

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 白朮之抗癌活性成分研究

The Antitumor Principle Constituents of *Atractylodes ovata* De Candolle

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-034

執行期限：88 年 12 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：王靜瓊 台北醫學大學生藥學研究所

共同主持人：顏焜熒、楊玲玲 台北醫學大學生藥學研究所

### 一、中文摘要

「癌」為目前威脅人類健康重要疾病之一，而臨床使用之抗癌藥物已發現有多種抗藥性及副作用產生，因此抗癌藥的研究，顯得日趨迫切需求。本研究應用體外抑制癌細胞株生長活性，追蹤分離白朮之抗癌活性成分。結果分離得到 atractylon、atractylenolide I、II、III、biatractylolide 等五個成分，其中以 atractylon 最具有抑制癌細胞(KB、Hep 3B、HeLa、AGS、DU-145、HL-60)生長  $IC_{50}$  15.0 ~ 23.8  $\mu\text{g/ml}$ ，且對 HL-60 癌細胞抑制作用最強，。並對正常細胞株 (WISH) 及初代培養人類正常單核球之毒性較小，顯示有選擇性抑制 HL-60 癌細胞。進而探討其作用機制發現：15  $\mu\text{g/ml}$  的 atractylon 加入 HL-60 細胞 6 小時後，即會使細胞 DNA 斷鏈，誘導細胞進行凋亡(apoptosis)；12 小時後，會誘導 P-388 細胞進行凋亡。將 P-388 細胞注射於 CDF<sub>1</sub> 小鼠腹腔，並連續注射 100 mg/kg atractylon 九日，發現 CDF<sub>1</sub> 小鼠體重無明顯增加，表示有抑制癌細胞之生長，但生命卻無明顯延長，故推測 atractylon，於體內、外皆會抑制 P-388 細胞生長，但體內給予之劑量須在評估。

關鍵詞：白朮，蒼朮酮，體外細胞毒性，凋零死亡，體內 P-388 抗癌活性。

### Abstract

Cancer has been reported as an important disease cause of death in human. However, many chemotherapeutic drugs have been reported to cause serious resistance in clinical studies. Therefore, it

is necessary to develop the new antitumor drugs to resolve this problem. In this studies, the antitumor principle constituents of Bai Zhu (*Atractylodes ovata* De Candolle) will be explore by bioassay-guide methods. Atractylon, atractylenolides I, II, III and biatractylolide were isolated from Bai Zhu and atractylon inhibited the growth of the various tumor cells (KB, Hep 3B, HeLa, AGS, DU-145, HL-60), with  $IC_{50}$  values ranging from 15.0 to 23.8  $\mu\text{g/ml}$ . Among the target cells, the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60, was more sensitive to atractylon than were normal WISH cells and primary-cultured human normal mononuclear cells. The mechanism of the atractylon-induced antitumor effect was explored on human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. The results showing, atractylon caused DNA fragmentation in HL-60 at 15  $\mu\text{g/ml}$  for treatment 6 h and P-388 cells for 12 h. Moreover, P-388 cells were injected intraperitoneally into the abdominal cavity of CDF<sub>1</sub> mice and treated 100 mg/kg atractylon for 9 days. The mean body weight of the mice was significantly lower than that of the control group. However, atractylon did not significantly prolong the survival of P-388 bearing mice. In the above results, we suggested atractylon inhibited the growth of P-388 *in vitro* and *in vivo*. In the further, the dosage of atractylon *in vivo* must be evaluated.

Keywords: Bai Zhu (*Atractylodes ovata* De Candolle), atractylon, cytotoxicity, apoptosis, P-388 *in vivo* antitumor effects

## 二、緣由與目的

中藥為我國固有醫藥智識，經數千年人體臨床驗證累積之寶庫，其療效確實可靠但以往因欠缺科學化之實驗數據驗證，造成許多歐美學者之存疑，但近年來美國 FDA 已承認中草藥之療效，並准許經適當品質管制之中草藥萃取物上市，此為中草藥發展之契機。未來二十一世紀將是中藥的時代，如何應用中藥資源以開發新抗癌天然物，值得進一步開發與研究。

白朮為補益中藥材，在處方上應用亦極為廣泛。一些臨床治療上常用的中藥方劑如補中益氣湯、四君子湯、十全大補湯等方劑都含有白朮，且皆有抗癌作用之報導<sup>1-5</sup>，故本研究首先將針對白朮之抗癌活性成分進行研究，以期開發毒性小、藥效高之抗癌藥。

“朮”最早收載於「神農本草經」屬於草部上品，直到唐代孫思邈「千金方」及宋代寇宗奭「本草衍義」才有“白朮”、“蒼朮”之區分。白朮為菊科(Compositae)植物白朮(*Atractylodes ovata* De Candolle)之乾燥根莖<sup>6</sup>；性微溫味甘苦，入脾胃二經，其臨床上用於補脾健胃，和中，燥溼化痰，利水止汗及安胎<sup>7</sup>。白朮主要含有倍半萜類(sesquiterpenoid)的成分如: atractylon, atractylenolides I, II, III, 3-hydroxyatractylon, 3-acetoxyatractylon 等<sup>8, 9</sup>。現代藥理學的研究則發現白朮之丙酮(acetone)及 50% 甲醇(MeOH)抽出物具有抗壓力性胃潰瘍作用<sup>10-12</sup>，白朮中的 atractylon 能抑制四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)引起大白鼠初代培養肝細胞之細胞毒性，對 CCl<sub>4</sub>所引起肝臟微粒體的脂質過氧化有抑制作用<sup>13</sup>，attractylenolide I, II, III 則有抑制發炎的作用<sup>14</sup>。且成分中之精油亦被報導具有抑制 esophageal 癌細胞生長，亦可延長艾氏腹水癌擔癌鼠(Ehrlich ascites carcinoma)之生命<sup>15,16</sup>。

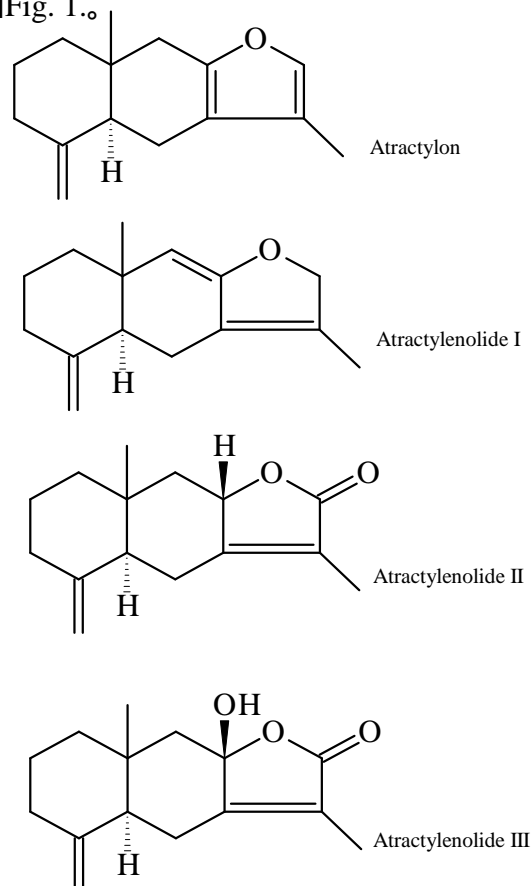
為避免目前癌症化學治療藥之缺點，本研究將針對中藥之補益藥白朮進行其精油成分分離、純化，再經儀器分

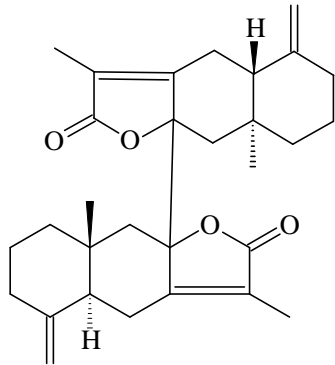
析技術鑑別其構型。分離得到之天然物再依循美國癌症研究中心(National Cancer Institute; NCI)的抗癌研發方法<sup>17</sup>，評估其抗癌效果，以期從白朮中尋得新的抗癌活性成分。

## 三、結果與討論

### 1. 白朮活性成分之分離、純化、鑑別

將10公斤白朮藥材粉碎成碎片，以正己烷40公升冷浸萃取，將萃取液過濾，濃縮，經矽膠管柱(silica gel column)以正己烷及乙酸乙酯梯度(100:0→90:10→80:20→70:30→60:40→50:50→25:75→0:100)為移動相進行劃分，再以ODS 膠體管柱進行純化，並以乙醇/正己烷再結晶純化活性成分。所得之五個天然物以<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, 二維 NMR(HMBC, HMQC, NOSY, COSY) IR, UV, Mass, Element Analysis等儀器進行構造式決定，並與已知之天然物圖譜比對，確認其化學結構分別為：attractylon (產率:0.15%)、attractylenolide I (產率:0.07%)、attractylenolide II (產率:0.52%)、attractylenolide III (產率:0.33%)、biatractylolide(產率:0.02%)，結構如Fig. 1。





biatractylenolide

Fig. 1. The structures of atractylon, atractylenolides I, II, III and biatractylenolide.

## 2.天然物之抗癌活性檢測

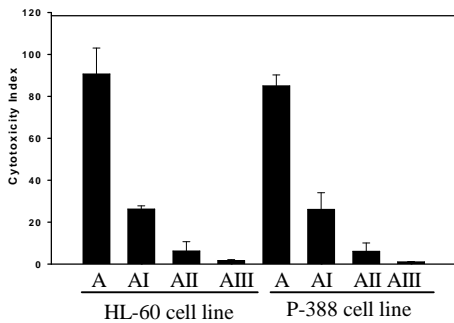
### 2-1. 對不同癌細胞株之抑制作用

由 Table 1 顯示，atractylon 比 atractylenolides I、II、III 對癌細胞株具有較強的抑制作用，且  $IC_{50}$  值比正常細胞 (WISH) 高 3~8 倍，且對血癌細胞具有明顯的生長抑制作用，故選擇 atractylon 進行其作用機制之探討及體內抗癌活性試驗。

Table 1  $IC_{50}$  values of tested compounds on contrast normal cell lines after 36h treatment.

Compound	Tumor Cell Lines					Normal Cells
	KB	DU-145	Hep 3B	AGS	HeLa	WISH
Atractylon	21.0	17.6	23.8	26.1	17.6	100.5
Atractylenolide I	41.1	41.7	>100.0	52.5	>100.0	129.0
Atractylenolide II	47.8	>100.0	>100.0	>80.0	>100.0	152.9
Atractylenolide III	80.0	>100.0	>100.0	>80.0	>100.0	>200

n=3



n=3

Fig. 2. Tested compounds treated HL-60 and P-388 cell line with 15  $\mu$ g/ml for 12h. A:atractylon, AI, II, III: atractylenolide I, II, II.

### 2-2.Atractylon 誘導 HL-60 細胞凋亡

Atractylon 在濃度 7.5, 15  $\mu$ g/ml 下，不同作用時間對 HL-60 淋巴癌細胞株之生長抑制作用。將  $2.0 \times 10^5$  cells/ml 的 HL-60 細胞植入 24 well 培養盤，再加入待測樣品，並每 12 小時取出細胞用 trypan blue 染色計算細胞存活率。結果顯示：15  $\mu$ g/ml 的 atractylon 對 HL-60 細胞具有明顯的抑制作用 (Fig. 3)，對從健康人之全血中分離得單核細胞，則毒性較小 (Fig. 4)。

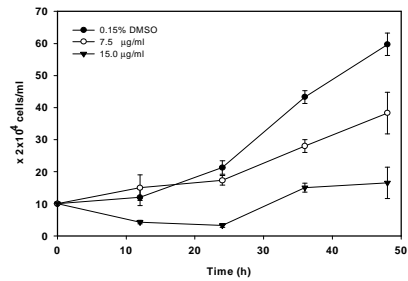


Fig. 3. Concentration- and time-dependent cytotoxicity of atractylon in HL-60 cells by trypan blue stain.

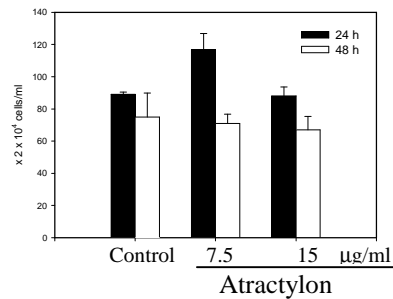


Fig. 4. Concentration- and time-dependent cytotoxicity of atractylon in human mononuclear cells by trypan blue stain.

Atractylon 處理 HL-60 細胞株後，利用流式細胞儀、瓊膠電泳分析法測量 DNA 斷鏈的狀態。結果如 Fig. 5-6 顯示，15  $\mu$ g/ml 作用 6 小時即出現 sub-G1 峰及 DNA 斷鏈之 band。再經 Western blot 分析負責細胞內修復 DNA 之 PARP 蛋白，發現 PARP 有被斷鏈之現象 (Fig. 7)。綜合上述表示 15  $\mu$ g/ml atractylon 加入 HL-60 細胞，6 小時後即會引起凋零 (apoptosis) 作用。

Control 15  $\mu$ g/ml 30  $\mu$ g/ml 60  $\mu$ g/ml

Fig. 5. DNA content frequency histograms of HL-60 cells after treatment with 15, 30 and 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  atractylon for 6h.

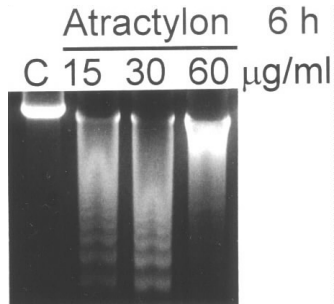


Fig. 6. Effect of atractylon induction of DNA fragmentation in HeLa cells after treatment for 6 h. C: 0.3% DMSO.

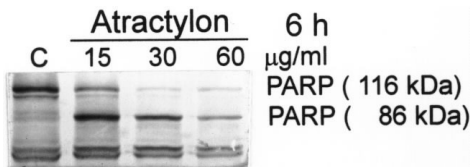


Fig. 7. Western blot analysis of PARP proteins in atractylon-treated HL-60 cells for 6 h. C: 0.3% DMSO.

### 2-3. Atractylon 對 P-388 老鼠淋巴癌細胞之體內、外細胞毒性

Atractylon 加入 P-388 細胞體外培養 12 小時，濃度於 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  即會明顯誘導細胞凋零死亡。將  $2 \times 10^5$  cells/ml P-388 細胞懸浮液，注入 0.2 ml 於 CDF<sub>1</sub> 小鼠腹腔內 ( Fig. 8-9 )，並連續注射 100mg/kg atractylon ( 以大豆油為溶劑 ) 九日，觀察其體重變化。結果發現：治療組之 CDF<sub>1</sub> 小鼠於 12 天候，體重無明顯增加，表示有抑制癌細胞之生長 ( Fig. 10 )。但生命卻無明顯延長，故推測 atractylon 在治療期間可有意義的殺死癌細胞，但未能有效的持續療效，可能是 atractylon 在體內半衰期短，迅速轉化成不具抑制癌細胞活性之 atractylenolides II, III，故治療期間可抑制癌細胞生長，停藥後卻無法延長生命。

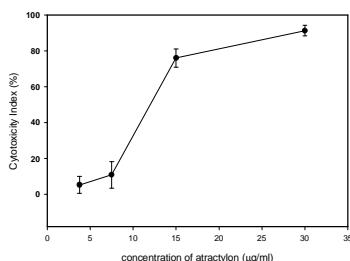


Fig. 8. Concentration-dependent cytotoxicity of atractylon in P-388 cells after treatment 12h.

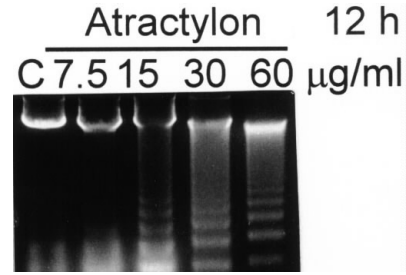


Fig. 9. Effect of atractylon induction of DNA fragmentation in P-388 cells after treatment for 12 h. C: 0.3% DMSO.

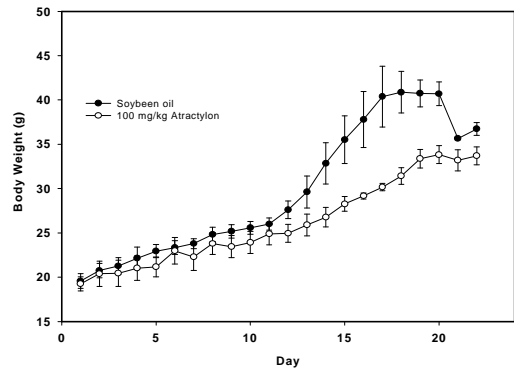


Fig. 10. Effects of atractylon on body weight of P-388 tumor-bearing CDF<sub>1</sub> mice. The body weight of CDF<sub>1</sub> mice was evaluated every day while the mice were alive. The difference in the body weight between the test and control group was significant for 12 to 22 days. ( $p < 0.005$ )  $n = 5$ .

### 四、計畫結果自評

本計畫由白朮中分離純化出五個倍半萜類之天然物: atractylon, atractylenolide I, atractylenolide II, atractylenolide III, biatractylolide。其中因 biatractylolide 之溶解度差，故無法進行生物活性檢測。其餘四個天然物，檢測其對各種癌細胞之毒性，發現 atractylon 對各種癌細胞皆具有生長抑制作用，且對血癌細胞 (HL-60) 效果最明顯，並在相同濃度下對正常淋巴細胞無明顯之抑制作用，因此進行其對 HL-60 細胞毒性作用之機制探討。

利用 agarase gel 及 flow cytometry 偵測 HL-60 細胞內 DNA 斷鏈的狀況，及 Western blot 分析 RAPA 的變化，發現 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 atractylon 加入 HL-60 細胞 6 小時後，即會誘導細胞進行凋亡。所再利用 P-388-CDF<sub>1</sub> 血癌老鼠模式，檢測 atractylon 之體內抑制小鼠血癌細胞 (P-388) 生長之作用。

首先進行體外毒性試驗，發現 15  $\mu\text{g/ml}$  的 atractylon 加入細胞 12 小時，會誘導 P-388 細胞進行凋亡。將 P-388 細胞注射於 CDF<sub>1</sub> 小鼠腹腔，並連續注射 100mg/kg atractylon 九日，發現 CDF<sub>1</sub> 小鼠體重無明顯增加，表示有抑制癌細胞之生長，但生命卻無明顯延長，故推測 atractylon，於體內、外皆會抑制 P-388 細胞生長。

綜合上述結果，補益類中藥之白朮精油成分，以 atractylon 的抗癌活性最強，相對毒性也大。本體內試驗結果，並無延長 CDF<sub>1</sub> 小鼠生命，推測與其在體內代謝有關。因 atractylon 會自然氧化成不具抑制癌細胞活性之 atractylenolides II, III，所以未來應針對其在小鼠體內代謝之狀況，並規劃出新的療程應用於體內抗癌模式，以期證明 atractylon 抗癌活性。

本計畫依計畫書進度逐一完成，並且了解補益中藥材之白朮精油類成分 atractylon 具有體內、外抑制血癌細胞之生長，結果可供未來開發中藥抗癌藥之參考。

## 五、參考文獻

1. Haranaka R, Hasegawa R, Nakagawa H, Sakurai Y, Satomi N, Haranaka K. *J. Biol. Response Mod.*, 7, 77-90 (1988).
2. Sugiyama K, Ueda H, Ichio Y, Yokota M. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 53-58 (1995).
3. Sugiyama K, Ueda H, Ichio Y. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 544-548 (1995).
4. Kawamura H, Maruyama H, Takemoto N, Komatsu Y, Aburada M, Ikehara S, Hosoya E. *Int. J. Immunother.*, 5, 35-42 (1989).
5. Ohnishi Y, Yasuzumi R, Fan H, Liu L, Takao-Liu F, Komatsu Y, Hosoya E, Good RA, Ikehara S. *Exp. Hematol.*, 18, 18-22 (1990).
6. 顏焜熒，「原色生藥學」，p.76，南天書局，臺北 (1985)。
7. 顏焜熒，「原色常用中藥圖鑑」，p.87，南天書局，臺北 (1980)。
8. Yosioka I, Takahashi S, Hikino H, Sasaki Y. *Yakugaku Zasshi.* 80(11), 1564-1566 (1960).
9. Chen Z-L. *Planta Medica.* 493-494 (1987).
10. Kubo M, Nogami M, Nishimura M, Moriura T, Arichi S. *Yakugaku Zasshi.* 103(3), 442-448 (1983).
11. Nogami M, Iwanaga M, Moriura T, Kubo M. *Yakugaku Zasshi.* 106, 498-503 (1986).
12. Matsuda H, Li Y, Taniguchi K, Yamahara J, Tamai Y. *Yakugaku Zasshi.* 111, 36-39 (1991).
13. Kiso Y, Tohkin M, Hikino H. *Planta Medica.* 51, 97-100 (1985).
14. Endo K, Taguchi T, Taguchi F, Hikino H, Yamahara J, Fujimura H. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 2954-2958 (1979).
15. Saiki I, Yamaura T, Ohnishi Y, Hayakawa Y, Komatsu Y, Nunome S. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1170-1174 (1999).
16. Wang YS. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, pp 326-330. Beijing: People's Health Publisher (1983).
17. Boyd MR. *Principle & Practices of Oncology.* 3 (10), 1-12 (1989).

附件：封面格式

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 白朮之抗癌活性成分研究

The Antitumor Principle Constituents of *Atractylodes ovata* De Candolle

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-034

執行期間：88年12月01日至89年07月31日

計畫主持人：王靜瓊

共同主持人：楊玲玲、顏焜熒

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台北醫學大學 生藥學研究所

中 華 民 國      89 年 10 月 31 日