

# 去甲基斑蝥素誘發卵巢癌細胞凋亡

楊佩玉<sup>1</sup>、黃群翔<sup>1</sup>、林琮諺<sup>1</sup>、楊玉英<sup>1,\*</sup>、林益卿<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> 秀傳醫療社團法人秀傳紀念醫院檢驗科，彰化，臺灣

<sup>2</sup> 彰化基督教醫院家庭醫學科，彰化，臺灣

去甲基斑蝥素 (NCTD)，來自斑蝥素的修飾化合物，先前研究證明可以誘導癌細胞的凋亡。本研究旨在探討 NCTD 對於卵巢癌細胞中的抗癌活性和所涉及的抗癌機制。卵巢癌細胞 SKOV-3 以濃度範圍 1 至 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 NCTD 處理，MTT 測定細胞活性，結果顯示 NCTD 對 SKOV-3 細胞的毒殺作用與劑量和作用時間成正相關。用 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  或更高的 NCTD 處理顯著增加了寡核苷酸形成，並伴隨著 PARP 裂解的出現，這意味著細胞凋亡的發生。NCTD 的作用也導致細胞質中細胞色素 c 釋放增加以及 caspase-3, -8 和 -9 的活化增加。另外，NCTD 增加促/抗凋亡蛋白的比例和減少 IAP 家族蛋白的表達，包括 cIAP1、cIAP2 和 XIAP。總之，NCTD 是透過影響內在和外在路徑誘發卵巢癌 SKOV-3 細胞走向凋亡，因此 NCTD 有潛力成為卵巢癌的治療藥物。

**關鍵字：**去甲基斑蝥素，卵巢癌、細胞凋亡

## 前言

上皮性卵巢癌是死亡率很高的疾病。在美國的癌症統計中，2017 年估計有 22440 例新病例並導致 14080 人死亡 [1]。在癌症發生的早期階段，缺乏特異性症狀及有效的篩選方法，因此卵巢癌患者大約四分之三在晚期才被診斷出來。大約 15% 的上皮性卵巢癌診斷時已為第四期癌症，其預後很差，五年存活率僅 18.6%。目前的治療方法是減積手術 (cytoreductive surgery) 切除腫瘤後，輔助化

療是標準的治療方式。然而，有四分之三的患者可能復發，救援性化療和分子標靶治療只能將大部分患者存活率延長數週到數個月的時間 [2]。由於目前的治療策略效果有限，治療失敗是導致高死亡率的其中一個因素。因此，發展卵巢癌的新治療策略是必要的。

去甲基斑蝥素 (Norcantharidin, NCTD) 是斑蝥素 (cantharidin, CTD) 的化學衍生物，而斑蝥素則是由乾燥的斑蝥蟲體中純化而得。根據文獻指出，斑蝥素具有抗腫瘤效應，但是此藥對泌尿系統有嚴重的副作用。

\* 通訊作者 (兩者貢獻相同)：1. 楊玉英，秀傳醫療社團法人秀傳紀念醫院檢驗科，地址：彰化市中山路一段 542 號，電話：04-7256166 分機 81022，傳真：04-7262491，E-mail：myriam5151@gmail.com 2. 林益卿，彰化基督教醫院家庭醫學科，地址：彰化市南校街 135 號，電話：04-7238595 分機 4192，傳真：04-7247517，E-mail：licypy05@gmail.com

經化學結構改變的 NCTD 具有毒性較低且易於合成的優點 [3]，且保留抗腫瘤效果。許多有關 NCTD 抗腫瘤的研究已陸續被報導。文獻報告中指出，NCTD 可以經由誘發細胞凋亡、細胞自噬或細胞週期停滯等相關機轉來抑制癌細胞株的生長，包括口腔癌、肝癌、血癌、大腸直腸癌、乳癌、黑色素細胞瘤、膽囊癌及前列腺癌等 [4-14]。在動物實驗中顯示，NCTD 可抑制血管新生、肺轉移及延長存活率。而在分子機轉中，NCTD 透過活化 caspases、調控 MAPKs 路徑、PKC 路徑、Bcl-2 家族相關蛋白、抑制抗藥性機轉並抑制腫瘤細胞之侵犯與轉移等相關蛋白而引發的抗腫瘤效應 [9, 15-17]。

我們之前的研究已經證實，NCTD 可誘導大腸直腸癌、乳癌和前列腺癌細胞株的細胞凋亡 [13, 18, 19]。此研究進一步探討 NCTD 是否能抑制卵巢癌細胞株的生長，並研究其相關的機轉。

## 材料與方法

### 1. 細胞株及藥品

NCTD 購自 SIGMA (St, Louis, MO, USA)。卵巢癌細胞株 SKOV-3 購自美國 ATCC 細胞庫。SKOV-3 細胞培養於 McCoy's 5a Medium 含 10% 胎牛血清 (FBS) (GIBCO) 及 50  $\mu\text{g/ml}$  的 gentamycin (GIBCO)。

細胞於恆溫 37°C 的 CO<sub>2</sub> 自動調節培養箱內培養，箱內充以濕潤的 95% 空氣和 5% 的 CO<sub>2</sub> 氣體。細胞傳代時，以 0.25% trypsin 和 0.02% EDTA 1:1 (v/v) (GIBCO) 混合的消化液使細胞脫離，成為單細胞懸浮液。

### 2. 細胞毒性及生長抑制試驗

細胞毒性試驗是 MTT 試驗 (microculture

tetrazolium test)，方法如下：SKOV-3 細胞生長至接近全滿 (confluence) 後，用 trypsin-EDTA 將細胞脫下，離心與再懸浮後接種至 96 皿板，每皿加入培養液 (含 10% 胎牛血清的培養液) 100  $\mu\text{l}$  與卵巢癌細胞 3000-4000 個，在 37°C 下培養 24 小時後加入含 NCTD 的培養液 100  $\mu\text{l}$ ，最終濃度分別為 0, 1, 3, 10 和 30  $\mu\text{g/ml}$  等五個濃度。每個濃度各做三重覆。分別培養 24、48 及 72 小時後，每皿加入 1 mg/ml MTT (SIGMA) 50  $\mu\text{l}$ ，於 37°C 培養 4 小時，去除上清液，各加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO，震盪混合後，於 30 分鐘內以 Multiskan EX Version 1.0 比色計 (Labsystems, Finland) 於波長 550 nm 測定吸光度。

### 3. 細胞死亡測定

SKOV-3 細胞以 NCTD 不同濃度 (0, 3, 10, 30  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理 24 小時後，以細胞死亡測定套組進行分析 (Cell Death Detection ELISA Kit, Roche, Germany)。先離心去掉上清液，細胞以 lysis buffer 作用 30 分鐘，再離心，分別取上清液 20  $\mu\text{l}$  與 immunoreagent (含 anti-histone-biotin 及 anti-DNA-POD) 一起加入 96 皿盤中以 300 rpm 震盪 2 小時，再以 incubation buffer 清洗 4 次後，每皿加入 ABST 溶液 100  $\mu\text{l}$  作用 10-20 分鐘直到呈色，每皿再加入 ABST 終止溶液 100  $\mu\text{l}$ ，405 nm 計讀結果。結果以增強因子 (enrichment factor) = (處理過 NCTD 的細胞的吸光度 / 未處理過 NCTD 的細胞的吸光度) 表示。

### 4. Caspase 3, 8, 9 的活性測定

SKOV-3 細胞以 NCTD 不同濃度 (0, 3, 10, 30  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理 24 小時後，以 Caspase 3, 8, 9 測定套組進行分析 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)。細胞溶解產物總蛋白 100  $\mu\text{g}$  (50  $\mu\text{l}$ ) 加入 50  $\mu\text{l}$  reaction

buffer 中，再加入 5  $\mu\text{l}$  內含特異性呈色受質 [caspase-3 (DEVD-pNA), caspase-8 (IETD-pNA) 或 caspase-9 (LEHD-pNA)]。在 37°C 下作用 2 小時，405 nm 計讀結果。

## 5. 細胞色素 c (cytochrome c) 的分析

細胞色素 c (cyto. c) 以 cyto. c ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc. Farmingdale, NY) 測定。SKOV-3 細胞以 NCTD 不同濃度 (0, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 處理 24 小時後，收集細胞並以 PBS 清洗細胞後，以 Digitonin cell permeabilization buffer 在冰上作用 5 分鐘將細胞溶解，離心後取上清液測定細胞質中的 cyto. c 濃度。將所有檢體稀釋後加入 cyto. c 96-well plate，500 rpm 作用 1 小時，清洗過後加入抗體作用一小時，再清洗，加入 cyto.c conjugate 在 500 rpm 下作用 30 分鐘，再加入呈色基質，室溫下作用 45 分鐘後加入終止溶液，405 nm 計讀結果。

## 6. 統計分析

所有分析結果以平均值  $\pm$  標準偏差呈現。統計方法以 Student's t-test 和 ANOVA 分析。p < 0.05 為具有統計學上的意義。

## 結果

### 1. 細胞毒性

本研究使用 MTT 方法以 NCTD 對卵巢癌細胞株 SKOV-3 進行細胞毒性試驗。NCTD 對 SKOV-3 細胞 24、48 及 72 小時的  $\text{IC}_{50}$  值分別為  $23.17 \pm 1.16$ 、 $7.76 \pm 0.86$  及  $5.36 \pm 0.55$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，如圖 1 所示。NCTD 對於 SKOV-3 細胞的抑制作用和其濃度及作用時間呈現正相關的現象。

### 2. 細胞死亡測定

SKOV-3 細胞經 NCTD 作用 24 小時，以細胞死亡分析套組分析的結果顯示，NCTD

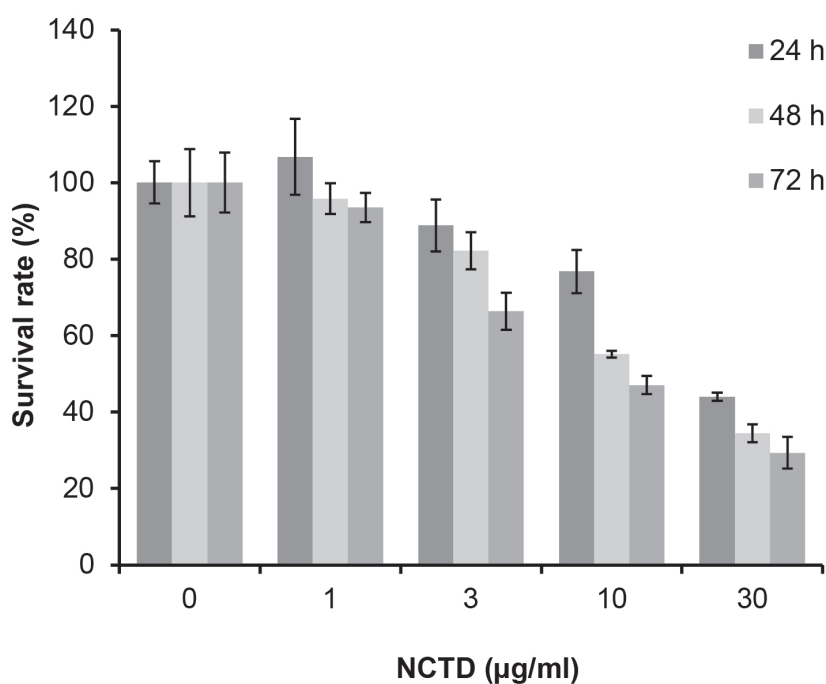


圖 1 NCTD 對 SKOV-3 卵巢癌細胞的細胞毒性作用。用 0, 1, 3, 10 和 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 NCTD 處理細胞 24、48 和 72 小時，並進行 MTT 細胞毒性測定。數據以平均值  $\pm$  SD 表示，統計方式以 ANOVA 分析。

濃度越高其 DNA 呈現片段的情形越明顯，我們以未處理過的 NCTD 的細胞當作指標，處理過 NCTD 的細胞，依其濃度的增加，其增強因子越高，NCTD 濃度在 3  $\mu\text{g/ml}$  時，其增強因子達 2.35 倍 ( $p < 0.01$ )，當濃度達到 30  $\mu\text{g/ml}$  時，其增強因子高達 26.88 倍 ( $p < 0.01$ )，與未加 NCTD 的細胞比較並經過統計學分析後，都具有顯著的差異；表示 SKOV-3 細胞經 NCTD 作用後，其 DNA 及組蛋白 (histone) 的外露明顯，證實 NCTD

引發卵巢癌細胞的死亡是藉由誘發細胞凋亡 (圖 2A)。當細胞凋亡時 116 kDa 的 PARP 蛋白將被裂解成一個 85 kDa 片段啟動細胞凋亡機制，在處理過 NCTD 的 SKOV-3 細胞，也可以發現 PARP 被裂解 (圖 2B)。

### 3. caspase-3，-8 和 -9 的活性測定

本研究釐清 NCTD 對卵巢癌細胞的凋亡的分子作用機制，針對 NCTD 處理 SKOV-3 細胞參與內在及外在途徑進行了研究。Caspase 活性測定法顯示，NCTD 引起

圖 2A

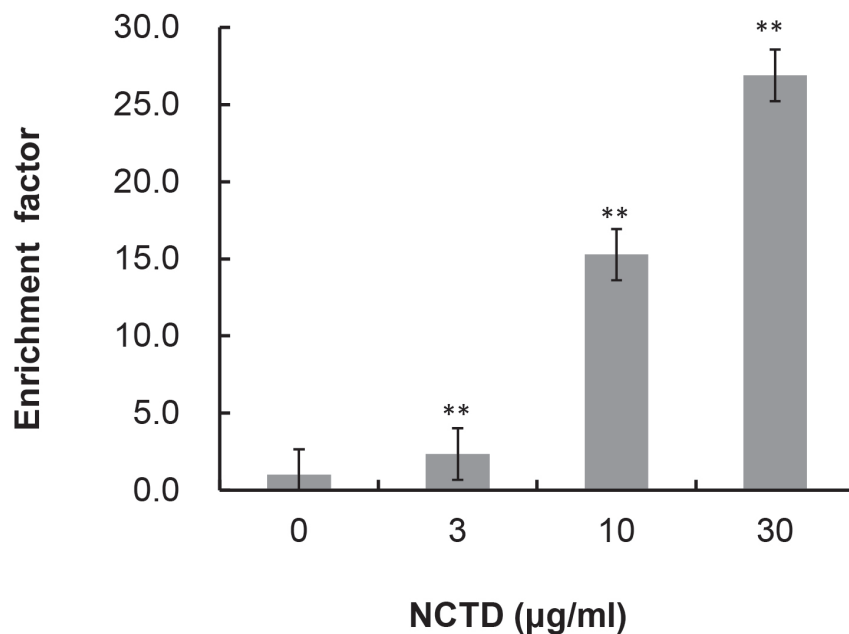


圖 2B

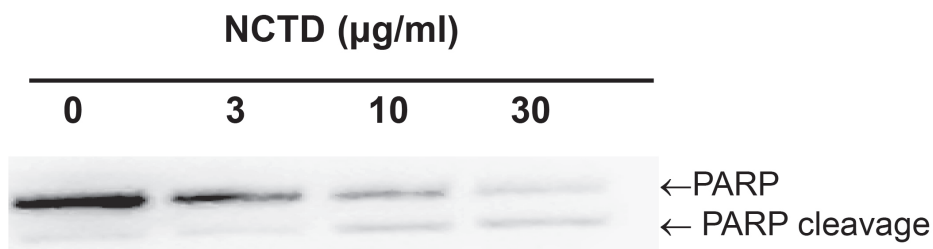


圖 2 NCTD 對 SKOV-3 卵巢癌細胞誘導凋亡的影響。(A) 細胞經 NCTD 處理 24 小時。以 ELISA 試劑證明了 NCTD 對凋亡寡核苷酸形成具有劑量依賴性。\*\* 表示與對照組相比  $P < 0.01$ 。結果統計以 Student's t-test 方法分析。(B) Western 結果顯示，在 NCTD 處理的 SKOV-3 卵巢癌細胞中出現 PARP 的斷裂。

caspace-3, -8 和 -9 的活性增加, 且與 NCTD 的劑量呈現正相關 (圖 3)。這個結果顯示, NCTD 誘導的凋亡與外在和內在的信號途徑有關。

#### 4. 細胞色素 c 的分析

本研究使用細胞色素 c 的分析套組, 偵測 NCTD 由粒線體所釋出的細胞色素 c 是

導致細胞凋亡的重要因子。我們進一步研究 NCTD 對 SKOV-3 在細胞質中對細胞色素 c 釋放的影响。在細胞色素 c 的測定中, 其結果顯示 NCTD 引起 SKOV-3 細胞質中細胞色素 c 的濃度隨著 NCTD 劑量增加而增加 (圖 4)。當 NCTD 處理到 30  $\mu\text{g/ml}$  時, 細胞色素 c 的濃度可增加至控制組 (未處理過

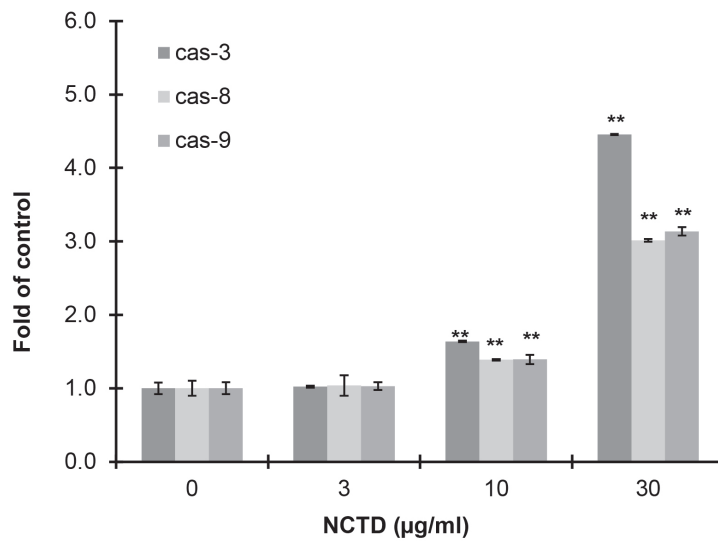


圖 3 處理過 NCTD 的 SKOV-3 卵巢癌細胞 caspase -3、-8 和 -9 的活性增加。\* 和 \*\* 分別與對照組相比  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。結果統計以 Student's t-test 方法分析。

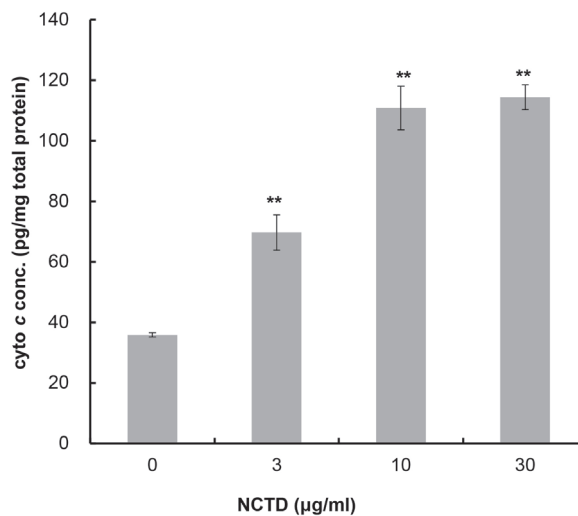


圖 4 以 NCTD 處理過的 SKOV-3 細胞其細胞色素 c 的釋放增加。\* 和 \*\* 分別與對照組相比  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。結果統計以 Student's t-test 方法分析。

NCTD) 的 3.19 倍。

### 5. NCTD 對於 SKOV-3 細胞中調控細胞 凋亡之蛋白表現的影響

圖 5 表示經 NCTD (0、3、10、30  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理 SKOV-3 細胞 24 小時後，收取細胞之萃取液，以西方墨點法測 Bax 及 Bcl-xL 蛋白質表現情形，以 Actin 作為 internal control。在 SKOV-3 細胞中，經藥物處理 24 小時後，可看到 Bax 蛋白隨著藥物濃度增加而增加的趨勢，但 Bak 則未因 NCTD 處理而有變化；Bcl-xL 蛋白則有隨藥物濃度增加而減少的趨勢。而在凋亡抑制相關蛋白家族中 (Inhibitor of Apoptosis, IAP family)，經過 NCTD 處理過的 SKOV-3 細胞在 XIAP、cIAP1 及 cIAP2 三種蛋白的表現均呈現與濃度相關的減少趨勢。

## 討論

凋亡過程是影響腫瘤生長速度的重要因素之一。腫瘤細胞對抗凋亡起因於凋亡路徑發生缺陷，而使得腫瘤對細胞毒性藥物有抗藥性。因此，提高腫瘤細胞的凋亡在癌症治療中是有效的治療策略 [20]。斑蝥是中國及越南的傳統藥物，主要活性成分為斑蝥素 (CTD)，CTD 及其衍生物的藥理作用是抑制蛋白磷酸酶 1 及 2A (protein phosphatase 1 and 2A)，蛋白磷酸酶涉及細胞內多種調控機制，包括細胞凋亡、訊息傳遞路徑、細胞週期的調節、葡萄糖的代謝及鈣離子的傳送等；許多研究報告顯示 CTD 及 NCTD 具有多種生物活性，如抗氧化，抗發炎以及抗癌作用等，然而，CTD 的藥理作用雖然非常明

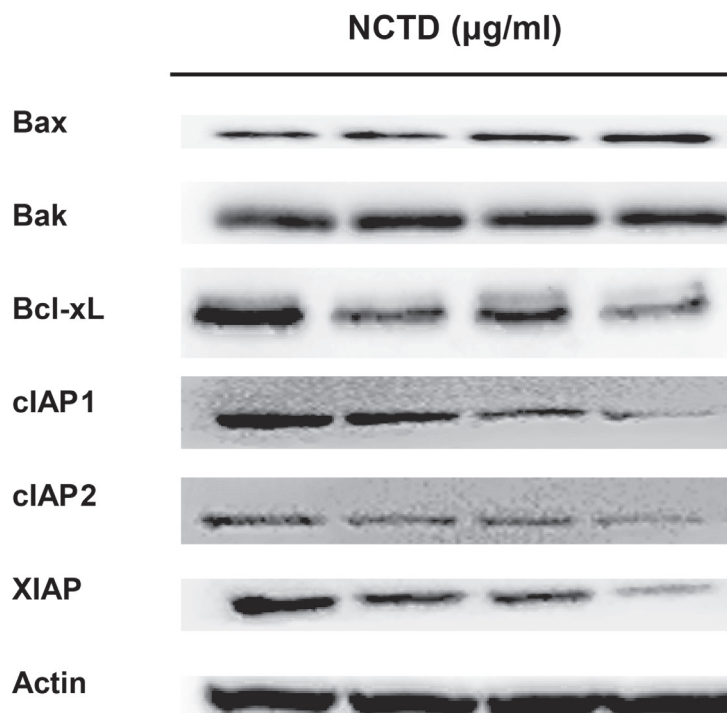


圖 5 在 NCTD 處理的 SKOV-3 卵巢癌細胞中 Bcl-2 家族成員的蛋白表現。以 NCTD 處理 SKOV-3 卵巢癌細胞 24 小時。細胞蛋白萃取後進行西方墨點分析，分析促凋亡蛋白 (Bax 及 Bak)、抗凋亡蛋白 (Bcl-xL) 及 IAP 家族蛋白的表現量。β-actin 為 internal control。

顯，其毒性卻有致命的風險，而修飾結構後的衍生物 NCTD，毒性較低但保留 CTD 的藥理活性 [21, 22]。在體外和動物研究中發現 NCTD 可抑制許多種類的癌症 [22, 23]，其抑制腫瘤細胞生長的作用機轉包括透過誘發外在及內在路徑而導致細胞凋亡 [4, 13, 14, 18, 19, 25]；亦可誘發細胞自噬 (autophagy) [25]；中止細胞週期於 G2 或 S 期 [8, 9, 10, 12, 28]；並透過抑制基質金屬蛋白酶表現或抑制血管新生而影響了腫瘤的轉移與擴散 [15, 23]，也可透過抑制 P-gp (P-glycoprotein) 而克服多重抗藥性 [23]。在 NCTD 的相關研究中，僅有 NCTD 的衍生物 norcantharimides 對卵巢癌 A2780 細胞及 Nd3 對 SKOV-3 的研究報告 [33]。而在已發表的文獻中則尚無 NCTD 針對卵巢癌細胞作用機轉的研究結果。在 Nd3 對 SKOV-3 的研究報告中指出，Nd3 會明顯抑制 SKOV-3 細胞的增殖，其 24、36 及 48 小時的  $IC_{50}$  值分別是  $25.1 \pm 2.3 \mu\text{M}$ 、 $21.8 \pm 2.8 \mu\text{M}$  及  $20.4 \pm 3.3 \mu\text{M}$ ；Nd3 作用後的 SKOV-3 細胞會停止在 G2/M 期，且會影響 cdc2、cyclin B1、Bcl-2 及 Bax 蛋白表達的改變並誘發細胞凋亡 [33]。在本研究中，我們的結果顯示 NCTD 對 SKOV-3 的卵巢癌細胞抑制效應與劑量和作用時間有關，此結果和 Nd3 對 SKOV-3 的研究報告相似，NCTD 及 Nd3 對 SKOV-3 的細胞增殖抑制效應均具有時間及劑量的相關性 [33]；Nd3 的研究結果顯示其細胞毒殺效果較 NCTD 佳，然而，Nd3 為實驗室自行合成的 NCTD 衍生物，相較 NCTD 易於合成且毒性低的優點，Nd3 在發展成為藥物仍需要進一步探討其毒性及是否可大量生產。

細胞凋亡為誘導癌細胞死亡提供了新的標的。在這項研究中，我們的結果顯示

NCTD 以劑量相關方式誘導凋亡寡核小體形成 (圖 2A)，並導致 SKOV-3 細胞中下游標的蛋白 PARP 被裂解切割 (圖 2B)。細胞凋亡可以透過內在及外在兩個主要途徑誘導，在 Peng 及 Yeh 的研究中，NCTD 通過活化細胞死亡受體途徑誘導結直腸癌細胞和肝癌細胞凋亡 [14, 24]；在黑色素瘤和肝癌細胞的研究中顯示，NCTD 作用過的細胞，caspase-3 和 -9 活性升高 [4, 8, 25]；而在我們先前的研究中顯示 NCTD 可透過外在和內在途徑誘導大腸癌、乳癌細胞及前列腺癌走向凋亡 [13, 18, 19]。在本研究中，則顯示 NCTD 作用於 SKOV-3 細胞時，caspase-3、-8 和 -9 活性會依 NCTD 的作用濃度上升 (圖 3A)。細胞色素 c 是內在凋亡途徑的重要介質，本研究結果也顯示細胞質中的細胞色素 c 濃度也隨著 NCTD 作用濃度增加而增加。另外，調控細胞凋亡的 Bcl-2 蛋白家族中的促細胞凋亡及抗細胞凋亡蛋白若發生不平衡也會導致細胞走向凋亡，本研究結果顯示 NCTD 處理過的 SKOV-3 細胞，促細胞凋亡 Bax 表現增加，而抗細胞凋亡的 Bcl-xL 蛋白減少。此種不平衡的結果也使得 NCTD 作用後的 SKOV-3 細胞走向凋亡，此結果與 NCTD 作用在其他腫瘤細胞的結果相似，也與 Nd3 導致 SKOV-3 細胞的 Bcl-2 及 Bax 不平衡引發細胞凋亡的報告相似 [33]。

癌細胞逃脫細胞死亡路徑是導致癌症治療失敗的一個典型特徵。IAP 蛋白是通過阻斷 caspase 的活化來促進細胞存活的抗凋亡蛋白家族。在各種人類癌症中經常觀察到的 IAP 蛋白的過度表達，IAP 蛋白並且涉及腫瘤進展、復發和轉移 [29-31]。因此認為 IAP 蛋白的抑制也可作為癌症治療的靶分子。以前的研究顯示 NCTD 會抑制膽囊癌和淋巴瘤中

survivin、XIAP 和 cIAP1 的表達 [9, 27, 32]。我們先前的研究也發現 NCTD 降低了前列腺癌 Du145 細胞中的 survivin、XIAP、cIAP1 和 cIAP2 蛋白表達，在 22Rv1 細胞中也降低 survivin、XIAP 和 cIAP1 的蛋白表現。而在本研究中，我們的結果顯示在 NCTD 作用過的 SKOV-3 也呈現類似的結果，cIAP1、cIAP2 及 XIAP 蛋白的表達受到抑制（圖 5）。

總之，NCTD 通過激活外部和內部途徑誘導卵巢癌 SKOV-3 細胞的凋亡，包括釋放細胞色素 c、影響促凋亡和抗凋亡的 Bcl-2 家族蛋白之間的平衡、抑制 IAP 相關蛋白表達等相關機轉。因此，NCTD 對卵巢癌的抑制作用，可進一步深入探討。

## 誌謝

感謝秀傳醫療社團法人秀傳紀念醫院提供研究計畫經費補助（計畫編號為 RA13003），使本研究得以順利完成。

## 參考文獻

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.*, 2017; 67(1):7-30.
2. Jelovac D and Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J. Clin.*, 2011; 61(3):183-203.
3. Wang GS. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J. Ethnopharmacol.*, 1989; 26(2):147-62.
4. An WW, Wang MW, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Norcantharidin induces human melanoma A375-S2 cell apoptosis through mitochondrial and caspase pathways. *J. Korean Med. Sci.*, 2004; 19(4):560-6.
5. An WW, Tashiro SI, Onodera S, Ikejima T. Mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in norcantharidin-treated A375-S2 cells is preceded by the activation of protein kinase C. *Chin. Med. J.*, 2005; 118(3):198-203.
6. Chen S, Wan P, Ding W, Li F, He C, Chen P, Li H, Hu Z, Tan W, Li J. Norcantharidin inhibits DNA replication and induces mitotic catastrophe by degrading initiation protein Cdc6. *Int. J. Mol. Med.*, 2013; 32(1):43-50.
7. Chen YJ, Kuo CD, Tsai YM, Yu CC, Wang GS, Liao HF. Norcantharidin induces anoikis through Jun-N-terminal kinase activation in CT26 colorectal cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2008; 19(1):55-64.
8. Chen YN, Chen JC, Yin SC, Wang GS, Tsauer W, Hsu SF, Hsu SL. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer*, 2002; 100(2):158-65.
9. Fan YZ, Zhao ZM, Fu JY, Chen CQ, Sun W. Norcantharidin inhibits growth of human gallbladder carcinoma xenografted tumors in nude mice by inducing apoptosis and blocking the cell cycle in vivo. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 2010; 9(4):414-22.
10. Hong CY, Huang SC, Lin SK, Lee JJ, Chueh LL, Lee CH, Lin JH, Hsiao M. Norcantharidin-induced post-G(2)/M apoptosis is dependent on wild-type p53 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 276(1):278-85.
11. Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Lee CH, Lee JJ, Lou IU, Lee MS, Hsiao M, Lin SK. Comparisons of norcantharidin cytotoxic effects on oral cancer cells and normal buccal keratinocytes. *Oral Oncol.*,



- 2003; 39(1):19-26.
12. Liao HF, Chen YJ, Chou CH, Wang FW, Kuo CD. Norcantharidin induces cell cycle arrest and inhibits progression of human leukemic Jurkat T cells through mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of interleukin-2 production. *Toxicol. In Vitro.*, 2011; 25(1):206-12.
  13. Yang PY, Chen MF, Tsai CH, Hu DN, Chang FR, Wu YC. Involvement of caspase and MAPK activities in norcantharidin-induced colorectal cancer cell apoptosis. *Toxicol. In Vitro.*, 2010; 24:766-775.
  14. Yeh CH, Yang YY, Huang YF, Chow KC, Chen MF. Induction of apoptosis in human Hep3B hepatoma cells by norcantharidin through a p53 independent pathway via TRAIL/DR5 signal transduction. *Chin. J. Integr. Med.*, 2012; 18(9):676-82.
  15. Chen YJ, Shieh CJ, Tsai TH, Kuo CD, Ho LT, Liu TY, Liao HF. Inhibitory effect of norcantharidin, a derivative compound from blister beetles, on tumor invasion and metastasis in CT26 colorectal adenocarcinoma cells. *Anticancer Drugs*, 2005; 16(3):293-9.
  16. Cimmino F, Scoppettuolo MN, Carotenuto M, De Antonellis P, Dato VD, De Vita G, Zollo M. Norcantharidin impairs medulloblastoma growth by inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *J. Neurooncol.*, 2012; 106(1):59-70.
  17. Yang EB, Tang WY, Zhang K, Cheng LY, Mack PO. Norcantharidin inhibits growth of human HepG2 cell-transplanted tumor in nude mice and prolongs host survival. *Cancer Lett.*, 1997; 117(1):93-8.
  18. Yang PY, Chen MF, Kao YH, Hu DN, Chang FR, Wu YC. Norcantharidin induces apoptosis of breast cancer cells: involvement of activities of mitogen activated protein kinases and signal transducers and activators of transcription. *Toxicol. In Vitro.*, 2011; 25(3):699-707.
  19. Yang PY, Hu DN, Kao YH, Lin IC, Chou CY, Wu YC. Norcantharidin induces apoptosis in human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways. *Pharmacol. Rep.*, 2016; 68(5):874-80.
  20. Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2009; 9(3):320-40.
  21. Ghoneim K. Cantharidin as promising chemotherapeutic agent in the modern medicine: a comprehensive review. *J. Sci.*, 2014; 4(5): 272-292.
  22. Puerto Galvis CE, Vargas Mendez LY, Kouznetsov VV. Cantharidin-based small molecules as potential therapeutic agents. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2013; 82(5):477-99.
  23. Hsieh CH, Chao KS, Liao HF, Chen YJ. Norcantharidin, derivative of cantharidin, for cancer stem cells. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2013; 838651. doi: 10.1155/2013/838651.
  24. Peng F, Wei YQ, Tian L, Yang L, Zhao X, Lu Y, Mao YQ, Kan B, Lei S, Wang GS, Jiang Y, Wang QR, Luo F, Zou LQ, Liu JY. Induction of apoptosis by norcantharidin in human colorectal carcinoma cell lines: involvement of the CD95 receptor/ligand. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2002; 128(4):223-30.
  25. Chen YN, Cheng CC, Chen JC, Tsauer W, Hsu SL. Norcantharidin-induced apoptosis is via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase signaling pathways in human hepatoma HepG2 cells. *Br. J. Pharmacol.*, 2003; 140(3):461-70.

26. Han Z, Li B, Wang J, Zhang X, Li Z, Dai L, Cao M, Jiang J. Norcantharidin Inhibits SK-N-SH Neuroblastoma Cell Growth by Induction of Autophagy and Apoptosis. *Technol Cancer Res Treat.*, 2017; 16(1):33-44.
27. Lv H, Li Y, Du H, Fang J, Song X, Zhang J. The Synthetic Compound Norcantharidin Induced Apoptosis in Mantle Cell Lymphoma In Vivo and In Vitro through the PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013; 2013:461487.
28. Yu CC, Ko FY, Yu CS, Lin CC, Huang YP, Yang JS, Lin JP, Chung JG. Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH 8301 human urinary bladder carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, 2012; 41(3):1050-60.
29. Cheung CH, Huang CC, Tsai FY, Lee JY, Cheng SM, Chang YC, Huang YC, Chen SH, Chang JY. Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Onco. Targets Ther.*, 2013; 6:1453-62.
30. Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality? *Cancer Treat. Rev.*, 2013; 39(7):802-11.
31. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2015; 16(6):2129-44.
32. Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, Chen CQ. Inhibitory effect of norcantharidin on the growth of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells in vitro. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 2007; 6(1):72-80.
33. Cao JH, Xu B, Li M, Wu DZ, Huang W, Cui JR. Effect of norcantharidin's derivative Nd3 on proliferation of human ovarian cancer cell line SKOV3 and its possible mechanisms. *Ai Zheng.*, 2007; 26(4):361-6.

## Norcantharidin Induces Apoptosis In Human Ovarian Cancer Cells

Pei-Yu Yang<sup>1</sup>, Chun-Hsiang Huang<sup>1</sup>, Tsung-Yen Lin<sup>1</sup>, Yu-Ying Yang<sup>1,\*</sup>, I-Ching Lin<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory, Show Chwan Memorial Hospital, Changhua., Taiwan

<sup>2</sup>Department of Family Medicine, Changhua Christian Hospital, Changhua., Taiwan

Norcantharidin, a modified pure compound from blister beetles, was previously demonstrated to induce apoptosis of cancer cells. This study investigated its anti-cancer activity in ovarian cancer cells and the mechanisms involved. An ovarian cancer cell line, SKOV-3, was treated with norcantharidin at concentrations ranging from 1 to 30 µg/ml. An MTT assay revealed that norcantharidin induced cytotoxicity against the cancer cells in dose- and time-dependent manners. Treatment with norcantharidin at 3 µg/ml or higher significantly increased oligonucleosomal formation with concomitant appearance of PARP cleavage, implicating the induction of apoptosis. Norcantharidin elevated cytosolic cytochrome c levels and activated caspase-3, -8, and -9 in SKOV-3 cells. Mechanistically, norcantharidin increased ratios of pro-/anti-apoptotic proteins and decreased expression of IAP family member proteins, including cIAP1, cIAP2 and XIAP. In conclusion, norcantharidin exhibited cytotoxicity against SKOV-3 cells by inducing both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways and could thus potentially be a remedy for ovarian cancer.

**Key words:** Norcantharidin; ovarian cancer; Apoptosis; Bcl-2 family; Inhibitor of apoptosis (IAP)

---

\*Correspondence author: (Both authors are equal contribution to this work) 1. Yu-Ying Yang, Department of Laboratory, Show Chwan Memorial Hospital, Changhua., Taiwan., 542, Sec1 Chung-Shan Rd., Changhua, Taiwan, Tel: +886-4-7256166 ext. 81022, Fax: +886-4-7262491, E-mail: myriam5151@gmail.com 2. I-Ching Lin, Department of Family Medicine, Changhua Christian Hospital, Changhua., Taiwan., 135, Nan-Xiao St., Changhua, Taiwan, Tel: +886-4-7238595 ext. 4192, Fax: +886-4-7247517, E-mail: licypy05@gmail.com