

行政院衛生署中醫藥委員會 96 度
研究計畫成果報告

補益類中藥保護幹細胞及影響癌病患腫瘤細胞之免
疫相關之功能基因體研究(2-2)

**A Functional Genomic study of Some Bu-Yi Chinese
Herbs' Pharmacologic Effects on Protection of
Tissue Stem/Progenitor Cells and
Immuno-modulation of Patient's Cancer Cells**

執 行 機 構：台北醫學大學

計 畫 主 持 人：施子弼

研 究 人 員：葉劭德

執 行 期 限：96 年 6 月 20 日至 97 年 6 月 19 日

** 本研究報告僅供參考，不代表本會意見，依合約之規定：
如對媒體發布研究成果應事先徵求本會同意 **

目錄

中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
計畫內容	
壹、前言.....	4
貳、材料與方法	5
參、結果	7
肆、討論	10
伍、結論與建議	10
陸、參考文獻	11
柒、圖表	15
捌、附件	20

編號：CCMP95-RD-204(2-2)

補益類中藥保護幹細胞及影響癌病患腫瘤細胞之免疫相關之功能基因體研究(2-2)

施子弼

台北醫學大學 醫學科學研究所

摘要

幹原細胞具有多機能特性，是個體組織器官發育之起源，特別是當個體損傷如同癌症之化療、放射線治療等面臨環境壓力下，幹細胞對於組織傷害復原顯的格外重要。

本研究計畫延續探討補益類防護人體幹細胞分子藥理，同時亦將平行比對分析補益類中藥對癌組織細胞之影響。本年計畫針對男性前列腺癌，深入探討四物湯(4D)及六味丸(6D)等保護人體幹細胞分子藥理異同，以對癌組織細胞之不同反應尋找中藥輔助癌症醫療應用契機。

具體實施方法將利用 RT-PCR 及定量 PCR 陣列等技術，探討補益中藥對癌細胞及正常體組織幹細胞在放射照射(RI)壓力下影響致癌基因、腫瘤抑制基因、細胞凋亡基因、細胞週期基因、前驅細胞早期基因及生長分化訊息傳導基因之表達特性變化。利用螢光免疫染色分析前列腺癌腫瘤細胞附著分子，以及表面蛋白標記受放射線壓力及四物湯藥效之影響。同時也利用細胞激素蛋白微陣列分析探討四物湯影響前發炎因子、細胞激素、趨化激素、介白素及其他細胞生長分化因子等蛋白表達之分析。實驗結果顯示補益中對四物湯在 RI(放射線)傷害壓力下對不同之前列癌細胞有不同之反應及效益。其在 RI(放射線)傷害壓力下對 PCC2 前列腺癌細胞有明顯的失去修復之加層效益。但似乎對 Androgenic independent 之前列癌細胞負面作用最為明確，顯示四物湯抑制癌細胞之凋亡，促進週期基因 Cyclin D 等基因表達對癌細胞輔助醫療之負面多於正面效益。在 RI(放射線)傷害壓力下，六味丸對前列腺癌腫瘤病患細胞之初步探討亦有增加腫瘤基因 PSCA 及癌細胞之表面附著相關因子 CD44 表型之表現等多項負面作用，但在沒 RI 傷害壓力情況下反之對 PCC3 前列腺癌細胞有顯著的存活成長抑制效用與對正常幹細胞及未確定癌之前列腺腫病患之保護效益有顯著差異，顯示六味丸之服用效用在於保護正常細胞、防護癌之形成作用但不適用於放射醫療癌症效益，以及病症不同用藥之效果具大差異。兩者均顯示補益中藥在防癌及癒後修復之個人醫療應用之機能差異。初步結果有賴於進一步的分子微陣列分析確認。關鍵詞【至少三項】：幹細胞、前列腺癌細胞、補益類中藥、功能性

A Functional Genomic study of Some Bu-Yi Chinese Herbs' Pharmacologic Effects on Protection of Tissue Stem/Progenitor Cells and Immuno-modulation of Patient's Cancer Cells(2-2)

Daniel Tzu_Bi Shih
Taipei Medical University
Graduate Institute of Medical Sciences

ABSTRACT

Aim: In this proposal study, we aimed to compare the pharmagenomic effect of Bu-Yi prescriptions on gamma-ray irradiated human prostate cancer cells and normal MSCs/fibroblasts by subtraction analyses of molecular profile changes between them. And hope to find out the drug candidate that may uniquely protect or help the stress release of normal tissue stem/progenitor cell but not the malignant tumor cells.

Method: The drug effect on prostate cancer cells and mesenchymal stem/progenitor cells will be qualitatively and quantitatively evaluated by cytokine protein array, immunofluorescence stain, and quantitative PCR super array under the physical and chemical stressed culture conditions. Specifically, we will also focus on analyzing the expressions of oncogenes, tumor suppressor genes, apoptotic genes, early genes, cell adhesion/interactive molecules, proinflammatory factors, cytokines and growth factors. Systemic integration with information from results of protein array and quantitative PCR super array will be analyzed subsequently.

Results & Discussion

We have analyzed the Bu-Yi Chinese Drug's pharmacologic effect on protection and repair of tissue stem/progenitor during cancer therapy in functional genomic and proteomic level. Results obtained from this study showing that Su-Wu Tang (四物湯) enhances cell cycle gene Cyclin D expression, and inhibits cell apoptotic genes indicating the negative effect may influence the cancer irradiation therapy. The result also showed that Su-Wu Tang (四物湯) exhibits heterogeneous responses to different prostate cancer patient cells, prostate cancer cell lines and normal MSCs. This property is also shown in the Lio-Wei Wan (六味丸) which exhibits enhance PSCA gene expression and CD44 cancer cell adhesion molecule of prostate cancer cells or cell lines, but on the other hand presented more preventive and protective effects to the non-cancer detected prostate patient and normal stem cells. These informations will be organized and served as a pharmacogenomic evaluation reference for the application of Chinese medicine on promoting normal stem cell and discouraging cancer cell in patient's body.

Keywords: Human tissue stem/progenitor cell, prostate cancer cell, Bu-Chi Chinese medicine, Functional genomics

壹、前言

幹原細胞具有多機能特性，是個體組織器官發育之起源，特別是當個體損傷如同癌症之化療、放射線治療等面臨環境壓力下，幹細胞對於組織傷害復原顯的格外重要，因此透過藥物對幹原/前驅細胞影響的生物系統性研究，除了可增加我們對中藥作用機理了解，並擴大中藥在醫療上與分子生物醫學諮詢之溝通。隨著幹細胞生物學研究領域的日趨成熟，科學家們逐漸從對造血系統中存在幹細胞的研究轉向對一些組織特異性幹原/前驅細胞的分離與研究、對它們的特徵和基因表達程式的闡述，以及在再生醫學中對它們應用的研究。眾所皆知幹細胞的自我更新能力是其最重要和最有用的特徵。通過這一特徵也發現幹細胞和癌細胞之間有驚人的相似：腫瘤可能通常起源於正常幹細胞的轉化，相似的訊息傳導及轉錄調控機制可能既調節幹細胞也調節癌細胞的自我更新。癌之形成理論已漸有共識，其多數經由正常細胞基因受損之累積而形成故雖其患有同樣之癌型其個人醫療效率也不相等。最近又已發現一些癌細胞中包含有腫瘤幹細胞（cancer stem cells）之特性-它們是一些極少的具有自我更新及不定潛能的驅使腫瘤形成的細胞。因此探討藥物對正常幹細胞及腫瘤細胞之作用，將可能釐清正常幹細胞及腫瘤幹細胞之間生理差異性，有助於中醫藥於輔助正常幹細胞及減少腫瘤細胞生長蔓延之應用。本年度針對四物湯對人類幹細胞及前列腺癌腫瘤細胞之作用進行研究，探討四物湯方劑於放射線療程中合併具女性荷爾蒙之佐劑效能影響。具體上將利用細胞激素蛋白微陣列或酵素連結免疫吸附分析法探討四物湯影響前發炎因子、細胞激素、趨化激素、介白素及細胞生長因子等蛋白表達之分析以瞭解前列腺腫瘤細胞附著分子，細胞間交互作用分子及受體等蛋白表達之功能基因體變化影響。執行重點及方法與第一年相同。我們預期經過比對上述藥材對正常幹細胞及異常的腫瘤細胞所影響之基因，將可探討各種藥劑之有效功能及釐清其分子藥理機制。

貳、材料與方法

一、天然藥物成分萃取：

本計劃之方劑由國家檢驗合格之合作廠商提供標準化方劑進行研究，其製備流程遵守標準操作步驟管理，品管條件亦符合檢驗規定。

二、臨床病理資訊及腫瘤組織檢體：

由台北醫學大學附設醫院泌尿科江漢聲、陳冠州醫師負責篩選適當臨床病人之前列腺癌腫瘤組織檢體及病理評估，傳統醫學科戴承杰主任將負責提供病患中醫輔助療養諮詢。

三、人類幹原/前驅細胞及腫瘤細胞之體外培養系統

脂肪間質幹原/前驅細胞：我們收集外科整形去除的脂肪組織，經過膠原蛋白酶與核苷酸酶作用後，收集附著於培養皿之細胞，培養至定量細胞數後，以單一細胞分離技術挑選單一細胞，培養增殖成一穩定細胞株。除了利用免疫螢光染色分析細胞表面特定表達之抗原標記組成外，並利用分化誘導劑測試其多潛能特性。

腫瘤細胞：收集臨床醫師所提供的腫瘤組織，經過物理性切割後，以 DMEM-F12 加入 20% 血清或 KSFM 加入無血清培養配方培養可貼附於培養皿之細胞，培養至定量細胞數後。除了利用免疫螢光染色分析細胞表面特定表達之抗原標記組成外，並利用 RT-PCR 鑑定各種腫瘤細胞相關表達基因。

四、中藥對於正常幹細胞及腫瘤細胞之體外生長影響

細胞之體外生長影響：我們將利用已建立之間質葉幹細胞及腫瘤細胞培養方法，培養穩定之幹細胞來源，將欲檢測之中藥成份依不同劑量加入細胞生長培養基中，觀察並統計細胞生長曲線。並利用前驅細胞早期、晚期所表達標記蛋白之產生與變化，分析中藥對貼附性細胞的生理性影響。

流式細胞儀鑑定細胞表面分子表現：收集經中藥處理之臍帶血球細胞、骨髓間質幹細胞、初代腫瘤細胞或腫瘤細胞株後，以流式細胞儀鑑定細胞表面生長分化相關蛋白分子。將待檢測細胞收集於 1XPBS 中，加入欲觀測表面分子的單株抗體，避光培養後，洗去未結合之抗體。利用流式細胞儀觀察特定表面分子被標定細胞，使用流式細胞儀 (fluorescence-activated cell sorting, FACS-Calibus; Becton Dickinson) 以及 CellQuest software 進行定量分析。

鑑定細胞特定基因表達性：自細胞以 RNeasy mini kit (Qiagen) 抽取 total RNA, 以反轉錄酵素合成互補 DNA, 使用基因特異性引子進行 PCR 反應以分

析基因表現特性。

五、功能性基因體分析建立

在初步確定特定藥物成分可影響於細胞之生長分化特性後。收集經藥物刺激後，各分化階段之幹細胞、前驅細胞、已分化細胞與控制組之訊息核糖核苷酸，經放大反應增加及合成互補去氧核糖核苷酸，以螢光標記後與已知之調控細胞生長及分化之基因組晶片進行雜交結合反應。比較得知差異性基因種類與觀察的細胞型態綜合藥效作用分子途徑。基因體表達檢測對象將包含參與細胞生長、細胞週期、細胞凋亡及細胞分化等作用的基因。其他如細胞表面標記抗原與專屬細胞蛋白之表達偵測，提供我們判別細胞生長分化時期與藥物作用效能評估。再與細胞蛋白表達量檢測作交互印證後，我們預期經比對不同藥劑與單方、複方所影響之基因，可探討各種藥劑之有效功能及釐清其分子藥理機制。

- 六、細胞激素蛋白微陣列：將經中藥刺激培養後之幹細胞/分化細胞培養基，與未加藥之幹細胞培養基，用細胞激素蛋白晶片，進行蛋白激素表達種類與濃度測定，方法如下：先分別取 2ml 的 conditional medium 和 membrane VI 和 membrane VII 作用，丟棄 medium，並加入 2ml blocking buffer 於室溫下作用 30 分鐘。丟棄作用完畢之 blocking buffer，並加入 2ml wash buffer I 清洗五分鐘，重複三次後，再以 2ml wash buffer II 同樣清洗五分鐘，重複三次。清洗完畢之後，加入 1ml biotin 作用 1~2 小時。再重複上述清洗步驟。清洗完畢後，加入 2ml streptavidin 於室溫下作用 40 分鐘。作用完畢後同樣重複上述清洗步驟。清洗完畢後，避光並分別加入螢光染劑 I 和 II 各 500 λ ，作用 1 分鐘後，於濾紙上吸去多餘染劑。將處理完之 membrane VI 和 membrane VII 放入 cascade 中，於暗房進行壓片。最後照相出來之底片，擷取數位影像輸入電腦後利用 KODAK 1D 3.5 軟體進行訊號強度偵測。判別蛋白質表現之強弱。

結果

本計劃今年針對四物湯(4D)、六味丸(6D)等補益中藥在放射線照射(RI)傷害壓力下對幹細胞及腫瘤細胞之功能基因體影響之藥理差異作探討。具體上經由正常幹細胞(PLA)與癌腫瘤細胞作各別培養、探討細胞表型螢光檢測、基因表達分析(RT-PCR 或定量 PCR)、以及微陣列蛋白分子變化鑑定分析等比較實驗。我們針對四物湯、六味丸等補益中藥在放射線照射壓力傷害下對於前列腺癌腫瘤病患細胞及癌腫瘤細胞株(例如 PC3 及 DU145)之細胞表型、基因體[腫瘤基因(例如:erbB2, Muc1)、腫瘤抑制基因(例如:p53, Rb, PTEN, BRCA, p16^{INK4a}, p19^{ARF})、細胞凋亡基因(例如:Bcl2, Bcl_{XL}, Bax)、細胞週期基因(例如: p21, p27, cyclin D)及前驅細胞早期基因(例如:BMP4, Sox-2, Rex-1 及 Oct-4)]以及 120 種之人體細胞激素蛋白體等影響作藥理對比差異之探討。其結果顯示如下：

(一)細胞層次之藥物影響差異

幹細胞(e. g. BM-MSCs, PLA-MSCs)生長及分化，造血幹細胞(HSCs)分化紅血球系及髓性血球細胞系群落生長數量，其中尤其是以晚期紅血球群落(CFU-E)及顆粒性血球細胞系群落(CFU-G)之補益作用最為明顯。本期研究以 PLA-MSCs (PLA) 為正常對照組探討兩種前列腺癌細胞株(PC-3, DU-145)及三個前列腺癌症病患初代培養之腫瘤細胞(PCC1, PCC2, 及 PCC3)探討補益中藥四物湯(4D)及六味丸(6D)在有無 RI 傷害壓力下之影響差異作比對實驗。其結果如下所述並加註於 Appended 之圖及表：

*在正常狀態 (RI-)下 4D 及 6D 對前列腺癌細胞及正常幹細胞存活數之影響比較影響培養細胞存活數均稍有促進增殖傾向但差異不很顯著。

*在受放線之照射傷害之細胞保護(protection)或修復(Repair)實驗，各組細胞存活數之反應差異顯然有別(加註圖一、二)。

四物湯 (4D) 對 DU145 及 PCC2 有同時抑制保護及修復癌細胞之存活率。

對 PCC2 以及 PC-3 細胞顯示抑制其存活但其因由有待探討。4D 對 PCC3 之 P、R 組細胞癌基因 PSCA、BRCA 及 Bcl-2 等基因表達抑制之正面效應。

六味丸(6D)在 RI 壓力狀態下對 PCC3 癌細胞之修復有顯著的促進作用之負面反應(加註圖三)。

(二)基因體影響之藥理差異

D 組:只有投以藥物(D); P 組:先投以藥物再照放射線(P)

R 組:先照放射線之後再投以藥物(R)

*腫瘤基因:

四物湯會降低 PSCA 的表現 [PCC3(D、P)、PCC1(P、R)]，並降低 BRCA-1 的表現 [PCC3(R)]、降低 BRCA-2 的表現 [PCC-3(P)、PCC1(R)、PCC2(P)]。六味丸會增加 erbB2 基因表現 [PCC1(R)、DU-145(D、P)]，也會增加 PSCA 表現 [PC-3(D)]，和 BRCA-1 的表現 [DU-145(D)]，和 BRCA-2 的表現 [PCC-2(R)、DU-145(D)]。(圖一～圖五)，由實驗可知，六味丸促進腫瘤基因的表達，但四物湯則多為抑制作用。但在無照放射線之下，六味丸則增加 PCC3 細胞 PTEN (cancer inhibit gene) 表現 (圖六)，顯示若單獨投以六味丸沒有照射放射線時，就會抑制癌症。另外，沒有照放射線的情況下，投以六味丸和四物湯均會抑制正常幹細胞(PLA)和大多數癌細胞生長。

*細胞凋亡基因:

四物湯會增加 Bax 的表現 [PCC3(R)、PLA(P)]，以及 Bcl_{XL} 表現量 [PCC3(P)、PLA(D)] (圖七)，但會降低 PCC3(D)未受放射線壓力組別之 Bax 表現 (圖八)；六味丸對 PLA 細胞影響上有降低 Bax 表現 [PLA(P)]，降低 Bcl_{XL} [PCC2(D、P)] (圖九)，但會增加 DU-145(D、P)及 PLA(D、P)之 Bcl_{XL} 表現 (圖十)。

*細胞週期基因:

四物湯可降低 PCC1 (P)、PCC2(R)之 P27 表現，增加 PLA(R)之 P21 表現 (圖十一)；六味丸會降低 PCC3(R)之 P21 表現，但對 PLA 則沒有影響 (圖十二)，表示四物湯在 RI 醫療有加成效果之輔佐醫療效應。六味丸會降低 CyclinD 的表現 [PLA(P)、DU-145(P)、PCC2(P)]，所以會降低其細胞週期的進行 (圖十三)。

* 前驅細胞早期基因:

四物湯會降低 BMP-2 [PCC3(P)]，BMP-4 [PLA(R)]，EGF-R [PLA(P)] 這三種基因表現 (圖十四)；六味丸亦對 PCC2(D)，DU145(R)，PC-3(R) 之 EGFR 表現降低 (圖十五、十六)，但是 [PCC3(D)、DU145(R)] BMP-2 基因表現增加，PC-3 (P) 之 BMP4 表現增加 (圖十六)。故四物湯在 RI+ 下對癌細胞和 PLA 之早期基因作用上大致有降低早期基因表現之作用。而六味丸雖未有一致性效果，但也降低 EGFR 的表現。

(二) 由免疫染色法研究四物湯對於正常體幹細胞，前列腺癌腫瘤細胞初代細胞及細胞株 (例如 PC3 及 DU145) 之表面附著相關分子 (例如: ICAM, VCAM, integrin, MMP)，細胞間交互作用分子 (例如: Hedgehog, Notch, Wnt) 及受體蛋白表達之影響。本項執行目標將可探討細胞之間及細胞組織間的交互訊息，藉此可分析藥物調節組織細胞表型及功能。

*表面附著相關分子:

四物湯會少許提升檢體細胞之 CXCR4 及 AC133，在 PLA 方面則明顯減少 CD44 表現，但微量增加 $\text{intergrin}\alpha 2\beta 1$ 之表現（圖十七）；六味丸會顯著增加 PCC2 之 EGFR、PCC3 之 CD44 之表現量增加 PLA 之 $\text{intergrin}\alpha 2\beta 1$ 表現，對 PC3 之 EGFR 則些減少其表現量，但作用效果待確認。因此四物湯無顯著影響癌細胞表現相關分子之表達比例。而六味丸則增加癌細胞之表面附著相關因子之表達，效果較偏向於負面作用。

- (三) 由細胞激素蛋白微陣列可廣泛篩選四物湯成份，對於正常體幹細胞，前列腺癌腫瘤細胞初代細胞及細胞株(例如 PC3 及 DU145)分泌前發炎因子(例如: GRO, PARC, RANTES, ENA-78, MIP-1MIP - 3, MCP1~4, MSP 等)、細胞激素(例如: IFN, Leptin, BMP, FGF, G-CSF, GM-CSF, oncostatin M 等)、介白素(例如: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 等)、細胞凋亡調控因子(例如: TNF, Fas, OPG, TRAIL 等)及細胞生長因子等蛋白表達之影響。由正常體幹細胞及前列腺癌腫瘤細胞 DU145 對 4D 及 6D 之分泌細胞激素群作比照如註圖及表新述，4D 刺激分泌較多種蛋白表達，唯在六味丸對 DU-145 唯有刺激之一 Leptin 分泌抑制。

總括:本計劃研究針對四物湯及六味丸兩補益中藥輔佐前列腺癌細胞受放射線傷害及細胞保護、修復效應與對正常組織間質幹細胞反應之異同比較，做系統性之細胞及其功能基因體變化比對。如於 Summary 總括表所顯示，兩補益中藥對五種前列腺癌細胞(二種細胞株:DU-145、PC-3，三種癌病患細胞:PCC1,PCC2,PCC3)和正常幹細胞(PLA)之存活生長、表型及基因表達變化說明如下:

- (1).在無 γ -ray 傷害下:四物(4D)及六味(6D)(於表中 D $\pm$ 4d/6d 欄所示) 對正常 PLA, 4D 有 25%增生效應,但對 PCC3 病患細胞數則反之減少 18%; 6D 對 PLA 之成長無影響,但對 PCC3 亦有抑制 25%生長效應。反之 4D 及 6D 對 DU-145、PC-3 細胞株及 PCC-1、PCC-2, 兩病人之細胞均有助長之現象,顯示這些細胞型之癌症不適以服用 4D 或 6D 補益輔佐保護。
- (2).在有 γ -ray 壓力傷害下: i) 在補益佐劑之保護狀況下 4D 有保護正常 PLA 之效益,除對 PCC-2 病患細胞有同樣保護效應外,對 PCC1、PCC3 病患細胞及 DU-145、PC-3 細胞株均有相反之抑制成長效應,顯示 4D 在放療前服用對大部份前列腺癌症,尤其 PCC3 類型有輔佐放射醫療效用。6D 對 γ -ray 照射之保護及修復正常 PLA 與癌細胞無巨大區別,除了對 PCC1 保護降低及 PCC2 修復降低外,其比 4D 來的效用並不顯著。
- ii) 在無補益佐劑之保護狀況下,各種細胞對 γ -ray 傷害的反應不一,尤其於放療後服用 4D 對 PC-3 型及 6D 對 PCC3 細胞可助抗放射性照射傷

害之反效應。

(3) 4D 對 PCC3 型癌細胞在 γ -ray 傷害前服用有輔佐療效與其降低 PSCA、BMP2、及 BRCA2 基因表達效用有關。4D 之對 PC-3 型癌細胞抗放射性照射傷害反效應之因由不清；6D 對 PCC3 可能與其降低 EGFR 表達產生之抗放射性照射傷害效應有相關。

參、討論

針對補益中藥對受/未放射線傷害之癌細胞影響比較可觀察，過去實驗選用之補益中藥益氣場對於乳癌細胞在 cell surface marker 上可明顯減少帶有 AC133 之細胞群落。而在細胞週期基因上，可增加抑制細胞週期之 P27 表現量，同時增加細胞凋亡基因 P53 之表現。除此之外，降低 BRCA-1 及 BRCA-2 之表現。在針對腫瘤轉移基因進行 array 分析，癌細胞抑制基因 PNN 及乳癌轉移抑制基因 BRMS1 其表現量分別有 1300 及 200 倍增加。故其輔助性治療上可能有正向之功用。相對觀察補益中藥四物湯對前列腺癌細胞之影響，在 cell surface marker 之分析上，雖對細胞株有正面影響，但在檢體細胞上，則未見相同作用，像是 AC133 之表現上，大幅增加帶有 AC133 群落之檢體細胞。在基因表現的分析上，四物湯則抑制 P27 之表現，雖然在觀察前列腺癌幹細胞 PSCA 之表現上，補益中藥四物湯可降低其表現量，但各項研究結果未有一致性的正面影響，因此四物湯對於前列腺癌之輔助性治療上，仍有待考量。綜合以上實驗可發現，漢方中藥雖在前人研究上對正常細胞有補益效果，但對患有癌症之病患癌細胞反應不一，在補益正常細胞之同時，是否也同時增加了癌細胞之生長或轉移能力趨勢，顯示著個人化癌症醫療及細胞功能基因體藥理分析的重要。更多詳盡的 Cell base 及活體實驗有待更進一步的探討研究。

肆、結論與建議

本期研究發現補益中藥對四物湯對不同之前列癌細胞有不同之反應及效益。四物湯對 Androgenic dependent 之前列癌細胞作用明確，但對 Androgenic independent 之前列癌細胞負面作用，顯示四物湯對癌細胞輔助醫療之不同之反應。六味丸檢測之初步結果亦顯示其對正常幹細胞及未成癌前列腺腫大病患細胞之防護癌形成之效益而對不同之前列癌細胞有不同之效應。兩者均顯示補益中藥在防癌及癒後修復 personal medicine 之機能。

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 CCMP94-RD-204)提供經費贊助，使本計畫順利完成，特此致謝。

伍、參考文獻

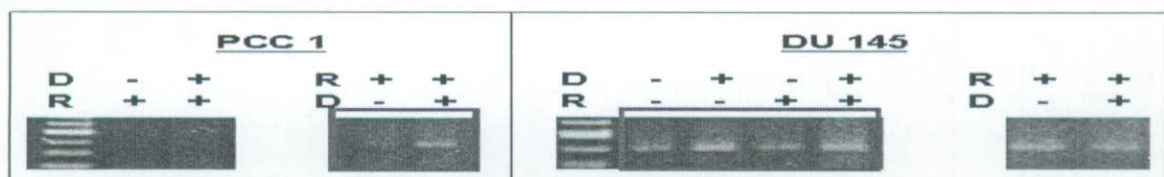
1. Bianchi Scarra` GL, Romani M, Coviello DA, Garre C, Ravazzolo R, Vidali G and Ajmar F (1986) Terminal erythroid differentiation in the K-562 cell line by 1-b-D-arabinofurano-sylcytosine by c-myc messenger RNA decrease. *Cancer Res* 46: 6327–6332.
2. Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C. & Vescovi, A.L. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283, 534–537.
3. Clarke, D.L. *et al.* (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660–1663.
4. Detmer K, Walker AN, Jenkins TM, Steele TA, Dannawi H. (2000) Erythroid differentiation *in vitro* is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling. *Blood Cells Mol Dis.* 26(4): 360-72.
5. Ferrari, G. *et al.* (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528–1530.
6. Fujii Y, Imamura M, Han M, Hashino S, Zhu X, Kobayashi H, Imai K, Kasai M, Sakurada K, Miyazaki T. (1994) Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *International Journal of Immunopharmacology.* 16(8):615-22.
7. Gambari R, del Senno L, Barbieri R, Viola L, Tripodi M, Raschella` G and Fantoni A (1984) Human leukemia K-562 cells: Induction of erythoid differentiation by 5-azacytidine. *Cell Differ* 14: 87–97.
8. Gussoni, E. *et al.* (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390–394.
9. Hasinoff BB, Abram ME, Barnabe N, Khelifa T, Allan WP, Yalowich JC. (2001) The Catalytic DNA Topoisomerase II Inhibitor Dexrazoxane (ICRF-187) Induces Differentiation and Apoptosis in Human Leukemia K562 Cells, *Mol Pharmacol*, Vol. 59:453–461, 2001
10. Hisha H, Yamada H, Sakurai MH, Kiyohara H, Li Y, Yu C, Takemoto N, Kawamura H, Yamaura K, Shinohara S, Komatsu Y, Aburada M, Ikehara S (1997) Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood.* 90(3): 1022-30.
11. Hsu HY, Ho YH, Lin CC. (1996) Protection of mouse bone marrow by Si-WU-Tang against whole body irradiation. *Journal of Ethnopharmacology.* 52(2): 113-7.
12. Jackson, K.A., Mi, T. & Goodell (1999) M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14482–14486.
13. Lagasse, E. *et al.* (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate to hepatocytes *in vivo*. *Nature Med.* 6, 1229–1234.
14. Lloyd T. Lam, Chiara Ronchini, Jason Norton, Anthony J. (2000) Capobianc, and Emery H. Bresnick, Suppression of Erythroid but Not Megakaryocytic Differentiation of Human K562 Erythroleukemic Cells by Notch-1 *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 26, pp. 19676–19684, 2000.
15. Maximow A.A. (1924) Relation of blood cells to connective tissue and endothelium. *Physiol. Rev.* 4, 533..
16. Nicoletta Bianchi, Federico Ongaro, Cristiano Chiarabelli, Licia Gualandi, Carlo Mischiati, Paola Bergamini and Roberto Gambari. (2000) Induction of Erythroid Differentiation of Human K562 Cells by Cisplatin Analogs, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 60, pp. 31–40.
17. Ohnishi Y *et al.* (1990) Effects of juzen-taiho-toh (TJ-48), a traditional Oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice. *Experimental Hematology.* 18(1):

18-22, Jan.

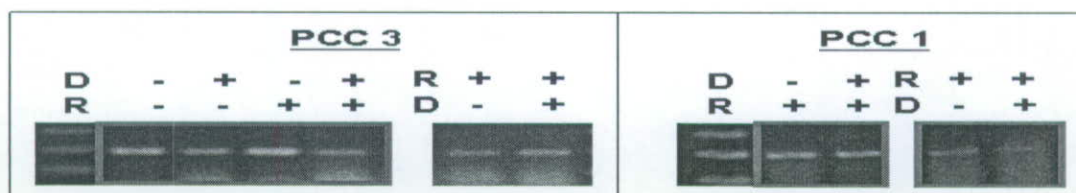
18. Olaf Witt, Katrin Sand, and Arnulf Pekrun (2000) Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways *Blood* 95, 2391-2396.
19. Petersen, B.E. *et al.* (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168–1170.
20. Rutherford TR, Clegg JB and Weatherall DJ (1979) K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 280: 164–165.
21. Theise, N.D. *et al.* (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31, 235–24.
22. Till J.E. & McCulloch E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213-222.
23. Tomoko Iguchi, Shinji Sogo, Hiroko Hisha, Shigeru Taketani, Yasushi Adachi, Rika Miyazaki, Hajime Ogata, Seiji Masuda, Ryuzo Sasaki, Motoki Ito, Shirou Fukuhara and Susumu Ikehara (1999) HGF Activates Signal Transduction from EPO Receptor on Human Cord Blood CD34⁺/CD45⁺ Cells, *Stem Cells*, Vol. 17, No. 2, 82-91, March.
24. Yukimasa Shiotsu, Leonard M. Neckers, Ivo Wortman, Won G. An, Theodor W. Schulte, Shiro Soga, Chikara Murakata, Tatsuya Tamaoki, and Shiro Akinaga (2000) Novel oxime derivatives of radicicol induce erythroid differentiation associated with preferential G1 phase accumulation against chronic myelogenous leukemia cells through destabilization of Bcr-Abl with Hsp90 complex, *Blood*, 96:2284-2291.
25. Lu X, Guo J, Hsieh TC, Wu JM (2003) Inhibition of proliferation and expression of AR/PSA by herbal supplement Equiguard in LNCaP cells cultured in androgen-proficient FBS and androgen-deficient charcoal-stripped FBS is correlated with increased serine-15 phosphorylation of the tumor suppressor gene p53. *Anticancer Res*, May-Jun; 23(3B):2489-98.
26. Hsieh TC, Lu X, Guo J, Xiong W, Kunicki J, Darzynkiewicz Z, Wu JM (2002) Effects of herbal preparation Equiguard on hormone-responsive and hormone-refractory prostate carcinoma cells: mechanistic studies. *Int J Oncol*, Apr; 20(4):681-9.
27. Kubota T, Hisatake J, Hisatake Y, Said JW, Chen SS, Holden S, Taguchi H, Koeffler HP. (2000) PC-SPES: a unique inhibitor of proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate*, Feb 15; 42(3):163-71.
28. Miki J, Rhim JS. (2008) Prostate cell cultures as in vitro models for the study of normal stem cells and cancer stem cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008; 11(1):32-9.
29. Zhigang Z, Wenlu S. (2007) Prostate stem cell antigen (PSCA) mRNA expression in prostatic intraepithelial neoplasia: implications for the development of prostate cancer. *Prostate*, Aug 1; 67(11):1143-51
30. Lam JS, Yamashiro J, Shintaku IP, Vessella RL, Jenkins RB, Horvath S, Said JW (2005) Reiter RE. Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases. *Clin Cancer Res.* Apr 1; 11(7):2591-6.
31. Gapter L, Wang Z, Glinski J, Ng KY (2005) Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 15; 332(4):1153-61
32. Kim HS, Lee EH, Ko SR, Choi KJ, Park JH (2004) In vitro effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch Pharm Res.* Apr; 27(4):429-35
33. Shen, J.-P., Ye, B.-D. & Zhou, Y.-H (2008). Treatment of refractory severe autoimmune disease by combined therapy with Chinese drug and autohemopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 28, 212-215

34. Shepherd CJ, Rizzo S, Ledaki I, Davies M, Brewer D, Attard G, de Bono J, Hudson DL(2008)Expression profiling of CD133+ and CD133- epithelial cells from human prostate Prostate.Jun 15;68(9):1007-24
35. Lam JS, Reiter RE(2006) Stem cells in prostate and prostate cancer development.Urol Oncol Mar-Apr;24(2):131-40
36. Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S(2007)Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo.Cancer Res.May 15;67(10):4807-15
- 37.HARADA N, OKAMURA S, SHIMODA K, et al.(1992) INFLUENCE OF A TRADITIONAL CHINESE HERBAL MEDICINE REN-SHEN-YANG-RONG-TANG (JAPANESE NAME - NINJIN-YOEI-TO) ON THE PRODUCTION OF INTERLEUKIN-6 FROM PERIPHERAL-BLOOD MONONUCLEAR-CELLS AND BONE-MARROW ADHERENT CELLS. INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY Vo8 ,No3,p141-145
39. Gao, F. et al. (2008). In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Translational Research* 151, 293-302
- 40.Kong, D.J. et al.(2008) Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells. *Stem Cells* 26, 1425-1435
43. Chung, V.Q., Tattersall, M. & Cheung, H.T.A. (2004). Interactions of a herbal combination that inhibits growth of prostate cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 53, 384-390
44. Jensen, J.B. & Langkilde, N.C(2004).PC-SPES and ProstaSol: Chinese herbal medicine as a treatment for prostate cancer.*Ugeskr Laeger* 166, 4611-4612
- 45.Ho JW, Song JZ, Leung YK(2005)Activation of p53 by specific agents in potential cancer therapy *Curr Med Chem Anticancer Agents*. Mar;5(2):131-5.
- 46.Shepherd CJ, Rizzo S, Ledaki I, Davies M, Brewer D, Attard G, de Bono J, Hudson DL.(2008)Expression profiling of CD133+ and CD133- epithelial cells from human prostate. *Prostate*. Jun 15;68(9):1007-24
- 47.沈建忠, 補中益氣湯抑制多種惡性細胞腫瘤生長機轉體外細胞與氣虛老鼠模型之先驅研究. 中醫藥資訊網, CCMP93-CT-107,2004
48. 謝長堯, 中藥材薏苡萃取物對免疫調控因子基因表現之調控對於腫瘤細胞與惡質化的影響. 中醫藥資訊網, CCMP94-RD-046,2005
- 49.沈建忠, 補中益氣湯抑制腫瘤生長增加免疫力及併用免疫療法的療效分析之先驅研究. 中醫藥資訊網, CCMP92-RD-027,2003
- 50.賴易成, 沙參麥冬湯對放射線治療中癌症病患之血中抗氧化及調節免疫功能之臨床評估. 中醫藥資訊網, CCMP92-RD-026,2003
- 51.林俊清, 傳統中藥方劑對人類乳癌細胞增生抑制作用和細胞程式死亡機制之探討. 中醫藥資訊網, CCMP 94 -RD-045,2005
52. 謝易修, 中藥抑制癌細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究.中醫藥資訊網,CCMP 94-RD-029,2005
- 53.楊賢鴻, 補中益氣湯對緩解期過敏性鼻炎患者免疫機轉影響之研究. 中醫藥資訊網, CCMP88-RD-003,1999
- 54.譚世特, 由中藥草中分離能提升輻射治癌效果的輻射增敏劑 (3-3) . 中醫藥資訊網, CCMP88-RD-029,1999
- 55.施子弼, 應用幹原細胞探討中藥對人體組織修復再生功能之基因體研究. 中醫藥資訊網, CCMP92-RD-021, 2003
56. 施子弼, 補益類中藥及其方劑對於人體幹胞之系統分析研究. 中醫藥資訊網, CCMP93-RD-001, 2004

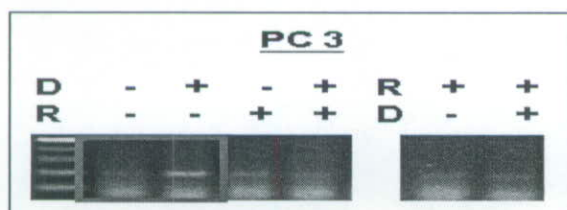
陸、圖表



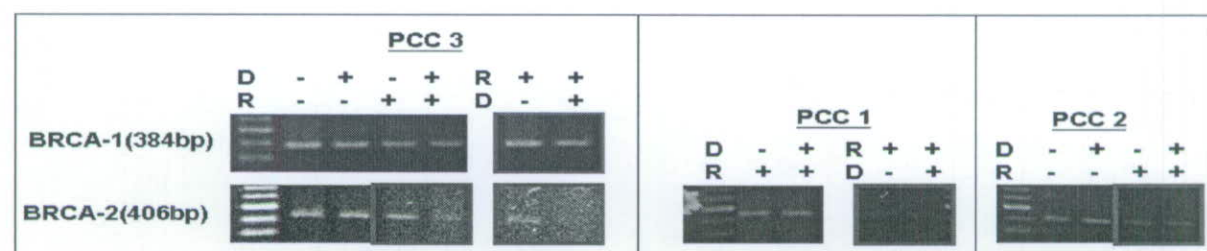
圖一：六味丸增加 PCC1 及 DU145 之 erbB2 表現



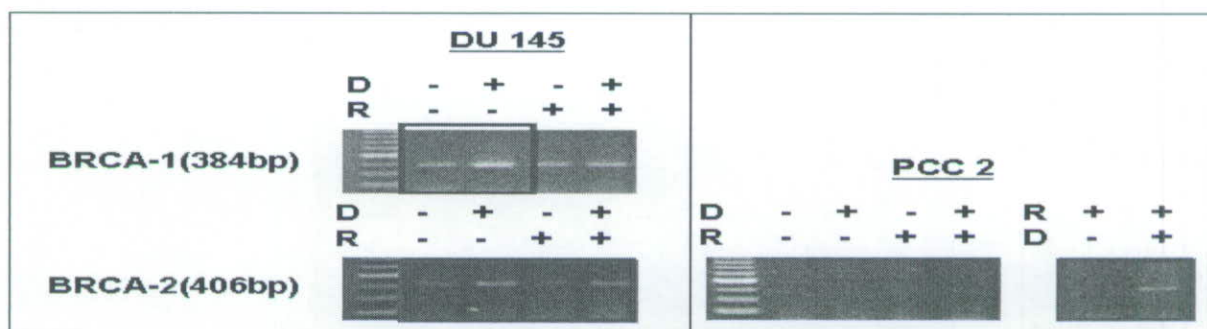
圖二：四物湯降低 PCC1 及 PCC3 之 PSCA 表現



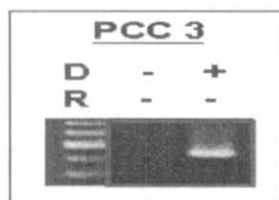
圖三：六味丸增加 PC3 之 PSCA 表現



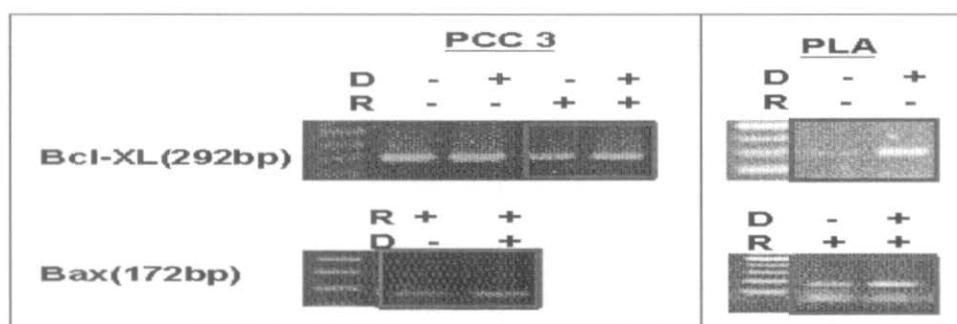
圖四：四物湯會降低 PCC3 之 BRCA1 及 PCC1、PCC2、PCC3 之 BRCA2



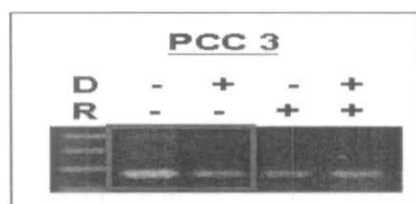
圖五：六味丸則加 DU-145 之 BRCA1 及 PCC2、DU-145 之 BRCA2 表現



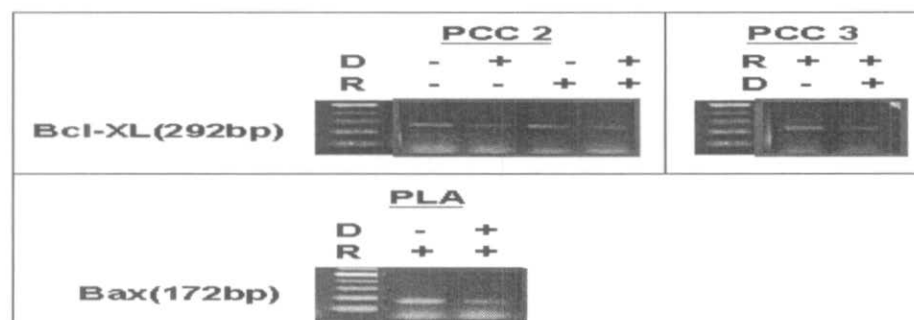
圖六：六味丸有增加 PCC3 之 PTEN 表現的趨勢



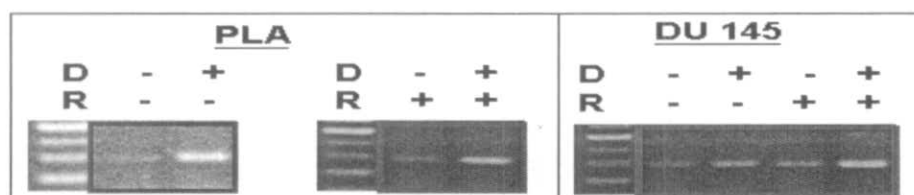
圖七：四物湯增加 PCC3、PLA 之 Bcl_{XL} 及 PCC3 修復組、PLA 之 Bax 表現量



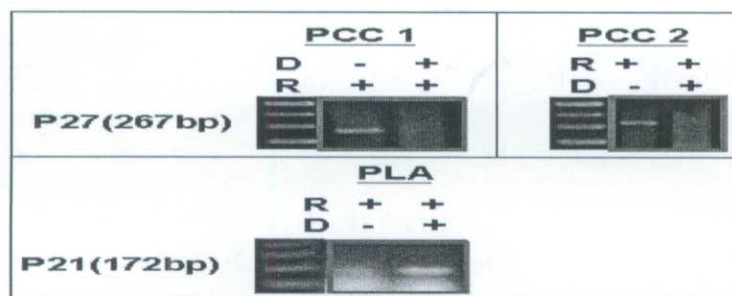
圖八：四物湯降低 PCC3 未受放射線壓力組別之 Bax 表現



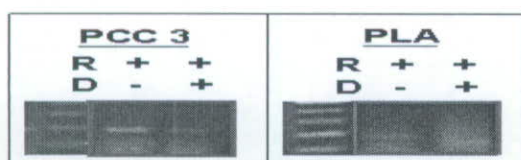
圖九：六味丸會降低 PCC2、PCC3 之 Bcl_{XL} 及 PLA 之 Bax 表現



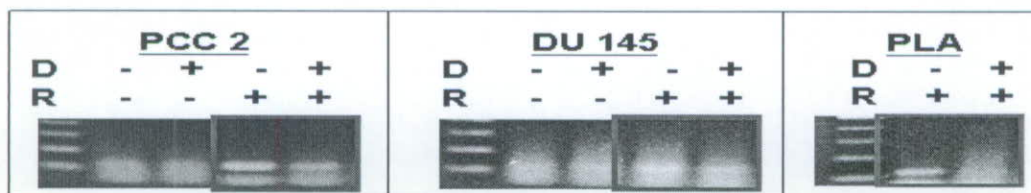
圖十：六味丸增加 DU-145 及 PLA 之 Bcl_{XL} 表現



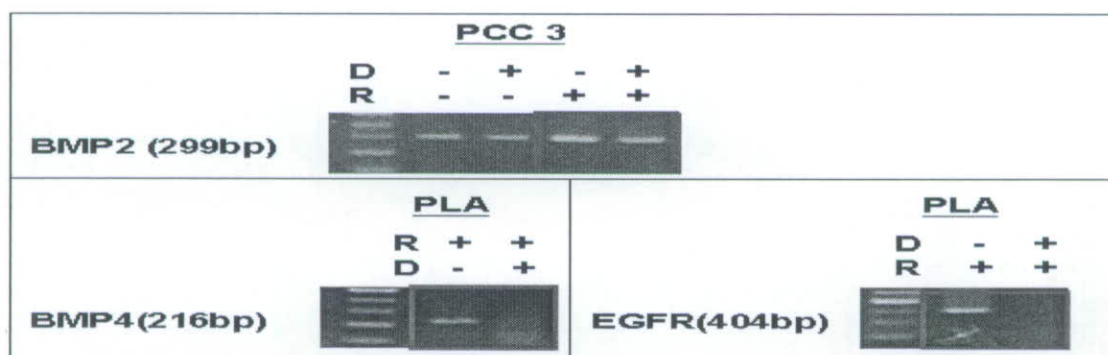
圖十一：四物湯降低 PCC1、PCC2 之 P27 表現，增加 PLA 之 P21 表現



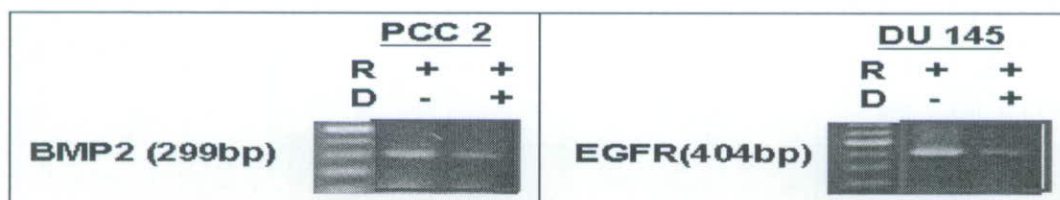
圖十二：六味丸會降低 PCC3 之 P21 表現，但對 PLA 方面效果無顯著



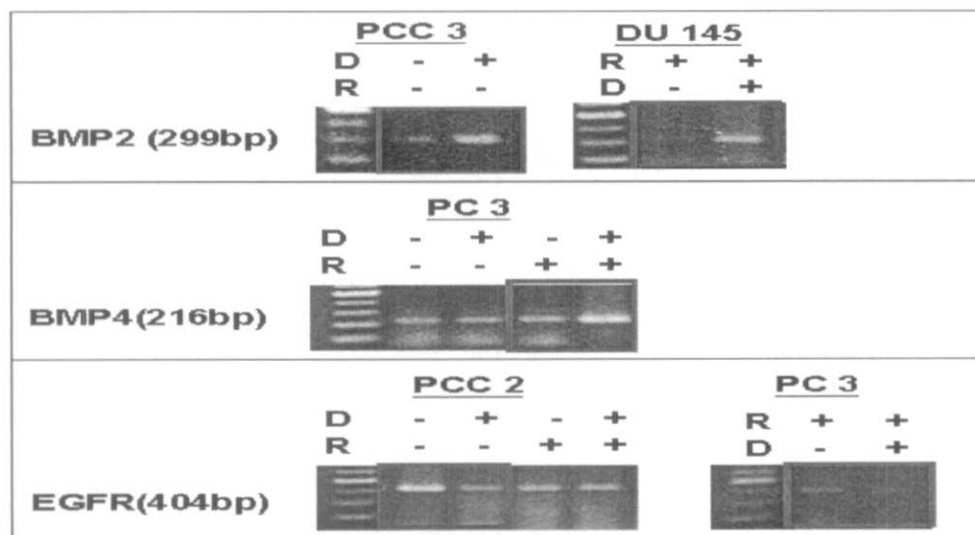
圖十三：六味丸會降低 PCC2 及 DU145 之 cyclin D 表現



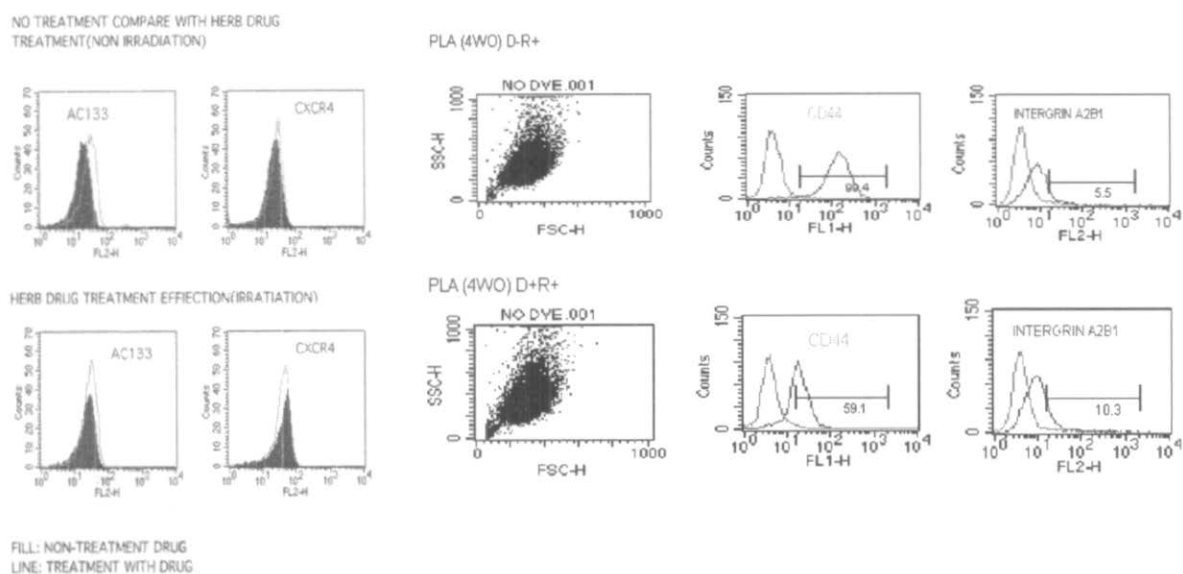
圖十四：四物湯降低 PCC3 之 BMP2、PLA 之 BMP4、PLA 之 EGFR 表現



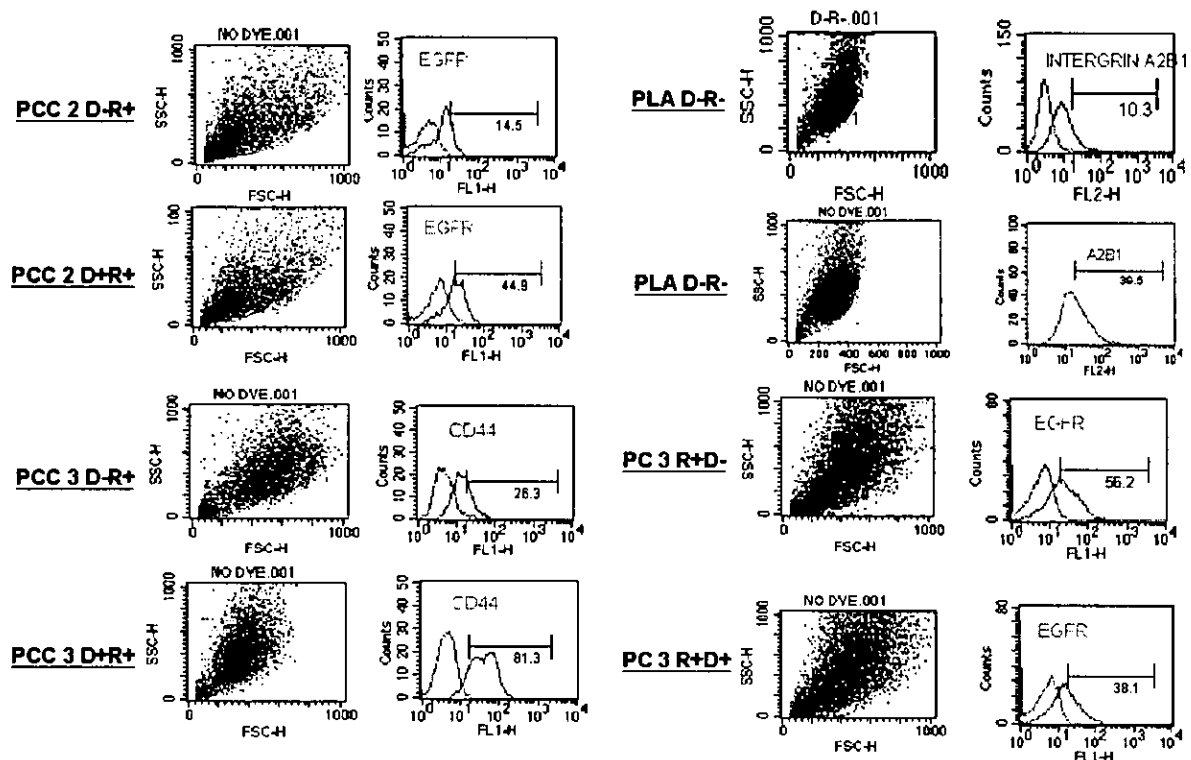
圖十五：六味丸使 PCC2 之 BMP2、DU145 之 EGFR 表現降低



圖十六：六味丸作用使 PCC3、DU145 之 BMP2、PC3 之 BMP4、PCC2 及 PC3 之 EGFR 表現增加

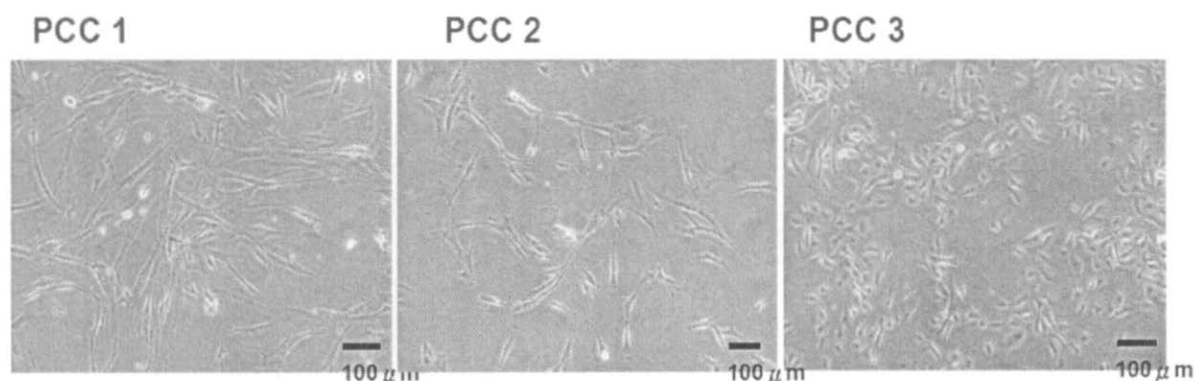


圖十七：四物湯少許提升癌檢體細胞之 CXCR4 及 AC133，在 PLA 方面則明顯減少 CD44 表現，微量增加 intergrin $\alpha 2 \beta 1$ 之表現



圖十八:六味丸增加 PCC2 之 EGFR、PCC3 之 CD44 之表現,微量增加 PLA 之 intergrin $\alpha 2 \beta 1$ 表現,對 PC3 之 EGFR 則些微減少其表現量

柒、附加註圖 及表

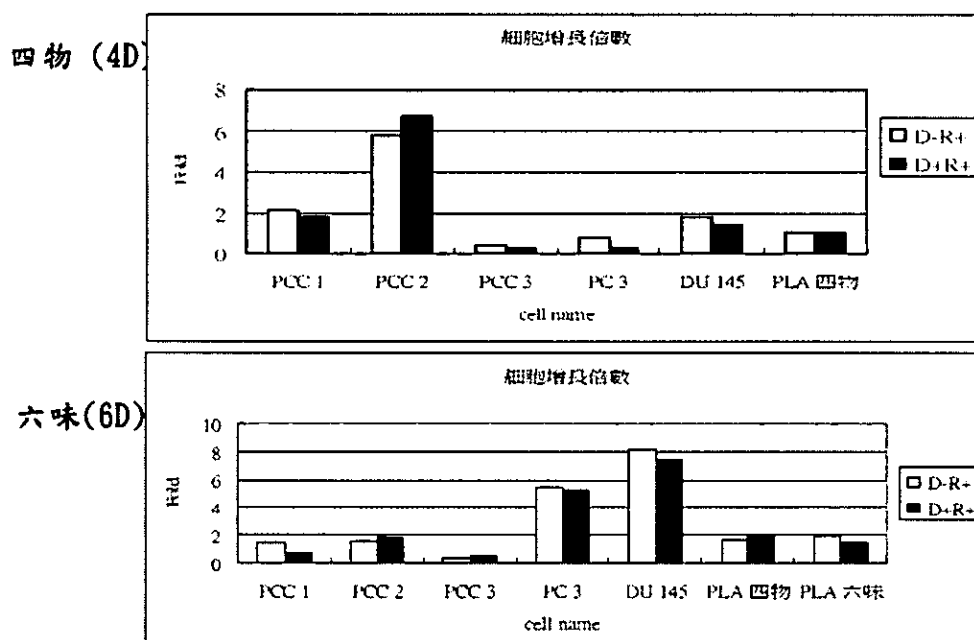


五種細胞之Cell marker 表現差異統整 (皆為未經任何處理之細胞)

Prostate cancer tumor cells	PCC 1	PCC 2	PCC 3	PC-3	DU-145
CD24	-	-	Dim+	-	+
CD44	+	+	+	+	+
CD105	+	+	Dim+	-	-
CD133	Dim+	+	+	-	-
EGFR	Dim+	Dim+	+	+	+
Integrin $\alpha 2 \beta 1$	+	+	+	+	+

Note: (-) : 0~15%, (Dim+) : 16~35%, (+) : > 35%

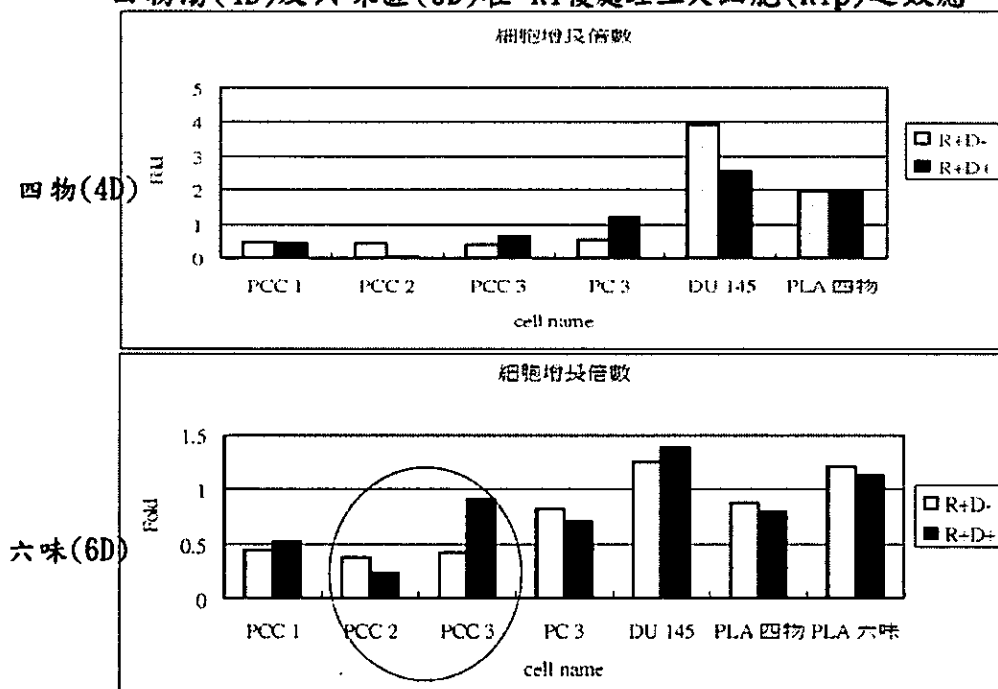
四物湯(4D)及六味區(6D)在 RI前三天處理細胞(RIp)之效應



(圖二) 在RI傷害壓力下作用：

四物湯(4D)及六味丸(6D)在 RI+壓力狀態下對正常幹細胞單與癌腫瘤細胞存活影響相較顯著不同. 顯示著6D對 癌腫瘤細胞RIp(protectio))作用影響有差異.

四物湯(4D)及六味區(6D)在 RI後處理三天細胞(RIp)之效應



(圖三) 在RI傷害壓力下之修復作用分析：

四物湯(4D)及六味丸(6D)在 RI+壓力狀態下對正常幹細胞單與癌腫瘤細胞存活影響相較顯著不同. 顯示著6D對癌腫瘤細胞RIr(repair))作用影響有差異.

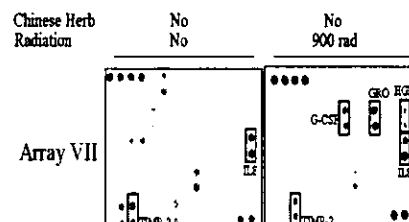
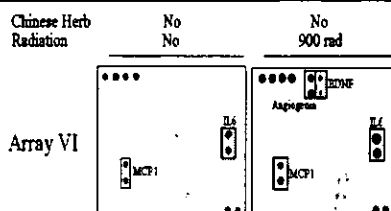
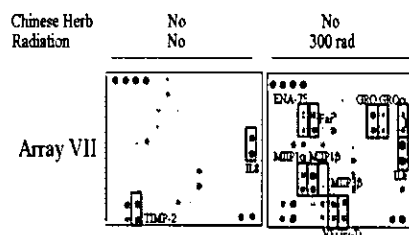
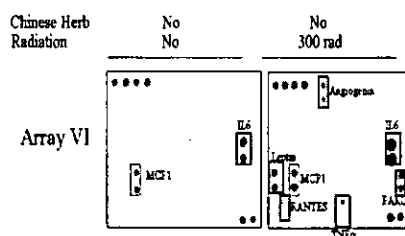
Table : Influences of 4D vs 6D on Prostate Cancer Cells Gene Expressions.

Genes	4D / 6D	PLA	DU-145	PC-3	PCC1	PCC2	PCC3
<u>Cancer (Ca.)</u>	4D						
ErbB-2	6D		D ⁺ , P ⁺		R ⁺		
PSCA	4D				P ⁻ , R ⁻		D ⁻ , P ⁻
	6D			P ⁺			
BRCA1	4D						R ⁻
	6D		D ⁺				
BRCA2	4D				R ⁺	P ⁺	P ⁻ , R ⁻
	6D		D ⁺ , P ⁺			R ⁺	
<u>Ca. Inhibit.</u>	4D						
PTEN	6D						D ⁺
<u>Cell Apopt.</u>	4D	P ⁺					D ⁻
Bax	6D	P ⁻					R ⁻
BclXL	4D	D ⁺					P ⁺
	6D	D ⁺ , P ⁺	D ⁺ , P ⁺			D ⁻ , P ⁻	R ⁻
<u>Cell Cycle</u>	4D	R ⁺					
P21	6D						R ⁻
P27	4D				P ⁻	R ⁻	
	6D						
CyclinD	4D						
	6D	P ⁻	P ⁻			P ⁻	
<u>Progenitor</u>	4D						P ⁻
BMP-2	6D		R ⁺			R ⁻	D ⁺
BMP-4	4D	R ⁻					
	6D			P ⁺			
EGFR	4D	P ⁻					
	6D		R ⁻	R ⁻		D ⁻	

Note: 4D: _____; 6D: _____; D: Non RI Drug Influences; P: Protection from RI stress, R: Repairing/Healing from RI stress; + :Up regulation; - : Down regulation. (RI stress :Radioactive Gamma ray Irradiation)

Array VII

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
1	POF	POF	POF	POF	Blank	Blank p min (10)	Blank (100)	ILC (10)	Blank	Blank	CR p 0 (1000)	CH1F (10)	COF (1)	Blank (1)
2	POF	POF	POF	POF	Blank	Blank p min	Blank (100)	ILC	Blank	Blank	CR p 0 (1000)	CH1F	COF	Blank
3	Blank 1 (1)	Blank 2 (10)	POF 1 (1000)	POF 7 (1)	PO 3 Legend (1)	Blank min (100)	COCP 2 (100)	COCHF (100)	COB CF (100)	1-300 (1000)	1PF 7 (100)	COFED 1 (1)	1-3PF 2 (10)	1-3PF 4 (1000)
4	Blank 1	Blank 2	POF 1	POF 7	PO 3 Legend	Blank min	COCP 2	COCHF	COB CF	1-300	1PF 7	COFED 1	1-3PF 2	1-3PF 4
5	POF 1 (1)	IL-10 (10)	IL-13 (100)	IL-13 (100)	IL-14 (1)	IL-10 (1000)	IL-10 (100)	IL-10 (10)	IL-2 (12)	IL-3 (100)	IL-4 (1)	IL-5 (1)	IL-6 (1)	IL-7 (100)
6	POF 1	IL-10	IL-13	IL-13	IL-14	IL-10	IL-10	IL-10	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Legend (100)	LEGH (1)	MEP-1 (10)	MEP-2 (100)	MEP-3 (1000)	MEP-4 (100)	ME-CF (1)	MDC (1000)	MED (10)	MEP-10 (100)	MEP-10 (100)	MEP-12 (100)	ME-3 (10)	MEAC (1000)
8	Legend	LEGH	MEP-1	MEP-2	MEP-3	MEP-4	ME-CF	MDC	MED	MEP-10	MEP-10	MEP-12	ME-3	MEAC
9	POFED 10 (1000)	1-3PF 2 (1000)	COF (1)	COF 1 (1000)	1-3AC (100)	COF 1 (100)	COF 1 (100)	1PF 0	1PF 0 (1000)	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
10	POFED 10	1-3PF 2	COF	COF 1	1-3AC	COF 1	COF 1	1PF 0	1PF 0	Blank	Blank	Blank	POF	COF

[illegible]

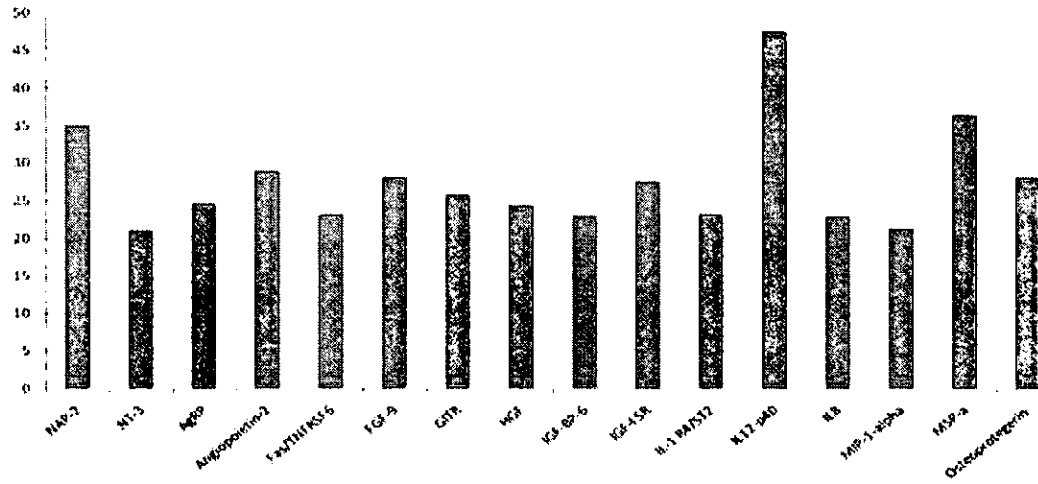
PLA MSC

Herb	—	—
Radiation	—	300 rad
Cytokines	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2 •Angiogenin, GRO, HGF •Leptin, PARC, RANTES, TNF α , ENA-78, Fas, GRO α , MIP-1 α , -1 β , -3 β , VEGF, VEGF-D
Herb	—	—
Radiation	—	900 rad
Cytokines	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2	•MCP-1, IL8, IL6, TIMP2 •Angiogenin, GRO, HGF •BDNF, G-CSF

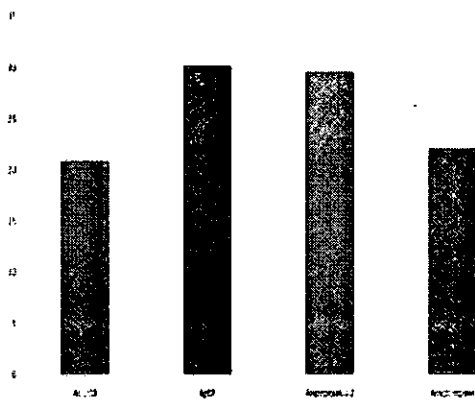
四物湯比沒加藥多表現的cytokine	NAP-2、NT-3、AgRP、Angiopoietin-2、Fas/TNFRSF6、FGF-9、GTR、HGF、IGF-BP-6、IGF-1 SR、IL-1 R4/ST2、IL12-p40、IL8、MIP-1-alpha、MSP-a、Osteoprotegerin
六味丸比沒加藥多表現的cytokine	Acrp30、AgRP、Angiopoietin-2、Amphiregulin
六味丸比沒加藥少表現的cytokine	Leptin

四物表現量比六味多的cytokine	GDNF、LIGHT、NAP-2、NT-3、PARC、Fas/TNFRSF6、FGF-9、HGF、IGF-BP-3、IGF-BP-6、IGF-1 SR、IL-1 R4/ST2、IL12-p40、MIP-1-alpha、MIP-1-beta、MSP-a、Osteoprotegerin、VEGF、VEGF-D
六味表現量比四物多的cytokine	BMP-4、BMP-6、IL-6、axl、bFGF、Beta-NGF

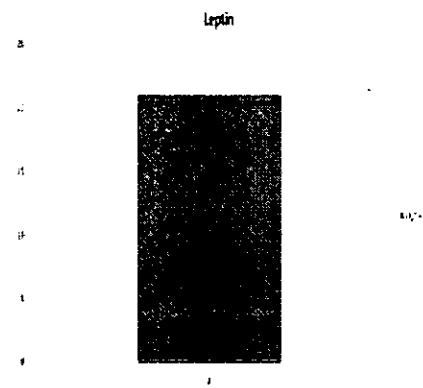
四物比沒加藥多表現的cytoine



六味比沒加藥多表現的cytokine

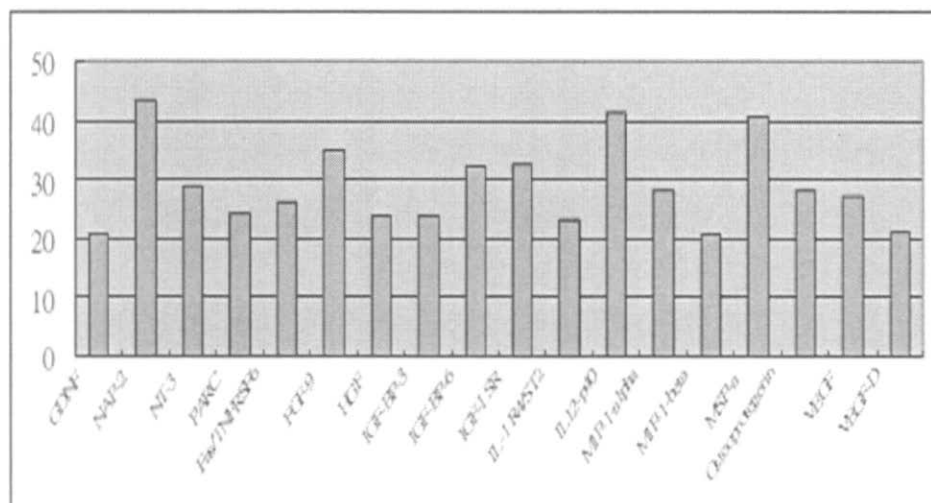


六味比沒加藥少表現的cytokine

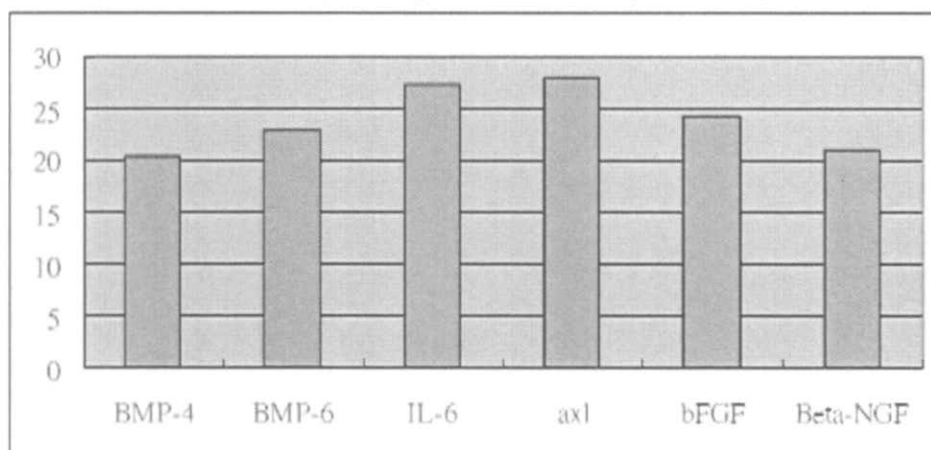


(圖四) Effect s of 4D and 6D on Prostate Cancer DU-145 cell cytokine secretion

四物表現量比六味多的cytokines, 各cytokine多出的程度



六味表現量比四物多的cytokines, 各cytokine多出的程度



(圖五) Comparison of 4D and 6D effect on the cytokine secretion profile of Prostate Cancer DU-145 cells.

Summary

Influences of 4D and 6D on Prostate Cancer Cells and the Normal MSCs

<u>4d/6d Cell No.(Growth)</u>	PLA	DU-145	PC-3	PCC1 _(g⁵⁺)	PCC2 _(g[±])	PCC3 _(g²⁺)
Control D-/R+	1.0	5.0	3.2	0.8	1.2	0.2
D ⁺ __4d/6d	↑25%/=-%	↑35%/↑10%	↑30%/↑25%	↑25%/↑12%	↑15%/↑10%	↓25%/↓18%
RI _p ⁺ __4d/6d	↑10%/↓9%	↓10%/↓5%	↓60%/↓5%	↓10%/↓60%	↑15%/↑10%	↓10%/↑10%
RI _l ⁺ __4d/6d	↓10%/↓8%	↓35%/↓10%	↑50%/↓14%	0%/↑10%	↓80%/↓35%	↓25%/↑50%
<u>SurfaceMarker Change</u> D ⁺ __4d/6d		↓EGFR/	↓AC133/			
RI _p ⁺ __4d/6d		↓CXCR4 ↑CD24 /	↓CXCR4 ↑AC133 /		/↑EGFR	AC133/↑CD44
RI _l ⁺ __4d/6d						/↓EGFR
<u>Gene Express. Change</u> D ⁺ __4d/6d	↑Bcl-XL /↑Bcl-XL ↑Intergein α2β1	/↑Bcl-XL ↑BRCA1,2 ↑erbB2	/↑PSCA		/↓Bcl-XL ↓EGFR	/↓Bcl-XL, ↑PTEM ↑EGFR, ↑BMP2
RI _p ⁺ __4d/6d	↑Intergein α2β1 ↑Bcl-XL ↓Cyclin D ↓EGFR ↑Bax/↓Bax	/↓Cyclin D ↑Bcl-XL ↑BRCA2, ↑erbB2	/↑BMP4	↓PSCA ↓P27 /	↓BRCA2 ↑BMP2 /↓Cyclin D ↓Bcl-XL	↓BMP2 ↓BRCA2 ↓PSCA /
RI _l ⁺ __4d/6d	↑P21 /↓P21 ↓BMP4	/↑BMP2 ↓EGFR	/↓EGFR	↓BRCA2 /↑erbB2	↓BRCA2 ↑BMP2 /↓BMP2 ↑BRCA2	↓BRCA2 ↓P27 ↑Bax /↓Bcl-XL ↓EGFR

六味丸之 Ames Test 結果
Effect of D6 on Ames Test

(A) Without S9 metabolic activation

	TA98	TA100
Negative	24±4	156±3
Positive	242±108**	1768±72***
0.312 mg/p	28±2	140±6
0.625 mg/p	28±4	149±2
1.25 mg/p	22±1	152±3
2.5 mg/p	22±2	173±6
5.0 mg/p	25±1	157±16

(B) With S9 metabolic activation

	TA98	TA100
Negative	48±7	150±5
Positive	779±53***	835±102**
0.312 mg/p	37±3	154±5
0.625 mg/p	37±4	172±4
1.25 mg/p	39±7	179±9
2.5 mg/p	40±2	162±6
5.0 mg/p	33±2	138±6

1. The values were presented as Mean ± S.E.(N≥3).
2. 30 µl solvent(with10% DMSO)/plate was used as negative control.
3. Positive control in -S9 plate: TA 98, 4-Nitro-o-phenylenediamine 2.5 µg / plate; TA 100, Sodium azide 5µg / plate; Positive control in +S9 plate: TA100 TA 98,2-aminoanthrene 5 µg/plate. Significant difference between control treated group at *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control by Student *t*-test.