

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

香豆雌酚衍生物抑癌惡化及其分子機制之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2320-B-040-001-
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：中山醫學大學應用化學系(所)

計畫主持人：曾翠華

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：王紹銘
碩士班研究生-兼任助理人員：陳乃鳳
碩士班研究生-兼任助理人員：陳建霖

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 100年10月14日

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

香豆雌酚衍生物抑癌惡化及其分子機制之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2320-B-040 -001

執行期間：99 年 8 月 1 日至 100 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學

計畫主持人：曾翠華

計畫參與人員：陳乃鳳 王紹銘 莊賢凱 陳建霖

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

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除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

中 華 民 國 100 年 9 月 30 日

目錄

一、中文摘要及關鍵詞 (keywords)	2
二、英文摘要及關鍵詞 (keywords)	2
三、內容	
前言	3
研究目的	4
文獻探討	5
研究方法	6
結果與討論	6
圖	7
四、自評	11

一、 中文摘要及關鍵詞(香豆雌酚, 蟛蜞菊內酯, 去甲基蟛蜞菊內酯, 乳癌細胞, 侵移)

香豆雌酚衍生物如含於苜蓿芽中的 coumestrol 及在中草藥中黃花蟛蜞菊及早蓮草中所含蟛蜞菊內酯 (Wedelolactone ; WEL) 和去甲基蟛蜞菊內酯 (Demethylwedelolactone ; DWEL), 在我們預試驗中發現 coumestrol, wedelolactone 及 demethylwedelolactone, 皆可抑制惡性乳癌細胞 MDA-MB-231 之侵犯性, 其中蟛蜞菊內酯 和去甲基蟛蜞菊內酯作用又較 coumestrol 來得強, 因此進一步利用血清誘發乳癌細胞侵移的模式來研究 WEL 和 DWEL 對乳癌細胞 MDA-MB-231 侵移特性的影響, 結果顯示 WEL 和 DWEL 可抑制乳癌細胞株移動、侵犯...等現象, 接著我們以免疫點墨法評估 WEL 和 DWEL 對血清所誘導活化與侵犯性生長有關訊息路徑的影響, 結果顯示 WEL 和 DWEL 可以抑制血清誘導的 ERK、Akt 和 I κ B- α 磷酸化表現, 但不影響 JNK、p38 的磷酸化。在癌細胞移轉的過程當中 MMP (基質金屬蛋白酵素) 扮演重要的角色, 所以我們利用凝膠酶譜法和免疫點墨法分析癌細胞其 MMP-2、-9 和 uPA 表現狀況, 結果發現, WEL 和 DWEL 會抑制 MMP-2、-9 和 uPA 的活性及表現。最後我們利用動物模式, 研究 DWEL 對乳癌細胞在裸鼠中肺部移生的影響, 結果發現 DWEL 有意義減少肺部的大小及重量和肺部移生的現象。

二、 英文摘要及關鍵詞 (keywords: Coumestan, Wedelolactone, Invasion, Breast cancer cell)

Coumestan derivative are one of phytoestrogen natural products. However, it is not well known about anti-tumor progression effect of coumestan derivatives. In addition to coumestrol, Wedelolactone, a coumestan derivative, was first isolated from the extract of *Wedelia calandulaceae* in 1956 and later from *Eclipta prostrate*. Wedelolactone exhibits a broad range of biological activities including antidote for snake venom, beneficial effects in liver disease, and stimulation of liver cell regeneration and direct inhibition of IKK complex. In the preliminary study, we found coumestan derivatives possess anti-invasion properties. While the effect of WEL and DWEL on the suppressing breast cancer invasion and metastasis is potent and poorly understood we use fetal bovine serum (FBS) as an invasive inducer to investigate the effect of WEL and DWEL on invasive growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells. The results showed WEL and DWEL inhibited the cell motility and invasion. The effect of WEL and DWEL on FBS-induced signaling activation involving

invasive growth was evaluated by immunoblotting analysis. It showed that WEL and DWEL block the, ERK, Akt and I κ B- α phosphorylation but not JNK and JNK phosphorylation. Evidenced showed that metalloprotease (MMPs) play important role in breast cancer cells migration and invasion. We performed zymography assay and western to investigate whether WEL and DWEL inhibits MMP-2 and -9 activity and expression. Furthermore, we use animal models to study DWEL on lung colonization of MDA-MB-231 cells in nude mice. The results showed DWEL significantly reduced the size and weight of lung as well as lung colonization. Take together the result show anti-invasion and anti-metastasis activity of WEL and DWEL in breast cancer are associated with inhibition of signaling pathway.

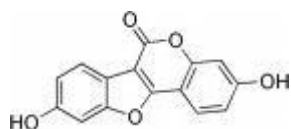
三、內容

前言

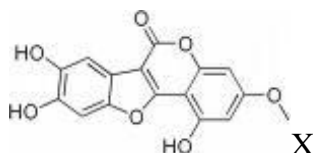
癌症是國人十大死因之第一位,因此如何減少癌症之發生或惡化是一重要研究課題,近年來誘發腫瘤細胞分化及抑制癌細胞或減緩癌細胞轉移之物質開發為癌症預防與治療開啟另一新方向。大部份癌細胞具有分化不佳且展現高度增生之特性,如能誘發分化讓不成熟、不正常或惡性之細胞反轉成正常或良性之細胞,使細胞呈現成熟細胞之表現型,將可減少癌症之惡化。另外癌細胞轉移惡化是癌細胞致命的主因,其過程包括如癌細胞骨架的改變,打亂細胞與細胞間或細胞與間質之作用力,增加基質金屬蛋白酵素及血管新生因子的分泌進而促進細胞轉移,而這些作用可能與轉譯因子的活化有關,如能預防或減少這些現象之發生,將可延長癌症病患之壽命。

天然物在人類預防保健中扮演重要角色,也是人類醫藥開發的寶藏,異黃酮 (isoflavone) 、木質素(lignin) 及 香豆雌酚(coumestan)被稱為植物荷爾蒙(phytoestrogen),報導指出其對停經後婦女潮熱心悸、骨質流失、記憶力衰退等現象具有改善之作用,文獻也指出其具有抗菌、抗氧化、抗癌及保肝等活性,然有關香豆雌酚衍生物之抗癌活性及其作用機制文獻較少,香豆雌酚衍生物如 coumestrol 主含於苜蓿芽中,在中草藥中發現黃花虻蜚菊及早蓮草中含有豐富香豆雌酚衍生物 wedelolactone ,本計劃以此類天然物為材料對惡性乳癌細胞進行抑癌惡化活性評估及其機制探討。

structure



Coumestrol



Wedelolactone (WL)(X=CH₃)

Demethylwedelolactone (DWL)(X=OH)

癌細胞轉移惡化是癌細胞致命的主因，癌細胞轉移惡化有幾個過程如癌細胞先變形細胞骨架改變往外伸展(scattering),打亂細胞與細胞間或細胞與間質之作用力,細胞前端突起背端凹縮而移動(migration),增加基質金屬蛋白酵素(MMPs)活性有助癌細胞之移動(invasion),又增加 vascular endothelial growth factor (VEGF)、HGF 及 fibroblast growth factor(FGF)等蛋白分子皆有促進血管新生加速腫瘤之擴散與轉移之作用(1),而從過去文獻中發現癌症轉移與 NFκB AP-1 及 STAT 等轉譯因子的訊息路徑活化有密切關係,因此中止癌細胞惡化之訊息路徑或調控蛋白將可減緩癌症之惡化。

研究目的

了解香豆雌酚衍生物在癌症 預防保健中扮演的角色,做為醫藥開發的依據與參考.

文獻探討

過去科學家從虻蜚菊及鱧腸等植物中分離得到 coumestan 衍生物 wedelolactone,曾有報導指出其具有抗菌、抗氧化及保肝等活性,最近科學家指出其對內毒素活化之 IKK 有抑制作用,中研院學者也發現其具有抑制攝護腺癌之作用(ref)。但香豆雌酚(coumestan)衍生物抑癌活性及作用機制仍有待進一步了解。

- 1.Wong S.M., Antus S., Gottsegen A., Fessler B., Rao G.S., Sonnenbichler J., Wagner H. (1988) Wedelolactone and coumestan derivatives as new antihepatotoxic and antiphlogistic principles. *Arzneimittelforschung* 38, 661-665.
2. Melo P.A., Nascimento M.C., Mors W.B., Suarez K.G. (1994) Inhibition of the mytotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* 32, 595-603.
3. Unnikrishnan K.P., Anu Fathima K.M. (2007) Antioxidant studies and determination of Wedelolactone in *Eclipta alba*. *Journal of Plant Sciences* 2, 459-464.
4. Kobori M., Yang Z., Yuan J. (2004) Wedelolactone suppresses LPS-induced caspase-11 expression by directly inhibiting the IKK complex. *Cell Death and Differentiation* 11, 123-130.
5. Lin F.M., Chen L.R., Ke F.C., Chen H.Y., Tsai M.J., Hsiao P.W. (2007) Compounds from

Wedelia chinensis synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 2521-2529.

6. Dalal S, Rana S., Satry K., Kataria S. (2009) Wedelolactone as an antibacterial agent extracted from *Eclipta alba*. *The internet Journal of Microbiology*, 7.

研究方法

[1] 細胞培養 (cell culture)

人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 (from *The NHRI Cell Bank*), 培養於含有 10% fetal bovine serum (FBS : Gibco BRL)、1% nonessential amino acid (NEAA : Gibco)、1% Penicillin-Streptomycin (PS : Gibco) 的 Dulbecco's Modified eagle medium (DMEM : Gibco), 培養箱設定 5% CO₂, 37°C 恆溫環境, 細胞密度維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$, 每週更換培養基 2~3 次。

[2] 細胞毒性測試---MTT assay

[3] Wound **Healing Assay**

[4] cell-matrix adhesion 分析

[5] 細胞侵入(invasion)與細胞移動(migration)分析

[6] 西方點墨法(Western blotting)

[7] Animal study: 裸鼠靜脈注射轉移試驗

[8] 統計分析 (Statistical analysis)

結果與討論

1. 癌細胞轉移惡化是癌細胞致命的主因, 其過程包括如癌細胞骨架的改變, 打亂細胞與細胞間或細胞與間質之作用力, 進而促進細胞轉移, 由 Fig. 1 和 Fig. 2 中發現, 蟛蜞菊內酯, 去甲基蟛蜞菊內酯比香豆雌酚在抑制惡化性乳癌細胞移行及吸附上都有較強作用, 因此以下以蟛蜞菊內酯, 去甲基蟛蜞菊內酯為材料做進一步的探討。
2. 乳癌細胞末期因為伴隨著侵入以及轉移之能力, 所以其致死率高於其他原位性癌症。所以癌細胞的侵入能力對於癌細胞的轉移是十分重要地。以 Boyden chemotaxis chamber 實驗證實蟛蜞菊內酯和去甲基蟛蜞菊內酯會隨著濃度的增加而加強抑制 MDA-MB-231 細胞的移動及侵犯能力 (Fig.3)。
3. matrix metalloproteinases (MMPs) 具有分解基底膜與結締組織的能力, 先前也提到 MMPs 會參與了細胞侵犯及轉移的過程, 因此我們以 zymography and western blotting assay 觀測蟛蜞菊內酯和去甲基蟛蜞菊內酯對 MMP 活性及蛋白表現之影響, 結果發現蟛蜞菊內酯和去甲基蟛蜞菊內酯 具有抑制 MDA-MB-231 細胞自發性轉移的蛋白質表現和蛋白酶活性上的作用。
4. ERK1/2、JNK、p38 MAPK 和 Akt pathway 參與了細胞內的訊息傳遞, 當細胞接受到不同的

刺激，便會活化、傳遞訊息，調控細胞的增生、轉移、存活、凋亡等各種現象，因此進一步的探討蟛蜞菊內酯和去甲基蟛蜞菊內酯對癌細胞不正常訊息路徑活化之影響，結果可以看到，在處理 5、10、20 μM 後，ERK 和 Akt 的磷酸化就濃度增加而減少，但並不會影響 JNK 和 p38 的活化 (Fig. 5)，由此可知蟛蜞菊內酯和去甲基蟛蜞菊內酯能夠抑制 MDA-MB-231 細胞內 ERK 和 Akt 兩條訊息傳遞路徑，另外過去的研究顯示 Akt/protein kinase B 可藉由增加 NF κ B 的轉錄活性促進 MMP-2, -9 的表現，進而增加細胞侵犯及移動的能力，我們也以 0, 5, 10, 20 μM 的蟛蜞菊內酯和去甲基蟛蜞菊內酯加在培養 12 小時後，發現依濃度的增加而減少 I κ B- α 的磷酸化，我們也發現在上游的 IKK α/β 和下游的 p65 也具有同樣被抑制效果 (Fig. 5)。

- 最後，我們利用此動物模式進一步研究去甲基蟛蜞菊內酯對癌細胞在裸鼠中形成肺部移生的影響，結果發現這些注射癌細胞的裸鼠都會形成肺部的乳癌移生現象，而處理去甲基蟛蜞菊內酯組這些有產生移生的肺部現象，無論在肺部的大小及重量都有明顯減少的現象 (Fig. 6)，此現象顯示去甲基蟛蜞菊內酯具有抑制癌細胞轉移之作用。

圖

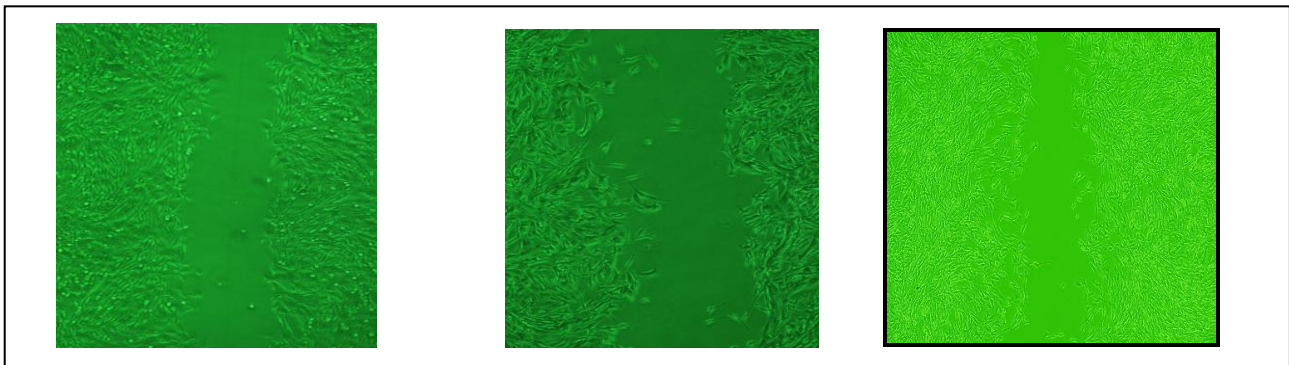


Fig.1 Evaluation wedelolactone and coumestrol on cell motility in MDA-MB-231 cells. Microphotographs of a similar randomly chosen field for each one of the wounded monolayers were taken when the wound was created after 12 hours.

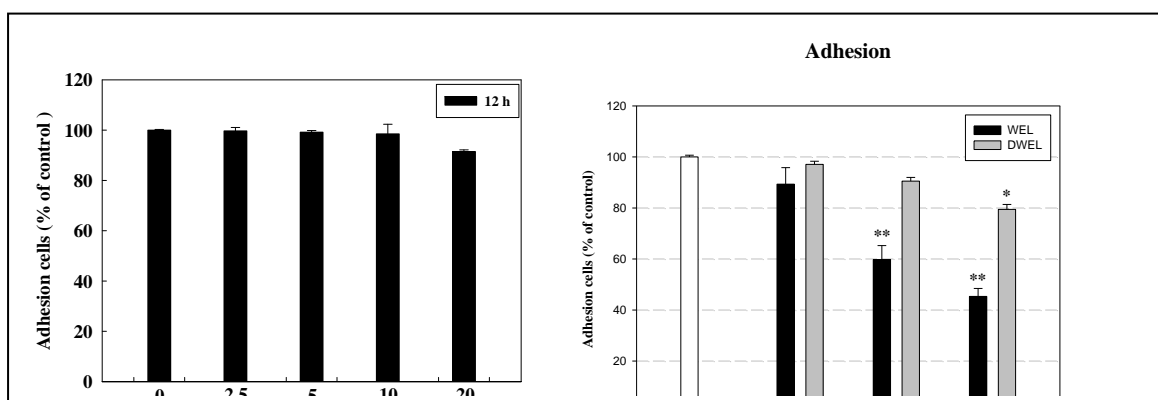


Figure 2 Wedelolactone and demethylwedelolactone inhibit of MDA-MB-231 breast cancer cell adhesion to coated with Matrigel.

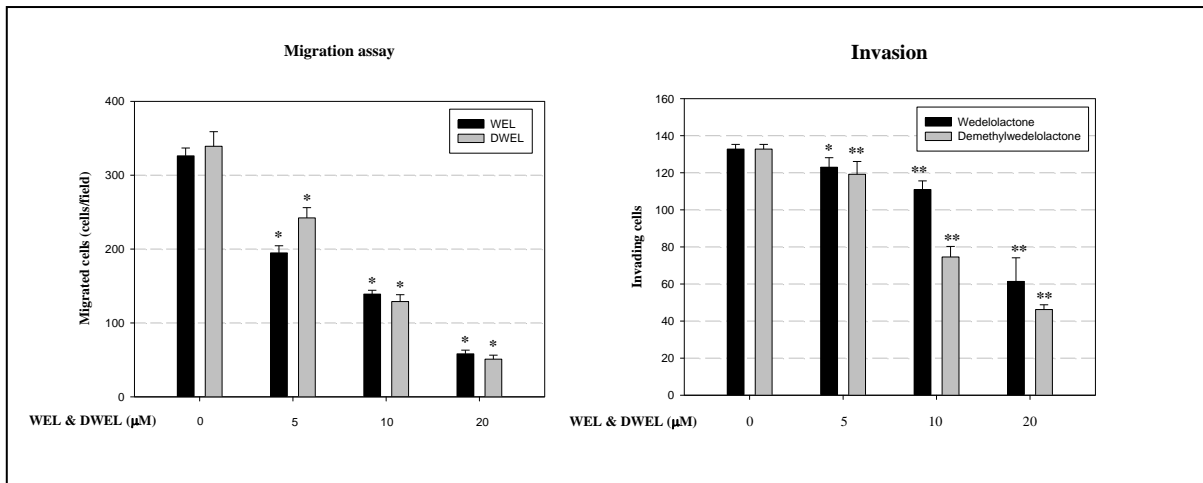


Figure 3. The inhibitory effect of wedelolactone and demethylwedelolactone on cell migration and invasion.

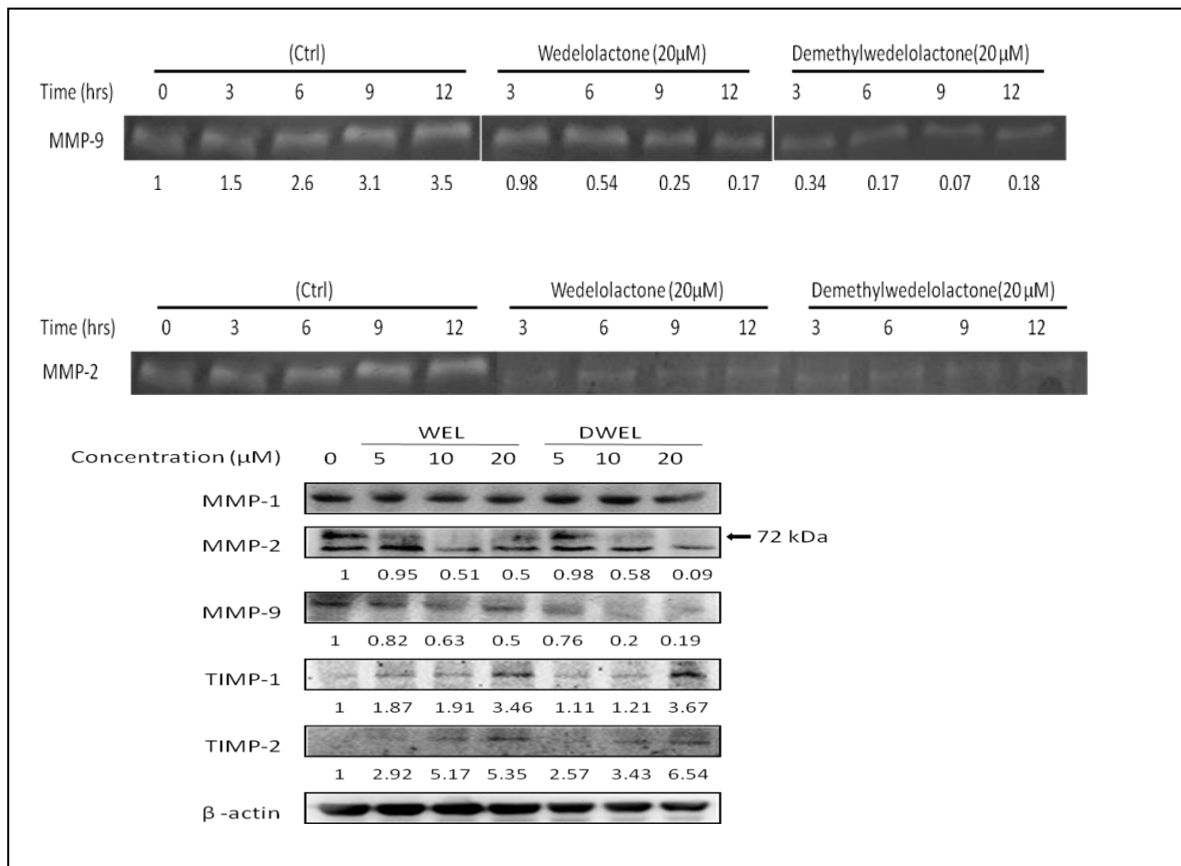


Figure 4. The effect of wedelolactone and demethylwedelolactone on the activity and expression of MMPs in MDA-MB-231 cells. Zymograms were performed from supernatants MDA-MB-231 cells treated with or without wedelolactone and demethylwedelolactone for 0, 3, 6, 9 and 12 hours. Conditioned media were normalized to cell number prior to loading on a 8% SDS-polyacrylamide gel co-polymerized with 0.2% gelatin. Following electrophoresis, gelatin zymography was performed. Pro-MMP-9 is detected in gelatin gels as a single band of ~92 kDa. Pro-MMP-2 is detected in gelatin gels as a single band of ~72 kDa.

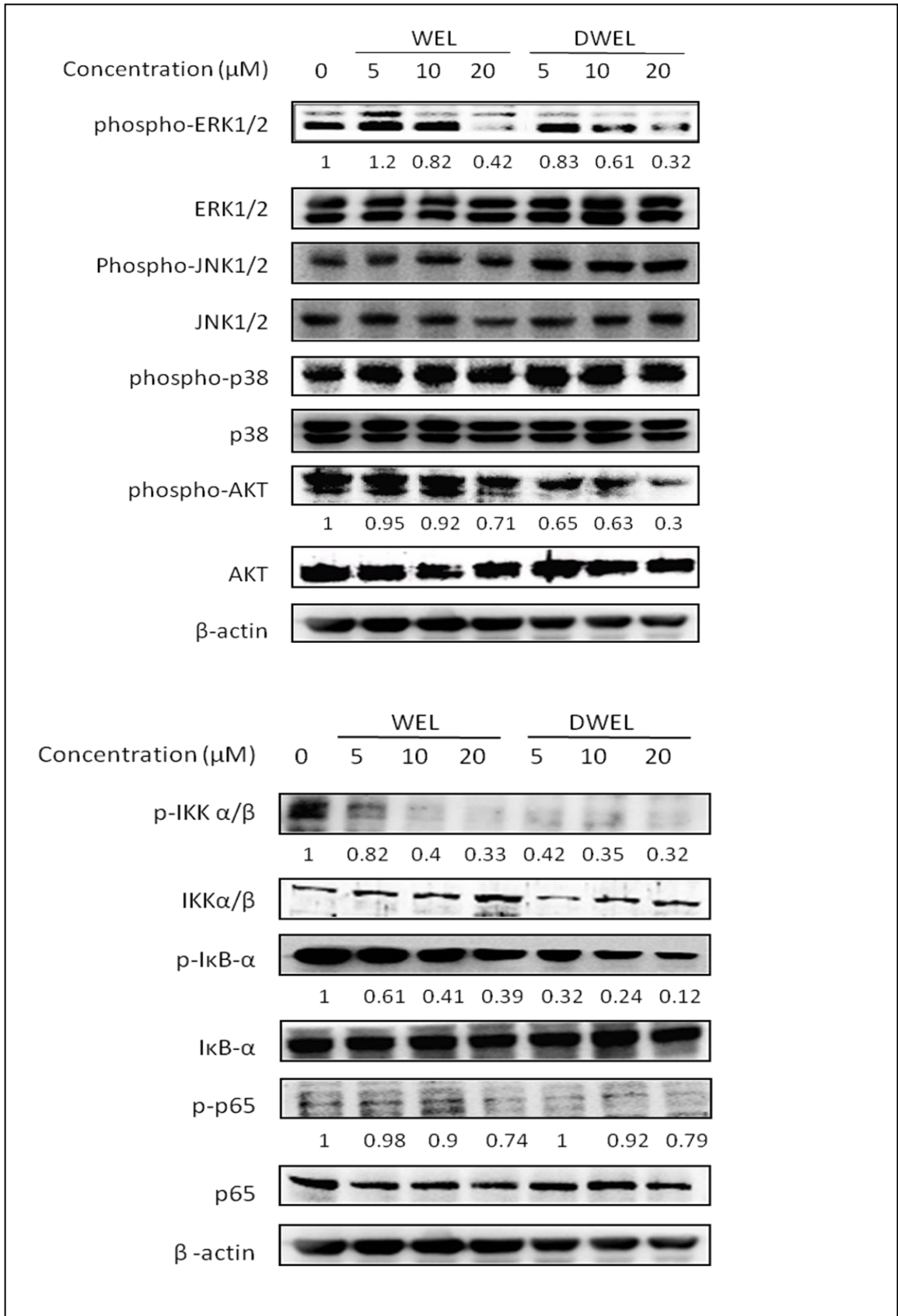


Figure 5. Effects of wedelolactone and demethylwedelolactone on phosphorylation of MAPKs , Akt , $\text{i}\kappa\text{K}$ and $\text{i}\kappa\text{B-}\alpha$ expression in MDA-MB-231 cells.

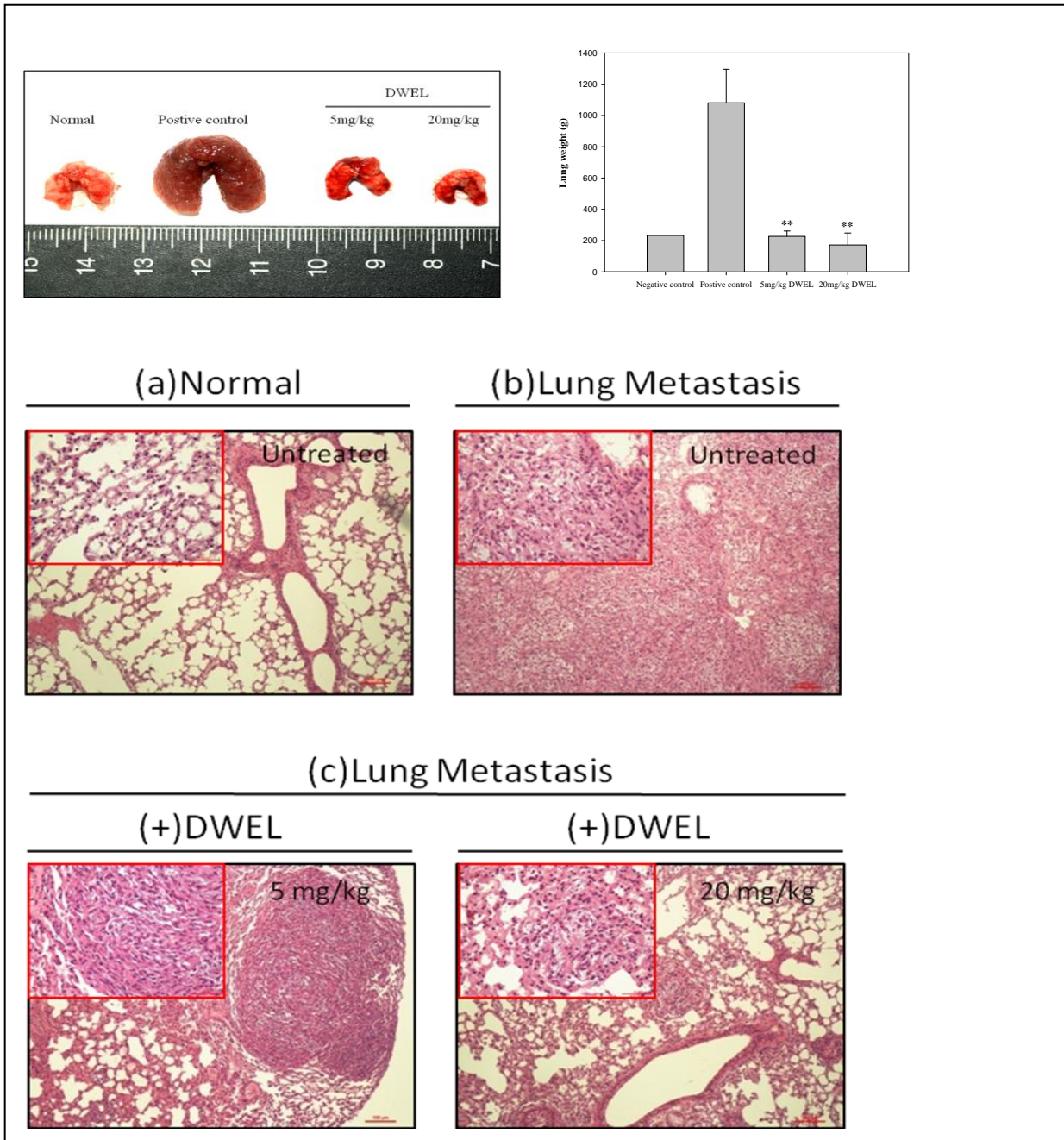


Figure 6. Effect of demethylwedelolactone on lung colonization of MDA-MB-231 cells in nude mice. The female mice were divided to four group (n=6). DWEL were administered (i.p.) every other day for 5 weeks. After treatment with serum-free DMEM (i.p.) for week, MDA-MB-231 cells (10^6) suspended in $100\mu\text{l}$ of DMEM were injected into the tail vein of positive control group and DWEL-treatment group. Mice were sacrificed 4 weeks later the cell injection and the lung were cut for assessment. (A) The representative of grow view were photographed. (B) The weight of the lung were measured and (C) the representative of histological view of the lung sections (H & E stain, x 100) was photographed. (a) negative control (b) positive control. (c) DWEL treated. Red squares correspond to magnifications of selected lung sections. Scale bar = $100\mu\text{m}$. Data presented as means \pm SD of six independent experiment. ** $p < 0.001$, compared with the group treated with Positive control.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究發現食材如苜蓿芽及一些菊科中草藥中含有香豆雌酚衍生物，這類衍生物具有抑制癌惡化即抑制癌轉移之潛力，因此多攝取此類食材具有提升預防保健之功效。

另外從結構活性研究上比較發現去甲基蟛蜞菊內酯具有較強活性作用，可能與其具有較多的氫氧取代基有關。本研究結果除將發表於國際期刊外，也提供合成製藥業結構與活性參考資料，有助醫藥之開發。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/14

國科會補助計畫	計畫名稱: 香豆雌酚衍生物抑癌惡化及其分子機制之研究
	計畫主持人: 曾翠華
	計畫編號: 99-2320-B-040-001- 學門領域: 中醫藥
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：曾翠華		計畫編號：99-2320-B-040-001-					
計畫名稱：香豆雌酚衍生物抑癌惡化及其分子機制之研究							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	3	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究發現食材如苜蓿芽及一些菊科中草藥中含有香豆雌酚衍生物，這類衍生物具有抑制癌惡化即抑制癌轉移之潛力，因此多攝取此類食材具有提升預防保健之功效。

另外從結構活性研究上比較發現去甲基蟛蜞菊內酯具有較強活性作用，可能與其具有較多的氫氧取代基有關。本研究結果除將發表於國際期刊外，也提供合成製藥業結構與活性參考資料，有助醫藥之開發。