

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

桑椹功能性成分抗癌作用之研究(二)桑椹花青素抑制癌細胞惡化轉移之作用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-046-

執行期間：94年08月01日至95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：王朝鐘

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 27 日

中文摘要

關鍵詞：桑椹花青素、胃癌細胞、轉移、B16 黑色素細胞瘤細胞

癌症預防已為一世界趨勢，因此尋找一化學預防物質(chemopreventive agent)為一重要工作。花青素(anthocyanins)廣存於蔬菜、水果等植物中，且有許多報告證明花青素具抗氧化活性、抑制心血管病變及防癌等作用。桑椹(Mulberry fruit)含有豐富之花青素(MAC)，而本實驗室已定量並計算出萃取 MAC 中含有 85-95%的花青素。最近我們發現 MAC 明顯造成 AGS 細胞的凋謝死亡，其詳細機制推測可能經由 p38-Fas L 與 Bid pathway 抑制癌細胞生長。

本年度我們利用 MMP 電泳、轉移分析及傷口癒合實驗來觀察花青素是否可以抑制 AGS 細胞轉移，結果顯示在 MAC 處理以後，MMP2 及 MMP9 的表現量減少；此外，在 MAC 高劑量(3mg/ml)處理以後，傷口癒合及轉移能力明顯變差。因此，我們進一步以 immunoblotting 分析其相關蛋白的表達，實驗數據顯示出 Ras、Akt、Rho A 及 NF- κ B 都相對減少，故推測 MAC 可能經由 Ras 與 Rho A 的路徑去抑制 AGS 的轉移能力。為了確定 MAC 是否可以抑制動物腫瘤的轉移，C57BL/6 小鼠先於右鼠蹊注射 B16-F1 細胞，同時餵管 MAC 5 週後發現，MAC 可抑制 B16-F1 細胞轉移至肝、肺、皮膚等，其中以抑制轉移至肝臟最明顯。

從以上結果我們可以提出 MAC 可以預防及治療癌症轉移，並說明其機轉。由於桑椹易在國內種植，MAC 產率高也易分離，因此本研究成果可應用於發展為抗癌物質。

英文摘要

Key word : Mulberry anthocyanins (MAC)、Human gastric carcinoma (AGS)、migration、B16 melanoma cells

Over the pass decade, advances in understanding carcinogenesis have made possible the identification of the candidates of chemopreventive agents that are being developed to hit the key molecular targets. Mulberry fruit has abundant anthocyanins (MAC), and our laboratory has been quantified and calculated that Mulberry fruit contains 85-95% anthocyanin. Recently, Mulberry anthocyanins (MACs) were isolated from the dried fruit of Mulberry to know the effect of MACs caused cancer cell apoptosis. We have proved that MAC mediated AGS apoptosis via the p38-FasL and Bid pathway.

In this year, experiments are design to confirm MAC as a metastasis inhibitor evaluated by gelatin zymography, migration assay and wound healing analysis to exhibit a key role in inhibition of metastasis-associated metalloproteinase secretion. As was expected, the expression levels of MMP9 and MMP2 were inhibited when treated with MAC (1, 2 and 3 mg/ml). After treating 3 mg/ml MAC with AGS cells, the ability of wound healing was abolished at Day 4 and migration numbers of cell were decreased too. We further used immunoblotting assay to evaluate their effect on the MAC-inhibited AGS metastasis. The data showed that expression of Ras, Akt, Rho A and NF- κ B in the MAC-treated AGS cells were reduced. Therefore, we suggested that

MAC mediated AGS metastasis via the Ras and Rho A pathway. To investigate whether MAC could also affect tumor metastasis in vivo, we design an animal model for the inhibition of liver metastasis induced by B16 melanoma cells in mice, we observe that MAC can inhibit the migration of B16-F1 cell.

To summarize these results, MAC can inhibit the development and migration stages of the cancer cell. We suggest that MAC may offer the application in clinical medicine.

前言

桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木“桑”(Morus alba L.) 的果實，其科、屬、種名為 MORACEAE Morus spp.。桑椹味甘酸、性涼，具滋陰養血、生津止渴、潤腸通便等作用，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象，許多古籍記載了桑椹的藥用價值，但是在科學研究上卻缺乏科學證據來證實。而由桑椹果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑椹具有豐富的色素成分，而許多的色素成分被證實是一種很好的抗氧化物質。由 Toscano 和 Lamonica(1) 鑑定出桑椹的色素成分為花色苷，而桑椹的花色苷為 cyanidin 3-glucoside 及 cyanidin 3-rutinoside，因此我們推測桑椹具有豐富的天然抗氧化成分。此外桑椹除含有豐富的黃酮素 (如 quercetin, gossypetin) 亦含有原兒茶酸，這些成份都以具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變(2-11)。

花青素廣泛存在於許多食用的植物果實中，不同的花青素具有不同的顏色，其中包含了：藍色、紫色或紅色等。一些具有醣基的醣化 delphinidin 與 cyanidin 也發現存在許多的植物中。在營養食品中添加入花青素萃取物，可以有效的使人們攝取到數個毫克的花青素。根據統計，在美國每人每天會攝取 180-250 毫克的花青素。現今，由天然植物果實中所萃取出具有高度花青素含量產物也廣泛的被接受。對於花青素的應用方面，被認為對於許多的疾病是具有有效的預防作用，如：糖尿病視網膜病變及的微血管循環疾病等，此外也具有抗發炎及化學預防作用的功效。已有許多報告指出花青素具有抗氧化活性 (12-16) 抗致突變性 (17-19)，抗癌作用 (20-22) 及降低脂質過氧化作用和 DNA 損傷 (23)。本實驗室先前已發現桑椹花青素(MAC)抑制胃癌細胞生長之作用及其機制，因此，我們希望進一步確認花青素抑制胃癌細胞轉移之能力。希望由本研究，能夠得到一種天然、安全並具有保健預防效用的天然物，進一步應用於預防或延緩甚至治療癌症發生的保健食品之發展。

研究目的

由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，因此如何預防或延緩癌症的發生時為刻不容緩的事。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。目前許多研究趨向以天然物成份或複方來達到抑制癌細胞的增生及惡化，例如 Tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為 chemopreventive agents，因此本研究室也致力於開發可食用之天然物中之 chemopreventive agents，希望可以由攝取食品來達到預防或延緩癌症。本研究以台灣特有之桑椹萃取物，分離之花青素及多酚探討其對人類癌細胞之作用，及抗癌之分子

機制。目前世界上許多研究單位發現，癌細胞如果發生轉移，會更增加病人死亡的機率，因此本研究首先探討桑椹成份 MAC 抑制癌細胞轉移惡化之能力，並探討其分子機制，進一步以動物模式探討其抑癌作用及機轉，俾以發展為抗癌物質。

研究方法

(A) 桑椹花青素(MAC)之製備

(1) MAC extracts 製備及定量

將桑椹以酸化甲醇(1% HCl)浸泡隔夜後，所得的液體以濾紙過濾後真空乾燥，所得的物質即為桑椹花青素粗萃取物，隨後以 pH 區分法定量總花青素含量。200 µg/ml 的桑椹花青素萃取物溶於 pH1.0 及 4.5 下，在以分光光度儀測其 510 及 700 nm 之吸光值，使用 $A=[(A_{510}-A_{700})_{pH1.0}-(A_{510}-A_{700})_{pH4.5}]$ 公式，與 delphinidin 標準曲線比照定量。

(2) HPLC 分析

為使 MAC 製備標準化，進一步以 HPLC 分析 cyanidin-3-glucoside 及 delphinidin-3-glucoside 之含量是必要的，將桑椹花青素萃取物溶於水中，以高效能液像層析管柱(250x4.6 mm, 5 µm Hypersil ODS)，mobile phase 為 1.5% H₃PO₄、20% HPAc、MeCN in H₂O、流速為 0.5ml/min。

(B) Migration 相關分析

(1) Gelatin Zymography

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 5×染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100 V 與 140 V 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。

(2) 傷口癒合實驗(Wound healing assay)

將細胞(1×10^5 /ml)種於 6 well plate 中，用 tip 在 well 中由上而下劃一直線，並加不同濃度之 MAC 處理，同時在顯微鏡下照相(Day 0)。隔天用 PBS 洗去 MAC，繼續以 F-12K 培養基培養，之後每天在顯微鏡下照相，連續 4 天(Day 1, 2, 3 and 4)。細胞內 DNA 片段之 ELISA 分析

(3) 細胞移動性分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 0.1% gelatin 的 conditioned medium，將細胞處理 MAC 後，subculture 並計算細胞數，然後注入固定量的細胞(10^4 - 1.5×10^4)於 upper chamber，待細胞移動 5 小時以後，取下薄膜，以甲醇：醋酸(3：1)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，擦掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

(4) Migration-related proteins 分析

癌細胞經處理後，其 lysate 經 western blotting 分析 Ras family (包括 Ras, PI3K, Akt 及 NF- κ B), Rho A, Rho B 等蛋白表現之影響。

(C) 抑制小鼠中 B16 細胞轉移

取 6 週大 C57BL/6 雄性小鼠，分為 6 組，每組 6 隻，A 組為正常組，B 組只處理 MAC，C-F 組別將 B16 細胞 2×10^6 腹腔注射小鼠腹腔中(C, B16 alone; D, B16+MAC 1%; E, B16+MAC 2%; F, B16+MAC 3%)，三天後依組別進行以下試驗：

A 組及 C 組：每一、三、五天餵管 normal saline

B, D, E, F 組：每一、三、五天分別餵管 MAC 1, 2 及 3%/mouse

以上連續重複五週療程，若動物不幸於療程中死亡，即行屍體解剖，實驗結束時亦將存活的動物犧牲並進行解剖，取出腹腔的腫瘤秤重並觀察肝臟、肺部、皮膚等 tumor metastasis 現象。

結果與討論

(1) 桑椹花青素(MAC) 抑制胃癌細胞金屬水解蛋白酶：

以 gelatin zymography assay 觀察 AGS 細胞加入桑椹花青素(0, 1, 2, 3 mg/ml)，於 24 小時後吸取其培養基，分析 MMP2 及 MMP9 的表現。我們發現桑椹花青素在濃度越高的情況之下對 MMP2 及 MMP9 的抑制作用越強，且在最高濃度處理下 MMP9 的表現量只剩原來未處理 MAC 的 48%，而 MMP2 幾乎不分泌(圖一)。

(2) 桑椹花青素(MAC) 抑制胃癌細胞傷口癒合之能力

以 Wound healing assay 觀察 AGS cell 加入桑椹花青素，分別在 0, 1, 2, 3, 4 天以顯微鏡照相。結果發現桑椹花青素也同樣的在濃度越高的情況之下對胃癌細胞傷口癒合的抑制作用越強，且呈現 time-dependent 的現象。在第 4 天照像結果顯示，處理高劑量的花青素之胃癌細胞數，與未處理花青素的組別比較之下，減少了 6 倍之多 (圖二)。

(3) 處理桑椹花青素(MAC)降低胃癌細胞轉移的現象

利用 Boyden chamber 分析，是另一種較直接觀察細胞轉移現象的方法，因此，當細胞處理不同花青素濃度後，將細胞打下，種入 Boyden chamber 中，5 小時後觀察細胞轉移至下層膜的數目。以 Giemsa stain 進行染色後，發現當細胞處理高劑量之花青素後，轉移至下層的細胞數明顯減少，代表胃癌細胞轉移能力被花青素所抑制 (圖三)。

(4) 桑椹花青素(MAC)抑制胃癌細胞轉移之機制—Ras and Rho A signalling

由前面的結果可得知桑椹花青素可以抑制 AGS 胃癌細胞之轉移能力，因此，本研究進一步利用 Western blotting 來分析其機轉，目前與轉移有關的蛋白分別為 Ras, Rho A 及 Rho B 等，由圖四可知 AGS 細胞在桑椹花青素處理下，Ras, Rho A, Akt 及 NF- κ B

蛋白量都下降，顯示桑椹花青素可經由 Ras→Rho A→Akt→NF-κB 來抑制抑制其 migration 的能力；此外，PI3K 並未減少，可知 Akt 並不是經由 PI3K 的路徑，而是經由 Rho A 的 pathway。然而，許多研究顯示，Rho B 與轉移有關，但由本實驗的結果得知，花青素抑制胃癌細胞的機制沒有經過 Rho B 的調控。因此可知，桑椹花青素可能經由 Ras 及 Rho A 路徑而造成 AGS cell 細胞的轉移能力降低。

(5) 桑椹花青素(MAC)抑制 B16-F1 黑色素細胞瘤對 C57BL/6 小鼠之轉移現象

由於沒有文獻顯示 AGS 細胞處理動物會導致癌細胞轉移現象，所以動物實驗部份改用 B16-F1 黑色素細胞瘤，其優點是轉移能力佳，且轉移現象易觀察(腫瘤部分為黑色)。將 B16-F1 細胞打入 C57BL/6 小鼠的幼鼠蹊部位，之後胃管桑椹花青素(佔飼料之 1%, 2%, 3%)；結果顯示，單一處理 B16-F1 細胞的老鼠，在一週內全部死亡(data not shown)。另外，不同濃度的桑椹花青素(1%, 2%, 3%)處理後，高濃度花青素組別的老鼠，其轉移現象可被抑制(圖五 (A))，並可存活到第 5 週，其他低劑量組別之動物，則在 5 週內陸續死亡。老鼠在死亡或是存活到 5 週之動物犧牲後，分別取下其皮膚、肝臟、肺臟、心臟及腫瘤部份，利用 HE stain 染色觀察癌細胞之轉移現象；色深濃染代表有癌細胞存在，結果發現在肝臟及肺臟部份，高劑量之花青素可以抑制 B16-F1 細胞的轉移，其中以肝臟部分最明顯(圖五 (B)、(C))。為了觀察部分已轉移但 HE stain 觀察不到的細胞，我們利用 S100 抗體作免疫染色(IHC)，褐色部份代表 B16-F1 細胞被染色的結果，由圖五 (D)及(E)可知，肝臟及肺臟中，高濃度處理的組別，並未發現癌細胞轉移的現象。

結論

從以上相關的研究，我們可以得到一個結論，MAC 是透過 Ras 及 Rho A 的路徑，而抑制 AGS 細胞的轉移能力，並且在動物實驗中確認 MAC 具有抑制黑色素細胞瘤惡化轉移之作用。結果顯示桑椹為一種天然、安全無毒性並具有預防疾病效用的天然物，能應用於預防疾病發生的保健食品之發展。希望藉由本研究為基礎，除能把桑椹發展為保健食品外，更進一步由桑椹中分離出單一有效成分，提高其效力甚至進一步在確認有效機制後，將此有效成分發展為治療癌症的藥品。

參考文獻

1. Toscano, M. A. and Lamonica, G. (1975) Pigments from Morus nigra fruits. Chem.Abstr. 83, 55669.
2. Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Hoult, R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, T. and Leake, D.S. (1993) The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. Biochem. Pharmacol., 45, 67-75.
3. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., Jessup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. Biochem.

Pharmacol., 39, 1743-1750.

4. Thanka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.*, 53, 2775-2779.
5. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, M., Mori, H. and Hara, A. (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res.*, 54, 1359-2365.
6. Kawamori, T., Thanka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M. and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 54, 2359-2365.
7. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M. and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer (Suppl.)*, 75, 1433-1439.
8. Hirose, Y., Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita H. and Satoh, K. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
9. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, C.Y. (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 101, 137-148.
10. Wang, C.J., Lee, M.J., Chang, M.C. and Lin, J.K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
11. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. (2000) Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 307-315.
12. Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative pigments isolated from the seeds of phaseolus vulgaris L. *J. Agric. Fd. Chem.*, 42, 248-251.
13. Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from Phaseolus vulgaris L. *Biochem. Pharmacol.*, 52, 1033-1039.
14. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1998) Dietary cyanidin 3-o- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33, 583-588.
15. Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J. and Osawa, T. (1999) Protective effects of dietary cyaniding 3-o- β -D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 316-366.
16. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1999) Absorption and bolism of cyaniding 3-o- β -D-glucoside in rats. *FEBS Lett*, 449, 179-182.
17. Edenharder, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S. and Seeger, K. (1994) In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2- amino- 3- methylimidazo

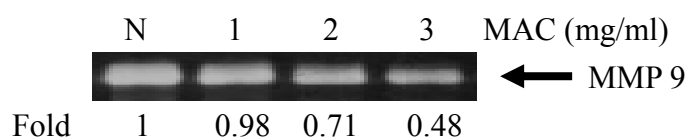
- [4,5- f] quinoline, 2- amino- 3,4- dimethylimidazo [4,5- f] quinoxaline and 2- amino- 3,8- methylimidazo [4,5- f] quinoline. *Fd. Chem. Toxicol.*, 32, 443-459.
18. Eedenharder, R., Lepold, C. and Kries, M. (1995) Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella tryphimurium* TA98. *Mutat. Res.*, 341, 303-318.
 19. Yishimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M. and Yamada, J. (1999) Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 537-541.
 20. Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T. and Hasegawa, M. (1996) Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 11, 273-277.
 21. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K. (1997) Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 12, 277-280.
 22. Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N. and Shirai, T. (2001) Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2- amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-6)pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F334 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine, *Cancer Lett.*, 171, 17-25.
 23. Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R. and Duthie, G.G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats, *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 1033-1037.

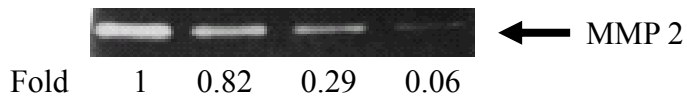
計畫成果自評

- (1) 提出桑椹花青素為新的 chemopreventive agents。
- (2) 說明抗癌的機轉。
- (3) 提供食物成份在抗癌研究的模式。

圖表

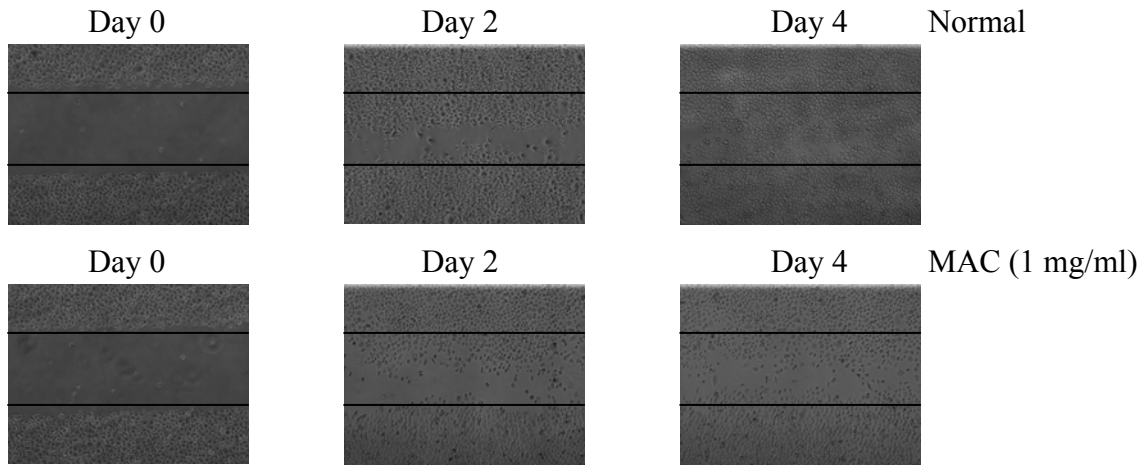
圖一：桑椹花青素(MAC) 抑制胃癌細胞金屬水解蛋白酶



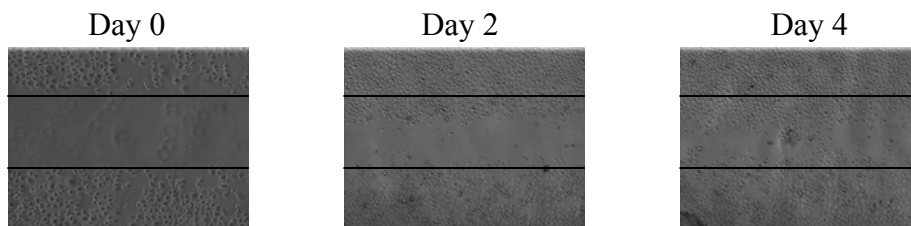


圖二：桑椹花青素(MAC) 抑制胃癌細胞傷口癒合之能力

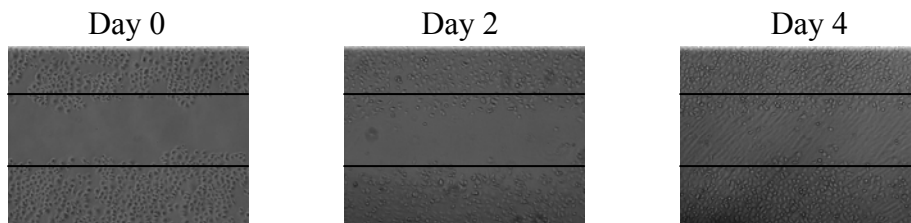
(A)



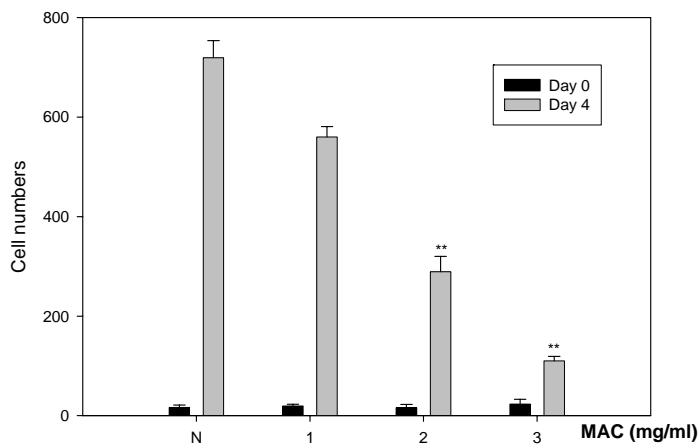
(C) MAC (2 mg/ml)



(D) MAC (3 mg/ml)

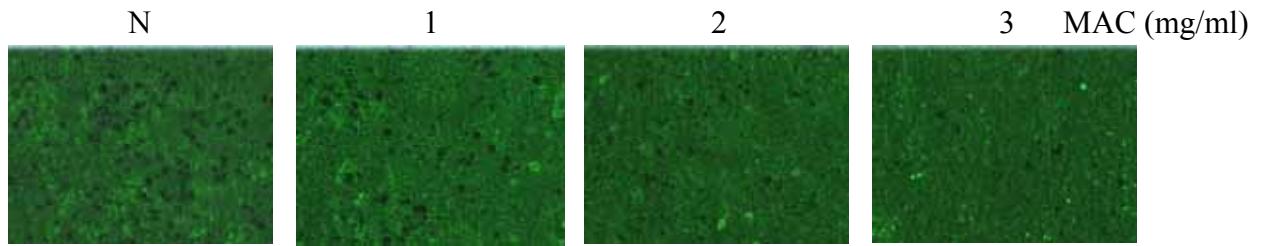


(B)

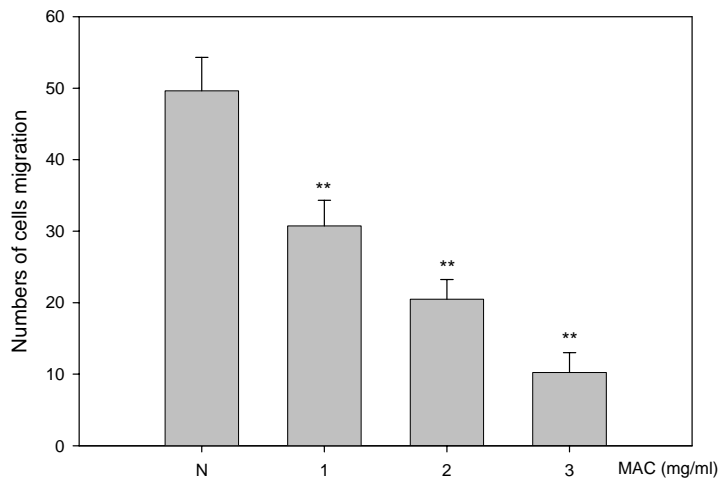


圖三：處理桑椹花青素(MAC)降低胃癌細胞轉移的現象(migration assay)

(A)

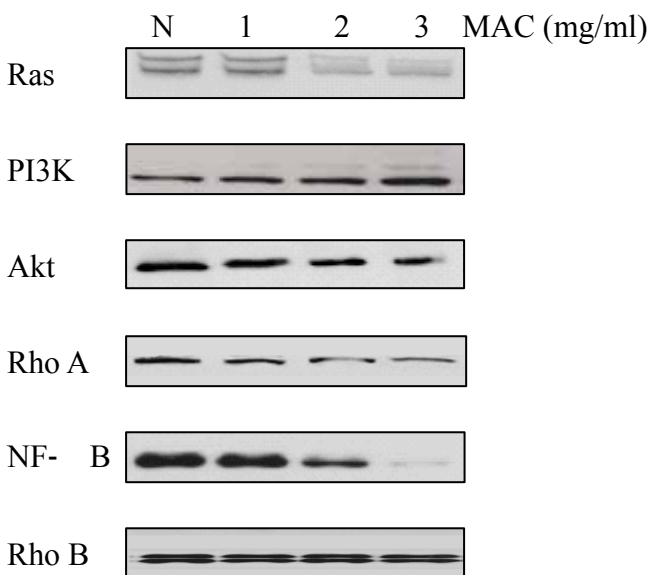


(B)

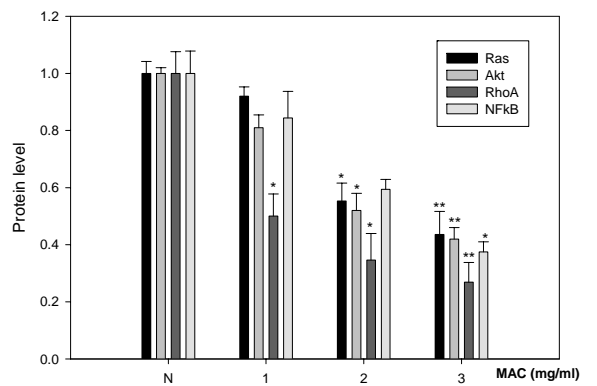


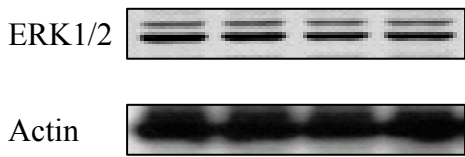
圖四：桑椹花青素(MAC)抑制胃癌細胞轉移之機制—Ras and Rho A signalling (Western blotting)

(A)

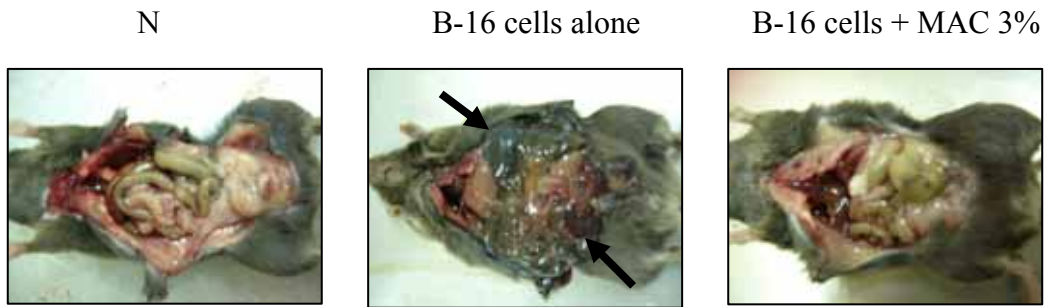


(B)

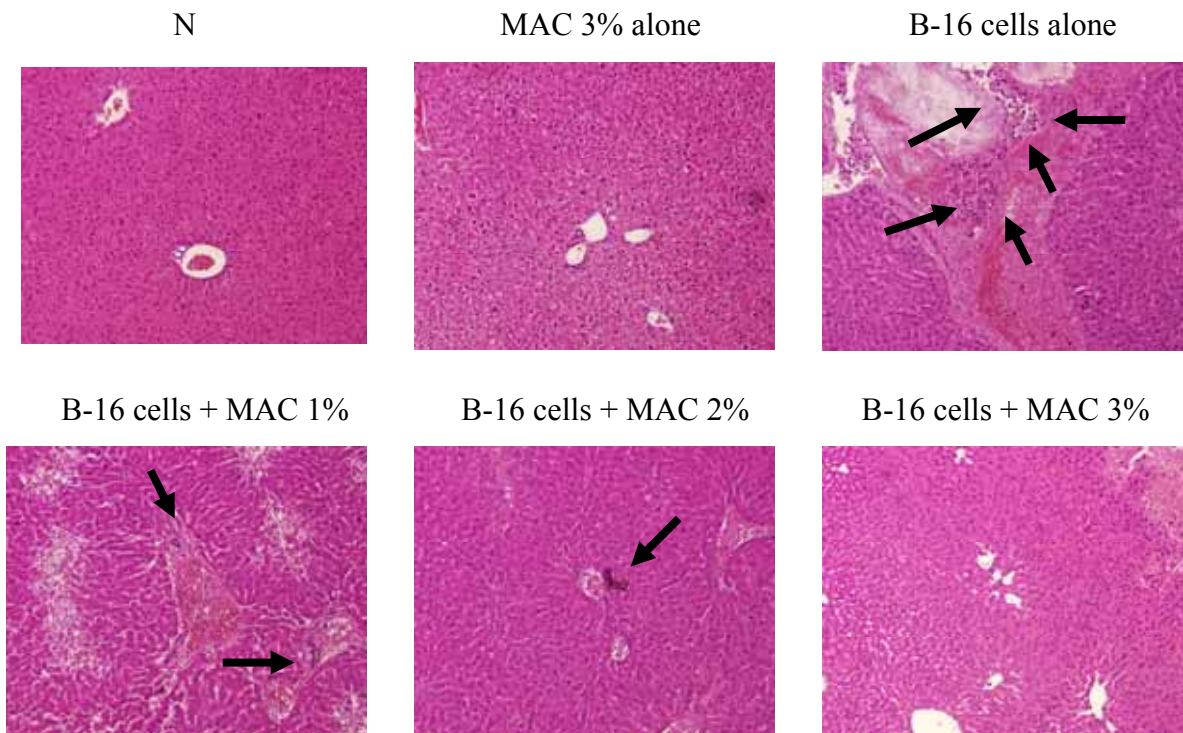




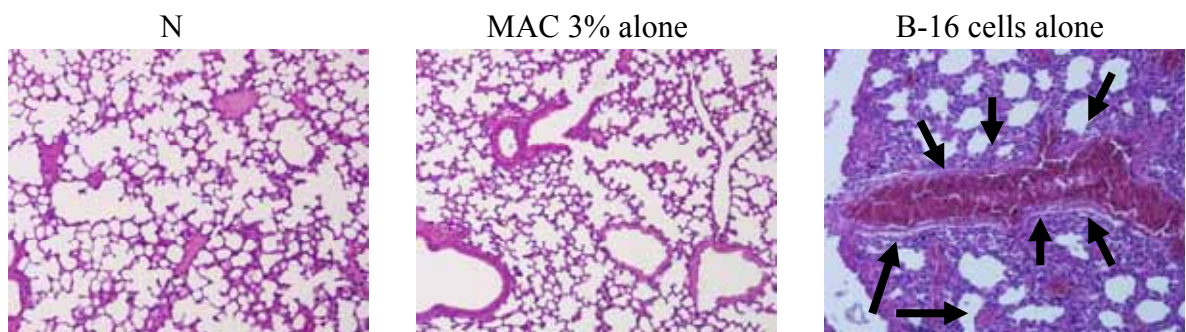
圖五：桑椹花青素(MAC)抑制 B16-F1 黑色素細胞瘤對 C57BL/6 小鼠之轉移現象 (A)

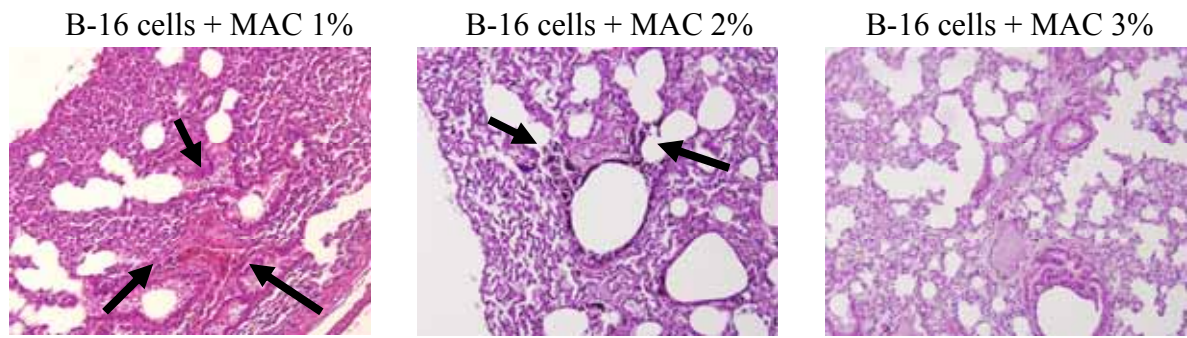


(B) HE stain (liver 100X)

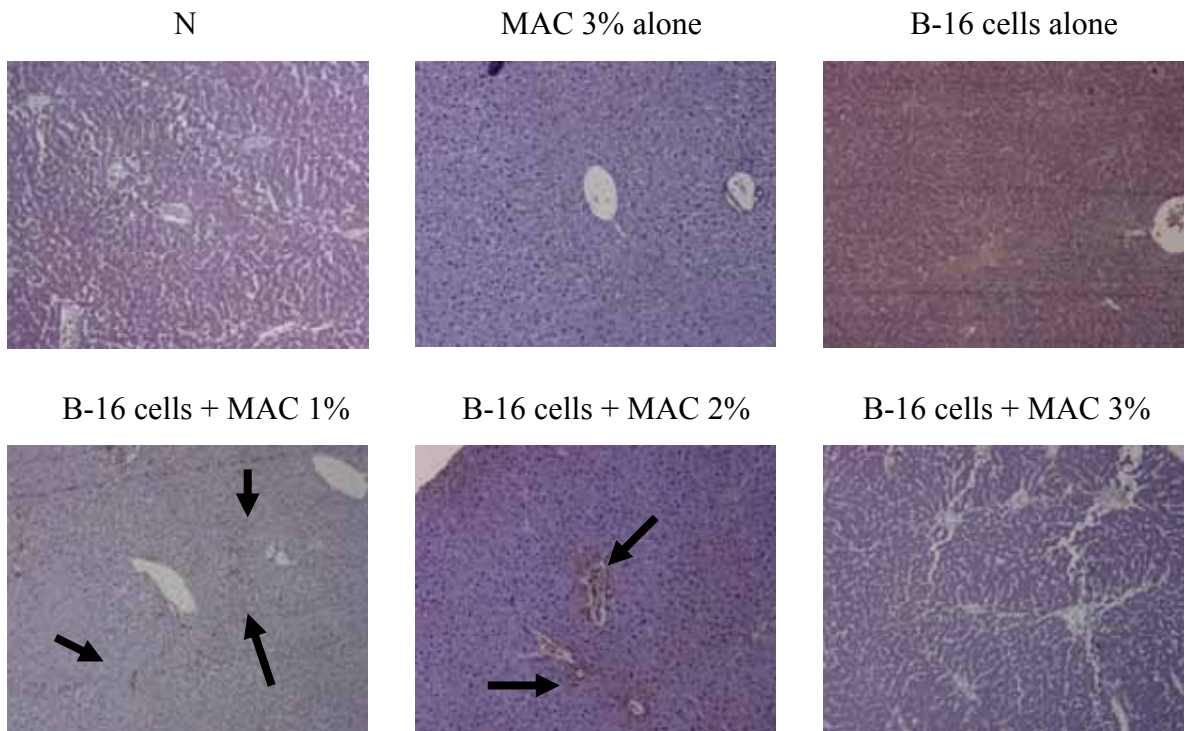


(C) HE stain (lung 100X)





(D) IHC (liver)



(E) IHC (lung)

