

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

省產石花菜對於誘導癌細胞程序化凋亡的探討

Induction of apoptosis by a red agar, *Gelidium amansii*, cultivated in Northeast Taiwan

計畫編號：NSC 89-2320-B-038-037

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：陳玉華 臺北醫學院保健營養學研究所

計畫參與人員：研究生助理 杜青蓉 臺北醫學院保健營養學研究所

E-mail: yuehwa@tmc.edu.tw

一、中文摘要

本研究在探討省產石花菜對於癌細胞之生長是否具有抑制作用，且觀察其生長之抑制作用是否具有選擇性，同時並探討此作用是否因誘導細胞程序化凋亡 (apoptosis) 之故。乾燥之石花菜經磨碎後分別以 PBS 及 methanol 萃取之，或依照一般食用方式製備石花凍，經冷凍乾燥後溶解於 DMSO 中，而後偵測不同之萃取物對 Hepa-1 (murine hepatoma cells)、HL-60 (human promyelocytic leukemia cells) 二株癌細胞以及正常之 NIH3T3 (murine embryo fibroblast cells) 細胞生長的影響。細胞數目使用 Coulter counter 計算之，細胞增殖則使用 MTS assay kit 偵測，並以 DNA 電泳以及 Annexin V-FITC 螢光染色法觀察細胞是否產生 apoptosis 的現象。結果顯示，石花菜之 PBS 萃取物對於 3 種細胞株之生長及增殖都沒有抑制的效果 ($p > 0.05$)；但 methanol 萃取物對 Hepa-1 及 NIH3T3 細胞、以及 DMSO 萃取物對 3 種細胞株之生長及增殖皆有抑制的作用 ($p < 0.05$)；螢光染色及 DNA 電泳分析顯示，Hepa-1 及 NIH3T3 細胞經 methanol 萃取物處理，3 種細胞株經 DMSO 萃取物處理後，都有 annexin V positive 反應，細胞之 DNA 亦有斷片之產生，顯示這些石花菜萃取物會誘導細胞 apoptosis 的發生。總言之，石花菜之 methanol 及 DMSO 萃取物具有抑制細胞

生長的效果，且其生長抑制作用可能藉由其誘導細胞 apoptosis 的發生而造成，但是此作用並不具有選擇性。

關鍵詞：石花菜、生長抑制、細胞凋亡、螢光染色法、DNA 斷片

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of *Gelidium amansii*, a red agar found in the North coast of Taiwan, on the growth of the cultured cells. Besides, its potential role on the induction of apoptosis was also explored. Two lines of cancer cells, murine hepatoma cells (Hepa-1) and human leukemia cells (HL-60), and a normal cell line, murine embryo fibroblast cells (NIH3T3), were used in this study. *Gelidium amansii* was extracted with PBS, methanol or DMSO, and the effects of these extracts on the cell growth and on the cell proliferation were measured. The results indicated that the PBS extract of the *Gelidium amansii* did not have any effect on the cell growth in all lines of cells, whereas the methanol extract had the growth inhibitory effect on the Hepa-1 and NIH3T3 cells ($p < 0.05$), and the DMSO extract inhibited the growth of all lines cells ($p < 0.05$). The methanol extract treated Hepa-1 and NIH3T3 cells, and the DMSO extract treated cells showed annexin V positive response and fragmented DNA ladders on the agarose gels indicating the cells underwent apoptosis. In summary, the

methanol and DMSO extracts of *Gelidium amansii* possess the antiproliferation effect on the cultured cells and this may be due to the induction of the apoptosis. In addition, this inhibitory effect did not show cell specificity.

Keywords: *Gelidium amansii*, growth inhibition, apoptosis, DNA fragmentation, Annexin V staining

二、緣由與目的

癌症自民國七十一年起已連續十八年位居國人十大死因之首位[1]。癌症在治療上多數先以外科手術切除腫瘤的發生部位，同時伴隨著化學或放射線治療法，但這三種治療方法卻無法保證能夠有效的降低癌症的復發率以及死亡率，況且在進行化學以及放射線治療的同時亦會傷害正常細胞而產生一些副作用，例如：免疫力降低而引發感染、消化吸收不良、脫髮等等[2]，因此尋求一個更有效且不會為病患帶來副作用的癌症治療劑便成為目前相當熱門的研究方向。近年來許多研究發現“細胞程序性凋亡”(apoptosis)與疾病的發生有相當程度的關連性。研究指出，體內細胞之 apoptosis 若受到抑制會導致細胞過度增生而產生不正常的堆積，如癌症、病毒感染及自體免疫功能失調等皆屬此類[3]。因而若能誘導癌細胞產生 apoptosis，對於癌症的治療將有所助益。

研究顯示日常所食之海藻具有抑制癌細胞生長的效果[4]，而國人之夏日盛品石花菜亦是其中之一種，因此石花菜在癌症治療上可能有其價值。因此本研究使用小老鼠肝癌細胞(Hepa-1)、人類血癌細胞(HL-60)的體外實驗模型探討日常所食之石花菜是否具有抑制癌細胞生長的效果，並且亦使用正常小老鼠纖維母細胞(NIH3T3)觀察其生長抑制效果是否具有選擇性，同時探討其作用機轉是否與誘導細胞產生 apoptosis 有關。

三、結果與討論

石花菜之 PBS 萃取物對三種細胞的生長均不具有抑制的作用；但其 methanol 萃取物則於每毫升培養基中含乾燥石花菜 1.2 mg、2.5 mg、3.5 mg、5 mg、6 mg 以及 7 mg 對 Hepa-1 細胞生長有抑制的作用，於 2.5 mg、3.5 mg 及 5 mg 可抑制 NIH3T3 細胞的生長；其 DMSO 萃取物則對三種細胞株都具有生長抑制的作用，其作用濃度分為 HL-60 細胞，150 μ g (每毫升培養基中含乾燥石花菜粉末)、170 μ g、500 μ g；Hepa-1 細胞，150 μ g、170 μ g；NIH3T3 細胞，100 μ g、130 μ g、150 μ g、170 μ g、200 μ g、500 μ g，但其對 Hepa-1 及 NIH3T3 細胞的作用並不具有劑量效應。同樣於細胞增殖測試中亦發現石花菜之 methanol 及 DMSO 萃取物對這些細胞的增殖亦有抑制的作用。

為探討石花菜之 methanol 及 DMSO 萃取物是否因誘導細胞產生 apoptosis 而造成其生長之抑制現象，亦使用螢光染色以及 DNA 電泳之方式觀察之。結果發現 Hepa-1 及 NIH3T3 細胞經 methanol 萃取物處理後，與 methanol 控制組相比有較多細胞被 annexin V-FITC 螢光染色，且由於 propidium iodide 已擴散進入細胞，因此細胞可能已進入 apoptosis 晚期或產生壞死的現象；同樣的經 DMSO 萃取物處理後之 HL-60、Hepa-1 及 NIH3T3 細胞亦較 DMSO 控制組有較多 annexin V 及 propidium iodide positive 反應。同時經 DMSO 萃取物處理之 HL-60 細胞及 Hepa-1 細胞與經 methanol 萃取物處理之 Hepa-1 細胞，其 DNA 有斷片之產生，且隨時間之增加，DNA 之斷片愈小；與前兩株細胞相同，NIH3T3 細胞經 methanol 萃取物處理後，其 DNA 有斷片之產生，且強度隨時間增加而增加；而於 DMSO 組發現，細胞之 DNA 斷片於控制組最為明顯，顯示 NIH3T3 細胞之凋亡現象可能是由 DMSO 所誘發。石花菜之 methanol 萃取物只對 Hepa-1 及 NIH3T3 細

胞有生長抑制的作用而其 DMSO 萃取物則對三種細胞都具有生長抑制作用，可能是由於其 DMSO 萃取物中含有可抑制 HL-60 細胞生長但不溶於 methanol 的物質。又實驗所使用之 3 種細胞株中 Hepa-1 及 NIH3T3 細胞皆源自小老鼠，而 HL-60 細胞源自於人類，可能由於來源種族的不同而造成各細胞對石花菜萃取物的感受性亦不同。

紅藻之水溶性萃取物中主要含有 polysaccharide，具有抗突變的作用[5]，同時可藉由活化免疫系統作用而抑制癌細胞的生長[6, 7]。本研究石花菜 PBS 萃取物對細胞並沒有生長抑制現象，可能是因其中所含之 polysaccharide 之碳氫鏈較長，而無法進入細胞。而由紅藻 *Porphyra tenera* 中所含之脂溶性組成發現，其中主要含有 β -carotene、lutein 及 chlorophylla 三種脂溶性色素，且三者都具有抑制突變原誘導之 *umu C gene* 表現的作用。其中又以 β -carotene 之作用最強。研究亦發現，海藻包括石花菜，具有抗氧化的作用[8]。因此推測石花菜之 methanol 及 DMSO 萃取物對細胞之生長抑制作用，可能是因為其內含有 β -carotene 之故，而 DMSO 萃取物可能亦額外包括 polysaccharide。

Annexin V 螢光染色結果顯示，石花菜萃取物可能同時誘導細胞發生 apoptosis 及 necrosis 的現象；又於 DNA 電泳結果發現石花菜萃取物會促使細胞 DNA 產生斷片，因此推論石花菜萃取物可能主要藉由誘導細胞發生 apoptosis 而抑制細胞的生長。除此之外，本研究結果顯示石花菜萃取物對細胞之生長抑制作用並不具有選擇性，但由於本研究只使用小老鼠纖維母細胞(NIH3T3)作為正常細胞之來源，可能無法代表所有正常細胞對石花菜萃取物之反應，因此若使用相對應之正常細胞株，如：Hepa-1、正常小老鼠肝細胞，結果可能會更明確。又於 DMSO 組中 NIH3T3 細胞之

生長抑制現象可能是由於 DMSO 濃度過高所產生，因此降低 DMSO 之濃度可能可使石花菜萃取物對正常細胞以及癌細胞生長抑制作用之差異性更為明確。

四、計畫成果自評

在以小老鼠肝癌細胞、人類血癌細胞以及正常小老鼠纖維母細胞為實驗模型所做之研究發現，石花菜之 methanol 萃取物可抑制 Hepa-1 及 NIH3T3 細胞之生長，而其 DMSO 萃取物則可抑制 3 種細胞株之生長，顯示石花菜萃取物有抑制細胞生長之作用，但其生長抑制作用並不具有選擇性；此外由螢光染色及 DNA 電泳法亦發現，石花菜萃取物可誘導 apoptosis 的發生，因此石花菜對於細胞之生長作用可能主要由於其誘導 apoptosis 發生之故。本研究可提供由飲食的角度治療癌症的可能性。但是其萃取物中之組成並未於此加以分析，同時需要有更多的動物以及人體實驗的佐證，才得以推廣之。

五、參考文獻

- [1] 中華民國公共衛生概況，2000。行政院衛生署。臺北。
- [2] Haskell CM, 1990. Cancer treatment. 3rd edition. pp9 - 43.
- [3] Tompson CB, 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 267, 1456 - 1462.
- [4] Harada H, Noro T and Kamei Y, 1997. Selectivity antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts. Biol. Pharm. Bull. 20(5), 541- 546.
- [5] Okai Y, Higashi-Okai K and Nakamura S, 1993. Identification of heterogenous antimutagenic activity in the extract of edible brown seaweeds, *Laminaria japonica* (Makonbu) and *Undaria*

pinnarifida (Wakame) by the umu gene expression system in *Salmonella typhimurium* (535/ SK1002). *Muta. Res.* 303(2): 63-70.

- [6] Furusawa E and Furusawa S, 1985. Anticancer activity of a natural product, viva-natural, extracted from *Undaria pinnatifida* on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma. *Oncology.* 42, 364- 369.
- [7] Yamamoto I, Takahashi M, Suzuki T, Seino H and Mori H, 1984. Antitumor effect of seaweeds. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjermanianum*. *Japanese J. Exper. Med.* 54(4) : 143-51.
- [8] Yan X, Nagata T and Fan X, 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutri.* 52(3) : 253-62.