

臺灣金線連鐮刀菌莖腐病抗病基因差異性表現之研究成果報告

計劃編號：NSC89-2317-B-038-001

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

主持人：鄭可大 執行單位：臺北醫學院生化學科

計劃參與人員：曾金章 執行單位：臺北醫學院微免學科

汪棧芳 執行單位：臺北醫學院生化學科

蘇柏誠 執行單位：臺北醫學院生化學科

一、中文摘要

金線連的甲醇萃取物會降低 Hep 3B, Hep G2(人類肝癌細胞株), CT-26(人類直腸癌細胞株)和 HL-60(人類血癌細胞株)的 MTT 活性，進而達到抑制的效果。其 IC₅₀ 為 26 µg/ml。金線連的水萃取液以 50 µM H₂O₂ 加入 HL-60 cells，會造成 PARP 從 113 Kd 斷裂至 89 Kd，表示細胞在進行程序性死亡。以 0.5, 1 及 2.5 mg/ml 的濃度加入培養基內，可顯著地減少 PARP 的斷裂。因為 CPP32 是分解 PARP 的酵素，所以 AF 也可以同時減少活化型的 CPP32。因此，金線連水萃取物可減少 H₂O₂ 對細胞所產生的毒性。此外，在試管內，金線連水萃取物可增強腹腔巨噬細胞的 MTT 活性及對細菌的吞食作用。並對 CT-26 在小白鼠體內的腫瘤形成，有明顯的抑制效果。

Abstract

The methanol extract of the prepared AF was investigated against hepatocellular carcinoma cell lines, Hep 3B and Hep G2, and a leukemia cell line, HL-60, and evaluated using MTT cell viability assays, the IC₅₀ value of the most potent cytotoxic fraction was 26 µg/ml. When 50 µM H₂O₂ added to HL-60 cells, resulted in the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) from its native 113 Kd form to a processed 89 Kd fragment, indicating cells undergoing apoptosis. At concentrations of 0.5, 1.0 and 2.5 mg/ml, the extract significantly decreased the cleavage of PARP. Since PARP is cleaved by CPP32 (caspase-3), the active form of CPP32 was also decreased in the AF-treated cells. Pre- or post-treatment of the AF extract inhibits the tumor formation in BALB/C mice after subcutaneous transplantation of CT-26 cell (human colon cell line).

二、計劃緣由

臺灣金線連的開發與利用面臨兩大瓶頸，一為藥理活性成分之決定，二是金線連培病害的克服。本計劃之研究即在探討金線連藥理活性的機轉；金線連的抗氧化、抗菌及抗腫瘤活性在本年計劃中均已得到明確的證實；我們更進一步純化金線連多醣體，對小白鼠口服投予，進行體內抗腫瘤活性的研究。結果證明金線連多醣體可有效抑制直腸癌細胞腫瘤的生成。

三、結果

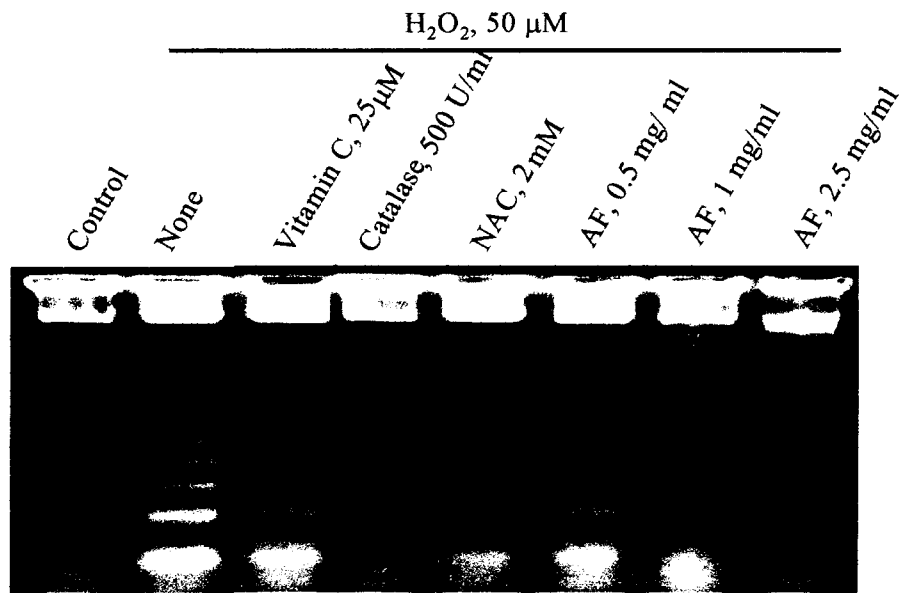
1. 如圖一所示，金線連的水萃取液可提高細胞的抗氧化能力。以 50 μ M 的 H₂O₂ 處理 HL-60 細胞，造成細胞的 apoptosis 的現象。若同時以 25 μ M 的 vitamin C 處理，則 apoptosis 減少。以另一種抗氧化劑處理時，情形與 vitamin C 相近。當加入金線連的水萃取液時，隨著劑量的增加，HL-60 的抗氧化能力逐漸增強。以此結果得知，金線連的水萃取液對細胞具有保護的作用。
2. 由圖二得知，金線連的水萃取液亦會造成如 vitamin C 的效果，誘導 Cpp32 酵素的增加，活化 PARP 酵素的裂解，造成細胞的 apoptosis。
3. 在培養基中，金線連水萃取物 10 及 50 mg/ml 處理腸胃道常見的細菌株，結果由表一的菌落數可知，金線連對於一些非產酸的細菌如 *Bacillus subtilis* 及 *Staphylococcus aureus* 有明顯的抑制作用，相反的，對一些人體消化有益的菌如 *Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium bifidum* 及 *Lactobacillus acidophilus* 卻有促進的效果。
4. 先以 CT-26 人類直腸癌細胞株皮下接種小白鼠，俟其腫瘤長到約 0.5cm³ 時，再以金線連水萃取物 10 及 50 mg/ml 口服餵食小白鼠 12 天，結果由表二得知，實驗組的腫瘤明顯較對照組小，以腫瘤重量計算，10 mg/ml 的抑制率達 40%。可見口服金線連可有效抑制 CT-26 腫瘤細胞在體內的形成。若進一步以不同酒精量沉澱金線連的多醣體，初步純化成 I 及 II 部分；分別以 5 及 1.25 mg/ml 多醣體，在 CT-26 接種前 6 天至接種後 8 天，口服投予小白鼠；結果由表三可知，實驗組的腫瘤明顯較對照組小，以腫瘤重量計算，1.25 mg/ml 多醣體處理的抑制率更達 40%。可見金線連多醣體在抗腫瘤形成上所扮演的角色。

四、結論

本計劃在第三年的研究方向：

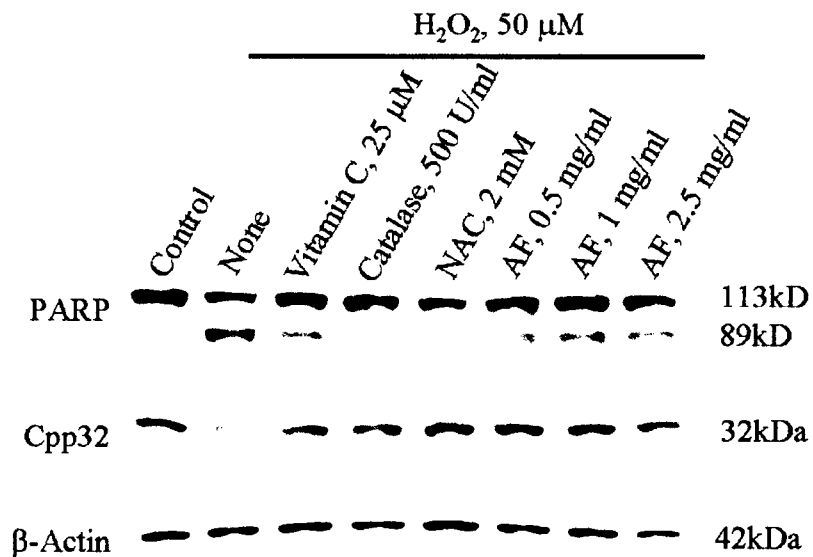
1. 對金線連多醣體做進一步的純化，並做初步的定性。
2. 評估各分劃部分的多醣體對抗腫瘤形成的效果。
3. 分別以人及小白鼠的白血球為對象，探討金線連多醣體在免疫抗腫瘤的相關基因之表現情形。

圖一



Effect of antioxidants and AF water extract on DNA ladder formation induced by H₂O₂ in HL-60 cells.

圖二



Effect of antioxidants and AF water extract on H₂O₂-induced PARP cleavage, Cpp32 activation and β-actin protein expression

表一

Stimulatory effect of AF on the growth of acid-producing bacteria

Concentration (mg/mL)	Acid producing-bacteria (x10 ⁶ CFU/ml)				None acid producing-bacteria (x10 ⁶ CFU/ml)		
	Ba*	Bb	Bc	La	Bs	Sa	Ec
100	31	38	7	950	< 1	< 1	305
50	630	21	400	360	24	8	380
10	90	121	300	38	79	22	465
0	< 1	1	< 1	7	208	53	65

*Ba: Bifidobacterium adolescentis

Bb: Bifidobacterium bifidum

Bc: Bifidobacterium was obtained from clinical isolate

La: Lactobacillus acidophilus

Bs: Bacillus subtilis

Sa: Staphylococcus aureus

Ec: Escherichia coli

表二

Inhibitory effect of AF administration against CT-26 tumor bearing-mice

AF treatment (mg/mouse)	Tumor wt. (gm)	% inhibition	P value
50	0.32 ± 0.13	23.8	0.1811
10	0.25 ± 0.17*	40.5	0.0301
0	0.42 ± 0.16	100	-

表三

Inhibitory effect of polysaccharide of AF against CT-26 subcutaneously inoculation

Fraction (mg/mouse)	Tumor wt. (gm)	% inhibition	P value
F-I 5	0.33 ± 0.13	21.4	0.1818
1.25	0.31 ± 0.08	26.2	0.0814
F-II 5	0.25 ± 0.09*	40.5	0.0260
1.25	0.25 ± 0.13*	40.5	0.0275
Control	0.42 ± 0.16	100	-