

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 : 欖仁樹(Terminalia catappa L.)的葉之溶劑分層萃取 *
* 名 稱 : 物抑制人類肺癌細胞株 A549 侵襲與轉移之能力 *
* ***** *

執行計畫學生： 卓彥好
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-023-B
研究期間： 100年07月01日至101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 101年03月01日

欖仁樹(*Terminalia catappa* L.)的葉之溶劑分層萃取物抑制人類肺癌細胞株 A549 侵襲與轉移之能力

一、中文摘要:

癌症是現代社會的無情殺手，不僅會奪取個人的生命，更會影響到整個家庭。經調查顯示癌症發生率有逐年上升的趨勢。癌細胞是具有異常增生與高度轉移能力的細胞，並且癌細胞轉移是導致病人致死、癒後不好及最難根治的主要原因，其過程包括細胞骨架的改變、細胞的貼附、細胞外基質的降解以及細胞侵襲能力的改變。由衛生署公佈國人十大死因，癌症仍為台灣十大死因之首，因此找到有效的抗癌藥物為重要的課題。欖仁樹(*Terminalia catappa* L.)屬使君子科是台灣自生種的落葉大喬木，其果實為扁橢圓形之核果，周邊有稜線狀之突起，形似欖仁子，故名欖仁樹。近年有研究指出，低劑量的欖仁葉水可以抑制細胞變異效果，但如果服用過量，會使毒性在體內積蓄造成中毒的現象，台灣民間習慣將枯乾的欖仁樹葉泡成茶，據說有保肝健身的效用，因此，在本實驗中，我們利用欖仁樹葉之甲醇萃取物(TLME) 觀察其抑制肺癌細胞株 A549 轉移之功效。我們先利用 MTT assay 發現在不同濃度 TLME 下對 A549 是無毒劑量的，再利用 gelatin-zymography 與 casein-zymography 的方法分析肺癌細胞株 A549，結果發現 TLME 對 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的分泌量亦有明顯的抑制，並呈現有濃度效應的關係。接著我們再用 cell motility/invasion assay 來分析 TLME 對具有轉移能力的肺癌細胞株 A549 侵入能力之影響。我們發現 TLME 對 A549 的 motility 及 invasion 能力都有顯著的抑制效果，並都呈現濃度效應關係。當 TLME 的濃度在 10 g/mL 時，經 24 hr 處理對 A549 的 migration 及 invasion 能力抑制就有顯著的抑制效果。我們發現 TLME 可能是透過抑制 A549 細胞株 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的分泌進而抑制癌細胞侵襲作用的能力。

關鍵字: 肺癌細胞株 A549、欖仁樹葉、侵襲、基質金屬蛋白酶

二、研究背景及目的:

癌症是現代社會的無情殺手，不僅會奪取個人的生命，更會影響到整個家庭。根據行政院衛生署的統計，惡性腫瘤已成為台灣十大死因之首，平均每十三分五秒就有一人因癌症死亡，而肺癌在全世界的發病及死亡率急劇上升，而在女性癌症排行中，肺癌首屈一指，男性則位居排行的第二名，抽菸、空氣汙染、烹調食物的油煙、攝取過多高脂食物、因某些職業需經常性接觸致癌物質以及由某些疾病感染都有可能又發肺癌，肺癌的初期症狀並不明顯。持續性咳嗽是肺癌最常見的病徵，痰中帶血、胸部悶痛、呼吸困難、發燒原因不明、聲音啞啞，因此尋找

有效、毒性低的藥物是非常急迫的。欖仁樹，是台灣自生種的落葉大喬木，有研究指出，低劑量的欖仁樹的葉水可以抑制細胞變異效果，但如果服用過量，會使毒性在體內積蓄造成中毒的現象。由目前臨床治療癌症病人的統計指出，癌細胞的轉移是主要導致癌症病人死亡的主要原因，此外，癌細胞在移動的時候，細胞骨架佔有很重要的角色。移動上會因為細胞骨架的變化而有侵襲和轉移的現象，因為癌細胞侵襲和轉移都會造成死亡率的增加，以及治癒率的困難度。近年有研究報告指出，低劑量的欖仁葉水可以抑制細胞變異效果，但如果服用過量，會使毒性在體內積蓄造成中毒的現象，台灣民間習慣將枯乾的欖仁樹葉泡成茶，據說有保肝健身的效用，因此探討欖仁樹的葉之分層萃取物是否可以抑制癌細胞的轉移、侵襲能力、蛋白酶的分泌以及細胞骨架的改變。

三、文獻回顧與探討

肺臟位於胸腔，左右肺以縱隔膜隔開，縱隔腔內包括心臟、大血管、氣管、食道、胸腺和許多淋巴結。呼吸時，空氣由鼻子或嘴巴進入體內，經過喉嚨、氣管和左、右主支氣管，最後到細支氣管與肺泡相連；肺裡有許多肺泡，其上有上皮細胞，上面佈滿網狀微血管，在此與外界空氣進行氣體交換。此為肺最大的功用—吸進氧氣以維持細胞生存及正常的功能，並且將身體各部位細胞代謝的二氧化碳排出體外。抽菸、空氣汙染、烹調食的油煙、攝取過多高脂食物、因某些職業需經常性接觸致癌物質以及由某些疾病感染都有可能誘發肺癌。

肺癌最主要的兩種類型：一種為最常見的非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)，另一種是擴散較快的小細胞肺癌。非小細胞癌在台灣約佔全部肺癌 88%，和小細胞癌比較起來，非小細胞肺癌生長速率較慢，轉移發生也較慢，但是只有少數人是在診斷出來時是屬於可以開刀治療的。依據細胞形態可分成腺癌、鱗狀細胞癌、大細胞癌。小細胞癌，在顯微鏡下看起來很像燕麥，又稱為燕麥細胞癌。這種類型的肺癌多發生在男性，與抽菸關係極為密切。它生長的很快，容易迅速擴散到其他器官，但對化學治療或放射線治療約有八成的反應率。病灶通常位於肺部中央靠肺門位置，容易往大的支氣管發展，使氣管堵塞造成肺葉萎陷，診斷時常已有縱隔腔淋巴結的擴散，甚至三分之二的病人發生遠端轉移。

癌細胞的轉移及侵入往往是癌症病人最後致死的重要原因。在癌症的分期上，癌細胞的轉移擴散與否也是一個重要的分界。當腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部癌，假使能在此階段偵測到癌細胞進而治療則治癒率最高；然而當腫瘤細胞藉由血液、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長成續發性惡性腫瘤，就稱為轉移性癌，若此時才檢查到癌細胞，那這時進行手術的治癒能力則大大降低，並且通常在癌症發生早期並不會發現轉移的現象，通常都是在癌症晚期才察覺，因此也增加了癌症治癒的困難度。

在癌細胞的轉移擴散過程中，癌細胞會藉由蛋白水解酶分解細胞外基質的蛋白質，促使癌細胞與週邊的基質分離，造成癌細胞的移動。而惡性腫瘤細胞會產

生胞外基質分解酶，根據酵素的活化位置可以分為四類 serine proteinase (urokinase plasminogen activator, u-PA)、metalloproteinases (MMPs)、cysteine proteinase (cathepsins)以及 aspartic proteinase (pepsin)。其中 MMP-9、MMP-2 及 u-PA 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵入及轉移最有關。惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，當越惡性的癌細胞其 MMPs 亦會相對的增加，而 MMPs 具有蛋白分解活性可分解膠原蛋白，在腫瘤破裂的基底膜處可測得大量的 MMPs，目前已證實是用來作局部侵入和遠處轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管滲入組織而達轉移之目的。

四、研究方法

1. 欖仁樹之分層成份萃取

將欖仁樹的葉子洗滌後，將之烘乾，而後稱取 100 公克，切碎放入鍋內並加入熱水 500cc，以 100 度左右的溫度浸煮 30 分鐘，之後收其萃取液，再重複兩次之前的加水浸煮之動作，並合併三次經過濾之之萃取液，進行減壓濃縮，將其濃縮至 500cc，此萃取液在與氯仿 500cc 均勻混合後，置於分液漏斗靜置 8 小時，待其分層後，將氯仿層收下，重複混合氯仿之步驟共三次，合併三次分層的氯仿萃取液並避光保存，另一水層再以乙酸乙酯、正丁醇分別重複上述之步驟，此階段共得到氯仿層萃取液、乙酸乙酯層萃取液、正丁醇層萃取液、與水層萃取液；而先前以水煮過的欖仁樹的葉子，再次烘乾，之後放入圓底燒瓶中，加入適量之甲醇於 70°C 水浴中迴流十二小時，萃取液趁熱過濾並保存之。重複迴流步驟共二次，並合併二次經過濾之萃取液，最後將上述之萃取液進行減壓濃縮，待去除有機溶劑則冷凍乾燥而存放於-20°C 冰櫃中以備分析用。

2. 細胞培養及處理

肺癌細胞株 A549 以 DMEM 培養基培養，加入適量 antibiotics 及 10% heat-inactivated FBS。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，即可裝一些到事先裝有新鮮培養液的 dish 中繼續進行培養。

3. 篩藥、MTT 分析：

將 A549 細胞株從 CO₂ 培養箱取出後，吸掉原有的培養液，用 PBS 沖洗 1 次再加 trypsin-EDTA 於 CO₂ 培養箱中反應 5 分鐘來打細胞，加新的培養液沖吸後，吸到 15ml 的離心管中進行離心，離心前先吸 100 入含細胞的培養液加到加 100 入 trypan blue (dye) 中，數細胞用要計算分裝到 24 well 的量，離心完成後，將上清液倒掉，加入新的培養液混合均勻，每個 well 加入 1c.c 放入 CO₂ 培養箱中生長。第二天將含 FBS 的 DMEM 分裝到 eppendorf 中，加入 1 入/ml 量的藥物，藥物要先 vortex，將 24well 中反應

24 小時。拿 15ml 離心管加入 9ml DMEM 和 1ml 的 MTT (DMEM : MTT = 9 : 1) , 將 24well 中的培養液吸掉加 400 μ l 含 MTT 的 DMEM 至 CO₂ 培養箱培養 4~5 個小時, 培養液吸掉後會留下藍紫色的結晶, 測吸光值時, 各 well 加入 1c.c 的異丙醇液體, 用 O.D565nm 開始測量。

4.細胞傷口癒合試驗 (Wound healing assay)

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 \times 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。

5.gelatin-zymography (gelatinase 活性測試)

首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片, 置於電泳槽中, 並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample(蛋白總量 20 μ g), 加入 4 μ l loading buffer, 將 sample loading 到電泳片中, 以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後, 將膠拆下, 加入 50 ml 的 washing buffer, 在室溫下洗 30 分鐘, 共兩次。倒掉 washing buffer 之後, 加入 50 ml 的 reaction buffer, 於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱下反應 12 個小時。將反應完後的 gel, 以 staining buffer 染色 30 min, 之後再以退色液退染觀看結果, 並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

6.casein-zymography (u-PA 及 t-PA 活性測試)

首先製備 10 % SDS-PAGE 電泳膠片, 並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 12 μ g/ml 的 plasminogen, 置於電泳槽中, 並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample (蛋白總量 20 μ g), 加入 4 μ l loading buffer, 將 sample loading 到電泳片中, 以 140V 進行電泳分離, 大約 3 小時之後, 將膠拆下, 加入 50 ml 的 washing buffer (2.5% Triton X-100 in d H₂O), 在室溫下洗 30 分鐘, 共兩次, 倒掉 washing buffer 之後, 加入 50 ml 的 reaction buffer(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM CaCl₂, 0.01% NaN₃), 於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱下反應 12 個小時, 將反應完後的 gel, 以 staining buffer 染色 30 min, 之後再以退色液退染觀看結果, 並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

7.cell invasion 分析

將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 100 μ g/cm² Matrigel (0.5 mg/ml), 在 laminar flow 風乾 3~5 小時, 其後方法同前一項 cell migration 分析, 而培養細胞移動時間則延長為 20 小時。

8.cell migration 分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM，將細胞處理葉下珠 24 小時後，以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (1.5×10^4 cell/well - 2×10^4 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 8 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 400×顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 well，作移動細胞數之統計。

五、結果與討論

欖仁樹，學名 *Terminalia catappa*，使君子科欖仁樹屬，又稱枇杷樹、雨傘樹、龜仔樹，落葉性喬木，四季變化明顯。老株的樹根會形成板根；葉具短柄，叢生在枝端，倒卵形，先端圓，長約 20~25 公分；核果呈扁平橢圓形，長 5~6 公分，寬 4 公分，狀如橄欖，故有「欖仁樹」之名。長在樹上的綠色欖仁葉並無藥效，但自行掉落變紅的欖仁葉，用熱水煮過飲用或直接泡茶喝，一直被廣泛的流傳為預防肝癌及治療肝炎的民俗療法。經過多年的研究，欖仁葉所含的有效成分已確認分析，其中最主要的成分為 Punicalagin 及 punicalin，此兩種成分被發現具有很強的藥理作用，包括：預防及治療肝炎、殺死肝癌細胞、清除自由基、抗氧化、用於預防及治療皮膚發炎、抗細胞突變、降血糖活性。

因此，我們用欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)來探討對肺癌細胞株 A549 的轉移及侵襲作用，我們分別處理 TLME 的濃度為 0,10,30,50 $\mu\text{g/mL}$ ，並利用 MTT assay 發現這些濃度對 A549 為無毒劑量 (Fig-1)。我們利用傷口癒合實驗 (wound healing assay) 分析 TLME 對於 A549 的 migration 能力。我們發現 TLME 在不同劑量下對於 A549 的移動能力(migration)都有明顯的抑制，並且具有濃度效應(Fig-2)。接著我們用 gelatin-zymography 與 casein-zymography 的方法分析 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 的活性表現，結果發現 TLME 對於 A549 分泌具有細胞侵襲能力的 MMP-2、MMP-9 與 u-PA 抑制效果，並呈現濃度效應關係 (Fig-3；Fig-4)。再來我們利用不同濃度的 TLME 處理 A549 並分析其 invasion 的能力，我們發現在 24hr 的時候，不同劑量下的 TLME 對於 A549 的 invasion 能力都有抑制的效果並且具有濃度效應(Fig-5)。在細胞 motility assay 中發現 TLME 對於 A549 的 motility 能力也有抑制的效果同時具有濃度效應(Fig-6)。

因此，我們發現 TLME 是透過抑制 MMP-2 與 u-PA 的作用進而抑制肺癌細胞(A549)轉移和侵襲的能力，以達到抗癌的功效。基質金屬蛋白酶 (MMPs) 是一系列的家族性酵素，能參與蛋白的合成與分解並在維持細胞外基質(ECM)上扮演重要的角色。在正常的狀態下，MMPs 會參與血管之生成、組織重組等。當癌細胞進展時，利用基質金屬蛋白酶 (MMP) 作為武器，將周圍的正常組織破壞，同時進行增生，然後潛入正常組織中。

多種證據顯示出基質金屬蛋白酶在腫瘤細胞成長的許多階段中皆扮演關鍵性的角色，基質金屬蛋白酶可以促進腫瘤轉移和血管增生，甚至是腫瘤的發源。

六、參考文獻

1. Pinmai K, Chunlaratthanabhorn S, Ngamkitidechakul C, Soonthornchareon N, Hahnvajjanawong C. *World J Gastroenterol*. 2008 Mar 14;14(10):1491-7.
2. Chu SC, Yang SF, Liu SJ, Kuo WH, Chang YZ, Hsieh YS. *Food Chem Toxicol*. 2007 Jul;45(7):1194-201. Epub 2007 Jan 11.
3. Kuo PL, Hsu YL, Lin TC, Chang JK, Lin CC. *Anticancer Drugs*. 2005 Apr;16(4):409-15.
4. Ogata T, Teshima T, Inaoka M, Minami K, Tsuchiya T, Isono M, Furusawa Y, Matsuura N. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2011 Feb 19. [Epub ahead of print]
5. Halim H, Chunhacha P, Suwanborirux K, Chanvorachote P. *Anticancer Res*. 2011 Jan;31(1):193-201.
6. Wong DW, Leung EL, Wong SK, Tin VP, Sihoe AD, Cheng LC, Au JS, Chung LP, Wong MP. *Cancer*. 2011 Jan 10. [Epub ahead of print]
7. Shih YW, Chien ST, Chen PS, Lee JH, Wu SH, Yin LT. *Cell Biochem Biophys*. 2010 Sep;58(1):31-44.
8. Takino J, Yamagishi S, Takeuchi M. *J Oncol*. 2010;2010:739852. Epub 2010 Jun 29.
9. Zhou L, Zhang PH, Xu X, Xu N, Gao L, Bai CX, Zhang X. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009 Sep 15;89(34):2424-8. Chinese.
10. Akino Y, Teshima T, Kihara A, Kodera-Suzumoto Y, Inaoka M, Higashiyama S, Furusawa Y, Matsuura N. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Oct 1;75(2):475-81.
11. Chen JH, Lin HH, Chiang TA, Hsu JD, Ho HH, Lee YC, Wang CJ. *Toxicol Sci*. 2008 Dec;106(2):364-75. Epub 2008 Sep 16.

12. Chen JH, Lin HH, Chiang TA, Hsu JD, Ho HH, Lee YC, Wang CJ. Toxicol Sci. 2008 Dec;106(2):364-75. Epub 2008 Sep 16.

七、圖表

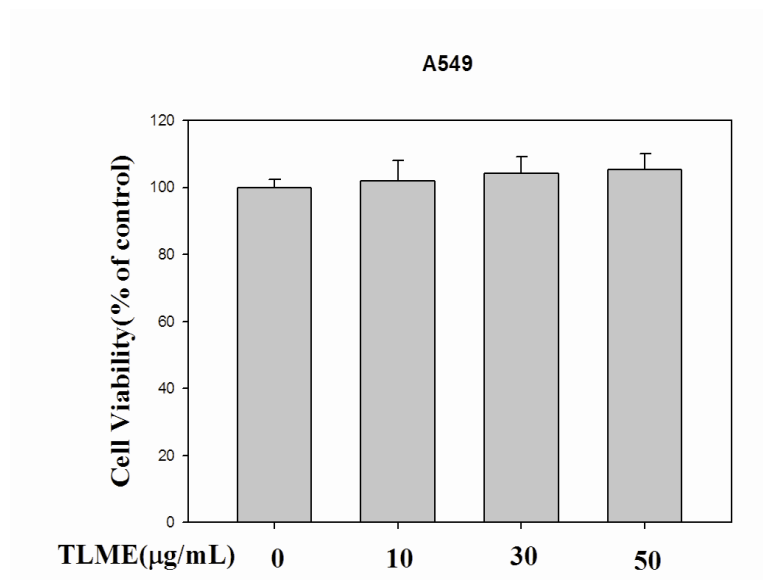


Fig-1. A549 細胞處理欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 24hr 其細胞存活率分析。以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃(TLME)，其 24hr 細胞存活率分析，並且量化製成柱狀圖。

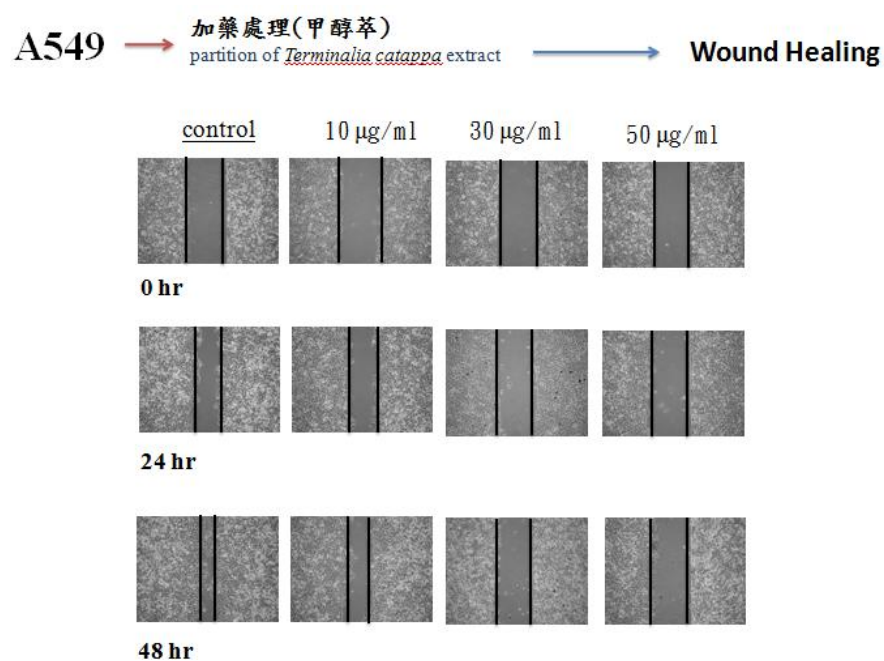


Fig-2. A549 細胞處理欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 其 wound healing 移動能力之分析。

以 wound healing assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME)，其 24hr 後 cell migration 的表現情形。

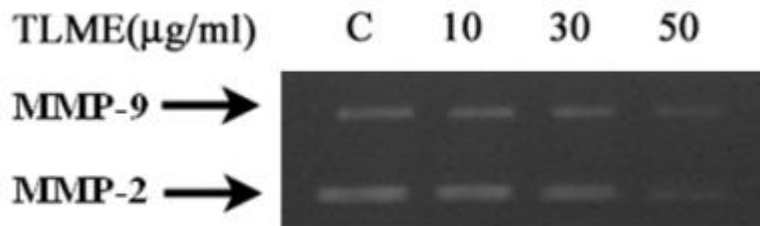
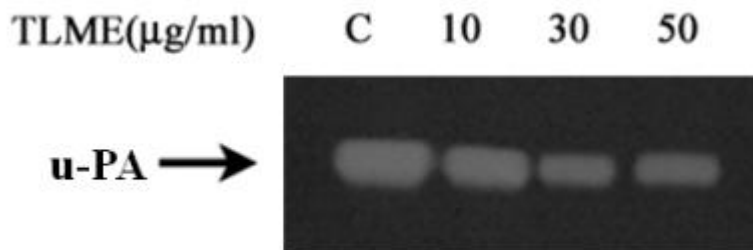


Fig-3. A549 細胞處理不同劑量欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 於培養液 24hr 後 MMP-2 和 MMP-9 蛋白活性分析。

以 zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 於培養液 24hr 後 MMP-2 和 MMP-9 蛋白活性表現情形。

Fig-4. A549 細胞處理不同劑量欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 於培養液 24hr 後 u-PA 蛋白活性分析。



以 zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME)，在培養液培養 24hr 後 u-PA 蛋白活性表現情形。

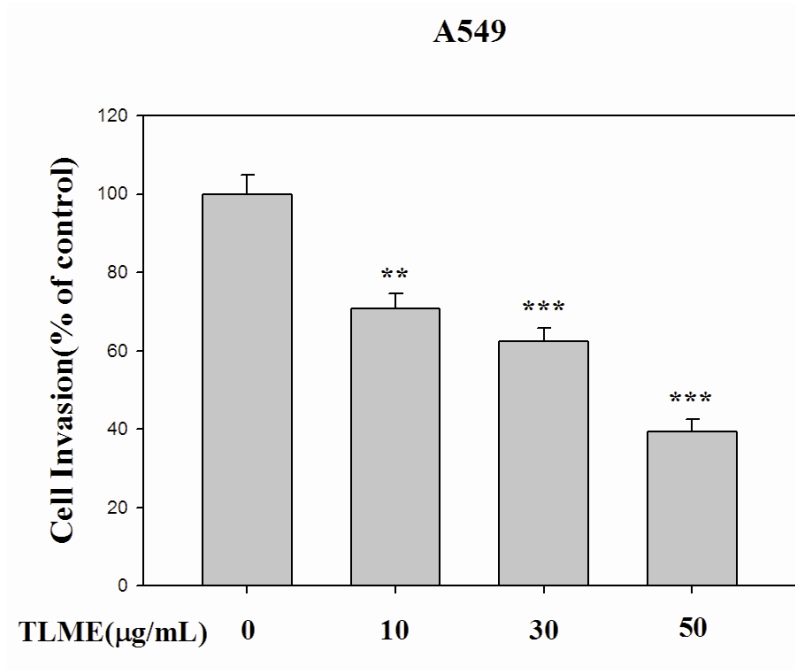


Fig-5. A549 細胞處理欖仁樹的葉之甲醇萃 (TLME) 其 invasion 之能力分析。以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 TLME，24hr 後 cell invasion 能力表現情形，並且量化製成柱狀圖。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

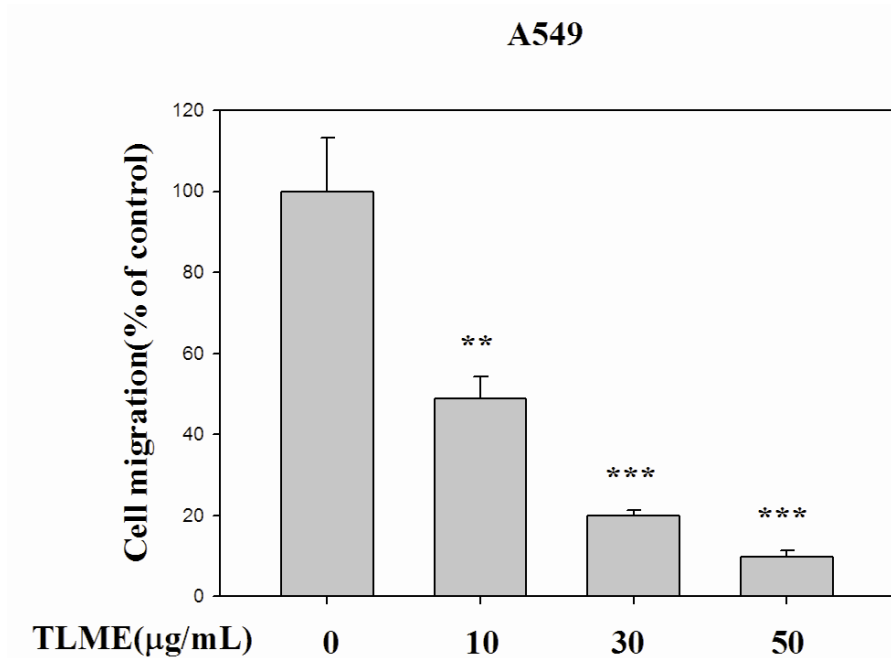


Fig-6. A549 細胞處理不同劑量欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME) 其 motility 能力之分析。以 motility assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的欖仁樹葉之甲醇萃 (TLME)，

其 24hr 後 cell motility 能力表現情形，並量化製成柱狀圖。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;
*** $p < 0.001$.