

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNHN9504

計畫名稱：台灣民間藥活性成分研究-抗肺癌活性及作用機轉研究

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

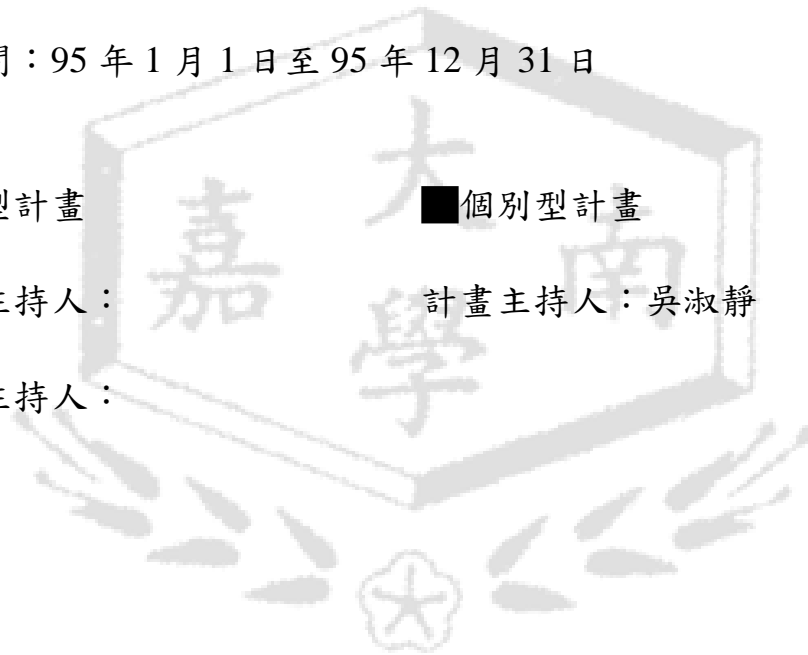
整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：吳淑靜

子計畫主持人：



(一)中文摘要

三十種台灣民間藥將以 1 種肺癌細胞株(A549)進行細胞培養，分為控制組及加入不同濃度藥物處理，於 48 小時培養後，再利用 MTT 試劑分析細胞生長抑制率來評估台灣民間藥之抗肺癌活性，結果發現以 MR3 酒精抽出物之毒殺肺癌細胞(A549)效力較其他熱水及酒精抽出物為佳。

(二)研究動機及目的

目前,對於三十種台灣民間藥物(包括熱水與酒精抽出物)之抗肺癌的活性並不清楚! 因此,本研究即以各不同抽出物對肺癌細胞(A549)的作用,以其細胞毒殺的效果進行實驗。在實驗中,評估台灣民間藥之抽出物對肺癌細胞株(A549)之抗癌活性。

(三)文獻回顧與探討

最近行政院衛生署所公佈的國人十大死因原因中，以惡性腫瘤(癌症)高居榜首，在臺灣地區近年來十大癌症死因排行榜中，肺癌仍高居第一位，這是值得國人重視的健康危害警訊(衛生署, 2005)。目前,臨床治療肺癌方面，常使用外科手術、化學療法(chemotherapy)、免疫療法(immunotherapy)、放射線療法或合併療法等來治療癌症,但

無任何方法能達到完全的根除癌細胞,使癌化細胞不會再發、聚集及轉移到其它的組織臟器中。因此,從天然藥物中尋求效力強且具安全性之新的生藥及其純化合物或方劑等,將是相當核心之重點研發工作。未來在治療癌症病患,可降低臨床抗癌藥物的劑量,以減輕對病人的副作用,並能達到有效的抗癌作用及延長壽命。

細胞凋亡(Apoptosis)是一種高等生物體必要之生理過程,在調控細胞的恆定中扮演著非常重要之角色。細胞凋亡被定義為一群細胞形態及生化改變之程序,包括 membrane bubbling、cell shrinkage、chromatin condensation、DNA fragmentation 及在漿膜的外側出現 phosphatidylserine (Schulze et al., 1998; Kim et al., 1999; Park et al., 2002)。相反地,壞死(necrosis)不會造成早期細胞膜之破壞但會引發細胞內容物釋放進入細胞間質中而導致組織發炎及壞死,其並非理想的抗癌機制途徑,若以細胞凋亡(apoptosis)為抗癌藥物之主導機制,可減低因藥物引發之負面影響 (Mukhtar et al., 1999)。本研究將針對台灣民間藥物之抗肺癌活性進行評估及討論。

(四)研究方法與步驟

1.抽出物之製備

熱水抽出物 100 gm 的藥物粉末使用 1 公升的熱水加熱煮沸 1 小時,以濾紙趁熱過濾,殘渣在相同的條件下,再加熱煮沸萃取兩次,

三次濾液收集、混合並經減壓濃縮到乾燥。

酒精抽出物 100 gm的藥物粉末使用1公升的95 %酒精在室溫下浸置3天，樣品使用濾紙 (Advantec No.1, Japan) 過濾，殘渣在相同的條件下萃取兩次,三次萃取液收集、混合並經減壓濃縮到乾燥。

3.細胞解凍與保存

本研究所使用之1種肺癌細胞株為(A549)。將貯存之細胞由液態氮中取出，立即放入37°C水浴使其快速解凍，將解凍之細胞移至含有37°C培養液的離心管中，以800 rpm 離心5分鐘，去除上清液後，以完全培養液均勻混合之，然後移入10 cm 的培養皿中，放入37°C的5% CO₂ 培養箱中培育。欲保存之細胞用胰蛋白酶 (trypsin/EDTA, TE)處理，以單離細胞，再取部分完全均勻分散的細胞懸浮液，以細胞自動計數器計算細胞數目，並取1x10⁶個細胞到無菌離心管中以800 rpm 離心5分鐘，除去上清液並以含有10 % dimethylsulfoxide (DMSO)之1 ml 完全培養液均勻混合後移入抗凍管中，置於-70°C的冰櫃靜置2小時後，再移至液態氮桶中貯存。

4.細胞培養

肺癌細胞株以含有 10 % 的 fetal bovine serum, sodium bicarbonate (0.22%, m/v) , 100 μ M non-essential amino acid(NEAA), 1mM sodium pyruvate, 0.03% penicillin/ streptomycin (100 U/ml)和 L-glutamine (0.33%, m/v)的 RPMI medium 培養，並置於 37°C 含有 5% CO₂ 之培養箱中生長。

5.藥物誘發之肺癌細胞生長抑制率(MTT 法)

取 10×10^4 cell/ml置於96 well的culture plate中，於95%O₂，5%CO₂之培養箱中培養12小時後，各加控制組及不同濃度藥物處理，入無PBS之培養基，待培養48小時後，加入50 μ l MTT試劑到每一well中，繼續培養4小時，以ELISA reader(波長550 nm)測定其光學活性(optical density,OD)，求細胞生長抑制率(%)。

(五)結果與討論

進行台灣民間藥包括(熱水及酒精)抽出物之抗肺癌活性篩選分析,結果發現經 48 小時之藥物作用，如表一及表二所示，以 MR3 酒精抽出物之毒殺肺癌細胞(A549)效力較佳(35.78 \pm 0.94 %),而其他抽出物之抗肺癌活性均表現較差。這些台灣民間藥物多數運用於治療尿酸症、骨質疏鬆症及糖尿病等方向，並不如預期適用於抗肺癌之方向，

因此下一步必要再尋找合適之藥理活性進行研究。

Table 1. The cell cytotoxicity values of some hot water extracts

Drug	Extraction	Dose (μ g/ml)	Inhibition rate (%) \pm SD
LC	H ₂ O	10	4.54 \pm 0.44
	H ₂ O	30	8.28 \pm 4.25
	H ₂ O	50	14.63 \pm 3.00
	H ₂ O	100	18.25 \pm 0.52
RT	H ₂ O	10	10.43 \pm 2.46
	H ₂ O	30	14.17 \pm 4.71
	H ₂ O	50	14.20 \pm 6.50
	H ₂ O	100	13.15 \pm 1.71
CD	H ₂ O	10	0.00 \pm 0.00
	H ₂ O	30	6.12 \pm 3.45
	H ₂ O	50	8.10 \pm 2.43
	H ₂ O	100	8.84 \pm 3.25
FA	H ₂ O	10	5.00 \pm 1.00
	H ₂ O	30	6.58 \pm 3.00
	H ₂ O	50	6.70 \pm 0.20
	H ₂ O	100	7.37 \pm 2.58
DP	H ₂ O	10	0.00 \pm 0.00
	H ₂ O	30	0.00 \pm 0.00
	H ₂ O	50	4.08 \pm 1.53
	H ₂ O	100	5.00 \pm 0.25
CKW	H ₂ O	10	8.39 \pm 2.16
	H ₂ O	30	9.40 \pm 3.00
	H ₂ O	50	8.96 \pm 0.73
	H ₂ O	100	12.25 \pm 2.23
BC	H ₂ O	10	0.00 \pm 0.00
	H ₂ O	30	4.08 \pm 0.90
	H ₂ O	50	5.00 \pm 1.53
	H ₂ O	100	6.70 \pm 2.25
CL	H ₂ O	10	3.63 \pm 2.72
	H ₂ O	30	0.23 \pm 0.30
	H ₂ O	50	5.80 \pm 2.23

	H ₂ O	100	8.96±1.53
HT	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	1.59±0.09
	H ₂ O	50	4.42±0.50
	H ₂ O	100	4.76±2.23
CAJAN	H ₂ O	10	1.25±0.20
	H ₂ O	30	4.31±1.29
	H ₂ O	50	9.18±2.78
	H ₂ O	100	9.18±2.36
AS	H ₂ O	10	18.03±2.78
	H ₂ O	30	19.05±0.90
	H ₂ O	50	23.92±3.75
	H ₂ O	100	25.40±1.68
FH	H ₂ O	10	6.00±0.62
	H ₂ O	30	6.35±0.98
	H ₂ O	50	8.05±2.35
	H ₂ O	100	9.41±2.58
PGM	H ₂ O	10	18.25±3.54
	H ₂ O	30	20.30±1.93
	H ₂ O	50	24.60±2.83
	H ₂ O	100	31.18±1.71
GJ	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	2.15±0.90
	H ₂ O	50	6.80±4.00
	H ₂ O	100	6.00±2.00
RSR	H ₂ O	10	3.86±2.00
	H ₂ O	30	7.03±2.77
	H ₂ O	50	9.64±1.53
	H ₂ O	100	32.99±7.00
CA	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	2.61±0.80
	H ₂ O	50	3.06±1.00
	H ₂ O	100	4.52±2.00
D2W	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	3.40±2.45
	H ₂ O	50	5.33±0.53

	H ₂ O	100	6.69±3.00
FRU247	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	5.56±0.71
	H ₂ O	50	9.52±0.34
	H ₂ O	100	13.83±2.41
MR	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	3.63±0.50
	H ₂ O	50	8.50±3.00
	H ₂ O	100	13.72±0.52
BL	H ₂ O	10	7.82±3.00
	H ₂ O	30	8.62±0.90
	H ₂ O	50	17.69±2.07
	H ₂ O	100	26.64±3.73
AI	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	0.23±0.39
	H ₂ O	50	1.25±0.53
	H ₂ O	100	2.27±0.25
PC	H ₂ O	10	5.44±1.00
	H ₂ O	30	6.24±1.80
	H ₂ O	50	7.03±4.00
	H ₂ O	100	12.00±3.92
PI	H ₂ O	10	0.91±0.59
	H ₂ O	30	0.00±0.00
	H ₂ O	50	6.01±1.42
	H ₂ O	100	10.09±1.71
PI20	H ₂ O	10	3.06±0.28
	H ₂ O	30	7.48±0.19
	H ₂ O	50	9.18±1.18
	H ₂ O	100	13.38±1.53
SS	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	0.00±0.00
	H ₂ O	50	0.00±0.00
	H ₂ O	100	2.00±0.07
POS	H ₂ O	10	0.00±0.68
	H ₂ O	30	0.34±0.00
	H ₂ O	50	3.18±0.71

	H ₂ O	100	4.31±1.37
FEB	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	0.00±0.00
	H ₂ O	50	0.00±0.00
	H ₂ O	100	1.13±1.00
FRU-1	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	4.98±0.40
	H ₂ O	50	5.44±0.82
	H ₂ O	100	5.78±0.46
BM	H ₂ O	10	0.00±0.00
	H ₂ O	30	1.70±0.72
	H ₂ O	50	1.93±0.33
	H ₂ O	100	2.83±0.25

Table 2. The cell cytotoxicity values of some ethanol extracts

Drug	Extraction	Dose (μ g/ml)	Inhibition rate (%)±SD
LC	Ethanol	10	12.44±1.71
	Ethanol	30	9.22±1.36
	Ethanol	50	13.76±1.40
	Ethanol	100	16.09±0.77
RT	Ethanol	10	0.00±0.00
	Ethanol	30	11.63±6.36
	Ethanol	50	11.00±4.79
	Ethanol	100	11.20±1.30
CD	Ethanol	10	0.00±0.00
	Ethanol	30	8.64±1.98
	Ethanol	50	8.22±0.74
	Ethanol	100	8.50±0.26
FA	Ethanol	10	19.11±1.98
	Ethanol	30	25.81±0.20
	Ethanol	50	29.84±2.72
	Ethanol	100	30.00±5.26
DP	Ethanol	10	13.37±9.79
	Ethanol	30	16.82±3.87
	Ethanol	50	19.42±1.99

	Ethanol	100	23.33±2.91
CKW	Ethanol	10	15.04±3.00
	Ethanol	30	15.70±7.40
	Ethanol	50	19.34±1.17
	Ethanol	100	25.58±4.60
BC	Ethanol	10	2.36±0.60
	Ethanol	30	19.42±3.92
	Ethanol	50	23.64±1.35
	Ethanol	100	24.03±1.06
CL	Ethanol	10	1.20±0.10
	Ethanol	30	12.05±4.67
	Ethanol	50	20.35±0.81
	Ethanol	100	21.47±1.13
HT	Ethanol	10	7.36±2.28
	Ethanol	30	12.98±6.22
	Ethanol	50	17.21±3.63
	Ethanol	100	19.53±0.70
CAJAN	Ethanol	10	0.00±0.00
	Ethanol	30	5.19±7.72
	Ethanol	50	8.64±0.80
	Ethanol	100	18.95±3.26
AS	Ethanol	10	11.82±3.84
	Ethanol	30	14.11±2.40
	Ethanol	50	19.92±5.59
	Ethanol	100	19.00±4.04
FH	Ethanol	10	0.00±0.00
	Ethanol	30	0.00±0.00
	Ethanol	50	10.89±3.66
	Ethanol	100	20.39±2.75
PGM	Ethanol	10	20.74±1.32
	Ethanol	30	21.24±2.50
	Ethanol	50	22.52±4.62
	Ethanol	100	27.17±4.15
GJ	Ethanol	10	18.18±5.51
	Ethanol	30	18.29±2.41
	Ethanol	50	18.22±0.79

	Ethanol	100	21.86±1.37
RSR	Ethanol	10	13.91±4.13
	Ethanol	30	21.12±4.91
	Ethanol	50	21.51±0.76
	Ethanol	100	26.63±1.96
CA	Ethanol	10	0.00±0.00
	Ethanol	30	11.05±2.13
	Ethanol	50	14.53±3.52
	Ethanol	100	27.75±1.78
D2W	Ethanol	10	18.45±4.46
	Ethanol	30	20.85±1.61
	Ethanol	50	22.29±1.40
	Ethanol	100	24.92±2.84
FRU247	Ethanol	10	17.13±1.49
	Ethanol	30	19.42±4.96
	Ethanol	50	20.08±2.53
	Ethanol	100	20.85±2.22
MR	Ethanol	10	19.15±4.52
	Ethanol	30	20.62±0.84
	Ethanol	50	29.57±4.21
	Ethanol	100	35.78±0.94
BL	Ethanol	10	5.58±0.61
	Ethanol	30	8.37±2.00
	Ethanol	50	22.17±5.00
	Ethanol	100	31.55±2.07
AI	Ethanol	10	16.09±4.63
	Ethanol	30	20.12±2.52
	Ethanol	50	24.50±2.42
	Ethanol	100	28.02±0.65
PC	Ethanol	10	9.88±0.16
	Ethanol	30	12.02±6.82
	Ethanol	50	15.23±1.32
	Ethanol	100	21.47±4.68
PI	Ethanol	10	18.95±2.21
	Ethanol	30	20.43±8.50
	Ethanol	50	27.13±7.70

	Ethanol	100	26.71±0.99
SS	Ethanol	10	16.55±0.87
	Ethanol	30	16.55±0.87
	Ethanol	50	24.81±3.68
	Ethanol	100	29.26±2.26
POS	Ethanol	10	13.26±4.38
	Ethanol	30	13.80±0.41
	Ethanol	50	18.10±4.68
	Ethanol	100	20.74±2.01
FRU-1	Ethanol	10	4.22±2.00
	Ethanol	30	8.29±2.19
	Ethanol	50	8.64±2.80
	Ethanol	100	20.85±6.18
BM	Ethanol	10	19.30±0.53
	Ethanol	30	26.28±0.12
	Ethanol	50	29.34±2.91
	Ethanol	100	31.05±1.16

(六) 參考文獻

1. 衛生署., 2005. 國人十大死亡原因。
2. Kim J.A., Kang Y.S., Jung M.W., Lee S.H., Lee Y.S., 1999. Involvement of Ca^{2+} influx in the mechanism of tamoxifen-induced apoptosis in Hep G2 human hepatoblastoma cells. *Cancer Letters* 147, 115-123.
3. Mukhtar H., Ahmad N., 1999. Chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 158, 207-210.
4. Park W.H., Lee M.S., Park K., Kim E.S., Kim B.K, Lee, Y.Y., 2002. Monensin-mediated growth inhibition in acute myelogenous leukemia cells via cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Cancer* 101, 235-242.

5.Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E., 1998. Apoptosis signaling by death receptors. European Journal of Biochemistry 254, 439–459.

