

以大黃素(Emodin) 調控細胞中 DNA 修補酵素活性及其具組織特異性之超微粒製劑在抗肝細胞腫瘤上的應用

Role of emodin in the Regulation of DNA Repair Enzymes in Cells and the Application of Tissue-Specific Nanosphere Preparation in the Therapy for Hepatocellular Carcinoma

郭 國 華 副教授

高雄醫學院生化研究所

摘 要

癌症為臺灣第一大死亡原因，其發生率有逐年增加的趨勢，目前癌症的治療可藉助外科手術與化學療法，但有些癌灶生於較高危險之區域而不易接近或癌灶已經漫延至其它部位，故無法以外科手術切除。採用一般化學療法治療癌症實際上並無法有意義的降低其死亡率，尤其引起全身性的副作用常使患者捨去治療的意願。因此研究降低藥物的副作用，增加藥物對器官之專一性，對改善癌症的治療將有很大的助益。

癌的發生原因已被研究很多，基本上均與細胞基因之突變有關，例如肝癌、肺癌、膀胱癌、乳癌、胰臟癌及其他癌症均可發現細胞染色體 DNA 有變異現象，因此 DNA 變異是造成細胞癌化的直接因素。但是細胞中具有自動修補 DNA 變異的能力，這些 DNA 修補酵素穿梭染色體中能認識變異位置並修補入正確的 DNA 序列，因此具有預防細胞癌化的功能。本計畫所用之大黃素 (Emodin) 已有報告具有抗腫瘤及抗突變的作用，但其機轉尚不清楚。另一方面，藥劑學上之超微粒子 (Nanosphere) 具有組織及器官的特異性，特定大小的含藥粒子能經由血流送至特定的器官，細胞再經由吞噬作用 (Phagocytosis) 將藥物送入細胞中而達到治療的效果。因此本計畫的目的：(1). 製備 Emodin 超微粒製劑並應用於人類肝癌

細胞以評估其應用上的潛力。(2). 探討 Emodin 對人類細胞中 DNA 修補系統的影響及其抗腫瘤機轉。在本計畫的實驗結果，發現 Emodin 對肝癌細胞 (Hep3B) 皮膚纖維母細胞與正常細胞均有毒性 (WI-38)。經製備成 Emodin 超微粒子並以 Coulter counter 測量其粒徑，其中 92% 以上之超微粒子均約為 180 ± 15 nm，顯示粒徑均勻一致，且此粒徑大小已有報告對肝細胞具有特殊的親和力。經熱分析試驗結果，Emodin 與超微粒子之 Polymers 並不會引起交互作用而影響 Emodin 之藥效。將 Emodin 超微粒子溶解後以 HPLC 測定其藥物含量為 $28.5 \mu\text{g/ml}$ 。經實際評估 Emodin 超微粒子製劑與單純 Emodin 對正常細胞與肝癌細胞之細胞毒性結果，Emodin 超微粒子的藥效可達等劑量單純 Emodin 之 300 倍以上，顯示超微粒子確實能有效改善 Emodin 作用細胞的能力，而可在極低劑量下即可有預期的效果。因此 Emodin 超微粒子低劑量的使用同時配合較具器官導向性 (Target specificity) 對降低該藥物所引起的副作用將有幫助。另一方面，Emodin 除了有上述抗腫瘤作用外，亦可顯著提高對 UV-induced DNA damage 之細胞 DNA 修補能力，隨著 Emodin 濃度增加而有逐漸增強的作用。其詳細影響細胞 DNA 修補酵素之作用機轉即將完成。

關鍵詞：大黃素、超微粒子、肝癌細胞、細胞毒性、DNA 修補作用

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a predominant malignancy in Taiwan. Some anticancer drugs inhibit tumor growth by blocking cell cycle. However, the tumor cells are recovered once the anticancer drug is eliminated. Treatment of tumors in patients remains principally by surgery and chemotherapy. Because of lacking target specificity of anticancer drugs, the dosage of drug is usually elevated in order to achieve appropriate concentration in blood stream. This raising dosage of anticancer drug consequently generates severe side effects on normal tissues. By developing target-specific preparation, the side effects induced by cancer therapy may be improved.

The carcinogenesis is wildly investigated in the world. In general, there are all related with the mutations on particular genes. The chromosomal mutations in several cancers, *e.g.*, hepatoma, lung cancer, bladder cancer, breast cancer, pancreatic cancer and other cancers have been identified. These chromosomal mutations may be the important factors that causing cancers. DNA-repair enzymes recognize chromosomal mutation and restore correct sequence. This effect prevents carcinogenesis in cells. The functions of anticancer and anti-mutagenesis of emodin has been reported. On the other hand, the particular size

of drug-coated nanoparticles are enable to be transferred to liver, and the particles are then entered the liver cells by phagocytosis. There are two aims in the proposal: (1). Evaluation and application of emodin-nanoparticle in the therapy of human hepatoma cell (2). Studies of the effect of emodin in the regulation of DNA-repair enzymes and the mechanism of anticancer activity of emodin. The results indicate that emodin possesses cytotoxicities to human hepatoma cell (Hep3B), skin fibroblast and normal lung fibroblast (WI-38). The emodin-nanoparticle was prepared according to previous report. The diameter of the particle (more than 92%) was estimated to be 180 ± 15 nm by Coluter counter, suggesting the consistency of the particles. In addition, the polymer matrix of particle was evidenced no cross-reaction with emodin. The emodin content in the nanoparticle was calculated to be $28.5 \mu\text{g/ml}$ by HPLC. It demonstrated that the potency of emodin-nanoparticle was 300-fold higher than that of equal amount of emodin. This implies that the features of low dose usage and target-specific of emodin-nanoparticle may reduce side effects of emodin in cancer therapy. In addition to the effect of anticancer activity, emodin promotes the capacity of DNA-repair for UV-induced DNA damage with a dose-dependent manner. The real mechanism of the regulation of DNA-repair enzymes is accomplished.

Keywords: Emodin, Nanoparticle, Hepatocellular carcinoma, Cytotoxicity, DNA repair

前言

應用中藥治療癌症應是值得開發的研究，但是中藥在治療癌症上常僅於輔助的角色，其原因與中藥並未被廣泛且實際的科學證據証明其作用機轉有關。目前臨床正應用的 Taxol (美國必治妥公司) 因能結合至 Microtubules 而穩定其結構並終止細胞的有絲分裂 (Mitosis)，故其作用機轉被研究得較詳細，因此在應用上較有理論的根據。本計畫主持人過去主持中藥計畫時即發現藥用植物中含有許多成份能影響人類細胞之多種基因表現，因此如能有計畫的開發，中藥成份在抗癌應用上應可單獨做為主導的地位。因此沿續中國幾千年應用的實際經驗與研究成果，配合中藥成份的純化，再進一步以科學證據證明其詳細作用機轉，對中藥的開發與應用將有很大的助益。

目前癌症的治療除了藉助外科手術與化學藥物外，尚無理想有效之方法。基因療法雖有很大的進展，但目前僅於臨床實驗性階段，同時僅限於特定致癌機轉較明白之部份癌症，因此仍需有一段長時間的研究。癌症是台灣第一大死亡原因，尤其肝癌是國人最主要之癌症，目前對於肝癌尚

無理想有效治療藥物 (1)，採用一般化學療法對肝癌治療並無法實際降低其死亡率。對於如何啟動體內正常細胞形成腫瘤的機轉很多，但腫瘤的發生導因於細胞基因的改變是最主要與直接的原因 (2-4)，因此目前僅以化學藥物毒殺癌細胞同時對正常細胞亦造成傷害，而同時產生嚴重的副作用並不是理想的治療方式。國人罹患 B 型及 C 型慢性活動性肝炎或食物受到 aflatoxin B1 (AFB1) 污染相當嚴重，這些患者得到肝癌或肝硬化之機率約為正長常人的兩百倍以上 (5)。但對於如何導致肝癌之機轉仍不很清楚 (6-8)。但幾乎所有癌症細胞之 DNA 均有染色體變異現象。

正常細胞中有自動修補 DNA 變異系統，含有一些修補特定變異之 DNA glycosylase 酵素，這些酵素穿梭染色體中能認識變異位置而將該點或該段變異處移去，接著並由 DNA polymerase 及 DNA ligase 修補所移去的空缺。因此這些酵素組合在防止 DNA 變異上扮演非常重要的角色。既然癌症產生的主要原因係 DNA 變異產生錯誤的訊息傳遞蛋白質而導至細胞無法受到控制，但細胞中之 DNA 修補酵素為何無法認識變異位置？是否 DNA 修補酵素活性受到抑制？是值得探討的問題。因此如果能夠利用藥物啟動 DNA 修補酵素活性或基因表現使能夠正確的除去變異處，則對細胞癌化將有預防的效果。因位不僅不會影響正常細胞功能，同時對於癌症有預防及治療效果。比起傳統治療方法，僅以藥物毒殺癌細胞同時亦造成正常細胞之傷害更具有意義。

目前西藥中尚無此種作用的藥物，而中藥在中國已沿用並累積幾千年之寶貴經驗，部份中藥雖尚缺科學證據證明，但其療效已確定，同時植物中含有多種成份，部份成份也已被證實具有生物活性。例如本計畫所採用的大黃素 (Emodin) 已有報告具有抗腫瘤及抗突變的作用 (9, 10)，但其詳細之作用機轉並不清楚。另一方面，以化學藥物治療癌症，由於必須達到適當之血中濃度才有預期效果而必須提高所用劑量，但往往能作用癌細胞的藥物對正常細胞亦會傷害，結果癌細胞確實有縮小的現象，但所引起全身性的副作用常使患者失去治療的意願或嚴重威脅其生命。因此應用大量人力與財力盲目開發抗癌藥物而不考慮其作用機轉與副作用，對目前實際癌症患者的問題並未解決。

另一方面，藥劑學上之超微粒子 (Nanosphere) 具有組織及器官的特異性，特定大小的含藥粒子能經由血流送至特定的器官，細胞再經由吞噬作用 (Phagocytosis) 將藥物送入細胞中而達到治療的效果。有鑑於此，本計畫乃設計並製備具器官導向之 Emodin 超微粒子，藉著其高效率的細胞吞噬作用將較低劑量之 Emodin 送入細胞以達到治療效果，同時藉著特定大小之超微粒子對肝細胞之親和力，將可增加器官導向性及有效降低藥物使用劑量而可能減少產生的副作用。同時探討 Emodin 在調節 DNA 修補酵素活性的角色，藉以探討 Emodin 的抗突變機轉並實際提供癌症患者較理想有效的抗癌製劑，對人類健康與癌症預防或有幫助。本計畫完成後，對大

黃素之抗癌應用將有更進一步的認識，同時亦改變傳統治療觀念 (11, 12)，對中藥在癌症研究上提供一預防及治療的新方向。

材 料 與 方 法

實驗材料

本計畫所採用 Emodin 係購至於美國Sigma 公司。

細胞株 (Cell lines)

使用的細胞株為肝腫瘤細胞 (Hep3B)**、Human normal skin fibroblast 及 Normal Lung cell (WI-38) 係由美國 ATCC 公司、新竹食品工業發展研究所購得及高雄醫學院微生物學科獲得，細胞培養於 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 及 Minimum Essential Medium (MEM) 含 10% FBS 及 40 mg Gentamycin 抗生素中。

****補充說明：**HepG2 及 Hep3B 同是人類肝癌細胞株，HepG2係非B型肝炎病毒引起之肝癌，而 Hep3B 係B型肝炎病毒嵌入細胞之肝癌，國人眾多肝癌病人係B型肝炎帶原者，因此選用 Hep3B 細胞較符合國人健康之實際情形。

細胞中 RNA 的萃取

Cellular RNA 的萃取係將細胞收集後，以 TE 或 TBS buffer 洗淨，並以 Lysis 溶液溶解細胞，以 Guanidinium Thiocyanate 方法萃取，並經 5.7 M CsCl/EDTA 以超高速離心 20 小時純化之。RNA 濃度的計算，以測其 260nm 之吸光度為基準，並計算其 260 nm /280 nm 的比值。

Polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles (PIBC -NP)的製備方法

以 isobutylcyanoacrylate 來製備毫微粒子的優點在單體聚合的過程不需加入能量，在陰離子催化劑存在下即可聚合，且控制製備的條件可調整其聚合反應速度，可製備成毫微球。以前用 acrylic derivatives 來製備毫微粒子時需能量來聚合，易阻礙藥品吸附在毫微粒子上 (13)。

Interfacial polymerization : nanocapsules 這種方法主要是用於脂溶性藥 (14)，從單體聚合成高分子。單體在油相和水相的界面逐漸聚合，最後高分子聚合物形成囊狀物，將油及藥物包圍在內，而與水相隔開。emodin 不溶於水，可溶於無水乙醇，適合以此法製備 emodin 毫微粒子。製備方法如下：

油相：absolute ethanol 25 ml
 emodin 25 mg
 Lipiodol 0.5 ml
 isobutylcyanoacrylate 250 μ l
水相：含 0.5% Pluronic F68 之水溶液 50 ml(pH 6)

以磁石不斷攪拌下，將油相一滴滴的滴入水相中，nanocapsules 立即形成，使水溶液變成乳白色，繼續攪拌 3 小時使聚合完全。再以減壓濃縮的方法，將體積減少至 12.5ml，除去乙醇。最後再經 sintered glass funnel(grade 4, poresize 11-16 μ m)，除去過大的顆粒後，即可製得平均粒徑為 200-300 nm 之毫微粒膠囊，直接測其性質或冷凍乾燥待用。

藥品在 PIBC NP 中之含量測定

將含藥品之 PIBC NP 溶於 acetonitrile，再以 HPLC 測藥品的含量，即為總藥品含量。另外取定量之 PIBC NP 以 45000 rpm 離心 1 小時，測上清液藥含量。以總藥品含量減去上清液藥含量即為藥品在 PIBC NP 中之含量。

藥品從 PIBC NP 中之體外釋出

依 USP XXIII 的方法，將載藥之 nanoparticle 懸浮液置入透析袋 (Spectra/por; MW cut-off 50000)，paddle 的轉速為 150 rpm 經時抽出媒液，以 HPLC 測藥之含量。

Emodin 之分析方法

Emodin 的 HPLC 分析條件：

Column: Merck, LiChroCART RP-18 (5 μ m), 4.0 $\times$ 125 mm

Mobile phase: acetonitril : water = 60:40，以 phosphoric acid 調整 pH 值至 2.5，並以 0.45 μ m 過濾膜過濾。

Flow rate: 1.0 ml/min

UV detector: Spectra-Physics UV2000，波長固定於 220 nm

Internal standard: indomethacin

PIBC NP 大小之測定及外觀

平均粒徑大小之測量是利用光子相關光譜法(photon correlation spectroscopy, PCS)。基本上是量測粒子散射光強度的相關函數，所以稱為光子相關光譜法。且因為是量測粒子的動態或稱為動態雷射散射法(dynamic light scattering)。光子相關光譜法為利用雷射光射入含粒子的溶液中，散射的雷射光強度會隨時間呈現起伏變化(fluctuation)，從散射光強度隨時間起伏變化情形可以得到有關粒徑大小的訊息。其原理為粒子在溶液中會進行無規則的布朗運動，粒徑大小不同的粒子在溶液中的擴散速度也不同。當一束光打在樣品上時，同時有許多粒子會在雷射光束照射區，在不同位置的粒子所產生的散射光到達光子偵檢器時，會有光程差，造成干涉(inter-ferece)效應，影響散射光強度。因為這些粒子隨時在動，其相對位置隨在變，所以各粒子散射光的相互干涉也隨時在變，造成散射光強

度會隨時間有起伏變化。粒徑大的粒子運動和擴散緩慢，造成低頻率之擾動，粒徑小的粒子由於運動快速，造成高頻率之擾動。可用相關器(correlator)來分析散射光強度的擾動訊，可得到散射光強度的自身相關函數(self-correlation function)，此相關函數一般呈指數衰減的曲線，衰減的快慢和粒子擴散有關，而擴散係數和粒徑有一定之關係，由此即可定出粒子的粒徑。測量的散射角設在 90° 量測，因為由灰塵、雜質和其它雜訊所造成的效應較小。測量時將毫微粒子懸浮液，以 $0.2\mu\text{m}$ 過濾膜過濾二次之蒸餾水，稀釋至適當濃度，放入石英 cell 中，以超音波振盪 3 min 後置入 Coulter 次微米粒徑分析儀測之。此法適用於毫微米(nm)的粒徑大小的量測，但無法了解粒子的外觀及形狀。為了觀察粒子的外觀及形狀，將毫微粒子懸浮液滴入 0.5% phosphotungstic acid 溶液中染色，再滴入銅網膜上，乾燥後以穿透式電子顯微鏡觀察拍照。

示差掃描熱分析(Differential Scanning Calorimetry)

精稱檢品(5mg)放入小鋁盤內，置入檢品盤中，依各檢品設定加熱溫度($30-250^\circ\text{C}$)及掃描速度($10^\circ\text{C}/\text{min}$)後，進行分析。

PCR 及 RT-PCR

PCR 操作步驟：總體積 100 μl 中含有 100 ng DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10mM dNTP 及 200 ng primers。95 $^\circ\text{C}$ Denatured 3 分鐘，添加 1 μl Taq DNA polymerase, 接著於 94 $^\circ\text{C}$, 30 秒; annealing temperature 30 秒; 72 $^\circ\text{C}$, 30 秒共 40 Cycles, 最後於 72 $^\circ\text{C}$, 10 分鐘。RT-PCR 標準操作步驟：微量離心管中，總體積 100 μl 中含有 RNA 250 ng, 10 mM dNTP, 25 mM MnCl_2 , 200 ng Primers 及 2 μl rTth 溶於 Reaction buffer，以 70 $^\circ\text{C}$, 10 分鐘製備 cDNA，隨即置於冰中，等待下一步驟。以 Chelating buffer 除去 MnCl_2 ，添加 MgCl_2 並於 94 $^\circ\text{C}$, 30 秒; Annealing temperature, 30 秒; 72 $^\circ\text{C}$, 1 分鐘, 共 40 Cycles。所得 PCR 及 RT-PCR 產物分別以 Ethidium bromide 染色，並以 Agarose 電泳分離之。

細胞毒性試驗

不同濃度之中藥成份加入細胞培養盤後於 37 $^\circ\text{C}$ 培養 16 h. $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ (2 mCi) 再加入 each well 中並繼續培養 37 $^\circ\text{C}$ for 4 h. 放射性 Thymidine 結合反應以 diluting with 1ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing cold thymidine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)終止後。DNA 再以 cold 10% trichloroacetic acid (TCA) 沉澱，經 5% TCA 水洗後，以 95% ethanol 乾燥之。 $[^3\text{H}]\text{DNA}$ 以 0.5 ml 之 0.2 M sodium hydroxide solution 溶解後，轉至 vials 中內含 3 ml of Ecolume scintillation fluid (ICN Biomedicals).

[3H]DNA 放射線強度以 Packard Model LS 6800 scintillation counter 測定之。

Flowcytometry

Emodin (25 g/ml) 加入細胞 (1×10^7 cell/ml) 後, 在不同時間以 PBS 終止其反應並水洗細胞。以 4% para-formaldehyde/PBS (pH 7.4) 於室溫下固定 30 min. 於 1,000 rpm 離心 10 min, 再以 0.1% Triton X-100/0.1% sodium citrate at 4°C 增加細胞之通透性 2 min. Propidium iodide in PBS (10 g/ml) 用以染細胞並於 37°C 作用 30 min. 紅色螢光強度以 FACScan flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) 測定之。每次測定至少含有 5,000 cells, 所得結果再以 LYSIS II software 分析之。

Southern Hybridization

Southern blotting 係根據一般標準步驟進行, 略述如下: DNA 片段以 Agarose 電泳分離, 以 1.5 M NaCl-0.5 M NaOH denatured 後, 轉漬至 Nylon membrane。經 pre-hybridization 及 hybridization 步驟後, 探針以 random-priming 方式標上放射線, 進行 hybridization 隔夜, 以 SSC/SDS 洗去過剩的探針, 風乾後, 置於含 intensive screen 的卡夾內, -70°C autoradiography 後將底片沖洗並分析結果。

DNA Sequencing

根據 dideoxy sequencing 方法, 以 Sequenase 2.0 kit(USB) 或 Cycle sequencing kit (Promega) 分析其 DNA 序列。操作步驟依據產品所附之標準操作步驟。

Cell-Free Extracts 的製備

細胞培養於含或未含大黃素超微粒製劑培養液中, 離心後以低張溶液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 含 1 mM EDTA 及 5 mM DTT) 使細胞破裂, 隨即添加蛋白質水解酵素之抑制劑。添加 4 ml 冰冷溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 25% Sucrose 及 50% Glycerol] 及 1 ml 飽合 Ammonium sulfate, 於 0°C 下攪拌 30 min 後, 再於 42,000 rpm 離心 3 小時。所得上清液以 0.33 g/ml Ammonium sulfate 沉澱所含的蛋白質, 並以 25 mM Hepes-KOH (pH 7.9) 含 0.1 M KCl, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM DTT 及 17% Glycerol 透析 12 小時。所得溶液儲存於 -80°C。

UV 照射之 Plasmid DNA 的製備

Plasmid DNA 經萃取後以 50 µg/ml 溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl,

pH 8.0)，以 254 波長之 UV 光照射 (0.5 W/m²)，並以 Pyrimidine dimer-DNA glycosylase (700U/ μ g protein) 偵測 plasmid DNA 變異情形。

DNA 修補反應

50 μ l 混合液中含有 0.3 μ g unirradiated closed pBR322 及 0.3 μ g irradiated pAT153 substrate, 45 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 70 mM KCL, 7.4 mM MgCl₂, 0.9 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 2 mM ATP, 20 μ M dGTP, dCTP, dTTP, 8 μ M dATP, 2 μ ci [α -³²P]dATP, 40 mM phosphocreatine, 2.5 μ g creatine phosphokinase, 3.4% Glycerol, 18 μ g BSA 及 80 μ g extract protein.

30°C 反應 6 小時。

DNA 修補能力的測定

修補能力的測定是採用 Autoradiography 的方法，DNA 修補反應經 20 mM EDTA 終止後，以 RNAase 作用 10 min 後添加 SDS 至 0.5% 及 Proteinase K 至 190 μ g/ml，於 37°C, 30 min 再以 Phenol/Chloroform 萃取其 DNA。以 1% agarose 電泳分離，膠片乾燥後曝於 Kodak 底片 (XAR-5)。

結 果

癌症長久以來一直是人類健康上的最大問題，而肝細胞腫瘤則是台灣居民因惡性腫瘤死亡之最主要癌症，目前高發生率的原因可能與眾多 B 型肝炎帶原者之年齡層有關。雖然新生代已廣泛實施肝炎疫苗注射，因此應可降低其罹患率，但對於目前眾多已是 B 型肝炎病毒帶原者，其終生仍將受到癌症的威脅。在許多癌細胞中，包括 肝癌、肺癌、膀胱癌、乳癌、胰臟癌及其他癌細胞中均可發現染色體異常及基因變異的現象。為了研究大黃素 (Emodin) 在抗癌上的應用潛力，我們將 Emodin 製備成超微粒 (nanoparticle) 製劑以增加對肝細胞之親和力，其製備過程如“材料與方法”中所述 (如圖一)。所製備出之 Emodin-nanoparticle 以 Coulter counter 測定其粒徑結果，92% 以上之超微粒徑均為 180 $\pm$ 15 nm (如圖二)，顯示所製備之超微粒品質一致。利用掃描式電子顯微鏡觀察 Emodin-nanoparticle 外觀 (如圖三)，其製備與儲存過程時冷凍前後及儲存六個月後其 Emodin-nanoparticle 的粒徑與藥品包埋率並無明顯改變 (如表一)，顯示其藥品安定性高。另一方面，定性 Emodin 之 UV 圖譜 (如圖四) 並以 HPLC 分析 Emodin 超微粒之藥品含量並與檢量線比較結果 (如圖五及圖六)，Emodin

的含量為 28.5 μ g/ml。以熱分析試驗測定藥物間相互作用關係，顯示 Emodin 與 Polyisobutylcyanoacrylate (PIBC) 超微粒材料並無交互作用 (如圖七及圖八)。經實際評估 Emodin 超微粒子製劑與單純 Emodin 對正常細胞

表一、Emodin 超微粒子冷凍乾燥及儲存前後之粒子大小與包埋率之變化

Emodin-NP		
	size (nm)	Drug binding level(%)
Before freeze-drying	196 ± 33	92 ± 5
After freeze-drying	205 ± 41	91 ± 8

Emodin-NP		
	size (nm)	Drug binding level(%)
Before storage	196 ± 23	92 ± 5
After storage	211 ± 38	86 ± 6

本實驗所使用之 Coulter Counter 係以每秒計數 $1.0 - 1.5 \times 10^6$ 個超微粒測定之，本表數據係測定 200 秒後所得之結果，以 Mean ± S.D. 表示之。

1. Emulsion polymerization : nanospheres

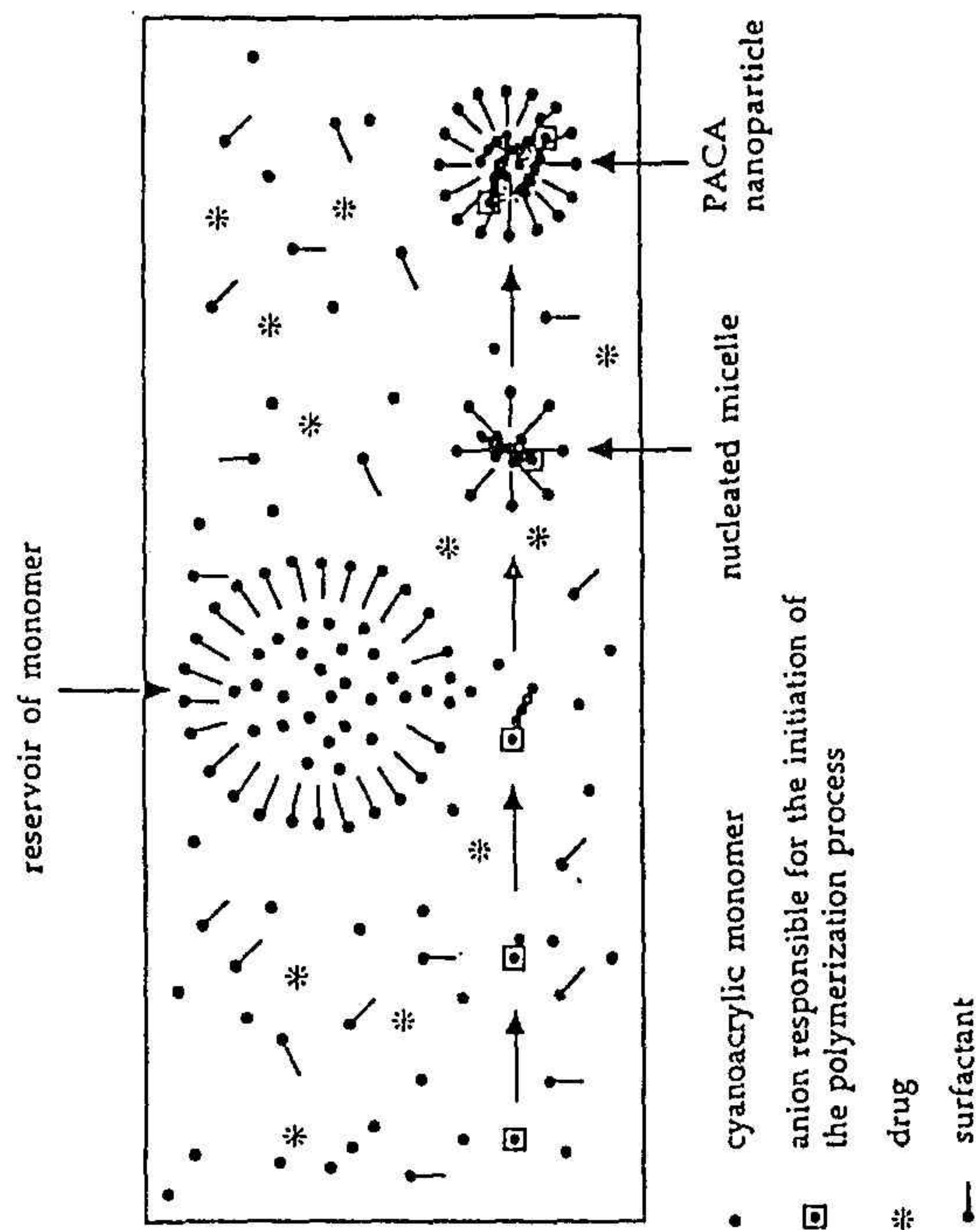
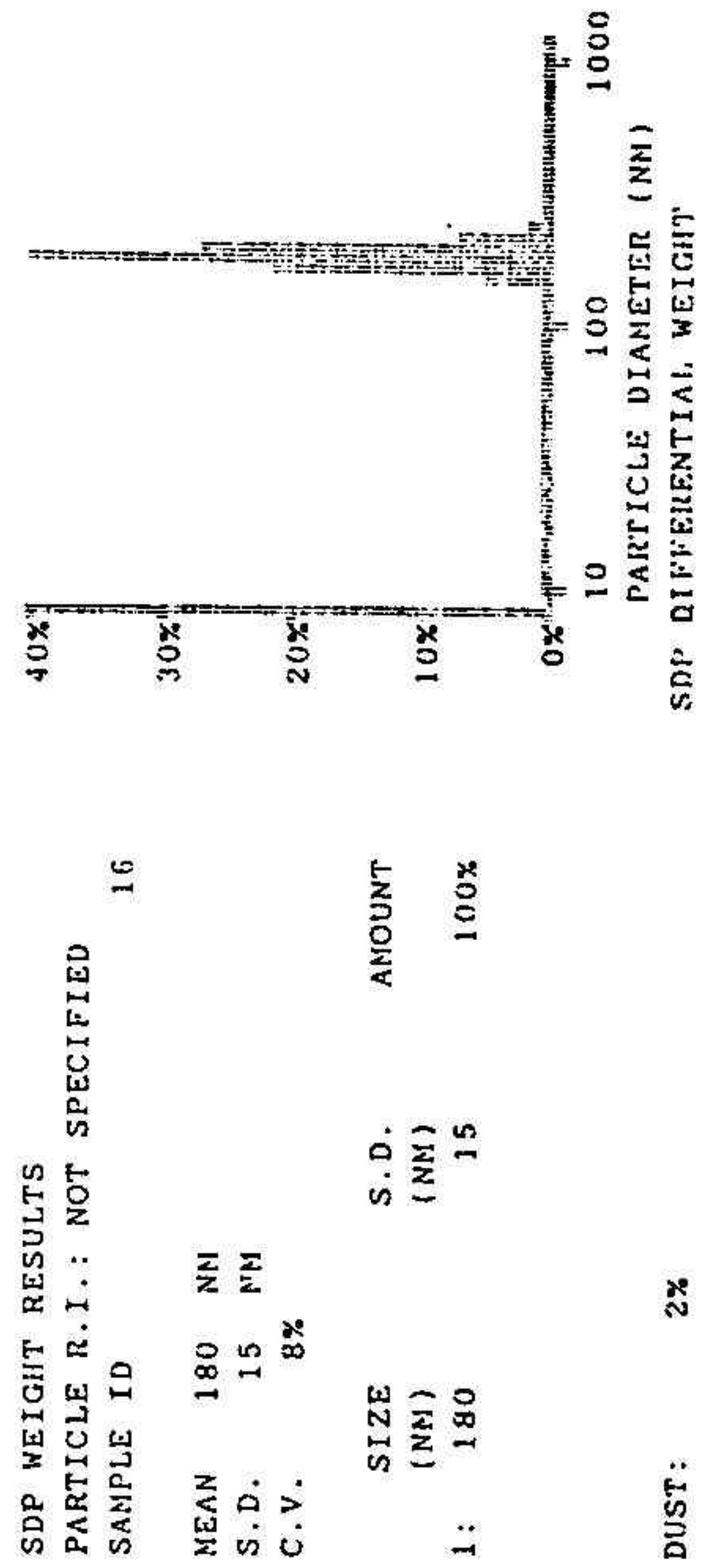


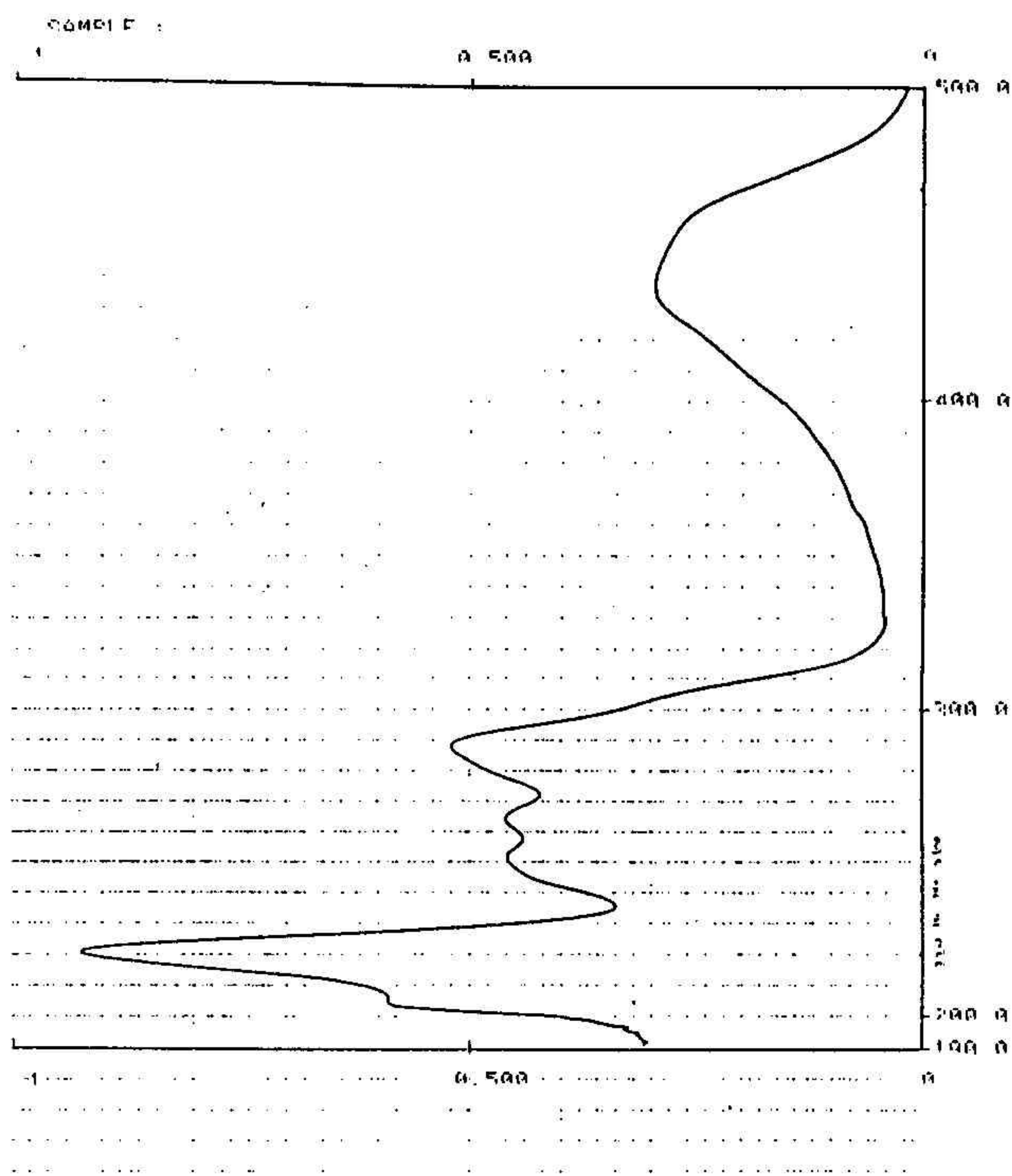
圖--、Emodin 超微粒製劑之製備原理



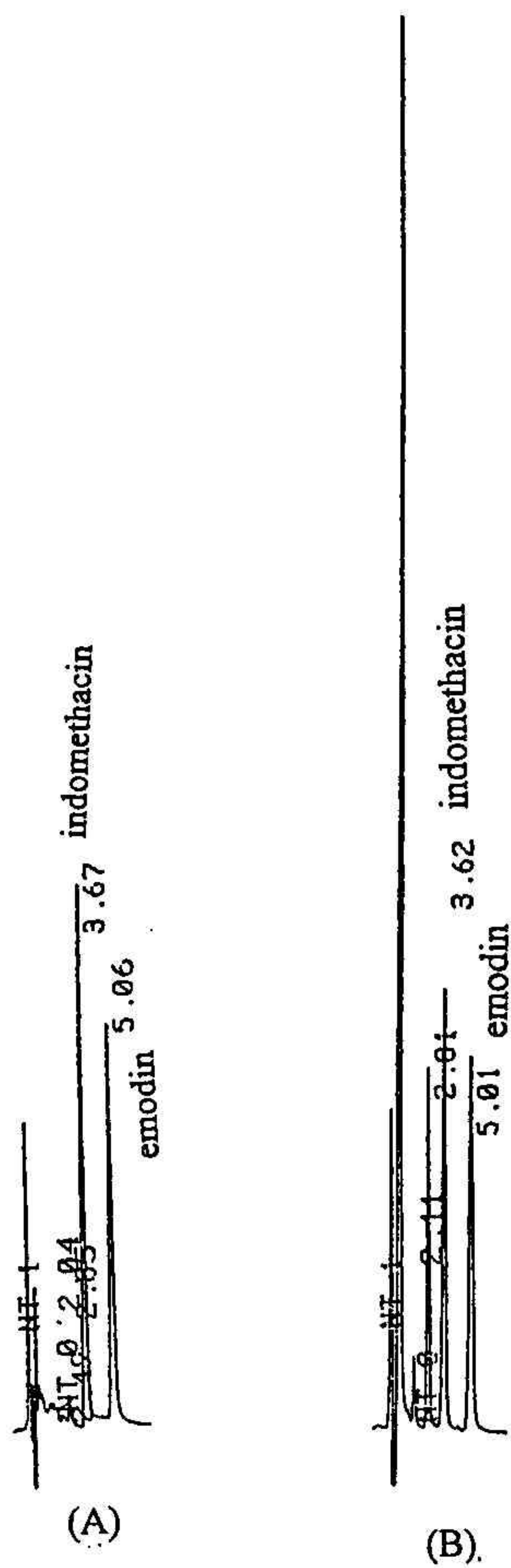
圖二、以 Coulter counter 檢測 Emodin 超微粒子之粒徑



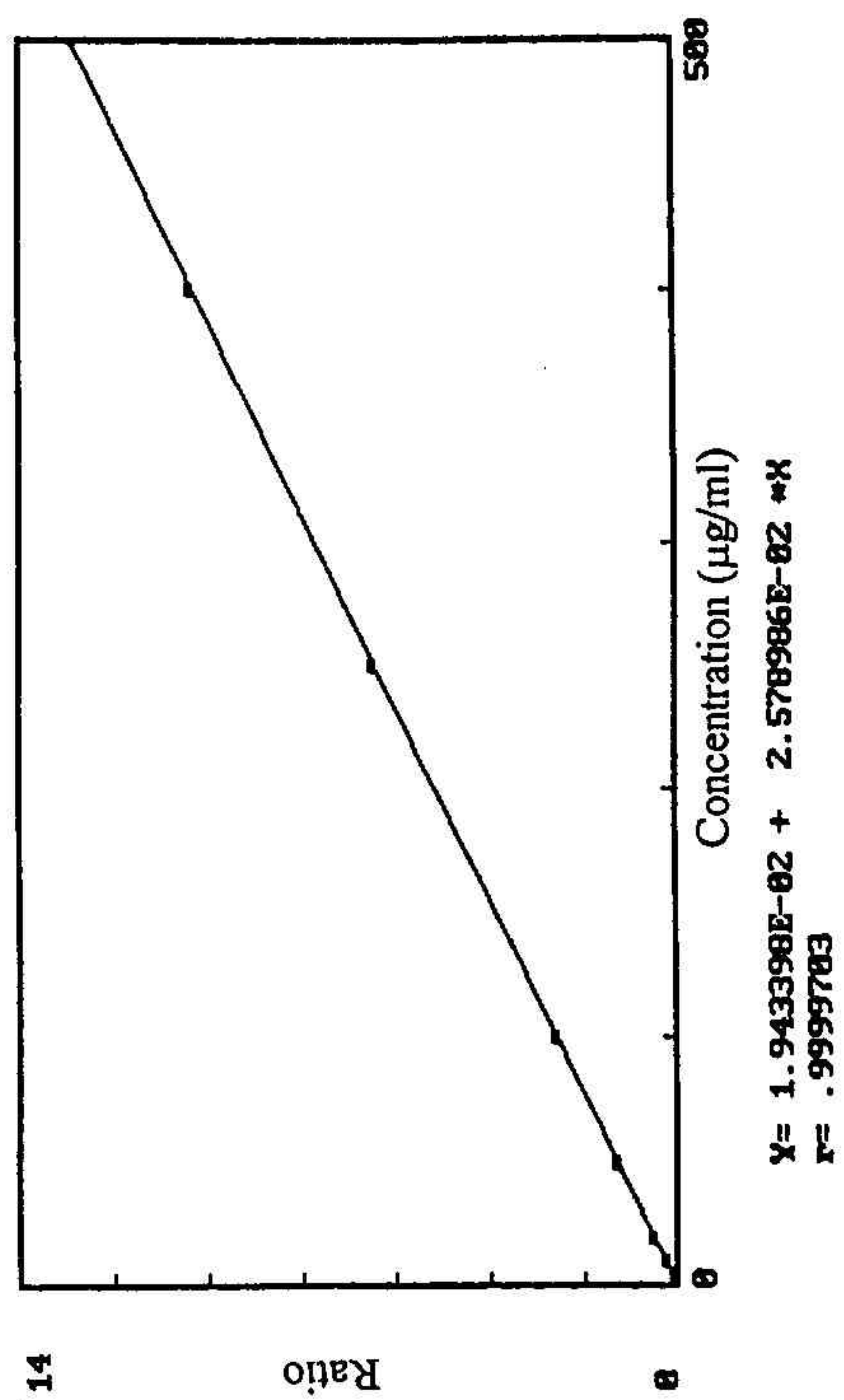
圖三、Emodin 超微粒子之掃描電子顯微鏡 (TEM) 圖



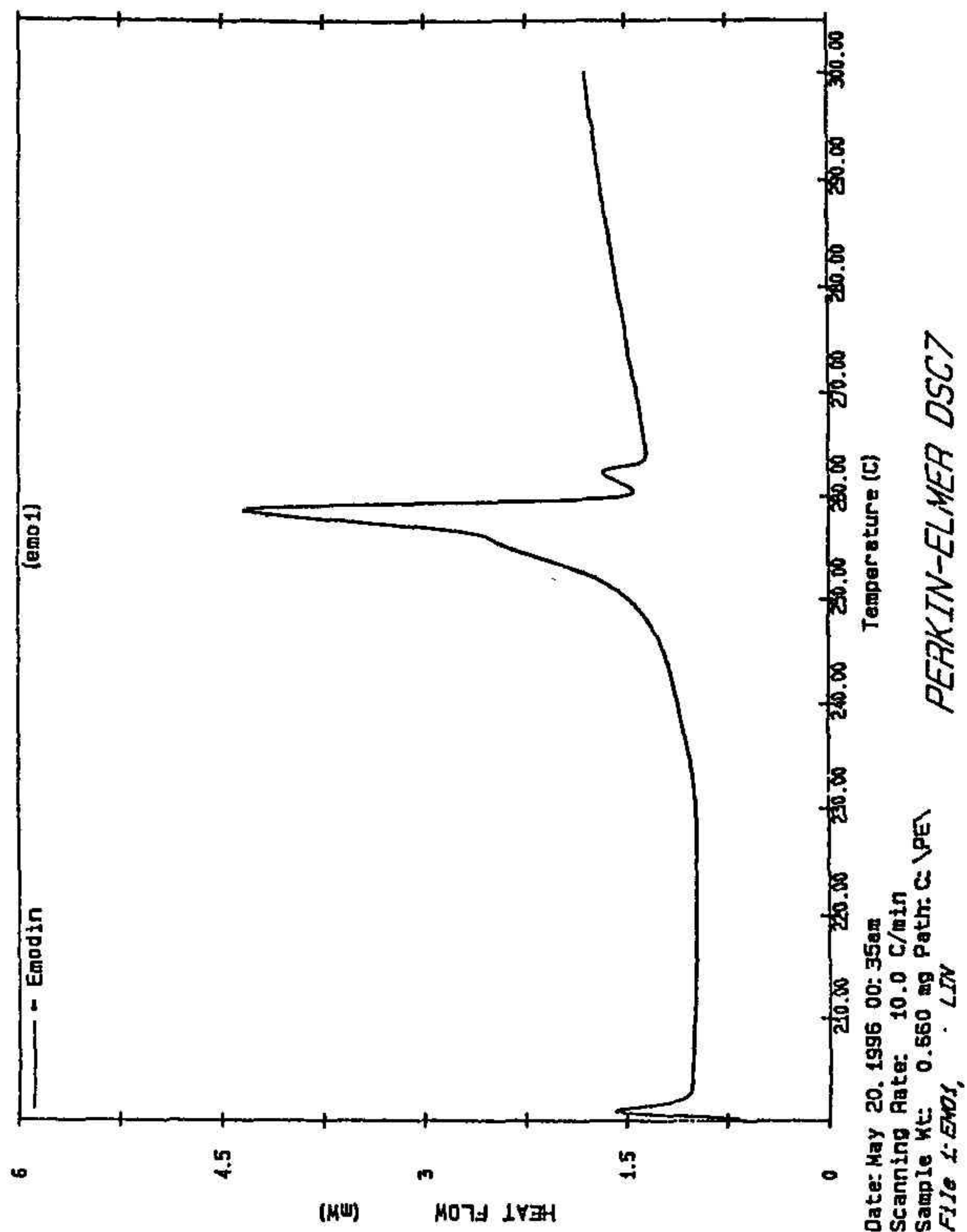
圖四、Emodin 之 UV 圖譜



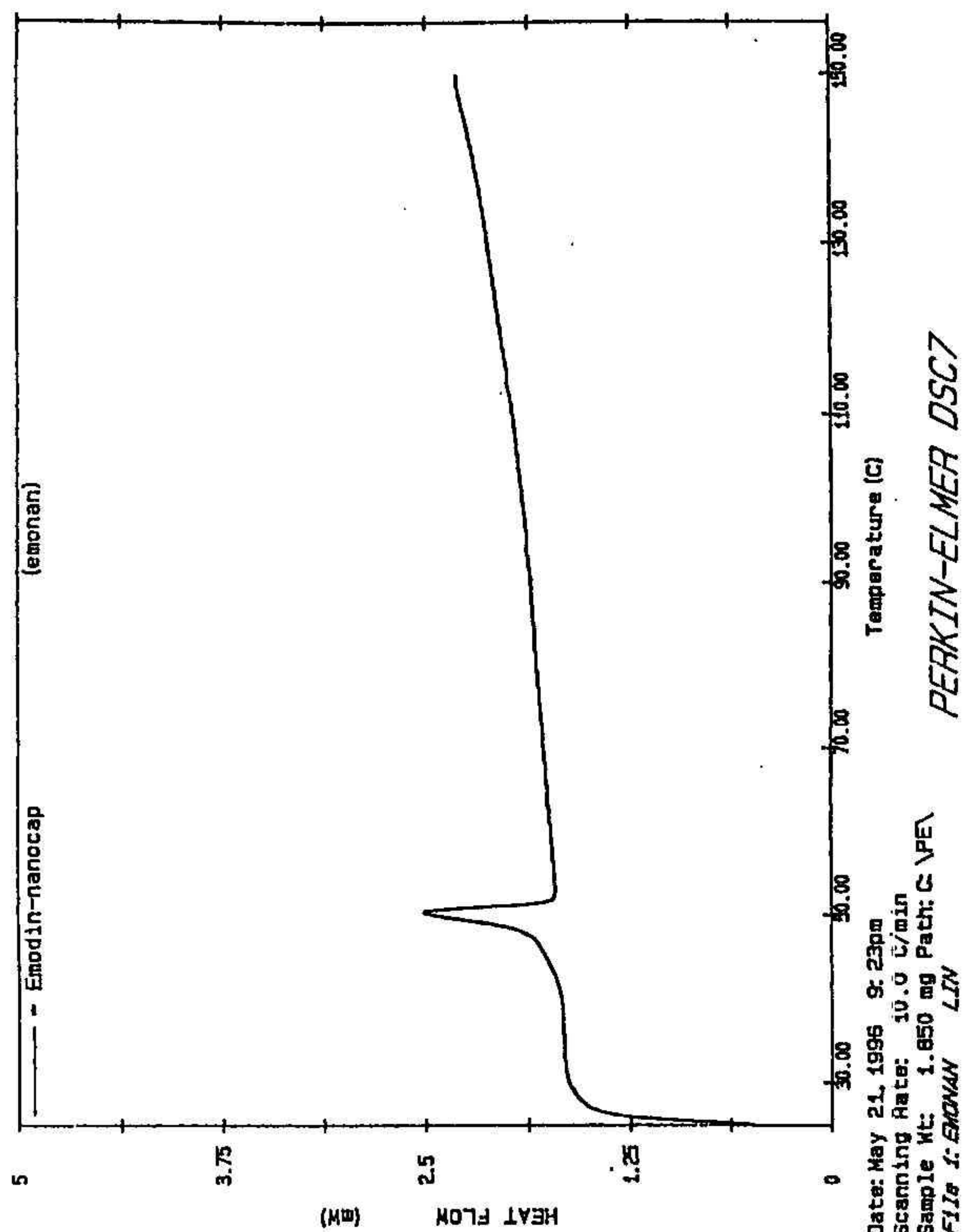
圖五、 Emodin HPLC 層析圖
 (A) Emodin 及內部標準品
 (B) 在 Nanoparticle 中測得之 Emodin



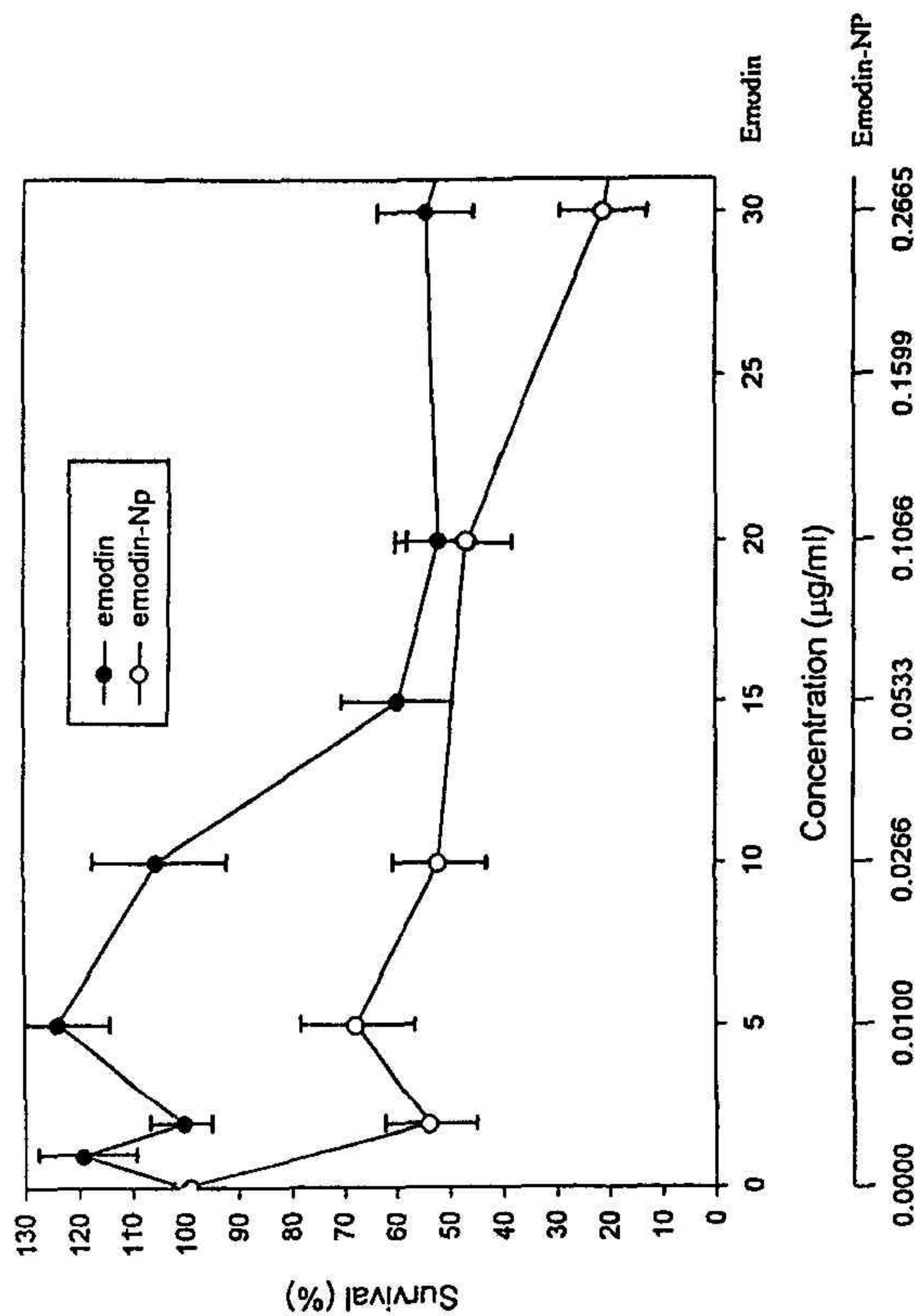
圖六、Emodin 之校正曲線圖



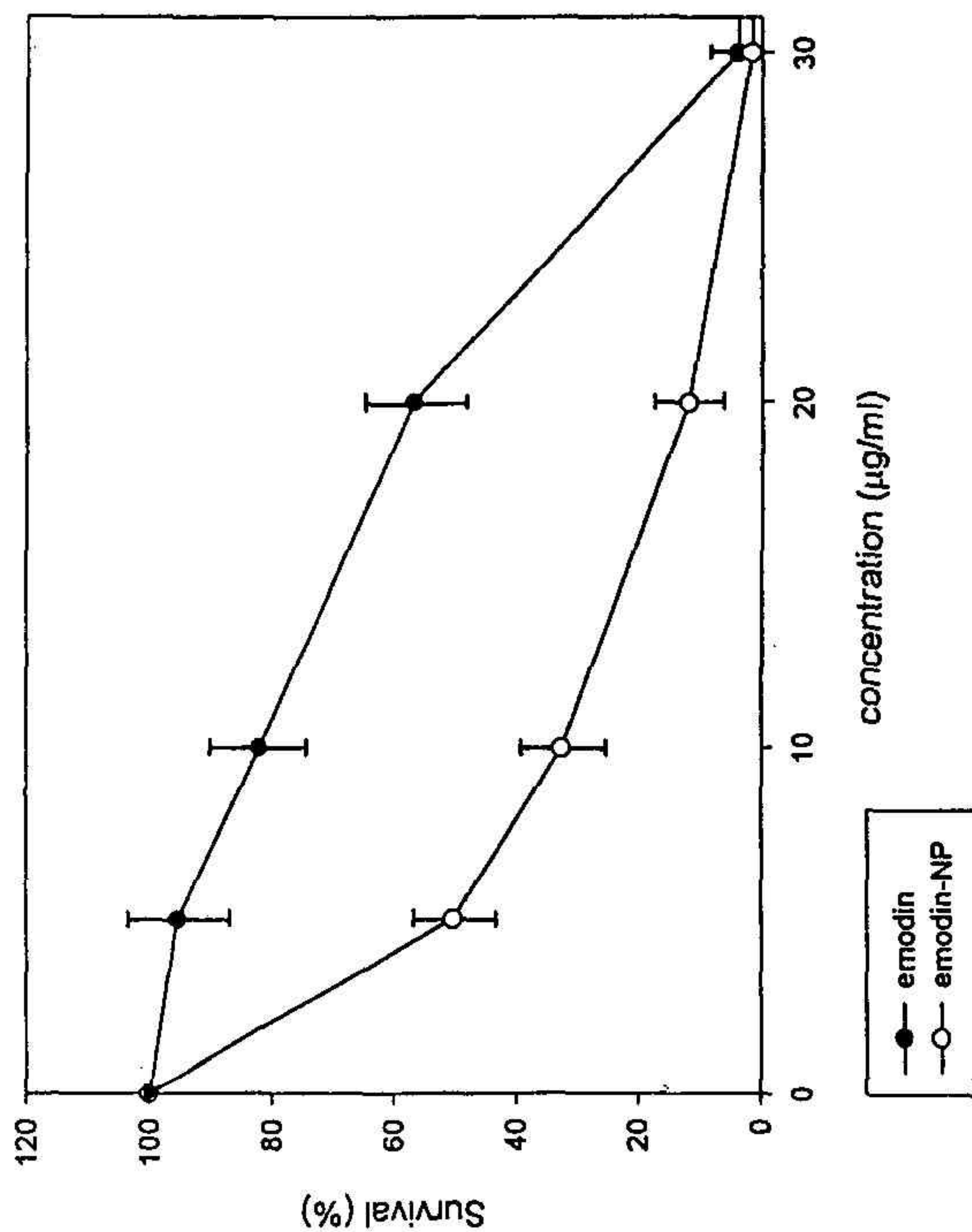
圖七、Emodin 之熱分析試驗圖譜



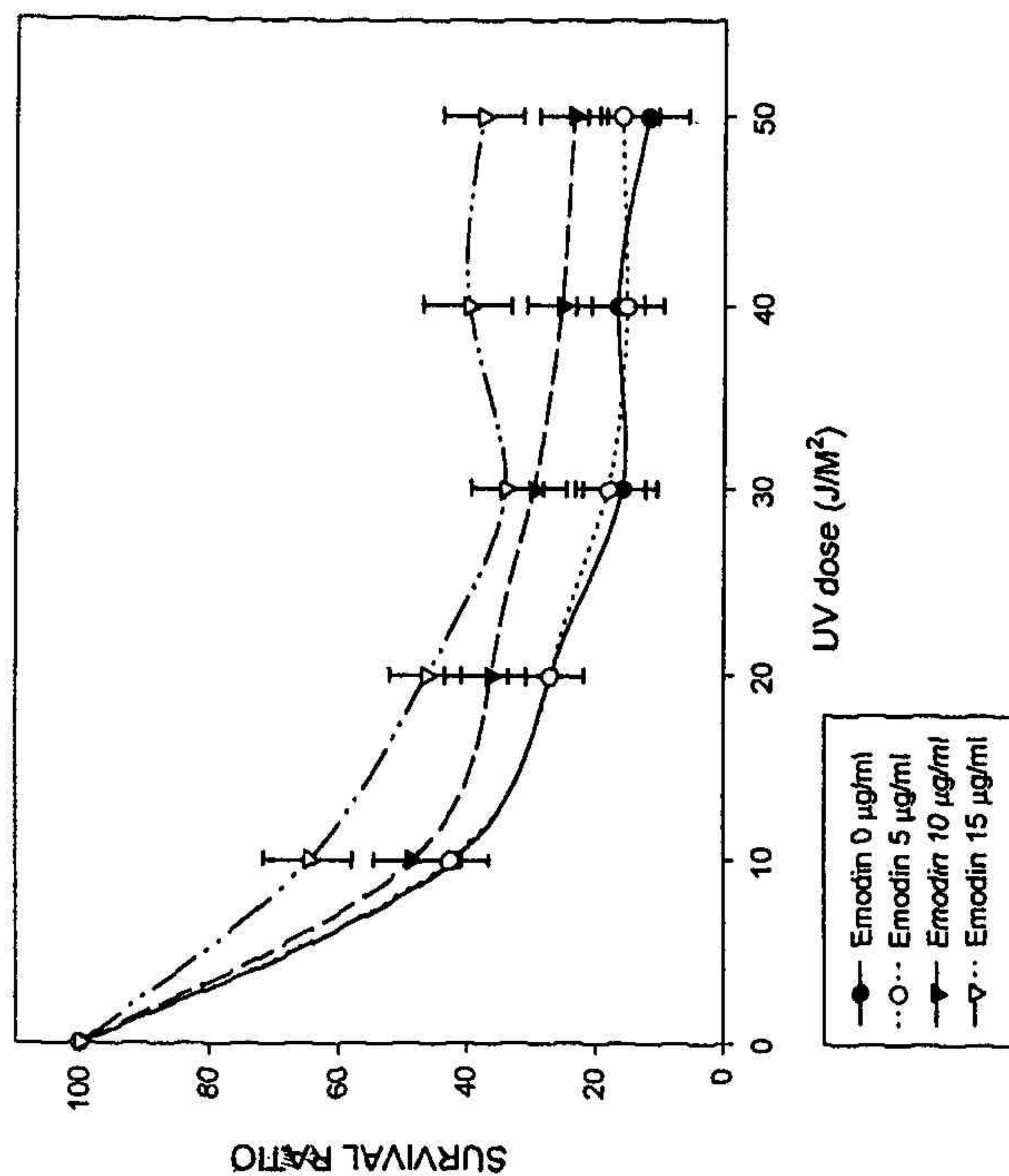
圖八、Emodin 超微粒子之熱分析試驗圖譜



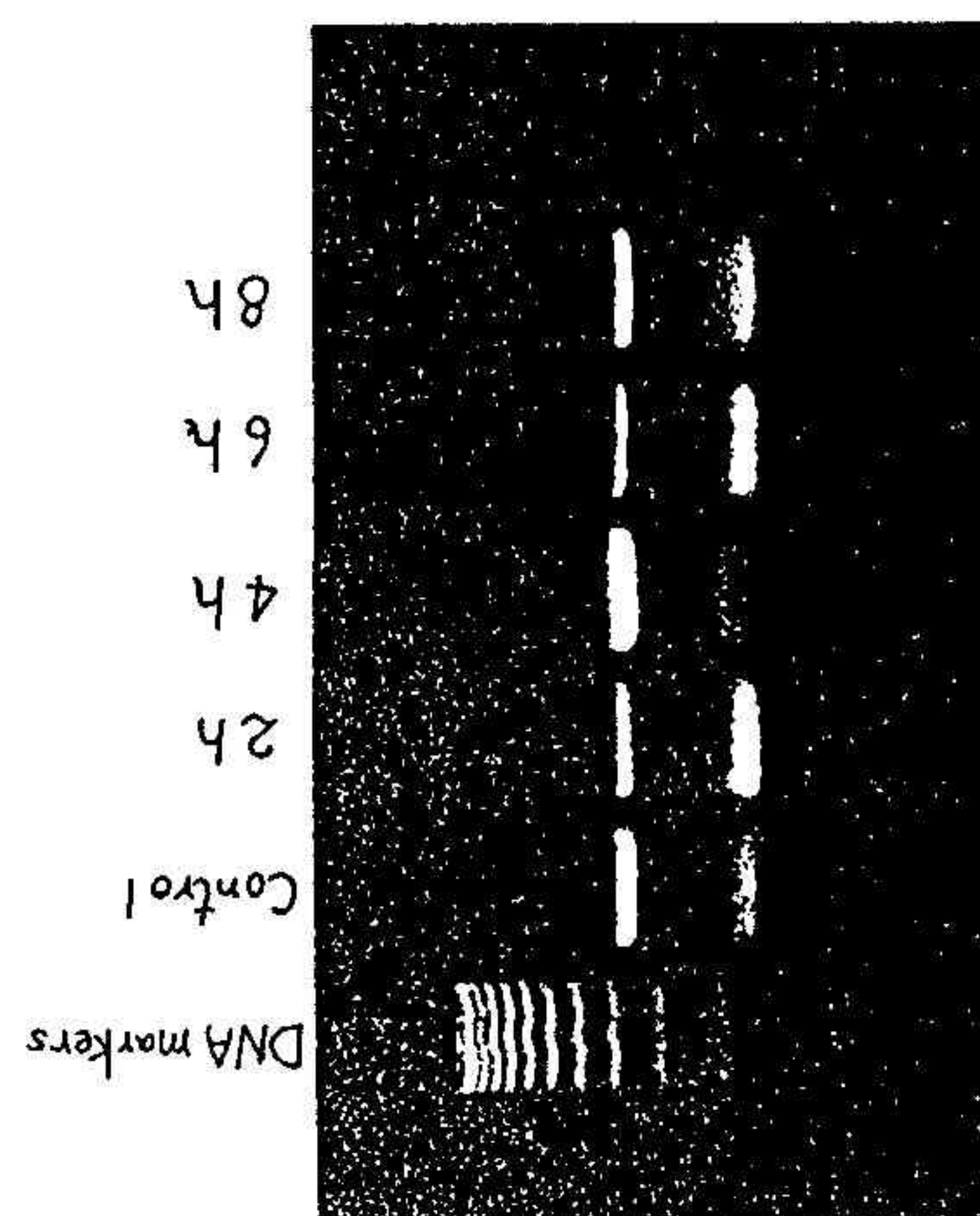
圖九、Emodin 及 Emodin 超微粒製劑對肝癌細胞之細胞毒性



圖十、Emodin 及 Emodin 超微粒製劑對正常細胞之細胞毒性



圖十一、Emodin 拮抗 UV-Induced DNA 變異引起之細胞傷害



圖十二、以 RT-PCR 偵測 Emodin 啟動人類 DNA 修補酵素(XPA)之基因表現電泳圖，箭頭表示位置為 XPA 之基因在不同作用時間之基因表現

與肝癌細胞之細胞毒性結果，Emodin 超微粒子達到 50% 的藥效可降低單純Emodin等劑量之200倍以上（如圖九及圖十），顯示超微粒子確實能有效改善Emodin作用細胞的能力，而可在極低劑量下即可有預期的效果。因此Emodin超微粒子低劑量的使用同時配合較具器官導向性（Target specificity）對降低該藥物所引起的副作用將有幫助。

另一方面，Emodin已有報告具有抗突變作用，本計畫乃利用Emodin探討該藥物在調節細胞中DNA修補作用的真正機轉。當紫外線（UV）照射細胞後將引起DNA 形成 Pyrimidine dimer而造成變異，正常細胞之DNA修補酵素此時能認識變異處而進行修補的工作。因此隨著 UV 照射的強度增加而DNA受傷害程度愈高，則細胞將逐漸死亡。本計畫發現Emodin (5-15 $\mu\text{g/ml}$) 能拮抗UV-induced DNA變異所造成的細胞傷害，同時隨著Emodin 濃度增加，其拮抗作用愈強（如圖十一），顯示 Emodin 具有增強細胞 DNA修補的能力。為進一步瞭解其作用之分子機轉，我們利用RT-PCR偵測DNA修補酵素 XPA 之基因表現，結果發現在 Emodin 作用 4 小時後，其 DNA修補酵素 XPA 之基因表現明顯的增加（如圖十二）。因此Emodin可能係具有啟動人類細胞中DNA修補酵素 XPA 基因表現之能力，因此具有拮抗 UV-induced DNA變異的能力。更詳細的作用機轉正進行中，於成果發表會中將提出討論。

討 論

癌症名列台灣第一大死亡原因，而肝細胞腫瘤則又是台灣最首要的癌症，目前對肝細胞腫瘤並無有效治療藥物，再加上並無理想之肝細胞腫瘤標誌可供早期診斷，因此被診斷出罹患肝細胞腫瘤患者，其生命僅有數月而已。傳統上研究治療癌症之藥物均著重於對細胞毒性(Cytotoxicity) 的研究，但是能毒殺癌細胞的藥物通常對正常細胞亦會造成傷害，這是目前利用中及西藥治療癌症之最大困擾。同時癌組織雖經外科手術除去後常有再發生的現象，所以利用藥物抑制癌細胞生長的方法僅是治標而非治本的辦法。

隨著分子生物學的進展，對癌細胞的形成理論有進一步的瞭解。正常細胞要轉變成癌細胞必須細胞內之基因發生變化，產生錯誤的訊息傳遞蛋白質而造成細胞生長無法受到正常的調節。本計畫之實驗證實細胞癌化成型後，其 DNA 變異位置已固定，欲藉由藥物矯正其 DNA 序列可能無法達成，唯有以藥物毒殺癌細胞並配合藥物預防該部位細胞使其不會癌化，如此才是癌症之治本辦法。但要預防細胞癌化最直接的方法及是強化細胞DNA修補功能。

正常細胞中存有一套自動修補 DNA 變異之酵素組合（包括 DNA Glycosylase、DNA Polymerase 及 DNA Ligase）能定點或整段修補變異之

DNA Sequence。因此欲使正常細胞不會癌化，調節細胞本身之 DNA 修補功能是有有效的途徑。但是為何在癌細胞形成之前而細胞 DNA 變異時，這些修補酵素未發生功用？是否其活性受到抑制？這可能是研究中西藥治療癌症之學者急待解決的問題。因此如有藥物能增強抑癌基因表現(expression)或增加修補 DNA 之酵素活性，則該藥物將具有預防正常細胞癌化的功能，這對於台灣眾多的 B 型肝炎帶原者使其不致轉變成肝硬化或肝癌會有實質的意義。因此對癌細胞有治療的效果且不影響正常細胞功能。這是本計畫的主要目的及所要達成的目標。

本計畫研究已發現傳統中藥之大黃與虎杖主成份 - 大黃素(Emodin) 具有毒殺癌細胞的功能，但其對正常細胞亦造成傷害。因此設計改良其劑型以增加其器官導向性 (Target specificity) 將可改善此缺點。事實上本計畫已證據顯示所製備的Emodin超微粒製劑，其藥效比單獨等量之Emodin 強200倍以上。另外本計畫亦發現低劑量的 Emodin (5-15 $\mu\text{g/ml}$) 具有啟動人類細胞中 DNA 修補酵素 XPA 之基因表現，進而具有拮抗 DNA 變異的能力，因此再進一步決定適當之血中 Emodin 量，則 Emodin超微粒製劑應是理想且具有臨床應用的潛力，其進一步之詳細作用機轉結果將於成果發表會中提出。

綜合以上之結果，有鑑於癌症的形成與細胞基因變異息息相關，因此本計畫乃應用分子生物學技術探討 Emodin 之抗癌機轉並研究其強化 DNA 修補酵素活性之角色，此計畫完成後將是第一篇應用中藥超微粒製劑探討抗癌的新研究方向，同時在預防細胞癌化上更具有重要地位。

結 論 與 建 議

本計畫之研究發現 Emodin超微粒製劑，其藥效比單獨等量之Emodin 強200倍以上，亦發現低劑量的 Emodin (5-15 $\mu\text{g/ml}$) 具有啟動人類細胞中 DNA 修補酵素 XPA 之基因表現，進而強化細胞DNA修補能力而具有拮抗 DNA 變異的能力。因此值得繼續開發研究，更詳細之作用機轉目前仍繼續探討中，將於本年度成果發表會中提出討論，待更詳細的作用機轉研究出後，Emodin 應具有實際臨床應用的潛力。目前計畫主持人主持之中醫藥委員會中藥研究計畫係與本院藥學系林忠男教授（負責中藥成份的提供、萃取與鑑定）、顏銘宏副教授（負責植物採集與基原確定）、蔡東榮講師（負責劑型開發與品質分析）及生化所碩士班研究生共同結合成一合作團隊。事實上，我們已建立一套分析抗癌作用機轉及偵測 DNA 修補酵素活性之模式系統，將可與其他研究學者合作並大量篩選相關中藥之作用機轉，但由於人力不足及研究生畢業流動性等問題而一直無法大量進行。目前國內研究學者純化出許多有效成份，但進一步分析其機轉則較

不普遍，因此如能結合國內各研究中藥之專家學者提供其專長，共同合作推動中藥作用機轉之探討，則對中藥之發展與應用應有實質的幫助。本計畫正進行中的調控 DNA 修補酵素活性，對癌症治療是一新研究方向，在應用中藥抗癌上具有重要而實質的意義。研究雖然堅苦，但如能找出一種中藥能強化 DNA 修補酵素活性，則可能將有預防細胞癌化之功能，直接造福數百萬癌症高危險群患者。

參 考 文 獻

1. Edamoto Y, Tani M, Kurata T, et al: (1996) Hepatitis C and B virus infections in hepatocellular carcinoma. Analysis of direct detection of viral genome in paraffin embedded tissues. *Cancer* 1996;77:1787-91.
2. Caselmann WH: Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22:34-7.
3. Henkler F, Waseem N, Golding MH, et al: Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:6084-6091.
4. Graef E, Caselmann WH, Well J, et al: Insertional activation of mevalonate kinase by hepatitis B virus DNA in a human hepatoma cell line. *Oncogene* 1994;9:81-7.
5. Rustigi V: Hepatocellular carcinoma. *Annu Rev Intern Med* 1988;108:390-401.
6. Schluter V, Meyer M, Hofschneider PH, et al: Integrated hepatitis B virus X and 3'truncated preS/S sequences derived from human hepatomas encode functionally active transactivators. *Oncogen* 1994;9:3335-44.
7. Moroy T, Marchio A, Etiemble J, et al: Rearrangement and enhanced expression of *c-myc* in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature* 1986;324:276-9.
8. Lubber B, Arnold N, Sturzl M, et al: Hepatoma-derived Integrated HBV DNA causes multi-stage transformation in vitro. *Oncogene* 1996;12:1597-608.
9. Zhang L, Chang CJ, Bacus SS, et al: Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res* 1996;55:3890-6.
10. Su HY, Cherng SH, Chen CC, et al: Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutation Res* 1995; 329:205-12.
11. Von Wright A, Raatikainen O, Taipale H, et al: Directly acting geno- and cytotoxic agents from a wild mushroom *Dermocybe sanguinea*. *Mutation Res* 1992;269:27-33.

12. Ishii Y, Tanizawa H, Takino Y: Studies of aloe. III. Mechanism of cathartic effect. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1990;38:197-200.
13. Couvreur P, Lenaerts V, Leyh P, et al: Microspheres and Drug therapy: Pharmaceutical, immunological and medical aspects. 1984; 103-115.
14. Al-khouri NF, Treupel LR, Fessi H, et al: Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Int J Pharm* 1986;28: 125-31.