

編號：CCMP93-RD-046

中藥材薏苡萃取物之基因體研究-由主要 組成分進行機轉研究與臨床應用

謝長堯

國立台灣大學

摘 要

薏苡為重要的中藥材和食補的材料。在本年度計畫中，我們以薏苡專一性作用基因蛋白質為基礎，進一步探討薏苡組成物作用機轉與臨床可能之運用方式。運用由化學系郭悅雄教授自薏苡殼甲醇萃取物中分離純化出的十多種化合物，針對我們先前由薏苡粗萃物觀察到的包含抑制腫瘤細胞促血管新生能力、抑制發炎反應分子、抑制血清誘發腫瘤細胞侵襲力。分別以 VEGF、IL-6、Cox-2、MMP-9 等基因作為薏苡組成物作用機轉評估標準。我們發現薏苡組成物中以目前僅在薏苡中被發現 4-ketopinoresinol(已發表於 J Agric Food Chem. 2002. Kuo YH. et.al)，對腫瘤細胞 IL-6、MMP-9 的產生具有良好抑制作用，在機轉探討上，首先由細胞生長曲線與細胞週期分析，我們發現 4-ketopinoresinol 並無細胞毒性，它對腫瘤細胞具有延緩細胞週期 G2/M 的作用。此外 4-ketopinoresinol 會抑制血清誘發包括 Akt、ERK、p38、JNK 的磷酸化，也會抑制 NF-kB 的活性，包括抑制 NF-kB 進入細胞核內與結合能力。我們認為薏苡組成物對細胞內訊息傳遞分子與轉錄分子活性的抑制作用結果，解釋了由細胞生物學上所看到的包含抑制血清誘發之腫瘤細胞侵襲、腫瘤細胞之促血管新生能力等效應。

臨床可能之運用方式的研究上，我們分別以薏苡的部分攝食取代（混於飼料）、粗萃物（管餵）、純物質（腹腔注射）測試它們與具放射線治療併用的作用，我們的結果顯示薏苡的部分攝食取代最具有增強放射線治療效果的作用，其中又以 20%的薏苡籽實取代效果最佳，我們發現薏苡的部分攝食取代能降低放射線治療誘發的 IL-6，我們認為薏苡的食用應與其抗發炎的效應

有關，此外我們也觀察到薏苡的部分攝食取代會使得治療過程中小鼠的體重變化穩定，此一結果可以運用於預防腫瘤患者的惡質化 (cachexia)。

關鍵詞：薏苡、放射線治療、惡質化、抗發炎

Number: CCMP93-RD-046

Genomic Study of Chinese Herb-Adlay-Clinical Application and Mechanism Study of its Components

Hsieh-Chay Yeo

National Taiwan University

ABSTRACT

According to the Chinese traditional therapy, adlay is used as an anti-inflammatory herb. In recent research, adlay was also found to have anti-tumor properties in an animal model. We investigated the therapeutic effect of adlay on gynecological cancer. Different adlay extracts were used to test in ovarian cancer cell lines SKOV-3, CaoV-3 and cervical cancer cell lines SiHa, HeLa. Our results showed that pure compound 4-ketopinoresinol (J Agric Food Chem. 2002. Kuo YH. et.al) from AHM in the non-cytotoxic concentration, could significantly arrest both ovarian cancer and cervical cancer cell lines cell cycle, attenuate the serum-induced invasion in both ovarian cancer and cervical cancer cell lines, decrease the angiogenic effect of ovarian cancer and cervical cancer cell lines on HUVEC growth and tube formation. Attenuated tumor cell intravasation in CAM model. In the mechanism study 4-ketopinoresinol down-regulated IL-6, Cox-2, MMP-9 through blocking the NFkB activity and signal transduction mediators including Akt, p38, Erk, Jnk phosphorylation. We combine the adlay replacement feed with radiotherapy, the result showed that adlay could enhance the therapeutic effect of radiotherapy especially sustain the body weight during radiotherapy. We also found the serum level of IL-6 in mouse that induced by radiation could be inhibited by adlay. We conclude that adlay is a highly potential herb for cancer therapy especially in tumor therapy caused cachexia, the more appropriate application

worthy to be study in the future.

Keywords : adlay, radiotherapy, cachexia, anti-inflammation

壹、前言

中醫藥是華人數千年來累積的智慧結晶，也被公認為台灣在生物科技發展方面的強項及最有希望及潛力的領域之一。因此，如何加速國內中草藥具備國際性競爭力成為國內產官學界積極努力的課題。

薏仁是藥食兼用的食物，自古以來一直是供作中藥材和食補的材料，屬禾本科一年生草本植物，學名為 *Coix lachryma-jobi L. var. mayuen Stapf*，又稱薏珠子、鳩麥、草珠子等，日文名稱為鳩麥，英文名為 adlay，Job's tears。薏苡為本省山野間零星栽培之小作物，本省目前主要集中在中部彰化縣二林鎮、台中縣大雅鄉及南投縣草屯鎮…等地，每年栽培約 200 公頃左右，由於其保健功效漸被肯定，其栽種面積可望逐年增加（江，1997；）。中國傳統醫學中，薏苡始記載於「神農本草經」，列為上品，味甘淡、氣微寒，為養命、應天、無毒，久服多服不傷身，輕身、益氣，不老長生之君藥。本草綱目謂「薏苡，氣味甘、微寒，無毒。益胃健脾、治水腫濕痺、腳氣疝氣、泄痢熱淋、補肺清熱、治風熱筋急拘攣」。其他如本草經解也有提及薏苡功效，故在中國與日本的民間療法中，薏苡被用來補肺、益胃、利尿、清熱、利濕、消炎、鎮痛、去風濕、強筋骨、抗痙攣、止消渴、治腳氣、抗腫瘤等。（莊，1977）薏仁營養價值高，對於現代人容易罹患之癌症，心血管疾病，糖尿病，慢性發炎疾病等初步實驗數據顯示有預防或治療的功效，基於中醫食療理論基礎，相當具有應用於保健方面之潛力，是值得深入探討研究的中草藥。本計畫中我們主要在探討薏苡組成物作用機轉探討與臨床可能之運用方式，使得薏苡的運用更具科學性且使整體研究更趨完整。本研究計畫內容包含第一部份為探討薏苡殼甲醇萃取物（AHM）中不同組成物對於 AHM 作用基因之蛋白質及細胞生理行為影響，內容包含對腫瘤血管新生、腫瘤細胞侵襲轉移及發炎反應相關基因蛋白質的影響。第二部份為探討薏苡殼甲醇萃取物（AHM）中的成分物質對腫瘤血管新生、侵襲轉移、發炎反應等作用基因之蛋白質及細胞生理行為影響之分子作用機轉。第三部份為探討薏苡籽實、薏苡甲醇萃取物（AHM）及成分物質與放射線併用之效果。

貳、材料與方法

一、本實驗所使用之薏苡材料備製

(一) 本實驗所使用之薏苡籽實、薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 材料為委請台中區農業改良場和農民契作的台中選育四號。薏苡籽實以脫殼機脫殼，並用風篩分成外殼，種皮及糙薏仁等不同部位。

(二) 樣品瓶準備：0.1 N HCl 浸泡 24 小時，清水沖洗數次，在以蒸餾水浸泡 30min 兩次，烘乾。

甲醇萃取物之製備：

將實驗材料 100-200g 磨粉，以材料 10 倍量的甲醇，避光攪拌萃取 24 小時，抽氣過濾出萃取液，並進一步離心 (9,000rpm, 30min) 以除去微細粒子，測試過濃度後進行無菌分裝減壓濃縮後存放於-20°C。

(三) 薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 及其不同組成物由郭悅雄教授實驗室分離純化、定性定量。

二、細胞試驗

(一) 使用源自 ATCC 的 5 株子宮頸癌 (SiHa、HeLa、C33A、Caski、MS-751) 及 4 株卵巢癌 (SKOV-3、CAOV3、OVCAR-3、ES-2) 細胞株。不同細胞所須之培養液之組成及配製完全依照 ATCC 的規範，細胞皆在相對濕度 9.8%，37°C，含 5% CO₂ 的培養箱中培養。

(二) 腫瘤細胞促使血管新生能力測試

1. 準備 Conditioned Medium (CM)

腫瘤細胞經過 PBS 二次洗滌之後，於 10mL 不加血清的培養基中培養並與以 ATH 或成分物質處理。經過 24 小時培養之後，收集細胞的培養基，加入 25mM HEPES buffer (PH7.4)、1mg/mL leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1mM EDTA、0.02% NaN₃、0.1% BSA。利用離心取的 CM，測試其中促使血管新生能力之相關基因蛋白質的含量並進行血管新生能力測試。

2. 血管內皮細胞的生長測試 (Cell growth)

人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC) 是從新鮮臍帶中分離出來的，在 96-well plate 上接種 5×10^3 個細胞，加入 100 μ L 從多種子宮頸癌培養出的 CM 及 2% 胎牛血清，並在 37°C 下培養。經過 3、5、7、9 天生長後收取細胞，利用 microplate reader 在 570nm 下測其吸光值。

3. 在 Matrigel 中血管內皮細胞形態生成分析 (Tube formation assay)

在 24-well microtiter plate 每 well 放置 300 μ L 未經聚合作用的 Matrigel 且讓其聚合 37°C 一小時。在每個 well 中接種 2×10^5 個人類臍靜脈血管內皮細胞，加入 0.5mL 不加血清的培養基及 50ng/mL 血管內皮細胞生長因子或是從多種子宮頸癌細胞株得到的 CM。經過 5% CO₂ 及 37°C 下培養六小時之後，透過倒立式位相差顯微鏡觀察細胞的生長及三度空間結構。

4. 血管內皮細胞移動能力測試 (In vitro wound healing)

人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC) 是從新鮮臍帶中分離出來後，培養至第三代後在 12-well plate 上培養至九分滿，以吸管末端在 plate 中刮出一道空白區域並以 PBS 清洗數次將刮除之細胞洗去加入 CM 及 2% 胎牛血清，並在 37°C 下培養。六小時之後，透過倒立式位相差顯微鏡觀察細胞的移動情況。

5. 血管內皮細胞間隙通透能力測試 (In vitro permeability test)

人類臍靜脈血管內皮細胞分離出來後，培養至第三代後培養於孔徑為 0.4 μ m 的 Boyden chamber 中至九分滿，以 PBS 清洗數次後加入不同條件之 CM 及 2% 胎牛血清並加入 HRP 分子，並在 37°C 下培養。一小時之後，測試通透過血管內皮細胞在 Boyden chamber 下層的 HRP 分子濃度。

6. 西方墨點法分析

分離實驗組控制組細胞蛋白質依照預偵測分子大小以適當濃度 SDS-PAGE 分離，轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane，利用不同的專一性抗體作免疫墨點法。利用含過氧化酶的二級抗體偵測一級抗體，最後用加強性的化學螢光法偵測系統偵測。

7. 生物統計

所有實驗數據均利用 T-test 進行統計分析，*= $p < 0.01$ 為有顯著差異。

參、結果

一、第一部份為探討薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 中不同組成物對於 AHM 作用基因之蛋白質及細胞生理行為影響

(一) 薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 的組成物中，含有能專一性抑制作用基因蛋白質 VEGF、MMP-9、IL-6、Cox-2 產物 PGE-2 的單一成份。

我們利用 DNA 微陣列 (生物晶片) 分析受 AHM 處理之腫瘤細胞及移植於老鼠之腫瘤比較在有無 AHM 處理下整體基因表現的模式。發現 AHM 最主要會降低與血管新生、轉移、發炎反應等三大類有關的基因。因此我們以分離純化自 AHM 中的主要成分 (coniferyl alcohol, syringic acid, ferulic acid, syringaresinol, 4-ketopinoresinol 及 mayuenolide 已由郭悅雄教授發表於 J Agric Food Chem. 2002. Fig.1)，以無細胞毒性劑量 (50ng/mL) 對腫瘤細胞受血清誘發產生血管新生 (VEGF)、轉移 (MMP-9)、發炎反應 (IL-6、PGE-2) 相關基因之蛋白質層次調控及細胞生理行為的影響。運用 EIA 在基因蛋白質層次的研究上我們發現 AHM 中的主要成分中的 4-ketopinoresinol 對於血清誘發子宮頸癌細胞株 HeLa 產生 VEGF (Fig.2A)、MMP-9 (Fig.2B)、IL-6 (Fig.2C)、PGE-2 (Fig.2D) 均有很好的抑制效果。此效應也存在於其他子宮頸癌細胞株 SiHa、C33A、Caski、MS-751 及卵巢癌細胞株 SKOV-3、CAOV3、OVCAR-3、ES-2。

由於 4-ketopinoresinol 為目前僅在薏苡被發現的分子，因此我們後續的研究以深入探討 4-ketopinoresinol 的作用機轉為主。我們進一步以無細胞毒性劑量進行細胞生長取線測試，實驗結果顯示 4-ketopinoresinol 會使細胞生長區線在 48-72 小時間相較於控制組呈現遲緩的情況 (Fig.3A)。利用流氏細胞儀偵測細胞週期變化則發現 4-ketopinoresinol 會使細胞在 48 小時的時間點產生細胞週期 G2/M 停滯現象 (Fig.3B)。

(二) 薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 的組成物 4-ketopinoresinol 能抑制腫瘤細胞促使血管新生能力的影響

腫瘤血管新生包含腫瘤細胞本身促使血管新生的能力 (angiogenicity) 及血管內皮細胞對促血管新生因子 (angiogenic

factors) 的反應，我們分別利用腫瘤細胞及血管內皮細胞的血管新生能力測試釐清 AHM 不同組成物抑制腫瘤血管新生的作用機轉。腫瘤細胞本身促血管新生的能力方面，我們將 HeLa 細胞前處理 4-ketopinoresinol 50ng/mL 4 小時後，去除 4-ketopinoresinol，在培養於 2%FBS M199 培養基中 24 小時，之後收及此條件培養基 (CM)。進行腫瘤細胞對血管內皮細胞的生長能力測試與通透性能力測試，實驗結果顯示 4-ketopinoresinol 的前處理會使血管內皮細胞在 48 小時存活率由單純腫瘤細胞培養基的 156% 降到 112% (Fig.4A)。通透性能力測試結果則顯示 4-ketopinoresinol 的前處理會使血管內皮細胞通透性由單純腫瘤細胞培養基的 246% 降到 160% (Fig.4B)。以上的結果顯示 4-ketopinoresinol 對於腫瘤細胞本身促使血管新生的能力具有抑制作用。4-ketopinoresinol 對血管內皮細胞本身的影響方面，實驗結果顯示 4-ketopinoresinol 會抑制由 VEGF 誘發血管內皮細胞在 Matrigel 上的管狀行成活化作用 (tube formation) (Fig.4C)，有趣的是另一分子 Mayuenolide，在結構上與 4-ketopinoresinol 僅差一個甲基，卻無抑制作用。

(三) 薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 的組成物 4-ketopinoresinol 能抑制腫瘤細胞侵襲轉移的行為能力

侵襲轉移的行為能力是腫瘤細胞惡性化的生理現象，由於先前的研究中我們發現薏苡殼甲醇萃取物能抑制腫瘤細胞的侵襲轉移，因此我們也進行 4-ketopinoresinol 對腫瘤細胞侵襲轉移能力測試。利用孔徑為 8 μ m 的 Boyden chamber 測試 4-ketopinoresinol 對由血清誘發之細胞侵襲轉移的影響。結果顯示 4-ketopinoresinol 對於腫瘤細胞 SiHa 由血清誘發之細胞侵襲轉移能力具有抑制作用 (Fig.5A)。值得注意的是 Mayuenolide，在結構上與 4-ketopinoresinol 僅差一個甲基，卻無抑制作用。我們也應用 Kim 發表於 1998 年 Cell 期刊的體內轉移半定量雞胚模式。其原理為十天大的雞胚會有上尿囊膜與下尿囊膜的區隔，當腫瘤細胞被置於上尿囊膜時有可能經由侵襲能力進入血管 (Intravasation) 轉移至下尿囊膜。偵測時將下尿囊膜組織取出萃取 DNA，以 PCR 方式測試人類細胞 DNA 特有之重複序列 Alu。我們將 HeLa 細胞前處理 4-ketopinoresinol 50ng/mL 4 小時後，去除 4-ketopinoresinol，再置於上尿囊膜，48 小時後萃取下尿囊膜組織 DNA 並以 PCR 方式測試 Alu 存在程

度。結果顯示 4-ketopinoresinol 的前處理會使 HeLa 在雞胚上尿囊膜之細胞侵襲轉移能力降低 (Fig.5B)。

二、第二部份為探討薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 中的成分物質對腫瘤細胞內訊息傳遞之影響

雖然我們的研究結果已經顯示薏苡對腫瘤抑制具有效果，而且薏苡殼甲醇萃取物 (AHM) 最有潛力，然而 AHM 為混合物的狀態，不同批的萃取物也許其中的組成比例就不同效果更可能有差異，這樣的問題是中藥材無法如同西藥受到肯定的關鍵。由於我們在生物晶片的分析結果中發現許多受 NF-kB 調控的基因如 IL-6、Cox-2、MMP-9 等，因此我們以薏苡殼甲醇萃取物中的 4-ketopinoresinol 為探討目標，測試其對 NF-kB 活性調控與細胞內訊息傳遞分子活化的影響。以釐清成分物質對薏苡殼甲醇萃取物具有之細胞生理行為效應之可能分子作用機轉。我們主要測試 4-ketopinoresinol 對於血清誘發之細胞內訊息傳遞分子磷酸化活化的影響。以西方墨點法偵測血清誘發 Akt、p38、Jnk、Erk 訊息傳遞分子磷酸化情況發現 4-ketopinoresinol 會抑制血清誘發之細胞內訊息傳遞分子磷酸化活化。

研究方法包含細胞培養處理及蛋白質磷酸化測試 (Fig. 6A)。我們也分析 4-ketopinoresinol 對血清誘發之 NF-kB 活性的影響，試驗結果發現 4-ketopinoresinol 會抑制血清誘發 NF-kB 由細胞質進入細胞核，進而影響 NF-kB 與核酸結合的程度 (Fig. 6B)。由實驗結果我們認為以薏苡殼甲醇萃取物中確實存在有能抑制 NF-kB 活性調控與細胞內訊息傳遞分子活化程度的組成分子，4-ketopinoresinol 即是其中之一。

三、第三部份為以動物試驗探討探討薏苡籽實、甲醇萃取物及其不同組成物與放射線併用之效果

近年來許多研究顯示中草藥對於腫瘤治療上具有輔助的功效，然而欲將中草藥運用於腫瘤治療必須有強而有力的理論基礎。目前在西醫上對腫瘤的治療主要有放射線治療、外科手術及化學治療。放射線治療的使用已達百年歷史，雖然具有不錯的效果但是仍然有些問題，包括：(一)放射線治療會造成組織的發炎反應⁽³²⁻³³⁾；(二)放射線治療可能與腫瘤細胞侵襲轉移有關⁽³⁴⁻³⁵⁾。目前許多研究已經顯示發炎反應的相關物質會增強腫瘤細胞侵襲轉移能力⁽⁴⁰⁾，我們近年來的研究也發現發炎反應的相關物質與血管新生及腫瘤細胞抗凋亡能力有關

(36, 37)；針對這些問題，近年來已經有併用抑制發炎反應藥物⁽³⁸⁾（如 NS398：COX-2 抑制劑）或抗腫瘤血管新生藥物⁽³⁹⁾（endostatin）於放射線治療的研究報告而且顯示成效良好。基於上述理由以及我們所發現 AHM 的作用點在血管新生、轉移、發炎反應等基因。我們的初步研究結果顯示薏苡與放射線併用有良好的效果，因此我們分別以薏苡攝食取代（混於飼料）、管餵口服（萃取物）、腹腔注射（組成分子，4-ketopinoresinol）探討它們與放射線併用的效果。運用人類腫瘤細胞 HeLa 於免疫不全的裸鼠測試薏苡、萃取物、組成分子在體內形成腫瘤與放射線併用效果測試。分別以薏苡籽實 20%攝食取代、50mg/kg/day 萃取物管餵、1mg/kg/day 4-ketopinoresinol 腹腔注射，皆於腫瘤植入裸鼠右腿形成 0.2cm 時開始給予並進行放射線治療。放射線治療以 5Gy/day 處理 5 天的方式進行，在完全不處理組之腫瘤直徑達 1.5 公分時停止實驗。每組共 5 隻老鼠，重複兩次，老鼠犧牲後將腫瘤分離自鼠體分離量測重量。結果顯示薏苡籽實、萃取物、組成分子 4-ketopinoresinol 三種形式中以薏苡籽實 20%攝食取代最能增加腫瘤放射線治療效果，三者相較於完全不處理組之腫瘤重量分別為 47±6%、54±7%、60±8%，單純放射線治療組則為 62±8%（Fig.7A）。我們進一步運用最被國際級科學期刊接受之放射線治療動物模式 Lewis lung carcinoma (LLC-LM) /C57BL/6mice (Cancer Res. 2001)，此模式為 Joint Center for Radiation Therapy, Harvard Medical School 所提出，其優點為屬種為免疫完整且原位腫瘤具有治療效果，可觀察肺轉移。運用 (LLC-LM) /C57BL/6 與放射線併用效果測試。分別以薏苡籽實 10%、20%、30%攝食取代（混於飼料），於腫瘤植入裸鼠右腿第 8 天時開始給予並進行放射線治療。放射線治療以 10Gy/day 處理 5 天的方式進行。在完全不處理組之腫瘤直徑達 1.5 公分時停止實驗。每組共 5 隻老鼠，重複兩次，老鼠犧牲後將腫瘤分離自鼠體分離量測重量。結果顯示薏苡籽實 20%及 30%攝食取代最能增加腫瘤放射線治療效果，兩者與放射線治療併用的腫瘤重量分別為 0.41±0.1g、0.37±0.07g，單純放射線治療組則為 0.6±0.1g（Fig.7B），在此試驗中我們發現單純給予薏苡籽實攝食取代對腫瘤生長是無法控制的（Fig.7C），值得一提的是薏苡籽實攝食取代對老鼠體重具有維持的作用。因此我們重複上述之試驗，在實驗過程中記錄老鼠體重變化，結果顯示薏苡籽實攝食取代確實能維持放射線治療引發的體重降低（Fig.7D），最新的研究顯示腫瘤本身或治療所引起的體內 IL-6 濃度升高導致人體在病程中體重下降惡質化（Cachexia）的原因之一，因

此我們測試實驗過程中老鼠血清中 IL-6 的變化。結果顯示薏苡籽實攝食取代確實能降低放射線治療過程誘發的老鼠血清中 IL-6 上升 (Fig.7F)。此外在本組試驗中我們定義實驗停止點為腫瘤直徑達 1.5 公分以及自然死亡。我們觀察到事實上最後自然死亡的老鼠都有肺部轉移的情況產生 (Fig.7G)，因此雖然薏苡具有增強放射線治療效果與維持體重的作用，但我們必須承認在腫瘤轉移方面仍需更多的研究投入。

肆、討論

中醫藥是華人數千年來累積的智慧結晶，也被公認為台灣在生物科技發展方面的強項及最有希望及潛力的領域之一，政府推動中草藥的發展的層級越來越高在衛生署及經濟部都有專職推動中草藥的發展的部門，顯示如何加速國內中草藥具備國際性競爭力成為國內產官學界積極努力的課題。中醫藥基因體醫學的研究計畫主要期望藉由瞭解中醫與基因表現之關係及中藥對基因表現效應，以建立中醫理論之實證基礎，加速中醫藥之現代化並作為同病異治、異病同治之依據，促進中西醫學相輔成。

薏苡適於國內種植，是水田轉作的有利作物。自古以來薏苡即為藥食兼用的食物一直是供作中藥材和食補的材料。傳統漢藥書中記載薏仁在人體內具有除濕利尿、健脾益胃、養顏美容、消炎抗腫瘤、墮胎等功效⁽¹⁻⁵⁾。且對於現代人容易罹患之癌症、新血管疾病、糖尿病、氣喘過敏及腸胃不適等病症具有功效，是值得深入探討研究的中草藥，也是活用幾千年來中醫食療知識，配合現代科技建立及開發具東方特色有療效之食材。近年來研究顯示薏苡籽實萃取物、薏仁、薏仁油及薏仁加工製品均具有抗腫瘤的功效。目前薏苡中已被鑑定具有抗腫瘤發展潛力的成分共計有 17 種，包括：8 種酚類 (vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, w-hydroxypropioiguaiacone, trans-p-coumaric acid, syringic acid, ferulic acid, vanillic acid)、2 種類黃酮 (naringenin, tricin)、3 種脂肪酸 (oleic acid, linoleic acid, linolenic acid) 以及 beta-sitosterol, trypsin inhibitor, alpha-monolinolein, coixenolide⁽⁶⁻¹⁰⁾。在抗氧化作用方面，1984 年戶田等，以亞麻油酸過氧化試驗研究 107 種中藥之抗氧化性，發現薏仁抑制氧化百分率達 70%。也有研究指出薏苡甲醇萃取物具有很好的抗氧化能力，其抗氧化效果 TBARS 與 POV 皆明顯優於維生素 E (劉，2000)。此外，薏仁的水與丙二醇萃取物也具有較高的超氧陰離子自由基的清除效果 (陳，1998)；糙薏仁去除正己烷之甲醇萃取物在 200ppm 的過氧化抑制率為 67%，進一步進行抗氧化機制的研究發現，其具有還原力和清除 DPPH 自由基的能力及金屬螯合能力。在抗發炎作用方面，在 RAW264.7 細胞模式下，四種薏苡籽實萃取物 (薏苡殼甲醇萃取物 AHM、薏苡種皮甲醇萃取物 ATM、薏苡麩皮甲醇萃取物 ABM、薏苡種皮的高溫水萃取物 ATHW) 能明顯同時抑制經 LPS 誘發產生之 COX-2 和 iNOS 蛋白質的表現量 (施，2001)，且薏苡殼、種皮及麩皮的甲醇萃取物也發現具有抑制巨噬細胞經刺激後 NO 的產生 (郭，2001)。目前，

薏苡分離純化出消炎成分有 Syringaldehyde、Sinapaldehyde、Coniferyl alcohol、trans-p-Coumaric acid、Syringic acid、Ferulic acid、Narigenin、Stigmasterol、 β -Sitosterol、coixol 等，藉由抑制 COX-2 活性、抑制 Lipoxygenase 活性、抑制巨噬細胞產生 NO 以及 superoxide、抑制 myeloperoxidase 活性、抑制 Neutrophil 遷移到發炎組織等達到消炎的效果。在調節血糖血脂方面（杜，1999）的實驗發現，體外試驗中糙薏仁甲醇抽出物於劑量 40ug/mL 下，對人體膽固醇脂轉移蛋白（cholesteryl ester transfer protein, CETP）活性抑制率為 20-30%（IC₅₀ 約 65-100 ug/mL）。在動物實驗中也證明糙薏仁甲醇抽出物能降低動物血漿中 CETP、三酸甘油脂濃度以及肝臟膽固醇含量，另外亦可升高血漿 HDL，具有降血脂作用⁽³⁾。Takahashi 等（1986）年將薏仁分離出 Coixan A、B、C 具有調節血糖的活性。此外，Romas 等在 1992 年發現薏仁具有緩和血糖上升的能力。在改善腸道菌叢作用方面：以糙薏仁取代部分動物飼料的實驗發現，20%及 40%糙薏仁取代組可以明顯增加 Sprague-Dawley 大鼠盲腸中短鏈脂肪酸總量，其中 40%取代組可以顯著增加醋酸、丙酸和丁酸含量，具有調節腸道生理的效果，同時也具有顯著增加腸內乳酸菌並減少大腸桿菌的作用（Chiang et al., 2000）。在調節賀爾蒙調節方面，薏苡成分 coixol 在動物實驗上發現，具有促進腦下腺前葉分泌 LH 及 FSH 的作用。此外，在薏苡粗萃物上也發現具有同樣效果（夏，2001）。動物實驗上也發現具有促進排卵的作用（Kondo et al., 1988）。癌症是國人最主要的死亡原因，由於研究顯示罹患率會與日俱增，因此由醫療保健達到對癌症的預防與治療是十分重要的問題。因此如何運用薏苡來增強癌症治療效果或減少治療產生之副作用，成為臨床與基礎研究上值得探討的問題。

伍、結論與建議

綜合我們的基礎與動物試驗結果，我們針對本計畫成果提出之結論為：薏苡組成物中至少含有例如 4-ketopinoresinol 的分子，能藉由抑制包括 Akt、ERK、p38、JNK 等訊息傳導分子的磷酸化，也會抑制轉錄分子 NF- κ B 進入細胞核內與結合能力而影響 IL-6、Cox-2、MMP-9、VEGF 等基因而產生對腫瘤細胞侵襲、腫瘤細胞之促血管新生能力、產生發炎反應分子等生物效應。我們認為本身即具有治療效果但卻有發炎副作用的放射線治療為臨床應用的最佳切入點 (Fig.8)。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-RD-046 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. 江文章，徐明麗，蘇瑞弒，龐飛。2000。薏仁加工食品輔助抑制腫瘤功效之評估。醫護科技學刊。1(2)：113-121。
2. 林方宜。1999。薏苡種皮油溶性成分分離純化。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
3. 杜姿瑩。1999。糙薏仁降血脂作用之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
4. 徐明麗，林璧鳳，江文章。1998。糙仁對致敏鼠過敏反應之影響。中華民國營學合雜誌。23(2)：161-170。
5. 黃士禮，陳瑤峰，江文章。1994。省產薏苡籽實中胺基酸脂肪酸和一般組成分分析。食品科學 21：67-74。
6. 黃士禮。1996。薏苡籽實貯藏條件抗突變效應及抗腫瘤效果之研究。博士論文。
7. 黃士禮，江文章。1999。薏苡籽實各部為之化學組成分及其丙酮萃取物黃士禮之抗突變效應。食品科學 26：121-130。
8. 簡雅琳。1998。薏苡殼油溶性萃取物的抗致突變性成分之分離與純化。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
9. 劉桂萍。2000。薏苡殼甲醇萃取物清除自由基成分之分離純化。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
10. Ukita, T.; Tanimura, A. Studies on the antitumor components in the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf. I. Isolation and antitumor activity of coixenolide. *Chem. Pharm. Bull.* 1961, 9, 43-46.
11. Tanimura, A. Studies on the antitumor components in the seeds of *Coix lachryma-jobi* L var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf. II. The structure of coixenolide. *Chem. Pharm. Bull.* 1961, 9, 47-53.
12. Nagao, T.; Otsuka, H.; Kohda, H.; Sato, T.; Yamasaki, K. Benzoxazinone from *Coix lachryma-jobi* L var. *ma-yuen*. *Phytochemistry* 1985, 24, 2959-2962.
13. Park, Y.; Suzuki, H.; Lee, Y. S.; Hayakawa, S.; Wada, S. Effect of coix on plasma, liver, and fecal lipid components in the rat fed on lard or soybean oil cholesterol diet. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 1988, 39, 11-17.

14. Hidaka, Y.; Kaneda, T.; Amino, N.; Miyai, K. Chinese medicine, coix seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells. *Biotherapy* 1992, 5, 201-203.
15. Check, J. B.; K'Ombut, F. O. The effect on fibrinolytic system of blood plasma of Wistar rats after feeding them with Coix mixed diet. *E. Afr. Med. J.* 1995, 72, 51-55.
16. Kondo, Y.; Nakajima, K.; Nozoe, S.; Suzuki, S. Isolation of ovulatory-active substances from crops of Job's tears (*Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* stapf.). *Chem. Pharm. Bull.* 1998, 36, 3147-3152.
17. Otsuka, H.; Hirai, Y.; Nagao, T.; Yamaski, K. Antiinflammatory activity of benzoxaninoids from roots of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*. *J. Nat. Prod.* 1988, 51, 74-79.
18. Tsai, C. E.; Yang, L. J.; Hsu, H. C. Ingestion of adlay may reduce liver fat accumulation in hamsters fed high fat diets. *Food Sci.* 1999, 26, 265-276.
19. Shyu, M. L.; Lin, B. F.; Chiang, W. Effect of dehulled adlay on allergic responses of sensitized mice. *Nutr. Sci. J.* 1998, 23, 161-170.
20. Huang, S. L.; Chiang, W. Composition of the different fractions of adlay seed and the demutagenic effect of their acetone extract. *Food Sci.* 1999, 26, 121-130.
21. Tu, Z.-Y. Studies on the hypolipidemic effect of dehulled adlay. M.S. Thesis, Graduate Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei, 1999.
22. Chiang, W.; Cheng, C. Y.; Chiang, M. T.; Chung, K. T. Effects of dehulled adlay on the culture count of some microbiota and their metabolism in the gastrointestinal tract of rats. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 829-832.
23. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991, 91, 14S-22S.
24. Jin-Yuan Shih, Shuenn-Chen Yang, Tse-Ming Hong, Ang Yuan, Jeremy J. W. Chen, Chong-Jen Yu, Yih-Leong Chang, Yung-Chie Lee, Konan Peck, Cheng-Wen Wu, Pan-Chyr Yang. Collapsin Response Mediator Protein-1 and the Invasion and Metastasis of Cancer Cells. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Sep 19; 93(18): 1392-400.
25. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, et al. The

- transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999; 283: 83-7.
26. Hong TM, Yang PC, Peck K, Chen JJ, Yang SC, Chen YC, et al. Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am J Repir Cell Mol Biol* 2000; 23:355-63.
 27. Chen JJ, Peck K, Hong TM, Yang SC, Sher YP, Shih JY, et al. Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model. *Cancer Res* 2001; 61: 5223-30.
 28. Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, Elkahloun AG, Bittner ML, Meltzer PS, Trent JM, Dalton WS, Chin KV. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res.* 2000 Aug 1; 60(15): 4161-6.
 29. Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltnane JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M, Wahl LM, Harris ED, Mikovits JA, Monks AP, Hollingshead MG, Sausville EA, Staudt LM. Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol.* 2001; 2(10): 0041.
 30. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 2000 Mar; 24(3): 227-35.
 31. Pyo H, Choy H, Amorino GP, Kim JS, Cao Q, Hercules SK, DuBois RN. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res.* 2001 (10): 2998-3005.
 32. Quarmby S, Kumar P, Kumar S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int J Cancer.* 1999; 82(3): 385-95.
 33. Camphausen K, Moses MA, Beecken WD, Khan MK, Folkman J, O'Reilly MS. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res.* 2001 Mar 1; 61(5): 2207-11.

34. Folkman J, Camphausen K. What does radiotherapy do to endothelial cells? *Science*. 2001; 293(5528): 227-8.
35. Huang SP, Wu MS, Wang HP, Yang CS, Kuo ML, Lin JT. Correlation between serum levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 (11): 1165-9.
36. Pecoits-Filho R, Araujo MR, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romao JE Jr, Marcondes M, De Oliveira AH, Noronha IL. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 (8): 1480-6.
37. Raju U, Nakata E, Yang P, Newman RA, Ang KK, Milas L. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 54(3): 886-94.
38. Landuyt W, Ahmed B, Nuyts S, Theys J, Op de Beeck M, Rijnders A, Anne J, van Oosterom A, van den Bogaert W, Lambin P. In vivo antitumor effect of vascular targeting combined with either ionizing radiation or anti-angiogenesis treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 49(2): 443-50.

柒、圖

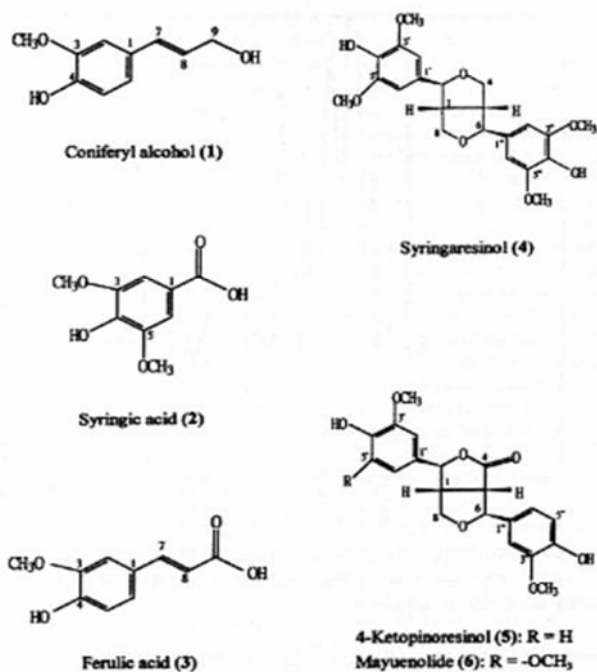


Fig.1 分離純化自 AHM 中的主要成分包含 coniferyl alcohol、syringic acid、ferulic acid、syringaresinol、4-ketopinoresinol 及 mayuenolide 其結構式如下圖，已由郭悅雄教授發表於 J Agric Food Chem. 2002。

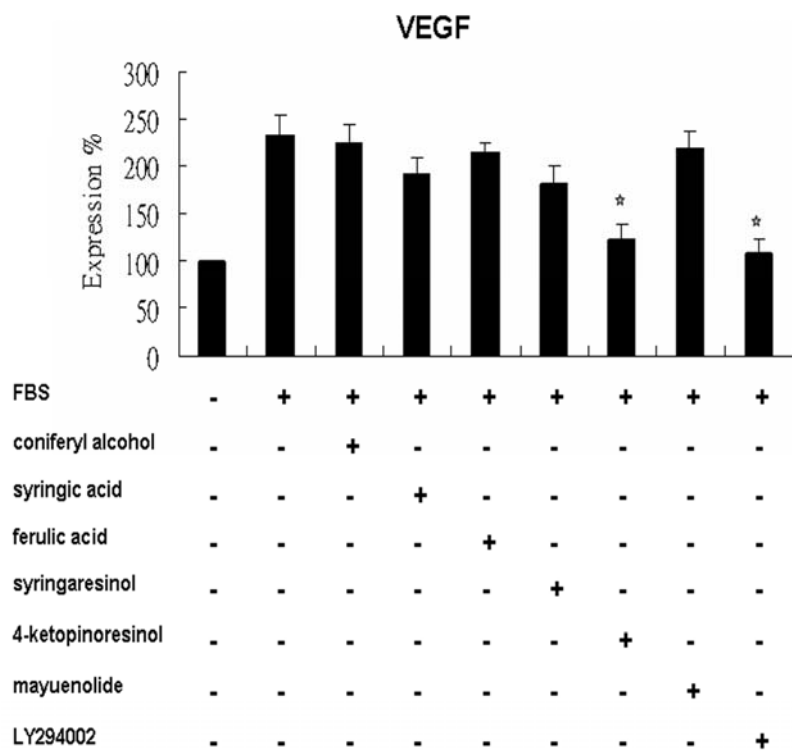


Fig.2A

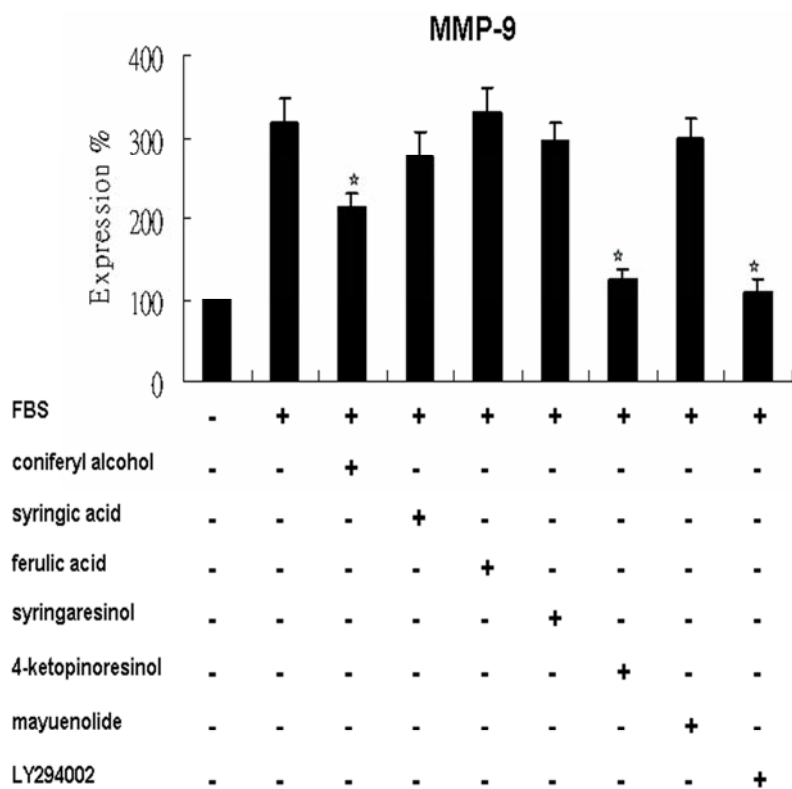


Fig.2B

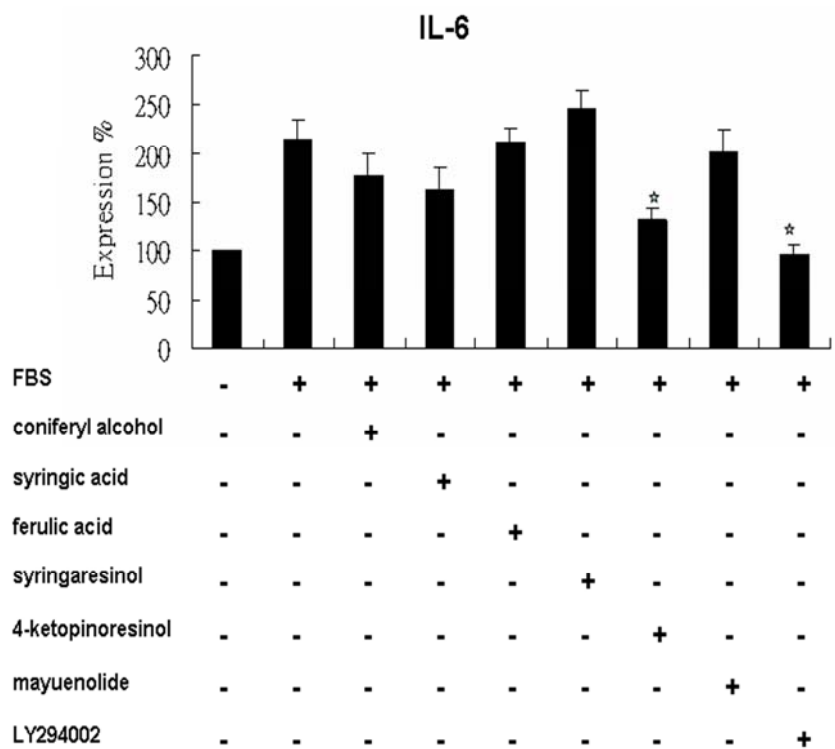


Fig.2C

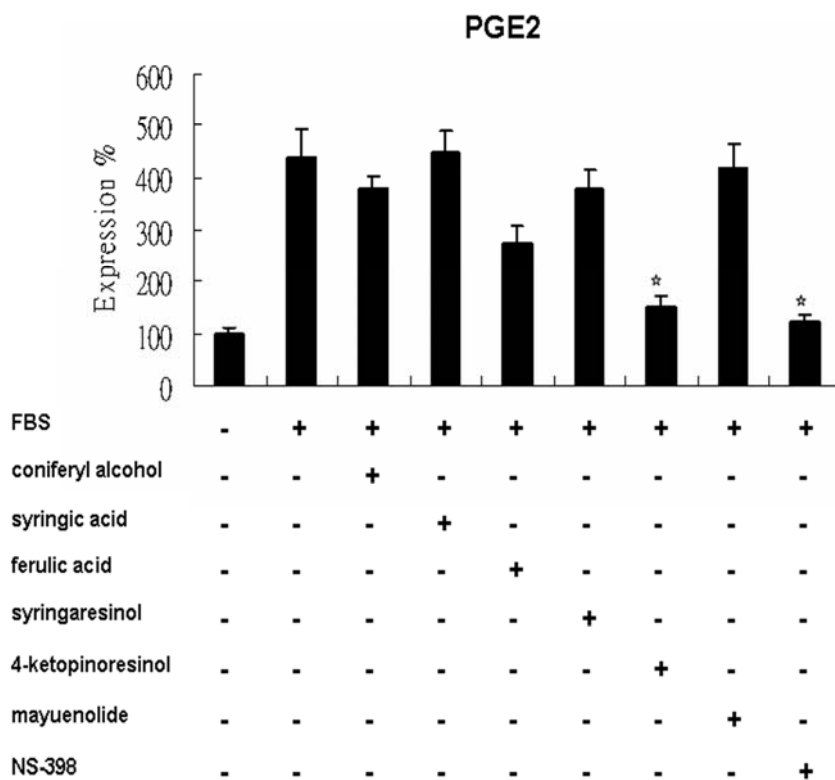


Fig.2D

Fig.2 AHM 中的主要成分中的 4-ketopinoresinol 對於血清誘發子宮頸癌細胞株 HeLa 產生 VEGF (Fig.2A)、MMP-9 (Fig.2B)、IL-6 (Fig.2C)、PGE-2 (Fig.2D)均有很好的抑制效果。 2×10^5 /mL 的 HeLa cell 培養於 6 well plate. 無血清存在情況培養 24 小時後，加入 20%血清及 4-ketopinoresinol 等條件。24 小時後收及細胞培養上清液，以 EIA 方式偵測 VEGF (Fig.2A)、MMP-9 (Fig.2B)、IL-6 (Fig.2C)、PGE-2 (Fig.2D) 等的濃度變化。圖示結果為三次獨立測試的平均值 \pm S.D.以相對於完全不處理組的百分比表示，並以 t-test 檢測不同化合物相較於血清誘發組的統計差異，“*”表示 $P < 0.05$ 。

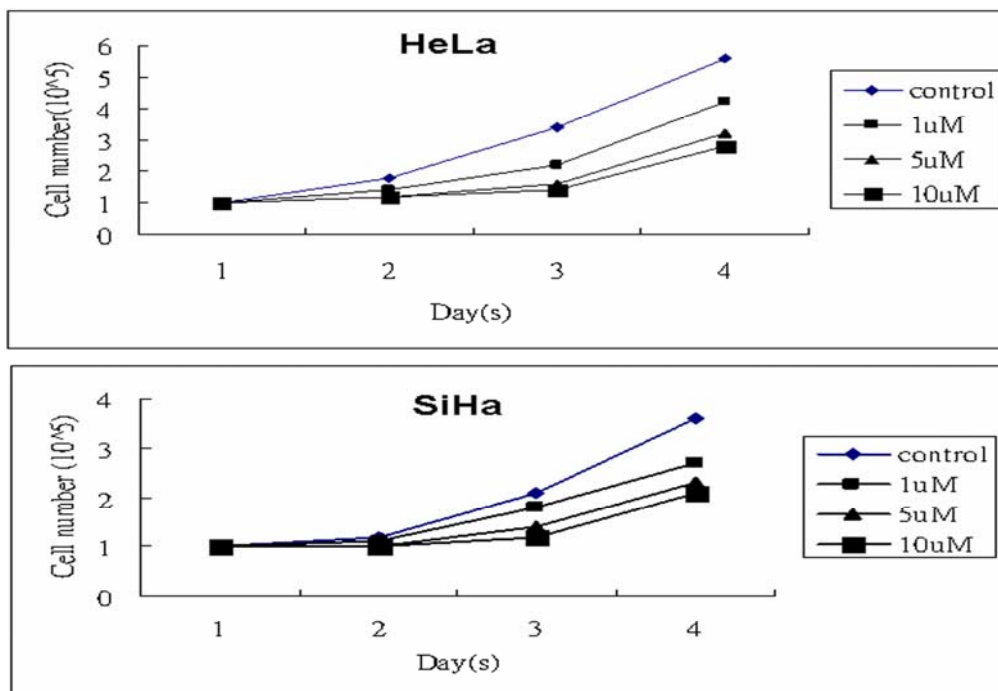


Fig.3A

Fig.3 4-ketopinoresinol 的細胞毒性測試。無細胞毒性劑量進行細胞生長曲線測試 (Fig.3A)。利用流氏細胞儀偵測細胞週期變化 (Fig.3B)。 2×10^4 /mL 的 HeLa cell 即培養於 96 well plate. 加入不同濃度 4-ketopinoresinol。不同時間點後收集細胞，以記數方式偵測細胞生長曲線的濃度變化 (Fig.3A)。另一方面加入不同濃度 4-ketopinoresinol 的細胞在 48 小時進行利用流氏細胞儀偵測細胞週期變化。

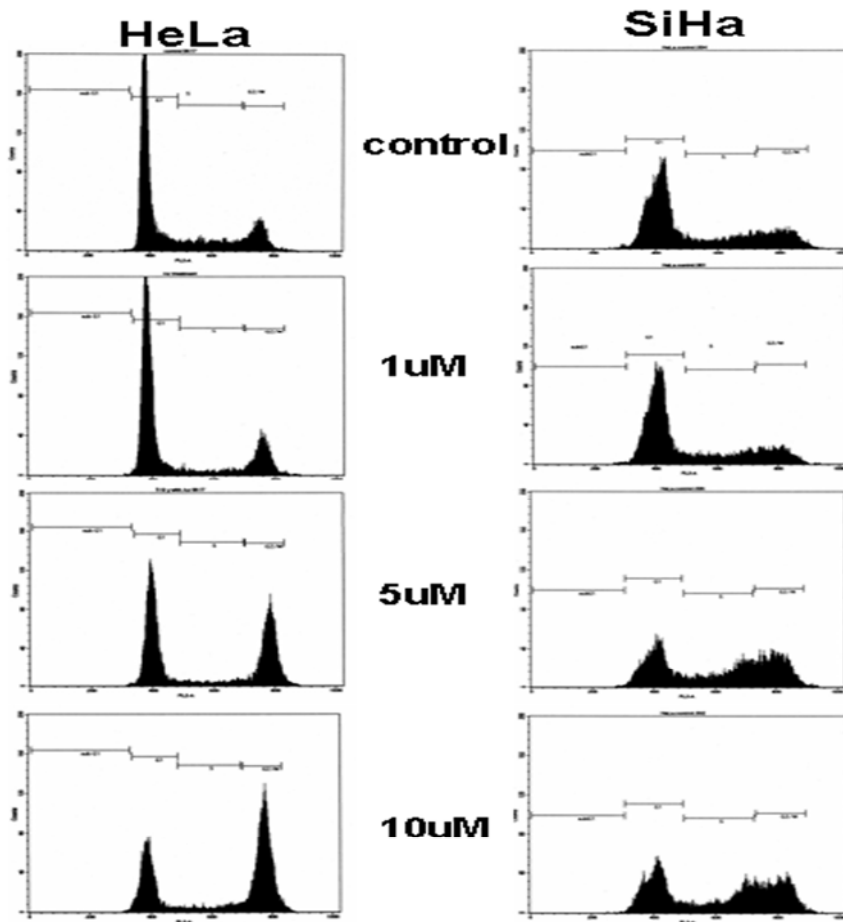


Fig.3B

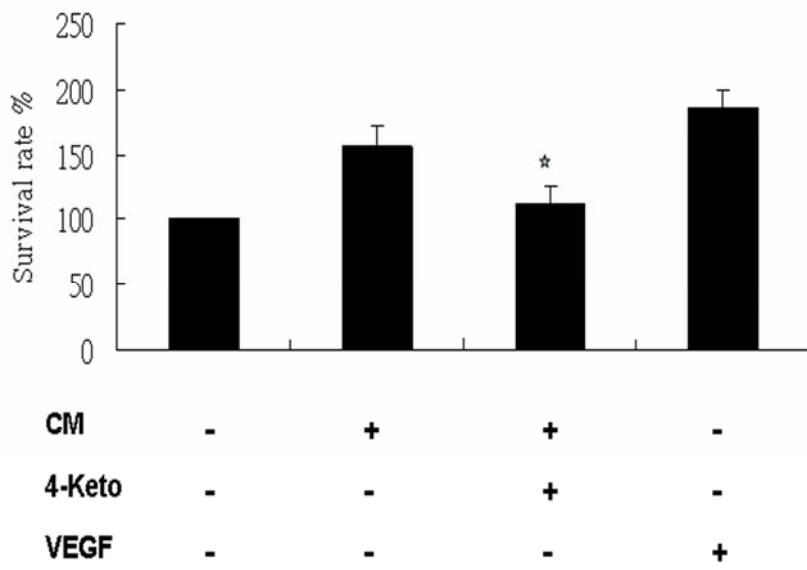


Fig.4A

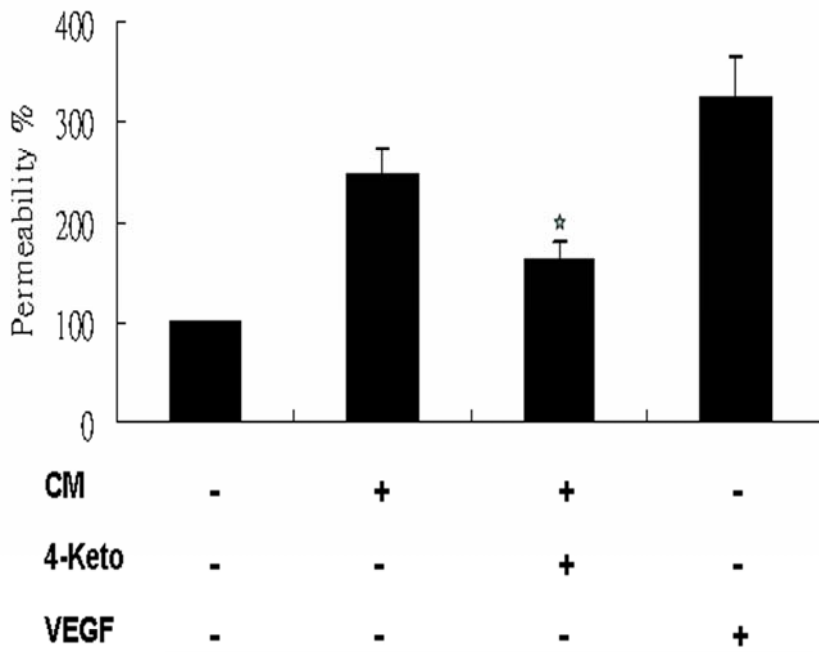


Fig.4B

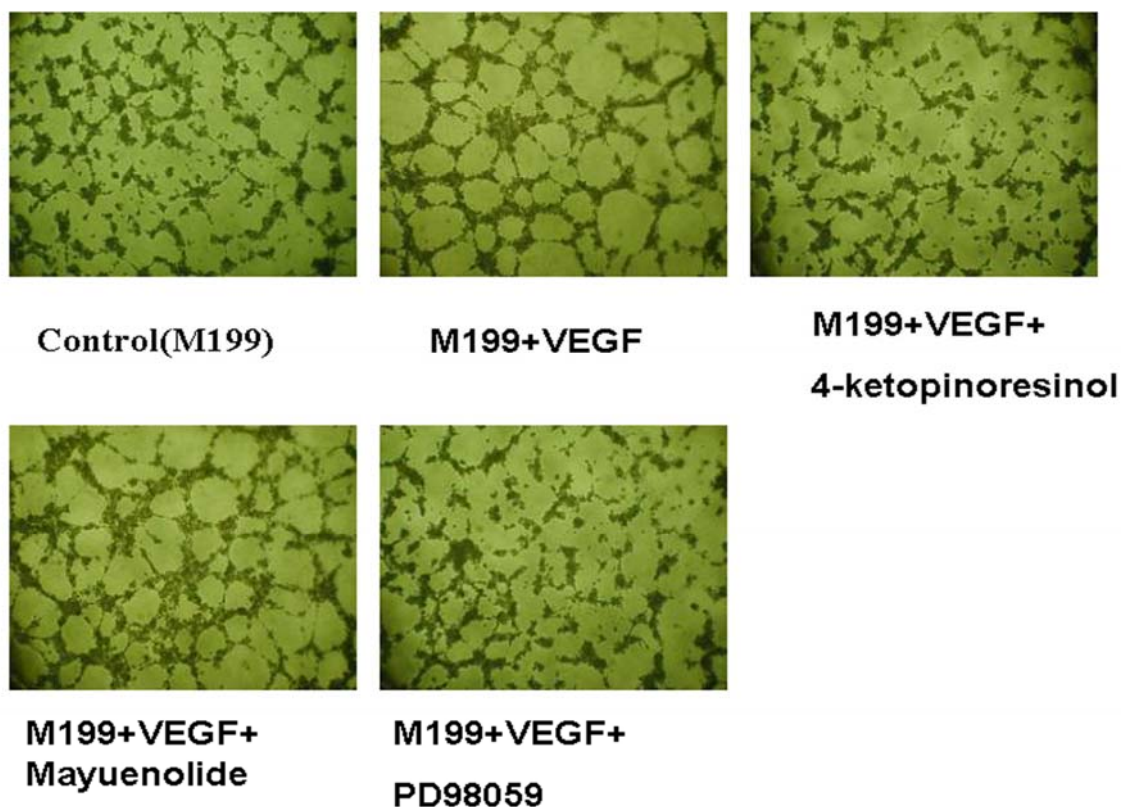


Fig.4C

Fig.4 4-ketopinoresinol 對腫瘤細胞條件培養基對血管內皮細胞的生長能力與通透性能力測試。血管內皮細胞以腫瘤細胞條件培養基進行培養，並加入 4-ketopinoresinol，VEGF 等測試 (Fig.4A)。通透性能力測試則運用檢測 HRP 分子由 Boyden chamber 上層擴散到下層的情況 (Fig.4B) 圖示結果為三次獨立測試的平均值±S.D.以相對於腫瘤細胞條件培養基組的百分比表示，並以 t-test 檢測不同化合物相較於腫瘤細胞基處培養基組的統計差異，“*”表示 $P < 0.05$ 。4-ketopinoresinol 對血管內皮細胞本身的影響方面，實驗結果顯示 4-ketopinoresinol 會抑制由 VEGF 誘發血管內皮細胞在 Matrigel 上的管狀形成活化作用 (tube formation) (Fig.4C)，有趣的是另一分子 Mayuenolide，在結構上與 4-ketopinoresinol 僅差一個甲基，卻無抑制作用。

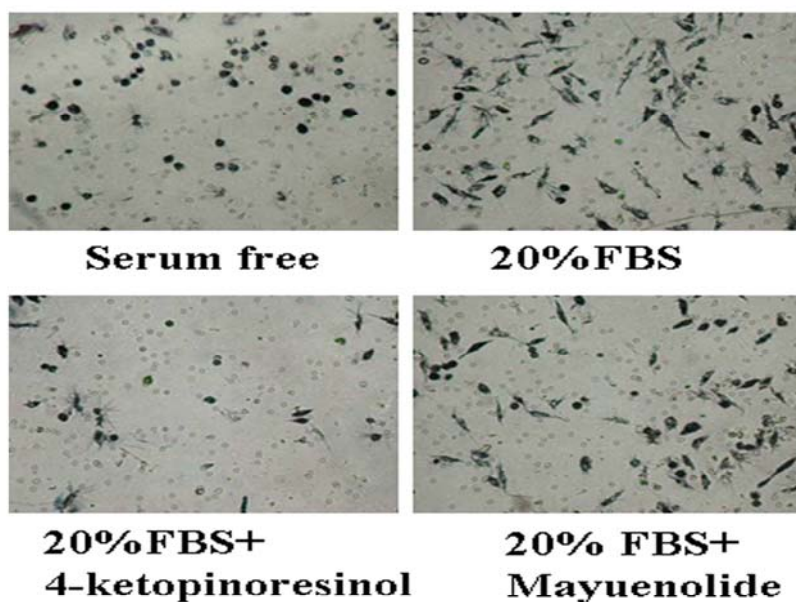


Fig.5A

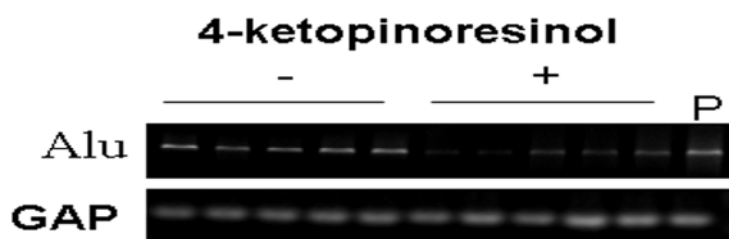


Fig.5B

Fig.5 4-ketopinoresinol 對於腫瘤細胞 SiHa 由血清誘發之細胞侵襲轉移能力具有抑制作用。利用孔徑為 8 μ m 的 Boyden chamber 測試 4-ketopinoresinol 對由血清誘發之細胞侵襲轉移的影響 (Fig.5A)。應用 Kim 發表於 1998 年 Cell 期刊的體內轉移半定量雞胚模式。其原理為十天大的雞胚會有上尿囊膜與下尿囊膜的區隔，當腫瘤細胞被置於上尿囊膜時有可能經由侵襲能力進入血管 (Intravasation) 轉移至下尿囊膜。偵測時將下尿囊膜組織取出萃取 DNA，以 PCR 方式測試人類細胞 DNA 特有之重複序列 Alu。HeLa 細胞前處理 4-ketopinoresinol 50ng/mL 4 小時後，去除 4-ketopinoresinol，再置於上尿囊膜，48 小時後萃取下尿囊膜組織 DNA 並以 PCR 方式測試 Alu 存在程度 (Fig.5B)。

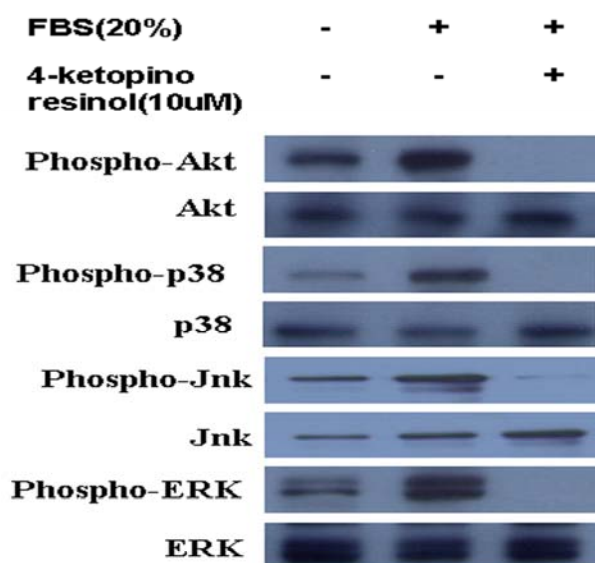


Fig.6A

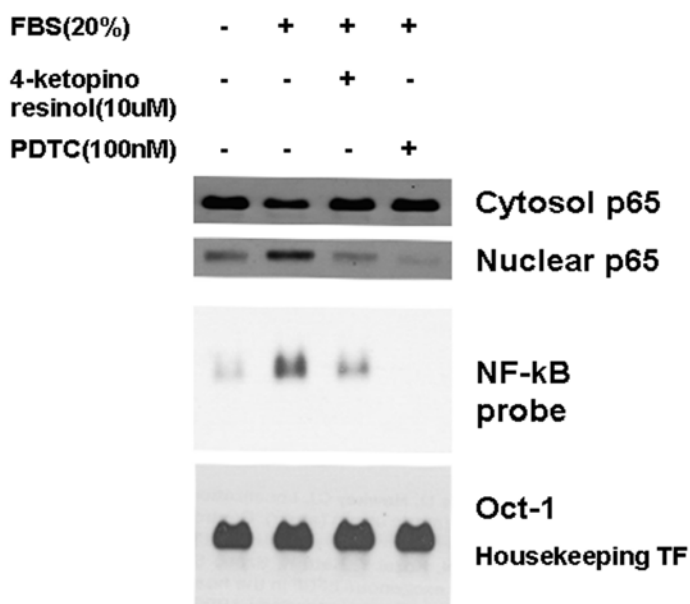


Fig.6B

Fig.6 4-ketopinoresinol 會抑制血清誘發之細胞內訊息傳遞分子磷酸化活化。

以西方墨點法偵測血清誘發 Akt、p38、Jnk、Erk 訊息傳遞分子磷酸化情況發現細胞培養處理及蛋白質磷酸化測試(Fig.6A)。4-ketopinoresinol 對血清誘發之 NF-kB 活性的影響，以西方墨點法偵測 4-ketopinoresinol 是否會抑制血清誘發 NF-kB 由細胞質進入細胞核，以 EMSA 分析 4-ketopinoresinol 對 NF-kB 與核酸結合的程度 (Fig.6B)。

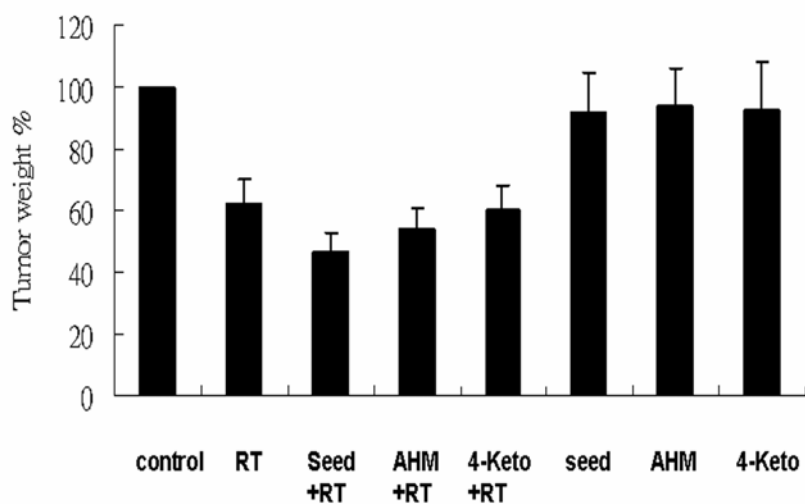


Fig.7A

Adlay reduced mouse body weight loss during radiotherapy

	Body weight(g)	Tumor weight(g)	Mean B-T
Control	17.9±2	4.8±0.4	13.1
RT	17.1±1.7	0.6±0.1	16.5
Adlay 10%	18.9±2.2	4.1±0.6	15.8
Adlay 20%	19.2±1.9	3.8±0.5	15.4
Adlay 30%	19.2±0.6	3.7±0.3	15.5
Adlay 10%+RT	19.4±1.2	0.52±0.1	18.88
Adlay 20%+RT	20.1±2	0.41±0.1	19.69
Adlay 30%+RT	20.3±1.3	0.37±0.07	19.93
RT+ATO	18.3±1.6	0.52±0.2	17.78

Fig.7B

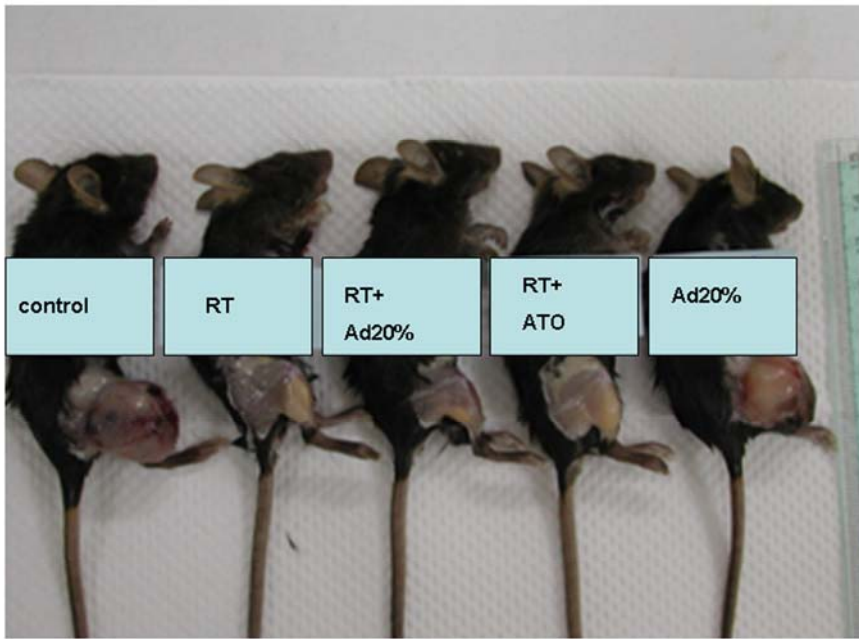


Fig.7C

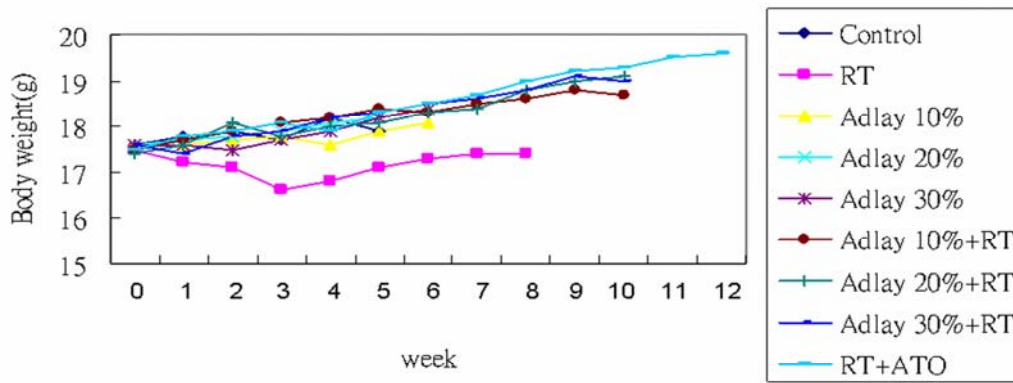


Fig.7D

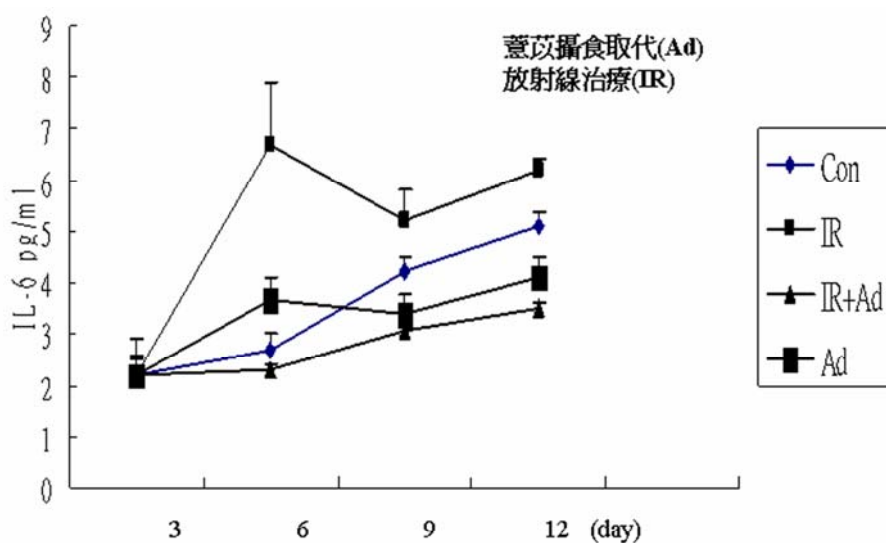


Fig.7E

Pathology of mice death

	tumor>1.5cm	lung meta
Control	35±3 day	
RT		56±4 day
Adlay 10%	39±4 day	
Adlay 20%	42±5 day	
Adlay 30%	43±3 day	
Adlay 10%+RT		63±5 day
Adlay 20%+RT		67±4 day
Adlay 30%+RT		70±3 day
RT+ATO		84±6 day

Fig.7F

Fig.7 薏苡攝食取代與放射線併用的效果。運用人類腫瘤細胞 HeLa 於免疫不全的裸鼠測試薏苡、萃取物、組成分子在體內形成腫瘤與放射線併用效果測試。分別以薏苡籽實 20%攝食取代、50mg/kg/day 萃取物管餵、1mg/kg/day 4-ketopinoresinol 腹腔注射，皆於腫瘤植入裸鼠右腿形成 0.2cm 時開始給予並進行放射線治療。放射線治療以 5Gy/day 處理 5 天的方式進行，在完全不處理組之腫瘤直徑達 1.5 公分時停止實驗。每組共 5 隻老鼠，重複兩次，老鼠犧牲後將腫瘤分離自鼠體分離量測重量 (Fig.7A)。運用 (LLC-LM) /C57BL/6 與放射線併用效果測試。分別以薏苡籽實 10%、20%、30%攝食取代 (混於飼料)，於腫瘤植入裸鼠右腿第 8 天時開始給予並進行放射線治療。放射線治療以 10Gy/day 處理 5 天的方式進行。在完全不處理組之腫瘤直徑達 1.5 公分時停止實驗。每組共 5 隻老鼠，重複兩次，老鼠犧牲後將腫瘤分離自鼠體分離量測重量 (Fig.7B) 圖示結果為二次獨立測試 (N=10) 的平均值±S.D.並以 t-test 檢測，然而各組間差異並無統計上的意義。在此試驗中我們發現單純給予薏苡籽實攝食取代對腫瘤生長是無法控制的 (Fig.7C)，值得一提的是薏苡籽實攝食取代對老鼠體重具有維持的作用。因此我們重複上述之試驗，在實驗過程中記錄老鼠體重變化，結果顯示薏苡籽實攝食取代確實能維持放射線治療引發的體重降低 (Fig.7D)。最新的研究顯示腫瘤本身或治療所引起的體內 IL-6 濃度升高導致人體在病程中體重下降惡質化 (Cachexia) 的原因之一，因此我們測試實驗過程中老鼠血清中 IL-6 的變化。結果顯示薏苡籽實攝食取代確實能降低放射線治療過程誘發的老鼠血清中 IL-6 上升 (Fig.7E)。此外，在本組試驗中我們定義實驗停止點為腫瘤直徑達 1.5 公分以及自然死亡。我們觀察到事實上最後自然死亡的老鼠都有肺部轉移的情況產生 (Fig.7F)，圖示結果為二次獨立測試 (N=10) 的平均值±S.D.並以 t-test 檢測，存活率的部份就數量級而言，放射線治療組明顯較未處理放射線治療組存活率高，然而同為放射線治療組或併用組各組間差異並無統計上的意義。

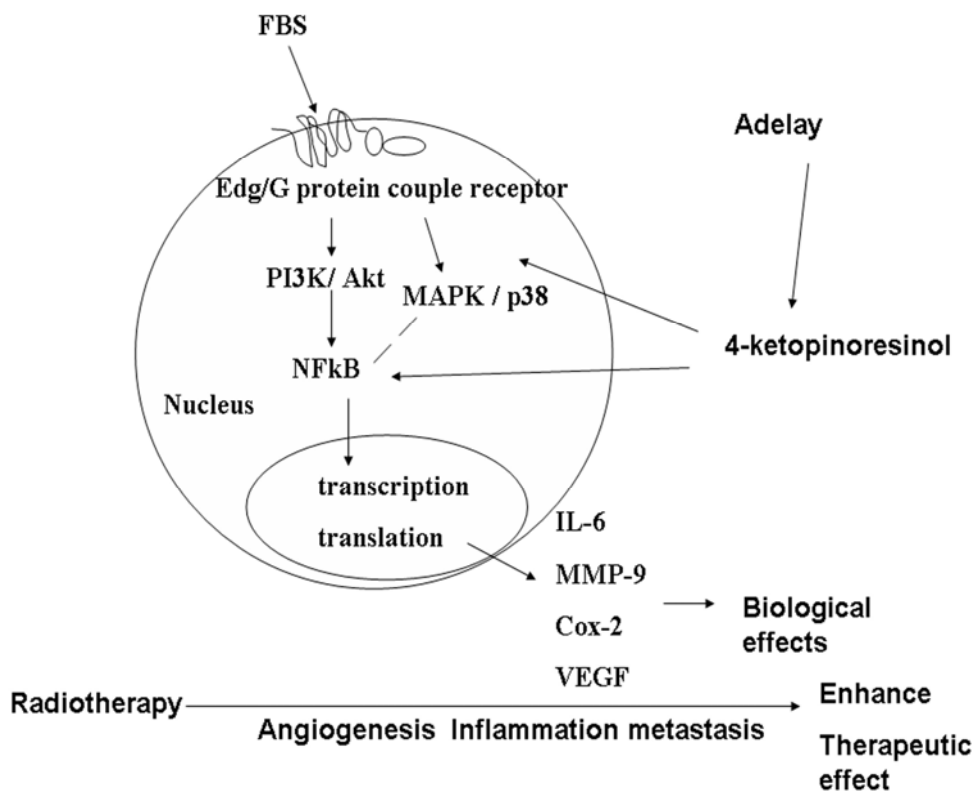


Fig.8 薏苡組成物中至少含有例如 4-ketopinoresinol 的分子，能藉由抑制包括 Akt、ERK、p38、JNK 等訊息傳導分子的磷酸化，也會抑制轉錄分子 NF-κB 進入細胞核內與結合能力而影響 IL-6、Cox-2、MMP-9、VEGF 等基因而產生對腫瘤細胞侵襲、腫瘤細胞之促血管新生能力、產生發炎反應分子等生物效應。