

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

以薑黃素做為口腔癌化學預防與治療藥物之潛力及其作用 機轉之研究(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-119-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院臨床牙醫研究所

計畫主持人：郭彥彬

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 5 月 18 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

以薑黃素做為口腔癌化學預防與治療藥物之潛力及
其作用機轉之研究(2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2314-B-002-119

執行期間：92年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：郭彥彬

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告

執行單位：國立臺灣大學醫學院臨床牙醫研究所

中 華 民 國 93 年 5 月 10 日

中文摘要

薑黃素(curcumin，化學名 diferuloylmethane)，自薑黃(*Curcuma longa*)的根莖萃取而來，是鬱金粉(turmeric)及咖哩(curry)中主要黃色的成分。薑黃素具有抗氧化、抗發炎，及抗癌的效果。近年來的研究指出，食用薑黃素的小鼠和大鼠可減少皮膚、直腸、口腔致癌物處理而引起癌瘤形成的機率。故薑黃素具有做為口腔癌抗癌藥物的潛力。

本研究在探討薑黃素對人類口腔癌細胞株 SAS 及 Ca9-22 所造成的影響。我們發現，薑黃素可以抑制人類口腔癌細胞株的生長，且其抑制具有劑量依賴性(dose-dependent)。藉由 western blot 發現，薑黃素可以減少人類口腔癌細胞株表皮生長因子受器 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 的含量，可能是其抑制人類口腔癌細胞株生長的一個抑制機轉。但是薑黃素並不能夠抑制口腔癌細胞株 EGFR 的酪氨酸激酶受器(Receptor tyrosine kinas, RTK) 活性。

藉由流式細胞儀分析細胞的 DNA 含量發現，薑黃素會造成 SAS 及 Ca9-22 皆停滯在 G2/M 期。而 Hoechst 33258 染色、TUNEL 標定、DNA 片段，及 PARP 的活化等，證實薑黃素可引起人類口腔癌鱗狀細胞癌細胞的細胞凋亡。

另外，在 p53 野生型的 SAS 細胞株中，薑黃素的處理會促使 p53 蛋白在細胞核中表現，而 p53 的下游基因如 p21^{CIP1/WAF1} 和 Bax 也有隨著薑黃素處理的時間有增加的趨勢。不同於過去的研究，我們發現薑黃素會誘使人類口腔鱗狀細胞癌細胞 NF-κB 活性的增加。本研究也首先發現，薑黃素處理 SAS 細胞株會造成 PKR (ds RNA-activated protein kinase)有隨作用時間增加而呈現正相關的現象。或許 PKR 在薑黃素對人類口腔鱗狀細胞癌所造成的細胞凋亡機轉中也扮演了一個重要的角色。

薑黃素，屬於多酚類化合物，萃取自薑黃(俗稱鬱金 (Turmeric) ，學名 *Curcuma longa* Lin) 的根莖，是鬱金粉、芥菜及咖哩中主要的黃色成分。在印度及亞洲應用超過 6000 年以上。日本人愛吃的醃黃蘿蔔就是用薑黃粉著色的。薑黃素亦被用來當作消炎藥，本草：「鬱金，味辛微苦，無毒；能健胃利膽、行氣活血、保肝健腎，祛風去濕」。近幾年在薑黃素抗癌功能的探討上有許多研究報告，老鼠的皮膚實驗證實，表面塗抹薑黃素可抑制由 benzo(a)pyrene 及 DMBA 引起的皮膚癌(Huang et al., 1988)。Korutla(1995) 等人指出**薑黃素能夠抑制人類表皮樣癌 A431 細胞株的 EGFR 相關的 RTK 活性及自我磷酸化**，因而得以抑制人類表皮樣癌 A431 細胞株的生長。Hong 等人指出薑黃素除了能夠抑制乳癌細胞株 p185^{neu} 的 RTK 活性外，並能減少乳癌細胞株 p185^{neu} 的含量，因而得以抑制乳癌細胞株的生長。所以薑黃素具有做為口腔癌抗癌藥物的潛力。**但薑黃素是否能抑制口腔癌細胞生長，EGFR-, p185^{neu}-RTK，則尚未見報告**。其他研究報告指出，食用薑黃素的小鼠和大鼠可減少 BP 引發的胃癌、azoxymethane 引發的直腸癌(Huang et al., 1994; Rao et al., 1995)、DMBA 引發的口腔癌 (Krishnaswamy et al., 1998)，但對 BP 及 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)- 1-butanone 引起的肺癌則沒作用 (Hecht et al., 1999)。最近的臨床實驗發現，口服薑黃素 8,000 mg/day 三個月後，2/7 (28%) 口腔白斑症病人可以改善其組織學型態 (Cheng et al., 2001)，但其作用機轉為何，則並不清楚。對於對於**是否可以預防口腔癌再發，也不清楚**。

近幾年研究指出細胞凋亡(apoptosis)作用參與在許多抗癌藥物誘導的細胞死亡過程中，如 cisplatin、camptothecin、amsacrine、或 etoposide (Holm et al., 1994; Eischen et al., 1997)。而越來越多的證據顯示，抗癌藥物對於癌細胞的毒殺效果，決定於該藥引起細胞凋亡的效率(efficiency) (Villunger et al., 1997)。相反的，腫瘤促進劑(promoter) 的抗凋亡作用，使得正常狀況下原本應該發生的細胞凋亡作用被抑制，而讓前腫瘤細胞 (pre-neoplastic cells) 有機會繼續存活，進而在日後形成真正癌組織，而為其促癌作用的重要機轉 (Shibata et al., 1996)。

薑黃素可引起某些癌細胞株，例如人類直腸癌細胞 HT-29，人類白血病細胞，人類肝癌細胞 Hep G2，人類皮膚基底癌細胞及人類腎癌細胞 293 等的凋亡 (Jiang et al., 1996; Jee et al., 2001)，其現象包括細胞收縮、染色質集中及 DNA 斷裂成階梯狀等。**但是在正常細胞 (如人類及老鼠纖維母細胞，大白鼠肝細胞)，薑黃素卻不能引起細胞凋亡**。以薑黃素所誘發的人類皮膚基底癌細胞凋亡，是經由 p53-dependent 路徑引起細胞凋亡 (Jee et al., 2001)。另外，薑黃素的處理不但會促使 p53 蛋白在細胞核中大量表現，也會增加 p53 蛋白與 DNA 結合的能力，而 p53 的下游基因如 p21cip 或 Gadd45 等與 p53 也有相似變化趨勢，會隨著薑黃素處理的時間有增加的趨勢。但是以薑黃素處理人類黑色素細胞癌會引起細胞凋亡，細胞內 p53 蛋白卻沒有增加，走的是 p53-independent- Fas Receptor/ Caspase- 8 Pathway (Bush et al., 2001)。而以薑黃素處理直腸癌細胞及 B cell lymphoma，會引起細胞凋亡，p53 蛋白反而會減少 (Chen et al., 1996; Han et al., 1999)。因此在薑黃素引起的細胞凋亡中所扮演的角色，似乎是 cell type-specific。但是薑黃素是否能在口腔癌細胞中產

生細胞凋亡，則尚未見報告。

本計畫擬在口腔癌細胞株中加入薑黃素，觀察薑黃素是否可對口腔癌細胞株造成細胞凋亡及瞭解薑黃素造成口腔癌細胞細胞凋亡的機制。

實驗結果

一、薑黃素誘導人類口腔鱗狀細胞癌細胞之生長抑制

先前的研究已發現，薑黃素(curcumin)對不同種類的細胞株產生的細胞毒性不盡相同，如薑黃素對人類血癌細胞 HL-6 的半致死劑量為 20 μM (Kuo *et al.*, 1996)，但是對人類肝癌細胞 Hep3B、HepG2 及人類皮膚基底癌細胞卻需要將薑黃素濃度提高至 50 μM 才足以殺死半數的癌細胞(Jiang *et al.*, 1996；Kuo *et al.*, 1998)。另外在人類表皮樣癌細胞株 A431，薑黃素也可造成劑量及時間依賴性的生長抑制情形(Korutla and Kumar, 1994)。本實驗中利用 MTS tetrazolium assay，來檢測細胞的存活率。數據顯示，隨著薑黃素劑量的增加，會降低人類口腔鱗狀細胞癌細胞的細胞增生與存活；人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 及 Ca9-22，以薑黃素處理 24 小時的半致死劑量(IC₅₀, 50% inhibitory concentration)分別為 30、20 μM (圖一)。

二、薑黃素可減少人類口腔癌細胞株表皮生長因子受器 (EGFR) 的含量

Korutla (1995) 等人指出薑黃素能夠抑制人類表皮樣癌 A431 細胞株的 EGFR 相關的 RTK 活性及自我磷酸化，因而得以抑制人類表皮樣癌 A431 細胞株的生長。Hong 等人指出薑黃素除了能夠抑制乳癌細胞株 p185^{neu} 的 RTK 活性外，並能減少乳癌細胞株 p185^{neu} 的含量，因而得以抑制乳癌細胞株的生長。為了解薑黃素是否可以減少人類口腔癌細胞株 EGFR 的含量，於是分別以 10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM 、50 μM 的薑黃素處理 SAS 口腔癌細胞株。結果發現，薑黃素可以減少 SAS 細胞株表皮生長因子受器 EGFR 的含量(圖二 A)，EGFR 的減少可能是其抑制人類口腔癌細胞株生長的一個抑制機轉。但是薑黃素並不能夠抑制口腔癌細胞株 EGFR 的酪氨酸激酶受器(Receptor tyrosine kinas, RTK) 活性 (圖二 B)。

二、薑黃素誘導人類口腔鱗狀細胞癌細胞之細胞週期遲滯

為了釐清薑黃素對人類口腔鱗狀細胞癌細胞所造成的生長抑制情形，於是以薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 及 Ca9-22，並且利用流式細胞儀分析細胞週期。結果顯示，人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 以 30 μM 薑黃素處理 24 小時之後，G2/M phase 從 38.31%增加至 65.00%，而 G0/G1 phase 從 43.74%降至 14.25% (圖三)。而另一人類口腔鱗狀細胞癌細胞 Ca9-22，以 20 μM 薑黃素處理 24 小時之後，G2/M phase 則從 27.14%增加至 59.16%，G0/G1 phase 從 52.60%降至 16.66% (圖三)。薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 及 Ca9-22 皆造成細胞週期遲滯在 G2/M phase，對於 S phase 並無顯著的影響。此外，薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 48 小時後，也造成 sub-G1 的明顯增加，亦即 DNA 異倍體(hypodiploid DNA)含量的增加。DNA 異倍體的出現，是細胞凋亡時，DNA 斷裂，而在流式細胞光度計上呈現 sub-G1 的特徵。

三、薑黃素誘導人類口腔鱗狀細胞癌細胞之 DNA 發生斷裂

爲了解薑黃素對於人類口腔鱗狀細胞癌細胞所引發的細胞死亡是壞死(necrosis)或凋亡(apoptosis)方式，於是分別以 30 μM 、20 μM 的薑黃素處理 SAS 及 Ca9-22，經 0、12、24、48 小時後，萃取其 genomic DNA，並利用 DNA 瓊膠電泳方式鑑定之。結果顯示(圖四)，隨處理薑黃素的時間增加，有越來越明顯的階梯狀小片段 DNA 產生。這是因細胞凋亡過程的最後階段，發生在細胞核內的 DNA 降解，降解後產生的 DNA 片段由 185-200 bp 多聚體組成，於是在瓊脂凝膠上呈現特徵性凋亡梯型(DNA ladder)。因此可以確定，薑黃素引起人類口腔鱗狀細胞癌細胞死亡的方式爲程式性細胞死亡。

四、薑黃素誘導人類口腔鱗狀細胞癌細胞進行細胞凋亡

研究指出，薑黃素(30 μM)可誘導許多腫瘤細胞株產生細胞凋亡(apoptosis) (Jiang *et al.*, 1996)。

細胞凋亡時，細胞會萎縮、細胞膜皺褶，但粒線體及胞膜均保持完整，染色質會開始濃縮，並斷裂成幾片。在細胞凋亡的晚期，DNA 被內源性核酸內切酶(endogenous endonuclease)降解，產生帶有 3'-OH 末端的 DNA 片段，在末端去氧核糖核苷酸轉移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)介導下，使標有螢光素(flurescein)的核酸連接到 DNA 片段的 3'-OH 末端。最後胞膜會將各種胞器及染色質破片包成一顆顆的凋亡小體(apoptotic body)。分別以 30、20 μM 薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 及 Ca9-22，經 12 小時後以 TUNEL 染色，藉由螢光顯微鏡觀察並拍照(microscopy)。結果顯示(圖五)，薑黃素會造成人類口腔鱗狀細胞癌細胞株產生細胞膜皺縮、染色質濃染、凋亡小體等現。另外，以 30 μM 薑黃素處理 SAS 細胞株，經 36 小時後以 Hoechst 33258 染色，同樣藉由螢光顯微鏡觀察並拍照，也觀察到核濃染、凋亡小體等現象產生。由此更可確定，薑黃素引起人類口腔鱗狀細胞癌細胞死亡的方式爲程式性細胞死亡。

研究指出真核細胞的細胞核中，廣泛存在一種與 DNA 修復(DNA repair)機轉有關的酵素，稱之爲腺核糖二磷酸聚合酶(poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) (Benjamin and Gill, 1980)。當執行細胞凋亡的 Caspase-3 被活化之後，會開始切割其他的蛋白質。當凋亡活化以後，PARP 蛋白質會被切割成分子量約爲 24 KDa 及 89 KDa 的兩個片段；24 KDa 片段具有與 DNA 結合的能力，89 KDa 片段則具有自我修復及催化的兩種功能(Gu *et al.*, 1995)。而在細胞凋亡機轉中，PARP 的活化是一個重要的標記。於是分別以 30、20 μM 之薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS 及 Ca9-22，經 0、12、24、48 小時，利用西方點墨法偵測 PARP 蛋白質含量的表現。結果顯示(圖六)，薑黃素在處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 24 小時後，89 KDa 的片段明顯增加。由此更可說明，薑黃素會對人類口腔鱗狀細胞癌細胞造成程式性細胞死亡(圖六)。

五、薑黃素增加 p53 蛋白的表現

在各種不同刺激物所誘導的細胞凋亡過程中，p53 蛋白普遍參與這些反應，而且扮演著重要的角色(Barley *et al.*, 1998；Allan *et al.*, 1998)。因此，想了解薑黃素對於人

類口腔鱗狀細胞癌細胞所誘發的訊息傳遞路徑中，p53 是否參與在其中。

於是，利用西方點墨法來觀察 p53 蛋白質變化的情形。以 30 μ M 薑黃素處理 p53 野生型(wild type)之人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS，結果顯示薑黃素處理 12 小時之後，p53 蛋白質量明顯增加，一直到 48 小時左右到達高峰(圖七)。然而，以 20 μ M 薑黃素處理 p53 突變型(mutant type)之人類口腔鱗狀細胞癌細胞 Ca9-22，p53 蛋白質在 0、12、24、48 小時皆無顯著的變化(圖七)。薑黃素在 p53 野生型的細胞株 SAS 會誘發 p53 蛋白質量的大量表現；由此推測，薑黃素對人類口腔鱗狀細胞癌細胞可能藉由 p53 路徑而造成細胞凋亡。

六、薑黃素誘使 p53 下游基因 p21^{CIP/WAF-1} 及 Bax 的表現

因為 p21^{CIP/WAF-1} 及 Bax 皆為 p53 的下游基因，為了解 p53 蛋白在 p53 野生型之人類口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 的生物功能變化，針對這兩個下游基因的變化來作進一步確定。於是，利用西方點墨法來偵測 p21^{CIP/WAF-1} 及 Bax 的蛋白質量變化情形。以 30 μ M 薑黃素處理 SAS，結果顯示在薑黃素處理 12 小時後，p21、Bax 這兩種蛋白質量都有明顯增加的情形，而 Bax 的蛋白質量到 48 小時達高峰(圖七)。依上述結果發現，薑黃素處理 p53 野生型的細胞株 SAS 不僅會增加 p53 的表現量，對於 p53 的下游基因 p21^{CIP/WAF-1} 及 Bax 也同樣具有誘導其表現的能力。

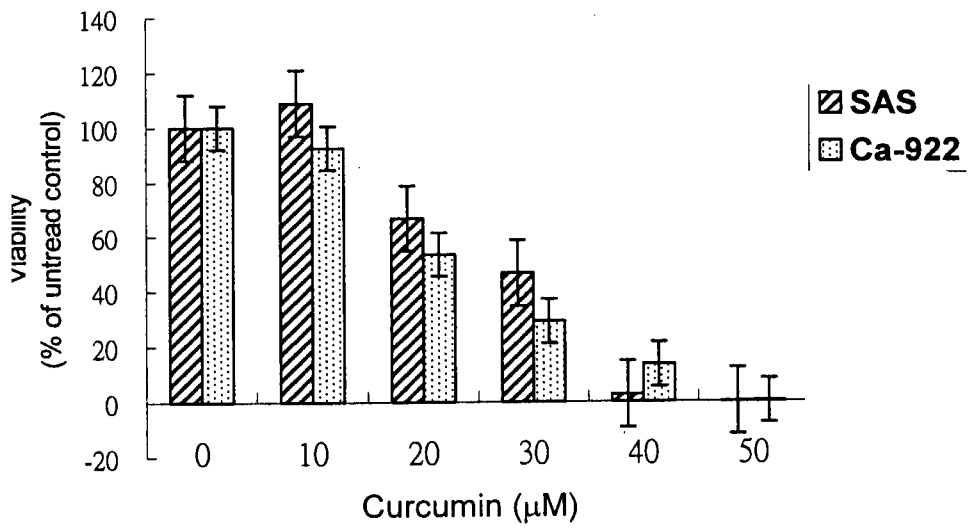
七、薑黃素對 p53 上游基因 NF- κ B 的影響

過去研究指出，NF- κ B (Nuclear factor-*kappa* B)可以透過活化 p53 基因而誘使細胞計畫性的死亡(Kevin *et al.*, 2000)。但其他研究表示，薑黃素會抑制 NF- κ B 的活化 (Surh *et al.*, 2001; Bremner and Heinrich, 2002)。為了進一步研究薑黃素於此次實驗中，在促使 p53 增加並非透過 NF- κ B 參與，因此利用 NF- κ B 轉錄子活性分析(NF- κ B trans-activation assay)來偵測薑黃素對人類口腔癌細胞的影響。而結果顯示，以 30 μ M 薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞癌細胞 SAS，經 0、12、24、36 小時後，發現螢火蟲冷光酵素與水母冷光酵素的比值(Firefly/Renilla Luciferase)有增加趨勢。冷光酵素活性測定(Luciferase activity assay)結果顯示(圖十一)，薑黃素處理 36 小時與對照組之比較轉染具 NF- κ B 結合位而影響轉錄活性增加約 2.0 倍。由此可以說明，薑黃素會誘使人類口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 的 NF- κ B 活性增加，進而可能活化 p53 蛋白質而造成程式性細胞死亡。

八、薑黃素對 p53 上游基因 PKR 的影響

一些研究發現，PKR (double-strand RNA-activated protein kinase)可藉由調節 I κ B kinase (IKK) complex 的活性而刺激轉錄因子 NF- κ B 的表現，但並非受到 PKR 本身酵素活性(kinase activity)的影響(Marion *et al.*, 2000)。因此利用西方點墨法來偵測 PKR 的蛋白質量變化情形。在以 30 μ M 薑黃素處理人類口腔鱗狀細胞 SAS，經 12 小時後，PKR 蛋白質量有明顯增加的情形，而 PKR 的蛋白質量到 48 小時達高峰。由此實驗結果發現(圖九)，薑黃素在人類口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 可能藉由增加 PKR 的表現，進一步造成程式性細胞死亡。

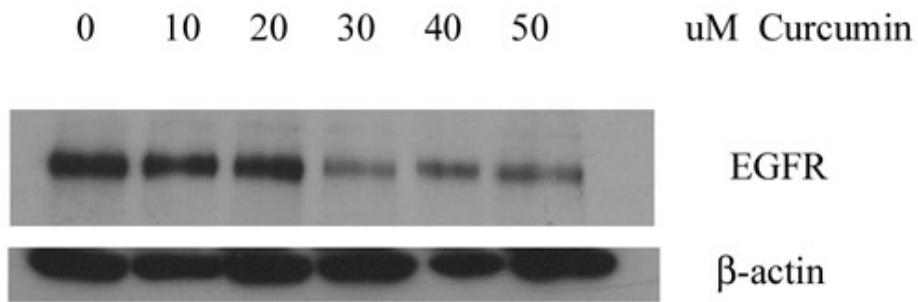
Growth Inhibition Assay



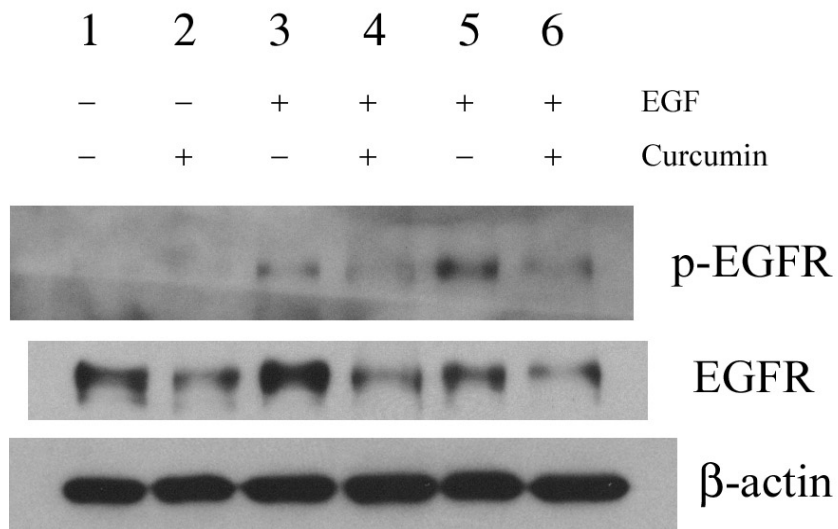
圖一 薑黃素誘導人類口腔鱗狀細胞癌細胞之生長抑制

以 0、10、20、30、40、50 μM curcumin 處理 SAS、Ca9-22 細胞 24 小時，利用 MTS tetrazolium assay，來檢測細胞的存活率。

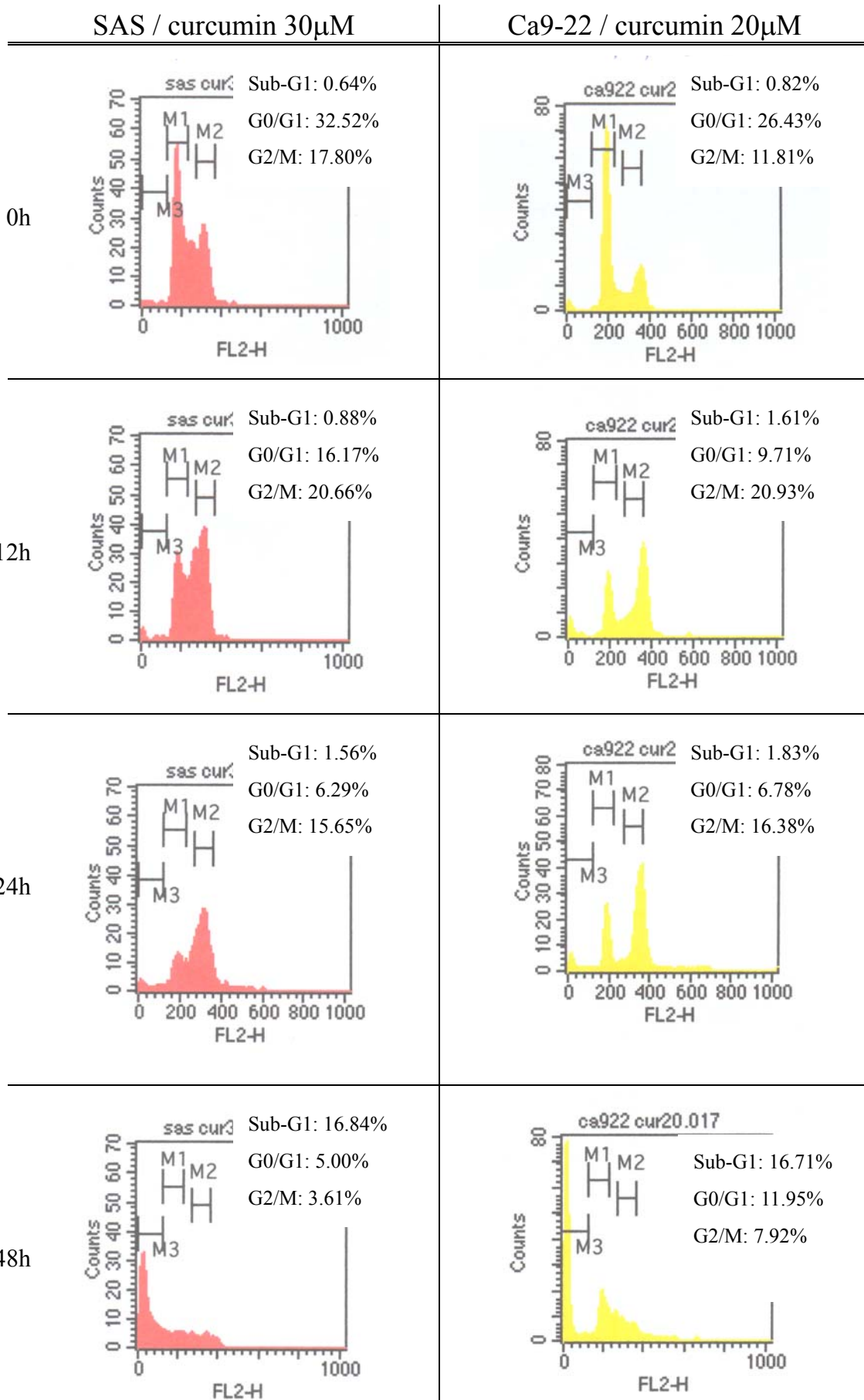
A



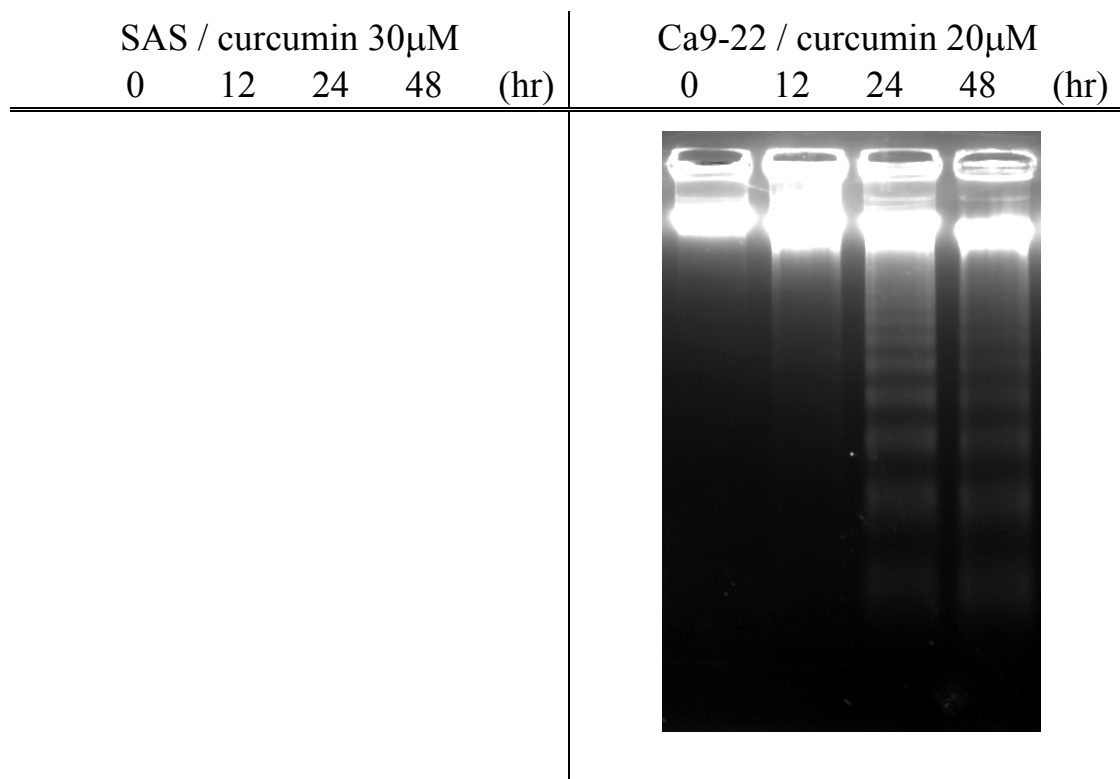
B



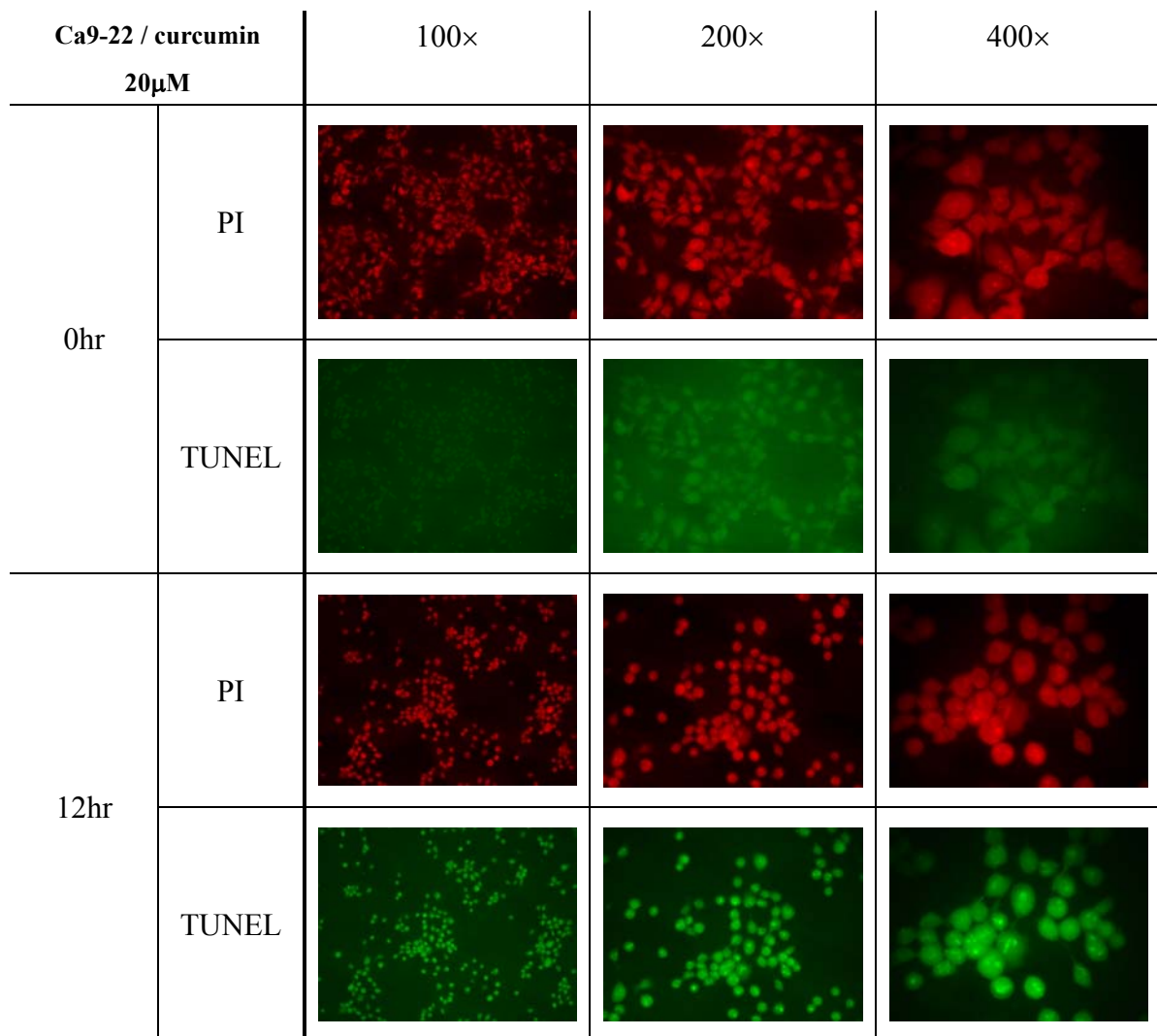
圖二、(A) 薑黃素可以減少 SAS 細胞株表皮生長因子受器 EGFR 的含量。(B) 薑黃素並不能夠抑制口腔癌細胞株 EGFR 的酪氨酸激酶受器(Receptor tyrosine kinase, RTK) 活性。



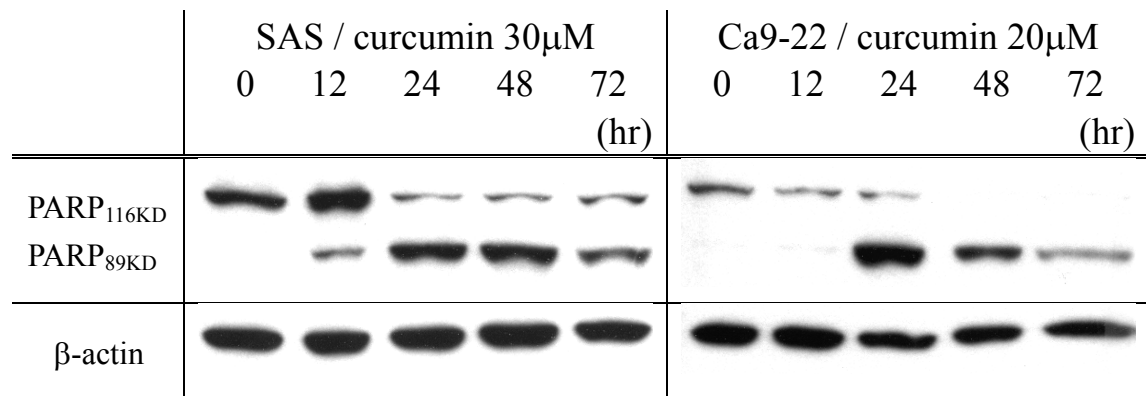
圖三. 流式細胞儀分析薑黃素處理後 SAS、Ca9-22 細胞的 DNA 含量組成
 6.6×10^5 個細胞處理 curcumin 後，依照不同時間點收集細胞，再以流式細胞儀定量之。



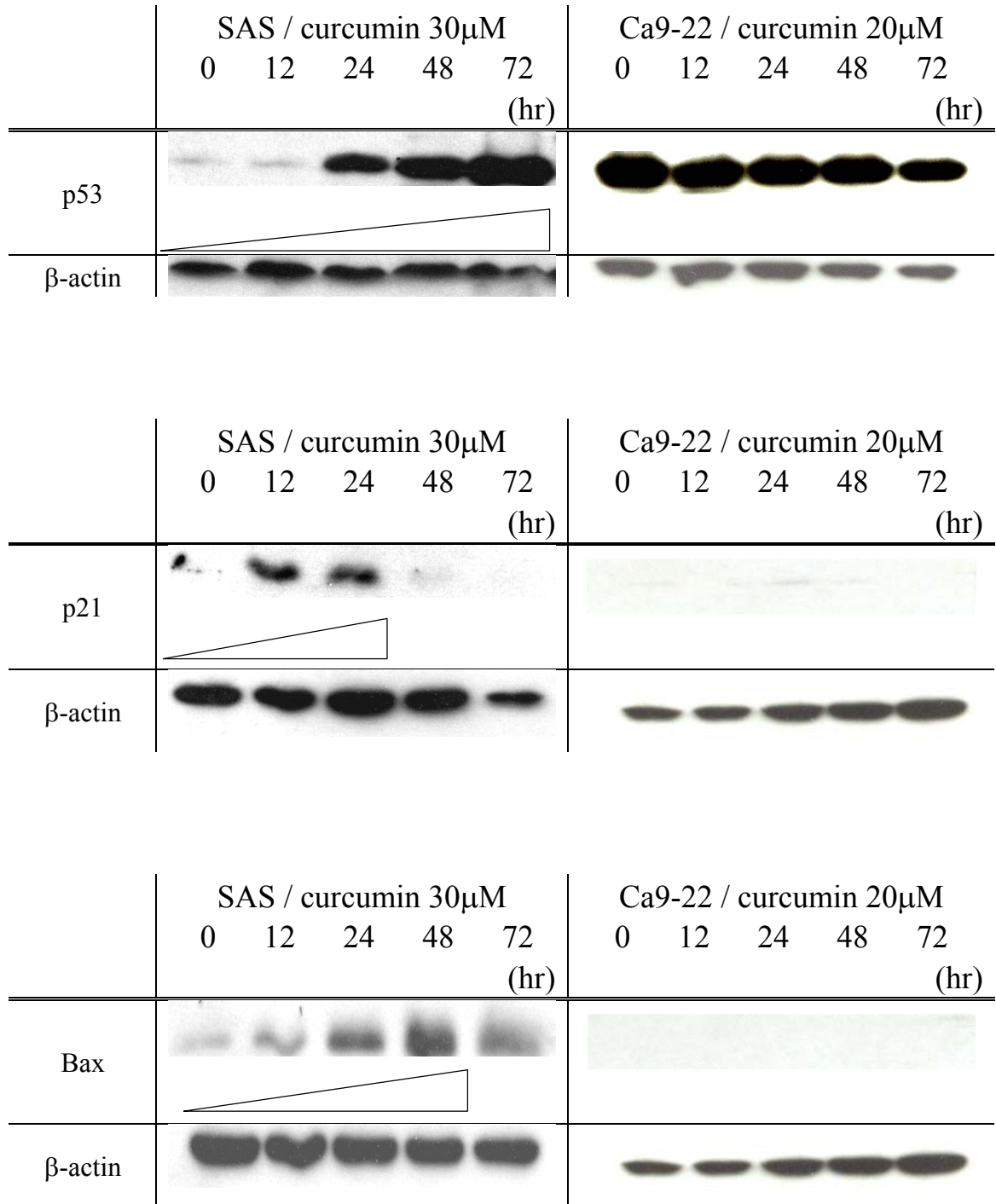
圖四. 薑黃素促使 SAS、Ca9-22 細胞核內之 DNA 斷裂
 分別以 30 μ M、20 μ M curcumin 處理 SAS、Ca9-22 細胞 0 到 48 小時，
 在不同時間點收集細胞並抽取 DNA，之後以 2%的瓊脂進行電泳分析，
 並以 EtBr 染色拍照。



圖五. 以薑黃素處理 Ca9-22 細胞的 TUNEL stain
 以 20 μ M 處理 Ca9-22 細胞 0、12hr 後，染 TUNEL stain，並以
 螢光顯微鏡拍照。



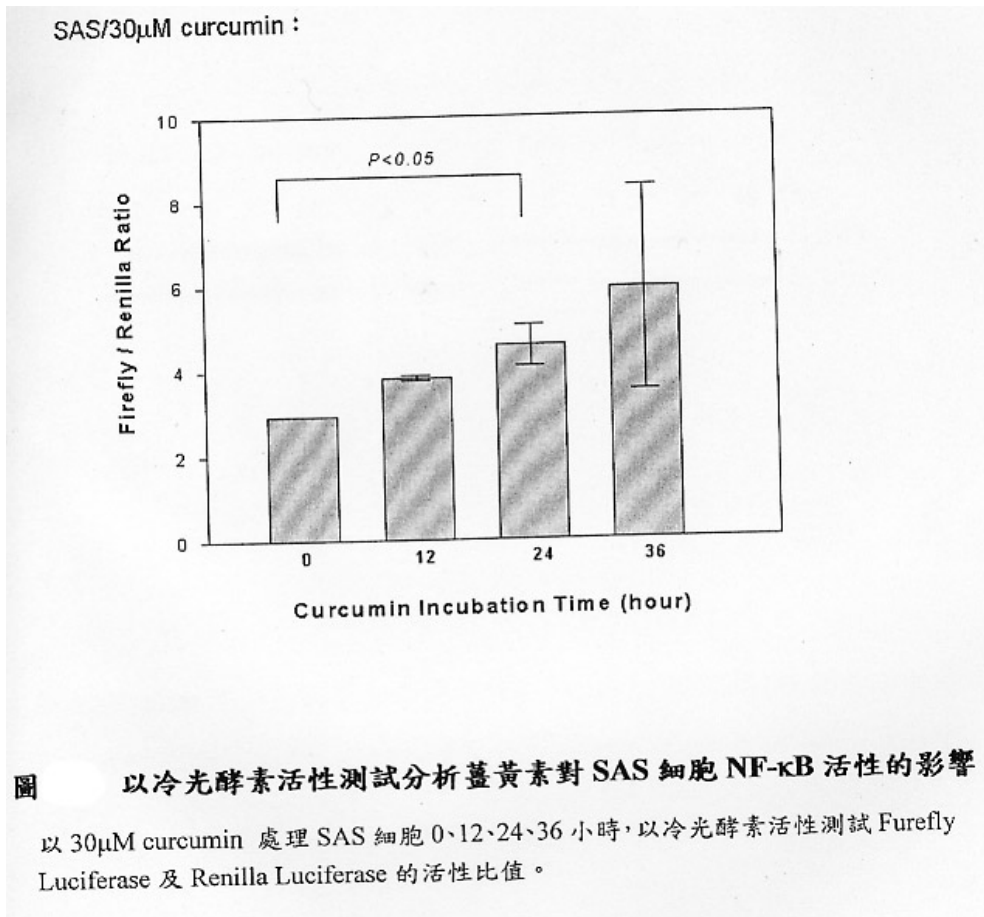
圖六. 薑黃素促使 SAS、Ca9-22 細胞產生 PARP 斷裂
分別以 30 μ M、20 μ M curcumin 處理 SAS、Ca9-22 細胞 0 到 72 小時，
在不同時間點收集細胞，利用 RIPA 溶液萃取後，將蛋白質萃取液與
pAb PARP 進行免疫反應，最後利用西方點墨法偵測之； β -actin 為實驗
控制組。

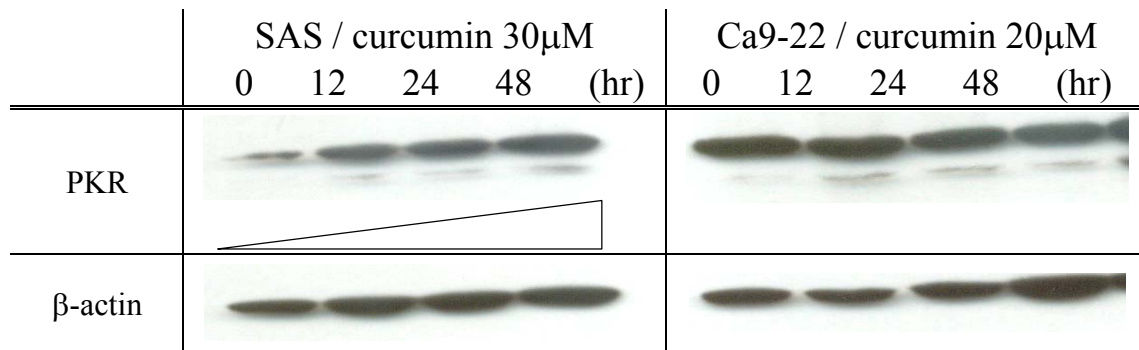


圖七 西方點墨法偵測薑黃素處理 SAS、Ca9-22 細胞的蛋白質質量變化

分別以 30 μ M、20 μ M curcumin 處理 SAS、Ca9-22 細胞 0 到 72 小時，在不同時間點收集細胞，利用 RIPA 溶液萃取後，將蛋白質萃取液分別與 mAb p53、mAb p21、mAb Bax 進行免疫反應，最後利用西方點墨法偵測之； β -actin 為實驗控制組。

圖 八





圖九 西方點墨法偵測薑黃素處理 SAS、Ca9-22 細胞的蛋白質量變化

分別以 30 μ M、20 μ M curcumin 處理 SAS、Ca9-22 細胞 0 到 48 小時，在不同時間點收集細胞，利用 RIPA 溶液萃取後，將蛋白質萃取液分別與 mAb PKR 進行免疫反應，最後利用西方點墨法偵測之； β -actin 為實驗控制組。