

細胞膜上的死亡受體 TRAIL-R1 (DR4)在人參皂甙 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的過程扮演重要的角色

楊淑媚^{1,3} 陳延年^{1,3} 蔡昆道²

¹中國醫藥大學北港附設醫院 中醫部 ²胸腔內科

雲林縣

³中國醫藥大學 中醫學系

台中市

(2004 年 8 月 5 日受理, 2004 年 10 月 11 日接受刊載)

Rh2 是從紅參中萃取出來的一種二醇類人參皂甙, 在過去的研究中發現其對於某些種類的癌細胞具有抑制癌細胞增殖 (antiproliferative effect) 的作用, 但其抗癌的分子作用機轉尚有未清楚之處, 本文以肺腺癌 (A549) 細胞作為研究, 探討 Rh2 是否會對其生長造成影響, 並進一步探討其分子作用機轉。Rh2 處理後的肺腺癌細胞不論是在細胞形態上或是 TUNEL assay 及 DNA fragmentation analysis 都發現 Rh2 會造成肺腺癌細胞的凋亡, 我們進一步探討其凋亡路徑, 分析了 Bcl-2 家族相關分子, 發現其表現量無多大的變化, 其凋亡路徑與粒線體凋亡路徑的 Bcl-2 家族無關。但分析了細胞膜上的死亡受體路徑, 發現 TRAIL-R1 (DR4) 的表現量增加, 所以其凋亡路徑可能走的是細胞膜上的死亡受體路徑。在創蛋白酶 (caspase) 方面, caspase-2, -3 及 -8 有被活化的現象, 若加入 caspase-8 的抑制劑則會影響 caspase-2 及 -3 的活化, 所以可能是先活化了 caspase-8, 之後再活化 caspase-2 及 -3。

關鍵詞：人參皂甙 Rh2, 肺腺癌 (A549) 細胞, 凋亡路徑。

前 言

近幾年來, 癌症的發生高居國人十大死因的第一位。世界衛生組織更將癌症列為二十一世紀的三大殺手之一。最近的統計更顯示, 在台灣約每 9 分 20 秒就發現一個新的癌症個案, 其中肺癌 (lung cancer) 在男性人口十大癌症發生率佔第二名, 為女性人口死亡率的第一名, 顯示到目前為止, 臨床上並無藥物可有

聯絡人：蔡昆道, 中國醫藥大學北港附設醫院胸腔內科, 電話：05-7837901 轉 1301, 傳真：05-7823897, E-mail: d4295@yahoo.com.tw。

效的控制及治療肺癌的發生。臨床上肺癌分為兩大類，即小細胞癌（Small Cell Lung Cancers, SCLCs）與非小細胞癌（Non-Small Cell Lung Cancers, NSCLCs），多數的患者屬於非小細胞癌，肺非小細胞癌又可分為肺腺癌（adenocarcinoma lung cancer）、肺鱗狀細胞癌（squamous cell lung cancer）和肺大細胞癌（large cell lung cancer），其中肺腺癌為肺癌患者中最常見，無吸煙者所罹患肺癌常為此類，而肺鱗狀細胞癌則常見於吸煙患者當中。

先前的研究認為化學治療的作用是在於造成腫瘤細胞的壞死，但近年來的文獻報導指出許多抗癌劑是造成細胞生理的混亂，進而引起細胞的計劃性死亡（programmed cell death）¹，所謂計劃性死亡幾乎存在所有組織細胞，當細胞老化、受損、失去功能時，多數細胞會經由自殺行為來清除這些無用的細胞²，這樣的死亡方式有別於一般的壞死，稱為細胞凋亡（apoptosis）。正因為細胞凋亡不會像壞死一樣引起發炎反應（inflammation），且凋亡的細胞很快會被鄰近細胞吞噬分解，所以以往一直未被注意，目前經由對線蟲類（*caenorhabditis elegans*）的研究，已分離出許多調控細胞凋亡的基因³，也認同 apoptosis 需透過許多內在及外來的訊號分子調控⁴。在哺乳動物中最早被分離出的是 bcl-2 基因，當 bcl-2 gene 過度表現會抑制 apoptosis 的進行，某些癌症就是依賴 bcl-2 及相關基因，來防止細胞死亡。而前列腺癌、大腸癌的預後也和 bcl-2 的表現有關⁴。另外，p53 gene 也被廣泛研究，當 DNA 受損時，p53 大量表現，使細胞停留在 G1 期，以進行修補或是誘導細胞死亡。在某些癌症，可以偵測到 p53 gene 的缺陷⁵。而 PARP（Poly ADP-Ribose Polymerase）作用和 p53 類似⁶，具有修補缺損 DNA 的功能與細胞週期之進行有關⁷。

以往抗癌劑只是手術及放射線療法的輔助，直到 1980 年代，新的抗癌劑、投藥方式還有合併療法的進步，對某些癌症，如小兒急性淋巴性白血病，成人急性非淋巴性白血病，睪丸癌等已可達治療效果。因此，癌化學療法已和手術、放射線治療合併成為治療腫瘤的重要方法⁸。抗癌劑的主要作用之一是干擾細胞週期的進行，影響 DNA，RNA 及蛋白質的合成，以達到抑制腫瘤細胞的增殖⁸。許多中藥也可以抑制腫瘤生長或誘導腫瘤凋亡，但其中是否含具抗癌的化學成分，或促進細胞的凋亡達到殺死腫瘤細胞的效應，是值得探討的。

傳統中藥使用以複方為主，加上中藥成分複雜，所以在研究上受到許多限制，但隨著藥理學的發展，許多中藥的有效成分已被確定，且進一步分離出來，對於研究的進行頗有助益。以人參為例，其屬於五加科植物，始載於神農本草經，列為上品，歷代本草皆有收載。其種類繁多⁹，主治方面多強調其大補元氣，治療內傷及一切血證¹⁰。而早在 1858 年 Garrique 就已經自美國人參分離出粗皂甙¹¹，但直到 1950 年代中期，對人參的化學成分分析才有顯著進展，尤其在 1960 年代以後，陸續有研究發現人參皂甙（ginsenoside）是人參生理活性的主要成分⁹。各國科學家進行大量的研究，以探究人參皂甙的有效成分及其機理，某些人參皂甙的生物活性已被確認，包括對心肌細胞及神經細胞的離子通道活性之改變¹²⁻¹⁴，對蛋白質、脂質合成之活化^{15,16}，對 DNA、RNA 的合成調整^{17,18} 均有影響。

Rh 類的人參皂甙在 1980 年代中期被分離出來^{19,20}，它們存在紅參中，Rh2 為二醇型人參皂甙，其結構式畫於圖 1A。所以 Rh2 的來源為人參的根，人參根炮製成紅參，紅參裡面含有許多人參皂甙，而 Rh2 是屬於二醇類人參皂甙。

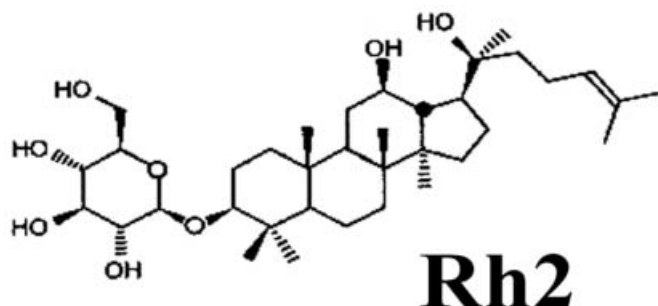


圖 1A：Rh2 的結構式²¹。Rh2 為二醇類人參皂甙，其四個碳環上的醇基「OH」個數為二。Ginsenoside Rh2 又名 20 (s)-protopanaxdiol-3-O-β-D-glucopyranoside，分子量 622。

Rh2 的相關實驗做的最多的是日本人和韓國人，這可能與該國家有種植人參有關，人參其栽種需特別的環境，而且 Rh2 在紅參中的含量極少，取得不易。

Rh2 抑制癌細胞生長的動物實驗中，日本的一個研究團隊研究做的很詳盡，他們在裸鼠身上種植人類卵巢癌細胞，再口服 Rh2，證實 Rh2 可以抑制癌細胞的生長，並且在 1990, 1993, 1998 發表他們的研究成果²²⁻²⁴。

細胞實驗中有一個南韓的漢城大學與釜山大學合作的研究團隊，他們以 SK-HEP-1 這株肝癌細胞為研究對象，證實 Rh2 可以使癌細胞的細胞週期停滯 (cell cycle arrest)，並且造成癌細胞的凋亡 (apoptosis)^{25,26}。日本亦有做相關的實驗，他們取的是 murine 的 B16 melanoma 這株細胞，也證實了 Rh2 可使癌細胞的細胞週期停滯在 G1 期²⁷。

由於台灣 Rh2 的相關實驗做的很少，在國際上無相關論文發表，所以本實驗取人類肺腺癌細胞株 A549 來進行實驗，看是否會抑制癌細胞的生長以及探討其分子作用機轉。

材料與方法

一、實驗材料

(一)細胞株來源：

本實驗所使用之細胞株 A549、CH27、H460 為人類肺癌細胞株 (human lung cancer cell lines)，由美國組織細胞庫 (ATCC) 購得。A549 為肺腺癌細胞株 (lung adenocarcinoma cell line)；CH27 為肺鱗狀細胞癌細胞株 (squamous lung cancer cell line)；而 H460 則為大細胞肺癌細胞株 (large cell lung cancer cell line)。

(二)實驗試劑 Rh2：

由台灣生福生技公司提供，粉劑溶於 DMSO 及 100 % alcohol 中，比例為 1：5。

二、實驗方法與步驟

(一)細胞培養：

1. 細胞培養液的配製

將 RPMI 1640 粉末先溶於約 9.5 L Mili-Q 去離子水中，加入 20 g 的 NaHCO₃，再用 HCl 調整 pH 至 7.0~7.2

後以 Mili-Q 去離子水補足體積至 10 L，然後以 0.22 μ m 的過濾器過濾滅菌，最後儲存於 4 °C 冰箱備用。

2. 完全培養液

每 500 mL RPMI 1640 細胞培養液添加 100 IU/mL 青黴素(Penicillin)、100 μ g/mL 鏈黴素(Streptomycin)、2 mM 麩胺酸 (L-glutamine)、100 μ M 非必須胺基酸 (non-essential amino acid)，1 mM 焦葡萄糖酸鈉 (sodium pyruvate)，最後加入 10 %胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 即得。

3. 細胞株的培養

H460、A549 和 CH27 三種肺癌細胞株，均以 RPMI 1640 完全培養液培養於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱中；繼代培養(subculture)時，先用 PBS(Phosphate-Buffered Saline)清洗 1 至 2 次，再以 TEG(0.05 mM trypsin、2.5 mM EDTA 和 2.8 mM glucose) 處理數分鐘，使細胞與培養皿底解離，最後分種於新的細胞培養皿中，每一培養皿注入約 7 mL 的細胞培養液，細胞培養液每兩天更換一次。

(二)細胞數目的測定：

將培養於細胞培養皿的細胞經 TEG 處理過後，以 3~5 mL 的培養液將細胞打下來，使用血球計數器 (hemocytometer) 計算所有的細胞數目，接著以每 mL 有 1×10^5 個細胞分種於 12 孔細胞培養盤中，每孔加入 1 mL 細胞與培養液的混和液，均勻搖散細胞後，將細胞培養於 37，5 % CO₂ 的培養箱中，經 24 小時後給予各濃度藥物 (4.8 μ M，16 μ M，48 μ M) 處理，再經 8、16、24、48、72 小時後，以血球計數器計算各孔盤內的細胞數，每一藥物濃度處理為三重覆。

(三)細胞內分子之螢光染色 (Intracellular fluorescence staining)

1. 懸浮或漂起的細胞：

收集細胞培養液以 3600 rpm 離心 5 分鐘，沉降之細胞以含有 2 mM EDTA 的 PBS(Phosphate buffer saline) 溶液清洗後再離心，然後細胞以 75 % ethanol 浸泡並置於-20 °C 固定 1 小時，再以 PBS 清洗離心，倒掉上清液，加入 0.1 % Triton X-100 in PBS 在室溫下處理 30 分鐘後重複清洗離心的步驟。加入 1 μ g/mL DAPI 置黑暗中染色 1 小時，最後經 2 次以上的清洗去除多餘的染劑後加入少許 PBS 使細胞懸浮其中，將懸浮液倒在培養盤中於螢光顯微鏡下觀察、拍照。

2. 貼附在培養皿的細胞：

附著在培養盤之細胞以 PBS 清洗後，用 75 % ethanol 在-20 °C 下固定 1 小時，再以 0.1 % Triton X-100 in PBS 處理 30 分鐘使細胞膜產生孔隙得以讓染劑進入。30 分鐘後以 PBS 清洗後加入 DAPI 染劑在黑暗中染色 1 小時，以 PBS 清洗多餘染劑之後置螢光顯微鏡下觀察、照相。

(四)DNA 的萃取和電泳分析

收集細胞以 3600 rpm 室溫下離心 10 分鐘，沈降下來的細胞以 PBS 清洗後再離心。倒掉上清液加入 800 μ L 細胞溶解液(extraction buffer: Tris 50 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 0.3 %)置冰上作用 20-30 分鐘，加入 20 μ L RNase 於 55 °C 水浴作用 30 分鐘後再加入 20 μ L proteinase K 置 55 °C 水浴 10 分鐘，快速離心後取上清液以等體積的酚 (phenol) 萃取 1 次，氯仿 (chloroform) 萃取 2 次，依次將細胞溶出液與有機溶劑充分混合均勻，離心 5 分鐘後，收集水層並加入 10 %體積 NaOAc，再加入 2.5 倍體積冰冷的 100 % ethanol 置-20 °C 沈

降一夜。沈降完畢後以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，倒掉上清液，以棉籤將管壁拭乾，加入 TE buffer (10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM EDTA) 混合均勻後，置 65 °C 水浴 1 小時使之完全溶解。取 5 µl 稀釋 100 倍，在波長 260 nm 下測定吸光值，計算核酸濃度 (µg/mL)。取樣品 10 µg DNA 加 2 µl 的 10 × DNA loading dye 並置 65 °C 水浴 1 小時，配製 2 % agarose gel (2 g agarose in 100 mL 0.5 X TBE)，最後將樣品 DNA 注入電泳膠孔槽，以 0.5 X TBE buffer 【0.5 X TBE buffer containing: Tris 5.4 g, boric acid 2.75 g, 2 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)】為電泳緩衝液，電壓 25 Volts 跑 16-18 小時。

(五)凋亡細胞之偵測-TUNEL 分析

染色體斷裂為細胞凋亡的普遍現象，造成許多 DNA 3'OH 端的暴露。DNA 3'OH 端可被量化，以偵測細胞凋亡，而不需溶解細胞。

1. 細胞用 paraformaldehyde 固定在 PBS 中，接著用乙醇固定。
2. 細胞清洗後在 37 °C 緩衝液與 TdT enzyme (terminal deoxynucleotidyl transferase) 與 Br-dUTP (bromodeoxyuridine triphosphate) 反應 60 分鐘。在這過程中，bromodeoxyuridine 結合進入 3'DNA 端。
3. 在 bromodeoxyuridine 處理後，標示的細胞徹底的沖洗後與 bromodeoxyuridin 的抗體 FITC (fluorescein isothiocyanate) 培養 30 分鐘。FITC 標示的 anti-bromodeoxyuridine 抗體指出 3'自由端的數目。細胞的 RNA 被消化與所有的 DNA 被含 RNase A plus propidium iodide 染色。以 propidium iodide 對細胞染色用來檢測細胞 DNA 的總量。
4. 著色的細胞用 flow cytometry 分析

flowcytometer 用 argon laser 發出 488 nm 的光以分析 FITC 與 propidium iodide 信號。FITC 在 520 nm 波長顯示螢光，propidium iodide 在 623 nm 波長顯示螢光，然而，FITC 與 propidium iodide staining 只能觀察單一樣品。

(六)蛋白質定性與定量的分析：

1. 蛋白質的萃取 (Protein Extraction)

將細胞用冰的 PBS 洗二次後用刮棒刮下，於 4 °C 下 5000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液並用棉棒將多餘的水吸乾，加入適量的 RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.25 % Na Deoxycholate, 5 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM EGTA (pH 8.0), *1 mM DTT, *5 µg/mL Leupeptin, *0.2 mM PMSF, *5 µg/mL Aprotinin, *1 mM Na Vanadate, *1 mM NaF (*add before use)]，將細胞 pellet 均勻打散置於冰上作用 20 分鐘，接著以超高速離心 55000 rpm、4 °C、30 分鐘，收集上清液，以 Bradford 的方法測量蛋白質溶液，在波長 595 nm 下的吸光值，換算成蛋白質濃度 (g/l) [以一系列已知濃度的 BSA 做成之 standard curve 換算蛋白質濃度。以每個 eppendorf tube 50 µg 的蛋白質分裝並用 RIPA buffer 調整成相同體積，接著再加入調整完體積的蛋白質溶液 1/3 量的 4 X protein loading dye (8 % SDS, 0.04 % Serva blue R-250, 40 % glycerol, 200 mM Tris pH 6.8, 10 % 2-mercaptoethanol)，以 95 °C 乾浴加熱變性 10 分鐘後，即可置於-80 °C 中保存。

2. 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE Assay)

將蛋白質依分子量分離利用 SDS-PAGE，首先配製 1.5 mm 厚的 discontinuous acrylamide gel, gel 分上下兩層，下層 separating gel 其 acrylamide 的百分比視分析蛋白質分子量而定，上層的 stacking gel 則含 4 % acrylamide。配製完成的膠體放置於電泳槽內，加入電泳緩衝液 (running buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS)。接著將萃取出的蛋白質與 4 X protein loading dye 混合液再以 95 °C 乾浴加熱變性 10 分鐘，冰浴冷卻後離心。將各 sample 及標示標準分子量的 Multimer 依序注入膠體的孔槽中，通以電壓 80 Volts，待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 100 Volts，當 serva blue R-250 的 dye 跑到膠片底部或視其需要，即可將電源關閉。

3. 西方轉漬法 (Western blot)

將 PVDF membrane 浸於 methanol 數秒後以 Mill-Q 水浸濕，接著裁好的濾紙與 membrane 先浸泡在 transfer buffer (50 mM tris, 40 mM glycine, 0.375 % SDS, pH 9.0-9.4; 20 % methanol) 中。裁下電泳膠中所要轉漬的區域後，亦浸泡於 transfer buffer 中。轉印石墨板之正極板以 transfer buffer 潤濕後，依序重疊平鋪 4 張濾紙、membrane、gel、4 張濾紙，最後蓋上以 transfer buffer 潤濕的負極石墨板，設定電流 (電流 = 濾紙面積 $\times$ 9/7 $\times$ 疊數)，通電流經 1 小時又 10 分鐘後將 membrane 取出，浸泡於 5 % non-fat milk/TBST 中，於室溫下搖晃至少 30 分鐘。以 TBST buffer (24.22 g Tris, 87.75 g NaCl, 10 mL Tween 20, 加水調到 1 L) 清洗 membrane 10 分鐘三次，加入一級抗體，並置於 4 °C 下作用一天。

隔日先以 TBST buffer 清洗 membrane 10 分鐘三次，加入二級抗體，使其在室溫下搖晃作用 1 小時之後，再用 TBST buffer 清洗 10 分鐘三次，接著在暗房中將 membrane 與 ECL (enhanced chemi-luminescence) 反應後，裝於透明塑膠袋內並置於壓片夾中，以 X-ray film 感光顯影，再以自動沖片機沖片。

(七) Caspase activity assay (caspase 活性分析)

Caspase 的活性以原廠的提供步驟進行。簡述之，即細胞溶液 (100 μ g 總蛋白) 加入反應混合物 (最後容量 50 μ l) 內含螢光氨基酸物質為 caspase 的分解基質 (即 caspase-1 (YVAD-AFC), caspase-3 (DEVD-AFC), caspase-8 (IETD-AFC) 與 caspase-9 (LEHD-AFC) 的反應基質 (substrates))。此反應在 37 °C 中作用 2 小時。螢光用 fluorescence microplate reader (excitation wavelength, 400 nm; emission wavelength, 505 nm) 偵測。

(八) 統計分析 (statistical analysis)

所有資料於此報告中以三個獨立的實驗後以 mean $\pm$ SD 評估。統計誤差以 Student's *t*-test，其 *p* 值設在*, *p* < 0.05, **, *p* < 0.01, ***, *p* < 0.001。

結 果

一、Rh2 對肺腺癌細胞的抑制增殖作用

三種人類肺癌細胞株 A549 (肺腺癌細胞)、CH27 (鱗狀細胞癌)、H460 (大細胞癌) 以每孔 1×10^5 的細胞密度植入 12 孔的培養盤中，分別以 0、4.8 μ M、16 μ M、48 μ M 的 Rh2 處理 72 小時。每二天重新更新

含有藥劑的培養液，分別於給藥的 8、16、24、48、72 小時後，以 Trypan blue dye 染色，利用血清計數器計算出確實的細胞數目，而得一細胞生長的曲線圖（圖 2A）。由圖 2A 得知對三株肺癌細胞株均有顯著且相近的生長抑制作用，隨著劑量的增加及作用時間的加長，Rh2 對肺癌細胞的抑制增殖作用愈強，呈現劑量-時間依存效應（dose-and time-dependent response）。細胞在處理 16 μM 、48 μM 的濃度下經過 16 小時即有明顯的生長抑制現象。48 μM Rh2 經 24 小時的培養發現細胞的增殖現象幾乎完全的被抑制，48 小時之後的培養發現細胞的數目明顯減少，有漂浮死亡的細胞出現，到了 72 小時肺癌細胞幾乎全數死亡。

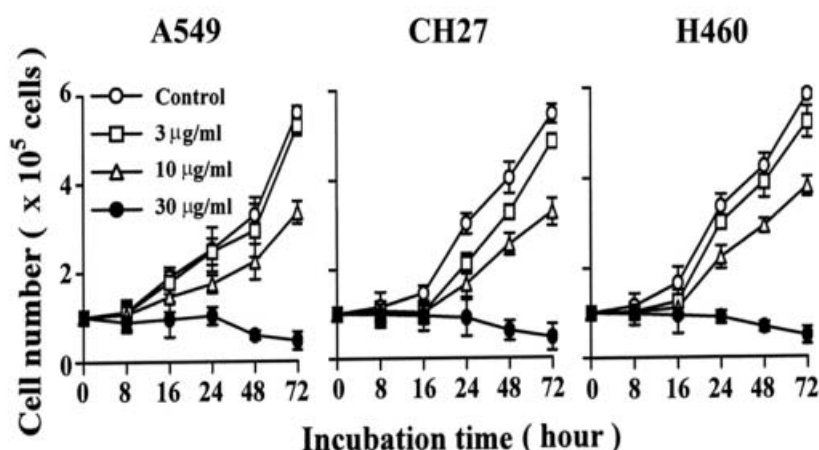


圖 2A：Rh2 抑制肺腺癌細胞的增殖。三種肺癌細胞（A549, CH27, H460）分別處理不同濃度的 Rh2（0, 4.8, 16, 48 μM ），0, 8, 16, 24, 48 及 72 小時後以 Trypan blue dye 染色，用血清計數器直接計數癌細胞的數目。隨著劑量的增加及作用時間的加長，Rh2 對肺癌細胞的抑制增殖作用愈強，呈現劑量-時間依存效應（dose-and time-dependent response）。圖中 Rh2 濃度 3, 10, 30 $\mu\text{g/mL}$ 分別等於 4.8, 16, 48 μM 。

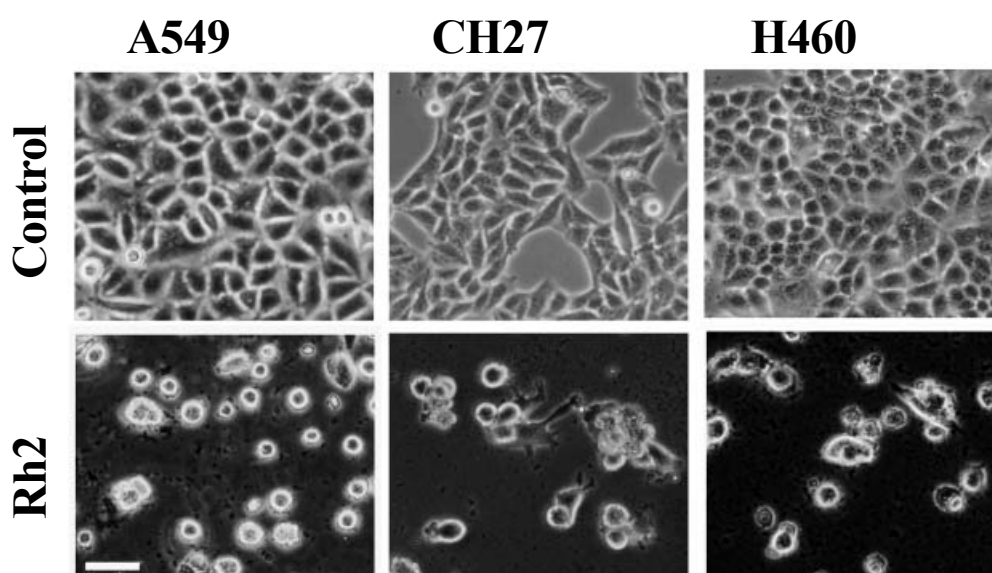


圖 2B：Rh2 造成癌細胞形態上的改變。三種肺癌細胞（A549, CH27, H460）分別未處理及給予 48 μM Rh2，48 小時後在顯微鏡下觀察細胞的形態（morphology），下排三個圖為 Rh2 處理組，細胞的數目減少且細胞的外形也有改變--細胞較皺縮。此圖為顯微鏡放大倍率 100 倍；scale bar，20 μm 。

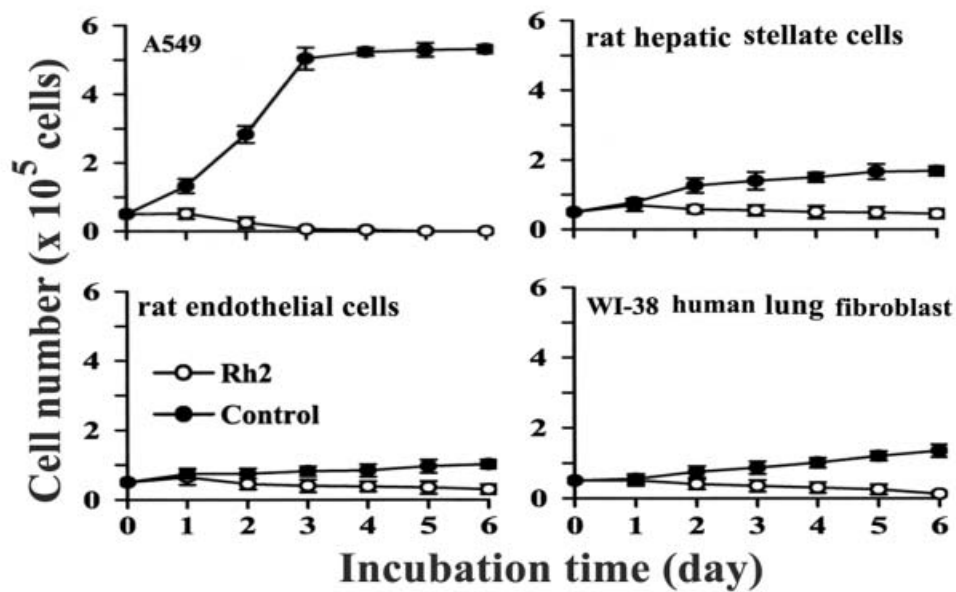


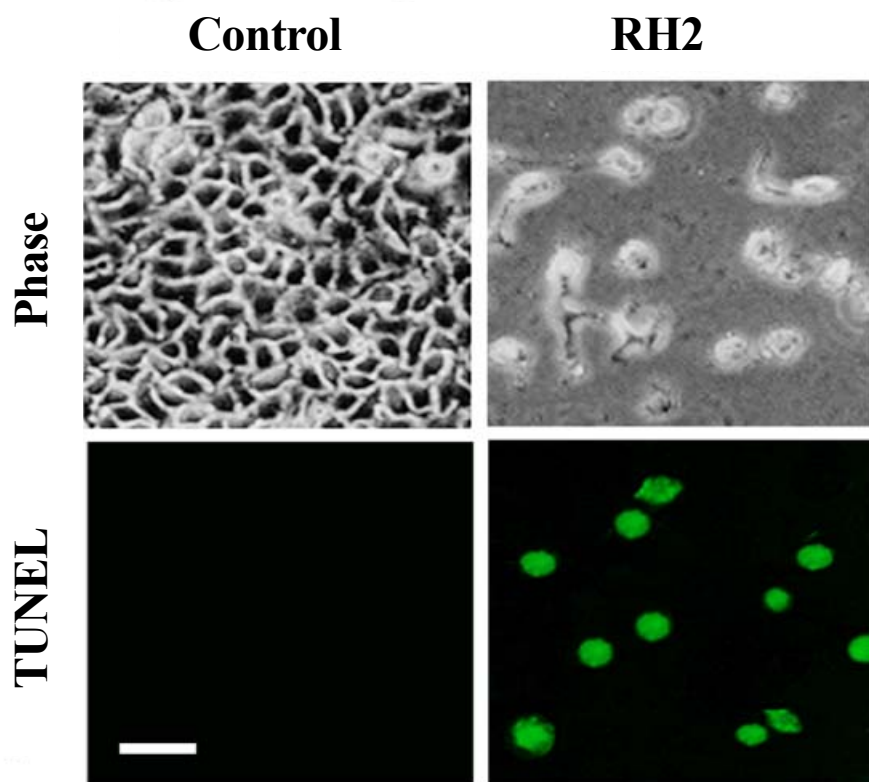
圖 2C：正常細胞對 Rh2 較具抗性。取大鼠的肝臟星狀細胞 (rat hepatic stellate cells)、內皮細胞 (rat endothelial cells) 及人類肺纖維細胞 (WI-38 human lung fibroblast) 當作正常細胞，分別未處理及處理 48 μ M Rh2，培養 0-6 天，Trypan blue dye 染色後以血清計數器計算細胞數目。結果發現同樣濃度之 Rh2 會顯著抑制肺腺癌細胞的增殖，但對正常細胞存活之影響較不大，不會直接造成正常細胞的死亡。

於顯微鏡下觀察三種人類肺癌細胞株 A549 (肺腺癌細胞)、CH27 (鱗狀細胞癌)、H460 (大細胞癌) 處理 48 μ M Rh2 後之形態變化，發現給藥 8, 16, 24 小時可看出處理組的生長受到抑制，48 小時後細胞的數目明顯少於未處理藥物之對照組 (圖 2B)，除了細胞的數目減少之外細胞的形態 (morphology) 也有所不同，細胞變的較皺縮，甚至有細胞無法貼附在培養皿上而飄浮起來。

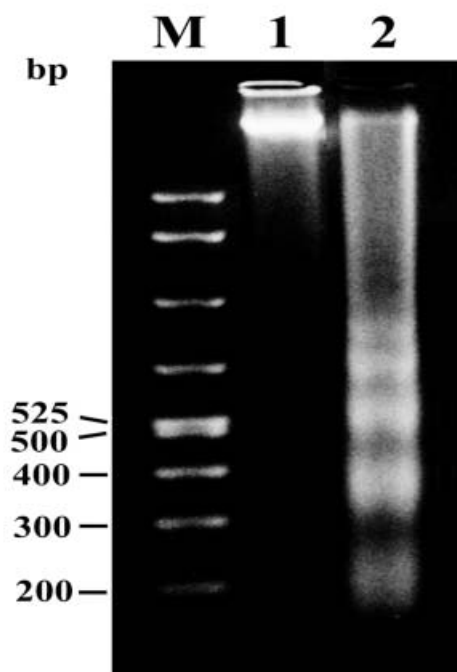
由上面的結果得知 Rh2 對肺腺癌細胞有抑制增殖作用，這樣的作用是否會對正常的細胞也會造成影響，於是本實驗取大鼠的肝臟星狀細胞 (rat hepatic stellate cells)、內皮細胞 (rat endothelial cells) 及人類肺纖維細胞 (WI-38 human lung fibroblast) 當作正常細胞，分別未處理及處理 48 μ M Rh2，培養 0-6 天，Trypan blue dye 染色後以血清計數器計算細胞數目。結果發現 Rh2 會抑制肺腺癌細胞株的增殖，且長時間處理會造成細胞死亡，但對這三株正常細胞的生長會抑制，但並不會造成正常細胞的死亡 (圖 2C)。圖中 Rh2 似乎會造成 WI-38 細胞的死亡，這有可能是因為被長時間抑制後，細胞走向死亡 (second effect)，這樣的死亡與 Rh2 引發的腫瘤細胞凋亡可能不一樣。

二、Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡

肺腺癌 A549 細胞以 48 μ M Rh2 處理 48 小時後，用位相差顯微鏡觀察顯示細胞質及核濃縮，細胞圓起飄浮於培養盤中 (圖 3A 右上及 2B 左下圖)，顯示細胞死亡。我們進一步檢視細胞死亡是否經由凋亡路徑，我們以 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) assay 將 DNA 3'OH 端接上螢光，在螢光顯微鏡下觀察，與對照組 (control) 比較，處理組螢光明顯增加，顯示 Rh2 造成肺腺癌細胞 DNA fragmentation 而造成凋亡 (圖 3A 右下圖)。DNA 電泳分析再確認 Rh2 處理之細胞是死於細胞凋



■ 3A: Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡-TUNEL Assay。肺腺癌 A549 細胞以 48 μ M Rh2 處理 48 小時後，用 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) assay 將 DNA3'OH 端接上螢光，在螢光顯微鏡下觀察，與 control 組相比較螢光明顯增加，顯示 Rh2 造成肺腺癌細胞 DNA 斷裂。



■ 3B: Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡-DNA fragmentation analysis。Lane 2: 肺腺癌 A549 細胞以 48 μ M Rh2 處理 72 小時後，萃取 DNA 跑電泳(2 % agarose gel)，與對照組(Lane 1)相比較，肺腺癌細胞的 DNA 斷裂(fragmentation) 成 180-200 bp 的倍率。Lane M 為 DNA size marker。

亡之作用，肺腺癌 A549 細胞以 48 μ M Rh2 處理 72 小時後，萃取 DNA 跑電泳 (Lane 2)，與對照組 (Lane 1) 相比較，肺腺癌細胞的 DNA 有斷裂 (fragmentation) 的情形，其斷裂的長度大約為 180-200 bp 的倍率 (圖 3B)。所以這兩個實驗都說明了 Rh2 會造成肺腺癌細胞的 DNA 裂解而使細胞凋亡。

三、Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡非經由粒線體凋亡路徑

細胞進行凋亡有許多路徑，其中較有名以及研究較透徹的為粒線體路徑及細胞膜上死亡受體路徑。粒線體中的 Bcl-2 家族蛋白質在細胞凋亡的控制過程中扮演相當重要的角色，這一群蛋白質可分為促進細胞凋亡的分子 (pro-apoptotic molecules) 及抑制細胞凋亡的分子 (antiapoptotic molecules) 兩大類。

實驗由 TUNEL assay 及 DNA fragmentation analysis 的電泳表現知道 Rh2 會造成肺腺癌細胞的凋亡，為了進一步了解所造成的凋亡路徑為何，首先實驗分析 Rh2 是否會對 Bcl-2 家族造成影響，肺腺癌細胞分別未處理及處理 48 μ M Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 小時後，以 Western blot 來分析 Bcl-2 家族中相關分子 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax 及 Bak) 的表現。其中 Bcl-2, Bcl-X_L 是抑制凋亡分子；Bax 及 Bak 是促進凋亡分子。結果 Bcl-2 家族中相關分子未處理及處理 Rh2 其表現量皆無變化，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑為 Bcl-2 independent (圖 4A)。我們亦藉由肺腺癌細胞載入 adenoviral 及 adeno-Bcl-2 viral vector 使 Bcl-2 過度表現來看結果，發現 Bcl-2 的過度表現並不會影響 Rh2 所造成的癌細胞死亡情形，因此證實 Bcl-2 家族並沒有參與 Rh2 誘發的凋亡路徑 (圖 4B)。

四、Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡與細胞膜上死亡受體路徑有關

本實驗進一步觀察 Rh2 是否會對細胞膜上死亡受體路徑造成影響，肺腺癌細胞分別未處理及處理 48 μ M Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 小時後，以 Western blot 來分析細胞膜凋亡路徑相關分子 [FasL/Fas, DR4 (TRAIL-

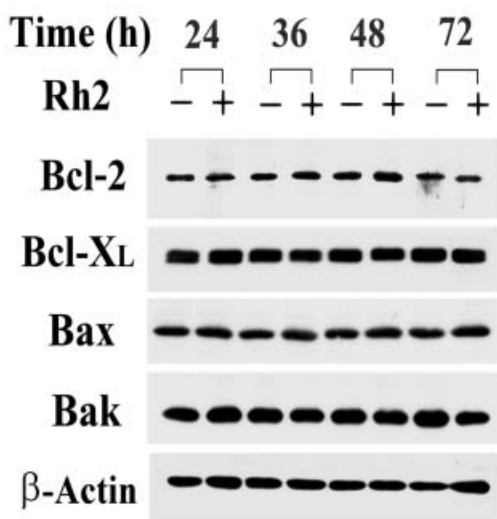


圖 4A：Bcl-2 家族之分子未參與 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之路徑。肺腺癌細胞分別未處理及處理 48 μ M Rh2，經過 24, 36, 48 及 72 小時後，以 Western blot 來分析 Bcl-2 家族中相關分子 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax 及 Bak) 的表現。其中 Bcl-2, Bcl-X_L 是抑制凋亡分子；Bax 及 Bak 是促進凋亡分子。結果 Bcl-2 家族中相關分子未處理及處理 Rh2 其表現量皆無變化，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的過程中不需要 Bcl-2 家族分子的參與。

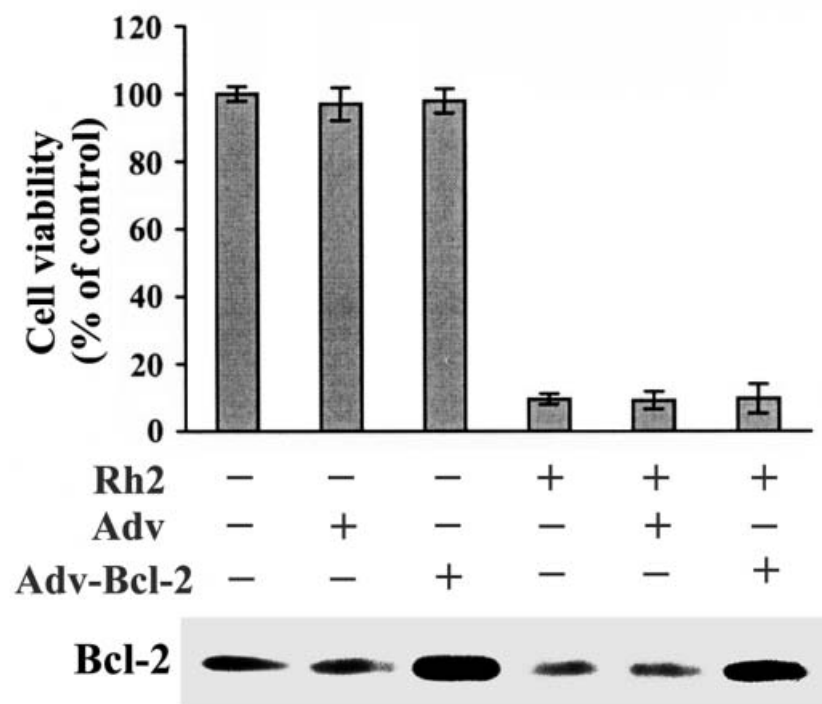


圖 4B: Bcl-2 家族之分子未參與 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之路徑。肺腺癌細胞載入 adenoviral 及 adeno-Bcl-2 viral vector 16 小時後加入 48 μ M Rh2, 72 小時後觀察細胞的存活情形。外加 Bcl-2 會使 Bcl-2 過度表現(見下方 Western blot 圖), 但 Bcl-2 的過度表現並不會影響 Rh2 所造成的凋亡現象。

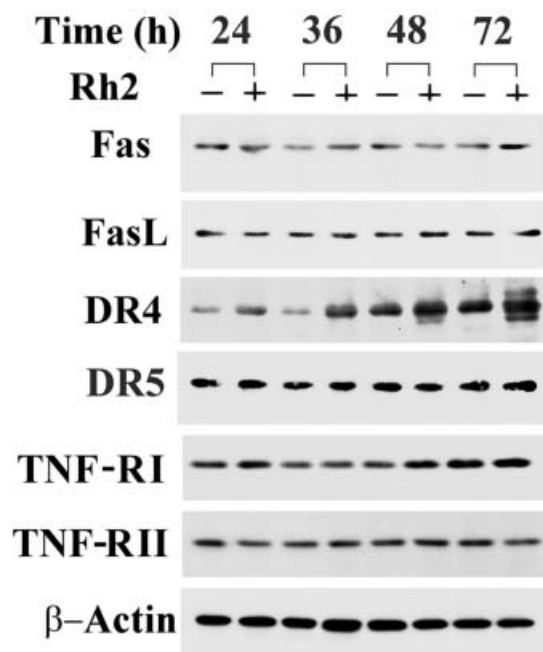


圖 5A: Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關。肺腺癌細胞分別未處理及處理 48 μ M Rh2, 經過 24, 36, 48 及 72 小時後, 以 Western blot 來分析細胞膜凋亡路徑相關分子 (Fas, FasL, DR4, DR5, TNF-RI 及 TNF-RII) 的表現。結果 DR4 的表現量增加, 顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑與細胞膜上之 DR4 有關。

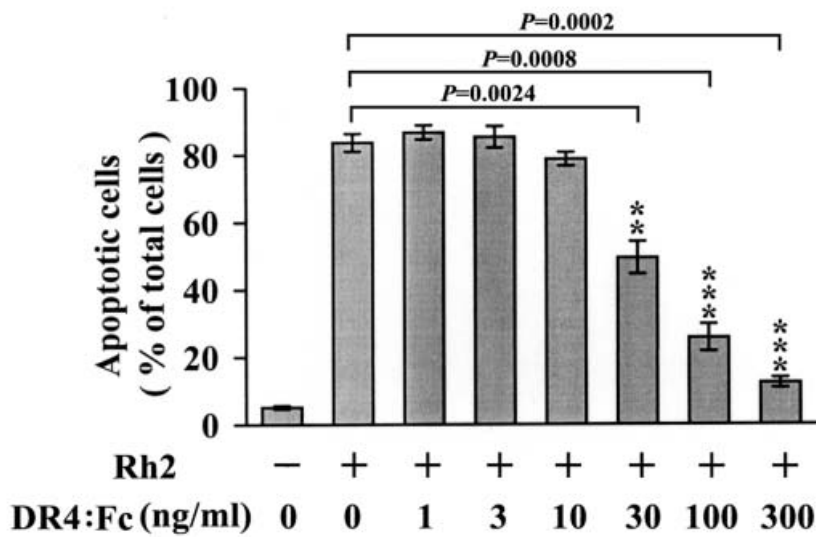


圖 5B：Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關。DR4：Fc 為抑制 DR4 表現的抑制劑，當我們加入 30, 100 及 300 ng/mL 的 DR4：Fc，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的情形會減弱，且抑制劑的劑量越重抑制的效果越強（dose-dependent），P 值分別為 0.0024，0.0008 及 0.0002，有極顯著的差異。所以 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關。註：Apoptotic cell 是以 TUNEL assay 方式評估。

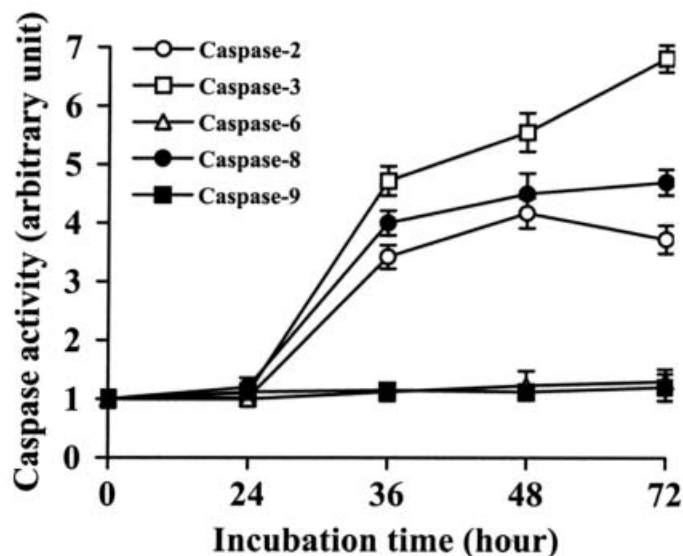


圖 6A：Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡造成蛋白酶（caspase）活化。48 μ M Rh2 作用肺腺癌細胞 24, 36, 48 及 72 小時後，以 caspase activity assay kit 測 caspase 的活性，結果 caspase-3, -8, -2 活性有上升，caspase-6, -9 活性沒有多大改變。

R1)，DR5（TRAIL-R2），TNF-RI 及 TNF-RII 的表現。結果 DR4（TRAIL-R1）的表現量增加，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑與細胞膜上之 DR4 路徑有關（圖 5A）。同樣為了證實這個論點，實驗加入抑制 DR4 表現的抑制劑（DR4：Fc）來探討 Rh2 所造成的凋亡情形，當加入 30, 100 及 300 ng/mL 的 DR4：Fc，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的情形會減弱，且抑制劑的劑量增加，抑制的效果越強（dose-dependent），P 值分別為 0.0024，0.0008 及 0.0002，具統計學上極顯著的差異，更一步證實了 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡路徑與 DR4 有關（圖 5B）。

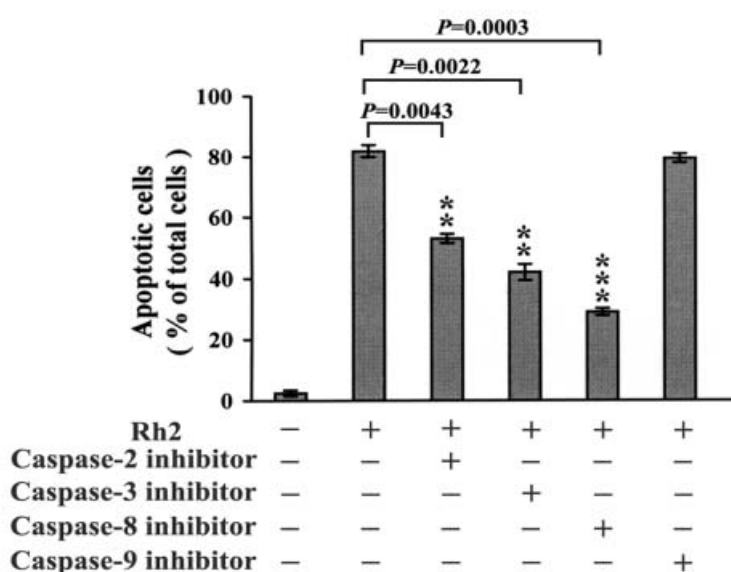


圖 6B: Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡造成創蛋白酶 (caspase) 活化。肺腺癌細胞細胞先加入某一種 caspase 抑制劑 (100 μ M), 2 小時後再加入 Rh2, 72 小時後再分析 Rh2 造成的凋亡情形。結果發現加入 caspase-2, -3, -8 抑制劑者, 會抑制 Rh2 所造成的凋亡, 其抑制的程度分別為 30 %, 48 % 及 65 %, 所以又進一步證實 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡與 caspase-2, -3 及 -8 有關。caspase-2 的抑制劑為 z-VDVAD-fmk; caspase-3 的抑制劑為 z-DEVD-fmk; caspase-8 的抑制劑為 z-IETD-fmk; caspase-9 的抑制劑為 z-LEHD-fmk。

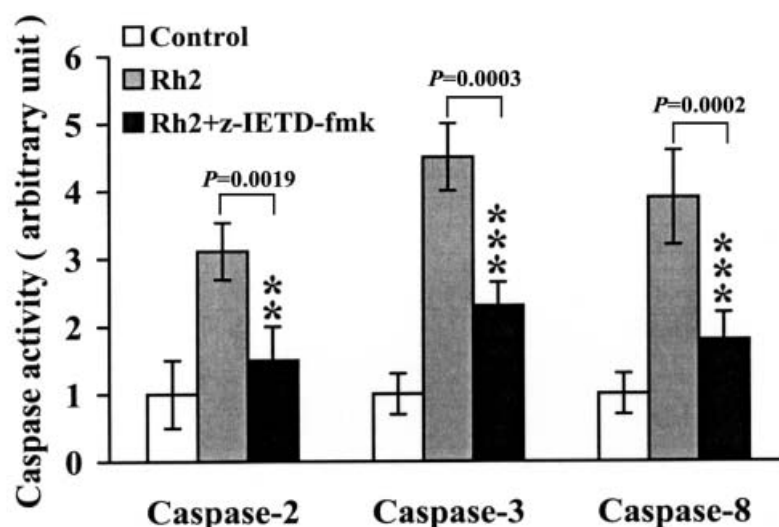


圖 6C: Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡是經由 caspase-8 的活化。肺腺癌細胞加入 Rh2 合併 100 μ M caspase-8 的抑制劑 (z-IETD-fmk) 後, 以 caspase activity assay kit 看 caspase-2, -3, -8 的活性表現, 與單純加入 Rh2 者相比較, caspase-2, -3, -8 三者的活性皆下降。因此, Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的路徑可能是先誘發 caspase-8 活化, 再誘發 caspase-2, -3 的活化, 所以抑制了 caspase-8 的活性會影響 caspase-2 及 -3 的活性。

Rh2 會誘導肺腺癌細胞凋亡, 無論是走粒線體路徑或細胞膜上死亡受體路徑都會活化創蛋白酶 (caspase), 所以進一步探討 Rh2 活化了哪些 caspase 進而促使細胞凋亡。48 μ M Rh2 作用肺腺癌細胞 24, 36, 48 及 72 小時後, 以 caspase activity assay kit 測 caspase 的活性, 結果 caspase-3, -8 及 -2 活性有上升, caspase-6 及 -9 活性沒有多大改變 (圖 6A)。因此進一步加入 caspase 抑制劑觀察是否會抑制 Rh2 的作用, 將肺腺癌

細胞細胞先加入某一種 caspase 抑制劑 (100 μ M)，2 小時後再加入 Rh2，72 小時後觀察 Rh2 造成的凋亡情形。結果發現加入 caspase-2, -3, -8 抑制劑者，會減弱 Rh2 所造成的凋亡，其抑制的程度分別為 30 %，48 % 及 65 %，所以又進一步證實 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡與 caspase-2, -3 及-8 有關 (圖 6B)。實驗又假設 Rh2 是先活化了 caspase-8，再活化其他的 caspase，因此將肺腺癌細胞加入 Rh2 合併 100 μ M caspase-8 的抑制劑 (z-IETD-fmk) 後，以 caspase activity assay kit 觀察 caspase-2, -3, -8 的活性表現。其結果與單純加入 Rh2 者相比較，caspase-2, -3, -8 三者的活性皆下降。因此，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的路徑可能是先誘發 caspase-8 活化，再誘發 caspase-2, -3 的活化，所以抑制了 caspase-8 的活化會影響 caspase-2 及-3 的活化 (圖 6C)。

討 論

一、Rh2 造成肺腺癌細胞的凋亡

細胞凋亡會有形態上的變化也會有 DNA fragmentation 的現象，本實驗從 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) 分析及萃取 DNA 跑電泳，都可發現 Rh2 會造成肺癌細胞的凋亡。在其他許多學者所做的 Rh2 抗癌研究方面，也發現 Rh2 會造成癌細胞凋亡這樣的結果²⁸⁻³⁵。

Rh2 會造成癌細胞 DNA fragmentation 進而造成細胞凋亡。至於 DNA fragmentation 會斷裂成 180-200 bp 倍率的固定長度的原因，可能是細胞凋亡的過程中基因體是以 domain cleavage 的方式切成 200-300 kb 的斷片，第二期則是 Wyllie 所發現的 DNA laddering，其具有酵素活性是 fragmentation nuclease 故造成 180-200 bp 倍率的規則斷片。

二、Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之途徑 (apoptosis pathway)

細胞進行凋亡有許多路徑，其中較有名以及研究較透徹的為粒線體路徑及細胞膜上死亡受體路徑。在處理 Rh2 後 Bcl-2 家族中相關分子其表現量在 Western blot 的圖中皆無變化。若大量表現 Bcl-2 也無法影響 Rh2 造成的凋亡結果，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑與 Bcl-2 家族分子相關性不大 (圖 4A)。許多其他學者的研究亦看到同樣的結果^{26, 30-32}，表示 Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡之途徑非經由粒線體及 Bcl-2 家族調控的凋亡路徑，之前的學者僅探討了粒線體上的一些促進或抑制凋亡的分子，如 bcl-2, Bcl-X_L 或 Bax，這些分子皆與 Rh2 誘導細胞凋亡無關。本實驗除了呼應了先前學者的結果，更進一步尋找到更可能的凋亡途徑—DR4 (TRAIL-R1)。

本實驗發現 Rh2 在誘發肺腺癌細胞凋亡的過程中 DR4 (TRAIL-R1) 的表現量增加，顯示 Rh2 誘導肺腺癌細胞的凋亡路徑或許與細胞膜上之 DR4 有關 (圖 5A)。細胞膜上死亡受體路徑則是經由活化細胞膜上 Fas、TNFR 或 TRAIL-R 等死亡受體，吸引 FADD 與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC (death-inducing signaling complex)，將 caspase-8 活化後再直接活化 caspase-3，或者 caspase-8 的活化促使 Bcl-2 家族成員 Bid 的裂解，tBid 位移至粒線體，促使粒線體釋放出 cytochrome c 接著活化 caspase-9 和 caspase-3。在臨床上有許多疾病的發生就是經由這條路徑，例如，呼吸性融合病毒 (RSV) 是常見的小兒呼吸道感染

原，人體清除受 RSV 感染的呼吸道細胞使之凋亡，透過的路徑是經由 TRAIL/DR4, 5 來達成³⁶。另外第一型的糖尿病其胰島素的分泌不足可能與 Beta-cell destruction 有關，而 Beta-cell 的死亡路徑可能與 TRAIL death pathway 有關³⁷。連慢性胰臟炎也與這條路徑有關³⁸。所以在人體中這是一條重要的凋亡路徑也與許多疾病息息相關。

本實驗 Rh2 會造成肺腺癌細胞的凋亡，其依循的是細胞膜上的死亡受體路徑，之後會活化一系列的蛋白酶，由圖 6A 可看出 caspase-3, -8 及-2 活性有上升，加入三者的抑制劑亦會抑制其活性（圖 6B），實驗更進一步將肺腺癌細胞加入 Rh2 合併 caspase-8 的抑制劑（z-IETD-fmk）後，觀察 caspase-2, -3, -8 的活性表現，其結果與單純加入 Rh2 者相比較，caspase-2, -3, -8 三者的活性皆下降。因此，Rh2 誘導肺腺癌細胞凋亡的路徑可能是先誘發 caspase-8，再誘發 caspase-2, -3 的活性上升，所以抑制了 caspase-8 的活性會影響 caspase-2 及-3 的活性（圖 6C）。這樣的結果與細胞膜上的死亡受體路徑，活化細胞膜上 TRAIL-R 死亡受體，吸引 FADD 與之結合，接著再與 procaspase-8 結合形成 DISC，將 caspase-8 活化後再活化 caspase-3 結果相符。

總結本實驗 Rh2 所造成的凋亡現象：Rh2 所誘發的凋亡路徑並非粒線體凋亡路徑而是細胞膜上的死亡受體路徑，Rh2 會使 DR4（TRAIL-R1）的表現量增加，先誘發 caspase-8，再誘發 caspase-2, -3 的活性上升，使得分解 DNA 的酵素活化，因而裂解 DNA 成片斷，結果便造成肺癌細胞的凋亡（圖 7A）。

這樣的結論似乎已完整，然而仍有待進一步深入探討之處，在其他 Rh2 的相關論文中，有人提出 Rh2 會造成 Reactive Oxygen Species（ROS）的釋放增加³²，ROS 有許多功用³⁹，它可以 1. 活化 NF-kB 或使之表現量增加，2. 與粒線體凋亡路徑有關，3. 參與 DNA 的受損與 P53 的活化，4. 活化 SAPK 凋亡路徑。ROS 的釋放

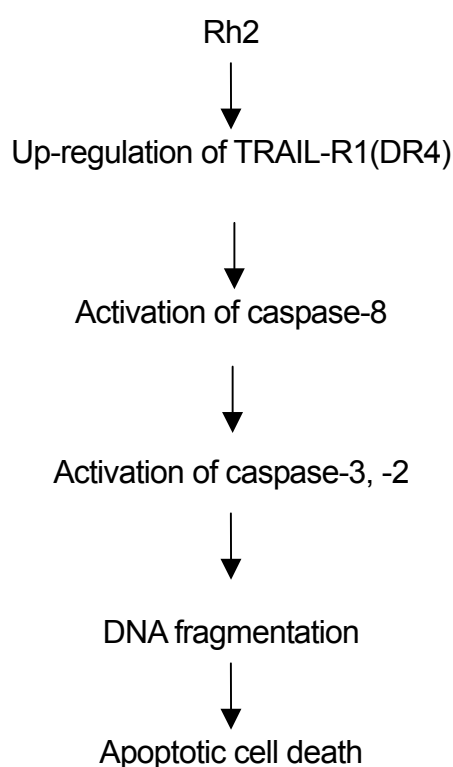


圖 7A：Rh2 造成凋亡之路徑圖。

增加與 DR4 (TRAIL-R1) 的表現量增加，兩者之間是不是有關連性，或者兩者是不同的路徑表現，這則是值得再進一步深入探討的地方。

參考文獻

1. Carson DA., and Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet*. 341: 1251-1254, 1993.
2. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 356: 397-399, 1992.
3. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 267: 1445-1449, 1995.
4. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267: 1456-1462, 1995.
5. Anelli A, Anelli TF, Youngson B, Rosen PP, and Borgen PI. Mutations of the p53 in male breast cancer. *Cancer*. 75: 2233-2238, 1995.
6. Noseri C. Possible involvement of poly (ADP-Ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 212: 367-373, 1994.
7. Greenberg AH, and Litechfield DW. P34 and apoptosis. *Science*. 259: 106-107, 1995.
8. 郭俊逸，癌症的現代觀（基礎與臨床的新進展），合記圖書出版社，台北，pp. 151-152, 1990。
9. 林景彬，常用中藥藥理與應用，中國醫藥學院出版，台中，p. 400, 1985。
10. 張賢哲，本草備要解析，中國醫藥學院出版，台中，pp. 6-9, 1990。
11. 尚培根、張福全、陳金堂、劉耕陶、朱蔚華等，人參的研究及栽培，淑馨出版社，台北，p. 169, 1989。
12. Enomoto Y, Ito K, Kawagoe Y, Morio Y, and Yamasaki Y. Positive inotropic action of saponins on isolated atrial and papillary muscles from the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 88: 259-267, 1986.
13. Jiang Y, Zhong GG, Chen L, and Ma XY. Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3 on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*. 13: 403-406, 1992.
14. Kim ND, Kang SY, Kim MJ, Park JH, and Schini KV. The ginsenoside Rg3 evokes endothelium-independent relaxation on rat aortic rings: role of K^+ channels. *Eur. J. Pharmacol.* 367: 51-57, 1999.
15. Danesi R, Figg WD, Reed E, and Myers CE. Paclitaxel (taxol) inhibits protein isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 47: 1106-1111, 1995.
16. Kang SY, Lee KY, and Lee SK. Ginsenoside-Rg1 regulates the induction of tyrosine aminotransferase gene transcription in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1696-1701, 1994.
17. Salim KN, McEwen BS, and Chao HM. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47: 177-182, 1997.
18. Yokozawa T, Yasui T, and Oura H. Molecular biological analysis of the effects of ginsenoside-Rb2 on albumin mRNA in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 763-767, 1996.
19. Kanazawa H, Nagata Y, Matsushima Y, Tomoda M, and Takai N. Simultaneous determination of ginsenosides and saikosaponins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 507: 327-332, 1990.
20. Samukawa K, Yamashita H, Matsuda H, and Kubo M. Simultaneous analysis of ginsenosides of various ginseng radix by HPLC. *Yakugaku Zasshi*. 115: 241-249, 1995.

21. <http://www.shpv.com/Rh.htm>
22. Kikuchi Y, Sasa H, Kita T, Hirata J, Tode T, and Nagata I. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplatin in vivo. *Anti-cancer drugs*. 2: 63-67, 1990.
23. Tode T, Kikuchi Y, Kita T, Imaizumi E, and Nagata I. Inhibitory effects by oral administration of ginsenoside Rh2 on the growth of human ovarian cancer cells in nude mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120: 24-26, 1993.
24. Nakata H, Kikuchi H, Tode T, Hirata J, Kita T, Ishii K, Kudoh K, Nagata I, and Shinomiya N. Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth on nude mice bearing human ovarian cancer cell. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 733-740, 1998.
25. Lee KY, Park JA, Chung E, Lee YH, Kim SI, and Lee SK. Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27^{kip1}. *Cancer Lett.* 110: 193-200, 1996.
26. Park JA, Lee KY, Oh YJ, Kim KW, and Lee SK. Activation of caspase-3 protease Via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121: 73-81, 1997.
27. Ota T, Maeda M, Odashima S, and Tatsuka M. G1 phase-specific suppression of the Cdk2 Activity by Ginsenoside Rh2 in cultured murine cells. *Life Sci.* 160: 39-44, 1997.
28. Popovich DG, and Kitts DD. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and induce apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 406: 1-8, 2002.
29. Kim YS, Jin SH, Lee YH., Park JD, and Kim SI. Differential expression of protein kinase C subtypes during Ginsenoside Rh2-induced apoptosis in SK-N-BE(2) and C6Bu-1 cells. *Arch. Pharm. Res.* 23: 518-524, 2000.
30. Park JA, Lee KL, Oh YJ, Kim KW, and Lee SK. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of Ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121: 73-81, 1997.
31. Kim YS, Jin SH, Lee YH, Kim SI, and Park JD. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis independently of Bcl-2, Bcl-XL, or Bax in C6Bu-1 cells. *Arch. Pharm. Res.* 22: 448-453, 1999.
32. Kim HE, Oh JH, Lee SK, and Oh YJ. Ginsenoside Rh2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen-and caspase-dependent but Bcl-X_L-independent pathway. *Life Sci.* 65: 33-40, 1999.
33. Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, and Lee SK. Caspase 3- mediated cleavage of p21^{WAF/CIP1} associated with the cyclin A dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *The J. Biol. Chem.* 275: 30256-30263, 2000.
34. Fei XF, Wang BX, Tashiro S, Li TJ, Ma JS, and Ikejima T. Apoptosis effects of Ginsenoside Rh2 on human malignant melanoma A375-S2 cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* 23:315-322, 2002.
35. Ham YM, Chun KH, Choi JS, Kim DH, and Lee SK. SEK1-dependent JNK1 activation prolongs cell survival during G-Rh2-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:358-364, 2003.
36. Kotelkin A, Prikhod'ko EA, Cohen JJ, Collins PL, and Bukreyev A. Respiratory Syncytial Virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Virol.* pp. 9156-9172, 2003.
37. Ou D, Metzger DL, Wang X, Hung J, Pozzilli P, and Tingle AJ. TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction. *Diabetologia.* 45: 1678-1688, 2002.

38. Hasel C, Durr S, Rau B, Strater J, Schmid RM, Walczak H, Bachem MG, and Moller P. In chronic pancreatitis, Widespread emergence of Trail receptors in Epithelia coincides with neoexpression of TRAIL by pancreatic stellate cells of early fibrotic areas. *Lab. Invest.* 83: 825-836, 2003.
39. Chu Q, Yang K, and Wang A. Research progress on oxidative stress and apoptosis. *Wei Sheng Yen Chiu/J. Hygiene Res.* 32: 276-279, 2003.

A STUDY OF THE CITICAL ROLE OF TRAIL-R1 (DR4) IN RH2-TRIGGERED APOPTOSIS IN HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA A549 CELLS

Shu-Mei Yang^{1,3}, Yan-Nian Chen^{1,3} and Kun-Tao Tsai²

¹ *Department of Chinese Medicine, China Medical University Peikang Hospital,*

² *Department of Thoracic Medicine, China Medical University Peikang Hospital,
Yun-Lin, Taiwan*

³ *School and Research Institute of Chinese Medical University,
Taichung, Taiwan*

(Received 5th August 2004, accepted 11th October 2004)

Ginsenoside Rh2 (Rh2), a purified ginseng saponin, has been shown to have antiproliferative effects in certain cancer cell types. However, the molecular mechanisms of Rh2 on cell growth and death have not been fully clarified. In this study, the anti-proliferative effect of Rh2 in human lung adenocarcinoma A549 cells was investigated. Rh2-induced apoptosis was confirmed by TUNEL assay and DNA fragmentation analysis. Results show that the administration of Rh2 caused an increase in the expression level of TRAIL-R1 (DR4) death receptor but did not alter the level of other death receptors and Bcl-2 family molecules. Furthermore, the Rh2-induced apoptosis was significantly inhibited by DR4: Fc fusion protein, which inhibited the TRAIL-DR4-mediated apoptosis. In addition, the caspase-2, -3 and -8 were drastically activated upon Rh2 treatment. The inhibitors of caspase-2, -3, and caspase-8 markedly prevented the cell death induced by Rh2, and the inhibitor of caspase-8 also significantly inhibited the activation of caspase-2, -3 and -8. This suggest that the increase in the expression level of DR4-death receptor may play a critical role in the initiation of Rh2-triggered apoptosis, and the activation of caspase-8/caspase-3 cascade also acts as the executioner of the Rh2-induced death process.

Key words: Ginsenoside Rh2, TRAIL-R1, Caspase.