

計畫編號：CCMP88-RD-026

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

## 龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

委託研究報告

計畫委託機關：國立臺灣大學

計畫主持人：黃慧貞

研究人員：李德源 鄭振鴻

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

計畫編號：CCMP88-RD-026

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：PG88BO-0034

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

## 龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

委託研究報告

計畫委託機關：國立臺灣大學

計畫主持人：黃慧貞

研究人員：李德源 鄭振鴻

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

附件 1

編號：CCMP88-RD-026

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度  
委託研究計畫成果報告

龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

執行機構：台大醫學院藥理學科

計畫主持人：黃慧貞教授

研究人員：李源德教授 鄭振鴻主任

執行期限：87年7月1日至88年6月30日

## 目錄

目次	頁碼
封面	1
目錄	2
摘要	3-7
中文摘要	3-4
英文摘要	5-7
本文	
前言	8-9
材料與方法	10-16
結果	17-22
討論	23-27
結論與建議	28
參考文獻	29-33
圖表	34-49
自我評估表	40
圖次	
圖一	41
圖二	42
圖三	43
圖四	44
圖五	45
圖六	46-47
圖七	48
圖八	49

附件 2

編號：CCMP88-RD-026

## 龍膽瀉肝湯免疫機轉研究

黃慧貞教授

台大醫學院藥理學科

### 摘要

本研究探討龍膽瀉肝湯及其中活性成分對於 CEM lymphocytes 淋巴細胞之增生及 cytokine 處理 HepG2 cells 肝臟細胞毒性具有保護作用。在我們的初步結果中，龍膽瀉肝湯複方及其中活性成分 baicalein, saikosaponin, alisol 能抑制 CEM lymphocytes 淋巴細胞之增生。龍膽瀉肝湯複方及其中活性成分 gentiopicoside, baicalein, geniposide, alisol, saikosaponin 能保護 cytokine 處理 HepG2 cells 肝臟細胞毒性。Saikosaponin 抑制 CEM lymphocytes 淋巴細胞增生的作用機轉更進一步研究是否與基因表現相關。

關鍵詞：龍膽瀉肝湯，saikosaponin，CEM lymphocytes 淋巴細胞，*c-myc*, *p53*, *bcl-2* mRNA.

Saikosaponin-d 是中藥材柴胡中一種 triterpene saponin，本研究對其能在人類 CEM lymphocytes 引起細胞死亡抑制增生之作用機轉進一步探討並與 dexamethasone 之作用機轉比較。DNA 合成以 tritiated thymidine uptake 來測定。Saikosaponin-d ( $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  M) 能劑量相依性的抑制血清刺激引起的 [ $^3$ H]thymidine 攝入量。Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M) 也能抑制血清刺激引起的 [ $^3$ H]thymidine 攝入量。以 trypan blue dye exclusion 方法測定細胞活性，不受  $10^{-6}$  M saikosaponin-d 影響。但在較高濃度 saikosaponin-d ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M)，活細胞數有意義的被降至比基礎值低。Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M, 48 h) 處理也能有意義的降低活細胞數至比基礎值低。以 flow cytometry 分析 propidium iodide 染色細胞，saikosaponin-d ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M) 處理後在凋亡區之細

胞數增加 Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M, 48 h)也能有意義的增加凋亡細胞比例。活細胞以 propidium iodide 及 annexin V 染色顯示 saikosaponin-d ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M)引起細胞凋亡 apoptosis 及壞死 necrosis。Saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-4}$  M, 48 h) 引起細胞凋亡的作用也以 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis 法及 DNA laddering 法來顯示。Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M, 48 h)也有類似結果。Saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-5}$  M)減少 DNA 合成不受 Z-VAD-FMK 影響，Z-VAD-FMK 是一種 fluoromethylketone 為 caspases 抑制劑。顯示 saikosaponin-d 引起之細胞凋亡並不經過 caspases 活性。以 reverse transcription-polymerase chain reaction 分析 *c-myc* 及 *p53* mRNA 之量能有意義的被 saikosaponin-d ( $10^{-5}$  M)增加，而 *bcl-2* mRNA 能有意義的被減少。Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M)不能有意義的改變 *c-myc*, *p53*, 及 *bcl-2* mRNA 之量。Saikosaponin-d 引起細胞凋亡的作用可能部分經由增加 *c-myc* 及 *p53* mRNA 量，減少 *bcl-2* mRNA 量。

## Study on the immunological mechanisms of therapeutic effect of Long-dan-tan

Huei-Chen Huang

Department of Pharmacology, College of Medicine, National Taiwan University

### ABSTRACT

The protective effect of crude Long-Dan Tan and its active components against the proliferation of CEM lymphocytes and the cell effect of cytokine-treated HepG2 cells were investigated in this study. In our preliminary results, crude Long-Dan Tan and its components, baicalein, saikosaponin, and alisol, inhibited the proliferation of CEM lymphocytes. Crude Long-Dan Tan and its components, gentiopicroside, baicalein, geniposide, alisol, and saikosaponin, protected against the cell effect of cytokine-treated HepG2 cells. The action mechanism of saikosaponin on the proliferation of CEM lymphocytes was first further investigated on the possible related genes expression.

Keywords : Long-Dan Tan, saikosaponin, CEM lymphocytes, *c-myc*, *p53*, *bcl-2* mRNA.

The possible mechanisms involved in the effect of saikosaponin-d, a triterpene saponin from *Bupleurum falcatum L.*, on cell death were studied in human CEM lymphocytes and compared with those of dexamethasone. DNA synthesis was determined by tritiated thymidine uptake. Saikosaponin-d ( $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  M)

inhibited the serum-stimulated [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation in a concentration-dependent manner. Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M) also inhibited serum-stimulated [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation. Cell viability, determined by the trypan blue dye exclusion, was unaffected by  $10^{-6}$  M saikosaponin-d. However, at higher saikosaponin-d concentrations ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M), the number of viable cells was significantly reduced to lower than the basal value. Dexamethasone treatment ( $3 \times 10^{-7}$  M, 48 h) also significantly reduced the number of viable cells. Following saikosaponin-d ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M) treatment, flow cytometry analysis of propidium iodide-stained cells showed a significant increase in the percentage of cells in the apoptotic region. Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M, 48 h) also significantly increased the percentage of apoptotic cells. The supravital exposure to propidium iodide and annexin V labeling demonstrated that saikosaponin-d ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M) induced apoptosis and also necrosis. The apoptotic effect of saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-4}$  M, 48 h) was also demonstrated by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis and DNA laddering. Similar results were seen with dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M, 48 h). The DNA synthesis reduced by saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) was unaffected by treating cells with Z-VAD-FMK, a cell-permeable fluoromethylketone inhibitor of caspases, indicating that saikosaponin-d-induced apoptosis is not mediated by caspase activity. Levels of *c-myc*, *p53*, and *bcl-2* mRNA were analyzed by the reverse transcription-polymerase chain reaction. Levels of *c-myc* and *p53* mRNA were significantly



increased and the level of *bcl-2* mRNA significantly decreased by saikosaponin-d ( $10^{-5}$  M) treatment. Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M) did not significantly change *c-myc*, *p53*, and *bcl-2* mRNA level. It is suggested that the apoptotic effect of saikosaponin-d may be partly mediated via an increase in *c-myc* and *p53* mRNA levels and a decrease in *bcl-2* mRNA level.

## 附件 4

### 壹、前言

Saikosaponin-d 是從三島柴胡(*Bupleurum falcatum* L)中所萃取出的一種植物皂素，Saikosaponin-d 具有許多藥理活性，除了抗發炎外，有報告指出 Saikosaponin-d 也具有降血脂、減輕肝傷害、慢性肝炎(Ohuchi *et al.*, 1985)的作用，並且是中藥小柴胡湯(日本名: sho-saiko-to)的主成份之一，Yamamoto 等人 (1975) 有報告指出 saikosaponin-a 和 saikosaponin-d, 但不是 saikosaponin-c, 具有抗發炎和降血脂的作用。Saikosaponin-d 也被報導具有細胞種類依賴性(cell type-dependent)的免疫調控作用(Kato *et al.*, 1995)。最近，我們發現 saikosaponin-d 會抑制 CEM 淋巴球細胞和血管平滑肌細胞 DNA 的合成並引發細胞凋亡。有報告指出人蔘皂素(ginseng saponin)之一的 ginsenoside Rh2, 在人類肝癌細胞也會引發細胞凋亡(Park *et al.*, 1997)。細胞凋亡(Apoptosis)，也就是程序性的細胞死亡(programmed cell death)，在正常發育過程或是不同組織的病理狀態都扮演著重要的角色，細胞凋亡的結果會使細胞核內的核染色質濃染(nuclear condensation), 細胞質收縮(cytoplasmic shrinkage),和造成 DNA 斷片 (DNA fragmentation) (Jacobson *et al.*, 1997; Nagata, 1997)。細胞凋亡是由細胞所接受到的死亡和生存訊息間的平衡所調控(Musci *et al.*, 1997)。近幾年來，細胞週期的調控和細胞凋亡引起大家的重視並可能藉此過程來減少過度增生的細胞。在組織細胞層次的免疫防禦(immune defense) 和發炎過程中包含了一些增生的

反應，因此 saikosaponin-d 可能可以作為發展新的免疫抑制劑 (immunosuppressive) 及抗發炎劑 (anti-inflammatory agents) 的一種模板，動脈硬化和血管成型術後再增生的病理狀態都包括不正常的血管平滑肌細胞、發炎細胞、胞外間質蛋白的過度增生堆積 (Ross, 1993; Lundergan *et al.*, 1991)。Saikosaponin-d 不僅在淋巴細胞也會在血管平滑肌細胞引發細胞凋亡的作用，或許可用來研究或治療和動脈硬化或血管再增生相關的病理變化。本研究是利用人類 CEM 淋巴球細胞 (CEM cells) 來探討 saikosaponin-d 引發淋巴球細胞凋亡的可能作用機轉。由細胞膜至細胞核的訊息傳遞包含許多不同的路徑，我們先前證明 curcumin 的細胞凋亡作用是藉由抑制 *c-myc* 和 *bcl-2* mRNA 的表現而來 (Chen & Huang, 1998)，因此我們也有興趣研究 saikosaponin-d 對於基因表現的影響，一些 proto-oncogenes 如 *bcl-2* 和 *c-myc*，或 tumor suppressor gene 如 *p53*，都曾被報導具有調控細胞增生或細胞凋亡的作用 (Hale *et al.*, 1996)。在本研究中，將探討 saikosaponin-d 引起 CEM 細胞凋亡的分子作用機轉中是否有基因表現的參與，因為這些化合物都具有類似類固醇 (steroid-like) 的結構，所以它們可能具有部份類固醇相關 (steroid-related) 的藥理活性，因為 Glucocorticoid 是一般熟知的可導致 T-淋巴球細胞凋亡的藥物 (Brunetti *et al.*, 1995)，所以本實驗將比較 asaikosaponin-d 與 dexamethasone 引發細胞凋亡的作用及機制。

## 貳、材料與方法

### DNA 合成的測定

DNA的合成以 $[^3\text{H}]$ thymidine 攝入量來測定(Huang *et al.*, 1992; Watabe *et al.*, 1984). 人類 CEM 淋巴球細胞 (CEM cells; human lymphoblastoid leukemia cells)置於25cm<sup>2</sup> 培養瓶中，加入含有10 % v/v 胎牛血清(foetal calf serum ; FCS)的RPMI培養液(內含100 u/ml penicillin及1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin)培養細胞。CEM細胞先以0.5 % v/v FCS/RPMI靜止生長48小時(每24小時換一次培養液)。再以 $3 \times 10^3$  cells/well的密度種在96-well培養盤。隨後以5 % v/v FCS/RPMI刺激細胞生長48小時，實驗組加入saikosaponin-d或dexamethasone 對照組則加入等體積的PBS代之。細胞在harvested前24小時加入 $[^3\text{H}]$ thymidine (1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ) 並以閃爍計數器測定細胞之 $[^3\text{H}]$ thymidine 攝入量，代表細胞DNA合成的多寡。實驗結果以c.p.m表示。並計算每次實驗結果的% of control及50 % maximal inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) 。每個實驗皆重覆操作五到六次。

細胞存活力(Cell viability)以trypan blue dye exclusion method測定。細胞以藥物處理48小時後，以PBS再懸浮(resuspension)並以0.1% w/v trypan blue in saline染色。再利用計數器(hemocytometer)以顯微鏡觀察並計算出存活細胞數目。

## 流式細胞儀分析(Flow cytometric analysis)

細胞先以 0.5 % FCS/RPMI 靜止生長48小時將大部分細胞停留在G<sub>0</sub>期，再以5 % FCS/RPMI刺激細胞生長進行細胞週期。然後以流式細胞儀分析不同時間細胞的細胞週期分佈 (Chen & Huang, 1998; Sherwood & Schimke, 1995). 以藥物處理後，將CEM 細胞( $5 \times 10^6$  cells/sample)離心收集，以PBS (pH 7.4)沖洗二次，再以冰的70 % v/v ethanol再懸浮(resuspension)後放置於-20°C，隔夜。CEM細胞在室溫下加入0.4 ml phosphate-citric acid buffer (pH 7.8) 包括 $5 \times 10^{-2}$  M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $2.5 \times 10^{-2}$  M citric acid and 0.1 % Triton X-100, 5 分鐘後，以1.5 ml propidium iodide staining buffer (0.1 % Triton X-100,  $1 \times 10^{-8}$  M PIPES,  $1 \times 10^{-1}$  M NaCl,  $2 \times 10^{-3}$  M MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/ml RNase A, 50 µg/ml propidium iodide (PI))染色,須避光。超過30分鐘後細胞先以nylon mesh filter過濾後以FACScan和Cellquest program(Becton Dickinson)分析。每個實驗皆重複操作五到六次。

凋亡的細胞另外也以propidium iodide 和 Annexin V 染色(Zamai *et al.* (1996) ; Boersma *et al.* (1996)). 細胞在37 °C下進行雙染色(double labelling) 如下: 細胞培養液加入propidium iodide (50 µg/ml)和 Annexin V (2 µg/ml)兩小時。染色完後馬上以FACScan分析。Annexin V 是一種會和phosphatidylserine結合的蛋白質,而phosphatidylserine在細胞凋亡時會暴露

在細胞表面，正常細胞不會有此現象，在健康的細胞中，phosphatidylserine groups是排列在細胞膜的內側，當細胞凋亡時，會失去這種排列對稱性，而使得phosphatidylserine暴露在細胞外側。Annexin V 染色因此被用來當作一種細胞凋亡的生化標記(biochemical marker)。細胞膜完整性和功能的部份喪失有助於分辨細胞是處於凋亡(apoptotic)、壞死(necrotic)還是存活(living)狀態。

*The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay for apoptosis*

將修飾過的核酸嵌入細胞 DNA 的 3'-OH 端的方法是參閱 Gavrieli 等人的報告(Chen & Huang, 1998; Gavrieli *et al.* 1992)。以藥物處理細胞後，將 CEM 細胞離心收集，利用 cytospin 將細胞固定在玻片後再以冰冷的 95 % v/v ethanol 固定細胞，將玻片以 blocking solution(0.3 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol) 處理 30 分鐘來抑制內生性 peroxidase 的作用。DNA 斷裂處是以 in situ cell death detection kit 來測定(Boehringer Mannheim)，然後將玻片以 TUNEL reaction mixture containing enzyme solution (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT)和 label solution (modified nucleotide mixture in reaction buffer)在 37°C 下處理一小時。以 PBS 沖洗終止反應後加入 Converter-POD (Anti-fluorescein antibody conjugated with horse-radish peroxidase, POD) ，30 分鐘，以 3,3'-diaminobenzidine 染色 10 min 再以 5 % w/v methyl green in 0.1

M sodium acetate solution (pH 4.0)做 counterstaining 最後利用光學顯微鏡觀察、照相。Negative control 則是步驟相同，但在以 TUNEL reaction mixture 處理的過程中只加入 label solution 而未加入 enzyme solution。Positive control 則是在做 TUNEL 之前，在室溫下先以 DNase I (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 40 mM Tris-HCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.5)處理 10 分鐘(Chen & Huang, 1998)。

### *DNA laddering*

CEM細胞先以0.5 % v/v FCS/RPMI靜止生長48小時(每24小時換一次培養液)後，再以5 % v/v FCS/RPMI刺激細胞生長，實驗組加入saikosaponin-d或 dexamethasone對照組則加入等體積的PBS代之。48小時之後將CEM細胞 ( $10^7$  cells/sample)離心收集，以PBS沖洗，以 cell lysis buffer(內含Tris, EDTA 和 sodium dodecyl sulphate)，將細胞溶解後加入RNase A (0.6 u/ml)，在37°C 水浴30分鐘，加入Protein precipitation solution (ammonium acetate)使蛋白質沈澱而不致於污染DNA，離心(2,000g )10分鐘。取上清液加入100 % isopropanol 使DNA沈澱出來，離心(2,000g )10分鐘。DNA再以70 % v/v ethanol沖洗後溶解於DNA hydration buffer (內含Tris 和 EDTA)。DNA的濃度可利用分光光度計(spectrophotometry)測260nm波長之吸光度即可得知。取20  $\mu\text{g}$  的DNA將其loading在1 % w/v agarose gel(含0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide)。維持在20V的電壓跑電泳。經14小時後將gel置於UV transluminator

上，在254nm波長照射下，以Polaroid type 667底片感光而得結果。再以image analyzer分析。

逆轉錄-聚合酵素連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR)測定 *c-myc*, *p53* 和 *bcl-2 mRNA* 的量

*c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2 mRNA*的表現是利用逆轉錄-聚合酵素連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR) 的方法來測定(Huang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1989)。CEM細胞先以0.5 % v/v FCS/RPMI靜止生長48小時(每24小時換一次培養液)後，再以5 % v/v FCS/RPMI刺激細胞生長，實驗組加入saikosaponin-d或dexamethasone對照組則加入等體積的PBS代之。12小時之後將CEM細胞離心收集，細胞RNA是利用acid guanidinium thiocyanate 萃取(Chomczynski & Sacchi, 1987)，取1  $\mu$ g total RNA至microtube，加入2  $\mu$ g oligo (dT) primer 在65 °C下加熱10分鐘，以破壞RNA的二級結構(secondary structure)並將oligo (dT) primer結合至mRNA上。再加入RT buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM spermidine), 1.25 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 4 mM sodium pyrophosphate, 10 units of RNase inhibitor, and 5 units of AMV (avian myeloblastosis virus) 至最後體積為20  $\mu$ l。經42 °C，1小時處理再加熱至95 °C，5分鐘後，立即冰浴，即合成cDNA。取0.5 到 5  $\mu$ l first strand



complementary DNA(cDNA) 加入 10×PCR buffer (500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、100mM Tris-HCL、0.1% gelatin)、0.25mM dNTP、2.5 unit *Taq* DNA polymerase (HT Biotech)及待測之GAPDH、*c-myc*、*p53* 和 *bcl-2*之5'、3'-*primer*各0.4μM至最後體積為50μl。再將microtubes置於Perkin-Elmer thermal cycler (GeneAmp PCR System 9600)進行cDNA之基因放大，其cycle進行之條件如下：denaturation :94 °C，45秒；annealing : 60 °C，45秒；DNA extension : 72 °C，2分鐘，如此進行30個循環。最後在72°C，7分鐘處理後，即得放大之DNA產物。取10-30 μl放大之PCR產物，將其loading在1.5%agarose gel (含 $5 \times 10^{-7}$  g/ml ethidium bromide)，維持在95V的電壓，經兩小時後，如預期可以看到 *c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* band 位在 479、371、235 bp 的位置。將gel置於UV transluminator上，在254nm波長照射下，以Polaroid type 667 底片感光後，再利用影像分析儀(image analyzer)分析相對灰度(gray level)而將結果數據化，並以GAPDH作為internal standard。每個實驗的negative control步驟相同，但未加入reverse transcriptase。最後結果再以Northern blotting (Sambrook *et al.*, 1989)加以確認。在起初實驗中，我們取不同量的RT反應產物，進行PCR反應並分析代測的PCR產物，發現在0.5 到 5 μl的cDNA產物會和其所進行PCR得到的產物成一比例關係，所以之後的實驗，我們都在這線性範圍內取代測mRNA的量，來確定RT-PCR產物的量能真實反應出原始sample中代測mRNA的量。

## 材料

Saikosaponin-d (Figure 1)購自Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Human CEM lymphocytes (CEM cells; human lymphoblastoid leukemia cells)購自 American Type Culture Collection (Rockville, MD). Foetal calf serum, penicillin, streptomycin, 和 RPMI 1640 培養液購自Gibco Lab. (Grand Island, NY). Thymidine [methyl-<sup>3</sup>H] (5 Ci/mmol) 購自 Amersham Co. (Buckinghamshire, UK). Dexamethasone (water-soluble) 和 3,3'-diaminobenzidine 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). In situ cell death detection kit, converter-POD (anti-fluorescein antibody, Fab fragment from sheep, conjugated with horseradish peroxidase), 和 Annexin-V-FLUOS (fluorescence-conjugated anticoagulant)購自 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN). DNA isolation kit 購自Gentra systems, Inc. (Research Triangle Park, NC). AMV (avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase 和 Taq DNA polymerase 購自HT Biotech. Ltd. (Cambridge, UK). *Bcl-2* 的 primer (235 bp) 購自Maxim Biotech, Inc. (So. San Francisco, CA). *C-myc* (479 bp), *p53* (371 bp), 和 *GAPDH* (452 bp) 購自Clontech Lab., Inc. (Palo Alto, CA). Z-VAD-FMK, caspase inhibitor,購自Calbiochem (San Diego, CA).

統計方法:實驗數據以平均值±標準誤差(mean ±s.e. mean)表示 *P* values 小於0.05 則被認為是具有統計上的意義 (Student's *t*-test)。

## 結果

### 對細胞DNA合成的影響

本實驗是利用細胞在合成DNA時攝取 [ $^3\text{H}$ ]-thymidine量來判斷是否有抑制DNA合成的作用。以5%FCS/RPMI刺激CEM細胞( $3 \times 10^3$  cells/well)，經48小時之後測得 [ $^3\text{H}$ ]-thymidine的攝入量。對照組為 $9,205 \pm 945$  c.p.m./well。以saikosaponin-d ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M)處理CEM細胞會發現saikosaponin-d對CEM細胞DNA合成的抑制作用是呈濃度相依性(concentration-dependent manner) (n=5) (圖二)。Saikosaponin-d 的 $\text{IC}_{50}$ 值是 $3.1 \pm 0.4 \times 10^{-6}$  M，而saikosaponin-d濃度為 $10^{-5}$  M時即可達到 $100.0 \pm 0.0$  %的最大抑制效果(n=5)。在此實驗中dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M)對 In this study, dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M) [ $^3\text{H}$ ]-thymidine攝入量的抑制則可達到 $93.0 \pm 3.3$  % (圖二) (n=5)。

### 對細胞存活力(Cell viability)的影響

細胞存活力是以trypan blue dye exclusion方法來測定，加入 $10^{-6}$  M saikosaponin-d並不會影響CEM細胞存活力(n=5) (圖三)，而且存活的細胞數大於基準值( $2 \times 10^5$  cells)。當加入 $10^{-5}$  到  $10^{-4}$  M的saikosaponin-d時，則可有意義地降低細胞存活率(n=5)。在此實驗中，dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M)也可有意義的降低細胞存活率(n=5)。

## 對細胞凋亡的影響

以saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-4}$  M) 處理CEM細胞24小時和48小時會引起細胞凋亡，可觀察到部份細胞縮小，核染色質濃染和突起(blebbed)的apoptotic bodies。部份存活細胞的形態也有一定程度的改變，這些細胞凋亡的現象分別以flow cytometry, TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 和 DNA laddering來分析。

以Flow cytometry分析CEM細胞凋亡的現象：

以藥物引起CEM細胞凋亡所佔的百分比進一步以flow cytometry (圖四)分析。細胞先以 0.5 % FCS/RPMI 靜止生長48小時將大部分細胞停留在 $G_0$ 期，再以5 % FCS/RPMI刺激細胞生長進行細胞週期。在不同時間收集細胞再以 propidium iodide 染色後以flow cytometry分析。Figure 4 顯示saikosaponin-d會以時間及濃度相依性的作用引起細胞凋亡。以 $3 \times 10^{-6}$  M saikosaponin-d 處理48小時後會造成凋亡細胞的區域(Ap, sub- $G_0/G_1$  peak, subdiploid peak)有意義的增加至 $5.1 \pm 0.6$  % (圖四) (n=3)。在 $10^{-5}$  M (48小時), saikosaponin-d 引起細胞凋亡的百分比增加至 $22.2 \pm 1.9$  %。在本實驗中，

$3 \times 10^{-7}$  M 的 dexamethasone (48小時) 引起細胞凋亡的百分比也會有意義增加至  $11.5 \pm 0.8\%$  (圖四) ( $n=6$ )。

在 A7r5 細胞, saikosaponin-d ( $10^{-5}$  M, 48 小時) 會有意義地增加凋亡細胞百分比至  $41.0 \pm 1.1\%$  ( $n=3$ )。

我們利用 propidium iodide (PI) 和 Annexin V 雙染色來測定細胞凋亡的現象, Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> (右上象限) 或 Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> (右下象限) 通常都可觀察到 (圖五), 以  $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-5}$  M 的 saikosaponin-d 處理過的細胞主要是 Annexin V<sup>+</sup> 並呈現兩種不同染色程度: Annexin V<sup>+</sup> 的細胞但仍然 PI<sup>-</sup>, 和早期的凋亡細胞有關, 另一則是 Annexin V<sup>++</sup> 的細胞但也 PI<sup>+</sup>, 和進一步的凋亡細胞和壞死細胞有關。我們的結果顯示 saikosaponin-d 在  $10^{-5}$  to  $10^{-4}$  M 的濃度下不僅會引起細胞凋亡也會有細胞壞死的現象。

#### *Terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL assay)*

以 TUNEL 方法染細胞核包括產生裂痕的 DNA (早期細胞凋亡的特徵) (圖六)。未處理或以  $10^{-6}$  M saikosaponin-d 處理的細胞沒有細胞凋亡的現象 (圖六d和六a)。這些細胞 (TUNEL-negative, green-colored) 的細胞核並未藉由 TUNEL 染色, 並以 methyl green 做 counterstaining 染成綠色。但在 48 小時的

saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-4}$  M)處理下，可以看到大部分核內呈棕色的細胞 TUNEL-positive (brown) (n=3) (圖六b和六c 分別表示  $10^{-5}$  和  $10^{-4}$  M, respectively)。TUNEL-positive的細胞也可在  $3 \times 10^{-7}$  M dexamethasone 處理後看到(n=3)(圖六e)。

### *DNA laddering*

DNA 退化(degadation)成特殊的斷片是細胞凋亡的特徵之一，和壞死細胞比較，凋亡細胞的genomic DNA被endonuclease以規則的間隔切除後會產生約200bp大小的mono-或oligonucleosomal DNA，也就是所謂的DNA斷片(fragmentation)，可利用電泳觀察到DNA ladder的現象。在以saikosaponin-d或dexamethasone處理CEM細胞48小時後，將細胞的genomic DNA分離出來跑電泳 (n=3)(圖七)，在  $10^{-4}$  M saikosaponin-d組可看到清楚的DNA ladder的現象 (n=3) (圖七, lane 4); 這種現象在  $3 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M saikosaponin-d 或  $3 \times 10^{-7}$  M dexamethasone組較不明顯 (n=3) (圖七, lanes 3 和 5 分別表示  $10^{-5}$  M saikosaponin-d 和  $3 \times 10^{-7}$  M dexamethasone)。而在對照組或  $10^{-6}$  M saikosaponin-d組則看不到DNA斷片的現象(n=3)(圖七, lanes 1 和 2)。

### *caspase inhibitor* 的影響

Saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) 抑制DNA合成(利用 tritiated thymidine uptake 測定)的作用並不會被Z-VAD-FMK ( $10^{-4}$  M, 4小時)所影響, 而Z-VAD-FMK 是一種cell-permeable fluoromethylketone 的caspase抑制劑 ( $27.0 \pm 3.2$  % vs.  $28.0 \pm 5.6$  % for  $3 \times 10^{-6}$  M saikosaponin-d, n=5)。

### 對*c-myc*, *p53*, and *bcl-2* mRNA表現的影響

在以血清刺激生長的CEM細胞中, 利用RT-PCR的方法來測定對照組或實驗組細胞內*c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* mRNA 的表現量(圖八)。這些待測基因和GAPDH的表現強度都以image analyzer量化(quantified)。這些待測基因相對於GAPDH的表現量記錄於Figure 8 (圖八下行)。這三個基因在有血清存在下的CEM細胞中都會表現, 在最初的實驗, 我們由CEM細胞以saikosaponin-d 處理之time course, 可知在12小時*c-myc* 及 *p53* mRNA的表現為最大值。因此在接下來的實驗, 我們都以12小時的時間點來測定待測基因的表現量, 而以saikosaponin-d ( $10^{-5}$  M)處理CEM細胞12小時之後, *c-myc* mRNA的表現會有意義的增加( $3.5 \pm 0.8$  fold increase, n=3) (lane 2), *p53* mRNA 的表現也會有意義的增加( $6.1 \pm 1.1$  fold increase, n=3) (lane 5), 而*bcl-2*

mRNA 則會有意義的減少 ( $0.73 \pm 0.03$  fold inhibition,  $n=3$ ) (lane 8)。以 Dexamethasone ( $3 \times 10^{-7}$  M) 同樣處理CEM細胞12小時之後則會使p53 mRNA 的表現稍微增加，*c-myc* 和 *bcl-2* mRNA的表現稍微減少 (lane 3, 6 和 9) ( $n=3$ ); 但卻都不具統計上的意義。saikosaponin-d 對細胞mRNA的影響都再以Northern blotting進行確認。



## 肆、討論

由這些實驗結果，首度證明saikosaponin-d會抑制人類CEM細胞之DNA合成和引起CEM細胞凋亡，Saikosaponin-d是三島柴胡(*Bupleurum falcatum* L.)中的活性成份之一，而柴胡被廣泛應用在許多中藥處方中，包括小柴胡湯(xiao-chai-hu-tang)等，且有報告指出saikosaponin-d具有hepatoprotective、hypolipidemic 和 anti-allergic的作用(Yen *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1975)。柴胡含有活性triterpene 成份，包括saikosaponin-a, -c, -d 和其相關代謝物。Saikosaponins-a 和-d 被報告具有降低膽固醇(cholesterol-lowering)和抗發炎(anti-inflammatory)的作用 (Yamamoto *et al.*, 1975)。Saikosaponin可降低因餵食高膽固醇動物體內所升高的膽固醇(Yamamoto *et al.*, 1975)。動脈硬化和血管成型術後再增生的病理狀態都包括不正常的血管平滑肌細胞、發炎細胞、胞外間質蛋白的過度增生堆積 (Ross, 1993; Lundergan *et al.*, 1991)。血管平滑肌細胞和單核球細胞的增生反應在動脈硬化和血管成形術後再增生的病理過程中扮演重要角色，我們發現saikosaponin-d會抑制淋巴球和血管平滑肌細胞的DNA合成和引起兩種細胞凋亡，因此saikosaponin-d將有助於應用在研究或治療動脈硬化和再增生的病理狀態，除了引起凋亡，在利用annexin-V 染色的實驗中也發現，saikosaponin-d在高濃度下( $>10^{-5}$  M)也會引起細胞壞死的現象，Saikosaponin-d也被報告具

有細胞種類依賴性的免疫調控作用 (Kato *et al.*, 1995). Saikosaponin-d本身並不具有促進細胞增生的活性，但會減少脾臟細胞(spleen cell)對T細胞mitogen的增生反應，卻增加其對B細胞mitogen的增生反應(Ushio & Abe, 1991)；這些作者也證明saikosaponin-d 可能會刺激活化體內免疫淋巴球細胞的功能，部份藉由活化特定巨噬細胞(macrophage)功能而來(Ushio *et al.*, 1991)。

細胞凋亡(Apoptosis)，是組織形態發育或恆定過程中的一種程序性的細胞死亡(programmed cell death)，細胞凋亡的結果會使細胞核內的核染色質濃染(nuclear condensation),細胞質收縮(cytoplasmic shrinkage),和造成DNA斷片 (DNA fragmentation)。除了抑制DNA的合成，saikosaponin-d ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-4}$  M)也會引起CEM淋巴球細胞凋亡(由流式細胞儀、TUNEL和DNA laddering分析證明)，Saikosaponin-d在高濃度下抑制細胞tritiated thymidine攝取量的作用可能部份經由其細胞凋亡作用而來，有證據顯示，當細胞無法進行凋亡時可能和一些人類疾病如癌症、自體免疫疾病、病毒感染有關，除此之外，有許多疾病其特徵是細胞的不正常減少如神經退化性病變(neurodegenerative disorders)、AIDS、骨質疏鬆等可能導因於加速生理狀態下的細胞死亡過程。因此針對特定細胞種類，加速或減少其細胞凋亡的速度可能可以作為治療許多人類疾病的基本模板(Thompson, 1995)。

Saikosaponin-d的免疫調控作用已被Kato等人證實(Kato *et al.*, 1994), Keto證實saikosaponin-d 會特異的調控T淋巴球的功能, 而且至少有一個作用點是位於或*c-fos* 基因轉譯之前, 並伴隨著T細胞/CD3媒介的protein tyrosine kinase 活化, 我們先前的研究證明, curcumin(一種植物酚類)的細胞凋亡作用部份是經由減少*c-myc* 和 *bcl-2* mRNA表現而來(Chen & Huang, 1998)。一些oncogenes 和 oncosuppressor在細胞週期或是細胞凋亡過程中扮演重要角色, 引起細胞凋亡的訊息有許多, 而相同的訊息在不同環境下可能卻會引起細胞分化或增生, 有些已知在細胞增生和分化中佔重要地位的基因, 對於控制細胞凋亡也是非常重要, 一些這類的基因如: proto-oncogene(*c-myc*), 或是 tumor suppressor gene(*p53*)。然而有些訊息傳遞路徑對於控制細胞的死亡具有特別的意義, 和*bcl-2*相關的基因就屬於這類基因(Hale *et al.*, 1996), 我們利用RT-PCR的方法測定saikosaponin-d對於*c-myc*, *p53*, 和 *bcl-2* mRNA表現量的影響, 在saikosaponin-d ( $10^{-5}$  M) 存在下, *c-myc* 和 *p53* mRNA 的表現有意義的增加, 而*bcl-2* mRNA 的表現卻有意義的減少, 然而dexamethasone對於*p53* and *bcl-2* mRNA表現的影響卻未達有意義的程度, 因此, saikosaponin-d對基因表現的影響可能和其細胞凋亡作用只有某種程度的關連性, 在哺乳類動物, Myc在細胞增生中具有主要調控者的地位並且串連著胞外訊息和細胞週期的機制, 它也會引起細胞凋亡, 除非細胞激素或致癌基因提供的訊息阻擋其凋亡的訊息傳遞路徑, 最