

編號：CCMP 95 -RD-211

以端粒酶活性為篩選平台從當歸分離出 抗腫瘤成份 Butylidene-phthalide 並研究 其藥物萃取物抗肝癌胞生長調控之 基因體研究

韓鴻志

財團法人佛教慈濟綜合醫院

摘要

研究目的：我們初步實驗結果顯示，當歸丙酮層之萃取物 TZU-01 對人類惡性肝腫瘤 J5 細胞株具有良好的體外生長抑制效果， IC_{50} 約為 106 μ M。以 TUNEL 和 Flow 方法發現 TZU-01 使細胞環停留在 G1/S 且引發惡性肝癌細胞凋亡。本實驗接著利用微陣列分析的技術，探討 TZU-01 對抗肝癌腫瘤的標的基因。

材料與方法：將 TZU-01 處理後的肝癌細胞株 (J5) 以微陣列分析基因表現，以西方墨點法、流式細胞儀分析和 RT-PCR 等技術分析 TZU-01 引起的細胞環週期和細胞凋亡情形。進一步進行動物實驗以釐清其抗癌途徑。

結果與討論：經 TZU-01 處理後的肝癌細胞株 (J5) 以微陣列分析基因表現，其中 Nur77、Nurr1 和 Nor-1 等同屬於 Nur77 家族的基因有明顯被調高，以 Nur77 的 siRNA 可明顯抑制 TZU-01 所造成的細胞凋亡，證實 TZU-01 可能透過 Nur77 造成細胞凋亡。最後，分析 TZU-01 對裸鼠皮下肝腫瘤生長相對控制組而言有明顯的抑制效果，而隨著 TZU-01 劑量的提高 (100 ~ 500 mg/kg) 抑制效果愈顯著且無明顯的副作用。以目前結果來看，TZU-01 可造成肝癌細胞 Nur77 的大量表現，導致細胞走向凋亡，具有發展成為對抗肝癌新藥的潛力。

關鍵詞：微陣列分析，抗腫瘤，標的基因

編號：CCMP95–RD-211

The antitumor effect of butylidenephthalide derived from *Angelica sinensis* on human hepatocellular carcinoma: An example of using telomerase activity as a screening platform

Harn, Horng-Jyh
Buddish Tzu Chi Hospital

ABSTRACT

Aim: The naturally-occurring compound, TZU-01, which is isolated from the chloroform extract of *Angelica sinensis* (AS-C), has been demonstrated its anti-tumor effect on human GBM. In this study, we further examined its anti-tumor effect on hepatocellular and also exploited its target genes by microarray.

Method: In order to realize the mechanism of TZU-01-induced tumor growth arrest and apoptosis, we examined TZU-01-induced changes in gene expression by oligodeoxynucleotide-based microarray screening using human hepatocellular carcinoma J5 cells. Western blot and siRNA techniques had been applied to further conform. Finally, the xenograft animal study of hepatocellular carcinoma had also been performed.

Result and Discussion: By microarray and western blot analysis, Nur77, Nor-1 and Nurr1 were all induced after TZU-01 treatment in a time- and dose-dependent manner. In addition, cytochrome c release and caspase-3 activation were induced after TZU-01 treatment. Inhibition of TZU-01-induced Nur77 expression by Nur77 short interfering RNA (siRNA) significant reversed TZU-01-induced apoptosis in J5 cells, suggesting that the expression of Nur77 plays an important role in TZU-01-induced apoptosis. In vivo study, TZU-01 could significant

inhibit tumor growth in dose dependent and no any side effects had been observed. Taken together, these results demonstrated the TZU-01 could induced Nur77 family genes, leading apoptosis in live cancer. These *in vitro* and *in vivo* anti-cancer effects indicate that TZU-01 could serve as a new anti-liver tumor drug.

Keywords : microarray , anti-tumor , target genes

壹、前言

本實驗之目的是從中草藥中開發出一種能抑制或毒殺惡性肝腫瘤生長之藥物。此藥物的萃取過程可以標準化，而且可以以生物活性抑制的程度 (hTERT promoter activity) 作為藥物效用品管的標準。另外，此藥物的毒性必須是生理可接受。本實驗之研究策略及預定達成之目標如下：

第一年、篩選當歸中藥有效萃取層及純化物 TZU-01 並研究其體外 (*in vitro*) 作用機轉：

- 1.當歸中藥藥材之選擇、萃取及標準化流程之建立
- 2.體外肝腫瘤細胞生物活性測試之建立 (AS-C 及 TZU-01 對於 TERT 表現抑制情形之分析)
- 3.當歸丙酮層粗萃物 (AS-C) 及其純化物 TZU-01 抑制惡性肝腫瘤細胞生長之情形(MTT cytotoxicity assay)
- 4.分析 AS-C 及 TZU-01 對惡性肝腫瘤細胞週期 (Cell cycle) 之影響
- 5.分析 AS-C 及 TZU-01 對惡性肝腫瘤細胞凋亡 (Apoptosis) 之影響
6. TZU-01 抗惡性肝腫瘤細胞標地基因 (target gene) 之尋找

第二年、建立惡性肝腫瘤化學治療之動物模式 (*in vivo*)

- 1.建立同源性 (Syngenic) 之動物 (Rat,免疫系統健全) 惡性肝腫瘤模式並分析 TZU-01 對其生長抑制作用及動物存活率分析
- 2.建立人類惡性肝腫瘤細胞之動物 (Nude mice,免疫系統不全) 模式並分析 TZU-01 對其生長抑制作用及動物存活率分析
3. AS-C 及 TZU-01 之生理毒性測試

貳、材料與方法

1. 當歸藥材之選擇及萃取
2. 細胞培養及處理 (Cell lines and cell culture)
3. 利用MTT (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyltetrazolium bromide)法測試細胞毒性
4. 分析當歸粗萃物及單一純化物TZU-01對惡性肝腫瘤細胞週期之影響以Propidium iodide (PI)染色法檢測分析細胞週期之變化
5. 分析當歸粗萃物及單一純化物TZU-01抑制肝腫瘤細胞之端粒酶 (Telomerase)活性之情形
6. DNA的延伸 (Extension)和聚合酶連鎖反應
7. 分析當歸粗萃物及單一純化物TZU-01引起肝腫瘤細胞之細胞凋亡(Apoptosis)之情形
8. 當歸粗萃物及單一純化物TZU-01於人類惡性肝腫瘤化學治療之動物模式
9. 統計分析:結果數據以平均值±標準差表示。統計分析以Student's t-test方式分析實驗數據之統計學意義，統計結果之P值小於0.05視為具備統計學上之意義。

參、結果

實驗結果顯示當歸丙酮層之萃取物 TZU-01 對人類惡性肝腫瘤 J5 及 HepG2 細胞株具有良好的體外生長抑制效果， IC_{50} 約為 106 M (圖一)。將 TZU-01 處理後的肝癌細胞株 (J5) 以微陣列分析基因表現，其中 Nur77、Nurr1 和 NOR-1 等同屬於 Nur77 家族的基因有明顯被調高，經過 RT-PCR 及 Western blot 分析法觀察 Nurr-1、Nurr-77、NOR-1 等細胞凋亡基因的表現，發現 TZU-01 會誘導上述基因的大量表現 (圖二)。確認無誤後，以 Nur77 的 siRNA 處理的肝癌細胞株 (J5) 發現可明顯抑制 TZU-01 所造成的細胞凋亡，證實 TZU-01 可能透過 Nur77 造成細胞凋亡 (圖三)。藉由分離細胞質及粒線體蛋白質，以西方墨點分析法觀察細胞色素 c 的表現，發現 TZU-01 會誘導細胞色素 c 轉移到細胞質中，接著提高 Caspas-9 及 Caspas-3 的活性，造成細胞凋亡(圖四)。最後分析 TZU-01 對抑制皮下肝腫瘤生長之情形，發現 TZU-01 對裸鼠皮下肝腫瘤生長相對控制組而言有明顯的抑制效果，而隨著 TZU-01 劑量的提高 (100 ~ 500 mg/kg) 抑制效果愈顯著且無明顯的副作用(圖五)。

肆、討論

以目前結果來看，TZU-01 可造成肝癌細胞 Nur77 的大量表現，誘導細胞色素 c 轉移到細胞質中，接著提高 Caspas-9 及 Caspas-3 的活性，導致細胞走向凋亡，具有發展成為對抗肝癌新藥的潛力。

伍、結論與建議

除上述結果外，我們也試圖利用訊息傳遞抑制劑，測試 TZU-01 是否透過訊息傳遞路徑造成細胞凋亡。在本次實驗中，我們使用 ERK 的抑制劑 PD98059、JNK 的抑制劑 SP600125 以及 P38 的抑制劑 SB203580。結果發現，TZU-01 造成肝癌細胞株 J5 細胞凋亡的過程中，並未涉及此三條路徑，是否透過其他路徑或是不經由訊息傳遞路徑，是未來可再探討的目標。

陸、參考文獻

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會（計畫編號 CCMP 95-RD-211）提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝

1. Ko WC. A newly isolated antispasmodic-butyridenepthalide. *Jpn J Pharmacol* 30:85-91, 1980.
2. Leung TW and Johnson PJ. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 28:514-520, 2001.
3. Leung TW, Patt YZ, Lau WY. Complete pathological remission is possible with systemic combinaton chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 5:1676-1681, 1999.
4. Li C, Qian J, Lin JS. Purification and characterization of alpha-L-fucosidase from human primary hepatocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 12:3770-3775, 2006.
5. Lin CC, Ng LT, Hsu FF, Shieh DE, Chiang LC. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukemia cell growth. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:65-69, 2004.
6. Nu-Man Tsai, Shinn-Zong Lin, Chau-Chin Lee, Shee-Ping Chen, Hsuan-Chi Su, Wen-Liang Chang, Horng-Jyh Harn. The anti-tumor

- effects of *Angelicae Sinensis* on malignancy brain tumors in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research* 11:3475-3484, 2005.
7. Peng S, Qian AR, Yang TH, et al. Experimental study of anti-tumor effects of polysaccharides from *Angelica sinensis*. *World J Gastroenterol* 9:1963-1967, 2003.
 8. Porta C, Hadj-Slimane R, Nejmeddine M, et al. Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively. *Oncogene*
 9. Ye YN, Liu ES., Shin VY, et al. A mechanistic study of proliferation induced by *Angelica sinensis* in a normal gastric epithelial cell line. *Biochem Pharmacol* 61:1439-1148, 2001.
 10. Ye YN, So HL., Liu ES, Shin VY, Cho CH. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. *Life Sci* 72:925-932, 2003.
 11. 行政院衛生署中醫藥委員會：肝病研究成果報告彙編第一冊 (71-75 年度) 2000 年 5 月
 12. 行政院衛生署中醫藥委員會：肝病研究成果報告彙編第二冊 (80-88 年度) 2000 年 5 月
 13. 行政院衛生署中醫藥委員會：急慢性肝炎 2000 年 12 月
 14. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣常用藥用植物圖鑑 (一) 2002 年 9 月
 15. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣原住民藥用植物彙編 (三版) 2002 年 11 月
 16. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣中草藥整合與前瞻 2003 年 12 月
 17. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣中草藥臨床試驗環境與試驗法規 (93 年版) 2004 年 8 月

柒、圖表

Fig. 1 (A)

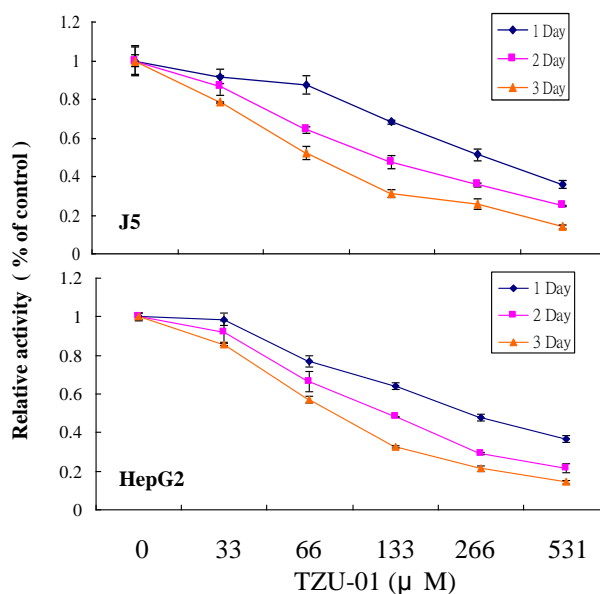
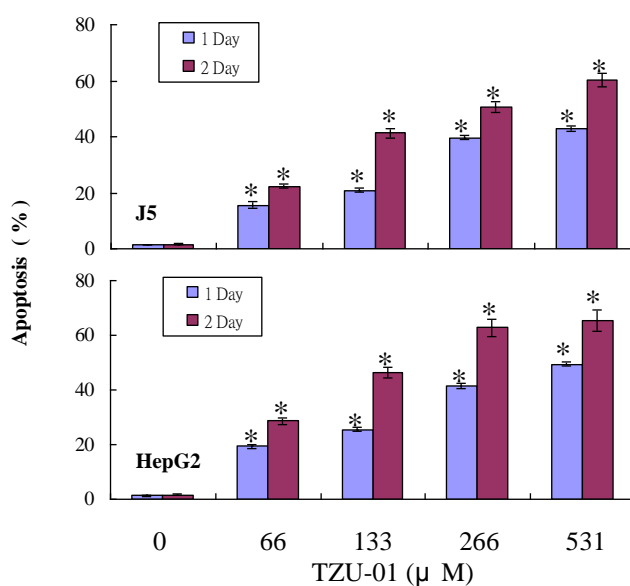


Fig. 1 (B)



圖一 TZU-01抑制肝癌細胞生長並造成細胞凋亡。人類肝癌細胞株 HepG2及J5以33-531 μ M TZU-01處理24、48及72小時，以MTT分析細胞存活率(A)，及PI/Annexin V分析細胞凋亡情形(B)。* $P < 0.05$ 。

Fig. 2 (A)

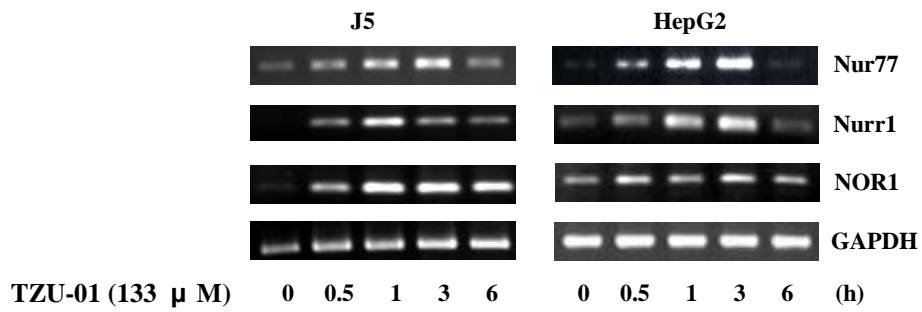
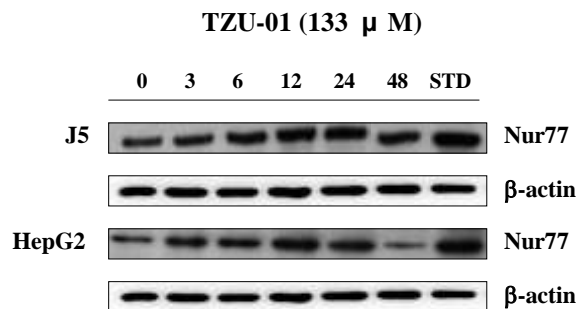


Fig. 2 (B)



圖二 利用RT-PCR技術分析法評估Nurr1、NOR-1 及 Nur77 mRNA表現情形人類肝癌細胞株HepG2及J5以133 μM TZU-01處理3、6、12、24及48小時，以RT-PCR (A)及西方墨漬法 (B) 分析Nurr77表現情形。以CD437處理細胞的表現量做為正向控制組。

Fig. 3 (A)

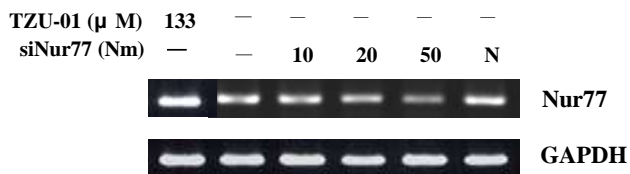


Fig. 3 (B)

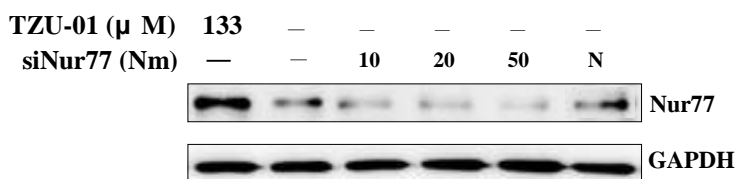
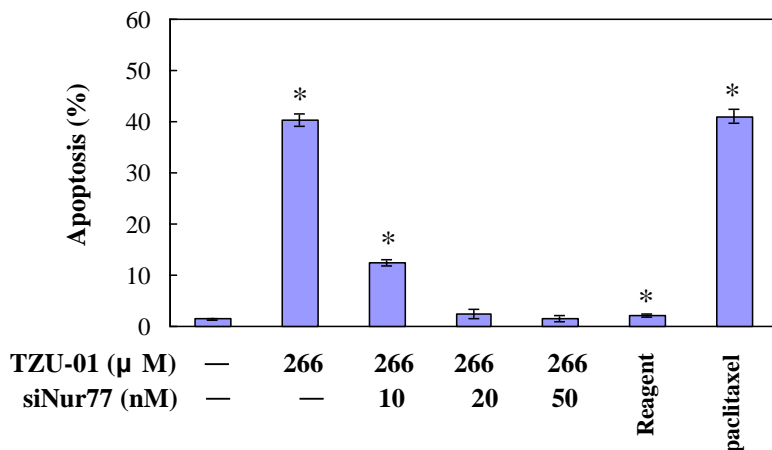
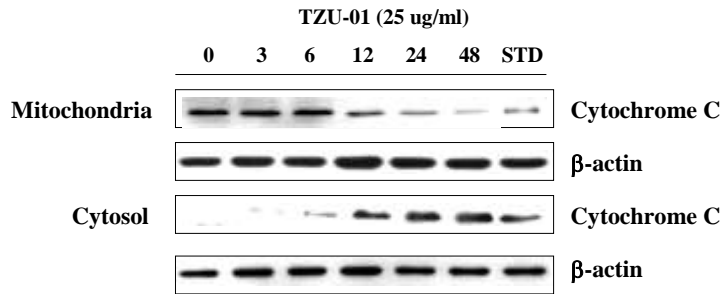


Fig. 3 (C)



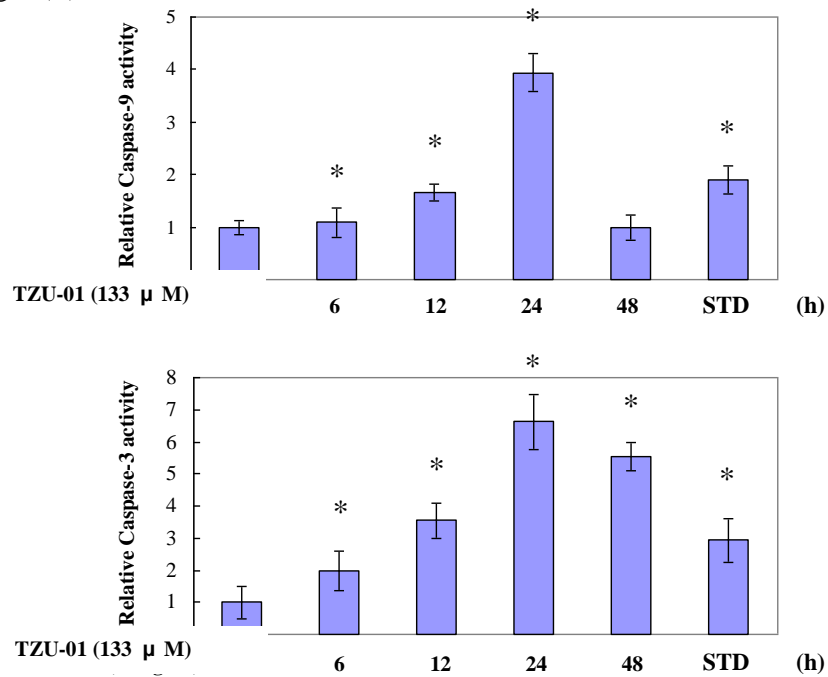
圖三 TZU-01透過Nur77造成肝癌細胞J5凋亡。肝癌細胞J5傳入Nur77的siRNA (10-50 nM)，經過48小時後以RT-PCR (A)及西方墨漬法 (B) 分析Nur77表現情形。(C)PI/Annexin V分析細胞凋亡情形。* P < 0.05。

Fig. 4 (A)

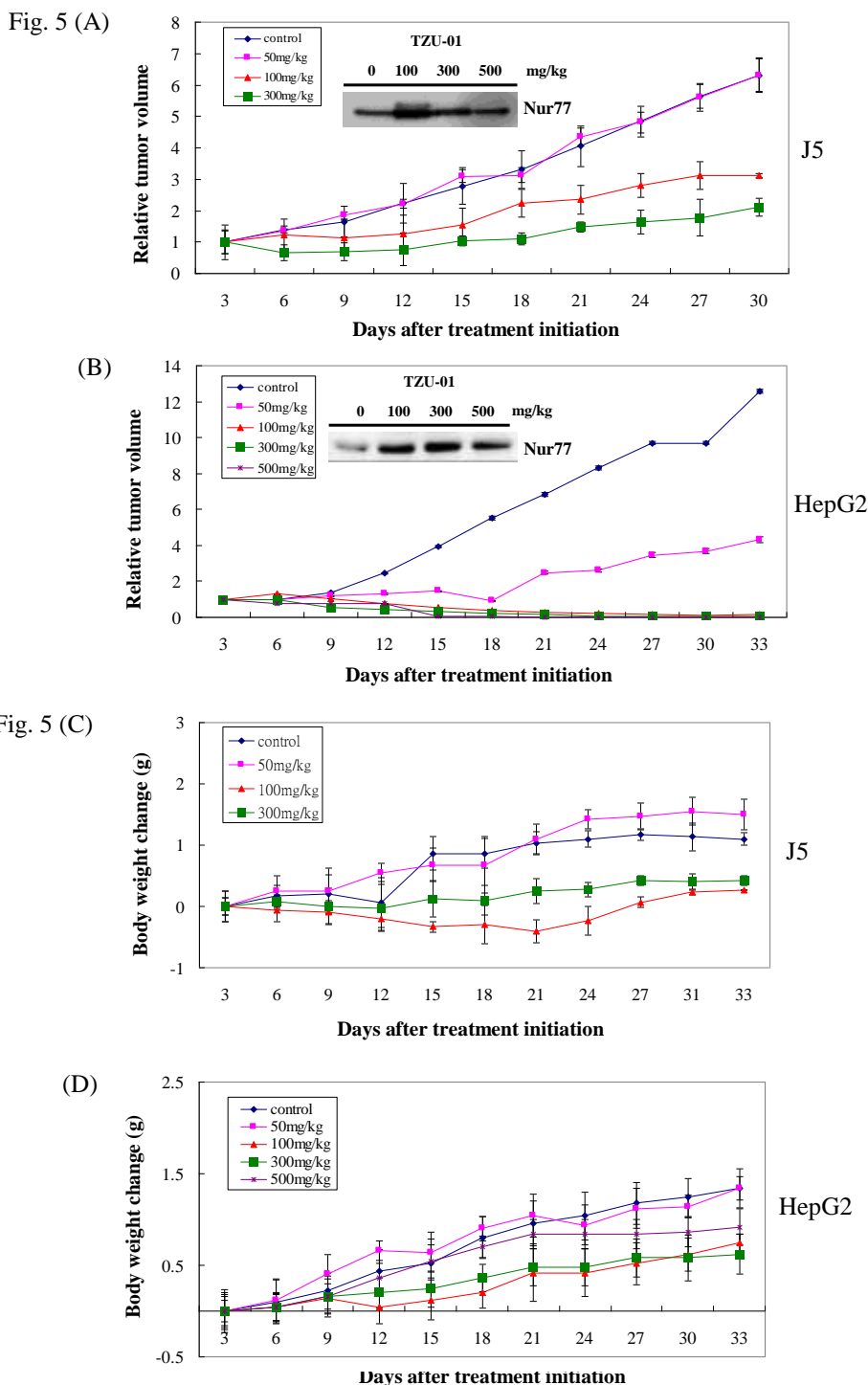


TZU-01 (133 μ M)

Fig. 4 (B)



圖四 TZU-01 造成粒線體細胞色素c的釋出引發 caspase-9 及 caspase-3活化。(A) 肝癌細胞J5以133 μ M TZU-01處理3、6、12、24及48小時，分離細胞質及粒線體的蛋白後，以西方墨漬法分析細胞色素c。(B) 肝癌細胞J5以133 μ M TZU-01處理3、6、12、24及48小時，分析caspase-9 及 caspase-3活性。
* P < 0.05。



圖五 TZU-01 於人類肝腫瘤化學治療之動物模式。將以處理好之肝癌細胞 HepG2 (2×10^6 /隻)及 J5(5×10^6 /隻)分別種植於裸鼠皮下，待腫瘤體積長至 100-250 mm^3 時，分別以 TZU-01 (0、100、300、500 mg/kg)連續治療 5 次，隨後觀察腫瘤生長情形。(A) 裸鼠皮下腫瘤生長紀錄及利用西方墨漬法分析腫瘤 Nur77 表現。(B) 裸鼠體重紀錄。