

行政院衛生署 94 年度科技研究發展計畫

中文：中藥抑制癌瘤細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究

英文：The study of Chinese medicinal herbs inhibits cancer cell migration/invasion

研究報告

計畫委託機關：行政院衛生署中醫藥委員會

計畫主持人：謝易修 教授

研究人員：楊順發、柳尚容、詹雅筑

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署 94 年度科技研究發展計畫

中文：中藥抑制癌瘤細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究

英文：The study of Chinese medicinal herbs inhibits cancer cell
migration/invasion

研究報告

計畫委託機關：行政院衛生署中醫藥委員會

計畫主持人：謝易修 教授

研究人員：楊順發、柳尚容、詹雅筑

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

行政院衛生署中醫藥委員會 94 年度
研究計畫成果報告

**中文：中藥抑制癌瘤細胞遷移和侵犯作用之系統
分析研究**

**英文：The study of Chinese medicinal herbs
inhibits cancer cell migration/invasion**

執行機構：中山醫學大學醫學系生化學科

計畫主持人：謝易修 教授

研究人員：楊順發、柳尚容、詹雅筑

執行期限：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

中藥抑制癌瘤細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究

謝易修

中山醫學大學醫學系生化學科

摘要

研究目的

中藥對癌症所引起的諸多症狀的治療能有所助益，已是不爭的事實。而以化學療法的觀點，發展並研究出中藥的有效成份，以供臨床上抗發炎、抗過敏及抗癌的應用，在近年來受到廣泛注意。目前已有多種中藥已被確認具有抗發炎，抗過敏及抗癌的活性，而其中有關活性的有效成份，部分已被單離並經分析鑑定。而中藥之抗癌有效成份之作用機轉，為有效地促使凋謝死亡及抑制癌瘤細胞增生，侵襲及轉移，但對其系統生物學方面的研究及建立尚很少。因此本計畫擬進行(1)分析 57 種中藥對癌瘤細胞如肺癌及肝癌等細胞之 cell adhesion, motility, migration 及 invasion 活性的影響；(2)探討 57 種中藥對癌瘤細胞如肺癌及肝癌等細胞之 ECM 分解相關基因表現量的影響，包括 MMPs、TIMPs、t-PA、u-PA 及 PAIs；(3)利用動物模式探討中藥抑制癌瘤細胞的生長。

研究方法

本實驗利用了 MTT assay 探討中藥對肺癌細胞 A549 的細胞存活率；也利用 Boyden chamber 分析中藥對肺癌細胞之 cell adhesion、motility、migration 及 invasion 活性的影響。我們也利用 gelatin zymography 及 western blotting 分析中藥對肺癌細胞 ECM 分解有關基因表現量的影響。最後我們利用 Lewis lung carcinoma 及 C57BL/6 的動物模式探討中藥對抑制癌瘤細胞生長的影響。

結果與討論

我們取中藥萃取物，加入 A549 細胞株中，利用這些中藥萃取物在 100µg/ml 是否影響 A549 的細胞生長能力、invasion 及 migration 能力，我們將中藥分成三大類，第一大類是在 100µg/ml 的濃度時，不影響細胞生長能力、卻會抑制細胞 invasion 及 migration 能力；第二大類是在 100µg/ml 的濃度時，會抑制細胞生長能力、細胞 invasion 及 migration 能力；第三大類是在 100µg/ml 的濃度時，完全不會抑制細胞生長能力、細胞 invasion 及 migration 能力。而我們發現紫丁地、卷柏、夏枯草、葉下珠、骨碎補及欖仁樹的葉這六種中藥萃取物抑制 A549 細胞株 invasion 及 migration 能力是經由抑制癌症轉移及侵襲的相關基因 MMP-2 及 u-PA 的表現及其抑制劑之間的表現所造成的。另外，我們也在 mRNA level 方面看到類似的抑制結果。而我們也在動物模式方面，更加應證了這些中藥萃取物會抑制腫瘤轉移及侵襲的能力。

關鍵詞：中藥、癌瘤細胞轉移、侵入、金屬蛋白水解酶

The study of Chinese medicinal herbs inhibits cancer cell migration/invasion

Yih-Shou Hsieh
Institute of Biochemistry and Biotechnology

Aim

It has been well established that Chinese herbal medicines have beneficial effects for various symptoms of cancers. For chemotherapy, a great deal of attention has been focused on studies and researches for the active ingredients of Chinese herbal medicines for the treatment of inflammation, allergy, and cancers. So far, various Chinese herbal medicines have been confirmed to possess an activity against inflammation, allergy and cancers, while some of active ingredients have been isolated and identified. The anticancer mechanisms of these active ingredients are to effectively promote apoptosis, inhibit the proliferation, invasion and metastasis of cancer cells. However, there are still inadequate researches to establish the detailed mechanisms. (1) to analyze the impacts of 57 Chinese herbal medicines on the cell adhesion, motility, migration and invasion of various cancer cells, including cancers of lung and liver cancer (2) to investigate the impacts of 57 Chinese herbal medicines on the expression of genes relevant to ECM-degradation, such as MMPs, TIMPs, t-PA, u-PA, and PAIs of various cancer cells, including cancers of lung and liver cancer; and (3) to use the animal model to evaluate the impacts by the addition of Chinese herbal medicines and their applications.

Method

With a few established techniques, including gelatin, casein zymography, immunoblotting, RT-PCR and Boyden chamber for MMPs, u-PA, and t-PA, our Lab is very capable of performing studies on genes relevant to ECM-degradation, such as MMPs, TIMPs, plasmin, t-PA, and u-PA to clarify their involvements in anticancer ability. We also use the animal model including Lewis lung carcinoma and C57BL/6 miceto clarify the Chinese herbal medicines in anticancer ability.

Results & Discussion

We analyze the impacts on the cell adhesion, motility, migration and invasion of A549 lung cancer cell using 57 Chinese herbal medicines. 57 Chinese herbal medicines were divided into three groups based on the inhibitory ability of viability, invasion and migration. With 6 Chinese herbal medicines including *Phyllanthus urinaria*, *Selaginella tamariscina*, *Terminalia catappa*, *Davallia mariesii* Moore, *Prunella vulgaris* and *Syringa vulgaris* treatment on A549 cell showed may decrease the expressions of MMP-2 and u-PA in a concentration- manner. Further analysis with semi-quantitative RT-PCR showed that these Chinese herbal medicines may regulate the expressions of MMP-2 and u-PA on the transcriptional level. Furthermore, use the animal model also showed that these Chinese herbal medicines may inhibit the tumor growth and migration in vivo.

Keywords : metastasis, tumor cell, Chinese herbal medicines

癌瘤細胞的轉移擴散(metastasis)往往是癌症病人在臨床治療上預後的一重要指標，在癌症的分期上，癌細胞的轉移擴散與否也是一個重要的分界，當腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部或原位癌。如果能在此階段進行治療則治癒率最高。當腫瘤細胞藉由血液、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長程續發性惡性腫瘤，就稱為轉移性癌[1]。大部分的原發性的病灶可以由外科手術及其他治療方式將其移除，但是轉移性癌因已擴散至身體各處，造成治療上的困難。一般而言，癌細胞的轉移擴散必須伴隨著細胞生理狀態的改變，其中包含了【一】細胞移動(motility)和侵襲(invasion)能力的增加；【二】細胞與細胞間相互作用力的破壞；【三】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間結合能力(adhesion)的增加；以及【四】細胞外基質的分解。而癌細胞的轉移擴散是由癌細胞穿過細胞外基質開始，緊接著侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管的新生成(angiogenesis)，奪取正常組織器官的養分而使癌細胞大量增生(proliferation)造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。而癌細胞在轉移擴散的過程中，可分為侵襲(invasion)及轉移(migration)兩個階段，其中腫瘤細胞破壞基底膜(basal membrane)以侵入周圍組織，便稱之為侵襲，而癌細胞藉由侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，便稱之為轉移。當正常細胞轉變成癌症細胞時，需要特殊的訊息傳導使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發癌細胞組織周圍血管增生以供應足夠的養分另外提升癌細胞對周圍組織的侵潤和轉移[2]。造成癌細胞轉移的機轉並不是很清楚，可能導因於某些基因的突變造成功能失調，如 Myc、Ras 及 p53 等。當 Myc 基因突變時會造成癌細胞具有抗凋亡的能力，這主要是因為 Myc 誘發 Bcl-XL 蛋白質的表現[3]。而 Ras 的突變在很多研究證實與腫瘤細胞轉移有關，其可能原因為 Ras-MAPK 訊息持續被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)的大量表現，促使腫瘤細胞分解基底膜造成轉移[4-6]。

傳統中藥使用以複方為主，加上中藥成分複雜，所以在研究上受到許多限制，但隨著藥理學的發展，許多中藥的有效成分已被確定，且進一步分離出來，對於研究的進行頗有助益。以人參為例，其屬於五加科植物，始載於神農本草經，列為上品，歷代本草皆有收載。其種類繁多[7]，主治方面多強調其大補元氣，治療內傷及一切血證[8]。而早在 1858 年 Grarrique 就已經自美國人參分離出粗皂甘[9]，但直到一九五十年代中期，陸續有研究發現人參皂甘(ginsenoside)是

人參生理活性的主要成分[7]。而在人參皂甘抑制癌細胞生長的動物實驗中，日本的一個研究團隊研究做的很詳盡，他們在 nude mice 身上種植人類卵巢癌細胞，再口服人參皂甘，證實人參皂甘可以抑制癌細胞的生長，並且在 1990，1993，1998 發表他們的研究成果 [10-12]。另外在細胞實驗中方面有研究團隊指出，他們以 SK-HEP-1 這株肝癌細胞為研究對象，證實人參皂甘可以使癌細胞的細胞週期 (cell cycle arrest)，並且造成癌細胞的凋亡 (apoptosis) [13-14]。日本亦有做相關的實驗，他們取的是 murine 的 B16 melanoma 這株細胞，也證實了人參皂甘可使癌細胞的細胞週期停滯在 G1 期 [15]。另外，在台灣金線蓮方面，台灣金線蓮為多年生草本植物，屬地生蘭的一種，亦為台灣特有種，在民間是一應用極廣的藥草植物，全株皆可入藥。早期台灣原住民及利用金線蓮來治療病痛及蛇類咬傷，目前經中藥臨床實驗亦認為其有抗菌及抗癌功效，並被廣泛應用於治療各臟器引起的各種病症，對人體的保健調養甚具功效 [16-18]。也因此，引起許多對於其植株內各項成分的研究興趣，以期能對其生理特性及營養成分有更清楚的了解，而有助於其醫藥方面的應用 [19-21]。

而在其他中藥方面如厚朴 (*magnolia officinalis*)，其主要成份為 Magnolol。Magnolol 是傳統中藥厚朴 (*magnolia officinalis*) 中萃取出來的有效成分之一，至今已發現其具有許多的藥理作用，包括抗發炎、抗氧化 [22]、抗凝血、抑制 VCAM-1 [23] 及 MCP-1 [24] 表現、及血管舒張等作用。除此之外，Magnolol 也具有抑制腫瘤細胞增生及誘發發炎細胞凋亡的效果 [25]。

由之前的文獻報導可以發現，中藥的確具備許多的功效，無論在抗病毒、抗菌、抗發炎、抗過敏、對心血管疾病、預防癌症及抗癌效果外皆有明顯的功效。因此，本計劃擬從上百種中藥中，挑選 57 種中藥，利用 invasion/migration 之系統來探討中藥對抑制癌細胞侵入及轉移的能力；並建立一套中藥對人類癌細胞侵襲及轉移的抑制能力評估標準。

貳、材料與方法

1. 57 種中藥成分之萃取 [26]

57 種中藥藥材如表一，分別採用田間的藥用植物或購自各地的藥材市場，經專家鑑定後才進行處理。各藥材經洗滌，陰乾後，各稱取 100-200 公克，切碎放入圓底燒瓶中，分別以水或有機溶劑如 50% 酒精，80% 丙酮或甲醇於 70°C 水浴中迴流六小時，萃取液趁熱過濾並保存之。重複迴流步驟共四次，並合併四次經過濾之萃取液，進行減壓濃縮，待去除有機溶劑則冷凍乾燥而存放

於-20°C冰櫃中以備分析用。

2. 細胞培養及處理

不同細胞株選擇適當培養基培養，如 A549，HA22T 細胞以 DMEM 培養基培養；加入適量 antibiotics 及 heat-inactivated FCS，及適量測試之中藥萃取成分於細胞培養箱中培育，不同間隔 (4, 8, 12, 24, 48, 72 小時)後取出 conditioned medium 及 cell lysate 進行 MMPs, TIMPs, t-PA, u-PA, PAIs 含量或活性分析。

3. cell invasion 分析 [27]

在 Transwell (Corning Costar, Cambridge, MA) 或 modified Boyden 上下兩個 chamber 分別以 10 μ l type I collagen (0.5 mg/ml) 及 20 μ l Matrigel:DMEM (1:2) 溶液塗膚；並於上層 chamber 加入 5×10^4 試驗細胞/chamber 及適量測試之中藥萃取成分 (上下層 chamber 培養液均含 0.1 mg/ml BSA)，於細胞培養箱中培浴 18 小時後，經固定染色在顯微鏡下計算侵入到下層 chamber 外膜細胞數。

4. cell migration 分析[27]

方法同 cell invasion 分析，只是上下兩個 chamber 都塗膚 10 μ l type I collagen (0.5 mg/ml)，再加入 5×10^4 cells/chamber 及適量測試之中藥萃取成分(上下層 chamber 培養液均含 0.1 mg/ml BSA)，於細胞培養箱中培浴 18 小時後，經固定染色在顯微鏡下計算侵入到下層 chamber 外膜細胞數。

5. 細胞生長測試

利用 BioSOURCE 的細胞生長測定系統進行分析；將 200 μ l alamar blue 加入培養細胞的 2ml 培養液(medium)中，在 24、48 和 72 小時時，各取培養液 200 μ l 再加入 PBS 到 500 μ l，利用光譜分析儀選 570nm 和 600nm 測定 O.D.值，換算細胞生長速率。

6. 蛋白質 (protein lysate) 製備[28]

試驗細胞經 PBS 洗淨，以刮杓自 culture dish 刮離，接著加入適量緩衝液 A (20mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.5mM EGTA、0.3M sucrose、2mM PMSF、10 μ g/ml leupeptin、25 μ g/ml soybean trypsin inhibitor typ I-S 和 50mM β -mercaptoethanol, pH 7.5)，以攪拌器研磨組織，先將所得萃取液經 4°C 下離心(800g)10min 移除細胞核後，再將上清液經超高速離心在 4°C 下離心(40Krpm) 1 hr，分出上清液(即細胞質部份)及沉澱物(含胞膜及胞核之部份)。將細胞質部份置於 -80°C 貯存；沉澱物以 2ml 緩衝液 B (含有 0.1% Triton-X 100 的緩衝液 A)處理之，混合完全後靜置 1 小時，在 1 小時內每 15 分鐘混合一次(重覆四次)，在 4°C 下離心(40Krpm) 1 hr，取上清液即為微粒部份，分裝於 -80°C 貯存。

7. 蛋白濃度測定[29]

蛋白質的定量採用"Bradford's protein assay"方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物。測定方法：首先以一系列已知濃度 BSA，加入五分之一體積的 Bradford protein dye 以波長 595nm 之吸光度作一標準曲線，再以同樣的測定方法測得樣品之 O.D.值，即可對照標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

8. gelatin-zymography (gelatinase 活性測試) [30]

首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample(蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱下反應 12 個小時。將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

9. casein-zymography (u-PA 及 t-PA 活性測試) [31]

首先製備 10 % SDS-PAGE 電泳膠片，並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 12 μ g/ml 的 plasminogen，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample(蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離，大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer (2.5% Triton X-100 in d H₂O)，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次，倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)，於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱下反應 12 個小時，將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

10. Western blotting 分析:[32]

利用 western blotting 可測定的 MMPs, u-PA, t-PA, TIMPs, PAI 及 u-PAR 的蛋白量; 首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 μ l sample (蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample denature (95 $^{\circ}$ C, 10 min)之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下後進行蛋白轉移，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 transfer holder，於 4 $^{\circ}$ C 下，以 100V 進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4 $^{\circ}$ C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS+0.05% Tween

20)清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應(或以 ECL 冷光系統紀錄)，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應並晾乾，並以 densitometer(Alphalimage 2000，AlphaImage comp)量化結果。

11. total RNA 及 mRNA 分離 [33]

檢體 total cellular RNA 是以傳統在 4M guanidine thiocyanate-acid phenol method 或以 RNA 萃取套組 RNazol 進行分離; poly(A)RNA 則是用 oligo(dT)-latex 進一步純化。

12. RT-PCR 分析 [34]

取 15 μ g mRNA 利用 oligo-d(T)15 為 primer (或「random primer」以 MMLV-RTase (200units)在 20 μ l 反應溶液中(50mM Tris-HCl, pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20units RNasin)進行 cDNA 合成; 取 5 μ l cDNA 至 PCR 反應溶液中(最終為 50 μ l)以 primers 資料的預估溫度，利用 Taq polymerase 進行 30 cycles PCR 反應，其產物再以 1.8 % agarose 膠電泳分離，以 ethidium bromide 染色並觀察。

13. 動物模式: [35]

在動物模式方面，我們參考文獻，將 5x10⁶/100 μ l PBS 洗淨的 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞，打入 C57BL/6 老鼠的 right hind limb，5 天後將接種癌瘤細胞的老鼠隨機分組，進一步餵食中藥萃取物 (3 mg 中藥萃取物/每公克老鼠)，每天餵食一次，3 週後犧牲老鼠，取出腫瘤及肺臟以觀察其腫瘤大小、重量及轉移至肺部的能力，同時分析 MMPs family, t-PA, u-PA, TIMPs 及 PAIs 等研究標的，以評估應用的可行性。

14. 統計分析

所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA)進行 one-way analysis of variance(one-way ANOVA)分析。

參、結果

我們取 50 及 100 μ g/ml 中藥萃取物，加入 A549 細胞株中，探討這些中藥對 A549 細胞株細胞生長能力、invasion 及 migration 能力的影響。利用這些中藥萃取物是否影響 A549 的細胞生長能力、invasion 及 migration 能力，我們將中藥分成三大類，第一大類是在 100 μ g/ml 的濃度時，不影響細胞生長能力、卻會抑制細胞 invasion 及 migration 能力(Table 1)；第二大類是在 100 μ g/ml 的濃度時，會抑制細胞生長能力、細胞 invasion 及 migration 能力(Table 2)；第三

大類是在 100 μ g/ml 的濃度時，完全不會抑制細胞生長能力、細胞 invasion 及 migration 能力(Table 3)。經由初步的區分之後，我們選擇第一大類繼續深入去探討其抑制細胞 invasion 及 migration 能力的詳細機制。因此，我們利用 gelatin zymography 及 casein zymography 觀察這一大類 6 種中藥處理 A549 細胞株 24 小時之後，其分泌 MMP-2 及 u-PA 這兩種蛋白水解酵素的結果。從 Fig-1 我們發現這六種中藥萃取物都會抑制 A549 細胞株分泌 MMP-2 的能力，並且有 dose-dependent 的趨勢。而我們也發現這六種中藥萃取物也都會抑制 A549 細胞株分泌 u-PA 的能力，並且也有 dose-dependent 的趨勢(Fig-2)。而我們也利用 western blotting 的分析方式，觀察 MMP-2 及 u-PA 的抑制劑 TIMP-2 及 PAI-1 的表現量，我們發現這六種中藥萃取物有的會抑制 A549 細胞株 TIMP-2 及 PAI-1 表現量的能力(Fig-3.)。另外在 MMP-2、u-PA 及其抑制劑的 mRNA level 方面，我們利用 RT-PCR 的分析方式，也看到類似的抑制結果(Fig-4 及 Fig-5.)。接著，我們進一步利用 Lewis lung carcinoma 及 C57BL/6 的動物模式，將 5x10⁶/100 μ l PBS 洗淨的 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞，打入 C57BL/6 老鼠的 right hind limb，5 天後將接種癌瘤細胞的老鼠逢機分組，進一步餵食適量中藥萃取物(3 mg 中藥萃取物/每公克老鼠)，每天餵食一次，3 週後犧牲老鼠，取出腫瘤及肺臟以觀察其腫瘤大小、重量及轉移至肺部的能力。從 Fig-6 我們可以發現，紫丁地、卷柏及欖仁樹的葉會有明顯抑制腫瘤大小及重量的情形。而在抑制轉移至肺部的能力方面，我們發現紫丁地、卷柏、夏枯草、葉下珠及欖仁樹的葉會有明顯抑制腫瘤轉移至肺部的能力(Fig-7)。接著我們進一步加入 0、10、25、50、75 及 100 μ g/ml 的欖仁樹萃取物，我們發現欖仁樹萃取物不會抑制 A549 細胞株細胞生長能力(Fig-8)，去會影響其 invasion 及 migration 能力的影響(Fig-9)。而且也會抑制其相關基因 MMP-2、u-PA、PAI-1 及 TIMP-2 的表現(Fig-10、Fig-11)。

肆、討論

由上述的結果，我們發現在 57 種中藥萃取物中，加入 A549 細胞株，探討這些中藥對 A549 細胞株細胞生長能力、invasion 及 migration 能力的影響。利用這些中藥萃取物是否影響 A549 的細胞生長能力、invasion 及 migration 能力，我們將中藥分成三大類。而第三大類是在 100 μ g/ml 的濃度時，完全不會抑制細胞生長能力、細胞 invasion 及 migration 能力(Table 3)。所以我們也不加以討論。另外，在第二大類而言，第二大類是在 100 μ g/ml 的濃度時，會抑

制細胞生長能力、細胞 invasion 及 migration 能力(Table 2)；這一類中藥萃取物在抗癌的應用上應該是最有效果的一群。因為這一類的中藥萃取物不只會抑制細胞的細胞生長能力還會抑制細胞 invasion 及 migration 能力。因此，這一類中藥萃取物是我們最終要繼續探討的一群。

而我們發現紫丁地、卷柏、夏枯草、葉下珠、骨碎補及欖仁樹的葉這六種中藥萃取物在 100 μ g/ml 的濃度時，不會抑制 A549 的細胞生長能力、卻會抑制細胞 invasion 及 migration 能力(Table 1)。因此我們也發現它們抑制 A549 細胞株 invasion 及 migration 能力是透過抑制癌症轉移及侵襲的相關基因 MMP-2 及 u-PA 的表現及其抑制劑之間的表現所造成的。另外，我們也在 mRNA level 方面看到類似的抑制結果(Fig-4 及 Fig-5.)。而在動物模式方面，更加應證了這些中藥萃取物會抑制腫瘤轉移及侵襲的能力。

而這六種中藥的抗癌效果，直至目前而言，還沒有任何文獻指出在抑制細胞 invasion 及 migration 方面有相關的發現。因此，我們的發現是中藥在抗癌方面的一大進展。而這六種中藥萃取物，就欖仁樹的葉而言，有許多文獻發現它具有保肝的效果[36-38]、同時具有抗發炎及抗突變的效果[39-41]，但在抑制細胞 invasion 及 migration 方面，卻沒有任何相關文獻。因此，我們也將欖仁樹的葉抑制細胞 invasion 及 migration 的結果整理，並準備發表在 SCI 期刊上。另外，在卷柏的抗癌效果方面，我們發現有一篇文獻是針對抑制細胞凋亡的方面去詳加探討[42]，但在抑制細胞 invasion 及 migration 方面，也沒有任何相關文獻。因此，我們的這些發現，相信對中藥萃取物在抗癌方面，可以提供一個新的方向及思維，並可以利用癌瘤細胞侵襲及轉移的特性，建立一套系統性的模式，來針對不同中藥對於癌瘤細胞的抑制能力做一個初步的探討，期許能建立不同中藥對不同人類癌瘤細胞侵襲及轉移的抑制能力評估標準。並使中藥在抗癌的機制上有更明顯的定位及突破。

伍、結論與建議

由上述的結果，我們可以做一個結論:在 57 種中藥萃取物中，我們發現在 100 μ g/ml 的濃度時，有 6 種中藥萃取物不會抑制 A549 細胞株細胞生長能力、卻會抑制細胞 invasion 及 migration 能力。而我們也已經完成了這 6 種中藥萃取物抑制細胞 invasion 及 migration 的機制及動物模式。我們發現這 6 種中藥萃取物抑制 A549 細胞 invasion 及 migration 是透過抑制 MMP-2 及 u-PA 的 protein 及 mRNA level。而這 57 種中藥萃取物中，有 20 種中藥萃取物都會抑制細胞生長、invasion 及 migration 能力。我們猜測這一類中藥萃取物在抗

癌的應用上應該是最有效果也最具發展性的一群。因為這一類的中藥萃取物不只會抑制細胞的細胞生長能力還會抑制細胞 invasion 及 migration 能力。這些中藥也將是我們未來所需要努力發展的主題之一。

陸、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-029 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

柒、參考文獻

1. Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52:255-264.
2. 行政院衛生署八十年度委託研究計畫研究報告. 計畫名稱：本土醫學資料庫之建立及衛生政策上之應用
3. Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999; 96:7490-7495.
4. De La Puerta R, Martinez E, Bravo L, Ahumada MC. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48:968-970.
5. Bhatia N, Agarwal C, Agarwal R. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr. Cancer.* 2001; 39:292-299.
6. Singh RP, Agarwal R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid. Redox. Signal.* 2002; 4:655-663.
7. 林景彬，常用中藥藥理與應用，中國醫藥大學出版. p.400, 1985.
8. 張賢哲，本草備要解析中國醫藥大學出版. pp.6-9, 1990
9. 人參的研究及栽培，淑馨出版社. p169, 1989.
10. Kikuchi Y, Sasa H, Kita T, Hirata J, Tode T, Nagata I. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplatin in vivo. *Anti-cancer drugs.* 1990;2:63-67.
11. Tode T, Kikuchi Y, Kita T, Imaizumi E, Nagat I. Inhibitory effects by oral administration of ginsenoside Rh2 on the growth of human ovarian cancer cells in nude mice. *J Can Re Clin Onco.* 1993;120:24-26.
12. Nakata H, Kikuchi H, Tode T, Hirata J, Kita T, Ishii K, Kudoh K, Nagata I, Shinomiya N. Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor

- growth on nude mice bearing human ovarian cancer cell. *Jap J Can Res.* 1998;89:733-740.
13. Lee K Y, Park J A, Chung E, Lee Y H, Kim S I, Lee S K. Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27kip1. *Cancer Letters.* 1996;110: 193-200.
 14. Park JA, Lee K Y, Oh Y J, Kim K W, Lee SK. Activation of caspase-3 protease Via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Letter.* 1997; 121:73-81.
 15. Ota T, Maeda M, Odashima S, Tatsuka M. G1 phase-specific suppression of the Cdk2 Activity by Ginsenoside Rh2 in cultured murine cells. *Life Sci.* 1997;160:39-44.
 16. 李煥炎、劉國柱、周正仁。1976。台灣藥用植物之探討。台北市。國立中國醫藥研究所。p. 279-280。
 17. 林哲民、林俊清、吳佩珊、邱慧芬、李興進。1991。台灣產生藥金線蓮、靈芝、絞股藍之抗炎症及保肝作用研究。藥用及保健植物研討會專輯。台東市。台東區農業改良場編印。p. 89-98。
 18. 顏東敏、陳幸琴、廖正雄。1996。金線連繁殖技術。東港鎮農會出版。淑馨出版社經銷。
 19. Huang DD, Law CS, Mak OT. Effects of tissue-cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1991; 32: 113-119.
 20. Takatsuki S, Wang JD, Narui T, Okuyama T. Studies on the components of crude drug "Kim-soan-lian". *J Jap Botany.* 1992; 67: 121- 123.
 21. Du XM, Yoshizawa T, Shoyama Y. Butanoic acid glucoside composition of whole body and in vitro plantlets of *Anoectochilus formosanus*. *Phytochemistry* 1998; 49: 1925-1928.
 22. Chiu JH, Wang JC, Lui WY, Wu CW, Hong CY. Effect of magnolol in vitro mitochondrial lipid peroxidation and isolated cold-preserved wam reperfused rat livers. *J Sur Res* 1999; 82:11-16
 23. Chen YH, Lin SJ, Chen IW, Ku HH, Chen YL. Magnolol attenuates VCAM-4-1 expression in vitro in TNF- α -treated human aortic endothelial cells and in vivo in the aorta of cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol* 2002;135:37-47
 24. Chen YL, Lin KF, Shiao MS, Chen YT, Hong CY, Lin SJ. Magnolol, a potent antioxidant from *Magnolia officinalis* attenuated intimal thickening and MCP-1 expression after balloon injury of the aorta in cholesterol-fed rabbit. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:353-363
 25. Lin SY, Liu JD, Chang HC, Yeh SD, Lin CH, Lee WS. Magnolol suppresses proliferation of cultured human colon and liver cancer cells

- by inhibiting DNA synthesis and activating apoptosis. *J Cell Biochem* 2001; 84:532-544
26. Yang LL, Yen KY. Analysis of metals in Chinese crude drugs. *Bull. Taipei Med. Coll.* 1993; 13: 27-41.
27. Sattler M, Quinnan LR, Pride YB, Gramlich JL, Chu SC, Even GC, Kraeft SK, Chen LB, Salgia R. 2-methoxyestradiol alters cell motility, migration, and adhesion. *Blood*. 2003; 102:289-296.
28. Kuo WH, Chiang WL, Yang SF, Yeh CT, Yeh CM, Hsieh YS, Chu SC. The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci*. 2003; 73: 2211-2223.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
30. Chu SC, Chiou HL, Chen PN, Yang SF, Hsieh YS. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Mol. Carcinog*. 2004; 40: 143-149.
31. Sitrin RG, Gyetko MR, Kole KL, McKeever P, Varani J. Expression of heterogeneous profiles of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by human glioma lines. *Cancer Res*. 1990; 50:4957-4961.
32. Chiang WL, Chu SC, Lai JC, Yang S, Chiou HL, Hsieh YS. Alternations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency individuals. *Clin Chim Acta*. 2001; 314: 195-201.
33. Chiang WL, Chu SC, Yang SS, Li MC, Lai JC, Yang SF, Chiou HL, Hsieh YS. The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*. 2002; 188: 199-205
34. Kuo WH, Yang SF, Chu SC, Lu SC, Chou FP, Hsieh YS. Differential inductions of MMP-2 and MMP-9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice. *Cancer Letters* 2003; 189: 103-112.
35. Wei LN, Lai KP, Chen CA, Cheng CH, Huang YJ, Chou CH, Kuo ML, Hsieh CY. Aresenic trioxide prevents radiation-enhanced tumor invasiveness and inhibits matrix metalloproteinase-9 through downregulation of nuclear factor κ B. *Oncogene* 2005;24:390-398.
36. Tang X, Gao J, Wang Y, Fan YM, Xu LZ, Zhao XN, Xu Q, Qian ZM. Effective protection of *Terminalia catappa* L. leaves from damage induced by carbon tetrachloride in liver mitochondria. *J Nutr Biochem*. 2005 (in press)

37. Gao J, Tang X, Dou H, Fan Y, Zhao X, Xu Q. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56:1449-1455.
38. Tang XH, Gao L, Gao J, Fan YM, Xu LZ, Zhao XN, Xu Q. Mechanisms of hepatoprotection of *Terminalia catappa* L. extract on D-Galactosamine-induced liver damage. *Am J Chin Med.* 2004;32:509-519.
39. Ko TF, Weng YM, Lin SB, Chiou RY. Antimutagenicity of supercritical CO₂ extracts of *Terminalia catappa* leaves and cytotoxicity of the extracts to human hepatoma cells. *J Agric Food Chem.* 2003; 51:3564-3567.
40. Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytother Res.* 2001; 15:206-212.
41. Lin CC, Chen YL, Lin JM, Ujiie T. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*. *Am J Chin Med.* 1997; 25: 153-161
42. Lee IS, Nishikawa A, Furukawa F, Kasahara K, Kim SU. Effects of *Selaginella tamariscina* on in vitro tumor cell growth, p53 expression, G1 arrest and in vivo gastric cell proliferation. *Cancer Lett.* 1999; 144: 93-99.

捌、圖、表

Table I: 6 種中藥萃取物對 A549 細胞株細胞生長能力、invasion 及 migration 能力的影響。6 種中藥萃取物在 100 μ g/ml 的濃度時，不影響細胞生長能力、卻會抑制 A549 細胞 invasion 及 migration 能力。(+)代表在 100 μ g/ml 的濃度時，會抑制其能力。

	cell viability	cell invasion	cell migration
葉下珠 (<i>Phyllanthus urinaria</i>)	-	+	+
卷柏 (<i>Selaginella tamariscina</i>)	-	+	+
欖仁樹的葉 (<i>Terminalia catappa</i>)	-	+	+
骨碎補 (<i>Davallia mariesii Moore</i>)	-	+	+
夏枯草 (<i>Prunella vulgaris</i>)	-	+	+
紫丁地 (<i>Syringa vulgaris</i>)	-	+	+

Table II: 20 種中藥萃取物對 A549 細胞株細胞生長能力、invasion 及 migration 能力的影響。20 種中藥萃取物在 100 μ g/ml 的濃度時，會影響 A549 細胞生長能力、invasion 及 migration 能力。(+)代表在 100 μ g/ml 的濃度時，會抑制其能力。

	cell viability	cell invasion	cell migration
何首烏 (<i>Polygonum multiflorum</i>)	+	+	+
穿山龍 (<i>Dioscorea nipponica</i>)	+	+	+
雞血藤 (<i>Spatholobus suberectus</i>)	+	+	+
丹皮 (<i>Paeonia suffruticosa</i>)	+	+	+
七層塔 (<i>Salvia plebeian</i>)	+	+	+
連召 (<i>Forsythia suspensa</i>)	+	+	+
茜草 (<i>Rubia cordifolia</i> L)	+	+	+
五靈脂 (<i>Pteropus dasymallus</i>)	+	+	+
肉豆叩 (<i>Myristica fragrans</i>)	+	+	+
續隨子 (<i>Euphorbia lathyris</i>)	+	+	+
一點紅 (<i>Emilia sonchifolia</i>)	+	+	+
覆盆子 (<i>Rubus palmatus</i>)	+	+	+
正川丹參 (<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge)	+	+	+
紅麴 (<i>Monascus purpureus</i>)	+	+	+
王不留行 (<i>Vaccaria pyramidata</i>)	+	+	+
北柴胡 (<i>Bupleurum chinense</i>)	+	+	+
仙鶴草 (<i>Rhinacanthus nasutus</i>)	+	+	+
風不動 (<i>Dischidia formosana</i> Maxim)	+	+	+
補骨脂 (<i>Psoralea corylifolia</i>)	+	+	+
山葡萄莖 (<i>Ampelopsis brevipedunculata</i>)	+	+	+

Table III: 31 種中藥萃取物對 A549 細胞株細胞生長能力、invasion 及 migration 能力的影響。31 種中藥萃取物在 100 μ g/ml 的濃度時，皆不會影響 A549 細胞生長能力、invasion 及 migration 能力。(-)代表在 100 μ g/ml 的濃度時，不會抑制其能力。

	cell viability	cell invasion	cell migration
茵陳蒿 (<i>Artemisia capillaris</i>)	-	-	-
大麻仁 (<i>Cannabis sativa</i>)	-	-	-
蒼朮 (<i>Atractylodes lancea</i>)	-	-	-
商陸 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	-	-	-
當歸 (<i>Angelica sinensis</i>)	-	-	-
赤芍 (<i>Paeonia veitchii Lynch</i>)	-	-	-
川六汗 (<i>Dipsacus japonicus</i>)	-	-	-
薑黃 (<i>Curcuma longa</i>)	-	-	-
川七 (<i>Boussingaultia gracilis</i>)	-	-	-
杜牛七 (<i>Nodus nelumbinis rhizoma</i>)	-	-	-
蒲公英 (<i>Taraxacum officinale Weber</i>)	-	-	-
酒芎 (<i>Lagerstroemia indica</i>)	-	-	-
魚腥草 (<i>Houttuynia cordata</i>)	-	-	-
巴戟夫 (<i>Morinda officinalis</i>)	-	-	-
番瀉葉 (<i>Cassia angustifolia</i>)	-	-	-
菟絲子 (<i>Cuscutra Japonica</i>)	-	-	-
五味子 (<i>Schisandra chinensis</i>)	-	-	-
北茵陳 (<i>Origanum vulgare</i>)	-	-	-
蜈蚣 (<i>Scolopendra subspinipes</i>)	-	-	-
金銀花 (<i>Lonicera caprifolium</i>)	-	-	-
枳實 (<i>Poncirus trifoliata</i>)	-	-	-
小金英 (<i>Rosa cymosa</i>)	-	-	-
山防風 (<i>Echinops griffithii</i>)	-	-	-
陳皮 (<i>Citrus aurantium</i>)	-	-	-
青皮 (<i>Citrus tangerine</i>)	-	-	-
左手香 (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	-	-	-
黃金桂 (<i>Cudrania cochinchinensis</i>)	-	-	-
烏藥 (<i>Lindera strychnifolia</i>)	-	-	-
敗醬草 (<i>Patrinia villosa</i>)	-	-	-
半支蓮 (<i>Coptis chinensis franch</i>)	-	-	-
巴豆 (<i>Croton tiglium</i>)	-	-	-

Fig-1

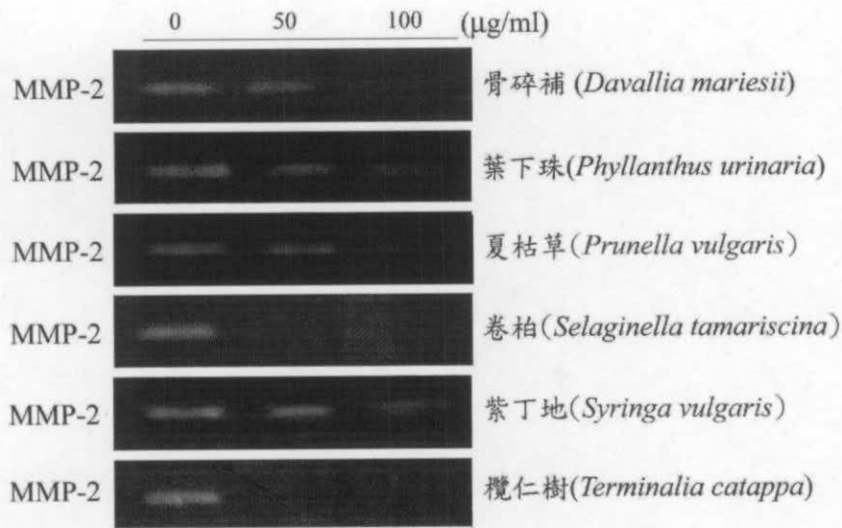


Fig-1 觀察 6 種中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞分泌 MMP-2 蛋白的表現量。我們利用 gelatin zymography 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的培養液，發現其 MMP-2 不論 50 或 100 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度都有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢。

Fig-2

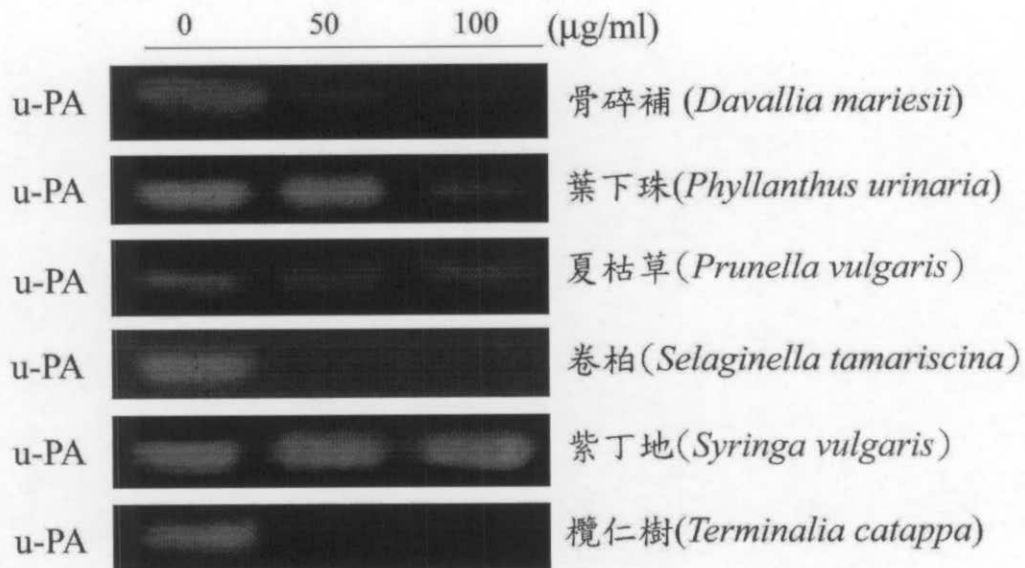


Fig-2 觀察 6 種中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞分泌 uPA 蛋白的表現量。我們利用 casein zymography 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的培養液，發現其 u-PA 不論 50 或 100 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度都有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢。

Fig-3

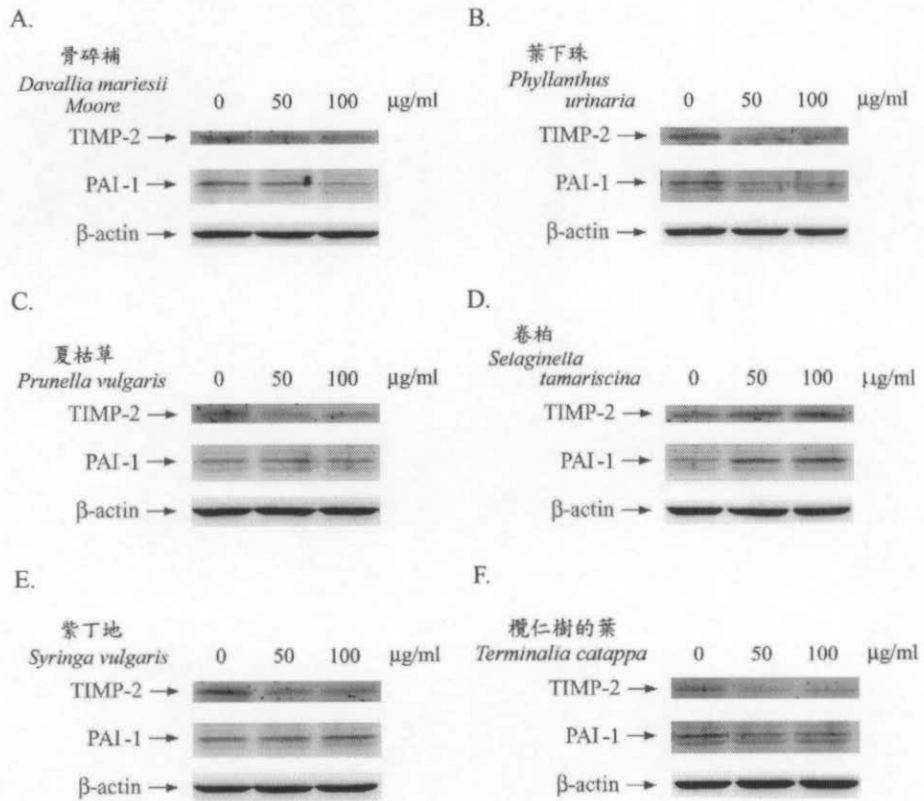


Fig-3 觀察 6 種中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞中 TIMP-2 及 PAI-1 蛋白的表現量。我們利用 western blotting 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的細胞萃取物，發現其 TIMP-2 及 PAI-1 不論 50 或 100µg/ml 的濃度都有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢。

Fig-4

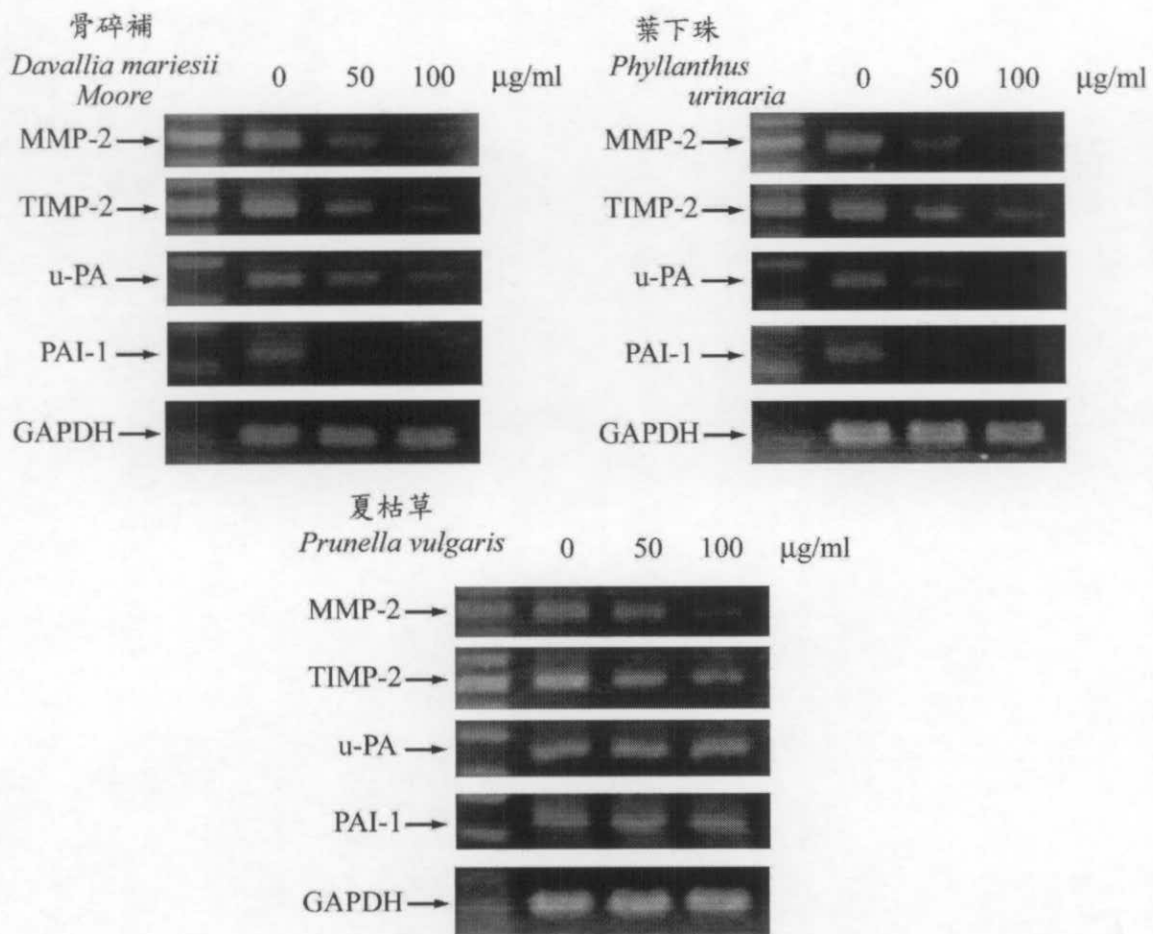


Fig-4 觀察 3 種中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞中 MMP-2, u-PA, TIMP-2 及 PAI-1 mRNA 的表現量。我們利用 RT-PCR 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的 mRNA，發現其 MMP-2, u-PA, TIMP-2 及 PAI-1 mRNA 的表現量不論 50 或 100µg/ml 的濃度都有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢

Fig-5

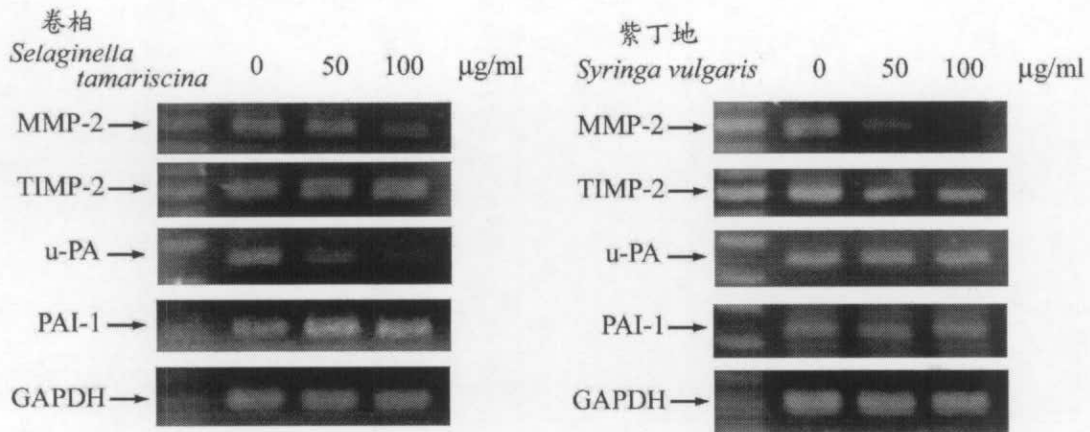


Fig-5 觀察 2 種中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞中 MMP-2, u-PA, TIMP-2 及 PAI-1 mRNA 的表現量。我們利用 RT-PCR 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的 mRNA，發現其 MMP-2, u-PA, TIMP-2 及 PAI-1 mRNA 的表現量不論 50 或 100µg/ml 的濃度都有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢

Fig-6

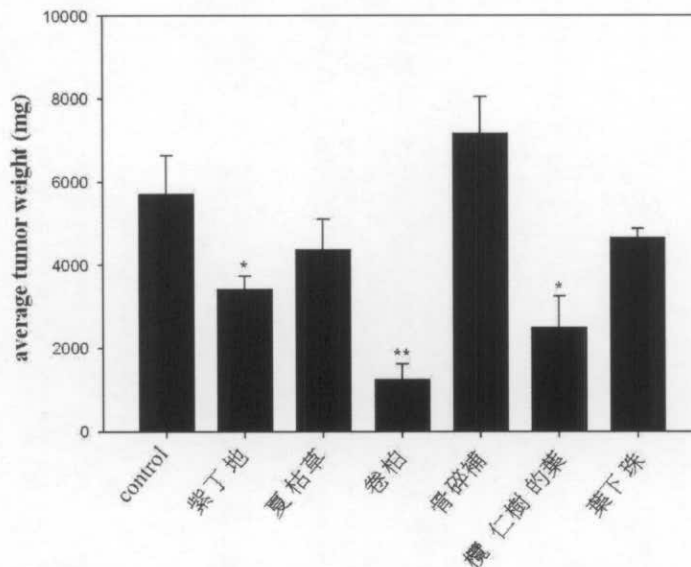


Fig-6 C57BL/6 老鼠接種 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞之後，並進一步餵食中藥萃取物(3 mg 中藥萃取物/每公克老鼠)觀察其腫瘤大小的變化。我們將 $5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ PBS 洗淨的 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞，打入 C57BL/6 老鼠的 right hind limb，5 天後將接種癌瘤細胞的老鼠逢機分組，進一步餵食適量中藥萃取物，3 週後犧牲老鼠，取出腫瘤以觀察其腫瘤大小、重量。發現餵食紫丁地、卷柏及欖仁樹的葉會有明顯抑制腫瘤大小及重量的情形。*代表

P<0.05 ; **代表 P<0.01 。

Fig-7

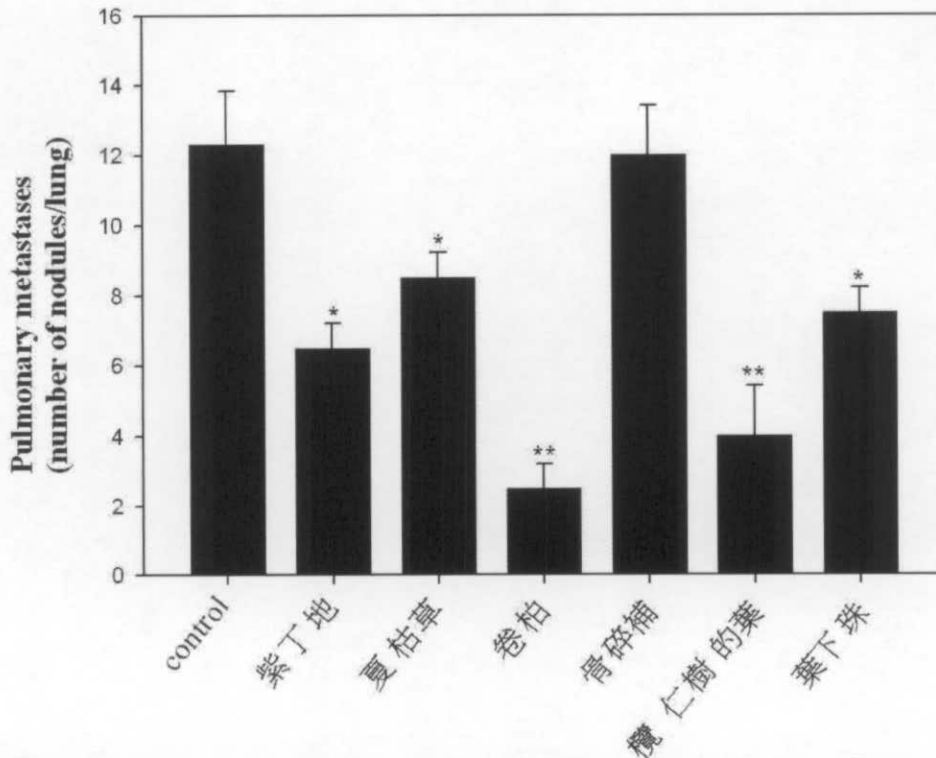


Fig-7 C57BL/6 老鼠接種 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞之後，並進一步餵食中藥萃取物(3 mg 中藥萃取物/每公克老鼠)，每天餵食一次，觀察其腫瘤轉移至肺部的能力。我們將 $5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ PBS 洗淨的 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞，打入 C57BL/6 老鼠的 right hind limb，5 天後將接種癌瘤細胞的老鼠逢機分組，進一步餵食適量中藥萃取物，3 週後犧牲老鼠，觀察腫瘤轉移至肺部的能力。我們發現紫丁地、卷柏、夏枯草、葉下珠及欖仁樹的葉會有明顯抑制腫瘤轉移至肺部的能力。*代表 P<0.05；**代表 P<0.01。

Fig-8

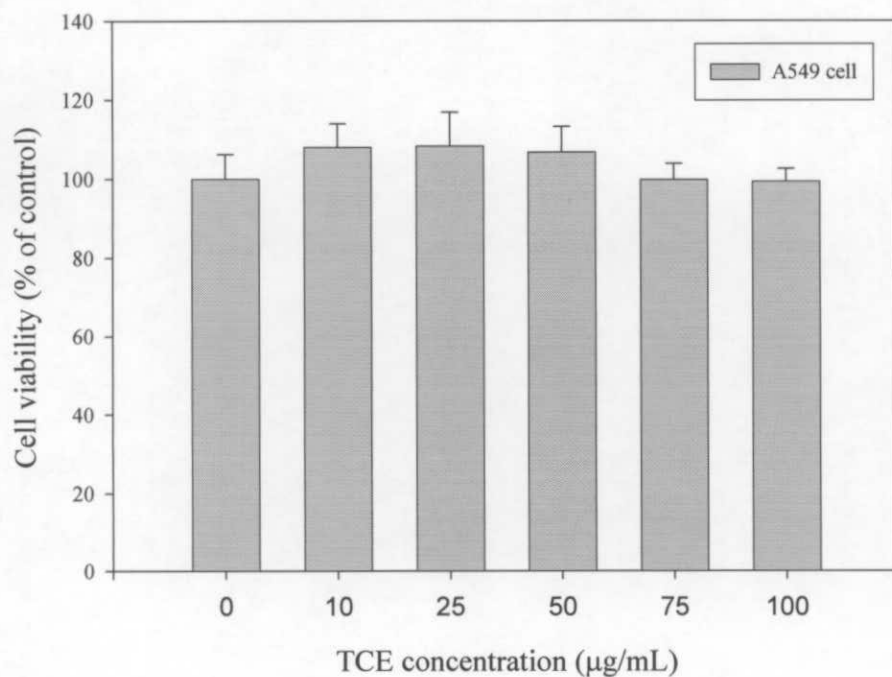


Fig-8 欖仁樹萃取物對 A549 細胞株細胞生長能力的影響。欖仁樹萃取物在 0-100µg/ml 的濃度時，不影響細胞生長能力。

Fig-9

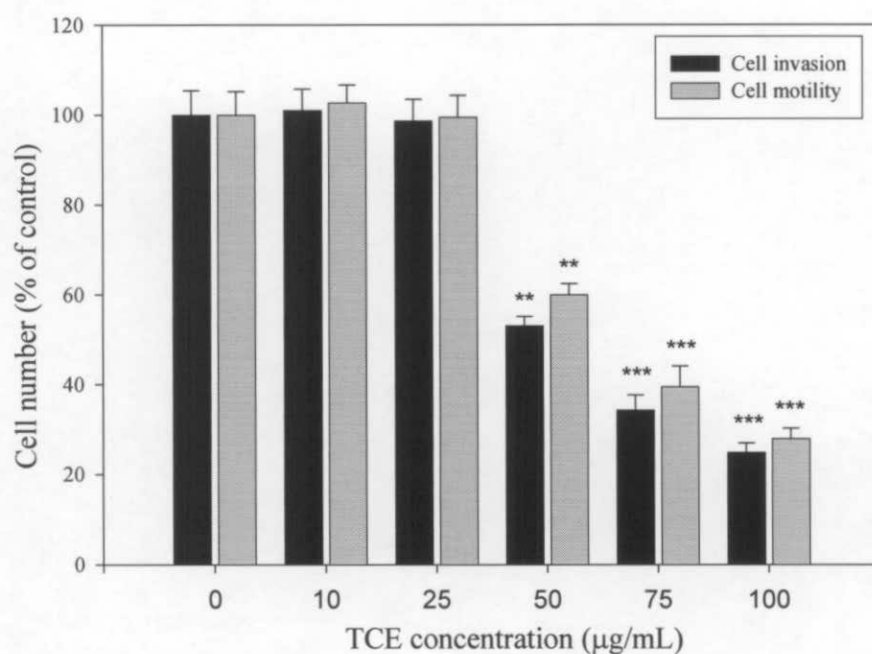
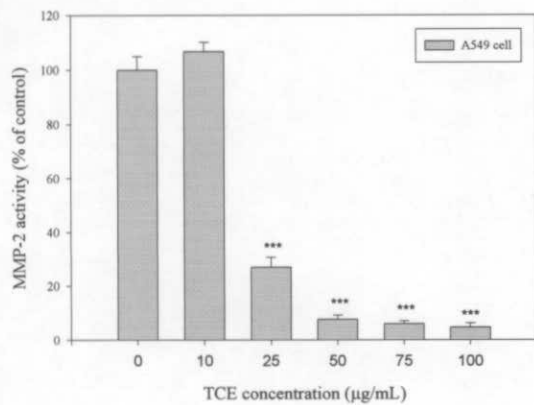
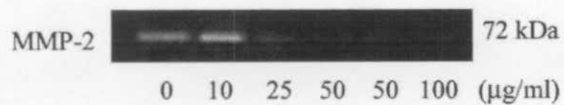


Fig-9 欖仁樹萃取物對 A549 細胞株 invasion 及 migration 能力的影響。欖仁樹萃取物在 0-100µg/ml 的濃度時，會影響 A549 invasion 及 migration 能力。

Fig-10
(A)



(B)

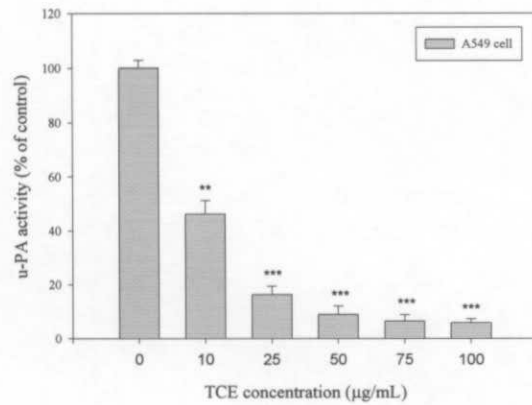
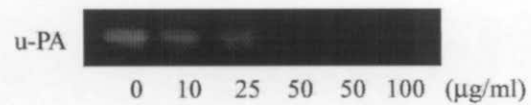


Fig-10 觀察欖仁樹萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞分泌 (A)MMP-2 及(B) u-PA 蛋白的表現量。我們利用 gelatin 及 casein zymography 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的培養液，發現其 MMP-2 及 u-PA 不論從 25-100µg/ml 的濃度有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢。

Fig-11

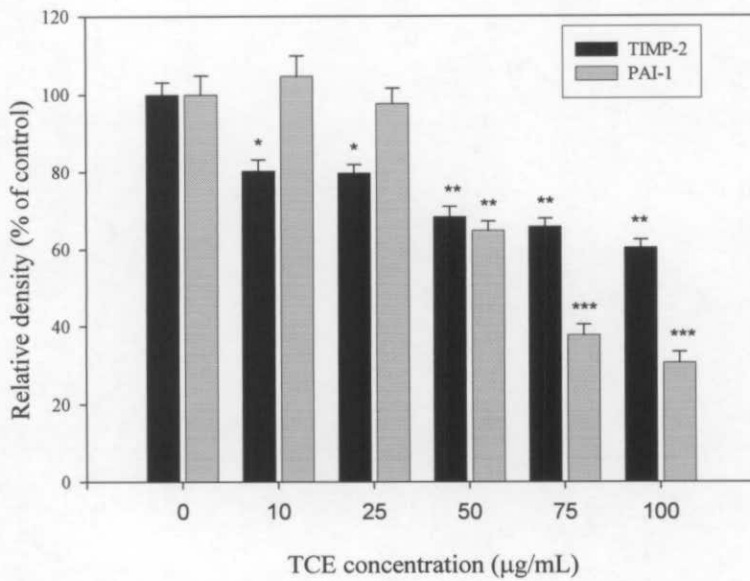
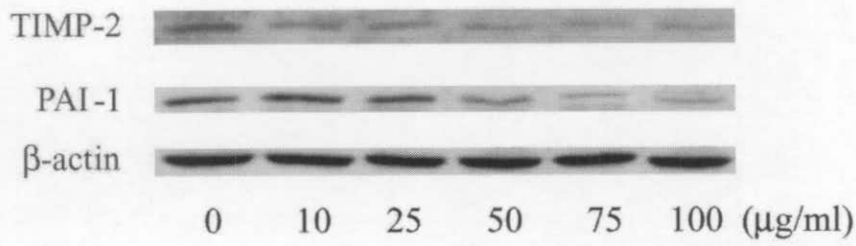


Fig-11

觀察欖仁樹萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後，其細胞中 TIMP-2 及 PAI-1 蛋白的表現量。我們利用 western blotting 分析中藥萃取物處理 A549 細胞株 24 小時之後的細胞萃取物，發現其 TIMP-2 及 PAI-1 從 25-100 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度都有抑制的現象，並且有 dose-dependent 的趨勢。