

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

薑黃索引發抗發炎機制之探討與應用

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNCS-91-11

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：林朝賢

共同主持人：

計畫參與人員：林朝賢

執行單位：化妝品應用與管理系

中華民國 92 年 2 月 28 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

題目：薑黃素引發抗發炎機制之探討與應用

計畫編號：CNCS-91-11

執行期限：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

主持人：林朝賢 nchlin@mail.chna.edu.tw

執行機構單位名稱：化妝品應用與管理系

一、中文摘要

本實驗主要目的想進一步瞭解薑黃素的衍生物 1-(2-Hydroxyphenyl)-3-phenyl-1,3-propanedione (DP-17)、1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-3-phenyl-1,3-propanedione (DP-19)、Dibenzoylmethane (DBM)，這些化學結構為 β -diketone 類似衍生物，在人類直腸癌細胞 COLO205，執行細胞程式死亡 (apoptosis) 上所扮演的角色。實驗大致上利用 DNA 階梯狀段裂 (fragmentation) 及分析凋亡蛋白質酵素 (caspases) 的活化技術完成、初步結果發現對 COLO205 細胞執行細胞程式死亡 (apoptosis) 活性為 HDB > HMDB > DBM。HDB 誘導細胞程式死亡可經由粒線體路徑。因此適合開發成抑癌劑 (cancer chemopreventive) 藥物。

關鍵詞：薑黃素，細胞程式死亡，nitric oxide synthase (iNOS)

Abstract

The structurally related β -diketone, such as Dibenzoylmethane (DBM), hydroxy

-dibenzoylmethane (HDB), hydroxymethyl-dibenzoylmethane (HMDB), were able to induced apoptosis in COLO205 human colorectal cancer cells. Thus, the effect of structurally related β -diketone on cell viability, DNA fragmentation and Caspase activity was assessed. Treatment these compounds caused Caspase 3 activity increase by dose-dependent and stimulated proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). The potency of these compounds on these features of apoptosis were in the order of : HDB > HMDB > DBM in COLO205 cell. Overall, our results indicate the HDB induced COLO205 cancer cell apoptosis through mitochondria pathway The induction of apoptosis by dibenzoylmethane analogs may provide a pivotal mechanism for its cancer chemopreventive action.

二、緣由與目的

薑黃素已證實會影響人類血癌細胞 HL-60 細胞粒腺體的膜電位改變，使 cytochrome c 會從粒腺體釋放至細胞質，同時活化 caspase-9，進而活化 caspase3，再者，

caspase3。

由以前的研究資料中發現薑黃素可明顯的抑制 lipopolysaccharide(LPS)誘發 iNOS 蛋白及其基因的表現，其機制是 curcumin 透過抑制 NF κ B 的活性來制 iNOS 基因的表現，再由 I κ B 和 NK κ B 蛋白質的分佈發現，薑黃素可透過抑制 LPS 誘發的 I κ B 蛋白質進入細胞核啟動基因的能力。許多研究顯示薑黃素可藉由不同的機制來抑制癌症的生成作用，薑黃素可以抑制代謝活化作用及促進致癌物質的去毒作用，在致癌過程的 post-initiation phase，薑黃素可以抑制 TPA 所誘發的 ornithine decarboxylase(ODC) 活性，細胞增生和癌症促進作用。薑黃素亦具有很強的抗氧化和清除自由基的能力，薑黃素一方面直接提取 ROIs，另一方面則直接抑制自由基生成酵素，如 arachidonic acid-cyclooxygenase cascade enzymes (cyclooxygenase 及 lipoxygenase) 及 XO (xanthine oxidase) 的活性，以便間接減少自由基的產生。食用薑黃素的小鼠和大鼠減少皮膚、直腸、口腔等致癌處理而引起癌瘤形成的機率。薑黃素可以抑制 PKC，EGF-receptor 之 tyrosine kinase 及 I κ B kinase 之活性，薑黃素可抑制 NF κ B 活性及各種 nuclear oncogen 如 c-jun，c-fos，c-myc 及 iNOS 之表現；薑黃素具有抗癌的能力，在臨床上以薑黃素處理可明顯減少癌瘤所造成的組織潰爛。

在許多細胞生物的胚胎發育過程中都會面臨到一些細胞內在的變化，這其中包含細胞增生(proliferation)、分化(differentiation)和死亡(cell death)。細胞死亡的方式大略可分為二種：細胞凋亡(apoptosis)與細胞壞死(necrosis)，其中 apoptosis 在腫瘤細胞的增生

中扮演重要角色。細胞凋亡的形態學特徵包括細胞會收縮、細胞質濃縮、染色質濃縮、細胞形態變得不規則而且有段裂(fragmentation)及由凋亡細胞脫落出細胞凋亡體(apoptotic body)，在生化學上細胞凋亡的特徵包括細胞膜變化、凋亡蛋白質酵素(caspases)的活化、細胞的 DNA 會被 endonuclease 分解切割成約 180 鹼基對的大小倍數而在凝膠電泳呈現由大至小分子量的階梯狀。Apoptosis 是一種細胞受環境刺激後，在基因調控之下所產的自然死現象，調控 apoptosis 的因子目前已被陸續發現，包括(1)傳遞 apoptosis 訊息的蛋白質，如 fas、fas ligand，TNF α 、TNFR1 等，(2)導致 apoptosis 的因子如 p53，則會使細胞 DNA damage，這也被認為其可抑制癌症的原因。腫瘤是由一群不正常分裂的細胞所組成，在正常組織中其細胞族群維持一個平衡，也就是細胞的增生率與死亡率維持一定；但在腫瘤細胞剛好相反，其增生速率遠大於死亡速率，所以放群數目一直擴大，所以誘使腫瘤細胞的死亡率上升同時抑制其增生為治療癌症的一大方針。

三、結果與討論

為了證明 curcumin 和其衍生物具有去除自由基效果，利用 DPPH 自由基活性去除實驗，比較 curcumin、DBM、HDB 和 HMDB 各種濃度與 150 μ M 的 DPPH 以 OD517 讀值代表自由基清除率，從 Fig. 1(A)代表 curcumin 清除自由基能力確實比 DBM、HDB 和 HMDB 要好。

欲了解這些抗氧化物對細胞執行細胞程序死亡(apoptosis)上所扮演的角色，利用 MTT 試驗人類直腸癌細胞 COLO205 對藥物反應後的存活率比較。結果發現 HDB > HMDB > DBM，顯示 HDB 毒性較低，參考 Fig 2。

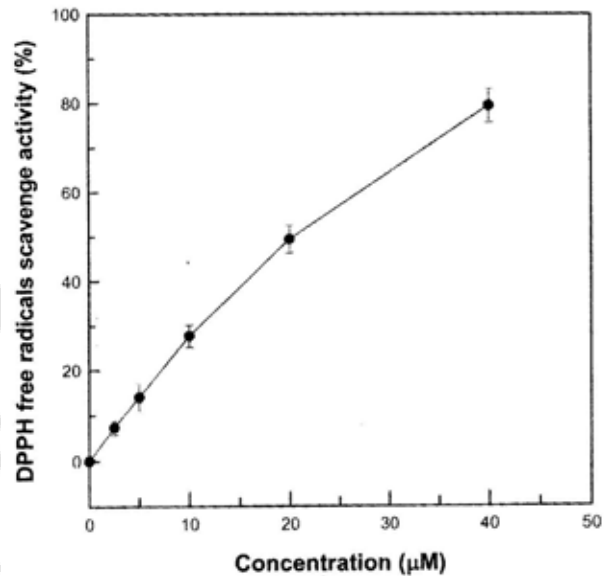
DNA 階梯狀段裂(fragmentation)及分析
 凋亡蛋白質酵素(caspases)的活化技術完成、初
 步結果發現對 COLO205 細胞執行細胞程式死
 亡(apoptosis)活性為 HDB > HMDB > DBM 參
 考 Fig. 3。

六、圖表

Fig. 1

四、計畫成果自評

1. 探討薑黃素及其衍生物(DB、DP-17、DP-19)的細胞毒性比較。
2. Curcumin 及其衍生物(DB、DP-17、DP-19)對自由基之清除作用之比較。
3. 探討薑黃素及其衍生物(DB、DP-17、DP-19)對 lipopoly- saccharid (LPS) 誘發 RAW247.4(巨噬細胞)產生 inducible nitric oxide synthase(iNOS)的活性比較。



五、參考文獻

- [1] Liang Ye, Yan Chaohua and Schor Nina F. (2001) Apoptosis in the absence of Caspase3. *Oncogene* 20,6570-6578.
- [2] Li H, Cheng Y, Wang H, Sun H, Liu Y, Liu K, Peng S. (2003) Inhibition of nitrobenzene-induced DNA and hemoglobin adductions by dietary constituents. *Appl Radiat Isot.* Mar; 58(3):291-8.
- [3] Greenwald P, Milner JA, Anderson DE, McDonald SS. (2002) Micronutrients in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21(3-4):217-30.
- [4] Devasena T, Rajasekaran KN, Gunasekaran G, Viswanathan P, Menon VP. (2003) Anticarcinogenic effect of bis -1,7 -(2-hydroxyphenyl) -hepta -1,6 -diene -3,5 -dione a curcumin analog on DMH-induced colon cancer model. *Pharmacol Res.* Feb;47(2):133-40.

(B)

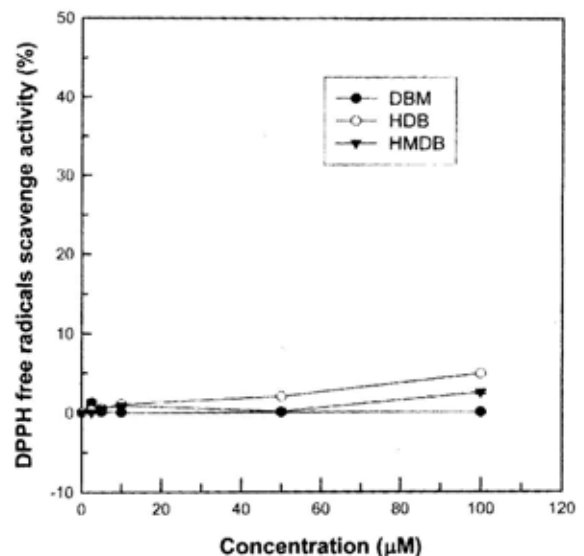


Fig. 2

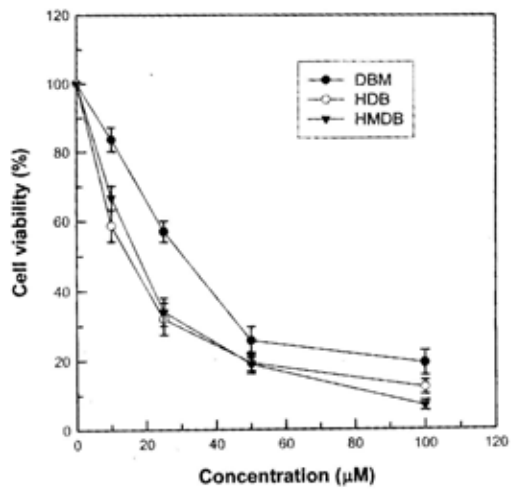


Fig. 3

