

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 純化黃豆皂素抑制人類結腸癌細胞生長機制的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-038-003-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：林士祥

共同主持人：陳玉華

計畫參與人員：蔡政諭

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 12 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 94-2313-B-038-003

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：林士祥

台北醫學大學保健營學系

計畫參與人員：蔡政諭

台北醫學大學保健營學研究所

## 中文摘要

癌症連續二十年為國人十大死亡原因第一位，其中結直腸癌為成人癌症死因排名第三位，在西方國家中罹患結腸癌的機率高於東亞國家，原因可能為東亞國家較西方國家攝取較多的黃豆及豆製品。而黃豆中皂素有抑制結腸癌的效果，因此本實驗以細胞培養之模式探討黃豆皂素和結腸癌之關係。結果發現 300 ppm、600 ppm、1200 ppm 濃度的黃豆皂素粗萃取物可抑制大腸癌 WiDr 細胞的生長，改變細胞形態，使細胞質產生空泡，並且抑制由 12-O-tetradecanol phorbol 13-acetate 誘導之 PKC 活性。600 ppm 與 1200 ppm 濃度的黃豆皂素粗萃取物可增加 AP 的活性。因此推測黃豆皂素粗萃取物可以促使 WiDr 細胞分化，抑制細胞增生，並誘導 type II autophagic death 而抑制細胞的生長。

關鍵字：黃豆皂素、alkaline phosphatase、protein kinase C

## Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of extracted crude soybean saponins on human colon cancer cells. Results indicated that soybean saponins decreased cell growth in a dose-dependent manner, and

pre-treatment of cells with saponins significantly suppressed the 12-O-tetradecanol phorbol 13-acetate-stimulated PKC activity. Treating Cells with 600 and 1200 ppm of saponins significantly increased AP activity. Cells treated with saponins developed cytoplasmic vesicles and wrinkled plasma membrane. However, the effects of saponins on P53, c-Fos and c-Jun expression were not significant. In conclusion, soybean saponins interacted with cell membranes, suppressed PKC activation and induced differentiation, and induce type II autophagic death, which possibly mediate the growth inhibition of tumor cells.

Key words : soybean saponins, alkaline phosphatase, protein kinase C

## 計畫緣由與目的

根據行政院衛生署資料統計結直腸癌 (colorectal cancer) 1990 年至今為成人癌症死因排名第三位 (行政院衛生署, 2004)，結直腸癌發生的原因至今尚無明確的定論，發生原因通常是許多因素交互作用的結果 (Fearon and Vogelstein, 1990)，可能和老化、家族病史、缺乏運動、高脂低纖飲食有關 (Gerber and Corpet, 1999 ;

Trock *et al.*, 1990)。流行病學研究指出 (Messina *et al.*, 1994)，在西方國家中罹患結腸癌的機率高於東亞國家，其原因除了油脂攝取量外，東亞國家較西方國家攝取較多的黃豆及豆製品也是原因之一。黃豆中主要的抗癌成分有皂素 (saponin)、異黃酮素 (isoflavone)、蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor) 及植酸 (inositol phosphate) (Messina and Barnes, 1991)。皂素為一種兩性物質，此一特性使得皂素可作用於細胞膜 lipid bilayer 的結構上 (Seeman, 1974)。研究指出在動物實驗模式中不論是大鼠、小鼠或雞，經口攝取黃豆皂素過後，在血液中無皂素或是皂苷之存在 (Gestetner *et al.*, 1968)。本實驗利用細胞培養模式來探討粗萃取黃豆皂素對於結腸癌細胞的影響。

## 材料與方法

### 實驗設計

選用結腸癌細胞 WiDr 細胞株加入不同濃度萃取的黃豆皂素分別為 150 ppm、300 ppm、600 ppm、1200 ppm 觀察其對細胞的生長、alkaline phosphatase (AP)、protein kinase C (PKC) 的活性及 P53、c-Fos、c-Jun 蛋白質表現的影響，並利用掃描式電子顯微鏡 (SEM) 及穿透式電子顯微鏡 (TEM) 觀察其對細胞形態的影響。

### 黃豆皂素製備

黃豆打碎磨粉過篩 (mesh number : 30) 後取 200 g 的黃豆粉及 1 L 的 n - hexane 置於三角錐瓶攪拌 24 小時後過濾，重複三次後即可將黃豆粉脫脂，再將脫脂黃豆粉於室溫下放置通

風櫥內 2 小時再移置 55 °C 的烘箱一小時烘乾殘餘的 n - hexane。取 100 g 過篩 (mesh number : 30) 的脫脂黃豆粉及 800 mL 的 methanol 置於三角錐瓶攪拌 24 小時進行萃取，過濾後萃取液部分經減壓濃縮抽乾後再加入 100 mL 80% butanol 將其溶出，利用分液漏斗將上層 (butanol 層) 取出，再經減壓濃縮至糖漿狀後加入水溶出，溶出的樣品置於冷凍乾燥機經冷凍乾燥 3 天後即得黃豆皂素粗萃取物。

### 細胞培養

WiDr 細胞株其為人類結腸癌附著形之上皮細胞，培養在含 10% FBS 的 MEM 培養基並添加 sodium bicarbonate (1.5 g / L) 和 1.0 mM sodium pyruvate 於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 環境下。當細胞生長至高密度時進行細胞繼代培養將其分殖至新的培養皿 (100 mm dia. dish) 中，稀釋比例為 1 : 3 至 1 : 6。方法：先吸掉舊培養液用 Phosphate-buffered saline (PBS) 洗滌細胞 1 ~ 2 次，加入 1.5 mL trypsin-EDTA (0.01% trypsin-0.53 mM EDTA) 溶液，緩緩搖動使培養皿表面充分潤濕，吸除 trypsin-EDTA 後放回無菌培養箱於 37 °C 作用 3 ~ 5 分鐘，加入 10 mL 新鮮培養液以吸管上下吸放數次打散細胞團塊，混和均勻後依稀釋比例轉移至新的培養皿中置於無菌細胞培養箱於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 環境下培養。

### 細胞存活率之測定

將  $2 \times 10^3$  / well 的細胞種於 96 孔的培養盤分為六組，分別為控制組及

黃豆皂素組 (150、300、600、1200、2400 ppm) 待其穩定附著於培養皿後，控制組更換新鮮培養液而黃豆皂素組更換含不同濃度黃豆皂素粗萃取物的培養液此為第 0 天，之後每隔 24 小時為期 3 天，利用 CellTiter 96<sup>R</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 商業試劑組測定黃豆皂素粗萃取物對於細胞存活率的影響 (三重複)。

#### AP 活性

以 ALKALINE PHOSPHATASE liquid color, Colorimetric Test (12027) (Human, Germany) 測定。

#### PKC

以商業試劑組 Peptag<sup>®</sup> Assay for non-radioactive Detection of Protein Kinase C (V5330)(Promega, USA) 分析。

#### c-Jun、c-Fos、P53 蛋白質的表現

以 SDS-PAGE 及 Western blot 分析。

#### 統計分析方法

實驗數值均以 mean  $\pm$  SD 表示，利用 SAS<sup>R</sup> 軟體 8.13 版進行單因子變異數分析 (One-way ANOVA)，並以 Fisher's test 進行組間差異比較，當  $p < 0.05$  則代表有顯著統計差異。

#### 結果討論

黃豆皂素粗萃取物可作用在細胞膜上，其中 300 ppm、600 ppm、1200 ppm 濃度的黃豆皂素粗萃取物可降低 WiDr 細胞的存活率 ( $P < 0.05$ )，改變細胞形態，使細胞質產生空泡，可能

可誘導 type II autophagic death，並且抑制由 12-O-tetradecanol phorbol 13-acetate 誘導 PKC 活性的增加 ( $P < 0.05$ ) 而有抑制細胞增生的效果。600 ppm、1200 ppm 濃度的黃豆皂素粗萃取物可增加 AP 的活性 ( $P < 0.05$ )，促使 WiDr 細胞分化。因此黃豆皂素粗萃取物可以抑制細胞的生長。然而黃豆皂素粗萃取物對 P53、c-Fos 和 c-Jun 蛋白質的表現沒有顯著的影響 ( $P > 0.05$ )。

由本實驗得知，黃豆皂素粗萃取物可作用在細胞膜上，其中 300 ppm、600 ppm、1200 ppm 濃度的黃豆皂素粗萃取物可降低 WiDr 細胞的存活率，改變細胞形態，使細胞質產生空泡，可能可誘導 type II autophagic death，並且抑制由 12-O-tetradecanol phorbol 13-acetate 誘導 PKC 活性的增加而有抑制細胞增生的效果。600 ppm、1200 ppm 濃度的黃豆皂素粗萃取物可增加 AP 的活性，促使 WiDr 細胞分化。因此黃豆皂素粗萃取物可以抑制細胞的生長。除此之外，雖然黃豆皂素粗萃取物對 P53、c-Fos 和 c-Jun 蛋白質的表現沒有顯著的影響，但未來可針對 AP-1 活性、磷酸化 c-Jun、p21 和 Bcl-2 family 蛋白質的表現，做更進一步的探討。

#### 對於本次計畫之自評

本計畫於執行結果基本上與假設相符，因此本人認為此次研究結果令人振奮，在許多環節上有再連貫的必要，並有繼續研究的可行性。目前也著手進行動物體內實驗。

**參考資料：**

1. Fearon ER and Vogelstein A. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
2. Gerber M and Corpet D. (1999) Energy balance and cancers. *Eur J Cancer Prev* 8:77-89.
3. Messina MJ, Persky V, Setchell KDR and Barnes S. (1994) Soy intake and cancer risk : a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21:113-131.
4. Messina M and Barnes S. (1991) The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst* 83:541-546.
5. Seeman P (1974) Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and rug-induced lysis, *Fed. Proc.* 33: 2116–2124.
6. Gestetner B, Birk Y, and Tencer Y (1968) Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity. *J Agric Food Chem.*16:1031-1035
7. Trock B, Lanza E, and Greenwald P. (1990) Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analysis of the epidemiologic evidence. *JNCI* 82:650-661.