

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

覆盆子、七葉膽與番石榴葉萃取物預防動脈粥狀硬化及抑制癌瘤細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之功能與機制探討(第3年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2313-B-040-004-MY3
執行期間：101年08月01日至102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：謝易修
共同主持人：高紹軒、陳霽霓
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林孟璇
碩士班研究生-兼任助理人員：康惠豪
碩士班研究生-兼任助理人員：李宜勳
碩士班研究生-兼任助理人員：鄭新霖
碩士班研究生-兼任助理人員：鄭新霖
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：林君香

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

中華民國 102年09月23日

中文摘要：癌細胞的轉移往往是惡性腫瘤的重要特徵之一，並且也是在臨床治療上最難以根治的。因此，在很多研究中，大都是以針對癌細胞的轉移過程，開發新藥或是利用天然藥物處理是否會影響癌細胞的轉移。目前已有多種中藥已被確認具有抗發炎，抗過敏及抗癌的活性，且其中具有生物活性的有效成份，部分已被單離並經分析鑑定。中藥對癌症所引起的諸多症狀的治療能有所助益，已是眾所皆知的事實，而中藥的抗癌有效成份之作用機轉，常為有效地促使癌細胞凋亡及抑制癌細胞增生，但對其抑制侵襲及轉移作用和其詳細機制方面的研究還很少。因此，本研究選用一株具有高度轉移能力的人類肺癌細胞：A549，處理覆盆子的萃取物來探討對於癌細胞移動和侵入能力的影響。首先藉由 wound healing assay 與 Boyden chamber assay，發現覆盆子萃取物具有抑制 A549 移動和侵入的能力，而且不具有細胞毒性。我們藉由 cells adhesion assay 也發現覆盆子酒精萃取物(RIE)能抑制細胞的貼附和延伸。而當癌細胞轉移時常常會伴隨著細胞外基質的分解及細胞移動能力的改變，在 gelatin zymography 與 casein zymography assay 中也發現到它們可以抑制 A549 人類肺癌細胞的 MMP-2 及 u-PA 的表現。因此我們再利 Western blot 發現覆盆子萃取物會抑制 A549 人類肺癌細胞 FAK 和 Erkl/2 的磷酸化。此外，當處理覆盆子後會增加上皮細胞的特徵，如：E-cadherin 和 脉-catenin，以及減少間質細胞的特徵，如：Snail-1、vitmentin、fibronectin 和 N-cadherin，使細胞的入侵和轉移降低。我們也發現覆盆子萃取物具有抑制細胞核內 AP-1 的表現及 DNA binding 的活性。綜合以上結果，覆盆子萃取物可能是透過抑制 MAPK pathways 中蛋白的磷酸化及轉錄因子的活性，與抑制癌細胞蛋白水解酶來達到反轉 EMT 以及抑制癌細胞轉移的能力。再使用覆盆子乙酸乙酯萃取物(RIAE)，進行 wound healing assay 與 Boyden chamber assay，發現覆盆子乙酸乙酯萃取物具有抑制 A549 移動和侵入的能力，而且不具有細胞毒性。我們藉由 cells adhesion assay 也發現覆盆子乙酸乙酯萃取物能抑制細胞的貼附和延伸。而當癌細胞轉移時常常會伴隨著細胞外基質的分解及細胞移動能力的改變，在 gelatin zymography 與 casein zymography assay 中也發現到它們可以抑制 A549 人類肺癌細胞的 MMP-2 及 u-PA 的表現。因此我們再利 Western blot 發現覆盆子乙酸乙酯萃取物會抑制 A549 人類肺癌細胞 Akt 的磷酸化。此外，當處理覆盆子乙酸乙酯萃取物後會增加上皮細胞的特徵，如：E-cadherin 和 脉-catenin，以及減少間質細胞的特徵，如：Snail-1、NF- κ B 和 N-cadherin，使細胞的入侵和轉移降低。綜合以上結

果，覆盆子乙酸乙酯萃取物可能是透過抑制 Akt 的磷酸化及轉錄因子的活性，與抑制癌細胞蛋白水解酶來達到反轉 EMT 以及抑制癌細胞轉移的能力。此外第一年結果，番石榴葉之 50%酒精萃取物(Psoralea guajava L. extracts; PGE) 及七葉膽萃取物(Gynostemma pentaphyllum; GPE)能十分有效地抑制 LDL 氧化，利用 relative electrophoretic mobility (REM) shift assays、electrophoresis of ApoB fragmentation、Diene conjugation assay、自由基清除率、證實番石榴葉之 50%酒精萃取物可有效抑制硫酸銅所誘導 LDL 的氧化。在氧化型低密度脂蛋白對人類血管內皮細胞所造成的傷害實驗中，番石榴葉之 50%酒精萃取物同時也可抑制氧化型低密度脂蛋白誘發人類臍靜脈內皮細胞的損傷，主要是透過抑制氧化型低密度脂蛋白所破壞粒腺體膜電位 (mitochondrial membrane potential) 及抑制細胞凋亡過程中所釋放出的 cytochrome C 和下游基因 caspase 3 之活化，此外，番石榴葉之 50%酒精萃取物同時也可降低氧化型低密度脂蛋白誘發人類臍靜脈內皮細胞的細胞內導致 ROS 的產生。利用 Raw-264.7 處理 oxLDL，發現 PGE 可以抑制 Raw-264.7 產生 Nitrite 的能力。並且 PGE 可以抑制 Raw-264.7 吞噬 lipid 的能力。利用西方墨點法證實 PGE 可以抑制 LPS 所誘導 Raw cells 產生 iNOS 及 Cox-2 的能力。以 A7R5 平滑肌細胞株處理 PGE，以 PDGF 誘導其細胞移動能力，證實 PGE 可以有效抑制由 PDGF 所誘導細胞的移動能力，同時以 zymography assay，證實 PGE 可以有效抑制由 PDGF 所誘導細胞 MMP-9 的活性。

中文關鍵詞： 氧化型低密度脂蛋白； 動脈粥狀硬化； 癌症轉移； 細胞凋亡； 上皮間質轉化

英文摘要： Herein we provided molecular evidence associated with the antimetastatic effect of *Rubus idaeus* L. extracts (RIE) by showing a nearly complete inhibition on the invasion ($p < 0.001$) of highly metastatic A549 cells via a reduced activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2; $p < 0.001$) and urokinasetype plasminogen activator (u-PA; $p < 0.001$). We performed Western blot to find that RIE could induce up-regulation of epithelial marker such as E-cadherin and alpha-catenin and inhibit the mesenchymal markers such as N-cadherin, fibronectin, snail-1, and vimentin. Selective snail-1 inhibition by snail-1-specific-siRNA also showed increased E-cadherin expression in A549 cells suggesting a possible involvement of

snail-1 inhibition in RIE-caused increase in E-cadherin level. RIE also inhibited p-FAK, p-paxillin and AP-1 by Western blot analysis, indicating the anti-EMT effect of RIE in human lung carcinoma. Importantly, an in vivo BALB/c nude mice xenograft model showed that RIE treatment reduced tumor growth by oral gavage, and RIE represent promising candidates for future phytochemical-based mechanistic pathway-targeted cancer prevention strategies. The anti-oxidative activity of *Psoralea guajava* L. (PGE) and *Gynostemma pentaphyllum* (GPE) was defined by the relative electrophoretic mobility of oxLDL, fragmentation of Apo B, and Diene conjugation assay of the Cu²⁺-mediated oxidation of LDL. *Psoralea guajava* L. (PGE) also inhibited the generation of ROS, and the subsequent mitochondrial membrane potential collapse, chromosome condensation, cytochrome c release, and caspase-3 activation induced by oxLDL in HUVECs.

英文關鍵詞： oxLDL； atherogenesis； metastasis； apoptosis； EMT

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
期末報告

覆盆子、七葉膽與番石榴葉萃取物預防動脈粥狀硬化及抑制癌瘤細胞轉移與
誘導癌細胞凋亡之功能與機制探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC NSC99-2313-B-040-004-MY3

執行期間：99年8月1日至102年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學生化所

計畫主持人：謝易修 中山醫學大學 生化所

共同主持人：陳霈霓 中山醫學大學 生化科

高紹軒 中山醫學大學 生化所

計畫參與人員：林孟璇, 林敬尹, 林君香

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 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 102年 9月 10日

中英文摘要

癌細胞的轉移往往是惡性腫瘤的重要特徵之一，並且也是在臨床治療上最難以根治的。因此，在很多研究中，大都是以針對癌細胞的轉移過程，開發新藥或是利用天然藥物處理是否會影響癌細胞的轉移。目前已有各種中藥已被確認具有抗發炎，抗過敏及抗癌的活性，且其中具有生物活性的有效成份，部分已被單離並經分析鑑定。中藥對癌症所引起的諸多症狀的治療能有所助益，已是眾所皆知的事實，而中藥的抗癌有效成份之作用機轉，常為有效地促使癌細胞凋亡及抑制癌細胞增生，但對其抑制侵襲及轉移作用和其詳細機制方面的研究還很少。因此，本研究選用一株具有高度轉移能力的人類肺癌細胞：A549，處理覆盆子的萃取物來探討對於癌細胞移動和侵入能力的影響。首先藉由 wound healing assay 與 Boyden chamber assay，發現覆盆子萃取物具有抑制 A549 移動和侵入的能力，而且不具有細胞毒性。我們藉由 cells adhesion assay 也發現覆盆子酒精萃取物(RIE)能抑制細胞的貼附和延伸。而當癌細胞轉移時常常會伴隨著細胞外基質的分解及細胞移動能力的改變，在 gelatin zymography 與 casein zymography assay 中也發現到它們可以抑制 A549 人類肺癌細胞的 MMP-2 及 u-PA 的表現。因此我們再利 Western blot 發現覆盆子萃取物會抑制 A549 人類肺癌細胞 FAK 和 Erk1/2 的磷酸化。此外，當處理覆盆子後會增加上皮細胞的特徵，如：E-cadherin 和 α -catenin，以及減少間質細胞的特徵，如：Snail-1、vitmentin、fibronectin 和 N-cadherin，使細胞的入侵和轉移降低。我們也發現覆盆子萃取物具有抑制細胞核內 AP-1 的表現及 DNA binding 的活性。綜合以上結果，覆盆子萃取物可能是透過抑制 MAPK pathways 中蛋白的磷酸化及轉錄因子的活性，與抑制癌細胞蛋白水解酶來達到反轉 EMT 以及抑制癌細胞轉移的能力。再使用覆盆子乙酸乙酯萃取物(RIAE)，進行 wound healing assay 與 Boyden chamber assay，發現覆盆子乙酸乙酯萃取物具有抑制 A549 移動和侵入的能力，而且不具有細胞毒性。我們藉由 cells adhesion assay 也發現覆盆子乙酸乙酯萃取物能抑制細胞的貼附和延伸。而當癌細胞轉移時常常會伴隨著細胞外基質的分解及細胞移動能力的改變，在 gelatin zymography 與 casein zymography assay 中也發現到它們可以抑制 A549 人類肺癌細胞的 MMP-2 及 u-PA 的表現。因此我們再利 Western blot 發現覆盆子乙酸乙酯萃取物會抑制 A549 人類肺癌細胞 Akt 的磷酸化。此外，當處理覆盆子乙酸乙酯萃取物後會增加上皮細胞的特徵，如：E-cadherin 和 α -catenin，以及減少間質細胞的特徵，如：Snail-1、NF- κ B 和 N-cadherin，使細胞的入侵和轉移降低。綜合以上結果，覆盆子乙酸乙酯萃取物可能是透過抑制 Akt 的磷酸化及轉錄因子的活性，與抑制癌細胞蛋白水解酶來達到反轉 EMT 以及抑制癌細胞轉移的能力。此外第一年結果，番石榴葉之 50%酒精萃取物(*Psoralea guajava* L. extracts; PGE)及七葉膽萃取物(*Gynostemma pentaphyllum*; GPE)能十分有效地抑制 LDL 氧化，利用 relative electrophoretic mobility (REM) shift assays、electrophoresis of ApoB fragmentation、Diene conjugation assay、自由基清除率、證實番石榴葉之 50%酒精萃取物可有效抑制硫酸銅所誘導 LDL 的氧化。在氧化型低密度脂蛋白對人類血管內皮細胞所造成的傷害實驗中，番石榴葉之 50%酒精萃取物同時也可抑制氧化型低密度脂蛋白誘發人類臍靜脈內皮細胞的損傷，主要是透過抑制氧化型低密度脂蛋白所破壞粒腺體膜電位 (mitochondrial membrane potential) 及抑制細胞凋亡過程中所釋放出的 cytochrome C 和下游基因 caspase 3 之活化，此外，番石榴葉之 50%酒精萃取物同時也可降低氧化型低密度脂蛋白誘發人類臍靜脈內皮細胞的細胞內導致 ROS 的產生。利用 Raw-264.7 處理 oxLDL，發現 PGE 可以抑制 Raw-264.7 產生 Nitrite 的能力。並且 PGE 可以抑制 Raw-264.7 吞噬 lipid 的能力。利用西方墨點法證實 PGE 可以抑制 LPS 所誘導 Raw cells 產生 iNOS 及 Cox-2 的能力。以 A7R5 平滑肌細胞株處理 PGE，以 PDGF 誘導其細胞移動能力，證實 PGE 可以有效抑制由 PDGF 所誘導細胞的移動能力，同時以 zymography assay，證實 PGE 可以有效抑制由 PDGF 所誘導細胞 MMP-9 的活性。

關鍵詞：氧化型低密度脂蛋白；動脈粥狀硬化；癌症轉移；細胞凋亡；上皮間質轉化

Abstract

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) has been considered essential for cancer metastasis, a multistep complicated process including local invasion, intravasation, extravasation, and proliferation at distant sites. Herein we provided molecular evidence associated with the antimetastatic effect of *Rubus idaeus* L. extracts (RIE) by showing a nearly complete inhibition on the invasion ($p < 0.001$) of highly metastatic A549 cells via a reduced activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2; $p < 0.001$) and urokinasetype plasminogen activator (u-PA; $p < 0.001$). We performed Western blot to find that RIE could induce up-regulation of epithelial marker such as E-cadherin and α -catenin and inhibit the mesenchymal markers such as N-cadherin, fibronectin, snail-1, and vimentin. Selective snail-1 inhibition by snail-1-specific-siRNA also showed increased E-cadherin expression in A549 cells suggesting a possible involvement of snail-1 inhibition in RIE-caused increase in E-cadherin level. RIE also inhibited p-FAK, p-paxillin and AP-1 by Western blot analysis, indicating the anti-EMT effect of RIE in human lung carcinoma. Importantly, an *in vivo* BALB/c nude mice xenograft model showed that RIE treatment reduced tumor growth by oral gavage, and RIE represent promising candidates for future phytochemical-based mechanistic pathway-targeted cancer prevention strategies. In this paper, we test the hypothesis that *R. idaeus* L. ethyl acetate (RIAE) possesses an antimetastatic effect and reverses the EMT potential of human lung A549 cells. We extract the raspberry *R. idaeus* L. with methanol (RIME), chloroform (RICE), ethyl acetate (RIAE), *n*-butanol (RIBE), and water (RIWE). The RIAE treatment obviously inhibits the invasive ($p < 0.001$), motility ($p < 0.001$), spreading, and migratory potential ($p < 0.001$) of highly metastatic human lung cancer A549 cells. The zymography and promoter luciferase analysis reveals that RIAE decreases the proteinase and transcription activities of MMP-2 and u-PA. The molecular analyses show that RIAE increases the E-cadherin level that is mainly localized at the cellular membrane. This result was also verified through confocal analyses. RIAE also induces the up-regulation of an epithelial marker, such as α -catenin, and decreases mesenchymal markers, such as snail-1 and N-cadherin, that promote cell invasion and metastasis. RIAE inhibits MMP-2 and u-PA by attenuating the NF- κ B and p-Akt expression. The inhibition of RIAE on the growth of A549 cells *in vivo* was also verified using a cancer cell xenograft nude mice mode. Our results show the anti-invasive/anti-tumor effects of RIAE and associated mechanisms, which suggest that RIAE should be further tested in clinically relevant models to exploit its potential benefits against metastatic lung cancer cells. In this study, we evaluated the anti-oxidative activity of the extracts of *Psoralea guajava* L. (PGE) and *Gynostemma pentaphyllum* (GPE) rescues human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) from oxidized LDL (oxLDL)-mediated dysfunction. The anti-oxidative activity of *Psoralea guajava* L. (PGE) and *Gynostemma pentaphyllum* (GPE) was defined by the relative electrophoretic mobility of oxLDL, fragmentation of Apo B, and Diene conjugation assay of the Cu²⁺-mediated oxidation of LDL. *Psoralea guajava* L. (PGE) also inhibited the generation of ROS, and the subsequent mitochondrial membrane potential collapse, chromosome condensation, cytochrome c release, and caspase-3 activation induced by oxLDL in HUVECs. Our results suggest that PGE may protect LDL oxidation and prevent oxLDL-induced cellular dysfunction. In conclusion, we have demonstrated the prevention and its mechanism of *Psoralea guajava* L. (PGE) and *Gynostemma pentaphyllum* (GPE) on LDL oxidation and oxLDL-induced endothelial cell dysfunction. In the early stages of atherogenesis, Monocytes differentiate into macrophages that take up oxidized low-density lipoprotein converted to foam cells, PGE effective foam cells formation. In the atherogenesis and restenosis, vascular smooth muscle cells (VSMCs) migration plays an important role. Then, the PLE inhibited PDGF-induced VSMCs migration. Our results suggest that ELE is protection for a role in the different phases of atherosclerotic process.

Keywords: oxLDL; atherogenesis; metastasis; apoptosis; EMT

報告內容

一、前言及研究目的

國人在飲食西化，以及工作壓力急劇加大後，心臟疾病(CVD)的發生率也隨之增加。根據衛生署近五年內調查統計，台灣的總死亡率近四十年來呈明顯下降，然而動脈硬化性疾病的死亡率都明顯增加，腦血管及心臟病近三十年來一直名列十大死因前茅，更是老人最主要的病因與死因；並且由全國健康訪問調查結果指出，十二歲以上的國人近一百四十五萬人罹患心臟病，其中六十五歲以上的老人大約每五位就有一人罹患心臟病。以民國八十九年為例，國民因心臟病死亡的人數高達 10,552 人，也就是一天之內至少有 29 人死於心臟病。調查同時發現，罹患心臟病的個案中，約百分之十八到百分之四十六的比例亦是高血壓、糖尿病、高血脂等三高疾病的高危險群。此外，腦血管與心臟疾病在近幾年來則是分居台灣地區十大死因之第二及第三名，僅次於惡性腫瘤之後，因此心血管疾病的預防與治療，是一個急待解決與重視的課題。

癌症(cancer)是導致台灣人民死亡的主因，其中癌細胞的轉移擴散往往是造成癌症病人病灶復發致死的最主要因素，惡性腫瘤可藉由淋巴及血液系統散播到身體其他的組織器官，造成癌症的轉移擴散，所以即使腫瘤經由手術切除或放射線治療後，依舊難以根治，造成病人癒後狀況不佳，如何治療癌症病人，尋找更有效、毒性低的抗癌藥物，是一個迫切的問題。當良性腫瘤變惡性腫瘤，癌細胞則會向四周擴散，並壓迫和毀壞相鄰的正常細胞與轉移的組織與臟器，使器官衰竭，最後造成癌症病人的死亡。癌症的形成是透過許多複雜且多重的過程，但惡性腫瘤目前治療方式多是以化學療法與放射線療法搭配免疫療法，已知化學療法對人體具有相當大之副作用與傷害，在殺死癌細胞的同時也會傷害正常細胞，因此目前許多研究趨向以天然物成份如多酚類或黃酮類等天然物合併抗癌藥物的使用，期望能加強抗癌藥物的療效，降低抗癌藥物的濃度，以減少化療對人體造成之傷害，達到輔助治療的效果，抑制癌細胞的惡化。

一. 癌細胞的侵襲與轉移

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(apoptosis)且具有異常的增生(proliferation)能力。另外，在癌細胞的侵入(invasion)及轉移(metastasis)亦是癌症導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因；而癌細胞轉移已知與多種細胞生理改變密切相關，其中包含【1】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間結合能力(adhesion)的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞(Cuiyan et al., 2007; Gavert and Ben-Ze'ev, 2007; Jeanes et al., 2008; Nahari et al., 2007; Song et al., 2007; Sossey-Alaoui et al., 2007; Tommasi et al., 2007; Yamaguchi and Condeelis, 2007; Yanamoto et al., 2008; Yu et al., 2007)；【2】細胞的侵襲及移動(motility)能力上升；【3】細胞骨架的重整；【4】細胞外基質的分解，接著癌細胞會分泌大量的蛋白酶(proteinase)，如 serine proteinase (Borstnar et al., 2002; Duffy, 2002; Evans and Sloan-Stakleff, 1998; Foekens et al., 2003; Hildenbrand and Arens, 2004; Kobayashi et al., 2003; Robert et al., 1999; Suzuki et al., 2003)、metalloproteinase (MMPs)、cathepsins (Bao et al., 2006; Gopal et al., 2006; Hashimoto et al., 2006; Mohamed and Sloane, 2006; Vasiljeva et al., 2006)以及 plasminogen activator (PA) 分解 ECM 幫助其穿過細胞外基質(Chakrabarti and Patel, 2005a, b; Chakrabarti et al., 2006)；【5】侵入到循環系統中的血管或淋巴管，經由逃避免疫系統的防護，貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官；【6】再經由大量的增生及；【7】血管新生(angiogenesis)作用，癌細胞便藉由奪取正常組織器官的養分而造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡(Bhat and Singh, 2008; Finney et al., 2008; Gretschel et al., 2008; Legg et al., 2008; Ma et al., 2008; Spannuth et al., 2008; Vamesu, 2008)。以上皮細胞為例，細胞癌化至轉移侵入的過程：正常的表皮細胞受到物理性或化學性的刺激後，轉型成癌細胞，轉型後的癌細胞便開始大量的增生，增生後的癌細胞會分泌胞外蛋白水解酵素，分解基底膜以及細胞間基質，最後藉由循環系統以轉移到新的組織器官，然後再開始增生，形成一個新的腫瘤。

在轉移擴散的癌細胞中，癌細胞藉由分泌蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，導致細胞基質的降解

與細胞和細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性。與胞外基質分解有關的酵素，包括有 serine proteinase、matrix metalloproteinases (MMPs)、cathepsins、plasminogen activator (PA)，其中 MMP-9、MMP-2 及 u-PA 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移最有關係。惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，在癌症越末期時某些 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，由血管滲入組織而達轉移之目的。

二、動脈粥狀硬化簡介

動脈粥狀硬化(atherogenesis)引發的病理機制非常複雜，其形成的成因主要成因有三：1. 低密度脂蛋白氧化損傷；2. 血管內皮功能破壞及損傷；3. 慢性發炎反應。動脈硬化疾病的危險因子，主要是高膽固醇血症、高血壓、糖尿病、年紀大、抽煙及早發性動脈硬化疾病家族史。具有這些危險因子的人，大多被證實會傷害內皮細胞或使其功能失常，因而容易發生動脈硬化。

三、動脈粥狀硬化與血管內皮細胞損傷

動脈粥狀硬化的成因為內皮細胞損傷而形成的慢性發炎之疾病(Pearson, 2000)，內皮細胞或血管內皮為單一細胞厚度組成的血管內壁，能將血液與血管壁分開 (Jaffe, 1985)。內皮細胞的功能主要為參與血管生成過程，調控凝血作用，控制發炎反應，及血液與組織間物質之交換。越來越多的研究顯示血管內皮細胞的功能不良，會使得血小板或其他白血球容易黏附在血管壁上，甚至透過內皮細胞所釋放的舒張因子一氧化氮(NO)也會產生缺失。一氧化氮原作用原理是會迅速滲透細胞膜到底層的肌肉細胞，控制收縮肌肉的鈣離子濃度下降，使平滑肌鬆弛，讓血管擴張而調節血壓，並協助各器官的血液順暢流動，一氧化氮同時也可以滲透回去血管內，降低血小板的凝集及附著和降低血栓的形成(Aljada, 2003; Dandona, 2002; Salimi et al., 2008)。當一氧化氮產生受阻，進一步會導致血管收縮異常，並伴隨產生失調性的發炎反應，心血管方面的疾病因而逐漸形成。因此一般認為內皮功能障礙和內皮細胞不正常死亡，會造成血管內皮層(endothelium)的不完整性 (Goss et al., 1997)，而這種不完整性就是心血管疾病發展早期的病理特點。

。

二、研究方法

1. cell migration 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 berberine 24 小時後，以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (1.5×10^4 cell/well - 2×10^4 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 8 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 400×顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 well，作移動細胞數之統計。

2. cell invasion 分析(1)

將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel (0.5 mg/ml)，在 laminar flow 風乾 3~5 小時，其後方法同前一項 cell migration 分析，而培養細胞移動時間則延長為 20 小時。

3. 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，將癌細胞以 $3 \sim 5 \times 10^4$ 細胞數分至 24 well 中，37°C 培養 16 小時後，處理不同濃度 berberine 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。

4. 細胞質及核蛋白質 (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 (20mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.5mM EGTA、0.3M sucrose、2mM PMSF、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ soybean trypsin inhibitor typ I-S 和 50mM β -mercaptoethanol, pH 7.5)，研磨後將所得萃取液經 4°C 下離心(800g)10min 移除細胞碎片後，再將上清液經超高速離心在 4°C 下離心(40Krpm) 1 hr，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 2ml 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(40Krpm) 1 hr, 取上清液即為微粒部份, 分裝於 -80°C 貯存。

5. gelatin-zymography (gelatinase 活性測試)

首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片, 置於電泳槽中, 並加入電泳緩衝液。取 16 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 (Alphalmage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

6. 分離人類血管內皮細胞 (HUVECs)

利用 PBS (內含 1% penicillin 及 streptomycin) 清洗臍帶後, 將 1% trypsin 灌滿臍帶內壁, 以針筒固定兩端臍帶開口, 作用約 6 分鐘, 來回沖洗臍帶內壁, 收集此溶液以含 10% FBS 的 M199 培養液終止 trypsin 的活性, 之後再以 M199 培養液 (不含 FBS) 沖洗臍帶內壁約 20 次, 兩部分混合後離心 1200 rpm 5 分鐘, 去掉上清, 以含 10% FBS 的 M199 培養液打散細胞, 將細胞培養在 37°C , 5% CO_2 overnight, 換新鮮的 M199 培養液 (含 15% FBS、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ endothelial cell growth supplement、5 units/ml heparin sodium、100 units/ml penicillin-streptomycin, 及 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin) 持續培養。

7. Western blotting 分析

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 μl sample (蛋白總量 20 μg), 加入 4 μl loading buffer, 將 sample denature (95°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漬, 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°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°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 (Alphalmage 2000, AlphaImage comp) 量化結果。

8. total RNA 及 mRNA 分離

檢體 total cellular RNA 是以傳統在 4M guanidine thiocyanate-acid phenol method 或以 RNA 萃取套組 RNazol 進行分離; poly(A)RNA 則是用 oligo(dT)-latex 進一步純化。

9. RT-PCR 分析

取 15 μg mRNA 利用 oligo-d(T)₁₅ 為 primer (或「random primer」以 MMLV-RTase (200units) 在 20 μl 反應溶液中 (50mM Tris-HCl, pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl_2 , 10mM DTT, 20units RNasin) 進行 cDNA 合成; 取 5 μl cDNA 至 PCR 反應溶液中(最終為 50 μl) 以下表之 primers 資料的預估溫度, 利用 Taq polymerase 進行 30 cycles PCR 反應, 其產物再以 1.8 % agarose 膠電泳分離, 以 ethidium bromide 染色並觀察。

10. LDL electrophoretic motility assay [2]

利用 lipoprotein 氧化後其帶電荷會由正電性轉為負電性的特性, 將氧化後的 oxLDL 90 μl 加入 0.1% sudden black 染劑 10 μl , 在 30°C 混合作用 20 分鐘後, 與 10 μl 50% 之甘油混和後, loading 到 1% agarose 電泳膠片上, 通電 100 伏特, 30 min 後, 依電泳結果以 band 移動的距離 (electrophoretic mobility; EM) 判定 LDL 氧化程度, 以未氧化之 LDL 之 EM 為 1, 以相對程度作為定量。

11. ApoB 蛋白片段化 (fragmentation) 的測試[2]

在 LDL 氧化反應結束之後, 樣本須以 denaturing bugger (3% SDS, 10% glycerol 及 5% 2-mercaptoethanol) 在 95°C 加熱 5 分鐘。接著配製 3-15% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), 取樣本 40 μl 注入膠的孔洞中, 然後以 48 V 進行電泳 150 分鐘。在電

泳結束之後以 Coomassie Brilliant blue R250 染色 2 小時後再進行乾膠

12. Diene conjugation assay

脂質過氧化之重要特徵為其氧化產物共軛雙烯(diene)之生成量，會隨氧化時間增長而增加。利用共軛雙烯可在 230~235nm 吸光值下被偵測之原理，將 sample 以銅離子於 37°C 誘導 LDL 氧化 360 min (約 6 小時)，反應開始起每 10 分鐘測量一次吸光值，以共軛雙烯生成量 (吸光值) 為縱座標，氧化時間為橫座標作圖。

13. 統計分析

所有數據以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

三、結果與討論

使用 50% DMSO 配製覆盆子酒精萃取物 (*Rubus idaeus L. extracts*; RIE; 10 μ l 25 μ g/mL)，萃取液以高效能液相層析儀 (Waters 600 pump) 進行分析並紀錄每個 pick 的 retention time 同時與標準品做比對 (Figure 1B & 1C)。及標準品分析結果如 Fig. 1A & 1B。以不同濃度覆盆子酒精萃取物 RIE (0、10、25、50、75、100 μ g/mL)，處理肺癌 A549 細胞與正常肺 MRC-5 纖維母細胞 24 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率。結果發現 A549 (Fig. 2A) 與 MRC-5 (Fig. 2B) 細胞在覆盆子酒精萃取物 RIE 的處理之下並不會影響細胞的存活率。利用 wound healing assay 證實將 A549 細胞處理 48 小時後可明顯抑制細胞的移動能力 (Fig. 2C) 並將其移動能力作定量圖隨著 RIE 濃度增加細胞移動能力有明顯受到抑制此現象具有濃度效應 (Fig. 2D)。利用 modified Boyden chamber coating type IV collagen 的分析。結果顯示，其侵入能力會隨著覆盆子酒精萃取物 RIE 濃度增加而降低，代表覆盆子酒精萃取物 RIE 可以去抑制 A549 細胞的侵入能力 (Fig. 3A & 3C)。另外，也利用了 Boyden chamber motility assay 去觀察葉覆盆子酒精萃取物對於 A549 C 細胞移動能力的影響，結果發現和侵入能力的影響有相同的結果 (Fig. 3B & 3D)。以 cell-matrix adhesion assay，證實 RIE 可抑制細胞與 type collagen 的貼附能力 (Fig. 3E)，同時 RIE 對於細胞的 spreading 能力也具有明顯抑制效果 (Fig. 3F)。將 3×10^4 /mL 的 A549 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿中，接著在 serum-starved 的情況下 (以減少血清中蛋白質之干擾)，處理不同濃度的覆盆子酒精萃取物 24 小時，收集其 medium，以 gelatin zymography 方法，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，處理過覆盆子酒精萃取物的細胞分泌 MMP-2 的量確實有降低的現象 (Fig. 4A)。以 casein zymography 來分析 u-PA 的表現，結果 A549 在處理不同濃度的 RIE 24 小時後，細胞分泌出來的 u-PA 都會隨著 RIE 的濃度增加而降低 (Fig. 4B)。西方墨點法也證實 TIMP-2 與 PAI-1 蛋白表現也有增加的趨勢 (Fig. 4C)。同時利用 MMP-2 promoter Luciferase assay 證實頁下珠可以抑制 MMP-2 與 U-PA promoter 的轉錄活性 (Fig. 4D & 4E)。以西方墨點法，觀察與細胞上皮間質的轉化 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) 相關細胞骨架蛋白的變化，發現 RIE 會減少 p-focal adhesion kinase (p-FAK Try 925)，p-paxillin (Tyr 118)，fibronectin，N-cadherin，vimentin 的表現並且增加 E-cadherin and α -catenin 的表現 (Fig. 5)，萃取細胞核萃取液，發現 snail-1 的蛋白表現量會隨著 RIE 濃度上升而減少 (Fig. 5)。收集其 cell lysates，以 anti-phospho-p38、anti-p38、anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-phospho-Akt 及 anti-Akt 的抗體去進行 Western blot 分析。實驗結果發現 ERK1/2 蛋白的磷酸化會隨著 RIE 的濃度提高而減少，而 p38 及 Akt 蛋白的磷酸化則不受到影響 (Fig. 6A)。將 A549 處理不同濃度的 RIE (0、10、25、50、75、100 μ g/mL) 24 小時後，萃取其核蛋白，以 EMSA 方法分析 NF- κ B 和 AP-1 與 DNA 結合的能力，其結果顯示，AP-1 與 DNA 結合的能力隨著處理 RIE 濃度的增加而逐漸受到抑制 (Fig. 6B)。以 Western blot 分析 NF- κ B (p65) 與 AP-1 的次單元：c-Jun 與 c-Fos，發現 c-Jun 與 c-Fos 的蛋白量皆隨著 RIE 萃取物的濃度增加而下降 (Fig. 6D)。由第一年實驗結果我們證實，覆盆子酒精萃取物 (*Rubus idaeus L. extracts*; RIE) 可有效抑制肺癌細胞侵襲及移動能力，延續第一年的結果我們進一步利用 MEKU0126 抑制劑證實覆盆子酒精萃取物的確是透過 p-ERK 路徑抑制蛋白酶的活性 (Figure 7B & 7C) 進而抑制細胞的侵襲能力 (Figure 7A)，利用 FAK 抑制劑 PF573228 證實覆盆子酒精萃取物的確是透過 p-FAK 路徑抑制促進 E-cadherin 的表現 (Figure 1D) 但是不是透過 FAK 去促進 ERK1/2 的磷酸化 (Figure 7E)。動物實驗也證實 RIE 可抑制 TUMOR 的生長及腫瘤大小

(Fig. 8)。Figure 9 為 RIE 抑制 A549 轉移及侵襲的模型圖。緊接著利用更精細不同有機溶液分層萃取的方式(Figure 10A), 發現在乙酸乙酯層(raspberry *Rubus idaeus* L. ethyl acetate extracts ; RIAE) 可顯著降低人類肺癌細胞 A549 的侵襲(Figure 10B&10D)及活動能力(Figure 10C&10E)。利用 HPLC-MASS 分離並分析 RIAE 的組成及內含物發現 RIAE 含有 gallic acid, protocatechuic acid, epigallocatechin, methyl gallate, epicatechin, epigallocatechin gallate, rutin, epicatechin-3-gallate, and naringin 等多酚類(Figure 11)。利用 modified Boyden chamber coating Matrigel 的分析。結果顯示, 其侵入能力會隨著覆盆子乙酸乙酯萃取物 RIAE 濃度增加而降低, 代表覆盆子酒精萃取物 RIAE 可以去抑制 A549 細胞的侵入能力(Figure. 12A &12C)。另外, 也利用了 Boyden chamber motility assay 去觀察葉覆盆子乙酸乙酯萃取物對於 A549 C 細胞移動能力的影響, 結果發現和侵入能力的影響有相同的結果(Figure. 12B&12D)。同時 RIAE 對於細胞的 spreading 能力也具有明顯抑制效果(Figure. 12E)。利用 wound healing assay 證實將 A549 細胞處理 48 小時後可明顯抑制細胞的移動能力(Figure. 13 A) 並將其移動能力作定量圖隨著 RIAE 濃度增加細胞移動能力有明顯受到抑制此現象具有濃度效應(Figure. 13 B)。將 3×10^4 /mL 的 A549 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿中, 接著在 serum-starved 的情況下 (以減少血清中蛋白質之干擾), 處理不同濃度的覆盆子萃取物 24 小時, 收集其 medium, 以 gelatin zymography 方法, 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, 處理過覆盆子乙酸乙酯萃取物的細胞分泌 MMP-2 的量確實有降低的現象(Figure. 14 A)。以 casein zymography 來分析 u-PA 的表現, 結果 A549 在處理不同濃度的 RIAE 24 小時後, 細胞分泌出來的 u-PA 都會隨著 RIAE 的濃度增加而降低(Fig. 14B)。同時利用 MMP-2 promoter Luciferase assay 與 u-PA promoter Luciferase assay 證實頁下珠可以抑制 MMP-2 與 u-PA promoter 的轉錄活性(Figure. 14C&14D)。以西方墨點法, 觀察與細胞上皮間質的轉化 (Epithelial- mesenchymal transition; EMT) 相關細胞骨架蛋白的變化, 發現 RIAE 會減少 N-cadherin 的表現並且增加 E-cadherin and α -catenin 的表現(Figure. 15C), 萃取細胞核萃取液, 發現 snail-1 的蛋白表現量會隨著 RIAE 濃度上升而減少(Figure. 15E)。收集其 cell lysates, 以 anti-phospho-GSK-3 β , anti-GSK-3 β , anti-phospho-Akt 及 anti-Akt 的抗體去進行 Western blot 分析。實驗結果發現 phospho-Akt 蛋白的磷酸化會隨著 RIAE 的濃度提高而減少, 而 pGSK-3 β 蛋白的磷酸化則會隨著 RIAE 濃度增加而增加 (Figure. 15B)。將 A549 處理不同濃度的 RIAE(0、10、30、50 μ g/mL) 24 小時後, 以免疫螢光染色證實 RIAE 會增加細胞內 E-cadherin 的表現量。動物實驗也證實 RIE 可抑制 TUMOR 的生長及腫瘤大小(Fig. 16)。使用 50% DMSO 配製覆盆子乙酸乙酯萃取物 (RIAE), 萃取液以高效能液相層析儀(Waters 600 pump)進行分析並紀錄每個 pick 的 retention time 同時與標準品做比對(Figure 17 & Table 1)。Figure 18 為 RIAE 抑制 A549 轉移及侵襲的模型圖。在計畫第一年的結果中我們取純化之 LDL (100 μ g/ml), 加入 10 μ M CuSO₄ 使其氧化, 同時處理不同濃度(高濃度: 0, 25, 50, 75, 100 μ g/mL 或是低濃度: 5, 10, 15, 20 μ g/mL)的番石榴葉之 50% 酒精萃取物(*Psoralea guajava* L. extracts; PGE)及七葉膽萃取物(*Gynostemma pentaphyllum*; GPE), 在 37°C 下共同反應 4 小時(ApoB fragmentation assay)、Diene conjugation assay、16 小時 LDL electrophoretic motility, 首先分析番石榴葉之 50% 酒精萃取物(PGE)保護 LDL 氧化的效果。結果顯示, 10 μ g/mL 的番石榴葉萃取物(PGE)對於 ApoB 斷裂化、LDL 泳動率 (Fig. 8)及共軛雙烯(diene)之生成量、自由基的清除率(DPPH radical scavenging assay)皆有很好的保護效果, 而 25 μ g/mL 的番石榴葉萃取物(PGE)其保護效果更是超過 80%。證實番石榴葉萃取物(PGE)具有保護 LDL 不受氧化的效果。接下來我們進一步以不同濃度(0, 25, 50, 75, 100 μ g/ml)的番石榴葉萃取物(PGE)處理靜脈血管內皮細胞(HUVEC 細胞), 同時再加入 200 μ g/ml 的氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)處理, 共同培養 24 小時, 觀察細胞於 24 小時的 morphology (Fig. 19)。利用 MTT assay 偵測細胞的存活率, 發現番石榴葉萃取物(PGE)可以保護由 oxLDL 所造成的內皮細胞死亡 (Fig. 20A)。再以 Trypan blue exclusion assay, 計數 HUVEC 細胞死細胞與活細胞的數目, 證實 PGE 的確可以保護 oxLDL 處理下內皮細胞的存活細胞以及降低死亡細胞數 (Figure. 20B)。而內皮細胞的型態及其細胞的完整性會影響內皮細胞控制分子通透的功能, 且這個功能的缺失與動脈粥狀硬化的形成有關。因此, 我們同時也以相位差顯微鏡觀察細胞型態, 證實 PGE 不僅有效提高 oxLDL 處理下內皮細胞的存活, 且存活細胞的細胞型態與 control 組相比並無明顯不同。進一步以 DAPI 染色及 Flow cytometry 分析 oxLDL 的處理是否

造成 HUVEC 細胞的細胞凋亡。證實 oxLDL 的處理會造成 chromosome condensation，而 PGE 可以明顯降低這個現象 (Figure. 21)。針對 oxLDL 造成 HUVEC 細胞的細胞凋亡及 PGE 的保護效果，探討其中的分子機制。首先，以 DCFH-DA 染色再以 Flow cytometry 進行分析細胞內 ROS 的產生，發現 oxLDL 會造成 HUVEC 細胞內的 ROS 增加，而 PGE 則會抑制 ROS 的增加 (Figure. 22)。另外，以 JC-1 染色再以螢光顯微鏡觀察 HUVEC 細胞的粒線體膜電位，發現 oxLDL 會造成 HUVEC 細胞的粒線體膜電位降低，而 PGE 則會保護粒線體膜電位的降低 (Figure. 23)。進一步以 Western Blot 分析，證實 oxLDL 會促使 caspase 3 的活化以及 PARP 的切割，同時，也發現 cytochrome C 減少而 PGE 對於 oxLDL 所造成的 apoptosis 相關蛋白的變化都有保護的效果 (Figure. 24)。綜合以上結果，番石榴葉萃取物(PGE)不僅可以有效保護 LDL 不受氧化，且對於 oxLDL 所造成的內皮細胞的 apoptosis 也有相當好的保護效果，而其中機制，可能是透過降低 oxLDL 所造成細胞內 ROS 的增加，進而保護粒線體不受傷害且防止細胞的 apoptosis。在七葉膽萃取物(*Gynostemma pentaphyllum*; GPE)的抗氧化能力部分，結果顯示，七葉膽萃取物(*Gynostemma pentaphyllum*; GPE)對於 ApoB 斷裂化、LDL 泳動率皆有很好的保護效果，證實番石榴葉萃取物具有保護 LDL 不受氧化的效果。但是對於自由機清除率顯示並沒有很明顯的效果。我們利用 Raw-264.7 處理 oxLDL，並加入 PGE,發現 PGE 可以抑制 Raw-264.7 產生 Nitrite 的能力(Figure. 25A), 但是並不會抑制 RAW-264.7 的細胞存活率(Figure. 25B)。並且 PGE 可以抑制 Raw-264.7 吞噬 lipid 的能力(Figure. 26)。利用西方墨點法證實 PGE 可以抑制 LPS 所誘導 Raw cells 產生 iNOS 及 Cox-2 的能力(Figure.27)。以 A7R5 平滑肌細胞株處理 PGE，發現在 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PGE 濃度會抑制 A7R5 細胞的存活率(Figure.28)但是在 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PGE 濃度並不會影響 A7R5 細胞的存活率(Figure. 28B)。因此之後我們選用 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PGE 濃度。將 A7R5 細胞以 PDGF 誘導其細胞移動能力，處理 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PGE, 證實 PGE 可以有效抑制由 PDGF 所誘導細胞的移動能力(Figure. 29),同時以 zymography assay，證實 PGE 可以有效抑制由 PDGF 所誘導細胞 MMP-9 的活性(Figure. 30)。

四、計畫成果及自評

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析覆盆子酒精萃取物對肺癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對肺癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前 覆盆子酒精萃取物抑制肺癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表，其他細胞株的相關實驗也正在進行及整理中。關於探討番石榴葉萃取物保護 LDL 的氧化及保護內皮細胞不受 oxLDL 傷害的效果及機制，已正在整理。本計劃有系統的分析番石榴葉萃取物對於降低 LDL 氧化的效果，以及對血管內皮細胞的保護效果，期望能在心抗血管疾病的應用上有所貢獻。未來希望透過動物活體實驗我們將證實番石榴葉萃取物具有預防心血管疾病的功效及應用性。

參考文獻

- Aljada, A. (2003). Endothelium, inflammation, and diabetes. *Metabolic syndrome and related disorders* 1, 3-21.
- Bao, B.Y., Yeh, S.D., and Lee, Y.F. (2006). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis* 27, 32-42.
- Bhat, T.A., and Singh, R.P. (2008). Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol* 46, 1334-1345.
- Borstnar, S., Vrhovec, I., Svetic, B., and Cufer, T. (2002). Prognostic value of the urokinase-type plasminogen activator, and its inhibitors and receptor in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 3, 138-146.
- Chakrabarti, S., and Patel, K.D. (2005a). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 31, 599-621.
- Chakrabarti, S., and Patel, K.D. (2005b). Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* 78, 279-288.
- Chakrabarti, S., Zee, J.M., and Patel, K.D. (2006). Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol* 79, 214-222.
- Cuiyan, Z., Jie, H., Fang, Z., Kezhi, Z., Junting, W., Susheng, S., Xiaoli, F., Ning, L., Xinhua, M., Zhaoli, C., *et al.* (2007). Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and

correlates with DNA copy number changes. *Cancer Biol Ther* 6, 335-342.

Dandona, P. (2002). Endothelium, inflammation, and diabetes. *Current diabetes reports* 2, 311-315.

Duffy, M.J. (2002). Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48, 1194-1197.

Evans, D.M., and Sloan-Stakleff, K.D. (1998). Maximum effect of urokinase plasminogen activator inhibitors in the control of invasion and metastasis of rat mammary cancer. *Invasion Metastasis* 18, 252-260.

Finney, L., Vogt, S., Fukai, T., and Glesne, D. (2008). Copper and Angiogenesis: Unravelling a Relationship Key to Cancer Progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.

Foekens, J.A., Ries, C., Look, M.P., Gippner-Steppert, C., Klijn, J.G., and Jochum, M. (2003). The prognostic value of polymorphonuclear leukocyte elastase in patients with primary breast cancer. *Cancer Res* 63, 337-341.

Gavert, N., and Ben-Ze'ev, A. (2007). beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 102, 820-828.

Gopal, P., Rehman, R.U., Chadha, K.S., Qiu, M., and Colella, R. (2006). Matrigel influences morphology and cathepsin B distribution of prostate cancer PC3 cells. *Oncol Rep* 16, 313-320.

Goss, S.P., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1997). The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* 272, 21647-21653.

Gretschel, S., Astrosini, C., Vieth, M., Jons, T., Tomov, T., Hocker, M., Schlag, P.M., and Kemmner, W. (2008). Markers of tumour angiogenesis and tumour cells in bone marrow in gastric cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 34, 642-647.

Hashimoto, Y., Kondo, C., Kojima, T., Nagata, H., Moriyama, A., Hayakawa, T., and Katunuma, N. (2006). Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm* 21, 217-224.

Hildenbrand, R., and Arens, N. (2004). Protein and mRNA expression of uPAR and PAI-1 in myoepithelial cells of early breast cancer lesions and normal breast tissue. *Br J Cancer* 91, 564-571.

Jaffe, E.A. (1985). Physiologic functions of normal endothelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 454, 279-291.

Jeanes, A., Gottardi, C.J., and Yap, A.S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27, 6920-6929.

Kobayashi, H., Suzuki, M., Tanaka, Y., Kanayama, N., and Terao, T. (2003). A Kunitz-type protease inhibitor, bikunin, inhibits ovarian cancer cell invasion by blocking the calcium-dependent transforming growth factor-beta 1 signaling cascade. *J Biol Chem* 278, 7790-7799.

Legg, J.A., Herbert, J.M., Clissold, P., and Bicknell, R. (2008). Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* 11, 13-21.

Ma, J., Sawai, H., Matsuo, Y., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Wakasugi, T., Funahashi, H., Sato, M., Okada, Y., *et al.* (2008). Interleukin-1alpha enhances angiogenesis and is associated with liver metastatic potential in human gastric cancer cell lines. *J Surg Res* 148, 197-204.

Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-775.

Nahari, D., Satchi-Fainaro, R., Chen, M., Mitchell, I., Task, L.B., Liu, Z., Kihneman, J., Carroll, A.B., Terada, L.S., and Nwariaku, F.E. (2007). Tumor cytotoxicity and endothelial Rac inhibition induced by TNP-470 in anaplastic thyroid cancer. *Mol Cancer Ther* 6, 1329-1337.

Pearson, J.D. (2000). Normal endothelial cell function. *Lupus* 9, 183-188.

Robert, C., Bolon, I., Gazzeri, S., Veyrenc, S., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1999). Expression of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in lung cancer and their role in tumor progression. *Clin Cancer Res* 5, 2094-2102.

Salimi, S., Firoozrai, M., Nourmohammadi, I., Shabani, M., Shafiee, S.M., Mohebbi, A., and Tavidani, H. (2008). Lack of evidence for contribution of intron4a/b polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene to plasma nitric oxide levels. *Acta cardiologica* 63, 229-234.

Song, J., Bai, J., Yang, W., Gabrielson, E.W., Chan, D.W., and Zhang, Z. (2007). Expression and clinicopathological significance of oestrogen-responsive ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in breast cancer. *Histopathology* 51, 40-53.

- Sossey-Alaoui, K., Safina, A., Li, X., Vaughan, M.M., Hicks, D.G., Bakin, A.V., and Cowell, J.K. (2007). Down-regulation of WAVE3, a metastasis promoter gene, inhibits invasion and metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol* 170, 2112-2121.
- Spannuth, W.A., Sood, A.K., and Coleman, R.L. (2008). Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 5, 194-204.
- Suzuki, M., Kobayashi, H., Tanaka, Y., Hirashima, Y., Kanayama, N., Takei, Y., Saga, Y., Itoh, H., and Terao, T. (2003). Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin. *Int J Cancer* 104, 289-302.
- Tommasi, S., Mangia, A., Lacalamita, R., Bellizzi, A., Fedele, V., Chiriatti, A., Thomssen, C., Kendzierski, N., Latorre, A., Lorusso, V., *et al.* (2007). Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins. *Int J Cancer* 120, 2078-2085.
- Vamesu, S. (2008). Angiogenesis and tumor histologic type in primary breast cancer patients: an analysis of 155 needle core biopsies. *Rom J Morphol Embryol* 49, 181-188.
- Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B.S., Almholt, K., Bogyo, M., *et al.* (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 66, 5242-5250.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 1773, 642-652.
- Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S.I., Yoshitomi, I., Yoshida, H., and Mizuno, A. (2008). Ribonucleotide reductase small subunit p53R2 promotes oral cancer invasion via the E-cadherin/beta-catenin pathway. *Oral Oncol*.
- Yu, K.P., Itokawa, T., Zhu, M.L., Syam, S., Seth, A., and Insogna, K. (2007). Breast cancer-associated gene 3 (BCA3) is a novel Rac1-interacting protein. *J Bone Miner Res* 22, 628-637.

附表及附圖

Figure 1

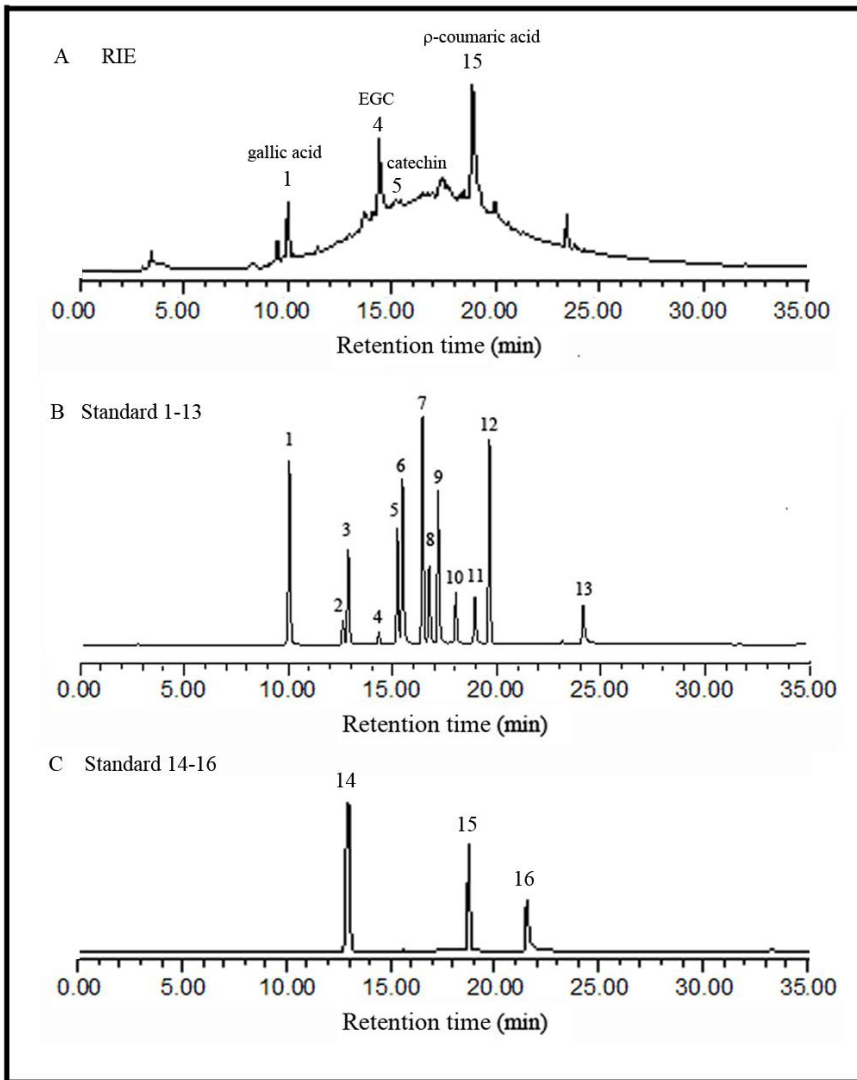


Figure 1. The chemical profile of RIE was analyzed by HPLC-mass spectrometry. (A) Chromatographic patterns from HPLC analysis of RIE extracts showed peaks corresponding to the retention times (min). Absorbance was monitored at 280 nm. (B) HPLC chromatogram of 13 kinds of standard compound. Peaks: 1, 5 μg of gallic acid; 2, 10 μg of GC; 3, 5 μg of protocatechuic acid; 4, 5 μg of EGC; 5, 5 μg of catechin; 6, 5 μg of methyl gallate; 7, 5 μg of EC; 8, 5 μg of EGCG; 9, 1 μg of GCG; 10, 5 μg of rutin; 11, 5 μg of ECG; 12, 10 μg of naringin; 13, 5 μg of quercetin. (C) Standard compound. Peaks: 14, 25 μg of 3,4-dihydroxybenzoic acid; 15, 25 μg of p -coumaric acid; 16, 8 μg of myricetin.

Figure 2

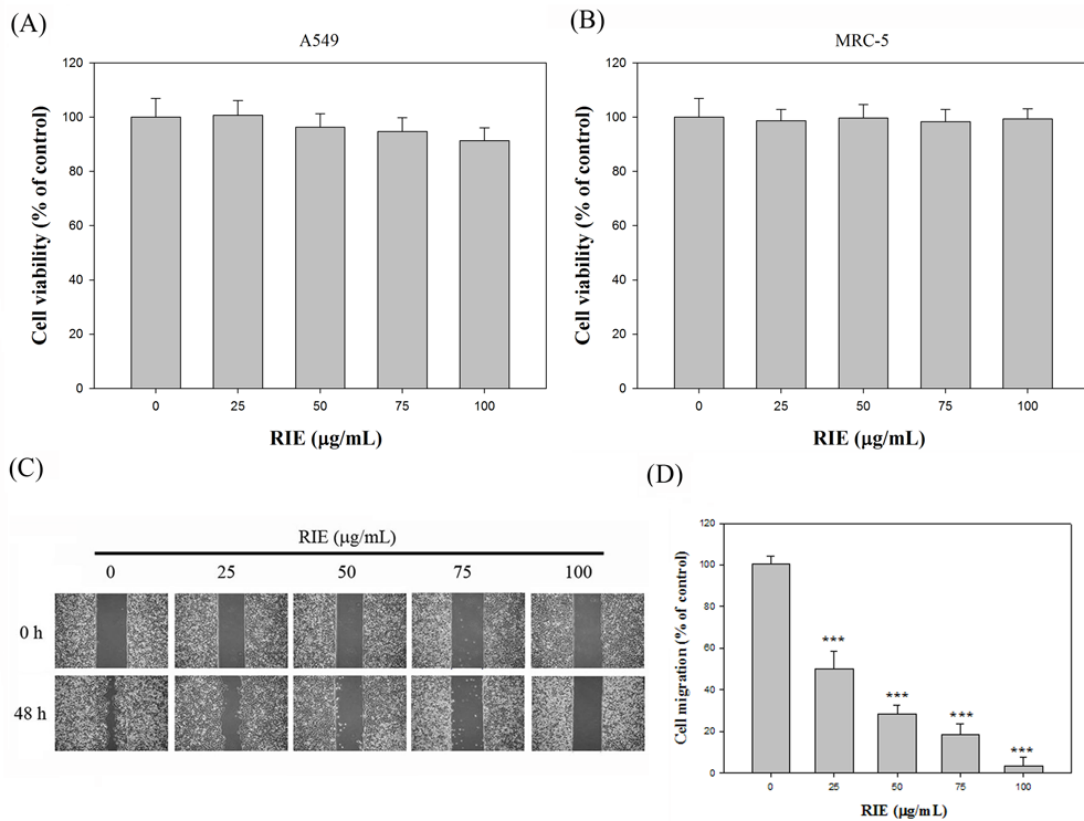


Figure 2. The effects of RIE on cell viability and migration of A549 cells. (A) A549 and (B) MRC-5 cells were treated with RIE for 24 h by MTT assay. (C) A549 cells were subjected to analyze for cell migration by wound healing assay. (D) Determined migration ability of A549 was subsequently quantified with that of control being 100% (without RIE for 48 h). Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (***, $P < 0.001$). Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

Figure 3

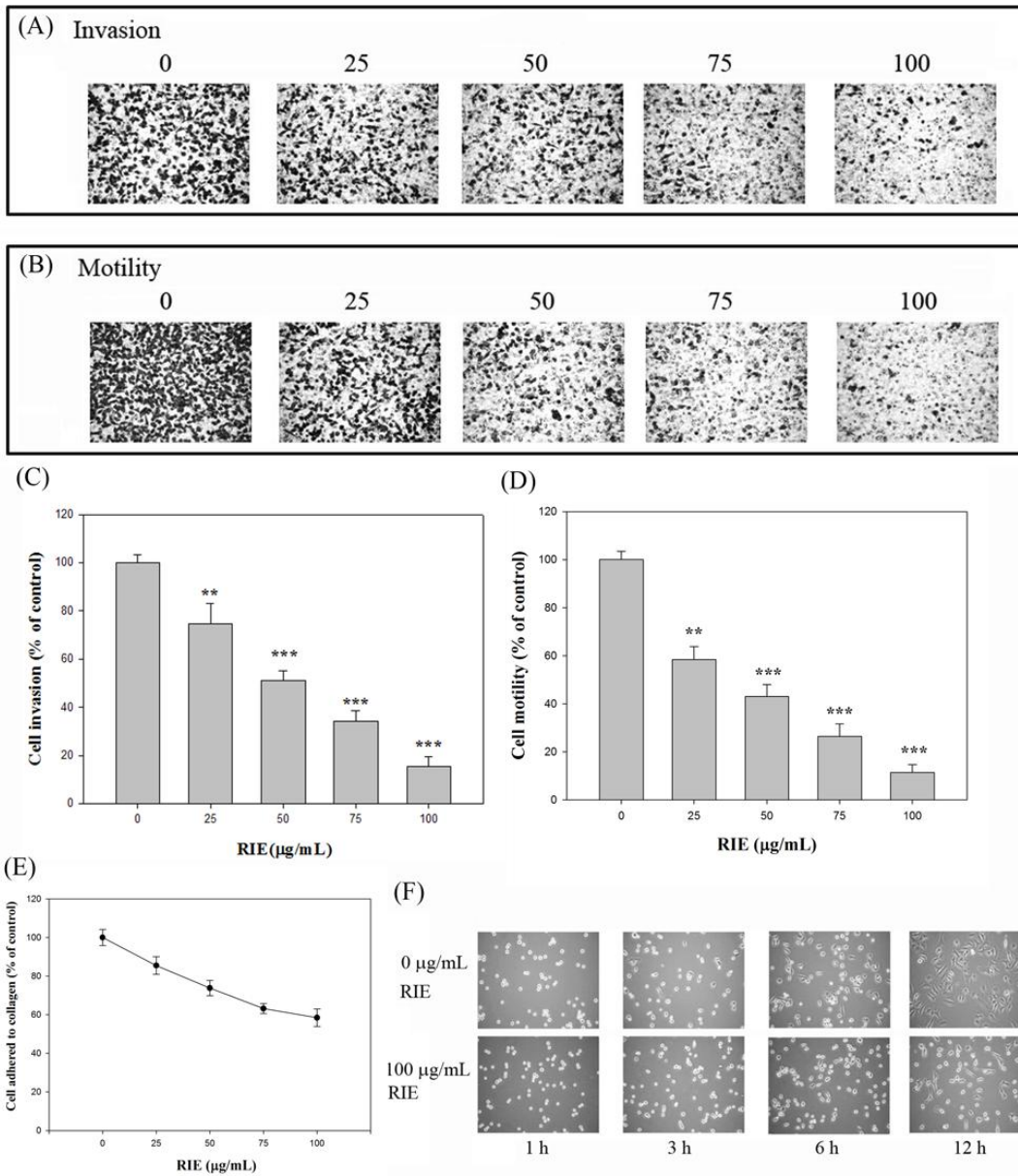


Figure 3. The effects of RIE on cell invasion, motility, adhesion, and spreading. A549 cells were subjected to analyze for cell (A & C) invasion, (B & D) motility, (E) cell-matrix adhesion, and (F) cell spreading as described in Materials and Methods. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

Figure 4

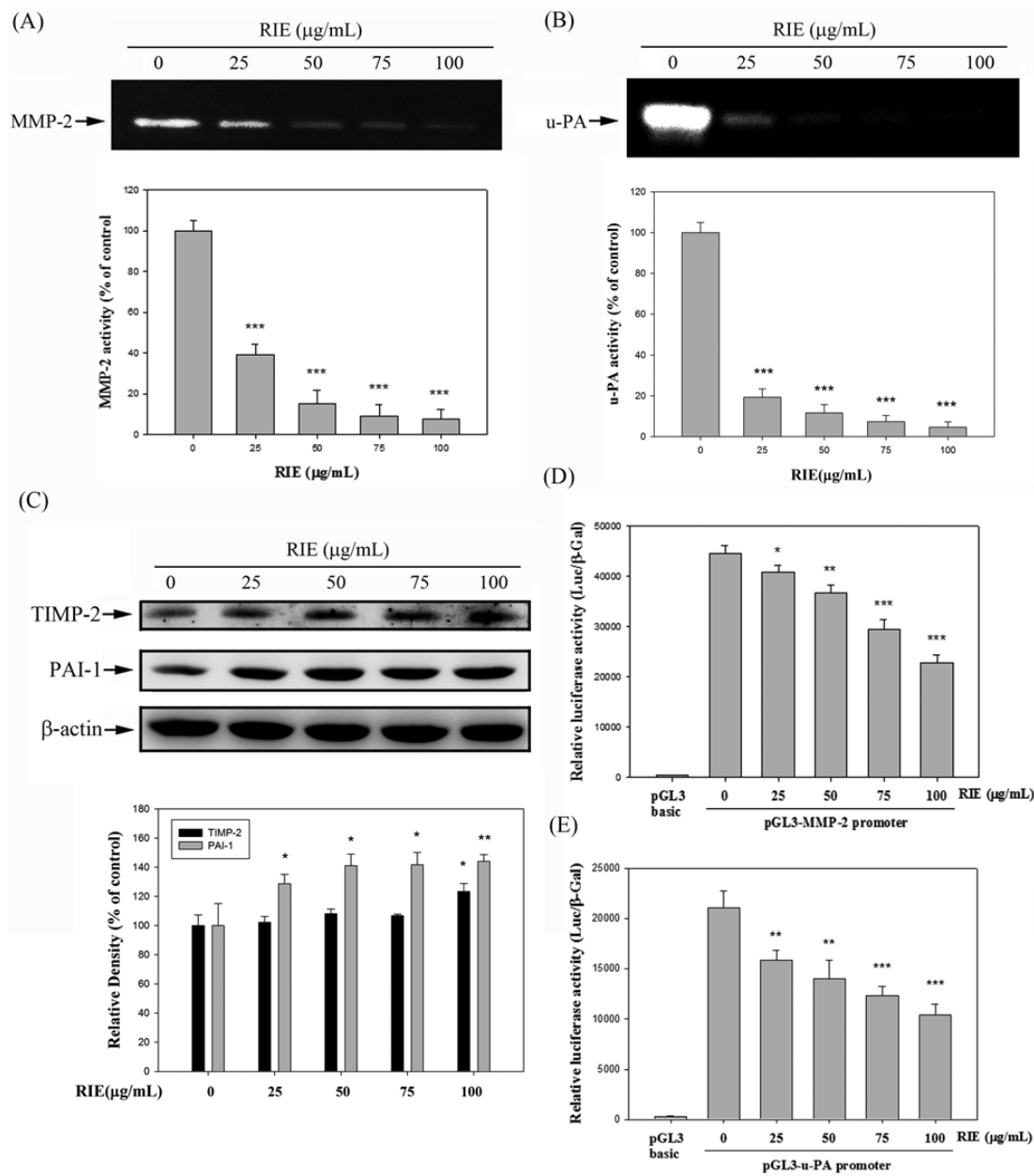


Figure 4. The effects of RIE on the protein and transcription activities of MMP-2 and u-PA. Cells were treated with RIE for 24 h, and then subjected to gelatin zymography and casein zymography to analyze the activities of (A) MMP-2 and (B) u-PA respectively. (C) TIMP-2 and PAI-1 protein expression. (D) pGL3-MMP-2 and (E) pGL3-u-PA. Data represented mean \pm SD with that of control being 100%, and the statistical significance of results was analyzed by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 5

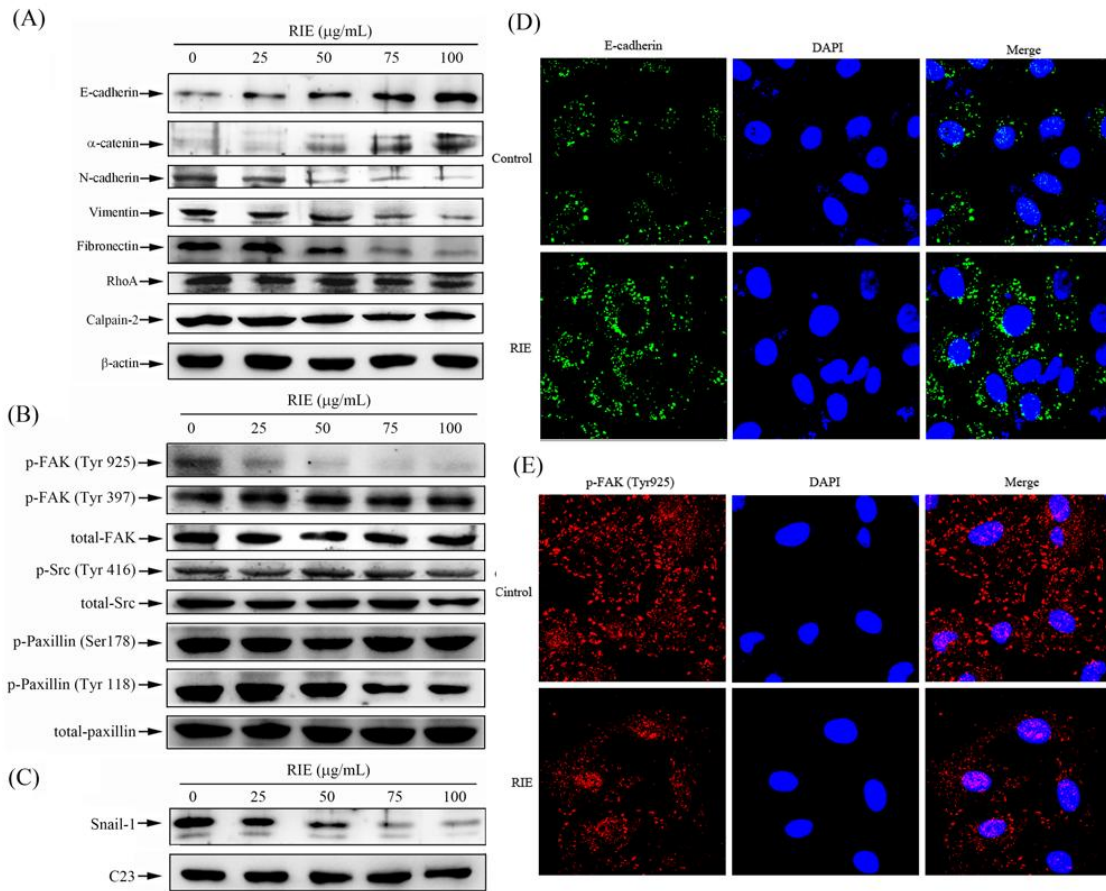


Figure 5. The effects of RIE on the cytoskeleton related protein. (A&B) Western blot analysis of cytoskeleton related protein with β -actin being an internal control in A549 cells. (C) Nuclear extracts were subjected to Western blotting with anti-snail-1 antibodies. Immunofluorescence analysis of (D) p-FAK and (E) E-cadherin. Similar results were obtained from three repeated and independent experiments.

Figure 6

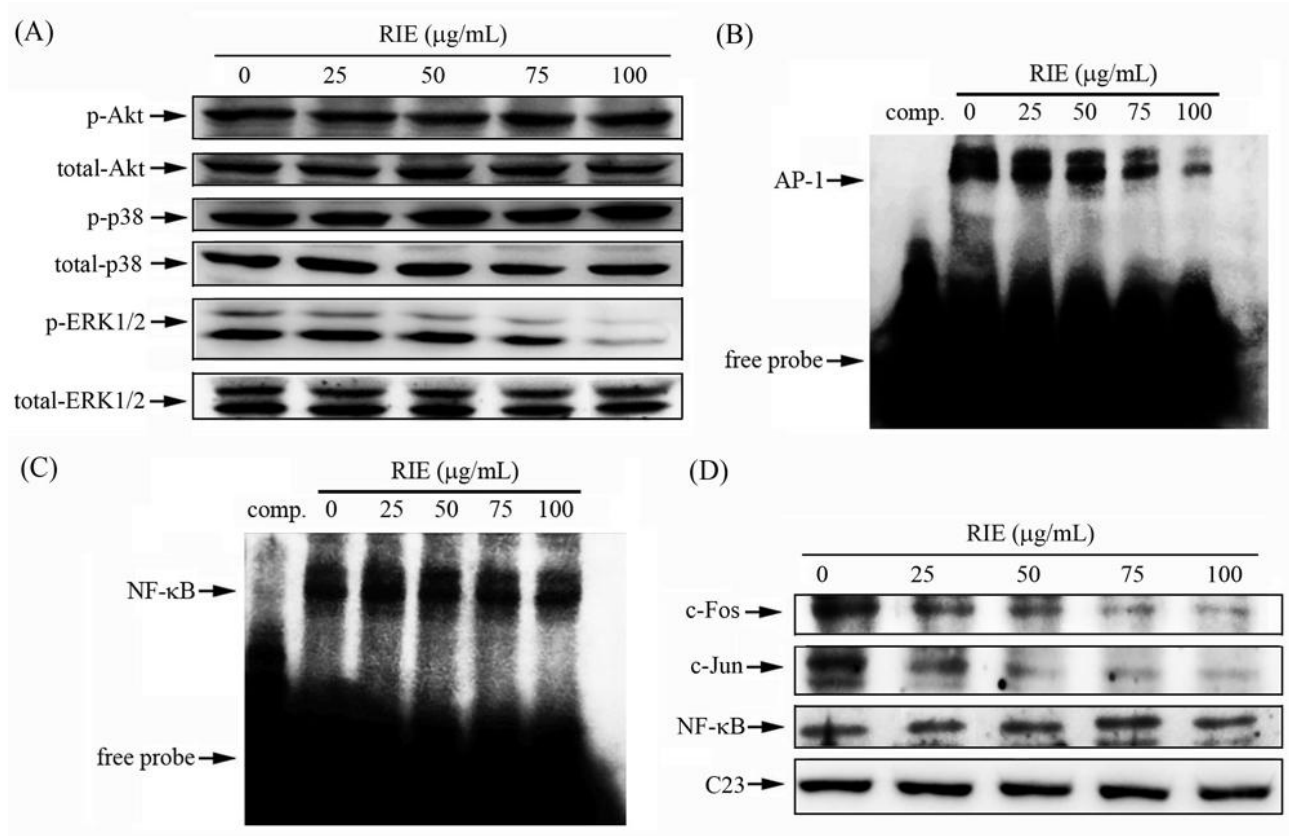


Figure 6. The inhibitory effect of RIE on the phosphorylation of ERK1/2 pathways and the activation of AP-1. A549 cells was treated with RIE for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with (A) anti-Akt, anti-phospho-Akt anti-p38, anti-phospho-p38, anti-ERK1/2, and anti-phospho-ERK1/2 antibodies. Nuclear extracts were analysed for DNA binding activity of (B) AP-1 and (C) NF- κ B using biotin labeled NF- κ B and AP-1 specific oligonucleotide in EMSA. The last lane represented nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (Comp) to confirm the specificity of binding. (D) Nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-NF- κ B, c-Fos, c-Jun, or C23 antibodies. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system. The experiments were repeated three times with similar results.

Figure 7

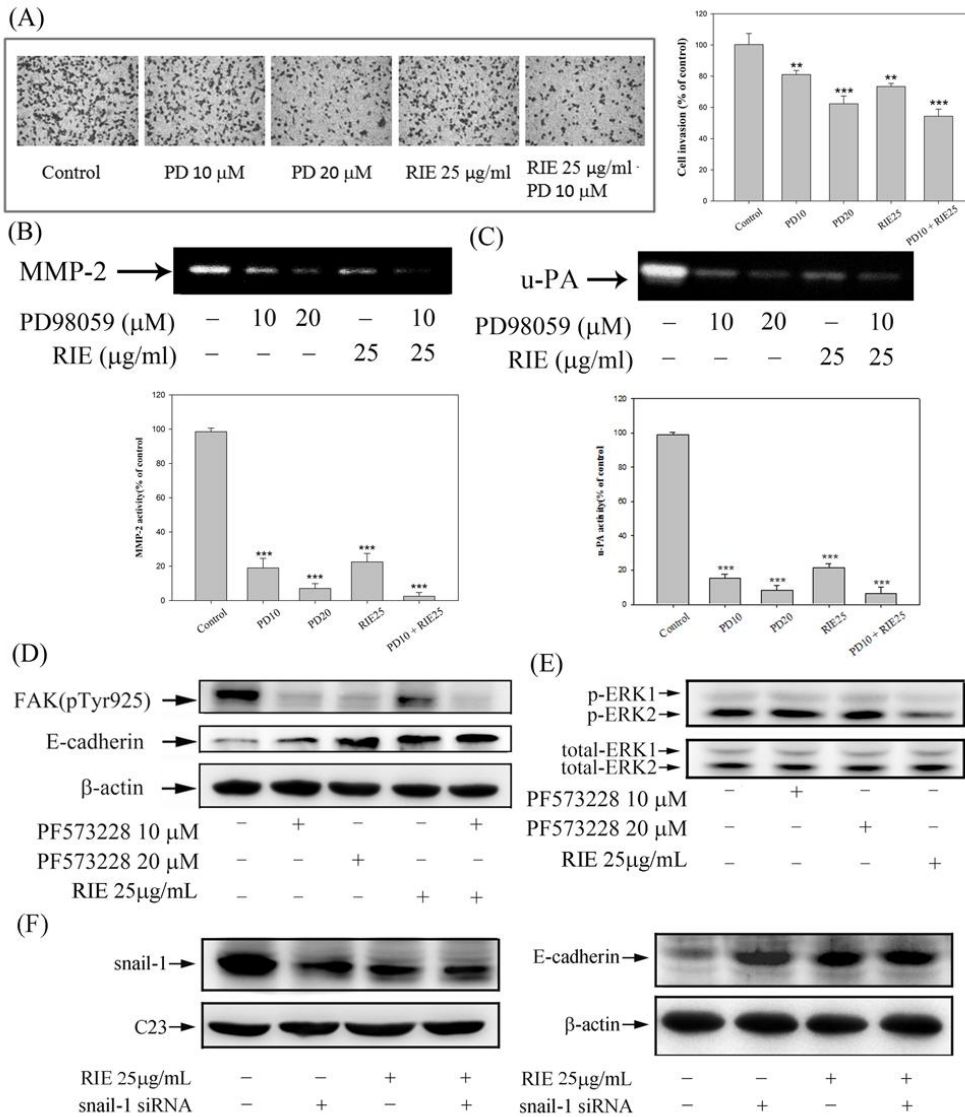


Figure 7. Effects of PD98059, PF573228 and snail-1 siRNA in A549 cells. Cells were treated with PD98059 and then incubated in the presence or absence of RIE for 24 hours. Condition media were subjected to gelatin zymography and casein zymography to analyze the activities of (A) MMP-2 and (B) u-PA. (C) For invasion assay, cells were subjected to *in vitro* invasion assay to analyze invasion ability. Cells were treated with PF573228 and/or RIE (25 μg/mL), and then cell lysates were analyzed for (D) p-FAK, E-cadherin, (E) p-ERK1/2 and total-ERK1/2 expression. (F) Cells were treated snail-1 siRNA and/or RIE, and then cell lysates were subjected to Western blotting with anti-snail-1 and anti-E-cadherin antibodies. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 8

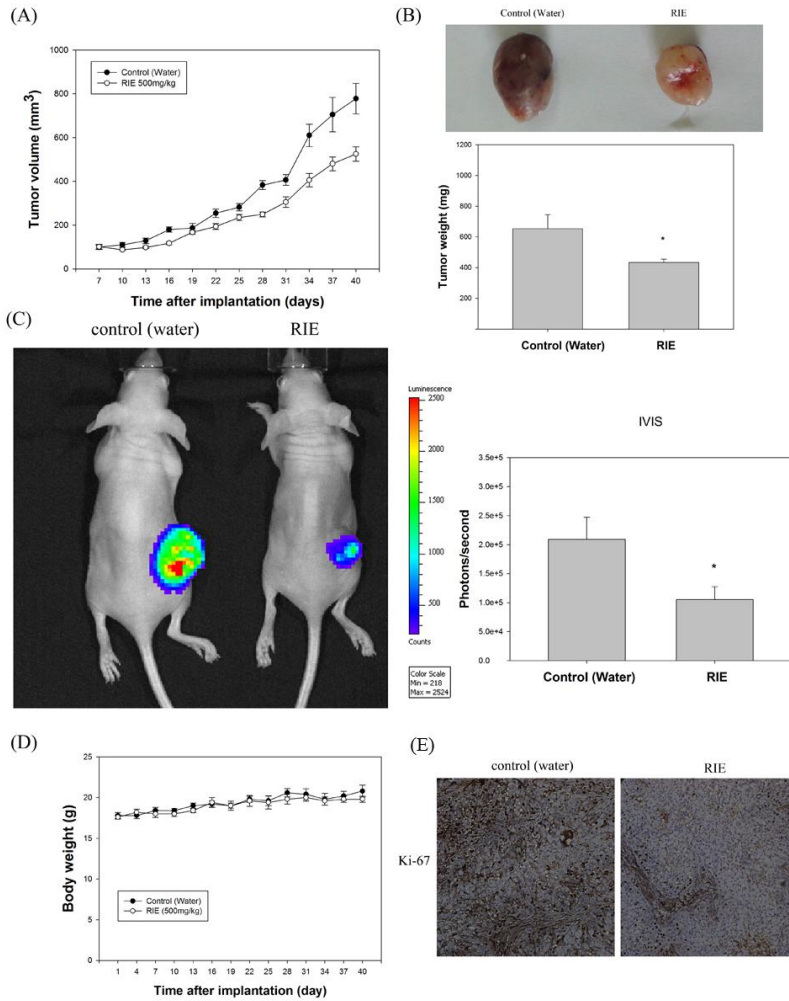


Figure 7. Effects of PD98059, PF573228 and snail-1 siRNA in A549 cells. Cells were treated with PD98059 and then incubated in the presence or absence of RIE for 24 hours. Condition media were subjected to gelatin zymography and casein zymography to analyze the activities of (A) MMP-2 and (B) u-PA. (C) For invasion assay, cells were subjected to *in vitro* invasion assay to analyze invasion ability. Cells were treated with PF573228 and/or RIE (25 μ g/mL), and then cell lysates were analyzed for (D) p-FAK, E-cadherin, (E) p-ERK1/2 and total-ERK1/2 expression. (F) Cells were treated snail-1 siRNA and/or RIE, and then cell lysates were subjected to Western blotting with anti-snail-1 and anti-E-cadherin antibodies. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 9

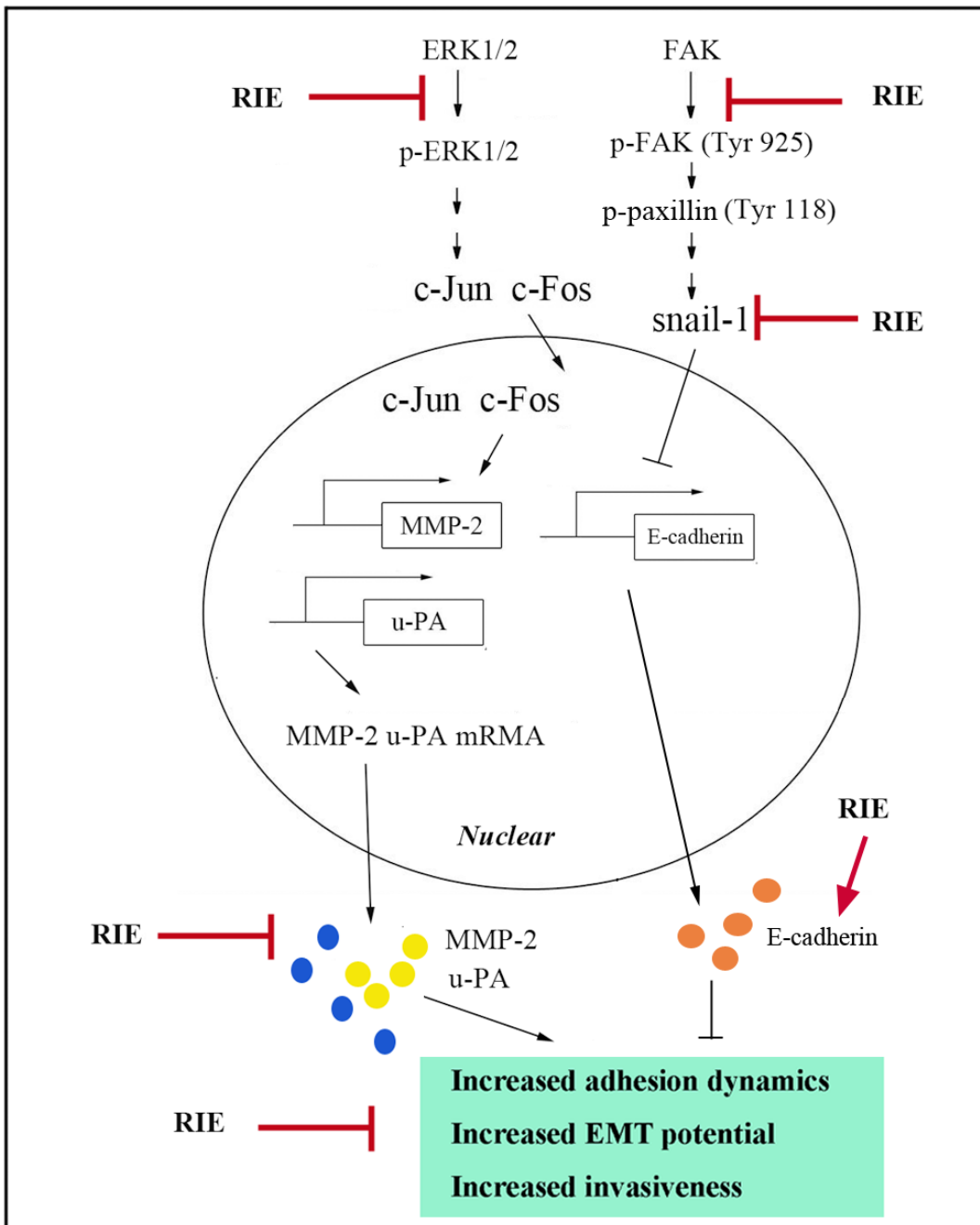


Figure 9. Proposed molecular targets in anti-migratory and EMT efficacy of RIE. RIE targets FAK and snail-1 mediated E-cadherin expression as well as translocation activities of MMP-2 and u-PA; thereby prevents loss of cell-cell contact and inhibits invasive and EMT potential of A549 cells

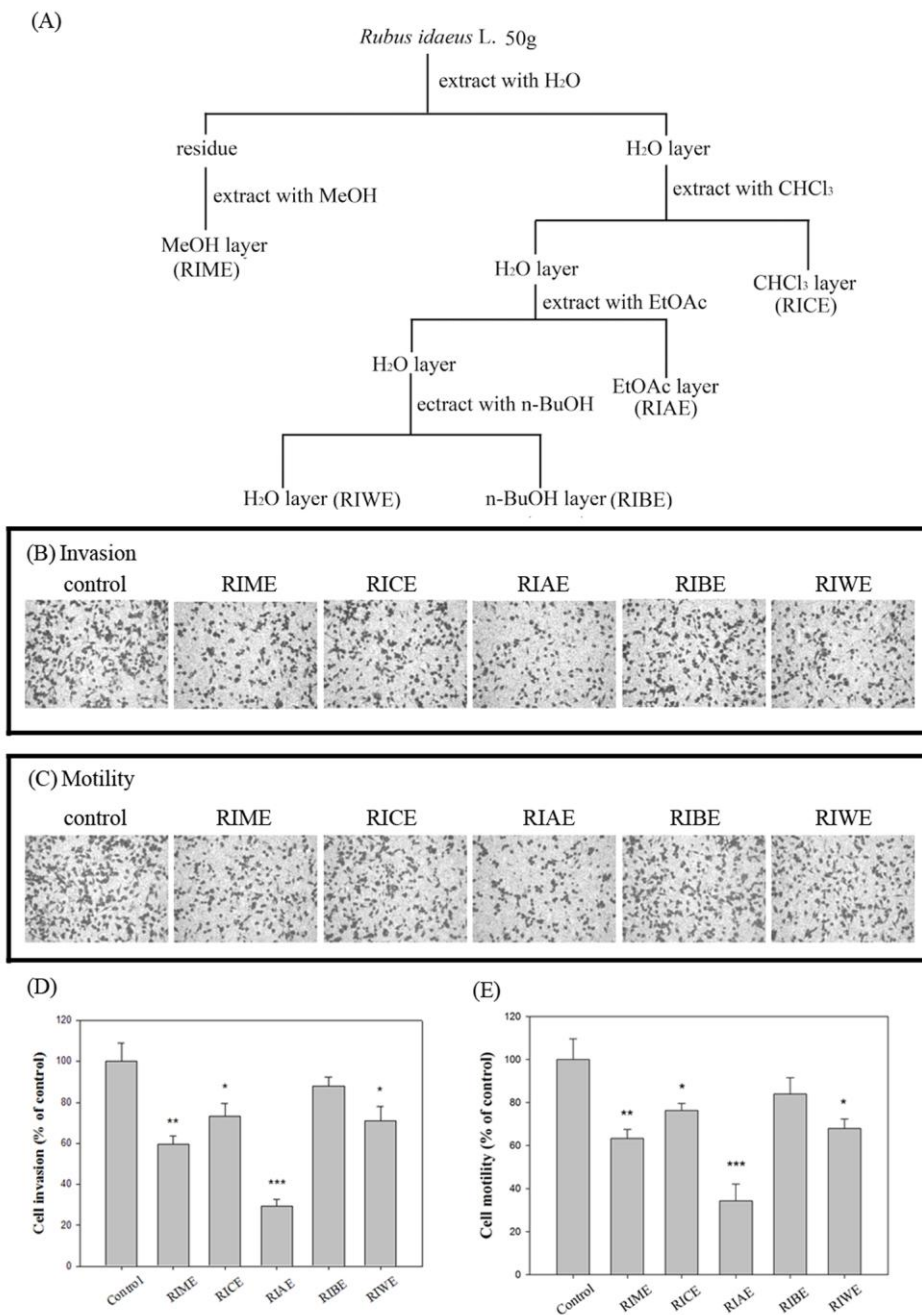


Figure 10. The chemical profile of *Rubus idaeus* extract was analyzed by HPLC-mass spectrometry. (A) Procedure for fractionation of the extracts from *Rubus idaeus*. A549 cells were treated with these fractions by Transwell invasion assay (B&D) and motility assay (C&E). The statistical significance of results was analyzed by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

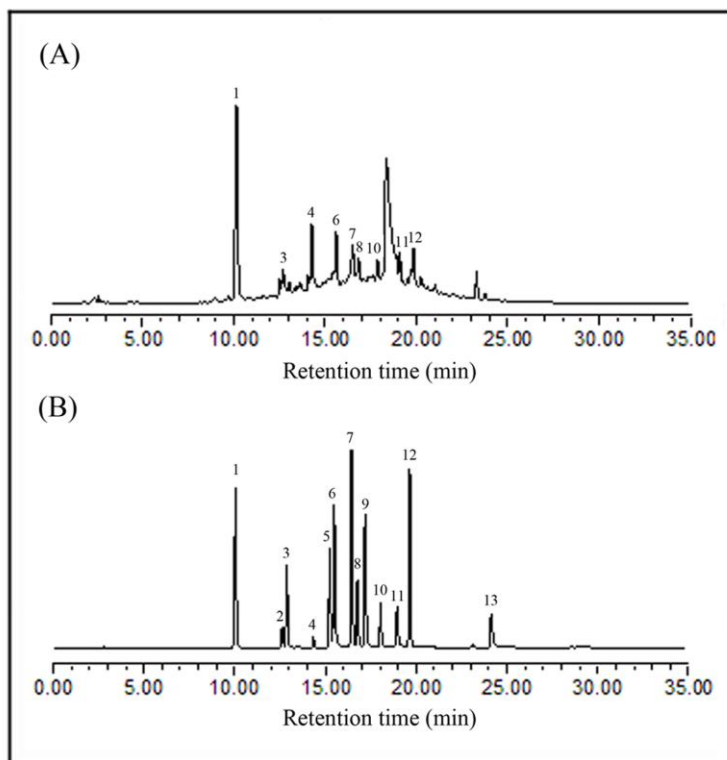


Figure 11. The chemical profile of RIAE was analyzed by HPLC-mass spectrometry. (A) Chromatographic patterns from HPLC analysis of RIAE extracts showed peaks corresponding to the retention times (min). (B) HPLC chromatogram of 13 kinds of standard compound. Peaks: 1, 5 μg of gallic acid; 2, 10 μg of GC; 3, 5 μg of protocatechuic acid; 4, 5 μg of EGC; 5, 5 μg of catechin; 6, 5 μg of methyl gallate; 7, 5 μg of EC; 8, 5 μg of EGCG; 9, 1 μg of GCG; 10, 5 μg of rutin; 11, 5 μg of ECG; 12, 10 μg of naringin; 13, 5 μg of quercetin. Absorbance was monitored at 280 nm.

Table 1. Characterization of Phenolic Compounds of RIAE

peak no.	retention time (min)	assigned identity ^a
1	9.980	gallic acid
3	12.868	PCA
4	14.361	EGC
6	15.591	methyl gallate
7	16.488	EC
8	16.830	EGCG
10	18.073	rutin
11	18.993	ECG
12	19.673	naringin

^a PCA, protocatechuic acid; EGC, Epigallocatechin; EC, Epicatechin; EGCG, Epigallocatechin gallate; ECG, Epicatechin gallate

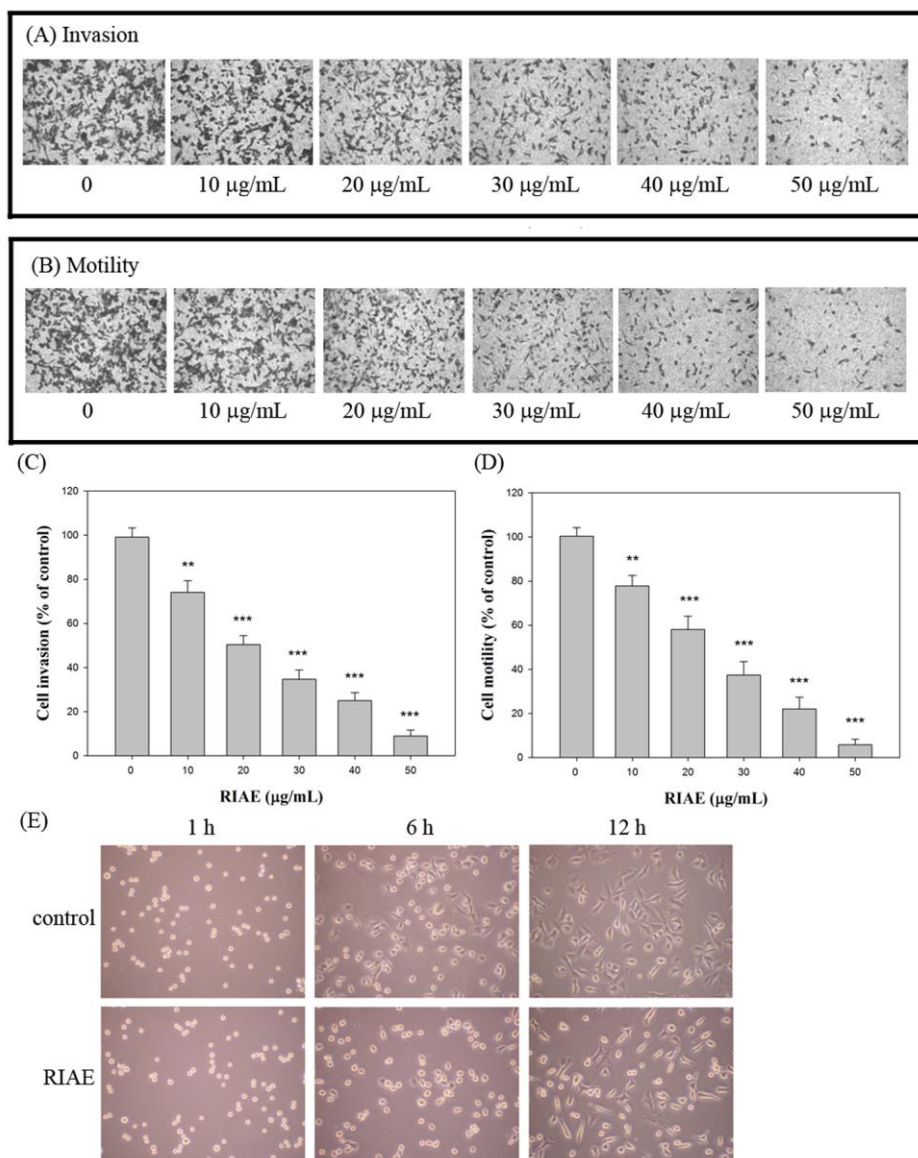


Figure 12. The effects of RIAE on cell invasion, motility, and spreading. A549 cells were subjected to analyze for cell (A & C) invasion, (B & D) motility, (E) cell spreading as described in Materials and Methods. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

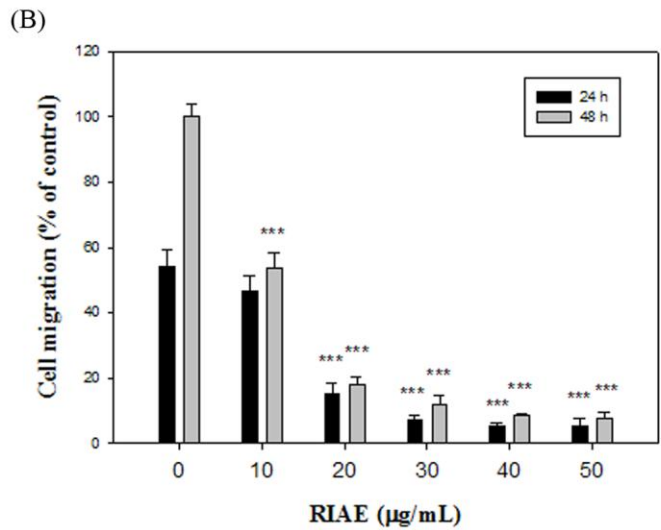
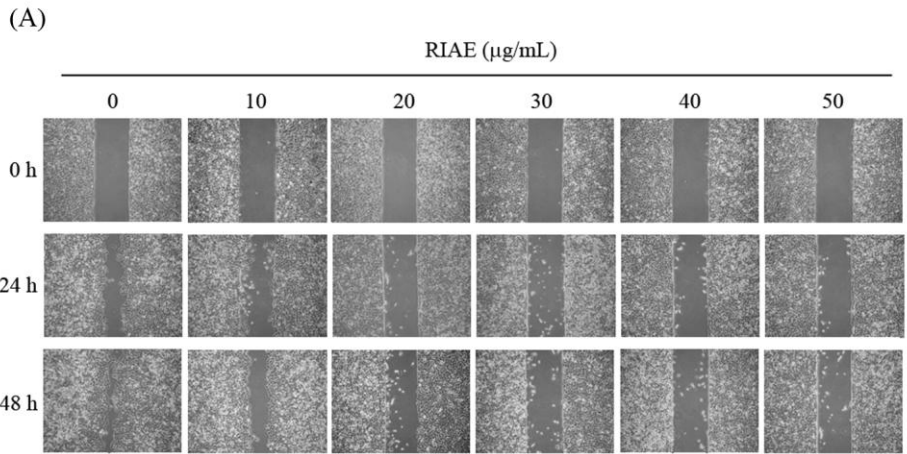


Figure 13. The effects of RIAE on cell migration of A549 cells. (A) A549 cells were subjected to analyze for cell migration by wound healing assay. (B) Determined migration ability of A549 was subsequently quantified with that of control being 100% (without RIAE for 48 h). Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (***, $P < 0.001$). Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

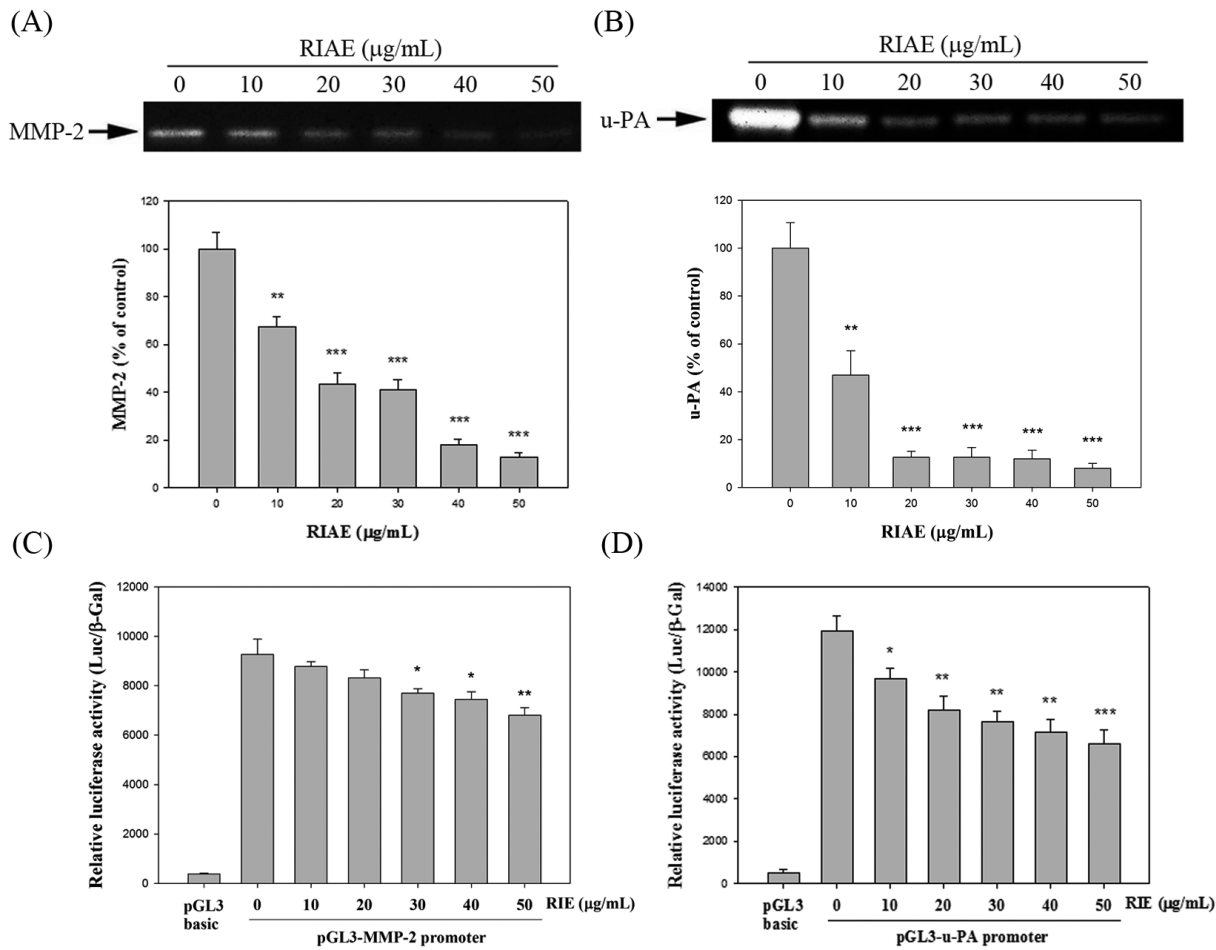


Figure 14. The effects of RIAE on the protein and transcription activities of MMP-2 and u-PA. Cells were treated with RIAE for 24 h, and then subjected to gelatin zymography and casein zymography to analyze the activities of (A) MMP-2 and (B) u-PA respectively as described in Materials and Methods. Luciferase activity was measured in transiently transfected A549 cells using (C) pGL3-MMP-2 and (D) pGL3-u-PA. Data represented mean \pm SD with that of control being 100%, and the statistical significance of results was analyzed by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

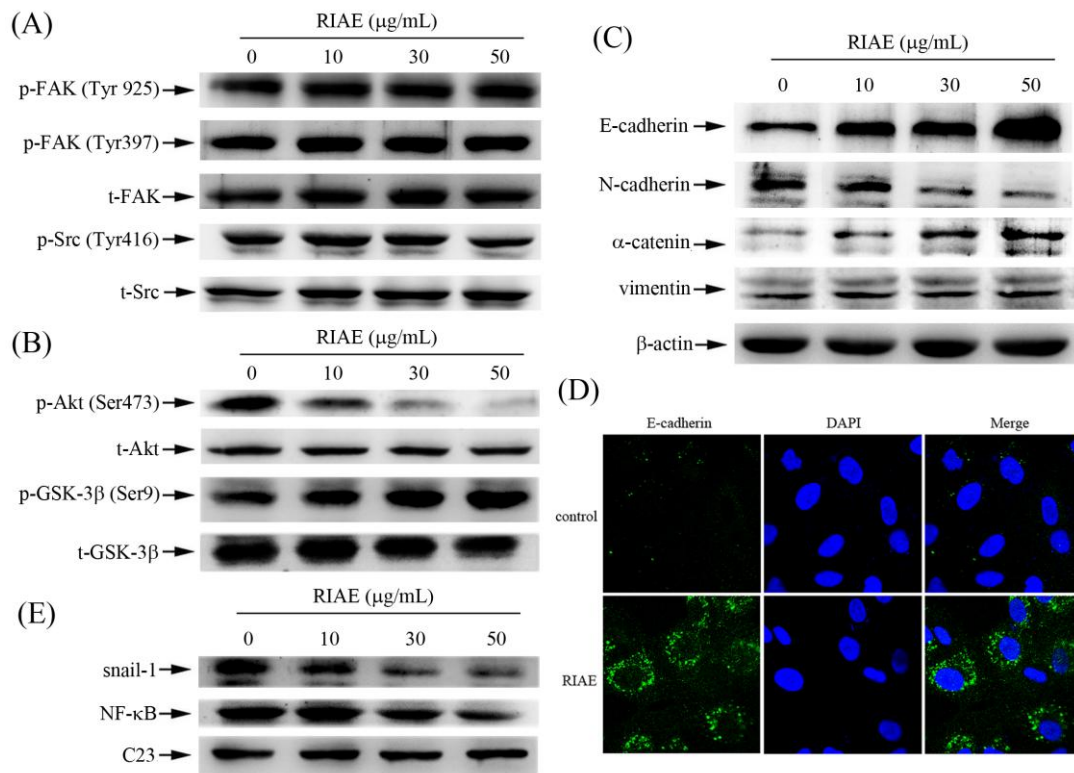


Figure 15. The effects of RIAE on the cytoskeleton related protein. Western blot analysis of (A) p-FAK (Tyr 925), p-FAK (Tyr 397), p-Src (Tyr 416), t-FAK, t-Src, (B) p-Akt (Ser473), and p-GSK-3 β (Ser9) in A549 cells after 24 hours of treatment with RIAE. (C) Western blot analysis of E-cadherin, N-cadherin, α -catenin, and vimentin with β -actin being an internal control. (D) Immunofluorescence analysis of E-cadherin in A549 cells with or without RIAE adding. (E) Nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-NF- κ B and anti-snail-1 antibodies with anti-C23 being an internal control. Similar results were obtained from three repeated and independent experiments.

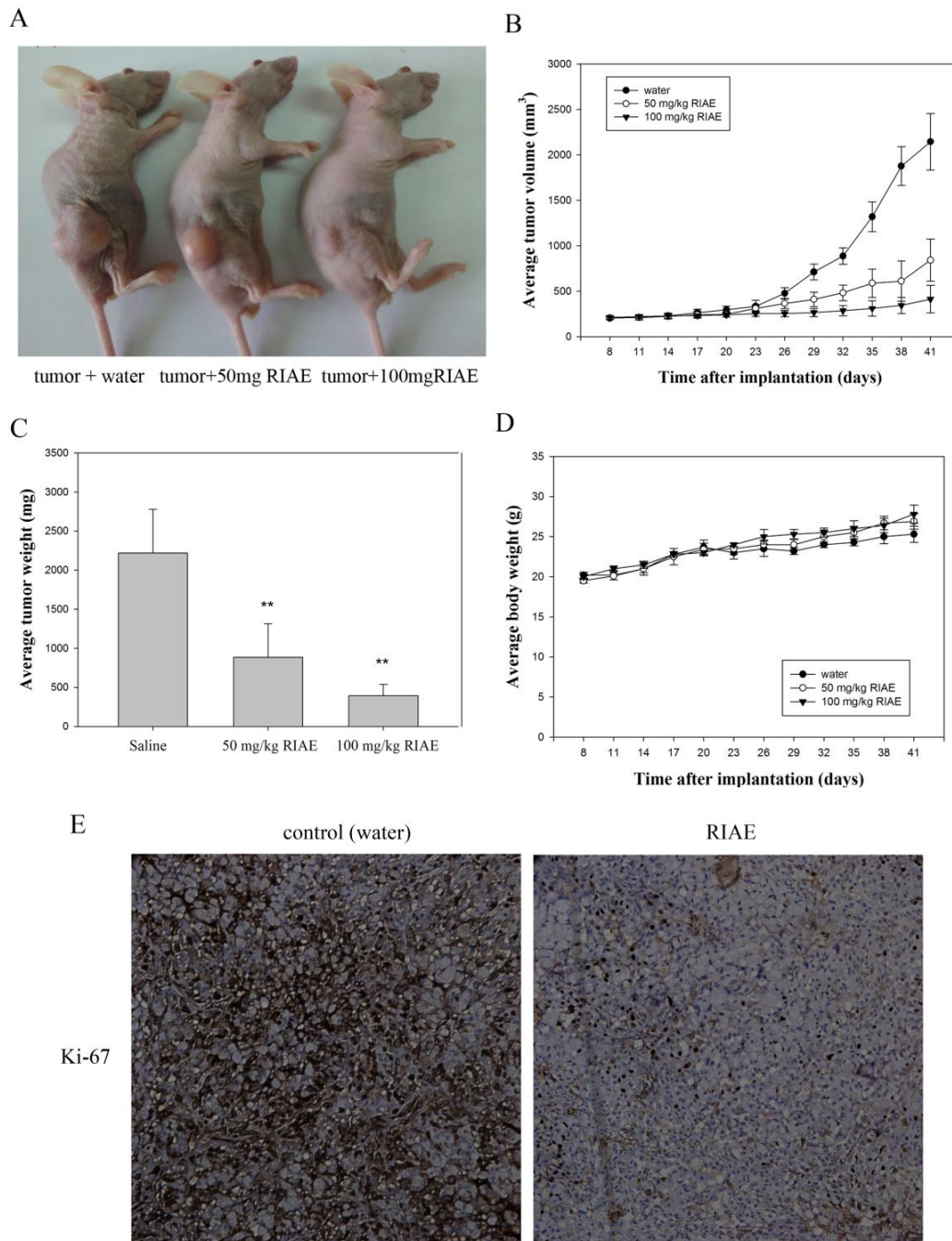


Figure 16. *In vivo* anti-tumor effects of RIAE. After the subcutaneous implantation of the A549 cells, the BALB/c nude mice were treated with saline or RIAE and were analyzed for tumor growth. (A) Control group (water), 50 mg/kg/day RIAE, and 100 mg/kg/day RIAE, (B) average tumor volume, (C) tumor weight, and (D) body weight. (E) Immunohistochemistry (IHC) for Ki-67 (cell proliferation marker) in A549 tumors (200×). The results were statistically evaluated using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (** $p < 0.01$).

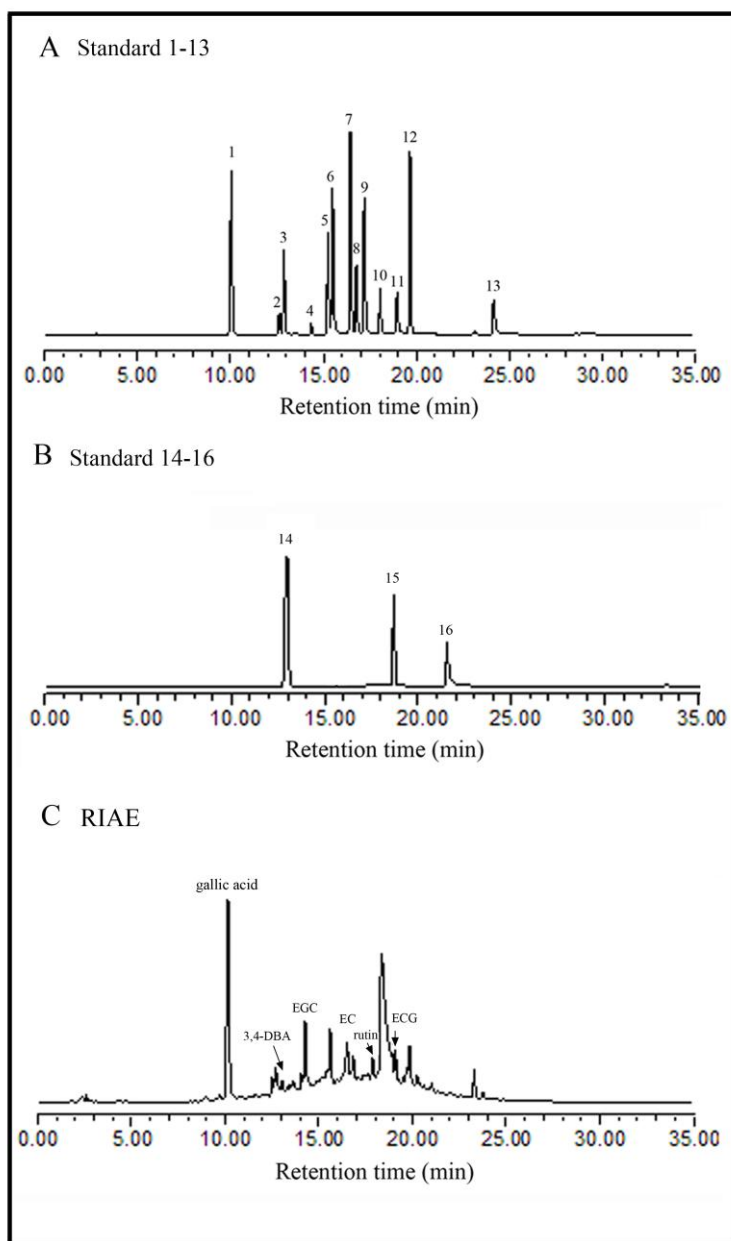


Figure 17. Chemical profile of RIAE analyzed via HPLC-mass spectrometry. (A) HPLC chromatogram of 13 kinds of standard compound. Peaks: 1, 5 μg of gallic acid; 2, 10 μg of GC; 3, 5 μg of protocatechuic acid; 4, 5 μg of EGC; 5, 5 μg of catechin; 6, 5 μg of methyl gallate; 7, 5 μg of EC; 8, 5 μg of EGCG; 9, 1 μg of GCG; 10, 5 μg of rutin; 11, 5 μg of ECG; 12, 10 μg of naringin; 13, 5 μg of quercetin. (B) Standard compound. Peaks: 14, 25 μg of 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DBA); 15, 25 μg of p -coumaric acid; 16, 8 μg of myricetin. (C) The chromatographic patterns from the HPLC analysis of the RIAE extracts showed peaks that correspond to the retention times (min).

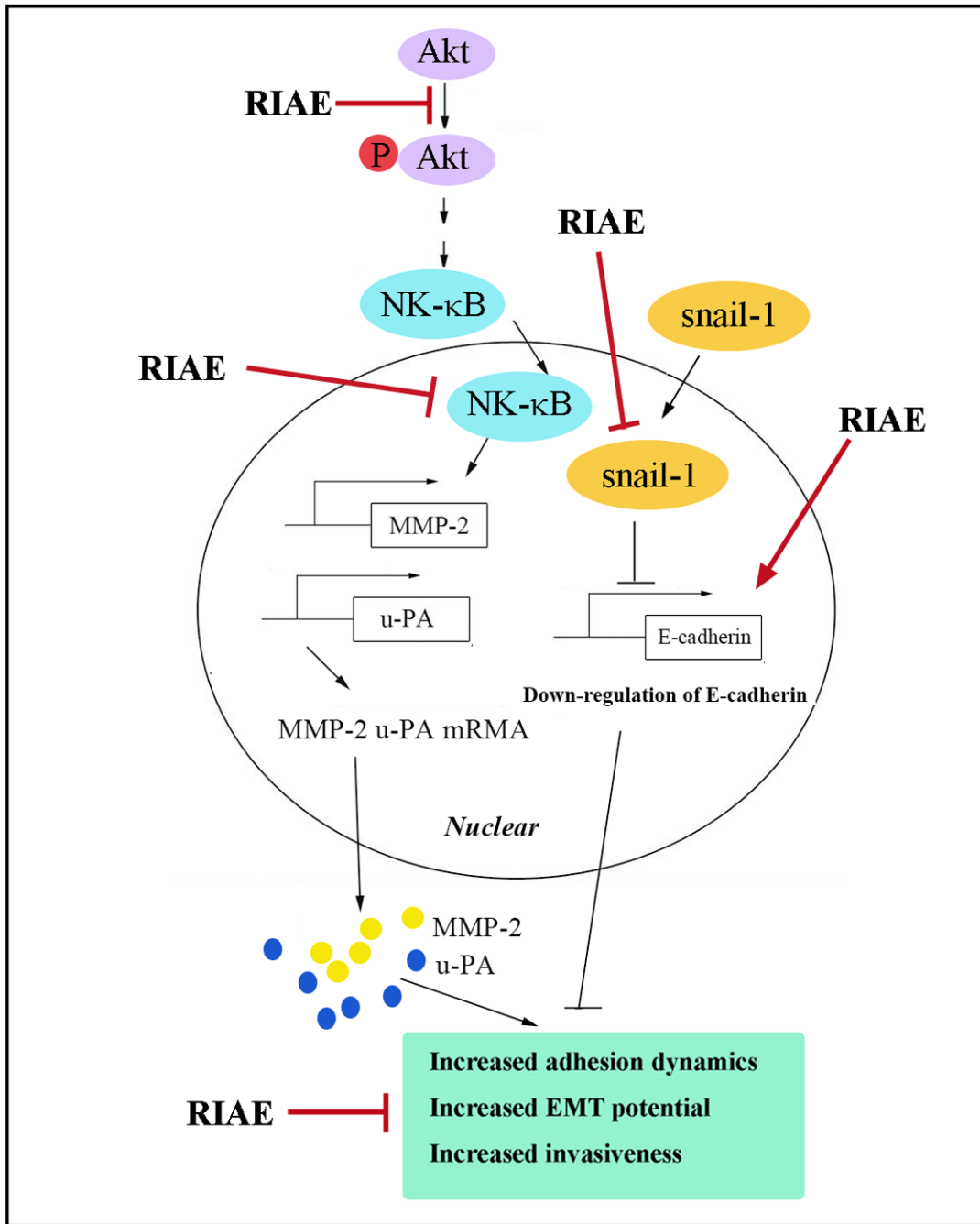


Figure 18. Proposed molecular targets in the anti-migratory and anti-invasive efficacy of RIAE in A549 cells. RIAE targets the snail-1 mediated E-cadherin expression and the translocation activities of MMP-2 and u-PA, which prevents the loss of cell-cell contact and inhibits the invasive and EMT potential of A549 cells.

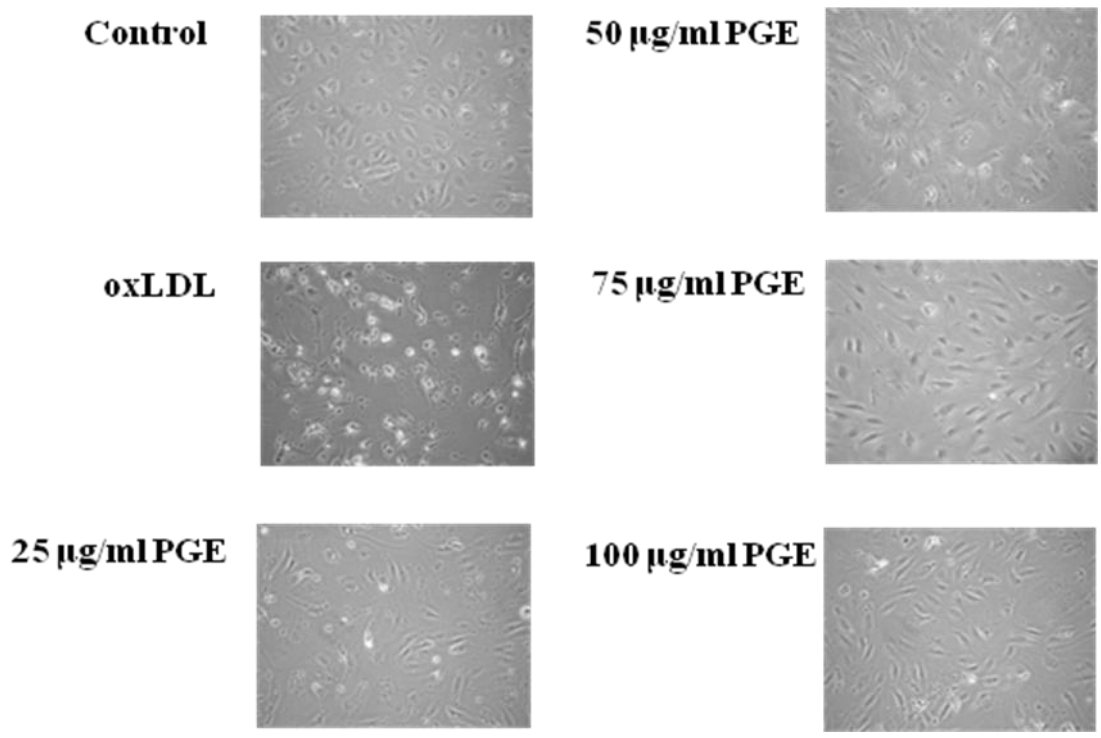
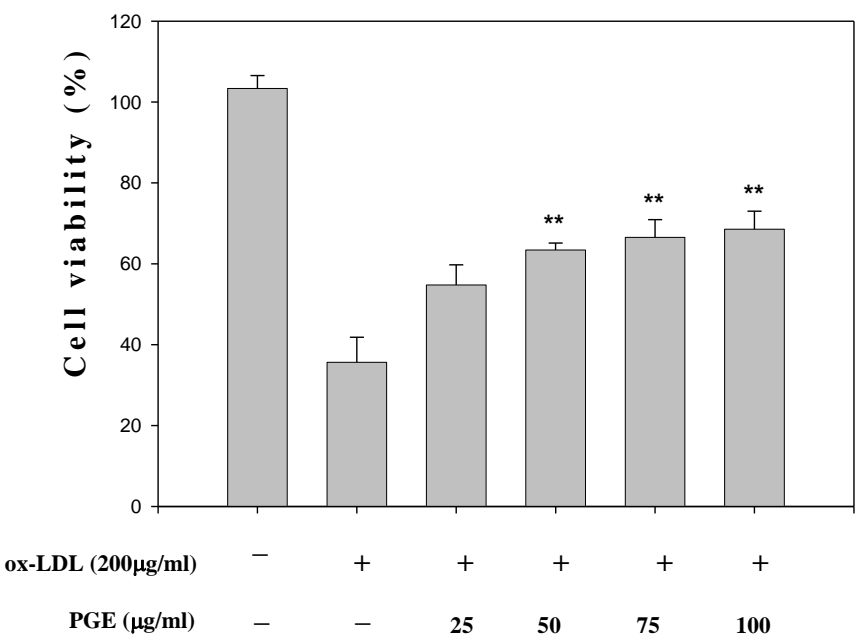


Fig 19. Effect of PGE on oxLDL-induced endothelial cell death. HUVECs were incubated with oxLDL (200 µg/mL) in the absence and presence of PGE (25, 50, 75, and 100 µg/mL) for 16 h. (A) Photomicrographs of the treated HUVEC cells were observed by using phase-contrast microscopy.



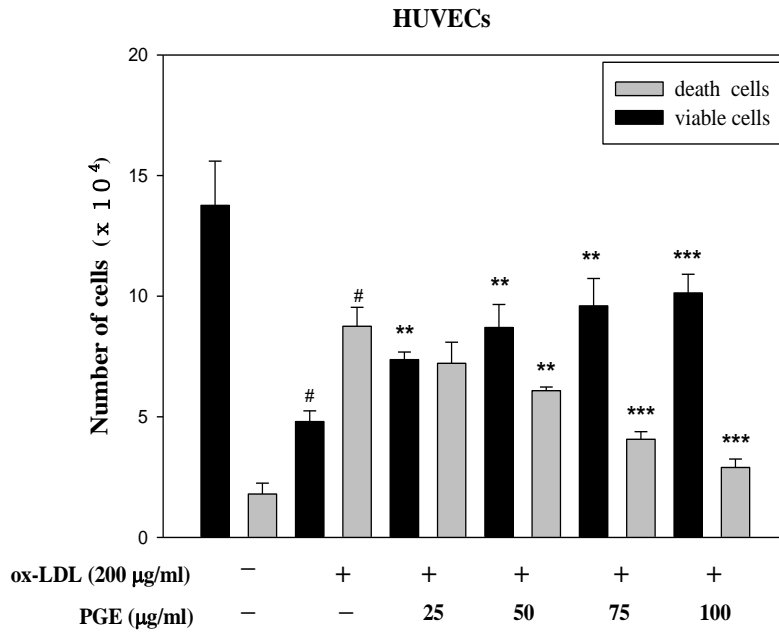


Fig.20. Effect of PGE on oxLDL-induced endothelial cell death. HUVECs were incubated with oxLDL (200 µg/mL) in the absence and presence of PGE (25, 50, 75, and 100 µg/mL) for 16 h. (A) The viability of treated HUVEC cells was detected using the MTT assay as described in the Materials and Methods. (B) Viable cells and dead cells were counted using the Trypan blue exclusion assay. The quantitative data were presented as means (SD of three independent experiments. #, P < 0.001 compared with control. *, P < 0.05; **, P < 0.01; and ***, P < 0.001 compared with the oxLDL-treated group.

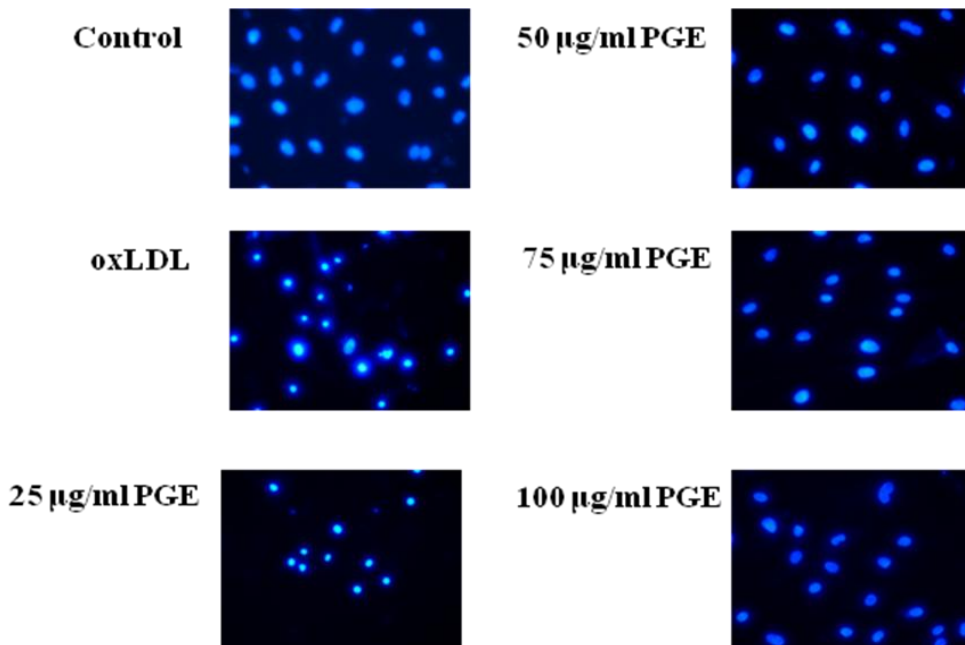


Fig.21. Protective effect of PGE on oxLDL-induced endothelial cell apoptosis. HUVECs were incubated with oxLDL in the presence and absence of PGE for 16 h. The nuclear morphology of the treated cells was observed by fluorescence microscopy using DAPI stain (at a magnification of 100×). Arrows showed areas of intense fluorescence staining with condensed nuclei.

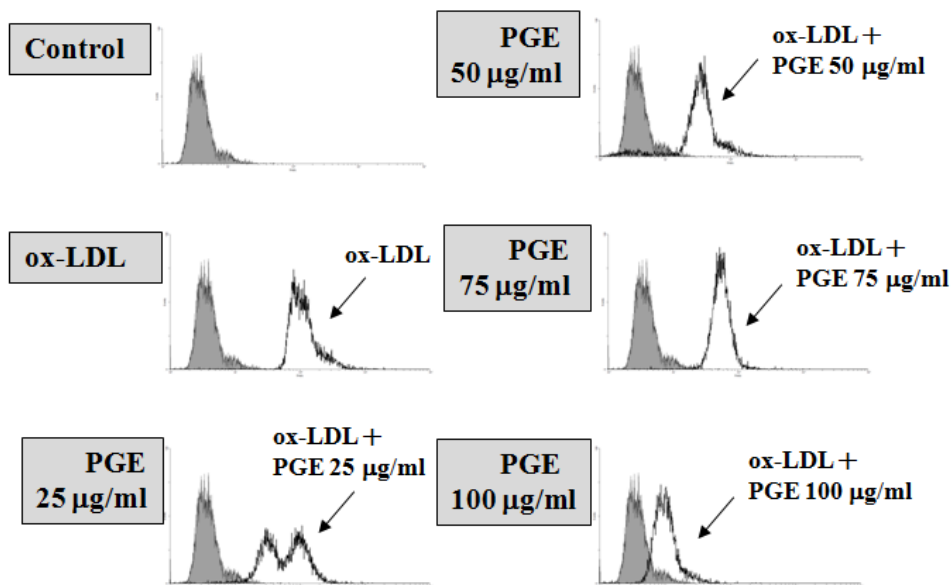


Fig.22. Effects of PGE on oxLDL-induced ROS production in HUVECs. The ROS levels of (A) the HUVEC cells without treatment, control (without oxLDL)(gray trace); (B) the HUVEC cells with treatment of oxLDL(200 µg/mL), control (with oxLDL)(dark trace); (C) the HUVEC cells with treatment of oxLDL and PGE(25 µg/mL), PGE 25 µg/mL (dark trace); (D) the HUVEC cells with treatment of oxLDL and ELE(50 µg/mL), PGE 50 µg/mL (dark trace); (E) the HUVEC cells with treatment of oxLDL and ELE(75 µg/mL), PGE 75 µg/mL (dark trace); and (F) the HUVEC cells with treatment of oxLDL and PGE(100 µg/mL), PGE 100 µg/mL (dark trace), were measured by flow cytometry using DCFH staining.

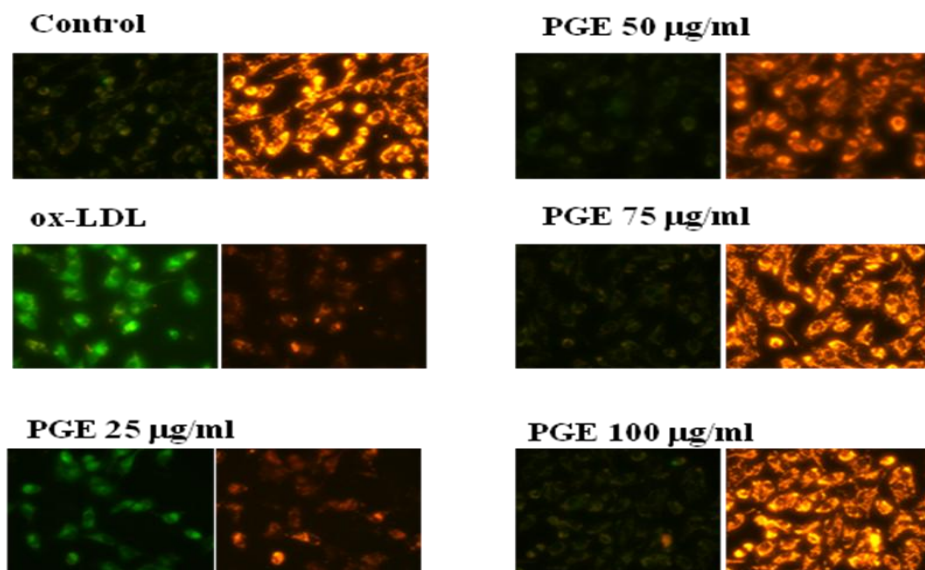


Fig.23. Effects of PGE on oxLDL-induced changes in the mitochondrial membrane potential in endothelial cells. HUVECs were incubated with oxLDL (200 µg/mL) in the absence and presence of PGE (25, 50, 75, and 100 µg/mL) for 16 h. The changes of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were assessed by using fluorescent lipophilic cationic JC-1 dye. JC-1 is selectively accumulated within intact mitochondria to form multimer J-aggregates emitting fluorescence light at 590 nm (red) at a higher membrane potential, left, and monomeric JC-1 emits light at 527 nm (green) at a low membrane potential, right.

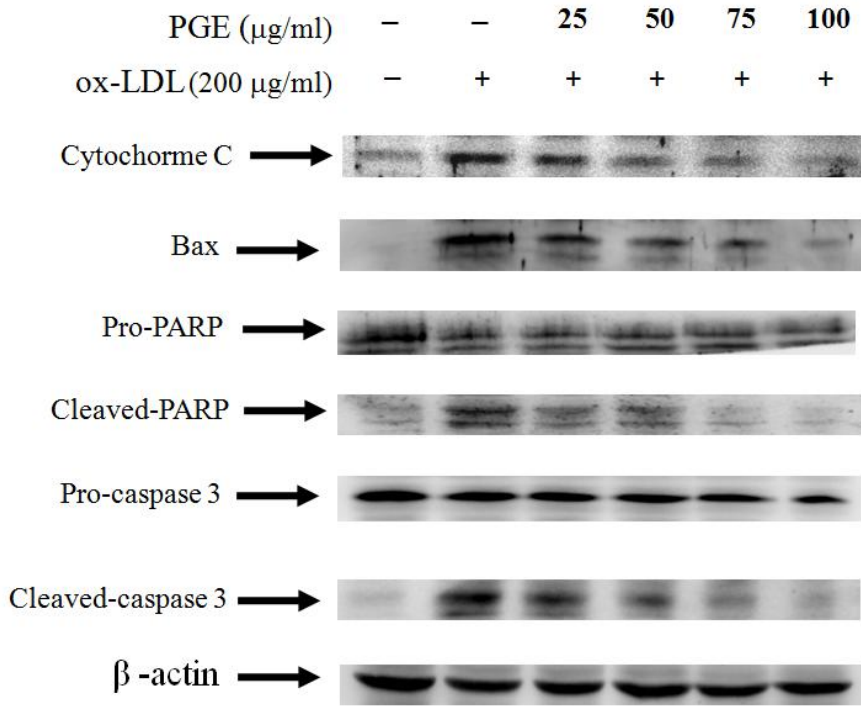
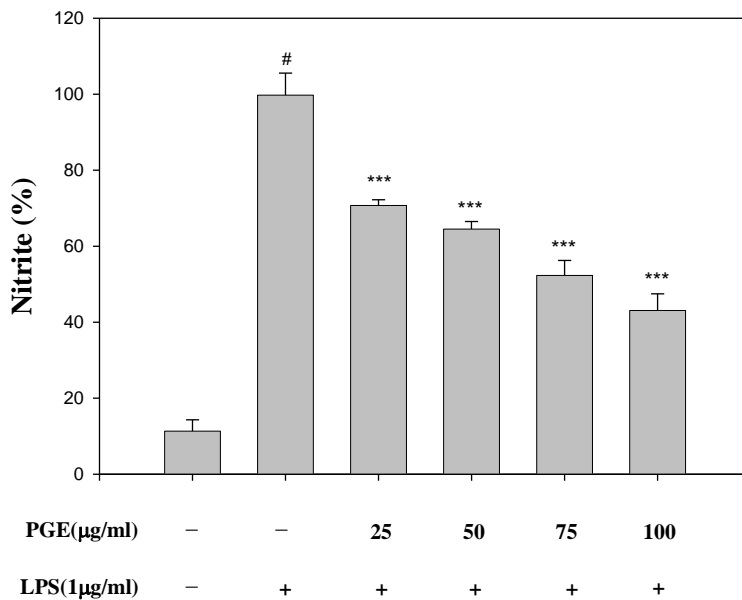


Fig. 24. Effects of PGE on oxLDL-induced caspase-3 and PARP activation. In the Western blot assay, cell lysates were subjected to SDS-PAGE, with β -Actin used as an internal control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system. The results were representative of three independent experiments.

(A)

Raw-264.7



(B)

RAW 264.7

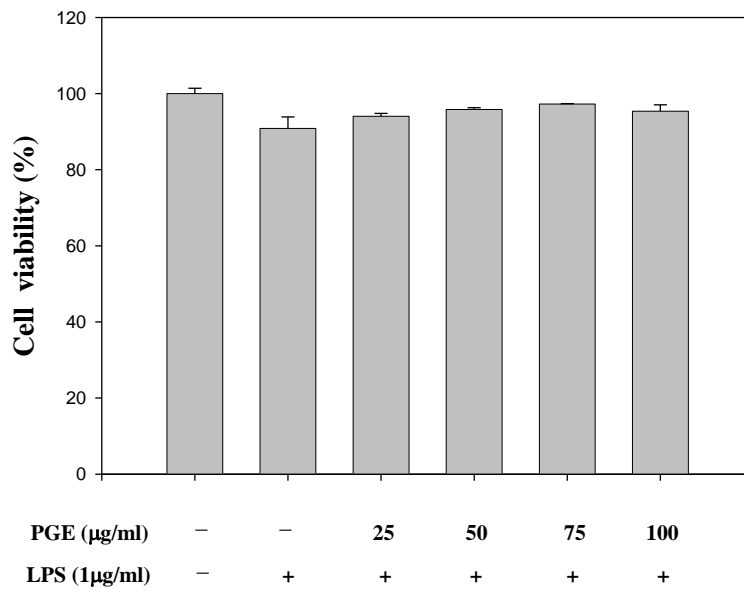


Figure 25. Effect of PGE on LPS-induced (a) nitrite production and (b) cell viability in Raw 264.7 cells. Reported values are the means \pm SD (n=3). # $p < 0.05$ indicates significant differences from the untreated group. * $p < 0.05$ indicates significant differences from the LPS treated group.

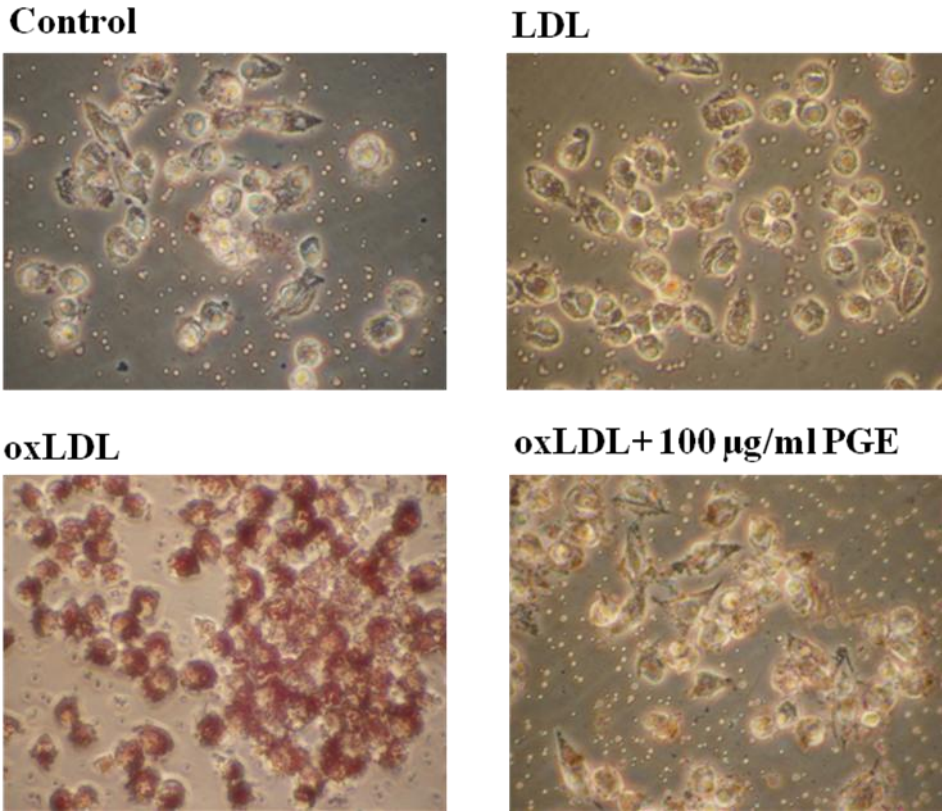


Figure 26. Effect of PGE on lipid accumulation in RAW 264.7 cells. Cells were incubated with copper-mediated LDL (100 µg/mL) or native LDL (LDL) in the absence or presence of PGE (100 µg/mL) for 24 h. After incubation, cells were washed with PBS and stained with Oil Red O (ORO). Panel A, macrophages (400× magnification); Panel B, macrophages incubated with nLDL; Panel C, macrophages incubated with ox-LDL; Panel D, macrophages incubated with ox-LDL and treated with PGE.

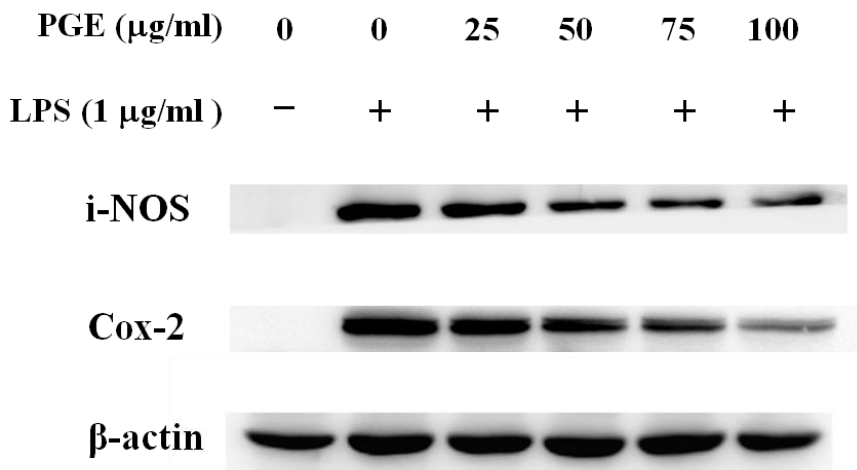


Figure 27. Effect of PGE on protein expression of iNOS and COX-2. Western blot analysis of iNOS and COX-2 in Raw cells after 24 h of treatment with PGE. PGE inhibited the iNOS and COX-2 protein expression in a dose-dependent manner. Actin was used as a loading control.

(A)

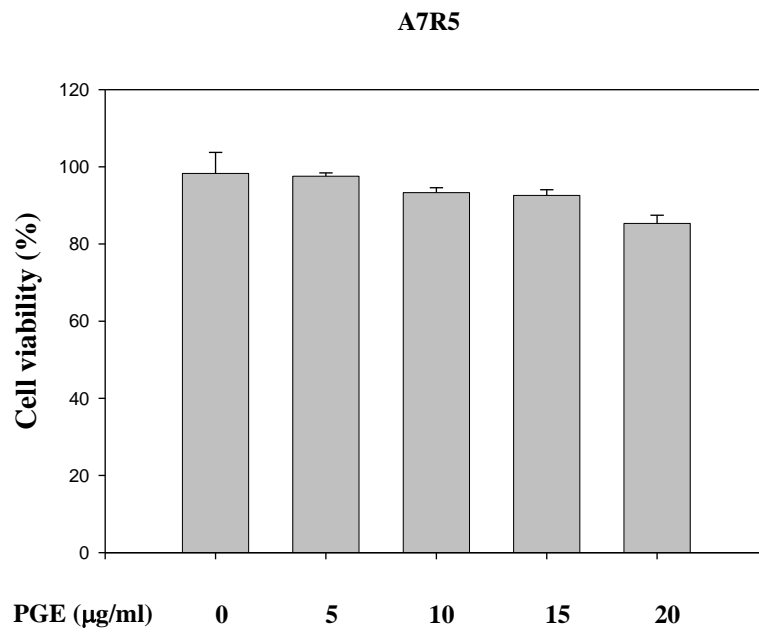
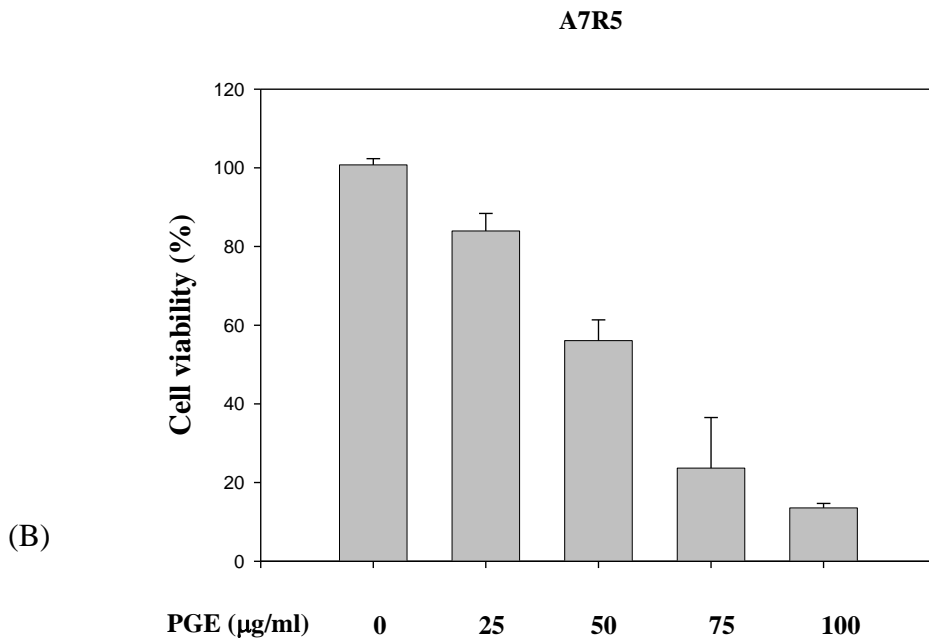


Fig.28. Effect of PGE on the viability of A7r5 cells. A7r5 cells were 1% serum starved for 24 h and then treated with 25, 50, 75 and 100 µg/ml of PGE for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. The data is presented as means \pm SD from at least three independent experiences. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to non-treated control.

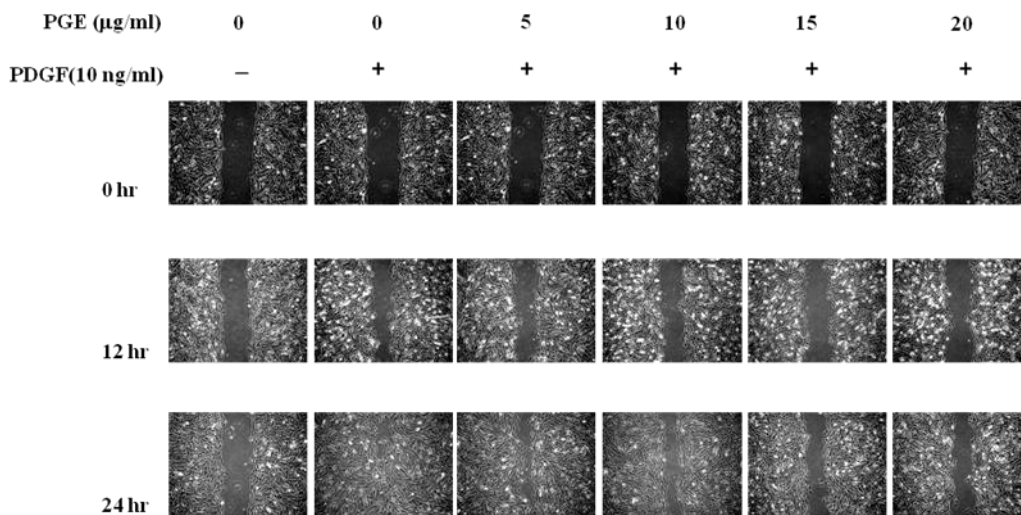


Fig.29. Effect of PGE on the migration of A7r5 cells by the wound healing assay. Photographs show wound closure of A7R5 treat the PGE (0, 5, 10, 15 ,20 $\mu\text{g/ml}$) at 0, 12, 24 hr. Cell wound healing assay were then performed as described in Materials and Methods. Representative fields were photographed at 0 , 12 and 24 hr. (40X) . Data represent mean \pm SD from 3 independents experiments.

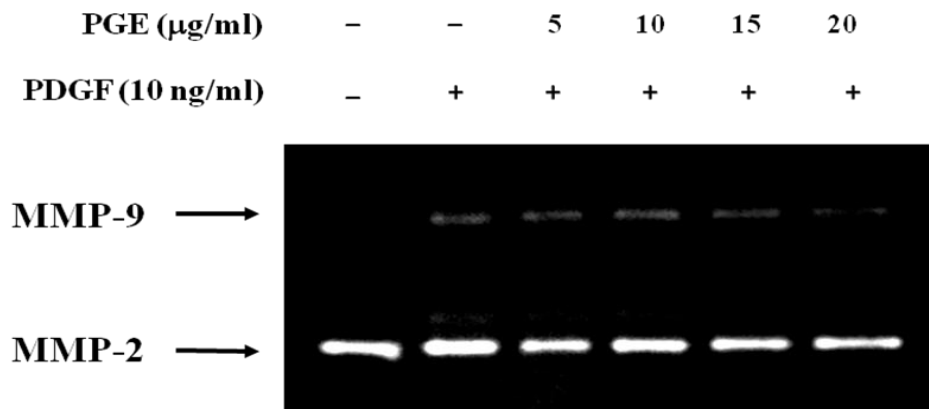


Fig. 30. Effects of PGE on the activities of MMP-2 and MMP-9. (A) A7R5 cells was treated with 0, 5, 10, 15 or 20 $\mu\text{g/ml}$ of PGE for 24 hours and then subjected to gelatin zymography to analyze the activities of MMP-2 and MMP-9 on the A7R5 cells. Data represent mean \pm SD from 3 independents experiments.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/09/05

國科會補助計畫	計畫名稱: 覆盆子、七葉膽與番石榴葉萃取物預防動脈粥狀硬化及抑制癌細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之功能與機制探討
	計畫主持人: 謝易修
	計畫編號: 99-2313-B-040-004-MY3 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：謝易修		計畫編號：99-2313-B-040-004-MY3					
計畫名稱：覆盆子、七葉膽與番石榴葉萃取物預防動脈粥狀硬化及抑制癌瘤細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之功能與機制探討							
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	1	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	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%		
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	2	0	100%	人次	
		博士生	2	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：完成分析覆盆子酒精萃取物對肺癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對肺癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前覆盆子酒精萃取物抑制肺癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理並已投稿至期刊雜誌社等待發表，其他細胞株的相關實驗也正在進行及整理中。關於探討番石榴葉萃取物保護 LDL 的氧化及保護內皮細胞不受 oxLDL 傷害的效果及機制，已正在整理。本計畫有系統的分析番石榴葉萃取物對於降低 LDL 氧化的效力，以及對血管內皮細胞的保護效果，期望能在心抗血管疾病的應用上有所貢獻。未來希望透過動物活體實驗我們將證實番石榴葉萃取物具有預防心血管疾病的功效及應用性。</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	

國科會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）

已寫完未發表之文稿已有兩篇，皆在投稿中

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）

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析覆盆子酒精萃取物對肺癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對肺癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前覆盆子酒精萃取物抑制肺癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表，其他細胞珠的相關實驗也正在進行及整理中。關於探討番石榴葉萃取物保護 LDL 的氧化及保護內皮細胞不受 oxLDL 傷害的效果及機制，已正在整理。本計劃有系統的分析番石榴葉萃取物對於降低 LDL 氧化的效果，以及對血管內皮細胞的保護效果，期望能在心抗血管疾病的應用上有所貢獻。未來希望透過動物活體實驗我們將證實番石榴葉萃取物具有預防心血管疾病的功效及應用性。