

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

兔兒菜抑制肝癌細胞增長及其活性成份之作用研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-038-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：曾翠華

計畫參與人員：簡連福 李恆君

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 8 月 31 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

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92 -2320-B-040-038-

執行期間： 92 年 08 月 01 日 至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：曾翠華

共同主持人：

計畫參與人員： 李恆君 簡連福 吳蘭鳳

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：中山醫學大學

中 華 民 國 93 年 08 月 日

中文摘要

關鍵詞:兔兒菜、肝癌細胞、細胞凋亡

人類經過幾十年來的努力不懈，惡性腫瘤的藥物治療已有了巨大的進步。現代科學，特別是生命科學的迅速發展，正在逐步揭開惡性腫瘤中發生本質的秘密，抗腫瘤藥物研究已進入一個新的階段。目前醫界尋找新藥的迫切性逐漸提高，而且在紫杉醇等抗癌藥物的研究成功，顯示從自然界找尋具新作用機制及獨特化學結構的細胞毒性藥物仍有重要意義。兔兒菜(*Ixeris chinensis*)是民間普遍使用的藥材，有解熱、鎮痛、消炎、退乳癰、治血癰、肝癌之說，由先前本實驗室已發現兔兒菜的萃取物具有良好的抗氧化能力，而本實驗發現兔兒菜的某些層萃取物對一些癌細胞株具有細胞毒性，再進一步進行成分及活性分析發現，存在於兔兒菜中的類黃酮化合物-Luteolin 不但有良好抑制 HepG2 人類肝癌細胞的增生外，在經由流式細胞儀、DAPI 核染分析、DNA 片段化分析等證明能誘導細胞凋亡的發生。在利用西方墨點法探討 Luteolin 誘導 HepG2 肝癌細胞凋亡時的蛋白發現，除了 CPP32 有明顯活化且其受質 PARP (poly [ADP-ribose] polymerase)也出現被分解的結果，細胞凋亡之中上游蛋白，如：cytochrome C 在細胞質表現上升。綜合以上結果:兔兒菜能抑制 HepG2 肝癌細胞增生，而從兔兒菜鑑定分離出來的 Luteolin 的抑制效果更佳，甚至還能誘導細胞凋亡，顯示兔兒菜兼具保健與治療的功能，值得進一步開發研究。

英文摘要

Abstract

After human striving for decades, there is a huge progress on the medicine therapies of malignant tumor. Modern science develops speedily especially life science which is probing the secret of carcinogen. It sets a milestone for researches of antitumor drug. The success of antitumor drug like Paclitaxel reveals the importance to discover new mechanism and unique chemical structure of cytotoxicity drug from the nature. *Ixeris chinensis* is a kind of popular herb for bleeding, swelling, inflammatory, and pain. Previous study showed *Ixeris chinensis* to be well antioxidant. In this study, we found the crude extract of *Ixeris chinensis* having cytotoxicity to tumor cell lines. After analyzed the component and activity, we discovered Luteolin a kind of flavonoid inhibited the growth of human hepatoma cell-HepG2. Taking use of flow cytometry, nuclear stain assay, DNA fragmentation assay, we confirmed that Luteolin induced apoptosis. We found that Luteolin induced HepG2 cells apoptosis through increase expression of CPP32 and its substrate, PARP, had been degraded. The upstream proteins of apoptosis like cytochrome C,. There was a conclusion that *Ixeris chinensis* has potential to inhibit the proliferation of HepG2 cells. Luteolin isolated from *Ixeris chinensis* got better inhibit effect and it can even induce apoptosis. The result showed *Ixeris chinensis* had health protection and cure function that is worth advanced development.

前言

根據行政院衛生署 92 年統計，癌症依然蟬連臺灣十大死因之首，但肝癌晉升成爲男性排行第一位，在女性則爲第二位，代表肝癌已成爲國人最揮之不去的夢魘。肝腫瘤發生的致病因素很多，目前公認最有關係的爲：過量的酒精和吸菸將加速外來致癌性物質與肝細胞的接觸而致癌；其他像黴菌毒素（如黃麴毒素）、病毒（如 C 型肝炎病毒、B 型肝炎病毒）亦與肝癌的引起有關。肝癌在早期階段是沒有症狀的，幾乎感覺不到任何的不適，因而延誤了最佳治療時機。肝癌不但死亡率高，預後很差，病因複雜，症狀又不明顯，可謂十分「狡滑」，目前醫界預防唯一的方法仍只有從「早期診斷，早期治療」著手。今日雖然很多疾病都能被妥善治療，但惡性腫瘤卻仍是不治之症。即使手術、合成藥物及化學放射療法對癌症可以產生積極的治療效果，但卻經常伴隨驚人的副作用或是產生抗藥性，這突顯人們應對腫瘤的發生機制及抗腫瘤藥物作用要有更爲深入的瞭解，以期孕育出更有效的抗腫瘤藥物。

兔兒菜(*Ixeris chinensis Nakai*)，爲菊科(*Asteraceae*)草本植物，全株有白色乳汁，可取其根部或全草鮮食用或乾燥後藥用，其藥性苦寒入肝、胃、肺三經，民間常用於解熱、消炎、腫瘍、乳癌、毒蛇咬傷等，且權充蒲公英入藥(1,2,3)。對於兔兒菜之研究，最早在 1990 年 陳榮才等學者(4)，鑑定兔兒菜白色乳汁中的苦味成分，發現含有 8-epicrepiside G(taste bitter)、8-epidesacylcynaropicin glucoside (taste bitter)、ixerin D(taste bitter)、luteolin 7-0- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside 等抗腫瘤活性之黃酮類及一些糖類、配糖體(5)等，應驗民間普遍有解熱、鎮痛、消炎、退乳癰、治血癌、肝癌等傳統療效之說；於 1994 年 Lin 等人由動物實驗發現，兔兒菜萃取物具有 hepatoprotective activity，避免 carbon tetrachloride、 β -D-galacto-samine (GalN)和 Acetaminophen(PcmL)對大白鼠(GalN)和小白鼠(Pcm L & carbon tetrachloride)誘發肝臟 SGOT，SGPT 值的驟升，且顯著改善此三種物質所造成肝組織病理學上的變化，減低肝炎發生的可能，達保健之效果(6)，而其他抗癌活性及其有效成份有待進一步探討。

研究目的

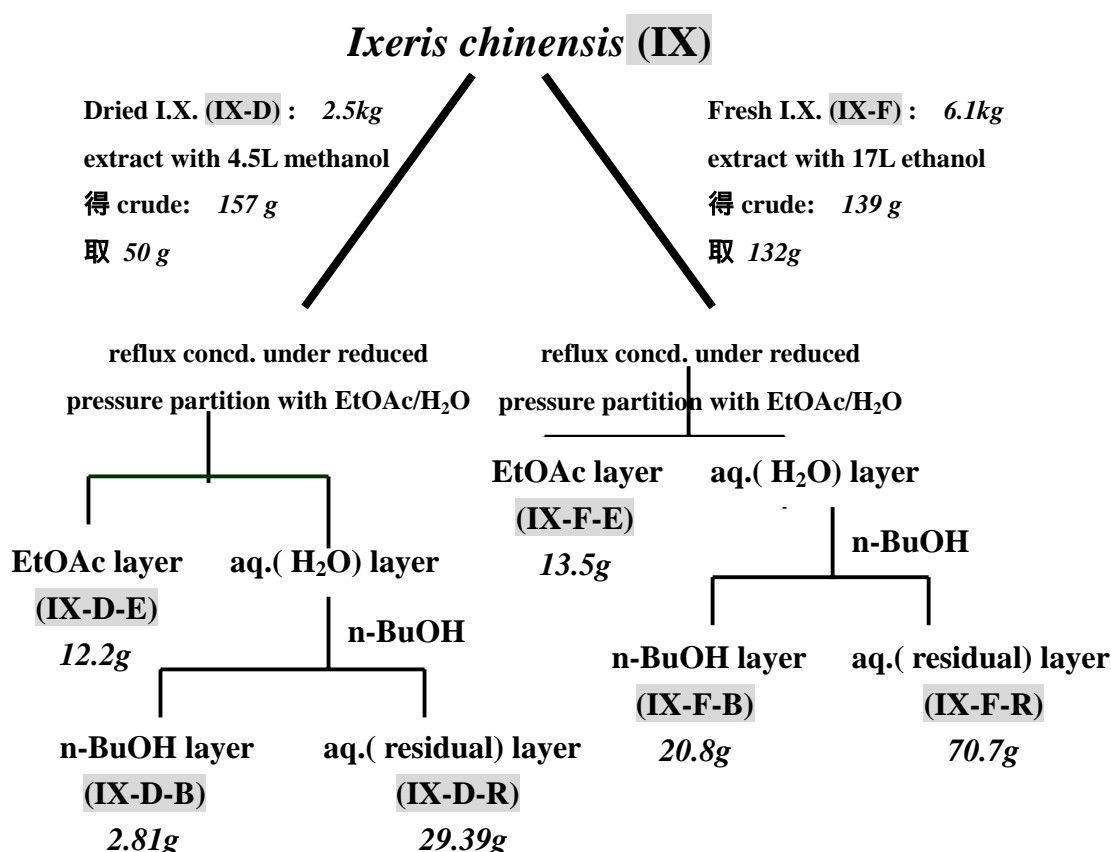
人類利用天然物治療疾病的歷史相當久遠，早在西元前 3000 至 2700 年中國的神農氏所著的本草經記載了 365 種草藥方；西元前 1770 年的巴比倫經書 Code of Hammurabi 中亦列出許多藥用植物，此外，如：希臘、印度、阿拉伯等各民族的傳統醫學中亦有大量使用草藥的記載，或是以口耳相傳的方式將藥方流傳至今。目前，西方廣泛使用的醫學藥物中，有 74%是靠傳統醫藥提示而發現的，例如：近代臨床上醫療藥物已有來自柳科植物的止痛藥-阿斯匹靈(Aspirin)；自金雞納樹分離出治療瘧疾的奎寧(Quinine)；自毛地黃取的毛地黃素(digitoxin)已用於醫療上增強心肌的收縮力；自罌粟提煉的嗎啡(morphine)具有鎮痛及催眠作用；目前已上市的抗癌藥物-太平洋紫杉醇(Paclitaxel)，便是取自太平洋紫杉的樹皮等。天然中草藥科學已逐漸成爲本世紀重要的研究潮流，且從植物獲取有效成份並以此爲先趨化合物作爲抗腫瘤藥物研究與開發的重要途徑之一，本實驗便是以天然植物-兔兒菜(*Ixeris chinensis*)作爲研究的對象，探討其中的抗癌活性成分在抑制肝癌細胞生長的效果及作用機轉。

研究方法

一、兔兒菜粗萃取物之制備

(Preparation of crude extracts of *Ixeris chinensis*)

將乾/鮮品兔兒菜(由南投購得本土野生之兔兒菜)分別以甲醇、乙醇浸泡四周,藉由減壓濃縮機濃縮處理後,以1:1比例之EtOAc(E.A.)/H₂O 500ml 溶劑萃取,可得E.A 分層及剩下的aqueous extract;接著用n-BuOH將aqueous部分重覆萃取,如此共得E.A.、n-BuOH、residual三種萃取層,再接著用乾燥濃縮機進一步將之乾燥。兔兒菜成份之萃取步驟詳細的流程如下:



(一) 兔兒菜粗萃取物(IX-F-E)之純化製備

每次取0.1~0.2 g 兔兒菜粗萃取物(IX-F-E)用 silica gel column (預先填充 match:230~400 之 silica gel 約 50g) 進行純化製備,沖提液的 solvent system 由 CHCl₃:Methanol=95:5 開始,依次逐漸提高 Methanol、降低 CHCl₃ 的比例,約至 CHCl₃:Methanol=1:1 時,所有 sample 皆自 silica gel column 通出。控制 sample 自 column 流出之速度約為 1.0 滴/2 秒,用玻璃試管收取通出之 sample,每管約 10ml,將依不同 solvent 比例收得的 sample 進行 TLC(薄層色層分析法)分析,展開液與 silica column 之沖提液相同,觀察並紀錄出現 band 的數目與每條 band 的 R_f 值,以上步驟重覆數次直到收集到足夠的樣品為止。

(一) 高壓液相層析儀分析 (High pressure liquid chromatograph)

儀器: Hitachi UV-Vis detector (L-7420); Hitachi pump (L-7100)

高效能液相層析分離管柱: 250×4.6mm 5u Hypersil ODS

藥品: 1. Luteolin

2. 乾/鮮品兔兒菜及其 (E.A.、But.及 Res.) 各分層粗萃取物：1 mg/ml

流動液相劑 (Mobil phase)：

Methanol

H₂O

A 液— Acetonitrile : H₂O : Acetic acid = 90 : 10 : 3

B 液— Acetonitrile : H₂O : Acetic acid = 10 : 90 : 3

操作方法：將整個管路接上並確認管路中並無氣泡產生，UV 光源設定為 360nm，幫浦流速設為 0.8 ml/min，整個系統平衡約需 2 小時，待平衡後，打入數種濃度的 Luteolin 標準品 (retention time=27.04)，確定管柱的分離效果及標準品濃度並無問題後，依 Luteolin 濃度與積分面積畫出標準曲線，開始施打兔兒菜粗萃取物並予以積分計算樣品中 Luteolin 的含量。

(二) 細胞毒性分析 (MTT assay)

根據 Alley 等人發表於 1988 年的 *Cancer research* 期刊(7)，其原理是利用活細胞能經由粒線體 dehydrogenase 的作用，將(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT)代謝還原成紫色的 formazan crystal，並在波長 563nm 有特殊吸光。將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，用 PBS 沖洗後，以培養基將細胞濃度調整成 2×10^4 cells/ml，各取 1ml 的細胞液分別培養於 24-well 的培養皿中。待細胞貼壁，更換新的培養基，同時加入不同濃度的 24 小時；另一組實驗設計乃以各層兔兒菜萃取物 (實驗組) 或 0.2% DMSO (對照組)，分別培養 24 小時後，分別更換新的培養基，同時加入 100 μ l MTT (5mg/ml)反應 4 小時，除去培養基後，最後以 1ml 的 isopropanol 將紫色的 formazan 結晶溶解，並於波長 563nm 下測定吸光值(O.D.)。比較實驗組與對照組吸光值的差異，以反映出兔兒菜萃取物對 HepG2 cells 的細胞毒性。

(三) DNA 片段化分析 (DNA fragmentation)(8)

用上述方法將細胞培養並加藥處理後，以 PBS 沖洗，trypsin-EDTA 打下細胞後，以 300g 離心 5 分鐘，除去上清液，pallet 加入 lysis buffer (20 mM Tris，10 mM EDTA，0.2% Triton X-100) 於冰上作用 10 分鐘後，離心 12,000 rpm 10 分鐘，取上清液加入 12.5 μ l proteinase K (40 mg/ml)於 50 $^{\circ}$ C 水浴作用 6 小時後，再加入 5 μ l RNase (10 mg/ml)於 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 小時，開始加入等體積的飽和 phenol (pH=8.0)，用手輕輕搖晃均勻，離心 12,000 rpm 10 分鐘後取上清液，在加入等體積的(phenol/chloroform/isoamylalchol [25 : 24 : 1])，用手輕輕搖晃均勻，離心 12,000 rpm 10 分鐘後，取上清液加等體積 isopropanol 及 4 μ l Glycogen (5mg/ml)，在 -20 $^{\circ}$ C 靜置 overnight 後，進行離心 12,000 rpm 15 分鐘，取沈澱部分溶於適量的 TE buffer (10mM Tris，1Mm EDTA)，用 50V 跑 1.5% 的 agerose gel 電泳，將 gel star 染後用 KODAK 數位影像系統 EDAS 290 定量。

(四) 細胞週期分析 (Cell cycle assay)

將細胞培養之後，用 trypsin-EDTA 將細胞自培養皿打下，接著以 PBS 沖洗後，以 300g 離心 5 分鐘，取沈澱細胞，加培養基使細胞懸浮，並將細胞濃度調整成 2×10^5 cells/ml，培養於 10 公分的培養皿中。待細胞貼壁，更換新的培養基，在此同時加入各種劑量兔兒菜萃取物、Luteolin (實驗組) 或 0.2% DMSO (對照組)，作用 24 小時後，以 trypsin - EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗，調整細胞濃度成 2×10^6 cells/ml，以 300g 離心，倒除上層液，加入 80%酒精置入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱固定細胞至少 30 分鐘以上。接著以 400 g 離心 5 分鐘，倒除上層液，並加 0.1% tritonX-100 0.5ml 於暗室中反應 30 分鐘。再次離心，倒除上層液，加

入 1ml PI solution (10 μ g/ml, 內含 40 μ g/ml Rnase A), 於 37°C 水浴槽中避光反應 30 分鐘, 最後置於冰上, 以流式細胞儀(flow cytometry)測定。

(五) 西方墨點法 (Western blotting)

將細胞培養後, 以 trypsin - EDTA 將細胞由培養皿打下, PBS 沖洗後, 以 1000rpm 離心 5 分鐘, 取沈澱細胞, 加培養基使細胞懸浮, 將細胞濃度調整成 2 \times 10⁵ cells/ml, 培養於 10 公分的培養皿中。待細胞貼壁, 更換新的培養基, 同時加入指定量的 Luteolin 培養特定的時間後, 以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下, PBS 沖洗離心後, 倒除上層液, 加入 RIPA buffer【(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5%Deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50mM Tris - base, PH=7.5), 內含 1mM sodium orthovanadate, 100 μ g/ml PMSF, 170 μ g/ml leupeptin】, 於冰上震蕩 30 分鐘後在 4°C 下以 10000 g 離心 10 分鐘, 即得 Total cell lysate, 取上層液定量蛋白濃度。將定量後之蛋白質取 50 μ g, 加入等量的 Sample Buffer 【2ml 0.5M Tris-HCl (PH=6.8), 1.6ml Glycerol, 3.2ml 10%SDS, 0.8ml 2- β -mercaptoethanol, 0.4ml 0.5% bromophenol blue】, 以 95°C 加熱 3 分鐘, 並快速置入冰中冷卻。以小型離心機將 Sample spin down 後再 loading 至每個 well 中。上層膠以 70 伏特, 下層 130 伏特跑電泳。待電泳結束後跟著進行蛋白質的轉漬, 也就是將膠上已依分子量分層的蛋白質轉漬到 Nitrocellular paper 上。以 5% 脫脂牛奶【PBS-non-fat milk powder】於室溫下進行 blocking 1 小時, 稍稍 wash 後, 將 NC paper 置於 4 度冰箱中與一級抗體反應 overnight, 之後用 washing buffer【PBS with 0.5% tween-20】以 5'-5'-5'-5', 150rpm 的方式清洗 NC-paper, 再以 Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse/rabbit antibody 反應 50-60 分鐘, 以相同的方式 wash NC-paper, 最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應 1 分鐘後, 於 LAS-1000plus system 定量分析。

(六) DAPI 細胞螢光染色

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) 是一種 DNA 染劑, 可以穿透細胞膜至細胞核內, 插入雙股 DNA 的 minor groove 中 Adenine 及 Thymine rich 的位置。利用 DAPI 在螢光顯微鏡 (340 / 380 excitation) 可以看出 DNA 的改變, 來判斷是否有別於正常細胞。將細胞培養後, 以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下, 以 1000rpm 離心 5 分鐘, 除去培養液, 加培養液將細胞濃度調整成 2 \times 10⁵ cells/ml, 培養於 10 公分的培養皿中。待 10~12 小時細胞貼壁, 更換新的培養液, 同時給予各種不同濃度的 Luteolin 及兔兒菜之萃取物 (實驗組)、0.2% DMSO (對照組)。作用一定時間, 以 PBS 洗數次, 將細胞以 4% 甲醛 (paraformaldehyde) 室溫固定 30 分鐘後, PBS 洗三次, 以 DAPI (1 μ g/ml) 染色 30 分鐘再以 PBS 洗三次, 利用螢光顯微鏡 (340/380 nm excitation) 波長並以 100 \times 、200 \times 、400 \times 觀察。

結果與討論

二、 乾/鮮品兔兒菜粗萃取物 (E.A.、But.、Res.) 之分離

新鮮採收的兔兒菜稱為鮮品(IX-F), 若經由陽光曝曬一週後則稱為乾品(IX-D)。將乾/鮮品兔兒菜分別以甲醇/乙醇萃取後, 經由 E.A. (Ethyl Acetate) /H₂O 各 1:1 比例之溶劑萃取後, 剩下之水溶液, 再用 But. (n-Butanol) 萃取, 將乾/鮮品兔兒菜各分成 E.A.、But. 及 Res. (Residual) 三層粗萃取物 (Figure 1)。

三、 以各層兔兒菜萃取物對各種癌細胞株的毒性測試

利用 MTT assay 來篩選各層兔兒菜萃取物(八種)對不同種癌細胞株之毒殺能力分析

(Table 1)。結果顯示兔兒菜的各層萃取物，普遍以鮮品(IX-F)較乾品(IX-D)的效果好，其中又以鮮品(IX-F)中的 E.A. (Ethyl Acetate) 萃取層(IX-F-E)對各種癌細胞株都有較低的 IC₅₀ 值，另外發現對 HepG2 細胞毒殺效果最佳，IC₅₀ 達 0.450 mg/ml，其次為 IX-F-B，有趣的是不論鮮品(IX-F)或乾品(IX-D)的 Res. (Residual)層對任何細胞株都完全沒有細胞毒性，甚至還能促進細胞增生；因此由實驗數據顯示 IX-F-E 存在著具有一定生物活性的化合物，值得進一步分離鑑定；另一個值得注意的結果為，鮮品(IX-F)對正常人類肝細胞株-Chang liver cell 的細胞毒性遠低於其他癌細胞株，這與前人研究發現兔兒菜萃取物在動物實驗中具保肝作用之結果相呼應(6)。

四、兔兒菜 IX-F-E 層的成份分析及活性測試

將由 MTT 試驗中發現最有毒殺效果的 IX-F-E 層進行 silica gel column 分離，每次取 1.0~2.0 g 兔兒菜粗萃取物 (IX-F-E) 用 silica gel column (預先填充 match: 230~400 之 silica gel 約 50g) 進行純化製備，用 solvent system (CHCl₃:Methanol=95:5~1:1) 進行流沖，直到所有 sample 皆自 silica gel column 通出。將通完 silica gel column 所收到的各層樣品，用薄層色層分析法(TLC)發現至少有三種主要的部分，在展開液為- CHCl₃:Methanol=85:15 時，依 Rf 值由高到低分別命名為：**IX-F-E1(黑色)** Rf=0.98、**IX-F-E2(茶色)** Rf=0.73 及 **IX-F-E3(黃色)** Rf=0.51，其中 IX-F-E1(黑色)為 4 個 plots 以上；IX-F-E2(茶色)為 3 個 plots，但其中有一個 major；IX-F-E3(黃色)為單一 plot，且經與 Luteolin 標準品比對下有相同的 Rf 值。

取各層兔兒菜萃取物與 Luteolin 標準品，利用高壓液相色層分析儀(HPLC:High pressure liquid chromatograph) 比對分析發現，IX-F-E 中含有 Luteolin，Luteolin 的含量以 IX-F-E 最多，IX-F-B 次之，IX-F-R 最少 (Table 2)(Figure 1)，且鮮品兔兒菜(IX-F)較乾品(IX-D)含有較多的 Luteolin，此時可發現 Luteolin 含量與毒殺能力呈一個正比關係，因此初步懷疑 Luteolin 是否為決定兔兒菜活性之分子，需要進一步分析試驗。

最後進行 NMR (nuclear magnetic resonance) 分析鑑定 IX-F-E3 為黃酮類中的木犀草素 (Luteolin)。

將來自於 IX-F-E 的三種不同部分 (IX-F-E1、IX-F-E2、IX-F-E3) 進行 MTT assay，此時依先前實驗結果，我們鎖定先前毒殺效果最佳的 HepG2 細胞，另外還選取人類正常肝臟細胞株-Chang liver cell，作為試驗對象，結果發現，此來自於兔兒菜 IX-F-E 層中三種不同的部分，在 HepG2 細胞中，以 IX-F-E3 的毒殺效果最佳，IC₅₀ 達 0.022 mg/ml，其次為 IX-F-E2，IC₅₀ 為 0.151 mg/ml，最差的是 IX-F-E1，IC₅₀ 為 0.287 mg/ml；但在 Chang liver 細胞中亦得到相同的結果，顯示這些活性成分的毒殺效果不具專一性 (Table 1)。

五、兔兒菜 IX-F-E 層各成份在抑制 HepG2 細胞生長之效果分析

利用測試細胞的生長效率來分析各層兔兒菜萃取物是否具有 anti-proliferation 的作用。由先前已經由成份分析得知，IX-F-E3 為 Luteolin，為節省萃取製備之步驟，於是以下實驗皆由 Luteolin 標準品取代 IX-F-E3；實驗結果發現在 IX-F-E1 層、IX-F-E2 層及 Luteolin 中，以 Luteolin 的抑制效果最佳，甚至在高劑量下出現殺死 HepG2 細胞的現象 (Figure 2)。

六、兔兒菜 IX-F-E 層各成份對細胞週期的影響

將細胞處理 0.15 mg/ml IX-F-E1、IX-F-E2 與兩種劑量 (40、80 μM) Luteolin 之後，

分別於 24、48 小時收取細胞，以絕對酒精固定，用 Propidium iodine 染 DNA，接著用 flow cytometry 分析細胞 DNA 含量。由定量的結果顯示，在處理 IX-F-E1、IX-F-E2 之後，細胞的 G0/G1 期與對照組 (DMSO) 相較下些微增加，而處理 Luteolin 的實驗組在 24 小時下，40、80 μM 已出現 sub-G0/G1 期，甚至到了 48 小時之後 sub-G0/G1 期已增加到 45% 以上 (Figure 3)。

七、 兔兒菜 IX-F-E 層各成份誘導 HepG2 細胞凋亡之證據

將 0.15 mg/ml IX-F-E1/2 與四種劑量 (10、20、40、80 μM) Luteolin 處理 HepG2 細胞 18 小時後，經 DNA 抽取與電泳分析，由實驗結果可明顯發現，Luteolin 在 40 μM 開始出現 DNA 斷裂的情況，而在 80 μM 下斷裂狀況達到最高，另外兩種兔兒菜萃取物 IX-F-E1/2，則以 IX-F-E2 有出現些微的 DNA 片段化的情形，證明 Luteolin 誘導 Hep G2 細胞凋亡的能力較另外兩種兔兒菜萃取物來得強 (Figure 4)。

以觀察細胞外觀來鑑定細胞是否有凋亡之現象發生，將細胞處理 0.15 mg/ml IX-F-E1、IX-F-E 2 與兩種劑量 (40、80 μM) Luteolin 之後，分別於 24 小時收取細胞，以 DAPI (1 μg / ml) 染色，利用螢光顯微鏡 (340 / 380 nm excitation) 波長觀察，明顯可觀察到細胞凋亡時會有細胞外型皺縮，且細胞膜產生氣泡、核染質 (chromatin) 濃縮等現象，計算完凋亡之細胞數目發現與先前實驗相符合，以處理 Luteolin 80 μM 時凋亡的細胞最多，其次為 IX-F-E2，最後為 IX-F-E1 (Figure 5)。

八、 Luteolin 誘導 HepG2 細胞凋亡在 protein level 之證據

由先前實驗證明兔兒菜中以 Ethyl Acetate 萃取的 IX-F-E 層的毒殺效果最佳，再將 IX-F-E 層進行成份的分析及活性試驗後發現，以 IX-F-E3 (即為 Luteolin) 的效果明顯最突出，因此可初步推論 IX-F-E 層的高毒殺效果可能就是來自於 Luteolin 的活性，而到底 Luteolin 在誘導 HepG2 細胞凋亡中，調控細胞凋亡之蛋白的表現如何，便是以下接著要探討的。首先探討最終執行細胞凋亡的蛋白-Caspase 3 (CPP32)，Caspase 3 的活化常作為細胞凋亡時的重要指標，而 Caspase 3 的活化會被 Caspase 9 切割，使 pro-Caspase 3 (32 kDa) 逐漸減少，活化態則逐漸增加，由實驗結果顯示，隨時間及 Luteolin 的增加，果然 pro-Caspase 3 的量有逐漸減少之勢，代表有越來越多 pro-Caspase 3 被活化，到 12 小時，在 Luteolin 80 μM 處理下約只剩下約一半的 pro-Caspase 3 (Figure 6)。

而 Caspase 3 活化的程度，常拿 PARP (poly[ADP-ribose] polymerase) 被分解的狀況作為參考，PARP 為 Caspase 3 作用的受質之一，當 Caspase 3 活化會去切 PARP 使原本分子量為 112 kDa 將變為 89kDa，在此亦發現伴隨時間及 Luteolin 劑量增加，112 kDa 的 PARP 逐漸減少，隨之增加的是 89 kDa 的片段，且 PARP 減少的趨勢與先前 Caspase 3 活化的程度是相符合的，因此更能證明 Luteolin 果然能誘導 HepG2 細胞凋亡 (Figure 7)。已證明在細胞凋亡時下游蛋白表現如預期，而位於細胞凋亡中游的關鍵步驟便是粒線體釋放出 cytochrome C (9)，此時便要來探討重要指標蛋白- cytochrome C 之表現又是如何？經實驗結果顯示，在處理 Luteolin 後，收取細胞的細胞質部分發現 cytochrome C 自 3 小時開始明顯逐漸增加，在 12 小時達到最高，約為 0 小時的 6 倍 (Figure 8)。

本研究證明了兔兒菜具有抑制 HepG2 人類肝癌細胞株生長之能力，在經由一連串實驗發現存在於兔兒菜的 Luteolin 不但抑制癌細胞生長甚至還能誘發細胞凋亡，最近有文獻指出 flavonoid 衍生物富含與蔬果中具防癌抗癌活性(10)似乎相呼應。

參考文獻

1. 行政院衛生署中醫藥委員會編著。(1999) 中藥材品質管制-組織形態學鑑定。P221，行政院衛生署中醫藥委員會出版，台北市。
2. 許鴻源編著。(1972) 臺灣地區出產中藥藥材圖鑑。P312，行政院衛生署中醫藥委員會出版，台北市。
3. 高本釗編著。(1982) 新編中藥大辭典。P1366-7，南新文豐出版公司出版，台北市。
4. 陳榮才編著。(1990) 臺灣產苦味藥用之成分研究。172-98，國立清華大學，化學研究所博士論文，新竹市。
5. Zhang S, Wang J, Xue H, Deng Q, Xing F, and Ando M. Three new guaianolides from *Siyekucui (Ixeris chinensis)*. *Journal of Natural Products* 65: 1927-9, 2002.
6. Lin SC, Lin CC, Lin YH, and Yao CJ. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine: *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nak. on experimental liver injuries. *American Journal of Clinical Medicine* 22: 243-54, 1994.
7. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, and Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48: 589-601, 1988.
8. Green DR. Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. *Cell* 102: 1-4, 2000.
9. Kroemer G, and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 6: 513-6, 2000.
10. Marchand LL. Cancer preventive effects of flavonoids. *Biomedicine Pharmacotherapy* 56: 296-301, 2002.

圖表

	IC50 (mg/ml)			全 24h	
	HepG2	Hep3B	HL60	C6	Chang liver
IX-D	2.077	6.718	30.888	1.922	7.302
IX-D-E	1.694	1.602	4.190	1.715	
IX-D-B	2.393	1.988	1.987	1.074	
IX-D-R	-	-	-	-	
IX-F	0.723	2.856	2.696	0.857	6.140
IX-F-E	0.450	0.626	0.558	0.523	0.432
IX-F-B	0.570	0.707	1.508	0.672	0.584
IX-F-R	-	-	-	-	
IX-F-E 1	0.287				0.325
IX-F-E 2	0.151				0.179
IX-F-E 3	0.022				0.023

Table 1. Cytotoxicity of *Ixeris chinensis* or Luteolin in HepG2 cells. Cells were cultured in medium containing *Ixeris Chinensis* or Luteolin. At 24h following treatment cells were then incubated with MTT for 4 hours. The optical density is then read at 560nm by a spectrophotometer.

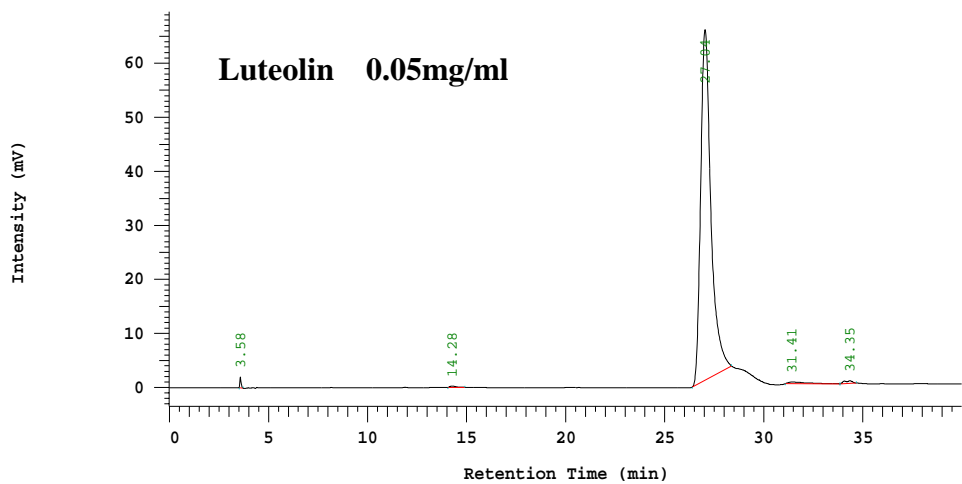
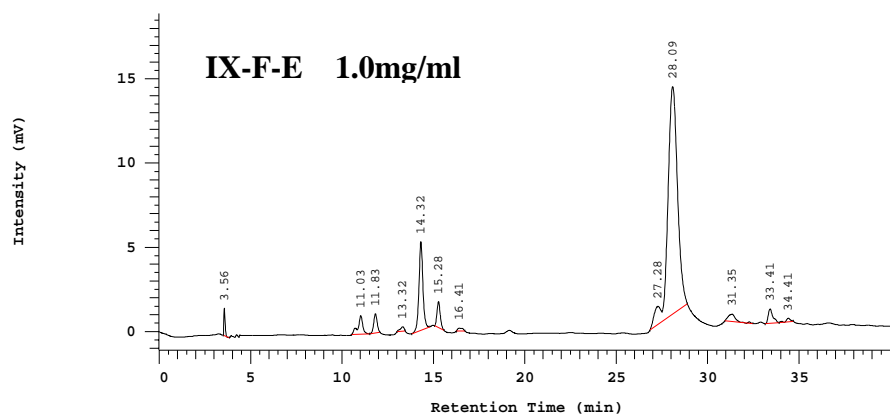


Figure 1. The Luteolin content of ethyl acetate soluble fraction of *Fresh Ixeris chinensis* (IX-F-E) in HPLC assay.

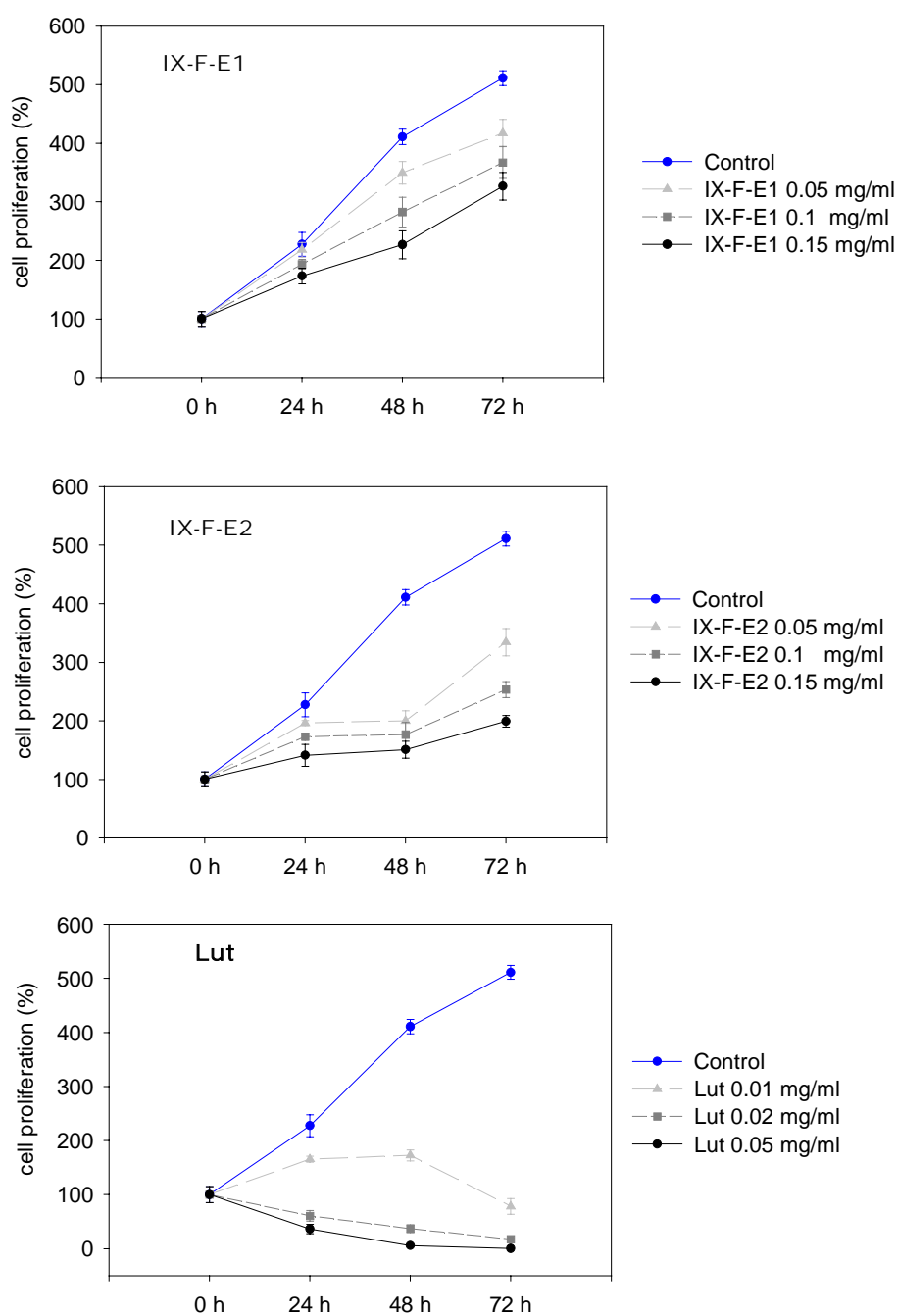


Figure 2. Effects of the two fractions of IX-F-E or Luteolin in HepG2. Cells were cultured with indicated concentrations of IX-F-E1, IX-F-E2 or Luteolin in the indicated times. The percentage of viable cells was determined using trypan blue dye exclusion assays. Data presented as means \pm S.D. of three independent experiments.

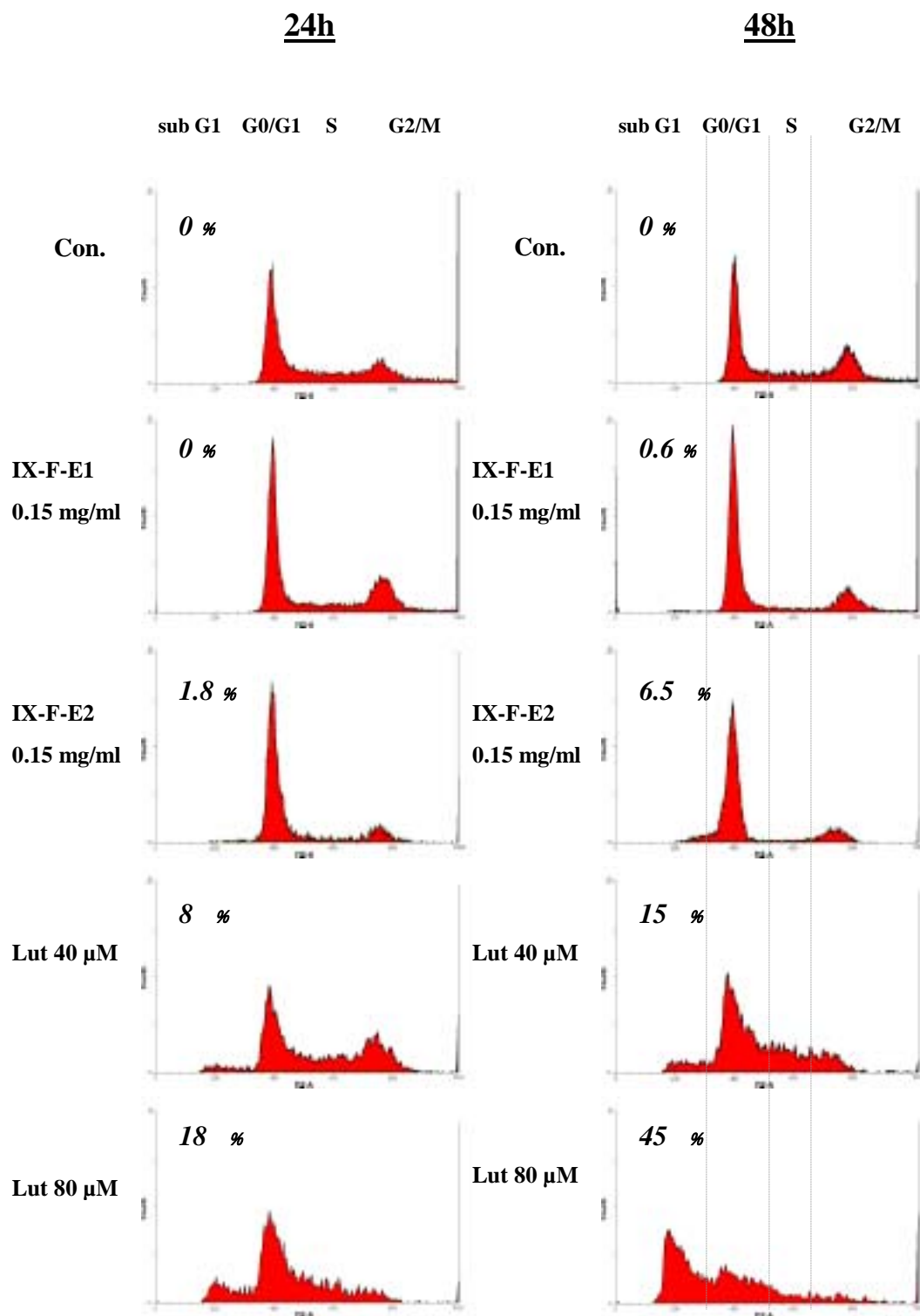


Figure 3. Flow cytometry analysis of HepG2 cells. Cells were treated with indicated concentrations IX-F-E1, IX-F-E2 or Luteolin for 24h and 48h, than washed and harvested. The cells were fixed with 80 % ice ethanol and stained with propidium iodide and DNA concentration was analysis by flow cytometry.

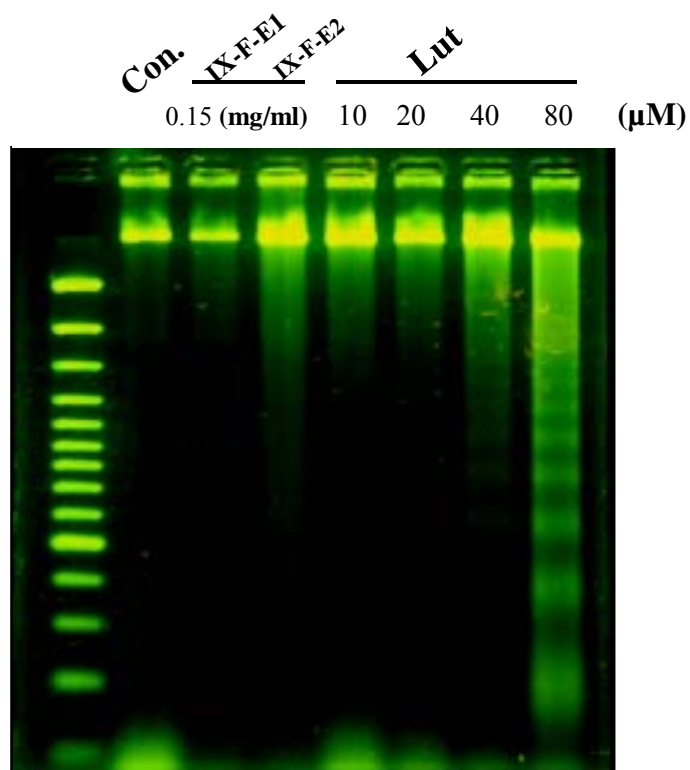


Figure 4. DNA fragmentation assay of HepG2 cells induced by indicated concentrations of IX-F-E1, IX-F-E2 or Luteolin for 18h. After DNA extraction, pure DNAs were electrophored in a 1.5 % agarose gel, stained with gel star, and photographed under UV illumination.

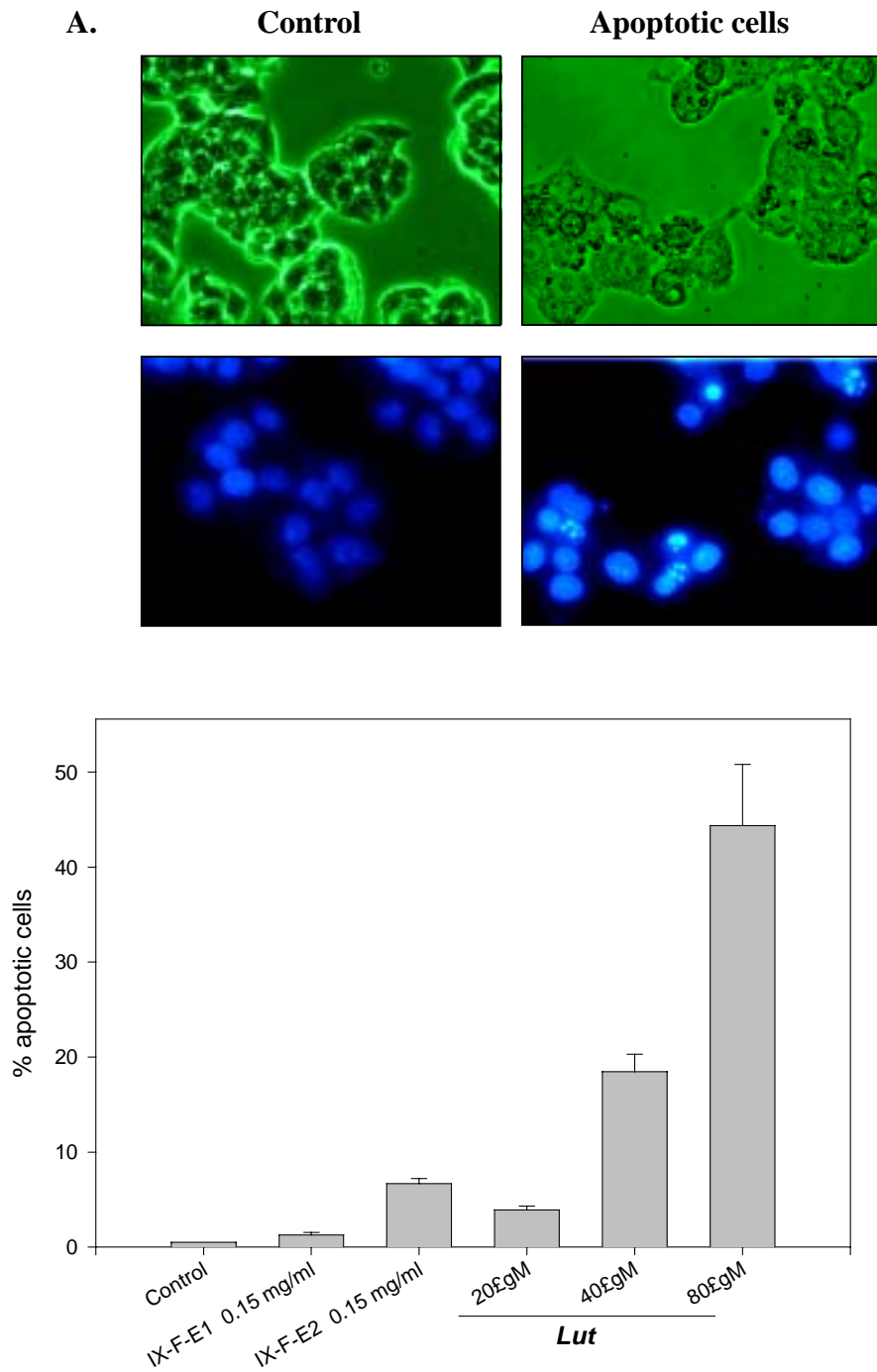


Figure 5. *A*, representative phase contrast microscopy (*upper panels*) and DAPI staining (*lower panels*) of untreated or treated with DMSO (drug vehicle control) indicated concentrations of IX-F-E1, IX-F-E2 or Luteolin for 24h. Nuclei of apoptotic cells are fragmented and condensed. *B*, quantitation of apoptosis with DAPI staining. * $P < 0.05$, compared with control group (0.2 % DMSO).

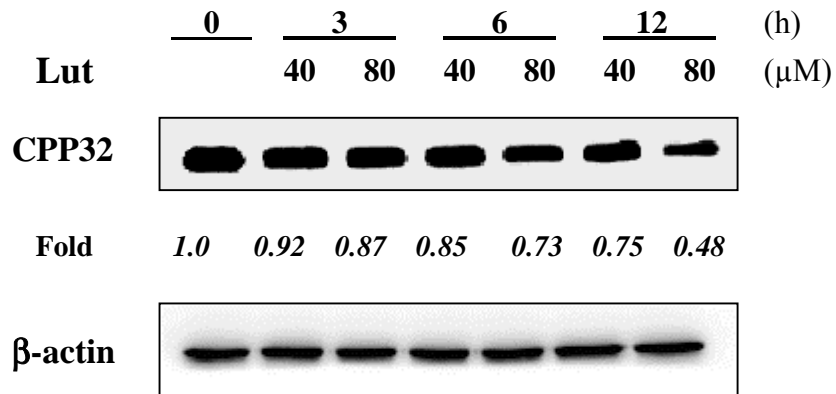


Figure 6. Time course effect of Luteolin on CPP32 protein expression in HepG2 cells. Cells were cultured in medium containing 40 or 80 μ M Luteolin. At the indicated times following treatment cells were harvested. Cell lysates prepared and subjected to western blot analysis: 50 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 15% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti-CPP32 antibody or actin used for equal loading.

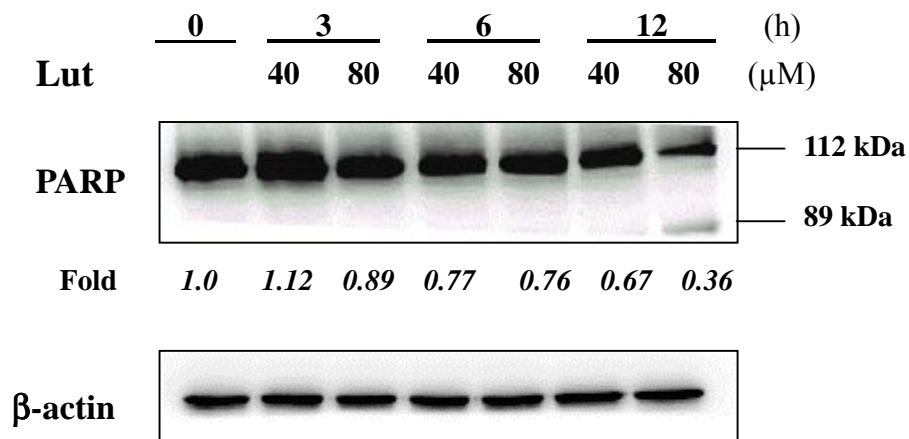


Figure 7. Time course effect of Luteolin on PARP protein expression in HepG2 cells. Cells were cultured in medium containing 40 or 80 μ M Luteolin. At the indicated times following treatment cells were harvested. Cell lysates prepared and subjected to western blot analysis: 50 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 8% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti-PARP antibody or actin used for equal loading.

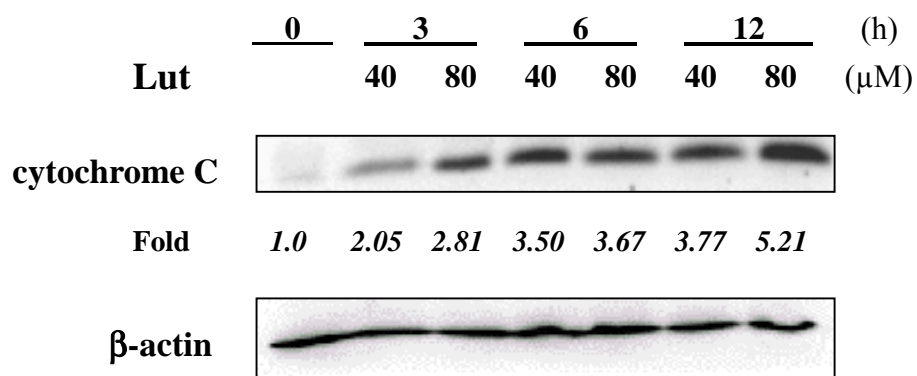


Figure 8. Time course effect of Luteolin on cytochrome C protein expression in HepG2 cells. Cells were cultured in medium containing 40 or 80 μ M Luteolin. At the indicated times following treatment cells were harvested. The cytosolic protein prepared and subjected to western blot analysis: 50 μ g of protein extract from each condition was electrophoresed in each lane of 15% SDS-PAGE and analysed by immunoblot with the anti-cytochrome C antibody or actin used for equal loading.