

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

桑椹花青素抑制發炎作用所促進之胃癌細胞惡化轉移機轉
之研究(第2年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 101-2320-B-040-020-MY2
執行期間：102年08月01日至103年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

計畫主持人：黃惠珮

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：侯品儀
碩士班研究生-兼任助理人員：林言勳
大專生-兼任助理人員：賴俊榕

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 103年10月11日

中文摘要：花青素(anthocyanins)廣存於蔬菜、水果等植物中，且有許多報告證明花青素具抗氧化活性、抑制心血管病變及防癌等作用。台灣特有植物桑椹(Mulberry fruit)含有豐富之花青素(Mulberry anthocyanins; MACs)，本實驗室以 HPLC 分析，經定量並計算出乾燥後的桑椹含有約 5% MACs。我們利用 MTT assay、Flow cytometry、TUNEL assay 及 Western blot 等方法，探討 MACs 之抗癌作用。結果發現 MACs 明顯造成 AGS 細胞 DNA 斷裂，導致細胞的凋謝死亡，透過三種抑制劑的使用，如 SB203580 (p38 抑制劑)、PD98059 (MEK 抑制劑)、and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase; PI-3K 抑制劑)，結果推測可能經由 p38 pathway 抑制癌細胞生長。細胞經由 MACs 的處理，活化 p38/JNK 造成 c-jun 的磷酸化，同時也造成 p53 磷酸化，而活化下游的 FasL/Fas 使得 Bid 變成 tBid，使得 Bax 在粒腺體膜上聚集在一起而形成孔洞，結果 cytochrome c 釋放出來跑到細胞質活化 caspase-3 造成細胞的死亡。

近年來之臨床數據與研究顯示，腫瘤相關巨噬細胞(tumor-associated macrophage; TAM)可增加癌細胞增生、侵襲與血管新生能力，並導致病人有較差的癒後。因此，本實驗再進一步釐清 MACs 之抑癌、減少血管新生及轉移作用，與透過抑制 TAM 形成之關係及其機轉。結果顯示胃癌細胞可誘導 THP1 細胞成為 M2 巨噬細胞，而 MACs 可抑制此現象。不論是與 THP1 共同培養或以 M2 細胞收集之 CM (conditioned medium)培養之胃癌細胞，MACs 皆可減緩其增生、移行、侵襲與血管新生之能力。利用 ELISA 分析結果，發現 MACs 可能透過調節腫瘤微環境之 TNF- α 、IL-6 與 CSF-1 的分泌，抑制胃癌細胞生長、發炎現象與血管新生作用，同時抑制 MMP1 分泌去改變細胞黏附作用，並降低 MMP2/MMP9 之表現，以抑制腫瘤侵襲作用。本實驗結果確認桑椹花青素有抑制胃癌之作用。除了可發展為防癌保健食品，未來期待可進入中草藥臨床試驗成為新的癌症轉移之輔助療法用藥。

中文關鍵詞：桑椹花青素、凋謝死亡、細胞生長停滯、腫瘤相關巨噬細胞、侵襲、血管新生

英文摘要：Plant anthocyanins are important part of diet because of their effects on modulating carcinogenesis and cardiovascular disease. Mulberry fruit has abundant anthocyanins, and our laboratory has been quantified and calculated that dried-Mulberry fruit contains 5% anthocyanins by HPLC experiment. Next, we used MTT

assay, flow cytometry, TUNEL assay and Western blot to analyze the antitumor effect of Mulberry anthocyanins (MACs). MACs were isolated from the dried fruit of Mulberry and the effect of MACs was to cause the cancer cell apoptosis. We further used SB203580 (p38 inhibitor), PD98059 (MEK inhibitor), and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase; PI-3K inhibitor) to evaluate their effect on the MACs-induced AGS death. The data showed that only SB203580 had strong potential in inhibiting AGS cell apoptosis and also revealed increased phosphorylation in p38 and c-Jun, cytochrome c release, and expression of tBid, Fas and FasL in the MACs-treated AGS cells. Therefore, we suggested that MACs mediated AGS apoptosis via the p38-FasL and tBid pathway. Evidences from clinical and experimental researches have suggested tumor-associated macrophage (TAM) functioning in tumor cell proliferation, tumor cell migration and invasion and tumor angiogenesis. Clinical studies have shown a correlation between an abundance of TAM and poor prognosis. Anthocyanins richly exist in mulberry plants and have been well characterized to have various bioactive properties. The aim of the present study is to determine the effect of the MACs the reducing macrophage contributes to gastric cancer (GC) cell migration, invasion and angiogenesis. Using cell proliferation study and flow cytometry, we find that AGS cell can induce THP1 monocyte differentiation to macrophage, which can be inhibited by treatment of MACs. The MACs inhibit proliferation, migration and metastasis of AGS cell enhanced by macrophage through regulating the secretion of MMP1, IL-6, CSF-1 and interferon-gamma by using ELISA assay. Also, after co-culture of AGS and THP1 cell, MACs can decrease the MMP2/9 levels of AGS cells. Beside, MACs can decrease the formation of tumor angiogenesis inducing by TAM in vitro and in vivo via inhibiting VEGF formation. Comprehensive, this work will provided the research model about the natural food inhibiting the tumor formation, metastasis, and angiogenesis. Besides, we can prove the mulberry anthocyanins as an efficient

agent against the cancer

英文關鍵詞： Mulberry anthocyanins (MACs)、apoptosis、cell cycle arrest、tumor-associated macrophage (TAM)、invasion、angiogenesis

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

(計畫名稱)

桑椹花青素抑制發炎作用所促進之胃癌細胞惡化轉移機轉之 研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC101-2320-B-040-020-MY2

執行期間：101年08月01日至103年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學系生物化學科

計畫主持人：黃惠珮

共同主持人：

計畫參與人員：侯品儀、林言勳、賴俊榕

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，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

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，____ (請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中 華 民 國 103 年 10 月 11 日

目 錄

中文摘要.....II

英文摘要.....III

前言與研究目的.....1

文獻探討.....1

研究方法.....2

結果與討論.....2

圖表.....6

計畫成果自評.....22

中文摘要

花青素(anthocyanins)廣存於蔬菜、水果等植物中，且有許多報告證明花青素具抗氧化活性、抑制心血管病變及防癌等作用。台灣特有植物桑椹(Mulberry fruit)含有豐富之花青素(Mulberry anthocyanins; MACs)，本實驗室以 HPLC 分析，經定量並計算出乾燥後的桑椹含有約 5% MACs。我們利用 MTT assay、Flow cytometry、TUNEL assay 及 Western blot 等方法，探討 MACs 之抗癌作用。結果發現 MACs 明顯造成 AGS 細胞 DNA 斷裂，導致細胞的凋謝死亡，透過三種抑制劑的使用，如 SB203580 (p38 抑制劑)、PD98059 (MEK 抑制劑)、and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase; PI-3K 抑制劑)，結果推測可能經由 p38 pathway 抑制癌細胞生長。細胞經由 MACs 的處理，活化 p38/JNK 造成 c-jun 的磷酸化，同時也造成 p53 磷酸化，而活化下游的 FasL/Fas 使得 Bid 變成 tBid，使得 Bax 在粒腺體膜上聚集在一起而形成孔洞，結果 cytochrome c 釋放出來跑到細胞質活化 caspase-3 造成細胞的死亡。

近年來之臨床數據與研究顯示，腫瘤相關巨噬細胞(tumor-associated macrophage; TAM)可增加癌細胞增生、侵襲與血管新生能力，並導致病人有較差的癒後。因此，本實驗再進一步釐清 MACs 之抑癌、減少血管新生及轉移作用，與透過抑制 TAM 形成之關係及其機轉。結果顯示胃癌細胞可誘導 THP1 細胞成為 M2 巨噬細胞，而 MACs 可抑制此現象。不論是與 THP1 共同培養或以 M2 細胞收集之 CM (conditioned medium)培養之胃癌細胞，MACs 皆可減緩其增生、移行、侵襲與血管新生之能力。利用 ELISA 分析結果，發現 MACs 可能透過調節腫瘤微環境之 TNF- α 、IL-6 與 CSF-1 的分泌，抑制胃癌細胞生長、發炎現象與血管新生作用，同時抑制 MMP1 分泌去改變細胞黏附作用，並降低 MMP2/MMP9 之表現，以抑制腫瘤侵襲作用。本實驗結果確認桑椹花青素有抑制胃癌之作用。除了可發展為防癌保健食品，未來期待可進入中草藥臨床試驗成為新的癌症轉移之輔助療法用藥。

關鍵字：桑椹花青素、凋謝死亡、細胞生長停滯、腫瘤相關巨噬細胞、侵襲、血管新生

英文摘要

Plant anthocyanins are important part of diet because of their effects on modulating carcinogenesis and cardiovascular disease. Mulberry fruit has abundant anthocyanins, and our laboratory has been quantified and calculated that dried-Mulberry fruit contains 5% anthocyanins by HPLC experiment. Next, we used MTT assay, flow cytometry, TUNEL assay and Western blot to analyze the antitumor effect of Mulberry anthocyanins (MACs). MACs were isolated from the dried fruit of Mulberry and the effect of MACs was to cause the cancer cell apoptosis. We further used SB203580 (p38 inhibitor), PD98059 (MEK inhibitor), and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase; PI-3K inhibitor) to evaluate their effect on the MACs-induced AGS death. The data showed that only SB203580 had strong potential in inhibiting AGS cell apoptosis and also revealed increased phosphorylation in p38 and c-Jun, cytochrome c release, and expression of tBid, Fas and FasL in the MACs-treated AGS cells. Therefore, we suggested that MACs mediated AGS apoptosis via the p38-FasL and tBid pathway.

Evidences from clinical and experimental researches have suggested tumor-associated macrophage (TAM) functioning in tumor cell proliferation, tumor cell migration and invasion and tumor angiogenesis. Clinical studies have shown a correlation between an abundance of TAM and poor prognosis. Anthocyanins richly exist in mulberry plants and have been well characterized to have various bioactive properties. The aim of the present study is to determine the effect of the MACs the reducing macrophage contributes to gastric cancer (GC) cell migration, invasion and angiogenesis. Using cell proliferation study and flow cytometry, we find that AGS cell can induce THP1 monocyte differentiation to macrophage, which can be inhibited by treatment of MACs. The MACs inhibit proliferation, migration and metastasis of AGS cell enhanced by macrophage through regulating the secretion of MMP1, IL-6, CSF-1 and interferon-gamma by using ELISA assay. Also, after co-culture of AGS and THP1 cell, MACs can decrease the MMP2/9 levels of AGS cells. Beside, MACs can decrease the formation of tumor angiogenesis inducing by TAM in vitro and in vivo via inhibiting VEGF formation. Comprehensive, this work will provided the research model about the natural food inhibiting the tumor formation, metastasis, and angiogenesis. Besides, we can prove the mulberry anthocyanins as an efficient agent against the cancer.

Key words: Mulberry anthocyanins (MACs) 、 apoptosis 、 cell cycle arrest 、 tumor-associated macrophage (TAM) 、 invasion 、 angiogenesis

(三)報告內容：包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）等。

前言與研究目的

癌症的形成原因是透過許多複雜且多重的過程，近年來對於癌症治療的方法雖然日新月異，但效果仍然有限。由於目前癌症仍為台灣十大死因之首，因此如何預防或延緩癌症的發生實為刻不容緩之事。許多研究趨向以天然物成份或複方來達到抑制癌細胞的增生及惡化，例如 Tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為 chemopreventive agents，因此本實驗也希望藉由對桑椹花青素的研究，來達到預防或延緩癌症。

然而對於桑椹在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有桑椹的成分分析等，國內的研究從網路搜尋也只有花青素成份分離及鑑定等，至於其他相關植物花青素及多酚之研究則如緒論所述，大部分對於乳癌、大腸直腸癌及皮膚炎都有預防的作用，但對於胃癌僅止於活體外實驗，而動物方面的研究研究則更少。本研究先前已證實並於今年發表桑椹花青素(MACs)抑制胃癌細胞生長及血管新生作用，於細胞實驗中發現 MACs 可以減少 AGS 胃癌細胞促使腫瘤相關巨噬細胞(TAM)形成與移行能力，因此，本實驗再次以台灣特有之桑椹萃取物分離之花青素，進一步以各種胃癌細胞與不同動物誘導胃癌模式，觀察其透過調控腫瘤相關巨噬細胞形成之為環境，以達到抑癌、減少血管新生及轉移作用之機制，俾以發展為一天然抗癌物質。

對於桑椹在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有桑椹的成分分析等，國內的研究從網路搜尋也只有花青素成份分離及鑑定等，至於其他相關植物花青素之研究則甚多，已描述於背景資料中。本實驗之相關研究如桑椹萃取物可抑制兔子之動脈粥狀硬化、桑椹花青素能抑制氧化態 LDL 產生及黑色素瘤轉移，本實驗室於今年發表桑椹花青素能藉由促進胃癌細胞凋亡而抑制生長，並於動物實驗獲得證明，此外桑葉成分亦可以降低心血管疾病的產生。

有關胃癌之治療，除了傳統的手術與目前合併化療之新療法之外，十字花科之 indole 成分、葡萄之 resveratrol、大豆之 isoflavone 等，都可有效的抑制胃癌細胞生長，但都僅止於活體外研究。而 Liu, M 等人發現 cranberry 可以抑制 SGC-7901 胃癌細胞生長，並減少 SGC-7901 在 Balb/c mice 之腫瘤體積，以上文獻為天然物治療胃癌一線曙光，但都未進一步有動物胃癌抑制作用詳細之研究。

文獻探討

癌症的形成原因是透過許多複雜且多重的過程，近年來對於癌症治療的方法雖然日新月異，但效果仍然有限。由於目前癌症仍為台灣十大死因之首，因此如何預防或延緩癌症的發生為今日刻不容緩之事。許多研究趨向以天然物成份或複方來達到抑制癌細胞的增生及惡化，例如 Tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為 chemopreventive agents，有關胃癌之治療，除了傳統的手術與目前合併化療之新療法之外，十字花科之 indole 成分、葡萄之 resveratrol、大豆之 isoflavone 等，都可有效的抑制胃癌細胞生長，但都僅止於活體外研究。而 Liu, M. 等人發現 cranberry 可以抑制 SGC-7901 胃癌細胞生長，並減少 SGC-7901 在 Balb/c mice 之腫瘤體積，以上文獻

為天然物治療胃癌一線曙光，因此本實驗也希望藉由對桑椹花青素的研究，來達到預防或延緩胃癌發生或惡化。

然而對於桑椹與其他相關植物花青素及多酚，在醫學上的報導則如緒論所述，大部分對於乳癌、大腸直腸癌及皮膚炎都有預防的作用，但對於胃癌僅止於活體外實驗，而動物方面的研究則更少。此外，由於慢性發炎會活化巨噬細胞與嗜中性白血球，並促使其釋放出極具侵害性的自由基以攻擊入侵的病原體，在長期自由基的微環境下，可造成細胞內遺傳基因的突變，使細胞增生產生異常，而導致癌症的發生。因此可解釋為什麼慢性胃炎最後會導致胃癌、大腸的慢性發炎可轉化成大腸癌、以及肝臟的慢性發炎會引起肝癌發生的原因。同時癌細胞會趨化免疫細胞，轉而利用之，以達到腫瘤增生、侵襲、轉移與血管新生之目的。本研究先前已證實洛神花青素可以經由促進胃癌細胞週期停滯、凋亡，使胃癌細胞生長被抑制，因此，本實驗再次以台灣特有之桑椹萃取物分離之花青素，探討其對人類胃癌細胞之作用，及抗癌之分子機制，並進一步以動物模式觀察其抑癌作用，同時以細胞與動物模式，觀察其透過抑制腫瘤相關巨噬細胞形成之抑癌、減少血管新生及轉移作用之機制，俾以發展為一天然抗癌物質。

研究方法

【A】 桑椹花青素(MACs)之製備

【B】 胃癌細胞株與單核球細胞 Co-culture 條件設定：利用 migration assay 方法

【C】 桑椹花青素 MACs 抑制巨噬細胞促進胃癌之轉移及侵犯能力：分析 cell migration, invasion, and MMP2 and 9 secretion

【D】 桑椹花青素抑制 TAM 促進胃癌之血管新生能力之探討：利用雞胚尿囊絨毛膜血管增生 (Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Vascularisation) 方法

【E】 桑椹花青素抑制 TAM 促進胃癌細胞生長、轉移侵犯及血管新生能力機制之探討：利用 cell proliferation, flow cytometry, ELISA, western blotting 等方法分析之

結果與討論

【一】 桑椹花青素 (MACs) 之分離與鑑定

取乾燥桑椹果粒秤取乾重 20 g，以 0.1 % 鹽酸甲醇溶液於 4°C 下浸泡，隔夜，將果實過濾後，以真空減壓濃縮機濃縮。濃縮後的溶液加入 250 ml 二次水溶解，在利用 Diaion HP-20 樹脂充填之管柱浸泡 24 小時，然後，以 0.1 % 鹽酸水溶液清除雜色素，再以甲醇將花青素沖提後以真空濃縮，所得產物取二次水 250 ml 溶解再經真空冷凍乾燥機乾燥為粉末。所得的粉末約有 1g 左右。經換算桑椹果實內萃取的 MACs 產率有 5 % (Figure 1A)。由分光光度計 (spectrophotometer) 分析萃取出之 MACs，其吸光值在經公式換算，而換算出所萃取出之花青素純度大約有 85~95 %。經 HPLC 分析，Cyanidin 的滯留時間 (retention time; RT) 在 25.6 分鐘，而 delphinidin 在 24.1 分鐘，pelaryanidin 的 RT 在 27.1 分鐘；malcadin 的 RT 在 27.4 分鐘；peonidin 的 RT 在 27.6 分鐘；萃取出之 MACs 酸水溶液 RT 分別為 24.1 及 25.6 分鐘。從結果可得，MACs 主要含有 cyanidine 與 delphinidin (Figure 1B)。

【二】 胃癌細胞株與單核球細胞 Co-culture 條件、M2 巨噬細胞之誘導與其 CM (conditioned medium) 培養之比例設定

本實驗進一步選取 3 株不同胃癌細胞 (AGS、MKN74 與 SCM1)，以不同比例之細胞數與單核球細胞 THP1 共養 (co-culture)，再以 migration and invasion assay 決定最佳共養細胞數。Figure 2A 與 Figure 2B 皆顯示當 AGS 細胞 5×10^4 cells/ml，THP1 細胞 2.5×10^4 cells/ml 時，AGS 細胞有最好的移行與侵襲能力，因此本實驗後續之研究皆以 AGS : THP1=2:1 之比例培養；Figure 2C 與 Figure 2D 則同樣顯示當

MKN74 細胞 5×10^4 cells/ml，而 THP1 細胞 2.5×10^4 cells/ml 時，其 MKN74 細胞有最好的 migration 與 invasion 能力，故後續之實驗以 MKN74:THP1=2:1 之比例培養；Figure 2E 表示當 SCM1:THP1=2:1~1:1 時，SCM1 細胞有最佳的 migration 能力，然而於 Figure 2F 中發現當 SCM1 細胞 5×10^4 cells/ml，THP1 細胞 2.5×10^4 cells/ml 時，SCM1 細胞有最好的 invasion 能力，因此本實驗後續之研究決定以 SCM1:THP1=2:1 之比例進行實驗。

M2 巨噬細胞之誘導方式，本實驗使用 10 ng/ml PMA 培養 48 小時，再以 IL-4 (25 ng/ml) 刺激 2 小時，誘導後之 M2 巨噬細胞再經過 1 天之培養，所收集之培養基則為 CM (conditioned medium)。選取 3 株 AGS、MKN74 與 SCM1 胃癌細胞，以不同比例之 RPMI-1640 或 DMEM 與 CM (3:7、4:6、5:5、6:4、7:3) 培養後，利用 migration assay 方式選擇最佳培養基比例，結果顯示於 Figure 3。以單純培養基 (RPMI-1640 或 DMEM) 培養之胃癌細胞，其 migratory cells 作為 100% (CLT)，發現 CM 在不同比例存在下，皆會促進胃癌細胞移行，最佳比例介於 medium:CM=4:6~6:4，未來實驗 medium:CM=1:1 之比例進行。

為研究胃癌細胞與 THP1 共養後，與胃癌細胞在 M2 巨噬細胞之 CM 培養後之移行能力的差異，3 株細胞以上述共養條件培養，或以 medium:CM=1:1 之條件處理 24 小時後，收集細胞進行 migration assay，結果如 Figure 4 所示，以單純胃癌細胞培養之 migratory cells 作為 100% (CLT)，共養以 co-culture 表示，與 M2 巨噬細胞之 medium 培養以 CM 表示，由結果可知，AGS 細胞不論是在 co-culture 或 CM 之條件，被促進之移行能力皆為最高 (分別為 2.2 倍與 2.22 倍)；雖然 MKN74 細胞在 Figure 2C 與 Figure 2D 所表現之移行與侵襲能力與 AGS 細胞類似，但與單純培養之 MKN74 細胞比較，其被巨噬細胞誘導之移行與侵襲能力表現為最低 (分別為 2.0 倍與 1.78 倍)；相對的，SCM1 雖然在 co-culture 後被誘導之移行與侵襲能力表現為最低 (Figure 2E and F)，但與單純培養之細胞比較，其被促進之移行能力分別為 2.2 倍與 2.0 倍。綜合以上結果可知，三株胃癌細胞本身之移行能力分別為 MKN74>AGS>SCM1，而經 M2 細胞誘導後則為 AGS>SCM1>MKN74。MKN74 本身雖具有較高之移行能力，但 M2 細胞卻僅能些微加劇其移行結果，而 M2 細胞誘導 AGS 之效果最佳，因此本研究優先採取 AGS 細胞進行以下實驗。

【三】桑椹花青素(MACs)抑制 THP1 細胞轉型成 M2 巨噬細胞之能力

利用流式細胞儀分析 M2 巨噬細胞表面抗原 CD206，MACs 影響 THP1 細胞轉型成 M2 巨噬細胞之結果如 Figure 5 所示，AGS 與 THP1 細胞共養後，使 THP1 轉型成 M2 細胞能力，與 PMA 誘導 THP1 細胞形成 M2 細胞相比較之下，AGS 誘導 THP1 轉型成 M2 細胞能力，效果較 PMA 強，此外低劑量之 MACs (1 mg/ml) 則可抑制 THP1 轉型成 M2 細胞，此初步實驗結果證實 MACs 具有抑制 AGS 誘導單核球細胞轉變為 M2 巨噬細胞之能力。

Figure 6 為 THP1 與 AGS 細胞共養情形下，分別以不同劑量之 MACs 處理 1 天後，於顯微鏡下照相之結果。白色箭頭所指之細胞較小且型態成紡錘體狀，顏色較深，為 AGS 胃癌細胞；紅色箭頭代表從懸浮之 THP1 細胞轉型為貼壁之巨噬細胞，細胞呈圓形型態，顏色較亮。由 Figure 5 與 Figure 6 結果，顯示出在高劑量 MACs 處理後之 AGS 細胞量，與不處理 MACs 之組別比較之下，貼壁之巨噬細胞均減少，未來將使用 M2 巨噬細胞表面抗原實驗，以確認 MACs 可以抑制 THP1 細胞轉型成 M2 巨噬細胞。

【四】桑椹花青素(MACs)抑制巨噬細胞促進胃癌之增生能力

將 AGS 與 THP1 細胞共養，同時加入不同 MACs 濃度 (0-3 mg/ml) 分別處理 1, 2, 3 天，以 Trypsin 收集貼壁 AGS 細胞，利用 Trypan blue 染色方法計數細胞，所得到的細胞數結果如 Figure 7A。AGS 細胞經過不同濃度 MACs 處理 1 與 2 天之後，3 mg/ml MACs 處理之細胞數為未處理 MACs 之 50% 左右，可知 MACs 可以抑制共養情形下 AGS 的增生能力，而在 MACs 處理 3 天後，其抑制效果更為顯著，2 mg/ml MACs 可抑制共養情形下 AGS 的增生能力約 50%。由此可知在高濃度或長時間處理 MACs 後，

可以降低與 THP1 細胞共養下，造成胃癌細胞增生之現象。

Figure 7 B 為將 AGS 細胞培養於 CM，並處理不同 MACs 濃度 (0-3 mg/ml) 1 到 3 天，最後再利用 Trypan blue 染色方法計數細胞，所得到的細胞數結果。M2 巨噬細胞以共養方式比以 CM 培養更能促進胃癌細胞增生能力，與 Figure 7A 比較之下，MACs 抑制 M2 巨噬細胞促進胃癌細胞增生能力，共養方式與以 CM 培養所得結果類似。綜合以上結果可知，桑椹花青素 MACs 具有抑制巨噬細胞促進胃癌之增生能力。

【五】桑椹花青素 MACs 抑制巨噬細胞促進胃癌之轉移及侵犯能力

利用 Transwell 分析細胞轉移現象，當 AGS 與 THP1 細胞共養，或以 RPMI-1640 : CM=1 : 1 培養，並處理不同 MACs 濃度後，再將 AGS 細胞打下，種入 Transwell 中，5 小時後觀察細胞轉移至下層膜的數目。以 Giemsa stain 進行染色後，發現在共養情形下，當細胞處理高劑量之 MACs 後，轉移至下層的細胞數明顯減少，代表 AGS 細胞轉移能力被 MACs 所抑制(Figure 8A)。預先使用 metrigel 覆蓋於 Transwell 膜上，所進行之 invasion assay，亦有類似之結果 (Figure 8B)。然而在使用 CM 於 transwell 於下層做為趨化物，雖然 MACs 也會降低 AGS 細胞的移行與侵襲的細胞數，但並無統計上的意義(data not shown)。

接著以 gelatin zymography assay 觀察 AGS 細胞與 THP1 細胞共養加入不同 MACs 濃度後，於 24 小時後吸取其培養基，分析 MMP2 及 MMP9 的表現。我們發現 MMP9 的表現量在低劑量之 MACs 處理下級有抑制作用，MACs 在濃度越高的情況之下對 MMP2 及 MMP9 的抑制作用越強，且在最高濃度處理下 MMP9 與 MMP2 的表現量只剩原來未處理 MACs 的 3%及 33% (Figure 9 A)，顯示出 MACs 可以抑制細胞外基底膜被 MMPs 水解，並具有統計意義。Figure 9B 則為 AGS 細胞以 CM 培養並以 MACs 處理後，收集其培養基，所得之 MMP2 與 MMP9 之分析結果。有別於 AGS 細胞與 THP1 細胞共養的結果，MACs 對 MMP9、proMMP2 與 MMP2 抑制效果較差，只有在中高濃度處理後，減少量才有統計意義。

【六】桑椹花青素抑制 TAM 促進胃癌之血管新生能力之探討

利用雞胚尿囊絨毛膜血管增生實驗 (Chorioallantoic membrane vascularisation ; CAMV assay)，觀察 MACs 對 TAM 促進 AGS 血管新生之影響。首先 AGS 細胞以不同濃度 MACs 處理 24 小時後，以 AGS : THP1=2 : 1 之細胞數，種於 CAM 上，並於蛋殼上標示記號，每日固定於同一位置拍照，持續 7 天，血管分布面積(紅色部分)以 IPWIN60 圖片編輯計算軟體分析之，相片圖示於 Figure 10A。而各組平均量化圖，以施打 THP1 後 7 天血管量化/施打 THP1 第 0 天血管量化=100% (CLT)，其他實驗組與對照組再與之比較 (Figure 10B)。由 Figure 10B 可知，單獨施打 M2 巨噬細胞只能些微增加血管新生，單獨處理 AGS 細胞造成之血管新生現象較 M2 細胞多，但皆不具統計上之意義，如果同時施打 AGS 與 THP1 細胞，7 天後之血管量化後，約為 CLT 之 3.5 倍，然而經 MACs 處理之 AGS 細胞與 THP1 共同施打於 CAM 上，7 天後血管並無變粗之情形 (Figure 10A)，甚至略細於第 3 天之血管，所得之量化結果亦低於 100%。綜合以上可得知，MACs 可以抑制 TAM 促進胃癌之血管新生能力。

【七】桑椹花青素抑制 TAM 促進胃癌細胞生長、轉移侵犯及血管新生能力機制之探討

腫瘤可分泌趨化因子 (CC-chemokines，如 CCL2)、M-CSF 與 VEGF，去招募血液中單核球細胞至腫瘤附近，使其成為 M2 巨噬細胞 (TAM)，而 TAM 可以分泌生長因子 (如 EGF、FGF、cytokines 等) 以促進腫瘤生長；TAM 同時也分泌血管新生因子 (VEGF、FGF、TGFβ、chemokines) 啟動血管新生作用，並分泌 MMPs 來降解與重組基質。因此我們進一步利用 ELISA 分析各種調控因子，Figure 11 顯示，AGS 細胞幾乎不分泌 TNF-α、CSF-1、IL-6、MMP1 與 IFNγ，但當 AGS 與 THP1 共養後，分泌之 TNF-α、CSF-1、IFNγ 與 M2 巨噬細胞分泌量相同或略高 (Figure 11A、B、E)，經 MACs 處理後，分泌量皆下降，且高劑量 MACs 可將 TNF-α、CSF-1、IFNγ 恢復至與 THP1 細胞分泌量相同。IL-6 可促進慢性發炎、腫瘤生長、轉移、血管新生、與各種相關訊息傳遞作用，Figure 11C 顯示 AGS 與 THP1 共養分泌

之 IL-6 高於 M2 巨噬細胞表現量，高劑量 MACs 處理下才能抑制 IL-6 之分泌。Figure 11D 結果表示 MMP1 分泌情形，可看出 AGS 與 THP1 共養分泌之 MMP1 較 M2 巨噬細胞表現量低，MACs 雖可降低兩種細胞共養之 MMP1 表現量，但卻無法降至與 THP1 分泌之數值。以上結果顯示，雖然低劑量 MACs 對抑制腫瘤與 TAM 為環境之相關因子作用不一，但在高劑量 MACs 作用下，皆可抑制 TNF- α 、CSF-1、IFN γ 、MMP1、IL-6，且皆具有統計意義。然而 MACs 雖然在高劑量可以抑制 IL-8 與 ICAM-1 之分泌量，但不具統計意義；此外，其他有關抗腫瘤細胞激素如 GM-CSF 與 IL-12，以及 TIMP-1 之分析，發現 MACs 皆無法增加其表現 (data not shown)。Table 1 為 MACs 抑制 TAM 分泌 TNF- α 、CSF-1、IFN γ 、MMP1、IL-6 數據統整表。

TNF- α 與 IL-6 與其接受體結合後，可活化 Jak/Stat、SHP2/ERK 或 Akt 三條不同路徑，促進癌細胞增生、血管新生、並抑制免疫細胞凋亡，最後導致慢性發炎而加劇癌症惡化。本實驗最後利用 Immunoblotting 方法，證實 MACs 可抑制 THP1 與 AGS 共養下，所活化之 PI3K/Akt、Stat3、Ras/ERK and p38 pathways，而降低 NF- κ B、COX2 and VEGF 的表現量(Figure 12)，但其上下游關係，與更詳細之調節機制，仍需進一步探討。

【八】桑椹花青素(MACs) 抑制 TAM 促進胃癌細胞生長、轉移侵犯及血管新生能力機制

本研究結果顯示，AGS、MKN 74、SCM1 胃癌細胞皆可以促進 THP1 單核球細胞轉型為 M2 巨噬細胞，我們進一步使用 AGS 與 THP1 共養處理後，發現 TNF- α 、IL-6、CSF-1、MMP1、IFN γ 、MMP2/9 皆增加，促使 AGS 細胞增生、移行、血管新生等現象。然而以 MACs 處理 AGS 與 THP1 共養後，THP1 單核球細胞轉型為 M2 巨噬細胞被抑制，AGS 增生情形消失，AGS 細胞移行與侵襲能力降低，TNF- α 、IL-6、CSF-1、MMP1、IFN γ 、MMP2/9 等分泌皆減少，於雞胚尿囊絨毛膜血管增生實驗中也發現 MACs 可抑制 AGS 與 THP1 共養之血管新生能力，初步判斷可能經由抑制 PI3K/Akt、Stat3、Ras/ERK 與 p38 等路徑，降低 NF- κ B、COX2 和 VEGF 的表現量，而減少發炎、增生因子、與血管新生之能力 (Figure 13)。

圖表

Figure 1. Anthocyanins content of mulberry anthocyanins (MACs). (A) The yield and total anthocyanins content of mulberry extracts. (B) Cyanidin and delphinidine content of HAs were analyzed by HPLC. Standards are cyanidin (red), delphinidin (green), pelaryandin (blue), malcidin (orange) and peonidin (purple).

(A)

Dried <i>Mulberry</i>	MACs	Total anthocyanins	Yield (%)
20g	1g	0.85-0.95g	5%

(B)

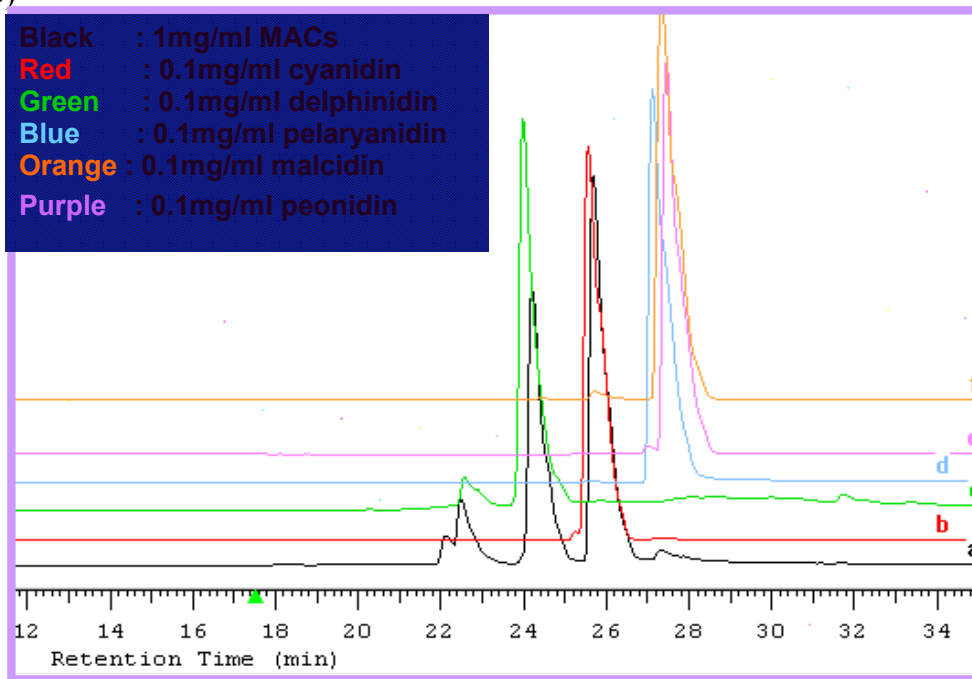


Figure 2. THP1 cells induced 3 gastric cancer cells migratory/invasion ability. The different density THP1 cells were co-cultured with AGS (A, B), MKN74 (C, D) and SCM1 (E, F) gastric cancer cell lines (5×10^4 cells/ml) for 24 h, then the migration (A, C, E) and invasion (B, D, F) of AGS, MKN74 and SCM1 cells were obviously increased with THP-1 cell in 2.5×10^4 cells/ml.

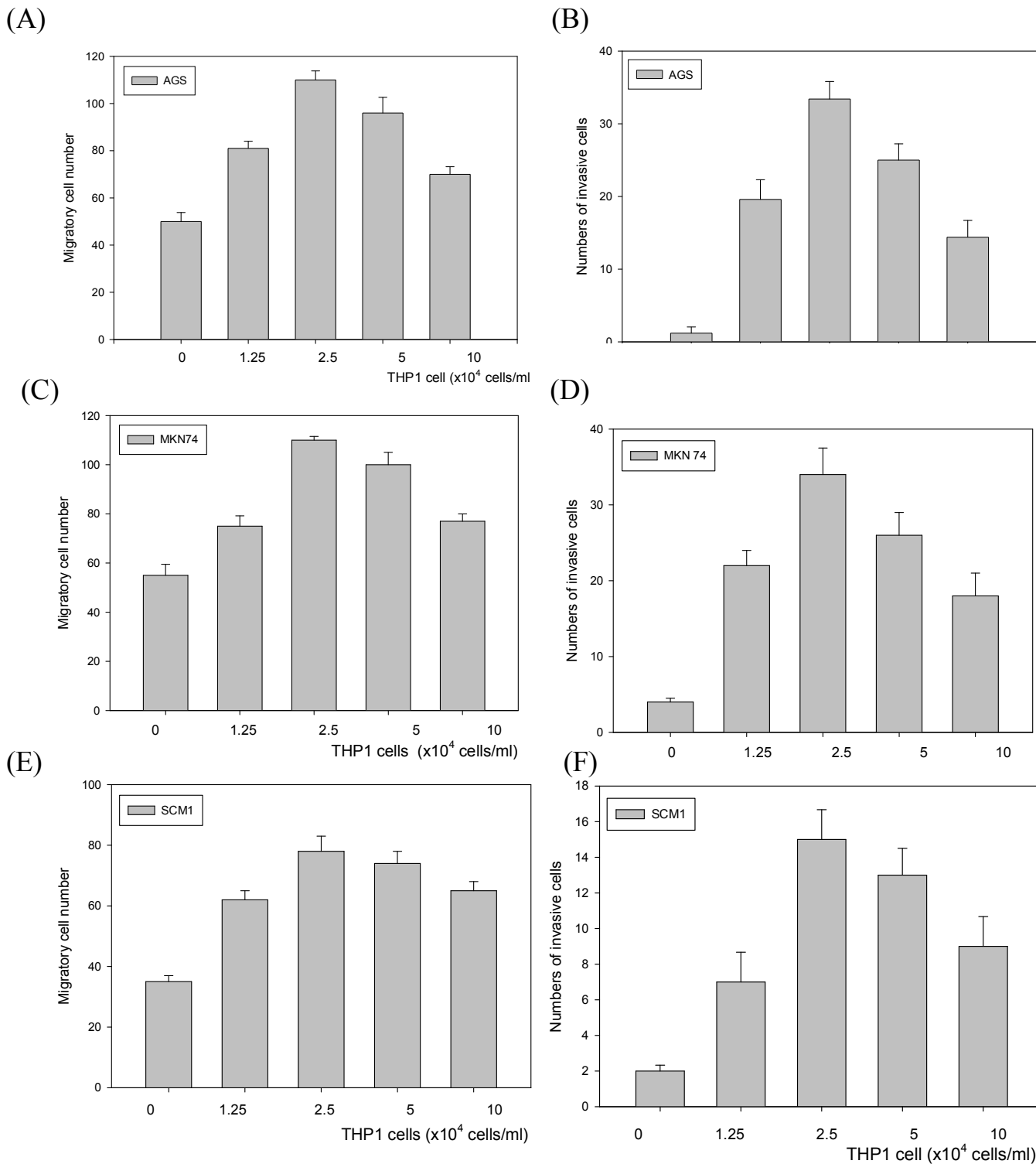


Figure 3. CM from M2 macrophage induced 3 gastric cancer cells migratory ability. Three different gastric cancer cell lines (5×10^4 cells/ml) were cultured in indicated RPMI-1640 or DMED/CM ratio (3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3) for 24 h, the migratory abilities of AGS, MKN74 and SCM1 cells were detected by Transwell assay and compared with control medium (CLT).

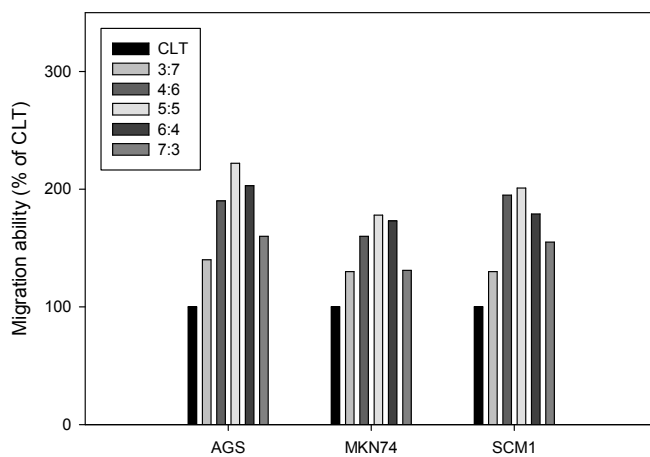


Figure 4. Migratory abilities of 3 gastric cancer cells in co-culture or CM conditions. Three different gastric cancer cell lines (5×10^4 cells/ml) were cultured in indicated RPMI-1640 or DMED/CM=1:1 or co-cultured with THP1 cells (2.5×10^4 cells/ml) for 24 h. The migratory abilities of these treated cells were compared with untreated gastric cancer cells (CTL) respectively. Values were expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the CTL group.

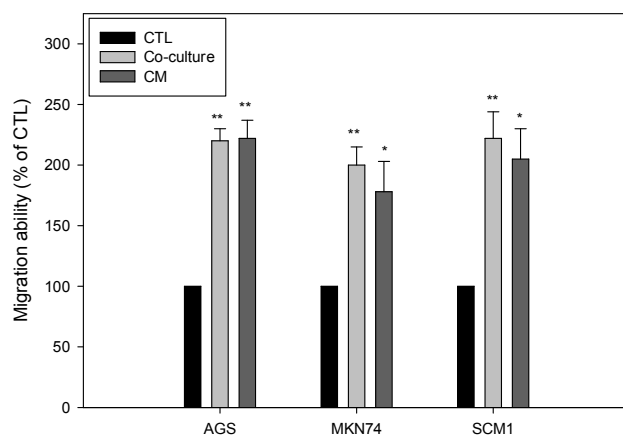


Figure 5. MACs inhibited M2 cells formation from THP1 cells after co-cultured with AGS cells. AGS (5×10^4 cells/ml) was co-cultured with THP1 (2.5×10^4 cells/ml). After exposure of various concentrations of MACs for 24h, increased M2 cells were confirmed by flow cytometric analyses with CD206 M2 macrophages marker. After exposure to 10 ng/mL PMA for 48 hr, THP1 cells were then treated with IL-4 (25 ng/ml) for 2 hr. The cell, described as M2 macrophage, was as a positive control.

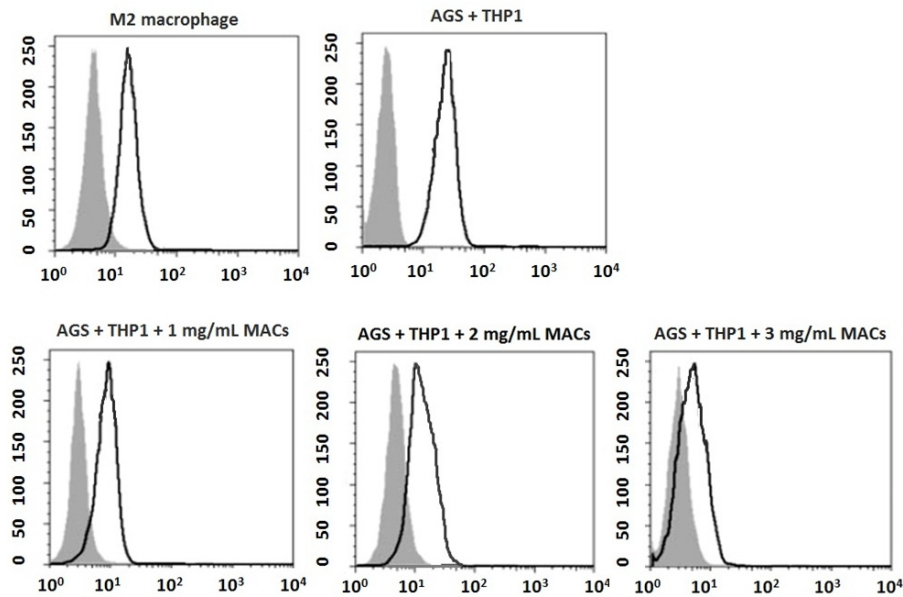


Figure 6. MACs inhibited THP1 monocytes adhesion after co-cultured with AGS cells. AGS (5×10^4 cells/ml) was co-cultured with THP1 (2.5×10^4 cells/ml). The photos of TAMs were observed after exposure of various concentrations of MACs for 24h. (red arrow, adhesive cells; white arrow, AGS cells)

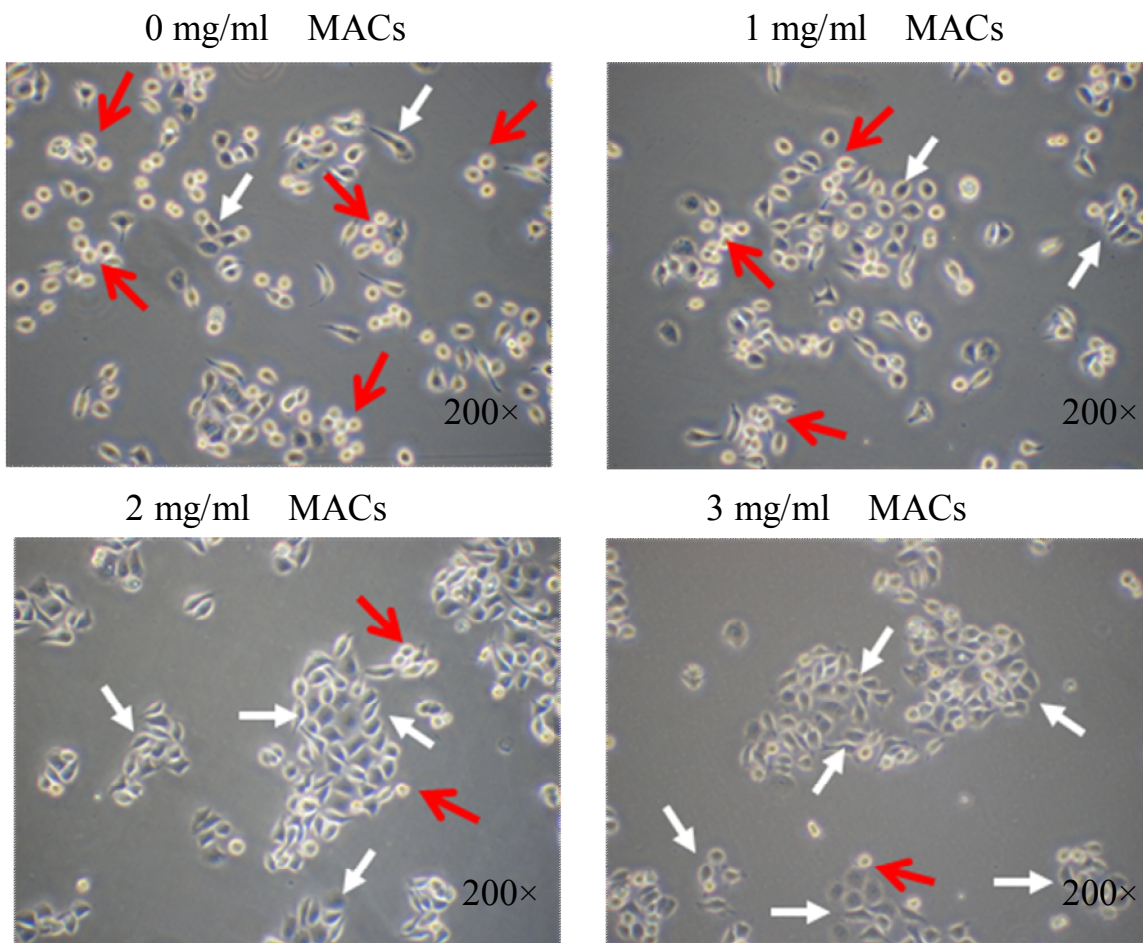


Figure 7. MACs inhibited AGS cells proliferation. AGS (5×10^4 cells/ml) was seeded in 24-well plate and co-culture with THP1 (2.5×10^4 cells/ml) (A), or cultured with CM (B). After exposure of various concentrations of MACs for 1, 2, and 3 days, AGS cells viability was assayed by MTT. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the no treatment group.

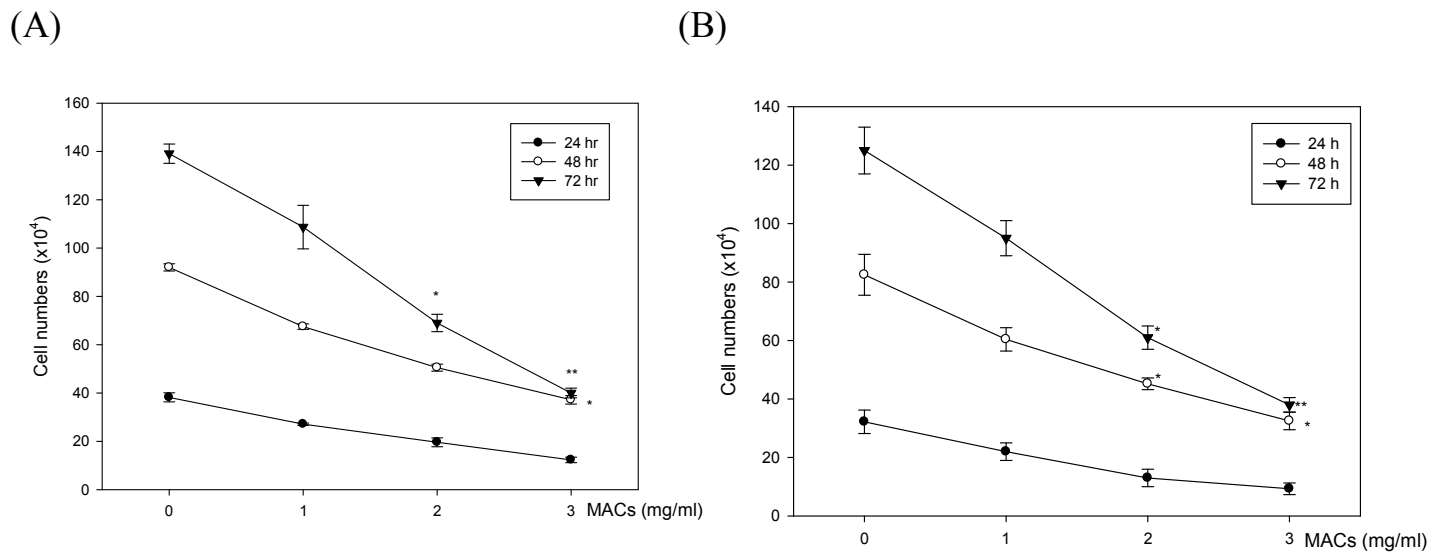
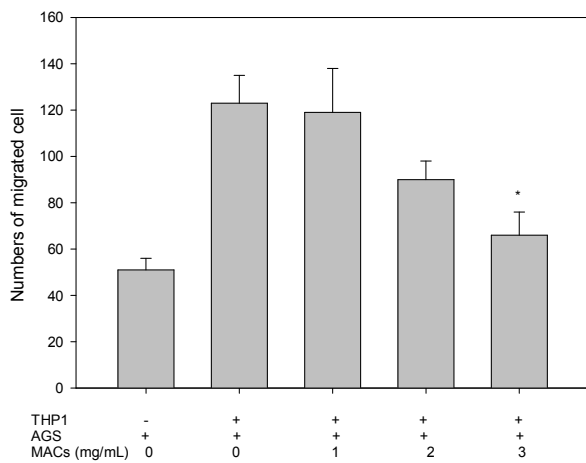


Figure 8. MACs reduced macrophage enhanced AGS cell migration and invasion. AGS (5×10^4 cells/ml) was co-cultured with THP1 (2.5×10^4 cells/ml). After exposure of various concentrations of MACs for 24h, the migratory (A) and invasive (B) effects of AGS cells were determined by transwell migration assay. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the no MACs treatment group.

(A)



(B)

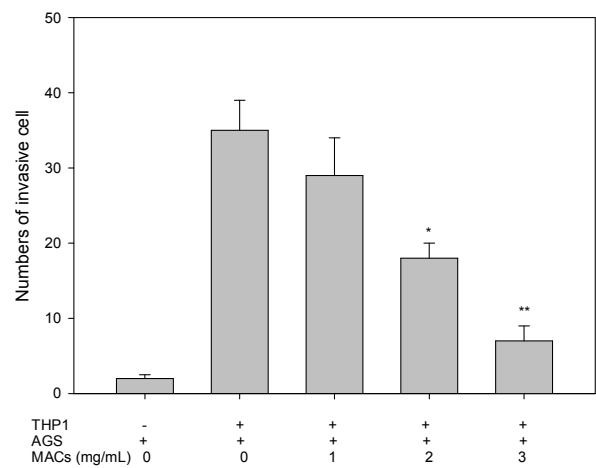
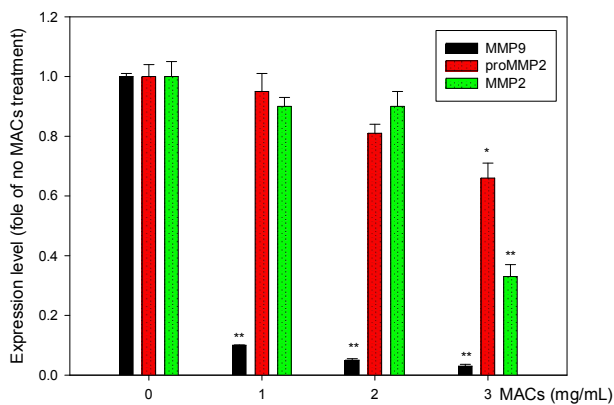
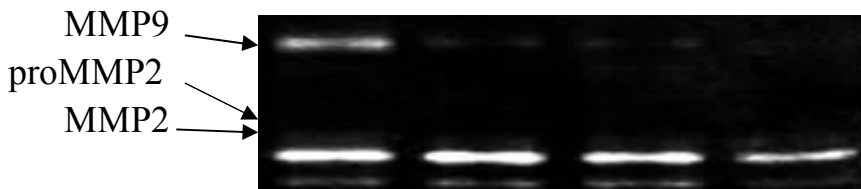


Figure 9. MACs reduced MMP2/9 levels of AGS cells induced by macrophage. After exposure of various concentration of MACs for 24h, the MMP2/9 level of AGS cells co-cultured with THP1 cells (A) or cultured in CM (B) were determined by zymography assay respectively. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the no MACs treatment group.

(A)



(B)

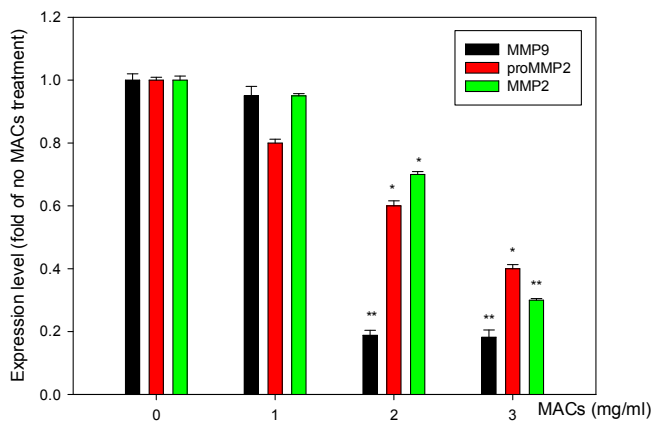
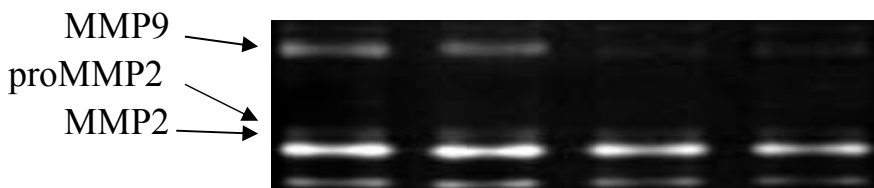


Figure 10. MACs reduced tumor-associated macrophage enhanced angiogenesis. After exposure of various concentrations of MACs for 24h, AGS was co-cultured with THP1 cells. The angiogenesis was studied by CAMV (chorioallantoic membrane vascularisation) assay. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the no MACs treatment group.

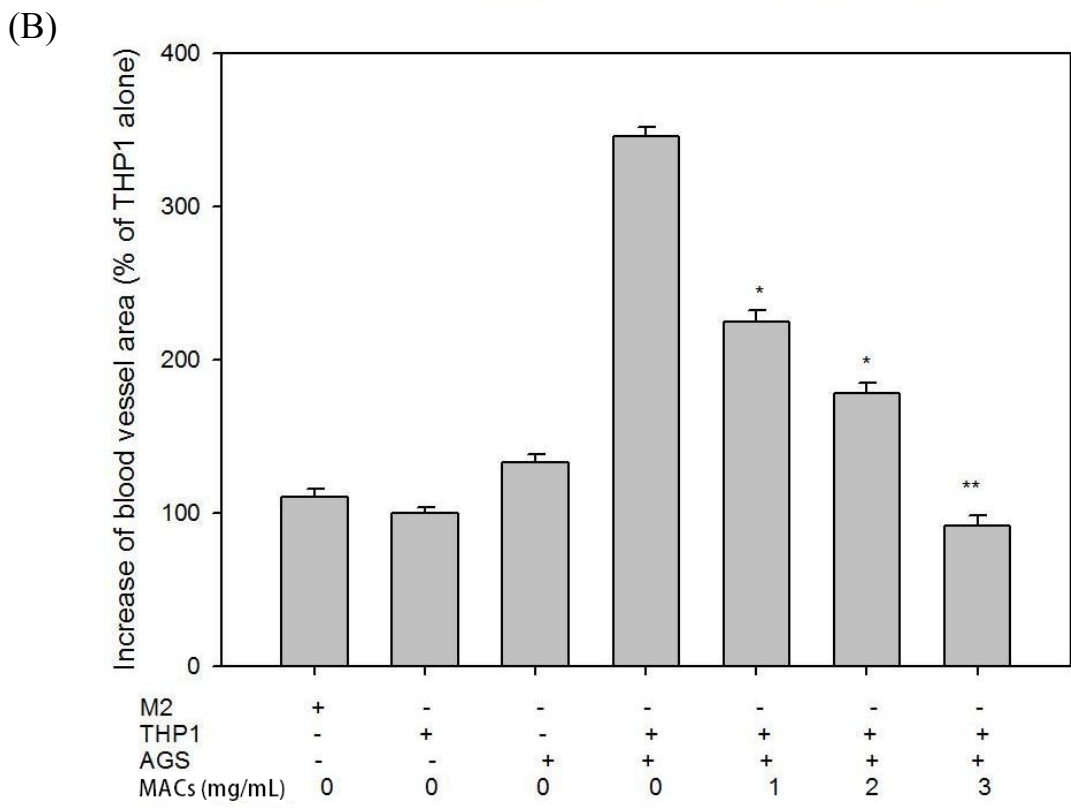
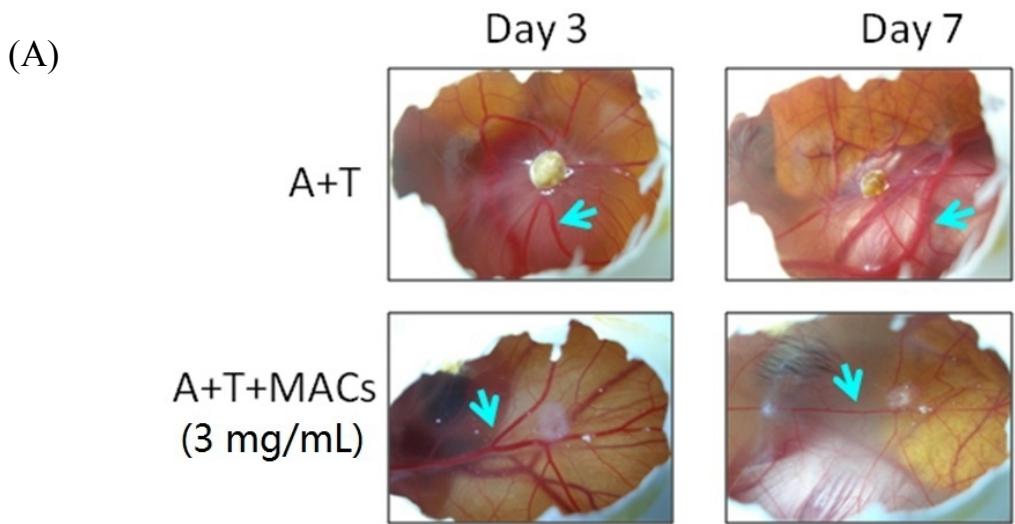
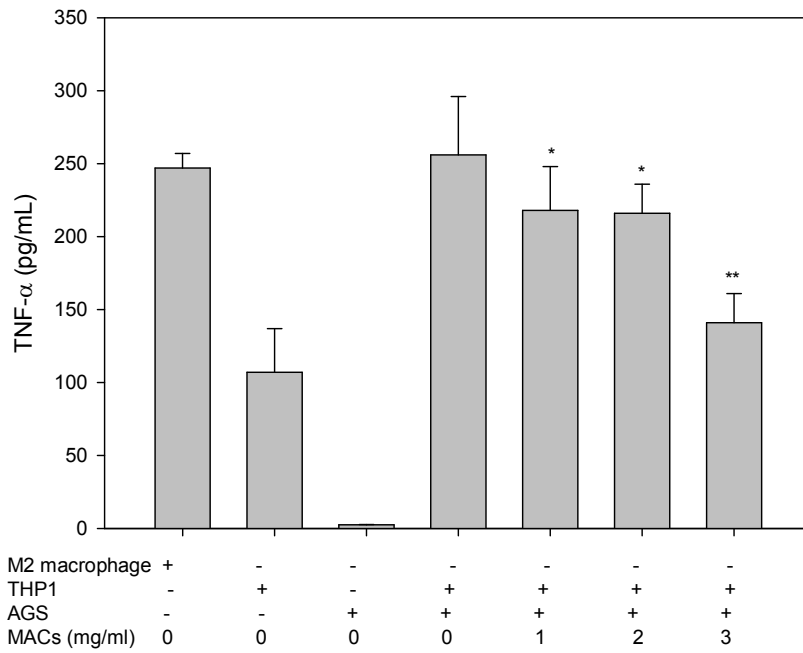
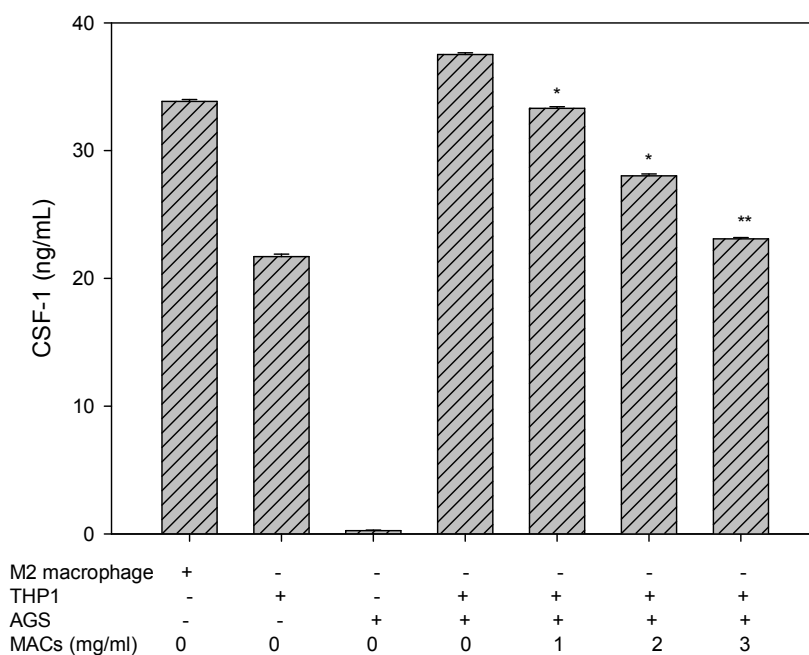


Figure 11. MACs reduced tumor-associated macrophage induced cytokine/chemokine production. AGS was co-cultured with THP1 cells and exposed to various concentrations of MACs for 24h, the cytokine/chemokine production was studied by ELISA assay. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the no MACs treatment group.

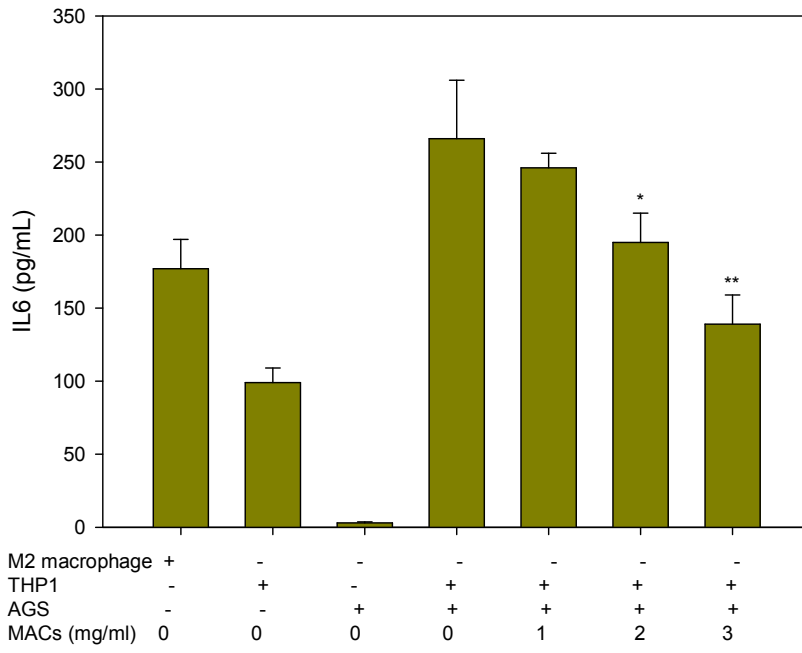
(A)



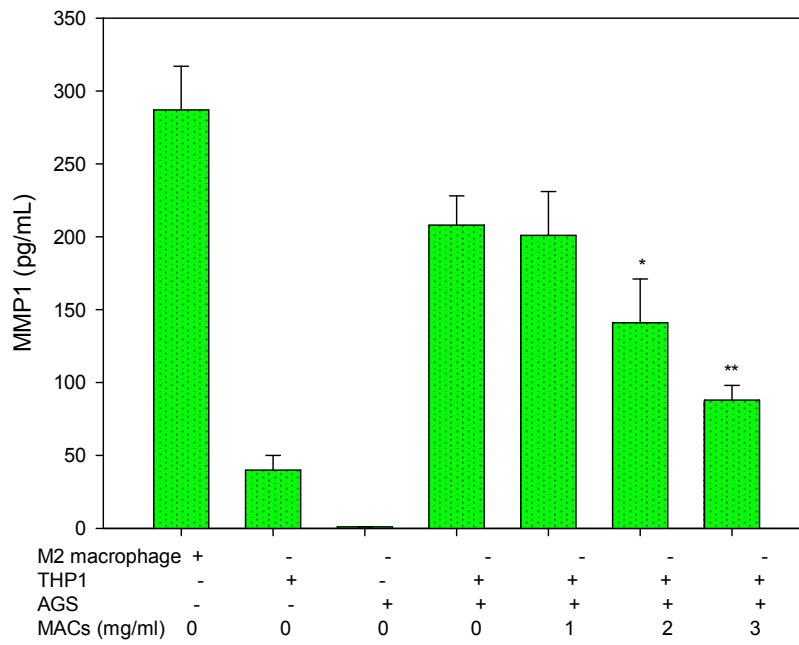
(B)



(C)



(D)



(E)

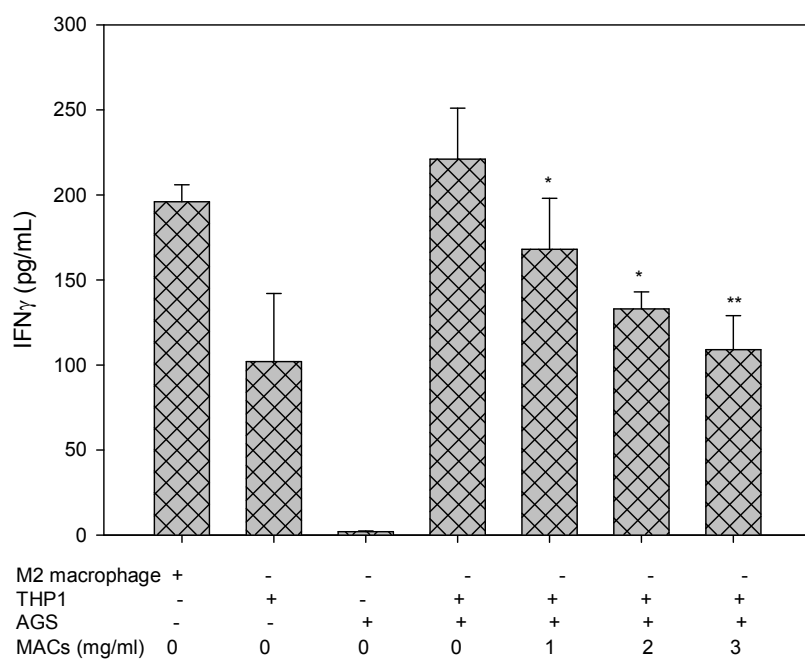


Figure 12. MACs inhibited the proteins expression of AGS cells activated by co-cultured with THP1 cells. AGS cells were co-cultured with THP1 cells and treated with various concentrations (0-3 mg/ml) of MACs for 1 day. Total cell lysates were prepared, and the protein expression levels were assessed by Immunoblotting. Actin and tubulin were used as a loading control. Results from three repeated and separated experiments were similar.

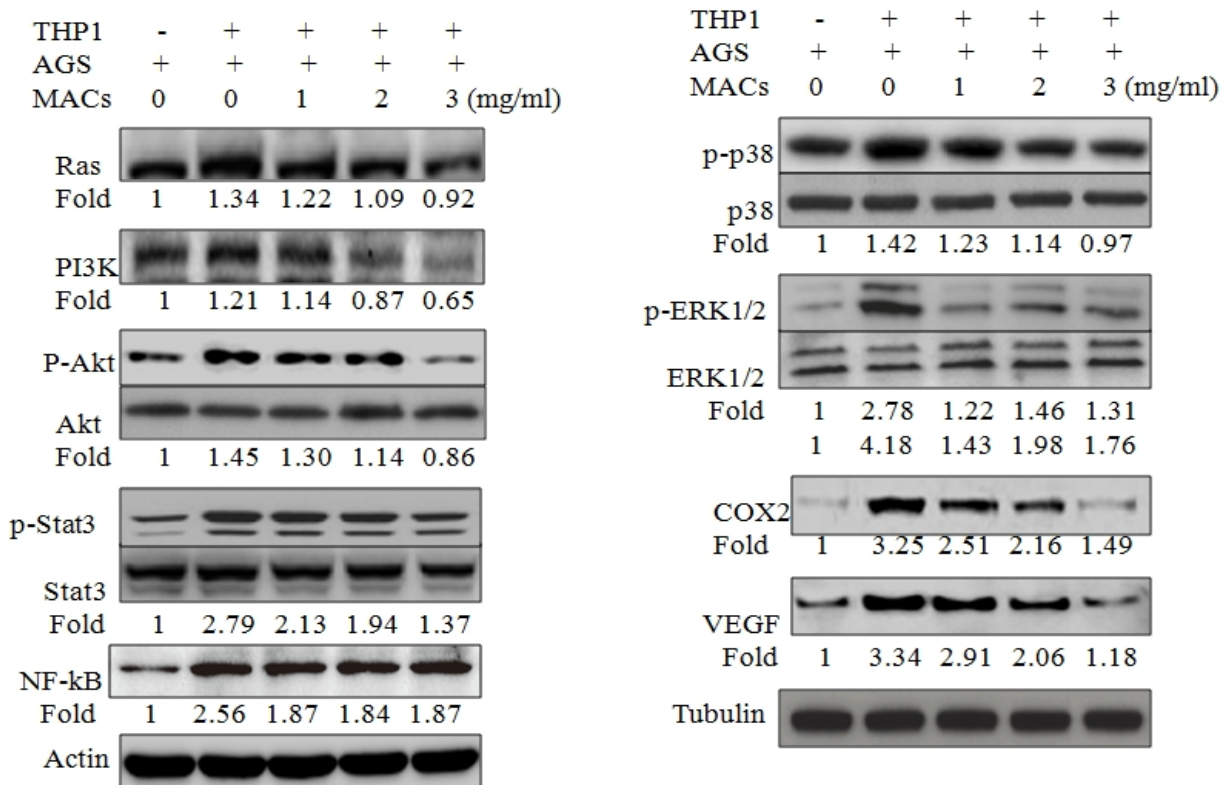


Figure 13. A proposed assumption for the effects of MACs inhibiting macrophage enhanced gastric cancer migration, invasion and angiogenesis. Tumor-promoting cytokines, such as TNF- α , IL6 and CSF1, act on immune and malignant cells to tilt the balance and recruit the tumor-associated macrophages toward tumor promotion. MACs inhibit the macrophage enhanced cancer migration, invasion and angiogenesis by r1egulating Ras/p38 or ERK, Stat3, and PI3K/Akt signaling.

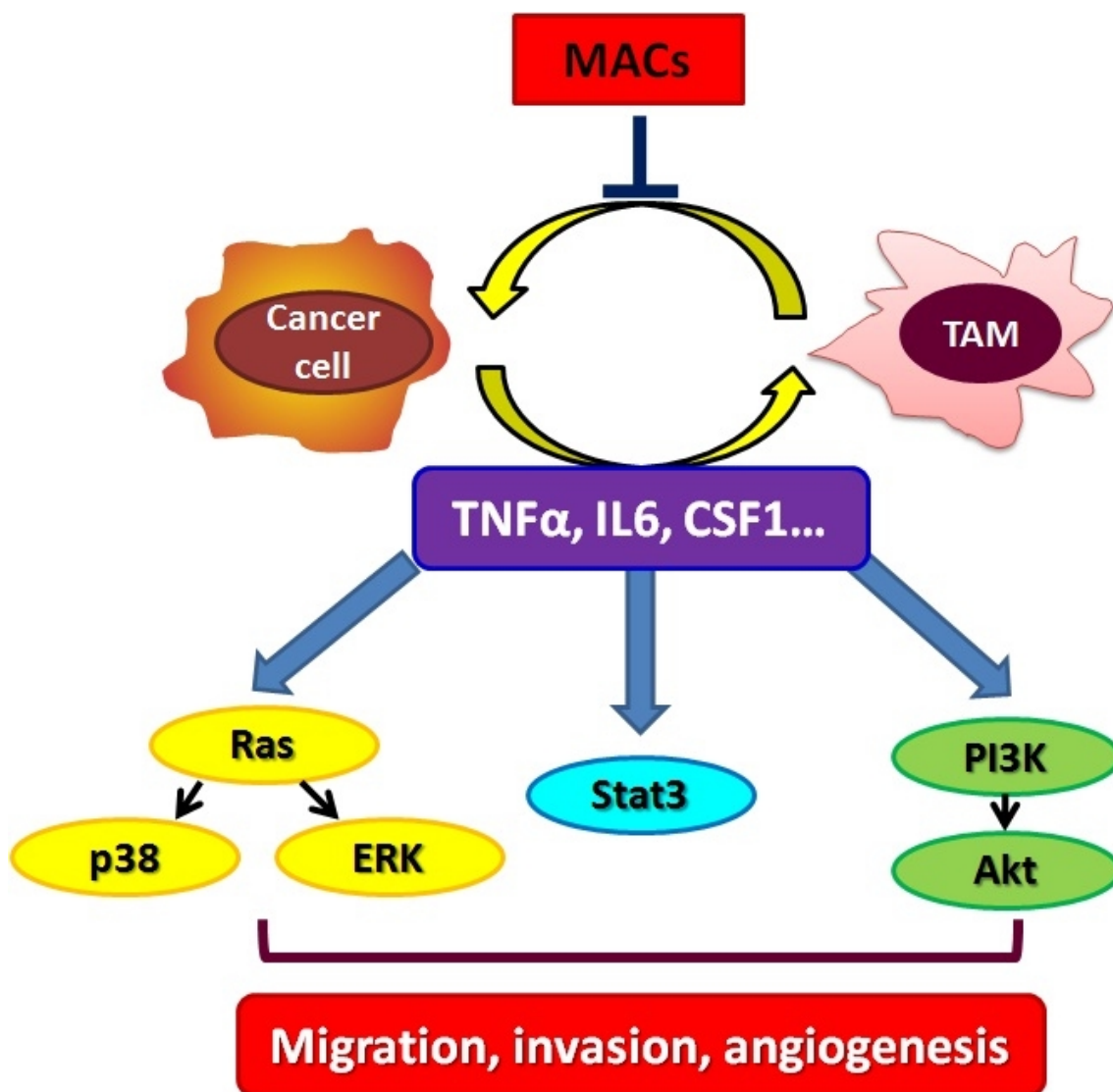


Table 1. MACs inhibited the cytokine production of AGS cells activated by co-cultured with THP1 cells.

Treatment	TNF- α	CSF-1	IL-6	MMP1	IFN γ
			ng/mL		
M2 macrophage	0.247 \pm 0.01	33.85 \pm 0.09	0.177 \pm 0.02	0.287 \pm 0.03	0.196 \pm 0.01
T	0.107 \pm 0.03	21.71 \pm 0.19	0.099 \pm 0.01	0.040 \pm 0.01	0.102 \pm 0.04
A+T+MACs(0 mg/ml)	0.256 \pm 0.04	37.52 \pm 0.14	0.266 \pm 0.04	0.208 \pm 0.02	0.221 \pm 0.03
A+T+MACs(1 mg/ml)	0.218 \pm 0.03 *	33.31 \pm 0.08 *	0.246 \pm 0.01	0.201 \pm 0.03	0.168 \pm 0.03 *
A+T+MACs(2 mg/ml)	0.216 \pm 0.02 *	28.03 \pm 0.06 *	0.195 \pm 0.02 *	0.141 \pm 0.03 *	0.133 \pm 0.01 *
A+T+MACs(3 mg/ml)	0.141 \pm 0.02**	23.09 \pm 0.05 **	0.139 \pm 0.02 **	0.088 \pm 0.01 **	0.109 \pm 0.02 **

Significantly different from no treatment of MACs, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$;
A, AGS cell; *T*, THP1 cell

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（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）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）

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），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

各種食物中的花青素常用於抗癌的研究，由表一可看出，在細胞實驗方面，飲食中的花青素確實可以抑制各種癌細胞生長，但在動物實驗方面，花青素對於乳癌、皮膚癌及腸癌的抑制效果較佳，但在胃癌方面效果較不顯著。然而，在我們的動物模式中可看出，桑椹花青素確實可以有效的抑制胃癌發生。由於胃癌的發展速度很慢，早期變化很少有症狀，即使發現後，經手術合併化療與放療也常會引起全身性副作用。因此，由於人體對花青素的高耐受性，桑椹應該可以成為一種天然、安全無毒性並具有預防疾病效用的天然物。

以人體每日花青素 180-215 mg 建議量，與本實驗室所萃取之桑椹花青素產率為果實乾重之 5% 來計算，每日攝取 36-43 g 之桑椹果實，可達到每日攝食之建議標準。而台灣桑椹因每年季節影響量產，價錢每公斤 70~110 元不等，若以平均約 100 元/公斤計算，每日約花 3.6~4.3 元，即可達到預防疾病之建議量。此外，本研究乃對 MACs 在抑制巨噬細胞促進胃癌細胞之轉移及血管新生之機制做初步探討，其目的是先確定 MACs 對 AGS 與 THP1 共養下，可調控哪些因子，未來擬對 TNF- α 、IL-6、CSF-1、MMP1、IFN γ 、MMP2/9 之上下游路徑做詳細之分析，並利用不同之動物實驗模式進一步確認 MACs 對胃癌細胞與 TAM 之影響。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/10/08

科技部補助計畫	計畫名稱: 桑椹花青素抑制發炎作用所促進之胃癌細胞惡化轉移機轉之研究
	計畫主持人: 黃惠珮
	計畫編號: 101-2320-B-040-020-MY2 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：黃惠珮		計畫編號：101-2320-B-040-020-MY2					
計畫名稱：桑椹花青素抑制發炎作用所促進之胃癌細胞惡化轉移機轉之研究							
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	2	2	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	2	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%			
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	1	1	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 style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(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 style="text-align: center;">無</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）

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）

各種食物中的花青素常用於抗癌的研究，由表一可看出，在細胞實驗方面，飲食中的花青素確實可以抑制各種癌細胞生長，但在動物實驗方面，花青素對於乳癌、皮膚癌及腸癌的抑制效果較佳，但在胃癌方面效果較不顯著。然而，在我們的動物模式中可看出，桑椹花青素確實可以有效的抑制胃癌發生。由於胃癌的發展速度很慢，早期變化很少有症狀，即使發現後，經手術合併化療與放療也常會引起全身性副作用。因此，由於人體對花青素的高耐受性，桑椹應該可以成為一種天然、安全無毒性並具有預防疾病效用的天然物。

以人體每日花青素 180-215 mg 建議量，與本實驗室所萃取之桑椹花青素產率為果實乾重之 5% 來計算，每日攝取 36-43 g 之桑椹果實，可達到每日攝食之建議標準。而台灣桑椹因每年季節影響量產，價錢每公斤 70~110 元不等，若以平均約 100 元/公斤計算，每日約花 3.6~4.3 元，即可達到預防疾病之建議量。此外，本研究乃對 MACs 在抑制巨噬細胞促進胃癌細胞之轉移及血管新生之機制做初步探討，其目的是先確定 MACs 對 AGS 與 THP1 共養下，可調控哪些因子，未來擬對 TNF- α 、IL-6、CSF-1、MMP1、IFN γ 、MMP2/9 之上下游路徑做詳細之分析，並利用不同之動物實驗模式進一步確認 MACs 對胃癌細胞與 TAM 之影響。

