

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 菟絲子及其黃酮成分抗細胞增殖作用之分子機轉

### Molecular mechanism in the antiproliferative action of *Cuscuta australis* R.

#### Br and its flavonoids component

計畫編號：NSC89-2320-B-039-044

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：高尚德 中國醫藥學院 中國醫學研究所

共同主持人：劉校生 國立成功大學醫學院微生物免疫研究所

曾慶誠 國立成功大學醫學院病理學科

張翠砮 國立成功大學醫學院寄生蟲學科

計畫參與人員：謝長奇 中國醫藥學院 中國藥學研究所

#### 一、中文摘要

膀胱癌為泌尿系統惡性腫瘤的第一位，在中醫是屬於“淋病”“血尿”“癃閉”之類的病症範疇。菟絲子在臨床上常用來治療膀胱癌，本研究發現菟絲子之黃酮成分- Quercetin 及 Kaempferol 能抑制人類膀胱癌 T1 細胞及誘發 Ras 活性之膀胱癌 T1R1 細胞之增生，其抗增生的作用是誘導腫瘤細胞的細胞凋亡(apoptosis)。Quercetin 引發細胞凋亡之分子機轉與其增加 p53 媒介轉活化 p21 基因表現而造成 G1 靜止有關。p21 基因是 CDK(cyclin-dependent kinase)抑制劑。由於 Quercetin 具有抗自由基性質，可減少 DNA 損傷，表現抗癌的作用。Quercetin 之抗增生機轉與抑制 Ras 活性及其下游轉錄因子(transcription factor)如 c-jun 及 c-myc 表現有關。

**關鍵詞：**Quercetin、Kaempferol、T1 細胞、T1R1 細胞、Ras 基因、c-jun、c-myc

#### Abstract

The present study, we found that quercetin and kaempferol, isolated from *Cuscuta australis* R. Br, inhibited the proliferation of human bladder carcinoma cell T1 cell and (T1R1) in a dose-dependent manner. The IC<sub>50</sub> of inhibiting proliferation of T1 and T1R1 cell by quercetin and kaempferol was 68, 58μg/ml (for T1 cell), 96 and 789μg/ml (for T1R1 cell), respectively. The action

mechanism of quercetin induced antiproliferation was involved in inhibiting Ras protein activation and Ras mediated transcription factor (such as c-jun, c-myc) expression. The antiproliferative effect of quercetin was associated with its induced the apoptosis of tumor cells. Quercetin induced apoptosis process was associated with its enhanced p53 gene and p53-mediated p21 gene expression, that leading to G1 arrest of cell cycle. p21 gene is cyclin dependent kinase inhibitor. Quercetin have free radical scavenger properties that attenuate DNA damage may kaempferol dose dependent manner inhibited the T1 and T1R1 cell proliferation (induced cancer cells apoptosis) that may have potential for treating human bladder carcinoma.

**Keywords:** Quercetin、Kaempferol、T1 cell、T1R1 cell、Ras gene、c-jun、c-myc

#### 二、計畫緣由與目的

膀胱癌為惡性腫瘤的一種，在我國居泌尿系統惡性腫瘤的第一位，發病年齡 30 歲以後，男性比女性發病率高，其比例約為 5：1。菟絲子(*Cuscuta australis* R.BR.)為旋花科植物，最常用來治療腎虛型膀胱癌之藥物。菟絲子及其抽提物具有免疫增強的作用，能促進體液免疫，細胞免疫及網

狀內皮系統吞噬能力，且具有抗衰老作用 [1-4]，其抗衰老的作用與其自由基清除能力有關[5]。

菟絲子含有黃酮成分-槲皮素 (Quercetin) 及山奈酚 (Kaempferol)[6]。Quercetin 為一抗癌物質，其能誘發腫瘤細胞進行細胞凋亡(apoptosis)，且抑制癌細胞株的生長，其抗增殖活性是經由活化 Type II estrogen binding site，抑制 PKC、PTK 及 phosphoinositides 的產生有關。Quercetin 抑制 T cell 生長，使 cell cycle arrest 在 G1 期[7]，其機能能抑制 protein kinase、PIP2 hydrolysis 造成 IP3 濃度下降有關[8]。Quercetin 亦發現引起 K562 leukemia cell lines 進行 apoptosis，其機轉與調節 c-myc、kiras oncogene expression 及減少 IP3 的濃度有關[9]。P53 及 P21 gene 之表現與 apoptosis 有密切相關，P53 (為 suppressor gene)，參與細胞 DNA 損傷反應之修補及造成 cell cycle 停留在 G1。細胞對 DNA 損傷的反應為在 G1/G2 check point，停止 cell cycle progression 是為讓細胞在進入 S 及 M 期時修補損傷的 DNA[10]，故 P53 在 G1 checkpoint 扮演基因監護之角色，受損的 DNA 會增加 P53 蛋白質的含量。P53 含量增加後，(1)可刺激 P21 基因表現，P21 Protein 可與 CDK/cyclin 結合，抑制 cell cycle 前進，且 p21 與 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)作用，而抑制 DNA replication。(2)刺激 DNA 修補基因的表現如 GADD45 及 ERCC3。在哺乳類細胞之 cell cycle 調節機轉中，cyclin 及 CDK(cyclin-dependent kinase)之複合體對 S 期進行與 G2/M 期 progress 非常重要[11]，然而 p21 卻是 CDK inhibitor 之一，它在 DNA 損傷部分所造成 p53-mediated cell cycle 靜止中扮演重要的角色[12-13]，故 DNA 損傷物質引發 G1/S checkpoint 部分是由 p53-dependent p21 活化參與[14]。

癌症之形成是歷經許多步驟，當外在

或內在之因素刺激均能造成細胞轉化。外在因素包括 UV light、X-ray、chemical mutants 及 virus 等均能造成 DNA 突變；而內在的突變會造成基因突變、轉位、重排或擴大等。若致癌基因被活化即有可能轉化為 cancer cell。本研究使用 Ha-ras 致癌基因於細胞轉化時，所扮演的角色。正常之 Ras protein 是 G protein family 一員，它本身是一個功能與 G2 subunit 相似之 protein，Ras protein 移型至胞膜時，具有 GTPase activity，當 Ras 與 GDP 結合時為不活化狀態，但當 GDP 由 Ha-Ras 上分離後，GTP 便結合到 Ras 上並使之活化[15]，在一活化狀態便可將細胞生長調節的訊息傳遞下去，正常情況下 Ras protein 之活化可受生長因子刺激，當 Ras 突變後，基因活化失去控制，活化的 Ras-GTP 持續存在，便造成 cell 異常生長。

本研究利用 Ha-ras oncogene 第 12 個胺基酸(由 Valine 取代 glycine)使 Ras gene 失去 GTPase 活性，保持 GTP-Ras 活化狀態，使 signal transduction 不斷進行，而造成 T1 cell 轉化[16]，以便觀察 cell cycle、cell growth、differentiation 及 death 等過程中分子機轉，本研究將 lac O 安插在猴病毒第 40 型(simian virus 40, sv40)的啟動子與 Ha-ras gene 之間而構築成一質體 pSV lacOras，將 pSV lacOras 質體與含有表現乳糖抑制基因(lac I)之質體：pH  $\beta$  lacINLSneo，協同 transfection T1 cell，命名為 T1R1。本研究發現 Quercetin 造成 T1 bladder carcinoma cell 及 Ha-ras 但未誘發之 T1R1 bladder carcinoma cell 產生 apoptosis，但對大量誘發表現 Ha-ras T1R1 之 apoptosis 卻為抑制作用，但對 G2/M 期 oncogene 活性參與誘發 apoptosis[12]無太大的改變。本研究針對菟絲子及其黃酮成分 Quercetin、Kaempferol 對 T1 cell 及 T1R1 cell 引起細胞凋亡的影響，並探討其分子機轉。

### 三、結果與討論

(一)Effects of quercetin, kaempferol, CCC

and CCO on T1, T1R1 and T1R1 (in the presence of IPTG)-induced cell proliferation: Quercetin 及 kaempferol 以 dose-dependent 方式抑制 T1 及 T1R1 細胞增生，其 IC50 分別為 68；58 $\mu$ g/ml (for T1 cell) 96.789 $\mu$ g/ml (for T1R1 cell)，在有誘導子(IPTG)存在下，quercetin 及 kaempferol 抑制細胞增生之情形亦相似。若將 quercetin 與 kaempferol 以 1:3.5 比例混合製成 CCC 或 1:2.5 比例混合製成 CCO 亦抑制 T1 及 T1R1 細胞增生，但抑制作用稍減弱。

(二)Effects of quercetin on cMyc level, Rb gene, p53 gene, bcl-2 level in T1/T1R1 or T1R1 cell (in the presence of IPTG): Quercetin (70 $\mu$ g/ml)明顯增加 T1 及 T1R1 細胞 p53 expression，同時減少 bcl-2 的表現，對 Rb 影響不大，對 c-Myc 含量稍微增加。在有 IPTG(2mM)存在下，quercetin 增加 T1R1 細胞 p53 表現與抑制 bcl-2 gene 表現的作用會消失。

(三)Effects of CCO on cMyc, p53 gene, bcl-2 level in T1R1 or T1R1 cells (in the presence of IPTG): 將 Quercetin 與 kaempferol 以 1:2.5 比例混合製成 CCO 在 T1 cell 明顯增加 cMyc level，但對 p53 及 bcl-2 影響不大。

Effects of quercetin on Ras activity, p21 gene expression, c-jun, c-myc activity, p53, Rb gene, bcl-2 level in T1/T1R1 or T1R1 cells (in the presence of IPTG): Quercetin (70 $\mu$ g/ml)明顯抑制 T1 及 T1R1 細胞 Ras activity, c-jun 及 cMyc level, bcl-2 gene 表現亦顯著減少；相反地，p53 及 p21 gene 表現是增加，但當有 IPTG (5mM)存在下，quercetin 對上述 gene 表現之調節作用即消失。

本研究發現菟絲子之黃酮成分—quercetin 及 kaempferol 以 dose-dependent 方式抑制人類膀胱癌 T1 細胞及未誘發 Ras 活性之膀胱癌 T1R1 細胞之增生，但以 IPTG 誘導子大量誘發表現

Ha-ras 之 T1R1 細胞，quercetin 之抗增生作用即減弱。此結果說明 quercetin 及 kaempferol 具有引發 T1 及 T1R1 cell 引起 apoptosis 之現象，但已引發 Ras-dependent signal transduction 增生之機轉後，quercetin 之抑制作用即減弱。Quercetin 抑制 T1 及 T1R1 cell 增生伴隨抑制 Ras 活性及 c-Jun/cMyc 含量；同時 p53 及 p21 gene 表現增加。在 K562 leukemia cell line, Quercetin 亦調降 c-Myc 及 ki-ras oncogene 活性參與誘發。先前研究指出 p53 在 G1 checkpoint 扮演基因監護之角色，受損的 DNA 會增加 p53 protein 含量，再經由刺激 p21 gene, p21 能與 CDK/cyclin 形成 complex 來抑制 cell cycle 前進，故 p21 在因壓力如 DNA 損傷所造成 p53-mediated cell cycle arrest 中扮演重要角色 (12-13)。本研究初步結果發現 quercetin 引起 apoptosis 與其增加 p53 及 p21 gene expression 有關。

Ras oncogene 由 point mutation 所活化，參與癌症形成 (17-18)，大約 30% 人類腫瘤與 ras 突變相關，Ras protein 在控制 cell proliferation 及 differentiation 的 signal transduction pathway 扮演樞紐的角色 (19-20)，由於 Ras 可啟動 transcription factor 如 c-Jun, c-myc 活化來參與增生，因此 Ras protein 在 mitogens 或其他生長因子傳遞至核內的路徑上是關鍵角色。本研究發現 quercetin 之抗細胞增生作用與其抑制 Ras 活性有關，同時轉錄因子(transcription factor) 如 c-Jun, c-Myc 活性伴隨抑制。先前本研究指出 quercetin 抑制 cancer cell 生長是經由活性 type II estrogen binding site (Type II Ebs) (21)，抑制 phosphoinositides breakdown (22) 是否在 T1/T1R1 cell 也抑制 PIP2 breakdown 有待進一步研究。quercetin 在人類胃及大腸癌細胞抑制 G1/S transition 而誘發細胞凋亡。P53 參與細胞 DNA 損傷反應 G1 arrest 或 apoptosis (23)，故 G1 靜止

是由 p53 媒介轉活化 p21 gene 所引發，p21 是 CDKI 可抑制 cell cycle 進行。本研究 quercetin 提昇 T1 及 T1R1 細胞 p53 及 p21 表現引起 apoptosis 很可能是經由造成 G1 靜止，但當大量誘發表現 Ha-ras 後之 T1R1 的凋亡現象即減弱，quercetin 似乎對 cell cycle G2/M 期無太大影響。

結論：quercetin 及 kaempferol 抑制 T1 及 T1R1 細胞增生，可能是經由抑制 Ras 活化及其依賴的轉錄因子 c-jun，c-myc 活性。同時造成腫瘤細胞進行細胞凋亡，其分子機轉可能是經由增加 p53 及 p21 基因表現所致。

### 計劃成果自評

本研究成果與原計劃相符合，並已基本達到預期目標，此研究成果適合於學術期刊發表。

### 五、參考文獻

1. 李儀奎，中藥藥理學，中國醫藥科技出版社，1993，180。
2. 陳泉生，中成藥研究，7:1，1983。
3. 鄒莉波，中藥藥理與臨床，6(5):16，1990。
4. 寧鶴鳴，中草藥，22(12):547，1991。
5. 丁安榮，中成藥，12(9):23，1990。
6. Nisa M, Akbar S, Tariq M, Hussain Z. Effect of *Casuta chinensis* water extract on 7,12-dimethylbenze [a] anthracene-induced skin papillomas and caseinomas in mice. *J Ethnopharmacol* 18(1):21-31, 1986.
7. Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 52(23):6676-81, 1992.
8. Nishioka H, Imoto M, Sawa T, Hamada M, Naganawa H, Takeuchi T, Umezawa K. Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from *Streptomyces*. *J Antibiotics.* 42(5):823-5, 1989.
9. Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sciences.* 60(24):2157-63, 1997.
10. Ron D : Inducible growth arrest: new mechanistic insights. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91(6):1985-6, 1994.
11. Pines J, Hunter T. Cyclins A and B1 in the human cell cycle. *Ciba Found Symp.* 170:187-96; discussion 196-204, 1992.
12. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature.* 377(6549):552-7, 1995.
13. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9(8):935-44, 1995.
14. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21<sup>CIP1</sup>/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 82(4):675-84, 1995.
15. Trahey M, Milley RJ, Cole GE, Innis M, Paterson H, Marshall CJ, Hall A, and McCormick F. Biochemical and biological properties of the human N-ras p21 protein. *Mol. Cell. Biol.* 7(1):541-4, 1987.
16. Tzeng CC, Liu SS, Li C, Jin YT, Chen RM, Yang WH, Lin JS: Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Res* 1996, 16:1797-804.
17. Barbacid M. Ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest.* 20(3):225-35, 1990.
18. Rodenhuis S. Ras and human tumors. *Semin Cancer Biol.* 3(4):241-7, 1992.
19. Khosravi-Far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 13(1): 67-89, 1994.
20. Medema RH, Bos JL. The role of p21<sup>ras</sup> in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog.* 4(6):615-61, 1993.
21. Piantelli M, Rinelli A, Macri E, Maggiano N, Larocca LM, Scerrati M, Roselli R, Iacoangeli M, Scambia G, Capelli A, et al. Type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of quercetin in human meningiomas. *Cancer.* 71(1):193-8, 1993.
22. Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 54(9):1013-8, 1997.
23. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10(9):1054-72, 1996.

