

由中藥草中分離能提升輻射治癌效果 之輻射增敏劑

Screening the Chinese Medicine for Radiation Sensitizers in Radiotherapy for Human Cancers

譚世特

國立清華大學輻射生物所

摘要

這是三年計畫的第二年的成果報告。計畫之主要目的在：由中藥草等天然物之萃取物中篩檢出能使生物細胞增加游離輻射敏感性者。這些細胞輻射增敏劑有潛力被研發成能提升人類輻射治癌效用的輻射增敏劑(radiosensitizers)。到目前為止的研究成果包括：(一) 建立一套以微生物細胞 *Deinococcus radiodurans* 為基礎的快速篩檢步驟。篩檢條件的考慮要點包括菌株種類，測試時的細胞生理狀態，藥物處理條件，及游離輻射照射劑量等。(二) 已檢測出對測試細胞 *D. radiodurans* 有明顯輻射增敏效應的兩個樣品 (THKM8605 與 THKM75)；此成功初步證明所採用的篩檢步驟的有效性。(三) THKM8605 與 THKM75 二化合物的學名及化學構造式已定出。(四) 初步實驗顯示 THKM75 對癌細胞有選擇性的毒殺效果，特別值得進一步評估與開發。(五) 已純化出與 THKM8605 或 THKM75 構造稍有不同的化合物，分別是 THKM8605-1、THKM8605-2 與 THKM75-1。這些化合物將為下一年度實驗的對象，以推測與輻射增敏效應有關的化學構造。

關鍵詞：癌症治療、中藥輻射增敏劑、抗癌中藥

ABSTRACT

This is the second-year progress report of a 3-year project designed to screen Chinese medicine for components that could sensitize cells to radiation inactivation. The cell radiosensitizers screened out will be used as the starting materials for developing radiosensitizers potentially useful in radiotherapy in human cancers. Up to now, we have (a) established a microbe-based screening procedure for cell radiosensitizers; The procedure has been improved by considering the following points: strain, cell physiological state, conditions for drug treatment and for ionizing irradiation. (b) identified two samples (THKM8605 and THKM75) capable of displaying profound radiosensitizing effect; this success demonstrates the usefulness of our screening protocol. (c) determined the scientific names and chemical structures for THKM8605 and THKM75. (d) shown that THKM75 may be cancer-specific in cell cytotoxicity. (e) prepared pure compounds with structures similar to THKM8605 or THKM75; these compounds will be used in the following year to help identify the specific chemical structure(s) responsible for the radiosensitizing effect.

Keywords: cancer therapy, Chinese medicine as radiosensitizer, anticancer drugs.

壹、前言

衛生署近年統計資料顯示惡性腫瘤為國人十大死因之首；治癌及防癌藥物的研發具迫切的社會需要性，也有極重要的學術價值。

在國外，除熟知已用於臨床的AZT、ddT、及一些hematopoietic stimulators ^{ex}IL-B、CSFs等，雖不斷有相關癌症治療新藥被發展出，但臨床效果皆未達預期理想。另一方面，從天然藥物（中藥材）分離具有抗癌藥理的新成分的嘗試已露曙光。例如，由長春花分離得到

的 vinblastine 及 vincristine 的抗癌（小兒白血病）療效等。

統計資料顯示，國內肺癌死亡人口在過去40年中增加約四十倍，分別居男女癌症死因第一、二位。肺癌病患中只有約15-20%適合外科手術切除病灶。其餘病人若尚無癌細胞轉移現象，則絕大數有賴放射療法（radiotherapy）。在臨床治療上，肺部腫瘤一般分為小細胞肺纖維瘤（small cell lung carcinoma; SCLC）和非小細胞肺纖維瘤（non-small cell lung carcinoma; NSCLC）兩類。報導[1-3]指出：(1) Stage I & II NSCLC的3-年及5-年存活率分別為36-56%及16-32%；(2) Stage IIIA NSCLC的3-年存活率只有約20%；(3) SCLC病人情況更不好，病情階段一般分為limited期和extensive期。SCLC一般採用放射治療與化學治療之合併療法。然而，即使在limited期，SCLC的二年存活率只有約28%。整體看，放射療法在肺癌治療上佔重要位置，但效果仍有待提昇。在諸多辦法中，對付癌細胞之輻射增敏劑（radiosensitizers）之採用是有發展潛力的一種[4,5]。

Misonidazole是廣泛使用之腫瘤輻射增敏劑。由於作用機制只及於腫瘤之缺氧細胞（hypoxic cells），misonidazole只對頭頸部腫瘤比較有療效[6]。再者，misonidazole具神經毒性，所以施用量受限。與misonidazole構造相似的ethanidazole（SR2508）毒性較低，但是和misonidazole一樣，作用點只限於腫瘤中的缺氧細胞。某些halogenated pyrimidines，如5-iododeoxyuridine及5-bromodeoxyuridine，也有腫瘤輻敏效果，不過對正常組織也會造成大的傷害[7]。整體說來，目前臨床使用的腫瘤輻射增敏劑的效果都未達理想。

近年來，輻射增敏劑之發展轉由天然物質中找尋。一個頗受注目的例子是由Western Yen分出的paclitaxel（taxol）[8]。Taxol屬diterpene類化合物，含有一個texane ring結構。Taxol可結合microtubules之tubulin次單位，會使細胞停在細胞週期（cell cycle）的G2/M期[9,10]。因為在各細胞週期中G2/M是輻射敏感度較高者，taxol才被考慮拿來作輻射增敏劑之研發。Tishler et al [11]報導說taxol可使人類astrocytoma細胞株輻射增敏化。不過，Liebmann et al [12]報導說taxol對對某些人腫瘤細胞只有中度之輻射增敏效果，另有

些腫瘤細胞並沒有因 taxol 導致輻射增敏反應。另外一方面, Hei et al [13]發現 taxol 會促進老鼠細胞株的輻射癌化。因此, taxol 作為輻射增敏劑仍有待一步研究與評估。不論如何, taxol 的例子指出了由天然化合物中分離輻射增敏劑之潛力。

近年來, 國內的生物技術的發展, 尤其是新藥物的研發, 受到產、官、學界普遍的重視。一般認為由中藥草成分中篩選新藥是比較有國際競爭力的方向。在本三年計劃中, 我們根據此理念, 擬利用『細胞系統對輻射之反應』為簡便工具, 由天然物(中藥草)中篩檢有潛力之輻射增敏劑。

輻射線對生物細胞有致死、生長抑制、及致突變等效應。這些效應所涉及之作用機轉非常複雜 [14]。高劑量輻射會造成細胞重要成份(尤其是DNA或染色體者)嚴重受損。若細胞無法修復DNA傷害則會步上死亡。細胞輻射增敏劑主要在利用該化合物之存在或處理使遭受輻射照射之細胞只要更低的輻射劑量就會造成大量傷害或減低其修復能力而導致死亡。已有不少證據顯示, 不同生物細胞常會有相似的生化及代謝上原因使其對輻射線敏感或具有抗性 [14]。換句話說, 由原核細胞(如細菌), 到真核的微生物(如酵母菌), 到如人類的哺乳類細胞在DNA傷害方式及修復機制及其調控具有相當程度的相似性。

在計畫的前二年中, 我們已建立了利用單細胞微生物奇異球菌 *Deinococcus radiodurans* [15-18] 的輻射增敏劑快速篩選系統。我們也成功篩檢到能顯著提升 *D. radiodurans* 細胞的輻射敏感性的兩個樣品 THKM8605 及 THKM75。二化合物的學名及化學構造式已定出。初步實驗顯示一個令人鼓舞的結果: THKM75 對癌細胞有選擇性的毒殺效果。本年度報告敘述及討論這些結果(註: 化合物的學名及化學構造式先前已以清華大學機密文件函送中醫藥委員會)。

貳、材料與方法

一、受測樣品

受測樣品由高雄醫學院天然物研究所吳永昌教授提供。樣品原

則上以 dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶解，並配成 20 mg/ml 溶液，保存於冰箱中待用。樣品測試濃度先定為 200 $\mu\text{g/ml}$ 若對細胞毒性太強，再適當稀釋。由於已由受測樣品篩選到有潛力的樣品，受測樣品的名稱有暫時保密的必要，本報告中不予列出。

二、細胞培養

D. radiodurans 菌細胞培養如前述[16-18]。液體培養基為 plate count broth (PCB)、固體培養基為 plate count agar (PCA)。這些培養基的成分皆包括 yeast extract、tryptone 及 glucose。培養溫度為 32 $^{\circ}\text{C}$ 。液體培養採震盪培養。

哺乳動物細胞株包括中國倉鼠卵巢細胞 CHO-K1 及其輻射敏感突變株 xrs6、人類二倍體纖維原細胞株 (Human diploid fibroblast cell lines; HDF) HF 及人類結腸線癌細胞 (RKO cells) 等。細胞株基本培養條件如我們先前發表之文章[19]，摘要如下：細胞株 CHO-K1 及 xrs6 的培養基採用 F-10 (Difco)，細胞株 RKO 及 HF 用 DMEM 培養基。上述培養基另添加 glutamine、bicarbonate、10% fetal calf serum、及抗生素 penicillin 和 streptomycin。細胞株保存時以 3×10^5 cells/ 25 cm^2 tissue culture flask 的濃度接種。培養條件為 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及 95% air。欲取得對數生長期之細胞時則於 24 h 前在 75 cm^2 之 flask 中接種 1×10^6 cells。前述人類細胞以 DMEM 培養基/15 mM NaHCO_3 /5% CO_2 培養；CHO-K1 及 NIH/3T3 細胞以 F10 培養基/5% CO_2 培養。

三、輻射照射

照射細菌細胞時採用 ^{60}Co γ -ray。動物細胞輻射照射用 150 keV X-ray 機器 (Torrey 150D)。

四、細胞輻射存活度測試

微生物細胞懸浮液以適當輻射劑量照射後，取樣經適當稀釋後，以平板計數法 (plate count) 測定存活細胞數[16]。

哺乳動物細胞株則在輻射照射處理後，先經 trypsinized，再取適量接種在含 5 ml 培養基之 60 mm dish 中。每一次測定中，使用 3 種不

同細胞濃度、每個濃度用5 dishes。含細胞之dishes經培養後出現colonies。在做存活計數時先測定plating efficiency (PE) 值(即以平板(plate)之總細胞數除colony數)。細胞照射存活度則為處理後之PE除以對照組(不照射)之PE。

天然藥樣品之細胞毒性測試：

基本步驟如前述之輻射照射存活度試驗，只是將輻射線處理換成天然藥物成份樣品之處理。天然物成分處理在不同之濃度及時間下，測細胞存活度做為毒性之指標。另外，也測定生長抑制濃度。在此，我們將考慮到樣品的有效濃度及可用之量來規劃最合適之條件。

細胞之繼代培養步驟如下：在裝DMEM或F10培養基的培養皿中長到50-60%的覆蓋度(confluence)後以PBS緩衝液(10X PBS含0.1 g KCl, 0.1 g KH_2PO_4 , 4 g NaCl, 1.08 g Na_2HPO_4 in 500 ml;高壓蒸氣滅菌後備用)洗兩次離心條件為1000 rpm (400 x g), 5 min。PBS洗過的細胞以0.05% trypsin/0.02% EDTA (T/E)溶液在37°C培養箱中處理5 min後細胞呈球狀，輕敲培養皿使細胞懸浮。此時，加入四至九倍於T/E溶液體積的培養基以停止T/E的作用。細胞懸浮液以吸量器抽吸數次並藉撞擊培養皿底部以使細胞團塊散開。取適當細胞稀釋液加入新鮮DMEM或F10培養基中，在37°C培養箱中培養。細胞之冷凍保存步驟如下：如上培養並以PBS緩衝液洗過的細胞以10% DMSO F10/DMEM (HeLa使用5% DMSO)配製細胞密度為 $\sim 10^6/\text{ml}$ 的細胞懸浮液。將細胞懸浮液分裝至冷凍保存瓶中(每瓶1 ml)。先置於-70°C, 2 h後放入液態氮桶中儲存。

欲重新培養冷凍保存細胞時，先置於37°C水浴解凍後，將細胞懸浮液接種於25 cm^2 培養皿中。加入4 ml新鮮DMEM或F10培養基並在37°C培養箱中培養2 h後觀察。當大部分細胞貼附培養皿上時，吸除培養基，加入5 ml新鮮DMEM或F10培養基，在37°C培養箱中培養。10%FCS/F10培養基含10%FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 0.12% sodium bicarbonate, 及F10 powder (F10粉一包容於20L ddH₂O，過濾滅菌後加入血清等)。

10% DMSO/10%FCS/F10 培養基含 10% DMSO, 10%FCS. 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 0.12% sodium bicarbonate, 及 F10 powder (DMSO 加入 F10 培養基後再過濾滅菌)。

五、樣品細胞毒性測試

毒性測試根據樣品生長抑制測定或存活度試驗。我們將考慮到樣品的有效濃度及可用之量來規劃最合適之輻射增敏測試條件。

六、輻射增敏測試

在初步評估天然物輻射增敏效力時, 細胞先以天然物樣品處理後接受輻射照射進行存活測試。無葯有照射及有葯物無照射二者為控制組。有輻射增敏效力即葯物處理組有較高的輻射致死率者。若初步結果顯示有增敏效力者才做較仔細的評估, 包括葯物之濃度效應及輻射增敏最適輻射劑量範圍。不同細胞若有不同數值, 也可做為推測輻射增敏可能機制之參考。

參、結果

一、輻射增敏劑之篩檢

繼上一年度報告的輻射增敏劑 THKM8605 後, 我們又檢測出對測試細胞 *Deinococcus radiodurans* 有明顯輻射增敏效應的一樣品 (編號 THKM75) (圖一) (來自樟樹)。藥品處理細胞濃度為 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 時間為 12 h。

如圖一及圖二所示 (數據為兩次實驗的平均值), 與對照組(無樣品處理者)比較, THKM75 處理 *D. radiodurans* IR 細胞後, 視藥品處理細胞濃度的不同, 可提高細胞輻射死亡率可達百倍至千倍以上。若換成相同死亡率下所需輻射劑量則可得達 3 的輻射增敏比率 (enhancement ratio, ER)。更具體的說, 若此藥品將來確定在臨床治療上可用來增敏人類的癌細胞, 則有使用葯物的病人只要接受低於 1/3 的輻射劑量即可得到相同的殺癌細胞效果。

圖三為 THKM75 對 *D. radiodurans* IR 處理之細胞存活曲線 (數據

為兩次實驗的平均值)。THKM75 (200 μ g/ml) 處理33 h後未見細胞死亡的結果顯示：此藥對*D. radiodurans* IR的細胞毒性不高。一個推論的結果是：雖然THKM75對*D. radiodurans*的輻射抗性的表現有負面的影響，它的作用位置（或毒性）似乎不落在細胞生長或生存上重要的代謝途徑。這種低細胞毒性也可能反映THKM75的作用是輻射引發性者（或說是傷害專一者）。另外，THKM75的作用輻射增敏是time-dependent，因為如圖四所示，僅2 h的藥物處理時間未見顯著的輻敏效果（數據為兩次實驗的平均值）。

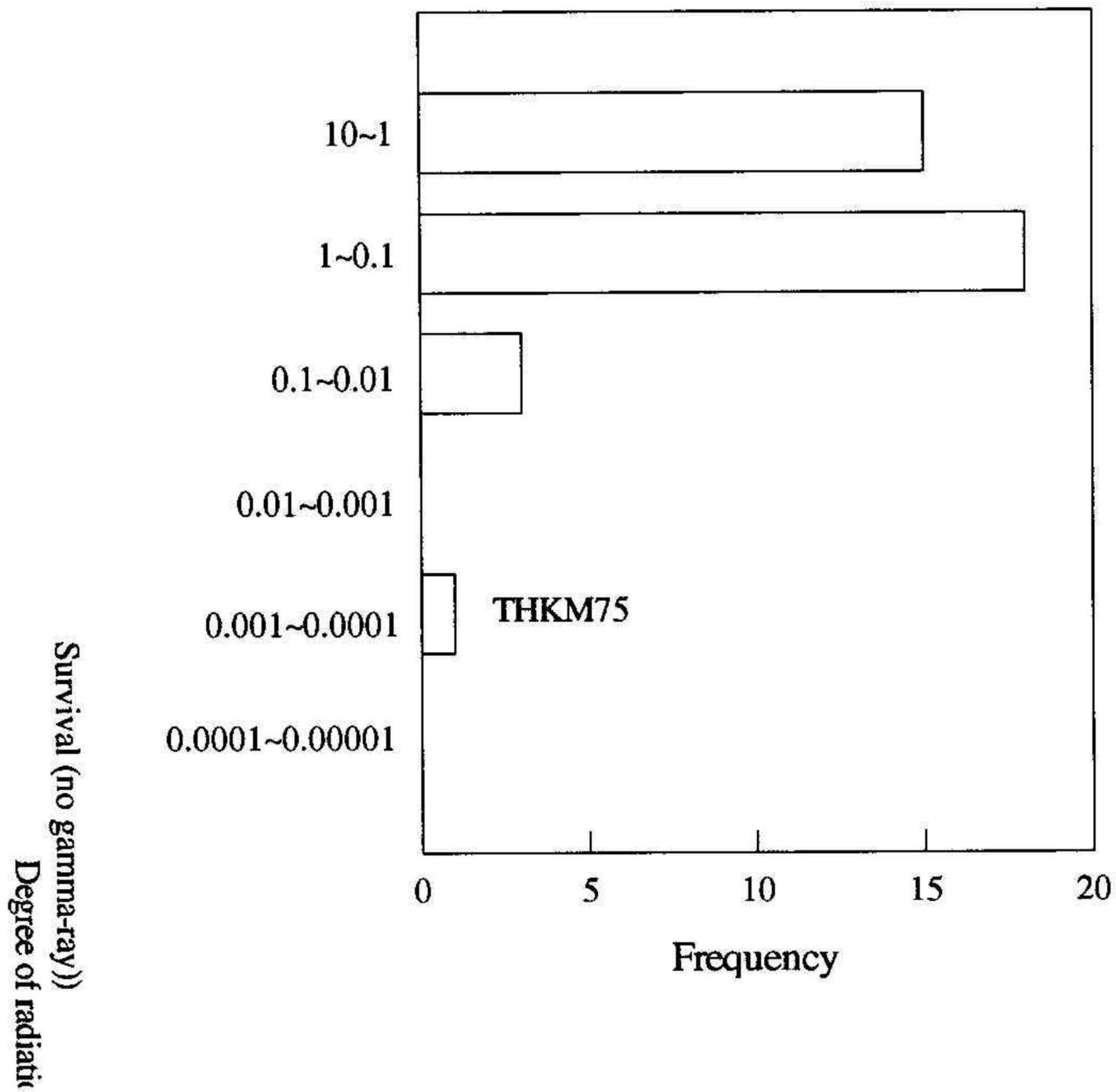
一、THKM75與THKM8605對人類細胞的毒性

如圖五所示，THKM75與THKM8605同樣對人類正常細胞（纖維母細胞株HF）毒殺性不高（一次實驗）。不過，對人類癌病細胞（直腸癌細胞株RKO），二者則大不相同：THKM75似乎對癌病細胞有某種尚不知原因的選擇性毒殺效果。THKM75與THKM8605對人類細胞的毒性及輻射增敏效應都將在下一年度作詳細的探討。

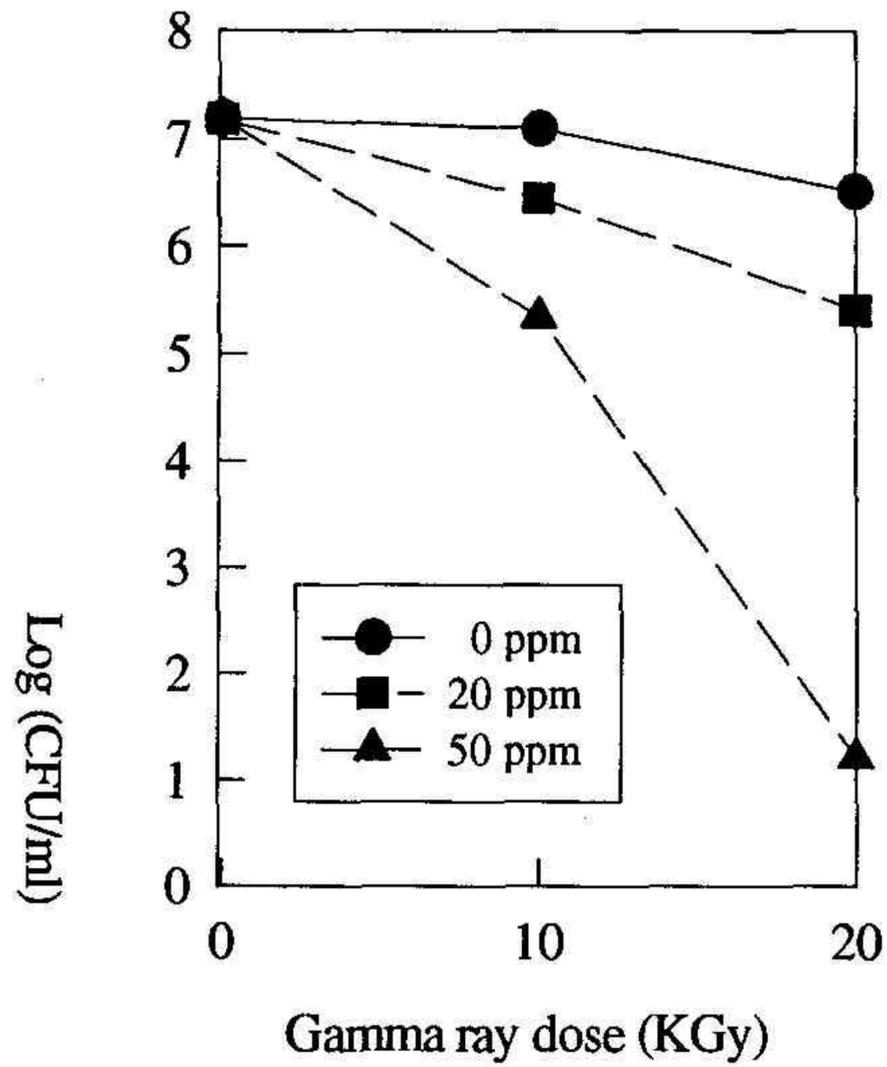
三、Hydroxyurea (HU)的細胞毒性及輻射增敏效應

HU是目前在臨床上用的輻射增敏劑，最近的報導指出它對HIV感染後的相關癌症也有療效，而受到注意。我們測試了HU的細胞毒性及增敏效應。我們以它來處理中國倉鼠卵巢細胞CHO-K1及其輻射敏感突變株xrs-6。結果的確顯出HU對CHO-K1及xrs-6皆有增敏效果，但ER值僅約1.5（圖六）（數據為三次實驗的平均）。另外臨床上數據顯示HU對人體細胞毒性頗高。

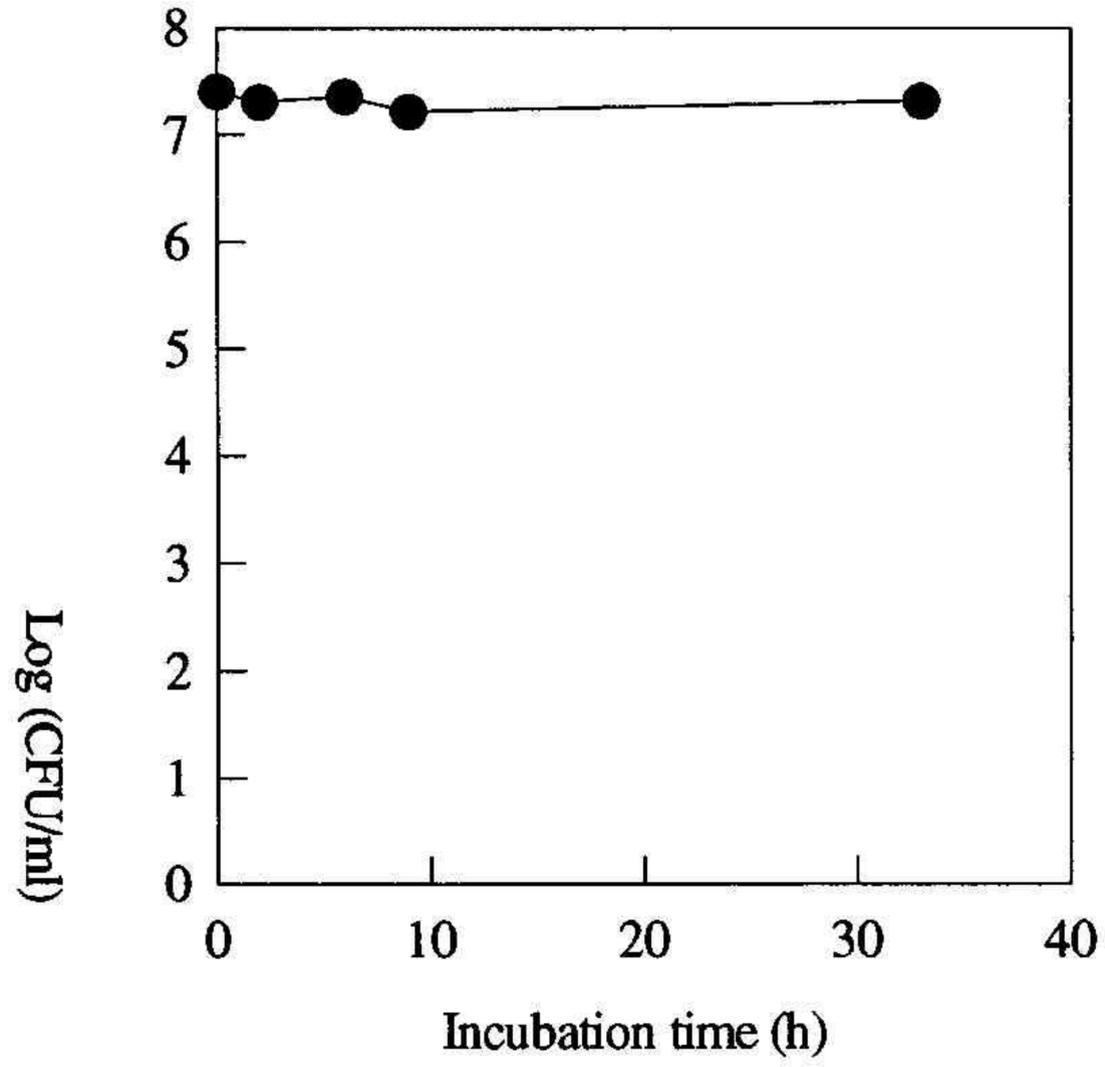
粗略比較起來，我們所篩選到的THKM75與THKM8605應該有超過HU效用的潛力。



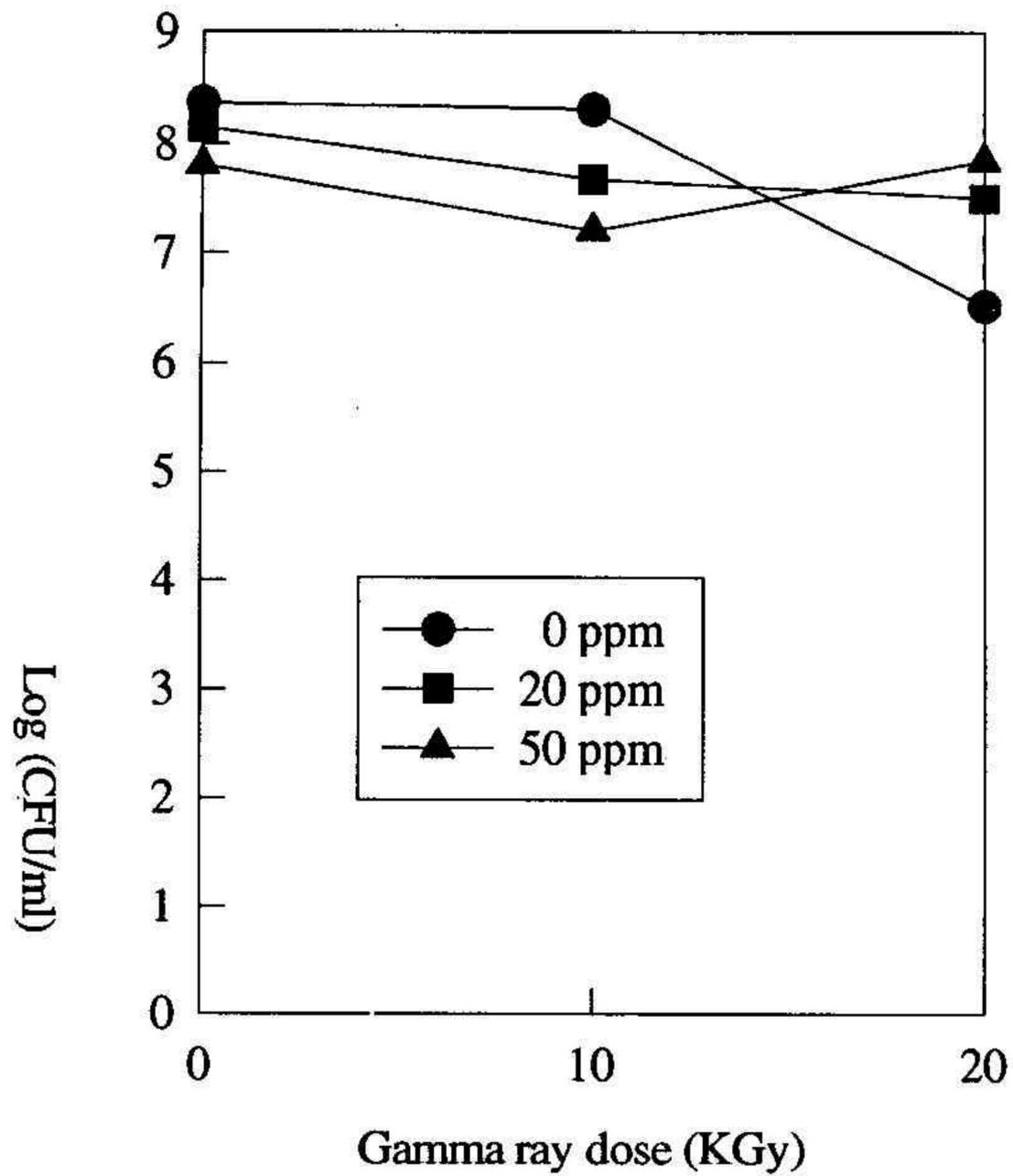
圖一 以 *D. radiodurans* IR 檢測 37 種樣品之加馬射線增敏效應。樣品 THKM75 顯出死亡率可增加千倍以上。樣品處理濃度 200 ppm 處理時間 12 h, 加馬射線劑量 20 KGy。



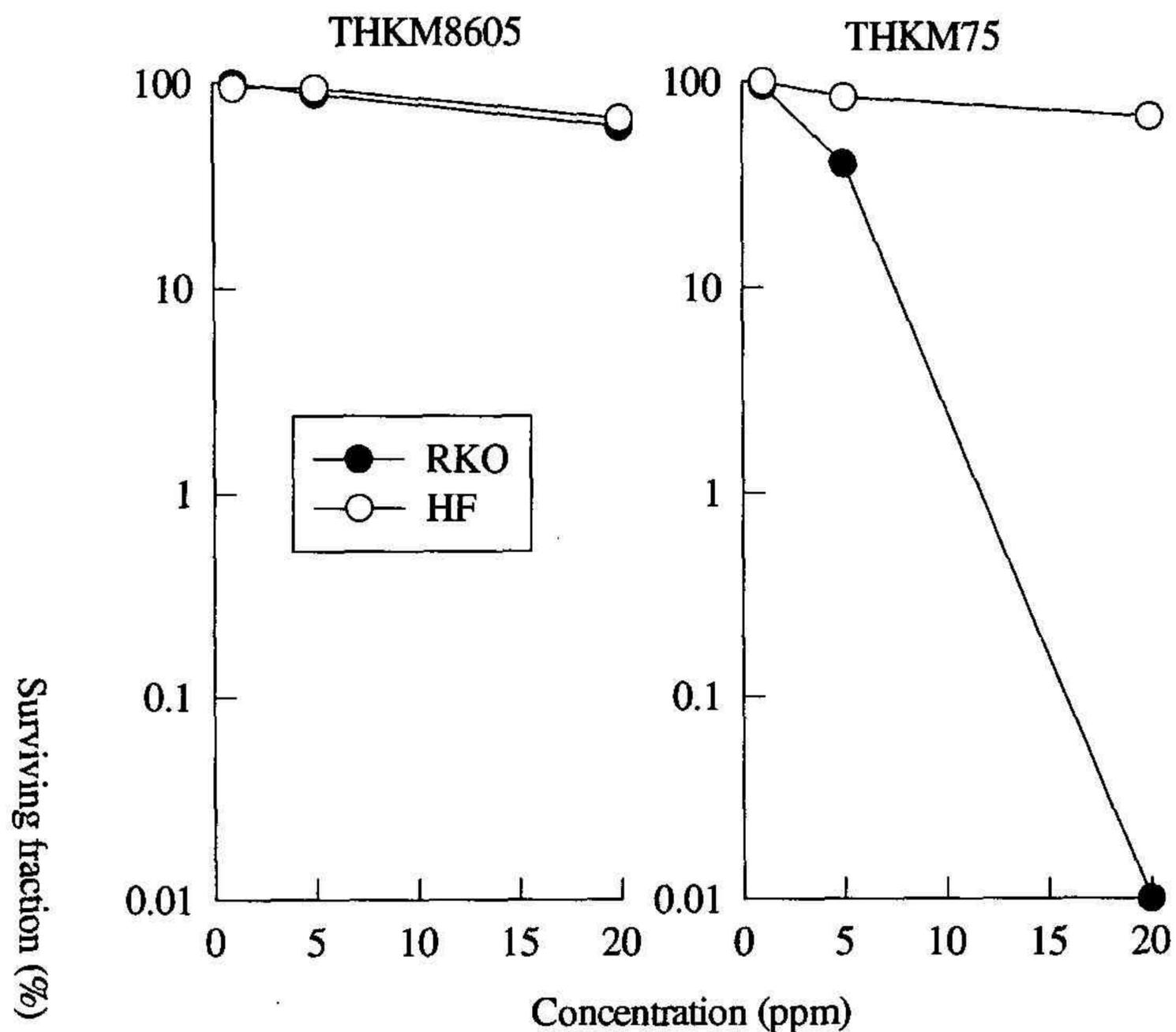
圖二 THKM75在不同濃度(0, 20, 50ppm)下及不同加馬射線劑量(0, 10, 20 KGy) 下之*D. radiodurans* IR細胞存活。在此 THKM75處理細胞時間為12 h。數據顯示THKM75有極佳的輻敏效果(由圖中可估算出ER值可達3~5)。



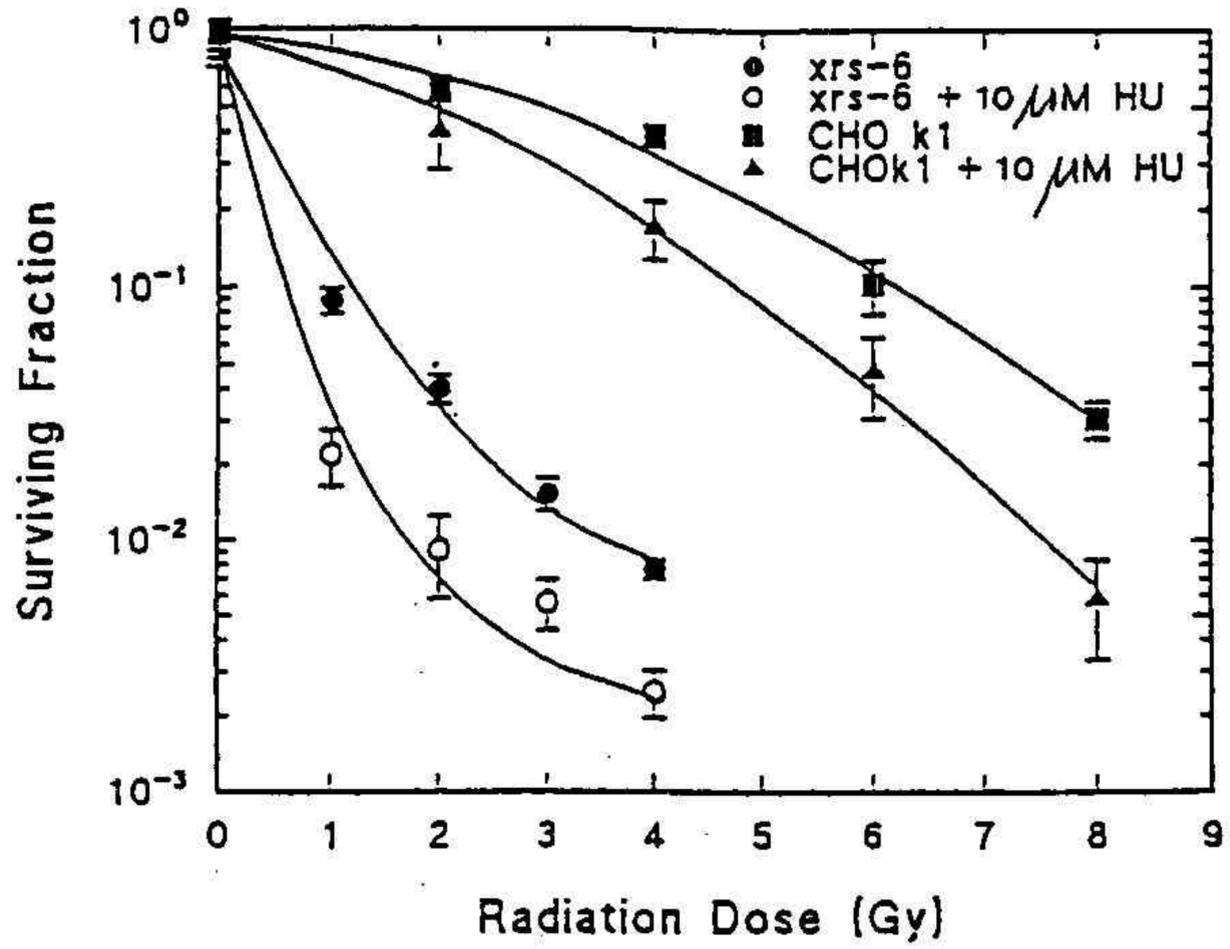
圖三 THKM75對*D. radiodurans* IR 細胞長時間處理後之存活。數據顯示200 ppm處理33 h未見細胞死亡，顯示THKM75毒性不高。



圖四 THKM75在不同濃度(0, 20, 50 ppm)下及不同加馬射線劑量(0, 10, 20 KGy) 下之處理*D. radiodurans* IR細胞存活。在此THKM75處理細胞僅2 h。數據顯示在處理2h下未見THKM75的輻敏效果所以THKM7之進入細胞及影響細胞的輻射抗性的作用是 time-dependent 的。



圖五 THKM75與THKM8605對人類細胞的毒性。THKM75與THKM8605同樣對人類正常細胞（纖維母細胞株HF）毒殺性不高。不過，對人類癌細胞（直腸癌細胞株RKO），THKM75顯現特高的細胞毒殺效應。



圖六 Hydroxyurea(HU)的輻射增敏作用。K1或xrs-6細胞不處理或處理10 μM HU,4 h後接受不同劑量的x-ray照射,再以clonogenic assay測surviving fraction。

肆、討論

一、篩檢系統的有效性

在此三年計畫前二年，我們已建立一套以微生物細胞為基礎的快速篩檢步驟。篩檢條件改良的考慮要點包括菌株種類、測試時的細胞生理狀態、藥物處理條件、及游離輻射照射劑量等。

我們已運用此系統檢測出對測試細胞 *Deinococcus radiodurans* 有明顯的輻射增敏效應兩個的樣品 (THKM8605 與 THKM75) ;此成功初步證明所採用的篩檢步驟的有效性。

二、THKM75 似乎能選擇性的殺死癌細胞

數據顯示，THKM75 對人類癌病細胞 RKO (結腸線癌細胞株) 細胞毒性比起人類正常細胞 HF (二倍體纖維原細胞株) 者顯著較高。此種對癌病細胞的選擇性毒性的原因尚待探討，但這樣的結果暗示，我們的篩檢系統不但能篩選到輻射增敏劑，更重要的是，似乎可以篩選到只對癌細胞有選擇性毒性的。若最後證明 THKM75 對癌病細胞有理想的輻射增敏效果，則 THKM75 可謂具有雙重抗癌的效力 (選擇性細胞毒性及輻射增敏性)。若如此，則 THKM75 將是非常有潛力的新抗癌利器了！

三、本藥物研發應用計畫也提供基礎科學新知

本應用型計畫的藥物研發策略也可經由新藥物及藥效的發現導致細胞輻射生物效應機制的發掘與了解。本計畫的初步研究成果即顯示，某種化合物可能有特殊的輻射生物效應。因此，也提供輻射生物學研究的新途徑。這點反過來也會有助於新藥物研發工作的構思。因此，在本藥物研發計畫中，應用與基礎二者有相輔相成之功。

四、研究成果具體化並加速進入臨床評估

根據已有的成果，後續計畫的工作將包括以下四項，期望儘快將研究成果具體化，並進入臨床評估階段：

- (一) 測試 THKM8605 與 THKM75 對各類哺乳類細胞（包括癌細胞與正常細胞）的輻射增敏效應及毒性；
- (二) 測試與 THKM8605 或 THKM75 構造相似的化合物（分別是 THKM8605-1、THKM8605-2 與 THKM75-1）的增敏效果，以推測與輻射增敏效應有關化學構造；
- (三) 探討 THKM8605 與 THKM75 的輻射增敏效應的機制；
- (四) 動物活體實驗。

五、結論與建議

THKM8605 與 THKM75 對正常細胞的低毒性使它們都擁有發展成鹽症治療時的輻射增敏劑的潛力。THKM75 對人類癌病細胞的高細胞毒性更使其特別值得深入評估。新藥研發一向被認為困難重重，THKM75 的出現與治癌潛能或許是可以給予較樂觀的期待 --- 期待一個真正國產的抗癌新利器。好的開始是成功的一半，另一半可能需要非拿奧運金牌不可的魄力與作為了。

六、參考文獻

1. Haffty BC: Results of radical radiation therapy in clinical stage I, technically operable NSCLS. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1988;15:69-73.
2. Ncordijk EM: Radiotherapy as an alternative to surgery in elderly patients with resectable lung cancer. *Radiother Oncol.* 1988;13:83-89.
3. Zhang HX: Curative radiotherapy of early operable NSCLC. *Radiother. Oncol.* 1988;14:89-94.
4. Lawrence TS et al. 1997. Gemcitabine-mediated radiosensitization. *Semin. Oncol.* 24(2 Suppl 7):S7-24-S7-28.
5. Muderspach LI et al. 1997. Carboplatin as a radiation sensitizer in locally advanced cervical cancer: a pilot study. *Gynecol-Oncol.*

65:336-42.

6. Coleman CN: Hypoxic cell radiosensitizer: expectations and progress in drug development. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1985 11:323-329.
7. Kinsella TJ, et al : The use of halogenated thymidine analogs as clinical radiosensitizer: rationale, current status, and future prospects - nonhypoxic cell sensitizer. *Int. J. Radiat. Oncol. Phys.* 1984;10:1398-1406.
8. Wani MC et al : Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol: a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Amer. Chem. Soc.* 971;93:2325-2327.
9. Schiff PB, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Acad. Sci. USA.* 1980;77:1561-1565.
10. Manfredi IJ, Horwitz SB: An antitumor agent with a unique mechanism of action. *Pharmacol. Ther.* 1984;25:83-93.
11. Tishler RB et al: Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res.* 1992;52:3495-3497.
12. Liebmann J et al: Changes in radiation survival curve parameters in human tumor and rodent cells exposed to paclitaxel. *J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994;29:559-564.
13. Hei TK, et al: Taxol and ionizing radiation: Interaction and mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Phys.* 1994;29:267-271.
14. Friedberg EC et al.(eds). 1995. "DNA Repair and Mutagenesis", ASM Press.
15. Moseley BEB: Photobiology and radiology of *Micrococcus* (*Deinococcus*) *radiodurans*. *Photochem. Photobiol. Rev.* 1983;7:223-274.
16. Chou FI, Tan ST: Manganese(II) induces cell division and increases in catalase and superoxide dismutase activities in aging deinococcal

culture. *J. Bacteriol.* 1990;172:2029-2035.

17. Lin CL et al: Mutations showing specificity for normal growth or Mn(II)-dependent post-exponential-phase cell division in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 1995;141:1707-1714.
18. Lin CL Tan ST: Isolation and characterization of a novel *Deinococcus radiodurans* mutant abnormally susceptible to mutation induction by UV, -ray, and mitomycin C. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996;69:493-502.
19. Zhu W et al: Differential gene expression in wild type and x-ray sensitive Chinese hamster ovary cell lines. *Mutat. Res.* 1992;274:237-245.