

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

中藥蛇床子及沙苑子抑制人乳癌細胞有效成分之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-041-007-

執行期間：92年08月01日至94年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：丁秀玉

共同主持人：陳榮秀，張自忠，林漢欽

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 94 年 11 月 9 日

一、摘要

本計畫從傳統中藥蛇床子 (*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.) 及沙苑子 (*Astragalus complanatus* R. Br.) 中抽取出抗乳癌之有效部分，其中發現蛇床子及沙苑子之正己烷萃取層和乙酸乙酯萃取層均具有抗乳癌之作用，再針對蛇床子及沙苑子之正己烷萃取層和乙酸乙酯萃取層進行抗乳癌有效成分離之研究。其蛇床子共得五個化合物，其化合物為 osthole (1)、bergapten (2)、imperatorin (3)、isopimpinellin (4) 及 β -sitosterol (5)。沙苑子共得六個化合物，其化合物為 2-(3- β -D-glucopyranosyloxy-4',5'-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-chromen-4-one (6)、3- β -D-glucopyranosyloxy-5,7-dihydroxy-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)-chromen-4-one (7)、kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (8)、rhamnocitrin 3-O- β -D-glucopyranoside (9) 3,5,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (10) 及 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (11)，上述化合物是經由各種光譜分析而確認其結構式。

上述化合物進行癌細胞毒性試驗，其結果顯示化合物 β -sitosterol (5)、3- β -D-glucopyranosyloxy-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-chromen-4-one (7)、kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (8) 及 rhamnocitrin 3-O- β -D-glucopyranoside (9) 對人乳癌細胞 MDA-MB231 有抑制作用。

關鍵詞：蛇床子、沙苑子、細胞毒性

二、前言

乳癌是西方婦女癌症第一位，在我國則為第四位(僅次於肺癌、肝癌、結腸癌)，而且中西方乳癌，從遺傳基因變異來看是乎有些不同。故從預防與治療角度考量，此類藥物之研究在我國有其迫切性。雖然目前已有 tamoxifen 藥物可供使用，但由於其副作用(子宮頸癌及中風)，又使得使用者造成恐懼心理。故新的安全性高且副作用低之藥物開發有其必要性。

引起乳癌之高危險群除了熟知之遺傳因子變異外，女性荷爾蒙之改變對乳癌的發生，仍扮演有決定性之角色。當婦女停經時，顯示從中年步入老年女性，estrogen 不再分泌，因 estrogen 量減少，顯然引起許多症狀，如骨質疏鬆、動脈硬化(心臟血管疾病)、結腸癌及記憶力衰退(如阿滋海默症)。故醫學上採用婦女荷爾蒙(estrogen)補充療法對延緩老化病症有其重要性，但因使用 estrogen 有加速乳癌產生之陰影，也阻止了婦女使用此療法來防止或治療更年期後各種症狀。

Tamoxifen 為西方常用來治療乳癌之藥物，但也產生許多嚴重副作用，如引起子宮內膜癌與可能因是產生血栓而引起中風，故更安全性(或副作用性小)之治療乳癌藥物研發有其重要性。流行病學之研究，顯示東方人因攝食黃豆而相對減少乳癌發生率，相較於西方開發中國家，東方國家只有其四分之一發生率。有趣的是，黃豆除營養素高外(含蛋白質)，在中國傳統藥物中它是解毒藥，中藥中之有毒中藥常用黃豆來炮製以減少其毒性。由於近年來拜受科學進步之研究，已有千篇論文以上研究它，因而他減少乳癌之發生機轉逐漸被人發現，它的成分 isoflavones 中之 genistein 及 daidzein 具有乳癌細胞 estrogen 致效劑(agonist)之作用，因而減少更年婦女之骨質疏鬆或動脈硬化。但其 estrogen 之作用，在理論上應會惡化乳癌患者，但是事實上它是抑制乳癌，其原因經研究為 genistein 另有其他作用機轉，如它有 tyrosine kinase 抑制作用及血管新生抑制作用，另外也發現它能誘導乳癌細胞進行計劃性死亡(apoptosis)。因此從傳統中藥中找抗乳癌尋藥物是一項值得努力之工作。

三、材料與方法

(A)有效成分萃取步驟：

中藥蛇床子活性成分之研究，乃依其生物活性為導向進行分離及純化。先以乙醇抽取，將抽取物用不同極性之溶媒多次分配萃取，並進行測試其生物活性(T47D 及 MDA-MB231 細胞試驗)作分離純化有效成分之方向。因有效成分存在於正己烷萃取層及乙酸乙酯萃取層，故此二部份萃取物再進一步層析分離，分離物(Fractions)會再進一步以生物檢定追蹤直到真正有效成分分離出來。

(B)萃取物之成分分離：

(a) 萃取物之成分分離 — n-Hexane 萃取物

原則性以正相吸附層析分離為主要之方法(輔之以逆相層析方法)。萃取物

(b) 萃取物之成分分離 — EA 萃取物

先以逆相層析分出極性大小不同成分，若極性較大之成分，以逆相層析分離(中壓層析(C-8)或低壓層析 C-8 或 C-18)；極性較小之成分，則以正相層析(如矽膠)分離純化，如無法純化則再轉以逆相層析。

(C)有效成分之鑑定：

利用大家所熟知之 ^1H NMR 及 ^{13}C NMR (1D 或 2D NMR)，輔之以其他光譜(如 IR，UV)及質譜(Mass)來鑑定化學結構。如有其他各種光學異構物存在，難以決定絕對結構，可以以 X-ray 方式來測定其化學結構。

(D)細胞培養篩選有效成分試驗：

此方法是一種大家所熟知之篩選試驗，利用癌細胞(約 10^4 細胞/well)，分成對照組(只加溶解藥物溶媒，DMSO)，給藥組(萃取物或純化物)及正對照組(臨床治乳癌藥物，tamoxifen)培養 48 小時後測定細胞量，然後利用給藥組-對照組/對照組可得出癌細胞增加百分比(給藥組細胞>對照組)或癌細胞抑制百分比(給藥組<對照組)。癌細胞量之測定是利用存活細胞具有氧化還原之能力，而將加入試劑(tetrazolium salt)還原成 formazan 結構，因 tetrazolium 及 formazan 之紫外光吸收不同，故利用 formazan 之吸收波長(490 nm)可直接得到吸光度(Absorbance)。因此，吸光度大小反映活的癌細胞數(此試驗利用國防醫學院生化系設備及由生化系張自忠教授指導下進行)。

四、結果

表一、蛇床子萃取物對 estrogen 非依賴型人乳癌細胞(MDA-MB231)之細胞實驗

抑制百分比(相對於不給藥之對照組)			
濃度(M)			
	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Tamoxifen(正對照組)	+ 6.5	+10.7	- 84.0
濃度(ug/ml)			
	10	100	300
n-Hexane layer	+ 8.0	- 89.9	- 94.5
Ethylacetate layer	- 31.6	- 98.8	- 85.3
n-BuOH layer	+ 25.4	+ 15.5	- 33.7

表二、沙苑子子萃取物對 estrogen 非依賴型人乳癌細胞(MDA-MB231)之細胞實驗

抑制百分比(相對於不給藥之對照組)			
濃度(M)			
	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Tamoxifen(正對照組)	+ 6.5	+10.7	- 84.0
濃度(ug/ml)			
	10	100	300
n-Hexane layer	+ 2.3	- 61.2	- 51.7
Ethylacetate layer	+ 3.8	- 19.0	- 69.2
n-BuOH layer	+ 2.3	+ 57.6	+ 31.3

表三、蛇床子及沙苑子子純化合物對 estrogen 非依賴型人乳癌細胞(MDA-MB231)之細胞實驗

compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
IC ₅₀ (uM)	> 100	> 100	> 100	> 100	37.4	> 100	70.5	35.5	47.1	> 100	> 100

五、結論

本計畫之研究結果發現傳統中藥蛇床子及沙苑子進行抗乳癌細胞有效成分分析時，其中蛇床子及沙苑子之正己烷萃取層和乙酸乙酯萃取層均具有抗乳癌之作用，則進行有效成分之純化分離，蛇床子共得五個化合物，其化合物為 osthole (1)、bergapten (2)、imperatorin (3)、isopimpinellin (4) 及 β -sitosterol (5)。沙苑子共得六個化合物，其化合物為 2-(3- β -D-glucopyranosyloxy-4',5'-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-chromen-4-one (6)、3- β -D-glucopyranosyloxy-5,7-dihydroxy-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)-chromen-4-one (7)、kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (8)、rhamnocitrin 3-O- β -D-glucopyranoside (9) 3,5,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (10) 及 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone(11)。

將上述化合物進行抗乳癌細胞試驗，其結果顯示化合物 β -sitosterol (5)、3- β -D-glucopyranosyloxy-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-chromen-4-one (7)、kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (8) 及 rhamnocitrin 3-O- β -D-glucopyranoside (9) 對人乳癌細胞 MDA-MB231 有抑制作用。