

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 洛神葉水萃取物對於前列腺癌細胞侵襲作用的影響及 *
* 名稱 : 其分子機制之研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳慧穎
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-020-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 林慧萱

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 103年03月17日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 洛神葉水萃取物對於前列腺癌細胞侵襲作用的影響及其 *
* 名稱 分子機制之研究 *

執行計畫學生：陳慧穎

學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-020-B

研究期間：102年7月1日至103年2月底止，計8個月

指導教授：林慧萱

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系

中華民國 103 年 03 月 14 日

(一) 摘要

癌症為國人十大死因中排名第一，其中以前列腺癌(prostate cancer)是男性最常見的癌症之一，前列腺癌好轉移至淋巴及骨頭等組織。雖然目前已有用來治療前列腺癌的化療藥物，但大部分的藥物都具有嚴重的副作用，因此近年來對於癌症藥物的開發傾向於以研究天然物質抑制癌細胞轉移及侵襲(invasion)為目的。在過去的研究中已證實，多酚化合物(polyphenols)可預防癌症及抑制癌細胞的生長與轉移。洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)為富含多酚之天然物，顯示洛神葉可能具有抑制癌症的潛力。近年來，我們實驗室研究結果已顯示洛神葉水萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)具有抑制前列腺癌 LNCaP 細胞的侵襲作用，研究中指出 HLE 的作用途徑可能與抑制 Akt 訊息路徑有關，進而調控下游 MMP-9 及 NFκB 等蛋白。因此本研究以 LNCaP 細胞轉殖(cell transfection)促使 Akt 蛋白過量表現後，再加入 HLE 作為研究模式。首先利用西方點墨法(Western blotting)來觀察其中蛋白表現量的變化，確認 LNCaP 細胞過量表現 Akt；並且同時觀察轉染 Akt 會增加細胞核內轉錄因子 NFκB 及基質金屬蛋白酶 MMP-9 之表現量。當同時以 HLE 處理細胞後發現 Akt 蛋白及其磷酸化表現都受到抑制。接著再觀察 NFκB 和 MMP-9 之蛋白表現也有下降的趨勢；然而此 Akt 蛋白過量表現會降低原先 HLE 的抑制效果，而 MMP-9 的活性分析也呈現類似的結果。最後，在細胞傷口癒合結果發現 LNCaP 細胞以 Akt 基因轉殖後，確實會促使細胞移動力增強，HLE 可以抑制此 Akt 作用。綜合上述，證實 Akt 能夠促進 NFκB 和 MMP-9 之表現，並增強 LNCaP 細胞的侵襲能力；同時說明 HLE 是透過抑制 Akt/NFκB/MMP-9 訊息路徑來達到阻斷癌細胞的侵襲作用。

關鍵字：前列腺癌、侵襲、多酚化合物、洛神葉、Akt 蛋白。

(二) 研究動機與問題：

近年來，對於洛神花已有許多疾病化學預防的相關研究，為了提高洛神的應用價值，我們實驗室進一步研究洛神葉水萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)對於前列腺癌 LNCaP 細胞的影響。從我們實驗室先前的研究中顯示 HLE 對於 LNCaP 的侵襲作用有抑制的效果，其中的機制可能與 Akt、MMP-9 及 NFκB 有關。因此接下來的實驗利用細胞轉殖(cell transfection)使 LNCaP 細胞內的 Akt 蛋白過量表現，再加入 HLE 觀察其中相關蛋白表現的變化，以及其對於細胞侵襲作用的影響。計劃了解下列幾項研究問題：

1. 細胞過量表現 Akt 蛋白後，對於下游路徑：轉錄因子 NFκB、基質水解酶 MMP-9 等是否有影響？
 - (1) 經由 Akt 調節的轉錄因子(transcription factor)是否有影響？
 - (2) Akt 過量表現是否會影響 MMP-9 的活性？
 - (3) Akt 過量表現是否會促進細胞侵襲能力？
2. HLE 是否會抑制 Akt overexpression vector 的表現？
3. Akt overexpression vector 是否會減弱 HLE 的對於癌細胞的抑制作用？
4. HLE 是否經由抑制 Akt/NFκB/MMP-9 路徑，以影響 LNCaP 細胞移行及侵襲的表現？

(三) 文獻回顧與探討

1. 洛神葉(*H. sabdariffa* leaf)

洛神花學名為 *Hibiscus sabdariffa*，又稱「洛神葵」、「洛濟葵」、「山茄」、「紅葵」，屬於錦葵科木槿，為一年生草本植物或多年生灌木。傳統中藥藥理上，洛神花具有解熱、降血壓、補血、促進陳代謝、利尿等作用。在許多東南亞國家，洛神花被當成藥用植物使用。過去已知洛神花萃取物中含有類黃酮(flavonoids)、原兒茶酸(proto catechuic acid)、花青素(anthocyanidin)和植物雌激素(phytoestrogen)等成分。研究顯示洛神花萃取物能清除活性氧、氮化合物，並且抑制低密度脂蛋白的脂質過氧化作用。近年來有研究顯示洛神花除了具有抗高血壓、治療肝病外，還具有避免動脈硬化、造成癌細胞凋亡(apoptosis)等多種功效[1]。但目前的研究大多關注在花萼的部分，相較之下，關於洛神葉的研究便為少數。過去研究也發現洛神葉富含多酚化合物(polyphenols)，多酚是植物中化學物質的統稱，結構中含有多個酚基團。多酚化合物的共同特點是具有良好的抗氧化活性以及清除自由基的能力。有研究證實天然植物中多酚化合物可以預防癌症、誘導癌細胞進行細胞凋亡[2]以及抑制癌細胞的生長與轉移[3]。近來研究已顯示洛神葉水萃取物(*H. sabdariffa* leaf extract, HLE)能夠促進前列腺癌 LNCaP 細胞走向凋亡[4]，顯示 HLE 對於前列腺癌可能具有預防的功效。

2. 前列腺癌(prostate cancer)

前列腺癌是出自前列腺的惡性腫瘤，為男性最常見的癌症之一，特別發生在老年男性介於60-80歲的年齡。前列腺癌遍跡全球，但各地的發病率並不相同。致病因素有

年齡、種族、家族史及飲食習慣。前列腺癌隨著年齡的增加，發生率也逐漸上升[5]。種族的因素上，目前在美國地區已統計出黑人罹患前列腺癌的比例遠高於白人，而北美與北歐的發生率也高於非洲、亞洲等地區，顯示種族差異與前列腺癌的關係。在家族史中，罹患前列腺癌病患的兄弟或父子，發病率也比沒有相關家族史的人還要高，但目前尚未有足夠證據證明某些基因與前列腺癌之間的相關性。在西方國家，它是繼皮膚癌之後最常見的癌症，雖然在亞洲男性較少見，但疾病發生率正在上升；相信是由於亞洲人的飲食中，肉類和動物脂肪含量增加所導致前列腺癌的發生。惡性細胞除了體積擴大或侵犯鄰近器官，也可能轉移到身體其他部位，尤其是骨頭和淋巴結。前列腺癌可能造成疼痛、排尿困難、勃起功能不全等症狀[6]。目前前列腺癌的治療方法包括手術、放射治療、荷爾蒙治療、以及化學治療，這幾種療法可以合併運用。患者本身的年齡和健康狀況、癌細胞的擴散程度、顯微鏡所見的細胞形態，和初期治療的效果都關係到患者的預後。前列腺癌可分為荷爾蒙依賴型(andro-gen-dependent prostate cancer)和非荷爾蒙依賴型(andro-gen-independent prostate cancer)，荷爾蒙依賴型若用荷爾蒙治療法抑制男性荷爾蒙，80%-90%的前列腺癌病患會在2-3年後再度復發[7]，復發後的腫瘤不再依賴男性荷爾蒙，成為非男性荷爾蒙依賴型前列腺癌，這種轉變便稱為惡化，目前仍沒有有效的治療方法。

3. 細胞侵襲作用(cell invasion)

當癌細胞的體積超過一定程度，而正常血流已無法供給癌細胞生長所需的養分時，便會開始癌細胞的侵襲與轉移。一般來說分為四個階段，第一階段稱為侵襲，癌細胞會分解緊密的上皮細胞，使癌細胞與上皮細胞之間的連結變鬆散。第二階段為內滲(intravasation)，癌細胞會穿越至血管或淋巴管進入循環系統。第三階段為外滲(extravasation)，躲過免疫系統的癌細胞會穿過微血管內皮到達其他組織。最後便在到達的組織中生長，形成轉移的惡性腫瘤。癌細胞的侵襲作用是轉移的關鍵步驟，但是癌細胞如何在複雜的細胞外基質中進行侵襲並且開啟轉移，其中機制目前還尚未釐清[8]。在生理層面上細胞侵襲作用大多仰賴血管及淋巴管的循環系統，以前列腺癌為例，最常見的癌細胞轉移便是侵襲淋巴結，經由淋巴循環轉移到其他組織[9]。有研究提出癌細胞中基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)具有裂解膠原和細胞外基質(extracellular matrix, ECM)的能力，若 MMPs 蛋白的表現增加，則會促進癌細胞的侵襲作用[10]。目前已知 MMPs 可經由轉譯後修飾作用、蛋白抑制劑 TIMP 或具有轉錄調控功能的蛋白 NFκB、AP-1 等[11]途徑來調控。而上述因子往往受到蛋白激酶 Akt/PKB (protein kinase B)的調控作用[12]。此外，許多癌細胞可以藉由 PI3K/Akt

路徑以調控 MMP-2 與 MMP-9 的表現與增強細胞侵襲的能力[13]，Akt 路徑被認為是腫瘤細胞惡化轉移侵襲的重要機制之一[14]。

(四) 研究方法及步驟

1. 洛神葉水萃物 HLE 之製備及成份分析

1.1. HLE 之製備

秤取乾燥洛神葉 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷卻後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為洛神葉粗萃取物。HLE 之產率約為 50%。

1.2. 總多酚含量之測定(Folin-Ciocalteu method)

配製食子酸(Gallic acid, GA)標準品，取 10 mg 溶於 25 ml 甲醇中，分別取 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 ml 並以甲醇補至體積 1 ml，另配製待測樣品，以 1000 倍稀釋，並加入甲醇將體積補至 1 ml。接著各加入 0.5 ml 2 N Folin-Ciocalteu's reagent 混勻後，再加入 3 ml 20% Na₂CO₃ 靜置於室溫中 15 min。加入 5 ml ddH₂O 搖勻，以 1000 rpm 進行離心 5 min。在波長 725 nm 下測吸光值(以甲醇歸零)，並求其標準曲線，對照樣品吸光值，進一步推算出樣品總多酚含量。

1.3. 總黃酮量之測定(Jia method)

以 rutin 為標準品，取 rutin 8.8 mg 溶於 25 ml 之甲醇中，再分別取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 以 30% 乙醇進行稀釋並補足體積至 10 ml，接著各加入 0.3 ml 之 1 M Na₂NO₃ 混勻，靜置室溫 6 min，再加入 0.3 ml 之 10% AlNO₃ 混勻並靜置室溫 6 min。最後加入 4 ml 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml ddH₂O，放置 15 min。在波長 510 nm 下測吸光值(乙醇歸零)，求得標準曲線。計算方程式，對照樣品吸光值，進一步推算出樣品總黃酮含量。

1.4. 總花青素含量之測定(Fuleki and Francis method)

將樣品進行稀釋 1000 倍後，分別取 2 ml 至兩管離心管中，以酸鹼 Buffer 調 pH 值，使一管 pH 為 1.0，另一管為 pH 4.5。兩份稀釋液分別以分光光度儀在 520 nm 進行吸光測試，得 A1(pH 為 1.0)與 A2(pH 為 4.5)，再以下列公式計算 sample 中所含總花青素含量。

$$\frac{|A1-A2| \times F \times MW}{\epsilon}$$

MW：花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

F：稀釋倍數

ϵ : 花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient), 以delphinidin-3-diglycoside 在含0.1%鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ϵ 值301.6計算。

2. 細胞培養 (cell culture)

2.1. 細胞培養

選用前列腺癌細胞LNCaP clone FGC, 細胞來源為食品工業發展研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫, 培養液為含有2 mM L-glutamine的 RPMI 1640, 外加1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 1.0 mM sodium pyruvate, 90%; fetal bovine serum, 10%. 培養在75 cm² Nunclon™ delta treated flask中, 並放置37°C; 5% CO₂ 環境的恆溫箱裡。每2至3天更換一次培養液。

2.2. 細胞儲存

細胞長滿 75T flask 時, 先以培養液 wash 細胞, 再加入 2 ml trypsin, 放入 37°C 培養箱中等待 6~8 分鐘。加入 2 ml 培養液回沖細胞, 把細胞液吸取至離心管中, 以 1000 rpm 離心五分鐘。倒掉上清液, 以 7% DMSO 回溶細胞, 分裝於冷凍小管中。將冷凍小管放置 4°C 冰箱 15 分鐘, -20°C 冰箱 20 分鐘, 再移到 -80°C 冰箱 12 小時, 最後儲存於液態氮中。

2.3. 解凍細胞

從液態氮中取出冷凍小管放入水浴槽中, 直到冰凍的細胞液呈現半溶狀態, 盡速將細胞液吸取到含有培養液的離心管中, 以 1000 rpm 離心五分鐘。倒掉上清液, 加入培養液回溶細胞, 再將細胞液移至 25T flask 中, 放置 37°C; 5% CO₂ 環境的恆溫箱裡培養。

3. 基因轉殖 (cell transfection)

在 6 well 或 3.5 cm 的培養皿中接種 2~3×10⁵ 之前列腺癌 LNCaP 細胞, 等待細胞貼附 24 小時, 在進行質體轉殖實驗。準備兩管已滅菌的微量離心管, 每一管各加入 100 μ l 不含抗生素與血清的培養液, 其中一管加入 2 μ g DNA (Akt expression vector), 另一管加入 5 μ l LIPOFETAMINE reagent, 再將兩管混合在一起, 利用 pipetman 吸放混合, 增加 DNA 和 liposome 的碰撞機率, 並於室溫下的無菌操作檯上靜置 45 分鐘, 讓 DNA 和 liposome 形成聚合體。此時利用 2 ml 不含抗生素與血清的培養液浸潤細胞, 並置入 37°C 培養箱中培養。當 DNA 和 liposome 作用時間到時, 於混合液中加入 0.8 ml 不含抗生素與血清的培養液。並去除培養皿中的培養液, 加入 1 ml DNA 和 liposome 的混合液, 放進 37°C 培養箱中, 進行轉殖作用。轉殖 12 小時後, 去除培養皿中的培養液, 加入 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液。培養 24 小時後, 換成

完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 4~12 小時內加入 1 ml HLE 0.5 mg/ml，放置 37°C 培養箱中處理 24 小時。

4. 西方點墨法 (Western blotting)

4.1. 蛋白萃取

培養前列腺癌 LNCaP 細胞，以 control vector 作為對照組，另一組以 Akt vector 進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，更換成含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 4~12 小時內加入 HLE 0.5 mg/ml，放置 37°C 培養箱中。24 小時後，再去除上清液，並使用適量的胰蛋白酶 trypsin 使細胞脫落，收取細胞溶液，進行離心 1000 rpm 五分鐘。去除上清液後，以 1ml PBS 打散細胞，再用 1000 rpm 離心五分鐘，離心後去除上清液，重複二次。加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5 % Deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris-base，pH 7.5 內含 1 mM sodium orthovanadate、100 µg PMSF、170 µg/ml leupeptin) 後，再加入蛋白酶抑制劑。以均質機破壞細胞，處理後再加入蛋白酶抑制劑，在 4°C 12000 rpm 進行離心 30 分鐘，保存上清液。

4.2. 蛋白定量

利用 BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Reagent 進行蛋白定量。首先將標準品 BSA 進行序列稀釋 (16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/ml)。分別將標準品以及待測樣品，分別取量加入 96 well ELISA 孔盤中。再配置 Reagent A 以及 Reagent B (50 : 1) 之混合液，分別加入標準品及待測樣品中，使總體積為 200 µl。將 ELISA 孔盤放置 37°C 培養箱中反應半小時，再以 562nm 波長下之 ELISA reader 讀取吸光值。畫出標準曲線，推算出樣品蛋白濃度。

4.3. 西方點墨法

每一管 samples 吸取相對應的量，並以二次水補至相同體積，再加入 loading dye，將 samples 放到乾熱器上 100°C 加熱變性 10 分鐘。配好 10% 聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行電泳，以 70V 電泳約三小時。再將凝膠以 100V 兩小時把蛋白轉印到硝化纖維膜上。將硝化纖維膜以麗春紅染染色，再用 TBS 清洗。接著浸泡在 5% 的脫脂牛奶中 1 小時並以 TBS+Tween 清洗 10 分鐘，重複三次。加入一級抗體在 4°C 反應 overnight (12 小時)。再以 TBS+Tween 清洗 10 分鐘，重複三次。換成對應的二級抗體反應一小時後，用 TBS+Tween 清洗 10 分鐘，重複三次。

4.4. 結果分析

將處理好的硝化纖維膜用 ECL 溶液覆蓋再使用冷光儀拍攝。以分析軟體透過亮

度深淺來定量測定的蛋白。

5. 基質金屬蛋白酶分析 (MMP zymography assay)

5.1. 細胞處理

在 6 well 的培養皿中種植前列腺癌 LNCaP 細胞，等待細胞貼壁 24 小時，以 vector 作為對照組，另一組以 Akt vector 進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，更換成 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 4~12 小時內加入 1 ml HLE 0.5 mg/ml，放置 37°C 培養箱中。24 小時後，收取全部的懸浮液，以 3000 rpm 離心 5 分鐘，小心取出上清液至新的微量離心中，可放置 -20°C 保存。

5.2. Gelatin zymography

配製 8% 聚丙烯醯胺凝膠，製備時還需另加 2% 的 Gelatin solution 0.3 ml。每個組別各取 20 μ l 樣本液與 5 μ l 的 5x MMP dye 混合均勻，以 1% FBS 作為 marker，開始 80 V 電泳，待 samples 跑至下膠時，可調到 100 V。電泳結束後，將上膠去除，以 MMP wash buffer(含 0.2% TRITON X-100)清洗兩次，每次 30 分鐘。去掉 wash buffer 後，加入 reaction buffer，在 37°C 的溫箱中放置 12 小時。反應後倒掉 reaction buffer，以 coomassie blue R-250 染色 10~15 分鐘，再用脫色液去除多餘的染劑，直到可清楚看見 MMP-2 及 MMP-9 的 band，藉此分析基質金屬蛋白酶的活性。

6. 細胞生長曲線分析 (MTT assay)

6.1. 細胞處理

在 24 well 的培養皿中種植細胞，等待細胞貼壁 24 小時，以 vector 作為對照組，另一組以 Akt vector 進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，更換成 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 4~12 小時內加入 1 ml HLE 0.5 mg/ml，放置 37°C 培養箱中。

6.2. MTT assay

加藥處理 24 小時後，去除上清液，並加入 1 ml 10% MTT reagent，在 37°C 培養箱中反應 4 小時。小心吸取上清液丟棄，只保留紫色結晶。每一個 well 中加入 600 μ l 異丙酮並輕微搖晃，直到紫色結晶溶解。再取出 200 μ l 到 96 孔盤中，以 ELISA reader 測 563nm 吸光值，將結果繪製成細胞生長曲線圖。

7. 傷口癒合試驗 (Wound healing assay)

在 6 well 的培養皿中種植前列腺癌 LNCaP 細胞，等待細胞貼壁 24 小時，以 vector

作為對照組，另一組以 Akt vector 進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，更換成 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 4~12 小時後去除培養液，以 tip 在底部畫出兩條平行線，再用培養液 wash 掉漂浮的細胞。再加入 HLE 0.5mg/ml 放置 37°C 培養箱中培養，並在時間點(0、24、48、72 小時)移至光學顯微鏡觀察細胞移動的表現並拍照紀錄。

8. 統計分析

數據以 Sigma Plot 軟體分析，mean \pm SD 表示。利用 t-test-Unpaired 來評估統計差異。p < 0.05 表示具有顯著意義。

(五) 結果與討論

1. 過去的研究中已證實，多酚化合物可預防癌症及抑制癌細胞的生長與轉移。有鑒於此，利用 Folin-Ciocalteu method 定量分析洛神葉水萃取物(HLE)功能性成分，發現 HLE 為富含多酚物質，其中又以類黃酮的含量最多(Table 1)。
2. 從我們實驗室先前的研究結果顯示 HLE 對於 LNCaP 細胞的侵襲作用有抑制的效果(Fig. S1A)，其中的機制可能與 Akt、MMP-9 及 NF κ B 有關(Fig. S1B)。因此接下來的實驗利用基因轉殖使 LNCaP 細胞內的 Akt 蛋白過量表現，再加入 HLE 觀察其中相關蛋白的變化及細胞侵襲的情形。
3. 將 LNCaP 細胞培養 24 小時後進行 Akt 基因轉殖，首先透過西方點墨法(Western blotting)可以得知在 Akt expression vector 組別中 Akt 蛋白及其磷酸化有過量表現的情形。再以 0.5 mg/ml HLE 處理 24 小時後，發現 Akt 蛋白及其磷酸化表現皆受到抑制(Fig. 1A)；並且在 Akt 蛋白過量表現下，可同時促進 NF κ B、MMP-9 及 MMP-2 等蛋白的表現(Fig. 1B & 1C)，過量表現的 Akt 並不影響 c-Jun 蛋白表現量。此外，在相同細胞模式及 HLE 處理劑量下，HLE 可以降低 NF κ B 及 MMP-9 的表現(Fig. 1B & 1C)；但 HLE 對於 MMP-2 蛋白的影響較不顯著。
4. 以 MMP zymography assay 分析在 MMP-9 活性表現方面，Akt expression vector 組別有明顯的增強；同時以 0.5 mg/ml HLE 處理 24 小時後，MMP-9 的活性表現則受到抑制。而 MMP-2 的活性在 Akt 基因轉殖後也有明顯的增加，但以 0.5 mg/ml HLE 處理後並沒有降低此活性(Fig. 2)，此部分呼應在 Western blotting 得到的結果。
5. 為了進一步確認 Akt 基因轉殖是否會影響細胞生長，將 LNCaP 細胞培養 24 小時後進行 Akt 基因轉殖，並分析細胞生長曲線(MTT assay)。結果顯示細胞轉染後並沒有明顯促進生長。再以 0.5 mg/ml HLE 處理 24 小時後，發現細胞生長數量有稍

微降低，但不具統計上的意義(Fig. 3)。

6. 以 Wound healing 分析細胞移動的能力，同樣將 LNCaP 細胞培養 24 小時後以 Akt 基因轉殖，使用 p10 tip 劃出傷口，並拍照記錄 0、24、48 及 72 小時傷口癒合之情形。從顯微鏡下觀察到的細胞移行數量可得知在 Akt expression vector 組別中從 48 小時開始便有明顯的傷口癒合。再以 0.5 mg/ml HLE 處理 24 小時後，發現 HLE 會抑制 Akt 所促進傷口的癒合(Fig. 4)。
7. 總結上述實驗結果，證實 Akt 蛋白大量表現下，HLE 可以減低 Akt 磷酸化作用，進而抑制 NF κ B 和 MMP-9 之表現，達到阻斷前列腺癌 LNCaP 細胞的侵襲作用。同時也說明 Akt 在 HLE 抑制細胞侵襲的訊息路徑中扮演重要的角色(Fig. 5)。我們可提出洛神葉水萃取物能夠抑制前列腺癌細胞侵襲作用並釐清其分子機制，也顯示洛神葉具有作為前列腺癌的化學預防物質之潛力。

(六) 參考文獻

1. Lin HH, Chen JH, Wang CJ. Chemopreventive properties and molecular mechanisms of the bioactive compounds in Hibiscus sabdariffa Linne. *Curr Med Chem*. 2011; 18: 1245-54.
2. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD and Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 2000; 60: 3823-3831.
3. Lee SH, Jaganath IB, Wang SM, Sekaran SD. Antimetastatic effects of Phyllanthus on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *PLoS One*. 2011; 6: 6.
4. Lin HH, Chan KC, Sheu JY, Hsuan SW, Wang CJ, Chen JH. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chem*. 2011; 132: 880-891.
5. Carter HB, Coffey DS. The prostate: an increasing medical problem. *Prostate*. 1990; 16: 39-48.
6. Ip S, Dahabreh IJ, Chung M, Yu WW, Balk EM, Iovin RC, Mathew P, Luongo T, Dvorak T, Lau J. An evidence review of active surveillance in men with localized prostate cancer. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2011; 204: 1-341.
7. Yu CC, Huang SP, Lee YC, Huang CY, Liu CC, Hour TC, Huang CN, You BJ, Chang TY, Huang CH, Bao BY. Molecular markers in sex hormone pathway genes associated with the efficacy of androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *PLoS One*. 2013; 8: 1.

8. Cui Y, Yamada S. N-Cadherin Dependent Collective Cell Invasion of Prostate Cancer Cells Is Regulated by the N-Terminus of α -Catenin. *PLoS One*. 2013; 8: 1.
9. Cho S, Kang SG, Tae BS, Cheon J. Influence of nonregional lymph node metastasis as a prognostic factor in metastatic prostate cancer patients. *Korean J Urol*. 2012; 53: 673-9.
10. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25: 9-14.
11. Park SY, Kim JH, Lee YJ, Lee SJ, Kim Y. Surfactin suppresses TPA-induced breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9 expression. *Int J Oncol*. 2013; 42: 287-96.
12. Jayasooriya RG, Lee YG, Kang CH, Lee KT, Choi YH, Park SY, Hwang JK, Kim GY. Picetannol inhibits MMP-9-dependent invasion of tumor necrosis factor- α -stimulated DU145 cells by suppressing the Akt-mediated nuclear factor- κ B pathway. *Oncol Lett*. 2013; 5: 341-347.
13. Kubiakowski T, Jang T, Lachyankar MB, Salmonsens R, Nabi RR, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Ross AH, Recht LD. Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. *J Neurosurg*. 2001; 95: 480-488.
14. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sefti S. Akt Mediates Ras Downregulation of RhoB, a Suppressor of Transformation, Invasion, and Metastasis. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 5565-5576.

附圖表

Table 1 — Composition of the HLE	
Functional compound analysis	HLE(%)
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	5.22±0.1
Total flavonoid (Jia method)	20.98±1.7
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)	1.93±1.2

Table 1. 分析洛神葉水萃取物(HLE)的功能性成分，以Folin-Ciocalteu method分析HLE的總多酚含量，得到其結果為5.22±0.1%。以Jia method分析總類黃酮成分，其含量為20.98±1.7%。而Fuleki and Francis method則是檢測總花青素的含量，其結果為1.93±1.2%。

Fig. S1.

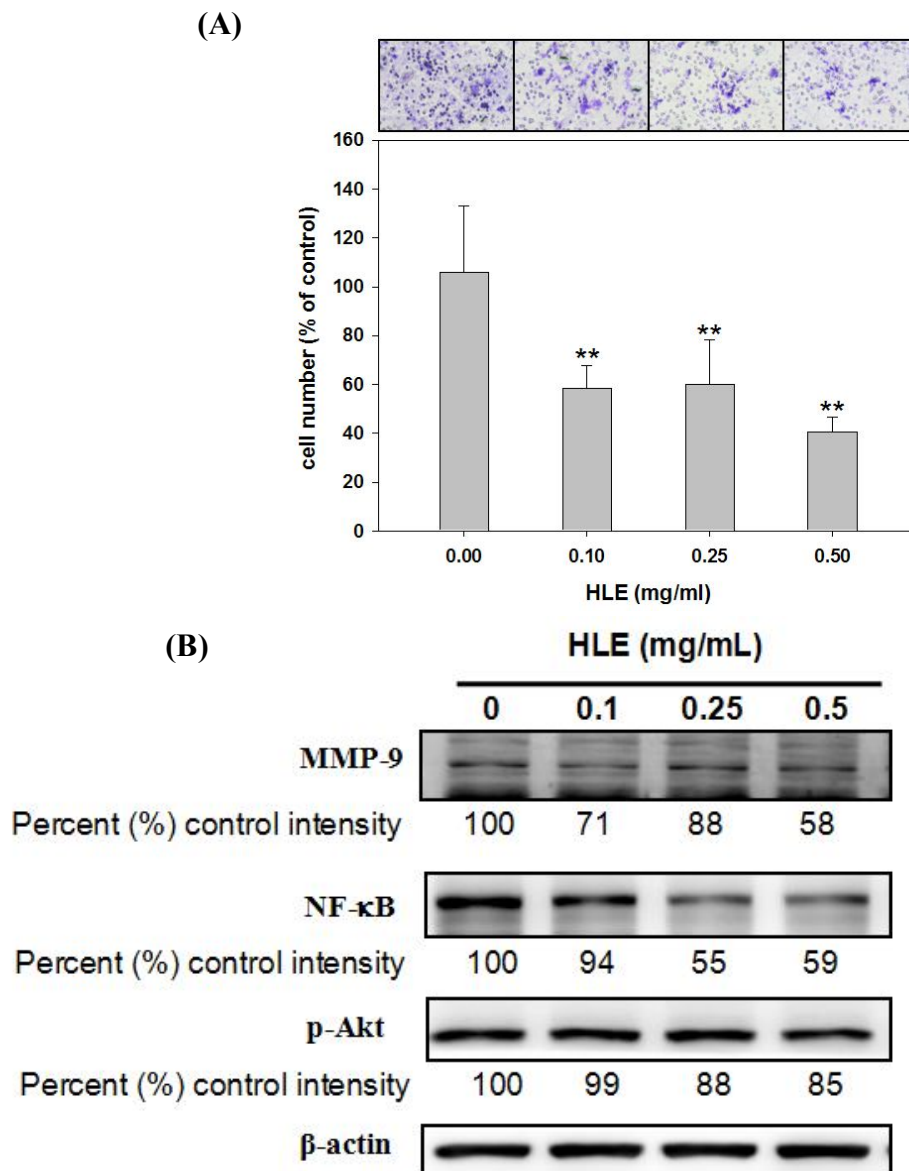


Fig. S1. 先前我們實驗室以 LNCaP 細胞培養 24 小時後，分別處理 0、0.1、0.25 及 0.5 mg/ml HLE 24 小時，(A)以 Boyden chamber 分析細胞的移動力，結果顯示隨著 HLE 的劑量越高，抑制細胞移動數越明顯。(B) 再以西方點墨法分析調控細胞侵襲相關蛋白的表現量，發現處理 HLE 之細胞內 MMP-9、NFκB 蛋白及磷酸化 Akt 表現都有降低的趨勢。

Fig. 1.

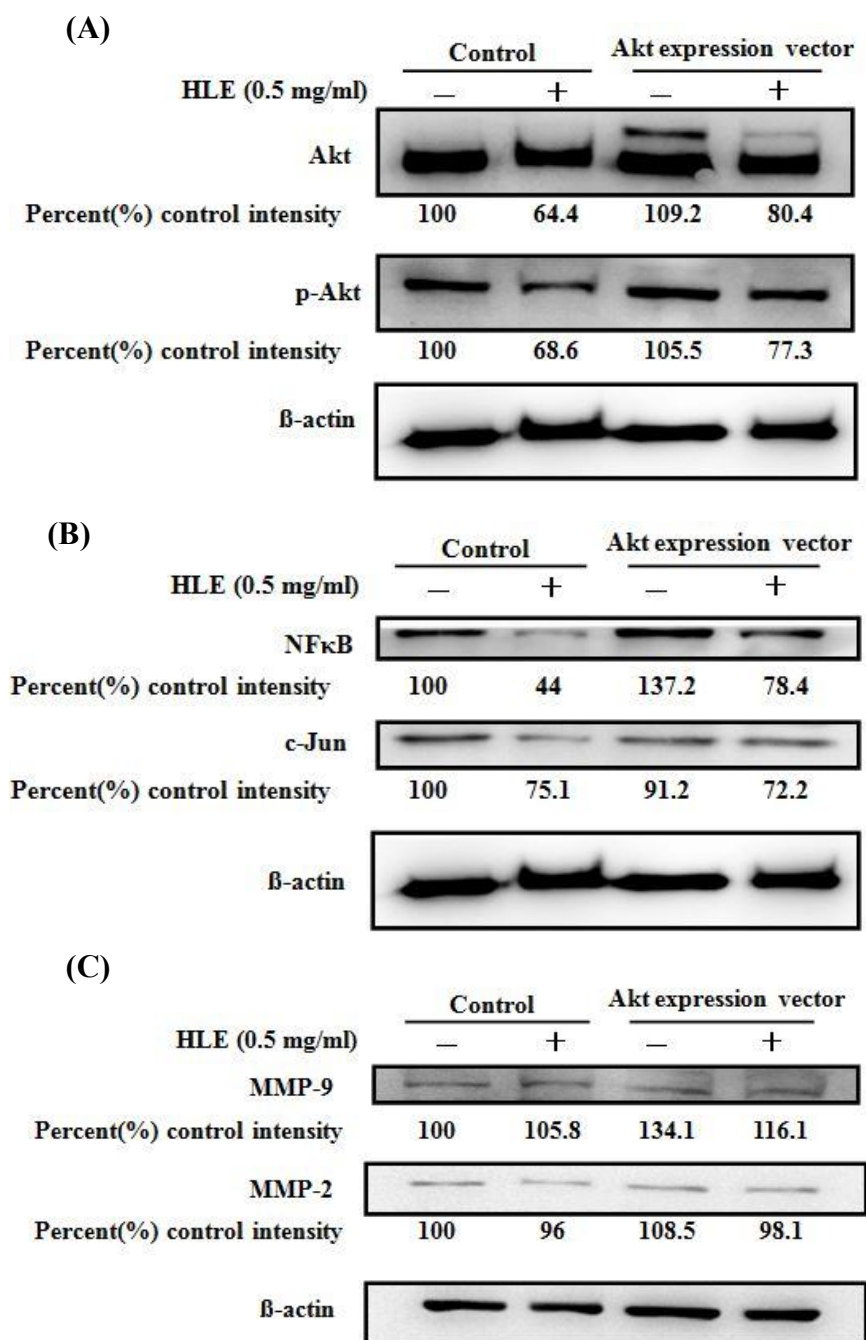


Fig. 1. (A) LNCaP細胞培養24小時後進行Akt基因轉殖，結果顯示Akt蛋白及其磷酸化有過量表現。再以0.5 mg/ml HLE處理24小時後，發現Akt蛋白及其磷酸化表現都有明顯下降。(B) LNCaP細胞培養24小時後進行基因轉殖，使細胞內的Akt蛋白過量表現，並同時促進NF κ B蛋白表現。加入0.5 mg/ml HLE處理24小時後則可以減少NF κ B蛋白表現，但c-Jun蛋白沒有明顯變化。(C) LNCaP細胞培養24小時後進行基因轉殖，使細胞內的Akt蛋白過量表現，並同時促進MMP-9蛋白表現。加入0.5 mg/ml HLE處理24小時後可以降低MMP-9的蛋白表現，但MMP-2蛋白表現比較不受到影響。

Fig. 2.

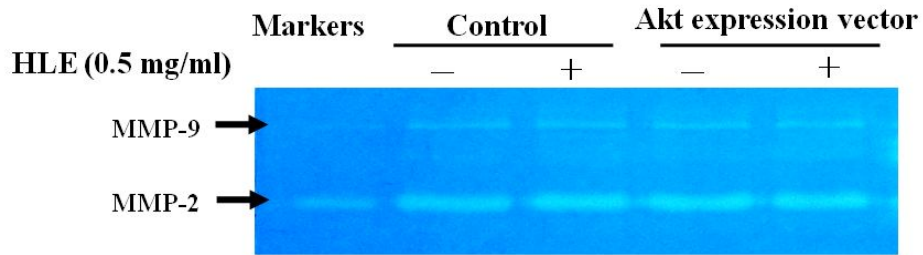


Fig. 2. 以MMP zymography assay分析MMPs活性，Akt expression vector對於MMP-9及MMP-2的活性表現上均有明顯增加；再以0.5 mg/ml HLE處理24小時後，MMP-9的活性有減少情形，但MMP-2的活性則不受到影響。

Fig. 3.

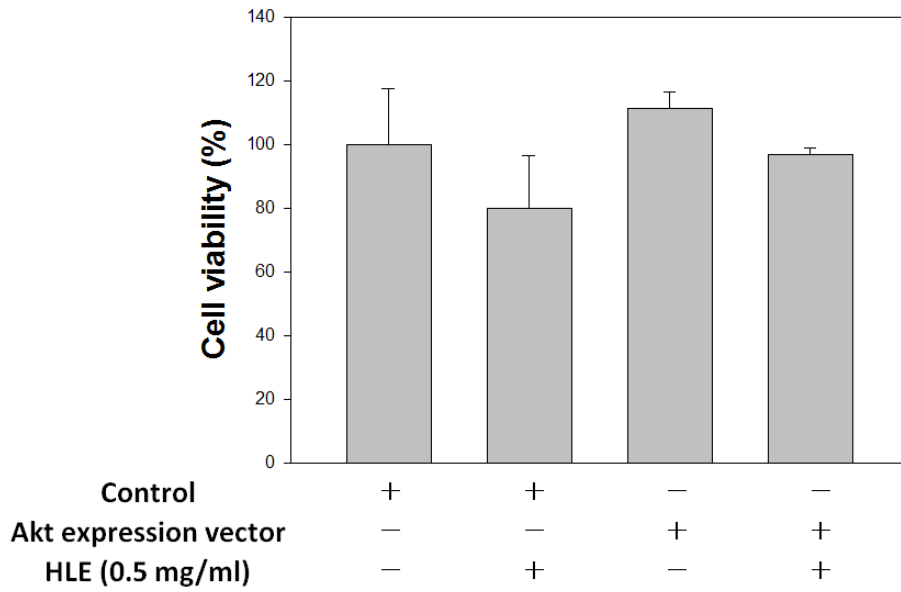


Fig. 3. LNCaP 細胞培養 24 小時後進行 Akt 基因轉殖，結果顯示細胞生長不受影響。再以 0.5 mg/ml HLE 處理 24 小時後，發現細胞生長數量雖有稍微降低，但不具統計上的意義。

Fig. 4.

(A)

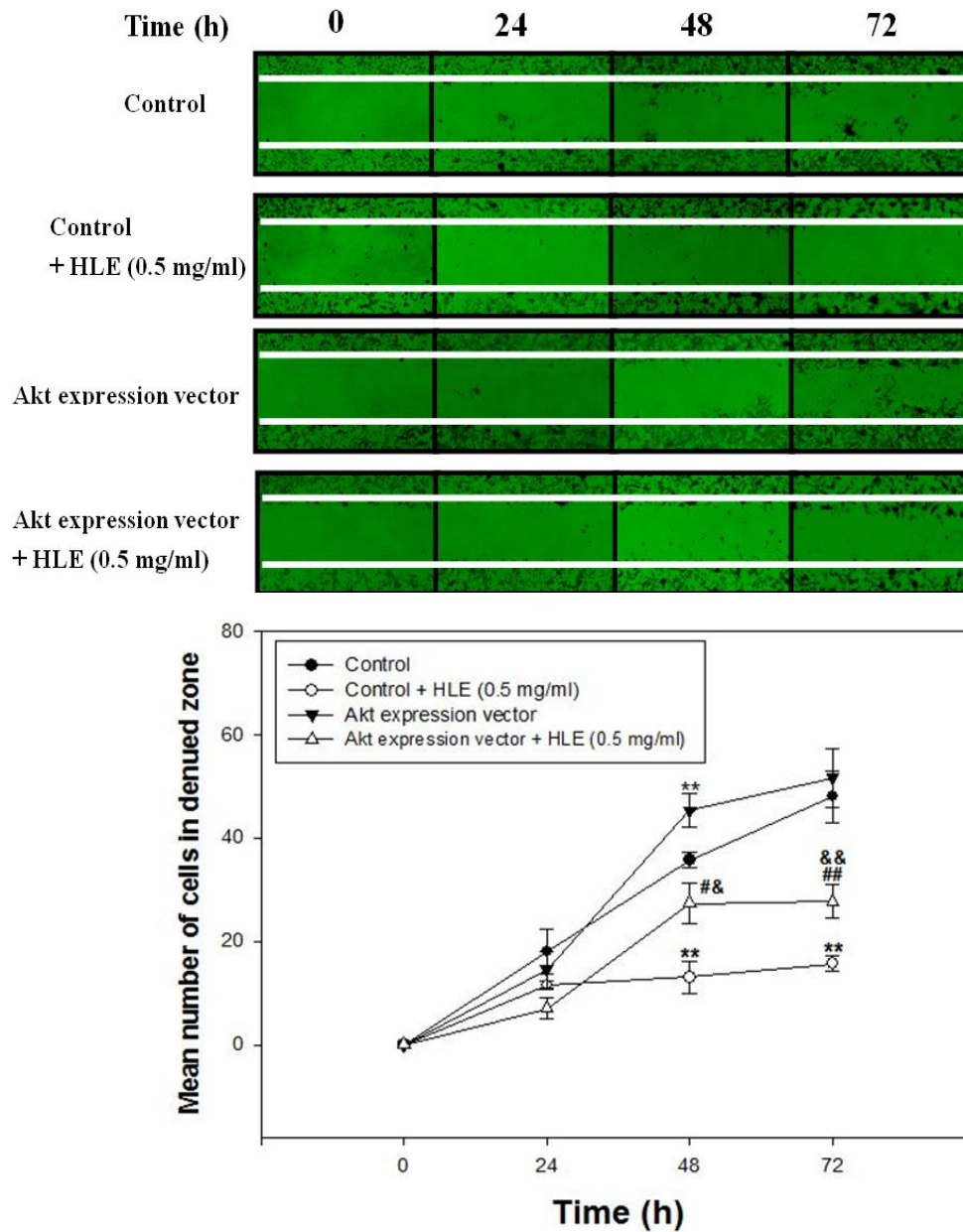


Fig. 4. 以wound healing分析細胞移動的能力，將LNCaP細胞培養24小時後進行Akt基因轉殖，並以p10 tip劃出傷口，拍照記錄0、24、48及72小時傷口癒合之情形。結果顯示Akt vector組別從48小時開始便有明顯的傷口癒合。再以HLE 0.5 mg/ml處理24小時後，發現HLE會抑制Akt所促進傷口的癒合。(**p < 0.01 compared with the control. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with HLE-treated LNCaP/vector group compared with HLE-treated LNCaP/*Akt1* cDNA group. &p < 0.05, &&p < 0.01 compared with HLE-treated LNCaP/vector group compared with untreated LNCaP/*Akt1* cDNA group.)

Fig. 5.

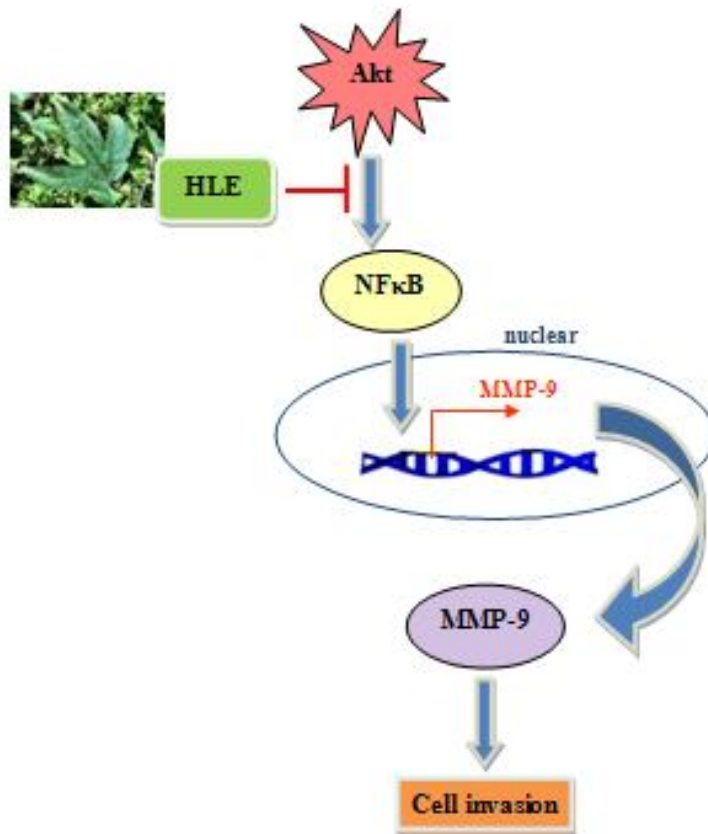


Fig. 5. 綜合實驗結果得知前列腺癌LNCaP細胞轉殖Akt expression vector後會促使Akt蛋白過量表現，進而增加NFκB及MMP-9蛋白量，促進LNCaP細胞的侵襲作用。而HLE可以藉由降低Akt磷酸化表現，達到抑制NFκB及MMP-9，使得前列腺癌LNCaP細胞的侵襲作用受到阻斷。