

黃耆皂苷IV (astragaloside IV) 對人類大腸癌細胞株 (HT-29) 細胞增殖和基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase) 基因表現的影響

陳光偉¹ 蘇進成² 林昭庚¹

¹中國醫藥大學中醫學院中國醫學研究所

²中國醫藥大學附設醫院外科部

台中，台灣

(2005年2月24日受理，2005年9月13日接受刊載)

惡性腫瘤是國人十大死亡原因的首位，大腸癌躍居癌症死亡的第三位。有文獻報導大腸癌的復發或轉移和基質金屬蛋白酶 MMP-2、MMP-7 和 MMP-9 的過度表達有正相關。黃耆皂苷 IV (astragaloside IV) 是黃耆之主要成分。本研究結果發現黃耆皂苷 IV 在濃度 10~100 ng/mL 作用 12~48 小時皆可促進人類大腸癌 HT-29 細胞株的生長，尤其在 50 ng/mL 時更明顯。研究結果亦發現 MMP-2 mRNA 在黃耆皂苷 IV 濃度 10 及 20 ng/mL 時有明顯表達，但在濃度 50~100 ng/mL 時則有抑制的作用。黃耆皂苷 IV 在濃度 20~100 ng/mL 時 TIMP-1 mRNA 有明顯表達，而 MMP-7、MMP-9 及 TIMP-2 皆沒有表達。

關鍵詞：黃耆皂苷 IV，大腸癌細胞株，基質金屬蛋白酶基因表現。

前 言

細胞外基質 (Extra cellular Matrix) 主要由膠原蛋白、彈性蛋白、糖蛋白和蛋白多糖 4 種組成分子組成，不同組織器官，各種組成成分比例不同¹。這些結構的降解有利于腫瘤細胞的侵襲與轉移。當腫瘤細胞從原發腫瘤分離脫落，必須降解細胞外基質，穿透原發腫瘤周邊的宿主結締組織才能進入血管系統²。基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase, MMPs) 降解細胞外基質及基底膜，促進了惡性腫瘤的侵襲與轉移。基質金屬蛋白酶組織內的抑制劑 (Tissues inhibitors of metalloproteinase, TIMPs) 家族是多基因編碼的蛋白，TIMP-1 可與活化的間質膠原酶、活化的基質溶解素酶和 MMP-3 形成 1:1 的複合體；TIMP2 可以 1:1

的非共價鍵形式與活化的 MMP-2 形成複合物，有效地抑制 MMP-2 的膠原分解活性，與 TIMP-1 不同的是 TIMP-2 既能調解無活性的 MMP-2 膠原，又能結合激活狀態下的 MMP-2，而且可以終止 MMPs 家族所有成員的水解活性，TIMP-1 可以抑制 MMP-9 的活性，大量研究表明，腫瘤細胞分泌 MMPs 能降解，可促進腫瘤的浸潤與轉移，其中最重要的是 MMP-2、MMP-9 用特異性抑制因子，TIMP-1 和 TIMP-2 抑制 MMPs 活性或阻止其分泌能在體外阻止腫瘤細胞的浸潤，因此腫瘤的浸潤與轉移中細胞外基質的降解是 MMPs 及其 TIMPs 不平衡的結果^{3,4}。文獻指出 TIMPs 及 MMPs 目前已知是由癌細胞所製造，並非移至巨噬細胞、單核球、體纖維細胞等，而是受控於數個調控因子引起自體、周圍和隨血液循環到其他組織和器官中 (autocrine, paracrine, endocrine) 而這些調控因子有些卻來自於致癌環境中^{5,6}。

黃耆源自豆科植物之膜莢黃耆 *Astragalus membranaceus* Bunge 及內蒙黃耆 *A. mongholicus* Bunge 之根，別名：北耆。《本草綱目》又名「黃耆」。李時珍曰：「老，長也，黃耆色黃為補藥之長故名」。臺灣則稱為「青耆」、「晉耆」、「蜜耆」(以蜂蜜蜜炙者)。性甘，微溫，歸入脾、肺經。能固表，止汗，補氣升陽，利水消腫。有興奮神經，利尿，降壓，抗腎炎，並有保護肝臟，強壯，抗菌等作用⁷。

黃耆含有多種化學成分，而黃耆皂苷IV (astragaloside IV) 常用來做為定量分析之標計⁸。現代藥理作用研究文獻指出，黃耆有調節免疫，抗腫瘤等作用。能使人體血中 IgM、IgE 顯著增加，促進動物體內抗體合成，增強免疫功能⁹。黃耆被証實可同時提升癌症病患在化學或放射治療後的白血球、紅血球和血小板，因而使病患提升免疫力，改善體質和生活品質，被認為是輔助化學療法的抗癌輔助劑¹⁰⁻¹²。本研究希望能探討黃耆皂苷IV對人類大腸癌細胞株細胞增殖和基質金屬蛋白酶基因表現的影響，作為醫護人員對大腸癌病人服用含黃耆中藥的參考。

材料與方法

一、材料

人類大腸癌 HT-29 細胞株，購自新竹食品工業發展研究所。黃耆皂苷IV，Fluka Biochemika 74777 1 mg > 98% (TLC)，化學式為 $C_{41}H_{68}O_{14}$ ，購自建宏層析企業公司。MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 primer 由基因銀行找到序列，委託明欣生物科技公司合成。CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (購自 Promega corporation U.S.A.)，TRIzol Reagent, Total RNA 轉 cDNA 及 PCR 試劑盒 Reverse Transcription system (購自 Promega corporation U.S.A.)，Gene TagDNA polymerase (購自伯森公司，台灣)。PCR 機型 Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapore)。酵素免疫分析儀連線軟體 (REVELATION) (DYNEX TECHNOLOGIES)。培養液：Minimum Essential medium M.E.M. (購自 Hyclone Cat. No. SH30008.01)。

二、方法

(一)活細胞的測定

HT-29 以每 well 2×10^4 cells 種植入 96 well plate 培養 24 小時，然後分別加入不同濃度 (10, 20, 50, 100 ng/mL) 的黃耆皂苷IV，而控制組不加入黃耆皂苷IV，接著放入於 37 °C，5% CO₂ 培養箱中培養不同的

時段 12、24、48 小時。然後加入 CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent，再培養 2 小時，再利用酵素免疫分析儀，用 490 nm 來測量，加以分析比較，可得知其細胞增殖的相對比例。

(二)MMPs；TIMPs 在大腸癌 HT-29 細胞株的表現有否受黃耆皂苷IV的影響

抽取培養 24 小時有無加入不同濃度 (10, 20, 50, 100 ng/mL) 的黃耆皂苷IV的 HT-29 total RNA，依據 TRIzol Reagent 的 protocol 處理。抽取出來的 Total RNA (1 µg), 0.5 µg oligo (dT)₁₅ primer, dNTP mixture 10 mM 和含有 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 的滅菌去離子水混和均勻，放入微離心管，其總體積為 20 µl。接著將全部的混和物以 70 °C，5 分鐘加熱，後冷卻 4 °C，5 分鐘。其反轉錄出來的產物可來當作 PCR 的模板。當放大目標 cDNA 時，他的所有產物總體積為 25 µl，內含有：25 mM MgCl₂、10 mM dNTP mix、10 µmoles primer (如下所列 primer)，這些 primer 設計來自於基因銀行。Primer 的序列如下：這些 primer 設計來自於基因銀行。Primer 的序列如下：

MMP-2 : Forward ; TGCGGTTTTCTCGAATCCAT Reverse ; GGAGTCCGTCCTTACCGTCAA ,
MMP-7 : Forward ; CCAAATAGCCCAAATGGACTTC , Reverse ; CTTTGCCCCACATGTTTAAAGC ,
MMP-9 Forward ; AGACCTGGGCAGATTCCAAAC , Reverse ; GAAGGCGCGGGCAAA
TIMP-1 : Forward ; TGTTGGCTGTGAGGAATGCA , Reverse ; CTGGTCCGTCCACAAGCAAT ,
TIMP-2 ; Forward ; ACCCGCAACAGGCGTTT Reverse ; GATAGGGTTGCCATAAATGTCGTT。接下來按照試劑盒的步驟操作 (Total RNA 轉 cDNA 及 PCR 試劑盒, Promega corporation U.S.A)。概略敘述如下：先變性，在 94 °C，2 分鐘，然後在 94 °C，1 分鐘，58 °C，1 分鐘，72 °C，1 分鐘，如此 35 個循環，72 °C，10 分鐘，然後在 4 °C 的環境下保存，若要長久須保存貯藏在 -20 °C 備用。RT-PCR 產物用 1.5% agarose gel 電泳，100 伏特 45 分鐘，然後在紫外光下顯影照相。

(三)統計分析 (statistical analysis)

所有細胞增殖的相對比例資料，於此報告中以大於三次以上獨立的實驗後，以平均值加減標準差 (mean ± SD) 來表示。統計誤差以 Student's *t*-test，其 *p* 值設在 *p* < 0.05 時有顯著意義。

結 果

人類大腸癌 HT-29 細胞株以 2×10^4 細胞/per well 分別加入濃度為 10、20、50、100 ng/mL 黃耆皂苷 IV，經 12 小時培養，用 ELISA 定量分析，在不同濃度的黃耆皂苷IV中 HT-29 細胞株之細胞數分別為對照組的 1.28 ± 0.02 、 1.43 ± 0.08 、 1.31 ± 0.12 、 1.02 ± 0.03 倍。經 24 小時培養，分別為對照組的 1.15 ± 0.02 、 1.13 ± 0.01 、 1.09 ± 0.06 、 0.95 ± 0.03 倍。經 48 小時培養，分別為對照組的 0.89 ± 0.03 、 0.98 ± 0.08 、 1.80 ± 0.09 、 1.18 ± 0.13 倍 (圖 1)。

HT-29 細胞株 以 1×10^5 細胞/per well 分別加入濃度為 10、20、50、100 ng/mL 黃耆皂苷IV經 24 小時培養，抽取 total RNA，以 β -actin 當做內生性對照，經 RT-PCR 後，RT-PCR 產物分別用 1.5% agarose gel 電泳 (100 伏特 45 分鐘)，電泳後，在紫外光下顯影照相。 β -actin 在不同濃度的黃耆皂苷IV中，結果皆有明顯表達。MMP-2 mRNA 在黃耆皂苷IV濃度 10 ng/mL，20 ng/mL 時有明顯表達，其餘濃度皆沒有表

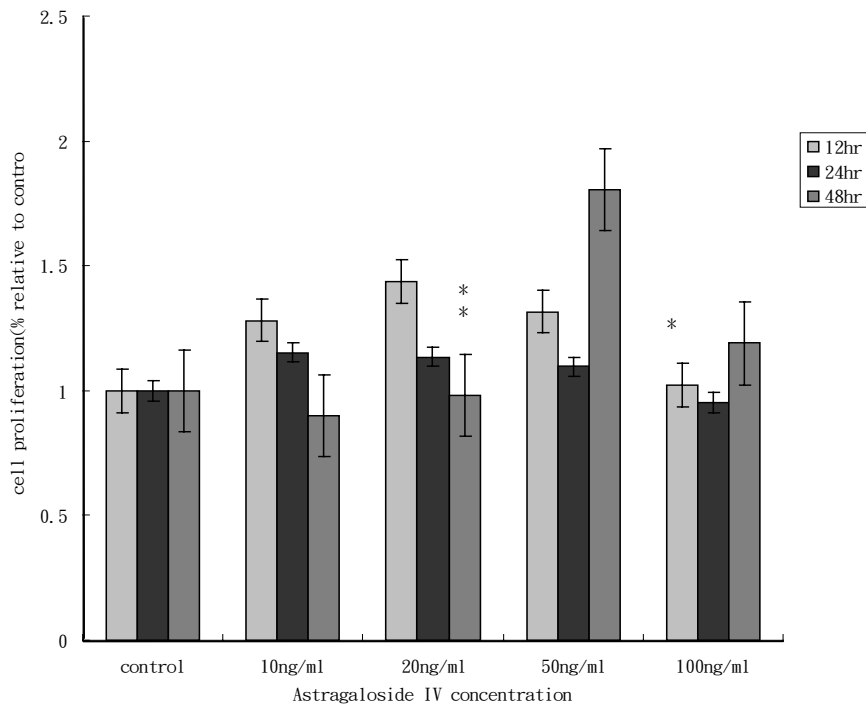


圖 1：HT-29 1×10^5 細胞/per well 分別加入濃度為 10, 20, 50, 100 ng/mL 黃耆皂苷IV經 12, 24, 48 小時培養，用 ELISA 定量分析，經 12 小時培養，在不同濃度的黃耆皂苷IV中 HT-29 細胞株之細胞數分別為對照組的 1.28 ± 0.02 , 1.43 ± 0.08 , 1.31 ± 0.12 , 1.02 ± 0.03 倍。經 24 小時培養，在不同濃度的黃耆皂苷IV中 HT-29 細胞株之細胞數分別為對照組的 1.15 ± 0.02 , 1.13 ± 0.01 , 1.09 ± 0.06 , 0.95 ± 0.03 倍。經 48 小時培養，在不同濃度的黃耆皂苷IV中，HT-29 細胞株之細胞數分別為對照組的 0.89 ± 0.03 , 0.98 ± 0.08 , 1.80 ± 0.09 , 1.18 ± 0.13 倍。
*經 12 小時培養，濃度為 100 ng/mL 時和對照組的 t-test, p 值為 0.356，大於 0.05 不顯著。
**經 48 小時培養，濃度為 20 ng/mL 時和對照組的 t-test, p 值為 0.698 大於 0.05 不顯著。
其餘和對照組的 t-test, p 值皆小於 0.05 皆達顯著。

達。TIMP-1 mRNA 在黃耆皂苷IV濃度 20、50、100 ng/mL 時有明顯表達，其餘濃度皆沒有表達。其餘 MMP-7 mRNA, MMP-9 mRNA, TIMP-2 mRNA, 在不同濃度 (10, 20, 50, 100 ng/mL) 的黃耆皂苷IV中，皆沒有表達 (圖 2)。

討 論

黃耆是民間常用的保健及養生藥物，也是藥膳之一，常用來改善體質，達到補益脾胃、提高免疫功能的效果。並且有文獻報導在癌症化療同時用含黃耆中藥，可增強胸腺細胞功能及延長存活率¹³。很多大腸癌病人在手術及化療後，都會直接用黃耆煮魚、肉食用或服用含黃耆中藥，臨床上可見大腸癌不久即復發或轉移，有文獻報導大腸癌的復發或轉移和基質金屬蛋白酶 MMP-2、MMP-7、MMP-9 的過度表達有正相關¹⁴⁻¹⁷。

本研究結果發現黃耆皂苷IV在 10~100 ng/mL 濃度作用 12 小時可幫助人類大腸癌 HT-29 細胞株生長，在作用 24 小時也可幫助 HT-29 細胞株生長，在作用 48 小時也可上升 HT-29 細胞株生長，尤其在 50 ng/mL

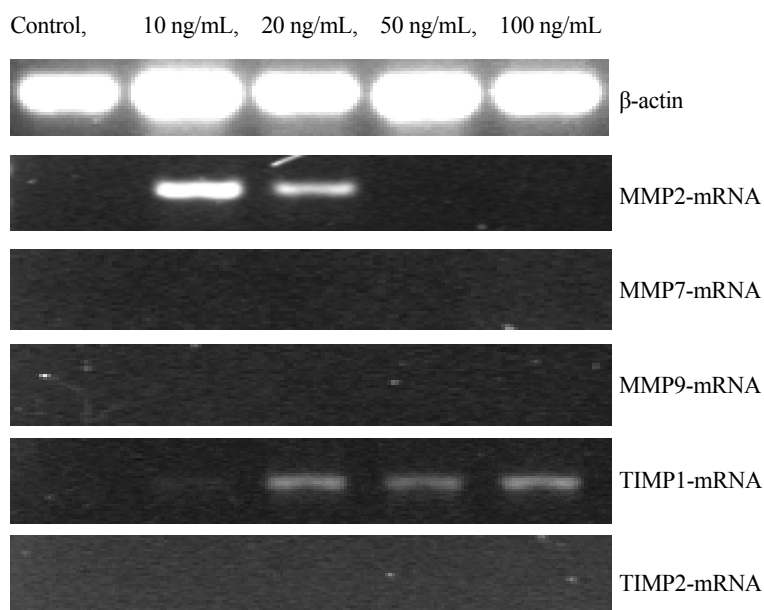


圖 2：人類大腸癌細胞株 (HT-29) 1×10^5 細胞/per well 分別加入濃度為 10, 20, 50, 100 ng/mL 黃耆皂苷IV，經 24 小時培養，抽取 total RNA，以 β -actin 當做內生性對照，經 RT-PCR 後，RT-PCR 產物用 1.5% agarose gel 電泳，100 伏特 45 分鐘，在紫外光下顯影照相。結果發現 MMP2-mRNA 在黃耆皂苷IV濃度 10 ng, 20 ng 時有明顯表達。TIMP1-mRNA 在黃耆皂苷IV濃度 20 ng, 50 ng, 100 ng 時有明顯表達。MMP7-mRNA, MMP9-mRNA, TIMP2-mRNA 在黃耆皂苷IV濃度 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng 時皆不見有明顯表達。

時更明顯。研究結果發現黃耆皂苷IV對 HT-29 細胞株中基質金屬蛋白酶 MMP-7、MMP-9、TIMP2-mRNA 基因表達並沒有影響，但可使 MMP2-mRNA 過度表達。MMP2-mRNA 過度表達，可促進癌細胞轉移的能力。是否可進一步推測認定，黃耆皂苷IV可促進癌細胞轉移的能力。所以大腸癌手術後服用含黃耆中藥，是否也會促進癌細胞的增殖跟轉移，是還須有更進一步的臨床研究，來解開這個疑慮。

致 謝

黃耆皂苷IV由中國醫藥大學陳悅生教授購買轉贈。

參考文獻

1. Yurchenco PD, Schittny JC: Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4: 1577-1590, 1990.
2. Fidler IJ: Molecular biology of cancer: Invasion and metastasis, in DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (ed. 5). Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, pp 135-152, 1997.
3. Chambers AF, Matrisian LM: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270, 1997.

4. Koop S, Khokha R, Schmidt EE, et al: Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res* 54: 4791-4797, 1994.
5. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2: 163-176, 2002.
6. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11: S37-S43, 2002.
7. 黃瑞東, 黃耆成分及藥理作用, 生藥資訊 (ROC) April. 4: 34-44, 1996.
8. Xia Q, Ma Q, Shi JA, Duan, Tina TX, Dong, Karl WK. Tsim: Chemical analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4861-4866, 2002.
9. 賴榮祥, 各種黃耆及其相關藥製劑之應用, 生藥資訊 (ROC) 4: 25-33, 1996.
10. Zou YH, Liu XM. Effect of astragalus injection combined with chemotherapy on quality of life in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jiangmen Central Hospital, in Chinese.* 23: 733-5, 2003.
11. Mao SP, Cheng KL, Zhou YF. Modulatory effect of Astragalus membranaceus on Th1/Th2 cytokine in patients with herpes simplex keratitis. [Article in Chinese] *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 24: 121-123, 2004.
12. Wei H, Sun R, Xiao W, Feng J, Zhen C, Xu X, Tian Z. Traditional Chinese medicine Astragalus reverses predominance of Th2 cytokines and their up-stream transcript factors in lung cancer patients. *Oncol Rep.* 10: 1507-12, 2003.
13. Sun Y, Hersh E, Lee S, McLaughlin M, Loo T, Mavligit G. Preliminary observations on the effects of the Chinese medicinal herbs Astragalus membranaceus and Ligustrum lucidum on lymphocyte blastogenic response. *J. Biol. Response Mod.* 2: 227-237, 1983.
14. Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell. A: Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin. Exp Metastasis.* 11: 183-189, 1993.
15. Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (72 kd type iv collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J. Pathol.* 180: 283-289, 1996.
16. Murray GI, Duncan ME, Oneil P, Melvin WT, Fothergill JE: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat.Med.* 2: 461-462, 1996.
17. Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N, Yamaguchi S, Masui H, Hasegawa S. Detection of regional lymph node metastases in colon cancer by using RT-PCR for matrix metalloproteinase-7, matrilysin. *Clin Exp Metastasis* 16: 3-8, 1998.

THE EFFECTS OF ASTRAGALOSIDE IV ON THE CELL PROLIFERATION AND MATRIX METALLOPROTEINASE MESSENGER RNA EXPRESSION OF THE HUMAN COLON CANCER CELL LINE (HT-29)

Guan-Wei Chen¹, Chin-Cheng Su² and Jaung-Geng Lin¹

¹Chinese Medical research institute, China Medical University

²Division of Digestion Surgery, China Medical University Hospital
Taichung, Taiwan

(Received 24th February 2005, accepted 13th September 2005)

Malignant tumor (cancer) is the most important disease of the top ten causes of death in Taiwan. Among cancer types, colon cancer is the third most common cause of cancer-related mortality. The metastases and recurrent rate of colon cancer was correlated with the mRNA level of Matrix Metalloproteinase (MMP). *Astragaloside IV* is one of the important constituents of Huang-qi. In the present study, our results showed that the cell proliferation rate of HT-29 was stimulated by treatment with *Astragaloside IV* at 10-100 ng/mL for 12-48 hrs, especially high at 50 ng/mL. The mRNA level of MMP-2 was elevated by *Astragaloside IV* at 10 and 20 ng/mL. However, this level was decreased by *Astragaloside IV* at 50 and 100 ng/mL. The mRNA level of TIMP-1 was increased by *Astragaloside IV* at 20-100 ng/mL. In contrast, the mRNA levels of MMP-7, MMP-9, and TIMP-2 were not detectable in HT-29.

Key words: *Astragaloside IV*, Human colon cancer cell line, Matrix metalloproteinase (MMPs), mRNA expression.