

探討樟芝萃取物誘發人類肝癌細胞凋亡反應與其相關訊息 路徑研究

張旭男¹，姜泰安²，林恆騰^{3,*}，吳佩芬^{4,*}

¹ 高雄榮總台南分院內科部肝膽胃腸科 ² 中華醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

³ 麻豆新樓醫院復健科 ⁴ 大仁科技大學環境與職業安全衛生系

通訊作者: 吳佩芬大仁科技大學環境與職業安全衛生系 E-mail: russell@tajen.edu.tw

林恆騰麻豆新樓醫院復健科 E-mail: e1971600318@yahoo.com.tw

摘要

本研究擬探討樟芝萃取物在探討樟芝萃取物誘發人類肝癌細胞凋亡反應與其相關訊息路徑研究，本研究以肝臟 HepG2 細胞進行體外培養，以流式細胞儀分析癌細胞之細胞週期、細胞凋亡以及使用西方墨點法分析細胞凋亡相關訊息路徑變化情形與下游蛋白質的表現，以進一步探討樟芝萃取物抑制肝癌細胞之機轉。在添加不同濃度之樟芝萃取物 (5、10、20 μ g/ml) 下，研究結果顯示經 flow-cytometry 分析發現樟芝萃取物明顯誘發細胞凋亡反應，顯示樟芝萃取物確實具有促使肝癌細胞細胞凋亡之能力，然後經西方墨點法分析後發現，樟芝萃取物亦明顯誘發細胞凋亡蛋白 caspase3/7/9、Cyt-C 與 PARP(Poly (ADP-ribose) polymerase) 等 ($p < 0.05$)，本研究結果證實樟芝萃取物可透過誘發細胞凋亡蛋白質之含量來達到誘發肝癌細胞凋亡反應的效果。

關鍵詞：肝癌、細胞凋亡、樟芝萃取物

The signal transduction pathway of apoptosis by Antrodia camphorate extracts in human liver cancer cell

Shiuh-Nan Chang¹ Tai-An Chiang² Heng-Teng Lin^{3*} Pei-Fen Wu^{4*}

¹ Department of Gastroenterology, Kaohsiung Veterans General Hospital, Tainan Branch, Taiwan

² Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Chung-Hwa University of Medical Technology, Tainan, Taiwan

³ Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Modau Sinlau Hospital, Tainan, Taiwan

⁴ Department of Environmental Science and Occupational Safety and Hygiene, Tajen University, Pingtung, Taiwan

* Corresponding Author: Pei-Fen Wu. Department of Environmental Science and Occupational Safety and Hygiene, Tajen University, Pingtung, Taiwan. E-mail: russell@tajen.edu.tw; Heng-Teng Lin. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Modau Sinlau Hospital, Tainan, Taiwan. E-mail: e1971600318@yahoo.com.tw

Abstract

The anti-cancer effects by Antrodia camphorate extracts against liver cancer were never been systemic evaluated. The purpose of this study is to verify the inhibitory effect on liver carcinogenicity by Antrodia camphorate extracts. In this study, we used Antrodia camphorate extracts to inhibit liver cancer cell proliferation and tumor growth, and investigate the underlying molecular mechanisms. HepG2 cell line (human hepatocellular carcinoma cell line) was used in this study. Cell cycles were analyzed by Flow cytometry. Signal transductions were analyzed by western blots. The results indicated the amounts of caspase3/7/9, Cyt-C and parp and the apoptosis effects were dose-related induced ($p < 0.05$). The results from these investigations will prove to be helpful for understanding the anti-cancer mechanics by Antrodia camphorate extracts and provide novel insights in controlling liver cancer in our population.

Key words: liver cancer, apoptosis, Antrodia camphorate extracts

前言

中藥萃取物所含的活性物質及其代謝物已證實具有多種藥理活性，在動物實驗中亦證實具有抑制腫瘤生長的作用(Zhang et al., 2004)。其抗癌的作用模式，可藉由以下方式進行，包括清除活性氧自由基、清除活化態的致癌劑或致突變劑、調節細胞週期蛋白、改變基因表達(Kimura et al., 2002) 等，來預防或對抗癌症的發展。儘管有關中草藥萃取物抗癌的研究已有許多國內外的研究團隊在進行，但針對產業結合的抗癌藥物研究仍有努力之空間。樟芝 (*Antrodia camphorata*) 為台灣特有的真菌，僅生長於台灣特有種牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirae*) 上，又被稱為樟菇、樟菰、樟窟內菰、牛樟菇、牛樟芝、紅樟、以及紅樟芝；在自然狀態下樟芝的生長相當緩慢，所以野生樟芝數量相當稀少且價格昂貴，早期原住民用來治療因飲酒過度所造成的肝臟病變，被原住民視為珍寶(程一華, 1993)。為了大量繁殖樟芝以供市場需求，研究人員企圖利用其他方式如液態深層發酵或固態發酵大量繁殖樟芝，並保有與野生樟芝具相同的功效或添加其他食材共同培養發酵使樟芝具療效之成分提高(Shen et al., 2003)。樟芝子實體和一般的食藥用蕈菇類一樣具有複雜的成分，包括多醣體 (polysaccharides, β -葡聚糖)、三帖類 (triterpenoids)、超氧歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD)、腺苷 (adenosine)、蛋白質、維生素[維生素 B、菸鹼酸、麥角固醇(ergosterol)]、微量元素 (鈣、磷、鋅)、核酸、凝集素、胺基酸、固醇類、木質素及血壓穩定物質 (antrodia acid) 等(Hseu et al., 2002)。這些成分的生理活性功能包括：抗腫瘤、提升免疫能力、抗病毒、抗過敏、抗高血壓、抑制血小板凝集、降血糖、降膽固醇、抗細菌及護肝功能(Song et al., 2002; Hsiao et al., 2003; Jaylor et al., 1993; Hseu et al., 2002; Kimura et al., 2002; Lee et al., 2002; Mau et al., 2004)。本研究團隊擬以樟芝萃取物來評估其是否具有抑制肝癌效果並探討樟芝萃取物誘發人類肝癌細胞凋亡反應與其相關訊息路徑研究。

材料與方法

一、樟芝萃取物 樟芝萃取物擬以農試所研發之標準程序製備，所使用之樟芝菌

絲體(*Antrodia camphorata mycelia*, ACM)業經農試所基原鑑定，本實驗擬以液態培養之樟芝菌絲體甲醇萃取液(*Antrodia camphorata methanol extract*, ACME)作為研究材料，以 100 mg 之樟芝菌絲體粉末加入 1 mL 之甲醇分別於室溫下置放 24, 48, 72, 96 小時，再以 50°C 乾燥後秤重。

二、細胞培養

HepG2 肝細胞乃取自 ATCC (Rockville, MD, USA)，將細胞分別培養於含 5% 小牛血清(BCS)、100 U/ml 盤林西林 100 g/ml 鏈黴素的 DMEM (GIBCO, NY, USA)培養基中以及培養於含 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/ml 盤林西林、100 g/ml 鏈黴素的 F12K (GIBCO, NY, USA) 培養基中，並置於 37°C，5% CO₂ 的培養箱 中培養。

三、MTT 細胞存活率分析

細胞培養於 12-well 的培養皿上，每個 well 含 50000 個細胞，培養液含各種不同濃度之黃芩萃取成分，經各種時間的培養後，將含藥物的培養液吸除，以一倍濃度的 HBSS 緩衝液洗滌細胞，加入以 PBS 緩衝液配製的 MTT 溶液濃度為 0.5 mg/ml，每個 well 0.35 ml，於 37°C 培養 5 小時，若細胞粒線體的呼吸作用仍在進行，則粒線體內的 dehydrogenase 酵素會將 MTT 轉化成紫色的 formazan 化合物結晶，細胞越健康，粒線體呼吸作用越旺盛，其 dehydrogenase 活性越高，則所形成的紫色結晶越多，再於培養皿中加入 10% SDS，於 37°C 培養 12 小時，將結晶溶解，從每個 well 取出 0.2 ml 至 96-well 培養皿中，於 570-630nm 的 microtitre plate reader 測定吸光值，互相作比較以決定各種濃度的藥物處理後細胞的活性。

四、Flow cytometry 偵測癌細胞細胞凋亡

細胞以 4°C 的 PBS 洗二次後，加入 3 ml 0.1% trypsin-EDTA 置於 37°C，5 分鐘後，輕拍培養皿底部，加入 7 ml 新鮮的培養液以中和掉 trypsin 的作用，以 pipet 小心吸放使細胞皆成為單一顆粒，以 PBS 清洗並離心 1000 rpm 二次，使細胞懸浮於 1ml 的 PBS，取適量的細胞以 hemacytometer 計算細胞數目，以 PBS 調整細胞濃度為 10⁶ 個/ml，取出 1 ml 的細胞置於離心管，加入適量的 FITC-conjugated annexin-V 與存在於細胞膜表面的 phosphatidyl serine 結合，在

37°C作用 15 分鐘後，加入 0.2 ml RNase (125 units/ml)及 1 ml propidium iodide (20mg/ml)，然後以 FACScan flow cytometer 分析早期的計畫性細胞凋亡。

五、西方墨點法

將細胞液加 150 μ l 蛋白細胞裂解緩衝液(cell lysis buffer)30 分鐘後，以 4°C 下 10,000xg 離心 10 分鐘，取出上清液即為細胞質部分(cytosolic fraction)，定量後等待蛋白質轉漬及西方墨點法實驗使用。將 SDS-PAGE 電泳後的分離膠取下，放置於 2 張相同大小的 Whatman 3M paper 及一張適當大小並浸泡過 Methanol 5 分鐘的 PVDF 轉漬膜 (PALL Life sciences, Biotyne, MA, USA) 浸泡於轉漬溶液[transfer buffer:50mM Tris-base, 40mM glycine, 1.3mM SDS, 20% methanol]中在置於半乾式電泳轉移 (BIORAD, NY, USA) 裝置中，在室溫下以每平方公分 5.5mA、兩小時的條件將蛋白質轉漬到 PVDF 轉漬膜上。再以 Ponceau S (0.5% w/v ponceau S, 1% glacial acetic acid) 浸泡 5 分鐘，確認蛋白質是否轉漬成功。然後加入 anti-polyclonal antibody (pAb; 1:800, no. 4272; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) 與 β -actin (1:500, sc-47778; Santa Cruz Biotechnology) 12 小時(4°C)，而後將 PVDF 轉漬膜放入清洗溶液 (PBS-T) (0.1% Tween 20 in PBS) 中清洗三次每次五分鐘，倒除 PBS-T 後放入遮蔽溶液 (5% non-fat dry milk, 0.1% Tween 20 in PBS) 中搖動 30~60 分鐘，再以 PBS-T 溶液清洗之後反應 2 小時，再以 PBS-T 清洗三次每次五分鐘，接著加入稀釋 5000 倍遮蔽溶液的二級抗體(HRP-conjugated goat-anti mouse IgG (1:5000))，反應 45~60 分鐘，最後再以 PBS-T 清洗三次每次五分鐘，再將 PVDF 轉漬膜放入適量的 ECL 呈色劑 (ECL puls kit, Amersham, England) 作用 5 分鐘以進行螢光顯影分析。

六、統計分析

實驗數據皆重複執行三次並以平均值 $\pm$ 標準誤差(mean $\pm$ standard deviation [SD])表示，不同濃度與對照組之差異以 Student T test 分析，分析結果以 $P < 0.05$ 視為有統計意義之差異。

結果與討論

本研究使用了不同的樟芝萃取物濃度去抑制肝臟 HepG2 細胞生長和誘導細胞凋亡，並進一步分析相關的分子機制。研究結果顯示，細胞再加入不同濃度之樟芝萃取物後，確實使癌細胞細胞生長變緩之趨勢(圖一)，經 flow-cytometry 分析後發現樟芝萃取物會誘發細胞凋亡反應(圖二)，顯示樟芝萃取物確實具有促使癌細胞細胞凋亡之能力。本研究擬使用西方墨點法分析細胞凋亡相關訊息路徑變化情形與下游蛋白質的表現，以進一步探討樟芝萃取物抑制肝癌細胞之機轉。肝癌細胞在添加不同濃度之樟芝萃取物 (10、20、40 μ g/ml)下，經西方墨點法分析後發現，樟芝萃取物亦明顯誘發細胞凋亡蛋白 caspase3/7/9(圖三-五)、Cyt-C(圖六)與 PARP(Poly (ADP-ribose) polymerase(圖七)等 ($p<0.05$)，本研究結果證實樟芝萃取物可透過誘發細胞凋亡蛋白質之含量來達到誘發肝癌細胞凋亡反應的效果。

本研究結果顯示樟芝萃取物亦明顯誘發細胞凋亡蛋白 caspase3/7/9、Cyt-C 與 PARP 等細胞凋亡蛋白，Caspase 屬於半胱氨酸蛋白酶，主要功能是執行細胞凋亡的過程，而 PARP 的功能是修復受損的 DNA，並調節細胞凋亡，PARP 是一個參與 DNA 修復酶，當細胞凋亡時 116 kDa 的 PARP 蛋白將被裂解成一個 85kDa 片段啟動細胞凋亡機制，而當細胞凋亡時 poly ADP-ribose polymerase 會蛋白水解並且活化 caspase3、caspase7 並進行細胞凋亡(Wyllie et al., 1980; Tewari et al., 1995)。研究結果顯示加入樟芝萃取物之後，除了會依序使 caspase3/7 與 PARP 三種細胞凋亡蛋白質的表現增加外，並透過粒線體釋出 Cyt-C 蛋白質之含量以增加對凋亡蛋白的誘發作用，顯示樟芝萃取物藉由誘發細胞凋亡蛋白之作用機轉來達成抑制癌細胞之效果。

許多研究指出樟芝具有對肺癌、乳癌細胞具細胞毒殺效果[(Jaylor et al., 1993; Hseu et al., 2002; Kimura et al., 2002)；本研究結果顯示樟芝萃取物藉由誘發細胞凋亡之作用機轉來達抑制癌細胞與促使癌細胞凋亡能力而達到抑制癌細胞存活率之效果，本研究不止促進抗癌細胞相關機制的瞭解，亦可開發另一種抗癌之輔助療法。

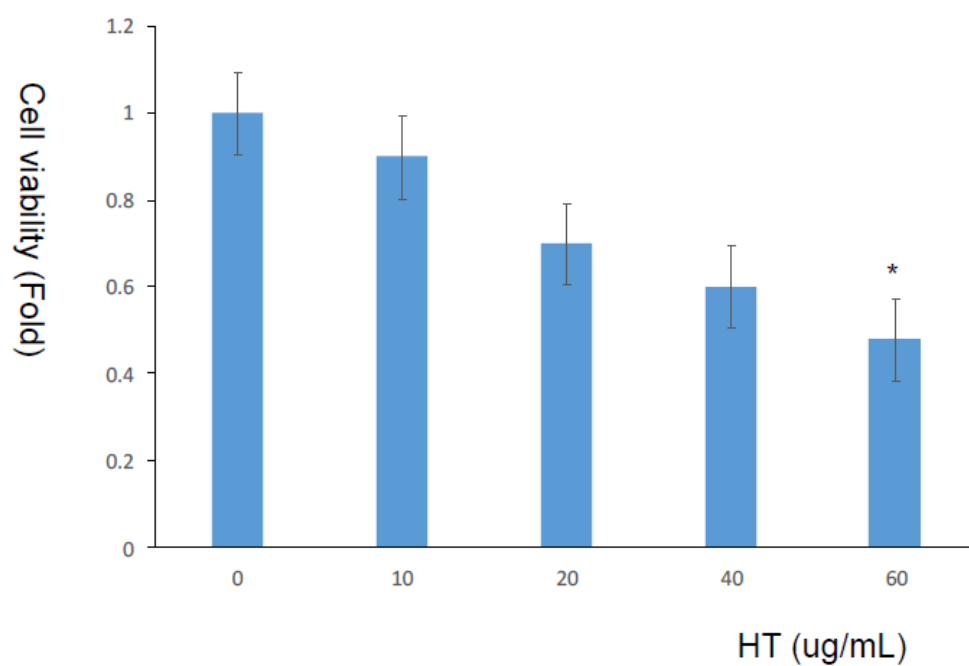


Fig 1. The MTT assay via Antrodia camphorate extraction HepG2 cells

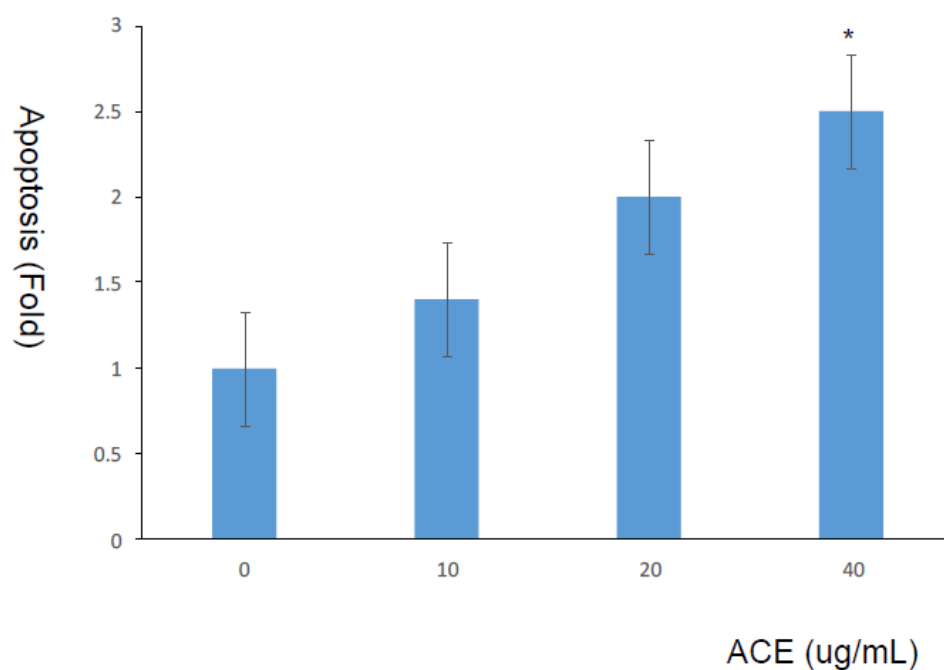


Fig 2. The apoptosis assay via Antrodia camphorate extraction HepG2 cells

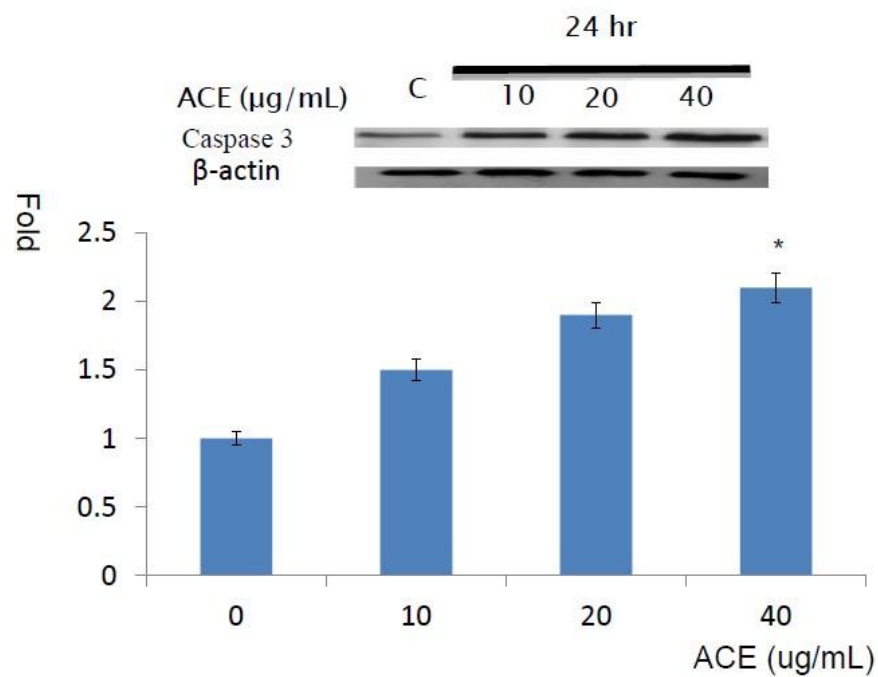


Fig 3. The Caspase 3 western blots via Antrodia camphorate extraction HepG2 cells

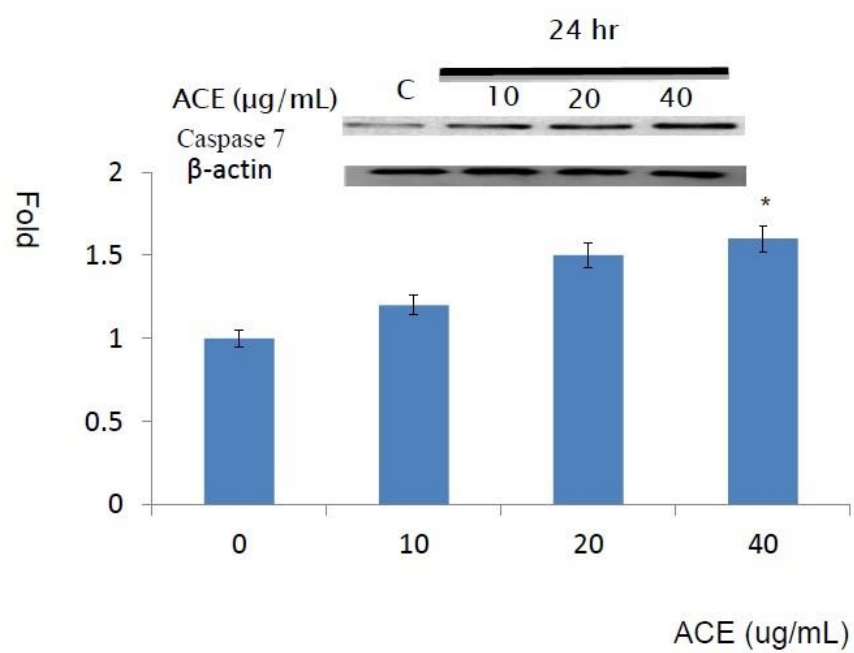


Fig 4. The Caspase 7 western blots via Antrodia camphorate extraction HepG2 cells

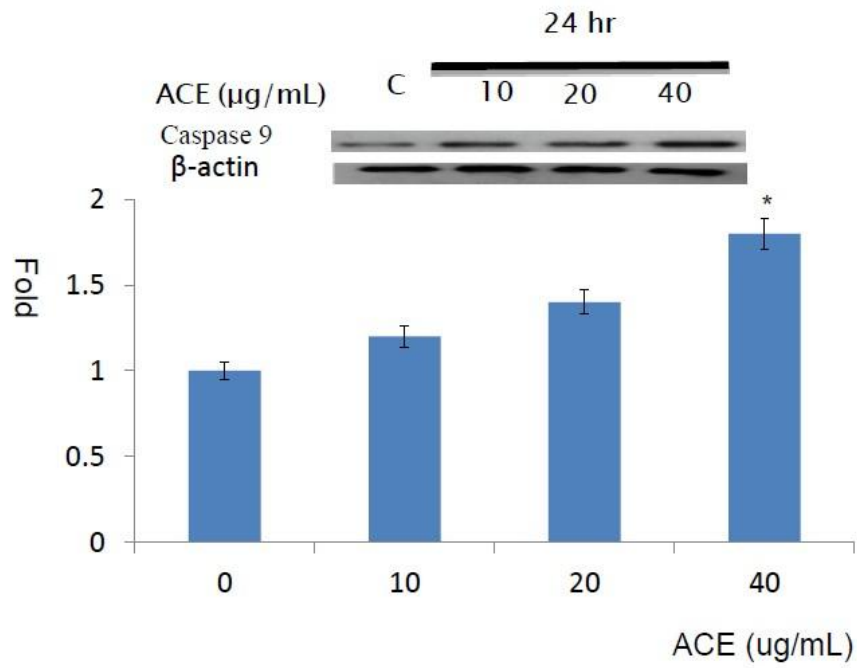


Fig 5.The Caspase 9 western blots via Anrodia camphorate extraction HepG2 cells

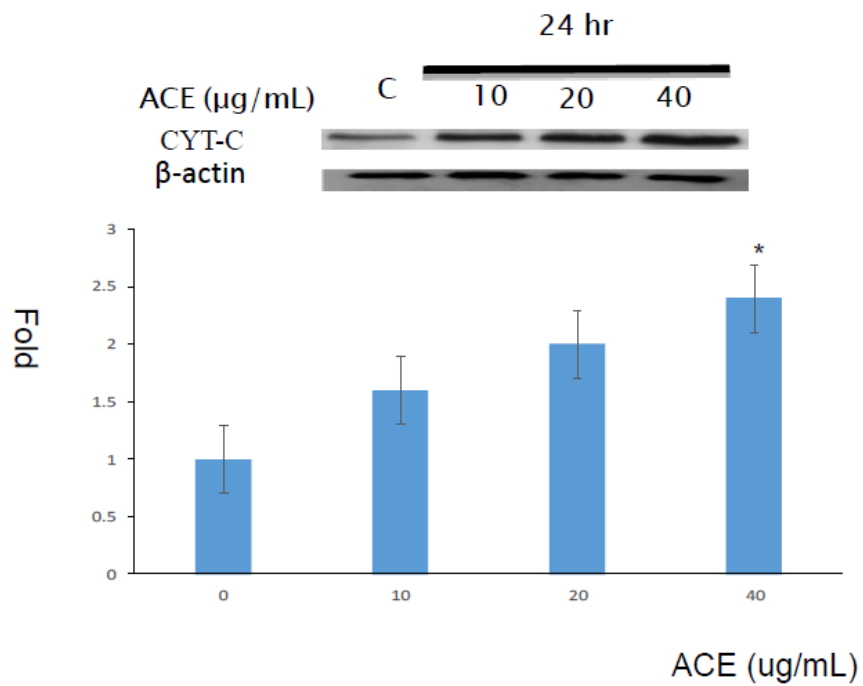


Fig 6.The CYT-C western blots via Anrodia camphorate extraction HepG2 cells

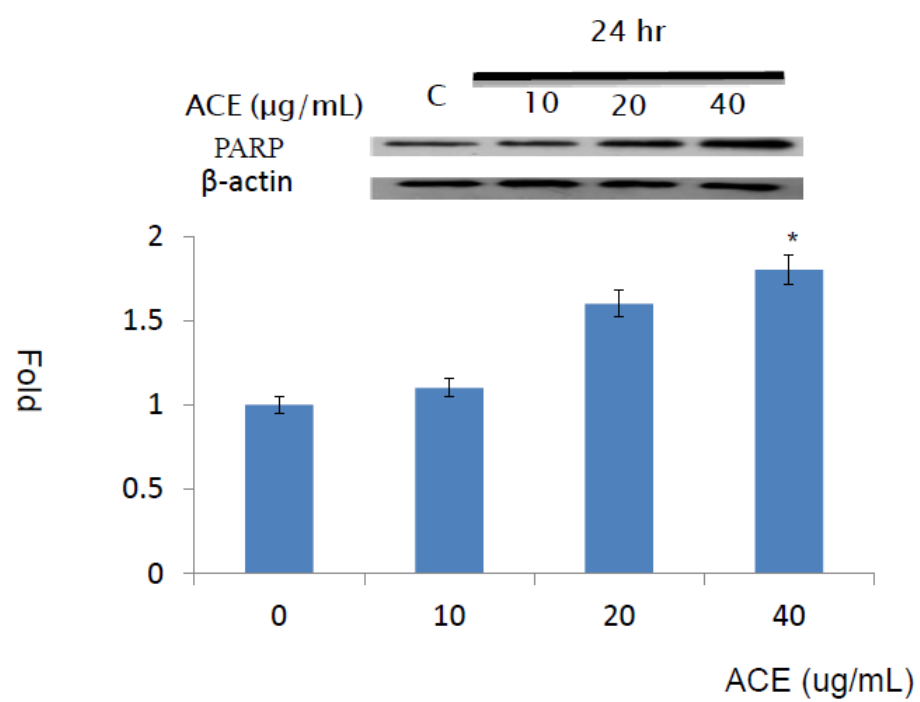


Fig 7. The PARP western blots via Antrodia camphorate extraction HepG2 cells

參考文獻

- Zhang, Z., Wang, Y., Yao, R., Li, J., Yan, Y., Regina, M.L., Lemon, W.L., Grubbs, C.J., Lubet, R.A. and You, M. (2004) Cancer chemopreventive activity of a mixture of Chinese herbs (antitumor B) in mouse lung tumor models. *Oncogene*. 23: 3841-50.
- Kimura, Y., Taniguchi M. and Baba K. (2002) Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res*. 22: 3309-18.
- 程一華 (1993) 樟芝之成份研究 國立臺灣師範大學化學研究所 碩士論文 p.1-122。
- Shen, C., Kuo, Y., Huang, R., Lin, L., Dong, M., Chang, T. and Chou, C. (2003) Studies on the bioactive principles of *Antrodia camphorata*. *J Chin Med* 14: 247-58.
- Hseu, Y.J., Chang, W.H., Hseu, Y.T., Lee, C.Y., Yech, Y.J., Chen, J.Y. and Yang, H.L. (2002) Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci*. 71: 469-82.
- Song, T.Y. and Yen, G.C. (2002) Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J. Agri. Food Chem*. 50: 3322-27.
- Hsiao, G. Shen, M.I., Lin, K.H., Lan, M.H., Wu, L.Y., Chou, D.S., Lin, C.H., Su, C.H. and Sheu, J.R. (2003) Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J. Agric. Food Chem*. 51: 3302-08.
- Jaylor, D.D., Gercel- Taylor, C., Fowler, W.C. and Weese, J.L. (1993) Enhancement of antitumor effects of combined chemoimmunotherapy. 13: 91-97.
- Kimura, Y., Taniguchi M. and Baba K. (2002) Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res*. 22: 3309-18
- Lee I.H., Huang R.L., Chen C.T., Chen H.C., Hsu W.C., Lu M.K. (2002) *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbi. Lett*. 209: 63-67.
- Mau, J.L., Huang, P.N., Huang, S.J. and Chen, C.C. (2004) Antioxidant properties of

methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chem.* 86: 25-31.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol.* 68:251–306.

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K. (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 81:801–09.