

蛹蟲草發酵產物萃取液誘導人類及犬乳癌細胞凋亡機制之探討



魏羽橙、陳淑德*、鄭永祥、賴裕順
國立宜蘭大學 生物技術研究所



摘要

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)在自然界中產量稀少，其一次與二次代謝產物腺苷(adenosine)及蟲草素(cordycepin)可以抗癌，本實驗以各種不同氮源包括酵母抽物(yeast extract)、酵母粉(yeast powder)及蛋白凍(peptone)進行固態發酵，並利用HPLC分析蟲草素(cordycepin)及腺苷(adenosine)之產量，結果指出以酵母粉做為氮源時於固態發酵第二十天可獲得最高量的蟲草素4087.566 $\mu\text{g/g}$ ，而腺苷的產量在第十七天可達最高產量221.43 $\mu\text{g/g}$ 。再將熱水萃取後之發酵產物分別對犬乳癌細胞株(DTK-SM2和DTK-SME-like)及人類乳癌細胞株(HCC 1937和HCC 1500)進行細胞毒性測試，結果發現蟲草素(cordycepin)濃度在10 $\mu\text{g/mL}$ 培養12-18小時後於顯微鏡下觀察發現，可誘導犬及人類乳癌細胞株產生凋亡小體，經TUNEL(Terminal transferase dUTP Nick End Labeling)分析可在螢光顯微鏡下觀察到DNA的斷裂處染上螢光，故蛹蟲草固態發酵產物熱水萃取液可以誘導犬及人類乳癌細胞凋亡，並且是透過活化caspase 3造成犬乳癌細胞凋亡。

前言

衛生署公佈九十四年國人十大死因，癌症連續第十九年蟬聯頭號死因，平均每十六分三十九秒就有一人死於癌症，其中人類女性乳癌死亡人數相較於民國九十三年增加6.9%，因此乳癌的預防及治療是目前的首要工作。

蛹蟲草為中國的傳統藥草，其一次及二次代謝產物腺苷及蟲草素具有抗癌的效果，因此利用不同的氮源進行蛹蟲草固態發酵以期能產生高量的蟲草素及腺苷，作為放療及化療之外輔助療法。本研究選用犬及人類乳癌細胞株並進行細胞毒性測試，探討誘發乳癌細胞凋亡及其機制，以期作為醫療研究之用。

材料與方法

固態發酵

蛹蟲草(*Cordyceps militaris* BCRC 32219)接種於含水量為50%的小麥培養基，其中含5%氮源分別為蛋白凍、酵母抽物及酵母粉

萃取

於22°C下發酵9、11、14、17、21天後，將產物以60°C熱風乾燥後，並使用沸水萃取Cordycepin及Adenosine

分析方法

使用HPLC分析，C18管柱分析發酵產物中Cordycepin及Adenosine含量

細胞毒性測試

將熱萃物過濾後，濾液凍乾後，再以RPMI 1640培養基回溶，使培養基中含10 $\mu\text{g/mL}$ cordycepin進行細胞毒性測試

細胞凋亡分析

觀察細胞的形態變化及TUNEL的分析

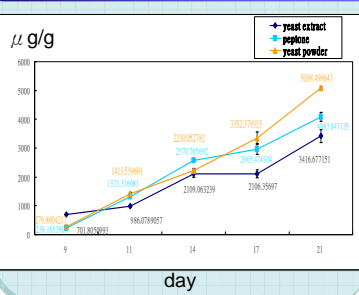
細胞凋亡路徑分析

以西方轉漬法分析caspase 3細胞凋亡路徑

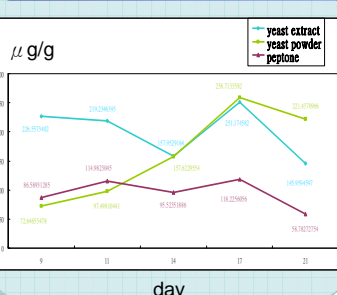
結果與討論

以酵母粉作為氮源進行蛹蟲草固態發酵，在第二十天可獲得最高量的蟲草素為4087.566 $\mu\text{g/g}$ (圖一)，而腺苷的生成量則在第十七天達最高量為221.43 $\mu\text{g/g}$ (圖二)。將犬和人類的乳癌細胞分別培養於RPMI 1640培養基(對照組)及含10 $\mu\text{g/mL}$ 蟲草素的蛹蟲草熱萃物培養基進行細胞毒性測試，由圖三A顯示犬乳癌細胞DTK-SM2和DTK-SME-like於第14及12小時可使細胞凋亡，而圖三B顯示人類乳癌細胞株(HCC1937和HCC1500)則於第15及22小時才可觀察到凋亡小體的生成。經12小時培養後的犬及人類乳癌細胞會造成細胞凋亡並被TUNEL染上螢光，表示DNA片段化(圖四)。圖五指出犬乳癌細胞DTK-SME like在12小時即可將未活化之caspase 3活化，並切割成具有活性的次單位，且隨著時間增長可活化更多的caspase 3，使乳癌細胞進行凋亡。

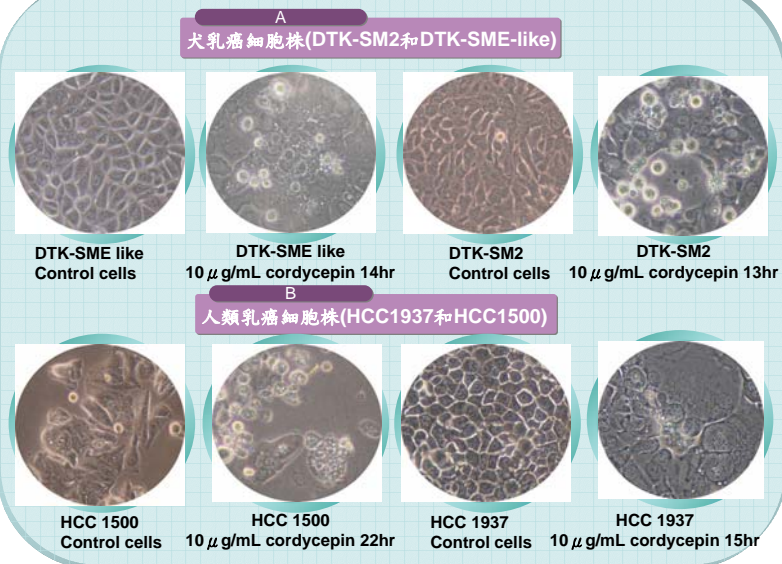
圖一、發酵期間蟲草素產量變化



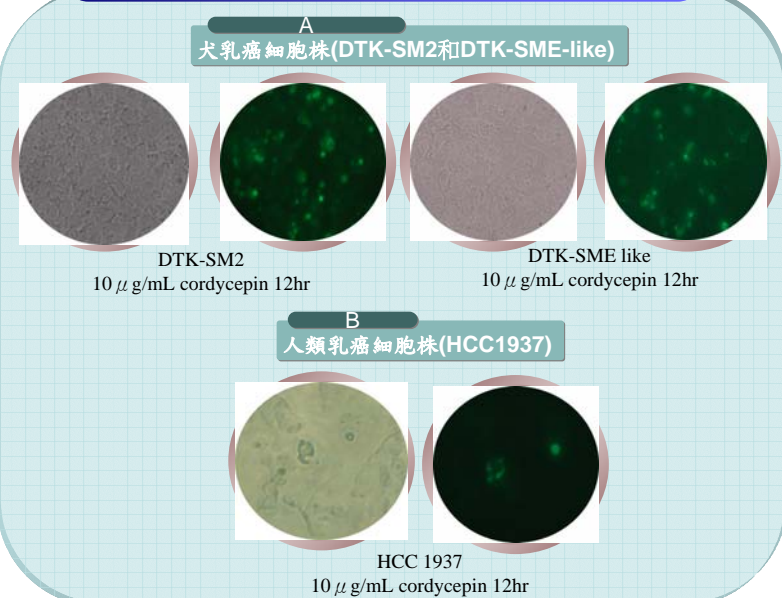
圖二、發酵期間腺苷產量變化



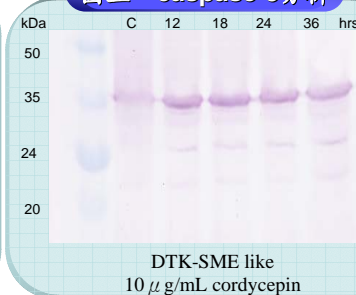
圖三、蛹蟲草熱萃物對乳癌細胞形態的影響



圖四、TUNEL 分析蛹蟲草熱萃物對乳癌細胞凋亡



圖五、caspase-3分析



結論

以各種不同氮源進行蛹蟲草固態發酵，結果指出以酵母粉作為氮源時可以在第二十天生成最高量之蟲草素，在第十七天可達最高的腺苷產量，而後被分解。細胞毒性測試中指出蛹蟲草熱水萃取物含10 $\mu\text{g/mL}$ 蟲草素可以誘發人類及犬乳癌細胞凋亡，在犬乳癌細胞中可活化Caspase 3誘導細胞凋亡。