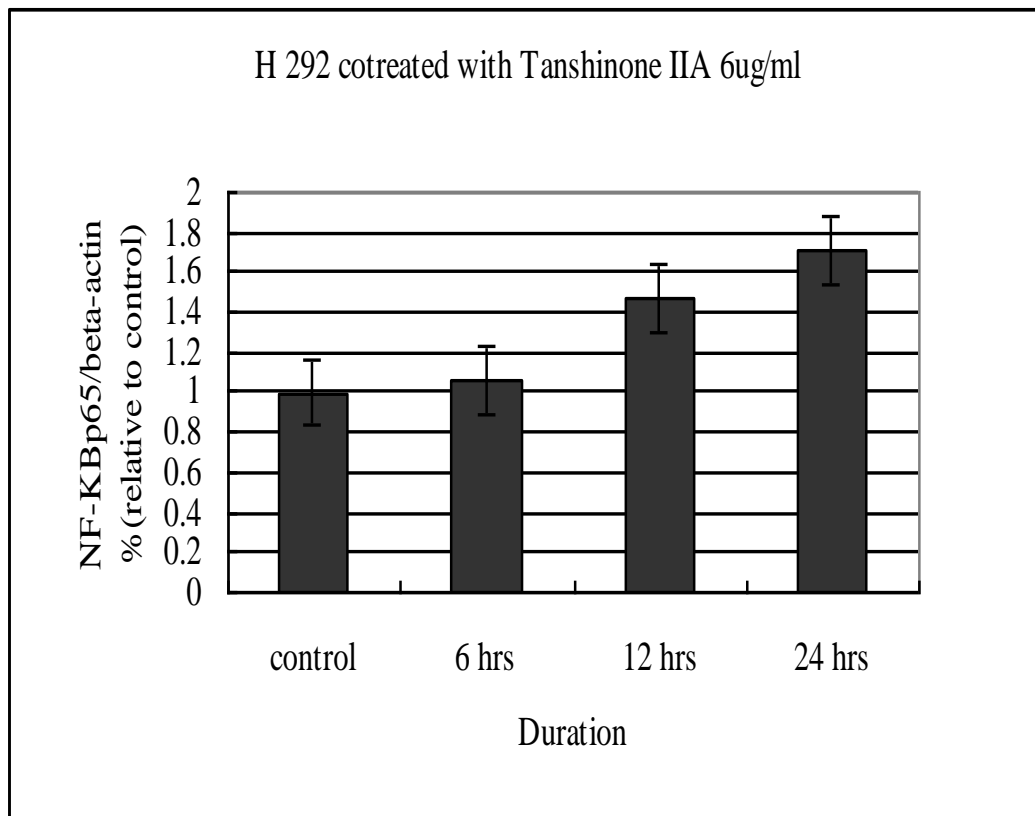
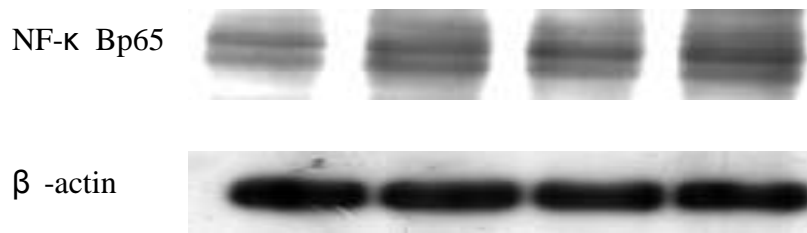


圖 3.82 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 NF- κ Bp65 蛋白量的表現

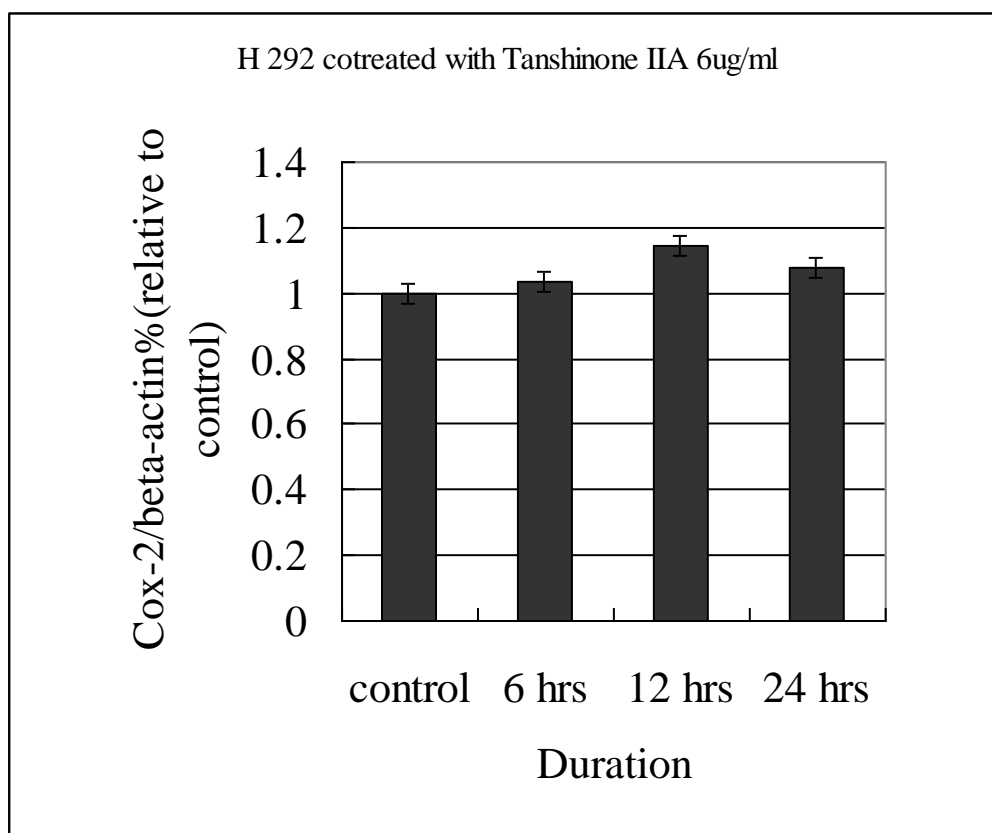
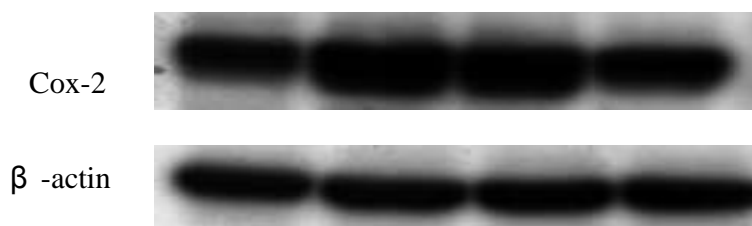


圖 3.83 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 Cox-2 蛋白量的表現

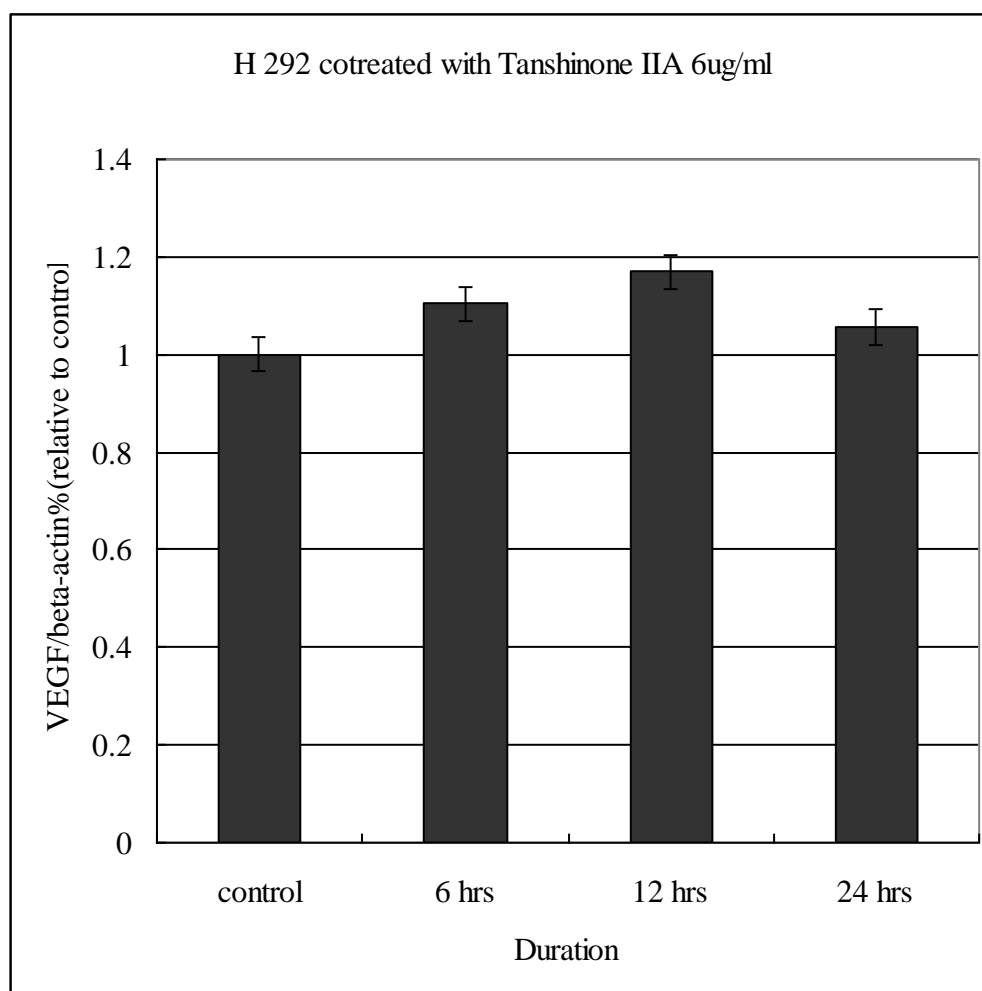
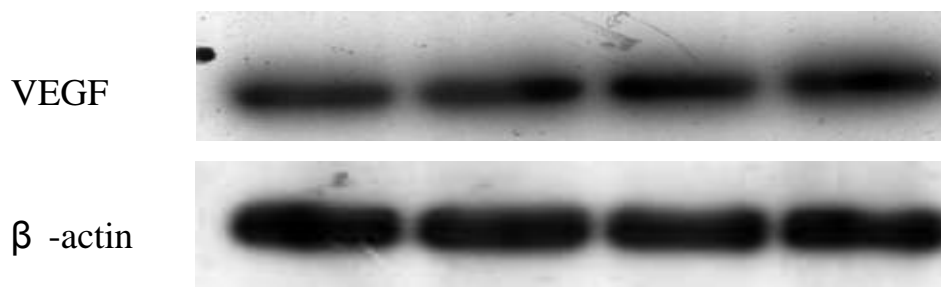


圖 3.84 肺癌細胞 H292 加入丹參酮 IIA(6 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 VEGF 蛋白量的表現

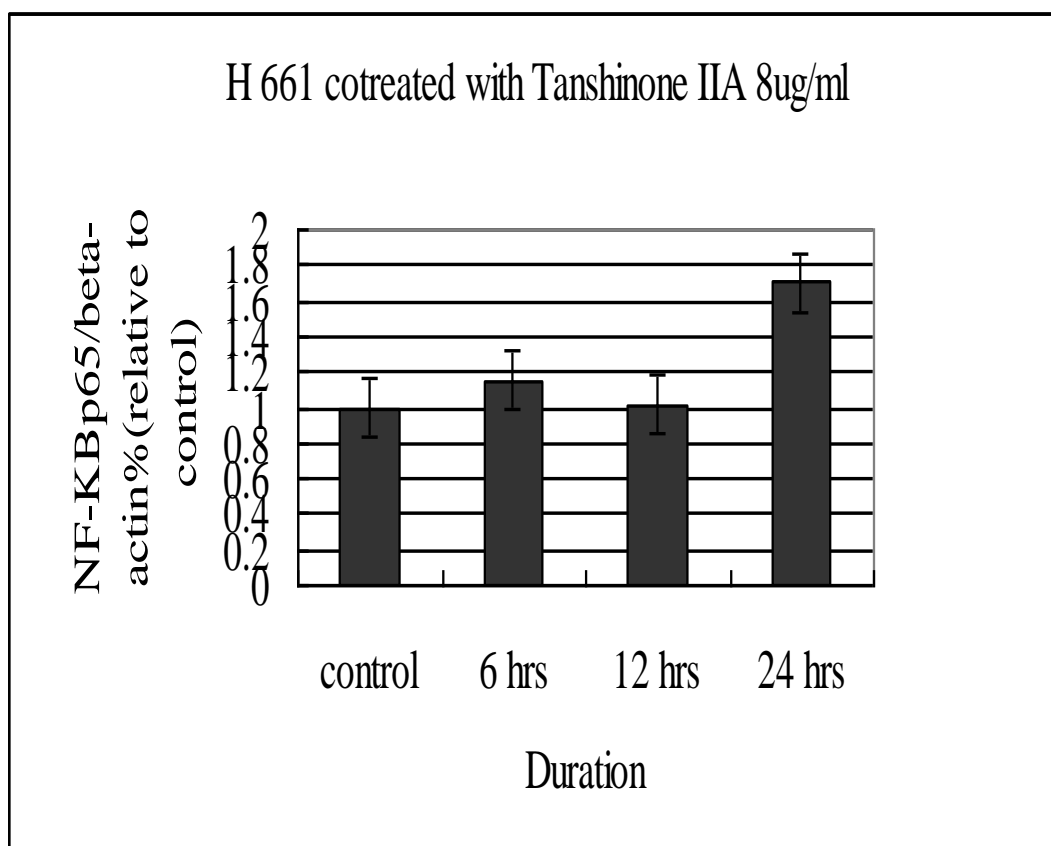
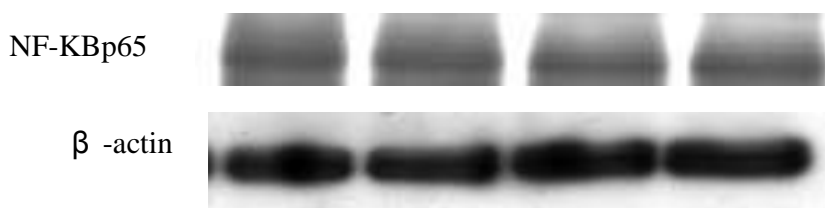


圖 3.85 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8μg/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 NF-κBp65 蛋白量的表現

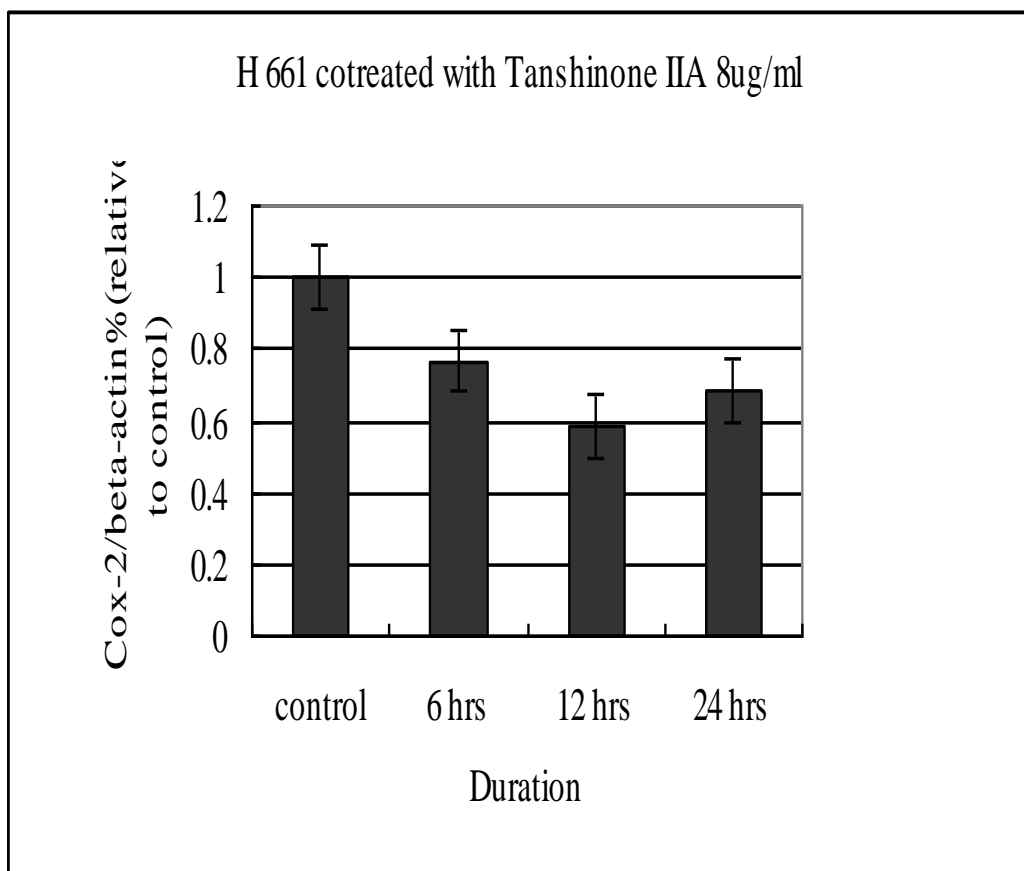
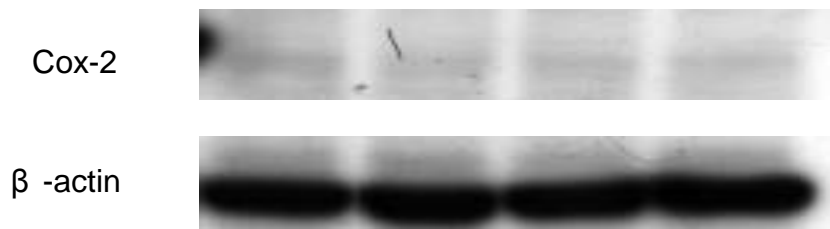


圖 3.86 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 Cox-2 蛋白量的表現

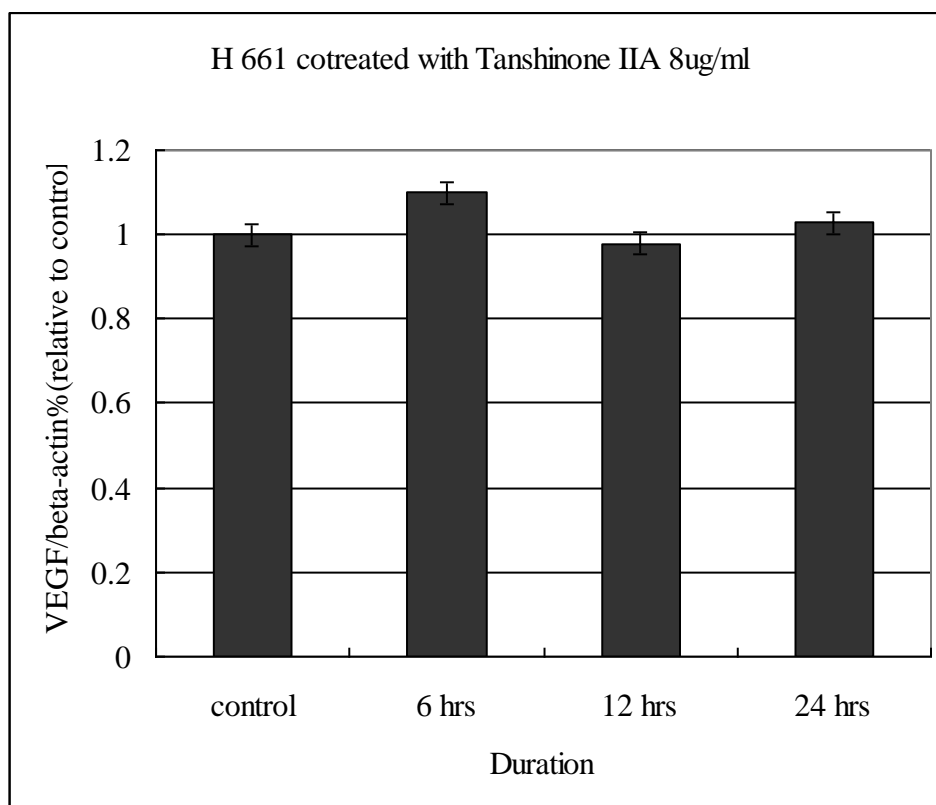
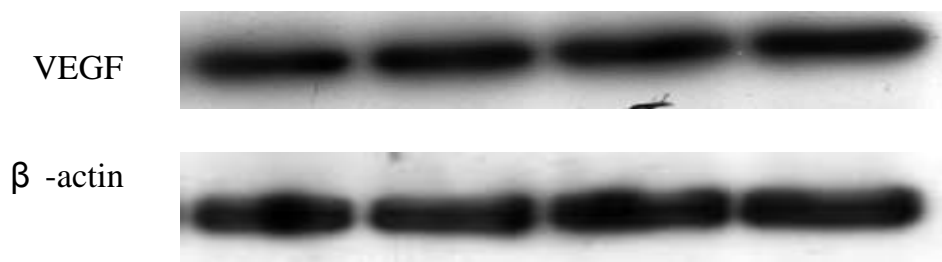


圖 3.87 肺癌細胞 H661 加入丹參酮 IIA(8 μ g/ml)後，分別培養不同時間 6, 12 和 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 VEGF 蛋白量的表現

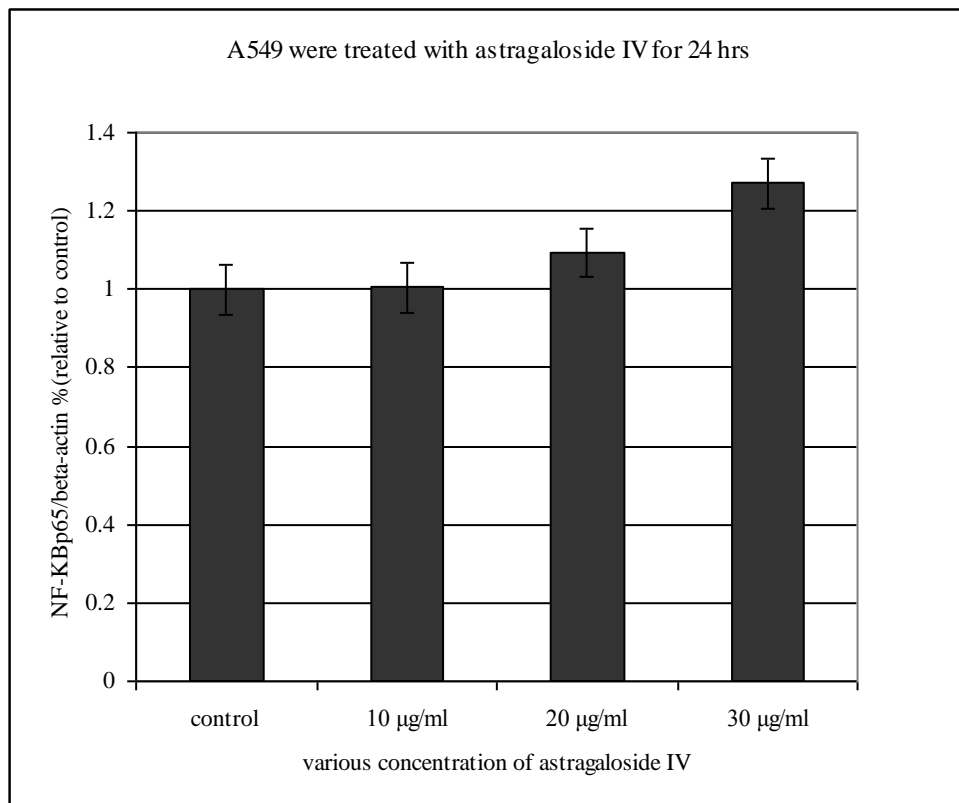
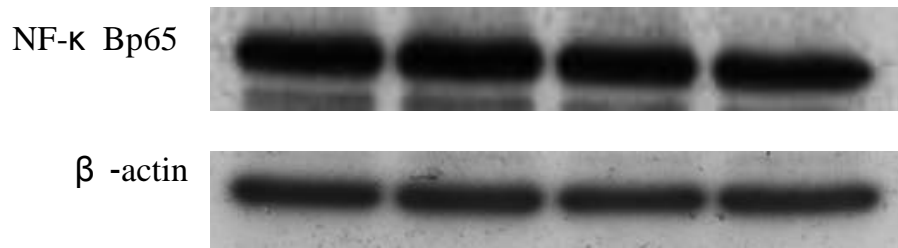


圖 3.88 肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷IV(10, 20,30μg/ml) 後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 NF-κBp65 蛋白量的表現

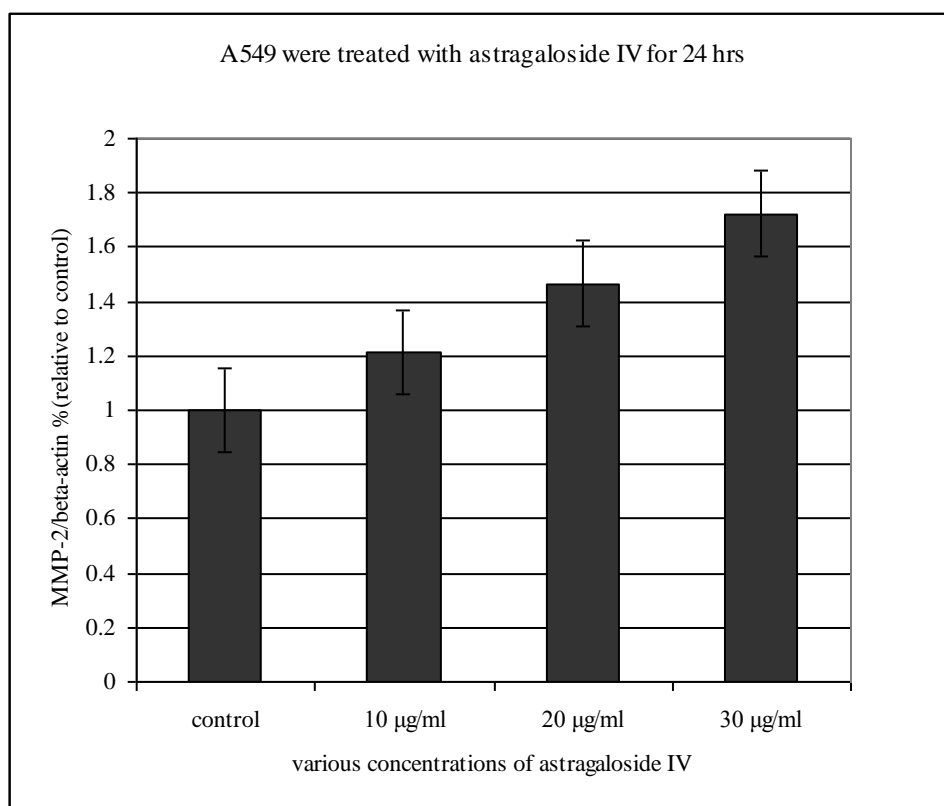
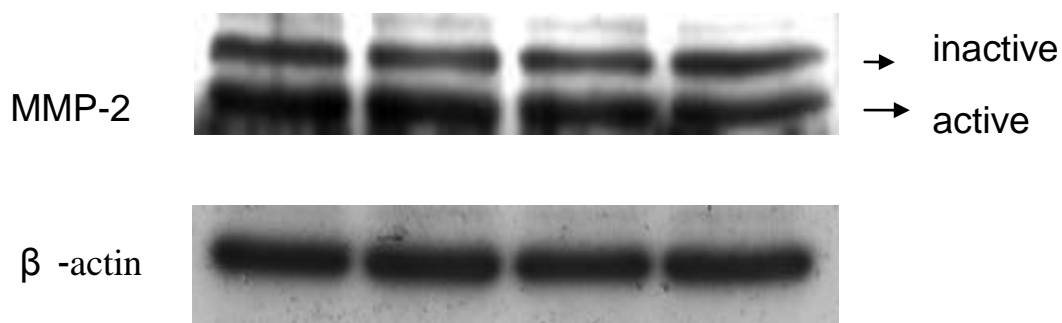


圖 3.89 肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷IV(10, 20,30μg/ml) 後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 MMP-2 蛋白量的表現

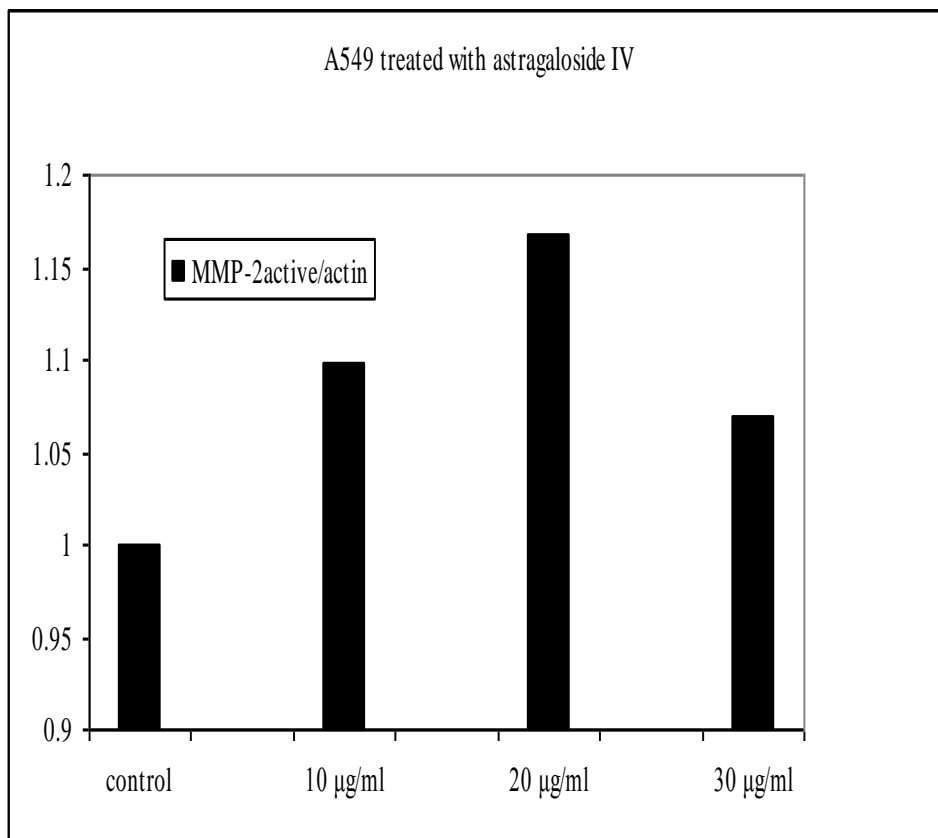
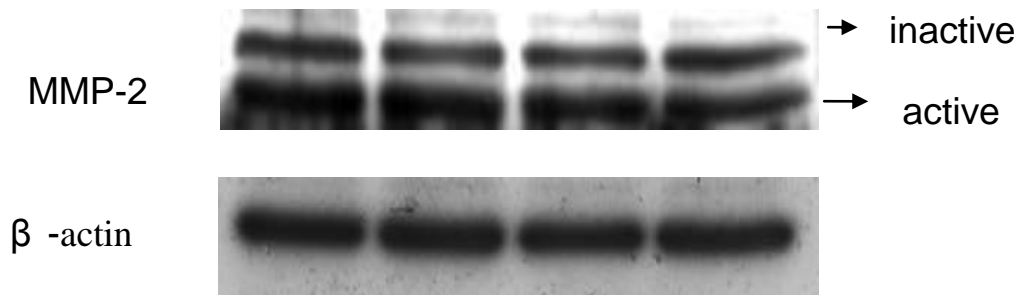


圖 3.90 肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷IV(10, 20,30 μ g/ml) 後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 MMP-2 active 蛋白量的表現

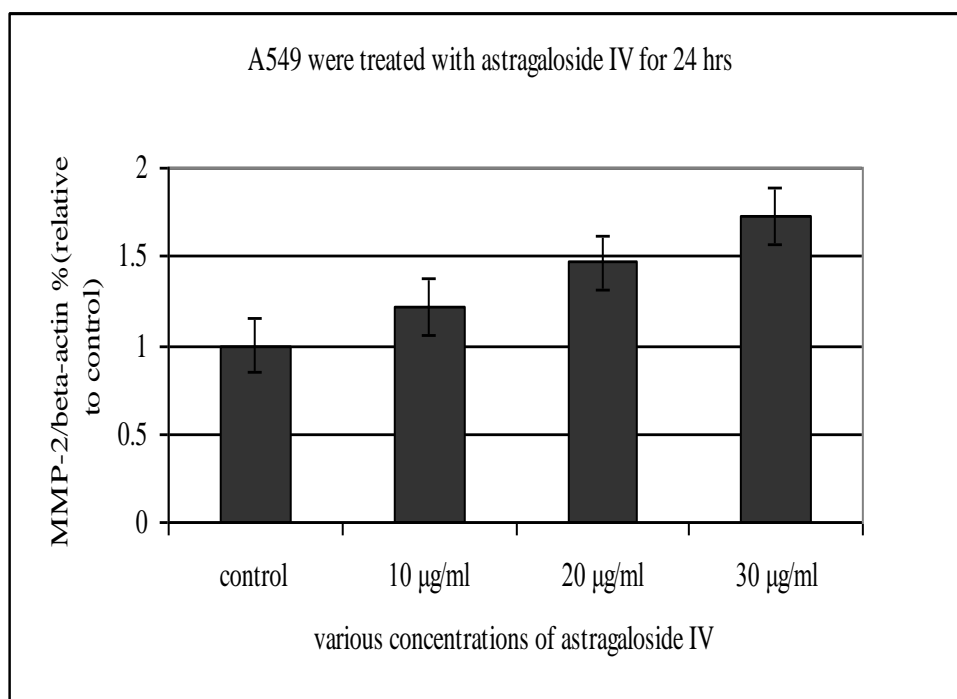
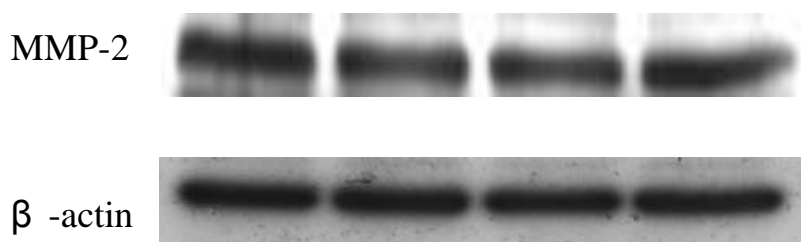


圖 3.91 肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷IV(10, 20,30 μ g/ml)後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 MMP-2 inactive 蛋白量的表現

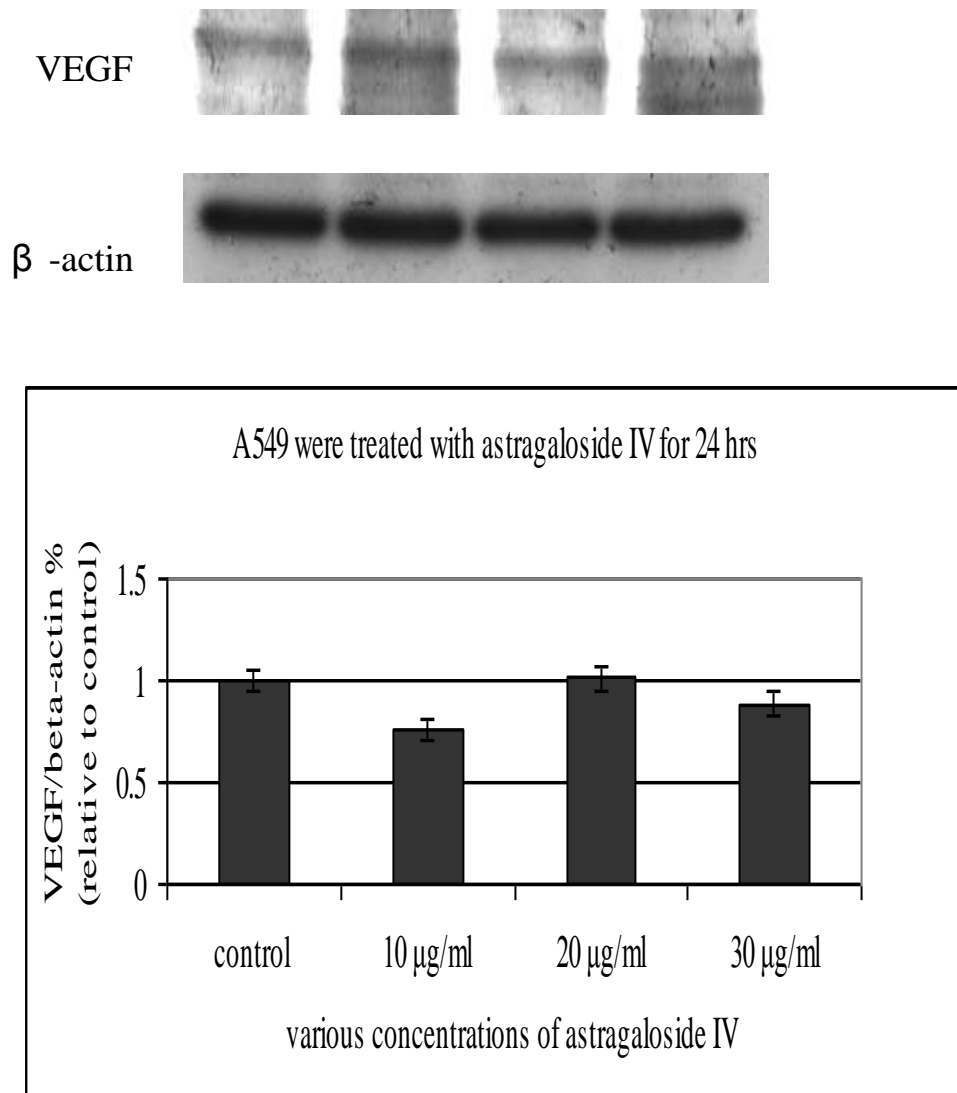


圖 3.92 肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷IV(10, 20,30μg/ml)後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 VEGF 蛋白量的表現

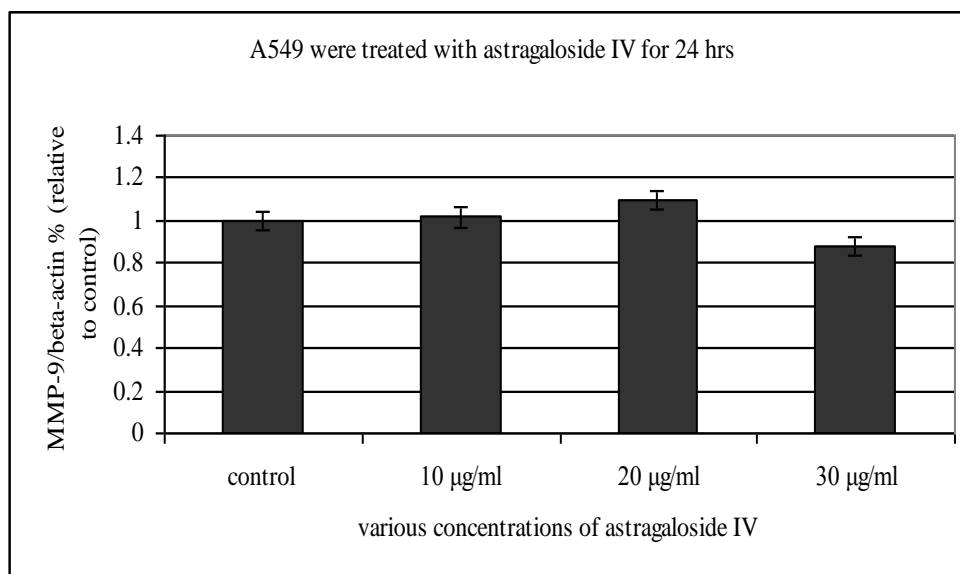
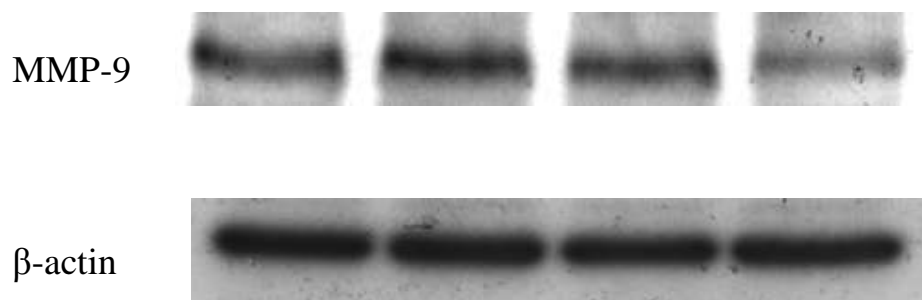


圖 3.93 肺癌細胞 A549 加入不同濃度的黃耆皂苷IV(10, 20,30 μ g/ml)後，分別培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 MMP-9 蛋白量的表現

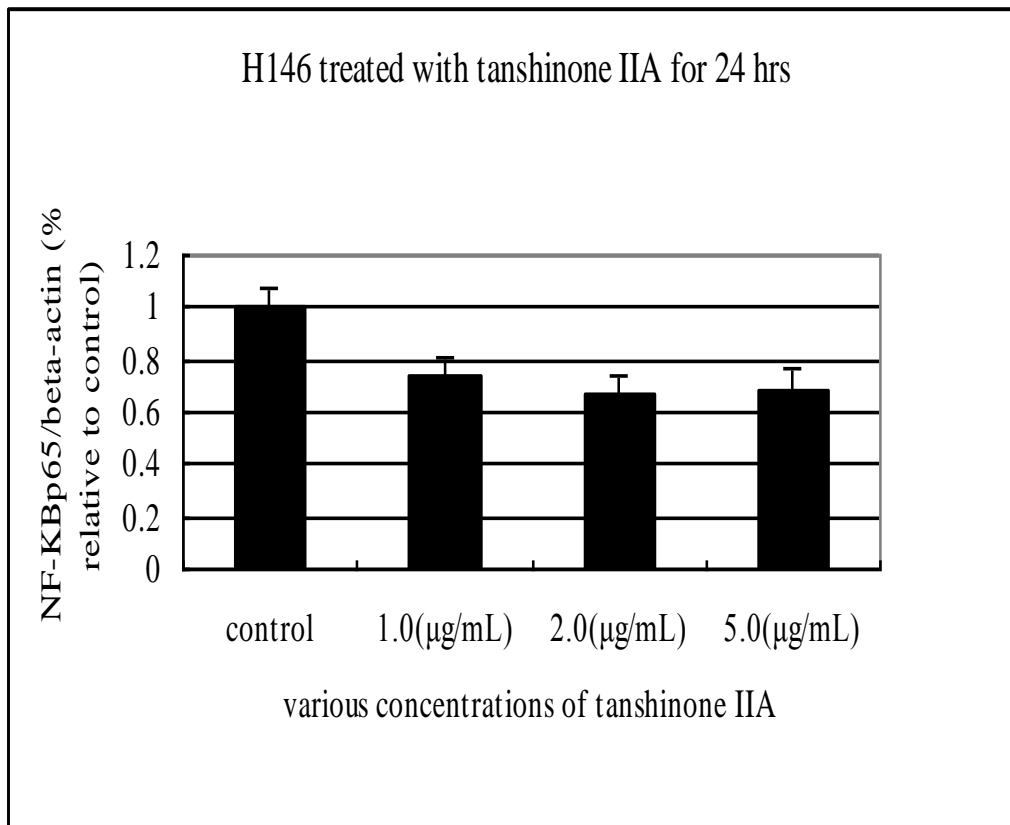
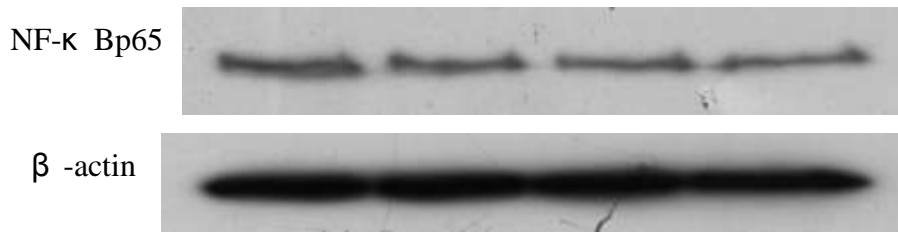


圖 3.94 肺癌細胞 H146 加入不同濃度的丹參酮 IIA(1, 2,5μg/ml)後，培養 24 小時，利用西方墨點法(Western blot) 檢測 NF-κBp65 蛋白量的表現

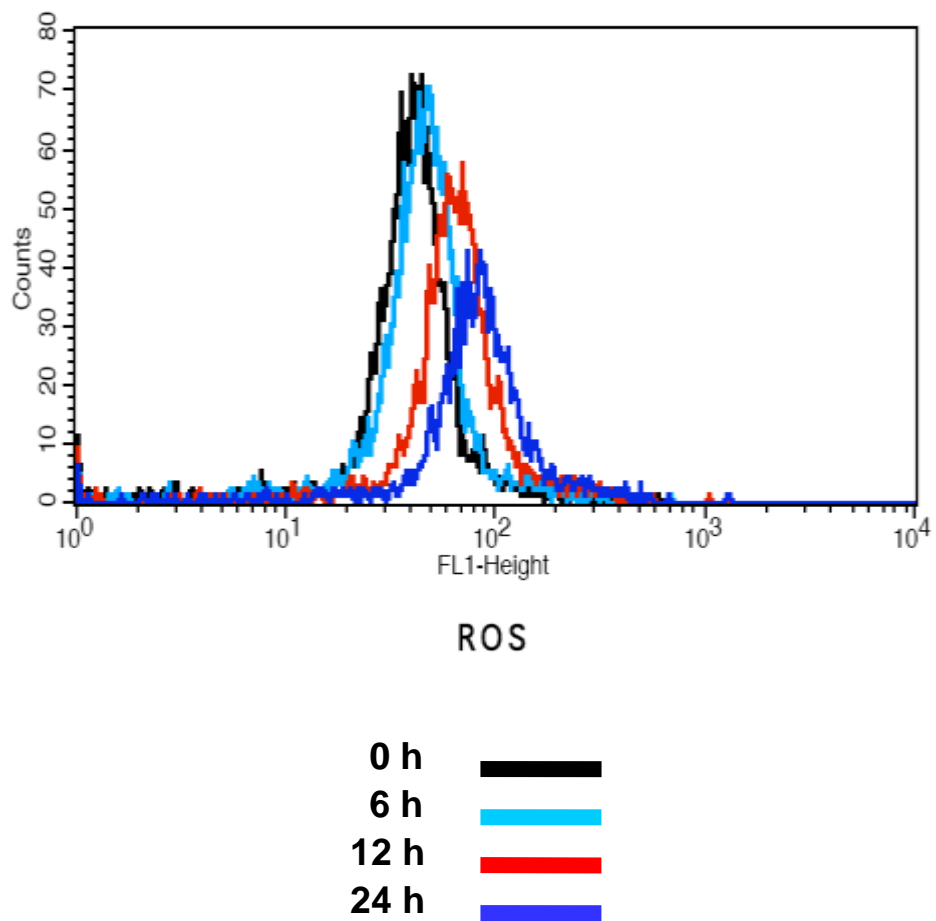


圖 3.95 丹參酮 IIA($5 \mu\text{g/ml}$)對肺癌細胞 A549 ROS 的效應。

表 3.10 丹參酮 IIA (5 μ g/ml)對肺癌細胞 A549 ROS 的效應。

Time	ROS increase(%)
0 h	1.20 \pm 0.58 %
6 h	12.35 \pm 2.12 %
12 h	67.62 \pm 5.67 %
24 h	83.17 \pm 3.21 %

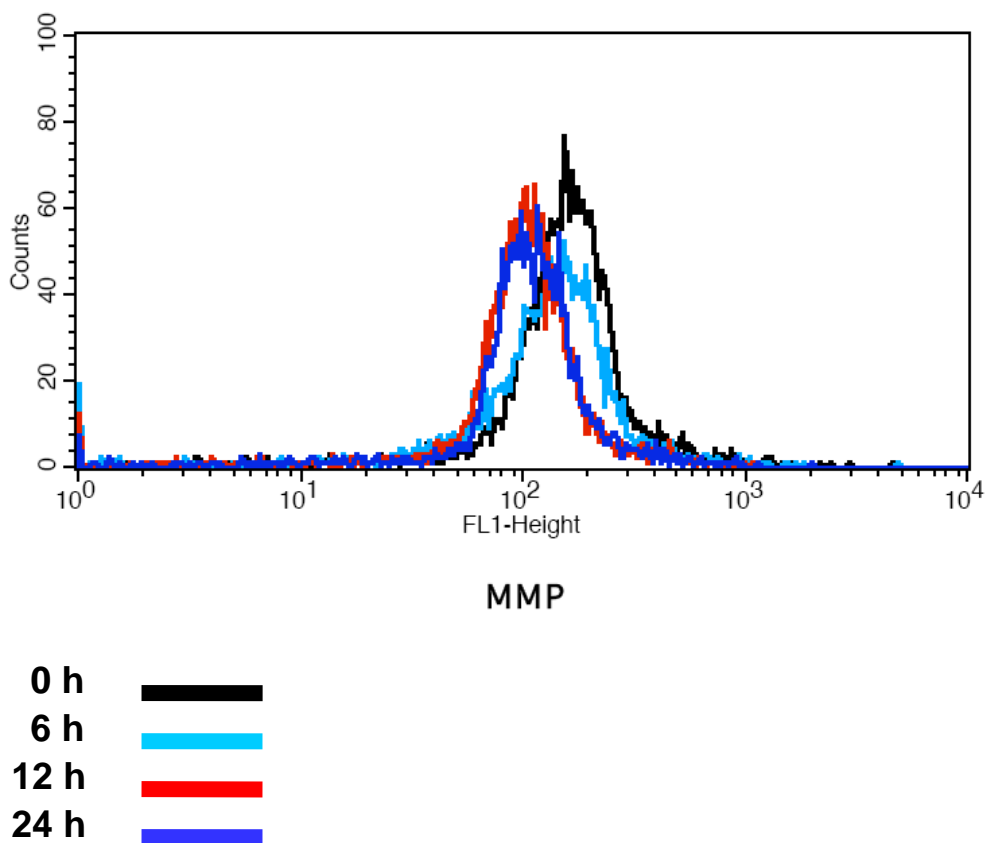


圖 3.96 丹參酮 IIA(5 μ g/ml)對肺癌細胞 A549 MMP 的效應。

表 3.11 丹參酮 IIA(5 μ g/ml)對肺癌細胞 A549 MMP 的效應。

Time	MMP decrease(%)
0 h	3.21 \pm 1.11 %
6 h	4.32 \pm 3.10 %
12 h	48.62 \pm 3.32 %
24 h	57.33 \pm 6.30 %

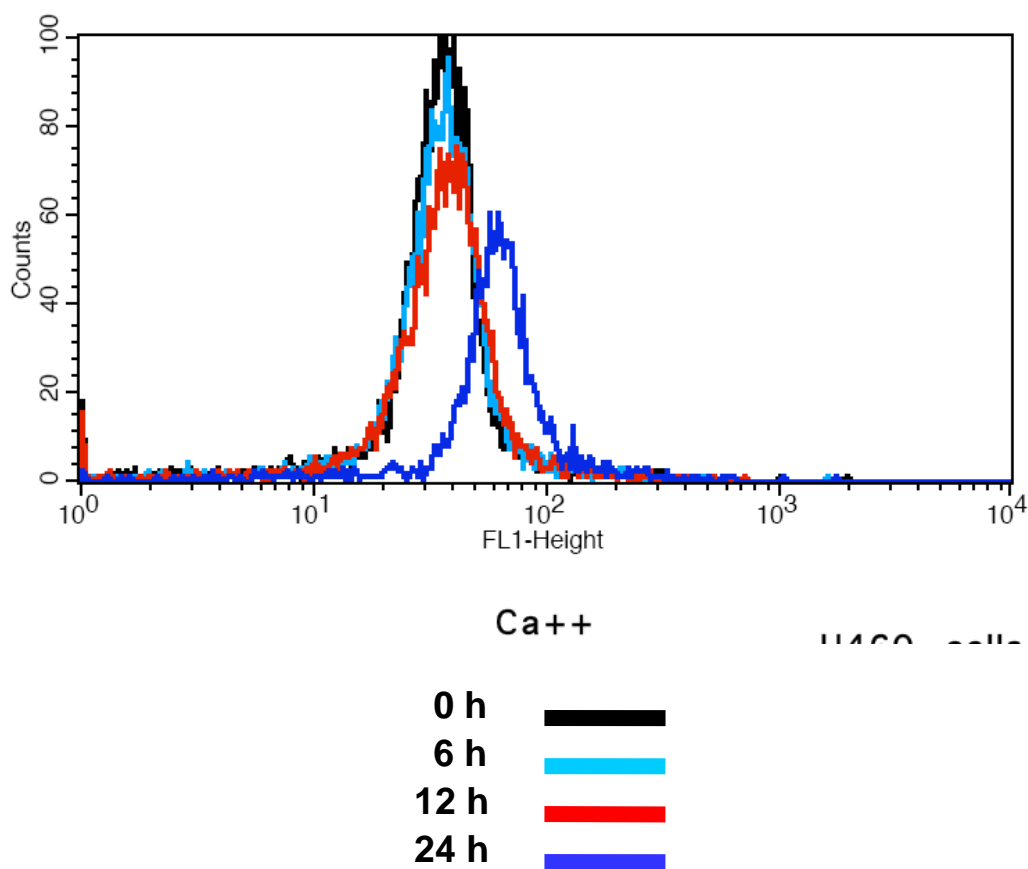


圖 3.97 丹參酮 IIA(5 μ g/ml)對肺癌細胞 A549 Ca⁺² 的效應。

表 3.12 丹參酮 IIA(5 μ g/ml)對肺癌細胞 A549 Ca²⁺ 的效應。

Time	Ca ²⁺ increase(%)
0 h	0.65 \pm 0.11 %
6 h	1.02 \pm 1.00 %
12 h	2.01 \pm 1.09 %
24 h	21.21 \pm 3.01 %

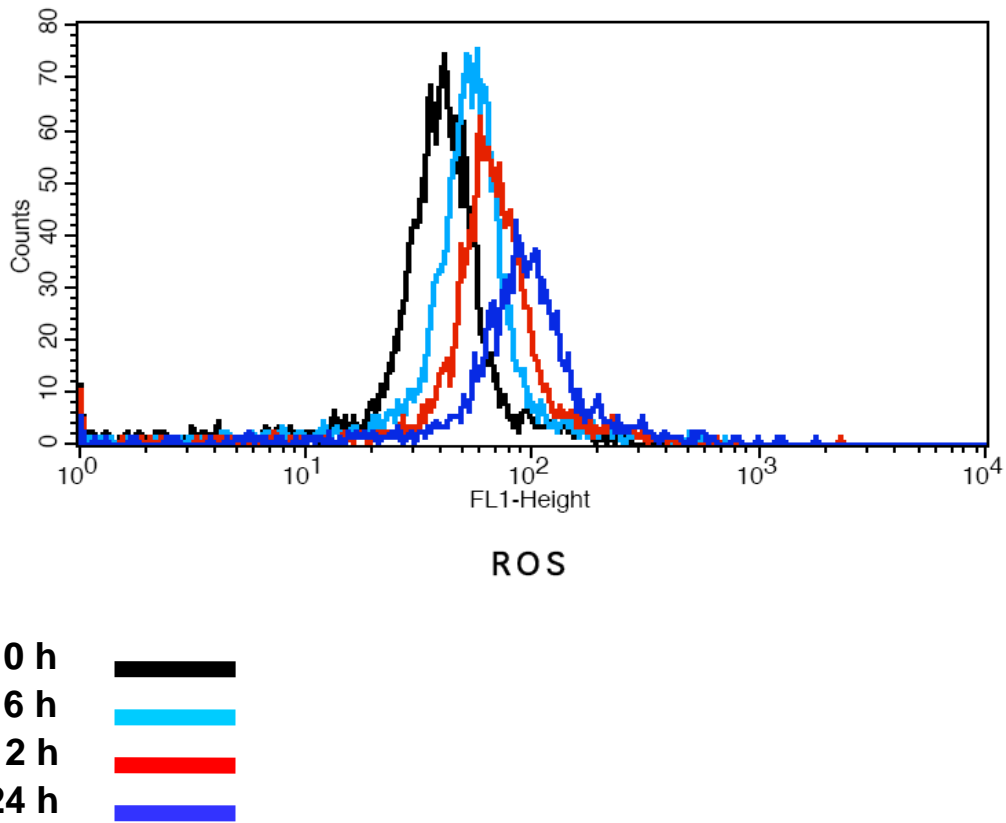


圖 3.98 丹參酮 IIA(6 μ g/ml)對肺癌細胞 H292 ROS 的效應。

表 3.13 丹參酮 IIA(6 μ g/ml)對肺癌細胞 H292 ROS 的效應。

Time	ROS increase(%)
0 h	2.10 \pm 1.33 %
6 h	34.62 \pm 6.36 %
12 h	68.68 \pm 4.77 %
24 h	90.32 \pm 8.76 %

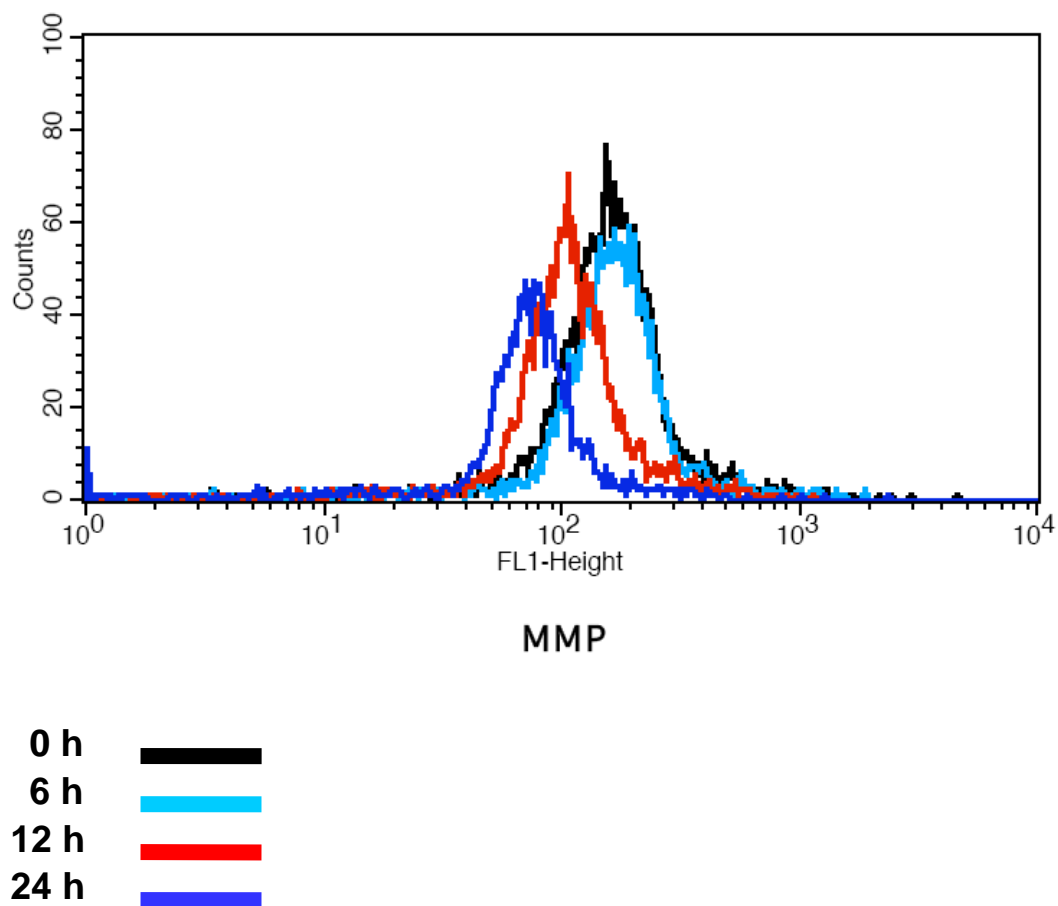


圖 3.99 丹參酮 IIA(6 μ g/ml)對肺癌細胞 H292 MMP 的效應。

表 3.14 丹參酮 IIA(6 μ g/ml)對肺癌細胞 H292 MMP 的效應。

Time	MMP decrease(%)
0 h	2.01 \pm 0.32 %
6 h	3.02 \pm 1.32 %
12 h	57.65 \pm 6.02 %
24 h	78.74 \pm 3.39 %

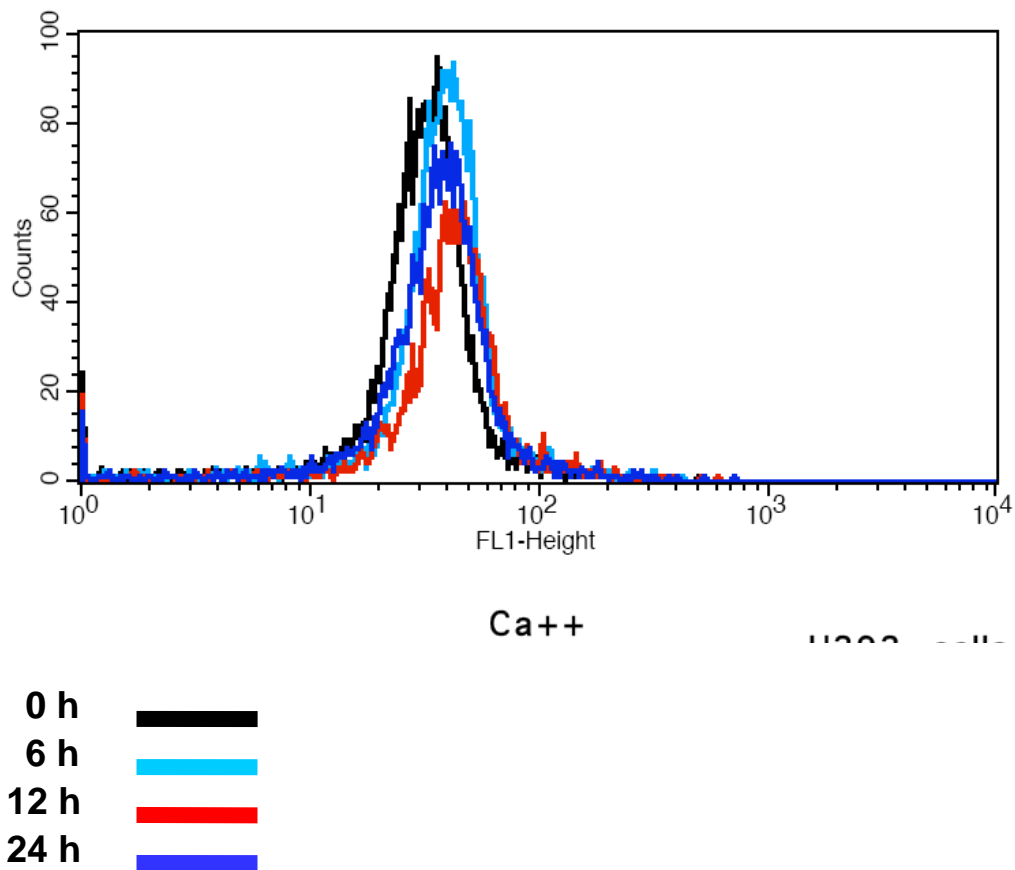


圖 3.100 丹參酮 IIA(6 μ g/ml)對肺癌細胞 H292 Ca⁺⁺ 的效應。

表 3.15 丹參酮 IIA(6 μ g/ml)對肺癌細胞 H292 Ca⁺² 的效應。

Time	Ca ⁺² increase (%)
0 h	1.01 \pm 0.32 %
6 h	2.10 \pm 2.11 %
12 h	2.54 \pm 1.36 %
24 h	4.48 \pm 2.68 %

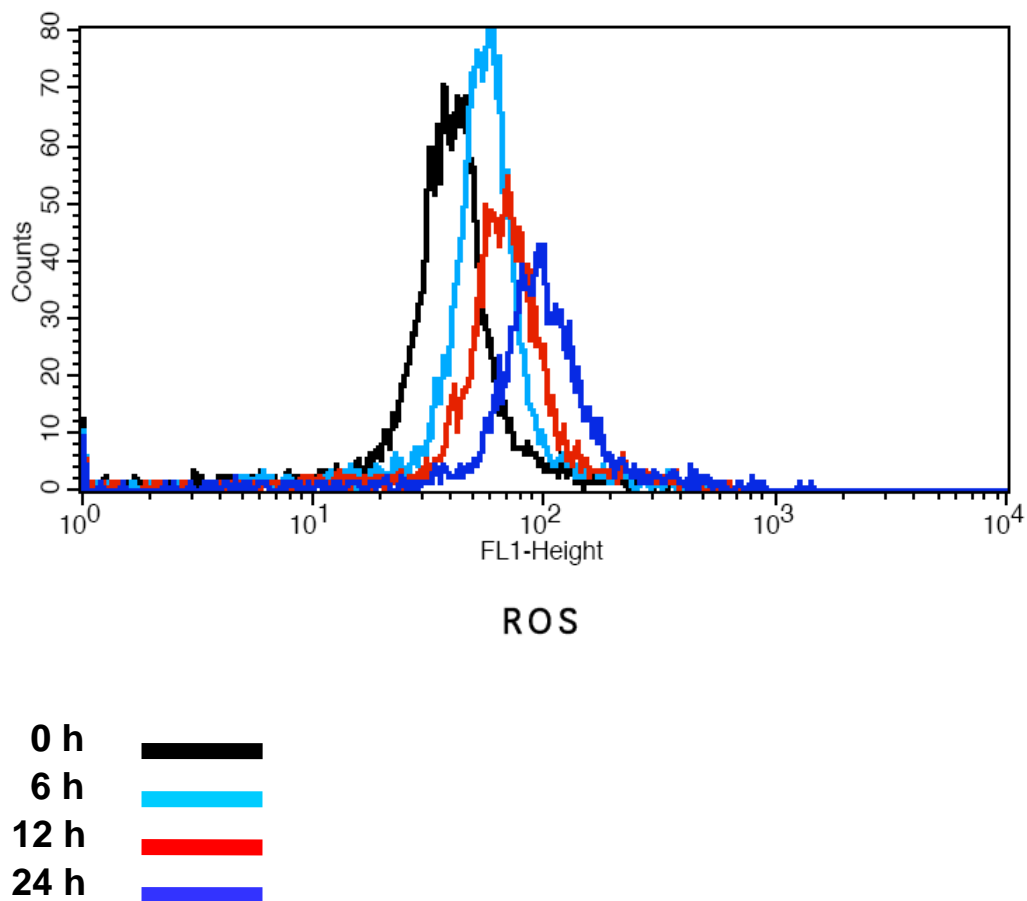


圖 3.101 丹參酮 IIA(8 μ g/ml)對肺癌細胞 H661 ROS 的效應。

表 3.16 丹參酮 IIA(8 μ g/ml)對肺癌細胞 H661 ROS 的效應。

Time	ROS increase (%)
0 h	4.52 \pm 1.32 %
6 h	78.78 \pm 5.32 %
12 h	85.32 \pm 6.33 %
24 h	91.36 \pm 8.14 %

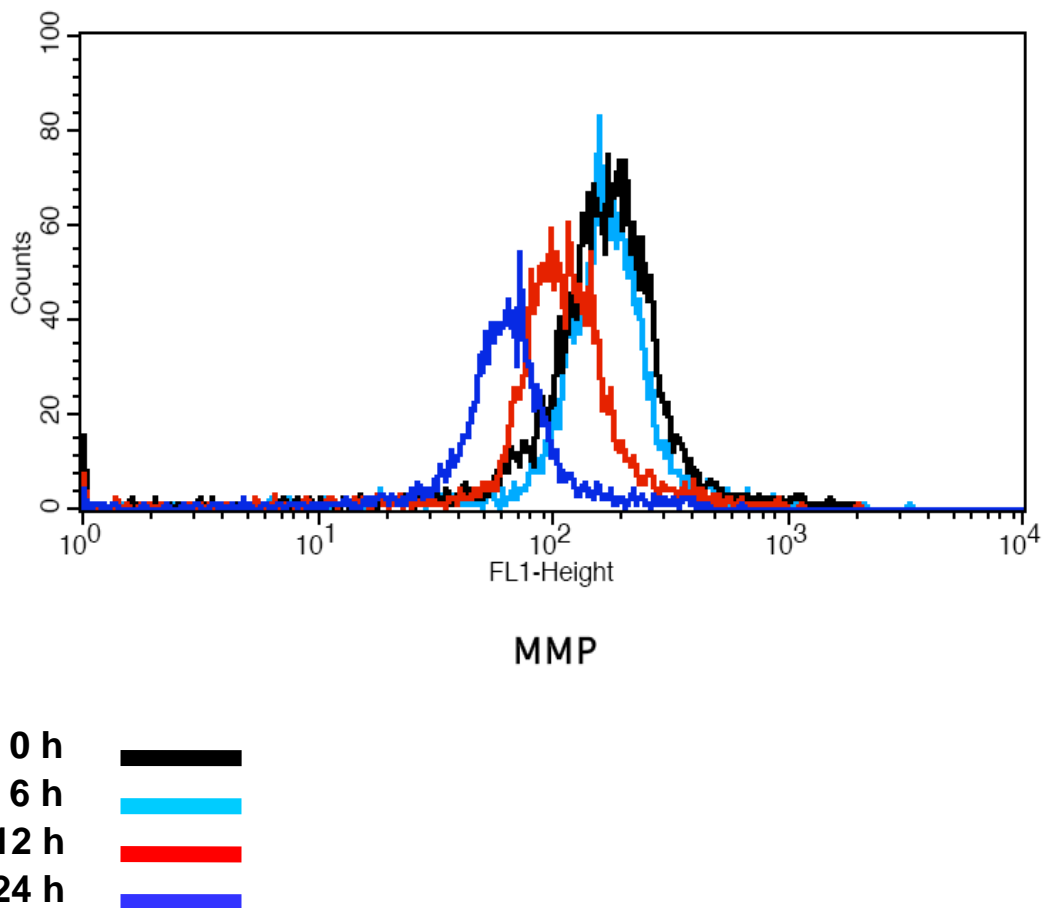


圖 3.102 丹參酮 IIA(8 μ g/ml)對肺癌細胞 H661 MMP 的效應。

表 3.17 丹參酮 IIA(8 μ g/ml)對肺癌細胞 H661 MMP 的效應。

Time	MMP decrease (%)
0 h	3.33 \pm 2.01 %
6 h	4.00 \pm 2.32 %
12 h	45.36 \pm 3.87 %
24 h	82.36 \pm 4.10 %

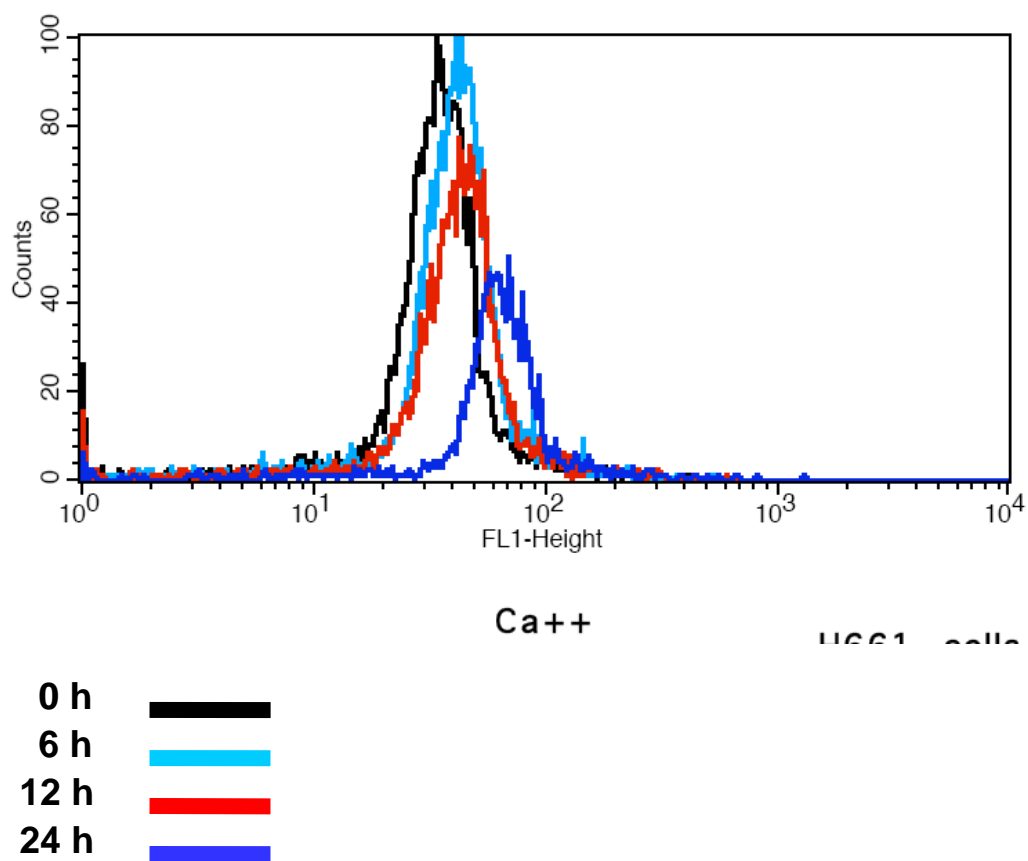


圖 3.103 丹參酮 IIA(8 μ g/ml)對肺癌細胞 H661 Ca +2 的效應。

表 3.18 丹參酮 IIA(8 μ g/ml)對肺癌細胞 H661 Ca²⁺ 的效應。

Time	Ca ²⁺ increase (%)
0 h	2.33 \pm 1.00 %
6 h	4.58 \pm 2.01 %
12 h	5.21 \pm 3.14 %
24 h	8.99 \pm 4.10 %

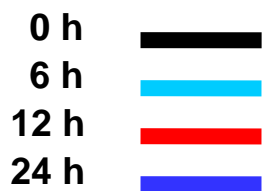
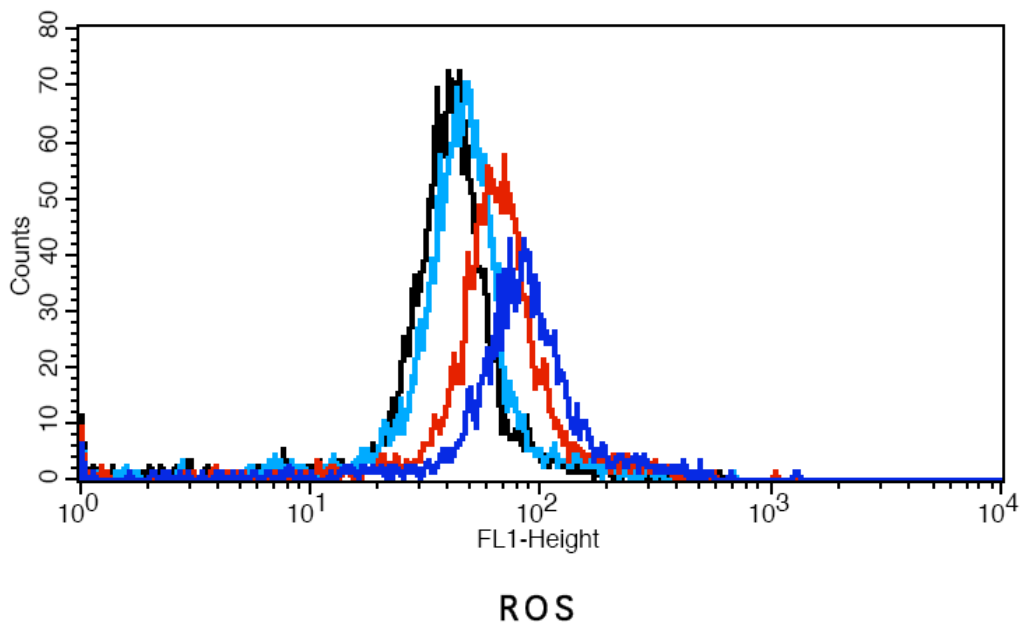


圖 3.104 丹參酮 IIA(1 μ g/ml)對肺癌細胞 H146 ROS 的效應。

表 3.19 丹參酮 IIA(1 μ g/ml)對肺癌細胞 H146 ROS 的效應。

Time	ROS increase (%)
0 h	5.32 \pm 2.11 %
6 h	18.32 \pm 3.25 %
12 h	58.62 \pm 4.78 %
24 h	87.66 \pm 2.14 %

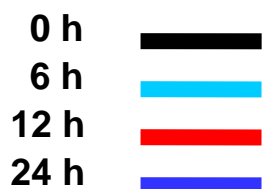
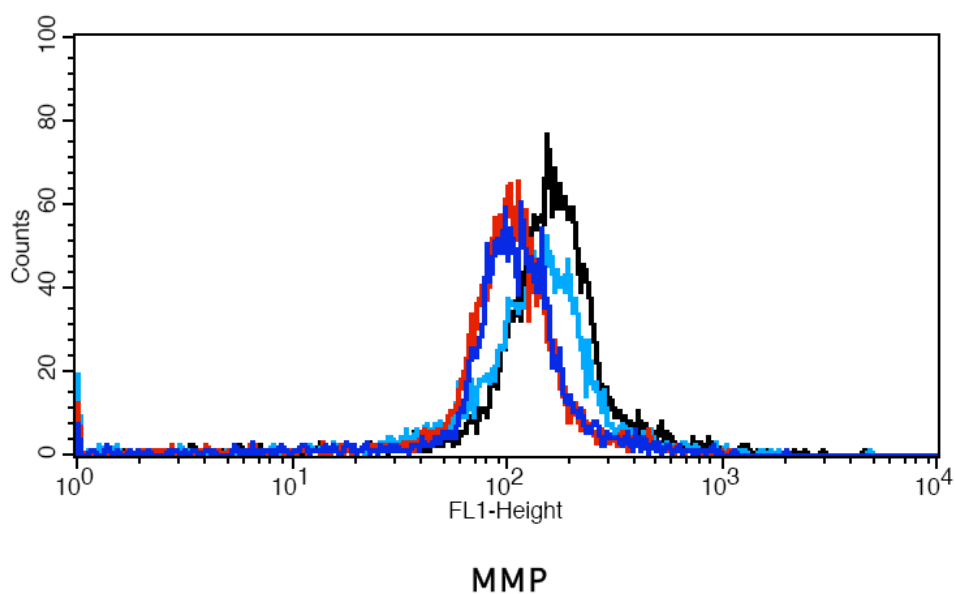


圖 3.105 丹參酮 IIA(1 μ g/ml)對肺癌細胞 H146 MMP 的效應。

表 3.20 丹參酮 IIA(1 μ g/ml)對肺癌細胞 H146 MMP 的效應。

Time	MMP decrease (%)
0 h	2.38 \pm 0.19 %
6 h	2.98 \pm 3.14 %
12 h	23.32 \pm 4.87 %
24 h	44.33 \pm 5.10 %

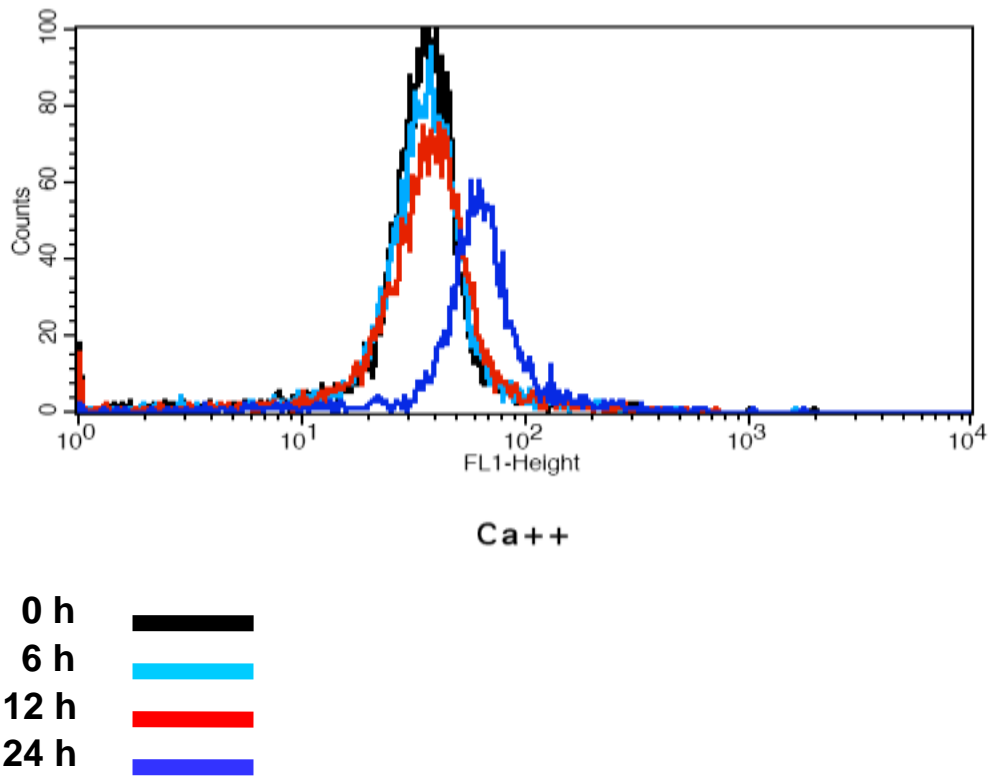


圖 3.106 丹參酮 IIA(1 μ g/ml)對肺癌細胞 H146 Ca⁺⁺ 的效應。

表 3.21 丹參酮 IIA(1 μ g/ml)對肺癌細胞 H146 Ca⁺² 的效應。

Time	Ca ⁺² increase (%)
0 h	1.09 \pm 0.98 %
6 h	2.09 \pm 1.00 %
12 h	2.87 \pm 2.69 %
24 h	18.32 \pm 5.12 %