

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移、血管新生之  
機制探討(第2年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2314-B-040-006-MY2  
執行期間：103年08月01日至104年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：呂克修  
共同主持人：謝易修  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：廖翊翔  
碩士班研究生-兼任助理人員：陳映愉  
博士班研究生-兼任助理人員：林敬尹  
博士班研究生-兼任助理人員：蘇俊文  
博士後研究：楊嘉欣

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 08 月 03 日

中文摘要：骨肉瘤 Osteosarcoma (OS)，是原發性骨瘤中最常見，惡性程度最高的骨腫瘤，常見於膝關節，這是因為膝關節附近的生長板成長得最快，且病情進展迅速容易發生肺轉移及肝轉移，是導致病人死亡的主要原因。類黃酮之 C-3 位置上有羥基 (hydroxy; OH) 者稱之為黃酮醇，3-hydroxyflavone 為黃酮醇的結構骨架，已有報告指出可抑制乳癌、前列腺癌細胞和大腸癌細胞的增生，對於人類骨肉瘤細胞亦有所抑制作用。本實驗研究 3-hydroxyflavone 是否能抑制人類骨肉瘤細胞 143B 的侵襲與轉移，以免疫缺陷小鼠 (BALB/cAnN.CgFoxnlnu/Cr1Narl) 進行動物實驗，觀察注射癌細胞後，老鼠體重變化、體表腫瘤生長、腫瘤組織大小，再利用活體影像分析系統 (IVIS) 進一步觀察腫瘤在活體內的生長狀況及癌轉移，比較管餵 3-hydroxyflavone 的實驗組與未餵食的控制組，結果發現 3-hydroxyflavone 具有抑制骨肉瘤大小，但是針對癌轉移觀察並沒有產生癌細胞的轉移現象。再利用 143B 細胞探討 3-hydroxyflavone 是否會抑制細胞的侵襲及轉移，分別以 MTT assays、modified Boyden chamber assay、zymography assay 及細胞傷口癒合分析，發現 3-hydroxyflavone 無細胞毒性，可以降低骨癌細胞中 MMP-2 的表現，對細胞的移動與侵襲能力具有抑制的作用。由以上實驗結果推測在人類骨肉瘤細胞的侵襲能力上，3-hydroxyflavone 可能具備抑制效果，但仍需進一步進行長期動物實驗追蹤與蛋白分析，取得更有利證據以期應用到臨床治療。

中文關鍵詞：骨癌、類黃酮、侵襲、轉移、基質金屬蛋白酶

英文摘要：Osteosarcoma (OS) is the most common primary osteoma with the highest level of malignancy. It frequently occurs at knees because knees contain growth plates with the fastest growing rate. The disease progresses rapidly and which make lung and liver metastases occur easily, which are the main causes of death. The flavonoid with a hydroxyl group (OH) on its C-3 position is called flavonol. 3-hydroxyflavone is the structural skeleton for flavonol which has been reported not only to inhibit cell proliferation in breast cancer, prostate cancer and colon cancer, but also have the effect on the inhibition for human osteosarcoma cells. The study has been designed to investigate 3-hydroxyflavone if it may inhibit the invasion and metastasis of 143B human osteosarcoma

cells. First, after injection of cancer cells into immunodeficient mice (BALB/cAnN.CgFoxnlnu/ Cr1Nar1), the change of body weight in mice, the tumor growth of body surface, and tumor size were observed. Second, for comparing the experimental group fed with 3-hydroxyflavone (tube feeding) to the unfed control group, in vivo tumor growth and cancer metastasis were observed further by in vivo image analysis system (IVIS). These results have showed that 3-hydroxyflavone could inhibit the tumor size of osteosarcoma, However, no metastasis occurred during the observation of metastasis for cancer cells. Further using 143B cells to explore if 3-hydroxyflavone may inhibit cell invasion and metastasis by MTT assays, modified Boyden chamber assay, zymography assay and cell wound healing assay, which have found that 3-hydroxyflavone is not cytotoxicity, is able to reduce the expression level of MMP-2 in bone cancer cells, and has the effect of inhibition on the abilities of cell mobility and invasion. Based on these experimental results above, which have suggested that 3-hydroxyflavone may have the inhibitory effect on the invasion ability of human osteosarcoma cells, however, further long-term follow-up in animal studies and protein analysis have to be performed in order to obtain more favorable evidences for application of clinical therapy.

英文關鍵詞： Osteosarcoma , flavonoid, invasion, metastasis, MMP

行政院科技部補助專題研究計畫

期中進度報告

期末報告

黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移、血管新生之機制探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2314-B-040 -006 -MY2

執行期間： 102年 8月 1日至104年 7月 31日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學系

計畫主持人：呂克修 中山醫學大學 醫學系

計畫參與人員：謝易修中山醫學大學 生化所

林敬尹中山醫學大學 生化所

廖翊翔 山醫學大學 生化所

蘇俊文 山醫學大學 醫研所

陳映愉 山醫學大學 口腔所

楊嘉欣山醫學大學 醫研所

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後

可公開查詢

中 華 民 國 104年 8月 3日

## 中英文摘要

### (一) 計畫中文摘要

骨肉瘤 Osteosarcoma (OS)，是原發性骨瘤中最常見，惡性程度最高的骨腫瘤，常見於膝關節，這是因為膝關節附近的生長板成長得最快，且病情進展迅速容易發生肺轉移及肝轉移，是導致病人死亡的主要原因。類黃酮之 C-3 位置上有羥基 (hydroxy; OH) 者稱之為黃酮醇，3-hydroxyflavone 為黃酮醇的結構骨架，已有報告指出可抑制乳癌、前列腺癌細胞和大腸癌細胞的增生，對於人類骨肉瘤細胞亦有所抑制作用。本實驗研究 3-hydroxyflavone 是否能抑制人類骨肉瘤細胞 143B 的侵襲與轉移，以免疫缺陷小鼠(BALB/cAnN.CgFoxnl<sup>tmu</sup>/CrINarl)進行動物實驗，觀察注射癌細胞後，老鼠體重變化、體表腫瘤生長、腫瘤組織大小，再利用活體影像分析系統 (IVIS)進一步觀察腫瘤在活體內的生長狀況及癌轉移，比較管餵 3-hydroxyflavone 的實驗組與未餵食的控制組，結果發現 3-hydroxyflavone 具有抑制骨肉瘤大小，但是針對癌轉移觀察並沒有產生癌細胞的轉移現象。再利用 143B 細胞探討 3-hydroxyflavone 是否會抑制細胞的侵襲及轉移，分別以 MTT assays、modified Boyden chamber assay、zymography assay 及細胞傷口癒合分析，發現 3-hydroxyflavone 無細胞毒性，可以降低骨癌細胞中 MMP-2 的表現，對細胞的移動與侵襲能力具有抑制的作用。由以上實驗結果推測在人類骨肉瘤細胞的侵襲能力上，3-hydroxyflavone 可能具備抑制效果，但仍需進一步進行長期動物實驗追蹤與蛋白分析，取得更有利證據以期應用到臨床治療。

中文關鍵詞：骨癌、類黃酮、侵襲、轉移、基質金屬蛋白酶

## **Abstract**

Osteosarcoma (OS) is the most common primary osteoma with the highest level of malignancy. It frequently occurs at knees because knees contain growth plates with the fastest growing rate. The disease progresses rapidly and which make lung and liver metastases occur easily, which are the main causes of death. The flavonoid with a hydroxyl group (OH) on its C-3 position is called flavonol. 3-hydroxyflavone is the structural skeleton for flavonol which has been reported not only to inhibit cell proliferation in breast cancer, prostate cancer and colon cancer, but also have the effect on the inhibition for human osteosarcoma cells. The study has been designed to investigate 3-hydroxyflavone if it may inhibit the invasion and metastasis of 143B human osteosarcoma cells. First, after injection of cancer cells into immunodeficient mice (BALB/cAnN.CgFoxnl<sup>tmw</sup>/CrINarl), the change of body weight in mice, the tumor growth of body surface, and tumor size were observed. Second, for comparing the experimental group fed with 3-hydroxyflavone (tube feeding) to the unfed control group, *in vivo* tumor growth and cancer metastasis were observed further by *in vivo* image analysis system (IVIS). These results have showed that 3-hydroxyflavone could inhibit the tumor size of osteosarcoma, However, no metastasis occurred during the observation of metastasis for cancer cells. Further using 143B cells to explore if 3-hydroxyflavone may inhibit cell invasion and metastasis by MTT assays, modified Boyden chamber assay, zymography assay and cell wound healing assay, which have found that 3-hydroxyflavone is no cytotoxicity, is able to reduce the expression level of MMP-2 in bone cancer cells, and has the effect of inhibition on the abilities of cell mobility and invasion. Based on these experimental results above, which have suggested that 3-hydroxyflavone may have the inhibitory effect on the invasion ability of human osteosarcoma cells, however, further long-term follow-up in animal studies and protein analysis have to be performed in order to obtain more favorable evidences for application of clinical therapy.

**Keywords:** Osteosarcoma , flavonoid, invasion, metastasis, MMP

## 報告內容

### (A). 惡性骨腫瘤細胞的侵襲及轉移

惡性腫瘤細胞的擴散轉移(metastasis)往往是癌症病人在臨床治療上預後的一個重要指標；在癌症的分期上，惡性腫瘤細胞的擴散轉移與否也是一個重要的分界。當惡性腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部癌；若惡性腫瘤細胞尚未破壞基底膜(basement membrane)穿出，稱為原位癌(carcinoma in situ)。如果能在此階段進行治療，則治癒率最高。當惡性腫瘤細胞藉由血管、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[1]。大部分的原發性的病灶可以由外科手術及其他治療方式將其完全移除，但是轉移性癌因已轉移至身體各處，進而造成治療上的困難。

早在 1970 年代之前，肢體骨癌(osteogenic sarcoma、osteosarcoma)的治療只有截肢且預後悲慘；一半的病人死於診斷後一年之內，2 年的存活率也只有 25% 左右，活超過 5 年的更少於 20% [2]；這是由於治療時多已有顯微轉移(micrometastasis)，所以腫瘤很快再復發造成病人死亡；幸運地近 20 年來有效的輔助化學療法，使骨癌的預後顯著改善；如今 2/3 的骨癌病人，可以預期達到長期的存活(long-term survival)[3,4]，但仍舊無法完全控制，甚至於發現時已經 80% (或許有些無法偵測到) 有肺部轉移(pulmonary metastasis)[5]。

一般而言，惡性腫瘤細胞的擴散轉移必須伴隨著細胞生理狀態的改變，其中包含了【一】細胞移動(migration)和侵襲(invasion)能力的增加；【二】細胞與細胞間相互作用力的破壞；【三】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間貼附能力(adhesion)的增加；以及【四】細胞外基質的分解。而惡性腫瘤細胞的擴散轉移是由惡性腫瘤細胞穿過細胞外基質開始，緊接著侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管的新生成(angiogenesis)，惡性腫瘤奪取正常組織器官的養分，而使惡性腫瘤細

胞大量增生(proliferation)，造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。

而惡性腫瘤細胞在擴散轉移的過程中，可分為侵襲(invasion)及轉移(metastasis)兩個階段，其中惡性腫瘤細胞破壞基底膜後侵入周圍組織，便稱之為侵襲；而惡性腫瘤細胞藉由侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動至遠處的器官組織，便稱之為轉移。當正常細胞轉變成惡性腫瘤細胞時，需要特殊的訊息傳導使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發惡性腫瘤細胞組織周圍血管增生，以供應足夠的養分，另外也提升惡性腫瘤細胞對周圍組織的侵襲和轉移能力[6]。

事實上，造成惡性腫瘤細胞轉移的機轉並不是很清楚，可能導因於某些基因的突變造成功能失調，如：Myc、Ras 及 p53 等。當 Myc 基因突變時會造成惡性腫瘤細胞具有抗凋亡的能力，這主要是因為 Myc 誘發 Bcl-XL 蛋白質的表現[7]。而 Ras 的突變在很多研究證實與惡性腫瘤細胞轉移有關，其可能原因為 Ras- mitogen-activated protein kinases (MAPK) 訊息持續被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2(MMP-2)的大量表現，促使惡性腫瘤細胞分解基底膜造成局部的侵襲和遠處的轉移[8-10]。

## **(B) 細胞外基質的相關蛋白**

惡性腫瘤細胞會產生細胞外基質分解酵素，包括有 serine proteinase、matrix metalloproteinases (MMPs)、cathepsins、plasminogen activator (PA)，其中 MMP-2、MMP-9 及 urokinase-type PA (u-PA)在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移能力最有關。惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，在癌症等級增加時某些 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，現已證實是用來作局部侵襲和遠處轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管或淋巴管滲入組織而達轉移之目的[11-18]。

Matrix metalloproteinases (MMPs)為一群含鋅之蛋白分解酵素，依其作用之受質特性及作用方式，共可分為五大類，分別是 collagenases，



gelatinases, stromelysins, matrilysins 和 membrane type-metalloproteinases (MT-MMPs), 分別參與 ECM 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, 需經過蛋白分解酵素, 如 PA 轉換成活化態之後才具有酵素活性; 另外, 許多證據顯示這些活化後 MMPs 可受內生性組織抑制劑(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)調節而改變其活性, 也就是說 MMPs 與 TIMPs 之間 imbalance 為決定 ECM 分解或堆積的, 甚至惡性腫瘤細胞貼附、移動、侵襲和轉移的主要因素[19-30]。

類黃酮是屬於天然多酚類(polyphenol)並廣泛存在於日常生活蔬果之中, 主要存在於柑橘類植物(citrus)、豆類(soy bean)、蔬菜及藥草類植物之中。在傳統療法中, 常被用作抗發炎藥物的成分。槲皮酮(queracetin)、山茶酚(kaempferol)、芸香醇(rutin)、芹菜素(apigenin)等都是常見的類黃酮。其中已有不少成員被認為擁有各種顯著的生物活性, 包括: 抗過敏(antiallergic)、抗發炎(anti-inflammatory)、抗氧化(antioxidant)、抗突變(antimutagenic)、抗致癌化(anticarcinogenic)以及調節酵素活性(enzyme modulation)等[31]。其中較廣為人知的是槲皮酮(queracetin)及芸香醇(rutin), 這兩種類黃酮能有效強化毛細血管, 並調節毛細血管的通透性, 有預防心血管疾病及腦中風的效用, 也能降低糖尿病性白內障及高血壓[32-36]。近來也有許多關於抑制癌化的研究, 而參與其中的主要分子機轉, 可分為:

【一】preventing carcinogen metabolic activation、【二】anti-proliferation、【三】cell cycle arrest、【四】induction of apoptosis、【五】promotion of differentiation、【六】antioxidative activity、【七】inhibition of angiogenic process、【八】modulation of multidrug resistance [37-48]。

類黃酮實際上是一個龐大的家族, 在化學結構上都具有由 15 個碳原子以 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>所構成的三個環狀構造(phenylbenzopyrone structure), 然而類黃酮的化學分類極為複雜, 其中包括: 黃酮(flavone)、黃烷酮(flavanone)、黃烷醇(flavanol)、異黃酮(isoflavone)、花青素(anthocyanidin)等[49]。黃酮化合

物(flavones)是類黃酮(flavonoids)的主要基本結構，在自然界中具有許多不同取代基的衍生物，其中以氫氧基(-OH)、甲基(-CH<sub>3</sub>)及醣苷基(-glycoside, -rutinoside)的取代最為常見，而黃酮由 15 個碳原子以 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>所構成的三個環狀構造具有十個可供取代的位置，其中常見的取代位置為 A 環上 3, 5, 7 號碳原子(R3, R5, R7)及 B 環上 3, 4, 5 號碳原子(R3', R4', R5')。在抗氧化的研究中，有文獻指出黃酮可有效抑制 LPS 或 LTA 所誘導之 NO 表現，且實驗結果顯示第 3 個碳原子(R3)上之氫氧基對抑制 NO 產生活性而言是很重要的，而且黃酮化合物結構上之氫氧基數目越多其抗氧化能力越強[50]。而在抑制癌症的研究方面，則是主要作用於抑制正常細胞的癌化，及抑制癌瘤細胞的增生，誘發細胞凋亡等作用。對於抑制癌瘤細胞轉移能力的研究則尚未明瞭。最近研究顯示，綠茶及大豆中類黃酮成分 EGCG (epigallocatechingallat)及 genistein 具有顯著的抑制癌瘤細胞轉移之能力 [65-70]。雖然黃酮化合物可抑制惡性腫瘤細胞生長能力，甚至高劑量時可促使惡性腫瘤細胞凋亡的作用已經相當明確。但在化學防癌作用之角色上，如低劑量下黃酮化合物可否影響 MMPs family、plasmin、u-PA、tissue-type PA(t-PA)或其抑制劑 TIMPs、PA inhibitors (PAIs)之表現，除了本實驗室近年來的相關研究之外，仍極少被研究。

## References

1. Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002;52:255-64.
2. Friedman MA, Carter SK. The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* 1972;4:482.
3. Raymond AK, Chawla SP, Carrasco CH, Ayala AG, Fanning CV, Grice B, Armen T, Plager C, Papadopoulos NE, Edeiken J. Osteosarcoma chemotherapy effect: a prognostic factor. *Semin Diagn Pathol* 1987;4:212-36.
4. Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, Applewhite A, Vlamis V, Rosen G. Chemotherapy for Non-metastatic Osteogenic Sarcoma: The Memorial Sloan-Kettering Experience. *J Clin Oncol* 1992;10:5-15.
5. Weis L. Common malignant bone tumors: osteosarcoma. In: Simon MA, Springfield D, editors. *Surgery for bone and soft tissue tumors*. Philadelphia, NY: Lippincott-Raven; 1997.
6. Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25:482-9.
7. Lin YH, Park ZY, Lin D, Brahmabhatt AA, Rio MC, Yates JR 3rd, Klemke RL. Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *J Cell*

Biol 2004;165:421-32.

8. Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, Hirai I, Tanino H, Kokawa Y, Naito Y, Okamura Y, Ota I, Tani N, Matsuura N. Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci* 2004;95:142-8.
9. Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997;32:175-253.
10. Tantivejkul K, Vucenik I, Shamsuddin AM. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: II. Effects on integrins and focal adhesions. *Anticancer Res* 2003;23:3681-9.
11. MacDougall JR, Matrisian LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:351-62.
12. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:128-37.
13. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002;21:2245-52.
14. Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis* 1997;17:221-39.
15. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-43.
16. Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50:71-87.
17. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-33.
18. Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int J Oncol* 1998;13:893-906.
19. Abecassis I, Olofsson B, Schmid M, Zalcman G, Karniguian A. RhoA. Induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Exp Cell Res* 2003;291:363-76.
20. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol* 2001;53:177-85.
21. Tester AM, Ruangpanit N, Anderson RL, Thompson EW. MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:553-60.
22. Ntayi C, Lorimier S, Berthier-Vergnes O, Hornebeck W, Bernard P. Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. *Exp Cell Res* 2001;270:110-8.
23. Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of

- metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 2001;276:3203-14.
24. Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 1998;58:3743-50.
  25. Ree AH, Bjornland K, Brunner N, Johansen HT, Pedersen KB, Aasen AO, Fodstad O. Regulation of tissue-degrading factors and in vitro invasiveness in progression of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:205-15.
  26. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75:246-53.
  27. Mitra A, Chakrabarti J, Chattopadhyay N, Chatterjee A. Membrane-associated MMP-2 in human cervical cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003;22:93-100.
  28. Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Sato H. Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res* 2003;63:3364-9.
  29. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albini A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol* 2003;163:753-62.
  30. Munshi HG, Wu YI, Ariztia EV, Stack MS. Calcium regulation of matrix metalloproteinase-mediated migration in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:41480-8.
  31. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003;23:519-34.
  32. Yamashiro S, Noguchi K, Matsuzaki T, Miyagi K, Nakasone J, Sakanashi M, Sakanashi M, Kukita I, Aniya Y, Sakanashi M. Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L and *Limonium wrightii*, Okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. *Pharmacology* 2003;67:128-35.
  33. Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R, Villar IC, Wangensteen R, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med* 2004;70:334-41.
  34. Gueguen-Duchesne M, Durand F, Le Goff MC, Genetet B. Effects of Troxerutin on the hemorheological parameters of patients with moderate arterial hypertension. *Prog Clin Biol Res* 1988;280:401-6.
  35. Hellerstein HK, Orbison JL, Rodbard S, Wilburne M, Katz LN. The effect of rutin in experimental malignant hypertension. *Am Heart J* 1951;42:271-83.
  36. Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 1998;36:617-21.
  37. Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 1998;36:617-21.

38. Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TT, Phang JM. Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:2379-84.
39. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A, Sumida T, Fukutani K, Tanaka T, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res* 1997;57:246-52.
40. Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, Mori H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res* 1996;56:4904-9.
41. Lin JK, Chen YC, Huang YT, Lin-Shiau SY. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 1997;28-9.
42. Weber G, Shen F, Prajda N, Yang H, Li W, Yeh A, Csokay B, Olah E, Look KY. Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv Enzyme Regul* 1997;37:35-55.
43. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 2001;19:837-44.
44. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1205-15.
45. Senderowicz AM. Flavopiridol. The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs* 1999;17:313-20.
46. Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999;38:28-34.
47. Fotsis T, Pepper MS, Montesano R, Aktas E, Breit S, Schweigerer L, Rasku S, Wahala K, Adlercreutz H. Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12:649-66.
48. Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP. Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol* 2001;59:1171-80.
49. Sarkar FH, Li Y. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 2003;21:744-57.
50. Blonska M, Czuba ZP, Krol W. Effect of flavone derivatives on interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA expression and IL-1beta protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages. *Scand J Immunol* 2003;57:162-6.

## 2 Materials and Methods

### 1. 細胞培養及處理

不同的骨癌細胞株(MG-63, U2OS, 143B, SaOS2)以不同培養基培養。U2OS, 143B 及 SaOS2 利用 DMEM 培養基培養, 加入適量 antibiotics 及 10% heat-inactivated FCS; MG-63 以 MEM 培養基培養, 加入適量 antibiotics 及 10% heat-inactivated FCS; 以不同濃度之黃酮類化合物(0、10、20、30、40、

50  $\mu$ M)於細胞培養箱中培育 24、48、72 小時後，取出 conditioned medium 及 cell lysate 進行 zymography 及 Western blot 分析 MMPs、TIMPs、plasmin、u-PA、t-PA、PAIs 含量或活性及相關蛋白表現；並收取細胞進行 adhesion assay 及 *in vitro* invasion/migration assay。

## 2. MTT(microculture tetrazolium)分析

本實驗室用來測試細胞是否有活性以及是否存活的方法，將不同的骨癌細胞株(MG-63, U2OS, 143B, SaOS2)，以  $3\sim 5\times 10^4$  細胞數分至 24 孔盤中，37°C 培養 16 小時後，加入不同的黃酮類化合物處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，再加入 1 ml 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent(final concentration 0.5 mg/ml)，待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 O.D. 565 nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

## 3. cell motility 分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將細胞處理不同的黃酮類化合物 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( $10^4\text{-}1.5\times 10^4$  cell/well)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 400 $\times$ 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 wells，作移動細胞數之統計。

## 4. cell invasion 分析

將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 100  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Marix gel(0.5 mg/ml)，在 laminar flow 風乾 3~5 小時，在將細胞處理不同的黃酮類化合物 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( $10^4\text{-}1.5\times 10^4$  cell/well)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 400 $\times$ 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 wells，作移動細胞數之統計。

## 5. cell-matrix adhesion 分析

方法同 cell-cell adhesion 分析，只是在 24-well dishes 並不培養 cancer cells，而是塗敷 10  $\mu$ l(0.5 mg/ml)type I collagen 或 type IV collagen，再加入另一事先以 [<sup>3</sup>H]-thymidine 培養之相同 cancer cell 及適量不同的黃酮類化合物，於細胞培養箱中培浴 3 小時後，以 PBS 洗去尚未 adhesion 之 [<sup>3</sup>H]-thymidine cancer cell，經 trypsinized 之後以 liquid scintillation counter 計算 radioactivity。

## 6. 細胞生長測試

利用 BioSOURCE 的細胞生長測定系統進行分析，將 200  $\mu$ l alamar blue 加入培養細胞的 2 ml 培養液(medium)中，在 24、48 和 72 小時時，各取培養液 200  $\mu$ l 再加入 PBS 到 500  $\mu$ l，利用光譜分析儀 570 nm 和 600 nm 測定 O.D.值，換算細胞生長速率。

## 7. 蛋白質(protein lysate)製備

試驗細胞經 PBS 洗淨，以刮杓自 culture dish 刮離，按著加入適量緩衝液 A(20 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、0.5 mM EGTA、0.3 M sucrose、2 mM

PMSF·10 µg/ml leupeptin·25 µg/ml soybean trypsin inhibitor typ I-S 和 50 mM β-mercaptoethanol, pH 7.5), 以攪拌器研磨細胞, 先將所得萃取液經 4°C 下離心(800 g)10 min 移除細胞核後, 再將上清液經超高速離心在 4°C 下離心(40 Krpm) 1 小時, 分出上清液(即細胞質部份)及沉澱物(含胞膜及胞核之部份)。將細胞質部份置於-80°C 貯存; 沉澱物以 2 ml 緩衝液 B(含有 0.1% Triton-X 100 的緩衝液 A)處理之, 混合完全後靜置 1 小時, 在 1 小時內每 15 分鐘混合一次(重覆四次), 在 4°C 下離心(40 Krpm)1 小時, 取上清液即為微粒部份, 分裝於-80°C 貯存。

#### 8. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量採用"Bradford's protein assay"方法, 其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物。測定方法: 首先以一系列已知濃度 BSA, 加入五分之一體積的 Bradford protein dye 以波長 595 nm 之吸光度作一標準曲線, 再以同樣的測定方法測得樣品之 O.D.值, 即可對照標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

#### 9. 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 µl sample(蛋白總量 20 µg), 加入 4 µl 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°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。

#### 10. 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 µg/ml 的 plasminogen, 置於電泳槽中, 並加入電泳緩衝液。取 16 µl sample(蛋白總量 20 µg), 加入 4 µl loading buffer, 將 sample loading 到電泳片中, 以 140 V 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 H<sub>2</sub>O), 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, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaN<sub>3</sub>), 於 37°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。

### 結果

#### 動物實驗(1)結果:

- 一、穩定表達 Pg14. 50 [ luc2/CMV/Hygro ] 載體的 143B 細胞株建立  
利用 luciferase 測試細胞光學訊號的強度檢測, 結果顯示載體有轉入細胞中穩定表達 (Figure 1)。
- 二、活體影像分析 (IVIS) 分析腫瘤光學訊號  
用活體影像系統觀察腫瘤的生長情形, 觀察到餵食 3-hydroxyflavone ( 10mg/kg, 20mg/kg ) 的實驗組其光學訊號明顯較弱於 Control 組, 表示藥物對 143B 細胞產生抑制作用 (Figure 2)。
- 三、由老鼠皮下腫瘤的圖片可以看到餵食 3-hydroxyflavone ( 10mg/kg, 20mg/kg ) 的老鼠其腫瘤大小相較於 Control 組明顯較小, 表示藥物對 143B 細胞

產生抑制作用 (Figure 3)。

#### 四、老鼠腫瘤體積大小觀察

由餵藥的第 8 天開始觀察老鼠身上腫瘤的體積，每 3 天測量老鼠的腫瘤大小，一直到第 35 天。從腫瘤體積統計圖中可以看出有餵食 3-hydroxyflavone (10mg/kg, 20mg/kg) 的實驗組隨著藥物濃度上升其腫瘤生長的情形較 Control 組有較低的趨勢，表示藥物對 143B 細胞產生抑制作用 (Figure 4)。

#### 五、老鼠犧牲後腫瘤重量觀察

35 天後將老鼠以 CO<sub>2</sub> 安樂死取下腫瘤，將腫瘤秤重並記錄。從腫瘤克數量化圖中可以看到給予 3-hydroxyflavone (10mg/kg, 20mg/kg) 的組別其腫瘤重量較 Control 組別小，表示藥物對 143B 細胞產生抑制的作用 (Figure 5)。

#### 六、老鼠體重觀察

由餵藥的第 8 天開始，每 3 天測量老鼠的體重，一直到第 35 天，從老鼠平均的體重圖觀察到給予 3-hydroxyflavone (10mg/kg, 20 mg/kg) 的期間，藥物對於老鼠並不會有太大的影響 (Figure 6)。

#### 動物實驗(2)結果:

##### 七、穩定表達 Pgl4.50 [ luc2/CMV/Hygro ] 載體的 U2OS 細胞株建立

利用 luciferase 測試細胞光學訊號的強度檢測，結果顯示載體有轉入細胞中穩定表達 (Figure 7)。

##### 八、活體影像分析系統 (IVIS) 分析光學訊號，觀察是否發生轉移現象

由影像結果顯示 wild type 組和 control 組均未發生轉移現象，而這個未發生轉移的現象可能和實驗天數不夠長有關係，在日後的實驗裡將會繼續觀察 (Figure 8)。

#### 細胞實驗結果:

##### 九、細胞存活率分析 (MTT assay)

以 MTT assay 分析藥物 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50 μM) 處理，37 °C 培養 24 跟 48 小時後處理下的 143B 細胞存活率，結果發現 3-hydroxyflavone 對於 143B 細胞的存活並無明顯的影響。所以也證實在實驗中細胞分泌的 MMP-2 表現量降低是因為藥物濃度的作用，而不是細胞死亡 (Figure 9)。

##### 十、MMP 活性分析 (Gelatin zymography)

以不同濃度的 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50 μM)，處理 143B 細胞之後其 MMP-2 的酵素活性明顯下降，表示藥物對 143B 細胞產生抑制作用 (Figure 10)。

##### 十一、u-PA 活性分析 (Casein zymography)

以不同濃度的 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50 μM)，處理 143B 細胞之後其 u-PA 的酵素活性無明顯差異 (Figure 11)。

##### 十二、細胞傷口癒合分析 (wound healing assay, migration)

以不同濃度的 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50 μM)，處理 143B 細胞之後，在 0, 24 小時以目鏡 10X、物鏡 4X 的條件在顯微鏡下觀察固定位置的傷口癒合狀況，在時間點 24 小時下觀察，加藥的組別對照 control 組別其爬行能力有明顯受到抑制，表示藥物對 143B 細胞產生抑制作用 (Figure 12)。

##### 十三、細胞移動性分析 (Motility)

使用 Boyden chamber assay 確認 3-hydroxyflavone 對於 143B 細胞移動能力的影響。以不同濃度 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50 μM) 處理的 143B 細胞在時間點 24 小時下，加藥的組別和 control 組相比 Motility 有受到抑制，表示



藥物對 143B 細胞產生抑制作用 (Figure 13)。

#### 十四、細胞侵入性分析 (Invasion)

使用 Boyden chamber assay 確認 3-hydroxyflavone 對於 143B 細胞的侵入能力的影響。不同濃度 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50  $\mu\text{M}$ ) 處理的 143B 細胞在時間點 24 小時下，加藥的組別 Invasion 有受到抑制 (Figure 14)。

#### 十五、3-hydroxyflavone 抑制 U2OS 人類骨肉瘤細胞爬行能力 (wound healing assay)

將 U2OS 細胞以固定的細胞數 ( $1.5 \times 10^4/\text{well}$ ) load 至 6 well 之 culture-insert kit 裡放入培養箱，等待細胞貼附製 well 上後，將 culture-insert kit 取下，並以 PBS buffer 洗淨未完整貼附的細胞，再加入 1% 血清的細胞培養液，將六種類黃酮化合物 (2-hydroxyflavanone、4-hydroxyflavanone、6-hydroxyflavanone、flavone、3-hydroxyflavone、5-hydroxyflavone) (如附圖三) 以不同劑量 (0、10、30、50  $\mu\text{M}$ ) 處理 U2OS 人類骨肉瘤細胞，在顯微鏡下 (10X x 4X) 觀察 U2OS 人類骨肉瘤細胞於固定位置的傷口癒合狀況，並且分別在 0、24 小時使用拍照記錄，結果發現在 24 小時的時間點下 control 組的細胞與其他加藥處理的組別相比，這六種類黃酮中，3-hydroxyflavone 其爬行能力皆明顯受到抑制 (Fig. 15)，因此接下來就以 3-hydroxyflavone 這個黃酮醇化合物作後續的研究。

#### 十六、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞存活率的影響 (MTT assay)

將不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50  $\mu\text{M}$ ) 處理 U2OS 細胞 24 小時和 48 小時後，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率。其結果與處理 DMSO 的控制組作比較，發現 U2OS 人類骨肉瘤細胞在 3-hydroxyflavone 的處理之下並不會影響細胞的存活率 (Fig. 16: A and B)，另外也可證實實驗中細胞分泌的 MMP-2 表現量降低並非因為細胞死亡或是細胞數降低所造成。

#### 十七、3-hydroxyflavone 抑制 U2OS 人類骨肉瘤細胞侵入及移動能力

使用 Boyden chamber assay 確認 3-hydroxyflavone 對於 U2OS 人類骨肉瘤細胞的侵入及移動能力的影響。不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50  $\mu\text{M}$ )，處理 U2OS 細胞 24 小時後，將細胞以 trypsin-EDTA 打下來，用 trypan blue 計算細胞數，然後以固定量的細胞 ( $1.5 \times 10^4/\text{well}$ ) 直接 load 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 20 小時，然後再利用 modified Boyden chamber coating type IV collagen 的分析。結果顯示，其侵入能力會隨著 3-hydroxyflavone 的濃度增加而降低，代表著 3-hydroxyflavone 可以抑制 U2OS 細胞的侵入能力。另外，也利用了 Boyden chamber motility assay 觀察 3-hydroxyflavone 醇對於 U2OS 細胞移動能力的影響，結果和侵入能力的影響有相同的結果 (Fig. 17)。

#### 十八、3-hydroxyflavone 並無抑制 U2OS 人類骨肉瘤細胞之貼附能力

將 U2OS 細胞處理 24 小時不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50  $\mu\text{M}$ ) 對於其細胞的貼附作用，沒有明顯的受到藥物處理濃度增加而降低貼附效果，對 collagen type I 其細胞的貼附能力並無顯著的抑制效果 (Fig. 18)。

#### 十九、3-hydroxyflavone 並無減緩 U2OS 人類骨肉瘤細胞的細胞延伸能力

在實驗中發現，將 U2OS 細胞處理 24 小時不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50  $\mu\text{M}$ ) 後，再將細胞以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下，並用 trypan blue 計算細胞數 (存活之細胞)，然後注入固定量的細胞 ( $3 \times 10^5$ ) 並在 0.5、1、2、3 小時的時間點下觀察其細胞延伸之狀態。發現加藥處理後的細胞與控制組相比，其細胞延伸能力沒有明顯受到抑制，在第 3 小時控制組的細胞已完全延伸附著於

well 上，而加藥處理 3-hydroxyflavone (50  $\mu\text{M}$ ) 的細胞則也同樣完全延伸的狀態，由此現象得知 3-hydroxyflavone 並無法減緩其細胞延伸的能力 (Fig. 19)。

#### 二十、3-hydroxyflavone 抑制 U2OS 人類骨肉瘤細胞分泌 MMP-2

將  $5 \times 10^4/\text{mL}$  的 U2OS 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿，接著在 serum-starved 的情形下（以減少血清中蛋白質之干擾），處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時，收集其培養液，以 gelatin zymography，分析其 MMP-2 的表現，並且以 MTT assay 來定量細胞的存活數作為基準。結果發現，處理 3-hydroxyflavone 的細胞分泌的 MMP-2 確實有降低的現象 (Fig. 20)。

#### 二十一、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞 Src 蛋白磷酸化的影響

將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-phospho-Src、anti-Src 及 anti- $\beta$ -actin 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 Src 蛋白的磷酸化會隨著 3-hydroxyflavone 的濃度提高而減少 (Fig. 21)。

#### 二十二、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞 MEK1/2、MLC2 Ser19、ERK1/2 磷酸化的影響

將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-phospho-MEK1/2、anti-MEK1/2、anti-phospho-MLC2 Ser19、anti-MLC2、anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2 及 anti- $\beta$ -actin 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 MEK1/2、MLC2 Ser19、ERK1/2 的磷酸化會隨著 3-hydroxyflavone 的濃度提高而減少 (Fig. 22)。

#### 二十三、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞 FAK 訊號傳導路徑相關磷酸化蛋白的影響

將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時之後，收集其 cell lysates，收集其 cell lysates，以 anti-phospho-FAK (Tyr397)、anti-phospho-FAK (Tyr925)、anti-FAK 及 anti- $\beta$ -actin 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 FAK (Tyr397)、FAK (Tyr925) 蛋白的磷酸化蛋白表現量會隨著 3-hydroxyflavone 的濃度提高而減少 (Fig. 23)。

#### 二十四、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞 MMP-2、u-PA 蛋白的影響

將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時之後，收集其 cell lysates，收集其 cell lysates，以 anti-MMP-2、anti-u-PA 及 anti- $\beta$ -actin 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現的 MMP-2 和 u-PA 的蛋白表限量會隨著 3-hydroxyflavone 的濃度提高而減少 (Fig. 24)。

#### 二十五、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞 EpCAM、p-PTEN、RhoA、RhoB 及 fibronectin 蛋白的影響

將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時之後，收集其 cell lysates，收集其 cell lysates，以 anti-EpCAM、anti-phospho-PTEN、anti-RhoA、anti-RhoB、anti-fibronectin 及 anti- $\beta$ -actin 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現的 EpCAM、RhoA 和 fibronectin 的蛋白表限量會隨著的濃度提高而減少，p-PTEN 及 RhoB 的表現量較無顯著的影響 (Fig. 25)。

#### 二十六、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞之 EMT 相關骨架蛋白的影響

將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu\text{M}$ ) 24 小時之後，收集其 cell lysates 並做核質分離，以 anti-E-cadherin、anti-N-cadherin、

anti-Vimentin、anti- $\alpha$ -catenin、anti- $\alpha$ -catenin 及 anti- $\beta$ -actin 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現間葉細胞的特徵 Vimentin 及  $\alpha$ -catenin 表現量會隨著藥物濃度的提高而降低蛋白表現 (Fig. 26)。

二十七、3-hydroxyflavone 對 U2OS 人類骨肉瘤細胞之核蛋白表現量的影響  
利用西方墨點法，將 U2OS 細胞處理不同濃度的 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 $\mu$ M) 24 小時之後，收集其 cell lysates 並做核質分離，以 anti-Slug、anti-Snail-1、anti-NF- $\kappa$ B、anti-wist-1 及 anti-C23 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果以 C23 做為 internal control，發現 Slug 的表現量會隨著 3-hydroxyflavone 濃度提高而下降，而對於 Snail-1、NF- $\kappa$ B、wist-1 等的蛋白之表現量就較無顯著的影響 (Fig. 27)。

### 玖、圖表與圖表說明

#### 143B Luc#5

$1 \times 10^4$   $2 \times 10^4$   $3 \times 10^4$   $4 \times 10^4$

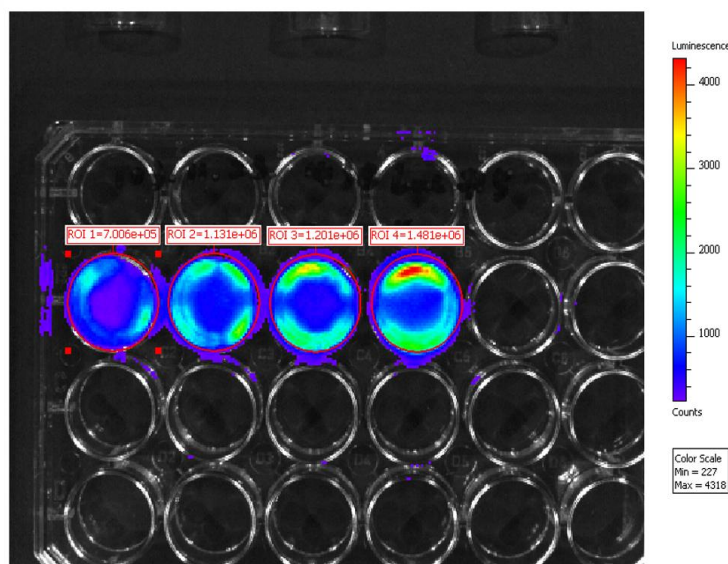


Figure 1 檢測載體是否成功轉入細胞株中

利用 luciferase 測試細胞光學訊號的強度以檢測載體是否有轉入細胞中建立穩定表達載體的細胞株。

Placebo 10 mg/kg 20 mg/kg

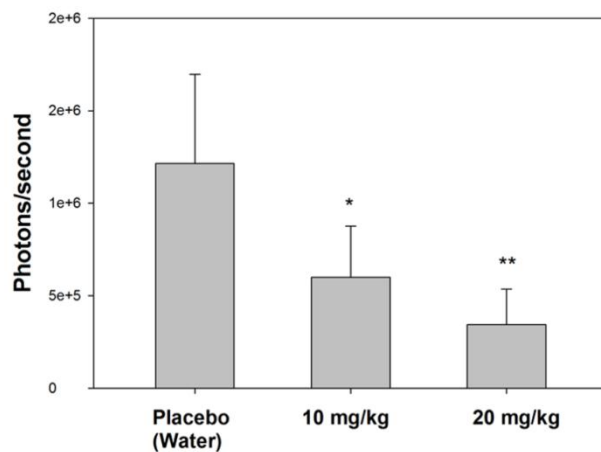
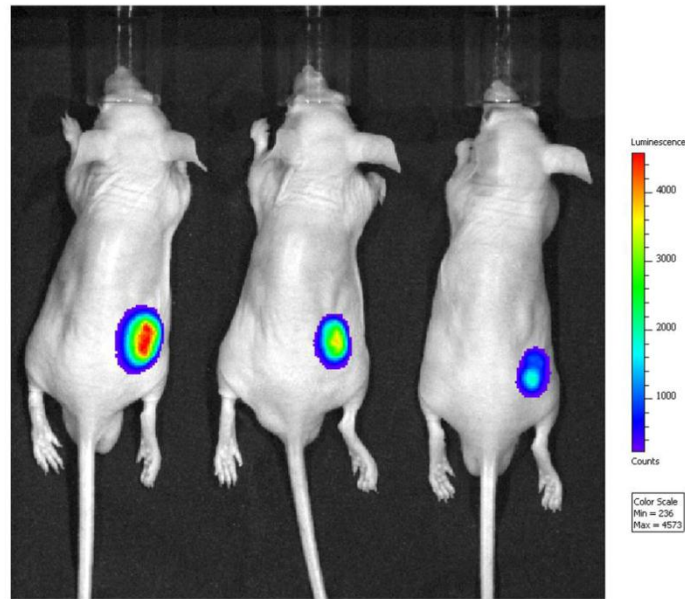


Figure 2 活體影像分析(IVIS)分析腫瘤光學訊號及其量化

利用活體影像系統觀察腫瘤在活體內的生長情形，以腹腔注射的方式給予老鼠 luciferin (200 mg/kg)，利用酵素與受質的專一性反應，反應後發出的冷光可作量化的偵測，等待 20 分鐘後進行拍攝。可以看到餵食 3-hydroxyflavone (10mg/kg, 20mg/kg) 的組別光學訊號明顯較弱於 Control 組別，表示 3-hydroxyflavone 對 143B 細胞產生抑制作用。統計分析(statistical analysis) 試驗結果以平均值±標準偏差 (Mean ± SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

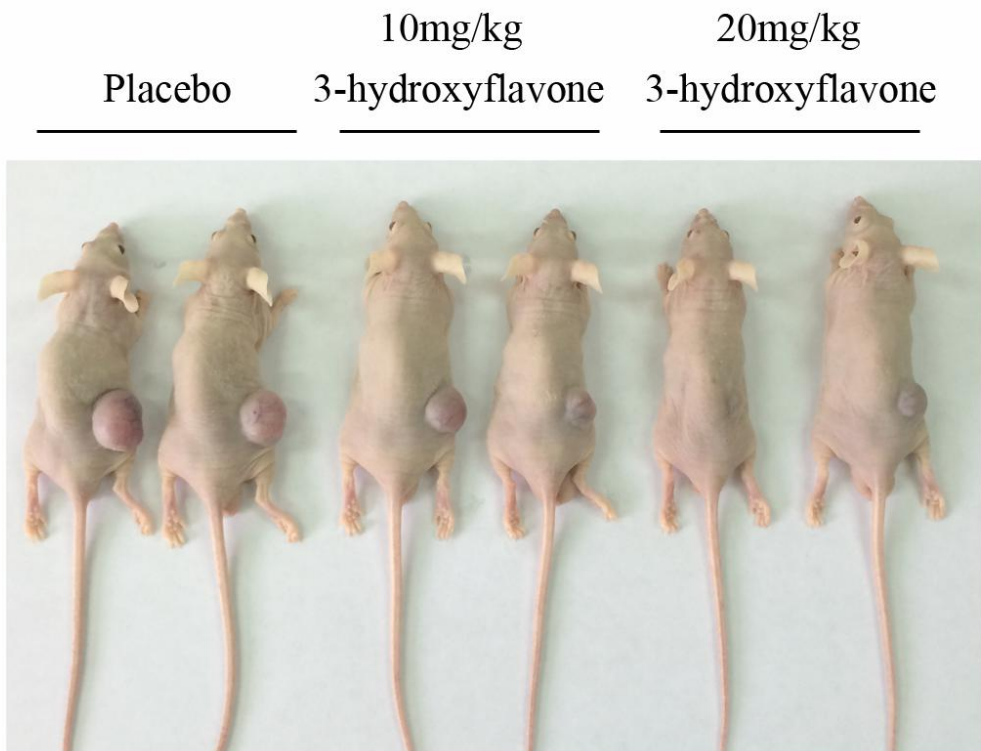


Figure 3 活體老鼠腫瘤大小觀測

將 143B 細胞種於裸鼠皮下，在第 8 天分組後，分別餵食水和 3-hydroxyflavone (10mg/kg, 20mg/kg)，在第 35 天時將老鼠犧牲拍照。

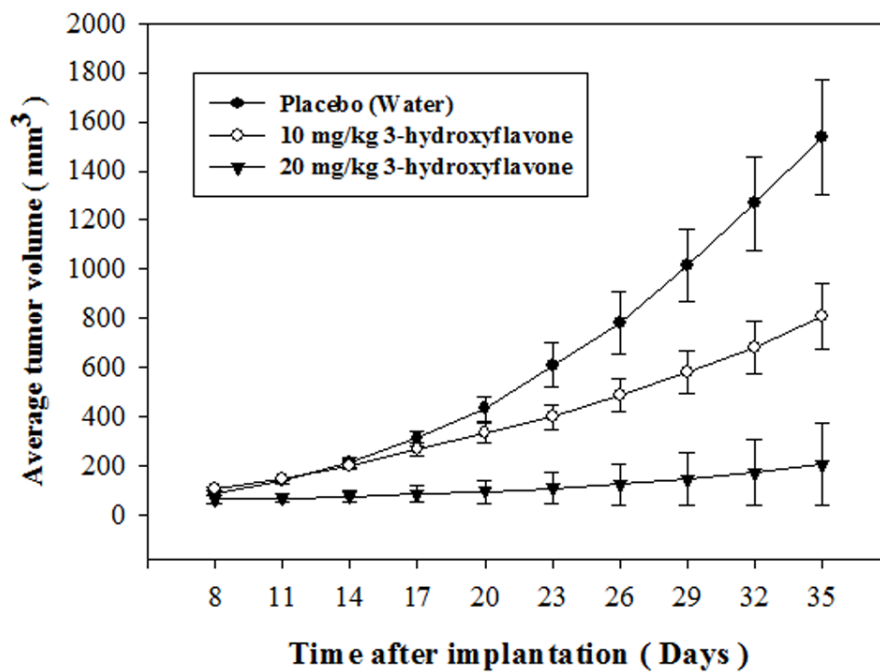


Figure 4 老鼠腫瘤體積大小觀察

由餵藥的第 8 天開始，每 3 天測量老鼠的腫瘤體積，一直到第 35 天。從腫瘤體積統計圖中可以看出有餵食藥物 3-hydroxyflavone ( 10mg/kg ,20mg/kg ) 的組別隨著藥物濃度上升其腫瘤生長的情形較 Control 組別有較低的趨勢。

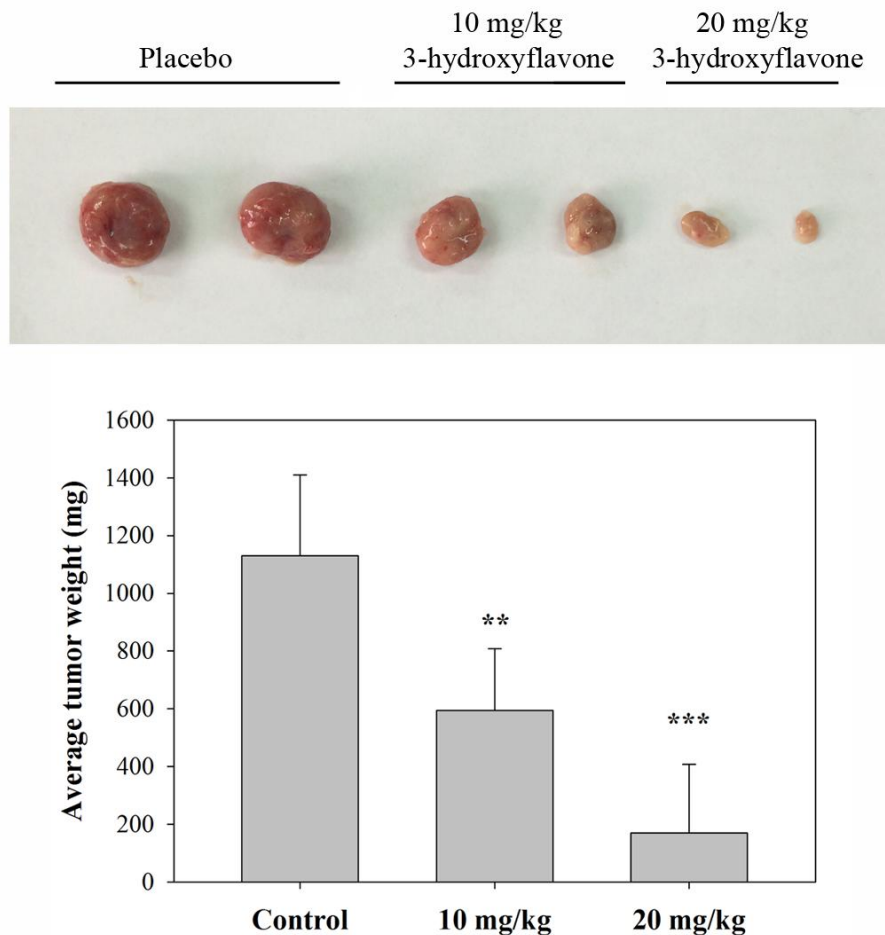


Figure 5 犧牲老鼠後腫瘤重量觀察

第 35 天將老鼠犧牲取下腫瘤，將腫瘤秤重並記錄。從腫瘤克數量化圖中可以看到給予 3-hydroxyflavone ( 10mg/kg , 20mg/kg ) 的組別其腫瘤重量較 Control 組別小。試驗結果以平均值±標準偏差 (Mean ± SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。



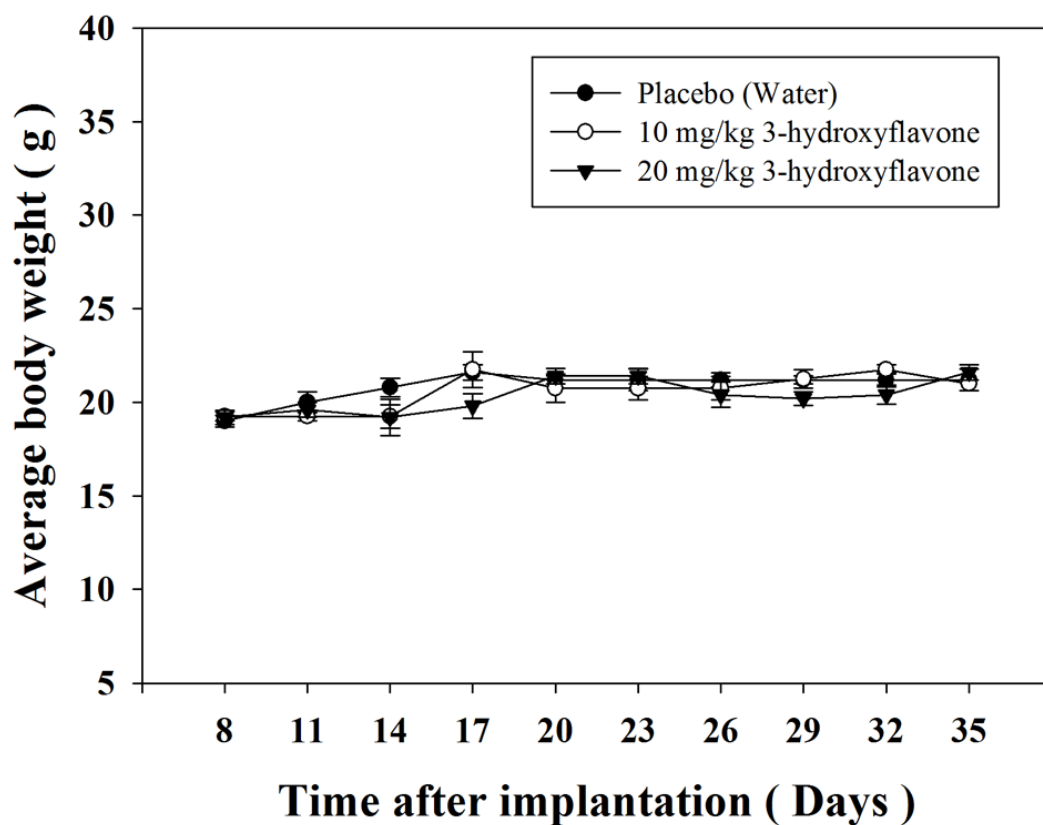


Figure 6 老鼠體重觀察  
 由餵藥的第 8 天開始，每 3 天測量老鼠的體重，一直到第 35 天，從老鼠平均的體重圖可以看出給予 3-hydroxyflavone ( 10mg/kg , 20mg /kg ) 的期間，藥物對於老鼠並不會有太大的影響。

### U2OS Luc#7

$2 \times 10^4$   $4 \times 10^4$   $6 \times 10^4$

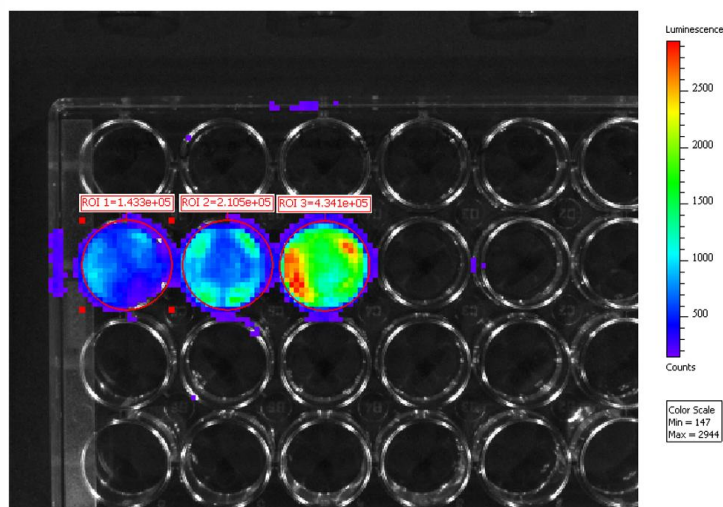
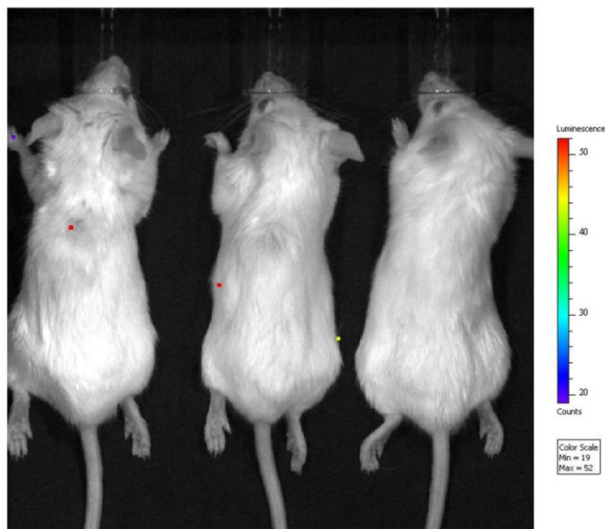


Figure 7 穩定表達 Pgl4.50 [ luc2/CMV/Hygro ] 載體的 U2OS 細胞株  
利用 luciferase 測試細胞光學訊號的強度，結果顯示載體有轉入細胞中穩定表達。

U2OS 40 Days

Control (Water)



20 mg/kg 3-hydroxyflavone

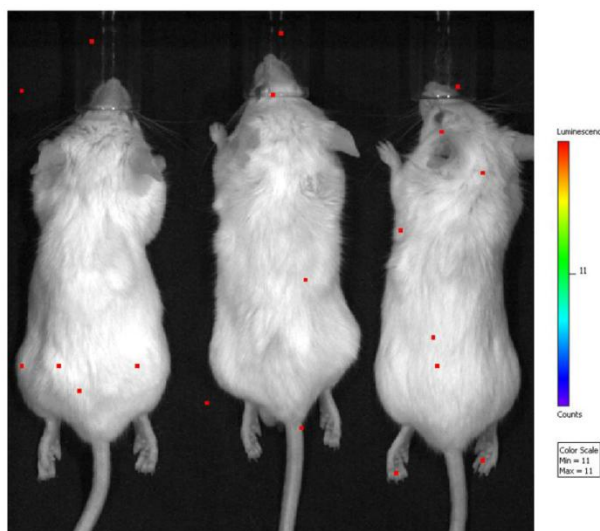


Figure 8 活體影像分析(IVIS)分析肺光學訊號

取四到五周大的 C.B17/IcrPrkdc<sup>scid</sup>/CrINarl 免疫缺陷鼠以尾靜脈注射方式給予  $1 \times 10^6$  穩定表達 Pgl4.50 [ luc2/CMV/Hygro ] 載體的 U2OS 細胞株，利用管餵方式給予 3-hydroxyflavone (10 mg/kg、20 mg/kg) 40 天。利用活體影像分析系統觀察細胞在活體內的生長情形，以腹腔注射的方式給予老鼠 luciferin (200 mg/kg)，等待 20 分鐘後進行拍攝。由影像結果顯示 wild type 組和 control 組並沒有產生癌細胞的轉移現象。



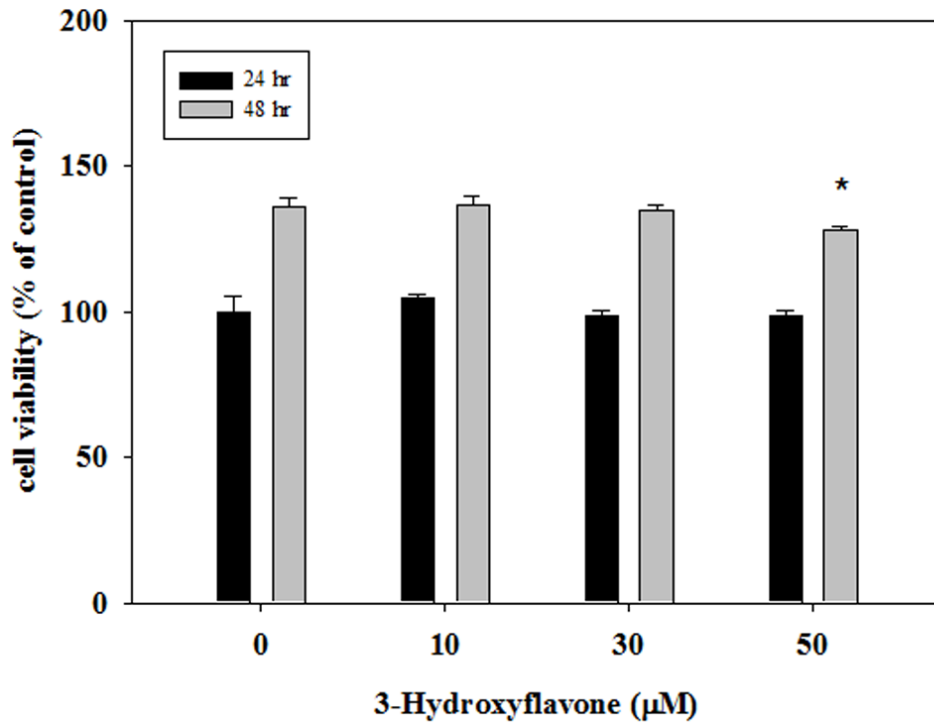


Figure 9 細胞存活率分析 (MTT assay)

利用 MTT assay 分析細胞存活率，結果發現 3-hydroxyflavone 對於 143B 細胞的

存活並無明顯的影響。所以也證實在實驗中細胞分泌的 MMP-2 表現量降低

是因為藥物濃度的作用，而不是細胞死亡。統計分析(statistical analysis) 試驗

結果以平均值±標準偏差 (Mean ± SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或\*\*\* $p <$

0.001 表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel

Scientific Software,USA 進行 one-way analysis of ariance (one-way ANOVA)分

析。

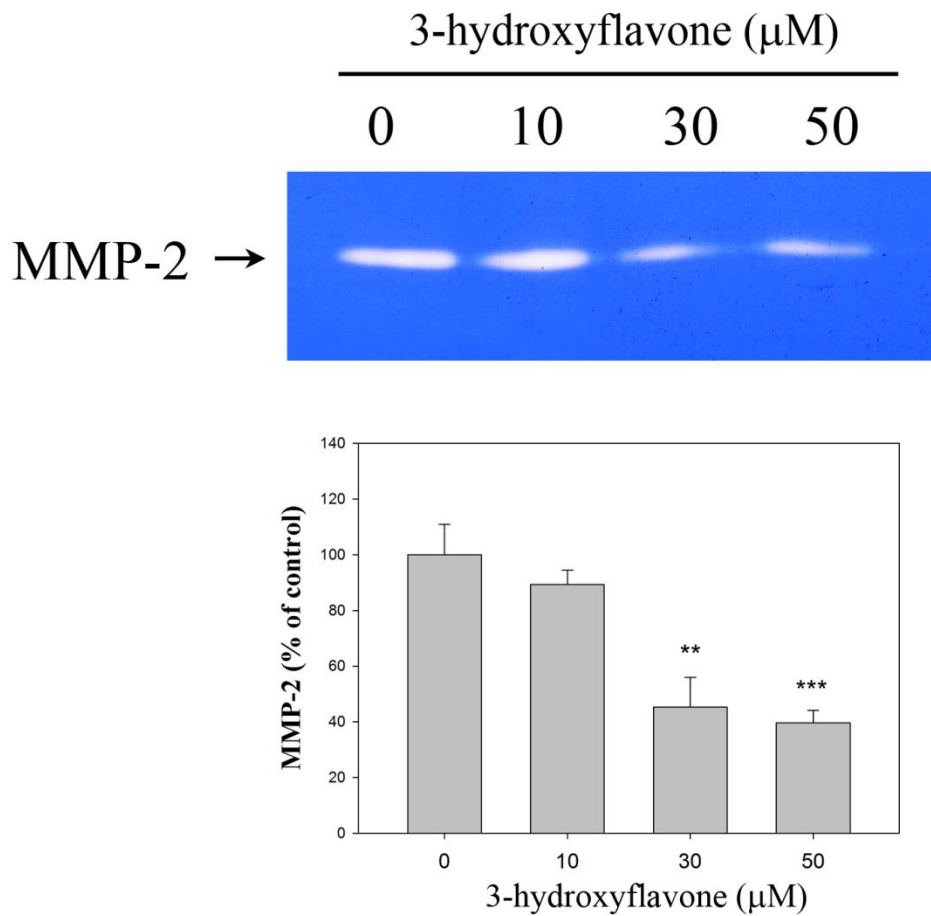
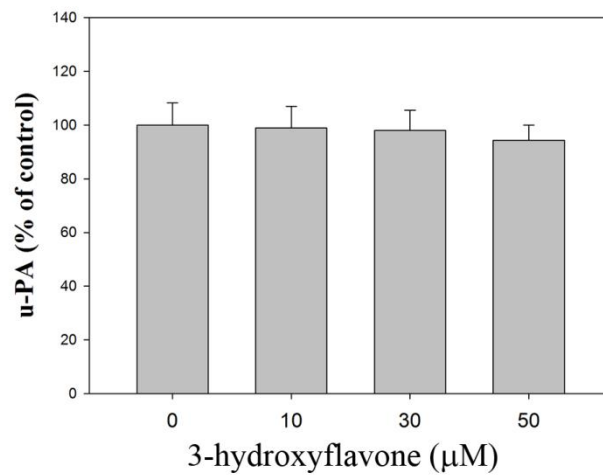
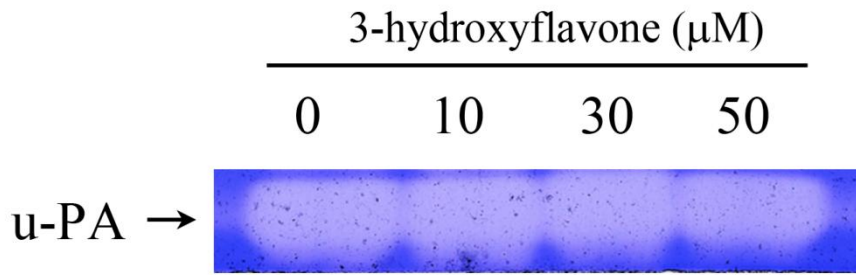


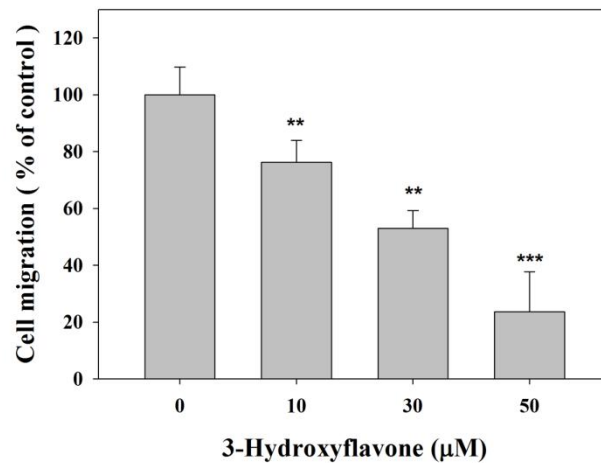
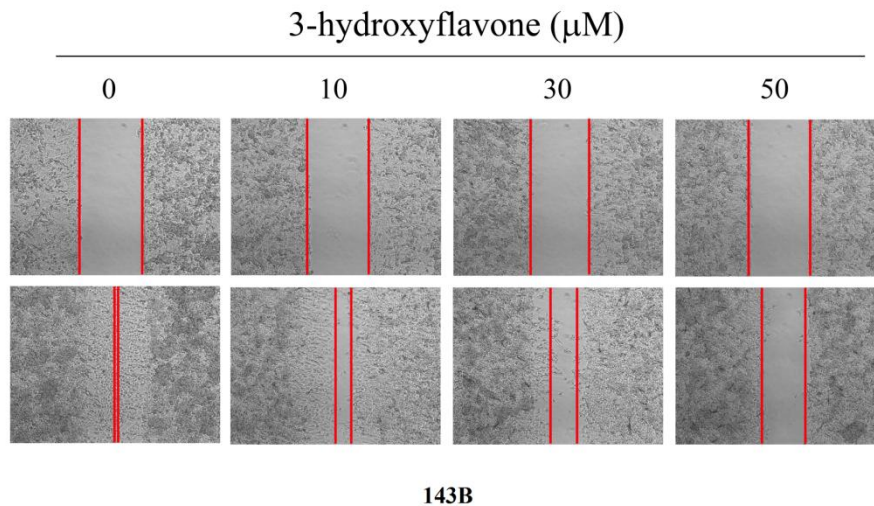
Figure 10 MMP 活性分析 (Gelatin zymography)

以不同濃度的 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50  $\mu\text{M}$ ) 處理 143B 細胞其 MMP-2 的酵素活性有所下降。統計分析(statistical analysis) 試驗結果以平均值 $\pm$ 標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。



**Figure 11 u-PA 活性分析 (Casein zymography)**

以不同濃度的 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50  $\mu\text{M}$ ) 處理 143B 細胞其 u-PA 的酵素活性無明顯差異。統計分析(statistical analysis) 試驗結果以平均值 $\pm$ 標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

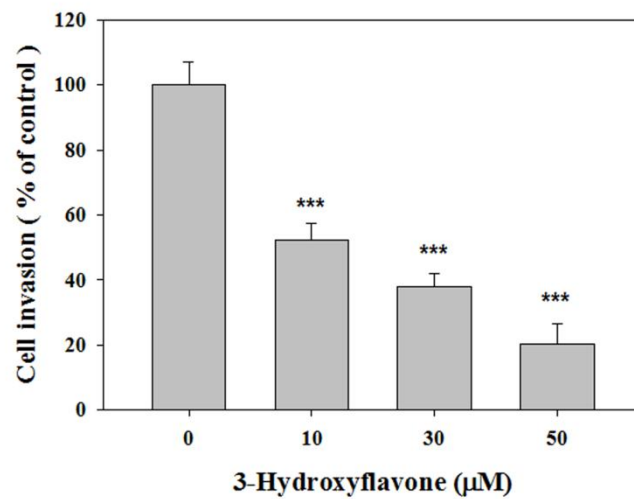
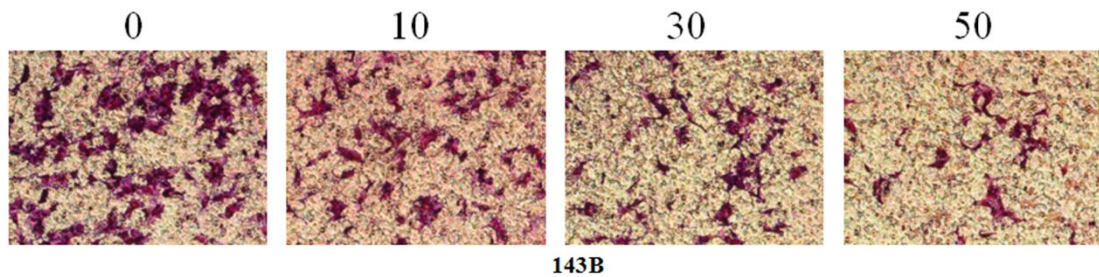


**Figure 12 細胞傷口癒合分析 (wound healing assay, migration)**

以不同濃度的 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50  $\mu\text{M}$ )，處理 143B 細胞在 0, 24 小時以目鏡 10X，物鏡 4X 的條件在顯微鏡下觀察固定位置的傷口癒合狀況，在時間點 24 小時下觀察，加藥的組別對照 control 組別其爬行能力明顯受到抑制。統計分析 (statistical analysis) 試驗結果以平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

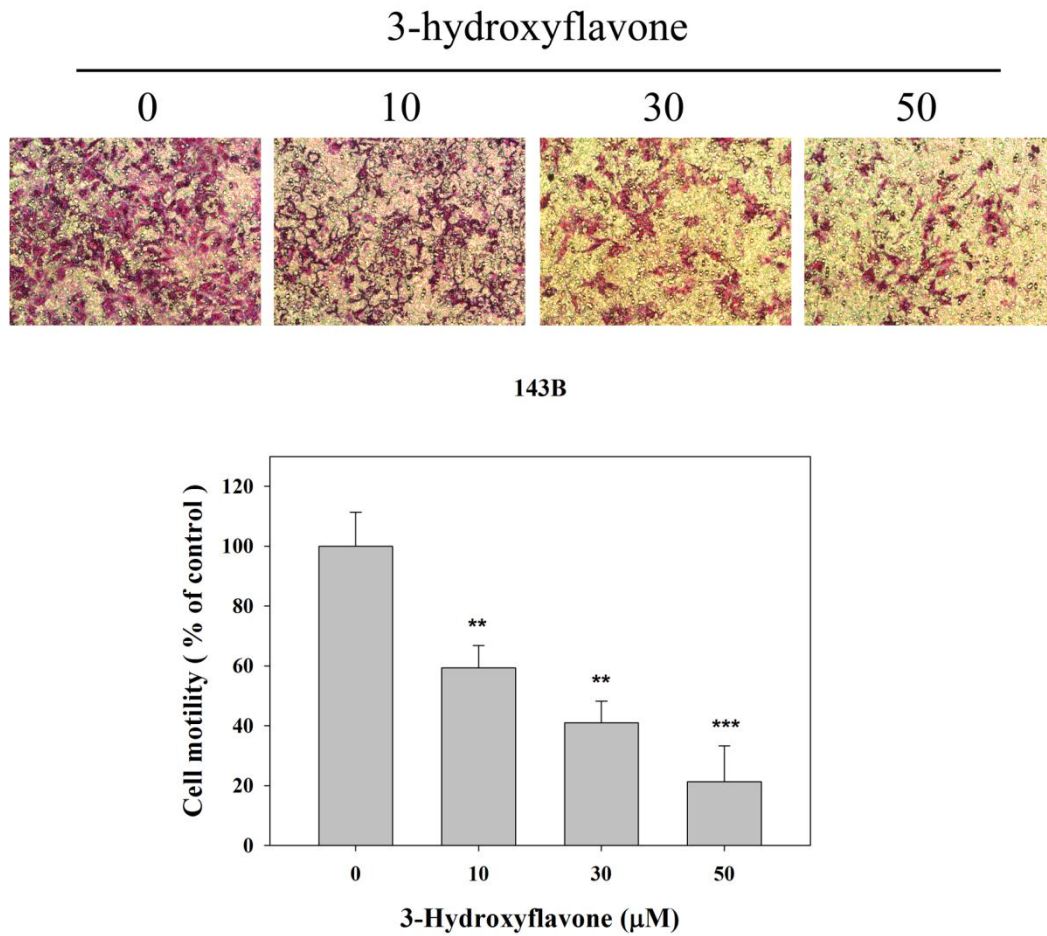
143B

3-Hydroxyflavone ( $\mu\text{M}$ )



**Figure 13 細胞移動性分析 (Motility)**

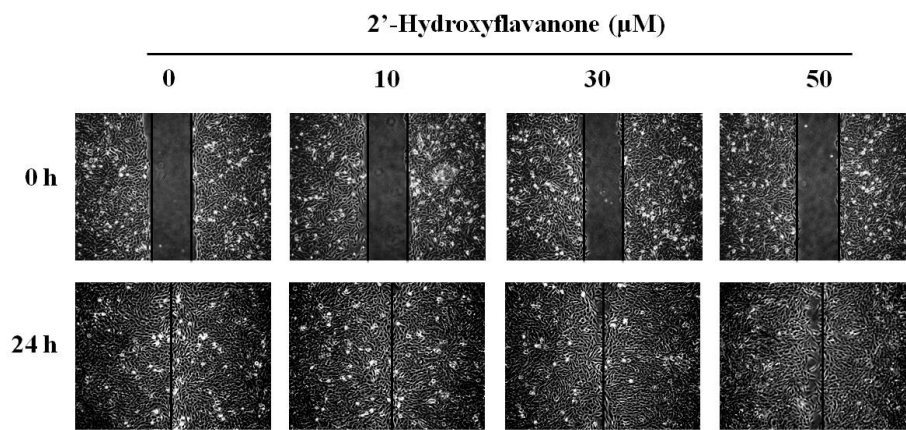
用 Boyden chamber assay 確認 3-hydroxyflavone 對 143B 細胞移動能力的影響。不同濃度 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50  $\mu\text{M}$ ) 處理骨肉瘤細胞 143B 在時間點 24 小時下, 加藥的組別和 control 組相比 Motility 受到抑制。統計分析 (statistical analysis) 試驗結果以平均值 $\pm$ 標準偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異, 所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。



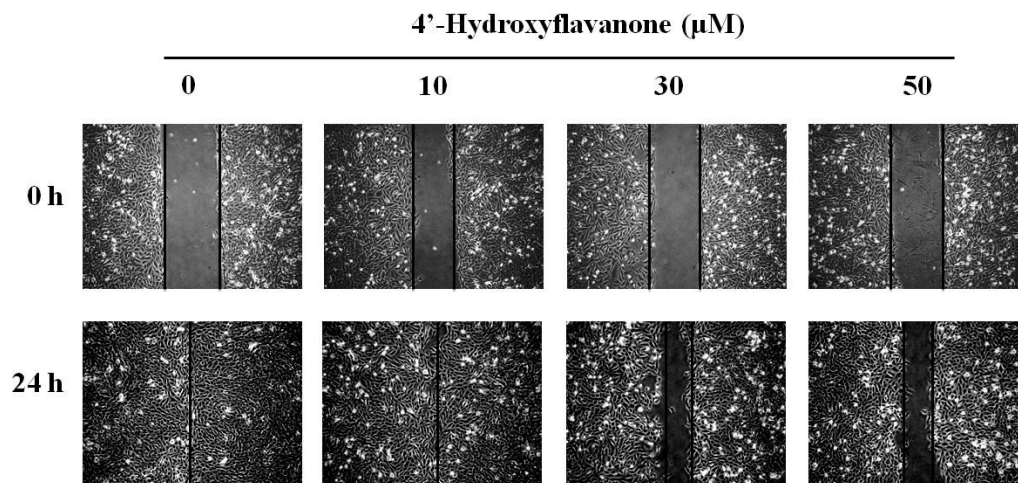
**Figure 14 細胞侵入性分析 (Invasion)**

用 Boyden chamber assay 確認 3-hydroxyflavone 對 143B 細胞侵入能力的影響。不同濃度 3-hydroxyflavone (0, 10, 30, 50  $\mu\text{M}$ ) 處理 143B 細胞在時間點 24 小時，實驗組和對照組相比 Invasion 受到抑制。統計分析 (statistical analysis) 試驗結果以平均值 $\pm$ 標準偏差 (Mean  $\pm$  SD)表示 \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  或 \*\*\* $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異，所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA)進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA)分析。

(A)

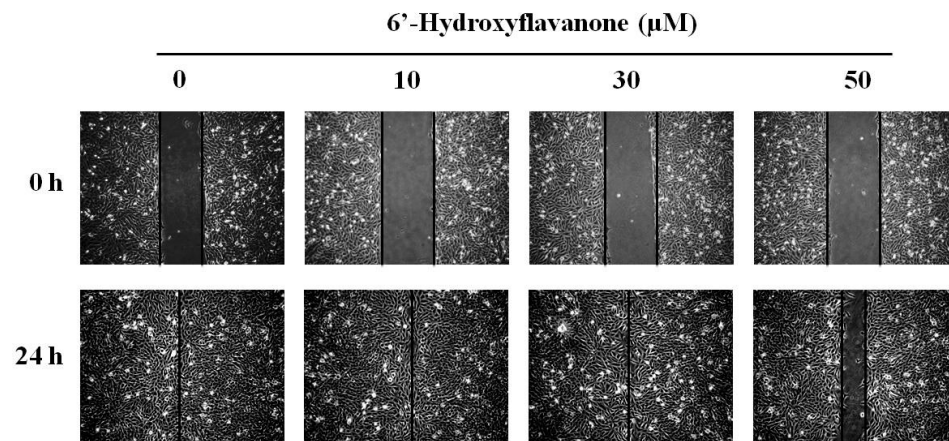


(B)

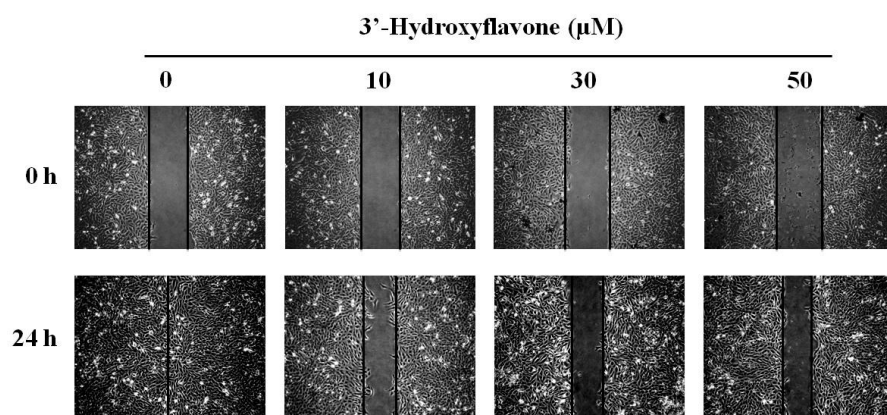
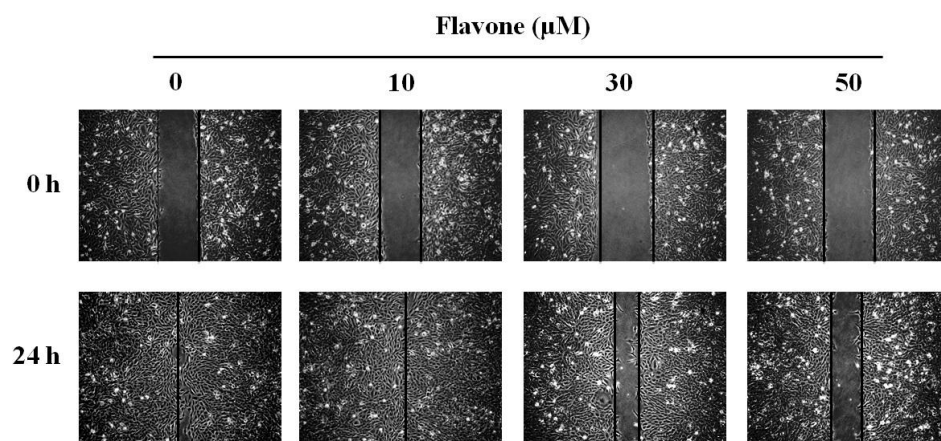




(C)



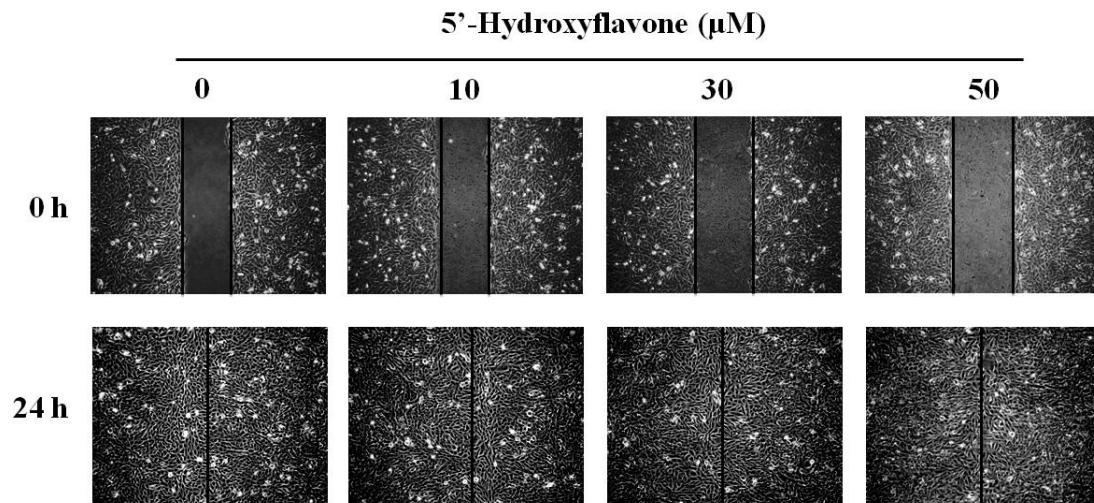
(D)



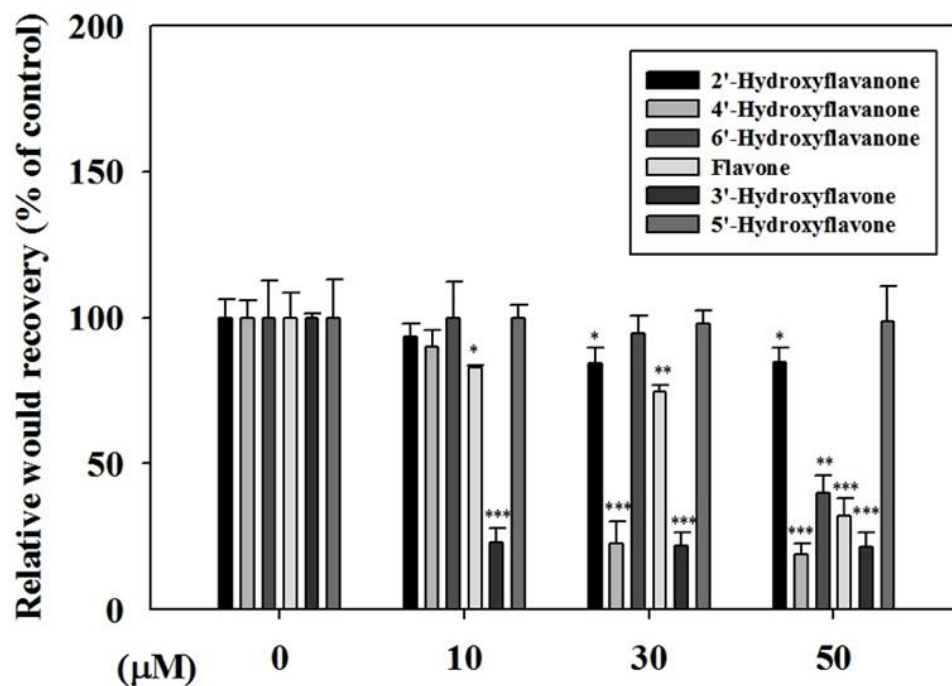
(E)



(F)

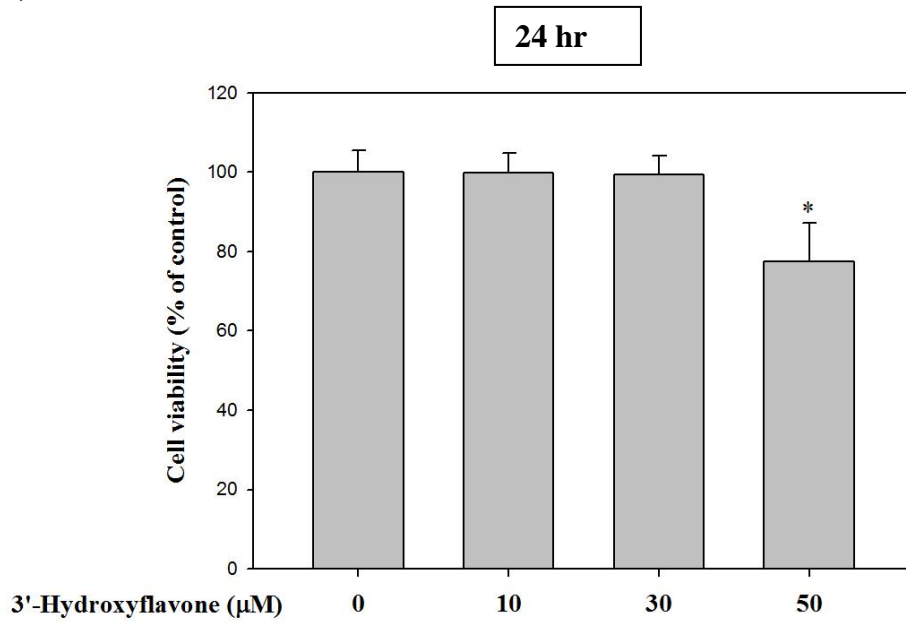


(G)

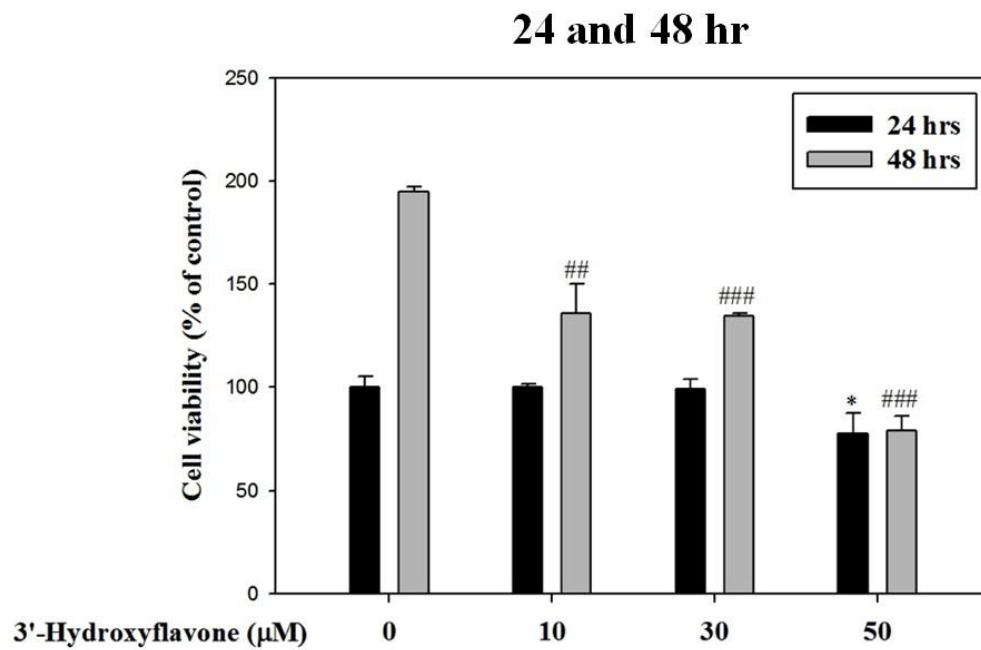


**Fig. 15.** Effects of six flavonoids on wound-healing assay of U2OS cell. After being treated with six flavones at a concentration of 0, 10, 30, 50 $\mu\text{M}$  for 24 hours. Representative fields were photographed at 0 · 24 hr. (40X) The flavones decrease cell migration capability with respect to the experimental control consisting of only solvent by wound-healing assay on U2OS cells. Statistical significance (\*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ) was checked using one-way ANOVA.

(A)



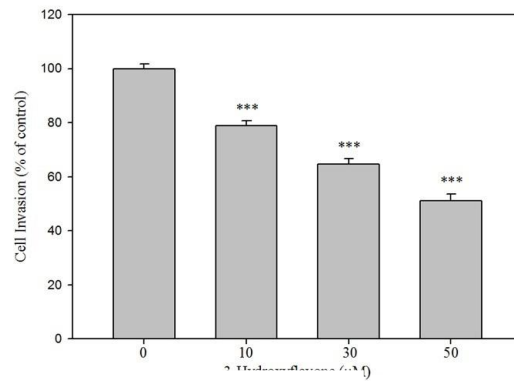
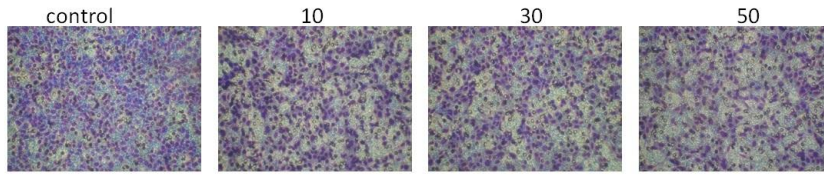
(B)



**Fig. 16.** Human osteosarcoma cells, U2OS were treated with 3-hydroxyflavone (0,10 ,30, 50μM) for 24 and 48 hours, and then subjected to MTT assay for cell viability. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

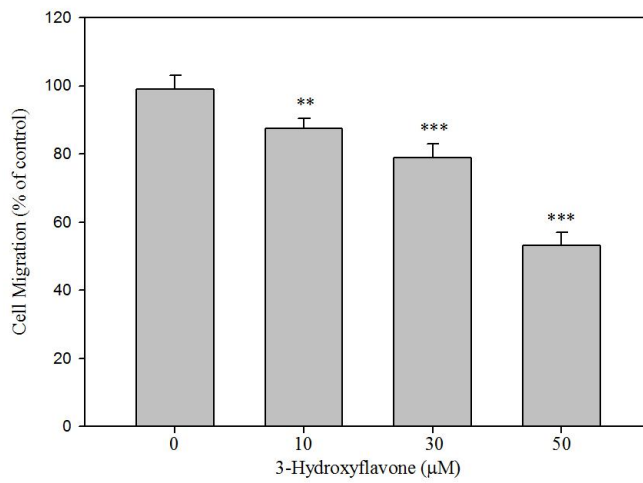
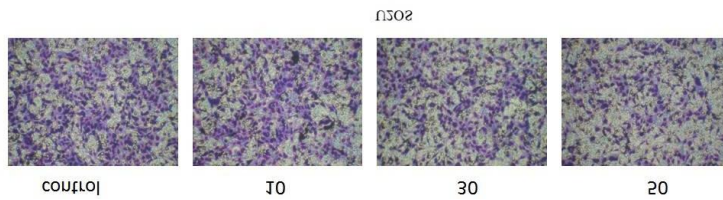
(A) Invasion assay

20hr

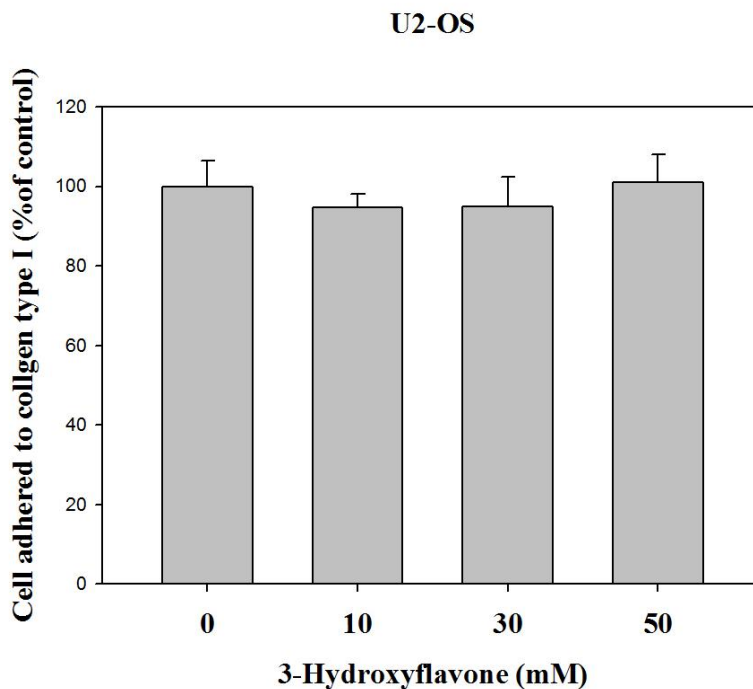


(B) Migration assay

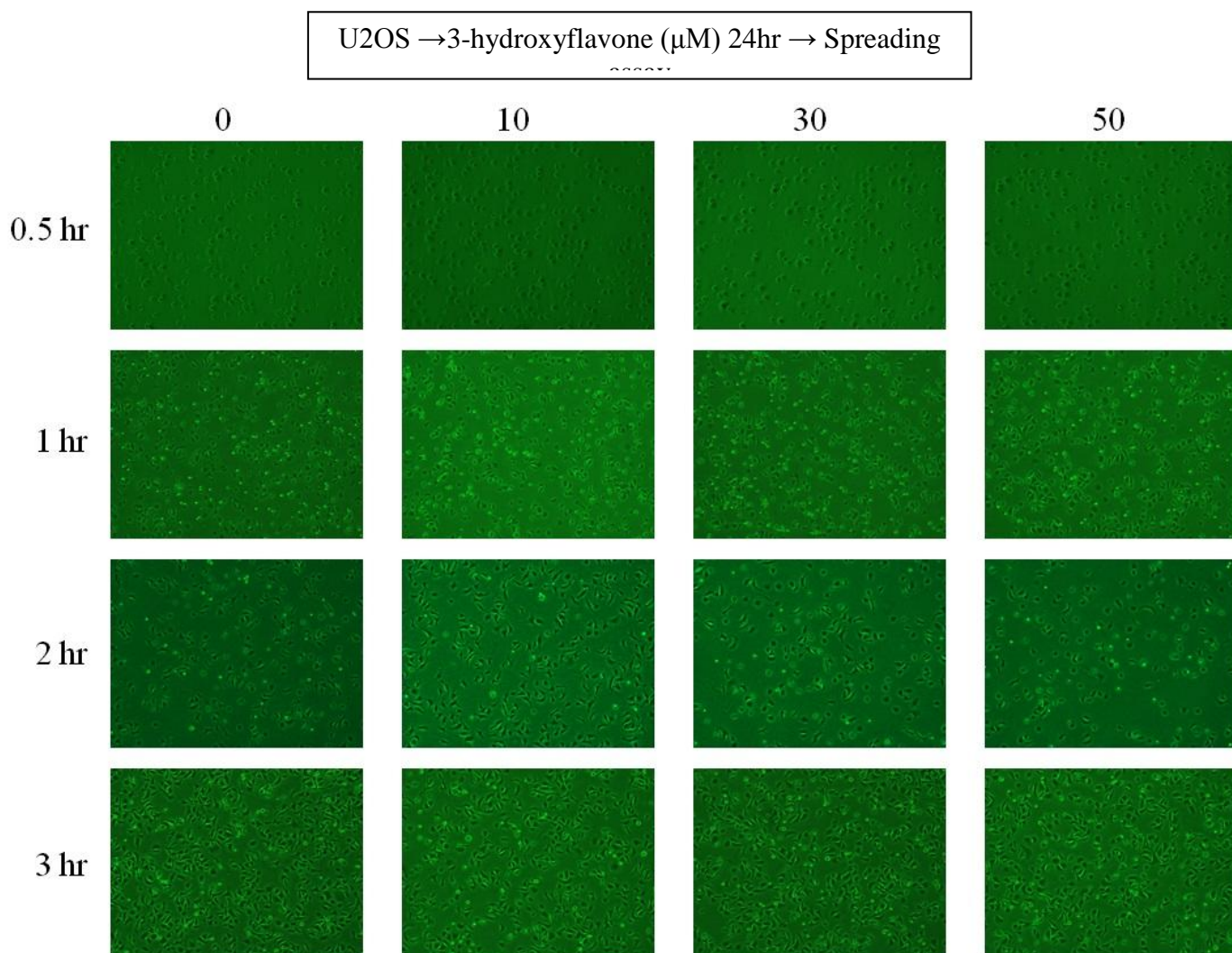
8hr



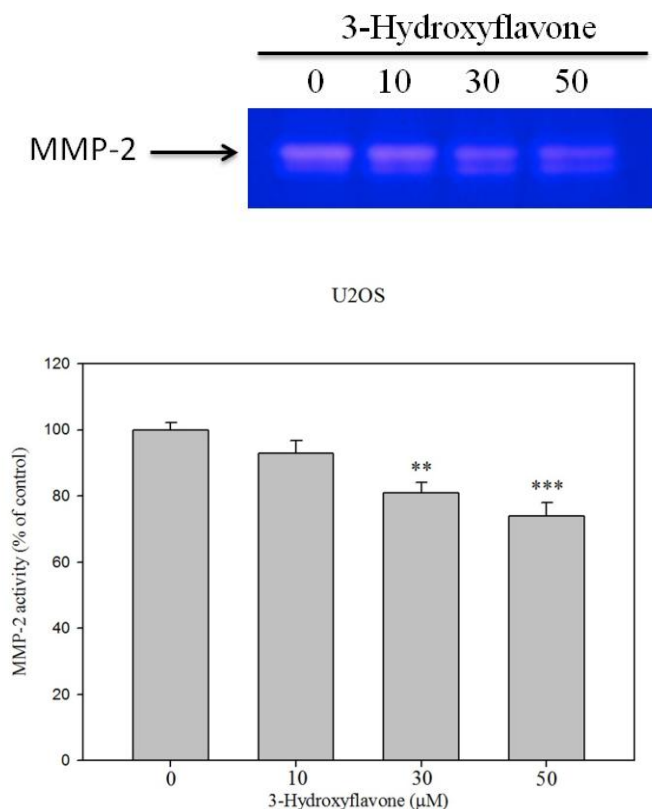
**Fig. 17.** In vitro invasive ability was tested by Boyden Chamber assay. Invasion Chamber with 8 mm-pores in their polycarbonate membrane had been coated by matrigel. DMEM with 100 ml/L fetal bovine serum was added to the bottom chamber, and  $1.5 \times 10^4$  cells in serum-free DMEM were added to the upper compartment of the chamber. Each cell groups were plated in 8 duplicate wells. After incubation, the matrigel and filter were removed and washed, cells were fixed by methanol and stained with Giemsa solution. Each filter pore was examined with a microscope and the number of cells were counted. Results are expressed as the number of migrated cells (means) per high-power field. The values represent the mean of 3 independent experiments. Statistical significance: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. untreated control.



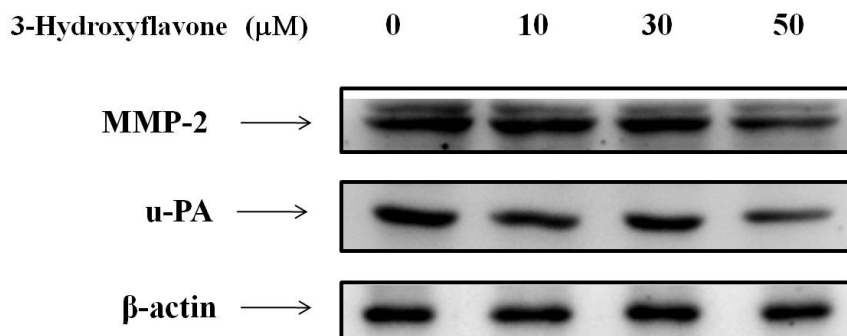
**Fig. 18.** U2OS treat 3-hydroxyflavone (0、10、30、50 μM) for 24 hr, exhibit dose not decreased adhesion rate. Cell adhesion assay were then performed as described in Materials and Methods. Representative adhesion to used collagen coating on 24 well overnight were evident that effect from U2OS treated 3-hydroxyflavone data represent mean  $\pm$  SD from 3 independents.



**Fig. 19.** After treatment with 3-hydroxyflavone, cells were plated in type I coated 24-well plates and cultured in culture media with or without 3-hydroxyflavone. Cell morphology was photographed for morphological studies. We show that the spreading dynamics on 2D surfaces can be described as a hydrodynamic process.

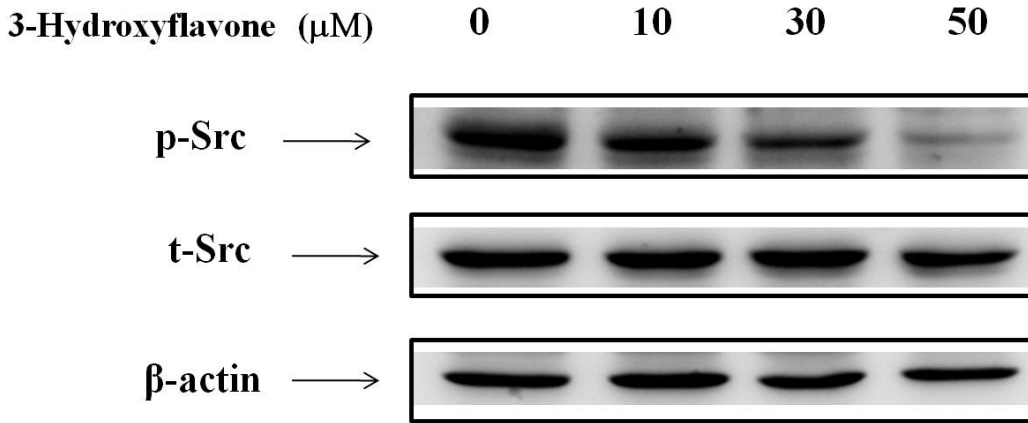


**Fig. 20.** Human osteosarcoma cells, U2OS were treated with 3-hydroxyflavone (0,10 ,30, 50 μM) for 24 hours, and gelatin zymography analyze the activities of MMP-2. Data represented the mean ±SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

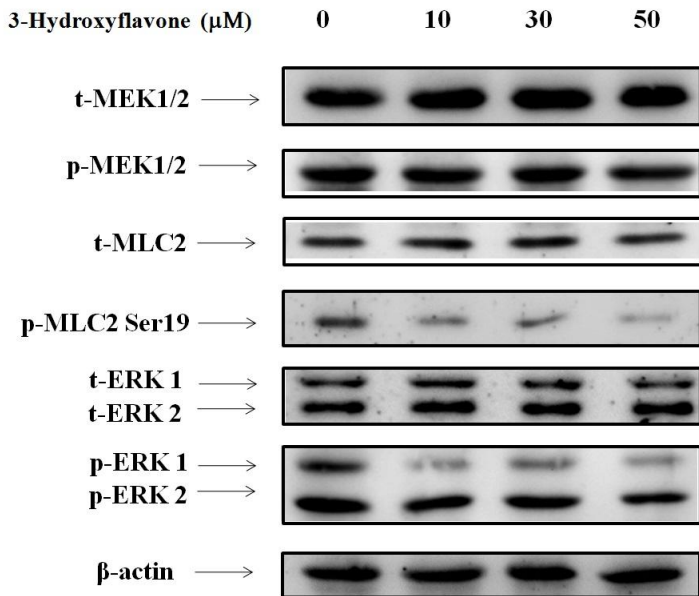




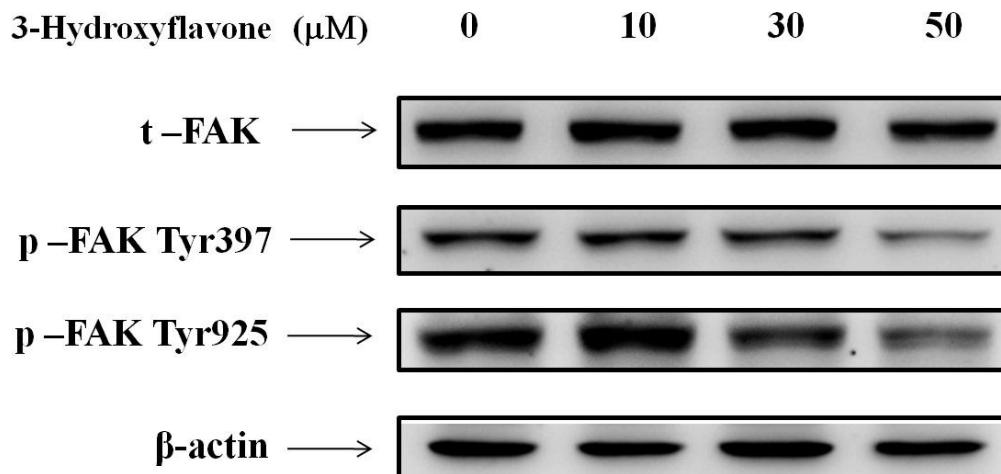
**Fig.21.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. The MMP-2 and u-PA protein , expression levels was decreased. Related proteins were analyzed by Western blotting.



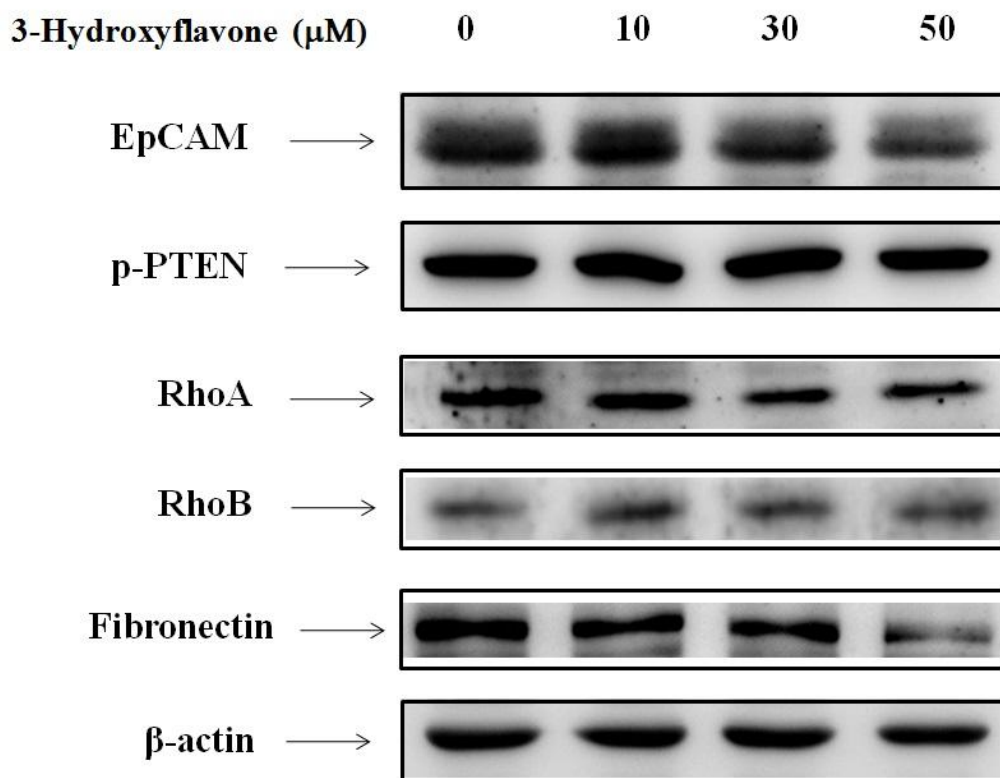
**Fig. 22.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. 3-hydroxyflavone decreased the activity of Src signaling in U2OS cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.



**Fig. 23.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. The phosphorylation MEK1/2, phosphorylation MLC2 Ser19 and phosphorylation ERK1/2 protein , expression levels was decreased. Related proteins were analyzed by Western blotting. Related proteins were analyzed by Western blotting.

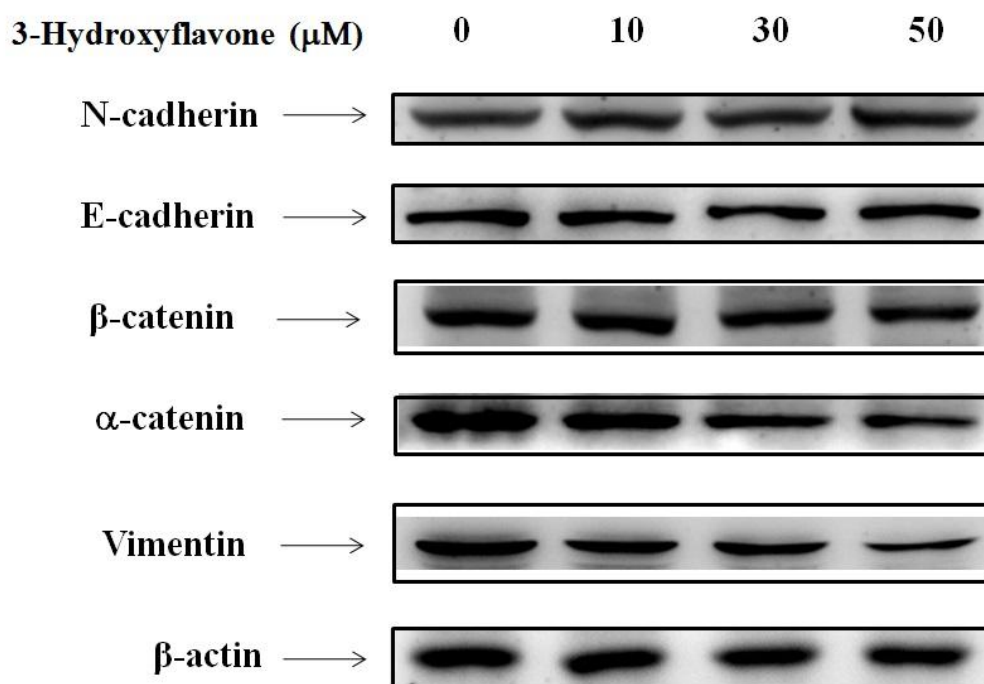


**Fig. 24.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. The phosphorylation FAK Tyr397 and phosphorylation FAK Tyr925 protein , expression levels was decreased. Related proteins were analyzed by Western blotting..

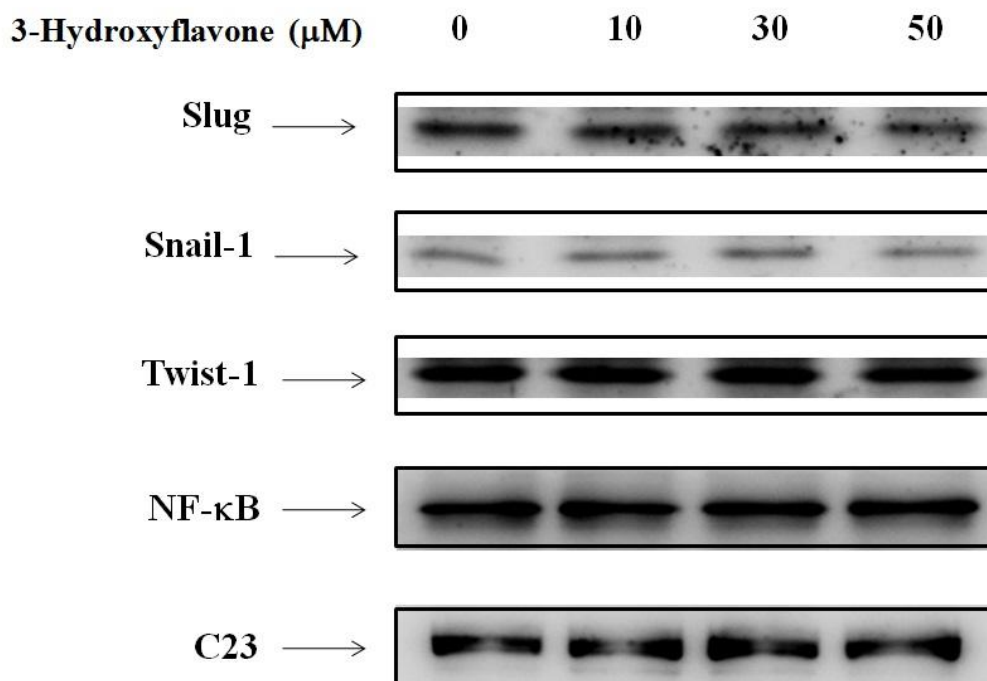


**Fig. 25.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. The EpCAM, RhoA and fibronectin protein , expression levels was decreased. Related proteins were analyzed by Western blotting.





**Fig. 26.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. Vimentin and  $\alpha$ -catenin, mesenchymal markers are declined by 3-hydroxyflavone. Related proteins were analyzed by Western blotting.



**Fig.27.** U2OS cells were treated with 3-hydroxyflavone at indicated concentrations for 24 hr, cell lysates prepared from U2OS cells at various concentration points. The decreased expression of trascription factor Slug in 3-hydroxyflavone-treated U2OS cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.

## 5、計畫成果及自評

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移的效果，並進一步針對骨癌細胞進行相關機制探討及研究。上述之實驗結果，目前黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表。由本實驗室研究證實，為進一步探討類黃酮於骨癌治療的可能性，本研究證實黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移及活體腫瘤生長，顯示類黃酮具有成為輔助性抗癌藥物的潛力。未來希望透過動物活體及細胞實驗我們將證實類黃酮具有抑制癌細胞血管新生的功效及應用性。

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/08/03

科技部補助計畫	計畫名稱: 黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移、血管新生之機制探討
	計畫主持人: 呂克修
	計畫編號: 102-2314-B-040-006-MY2      學門領域: 骨科
無研發成果推廣資料	

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：呂克修		計畫編號：102-2314-B-040-006-MY2					
計畫名稱：黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移、血管新生之機制探討							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	2	0	100%	人次	
		博士生	2	0	100%		
博士後研究員		1	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>目前已達成計畫中預期之進度：完成分析黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移的效果，並進一步針對骨癌細胞進行相關機制探討及研究。上述之實驗結果，目前黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表。由本實驗室研究證實，為進一步探討類黃酮於骨癌治療的可能性，本研究證實黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移及活體腫瘤生長，顯示類黃酮具有成為輔助性抗癌藥物的潛力。未來希望透過動物活體及細胞實驗我們將證實類黃酮具有抑制癌細胞血管新生的功效及應用性</p>
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

目前黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

由本實驗室研究證實，為進一步探討類黃酮於骨癌治療的可能性，本研究證實黃酮類化合物抑制不同骨癌細胞其細胞轉移及活體腫瘤生長，顯示類黃酮具有成為輔助性抗癌藥物的潛力。未來希望透過動物活體及細胞實驗我們將證實類黃酮具有抑制癌細胞血管新生的功效及應用性。