

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Aloe-emodin 調控皮膚細胞中 DNA 修補酵素活性之機轉探討 及預防與治療 UV 誘導皮膚癌之療效評估

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2312-B-041-003-

執行期間：94 年 09 月 01 日至 95 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：梁家華

共同主持人：郭國華，許漢銘

計畫參與人員：李美鳳

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 11 日

一、摘要

許多環境的物理或化學因子會導致 DNA 發生變異而致使細胞發生突變，UV-B 是最容易對皮膚造成傷害而使細胞 DNA 發生突變，也是皮膚癌的重要起因。核苷酸切除修補為哺乳類動物細胞移除、修復紫外線及許多常見突變原所造成的 DNA 損傷之主要修補方式。許多文獻報導中指出非黑色素細胞皮膚癌的起因與核苷酸切除修補活性的降低有關。本計畫以蘆薈大黃素(Aloe-emodin)作用於人類皮膚癌細胞株(SCC)和人類皮膚角質化細胞株(HaCaT)後，透過 MTS 分析、觀察細胞型態之變化測定，來評估經不同濃度的蘆薈大黃素後，SCC 和 HaCaT 不同的影響與差異，並探討蘆薈大黃素增強 DNA 修補及調節核苷酸切除修補的基因表現，進而增強 DNA 的修補能力相關之機轉，而有預防紫外線引起之皮膚癌作用，並期望能開發有效及專一性的皮膚癌預防及治療上之藥物。

關鍵字：皮膚癌、DNA 修補、核苷酸切除修補、蘆薈大黃素

二、緣由與目的

生物體的遺傳訊息幾乎都是儲存在 DNA 這巨分子內，所以 DNA 必須具有相當的穩定性才可將遺傳訊息一

代代傳遞下去而不發生改變。為了遺傳的穩定性，細胞本身即具有相當完善的複製(replication)與修補(repair)機制才能使 DNA 在複製時維持相當高的保留性及完整性。早期注意到癌症的發生(oncogenesis)特別是由控制細胞生長的基因發生突變(mutation)或落失(deletion)所導致，此顯示基因體(genome)的穩定性對於預防癌症生成是非常重要的(Hoeijmakers, 2001)。隨著時間演進，DNA 會累積許多改變，而這些改變會活化原致癌基因(proto-oncogene)及去活化腫瘤抑制基因(tumour-suppressor gene)，而 DNA 損傷(lesion)及 DNA 自發性的錯誤會驅使不穩定的基因誘發腫瘤生成(tumorigenesis)。修補系統(repair system)可以消除自發性或致癌因子引起的 DNA 變異，此對維持原核細胞(prokaryotic cell)或真核細胞(eukaryotic cell)生理及基因體的穩定上為一重要的角色，目前已證實許多癌症生成與先天或後天基因體修補系統出現瑕疵有關，所以 DNA 修補系統在人類基因體完整性的維持與癌症生成預防上扮演著關鍵性角色。中藥中已發現許多有效成分可以調節細胞活性。因此若能從中藥中篩選出具有促進 DNA 修補能力的化合物將有助於細

胞抵禦自發性突變或突變原、致癌物質所引起的DNA損害，並可預防癌症的發生。

三、研究方法

1. 細胞株與培養條件：SCC細胞培養於DMEM-F12，HaCaT細胞培養於DMEM，0.37%碳酸氫鈉、0.03%麩胺酸、FBS 10%以及100 U/ml penicillin + 100 µg/ml streptomycin的培養液中。

2. 四錯鹽分析法測試細胞毒性(MTS tetrazolium salt assay)：將定量的細胞(1×10^4 /well)培養在96-well multiplates，並在37°C、5% CO₂培養箱中至少生長16小時以上，接著加入蘆薈大黃素於指定的時間作用後，先更換培養液，於每個well加入20 µl的MTS/PMS溶液反應3小時後，使用酵素免疫分析儀(ELISA reader 312e, Bio-TEK)於波長490 nm下測定其optical density。

3. 光學顯微鏡觀察細胞型態之變化：將細胞以 1×10^4 /well之密度培養於96-well培養盤中，並在37°C、5% CO₂培養箱中至少生長16小時以上，接著分別加入不同濃度的蘆薈大黃素於指定的時間作用後，於倒立式顯微鏡(Olympus)下，以40×及20×物鏡觀察細胞形態之變化，如細胞膜的變化、細胞內胞器、細胞內是否有空泡產生、

細胞核是否有皺縮並濃染及凋亡小體的產生，並將之拍照。

4. 聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)：取10 µl cDNA至微量離心管中，先後分別加入5 µl 10×Reaction Buffer、2 µl的25 mM MgCl₂、0.8 µl 10 mM dNTP (200 mM each dGTP、dATP、dTTP、dCTP)及各1 µl之50 µM upstream primer、downstream primer、*Taq* DNA Polymerase (5 unit/µl)，最後加入去離子水使總體積達50 µl。置於自動溫度循環機(Techno Progene)進行PCR反應，其反應條件如下：前變性反應(denaturation) 98°C 3分鐘一個循環；繼之變性反應 94°C、黏合反應(annealing) 60°C、合成反應(extension) 72°C各1分鐘之聚合酶鏈反應，總反應過程共進行35個循環。待反應完畢後，取出適量反應產物進一步以瓊脂凝膠電泳來分析。而用來半定量的β-actin其引子(primer)序列如下：5'-CGG AAC CGC TCA TTG CC-3'及5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA-3'。

5. 西方墨點(Western blotting)分析蛋白質的表現：本實驗方法是依據ECL Western Blotting Protocols。先將細胞溶解物取得之上層液做蛋白質定量分

析，取30~50 μg 的檢體進行上述之 SDS-PAGE，接著將凝膠上的蛋白質藉由轉漬槽轉漬到硝化纖維紙 (nitrocellulose paper, NC paper)上。在轉漬緩衝液[25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH8.3]中以固定電壓100伏特轉漬1小時。以5%低脂奶粉之Tris-buffer saline/Tween-20 (TBS-T) [20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH7.6] 緩衝液覆蓋 NC paper，其目的是將NC paper上之非特异性結合位置覆蓋(blocking)住，此 blocking可於室溫反應2小時或4°C隔夜反應。接著將blocking緩衝液移除，加入以blocking緩衝液稀釋之初級抗體 Mouse anti-XPA mAb (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (1:100)，於室溫下搖動使其均勻作用2小時。初級抗體使用濃度參考廠商或相關報告之建議，反應後之初級抗體一般可回收使用一至二次。初級抗體反應結合後，以TBS-T緩衝液清洗NC paper三次，每次5分鐘。接著加入以 blocking 緩衝液稀釋的 Horseradish peroxidase 所接合之二級抗體 (anti-mouse IgG) (1:1000)，在室溫緩慢震盪1小時，再以TBS-T緩衝液清洗NC paper五次，每次5分鐘。最後洗淨之 NC paper加入ECL冷光感應試劑(ECL chemi-luminescent-based detection system)作用後，以保鮮膜覆蓋並趕走

氣泡，使其平放在X-ray film感光，並於暗房內至入一高感度底片，底片以自動沖片機顯像(autoradiography)。沖洗後之底片以密度分析儀分析結果，進而瞭解欲測定之蛋白質在細胞內的表現。

6. 統計分析 (Statistical analysis)：以 unpaired Student's *t*-test、analysis of variance和Student's-Newman-Keuls test 來評估顯著性。P<0.05表示有統計上顯著性差異。數值是比較改變的百分比和控制組。

四、結果與討論

1. 利用 MTS tetrazolium salt assay 分析蘆薈大黃素對 SCC 和 HaCaT 細胞之細胞毒性探討：

對定量之 SCC 和 HaCaT 細胞投與濃度 0、1、2、4、6、8、10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之蘆薈大黃素作用 24、48 和 72 小時後進行 MTS 分析。其結果如 Figure 2 所示，由結果可知蘆薈大黃素對 SCC 和 HaCaT 細胞之細胞毒殺作用呈現濃度和時間效應 (dose- and time-dependent) 模式。

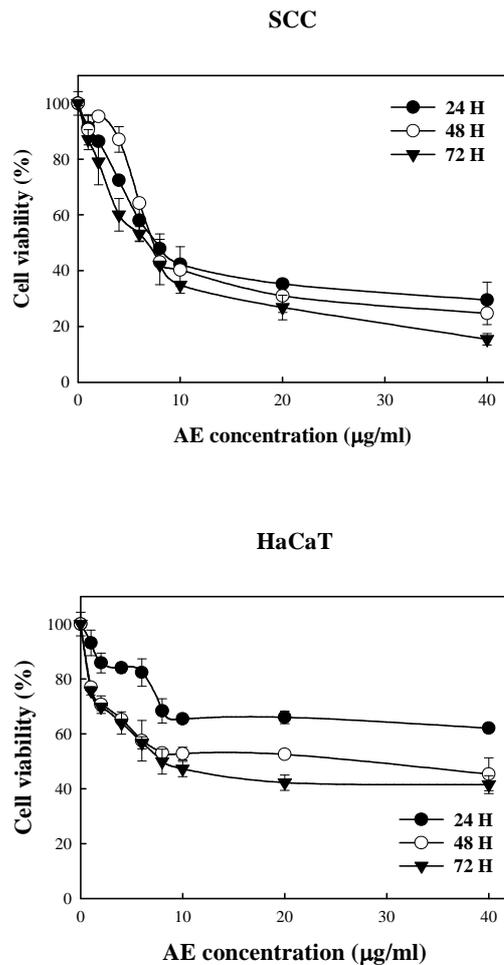


Figure 2. Dose and time dependency of Aloe-emodin-induced cell cytotoxicity in HaCaT and SCC cells. Cell viability was determined by the MTS assay. Data represents the mean \pm S.D. from three independent experiments.

2. 觀察蘆薈大黃素作用於 SCC 和 HaCaT 細胞之細胞型態變化：

將 SCC 和 HaCaT 細胞培養於 96-well 培養盤中，並在 37°C、5% CO₂ 培養箱中隔夜培養後，分別以對 SCC 和 HaCaT 細胞之 IC₅₀ 濃度的蘆薈大黃素作用反應 0、24、48 和 72 小時後，觀察細胞之型態變化。其結果如 Figure 3 所示，當蘆薈大黃素作用後，細胞發

生萎縮(shrinkage)，細胞核偏向一邊、染色質濃染(chromatin condensation)並出現細胞核分裂為數個核質(apoptotic bodies 的特徵)。

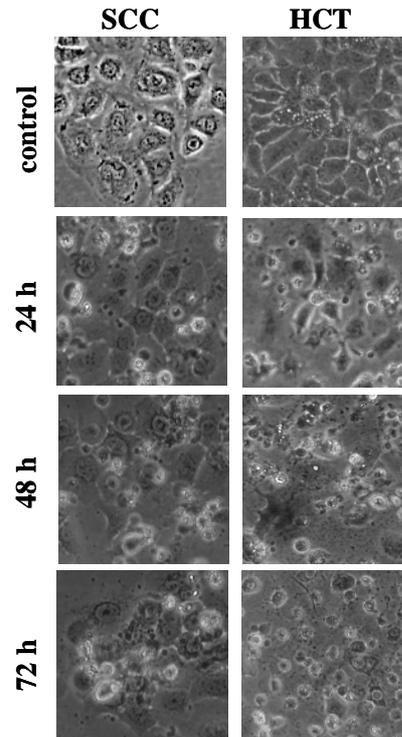
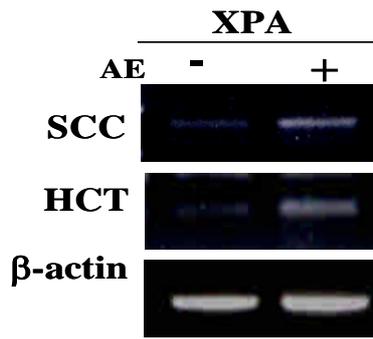


Figure 3. Morphological change of Aloe-emodin-induced apoptosis in SCC and HaCaT cells. The change was inspected by light-microscopy (200 \times).

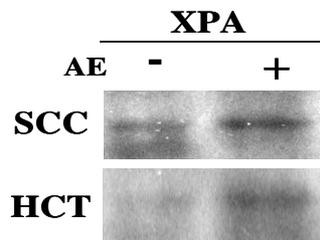
3. 參與核苷酸切除修補基因在 SCC 和 HaCaT 細胞中的表現情形：

結果發現經蘆薈大黃素作用後，XPA 在 SCC 和 HaCaT 細胞中之表現有顯著的增加，顯示經蘆薈大黃素作用後，能提升參與核苷酸切除修補基因 XPA 在 SCC 和 HaCaT 細胞中的表現情形。



4. XPA 蛋白質在 SCC 和 HaCaT 細胞中的表現情形：

結果發現經蘆薈大黃素作用後，XPA 蛋白質在 SCC 和 HaCaT 細胞中之表現有顯著的增加，顯示經蘆薈大黃素作用後，能提升參與核苷酸切除修補 XPA 蛋白質在 SCC 和 HaCaT 細胞中的表現情形。



五、結論

本研究依照計畫進行實驗，首先探討蘆薈大黃素具有的抗癌活性。來評估不同濃度的蘆薈大黃素在不同作用時間下於 SCC 和 HaCaT 細胞上不同的影響與差異。正常細胞中存有一套自動修補 DNA 變異之酵素組合，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。以蘆薈大黃素作用於 SCC 和 HaCaT 細胞後，能提升參與核苷酸切除修補 XPA 基因和蛋白質的表現情形。透過上述相關研究結果可以瞭解蘆薈大黃素於人類皮膚細胞生長作用上之調控，並希望能為新藥物之設計與研發與臨床上應用上提供另一種治療皮膚癌的方式，未來並將研究成果完成投稿。

六、參考文獻

1. Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
2. Parris, C.N., and Kraemer, K.H. (1993). Ultraviolet-induced mutations in Cockayne syndrome are primarily caused by cyclobutane dimer photoproducts while repair of other photoproducts is normal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7260-7264.
3. Pecere, T., Gazzola, M.V., Mucignat, C., Parolin, C., Vecchia, F.D., Cavaggioni, A., Basso, G., Diaspro, A., Salvato, B., Carli, M., and Palu, G. (2000). Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 60, 2800-2804.

4. Reardon, J.K., Thompson, L.H., and Sancar, A. (1997). Rodent UV-sensitive mutant cell lines in complementation groups 6-10 have normal general excision repair activity. *Nucleic Acids Res.* 25, 1015-1021.
5. Reed, J.C. (2001). Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.* 7, 314-319.
6. Reynolds, T. (1985). The compounds in Aloe leaf exudates: a review. *Bot. J. Linn. Soc.* 90, 157-177.
7. Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J., and Egly, J.M. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 13, 2388-2392.
8. Setlow, R.B., Grist, E., Thompson, K., and Woodhead, A.D. (1993). Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6666-6670.