

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 防治口腔癌新型組合藥方之研究
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 李智蓉
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-002-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 林仁混

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學口腔科學研究所

中華民國 105年03月31日

摘要

台灣目前口腔癌發生率及死亡率日漸嚴重，而治療癌症的藥物會產生副作用及抗藥性，因此選擇具有抗氧化、抗癌之作用的天然植多酚茶多酚及薑黃素，和阿黴素(doxorubicin 俗稱小紅莓)、5-Fluorouracil、紫杉醇(Taxol)組合、Amitriptyline(AMT)和紫杉醇組合、氯化銅和金屬螯合劑 pyrrolidine dithiocarbamate 組合，利用 MTT assay 來看組合藥物抑制癌細胞生長效果更佳，本研究發現天然植多酚和抗癌藥物組合效果並沒有更好，但薑黃素和 5-Fluorouracil 有協同作用，氯化銅和金屬螯合劑組合則發現抑制癌細胞生長效果更佳。

關鍵字:抗口腔癌藥物

前言

台灣目前口腔癌發生率及死亡率日漸嚴重，為 10 年前 2 倍以上，是男性所罹患的主要癌症中發生和死亡情形增加最快者，且有日漸嚴重的趨勢，是癌症死因前 10 名，很多研究顯示，發炎、氧化跟細胞癌化有密切關係，而治療癌症的藥物阿黴素(doxorubicin 俗稱小紅莓)、5-Fluorouracil (5-FU)、紫杉醇(Taxol)會產生副作用及抗藥性，因此選擇具有抗氧化、抗癌之作用的天然植多酚茶多酚(綠茶、烏龍茶、普洱茶萃取物)、薑黃素(curcumin)，和阿黴素(doxorubicin)、5-Fluorouracil (5-FU)、紫杉醇(Taxol)組合，Amitriptyline(AMT)和紫杉醇組合以及金屬如銅和金屬螯合劑 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 組合，利用 MTT assay 找到比原先單獨使用藥物對於口腔癌治療更有效且副作用較輕之組合藥方。

阿黴素(doxorubicin 俗稱小紅莓) 與 DNA 利用插入和抑制大分子的生物合成來相互作用⁽¹⁾。這個作用抑制了解開 DNA 超螺旋的拓撲異構酶 II。在拓撲異構酶 II 為了複製而解開 DNA 鏈後，阿黴素會穩定拓撲異構酶 II，防止 DNA 雙股螺旋再結合在一起，從而停止複製過程。其副作用包含噁心、嘔吐、靜脈炎、注射後 24 到 48 小時，尿液會變紅色、白血球減少、血小板減少、嚴重掉頭髮、心臟毒性（與累積劑量有關）、皮膚色素沉著等等。

5-Fluorouracil (5-FU) ⁽²⁾其主要的抗癌作用機轉，係與酵素 thymidylate synthase 結合並抑制其作用，使 thymidylate 無法合成，而影響癌細胞 DNA 之製造。如果同時給予 leucovorin(一種葉酸之衍生物)，它會與 5-FU 以及 thymidylate synthase 結合成一穩定的複合體，而增加 5-FU 抑制 thymidylate synthase 的效果。

此外 5-FU 也可影響 RNA 之合成。然而就現有的資料顯示，無論將 5-FU 之劑量或給藥方式作如何之調整，或合併 5-FU 及其他化療藥物之使用，其療效仍然相當有限，平均只有百分之十五至二十的反應率，而且對病患之存活並沒有太大的幫助。其副作用包含口腔炎和食道炎(可能引起脫皮和潰瘍)、腹瀉、食慾減退、噁心、嘔吐。

紫杉醇(Taxol、Paclitaxel)⁽³⁾⁽⁴⁾微小管抑制劑，可阻斷細胞於細胞周期之 G2 與 M 期，有聚合和穩定細胞內微管的作用，致使快速分裂的腫瘤細胞在有絲分裂階段被牢牢固定，使微小管不再分開，使癌細胞複製受阻斷而死亡，和目前常用的化療藥作用機理不同。其作用中，骨髓抑制、過敏反應、心律不整及神經毒性作用等較具有臨床上之重要性，且為主要限制 Taxol 繼續調昇劑量的因素。

Amitriptyline(AMT)是一種抗憂鬱藥物主要是作用在抑制腦內神經傳導物質(如 Norepinephrine, Serotonin 等)再回收至神經突觸前的神經末梢，如此可以提高這些傳導物質於突觸的作用，NMDA receptor 的拮抗劑，有研究發現對於一些疾病有新的療法，所以本研究創新將此藥物用於口腔癌治療，希望能有新的發現。⁽⁵⁾⁽⁶⁾

研究發現茶多酚具有抗炎功效及潛在預防癌治功能，阻止癌變過程產生，在抗發炎方面，它更有效的抑制產生細胞發炎因子，有效的增加負急性期蛋白(TTR 和 RBP)分泌物，形成抗發炎功效。在抗癌方面，它會誘導二期解毒/氧化酶和致癌物質催化結合反映後排出體外，從而防止致癌物質攻擊細胞 DNA，調控細胞週期、抑制生長、調解細胞凋亡而這些都和癌症形成有關，以及抗轉移能力以抑制癌症。⁽⁷⁾⁽⁸⁾

研究發現薑黃素具有抗發炎活性，並且是脂加氧酶、黃嘌呤氧化酶和誘導型一氧化氮合成酶的有效抑制劑，它還是是還蛋白 C 激酶、表皮生長因子受體酪氨酸激酶和的 I κ B 激酶的有效抑制劑。它也會抑制 NF- κ B 的活化和癌症基因的表達，包括 c-jun、c-fos、c-myc、NIK、MAPK、ERK、ELK、PI3K、Akt 蛋白、CDK、誘導型一氧化氮合成酶 iNOS。⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

「銅」作為醫療上的用途可追溯到公元前 2600 年，在埃及被用為胸部傷口以及飲用水的殺菌之用。直到抗生素於公元 1932 年被發現之後，銅在醫療上作為殺菌的用途才逐漸的減少。實驗中使用氯化銅 CuCl₂。⁽¹¹⁾

PDTC 的全稱為 Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate 或 Pyrrolidinedithiocarbamic acid, ammonium salt，是一種可以通透細胞膜的 NF- κ B 活化(NF- κ B activation)抑制劑，可以在多種細胞中抑制 NF- κ B 的激活，也是一種抗氧化劑(antioxidant)，以及金屬離子螯合劑(metal chelator)，並且可以在酸性溶

液中沉澱 As, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn, V, Zn 等重金屬。PDTC 可以誘導大鼠平滑肌細胞發生凋亡，也可以抑制白血病細胞 HL-60 發生凋亡。

材料與方法

MTT assay 是一種常用於測定細胞存活率或增殖作用的方法；MTT 為水溶性化合物，在水溶液中呈現黃色，可被活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶還原成紫色結晶，因此，well 中添加 MTT 試劑，well 中活細胞數越多，相對呈現出來脫氫酶活性越強，而使 MTT 被還原成紫色結晶堆積於細胞中量越高，即可依其呈現紫色深淺的吸光值來計算細胞存活率。

藥物對於細胞的作用彼此間可能有協同性(synergism)、或拮抗(antagonism)或加成(additive effect)效應，根據 Chou TC 等人(1984)提出之兩種藥物的聯用指數(combination index, CI)來分析兩種藥物之間的交互作用，計算公式為：

$CI = C_{A \cdot X} / IC_{A \cdot X} + C_{B \cdot X} / IC_{B \cdot X}$ ，其中 $C_{A \cdot X}$ 、 $C_{B \cdot X}$ 是指同時合併使用 A、B 兩種藥物達到 X% 有效時的個別藥物濃度， $IC_{A \cdot X}$ 、 $IC_{B \cdot X}$ 是指單獨用一種藥物達到 X% 有效時的藥物濃度，計算出 CI 值後，如果 $CI < 1$ 則兩藥物並用有協同作用， $CI = 1$ 兩藥物並用有加成作用， $CI > 1$ 兩藥物並用有拮抗作用。(12、13)

1. 培養口腔表皮癌細胞(OECM-1):將口腔表皮癌細胞(OECM-1)培養於不含酚紅的 RPMI DMEM，10% FBS，培養箱 37°C，5% CO₂
2. 將細胞種於 96well 中，每個 well 有 10000 個細胞/100 μl
3. 等待:等待 16~18 小時，確認細胞經過換盤後已經開始穩定附著才開始加藥
4. 配藥、加藥:按照設計好的藥物濃度及組合配置並在每個 well 加入所配好指定濃度之藥物 10 μl，且每個藥物濃度均重複 3 個 well，依實驗設計作用 24 小時、48 小時、72 小時
5. 測 O.D 值: 每個 well 加入配置好的 MTT cocktail 50 μl 放入培養箱中作用 4 小時後，將藍紫色沉澱物混和均勻，以 550nm 測其 O.D 值

MTT cocktail 配置 1000 μl：

Culture medium：900 μl/ml

蛋黃：80 μl/ml

(將蛋黃和 PBS1：1 均勻混和，以 8000 轉離心 10 分鐘，取上清液使用)

SDCA：10 μl/ml

(sodium deoxycholriacid)以二次水泡製 100mg/ml，10%)

Triton x-100：10 μl/ml

(Triton x-100 以二次水泡製 100mg/ml，10%)

MTT：5 μl/ml

(100mg/ml，溶於 DMSO)

6. 計算細胞存活率: $(\text{Sample O.D.值} - \text{Blank 平均}) / (\text{Control} - \text{Blank 平均}) * 100\%$
(Blank 為只有 100 μl Culture medium 的 well, Control 為含有 10000 個細胞/100 μl 的 well, 只加 10 μl Culture medium)
7. 計算兩種藥物的聯用指數(combination index, CI) 協同作用 (CI<1), 相加作用 (CI=1), 及拮抗作用 (CI>1)
公式: $CI = C_{A \cdot X} / IC_{A \cdot X} + C_{B \cdot X} / IC_{B \cdot X}$

結果

從研究結果看到加了單獨藥物阿黴素(doxorubicin)、5-Fluorouracil (5-FU)、紫杉醇(Taxol)和薑黃素(curcumin)、Amitriptyline(AMT)、氯化銅確實是會抑制口腔癌細胞生長，且呈現劑量反應關係，濃度越高抑制效果越好，但薑黃素和阿黴素以及紫杉醇的組合藥物雖然也會抑制癌細胞生長沒看到更加抑制的效果，而薑黃素和 5-Fluorouracil 則有協同作用，單獨使用茶多酚(綠茶、烏龍茶、普洱茶萃取物)會促進癌細胞生長，有的甚至比對照組生長高達兩倍，以致和茶多酚組合的藥物效果並沒有比單獨使用藥物來的好，而氯化銅對於癌細胞生長抑制效果很好，且和金屬螯合物 PDTC 並用發現比單獨只有氯化銅的抑制效果更加，而單獨使用 PDTC 發現高濃度會促進癌細胞生長。

從表一、表二、表三結果可以看到薑黃素及阿黴素在藥物作用 48 小時抑制細胞生長效果較 21 小時好，薑黃素在作用 21 小時 IC50 為 55.6 μM ，48 小時為 36.5 μM ，阿黴素在作用 21 小時 IC50 為 221 μM ，48 小時為 29 μM ，5-Fluorouracil 在作用 21 小時 IC50 為 412 μM ，48 小時為 278 μM 。

表五、表六、表七分別為薑黃素和阿黴素、5-Fluorouracil 以及紫杉醇的組合藥物，薑黃素濃度 50 μM 作用 21 小時存活率約為 50.3%，阿黴素濃度 100 μM 作用 21 小時存活率約為 95%，兩者並用存活率約為 93.7%，5-Fluorouracil 濃度 100 μM 作用 21 小時存活率約為 69.4%，和薑黃素並用存活率約為 98.6%，在 48 小時方面，薑黃素濃度 50 μM 作用 48 小時存活率約為 39.1%，阿黴素濃度 100 μM 作用 48 小時存活率約為 38.8%，兩者並用存活率約為 32.4%，薑黃素及阿黴素並用 48 小時 IC50 分別為 11.7 μM 、23.4 μM ，CI 值為 1.1，為相加作用，5-Fluorouracil 濃度 100 μM 作用 48 小時存活率約為 57.4%，和薑黃素並用存活率約為 36.6%，薑黃素及 5-Fluorouracil 並用 48 小時 IC50 分別為 17.5 μM 、35 μM ，CI 值為 0.6，為協同作用，薑黃素濃度 30 μM 作用 48 小時存活率約為 49.3%，紫杉醇濃度 1 μM 作用 48 小時存活率約為 76.2%，和薑黃素並用存活率約為 65.7%，薑黃素及紫杉醇並用 48 小時 IC50 分別為 15.3 μM 、0.5 μM ，CI 值為

3，為拮抗作用，其並用的抑制效果並沒有比單獨使用藥物來的好。

從表八結果可以看到氯化銅會抑制口腔癌細胞生長，且呈現劑量反，表九 PDTC 則無太大作用，但在表十可以看到氯化銅和 PDTC 並用更抑制癌細胞生長，且 PDTC 10 μ M 效果比 3 μ M 更佳，單獨使用氯化銅作用 24 小時濃度 0.03 μ M 存活率約為 62%，PDTC 作用 24 小時濃度 3 μ M 存活率約為 87.2%，兩者並用的結果則為 35%，而 PDTC 作用 24 小時濃度 10 μ M 存活率約為 91%，兩者並用的結果則為 19.5%。

表十一為 AMT 單獨使用之細胞存活率結果，在 30 μ g/ml 作用 48 小時存活率為 31.9%，IC50 約為 24 μ g/ml，和紫杉醇並用 48 小時 IC50 分別為 13 μ g/ml、0.5 μ M，CI 值為 3.4，為拮抗作用。

討論

實驗當中因銅離子的關係使 well 中呈現藍色，所以會在沒有細胞的 well 也加入藥物，將其測出的 O.D. 值作為背景值扣除。實驗結果中 IC50 利用趨勢線算得，但有些細胞存活率結果無法算得 IC50 所以沒有列出，紫杉醇(Taxol)應該再嘗試更高濃度，說不定有更好的結果，雖然天然植多酚茶多酚(綠茶、烏龍茶、普洱茶萃取物)及薑黃素，和阿黴素、紫杉醇並用組合、AMT 和紫杉醇並用組合效果並沒有比單獨使用藥物來的好，但 5-Fluorouracil 及薑黃素、氯化銅及 PDTC 則有更佳抑制的效果。在往後將對於 5-Fluorouracil 及薑黃素、氯化銅及 PDTC 作用後的細胞進行流式細胞儀分析，以及 in vivo 實驗，來看動物實驗是否有相同結果，作進一步的研究，進行另外將會比較不同金屬是否也會有相同效果，希望在口腔癌藥物有更新的發現。

參考文獻

1. Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res.* 1976-08, 36 (8): 2891-5.
2. Daniel B. Longley, D. Paul Harkin and Patrick G. Johnston. 5-FLUOROURACIL: MECHANISMS OF ACTION AND CLINICAL STRATEGIES. *Nature Reviews Cancer* 3, 330-338 (May 2003)
3. Anna Maria Barbuti and Zhe-Sheng Chen. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation

Therapy. *Cancers* 2015, 7(4), 2360-2371

4. Hu J, Zhang NA, Wang R, Huang F, Li G. Paclitaxel induces apoptosis and reduces proliferation by targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2015 ct;10(4):2378-2384.
5. Chen, HS; Lipton SA (2006). "The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists". *Journal of Neurochemistry* 97 (6): 1611–26.
6. Gardoni, F; Di Luca M (2006). "New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse". *European Journal of Pharmacology* 545 (1): 2–10.
7. Pan MH1, Chiou YS, Wang YJ, Ho CT, Lin JK. (2011) Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. *Food Funct.* Feb;2(2):101-10.
8. Chen PN1, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK, Hsieh YS. (2011) Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem.* Apr 27;59(8):3836-44.
9. Lin JK1, Lin-Shiau SY.(2001) Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* Apr;25(2):59-66.
10. Sak K1. (2014) Site-Specific Anticancer Effects of Dietary Flavonoid Quercetin *Nutr Cancer.*;66(2):177-93
11. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Mar;77(5):1541-7.
12. Takahashi, N., Li, W., Banerjee, D., Guan, Y., Wada-Takahashi, Y., Brennan, M. F., Chou, T. C., Scotto, K. W., Bertino, J. R. (2002). Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of ecteinascidin-743 and paclitaxel in human breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Cancer research*, 62(23), 6909-6915.
13. Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 70(2), 440-446.

表一：薑黃素(curcumin)細胞存活率及 IC50 結果

curcumin 濃度(μM)	21hr		48hr	
	MEAN%	SE	MEAN%	SE
10			87.7	11.2
20	85.6	5.1		
30	92.0	6.7	49.3	5.5
40	72.3	1.3		
50	50.3	4.5	39.1	3.5
60	52.6	3.3		
IC50	55.6(μM)		36.5(μM)	

薑黃素在作用 21 小時 IC50 為 55.6 μM ，48 小時為 36.5 μM

表二：阿黴素(doxorubicin)細胞存活率及 IC50 結果

doxorubicin 濃度(μM)	21hr		48hr	
	MEAN%	SE	MEAN%	SE
30	107.1	4.9	47.4	0.7
50	113.6	1.7	42.1	1.1
100	95.0	2.0	38.8	3.3
200	98.9	4.5	35.3	1.6
IC50	221(μM)		29(μM)	

阿黴素在作用 21 小時 IC50 為 221 μM ，48 小時為 29 μM

表三：5-Fluorouracil(5fu)細胞存活率及 IC50 結果

5fu 濃度(μM)	21hr		48hr	
	MEAN%	SE	MEAN%	SE
10	83.3	2.0	82.5	1.4
30	69.7	3.5	73.2	5.5
100	69.4	4.4	57.4	2.4
200	68.4	3.1	55.7	4.3
385	55.9	3.2	50.5	2.6
IC50	412(μM)		278(μM)	

5-Fluorouracil 在作用 21 小時 IC50 為 412 μM ，48 小時為 278 μM

表四：紫杉醇(Taxol)細胞存活率及 IC50 結果

taxol 濃度(μM)	21hr		48hr	
	MEAN%	SE	MEAN%	SE
0.001			94.1	2.1
0.003			88.1	2.2
0.01	81.5	17.2	78.3	2.1
0.1	110.5	11.5	77.5	1.2
1			76.5	1.2
IC50	0.2(μM)			

紫杉醇在作用 48 小時 IC50 為 0.2 μM

表五：薑黃素(50 μM)和阿黴素(100 μM)組合的細胞存活率、IC50、CI 結果

cur50dox100 濃度(μM)	21hr		48hr	
	MEAN%	SE	MEAN%	SE
1/8(6.25/12.5)	74.7	5.8	56.5	2.9
1/4(12.5/25)	86.0	12.1	58.6	4.9
1/2(25/50)	94.2	10.8	52.4	4.4
1(50/100)	93.7	12.5	32.4	1.8
IC50	11.7/23.4(μM)			
CI	1.1			

薑黃素及阿黴素並用 48 小時 IC50 分別為 11.7 μM 、23.4 μM ，CI 值為 1.1，為相加作用

表六：薑黃素(50 μM)和 5-Fluorouracil(100 μM)組合的細胞存活率、IC50、CI 結果

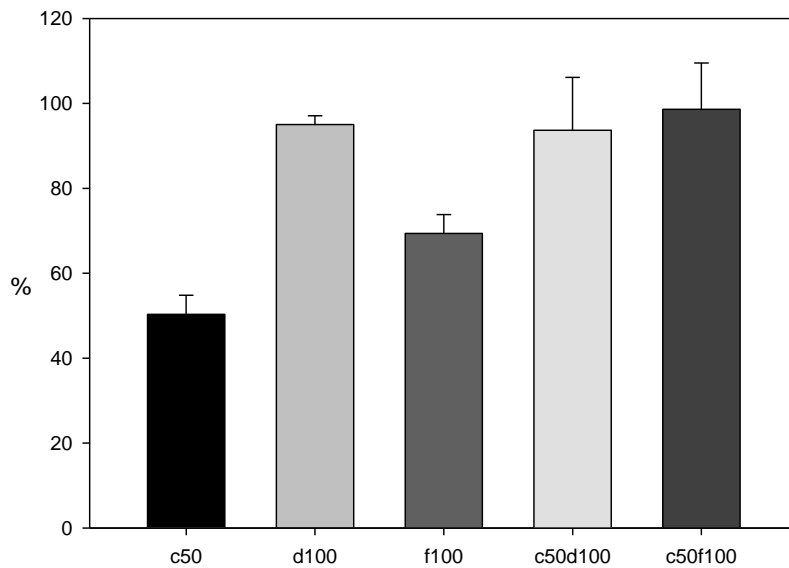
cur50f100 濃度(μM)	21hr		48hr	
	MEAN%	SE	MEAN%	SE
1/8(6.25/12.5)	91.7	4.8	95.6	7.5
1/4(12.5/25)	82.4	8.6	75.2	8.8
1/2(25/50)	100.0	8.6	56.3	1.0
1(50/100)	98.6	10.9	36.6	0.7
IC50	17.5/35(μM)			
CI	0.6 *			

薑黃素及 5-Fluorouracil 並用 48 小時 IC50 分別為 17.5 μM 、35 μM ，CI 值為 0.6，為協同作用

表七：薑黃素(cur 30 μ M)和紫杉醇(t 1 μ M)組合的細胞存活率、IC50、CI 結果

cur30t1(mix) 濃度(μ M)	48hr	
	MEAN%	SE
1/64(0.46/0.01)	117.7	14.4
1/32(0.93/0.03)	107.4	8.2
1/16(1.87/0.06)	89.2	5.7
1/4(7.5/0.25)	85.1	5.2
1(30/1)	65.7	6.6
IC50	15.3/0.5(μ M)	
CI	3.0	

薑黃素及紫杉醇並用 48 小時 IC50 分別為 15.3 μ M、0.5 μ M，CI 值為 3，為拮抗作用



圖一、為藥物作用 21 小時單獨、合併使用結果比較

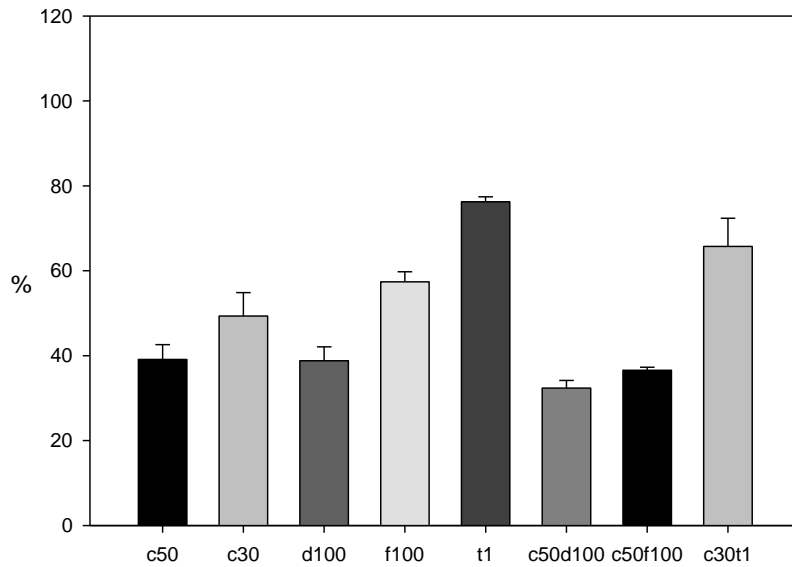
(c50：薑黃素濃度 50 μ M)

(d100：阿黴素濃度 100 μ M)

(f50：5-Fluorouracil 濃度 100 μ M)

(c50d100：薑黃素 50 μ M 和阿黴素 100 μ M 並用)

(c50f100 薑黃素 50 μ M 和 5-Fluorouracil 100 μ M 並用)



圖二、為藥物作用 48 小時單獨、合併使用結果比較

(c50：薑黃素濃度 $50 \mu\text{M}$)

(c30：薑黃素濃度 $30 \mu\text{M}$)

(d100：阿黴素濃度 $100 \mu\text{M}$)

(f50：5-Fluorouracil 濃度 $100 \mu\text{M}$)

(t1：紫杉醇濃度 $1 \mu\text{M}$)

(c50d100：薑黃素 $50 \mu\text{M}$ 和阿黴素 $100 \mu\text{M}$ 並用)

(c50f100 薑黃素 $50 \mu\text{M}$ 和 5-Fluorouracil $100 \mu\text{M}$ 並用)

(c30t1 薑黃素 $30 \mu\text{M}$ 和紫杉醇 $1 \mu\text{M}$ 並用)

表八：氯化銅細胞存活率及 IC50 結果

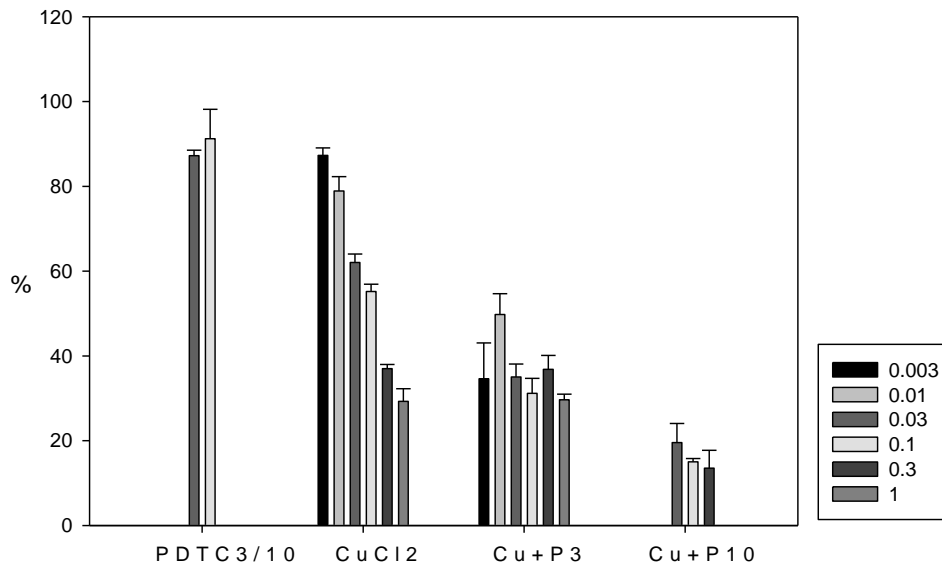
CuC12 濃度 (μM)	24hr	
	MEAN	SE
0.003	87.3	1.8
0.01	78.9	3.4
0.03	62.0	2.0
0.1	55.2	1.7
0.3	37.0	1.0
1	29.3	3.0
IC50	0.4 (μM)	

表九：PDTC 細胞存活率結果

PDTC 濃度(μM)	24hr	
	MEAN	SE
3	87.2	1.3
10	91.2	7.0

表十：氯化銅和 PDTC $3\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 組合的細胞存活率結果

Cu+PDTC 濃度(μM)	24hr		Cu+PDTC 濃度(μM)	24hr	
	MEAN	SE		MEAN	SE
0.003/3	34.6	8.5			
0.01/3	49.8	4.9			
0.03/3	35.0	3.1	0.03/10	19.5	4.5
0.1/3	31.2	3.6	0.1/10	15.0	0.8
0.3/3	36.8	3.3	0.3/10	13.5	4.2
1/3	29.7	1.3			



圖三、為藥物作用 24 小時單獨、合併使用結果比較

(PDTC 單獨使用濃度分別為 $3\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$)

(CuCl₂ 單獨使用濃度分別為 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、 $1\mu\text{M}$)

(並用 CuCl₂ 濃度 0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、 $1\mu\text{M}$ +PDTC $3\mu\text{M}$)

(並用 CuCl₂ 濃度 0.03、0.1、 $0.3\mu\text{M}$ +PDTC $10\mu\text{M}$)

表十一、Amitriptyline(AMT)的細胞存活率及 IC50 結果

AMT 濃度($\mu\text{g/ml}$)	48hr	
	MEAN	SE
10	82.2	5.3
15	64.0	2.6
20	54.1	2.4
30	31.9	3.0
50	13.7	2.4
IC50	24($\mu\text{g/ml}$)	

表十二、Amitriptyline(AMT)和紫杉醇組合的細胞存活率、IC50、CI 結果

amt30t1(mix)	48hr	
	MEAN	SE
1/32(0.93/0.03)	75.8	2.4
1/16(1.87/0.06)	74.2	1.8
1/8(3.75/0.12)	71.0	2.6
1/4(7.5/0.25)	63.5	1.1
1/2(15/0.5)	59.1	2.0
1(30/1)	51.3	2.5
IC50	13($\mu\text{g/ml}$)/0.5(μM)	
CI	3.4	

AMT 及紫杉醇並用 48 小時 IC50 分別為 13 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 μM ，CI 值為 3.4，為拮抗作用