

五爪金英 Td-F2 萃取物誘導人類肝癌細胞 Hep3B 細胞週期 阻滯及細胞凋亡作用

盧泯任*、李孟修**、陳錫金***、吳裕仁****、黃瑞齡*****

摘要

五爪金英 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gary 為菊科 (Compositae) 植物。在民間傳統使用以全草來治療不同肝疾，具有清熱解毒等效用，近年來僅有少許報告指出分離自五爪金英不同成分能抑制肝癌細胞生長，目前於稍早實驗篩選出五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 具有抑制人類肝癌細胞 HepG2(Wild-type p53)生長，並誘導產生細胞凋亡之活性。此次研究挑選不同基因表現之人類肝癌細胞 Hep3B(P53 deletion)進行實驗。經 MTT assay 測定顯示隨著 Td-F2 藥物濃度增加，細胞存活率逐漸減少，且處理 24 小時 IC₅₀ 為 15.9 μg/mL；處理 48 小時 IC₅₀ 為 6.3 μg/mL，具有時間與濃度依賴性。接著藉由 DNA 膠體電泳、ELISA kit、流式細胞儀測定，結果顯示 DNA 片段化、細胞凋亡率增加與 sub-G1 峰之細胞凋亡現象，綜合上述結果證明五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 同樣具有誘導人類肝癌細胞 Hep3B 細胞凋亡之活性，未來更進一步探討相關細胞凋亡調控機制。

關鍵字：五爪金英、細胞凋亡、細胞週期、肝癌。

*台東大學生命科學研究所學生

**中國醫藥大學中藥資源系助理教授

***明志科技大學環境與安全衛生工程系副教授

****美和科技大學美容系助理教授

*****美和科技大學生物科技系副教授(通訊作者)

壹、前言

根據衛生署公佈惡性腫瘤依然為十大死因之首，也就是大家所說的癌症，人人聞癌色變，其中肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)、簡稱肝癌，在台灣不論男女皆具有高發生率以及致死率。目前已知肝癌的成因，除了本身家族遺傳外，早期以病毒性肝炎為主，隨著時代進步，生活步伐緊湊，人們壓力過大，應酬多飲酒過度，甚至亂服不明成藥，以及誤食其他毒性物質(如:黃麴毒素)或不良習慣(如:熬夜)等因素，久而久之肝臟不堪負荷，肝細胞損傷發炎，一般情況下肝臟受損會自行修復，但若長期遭受損傷，來不及修補便會造成纖維化，久而久之形成肝硬化，最後演變成肝癌。肝癌常見的治療方式有:外科手術(移植與切除)、局部療法(如:無線雷射頻燒灼術、局部酒精注射療法、肝動脈栓塞療法)、放射線治療、化學療法等。治療方式雖多，往往必須考慮病患的各種條件決定來使用與否(蕭，2008)，若能有更多治療肝癌方法造福病患會更好。肝臟是沉默的器官，並無痛覺神經，因此當發現病徵時，大部分已經肝癌末期，且由文獻得知肝癌極易血管新生(Pang et al., 2006)，容易轉移至其他部位，因此通常治療方式會選擇全身性療法，也就是化學療法，現階段稱之為癌症化學預防劑(cancer chemoprevention agent)。

醫學與分子生物學的進步，目前癌症化學預防劑已有許多分子目標來對抗癌症 (Dorai et al., 2004)。癌症的形成為突變細胞不受控制生長，早期化療藥物是人工合成的，以干擾阻斷癌細胞細胞週期中 DNA 合成與有絲分裂的過程，達到殺死癌細胞，由於選擇性差，間接傷害正常細胞，導致許多副作用(如:掉髮)，但後人發現許多天然物中有不同活性成份，有更好的抗癌功效，且傷害較低副作用較小，目前已是臨床用藥(如:喜樹鹼, camptothecin)。此外自 1972 年 Kerr 發現細胞凋亡現象後(Kerr et al., 1972)，陸陸續續有許多相關的研究，簡單說細胞凋亡為一種正常生理機制(如:器官形成、清除細胞)，屬於一種細胞自殺的方式，其過程外觀型態上出現細胞與各胞器萎縮(cell shrinkage)、膜空泡化(membrane blebbing)以及染色質濃縮(chromatin condensation)，接著細胞核崩裂(nuclear collapse)並持續萎縮空泡化，逐漸形成凋亡小體(apoptotic body)，而凋亡小體所包覆的內含分解的胞質、胞器或核碎片，整個過程內容物不四散，最後由巨噬細胞吞噬(Fadeel et al., 2003)，因此也不會引起發炎反應。此外三種明顯的生化特徵在凋亡初期細胞內膜磷脂酰絲氨酸(phosphatidyl serine, PS)會翻轉至外膜、凋亡蛋白酶活化(Janicke, et al., 1998)以及於核酸內切酶作用下，DNA 會以核小體為單位斷裂(DNA fragmentation)，經洋菜膠(agarose gel)電泳法會於膠體上呈現 180~200 base pair 或其倍數的階梯狀的片段(Park, et al., 1997; Nagata, S et al., 2000)。因此若能誘導癌細胞以細胞凋亡方式死亡為很好的治療方式。

五爪金英 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gary 是一種多年生的菊科(Compositae)植物，又稱小向日葵、假向日葵、腫柄菊等。在台灣生長於海濱至海拔一千公尺陽光充足之處。各國民間傳統使用上有不同之功效，具有清熱解

毒，消腫止痛、治療急慢性肝炎、B 型肝炎、黃疸、急性腸胃炎、瘡傷腫毒、糖尿病、瘧疾(Tona, et al., 1998)、肝癌(Chiu, et al., 1992)等。如今已有不少的藥理活性研究報告，具有保肝、抗炎以及鎮痛(Lin, et al., 1993; Owoyele, et al., 2004)；抗病毒(Cos, et al., 2002; Chiang, et al., 2004)；抑制寄生蟲生長(Herrera, et al., 2007; Oyewole, et al., 2008)；改善血糖代謝功能(Miura, et al., 2005)的活性。而最重要的是分離自五爪金英不同成分對許多癌細胞具有細胞毒性，如：急性骨髓血癌細胞 HL-60 與人類結腸癌 Col2 以及人類肝癌細胞 HepG2 (Kuo, et al., 1997; Wu, et al., 2001; Kuroda, et al., 2007; Gu et al., 2002)。

肝細胞本身就帶有許多抗藥基因(Drug resistant gene)，細胞癌化後對許多癌症化學預防劑具有抗藥性(Choi et al., 2005)，此外癌症的形成與 DNA 突變有著密切關係，如抑癌基因 p53 失活，P53 為調控細胞週期與細胞凋亡之重要轉錄因子(King and Cidlowski, 1998)，文獻得知抑癌基因 P53 的缺失，同樣增加對化學預防劑的抗藥性(Lowe et al., 1993)，因此降低藥物對細胞的敏感性，研發有效治療肝癌的藥物十分重要。因此挑選人類肝癌細胞 Hep3B 進行實驗，此細胞能分泌 B 型肝炎病毒，並可偵測到表面抗原(HBsAg)，基因表現上為抑癌基因 P53 缺失(P53 deletion)(Puisieux et al., 1993) 屬於分化良好之肝癌細胞(Knowles et al., 1980)。綜合上述，本篇實驗目的為利用五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 是否對人類肝癌細胞 Hep3B(P53 deletion)具有停止細胞週期與誘導細胞凋亡(Apoptosis)之活性作用。

至今五爪金英已經被發現不少的化合物，主要以萜類化合物(Terpenoids)、黃酮類(flavonoid)為主。而最重要的是分離自五爪金英不同成分對許多癌細胞具有細胞毒性，如：急性骨髓血癌細胞 HL-60 與人類結腸癌 Col2 以及人類肝癌細胞 HepG2 (Kuo, et al., 1997; Wu, et al., 2001; Kuroda, et al., 2007; Gu et al., 2002)。

	Compound	
Terpenoids	Acetyltagitinin E	
	Tagitinin-F	
	Tagitinin C	
	2 α -hydroxytirotundin	
	Tithofolinolide	
	3 α -acetoxydiversifolol	
	3 β -acetoxy-8 β -isobutyryloxyreynosin	
	1 β ,2 α epoxytagitinin C	
	4 α ,10 α -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyryloxyguaia-11(13)-en-12,6 α -olide	
	3 α -acetoxy-4 α -hydroxy-11(13)-eudesmen-12-oic acid methyl ester	
	17,20-dihydroxygeranylnerol	
	Tagitinin A	
	Tirotundin	
	Tirotundin 3- <i>O</i> -methyl ether	
	1 α -hydroxytirotundin 3- <i>O</i> -methyl ether	
	Deacetylviguiestin	
	1 β -methoxydiversifolin	
	1 β -methoxydiversifolin 3- <i>O</i> -methyl ether	
	1 α -hydroxydiversifolin 3- <i>O</i> -methyl ether	
	4 β ,10 α -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyryloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide	
	4 β ,10 β -dihydroxy-3-oxo-8 β -isobutyryloxyguaia-11(13)-en-6,12-olide	
	1,3-dihydroxy-3,10-epoxy-8-(2-methylpropanoyloxy)-germacra-11(13)-ene-6,12-olide (1)	
	1,3-dihydroxy-3,10-epoxy-8-(2-methylpropanoyloxy)-germacra-4,11(13)-diene-6,12-olide (2)	
	1,3-dimethoxy-3,10-epoxy-8-(2-methylpropanoyloxy)-germacra-4,11(13)-diene-6,12-olide (3)	
	1-hydroxy-3-methoxy-3,10-epoxy-8-(2-methylpropanoyloxy)-germacra-4,11(13)-diene-6,12-olide (4)	
	1-acetyltagitinin A	
	8 β -isobutyryloxy cumambranolide	
	Methy 4 α -hydroxy-11(13)-eudesmen-12-oate	
	Diversifolol	
	flavonoids	Luteolin
		Nepetin
Hispidulin		

(Kuo, *et al.*, 1997; Kuo, *et al.*, 1998; Wu, *et al.*, 2001; Gu, J. Q, *et al.*, 2002; Kuroda, *et al.*, 2007; Herrera, *et al.*, 2007; Ragasa, C, *et al.*, 2008)

貳、材料與方法

(一) 天然活性材料製備與成分萃取

五爪金英(購自屏東惠明中藥行)乾燥葉片 15 kg，經研磨後秤取 13.5 kg 乾燥粉末，以 100 L 乙酸乙酯有機溶液室溫下浸泡 3 天，重複萃取 8 次，分別將有機溶劑萃取液以布氏漏斗抽氣過濾後，以減壓濃縮機在 42 °C 下濃縮移除溶劑，濃縮後之粗萃物再進行真空冷凍乾燥將水分完全抽乾，得到乙酸乙酯層，以矽膠(silica gel)分離進行柱相層析，並分別以正己烷(hexane)、乙酸乙酯(ethyl acetate)、甲醇(methanol)為溶媒進行梯度沖提分為 6 個 fraction(Td-F1、Td-F2、Td-F3、Td-F4、Td-F5、Td-F6)(圖一)，經真空冷凍乾燥將水分完全抽乾，密封存放於-20 °C 凍箱，供細胞活性試驗用。供試藥物以 DMSO 配置存放於室溫，添加於培養基中 DMSO 之最終濃度不超過 0.25%。目前於稍早實驗篩選出五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 具有抑制人類肝癌細胞 HepG2(Wild-type p53)生長，並誘導產生細胞凋亡之活性，因此僅繼續以此分劃進行不同抗癌活性試驗。

(二)、細胞培養

Hep3B 細胞培養於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培養基中。每毫升的培養基內添加 100 I.U. 青黴素 (penicillin)、100 μ g 鏈黴素(streptomycin)、2.5 μ g 防治黴 (fungizone)、2 mM 麩氨酸(L-glutamine)及 100 μ M 之非必需性氨基酸(non-essential amino acid, 包括 14.7 μ g glutamic acid, 7.5 μ g glycine, 8.9 μ g alanine, 13.3 μ g aspartic acid, 11.5 μ g proline, 15 μ g asparagine 及 10.5mg serine)，以上稱完全培養基，置於含 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中。

(三)、細胞型態觀察

在 24 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 3 × 10⁵ 細胞，培養於 5% CO₂，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予(12.5、6.25、3.125 μ g/mL)之供試藥物，給藥處理 24 小時後，以倒立顯微鏡觀察細胞型態並拍照紀錄。

(四)、細胞毒性試驗 MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide)是一種黃色的染劑，會被活細胞所吸收並經由粒線體中的 succinate dehydrogenase 還原成藍紫色的 formazan，可用來檢測細胞存活與生長變化。

在 96 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 2 × 10⁴ 細胞，培養於 5% CO₂，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予(100、50、25、12.5、6.25、3.125 μ g/mL)之供試藥物，每個劑量三重複。給藥處理 24、48 小時後，盤中留下 100 μ l 培養液，加入 25 μ L 含有 5 mg/mL MTT 溶液，放回 5% CO₂，37°C incubator 中 4 小時，移除培養液，加入 100 μ L 的 DMSO 於室溫下震盪 5 分鐘，待紫色結晶完全溶解後，在 540nm 測定吸光值，將不同處理後之吸光值扣除空白組吸光值後，帶入下列公式以求得細胞存活率 Cell viability(%)。

$$\text{Cell viability(\%)} = [\text{OD}_{540}(\text{sample}) / \text{OD}_{540}(\text{control})] \times 100\%$$

(五)、細胞週期分析

藉由細胞於不同週期DNA含量不同【G0/G1為(2N)、S為(2N~4N)、G2/M為(4N)】，當與PI螢光染劑結合其螢光強度不同，由流式細胞儀分析可測定出細胞週期，一旦經藥物處理後，細胞DNA含量於特定時期大量累積，也就判定細胞週期阻滯(cell cycle arrest)於該期，此外當細胞正處於細胞凋亡狀態，由於核酸內切酶作用DNA會斷裂，因此會有低於二倍體(2N)之DNA含量出現，也就是亞二倍體(hypodiploid)，於(G0/G1)前出現另一個峰，俗稱凋亡峰(sub-G1)。

在 24well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 3×10^5 細胞，培養於 5% CO₂，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予 Td-F2 (25、12.5、6.25、3.125 μg/mL)之供試藥物與 Silymarin(200 μg/mL)為正對照組(Santosh, et al., 2005)。給藥處理 24 小時後，將 well 內細胞液全部吸至離心管(ependorf)，若為貼附細胞需先以 trypsin-EDTA 取下。首先以 4000 rpm 離心 5 分鐘後，去除上清液以 1X PBS 清洗，加入 1mL 之絕對酒精於-20°C 作用 2 小時。再利用相同離心條件去除上清液以 1X PBS 清洗兩次，加入預先配置之 1mL PBS 溶液(內含 0.1mg/mL RNase A、0.5 % Tritone X-100)於 37°C 作用 1 小時，再加入 1mL 50μg/mL PI 於 4°C 避光 30 分鐘，接著以 1X PBS 清洗二次後，加入 200 μL 之 1X PBS 以 FACScan 流氏細胞儀(Becton Dickinson Immunocytometry Systems USA, San Jose, CA)進行分析細胞內 DNA 含量，每個處理組分析 10000 個細胞，最後以 Modfit 3.0 分析軟體分析 sub-G1 phase(apoptotic cells)與細胞週期百分比。

(六)、DNA 片段化分析

當細胞以細胞凋亡方式死亡時，由於核酸內切酶作用下，DNA 會以核小體為單位斷裂(DNA fragmentation)，經洋菜膠(agarose gel)電泳法會於膠體上呈現長度約為 180~200 base pair 或其倍數的階梯狀的片段。

在 6 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 8×10^5 細胞，培養於 5% CO₂，37 °C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予(25、12.5、6.25、3.125 μg/mL)與正對照組(Camptothecin, CPT 4.35 μg/mL)之供試藥物。給藥處理 24、48 小時後，將 well 內細胞液全部吸至離心管(ependorf)，若為貼附細胞需先以 trypsin-EDTA 取下。首先以 1,500 rpm 離心 5 分鐘，再將上清液移至新的離心管，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，兩管所取得的細胞 pellet 均以 1X PBS 沖洗一次後，加入 400μL extraction buffer(50mM, pH 8.0、Tris-HCl、10mM EDTA, pH 8.0、0.3% triton x-100)沖散並混勻於同離心管內，放置冰上作用 30 分鐘後，加入 10μL RNase A(20mg/mL)於 55°C 作用 30 分鐘後，再加入 8μL proteinase K(20mg/ml)在 55°C 作用 30 分鐘。加入等倍體積之 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 混合均勻，以 13,000 rpm 離心 30 分鐘，小心吸取上清液 300μL，並加入 1/10 倍體積的 3M NaOAc 及 2 倍體積的絕對酒精，於-20°C overnight。隔天以 13,000 rpm，4°C 離心 30 分鐘，去除上清液以 70%酒精沖洗，適度乾燥後，溶解於 12μL 0.1X TE buffer(10mM, pH8.0、Tris-HCl、1mM EDTA, pH 8.0))，利用 1.5% agarose gel(含 0.5μg/mL ethidium bromide)，以電壓 100V 進行膠

體電泳(agarose gel electrophoresis)分析，最後以凝膠成像系統(Bio-Rad Gel Doc XR Systems, USA)與 Quantity One 4.6.2 分析軟體進行觀察拍照。

(七)、細胞凋亡免疫酵素分析法

當細胞以細胞凋亡方式死亡時，由於核酸內切酶作用下，DNA 會以核小體為單位斷裂(DNA fragmentation)，因此本試驗利用原理為只抓取帶有 DNA 包覆之完整核小體之 ELISA kit 來測定。

在 96 well 的細胞培養皿(petri-dish)，種入 2×10^4 細胞，培養於 5% CO₂，37°C incubator 中，待隔夜細胞充份附著，更新培養基，同時給予(12.5、6.25、3.125、1.5625 μ g/mL)之供試藥物，每個劑量三重複。給藥處理 24 小時後，依照說明書指示，移除培養液，加入 lysis buffer 200 μ L，在室溫下反應 30 分鐘，隨後離心(200 \times g, 5 分鐘)，取上清液 20 μ L 放置有 streptavidin coated 的 microtiter plate，加入 80 μ L 的 immunoreagent(在 20 mL 的 immunoreagent 中含有 1 mL 的 Anti-DNA-POD 和 1 mL 的 Anti-histone-biotin 及 18 mL 的 incubation buffer)並以 200 rpm 的轉速震搖 2 小時，移除上清液並以 incubation buffer 清洗三次，加入 ABTS solution 100 μ L 以 250 rpm 的轉速避光震搖 10 分鐘，最後加入 Stop solution 100 μ L，再以 405nm 測定吸光值(以上 lysis buffer, immunoreagent, incubation buffer 及 ABTS solution 均為 Cell Death Cell Detection ELISA^{PLUS} kit 所附)。

(八)、統計方法

實驗所得之數據以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error of mean) 來表示。實驗組與對照組之間是否有差異以 Student's t-test 測定，當 $p < 0.05$ 時視為有統計意義。

參、結果

(一)、五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理人類肝癌細胞 Hep3B 之細胞型態影響

當細胞處理五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 24 小時後，首先人類肝癌細胞 Hep3B 是一種貼壁型細胞(adherent cell)，以顯微鏡觀察可看到(圖二-A)，於正常生長情況下，細胞結構完整呈多邊菱形，不輕易堆疊生長，為細胞最健康之狀態。從(圖二-C)可觀察到處理於濃度 3.125 μ g/mL 時，貼附細胞變形產生觸角，細胞逐漸萎縮，隨著處理濃度增加(6.25、12.5、25 μ g/mL)(圖二-D, -E, -F)，細胞逐漸萎縮死亡，並產生皺縮現象。另外處理不含藥物之 DMSO(圖二-B)細胞型態，於顯微鏡觀察下與未處理藥物之細胞(圖二-A)外觀型態相同，表示 0.25% DMSO 並不影響細胞生長。

(二)、五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 對人類肝癌細胞 Hep3B 細胞毒性之作用

將五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 配置於 DMSO 中，添加於 medium 之 DMSO 最終濃度為 0.25%，實驗中藥物作用濃度為(100、50、25、

12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。經細胞毒性試驗 MTT assay，由(圖三)實驗結果顯示隨著藥物濃度的增加細胞存活率顯著下降，百分比分別為(24 小時：98.93 \pm 2.37%、79.13 \pm 2.70%、67.25 \pm 0.82%、29.19 \pm 0.42%、7.88 \pm 0.09%、4.59 \pm 0.6%，IC₅₀ 為 15.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；48 小時：82.54 \pm 0.78%、35.56 \pm 0.51%、22.68 \pm 0.06%、15.72 \pm 0.15%、1.89 \pm 0.08%、1.60 \pm 0.01%，IC₅₀ 為 6.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外不含藥物之 DMSO 於實驗結果顯示並未影響細胞生長，其百分比(24 小時為 99.25 \pm 0.72；48 小時為 95.78 \pm 0.65%)。

(三)、以流式細胞儀分析五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理人類肝癌細胞 Hep3B 細胞週期分佈之影響

將五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理於人類肝癌細胞 Hep3B 24 小時後，由(圖四)柱狀圖可看到隨著藥物濃度的增加(3.125、6.25、12.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，G0/G1 期細胞分佈比例逐漸升高，而實驗中對照組水飛薊素(Silymarin) 為 G2/M 期細胞分佈比例增加，與前人研究結果相符(Varghese et al.,2005)。將結果量化於(圖四)得知，雖然藥物於低濃度 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對細胞毒性較低，但從細胞分佈比例與控制組比對，可發現低劑量下擾亂了細胞生長，減緩細胞生長週期速度，一旦處理於 6.25、12.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下，結果顯示與控制組相比 G0/G1 期分佈比例明顯升高(66.55~76.83~90.76)，相反的 S 與 G2/M 期比例逐漸減少，而代表細胞凋亡特徵之 sub-G1 峰，也隨著藥物劑量增加與處理時間增長，細胞凋亡比例顯著上升 (4.13~6.63~7.79~27.21)，實驗中對照組水飛薊素(Silymarin)於固定劑量 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下，處理時間 24 小時後，G2/M 期細胞分佈比例與控制組對照也明顯上升(7.71~17.62)，相反的 G0/G1 與 S 期比例減少，而細胞凋亡比例於 24 小時逐漸增加(4.13~8.58)，另外細胞處理不含藥物之 0.25% DMSO 其細胞分佈比例與控制組相近，顯示未對細胞週期造成影響。上述結果顯示五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 能使人類肝癌細胞 Hep-G2 細胞週期阻滯於 G0/G1 期(cell cycle arrest G0/G1 phase)，並誘導產生細胞凋亡。

(四)、五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理人類肝癌細胞 Hep3B DNA 片段化之作用

由(圖五-A, -B)很明顯看到，五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理於人類肝癌細胞 Hep3B 24 小時後，隨著藥物濃度增加(3.125、6.25、12.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，DNA 片段化現象越高劑量越明顯，且於長時間 48 小時處理下，較低劑量(3.125、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)也明顯有相同結果。另外實驗中正對照組喜樹鹼(3.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(圖五-C)同樣有 DNA 片段化現象，並與過去文獻相符 (Ng, et al., 2006)。

(五)、以 ELISA kit 測定五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 誘導人類肝癌細胞 Hep3B 細胞凋亡之作用

細胞經五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 以低濃度處理人類肝癌細胞 Hep3B 24 小時後，由(圖六)實驗結果顯示，隨著藥物濃度增加(1.5625、3.125、6.25、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，其 O.D 值分別為 0.48 \pm 0.07、0.95 \pm 0.00、1.62 \pm 0.18、

2.10±0.11，與控制組 O.D 值 0.44±0.07 相比，區間為 2.15~4.7 倍，顯示在低濃度 (3.125 µg/mL)藥物下也顯著的上升，產生細胞凋亡現象。另外細胞處理不含藥物之 0.25% DMSO 其 O.D 值為 0.34±0.02 與控制組相比並無顯著差異，也因此證明 0.25% DMSO 未能引起細胞凋亡現象。

肆、討論

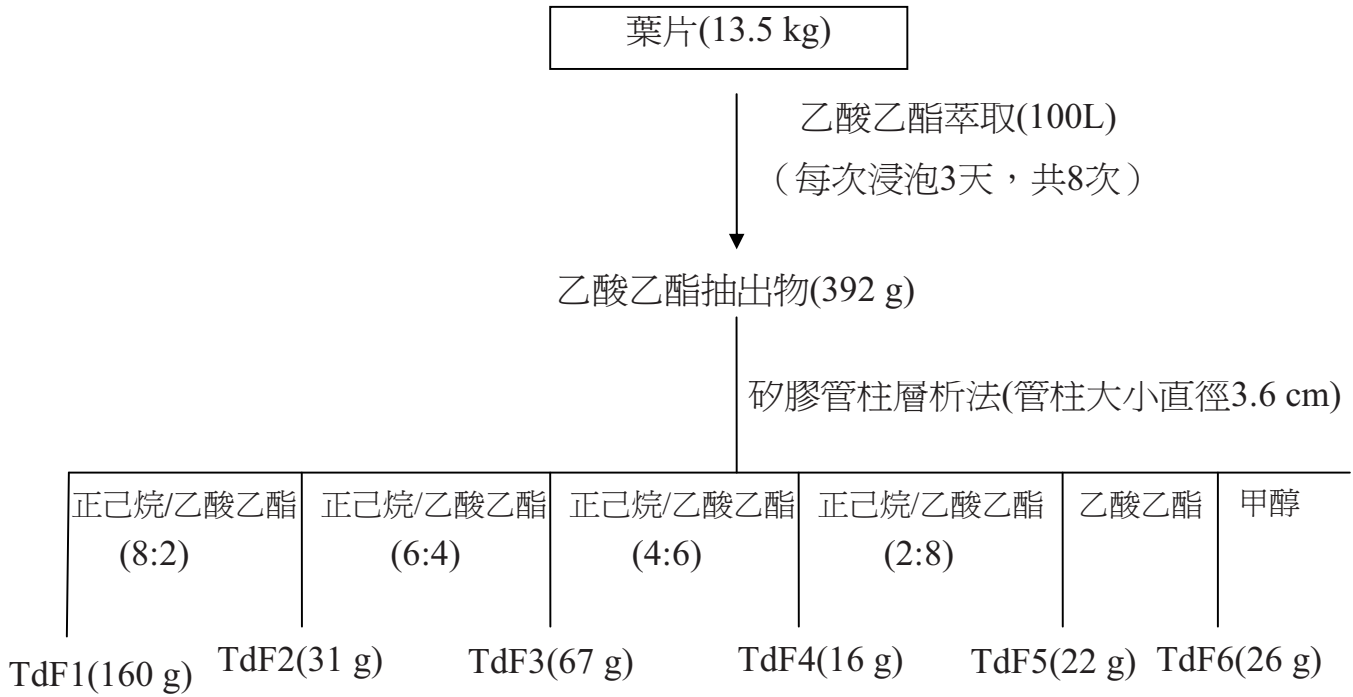
癌症的形成和 DNA 突變與缺失有著密切關係，此外肝細胞本身就帶有許多抗藥基因(Drug resistant gene)，癌化後對許多癌症化學預防劑具有抗藥性，因此降低藥物對細胞的敏感性，基於以上因素肝癌是難以醫治的疾病，研發有效治療肝癌的藥物十分重要。

將五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理於人類肝癌細胞 Hep3B，首先藉由外觀型態觀察，發現隨著藥物濃度增加，懸浮於培養基中的死亡細胞逐漸增加，細胞呈現皺縮現象，初步判定具有毒殺作用。進一步經 MTT assay 測定顯示，隨著作用濃度增加，細胞存活率逐漸減少，處理 24 小時 IC₅₀ 為 15.9 µg/mL；48 小時 IC₅₀ 為 6.3 µg/mL，具有時間與濃度依賴性抑制細胞生長。值得注意的是過去於人類肝癌細胞 HepG2 時處理 24 小時 IC₅₀ 為 6.7 µg/mL，而 48 小時 IC₅₀ 為 3.0 µg/mL，發現於人類肝癌細胞 Hep3B 抑制作用似乎變低了，也因此證明前文所述，會因 P53 的缺失，導致降低藥物對細胞的敏感性，且與過去前人研究於不同萃取物同時使用兩細胞類似結果 (Wu et al., 2001)，儘管如此，但是仍然有效的抑制細胞生長，因此繼續探討是否具有誘導產生細胞凋亡之活性。

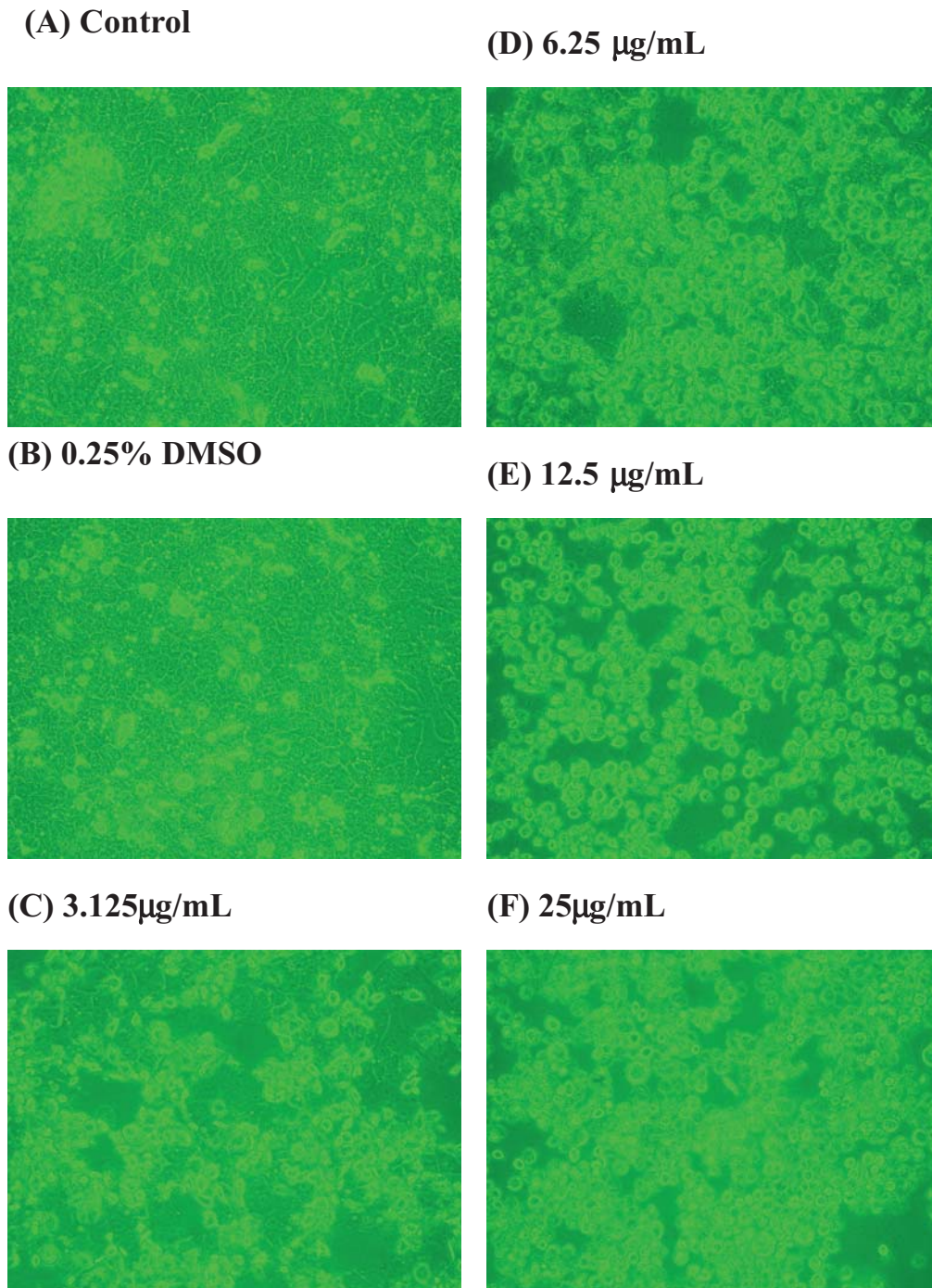
當細胞凋亡產生時，除了外觀型態上的改變外，同時會因核酸內切酶作用下，細胞 DNA 會以核小體為單位斷裂(DNA fragmentation)。經由洋菜膠電泳法與 ELISA kit 以及流式細胞儀測定證實，由(圖四、圖五、圖六)共同結果，推論五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 具有時間與濃度依賴性，有效誘導人類肝癌細胞 Hep3B 產生細胞凋亡現象。此外流式細胞儀另一項結果也得知五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 使人類肝癌細胞 Hep3B 細胞週期阻滯於 G0/G1 期(cell cycle arrest G0/G1 phase)。

綜合上述，雖然本篇未探討任何蛋白調控機制，目前已知 P53 為調控細胞週期與細胞凋亡之重要轉錄因子(King and Cidlowski ,1998)，而人類肝癌細胞 Hep3B 為 p53 缺失，因此以現有資訊判定五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 為非 p53 依賴性(p53 independent)誘導人類肝癌細胞 Hep3B 產生細胞凋亡與細胞週期阻滯之活性作用。

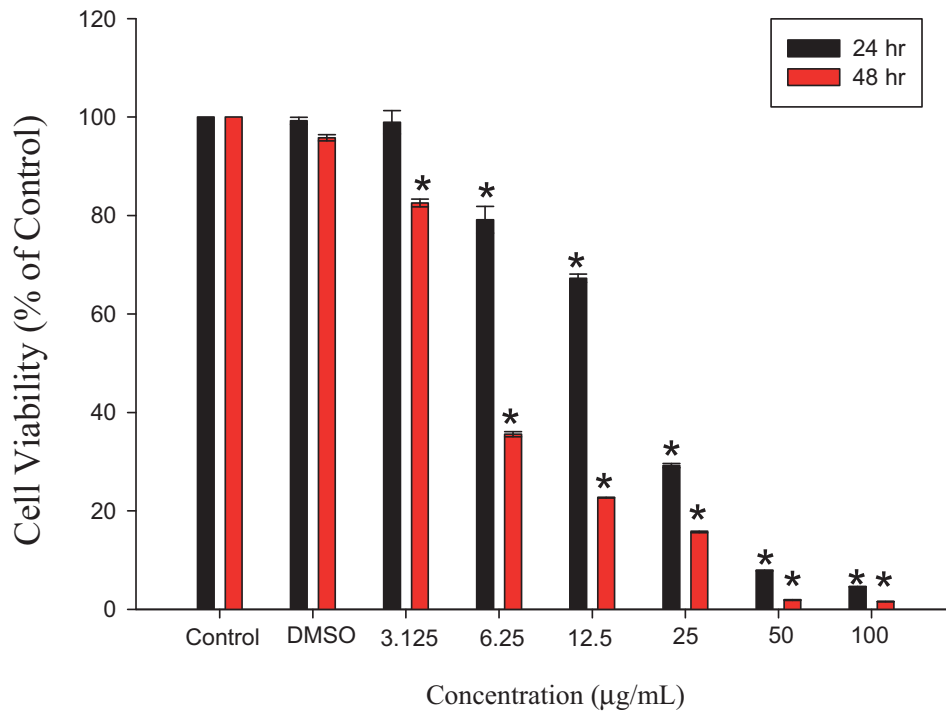
附圖



圖一、五爪金英乙酸乙酯層萃取與管柱層析法流程圖。

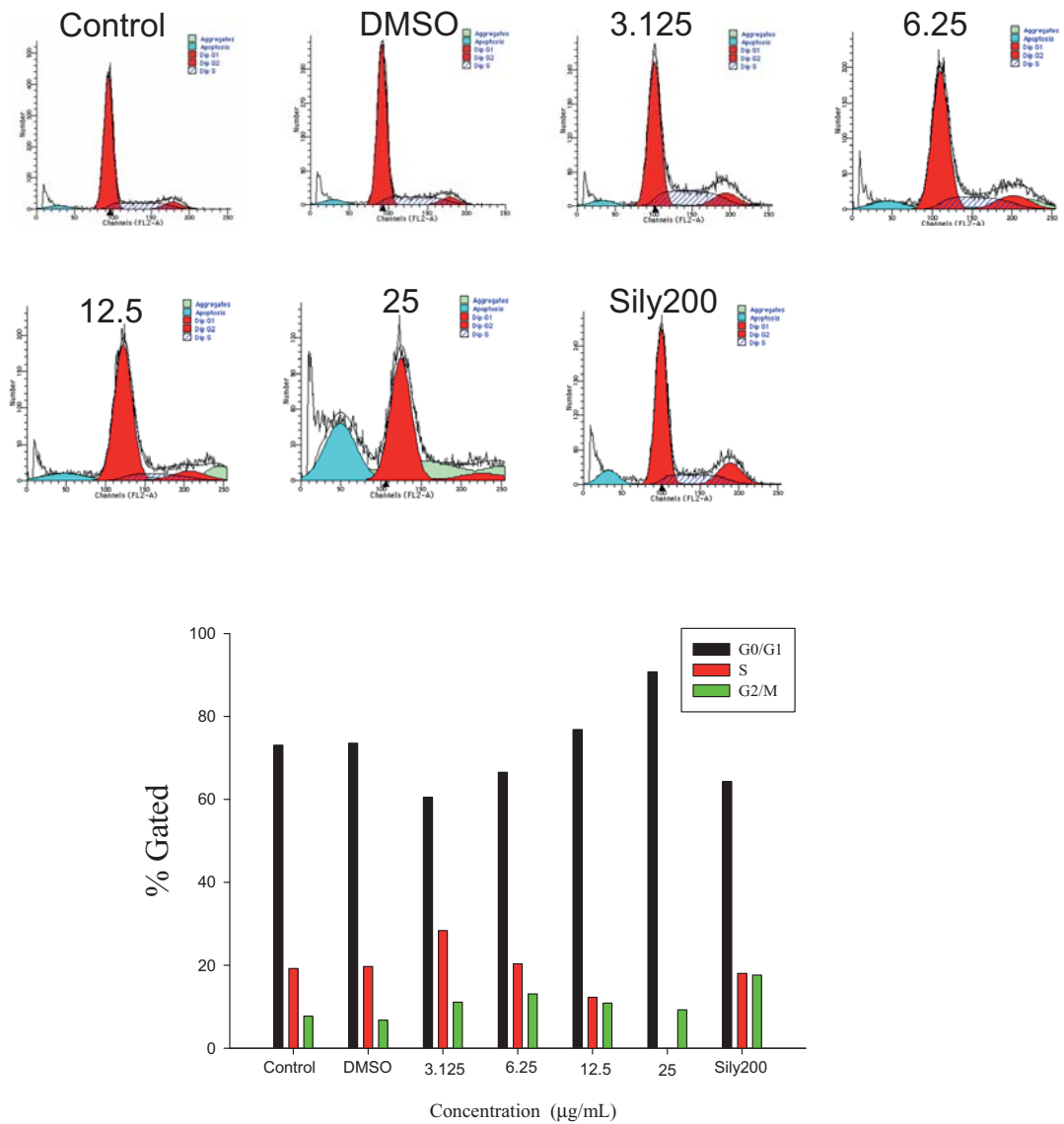


圖二、五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理人類肝癌細胞 Hep3B 之細胞型態影響。(A) Control (B) 0.25% DMSO (C) 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D) 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E) 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 顯微鏡放大倍數(400X).

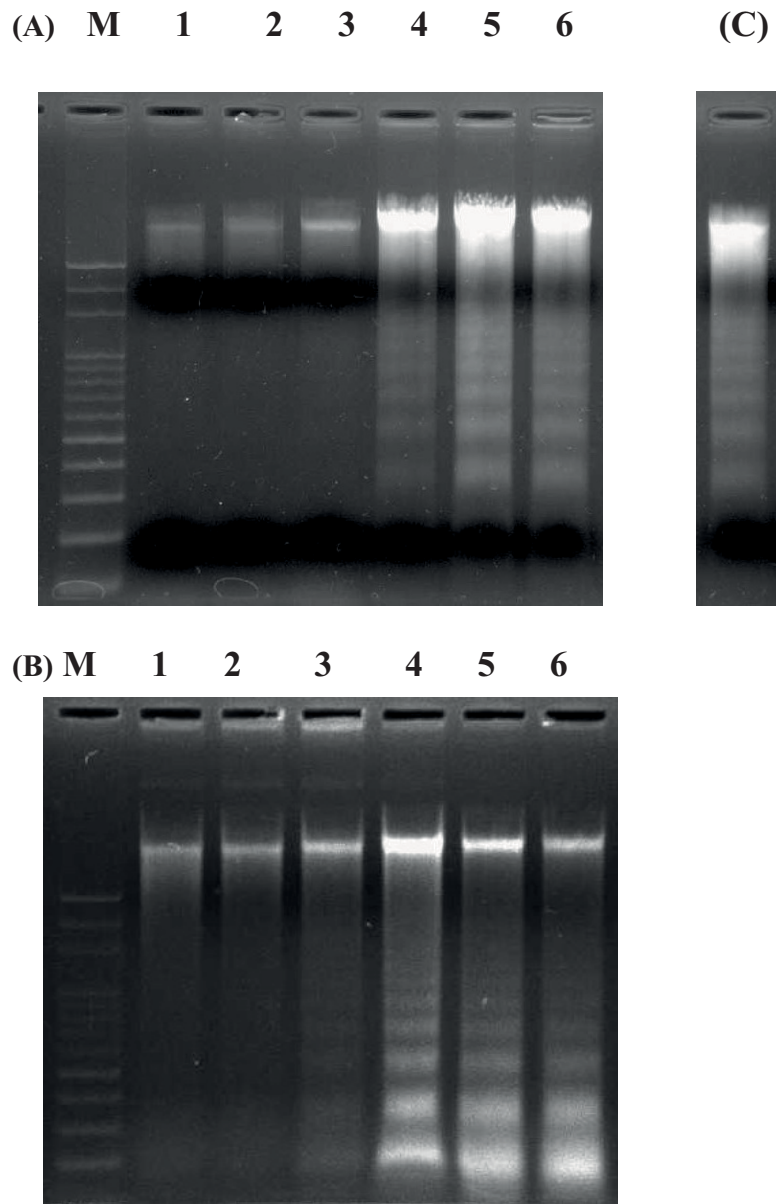


圖三、五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 對人類肝癌細胞 Hep3B 細胞毒性之作用。24 小時與 48 小時測定細胞毒性試驗 MTT，給藥濃度為 100、50、25、12.5、6.25、3.125 µg/mL。

Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

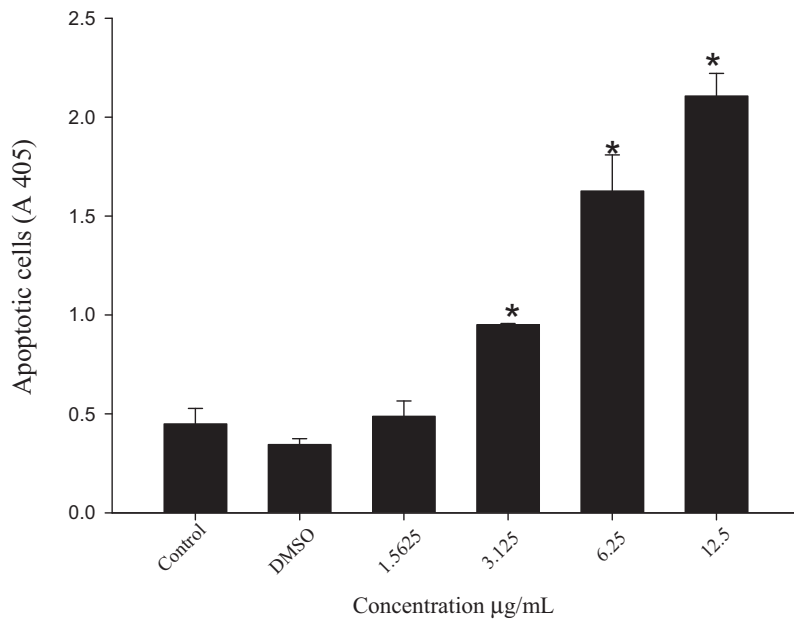


圖四、以流式細胞儀分析五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理人類肝癌細胞 Hep3B 細胞週期分佈之影響。



圖五、五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理人類肝癌細胞 Hep3B DNA 片段化之作用。

24hr(A) and 48hr(B). Lane(M) 100bp Marker ; lane(1) Control ; lane(2) DMSO ; lane(3) 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane(4) 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane (5) 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane (6) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) Camptothecin, CPT 4.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



圖六、以 ELISA kit 測定五爪金英葉部之乙酸乙酯萃取物第二分劃 Td-F2 處理 24 小時誘導人類肝癌細胞 Hep3B 細胞凋亡之作用。

Each value is mean \pm S.E. of three replicate analyses. * represents significant difference as compared with control ($P < 0.05$).

參考文獻

- 蕭千祐 (2008)。肝臟不好,護肝趁早:肝病止步101關鍵。台北:星盒子。
- Choi, C. H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 5, 1-13.
- Chiu, N., & Chang, K. (1992). The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan, *Southern Materials Center. Inc.: Taipei, Vol. 3*, p.254.
- Cos, P.H., De Bryne, T., Apers, S., Sindambiwe, J.B., Winthrow, M., et al. (2002). Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Phytomedicine*, 9, 62-68.
- Chiang, L. C., Cheng, H. Y., Chen, C. C., & Lin, C. C. (2004). *In vitro* anti-leukemic and antiviral activities of traditionally used medicinal plants in Taiwan. *Am J Chin Med*, 32, 695-704.
- Dorai, T., & Aggarwal, B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*, 215, 129-140.
- Fadeel, B. (2003). Programmed cell clearance. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2575-2585.
- Gu, J. Q., Gills, J. J., Park, E. J., Mata-Greenwood, E., Hawthorne, M. E., Axelrod, F., et al. (2002). Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. *J Nat Prod*, 65, 532-536.
- Herrera, J., Troncone, G., Sanchez, M. R., Miguel, V., & Lopez, S. E. (2007). The effect of furanoheliangolides from *Tithonia diversifolia* on superoxide anion generation in human neutrophils. *Fitoterapia*, 78, 465-469.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 9357-9360.
- Kerr, J., Wyllie, A., & Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J of Cancer*, 26, 239.
- Knowles, B. B., Howe, C. C., & Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209, 497.
- King, K., & Cidlowski, J. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology*, 60, 601.
- Kuo, Y., & CHEN, C. (1997). Diversifolol, a novel rearranged eudesmane sesquiterpene from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *Chemical &*

- Pharmaceutical Bulletin*, 45, 1223-1224.
- Kuo, Y. H., & Chen, C. H. (1998). Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *J Nat Prod*, 61, 827-828.
- Kuroda, M., Yokosuka, A., Kobayashi, R., Jitsuno, M., Kando, H., Nosaka, K., et al. (2007). Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 55, 1240-1244.
- Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., & Housman, D. E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74, 957-967.
- Lin, C., Lin, M., & Lin, J. (1993). The antiinflammatory and liver protective effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray and *Dicliptera chinensis* Juss. extracts in rats. *Phytotherapy Research*, 7, 305-309.
- Miura, T., Nosaka, K., Ishii, H., & Ishida, T. (2005). Antidiabetic effect of Nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 28, 2152-2154.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256, 12-18.
- Ng, L., Chiang, L., Lin, Y., & Lin, C. (2006). Antiproliferative and apoptotic effects of tetrandrine on different human hepatoma cell lines. *The American journal of Chinese medicine*, 34, 125.
- Owoyele, V. B., Wuraola, C. O., Soladoye, A. O., & Olaleye, S. B. (2004). Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *J Ethnopharmacol*, 90, 317-321.
- Oyewole, I., Ibidapo, C., Moronkola, D., Oduola, A., Adeoye, G., & Anyasor, G. (2008). Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 2, 171-175.
- Park, Y. H., Kim, J. A., Baek, J. H., Jung, E. J., Kim, T. H., Suh, H., et al. (1997). Induction of apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells by a novel derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA). *Archives of Pharmacal Research*, 20, 29-33.
- Pang, R., & Poon, R. T. P. (2006). Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*, 242, 151-167.
- Puisieux, A., Galvin, K., Troalen, F., Bressac, B., Marcais, C., Galun, E., et al. (1993). Retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in human hepatoma cell lines. *The FASEB journal*, 7, 1407.
-

- Ragasa, C., Tempora, M., & Rideout, J. (2008). Terpenoids from *Tithonia diversifolia*. *J of Research in Science, Computing and Engineering*, 4, 1-7.
- Santosh, K. Katiyar., Anshu, M. Roy., & Manjeshwar, S. Baliga. (2005). Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 207-216.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., & Vlietinck, A. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J of Ethnopharmacology*, 61, 57-65.
- Varghese, L., Agarwal, C., Tyagi, A., Singh, R. P., & Agarwal, R. (2005). Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research*, 11, 8441.
- Wall, M. E., & Wani, M. C. (1996). Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J of Ethnopharmacology*, 51, 239-254.
- Wu, T.S., Shi, L.S., Kow, P.C., Lew, Y.L., Liou, M.J., et al. (2001). Cytotoxic principles from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *Chinese Pharmaceutical J.* 53, 217-223.

A Td-F2 Extract from *Tithonia diversifolia* Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis on Hep3B Human Hepatoma Cells

Min-Ren Lu*, Meng-Shiou Lee**, Hsi-Jien Chen***, Yu-Jen Wu****,

Ray-Ling Huang*****

Abstract

Tithonia diversifolia belongs to the family of *Compositae*. The whole plant of *Tithonia diversifolia* has long been applied to the traditional folk medicine for the treatment of various liver disease, and is believed to be effective in relieving heat and body toxins. In recent years, there are only several reports confirming its effects on hepatoprotective, anti-inflammatory, and anti-cancer activities. However, researches are lacking for the exact anti-cancer mechanisms of *Tithonia diversifolia* on hepatoma. We had previously shown that the ethyl acetate extract from leaves of *Tithonia diversifolia* indeed indicated significant cytotoxicity effects on the human hepatoma cell HepG2 (Wild-type p53) and induced apoptosis. In this study, we used the human hepatoma cell Hep3B (P53 deletion) to assay the anti-tumor effect of the extracts from *Tithonia diversifolia*. Our results showed the effective fraction of the Fraction-2(Td-F2) inhibited the tumor cell growth ($IC_{50} = 15.9\mu\text{g/mL}$ at 24 hour and $IC_{50} = 6.3\mu\text{g/mL}$ at 48 hour) in a time and concentration-dependent manner. Moreover, we further analyzed the DNA fragmentation by gel electrophoresis, cell cycle by flow cytometry, and apoptosis by ELISA method. The results clearly showed that Td-F2 indeed induced cell cycle arrest and apoptosis on Hep3B cell.

Key words: *Tithonia diversifolia*, Apoptosis, Cell cycle, Hepatoma.

* Graduate student, Dept. Life Science, National Taitung University.

** Assistant Professor, School of Chinese Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine Resources, China Medical University

*** Associate Professor, Dept. Safety, Health and Environmental Engineering, Mingchi University of Technology

**** Assistant Professor, Dept. Beauty Science, Meiho University

***** Associate Professor, Dept. Biological Science and Technology, Meiho University (Corresponding authors)
