

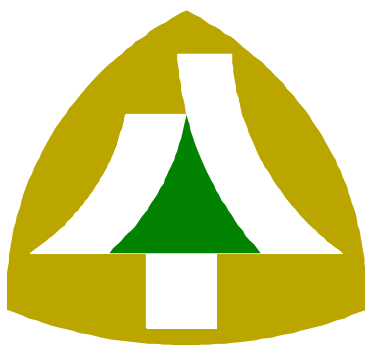
行政院農業委員會林務局委託研究計畫系列 94-06-2-01

計畫總結報告

墨水樹化學成分及抗癌活性研究

Phytochemical and Anti-cancer Studies on

*Haematoxylon campechianum*



委託機關：行政院農業委員會林務局屏東林區管理處

執行機關：國防大學國防醫學院

計畫主持人：張溫良副教授

中華民國 95 年 11 月

# 目 錄

<b>壹、計畫緣起及目標</b> .....	1
1.1 計畫緣起.....	1
1.2 計畫目標.....	1
<b>貳、實驗結果及討論</b> .....	2
2.1 墨水樹之體外細胞毒性預試驗結果.....	2
2.2 大量墨水樹抽取分層之結果.....	4
2.3 大量墨水樹抽取分層之體外細胞毒性結果.....	4
2.4 墨水樹正丁層之分離純化結果.....	6
2.5 墨水樹正己烷及二氯甲烷層之分離純化結果.....	7
2.6 墨水樹正丁層之動物毒性試驗結果.....	7
2.7 墨水樹之抗癌動物試驗結果.....	8
<b>參、實驗方法</b> .....	9
3.1 墨水樹少量抽取.....	9
3.2 大量墨水樹之抽取分離.....	10
3.3 細胞存活試驗.....	11
3.4 抗癌動物試驗.....	12
<b>肆、結論</b> .....	13

# 壹、計畫緣起及目標

## 1.1 計畫緣起

根據行政院衛生署之生命統計，惡性癌症為台灣地區九十一年十大死亡原因之首位，在台灣地區每 10 個死亡人口就有 2.7 個是死於癌症，每 5 個死於癌症的病人便有一個是死於肝癌。若與民國八十二年死亡率比較觀察，以癌症每十萬人口增加 45.83 人最多，其中肝癌增加為每十萬人口 6.86 人最為明顯。肝癌亦為台灣地區惡性癌症死亡原因之首位，死亡率大於肺癌。肝癌是男性最常見的一種癌症，其死亡率居所有癌症中的第一位。而在女性癌症中則居第二位。肝癌是十分惡性之癌，且好發於 45~55 歲壯年期，如未經治療，病人往往在半年內就會死亡。肝癌真正的成因，尚未十分清楚，但與 B 型肝炎病毒、肝硬化及肝毒性物質等有關，台灣是有名的 B 型肝炎盛行區，其 B 型肝炎帶原者約佔 15~20%，肝癌患者中 B 型肝炎表面抗原陽性者佔 80~90%。肝癌在台灣地區是一個高流行率及高死亡率的癌症，如何防治肝癌為台灣地區醫藥衛生之重要課題。

林務局屏東林區管理處恒春工作站管轄之墨水樹屢遭民眾盜伐，民間誤認為治療肝癌之草藥，為防止墨水樹被誤用，並遭民眾盜伐及釐清是否具有抗癌作用。

因此，本計畫將以墨水樹木材部分抽取後，擬採取體外抗癌活性（細胞毒性）試驗及抗癌動物試驗等科學方法評估墨水樹是否具有抗癌活性，如具有抗癌潛力則進一步分離鑑定抗癌有效活性成分，並進一步規劃有效成分抗癌動物試驗等評估，作為抗癌新藥發展之依據。

## 1.2 計畫目標

1.2.1 釐清墨水樹之抗癌作用：本計畫先用三種不同極性有機溶媒作為墨水樹粗步抽取濃縮後，各粗抽物採用體外抗癌活性試驗如人類食道癌(CE81T)、人類肝癌(A549)、人類肺癌(J5)、人類腦膠質細胞瘤(DBTRG-05MG)、鼠纖維細胞(3T3)等細胞株作為評估抗癌活性或細胞毒殺作用，作為評估墨水樹是否具有抗癌活性，有無進一步發展成抗癌藥物之潛力，或者具有毒性應教育民眾謹慎小心勿誤用。

1.2.2 進行抗癌有效成分研究：如有具有抗癌活性即進行大量抽取工作（10 kg），並依抗癌活性試驗為導向，分離及純化墨水樹之抗癌有效成分。其中如丙酮層粗抽物有效，將以正相（如矽膠柱層析）或逆相柱層析法（製備型高效液相層析法）分離純化有效成分。如甲醇或水層粗抽物先經大孔洞樹脂

柱層法區分為不同極性層，有效層依其特性將以正相（如矽膠柱層析）或逆相柱層析法（如低壓、中壓或製備型高效液相層析法）分離純化有效成分，並進行光譜解析鑑定其結構。

1.2.3 抗癌有效成分之確認及進行抗癌動物試驗：有效成分以體外抗癌活性試驗評估抗癌活性及抗癌作用機轉。如具有足夠量有效成分將進行抗癌動物試驗。

## 貳、實驗結果及討論：

### 2.1 墨水樹之體外細胞毒性預試驗結果：

先取少量墨水樹木部（400 g）分別用丙酮、甲醇、及水逐步抽取濃縮後，分為丙酮層(HACA-AE)、甲醇層(HACA-ME)、及水層(HACA-WE)之粗抽物(如流程圖一)，並以人類食道癌(CE81T)、人類肝癌(A549)、人類肺癌(J5)、人類腦膠質細胞瘤(DBTRG-05MG)、鼠纖維細胞(3T3)等五種細胞株作體外抗癌活性篩選評估。發現墨水樹之丙酮層及甲醇層對人食道癌細胞（ $IC_{50}$  8-21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及鼠纖維細胞（ $IC_{50}$  4-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）具有頗強細胞毒性作用（如表一及表三），而對肝癌及肺癌之細胞毒性不如預期的佳（如表四及五），但對人腦膠質細胞瘤株反而有促進生長作用（如表二），依美國國立癌症中心(National Cancer Institute, USA)之標準：粗萃物的 $IC_{50}$ 以 $\leq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，純化合物的 $IC_{50}$ 以 $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 被稱為有效抗癌物。故墨水樹中低極性成分對不同癌細胞或細胞具有選擇性作用，應進一步評估是否具有抗癌活性或細胞毒性。

表一、對人食道癌細胞株之作用

CE81T	HACA-AE		HACA-ME		HACA-WE	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	23.18	10.24	13.79	1.77	7.37	-2.73
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	39.74	42.68	26.01	24.35	17.56	30.09
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	42.67	39.84	46.02	19.54	30.25	63.05
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	77.09	78.47	43.73	40.25	50.53	70.28
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	94.43	105.15	65.90	64.77	57.06	72.79
$IC_{50}$	21.80	21.05	8.59	8.01	10.39	34.90

表二、對人腦膠質細胞瘤株之作用

DBTRG-05MG	HACA-AE		HACA-ME		HACA-WA	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
100 µg/mL	-174.82	-27.44	-201.96	-29.88	29.99	60.25
50 µg/mL	246.16	54.49	179.26	101.66	82.88	76.98
25 µg/mL	225.68	86.87	185.48	73.42	134.18	79.41
10 µg/mL	174.82	104.17	171.84	90.89	93.28	86.55
5 µg/mL	205.14	61.73	156.25	71.02	135.19	86.73
IC50		52.74		69.64	81.08	130.65

表三、對鼠纖維細胞株之作用

3T3	HACA-AE		HACA-ME		HACA-WA	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
100 µg/mL	-76.75	-30.86	-98.86	-28.83	-24.62	-19.31
50 µg/mL	-84.17	-30.92	-85.64	-29.26	129.89	-3.13
25 µg/mL	-84.82	4.47	-78.62	-19.23	117.65	108.91
10 µg/mL	36.75	152.27	33.95	-0.83	86.01	134.29
5 µg/mL	39.22	100.00	49.52	100.28	55.23	106.62
IC50	4.11	20.38	10.03	7.49		38.14

表四、對人肝癌細胞株之作用

J5	HACA-AE		HACA-ME		HACA-WA	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
100 µg/mL	-75.75	-15.53	-69.53	-21.56	59.21	104.00
50 µg/mL	94.96	75.31	-1.15	14.79	88.66	99.15
25 µg/mL	115.97	122.36	111.75	96.14	123.18	104.26
10 µg/mL	112.76	125.19	111.27	117.87	114.16	114.76
5 µg/mL	103.90	112.71	88.04	95.17	87.56	97.27
IC50	63.17	63.93	38.67	39.18	115.63	77.25

表五、對人肺癌細胞株之作用

A549	HACA-AE		HACA-ME		HACA-WA	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
100 µg/mL	-89.63	-3.34	-93.16	-5.24	79.68	85.56
50 µg/mL	193.11	83.09	-9.75	11.46	80.55	46.23
25 µg/mL	153.01	128.44	125.00	95.53	84.68	71.46
10 µg/mL	124.05	65.46	112.40	74.97	93.95	75.19

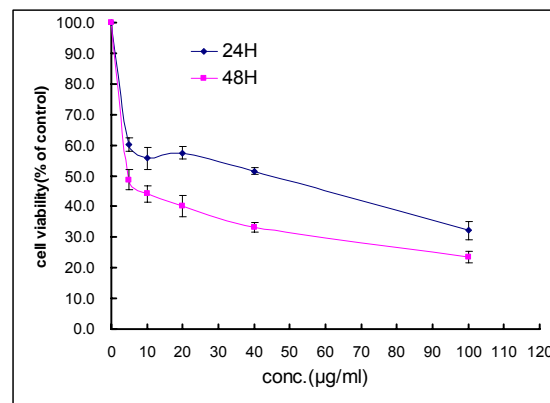
5 $\mu\text{g/mL}$	95.75	70.57	87.96	54.27	89.06	75.90
IC <sub>50</sub>	75.31	69.14	38.91	38.54		46.26

## 2.2 大量墨水樹抽取分層之結果

在進行大量墨水樹 (10.74 kg) 抽取工作，經甲醇抽取濃縮後(1126.4g)，甲醇粗抽物用 95% 甲醇溶解後，與正己烷進行萃取，可得正己烷層(HC-H, 30.14 g)。95% 甲醇層加適量水，以減壓濃縮方式除去大部甲醇後，並用二氯甲烷、正丁醇及水進行萃取，分別得二氯甲烷層(HC-C, 26.78 g)、正丁醇層(HC-B, 971.89 g)、水層(HC-W, 56.0 g)及沉澱物(HC-PP, 46.59)。

## 2.3 大量墨水樹抽取分層之體外細胞毒性結果

各種大量墨水樹之萃取層及層析層進行人類食道癌細胞株(CE81T)抗癌活性測試，其結果發現大量墨水樹抽取後，其中以正丁醇層之抗癌活性(IC<sub>50</sub>= 37.0  $\mu\text{g/mL}$ )最佳(如表六)。進一步將正丁醇層經中壓逆相柱層析法分成HC-B-1、HC-B-2及HC-B-3 三部分，其中HC-B-2 萃取物處理人類食道癌細胞株細胞 24 與 48 小時，對於抑制細胞的生長作用(如圖一)，發現HC-B-2 (IC<sub>50</sub> < 5  $\mu\text{g/mL}$ )之抗癌活性最佳(如表六)。



圖一：墨水樹 HC-B-2 萃取物處理 CE81T 腫瘤細胞 24 與 48 小時，對於抑制細胞的生長作用(MMT assay)

表六、大量墨水樹萃取物對人類食道癌細胞株之作用

CE81T	5 $\mu\text{g/mL}$		10 $\mu\text{g/mL}$		20 $\mu\text{g/mL}$		40 $\mu\text{g/mL}$	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H	24 H	48 H
HC-AE	106.2	98.5	109.6	93.3	98.8	78.5	64.5	46.8
HC-ME	106.4	98.2	101.5	96.4	93.3	84.6	46.1	52.1
HC-WE	99.0	103.4	92.3	98.0	88.7	80.9	75.8	56.3
HC-C	97.3	113.2	91.5	100.9	84.4	73.1	60.9	50.8

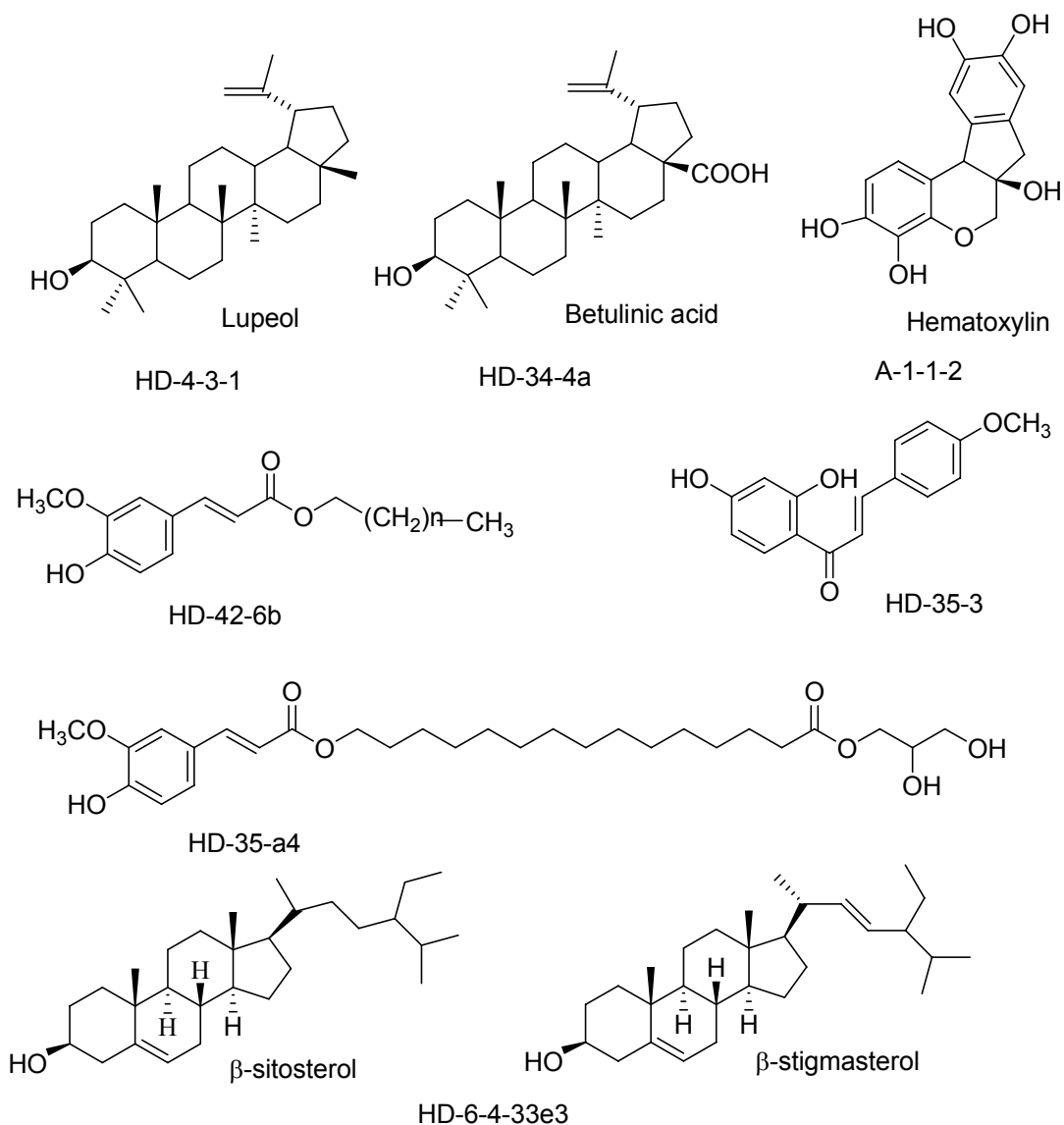
HC-B	105.7	101.1	91.6	102.8	90.9	96.2	54.5	47.7
HC-W	105.2	101.2	106.5	102.8	102.5	103.1	84.9	73.0
HC-PP	98.8	91.3	89.7	86.8	100.4	83.7	75.3	55.6
HC-B-1	97.0	97.6	98.3	101.0	98.4	91.2	44.5	55.9
HC-B-2	60.2	48.7	55.7	44.1	67.5	40.2	51.1	33.2
HC-B-3	84.2	73.1	66.4	60.8	65.4	49.5	63.1	38.8
HC-AE-1-1	102.5	96.5	92.8	96.9	83.4	90.1	32.1	37.8
Cisplatin	92.3	80.3	100.6	51.0	87.0	15.4	44.9	15.2

表七、大量墨水樹萃取物對人類食道癌細胞株之IC<sub>50</sub>劑量

CE81T	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	24H	48H
HC-AE	82.15	82.15
HC-ME	52.34	40.05
HC-WE	60.66	39.06
HC-C	39.06	44.28
HC-B	125.83	82.19
HC-W	183.19	47.23
HC-PP	47.17	44.26
HC-B-1	42.18	49.71
HC-B-2	37.07	17.75
HC-B-3	48.55	25.96
HC-AE-1-1	33.17	37.05
Cisplatin	40.55	16.13

## 2.4 墨水樹正丁層之分離純化結果

取墨水樹之正丁醇層(HC-B, 50 g)，經中壓柱層析法(MPLC, RP-8 column)以40% MeOH/H<sub>2</sub>O移動相分為三部分：HC-B-1 (25.6 g)、HC-B-2 (3.67 g)、及HC-B-3 (0.581 g)。HC-B-2 (800 mg)再經製備式高壓柱層析法(preparative HPLC, C-18 column, 移動相為30% MeOH/H<sub>2</sub>O)得四化合物：HC-B-2-k01、HC-B-2-k02、HC-B-2-k03、HC-B-2-k04。其中主要成分HC-B-2-k01經鑑定為墨水樹素(haematoxylin)，其他化合物在分離後，不穩定易被氧化破壞其物化性大變，無法鑑定，雖採用diazamethane反應後仍不能克服，目前已經改由取正丁醇層進行diazamethane之甲基化反應，希望能克服不穩定易被氧化破壞其物化性之問題。



圖二、墨水樹已分離純化之成分。

## 2.5 墨水樹正己烷及二氯甲烷層之分離純化結果

另外將正己烷層及二氯甲烷層合併後，經矽膠柱層析法分離得 7 個純化合物，其中 6 個化合物經圖譜鑑定為 lupeol、betulinic acid、ferulate ester、fatty acid 及 β-sitosterol 與 β-stigmasterol 混合物等（如圖二），其中 betulinic acid 對人類食道癌細胞 (CE81T) 具有細胞毒性作用，在作用 48 小時之細胞毒性作用為  $IC_{50} = 0.83 \mu\text{g/mL}$ （如表七）。



表七、大量墨水樹萃取物 HD-34-5a (betulinic acid)對人食道癌細胞株之作用

CE81T	HD-34-5a (Betulinic acid)	
	24 H	48 H
20 µg/mL	30.61	12.76
10 µg/mL	69.40	17.02
5 µg/mL	75.50	24.45
2.5 µg/mL	93.80	38.29
IC <sub>50</sub>	15.0 µg/ml	0.8 µg/ml

## 2.6 墨水樹正丁層之動物毒性試驗結果

選擇細胞毒性最佳之HC-B-2 (IC<sub>50</sub> < 5 µg/mL) 進行動物毒性試驗，分別用 20、50 及 200 mg/kg之劑量以腹腔注射給藥，觀察對小鼠之毒性作用，結果顯示在此劑量下短時間內對小鼠並無立即毒性如表八，但超過 400 mg/kg之劑量下會促使實驗老鼠致死。顯示墨水樹萃取物之治療指數(Therapeutic index: LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>; LD<sub>50</sub>: 一半致死劑量;ED<sub>50</sub>:一半有效劑量)很窄小

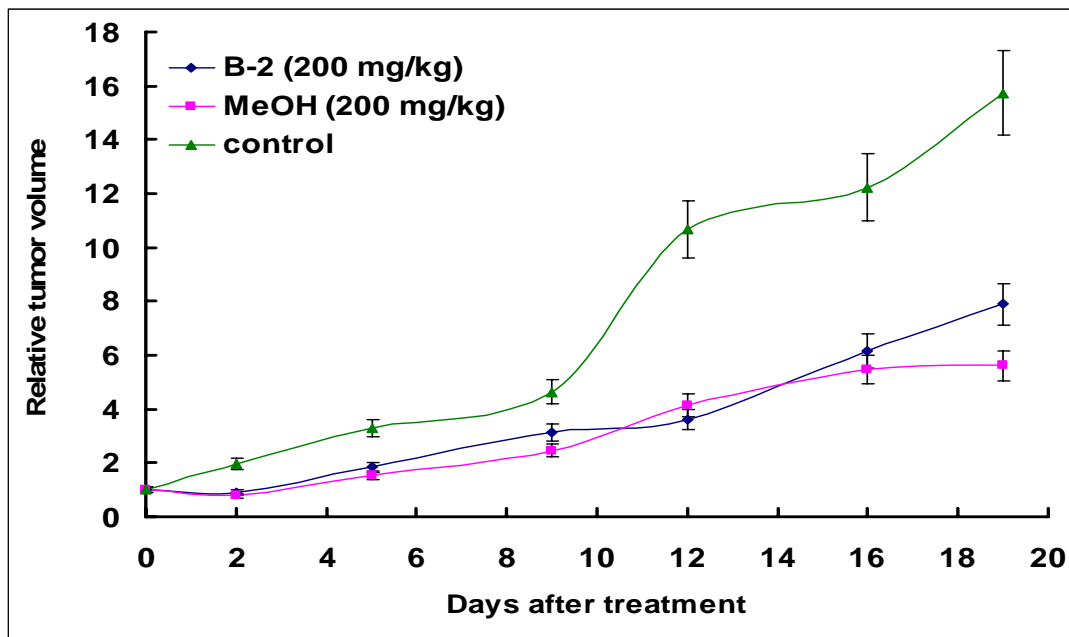
表八、墨水樹 HC-B-2 對小鼠之毒性作用

No.	Body weight (g)				
	11/7	11/8	11/9	11/10	11/11
1 (200 mg/kg)	34	34	34	34	34
2 (200 mg/kg)	31	31	30	30	30
3 (50 mg/kg)	34	34	34	34	34
4 (50 mg/kg)	30	30	30	30	29
5 (20 mg/kg)	32	32	32	32	31
6 (20 mg/kg)	35	35	35	35	34

## 2.7 墨水樹之抗癌動物試驗結果

本試驗將以裸鼠作抗癌動物試驗，裸鼠腫瘤模式是依據文獻[Pratesi et al., *Clin Cancer Res.* 8: 3904 ~ 3909 (2002)]，先培養CE81T癌細胞後，將  $1 \times 10^7$  數量的癌細胞經皮下注射裸鼠背部。等癌細胞長至 80 – 120 mm<sup>3</sup> 大小體積時，裸鼠隨機分為治療組及對照組，每組 3-4 隻裸鼠，取較好的HACA-B-2層以腹腔注射 200 mg/kg，每週注射 4 天，結果不佳，腫瘤持續增大；而 400 mg/kg以腹腔注射 3 天，第四天

裸鼠死亡，可能毒性太強所導致。另取HC-Me層及HC-B-2層改用皮下注射方式給藥 (subcutaneous injection)，在 200 mg/kg下，每週注射 3 次，每兩天測量相對腫瘤體積變化，結果發現第 19 天時HC-Me層及HC-B-2 層其T/C%分別為 31.5%及 47.0%，即其GI% ( $GI\% = 100\% - T/C\%$ )分別為 68.5%及 53.0%均大於 50%，被認為有效(如圖三) (參考文獻：Langdon S.P. et al., Preclinical phase II studies in human tumor xenografts: A European multicenter followup study. *Ann. Oncol.* 5: 415-422, 1994)。但最後無論HC-Me層或HC-B-2 層其腫瘤仍持續長大。



圖三：墨水樹 HC-Me 層及 HC-B-2 層對於皮下植入 CE81T 腫瘤之裸鼠的腫瘤 size 比值(Three times/ week, subcutaneous injection)



a. 接種人類食道癌細胞株裸鼠 b. 對照組裸鼠(19 天)



c. 給 HC-Me(200 mg/kg)組裸鼠 d. 給 HC-B-2(200 mg/kg)組裸鼠

## 參、實驗方法：

### 3.1 墨水樹少量抽取：

在少量墨水樹木部 (400 g) 用丙酮、甲醇、及純水分別抽取後之粗抽物 (如流程圖一)，以肝癌細胞等進行體外抗癌活性評估，初步發現墨水樹之丙酮層及甲醇層對人食道癌細胞 ( $IC_{50}$  8-21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 具有頗強細胞毒性作用 (如表一)，而對肝癌及肺癌之細胞毒性不如預期的佳，但對人腦膠質細胞瘤株反而有促進生長作用。故墨水樹中低極性成分對不同癌細胞或細胞具有選擇性作用，值得進一步評估細胞毒性或抗癌活性。

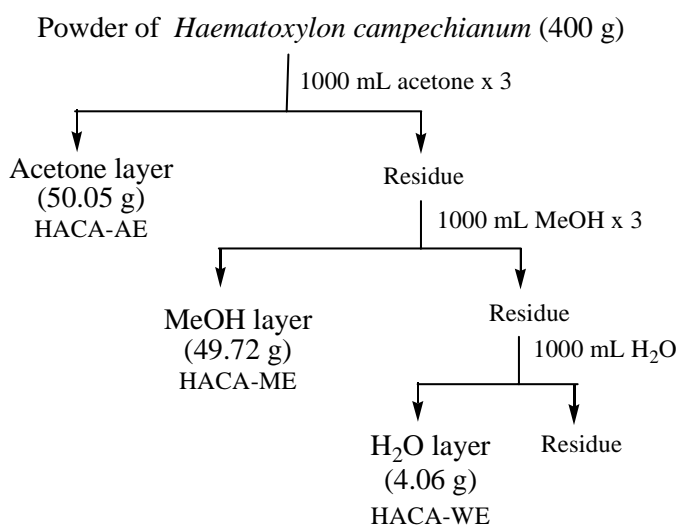
取少量抽取墨水樹之丙酮層 (HC-AE, 40 g)，以中壓柱層析法 (MPLC, RP-8 column) 經 40% MeOH/H<sub>2</sub>O 移動相分為四部分：HC-AE-1 (3.950 g)、HC-AE-2 (1.923 g)、HC-AE-3 (0.477 g)、及 HC-AE-4 (0.581 g)。而 HC-AE-1 (8.409 g) 再經低壓柱層析法 (Lobar, RP-18 column, 移動相為 30% MeOH/H<sub>2</sub>O) 分為五部分：HC-AE-1-1 (3.120 g)、HC-AE-1-2 (0.787 g)、HC-AE-1-3 (0.461 g)、HC-AE-1-4 (0.371 g) 及 HC-AE-1-5 (0.345 g)。HC-AE-1-1 (800 mg) 再經製備式高壓柱層析法 (preparative HPLC, C-18 column, 移動相為 30% MeOH/H<sub>2</sub>O) 得四化合物：HC-AE-k01 (73.8 mg)、HC-AE-k02 (42.6 mg)、HC-AE-k03 (3.4 mg)、HC-AE-k04 (3.7 mg)。其中 HC-AE-k01 經鑑定為墨水樹素 (haematoxylin)，其他化合物在分離濃縮後，可能被氧化破壞，其物化性質大變，各種溶媒均無法溶解，無法鑑定。

### 3.2 大量墨水樹之抽取分離：

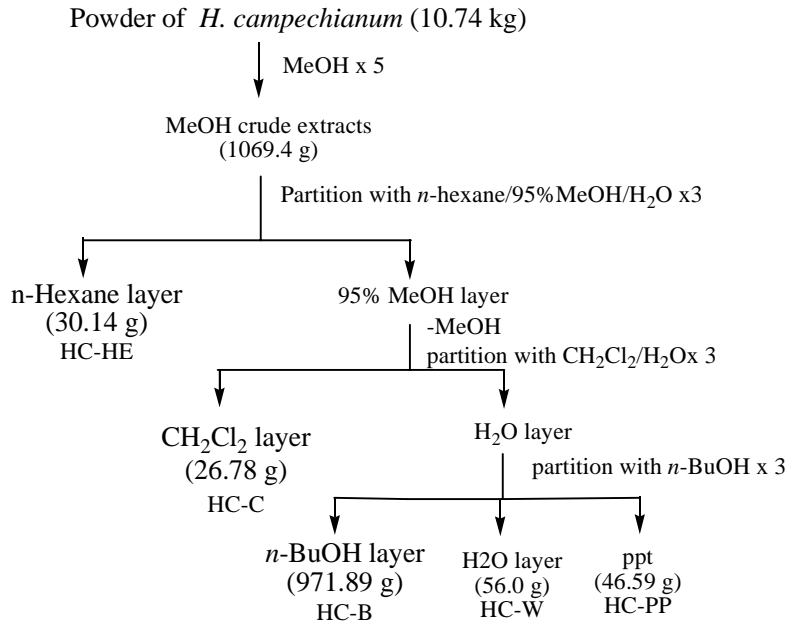
在進行大量墨水樹 (10.74 kg) 抽取工作，以甲醇抽取濃縮後(1126.4g)，經不同極性溶媒分割，用 95% 甲醇、正己烷、二氯甲烷、正丁醇及水進行萃取，分別得正己烷層(HC-H, 30.14 g)、二氯甲烷層(HC-C, 26.78 g)、正丁醇層(HC-B, 971.89 g)、水層(HC-W, 56.0 g)及沉澱物(HC-PP, 46.59)。取大量墨水樹之正丁醇層(HC-B, 50 g)，以中壓柱層析法(MPLC, RP-8 column)經 40% MeOH/H<sub>2</sub>O 移動相，分為三部分：HC-B-1 (25.6 g)、HC-B-2(3.67 g)、及HC-B-3 (0.581 g)。

取HC-B-2 (800 mg)再經製備式高壓柱層析法(preparative HPLC, C-18 column, 移動相為 30% MeOH/H<sub>2</sub>O)得四化合物：HC-B-2-k01、HC-B-2-k02、HC-B-2-k03、HC-B-2-k04。其中 HC-B-2-k01 經鑑定為墨水樹素(haematoxylin)，其他化合物在分離後，被氧化破壞其物化性大變，無法鑑定。雖然採用 diazomethane 進行酚基甲基化反應，但目前僅得 tetramethyl-haematoxylin，其他部分正進行分離純化中。

另外將正己烷層及二氯甲烷層合併後，經矽膠柱層析法分離得 7 個純化合物，化合物經圖譜鑑定為lupeol、ferulate ester、fatty acid、β-sitosterol及betulinic acid，其中betulinic acid對食道癌細胞CE81T作用 48 小時具有細胞毒性作用(IC<sub>50</sub>= 2.5 μg/mL)，可能為抗癌有效成分之一。



流程圖一、少量墨水樹粗抽步驟



流程圖二、大量墨水樹抽取步驟

### 3.3 細胞存活試驗

#### 3.3.1 實驗原理：

本實驗利用 CCK-8 assay 之方法來評估檢品之細胞毒性作用，其原理為活細胞的粒腺體(mitochondria)含有各種的脫氫酵素(dehydrogenase)，此酵素與 CCK-8 反應，會將其 tetrazolium 環切斷。此時，顏色由原有淡黃色轉為橘紅色之 formazan。利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)讀取波長設定在 450 及 650 nm 之吸光度，以對照組(以 0.2% DMSO 處理)細胞之吸光度視為 100%。吸光度之大小顯示活的細胞有多少，因此，本法可用來測量存活之細胞數量。

#### 3.3.2 實驗材料：

癌細胞株(Cancer Cell line)：

3T3：mouse fibroblast cells (鼠纖維細胞株)

A549: Human lung cancer cells (人類肺癌細胞株)

J5: Human hepatic cancer cells (人類肝癌細胞株)

DBTRG-05MG: Human glioblasta cells (人類腦膠質細胞瘤株)

CE81T：Human esophageal cancer cells (人類食道癌細胞株)

細胞檢驗試劑：Cell counting Kit 8 (CCK-8)

酵素免疫分析儀：ELISA reader；BIOTEK；CERES 900 EIA READER

### 3.3.3 實驗方法：

細胞存活試驗步驟：

- (1)將細胞稀釋成指定濃度 5000 cell/well，植入 96-well plates，每 well 0.2 ml。
- (2)在細胞培養箱內培養 24 小時，讓細胞平貼於底部。
- (3)檢品以 medium 稀釋成 0.001、0.01、0.1 及 1  $\mu$ M。
- (4)將配製好的檢品加入 well，每 well 0.2 ml，並於 48 小時後更換新鮮含藥的 medium。
- (5)再經 48 小時後，加入 CCK-8 Kit 於每一個 well，各 10  $\mu$ l。
- (6)在細胞培養箱內培養 2 小時。
- (7)用 ELISA reader 測定吸光度(OD=450 及 650 nm)

### 3.4 抗癌動物試驗

- (1) 動物: Female BALB/c nude (nu/nu) mice，裸鼠為 6-8 週大，體重約為 18-22 g，裸鼠購於國家實驗動物中心。
- (2) 先培養CE81T癌細胞後，將  $1 \times 10^7$  數量的癌細胞經皮下注射裸鼠背部。
- (3) 等癌細胞長至 80 – 120 mm<sup>3</sup> 大小體積時，裸鼠隨機分為治療組及對照組。
- (4) 對照組用皮下注射(sc.)給予 10%Tween 80/ normal saline (v/v)，墨水樹抽取物或所分離之純化物溶於 10%Tween 80/ normal saline (v/v) 用腹腔注射(ip)或皮下注射(sc.)給予四天。
- (5) 測量裸鼠之體重及癌細胞之體積，測量腫瘤之長度(L)及寬度(W)，第 n 天腫瘤體積(TVn)之測量為  $TV \text{ (mm}^3\text{)} = (L \times W^2)/2$ ，在第 n 天時之相對腫瘤體積為  $RTVn = TVn/TV0$ ，Tumor regression (T/C%)= (mean RTV of treated group)/(mean RTV of control group) x 100%，GI% (tumor volume growth inhibition ratio)= 100% - T/C%。
- (6) 當 GI% > 50%可判定為有效 (Langdon, S.P. et al., *Annals of Oncology* 5: 415-422, 1994; Voskoglou-Nomikos, T. et al., *Clinical Cancer Res.* 9: 4227-4239)。

## 肆、結論

初步篩選墨水樹木部之丙酮、甲醇及純水的抽取物，以人食道癌、人肝癌、人肺癌、人腦膠質細胞瘤、鼠纖維細胞等細胞株在體外抗癌活性評估之結果，發現墨水樹之丙酮層及甲醇層對人食道癌細胞（IC<sub>50</sub> 8-21 μg/mL）具有頗強細胞毒性作用（如表一所示），而對肝癌及肺癌之細胞毒性不如預期的佳（如表四、五所示），但對人腦膠質細胞瘤株反而有促進生長作用（如表二所示）。

初步顯示墨水樹中低極性成分對不同癌細胞或細胞可能具有選擇性作用，使用不慎將會癌症惡化，或是影響病情，應由醫療專業謹慎評估細胞毒性或抗癌活性。

在大量墨水樹(10.74 kg)以甲醇抽取濃縮後(HC-Me)，經不同極性溶媒分割為正己烷層(HC-He)、二氯甲烷層(HC-C)、正丁醇層(HC-B)、水層(HC-W)及沉澱物。正丁醇層經逆相柱層析法分為 HC-B-1、HC-B-2 及 HC-B-3 等三部分，其中 HC-B-2 對人食道癌細胞（IC<sub>50</sub> < 5 μg/mL）具有頗強細胞毒性作用。進一步在抗癌動物試驗結果發現，取較好的正丁醇層 HC-B-2 層用腹腔注射 200 mg/kg，每週注射 4 天，結果不佳，腫瘤持續增大；因此，取甲醇粗抽物 (HC-Me) 及正丁醇層之 HC-B-2 層改用皮下注射方式給藥 (subcutaneous injection)，在 200 mg/kg 的劑量下，每週注射 3 次，第 19 天時其 T/C% 分別為 31.5% 及 47.0%，即其 GI% 分別為 68.5% 及 53.0% 均大於 50%，雖被認為有效，但腫瘤仍一直長大。在腹腔注射 200 mg/kg 之劑量下對小鼠無明顯毒性作用，但無抗癌作用，如增加腹腔注射劑量為 400 mg/kg 注射 3 天後，第四天裸鼠死亡，表示可能毒性太強所導致。

綜合上述結果墨水樹中低極性成分對不同癌細胞或細胞具有選擇性毒性作用，毒性頗大，使用不當可能使癌症惡化。因此，墨水樹不適於作為抗癌藥物，應謹慎使用。