

嘉南藥理大學 107 年度 研究計畫成果報告

計畫名稱：子計畫三：中草藥萃取物的抗癌活性篩選

重點(整合型)研究計畫

與業界廠商合作之研究計畫

執行期間：107年 3 月 29 日至 12 月 31 日

總計畫主持人：李冠漢

本(子)計畫主持人：陳品晟、田孝威

中華民國 108 年 2 月 27 日

(一)摘要

本子計畫主要目的為探討子計畫一所提供之五癩散等中草藥萃取物進行抗癌活性篩選，五癩散是指五種民間消炎草藥，其包括虎咬癩(*Leucas chinensis*)、柳枝癩(*Vernonia Patula*)、茶匙癩(*Viola diffusa*)、大疔癩(*Euonymus laxiflorus*)和鼠尾癩(*Justicia procumbens*)。本計畫以肺癌與乳癌細胞為研究對象，建立分析癌細胞生長與非固著性生長的檢測平台，以探討新藥物的抗癌活性。以子計畫一所提供之中草藥萃取物分別處理癌細胞後，進行 MTT 試驗以評估細胞存活率，並以洋菜膠腫瘤細胞群落形成試驗(Soft agar tumor cell colony formation assay) 測試抑制腫瘤細胞群落生成的效果。結果發現鼠尾癩的乙醇萃取物對人類肺腺癌細胞 A549 與乳癌細胞 MDA-MB-468 具有較佳的毒殺效果；而虎咬癩與鼠尾癩的乙醇萃取物可顯著地抑制乳癌細胞 MDA-MB-468 之細胞群落生成。此兩種中草藥萃取物可能具有不同的抑癌機轉，可進一步分析其有效成分及抑癌機制，以開發為具潛力的抗癌藥物。

(二)前言

癌症是台灣近 30 年來的國人死亡原因第一名，其中肺癌，乳癌都已成為威脅台灣民眾的重要疾病。開發抑制癌細胞生長的療法，有助於提升癌症治療的成效。

在癌症形成機制的研究中，腫瘤起始細胞(tumor initiating cell)，或稱為癌幹細胞，被認為是腫瘤形成或復發的可能原因之一。癌幹細胞具有自我更新(self renewal)及分化成癌細胞的功能，在腫瘤形成與癌轉移扮演中重要角色。雖然癌幹細胞的數量在整個腫瘤中只佔一小部分，但對化學治癌藥物卻常具有抗藥性。因此腫瘤經放射線或化

學治療後，癌幹細胞可能還仍存活，並導致腫瘤的復發與轉移^[1]。癌幹細胞也可能參與癌細胞轉移的過程。一些轉移的惡性癌細胞中發現具有癌幹細胞特徵的細胞^[2]，而大量表現癌幹細胞標誌基因 CD44、Nanog 與 Hh 訊息路徑的前列腺癌幹細胞亦被發現有轉移能力^[3,4]。因此，癌幹細胞除被認為參與腫瘤形成，也伴隨發生癌幹細胞的局部侵入現象並轉移至遠端組織形成腫瘤。

癌細胞的轉移及擴散必須伴隨著細胞生理狀態的改變，包括細胞移動和侵入能力的增加；細胞與細胞間相互作用的破壞，以及癌細胞分解細胞外基質（extracellular matrix, ECM）^[5]。癌細胞會產生胞外基質分解酵素，主要包括 matrix metalloproteinases（MMPs），plasminogen activator，與 cathepsins 等。這些酵素可分解 ECM，幫助癌細胞穿透基底膜，由血管進入組織而達到轉移之目的。MMPs 的表現與活化可受到其他蛋白的調控，例如 extracellular inducer of matrix metalloproteinase（EMMPRIN）可促進 MMPs 的表現^[6]；而 reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs（RECK）與 tissue inhibitors of metalloproteinase（TIMPs）家族蛋白可抑制 MMPs 的活性^[7,8]。在攝護腺癌細胞株中，抑制 MMP-9 的基因表現，與促進 TIMP-1 基因的表現，都會導致攝護腺癌細胞轉移的能力降低^[9]。Urokinase plasminogen activator（uPA）和其受體（uPAR）對攝護腺癌細胞轉移也扮演很重要的角色^[10]。uPA 可以將 plasminogen 活化成 plasmin，plasmin 可促進腫瘤生長與血管新生，分解細胞外基質，並且活化 pro-MMPs。在攝護腺癌中可發現 uPA 與 uPAR 的大量表現，而抑制 uPA 與 uPAR 的表現也會抑制攝護腺癌的轉移^[11]。這些作用可幫助癌細胞改變細胞外基質結構，進一步幫助癌細胞突破胞外間質微環境的限制，得以生長、擴散、侵入及轉移。

閩南一帶“癩”的草藥，就是指治療感染和發炎的疾病，其具有活血化癥、止血止痛、消炎消腫之功用。五癩散是台灣地域性的民間消炎草藥，其包括鼠尾癩(*Justicia procumbens*)、茶匙癩(*Viola diffusa*)、虎咬癩(*Leucas chinensis*)、柳枝癩(*Vernonia Patula*)和大疔癩(*Euonymus laxiflorus*)。然而這些草藥是否具有抑癌的功效，或具有抗癌的成分，至今仍不清楚。本計畫的主要目的，即在探討此五種中草藥的乙醇萃取物是否具有抑癌的效用。

(三)研究方法與步驟

1. 細胞生長分析 (MTT assay)

將細胞種至 96-well 培養盤，一個 well 內的細胞數為 4×10^3 ，以不同劑量的待測藥物加至 well 內，以 0.4 % 的 DMSO 作為控制組。分別在藥物處理 24、48 小時後取其中一盤，抽起 well 內的培養液，重新加入 100 μ l 培養液和 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l。黃色的 MTT 試劑會進入細胞內並被 dehydrogenase 作用而產生藍紫色的 formazan 顆粒，細胞數越多，則產生的 formazan 也越多，藍紫色的顏色越深。經培養 2 小時後抽掉 well 含 MTT 的培養液，加入 100 μ l DMSO 溶解 formazan，以 OD₅₉₅ 測吸光值。

2. 洋菜膠腫瘤細胞群落形成試驗 (Soft agar tumor cell colony formation assay)

於 6-well plate 底層養滿乳癌纖維母細胞 199Ct，加入 0.5ml 含有各種濃度之測試藥物與 0.5% agar 的培養液；上層加入 0.5ml 含有各種濃度之測試藥物、1500 顆乳癌細胞 MDA-MB-468 與 0.35% agar 的培養液。於 37°C、5% CO₂ 下培養約 10 天，待腫瘤細胞群落形成，計

算大於 40 μ m 直徑的細胞群落數目，以評估測試藥物的 IC₅₀。

(四)結果與討論

1. 大疔癩、鼠尾癩、茶匙癩、柳枝癩、和虎咬癩乙醇粗萃取物對人類肺腺癌細胞 A549 存活率的影響

以 MTT 分析細胞存活率，圖一顯示鼠尾癩乙醇粗萃物有較高的細胞毒性，以 0.001 mg/mL 處理 A549 細胞 24 小時後約有 70% 的存活率，而 0.025 mg/mL 處理約有 60% 的存活率。其他四種植物的乙醇粗萃物之細胞毒性差不多，在 0.05 mg/mL 的劑量處理 A549 細胞時便顯著出現細胞毒性，並隨著處理劑量增加而降低細胞存活率。此實驗結果顯示鼠尾癩乙醇粗萃物對肺腺癌細胞有較強的毒殺效果，可進一步分析有效成分，研究其抑癌機轉以及開發成具潛力的抗癌藥物。

2. 虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物對人類乳癌細胞 MDA-MB-468 與乳癌纖維母細胞 199Ct 存活率的影響

MTT 細胞存活率分析的結果顯示在五種粗萃取物中，鼠尾癩乙醇粗萃物對乳癌細胞 MDA-MB-468 有顯著的細胞毒性，其 IC₅₀ 約為 80.1 μ g/ml；其他四種中草藥粗萃取物在 100 μ g/ml 的濃度下，對乳癌細胞 MDA-MB-468 則未顯示毒性（圖二）。抗乳癌藥物 Doxorubicin 在此作為有效對照組，其 IC₅₀ 約為 4.1 μ M。此外，五種粗萃取物在 100 μ g/ml 的濃度下，對乳癌纖維母細胞 199Ct 皆不具顯著毒性（圖三）。相對地，有效對照組 Doxorubicin 對纖維母細胞 199Ct 則具有毒性，其 IC₅₀ 約為 50 μ M。這些結果顯示鼠尾癩乙醇粗萃物對乳癌細胞 MDA-MB-468 有較強的毒性，但對纖維母細胞較不具毒性，顯示鼠尾癩粗萃物對乳癌細胞 MDA-MB-468 有專一性的毒殺效果。接下來可進

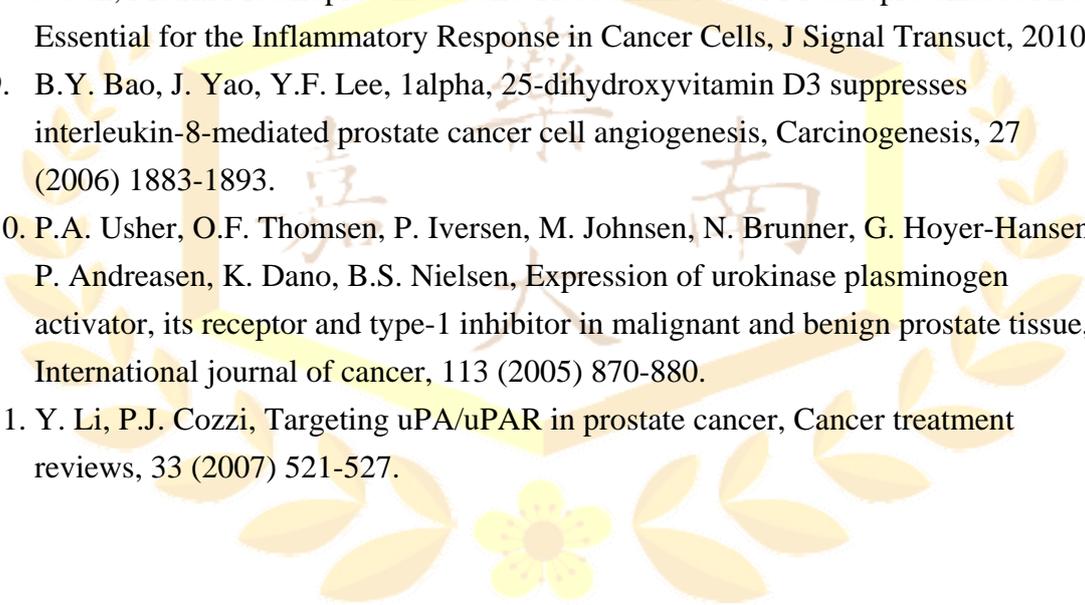
一步分析鼠尾癩乙醇粗萃物的有效成分，探討其抑癌機制及評估開發為抗癌藥物的潛力。

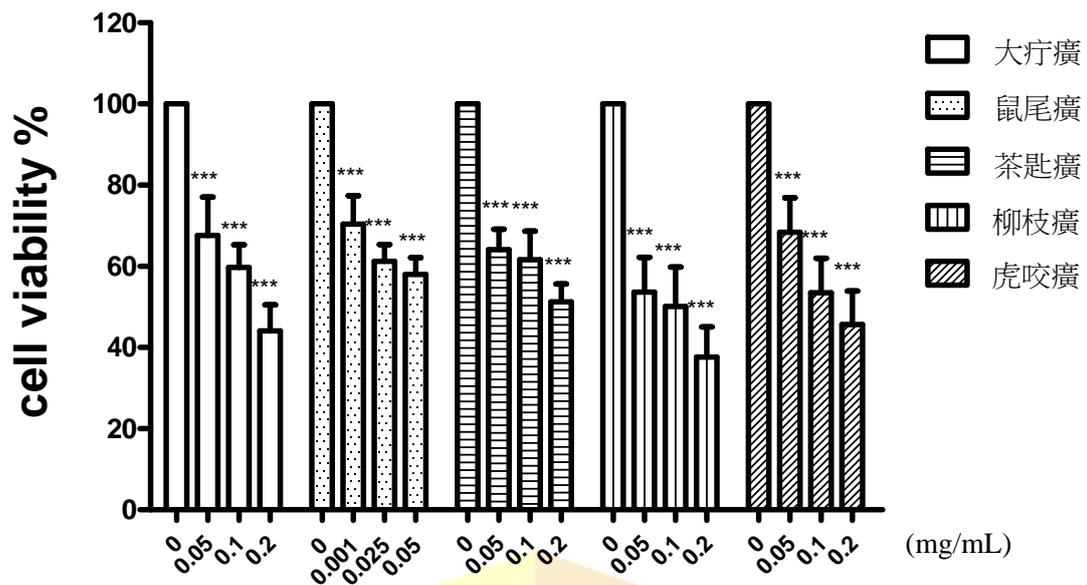
3. 虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃物對人類乳癌細胞 MDA-MB-468 之細胞群落形成的影響

洋菜膠腫瘤細胞群落形成試驗可顯示乳癌細胞於 3D 培養下受纖維母細胞調節，以形成腫瘤細胞群落的現象，並藉以評估藥物對乳癌腫瘤形成的抑制效果。本實驗以 100 μ g/ml 濃度的虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃物進行測試，結果顯示乳癌細胞 MDA-MB-468 必須在纖維母細胞共同培養下，才能長成腫瘤細胞群落；而五種中草藥粗萃物中，只有虎咬癩與鼠尾癩的乙醇粗萃物可顯著地抑制纖維母細胞所調節之乳癌腫瘤細胞群落生成。在 MTT 細胞存活率分析的實驗結果中顯示在 100 μ g/ml 濃度的濃度下，鼠尾癩乙醇粗萃物對乳癌細胞 MDA-MB-468 具毒殺效果，而虎咬癩的乙醇粗萃物並無毒性，顯示二者可能擁有不同的抑癌機制，值得進一步分析二者的有效成分，研究其抑癌機制，以開發為不同標的的抗癌藥物。

(五)參考文獻

1. S.Y. Chen, Y.C. Huang, S.P. Liu, F.J. Tsai, W.C. Shyu, S.Z. Lin, An overview of concepts for cancer stem cells, Cell transplantation, 20 113-120.
2. I. Ben-Porath, M.W. Thomson, V.J. Carey, R. Ge, G.W. Bell, A. Regev, R.A. Weinberg, An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors, Nature genetics, 40 (2008) 499-507.
3. L. Patrawala, T. Calhoun, R. Schneider-Broussard, H. Li, B. Bhatia, S. Tang, J.G. Reilly, D. Chandra, J. Zhou, K. Claypool, L. Coghlan, D.G. Tang, Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in

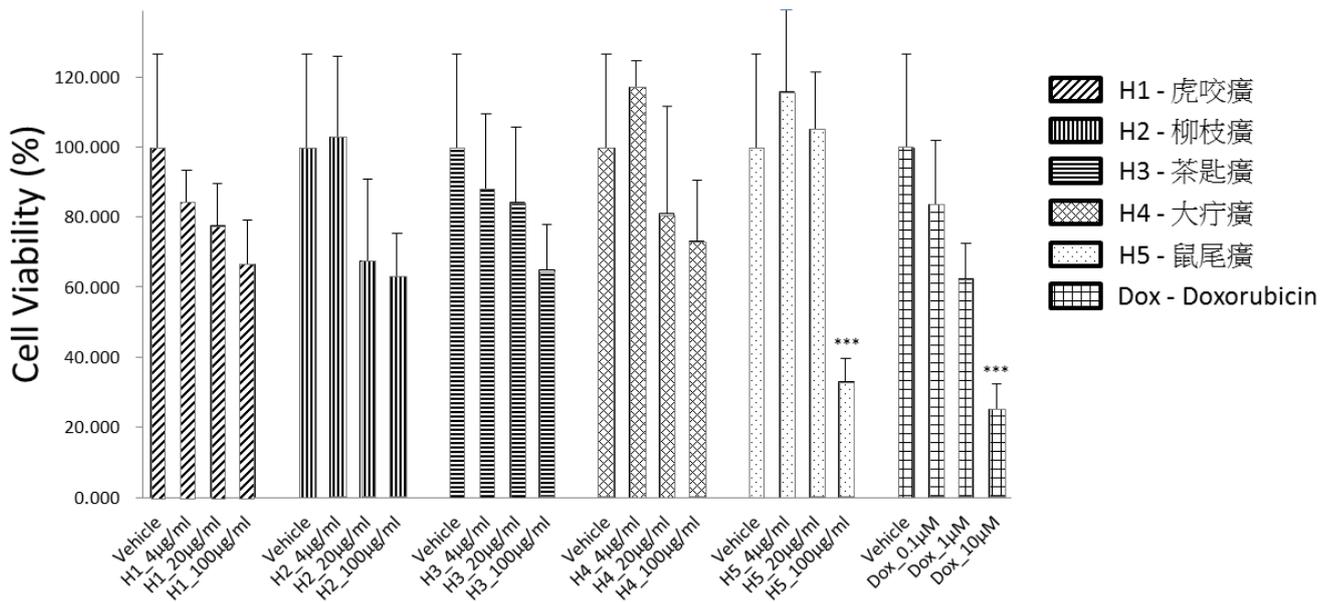
- tumorigenic and metastatic progenitor cells, *Oncogene*, 25 (2006) 1696-1708.
4. G.J. Klarmann, E.M. Hurt, L.A. Mathews, X. Zhang, M.A. Duhagon, T. Mistree, S.B. Thomas, W.L. Farrar, Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature, *Clinical & experimental metastasis*, 26 (2009) 433-446.
 5. T. Meyer, I.R. Hart, Mechanisms of tumour metastasis, *Eur J Cancer*, 34 (1998) 214-221.
 6. J.L. Hao, P.J. Cozzi, A. Khatri, C.A. Power, Y. Li, CD147/EMMPRIN and CD44 are potential therapeutic targets for metastatic prostate cancer, *Curr Cancer Drug Targets*, 10 287-306.
 7. J.C. Clark, D.M. Thomas, P.F. Choong, C.R. Dass, RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer, *Cancer metastasis reviews*, 26 (2007) 675-683.
 8. J. Sun, Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Are Essential for the Inflammatory Response in Cancer Cells, *J Signal Transduct*, 2010.
 9. B.Y. Bao, J. Yao, Y.F. Lee, 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis, *Carcinogenesis*, 27 (2006) 1883-1893.
 10. P.A. Usher, O.F. Thomsen, P. Iversen, M. Johnsen, N. Brunner, G. Hoyer-Hansen, P. Andreasen, K. Dano, B.S. Nielsen, Expression of urokinase plasminogen activator, its receptor and type-1 inhibitor in malignant and benign prostate tissue, *International journal of cancer*, 113 (2005) 870-880.
 11. Y. Li, P.J. Cozzi, Targeting uPA/uPAR in prostate cancer, *Cancer treatment reviews*, 33 (2007) 521-527.
- 



圖一、大疔癩、鼠尾癩、茶匙癩、柳枝癩和虎咬癩乙醇粗萃取物對人類肺腺癌細胞 A549 存活率的影響

A549 細胞以不同濃度的大疔癩、鼠尾癩、茶匙癩、柳枝癩、和虎咬癩乙醇粗萃取物處理 24 小時後，進行 MTT 試驗來測試細胞存活率。結果顯示五種粗萃取物對人類肺腺癌細胞 A549 皆具有毒性，其中鼠尾癩粗萃取物的毒性較高。***, $p < 0.001$ 表示與對照組相比，具顯著性差異。

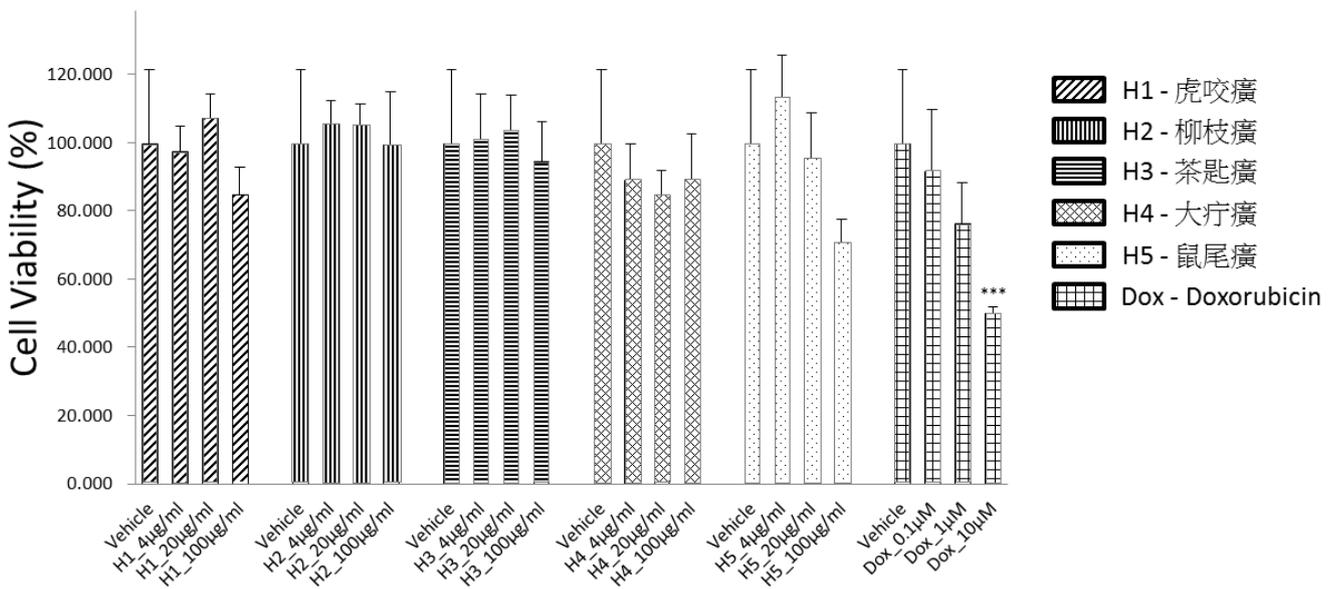
Viability of MDA-MB-468 Cells



圖二、虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物對人類乳癌細胞 MDA-MB-468 存活率的影響

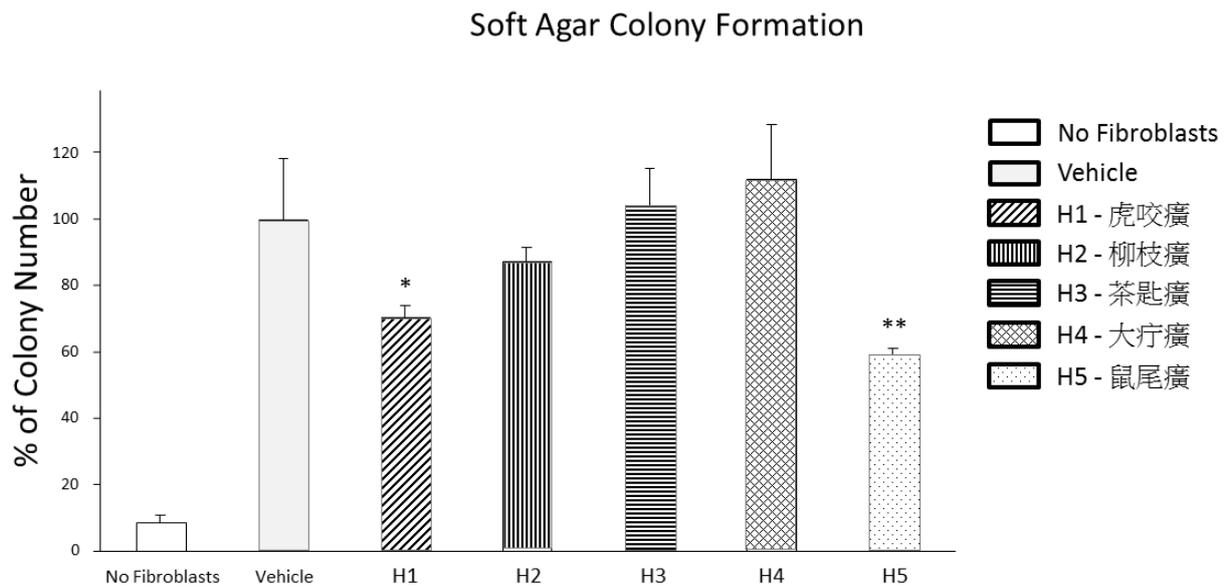
MDA-MB-468 細胞以不同濃度的虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物處理 24 小時後，進行 MTT 試驗來測試細胞存活率。結果顯示鼠尾癩粗萃取物對人類乳癌細胞 MDA-MB-468 較具毒性。抗乳癌藥物 Doxorubicin 在此作為有效對照組。***, $p < 0.001$ 表示與溶劑對照組 (Vehicle) 相比，具顯著性差異。

Viability of 199Ct Fibroblasts



圖三、虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物對人類乳癌纖維母細胞 199Ct 存活率的影響

199Ct 細胞以不同濃度的虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物處理 24 小時後，進行 MTT 試驗來測試細胞存活率。結果顯示五種粗萃取物對人類乳癌細胞人類乳癌纖維母細胞 199Ct 皆不具毒性。抗乳癌藥物 Doxorubicin 在此作為有效對照組。***, $p < 0.001$ 表示與溶劑對照組 (Vehicle) 相比，具顯著性差異。



圖四、虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物對人類乳癌細胞 MDA-MB-468 之細胞群落形成的影響

在洋菜膠腫瘤細胞群落形成試驗中，於 6-well plate 底層養滿乳癌纖維母細胞 199Ct，鋪以 0.5% agar 培養液；上層則加入含有 1500 顆乳癌細胞 MDA-MB-468 的 0.35% agar 培養液。上、下層洋菜膠培養液皆以 100 μ g/ml 濃度的虎咬癩、柳枝癩、茶匙癩、大疔癩和鼠尾癩乙醇粗萃取物處理，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培養 10 天，待腫瘤細胞群落形成。結果顯示在沒有纖維母細胞（No Fibroblasts）下，乳癌細胞無法形成細胞群落；惟有在纖維母細胞的調節下，乳癌細胞方能長成細胞群落。五種粗萃取物的測試結果則顯示虎咬癩與鼠尾癩的粗萃取物可顯著地抑制乳癌細胞群落生成。*， $p < 0.05$ ，**， $p < 0.01$ ，表示與溶劑對照組（Vehicle）相比，具顯著性差異。