

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 致癌毒素馬兜鈴酸之細胞毒性及其致毒機轉之探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2313-B-040-004-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：余豐益

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：王敬之  
大專生：陳頌璋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 96年11月01日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 致癌毒素馬兜鈴酸之細胞毒性及其致毒機轉之探討

### The effects of aristolochic acid-induced MAPK p38 signal transduction on the human cellular toxicity

計畫編號：NSC 95-2313-B-040-004

執行期限：95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

主持人：余豐益

中山醫學大學生物醫科學系

#### 一、中文摘要

馬兜鈴酸是一種由植物本身所產生的一種致癌毒素，主要常見於中草藥及一些減肥食品中，馬兜鈴酸的毒性不只引起人類的腎臟病變，亦會導致泌尿系統的癌症產生。國際上已公認它是一種致癌物，我們欲藉由 HL-60 細胞株(人類前骨髓性白血病細胞株)來探討馬兜鈴酸所造成的細胞毒性以及基因毒性之分子機制。我們藉由 MTT assay 觀察到以不同濃度的馬兜鈴酸處理 HL-60 細胞株 24 小時，細胞的存活率會隨濃度的增加而存活率相對下降。若將 HL-60 細胞株暴露在馬兜鈴酸下處理一小時，以 DCFH-DA 作為分子探針可偵測到有 ROS 的產生，並且若經過 ROS 抑制劑處理，馬兜鈴酸所誘發的 ROS 含量即有下降的趨勢。而抽取 HL-60 細胞株全蛋白來探討馬兜鈴酸與 p38 磷酸化的關係，則發現 p38 的活化會隨著馬兜鈴酸所處理的時間以及劑量的增加，而磷酸化程度也與之遽增。此外，若將 ROS 抑制劑與馬兜鈴酸共同處理細胞，則可以發現 p38 蛋白磷酸化有受到抑制的現象。根據以上發現，我們認為馬兜鈴酸所導致之 ROS 以及 MAPK pathway 的產生與馬兜鈴酸的基因毒性及細胞毒性有關

**關鍵詞：**馬兜鈴酸、ROS、MAPK

#### Abstract

Aristolochic acid (AA) is a carcinogen which produced from the *Aristolochia* spp.. It is found primarily in Chinese herbals and slimming remedies. Aristolochic acid has been associated with the development of a novel nephropathy, designated aristolochic acid nephropathy (AAN), and urothelial cancer in AAN patients. Treatment of various concentration of AA from 25 to 200  $\mu$ M, a significant decrease to 60% in cell viability was observed when HL-60 cultures were incubated with AA for 24 h at a concentration of 200  $\mu$ M. AA induces Reactive oxygen species (ROS) was also detected using DCFH-DA as a probe in HL-60. Western blotting showed that AA can activate the protein phosphorylation/dephosphorylation in

HL-60 cell. The results showed that treatment of various concentration of AA induces in a dose-dependent increase in p38 kinase phosphorylation. Treatment of HL-60 with ROS inhibitor and AA, a p38 protein kinase phosphorylation was reduced. According to our results, AA induced ROS and p38 protein kinase phosphorylation was associated with its genotoxicity and cytotoxicity.

**Keywords:** Aristolochic acid, p38 protein phosphorylation, HL-60, ROS

## 二、緣由與目的

馬兜鈴酸是常見於中草藥與減肥食品中的致癌性毒素，其主要的傷害標的器官為腎臟，服用含有馬兜鈴酸的中草藥與減肥食品會引起馬兜鈴酸腎病變(aristolochic acid nephropathy, AAN)，甚至尿道癌症，此症狀最早於1991年在比利時被發現，接著再許多國家亦有相同的病例發生(Vanhaelen, et al., 1994)。馬兜鈴酸的致突變機制主要是由於馬兜鈴酸會與體內DNA形成鍵結物，引起抑癌基因p53基因突變，此一推論在以大鼠為模式的H-ras oncogene的codon 61(CAA)誘發AT→TA transversion而導致基因突變(Volker, et al., 2002; Lord, et al., 2004)的實驗已獲得證實。至於服用含有馬兜鈴酸地中草藥或是減肥食品中所引起的人類腎臟間質纖維化的分子機制並不清楚，有待進一步加以研究。有一些研究報告指出腎臟間質纖維化與p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)的活化有直接關係(Stambe et al., 2004; Dong, et al., 2004)，因此是否馬兜鈴酸亦會藉由活化 mitogen-activated protein kinases 而導致腎臟間質纖維化傷害是我們要探討的主要目標。

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway主要有三條途徑：ERK1/2、JNK/SAPK和p38。ERK pathway一般而言會受到生長因子的調控而活化，可以促進細胞的增生與分化，並且與細胞存活有關。JNK和p38 pathway則可能因為受到一些壓力，如UV、化學致癌物、氧化壓力等活化，進而影響細胞週期、細胞凋亡、發炎反應以及基因穩定性(Abdelmegeed et al., 2004; Chao and Yang, 2001; Davis, 2000; Zarubin and Han, 2005)。已知數種黴菌毒素包括patulin、ochratoxin以及fumonisin B1均會誘導MAPK pathway的活化(Liu, B. H. et al. 2006)，也有研究指出以馬兜鈴酸處理細胞，mitogen-activated protein kinases有活化的現象，但是否由此途徑造成細胞凋亡卻尚不清楚。本實驗的主要目標在於探討馬兜鈴酸所造成細胞毒性及基因毒性的分子機制是否經由MAPK pathway及ROS的調控機制而促使其細胞死亡及DNA damage。

## 三、結果

### Cytotoxicity effects of OTA on HL-60

根據研究指出馬兜鈴酸會引起細胞的細胞毒性，因此本實驗藉由MTT assay來探討HL-60細胞株經由不同濃度之馬兜鈴酸處理24小時後所造成的細胞毒性。從實驗結果可以得知，細胞的存活率會隨著馬兜鈴酸濃度的增加而存活率也隨之下降，並且以馬兜鈴酸200  $\mu$ M處理細胞時，細胞的存活率只剩約六成左右(圖一)。

## 馬兜鈴酸誘導 MAPK pathway 中，p38 蛋白磷酸化

我們同樣以 HL-60 細胞株當作材料，分別處理對照組(DMSO)及不同濃度的馬兜鈴酸 (25  $\mu$ M~200  $\mu$ M) 24 小時，並且利用 western blotting 分析馬兜鈴酸對 MAPK pathway 的影響。實驗結果發現，當 HL-60 細胞株處理馬兜鈴酸至 200  $\mu$ M 時，p38 蛋白的磷酸化程度有明顯的增加，同時 capase 3 蛋白也有表現(圖二)。若以 100 $\mu$ M 馬兜鈴酸分別處理 HL-60 細胞株 8、16、24 小時，可以觀察到 p38 蛋白的磷酸化程度亦會隨著馬兜鈴酸處理的時間增加而磷酸化程度也與之上升，並且 capase 3 蛋白在 24 小時亦有被活化的跡象(圖三)。

## 馬兜鈴酸刺激 reactive oxygen species 的產生

藉由前人研究得知，有部份小分子毒素如棒麴黴素(patulin)可以刺激 ROS 的產生。因此，我們藉由 HL-60 細胞株來探討馬兜鈴酸是否亦可以刺激 ROS 產生。我們先以 10  $\mu$ M DCFH-DA 處理細胞 30 分鐘後，再將細胞暴露於不同濃度之馬兜鈴酸 1 小時。從實驗結果可以得知細胞中 ROS 的產生量會隨著馬兜鈴酸濃度的增加，ROS 的產生量也與之遽增。並且以 200  $\mu$ M 馬兜鈴酸處理時，可測得細胞內的 ROS 含量與對照組相比高達 6.8 倍左右(圖四)。接著，同樣以 10  $\mu$ M DCFH-DA 處理細胞 30 分鐘後，再處理 50  $\mu$ M、200  $\mu$ M 之馬兜鈴酸，以流式細胞儀分析單顆細胞的 DCF 螢光含量。從實驗結果一樣可以看到細胞經由 200  $\mu$ M 的馬兜鈴酸處理後，ROS 的含量大幅增加(圖五)。

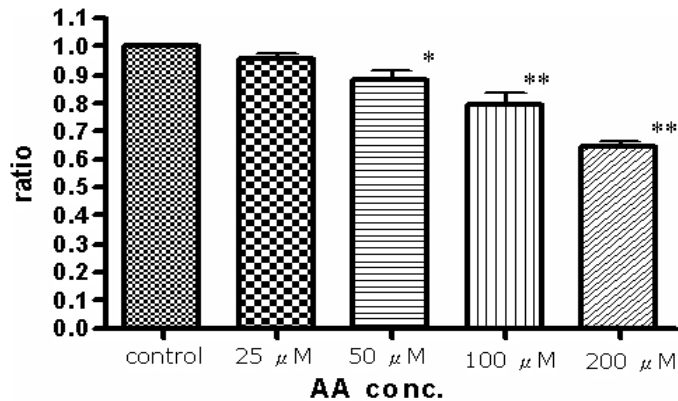
## ROS 抑制劑能抑制馬兜鈴酸誘發之 ROS

以 HL-60 細胞株為材料，分別先以 ROS 的抑制劑 Tiron、N-Acetyl-cysteine (簡稱為 NAC)、Mannitol 處理 2 小時後，再加入馬兜鈴酸 100 $\mu$ M 共同處理一小時。當我們以 Tiron 5mM 以及 NAC 5mM、10mM 處理細胞時，可使馬兜鈴酸所刺激的 ROS 含量被抑制約一半左右，而 mannitol 80mM 卻無法有效抑制受到馬兜鈴酸刺激而產生的 ROS(圖六)，但是我們仍能證實馬兜鈴酸可以誘發 ROS 的產生。

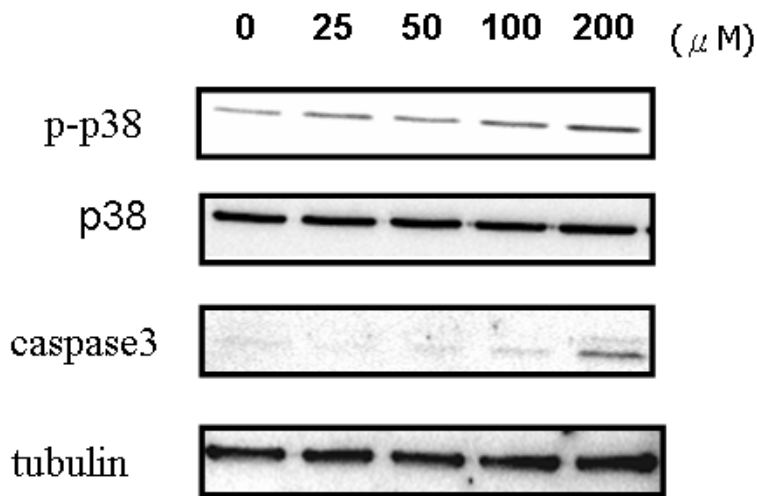
## 四、計畫成果自評

本實驗的主要目標在於探討馬兜鈴酸所造成細胞毒性及基因毒性的分子機制是否經由 MAPK pathway 及 ROS 的調控機制而促使其細胞死亡及 DNA damage。從實驗結果得知當我們以 200  $\mu$ M 馬兜鈴酸處理細胞 24 小時，可使細胞的存活率降低至六成左右，雖然尚未達到 IC<sub>50</sub> 細胞致死劑量，但仍可以確定馬兜鈴酸對於細胞有一定的致毒性。此外以 Western blotting 來分析馬兜鈴酸是否會誘發 p38 蛋白質的磷酸化。從實驗結果發現，p38 蛋白質磷酸化程度會隨著馬兜鈴酸濃度的增加而有上升的趨勢。接著我們藉由 DCFH-DA assay 得知馬兜鈴酸可以刺激細胞中 ROS 的產生，並且以 ROS 的抑制劑 Tiron、NAC 處理細胞時，可使受到馬兜鈴酸刺激所誘發的 ROS 含量降低。藉由本計畫作者亦研究致癌毒素馬兜鈴酸抗體之開發生產，目前此一毒素抗體生產與酵素免疫分析法均已經成功建立並可分析中草藥中此一毒素之含量，此一成果已經發表在已發表於 2006 年 Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:2496-2501.

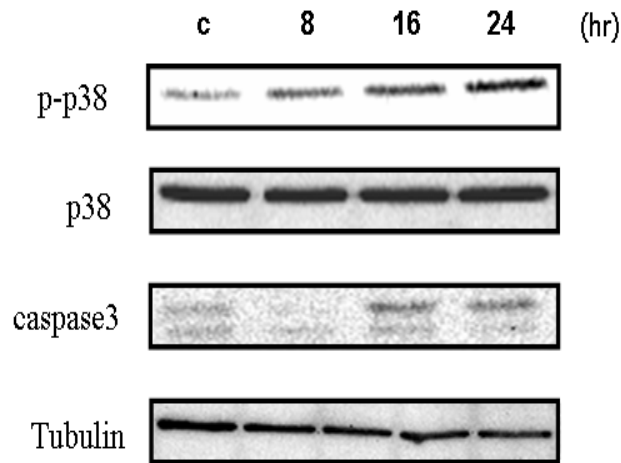
## Figures



圖一. 不同濃度的馬兜鈴酸對 HL-60 細胞株的細胞毒性 將  $5 \times 10^4$  顆/50  $\mu$ l HL-60 細胞培養於 96 孔盤，分別處理對照組(DMSO)及馬兜鈴酸 25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、200  $\mu$ M 24 小時，利用 MTT assay 計算細胞存活率。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。\*，所代表的意義為與對照組(DMSO)相比具有顯著性的差異。(p<0.05)

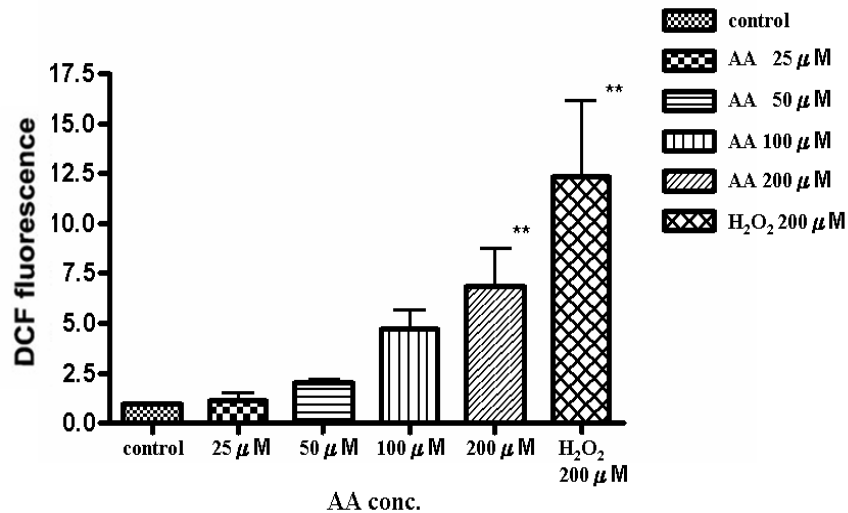


圖二. 馬兜鈴酸誘導 p38 蛋白質磷酸化及 caspase 3 蛋白質活化情形 HL-60 細胞株( $1.6 \times 10^6/2$  ml)以不同濃度之馬兜鈴酸處理 24 小時後，萃取蛋白質，取 40  $\mu$ g 蛋白進行 15% SDS-PAGE 電泳，待轉漬完畢，進行西方點墨法，最後以磷酸化之 p38 抗體分析。之後再以 stripping buffer 將原抗體去除，重新以 p38 蛋白質抗體分析。

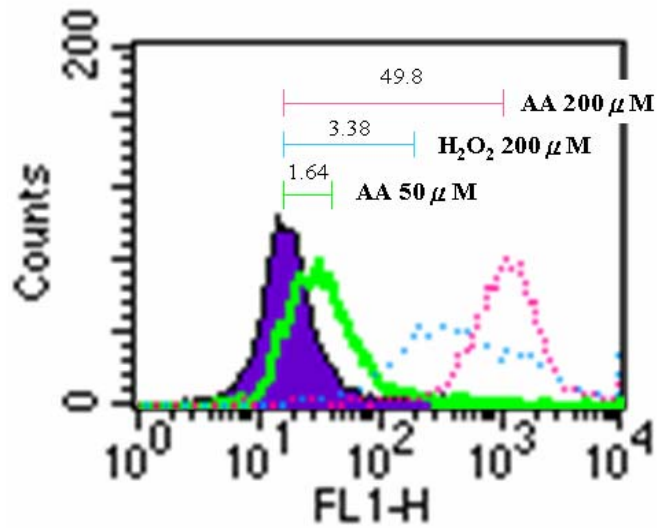


圖三. 馬兜鈴酸處理 HL-60 細胞株於不同時間點時，p38 蛋白質磷酸化之現象

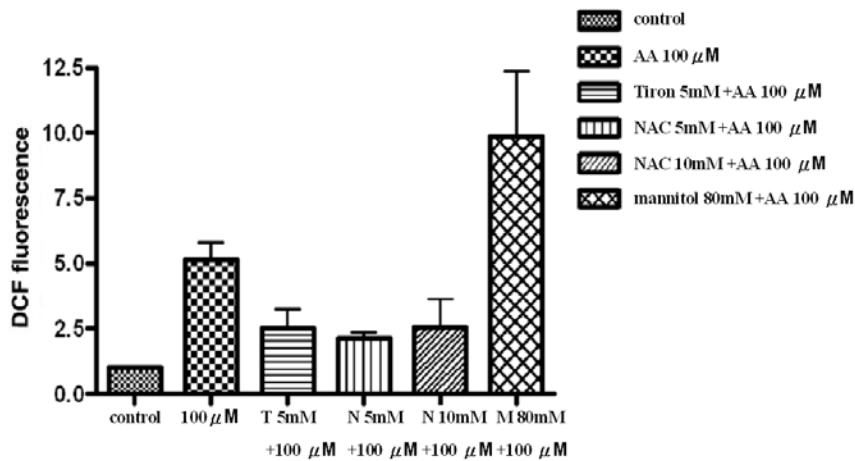
HL-60 細胞株( $1.6 \times 10^6/2$  ml)暴露於對照組(DMSO)及  $100 \mu\text{M}$  之馬兜鈴酸 8、16、24 小時後，萃取蛋白，取  $40 \mu\text{g}$  蛋白進行 15% SDS-PAGE 電泳，待轉漬完畢，進行西方點墨法，最後以磷酸化之 p38 抗體分析。之後再以 stripping buffer 將原抗體去除，重新以 p38 蛋白抗體分析。



圖四. 馬兜鈴酸刺激 HL-60 細胞株中 ROS 的產生 將( $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$  each well) HL-60 細胞株培養於 96 孔盤內，先以 DCFH-DA  $10 \mu\text{M}$  處理 30 分鐘後，再以不同濃度之馬兜鈴酸處理細胞 1 小時，並使用螢光微孔盤分析儀偵測 DCF 螢光含量，以此判斷 ROS 的含量多寡。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。\*，所代表的意義為與對照組(DMSO)相比具有顯著性的差異。(p < 0.05)



圖五. 以流式細胞儀分析單顆細胞受到馬兜鈴酸刺激而產生之 ROS 含量 將( $9 \times 10^5$ /1 ml each well) HL-60 細胞株培養於 24 孔盤中，先以 DCFH-DA 10  $\mu\text{M}$  處理 30 分鐘後，使細胞暴露於對照組(DMSO)、50  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$  之馬兜鈴酸以及對照組(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu\text{M}$ ) 1 小時，並使用 FACSCAN 雷射流式細胞儀分析  $1 \times 10^4$  顆細胞。



圖六. ROS 抑制劑能抑制馬兜鈴酸所誘發之 ROS 將( $5 \times 10^4$ /100  $\mu\text{l}$  each well) HL-60 細胞株培養於 96 孔盤內，先以 DCFH-DA 10  $\mu\text{M}$  處理 30 分鐘後，分別加入 ROS 抑制劑 Tiron 5mM、NAC 5mM、10mM 以及 Mannitol 80mM 2 小時、最後再以 100  $\mu\text{M}$  馬兜鈴酸共同處理細胞 1 小時，並藉由螢光微孔盤分析儀偵測 DCF 螢光含量，以此推估 ROS 含量。實驗數據為 3 次實驗所取得的平均值。

## 五、参考文献

- Arlt, V. A.; Stiborova, M.; Schmeiser, H. H. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*, **2002**, *17*, 265-277.
- Arlt, V. M.; Alunni-Perret, V.; Quatrehomme, G.; Ohayon, P.; Albano, L.; Gaid, H.; Michiels, J. F.; Meyrier, A.; Cassuto, E.; Wiessler, M.; Schmeiser, H. H.; Cosyns, J. P. Aristolochic acid (AA)-DNA adduct as marker of AA exposure and risk factor for AA nephropathy-associated cancer. *Int. J. Cancer* **2004**, *111*, 977-980.
- Cui, M.; Liu, Z. H.; Heng, Qiu, Q.; Li, H.; Li, L. S. Tumor induction in rats following exposure to a short-term high dose aristolochic acid I. *Mutagenesis*, **2005**, *20*, 45-49.
- Cosyns, J. P. Aristolochic acid and Chinese herbs nephropathy: a review of the evidence to date. *Drug Saf.* **2003**, *26*, 33-48.
- Dong, J.; Ramachandiran, S.; Tikoo, K.; Jia, Z.; Lau, S. S.; Monks, T. J. EGFR-independent Activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **2004**, *287*, 1049-1058.
- Galle, J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant* **2002**, *16*:Editorial Comments.
- Gekle M., Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Schramek H. 2000. Ochratoxin a induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 837-844.
- Gupta, A.; Rosenberger, S.F.; Bowden, G. T. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocytes cell lines. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2063-2073
- Hashimoto, K.; Higuchi, M.; Makino, B.; Sakakibara, I.; Kubo, M.; Komatsu, Y.; Maruno, M.; Okada, M. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 185-189.
- Ioset, J. R.; Raelison, G. E.; Hostettmann, K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 29-36.
- Kite, G. C.; Yule, M.A.; Leon, C.; Simmonds, M. S. J. Detecting aristolochic acids in herbal remedies by liquid chromatography/serial mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 585-590.
- Kyriakis, J. M., Avruch, J. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioassays* **18**, 567-577.
- Mengs, U.; Lang, W.; Poch, J. A. The carcinogenic action of aristolochic acid in rats. *Arch.*



- Toxicol.* **1982**, 51, 107-119.
- Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. The aristolochic acids and aristolactams. *J. Nat. Prod.* **1982**, 45, 657-666.
- Ong, E. S.; Woo, S. O.; Yong, Y. L. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medical plants. *J. Chromatog. A* **2000**, 313, 57-64.
- Schwetz, B. A. From the Food and Drug Administration. *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, 285, 2705.
- Stiborova, M.; Frei, E.; Sopko, B.; Wiessler, M.; Schmeiser, H. H. Carcinogenic aristolochic acids upon activation by DT-diaphorase form adducts found in DNA of patients with Chinese herbs nephropathy. *Carcinogenesis* **2002**, 23, 617-625.
- Stambe, C.; Paterson, D. J.; Hill, P. A.; Dowling, J.; Atkins, R. C. p38 mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, 15, 326-336.
- Tanaka, A.; Nishida, R.; Yoshida, T.; Koshikawa, M.; Goto, M.; Kuwahara, T. Outbreak of Chinese herbs nephropathy in Japan: are there any differences from Belgium? *Intern. Med.* **2001**, 40, 296-300.
- Vanherweghem, J. L.; Depierreux, M.; Tielemans, C.; Abramowicz, D.; Dratwa, M.; Jadoul, M.; Richard, C.; Vandervelde, D.; Verbeelen, D.; Vanhaelen-Fraste, R.; Vanhaelen, M. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*, **1993**, 341, 387-391.
- Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fraste, R.; But, P.; Vanherweghem, J. L.; Identification of aristolochic acid in Chinese herbs, *Lancet*, **1994**, 343, 174.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **1995**, 270, 1326-1331.
- Yu, F. Y.; Lin, Y. H.; Su, C. C. A Sensitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detecting carcinogenic Aristolochic Acid in Herbal Remedies. Submitted to *J. Agric. Food Chem.* **2005**.
- Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F. F., Woodgett, J. R. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cisplatin, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* **1996**, 6, 606-613.

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

致癌毒素馬兜鈴酸之細胞毒性及其致毒機轉之探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-040-004-

執行期間：95年 8月1日至 96年7月31日

計畫主持人：余豐益

共同主持人：

計畫參與人員：陳頌璋

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：中山醫學大學生物醫學系

中 華 民 國 九 十 六 年 十 月 三 十 日

## 可供推廣之研發成果資料表

 可申請專利 可技術移轉

日期：96年10月31日

國科會補助計畫	計畫名稱：致癌毒素馬兜鈴酸之細胞毒性及其致毒機轉之探討 計畫主持人：余豐益 計畫編號：NSC 95-2313-B-040-004- 學門領域：食品
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	
可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

- ※ 1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。