



計畫編號: NSC88-2314-B-040-017

執行期限: 87 年 8 月至 88 年 7 月

主持人: 曾翠華

執行機構及單位: 中山醫學院生化科

### 一、中文摘要

Eesculetin( 6,7-dihydroxycoumarin) 是香豆精的衍生物之一，常見於藥用植物如菊科的茵陳蒿、芸香科的橙柚、玄參科的毛地黃、大戟科的續隨、茄科的顛茄、蔓陀羅等，為一種多酚類化合物。過去本研究在抗氧化天然物開發中發現其具有不錯的抗氧化和抗發炎之作用，而近年來有文獻報告香豆精衍生物(如：1,2-benzopyrone、7-hydroxycoumarin)對人類惡性細胞株皆具有抑制生長的作用，然分子之作用機制仍不甚清楚。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。在本實驗中，觀察到 esculetin 可以抑制人類血癌細胞株(HL-60)的生長，而且由顯微鏡及核染色觀察發現以 esculetin 出處理 24 小時，可誘發 HL-60 細胞產生 apoptosis；由流速細胞儀測定顯示 esculetin 可使 HL-60 細胞週期停滯在 G1

phase，另由西方點墨法發現 esculetin 誘發 HL-60 apoptosis 是透過 cytochrome c 釋出活化 CPP32，促使 PARP- $\gamma$  裂解；亦觀察到 esculetin 導致 HL-60 細胞 G1 phase 停滯主要和 cyclin D 及 Cdk-4 有關。

關鍵詞: 香豆精衍生物，人類惡性白血癌細胞，程式性死亡，細胞週期

### Abstract

Esculetin, a phenolic compound, is a coumarin derivative containing in many plants such as *Atemisia capillaris* Flos (Compositae), leaves of *Citrus limonia*(Rutaceae), *Digitalis pur-purea* L. (Scrophulariaceae), *Euphorbia lathyris* L. (Euphobiaceae), *Atropa belladonna* (Solanaceae), *Datura stramonium* L. (Solanceae) *Hyoscyamus niger* L.(Solanceae) [1, 2]. Previously, we found that esculetin exhibited antioxidant and anti-inflammatory bioactivities. It is reported that coumarin derivatives can inhibit the proliferation of human malignant cell lines. However, the molecular mechanism of anti-proliferation of that are remain to be defined. The

exploration of intrinsic and extrinsic modulation of chemotherapeutic agents may prove the efficiency of anticancer treatment. In present study, esculetin showed the ability of to inhibit HL-60 cell growth and induced apoptosis in HL-60 cells. The flow cytometry analysis showed the esculetin could arrest HL-60 cells at G<sub>1</sub> phase. Also, we found HL-60 cell treatment with esculetin for 24 hours can significantly reduced the content of cyclin D and Cdk-4. In addition, esculetin treatment of HL-60 cells can induce cytochrome c releasing from mitochondria and breakage of PARP- $\gamma$ .

Key words: HL-60 cells, esculetin, apoptosis.

## 二、緣由與目的

過去我們在抗氧化天然物開發中發現 esculetin 具有不錯之抗氧化及抗發炎的作用,而近年來有文獻指出 Nonsteroidal antiinflammatory drugs 對大腸癌細胞株及乳癌細胞株具有抑制生長之作用 [3, 4], 又香豆精衍生物如 1,2-benzopyrone、7-hydroxycoumarin 對人類惡性細胞株如 A549, HCT-15, HL-60, PC-3 等皆有抑制生長之作用 [5, 6], 然以上作用機制仍不明朗。又近年很多報告指出大部份的抗癌藥如 topoisomerase inhibitors, alkylating agent, hormone antagonists [7-10]等都會使一些敏感性細胞株如白血癌細胞株及淋巴癌細胞株發生程式性

死亡 (apoptosis) [11-14] 並影響細胞週期, 達到抑制癌細胞的增生與惡化。至目前為止, 對於程序式死亡的機制雖然仍不甚清楚, 但一般認為細胞在接收到死亡訊息後, 可能藉由改變內在 target(如粒腺體)的正常功能, 進而活化一些酵素(如: CPP32、PARP- $\gamma$ ), 導致細胞死亡。此外, 調節細胞週期進行的蛋白 cyclin、cyclin-dependent kinase 及 cyclin-dependent kinase inhibitor 與腫瘤形成有極密切的關係[15, 16]。本期計劃先觀察 esculetin 對人類惡性白血癌細胞 (HL-60)生長之影響, 由是否誘發 apoptosis 及相關蛋白之變化研究, 並觀察 cell cycle 及相關蛋白是否受影響, 以了解 esculetin 之 antitumor activity 及其分子機制。

## 三、結果與討論

### (一)細胞毒性分析

HL-60 細胞株暴露不同濃度的 esculetin(包括: 0、10、20、50、100 $\mu$ M)24 小時後, 發現在 50 $\mu$ M 及 100 $\mu$ M 濃度下可看到輕微的細胞細胞毒性, 其細胞存活率分別為 80% 和 75%(P<0.1), 而以 50 $\mu$ M 及 100 $\mu$ M 濃度的 esculetin 處理細胞 48 小時後, 其細胞存活率降低至約 74% 和 40%(P<0.01)。當 esculetin 處

理 24h 後觀察細胞形態，發現有細胞皺縮、泡狀外膜形成、核濃染及斷裂等 apoptosis 之特性。

## (二)細胞週期分析

將 100 $\mu$ M esculetin 培養在 HL60 細胞株中 0、6、12、24、36、48 小時，然後以流速細胞儀分析其細胞週期變化。結果在實驗中明顯觀察到細胞週期在 24 小時有 G0/G1 phase 停滯及 G2/M phase 減少的現象，而至 36、48 小時除了有 G0/G1 phase 停滯及 G2/M phase 減少的現象外，更觀察到 hypodiploid DNA 的產生(即 apoptotic peak)。

## (三)以 100 $\mu$ M esculetin 處理 HL-60

細胞株不同時間，觀察細胞內蛋白質之表現。

### *RB protein*

由細胞週期測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 cells 細胞週期分布之變化，而 RB protein 與生長、分化、凋亡的調控有密切關係，故觀察 esculetin 對 RB

phosphorylation 之影響。結果顯示 HL-60 cells 在暴露 100  $\mu$ M esculetin 24h 後，hyper-RB 量開始下降，hypo-RB 量開始增加，在 48h 更為顯著。

### *cyclin D*

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而 cyclin D 在細胞週期中是負責調節 G1 早期的蛋白，且研究顯示 cyclin D 與腫瘤形成有關，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，cyclin D 在 24 小時明顯減少。

### *Cdk-4*

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而在 cell cycle 的 G1 早期，Cdk-4 可與 cyclin D 形成複合體，且研究顯示 Cdk-4 具有 oncogenic 的能力，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，Cdk-4 在 24 小時明顯減少。

### *Cyclin E*

由流速細胞儀測定顯示 esculetin

會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而 cyclin E 在細胞週期中是負責調節 G1 晚期的蛋白，且研究顯示 cyclin E 與腫瘤形成有關 [18]，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，cyclin E 在 24 小時有些微下降，而在 48 小時明顯減少。

#### *Cdk-2*

由流速細胞儀測定顯示 esculetin 會導致 HL-60 細胞株停滯在 G1 phase，而在 cell cycle 的 G1 晚期，Cdk-2 可與 cyclin E 形成複合體，且研究顯示 Cdk-2 與腫瘤形成有關 [18]，故測定其蛋白表現量。由實驗中發現，Cdk-2 在 0~36 小時的表現量並無改變，而到 48 小時才明顯減少。

#### *Tyrosine phosphorylation*

過去研究指出 esculetin 在抗發炎反應過程可透過抑制 protein tyrosine kinase [19] 是一 protein tyrosine kinase inhibitor，而 tyrosine phosphorylation 與增生分化又有密切關係 [20]，因此觀察 esculetin 對 protein phosphorylation 之影響，

結果發現 esculetin 暴露 12 h 後，80 kDa, 60-50 kDa, 40 kDa 附近蛋白質之磷酸化有減少現象。

#### *PARP- $\gamma$*

PARP- $\gamma$  的裂解與 apoptosis 有關。在實驗中發現 Esculetin 處理 24 小時，PARP- $\gamma$  開始分解，此結果與 CPP32 一致。

#### *Cytochrome c*

1996 年 Wang 等 (17) 發現 cytochrome c 從 mitochondria 釋放至 cytosol 可活化 CPP32，導致細胞走向 apoptosis 而由實驗發現，以 100 $\mu$ M esculetin (Fig) 處理 cytochrome c 12 小時 (Fig 22、23)，cytochrome c 大量從 mitochondria 釋放至 cytosol。

由以上結果顯示，esculetin 具有抑制 HL-60 cell 生長之 antitumor activity，其機制一方面與誘發凋亡有關，一方面與抑制增生訊息影響細胞週期相關蛋白表現有關。

#### 四、成果自評

本研究已如計劃進行，且有不錯之結果，讓我們對 esculetin 抗癌作用之機制有所了解，然於

esculetin 影響細胞週期相關蛋白表現之訊息傳遞分子機制有待進一步探討。

#### 五、參考文獻

1. Kan W.S. *Pharmaceutical Botany*, National Research Institute of Chinese Medicine. Taipei, Taiwan, ROC. 1986, p231.
2. *Chinese Drug Dictionary*, New ed, Vol 3, Sin Wen Hong Publications Inc, Taipei, Taiwan, ROC. p.2036.
3. Shiff, S.T., Koutsos, M.I., Qiao, L. and Rigas, B. (1996) Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp.Cell Res.* 222, 179-188.
4. Earashi, M., Noguchi, M., Kinoshita, K., and Tanaka, M. (1995) Effects of eicosanoid synthesis inhibitors on the in vitro growth and prostaglandin E and leukotriene B secretion of a human breast cancer cell line. *Oncology* 52, 150-155.
5. Thornes R.D., Lynch, G., and Sheehan, M.W. (1982) Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet II*: 328.
6. Marshall, M.E., Kervin, K., Benefield, C., Umerani, A., Albainy-Jenei, S., Zhal, Q., Khazaeli, M.B. (1994) Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 120, S3-S10.
7. Sachs, L. and Lotem, J. (1993) Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. *Blood* 82, 15-21.
8. Kerr J.F.R., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
9. Sen, S. and D'Incalci, M. (1992) Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett.* 307, 122.
10. Mesner, P., Budihardjo, I., and Kaufmann, S.H. (1997) Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol* 41, 461.
11. Shao, R.G., Shimizu, T. and Pommier, Y. (1997) 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Exp. Cell Res.* 234, 388-397.
12. Donald, W.N., Ambereen, A., Nancy, A.T., John, P.V., Connie, K.D., Michel, G., Yves, G., Patrick, R.G., Barc, L., Yuri,

- A.L., Neil, A.M., Sayyaparaju, M.R., Mark, E.S., Ting-Ting, Y., Violeta, L.Y. and Douglas, K.M. (1995) Identification and inhibition of ICE/CED3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.
13. Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.
  14. Cuchelarr, H.J., Vermes, A., Vermes, I., and Haanen C. (1997) Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci* 19 (3), 119-125.
  15. Sherr, C. (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
  16. Tyler, J. and Robert, A.W. (1996) Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 381, 643-644.
  17. Ruth, M.K., Ella, B.W., Douglas, R.G., and Donald, D.N. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria : A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
  - 18 Ito, K. Sasano, H.,Yoshida, Y., Sato, S., and Yajima, A. (1998) A immunohistochemical study of cyclins D and E and cyclin deperdent kinase (cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 18, 1661-1664.
  - 19.Huang, H.C., Hsieh, L.M., Chen, H.W., Lin, Y.S., Chen, J.S. (1994) Effects of baicalein and esculetin on transduction signal and growth factors expressoin in T-lymphoid leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 268, 73-78.
  - 20.Frank, D.A. and Sartorell, A.C. (1988) Alterations in tyrosine phosphorylation and during the granulocytic maturation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res* 48, 52-58.

#### 六、圖、表

Fig.1

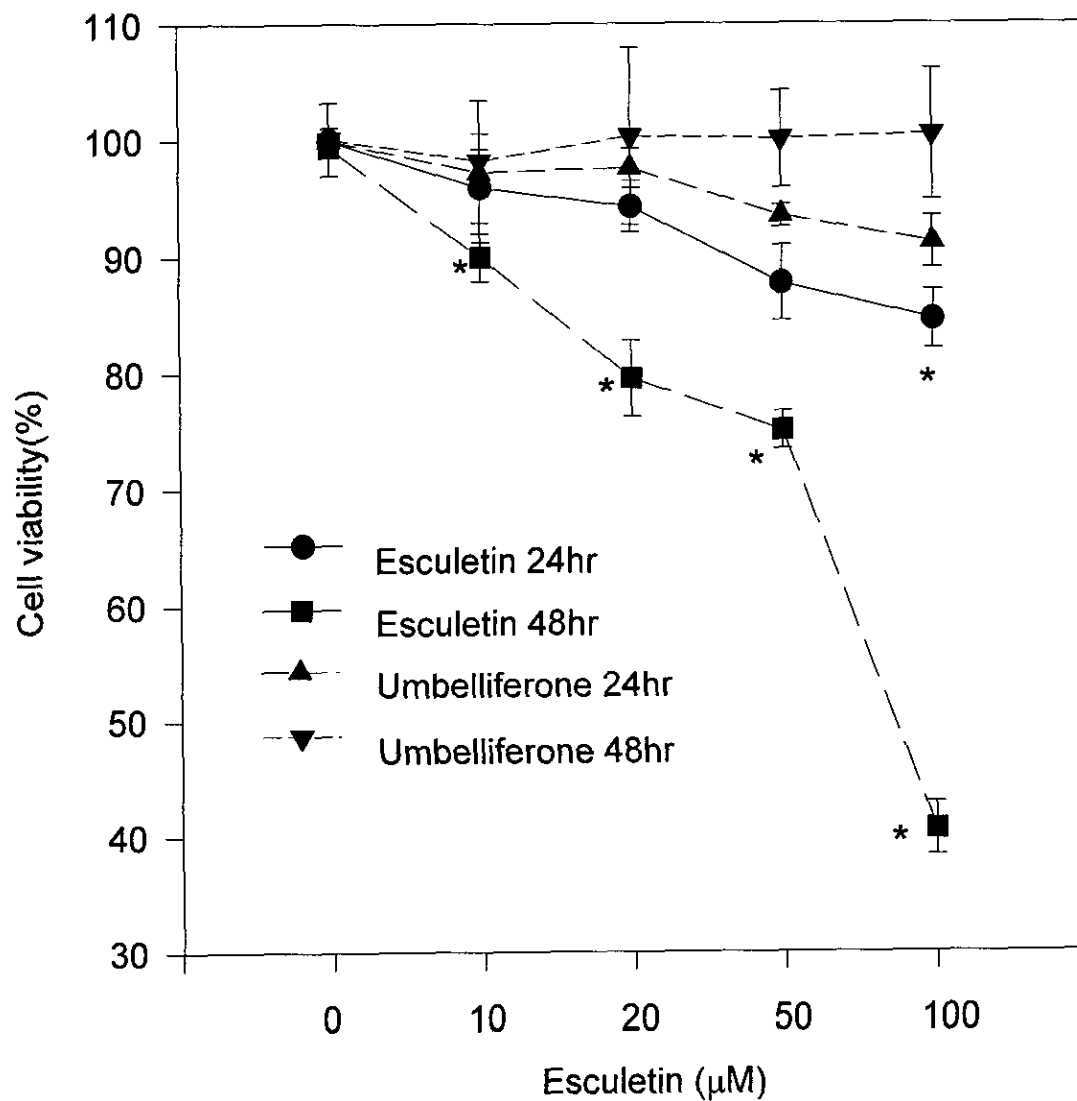


Fig.1 Cytotoxicity of esculetin in HL-60.

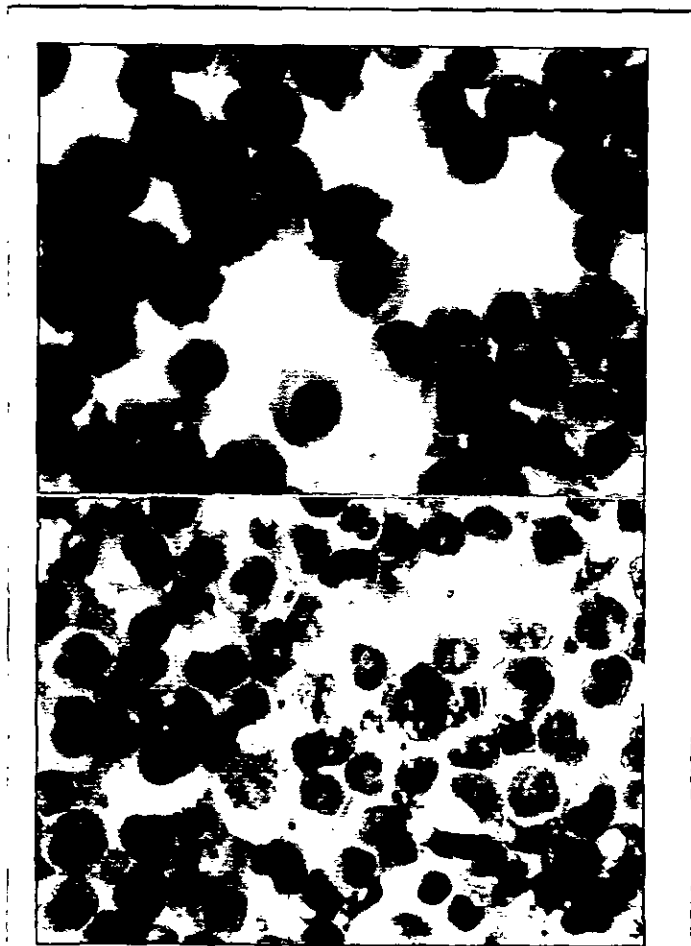


Fig.2 Nuclear staining of HL-60 cells with esculetin.



Fig.3

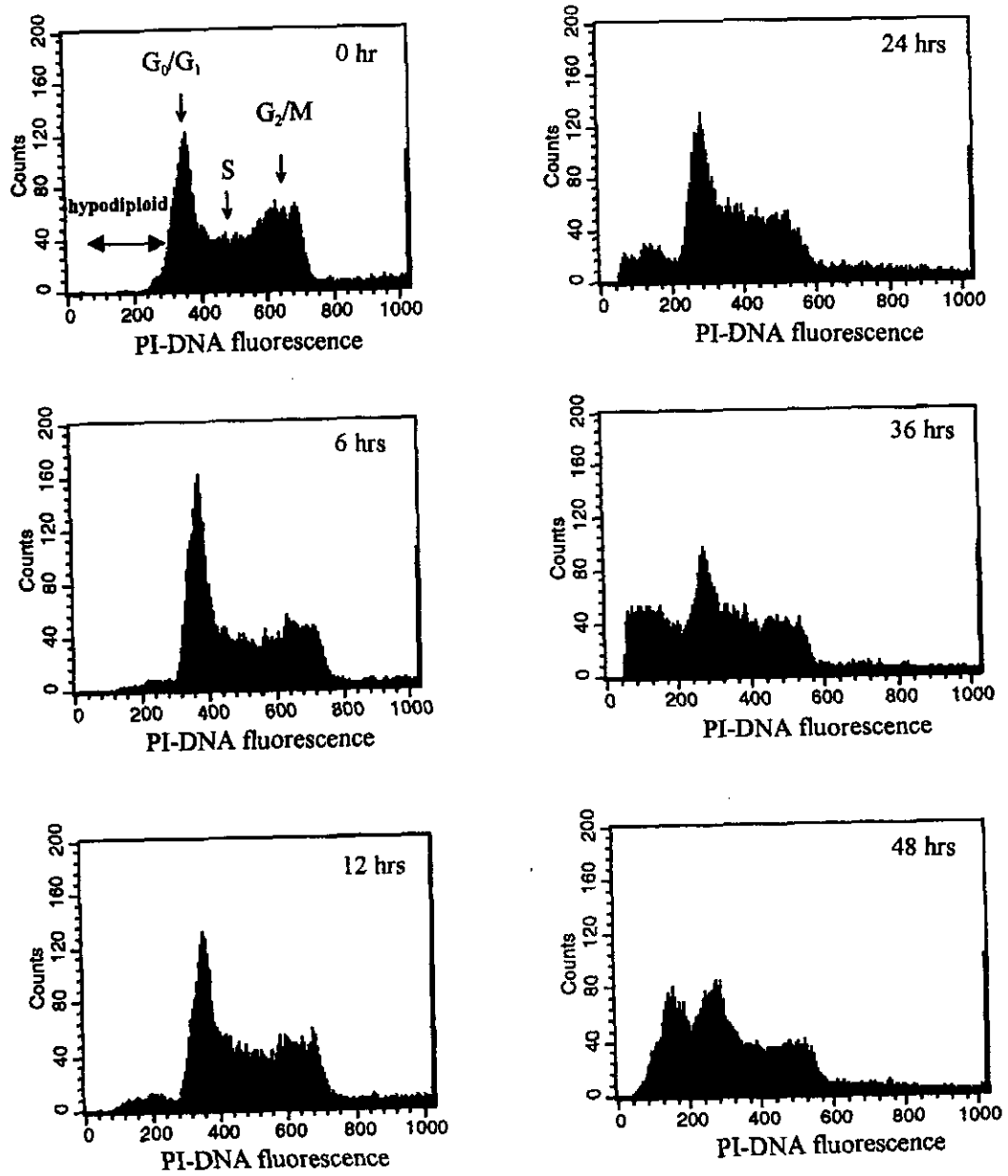


Fig.3 Flow cytometric analysis of HL-60 cells after treatment of esuletin

Fig.4

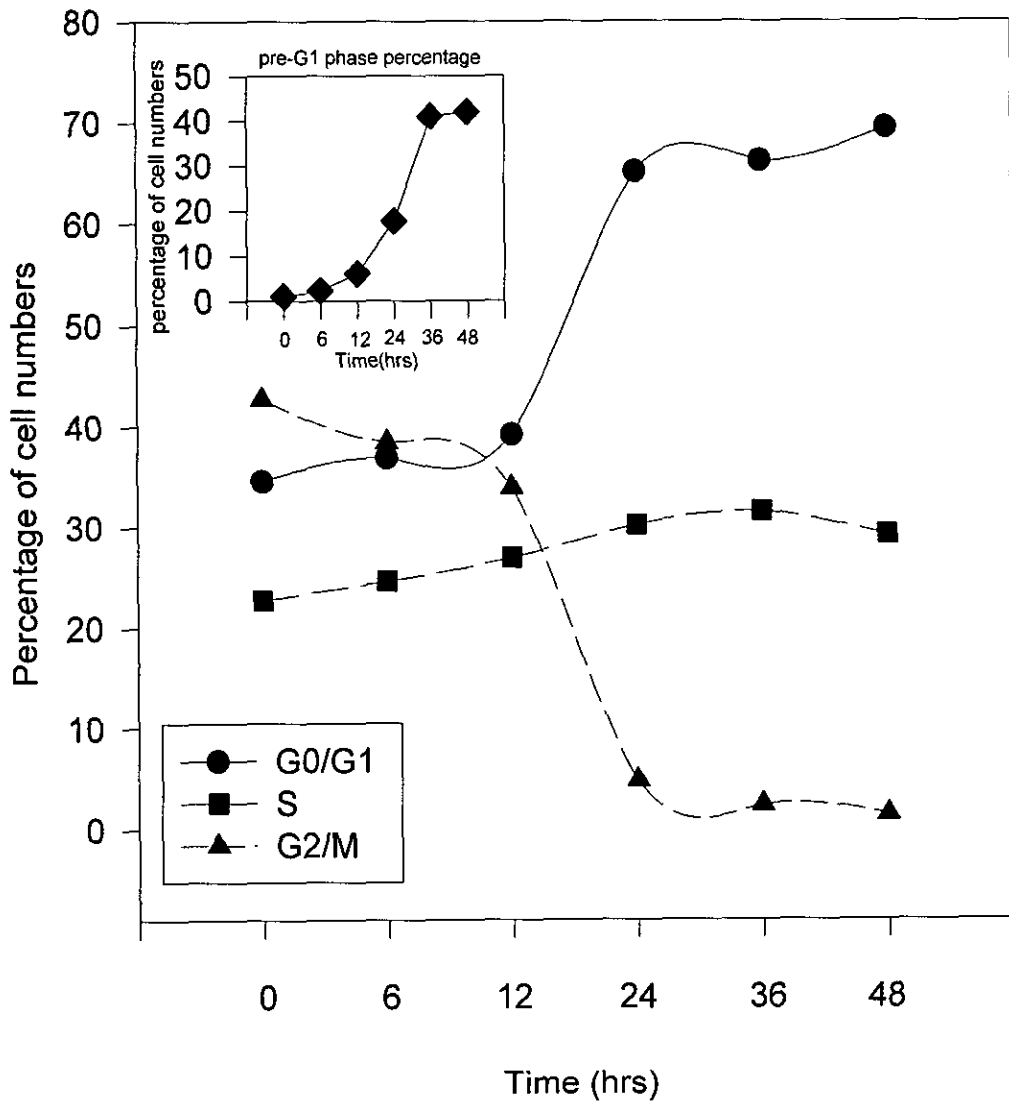


Fig.4 Cell cycle distribution of HL-60 cells after treatment of esculletin

Fig.5

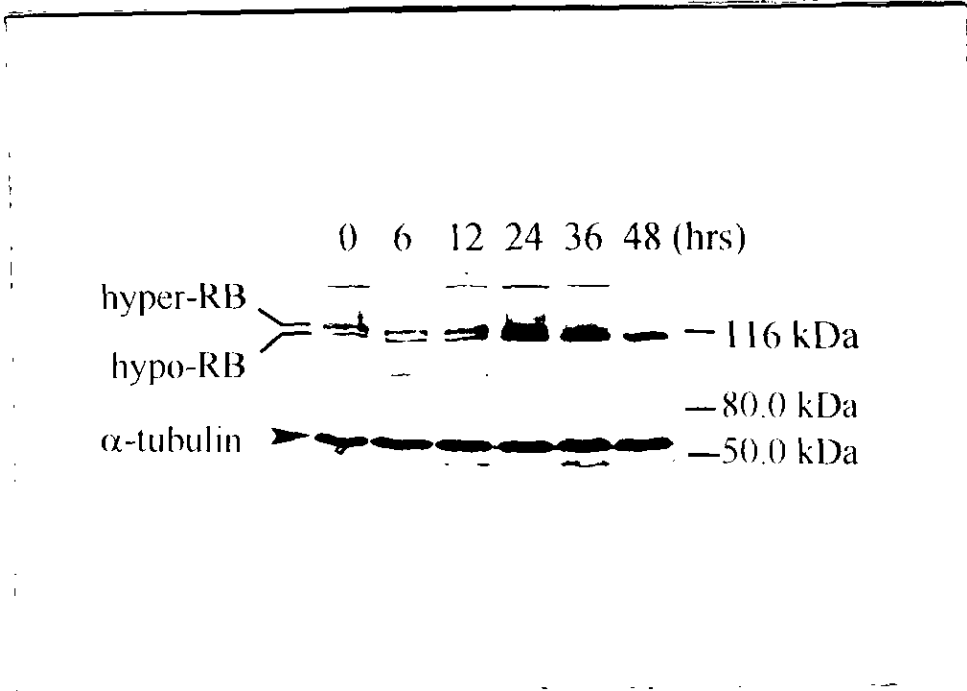


Fig.5 Effect of esculetin on RB protein in HL-60 cells.

Fig.6

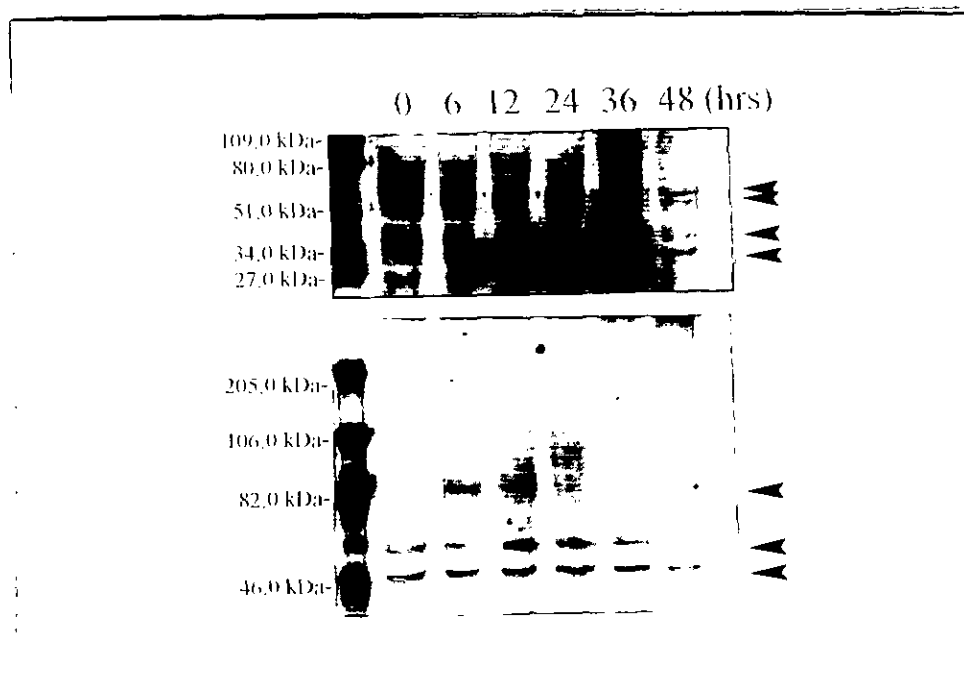


Fig.6 Effect of esculetin on tyrosine phosphorylation in HL-60 cells.

Fig.7

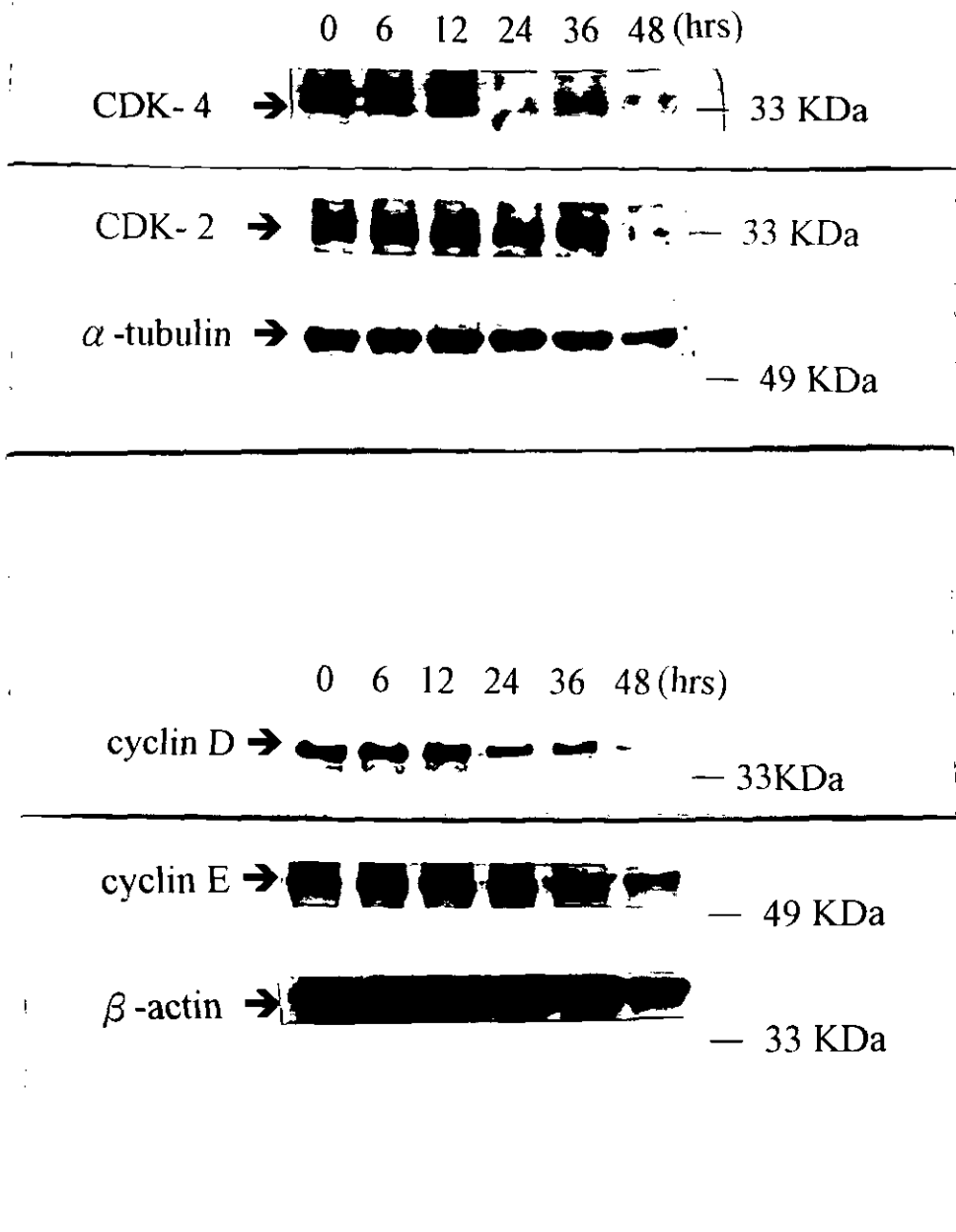


Fig 7. Effects of esculetin on Cdk-2, Cdk-4, cyclin E ,and cyclin D protein expressed in HL-60.

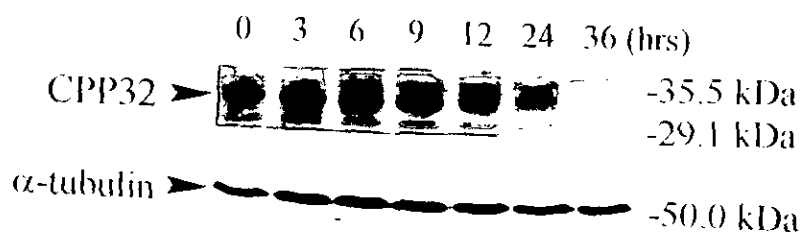


Fig 8. Time course effect of esculetin on CPP32 protein expression in HL-60.

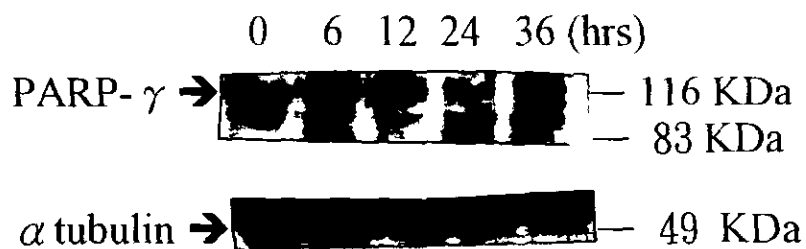


Fig 9. Time course effect of esculetin on PARP protein expression in HL-60.

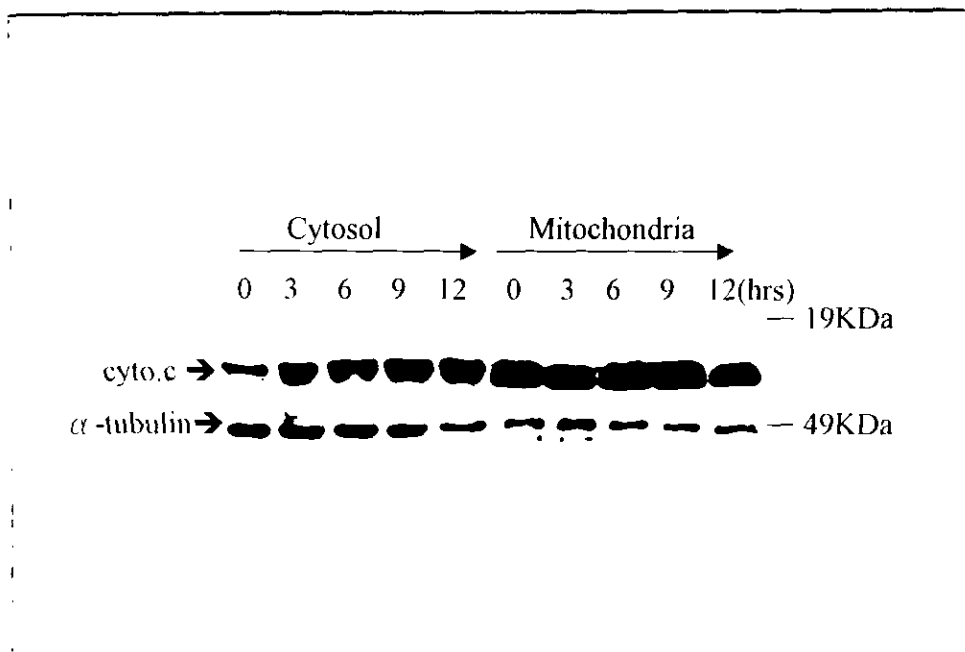


Fig 10. Time course effect of esculetin on cytochrome c protein expression in HL-60.

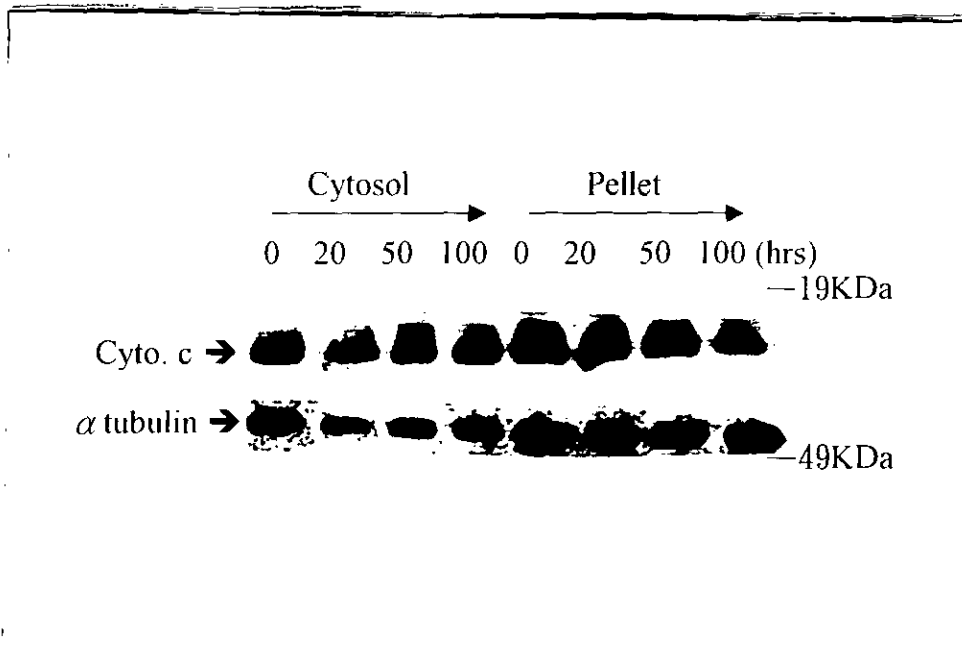


Fig 11. Dose course effect of esculetin on cytochrome c protein expression in HL-60.