

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱	： 白花前胡甲素化合物抗人類非小細胞肺癌之增殖及癌轉移分子機制
------	---------------------------------

執行計畫學生：林怡安

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-031-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：謝逸憲

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

中華民國 109年03月22日

中文摘要

在台灣，吸菸是導致肺癌高罹患率的主要原因之一，而近年來，因 PM2.5 等空氣汙染，導致人類罹患肺部疾病的機率也跟著升高，根據衛福部 106 年國人死因統計結果顯示，肺癌仍舊高居死亡率之首。導因於肺癌高罹患率，持續研究並尋找天然藥物開發並製成保健食品以此來達到降低人類非小細胞癌罹患率是現今刻不容緩的議題。白花前胡素在過去的研究中已發現此種天然藥物具有抗炎症及抗腫瘤的特性。白花前胡丙素(Praeruptorin C, PC)有保護神經功能。然而，現今白花前胡丙素對於肺癌細胞的轉移相關機轉仍然不清楚，因此本計畫將探討白花前胡丙素抑制人類非小細胞癌轉移以及其相關作用機制，並深入探討其白花前胡丙素作為保健食品以預防癌症發生之功效。

因此，為了試驗三種白花前胡素(PA: 白花前胡甲素, PB: 白花前胡乙素, PC: 白花前胡丙素)對非小細胞肺癌細胞株 A549 和 H1299 是否抑制細胞生長，我們利用 MTT 和群落生長試驗證實隨著 PC 藥物濃度增加會明顯抑制 A549 和 H1299 細胞生長。接著，我們利用 PI 染色並以流式細胞儀分析細胞週期分佈，發現白花前胡丙素隨著藥物濃度升高，G0/G1 phase 有逐漸上升的趨勢。利用不同濃度白花前胡丙素 (0-30 μM)處理 A549 和 H1299 細胞以 Boyden chamber 與 wound healing 方式證明隨著藥物劑量增加，白花前胡丙素抑制 A549 和 H1299 細胞之移動和侵襲能力。為了更進一步了解白花前胡丙素抑制細胞轉移之相關轉移蛋白表現，利用西方墨點法證實白花前胡丙素會減少 MMP-1, MMP-7 和 Cathepsin D 的蛋白表現。另外，利用西方墨點法分析 MAPK 相關蛋白的訊息傳遞路徑，發現白花前胡丙素會抑制 ERK 磷酸化的表現，利用 ERK 之磷酸化抑制劑 U0126 (20 μM)和白花前胡丙素 (20 μM)共同處理 A549 細胞以西方墨點法證實共同處理 U0126 和白花前胡丙素會更顯著抑制 A549 細胞轉移能力及 MMP-1, MMP-7 和 Cathepsin D 的蛋白表現。因此，我們可以初步推斷白花前胡丙素可作為一種抗腫瘤增生及轉移藥物。

Abstract

Background:

In Taiwan, smoking is one of the main reasons for the high incidence of lung cancer. Also, the risk of lung diseases has risen due to air pollution such as PM2.5 in recent years. According to the Ministry of Health and Welfare Statistics for recent years, the results show that NSCLC still has the highest mortality rate. Due to the high incidence of lung cancer, it is an urgent task to continue to explore the development of natural drug and make health food to reduce the incidence of lung cancer. In the past, Praeruptorin has been found that this natural medicine has anti-inflammatory and anti-tumor properties. Among them, Praeruptorin C (PC) has been found the function that can protect nerve. However, the mechanism related to the proliferation and metastasis of NSCLC is still unknown. Therefore, we will explore the molecular mechanism of PC inhibit cell proliferation and invasion of human NSCLC.

Materials & Methods:

Cell growth rate of NSCLC cell line A549 and H1299 was detected via MTT assay and colony formation. Cell cycle was detected by Flow cytometry. Wound healing assay and Boyden chamber assay was used to investigate cell migration and invasion. The expression of MAPKs, MMP1, MMP7 and Cathepsin D protein was measured by western blot.

Results:

MTT assay and colony formation showed PC inhibits cell growth and proliferation rate of A549 and H1299 in a dose dependent. Using PI stain by flow cytometry to detect that cell cycle arrest at G0/G1 arrest in PC-treated A549 and H1299 cells. The results of wound healing assay and Boyden chamber suggested that PC inhibits cell migration and invasion in A549 and H1299 cells. Western blot have confirmed that PC can reduce the protein expression of MMP1, MMP7 and Cathepsin D. Co-treatment with PC and U0126 significantly inhibited MMP1, MMP7 and Cathepsin D expression, cell migration, and cell invasion.

Conclusions:

These results demonstrate that PC can significantly decrease the proliferation and metastasis of NSCLC cell lines. In conclusion, we proved the association between the performance of MMP1, MMP7 and Cathepsin D in NSCLC progression. Thus, PC may be an anti-tumor drug for the prevention of NSCLC.

(一) 研究動機與研究問題

肺癌在世界所有癌症中死亡率佔首位，已開發與開發中國家間均是如此。在台灣，肺癌已連續超過 5 年為癌症死亡率之首，而在女性癌症死因中肺癌已蟬聯 20 年癌症死亡率之首。由於早期肺癌並無任何症狀，故絕大部分確診肺癌 7 成左右已屬晚期肺癌。為降低肺癌高罹患率並延長其存活率，現今天然物保健食品與天然藥物之研發為目前研究一大目標，過去文獻指出，天然物薑黃素具有抑制癌細胞生長之功效[1]，市面上也廣泛出現以薑黃素作為保健食品以其預防癌症發生。而白花前胡臨床上一般用於肺部疾病治療，對於是否預防肺癌細胞生長仍是至今探討的問題。多年來對於白花前胡的衍生物已有許多研究，其中白花前胡甲素 (Praeruptorin A, PA) 已被證實能減少 MMP-2 的 mRNA 和蛋白藉此抑制子宮頸癌細胞增生和轉移，然而白花前胡素對於肺癌細胞遷移和侵襲的相關蛋白 MMPs 和 uPA 以及其抑癌機制還未有研究。因此，本計畫將深入探討白花前胡素對於人類非小細胞癌的生物功能、訊息傳遞和相關基因調控，更進一步探討其詳細分子機制。

(二) 文獻回顧與探討

一、肺癌 (Pulmonary carcinoma)

1. 簡介

肺癌大多指的是生長在氣管、支氣管和肺臟的原發上皮性惡性腫瘤，就其生物特性和臨床表現主要可分為小細胞癌 (SCLC) 和非小細胞癌 (NSCLC)，而後者主要包括腺癌、鱗狀細胞癌和大細胞癌三種類型。在台灣，前者所佔的比例約為 12~15%，後者共約 85~88%，而常見症狀為咳嗽、咯血、體重減輕、胸痛、呼吸困難。肺癌是全球性的與日俱增的癌症，在全球平均男女罹病率比例約為 2.7:1，男性發生率最高的地區為歐洲、北美、澳洲/紐西蘭和南美洲，女性肺癌的地域分布則大約反映過去的吸菸比率分布，發生率最高位於北美和西北歐[2, 3]。在過去數十年當中，亞洲女性的肺癌死亡率則有顯著的增加，以台灣為例，肺癌死亡率在四十年來男與女都增加了近 12 倍，在男性癌症死亡病因中，肺癌位居第二位，至於女性方面，肺癌早已躍居女性癌症死亡率的第一位，自 2010 年起，肺癌患者的總人數更是超越肝癌，連續 8 年蟬連癌症死因首位。而肺癌一般好發於 40 歲以後，罹癌率隨著年齡上升而增加，50~60 歲上升的最顯著。

2. 肺癌的危險因子

細胞的癌變與 DNA 突變及遺傳訊息有關，這些變化會影響細胞的正常功能，包括細胞增殖、細胞凋亡和 DNA 修復。損傷累積的越多，罹患癌症的風險也就越高，而導致肺癌罹患率上升的幾項危險因子如下：

2-1.香菸：已有許多研究證實香菸是導致肺癌的主要危險因子，隨著吸菸的年數、每天吸菸量、焦油含量的增加，罹癌的機率也跟著上升[4]。在多數的國家中，因為吸菸而導致肺癌的患者佔了肺癌病患的 80%。除了吸菸，二手菸也是導致不吸菸者罹患肺癌的原因，有許多研究表明在西方國家吸二手菸而罹患肺癌的機率有顯著增加，和吸菸者共同生活的人罹癌風險增加 20~30%[5]，而工作環境中有二手菸的人其罹癌風險增加 16~19% [6]。

2-2.放射線物質：氡氣是和肺癌最有關的游離性輻射，其在鈾的天然放射性衰變中產生，是一種自然產生的放射性氣體[7]。鈾礦工因礦區中氡氣的暴露，導致罹患肺癌危險性增加。在美國，氡氣是造成肺癌的第二大危險因子[8]。居家氡氣濃度較高且吸菸者，其肺癌罹病機率也可能較高。

2-3.石棉：石棉是纖維狀的矽酸鹽結晶，有研究指出，使用石棉為原料的下游工廠，其員工罹患肺癌的風險越高[9]。最近也有研究發現，石棉和香菸具有加成作用，大幅增加罹患肺癌的機率。以瑞典為例，石棉造成肺癌的相對危險性達 10 倍，若同時又有吸菸，則危險性可達 80 倍[10]。

2-4.空氣汙染物：懸浮微粒(PM2.5)等戶外空氣汙染物會增加罹患肺癌的風險，特別是燃燒化石燃料所產生的廢氣。二氧化氮濃度每增加 10ppb，人類患肺癌風險就提高 14%。也有研究顯示，室內空氣汙染物例炒菜油煙、燃燒木材、木炭、糞便或作物殘渣都可能提高罹癌風險 [11]。

2-5.遺傳因素：約 8% 肺癌由遺傳因素所致。若親屬中有肺癌罹患者時罹病機率會增加一倍 [12]。

3. 肺癌的診斷

胸部 X 光是肺癌最常見的診斷方式，當病患的症狀疑為肺癌時，胸部 X 光可提供初步的檢查和評估。藉由 X 光片發現肺結節、肺腫瘤或肋膜積水而進行血液癌症指數分析、痰液癌細胞檢查、電腦斷層、正子攝影、支氣管鏡或胸腔超音波檢查。若病灶區在兩年前至今均無變化，大多為良性，持續追蹤即可。胸部 X 光上所見病灶可再由電腦斷層掃描幫助判別良性或惡性腫瘤。電腦斷層可以分析腫瘤大小、形狀、鈣化程度、縱膈腔淋巴結評估及病灶所分布的位置。近年來，低劑量電腦斷層用來偵測肺部較小病灶有較佳的敏感度，也已被多項研究證實，能於高危險族群中降低肺癌死亡率。所有肺癌均可使用 TNM 分期法。另外，小細胞癌亦可分為侷限期(limited stage)和擴散期(extensive stage)，其中侷限期定義為病灶限於單側胸腔，且位於單次放射治療的涵蓋範圍內，如果病灶擴散到另一側肺、對側胸部之淋巴結或遠處器官，則稱為擴散期。約半數以上的肺癌在初次診斷時，便已發現有遠端轉移的現象，而一旦出現遠端轉移，肺癌之五年存活率通常小於 5%。

4. 肺癌治療方法

早期非小細胞癌的治療以手術切除為主，將肺原發腫瘤和局部淋巴結切除為目前標準治療方式之一，依照病患心肺功能和身體狀況決定手術方式。假若病患不適合接受手術，則會選擇放射治療，利用高能輻射劑量集中於腫瘤部位，局部殺死癌細胞，減少對於正常組織影響。此外，化學藥物療法為全身性治療，第四期肺癌病患如果體力良好，行四至六週期的含鉑化學治療能有效增加存活率。近年來標靶藥物治療更是為後期的肺癌病患帶來了更多的治療選擇和希望。標靶治療，是在一開始就選擇癌細胞特有標的，用專一性的藥物攻擊癌細胞特殊構造藉以殺死癌細胞，而對正常的細胞不造成或極低傷害。標靶藥物能有效的延長存活期，維持生活品質。目前非小細胞癌的標靶藥物主要以抑制表皮生長因子受體(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)-酪胺酸酶(Tyrosine Kinase)活性的藥物為主[13]。這類的藥物在台灣目前有兩種，一種為艾瑞莎(Iressa)，學名為 Gefitinib，是全球第一個非小細胞癌標靶藥物，非小細胞肺癌常有過多 EGFR 表現，促使癌細胞快速生長、轉移和抗藥性，造成患者病況迅速惡化。而「艾瑞莎」就是 EGFR 抑制劑，主要攻擊目標為癌細胞過多的表皮生長因子受體，藉此抑制癌細胞增殖、轉移與抗藥性，以此達到治療效果。另一種為得舒緩(Tarceva)，學名為 Erlotinib，其與「艾瑞莎」有類似的作用機轉，同樣是表皮生長因子受體-酪胺酸激酶(EGFR-TK)的拮抗劑。另外市面上還有一些標靶藥物例如癌思停(Bevacizumab, Avastin)和爾必得舒(Cetuximab, Erbitux)，需要配合其他化療藥物一起治療，可小幅增加患者的存活率。

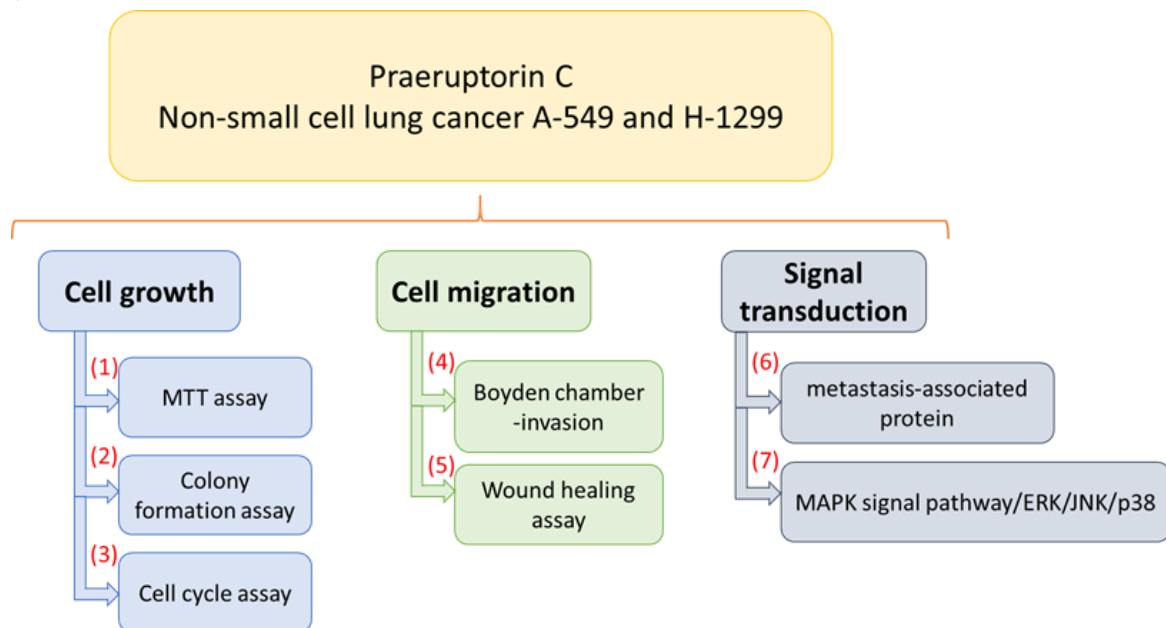
二、癌細胞的轉移

癌細胞轉移前，首先必須繞過周圍鄰近細胞，透過重組骨架蛋白，延伸細胞，附著在其他細胞和細胞外基質(extracellular matrix)，癌細胞能透過向前延伸一部份細胞，並讓後半部跟著向前進以此來進行遷移。而癌細胞和細胞外基質在腫瘤的侵襲過程中有著重要的相互作用。在上皮細胞和內皮細胞下細胞外基質形成基底膜(basement membrane)，當癌細胞遇到基底膜時，為了穿過基底膜，細胞會分泌消化酶的混和物，將基底膜的蛋白質水解，以便穿過基底膜進入血液循環系統，再經由血液轉移到附近器官。現已發現癌細胞的侵襲轉移和多種降解酶成正相關，包括基質金屬蛋白水解酵素(MMPs, matrix metalloproteinases)和 PA (Plasminogen activator) 的研究最為廣泛。其中以 MMP-2、MMP-9 和尿激酶型血漿酶原激活物(uPA, urokinase type plasminogen activator)與癌細胞的侵襲遷移最為相關。有文獻指出，存在於自然界中的順式肉桂酸，可藉由抑制 MAPKs 的訊息傳遞路徑並抑制轉錄因子 AP-1 與 NF- κ B 的活化，降低 MMP-2 和 MMP-9 之 mRNA 表現量，抑制了癌細胞的轉移能力[14]。另外，還有研究指出，一種由印度棟 (Azadirachta indica)樹葉與花提煉的天然物 Nimbolide，以 gelatin/casein zymography、西方墨點法方式證實可以抑制 uPA 蛋白表現和活性[15]。而目前也已有許多研究得知降低 MMP-2、MMP-9 與 uPA 蛋白酶的活性藉此達到抑制腫瘤細胞轉移[16]。

三、白花前胡素(Peucedanum praeruptorum Dunn)

白花前胡(Peucedanum praeruptorum Dunn)屬多年生草本植物，為傘形科(Apiaceae)，分布在中國的四川、浙江、福建、河南等地區，生長在海拔 250 米至 2000 米，而白花前胡的乾燥根為常見的中藥材，能解熱祛痰、治感冒咳嗽、支氣管炎等。過去有研究指出，白花前胡的根內含有白花前胡甲素(Praeruptorin A, PA)、白花前胡乙素(Praeruptorin B, PB)、白花前胡丙素(Praeruptorin C, PC)等的香豆素類成分，其中的白花前胡甲素抑制 NF- κ B 活性並且下調 TNF- α 表達[17]，還有通過抑制 NF- κ B 途徑的活化來抑制脂多醣誘導的發炎反應，藉此方法使 RAW 264.7 巨噬細胞發揮抗炎作用[18]，還有透過抑制 MMP-2 表現與 ERK1/2 訊息傳遞路徑進而抑制人類子宮頸癌的增殖和侵襲[19]。除此之外，也有研究試驗發現白花前胡甲素可以增強阿黴素(doxorubicin, DOX)對 SGC7901 胃癌細胞的作用，白花前胡甲素和 DOX 搭配治療後細胞生長的下降幅度高於單獨使用化療藥物，表明了 PA 可以減少 DOX 劑量後也可達到預期的治療效果[20]。而白花前胡乙素透過調節固醇調節元件結合蛋白(Sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)發揮降脂的作用。另外，白花前胡丙素透過抑制含有 GluN2B 的 NMDA 受體(N-methyl-D-aspartate receptor)對抗 NMDA 誘導的細胞凋亡(NMDA-induced apoptosis)進行神經保護作用[21]。過去文獻顯示，Praeruptorin A 等成分確實具有抑制腫瘤細胞轉移和抗發炎的能力，因此本次研究主要探討 PA、PB、PC 這三種藥物對於抑制人類肺癌細胞轉移之分子機制。

(三) 實驗架構圖



(四) 研究方法及步驟

細胞培養

非小細胞肺腺癌細胞株 A549，利用 DMEM 外加 10 % fetal bovine serum、100 units/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin 培養液培養細胞於 10 cm dish 中，培養條件為 37°C、5% CO₂，每日將細胞置於顯微鏡下觀察，並定期更換培養液。

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

將細胞以每 3 × 10⁴ 個細胞/well，接種在 24 well 中培養 24 小時。接著每個 well 各加入不同濃度(0、10、20、30、40、50 µM)的 PA、PB、PC。各在 24 與 48 小時後，去除上清液後每個 well 加入 1ml 10%MTT 試劑(5 mg/ml)，放置 4 小時後去除上清液。用異丙醇(isopropanol)溶解藍紫色結晶(Formazan)，利用 ELISA reader 以波長 573 nm 進行讀取吸光值。最後，將不同濃度(0、10、20、30、40、50 µM)與相對的吸光值畫成統計圖表。

Colony formation assay

將細胞以 1 × 10³ 個細胞/well 接種在 6 well 中培養 24 小時。接著每個 well 各加入不同濃度(0、10、20、30、40、50 µM)的 PA、PB、PC。藥物作用 14 天，每三天要更換一次培養液和藥物。之後在每個 well 中加入 2 ml 的甲醇固定 30min，用 10% Giemsa 染劑過夜染色，將結果掃描並計算細胞數量。

細胞侵襲與遷移試驗

下層 chamber 中加入每孔 35 µl 含有胎牛血清的細胞培養液，接著放置一片孔徑大小為 8 µm 的半透膜，再加上塑膠墊、上層 chamber。在上層 chamber 中加入每孔 50 µl 不含胎牛血清的細胞培養液以及不同濃度(0、10、20、30 µM)的 PA、PB、PC 處理過 24 小時的細胞。18 小時後將半透膜的下層面用甲醇固定 30min，用 5% Giemsa 染劑過夜染色，用光學顯微鏡拍照並用軟體計數。利用 Boyden chamber 研究細胞侵襲能力時，需在上層 chamber 的每孔加入 100 µg/cm² Marix gel (0.5 mg/ml)，用以模擬腫瘤細胞侵襲基底膜與細胞外基質。

細胞週期分析(Flow cytometry analysis)

將 4 × 10⁵ 個細胞培養於 6 cm dish 中。以不同濃度(0、10、20、30 µM)的 PA、PB、PC 處理細胞 24 小時，細胞以 trypsin 收取，緩慢加入冰的 70%酒精固定，放置於-20°C固定 3 天。細胞離心至底部，以 PBS 清洗細胞，接著加入 1 ml PI/Triton-100 溶液(0.02 mg/ml Propidium Iodide、0.02 mg/ml RNase 以及 0.1% Triton-100 溶於 PBS 中)並打散細胞，避光染色 30 分鐘，即可進行流式細胞儀分析。

Wound healing assay

6 well plate 每個 well 貼上 2 個 Culture-Insert 2 well，每個 Culture-Insert 的 well 中接種 10⁵ 顆細胞，培養 24 小時後，拆除 Culture-Insert 2 well，以光學顯微鏡拍攝 0 hr，之後吸除上清

液且加入含有血清與細胞生長抑制劑的培養液以不同濃度(0、10、20、30 μ M)的 PC，作用 12、24 小時後各拍一次照，觀察不同濃度下傷口癒合程度。

細胞培養中蛋白萃取及定量

PBS 清洗細胞後，加入含有蛋白酶抑制劑的 Lysis Buffer(NETN)反應 10 分鐘，將細胞從培養皿上刮取下來。超音波震碎細胞後，13000rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 30 分鐘，取上清液，即為蛋白萃取液。接著使用 Bradford 法測定蛋白質含量：使用 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBG)測定蛋白，其在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色時用分光光度計 OD 595 nm 波長的測量吸光值。先用胎牛血清白蛋白(BSA)作為一種標準蛋白質定量分析試劑，用以做出標準曲線，然後測量蛋白液，再以內插法算出其中蛋白質的含量。

西方墨點法

樣品 10 μ l 置入上膠，下膠為 10%的 SDS-PAGE 凝膠，80V，120 分鐘跑電泳。PVDF 膜放入甲醇活化，用轉印模組以 100V 將蛋白質轉印到膜。接著利用 Block buffer(30ml 的 TBST (TBS+0.1%Tween-20) + 1.5g 的脫脂牛奶)1 小時，TBST 清洗 10 分鐘/3 次，適當稀釋的一級抗體在 4 $^{\circ}$ C 反應 overnight。用 TBST 清洗 10 分鐘/3 次，使用二級抗體反應 1 小時。用 TBST 清洗 10 分鐘/3 次，之後加入呈色劑，以冷光法呈色並分析。

RNA 萃取

以不同濃度(0、10、20、30 μ M)的 PC 處理細胞 24 小時，將細胞以 trypsin 收取，每管細胞中加入 1ml TRIzol reagent 和 200 μ l chloroform，上下搖晃使溶液混和。冰上靜置 15 分鐘後，以 13000rpm，4 $^{\circ}$ C，離心 15 分鐘。將離心管中上層透明液體抽取至新離心管，以 1:1.25 的比例和冰 isopropanol 混和均勻。以 13000rpm，4 $^{\circ}$ C，離心 20 分鐘。將上清液吸除，使用冰 75% 酒精清洗三次。待上清液清除後，將 eppendorf 中的沉澱物風乾。加入 20 μ l 的 RNase-free water，將 eppendorf 置於乾浴槽中，以 70 $^{\circ}$ C 回溶 5 分鐘。

即時聚合酶連鎖反應

將 RNA 反轉錄成 cDNA 後，使用 Promega- GoTaq $^{\circ}$ qPCR Master Mix kit 於 PRISM ABI7700 Sequence Detecting System (美國 Applied Biosystems 公司)上機進行反應，反應結束後使用軟體分析數據。

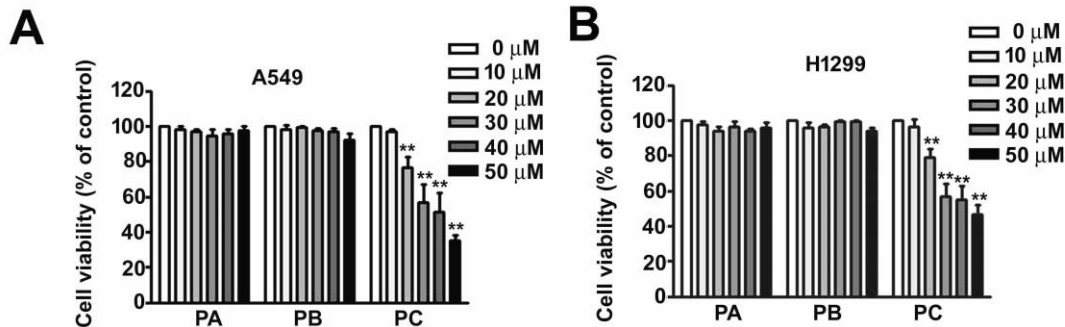
統計分析

所有數據將以電腦統計軟體 Sigma Stat (Jandel Scientific Soft ware, USA)進行 One-way analysis of variance (One-way ANOVA)分析。分析結果 $p < 0.05$ ，統計上具有顯著性差異。

(五) 實驗結果

探討 PC 對於 A549 和 H1299 細胞是否影響細胞生長速率

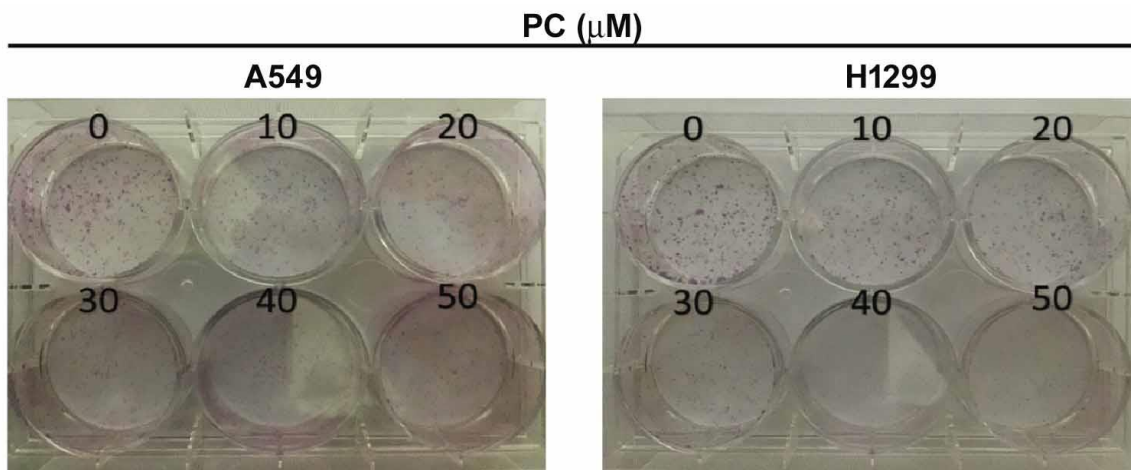
首先我們利用 MTT，將 PC 以不同濃度(0-50 μM)處理 A549 和 H1299 細胞，觀察藥物對於此兩株細胞是否抑制短期及長期生長影響。從實驗結果圖中可以發現，隨著藥物劑量濃度升高，PC 對於此 A549 和 H1299 細胞之生長具有抑制作用 (圖一)。



探討 PC 對於 A549 和 H1299 細胞是否影響細胞群落生長

我們利用 colony formation 方式，將 PC 以不同濃度(0-50 μM)處理 A549 和 H1299 細胞，觀察藥物對於此兩株細胞是否抑制細胞生長。從實驗結果圖二中可以發現，隨著藥物劑量濃度升高，PC 對於此 A549 和 H1299 細胞的增生具有顯著抑制作用。

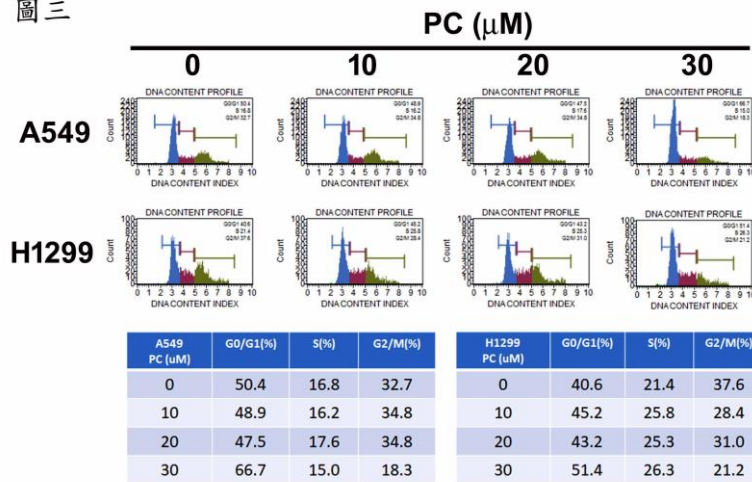
圖二



探討 PC 對於 A549 和 H1299 細胞是否影響細胞週期

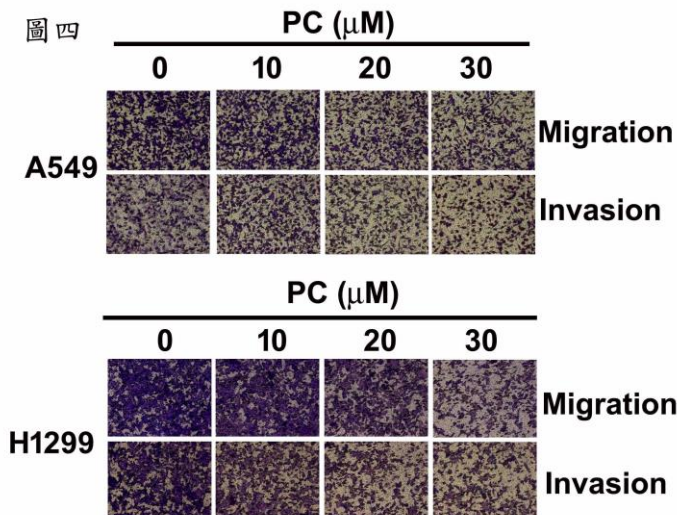
利用 PI 染色以流式細胞儀分析，試驗 PC 是否影響 A549 和 H1299 細胞週期分佈。從實驗結果來看可以發現細胞經過 PC 處理 A549 和 H1299 細胞會造成細胞週期 G0/G1 期 具有顯著的增加(圖三)。表示 PC 會誘導 A549 和 H1299 細胞週期停留 G0/G1 期。

圖三

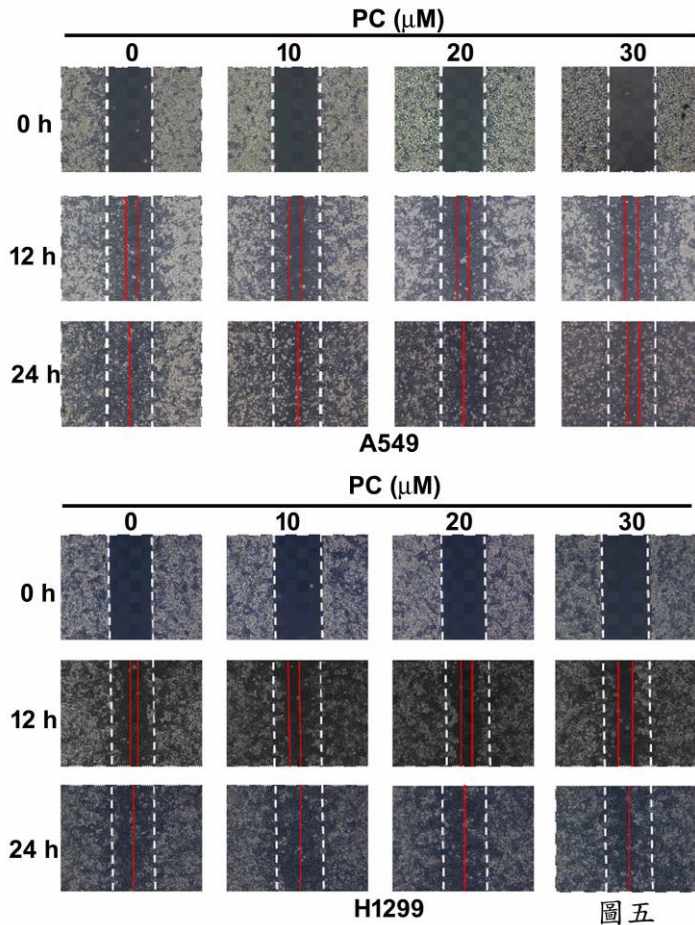


探討PC 是否具有抑制 A549 和 H1299 細胞移動及侵襲之能力

利用 Boyden chamber 試驗經由 PC 處理 A549 和 H1299 細胞株後是否抑制細胞移動及侵襲。從結果可得知 PC 隨著劑量提升，抑制 A549 和 H1299 細胞移動及侵襲效果越加明顯(圖四)。



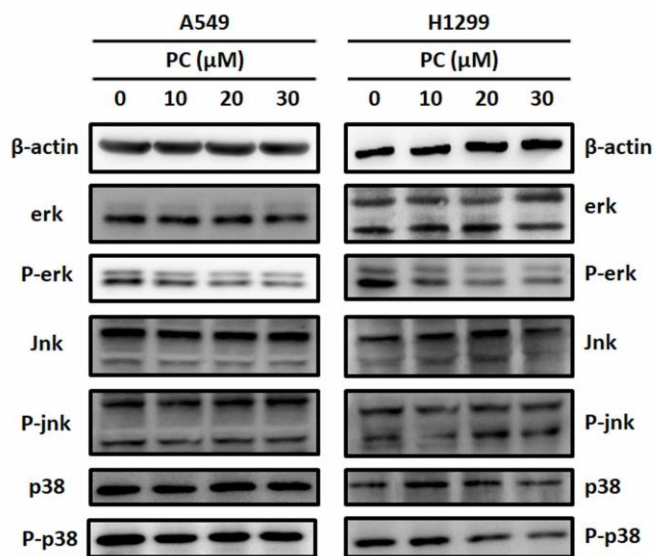
利用 Wound healing assay，將 PC 處理 A549 和 H1299 細胞作用 24 小時，試驗藥物是否能抑制 A549 和 H1299 細胞株的爬行能力。從結果可知，經過 12 小時和 24 小時藥物處理後，PC 隨著藥物濃度提升，抑制細胞爬行能力越明顯(圖五)。



圖五

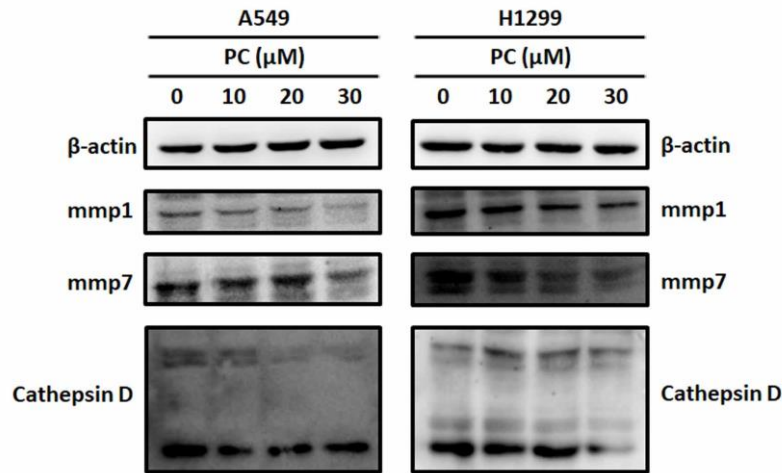
探討PC對A549和H1299細胞轉移機轉及相關訊息傳遞路徑

利用西方墨點法分析PC是否調控MAPK相關蛋白(ERK, JNK, p38)磷酸化等訊息傳遞路徑。從結果中發現PC會使ERK之磷酸化蛋白表現量下降，但不影響JNK和p38的活化路徑(圖六)。



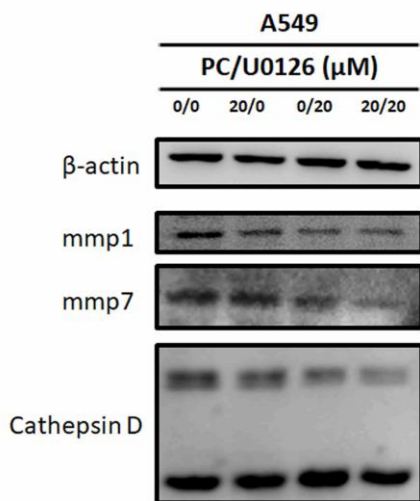
圖六

以西方墨點法試驗 A549 和 H1299 經由 PC 以不同濃度處理後，是否抑制 MMPs 和 Cathepsin D 的蛋白表現量。從結果中可以發現，PC 會使 MMP-1、MMP-7 及 Cathepsin D 之蛋白表現量下降(圖七)。

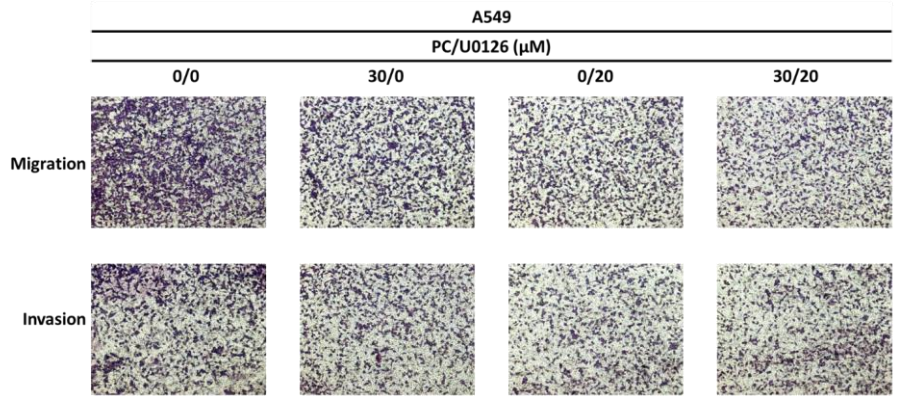


圖七

利用西方墨點法和 Boyden chamber 試驗分析 PC 是否藉由抑制 ERK 之磷酸化表現量來抑制 MMP1、MMP7 及 Cathepsin D 之表現量。經過西方墨點法分析結果可以得知，經由處理藥物 PC 和 ERK 磷酸化抑制劑 U0126 後，MMP1、MMP7 及 Cathepsin D 之蛋白表現量有更顯著下降(圖八)，而從 Boyden chamber 試驗中的結果可以發現處理 PC 和 U0126 後明顯抑制細胞移動和侵襲能力 (圖九)。



圖八



圖九

(六) 討論

近幾年來隨著空氣汙染等因素影響，造成人類罹患肺部疾病的機率不斷提升，而肺癌罹患率在台灣十大癌症中更是居高不下。要開發新的抗癌藥物，在治療或是預防癌症之餘又不會傷害到人體正常的細胞，是一項困難且艱深的任務。而尋找天然藥物來治療或預防癌症是現今癌症醫學研究的重要課題之一，至今在癌症治療的方面已經有許多顯著的突破。抑制肺癌細胞生長及轉移之過去文獻中，天然藥物水飛薊素對於非小細胞肺癌細胞株 A549 具有抑制細胞生長之作用[22]。此文獻中指出，水飛薊素處理 A549 細胞 72 小時後，G0/G1 phase 具有顯著的 cell arrest，且能誘導細胞凋亡。除了天然藥物抑制肺癌細胞外，也有研究指出以樺褐孔菌為原料，提取樺褐孔菌多醣，藉由下調 MMP-2 及 MMP-9 的蛋白表現量來抑制 A549 的轉移能力[23]。

綜觀以上研究，我們了解到某些天然生物萃取物具有抑制肺癌細胞生長的能力，但並不清楚天然萃取物如何影響肺癌的訊息傳遞路徑，而本次研究計畫所使用的白花前胡丙素常用於治療肺熱咳嗽、支氣管炎等臨床症狀，也曾於過去研究中發現可能具有保護神經的功效，並無發現是否具有抑制癌細胞等能力。為此回顧此次研究計畫之實驗結果，我們從 MTT 及 Cell colony assay 的結果中證實，PC 對於 A549 和 H1299 此兩株細胞，不論是短期或是長期生長都有延緩作用，於 30-50 μ M 之高劑量時能抑制細胞增生。以 PI 染色與流式細胞儀試驗結果可以證實 PC 具有抑制此兩株細胞的生長，減緩細胞 DNA 合成的速度。利用 Boyden chamber 和 Wound healing assay 中初步證實 PC 具有抑制細胞侵襲及轉移能力。而後為更加了解藥物是經由何種訊息傳遞路徑來抑制癌細胞生長及轉移，經由西方墨點法證實 PC 藉由抑制 ERK 磷酸化表現量來下調 MMP-1、MMP7 及 Cathepsin D 之蛋白表現量，並從 Boyden chamber 試驗中證實 PC 以此途徑來抑制肺癌細胞的轉移能力。綜觀以上，我們從本次研究推測 PC 以此機制來抑制 A549 及 H1299 之細胞生長和轉移。

未來實驗中，我們將進一步從下列幾個方向更深入了解藥物 PC 對肺腺癌細胞轉移的抑制機轉及訊息傳遞路徑，並且利用動物實驗來探討藥物是否具有抑制老鼠體內癌細胞之增生和轉移能力。

1. 利用西方墨點法與 qRT-PCR 分析 PC 是否影響 A549 和 H1299 之 EMT 相關蛋白與基因 (E-cadherin, N-cadherin, Slug, Snail 等) 表現。
2. 用核質蛋白分離以及免疫螢光染色分析 PC 是否影響 MMP1、MMP7 及 Cathepsin D 啟動子上的相關轉錄因子(transcription factor)，例如: Sp1, AP1, NF-kB, Oct4 等等
3. 利用動物實驗以背部注射腫瘤細胞觀察 PC 是否抑制腫瘤生長及尾靜脈注射觀察 PC 是否抑制腫瘤轉移，來說明 PC 作用在細胞實驗的結果。

參考文獻

1. Sordillo, P.P., et al., Curcumin and cancer stem cells: curcumin has asymmetrical effects on cancer and normal stem cells. *Anticancer Res*, 2015. 35(2): p. 599-614.
2. Barta, J.A., et al., Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*, 2019. 85(1).
3. Kabat, G.C., Aspects of the epidemiology of lung cancer in smokers and nonsmokers in the United States. *Lung Cancer*, 1996. 15(1): p. 1-20.
4. Shen, X.B., et al., Analysis and estimates of attributable risk factors for lung cancer in Nanjing, China. *Lung Cancer*, 1996. 14 Suppl 1: p. S107-12.
5. Doll, R., et al., The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 1981. 66(6): p. 1191-308.
6. Taylor, R., et al., Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol*, 2007. 36(5): p. 1048-59.
7. Schmid, K., et al., Radon in indoor spaces: an underestimated risk factor for lung cancer in environmental medicine. *Dtsch Arztebl Int*, 2010. 107(11): p. 181-6.
8. Neuberger, J.S. et al., Residential radon exposure and lung cancer: risk in nonsmokers. *Health Phys*, 2002. 83(1): p. 1-18.
9. Selikoff, I.J. et al., Asbestos-associated deaths among insulation workers in the United States and Canada, 1967-1987. *Ann N Y Acad Sci*, 1991. 643: p. 1-14.
10. Gustavsson, P., et al., Low-dose exposure to asbestos and lung cancer: dose-response relations and interaction with smoking in a population-based case-referent study in Stockholm, Sweden. *Am J Epidemiol*, 2002. 155(11): p. 1016-22.
11. Lim, W.Y. ,et al., Biomass fuels and lung cancer. *Respirology*, 2012. 17(1): p. 20-31.
12. Yang, I.A., et al., Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis*, 2013. 5 Suppl 5: p. S454-62.
13. Ettinger, D.S., et al., Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017. 15(4): p. 504-535.
14. Chen, Y.L., et al., Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Pharm Sci*, 2011. 43(3): p. 188-94.
15. Hsieh, Y.H., et al., Induction of cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis by nimbolide in human renal cell carcinoma cells. *Tumour Biol*, 2015. 36(10): p. 7539-47.
16. Conner, E.A., et al., HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating

- JNK1. *Carcinogenesis*, 1999. 20(4): p. 583-90.
17. Wang, C., et al., Effects of dl-praeruptorin A on nucleus factor-kappaB and tumor necrosis factor-alpha expression in ischemia-reperfusion hearts. *Acta Pharmacol Sin*, 2004. 25(1): p. 35-40.
 18. Yu, P.J., et al., Praeruptorin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in murine macrophages through inhibition of NF-kappaB pathway activation. *Phytother Res*, 2011. 25(4): p. 550-6.
 19. Wu, M.H., et al., Praeruptorin A Inhibits Human Cervical Cancer Cell Growth and Invasion by Suppressing MMP-2 Expression and ERK1/2 Signaling. *Int J Mol Sci*, 2017. 19(1).
 20. Liang, T., W. Yue, et al., Chemopreventive effects of Peucedanum praeruptorum DUNN and its major constituents on SGC7901 gastric cancer cells. *Molecules*, 2010. 15(11): p. 8060-71.
 21. Yang, L., et al., Neuroprotective effects of daphnetin against NMDA receptor-mediated excitotoxicity. *Molecules*, 2014. 19(9): p. 14542-55.
 22. Sharma, G., et al., Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells. *Anticancer Research*, 2003. 23(5): p. 2649-2655.
 23. Lee, K., et al., Inonotus obliquus-derived polysaccharide inhibits the migration and invasion of human non-small cell lung carcinoma cells via suppression of MMP-2 and MMP-9. *International journal of oncology*, 2014. 45(6): p. 2533-2540.