

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

黑殭菌素及蘇力菌素抑制腫瘤細胞效果及抗腫瘤機制之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-038-062-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：臺北醫學大學生物醫學技術研究所

計畫主持人：劉正民

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

附件一

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

(計畫名稱) 黑殭菌素及蘇力菌素抑制腫瘤細胞效果及抗腫瘤機制之探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 92 - 2314 - B - 038 - 026

執行期間： 92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：劉正民

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學生物醫學研究所

中 華 民 國 92 年 11 月 13 日

## 黑殭菌素及蘇力菌素抑制腫瘤細胞效果及抗腫瘤機制之探討

中文摘要：

黑殭菌素(Destruxin)是由昆蟲寄生性真菌(entomogenous fungi)之一的黑殭菌(*Metarhizium*)所分泌出的毒素，在已分離出的三十餘種中，本研究中採用的是 Destruxin B 作為抗腫瘤製劑。經發酵後自發酵液中抽取純化後，先以毛細管電泳及質譜儀鑑定其純度，純化出的 Destruxin B 以 Acetonitrile 為溶劑配製。在本實驗中，我們採用 DBA/2 品系老鼠經 methylcholanthrene 所引導出的 L5178Y 淋巴瘤細胞作反應。企圖了解 Destruxin B 對於對腫瘤細胞之生長影響。結果中發現 1.29  $\mu\text{M}$  及 2.58  $\mu\text{M}$  的 DB 對腫瘤細胞生長有顯著的抑制作用，當劑量超過 5.17  $\mu\text{M}$  時有毒殺腫瘤細胞的作用。然而相同劑量的 DB 對正常脾臟細胞及纖維母細胞株則沒有抑制作用。利用流式細胞儀觀測藥物引發細胞週期停滯於 G2/M 時期，並進一步誘使其發生細胞凋亡的現象。此外，探討會影響細胞週期行進和調控細胞凋亡的相關蛋白表現，以了解 Destruxin B 作用下 L5178Y 細胞的分子機轉。最後再以 DBA/2 品系老鼠作 *in vivo* 試驗，了解其在體內抗癌的效果。本實驗冀望為未來抗癌藥物開展一個新的領域。

**關鍵詞：**抗癌藥物、黑殭菌素、淋巴腫瘤細胞、自然凋亡、壞死現象、訊號傳遞之路徑

英文摘要:

Destruxin is a substance which secretes from fungus, *Metarhizium*. This substance is toxic to insects and has been used as an insecticide for decades. Over thirty species of destruxins have been isolated from different investigators. In this study, the purified destruxin B (DB) was tested for its *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activities by using L5178Y lymphoma cells. This cell line was induced by methylcholanthrene from T lymphocytes of DBA/2 mice. The results indicated that DB suppresses L5178Y lymphoma cells growth dramatically even in the dose as low as 1.29  $\mu\text{M}$ . When doses of DB over 5.17  $\mu\text{M}$ , the dead tumor cells were found. The same dose range has no growth suppression or tumoricidal effect on either mouse spleen cells primary culture or NIH3T3 fibroblast cells. The results from flow cytometric analyses indicated that DB induced cell cycle arrest at G2/M phase, consequently, caused cell apoptosis. The mechanisms of apoptosis were analyzed by Western blot. The results indicated that under DB treatment, the CDK1 (cdc2) protein expression was suppressed, p53 protein was increased and caspase 3 was activated. These results confirmed that previous growth suppression and flow cytometric results. The *in vivo* experiment was performed by implanting L5178Y lymphoma cells into DBA/2 mouse peritoneal cavity i.p. at a dose of 230  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The results showed that the treated group of mice may extend their survival days at least for 2 weeks longer than that of control group. From both *in vitro* and *in vivo* experiment results, it has proven that DB may be as a potential candidate for future anti-tumor drug.

Keywords: Anti-tumor drug, Destruxin B, lymphoma cell, Apoptosis

## 報告內容

### 1. 前言

黑殭菌素由五個胺基酸： $\beta$  丙胺酸( $\beta$ -alanine)、丙胺酸(alanine)、纈胺酸(valine)、異白胺酸(isoleucine)、脯胺酸(proline)及 $\alpha$ 羥酸( $\alpha$ -hydroxy acid)組成之環狀芳香脛鍵 (cyclodepsipeptide)為骨架，依其化學結構可區分為 A、B、C、D、E、F 六大類，其中以黑殭菌素 A、B、E 較常見，目前為止已被分離鑑定出三十餘種，且大部分由黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)產生，故稱之為黑殭菌素。*M. anisopliae* 產生黑殭菌素之可能途徑如(附圖一)，過程中會先合成其先驅物(protodestruxin)，此先驅物在所有氨基上之氫皆沒有被甲基取代，當丙胺酸上之氮基行甲基取代後形成去甲基黑殭菌素 B(desmethyl destruxin B)，去甲基黑殭菌素 B 在脛胺酸上之氮基再次甲基化後形成黑殭菌素 B。除此之外，十字花科作物之黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)、粉紅單端孢菌(*Trichothecium roseum*)、盤蛇孢菌(*Ophiosphaerella herpotricha*)也有能產生黑殭菌素 B、同黑殭菌素 B(homodestruxin B)之報導，並被認為與 *A. brassicae* 之致病力有關 (1)。目前黑殭菌素除了作為殺蟲劑外，若干研究結果也顯示 destruxin A<sub>4</sub>，DA 具有刺激紅血球生成素(Erythropoitin)的合成功效 (2)，此外，也發現 destruxin B 有抗病毒活性(3,4)及抑制 B 型肝炎表面抗原基因的表現。黑殭菌素已被證實作用在 Hep3B 細胞中可以抑制 HbsAg 的表現，而在本實驗中也初步證實其確有抗癌的效果，其抗癌機制可能與細胞之自然凋亡及細胞週期有關。

## 2. 研究目的

本研究目的是希望能夠更加了解由昆蟲寄生性真菌之一的黑殭菌 (*Metarhizium*) 所分泌出的毒素黑殭菌素 (Destruxin)，作用在小鼠 L5178Y 淋巴癌細胞上，所引發的癌細胞生長抑制以及細胞致死機轉的探討。期望能闡明其作用機轉，並且為未來抗癌藥物開展一個新的領域。

## 3. 文獻探討

在本研究中，我們證實了黑殭菌素 (Destruxin B) 的確具有抗腫瘤的效果。以小鼠 L5178Y 淋巴癌細胞株作為實驗對象，發現癌細胞對於 DB 的作用有很高的感受性。首先，在細胞生長抑制試驗中，我們觀察到只需要  $5.17 \mu\text{M}$  劑量的黑殭菌素，即對腫瘤細胞生長造成極大的抑制效果甚至使腫瘤細胞死亡。與之前的文獻(5)相比較，以 Destruxin B 作用於 P388 細胞株，當濃度達  $5.75 \mu\text{M}$  時作用 48 小時，可以觀察到約略有 50 % 的細胞生長抑制效果，而若使用  $0.575 \mu\text{M}$  或更低濃度則不會有抑制生長的現象，這和我們的實驗結果相當類似。然而，相較於腫瘤細胞對黑殭菌素的高度感受性，同樣的劑量使用於正常細胞身上，則無明顯的影響。由初步的實驗結果中，我們認為黑殭菌素的毒性作用似乎對於腫瘤細胞有較高的選擇性。

在早先的文獻中指出，將黑殭菌素水溶液注入老鼠的腹膜內，黑殭菌素 B 造成其立即昏厥死亡 ( $\text{LD}_{50}$ ) 的最低劑量為  $16.9 \text{ mg/Kg}$  體重(6)。在本實驗中，我們採用 *in vivo* 研究方式，以探討黑殭菌素 B 是否具有成為抗腫瘤製劑的潛力。根據實驗結果，低劑量的黑殭菌素 B 並不會對於鼠體造成立即的傷害，並且將其作用於攜有 L5178Y 淋巴癌細胞的 DBA/2 小鼠身上，和 vehicle 組相比較，可以發現黑殭菌素 B 能夠延遲小鼠的死亡時間點。並進而採用效果較佳的  $7.89 \mu\text{M}$  濃度進行第二回的存活率試驗，同時為了探討黑殭菌素 B 在體內的半衰期，或者是否會被生物體代謝掉，因此，採取一天 2 次、一天 1 次以及兩天 1 次的給藥方式進行實

驗，由結果可知，不同的給藥方式對於小鼠的存活率並沒有太大的差異性，然而，卻可以明顯的觀察到給藥與否(相較於 vehicle 組)對於小鼠的存活率之延長有顯著的不同。所以，在初步的 *in vivo* 研究中，雖然還無法找到有效提高小鼠存活率的劑量以及投藥方式，但已經可以初步證實黑殭菌素 B 在生物體內是具有抗癌的潛力的。

#### 4. 研究方法

##### 一、細胞培養

本實驗所採用的細胞株為 L5178Y 淋巴腫瘤細胞株，其是由 DBA/2 老鼠 T 細胞經 methylcholanthrene 誘導致癌。選購於 American Type Culture Collection (ATCC)。L5178Y 淋巴腫瘤細胞需培養於含有 10 % 小牛血清 (Fetal calf serum, FCS)、100 unit/ml Gentamycine、1mM L-glutamine 及 1mM sodium pyruvate 之 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 生長培養液內，將此細胞培養於 75 cm<sup>2</sup> flask 中，約培養 3 天細胞生長至九、十分滿時，再進行細胞繼代培養。當 L5178Y 細胞長滿後將培養液離心、抽乾，以 phosphate buffered saline (PBS) 清洗細胞一次再離心，再加入 10 ml 的培養液將細胞均勻沖散，留約五分之一的細胞在原瓶繼續培養，其餘的細胞懸浮液依實驗目的均勻分配到不同的培養皿中。

DBA/2 spleen cell primary culture：DBA/2 老鼠經安樂死後，將脾臟取出，在培養液中以手術刀橫切後向一方壓擠出，再將細胞懸浮液倒入 15 ml 試管中用 vortex 轉動之剪刀將細胞與結締組織分離，靜置約 5 分鐘，待結締組織沉澱後，將上清液含有脾臟之淋巴細胞收集，並放置於含有 5 % CO<sub>2</sub>、37 °C 恆溫之培養箱中培養。

Fibroblast(人類纖維母細胞)以 75 cm<sup>2</sup> flask 培養於含有 10 % 小牛血清 (Fetal calf serum, FCS)、100 unit/ml Gentamycine、1mM L-glutamine 及 1mM sodium pyruvate 之 DMEM culture medium 中，置於含有 5 % CO<sub>2</sub>、37 °C 恆溫之培養箱中

培養。當細胞在培養瓶中長滿後將 culture medium 抽乾，用 PBS 清洗細胞表層後加入 1 ml 0.25% Trypsin-1mM EDTA 將細胞輕輕拍下，接著加入約 10 ml culture medium 將細胞沖下收集，最後留約五分之一的細胞在原培養瓶中繼續培養，其餘細胞依實驗目的不同均勻分配到各培養皿中。

## 二、藥物配製

本實驗是利用由朝陽科技大學，應用化學系提供的 Dextruxin B(DB)純化物(用氬甲烷將黑殭菌素由發酵液中抽取出，抽取液再以半製備型高效液相層析法將四種不同之黑殭菌 DA、DB、DC 及 DMDB 分離及收集。然後用 FAB-MS 檢測其純度，並用純化之抽取物濃度與層析圖譜上之波峰面積作線性回歸相關性，並建立標準曲線作為定量分析之依據。)先用 Acetonitrile 溶解，再稀釋成 0.64、1.29、2.58、5.17 及 10.34  $\mu\text{M}$ 。以進行後續實驗。

## 三、細胞存活率計算

Trypan blue 是一種常用的細胞染色劑，能夠將死亡的細胞染上藍色，存活的細胞則不會被染色。藉由 Trypan blue 染色以及利用血球計數器於光學顯微鏡下觀察並計數活細胞的數目。將細胞以  $1 \times 10^6$  cells/well 的數目培養於 6-well culture plate 中，並投予不同濃度的 Dextruxin B 培養於 incubator 中，每隔一段時間將 plate 取出，再利用細胞計數器計算細胞數目，得其細胞生長曲線圖。Fibroblast 纖維母細胞株則以 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay，採 ELISA Reader(570 nm)測量其吸光值，回推其增殖率。

## 四、細胞生長同步化

在開始給予腫瘤細胞藥物之前，先將細胞培養在不含 FBS (FBS-free)的 DMEM starvation medium 中 24 小時，使每個細胞的生長週期都一致化停滯在細胞週期的 G0/G1 phase。24 小時後再將細胞離心收集進行後續的實驗。

## 五、細胞週期分析

流式細胞儀(flow cytometry)配有 15 微瓦的氬離子雷射，發射出 488 波長的藍光，細胞樣本附著能被 488 nm 藍光雷射激發的螢光染料後，會散發出或綠、或橙紅、或深紅的螢光，而能被儀器分析。常用來定量 DNA 的染劑為 Propidium iodide (PI)，能嵌入雙股 DNA 及 RNA 的鹼基對中，由於 PI 不能進入細胞膜，因此進行 DNA 分析時，須先在胞膜上打孔，再除去細胞中的 RNA，此法常用來做 DNA 細胞週期分析。正常細胞的 DNA 是雙套的(2N)，由於凋亡細胞 DNA 斷裂成小片段，因此會比正常 G0/G1 期細胞有較低的染色密度(stainability)，經 PI 染色後，可將凋亡細胞顯現出來，而在直方圖形成 sub G1 peak。細胞經同步化處理後換回 culture medium 並投予所需劑量之 Destruxin B，vehicle 組投予 Acetonitrile 溶劑。於作用時間終了時將細胞以 4°C，2000rpm 轉速離心 5 分鐘將細胞收集起來，接著以 PBS 清洗細胞，用冰的 75%乙醇將細胞固定然後置於冰箱中保存。欲上機分析前再以 PBS 清洗後加入適量的 RNase A 於 37°C 溫箱中作用 30 分鐘，然後用 40µg/ml propidium iodide 避光染色 30 分鐘，之後即可以 FACScan 雷射流式細胞分析儀 (Becton Dickinson, CA)分析。並用 CELLQuest (Becton Dickinson, CA)作細胞週期分析，以 FL2 channel 讀取 PI 之螢光，計數一萬個細胞後，再用 Cell Quest 軟體計算細胞週期的分佈比率。

## 六、DNA 裂片分析 (DNA fragmentation assay)

當細胞發生apoptosis 時，細胞核DNA 會被核酸內切酶分解，形成180~200bp 或其整倍數的DNA 片段。此時，藉由濃度1.8%的 agarose gel 進行電泳後，會出現類似梯狀圖譜(ladder pattern)。將細胞由incubator 中取出後，移至15ml 離心管中，然後將細胞離心下來(2000rpm，5min，4°C)。離心完畢後，去除上清液並加入1ml PBS 清洗細胞。然後將此細胞液移至ependorf 中，再次離心(2000rpm，5min，4°C)。去除上清液後，加入110 µl dialysis buffer 與

4.8  $\mu$ l proteinase K，置於55°C water bath 中overnight，以打破細胞並分解細胞內蛋白質。到了隔天將細胞由water bath 中取出，加入3  $\mu$ l RNase A，然後置於37°C，water bath 中3.5 小時。待RNA 被分解之後，加入phenol/chloroform solution，輕搖30 秒之後，將ependorf置於rotator 上轉動10 分鐘。十分鐘後，以12000rpm 的速度離心5分鐘。離心完後，會分成上下兩層，此時我們取上層液體，移至另一個ependorf，加入chloroform，輕搖30 秒之後，將ependorf 置於rotator 上轉動10 分鐘。十分鐘後，再次以12000rpm 的速度離心5 分鐘。最後吸取上層的透明液體，即為細胞的DNA。

前一步驟中所萃取出DNA，取16  $\mu$ l 同時加入4  $\mu$ l DNA loading dye，充分混合均勻之後，將之加入1.8 % agarose gel 的well 中，然後開始進行電泳。電泳結束後，將1.8 % agarose gel 取出，置於ethidium bromide(EtBr) 中染色約半小時，然後利用UV 燈照射觀察並且拍照。

## 七、PI-Annexin V-FITC 雙染色法

活細胞的細胞膜只有內側含有 phosphatidyl serine (PS)，對凋亡細胞而言，細胞膜尚未受到破壞，但會有 phosphatidyl serine 移位到膜外側面的現象，Annexin V 是一種鈣離子依賴型磷脂結合蛋白(Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid-binding protein)其和 PS 有高度的親合力，經 Annexin V 接合 FITC 螢光染劑可標示移位的胞膜外 phosphatidyl serine，再合併以 PI 對胞膜破損的壞死細胞進行染色，如此可區別活細胞、凋亡細胞及壞死細胞族群，可作為凋亡的早期變化之分析。細胞以 10-mm dish 培養於 culture medium，並投予所需劑量之 Destruxin B，control 組投予 Acetonitrile 溶劑。於作用時間終了時將細胞以 4°C，2000rpm 轉速離心 5 分鐘將細胞收集起來，接著以冰的 PBS 清洗細胞，並以 1x binding buffer 將細胞調整濃度為約 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml。之後取出 100  $\mu$ l 細胞液(1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells)至康式管中，加入 Annexin V-FITC 及 PI 染劑輕輕地和細胞液混合作用，在室溫下避光作用 15 分鐘，每管再加入 400  $\mu$ l 的 1xbinding buffer。並在一個小時內以流式細胞儀作分析。

## 八、西方墨點法(Western blot)

### 【細胞蛋白質粹取】

將細胞加藥處理48 小時之後，將細胞離心下來(2000rpm，5min，4°C)。加入PBS 清洗細胞兩次，然後離心除去上清液。接著加入50  $\mu$ l golden lysis buffer 並且vortex20 秒，使細胞破裂。然後將細胞置於冰上20 分鐘，再以離心機離心(12000rpm，30min，4°C)。最後經離心後所得之上清液即為細胞蛋白萃取液。

### 【蛋白質定量】

取乾淨之玻璃試管，在試管底部加入3  $\mu$ l 的蛋白萃取液。然後在每支試管中加入997  $\mu$ l 的蛋白質染色劑，並充分混合均勻。接著另取六支玻璃試管，其中四支分別加入20  $\mu$ l 的蛋白標準液以及980  $\mu$ l 的蛋白質染色劑，同樣混合均勻。剩下兩支則只加入染色劑作為空白對照組。混合均勻之後，將每支玻璃試管中的液體移至比色管中。以紫外光-可見光分光光度計(spectrophotometer)測定標準品與樣品在波長595 nm 的吸光值。測吸光值的全程需在30 分鐘內完成。以標準品濃度與吸光值作迴歸直線，得一標準曲線圖(standard curve)，其相關係數值必須大於0.995；將樣品的吸光數值代入此直線方程式，即可換算樣品的蛋白質濃度。

### 【聚丙醯氨凝膠電泳(SDS-PAGE)製作】

所使用的SDS-PAGE 分為上下兩層，上層為5% stacking gel (625  $\mu$ l 1.5M Tris-HCl，pH=6.8、3935  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、500  $\mu$ l 40% Bis/Acrylamine、50  $\mu$ l 10% SDS、10  $\mu$ l TEMED、50  $\mu$ l 10% APS)，下層為15%的 separating gel (3740  $\mu$ l 1.5M Tris-HCl，pH=8.9、5370  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、5660  $\mu$ l 40% Bis/Acrylamine、150  $\mu$ l 10% SDS、15  $\mu$ l TEMED、150  $\mu$ l 10% APS)。首先將配製好的separating gel solution 注入兩片玻璃中間，然後緩緩倒入ddH<sub>2</sub>O，使gel 上緣壓平。等到separating gel 凝固後，將水倒出。接著注滿stacking gel solution，然後立刻插入梳狀物。等到stacking gel 凝固後，SDS-PAGE 便製備完成。

### 【SDS-PAGE 電泳】

首先將做好之SDS-PAGE 電泳片裝置在電泳槽上，然後倒入電泳緩衝液。蛋白萃取樣本與1/2 體積的2X Protein loading dye (100mM Tris-HCl [pH 6.8], 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol) 混合，置於95°C 水浴中加熱5 分鐘。加熱完後，將蛋白質萃取液置於冰上冷卻，然後將SDS-PAGE 上的梳狀物抽出，再將蛋白萃取液注入。剛開始時，先以80V 電壓進行電泳，當 loading dye 跑至separating gel 時，再將電壓提高至120V。最後當loading dye 跑出 separating gel 時，關掉電源，準備進行蛋白質轉印。

### 【蛋白質轉印】

將PVDF membrane先以methanol 浸濕。在Hando 的半濕轉印槽(Semi-Wet Transfer Unit)內預鋪3 張經blotting buffer 浸潤的3M 濾紙，再鋪上已前處理完全的PVDF membrane；取出已跑完電泳的SDS-PAGE 凝膠，平鋪在PVDF membrane 上，不可有氣泡存在；最後在凝膠上再鋪上3 張經blotting buffer 浸潤的3M 濾紙，並且趕走氣泡。完成裝置後，以24 V、200 mA (最後電壓小於20 V)條件於室溫下進行轉印至少90 分鐘。

轉印完成的PVDF membrane 放入5% blocking buffer 中，在室溫下振搖1 小時，或者4°C 振搖至隔天(overnight)，以阻斷非特異性結合。然後進行免疫墨點法(Immunoblotting assay)。使用primary 抗體(alpha-tubulin, Bax, Bcl-2, caspase-3, CDK1, CDK2, CDK4, cyclin D3, PARP, PCNA, p36/MAT1, p53, Rb2, RBBP) 作用2 小時後用TBST (10mM Tris-base, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20) 輕洗4 次，接著使用secondary 抗體(anti-mouse IgG, anti-rabbit conjugated alkaline phosphatase [AP])作用1 小時後再用TBST 輕洗4 次，最後使用5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/4-nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) 呈色法來表現結果。最後，將PVDF membrane 置於ddH<sub>2</sub>O 中以中止反應，然後置於37°C 烘箱中乾燥。

## 九、*in vivo* 研究

在本實驗中使用的為年齡約8週大的DBA/2品系小鼠，在第一次的*in vivo* 實驗中以42隻DBA/2 mice 為實驗對象，分為6組(7隻/組)。均先以腹腔注射(i.p.) L5178Y cells  $1 \times 10^5$  / 0.1 ml PBS / 隻，並分別依組別注射對應的DB濃度：vehicle (將 Acetonitrile與PBS以1：4.46比例調和)、1.97  $\mu\text{M}$ 、3.94  $\mu\text{M}$ 、7.89  $\mu\text{M}$ 、15.78  $\mu\text{M}$  及 31.56  $\mu\text{M}$  DB。每隻老鼠均以i.p.方式注入0.1 ml的藥物，之後放回鼠籠飼養。連續7天每天均予以注射藥物，並觀察其存活率。在第二次的*in vivo* 實驗中以24隻鼠齡約8週大的DBA/2 進行，分為4組(6隻/組)。均先以腹腔注射(i.p.) L5178Y cells  $1 \times 10^5$  / 0.1 ml PBS / 隻，並i.p.注射vehicle 及7.89  $\mu\text{M}$  DB / 0.1 ml / 隻，i.p.過之mice放回鼠籠飼養，之後依一天2次、一天1次以及兩天1次給予藥物，並觀察其存活率。

## 5. 結果與討論

由於在 *in vitro* 實驗中，已可觀察到黑疆菌素 B 會對於 L5178Y 淋巴癌細胞的生長造成影響，甚至使細胞死亡。為了明瞭黑疆菌素 B 的抗癌機轉，我們分析 DNA content 探討細胞週期的運行，由結果發現在黑疆菌素 B 作用 24 小時下，會使得 Sub G1 的細胞增加，並且和黑疆菌素的濃度呈現正相關的 dose-dependent 現象。而採用 5.17  $\mu\text{M}$  的黑疆菌素 B 對於 L5178Y 細胞株進行時間點試驗，則發現隨著作用時間的增加，除了 Sub G1 細胞比率明顯提高外，還觀察到另有很高比例的細胞停留在 G2/M 時期。因此，可以得知，黑疆菌素 B 之所以會使 L5178Y 細胞的生長得到抑制，可能是因為有大量的細胞週期停滯於 G2/M 時期所造成，而這樣的成因也許是黑疆菌素 B 對於 L5178Y 淋巴癌細胞的 DNA 造成損傷所致。另一方面，Sub G1 的增加，同時也透露著有大量的細胞在黑疆菌素 B 的作用下趨於死亡。至於，要如何區分出細胞的死亡是由 necrosis 造成，或者是調控細胞走向 apoptosis，則必須仰賴後續的實驗，觀察屬於 apoptotic cell 特有的現象以為之辨別。然而，在早先發表的文獻中(5)提及，使用 Destruxin A, B 和 E 作用於 P388 細胞株上，觀察其 DNA content 則發現，除了 Destruxin E 在 5.75  $\mu\text{M}$  和 27.63  $\mu\text{M}$  濃度作用下 G0/G1 時期的細胞有增加外，其他兩種藥物則無此現象。另外，該文作者觀察到三種藥物對於 P388 細

胞株於 G2/M 時期的細胞其比率均有下降的現象，而較高劑量的 Destruxin B 對於該細胞 S 時期的細胞比率則有略微增加的情形出現。這樣的結果，和我們所觀察到 Destruxin B 作用於 L5178Y 細胞株上，出現 G2/M 時期細胞的堆積，以及 Sub G1 時期的細胞比率上升，有很大的不同。這似乎意味著，即便是相同的 Destruxin B，作用於不同的細胞株上，它們對於藥物的感受性以及生物反應機制是有所差異的。

我們透過 DNA 凝膠電泳看到，經過藥物刺激的 L5178Y 細胞其 DNA 表現出梯狀圖譜，表示細胞內的 DNA 被核酸內切酶(Endonuclease)裂解成不同倍數的 180~200 bp 左右的片段，此一情況即為細胞凋亡的一種特徵。同時，也利用 Annexin V 和細胞膜上 Phosphatidyl serine (PS) 的高度親合力，來觀察出現在細胞凋亡早期的 PS 移位到細胞膜外的現象。由實驗結果可以發現，在黑疆菌素 B 的作用下，隨著作用時間的增長 apoptotic cell 比率亦增加，呈現 time-dependent 現象外。另外，就同一時間點觀察不同劑量的黑疆菌素 B 所造成之影響，則可以發現其亦呈現出 dose-dependent 的情況。

由前面的實驗結果，我們可以得知 L5178Y 細胞株在 Destruxin B 的刺激下，細胞生長會受到抑制，細胞週期運行會改變：Sub G1 時期比率增加、G2/M 時期比率上升，以及細胞會表現細胞凋亡的現象。所以在接續的實驗中，我們探討會影響細胞週期行進和調控細胞凋亡的相關蛋白表現，以了解 Destruxin B 作用下 L5178Y 細胞的分子機轉。在細胞凋亡相關蛋白研究方面，在本實驗中，我們觀察到使用 Destruxin B 刺激 L5178Y 細胞株 48 小時後，Bax 蛋白的表現有隨劑量增加而增加的趨勢，而 Bcl-2 這個屬於抑制 apoptosis 進行的蛋白則隨著藥物濃度的增加有稍減的現象，表示細胞正走向 apoptosis 的方向，而觀察負責執行細胞凋亡的 caspase-3 蛋白，則發現 pro-form 的 caspase-3 蛋白有隨著 DB 劑量的增加而消失的現象，這個結果意味著在較高濃度 (< 5.17  $\mu$  M) 的刺激下，caspase-3 的蛋白有被活化的情況。同樣的，我們也發現 Caspase-3 蛋白質的受質 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，有出現裂解的現象。PARP 原本的作用為修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性。但當 PARP 受 caspase 3 裂解，會由 116 kDa 被水解成 85 kDa，進而失去原本的效用。

另外，caspase-3會促使核酸內切酶轉移至細胞核內水解DNA，產生我們所觀察到的DNA裂片現象。所以，藉由觀察到和細胞凋亡相關蛋白表現上的改變，更進一步的證實了Destruxin B的確使L5178Y細胞執行細胞凋亡，這和前面的實驗結果是相吻合的。

而在影響細胞週期運行的相關蛋白表現方面，我們發現，負責調控細胞由G2時期行進至M時期的蛋白CDK1(cdc2)，其表現量會隨著作用劑量的增加而明顯地減少。而其他相關蛋白如：cyclin D3或者是影響細胞週期G1期推進至S期的CDK2、CDK4蛋白，在會影響CDK1(cdc2)蛋白的相同劑量下，它們的表現似乎沒有什麼太大的差異。這樣的結果，和利用Flow cytometry所觀察到的細胞週期的改變，是屬於G2/M時期停滯而非停滯於G0/G1時期。兩者的結果是相符合的。

另外一方面，我們觀察到抑癌蛋白p53的蛋白表現量，有隨劑量逐漸增加的現象。在正常情況下，p53的半衰期約只有30分鐘，相當不穩定；然而當細胞經紫外線，離子化射線(如X光，伽瑪照射)，或當細胞缺氧、缺養時，p53被活化，同時它的穩定性提高，造成細胞內的p53大量增加，除了上述刺激外，化學治療上常用的藥物也有同效。這種p53的活化與增加常導致兩種可能的結果：一是細胞生長停止在G1或G2時期；另一是細胞採取細胞凋亡而死亡。在本實驗中，或許是透過p53蛋白的增加，誘導Bax蛋白表現以及抑制Bcl-2蛋白表現，進而使得細胞步向細胞凋亡。p21基因的活化受p53的調控，p21是透過N端與CDKs/cyclins complexes 結合，抑制細胞周期進行(7)；C端主要是proliferating cell nuclear antigen(PCNA，即DNA polymerase  $\delta$ 的次單元)的作用位置，實驗發現，PCNA的表現並不受藥物的影響。此外，p36/MAT1為分子量36kDa的蛋白，p36是RING finger 家族的一員，因為它也具有C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> zinc-bind domain的特徵，和調控cdk-activating kinase (CAK)的活化有關，在本實驗中，可得知黑殭菌素B並不會影響p36/MAT1的表現。然而，我們發現，隨著黑殭菌素B劑量的增加，retinoblastoma-binding protein (RBBP)會出現減少的現象，RBBP被推測為RB蛋白C端的functional domain，具有一段高度保留的WD (Trp-Asp)重複序列，在許多蛋白中都可以發現WD重複序列，這類蛋白一

般被認為和細胞分化、轉錄以及細胞訊息傳遞的調控有關。然而，RBBP蛋白的確實功能目前而言尚不知曉，這或許是未來研究可以探討的課題。

由本實驗證實了，昆蟲寄生性真菌之一的黑殭菌(*Metarhizium*)所分泌出的毒素黑殭菌素 B，作用在小鼠L5178Y淋巴瘤細胞上，可以引發細胞週期停滯於G2/M時期，並進一步誘使其發生細胞凋亡的現象。顯示黑殭菌素B有對抗腫瘤的潛力。而在未來的研究中，或許可以探討黑殭菌(*Metarhizium*)所分泌的其他各種毒素，如：Destruxin A、C、D、E等等，對於小鼠L5178Y淋巴瘤細胞株的影響。另一方面，也可以探討Destruxin B對於各種腫瘤細胞的不同反應機制。期望透過這一方面的研究努力，能夠替生物殺菌劑作為抗癌藥物開創一個新的領域。

#### 參考文獻：

1. Buchwaldt, L., and H. Green. Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*. *Plant pathology* 41, 55-63., 1992
2. Cai, P. et al. Destruxin-A<sub>4</sub> Chlorohydrin, a novel destruxin from fungus OS-F68576 : Isolation, structure determination, and biological activity as an inducer of erythropoietin., *J. Nat. Prod.* 61 290-293., 1998
3. Chen, H. C., Chou, C. K., Sun, C. M., and Yeh, S. F. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* 34, 137-144., 1997
4. Yeh, S. F., Pan, W., Ong, G. T., Chiou, A. J., Chuang, C. C., Chiou, S. H., and Wu, S. H. Study of structure-activity correlation in destruxins, a class of cyclodepsipeptides possessing suppressive effect on the generation of

hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 29, 65-72., 1996

5. Francoise Odier, Alain Vey, JP Bureau. *In vitro* effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells : study of destruxin A, B and E. *Biol Cell*, 74, 267-271., 1992
6. Strasser, H., A. Vey, and T. M. Butt. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10, 717 -735. 2000
7. Chen, H. C. et al. The novel desmethylclestruxin B<sub>2</sub>, from *Metarhizium anisopliae*, that suppresses hepatitis B virus surface antigen production in human hepatoma cells. *J. Nat. Prod.*, 58 527-531., 1995



