

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：牡丹皮抑制腫瘤轉移作用之評估

Evaluate the inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* on tumor metastasis

計畫編號：NSC 90-2320-B-038-049

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：許秀蘊 台北醫學大學藥學系

共同主持人：李明亭 中央研究院生化所

計畫參與人員：黃倫伶、劉冠論

台北醫學大學藥學研究所研究生

一、中文摘要

具入侵性癌細胞的轉移與一群蛋白裂解酵素(matrix metalloproteinase; MMPs)有關，故以高度表現 MMP-2 及 MMP-9 的 A431 為模式，探討牡丹皮(*Paeonia suffruticosa* Andrews; Ranunculaceae) 對其活性之影響。其水萃取物以溶媒劃分及管柱層析於各種溶媒系統下沖提；經細胞毒性試驗、DNA 段片、蛋白裂解酵素的測定。細胞毒性試驗顯示 Fr 5 於 24 小時之 IC_{50} 為 22.46 μ g/ml，DNA 段片及蛋白裂解酵素試驗均顯示其為活性部分。

關鍵詞：牡丹皮、腫瘤轉移、
蛋白裂解酵素

Abstract

The invasive cancer cell metastasis is related to matrix metalloproteinases (MMPs), the model was based on A431 cancer cell line, high expression on MMP-2 and MMP-9. Fractionation of an aqueous extract of *Paeonia suffruticosa* was achieved by solvent partition and column chromatography under various solvent system. All fractions were tested through cell viability, DNA fragmentation and MMPs inhibition. Fraction 5 showed potent inhibitory effect on cell viability ($IC_{50} = 22.46 \mu\text{g/ml}$ for 24hrs), also its bioactivities were found by DNA fragmentation and MMPs inhibitory test.

Keywords: *Paeonia suffruticosa*,
tumor metastasis

matrix metalloproteinase

二、緣由與目的

數十年來，惡性腫瘤位居台灣地區死亡原因之首位，對國民健康上構成很大之威脅，在全民健保上也是形成相當大的負擔。目前整個治療過程以外科手術、放射線治療、化學療法及激素控制等方式治療，但終究有 80% 的病人出現癌細胞轉移之現象。癌細胞的轉移為其由原發處經由血液或淋巴系統任意擴散至其他器官，亦即具有入侵性，而這種入侵性與一群蛋白裂解酵素(matrix metalloproteinase)有關，癌細胞通常會分泌一群不同的蛋白裂解酵素，以便能穿透不同的組織及血管障壁等(1~8)。其中以 collagenases IV、MMP-2 及 MMP-9 等高濃度出現於乳癌等多種之癌細胞(9)，因此選擇 EGF 過度表現之 A431(epidermoid carcinoma, human) 為模型，藉由觀察細胞培養液中 MMP-2 及 MMP-9 之含量，作為測定中藥對於癌細胞的入侵或轉移是否具有抑制作用之依據。經文獻考察，中藥牡丹皮廣用於活血化癥方面，對於抑制血小板之凝集有很好的效果(10~11)，及明顯抑制血管增生之作用(12)，因此採用牡丹皮觀測其對蛋白裂解酵素之抑制作用，並探討其對抑制癌細胞轉移之機轉。

三、結果與討論

由中藥牡丹皮之水萃取液、經由與乙酸乙酯劃分後，以逆相層析管柱

(sephadex LH-20)在乙醇及水之沖提下，分得 1~6 個部分。首先以 A431 之培養液測試 1~6 個部分之細胞毒性，結果顯示 Fr.5 分別以 10、50、100、150 μ g/ml 之濃度，於 12、24、36、48 小時表現出相當強之細胞毒性結果如表 1 所示；而 Fr.3 之細胞毒性則較微弱些。

表 1 Fr.5 之細胞存活率百分比測試

(μ g/ml)	10	50	100	150	IC50
hr	(g/ml)				
12	75.69	46.37	44.64	48.23	73.87
24	98.58	35.47	7.31	6.55	22.36
36	91.64	43.39	8.10	8.68	21.40
48	80.28	21.11	7.29	6.96	18.13

表皮生長因子(EGF)透過 EGFR (EGF receptor) 傳遞至細胞內，促使細胞生長分化及分泌 MMPs 的作用。但癌細胞則透過蛋白質酪胺酸激酶過度之表現、生長因子、治癌物之刺激，造成癌細胞之形成甚而加速其生長。同時加入 EGF 會促進 MMPs 分泌之增加，使得癌細胞更容易轉移(13-16)。因此針對 MMP-2、MMP-9 分泌之抑制作用測試牡丹皮 fr.5 之活性，結果如圖 1 所示，於 100、200 μ g/ml 均顯示明顯之抑制作用。

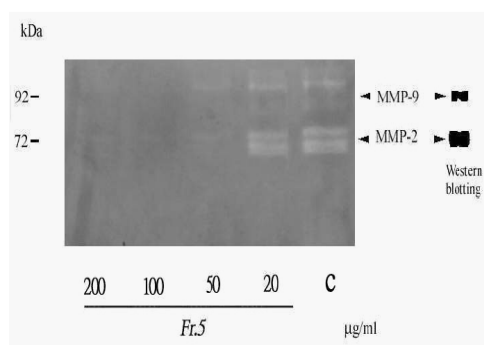


圖 1 Fr.5 對 MMPs 之抑制作用

細胞死亡途徑主要以細胞壞死或細胞凋亡兩種，也是探討活性成分對癌細胞作用機轉之方式。當細胞壞死，細胞膜破裂而釋放出趨化性細胞物質，引起發炎反應以便清除碎片。這些壞死細胞的 DNA 被任意切割，於是在 DNA 的凝膠電泳片上呈現模糊的光帶(17-21)。因此測試牡丹皮 fr.5 是否以細胞壞死之方式達到抑制癌細胞之生長，其結果如圖 2 所示，fr.5 於 100、200、

300 μ g/ml 均顯示明顯之 DNA 片段。

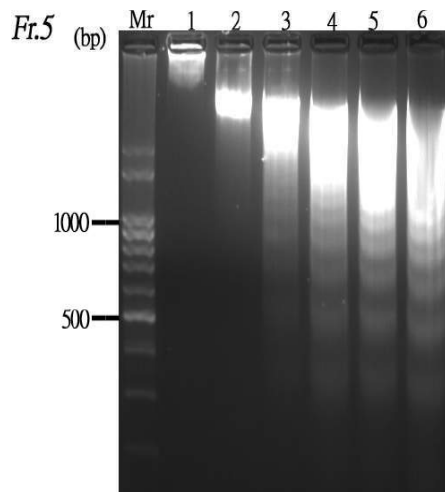


圖 2 Fr.5 於細胞培養 24 小時後，對 A431 細胞株之 DNA 裂解片段圖。Lane 1:10 μ g/ml; Lane 2:20 μ g/ml; Lane 3: 50 μ g/ml; Lane 4: 100 μ g/ml; Lane 5: 200 μ g/ml; Lane 6: 300 μ g/ml。

牡丹皮於傳統中藥上用於活血化癥，文獻上指出對於抑制血小板凝集之效果甚佳，且具明顯之抑制血管增生之作用。從本研究之數據顯示，fr.5 於 100、200 μ g/ml 均表現明顯之 MMP-2、MMP-9 分泌之抑制作用；而 NDA 之片斷試驗可知其促進細胞壞死亦是其作用機轉之一。從 fr.5 繼續分離純化之化合物，其結構式及活性仍在測定中。

四、計畫成果自評

1. 研究內容與原計畫之目的，完全相符。
2. 由於具活性之 fr.5 仍繼續分離純化之中，其結構式及活性尚須測定，故達成預期目標大約 75~80%。
3. 研究成果的學術及應用價值適合在學術期刊中發表。
4. 從中藥活性成分之作用機轉，與傳統中藥之藥理作一印證。

五、參考文獻

- [1] Liotta LA (1992) Cancer cell invasion and metastasis. *Medicine* Feb 142-148.
- [2] Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, Nicolson GL (1987) Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 47: 4869-4876.
- [3] Liotta LA, Steeg PS, Stetler-stevenson W (1991)

- Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336.
- [4] Neal DE, Marsh C, Bennet MK, Abel PD, Hall RR, Sainsbury JR, Harris AL (1985) Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* 336-368.
- [5] Paolo M, Daniel B, Rifkin (1993) Biology and biochemistry of proteinase in tumor invasion. *Physiological Reviews* 73(1): 161-195.
- [6] Kelloff GJ, Fay JR, Steele VE, Lubet RA, Boone CW, Crowell JA, Sigman CC (1996) Epidermal growth factor receptor tyrosin kinase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 657-666.
- [7] Wang YS (1983) Pharmacology and application of Chinese medica. Beijing: Peoples Health Publisher pp. 259-533.
- [8] Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB (1997) Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 70: 722-726.
- [9] Benaud C, Dickson RB, Thompson EW (1998) Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treatment* 50: 97-116.
- [10] Tani Y, Katsuki Y, Kosoto H, Arichi S, Kubo M, Tatsuda H, Kimura Y, Kitagawa I, Yoshikawa (1981) Studies of the medical history, chemical constituents and pharmacological effects of moutan cortex. *Proc Symp Wakan-Yaku* 14: 86-92.
- [11] Dictionary of Chinese Materia Medica (1977) Chiangsu New Medical College: Shanghai Scientific and Technological Publishing Co., Shanghai pp. 1127.
- [12] Cohen S, Carpenter G, King L. (1980) Epidermal growth factor receptor protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255: 4834-4842.
- [13] Bishop JM (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311.
- [14] Levitzki A, Gazit A (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267: 1782-1788.
- [15] Yasui W, Hata J, Yokozaki H, Nakatani H, Ochiai A, Ito H, Tahara E (1988) Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 41: 211-217.
- [16] Merlino GT, Xu YH, Clark AJ, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T, Pastan I (1984) Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science* 224: 417-419.
- [17] Green RD and Reed CJ (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1316.
- [18] Liotta LA (1992) Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 142-148.
- [19] Liotta LA, Steeg PS and Stetler-Stevenson W (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336.
- [20] Martin SJ and Green DR (1995) Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 18: 137-153.

