

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

葉下珠與補骨脂抑制癌瘤細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之研究(第3年)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 98-2313-B-040-004-MY3  
執行期間：100年08月01日至101年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：陳霽霓  
共同主持人：謝易修、高紹軒  
計畫參與人員：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  
博士班研究生-兼任助理人員：林君香  
博士班研究生-兼任助理人員：林敬尹

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

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 101 年 10 月 05 日



移與誘導細胞走向凋亡之效果，或許可以應用在預防肺癌或乳癌的轉移或輔助癌症的治療上。同時，在動物實驗中也證實實葉下珠的萃取物可抑制肺癌細胞 LLC 轉移至肺部形成 colony 的能力。在乳癌細胞皮下種植癌細胞的實驗也可證實乳癌細胞的腫瘤大小也有顯著的抑制效果。

中文關鍵詞： 基質金屬蛋白酶； 胞漿酶原活化劑； 細胞增生； 轉移； 細胞凋亡

英文摘要： According to the announcement of Department of Health, cancer is the biggest death rate among the top ten causes in Taiwan. So far, the most important thing for finding new cancer drug is urgent. It has been reported that cancer cells are not able to go through the normal apoptosis pathway and has abnormal proliferation ability. Moreover, metastasis, the major cause of cancer death and various treatment strategies have targeted on preventing the occurrence of metastasis, is a multi-step process involving change of cytoskeleton, cell adhesion and proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM), essential to achieving cell motility. Chinese medicinal herbs have been used for therapeutic purposes in traditional and folk medicine for a long time. A recent report showed that many kinds of Chinese medicinal herbs have the antioxidant, anti-inflammation, anti-allergic and anti-tumor activeness. Here, we provided molecular evidence associated with the anti-metastatic effects of *Phyllanthus urinaria* L. extracts (PUE), by showing a marked inhibition on the invasion and migration of highly metastatic A549 and Lewis lung carcinoma (LLC) cells. To further investigate the precise involvement of PUE in tumor metastasis, A549 and LLC cells were treated with PUE at various concentrations and results from zymography and Western blotting showed that a PUE treatment may decrease the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), -9, urokinase plasminogen activator (u-PA) and their endogenous inhibitors, that is tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and plasminogen activator inhibitor-1, in a concentration-dependent manner. RT-PCR and MMP-2 promoter luciferase analysis revealed

that PUE inhibits the transcription of MMP-9 mRNA. We performed western blot to find that PUE inhibited p-focal adhesion kinase, p-paxillin and vimentin and enhanced E-cadherin and  $\alpha$ -catenin, indicating the anti-EMT effect of PUE in lung carcinoma cells. We also demonstrated that *Psoralea corylifolia* L. extracts (PCE) induced cell death, chromatin condensation, and DNA fragmentation on MDA-MB-231 and JC cells. Treatment with the extracts also caused an increase in the sub-G1 fraction of cell by flow cytometry assay. In addition, PCE induced caspase-3 activation and the release of cytochrome C . In conclusion, PCE induced the apoptosis of breast cancer cells in vitro, suggesting that it may have therapeutic potential against human breast cancer.

英文關鍵詞： MMP； u-PA； proliferation； metastasis； apoptosis

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
畫  期中進度報告

葉下珠與補骨脂抑制癌瘤細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2313-B-040-004-MY3

執行期間：98年 8月 1日至 101年 7月 31日

計畫主持人：陳霽霓 中山醫學大學 生化所

共同主持人：謝易修 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：林敬尹，林君香 中山醫學大學 生化所

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
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

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 101年 8月 13日

## 中英文摘要

根據衛生署公佈之台灣十大死亡原因顯示癌症仍為十大死因之首，居高不下，如何治療癌症病人，尋找更有效的抗癌藥物，是一個迫切的問題。目前有許多文獻指出，癌細胞與正常細胞差別在於無法進行一般細胞凋亡且具有異常的增生能力。而癌細胞的轉移往往是造成癌症病人病灶復發致死及最難根治的主要原因，其過程包括細胞骨架的改變、細胞的貼附、細胞外基質的降解及細胞轉移能力的改變。長期以來，中草藥被應用於傳統醫學及民俗療法中的各種治療，並且已有多種中草藥被確認其具有抗氧化、抗發炎、抗過敏及抗癌的活性，但是到目前為止，對於中草藥抑制癌細胞轉移、誘導癌細胞凋亡以及其中之詳細機轉的都還不是很清楚。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，處理葉下珠的萃取物(*phyllanthus urinaria* extracts; PUE)來探討對於癌細胞侵入能力的影響。A549，處理葉下珠的萃取物(*phyllanthus urinaria* extracts; PUE)來探討對於癌細胞侵入能力的影響。利用 HPLC-MASS 分離並分析 PUE 的組成及內含物發現 PUE 含有 gallic acid, methyl gallate, epicatechin, epigallocatechin-3-gallate, gallocatechin-3-gallate, rutin, epicatechin-3-gallate and naringin 等多酚類。藉由 modified Boyden chamber invasion assay，發現葉下珠萃取物具有抑制 A549 侵入的能力，而且不具有細胞毒性。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。因此我們再利用 RT-PCR 及 Western blot 發現葉下珠萃取物會抑制 A549 人類肺癌的蛋白酶，及改變蛋白酶抑制劑的表現。同時利用 MMP-2 promoter Luciferase assay 證實葉下珠可以抑制 MMP-2 promoter 的轉錄活性。除此之外，我們也發現葉下珠萃取物具有抑制 JNK 及 Akt 磷酸化。利用補骨脂之酒精萃取物觀察其抑制多種乳癌細胞生長的功效，證實補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia* L. extracts; PCE)隨著濃度的增加，可抑制乳癌細胞 (MDA-MB-231)的活細胞數並增加死亡的細胞數目，以 DAPI stain 與 DNA 斷裂分析方法，發現補骨脂萃取物會導致 chromatin condensation 與 DNA 斷裂並進一步促使癌細胞走向凋謝死亡。同時利用流式細胞儀分析方法證實 PCE 會增加細胞位於 sub-G1 的數目並且此反應具有濃度效應關係。利用西方墨點法去研究其誘導細胞凋亡相關機轉，發現其會增加

cleaved-caspase 3 的蛋白表現，同時會促進 cytochrome C 的釋放。綜合以上結果，葉下珠萃取物與補骨脂之酒精萃取物具有抑制腫瘤細胞侵襲轉移與誘導細胞走向凋亡之效果，或許可以應用在預防肺癌或乳癌的轉移或輔助癌症的治療上。同時，在動物實驗中也證實葉下珠的萃取物可抑制肺癌細胞 LLC 轉移至肺部形成 colony 的能力。在乳癌細胞皮下種植癌細胞的實驗也可證實乳癌細胞的腫瘤大小也有顯著的抑制效果。

**關鍵詞：** 基質金屬蛋白酶；胞漿酶原活化劑；細胞增生；轉移；細胞凋亡

According to the announcement of Department of Health, cancer is the biggest death rate among the top ten causes in Taiwan. So far, the most important thing for finding new cancer drug is urgent. It has been reported that cancer cells are not able to go through the normal apoptosis pathway and has abnormal proliferation ability. Moreover, metastasis, the major cause of cancer death and various treatment strategies have targeted on preventing the occurrence of metastasis, is a multi-step process involving change of cytoskeleton, cell adhesion and proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM), essential to achieving cell motility. Chinese medicinal herbs have been used for therapeutic purposes in traditional and folk medicine for a long time. A recent report showed that many kinds of Chinese medicinal herbs have the antioxidant, anti-inflammation, anti-allergic and anti-tumor activeness. However, the effects and detailed mechanisms of Chinese medicinal herbs on cancer cell metastasis and inducing cell apoptosis were still unclear. Here, we provided molecular evidence associated with the anti-metastatic effects of *Phyllanthus urinaria* L. extracts (PUE), which contained polyphenols including gallic acid, methyl gallate, epicatechin, epigallocatechin-3-gallate, galocatechin-3-gallate, rutin, epicatechin-3-gallate and naringin, by showing a marked inhibition on the invasion ( $p<0.001$ ) and migration ( $p<0.001$ ) of highly metastatic A549 and Lewis lung carcinoma (LLC) cells. To further investigate the precise involvement of PUE in tumor metastasis, A549 and LLC cells were treated with PUE at various concentrations and results from zymography and Western blotting showed that a PUE treatment may decrease the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2;  $p<0.001$ ), -9 ( $p<0.001$ ), urokinase plasminogen activator (u-PA;  $p<0.001$ ) and their endogenous inhibitors, that is tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and plasminogen activator inhibitor-1, in

a concentration-dependent manner. RT-PCR and MMP-2 promoter luciferase analysis ( $p < 0.001$ ) revealed that PUE inhibits the transcription of MMP-9 mRNA. We performed western blot to find that PUE inhibited p-focal adhesion kinase (p-FAK), p-paxillin, fibronectin, N-cadherin, and vimentin and enhanced E-cadherin and  $\alpha$ -catenin, indicating the anti-EMT effect of PUE in lung carcinoma cells. We also demonstrated that *Psoralea corylifolia* L. extracts (PCE) induced cell death, chromatin condensation, and DNA fragmentation on MDA-MB-231 and JC cells. Treatment with the extracts also caused an increase in the sub-G1 fraction of cell by flow cytometry assay. In addition, PCE induced caspase-3 activation and the release of cytochrome C . In conclusion, PCE induced the apoptosis of breast cancer cells *in vitro*, suggesting that it may have therapeutic potential against human breast cancer.

**Keyword :** MMP; u-PA; proliferation; metastasis; apoptosis



## 報告內容

### 一、前言及研究目的

根據衛生署公佈之台灣十大死亡原因顯示癌症仍為十大死因之首，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原因，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。癌症的形成是透過許多複雜且多重的過程，其中形成的原因雖然被了解，但治療的效果仍然有限，良性腫瘤還可經由外科手術切除，但是惡性腫瘤治療方式多是以放射線療法與化學療法，且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 & Ben-Ze'ev, 2007; Jeanes, Gottardi & Yap, 2008; Nahari et al., 2007; Song, Bai, Yang, Gabrielson, Chan & Zhang, 2007; Sossey-Alaoui et al., 2007; Tommasi et al., 2007; Yamaguchi & Condeelis, 2007; Yanamoto, Kawasaki, Yamada, Yoshitomi, Yoshida & Mizuno, 2008; Yu, Itokawa, Zhu, Syam, Seth & Insogna, 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, Vrhovec, Svetic & Cufur, 2002; Duffy, 2002; Evans & Sloan-Stakleff, 1998; Foekens, Ries, Look, Gippner-Steppert, Klijn & Jochum, 2003; Hildenbrand & Arens, 2004; Kobayashi, Suzuki, Tanaka, Kanayama & Terao, 2003; Robert, Bolon, Gazzeri, Veyrenc, Brambilla & Brambilla, 1999; Suzuki et al., 2003)、metalloproteinase (MMPs)、cathepsins (Bao, Yeh & Lee, 2006; Gopal, Rehman, Chadha, Qiu & Colella, 2006; Hashimoto et al., 2006; Mohamed & 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 & Patel, 2005a; Chakrabarti & Patel, 2005b; Chakrabarti, Zee & Patel, 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 & Singh, 2008; Finney, Vogt, Fukai & Glesne, 2008; Gretschel et al., 2008; Legg, Herbert, Clissold & Bicknell, 2008; Ma et al., 2008; Spannuth, Sood & Coleman, 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、細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡一詞最早是在1972年由病理學家John Kerr所提出(Kerr, Wyllie & Currie, 1972)，直至1995年後才被廣泛研究。細胞凋亡是指為維持細胞內環境穩定，由基因控制細胞自主性並且有順序式的死亡。細胞凋亡與細胞壞死不同，細胞凋亡不是一件被動的過程，而是主動過程，涉及一系列基因的活化、表達以及調控等作用，它並不是病理條件下自體損傷的一種現象，而是為更好地適應生存環境而主動爭取的一種死亡過程(Radovic, Cucic & Altarac, 2008)。

發生細胞凋亡的細胞，細胞膜發生皺縮 (shrinkage)、凹陷，染色質變得緻密 (condensation)，最後斷裂成碎片；繼而細胞膜將細胞質分割包圍，內含細胞質的斷片，形成了多個膜結構完整的泡狀小體，就稱為凋亡小體 (apoptotic body)。細胞在發生凋亡過程中細胞質濃縮，細胞骨架蛋白被蛋白酶破壞。故具有4個重要外在特徵：(1)細胞質皺縮(2)染色體濃縮 (chromatin condensation) (3)DNA片斷化 (DNA fragmentation) 形成約185 bp的核小體(4)凋亡小體的產生。細胞在發生凋亡過程中它的特性是細胞膜不會破裂，細胞內容物不會流出，因為細胞質濃縮，細胞骨架蛋白被蛋白酶破壞。但粒線體、溶酶體等主要胞器的結構和功能則維持到凋亡的晚期。內質網在早期還有合成蛋白質的功能，後來擴張成泡狀，與細胞膜接觸融合，形成胞質氣泡。細胞膜則始終保持完整，細胞內容物無溢出，因此不會引起發炎反應或危害到周圍組織。胞核染色體的濃集 (chromatin condensation)、細胞核內DNA裂解 (DNA fragmentation) 形成約185 bp的核小體、細胞皺縮裂解形成凋亡小體 (apoptotic body) 等(Brietzke & Kapczinski, 2008; Radovic et al., 2008)。

## 二、研究方法

### 1. cell migration 分析 (1)

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 ( $1.5 \times 10^4$  cell/well -  $2 \times 10^4$  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  $400 \times$  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,  $37^\circ\text{C}$  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 (4)

試驗細胞經 PBS 洗淨, 以刮杓自 culture dish 刮離, 接著加入適量緩衝液 A (20mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.5mM EGTA、0.3M sucrose、2mM PMSF、10 $\mu\text{g}$ /ml leupeptin、25 $\mu\text{g}$ /ml soybean trypsin inhibitor typ I-S 和 50mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.5), 研磨後將所得萃取液經  $4^\circ\text{C}$  下離心(800g)10min 移除細胞碎片後, 再將上清液經超高速離心在  $4^\circ\text{C}$  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  $-80^\circ\text{C}$  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  $4^\circ\text{C}$  下離心(40Krpm) 1 hr, 取上清液即為微粒部份, 分裝於  $-80^\circ\text{C}$  貯存。

### 5. gelatin-zymography (gelatinase 活性測試) (6)

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 $\mu\text{l}$  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, 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  $37^\circ\text{C}$  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。

### 6. casein-zymography (u-PA 及 t-PA 活性測試) (8)

首先製備 10 % SDS-PAGE 電泳膠片, 並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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  $\text{H}_2\text{O}$ ), 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  $\text{CaCl}_2$ , 0.01%  $\text{NaN}_3$ ), 於  $37^\circ\text{C}$  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。

### 7. Western blotting 分析 (10)

首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片, 置於電泳槽中, 並加入電泳緩衝液, 取 16 $\mu\text{l}$  sample (蛋白總量 20 $\mu\text{g}$ ), 加入 4 $\mu\text{l}$  loading buffer, 將 sample denature ( $95^\circ\text{C}$ , 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  $4^\circ\text{C}$  下, 以 100V 進行轉漬 1 小時之後, 取出 NC paper 加入 blocking buffer, 在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer, 在  $4^\circ\text{C}$  下反應 overnight, 之後以 washing buffer (TBS+0.05%

Tween 20)清洗三次, 每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer, 於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗三次, 每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應(或以 ECL 冷光系統紀錄), 待 NC paper 上有明顯的 band 出現, 即以水終止反應並晾乾, 並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp)量化結果。

#### 8. total RNA 及 mRNA 分離 (11)

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。

#### 8. RT-PCR 分析 (12)

取 15 $\mu$ g mRNA 利用 oligo-d(T)<sub>15</sub> 為 primer (或「random primer」)以 MMLV-RTase (200units)在 20 $\mu$ l 反應溶液中(50mM Tris-HCl, pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 20units RNasin)進行 cDNA 合成; 取 5 $\mu$ l cDNA 至 PCR 反應溶液中(最終為 50 $\mu$ l)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. 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

本實驗中所採用的葉下珠, 分別以田間的藥用植物或購自各地的藥材市場, 經專家鑑定後才進行處理。各藥材經洗滌、蔭乾後, 取 100 g 葉下珠以 50%酒精溶液萃取, 再進行過濾、減壓濃縮及冷凍乾燥。最後與原來的重量相比較, 計算出回收率。使用 50% DMSO 配製紫花地丁與葉下珠萃取物(50  $\mu$ g/mL), 萃取液以高效能液相層析儀(Waters 600 pump)進行分析。分別與數種不同之標準品作比對分析結果如 Fig. 1 與 Table 1。利用 HPLC-MASS 分離並分析 PUE 的組成及內含物發現 PUE 含有 gallic acid, methyl gallate, epicatechin, epigallocatechin-3-gallate, gallic acid, methyl gallate, rutin, epicatechin-3-gallate and naringin 等多酚類。以不同濃度的葉下珠萃取物(0、10、25、50、75、100  $\mu$ g/mL), 處理 A549 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 與 MRC-5 細胞在葉下珠萃取物的處理之下並不會影響細胞的存活率。但在相同的濃度處理 LLC 細胞時, 卻發現會抑制細胞的存活率(Fig. 2)。利用 modified Boyden chamber coating type IV collagen 的分析。結果顯示, 其侵入能力會隨著葉下珠萃取物濃度增加而降低, 代表葉下珠萃取物可以去抑制 A549 細胞的侵入能力。再利用相同的濃度處理 LLC 細胞, 其結果與 A549 相同。另外, 也利用了 Boyden chamber motility assay 去觀察葉下珠萃取物對於 A549 及 LLC 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. 3)。

將  $3 \times 10^4$ /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), 處理不同濃度的葉下珠萃取物 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, 處理過葉下珠萃取物的細胞分泌 MMP-2 的量確實有降低的現象(Fig. 4A)。再利用相同的濃度處理肺癌 LLC 細胞分析其 MMP-9 的表現, 結果發現 MMP-9 也有降低的現

象(Fig. 4B)。以 casein zymography 來分析 u-PA 的表現，結果發現不論是 A549 或 LLC 細胞，在處理不同濃度的葉下珠萃取物 24 小時後，細胞分泌出來的 u-PA 都會隨著葉下珠萃取物的濃度增加而降低(Fig. 4C&4D)。以 Western blot 分析，結果發現 TIMP-2 及 PAI-1 蛋白的表現量，都是隨著濃度增加而減少。再利用相同的濃度處理 LLC 細胞，結果發現，其 TIMP-2、PAI-1 蛋白的表現量也會隨著處理的濃度而減少(Fig. 4E)。

利用半定量 RT-PCR 的分析方法，並以 GADPH 表現量作為 internal control，A549 細胞在不同濃度的葉下珠萃取物的處理下，MMP-2 及 u-PA mRNA 的表現量會隨著濃度的增加而遞減，另外發現 MMP-2 的抑制劑 TIMP-2 及 u-PA 的抑制劑 PAI-1 其 mRNA 的表現量是隨著濃度增加而減少(Fig. 4F)。同時利用 MMP-2 promoter Luciferase assay 證實葉下珠可以抑制 MMP-2 promoter 的轉錄活性(Fig. 4G)。

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 JNK 及 Akt 蛋白的磷酸化會隨著葉下珠萃取物的濃度提高而減少，而 p38 及 ERK1/2 蛋白的磷酸化則不受到影響(Fig. 5)。將 A549 處理不同濃度的葉下珠萃取物 (0、10、25、50、75、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 24 小時後，萃取其核蛋白，以 Western blot 分析 NF- $\kappa\text{B}$  (p65)與 AP-1 的次單元：c-Jun 與 c-Fos，發現 NF- $\kappa\text{B}$  (p65)、c-Jun 與 c-Fos 的蛋白量皆隨著葉下珠萃取物的濃度增加而下降(Fig. 6C)。以 EMSA 方法分析 NF- $\kappa\text{B}$  和 AP-1 與 DNA 結合的能力，其結果顯示，NF- $\kappa\text{B}$  與 DNA 結合的能力隨著處理葉下珠萃取物濃度的增加而逐漸受到抑制(Fig. 6A&6B)。

利用皮下種植 LLC 細胞於 C57BL/6 老鼠並餵食葉下珠萃取物(0.5 g/kg/ day of body weight)於 29 天後犧牲老鼠，實驗結果證實葉下珠萃取物可抑制癌細胞轉移至肺部的能力(Fig 7A)。每四天測量一次於皮下之腫瘤大小，結果證實餵食葉下珠之組別其腫瘤大小(Fig 7B)與腫瘤重量(Fig 7C)都有顯著下降，同時對於動物的體重並沒有顯著的影響(Fig 7D)。將位於皮下之腫瘤以西方墨點法檢測再處理 PUE 的組別其 MMP-9 的表現量也有顯著的抑制效果(Fig 8)。

同時將 PUE 的萃取物將 P1 與 P2 的萃取物分離出來並利用 Mass 分析(Fig 9)。

收集其 LLC cell lysates，以 anti-phospho-Akt 及 anti-Akt 的抗體去進行 Western blot 分析。實驗結果發現 Akt 蛋白的磷酸化會隨著葉下珠萃取物的濃度提高而減少 (Fig. 10)。收集其 A549 cell lysates，以 anti-phospho-JNK1/2、anti-JNK1/2 的抗體去進行 Western blot 分析。實驗結果發現 JNK1/2 蛋白的磷酸化會隨著葉下珠萃取物的濃度提高而減少 (Fig. 11)。

將 A549 細胞 subculture 到 6 cm 培養皿中培養 16 小時後，先分別加入 JNK 的專一性磷酸化抑制劑：SP600125 (10、20  $\mu\text{M}$ )與 PI3K 專一性抑制劑：LY294002 (10、20  $\mu\text{M}$ ) 1 小時，再加入葉下珠萃取物(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 24 小時後，利用 modified Boyden chamber coating type IV collagen 的方法分析細胞移動及侵襲的能力。結果顯示，在不導致細胞死亡的情況下，當 JNK 與 PI3K/Akt 這兩條路徑被抑制後，A549 細胞侵入的能力皆受到抑制。而當加入葉下珠萃取物(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )配合 LY294002 (10、20  $\mu\text{M}$ )時，我們發現比單獨處理 10  $\mu\text{M}$  與 20  $\mu\text{M}$  的 LY294002 時有更強的抑制效果。且此抑制現象較葉下珠萃取物配合 SP600125 (10、20  $\mu\text{M}$ ) 顯著(Fig.12 A&B)。

本實驗中所採用的補骨脂(*Psoralea corylifolia* L. extracts; PCE)，分別以田間的藥用植物或購自各地的藥材市場，經專家鑑定後才進行處理。各藥材經洗滌、蔭乾後，取 100 g 補骨脂與葉下珠以 50%酒精溶液萃取，再進行過濾、減壓濃縮及冷凍乾燥。最後與原來的重量相比較，計算出回收率(Table 2)。利用不同濃度的補骨脂萃取物(0、10、25、50、75、100 µg/mL)，處理乳癌細胞株(MDA-MB-231及 JC)24 及 48 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率(Fig. 13)隨著 PCE 濃度增加細胞存活率有顯著下降。用不同濃度(0, 25, 50, 75, 100 µg/mL)的 PCE 處理人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)，經過 24, 48 hours 的加藥處理後，以 trypan blue exclusion assay 分析其(Fig. 14A)存活細胞數回隨濃度增加而下降以及(Fig. 14B)細胞死亡數目卻會隨濃度增加而有明顯增加。同時用不同濃度的 PCE 處理老鼠乳癌細胞株(JC)，經過 24, 48 hours 的加藥處理後，以 trypan blue exclusion assay 分析其(Fig. 14C)存活細胞數以及(Fig. 14D)細胞死亡數也有相同的趨勢。以 flow-cytometry 分析 MDA-MB-231(Fig. 15A)及 JC(Fig. 15B)細胞週期的變化，隨著 PCE 濃度增加位於 sub-G1 的細胞數目也有顯著增加，以 DAPI stain 與 DNA 斷裂分析方法，發現補骨脂萃取物會導致乳癌細胞株 MDA-MB-231(Fig. 16A)與 JC (Fig. 16B) chromatin condensation。利用 DNA 斷裂分析方法，結果證實 PUC 會導致 MDA-MB-231 細胞株(Fig. 17A)與 JC 細胞(Fig. 17B)有 DNA 斷裂的情形產生並進一步促使癌細胞走向凋謝死亡，以西方墨點法探討相關機制，隨著 PCE 濃度增加其會增加 cleaved-caspase 3 的蛋白表現(Fig. 18A)，同時會促進 cytochrome C 的釋放(Fig. 18B)。將 JC 細胞打到老鼠皮下並觀察腫瘤大小，證實補骨脂酒精萃取物可抑制腫瘤細胞的大小(Fig. 19)。

#### 四、計畫成果及自評

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析葉下珠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，目前葉下珠萃取物抑制肺癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理發表，並以投稿至SCI期刊Integrative Cancer Therapy並在2011年時被接受。Tseng HH, Chen PN<sup>#</sup>, Kuo WH, Wang JW, Chu SC, and Hsieh YS. (2011 Dec5) Antimetastatic Potentials of *Phyllanthus urinaria* L. on A549 and LLC Lung Cancer Cells via Repression of Matrix-degrading Proteases. Integrative Cancer Therapies. (in press) (Impact factor: 2.136; Ranking: 6/22; Category: INTEGRATIVE & COMPLEMENTARY MEDICINE)。補骨脂萃取物抑制乳癌細胞增生及誘導凋亡部份也正在積極進行中，期望日後可以增加臨床診斷之應用性上述之實驗結果，目前補骨脂萃取物抑制乳癌的部份已積極整理準備發表，其他細胞株的相關實驗也正在進行及整理中。

#### 參考文獻

- Bao, B. Y., Yeh, S. D., & Lee, Y. F. (2006). 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis*, 27(1), 32-42.
- Bhat, T. A., & Singh, R. P. (2008). Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol*, 46(4), 1334-1345.
- Borstnar, S., Vrhovec, I., Svetic, B., & Cufer, T. (2002). Prognostic value of the urokinase-type plasminogen activator, and its inhibitors and receptor in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*, 3(2), 138-146.
- Brietzke, E., & Kapczinski, F. (2008). TNF-alpha as a molecular target in bipolar

disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(6), 1355-1361.

Chakrabarti, S., & Patel, K. D. (2005a). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*, 31(6), 599-621.

Chakrabarti, S., & Patel, K. D. (2005b). Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 78(1), 279-288.

Chakrabarti, S., Zee, J. M., & 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(1), 214-222.

Cuiyan, Z., Jie, H., Fang, Z., Kezhi, Z., Junting, W., Susheng, S., Xiaoli, F., Ning, L., Xinhua, M., Zhaoli, C., Kang, S., Bin, Q., Baozhong, L., Sheng, C., & Meihua, X. (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(3), 335-342.

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(8), 1194-1197.

Evans, D. M., & 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(5-6), 252-260.

Finney, L., Vogt, S., Fukai, T., & 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., & Jochum, M. (2003). The prognostic value of polymorphonuclear leukocyte elastase in patients with primary breast cancer. *Cancer Res*, 63(2), 337-341.

Gavert, N., & Ben-Ze'ev, A. (2007). beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, 102(4), 820-828.

Gopal, P., Rehman, R. U., Chadha, K. S., Qiu, M., & Colella, R. (2006). Matrigel influences morphology and cathepsin B distribution of prostate cancer PC3 cells. *Oncol Rep*, 16(2), 313-320.

Gretschel, S., Astrosini, C., Vieth, M., Jons, T., Tomov, T., Hocker, M., Schlag, P. M., & Kemmner, W. (2008). Markers of tumour angiogenesis and tumour cells in bone marrow in gastric cancer patients. *Eur J Surg Oncol*, 34(6), 642-647.

Hashimoto, Y., Kondo, C., Kojima, T., Nagata, H., Moriyama, A., Hayakawa, T., & Katunuma, N. (2006). Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 21(3), 217-224.

Hildenbrand, R., & 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(3), 564-571.

Jeanes, A., Gottardi, C. J., & Yap, A. S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27(55), 6920-6929.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.

Kobayashi, H., Suzuki, M., Tanaka, Y., Kanayama, N., & 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(10), 7790-7799.

Legg, J. A., Herbert, J. M., Clissold, P., & Bicknell, R. (2008). Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis*, 11(1), 13-21.

- Ma, J., Sawai, H., Matsuo, Y., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Wakasugi, T., Funahashi, H., Sato, M., Okada, Y., Takeyama, H., & Manabe, T. (2008). Interleukin-1 $\alpha$  enhances angiogenesis and is associated with liver metastatic potential in human gastric cancer cell lines. *J Surg Res*, 148(2), 197-204.
- Mohamed, M. M., & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(10), 764-775.
- Nahari, D., Satchi-Fainaro, R., Chen, M., Mitchell, I., Task, L. B., Liu, Z., Kihneman, J., Carroll, A. B., Terada, L. S., & Nwariaku, F. E. (2007). Tumor cytotoxicity and endothelial Rac inhibition induced by TNP-470 in anaplastic thyroid cancer. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1329-1337.
- Radovic, N., Cucic, S., & Altarac, S. (2008). [Molecular aspects of apoptosis]. *Acta Med Croatica*, 62(3), 249-256.
- Robert, C., Bolon, I., Gazzeri, S., Veyrenc, S., Brambilla, C., & Brambilla, E. (1999). Expression of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in lung cancer and their role in tumor progression. *Clin Cancer Res*, 5(8), 2094-2102.
- Song, J., Bai, J., Yang, W., Gabrielson, E. W., Chan, D. W., & Zhang, Z. (2007). Expression and clinicopathological significance of oestrogen-responsive ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in breast cancer. *Histopathology*, 51(1), 40-53.
- Sossey-Alaoui, K., Safina, A., Li, X., Vaughan, M. M., Hicks, D. G., Bakin, A. V., & Cowell, J. K. (2007). Down-regulation of WAVE3, a metastasis promoter gene, inhibits invasion and metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol*, 170(6), 2112-2121.
- Spannuth, W. A., Sood, A. K., & Coleman, R. L. (2008). Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*, 5(4), 194-204.
- Suzuki, M., Kobayashi, H., Tanaka, Y., Hirashima, Y., Kanayama, N., Takei, Y., Saga, Y., Itoh, H., & Terao, T. (2003). Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin. *Int J Cancer*, 104(3), 289-302.
- Tommasi, S., Mangia, A., Lacalamita, R., Bellizzi, A., Fedele, V., Chiriatti, A., Thomssen, C., Kendzierski, N., Latorre, A., Lorusso, V., Schittulli, F., Zito, F., Kavallaris, M., & Paradiso, A. (2007). Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins. *Int J Cancer*, 120(10), 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(2), 181-188.
- Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B. S., Almholt, K., Bogyo, M., Peters, C., & Reinheckel, T. (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res*, 66(10), 5242-5250.
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, 1773(5), 642-652.
- Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yamada, S. I., Yoshitomi, I., Yoshida, H., & 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., & Insogna, K. (2007). Breast cancer-associated gene 3 (BCA3) is a novel Rac1-interacting protein. *J Bone Miner Res*, 22(4), 628-637.

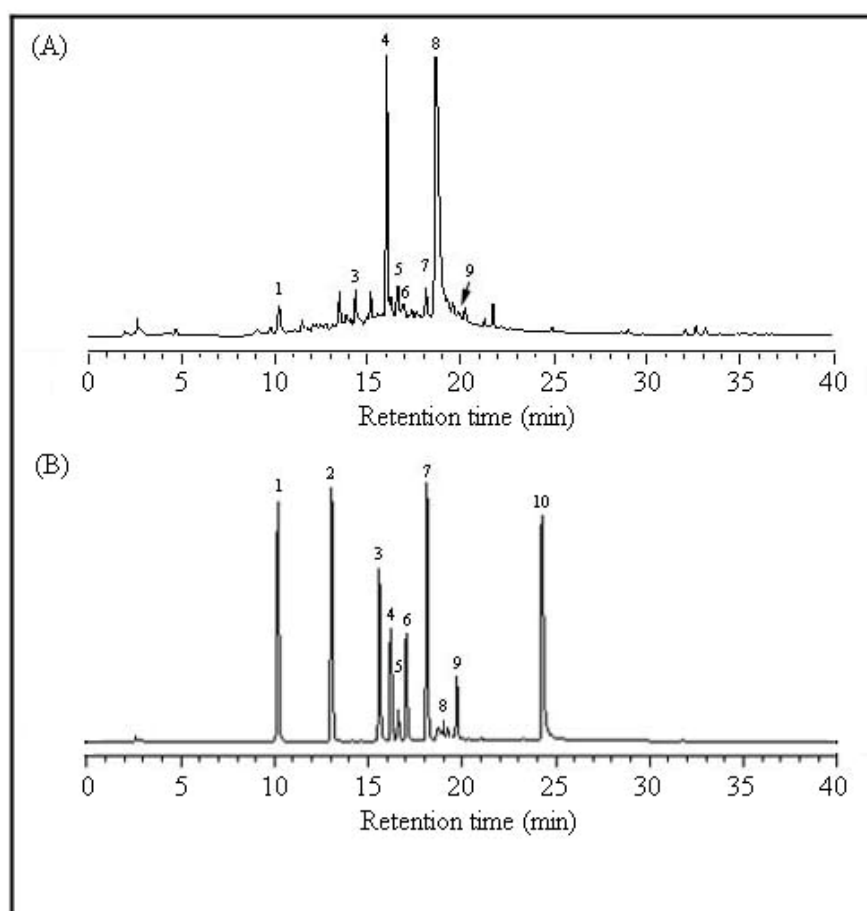


## 附表及附圖

**Table 1. Characterization of Phenolic Compounds of PUE**

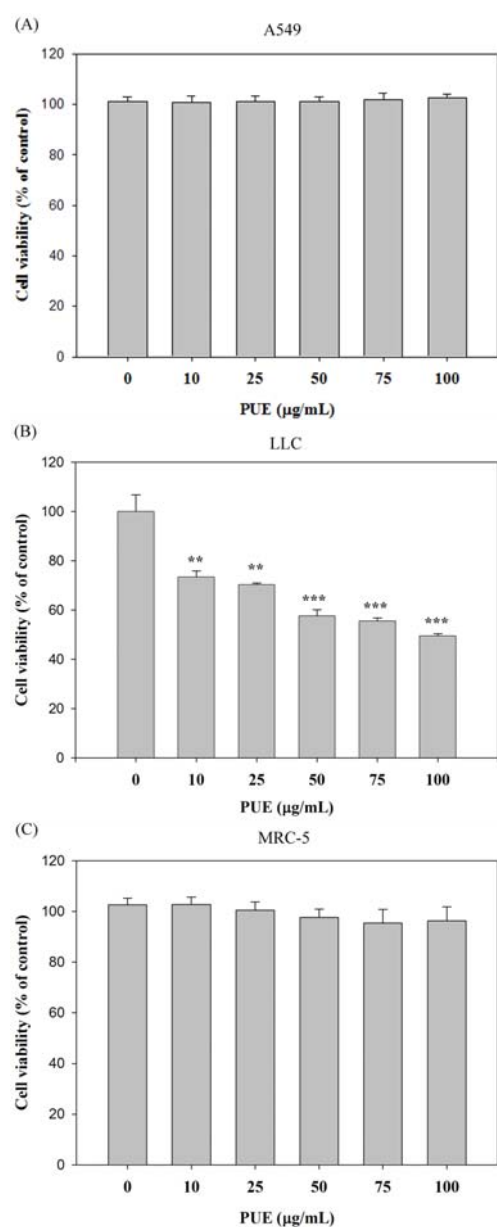
| peak no. | retention time (min) | assigned identity <sup>a</sup> |
|----------|----------------------|--------------------------------|
| 1        | 10.186               | gallic acid                    |
| 3        | 15.159               | methyl gallate                 |
| 4        | 16.019               | EC                             |
| 5        | 16.579               | EGCG                           |
| 6        | 16.907               | GCG                            |
| 7        | 18.128               | rutin                          |
| 8        | 18.912               | ECG                            |
| 9        | 19.714               | naringin                       |

<sup>a</sup> EC, epicatechin; EGCG, Epigallocatechin-3-gallate; GCG, galocatechin-3-gallate; ECG, epicatechin-3-gallate



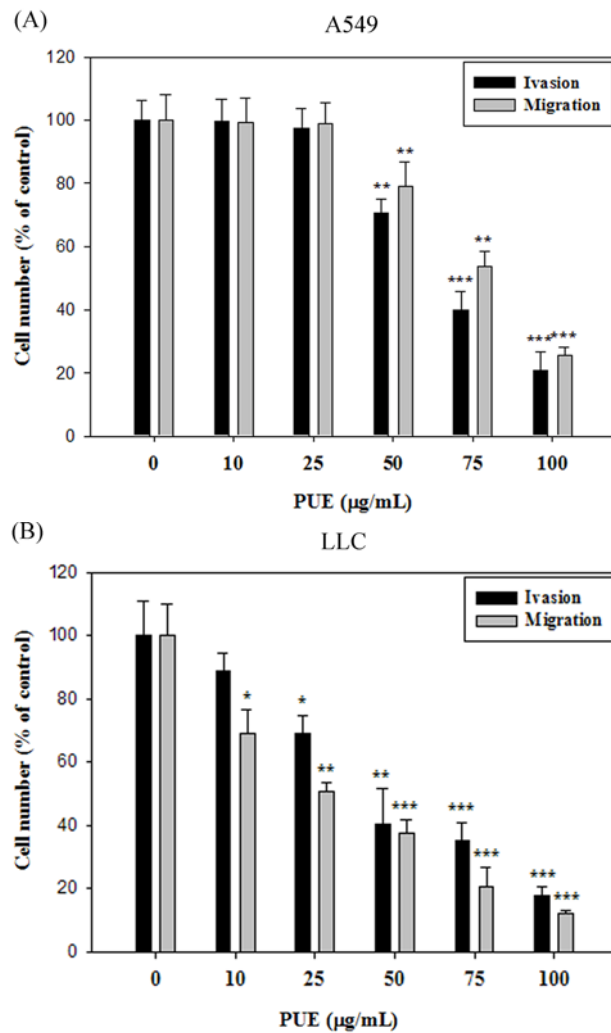
**Figure 1.** The chemical profile of PUE was analyzed by HPLC-mass spectrometry.

(A) HPLC chromatogram of 10 kinds of standard compound. Peaks: 1, 1  $\mu\text{g}$  of gallic acid; 2, 1  $\mu\text{g}$  of protocatechuic acid; 3, 1  $\mu\text{g}$  of methyl gallate; 4, 1  $\mu\text{g}$  of EC; 5, 1  $\mu\text{g}$  of EGCG; 6, 1  $\mu\text{g}$  of GCG; 7, 1  $\mu\text{g}$  of rutin; 8, 0.5  $\mu\text{g}$  of ECG; 9, 1.5  $\mu\text{g}$  of naringin; 10, 1  $\mu\text{g}$  of quercetin. (B) Chromatographic patterns from HPLC analysis of PUE extracts showed peaks corresponding to the retention times (min). Absorbance was monitored at 254 nm.



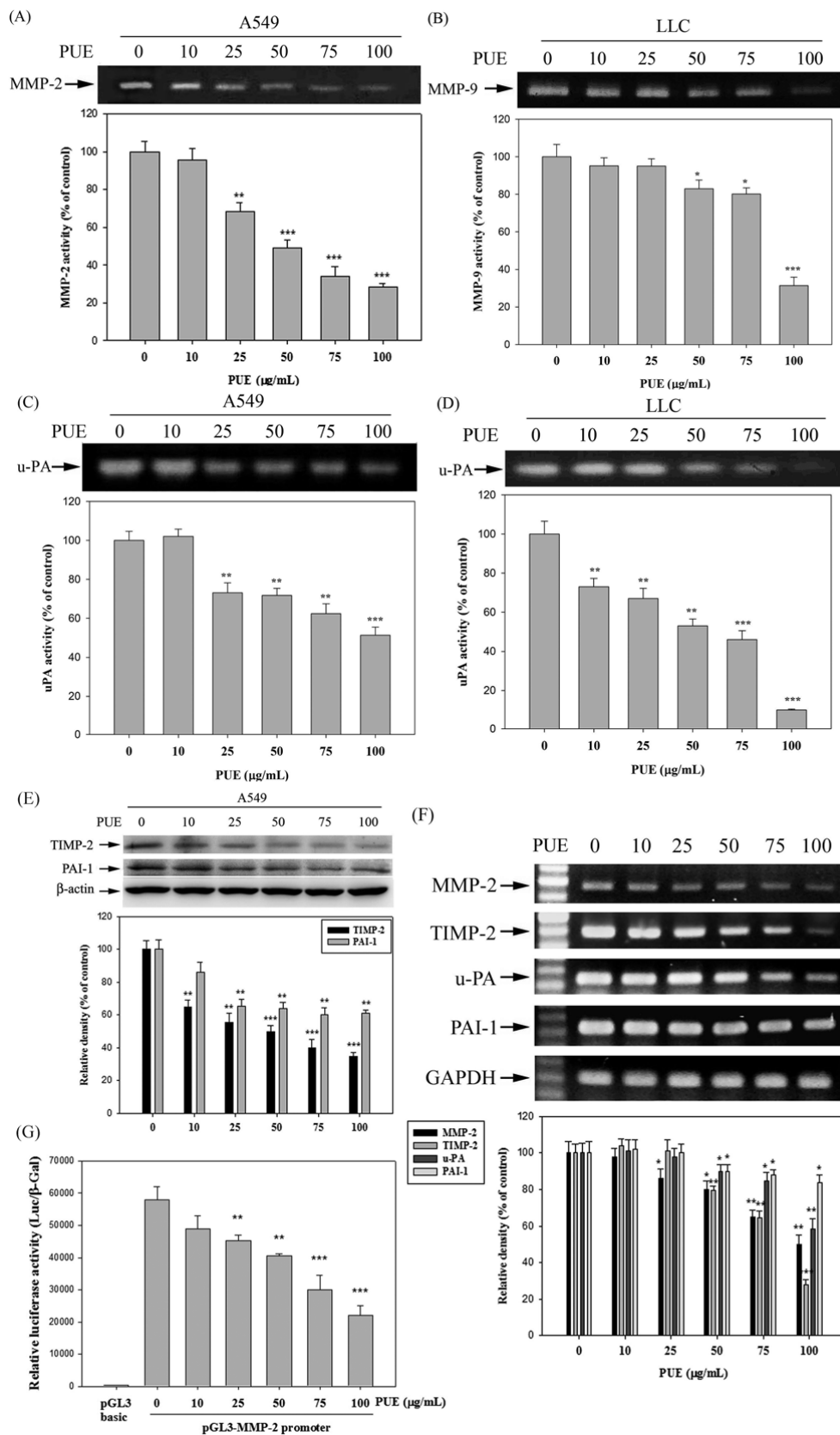
**Figure 2.** The effect of PUE on the viability of A549, LLC and MRC-5 cells. (A) A549, (B) LLC, and (C) MRC-5 cells were treated with PUE for 24 h, and then

subjected to MTT assay for cell viability. The values represented the means  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



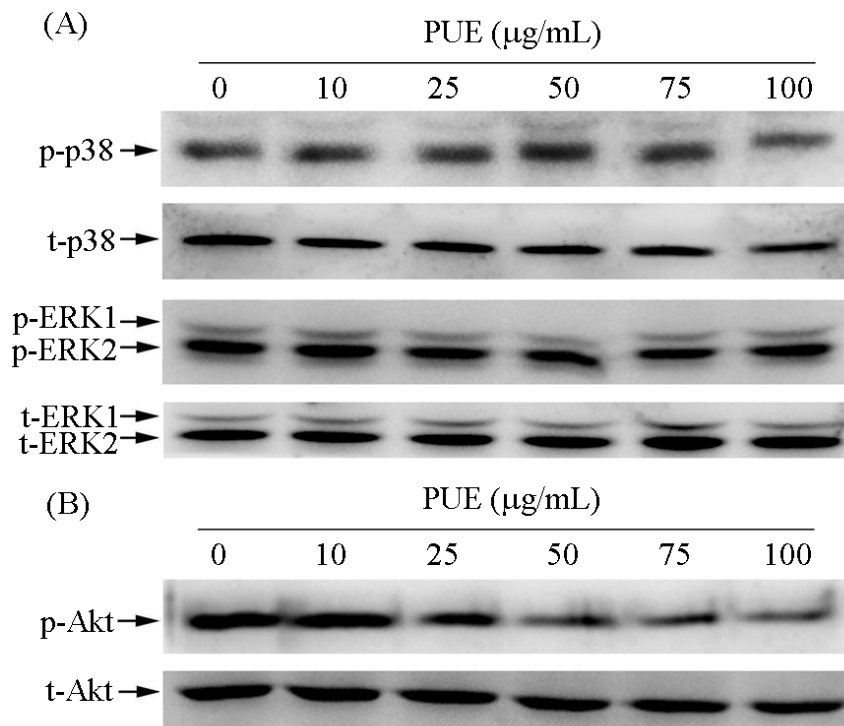
**Figure 3.** The effects of PUE on cell invasion and migration of A549 and LLC cells.

(A) A549 and (B) LLC cells were pre-treated with PUE at an indicated concentration for 24 h, and then equal numbers of cell were subjected to analyses for invasion and migration as described in Materials and Methods. 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 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



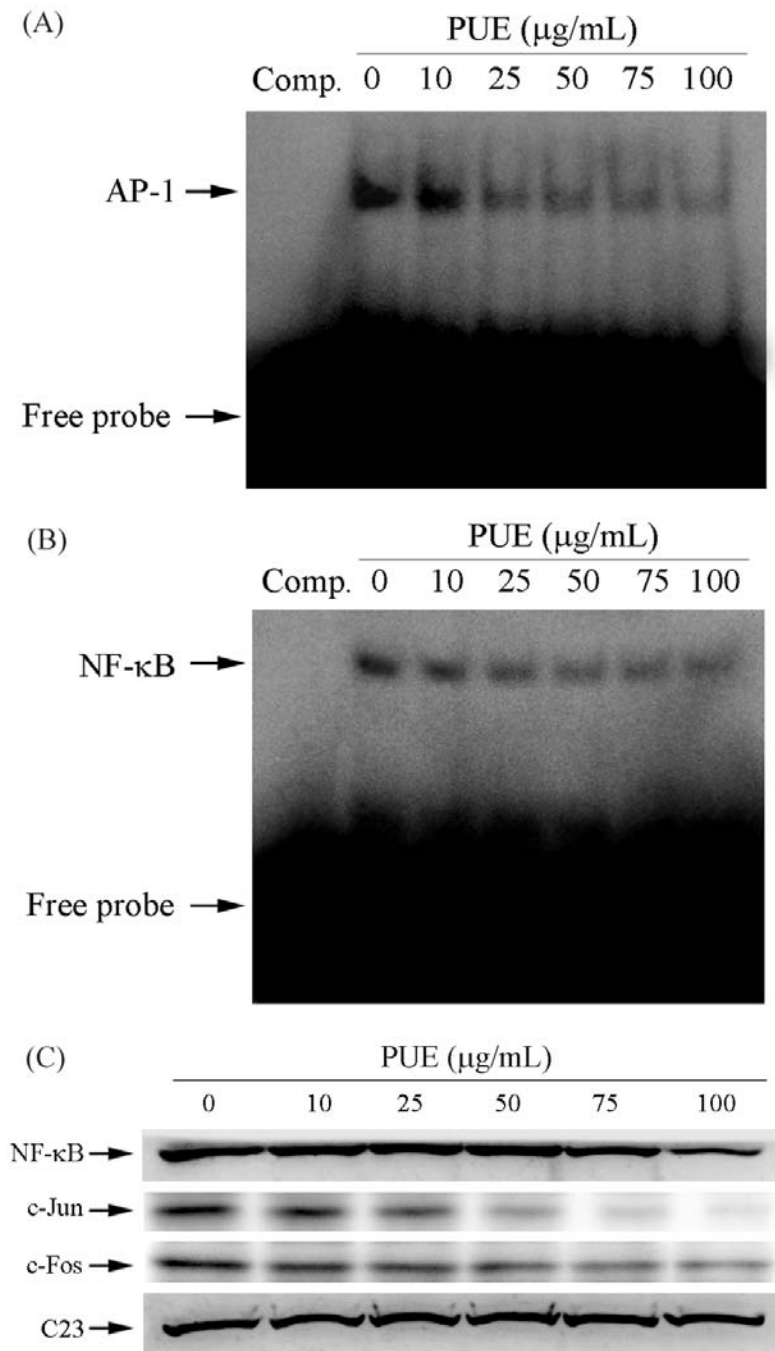
**Figure 4.** The effects of PUE on the protein and mRNA activities of MMP-2, -9 and u-PA. Cells were treated with PUE for 24 h, and then subjected to gelatin zymography,

casein zymography, and western blotting to analyze the activities of MMP-2, -9 (A and B), u-PA (C and D), TIMP-2, and PAI-1 (E) respectively as described in Materials and Methods. For mRNA levels, A549 total RNAs were extracted and subjected to a semi-quantitative RT-PCR for MMP-2, u-PA, TIMP-2, and PAI-1 with GAPDH being an internal control (F). (G) Luciferase activity was measured in transiently transfected A549 cells using pGL3-MMP-2. 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 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



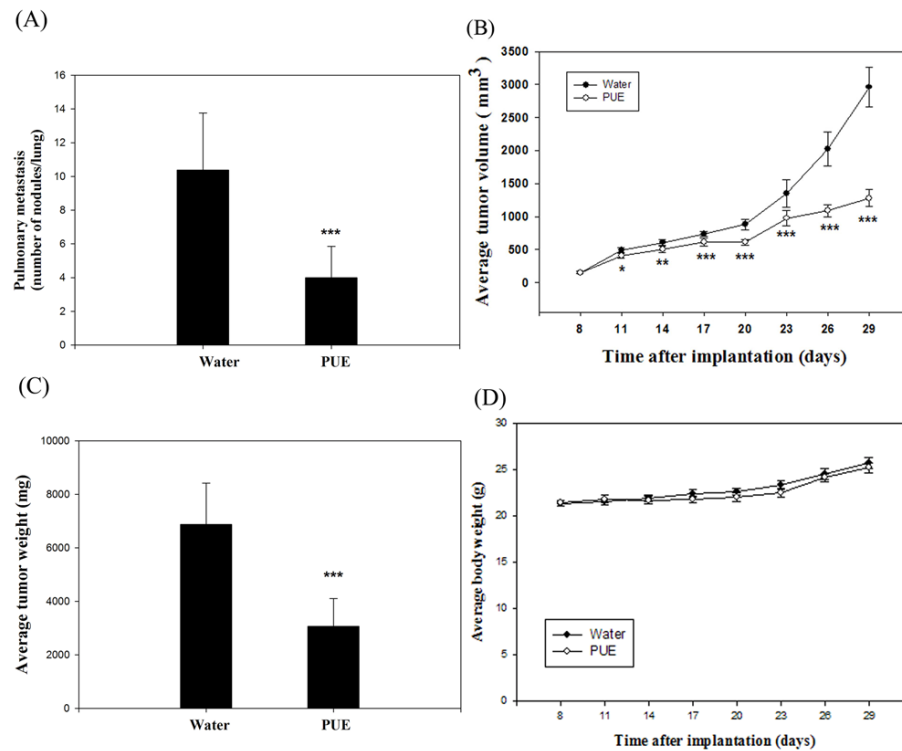
**Figure 5.** The inhibitory effect of PUE on the phosphorylation of Akt proteins. A549 cells was treated with PUE for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with (A) anti-p38, anti-phospho-p38, anti-ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2, (B) anti-Akt, and anti-phospho-Akt antibodies. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system. Results from 3

repeated and separated experiments were similar.

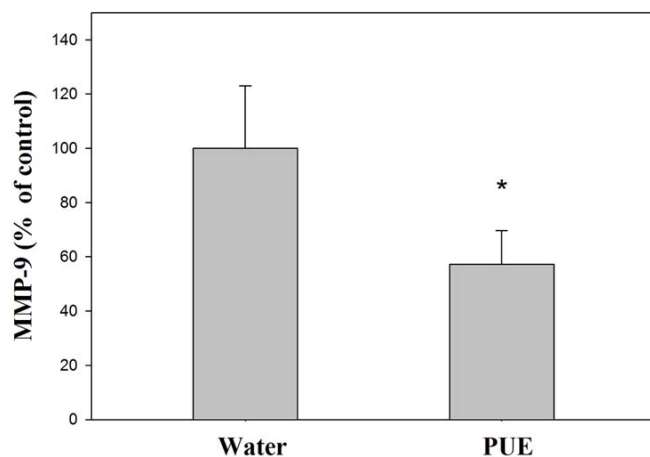
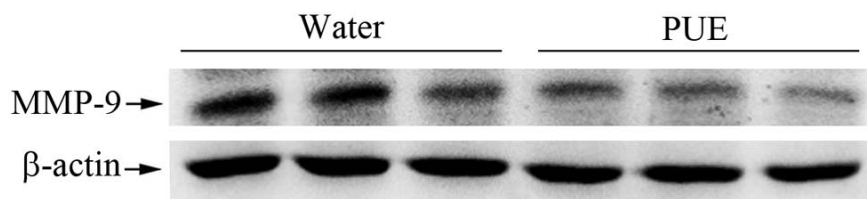


**Figure 6.** The effects of PUE on the activation of NF- $\kappa$ B, c-Jun, and c-Fos. A549 cells were treated with PUE and then nuclear extracts were analysed for DNA binding activity of AP-1 (A) and NF- $\kappa$ B (B) using biotin labeled NF- $\kappa$ B and AP-1 specific oligonucleotide in EMSA. The last lane represented nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (Comp) to confirm the specificity of binding. Nuclear

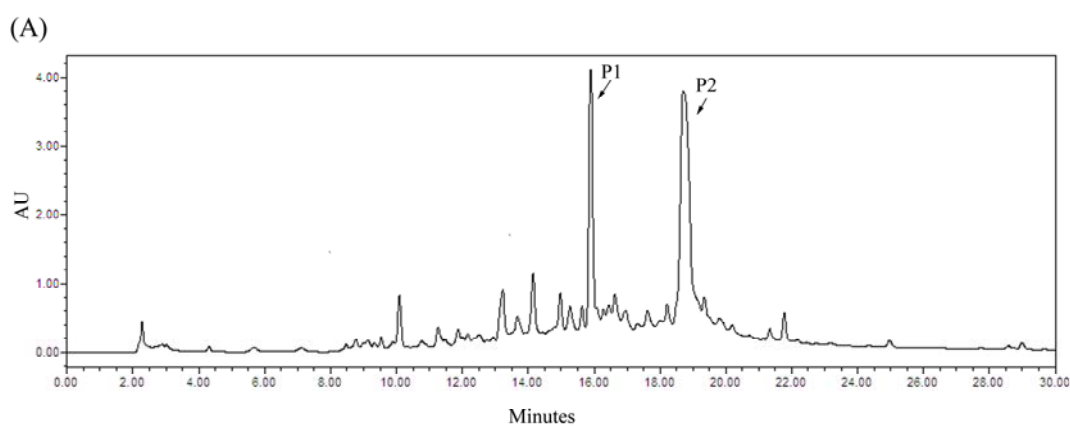
extracts were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-NF- $\kappa$ B, c-Fos, c-Jun, or C23 antibodies (C). Signals of proteins were visualized with an ECL detection system. The experiments were repeated three times with similar results.



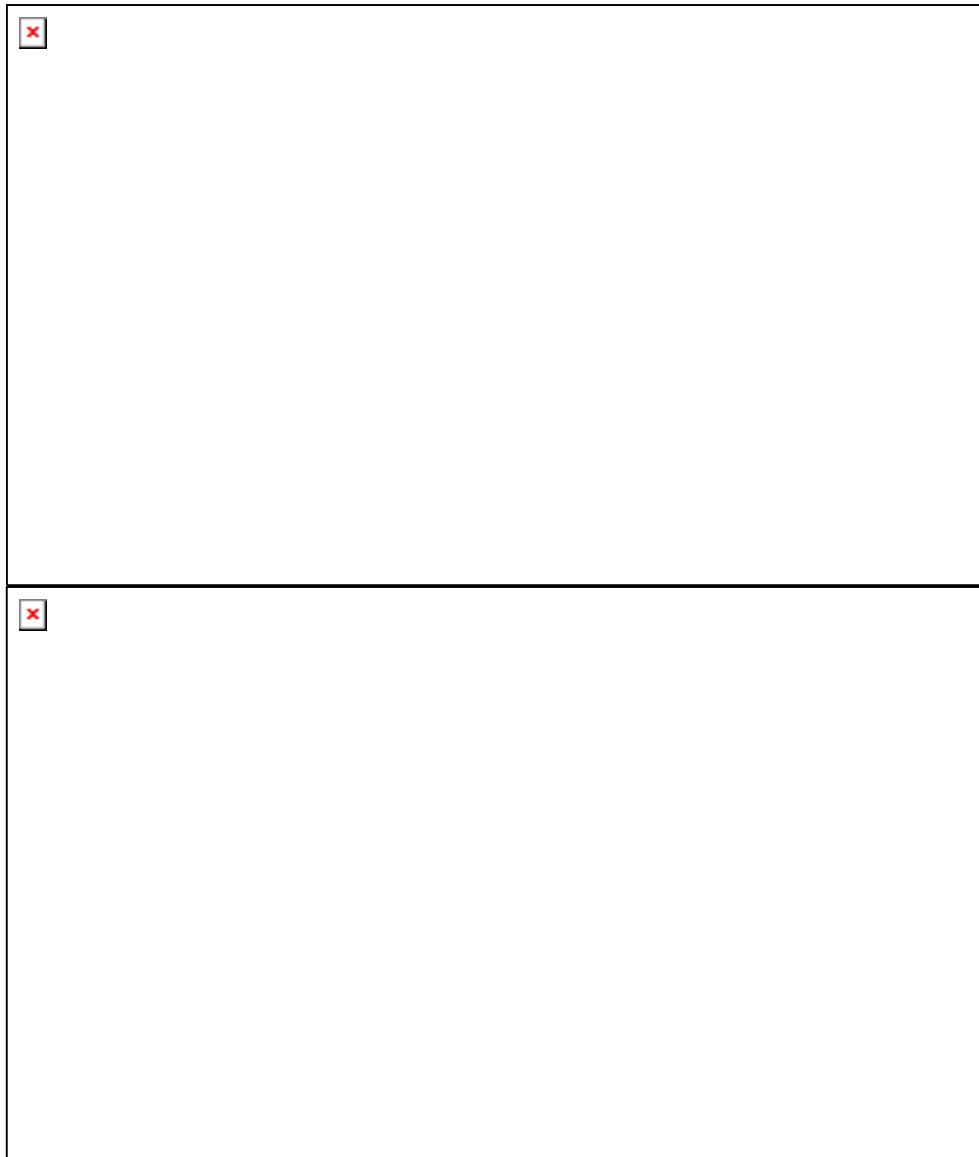
**Figure 7.** The *in vivo* anti-metastasis effect of PUE. After subcutaneous implantation of LLC cells, C57BL/6 mice were treated with PUE as described in Materials and Methods and then analyzed for the number of lung metastasis (A), the growth of tumor (B), the weight of primary tumor (C), and the body weight of mice (D). The values represented the means  $\pm$  SD. Comparisons were performed by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



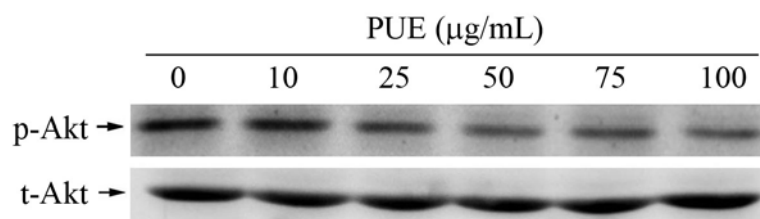
**Figure 8.** Inhibitory effect of PUE on the expression of MMP-9 in tumor of C57BL/6 mice. At the end of experiment, tumor tissues were homogenized and cell lysates prepared as detailed in Materials and Methods. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting. The membrane was probed with anti-MMP-9 antibody with  $\beta$ -actin as an internal control.





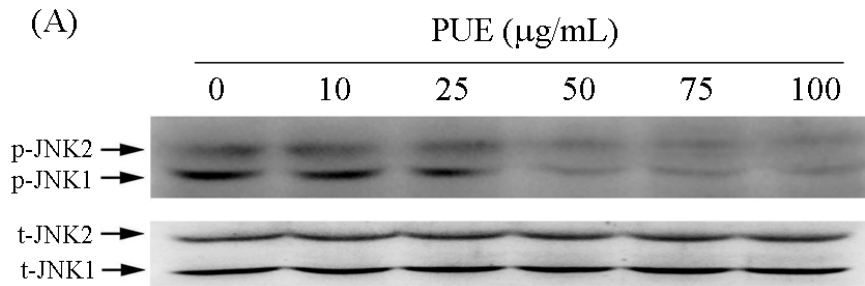


**Figure 9.** The chemical profile of PUE was analyzed by HPLC-mass spectrometry. (A) Chromatographic patterns from HPLC analysis of PUE extracts showed peaks corresponding to the retention times (minutes). Absorbance was monitored at 254 nm. The main products peaks, (B) P1 and (C) P2 as shown in Figure 1A, were then subjected to mass spectrometer.



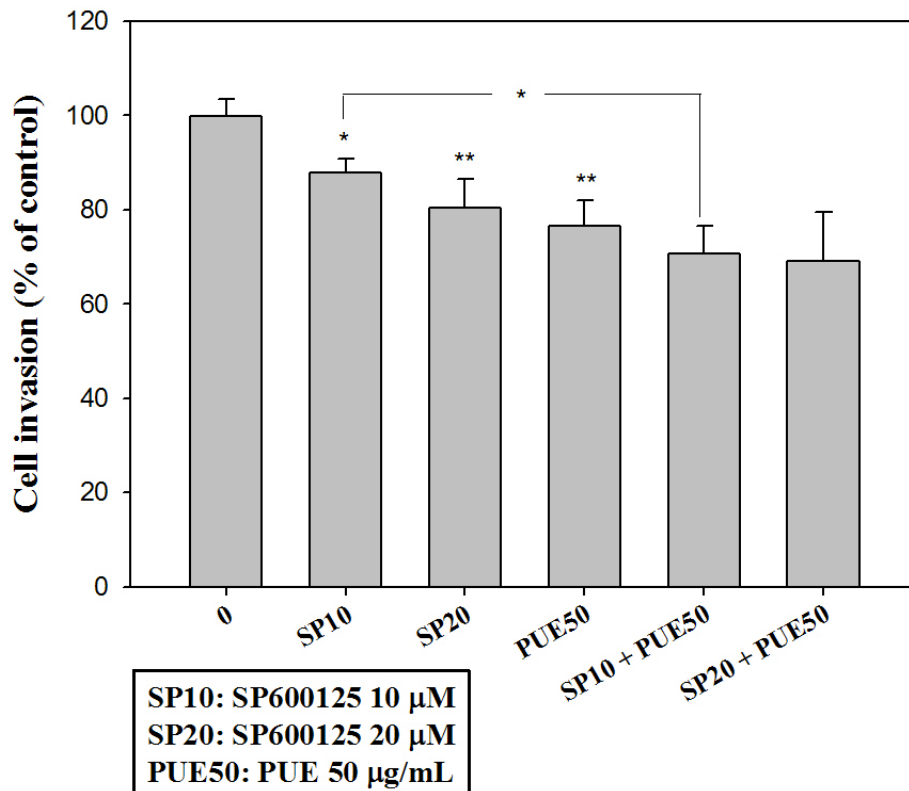
**Figure 10.** The inhibitory effect of PUE on the phosphorylation of Akt proteins. LLC

cells was treated with PUE for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-Akt, and anti-phospho-Akt antibodies. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system. Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

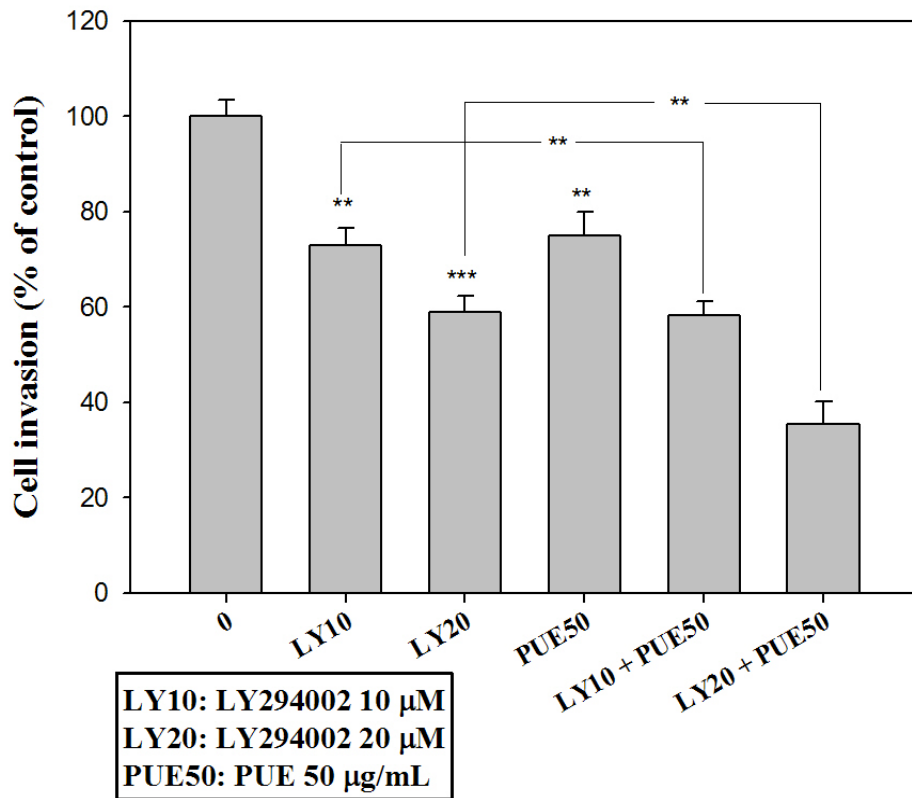


**Figure 11.** The effects of PUE on the phosphorylation of JNK1/2, A549 cells was treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{g/mL}$  of PUE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-JNK1/2, anti-phospho-JNK1/2 antibodies. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.

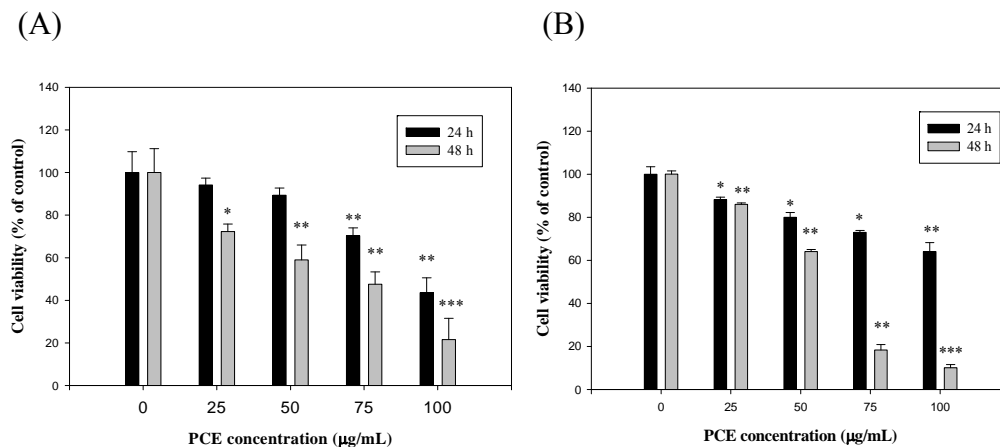
(A)



(B)

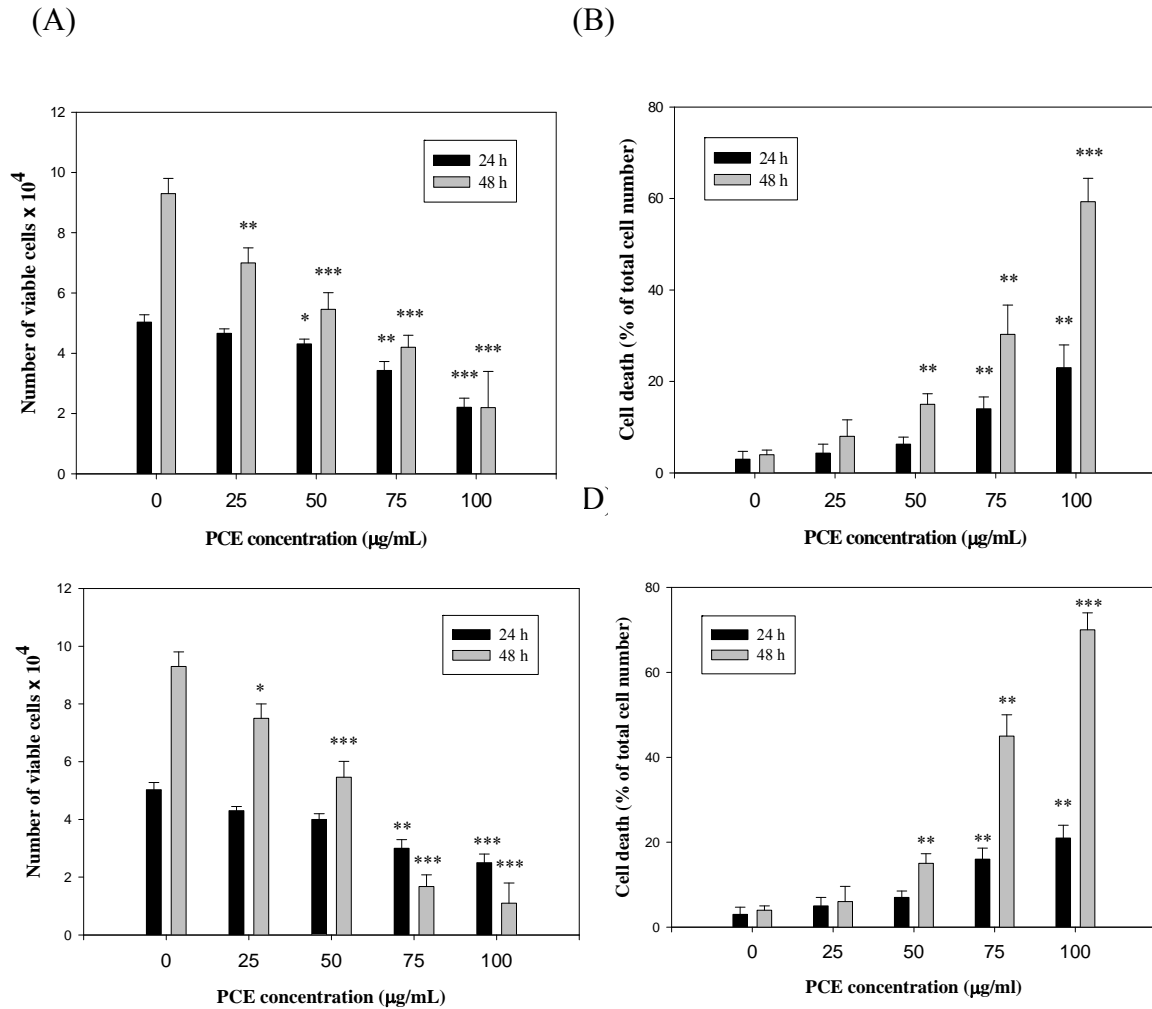


**Figure 12.** The effect of JNK inhibitor (SP600125), PI3K inhibitor (LY294002) and VYE on the cell invasion. A549 cells were plated in culture dishes and pre-treated with SP600125 (10 or 20  $\mu\text{M}$ ) or LY294002 (5 or 10  $\mu\text{M}$ ) for 1 hour, and then incubated in the presence or absence of PUE (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 hours. Afterward, the cells were subjected to analyze for invasion as described in Materials and Methods. The values represented the mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. (\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$ )



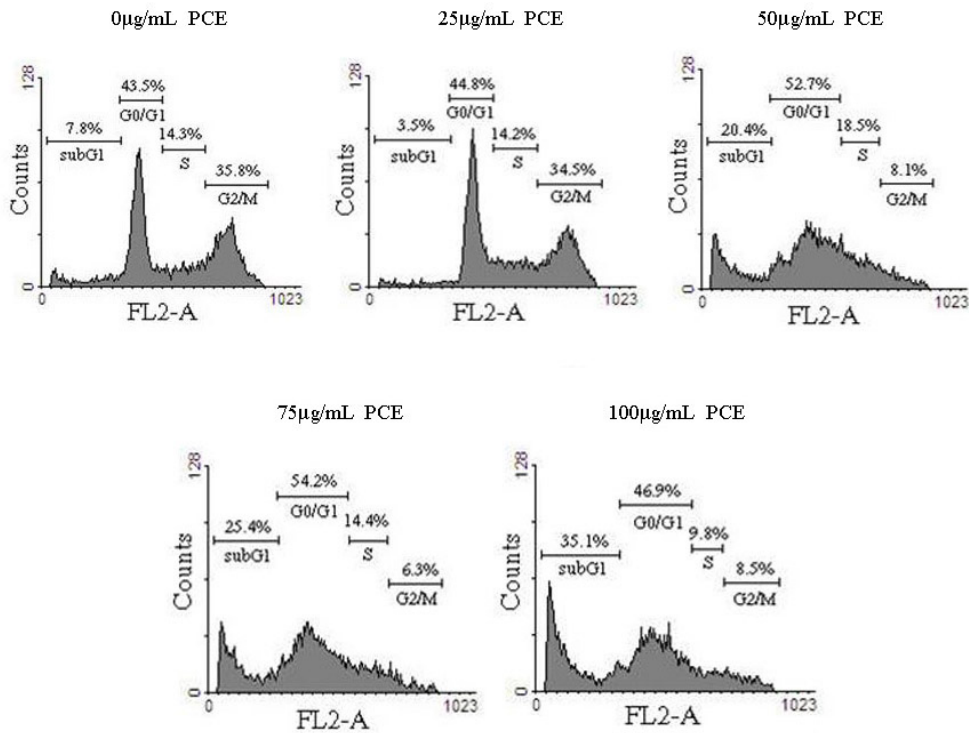
**Figure 13.** 補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia* L. extract, PCE)對於乳癌細胞株(MDA-MB-231 及 JC)的細胞存活率之抑制效果。(A)用不同濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 PCE 處理人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)，經過 24, 48 hours 的加

藥處理後，以 MTT assay 分析其 cell viability。(B)用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )處理老鼠乳癌細胞株(JC) 24, 48 hours 之 MTT，觀察其 cell viability 的情形。



**Figure 14. 補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia* L. extract, PCE)對於乳癌細胞株(MDA-MB-231 及 JC)的細胞生長及死亡之影響。**用不同濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 PCE 處理人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)，經過 24, 48 hours 的加藥處理後，以 trypan blue exclusion assay 分析其(A)存活細胞數以及(B)細胞死亡率。用不同濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 PCE 處理老鼠乳癌細胞株(JC)，經過 24, 48 hours 的加藥處理後，以 trypan blue exclusion assay 分析其(C)存活細胞數以及(D)細胞死亡率。

(A)



(B)

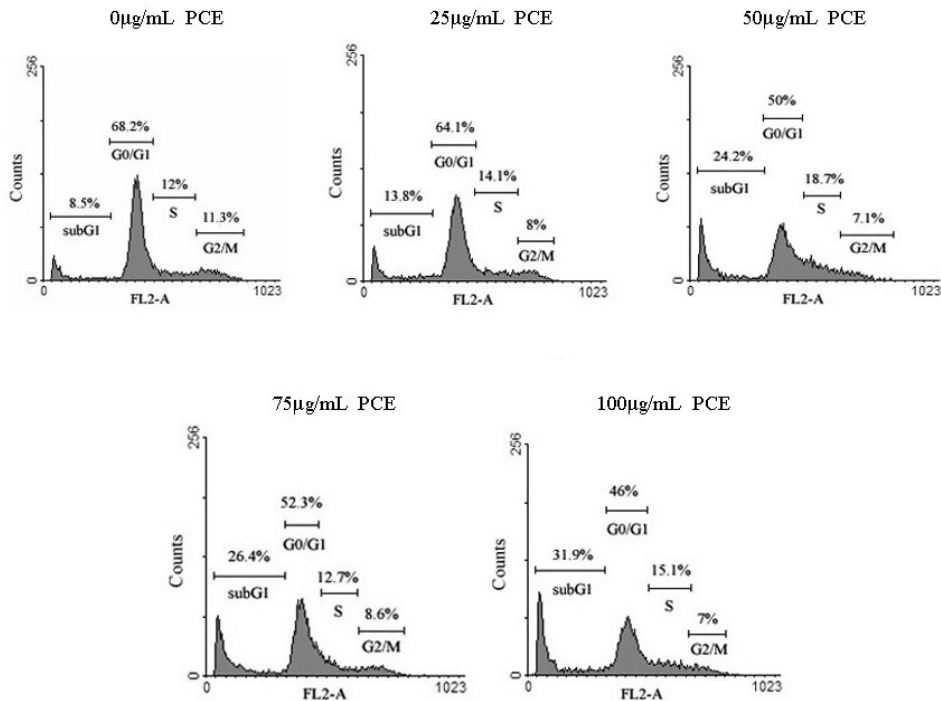
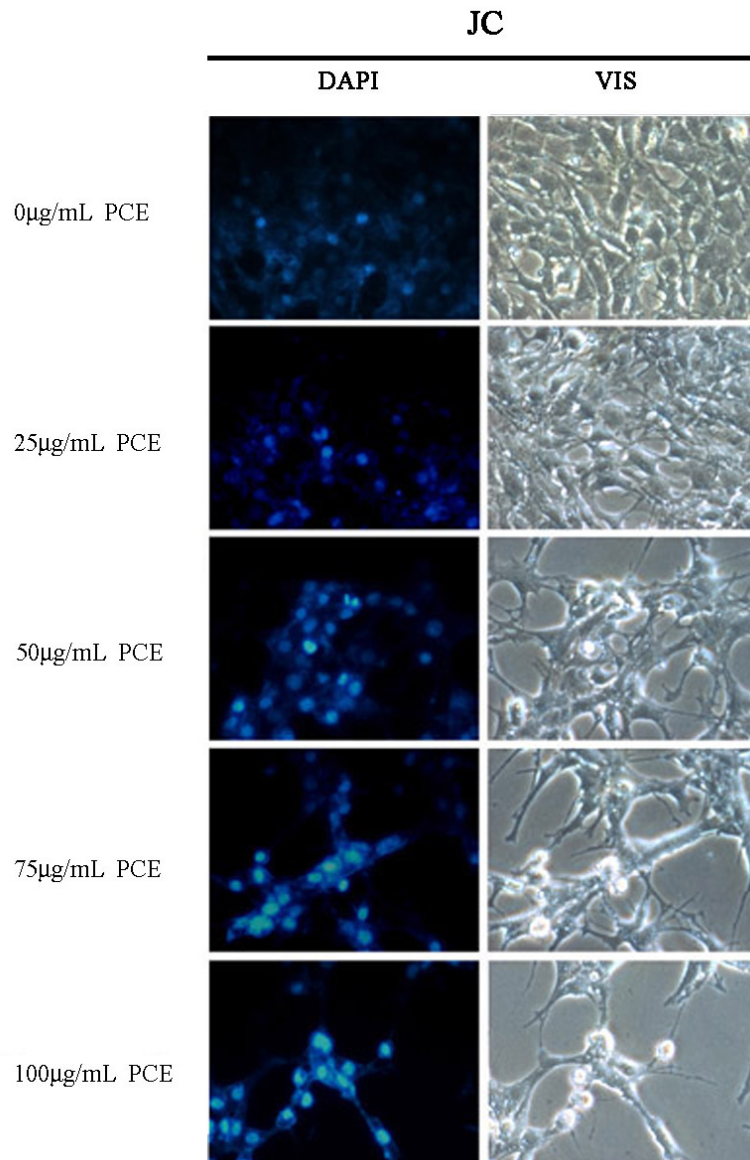


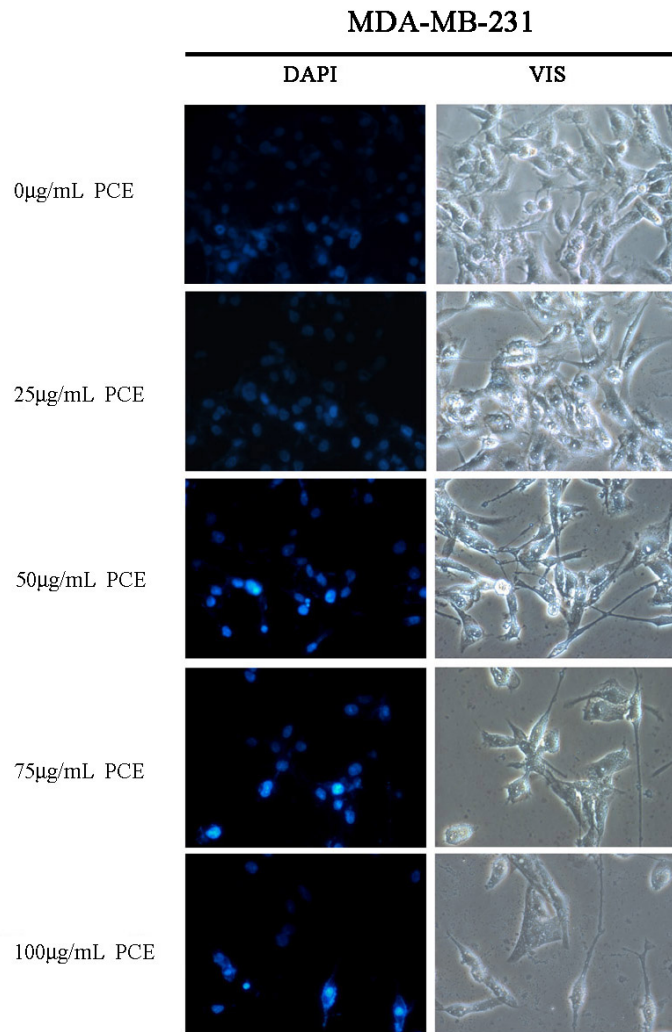
Figure 15. 補骨脂萃取物 (*Psoralea corylifolia* L. extract, PCE) 對於乳癌細胞株 (MDA-MB-231 及 JC) 細胞週期 (cell cycle) 之影響。(A) 用 PCE 多濃度 (0, 25, 50, 75, 100 µg/mL) 處理人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231), 經過 48 hours 的加藥處理後,

以 flow-cytometry 分析其細胞週期的變化。(B) 用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu$ g/mL)處理老鼠乳癌細胞株(JC)，經過 48 hours 的加藥處理後，以 flow-cytometry 分析其細胞週期的變化。

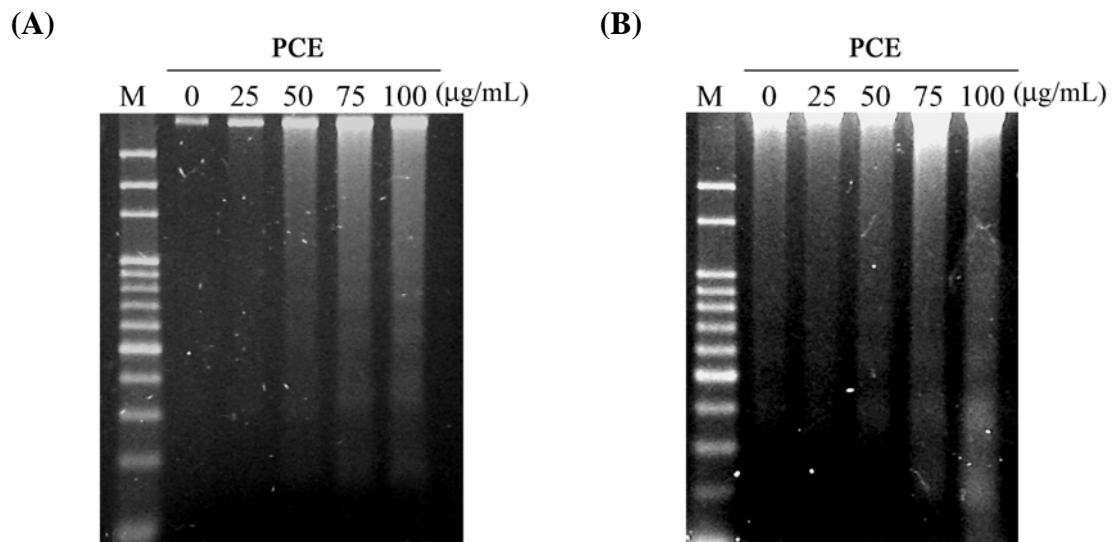
(A)



(B)

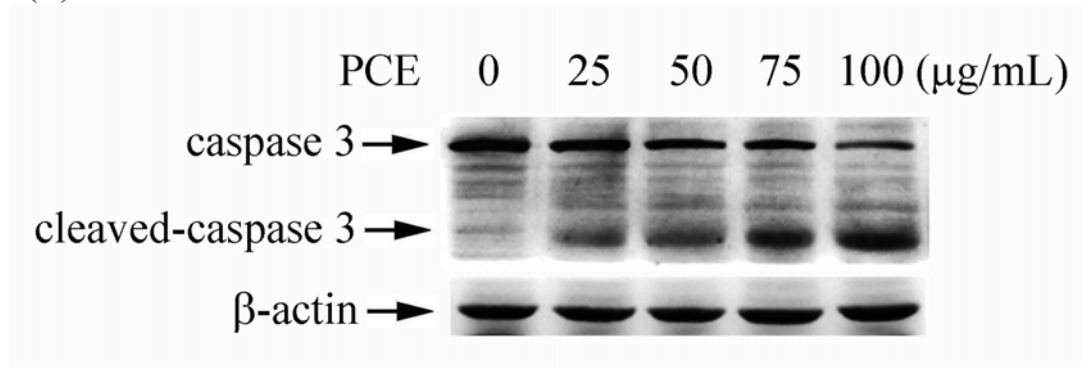


**Figure 16.** 補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia* L. extract, PCE)造成乳癌細胞株(MDA-MB-231及JC)的 chromosome condense 現象。(A)用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ )處理人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)，經過 48 hours 的加藥處理後，以 DAPI assay 分析其細胞核的 chromosome condense 現象。(B) 用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ )處理老鼠乳癌細胞株(JC)，經過 48 hours 的加藥處理後，以 DAPI assay 分析其細胞核的 chromosome condense 現象。

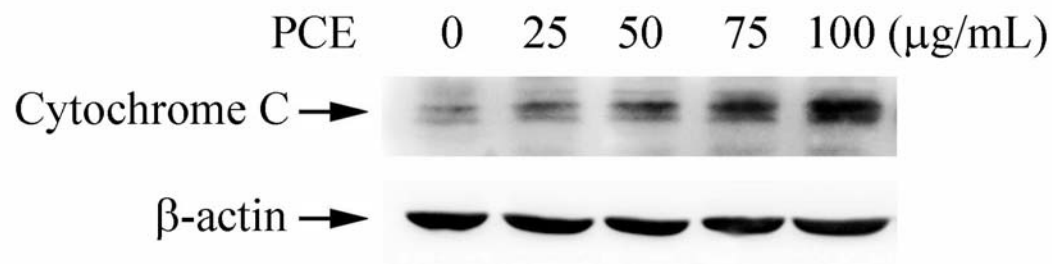


**Figure 17.**補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia L. extract*, PCE)對於乳癌細胞株(MDA-MB-231 及 JC)的 DNA 斷裂現象。(A)用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )處理人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)，經過 48 hours 的加藥處理後，以 agarose electrophoresis 分析其 DNA 的完整性。(B) 用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )處理老鼠乳癌細胞株(JC)，經過 48 hours 的加藥處理後，以 agarose electrophoresis 分析其 DNA 的完整性。

(A)



(B)



**Figure 18.**補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia L. extract*, PCE)對於乳癌細胞株(MDA-MB-231) cleaved-caspase 3 及 Cytochrome C 增加。用 PCE 多濃度(0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )處理人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)，經過 48 hours 的加藥處理後，以 Western Blot 分析其(A) caspase 3、cleaved-caspase 3 與 (B) Cytochrome C 的表現量。



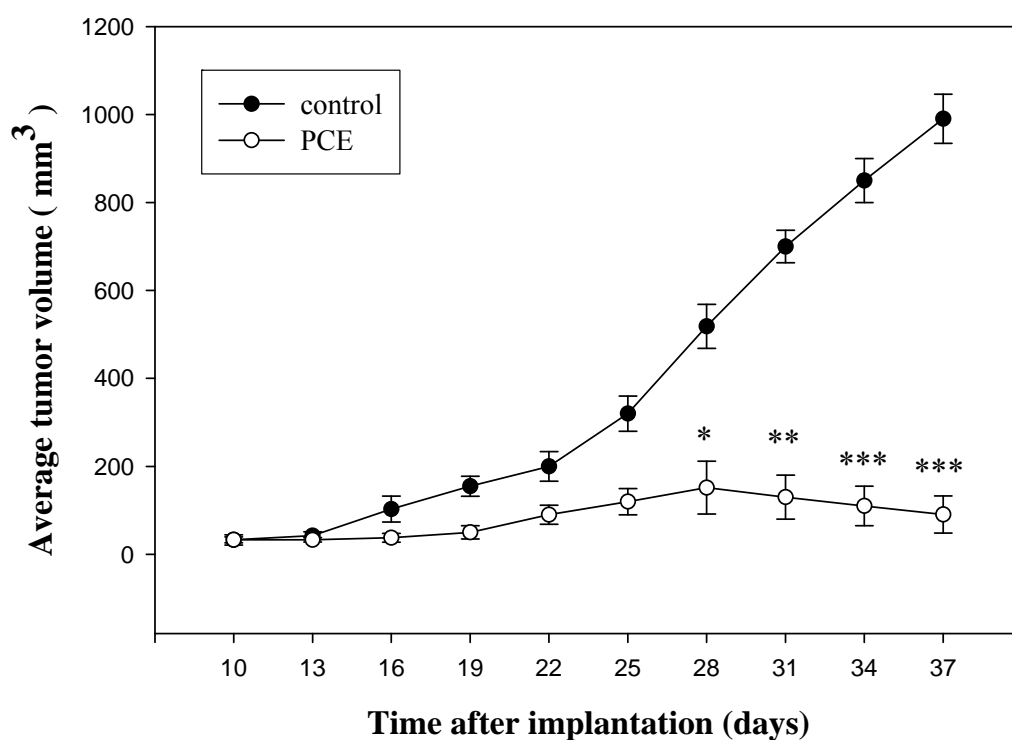


Figure 19. 補骨脂萃取物(*Psoralea corylifolia L.* extract, PCE)對於 JC-bearing BALB/c-mice 的腫瘤大小之影響。將 JC 細胞注入 BALB/c-mice 右背上，在第 4 天時用 PCE 以濃度 0.5g/kg/day 餵食 JC-bearing BALB/c-mice 6 週，於每 3 天量一次腫瘤大小並記錄。

Table 2

| 中文學名 | 英文學名                           | 縮寫  | 克數   | 回收      | 回收率    |
|------|--------------------------------|-----|------|---------|--------|
| 補骨脂  | <i>Psoralea corylifolia L.</i> | PCE | 100g | 19057mg | 19.06% |

## 國科會補助專題研究計畫項下赴國外(或大陸地區)出差或研習心得報告

日期：101 年 7 月 15 日

|        |  |         |                       |
|--------|--|---------|-----------------------|
| 計畫編號   | NSC 98-2313-B-040-004-MY3  |         |                       |
| 計畫名稱   | 葉下珠與補骨脂抑制癌細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之研究  |         |                       |
| 出國人員姓名 | 陳霈霓  | 服務機構及職稱 | 中山醫學大學 生物化學研究所<br>副教授 |
| 會議時間   | 101 年 6 月 29 日<br>至 101 年 7 月 05<br>日  | 會議地點    | 捷克歐羅摩茲(Olomouc)       |
| 會議名稱   | (中文)天然藥物會議<br>(英文) Nature Anticancer Drugs   |         |                       |
| 發表論文題目 | (中文) 黑茶多酚萃取物反轉上皮間質轉換與抑制口腔癌細胞侵襲轉移<br>(英文) Black Tea Polyphenols Reverses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Suppresses Cancer Invasion in Human Oral Cancer cells |         |                       |

## 一、參加會議經過

於 6 月 24 日抵達鄰近捷克歐羅摩茲開會地點最近的機場奧地利維也納後即轉機前往會議地點捷克歐羅摩茲(Olomouc), 6 月 30 日報到及領取大會議程及摘要手冊, 將準備好的論文海報張貼於指定位置。並於 7 月 1 日及 7 月 3 日前往會場聆聽多場特別演講, 並在 7 月 1 日 17:00-18:00 於展出海報處說明研究成果。展示期間, 多位學者表示對本研究的高度興趣, 並有多方討論。

## 二、與會心得

本人的研究主題主要是在探討黑茶萃取多酚類化合物抑制口腔癌細胞轉移的機轉。臺灣最近幾年口腔癌的發生率有逐年上升的趨勢，當中有超過 90% 的口腔癌被診斷為鱗狀上皮細胞癌，上皮間質的轉化 (Epithelial- mesenchymal transition ; EMT) 是上皮細胞腫瘤癌化 (tumorigenesis) 時 progression、侵襲 (invasion) 和轉移 (metastasis) 的關鍵。癌細胞的轉移往往是造成癌症病人病灶復發致死及最難根治的主要原因，其過程包括細胞的貼附、細胞外基質的降解及細胞轉移能力的改變。天然的多酚類，廣泛存在茶之中，目前已有許多文獻指出其具有抗氧化活性、降低血脂肪、促使癌細胞凋亡及防止正常細胞癌化等作用。然而，黑茶多酚對於口腔癌轉移的詳細作用機轉尚不清楚。因此，我們選用 SCC-4 這株高度惡化的口腔癌鱗狀上皮細胞，在體外實驗中，利用 MTT assay、Transwell assays、傷口癒合試驗、gelatin zymography 與 casein zymography assay 觀察黑茶多酚對 SCC-4 細胞的存活率、侵入和移動能力及其分泌 proteinases 能力的影響。結果顯示黑茶多酚不會影響癌細胞的存活率黑茶多酚可經由降低 SCC-4 細胞 MMP-2 ( $P < 0.001$ ) 和 u-PA ( $P < 0.001$ ) 的活性，而幾乎完全抑制 SCC-4 細胞侵襲 ( $P < 0.001$ )，且黑茶多酚亦能有效的抑制細胞的移行 (migration)、運動 (motility)、伸展 (spread) 及附著 (adhesion)。因此，我們進一步以 immunoblotting 分析其相關蛋白的表達，發現黑茶多酚會抑制 MMP-2、u-PA 蛋白的表現，並且抑制 4vimentin、snail-14 在細胞核內的表現，且會抑制經 PMA 誘發的細胞侵襲及 MMP-9 的表現。最後在動物實驗中，於 BALB/c nu/nu 老鼠皮下異種移殖 SCC-4 細胞，其結果與控制組相比，發現在有處理黑茶多酚的組別中，其腫瘤大小有明顯被抑制的效果。綜合以上結果，黑茶多酚具有抑制腫瘤細胞生長與侵襲轉移之效果，或許可以應用在預防口腔癌的轉移或輔助口腔癌的治療上。而

本次大會的主題除了涵蓋多種水果、天然物萃取物、多種天然化合物及食品在抗癌及多種疾病的基礎研究之外，還加入臨床治療及個案探討，並探討多種機能食品在臨床的應用及開發成為健康食品的另一條新路。因此藉由此次會議讓我有機會接觸到更實際的臨床領域，獲得不少新觀念及之前未曾有過的一些想法。會中聆聽許多大師級的演講，受益良多。與其他相關研究人員的諸多討論，也獲得很多寶貴的意見及肯定。此類與國外研究人員的溝通及聯繫是很重要的，讓我有機會與國外實驗室有初步之合作構想，並已有初步之計畫，希望能藉此有國際合作的機會。

### 三、考察參觀活動(無是項活動者略)

### 四、建議

國內應多加舉辦如此大型會議、增加補助出國額度、或盡量補助博士班學生出國開會或短期研究之經費，讓年輕研究學者有機會與大師級學者學習。

### 五、攜回資料名稱及內容

會議議程手冊

會議摘要手冊

### 六、其他

感謝國科會贊助與支持學專家出國開會,更能拓展其在研究領域上有不同的視野及想法。

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/08/16

|           |  |
|-----------|--|
| 國科會補助計畫   | 計畫名稱: 葉下珠與補骨脂抑制癌細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之研究              |
|           | 計畫主持人: 陳霽霓                                   |
|           | 計畫編號: 98-2313-B-040-004-MY3      學門領域: 食品及農化 |
| 無研發成果推廣資料 |  |

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

| 計畫主持人：陳霽霓 |             | 計畫編號：98-2313-B-040-004-MY3 |                 |            |      | 計畫名稱：葉下珠與補骨脂抑制癌瘤細胞轉移與誘導癌細胞凋亡之研究     |  |
|-----------|-------------|----------------------------|-----------------|------------|------|-------------------------------------|--|
| 成果項目      |             | 量化                         |                 |            | 單位   | 備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等） |  |
|           |             | 實際已達成數（被接受或已發表）            | 預期總達成數（含實際已達成數） | 本計畫實際貢獻百分比 |      |                                     |  |
| 國內        | 論文著作        | 期刊論文                       | 0               | 0          | 100% | 篇                                   |  |
|           |             | 研究報告/技術報告                  | 0               | 0          | 100% |                                     |  |
|           |             | 研討會論文                      | 0               | 1          | 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                        | 2               | 2          | 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                       | 1               | 2          | 100% | 篇                                   | Tseng HH, Chen PN#, Kuo WH, Wang JW, Chu SC, and Hsieh YS. (2011 Dec5) Antimetastatic Potentials of Phyllanthus urinaria L. on A549 and LLC Lung Cancer Cells via Repression of Matrix-degrading Proteases. Integrative Cancer Therapies. (in press) (Impact factor: 2.136 ; Ranking: 6/22 ; Category: INTEGRATIVE & COMPLEMENTARY MEDICINE) |

|  |                 |           |   |   |      |    |
|--|-----------------|-----------|---|---|------|----|
|  |                 | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% |    |
|  |                 | 研討會論文     | 0 | 1 | 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<br>(外國籍) | 碩士生       | 0 | 0 | 100% | 人次 |
|  |                 | 博士生       | 0 | 0 | 100% |    |
|  |                 | 博士後研究員    | 0 | 0 | 100% |    |
|  |                 | 專任助理      | 0 | 0 | 100% |    |

**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。)

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析葉下珠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，目前葉下珠萃取物抑制肺癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理發表，並以投稿至 SCI 期刊 Integrative Cancer Therapy 並在 2011 年時被接受。Tseng HH, Chen PN#, Kuo WH, Wang JW, Chu SC, and Hsieh YS. (2011 Dec5) Antimetastatic Potentials of Phyllanthus urinaria L. on A549 and LLC Lung Cancer Cells via Repression of Matrix-degrading Proteases. Integrative Cancer Therapies. (in press) (Impact factor: 2.136; Ranking: 6/22; Category: INTEGRATIVE & COMPLEMENTARY MEDICINE)。補骨脂萃取物抑制乳癌細胞增生及誘導凋亡部分也正在積極進行中，期望日後可以增加臨床診斷之應用性上述之實驗結果，目前補骨脂萃取物抑制乳癌的部份已積極整理準備發表，其他細胞株的相關實驗也正在進行及整理中。

|           | 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：

其細胞實驗及動物實驗皆在預期時間內完成

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）

Tseng HH, Chen PN#, Kuo WH, Wang JW, Chu SC, and Hsieh YS. (2011 Dec5)

Antimetastatic Potentials of Phyllanthus urinaria L. on A549 and LLC Lung Cancer Cells via Repression of Matrix-degrading Proteases. Integrative Cancer Therapies. (in press) (Impact factor: 2.136; Ranking: 6/22; Category: INTEGRATIVE & COMPLEMENTARY MEDICINE)

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）

補骨脂萃取物抑制乳癌細胞增生及誘導凋亡部分也正在積極進行中，期望日後可以增加臨床診斷之應用性上述之實驗結果，目前補骨脂萃取物抑制乳癌的部份已積極整理準備發表，其他細胞株的相關實驗也正在進行及整理中。