

# 當歸、丹參萃取物對抑制癌細胞之影響<sup>1</sup>

張同吳<sup>2</sup>、林珏羽<sup>3</sup>、曾英傑<sup>4</sup>

## 摘要

以花蓮地區優良農業操作(GAP)栽培體系所生產的當歸與丹參為材料，利用不同方式萃取其有效成分，以進行抑制癌細胞增生之研究，結果證實當歸與丹參萃取物均能有效抑制體外癌細胞生長。當歸與丹參以 80°C 乙醇處理可萃取出最高有效成分含量，且可抑制 MCF-7、MSG2 及 A549 等癌細胞株的生長。當歸、丹參與順鉑相互之間的聯用處理組合，對 HepG2 肝癌細胞皆有抑制效果；在 457  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  當歸萃取物與 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  丹參萃取物的處理濃度組合時，細胞的存活率為 20%；當歸萃取物與順鉑藥物聯用的處理組合，在 457  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  當歸萃取物與 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  順鉑處理濃度時，細胞的存活率為 10.9%；丹參萃取物與順鉑藥物聯用的處理組合，在 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  丹參萃取物與 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  順鉑處理濃度時，細胞的存活率為 50%。當歸、丹參萃取物與順鉑藥物三者聯用時，在 457  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  當歸萃取物、40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  丹參萃取物及 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  順鉑處理濃度時，細胞存活率為 31%。試驗結果顯示，當歸與丹參的有效成分與順鉑化療藥物聯用，有助於抑制 HepG2 肝癌細胞之增生，在未來抗癌與藥物動力學之臨床研究，可提供抗癌配方之應用，期能減少因化療藥物使用所產生的副作用，對未來開發保健產品及天然植物藥之應用上具有發展潛力。

關鍵詞：當歸、丹參、有效成分、抗癌、順鉑

- 
1. 花蓮區農業改良場研究報告第 251 號。
  2. 花蓮區農業改良場作物改良課副研究員。
  3. 慈濟大學醫學科學研究所博士班研究生。
  4. 慈濟大學分子生物暨人類遺傳學系助理教授。

## 前言

當歸 (*Angelica spp.*) 入藥開始記載於《神農本草經》，列為中品藥，使用歷史已超過 2,000 年以上，利用部位為根部，有活血補血、調經止痛及潤腸通便等功效(Zhao *et al.*, 2003)，在中國傳統醫療中常用來治療一些疾病，如更年期症狀(Circosta *et al.*, 2006)、胃黏膜損傷(Ye *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2003)及肝損傷(Chor *et al.*, 2005)。近年來在藥理研究與臨床應用上，主要用於貧血、高血壓、慢性氣管炎、氣喘及心血管疾病(Lin *et al.*, 1998)；促進血液循環、調節免疫系統(Zhao *et al.*, 2003)；亦有研究指出，當歸萃取物對前列腺癌的預防與治療(Jiang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009)以及抑制人類肺癌細胞(Cheng *et al.*, 2004)與惡性腦瘤細胞(Tsai *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2013)等均有良好效果。當歸目前被分離及證實之化合物種類達 70 種以上，主要成分為揮發油、butylidenephthalide、醣類、氨基酸及 bergaptene 等(顏, 1985)，其中最主要的生理活性成分為阿魏酸(ferulic acid)、藁本內酯(Z-ligustilide)及 phthalides 等成分(Lin *et al.*, 1998)。其有效成分阿魏酸易被人體所吸收與代謝，其具有很多生理功能，包括抗氧化能力、抗菌、抗發炎、抑制血小板凝集、抗血栓形成、增進心血管血液流量以及抗腫瘤活性，亦能避免冠狀動脈疾病、降低膽固醇及增加精子存活率，由於這些特性與低毒性，故廣泛用於食品和化妝品上，並作為運動食品與皮膚保護劑之成分(Ou and Kwok, 2004; Lu *et al.*, 2005)，例如維生素 C 與維生素 E 在防曬與保護皮膚上，再添加阿魏酸則有助其保護效果之穩定性，並大幅提高其協同性光保護作用，甚至提供額外的保護來有效預防皮膚癌(Lin *et al.*, 2005)，亦有研究指出阿魏酸具有抗癌活性，如大腸癌(Kawabata *et al.*, 2000)。另一有效成分藁本內酯為芳香類揮發油之酯類化合物，具有抑制血小板凝集、鬆弛子宮、預防婦科疾病、治療月經失調與高血壓等功能(Lu *et al.*, 2004)，以及治療前列腺癌(Su *et al.*, 2013)等，亦有研究指出對血癌細胞具有抑制效果(Chen *et al.*, 2007)。

丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 在《神農本草經》中列為上品生藥，使用部位為根部，在臨床上用來治療各種心血管疾病，如心絞痛、心肌梗塞、動脈粥樣硬化或凝血異常，廣泛用於婦女月經失調、失眠、關節炎及血液類等之疾病，在《本草綱目》中有「一味丹參功同四物湯」之記載(陸和黎, 1993)。現代之研究顯示其對於抗腫瘤、抗菌、冠心病、特別是心血管方面如心絞痛、和心肌梗塞有良好的治療功用(Gu *et al.*, 2007)，具有很強的抗氧化能力，在預防心血管疾病上有很大的助益(Weng and Gordon, 1992; Zhao *et al.*, 1996)，其有效活性成分主要分為水溶性與脂溶性化合物，水溶性化合物主要為酚類化合物，如丹參酚酸 B (salvianolic acid B)等；脂溶性化合物主要為丹參酮類(tanshinones)，包括隱丹參酮(cryptotanshinone)、丹參酮 I、丹參酮 II 及丹參酮 II A 等成分(Liu *et al.*, 2007)。關於丹參酮的抗癌活性，對多種癌細胞具有抑制或毒殺效果，如人類乳癌(Wang *et al.*, 2005)、人類肝癌(Yuan *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2007)、非小型細胞肺癌(Lee *et al.*, 2008)、白血病(Yuan *et al.*, 2004)、子宮頸癌(黃光琦等, 1996)、大腸癌(Su *et al.*, 2008)。由臨床實驗顯示，丹參酚酸 B 對心血管、腦、肝等器官均具有重要的藥理作用，而這些作用絕大部分是導源於丹參酚酸 B 具有很強的抗氧化能力，能清除自由基與保護局部缺血對心臟與腦部之傷害、抑制脂質過氧化反應(Gu *et al.*, 2007)。

臺灣的當歸種屬於大和當歸 (*A. acutiloba*)，於 1950 年代引進臺灣在東部地區推廣栽培，適應性良好，數十年來已在東部地區馴化成為歸化種，而臺灣目前所種植的丹參為 *S. miltiorrhiza*，為正品丹參，在一般平地大都可種植，適應性很廣。當歸與丹參二者皆具有活血、調經之功效，在民間傳統醫療體系中作為重要的藥膳食材及中藥處方，最近許多研究朝向聯合使用二種藥劑來進行協同效應，例如將丹參酮 IIA 與化療藥物順鉑(cisplatin)聯用在前列腺癌細胞(Hou *et al.*, 2013)；或與植物化學物質聯用，如薑黃素(curcumin)與白藜蘆醇(resveratrol)聯用可有效抑制 Hepa1-6 肝癌細胞(Du *et al.*, 2013)。目前協同效應方面的研究，應用在對抗腫瘤上日益增加，本研究以當歸與丹參的萃取物對抑制癌細胞及生理活性進行探討，與化療藥物順鉑聯用，分別以當歸與丹參、當歸與順鉑、丹參與順鉑、以及此二種萃取物與順鉑聯用等四種處理組合，對抑制 HepG2 肝癌細胞之影響進行探討，以作為未來天然物開發利用之參考。

## 材料與方法

### 一、當歸與丹參的萃取方式

#### (一) 樣品處理：

1. 當歸樣品：當歸來源為花蓮吉安鄉 10 月份種植，隔年 7 月份收穫之新鮮當歸 (*A. acutiloba*) 根部。
2. 丹參樣品：丹參來源為花蓮吉安鄉 10 月份種植，隔年 9 月份收穫之新鮮丹參 (*S. miltiorrhiza*) 根部。
3. 樣品製備：新鮮根部以 40°C 熱風乾燥 24 小時，再以粉碎機磨成粉末備用。

#### (二) 樣品溶液製備：

各取 1.0 g 的當歸與丹參粉末，加入 10 ml 水或乙醇，以不同溫度萃取 1 小時，再以 0.2  $\mu$ m 濾膜過濾備用。

#### (三) 萃取條件：

當歸與丹參樣品溶液的萃取條件，分別為 A: 60°C 水、B: 80°C 水、C: 100°C 水、D: 60°C 乙醇及 E: 80°C 乙醇等。在細胞試驗部分，是以熱水或乙醇萃取，來模擬典型的藥膳烹調方式。乙醇萃取物移除乙醇成分後，再以 DMSO 溶解進行抑制癌細胞之相關試驗。

#### (四) 有效成分含量分析：當歸與丹參的有效成分含量，以 HPLC 進行定量分析。

##### 1. 當歸之有效成分分析

阿魏酸與藁本內酯是以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography；簡稱 HPLC) 分析，HPLC 型號為 Waters 2695，光電二極體偵測器 (Photodiode Array Detector) 型號為：Waters 2998。分析管柱採 HypURITY C18 (250  $\times$  4.6 mm)，吸光值偵測設為 284 nm，樣品注射量為 20  $\mu$ l。分析方式採用梯度模式，沖提溶液分為：A: acetonitrile；B: 1% acetic acid 水溶液；C: methanol，起始時間時 A 5%+B 95%；10 min 時 A 35%+B 65%；30 min 時 A 70%+B 30%；40 min 時 A 95%+B 5%，分別對不同溶液梯度濃度轉換；41 min 時 C 為 100% 維持至 50 min，流洗管柱中殘餘的化合物；51 min 時換回起始條件 A 5%+B 95%。當歸標準品之阿魏酸及藁本內酯購自台灣默克股份有限公司 (Merck Ltd., Taiwan)。

##### 2. 丹參之有效成分分析

丹參酚酸 B 與丹參酮 IIA 是以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography；HPLC) 分析，HPLC 型號為 Waters 2695，光電二極體偵測器 (Photodiode Array Detector) 型號為：Waters 2998。分析管柱採 HypURITY C18 (250  $\times$  4.6 mm)，檢測波長為 254 nm，樣品注射量為 10  $\mu$ l。採用梯度模式分析，沖提溶液分為：A: acetonitrile；B: 1% acetic acid 水溶液；C: methanol，起始時間時 A 25%+B 75%；15 min 時 A 25%+B 75%；20 min 時 B 100%；25 min 時 B 100%，分別對不同溶液梯度濃度轉換；26 min 時 C 100% 維持至 30 min，流洗管柱中殘餘的化合物；31 min 時換回起始條件 A 25%+B 75%。丹參標準品丹參酚酸 B、丹參酮 IIA 購自台灣默克股份有限公司 (Merck Ltd., Taiwan)。

### 二、當歸與丹參萃取物對抑制癌細胞之影響

- (一) 細胞株與培養條件：本試驗所使用的癌細胞株，包括人類乳癌細胞(MCF-7)、人類肝癌細胞(MSG2)、人類肺癌細胞(A549)以及人類肝癌細胞(HepG2)等四種細胞，其中 MCF-7、MSG2、A549 等細胞株是由慈濟大學陳紀雄教授所提供，而 HepG2 則由慈濟大學羅時燕教授所提供。細

胞培養於含 10% 胎牛血清( FBS, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) 、100 U/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)之 Dulbecco's modified Eagle's medium with phenol red (DMEM, Gibco, New York, USA) 培養液，培養在 37 °C 、5% CO<sub>2</sub>培養箱中。

(二) 細胞存活率測定：以 WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio] -1,3-benzene disulfonate)細胞增殖與細胞毒性測定法 (Roche Co., South San Francisco, USA)來計算細胞存活率，其 tetrazolium 會被活細胞的粒線體脫氫酶 (mitochondria dehydrogenases)還原生成紫色的 formazan，細胞增殖越多，則顏色越深；若細胞毒性越大，則顏色越淺。為進行細胞生長測定，在 96 wells 培養盤中，每個 well 種約 1×10<sup>4</sup> 個細胞，並在上述相同條件下培養細胞隔夜，使細胞附著在每個孔槽底部，以當歸萃取物、丹參萃取物、前二者混合處理以及與順鉑藥物聯用等處理方式，當歸使用濃度為 28.6-457 µg·ml<sup>-1</sup>，丹參使用濃度為 2-40 µg·ml<sup>-1</sup>，順鉑使用濃度為 0.2-5 µg·ml<sup>-1</sup>，處理 60 hr。對照組是以相同濃度的 DMSO 處理。處理後，除去培養基，以 200 µl 的 1×PBS (phosphate buffer saline)清洗，加入含有 10 µl WST-1 cell proliferation reagent 和 190 µl phenol red free DMEM 的混合液，在上述相同培養條件下靜置 30 min，使細胞與試劑作用後，再以 microplate reader (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, New York, USA)在 450 nm 讀取吸光值。所有實驗均進行至少三次、每種濃度重複四次。計算細胞存活率的公式為：細胞存活率 (%)=實驗組的 OD 值/對照組的平均 OD 值) × 100。

## 結 果

### 一、當歸與丹參不同萃取方式的有效成分含量

#### (一) 當歸的有效成分比較

利用不同的溶劑與溫度萃取當歸的有效成分之阿魏酸與藁本內酯，試驗結果阿魏酸所萃取出含量以 80°C 乙醇的萃取條件可得最高含量為 2,109.2 µg·g<sup>-1</sup>，60°C 乙醇萃取者為 307.1 µg·g<sup>-1</sup>，60°C 水萃取者為 113.6 µg·g<sup>-1</sup>，100°C 水萃取者為 36.8 µg·g<sup>-1</sup>，而 80°C 水萃取者僅為 1.5 µg·g<sup>-1</sup> (表一)。藁本內酯所萃取出含量，試驗結果以 80°C 乙醇的萃取條件可得最高含量為 6.2 mg·g<sup>-1</sup>，60°C 乙醇萃取者為 4.5 mg·g<sup>-1</sup>，但 60°C 水、80°C 水及 100°C 水的萃取條件，均無法萃取出藁本內酯 (表一)。

表一、當歸不同萃取條件的有效成分含量比較

Table 1. The comparison on the active ingredient content with different extraction conditions of *Angelica acutiloba*.

Extraction condition	Ferulic acid (µg·g <sup>-1</sup> DW)	Z-ligustilide (mg·g <sup>-1</sup> DW)
A <sup>z</sup>	113.6 ± 5.6	- <sup>y</sup>
B	1.5 ± 0.2	-
C	36.8 ± 3.2	-
D	307.1 ± 7.9	4.5 ± 0.2
E	2109.2 ± 21.5	6.2 ± 0.2

<sup>z</sup>A: 60°C water, B: 80°C water, C: 100°C water, D: 60°C ethanol and E: 80°C ethanol.

<sup>y</sup>Not detected.

## (二) 丹參的有效成分比較

利用不同的溶劑與溫度萃取丹參的有效成分丹參酚酸 B 與丹參酮 IIA，其萃取條件如表二。試驗結果，丹參酚酸 B 所萃取出的含量，以 80°C 乙醇的萃取條件可得最高含量為 133.5 mg·g<sup>-1</sup>，60°C 乙醇萃取者為 41.1 mg·g<sup>-1</sup>，100°C 水萃取者為 35.2 mg·g<sup>-1</sup>，60°C 水萃取者為 27.6 mg·g<sup>-1</sup>，而 80°C 水萃取者僅為 7.1 mg·g<sup>-1</sup> (表二)。丹參酮 IIA 所萃取出的含量，試驗結果以 80°C 乙醇的萃取條件可得最高含量為 54.1 mg·g<sup>-1</sup>，60°C 乙醇萃取者為 27.3 mg·g<sup>-1</sup>，但 60°C 水、80°C 水及 100°C 水的萃取條件，均無法萃取出丹參酮 IIA (表二)。

表二、丹參不同萃取條件的有效成分含量比較

Table 2. The comparison on the active ingredient content with different extraction conditions of *Salvia miltiorrhiza*.

Extraction condition	Salvianolic acid B (mg·g <sup>-1</sup> DW)	Tanshinone IIA (mg·g <sup>-1</sup> DW)
A <sup>z</sup>	27.6 ± 1.1	- <sup>y</sup>
B	7.1 ± 0.3	-
C	35.2 ± 1.2	-
D	41.1 ± 2.2	27.3 ± 0.3
E	133.5 ± 4.8	54.1 ± 0.8

<sup>z</sup>A: 60°C water, B: 80°C water, C: 100°C water, D: 60°C ethanol and E: 80°C ethanol.

<sup>y</sup>Not detected.

## 二、當歸、丹參萃取物對癌細胞增生之抑制效果

## (一) 當歸萃取物對癌細胞增生的半抑制效應

利用不同萃取條件所得之當歸萃取物，進行不同癌細胞之半抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) 試驗。試驗結果顯示，對不同細胞株的 IC<sub>50</sub> 以乙醇萃取物對癌細胞的抑制效果較好，且以 80°C 乙醇萃取物有最佳的抑制效果 (表三)。在不同癌細胞方面，當歸的乙醇萃取物對 MCF-7 乳癌細胞抑制效果最好，其 IC<sub>50</sub> 為 0.8-1.35 mg·ml<sup>-1</sup>；對 A549 肺癌細胞抑制效果次之，其 IC<sub>50</sub> 為 2.07-2.55 mg·ml<sup>-1</sup>；對 MSG2 肝癌細胞抑制效果最差，其 IC<sub>50</sub> 為 3.27-4.84 mg·ml<sup>-1</sup>。

表三、當歸萃取物對不同癌細胞株的抑制效果

Table 3. Cytotoxic effect of *Angelica acutiloba* extracts on selected cell lines.

Extraction conditions	MCF-7 (mg·ml <sup>-1</sup> )	MSG2 (mg·ml <sup>-1</sup> )	A549 (mg·ml <sup>-1</sup> )
A <sup>z</sup>	1.25 ± 0.02	11.5 ± 0.01	49.68 ± 0.03
B	3.42 ± 0.02	4.02 ± 0.01	24.56 ± 0.02
C	3.37 ± 0.01	12.38 ± 0.02	10.68 ± 0.01
D	1.35 ± 0.01	4.84 ± 0.01	2.55 ± 0.01
E	0.80 ± 0.01	3.27 ± 0.01	2.07 ± 0.01

<sup>z</sup>A: 60°C water, B: 80°C water, C: 100°C water, D: 60°C ethanol and E: 80°C ethanol.

## (二) 丹參萃取物對癌細胞增生的半抑制效應

利用不同萃取條件所得之丹參萃取物，進行不同癌細胞之半抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) 試驗。試驗結果顯示，對不同細胞株的 IC<sub>50</sub> 以乙醇萃取物對癌細胞的抑制效果較好，且以 80°C 乙醇萃取物有最佳的抑制效果 (表四)。在不同癌細胞方面，丹參的乙醇萃取物對 MCF-7 乳癌細胞的抑制效果最好，其 IC<sub>50</sub> 為 0.017-0.034 mg·ml<sup>-1</sup>；對 MSG2 肝癌細胞的抑制效果次之，其 IC<sub>50</sub> 為 0.018-0.038 mg·ml<sup>-1</sup>；對 A549 肺癌細胞的抑制效果最差，其 IC<sub>50</sub> 為 0.03-0.04 mg·ml<sup>-1</sup>。

表四、丹參萃取物對不同癌細胞株的抑制效果

Table 4. Cytotoxic effect of *Salvia miltiorrhiza* extracts on selected cell lines.

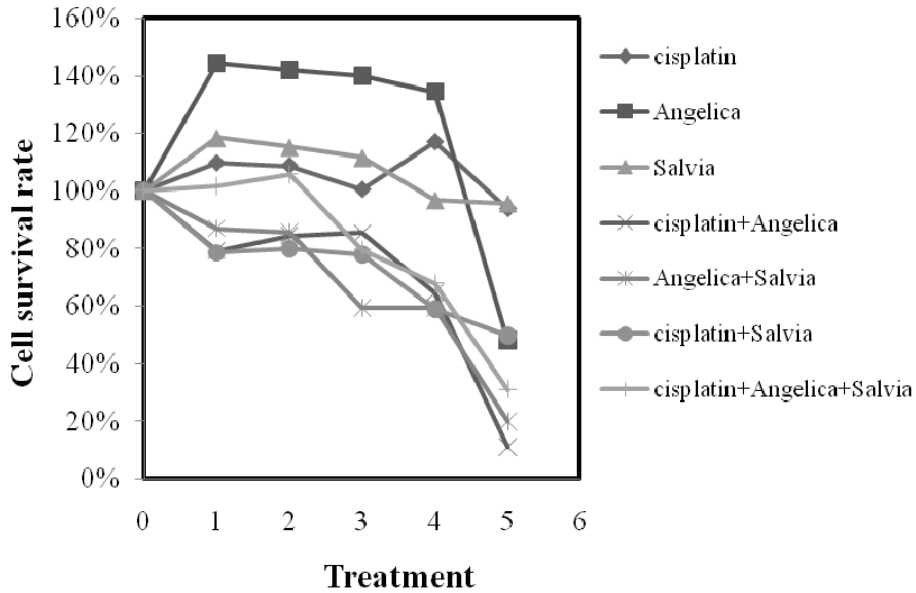
Extraction conditions	MCF-7 (mg·ml <sup>-1</sup> )	MSG2 (mg·ml <sup>-1</sup> )	A549 (mg·ml <sup>-1</sup> )
A <sup>z</sup>	1.6 ± 0.001	>5	18.37 ± 0.002
B	1.67 ± 0.002	>5	..y
C	1.1 ± 0.001	>5	3.48 ± 0.001
D	0.034 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.04 ± 0.001
E	0.017 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.03 ± 0.001

<sup>z</sup>A: 60°C water, B: 80°C water, C: 100°C water, D: 60°C ethanol and E: 80°C ethanol.

<sup>y</sup>Not detected.

### (三) 當歸、丹參與順鉑聯用對癌細胞增生之抑制效果

為瞭解當歸、丹參萃取物與順鉑之間的聯用效應，分別以當歸與丹參、當歸與順鉑、丹參與順鉑、以及當歸、丹參二種萃取物與順鉑聯用等四種處理組合，對抑制 HepG2 肝癌細胞之協同效應進行探討。試驗結果，當歸與丹參萃取物的處理組合在抑制癌細胞增生上有協同效應，在 114 µg·ml<sup>-1</sup> 當歸萃取物與 10µg·ml<sup>-1</sup> 丹參萃取物處理濃度時，腫瘤細胞存活率為 60%；在 457 µg·ml<sup>-1</sup> 當歸萃取物與 40 µg·ml<sup>-1</sup> 丹參萃取物處理濃度時，其抑制效果更為顯著，癌細胞的存活率為 20% (圖一)。當歸萃取物與順鉑聯用的處理組合在抑制癌細胞增生之協同效應，在 229 µg·ml<sup>-1</sup> 當歸萃取物與 2 µg·ml<sup>-1</sup> 順鉑之處理濃度對細胞的抑制效果開始顯著，在 457 µg·ml<sup>-1</sup> 當歸萃取物與 5 µg·ml<sup>-1</sup> 順鉑的處理濃度其聯用效應增強，細胞的存活率為 10.9% (圖一)。丹參萃取物與順鉑聯用的處理組合在抑制癌細胞增生之協同效應，在 20 µg·ml<sup>-1</sup> 丹參萃取物與 2 µg·ml<sup>-1</sup> 順鉑的處理濃度開始明顯抑制細胞，細胞的存活率在 60%以下；在 40 µg·ml<sup>-1</sup> 丹參萃取物與 5 µg·ml<sup>-1</sup> 順鉑的處理濃度時，細胞的存活率為 50% (圖一)。當歸、丹參萃取物與順鉑藥物聯用，在 114 µg·ml<sup>-1</sup> 當歸萃取物、10 µg·ml<sup>-1</sup> 丹參萃取物及 1 µg·ml<sup>-1</sup> 順鉑的處理濃度時，開始有抑制癌細胞增生之效果，隨著濃度增加抑制效果增強，在 457 µg·ml<sup>-1</sup> 當歸萃取物、40 µg·ml<sup>-1</sup> 丹參萃取物及 5 µg·ml<sup>-1</sup> 順鉑的處理濃度時，細胞存活率為 31% (圖一)。



圖一、當歸萃取物、丹參萃取物、順鉑 及其聯用 60 hr 對肝癌細胞 HepG2 之抑制情形。Treatment 0：為不加入藥劑處理；Treatment 1：28.6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  當歸、2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  丹參及 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  順鉑；Treatment 2：57.1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  當歸、5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  丹參及 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  順鉑；Treatment 3：114  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  當歸、10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  丹參及 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  順鉑；Treatment 4：229  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  當歸、20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  丹參及 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  順鉑；Treatment 5：457  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  當歸、40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  丹參及 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  順鉑

Fig. 1. The effect of *Angelica* extract, *Salvia* extract, cisplatin and combination on HepG2 cells at 60 hrs. Treatment 0: without agent; Treatment 1: 28.6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Angelica*, 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Salvia* and 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  cisplatin; Treatment 2: 57.1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Angelica*, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Salvia* and 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  229  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Angelica*, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Salvia* and 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  cisplatin; Treatment 5: 457  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Angelica*, 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Salvia* and 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  cisplatin.

## 討 論

使用不同的溶劑與萃取方式，所得到的成分含量會有很大的差異，如過去研究常使用甲醇作為溶劑，或混合其他溶劑如 methanol-formic acid (95:5)，以浸泡、振盪等方式萃取當歸 (*A. sinensis*) 的阿魏酸，其含量在 0.211-1.17  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，若使用乙醇作為溶劑，並以迴流裝置 (reflux) 或振盪方式，萃取阿魏酸含量在 0.468-1.02  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (Lu *et al.*, 2005)。本研究為模擬一般藥膳的烹調方式，故以水或乙醇加熱方式得到萃取物來進行細胞試驗，較符合實際烹調後的食用量，在本研究中以乙醇加熱方式萃取，所得到的阿魏酸含量在 0.3-2.1  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，成分含量並不亞於前者。由於當歸的藁本內酯與丹參的丹參酮 IIA 均為非水溶性之化合物，因此以乙醇作為溶劑使用才可萃取出其有效成分，而實際的藥膳烹調方式多會添加酒精來煎煮，來增加其藥性作用，且對有些成分更能有效溶出。另外，在市面上的當歸 (*A. sinensis*) 藥材是以酒炙法 (80°C 烘乾 90 min) 炮製來增強其藥理活性。

綜合試驗結果顯示，當歸與丹參以 80°C 乙醇所萃取得到的成分含量最高，而且丹參的有效成分溶出較多。在相同萃取條件下，對 MCF-7、MSG2 及 A549 三種癌細胞株的半抑制濃度 (IC50)，以丹參萃取物的抑制效果較好。在協同效應方面，當歸與丹參、當歸與順鉑、丹參與順鉑、以及當歸、丹參萃取物與順鉑之相互聯用等處理組合，對抑制癌細胞生長上皆有協同作用，當歸、丹參的萃取物與順鉑藥物聯用，有助於抑制 HepG2 肝癌細胞之效果，對需要以化療藥物治療的患者而言，可降低順鉑的使用劑量，減少化療藥物對人體所產生的副作用。本研究是以粗萃物進行癌細胞試驗，其抑制的作用機制為

何，則必須更進一步探討。以花蓮地區優良農業操作(GAP)栽培體系所生產的當歸與丹參為材料，利用酒精加熱方式萃取其有效成分，進行抑制癌細胞增生之研究，證實本土生產的當歸與丹參之生理活性成分，具有抑制癌細胞生長之功效，且符合藥膳料理的實際情況，與實際的攝取量較符合，證實對人體有保健的功效，對於推廣本土藥用食材及未來保健產品的開發利用更具應用價值。研究結果顯示，天然植物成分與化療藥物之聯用，有助於抑制癌細胞的生長，在未來抗癌與藥物動力學之臨床研究，提供抗癌配方之應用，期能減少因化療藥物使用所產生的副作用，對未來開發保健產品及天然植物藥之應用上，具有發展潛力。



## 參考文獻

1. 黃光琦、袁淑蘭、周宏遠 1996 丹參酮誘導人宮頸癌 ME180 細胞的分化 中國藥理學與毒理學雜誌 10(4):85-289。
2. 陸欽堯、黎明 1993 丹參 p.131-134 益壽中草藥 渡假出版社。
3. 顏焜熒 1985 原色生藥學 南天書局 台北。
4. Chen Q.C., J.P. Lee, W.Y. Jin, U.J. Youn, H.J. Kim, I.S. Lee, X.F. Zhang, K.S. Song, Y.H. Seong and K.H. Bae. 2007. Cytotoxic constituents from *Angelica sinensis* radix. Arch. Pharm. Res. 30:565-569.
5. Cheng Y.L., W.L. Chang, S.C. Lee, Y.G. Liu, C.J. Chen, S.Z. Lin, N.M. Tsai, D.S. Yu, C.Y. Yen and H.J. Harn. 2004. Acetone extract of *Angelica sinensis* inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis. Life Sci. 75:1579-1594.
6. Chor S.Y., A.Y. Hui and K.F. To, K.K. Chan, Y.Y. Go, H.L. Chan, W.K. Leung and J.J. Sung. 2005. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell. J. Ethnopharmacol. 100:180-186.
7. Circosta C., R.D. Pasquale, D.R. Palumbo, S. Samperi and F. Occhiuto. 2006. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. Phytother. Res. 20:665-669.
8. Du Q., B. Hu, H.M. An, K.P. Shen, L. Xu, S. Deng and M.M. Wei. 2013. Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells. Oncol. Rep. 29:1851-1858.
9. Gu M., X. Wang, Z. Su and F. Ouyang. 2007. One-step separation and purification of 3,4-dihydroxyphenyllactic acid, salvianolic acid B and protocatechualdehyde from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A. 1140:107-111.
10. Hou L.L., Q. J. Xu, G.Q. Hu and S.Q. Xie. 2013. Synergistic antitumor effects of tanshinone II A in combination with cisplatin via apoptosis in the prostate cancer cells. Yao Xue Xue Bao. 48:675-679.
11. Jiang C., H.J. Lee, G.X. Li, J. Guo, B. Malewicz, Y. Zhao, E.O. Lee, H.J. Lee, J.H. Lee, M.S. Kim, S.H. Kim and J. Lu. 2006. Potent antiandrogen and androgen receptor activities of an *Angelica gigas*-containing herbal formulation: identification of decursin as a novel and active compound with implications for prevention and treatment of prostate cancer. Cancer Res. 66:453-463.
12. Kawabata K., T. Yamamoto, A. Hara, M. Shimizu, Y. Yamada, K. Matsunaga, T. Tanaka and H. Mori. 2000. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Cancer Lett. 157:15-21.
13. Lee C.Y., H.F. Sher, H.W. Chen, C.C. Liu, C.H. Chen, C.S. Lin, P.C. Yang, H.S. Tsay and J.J. Chen. 2008. Anticancer effects of tanshinone I in human non-small cell lung cancer. Mol. Cancer Ther. 7:3527-3538.
14. Lee H.J., H.J. Lee, E.O. Lee, J.H. Lee, K.S. Lee, K.H. Kim, S.H. Kim and J. Lu. 2009. *In vivo* anti-cancer activity of Korean *Angelica gigas* and its major pyranocoumarin decursin. Am. J. Chin. Med. 37:127-142.
15. Lin F.H., J.Y. Lin, R.D. Gupta, J.A. Tournas, J.A. Burch, M.A. Selim, N.A. Monteiro-Riviere, J.M. Grichnik, J. Zielinski and S.R. Pinnell. 2005. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. J. Invest. Dermatol. 125:826-832.
16. Lin L., X. He, L. Lian, W. King and J. Elliott. 1998. Liquid chromatographic–electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide. J. Chromatogr. A. 810:71-79.
17. Lin Y.L., W.L. Lai, H.J. Harn, P.H. Hung, M.C. Hsieh, K.F. Chang, X.F. Huang, K.W. Liao, M.S. Lee and N.M. Tsai. 2013. The methanol extract of *Angelica sinensis* induces cell apoptosis and suppresses tumor growth in human malignant brain tumors. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 394636.
18. Liu A.H., H. Guo, M. Yeh, Y.H. Lin, J.H. Sun, M. Xu and D.A. Guo. 2007. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1161:170-182.
19. Lu G.H., K. Chan, C.L. Chan, K. Leung, Z.H. Jiang and Z.Z. Zhao. 2004. Quantification of ligustilides in

- the roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous medicinal plants by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1046:101-107.
20. Lu G.H., K. Chan, K. Leung, C.L. Chan, Z.Z. Zhao and Z.H. Jiang. 2005. Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis*. *J. Chromatogr. A.* 1068:209-219.
  21. Ou S. and K.C. Kwok. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* 84:1261-1269.
  22. Su C.C., G.W. Chen, J.C. Kang and M.H. Chan. 2008. Growth inhibition and apoptosis induction by tanshinone IIA in human colon adenocarcinoma cells. *Planta Med.* 74:1357-1362.
  23. Su Z.Y., T.O. Khor, L. Shu, J.H. Lee, C.L.L. Saw, T.Y. Wu, Y. Huang, N. Suh, C.S. Yang, A.H. Conney, Q. Wu and A.N. T. Kong. 2013. Epigenetic reactivation of Nrf2 in murine prostate cancer TRAMP C1 cells by natural phytochemicals Z-ligustilide and radix *Angelica sinensis* via promoter CpG demethylation. *Chem. Res. Toxicol.* 26:477-485.
  24. Tsai N.M., S.Z. Lin, C.C. Lee, S.P. Chen, H.C. Su, W.L. Chang and H.J. Harn. 2005. The antitumor effects of *Angelica sinensis* on malignant brain tumors *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 11:3475-3484.
  25. Wang X., Y. Wei, S. Yuan, G. Liu, Y. Lu, J. Zhang and W. Wang. 2005. Potential anticancer activity of tanshinone IIA against human breast cancer. *Int. J. Cancer.* 116:799-807.
  26. Weng X.C. and M.H. Gordon. 1992. Antioxidant activity of quinones extracted from Tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J. Agric. Food Chem.* 40:1331-1336.
  27. Ye Y.N., H.L. So, E.S.L. Liu, V.Y. Shin and C.H. Cho. 2003. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. *Life Sci.* 72:925-932.
  28. Ye Y.N., M.W. Koo, Y. Lin, H. Matsui and C.H. Cho. 2001. *Angelica sinensis* modulates migration and proliferation of gastric epithelial cells. *Life Sci.* 68:961-968.
  29. Yuan S.L., Y.Q. Wei, X.J. Wang, F. Xiao, S.F. Li and J. Zhang. 2004. Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* 10:2024-2028.
  30. Zhao B.J., W. Jiang, Y. Zhao, J.W. Hou and W.J. Xin. 1996. Scavenging effects of *Salvia miltiorrhiza* on free radical and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38:1171-1182.
  31. Zhao K.J., T.T. Dong, P.T. Tu, Z.H. Song, C.K. Lo and W.K. Tsim. 2003. Molecular genetic and chemical assessment of Radix *Angelica* (Danggui) in China. *J. Agric. Food Chem.* 51:2576-2583.
  32. Zhong Z.H., W.G. Chen, Y.H. Liu, Q.X. Li and Y. Qiu. 2007. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human hepatoma cell line HepG2 by tanshinone IIA. *J. Cent. South Univ. Med. Sci.* 32: 99-103.

# **Cytotoxic Effects of *Angelica acutiloba* and *Salvia miltiorrhiza* Extracts on Human Cancer Cell Lines<sup>1</sup>**

Tung-Wu Chang<sup>2</sup> Chueh-Yu Lin<sup>3</sup> Yin-Jeh Tzeng<sup>4</sup>

## Abstract

Various combinations of *Angelica acutiloba* and *Salvia miltiorrhiza* extracts produced by GAP cultivation system in Hualien were confirmed in this study to inhibit the cancer cells proliferation in vitro. Those extracts with ethanol at 80°C produce the highest content of active ingredients and inhibit the growth of MCF-7, MSG2 and A549 cell lines, and when combined with cisplatin can inhibit the proliferation of HepG2 cell line. Treated with combined extracts of 457  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Angelica* and 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Salvia* extract, cancer cell survival rate is 20%. Treatment of 457  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Angelica* extract and 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  cisplatin, the cancer cell survival rate is 10.9%. The combined treatment of 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *Salvia* extract and 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  cisplatin resulted in 50% cancer cell survival. Combined with all three, it resulted in 31% cancer cell survival. This study provides evidence that when combining active ingredients of *Angelica acutiloba* and *Salvia miltiorrhiza* with chemotherapeutic agent cisplatin, it inhibits HepG2 cell line that can be used in future anticancer and pharmacokinetic research, benefit the application of synergistic combination to reduce the side effects of chemotherapy drugs. There are potential applications in the development of functional food and herbal medicine in the future.

Key words: *Angelica acutiloba*, *Salvia miltiorrhiza*, active ingredient, anticancer, cisplatin.

---

1. Research article No.251 of Hualien District Agricultural Research and Extension Station.

2. Associate researcher, Division of Crop Improvement, Hualien DARES.

3. Institute of Medical Sciences, Tzu-Chi University, Hualien City, Taiwan, R.O.C.

4. Department of Molecular Biology and Human Genetics, Tzu-Chi University, Hualien City, Taiwan, R.O.C.