

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC90-2320-B040-027

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：王朝鐘，中山醫學大學生化所

計畫參與人員：張雲菁，中山醫學大學生化所

一、中文摘要

戊乙醯去氫梔子苷 [penta-acetyl geniposide , (Ac)₅GP] 是從山梔子 (Gardenia fructus) 萃取出來的一種醣苷 (glycoside)，在經乙醯化 (acetylation) 而得到的物質。近年來，有許多研究指出一些抗癌藥物可藉由引起癌細胞的程序式死亡或改變癌細胞的生長週期，來達到抑制癌細胞的增生與惡化。本實驗室之前的研究指出，(Ac)₅GP 可以抑制老鼠體內 C-6 神經膠瘤細胞的生長，且進一步發現，會造成 C-6 細胞凋謝死亡。在本篇實驗中，藉由流速細胞儀測定顯示 (Ac)₅GP 可以使 C-6 細胞週期停滯在 G₁ 期。而以 (Ac)₅GP 分別處理 C-6 細胞 0 至 24 小時後，由西方點墨法發現，(Ac)₅GP 會使 p53 蛋白表現量增加，進而活化下游的 p21，並抑制 cyclin D₁ 及 phospho-Rb 的表現，導致細胞週期停滯在 G₀ / G₁ 期。此時，CDK4 蛋白表現量上升。因此，推斷 (Ac)₅GP 會活化 p53 路徑而導致 C-6 細胞停滯在 G₁ 期而使細胞增生停止。

Abstract

Penta-acetyl geniposide [(Ac)₅GP] was a acetylated product from geniposide, a glycoside existing in *Gardenia fructus*. In recent years, many studies indicated that anticarcinogenic drugs inhibiting the proliferation and malignancy of cancer cell could be via inducing cancer cell apoptosis or changing cell cycle progression. In our

previous researches, we had explored that (Ac)₅GP can inhibit C-6 glioma cell growth and induce apoptosis. We further designed a series of experiments to clarify the mechanisms existing in the anticarcinogenic effect of (Ac)₅GP. In this study, we found that (Ac)₅GP can arrest C-6 glioma cell cycle at G₁ phase. After treated with (Ac)₅GP for 0 to 24 h, the expression of p53 protein was increased gradually and the expression of p21 was induced significantly. Furthermore, the treatment of (Ac)₅GP also inhibited the expression of phospho-Rb. Because of above, we issued that (Ac)₅GP maybe inhibited the expressions of p53, p21, cyclin D₁ and phospho-Rb to arrest cell cycle at G₀/G₁ phase. At this moment, the expression of CDK4 was increased. Conclusively, we suggested that (Ac)₅GP can arrest the cell cycle at G₁ phase through activating p53 pathway.

二、緣由與目的

近年來，在臺灣罹患癌症的國人，比例有愈來愈高的趨勢，且位居十大死因之首。這顯示了癌症的可怕，因此，如何預防及延緩癌症的發生實為當下迫切的任務。癌症的形成是一連串複雜且多重步驟的過程，環境中有許多致癌因子，例如：汽、機車及工廠排放的廢氣、毒氣；家庭和工廠排放的廢水，食品中的添加物，以至於臭氧層的破壞導致人們暴露於更多的 UV 輻射傷害，加

上近年來經濟富庶，飲食習慣種種因素，都是造就了癌症的高發生率。目前癌症形成的原因只有少數被了解，而治療的效果有限。現今對於癌症的治療大多採用化學治療或是投予抗癌藥物，此兩者皆會對人體造成極大的傷害。目前許多研究趨向以天然藥物來達到抑制癌細胞的增長及惡化，因此本實驗室致力於開發天然物中所含的抗癌成份，希望可以由攝取食品來達到預防癌症的發生。本篇計劃以中國藥材中常見的成份山梔子的衍生物 (Ac)₅GP，來探討其對人類癌細胞的影響及其可能造成的死亡機制。山梔或稱黃山梔(“*Gardenia jasminoides*” Ellis) 屬於茜草科 (Rubiaceae) 植物。多年生常綠灌木或小喬木。在五月間自小枝開出大形白色的花，白花在落花前會變為黃色。果實長橢圓形，外有縱稜 5~8 條，熟時呈黃紅包非常醒目。而曬乾的果實在中藥上稱之為「梔子」，是著名的清熱，瀉火，涼血藥，其主要成份為 Carotenoids (α -Crocetin, α -Crocetin, Nonacosane, β -Sitosterol, D-Mannitol, Genipin 及其他配醣體 Geniposide, Genitiobioside 等 (1-3)。去氫梔子苷為 iridoid 型之配醣體，是由梔子的果實中分離出來的 (4,5)。之前有報告指出去氫梔子苷是藉由增加 α -naphthol glucuronosyltransferase 及 Glutathione S-transferase 的活性而達到保肝的作用 (6)。本實驗發現去氫梔子苷在黃麴毒素 (aflatoxin B₁, AFB₁) 引致大白老鼠肝損傷的實驗中扮演著保護的角色 (7,8)。目前，對於去氫梔子苷最新的研究發現，在老鼠肝中，處理去氫梔子苷會導致 glutathione 含量上升，且可抑制 cytochrome P4503A monooxygenase 的活性 (9)。細胞週期又稱為生長週期或是細胞分裂週期，可以透過 mitosis 和 cytokinesis 的方式將已經複製完成的細胞質跟細胞核一分為二形成兩個新的個體。一般來說大致上分為四個時期：G₀/G₁ (gap 1)、S (synthesis)、G₂ (gap 2) 和 M (mitosis)，細胞週期的進行會

透過 3 個不同的機制來調控分別是 ①cyclin 蛋白的表現量，②cyclin-dependent kinase 的活性以及 ③cyclin-dependent kinase inhibitors 的抑制作用 (10)，當細胞受到生長因子刺激後，首先，活化一些跟細胞週期進行相關的蛋白包括：Rb、E2F、cyclin、Cdk 等等 (11)。其中在 G₁ 早期，cyclin D 可和 Cdk-4 或 Cdk-6 形成複合體，導致 Rb 蛋白磷酸化 (Pre-phosphorylation)，進而釋放出轉錄因子 E2F，接著在 G₁ 晚期 (G₁-S)，cyclin E / Cdk - 2 可使 Rb 蛋白完全磷酸化 (full-phosphorylation)，進而促使細胞進入 S 期，導致 cyclin A/Cdk-2 的活化 (12)。而釋放出的 free-E2F 再執行下游 S 期專有蛋白的轉錄作用 (13)。而三個調控細胞週期進行的機制都與腫瘤形成有極密切的關係，所以，了解抗癌藥物對細胞週期的調控作用有助於提高藥物之效率。愈來愈多研究指出癌症和細胞週期的調控有極密切的關係，而調節細胞週期進行的相關蛋白在癌症形成過程中則扮演重要角色。許多研究指出在腫瘤細胞中，如淋巴瘤、乳癌、頭頸部鱗狀細胞癌、結腸直腸癌、肝癌、肺癌、皮膚癌、副甲狀腺癌、胃癌、食道癌、子宮內膜癌、卵巢癌等常發現 G₁ 期的 cyclin (cyclin D、cyclin E) 均有過度表現的情形 (14-21)；而 Haas 等人說明 Cdk-4 具有 oncogenic 的能力 (22)；Ito 等人發現 Cdk-2 及 Cdk-4 的 overexpression 和子宮內膜異位癌有關 (14)。另外，有一部份的結直腸癌除了 cyclin E 的表現量增加外還伴隨著增加 cdk-2 gene 的表現 (14)。由這些研究報告知道，調節細胞週期的蛋白如果過度表現，會導致細胞週期縮短，讓細胞過度增生、產生癌化的情形，而有文獻報告提出以抗癌藥物處理癌細胞株可使 cyclin 及 Cdk 裂解或是增加 CDKI/CKI (cyclin dependent kinase inhibitor) 的表現，改變其生長週期，進而達到抑制腫瘤細胞的產生。G₁ cyclin 是否具有磷酸化 Rb 的能力跟 CDKI 有緊密的關聯

合物競爭時，將更容易靠近細胞膜而進入細胞。本實驗室之前相關的研究指出，(Ac)₅GP 不論是處理在細胞培養或將 C-6 細胞送入大白鼠身上，再投予 (Ac)₅GP，可發現其生長皆有明顯受到抑制 (27, 30)。也就是說，(Ac)₅GP 抑制 C-6 細胞生長方面的機轉，已知會造成 DNA fragmentation，另外，由於 c-Myc 表現增加，Bcl-2 表現下降等，導致 apoptosis，且 p53，p21 蛋白表現增加，而引起 cell cycle 停滯在 G₁ 期，本篇進一步利用 C-6 神經膠瘤細胞株，直接觀察 (Ac)₅GP 抑制 C-6 細胞生長的詳細機轉。p53 基因在某些抗癌試劑所誘導的 apoptosis 過程中扮演重要的角色，並且會導致細胞週期停滯在 G₀/G₁ 期 (31)。在一般 apoptosis 發生的過程中 p53 蛋白量會增加而累積於核。在本篇發現，(Ac)₅GP 導致 C-6 細胞走向 apoptosis 的過程中，其細胞內的 wild type p53 及 phospho-p53 蛋白有明顯的堆積現象發生，並且會活化下游 CKI p21 蛋白表現，而影響 Cdk / cyclin complex。因此初步斷定，(Ac)₅GP 造成 C-6 神經膠瘤細胞週期抑制作用，應是 p53 dependent，且經由 p21 的調控路徑。希望本實驗室所合成的 (Ac)₅GP 在釐清其作用機轉後發展成一具廣泛性、無毒害，且在人體治療上適用於各種癌症之抗癌藥。未來，本實驗室將秉持此一方針致力於此領域之研究。

四、計畫成果自評

1. 本計畫成果發現戊乙醯去氫梔子苷 [penta-acetyl geniposide, (Ac)₅GP] 可使細胞增生停止，抑制細胞週期停滯等作用。
2. 發現上述作用的分子機制。

五、參考文獻

1. Bellomo, G., Jewell, S.A., Thor, H. and Orrenius, S. (1982) Regulation of intracellular calcium compartmentation : Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6842-6846.
2. Hill, K.E. and Burk, R.F. (1984) Toxicity studies in isolated hepatocytes from selenium-deficient and vitamin E-deficient rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 72, 32-39.
3. Sies, H. and Gerstenecker, C. (1972) Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free per fused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathion by hydroperoxides. FEBS Lett., 27, 171-175.
4. Inouye, H., Takeda, Y., Saito, S., Nishimura, H. and Sakuragi, R. (1974) Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XXV. On the iridoid glucosides of Gardenia jasminoides. Yskugaku Zasshi, 94, 577-586.
5. Endo, T. and Taguchi, H. (1973) The constituents of Gardenia jasminoides, geniposide and genipin gentiobioside. Chem. Pharm. Bull., 21, 2684-2688.
6. Blumberg, P.M. (1988) Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters. Cancer Res., 48, 1-8.
7. Babior, B.M. (1987) The respiratory burst oxidase. Trends Biol. Sci., 12, 241-242.
8. Krystyna, F. (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. Pharmac. Ther. 53, 127-166.
9. Kang, J.J., Wang, H.W., Liu, T.Y., Chen, Y.C. and Ueng, T.H. (1997) Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from Gardenia jasminoides. Food

性(23)。CDKI 大致可分為兩個 group
Cip/Kip proteins — p21, p27, p57;INK4
proteins — p15, p16, p18, p19。INK4
proteins 主要抑制包含 D-type 的
cyclin/cdk 複合體, Cip/Kip proteins 主
要抑制 G₁ 期的 cyclin/cdk 複合體。另
Cip/Kip group 中的 p21 是 tumor
suppressor gene p53 下游的標的蛋白,
而且只有 wild type 的 p53 才能誘發 p21
的表現 (24), p21 的結構包含了 cyclin、
cdk、以及 PCNA (proliferation-cell
nuclear antigen) binding motif, 透過本
身結構不但可以調控哺乳動物細胞週
期由 G₁ 進入 S 期 cyclin-cdk 的活性, 也
抑制了 DNA 的複製 (25)。戊乙醯去氫
梔子苷是由山梔子萃取物分離得到
Geniposide 後, 再由乙醯化作用而得。
本實驗室先前報導過 (Ac)₅GP 可抑制
由 aflatoxin B₁ (AFB₁) 所引起的細胞
毒性 (26)。在 C-6 神經膠瘤細胞中,
以 (Ac)₅GP 處理後, 其細胞存活率降低
且 DNA 合成受抑制 (27)。另外, 在最
新發表的文章中, (Ac)₅GP 會抑制由
AFB₁ 所引起早期的
hepatocarcinogenesis 及 GGT foci 的發展
(28)。由於 (Ac)₅GP 會抑制細胞培養
及大白鼠身上惡性細胞的生長, 但其確
切的機制仍不清楚。目前, 已知
(Ac)₅GP 處理 C-6 細胞會使 p53, p21,
c-Myc 表現增加導致細胞週期停滯在
G₁ 期, 且 Bcl-2 降低, Bax 上升, 使
致 apoptosis 等, 故本篇研究則是繼續探
討 (Ac)₅GP 促進癌細胞凋謝死亡及其
分子機制。

三、結果與討論

利用 C-6 細胞處理 0.3 mM (Ac)₅GP
0-24 小時之後, 抽取所有的細胞蛋白
質, 觀察與 p53 調控 cell cycle 下游相
關蛋白的表現。之前, 有相關報導指
出, cyclin 與 cdk 形成複合體後會活化
下游的 Rb, 造成 E2F 釋出。

1. Cyclins : 結果發現, cyclin B,

D₃ 與 E 表現量並無明顯增加,
而 cyclin D₁ 表現量與控制組相
比約降低 50% (Fig.1.)。

2. Cdk : CKIs 可觀察到 Cdk2 與
Cdk4 蛋白皆有明顯的增加, 尤
以 CDK4 在 24 小時達最高表現
量, 約增加 2 倍。此為 Cdk2 與
Cdk4 free form 增加所致
(Fig.2.)。

3. CKIs (CDK inhibitor) : 結果
發現, p27 變化量並不大, 而 p21
的確會受到 (Ac)₅GP 的影響表
現增加, 在處理後 6 小時有約 1.8
倍的增加 (Fig.3.)。

4. Rb : 可觀察到在以 (Ac)₅GP 處
理 4 小時後, Rb 表現量增加約
1.4 倍, 而 phospho-Rb 表現量減
少大約 20%, 且 E2F/Rb 複合體
亦增加, 故證實了 p21 的表現增
加而抑制細胞週期進入 S 期
(Fig.4.)。

許多研究報告指出, p53 是調控凋
謝的重要因子。為了探究 (Ac)₅GP 造成 C
的凋謝死亡, 於是利用西方點墨法來觀
察蛋白的表現。結果發現, 當處理 (Ac)₅GP
之後, p53 蛋白明顯增加約 2.5 倍
phospho-p53 則是在 6 小時呈現最大量,
2.6 倍 (Fig.5.)。利用流式細胞儀來觀察
DNA 的含量比, 細胞處理 (Ac)₅GP
(0.3 mM) 0-48 小時之後, 發現細胞 G₀
/ G₁ 期的 DNA 含量由 58.95% 增加到
80.14%, 增加了約 35%。因此可知,
(Ac)₅GP 會造成 C-6 細胞的 G₀ / G₁
arrest (Fig.6.)。 (Ac)₅GP 是從 Gardenia
fructus 萃取分離出 Geniposide, 再經由
乙醯化 (acetylation) 而得到的產物
(27)。(Ac)₅GP 與 GP 在結構上的比
較, 由於 (Ac)₅GP 比 GP 多了五個乙醯
基, 故其不僅在結構上比較穩定, 且在
製備及保存方面也比較容易, 因此, 在
抗癌藥的開發上較具價值。雖然
(Ac)₅GP 的分子大且不易溶解於水溶液
中, 但其親脂性相對也較高, 與其他化

- Chem. Toxicol., 35, 957-65.
10. Koepp, D.M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1999) How the cyclin became a cyclin : regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97, 431-4. CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79, 573-582.
 11. Tony, H. and Jonathon, P. (1994) CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79, 573-582.
 12. Hunter, T., and Pines, J. (1991) Cyclins and cancer II : cyclin D and Cyclin and cancer. *Cell*, 66, 1071-1074.
 13. Halaban, R. (1999) Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Meta. Rev.*, 183, 333-43.
 14. Donnellan, R. and Chetty, R. (1999) Cyclin E in human cancers. *FASEB J.*, 13, 773-80.
 15. Hunter, T. and Pines, J. (1991) Cyclin and cancer. *Cell*, 66, 1071-1074.
 16. Nakamura, S., Seto, M. and Kojima, M. et al. (1994) Immunohistochemical analysis of cyclin D1 protein in hematopoietic neoplasms with special reference to mantle cell lymphoma. *Jap. J. Cancer Res.*, 85, 1270-9.
 17. Jiang, W., Kahn, S.M., Zhou, P., Zhang, Y.J., Cacace, A.M., Infante, A.S., Doi, S., Santella, R.M. and Weinstein, I.B. (1993) Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*, 8, 3447-57.
 18. Buckley, M.F., Sweeney, K.J., Hamilton, J.A., Sini, R.L., Manning D.L., Nicholson, R.I., Fazio A., Watts, C.K., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L. (1993) Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, 8, 2127-33.
 19. Zhang, Y.J., Jiang, W., Chen, C.J., Lee, C.S., Kahn, S.M., Santella, R.M. and Weinstein, I.B. (1993) Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular S., carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 1010-6.
 20. Leach, F.S., Elledge, S.J., Sherr, C.J., Willson, J.K., Markowitz, Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) Amplification of cyclin genes in colorectal Carcinomas. *Cancer Res.*, 53, 1986-9.
 21. Tam, S.W., Theodoras, A.M., Shay, J.W., Draetta, G.F. and Pagano, M. (1994) Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor human cells : association with Cdk-4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene.*, 9, 2663-2647.
 22. Hass, K., Staller, P., Geisen, C., Bartek, J., Filers, M. and Merry, T. (1997) Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation : evidence for cyclin D1/CDK-4 and P16^{INK4} as upstream regulators of Myc. *Oncogene*, 15, 179-192.
 23. Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73, 1059-65.
 24. Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D. Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75, 817-25.
 25. Funk, J.O. and Galloway, D.A. (1998) Inhibiting CDK inhibitors : new lessons from DNA tumor viruses. *Trends Biochem. Sci.*, 23,

- 337-41.
26. Tseng, T.H., Chu, C.Y. and Wang, C.J. (1992) Inhibition of penta-acetyl geniposide on AFB1-induced genotoxicity in C3H10T1/2 cells. *Cancer Lett.*, 62, 233-42.
 27. Wang, C.J., Tseng, T.H. and Lin, J.K. (1992) Penta-acetyl geniposide : isolation identification and primary effect on C6 glioma cell in vitro. *Anticancer Res.*, 12, 911-5.
 28. Lin, Y.L., Hsu, J.D., Chou, F.P., Lee, M.J., Shiow, S.J. and Wang, C.J. (2000) Suppressive effect of Penta-acetyl geniposide on the development of gamma-glutamyl transpeptidase foci-induced by aflatoxin B1 in rats. *Chem.-Biol. Interact.*, 128, 115-26.
 29. Bart, V., Scally, J.L., George, P. and Michael, D.W. (1997) Phosphoinositide 3-kinases : a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 267-272.
 30. Wang, C.J., Chu, C.Y., Tseng, T.H. and Lin, J.K. (1993) Penta-acetyl geniposide inhibits the growth and development of C6 glioma cells in rats. *Cancer Lett.*, 70, 113-118.
 31. Shao, Z.M., Dawson, M.I., Li, X.S., Rishi, A.K., Sheikh, M.S., Han, Q.X., Ordonez, J.V., Shroot, B. and Fontana, J.A. (1995) p53 independent G₀/G₁ arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. *Oncogene*, 11, 493-504.

Fig.1

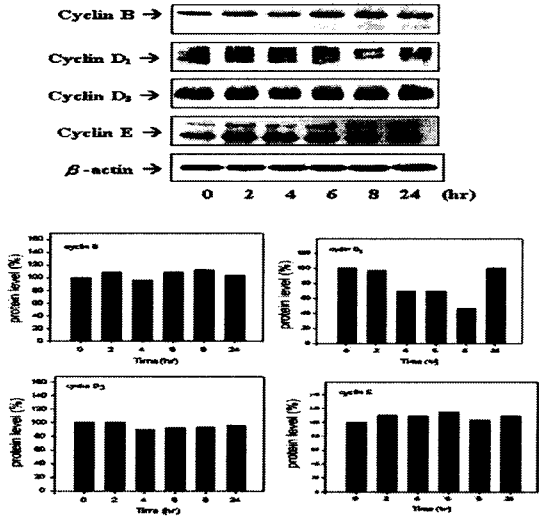


Fig.2

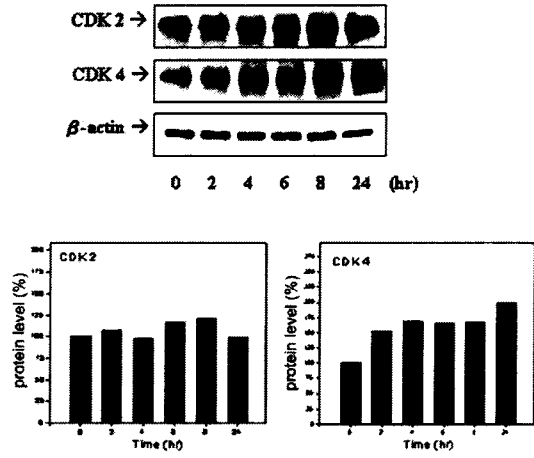


Fig.3

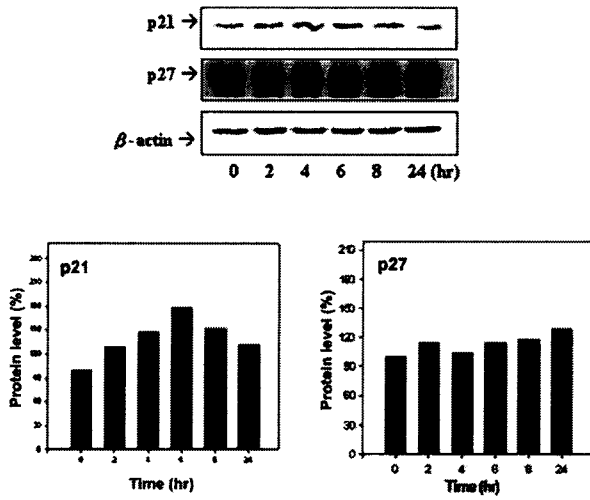


Fig.4

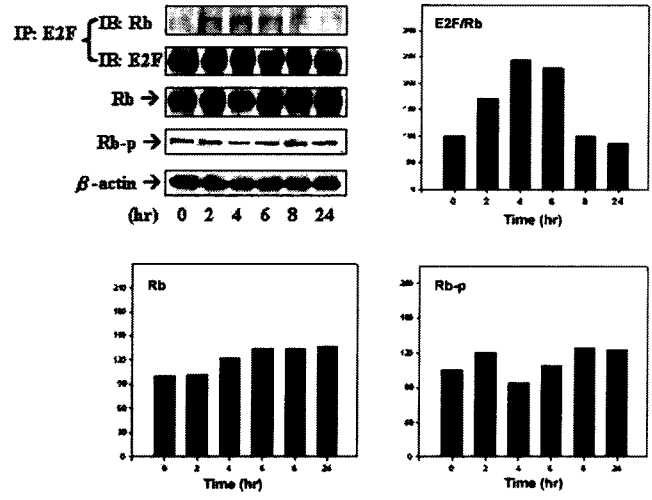


Fig.5

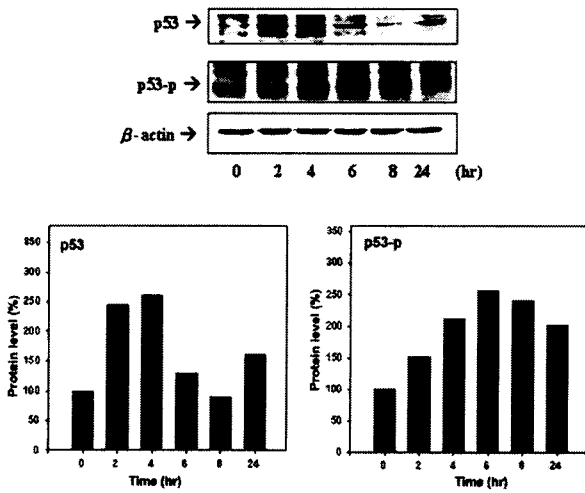


Fig.6

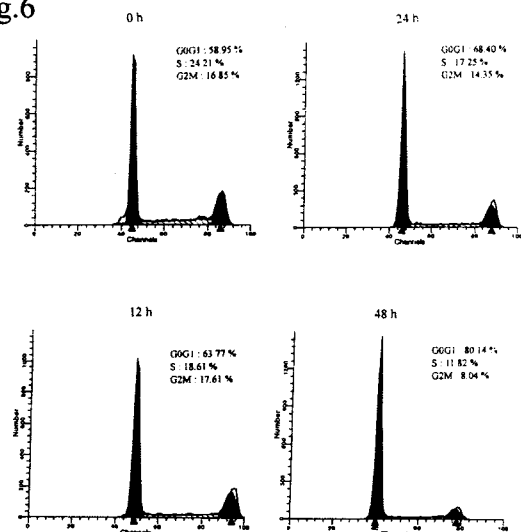


Fig. 1. Time course of (Ac)₅-GP treatment on cyclins expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (Ac)₅-GP 0.3 mM for indicated time. The cyclins proteins was analyzed by immunoblotting. The result shown is one data set representative of three independent experiments.

Fig. 2. Time course of (Ac)₅-GP treatment on CDKs expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (Ac)₅-GP 0.3 mM for indicated time. The CDKs proteins was analyzed by immunoblotting. The result shown is one data set representative of two independent experiments.

Fig. 3. Time course of (Ac)₅-GP treatment on CKIs expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (Ac)₅-GP 0.3 mM for indicated time. The CKIs proteins was analyzed by immunoblotting. The result shown is one data set representative of three independent experiments.

Fig. 4. Time course of (Ac)₅-GP treatment on Rb, phospho-Rb expression and E2F/Rb association in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (Ac)₅-GP 0.3 mM for indicated time. Cell lysates prepared and immunoprecipitation were performed with specific antibodies against E2F. The proteins was analyzed by immunoblotting. The result shown is one data set representative of three independent experiments.

Fig. 5. Time course of (Ac)₅-GP treatment on p53 and phospho-p53 expression in C-6 glioma cells. Cultured cells were treated with (Ac)₅-GP 0.3 mM for indicated time. The p53 proteins was analyzed by immunoblotting. The result shown is one data set representative of three independent experiments.

Fig. 6. Flow cytometry analysis of C-6 glioma cells. C-6 glioma cells were incubated with 0.3 mM (Ac)₅-GP for indicated times, then washed and harvested. The cells were fixed with 80% ice-ethanol and stained with propidium iodine and DNA concentration was analysis by flow cytometry.