

計畫編號：CCMP89-RD-037

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

苦寒性中藥對於蛋白質酪胺酸激酶之作用

委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：張 建 國

研究人員：王 妙 媛

執行期間：88年7月1日至89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：CCMP89-RD-037

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

苦寒性中藥對於蛋白質酪胺酸激酶之作用

委託研究報告

計畫委託機關：中國醫藥學院附設醫院

計畫主持人：張 建 國

研究人員：王 妙 媛

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

編號：CCMP89-RD-037

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究計畫成果報告

苦寒性中藥對於蛋白質酪胺酸激酶之作用

執行機構：中國醫藥學院附設醫院分子醫學科

計畫主持人：張建國

研究人員：王妙媛

執行期限：民國 88 年 7 月 1 日至民國 89 年 6 月 30 日

目 錄

	頁碼
壹、中文摘要	5
貳、英文摘要	6
參、本文	
一、前言	7
二、材料與方法	9
三、結果	11
四、討論	12
五、結論與建議	13
六、參考文獻	14
七、圖	18

計畫編號：CCMP89-RD-037

計畫名稱：苦寒性中藥對於蛋白質酪胺酸激 之作用

主持人：張 建 國

執行機構：中國醫藥學院附設醫院分子醫學科

苦寒性中藥，傳統上是被用於實症狀態的病症，但其作用的機轉一直沒有被現代醫學所了解，我們綜合過去的研究，推測這類藥物可能是經由抑制蛋白質酪胺酸激酶的活性而完成作用，為了證明此一推論，我們先建立一套篩選蛋白質激酶抑制劑的方法，並利用它來探討苦寒性中藥是否有此一作用。我們總共測試了大黃、黃柏、龍膽草的萃取液與經 LPS 刺激後的單核球作用，結果顯示，大黃及黃柏均可抑制蛋白激酶的活化，而龍膽草則否，因此我們認為部份的苦寒性中藥是透過不同蛋白質激酶的活化而產生作用，而且也可能透過 phosphatase 的去磷酸化而作用，其詳細的作用機轉，須未來進一步的研究。

關鍵詞：苦寒性中藥、蛋白質酪胺酸激酶、抑制劑

計畫編號：CCMP89-RD-037

**計畫名稱：Effects of “Ku-Han” Chinese Herbs on Protein
Tyrosine Kinase Activity**

主持人：JAN-GOWTH CHANG

執行機構：China Medical College Hospital

“Ku-Han” Chinese herbs have been used in traditional Chinese medicine to treat many common diseases. Although many of them become household name, the knowledge of their operation systems and regulation mechanisms on our immune system is still not clear yet. From previous studies, we have found that these Chinese herbs may play a role by inhibiting protein tyrosine kinase activity. In order to prove this hypothesis, we examined their inhibition activities on protein tyrosine kinase. Purified extracts of Rheum Officinale (大黃), Phellodendri (黃柏), and Gentianae Scabrae Radix (龍膽) were used to stimulate LPS-activate human mononuclear cells and the protein tyrosine kinase activities were analyzed. Our results showed that Rheum Officinale and Phellodendri can inhibit activation of tyrosine kinase; where as Gentianae Scabrae Radix has the opposite effect. We conclude that “Ku-Han” Chinese herbs may use different signal transduction pathway, such as dephosphorylation, to regulate protein kinase activity.

**Keywords： “Ku-Han” Chinese Herbs, Protein Tyrosine Kinase,
Inhibitor.**

參、本文

一、前言

蛋白質酪胺酸激酶(protein tyrosine kinases 簡稱 PTKs)在正常細胞之分裂及不正常細胞之繁殖佔有非常重要的角色。PTKs 活性的增強常在細胞增殖的疾病中發現，例如癌症、血管粥狀硬化、或乾癬等 (1-4)。又如以 HER-2/neu/c-erb B2 這一具有 PTK 功能的致癌基因而言，此基因在相當多的癌症均有增多及過度表現的情形，而且在此情形下，癌細胞更容易轉移及對化學治療更有抗性，因而造成預後不良 (5-10)。再以具有 PTK 功能之血小板有關的生長激素(platelet-derived growth factor 簡稱 PDGF)，當血管壁損傷引起 PDGF 的分泌，進而刺激血管平滑肌細胞的增殖，因而造成血管粥狀硬化的產生 (2)。由於 PTK 在細胞增殖上所佔的角色，因此特定的 PTK 抑制劑在臨床疾病的治療上將佔有非常重要的地位。而如何找出這些 PTK 抑制劑，其重要性就更不必說了！因此，若能在中藥中篩選出這類藥，未來不但可提供中醫治療的理論基礎，同時也可能對癌症或其它增殖有關的癌提供新的治療方法。

事實上，這一方面已有相當進展，如 Jayasuriya 等發現從虎杖提煉出來的大黃瀉素(emodin)具有蛋白激酶的抑制作用 (11)，Chan 等更進一步證明 emodin 可選擇性的抑制 RAS-transformed bronchial epithelial cells 的增殖 (12)，而 Hung 等更進一步證明 emodin 可抑制 HER-2/neu 過度表現的癌細胞之生長 (13)，因此他們更進一步合成一些大黃瀉素相關的衍生化合

物，以便臨床應用 (14-15)。不僅如此，其他的研究群也發展了一些不同的 PTK inhibitors，而且這些抑制劑可防止因細胞之脂多醣體 (Lipopolysacchaide 簡稱 LPS) 引起之致命的毒性 (16-17)。由此可見研究 PTKs 抑制劑的重要性。

傳統上，苦寒性中藥常被用來治療實症狀態的病變，如溫病條辨或傷寒論中，大量使用大黃、黃蓮、黃芩、羚羊角等苦寒的藥物來治療實熱症 (18-21)，而我們推測這些實熱症的表現，可能是由細胞過度活化的狀態所引起。而細胞活化狀態又與蛋白激酶的活性有關，特別是 PTKs 的活化。一般而言，蛋白激酶先透過細胞表面的訊息傳導而活化，然後再活化其它細胞內的蛋白質或蛋白激酶，使細胞在活化狀態 (22-25)，因此我們認為苦寒性中藥是透過抑制蛋白激酶的活性而發揮作用，特別是 PTKs 的抑制作用，事實上已有些證據顯示我們推測的合理性：除了中醫文獻處方中，苦寒藥被用於實證的場合外，由一些苦寒藥中萃取的成份 emodin 可抑制 PTKs 的作用即可證明此一觀點。為了進一步證明我們的假設，我們將建立一套篩選 PTK inhibitors 的方法，並探討大黃、黃柏及龍膽草的作用途徑。

我們所使用的方法是利用 LPS，刺激血液之單核細胞 (peripheral mononuclear cells)，然後再利用三種中藥的淬取液與其作用，經過 time course 及 dosage 的反應後分離蛋白質做 Western blot，測蛋白質磷酸化的變化，以決定所測的中藥是否有 PTK 的抑制作用 (26-29)。

二、材料及方法

- (一) **中藥之萃取**：將 5 g 的中藥粉溶於 100 ml 之水或 100 ml 之 50%酒精中，在 110-120 °C 之 glycerol bath 中煮沸至體積只剩 50 ml，利用 Whatman No.1 filter paper 過濾，去除固體物，過濾後的液體在 20000 rpm 離心 20 分，取上清液分別放入 2 c.c. 之 tube 中再利用 speed vacuum 脫水乾燥。進行實驗時，再將 2 c.c. 之 RPMI 1640 medium 加入 tube 中溶解中藥，然後再離去以 0.22 μ M Millipore 過濾，所得的溶液即當做 100% (100mg/ml)，再稀釋成不同濃度以進行實驗 (26-29)。
- (二) **人類單核細胞的收集**：主要利用 Ficoll-Hypaque 離心分離單核細胞，然後去除沒有附著能力的細胞，將有附著能力的細胞調至 2×10^6 /ml 之濃度在 RPMI 1640 medium, 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin 中培養 (26-29)。
- (三) **中藥與單核細胞的作用**：分別以 LPS 或其它可促進 tyrosine kinase phosphorylation 的物質刺激單核細胞，然後再以不同濃度之苦寒性中藥與其作用 (26-29)。
- (四) **Preparation of cell lysates 及 anti-phosphotyrosine immunoblotting**：其方法如 Weinstein 等 (30)。作用於之細胞以內含 1mM Na_3SO_4 之 ice-cold PBS Wash，然後利用 lysis buffer 將細胞破壞 (lysis buffer 的成份為 20mM Tris-HCl, pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4 , 2mM EDTA, 1mM PMSE, 20 μ M leupeptin 內含 0.15 unit aprotinin)，細胞之 lysed 再以 $1000 \times g$, 15 min,

三、結果

(一) 龍膽草對於單核球某些蛋白質經 16 小時刺激後，有促進 tyrosine phosphorylation 的作用，但有一些則有抑制作用 (圖一)，而其促進的作用與 LPS 不同 (圖二)。而龍膽草與 LPS 共同作用下，可促進與單一各別刺激產生不同的蛋白質 tyrosine 的 phosphorylation (圖三)，基本上龍膽草並無抑制 LPS 的作用，而圖四則為不加藥的 control。

(二) 龍膽草對於單核球某些蛋白質經 16 小時刺激後，有促進 serine/threonine phosphorylation 的作用，但有一些則有抑制作用 (圖五)，其作用的蛋白質與 LPS 作用不同 (圖六)，而龍膽草對於 LPS 的作用並無抑制作用 (圖七)，而 (圖八) 為不加藥的 control。

(三) 黃柏對於單核球某些蛋白質 serine 及 threonine 有抑制 phosphorylation 的作用，特別是在較高濃度時 (圖九) 其作用並不受 LPS 刺激的影響。(圖十)而對於 tyrosine 的 phosphorylation 也有類似的結果。

(四) 大黃對於單核球的大部分蛋白質的 tyrosine 有抑制 phosphorylation 的作用，特別是在較高濃度時 (圖十一)，其作用並不受 LPS 刺激的影響 (圖十二)。

四、討論

在本研究中，我們探討了龍膽草、大黃、黃柏三種苦寒藥，對於蛋白質激酶的作用。我們是由蛋白質 tyrosine, serine 及 threonine 之磷化的變化，來探討其作用。我們的結果顯示，雖然它們均屬於苦寒性中藥，但其影響蛋白質激酶有很大的不同。以大黃而言，在高濃度時，其全面性的抑制作用即產生，就是有 LPS 刺激下亦不受影響。而黃柏也會影響蛋白質激酶的作用，但並沒有如大黃般全面性的影響，它只影響少部分的蛋白質，而加入 LPS 後反而可促進其部分的作用。至於龍膽草的作用，則完全同，除了可促進或抑制某些蛋白質激酶的作用外，與 LPS 共同作用下甚至可促進完全不同蛋白質的磷酸化。

五、結論與建議

苦寒藥的作用基本上是透過蛋白質激酶的活化或抑制而產生，而且大致如大黃，大部分抑制小部分促進如黃柏，大部分促進小部分抑制如龍膽草。到底是那些蛋白質受到影響，或其牽涉到的路徑，須要進一步的探討。

六、参考文献

1. Bishop JM. (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 335: 305-311.
2. Ross R. (1989) Platelet derived growth factor. *Lancet* 1: 1179-1182.
3. Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, Bennet GL, Pittelkow MR, Coffey RJ, Ellingsworth L, Denrynk R & Voorhees JJ. (1989) Overexpression of transforming growth factor α in psoriatic epidermis. *Science* 243: 811-814.
4. Vassar R & Fuchs E. (1991) Transgenic mice provide new insights into the role of TGF α during epidermal development and differentiation. *Gene & Dev* 5: 714-727.
5. Salamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Vdove J, Ulrich A & Press MF. (1989) Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712.
6. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L & Robinson RA. (1990) P^{185neu} Expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 50: 5184-5191.
7. Hou L, Shi D, Tu SM, Zhang HZ, Hung MC & Ling D. (1992) Oral cancer progression and C-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett* 65:215-220.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A & McGuire WL. (1987) Human breast Cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.
9. Yu D, Hamada JI, Zhang H, Nicolson GL & Hung MC. (1992) Mechanisms of neu

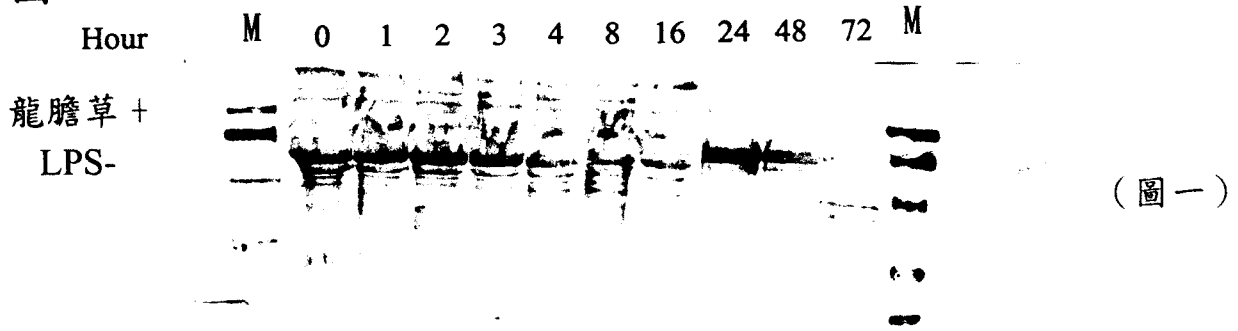
- oncogene induced metastasis and abrogation of metastatic properties by the adenovirus 5 E1A gene product. *Oncogene* 7: 2263-2270.
10. Yu D, Wang SS, Dulski KM, Tsai CM, Nicolson GL & Hung MC. (1994) C-erb β -2/neu Over-expression enhances metastatic potential of human Lung Cancer Cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res* 54:3260-3266.
 11. Jayasuriya H, Koonchanok NM, Geahlen RL, McLaughlin JL & Chang CJ. (1992) Emodin. A protein tyrosine kinase inhibitor from polygonum cuspidatum. *J Nat Prod* 55: 696-698.
 12. Chan TCK, Chang CJ, Koonchanok NM & Geahlen RL. (1993) Selective inhibition of the growth of RAS-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1152-1158.
 13. Zhang L, Chang CJ, Bacus SS & Hung MC. (1995) Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res* 55: 3890-3896.
 14. Zhang L & Hung MC. (1996) Sensitization of Her-2/neu overexpressing non-small cell lung cancer cells to chemotherapeutic drugs by tyrosine kinase inhibitor emodin. *Oncogene* 12: 571-576.
 15. Zhang L, Lau YK, Xi L, Hong RL, Kim DSHL, Chen CF, Hortobagyi GN, Chang CJ & Hung MC. (1998) Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and its metastasis-associated properties.

Oncogene 16:2855-2863.

16. Levitzki A. (1992) Tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. FASEB J 6: 3275-3282.
17. Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya M, Gazit A, Osherov N & Levitzki A. (1994). Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. Science 264: 1319-1322.
18. 中醫方藥學，啟業書局
19. 溫病條辨，明吳鞠道
20. 傷寒論，漢張仲景
21. 本草從新
22. Yarden Y & Ullrich A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. Annu Rev Biochem 57: 443-478
23. Signal transduction review issue. (1995). Cell 80: 179-278
24. Dhanasekaran N & Reddy EP. (1998) Signaling by dual specificity kinases. Oncogene 17: 1447-1455.
25. Kerkhoff E & Rapp UR. (1998) Cell cycle targets of Ras/Raf signaling. Oncogene 17: 1457-1462.
26. Chang JG, Shih PP, Chang CP, Chang JY, Wang FY & Tesng J (1994). The stimulating effect of Radix aconiti extract on cytokines secretion by human mononuclear cells. Planta Medical 60: 576-578.

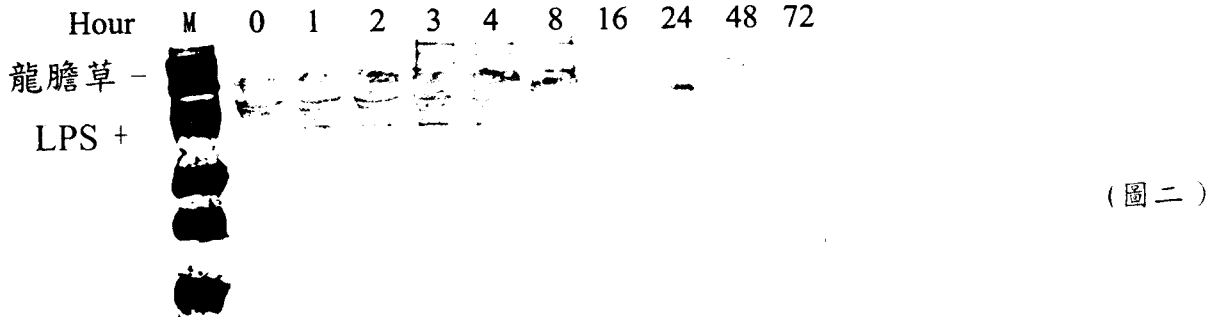
27. Chang CP, Chang JY, Wang FY & Chang JG (1995). The effect of Chinese medicinal herb *Zingiberis rhizoma* extract on cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol* 48: 13-19.
28. Chang CP, Chang JY, Wang FY, Tseng J & Chang JG (1995). The effect of *Evodia rutaecarpa* extract on cytokines secretion by human mononuclear cells in vitro. *Am J Chin Med* 23: 173-180.
29. Chang JY, Yang TY, Chang CP and Chang JG (1996). The effect of "Chi-Han" (hot nature) Chinese herbs on the secretion of IL-1 β and TNF- α by mononuclear cells. *Kaohsiung J Med Sci* 12: 18-24.
30. Weinstein SL, Gold MR * DeFranco AL. (1991) Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4148-4152.

七、圖



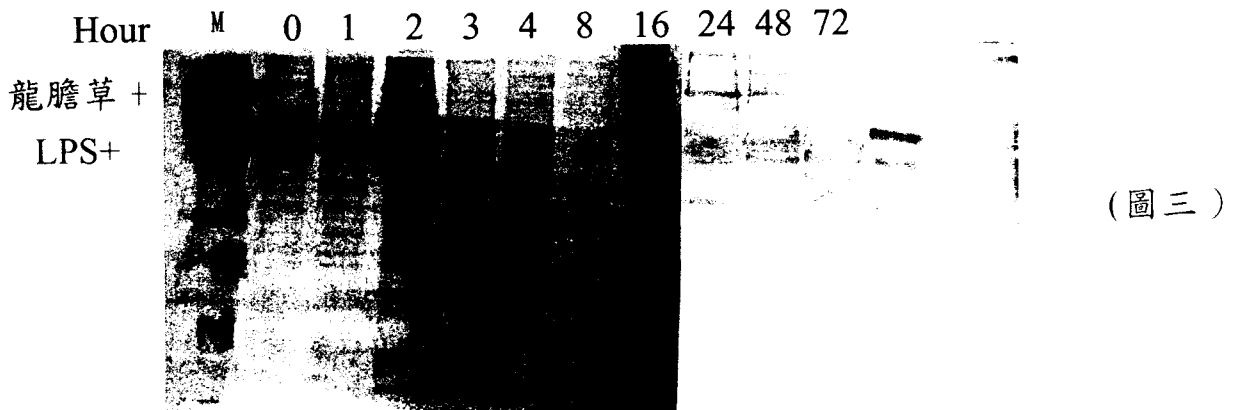
(圖一)

經龍膽草 24 小時作用後，蛋白質 tyrosine phosphorylation 產生變化，部分被增加，而有一些反被抑制，特別是較大的蛋白質。M: marker



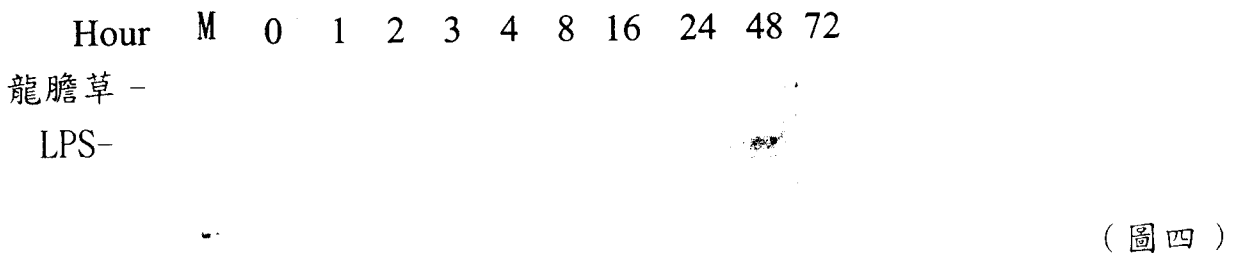
(圖二)

上圖龍膽草的作用與 LPS 刺激後之結果不用



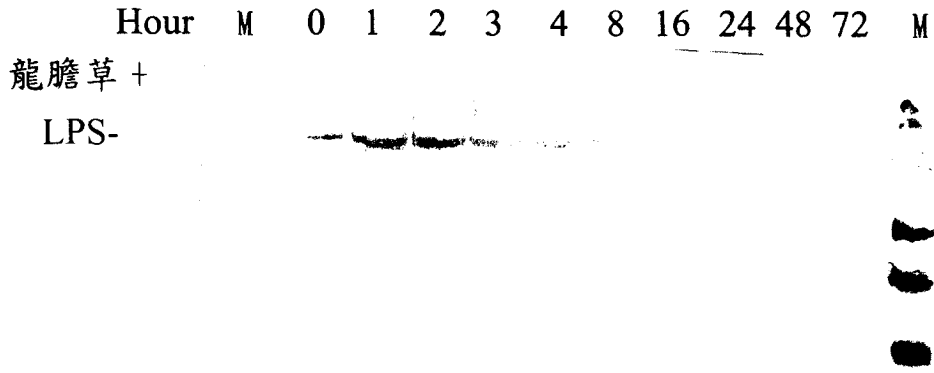
(圖三)

龍膽草與 LPS 同時刺激，可產生新的蛋白質 tyrosine 的磷酸化



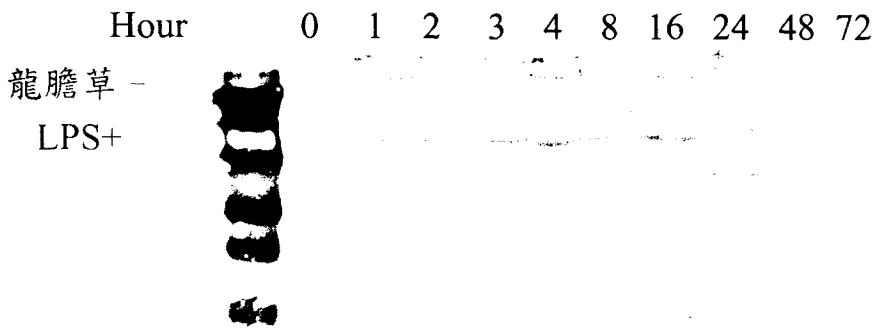
(圖四)

沒加藥的對照組



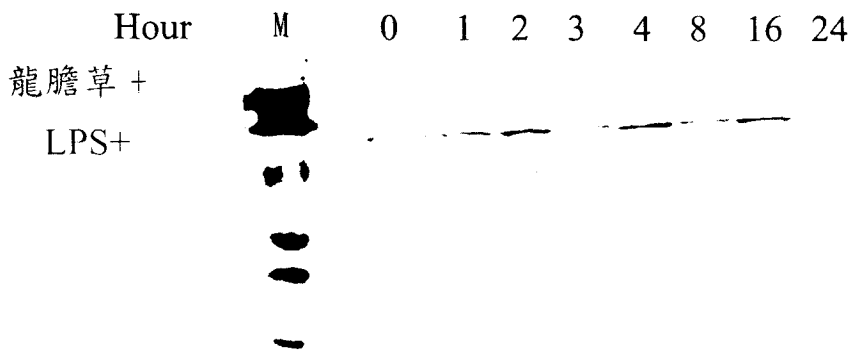
(圖五)

經龍膽草作用後，某些蛋白質的 serine/threonine 被磷酸化增強，但在 16 小時後，則被抑制



(圖六)

經 LPS 作用後蛋白質的 serine/threonine 磷酸化的表現與龍膽草不同



(圖七)

龍膽草對 LPS 並有抑制作用

M 0 1 2 3 4 8 16 24 (hr)

龍膽草 -

LPS-



(圖八)

不加藥的對照組

M 0 1/1000 1/100 1/10 1 10

黃柏

LPS+



(圖九)

黃柏對於某些蛋白質 serine 或 threonine 有抑制作用，特別是在高濃度時

0 1/1000 1/100 1/10 1 10

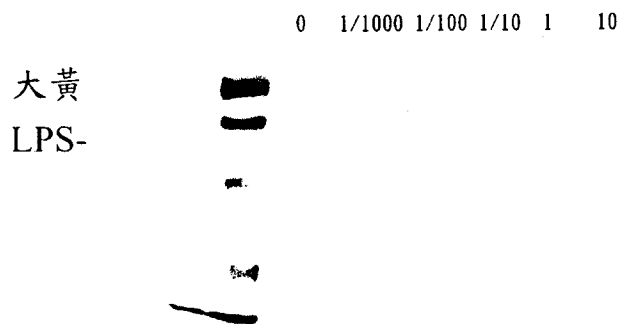
黃柏 +

LPS+



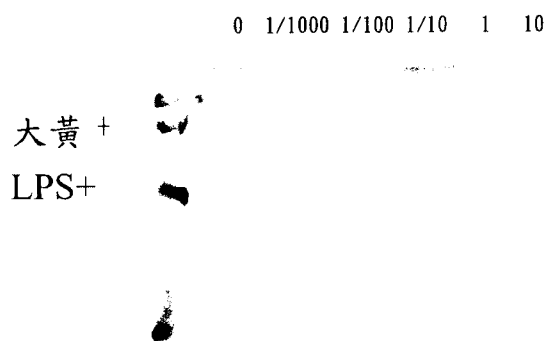
(圖十)

黃柏對蛋白質 serine 或 threonine phosphorylation 抑制作用並不受 LPS 刺激的影響



(圖十一)

大黃對於蛋白質的 tyrosine phosphorylation
有抑制作用，特別是在高濃度



(圖十二)

大黃對於蛋白質 tyrosine phosphoation
的抑制作用並不會受 LPS 的影響