



FACULTEIT FARMACEUTISCHE WETENSCHAPPEN

Vakgroep Geneesmiddelenleer

Laboratorium voor Farmacognosie en Fytochemie

Academiejaar 2010-2011

**ONDERSTEUNEND MOLECULAIR
BIOLOGISCH ONDERZOEK VAN HOP-
EN BAMBOE AFGELEIDE PRODUCTEN**

Stephanie VAN DER EIJK

Eerste Master in de Farmaceutische Zorg

Promotor

Prof. dr. D. Deforce

Commissarissen

Dr. A. Heyerick

Prof. dr. B. De Spiegeleer

DANKWOORD

Allereerst wil ik graag mijn promotor Prof. Dr. D. Deforce bedanken voor de algemene begeleiding van deze masterproef.

In het bijzonder wil ik apr. Laura van Hoyweghen en apr. Ciska Wyns heel hartelijk bedanken voor de dagelijkse begeleiding van de experimenten en de goede hulp bij het schrijven van mijn thesis. Ik hoop dat mijn onderzoek een waardevolle bijdrage levert aan hun doctoraatsonderzoeken.

Verder gaat mijn dank uit naar iedereen in het Laboratorium voor Farmacognosie en Fytochemie en in het Laboratorium voor Farmaceutische Biotechnologie, voor het beantwoorden van mijn vragen, voor de hulp bij eventuele problemen en voor de goede sfeer.

Tenslotte bedank ik mijn ouders, broer Mark en mijn vriend Martijn voor hun steun en goede zorgen, niet alleen tijdens de periode van mijn masterproef, maar natuurlijk altijd!

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING.....	1
1.1. BAMBOE.....	1
1.1.1. Algemeen.....	1
1.1.2. Wetenschappelijk onderzochte effecten van bamboe op de gezondheid	3
1.2. SECUNDAIR METABOLISME.....	5
1.2.1. Flavonoïden.....	6
1.3. HOP	8
1.3.1. Algemeen.....	8
1.3.2. Xanthohumol	8
1.4. ANTILICHAMEN	12
1.4.1. Indirecte competitieve enzyme-linked immunosorbent assay.....	13
1.5. TUMORVORMING	13
1.6. ANTIPROLIFERATIEVE TESTEN.....	14
1.6.1. MTT-test.....	14
1.6.2. SRB-test.....	15
2. OBJECTIEVEN.....	16
3. MATERIAAL EN METHODEN.....	18
3.1. ANTIPROLIFERATIEVE TESTEN MET BAMBOE-EXTRACTEN.....	18
3.1.1. Materiaal	18
3.1.2. Methoden	19
3.2. CHROMATOGRAFISCHE ANALYSE	23
3.2.1. HPLC analyse bamboe-extracten	24
3.2.2. HPLC analyse xanthohumolstalen	25
3.3. CELLULAIRE OPNAME XANTHOTHUMOL	25
3.3.1. Materiaal	25
3.3.2. Methoden.....	26
4. RESULTATEN EN DISCUSSIE.....	30

4.1.	ANTIPROLIFERATIEVE TESTEN MET BAMBOE-EXTRACTEN.....	30
4.1.1.	IJklijn vinblastinesulfaat.....	30
4.1.2.	<i>Pseudosasa japonica</i> bladextract	31
4.1.3.	<i>Fargesia robusta</i> 'Pingwu' bladextract.....	32
4.1.4.	<i>Sasa veitchii</i> bladextract	33
4.1.5.	<i>Arundinaria gigantea</i> bladextract	34
4.1.6.	<i>Dinochloa scandens</i> bladextract	34
4.1.7.	<i>Dendrocalamus hamiltonii</i> bladextract	35
4.1.8.	<i>Fargesia rufa</i> 'Green Panda' bladextract.....	35
4.1.9.	<i>Phyllostachys humilis</i> bladextract	36
4.1.10.	<i>Pleioblastus variegatus</i> bladextract.....	36
4.1.11.	<i>Bambusa balcooa</i> bladextract	36
4.1.12.	<i>Guadua amplexifolia</i> bladextract.....	37
4.1.13.	<i>Phyllostachys nigra</i> bladextract.....	37
4.1.14.	IJklijn tricine	38
4.1.15.	Algemeen.....	39
4.2.	CHROMATOGRAFISCHE ANALYSE BAMBOE-EXTRACTEN.....	40
4.3.	CELLULAIRE OPNAME XANTHOTHUMOL	41
4.3.1.	Calibratiecurve xanthohumol.....	41
4.3.2.	Optimalisatie extractieprocedure	41
4.3.3.	Recovery referentiestalen	42
4.3.4.	Cellulaire opname van xanthohumol	43
4.3.5.	Indirecte competitieve ELISA.....	45
5.	CONCLUSIE.....	46
6.	LITERATUURLIJST	47

GEBRUIKTE AFKORTINGEN

4-HBPH	4-hydroxybenzofenon
6-PN	6-prenylnaringenine
8-PN	8-prenylnaringenine
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AL	antilichaam
AOB	antioxidant of bamboo leaves
BSA	bovien serum albumine
COX	cyclo-oxygenase
CYP	cytochroom P450
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthraceen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	desoxyribonucleïnezuur
EDTA	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	ethylacetaat
FBS	foetaal bovien serum
HCT-8	humane colonkankercellen
HDL	high-density lipoproteïne
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
Ig	immunoglobuline
IQ	2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)quinoline

IS	interne standaard
IU	internationale eenheid
LDL	low-density lipoproteïne
MCF-7	humane borstkankercellen
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NK	natural killer
NSAID	niet-steroidale anti-inflammatoire drug
PBS	phosphate buffered saline
ROS	reactive oxygen species
(RP-)HPLC	(reversed phase-)high performance liquid chromatography
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SRB	sulforhodamine B
SULT	sulfotransferase
TCA	trichloorazijnzuur
Th1	T-helper 1
Tween	polysorbaat
UDP	uridine 5'-difosfaat
UV	ultraviolet
X	xanthohumol

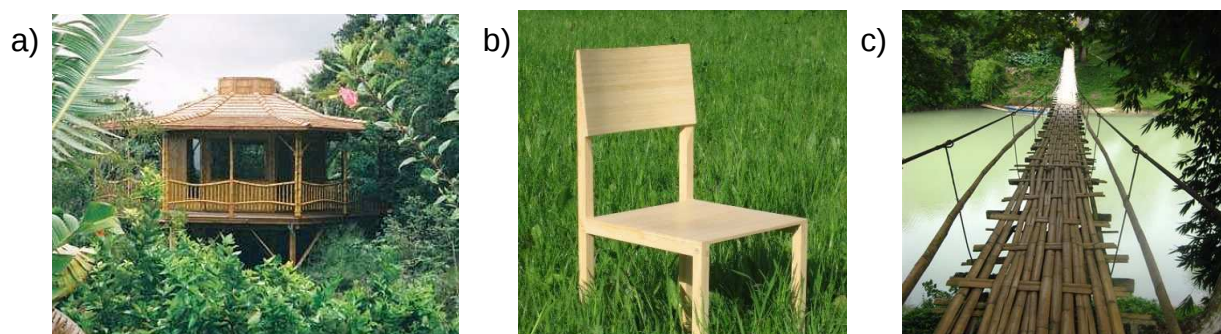
1. INLEIDING

1.1. BAMBOE

1.1.1. Algemeen

Bamboe behoort tot de familie van de Poaceae/Gramineae. De plant kan verder ingedeeld worden in de subfamilie Bambusoideae en de stam Bambuseae (<http://www.bamboo.org/bamboo-info.php>). Bamboes zijn grassen en kunnen onderverdeeld worden in houtige en kruidachtige bamboes. Vooral laatstgenoemde lijken veel op gras (<http://nl.bambooselect.com/bamboewereld.html>). De bamboe-extracten die in deze thesis getest worden, zijn alle afkomstig van houtige bamboes. Een andere onderverdeling is die tussen de monopodiale en sympodiale bamboes, op basis van de manier van groeien (Oprins et al., 2006). Er zijn ongeveer 1450 bamboesoorten bekend, verdeeld over meer dan 70 geslachten (<http://www.bamboo.org/bamboo-info.php>). Boven de grond bestaat een bamboeplant uit halmen en bladeren. De halmen bestaan uit knopen met daartussen holle stukken (internodiën). Onder de grond heeft bamboe geen echte wortels, maar rhizomen. Dit zijn eigenlijk ondergrondse halmen (Oprins et al., 2006).

Bamboe groeit van nature in vrijwel alle continenten, in gebieden met een tropisch, subtropisch of gematigd klimaat, behalve in Europa en West-Azië (Lee et al., 2008). Het wordt voor zeer veel verschillende toepassingen gebruikt (zie Figuur 1.1), bijvoorbeeld als bouw materiaal van onder andere meubels, woningen en bruggen; als bestanddeel van de voeding of als veevoeder; als basis voor papier; in de textiel-industrie als basis van kleding, lakens en handdoeken en in vele andere gebruiksvoorwerpen (<http://bamboodirect.com/bamboo/info/TheWorldofBamboo.html>).



Figuur 1.1. Enkele toepassingen van bamboe: a) huis; b) stoel; c) brug

Als bouw materiaal is bamboe al lange tijd zeer geschikt: het groeit snel en kan eenvoudig bewerkt worden (*Oprins et al., 2006*). Bamboe wordt natuurlijk ook veel gebruikt bij het inrichten van tuinen, omdat het een mooie plant is. In Europa is bamboe zelfs voornamelijk een sierplant, terwijl het in Azië een onderdeel is van het dagelijks leven (*Oprins et al., 2006*).

Voornamelijk in Zuid-China worden bamboebladeren en –halmen traditioneel gebruikt om de smaak en kleur van eten te verbeteren (*Koide et al., 2011*). Er zijn ook dieren die bamboe consumeren als voedsel, hoewel dit er maar weinig zijn. Een voorbeeld hiervan is de reuzenpanda, waarvan de voeding zelfs vrijwel uitsluitend bestaat uit bamboe. Bamboesoorten van het geslacht *Fargesia* zijn bijvoorbeeld een belangrijke voedselbron voor het dier (*Keski-Saari et al., 2008; Hansen et al., 2010*).

Verder heeft bamboe al meer dan duizend jaar een belangrijke rol in de traditionele (Aziatische) geneeskunde. Eén van de toepassingen van bamboe is als koortswerend middel, en het wordt ook gebruikt om te ontgiften. Daarbij kan het buikpijn, diarree en braken verminderen en wordt het toegepast bij inflammatie van het middenrif, rusteloosheid en zeer uitgesproken dorst (*Choi et al., 2008*). Extracten van bamboebladeren worden ook gebruikt bij de behandeling van hypertensie, arteriosclerose, hart- en vaatziekten en bepaalde vormen van kanker. Dit geldt o.a. voor de bladeren van het geslacht *Sasa* (*Choi et al., 2008; Hasegawa et al., 2008*).

Er worden tegenwoordig ook bamboesoorten in de voedingsindustrie gebruikt omwille van hun gezondheidsbevorderende werking en om voedingsproducten te beschermen tegen oxidatie. Zo is een extract van de bladeren van *Sasa veitchii*, (Kumazasa genoemd in Japan), een antioxidatief voedingssupplement en is een extract van *Phyllostachys nigra* 'Henonis', ('antioxidant of bamboo leaves', AOB), erkend als natuurlijk antioxidant in de voeding (*Nakajima et al., 2003; Zhang et al., 2005; Koide et al., 2011*). *Sasa veitchii* en *Phyllostachys nigra* zijn overigens twee van de bamboesoorten die in deze thesis onderzocht worden op hun antiproliferatief effect.

1.1.2. Wetenschappelijk onderzochte effecten van bamboe op de gezondheid

Er is al wetenschappelijk onderzoek gedaan naar de effecten van enkele bamboesoorten op de gezondheid. *In vitro* is al antioxidatieve activiteit aangetoond van bamboebladeren en –halmen van het geslacht *Phyllostachys* (Suga et al., 2003; Zhang et al., 2005). Verder is reeds aangetoond dat een extract van bamboeblaadjes van dit geslacht verschillende farmacologische eigenschappen heeft in diermodellen, zoals inhibitie van interleukine-12 productie, antimutagene activiteit, verminderde levertoxiciteit en verbeterde antioxidatieve werking (Kim et al., 2007; Lee et al., 2008). In deze thesis worden twee soorten van dit geslacht onderzocht, namelijk *Phyllostachys humilis* en *Phyllostachys nigra*.

Op het gebied van het onderzoek van deze thesis zijn al verschillende veelbelovende effecten van bamboe-extracten op tumorgroei aangetoond. Zo is er bewezen dat het toedienen van een extract van de bladeren van *Sasa senanensis* de groei van vaste tumoren *in vitro* en *in vivo* kan onderdrukken. Na orale toediening stimuleert het bamboe-extract de Th1-type cytokineproductie en tevens de cytotoxische activiteit van natural killer (NK) cellen en macrofagen. Zo wordt het immuunsysteem dus gestimuleerd. Een belangrijke oorzaak van tumorprogressie is het feit dat de functies van het immuunsysteem onderdrukt zijn. Het kan dus een strategie zijn om te proberen deze functies te herstellen. Immunistimulerende middelen zonder bijwerkingen kunnen daarom zeer belangrijk zijn bij de preventie en behandeling van kanker. Het extract van *Sasa senanensis* bleek over deze eigenschappen te beschikken (Seki et al., 2010a). In een volgend onderzoek van Seki & Maeda (2010b) werd voornamelijk gefocust op het effect van ditzelfde extract als preventief middel. Er bleek inderdaad dat het bladextract van *Sasa senanensis* als voedingssupplement positieve effecten had in ratten en muizen: het hielp de tumorgroei te onderdrukken en kanker te voorkomen. Sasa Health, wederom een extract van *Sasa senanensis* ('Rehder'), bleek in muizen een beschermend effect te hebben op het ontstaan van borstkanker. Het extract vertraagde de vorming van primaire tumoren en de tumorgroei (Ren et al., 2004).

In het onderzoek van Lin et al. (2008) werd het effect van het ethanol/water extract van *Phyllostachys edulis* op de ontwikkeling van borstkanker, geïnduceerd door 7,12-dimethylbenz[a]anthraceen (DMBA), bekeken. DMBA is een stof die het ontstaan van borstkanker in vrouwelijke ratten efficiënt stimuleert. Het bleek dat het extract inderdaad beschermend werkt tegen de ontwikkeling van borstkanker in ratten. Dit komt waarschijnlijk door een sterke inductie van het enzym sulfotransferase (SULT). SULT zorgt voor de metabolisatie van onder andere steroïden. Als dit enzym gestimuleerd wordt, worden er dus meer oestrogenen gemetaboliseerd en geëlimineerd. Oestrogenen spelen een rol bij de ontwikkeling van o.a. borstkanker, dus een vermindering van het oestrogeengehalte kan deze ontwikkeling remmen (Lin et al., 2008).

Het eerder genoemde extract van *Phyllostachys edulis* wordt gebruikt als voedingssupplement in de Verenigde Staten. *In vitro* is een sterk antilipotoxisch effect van dit extract aangetoond. Het bleek de apoptose van hartspiercellen als gevolg van een teveel aan vetzuren te inhiberen (Panee et al., 2008). Vervolgens bleek het in muizen chronische systemische inflammatie ten gevolge van obesitas te verminderen en de symptomen van diabetes type 2 te verbeteren. Het is dus een potentieel antidiabetisch middel (Koide et al., 2011).

Voor een extract van bamboesnipper (uit de middelste laag van de halmen), dat rijk is aan triterpenoïden, is een antitumoraal effect aangetoond. Dit extract zou dus nuttig kunnen zijn in de voeding. Het is echter niet helemaal duidelijk of de antitumorale activiteit te danken is aan dezelfde componenten die in bijvoorbeeld bamboeblaadjes voor het effect zorgen (Lu et al., 2010).

Ervan uitgaande dat bamboehalmen een sterkere antioxidatieve activiteit bezitten dan de bladeren, werd in het onderzoek van Lee et al. (2008) onderzocht of het verrijken van de voeding met een bamboehalmextract van *Phyllostachys bambusoides* een antioxidatief effect aan het licht zou brengen in muizen, die onder oxidatieve stress leefden doordat ze een atherogeen dieet kregen. Verder werd gekeken naar het effect van het extract op de lipidespiegels in het plasma. Er bleek dat het antioxidatieve systeem verbeterd was na de "behandeling" met het bamboehalmextract. Verder waren de high-density lipoproteïne (HDL-)cholesterolspiegels verhoogd. Dit is

positief: HDL-cholesterol beschermt tegen hart- en vaatziekten. In het onderzoek van Choi et al. (2008) is aangetoond dat naast bamboeblaadjes ook bamboe-olie een potentieel heeft om toegepast te worden in de voedings- en geneesmiddelindustrie omwille van zijn antioxidatieve effect en zijn mogelijkheid om nitriet te neutraliseren.

In de studie van Muniappan & Sundararaj (2003) werd het anti-inflammatoire effect van het bladextract van *Bambusa arundinacea* in ratten onderzocht. Het methanolextract van deze bamboesoort bleek inderdaad een anti-inflammatoir effect te hebben. Verder had het extract een duidelijk antiulcerogeen effect. De auteurs concludeerden dat het extract, al dan niet in combinatie met een niet-steroïdale anti-inflammatoire drug (NSAID), gebruikt kan worden bij chronische inflammatoire aandoeningen.

Uit de beschreven onderzoeken blijkt dat de aandacht voornamelijk naar *Sasa*- en *Phyllostachys*-soorten is gegaan. Gezien het aantal soorten en de diversiteit onder de bamboesoorten, leek het interessant om in het onderzoek van deze thesis ook andere, minder bekende soorten te betrekken.

In het onderzoek voorafgaand aan deze thesis werden twaalf bamboe-extracten getest op hun *in vitro* antiproliferatief effect op humane borstkankercellen (MCF-7/6 en MCF-7/AZ). De bamboe-extracten waren *Fargesia robusta* 'Pingwu', *Fargesia rufa* 'Green Panda', *Phyllostachys nigra*, *Sasa veitchii*, *Pseudosasa japonica*, *Dendrocalamus hamiltonii*, *Guadua amplexifolia*, *Bambusa balcooa*, *Dinochloa scandens*, *Arundinaria gigantea*, *Pleioblastus variegatus* en *Phyllostachys humilis*. Deze zijn *in vitro* vermeerderd en ter beschikking gesteld door OPrins Plant NV. De bladextracten van *Fargesia robusta* 'Pingwu', *Fargesia rufa* 'Green Panda' en *Bambusa balcooa* oefenden een antiproliferatief effect uit op beide celtypes. Dezelfde twaalf extracten worden in deze thesis getest op hun *in vitro* antiproliferatief effect op humane colonkankercellen (HCT-8).

1.2. SECUNDAIR METABOLISME

Naast de term primair metabolisme, waaronder het metabolisme van de koolhydraten, vetten, eiwitten en nucleïne-zuren vallen, komt in de natuur ook secundair metabolisme voor. Planten produceren secundaire metabolieten om zichzelf te be-

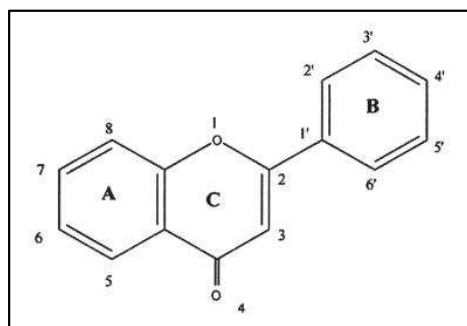
schermen tegen stressfactoren. Onder deze secundaire metabolieten worden fenolen, terpenoïden en alkaloiden verstaan (*Keski-Saari et al., 2008*). Ze worden geproduceerd uit primaire metabolieten. Er is veel interesse voor secundaire metabolieten, omdat vele van hen, (zoals taxol, artemisinine, digoxine en de *Vinca*-alkaloiden), interessante eigenschappen bezitten voor toepassing in de geneeskunde.

Fenolen zijn terug te vinden in de meeste vasculaire plantensoorten. Ze spelen een rol bij het beschermen van de plant tegen pathogenen en herbivoren. Dit gebeurt onder andere door de bittere smaak, sterke geur en giftigheid (*Freeland & Janzen, 1974*). Vooral deze fenolen spelen een zeer grote rol bij de bescherming van planten, en ze hebben ook vele gunstige effecten op andere organismen. Zo zijn polyfenolen afkomstig uit planten vaak het actieve bestanddeel in traditionele middelen tegen kanker en vele andere aandoeningen. Natuurlijk hebben ook de alkaloiden en terpenoïden hun effecten, maar deze zijn toch iets minder uitgebreid dan die van de fenolen. Een zeer grote groep binnen de polyfenolen is die van de flavonoïden. Tot nu toe zijn er al meer dan 8000 structuren die tot deze klasse behoren. Ze komen wijd verspreid voor in (hogere) planten (*Bracke et al., 2008; Hasegawa et al., 2008; Quideau et al., 2011*).

1.2.1. Flavonoïden

De flavonoïden zijn het product van een shikiminezuurafgeleide en een polyketide, samengesteld uit acetaat-/malonaateenheden (*Quideau et al., 2011*). Flavonoïden komen zeer veel voor in voedsel van plantaardige oorsprong, onder andere in fruit en groenten (*Stevens & Page, 2004; Om & Kim, 2008*). Er wordt aangenomen dat flavonoïden een gunstig effect op de gezondheid hebben. Zo is er een verband gevonden met een lagere incidentie van cardiovasculaire aandoeningen (*Stevens & Page, 2004*). Dit is voornamelijk toe te schrijven aan hun antioxidatieve eigenschappen. Ze beschermen cellen tegen de schadelijke effecten van reactieve zuurstofverbindingen (hydroxyl-, peroxide- en superoxideradicalen), door deze vrije radicalen weg te vangen. Oxidatieve stress, als gevolg van een verstoorde balans tussen antioxidant en reactieve zuurstofverbindingen, wordt in verband gebracht met kanker, atherosclerose, veroudering, ischemische aandoeningen, ontsteking en neurodegeneratieve ziekten (*Stevens & Page, 2004; Om & Kim, 2008*).

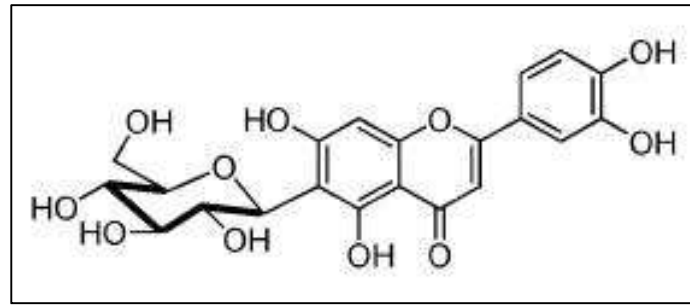
In Figuur 1.2 is de basisstructuur van de flavonoïden weergegeven. De flavonoïden bestaan uit verschillende chemische klassen: flavonen, isoflavonen, flavonolen, flavanolen, flavanonen en chalconen (Miranda et al., 1999). In het geval van bamboe zijn vooral de flavonen, die tevens de meest voorkomende flavonoïden zijn, belangrijk. De chalconen, waartoe xanthohumol (zie sectie 1.3.2.) behoort, zijn flavonoïden met een open C-ring, waarin de twee aromatische ringen verbonden worden door een carbonylsysteem van drie koolstoffen, dat α,β -onverzadigd is (Miranda et al., 1999). Het zijn verbindingen met een gele kleur, die niet zeer veel voorkomen, omdat ze gemakkelijk isomeriseren tot de overeenkomstige flavanonen. De chalconen zijn de voorlopers van een hele reeks flavonoïden. Veel flavonoïden komen voor als wateroplosbare glycosiden.



Figuur 1.2 Basisstructuur flavonoïden (Om & Kim, 2008)

1.2.1.1. Flavonoïden in bamboe

In het onderzoek van Hasegawa et al. (2008) werden vier flavonoïdglycosiden geïsoleerd uit *Sasa kurilensis* 'Gigantea'. Er werden twee nieuwe C-glycosylflavonen gevonden, kurilensine A en B, die allebei vrije radicalen konden neutraliseren en dus een antioxidatief effect hadden. In het onderzoek van Van Hoyweghen et al. (2010) hier in het Laboratorium voor Farmacognosie en Fytochemie van de Universiteit Gent, werden vijf flavonglycosiden geïsoleerd uit *Fargesia robusta* 'Pingwu'. Deze componenten werden geïdentificeerd als homo-orientine (luteoline-6-C- β -D-glucopyranoside), farobine A (luteoline-6-C- β -boivinopyranosyl-7-O- β -glucopyranoside), farobine B (luteoline-6-C- β -boivinopyranosyl-4'-O- β -glucopyranoside), tricine-5-O- β -D-glucopyranoside en cassiaoccidentiline B (2''-O- α -rhamnosyl-6-C-(6-deoxy-ribohexos-3-ulosyl)luteoline). Homo-orientine (zie Figuur 1.3) bleek van deze vijf componenten de sterkste antioxidatieve activiteit te bezitten, terwijl de activiteit van farobine B en tricine-5-O- β -D-glucopyranoside te verwaarlozen was. Het *Fargesia robusta* 'Pingwu' extract wordt ook onderzocht in deze thesis.



Figuur 1.3. Structuur homo-oriëntine (Van Hoyweghen et al., 2010)

1.3. HOP

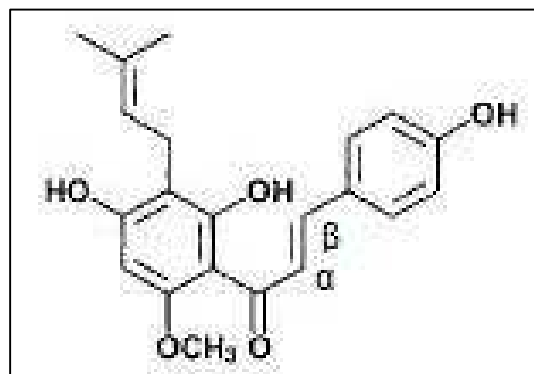
1.3.1. Algemeen

De wetenschappelijke naam van de hopplant is *Humulus lupulus* L. Hop behoort tot de familie van de Cannabaceae. De vrouwelijke hopbellen worden gebruikt bij het brouwen van bier: ze zorgen voor de bittere smaak. Humulones (α -zuren) en lupulones (β -zuren) zijn de eigenlijke substanties die de bittere smaak aan bier geven. Het zijn geprenyleerde acylfloroglucinolen (Stevens & Page, 2004). Hop bevat verder veel polyfenolen (4-14% in gedroogde hopbellen), een klein gehalte vluchtige olie (0,2-0,5%), proteïnen, ballaststoffen en mineralen. De hopbellen worden traditioneel ook therapeutisch gebruikt, als mild sedativum en om de eetlust te bevorderen (Gerhauser et al., 2002).

1.3.2. Xanthohumol

1.3.2.1. Algemeen

Xanthohumol (2',4',4'-trihydroxy-3'-prenyl-6'-methoxychalcon) is een geprenyleerd chalcon, dat behoort tot de prenylflavonoïden. De structuur van xanthohumol is weergegeven in Figuur 1.4.



Figuur 1.4. Structuur xanthohumol (Gerhauser et al., 2002)

Xanthohumol komt enkel voor in de hopplant, en dan voornamelijk in de vrouwelijke hopbellen, waar het wordt geproduceerd in de lupulineklieren. Omdat hop gebruikt wordt in bier, is bier de belangrijkste bron van xanthohumol en andere prenylflavonoïden in onze voeding (*Stevens & Page, 2004*).

Hoewel xanthohumol het voornaamste prenylflavonoïd in hop is, is isoxanthohumol dit in bier. Dit komt doordat xanthohumol tijdens het brouwen van bier onderhevig is aan thermische isomerisatie. Hierbij worden chalconen omgezet tot flavanonen, waardoor xanthohumol cycliseert tot isoxanthohumol. Een ander voorbeeld hiervan is de omzetting van desmethylxanthohumol tot 6- en 8- prenylnaringenine (6-PN en 8-PN) (*Gerhauser et al., 2002; Stevens & Page, 2004*). 8-PN is het meest potente fyto-oestrogeen tot op heden gekend. Zijn activiteit is nog wel veel lager (minder dan 1%) dan die van 17β -oestradiol, maar biedt mogelijkheden voor de behandeling van problemen tijdens de overgang bij vrouwen en voor het voorkomen van osteoporose in de menopauze (*Stevens & Page, 2004*). Isoxanthohumol en xanthohumol hebben geen oestrogene werking, al is gebleken dat xanthohumol de botresorptie wel kan inhiberen. Het is echter niet waarschijnlijk dat dit gebeurt via een oestrogeen mechanisme (*Tobe et al., 1997; Stevens & Page, 2004*). Xanthohumol is mogelijk wel een pro-oestrogeen. In het zure milieu van de maag kan xanthohumol namelijk cycliseren tot isoxanthohumol, dat door leverenzymen of bacteriën in het colon omgezet kan worden tot 8-PN (*Nikolic et al., 2005; Possemiers, et al. 2006*)

Xanthohumol en de andere prenylflavonoïden maken maar een klein deel uit van de totale hoeveelheid polyfenolen in bier en zullen dus in beperkte mate bijdragen aan de antioxidatieve eigenschappen van dit product. Ze zijn echter meer lipofiel dan de andere polyfenolen, waardoor ze aan lipofiele oppervlakken, bijvoorbeeld membranen en low-density lipoproteïne (LDL), meer effectief kunnen zijn als antioxidantia (*Stevens & Page, 2004*). Verder zou xanthohumol het risico op atherosclerose kunnen verlagen. Het inhibeert namelijk het diacylglycerol acyltransferase, wat kan leiden tot een verminderde opstapeling van triglyceriden (*Tabata et al., 1997*).

Xanthohumol kan tevens de vorming van O_2^- (superoxideradicaal) in mitochondriën stimuleren. Hierdoor stijgt het aantal reactieve zuurstofverbindingen

(ROS) en vermindert het gehalte aan gereduceerd glutathion. Dit resulteert uiteindelijk in celdood door apoptose. Bepaalde kankercellen en immuuncellen zijn rijker aan ROS dan andere cellen, waardoor deze cellen min of meer selectief aangepakt worden. De antioxidatieve activiteit van xanthohumol is voornamelijk toe te schrijven aan zijn fenolgroep, terwijl deze "redoxmodulerende" activiteit ontstaat dankzij de α,β -onverzadigde ketonfunctie (Strathmann, et al. 2010; Jacob et al., 2011).

1.3.2.2. Chemopreventieve werking van xanthohumol

Reeds heel wat onderzoek werd uitgevoerd naar de mogelijke cytotoxische en cytostatische werking van xanthohumol. (Gerhauser et al., 2002; Stevens & Page, 2004). Uit het onderzoek van Miranda et al. (1999) bleek dat xanthohumol de meest potente was van de reeks flavonoiden uit hop bij het inhiberen van de proliferatie van verschillende humane kankercellijnen, namelijk borst-, colon-, en ovariumkanker.

Chemopreventie van kanker is gericht op het inhiberen van de vorming van tumoren. Dit gebeurt door het inspelen op verschillende pathways die belangrijk zijn voor de carcinogenese. Xanthohumol werkt chemopreventief op drie manieren: 1) het inhiberen van de metabole activatie van procarcinogenen, gekatalyseerd door cytochroom P450 enzymen; 2) het induceren van enzymen die carcinogenen onschadelijk maken; 3) inhiberen van de tumorgroei in een vroeg stadium, bijvoorbeeld door het induceren van apoptose in kankercellen (Stevens & Page, 2004; Pan et al., 2005). Een voorbeeld van het effect van xanthohumol is de inhibitie van de metabole activatie van 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). IQ is een procarcinogeen, dat voorkomt in gebakken vlees. Het is een heterocyclisch aromatisch amine. De inhibitie komt waarschijnlijk tot stand door het inhiberen van CYP1A2, een cytochroom P450 enzym (Stevens & Page, 2004; Ferk et al., 2010). Ook uit het onderzoek van Gerhauser et al. (2002) blijkt dat xanthohumol *in vivo* een inhibitor van CYP1A is. Normale bierconsumptie zou echter niet genoeg prenylflavonoiden leveren om voldoende hoge plasmaspiegels te verkrijgen voor de gunstige effecten van xanthohumol (Gerhauser et al., 2002).

Omdat maligniteit van tumoren wordt gekenmerkt door invasie, is het zoeken naar anti-invasieve middelen een uitdaging. In het onderzoek van Vanhoecke et al. (2005) werd *in vitro* het effect van xanthohumol op verschillende processen die tus-

senkomen in de progressie van borstkanker onderzocht. Daaruit bleek dat xanthohumol de invasie in weefsels van bepaalde borstkankercellen kan inhiberen, waarschijnlijk door de groei van de kankercellen selectief te remmen. Verder bleek dat xanthohumol *in vitro* apoptose (geprogrammeerde celdood) van de kankercellen stimuleert, wat resulteert in een vermindering van het aantal invasieve cellen. Ook wordt de E-cadherine gemedieerde cel-cel adhesie gestimuleerd. Het E-cadherine/catenine complex onderdrukt invasie. Als dit complex niet goed functioneert, treedt sneller invasie van kankercellen op (Vanhoecke et al., 2005; Bracke et al., 2008). Ook andere effecten van xanthohumol kunnen bijdragen aan zijn anti-invasieve activiteit. Dit geldt bijvoorbeeld voor zijn inhiberend effect op de cyclooxygenase enzymen (COX-1 en -2), waardoor de prostaglandine synthese geremd wordt. Prostaglandines zorgen voor een stimulatie van de invasie van borstkanker. Ze zijn bovendien belangrijk voor de angiogenese, wat ook een belangrijke rol speelt bij tumorgroei. De inhibitie van de COX-enzymen zorgt tevens voor het anti-inflammatoire effect van xanthohumol (Gerhauser et al., 2002; Stevens & Page, 2004; Vanhoecke et al., 2005).

1.3.2.3. Biologische beschikbaarheid

Prenylatie, de substitutie die de chalconstructuur van xanthohumol ondergaan heeft, is een belangrijke posttranslationale modificatie van eiwitten. Hierdoor worden ze meer lipofiel en verplaatsen ze zich naar de celmembraan. Waarschijnlijk beïnvloedt deze prenylatie ook de oplosbaarheid, cellulaire opname en lokalisatie van xanthohumol in de cel. Dit kan belangrijk zijn voor de biologische activiteit van xanthohumol (Sinensky, 2000; Gerhauser et al., 2002).

De biologische beschikbaarheid van xanthohumol is zeer laag. Een van de mogelijke oorzaken hiervan is het feit dat xanthohumol onderhevig is aan een zeer sterke afbraak door micro-organismen in de darm (Stevens & Page, 2004). Daarnaast is het metabolisme van xanthohumol door de lever onderzocht. Zo is gebleken dat xanthohumol *in vitro* geglucuronideerd wordt door microsomen uit de lever van mensen of ratten. Glucuronidatie behoort tot de fase-II reacties van het metabolisme en wordt gekatalyseerd door UDP-glucuronosyltransferases. Uit verder *in vitro* onderzoek met recombinante humane UDP-glucuronosyltransferases en sulfotransferases, gekoppeld aan informatie over hun distributie in het lichaam, kon opgemaakt

worden dat xanthohumol zowel in de lever als in het gastro-intestinaal systeem geglucuronideerd en gesulfateerd zal worden. Verder zijn er verschillende cytochroom P450 enzymen betrokken bij de afbraak van xanthohumol (*Yilmazer et al., 2001a; Yilmazer et al., 2001b; Ruefer et al., 2005*).

Uit *in vivo* studies met ratten bleek echter dat oraal toegediend xanthohumol voor een groot deel onveranderd wordt uitgescheiden in de faeces. Verder wordt het niet teruggevonden in het plasma (*Avula et al., 2004; Nookandeh et al., 2004*). Het is dus goed mogelijk dat de slechte biologische beschikbaarheid van xanthohumol, onder andere door slechte absorptie in de darm en door sterke metabolisatie in lever en darm, zijn chemopreventieve activiteit beperkt. In het onderzoek van Pang et al. (2007) met epitheliale cellen van de darm bleek inderdaad dat xanthohumol zeer slecht wordt geabsorbeerd. Het stapelde echter wel zeer sterk op in het cytosol van de epitheelcellen en bond tevens aan cytosolische eiwitten. Aangezien de meeste vormen van colonkanker ontstaan uit epitheelcellen, kan xanthohumol nuttig zijn bij de bescherming tegen colonkanker (*Pang et al., 2007*).

1.4. ANTILICHAMEN

Antilichamen (AL) zijn glycoproteïnen, die gesecreteerd worden door plasma-cellen, gedifferentieerde B-lymfocyten van het adaptieve immuunsysteem. Ze worden gevormd in respons op het binnendringen van antigenen (lichaamsvreemde moleculen) in het lichaam. Elk AL kan binden op één specifiek antigen, meer bepaald op één epitoot. Een epitoot is het deel van het antigen waarop het AL bindt. Verder binden de AL op cellen van het immuunsysteem (*Harlow & Lane, 1988; Harlow & Lane, 1999*).

Antilichamen bestaan uit vier polypeptiden: twee kopiën van de zware keten en twee van de lichte keten. Deze polypeptiden worden samengehouden door covalente disulfidebruggen en door niet-covalente bindingen. Er zijn vijf klassen AL, die onderscheiden worden op basis van het soort zware keten: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Er zijn slechts twee verschillende lichte ketens (κ en λ). AL bestaan uit een Fc domein en een Fab fragment. Het Fc domein is constant en bindt op cellen van het immuunsysteem, het Fab fragment is variabel en bevat de antigenbindende plaats (*Harlow & Lane, 1988*).

In het serum komen AL, geproduceerd door verschillende plasmacellen, voor. Serum is dus polyklonaal. Daartegenover staan monoklonale AL, die slecht op één specifiek epitoom binden. Voor de productie van monoklonale AL kan als volgt te werk worden gegaan: een AL-producerende cel wordt geïsoleerd uit een geïmmuniseerd dier. Deze cel wordt gefuseerd met een myelomacel (B-cel tumor). Deze hybride cellen worden hybridoma's genoemd en secreteren specifieke, monoklonale AL. (*Harlow & Lane, 1988; Harlow & Lane, 1999*)

1.4.1. Indirecte competitieve enzyme-linked immunosorbent assay

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is één van de vele toepassingen van monoklonale antilichamen. Bij de indirecte competitieve ELISA, die ook in het onderzoek van deze thesis wordt gebruikt, wordt een antigeen geadsorbeerd op de bodem van de wells van een 96-well plaat. Dan wordt een oplossing met daarin het primaire AL toegevoegd, dat zal binden aan het antigeen. Dit primaire AL wordt dan gedetecteerd door het toevoegen van een secundair AL, dat specifiek is voor het Fc domein van het primaire AL. Verder is het secundair AL gekoppeld aan een enzym, bijvoorbeeld alkalische fosfatase. Na toevoeging van het substraat van dit enzym zal een gekleurd product worden gevormd. Aan de hand van het meten van de absorbantie kan de hoeveelheid product bepaald worden, waaruit afgeleid kan worden hoeveel secundair AL gebonden was en dus hoeveel primair AL aanwezig was.

1.5. TUMORVORMING

Het ontstaan van tumoren gebeurt in verschillende stappen. Aan al deze stappen liggen genetische veranderingen ten grondslag, die maken dat normale cellen veranderen in maligne tumorcellen. Oorzaken van deze genetische veranderingen kunnen bijvoorbeeld zijn: sigarettenrook, voedingsbestanddelen of –additieven, zonlicht of chronische inflammatie (*Hanahan & Weinberg, 2000; Sugimura, 2002*). Er kunnen drie grote stappen onderscheiden worden bij de tumorvorming: initiatie, promotie en progressie. Bij de initiatie wordt het DNA beschadigd door carcinogenen. Hierdoor ontstaan mutaties in oncogenen en/of tumor suppressor genen. Tijdens de promotie worden geïnitieerde cellen door mechanische, hormonale of genetische factoren gestimuleerd om te gaan delen. Zo ontstaan benigne tumoren. Door toenevende genetische instabiliteit van de tumor ontstaan mutaties op belangrijke punten

in het DNA. Dit leidt uiteindelijk tot progressie tot een maligne tumor die kan metastaseren (*Sukumar et al., 1995*). Op al deze fases kan worden ingespeeld door chemopreventieve fytochemische componenten waartoe onder andere xanthohumol en de verschillende componenten uit de bamboe-extracten behoren. Ze kunnen de initiatie blokkeren, de promotie omkeren en de progressie vertragen of stoppen (*Surh, 2003*).

Het aanvoeren van zuurstof en nutriënten is in het algemeen belangrijk voor het functioneren van cellen. Voor de groei van tumoren is het dus essentieel dat er ook angiogenese, (vorming van nieuwe bloed- en lymfevaten om de tumor van zuurstof en voedingsstoffen te voorzien), optreedt (*Hanahan & Weinberg, 2000; Bracke et al., 2008*). Daarnaast is angiogenese ook belangrijk bij de invasie van de primaire tumor en de metastase. Tumoren zijn benigne zolang ze zich niet verspreiden in nabijgelegen weefsels en metastaseren naar andere organen. Maligne tumoren doen dat wel. Deze invasie en metastase zijn de doodsoorzaken van kankerpatiënten, dus zijn dit de belangrijkste doelwitten waar het kankeronderzoek zich op richt (*Bracke et al., 2008*).

1.6. ANTIPROLIFERATIEVE TESTEN

1.6.1. MTT-test

MTT is een tetrazoliumzout (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). De tetrazoliumring van tetrazoliumzouten wordt in actieve mitochondriën gesplitst. De MTT-test is een colorimetrische test die de levensvatbaarheid van cellen meet. In levende, metabool actieve cellen wordt MTT (lichtgeel) namelijk omgezet tot formazankristallen (donkerblauw, wateronoplosbaar). Deze omzetting wordt gekatalyseerd door onder andere het mitochondriaal enzym succinaat dehydrogenase. Dit gebeurt niet in dode cellen en erythrocyten, omdat deze geen (actieve) mitochondriën bezitten. De hoeveelheid formazan, en dus de kleurintensiteit, is recht evenredig met het aantal levende cellen dat aanwezig is. De test wordt gebruikt in proliferatie- en cytotoxiciteitstesten. Ook in het onderzoek van deze thesis wordt deze test gebruikt, om het antiproliferatief effect van de bamboe-extracten te evalueren (*Mosmann, 1983; Wang et al., 2010*).

De MTT-test heeft echter wel verschillende beperkingen. Een voorbeeld hiervan is dat verschillende componenten kunnen interageren met MTT. Dit is bijvoorbeeld het geval voor flavonoiden en andere polyfenolen in plantenextracten: ze kunnen zelf MTT reduceren, in afwezigheid van cellen. Verder kunnen ze de hoeveelheid vrije radicalen in de cel beïnvloeden, waardoor de reductie van MTT verminderd wordt (*Peng et al, 2005; Jaszczyszyn & Gasiorowski, 2008*). Het is dus belangrijk om deze interacties met de kleurstof te voorkomen. In het geval van deze thesis gebeurt dat door het extract te verwijderen en de cellen te wassen met medium, voordat MTT toegevoegd wordt.

1.6.2. SRB-test

Sulforhodamine B (SRB) is een anionische, roze kleurstof. Het is een aminoxantheen en bevat twee sulfongroepen. Onder zwak zure omstandigheden bindt het elektrostatisch op eiwitten, meer bepaald op de basische aminozuren. Cellen worden gefixeerd met 50% trichloorazijnzuur (TCA). Na het kleuren worden de cellen gelyseerd, zodat de kleurstof vrijkomt. Hoe meer cellen er zijn, hoe meer kleurstof opgenomen en vervolgens weer vrijgesteld wordt. Dan wordt de absorbantie gemeten. Dit is een maat voor het aantal proteïnen en geeft dus een indicatie van het aantal cellen. De SRB-test is wederom een test om de cytotoxiciteit te bepalen en wordt daarom ook gebruikt bij het testen van het effect van de bamboe-extracten in deze thesis (*Skehan et al., 1990; Houghton et al., 2007*).

2. OBJECTIEVEN

Dit onderzoek kadert binnen twee projecten, namelijk rond hop- en bamboe afgeleide secundaire metabolieten. Bamboe heeft in Azië zeer veel toepassingen als gezondheidsbevorderend product, zowel in de voedingsindustrie als in de traditionele geneeskunde. In voorafgaand onderzoek aan deze thesis is voor bepaalde bamboesoorten, namelijk de bladextracten van *Fargesia robusta* 'Pingwu', *Fargesia rufa* 'Green Panda' en *Bambusa balcooa*, *in vitro* al een antiproliferatief effect op humane borstkankercellen (MCF-7/6 en MCF-7/AZ) aangetoond.

Het doel van het eerste deel van deze thesis is om te onderzoeken of bepaalde bamboesoorten eventueel een selectieve antiproliferatieve werking uitoefenen op specifieke cellen. Daarom worden nu de verschillende extracten onderzocht op hun antiproliferatief effect op colonkankercellen (HCT-8). Er wordt gewerkt met invasieve (HCT-8/E₁₁R₁) en niet-invasieve cellen (HCT-8/E₁₁). De bamboesoorten die getest worden zijn *Pseudosasa japonica*, *Fargesia robusta* 'Pingwu', *Sasa veitchii*, *Arundinaria gigantea*, *Dinochloa scandens*, *Dendrocalamus hamiltonii*, *Fargesia rufa* 'Green Panda', *Phyllostachys humilis*, *Pleioblastus variegatus*, *Bambusa balcooa*, *Guadua amplexifolia* en *Phyllostachys nigra*.

Als antiproliferatieve assays worden de MTT- en SRB-test gebruikt. In de MTT-test wordt de metabole activiteit van cellen, behandeld met bamboe-extract, bepaald, in de SRB-test het eiwitgehalte van deze cellen. Beide parameters geven een indicatie van het aantal cellen en daarmee ook van een eventueel antiproliferatief effect van de extracten. Alle bamboe-extracten worden ook geanalyseerd met behulp van HPLC met UV-detectie, om zo een idee te krijgen over de samenstelling van de verschillende extracten.

Het tweede deel van het onderzoek heeft voornamelijk als doel het moleculair werkingsmechanisme van xanthohumol op te helderen. Er is al gebleken dat xanthohumol, een prenylchalcon uit vrouwelijke hopbellen, een preventieve werking heeft tegen kanker. Hoe dit precies gebeurt en wat de fysiologische bindingspartner van xanthohumol in kankercellen is, is echter nog onbekend.

In dit deel van de thesis wordt vooral de nadruk gelegd op het bestuderen van de cellulaire opname van xanthohumol in humane borstkankercellen (MCF-7/6): wordt deze component daadwerkelijk opgenomen in de cellen, hoe snel gebeurt dit, wordt het later eventueel weer vrijgegeven? Het onderzoeken van deze cellulaire opname gebeurt door de cellen te behandelen met een oplossing van xanthohumol in medium. Er worden verschillende behandelingsduren ingesteld, zodat de invloed van de tijd bekeken kan worden. Door vervolgens xanthohumol te extraheren uit het medium en uit lysaten van de cellen die met xanthohumol behandeld waren, kan een idee gekregen worden over de cellulaire opname van deze component. Hierbij wordt nog geen rekening gehouden met de lage biologische beschikbaarheid van xanthohumol, omdat het direct aan de cellen toegevoegd wordt. Tenslotte wordt met behulp van een indirecte competitieve ELISA bekeken of er na extractie nog xanthohumol achter blijft in de waterige fase van de cellysaten.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1. ANTIPROLIFERATIEVE TESTEN MET BAMBOE-EXTRACTEN

3.1.1. Materiaal

- HCT-8/E₁₁ cellen = niet-invasieve humane colonkankercellen
 - HCT-8/E₁₁R₁ cellen = invasieve humane colonkankercellen
- De cellijnen werden ter beschikking gesteld door de Vakgroep Radiotherapie en Experimenteel Kankeronderzoek van het UZ Gent, België.
- Medium voor de HCT-8 cellen: Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) (Invitrogen Gibco, Merelbeke, België) met 10% Foetaal Bovien Serum (FBS), 1% antibioticaoplossing (penicilline G natrium 10000 IU/mL, streptomycinesulfaat 10000 µg/mL) en 1 mM natriumpyruvaat
 - Fosfaatbuffer = PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) (Invitrogen Gibco, Merelbeke, België)
 - Trypsine/EDTA oplossing (resp. 1% en 0,02%) (Invitrogen, Merelbeke, België)
 - Cultuurflessen (25 cm²) (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken)
 - Hemacytometer (Sigma Chemical, St. Louis, VS)
 - Trypaanblauw
 - Transparante 96-well platen (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken)
 - Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - Vinblastinesulfaat (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - MTT-reagens: 5 mg/mL in PBS (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - ELISA reader/microtiterplaatspectrofotometer (Tecan Safire II) (Grödig/Salzburg, Oostenrijk)
 - Trichloorazijnzuur (TCA) 50% (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - Sulforhodamine B (SRB-)reagens: 0,4% in 1% ijsazijn (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - IJsazijn 1% (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - Tris-base (10 mM, pH 10,5) (Sigma-Aldrich, Bornem, België)

3.1.2. Methoden

3.1.2.1. Cellen splitsen

De twee types colonkankercellen (HCT-8/E₁₁ en HCT-8/E₁₁R₁) werden in cultuur gehouden in cultuurflessen in een incubator bij constante temperatuur van 37 °C en een constante CO₂-druk van 5%. Op het moment dat het oppervlak van een cultuurfles 80 à 100% volgroeid was, werden de cellen gesplitst. Dit gebeurde als volgt: allereerst werd het medium verwijderd uit de cultuurfles m.b.v. een vacuümpomp. Vervolgens werd twee keer gespoeld met PBS om enzymen te verwijderen die trypsine zouden kunnen inactiveren. Er werd 1,5 mL trypsine toegevoegd om de cellen te splitsen. Trypsine is een protease dat de cellen losmaakt van elkaar en van de bodem van de cultuurfles. Het trypsine werd, na kort contact met de cellen, weer grotendeels verwijderd, en de cultuurfles werd opnieuw geïncubeerd gedurende ongeveer 15 minuten, zodat de cellen de tijd kregen om los te komen. Hierna werd onder de microscoop gekeken of het splitsingsproces goed door was gegaan. Dit was het geval indien de cellen een afgeronde vorm hadden gekregen. Dit duidt namelijk op individuele, losse cellen. Dan werd 1 mL medium toegevoegd zodat een celsuspensie ontstond. Vanuit deze celsuspensie kon opnieuw een verdunning gemaakt worden (1/10, 1/20 of 1/40; respectievelijk 100 µL, 50 µL en 25 µL celsuspensie in 5 mL medium) in een cultuurfles, om de cellen weer verder in cultuur te houden. Het werken met cellen moest onder steriele omstandigheden gebeuren en werd daarom gedaan in een 'Laminaire Air Flow' (LAF-)kast. Er werd verder gewerkt met steriel materiaal.

3.1.2.2. Cellen tellen en uitplaten

10 µL van bovenstaande celsuspensie werd in een epje gemengd met 10 µL trypaanblauw. Dit is een kleurstof die dode cellen binnendringt en deze blauw kleurt, zodat deze onderscheiden kunnen worden van de levende cellen. Voor het tellen van de cellen werd gebruik gemaakt van een hemacytometer. In een telkamer van de hemacytometer werd ongeveer 10 µL van het mengsel van de celsuspensie en trypaanblauw gebracht. Met behulp van een microscoop werden de cellen in 2 kwadranten, steeds bestaande uit 16 hokjes, geteld. Deze twee aantallen werden bij elkaar opgeteld en vervolgens kon een schatting van het aantal cellen in 1 mL celsuspensie gemaakt worden:

$$C = n \times 10^4$$

waarin: C = aantal cellen/mL

n = aantal getelde cellen

10^4 = omrekenfactor: cellen op $0,1 \text{ mm}^3$ geteld,
omrekenen naar $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$

N.B.: er werd 1/2 verdund, maar hiervoor werd al gecorrigeerd door 2 kwadranten te tellen.

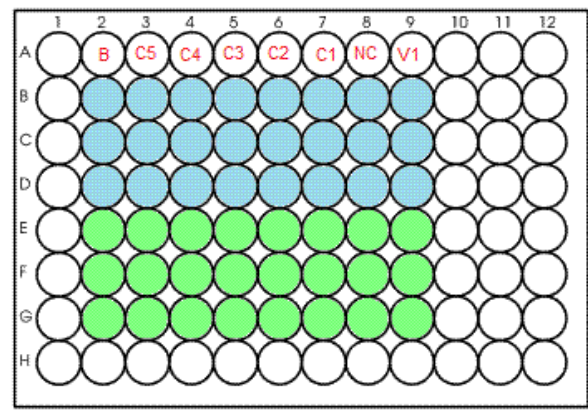
Om later het antiproliferatief effect van een bamboe-extract te kunnen bepalen, moesten de cellen eerst uitgeplaat worden in 96-well platen. Voor elk extract werden 2 platen gemaakt: één voor de MTT-test, één voor de SRB-test. Per celtype werden op elke plaat 3 rijen gevuld, zodat het experiment in drievoud gebeurde. Dit verhoogt de betrouwbaarheid van de resultaten. De wells werden gevuld met 100 μL celsuspensie aan 5000 cellen per well. Doordat de cellen geteld waren kon de hoeveelheid celsuspensie die nodig was berekend worden, net als de hoeveelheid medium waarmee aangelengd moest worden. De blanco wells (zie sectie 3.1.2.3.) werden gevuld met 100 μL medium. Vervolgens werden de platen in de incubator geplaatst.

3.1.2.3. Bamboe-extracten toevoegen

Na 2 dagen incubatie werd de celgroei in de 96-well platen bekeken. In elke well moesten ongeveer evenveel cellen aanwezig zijn, behalve natuurlijk in de blanco wells, waar geen celgroei waarneembaar mocht zijn. Uit onderzoek voorafgaand aan deze thesis is gebleken dat de cellen na ongeveer 2 dagen beginnen te prolifereren. Dit is de reden dat de bamboe-extracten steeds na 48 uur incubatietijd werden toegevoegd.

Eerst werd een verdunningsreeks gemaakt van het extract, zodat in de wells de volgende concentraties verkregen werden: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ en 500 $\mu\text{g/mL}$. De verdunningen werden gemaakt uitgaande van een stockoplossing van het extract van 100 mg/mL in 100% DMSO. Er werd gezorgd dat het percentage DMSO in elke well gelijk was (0,5%), zodat een eventueel effect van het solvent buiten beschouwing kon worden gelaten. Met behulp van de verdunningsreeks kon geëvalueerd worden bij welke concentratie eventueel een antiproliferatief effect

optreedt en of dit effect concentratieafhankelijk is. Ook kon zo de IC_{50} -waarde bepaald worden, indien een groei-inhiberend effect werd waargenomen. De IC_{50} -waarde ('50% inhibitory concentration') is de concentratie waarbij 50% inhibitie van de proliferatie optreedt. De indeling van de platen is weergegeven in Figuur 3.1.



Figuur 3.1. Schematische weergave 96-well plaat: ■ = E_{11} cellen; ■ = R_1 cellen; B = blanco (geen cellen); C_1 t/m C_5 = verschillende concentraties bamboe-extract; NC = negatieve controle; V_1 = vinblastinesulfaat

100 μ L van de juiste verdunning van het extract werd aan de juiste wells toegevoegd. Verder werd een negatieve controle meegenomen op de plaat, zoals weergegeven is in Figuur 3.1. Aan deze wells werd 100 μ L medium met dezelfde uiteindelijke concentratie DMSO (0,5%) als in de extracten toegevoegd. Omdat het effect van de extracten gemeten werd t.o.v. de negatieve controle, werd gecorrigeerd voor de eventuele effecten van DMSO. De laatste wells, met 20 nM vinblastinesulfaat, dienden als positieve controle (zie Figuur 3.1). Van vinblastine is namelijk bewezen dat het cytotoxisch is. Het behoort tot de *Vinca* alkaloiden en wordt gebruikt bij de behandeling van bijvoorbeeld bepaalde lymphoma's en borstkanker. Het is een 'metafase remmer', wat betekent dat het de celdeling remt in de metafase. Dit gebeurt door het inhiberen van de vorming van de microtubuli (Caron & Herwood, 2007).

3.1.2.4. Ijklijn vinblastinesulfaat

Om de cytotoxiciteit van vinblastinesulfaat te testen in functie van zijn concentratie, werd een ijklijn gemaakt. Hiervoor werd een verdunningsreeks van vinblastinesulfaat gemaakt, uitgaande van een stockoplossing van 4 μ M. Dit resulteerde in de volgende concentraties in de wells: 20 nM, 5 nM, 1 nM, 0,1 nM en 0,05 nM. 100 μ L van de juiste verdunning werd aan de juiste wells van een 96-well plaat (5000 cel-

len/well) toegevoegd. Aan deze plaat waren de stappen uit de secties 3.1.2.1. t/m 3.1.2.3. vooraf gegaan. Ook hier werd de negatieve controle meegenomen.

3.1.2.5. IJklijn tricine

Uit onderzoek voorafgaand aan deze thesis is gebleken dat tricine, een flavon dat geïsoleerd werd uit het extract van de bamboesoort *Fargesia robusta* 'Pingwu', antiproliferatief effect heeft op borstkankercellen. Om zijn effect op de HCT-8 cellen te testen in functie van de concentratie, werd een verdunningsreeks van tricine gemaakt, uitgaande van een stockoplossing van 15,15 mM. De concentraties in de wells waren: 75,75 μ M; 53,025 μ M; 34,09 μ M; 9,09 μ M en 0,91 μ M. Van de juiste verdunning werd 100 μ L aan de juiste wells van een 96-well plaat toegevoegd. Ook de negatieve en positieve controle werden meegenomen. Aan de plaat waren de stappen uit de secties 3.1.2.1. t/m 3.1.2.3. voorafgegaan.

3.1.2.6. MTT-test

MTT-test protocol:

- Ter voorbereiding: 1/25 verdunning van MTT-oplossing in medium maken
- Medium verwijderen uit de wells m.b.v. vacuümpomp
- Wells wassen met 100 μ L medium
- Medium verwijderen
- 100 μ L verdunde MTT-oplossing toevoegen aan de wells
- Plaat 2 uur incuberen bij 37 °C en 5% CO₂
- MTT-oplossing verwijderen
- 100 μ L DMSO toevoegen en formazankristallen suspenderen
- Absorbantie aflezen bij 570 nm en 650 nm (referentiegolflengte) m.b.v. ELISA reader (of microtiterplaatspectrofotometer)

Een ELISA reader is een spectrofotometer die in één 'run' de absorbantie in alle wells van een 96-well plaat meet. Van elke gemeten waarde werd de absorbantie van de blanco afgetrokken. Uit deze waarden kon de metabole activiteit van de cellen in de wells (als percentage t.o.v. de negatieve controle) berekend worden. De gemiddelde waarde met bijbehorende standaarddeviatie werd voor elke concentratie uitgezet in een staafdiagram om een eventueel antiproliferatief effect te visualiseren.

3.1.2.7. SRB-test

SRB-test protocol:

- Medium uit de wells verwijderen m.b.v. vacuümpomp
- Wells wassen met 100 μ L medium
- Medium verwijderen
- 50 μ L 50% TCA toevoegen
- Plaat 1 uur in de koelkast zetten
- 5 keer wassen met gedestilleerd water (verwijderen van vrije proteïnen en TCA)
- Plaat drogen in de oven (tussen 30 en 40 $^{\circ}$ C)
- 200 μ L SRB-oplossing (0,4% in 1% ijsazijn) toevoegen
- Plaat 30 minuten afschermen van licht (bij kamertemperatuur)
- SRB-kleurstof verwijderen en plaat 4 keer wassen met 200 μ L ijsazijn
- Plaat drogen in oven
- 200 μ L Tris-base toevoegen en kleurstof suspenderen
- Absorbantie aflezen bij 490 en 650 nm m.b.v. ELISA reader

Ook hier werd de absorbantie van de blanco steeds van de andere waarden afgetrokken. Uit de verkregen waarden kon het eiwitgehalte (als percentage t.o.v. de negatieve controle) berekend worden, dat werd uitgezet in een staafdiagram.

3.2. CHROMATOGRAFISCHE ANALYSE

De geëvalueerde extracten werden geanalyseerd met behulp van Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), zodat een eventueel antiproliferatief effect gelinkt kan worden aan een bepaalde samenstelling van dat extract. Ook de stalen die verkregen werden na het extraheren van xanthohumol uit medium of cellysaten (zie vanaf sectie 3.3), werden op deze manier geanalyseerd.

Chromatografie is in het algemeen een analytische scheidingstechniek. Componenten worden gescheiden op basis van een verschillende affiniteit voor de stationaire fase. Componenten met een hoge affiniteit voor de stationaire fase zullen later elueren dan componenten met een lage affiniteit voor de stationaire fase. In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van vloeistof-vaste fasechromatografie (adsorp-

tiechromatografie). De stationaire fase is een adsorbens, de mobiele fase een mengsel van organische solventen en water. In dit geval gaat het om RP-HPLC, wat betekent dat de stationaire fase apolair is en de mobiele fase polair/minder apolair. De analyses werden gedaan met een Waters Alliance 2695 Separation Module (Waters, Milford, USA). De kolom die gebruikt werd was een Phenomenex Luna C18. Deze kolom had een lengte van 250 mm, een interne diameter van 4,6 mm en bevatte silica gederivatiseerd met octadecylketens (adsorbens) met een partikeldiameter van 5 μm . De detector bij de analyse was een Photodiode Array Detector Waters 996 (Waters, Milford, USA). Dit is een UV-detector, waarmee het mogelijk is het volledige UV-absorptiespectrum (200-800 nm) van een staal te doorlopen. De precieze omstandigheden van de analyse waren verschillend voor de bamboe-extracten en de xanthohumolstalen. Deze worden dan ook in de volgende secties verder toegelicht.

3.2.1. HPLC analyse bamboe-extracten

Het elueren van de componenten gebeurde met behulp van gradiëntelutie, waarbij gebruik gemaakt werd van de volgende solventen: water (A), acetonitrile (B) en methanol (C), steeds aangezuurd tot 0,025% mierenzuur. De elutiegradiënt is weergegeven in Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Elutiegradiënt

Tijd (min.)	% solvent A (H ₂ O + 0,025% HCOOH)	% solvent B (Me-CN + 0,025% HCOOH)	% solvent C (Me-OH + 0,025% HCOOH)
0 – 3	85	7,5	7,5
3 – 8	85	7,5	7,5
8 – 11	76	12	12
11 – 18	76	12	12
18 – 28	66	17	17
28 – 36	56	22	22
36 – 42	19	40,5	40,5
42 – 50	5	47,5	47,5
50 – 57	5	47,5	47,5
57 – 60	85	7,5	7,5

Het debiet van het eluens was 0,7 mL/min, het injectievolume 10 µL en de kolomtemperatuur 35 °C. Een run duurde in totaal 60 minuten. De meest abundante fenolen in de bamboe-extracten, de flavonen, hebben hun absorptiemaximum bij een golflengte van 350 nm (band I). De chromatogrammen werden dan ook voornamelijk bij deze golflengte bekeken.

3.2.2. HPLC analyse xanthohumolstalen

Xanthohumol heeft zijn absorptiemaximum bij 370 nm en de interne standaard 4-hydroxybenzofenon (4-HBPH) bij 292 nm. Kwantificatie gebeurde bij deze twee golflengten via het verkregen chromatogram. Er werd gebruik gemaakt van de solventen water (A) en acetonitrile (B), beide aangezuurd tot 0,025% mierenzuur, en het debiet van het eluens bedroeg 1 mL/min. Het injectievolume was 20 µL. De elutiegradiënt is weergegeven in Tabel 3.2. Een volledige run duurde 40 minuten.

Tabel 3.2. Elutiegradiënt HPLC

Tijd (min.)	% solvent A (H ₂ O + 0,025% HCOOH)	% solvent B (MeCN + 0,025% HCOOH)
0 – 3	80	20
3 – 33	80	20
33 – 33,03	25	75
33,03 - 40	80	20

3.3. CELLULAIRE OPNAME XANTHOTHUMOL

3.3.1. Materiaal

- MCF-7/6 cellen: invasieve oestrogeenreceptor-positieve humane borstkankercellen (Vakgroep Radiotherapie en Experimenteel Kankeronderzoek UZ Gent, Gent, België)
- Medium MCF-7/6 cellen: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/HAMF12 (50/50) (Invitrogen, Merelbeke, België) met 10% Foetaal Bovien Serum (FBS) en 1% antibioticaoplossing (penicilline G natrium 10000 IU/mL, streptomycinesulfaat 10000 µg/mL)
- Fosfaatbuffer (PBS, pH 7,4) (Invitrogen Gibco, Merelbeke, België)
- Trypsine/EDTA-oplossing (resp. 1% en 0,02%) (Invitrogen, Merelbeke, België)

- Hemacytometer (Sigma Chemical, St. Louis, VS)
- Trypaanblauw
- Cultuurflessen 25 cm² (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken)
- 6-well platen (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken)
- Xanthohumol-oplossing (5 mg/mL in ethanol) (Laboratorium voor Farmacognosie en Fytochemie, Universiteit Gent, België)
- Ethanol (Acros Organics, Geel, België)
- Lyse-buffer:
 - 150 mM NaCl (Fisher Scientific UK Limited, Leicestershire, UK)
 - 1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
 - 50 mM Tris (ICN Biomedicals, Aurora, VS)
- Celschraper (TPP, Trasadingen, Zwitserland)
- Interne standaard: 4-hydroxybenzofenon (4-HBPH) (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
- Ethylacetaat (Chem Lab, Zedelgem, België)
- Methanol van HPLC kwaliteit (Biosolve, Valkenswaard, Nederland)
- 96-well Maxisorp platen (Nunc A/S, Roskilde, Denemarken)
- Bovien Serum Albumine (BSA) (Sigma-Aldrich, Bornem, België)
- X-BSA (Laboratorium voor Farmacognosie en Fytochemie, Universiteit Gent, België)
- Primair antilichaam: anti-xanthohumol (Laboratorium voor Farmacognosie en Fytochemie, Universiteit Gent, België)
- Tween (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, Frankrijk)
- Secundair antilichaam (anti-muis-HRP) (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Substraat, bestaande uit:
 - 1 tablet ABTS (Thermo Scientific, Rockford, USA) per 10 mL buffer (Stable Peroxide Substrate Buffer) (Thermo Scientific, Rockford, USA)

3.3.2. Methoden

3.3.2.1. Uitplaten

Voorafgaand aan deze stap werden de cellen gesplitst en geteld (zie secties 3.1.2.1. en 3.1.2.2.). De MCF-7/6 cellen werden uitgeplaat in 6-well platen, aan 200000 cellen per well in een volume van 4 mL/well.

3.3.2.2. Cellulaire opname xanthohumol: experiment

In dit experiment werd de opname van xanthohumol (X) door de MCF-7/6 cellen onderzocht. Hiervoor werden de MCF-7/6 cellen behandeld met xanthohumol in een concentratie van 10 μM per well. Er werd dus 40 nmol X per well toegevoegd. De volgende behandelingen werden ingezet: 24uurs-, 6uurs-, 4uurs-, 2uurs-, 1uurs- en 30 min-behandeling. Hiervoor werd 2 mL medium afgenomen uit 6 wells, om er vervolgens 2 mL X, opgelost in medium, aan toe te voegen. Dan werden de 6-well platen opnieuw geïncubeerd, zolang als nodig was voor de behandelingsduur.

Op het einde van de behandelingen werd het medium van alle wells afgenomen en overgebracht in falcons. Elke well werd nog twee maal gespoeld met 1 mL medium, dat ook in de falcon gebracht werd. Vervolgens werden de cellen drie keer gewassen met 1 mL PBS. De laatste wasstep werd bewaard. Dan werd aan iedere well 100 μL lyse-buffer toegevoegd en werden de platen 30 minuten op ijs gezet. Hierna werden de cellen losgemaakt m.b.v. een celschraper en werd 900 μL PBS toegevoegd. De cellen werden gesuspenderd in de buffer en overgebracht in een falcon. Dan kon worden overgegaan tot de extractie van xanthohumol.

3.3.2.3. Extractie van xanthohumol uit medium

Voordat met de extractie begonnen kon worden, werd 100 μL van een 100 $\mu\text{g/mL}$ oplossing interne standaard (IS) aan alle stalen toegevoegd. De interne standaard bij dit experiment was 4-hydroxybenzofenon (4-HBPH). Een IS is een component die compenseert voor alle variabelen tijdens het experiment, (bijvoorbeeld verlies tijdens de extractie), en die ongeveer dezelfde eigenschappen heeft als de te bepalen component. Zo moet bijvoorbeeld de retentietijd van de interne standaard in de buurt liggen van die van de te bepalen component. De extractie gebeurde met het organisch solvent ethylacetaat (EtOAc), volgens onderstaande extractieprocedure. X bevond zich, na faseafscheiding, steeds in de organische fase.

Extractieprocedure:

- 6 mL EtOAc toevoegen aan medium in falcon
- 1 minuut vortexen
- 5 mL organische, bovenstaande fase afnemen

- 6 mL EtOAc toevoegen
- 1 minuut vortexen
- 6 mL organische fase afnemen
- 11 mL afgenomen vloeistof droogdampen onder stikstofstroom
- Residu heroplossen in 200 μ L methanol
- HPLC analyse volgens procedure in sectie 3.2

Er werden tevens zes referentiestalen gemaakt, waarop dezelfde extractieprocedure werd toegepast. Deze stalen bestonden uit 6 mL medium met daarin ook 40 nmol X. Door te vergelijken met de hoeveelheid X die in deze stalen werd gedetecteerd, kon de recovery van X uit het medium, afgenomen uit de wells, bepaald worden. Tenslotte werden ook zes referentiestalen gemaakt die de extractieprocedure niet ondergingen. Deze stalen bevatten 40 nmol X + 100 μ L IS en werden direct geïnjecteerd in de HPLC. Uit de vergelijking van deze waarden met die van de referentiestalen die wel geëxtraheerd waren, kon het extractierendement afgeleid worden.

3.3.2.4. Extractie van xanthohumol uit cellysaten

Voor de extractie van X uit de cellysaten werd een variant van de extractieprocedure uit sectie 3.3.2.3 gevolgd. Het volume EtOAc dat gebruikt werd was nu 2 mL en het residu werd heropgelost in 100 μ L MeOH. Verder werd ieder staal nu onderworpen aan drie extracties.

3.3.2.5. Aanmaken calibratiecurve xanthohumol

Uitgaande van een stockoplossing van xanthohumol met een concentratie van 5 mg/mL werd een verdunningsreeks gemaakt. De initiële verdunning bestond uit 40 μ L stockoplossing en 960 μ L MeOH en had een concentratie van 200 μ g/mL xanthohumol. Vanuit deze oplossing werd steeds met een factor $\frac{1}{2}$ verdund. Uiteindelijk werd van elke oplossing 100 μ L genomen, waaraan 100 μ L IS werd toegevoegd. Dit leidde tot de volgende concentraties: 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL en 6,25 μ g/mL. De oplossingen werden in een vial met micro-insert gebracht en geanalyseerd met de HPLC (zie sectie 3.2).

3.3.2.6. Indirecte competitieve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Om te controleren of er in de waterige fase van de reeds geëxtraheerde cellysaten nog xanthohumol aanwezig was, dat om een bepaalde reden niet geëxtraheerd was, werd een ELISA uitgevoerd. Hiervoor werd het volgende protocol gevolgd:

ELISA:

- 96-well plaat coaten met 200 μ L antigen (10 μ g/mL X-BSA)
- plaat bedekken en overnacht bewaren op 4 $^{\circ}$ C
- plaat 4 keer wassen met een mengsel van PBS + 0,5% Tween
- plaat blokkeren met 250 μ L 3% BSA in PBS
- 1 uur incuberen op 37 $^{\circ}$ C
- 4 keer wassen met PBS + 0,5% Tween
- plaat vullen met 200 μ L van mengsels van primair AL (anti-X) met te onderzoeken stalen:

Ten eerste werd een calibratiereeks voor X samengesteld. Uitgaande van een stockoplossing van 5 mg/mL X werden de volgende concentraties verkregen: 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563; 0,0781; 0,0391; 0,195; 0,00977 en 0,00488 μ g/mL X. Verder werd een blanco (= AL zonder X) en negatieve controle (= geen AL en X) meegenomen. Om te controleren of met deze test wel xanthohumol, aanwezig in cellysaten, gedetecteerd kan worden, werden ook cellysaten die nog niet geëxtraheerd waren, onderzocht. Tenslotte werden de verschillende geëxtraheerde cellysaten toegevoegd. Dan werd verder gegaan met het protocol.

- 2 uur incuberen op 37 $^{\circ}$ C
- 4 keer wassen met PBS + 0,5% Tween
- 200 μ L secundair AL toevoegen (1/4000 in PBS + 0,3% BSA)
- 1 uur incuberen op 37 $^{\circ}$ C
- 4 keer wassen met PBS + 0,5% Tween
- 200 μ L ABTS toevoegen en plaat afschermen van licht
- na 15 tot 30 min absorbantie aflezen bij 405 nm

4. RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1. ANTIPROLIFERATIEVE TESTEN MET BAMBOE-EXTRACTEN

Twaalf verschillende bamboe-extracten werden getest op hun antiproliferatief effect op niet-invasieve (HCT-8/E₁₁) en invasieve (HCT-8/E₁₁R₁) colonkankercellen. Dit werd gedaan met behulp van de MTT-test en de SRB-test. Omdat er in de literatuur voornamelijk publicaties rond de geslachten *Sasa* en *Phyllostachys* te vinden zijn, werden aanvankelijk de grootste effecten verwacht bij de extracten van bamboesoorten van deze geslachten. Uit voorafgaand onderzoek bleek echter dat deze extracten geen effect hadden op borstkankercellen (MCF-7/6 en -/AZ). Dit gold wel voor extracten van het geslacht *Fargesia* en het extract van *Bambusa balcooa*. Antiproliferatieve effecten werden uitgedrukt als IC₅₀-waarde. Deze waarde kon gehaald worden uit de vergelijking van de spreidingsgrafiek van de extracten, (niet weergegeven in deze thesis), door de metabole activiteit of het eiwitgehalte gelijk te stellen aan 50% en vervolgens de bijbehorende concentratie te berekenen. Het celaantal waarvoor de gegeven IC₅₀-waarde geldt, kon berekend worden uit ijklijnen van de cellijnen. Hiervoor werd voor celaantallen van 1000, 5000, 20000, 50000, 100000 en 300000 de absorbantie gemeten en uitgezet in een spreidingsgrafiek. Het meten gebeurde voor de MTT-test bij 570 en 650 nm en voor de SRB-test bij 490 en 650 nm. De volgende formules voor het berekenen van de celaantallen konden aan de hand van deze metingen opgesteld worden.

MTT-test:

$$- E_{11}: y = (2 \times 10^{-5})x + 0,0667$$

$$- R_1: y = (8 \times 10^{-6})x - 0,0291$$

SRB-test:

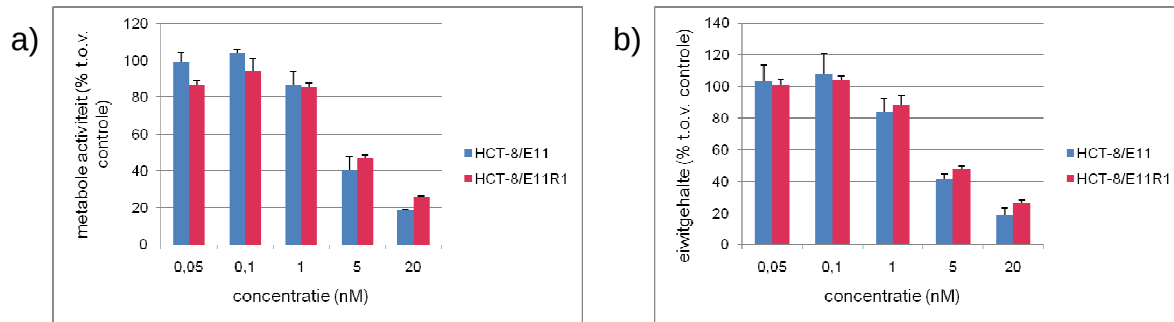
$$- E_{11}: y = (6 \times 10^{-6})x - 0,0212$$

$$- R_1: y = (6 \times 10^{-6})x - 0,021$$

waarin: y = absorbantie
 x = aantal cellen

4.1.1. IJklijn vinblastinesulfaat

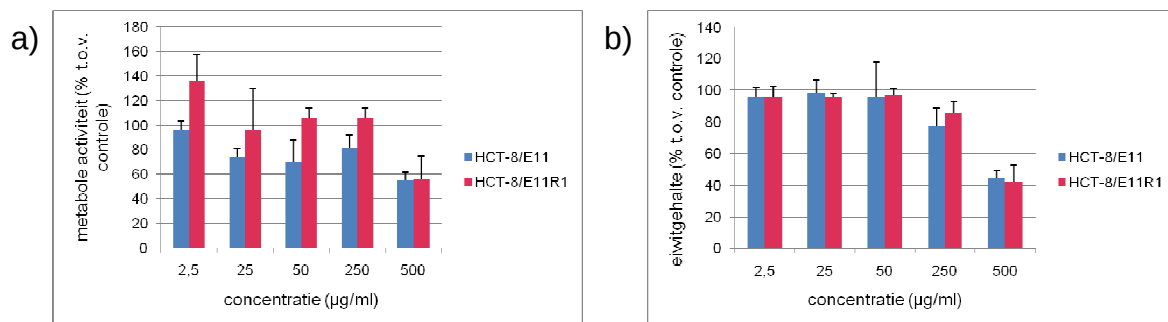
Vinblastinesulfaat werd gebruikt als positieve controle bij het testen van de bamboe-extracten, omdat deze componenten een bewezen cytotoxisch effect heeft. In Figuur 4.1 is de ijklijn van vinblastinesulfaat voor de HCT-8 cellen weergegeven.



Figuur 4.1. IJklijn vinblastinesulfaat voor E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

Uit deze resultaten blijkt inderdaad een groei-inhiberend effect van vinblastinesulfaat. Dit effect treedt nog niet op bij concentraties tot 0,1 nM. Boven deze concentratie neemt het effect snel toe in functie van de concentratie. Een concentratie van 20 nM zorgt al voor een daling in metabole activiteit tot 20% t.o.v. de negatieve controle. Deze concentratie werd ook gebruikt als positieve controle bij de bamboe-extracten. De IC₅₀-waarde van vinblastinesulfaat voor de E₁₁ cellen is $\pm 3,45$ nM voor een celaantal van 25000. Voor de R₁ cellen is de IC₅₀ $\pm 5,30$ nM bij 72000 cellen.

4.1.2. *Pseudosasa japonica* bladextract

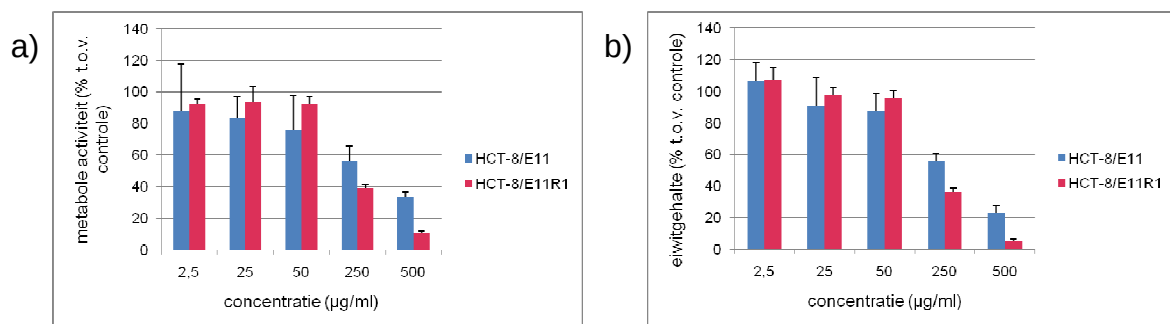


Figuur 4.2. Effect van *P. japonica* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

Het eerste extract dat getest werd op zijn antiproliferatief effect op de HCT-8 cellen was het bladextract van *Pseudosasa japonica*. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 4.2. Voor beide celtypes valt op dat zowel de metabole activiteit als het eiwitgehalte sterk gedaald zijn (tot bijna 50%) bij een concentratie van 500 µg/mL. Bij lagere concentraties is geen significant effect waarneembaar.

4.1.3. *Fargesia robusta* 'Pingwu' bladextract

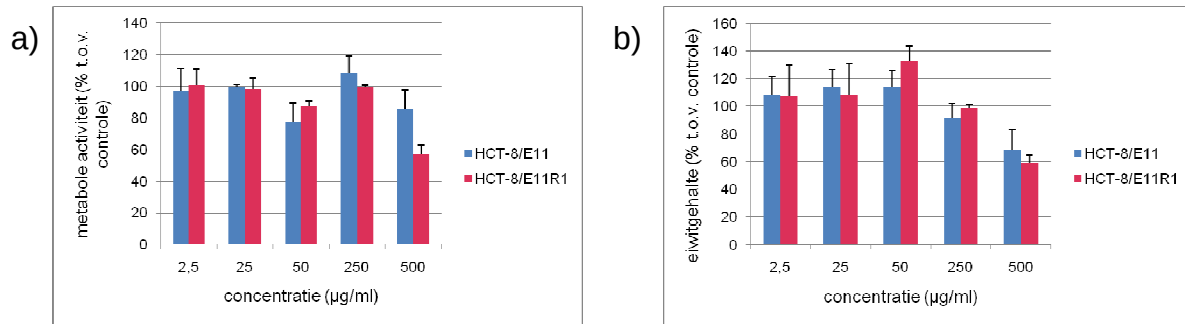
De resultaten van de testen op het bladextract van *Fargesia robusta* 'Pingwu' zijn voor beide celtypes weergegeven in Figuur 4.3. Hieruit blijkt een duidelijk anti-proliferatief effect van dit extract op zowel de HCT-8/E₁₁ als de HCT-8/E₁₁R₁ cellen. Dit effect is concentratieafhankelijk en blijkt uit zowel de MTT- als de SRB-test. Vanaf een concentratie van 250 µg/mL wordt het effect significant. De IC₅₀-waarde voor de E₁₁ cellen bedraagt ± 260 µg/mL bij een celaantal van ongeveer 22000. Voor de R₁ cellen is de IC₅₀ ± 187 µg/mL bij 78500 cellen.



Figuur 4.3. Effect van *F. robusta* 'Pingwu' op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

Omdat het *Fargesia robusta* 'Pingwu' extract dus een duidelijk effect heeft op de cellen, is dit extract nogmaals getest om uit te zoeken of het effect antiproliferatief of cytotoxisch is. Daartoe werden de cellen slechts 24 uur geïncubeerd met het extract (i.p.v. 48 uur). Uit eerder onderzoek is gebleken dat de verdubbelingstijd van de cellen 2 dagen is. Indien het extract een antiproliferatief effect heeft, zal dit na 1 dag nog niet merkbaar zijn, omdat de meeste cellen zich dan nog niet vermenigvuldigd hebben. Indien het effect cytotoxisch is, zal dit wel reeds waarneembaar zijn.

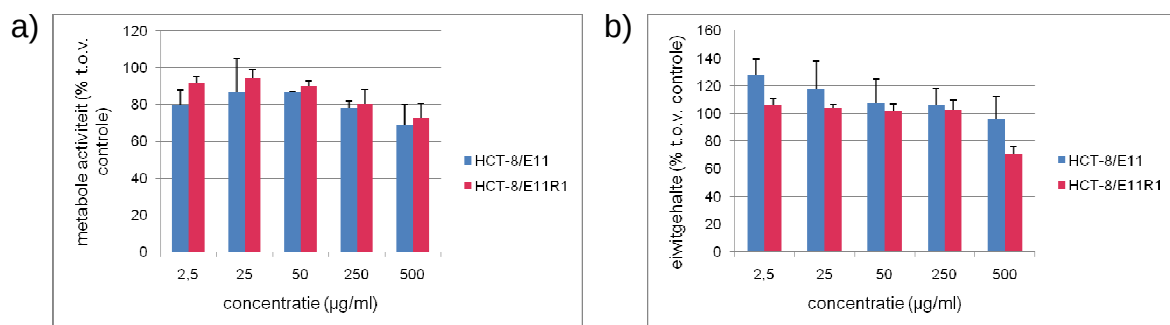
De resultaten van de tweede reeks testen van dit extract zijn weergegeven in Figuur 4.4. Hieruit blijkt een minder sterk effect dan in Figuur 4.3. Het effect van het *Fargesia robusta* 'Pingwu' bladextract is dus eerder antiproliferatief, alhoewel het in hoge concentratie wellicht ook wel cytotoxisch is. Dit valt op te maken uit het gegeven dat het extract bij een concentratie van 500 µg/mL toch wel een duidelijk daling in metabole activiteit en eiwitgehalte geeft bij beide celtypes.



Figuur 4.4. Effect van *F. robusta* 'Pingwu' op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen bij meting na 24 uur: a) MTT- b) SRB-test

Hoewel *Fargesia robusta* 'Pingwu' tot dusver niet gebruikt is in de traditionele geneeskunde en in de huidige voedingsindustrie, blijkt deze bamboesoort wel verschillende interessante eigenschappen te hebben. Zo is al gebleken dat het bladextract van deze bamboesoort een sterk antioxidatief effect heeft (Van Hoyweghen *et al.*, 2010), is een antiproliferatief effect op MCF-7/6 en -/AZ cellen aangetoond, en uit bovenstaande gegevens blijkt nu ook een antiproliferatief effect op HCT-8 cellen. Met betrekking tot het effect van deze bamboesoort op tumorcellen zijn in de literatuur nog geen studies terug te vinden, maar *in vivo* onderzoek zou een nuttig vervolg kunnen zijn.

4.1.4. *Sasa veitchii* bladextract

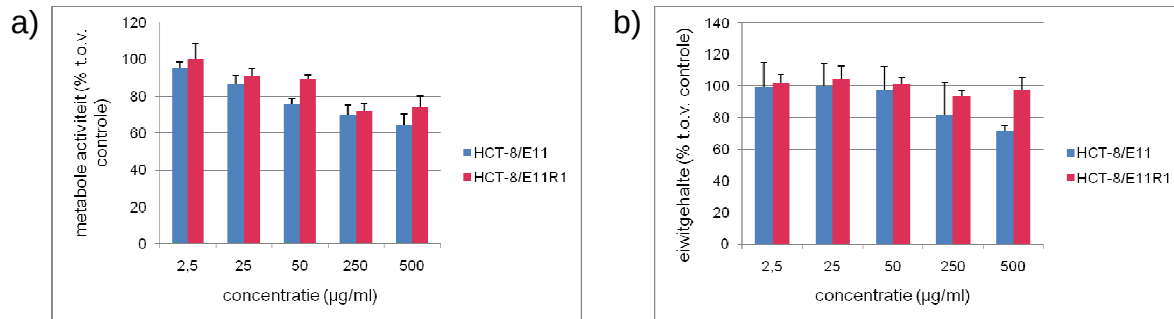


Figuur 4.5. Effect van *S. veitchii* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

Een derde extract dat getest werd, is het *Sasa veitchii* bladextract. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 4.5. Hoewel *Sasa veitchii* een veel gebruikt extract is in de traditionele Aziatische geneeskunde (Nakajima *et al.*, 2003), blijkt uit de nu uitgevoerde testen geen significant antiproliferatief effect voor het bladextract van deze bamboesoort op de HCT-8 cellen. Van een andere bamboesoort binnen het geslacht *Sasa*, namelijk *Sasa senanensis*, is het antitumorale en chemopreventieve effect al

wel uitgebreid aangetoond, zowel *in vitro* als *in vivo* (Ren et al., 2004; Seki et al., 2010a; Seki & Maeda, 2010b).

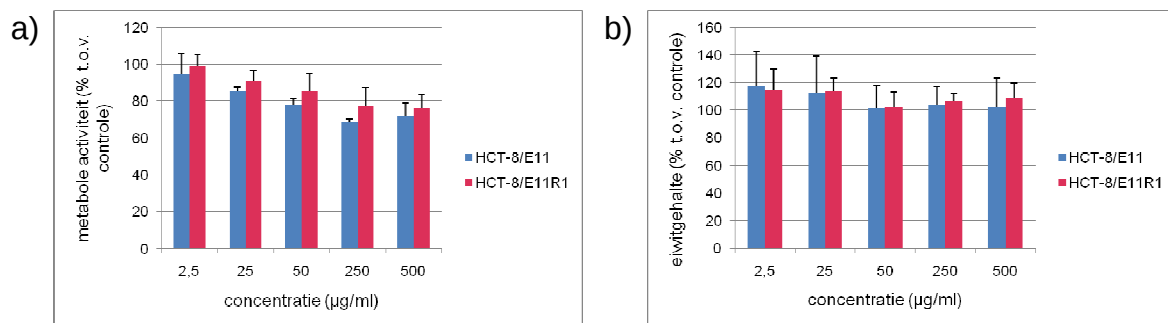
4.1.5. Arundinaria gigantea bladextract



Figuur 4.6. Effect van *A. gigantea* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

De resultaten voor het *Arundinaria gigantea* bladextract zijn weergegeven in Figuur 4.6. Uit de MTT-test blijkt een licht antiproliferatief effect op HCT-8/E₁₁ cellen. Voor de HCT-8/E₁₁R₁ cellen blijkt uit beide testen geen significant effect. In de literatuur ontbreekt het vooralsnog aan studies naar het gezondheidsbeïnvloedende effect van dit bamboe-extract.

4.1.6. Dinochloa scandens bladextract

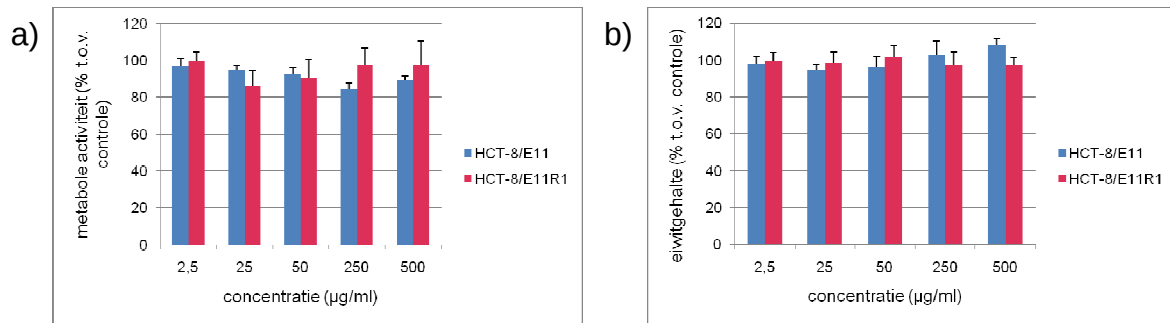


Figuur 4.7. Effect van *D. scandens* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

De resultaten voor het *Dinochloa scandens* bladextract zijn weergegeven in Figuur 4.7. Voor beide celtypes blijkt uit de MTT-test een zeer licht antiproliferatief effect, terwijl dit uit de SRB-test niet blijkt. Dit kan het gevolg zijn van een effect op de metabole activiteit, zonder inhibitie van de celproliferatie. De resultaten geven geen indicatie voor een bruikbaar groei-inhiberend effect.

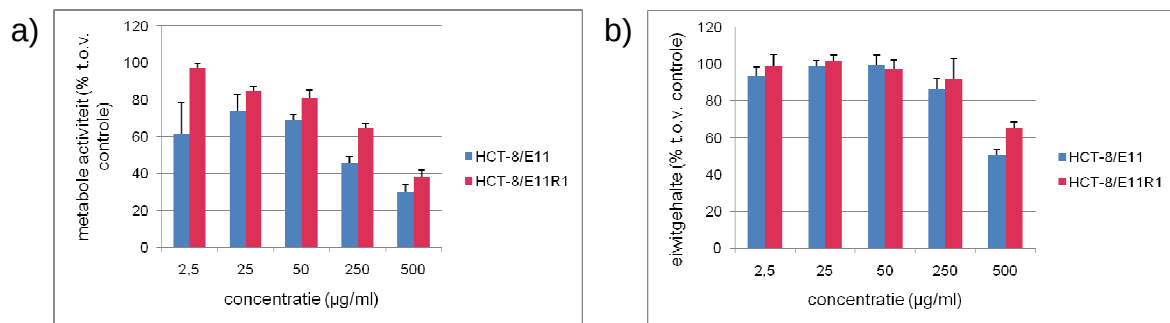
4.1.7. *Dendrocalamus hamiltonii* bladextract

De resultaten voor het *Dendrocalamus hamiltonii* bladextract zijn weergegeven in Figuur 4.8. Geen van de testresultaten geven een indicatie van een antiproliferatief effect van dit extract.



Figuur 4.8. Effect van *D. hamiltonii* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.8. *Fargesia rufa* 'Green Panda' bladextract

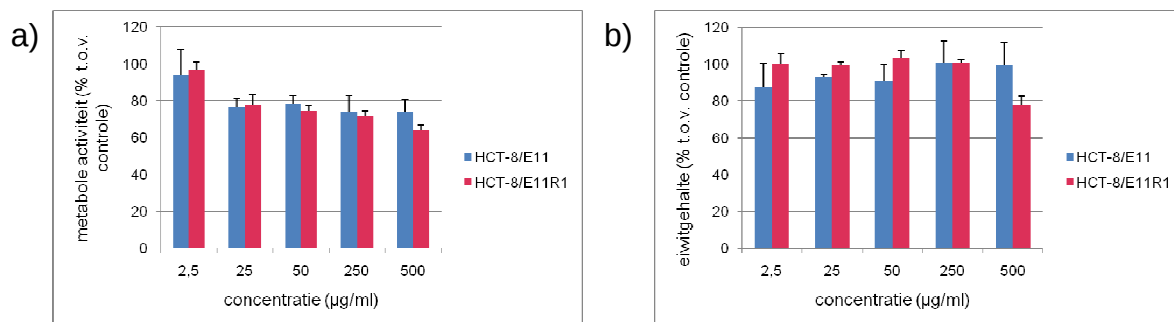


Figuur 4.9. Effect van *F. rufa* 'Green Panda' op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

De gegevens voor het *Fargesia rufa* 'Green Panda' bladextract zijn terug te vinden in Figuur 4.9. Uit deze resultaten blijkt dat het *F. rufa* 'Green Panda' bladextract een antiproliferatief effect heeft op beide celtypes. Voor de HCT-8/E₁₁ cellen bedraagt de IC₅₀-waarde ± 211 µg/mL bij 18000 cellen. Voor de HCT-8/E₁₁R₁ cellen is deze waarde ± 308 µg/mL bij 222000 cellen. Uit voorafgaand onderzoek is gebleken dat het flavon tricine in dit extract aanwezig is. De concentratie in het geteste extract was 24 µM. Deze concentratie tricine veroorzaakt een metabole inhibitie van 30%, waaruit opgemaakt kan worden dat deze component mede verantwoordelijk is voor het antiproliferatief effect van dit extract. In de literatuur ontbreken studies naar het effect van *Fargesia rufa* 'Green Panda' op de gezondheid, maar verder onderzoek naar de mogelijkheden van dit extract lijkt gerechtvaardigd.

4.1.9. *Phyllostachys humilis* bladextract

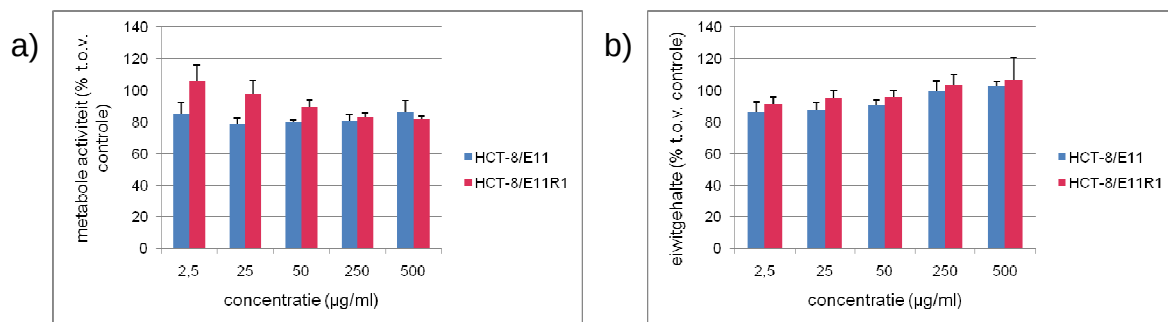
De resultaten voor het *Phyllostachys humilis* bladextract zijn weergegeven in Figuur 4.10. Terwijl uit de MTT-test van beide cellen een licht, niet concentratieafhankelijk antiproliferatief effect blijkt bij concentraties vanaf 25 µg/mL, blijkt dit niet uit de SRB-test. Het extract veroorzaakt dus een reductie in metabole activiteit zonder invloed op de celproliferatie te hebben. Hoewel er al veel wetenschappelijk onderzoek gedaan is naar verschillende *Phyllostachys*soorten, is dit niet het geval voor *Phyllostachys humilis*.



Figuur 4.10. Effect van *P. humilis* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.10. *Pleioblastus variegatus* bladextract

De testresultaten voor het bladextract van *Pleioblastus variegatus* zijn weergegeven in Figuur 4.11. Voor beide celtypes wordt een lichte daling in metabole activiteit waargenomen, terwijl uit de SRB-test geen effect blijkt. Er is dus voor beide celtypes geen significant inhiberend effect op de celgroei.

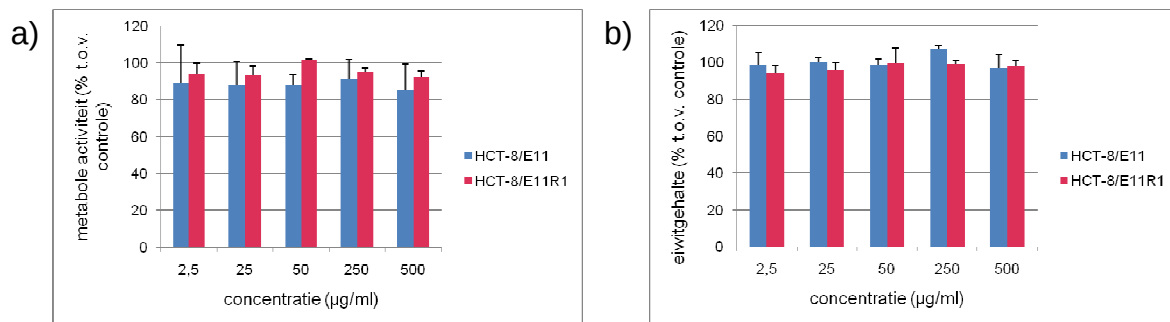


Figuur 4.11. Effect van *P. variegatus* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.11. *Bambusa balcooa* bladextract

De resultaten voor het *Bambusa balcooa* bladextract zijn weergegeven in Fi-

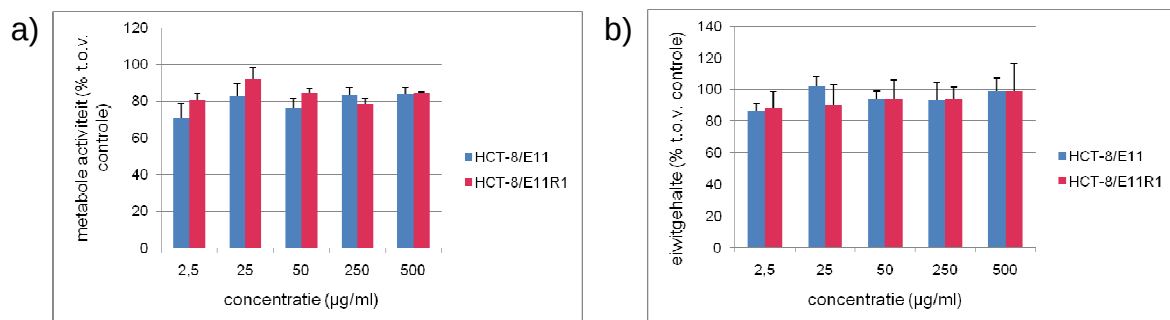
guur 4.12. Hieruit is niet op te maken dat het extract een antiproliferatief, dan wel stimulerend effect op de groei van de HCT-8 cellen heeft.



Figuur 4.12. Effect van *B. balcooa* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.12. *Guadua amplexifolia* bladextract

De resultaten voor het bladextract van *Guadua amplexifolia* zijn weergegeven in Figuur 4.13. Voor dit extract blijkt op beide celtypes uit de MTT-test een licht, niet-concentratieafhankelijk inhiberend effect, terwijl uit de SRB-test geen enkel effect blijkt. Het extract zou dus een reductie in de metabole activiteit kunnen veroorzaken, zonder invloed op de celproliferatie. In de literatuur zijn tot op heden ook nog geen onderzoeken te vinden naar het antiproliferatief effect van deze bamboesoort.

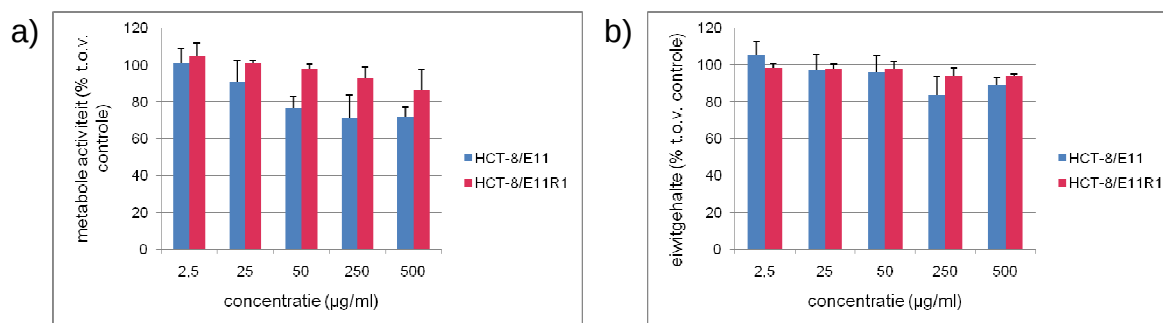


Figuur 4.13. Effect van *G. amplexifolia* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.13. *Phyllostachys nigra* bladextract

De resultaten voor het bladextract van *Phyllostachys nigra* zijn weergegeven in Figuur 4.14. Uit de MTT-test blijkt, met name voor de HCT-8/E₁₁ cellen, een licht groei-inhiberend effect. Uit de resultaten van de SRB-test wordt geen significant effect waargenomen, waaruit op te maken is dat dit extract mogelijk zorgt voor een lich-

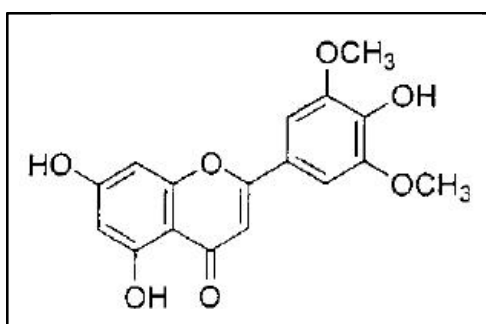
te daling van de metabole activiteit, zonder een invloed uit te oefenen op de celproliferatie.



Figuur 4.14. Effect van *P. nigra* op E₁₁ en E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.14. IJkljin tricine

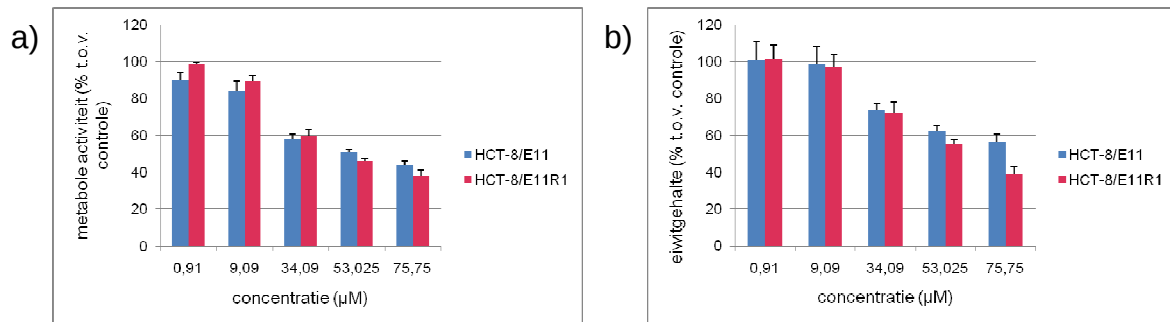
Tricine is een flavon, aanwezig in de bamboesoorten *Fargesia robusta* 'Pingwu' en *Fargesia rufa* 'Green Panda', met een in eerder onderzoek aangetoond significant antiproliferatief effect op MCF-7/6 en MCF-7/AZ cellen. De structuur van tricine is weergegeven in Figuur 4.15. Uit het onderzoek van Hudson et al. (2000) bleek dat tricine, onder andere ook aanwezig in bruine rijst, ook een chemopreventief effect heeft op colonkankercellen (HT 29), hoewel het effect op borstkankercellen (MDA MB 468) meer uitgesproken is.



Figuur 4.15. Structuur tricine (Hudson et al., 2000)

In Figuur 4.16 is de ijklijn voor de cytotoxiciteit van tricine terug te vinden. De resultaten tonen dat tricine op deze twee types colonkankercellen ook een concentratieafhankelijk antiproliferatief effect heeft. Voor de E₁₁ cellen is de IC₅₀-waarde ± 57,30 µM bij een celtaal van 28000, voor de R₁ cellen bedraagt deze waarde ± 61,16 µM bij 72000 cellen. Aan de hand van een ijklijn voor tricine kon de concentratie van dit flavon in *F. robusta* 'Pingwu' berekend worden. Hierbij bleek dat deze con-

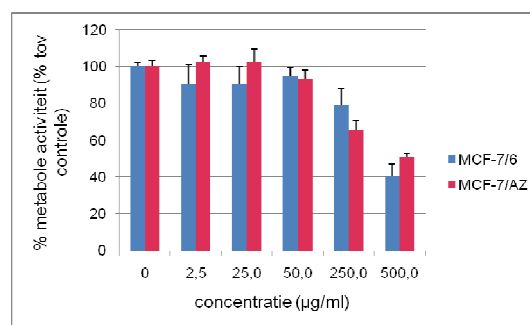
concentratie (13 μ M, 20% inhibitie) onvoldoende is om als enige component verantwoordelijk te zijn voor het antiproliferatief effect van het totaalextract.



Figuur 4.16. IJklijn tricine voor HCT-8/E₁₁ en HCT-8/E₁₁R₁ cellen: a) MTT- b) SRB-test

4.1.15. Algemeen

Voor alle extracten werd het effect op de HCT-8 cellen vergeleken met het effect op MCF-7 cellen (humane borstkankercellen), dat voorafgaand aan deze thesis onderzocht is. Er bleek dat het effect voor bijna alle extracten vergelijkbaar was op beide celtypes. Dit gold niet voor het bladextract van *Bambusa balcooa*. Voor dit extract was namelijk sprake van een zekere antiproliferatieve werking op de MCF-7/6 en MCF-7/AZ cellen, zoals weergegeven in Figuur 4.17, maar dit effect werd niet waargenomen op de HCT-8 cellen. Wellicht is dit extract dus selectief voor bepaalde celtypes. Naar het exacte mechanisme hiervan zou nog verder onderzoek gedaan moeten worden.

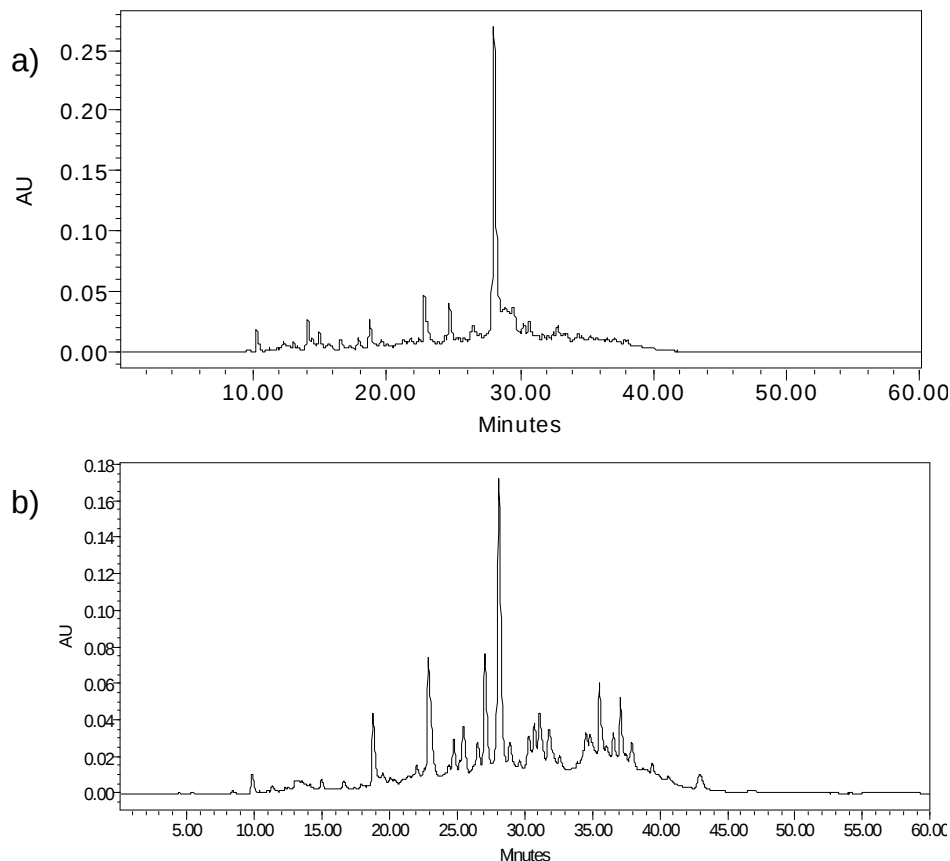


Figuur 4.17. Effect van *B. balcooa* op MCF-7 cellen (MTT-test)

De twee extracten van het geslacht *Fargesia* hadden op zowel de MCF-7 als de HCT-8 cellen een antiproliferatief effect. Verder onderzoek naar de mogelijkheden van deze extracten lijkt dus gerechtvaardigd. Voor de andere extracten werd geen significant effect waargenomen.

4.2. CHROMATOGRAFISCHE ANALYSE BAMBOE-EXTRACTEN

De verschillende bamboe-extracten werden ook geanalyseerd met behulp van HPLC. Enkel de chromatogrammen van de bladextracten van *Fargesia robusta* 'Pingwu' en *Fargesia rufa* 'Green Panda' zijn weergegeven in Figuur 4.18, omdat dit de twee extracten met een duidelijk antiproliferatief effect zijn.



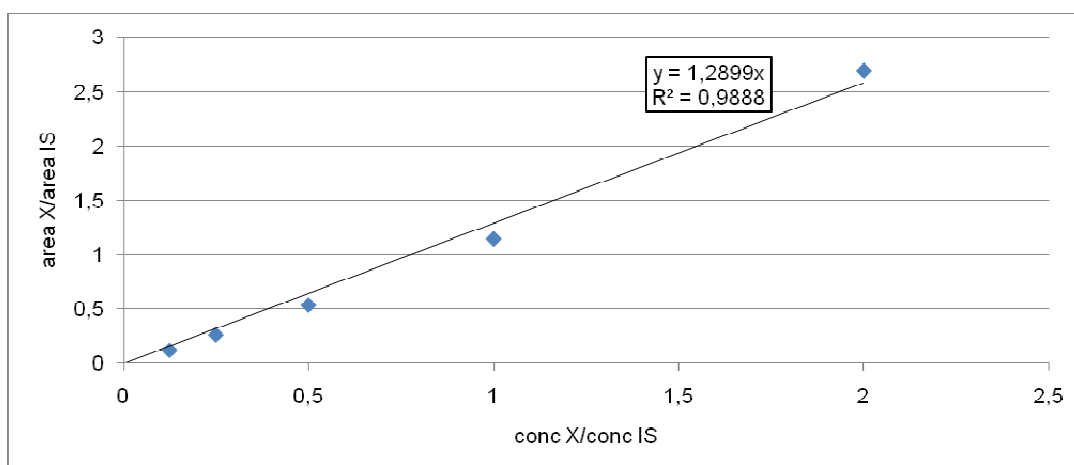
**Figuur 4.18. Chromatografische analyse (zie sectie 3.2) van het bladextract van
a) *F. robusta* 'Pingwu'; b) *F. rufa* 'Green Panda'**

In eerder onderzoek is tricine geïsoleerd uit beide extracten. De retentietijd van dit flavon is 37.0 minuten. Tricine is één van de componenten die bijdragen aan de antiproliferatieve werking van de extracten. Aan welke andere componenten het effect toe te schrijven is, is nog niet bekend. Om dit op te helderen zal nog verder onderzoek nodig zijn. Dit kan door de extracten te fractioneren, en de verschillende fracties te analyseren op hun samenstelling en hun effect.

4.3. CELLULAIRE OPNAME XANTHOHUMOL

4.3.1. Calibratiecurve xanthohumol

Voor het berekenen van onbekende concentraties xanthohumol in stalen, moest een calibratiecurve worden opgesteld. De richtingscoëfficiënt van deze curve vormt de omrekeningsfactor tussen piekoppervlakte en concentratie. Voor het opstellen van de curve werd de verhouding van de piekoppervlakte van X ten opzichte van die van de interne standaard berekend. Zo werd gecorrigeerd voor eventuele variaties die opgetreden waren tijdens het uitvoeren van het experiment. De verkregen waarden werden uitgezet in functie van de verhouding van de concentratie X ten opzichte van de concentratie IS. De concentratie IS was constant, namelijk 50 µg/mL, en de verschillende concentraties van X waren bekend: 100; 50; 25; 12,5 en 6,25 µg/mL. Uit de curve blijkt dat de calibratiefactor voor X 1,29 is. De calibratiecurve is weergegeven in Figuur 4.19.



Figuur 4.19. Calibratiecurve xanthohumol

4.3.2. Optimalisatie extractieprocedure

De extractieprocedure voor xanthohumol werd geoptimaliseerd. Allereerst werden de residuen, die achtergebleven waren na het droogdampen onder stikstof, opgelost in een mengsel van methanol en water (50/50), zoals ook gedaan werd in de studie van Maubach et al. (2008). In deze studie werd een zelfde cellulaire opname experiment gedaan, maar dan met andere componenten. Omdat xanthohumol veel minder polair is dan de componenten die in het hierboven genoemde onderzoek bestudeerd werden, bleek dit oplosmiddel niet geschikt: niet alle xanthohumol werd heropgelost. Het bleek dat 100% methanol als oplosmiddel in dit geval beter voldeed.

Voor de extractie van X uit de cellysaten werd ook, naast de in 3.3.2.4 beschreven procedure met ethylacetaat, onderzocht of het wellicht beter was enkel methanol te gebruiken. Hiervoor werd 500 µL cellysaat genomen, waaraan 2 mL MeOH en 100 µL IS werd toegevoegd. Vervolgens werd gevortext en 30 minuten op kamertemperatuur gecentrifugeerd. Dan werd 200 µL van het supernatans overgebracht in een vial met micro-insert en geanalyseerd met de HPLC. Deze methode bleek geen beter rendement op te leveren in vergelijking met de procedure met EtOAc. Wat verder ook gebleken is, is dat voor de extracties uit het medium twee keer extraheren volstond om vrijwel alle X mee te hebben, terwijl een derde extractie voor de cellysaten nog een aanzienlijke winst in X gaf. Daarom werden de cellysaten drie keer geëxtraheerd.

4.3.3. Recovery referentiestalen

Van de referentiestalen die de extractieprocedure niet hadden ondergaan, werd uit de piekoppervlakten die verkregen waren door de HPLC analyse de totale hoeveelheid xanthohumol (µg) bepaald aan de hand van volgende formule:

$$conc X = conc IS \times \frac{area X/area IS}{1,29} \quad (\text{Formule 4.1})$$

waarin: *conc X* = concentratie X (µg/mL)

conc IS = concentratie IS

area X = piekoppervlakte X

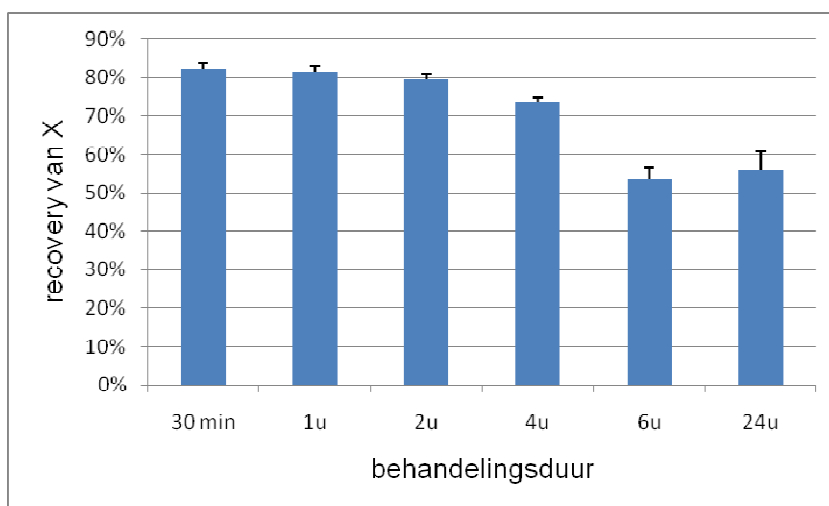
area IS = piekoppervlakte IS

1,29 = omrekeningsfactor voor X

Hieruit kon de hoeveelheid X in de 200 µL die in de HPLC-vial gebracht was, berekend worden. Het gemiddelde van deze zes waarden was 14,61 µg (± 0,44 µg). Vervolgens werd ook de totale hoeveelheid X, geëxtraheerd uit het medium van de referentiestalen, berekend aan de hand van bovenstaande formule. Uit deze laatste waarden werd het extractierendement bepaald. De gemiddelde waarde hiervan was 87,45% (± 2,1%). Er gaat dus 12,55% X verloren tijdens de extractie. Hiermee werd rekening gehouden bij het berekenen van de recovery van X uit het medium.

4.3.4. Cellulaire opname van xanthohumol

Voor de verschillende behandelingsduren werden steeds zes stalen voor het medium en zes voor de cellysaten gemaakt. Xanthohumol werd geëxtraheerd met EtOAc. Na droogdampen, heroplossen van het residu in 200 μL (medium) of 100 μL (cellysaten) MeOH en HPLC-analyse werd de recovery van X uit het medium en de concentratie X in de cellysaten berekend met Formule 4.1. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Figuur 4.20 en Tabel 4.1.



Figuur 4.20. Recovery van X uit medium

Uit Figuur 4.20. blijkt dat er inderdaad xanthohumol verdwijnt uit het medium. De hoeveelheid X in het medium daalt met de tijd en bereikt een minimum na 6 uur. Na 24 uur is meer X aanwezig dan na 6 uur, wat wellicht verklaard kan worden doordat er na 24 uur meer cellen afgestorven zijn, waardoor er opnieuw X is vrijgesteld.

Tabel 4.1. Concentratie X in cellysaten

behandelingsduur	concentratie X ($\mu\text{g/mL}$)
30 min	3,54 ($\pm 0,23$)
1 uur	5,08 ($\pm 0,58$)
2 uur	5,43 ($\pm 0,49$)
4 uur	5,45 ($\pm 0,43$)
6 uur	5,41 ($\pm 0,34$)
24 uur	5,07 ($\pm 0,56$)

De resultaten in Tabel 4.1 bevestigen het vermoeden, verkregen uit de resultaten van de recovery van X uit het medium (Figuur 4.20), dat X wordt opgenomen door de MCF-7/6 cellen. De concentratie X in de cellen stijgt naarmate de behandelingsduur langer is. Het maximum wordt bereikt na 4 uur, waarna de concentratie weer langzaam afneemt. Na 24 uur is hij alweer aanzienlijk gedaald. Opvallend is wel dat uit Figuur 4.20 blijkt dat er bij een behandelingsduur van 6 uur duidelijk minder X wordt teruggevonden in het medium dan bij een behandeling van 4 uur. Er zou dus na 6 uur meer X aanwezig moeten zijn in de cellen dan na 4 uur, maar dit is niet het geval.

In het onderzoek van Pang et al. (2007) werd de cellulaire opname van X door Caco-2 cellen (epitheliale cellen van de darm) bekeken. Hier bleek dat de opname van X al start na een paar minuten, en dat de opnamesnelheid afneemt naarmate de concentratie buiten de cellen daalt. Een soortgelijke trend blijkt uit de resultaten in Tabel 4.1. Ook hier is na 30 min al een redelijke opname van X waarneembaar, en hoewel de concentratie X in de MCF-7/6 cellen na 4 uur pas maximaal is, is de opnamesnelheid na 1 uur al zeer sterk afgenomen.

Wat verder opvallend is, is dat niet alle X (40 nmol) wordt teruggevonden, na optellen van de hoeveelheid X in het medium en in de cellysaten. Na het in rekening brengen van het verlies tijdens de extractie (12,55%), zou nog altijd ± 35 nmol teruggevonden moeten worden, maar dit is niet het geval. Er wordt in totaal maximaal 30 nmol teruggevonden. Waaraan dit verlies te wijten is, is niet bekend. Afbraak of omzetting van X zouden oorzaken kunnen zijn, maar dit is in dit onderzoek niet bestudeerd.

Het cellulaire opname experiment is in totaal drie keer uitgevoerd. Hoewel de variaties tussen de zes stalen van hetzelfde tijdstip binnen een experiment klein waren, waren de resultaten van de drie experimenten zeer verschillend. In deze thesis zijn de meest plausibele resultaten weergegeven. Om de juistheid van deze resultaten echter te kunnen bevestigen of weerleggen, zou dit experiment nog enkele malen uitgevoerd moeten worden. Ook is nog verder onderzoek nodig naar het mechanisme van de opname van X in de cellen. Indien dit opgehelderd zou worden en eventueel verder gegaan zou worden met *in vivo* experimenten naar de mogelijkheden

van X als chemopreventief middel, moet rekening gehouden worden met de lage biologische beschikbaarheid. In deze thesis is dat nog niet gebeurd, omdat X direct werd toegevoegd aan de cellen.

4.3.5. Indirecte competitieve ELISA

Er werd een extra controle voor het extractierendement van xanthohumol uit de cellysaten uitgevoerd door middel van het toepassen van een indirecte competitieve ELISA op de reeds geëxtraheerde cellysaten. Hierbij geeft de calibratiereeks een idee van de eventuele aanwezigheid van xanthohumol. De calibrator die in de ELISA een waarde geeft die gelijk is aan de absorbantie bij maximale binding van het primaire antilichaam aan de plaat, is de laagste concentratie die een meetbaar effect geeft. De absorbanties van de geëxtraheerde cellysaten waren nagenoeg allemaal gelijk aan die van de calibrator met maximale binding. Hieruit zou opgemaakt kunnen worden dat er, na de extractie, nagenoeg geen X, (of toch minder dan 97,5 ng/mL, de concentratie X in de calibrator waarvoor maximale binding met de plaat was), meer was achtergebleven in de cellysaten.

Om aan te tonen dat het wel degelijk mogelijk is om X in cellysaten te detecteren via het antilichaam, werden ook niet geëxtraheerde cellysaten onderworpen aan de assay. De lysaten van cellen die niet behandeld waren met X hadden een vergelijkbare absorbantie als die bij maximale binding van het AL. Voor de lysaten van behandelde cellen daalde de absorbantie met stijgende concentratie X. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat de extractie van X uit de cellysaten waarschijnlijk volledig is doorgegaan, tenzij het over hoeveelheden zou gaan beneden de detectielimiet van deze ELISA. Het feit dat niet alle toegevoegde X teruggevonden werd kan dus waarschijnlijk niet verklaard worden doordat er nog X is achtergebleven in de cellysaten.

5. CONCLUSIE

In het eerste deel van deze thesis werden verschillende bamboe-extracten onderzocht op hun eventuele antiproliferatieve werking op niet-invasieve (HCT-8/E₁₁) en invasieve (HCT-8/E₁₁R₁) humane colonkankercellen. Hoewel in de literatuur de meeste studies naar de verschillende gezondheidsbevorderende eigenschappen, (waaronder antiproliferatieve en antioxidatieve werking), van *Sasa*- en *Phyllostachys*-soorten gedaan zijn, bleken de extracten afkomstig van deze geslachten, (*Sasa veitchii*, *Phyllostachys humilis* en *Phyllostachys nigra*), geen duidelijk antiproliferatief effect te vertonen op de cellen. Er waren twee extracten waarvoor wel een significant effect optrad: *Fargesia robusta* 'Pingwu' en *Fargesia rufa* 'Green Panda'. Deze extracten hadden ook een antiproliferatief effect op borstkankercellen, zoals gebleken is uit eerder onderzoek. Een ander extract dat effect had op borstkankercellen, *Bambusa balcooa*, bleek echter geen effect te hebben op de colonkankercellen. Deze bamboesoort werkt dus mogelijk selectief op borstkankercellen. De bladextracten van *F. robusta* 'Pingwu', *F. rufa* 'Green Panda' en *B. balcooa* blijken voldoende interessant om verder te onderzoeken naar hun bio-actieve componenten en hun moleculaire mechanismen.

In het tweede deel van dit onderzoek werd de opname van xanthohumol door humane borstkankercellen (MCF-7/6) bestudeerd. Dit onderzoek ondersteunde experimenten waarbij een monokonaal antilichaam, gericht tegen xanthohumol, gebruikt wordt om via immunocytochemie de bindingslokalisatie vast te stellen. Uit het onderzoek van deze thesis bleek dat dit chalcon wel degelijk wordt opgenomen door de cellen. Deze opname begint al binnen 30 minuten en stagneert na 2 tot 4 uur. Na 24 uur is er opnieuw xanthohumol vrijgesteld in het medium, waar de concentratie dan weer gestegen is ten opzichte van de concentratie na 6 uur. Uit de ELISA bleek dat er na extractie met ethylacetaat geen xanthohumol achterblijft in de waterige fase van de cellysaten. Desondanks werd niet alle toegevoegde xanthohumol teruggevonden in het medium en/of de cellysaten. Een duidelijke verklaring hiervoor werd in dit onderzoek niet gevonden. In de toekomst zal verdere studie nodig zijn naar het mechanisme van de cellulaire opname van xanthohumol en naar zijn bindingspartner in de cellen.

6. LITERATUURLIJST

Avula, B.; Ganzera, M.; Warnick, J. E.; Feltenstein, M. W.; Sufka, K. J.; Khan, I. A. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of xanthohumol in rat plasma, urine, and fecal samples. *Journal of Chromatographic Science*, 42, 378-382.

Bracke, M. E.; Vanhoecke, B. W. A.; Derycke, L.; Bolca, S.; Possemiers, S.; Heyerick, A.; Stevens, C. V.; De Keukeleire, D.; Depypere, H.T.; Verstraete, W.; Williams, C. A.; McKenna, S.T.; Tomar, S.; Sharma, D; Prasad, A. K.; DePass, A. L.; Parmar, V.S. (2008). Plant Polyphenolics as Anti-Invasive Cancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8, 171-185.

Caron, J. M.; Herwood, M. (2007). Vinblastine, a chemotherapeutic drug, inhibits palmitoylation of tubulin in human leukemic lymphocytes. *Chemotherapy*, 53, 51-58.

Choi, D.; Cho, K.-A.; Na, M.-S.; Choi, H.-S.; Kim, Y.-O.; Lim, D.-H.; Cho, S. J.; Cho, H. (2008). Effect of bamboo oil on antioxidative activity and nitrite scavenging activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14, 765-770.

Ferk, F.; Huber, W. W.; Filipic, M.; Bichler, J.; Haslinger, E.; Misik, M.; Nersesyan, A.; Grasl-Kraupp, B.; Zegura, B.; Knasmüller, S. (2010). Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutation Research*, 691, 17-22.

Freeland, W. J.; Janzen, D. H. (1974). Strategies in herbivory by mammals - role of plant secondary compounds. *American Naturalist*, 108, 269-289.

Gerhauser, C.; Alt, A.; Heiss, E.; Gamal-Eldeen, A.; Klimo, K.; Knauff, J.; Neumann, I.; Scherf, H.; Frank, N.; Bartsch, H.; Becker, H. (2002). Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 959-969.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Hansen, R. L.; Carr, M. M.; Apanavicius, C. J.; Jiang, P.; Bissell, H. A.; Gocinski, B. L.; Maury, F.; Himmelreich, M.; Beard, S.; Ouellette, J.R.; Kouba, A.J. (2010).

Seasonal Shift in Giant Panda Feeding Behavior: Relationships to Bamboo Plant Part Consumption. *Zoo Biology*, 29, 470-483.

Harlow, E.; Lane, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Harlow, E.; Lane, D. (1999). *Using antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Hasegawa, T.; Tanaka, A.; Hosoda, A.; Takano, F.; Ohta, T. (2008). Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry*, 69, 1419-1424.

Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hylands, P. J.; Lee, C. C. (2007). The sulphorodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42, 377-387.

Hudson, E. A.; Dinh, P. A.; Kokubun, T.; Simmonds, M. S. J.; Gescher, A. (2000). Characterization of Potentially Chemopreventive Phenols in Extracts of Brown Rice That Inhibit the Growth of Human Breast and Colon Cancer Cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9, 1163-1170.

Jacob, C.; Jamier, V.; Ba, L. A. (2011). Redox active secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 149-155.

Jaszczyszyn, A.; Gasiorowski, K. (2008). Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 17, 525-529.

Keski-Saari, S.; Ossipov, V.; Julkunen-Tiitto, R.; Jia, J.; Danell, K.; Veteli, T.; Guiquan, Z.; Yaowu, X.; Niemelä, P. (2008). Phenolics from the culms of five bamboo species in the Tangjiahe and Wolong Giant Panda Reserves, Sichuan, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 758-765.

Kim, S. H.; Kim, T. S.; Kim, S. J.; Seong, C. N.; Lee, O. H.; Lee, H. J.; Yoo, J.C. (2007). Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages via suppression of nuclear factor-kappaB binding activity by *Phyllostachys nigra* var. *henonis*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 29, 131-139.

- Koide, C. L. K.; Collier, A. C.; Berry, M. J.; Panee, J. (2011). The effect of bamboo extract on hepatic biotransforming enzymes - Findings from an obese-diabetic mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 37-45.
- Lee, M.-J.; Kim, M.-J.; Song, Y.-S.; Song, Y.-O.; Moon, G.-S. (2008). Bamboo Culm Extract Supplementation Elevates HDL-Cholesterol and Ameliorates Oxidative Stress in C57BL/6 Mice Fed Atherogenic Diet. *Journal of Medicinal Food*, 11, 69-77.
- Lin, Y.; Collier, A. C.; Liu, W.; Berry, M. J.; Panee, J. (2008). The Inhibitory Effect of Bamboo Extract on the Development of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced Breast Cancer. *Phytotherapy Research*, 22, 1440-1445.
- Lu, B.; Liu, L.; Zhen, X.; Wu, X.; Zhang, Y. (2010). Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (Caulis bamfusae in Taeniam). *African Journal of Biotechnology*, 9, 6430-6436.
- Maubach, J.; Bracke, M.; Depypere H.; De Keukeleire, D.; Heyerick, A. (2008). Cellular uptake of soy-derived phytoestrogens in vitro and in human whole blood. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2, 064-070.
- Miranda, C. L.; Stevens, J. F.; Helmrich, A.; Henderson, M. C.; Rodriguez, R. J.; Yang, Y. H.; Deinzer, M.L.; Barnes, D. W.; Buhler, D. R. (1999). Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in Human Cancer Cell Lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 271-285.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Muniappan, M.; Sundararaj, T. (2003). Antiinflammatory and antiulcer activities of *Bambusa arundinacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 161-167.
- Nakajima, Y.; Yun, Y. S.; Kunugi, A. (2003). Six new flavonolignans from *Sasa veitchii* (Carr.) Rehder. *Tetrahedron*, 59, 8011-8015.
- Nikolic, D.; Li, Y. M.; Chadwick, L. R.; Pauli, G. F.; Van Breemen, R. B. (2005). Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 289-299.

Nookandeh, A.; Frank, N.; Steiner, F.; Ellinger, R.; Schneider, B.; Gerhauser, C.; Becker, H. (2004). Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry*, 65, 561-570.

Om, A.; Kim, J. H. (2008). A Quantitative Structure-Activity Relationship Model for Radical Scavenging Activity of Flavonoids. *Journal of Medicinal Food*, 11, 29-37.

Oprins, J.; van Trier, H.; Gielis, J.; Liese, W.; Lucas, S.; Shibata, S.; Brias, V.; Abadie, M.; Younge, C.; Lammersen, M.; Garland, L.; Cwierka, K. J.; Henderieckx, G.; Theunynck, A. (2006). *BAMBOO A Material for Landscape and Garden Design*. Birkhäuser - Publishers for Architecture, Basel, Switzerland.

Pan, L.; Becker, H.; Gerhauser, C. (2005). Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 837-843.

Panee, J.; Liu, W.; Lin, Y.; Gilman, C.; Berry, M. J. (2008). A novel function of bamboo extract in relieving lipotoxicity. *Phytotherapy Research*, 22, 675-680.

Pang, Y.; Nikolic, D.; Zhu, D.; Chadwick, L. R.; Pauli, G. F.; Farnsworth, N. R.; van Breemen, R.B. (2007). Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 872-879.

Peng, L.; Wang, B.; Ren, P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 108-111.

Possemiers, S.; Bolca, S.; Grootaert, C.; Heyerick, A.; Decroos, K.; Dhooge, W.; De Keukeleire, D.; Rabot, S.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T. (2006). The Prenylflavonoid Isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) Is Activated into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin In Vitro and in the Human Intestine. *Journal of Nutrition*, 136, 1862-1867.

Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 50, 586-621.

Ren, M.; Reilly, R. T.; Sacchi, N. (2004). Sasa Health Exerts a Protective Effect on Her2/NeuN Mammary Tumorigenesis. *Anticancer Research*, 24, 2879-2884.

- Ruefer, C. E.; Gerhauser, C.; Frank, N.; Becker, H.; Kulling, S. E. (2005). In vitro phase II metabolism of xanthohumol by human UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 851-856.
- Seki, T.; Kida, K.; Maeda, H. (2010a). Immunostimulation-Mediated Anti-tumor Activity of Bamboo (*Sasa senanensis*) Leaf Extracts Obtained Under 'Vigorous' Condition. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 7, 447-457.
- Seki, T.; Maeda, H. (2010b). Cancer Preventive Effect of Kumaizasa Bamboo Leaf Extracts Administered Prior to Carcinogenesis or Cancer Inoculation. *Anticancer Research*, 30, 111-118.
- Sinensky, M. (2000). Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology*, 1484, 93-106.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1107-1112.
- Stevens, J. F.; Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65, 1317-1330.
- Strathmann, J.; Klimo, K.; Sauer, S. W.; Okun, J. G.; Prehn, J. H. M.; Gerhäuser, C. (2010). Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB Journal*, 24, 2938-2950.
- Suga, A.; Takaishi, Y.; Goto, S.; Munakata, T.; Yamauchi, I.; Kogure, K. (2003). Two lignan dimers from bamboo stems (*Phyllostachys edulis*). *Phytochemistry*, 64, 991-996.
- Sugimura, T. (2002). Food and cancer. *Toxicology*, 181, 17-21.
- Sukumar, S.; McKenzie, K.; Chen, Y. (1995). Animal models for breast cancer. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 333, 37-44.

- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3, 768-780.
- Tabata, N.; Ito, M.; Tomoda, H.; Omura, S. (1997). Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 46, 683-687.
- Tobe, H.; Muraki, Y.; Kitamura, K.; Komiyama, O.; Sato, Y.; Sugioka, T.; Maruyama, H.B.; Matsuda, E.; Nagai, M. (1997). Bone resorption inhibitors from hop extract. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61, 158-159.
- Vanhoecke, B.; Derycke, L.; Van Marck, V.; Depypere, H.; De Keukeleire, D.; Bracke, M. (2005). Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *International Journal of Cancer*, 117, 889-895.
- Van Hoyweghen, L.; Karalic, I.; Van Calenbergh, S.; Deforce, D.; Heyerick, A. (2010). Antioxidant Flavone Glycosides from the Leaves of *Fargesia robusta*. *Journal of Natural Products*, 73, 1573-1577.
- Wang, X.; Xia, Y.; Liu, L.; Liu, M.; Gu, N.; Guang, H.; Zhang, F. (2010). Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 95B, 357-364.
- Yilmazer, M.; Stevens, J. F.; Buhler, D. R. (2001a). In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Letters*, 491, 252-256.
- Yilmazer, M.; Stevens, J. F.; Deinzer, M. L.; Buhler, D. R. (2001b). In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 223-231.
- Zhang, Y.; Bao, B.; Lu, B.; Ren, Y.; Tie, X.; Zhang, Y. (2005). Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1065, 177-185.
- <http://nl.bambooselect.com/bamboewereld.html> (15-02-2011)
- <http://bamboodirect.com/bamboo/info/TheWorldofBamboo.html> (09-03-2011)
- <http://www.bamboo.org/bamboo-info.php> (30-04-2011)