

中山醫學大學生物化學研究所  
Institute of Biochemistry Chung-Shan  
Medical University

碩士論文  
Master Thesis

Silibinin 抑制癌細胞轉移能力之機制  
The mechanism of silibinin inhibits cancer  
cell migration/invasion

指導教授：謝易修 博士 (Yih-Shou, Hsieh, Ph. D.)

研究生：陳霽霓 (Pei-Ni Chen)

中華民國九十二年七月

本論文為中山醫學大學授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中山醫學大學生物化學科教授

謝易修

謝易修

中山醫學大學生化所副教授

周芬碧

周芬碧

中台醫護技術學院食科系副教授

朱淑珍

朱淑珍

中華民國九十二年七月

學生陳霈霓論文題目為「Silibinin 抑制  
癌細胞轉移能力之機制」，其論文已經中山  
醫學大學醫學院生物化學研究所碩士論文  
考試委員會審查合格及口試通過，並由其指  
導教授核閱後無誤。

指導教授： 謝易修

簽名： 謝易修

中華民國九十二年六月

## 誌謝

感謝師恩 謝易修博士兩年來在學業及實驗上不厭其煩的教誨，使得本論文得以順利完成，學生深表感謝。文稿初成，承蒙 周芬碧博士在實驗上給予寶貴意見，亦感謝中台醫護學院 朱淑珍博士對本論文細心審查並詳加斧正使得本論文更臻完善，在此謹表感謝。

兩年的碩士班生活匆匆劃下句點，謝謝曾經陪在我身邊一起度過的朋友及學長姐，有你們的支持才有現在的我。

首先，謝謝順發及逸憲學長，兩年來在實驗上不遺餘力的指導，小珠學姊親切的陪伴，無論我做錯什麼事，都不曾對我惡言相向，乖巧聽話的小黑學弟，這一年來的忍辱負重，小強學長平日的關心及鼓勵，默默給予我支持。接著是善解人意的靜芬，妳永遠是大家的好朋友，賢慧的佩蓉，妳是我的開心果，少了妳世界是黑白的，還有建宏、宣竹，有你們的陪伴，為我的生活增添不少色彩。謝謝佩鈴，讓我認識 SAAB，並在我失意時，陪我度過了一切。也謝謝俊憲、正容、正浩、珈寧有你們家的顯微鏡和離心機，才有現在的我。還有嘉慧、淑俐、苡琪常提供我許多實驗上的幫助，瓊文學妹的桂圓紅棗茶、及佳冠學妹平日的讚美。謝謝星君學長為了幫我借藥品而四處奔波，謝謝忠榮學長平日親切的笑容。

最後，要謝謝我的家人，不論是精神或生活上所給予的支持，使我得以順利完成學業。

要謝謝的人太多了，文字無法表達我心中的感激。謝謝！

# 目錄

|                |    |
|----------------|----|
| 壹、中英文摘要.....   | 1  |
| 貳、縮寫檢索表.....   | 3  |
| 參、前言.....      | 5  |
| 肆、研究動機.....    | 17 |
| 伍、實驗方法與材料..... | 18 |
| 陸、實驗結果.....    | 29 |
| 柒、討論.....      | 34 |
| 捌、參考文獻.....    | 40 |
| 玖、圖表與圖表說明..... | 47 |
| 拾、附圖表.....     | 69 |

## 中文摘要

Silibinin 是由奶薊子所萃取出之類黃酮(flavonoid)抗氧化物，早期用於治療肝臟的解毒，近來有研究指出 silibinin 已被應用於抗癌的研究。在體外實驗中，為了要觀察 silibinin 對於癌細胞轉移能力的影響。我們選取了一株具有高度轉移能力的人類肺癌細胞：A549，分別處理不同濃度的 silibinin 來探討此藥物對於癌細胞侵入能力的影響。癌細胞的轉移通常必須伴隨著一些生理變化，其中主要包括細胞外基質的瓦解，改變細胞與細胞基質間的貼附能力以及調控細胞的移動性等來影響細胞的侵入能力。首先，藉由 modified Boyden chamber invasion assay，我們發現 silibinin 具有抑制 A549 侵入的能力，在 gelatin zymography 與 casein zymography assay 中也發現到 silibinin 可以抑制 A549 MMP-2 及 u-PA 的表現，此外，利用 Boyden chamber assay 與 cell-matrix adhesion assay 發現 A549 在處理 silibinin 之後，其細胞的移動能力與基質的貼附能力皆有明顯的下降。為了更進一步探求 silibinin 抑制癌細胞侵入的機轉，利用西方墨點法，我們發現到訊息傳遞途徑中的 Akt、ERK1/2、p38 磷酸化與 NF- $\kappa$ B 的蛋白表現會因藥物的處理而受到抑制。然而這些蛋白的活化是否調控著 A549 的侵入能力，藉由專一性抑制劑：LY294002、SB203580 和 U0126 幫助我們釐清了 PI-3K 和 p38 路徑可以調控 A549 MMP-2 表現以及細胞移動和侵入的能力，而 MEK 路徑則是調控著細胞 MMP-2 和 u-PA 的表現以及侵入能力。

## Abstract

Silibinin is a flavonoid antioxidant extracted from milk thistle. It was used as a liver detoxicant previously. In recent studies, silibinin has shown its anti-carcinogenesis property. In order to observe the effect of silibinin to cancer cells metastasis *in vitro*, we chose a high metastasis human lung cancer cell line : A549 cells treated with various concentration of silibinin to probe into the potential of inhibiting cancer cells invasion. Tumor metastasis are multifaceted processes that mainly involve proteolytic degradation of the extracellular matrix, changes cell-matrix adhesion, and regulate cell motility. In the first, we found that silibinin inhibited A549 cells invasion via modified Boyden chamber invasion assay and both of MMP-2 and its activator : uPA activity were also inhibited by silibinin via gelatin zymography and casein zymography assay. In the other side, silibinin also inhibited A549 cells motility and cell-matrix adhesion by Boyden chamber assay and cell-matrix adhesion assay. In the signal transduction pathway, we found Akt, ERK1/2 and p38 phosphorylation and NF- $\kappa$ B protein level were inhibited by silibinin via western blotting. In order to confirm the activation of above proteins whether regulate A549 invasion ability, we used specific inhibitors : LY294002, SB253080 and U0126 to clarified that PI-3K and p38 signaling regulate MMP-2 expression, cell motility and cell invasion of A549, and MEK signaling regulate MMP-2, u-PA expression and cell invasion.

## 貳、縮寫檢索表

**APS** : ammonium persulphate

**β-MSH** : 2-mercaptoethanol

**4CN** : 4-chlor-1naphthol

**DAB** : 3,3'-diaminobenzidine

**DMEM** : Dulbecco' s modified eagle medium

**DMSO** : dimethylsulfoxide

**DNA** : deoxyribonucleic acid

**ECM** : extracellular matrix

**ERK1/2** : extracellular regulated kinase 1/2

**EtBr** : ethidium bromide

**FBS** : fetal bovine serum

**HRP** : horse radish peroxidase

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase

**MMPs** : matrix metalloproteinases

**mRNA** : messenger RNA

**MT-MMPs** : membrane-type matrix metalloproteinases

**NC membrane** : nitrocellulose membrane

**NF-κB** : nuclear factor kappa B



**PI-3K** : phosphoinositide 3-kinase

**PAGE** : polyacrylamide gel electrophoresis

**PAI** : plasminogen activator inhibitor

**PKB** : protein kinase B/ Akt

**RT-PCR** : reverse transcription-polymerase chain reaction

**SDS** : sodium dodecyl sulfate

**TAE** : Tris-acetate-EDTA buffer

**TIMPs** : tissue inhibitor of matrix metalloproteinases

**t-PA** : tissue type plasminogen activator

**u-PA** : urokinase-plasminogen activator

**u-PAR** : urokinase-plasminogen activator receptor

**TEMED** : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

**Tris** : 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

**kDs** : kilo-dalton

## 參、前言

### 一、癌細胞的侵襲與轉移

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原因，一般而言，癌細胞的轉移擴散(metastasis)必須伴隨著細胞生理狀態的改變，其中包含了細胞與細胞外基質(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，細胞外基質的分解，緊接著癌細胞會穿過細胞外基質，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，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，再經由大量的增生導致血管的新生成。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。在轉移擴散的癌細胞中，癌細胞藉由蛋白質水解酵素來分解細胞外基質的組成蛋白質，導致細胞與細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性。

以上皮細胞為例，細胞癌化至轉移侵入的過程(附圖三)：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 tumor。

而惡性腫瘤細胞會產生胞外基質分解酵素，包括有 serine proteinase、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。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，由血管滲入組織而達轉移之目的(1)。

## 二、Lung cancer

近數十年來歐美國家的肺癌病人顯著增加，台灣也是如此。第二次世界大戰結束前肺癌病人在台灣非常罕見。在 1900 年至 1945 年間，於 3,153 例成人病理解剖中証實為肺癌者只有 12 例。直至 1951 年首次發現以支氣管鏡切片病理証實的臨床病例。嗣後肺癌病例年年不斷地增加，目前已是常見的疾病，而且是台灣癌症病人死亡的主要原因。

肺癌臨床上分成二大類，即小細胞癌和非小細胞癌。非小細胞癌佔所有的 75%，常見包括三型：鱗狀細胞癌、腺癌、大細胞癌。小細胞癌：約佔所有肺癌的 25%，生長快速且會很早就由淋巴或血路擴散。1. 鱗狀細胞癌：又稱類表皮樣癌，常見於男性吸煙者，早期多為局部向外延伸的轉移，後期則經血路擴散。2. 腺癌：為目前肺癌數量最多的一種類型，常常是在有遠處轉移之後才出現臨床症狀，多由血路轉移，無吸煙者所罹患肺癌常為此類。3. 大細胞癌：生長速度較緩慢，會經由血路及淋巴擴散。

肺癌的眼觀變化差異甚巨，而各種肺癌亦很少有任何特徵可資鑑別。各種肺癌的胸腔內種種性行，如胸壁浸潤、肋膜腔積液、血性胸水、肺梗塞等未見有明顯差異。肺癌發生局部淋巴腺轉移的頻率高達95%，然遠隔淋巴腺轉移則僅35%而已。肺癌發生遠隔器官的頻率極高[80%]，小細胞癌[100%]與腺癌[85.7%]更具轉移的潛能。肺癌之轉移，常常是幾個器官都有，常見著依序為腦、腎上腺、肝、骨骼及腎。

肺癌之臨床發病可分三大類：第一類，已有症狀但胸部 X 光尚無變化；第二類，先有 X 光變化但無症狀；第三類，症狀發生時所照 X 光片上發現有變化。第三類最多，第一類最少。

肺癌之臨床進展方式可分五類：第一類初發於大支氣管，主要引起呼吸道症狀，其後往支氣管內或沿支氣管壁進展，早晚發生肺萎陷，另一方面則經淋巴管或血液轉移至胸腔內或胸腔外；第二類亦為肺門型但其進展則先犯肺門或氣管旁淋巴腺，引起像縱隔瘤一樣的臨床像；第三類腫瘤發生於較小支氣管或末梢支氣管而未發生任何呼吸道腫瘤前已轉移到其他器官；第四類及第五類同為肺實質型或末梢型，前者先犯肺門，後者先犯肋膜或胸壁，然後轉至其他器官。

據前人研究，與吸煙有關之肺癌主要為鱗狀細胞癌及未分化癌，但是台灣的肺癌組織像以腺癌為主，與吸煙之相關性較少。據公賣局資料，香煙消售總額逐年增加，但早期則每人每年消耗量則未有顯著

增加。近年每人每年消耗量增加許多，但肺癌組織像仍以腺癌為主，不太容易說明。原住民吸煙者很多，但肺癌病人非常罕見。又台灣各地每人每年香煙平均消費量，都市與鄉村並無多大差異，因此吸煙未能說明何以都市比鄉村有更多的肺癌病人。

此外亞洲各地肺癌增加的速度很快的都是較開發的國家，如日本、台灣、新加坡和香港；而較落後的國家；如菲律賓、泰國和印尼，雖然國民吸煙情形跟較開發的國家沒有很大的差異，但是肺癌的死亡率還相當低。因此除了吸煙以外可能還有許多因素例如文明化、工業化、空氣污染、生活環境、遺傳因子以及可以同時影響男女兩性之其他未明的因素，實在值得深入探討研究(2)。

本篇所選用的細胞株：A549 cells，為一高度惡化人類肺癌細胞，屬非小細胞癌中腺癌(adenocarcinoma)的一種，具有高度的轉移能力。

### 三、 Silibinin 的背景介紹

水飛薊素(silymarin)由菊科的 *Silybum marianum* (*Carduus arianus*, milk thistle 乳薊)(附圖一)的果實抽取出來，為類黃酮(flavonoid)的 silibinin、isosilybin、dihydrosilybin、silicristin、silidianin 等同分異構物混合而成，是天然的多酚類的抗氧化物，其中 silibinin 為主要成分，其化學名稱為 3,5,7-trihydroxy-2-[3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl]-4-chromanone(3)(附圖二)。本篇主要是利用 silibinin 來進行以下的實驗。在西方國家利用奶薊治

病已約有 2000 年歷史，奶薊子含有黃酮類物質，具有護肝功能的成分(4)，主要用作治療酒精過量對肝臟的損害、及肝臟疾病包括肝硬化、急性肝炎及肝炎、脂肪肝、膽管炎、預防膽石、牛皮癬、高膽固醇症等。乳薊的相關產品在歐美國家非常暢銷，常見於一般健康食品或藥品，silymarin 在臺灣列為處方用藥，許多藥廠皆有生產含乳薊萃取物 silymarin 之保肝藥。

之前文獻指出，silibinin 能抑制皮膚癌細胞(A431) 的生長及增生(5-7)。在 LNCaP 細胞中，silibinin 經由使細胞生長停留在 G<sub>1</sub> 期，可降低攝護腺特異性抗原(prostate-specific antigen)及抑制細胞生長的速率(2,8)。若將老鼠(F344 rats)先餵食 silymarin 4 週，能有效預防由化學物質(azoxymethane；AOM)所誘導腸癌(colonic ACF)的形成(1)。此外，若將老鼠(athymic nude mice)餵食 silibinin，可抑制人類前列腺癌細胞(PCA)的生長及增生且會增加 plasmin insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3)的表現(9)。

此外有研究指出，在人類中央靜脈表皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)中，silymarin 能抑制 MMP-2 的表現及 HUVEC tube 的形成，進而抑制血管新生成作用(10)。而在一些文獻中指出，將細胞處理 silibinin，可誘導癌細胞走向凋謝死亡(apoptosis) (11-12)，在人類前列腺癌細胞中(DU145)，silibinin 可抑制由 TNF- $\alpha$  誘導所活化的 NF- $\kappa$ B 以及細胞凋亡(12)。此外，水飛

薊素可抑制由 xylene 所誘導的一些急性發炎反應及白血球的移動能力(3)，因此，它可以用於治療一些發炎反應。

過去的文獻已證明，將老鼠每天餵食 silymarin 持續五天，測量其肝臟 alanine aminotransferase 及 aspartate aminotransferase 的值，推測其不會造成肝臟的傷害。並且發現 silymarin 會增加 TGF- $\beta$ 及 c-myc 的量，但卻不會影響 hepatocyte growth factor (HGF)、tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )、class II major histocompatibility complex 及 interferon gamma (71)。

#### **四、Matrix metalloproteinases (MMPs)**

基質金屬蛋白水解酵素 (MMPs) 在細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 分解中扮演著重要的角色，故其在正常的生理功能中扮演著組織的修復，以及器官的形成、胚胎的殖入、神經的生長、子宮頸的擴張、傷口的癒合、血管新生成及細胞凋亡等角色，在病理上則是和組織的纖維化、心血管疾病以及癌細胞的轉移擴散等息息相關(13)。基質金屬水解蛋白酵素家族中的 MMP-2 (或稱 gelatinases A)與 MMP-9 (或稱 gelatinases B)具有水解基底膜中的主要成份：type IV collagen 的能力(14)，並且被豐富的表現在許多的惡性腫瘤中(15)，所以從文獻中可以發現 MMP-2 與 MMP-9 的表現與癌細胞的轉移和侵入具有高度相關性(16)。

##### **【4-1】基質金屬蛋白水解酵素之分類**

目前所知道的基質金屬蛋白水解酵素家族，依其特性主要分四大

類。第一類主要以 collagenase 為主，包括 interstitial collagenase (MMP-1)、neutrophil collagenase (MMP-8)、collagenase 3 (MMP-13) 及 collagenase 4 (MMP-18)。第二類以 gelatinase 為主，包括 MMP-2 與 MMP-9。第三類則以 stromelysin 為主，包括 stromelysin-1、procollagen (MMP-3)、stromelysin-2 (MMP-10) 及 stromelysin-3 (MMP-11)。第四類屬於 membrane-type MMPs，包括 MT1-MMP (MMP-14)、MT2-MMP (MMP-15)、MT3-MMP (MMP-16)、MT4-MMP (MMP-17)。另外有一些是最近才發現而尚未歸類，包括 MMP-7 (或稱 matrilysin, PUMP)、MMP-12 (或稱 macrophage metalloelastase)、MMP-19 (或稱 rheumatoid arthritis-associated metalloelastase)、MMP-20 (或稱 enamelysin)、MMP-21 (或稱 XMMP)、MMP-22 (或稱 CMMP) 及 MMP-23。

#### **【4-2】基質金屬蛋白水解酵素的表現與調控**

基質金屬蛋白水解酵素基因的表現是可藉由一些因子的誘導而有所改變，例如生長因子、細胞激素、化學試劑、甚至物理上的刺激，均可能造成基質金屬蛋白水解酵素表現的增加，然而，TGF- $\beta$ ，retinoic acids，glucocorticoids 等，則會去抑制基質金屬蛋白水解酵素的表現。基質金屬蛋白水解酵素基因上的表現受到許多不同的訊息傳遞蛋白以及轉錄因子所調控。在一些發炎的疾病當中，cytokine 與 chemokine 扮演非常重要的角色，以活化的 T-細胞為例，轉錄因子中的 NF- $\kappa$ B、AP-1，會調控這些 cytokine 與 chemokine 轉錄的表現(17)，而這些



cytokine 或 chemokine 亦是影響到基質金屬蛋白水解酵素基因的表現。NF- $\kappa$ B 在細胞體內是一個非常重要的轉錄因子，研究中指出，在 macrophage 中，抑制 NF- $\kappa$ B 的 peptide 可以降低 MMP-2、MMP-9 的表現(18)。在一些黑色素瘤細胞(murine melanoma cells)中，NF- $\kappa$ B 可藉由活化 MT-MMP 的表現而去活化 pro-MMP-2，增加癌細胞侵入的能力(19)。在單核細胞中發現，AP-1 會調控 MMP-2 與 MMP-9 基因的轉活化，進而影響到 MMP-2 與 MMP-9 的表現(20)。在 MAPK 訊息傳遞路徑中，已知當大鼠皮質受到物理性的刮傷時，活化的 p38 與 ERK 的路徑會去調控初代培養的星狀細胞 MMP-9 的表現(21)，肺癌細胞可藉由 ERK/Spl 這條路徑增加 MMP-2 的表現(22)。在 NIH3T3 細胞中，轉殖入活化的 Ras，MEK1 可以增加 MMP-2，MMP-9 的表現(23)。癌細胞可以藉由 PI-3K 路徑去調控 MMP-2 與 MMP-9 的表現與增強細胞侵入的能力(24)。在 HT1080 細胞中，Akt/PKB 可藉由增加 NF- $\kappa$ B 的轉錄活性，進而增加 MMP-9 的表現 (25)。此外，在老鼠乳房上皮細胞中，Akt 會誘導 MMP-2 的表現，增加細胞 invasion 的能力(26)。

#### **【4-3】基質金屬蛋白水解酵素活化機制**

基質金屬蛋白水解酵素屬於分泌型蛋白，以未活化態基質金屬蛋白水解酵素分泌至細胞外(27)，在生物體內基質金屬蛋白水解酵素的活化調節可以受到自己的催化(autocatalysis)或則藉由一些 urokinase plasminogen activator (u-PA)或 tissue-type plasminogen activator (t-PA)

二者啟動一連串的蛋白水解反應，將 plasminogen 轉變成 plasmin，這些活化的酵素例如：plasmin 或是其他基質金屬蛋白水解酵素將未活化態基質金屬蛋白水解酵素轉變成活化態基質金屬蛋白水解酵素(28)。而生物體外可藉由有機汞(APMA)、HOCl、oxidized glutathione (GSSG)所活化，活化過程將導致基質金屬蛋白水解酵素的 N 端 propeptide domain 被切除而少了 10kDa。但是基質金屬蛋白水解酵素的活性易受到內生性之抑制劑 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)所抑制，兩者間的平衡取決於細胞外基質的分解與形成(29)。

## 五、Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)

TIMPs 是基質金屬蛋白水解酵素的內生性抑制劑，它可以專一性的抑制基質金屬蛋白水解酵素的活性(30)。而基質金屬蛋白水解酵素對於癌細胞的侵入、轉移及細胞外機質的破壞中扮演一個很重要的角色(31)，因此 TIMPs 在抑制腫瘤的增生及維持細胞外機質的平衡方面便顯得格外重要(32-33)。

### 【5-1】TIMPs family

a. **TIMP-1:** 位於 X 染色體 p 區(Xp23) (34)，分子量大約為 28.5kDa，是 TIMPs 中最早被發現的，也是被研究最清楚的，已知 TIMP-1 的功能有許多，例如：抑制活化態的基質金屬蛋白水解酵素(35)和未活化的 MMP-9 結合(36-37)、抑制血管新生(38-40)、抑制腫瘤的侵襲和轉移(41-42)、在胚胎的形成過程中也扮演著重要的角色(45)。

b. **TIMP-2:** 位於第 17 對染色體 q 區(17q23) (46)，分子量大約為

21kDa，TIMP-2 在 1990 年由 human melanoma cell cDNA library 中所分離出來(47)。TIMP-2 和 TIMP-1 功能相似，尤其在抑制腫瘤的侵襲和轉移中扮演著重要的角色，雖然 TIMP-2 和 TIMP-1 的序列有 66% 的相似度，但在某些時候，因為 TIMP-2 的表達會被修飾，因此在同樣情況下，TIMP-2 和 TIMP-1 的結果往往會有所差異(48-49)。

**c. TIMP-3:** 位於 22 染色體 q 區(22q12)(50)，分子量大約為 21 kDa，TIMP-3 是 TIMP family 中唯一存在 membrane 中的，它會和 ECM 結合在一起(51-52)。TIMP-3 功能和 TIMP-1、2 較不相同，TIMP-3 主要功能是和調節細胞分化及細胞週期有關，甚至可以當成細胞分化結束時的一個指標(53)。其中有學者指出：在 HL-60 leukemia cells 的分化過程，TIMP-3 的上升和 cell cycle 停留在 G<sub>1</sub> phase 有關(54)。

**d. TIMP-4:** TIMP-4 是在 1996 年時，由人類心臟 cDNA library 中分離出來的(55)，分子量大約為 22 kDa，目前對 TIMP-4 的了解尚未清楚，只大約了解 TIMP-4 可能有組織特異性，尤其是存在人類的心臟組織。(55)

## 六、Plasminogen activator 的表現

Plasminogen activator (PA) 為一群 serine proteinases，因與 plasminogen 具有高度的專一性，故可以將其水解成 plasmin，活化的 plasmin 扮演著蛋白水解酵素的功能，不但可以將血液凝塊中的成分給分解掉，更具有活化其他蛋白水解酵素的功能。PA 中 urokinase-plasminogen activator (u-PA)，可藉由 urokinase-plasminogen

activator receptor 的結合來促進 u-PA 水解 plasminogen 的活性，進而造成細胞間基質的分解，故癌細胞可藉由 u-PA 的表現，調控著其細胞的移動和侵入；而 tissue-type plasminogen activator (t-PA) 主要存在血液中，其主要的功能在於藉由活化 plasminogen，來將血液凝塊中的成分給分解，進而防止血栓的形成。

u-PA 與 t-PA 的主要功能皆與 plasminogen 的活化有關，然而其生理意義上為何會有如此的不同，究其原因發現，當 t-PA 分泌到胞外後會與 plasminogen、fibrin、以及與細胞間基質的組成物質相結合，進而發揮蛋白水解酶的功能，幫助血管內 fibrinolysis 的作用。雖然 u-PA 亦是分泌型酶，但是 u-PA 必須藉由與細胞膜表面接受器 (u-PAR, CD87) 結合，才具有較強的蛋白水解活性，進而造成細胞外基質之物質的分解，因此被認定與癌細胞的侵入與轉移較有關 (56-57)。而有文獻指出，在人類的乳癌細胞 (MDA-MB-231) 中，PI3-kinase 可增加 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) 的轉錄活性來促進 u-PA 的表達，進而影響細胞的移動能力 (72)。

### **【6-1】 t-PA、u-PA 與 PAI**

t-PA 由內皮細胞所分泌，以單股型態被分泌出去，但是 t-PA 又可被一些 plasmin 或酶在 Arg-275-Ile-276 位置所切割形成雙股的 t-PA，單股或雙股的 t-PA 並不影響它們的酶活性，並且對 plasminogen 具有高專一性的分解能力 (58)。u-PA 亦是分泌型蛋白，能將 plasminogen 分解成 plasmin。u-PA、t-PA 蛋白活性又受到內生

性抑制劑 plasminogen activator inhibitor type I、II (PAI-1, PAI-2)所抑制。PAI-1 可以調節 PA 分解血管中血栓之平衡反應，PAI-2 對 u-PA、t-PA 皆有抑制能力；但是對於單股 t-PA 的抑制能力較弱(59)。

## 七、細胞外基質之組成及分類

細胞外基質可分成兩種：(一) 細胞組織間隙的結締組織 (interstitial connective tissue)：纖維母細胞(fibroblasts)、骨質母細胞 (osteoblasts)、軟骨細胞(chondrocytes)、巨噬細胞(macrophage)所構成主要作為支撐作用。(二) 基底膜(basement membranes)：是由基板、基質、網狀纖維三層所構成。基底膜的主要成分是(a) type-IV 膠原蛋白質 (b) ammin (c) heparin sulfate (d) chondroitin sulfate (e) entactin(60)。參與細胞外基質之酵素主要分為四大類 **I**、金屬蛋白水解酶：(a) interstitial collagenase (b) type-IV collagenase (c) stromelysin；**II**、Serine 蛋白水解酶：plasminogen activator、plasmin；**III**、Cyctein 蛋白水解酶：cathepsin B、cathepsin L；**IV**、Aspartyl 蛋白水解酶：cathepsin D。

## 肆、研究動機

水飛薊素 (silymarin) 為黃酮類物質 (flavonoid) silibinin、silicristin、silidianin 等同分異構物混合而成，是天然的多酚類的抗氧化物，其中 silibinin 為主要成分，佔 95% 以上。在先前的一些文獻中顯示，silymarin 可抑制由 xylene 所誘導的一些急性發炎反應及白血球的移動能力，此外，silibinin 能抑制多種癌細胞的生長及增生並誘導其走向凋謝死亡。

A549 細胞為一高度惡化的肺癌上皮細胞，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。我們知道癌細胞的侵入與細胞間質的分解、細胞的貼附能力及細胞的移動性有關。本實驗主要的研究動機在於 silibinin 是否可以有效的抑制 A549 肺癌上皮細胞的侵入能力及移動性，並進一步探討其分子機轉。

## 伍、實驗材料與方法

### 一、藥品試劑

#### 1.購自於美國 Sigma 公司：

acrylamide、Tris base, N, N'-methylene-bis-acrylamide、calcium chloride、gelatin、2-mercaptoethanol、N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine、citric acid、guanidine、sodium chloride。

#### 2.購自於 Merck 公司：

sodium acetate、formamide、glycine、glycerol。

#### 3.購自於美國 USB 公司：

ammonium persulfate、sodium dodecyl sulfate、sodium azide、coomassie brilliant blue R-250。

#### 4.購自於美國 Gibco-BRL 公司：

agarose

#### 5.購自聯工化學試藥：

Triton X-100、methanol、acetic acid、phenol。

#### 6.購自美國 FISHERE 公司

dimethyl sulfoxide (DMSO)

#### 7.購自 BioLabs

phospho-p38MAPK(Thr180/Tyr182)、phospho-Akt(ser473)。

#### 8.購自 Transduction Laboratories

PI3-kinase、NF- $\kappa$ B p65、phospho-ERK1/2。

## 二、實驗設備

| <u>名稱</u>                                | <u>廠牌</u>           |
|--|---------------------|
| Spectrophotometer                        | Beckman DU640       |
| Centrifuge                               | Sigma 2K15          |
| Centrifuge                               | Beckman GS-6R       |
| Power supply                             | Hoefer SX250        |
| Shaker                                   | TKS RS01            |
| Water bath                               | TKS WB201           |
| Vertical gel electrophoresis apparatus   | OWL P-1             |
| Vortex                                   | Genie SI-2          |
| Horizontal gel electrophoresis apparatus | Cosmo Mupid-2       |
| Laminar flow                             | NUAIR type A/B3     |
| Microfuge                                | Eppendorf 5415C     |
| Thermal cycler                           | Techne progene      |
| GeneAmp PCR system 2400                  | Perkin Elmer        |
| Millopore                                | Whatman             |
| pH meter                                 | Jenco microcomputer |
| Boyden chamber                           | Neuro Probe         |

## 三、緩衝液及溶液



**10 % SDS-PAGE 製備: Separating gel(12ml)**

1.5 M Tris-HCl 緩衝溶液，pH 8.8 (3ml)

30% acrylamide-1.2%N, N' methylene-bis-acrylamide (4.2ml)

ammonium persulfate (10 mg/ml) (0.6ml)

10% SDS (120 $\mu$ l)

dd H<sub>2</sub>O (3ml)

TEMED (10 $\mu$ l)

**4% Stacking gel 製備(5ml)**

0.5 M Tris-HCl 緩衝溶液，pH 6.8 (1.3ml)

30% acrylamide-1.2%N, N' methylene-bis-acrylamide (0.7ml)

ammonium persulfate (10 mg/ml) (0.25ml)

10% SDS (5 $\mu$ l)

dd H<sub>2</sub>O (2.7ml)

TEMED (10 $\mu$ l)

**Transfer buffer 製備(4000ml)**

Tris-base (6g)

Glycine (28.6g)

Methanol (800ml)                      加水至 4000ml

**Running buffer 製備(1000ml)**

Tris-base (3.0 g)

glycine (14.7 g)

10% SDS (10ml)

dd H<sub>2</sub>O (990ml)

**Zymography washing buffer 製備**

2.5% Triton X-100 in dd H<sub>2</sub>O

**Zymography reactivation buffer 製備**

40 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaN<sub>3</sub>

**Staining solution 製備**

0.125% Coomassie blue R-250, 0.1% amino black,

50% methanol, 10% acetic acid

**Destaining solution 製備**

20% methanol, 10% acetic acid

**TBS buffer (pH 7.4) 製備(2000ml)**

Tris-base (2.66 g)

NaCl (18 g)

dd H<sub>2</sub>O (2000ml)

**Washing buffer 製備(pH 7.4)**

TBS buffer + 0.05% Tween 20

**Blocking buffer 配置**

5% non-fat instant milk powder in TBS

**Substrate solution 製備**

15mg 4CN /1ml methanol, 3mg DAB/ 1ml d H<sub>2</sub>O,

10 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50ml TBS buffer

### **1.2% DNA gel 製備(50ml)**

agarose (0.6g)

50 $\times$  TAE buffer (1ml)

dd H<sub>2</sub>O (49ml)

### **RIPA buffer 製備**

4.38g NaCl

3.0285g Tris-HCl

1.25g deoxycholaet

5ml IGEPAL CA-630

Add dd H<sub>2</sub>O 至 500ml

### **Lysate buffer 製備**

500 $\mu$ l RIPA buffer

5  $\mu$ l Na<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>

5  $\mu$ l PMSF

8.5  $\mu$ l Leupetnin

## **四、實驗方法**

### **1. 細胞培養**

#### **【1-1】 解凍細胞**

將含有 A549 細胞的冷凍管由液態氮筒快速置於 37 $^{\circ}$ C 的水浴槽，

於一分鐘內急速解凍並置入內含培養液的離心管中，在 4°C 下，離心 1000rpm 5 分鐘，去除含有 DMSO 的上清液，以含有胎牛血的新鮮培養液將細胞均勻打散注入培養皿中，置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中生長。

### **【1-2】繼代培養**

A549 肺癌上皮細胞培養在含有 10% 胎牛血的 DMEM 培養液中，並外加入 1% penicillin/streptomycin、1mM glutamine，待細胞長滿後以 0.05% 的 trypsin-EDTA 將細胞打下，經離心後去除上清液，以新鮮的培養液亦將細胞打散並繼續培養之。

## **2. Gelatin zymography 分析**

將 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將細胞培養後不含胎牛血的培養液與 5x 染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下沖洗 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer 在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，最後反應完的膠片以染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

## **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，其原理為有活性的活細胞會將 MTT reagent 經由粒腺體中的 dehydrogenase 作用代謝還原成藍紫色結晶，待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 OD<sub>570nm</sub> 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多

寡。

#### 4. 西方點墨法

##### 【4-1】細胞溶解物之製備

將培養皿內的培養液吸取後，以 PBS 沖洗兩次，刮取細胞並加入 RIPA buffer 以及蛋白酵素抑制劑，在 0°C 下振蕩 10 分鐘，在 4°C 下，以 10000xg 離心 10 分鐘，吸取上輕易並存與 -70°C。

##### 【4-2】蛋白質之定量

蛋白質的定量是採用 Bradford 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，當藍色深表示蛋白含量越高。測試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 595nm 可見光之吸光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 O.D 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

##### 【4-3】樣品的製備

在求得樣品蛋白之濃度後，固定注入膠內的蛋白濃度，並與含有  $\beta$ -MSH 的染劑混和均勻，在 99°C 下加熱 10 分鐘後置於 4°C 的碎冰中，經離心後將樣品注入膠內，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分析。

##### 【4-4】電泳膠片的轉漬與 blocking

將膠片置於已浸潤 transfer buffer 的 NC paper 之上，在 4°C 下，以 110V 電壓進行轉漬 1 小時，轉漬完後，以 5% 脫脂奶粉在室溫下進行

blocking 1 小時。

#### 【4-5】一級與二級抗體

Blocking 完後，加入一級抗體並置於冷房中搖晃直到隔天，然後以 TBS + Tween 20 沖洗 3 次各 10 分鐘。再加入二級抗體在室溫下作用 2 小時，用 TBS + Tween 20 沖洗 3 次各 10 分鐘。最後以冷光螢光顯影系統拍照或是以 DAB、4-chlor-1inaphthol (4CN)、以及  $H_2O_2$  呈色。

#### 5. RNA 的萃取

將細胞液 PBS 沖洗兩次後，刮取置入研磨管中，加入 0.5ml solution D (4M GNTC, 25mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercapto-ethanol) 研磨，研磨完後把研磨液取 0.5ml 置入 1.5ml 離心管，加入 50 $\mu$ l sodium acetate (2M, pH4.0), 100 $\mu$ l chloroform 及 phenol (pH4.0) 0.5ml 混合均勻後置於冰上靜置一分鐘，再拿起來用手均勻搖動 30 秒，重複冰上靜置及搖動 10 分鐘，最後冰上靜置 5 分鐘後，離心 (10000xg, 2 分鐘)，吸取分層的上層液(RNA 及水層)到新的離心管，並加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，再離心，(10000xg, 2 分鐘)，吸上層到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到分層中看不見白色蛋白質沉澱後，把水層吸到新的離心管並加入等體積體積的 isopropanol，混合均勻後於-20 $^{\circ}$ C 冰箱靜置保存，要使用時再拿出離心 (10000xg, 4 $^{\circ}$ C, 30 分鐘)，倒掉上層 isopropanol 取沉澱物並加入 75% ethanol wash 之後，將 75% ethanol 倒掉並吸乾，加入適量的 DEPC- $H_2O$  溶解 RNA，並測量其吸

光值( $OD_{260}$ )換算 RNA 濃度。

## **6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)**

### **【6-1】 Reverse transcriptase reaction**

取 4 $\mu$ g 的 RNA 加入 33 $\mu$ l 的 DEPC-H<sub>2</sub>O，以 70 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘。然後加入 10 $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer 以及 4 $\mu$ l (2.5mM) dNTP、2.5 $\mu$ l (10 pmole/ $\mu$ l) Oligo dT、RTase (200u/ $\mu$ l)後，於溫度循環機在 42 $^{\circ}$ C 下反應 1 小時，再以 99 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後以 4 $^{\circ}$ C 保存。

### **【6-2】 引子合成**

本實驗所需之引子皆由生工公司訂制 (附圖四)

### **【6-3】 聚合酵素連鎖反應**

取 5 $\mu$ l cDNA 加入 9.85 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O，加入 2.5 $\mu$ l forward primer 與 2.5 $\mu$ l reverse primer，再加入 2.5 $\mu$ l dNTP (10mM) 以及 2.5 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer 和 0.25 $\mu$ l DNA polymerase，溫度循環機於開始進入第 1 個循環處理 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，annealing 溫度處理 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘數個循環後，以 72 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘最後以 4 $^{\circ}$ C 保存。

### **【6-4】 DNA 電泳**

取 5 $\mu$ l PCR 產物並加入 6 $\times$ loading dye 2 $\mu$ l 混和均勻與 DNA marker 2.5 $\mu$ l 一齊注入電泳膠片內，以 100V 電壓進行電泳 30 分鐘，經由 ethidium bromide 染色後，再 UV 光下觀察所要的基因產物是否會再相對應的 DNA marker 處有所表現。

## **7. Cell-matrix adhesion 分析(70)**

首先以 type IV collagen coating 24well 培養皿 overnight，並以含有 2 % FBS 的 PBS blocking 2 小時，再將處理過 silibinin 的 A549 細胞以 trypsin 打下，subculture 至 24well 的培養皿中，30 分鐘後以 PBS 沖洗掉未貼附的細胞，以 0.1% crystal violet 染色，將細胞溶於 0.2% Triton X-100，於 OD<sub>550nm</sub> 下測量吸附細胞的比例。

### 8. 細胞移動性分析(motility)

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 silibinin 24hr 後，subculture 並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 ( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ ) 於 upper chamber，待細胞移動 4.5 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×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。

### 9. 細胞侵入性分析(invasion)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，將 cellulose nitrate filters coating 上 100 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> type IV collagen，在 laminar flow 風乾 overnight，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將細胞處理 silibinin 後，subculture 並利用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 ( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ ) 於 upper chamber，待細胞移動 5 小時後，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。

#### **10. u-PA 及 t-PA 活性測試, casein zymography (73)**

首先製備 8 % SDS-PAGE 電泳膠片，並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 20  $\mu\text{g/ml}$  的 plasminogen。置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 $\mu\text{l}$  sample (蛋白總量 20 $\mu\text{g}$ )，加入 4 $\mu\text{l}$  loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing buffer (2.5% Triton X-100 in d 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 8.0，10mM 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。

## 陸、實驗結果

### 一、 Silibinin 會抑制 A549 肺癌上皮細胞侵入能力

將 A549 細胞 subculture 培養 18 小時後，分別處理 0 $\mu$ M、30 $\mu$ M、50 $\mu$ M、70 $\mu$ M、100 $\mu$ M 的 silibinin 24 小時後，利用 Boyden chamber coating typeIV collagen，實驗結果發現，與處理 DMSO 的控制組做比較，當處理 30、50、70、100 $\mu$ M 的 silibinin 對於 A549 細胞的侵入能力分別為對照組的 107.1%、90.2%、63.0%、41.5% (Fig. 1A)。接著，我們利用 30 $\mu$ M 低濃度的 silibinin，分別處理 0、12、24、48 小時，作侵入性分析實驗，結果發現，分別與處理 DMSO 的控制組做比較，其為控制組的 95.4%、90.7%、60.3% (Fig. 1B)。證實 silibinin 對 A549 肺癌上皮細胞的侵入能力有著顯著的抑制效果，無論是 dose 或 time course (\*P < 0.01, \*\*P < 0.001)。

### 二、 Silibinin 會抑制 A549 肺癌上皮細胞 MMP-2 表現

在 serum starvation 的條件下將 A549 細胞處理不同濃度的 silibinin，分別為 0、30、50、70、100 $\mu$ M，在 24 小時後，收取培養液，以 gelatin zymography 分析 MMP-2，-9 的表現，並以 MTT 的分析方法來定量細胞存活的數目 (Fig. 6)，作為 MMP-2，-9 表現的參考。經由實驗結果我們發現，與處理 DMSO 的控制組做比較，其 MMP-2 分別為對照組的 86.1%、44.1%、24.7%、12.5% (Fig. 2)。在 time course 實驗中，將 A549 細胞處理 30 $\mu$ M silibinin 12、24、48 小時，換上新鮮的 serum free DMEM 培養 12 小時後，收取培養液，與處理 DMSO

的控制組做比較，其 MMP-2 表現量分別為對照組的 86.8%、84.7%、49.27% (Fig. 3)。結果證實 silibinin 對 A549 肺癌上皮細胞的 MMP-2 有著顯著的抑制效果。

### 三、 Silibinin 會抑制 A549 肺癌上皮細胞 u-PA 表現

在 serum starvation 的條件下將 A549 細胞處理不同濃度的 silibinin (0、30、50、70、100 $\mu$ M) 與 DMSO，在 24 小時後，收取培養液，以 casein zymography 分析 u-PA 的表現，由實驗結果發現，與處理 DMSO 的控制組做比較，其 u-PA 分別為對照組的 90.0%、87.3%、75.0%、32.0% (Fig. 4)。結果證實 silibinin 對 A549 肺癌上皮細胞 u-PA 的分泌有著顯著的抑制效果。

### 四、 Silibinin 對 TIMP-2 蛋白表現量的影響

將 A549 細胞分別處理 0 $\mu$ M、30 $\mu$ M、50 $\mu$ M、70 $\mu$ M、100 $\mu$ M 的 silibinin 24 小時後，收集 cell lysates，利用西方墨點法，實驗結果發現，隨著 silibinin 濃度增加，TIMP-2 蛋白表現量也逐漸遞增(Fig. 5)。

### 五、 Silibinin 會抑制 A549 肺癌上皮細胞移動能力

將 A549 細胞 subculture 培養 18 小時後，分別處理 0、30、50、70、100 $\mu$ M 的 silibinin 24 小時後，利用 Boyden chamber motility assay，實驗結果發現，與處理 DMSO 控制組做比較，當處理 30、50、70、100 $\mu$ M 的 silibinin 對於 A549 細胞的移動能力分別為對照組的 81.9%、68.4%、55.9%、18.4% (Fig. 6A)。此外，我們利用 30 $\mu$ M 低濃度的 silibinin，分別處理 12、24、48 小時，作移動性分析實驗，發現，

與處理 DMSO 的控制組做比較，分別為對照組的 93.7%、80.9%、68.8% (Fig. 6B)。

#### 六、 Silibinin 會影響 A549 肺癌上皮細胞的貼附能力

利用 Cell-matrix adhesion assay 來探討 silibinin 是否具有抑制 A549 肺癌上皮細胞與細胞間基質之間的附著的能力。經由實驗結果發現，當 A549 肺癌上皮細胞預先處理 0、30、50、70、100 $\mu$ M 的 silibinin 24 小時後，與處理 DMSO 的控制組做比較，分別為 96.9%、95.5%、79.8% (Fig. 7)。

#### 七、 Silibinin 對 A549 肺癌上皮細胞存活率的影響

當細胞給予不同劑量的 silibinin，分別為 0、30、50、70、100 $\mu$ M，處理 24 小時後，將藥物移除，作 MTT assay，其結果與控制組做比較，存活率分別為 104.8%、98.1%、92.3%、93.2%，證實了在之前的實驗中其 MMP-2 表現量降低並非由於細胞死亡或細胞數降低所致 (Fig 8)。

#### 八、 Silibinin 對 MRC5 正常肺臟細胞存活率的影響

將 MRC5 細胞給予 0、30、50、70、100 $\mu$ M silibinin，處理 24 小時後，將藥物移除，作 MTT assay，細胞存活率分別為控制組的 97.75%、105.33%、106.54%、102.66%，證實在這些濃度下 silibinin 對正常的肺臟細胞其細胞存活率無影響 (Fig 9)。

#### 九、 Silibinin 會影響 A549 肺癌上皮細胞的細胞型態

將 A549 細胞 subculture 培養 18 小時後，分別處理 0 $\mu$ M、30 $\mu$ M、

50 $\mu$ M、70 $\mu$ M、100 $\mu$ M 的 silibinin 24 小時後，在顯微鏡下觀察細胞型態，結果發現，隨著藥物劑量的增加，其細胞會形成突觸或紡錘狀，並且其細胞與細胞貼附的能力降低 (Fig 10)。

#### 十、Silibinin 會抑制 MMP-2、u-PA、t-PA、uPAR mRNA 的表現

當 A549 細胞處理不同濃度的 silibinin (0、30、50、70、100 $\mu$ M) 24 小時之後，萃取出 total RNA，利用半定量 RT-PCR 的分析方法，從實驗的結果來看，若以 GAPDH 表現量作為一個 internal control，A549 細胞在不同濃度 silibinin 的處理下，MMP-2、t-PA、u-PA 和 u-PAR mRNA 的表現量，會隨著濃度的增加而遞減 (Fig. 11, 12, 13)，而對於 TIMP-2 和 PAI mRNA 的表現量卻不會有影響 (Fig. 11, 13)。因此我們推測 MMP-2、u-PA 蛋白表現量的減少，是調控在 mRNA 的層次。

#### 十一、Silibinin 可抑制 ERK1/2、P38 與 PKB/Akt 的磷酸化

為了要探討 silibinin 抑制 A549 肺癌上皮細胞 MMP-2 表現、細胞移動及侵入能力與訊息蛋白表現之間的相關性，利用西方墨點法，以 0、30、50、70、100 $\mu$ M silibinin 處理細胞 24 小時，收集 cell lysates，並且利用 anti-Pi-ERK1/2 與 anti-ERK1/2、anti-Pi-P38 與 anti-P38 和 anti-Pi-Akt 與 anti-Akt 抗體進行 Western immunoblotting。實驗結果發現，ERK1/2、P38 與 Akt 兩者蛋白表現，並不會受到 silibinin 的影響；但 ERK1/2、P38 與 Akt 的 phosphorylation，卻會隨著 silibinin 濃度增加而逐漸遞減 (Fig. 14, 15, 16)。

#### 十二、Silibinin 對 PI3K 蛋白表現量的影響

將 A549 細胞分別處理 0 $\mu$ M、30 $\mu$ M、50 $\mu$ M、70 $\mu$ M、100 $\mu$ M 的 silibinin 24 小時後，收集 cell lysates，利用西方墨點法，實驗結果發現，PI3K 蛋白的表現量不會因為 silibinin 的刺激而有所變化(Fig. 17)。

### 十三、Silibinin 可以抑制 NF- $\kappa$ B 的蛋白表現量

利用西方墨點法，將 A549 細胞分別處理不同濃度 silibinin (0、30、50、70、100 $\mu$ M) 24 小時後，收集 cell lysates，進行 Western immunoblotting，結果發現，NF- $\kappa$ B 的蛋白表現量，會隨著 silibinin 濃度增加而遞減 (Fig. 18)。

### 十四、PI3K、ERK1/2 及 P38 的專一性磷酸化抑制劑對 MMP-2、u-PA、細胞移動性與細胞侵入性的影響

利用 PI3K 專一性的磷酸化抑制劑：LY294002 (1-20 $\mu$ M)；ERK1/2 專一性的磷酸化抑制劑：U0126 (1-20  $\mu$ M)；P38 專一性的磷酸化抑制劑：SB203580 (1-25 $\mu$ M)。發現在不導致細胞死亡的情況下，抑制 PI3K 這條路徑會導致 A549 肺癌細胞 MMP-2 表現量減少、細胞的移動能力及侵入能力降低，但對於 u-PA 的分泌則沒有影響。而在 MAPK 路徑中，使用 U0126，抑制 ERK1/2 這條路徑，會抑制細胞分泌 u-PA、MMP-2 及細胞的侵入能力，但對於細胞的移動性則沒有影響；而當加入 SB203580，阻斷了 P38 這條路徑則會抑制細胞 MMP-2 的表現量、細胞的移動能力及侵入能力，但對於 u-PA 的分泌則沒有改變(Fig. 19, 20, 21, 22)。

## 柒、討論

在癌細胞的轉移過程中，伴隨著細胞許多生理狀態的改變，其中包含了細胞與細胞外基質之間結合能力的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞，及細胞外基質的分解。緊接著癌細胞會穿過細胞外基質，侵入血液或淋巴系統，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官(61-63)。最後癌細胞大量增生，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，是造成癌症病人的死亡的主要原因。

肺癌是具有高度轉移能力的癌症，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(62)，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。

在最近幾年，silibinin 被應用於一些癌症化學預防(5)，具有抗氧化與預防癌症(1)的功效。有文獻指出，silibinin 能抑制皮膚癌細胞的生長及增生(5-7)。並可誘導癌細胞走向凋謝死亡(11-12)。此外，水飛薊素可抑制一些急性發炎反應及白血球的移動能力(5)。而 A549 細胞為一高度惡化的肺癌上皮細胞，具有極高度的轉移能力，因此我們嘗試以 silibinin 刺激 A549 肺癌上皮細胞後，研究其對於肺癌細胞的侵入、移動能力及一些相關的蛋白水解酵素，和其間所涉及的分子機轉。

水飛薊素在許多歐美國家已被廣泛當作健康食品食用，對於人體的細胞毒性極低。在實驗中我們也利用正常的肺臟細胞(MRC5)去研究 silibinin 對正常細胞的細胞毒性，結果發現 silibinin 對正常的肺臟

細胞的細胞存活率並無影響。

我們利用 modified Boyden chamber invasion assay，發現 silibinin 能有效抑制肺癌細胞的侵入能力，證實了，silibinin 的確具有抑制癌細胞的侵入能力，對日後針對肺癌細胞，或許可作為一種有效用藥。

在轉移擴散的癌細胞中，癌細胞藉由蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，導致細胞與細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性。由過去的文獻中指出，基質金屬蛋白水解酵素家族中的 MMP-2 與 MMP-9 會被大量的表現在許多的惡性腫瘤中(15)，因此 MMP-2 與 MMP-9 的表現與癌細胞的轉移和侵入具有高度相關性(16,64)。由於 serum 中含有大量的 MMP-2，-9，且早期的實驗中發現，在含有 10 % FBS 的 medium 培養下，silibinin 對皮膚及攝護腺癌細胞的增生具有抑制作用(2,5)，為了排除 MMP-2 & -9 的表現的變化是因為 silibinin 導致 A549 肺癌上皮細胞的凋謝死亡與抑制增生。於是實驗中採取 serum starvation 的方式以 silibinin 處理 A549 肺癌上皮細胞，並以 MTT assay 作為細胞數定量的工具，以提高 gelatin zymography assay 的準確性。由實驗中證實了，當細胞處理 50 $\mu$ M silibinin，就可明顯抑制 MMP-2 的表達，並且有 dose-dependent 的現象，而 MMP-9 在此細胞株中，只有很微量的分泌，不易偵測。此外，利用 western immunoblotting，TIMP-2 蛋白表現量會隨著 silibinin 濃度的增加而增加。而在 RT-PCR 方面，更證明了 silibinin 會減少 A549 肺癌上皮細胞 MMP-2 的量。亦即 silibinin 可以藉由抑制 MMP-2 的轉錄作用，來



減少 MMP-2 的蛋白量，證實其調控的確是在 mRNA 的層次上。但其 MMPs inhibitor: TIMP-1 和 TIMP-2 由 RT-PCR 的結果，並沒有改變，推測，其 TIMP-2 是調控在 post-transcription level。

細胞的移動包括細胞骨架的改變、細胞表面貼附的能力。Rho GTPases 家族主要藉由調控 actin filaments 與 focal adhesion complex 相關蛋白來促使細胞伸出突觸以便移動，而細胞這種延伸(spreading) 的能力也就決定了細胞的移動性(65)。細胞的移動性，主要也決定了癌細胞在轉移的過程中，是否能順利到達目標器官，在本篇實驗中，我們利用 Boyden chamber assay 觀察其 motility 的能力。結果證實了，當細胞處理 50 $\mu$ M silibinin，就可明顯被抑制，當 silibinin 的濃度高達 100 $\mu$ M 時，A549 細胞的移動能力可被抑制達 80%。

在細胞轉移的過程中，轉移的細胞必須經由貼附與侵入才能移轉到新的組織器官，因此細胞轉移後的貼附能力也就影響到細胞的侵入(65)，經由 cell-matrix adhesion assay，發現預先處理 silibinin 的 A549 肺癌上皮細胞，其貼附能力會被抑制，在此我們推測 silibinin 可能具有抑制 A549 肺癌上皮細胞附著的能力。

當細胞處理 silibinin 24 小時後，由顯微鏡下觀察其細胞型態，發現隨著濃度的增加，其細胞型態由飽滿的多邊形變成紡錘狀，形成許多突觸，且細胞與細胞之間鍵結的能力減弱，使細胞不能緊密的貼附在一起，形成鬆散的狀態。因此推測 silibinin 可能會經由影響細胞骨架的排列，進而影響其細胞的移動能力或貼附能力。

u-PA 及 t-PA 為基質金屬蛋白水解酶的上游，由許多文獻中指出，其與癌症的轉移有關 (66)。u-PA 是分泌型酶，但 u-PA 必須藉由與位在細胞膜上的 uPAR 相結合才具有較強的蛋白水解活性，進而造成細胞外基質的分解，因此被認為與癌細胞的侵入與轉移較有相關性(56-57)。有文獻指出，在人類的乳癌細胞(MDA-MB-231)中，phosphatidylinositol3-kinase (PI3-kinase)可增加 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)的轉錄活性來促進 u-PA 的表達，進而影響細胞的移動能力 (72)。而 u-PA、t-PA 蛋白活性又受到內生性抑制劑 PAI 所抑制。利用 casein zymography，當細胞處理 50 $\mu$ M silibinin，就可明顯抑制 u-PA 的表達，並且有 dose-dependent 的現象。在 RT-PCR 方面，當細胞處理 silibinin 24 小時後，對 u-PA、t-PA 及 u-PAR 的 RNA level 皆有抑制的效果。但對於 PAI 的 RNA level 卻沒有影響。證明 silibinin 可以藉由抑制 u-PA 的轉錄作用，來減少 u-PA 的蛋白量。

Akt 調控細胞移動的機制，到目前為止都還不是很清楚。由一些文獻中指出，Akt 會去活化 MMP-2 (25) 與 MMP-9 (26)，且 Akt 會促進癌細胞侵入的能力，這可能是活化的 Akt 會去增加 NF- $\kappa$ B 的 transcriptional activity (26)。而在一些黑色素瘤細胞中，NF- $\kappa$ B 可藉由活化 MT1-MMP 的表現而去活化 pro-MMP-2 (19)，增加癌細胞侵入的能力。由 wetern immunoblotting，我們發現，以 silibinin 處理 A549 細胞 24 小時後，其 Akt 的磷酸化表現會受到抑制，並且呈現 dose-dependent 的現象。且 NF- $\kappa$ B 的蛋白表現量也隨著藥物的濃度增

加而遞減。

細胞體內的 Phosphoinositide 3-Kinases (PI3Ks) 可藉由磷酸化 inositol phospholipid 而產生 PtdIns(3)P, PtdIns(3,4) P(2), PtdIns(3,4,5)P(3) 等三種脂質，而這些脂質可和具有 pleckstrin homology (PH) domain 的蛋白相結合，進一步的去調控這些蛋白的活性以及下游訊息路徑的傳遞，而這些藉由 PH domain 與 phosphoinositides 相結合的蛋白主要可以分為三類：分別是 Rho family GTPases, TEC family tyrosine kinases, 以及 AGC superfamily 中的 serine/threonine protein kinases, 當細胞接受外來的刺激時，便會透過 PI3Ks 來影響下游蛋白的訊息傳遞，調控細胞週期的前進，細胞的生長、存活，以及細胞的附著力、移動性等。綜合上述，PI3Ks 對於細胞功能的調控，扮演著非常重要的角色，然而，就如同致癌蛋白一樣，它也參與著癌症的發生。我們知道，當正常細胞轉型成癌化細胞的過程中，細胞通常會伴隨著不正常的增生，附著力、移動性的改變，並且具有抗凋謝死亡和誘導血管新生成等能力。在本篇 PI3K 蛋白的表現量雖然沒有變化，但 silibinin 可能是影響其磷酸化態而非蛋白表現量。但其下游 Akt 的磷酸化，卻有明顯被抑制的情形。

有文獻指出，在前列腺癌細胞中，extracellular-signal-regulated kinase ( ERK1/2 ) 的活化會參與細胞的侵入與轉移能力(67)。而在 HT1080 細胞中，ERK1/2 的活化會影響 MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA level (68)。此外，在 單核細胞 THP1 中，mitogen-activated protein kinase

(MAPK) : ERK1/2、P38、cjun-NH2 terminal kinase ( JNKs )的磷酸化會參與單核細胞的侵入作用 (69)。在本篇實驗中，由 western immunoblotting，我們發現，當細胞利用處理 silibinin 處理 24 小時後，其 ERK1/2 與 P38 的磷酸化表現皆會受到抑制，並且呈現 dose-dependent 的現象。

加入專一性抑制劑處理，分別觀察細胞分泌 MMP-2、u-PA 的表現量及細胞的侵入性與移動性。當細胞處理 PI3K 專一性的抑制劑 (LY294002)，會使 A549 肺癌細胞 MMP-2 表現量減少、細胞的移動能力及侵入能力降低，但對於 u-PA 的分泌則沒有影響。而在 MAPK 路徑中，當細胞處理 U0126，抑制 ERK1/2 這條路徑，則會減少細胞 u-PA、MMP-2 的分泌及細胞的侵入能力，但卻不會影響細胞的移動性；而當阻斷了 P38 這條路徑(SB203580)，則會抑制細胞 MMP-2 的表現量、細胞的移動能力及侵入能力，但對於 u-PA 的分泌則沒有改變。因此推測，silibinin 可能是透過 PI3K、ERK1/2、P38 這三條路徑來影響細胞分泌 MMP-2 的量；透過 ERK1/2 這條路徑來抑制 u-PA 的表現量；但對於細胞的侵入性，可能是透過 PI3K、ERK1/2、P38 這三條路徑抑制細胞的侵入能力；此外，可能經由 PI3K、P38 這兩條路徑來影響細胞的移動性。

## 捌、參考文獻

1. Departments of Pathology and Neurosurgery, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52:255-64. Review.
2. 行政院衛生署八十年度委託研究計畫研究報告.計畫名稱：本土醫學資料庫之建立及衛生政策上之應用
3. Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96:7490-5.
4. De La Puerta R, Martinez E, Bravo L, Ahumada MC. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48:968-70.
5. Bhatia N, Agarwal C, Agarwal R. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Nutr. Cancer* 2001; 39:292-9.
6. Singh RP, Agarwal R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid. Redox. Signal.* 2002; 4:655-63.
7. Zi X, Agarwal R. Modulation of mitogen-activated protein kinase activation and cell cycle regulators by the potent skin cancer preventive agent silymarin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 263:528-36.
8. Tyagi A, Bhatia N, Condon MS, Bosland MC, Agarwal C, Agarwal R. Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells. *Prostate* 2002; 53:211-7.
9. Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Chan DC, Agarwal C, Agarwal R. Dietary feeding of silibinin inhibits advance human prostate carcinoma growth in athymic nude mice and increases plasma insulin-like growth factor-binding protein-3 levels. *Cancer Res.* 2002; 62:3063-9.
10. Jiang C, Agarwal R, Lu J. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine

- secretion by cancer epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 276:371-8.
11. Singh RP, Tyagi AK, Zhao J, Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 2002; 23:499-510.
  12. Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappa B and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:1759-67.
  13. Parks WC, and Mecham RP. Matrix metalloproteinases. 1998 *Academic Press*. San Diego.
  14. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999; 13:781-92.
  15. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1998; 10:667-71.
  16. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1996; 56:190-6.
  17. Palanki MS. Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr. Med. Chem.* 2002; 9:219-27.
  18. Yoshida M, Korfhagen TR, Whitsett JA. Surfactant protein D regulates NF-kappa B and matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways. *J. Immunol.* 2001; 166:7514-9.
  19. Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:44926-35.
  20. Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Hofmeyer D, Tripathy D, Dandona P. Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86:5988-91.

21. Wang X, Mori T, Jung JC, Fini ME, Lo EH. Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase. *J. Neurotrauma*. 2002; 19:615-25.
22. Pan MR, Hung WC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J. Biol. Chem*. 2002; 277:32775-80.
23. Welch DR, Sakamaki T, Pioquinto R, Leonard TO, Goldberg SF, Hon Q, Erikson RL, Rieber M, Rieber MS, Hicks DJ, Bonventre JV, Alessandrini A. Transfection of constitutively active mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase confers tumorigenic and metastatic potentials to NIH3T3 cells. *Cancer Res*. 2000; 60:1552-6.
24. Kubiakowski T, Jang T, Lachyankar MB, Salmonsens R, Nabi RR, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Ross AH, Recht LD. Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. *J. Neurosurg*. 2001; 95:480-8.
25. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*. 2001; 15:1953-62.
26. Park BK, Zeng X, Glazer RI. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2001; 61:7647-53.
27. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML., Matrisian LM. Matrix metalloproteinase: biologic activity and clinical Implications. *J Clin Oncol* 2000; 18:1135-49.
28. HECS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 2632-6.
29. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem*. 1997; 378:151-60.
30. Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res*. 1999; 19:1589-1592
31. Murphy G, Reynolds JJ, Hembry RM. Metalloproteinases and cancer invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* 1989; 44: 757-760
32. Murphy G, Docherty AJ. Matrix metalloproteinases and their

- inhibitors. *Cell Mol. Biol.* 1992; 7: 120-125
33. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 1997; 74:111-122
  34. Huebner K, Isobe M, Gasson JC, Golde DW, Croce CM. Localization of the gene encoding erythroid-potentiating activity to chromosome region Xp11.1-Xp11.4. *Am. J. Hum. Genet.* 1986; 38: 819-826.
  35. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5: 2145-2155
  36. Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker A, Zimmermann J, Ulbrich, N. (1995) Generation and activity of ternary gelatinase B/TTMP-1/LMW-stromelysin-1 complex. *Biol. Chem.* 1995; 376:495-500
  37. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 4583-4591
  38. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao WG, Bouck N, Polverini P J. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Cell Physiol.* 1994; 160: 194-202
  39. Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K, Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 171:1264-1271
  40. Thorgeirsson, U.P., Yoshiji, H., Sinha, C. C. and Gomez, D. E. Breast cancer: tumor neovasculature and the effect of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) on angiogenesis. *In Vivo* 1996; 10: 137-144
  41. Alvarez OA, Carmichael DE, DeClerck YA. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82: 589-595
  42. DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE. and Taylor, S. M. Inhibition of invasion and metastasis in cell transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* 1992; 52: 701-708
  43. Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF. Inhibition of human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases



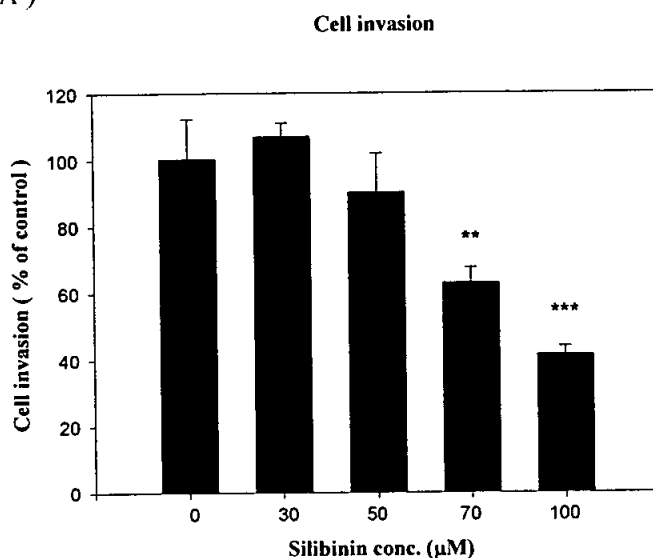
- of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.* 1988; 48:5539-5545
44. Thorgeirsson UP, Liotta LA, Kalebic T, Margulies IM, Thomas K, Rios-Candelore M, Russo RG. Effect of natural protease inhibitors and a chemoattractant on tumor cell invasion in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 1982; 69:1049-1054
  45. Flenniken AM and Williams BR. Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes Dev.* 1990; 4:1094-1106
  46. DeClerck YA, Szpirer C, Aly M S, Cassiman J J, Eeckhout Y, Rousseau G. The gene for tissue inhibitor of metallo- proteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics* 1992; 14:782-784
  47. Boone TC, Johnson MJ, DeClerck YA, Langley K E. cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:2800-2804
  48. Shapiro SD, Kobayashi DK, Welgus H G. Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:13890-13894
  49. Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J. Biol Chem.* 1990; 265:13933-13938
  50. Apte SS, Olaen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-3) and its inhibitor activities define the distinct TIMP gene family. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:14313-14318
  51. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 9352-9360
  52. Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenases inhibitors: purification and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:12252-12258
  53. Yang TT, Hawkes SP. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:10676-10680
  54. Wick M, Burger C, BNsselbach S, Lucibello E, Muller R. A novel member of human tissue inhibitor of metalloprotein- ases (TIMP)

- gene family is regulated during GI progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:18953-18960
55. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 30375-30380
  56. Hofmann GE, Glatstein I, Schatz F, Heller D, Deligdish L. Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 and 2 in early implantation sites. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994; 170: 671-6.
  57. Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund L, Flick MJ, Dengen JL, Dan K. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat. Med.* 1996; 2:287-92.
  58. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 1980; 43:77-89.
  59. Kruithoff EK, Vasalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J. Biol. Chem.* 1986; 261:11207-13.
  60. Thomas K, Ronald V. Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. 1999; 394-9.
  61. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1552:39-45.
  62. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer.* 2002; 36:115-24.
  63. Ellenrieder V, Adler G, Gress TM. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 1999; 10 Suppl 4:46-50.
  64. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 2000; 36:1621-30.
  65. Yoon SO, Kim MM, Chung AS. Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:20085-92.
  66. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1552:39-45.
  67. Suthiphongchai T, Promyart P, Virochrut S, Tohtong R, Wilairat P. Involvement of ERK1/2 in invasiveness and metastatic development of rat prostatic adenocarcinoma. *Oncol Res.* 2003; 13:253-9.

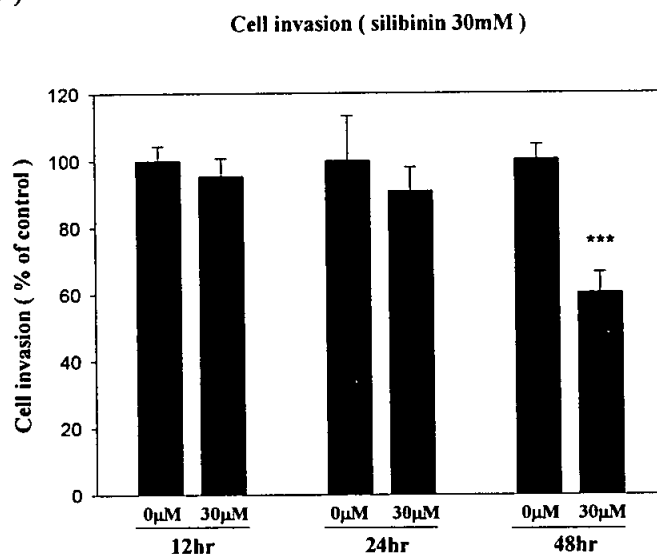
68. Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, Miyase T, Sano M, Hashimoto-Ohta A, Isemura M. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem.* 2003; 51:1858-63.
69. Valere A, Garnotel R, Villena I, Guenounou M, Pinon JM, Aubert D. Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. *Parasite.* 2003; 10:59-64.
70. Olaso E, Labrador JP, Wang L, Ikeda K, Eng FJ, Klein R, Lovett DH, Lin HC, Friedman SL. Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem.* 2002; 277:3606-13.
71. He Q, Osuchowski MF, Johnson VJ, Sharma RP. Physiological responses to a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: I induction of transforming growth factor beta1 and c-myc in liver with marginal effects on other genes. *Planta Med.* 2002; 68:676-9.
72. Sliva D, Rizzo MT, English D. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2002; 277:3150-7.
73. Roche PC, Campeau JD, Shaw ST, Jr.: Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein. *Biochim. Biophys. Acta* 1983; 745:82-9.

玖、圖表與圖表說明

(A)

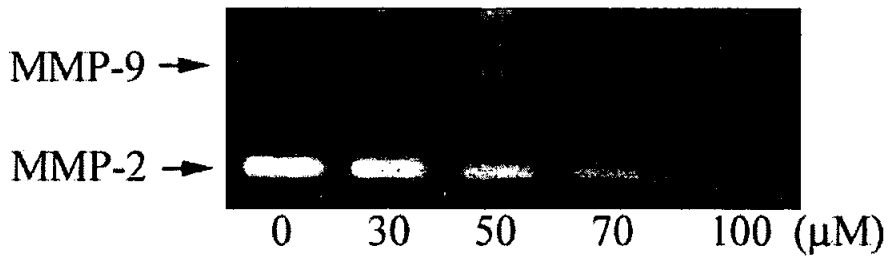


(B)



**Fig. 1. Dose- and time-response of silibinin on invasion of A549 cells.** Cells were treated with 0, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  silibinin for 24 hr (A) or 30  $\mu\text{M}$  silibinin for 0, 12, 24, 48 hr (B). Cell invasion ability were determined by modified Boyden Chambers. Filers (pore size, 8  $\mu\text{m}$ ) were precoated with type IV collagen over night. Invasion ability of A549 were quantified by counting the number of cells that invaded to the underside of the membrane under microscopy (200x magnification). \*\*,  $P < 0.01$  ; \*\*\*,  $P < 0.001$

(A)



(B)

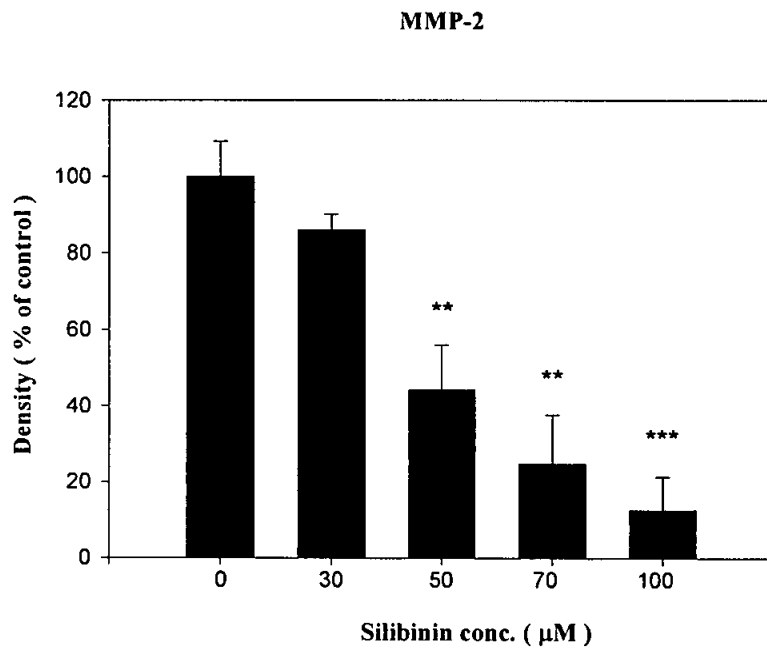
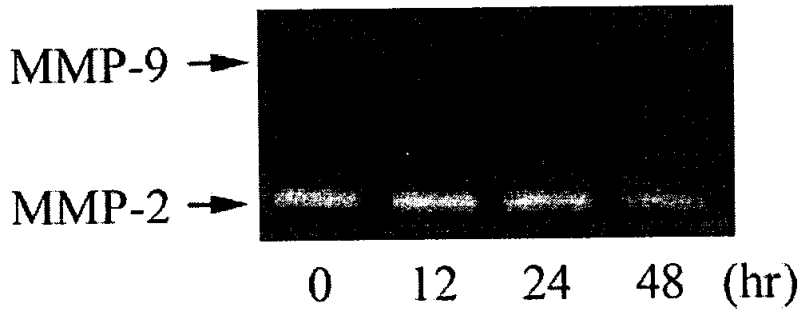


Fig. 2. **Effect of silibinin on secreted MMP-2.** (A) A549 cells were treated with 0, 30, 50, 70, 100 μM of silibinin for 24 hr. The conditioned media were collected and MMP-2 activity were determined by gelatin zymography.(B) MMP-2 activity were quantified by densitometric analysis.The densitometric data shown are mean ± SD of triplicate experiments. \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001

(A)



(B)

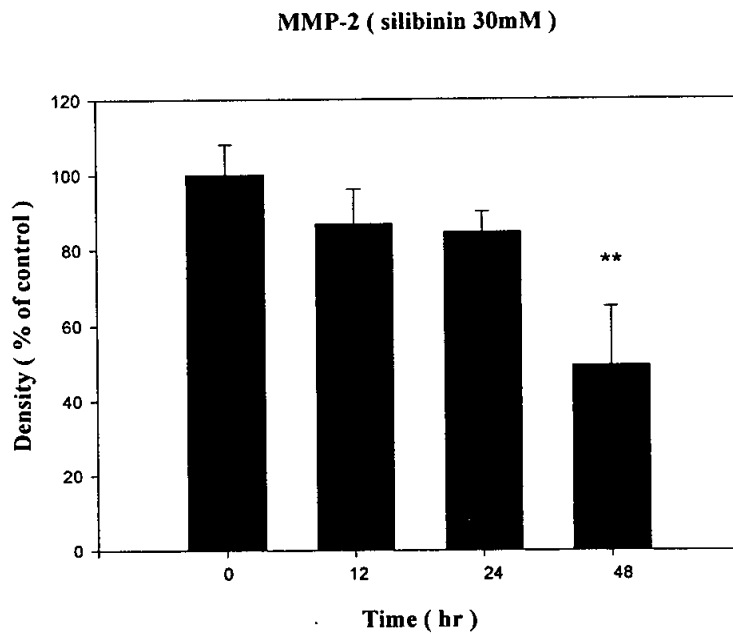
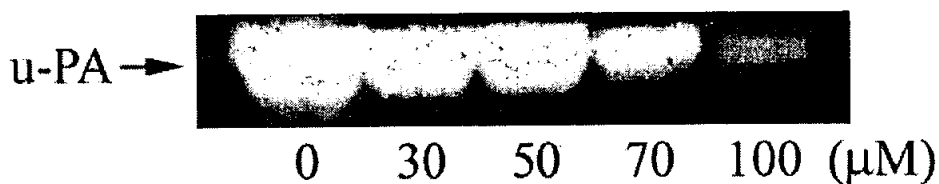


Fig. 3. **Effect of silibinin on secreted MMP-2** . (A) A549 cells were treated with either 30  $\mu$ M of silibinin for 0, 12, 24, 48 hr. The conditioned media were collected and MMP-2 activity were determined by gelatin zymography.(B) MMP-2 activity were quantified by densitometric analysis.The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\*, P < 0.01

(A)



(B)

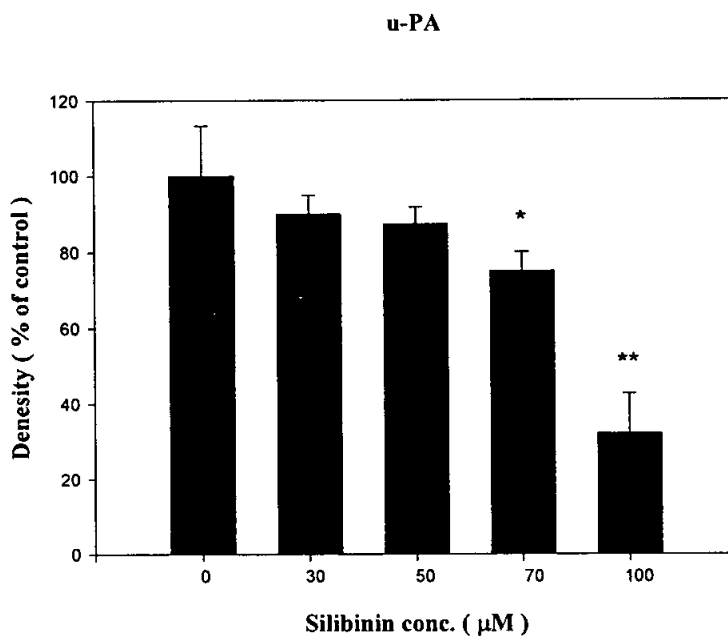
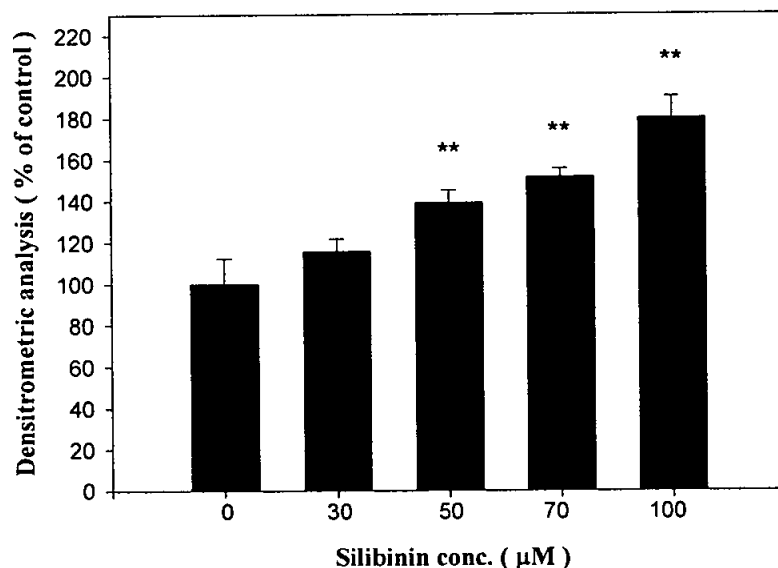
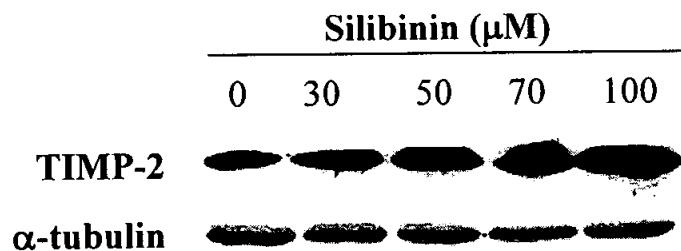


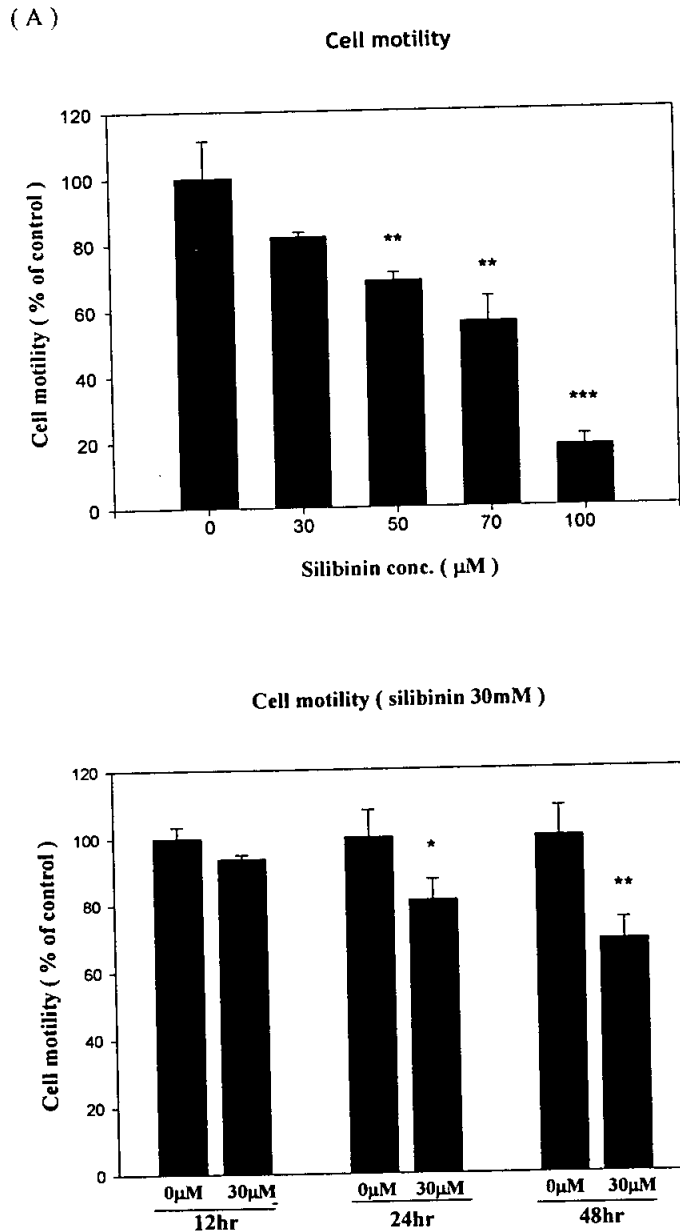
Fig. 4. **Effect of silibinin on secreted u-PA.** (A) A549 cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100 μM of silibinin for 24 hr. The conditioned media were collected and u-PA activity were determined by casein zymography.(B) MMP-2 activity were quantified by densitometric analysis. The densitometric data shown are mean ± SD of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$  ; \*\*,  $P < 0.01$



(A)



**Fig. 5. Effect of silibinin on A549 TIMP-2 expression.** Cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100  $\mu$ M of silibinin for 24 hr. Cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. The membranes were probed with anti-TIMP-2 antibody and then peroxidase-conjugate appropriate secondary antibody. Proteins were visualized with ECL detection system.(A) TIMP-2(upper panel),  $\alpha$ -tubulin (bottom panel) as an internal control.Treatment were as labeled in the figure. Densitometric analysis for TIMP-2 and  $\alpha$ -tubulin (B) The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



**Fig. 6. Dose- and time-response of silibinin on motility of A549 cells.** Cells were treated with 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  silibinin or DMSO for 24 hr (A) or 30  $\mu\text{M}$  silibinin for 12, 24, 48 hr (B). Cells motility were determined by Boyden Chambers. Filters (pore size, 8  $\mu\text{m}$ ) were precoated with type IV collagen over night. Invasion ability of A549 were quantified by counting the number of cells that invaded to the underside of the membrane under microscopy (200x magnification). \*,  $P < 0.05$  ; \*\*,  $P < 0.01$  ; \*\*\*,  $P < 0.001$

### Adhesion assay

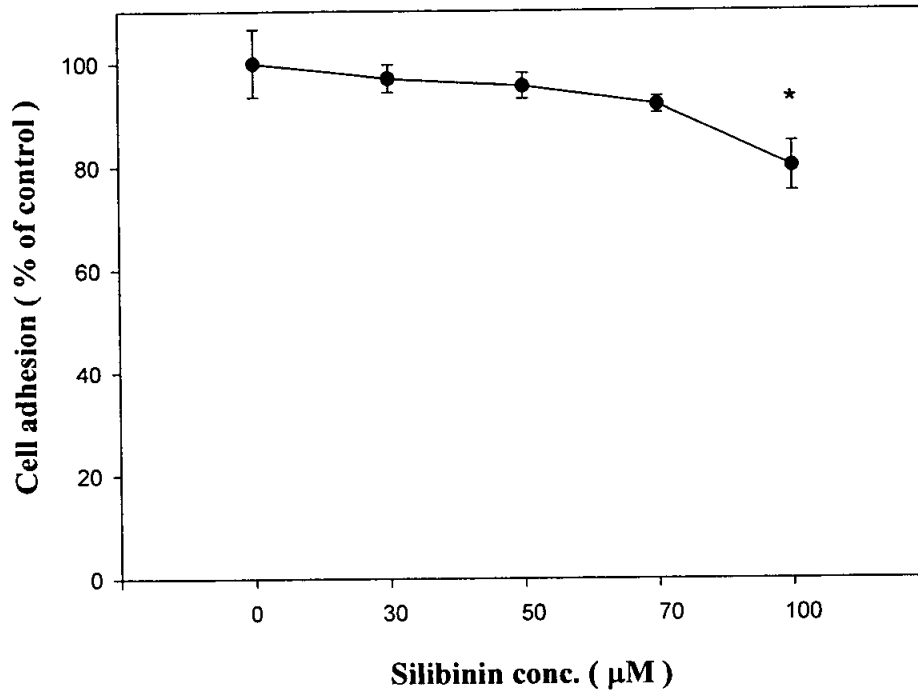
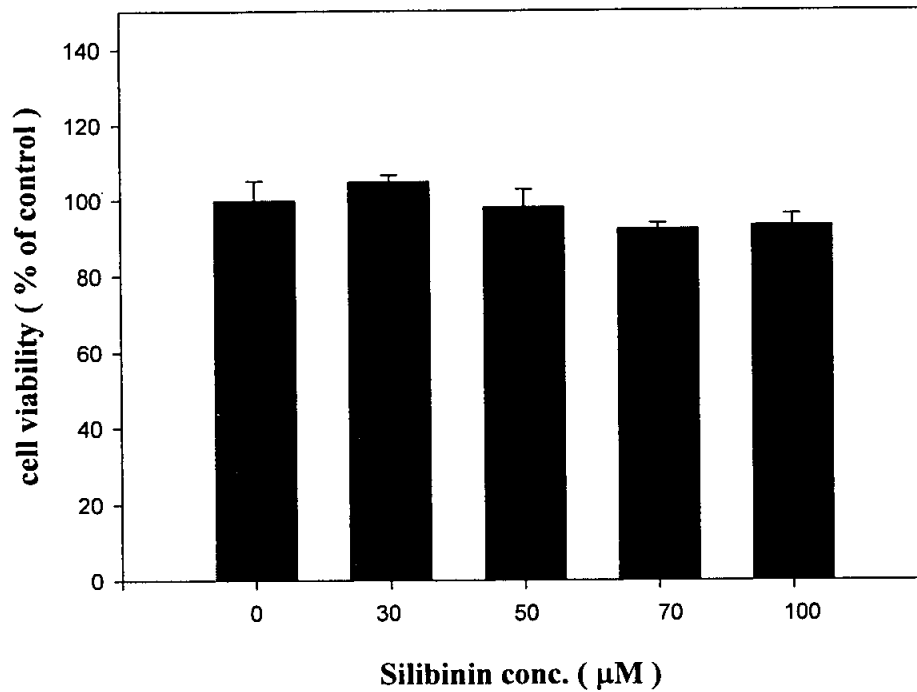


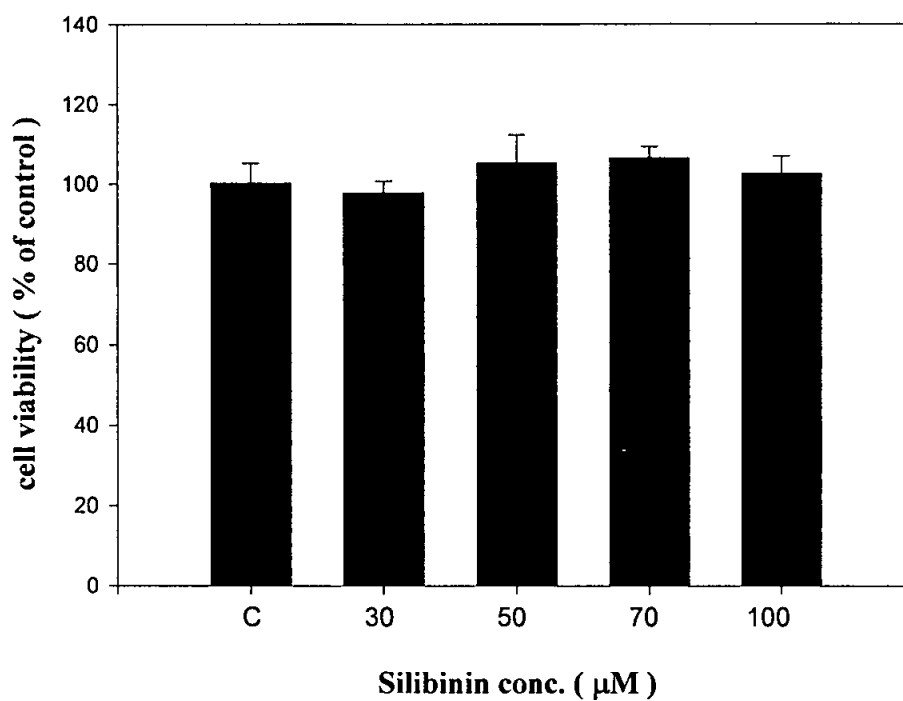
Fig. 7. **Effect of silibinin on cell- matrix adhesion.** A549 cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100 µM of silibinin for 24 hr. Adherent cell number were determined by cell- matrix adhesion assay. Each data point represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$

### MTT



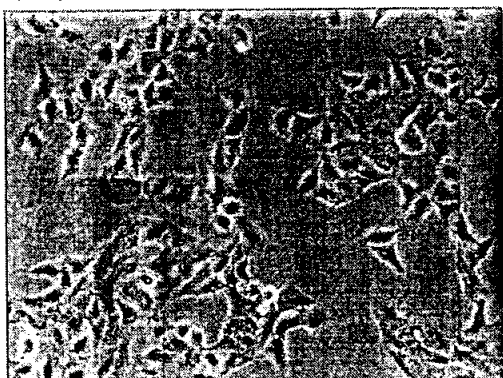
**Fig. 8. Effect of silibinin treatment on A549 cells viability.** A549 cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100  $\mu$ M of silibinin for 24 hr. Cells viability were determined by MTT assay. Each data point represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

### MTT



**Fig. 9. Effect of silibinin treatment on MRC5 cells viability.** MRC5 cells were treated with 0, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  of silibinin for 24 hr. Cells viability were determined by MTT assay. Each data point represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

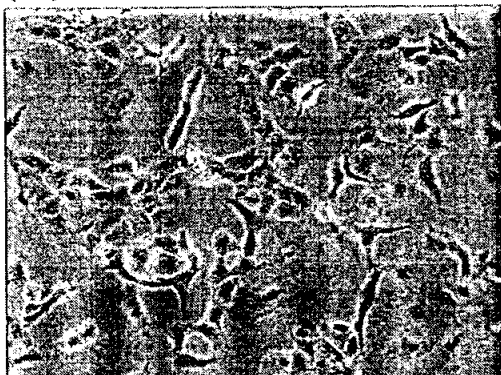
(A) Solvent vehicle



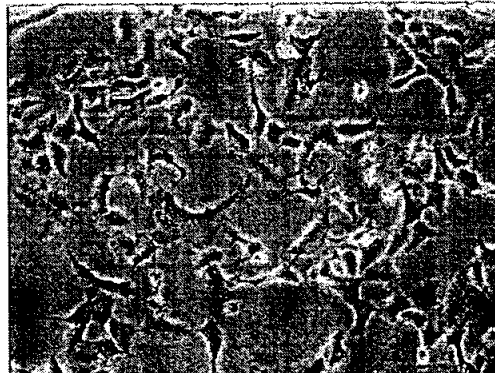
(B) Silibinin 50 $\mu$ M



(C) Silibinin 70 $\mu$ M

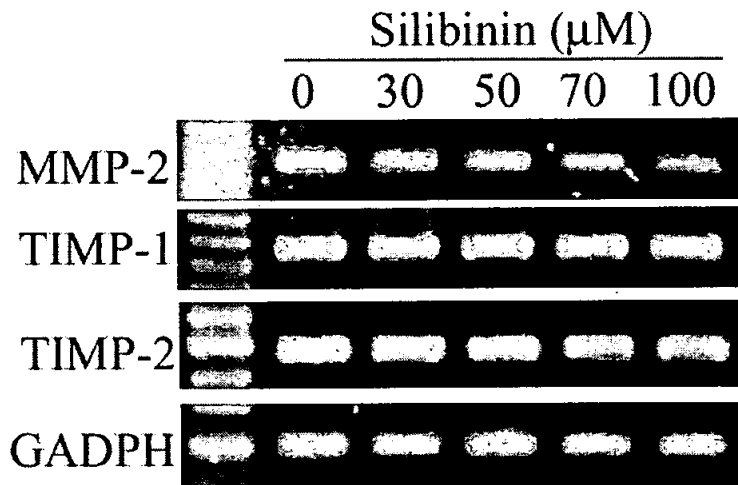


(D) Silibinin 100 $\mu$ M



**Fig. 10. Effect of silibinin treatment on A549 growth.** (A-D) Representative phase-contrast photomicrographs (100x magnification) of A549 at 24 hr after treatment was initiated with (A) DMSO, (B) 50, (C) 70, (D) 100 $\mu$ M of silibinin.

(A)



(B)

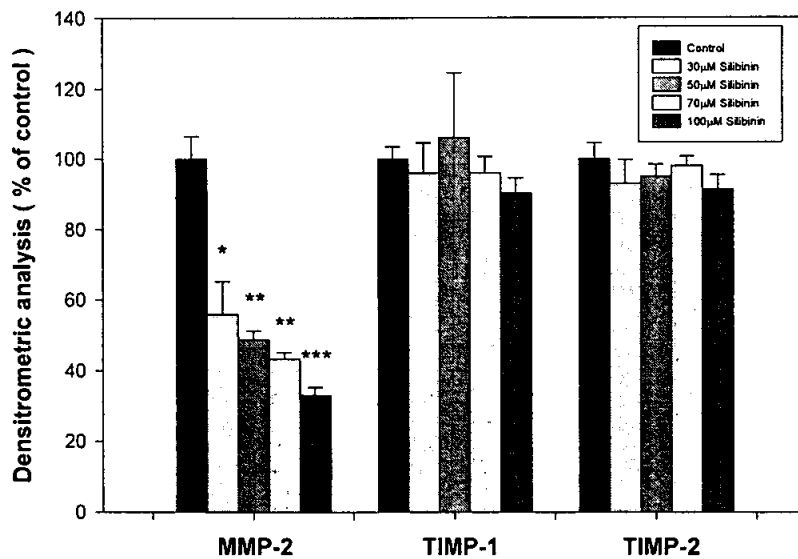
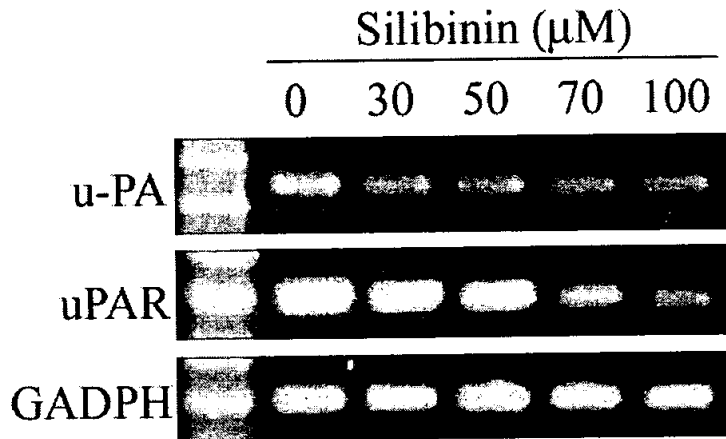
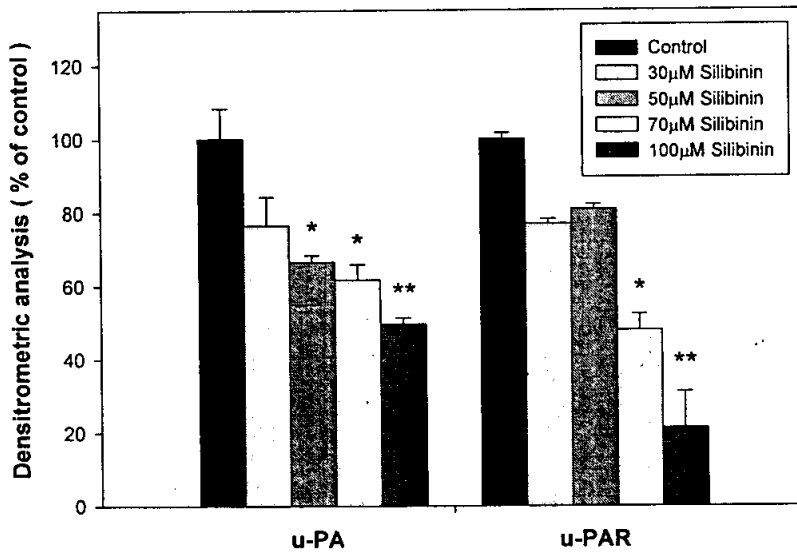


Fig. 11. **Semiquantitative RT-PCR of MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 and GADPH.** (A) A549 cells were treated with various concentration of silibinin for 24 hr. Latter, quantitative RT-PCR analysis was carried out. 5 μM total RNA-derived cDNA were used for PCR reaction. GADPH of amount was shown at the bottom panel as an internal control. (B) The MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 cDNA level was quantified by densitometric analysis (IS-100 Digital system). The results are expressed as mean ± SD of three independent experiments. \*, P < 0.05 ; \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001

(A)



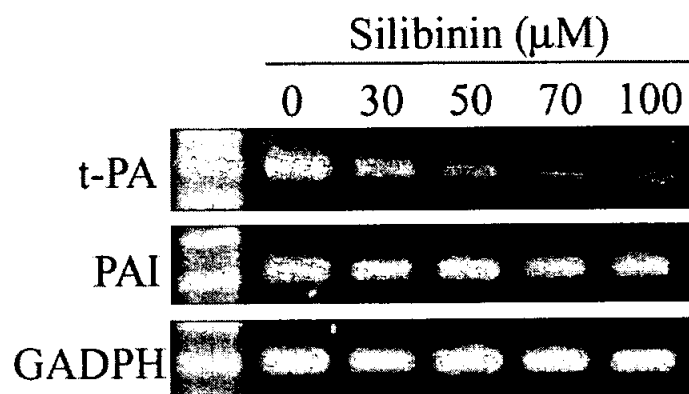
(B)



**Fig. 12. Semiquantitative RT-PCR of u-PA, u-PAR and GADPH.** (A) A549 cells were treated with various concentration of silibinin for 24 hr. Latter, quantitative RT-PCR analysis was carried out. 5 $\mu\text{M}$  total RNA-derived cDNA were used for PCR reaction. GADPH of amount was shown at the bottom panel as an internal control. (B) The u-PA and uPAR cDNA level was quantified by densitometric analysis (IS-100 Digital system). The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$  ; \*\*,  $P < 0.01$



(A)



(B)

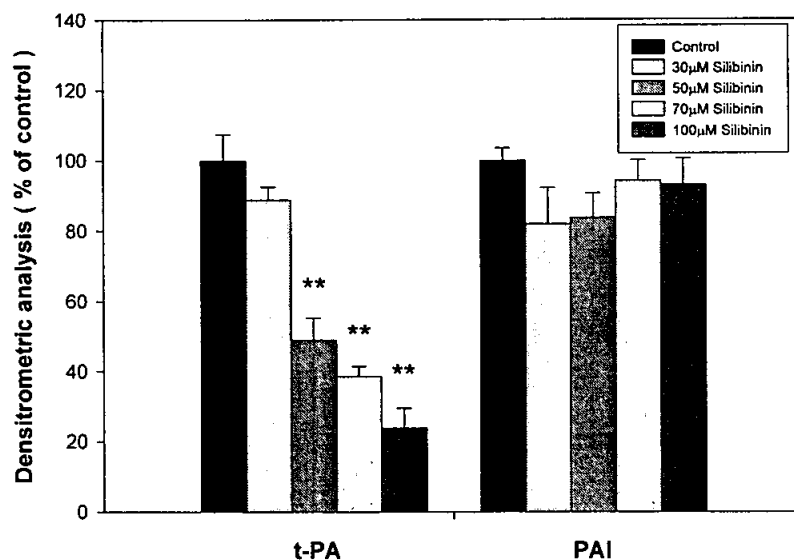
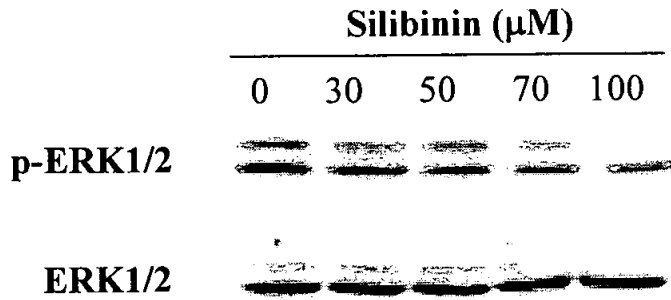


Fig. 13. **Semiquantitative RT-PCR of t-PA, PAI and GADPH.** (A) A549 cells were treated with various concentration of silibinin for 24 hr. Latter, quantitative RT-PCR analysis was carried out. 5 $\mu\text{M}$  total RNA-derived cDNA were used for PCR reaction. GADPH of amount was shown at the bottom panel as an internal control. (B) The t-PA and PAI cDNA level was quantified by densitometric analysis (IS-100 Digital system). The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*\*,  $P < 0.01$

(A)



(B)

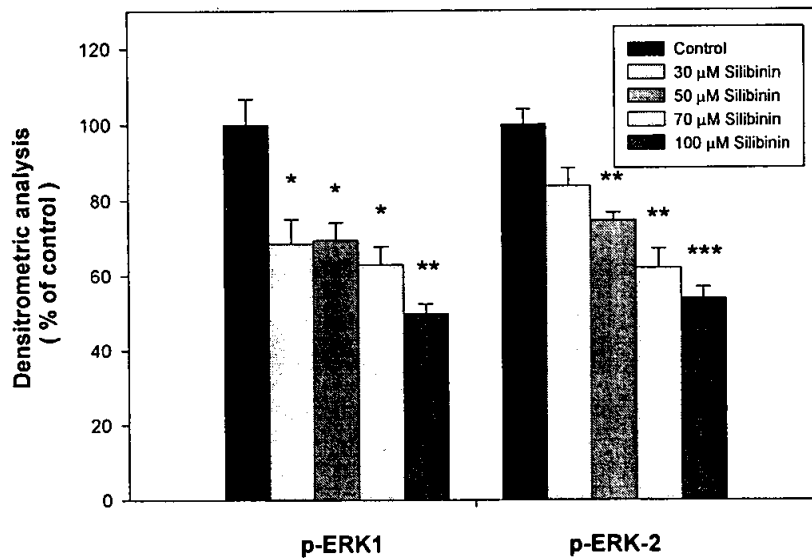
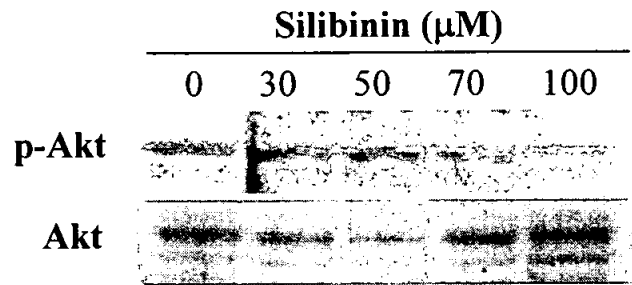
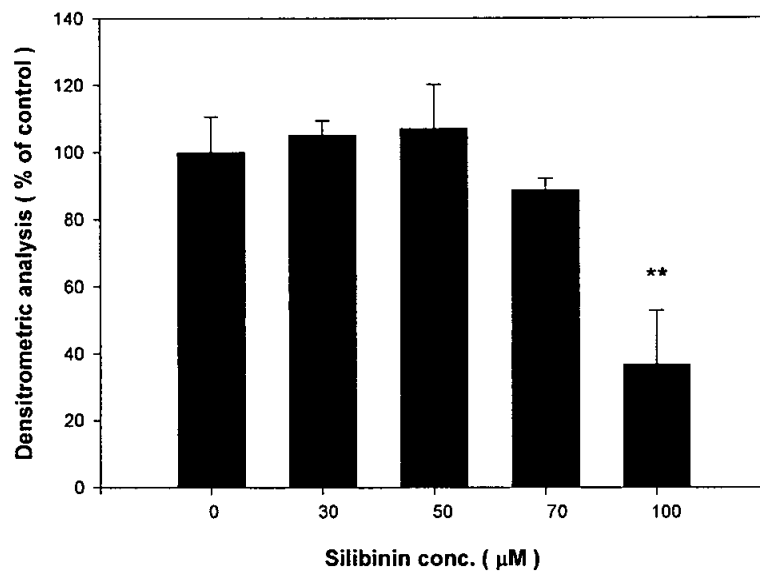


Fig. 14. **Silibinin inhibits constitutive activation of MAPK/ERK1/2 in A549 cells.** Cells were treated with either DMSO or 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  of silibinin for 24 hr. Cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. (A) Phosphorylation of ERK1/2 (upper panel), total levels of ERK1/2 (bottom panel). Treatment were as labeled in the figure. Densitometric analysis for phospho-ERK1 and phospho-ERK2 (B) blots was corrected for loading with the density of ERK1/2 blots. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$  ; \*\*,  $P < 0.01$  ; \*\*\*,  $P < 0.001$

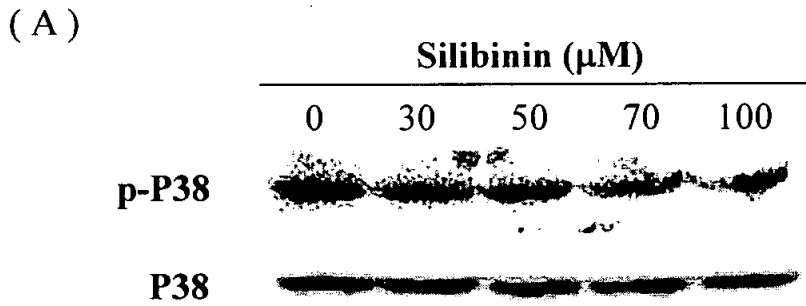
(A)



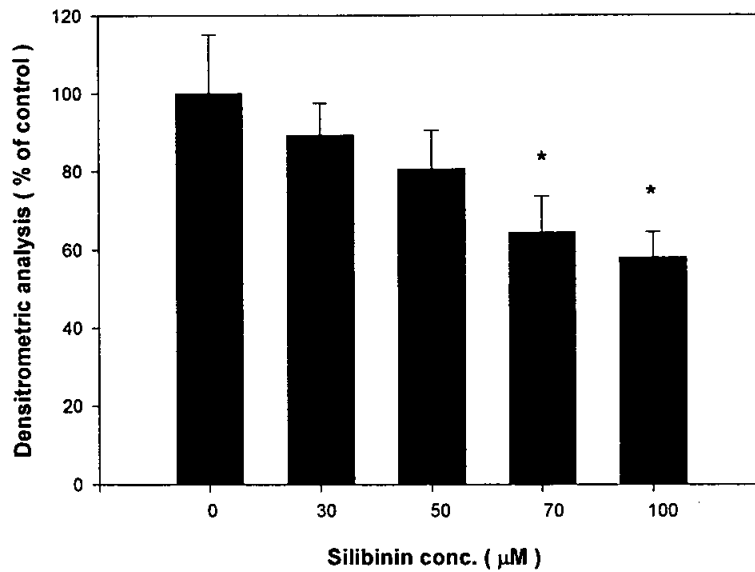
(B)



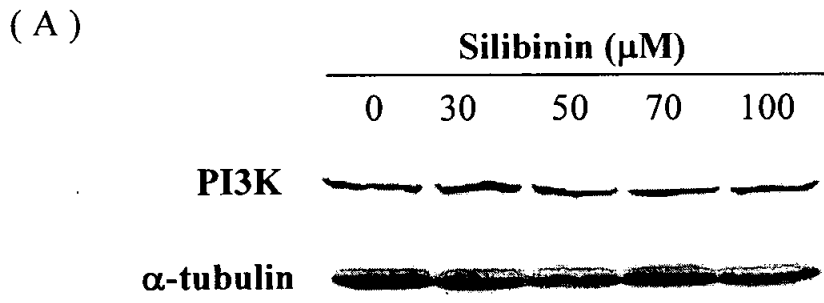
**Fig. 15. Silibinin inhibits constitutive activation of Akt in A549 cells.** Cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  of silibinin for 24 hr. SDS-PAGE and western blotting were the same as in Fig. 11. (A) Phosphorylation of Akt (upper panel), total levels of Akt (bottom panel). and (B) densitometric analysis for phospho-Akt. For densitometric analysis, blots were corrected for loading with the density of Akt blots. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*, P < 0.01



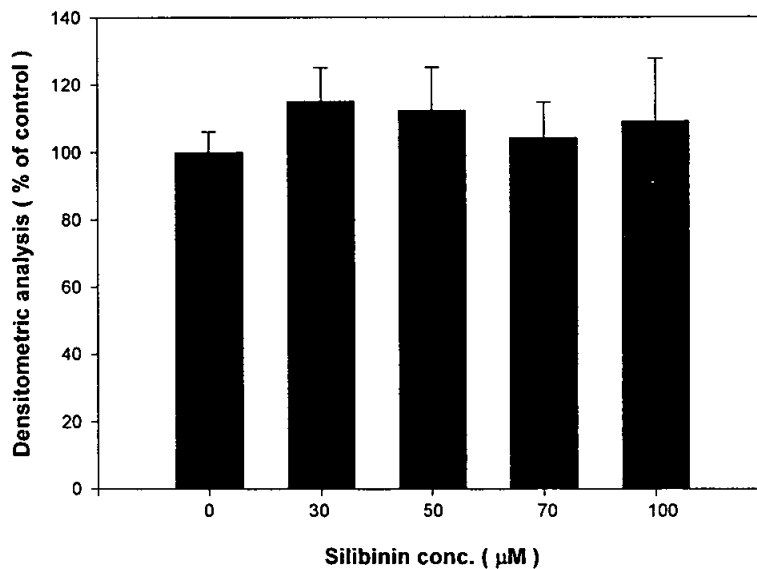
(B)



**Fig. 16. Silibinin inhibits constitutive activation of P38 in A549 cells.** Cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  of silibinin for 24 hr. Cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. (A) Phosphorylation of P38 (upper panel), total levels of P38 (bottom panel), and (B) densitometric analysis for phospho-P38. For densitometric analysis, blots were corrected for loading with the density of P38 blots. The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$

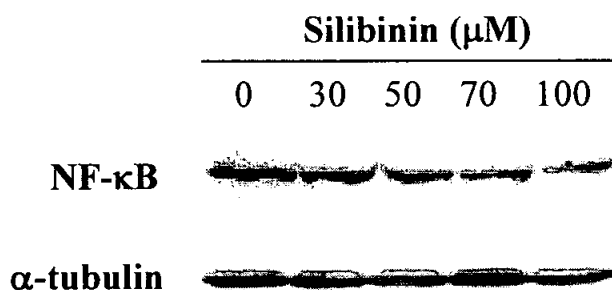


(B)



**Fig. 17. Effect of silibinin on A549 PI3K expression.** Cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100  $\mu\text{M}$  of silibinin for 24 hr. Cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. The membranes were probed with anti-PI3K antibody and then peroxidase-conjugate appropriate secondary antibody. Proteins were visualized with ECL detection system.(A) PI3K(upper panel),  $\alpha$ -tubulin (bottom panel) as an internal control.Treatment were as labeled in the figure. Densitometric analysis for PI3K and  $\alpha$ -tubulin (B) The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

(A)



(B)

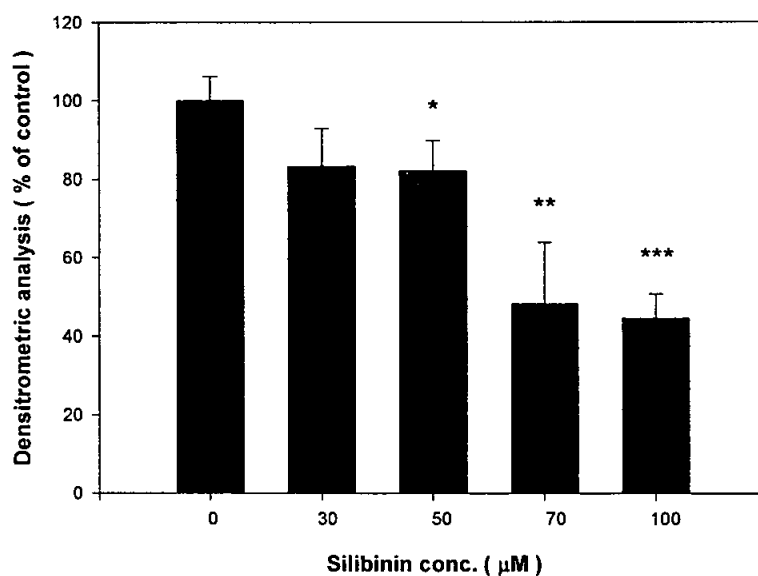


Fig. 18. **Silibinin inhibits constitutive activation of NF-κB in A549 cells.** Cells were treated with either 0, 30, 50, 70, 100 μM of silibinin for 24 hr. Cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. (A) NF-κB (upper panel), α-tubulin (bottom panel). Treatment were as labeled in the figure. Densitometric analysis for NF-κB and α-tubulin (B) blots was corrected for loading with the density of NF-κB blots. The results are expressed as mean ± SD of three independent experiments. \*, P < 0.05 ; \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001

### Cell invasion

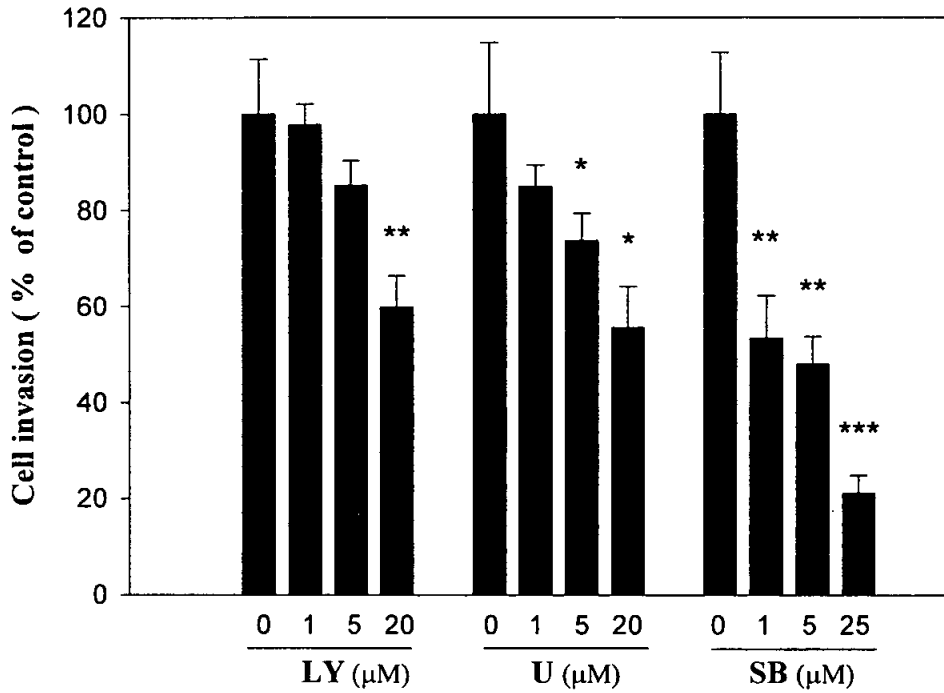


Fig. 19. **Effect of signaling inhibitors on A549 invasion** . A549 were treated with various concs signaling inhibitors : LY294002 , U0126 and SB203580 for 1 hr and Cell invasion ability were determined by modified Boyden Chambers. Filers (pore size, 8μm) were precoated with type IV collagen over night. Invasion ability of A549 were quantified by counting the number of cells that invaded to the underside of the membrane under microscopy (200x magnification). \*,P < 0.05 ; \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001

### Cell motility

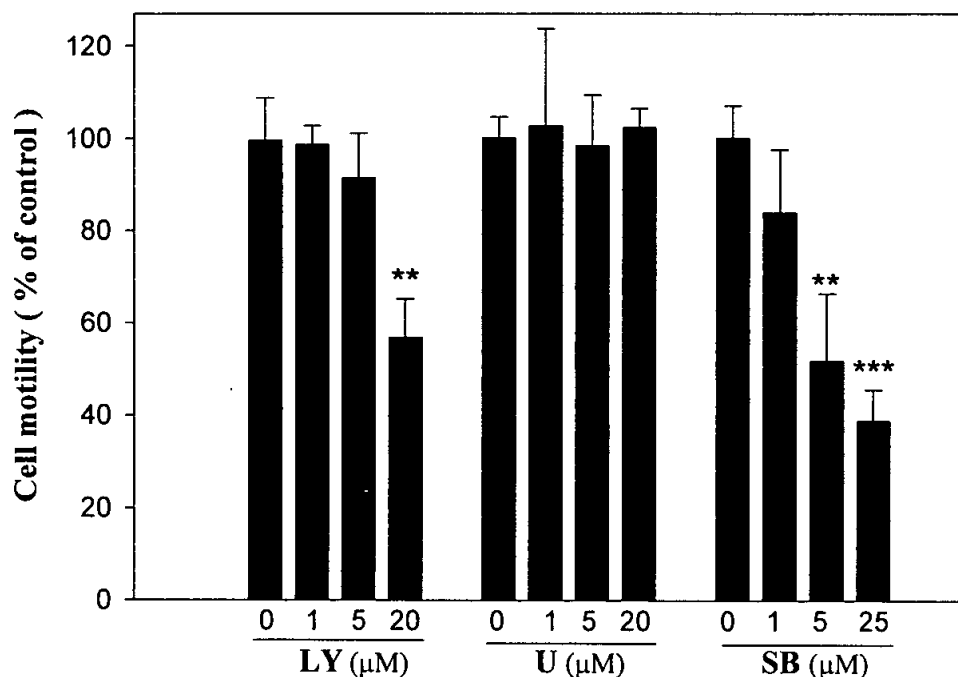


Fig. 20. **Effect of signaling inhibitors on A549 motility.** A549 were treated with various concs signaling inhibitors : LY294002 , U0126 and SB203580 for 1 hr and cell motility were determined by Boyden Chambers. Motility ability of A549 were quantified by counting the number of cells that migrated to the underside of the membrane under microscopy (200x magnification). \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001.



(A)



(B)

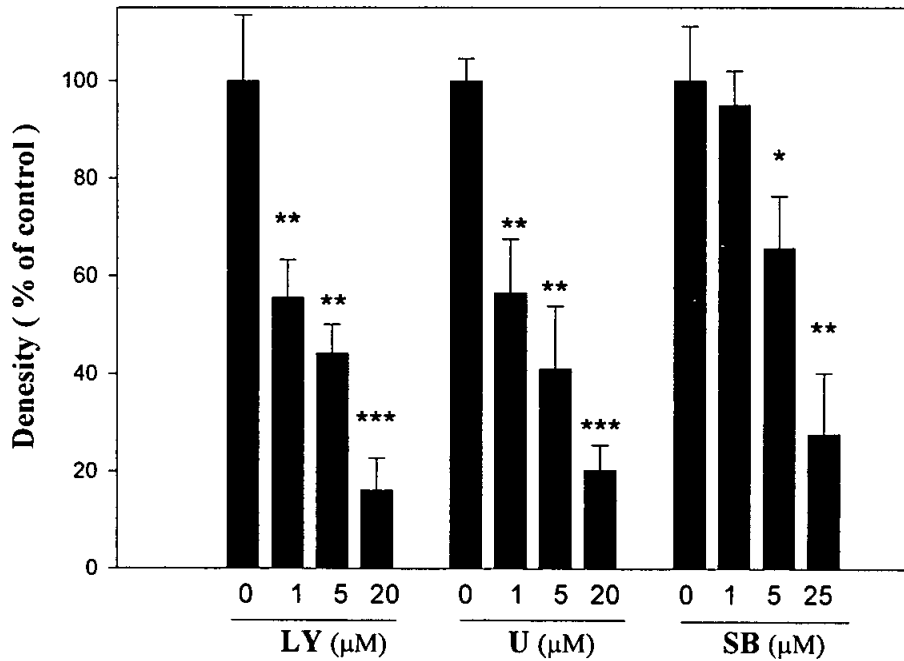
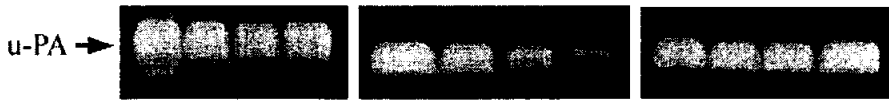


Fig. 21. **Effect of signaling inhibitors on MMP-2 expression.** A549 were treated with various concs signaling inhibitors : LY294002 · U0126 and SB203580 and conditioned medium were collected after 24 hr and MMP-2 activity were determined by gelatin zymography.(B) MMP-2 activity were quantified by densitometric analysis.The densitometric data shown are mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*, $P < 0.05$  ; \*\*,  $P < 0.01$  ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

(A)



(B)

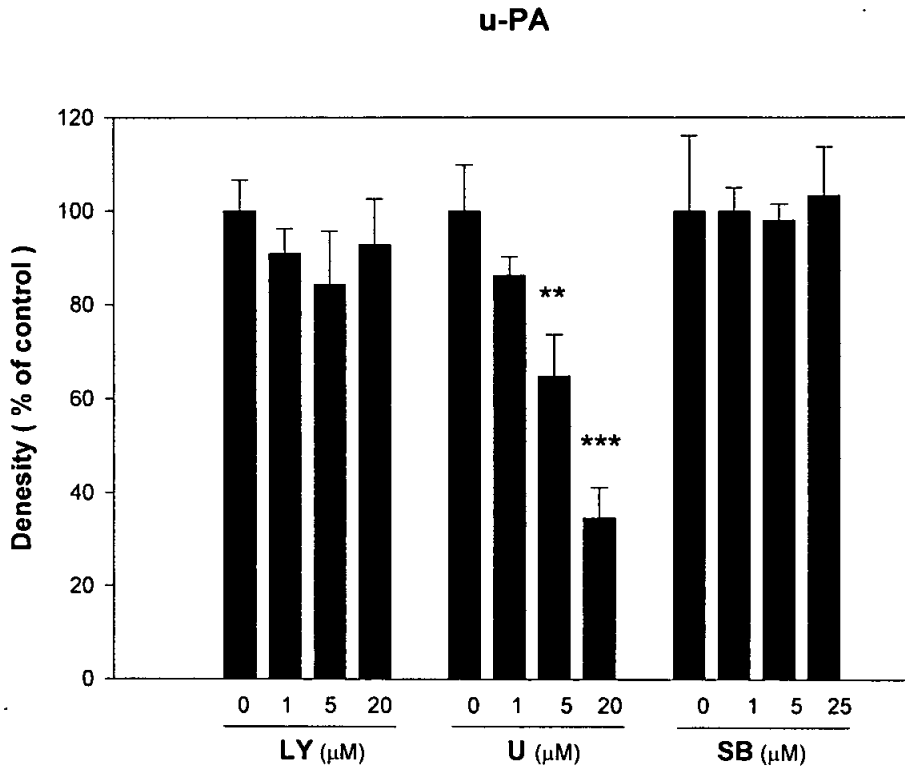


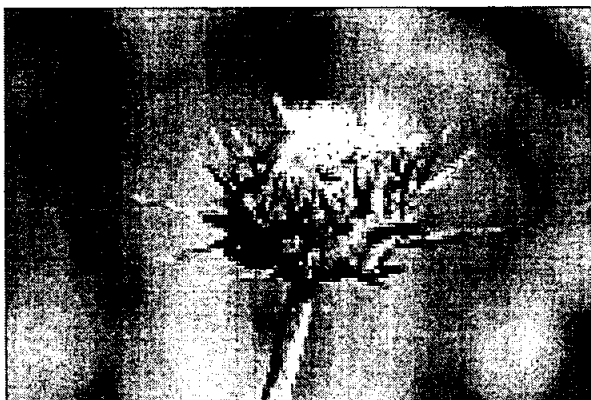
Fig. 22. **Effect of signaling inhibitors on A549 u-PA expression.** A549 were treated with various concs signaling inhibitors : LY294002 · U0126 and SB203580 and conditioned medium were collected after 24 hr and u-PA activity were determined by casein zymography.(B) u-PA activity were quantified by densitometric analysis.The densitometric data shown are mean ± SD of triplicate experiments. \*\*P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001.

拾、附圖表

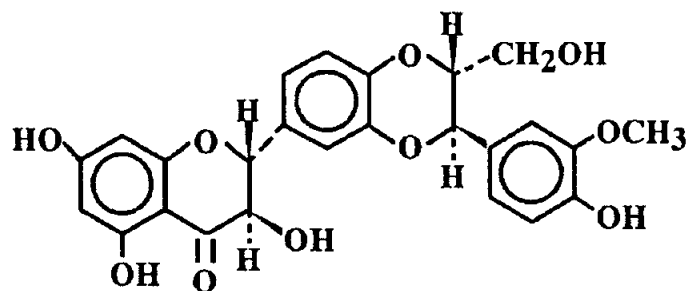


附圖一. Milk Thistle

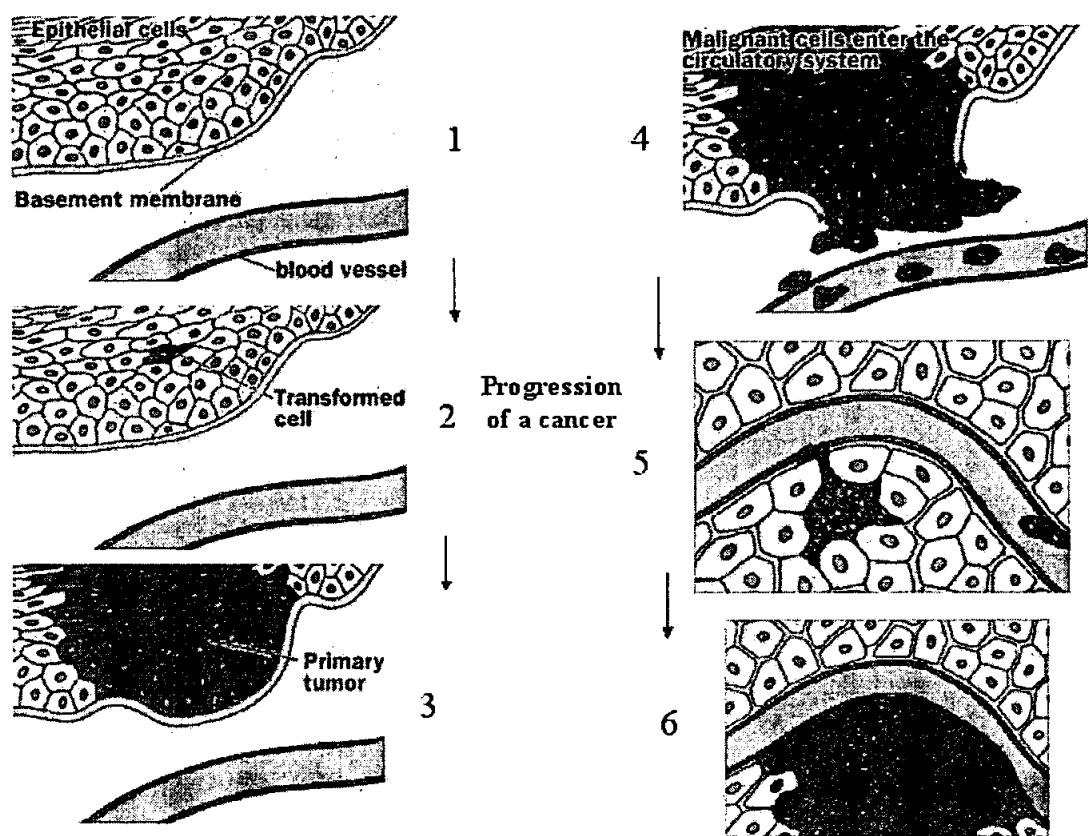
(A)



(B)



附圖二. (A) Milk thistle seed .(B) Chemical structure of silibinin



附圖三. 上皮細胞癌化致轉移侵入的過程

| Enzyme | Sequence 5'→3'   | Position (bp)          | Temp (°C) |
|--------|--|------------------------|-----------|
| MMP-2  | 5'-GGCCCTGTCACTCCTGAGAT-3'<br>5'-GGCATCCAGGTTATCGGGGA-3'                       | 1337-1356<br>2026-2007 | 62°C      |
| TIMP-2 | 5'-TTTATCTACACGGCCCCCTCCTCAG-3'<br>5'-ACGGGTCCTCGATGTCAAGAACTC-3'              | 480-504<br>739-717     | 63°C      |
| u-PA   | 5'-TTGCGGCCATCTACAGGAG-3'<br>5'-ACTGGGGATCGTTATACATC-3'                        | 654-672<br>1005-986    | 55°C      |
| t-PA   | 5'-AGGCTCATGTCAGACTGTACC-3<br>5'-CCTGAAATCAGACCAAGTCC-3                        | 1470-1490<br>1969-1950 | 55°C      |
| PAI-1  | 5'-GGATCCAGCCACTGGAAAGGCAACAT<br>G-3'<br>5'-GGATTCGTGCCGGACCACAAAGAGGA<br>A-3' | 1470-1490<br>1236-1216 | 55°C      |
| GADPH  | 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'<br>5'-AGCCTTCTCCATGGTTGGTGAAGAC-3'              | 94-126<br>399-375      | 65°C      |

附圖四. Primer

# 博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院) \_\_\_\_\_  
系所

\_\_\_\_\_ 組 91 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱: Silibinin 抑制癌細胞轉移能力之機制

同意    不同意    (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：\_\_\_\_\_，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意    不同意    (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名: 謝昂倫

研究生簽名: 陳露霞  
(親筆正楷)

學號: 9009006  
(務必填寫)

日期: 民國 92 年 8 月 9 日

---