

小柴胡湯成分による活性酸素の生成とアポトーシス誘導

牧野 登志子, 坪内 涼子, 村上 恵子, 吉野 昌孝
(愛知医大・医・生化学*)

Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis of HL60 cells by ingredients of Sho-saiko-to, the traditional herbal medicine

Toshiko MAKINO, Ryoko TSUBOUCHI, Keiko MURAKAMI and Masataka YOSHINO

Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine, Nagakute, Aichi 480-1195, JAPAN

Summary

Prooxidant and apoptosis-inducing effects of Sho-saiko-to, a traditional Sino-Japanese herbal medicine and its active ingredients were analyzed. Among the components of Sho-saiko-to, wogon the extract of *Scutellaria* root and licorice root induced an apoptosis of HL60 cells, and produced reactive oxygen species intracellularly. Baicalein the principal flavonoid in the *Scutellaria* root extract showed an induction of apoptosis of the cell, and further elevated the intracellular levels of reactive oxygen species at the concentrations of 5 to 20 μ M. Glycyrrhetic acid, an ingredient of licorice root extract, also induced apoptosis followed by the increase in the intracellular reactive oxygen species. Growth-inhibitory and differentiation-regulating effects of Sho-saiko-to can be explained by the apoptosis-inducing and reactive oxygen species-generating action of these ingredients, baicalein and glycyrrhetic acid.

小柴胡湯は古来、肝機能低下に有効な漢方薬として用いられて来た。この薬剤は柴胡を主とした7種類の生薬からなっている。我々はこの薬剤の主な作用機能として、抗酸化機能、即ち脂質過酸化生成の抑制作用を見出し、その作用が生薬成分中の黄芩とその主成分のバイカレインによるものであることを明らかにしてきた¹⁾。バイカレインなどのポリフェノール化合物は抗酸化物質として作用するとともに、遷移金属存在下においては金属イオンの還元を介してスーパーオキシドを生成して、プロオキシダントとして作用する²⁾ ことに基づき、今回、小柴胡湯を構成する生薬による活性酸素生成能とアポトーシス誘導との関連を解析した。その結果、黄芩と甘草によるアポトーシス誘導と活性酸素生成能を見出し、その作用がそれぞれの主成分であるバイカレインとグリチルレチン酸によるものであることを明らかにした。

実験方法

材 料

小柴胡湯、及びその構成生薬の柴胡(サイコ)、半夏(ハンゲ)、黄芩(オウゴン)、大棗(タイソウ)、人參(ニンジン)、甘草(カンゾウ)、生姜(ショウキョウ)抽出物の乾燥標品を50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)/200mM NaCl液に溶解し、8000×g遠心上清、及び黄芩、甘草の主成分のバイカレインとグリチルレチン酸によるHL60細胞のアポトーシスの誘導と活性酸素生成を検討した。

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作(〒480-1195)

方 法

1. アポトーシスの解析：フローサイトメトリー法³⁾によりアポトーシス細胞の出現を数量化するとともに、DNAの断片化をアガロース電気泳動法³⁾により解析した。さらにアポトーシス誘導における活性酸素種の関与をスーパーオキシドのスキャベンジャーであるTEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)を投与後、フローサイトメトリーによって解析した。
2. 細胞内活性酸素の測定：蛍光プローブDCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate,ジクロロフルオレスシン二酢酸)をHL60細胞に負荷した後、生薬成分、及び、バicalein, グリチルレチン酸を添加し、蛍光法により細胞内活性酸素の発生を定量した⁴⁾。

結 果

小柴胡湯の構成生薬によるHL60細胞に対するアポトーシスの誘導能を検討した。アポトーシスはアガロース電気泳動法によるDNAの断片化、及び、フローサイトメトリー法により確認した。構成生薬の中、黄芩及び甘草抽出物の添加により、DNAの断片化 (Fig. 1 A), 及びアポトーシス細胞の出現が認められた (Fig. 2A, 2B)。

小柴胡湯中の生薬である黄芩、甘草の主成分、バicalein、及びグリチルレチン酸によるアポトーシスの誘導を解析した。バicaleinは5-20 μ MでHL60細胞のアポトーシスを誘導し (Fig. 3A), さらにDNAの断片化を引き起こした (Fig.1B)。しかし、50 μ M以上の高濃度のバicaleinは誘導されたアポトーシスを抑制する傾向を示した (Fig. 3A)。甘草の主成分であるグリチルレチン酸もHL60細胞に対して、濃度依存的にアポトーシス細胞の出現を促進した (Fig. 3B)。

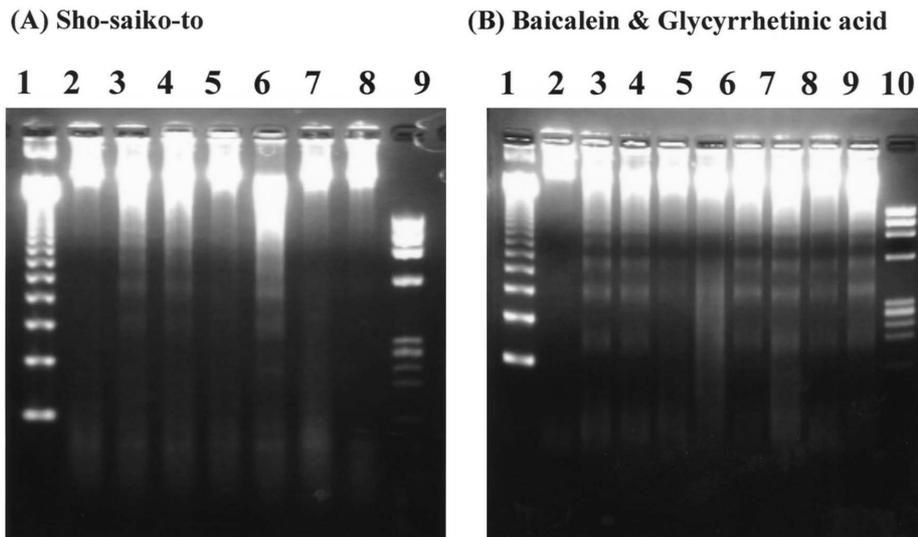


Fig. 1 DNA fragmentation in HL60 cells treated with the ingredients of Sho-saiko-to (A) and baicalein and glycyrrhetic acid (B). A. HL60 cells (cell numbers of 5×10^6) were treated with wogon, licorice and ginger extracts for 48hr. DNA was extracted with the Apoptosis Ladder Detection Kit. Extracted DNA was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide. Lane 1, 123bp marker; lane 2, no treatment; lane 3, 100 μ g/ml wogon; lane 4, 200 μ g/ml wogon; lane 5, 100 μ g/ml licorice; lane 6, 200 μ g/ml licorice; lane 7, 100 μ g/ml ginger; lane 8, 200 μ g/ml ginger; lane 9, standard, Φ X 174/Hae III digest. B. HL60 cells (cell numbers of 5×10^6) were treated with 5, 10, 50, 100 and 200 μ M of baicalein and glycyrrhetic acid for 5hr and 3hr, respectively. DNA extracted with the Apoptosis Ladder Detection Kit was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide. Lane 1, 123bp marker; lane 2, no treatment; lane 3, 5 μ M baicalein; lane 4, 10 μ M baicalein; lane 5, 50 μ M; lane 6, 100 μ M; lane 7, 5 μ M glycyrrhetic acid; lane 8, 10 μ M glycyrrhetic acid; lane 9, 50 μ M glycyrrhetic acid; lane 10, 200 μ M glycyrrhetic acid; lane 11, standard Φ x174/Hae III digest

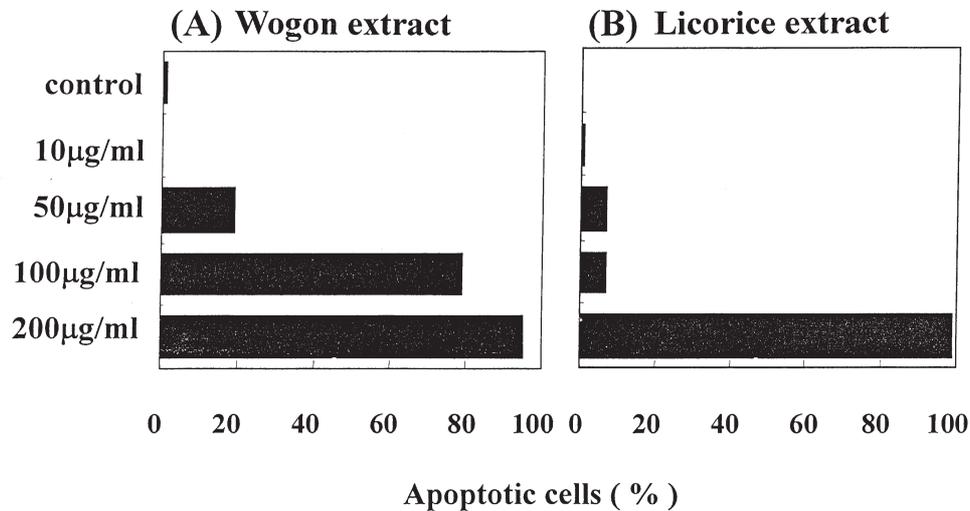


Fig. 2 Induction of apoptosis of HL60 cells treated with wogon (A) and licorice extracts (B). HL60 cells were treated with wogon and licorice of the indicated concentrations for 48 hr. Detection of apoptosis was described previously³⁾.

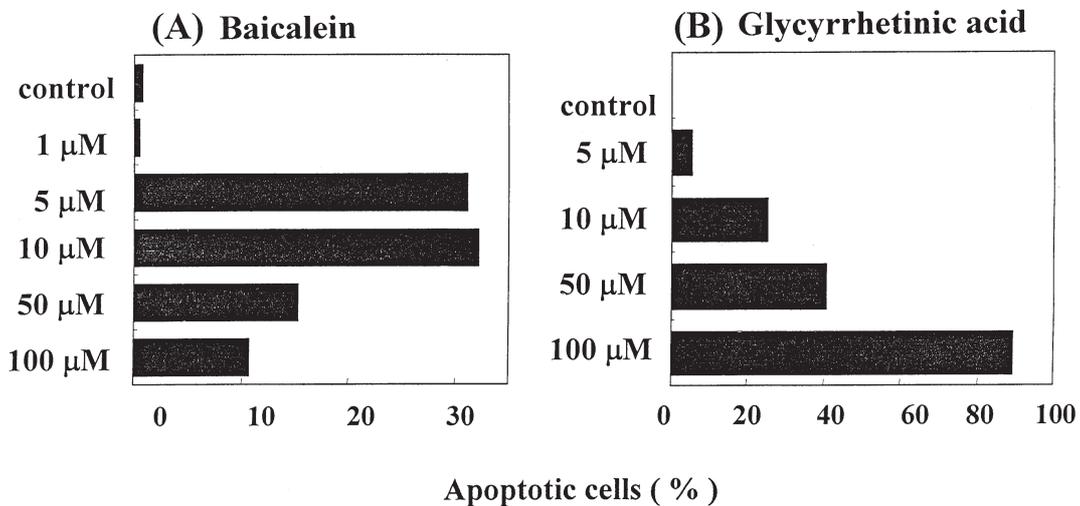


Fig. 3 Induction of apoptosis of HL60 cells treated with baicalein (A) and glycyrrhethinic acid (B). HL60 cells were treated with baicalein and glycyrrhethinic acid of the indicated concentrations for 4 and 3.5 hr, respectively, and detection of apoptosis was similar to those described in Fig. 2.

小柴胡湯成分を投与したHL60細胞内の活性酸素量をDCF-DA色素の前投与による蛍光法によって測定した結果、生薬成分中の黄芩によって著明に活性酸素が増加し、さらに甘草、生姜による若干の活性酸素の生成増加を認めた (Fig. 4A)。黄芩の主成分であるバイカレインの低濃度の添加によって活性酸素量は増加したが、高濃度によっては活性酸素の増加は抑制される傾向となり (Fig. 4B)、高濃度のバイカレインによるアポトーシスの抑制傾向 (Fig. 3A) とよい一致を示した。甘草成分のグリチルレチン酸の投与は細胞内活性酸素量を濃度依存的に増加させ (Fig. 4C)、アポトーシス細胞の出現の増加傾向 (Fig. 3B) とよく一致した。

小柴胡湯成分、とくにバイカレインによるアポトーシスの誘導と活性酸素増加の関連について、活性酸素、とくにスーパーオキシドのスカベンジャーであるTEMPOLを用いて解析した。TEMPOLの投与はバイカレインによるアポトーシスの誘導を抑制し、バイカレインによって生成する活性酸素がアポトーシスの誘導に直接関与していることを示した (Fig. 5)。またバイカレインは強力な遷移金属の還元能を示したことから、還元型遷移金属イオンによる酸素分子の活性化がスーパーオキシドの生成を引き起こすと推測された。

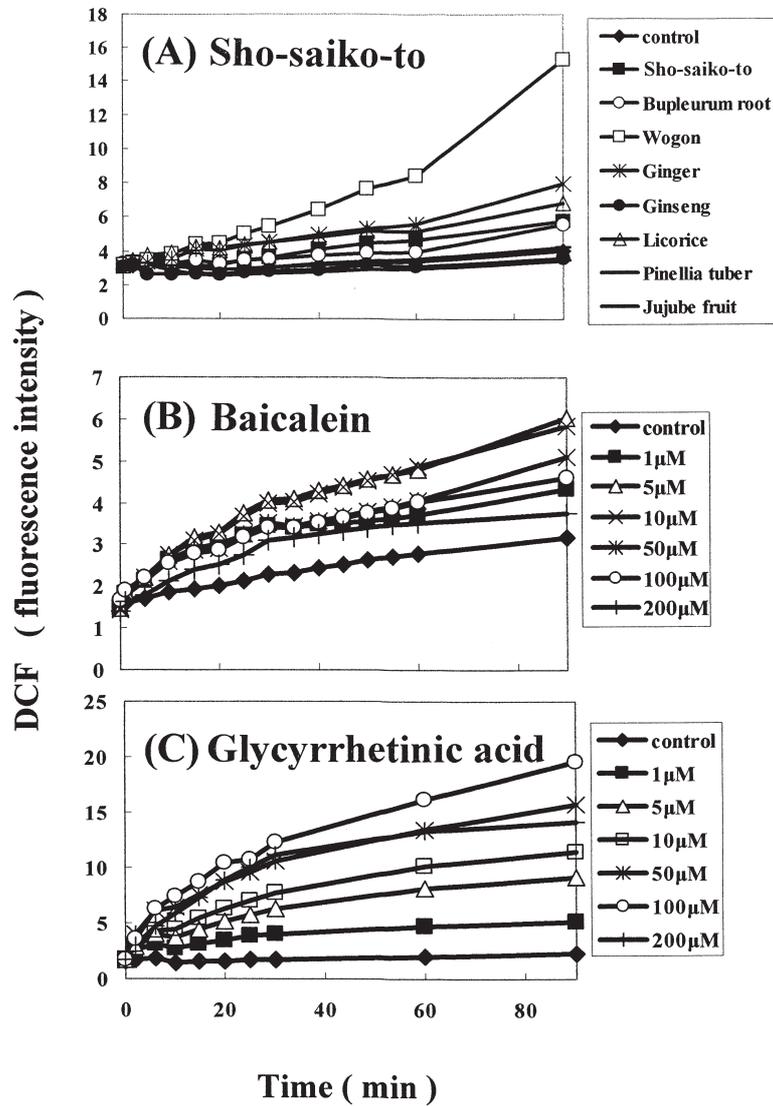


Fig. 4 Generation of intracellular reactive oxygen species in HL60 cells treated with the ingredients of Sho-saiko-to (A), baicalein (B) and glycyrrhetic acid (C). Intracellular reactive oxygen species were determined by loading fluorescent chromophore DCFH-DA to cells.

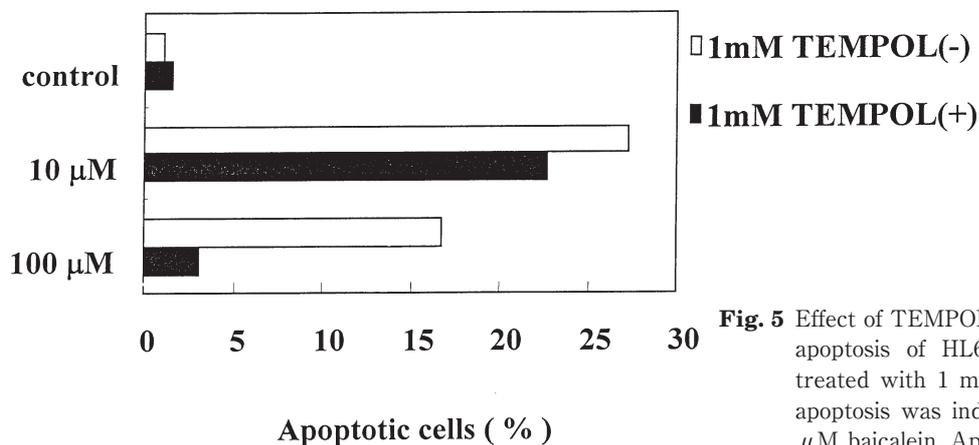


Fig. 5 Effect of TEMPOL on the baicalein-mediated apoptosis of HL60 cells. HL60 cells were treated with 1 mM TEMPOL for 1 hr, and apoptosis was induced by adding 10 or 100 μ M baicalein. Apoptotic cell death was analyzed by flow cytometry method 4 hr after the addition of baicalein as described above.

考 察

活性酸素は膜脂質, たんぱく質, DNAに障害を与え, 多くの疾患の発生に関与するが, 一方では, 抗菌性, 抗腫瘍性, 及び細胞分化の制御因子としても, 作用している。植物由来のフラボノイドはポリフェノールとして, 抗酸化物質機能を持つ^{1, 5)}他に, 遷移金属存在下においてはその還元を介して, 酸素分子を活性化することにより, 活性酸素生成に関与する²⁾。

今回小柴胡湯中の黄芩, 甘草がアポトーシスを誘導することを見いだした。この作用はそれぞれの構成成分であるバイカレイン, グリチルレチン酸によるものであることを明らかにした。黄芩, 甘草, 及びバイカレイン, グリチルレチン酸によるアポトーシスの誘導は細胞内の活性酸素生成と一致しており, また活性酸素のスキャベンジャーであるTEMPOによってアポトーシスが抑制されることもこれらの化合物による活性酸素の生成を介したアポトーシスの誘導であることを示している。なかでもバイカレインのアポトーシス誘導作用, 活性酸素生成能が最も強力であった。この強力な作用は酸素分子の活性化能に由来すると考えられる。バイカレインはフラボノイドの中でも最も強い還元力を持ち, DNAを強力に傷害する⁵⁾。バイカレインは遷移金属イオンを還元する結果, 生じた還元型遷移金属イオンは酸素分子と反応し, スーパーオキシドを生成する。スーパーオキシドは不均化反応によって過酸化水素となり, さらに遷移金属存在下においてはFenton反応によりヒドロキシルラジカルを生成して細胞傷害の原因となる。なお, グリチルレチン酸の還元力はバイカレインに比較すれば, 弱いものであるが, 共役カルボニル基をもつことから遷移金属の還元を介した活性酸素生成機構が提唱されている⁶⁾。

薬理作用, あるいは副作用としての細胞毒性の発現には構成生薬中の黄芩成分のバイカレイン, 甘草中のグリチルレチン酸による遷移金属の還元を介した活性酸素生成とアポトーシスの誘導が重要視される。本研究では, 小柴胡湯のアポトーシス誘導作用は構成生薬中のバイカレインとグリチルレチン酸によるものであることを明らかにし, さらにアポトーシスの誘導にはバイカレイン, グリチルレチン酸による活性酸素生成が関与していることを示した。ただし, この作用は培養細胞におけるものであり, またバイカレインについては比較的低濃度 (5-10 μ M) で誘導され, 高濃度のバイカレインは逆に抗酸化物質として生成した活性酸素をスキャベンジする作用が認められた。一方, グリチルレチン酸によるアポトーシスは100-200 μ Mという高濃度で誘導されており, 小柴胡湯を通常薬剤として使用する場合に今回示したようなアポトーシスが誘導されるかという問題については今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Yoshino M, Ito M, Okajima H, Murakami K, Haneda M. (1997) Role of baicalein compounds as antioxidant in the traditional herbal medicine. *Biomedical Res* 18: 349-352.
- 2) Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K (1999) Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab* 68: 468-472.
- 3) Hla Hla Htay, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Yoshino M. (2002) Induction of Apoptosis of HL60 cells by gallic acid derivatives. *Biomedical Res* 23: 127-134.
- 4) Tsubouchi R, Hla Hla Htay, Murakami K, Haneda M, Yoshino M. (2001) Aluminum-induced apoptosis in PC12D cells. *BioMetals* 14: 181-185.
- 5) Larson RA (1998) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978.
- 6) Fiore C, Salvi M, Palermo M, Sinigaglia G, Armanini D, Toninello A. (2004) On the mechanism of mitochondrial permeability transition induction by glycyrrhetic acid. *Biochim Biophys Acta* 1658: 195-201.