

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 : 紅茶萃取物抑制癌細胞轉移與調控細胞骨架蛋白表現 \*  
\* 名 稱 : 之研究分析 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 蔡洧宣  
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-047-B  
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月  
指導教授： 謝易修

處理方式： 本計畫可公開查詢

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 99年03月23日

# 紅茶萃取物抑制癌細胞轉移與調控細胞骨架蛋白表現之研究分析

計畫編號：98 - 2815 - C - 040 - 047 - B

計劃主持人：謝易修 中山醫學大學

## 一、中文摘要

根據衛生署公佈之台灣十大死亡原因顯示癌症仍為十大死因之首，居高不下，如何治療癌症病人，尋找更有效的抗癌藥物，是一個迫切的問題。目前有許多文獻指出，癌細胞與正常細胞差別在於無法進行一般細胞凋亡、具有異常的增生能力與高度轉移能力。而癌細胞的轉移往往是造成癌症病人病灶復發致死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、細胞外基質的降解及細胞侵襲能力的改變。長期以來，天然化合物被應用於傳統醫學及民俗療法中的各種治療，已有多種天然物，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。而紅茶為一種市面上經常可見的一種飲品，也是被大家普遍接受的一種茶類，因此，在本實驗中，我們利用紅茶之萃取物(black tea extract; BTE) 觀察其抑制口腔癌細胞株(SCC-9)轉移之功效。我們利用 cell motility/invasion assay 分析 BTE 對具有高度轉移能力舌癌細胞株(SCC-9) 侵入能力之影響。我們發現 BTE 對 SCC-9 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 BTE 的濃度為 10 $\mu$ g/mL 時，經 24 hr 處理對 SCC-9 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 BTE 對 MMP-2 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 BTE 可能是透過抑制 SCC-9 細胞株 MMP-2 與 u-PA 的分泌進而抑制癌細胞侵犯作用能力。此外，細胞基質貼附實驗中，BTE 也有顯著的抑制效果，此外 BTE 也可顯著抑制由 PMA 所誘導的細胞侵襲能力以及蛋白酶(MMP-9)的分泌。

**關鍵詞：**u-PA、MMP-2、migration、invasion

## 二、材料與方法

### 1. 西方點墨法(western blot) (1)

首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 $\mu$ l sample (蛋白總量 20 $\mu$ g)，加入 4 $\mu$ l loading buffer，將 sample denature (95 $^{\circ}$ C，10 min) 之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下後進行蛋白轉移，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 transfer holder，於 4 $^{\circ}$ C 下，以 100V 進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4 $^{\circ}$ C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS+0.05% Tween 20) 清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清

洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應(或以 ECL 冷光系統紀錄)，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應並晾乾，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

## 2. 細胞培養

SCC-9 口腔癌鱗狀上皮細胞培養在含有 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。

## 3. Gelatin zymography (3)

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 5X 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 CaCl<sub>2</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 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，再以退色液退染後觀看結果。

## 4. Casein zymography (4)

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 5X 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，再以退色液退染後觀看結果

## 5. Cell-matrix adhesion 分析(5)

首先以 type IV collagen (或 gelatin) coating 24well 培養皿整夜，並以含有 2% FBS 的 PBS block 住非專一性的結合 2 小時，再將處理過洛神花花青素及桑椹花青素的 A549 細胞以 trypsin 打下，subculture 至 24well 的培養皿中，30 分鐘後以 PBS 沖洗掉未貼附的細胞，以 0.1% crystal violet 染色，將細胞溶於 0.2% Triton X-100，於 O.D.550nm 下測量吸附細胞的比例。

## 6. 細胞移動性分析 (Motility) (6)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將細胞處理洛神花花青素及桑椹花青素後，SCC-9 細胞 subculture 並計算細胞數，然後注入固定量的細胞 ( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ ) 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。

## 7. 細胞侵入性分析 (Invasion) (6)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，將 cellulose nitrate filters coating 上  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  type IV collagen，在 Laminar flow 風乾 5 整夜，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將 SCC-9 細胞處理過洛神花花青素及桑椹花青素後，subculture 並計算細胞數，然後注入固定量的細胞 ( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ ) 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。

## 8.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。

## 三、結果與討論

目前為止已有很多文獻及臨床數據指出，茶葉中所含的多酚類化合物(polyphenol) 可以對許多癌症有很好的抑制效果，而除了多酚類化合物本身有很強的抗氧化(anti-oxidant)及清除自由基效果之外，也可以減少經由自由基所引發的細胞 DNA 傷害(DNA damage)，進一步預防癌化(carcinogenesis)的可能性，此外這些天然化合物也可以抑制癌細胞的增生(proliferation)作用或是癌組織中的血管新生作用(angiogenesis)。因此，我們利用紅茶萃取物(BTE)來探討對口腔癌細胞株 SCC-9 的遷移和侵犯作用及分子機制。我們處理細胞 BTE 的濃度為 0-20  $\mu\text{g/mL}$ ，並利用 MTT assay 發現這些濃度對 SCC-9 為無毒劑量 (Fig-1)。並且我們利用正常的口腔纖維母細胞細胞，利用 MTT assay，證實其對於正常細胞也沒有毒性(Fig-2)。接著我們利用這些濃度處理 SCC-9 並分析其 invasion 的能力，我們發現在 24hr 時，BTE 對於 SCC-9 的 invasion 能力都有抑制的效果並且具有濃度效應(Fig-3)。在細胞 motility assay 中發現 BTE 對於 SCC-9 的 motility 能力也有抑制的效果同時具有濃度效應(Fig-4)。

而 BTE 抑制 SCC-9 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 與 u-PA 的活性表現，結果發現 BTE 對於 SCC-9 所分泌的 MMP-2 與 u-PA 有明顯的抑制作用，並且具有濃度效應(Fig-5& Fig-6)。利用 PMA 去誘導癌細胞惡化，發現 BTE 可有效抑制由 PMA 所誘導細胞侵襲能力(Fig-7)以及蛋白酶 MMP-9 (Fig-8)與 u-PA(Fig-9)的分泌。

最後我們利用傷口癒合實驗(wound healing assay)及貼附能力實驗(cell-matrix adhesion assay)分析 BTE 對於 SCC-9 的 migration 能力及 cell 與 matrix 之間的 adhesion 能力。我們發現 BTE 對於 SCC-9 的移動能力(migration)都有明顯的抑制，並且具有濃度效應(Fig-10)。而在對於 SCC-9 的 adhesion 能力亦有相同的抑制情形(Fig-11)。

因此，我們發現 BTE 是透過抑制 MMP-2 與 u-PA 的作用進而抑制 BTE 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質無法被順利分解，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(16-35)。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

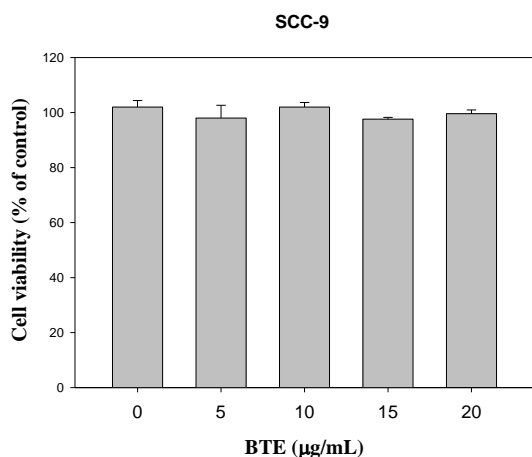
1. Chiang, W.L., Chu, S.C., Lai, J.C., Yang S.F., Chiou, H.L. and Hsieh, Y.S. Alternations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic

- anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency individuals. *Clinica Chimica Acta* 2001; 314:195-201.
2. Yang LL, Chang C C, Chen LG, Wang CC, Antitumor principle constituents of *Myrica rubra* Var. acuminata, *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51;2974-2979.
  3. Schleaf 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
  4. 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.
  5. Olaso E, Labrador JP, Wang L. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.* (2002) 277;3606-3613.
  6. 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.
  7. Augustin, K., Blank, R., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Wolffram, S., and Rimbach, G. (2008): Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**, 705-11.
  8. Boehm, K., Borrelli, F., Ernst, E., Habacher, G., Hung, S. K., Milazzo, S., and Horneber, M. (2009): Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005004.
  9. Inoue, M., Kurahashi, N., Iwasaki, M., Shimazu, T., Tanaka, Y., Mizokami, M., and Tsugane, S. (2009a): Effect of coffee and green tea consumption on the risk of liver cancer: cohort analysis by hepatitis virus infection status. *Cancer Epidemiol 10. Biomarkers Prev* **18**, 1746-53.
  10. Inoue, M., Sasazuki, S., Wakai, K., Suzuki, T., Matsuo, K., Shimazu, T., Tsuji, I., Tanaka, K., Mizoue, T., Nagata, C., 11. Tamakoshi, A., Sawada, N., and Tsugane, S. (2009b): Green tea consumption and gastric cancer in Japanese: a pooled analysis of six cohort studies. *Gut* **58**, 1323-32.
  11. Juskiewicz, J., Zdunczyk, Z., Jurgonski, A., Brzuzan, L., Godycka-Klos, I., and Zary-Sikorska, E. (2008): Extract of green tea leaves partially attenuates streptozotocin-induced changes in antioxidant status and gastrointestinal functioning in rats. *Nutr Res* **28**, 343-9.
  12. Koutelidakis, A. E., Argiri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., and Kapsokefalou, M. (2009): Green tea, white tea, and Pelargonium purpureum increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* **25**, 453-8.
  13. Milligan, S. A., Burke, P., Coleman, D. T., Bigelow, R. L., Steffan, J. J., Carroll, J. L., Williams, B. J., and Cardelli, J. A. (2009): The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of c-Met and epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* **15**, 4885-94.
  14. Molan, A. L., De, S., and Meagher, L. (2008): Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins. *Int J Food Sci Nutr*, 1-10.
  15. Pandey, M., and Gupta, S. (2009): Green tea and prostate cancer: from bench to clinic. *Front Biosci (Elite Ed)* **1**, 13-25.
  16. Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappa B and sensitizes

- human prostate carcinoma DU145 cells to TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:1759-67.
17. Bu W, Tang ZY, Sun FX, Ye SL, Liu KD, Xue Q, Chen J, Gao DM. Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. *Hepatogastroenterology*. 1998; 45:1056-1061.
  18. Emenaker NJ, Basson MD. Short chain fatty acids inhibit human (SW1116) colon cancer cell invasion by reducing urokinase plasminogen activator activity and stimulating TIMP-1 and TIMP-2 activities, rather than via MMP modulation. *J Surg Res*. 1998; 76:41-46.
  19. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH. Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 1998; 18:1435-1439.
  20. Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, Mundy GR. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest*. 1997; 99:2509-2517.
  21. Shou Y, Hirano T, Gong Y, Kato Y, Yoshida K, Ohira T, Ikeda N, Konaka C, Ebihara Y, Zhao F, Kato H. Influence of angiogenetic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2001; 85:1706-1712.
  22. Wollina U, Hipler UC, Knoll B, Graefe T, Kaatz M, Kirsch K. Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001; 127:631-635.
  23. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2001; 189:197-206.
  24. Okada N, Ishida H, Murata N, Hashimoto D, Seyama Y, Kubota S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver metastasis in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 288:212-216.
  25. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J*. 2001; 20:4782-4793.
  26. Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Spathe K, Harting K, Fenn A, Berger U, Fridman R, Schmitt M, Prechtel D, Kuhn W. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2001; 82:291-298.
  27. Ghilardi G, Biondi ML, Mangoni J, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:2344-2346.
  28. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2001; 85:383-392.
  29. Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, Palmer KC, Bright RC, Fridman R. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer*. 2001; 93:507-515.
  30. Lynch CC, McDonnell S. The role of matrilysin (MMP-7) in leukaemia cell invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18:401-406.
  31. Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz

- M, Stallmach A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis.* 2001; 16;133-140.
32. Yonemura Y, Endo Y, Takino T, Sakamoto K, Bandou E, Kinoshita K, Fushida S, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2000;25: 18321-18327.
  33. Theret N, Musso O, Turlin B, Lotrian D, Bioulac-Sage P, Campion JP, Boudjema K, Clement B. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 2001; 34:82-88.
  34. Papatoma AS, Zoumpourlis V, Balmain A, Pintzas A. Role of matrix metalloproteinase-9 in progression of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2001; 31:74-82.
  35. Canning MT, Postovit LM, Clarke SH, Graham CH. Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp Cell Res.* 2001; 267:88-94

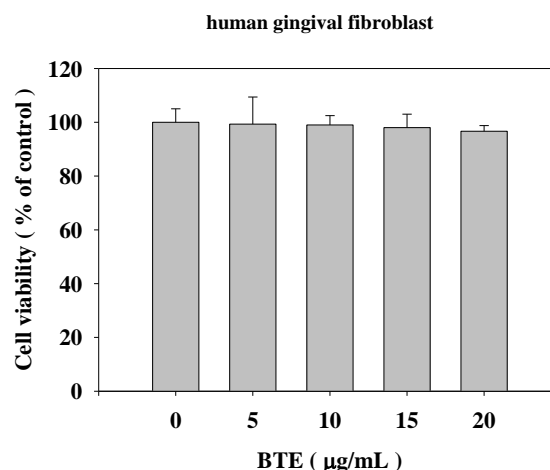
## 五、圖表



**Fig-1. SCC-9 細胞處理 BTE 24hr 其細胞存活率分析。**

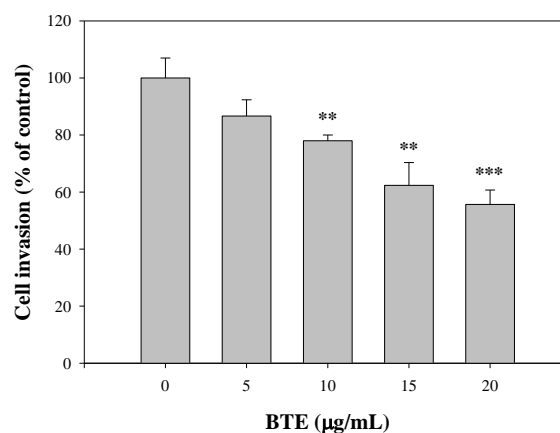
以 MTT assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr 細胞存活率分析，並

量化製成柱狀圖。



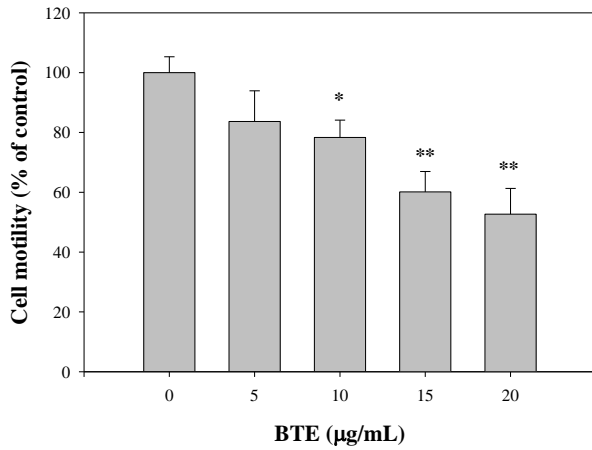
**Fig-2. 正常口腔纖維母細胞細胞處理 BTE 24hr 其細胞存活率分析。**

以 MTT assay 分析 human gingival fibroblast 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成柱狀圖。



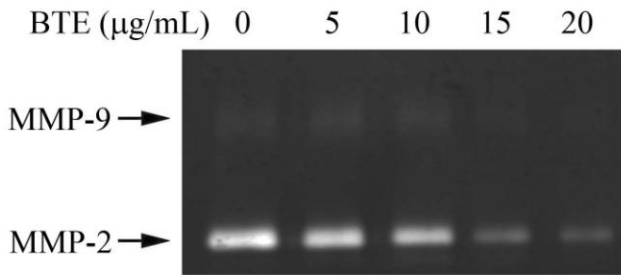
**Fig-3. SCC-9 細胞處理 BTE 其 invasion 能力之分析。**

以 invasion assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr 後 cell invasion 能力表現情形，並量化製成柱狀圖。\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



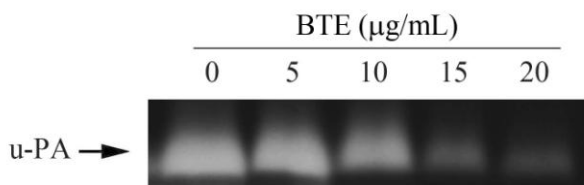
**Fig-4. SCC-9 細胞處理 BTE 其 motility 能力之分析。**

以 motility assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，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.



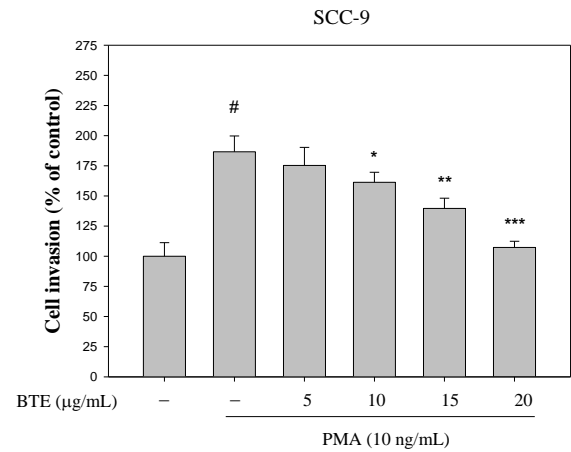
**Fig-5. SCC-9 細胞處理 BTE 24hr media 中 MMP-2 蛋白活性分析。**

以 zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr media 中 MMP-2 蛋白活性表現情形。



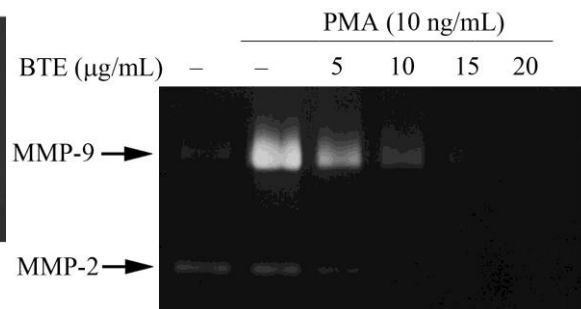
**Fig-6. SCC-9 細胞處理 BTE 24hr media 中 u-PA 蛋白活性分析。**

以 zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr media 中 u-PA 蛋白活性表現情形。



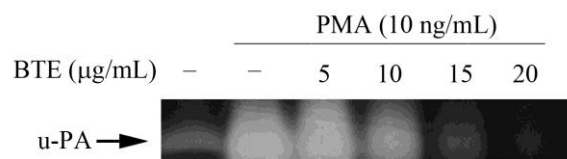
**Fig-7. BTE 保護 SCC-9 細胞經 PMA 刺激誘導細胞侵襲能力之分析。**

以 invasion assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，其抑制 1hr 後再以 10 ng/mL PMA 誘導細胞侵襲能力 cell invasion 能力表現情形，並量化製成柱狀圖。\* p<0.05; \*\* p<0.01.



**Fig-8. BTE 保護 SCC-9 細胞經 PMA 刺激誘導 MMP-9 表現之分析。**

以 gelatin zymography assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，其抑制 1hr 後再以 10 ng/mL PMA 誘導細胞 MMP-9 表現增加能力表現情形。

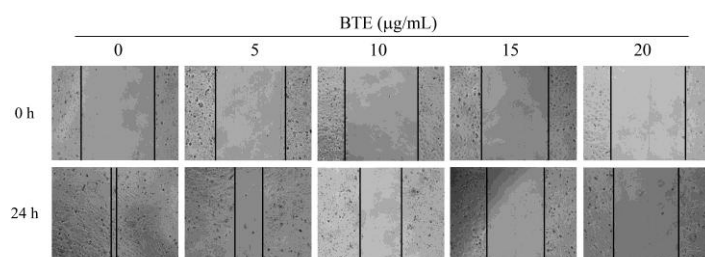


**Fig-9. BTE 保護 SCC-9 細胞經 PMA 刺激誘導 u-PA 表現之分析。**

以 casein zymography assay 分析 SCC-9 細胞

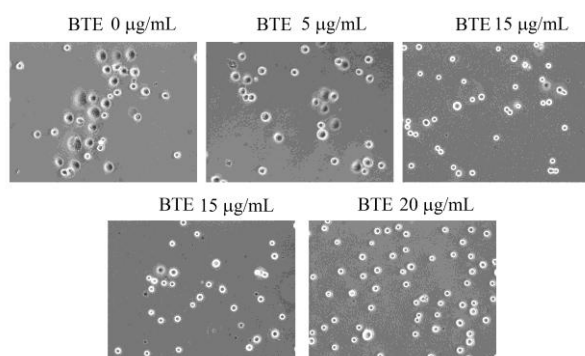


處理不同劑量的 BTE，其抑制 1hr 後再以 10 ng/mL PMA 誘導細胞 u-PA 表現增加能力表現情形。



**Fig-10. SCC-9 細胞處理 BTE 其 migration 能力之分析。**

以 wound healing assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr 後 cell migration 能力表現情形。



**Fig-11. SCC-9 細胞處理 BTE 其細胞貼附能力之分析。**

以 cell-matrix adhesion assay 分析 SCC-9 細胞處理不同劑量的 BTE，其 24hr 後 cell-matrix 之間 adhesion 能力表現情形。