

熊果酸及齊墩果酸誘導人類肺癌細胞凋亡

黃雯雯¹、楊家欣²、何偉真³

¹中國醫藥大學通識教育中心 助理教授

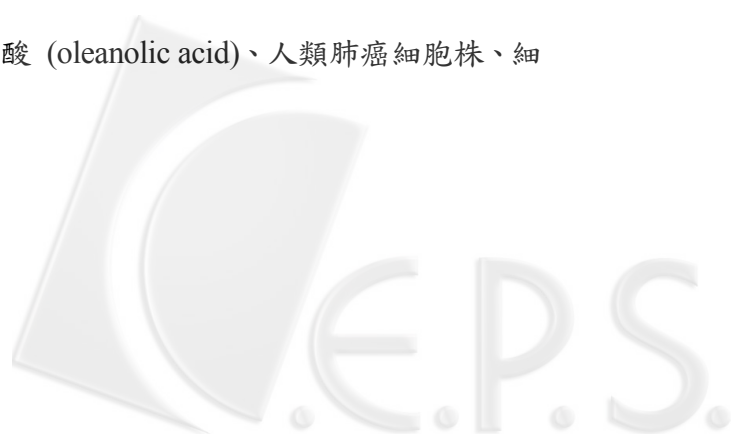
²元培科學技術學院 助理教授

³大葉大學生物資源系 教授

摘 要

熊果酸 (ursolic acid) 及齊墩果酸 (oleanolic acid) 皆屬 pentacyclic triterpene 化合物，有研究顯示此類化合物具細胞毒殺作用 (cytotoxicity)，可誘導細胞分化 (differentiation)，並有抗突變 (antimutagenic) 作用及抗病毒 (antiviral) 等活性。我們研究發現 ursolic acid 對人類血癌細胞株 (K562, U937)，人類大細胞肺癌株 (NCI-H460)，人類肺癌鱗狀上皮細胞株 (CH-27)，人類肺癌細胞株 (H1355) 皆具抑制效果，其中對 CH-27 細胞株，NCI-H460 細胞株，H1355 細胞株，抑制效果更為顯著， IC_{50} 分別為 50、100 and 300 $\mu\text{g/ml}$ ；而 oleanolic acid 對上述細胞株的毒殺作用似乎並不明顯。為更進一步探討熊果酸 (ursolic acid) 之抗癌機制，因此我們以熊果酸處理 CH27 細胞，進行 DNA 電泳分析，發現有 DNA 裂解現象，至於細胞周期試驗顯示無論是熊果酸還是齊墩果酸對 CH27 細胞株的細胞周期無明顯滯留現象，顯示二者沒有抑制細胞周期的作用。經西方墨點法測試蛋白質，結果顯示 Bcl-2 蛋白質的量隨處理時間增長而增加，而 Bax 蛋白質量則有下降的趨勢，顯示其抑制癌細胞生長的作用可能是藉由細胞凋亡 (apoptosis) 的途徑產生，造成凋亡的原因可能是透過與 Bcl-Xs 蛋白質相關機制，同時 Bax 蛋白質量降低亦是熊果酸導致細胞凋亡的機轉之一，值得作更深入之探討。

關鍵字：熊果酸 (ursolic acid)、齊墩果酸 (oleanolic acid)、人類肺癌細胞株、細胞凋亡 (apoptosis)



一、前言

我們在先前的實驗及文獻中發現茄科植物鈕仔茄 *Solanum incanum* 具有對癌細胞生長抑制的作用^{1,2}，並富含熊果酸 (ursolic acid, UA)³，此成分亦可在許多藥用植物中發現，因此我們即進行熊果酸 (ursolic acid)對癌細胞株毒殺作用之探討，將來或可作為部分抗癌中草藥的指標成分。熊果酸 (ursolic acid)為一種 pentacyclic triterpene 化合物，具細胞毒殺作用 (cytotoxicity)，可誘導細胞分化 (differentiation)，並有抗突變 (antimutagenic)作用及抗病毒 (antiviral)等活性^{4,5,6,7,8}。齊墩果酸 (oleanolic acid, OA)的化學結構與熊果酸類似，文獻報導二者皆具抗發炎、抗腫瘤作用⁹，本研究將比較齊墩果酸及熊果酸對人類肺癌細胞的抑制作用，並深入探討其誘導癌細胞凋亡 (apoptosis)之機轉。癌症一向是世界各國人口死亡的主因，國人癌症死亡人口亦長年居十大死亡原因之首，其中肺癌的發生率及致命率非常高，目前臨床上治療肺癌的方式主要是外科手術的切除、化學療法、放射線療法¹⁰，此外，尚有高溫療法、免疫療法及中草藥療法等，但預後並不十分良好，因此為了發展更有效的治療方法，可能要對肺癌細胞的生長特性作更深入的了解。一般肺腫瘤可區分為二大類，其一為小細胞肺癌 (Small cell lung carcinoma, SCLC)，另一種則為非小細胞肺癌 (Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)。而非小細胞肺癌又包括鱗狀上皮細胞肺癌 (Squamous cell carcinoma, SQCC)、大細胞肺癌 (Large cell carcinoma, LCC)及腺細胞肺癌 (Adenocarcinoma, ADC)等，CH27 細胞株是由國人分離而來，屬鱗狀上皮細胞肺癌，藉由研究熊果酸及齊墩果酸對此癌細胞株 (CH27)之制作用或可對國人肺癌的治療有一些幫助。

目前研究顯示細胞死亡的方式大致區分為幾類，其中細胞壞死 (necrosis)和細胞凋亡 (apoptosis)最為人知。細胞壞死為被動式死亡，細胞受到突然的嚴重傷害時，會使細胞內粒線體 (mitochondrion) 漲大，細胞無法調節滲透壓而細胞膜破裂溶解，細胞內溶解酵素 (lysosomal enzymes) 大量釋出，周圍組織細胞產生發炎反應。至於細胞凋亡則是有計畫性的死亡，是細胞在正常狀態下所發生有程序性的死亡過程。細胞凋亡時，細胞會有細胞膜皺縮 (shrinkage)，染色質縮合 (chromosome condensation)、DNA 斷裂 (DNA fragmentation)，以及形成凋

亡小體 (apoptotic bodies)等現象出現^{11,12}，但不會誘發發炎反應。直接偵測細胞凋亡的方法，可採用瓊脂凝膠電泳法 (agarose gel electrophoresis) 來觀察，DNA 會呈階梯狀排列的片段分析。執行細胞凋亡的機轉可能是一群蛋白水解酶 (protease)，尤其是 caspase (cysteine aspartate-specific protease) 有關，經由一連串 of 蛋白質酶解作用 (proteolysis cascade)，將死亡訊息傳送至下游，讓下游酵素 (如 endonuclease) 破壞 DNA 使細胞死亡。粒線體則是釋放出細胞色素 *c* (cytochrome *c*)，釋放至細胞質中的 cytochrome *c* 和 Apaf 1 結合後，即活化 caspase-9。caspase-8 和 caspase-9 的活化可啟動下游的 caspase-3 等蛋白質活化，一連串的活化機制最後造成核膜蛋白 (lamin) 的分解、PARP [poly (ADP-ribose) polymerase] 切斷以及 DNA fragmentation 等現象，最後導致細胞凋亡。因此藉由 DNA 裂解及以西方墨點 (Western blot) 偵測和凋亡有關蛋白質 (Bcl-2, Bax 等)¹³ 的表現量即可初步了解熊果酸是否可誘發 CH27 細胞凋亡。

二、實驗方法

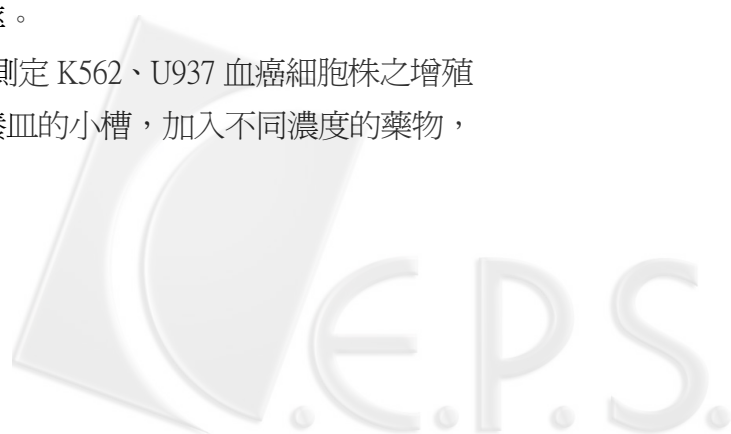
(一) 細胞株之培養

K562、U937、CH27、NCI-H460、H1355 等細胞株繼代培養於 RPMI-1640 培養基中，並添加 10 % FBS、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、2 mM L-glutamine；細胞置於 37°C，5% CO₂，溼度為 95% 的培養箱中培養。

(二) 細胞增殖率試驗

1. 應用 MTT method 測定肺癌細胞 CH27，NCI-H460，H1355 之增殖率，取 2.5×10^4 /ml 的細胞置於 96 well 培養皿的小槽中，以不同濃度的藥物與之培養 24 小時或 48 小時後，加入 10 μ l 5mg/ml MTT，於 37°C 反應 4 小時，再加等量含 0.02N HCl 的 isopropanol 溶解後，以 ELISA reader 分析其於 570 nm 下各樣品的吸光值，並計算細胞增殖率。

2. 以 PI (propidium iodide) exclusion 方法測定 K562、U937 血癌細胞株之增殖率，將 2.5×10^5 cells/ml 加入 24 well 培養皿的小槽，加入不同濃度的藥物，



培養 24 或 48 小時後，收集細胞，加入 PI 使其終濃度為 $5 \mu\text{g/ml}$ ，以流式細胞儀分析之，樣品中死亡細胞與活細胞的數目及比率，以 CELLQuest 軟體分析計算，以對照組之活細胞數為 100%，各處理組的活細胞數與對照組活細胞數的百分比則為細胞增殖率。

(三) DNA 裂解之電泳分析

細胞株經抽提物處理 24 小時後，收集細胞，加入 0.5 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 輕輕混合均勻後於冰上靜置 10 分鐘。經 13,000 rpm 離心 10 分鐘後取上清液，加入 0.1 mg/ml proteinase K 於 50°C 水浴中反應 24 小時後，再加入 $50 \mu\text{g/ml}$ RNase A 於 37°C 水浴中反應 30 分鐘。再以 phenol : chloroform (1 : 1) 萃取，上清液中的 DNA 以 50% isopropanol 及 $1 \mu\text{l}$ glycogen (20 mg/ml) 沉澱。純化的 DNA 樣品以 1% agarose gel (含 $1 \mu\text{g/ml}$ ethidium bromide 核酸染色劑) 電泳分析，於 UV 燈下觀察並照相記錄之。

(四) 西方墨點(Western blot)分析

不同時間點收集的細胞分別以下列兩種緩衝液處理之。(1) 欲測定總蛋白質中 Bcl-2、Bax、 β -actin 等蛋白質的表現量，則加入 $300 \mu\text{l}$ whole cell-lysis buffer (含 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% w/v bromophenol blue) (2) 欲測定細胞質中 cytochrome *c* 蛋白質量的變化，則加入 $150 \mu\text{l}$ cytosol-lysis buffer (含 pH 7.4 Tris-HCl 50mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, 0.3% 2-mercaptoethanol, 0.2 mM PMSF, $5 \mu\text{g}$ leupeptin, $55 \mu\text{g}$ aprotinin 之 $1\times\text{PBS}$)。混合均勻之細胞懸浮液經超音波震碎後，以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液並測量蛋白質濃度。取各時間點處理的蛋白質總量為 $30 \mu\text{g}$ 與 $3\times$ SDS 樣品緩衝液充分混合後，於 100°C 水中煮沸 5 分鐘，以 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 展開後，將蛋白質轉移至 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜上。PVDF 膜先以含有 5% non-fat milk 的 TPST (0.05% Triton X-100 in PBS) 緩衝液處理後，加入對人類蛋白質具專一性之初級抗體

(primary antibody, 如 anti-Bcl-2、anti-Bax 等), 以辨識各蛋白質, 4°C 反應隔夜後再利用接有 horseradish peroxidase 之次級抗體 (如 HRP conjugated anti-rabbit IgG 或 HRP conjugated anti-mouse IgG) 與之反應。各專一性抗體所辨識之蛋白質量的多寡, 利用 Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus Kit 試劑組進行酵素化學冷光反應後, 再以 Kodak X 光底片曝光呈像。

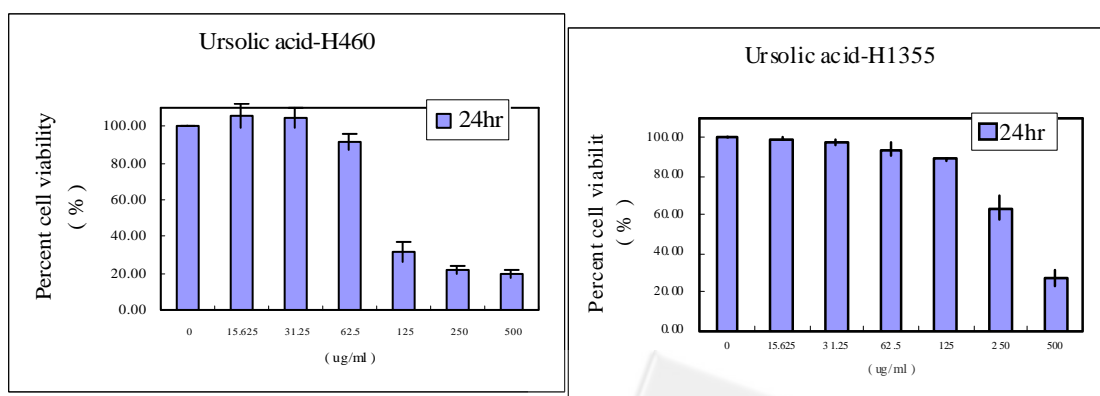
(五) 細胞週期之測定

經抽提物處理後之癌細胞株, 於間隔時間點收集, 用 1×PBS 清洗後, 加入低張 PI 溶液 (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 20 μ g/ml PI), 30 分鐘後立即以流式細胞儀測定 DNA 含量, 再以 Modfit 軟體分析細胞週期變化。

三、結果與討論

我們研究測試 ursolic acid 對肺癌細胞株(CH27, NCI-H460, H1355)及血癌細胞株(U937 及 K562) 皆有抑制生長的作用, 於處理 24 或 48 小時後, 以 MTT method 或 PI 染色及流式細胞儀分析法偵測細胞增殖率後結果顯示, ursolic acid 純品能顯著抑制以上各癌細胞株的增殖(圖 1, 2, 3), 並大致呈現劑量依存性 (dose-dependent) 之關係。而 oleanolic acid 對其他細胞株生長的抑制則不如預期 (data not show), 同樣的, 對 CH27 肺癌細胞株亦無明顯的抑制作用(圖 4)。而 ursolic acid 對癌細胞株增殖的抑制實驗結果顯示, ursolic acid 對癌細胞株有不同的致死敏感度, 意味著 ursolic acid 可能為具選擇性之癌細胞生長抑制劑。而 ursolic acid 對肺癌細胞株(CH27, NCI-H460, H1355)增殖率抑制作用中, 對 CH27 抑制效果最為明顯, 且 CH27 為台北榮總由國人所分離之肺癌細胞株, 值得對其進行進一步的研究(目前篩選抗癌藥物的重要指標有藉由細胞週期的停滯、誘導細胞凋亡與分化以達到抑制癌細胞的增生等機制)。而和 ursolic acid 皆屬 pentacyclic triterpene 化合物的 oleanolic acid, 二者結構類似⁹, 但對癌細胞株的增殖抑制似乎有很大差別, 將來或許可就結構的變化對癌細胞株的影響做進一步探討。

爲了證實在 ursolic acid 抑制 CH27 人類肺癌細胞之增殖是經由細胞凋亡的途徑，我們以 $50 \mu\text{g/ml}$ (IC_{50}) ursolic acid 處理 CH27 人類肺癌細胞後，抽取細胞質內的 DNA，並以瓊脂凝膠電泳分析，結果發現 DNA 呈 180 bp 梯度片段裂解的現象 (圖 5)。由 ursolic acid 處理後之人類肺癌鱗狀上皮細胞株 CH-27 可偵測到細胞凋亡的特性，包含細胞核的濃集及斷裂、DNA 的裂解等現象。顯示高劑量 ursolic acid 抑制肺癌細胞之增殖主要是經由細胞凋亡。ursolic acid 具細胞毒殺，誘導腫瘤細胞凋亡等作用¹⁴，經本實驗證明正確。有研究顯示，經 ursolic acid 處理之 HepG2 human hepatoblastoma cells 有 G0-G1 滯留的現象¹⁵，但在本實驗中細胞周期試驗顯示 ursolic acid 及 oleanolic acid 對 CH27 細胞株的細胞周期並無明顯滯留現象 (data not show)，表示二者沒有抑制細胞周期的作用，而 ursolic acid 誘發 CH27 細胞凋亡應不是經由抑制細胞周期而產生，同時亦顯示 ursolic acid 對不同細胞株之細胞周期的抑制作用具選擇性。西方墨點法測試經 ursolic acid 處理 CH27 細胞後之蛋白質，結果顯示 Bcl-2 蛋白質的量隨處理時間增長而降低，而 Bax 蛋白質量則有上升的趨勢(圖 6)，這和其他研究指出，ursolic acid 對 M4Beu melanoma cells 誘導凋亡是藉由改變 Bax-Bcl-2 之平衡，即 Bax 表現量增加，而 Bcl-2 表現降低之結果相吻合¹⁶。但對其他凋亡蛋白質則似乎並無明顯的影響，顯示 ursolic acid 抑制癌細胞生長的作用是藉由細胞凋亡(apoptosis)的途徑所產生，造成凋亡的原因可能是透過與 Bcl-Xs 蛋白質相關機制，值得作更深入之探討。



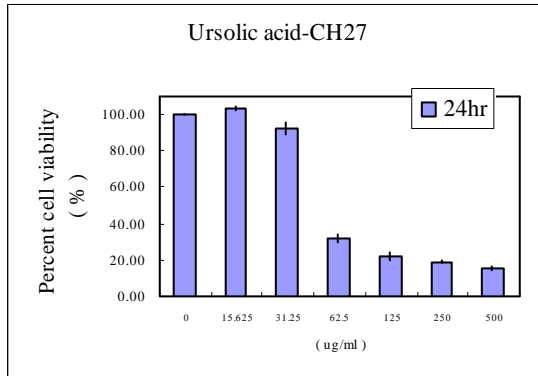


圖 1. 不同濃度 ursolic acid 對 H1355, H460, CH27 肺癌細胞株增殖率之影響。細胞經過處理 24 小時後，以 MTT method 偵測並利用 ELISA reader 分析其於 570 nm 下測定各樣品的吸光值。每個數值以平均值±標準差來表示（取樣數目為不同三重覆實驗）。

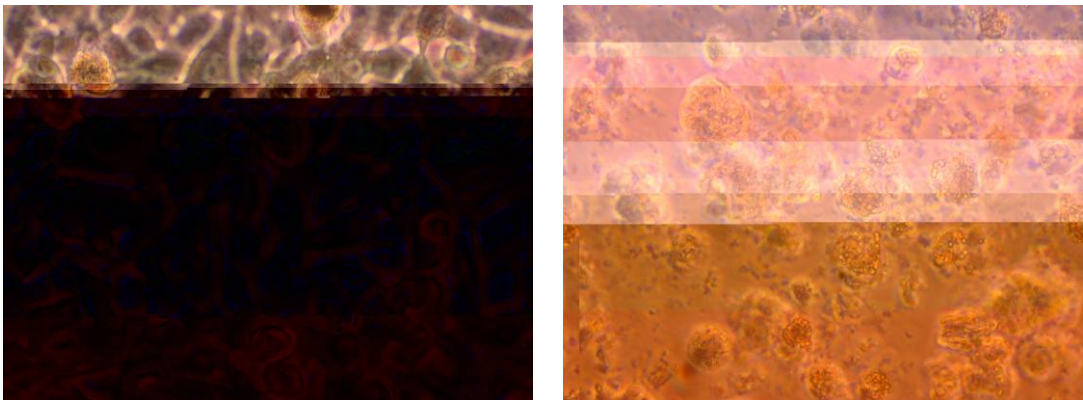


圖 2. 由左至右分別為 CH27 細胞株控制組，CH27 經 ursolic acid 處理 24hr 後細胞生長情形。

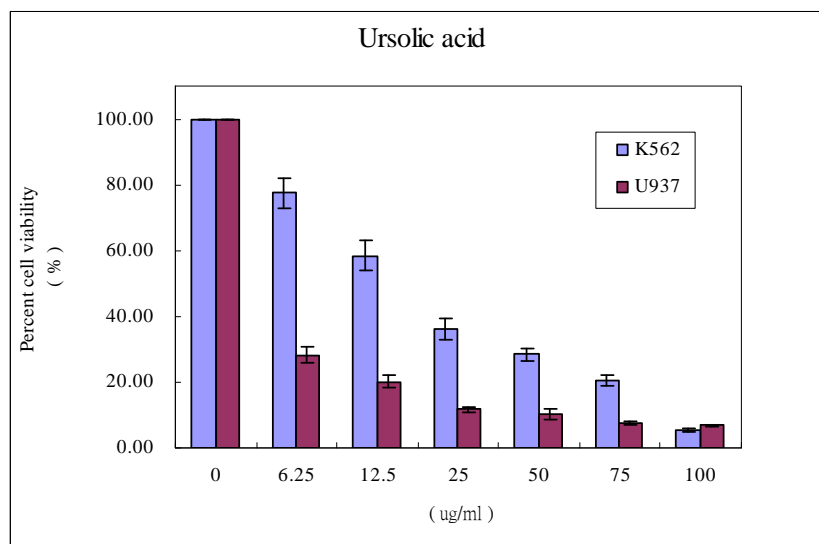


圖 3. 不同濃度 ursolic acid 對 K562 及 U937 血癌細胞株增殖率之影響。細胞經過處理 24 小時後，以 PI 染色。細胞增殖率為各處理樣品與對照組的存活細胞數目之百分比值。每個數值以平均值±標準差來表示（取樣數目為不同三重覆實驗）。

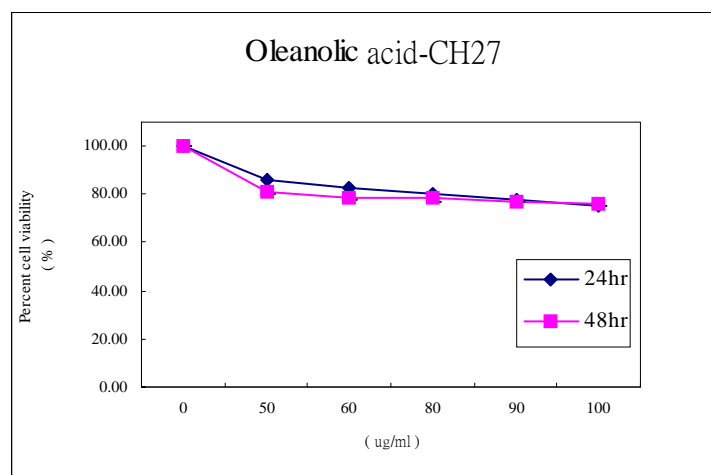


圖 4. 不同濃度 oleanolic acid 對 CH27 細胞株增殖率之影響。細胞經過處理 24 及 48 小時後，以 MTT method 偵測並利用 ELISA reader 分析其於 570 nm 下測定各樣品的吸光值。每個數值以平均值±標準差來表示（取樣數目為不同三重覆實驗）。

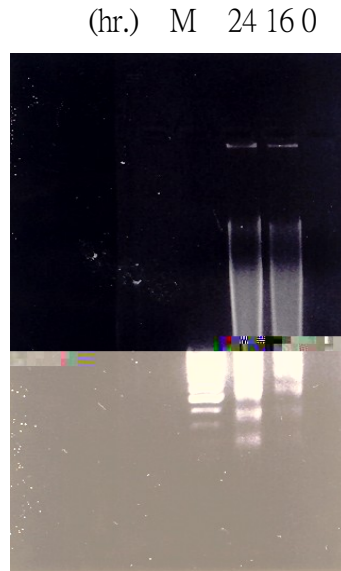


圖 5. 電泳分析 ursolic acid 處理之 CH27 細胞核 DNA 斷裂情形。
M : DNA Maker。CH27 以 50 μ g/ml 熊果酸處理。

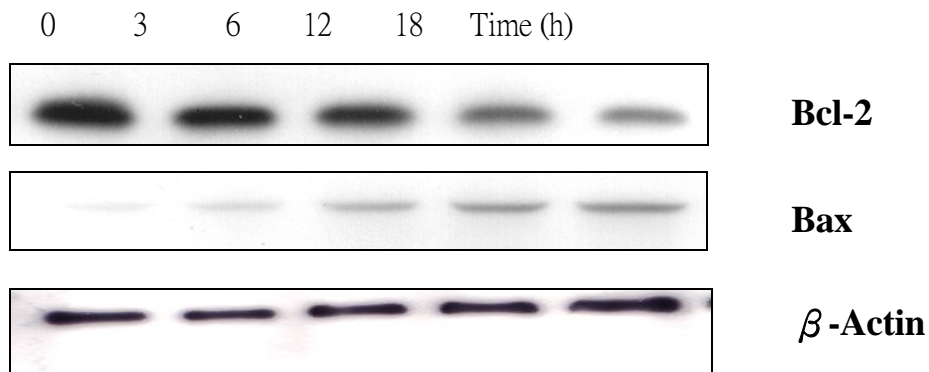


圖 6. Western blot 分析 50 μ g/ml ursolic acid 處理之 CH27 細胞內 Bcl-2, Bax 及 β -Actin 蛋白質量的表現, β -Actin 為 internal control。

誌 謝

感謝中國醫藥大學九十三學年度校內研究計畫 CMU93-GCC-05 之經補助, 使本文得以順利完成, 特此誌謝。



參考文獻

1. Kuo ,Kou-Wha, Shu-Hui Hsu, Yun-Ping Li, Wei-Ling Lin, Li-Feng Liu, Li-Ching Chang, Chih-Chao Lin, Chun-Nan Lin and Hamm-Ming Sheu (2000), Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine: Triggering apoptosis in human hepatoma cells . *Biochemical Pharmacology* 60(12): 1865-1873.
2. Hsu SH. TR.Tsai , CN. Lin, MH. Yen and KW. Kuo (1996) Solamargine purified from *Solanum incanum* Chinese herb triggers gene expression of human TNFR I which may lead to cell apoptosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 229(1): 1-5.
3. Lin CN. , CM. Lu, MK. Cheng, KH. Gan and SJ. Won (1990) The cytotoxic principles of *Solanum incanum*. *Journal of Natural Products*, 53(2): 513-516.
4. Chang, CI., CC. Kuo , JY. Chang and YH. Kuo (2004) Three new oleanane-type triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with cytotoxic activity against two human cancer cell lines. *Journal of Natural Products* 67(1): 91-93.
5. Harmand PO., R. Duval, B. Liagre , C. Jayat-Vignoles, JL. Beneytout, C. Delage and A. Simon (2003) Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells. *International Journal of Oncology* 23(1): 105-112.
6. Andersson D., JJ. Liu, A. Nilsson and RD. Duan (2003) Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. *Anticancer Research* 23(4): 3317-3322.
7. Hollosy F. , M. Idei, G. Csorba , E. Szabo , G. Bokonyi , A. Seprodi, G. Meszaros , B. Szende and G. Keri (2001) Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. *Anticancer Research*, 21(5): 3485-3491.
8. Novotny L., A. Vachalkova and D. Biggs (2001) Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. Minireview *Neoplasma* 48(4):

- 241-246.
9. Kim KA., JS. Lee, HJ. Park, JW. Kim, CJ. Kim, IS. Shim, NJ. Kim, SM. Han and S. Lim (2004) Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. *Life Sciences* 74(22): 2769-2779.
 10. Bunn P.A. Jr (1997) Overview of chemotherapy for small cell lung cancer. *Seminars in Oncology* 24 (Sup97): S7-69-S7-74.
 11. Reed J. C. (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.* 7: 314-319.
 12. Kerr J. F., C.M. (1994) Winterford and B.V. Harmon, Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): 2013-2026.
 13. Antonsson BJ. and C. Martinou (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256: 50-57.
 14. Novotny L, A. Vachalkova, and D. Biggs (2001) Ursolic acid: An anti-tumorigenic and chemopreventive activity. *Minireview Neoplasma* 48(4): 241-246 .
 15. Kim DK., JH. Baek, CM. Kang, MA. Yoo , JW. Sung, HY. Chung, ND. Kim, YH. Choi, SH. Lee and KW. Kim (2000) Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal of Cancer.*, 87(5): 629-36.
 16. Harmand PO., R. Duval, C. Delage and A. Simon (2005) Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *International Journal of Cancer* 114(1):1-11.



URSOLIC ACID AND OLEANOLIC ACID INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN LUNG CANCER CELLS

W. W. Huang¹, J. S. Yang², W. J. Ho³

¹ Assistant Professor, General Education Center, China Medical University

² Assistant Professor, Department of Medical Technology, Yuan-Pei University
of Science and Technology

³ Professor, Department of Bioresources, Da-Yeh University

Abstract

The compounds of pentacyclic triterpene (include ursolic acid and oleanolic acid) have been reported to raise anti-tumor activities. In this study, we investigated the anti-tumor effects of ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA) on human lung squamous cancer CH-27 cells, human lung large cell carcinoma NCI-H460 cells and human lung cancer H1355 cells lines. UA inhibited the cell proliferation with dose- and time- dependence, and the IC₅₀ of UA on CH27, NCI-H460 and H1355 cells were 50, 100 and 300 µg/ml, respectively.

But OA seemed to have no cytotoxic effect on CH27, NCI-H460 and H1355 cells. UA showed to have better inhibitory effect on CH-27 than the other two (NCI-H460, H1355). We focused on the apoptosis experiment of CH-27 cells and found a phenomenon of DNA fragmentation. Our results were consistent with the published research data as evidenced by the up-regulation of pro-apoptotic Bax protein and the down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein during UA induced apoptosis.

The precise mechanism of the induction of apoptosis by UA in CH27 cells will be the subject for further investigation in our research.

Key words: ursolic acid, oleanolic acid, human lung cancer cell lines, apoptosis
Requests for reprints should be sent to General Education Center, Department of
Biology , China Medical University, 91 Hsueh-Shih Road, Taichung 404, Taiwan
E-mail: wwhuang@mail.cmu.edu.tw

