

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Flavones 化合物抑制肺癌細胞 migration/invasion 或
viability 之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2311-B-040-005-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系生物化學科

計畫主持人：謝易修

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 95 年 9 月 14 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Flavones 化合物抑制肺癌細胞 migration/invasion 或 viability 之研究

計畫編號：94-2311-B-040-005

執行期限：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

計畫主持人：謝易修 中山醫學大學生化所

計畫參與人員：蕭永晉 中山醫學大學生化所

一、中文摘要

類黃酮(Flavonoids)廣存於蔬菜、水果等植物中，已有許多文獻證實具抗氧化活性，降低血脂肪，促使癌細胞凋謝死亡及防正常細胞癌化等作用。因此，本研究主要在於探討類黃酮中黃酮(flavones)衍生物之抑制癌細胞增生、遷移和侵犯作用及分子機制。選用 11 種黃酮衍生物(flavone, flavonol, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, chrysin, bacicalein, apigenin, luteolin, rutin, β -naphthoflavone, diosmin)，在 0-100 μ M 的濃度範圍下以 11 種黃酮衍生物分別處理肺癌細胞 A549，利用 cell migration/invasion assay 及 MTT assay 分析肺癌細胞的侵襲轉移能力以及細胞存活率的變化。結果發現，其中 chrysin, apigenin, β -naphthoflavone, diosmin 等四個化合物可顯著抑制細胞的存活率，其 LC_{50} 分別為 66 μ M (chrysin)、45 μ M (apigenin)、76 μ M (diosmin)、82 μ M (β -naphthoflavone)。而 flavonol, 7-hydroxyflavone, bacicalein, luteolin 等四個化合物則是顯著的抑制細胞的侵襲能力且對細胞存活率並無顯著影響，其 IC_{50} 分別為 41 μ M (flavonol)、59 μ M (7-hydroxyflavone)、100 μ M (bacicalein)、82 μ M (luteolin)。因此，進一步利用 gelatin-及 casein-zymography 的方法，探討 flavonol, 7-hydroxyflavone, bacicalein, luteolin 等四個化合物對於細胞外基質降解酵素表現關係。並分析細胞移動及貼附能力的影響。結果發現，此四

個化合物對細胞移動及貼附能力以及 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2), u-PA (urokinase-plasminogen activator) 的表現皆有不同程度的抑制效果。此外，以促癌物質 TPA 誘導 A549 細胞的侵襲轉移，發現 luteolin 可以消除 TPA 所促進的 MMP-9 表現進而阻斷 TPA 誘導 A549 細胞的侵襲轉移。然而，luteolin 的抑制效果與抑制 TPA 所誘導 ERK1/2 訊息傳遞的活化進而抑制 TPA 所促進的 MMP-9 表現有關。

關鍵詞：類黃酮(flavonoid)、黃酮(flavone)、motility/invasion、MMP-2

二、材料與方法

1. 細胞培養

A549 肺癌上皮細胞、SKHep-1 肝癌細胞與 HS578T 乳癌細胞分別培養在含有 10% 胎牛血清的 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，以新鮮的培養液將細胞打散並繼續培養之。

2. Gelatin Zymography (1)

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 \times loading dye 均勻混和後，注入膠片中，以 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer (2.5% Triton

X-100)在室溫下沖洗 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% NaN₃, pH 8.0)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. Casein Zymography (2)

48mg casein + 0.55mg plasminogen 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 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。

4. Cell-Matrix adhesion 分析(3)

首先以 typeIV collagen (或 gelatin) coating 24well 培養皿整夜，並以含有 2 % FBS 的 PBS block 住非專一性的結合 2 小時，再將處理過類黃酮的細胞以 trypsin 打下，記培養至 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_{550nm} 下測量吸附細胞的比例。

5. 細胞移動性分析(Motility) (4)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM，將細胞處理類黃酮後，A549 細胞 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，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

6. 細胞侵入性分析(Invasion) (4)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，將 cellulose nitrate filters coating 上 100 μ g/cm² matrigel，在 Laminar flow 風乾 5 整夜，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將 A549 細胞處理過類黃酮

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 6 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，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

7. MTT(Microculture Tetrazolium) 分析(5)

本實驗室用來測試細胞是否存活的方法，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_{570nm} 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

8. 西方墨點法 (Western blot) (6)

首先製備 10 % SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 μ l sample (蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample denature (95 °C;10 min)之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。3 小時之後，進行蛋白轉移，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，於 4°C 下，以 100V 進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4°C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS+0.05% Tween 20)清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應(或以 ECL 冷光系統紀錄)，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應並晾乾，並以 densitometer (AlphaImage 2000, AlphaImage comp)量化結果。

三、結果與討論

肺癌高居男性癌症死亡率排名的第

二名，女性則為第一名。在所有的癌症當中，肺癌佔為數約五分之一，而在因癌症而死亡的病人中，肺癌約佔三成。肺癌在臨床上分成二大類，即小細胞癌和非小細胞癌，其中非小細胞癌則佔所有肺癌的 75%。肺癌細胞株 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，具有高度的增生及轉移能力。而癌細胞的異常增生與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。類黃酮(flavonoids)、多酚酸(phenolic acids)及花青素(anthocyanin)廣存於蔬菜、水果等天然物中，已有許多報告證明上述成分具抗氧化活性，降低血脂肪，促使癌細胞凋死亡及防正常細胞癌化等作用(7-20)。而類黃酮依其結構可分為黃酮(flavone)、黃酮醇(flavonol)、黃烷酮(flavanone)、黃烷酮醇(flavanonol)、黃烷(flavane)、黃烷醇(flavanol)、異黃酮(isoflavone)等多種衍生物。其中，黃酮(flavone)及黃酮醇(flavonol)普遍被認為具有較高的抗氧化活性，且結構上的氫氧基(-OH)越多其自由基清除能力也越好，而二號碳及三號碳之間的雙鍵結構更是抗氧化能力的關鍵之一。因此，針對 A549 細胞株，選用 11 種黃酮衍生物(flavone, flavonol, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, chrysin, bacicalein, apigenin, luteolin, rutin, β -naphthoflavone, diosmin)，探討對於抑制細胞增生及侵襲轉移的效果。

首先，將 A549 細胞以 4.5×10^4 cell 分種到 24-well 的培養皿，培養 16 小時後，處理 11 種不同的藥物，分別給予不同劑量(0, 25, 50, 75, 100 μ M)處理 24 小時後，以 MTT assay 分析黃酮藥物處理下的癌細胞存活率，作為探討是否抑制肺癌細胞增生的初步篩選。同時，將 A549 細胞以 30×10^4 cell 分種到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，處理 11 種不同的藥物，分別給予不同劑量(0, 25, 50, 75, 100 μ M)處理 24 小時後，以 chemotactic Boyden chamber assay 分析黃酮藥物處理下的癌細胞侵襲能力，作為探討是否抑制肺癌細胞侵襲轉移的初步篩選。結果發現，

chrysin, apigenin, β -naphthoflavone, diosmin 等四個化合物可顯著抑制細胞的存活率(Fig-5A, 7A, 10A, 11A)，而其 LC₅₀ 的藥物濃度分別為 66 μ M (chrysin)、45 μ M (apigenin)、76 μ M (diosmin)、82 μ M (β -naphthoflavone)，且其中的 chrysin, apigenin, β -naphthoflavone 對細胞侵襲轉移的能力也有抑制的效果(Fig-5B, 7B, 10B, 11B)，其 IC₅₀ 的藥物濃度分別為 73 μ M (chrysin)、68 μ M (apigenin)、76 μ M (β -naphthoflavone)。此外，flavone, flavonol, 7-hydroxyflavone, bacicalein, luteolin, rutin 等六個化合物僅在最高濃度(100 μ M)時，對細胞的存活率具有些微抑制效果(Fig-1A, 2A, 4A, 6A, 8A, 9A)，而其中 flavonol, 7-hydroxyflavone, bacicalein, luteolin 在低濃度時即對細胞侵襲轉移的能力有顯著的抑制效果(Fig-1B, 2B, 4B, 6B, 8B, 9B)，其 IC₅₀ 的藥物濃度分別為 41 μ M (flavonol)、59 μ M (7-hydroxyflavone)、100 μ M (bacicalein)、82 μ M (luteolin)。然而，5-hydroxyflavone 則是對細胞存活率及侵襲轉移能力皆無抑制效果(Fig-3A, 3B)。

而 u-PA 及 MMP-2 參與胞外基質(extracellular matrix, ECM)蛋白的合成與分解；於正常生理情況下，參與如胚胎的發育，胚胎的著床，血管生成和組織重建等；自組織分泌出來的 MMPs 為 latent proenzymes，需經過轉換成活化態之後才具有酵素活性，一旦 MMPs 的合成或活化過程出了問題則基質蛋白質無法被順利分解，因而形成組織纖維化；另外，許多證據顯示 MMPs 與癌細胞的吸附，位移，侵入和轉移有關(21-35)。因此，根據先前的實驗結果，針對可有效抑制細胞侵襲能力但不影響細胞存活的 flavonol, 7-hydroxyflavone, bacicalein, luteolin 等四個化合物，進一步分析，藥物對於細胞移動及貼附能力的影響，以及對於細胞分泌 MMPs 及 u-PA 的影響。結果發現，flavonol 對於 A549 細胞的移動及貼附能力有顯著的抑制效果(Fig-12A)，同時也會抑制 MMP-2 的分泌，然而對 u-PA 則

無明顯抑制效果 (Fig-12B)。7-hydroxyflavone 對於 A549 細胞的移動及貼附能力 (Fig-13A) 以及 MMP-2 的分泌皆有顯著的抑制效果 (Fig-13B)，然而對 u-PA 則無明顯抑制效果 (Fig-13B)。Bacicalein 對於 A549 細胞的移動及貼附能力有抑制效果 (Fig-14A)，而對 MMP-2 及 u-PA 的分泌則有顯著的抑制效果 (Fig-14B)。Luteolin 對於 A549 細胞的移動及貼附能力 (Fig-15A) 以及 MMP-2 及 u-PA 的分泌皆有顯著的抑制效果 (Fig-15B)。

以化學促癌物質 TPA 誘導肺癌細胞 A549，作為探討當腫瘤受到生長環境的因子的作用而進一步惡化的情形。首先，以 zymography 分析 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的表現量是否受到影響，結果發現，10 ng/ml 的 TPA 誘導下，即可大量促進 MMP-9 的表現，然而對 MMP-2 及 u-PA 的表現則無促進現象 (Fig-16A)。同樣以 zymography 分析 luteolin 對於 A549 細胞分泌 MMP-2、MMP-9 及 u-PA 的影響，結果發現，10 μ M 的 luteolin 作用下即可抑制 MMP-2 及 u-PA 的表現，且 75 μ M 的 luteolin 作用下 MMP-2 及 u-PA 幾無表現 (Fig-8B)。然而，TPA 所誘導的 MMP-9 表現，在同時處理 luteolin 的作用下，也受到明顯的抑制，50 μ M 的 luteolin 可完全消除 TPA 所誘導的 MMP-9 表現 (Fig-16B)。

以 invasion assay 分析，發現 luteolin 對於 A549 細胞的侵襲能力具有濃度效應的抑制效果，且 100 μ M 的 luteolin 可抑制達六成，另外，在 TPA 的誘導下，A549 細胞的侵襲能力明顯增加了 2.5 倍以上，而 luteolin 對於 TPA 促進 A549 細胞的侵襲能力具有明顯的抑制效果，且 100 μ M 的 luteolin 可完全消除 TPA 的促進效果 (Fig-17A)。而 MTT assay 的結果顯示，TPA 對於 A549 細胞的生長並無明顯促進作用，而 luteolin 則會降低 A549 細胞的存活，但 TPA 的存在與否對 luteolin 降低 A549 細胞的存活並無影響 (Fig-17B)。然而，luteolin 對 A549 細胞存活率的抑

制並不至於影響其他實驗的結果。

在顯微鏡下的觀察發現，TPA 的刺激下，半滿狀態 (sub-confluent) 下彼此相連 A549 的細胞，會有細胞發散 (cell scating) 的現象，也就是會出現單一細胞脫離或是細胞間彼此的相連消失 (Fig-18A)。而細胞發散的現象被認為是癌細胞移動能力增加及細胞骨架改變所造成。然而，預先處理不同濃度的 luteolin 三小時，則會抑制 TPA 所誘導的細胞發散現象，且抑制效果隨濃度增加而加強 (Fig-18B)。

進一步以 western blot 分析，發現 A549 細胞在 TPA 的誘導下，ERK1/2 的磷酸化會被明顯的促進，尤其在 10 分鐘到 30 分鐘中間達到最高，然而對 p38 及 Akt 的磷酸化則沒有影響 (Fig-19A)。而在 TPA 誘導下且預先處理不同濃度的 luteolin 三小時，TPA 所誘導的 ERK1/2 磷酸化會受到抑制，且隨著 luteolin 的濃度增加，抑制的效果也有加強，在 100 μ M 的 luteolin 幾乎完全消除 TPA 促進 ERK1/2 磷酸化的效果。另外，雖然 p38 的磷酸化並不會受 TPA 的促進，但 luteolin 的作用下，會抑制 A549 細胞內生性持續活化的 p38 訊息傳遞路徑 (Fig-19B)。

四、參考文獻

1. Schleaf RR, Podor TJ, Dunne E, Mimuro J, and Loskutoff DJ. The majority of type 1 plasminogen activator inhibitor associated with cultured human endothelial cells is located under the cells and is accessible to solution-phase tissue-type plasminogen activator. *J. Cell Biol.* 1990; 110:155-163
2. Kuo WH, Yang SF, Chu SC, Lu SO, Chou FP, Hsieh YS. Differential inductions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice, *Cancer Lett.* 2003; 189 :103-112.
3. Olaso E, Labrador JP, Wang L.

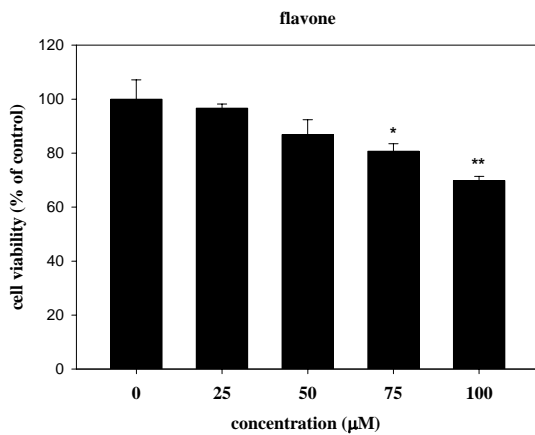
- Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:3606-3613.
4. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases, *Cancer Res.* 2000; 60:4629-4637.
 5. Kohno H, Taima M, Sumida T, Azuma Y, Ogawa H, Tanaka T. Inhibitory effect of mandarin juice rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. *Cancer Lett* 2001; 174: 141-150.
 6. Chen PN, Hsieh YS, Chiou HL, Chu SC. Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways. *Chem Biol Interact* 2005; 156: 141-150.
 7. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003; 23: 519-534.
 8. Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 617-621.
 9. Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TT, Phang JM. Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58: 2379-2384.
 10. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 1993; 13: 2165-2170.
 11. Chan WS, Wen PC, Chiang HC. Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res.* 1995; 15: 703-707.
 12. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A, Sumida T, Fukutani K, Tanaka T, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res.* 1997; 57: 246-252.
 13. Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, Mori H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res.* 1996; 56: 4904-4909.
 14. Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 1989; 49: 5111-5117.
 15. Lin JK, Chen YC, Huang YT, Lin-Shiau SY. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 1997; 28-29.
 16. Weber G, Shen F, Prajda N, Yang H, Li W, Yeh A, Csokay B, Olah E, Look KY. Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv Enzyme Regul* 1997; 37: 35-55.
 17. Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin Cancer Res.* 1998; 4: 1055-1064.
 18. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. Induction of cell cycle arrest

- and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 2001; 19: 837-844.
19. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: Regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1205-1215.
 20. Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999; 38: 28-34.
 21. Shou Y, Hirano T, Gong Y, Kato Y, Yoshida K, Ohira T, Ikeda N, Konaka C, Ebihara Y, Zhao F, Kato H. Influence of angiogenic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2001;85:1706-1712.
 22. Wollina U, Hipler UC, Knoll B, Graefe T, Kaatz M, Kirsch K. Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001; 127:631-5.
 23. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2001; 189:197-206.
 24. Okada N, Ishida H, Murata N, Hashimoto D, Seyama Y, Kubota S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver metastasis in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 288:212-6.
 25. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J*. 2001; 20:4782-93.
 26. Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Spathe K, Harting K, Fenn A, Berger U, Fridman R, Schmitt M, Prechtel D, Kuhn W. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2001; 82:291-8.
 27. Ghilardi G, Biondi ML, Mangoni J, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res*. 2001; 7:2344-6.
 28. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2001; 85:383-92.
 29. Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, Palmer KC, Bright RC, Fridman R. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer*. 2001; 93:507-15.
 30. Lynch CC, McDonnell S. The role of matrilysin (MMP-7) in leukaemia cell invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18:401-6.
 31. Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis*. 2001; 16:133-40.
 32. Yonemura Y, Endo Y, Takino T, Sakamoto K, Bandou E, Kinoshita K, Fushida S, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18:321-7.
 33. Theret N, Musso O, Turlin B, Lotrian D, Bioulac-Sage P, Campion JP, Boudjema K, Clement B. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human

- hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 2001; 34:82-8.
34. Papathoma AS, Zoumpourlis V, Balmain A, Pintzas A. Role of matrix metalloproteinase-9 in progression of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2001; 31:74-82.
 35. Canning MT, Postovit LM, Clarke SH, Graham CH. Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp Cell Res*. 2001; 267:88-94

五、圖表

(A)



(B)

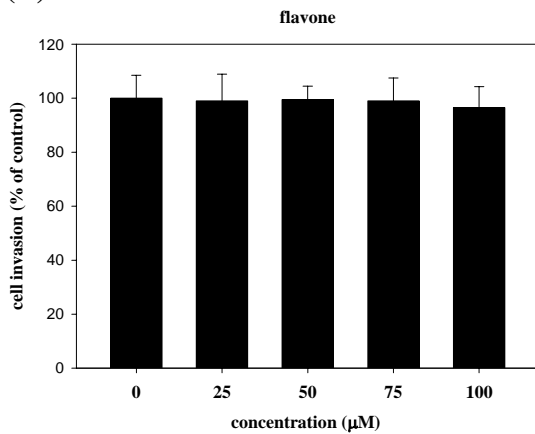
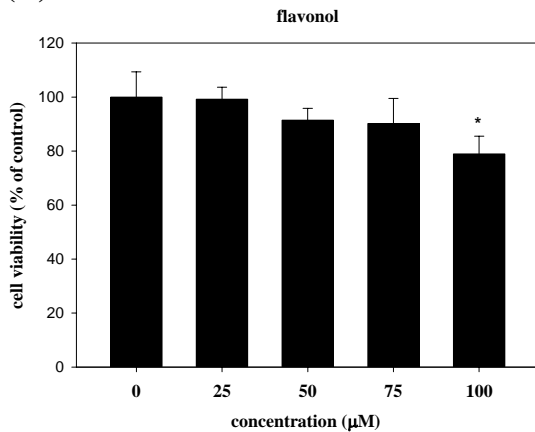


Fig-1. flavone 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 flavone，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 flavone，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

(A)



(B)

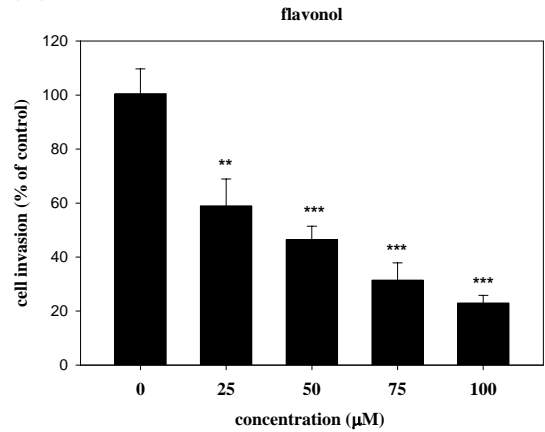
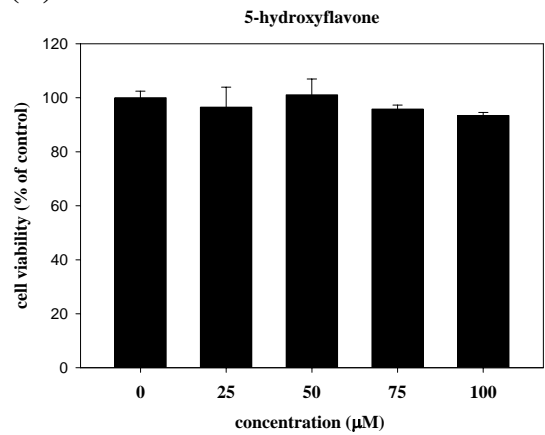


Fig-2. flavonol 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 flavonol，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 flavonol，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

(A)



(B)

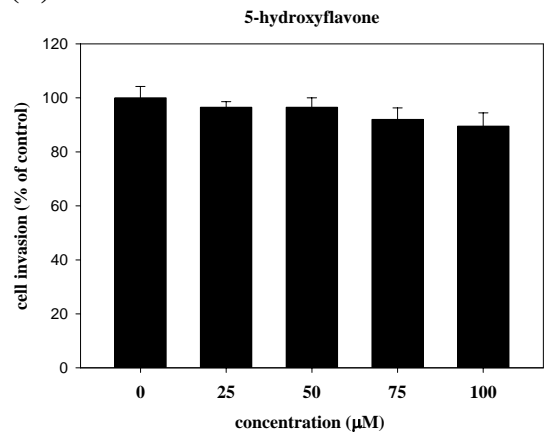


Fig-3. 5-hydroxyflavone 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 5-hydroxyflavone，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 5-hydroxyflavone，其 24hr 後侵襲能力表現情形。

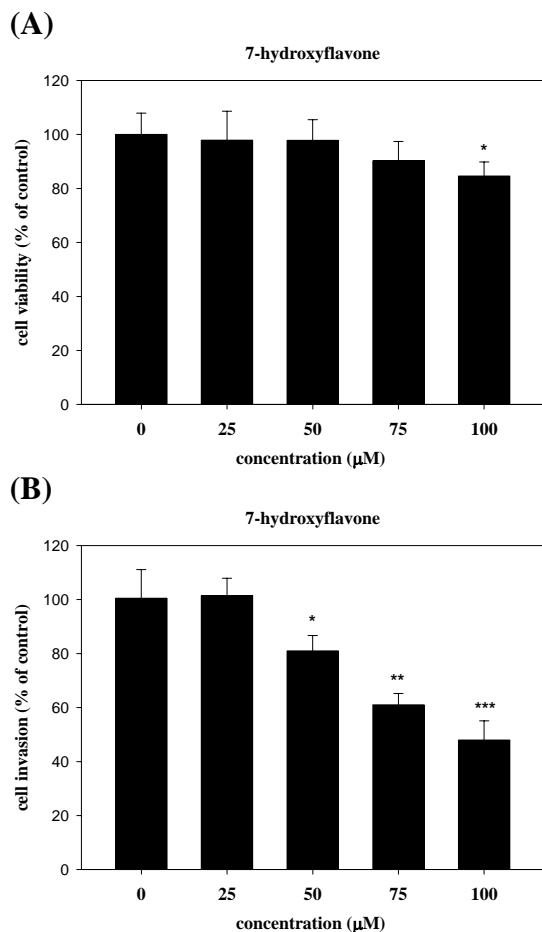


Fig-4. 7-hydroxyflavone 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 7-hydroxyflavone，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 7-hydroxyflavone，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

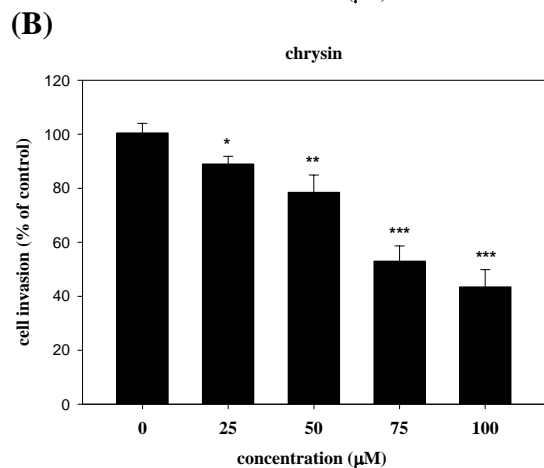
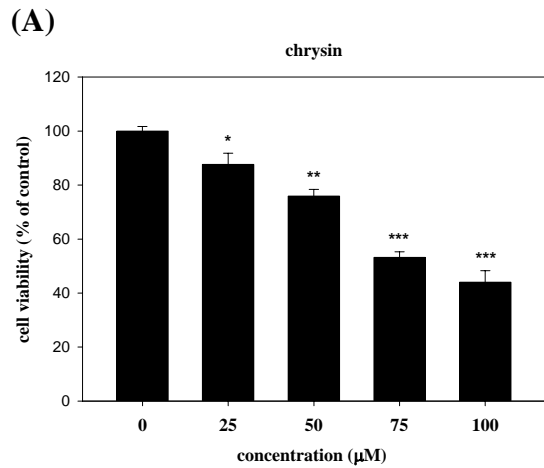
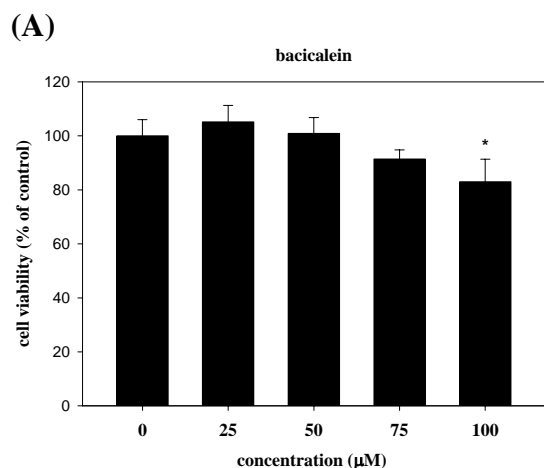


Fig-5. chrysin 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 chrysin，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 chrysin，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



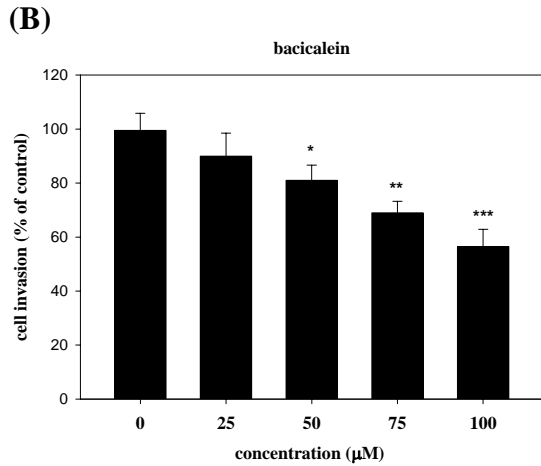


Fig-6. bacicalein 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 bacicalein，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 bacicalein，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

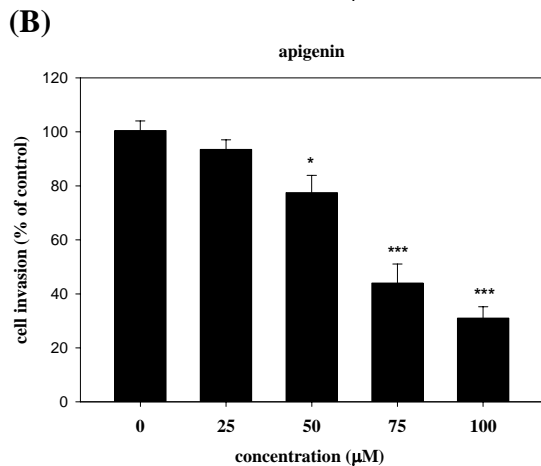
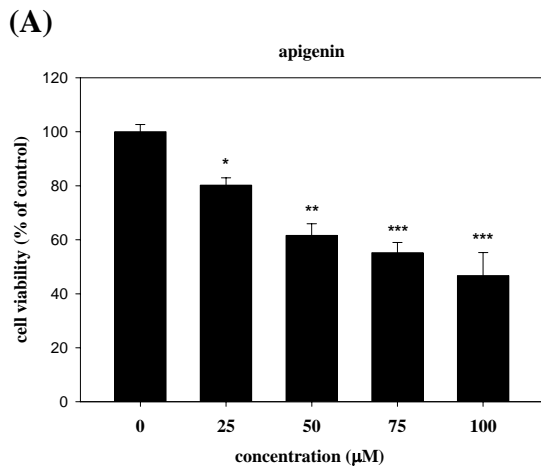


Fig-7. apigenin 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 apigenin，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 apigenin，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

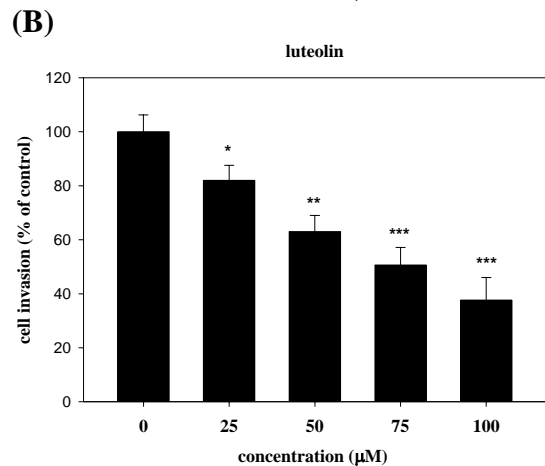
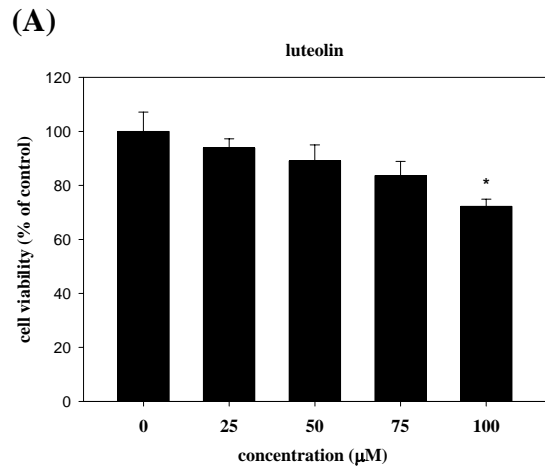


Fig-8. luteolin 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 luteolin，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 luteolin，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$)

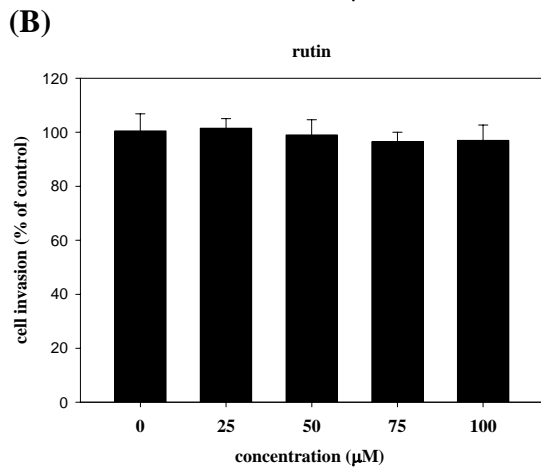
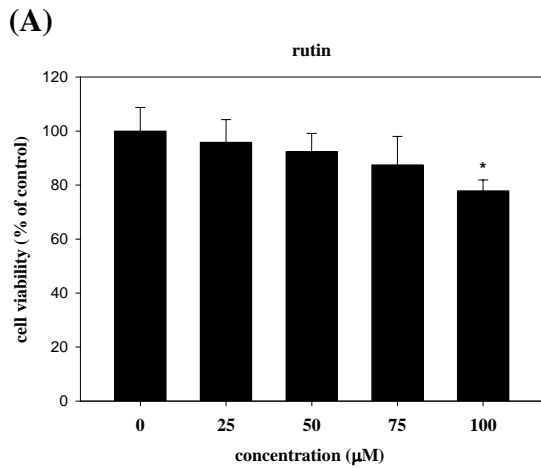


Fig-9. rutin 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 rutin，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 rutin，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$)

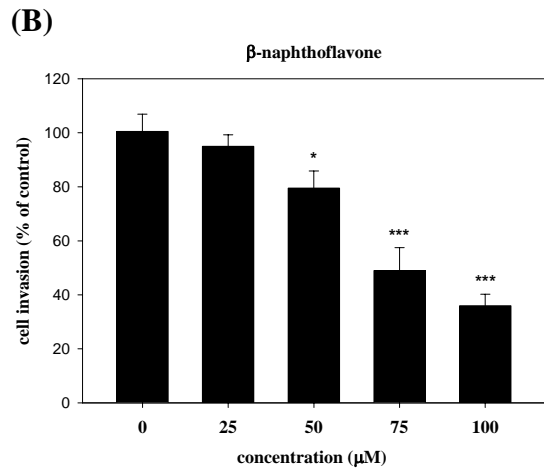
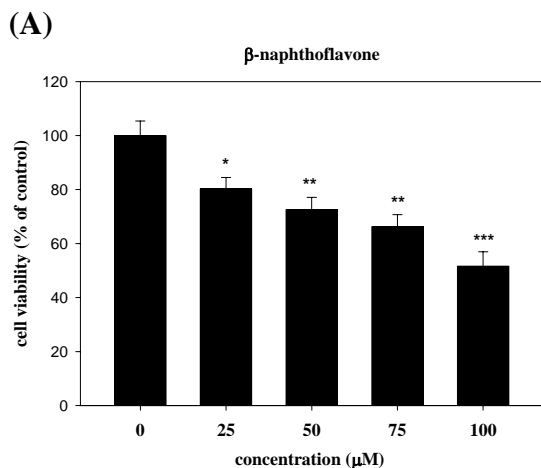


Fig-10. β-naphthoflavone 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 β-naphthoflavone，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 β-naphthoflavone，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

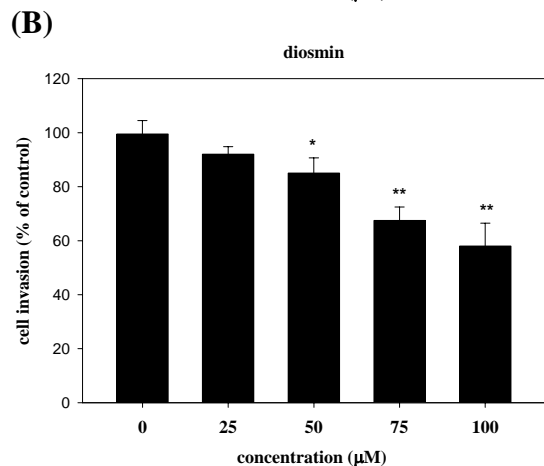
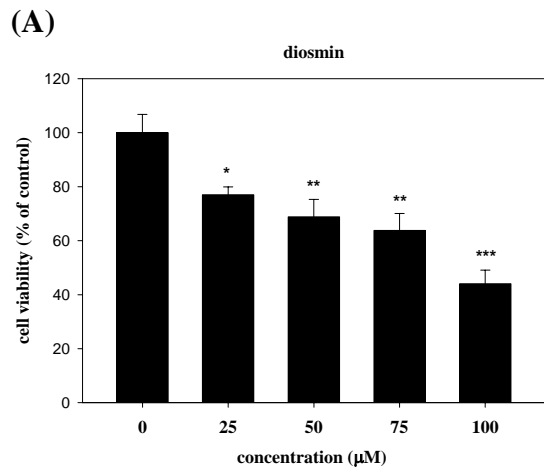


Fig-11. diosmin 對 A549 細胞的細胞存活及侵襲轉移能力的影響。

(A) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 diosmin，其 24hr 後細胞存活率的改變 (B) 以 invasion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 diosmin，其 24hr 後侵襲能力表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

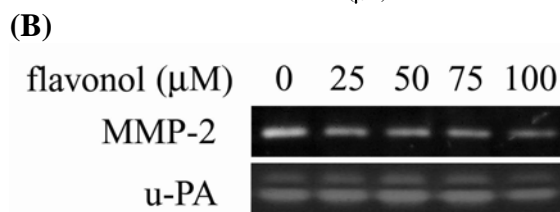
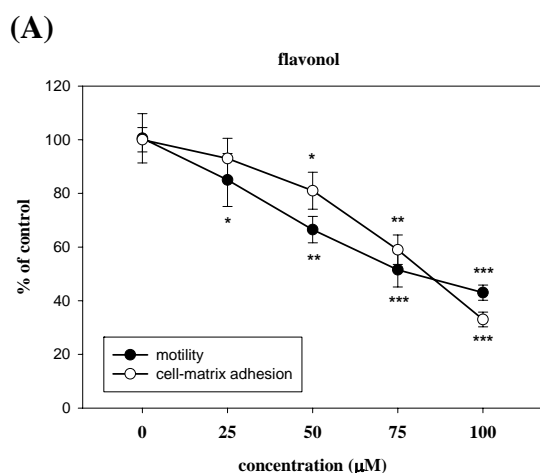


Fig-12. flavonol 對 A549 細胞的細胞移動、貼附及分泌 MMP-2, u-PA 能力的影響。

(A) 以 migration assay & cell-matrix adhesion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 flavonol，其 24hr 後細胞移動及貼附能力 (B) 以 gelatin zymography & casein zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的 flavonol，其 24hr 後 MMP-2, u-PA 的表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

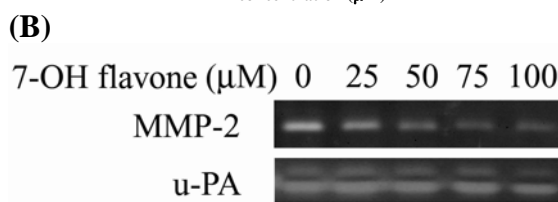
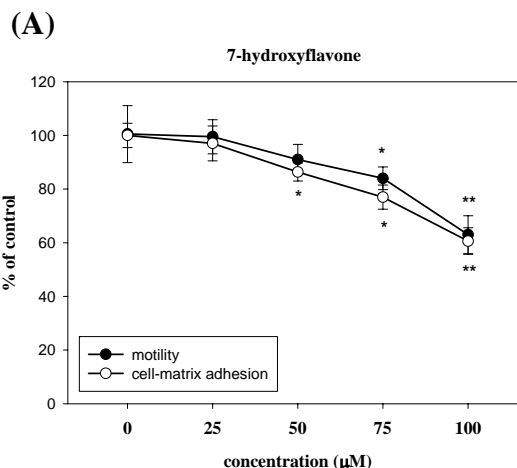


Fig-13. 7-hydroxyflavone 對 A549 細胞的細胞移動、貼附及分泌 MMP-2, u-PA 能力的影響。

(A) 以 migration assay & cell-matrix adhesion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 7-hydroxyflavone，其 24hr 後細胞移動及貼附能力 (B) 以 gelatin zymography & casein zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的 7-hydroxyflavone，其 24hr 後 MMP-2, u-PA 的表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

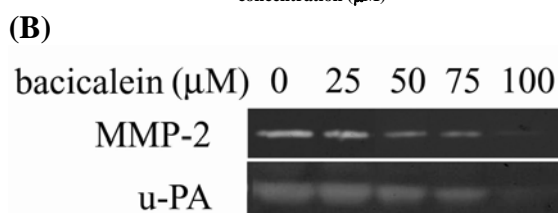
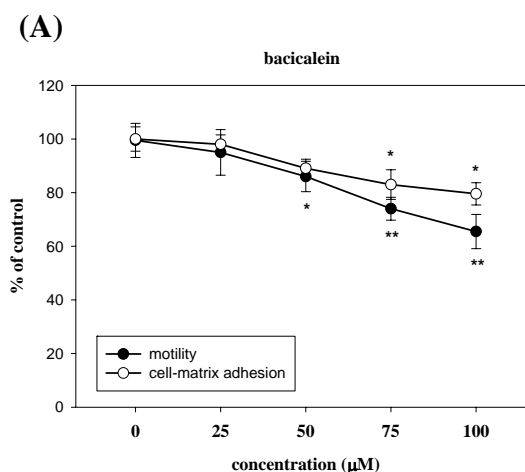


Fig-14. bacicalein 對 A549 細胞的細胞移動、貼附及分泌 MMP-2, u-PA 能力的影響。

(A) 以 migration assay & cell-matrix adhesion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 bacicalein，其 24hr 後細胞移動及貼附能力 (B) 以 gelatin zymography & casein zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的 bacicalein，其 24hr 後 MMP-2, u-PA 的表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

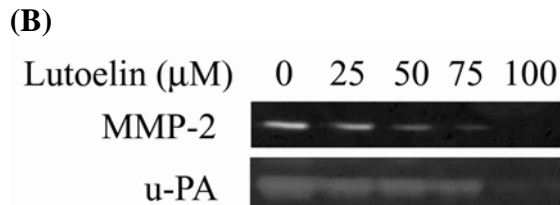
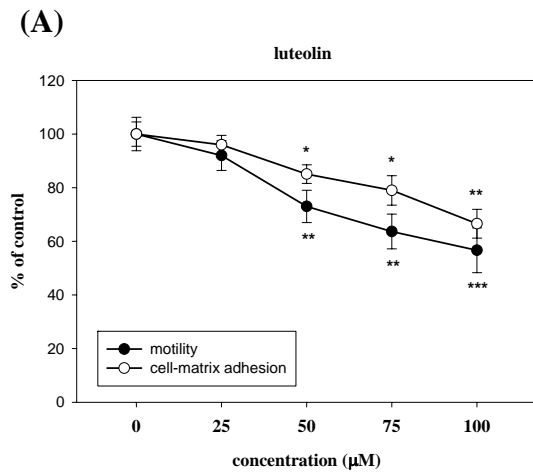


Fig-15. luteolin 對 A549 細胞的細胞移動、貼附及分泌 MMP-2, u-PA 能力的影響。

(A) 以 migration assay & cell-matrix adhesion assay 分析 A549 細胞處理不同劑量的 luteolin，其 24hr 後細胞移動及貼附能力 (B) 以 gelatin zymography & casein zymography 分析 A549 細胞處理不同劑量的 luteolin，其 24hr 後 MMP-2, u-PA 的表現情形。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

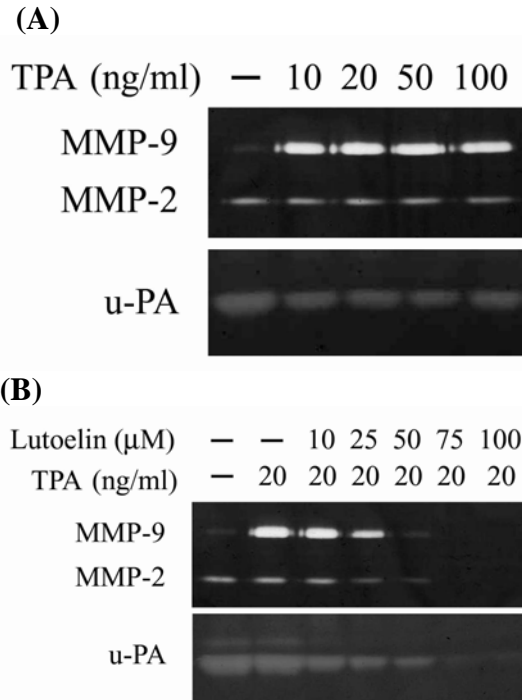
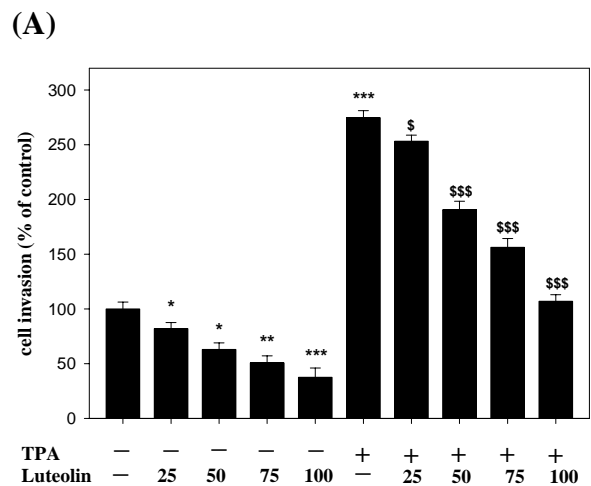


Fig-16. luteolin 對 TPA 所誘導 A549 細胞分泌 MMP-9 的影響。

(A) 以 gelatin zymography & casein zymography 分析 TPA 對 A549 細胞分泌 MMP-2, 9 及 u-PA 的影響 (B) 以 gelatin zymography & casein zymography 分析 luteolin 對於 TPA 誘導下 A549 細胞分泌 MMP-2, 9 及 u-PA 的影響。



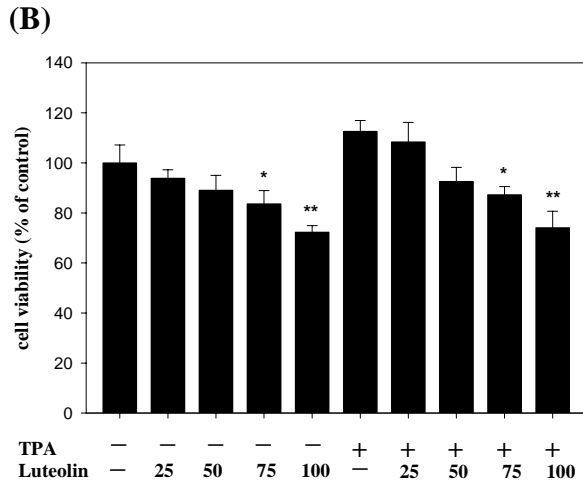


Fig-17. luteolin 對 TPA 所誘導 A549 細胞侵襲轉移的影響。

(A) 以 invasion assay 分析 luteolin 對於 TPA 誘導下 A549 細胞侵襲轉移能力的影響。(B) 以 MTT assay 分析 A549 細胞處理 TPA 及 luteolin，其 24hr 後細胞存活率的改變(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; \$, $P < 0.05$; \$\$\$, $P < 0.001$)

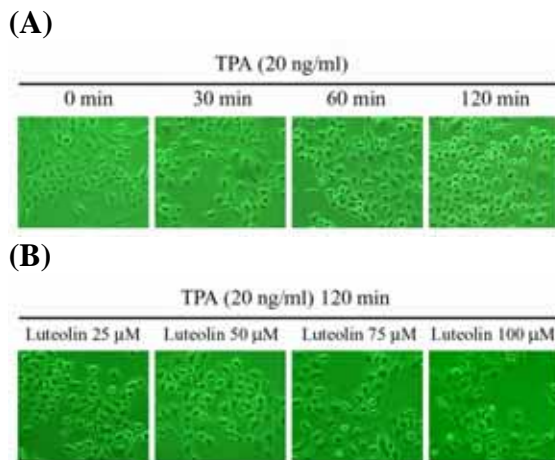


Fig-18. luteolin 對 TPA 所誘導 A549 細胞發散現象(cell scattering)的影響。

(A) 以像位差顯微鏡觀察以 TPA 處理 30, 60, 120 min 的 A549 細胞的型態改變 (B) 以像位差顯微鏡觀察 luteolin 對於 TPA 誘導下 A549 細胞型態改變的影響。

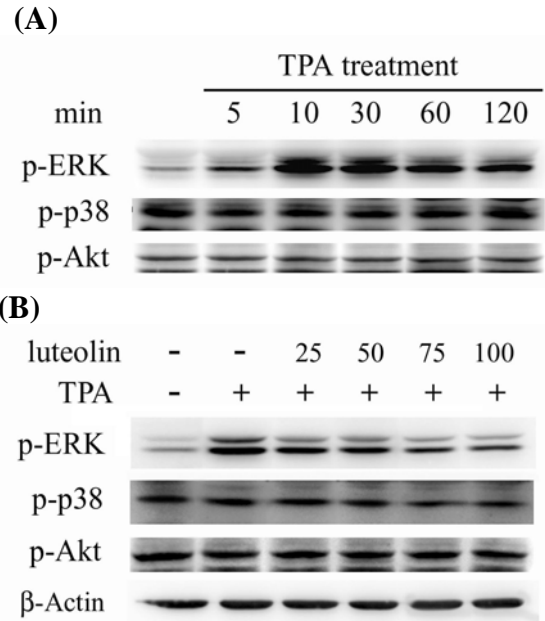


Fig-19. luteolin 對 TPA 所誘導 A549 細胞訊息傳遞的影響。

(A) 以 Western blot 分析 A549 細胞處理 TPA 不同時間(5, 10, 30, 60 min)的訊息傳遞路徑的活化 (B) 以 Western blot 分析 luteolin 對於 TPA 誘導下 A549 細胞訊息傳遞路徑活化的影響。