

編號：CCMP93-CT-107

補中益氣湯抑制多種惡性細胞腫瘤生長機轉 的體外細胞與肺氣虛老鼠模型之先驅研究

沈建忠

長庚大學中醫系

摘 要

本試驗主要目的為，補中益氣湯 BZYQT 抗腫瘤細胞株在實驗室的篩檢；建立氣虛動物模型；肺癌腫瘤細胞在氣虛動物模型的實驗；補中益氣湯對肺癌腫瘤的動物療效試驗。本計劃發現補中益氣湯可以抑制鼻咽癌、腎細胞癌及肺癌細胞株的生長。BALB/C 小鼠游泳五日後接種肺癌細胞株於後腿肌肉。接種十日後可觀察到小鼠接種處開始有 5mm 腫塊出現，再隔十日腫塊加速生長，約 50 天後小鼠即陸續死亡，腫瘤會轉移至肺臟、心臟、肝臟和腦。研究發現補中益氣湯可以讓氣虛小鼠肺癌生長減緩、延長存活期。將來可利用本計劃之結果再進行補中益氣湯預防肺癌及治療鼻咽癌、腎細胞癌和其他腫瘤生長的實驗。

關鍵詞：補中益氣湯、氣虛動物模型、肺癌

Number : CCMP93-CT-107

**BU ZHONG YI QI TANG (BZYQT)
inhibits some tumors growth and pilot
study to assess the mechanism of BZYQT
in vitro cell lines and Qi vacuity mice model**

Jiann-Jong Shen

School of Traditional Chinese Medicine, Chang Gung University

ABSTRACT

The objectives of this project are: to screen for anticancer activity of BZYQT on established cancer cell lines, to establish Qi vacuity animal model, to develop a lung cancer model of Qi vacuity model, and to treat the Qi vacuity mice with BZYQT. This study found that BZYQT were able to inhibit the growth of NPC, lung cancer and renal cell carcinoma cell lines in vitro. After swimming for five days BALB/c mice were inoculated with Line-1 lung cancer cells at the hind leg intramuscularly. Ten days after inoculation tumor mass could be observed at the injection site. Tumor grew rapidly in 10 days. Mice became moribund and dead at 50th days. Tumor metastases were observed in the lung, liver, heart and brain. We also found that tumor growth was delayed after treatment with BZYQT. The survival of the tumor-bearing mice were prolonged. In the future we may study the effect of BZYQT on the prevention of lung cancer as well as treatment for NPC, RCC and other malignancies.

Keywords: BZYQT, Qi vacuity animal model, lung cancer

壹、前言

最近我們發現 BZYQT 不僅可以提昇免疫力，刺激 T 細胞生長，更有抑制腫瘤生長的效果。藉此測驗，我們驗證中藥方劑 BZYQT，是否對其他上皮癌症的治療有效。隨著分子生物學技術的進展與應用，近年來一些研究表明，多種化療藥物可以誘導腫瘤細胞凋亡。我們已有能力於實驗室中，培養不同種類腫瘤細胞，來測量腫瘤的藥物敏感度。本研究應用 MTT 比色方法及流式細胞術 (FCM) 分析，探討臨床常用的藥物補中益氣湯對人鼻咽癌細胞、B16 細胞株、RCC 細胞株體外細胞增殖抑制和凋亡的誘導作用。研究 BZYQT 抗癌藥物是否對其他的癌細胞增殖有明顯抑制作用，並且是否可以誘導其細胞凋，也是本研究探討的重點。利用 MTT 法、RCM 檢測細胞增長抑制率及凋亡指數有助於化療方案的設計並指導臨床合理用藥。

近年研究發現，中醫虛証的發生與超氧化物 SOD 的活性下降有著密切的關係，而虛損及夾瘀的程度越重，SOD 的活性就越低。本實驗發現，造模組 SOD 活性明顯降低 ($P < 0.05$)，肝 LPO 和心肌 Li P 含量有增高趨勢，表明氣虛血瘀自由基代謝異常，主要表現為 SOD 活性降低，這與自由基衰老學說相符，本結果提示，氣虛血瘀証的出現預示著機體衰老亡結開始。近年來氣虛血瘀在衰老過程中的作用倍受重視，顏氏明確指出：氣虛血瘀是機體衰老的主要機中年是機體衰老過程的重要階段，故中年小鼠氣虛血瘀証動物模型的建立，對中年保健及抗衰老研究有重大的意義¹⁰。

免疫功能下降機體免疫功能的改變被視為衰老的前驅,研究表明,機體在衰老過程中,細胞免疫功能隨增齡而持續下降,老人細胞免疫能力改變是機體免疫功能減退的主要表現,中醫在抗衰老研究中認為,各種虛証的發生與衰老有關,細胞免疫功能的低下可能是虛証一個共性表現,對虛証有定性意義¹⁰。

C57BL/6 小鼠黑色素瘤 B16 細胞株在 ICR 小鼠腫瘤模型的建立的研究顯示,在白色 ICR 小鼠建立 B16 細胞株黑色素瘤模型,以便於接種、測量和觀察,既能降低研究成本,又能滿足不同實驗目的要求。方法:將 B16 細胞株黑色素瘤對數生長期細胞接種於 ICR 小鼠足墊、皮下、腹腔和尾靜脈等部位,建立移植瘤模型和肺部轉移瘤模型。觀察小鼠成瘤特點,並作病理和免疫組化染色檢查,分析接種細胞數與腫瘤生成的關係以及腫瘤生長對小鼠生活狀態和生存時間的影響。結論:B16 細胞株黑色素瘤在 ICR 小鼠具有成瘤率高、觀察和測量方便、費用低等優點,ICR 小鼠 B16 細胞株黑色素瘤模型是較為實用的腫瘤模型¹¹。

我們認為氣虛型小鼠 (BALB/c 小鼠) Qi vacuity (QV) 肺癌模型可能比較有希望符合第 4 期惡性腫瘤表現，腫瘤模型對研究腫瘤的病因、發病機制、抗癌藥物篩選及腫瘤防治等具有非常重要的意義¹¹⁻²¹。移植性腫瘤模型是目前抗癌藥物和藥效學研究中使用最多的一類動物腫瘤模型¹⁸。說明腫瘤動物模型在基礎研究上佔有一席之地，本研究需建立惡性轉移肺癌的動物模型，並作為評估中藥藥物的效果。

綜合上述，及我們初步的實驗數據及臨床經驗，我們將以科學化的肺腫瘤細胞株動物模型，進行中藥方劑 BZYQT 對國人重要疾病之療效、副作用等知比較評估，並找出指標性評估項目或條件，因此希望藉由基礎研究細胞株與動物試驗印證。希望能達成推動中草藥產品的補中益氣湯走上國際市場，並且符合國際規範要求，完成中醫證型模式動物 (注今年申請研究項目) 與人體療效評估 (注去年研究項目)，以及藥物試驗。

貳、材料與方法

一、實驗室部分 (非活體試驗)

補中益氣湯 (BZYQT) 抗腫瘤細胞株在實驗室的篩檢採用方法如下：

1. 利用 MTT 法檢測細胞增生情形：

針對人體腎細胞癌 (HH244)、鼻咽癌 (NPC-076) 以及小鼠肺癌 (Line-1) 等細胞株做篩檢，分別檢測 BZYQT 對其生長的影響。每一種細胞株先以 $3 \times 10^4 / 0.5\text{ml}$ 濃度加入 96 複孔盤，待於培養箱培養 24 小時後，再個別加入五個不同濃度的 BZYQT (20mg/ml、10mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml 和 0.625mg/ml) 反應 48 小時，之後，移除原先的細胞培養液，再加入 0.25mg/ml 的 MTT 於每個複孔中，放置 3.5 小時後再利用 ELISA 判讀機判讀。

2. ³H-Thymidine 檢測細胞增生情形：

用 96 孔盤檢測肺癌 Line-1 細胞株和黑色素細胞瘤 MS-1 細胞株。每一株以 $1 \times 10^4 / 0.1\text{ml}$ 加入三或四個複孔中，再加入 0.1ml 不同濃度的 BZYQT (5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml、0.625mg/ml、0.3125mg/ml 和 0.1563mg/ml) 共兩盤，分別在反應 48 小時及 72 小時後加入 H-Thymidine 再反應 6~8 小時，再用儀器判讀數值。

3. 利用細胞凋零檢驗試劑組偵測細胞凋零現象：

採用 NPC-076、MS-1 及 Line-1 等細胞株；每株細胞取 1×10^5 /ml 加入 6 孔盤中，一株細胞設計 3 個複孔。經過 24 小時，加入不同濃度 BZYQT（1mg/ml 及 10mg/ml）於其中。在反應 48 小時後，將所有細胞收集於流式細胞儀專用試管中，再以細胞凋零檢驗試劑組偵測細胞凋零現象，並用流式細胞儀判讀結果。

二、動物實驗部分（活體試驗）

1. 建立氣虛（QV）動物模型（BALB/c 小鼠）：

首先對尚未游泳的 BABL/C 小鼠採血，休息兩天後再以三種水溫（15°C、20°C 及 26°C）讓小鼠游泳直到小鼠無力快要喝到水為止，撈起小鼠，計算游泳時間與觀察小鼠結束游泳後體重；共觀察五日。第五日時，在游泳完後再採血，之後再 ELISA 測量小鼠血清游泳前後 IgG 的變化。

2. 建立肺癌（lung adenocarcinoma）在氣虛動物模型的實驗：

BABL/C 小鼠在水溫小於室溫五度下游泳五日。在第五日時，接種小鼠肺癌細胞株 Line-1（濃度 1×10^4 /ml）於後腿肌肉。每日觀察小鼠接種處腫塊大小變化，當小鼠死亡（約 50 days）時，取出其肺臟、心臟、肝臟和腦，觀察小鼠的肺癌轉移情形，並做石蠟包埋及 H&E 染色觀察。）

3. 補中益氣湯對肺癌腫瘤的動物療效試驗：

在小鼠氣虛模型建立後，當小鼠腫塊長 50mm 3 時，先將小鼠分成三組，每組各六隻（腹腔注射、口服投藥與對照組），分別餵食和注射 BZYQT 於小鼠的濃度為 1.25mg/ml。每日餵食小鼠 0.1ml 的 BZYQT 和每隔四日腹腔注射 0.1ml 的 BZYQT 一次。觀察其腫瘤大小及體重變化，並記錄小鼠的存活期。

參、結果

一、實驗室部分（非活體試驗）：

補中益氣湯 (BZYQT) 抗腫瘤細胞株在實驗室的篩檢，先培養各種癌細胞株於 96 孔盤中培養 24 小時後，加入不同濃度的 BZYQT 反應 48 小時，最後以 MTT 比色法檢測補中益氣湯抑制癌細胞株生長情形。結果 BZYQT 具有明顯 ($p < 0.05$) 抗腎細胞癌 (如圖一)、鼻咽癌 (如圖二)、肺癌細胞株 (如圖三) 的效果。H-Thymidine uptake 實驗也顯示 BZYQT 對黑色細胞瘤 (如圖四) 和肺癌細胞株 (如圖五) 的明顯抑制癌細胞株生長效果 ($p < 0.05$)。另外，在細胞凋零的研究初步發現，經 BZYQT 處理後的黑色素細胞瘤，細胞凋零百分比最高為對照組的 2.7 倍，且與 BZYQT 的濃度有關，1mg/ml 以及 10 mg/ml BZYQT 對黑色素細胞瘤誘發產生細胞凋零的分別 11.48% 以及 24.25%，而對照組僅 8.97%。然而此現象並未表現於肺癌細胞株 (如圖六)。

二、實驗動物部分（活體試驗）：

1. 建立氣虛動物模型 (BALB/c 小鼠)：

小鼠分成三組，每組 2 隻每日於不同溫度 (15°C、20°C 及 26°C) 的水中游泳，至小鼠筋疲力竭 (即小鼠沉入水中) 時，撈到保溫箱中，紀錄從下水游泳到沉下去的時間 (如圖七)，觀察小鼠的毛色、活動力及體重的變化，連續五日。結果發現小鼠在 15°C、20°C 及 26°C 水中會產生體重下降，毛色雜亂，游泳耐受時間日漸縮短。然這些變化在 20°C 及 26°C 時較不明顯。另外，結果除了 15°C 組之外，小鼠於 20°C 及 26°C 游泳後，其血清中 IgG 的濃度確實如預期明顯下降 ($p < 0.05$) (如圖八)。

2. 肺癌腫瘤細胞 (lung adenocarcinoma) 在氣虛動物模型實驗：

肺癌細胞株 Line-1 接種於氣虛小鼠 (即於水溫低於室溫五度下游泳五日後之小鼠) 後腿肌肉，接種十日後可觀察到小鼠接種處開始有直徑 5mm 腫塊出現，再隔十日腫塊加速生長，約 50 天後小鼠即陸續死亡，腫瘤會轉移至肺、心臟、腦和肝臟，以石蠟包埋處理並做 H&E 染色後觀察 (如圖九及圖十)。

3. 補中益氣湯對肺癌腫瘤的動物療效試驗：氣虛小鼠肺癌模型

經接受 BZYQT 治療方面，腹腔注射 ($n=3$) 治療後腫瘤生長比對照組 ($n=3$) 平均稍慢，但未達統計效力 ($p > 0.05$)。口服 ($n=4$) 治療後腫瘤生長比對照組 ($n=4$) 平均稍慢，但未達統計效力 ($p > 0.05$)。經實驗後發現腹腔注射組腫瘤

生長較對照組稍慢（如圖十一）。口服組較對照組生長稍慢（如圖十二），然均未達統計標準（ $p>0.05$ ）。治療組與對照組體重變化無明顯差別（ $p>0.05$ ）（如圖十三）。但是兩組治療後存活期均較對照組延長（ $p=0.0007$ ）（如圖十四）。

肆、討論

在實驗室方面，發現人類腎細胞癌、鼻咽癌及小鼠肺癌細胞株在 MTT 檢測中細胞增生皆有受到 BZYQT 的抑制現象（如圖一、圖二和圖三），而用 ^3H -thymidine 檢測時，黑色素細胞瘤和肺癌細胞瘤也受到 BZYQT 抑制其細胞增生（如圖四和圖五）。由細胞凋零研究，觀察到 BZYQT 可誘發黑色素細胞瘤進行細胞凋零，且與 BZYQT 的濃度有關，因此推論 BZYQT 的抑癌機轉可能經由誘發細胞凋零而產生，然而細胞凋零現象在小鼠肺癌細胞株 Line-1 卻未發生，因此 BZYQT 對小鼠肺癌細胞株的抑制機轉仍待進一步探討。

在動物實驗部分，氣虛模型建立時發現小鼠游泳後，血清中 IgG 濃度確實下降，符合龐樹玲、高金亮等人在大鼠實驗中的結論相同（11），但是我們卻意外發現在過度低溫時（ 15°C ），IgG 濃度反而上升。是否因極度寒冷、疲累時誘發腎上腺素或其他細胞素的分泌而導致 IgG 濃度上升仍需進一步研究證實。治療肺癌氣虛小鼠時，為減少個人主觀判斷誤差；所以測量小鼠腫瘤大小時，除操作者外，另有一人在場一起測量。為增加客觀性，將來可用小鼠電腦斷層或正子葡萄糖攝影來做測量。

補中益氣湯對於小鼠肺癌治療的療效部分，可延長存活期（ $p=0.0007$ ），此種效果可能與小鼠體內的 NK、LAK 細胞活性增加有關。因為去年我們曾經證實 BZYQT 在試管內具有增加 NK、LAK 細胞活性，給予黑色素瘤患者服用後其體內 NK、LAK 細胞活性也增加。我們已收集小鼠的脾臟細胞，若有機會將繼續探討研究 BZYQT 對活體免疫細胞功能的影響。

伍、結論與建議

此一小規模研究發現補中益氣湯可以抑制鼻咽癌、腎細胞癌及肺癌細胞株的生長。而且補中益氣湯具有誘導黑色素細胞瘤細胞株及鼻咽癌細胞株產生細胞凋零現象，但是在小鼠肺癌細胞株則無。另外，補中益氣湯治療肺癌氣虛小鼠時，皆出現肺癌生長減緩、維持體重及延長存活期的現象。本計劃之實驗動物數目屬小族群，統計稍嫌不足，但由初步結果顯示，仍可歸納出 BZYQT 具有抑癌功效，未來可考慮繼續申請計劃，完成具體結果，相信可以提供未來癌症新療法的參考指標之一，期望造福更多癌症患者。

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-CT-107 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. Ishihara K, Saida T, Yamamoto A: Nationwide survey of malignant melanoma (1992-1998). *Skin Cancer (japan)* 15:7-14, 2000
2. Seiji M, Takahashi M: Acral melanoma in Japan. *Human Pathology* 13(7): 607-9, 1982
3. DeVita, Hellman, Rosenberg: *Cancer principal and practise of oncology*, 6th edition, Philadelphia, 2001: p2018-2021
4. DeVita, Hellman, Rosenberg: *Cancer principal and practise of oncology*, 6th edition, Philadelphia, 2001: p2022
5. John WC Chang, Hsieh-Fong Chiang, Chi-Shin Yang, Kun-Yub Yeh, Cheng-Hsu Wang, Tsai-Shen Yang, Fu-Chan Wei: Malignant melanoma in Taiwan: A metaanalysis of 422 cases. 第七屆台灣癌症聯合學術年會 May 4, 2002 ~ May 5, 2002, p130.
6. Eton O, Legha SS, Bedikian AY, et al: Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 20:2045-52., 2002
7. 凌卓瑩、李佳荃、凌鴻英，補中益氣湯對細胞抗腫瘤活性的加強作用。
8. 鄭文龍，*中藥方劑的藥理與應用*，第一版，重慶，重慶出版社 1990: 684-686, 693-699。
9. 梁嶸，日本對外補中益氣湯的應用與研究日本醫學介紹 1991: (8): 383。
10. 陳惠新，許岸高黃參方劑誘導胃癌前病變細胞凋亡和影響 BCL-2 蛋白表達的研究廣州醫藥，2000 年第 31 卷第 6 期。
11. 龐樹玲、高金亮，中年大鼠氣虛血瘀証的模擬及其機制探討天津市中醫藥研究院，1997 年 9 月第 16 卷第 3 期。
12. 李桂圓、陳龍邦，C57BL6 小鼠黑色素瘤 B16 細胞株在 ICR 小鼠腫瘤模型的建立醫學研究生學報，2003 年 4 月。
13. 田維毅、周愛麗、劉燕，“脾虛証”，大鼠模型紅細胞免疫功能的探討貴陽中醫學院學報，1999 年 6 月。
14. 李傳英等，脾虛泄瀉証動物模型的研究浙江中醫雜誌，1982,(8):355。

15. 梁嶸等，用瀉下與勞倦因素塑造大鼠“脾氣虛”模型北京中醫學院學報，1992,(4):33。
16. 謝仰洲等用過勞和飲食失節法塑造大白鼠脾氣虛証模型的研究中醫雜誌，1987,(5):57。
17. 陸為民單兆偉大鼠慢性萎縮性胃炎癌前病變氣虛血瘀証動物模型的研製南京中醫藥大學學報（自然科學版），2000年5月第16卷第3期。
18. 李君徐錫鴻肺氣虛証大鼠模型內皮素含量變化的實驗研究。
19. 艾軍、何蘭欣，抗癌藥物對細胞株增殖的影響及凋亡誘導作用癌變·畸變·突變，2002年7月。
20. 劉世喜、楊煥，I L-2 和 I L-12 基因聯合治療小鼠頭頸鱗癌的實驗研究中華腫瘤雜誌，2002年7月第24卷第4期癌症，1996: 15(3), 225。

[\(6-15 圖表\)--CCMP93-CT-107.doc](#)