

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

牽牛子之抗癌活性成分研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-038-042-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：臺北醫學大學生藥技術學系

計畫主持人：王靜瓊

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 24 日

[illegible]

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

共同主持人：

- ☐ 赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐ 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐ 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

台北醫學大學藥技術學系

中 華 民 國 91 年 8 月 16 日

中文摘要

直腸癌為台灣地區好發率高的癌症，而臨床上使用之抗癌藥物常有抗藥性及副作用的問題，故將由中藥材中開發新的抗癌藥物。本研究收集坊間常用之 26 種抗癌中藥材，分別對直腸癌細胞株(CoLo 205, HT-29)進行毒性試驗篩選，結果以黑牽牛子之 50%乙醇萃取物對直腸癌細胞具有最強的抑制作用，並在相同濃度時對人類正常肝細胞毒性較小，且會誘導直腸癌細胞凋亡。繼而利用細胞毒性追蹤活性成份之分離黑牽牛子方式，經過一連串的管柱層析分離步驟，經 70% Acetone 沖提 Diaion HP-20 管柱之沖提物(D-70A)，對 CoLo 205 細胞毒性最強，其在 48 小時 IC_{50} 為 17.38 $\mu\text{g/ml}$ ，進一步利用去氧核糖核酸斷片分析法、流式細胞儀與 Giemsa 染色法及西方印跡法得知 D-70A 會誘導 CoLo 205 細胞 DNA 斷鏈及造成 PARP 被切割產生 85kDa 的片段，證明其會誘導 CoLo 205 細胞死亡模式為凋亡。繼而 D-70A 再經由 RP-18 層析管柱得到 Compound 1，其在 48 小時 IC_{50} 為 20.36 $\mu\text{g/ml}$ ，抑制癌細胞作用不及 D-70A 強，但作用 48 小時後，仍可引起 DNA 斷鏈而誘導凋亡。Compound 1 誘導之細胞毒性會被 catalase 所抑制，推測 Compound 1 誘導 CoLo 205 細胞之毒性作用，可能與自由基產生有關。黑牽牛子經一系列之活性追蹤管柱層析後，得到 D-70A 為最具活性之劃分部並分離得到 Compound 1 之天然物，故未來可利用 Compound 1 做為 D-70A 抗癌活性指標成份進行品質管制。

Abstract

Colorectal carcinoma is one of the leading causes of cancer deaths in Taiwan. Several previous studies demonstrated chemotherapy for colorectal carcinoma caused resistance and side effects on patients. Therefore, the new anticancer tumor drugs are going to develop from Chinese herbs. In this study, the cytotoxicity effects of the 50% ethanol extracts of Chinese herbs were screened by MTT assay in human colon adenocarcinoma cell lines (CoLo 205, HT-29). The cytotoxicity effects of 50% EtOH extracted-Pharbitidis Semen Atrum were exerted stronger in CoLo 205 cells than Chang normal liver cell (CNL). The cytotoxic principles of semen were isolated by bioassay-guided fractionation. The semen were extracted with methanol and chromatographed over Diaion HP-20 column with 70% aqueous acetone. Moreover, the cytotoxicity effect of 70% acetone fraction (D-70A) showed stronger than the other fractions in CoLo 205 cells and IC_{50} was 17.38 $\mu\text{g/ml}$ for 48h. Furthermore, the cytotoxic mechanisms of D-70A were measured by agarose gel electrophoresis, fluorescence flow-cytometry, Giemsa stain, Western blot analysis. The results showed that D-70A could induce apoptosis in CoLo 205 cells. Compound 1 was isolated from D-70A with RP-18 column chromatography. The IC_{50} value of compound 1 was 20.36 $\mu\text{g/ml}$ and induced apoptosis in CoLo205 cells for 48h. Moreover, treatment with catalase prevented compound 1-induced cytotoxicity. In according to the results, we suggested that compound 1 might produce free radicals and induce apoptosis in CoLo 205 cells. However, the cytotoxic effect of bibberellin was lesser than D-70A in CoLo 205 cells. Therefore, we suggested the D-70A fraction extract is good for antitumor effects. In the future, compound 1 will be a biosubstance to control the quality of D-70A.

Keywords: Cytotoxicity, Apoptosis, Colorectal carcinoma, CoLo 205 cell, HT-29 cell, Pharbitidis Semen

緣由與目的

近年來美國 FDA 已承認中草藥之療效，並准許經適當品質管制之中草藥萃取物上市，此為中草藥發展之契機。未來二十一世紀將是中草藥的時代，如何應用中草藥資源以開發新抗癌天然物，值得進一步開發與研究。

抗癌中藥材在民間普遍被流傳使用，雖然部分確有療效，但卻因缺乏有系統之科學研究，對現代醫學貢獻不大。本研究收集民間常用之二十種抗癌中藥材，利用各種癌細胞株檢測其

細胞毒性，結果顯示訶子、瓜蒌、牽牛子對癌細胞具有較強之毒性，其中又以牽牛子對 Colo 205 直腸癌細胞毒性最大，對正常肝細胞 (Chang Liver) 最小，選擇指數約 2-3 倍，且對直腸癌細胞 Colo 205 具有時間及劑量依存性之抑制作用，並會誘導其核質皺縮及 DNA 片段產生，使其凋亡 (apoptosis)，故本實驗選擇牽牛子進行抗癌活性成分分離。

結果與討論

1. 活性成分追蹤分離²⁻⁸

本研究首先以不同有機溶媒萃取牽牛子，進行抑制直腸癌細胞活性檢測，發現丙酮萃取物抑制癌細胞生長作用最強，故將以丙酮為溶劑進行萃取，再以並配合體外癌細胞毒性試驗，有系統的追蹤分離牽牛子之抗癌活性成分。

取水層，以(H₂O→20% MeOH→40%MeOH→60% MeOH→80% MeOH→70% Acetone→Acetone)沖提 Diaion HP-20 管柱進行粗分，其中 70% Acetone 沖提物具有最強之抑制作用，再以水、5%~100% 甲醇及丙酮沖提 MCI CHP20P 管柱，其中 95% 甲醇沖提物以 CH₃CN:H₂O = 80:20 沖提 RP-18 管柱，純化得到化合物 1，並以 Butanol-Acetic acid-H₂O 及 CHCl₃-MeOH- H₂O 兩個不同種的移動相，以 TLC 分析確定為純物質，目前正利用儀器資料鑑別其結構。

2. 劃分部及活性成分活性檢測

(1) 黑牽牛子萃取物誘導細胞死亡

黑牽牛子以 12.5 ~ 100 µg/ml 分別加入 CoLo 205 細胞，於不同時間取出，以 MTT 法分析其細胞毒性。結果在 12 小時內，黑牽牛子萃取物對細胞的抑制並無有意義的差別，但在長時間下(24~48 小時)則呈現濃度依存性的關係 (dose-dependent) 的關係。

藥物處理細胞後，利用 Giemsa 染色法，於光學顯微鏡下觀察，發現其細胞之染色質產生濃縮的現象(chromatin condensation)；當 CoLo 205 細胞以 12.5 ~ 100 µg/ml 濃度處理，培養 24 小時後，利用瓊膠電泳法的分析，在 UV 光下觀察，可看到細胞之 DNA ladders 的產生，即細胞有 DNA fragmentation 的現象；再藉由流式細胞儀的觀測可以發現由 12.5 ~ 100 µg/ml 濃度處理過 24 小時所收集到的細胞，其 DNA 的分佈在 G₁ phase 前有很明顯的 Sub-G₁ peak 產生，而且呈現濃度依存性 (Dose-dependence) 的關係，因而推論黑牽牛子誘導直腸癌細胞死亡的過程中會造成其 DNA 被切割成斷鏈，推論黑牽牛子對 CoLo 205 細胞具有細胞毒性，且誘導直腸癌細胞走向細胞凋亡 (apoptosis)。

(2) 以 Diaion 管柱分離得到之 70% Acetone fraction (D-70A) 誘導細胞死亡

70 % Acetone 沖提 Diaion 管柱得之沖提物(D-70A)以 6.25 ~ 100 µg/ml 之濃度分別加入 CoLo 205 細胞，培養 24 小時後，以 MTT 法分析細胞毒性。可得到抑制百分之五十細胞生長濃度為 35.11µg/ml。

當 CoLo 205 細胞加入 100µg/ml 濃度之 D-70A 培養 24 小時後，先以光學顯微鏡觀察其細胞形態之變化，再以 Giemsa stain 染色後，利用正向顯微鏡觀察。結果顯示有細胞聚集及凋亡小體產生的現象，再經 Giemsa 染色後則可見細胞染色質濃縮的現象。

利用流式細胞儀的分析，可以發現 CoLo 205 細胞分別加入 6.25 ~ 50µg/ml 之 D-70A，培養 12 及 24 小時後，其細胞之 DNA 分佈有 Sub-G₁ peak(M1)的產生，且隨著濃度的增加呈現 Dose-dependence 的情形(如圖 1,2)。

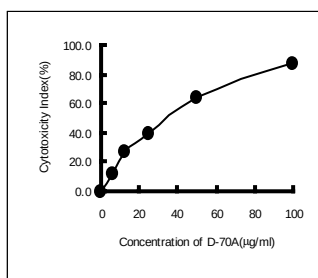


圖 1. 黑牽牛子 D-70A 引起 CoLo 205 細胞之毒性與濃度的關係。

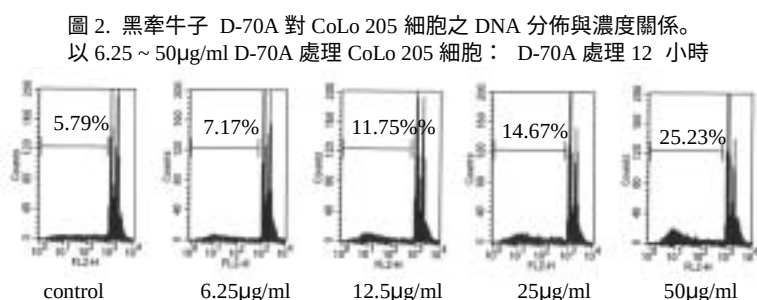


圖 2. 黑牽牛子 D-70A 對 CoLo 205 細胞之 DNA 分佈與濃度關係。
以 6.25 ~ 50µg/ml D-70A 處理 CoLo 205 細胞：D-70A 處理 12 小時

CoLo205細胞分別加入 6.25 ~ 50 μ g/ml 之黑牽牛子 D-70A 培養 24 小時後，引起 CoLo 205 細胞之 DNA 斷鏈片段產生，且具有濃度依存性。

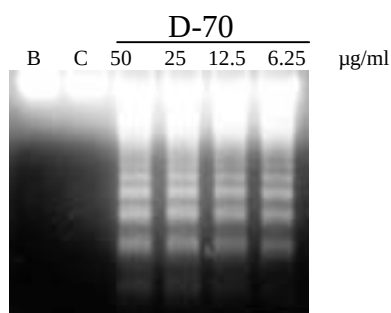


圖 3. 黑牽牛子 D-70A 誘導 CoLo 205 細胞之 DNA 斷鏈作用。

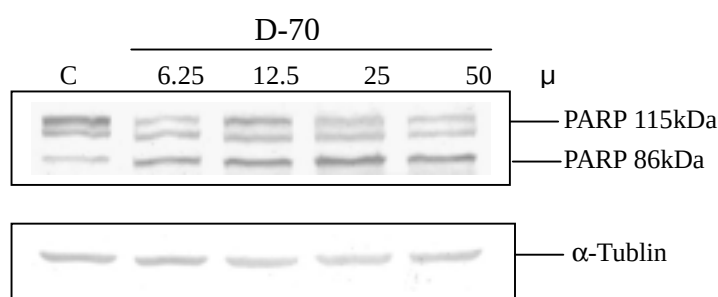


圖 4. D-70A 以 Western blotting 方法偵測 PARP 之變化情形。

當 CoLo205 細胞以 6.25 ~ 50 μ g/ml 之 D-70A 培養 24 小時後，以 Western-blot 之方法偵測其影響 PARP 表現之情形，發現 D-70A 會造成 PARP 被切割現象，而產生活化後之 PARP (85kDa 之蛋白質片段)，且隨著濃度的增加呈現濃度依存性的情形，顯示 D-70A 會誘導 CoLo 205 細胞進行凋亡。

當 CoLo205 細胞以 6.25 ~ 50 μ g/ml 之 D-70A 培養 24 小時後，以 Western-blot 之方法偵測其影響 PARP 表現之情形，發現 D-70A 會造成 PARP 被切割現象，而產生活化後之 PARP (85kDa 之蛋白質片段)，且隨著濃度的增加呈現濃度依存性的情形，顯示 D-70A 會誘導 CoLo 205 細胞進行凋亡。

(3)Compound 1 誘導細胞死亡

Compound 1 以 3.13 ~ 100 μ g/ml 濃度分別處理 CoLo 205 細胞，於不同時間取出，以 MTT 法分析細胞毒性。Compound 1 作用 24 小時後，對 CoLo 205 細胞具有明顯之細胞毒性，在低劑量時(25 μ g/ml 以下之濃度)，隨著作用時間增加，毒性亦會隨之上升。由結果得知 compound 1 在 24, 48, 72 小時時間點，抑制直腸癌細胞百分之五十細胞生長之濃度分別為，61.27 μ g/ml, 20.36 μ g/ml, 13.88 μ g/ml。

CoLo 205 細胞分別加入 12.5 ~ 100 μ g/ml 之 compound 1 培養 48 小時後，引起 CoLo 205 細胞之 DNA 斷鏈片段產生，且具有濃度依存性。

當 CoLo 205 細胞以 compound 1 50 μ g/ml 處理，同時加入不同濃度之 catalase (500~2000 U/ml)，24 小時後利用 MTT 法分析 catalase 對 compound 1 引起 CoLo 205 細胞毒性的影響。結果發現 catalase 能有效抑制 compound 1 所誘導之細胞毒性。

(4)結論

利用細胞毒性追蹤分離活性成份的方式，以(H₂O→20% MeOH→40%MeOH→60% MeOH→80% MeOH→70% Acetone→Acetone)沖提 Diaion HP-20 管柱，進行粗分，其中 70% Acetone 沖提物(D-70A)對 CoLo 205 細胞毒性最強，再以 H₂O、5% ~ 100% MeOH 沖提及 Acetone 沖提 MCI CHP20P 管柱，結果顯示 95% MeOH 沖提物抑制癌細胞作用最強，再以 CH₃CN:H₂O = 80:20 沖提 RP-18 column，純化得到 compound 1，其產率為 0.0014%。

根據活性追蹤分離得到之 compound 1 對 CoLo 205 細胞之毒性比 D-70A 萃取物差，且 D-70A 比未經提取之 MeOH 萃取物作用強，顯示藥材經部分分離純化之產物，產率高、性質穩定，如能找到指標成份，亦是值得開發之產物，因此針對 D-70A 進行細胞毒性機制之探討。

成果自評

本論文結果：1.本論文結果正投稿於 J. Agar. Food. Chem。 2. 參加研討會論文，結果發表於 2001 年中國藥學會。

參考文獻

1. 行政院衛生署 90 年 6 月公告 台灣地區十大死因 <http://www.wedar.com/library/10death.htm>
2. Kuo SM: Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters* 110; 41-48, 1996
3. Kong AT, Yu R, Hebbar V, Chen C, Owuor E, Hu R, Ee R, Mandlekar S: Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutation Research* 480/481; 231-241, 2001
4. 張學庸、吳一純：中西醫結合簡明腫瘤學，陝西科學技術出版社，西安，p147-150, 1989
5. Rao SS, Kavelock R, Beaty J, Ackerson K, Stumbo P: Effects of fat and carbohydrate meals on colonic motor response. *Gut* 46; 205-211, 2000
6. 于爾辛、姜廷良、郁仁存：腫瘤研究，知音中西醫結合研究叢書，台北，p379-385, 1994
7. 劉傳勝、徐凱：腫瘤科專病，人民衛生出版社，北京，p299-309, 2001
8. 中國中醫研究院西苑醫院腫瘤科 楊宇飛：中醫藥治療惡性腫瘤新策略的探討，中國抗癌協會臨床腫瘤學協作中心，北京，p1-3, 2002
9. 高等中醫研究參考叢書 顏正華：中藥學，知音出版社，台北，p273-275, 1998
10. 張明慶、龔惠明：抗腫瘤中藥的臨床應用，人民衛生出版社，北京，p134-135, 2001
11. 李佩文：中藥消水方外敷治療癌性腹水的研究，中醫雜誌 第 7 期，上海，p28-30, 1991
12. Mulder GJ, Nagelkerke FJ, Seinen W, Breimer DD, Bast A, Ijzerman AP: Cell death in rat hepatocytes. Apoptosis-induced and -protective mechanisms. ISBN 90-9013345-3, 2000
13. 許淑慧：細胞凋亡於臨床上的應用，臨床藥學 第 16 卷 第 3 期，p136-141, 1999
14. 陶聲洋防癌基金會之腸癌篇 <http://tis.mc.ntu.edu.tw/~dao/icon4-07.htm>
15. Rex DK: Screening for colon cancer and evaluation of chemoprevention with coxibs. *Journal of Pain and Symptom Management* 23(4S), S41- S50, 2002
16. Hirano T, Oka K, Mimaki Y, Kuroda M, Sashida Y: Potent growth inhibitory activity of a novel *ornithogalum* cholestane glycoside on human cells: induction of apoptosis in promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Life Sciences* 58(9); 789-798, 1996
17. Zhang LH, Longley RE: Induction of apoptosis in mouse thymocytes by microcolin A and its synthetic analog. *Life Sciences* 64(12); 1013-1028, 1999
18. Zhu XF, Liu ZC, Xie BF, Li ZM, Feng GK, Xie HH, Wu SJ, Yang RZ, Wei XY, Zeng YX: Involvement of caspase-3 activation in squamocin- induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. *Life Sciences* 70; 1259-1269, 2002
19. 寄宇彬 張廣美：中藥抗腫瘤有效成份藥理與應用，黑龍江科學技術出版社，哈爾濱，p76-77; p91-97; p98-102; p109-110; p123-124; p127-129; p294-297; p488-490, 1998
20. 李軍德：抗癌中草藥彩色圖譜，中國中醫藥出版社，北京 1996
21. 顏正華、王筠默：中藥現代研究與應用第四卷，學苑出版社，上海，p3274-3279, 2001
22. Kono T, Watanabe M, Koyama K, Kishimoto T, Fukushima S, Sugimura T, Wakabayashi K: Cytotoxic activity of pierisin, from the cabbage butterfly, *Pieris rapae*, in various human cancer cell lines. *Cancer Letters* 137; 75-81, 1999
23. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA: Crocin, safranal and picrocrocin from saffron(*Crocus sativus* L) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters* 100; 23-30, 1996
24. Guilet D, Helesbeux JJ, Seraphin D, Sevenet T, Richomme P, Bruneton J: Novel cytotoxic 4-phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. *Journal Natural Products* 64; 563-568, 2001
25. Shen YC, Chen CY, Kuo YH: New sesquiterpene hydroquinones from a Taiwanese marine sponge, *Hippospongia metachromia*. *Journal Natural Products* 64; 801-803, 2001
26. Lin SY, Chang YT, Liu JD, Yu CH, Ho YS, Lee YS, Lee WS: Molecular mechanisms of apoptosis induced by magnolol in colon and liver cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 32; 73-83, 2001