

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 山葡萄莖萃取物抑制骨癌細胞 Saos-2 侵襲轉移之機轉
* 名 稱
* *****

執行計畫學生：黃培倫
學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-004-B
研究期間：99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授：謝易修

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：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100年03月04日

山葡萄莖萃取物抑制骨癌細胞 Saos-2 侵襲轉移之機轉

計劃主持人：謝易修 中山醫學大學

一、中文摘要

癌細胞的轉移往往是惡性腫瘤的重要特徵之一，並且也是在臨床治療上最難以根治的。因此，在很多研究中，大都是以針對癌細胞的轉移過程，去開發新藥或者是利用天然藥物去觀察是否會影響細胞的轉移。其中骨癌的致死率也是居高不下，可於數月內出現肺部轉移，截肢后在 3~5 年間存活率只有 5~20%。少數轉移至腦、內臟、腎及經淋巴管至淋巴結。惡性骨肉瘤大約 75% 發生在 20 歲以前，尤其好發於 10~20 歲的男性。最近這幾年來，天然物在對於疾病的治療漸漸被受到重視，尤其是在亞洲地區，大家對於西方醫藥是以毒攻毒的印象，加上人們對於藥物的依賴性，大家都希望以較為緩和的方式治療疾病，而以前都認為是偏方的草藥，也經由科學而得到了具有療效的證實。如：多酚類、花青素等被確認其具有抗氧化、抗發炎、抗過敏及抗癌等活性，但是到目前為止，對於其抑制癌細胞轉移以及其中之詳細機轉的都還不是很清楚。在本實驗中，我們針對骨肉瘤細胞(osteosarcoma) Saos-2，利用多中草藥萃取物進行篩選，結果發現經由 gelatin zymography 與 casein zymography 實驗分析方法，漢氏山葡萄莖之 50% 乙醇萃取物可有效抑制 Saos-2 的 MMP-2 與 u-PA 的分泌，而這些蛋白酶已有許多文獻證明為癌細胞轉移侵襲的主要標誌。因此，在本實驗中，我們利用山葡萄莖萃取物 (Ampelopsis brevipedunculata extract; ABE) 觀察其抑制惡性骨癌細胞株(Saos-2)轉移之功效。我們利用 cell motility/invasion assay

分析 ABE 對具有高度轉移能力惡性骨癌細胞株(Saos-2)侵入能力之影響。我們發現 ABE 對 Saos-2 的 motility 及 invasion 能力都有顯著的抑制效果，並且都呈現濃度的效應關係。當 ABE 的濃度為 50 μ g/mL 時，經 24 hr 處理對 Saos-2 的 migration 及 invasion 能力抑制有顯著的抑制效果。我們再利用 gelatin-zymography 與 casein-zymography 的方法分析細胞 motility/invasion 與 ECM degradation genes expression 關係，結果發現 ABE 對 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的分泌量亦有明顯的抑制，並呈現濃度效應關係。從以上的結果，我們發現 ABE 可能是透過抑制 Saos-2 細胞株 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的分泌進而抑制癌細胞侵犯作用能力。
關鍵字：癌症轉移、骨癌、侵襲、基質金屬蛋白酶、細胞骨架蛋白

二、材料與方法

1. 細胞培養

Saos-2 惡性骨髓瘤細胞培養在含有 10% 胎牛血清的 DMEM+F12(1:1)培養液中，並外加入 1% penicillin/streptomycin、1mM glutamine，待細胞長滿後以 0.05% 的 trypsin-EDTA 將細胞打下，經離心後去除上清液，以新鮮的培養液將細胞打散並繼續培養之。

2. Gelatin zymography (1)

將 0.1% Gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將細胞培養後不含胎牛血的培養液與 5 \times loading dye 均勻混和後，注入膠片中，以 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer (2.5%

Triton X-100)在室溫下沖洗 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% NaN₃, pH 8.0)在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，最後反應完的膠片以染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

3. Casein zymography (2)

48mg casein + 0.55mg plasminogen 8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將細胞培養後不含胎牛血的培養液與 5×染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下沖洗 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer 在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，最後反應完的膠片以染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果

4. 細胞移動性分析 (Motility) (3)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM，並將細胞處理 ABE，Saos-2 細胞 subculture 並計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^4 - 1.5×10^4) 於 upper chamber，待細胞移動 5 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

5. 細胞侵入性分析 (Invasion) (3)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，將 cellulose nitrate filters coating 上 100 μ g/cm² type IV collagen，在 Laminar flow 風乾 5 整夜，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM，將 Saos-2 細胞處理過 ABE，subculture 並計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^4 - 1.5×10^4) 於 upper chamber，待細胞移動 6 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

6. 細胞生長測試 (Microculture tetrazolium; MTT) 分析

本實驗室用來測試細胞是否存活的方法，其原理為有活性的活細胞會將 MTT reagent 經由粒腺體中的 dehydrogenase 作用代謝還原成藍紫色結晶，待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 O.D. 570nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

7. 細胞傷口癒合試驗

(Wound healing assay) (4)

分別把細胞以每盤 2×10^5 個細胞種植至 24 孔的培養盤中。待細胞長到幾乎全滿時先處理含 0.5% FBS 之培養液 24 hr 以抑制細胞生長，接下來用吸管尖 (blue tip) 在每一個孔中劃線，其距離約為 80 μ m，再用 1×PBS 洗細胞，最後在加入 0.5% FBS 之培養液培養，每 24 hr 觀察 48 hr 及 96 hr 以乙醇固定 Giemsa 染色並照相，以觀察細胞移動情形。

三、結果與討論

漢氏山葡萄又稱為蛇葡萄、大本山葡萄、野葡萄，產地是在台灣和東南亞，是屬於鼠李目葡萄科山葡萄屬植物，拉丁學名 *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Traut. 在古書中也記載了《廣西民族藥簡編》：“根或根皮水煎服治心悶氣緊(瑤族)，子宮脫垂(侗族)，浸酒搽患處治跌打損傷(壯族)。全株水煎服治風濕性心臟病，產後或病後虛弱，產婦乳汁缺乏(瑤族)。它也是台灣常見的植物，平地和低海拔的路段上就可以見得，也有很多用其莖部來治療風濕關節痛、淋病、眼疾等例子，在民間更是有用其莖汁滴入耳內來治療外耳道炎，目前為止已有文獻報導漢氏山葡萄本身具有抗發炎、抗氧化、清除自由基、抗肝中毒以及當做利尿劑使用。因此，我們利用山葡萄莖萃取物 (ABE) 來探討對惡性骨癌細胞株 Saos-2 的遷移和侵犯作用及分子機制。我們處理細胞 ABE 的濃度為 0-100 μ g/mL，並利用 MTT assay

發現這些濃度對 Saos-2 為無毒劑量 (Fig-1)。接著我們利用這些濃度處理 Saos-2 並分析其 invasion 的能力，我們發現在 24hr 時，ABE 對於 Saos-2 的 invasion 能力都有抑制的效果並且具有濃度效應 (Fig-2)。在細胞 motility assay 中發現 ABE 對於 Saos-2 的 motility 能力也有抑制的效果同時具有濃度效應 (Fig-3)。

而 ABE 抑制 Saos-2 的 invasion 能力是透過何種機制? 我們利用了 gelatin-zymography 與 casein-zymography 的方法分析與細胞 invasion 及 ECM degradation genes—MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的活性表現，結果發現 ABE 對於 Saos-2 所分泌具有細胞侵襲能力的 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 有明顯的抑制作用，並且具有濃度效應 (Fig-4 & Fig-5)。

最後我們利用傷口癒合實驗 (wound healing assay) 分析 ABE 對於 Saos-2 的 migration 能力。我們發現 ABE 對於 Saos-2 的移動能力 (migration) 都有明顯的抑制，並且具有濃度效應 (Fig-6)。

因此，我們發現 ABE 是透過抑制 MMP-2 與 u-PA 的作用進而抑制 Saos-2 癌瘤細胞遷移和侵犯作用的能力，以達到其抗癌的效果。而 MMP-2 參與胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 蛋白的合成與分解；於正常生理情況下，參與如胚胎的發育，胚胎的著床，血管生成和組織重建等；自組織分泌出來的 MMPs 為 latent proenzymes，需經過轉換成活化態之後才具有酵素活性，一旦 MMPs 的合成或活化過程出了問題則基質蛋白無法被順利分解，因而形成組織纖維化；另外，許多證據顯示 MMPs 與癌細胞的吸附，位移，侵入和轉移有關 (14-33)。因此，接下來的工作，除了研究擬探討與 u-PA 之抑制癌瘤細胞位移及侵入作用相關分子機轉 (signaling pathway) 之外，並評估其應用性。

四、參考文獻

1. Schleef RR, Podor TJ, Dunne E, Mimuro J, Loskutoff DJ. The majority of type 1 plasminogen activator inhibitor associated with cultured human endothelial cells is located under the cells and is accessible to solution-phase tissue-type plasminogen activator. *J. Cell Biol.* (1990) 110;155-163
2. Kuo WH, Yang SF, Chu SC, Lu SO, Chou FP, Hsieh YS. Differential inductions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice, *Cancer Lett.* (2003) 189;103-112.
3. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR, Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases, *Cancer Res.* (2000) 60;4629-4637.
4. Chu SC, Chiou HL, Chen PN, Yang SF, Hsieh YS. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Mol Carcinog* 2004; 40, 143-9
5. Chen RS, Song YM, Zhou ZY, Tong T, Li Y, Fu M, et al. Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway. *Oncogene* 2009; 28(4), 599-609
6. Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(23), 9427-35.
7. Hou DX. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med.* 2003; 3(2), 149-59.
8. Wu MJ, Yen JH, Wang L, Weng CY. Antioxidant activity of Porcelainberry

- (*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv.). *Am J Chin Med* 2004;32(5):681-93.
9. Duffy, M. J., McGowan, P. M., and Gallagher, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008; 214, 283-93.
 10. Miles, F. L., Pruitt, F. L., van Golen, K. L., and Cooper, C. R. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25, 305-24.
 11. Zlotnik, A. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J Pathol* 2008; **215**, 211-3.
 12. Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2, 657-72.
 13. Conner, E. A., Teramoto, T., Wirth, P. J., Kiss, A., Garfield, S., and Thorgeirsson, S. S. HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1., *Carcinogenesis* 1999; 20, 583-90.
 14. Nabeshima K, Inoue T, Shimaoy, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathology International* 2002; 52, 255-264.
 15. Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. *Biochemical Society symposium* 2003;(70), 1-14.
 16. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB journal* 1999; 13, 781-792.
 17. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current opinion in cell biology* 1998; 10, 667-671.
 18. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Research* 1996; 56, 190-196.
 19. Yang SF, Chu SC, Liu SJ, Chen YC, Chang YZ, Hsieh YS: Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) on lung cancer cells in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2007; 110, 483-489.
 20. Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, Hsieh YS. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett* 2006; 235, 248-59
 21. Hsiao YC, Kuo WH, Chen PN, Chang HR, Lin TH, Yang WE, et al. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Chem Biol Interact* 2007; 167, 193-206
 22. Chen JH, Lin HH, Chiang TA, Hsu JD, Ho HH, Lee YC, et al. Gaseous nitrogen oxide promotes human lung cancer cell line A549 migration, invasion, and metastasis via iNOS-mediated MMP-2 production. *Toxicol Sci* 2008; 106, 364-75
 23. Chen RS, Song YM, Zhou ZY, Tong T, Li Y, Fu M, et al. Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway. *Oncogene* 2009; 28(4), 599-609
 24. Chen PN, Kuo WH, Chiang CL, Chiou HL, Hsieh YS, Chu SC. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA

expression. *Chem Biol Interact* 2006; 163, 218-29

25. Hsieh YS, Chu SC, Yang SF, Chen PN, Liu YC, Lu KH. Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2. *Carcinogenesis* 2007; 28, 977-87
26. Chen PN, Hsieh YS, Chiang CL, Chiou HL, Yang SF, Chu SC. Silibinin inhibits invasion of oral cancer cells by suppressing the MAPK pathway. *J Dent Res* 2006; 85, 220-5
27. Barbolina MV, Adley BP, Shea LD, Stack MS. Wilms tumor gene protein 1 is associated with ovarian cancer metastasis and modulates cell invasion. *Cancer* 2008; 112, 1632-41

五、圖表

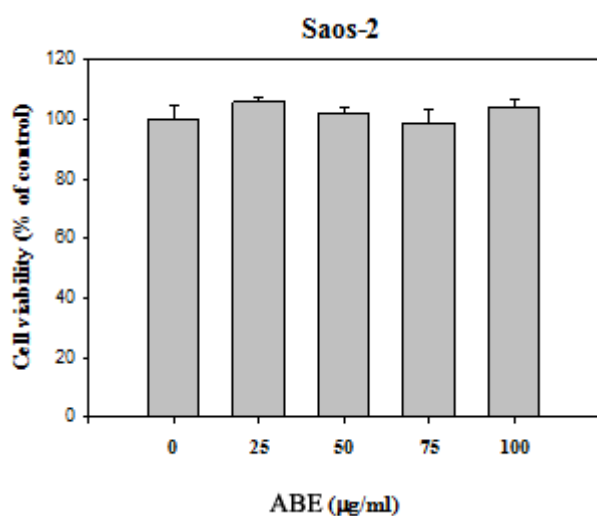


Fig-1. Saos-2 細胞處理山葡萄莖萃取物 ABE 24hr 其細胞存活率分析。
以 MTT assay 分析 Saos-2 細胞處理不同劑量的山葡萄莖萃取物(ABE)，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成柱狀圖。

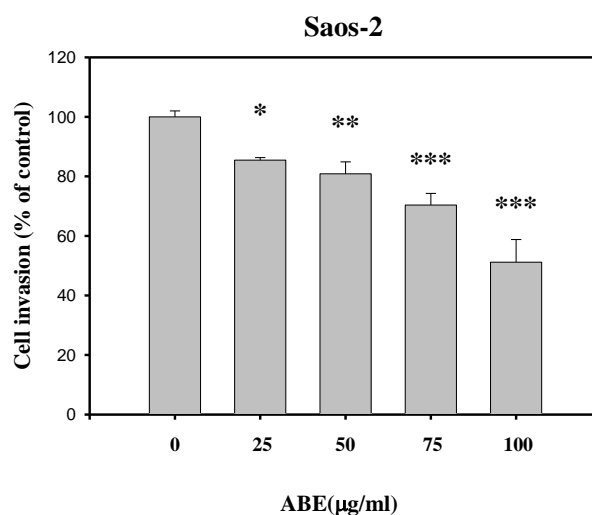


Fig-2. Saos-2 細胞處理山葡萄莖萃取物 ABE 其 invasion 能力之分析。
以 invasion assay 分析 Saos-2 細胞處理不同劑量的 ABE，其 24hr 後 cell invasion 能力表現情形，並量化製成柱狀圖。* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

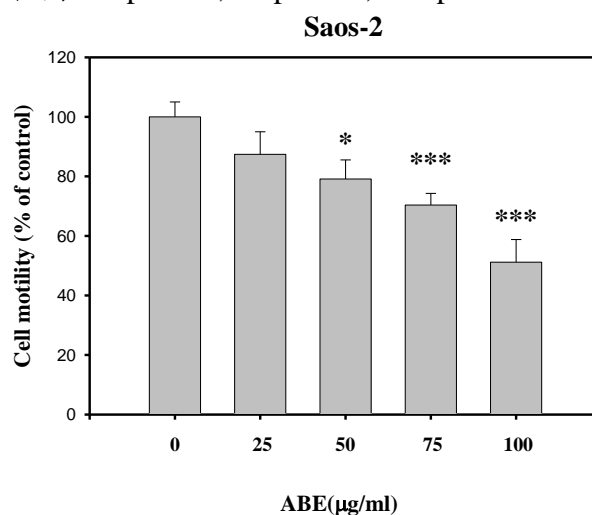


Fig-3. Saos-2 細胞處理 ABE 其 motility 能力之分析。
以 motility assay 分析 Saos-2 細胞處理不同劑量的 ABE，其 24hr 後 cell motility 能力表現情形，並量化製成柱狀圖。* p<0.05; ** p<0.01.

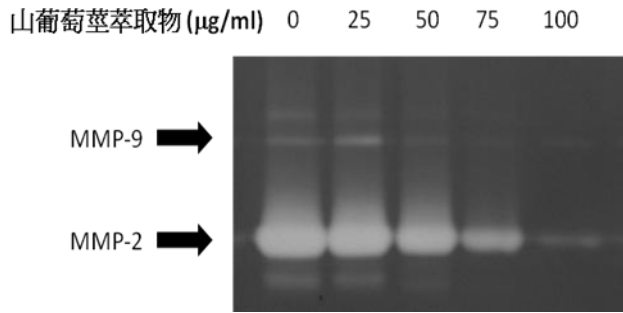


Fig-4. Saos-2 細胞處理山葡萄莖萃取物 24hr medium 中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白活性分析。

以 zymography 分析 Saos-2 細胞處理不同劑量的山葡萄莖萃取物，其 24hr medium 中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白活性表現情形

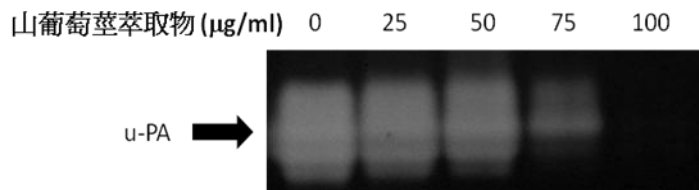


Fig-5. Saos-2 細胞處理山葡萄莖萃取物 24hr medium 中 u-PA 蛋白活性分析。

以 zymography 分析 Saos-2 細胞處理不同劑量的山葡萄莖萃取物，其 24hr medium 中 u-PA 蛋白活性表現情形。

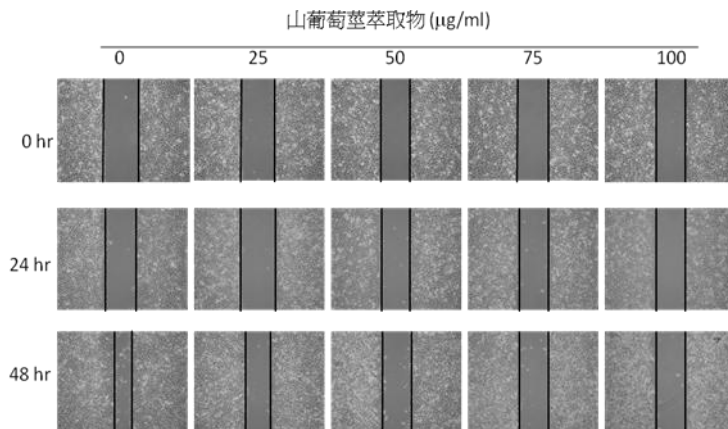


Fig-6. Saos-2 細胞處理山葡萄莖萃取物 其 migration 能力之分析。

以 wound healing assay 分析 Saos-2 細胞處理不同劑量的山葡萄莖萃取物，其 24hr 後 cell migration 能力表現情形。