

赤松松針萃取物在動物體內抗血癌作用之探討

黃雯雯¹、黃泰源²、楊家欣³

¹中國醫藥大學通識教育中心 助理教授

²國立中興大學化學工程所 博士生

³元培科學技術學院醫技系 助理教授

摘 要

我們篩選由中興大學化工所 張傑明 教授提供一系列松針萃取物，發現赤松松針萃取物 (RPS 與 FP) 對人類血癌細胞株 HL-60、U937、K562 與老鼠血癌細胞株 WEHI-3 之生長具良好抑制作用，且抑制作用呈劑量依存性關係。初步的研究顯示赤松松針萃取物抑制癌細胞生長的作用可能經由細胞週期抑制及誘發細胞凋亡。活體測試赤松松針萃取物對 Balb/c 小鼠之毒性，結果顯示口服給予赤松松針萃取物 100mg/kg 及 1000mg/kg 並無明顯的毒性反應。我們評估赤松松針萃取物在 WEHI-3/Balb/c 小鼠活體的抗癌的活性發現，經由 WEHI-3 癌細胞注射之小鼠於 28 天後體重有明顯下降的現象，同時活動力降低，毛色光澤度差，有身體捲曲之現象。而無論是以 WEHI-3 癌細胞注射之小鼠同時口服給予赤松松針萃取物或是給予癌細胞 7 天後再口服給予赤松松針萃取物的組別，雖然體重無明顯下降，其餘脾臟及肝臟腫大的情形，表面抗原增加的趨勢並沒有明顯的降低，因此推論赤松松針萃取物對 WEHI-3/Balb/c 小鼠體內血癌病變無明顯抑制作用。而由老鼠體重、活動力、肝臟及脾臟腫大情形，以及血清生化檢測值等毒性試驗結果顯示赤松松針萃取物對 Balb/c 小鼠無明顯的毒性，未來或許可從增加抵抗力等保健的方向作進一步的探討。

關鍵字：赤松、血癌、動物試驗



一、前言

根據衛生署之研究資料顯示癌症近二十年來一直是十大死因之首，因此，癌症之防治是研究人員共同奮鬥的目標之一，不論是對腫瘤之篩檢、抗癌新藥的開發及改善治療的方式皆有許多斬獲，同時早期發現之癌症亦有良好的治療方式。但癌症的死亡率仍然偏高，歸納其原因為國人普遍對癌症仍有諱疾忌醫心態，防治及宣導仍有加強之空間外，也可能是常用的化學療法、放射性療法等治療方法副作用過於劇烈所致，所以如何有效控制癌症節節升高的罹患率，仍有待共同的努力。本研究以血癌為探討目標，臨床上常使用化學療法治療血癌，但對人體易造成很大的傷害，但副作用大且部分已產生抗藥性，因此開發具有抑制血癌細胞生長且降低副作用的藥物，是刻不容緩的事^{1,2}。

新藥開發除需經細胞株的離體實驗證實外，建立疾病的動物模式及活體實驗亦非常重要。血癌動物模式的建立自 1996 年 Dr. Bertram 利用來自 Balb/c 老鼠產生的血癌細胞株 WEHI-3 (myelomonocytic leukemia of Balb/c origin)，以靜脈注射方式注入 Balb/c 老鼠體內，經 6-21 天後發現老鼠體內肝臟、脾臟皆有腫脹現象，並由組織切片染色發現脾臟內有 90% 以上為浸潤的血癌細胞，成功地誘導 Balb/c 老鼠產生 Leukemia³。源自 Balb/c 老鼠之血癌細胞株 WEHI-3 (myelomonocytic leukemia) 為一未分化完全之血癌細胞株，其特性和人類人類骨髓性白血細胞株 HL-60、U937、K562 等細胞類似。經由 Retinoic acid 等誘導劑處理的 WEHI-3 細胞以細胞表面抗原 CD11b (Mac-1) 染色等方法檢測均證實誘導劑確能誘導其分化為具有功能的巨噬細胞⁴。因此，本實驗利用以 WEHI-3 細胞為主建立的 Balb/c 血癌動物模式，篩選抗骨髓性白血病的作用藥物並且或可進一步探討藥物之作用機轉。

我們篩選由中興大學化工所張傑明教授提供一系列五葉松及二葉松(含赤松)松針萃取物進行一系列癌細胞株之毒殺試驗，發現赤松松針萃取物 (RPS) 對 HL-60、U937、K562 等血癌細胞株之生長具最佳的抑制作用⁵，由細胞週期之分析發現癌細胞株經由赤松松針萃取物可抑制細胞週期的進行，使 HL-60 之 G₀/G₁ 期細胞族群比例顯著增加，同時伴隨有 sub-G₀/G₁ 凋亡族群增加的現象⁵。在此，我們建立以 WEHI-3 血癌細胞株誘發 Balb/c 老鼠產生 Leukemia 的血癌動物模式 (Leukemia animal model)，並根據體重、

老鼠活動力、毛色之光澤、身體外觀現象、體內淋巴結與脾臟腫脹情形、血液細胞表面抗原的表現等對赤松松針萃取物進行離體及活體毒性及抗癌評估。結果顯示 WEHI-3 細胞以靜脈注射方式注入 Balb/c 老鼠體內能成功的誘導血癌病變產生。離體實驗顯示赤松松針萃取物具抑制老鼠血癌細胞株 WEHI-3 增殖的作用。毒性測試則顯示赤松松針萃取物對小鼠並無明顯的急性毒性。而針對赤松松針萃取物在小鼠的抗癌的活性方面，我們推論赤松松針萃取物對於老鼠體內血癌細胞可能無明顯的抑制作用。

二、材料與方法

(一) 實驗動物、細胞株培養、藥物配製與給藥方式

1. 實驗動物: 使用年齡為 16-20 週的 Balb/c 雄性小白鼠, 其體重為 17-25 公克重。小白鼠飼養於乾淨之鼠籠中, 並以乾淨的老鼠飼料與水餵食。
2. 細胞株: WEHI-3 (myelomonocytic leukemia of Balb/c origin) 購自食品工業研究所, 其 WEHI-3 細胞培養於 IMDM (GIBCO) 培養液中, 包含 10% 胎牛血清(Hyclon)、100 U/ml penicillin(GIBCO)、100 g/ml streptomycin(GIBCO)、0.06 % 2-mercaptoethanol(Sigma), 並置於 37 °C、5 % 之 CO₂ 培養箱中培養。
3. 藥物之配製及給藥方式: 赤松松針萃取物 (RPS)由中興大學化工所張傑明教授提供。赤松松針萃取物溶於 0.5% CMC (Sigma) 溶液中, 以口服方式給藥 (100mg/kg 或 1000mg/kg)。WEHI-3 細胞則以靜脈注射 (i.v.) 方式注入 20 µl 於 Balb/c 小白鼠體內。

(二) 赤松松針萃取物對 WEHI-3 細胞之體外毒殺作用(*in vitro*)測試-MTT 測驗

MTT 之試驗: 將 2.5×10^4 的 WEHI-3 細胞置於 96 well 細胞培養皿中, 以不同濃度之赤松松針萃取物處理, 各 well 之總體積為 100 µl, 待培養 24 小時後, 每一 well 之後加入 10 µl 之 5 mg/ml 之 MTT, 再於 37°C 下反應 4 小時後每 well 加入 110 µl 含 0.02 N HCl 的 isopropanol, 使細胞內黑色沉澱顆粒完全溶解後, 再用 ELISA reader 於波長 570 nm 下測定各樣品吸光值。



$$\text{存活率} = \frac{\text{抽提物處理(對照組)24 小時之 O.D.}_{570}}{\text{未做任何處理 24 小時之 O.D.}_{570}} \times 100 \%$$

(三) 赤松松針萃取物之毒性試驗

急性毒性試驗：Balb/c 小白鼠以赤松松針萃取物以 100、1000 mg/kg 之劑量連續 3 天餵食。依據以下方法檢測其毒性。毒性之評估以觀察外觀之變化並犧牲實驗老鼠，觀察其脾臟、肝臟及淋巴結的變化。同時以心臟採血的方式收集全血並離血清，依據 Chema 公司所提供的試劑組方法檢測血液之 ALB、GLU、PRO、CRE、BUN 等生化檢查值。

(四) 赤松松針萃取物的抗癌作用評估

以靜脈注射方式給予癌細胞，並分別同時口服給予赤松松針萃取物 1000mg/kg 或注射癌細胞 7 天後再給赤松松針萃取物 1000mg/kg，給藥後 28 天，我們評估 WEHI-3/Balb/c 血癌之改善與否，檢測方法如下：觀察外觀之變化、動物活動力是否降低、體重是否改變等，並犧牲實驗老鼠，觀察脾臟、肝臟及淋巴結等器官的變化，並將肝脾臟等器官秤重，同時紀錄老鼠存活率，並以螢光抗體染色法分析細胞表面抗原如 CD3、CD19、CD11b、CD14、Mac3、CD45 等表現之情形。

三、結果

(一) 赤松松針萃取物對 WEHI-3 細胞之體外毒殺作用

為確定赤松松針萃取物除可抑制 HL-60、U937、K562 等人類骨髓性白血細胞株之細胞增殖（圖一），也可有效的抑制老鼠血癌細胞株 WEHI-3 之增殖，我們將 WEHI-3 細胞以各種不同濃度之赤松松針萃取物處理 24 小時，以 MTT 方法檢測細胞增殖率。結果顯示赤松松針萃取物具抑制老鼠血癌細胞株 WEHI-3 的增殖之作用，且抑制作用呈劑量依存性 (dose-dependent) (圖二)。

(二) 赤松松針萃取物之毒性試驗

在毒性試驗中，我們分別以 100、1000 mg/kg 進行檢測。對照正常老鼠



發現經由赤松松針萃取物三天處理後小鼠後體重並無顯著改變（表一），活動力及毛色光澤亦無差異。將老鼠犧牲後，發現口服赤松松針萃取物之小鼠，鼠蹊及腸繫膜淋巴結、脾臟及肝臟與正常老鼠相比無明顯腫大現象（表一）。檢測血清之生化檢查值我們發現，口服赤松松針萃取物之小鼠與正常老鼠一樣，其 ALB、GLU、PRO、CRE、BUN 等生化檢查值並無顯著差異（圖三）。因此，我們推論赤松松針萃取物在 1000 mg/kg 劑量下並無明顯的毒性。

（三）赤松松針萃取物的活體抗癌作用評估

評估赤松松針萃取物在 1000 mg/kg 劑量下並無明顯的毒性，且離體實驗中亦證實具有抑制 WEHI-3 細胞的增殖效用，因此我們開始實驗赤松松針萃取物是否在 WEHI-3/Balb/c 小鼠體內具有抗癌的活性。以靜脈注射方式給予癌細胞後，並分別同時口服給予赤松松針萃取物 1000mg/kg 或注射癌細胞 7 天後再給赤松松針萃取物 1000mg/kg，給藥後 28 天後，作抗癌評估。對照正常老鼠發現經由 WEHI-3 癌細胞注射之小鼠 28 天後體重有下降的趨勢（表二），同時活動力降低，毛色光澤度差，有身體捲曲之現象。然而，同時口服赤松松針萃取物或是給予癌細胞 7 天後再口服赤松松針萃取物，其體重並沒有下降的情形（表二）。將老鼠犧牲後，發現給予癌細胞並同時口服赤松松針萃取物或是給予癌細胞 7 天後再口服赤松松針萃取物之小鼠，其肝臟及脾臟重量皆有增加的情形（表二）。以螢光抗體染色法分析細胞表面抗原，發現赤松松針萃取物或是給予癌細胞 7 天後再給予赤松松針萃取物，對照只給癌細胞的小鼠，其血液及脾臟細胞表面抗原 CD19、CD3、CD11b、CD14、Mac-3 增加的趨勢並無明顯降低的現象（圖四、五）。根據以上結果，我們初步推論口服給予赤松松針萃取物 1000 mg/kg 於老鼠體內似乎並沒有非常明顯抑制血癌病變生成的作用。

四、討論

先前的研究我們發現赤松松針萃取物對 HL-60、U937、K562 等人血癌細胞株具生長抑制作用，主要是經由細胞週期抑制(G_0/G_1 arrest)，及誘發細胞凋亡作用，對 HL-60 並具誘導細胞分化之作用⁵。其中，WEHI-3 細胞具正常 p53 之功能，而 HL-60 與 U937 皆為 p53 基因有缺失的細胞。同時在離

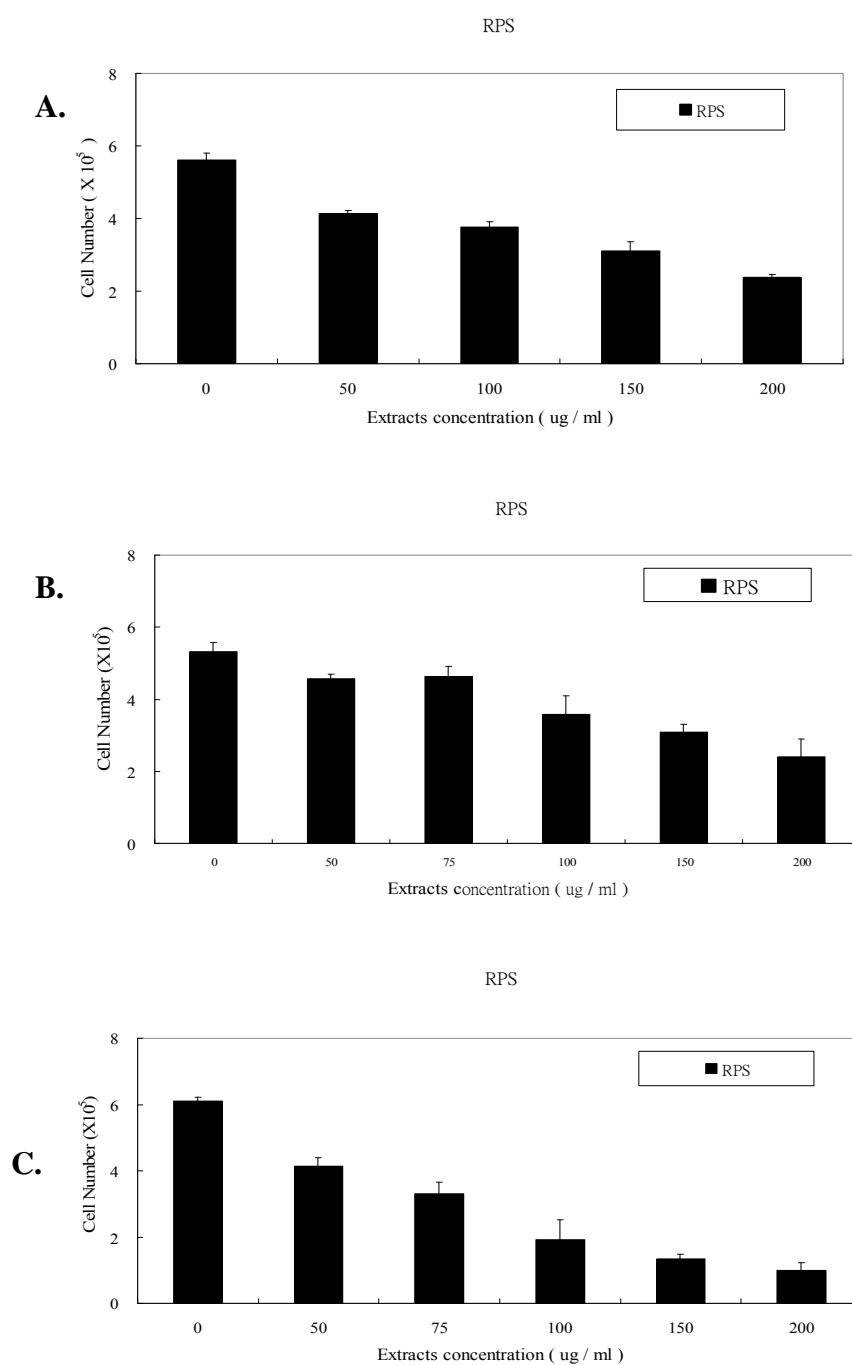
體的細胞實驗中，我們亦發現赤松松針萃取物可有效的抑制 WEHI-3 細胞的增殖率。至於赤松松針萃取物抑制 WEHI-3 細胞增殖之詳細機轉則須要作更進一步的探討。

在本實驗中，我們以同源老鼠的血癌細胞株 WEHI-3 打入 Balb/c 老鼠體內，成功的建立了誘發 Balb/c 老鼠產生血癌的動物模式。本實驗結果顯示將 WEHI-3 細胞株以靜脈注射的方式注入 Balb/c 老鼠體內 14 天後，不僅體重有開始下降，活動力降低，毛色光澤度變差，身體捲曲，鼠蹊及腸繫膜淋巴結有腫大情形，同時脾臟亦有腫大的等現象，進一步檢測發現，血液細胞表面抗原 CD11b、CD14 及 Mac3 等有增加的趨勢。

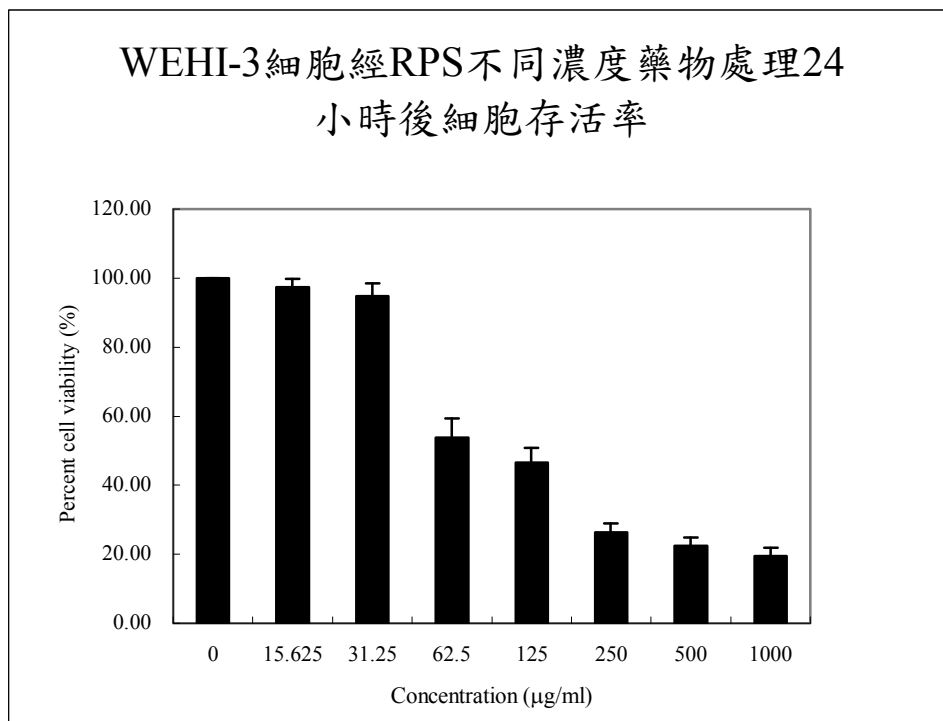
Dr. Bertram 等利用來自 Balb/c 老鼠產生的血癌細胞株 WEHI-3 以靜脈注射方式注入 Balb/c 老鼠體內，經 6-14 天後發現老鼠體內肝臟、脾臟也有腫脹現象，誘使小鼠體內產生血癌³，結果與我們所觀察而得的結果相似。另外 Dr. Qun 等亦曾經利用相同細胞株及實驗動物，以腹腔注射 (i.p.) 的方式誘發 Balb/c 老鼠發生血癌，亦同樣觀察到相似的結果，提供了一個誘導血癌更為便利的動物模式。事實上，除上述方法外，目前已發展出的血癌動物模式，包括以致癌物誘導小鼠產生血癌⁶，利用基因轉殖技術製造基因剔除的老鼠⁷，SCID 小鼠注入血癌細胞株誘導血癌⁸等方式。源於 Balb/c 老鼠血癌細胞株 WEHI-3 為一株未分化完全的單核球血癌細胞，其特性和人類人類骨髓性白血症細胞株 HL-60、U937、K562 細胞頗為相似。誘導劑如 ATAR 及 1,25-Vitamin D3 等皆能使 WEHI-3 細胞進行分化。對 WEHI-3 細胞進行表現抗體染色時，其細胞表面表現顯著的抗原包括有 CD11b、CD14、Mac-3，因此以 WEHI-3 細胞建立的血癌動物模式，可利用血液表面抗原染色法鑑別是否成功誘發血癌並可初步篩選藥物是否具有抗癌的作用。

我們的結果顯示赤松松針萃取物在 WEHI-3 血癌細胞的離體試驗雖然具有抑制生長的作用，但對 WEHI-3 所誘發的 Balb/c 小鼠產生血癌的活體試驗中，並沒有非常明顯的抗癌作用，是否因口服吸收不佳所致，尚待進一步釐清。但無論如何我們的研究結果顯示赤松松針萃取物毒性非常小，和吳克楓等 (1998) 及俞紅等 (1997) 之實驗結果相吻合^{11,12}，另外小劑量之赤松松針萃取物並可誘導 HL-60 細胞的分化⁵，且注射 WEHI-3 細胞後再給赤松松針萃取物之小鼠體重也沒有明顯的降低或活動力減少的情形，因此，我們認為赤松松針萃取物或可開發為一保健食品或癌症治療藥物的輔助劑。

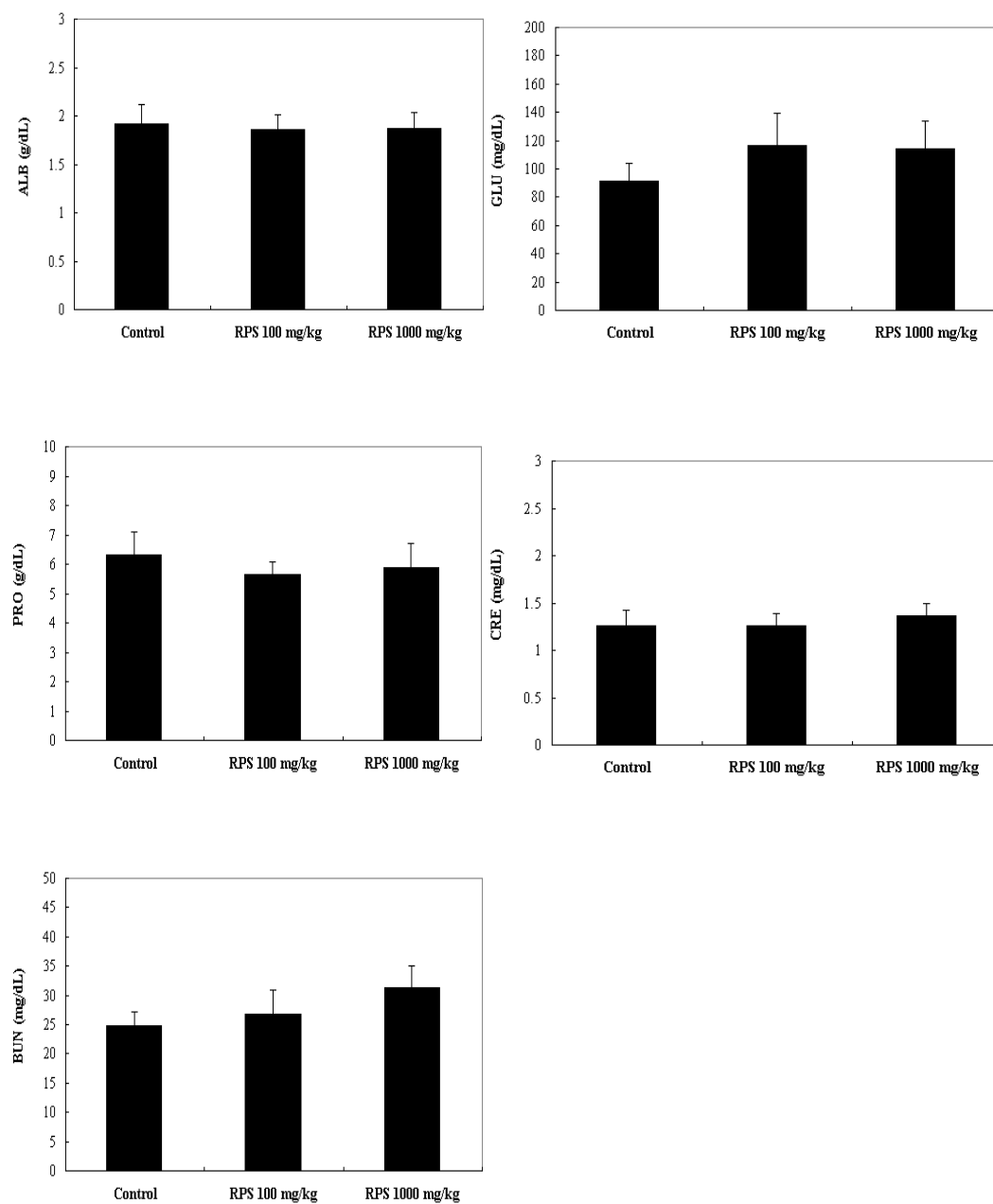




圖一 不同濃度赤松松針萃取物(RPS)對 HL-60 (A), U937(B), K562(C) 血癌細胞增殖率之影響，每個數值以平均值±標準差來表示（取樣數目為3）

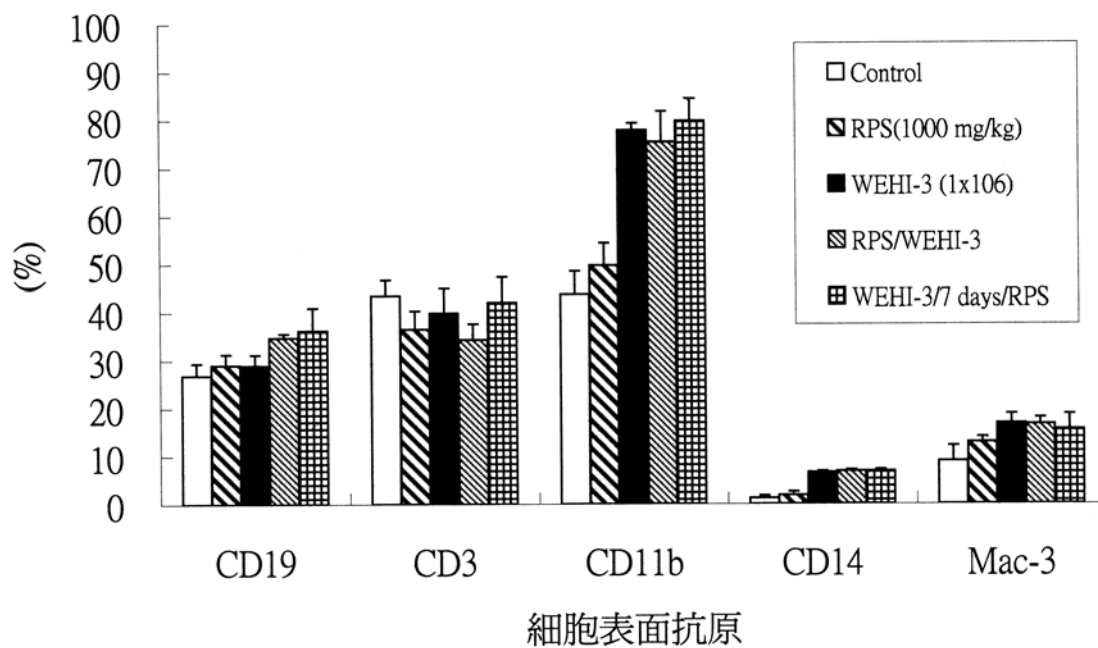


圖二 不同濃度赤松松針提取物(RPS)對 WEHI-3 血癌細胞增殖率之影響，每個數值以平均值±標準差來表示（取樣數目為3）



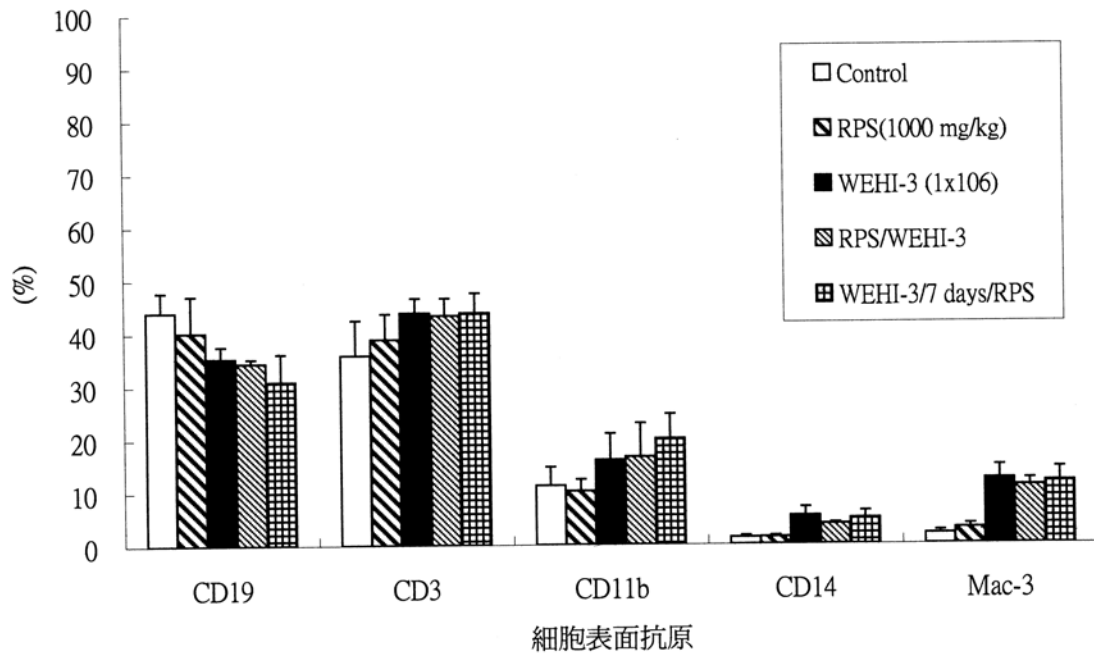
圖三 不同濃度赤松松針萃取物(RPS)對 Balb/c 老鼠血清生化值之影響，每個數值以平均值±標準差來表示（取樣數目為3）

圖四：Balb/c 小鼠血液細胞表面抗原分佈族群百分率



各組小鼠週邊白血球細胞族群分佈百分率，各細胞族群百分比乃週邊白血球以專一性的小鼠細胞表面抗原之螢光抗體染色後，經流式細胞儀分析，並以平均值±標準差表示。

圖五： Balb/c 小鼠脾臟細胞表面抗原分佈族群百分率



各組小鼠脾臟細胞族群分佈百分率，各細胞族群百分比乃脾臟細胞以專一性的小鼠細胞表面抗原之螢光抗體染色後，經流式細胞儀分析，並以平均值±標準差表示。

組別	0 天之體重	3 天後之體重	肝臟重量	脾臟重量
Control	21.70 ± 2.10	21.10 ± 1.90	1.01 ± 0.07	0.09 ± 0.02
0.5% CMC 200 μ l	21.80 ± 2.60	22.00 ± 2.40	1.04 ± 0.12	0.08 ± 0.01
RPS/0.5% CMC (100 mg/kg)	22.30 ± 1.90	22.00 ± 2.11	1.02 ± 0.12	0.08 ± 0.01
RPS / 0.5% CMC (1000 mg/kg)	22.30 ± 3.01	22.00 ± 3.01	1.06 ± 0.21	0.08 ± 0.01

組別	0 天之體重	28 天後之體重	肝臟重量	脾臟重量
Control	16.50 ± 0.50	18.33 ± 0.76	0.09 ± 0.01	0.95 ± 0.04
RPS/0.5% CMC (1000mg/kg)	15.83 ± 1.04	17.00 ± 0.87	0.07 ± 0.01	0.74 ± 0.06
WEHI-3 cell only	17.17 ± 0.58	16.67 ± 0.29	0.21 ± 0.03	1.11 ± 0.13
同時給 RPS/0.5% CMC (1000mg/kg) 及 WEHI-3 cell	16.83 ± 0.58	18.07 ± 1.25	0.16 ± 0.03	1.23 ± 0.28
給 WEHI-3 cell 7 天後再給予 RPS/0.5% CMC (1000mg/kg)	15.67 ± 1.26	17.33 ± 0.76	0.19 ± 0.06	1.22 ± 0.09

五、誌謝

感謝中國醫藥大學九十一學年度校內研究計劃（編號 CMC-91-GCC-07）之經費補助，使本文得以順利完成，特此誌謝。

六、參考文獻

1. Cunliffe, W.J., et. al., (1984) Retinoid Therapy, MTP: Lancaster.
2. Kizaki M. et. al., (1999), A novel retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in vitro and in vivo (review). *Int. J. Mol. Med.* . **4** , p359-364.
3. Glass B. et. al. (1996), Graft-versus-leukemia activity can be predicted by nature cytotoxicity against leukemia cells. *Bri. J. Heamatol.*. **93** , p412-20.
4. Abe J. et. al. (1986), Modulation of cell growth, differentiation, and production of interleukin-3 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in the murine myelomonocytic leukemia cell line WEHI-3. *Cancer Res.* **46** , p6316-21.
5. Huang W. et. al. (2002), Pine needle extract induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *J. Chin. Med. Sci.* 3(3), 197-210.
6. Pazos P. et. al.,. (2001), Protective role of medroxyprogesterone acetate on N-methyl-N-nitrosourea-induced lymphomas in BALB/c female mice. *Leukemia Res.* . **25** , p165-167.
7. Verbeek W. et. al., (2001), C/EBPepsilon $-/-$ mice: increased rate of myeloid proliferation and apoptosis. *Leukemia.* **15** , p103-111.
8. Fukuchi Y. et. al., (1999), Human acute myeloblastic leukemia-ascites model using the human GM-CSF- and IL-3-releasing transgenic SCID mice. *Ann. Hematol.* . **78** , p223-231.
9. Garcia-Castro J et. al. (2000), Transplantation of syngenic bone marrow contaminated with NGFr-marked WEHI-3B cells: an improved model of leukemia relapse in mice. *Leukemia.* **14** , p457-65.
10. He Q. et. al. (2001), The effects and mechanisms of a novel

2-aminosteroid on murine WEHI-3B **leukemia** cells in vitro and in vivo.
Leu. Res. **25**, p455-461.

11. 吳克楓等 (1998), 〈松針汁對大鼠生長發育與致畸性之研究〉, 《鐵道勞動安全衛生與環保》, 25, p97-100。
12. 俞紅等 (1997), 〈松針汁的毒性及致突變性研究〉, 《貴州醫藥》, 21, p131-133。



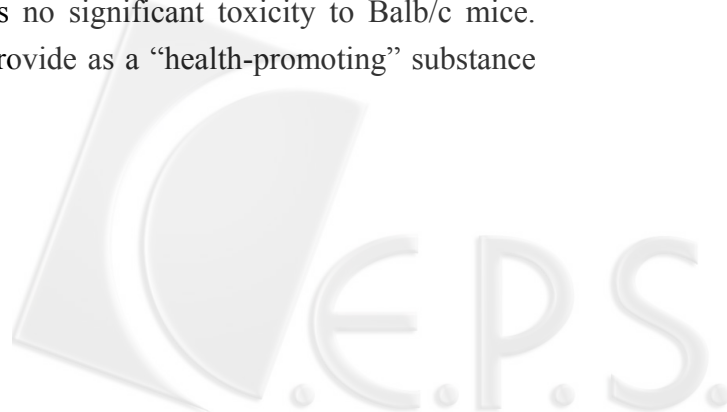
STUDY OF THE ANTICANCER ACTIVITY OF EXTRACT FROM PINUS DENSIFLORA IN LEUKEMIA ANIMAL MODEL

W. W. Huang¹, T. Y. Huang², J. S. Yang³

- ¹: **Assistant professor, Center of General Education, China Medical University**
- ²: **Graduate Student, Department of Chemical Engineering, National Chung Hsing University**
- ³: **Assistant professor, Department of Medical Technology, Yuan-Pei University of Science and Technology**

Abstract

We have investigated the effects of pine needles extract RPS (extracted from *Pinus densiflora*), on human leukemia cells HL-60, U937, K562 and WEHI-3. A dose-dependent decrease in cell proliferation was observed in RPS treated cells. The IC₅₀ of RPS was 166.07 µg/ml for HL-60, 93.96 µg/ml for U937, and 177.29 µg/ml for K562 cells respectively. Cell cycle analysis showed that RPS induced significant G0/G1 arrest and apoptosis in HL-60 cells. The RPS induced-G0/G1 arrest occurred before the onset of apoptosis. In animal study, RPS has less cytotoxic effects in Balb/c mice on 100mg/kg and 1000 mg/kg (P.O.). No effect of RPS on survival rate and body weight loss in leukemia mice with one month of experiment. The enlargement of spleen and lymph nodes and liver metastasis were not reduced in RPS treated groups. But flow cytometric analysis of leukocyte subtypes in PBMC showed that PBMC cell population was not change in RPS-treated mice than that in untreated mice. The results indicate that the RPS at concentrations of at 1000 µg/ml has no significant toxicity to Balb/c mice. These results suggest that RPS could provide as a “health-promoting” substance for human in the future.



Key word: *Pinus densiflora*, leukemia, animal test

Requests for reprints should be sent to Wen-wen Huang, General Education Center, China Medical University, 91 Hsueh-Shih Road, Taichung 404, Taiwan.
E-mail: wwhuang@mail.cmu.edu.tw

