

**Evaluation of the Anti-Lung Cancer Activities and the
Mechanisms *in vitro* of Furanodiene and its Synergetic
Effects with Paclitaxel**

By

Xu Wenshan



Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau

Evaluation of the Anti-Lung Cancer Activities and the Mechanisms in vitro of Furanodiene and its Synergetic Effects with Paclitaxel

By

Xu Wenshan

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Master of Chinese Medical Science

Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau

2013

Approved by _____

Supervisor

Date _____

碩士學位論文

呋喃二烯單獨用藥和與紫杉醇聯合用藥
的體外抗肺癌藥效及其作用機制研究




澳門大學中華醫藥研究院

University of Macau

原創性聲明

本人聲明：所呈交的學位論文，是本人在導師的指導下，獨立進行研究所取得的成果。除文中已經注明引用的內容外，本論文不包含任何其他個人或團體已經發表或撰寫過的科研成果。對本文的研究做出重要貢獻的個人和集體，均已在文中以明確方式標明。本人完全意識到本聲明的法律責任由本人承擔。

論文作者簽名：_____ 日期：_____



關於學位論文使用授權的聲明

本人完全瞭解澳門大學有關保留、使用學位論文的規定，同意學校保留或向政府有關部門或機構送交論文的影本和電子版，允許論文被查閱和借閱；本人授權澳門大學可以將本學位元元論文的全部或部分內容編入有關資料庫進行檢索，可以採用影印、縮印或其他複製手段保存論文和彙編本學位論文。

（保密論文在解密後應遵守此規定）

論文作者簽名：_____ 導師簽名：_____ 日期：_____

致謝

在澳門大學中華醫藥研究院的碩士研究生學習生活即將結束，值此論文完成之際，向一直關心、幫助我的老師、同學和朋友們致以我深深的謝意。

首先向我的導師王一濤教授表示最衷心最誠摯的感謝。感謝王教授在實驗和學業上的啟蒙、教導和幫助，以及生活上無微不至的關懷和鼓勵。感謝陳修平博士和陸金健博士對我的課題從選題、設計到完成的悉心嚴謹指導，以及在文獻資料收集、論文撰寫方面的指導與幫助。感謝李紹平教授、李銘源教授、許貝文博士、燕茹博士、鄭穎博士和張慶文博士在學業上給予我的無私教導。

此外，感謝譚雯、吳國勝、鐘章峰、李穎博、傅舒、黨元野、徐增濤等學長學姐，郭佳傑、鮑嬌琳、王勝鵬等同學，以及師弟師妹在我的實驗和學習中的幫助和鼓勵。特別感謝黨元野師姐提供的呔喃二烯。感謝澳門大學中華醫藥研究院的工作人員 Hattie, Chloe, Ada, Sandy, Wing, Joanna, Leon, Kio 和 Dorian 對我的實驗研究提供的無盡幫助。感謝澳門特別行政區科學技術發展基金會和澳門大學研究基金會提供研究經費。

最後，深深地感謝我的父母，感謝他們對我的付出和支持。

再次感謝所有關心我的老師、同學和朋友，衷心祝福所有人身體健康、一帆風順。

呋喃二烯單獨用藥和與紫杉醇聯合用藥 的體外抗肺癌藥效及其作用機制研究

摘要

中藥溫莪術 (*Rhizoma Curcumae*) 具有較好的抗癌作用，呋喃二烯 (furanodiene, FUR) 是從中提取的倍半萜類化合物，約占溫莪術油的 20%-30%，是其主要成分之一。我們的研究顯示，FUR 能劑量依賴性抑制 A549、NCI-H1299 和 95-D 三株肺癌細胞的增殖，作用 48 h 後其半數抑制率 (50% concentration of inhibition, IC_{50}) 分別為 157.9 μ M、126.1 μ M、118.3 μ M。與溫莪術油中的另一種廣泛用於各種腫瘤治療的倍半萜類化合物 β -欖香烯 (β -elemene, β -ELE) 相比，FUR 對 A549、NCI-H1299 細胞的抑制作用明顯強於 β -ELE (作用 48 h, IC_{50} 分別為 347 μ M、184 μ M)，而對 95-D 細胞兩者的作用相當。FUR 對 A549、95-D 細胞的克隆形成有顯著抑制作用，並阻滯腫瘤細胞於 G0/G1 期，下調細胞週期相關蛋白 cyclin D1、CDK6 表達，上調 p21、p27 表達。對於 95-D 細胞 FUR 作用 24 h 後，細胞內 PARP、caspase-7、Bcl-2、survivin 等蛋白表達明顯下調，說明 FUR 對於細胞凋亡通路信號分子有一定的作用。此外，FUR 顯著升高 A549、95-D 細胞中內質網應激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 分子標記物 BIP (binding immunoglobulin protein)、CHOP (C/EBP-homologous protein) 的 mRNA 和蛋白表達以及核內 CHOP 的聚集，說明 FUR 可誘導肺癌細胞產生 ERS。FUR 還可劑量依賴性誘導活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成，80 μ M FUR 作用於 95-D 細胞 24 h 後其 ROS 生成量與對照組相比增加了 2.4 倍，這可能與其誘導的 ERS 作用一起貢獻於對肺癌細胞的增殖抑制作用。FUR 作用於 95-D 細胞 24 h 後，與對照組相比，其對基質膠 (matrigel, MA) 和纖維粘連蛋白 (fibronectin, FN) 的粘附能力沒有明顯變化。通過 transwell 侵

襲實驗和劃痕實驗證實 FUR 對 95-D 細胞侵襲轉移能力的抑制作用較弱。

本研究還對 FUR 與化療藥物的聯合作用進行了研究。通過計算聯合用藥指數 (combination index, CI)，我們發現，FUR 與阿黴素 (doxorubicin, DOX) 聯合用藥在較高濃度時顯示出協同作用，低濃度則呈現拮抗作用。FUR 與紫杉醇 (paclitaxel, TAX) 聯合用藥對 NCI-H1299 和 95-D 細胞有較明顯的協同作用，對 A549 細胞協同作用較弱。以 95-D 細胞為模型，研究 FUR 與 TAX 的協同作用機制顯示，FUR 減少了 TAX 引起的 G2/M 期阻滯作用，作用 24 h 後 G2/M 期細胞比例由 0.2 μ M TAX 組的 94.48% 降低至聯合用藥組 (80 μ M FUR 加 0.2 μ M TAX) 的 55.01%，同時下調 cyclin D1、cyclin B1、CDK6 c-Myc 等蛋白的表達。FUR 與 TAX 聯合使用後，其 95-D 細胞中 Bcl-2、caspase-3、caspase-7 等蛋白的表達與其他組別相比也有明顯下調，說明 FUR 可增強 TAX 對細胞凋亡通路信號分子的作用。雖然 FUR 有明顯 ERS 誘導作用，但我們的實驗條件下沒有觀察到其與 TAX 聯合用藥後 BIP 和 CHOP 蛋白的表達變化，提示 ERS 通路可能並不參與 FUR 對 TAX 的協同作用。此外，通過檢測整合素 (integrin) 及其通路相關蛋白 integrin α 5、integrin α 6、integrin β 1、integrin β 3、integrin β 4、focal adhesion kinase (FAK) 和 paxillin 等的表達，我們發現聯合用藥組顯著下調 integrin β 4、FAK 和 paxillin 的蛋白表達，說明 FUR 對 integrin 及其通路的抑制可能是其協同作用機制之一。

綜上所述，中藥溫莖術中的主要成分之一 FUR 主要通過抑制腫瘤細胞的增殖來發揮其抗肺癌作用，由於其與莖術中的抗腫瘤成分 β -欖香烯具有類似的作用效果，提示其不僅是溫莖術中的主要藥理活性成分，同時也有可能進一步開發其成為新的抗腫瘤藥物。其與 TAX 的協同作用更顯示了 FUR 今後可能用在聯合用藥方面的潛力。

關鍵字：呋喃二烯， β -欖香烯，紫杉醇，肺癌，內質網應激，協同作用，整合素

Evaluation of the Anti-Lung Cancer Activities and the Mechanisms *in vitro* of Furanodiene and its Synergetic Effects with Paclitaxel

Abstract

Furanodiene (FUR) is a natural terpenoid isolated from *Rhizoma Curcumae*, a well-known Chinese medicinal herb that presents anti-proliferative activities in several cancer cell lines. In this study, we demonstrated that FUR concentration-dependently inhibited the cell proliferation of A549, NCI-H1299 and 95-D lung cancer cells with 50% concentrations of inhibition (IC₅₀) of 157.9 μM, 126.1 μM and 118.3 μM after 48 h-treatment, respectively. β-Elemene, another terpenoid isolated from *Rhizoma Curcumae*, exhibited weaker anti-proliferative effects in A549 and NCI-H1299 cells (with IC₅₀ of 347 μM and 184 μM, respectively after 48 h-treatment) and activities similar to FUR in 95-D cells. FUR significantly inhibited colony formation in A549 and 95-D cells and blocked their cell cycle progressions in G0/G1 phase through down-regulating the protein levels of cyclin D1 and CDK6, and up-regulating the protein expressions of p21 and p27. It affected the signaling molecules of apoptosis pathway in 95-D cells revealed by the down-regulation of the protein levels of PARP, caspase-7, Bcl-2 and survivin. FUR up-regulated the mRNA and protein expression levels of binding immunoglobulin protein (BIP) and C/EBP homologous protein (CHOP), and accumulated CHOP in the nucleus, indicating that endoplasmic reticulum stress (ERS) is induced. FUR also concentration-dependently enhanced the generation of reactive oxygen species (ROS). 80 μM FUR increased the ROS production to 2.4 folds of control after 24 h.

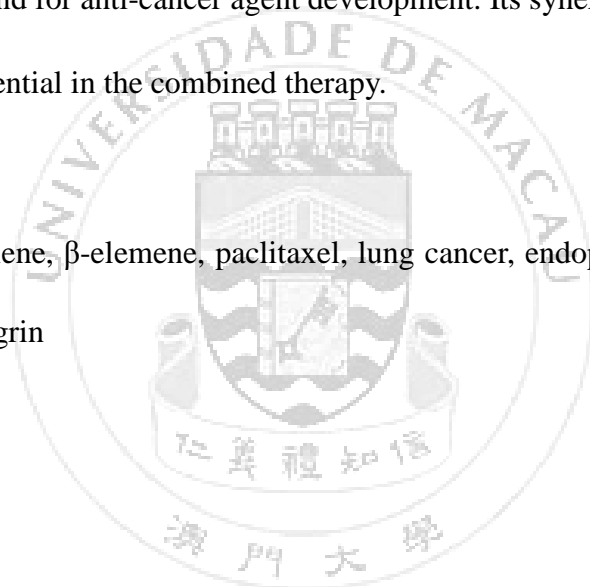
As well as the induction of ERS, the significant increasing of ROS generation is likely to, at least in part, be responsible for the anti-proliferative activities of FUR. However, the adhesion ability of 95-D cells to matrigel and fibronectin had been rarely inhibited after FUR treatment for 24 h. According to the results of the transwell invasion assay and the wound healing assay, FUR also exhibited slight suppression on cell invasion and migration in 95-D cells.

Furthermore, we investigated the effects of FUR in the combination with chemotherapy drugs. FUR plus doxorubicin (DOX) showed synergistic anti-cancer effects at high concentrations, whereas antagonism was observed at lower doses in all tested three cell lines according to the combination index (CI) after co-treatment. The combined treatment of FUR with paclitaxel (TAX) showed synergetic anti-proliferative activities in NCI-H1299 and 95-D cells, which was weaker in A549 cells. Using 95-D cells as a model to investigate the synergistic mechanisms, we demonstrated that 80 μ M FUR reduced the cell numbers distributed in G2/M phase induced by 0.2 μ M TAX (from 94.48% to 55.01% after 24 h-treatment) while increased those in G1 phase. The protein levels of cyclin D1, cyclin B1, CDK6 and c-Myc were all significantly down-regulated in the group of combined treatment. The co-treatment also induced more severe effects on the signaling molecules of apoptosis pathway revealed by decreasing the protein expressions of Bcl-2, caspase-3 and caspase-7. Though FUR alone obviously induced ERS, this signaling pathway may not contribute to the synergetic anti-proliferative effect as the protein expressions of CHOP and BIP in the combined treatment were similar to those in FUR alone group. The protein levels of integrin α 5, integrin α 6, integrin β 1, integrin β 3, integrin β 4, focal adhesion kinase (FAK) and paxillin were detected to explore the effects of FUR plus TAX on integrins and its related signaling pathway. The dra-

matically down-regulated expression of integrin β 4, FAK and paxillin might partially contribute the synergy effect.

These results indicate that FUR, one of the main components of *Rhizoma Curcumae*, presents its anti-lung cancer activities mainly through the anti-proliferative effects on lung tumor cells. FUR also showed similar anti-cancer activity compared with that of β -Elemene, another anti-cancer component isolated from *Rhizoma Curcumae*. These findings suggest that FUR is not only one of the main pharmacologically active ingredients of *Rhizoma Curcumae*, but also a promising compound for anti-cancer agent development. Its synergetic activity with TAX further indicates its potential in the combined therapy.

Keywords: furanodiene, β -elemene, paclitaxel, lung cancer, endoplasmic reticulum stress, synergetic activity, integrin



目錄

圖表目錄	xv
縮寫詞表	xvi
第一部分 引言.....	1
1 莪術.....	1
1.1 欖香烯	2
1.2 呋喃二烯	3
2 抗腫瘤藥物主要作用機制.....	4
2.1 細胞週期.....	5
2.2 細胞凋亡.....	5
2.3 內質網應激.....	6
2.4 活性氧.....	7
2.5 細胞粘附、侵襲、轉移能力.....	7
2.6 整合素.....	8
3 常用化療藥物.....	9
第二部分 呋喃二烯體外抗肺癌藥效及其作用機制研究.....	11
1 實驗材料與方法.....	11
1.1 實驗材料.....	11
1.2 細胞培養.....	12
1.3 MTT 檢測.....	12
1.4 克隆形成.....	13
1.5 流式細胞術.....	13

1.6	即時多聚酶鏈反應.....	14
1.7	Western Blot.....	15
1.8	免疫螢光.....	16
1.9	ROS 檢測.....	16
1.10	粘附抑制實驗.....	17
1.11	Transwell 侵襲實驗.....	17
1.12	劃痕實驗.....	18
1.13	統計方法.....	18
2	實驗結果.....	18
2.1	FUR 與 β -ELE 的細胞增殖抑制作用比較.....	18
2.2	FUR 對肺癌細胞的克隆形成抑制作用.....	20
2.3	FUR 對肺癌細胞的 G0/G1 期阻滯作用.....	22
2.4	FUR 對肺癌細胞凋亡通路信號分子的作用.....	23
2.5	FUR 對肺癌細胞的 ERS 誘導作用.....	24
2.6	FUR 對 95-D 細胞的 ROS 誘導作用.....	27
2.7	FUR 對 95-D 細胞粘附能力的影響.....	27
2.8	FUR 對 95-D 細胞侵襲能力的影響.....	27
2.9	FUR 對 95-D 細胞轉移能力的影響.....	31
3	實驗結果討論.....	32
3.1	FUR 與 β -ELE 的細胞增殖抑制作用比較.....	32
3.2	FUR 對肺癌細胞的 G0/G1 期阻滯作用.....	32
3.3	FUR 對細胞凋亡通路信號分子的作用.....	33

3.4	ERS 誘導作用	34
3.5	ROS 誘導作用	35
3.6	粘附、侵襲、轉移通路	35
3.7	小結	36
第三部分 FUR 與 TAX 對 95-D 細胞的協同作用及機制研究		37
1	實驗材料與方法	37
1.1	實驗材料	37
1.2	細胞培養	38
1.3	MTT 檢測	38
1.4	流式細胞術	39
1.5	Western Blot	39
1.6	統計方法	40
2	實驗結果	40
2.1	聯合用藥的細胞增殖抑制作用	40
2.2	FUR 加 TAX 對細胞週期的影響	40
2.3	FUR 加 TAX 對細胞凋亡通路信號分子的影響	44
2.4	FUR 加 TAX 對 ERS 通路的影響	44
2.5	FUR 加 TAX 對 integrin 信號通路的影響	45
3	實驗結果討論	47
3.1	細胞週期	47
3.2	細胞凋亡通路	47
3.3	ERS 通路	48

3.4 Integrin 信號通路.....	48
3.5 小結.....	49
第四部分 總結與展望	50
參考文獻.....	52
論文發表.....	63



圖表目錄

圖 1 莪術藥材 (A) 和莪術飲片 (B)	2
圖 2 β -欖香烯 (β -ELE) (A) 及呋喃二烯 (FUR) (B) 的化學結構式.....	4
圖 3 紫杉醇 (TAX)、阿黴素 (DOX) 的化學結構式	10
圖 4 FUR 與 β -ELE 對肺癌細胞的增殖抑制作用比較	20
圖 5 FUR 抑制肺癌細胞的克隆形成	21
圖 6 FUR 對肺癌細胞的 G0/G1 期阻滯作用	23
圖 7 FUR 對 95-D 細胞凋亡通路信號分子蛋白表達的作用	24
圖 8 FUR 誘導肺癌細胞的 ERS	26
圖 9 FUR 誘導 95-D 細胞 ROS 生成	28
圖 10 FUR 對 95-D 細胞粘附能力的影響	30
圖 11 FUR 對 95-D 細胞侵襲能力的影響	30
圖 12 FUR 對 95-D 細胞轉移能力的影響	32
圖 13 FUR 與 DOX、TAX 聯合用藥作用效果	42
圖 14 FUR 加 TAX 對細胞週期的作用	43
圖 15 FUR 加 TAX 對 95-D 細胞凋亡通路信號分子蛋白表達的作用	44
圖 16 FUR 加 TAX 對 ERS 通路的作用	45
圖 17 FUR 加 TAX 對 integrin 通路的作用	46
表 1 RT-PCR 引物序列.....	15
表 2 FUR 與 DOX、TAX 聯合用藥 CI 值.....	42

縮寫詞表

FUR	Furanodiene
β -ELE	β -Elemene
IC ₅₀	50% Concentration of inhibition
BIP	Binding immunoglobulin protein
GRP78	Glucose-regulated protein of 78 kDa
CHOP	C/EBP-homologous protein
GADD153	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 153
CI	Comcination index
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
MMP	Matrix metalloproteinase
AKT	Anti-apoptotic kinase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
TAX	Paclitaxel
DOX	Doxorubicin
CDK	Cyclin dependent kinase
ERS	Endoplasmic reticulum stress
UPR	Unfolded protein response

JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinases
ROS	Reactive oxygen species
CM-H ₂ DCFDA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
ECM	Extracellular matrix
MA	Matrigel
FN	Fibronectin
PLL	Poly-L-lysine,
HPLC-DAD	High-performance liquid chromatography coupled with diode array de- tection
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
PFA	Paraformaldehyde
BSA	Bovine serum albumin
t-BHP	tert-Butylhydroperoxide
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate buffered saline
PS	Penicillin-streptomycin
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PI	Propidium iodide
ATCC	American Tissue Culture Collection
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
TBST	Tris-buffered saline tween

SD Standard deviation

PVDF Polyvinylidene fluoride

