

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

龍葵保健食品研究開發--龍葵水萃取物及多酚抑制癌症作用之研究(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 97-2321-B-040-001-
執行期間：97年08月01日至98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

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：鍾佩君
碩士班研究生-兼任助理人員：杜昌哲
碩士班研究生-兼任助理人員：吳敦豪
博士班研究生-兼任助理人員：楊孟元

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 98 年 10 月 26 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

龍葵萃取物開發為護肝及降低肝癌發生率之保健食品

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2321-B-040-001

執行期間：95年08月01日至98年07月31日

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：楊孟元 鍾佩君 杜昌哲 吳敦豪

成果報告類型： 精簡報告 完整報告

執行單位：中山醫學大學

中華民國九十八年十月十一日

「保健食品」研究開發計畫 第一年度報告

龍葵水萃取物及多酚致肝癌細胞凋亡及機轉之作用.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
前言.....	6
文獻探討.....	7
研究目的.....	18
研究方法.....	19
研究結果.....	25
討論.....	29
參考文獻.....	32
實驗結果附圖.....	38

「保健食品」研究開發計畫 第二年度報告

龍葵萃取物抑制以 AAF 誘導大鼠.....	59
中文摘要.....	60
英文摘要.....	61
文獻探討.....	62
研究目的.....	66
研究方法.....	67
研究結果.....	71
討論.....	76
參考文獻.....	78
實驗結果附圖.....	82

「保健食品」研究開發計畫 第三年度第一部分報告

龍葵萃取物及多酚抑制癌細胞轉移之機轉及降低血管新生之作用.....	103
中文摘要.....	104
英文摘要.....	105
前言.....	106
文獻探討.....	107
研究目的.....	110
研究方法.....	111
研究結果.....	115
討論.....	118
參考文獻.....	119
實驗結果附圖.....	121

「保健食品」研究開發計畫 第三年度第二部分報告

龍葵萃取物及多酚抑制癌細胞轉移之機轉及降低血管新生之作用.....	138
中文摘要.....	139
英文摘要.....	140
前言.....	141
文獻探討.....	142
研究目的.....	145
研究方法.....	146
研究結果.....	152
討論.....	156
參考文獻.....	158
實驗結果附圖.....	161

「保健食品」研究開發計畫 第一年度報告

龍葵水萃取物及多酚致肝癌細胞
凋亡及機轉之作用

**SNWE and SNPE -mediated human
hepatocellular carcinoma cells apoptosis and
mechanism**

中文摘要

龍葵，為分布於全球的耕地、花園的野生植物。已被證實具有抗氧化、抗發炎、護肝作用以及抗腫瘤之醫學功能。在中國地區，龍葵及龍葵複方更是被廣泛用於惡性腫瘤後的治療。在本篇研究中證實了龍葵水萃物對多種癌細胞具有毒性，其中以肝癌細胞HepG2對龍葵水萃取物的處理最敏感，因此我們後續將以HepG2為研究之主軸。此外我們更進一步由龍葵水萃物中分離出多酚成分，並由MTT分析結果得知龍葵多酚也會對HepG2細胞產生毒性，且所需的劑量較龍葵水萃物低。我們接著發現龍葵水萃及多酚會誘導細胞產生核濃染、DNA片段化以及細胞週期G1期增多的現象，判斷龍葵水萃及多酚萃取物對HepG2細胞的毒性是引發其邁向細胞亡。且其造成細胞凋亡的機轉是增加Fas表現而促進caspase-8的切割，活化後的caspase-8則進一步活化下游caspase-3以及Bid的切割，最後導致PARP失去作用而無法修復DNA，使細胞走向凋亡。此外，我們也發現低劑量之龍葵水萃及多酚萃取物會造成HepG2細胞週期停滯於G2/M期。除了上述的細胞實驗外，我們也在裸鼠的動物實驗結果中發現，龍葵水萃及多酚萃取物能抑制肝癌細胞形成腫瘤。綜合細胞以及動物實驗的結果，我們推測龍葵具有治療肝癌的潛力。且其功效可能是來自於其中的多酚成份，期許將來在肝癌的治療，龍葵多酚可成為肝癌患者更好的選擇。

英文摘要

Solanum nigrum L. is worldwide weeds of arable land, gardens. It is believed to have anti-oxidative, anti-inflammatory, hepatoprotection and anti-tumor effects. In China, it has been used in traditional folk medicine to treat different cancers. In this study, we demonstrated that the water extract of *Solanum nigrum* L. (SNWE) expressed cytotoxic effects to many cancer cell lines. Among them, human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were the most susceptible to SNWE. We also isolated the polyphenolic compounds (SNPE) from SNWE and then used MTT assay to evaluate the cytotoxicity on the HepG2 cells. The results show that HepG2 cells were more susceptible to SNPE than SNWE.

Next, we observed the effects of SNWE and SNPE in inducing apoptosis in HepG2 cells by measuring the nuclear condensation, DNA fragmentation and increased the subG1 phase ratio in cell cycle. This effect of SNWE and SNPE in HepG2 cells might be mediated via increase the expression of Fas and cleaved-caspase 8, 3 protein. Furthermore, we treatment low dose of SNWE and SNPE to HepG2 cells and resulted in significant cell cycle arrest in G2/M phases. It might be due to decrease CDC25C protein expression.

Besides in vitro effects, the antitumor efficacy of SNWE and SNPE were also confirmed in human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. Thus, our data indicate that SNWE and SNPE could play an active role in mediating the cell cycle arrest and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells and might be potential drugs for antitumor therapy.

前言

肝癌簡介

癌症是全球每年十大死因的第一位，而在所有的癌症當中，死於肝癌的人數總是名列前茅，每年約有25萬人被診斷出罹患肝癌並有數十萬人因此死亡。肝癌好發於歐洲、美國南部、非洲東南方和亞洲東南亞包括中國大陸、韓國以及台灣等地。就台灣地區而言，肝癌以多年位居男性癌症死亡原因首位，女性則高居第二位，每年因肝癌死亡者超過6000人，成為危害國人健康之頭號殺手。因此如何預防肝癌的發生及治療肝癌成為目前研究領域中一個相當重要的課題。

肝癌主要有三種類型：(I)肝細胞癌(hepatocellular carcinoma；HCC)：肝癌最常見類型，約佔80%以上，其中60-80%是由肝硬化轉變而來的。(II)膽管細胞癌(cholangio-carcinoma)：此類佔肝癌的5%-20%。(III)混合型肝癌(hepatocholangio-carcinoma)：由肝細胞癌以及膽管細胞癌組成。肝癌的病例在流行病學的調查發現除了與地理環境有特殊關係之外，與飲食也有密切關係，例如黃麴毒素(aflatoxin B1)；長期以來被認為與肝癌有密切相關，黃麴毒素存在於食物中，是由黃麴菌和寄生麴黴菌代謝後所產生，代謝的主要產物為8,9-環氧化物(8,9-epoxide)，會結合在guanine殘基位置上，而使p53基因突變而失去抑制腫瘤形成之功能(1)，此外亦有動物實驗指出，以受感染食物或純黃麴毒素來餵食實驗動物會誘導動物產生肝癌。另一個與肝癌有關的飲食習慣是酗酒，酗酒對肝癌形成具有加乘效果，有酗酒習慣者，引發肝臟疾病的危險性較一般人高出10%-20%，而帶原者同時有酗酒習慣者，死於肝癌的危險性較一般人的高出數十倍，此外，長年酗酒也是引發肝硬化的主要原因之一(徐榮源, 1998)。雖然目前對於酗酒造成肝癌的積轉尚未釐清，但推測可能與氧化壓力、DNA甲基化及降低免疫反應有關(2)。除上述危險因子外，引起肝癌的最大的原因即為病毒性肝炎。台灣是世界上著名的B型肝炎盛行區，根據統計顯示台灣有80%以上的肝癌患者都有B型肝炎表面抗原(HBsAg)，且有10-20%的帶原者會罹患肝癌。研究顯示，B型肝炎病毒會藉由將其DNA嵌入肝癌細胞DNA中，造成基因重組、致癌基因活化或者是造成抑癌基因(P53)失去活性而造成細胞生長失去控制(3)。另外一個與肝癌有關的病毒為C型肝炎，雖然台灣目前的C型肝炎帶原者較少，但約有70%病毒感染患者會引發慢性肝炎。C型肝炎造成肝癌的機轉與B型肝炎不同，它不會嵌入人體染色體中，而可能是經由病毒本身的致癌性或引起慢性肝炎和肝硬化所造成。

肝癌是相當惡性的腫瘤，其治療相當困難且預後不佳，通常發現從發現有症狀到死亡，患者存活時間只有4~6個月。目前已知肝癌的治療方式有很多，包括外科手術切除、冷凍治療、放射線治療、免疫治療或血管栓塞、酒精注射等化學療法(4)，其中以外科手術切除癌細胞為最有效的方法，但此方式並不是用於肝硬化患者。而其他化學療法或是臨床藥劑的使用往往引起病人嚴重之副作用，甚至有致死的危險性。因此從天然植物中尋找有效抗癌又安全的草藥複方或化合物儼然已成為近年來的熱門課題之一。

文獻探討

龍葵(*Solanum nigrum* L.)簡介

一、背景介紹

龍葵(*Solanum nigrum* L.)始載於《唐本草》。原名龍葵、又名苦菜。《圖經本草》名苦葵、老鴉眼睛草。《本草綱目》名水茄、天泡草。【物種分類】：植物界 Plantae. 木蘭植物門(開花植物或被子植物)Magnoliophyta. 木蘭綱(雙子葉植物)Magnoliopsida. 茄目 Solanales. 茄科 Solanaceae. 茄屬 *Solanum*.。龍葵在台灣民間則俗稱黑甜仔菜，屬野生植物，為農田雜草，民間有取其幼苗，嫩葉炒熟當菜食用，也有取其成熟的果實食用，也有取幼苗或嫩葉搗碎外敷消癰疽腫毒、跌打瘀傷。

二、型態

龍葵屬野生植物，生於生於田邊、菜園、路旁、坡地陰濕肥沃的草地上，分佈於全國，為一年生草本。【根】圓錐形，淡黃色，多分枝，主根常木化。【莖】直立，有稜角，縱直稜線，沿稜被細毛。【葉】互生，葉片卵形或長卵形，長4~10 cm，寬3~6 cm，先端漸尖或鈍尖，基部寬楔形，下延至葉柄，全緣或波狀疏鋸齒緣，無毛或被疏毛。【花】，傘形聚繖花序頂生，有4~10朵花，花梗下垂；花冠白色，鐘形，5裂；雄蕊5花藥頂端2孔開裂；子房2室，花柱長，基部有絨毛。【果】漿果球形，徑約7 mm，垂生，初時為綠色，成熟後是紫黑色，有光澤，宿存花萼平伸或伏貼。花期6~10月，果期7~11月，夏、秋季採收，可鮮用或曬乾入藥。

全株



果實



葉



花



附圖一、龍葵型態

三、產地

台灣全島、蘭嶼、綠島、小琉球、金門、馬祖。

四、成分

龍葵全草含苷類甾體生物鹼，約 0.04%：龍葵鹼(茄鹼 solanine)，澳洲茄明鹼(茄達鹼 solasodamine)，澳洲茄邊鹼(茄邊鹼 solamargine)，澳洲茄鹼(茄解鹼 solasonine)還有龍葵定鹼(solanigridine)。龍葵鹼水解後的苷元是龍葵胺(salanidine)，其餘各鹼水解後的苷元是澳洲茄胺(solasodine)。龍葵葉和未成熟果實所含生物鹼比莖和成熟果實較多。成熟果實僅有微量配糖生物鹼。葉、莖和全植物含澳洲茄邊鹼量最高。在果實生成期所含澳洲茄鹼量最高。此外，龍葵尚含皂苷，其苷元為萆薢皂苷元(diosgenin)和替告皂苷元(tigogenin)；並含維生素 A 類物質和維生素 C，龍葵漿果的提出物中還含有酯、羧基化合物、甾醇、酚性化合物等，其主要成分為黃色不飽和酯。

五、性味功能

味苦甘，性甘寒，有小毒。一般認為龍葵於傳統醫學上效用有清熱、利尿、解毒、活血、消腫之功效。主治感冒發熱，牙痛，慢性支氣管炎，痢疾，泌尿系感染，乳腺炎，白帶，癌症；外用治癰癤疔瘡，天庖瘡，毒蛇咬傷。此外，已有論文期刊證實龍葵具有下列幾項功能：

1. 抗氧化功能(anti-oxidative effect)

1995 年 Sultana 等人藉由體外試驗證實，龍葵葉之酒精萃取物可以抑制由自由基所誘導的 DNA 傷害(5)。而在 2001 年發現龍葵之酒精萃取物能清除因服用抗生素而堆積的自由基，進而降低抗生素對猴子腎細胞(Vero cell)產生的細胞毒性(6)。最近則有學者利用大鼠動物模式證實了龍葵全株萃取物能降低肝臟中由四氯化碳所造成的氧化傷害，進而達到護肝之目的(7)。

2. 鎮痛解熱及抗發炎作用(antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects)

過去的研究發現，枸橼酸澳洲茄胺對小鼠有鎮痛作用且對兔耳熱灼傷有明顯的抗發炎效果。此外，Zakaria, Z. A.等學者在 2006 年發表之期刊中利用小鼠及大鼠的動物模式證實了龍葵葉之氣仿萃取物能有效降低化合物誘導老鼠的疼痛、發熱以及發炎反應(8)。

3. 保肝作用(hepatoprotection)

過去研究證實烹調後的龍葵葉餵食大鼠，能提高大鼠肝臟中解毒酵素 uridine diphosphate glucuronyltransferase (UDPGT)、aminopyrine N-demethylase 以及 glutathione S-transferase (GST)的活性並降低血清中由 aflatoxin B1 引起的 Glutamic-Oxalocetic Transaminase (GOT)、GTP (glutamate-pyruvate transaminase) 以及 γ -GT 等酵素的量(9)。另外亦有學者發現龍葵果實經酒精萃取後亦可降低 CCl₄ 誘發之肝毒性(10)，綜合過去研究顯示龍葵萃取物確實具有保肝之作用。

4. 抗癌作用(anti-cancer effect)

過去已有許多中國醫學期刊報導龍葵及龍葵複方被廣泛用於惡性腫瘤後的

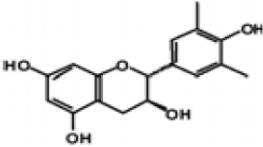
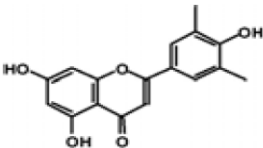
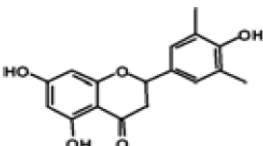
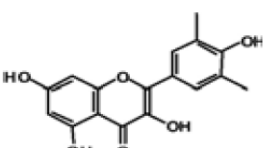
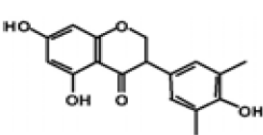
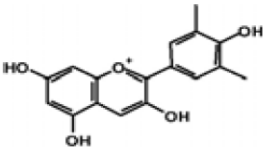
治療(肝癌、肺癌、胃癌以及膀胱癌)(王泳, 2000)。但其實早在 1982 年就有研究指出龍葵未成熟果實中的澳洲茄邊鹼(solamargine)及澳洲茄鹼(solasonine)活性成分具有抗癌之效果(11)。隨後學者利用澳洲茄邊鹼處理多種人類腫瘤細胞株(腸癌 HT-29、HCT-15, 前列腺癌 LNCaP、PC-3, 乳癌 T47D、MDA-MB-231), 結果顯示其能抑制癌細胞的增生(12)。而在 2003 年也發現龍葵的成熟果實能抑制乳癌細胞 MCF-7 的生長(13)。接著陸續有研究針對龍葵的抗癌作用作深入的探討, 像是 Lee SJ 等學者在 2004 年證實龍葵中分離出的醣蛋白成分能降低腸癌細胞 HCT-116 中 PKC 蛋白表現、抑制 NF κ B 與 DNA 結合的活性以及促進 NO 的產生, 進而促進腸癌細胞走向細胞凋亡(14), 相似的作用機制亦在乳癌細胞 MCF-7 中發現(15)。除此之外, 有文獻提出龍葵萃取物中含有大量多酚(16)。而多酚的抗癌功效在過去的研究中以被多方證實, 因此有學者提出龍葵的抗癌功能可能是來自於其中的多酚成分。綜合以上文獻可知, 龍葵的確具有輔助癌症治療之潛力。

多酚(polyphenol)簡介

一、多酚背景

多酚類物質廣泛存在於自然界植物, 如蔬菜、水果及藥草中。從 1930 年時, 多酚類中的 rutin 首次發現至今, 多酚類一直是多年來被廣為研究的天然物之一。多酚類是指有一個或一個以上芳香環, 並帶有一個以上烴基, 經過縮合及加成聚合而成的植物二次代謝產物, 分子量約介於 500~3000 dalton, 主要的生成途徑為 shikimate pathway 及 acetate pathway(16)。多酚在植物身體內的功能是防禦紫外線、授粉期的誘蟲劑、助花粉管的出芽、對抗入侵植物體內的細菌、抑制植物體過氧化作用等, 也就是植物本體的防禦與種籽保存繁殖上的重要成分。目前已有 8000 種以上的酚類化合物結構被發現。多酚結構非常複雜, 而依其碳骨架及化學結構不同可分為四大類: (1)類黃酮; flavonoids, (2)酚酸; phenolic acid, (3)二苯乙烯; stilbene, (4)木質酚素; lignan, (17, 18)。四類中以類黃酮在食物中含量最多, 而類黃酮有可依其鍵結方式不同可分為六大類: 黃酮類(flavones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷酮(flavanones)、黃烷醇(flavanols)、花青素(anthocyanidins)及異黃酮(isoflavones)(19)如附圖二(20)。

Basic chemical structure and major dietary sources of commonly occurring flavonoids

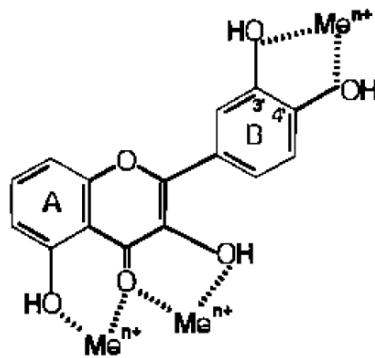
Flavonoid subgroup	Representative flavonoids	Food source
Flavanols 	EGCG Epigallocatechin Catechin Epicatechin	Chocolate, beans, tea, red wine, apple, cherry, apricot
Flavones 	Luteolin Apigenin Chrysin	Capsicum pepper, thyme Celery Parsley
Flavanones 	Naringenin Hesperidin Eriodictyol	Orange Grapefruit
Flavonols 	Quercetin Myricetin Kaempferol Rutin	Onion, apple, cherry, broccoli, tomato, berries, tea, red wine, leek
Isoflavonoids 	Genistein Daidzein	Soya beans, legumes
Anthocyanidins 	Pelargonidin Cyanidin Malvidin	Rhubarb, cherry, strawberry, red wine

附圖二、六大黃酮類化合物

(摘自 Am J Clin Nutr, 79: 727-747, 2004.)

二、多酚醫學功能

化學預防為近年許多學者都紛紛投入的研究方向，而其研究對象多以天然化合物為主，其中以多酚類最為熱門。多酚類化合物具有抗氧化、抗發炎以及預防腫瘤生成之生物活性。可能因為多酚屬多環性結構，具有共振特性，容易與自由基結合，進而抑制由自由基所引起的發炎反應。過去對於多酚的研究得知多酚可與維生素 C 及維生素 E 進行協同作用，共同抑制脂質過氧化的產生(21)。花青素對於 LDL 過氧化也有抑制效果(22)，類黃酮可抑制 LDL 氧化並具有清除自由基與螯合金屬離子的能力(23)(附圖三)。而在 2004 年，則學者利用大鼠模式証實葡萄中的多酚物質(resveratrol)，可藉由抑制前列腺素 D2 生成及 COX-2 表現而減少大鼠早期腸道發炎之氧化傷害(24)。



附圖三、Flavonoids 與金屬離子結合之位置

(摘自 Am J Clin Nutr, 68: 258-265, 1998.)

近幾年研究發現，飲食中的多酚對於健康的效益不只是具有抗氧化或抗發炎之作用，其亦具有抑制腫瘤生成之活性。流行病學針對多酚飲食與抗癌之間的關係做統計，報告結果顯示，飲食中的多酚確實能抑制某些腫瘤生成，如下表一。此外，亦有研究證實綠茶中的多酚物質(EGCG)可抑制多種癌細胞的增生，如血癌(25, 26)、前列腺癌(27)、胃癌(28)、腸癌(29)、肺癌(30)以及肝癌(31)。除了 EGCG 外，其他之多酚成分亦被證實具有抑制腫瘤細胞增生之作用，而其中作用機轉也漸漸被探討出。因此綜合過去研究可知，多酚化合物同時具有抗氧化、抗發炎之以及抑制腫瘤生成之活性可對人體健康有潛在保護作用，故本實驗室亦積極於探討多酚於抗癌及降低心血管相關之研究。

表一、多酚物質抑制多種癌細胞增生之作用

Epidemiologic studies: association between flavonoids or foods rich in phenolic compounds and cancer

	Effect	Sample
Flavonoids	Decreased cancer risk in all sites combined	9959 Men
	Decreased cancer risk in oral cavity, pharynx, larynx and esophagus	540 People
	Nonreduced risk of bladder cancer	497 People
	Nonreduced risk of cancer incidence	728 Men
	Nonreduced risk of lung cancer	103 Women
Quercetin, onions, white grapes	Decreased recurrence of lung cancer	582 People
Quercetin	Decreased incidence of lung cancer	10,054 Men
Myricetin	Decreased risk of prostate cancer	
Quercetin, kaempferol	Decreased risk of gastric cancer	354 People
Catechins	Decreased incidence of rectal cancer	34651 Women
Tea	Decreased risk of colon cancer	12,170 People
Green tea	Reduced risk of cancer in different organs	8552 People
	Decreased risk of breast cancer recurrence and metastasis	472 People
Black tea	No association with gastric cancer	11,902 Men and 14,409 women
	No association with risk of colorectal, stomach, lung and breast cancers	58,279 Men and 62,573 women
Soya	Decreased risk of lung cancer	999 Men
	Decreased risk of breast cancer	34,759 Women

細胞週期(cell cycle)簡介

一、背景介紹

真核生物的細胞週期主要分為 G0/G1(gap1)、S(DNA synthesis)、G2(gap2)和 M(mitosis)共四個時期。當細胞受到生長因子的刺激後，會推動整個細胞週期的進行，讓細胞體積變大、並且大量製造 DNA 複製所需之蛋白質，此階段稱作 G1 期。接著再經由 G1 期進入 S 期，開始進行 DNA 複製讓細胞 DNA 由 2N 變 4N 後進入 G2 期，此階段細胞繼續生長並合成新的蛋白質。最後，走入 M 期的細胞將會停止生長及蛋白質的合成，並將所有能量集中在細胞分裂的過程中，使細胞能準確無誤的由一分為二以完成整個細胞週期(32)。由上述可知，細胞週期中的每一時期均扮演重要角色。因此，為了維持細胞的正常生長，細胞週期必須受到非常精密的調控。

細胞週期的調控包括了許多蛋白的參與，主要可分為三類；Cyclins、Cyclin-dependent kinases(CDKs)以及 Cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKi)。其中 cyclins 會與 cdk 結合形成複合物，而這些複合物的活化及分解調節著週期的進行(33)。例如，在 G1 早期，cyclin D 會與 CDK4 或 CDK6 形成複合體並活化這些 kinase 的活性，促使 Rb 進行磷酸化、E2F 轉錄因子的釋放，而這些 E2F 轉錄因子就能做出更多與細胞週期相關的蛋白，包括 cyclin A、E、CDK1 和 DNA polymerase 等(34)。而在 G1 晚期時則是藉由 cyclin E 與 CDK2 複合物來調控，其會使 Rb 蛋白高度磷酸化，讓細胞週期進入 S 期。Cyclin A 是細胞進入 S 期、完成 S 期到進入 G2/M 期時所必須的。週期進入 G2/M 期後則是受到 CDK1 和 cyclin A 以及 cyclin B1、cyclin B2 複合物調控，當細胞完成分裂後，cyclin A 和 cyclin B 會被分解，細胞將再度進入 G1 時期，重新展開另一個新的細胞週期。

而 cyclin-dependent kinase inhibitor(CDKi)在細胞週期中，為一群可以抑制 cyclin/CDK 複合物活性的內生性小蛋分子白。CDKi 主要作用時期包括 G1 期、S 期以及 G2 期。目前發現的 CDKi 主要可分為兩大族群；INK4 家族與 KIP/CIP 家族。其中 KIP/CIP 家族包含了 p21^{CIP1/WAF1/SDI1}，p27^{KIP1} 以及 p57^{KIP2}。KIP/CIP 所調控的蛋白包括 cyclin E/CDK2，cyclin D/cdc2，cyclin D/CDK6，cyclin A/CDK2 及 cyclin B/cdc2 等，其作用可抑制大部份 cyclin-cdk 的複合物，阻斷這些複合物去磷酸化其下游分子。而 INK4 家族的主要成員有 p14、p15^{INK4B}，p16^{INK4A}，p18^{INK4C} 以及 p19^{INK4D}，其主要功能為抑制 cyclin D/CDK4 之結合及 cyclin D/CDK6 之結合且阻止 Rb 釋放 E2F，最終造成 G1 期的停滯現象(35)。

當細胞受到外界壓力時，會活化某些機制來抑制細胞週期的進行，以便細胞做修補的動作，這些機制稱為細胞週期檢查點(cell cycle checkpoint)修復完成則繼續細胞週期，但若無法修復傷害則會走向細胞凋亡。在整個細胞週期中，存在著兩個主要的細胞週期檢查點，分別為 G1-S checkpoint 和 G2 checkpoint。以上所提及的兩類 CDKi 主要都在調控細胞週期中 G1 要進入 S 時期的檢查點。然而，細胞週期中的另一個檢查點；G2 checkpoint 則是透過不同的蛋白所調控。當 DNA 受到傷害時，細胞內會啟動 ATM/ATR 路徑來造成 G2 時期的停滯。ATM，

全名為 ataxia telangiectasia mutated；其功能為磷酸化 CHK2 (Centrosome-associated checkpoint kinase 2)使其轉變為活化態。而 ATR，全名為 ATM and Rad3-related；主要功能是磷酸化且活化 CHK1(Centrosome-associated checkpoint kinase 1)。活化後的 CHK2/CHK1 會進一步磷酸化 CDC25(cell division cycle 25)家族蛋白上的 14-3-3 結合位，並且吸引 14-3-3 蛋白與其結合，使 CDC25 蛋白滯留在細胞質中(36)。在哺乳動物中，CDC25 蛋白家族有三的成員，分別為 CDC25A、CDC25B 和 CDC25C。此三中蛋白皆能調控細胞週期由 G1 期進入 S 期以及由 G2 其進入 M 期。例如：當以細胞週期要由 G2 進入 M 期時，CDC25 就會將 CDK1 蛋白上的特定位子的磷酸根去除，使去除磷酸根後的 cyclin B/CDK1 複合物具有活性，進一步推動細胞週期進入有絲分裂期。因此，若 CDC25 蛋白被滯留於細胞質時，cyclin B/CDK1 無法活化，最終會造成細胞週期停滯於 G2 時期(37, 38)。除此之外，ATM/ATR 亦會活化 p53 路徑，而活化後的 p53 則會增加 p21 及 14-3-3 蛋白的表現量(39)。大量增加的 p21 蛋白可以抑制 cyclin B/CDK1 複合物的活性，來阻止 G2 時期的運行。

細胞凋亡(cell apoptosis)簡介

一、背景介紹

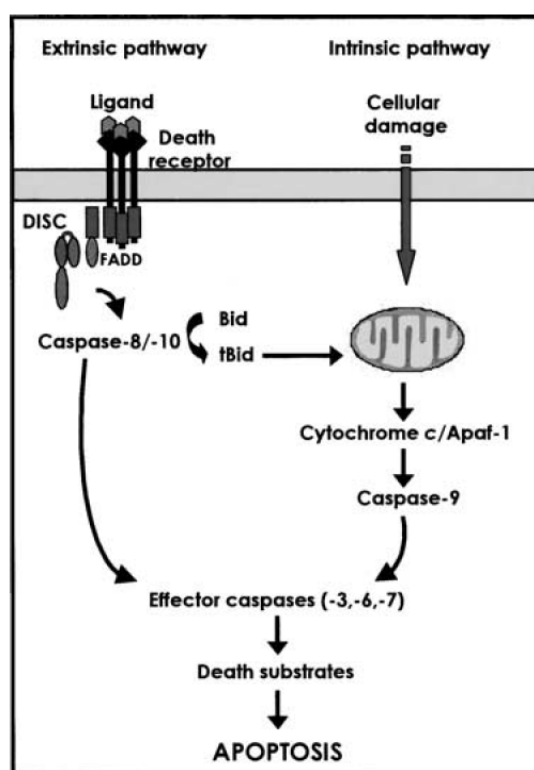
多細胞生物體內細胞的增生與死亡就像天秤的兩端，倚賴兩者間的動態平衡來維持著細胞衡定(homeostasis)。細胞死亡的方式主要有兩種；細胞壞死(necrosis)和細胞凋亡(apoptosis)，前者屬被動式死亡，通常是由嚴重的物理化學傷害所造成，例如：PH 值極端改變、高溫或缺氧等，都會造成細胞膜通透性發生改變而使細胞膨脹或破裂(40)，是一種非專一性的死亡方式。而上述所提到之主要調控細胞衡定的死亡方式為細胞凋亡。細胞在正常的生理成長階段或受到外力刺激時，皆可透過基因調控來主動且耗能的讓細胞有計畫性的邁入死亡，因此又稱程序性細胞死亡(programmed cell death)(41)。在正常的生理狀況，例如在胚胎的型態發育(morphogenesis)和免疫系統的發育過程中，生物體可透過適度的細胞凋亡將多餘的細胞或會辨認自身抗原的免疫細胞移除，來維持器官組織的正常以及避免自體免疫疾病(autoimmune disease)的產生(42)。但若細胞凋亡過度時，大量的細胞死亡會破壞細胞的衡定進而產生疾病(43)，例如神經退化、AIDS、阿茲海默症(Alzheimer's disease)以及帕金森氏症(Parkinson's disease)等，相反的，若細胞中凋亡反應受到不當的抑制時，過量不死的細胞往往是癌症的前兆，因此現今針對治療腫瘤的藥物研究方向有許多都是期望活化腫瘤細胞內的細胞凋亡路徑來達殺死癌細胞的目的。

在細胞凋亡的發生過程中，細胞型態上的改變是淺而易見的。初期的特徵為 Phosphatidylserine(PS)由細胞膜內翻至膜外的表層，此時可利用 Annexin VI/ PI 雙染技術來區分正常、凋亡或壞死細胞。而進入凋亡後期時，細胞內的核酸內切酶(endonuclease)會將 DNA 裂解成不同倍數的 180-200 bp 左右的片段(DNA fragmentation)，造成細胞核內的染色質濃染(chromatin condensation)、細胞皺縮(cell shrinkage)、細胞質中胞器聚集以及細胞膜產生泡狀邊緣(membrane

blebbing)，最後細胞膜會將各種胞器及 DNA 片段包覆形成凋亡小體(apoptotic bodies)(44)，隨後被鄰近的巨噬細胞吞噬清除以避免細胞發炎反應產生。

二、細胞凋亡的訊息傳遞路徑

細胞凋亡的過程是由基因所調控，而其中所涉及的基因非常繁雜，因此也造成了凋亡訊息傳導路徑的多樣性。簡單而言，細胞凋亡的機制可分為兩種；死亡受體活化之訊息路徑又稱外在路徑(death receptor pathway；the extrinsic pathway)以及粒線體調控路徑又稱內在路徑(mitochondria associated pathway；the intrinsic pathway)，此兩種途徑皆會活化 caspase，而活化的 caspase 可切割細胞受質導致細胞生化及型態學的改變而凋亡(45)(附圖五)。



附圖五、細胞凋亡主要路徑

(Cardiovasc Res, 45: 528-537, 2000.)

(1) 死亡接受體活化之訊息路徑(death receptor pathway)

死亡接受體是一群鑲嵌在膜上的蛋白，屬於 TNFR(tumor necrosis factor receptor)家族基因，包括 Fas(Apo-1/CD95)、DR4(TRAIL-R1)、TNFR1 以及 TNFR2，此家族的蛋白皆含有相似 domain 及大量的胱氨酸(cystine)，除此之外，在細胞質的內側部分皆含有 death domain(46)，可連接“細胞內連結蛋白”(intracellular adaptor protein)，來傳達一連串的死亡訊息。以 Fas/FasL(CD95/CD95L)路徑為例，當 Fas 與 FasL 結合會活化 Fas receptor 進行 trimerization，並吸引 FADD(as associating protein death domain)結合至細胞質的內側之 death domain 上，隨後 FADD 則會吸引多分子的 procaspase-8 與其形成一複合體

DISC(death-inducing signaling complex)，透過改變 procaspase-8 的構形來促使其活化，最後具有活性的 caspase-8 便會活化下游的 caspase-3、caspase-7 和 caspase-6(47)，此外 caspase-8 的活化也會促使 Bcl-2 家族的 Bid 裂解成 t-Bid，進而影響粒線體的膜電位，導致 cytochrome c 的釋放而活化了 caspase-3 及 caspase-9(48)，最後的結果都會造成細胞凋亡。

(2) 粒線體調控路徑(mitochondria associated pathway)

當細胞受刺激而造成DNA受損、鈣離子濃度失衡、ROS(reactive oxygen species)大量產生或是接收到死亡接受體活化的下游訊息時，會改變粒線體膜的通透性(mitochondria membrane permeabilization)導致粒線體膜電位差(mitochondria transmembrane potential)的瓦解，而使得粒線體內的促凋亡蛋白大量釋放到細胞質中，例如cytochrome c (49)、Smac/Diablo(50)、AIF(Apoptosis inducing factor)(51)以及EndoG (endonuclease G)(52)等，其中cytochrome c與Smac/Diablo可促使凋亡小體(Apoptosome; Apaf-1/cytochrome c/caspase-8 complex)的產生，進一步活化下游caspase-3而導致細胞凋亡，此種屬caspase-dependent cell death。而另一種不須經由caspase(caspase-independent cell death)(53)的粒線體死亡訊息是透過AIF和EndoG從粒線體釋放到細胞質，再由細胞質移動至細胞核內將DNA片段化(54)，導致細胞凋亡。由上述可知經粒線體引起的細胞凋亡主要是因為粒線體膜的通透性及電位差改變而造成。過去研究發現，細胞內有一群分佈在細胞質粒線體外膜、內質網膜以及細胞核膜上的蛋白家族；稱Bcl-2家族，其主要功能即是調控粒線體膜的完整性(55)。Bcl-2家族因其功能以及含有的BH domain不同而分為三類成員：(a)抑制細胞凋亡蛋白群：Bcl-2、Bcl-X_L和Mcl-1，(b)多區塊促細胞凋亡蛋白群：Bax、Bak，(c)單區塊促細胞凋亡蛋白群：Bad、Bid和 Bim。細胞內藉由此三類蛋白間的交互作用來調控粒線體膜的變化，在正常情況下，促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白的表現量會維持平衡狀態，但若此平衡遭破壞則會影響細胞正常的生長及死亡。例如當Bcl-2表現量大於Bax時，Bcl-2便可藉由與Bax形成異二聚體(heterodimer)來抑制細胞凋亡，但若細胞受死亡訊號刺激而使Bax的蛋白表現增加時，Bax便可自行形成同二聚體(homodimer)且結合到粒線體膜上形成孔洞，改變粒線體通透性及膜電位進而促進細胞凋亡。另外，死亡接受體活化後亦可透過caspase-8切割Bid，使其形成活化態t-Bid後進一步結合上粒線體進而改變其通透性，促使細胞凋亡。

(3) 細胞凋亡執行者- caspase 家族

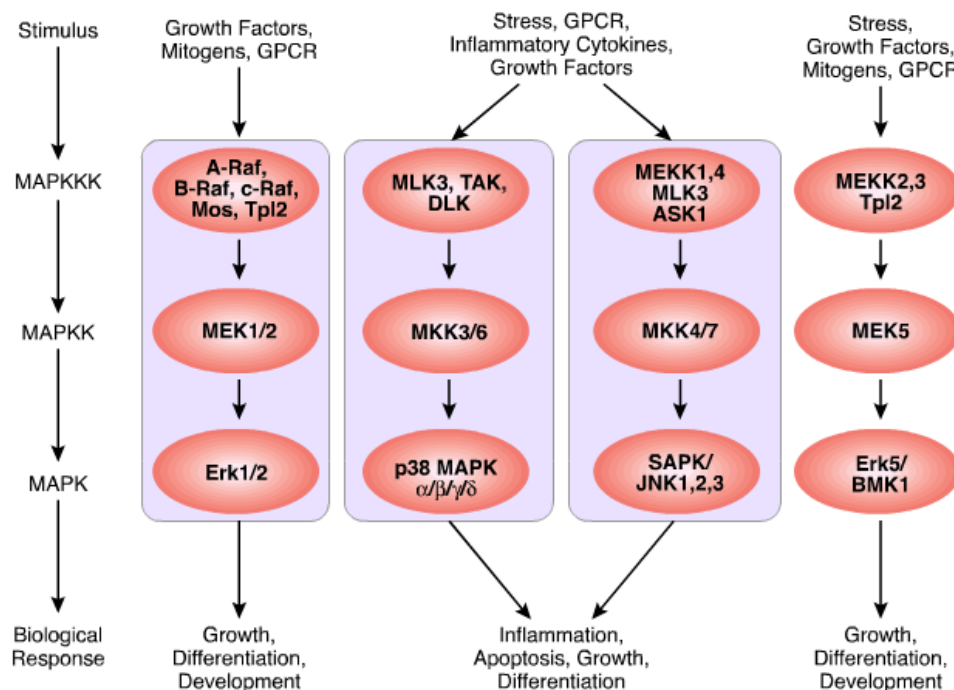
Caspase全名為Cysteine dependent aspartate specific protease，為胱氨酸蛋白酶家族，目前已發現有14種caspase，其中大多參與細胞凋亡過程(56)。在細胞內caspase以非活化態proenzyme的形式存在，一旦接受到死亡信號後就會切割成為活化態進而促進凋亡。而caspase因角色不同可主要分為兩類，分別為啟動者(initiator caspase)(caspase-8、caspase-9)和執行者(executor caspase)(caspase-3、caspase-6和caspase-7)，啟動者功能為接受死亡信號並促進並活化下游的執行者，而活化後的執行者則會直接裂解細胞內某些蛋白，如負責

DNA 修補功能的 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)使得 PARP 功能喪失，或是活化 DNA 水解酶(如 caspase-activated DNase)造成 DNA 不正常斷裂最後導致細胞凋亡。

(4) Mitogen-activated protein kinase(MAPK)訊息傳遞路徑

MAPK 屬 serine/threonine protein kinases，在調控細胞內的各種生理反應上扮演重要角色，例如增生、分化、發炎以及細胞死亡等。MAPK 訊息傳遞途徑包含三個以上的蛋白激酶參與：MAP kinase、MAPK kinase(MAPKK)和 MAPKK kinase(MAPKKK)。目前已知的 MAPK 訊息傳遞主要有三種，分別為 ERKs(extracellular responsive kinase)、JNKs/SAPK(c-Jun NH₂-terminal kinase/stress-activated protein kinase)以及 p38 路徑。當細胞在接收外界不同刺激時，會活化不同

的 MAPK 路徑來執行不同功能(57)(附圖六)，其中 ERK pathway 的功能主要為調控細胞增生及分化，許多物質例如生長因子、細胞激素以及致癌物質都可以活化 ERK1/2 路徑來促進細胞增生。過去研究也發現，當 ERK1/2 的路徑被啟動時會提高癌細胞的生長能力。而 JNKs/ SAPK 與 p38 路徑的活化，則與外來壓力如紫外線、活性氧或發炎物質(inflammatory cytokines)的刺激以及環境的壓力較有關，且主要參與調控細胞發炎反應、生長以及細胞凋亡(58)。



附圖六、MAPK 訊息傳導路徑

(Oncogene, 17: 3237-3245, 1998.)

研究目的

於行政院衛生署公布「2007 年國人十大死因」統計結果發現，惡性腫瘤已連續 26 年蟬聯榜首，且平均每 13 分 50 秒就有一人死於癌症，這顯示了癌症對國人的威脅性極大。雖然在過去幾年已陸續研究出癌化的過程及機轉，也發現許多致癌的危險因子，但卻無法降低癌症的死亡率，其中原因莫過於癌症治療上的阻礙。而目前常見的癌症的治療方法中，不論是化學治療或是抗癌藥物的使用往往會引起病人產生嚴重副作用，甚至有致死的危險性。因此從天然植物中尋找有效抗癌又安全的草藥複方或化合物儼然已成為近年來的熱門課題之一。而近幾年本實驗室也將研究方向轉移至開發天然物中的抗癌成分，期許能藉由健康食品的攝取來達到預防癌症發生的功效。

龍葵，為台灣隨處可見的野生植物，且已被證實具有抗氧化、抗發炎、護肝作用以及抑制癌症發生率之醫學功能。雖然過去已有許多中國醫學期刊報導龍葵及龍葵複方被廣泛用於惡性腫瘤後的治療，但其中的有效成分及作用機轉仍尚未討論完全。近年有文獻提出龍葵萃取物中含有豐富之多酚，且多酚已被證實確實具有抗癌效果。因此，本研究以台灣特有之龍葵全株為材料，探討龍葵之水萃取物及其中之多酚對人類癌細胞之作用和其中抗癌之分子機制。

研究方法

1. 龍葵水萃取物(SNWE)的製備

秤取 825 g 龍葵全株(含根、莖、葉、花、成熟及未成熟果實)乾品，稍微清洗龍葵後修剪成較小片段，加水覆至覆蓋龍葵，靜置隔夜。將靜置隔夜之龍葵加熱熬煮至沸騰後繼續悶煮 40 分鐘，重複上述動作 3 次，將取得之汁液粗過濾去除雜質後，放置於烘箱中乾燥去除水分，所得約 88 g 乾燥粉末即為龍葵水萃取物(SNWE)。產率約為 10.64 %。將乾燥後之萃取物磨碎分裝，而後將其冰在-20°C 冰箱存放。後續之實驗進行均以滅菌水溶解此龍葵水萃取物乾燥粉末作為實驗材料。在進行各種細胞實驗操作時，由 SNWE 配置成的各濃度溶液均需先經 0.22 µm filter(MILLEX®-HA)過濾除菌方可進行細胞實驗。

2. 龍葵多酚萃取物(SNPE)的製備

秤取 100 g 乾燥龍葵水萃(SNWE)粉末，以 300 ml 甲醇溶液浸泡，水浴 50°C，3 小時後過濾收集，連續 3 次，將濾液進行減壓濃縮乾燥，而後以 50°C，500 ml 二次水溶解，將濃縮之溶液加入 200 ml 己烷移除色素，取水層(下層)加入 180 ml 乙酸乙酯萃取後取上層溶液，連續萃取 3 次，進行減壓濃縮乾燥，最後加 250 ml 二次水溶解，冰在-70°C 放置隔夜，再經真空冷凍乾燥機乾燥為粉末，所得大約 2.31 g 粉末即為龍葵多酚萃取物。產率為 2.31%。後續之實驗進行均以含 50%酒精之滅菌水溶解龍葵多酚萃取物粉末作為實驗材料。

在進行各種細胞實驗操作時，由 SNPE 配置成的各濃度溶液均需先經 0.22 µm filter(MILLEX®-HA)過濾除菌方可進行細胞實驗。

2. 細胞培養(Cell culture)

2-1. 細胞株(Cell line)

本實驗所使用之細胞株皆購於食品工業研究所，詳細資料如下：

Cell line	Tissue	中文名稱	培養基
human gastric carcinoma (AGS)	Stomach; adenocarcinoma	人類胃癌細胞	F-12
human promyelocytic leukemia (HL-60)	Leukemia, acute promyelocytic	人類血癌細胞	RPMI (20%FBS; 懸浮型)
Hepatocellular carcinoma G2 (HepG2)	Liver, hepatoblastoma, human	人類肝癌細胞	MEM
Hepatocellular carcinoma 3B (Hep3B)	Liver, hepatoblastoma, human	人類肝癌細胞	MEM
Human lung carcinoma (A-549)	Lung; carcinoma	人類肺癌細胞	F-12
Human breast adenocarcinoma (MCF-7)	breast; mammary gland; adenocarcinoma; pleural effusion	人類乳癌細胞	MEM

human breast adenocarcinoma(grade III) (MDA-MB-231)	breast; mammary gland; adenocarcinoma; pleural effusion	人類乳癌細胞	DMEM
KB	Oral epidermoid carcinoma; HeLa contaminant	人類口腔癌細胞	MEM
Normal liver cell (Chang liver; CL)	Human, liver	正常人類肝細胞	BME

培養環境：將培養箱設定5% CO₂、37°C的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。

2-2. 解凍細胞

以人類肝癌細胞(Hepatocellular carcinoma G2; HepG2)為例，將含有HepG2細胞的冷凍管由液態氮筒快速移至37°C水浴槽，快速解凍兩分鐘後將管內細胞液移入含有培養液的離心管中，隨後已轉速1000 rpm 離心5分鐘，去除上清液，以含有10%胎牛血清的新鮮培養基將細胞打勻，而後將細胞液打散入75T 培養皿中，置於5% CO₂、37°C的恆溫環境中生長。

2-3. 繼代培養

將人類肝癌細胞—HepG2培養於含有2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids、1.0 mM sodium pyruvate以及10% fetal bovine serum的Minimum essential medium Eagle培養液中。將培養箱設定5% CO₂、37°C的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。待細胞長滿後用1x trypsin-EDTA於37°C培養箱作用5分鐘讓細胞脫落，隨後離心1000 rpm; 5 min，去除上清液，以新鮮培養基將細胞打勻並繼續培養。

2-4. 凍細胞

將人類肝癌細胞-HepG2以1x trypsin-EDTA於37°C培養箱作用5分鐘讓細胞脫落，隨後以1000 rpm離心5分鐘，去除上清液，再以含有7% DMSO; 10% FBS的培養基將細胞打勻，分裝置冷凍小管中，再將冷凍小管放入裝有異丙醇的冷凍保存盒中並於-80°C冰箱隔夜放置，最後將冷凍小管移入液態氮筒即完成。

3. 細胞毒性測試(Cytotoxicity assay, MTT assay)

本實驗是應用於測試細胞是否具有活性、存活的方法。此法是根據Alley等人所研究的結果所設計之實驗，其原理為具有活性的活細胞會將MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide)經由粒腺體中氧化去氫酶(dehydrogenase)作用代謝形成藍紫色結晶，之後再以異丙醇(isopropanol)將結晶溶出，並於OD_{563 nm}下測定溶液吸光，由吸光度的大小可得知有活性的細胞數目多寡，因活細胞才具有活性的粒腺體酵素，故所測得的吸光值會與活細胞數量成正比關係，而死細胞是無法進行此作用的，因此利用formazan產量的多寡來評估細胞的存活率。若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡的現象發生，故也可以藉此方法來判定細胞存活與死亡的情形。

將HepG2(4×10⁴ cell/well)培養於24 well culture plate，加入不同濃度的

SNWE(0.5、1、2、3 mg/ml)及 SNPE(0.1、0.5、0.75、1、2 mg/ml)處理 24 小時後，移除舊的培養基(含萃取物)，加入新的培養基和 MTT(0.5 mg/ml)37°C、5%CO₂ 反應 4 小時，移除培養基以 PBS washing，加入異丙醇將結晶溶出，在 OD_{563 nm} 下測定吸光值的變化。

4. 流式細胞儀技術分析細胞凋亡及細胞週期停止(analysis of apoptotic cells and cell cycle arrest by flow cytometry)

肝癌細胞株以繼代細胞培養的方式，將細胞種於6-well 培養皿中培養，待細胞長滿後，分別給予不同濃度SNWE及SNPE處理24小時，之後將培養液收集至離心管，以PBS清洗培養皿中之細胞，並加入trypsin使細胞懸浮，將含有細胞的懸浮液一併收集至離心管中，離心後吸去上清液後，加入70%酒精將細胞固定，置於-20°C冰箱至隔夜。待上機前，再次離心並吸去上清液，再用PBS wash一次並離心去上清液，加入PI染劑(PI 25 µg/ml，RNase A 50 µg/ml)將細胞懸浮，混勻後於室溫避光靜置15分鐘，最後將混勻的細胞懸浮液移至專用管中，利用流式細胞儀(flow cytometry, BD)偵測螢光強度，和控制組比較來換算apoptosis以及各個時期(G0/G1, S and G2/M phase)的百分比。

5. DAPI染色法(DAPI stain)

細胞在進行apoptosis時，會出現染色質濃縮及邊緣化(chromatin condensation and margination)、DNA斷裂(DNA fragmentation)、細胞皺縮(cell shrink)、與鄰近細胞脫離(detach from neighboring cells)並出現細胞膜起泡(membrane blebbing)的現象，最後會引起凋亡體(apoptosis bodies)的形成。DAPI(4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate)是常用的一種與DNA結合的螢光染劑。可以進入細胞核內，插入雙股DNA minor groove中adenine及thymine rich的位置，利用DAPI染色後於螢光顯微鏡(340/380 nm)下觀察，可看到細胞核的形態變化，作為判定細胞凋亡的依據。

將肝癌細胞株培養後，以trypsin-EDTA將細胞由培養皿中打下，以1000 rpm離心5分鐘，去除培養液，將細胞調整成 4×10^5 cells/ml培養於6-well的培養皿中，待細胞貼壁後，更換新的培養液同時加入不同濃度的SNWE與SNPE反應24小時，移除舊培養液，以PBS洗3次。將細胞以4% paraformaldehyde室溫固定細胞30分鐘，以PBS洗1次。隨後用DAPI(1 µg/mL)染色30分鐘 再以PBS清洗細胞3次。將細胞浸潤於PBS中後利用螢光顯微鏡，在波長340/ 380 nm excitation之下觀察細胞型態。

6. DNA 斷裂之測定(DNA fragmentation assay)

參與 DNA 分解的重要酵素稱為 CAD(一種 DNase)，在正常的細胞內有一種蛋白質叫做 ICAD(inhibitor of CAD，又叫作 DNA fragmentation factor 45)，平常的狀態下可抑制 CAD 的活性，使其不能分解 DNA；但是在 apoptosis 的過程中，ICAD 會被以 caspase 3 為主的 caspases 給切割而失活，當 CAD 不再受到抑制後，它便會展現高度的活性(其活性比 DNase I 和 DNase II 強)，迅速的將 DNA 分解為碎片，且因 apoptosis 是一種程序性的過程，所以被裂解的 DNA 碎片會成如同

階梯般的等距片段。

收集經 SNWE 與 SNPE 處理 24 小時之細胞，經 1800 rpm，4 °C 離心 10 分鐘後，使用 DNase Tissue kit(購自美國 Cell Signaling Technology 公司)抽取 DNA，溶於 AE buffer(10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0)，以 2% agarose gel electrophoresis。完成後取出膠片，置於 GELSTAR GEL STAIN10000 中進行染色 30 分鐘，而後直接以 UV 光激發並拍照。

【註】2% Agarose gel(100 ml)配方：稱取 2 g 的 agarose 粉末，以去離子水配置成 100 ml、混合均勻後放入微波爐中加熱至溶液呈現透明無色(約 2 分鐘)，以冷水稍微降溫後將溶液到入鑄膠器中，待膠凝集後即可置入 4°C 冰箱備用。

7. 蛋白質萃取及定量

7-1. 蛋白質萃取物之製備

收集 SNWE 與 SNPE 處理之細胞，經 1800 rpm，4 °C 離心 10 分鐘後去除上清液，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer:150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, pH 7.5)及蛋白質水解酶抑制劑(sodium orthovanadate(100 mM/ml), leupeptin(10 mM/ml)及 PMSF(100 mM/ml))，在 4 °C 下震盪 4 小時，再以 4 °C 高速離心 10,000× g，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -70°C，此上清液即為細胞全部蛋白之萃取液。

7-2. 蛋白質定量

利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 下有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。首先以 BSA (bovine serum albumin)為蛋白質標準溶液，配置不同濃度 BSA 作標準曲線，以換算樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。取 30 µl 細胞萃取液加入 1 ml 的 Coomassie blue，在室溫下反應 1 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化。

【註】BSA 標準曲線配置：將 8 mg/ml 的 BSA 以序列稀釋的方式分別稀釋成最終濃度為 1.6、1.2、0.8、0.4、0.2(mg/ml)的 BSA，再取 30 µl 的各濃度 BSA 加入 1 ml 的 Coomassie blue，在室溫下反應 1 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化，劃出標準曲線。

8. 西方墨點法 (Western blotting)

8-1. 樣品(sample)配置

取定量之蛋白液(70 µg)，以去離子水補至固定體積後加入五倍的 loading dye 混合均勻並以 95°C 加熱 10 分鐘，待加熱完將樣品至於冰上快速冷卻 5 分鐘隨後以 8000 rpm 離心 5 分鐘即可。

【註】五倍的 loading dye 配製(10 ml)：秤取 0.77 g DL-Dithiothreitol (DTT)與 1 g sodium dodecyl sulfate(SDS)，以 4 ml 的 1 M Tris-base (pH 6.8)於 50°C 加熱至完全溶解，之後再加入 5 ml Glycerol 和 0.3 ml 的 0.005% Bromophenol Blue 混合均勻即可。

8-2. 鑄膠

將電泳玻璃洗淨後擦拭，組裝至電泳座上固定，若要分析小分子蛋白則配置

12~15%的下層 separating gel；若要分析的是大分子蛋白就配 8~10%的 separating gel。將配下層膠所需溶液混勻後注入玻璃片中置固定高度(約留 1.5 cm 鑄上膠)，加入 30%酒精把下膠壓平，待膠凝集後將 30%酒精到掉並吸乾。隨後配製上層 stacking gel 並注入玻璃片中，插入電泳槽齒梳，待上膠凝後以去離子水將殘留在 well 內的上膠清洗乾淨。

【註】

Stacking gel(2ml)		10% Separating gel(10ml)	
H ₂ O	1.4ml	H ₂ O	4.0ml
30% Acrylamide mix	0.33ml	30% Acrylamide mix	3.3ml
1.0M Tris (PH 6.8)	0.25ml	1.5M Tris (PH 8.8)	2.5ml
10% SDS	0.02ml	10% SDS	0.1ml
10% APS	0.02ml	10% APS	0.1ml
TEMED	0.002ml	TEMED	0.004ml

8-3. SDS-PAGE

首先將電泳液(running buffer)倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣品小心注入 well 中，勿使樣品溢出 well，其中依個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後持續加入新的電泳液於內槽至覆蓋整個玻璃。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 伏特電壓開始跑，直至樣品跑過 stacking gel 與 separating gel 的交界處後再切換成 100 伏特電壓，當色帶跑至底線時才停止電泳。

8-4. 蛋白樣本之轉漬(electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘的部份，將膠體至於兩張經轉漬液(transfer buffer)濕潤過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同的硝化纖維膜(硝化纖維紙也需事先經轉漬液浸溼)，再放上兩張浸濕的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在各層中的氣泡，最後用含有海棉襯墊的夾板夾緊，放入轉漬槽中(槽中要放冰盒)，以固定 100 伏特轉漬 2 小時。

8-5. 免疫墨點法(immunoblot)

轉漬完將硝化纖維紙取出，以 5% blocking buffer 於室溫下作用 1 小時。隨後將 blocking buffer 到掉，再以 TBS-tween 漂洗三次 10 分鐘。換上一級抗體，置於 4°C 下作用 overnight，隔天再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘，接著換上二級抗體，於室溫下反應 1 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

9. 免疫沉澱反應(immunoprecipitation)

取 300 μg 的細胞蛋白質萃取物，加入其中一份所要觀察的蛋白質之專一性初級抗體(1:200)，於 4°C 下溫和搖晃反應隔夜後，加入 20 μl protein A sepharose beads(50%)於 4°C 下反應 1~3 小時。待反應結束後以 13200 rpm 離心 0.5 分鐘讓

beads 離下來，以已加蛋白質抑制劑的 RIPA buffer 清洗兩次，高速離心後去除上清液，在加入 20 μ l 3X SDS sample buffer(包含 187.5 mM Tris-HCl, 6%(w/v) SDS, 30% glycerol, 150 mM DTT, 0.03%(w/v)bromophenol blue)於 95°C 加熱 10 分鐘來終止反應，最後以西方墨點法分析。

10. 裸鼠實驗

實驗所用之五週大裸鼠(BALB/cAnN-Foxn1nu/CrlNarl)購於國家實驗動物中心，飼養於中山醫學大學實驗動物中心之 IVC (individually ventilated cage)室，並控制房內溫度在 22 \pm 2°C、溼度為 65 \pm 5%，光照與黑暗時間各為 12 小時。

10-1. 腫瘤生長實驗

實驗設計：將 400 μ l 的 matrix gel 懸浮 5 \times 10⁶ 個 HepG2 細胞，隨後注射入五週大之裸鼠的下背部以誘導腫瘤生成。一週後將裸鼠隨機分為六組並開始分別餵食一般飼料、龍葵水萃取(1%, 2%, 3%)及多酚萃取物(0.1%, 0.2%)飼料，每日每隻餵食 5 g，連續餵食 28 天，餵食期間定時觀察並每週測量腫瘤大小一次。四週實驗期間結束後，將裸鼠進行拍照紀錄，隨後以二氧化碳灌注進行犧牲並取其腫瘤秤重。

10-2. 血管新生實驗

實驗設計：將五週大之裸鼠以每組五隻為單位隨機分為四組，分別為控制組(裸鼠的下背部兩側單獨注入 400ul 的 Matrigel)、對照組(於兩側注入 400ul Matrigel 與 200ul HepG2(5 \times 10⁶)細胞的混合液)以及兩個加藥組(於兩側注入 400ul Matrigel、200ul HepG2 細胞與 0.25mg/ml 或 0.5mg/ml 之 SNPE 的混合液)。在完成注射動作後，以正常飼料餵食 15 天後犧牲，觀察注射部位血管新生的情形。

11. 雞胚胎絨毛膜試驗(chicken chorioallantoic membrane ; CAM)

本實驗是將九天大的雞胚胎，於雞蛋的氣室端(頓端)以及一邊側端各鑽一個小孔(注意不要傷到胚胎的血管)，之後利用吸取器吸住頓端之氣室端，使氣室移至側邊鑽孔的位置，即形成側邊人工氣室，隨後將側邊人工氣室孔洞附近的蛋殼小心的剝離，使孔洞擴大一些，最後以保鮮膜覆蓋孔洞的地方並將雞胚胎置於培養箱中培養 24 小時。

24 小時後取出雞胚胎，於雞胚胎孔洞中的大血管旁滴入 15ul Matrigel 與 15ul PBS 的混合液，作為控制組，而對照組則是滴入 15ul 的 HepG2 細胞懸浮液(1 \times 10⁷ 溶於 1 ml PBS)與 15ul 的 Matrigel 之混合液，此外還有兩個加藥組，是分別滴入 Matrigel、HepG2 細胞懸浮液與 0.25 mg/ml 或 0.5 mg/ml SNPE 之混合液。動作完成後再以保鮮膜封住，將雞胚胎置於培養箱中繼續培養，於 4 天後觀察滴入位置(突起)的血管新生情況，並計數其周圍的血管數。

12. 統計分析(Statistical analysis)

數據以 means \pm SD 表示。利用 Student t-test-Unpaired 來評估統計差異。P < 0.05 表示具有顯著差異。

研究結果

1. 龍葵水萃取物(SNWE)對九種癌細胞株之毒性測試

為了探究龍葵萃取物之抗癌能力，我們將九種不同的人類腫瘤細胞株各加入不同濃度的 SNWE 培養 24 小時後，利用 MTT 之細胞毒性試驗法觀察細胞存活情形。結果顯示 SNWE 能促使此九種人類腫瘤細胞的死亡，並且隨著處理 SNWE 的濃度增加，其細胞致死的能力越明顯(Tab. 1)。而 AGS(胃癌細胞)、HL-60(血癌細胞)及 HepG2、Hep3B(肝癌細胞)這四種癌細胞株都對 SNWE 有著高度的感受性，僅需微量的 SNWE 即可達到半致死劑量(IC₅₀)。相較於胃癌、血癌與肝癌之細胞株，SNWE 則對於 A549、H1299(肺癌細胞)、MCF7、MDA-231(乳癌細胞)與 KB(口腔癌細胞)則抑制能力相對較低(IC₅₀>3 mg/ml)。由結果可知，HepG2 和 Hep3B 此兩株肝癌細胞對 SNWE 有著特別的感受能力，所需的劑量最小，其中又以 SNWE 抑制 HepG2 細胞的效力最好，因此接下來的實驗均以 HepG2 作為實驗材料。

2. 龍葵多酚萃取物(SNPE)引發肝癌細胞死亡

由 Fig.2 得知 SNWE 能有效促使肝癌細胞死亡，我們接著確認是否 SNPE 也具有此能力。將 HepG2 細胞，處理不同劑量之 SNPE 培養 24 小時後，利用 MTT 細胞毒性試驗法觀察癌細胞存活率之情形。

結果顯示 SNPE 亦能有效促使 HepG2 細胞死亡，且半致死劑量只須 0.85 mg/ml(Fig. 1)。另外我們也在另一肝癌細胞 Hep3B 中得到相似的結果。

此外也以肝癌細胞 HepG2 處理不同劑量 SNWE 及 SNPE 後，分別在 24、48、72 及 96 小時後利用 MTT 細胞毒性試驗法觀察癌細胞存活率之情形。結果顯示：1 mg/ml SNWE 和 0.5mg/ml SNPE 能有效降低肝癌細胞 HepG2 的存活率分別長達 96 小時及 48 小時(Fig. 2)。

3. 龍葵水萃取物(SNWE)與多酚萃取物(SNPE)誘導 HepG2 細胞之凋亡現象

為了評估 SNWE 與 SNPE 對於抑制 HepG2 肝癌細胞生長的機制是否為促進細胞凋亡，因此利用以下的實驗來釐清。

(1) DAPI stain :

利用 DAPI 染劑，觀察 HepG2 細胞受到 SNWE 或 SNPE 刺激之後細胞核的變化情形。由 Fig. 3 可知以 HepG2 細胞處理濃度 0-3 mg/ml SNWE 和 0-1 mg/ml SNPE 作用 24 小時後，細胞開始出現典型的細胞凋亡特徵(細胞皺縮、細胞膜不規則及出現凋亡小體之現象)且隨著 SNWE 以及 SNPE 的劑量增加，細胞出現凋亡特徵的數目也逐漸增加。在 HepG2 處理 SNWE 濃度為 1.0 mg/ml 時，部份細胞開始出現細胞質減少及核濃染(亮藍色)的現象(Fig. 3A)；另外，當細胞處理 SNPE，且濃度為 0.5 mg/ml 時，HepG2 細胞就出現了細胞凋亡特徵及凋亡小體(apoptotic body)當 SNPE 濃度提高至 1.0 mg/ml 時即可看到非常明顯的核濃染現象(Fig. 3B)，顯示 HepG2 細胞對於 SNPE 的感受性要比 SNWE 來得高，也意謂著 SNPE 對於癌細胞之細胞毒性也比 SNWE 有效，應用價值較高。

(2) DNA fragmentation :

在細胞發生凋亡的過程當中，會發生細胞核內的 DNA 會被核酸水解酶 (endonuclease) 裂解成片段，稱之為 DNA fragmentation，故 DNA 斷裂可視為細胞走向凋亡的一項重要指標。在結果中發現 HepG2 細胞處理 SNWE 作用 24 小時後，在 SNWE 濃度需要高達 3.0 mg/ml 時，我們才可以觀察到少許的 DNA ladder 現象(Fig. 4A)相對的，SNPE 濃度僅需 1.5 mg/ml 時，就可以明顯地觀察到 DNA 斷裂現象(Fig. 4B)，也呼應前面 DAPI 染色法所觀察到之結果，相較於 SNWE，少量的 SNPE 即可誘導細胞產生凋亡現象。

(3) Flow cytometric analysis

我們進一步使用流式細胞儀來量化 SNWE 和 SNPE 所造成 HepG2 細胞凋零死亡的程度。流式細胞儀分析的結果，當 HepG2 肝癌細胞處理 SNWE 濃度為 2 mg/ml 時，分析 subG1 phase 有明顯的死亡細胞族群(apoptotic peak)出現，意謂著在這個劑量之下，有部分細胞呈現細胞凋亡的狀態，與正常組比較有約 44.17% 的增多，而後續劑量也明顯呈現濃度依賴性的現象，尤其當 SNWE 劑量增加至 4 mg/ml 時即有 90% 以上的細胞死亡現象(Fig. 5)。另外，當 HepG2 肝癌細胞處理 SNPE 濃度為 1.5 mg/ml 時，分析 sub G1 phase 即有大量 apoptotic peak 出現，增加的趨勢由正常組的 0.42% 增加到 42.14% (Fig. 6)，顯示 HepG2 在此劑量的 SNPE 刺激之下會大量走向細胞凋亡。

4. 龍葵水萃物(SNWE)對 HepG2 細胞凋亡相關蛋白之影響

(1) SNWE 促進 Fas/ FasL 表現及 caspases 的活化

已知 caspases 的活化在細胞凋亡過程中扮演著非常重要的角色。當細胞中 FasL 與其接受器 Fas 結合後可以活化下游的啟動者 caspase-8，活化後的 caspase-8 可促進執行者 caspase-3 的切割及活化，最後造成 PARP 裂解並導致細胞凋亡。在此，我們利用西方點墨法觀察 SNWE 對上述蛋白的影響，發現在以 SNWE 處理 HepG2 細胞時能誘導 Fas 及 FasL 的表現，且在 3mg/ml 劑量下有大量增加情形(Fig. 8A)。我們進一步觀察其下游 caspase-8 及 caspase-3 的表現，結果發現 HepG2 在處理 SNWE 後能促使 caspase-8 及 caspase-3 切割成活化態並造成 PARP 蛋白的裂解(Fig. 7)。

(2) SNWE 對 HepG2 細胞內 Bcl-2 family 的影響

由先前文獻可知活化的 caspase-8 可切割 Bcl-2 family 中的 Bid 蛋白使其裂解成 t-Bid。而 t-Bid 便會由細胞質跑到粒線體膜上，引發粒線體膜電位改變最後可促使細胞凋亡。而在 Fig. 8B 的結果顯示 SNWE 的處理能增加 HepG2 細胞中的 t-Bid 蛋白產生。另外我們也觀察了促凋亡蛋白；Bax 及抗凋亡蛋白；Bcl-2 的表現，結果發現 SNWE 並不影響此兩蛋白表現。

(3) SNWE 對 HepG2 細胞 MAPK 路徑之影響

MAPK 路徑調控著許多的細胞生理反應，也包括了細胞凋亡。因此接下來我們想瞭解 SNWE 是否是透過 MAPK 路徑來促使凋亡產生？我們利用西方點墨法觀察經 SNWE 處理後的 HepG2 細胞中 MAPK 蛋白(ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38 和 p-p38)表現。結果我們在 Fig. 9 中得知，無論是有無磷酸化的 ERK、JNK

以及 p38 都不會受到 SNWE 處理而影響。由以上結果可知 SNWE 並非透過 MAPK 路徑來引起 HepG2 細胞凋亡。

5. 龍葵多酚萃取物(SNPE)對 HepG2 細胞凋亡相關蛋白之影響

(1) SNPE 促進 Fas 蛋白表現及 caspases 的活化

在 Fig. 10 中可發現以 1 mg/ml 的 SNPE 處理 HepG2 細胞就可看到有 caspase-8、caspase-9 以及 caspase-3 的切割形式產生，而在相同的 SNPE 劑量處理下也發現有 Fas 蛋白的大量表現的情形(Fig. 11)。有此結果可知，SNPE 所活化的凋亡路徑下游與 SNWE 相似，其可能機制為增加 Fas 的表現量使其與 FasL 結合增加，而接著促進 caspase-8 的活化，活化後 caspase-8 再進一步活化 caspase-3 或改變 Bcl-2 family 蛋白結構而促使 caspase-9 活化來促進細胞凋亡。另外我們也觀察在到 PARP 蛋白的原始形態有減少趨勢，表示其有被活化的 caspase-3 所切割的可能。

(2) SNPE 對 HepG2 細胞內 Bcl-2 family 的影響

由 Fig. 11 結果圖中發現，在 HepG2 細胞受到 1 mg/ml 的 SNPE 刺激時可觀察到 Bid 的 inactive form 有減少的趨勢。另外，Bcl-2 蛋白的表現則會隨著處理之 SNPE 劑量增加而逐漸下降。

(3) SNPE 對 HepG2 細胞 MAPK 路徑之影響

為了進一步探討 SNPE 促進 HepG2 細胞凋亡的機制，我們一樣利用西方點墨法來觀察細胞中 MAPK 家族蛋白的表現及活化情形。其結果顯示，以 SNPE 處理 HepG2 細胞後同樣不會影響 ERK、JNK 以及 p38 的磷酸化情形(Fig. 12)。

6. 預先處理 MAPK 抑制劑對 SNPE 誘導 HepG2 細胞凋亡之影響

為了更加確認 MAPK 路徑是否參與 SNPE 誘導 HepG2 細胞凋亡的過程中，我們分別以 ERK、p38 以及 JNK 蛋白的抑制劑(PD98059、SB203580 和 SP600125) 事先處理細胞一小時後再以 Flow 分析其有無改變凋亡現象。結果顯示，無論是處理 ERK、p38 或 JNK 抑制劑都無法減少 HepG2 細胞處理 SNPE 後誘導的 subG1 期之比例(Fig. 13)。因此，依據此實驗結果我們可以更加的確定 MAPK 路徑並不參與在 SNPE 誘導 HepG2 細胞凋亡的過程中。

7. 低劑量 SNWE 以及 SNPE 誘導細胞週期停滯於 G2/M 時期

由 Fig. 14-15 中 Flow 結果得知在 SNWE 1mg/ml 以及 SNPE 0.75 mg/ml 時就開始有 subG1 期的產生，代表細胞正要邁向細胞凋亡，但在細胞處理 SNPE 0.5 mg/ml 的劑量下則發現其 subG1 並不明顯，但是細胞週期有停滯於 G2/M 的趨勢。因此，我們便想進一步瞭解，若以低劑量 SNWE 以及 SNPE 處理，是否會對 HepG2 細胞之週期有所影響？所以我們分別以 0.1- 0.75 mg/ml 的 SNWE 以及 0.1- 0.5 mg/ml 的 SNPE 處理 HepG2 細胞，結果發現，在處理低劑量 0.1 mg/ml 的 SNWE 與 SNPE 即可使其 G2/M 期的百分比分別由 19.57%和 18.41%增加至 23.9%與 21.13%。若將 SNWE 劑量提高至 0.75 mg/ml 時則發現 G2/M 期明顯的增加至 31.76%，而 SNPE 則只需 0.5 mg/ml 即可增加 G2/M 期的百分比至 31.62%。因此，由以上結果可知，低劑量的 SNWE 和 SNPE 會誘導細胞週期停滯於 G2/M

時期，且 G2/M 期的百分比會依據處理劑量增加而增加，呈現 dose-dependent 趨勢。

8. 龍葵多酚萃取物 SNPE 抑制細胞週期調控蛋白 cyclin B 與 CDK1 的結合以及降低 Cdc25C 的表現

由過去文獻可知 cyclin B/CDK1 複合物為促進細胞週期由 G2 進入 M 期的重要調控因子。且而在 Fig. 15 的結果中我們看到了 SNPE 誘導 HepG2 細胞週期停滯於 G2/M 的現象。因此我們想進一步瞭解，是否 SNPE 會透過影響 cyclin B/CDK1 複合物來抑制細胞週期進行。在此我們利用免疫沉澱法與西方點墨法證實，SNPE 在 0.75 mg/ml 的劑量下的確可以些微降低 cyclin B 與 CDK1 的結合，但此抑制效過並不明顯且在 0.25 mg/ml 及 0.5 mg/ml 的 SNPE 處理下 cyclin B 與 CDK1 的結合皆不受影響(Fig. 16)。

當細胞週期要由 G2 進入 M 期的過程中，需透過 CDC25C 來將複合物中 CDK1 蛋白上 Threonine-14 及 Tyrosine-15 位子的磷酸根去除，方可使 cyclin B/CDK1 活化，而促進細胞週期 G2/M transition。因此，我們下一步就去分析 SNPE 的處理是否會影響 CDC25C 蛋白表現。從結果中得知，CDC25C 蛋白表現會隨著處理 SNPE 的劑量增加而下降，在 0.5 mg/ml 及 0.75 mg/ml 時幾乎達到完全抑制的效果(Fig. 17)。

9. 龍葵水萃(SNWE)與多酚萃取物(SNPE)對於裸鼠之抗腫瘤作用

綜合以上 *in vitro* 試驗結果得知 SNWE 及 SNPE 能透過促進細胞週期停滯於 G2/M 以及誘導細胞凋亡來抑制 HepG2 肝癌細胞生長。為了確認 SNPE 在 *in vivo* 的情況下是否也具有抗腫瘤生長的能力，因此我們利用裸鼠皮下注入肝癌細胞的模式來進行分析。結果由 Fig. 18 顯示，在餵食 1% 的 SNWE 條件下即能明顯抑制裸鼠皮下腫瘤的體積及重量，而隨著餵食劑量增加 2% 及 3% 時腫瘤抑制效果更好。另外，在餵食 SNPE 的組別中更發現到只要餵食 0.1% 的 SNPE 就能幾乎完全抑制腫瘤的生長(Fig. 19)，由此結果証實了 SNWE 和 SNPE 的確具有抗腫瘤的效力。

討論

癌症是人類目前最難戰勝的頑症之一，亦是全球醫學極欲克服的一大難題。癌症的治療方法主要有手術、化療、放療、中草藥和生物治療等，在臨床上往往需幾種方法配合應用。隨著中草藥治療癌症研究的不斷深入，其在增強機體自身對癌細胞的免疫以及促進癌細胞凋亡兩方面獨特的療效和較低的有毒副作用，越來越引起人們關注。

龍葵，含有生物鹼、醣蛋白、多醣以及多酚等功能性成分，已有許多文獻證實龍葵中的生物鹼、醣蛋白、多醣成份皆具有殺死癌細胞之作用。相較之下，其中的多酚成分則較鮮為人所探討。因此，本實驗遂以龍葵作為題材，且萃取其中豐富之多酚，來研究其是否具有抗癌效果並進一步探討其中機制。

在以 MTT 試驗來分析 SNWE 對 AGS(胃癌細胞)、HL-60(血癌細胞)、HepG2、Hep3B(肝癌細胞)、A549、H1299(肺癌細胞)、MCF7、MDA-231(乳癌細胞)與 KB(口腔癌細胞)等九種癌細胞株是否產生細胞毒性。發現在九種癌細胞中，HepG2 細胞對 SNWE 的毒殺反應較為敏感，僅需 1.11 mg/ml 即達半致死劑量，因此選擇 HepG2 細胞作為研究對象。另外我們也觀察了 SNWE 是否亦會對正常肝細胞株有毒性，因此以 chang liver 細胞作為正常肝細胞的代表，來分析 SNWE 對其的影響。結果發現在處理 3mg/ml 的 SNWE 劑量時，chang liver 細胞仍有 80% 以上的存活率。此結果符合了篩選抗癌藥的準則，即藥物能專一性針對癌細胞作用，而不對正常細胞產生傷害。此外，我們發現 SNPE 對於 HepG2 細胞的半致死劑量為 0.8 mg/ml，較 SNWE 來的低，由此可知多酚成分對癌細胞的毒殺性較強。

細胞的死亡方式主要有兩種，分別為細胞壞死以及細胞凋亡，其中細胞凋亡的死亡方式較具專一性。過去發現的抗癌藥物作用機轉有許多都是促進癌細胞凋亡，這些結果可藉由細胞產生核濃染、DNA 斷裂以及細胞週期之 subG1 期增加來得到證實。而在本篇中也發現到相似的結果，無論是經 SNWE 或 SNPE 刺激後，特定時間內細胞都有上述的三個凋亡指標出現，由此判斷 SNWE 和 SNPE 促進的細胞死亡是透過凋亡的過程。另外在 DNA 斷裂的結果中可發現，SNWE 在處理 3 mg/ml SNWE 時開始有較明顯的斷裂現象，然而 SNPE 卻只需 1.5 mg/ml 即可達相同結果。藉由觀察核濃染與 SubG1 期可呼應了上述的 SNPE 對癌細胞的毒性較 SNWE 高。

在 Fig. 7-8 的結果顯示：隨著 SNWE 處理 HepG2 肝癌細胞的濃度增加，細胞內促細胞凋亡蛋白 caspase 3、8、cleaved PARP、t-Bid、Fas、FasL 都有增加的趨勢。過去文獻也證實 Fas 與 FasL 的結合可啟動死亡接受體的凋亡訊息，並藉由切割 caspase 8 而進一步活化 caspase 3 及 Bid 來促使凋亡發生(47)。而由本實驗的結果可說明 SNWE 可能透過此路徑來誘導 HepG2 細胞凋亡。然而在 SNPE 處理方面，亦觀察到 caspase 家族的活化及 Fas 的增加趨勢。由此可知 SNPE 與 SNWE 引發凋亡的機制也許相似。

我們接著探討 SNWE 與 SNPE 引發凋亡的上游路徑，由本篇結果得知 SNWE 以及 SNPE 會促進 Fas 的表現。而過去文獻指出許多的抗癌物質所誘導癌細胞凋

亡的機制是由 MAPK 家族中 P38 及 JNK 接受刺激而進一步活化下游的轉錄因子 c-jun，而活化後的 c-jun 即可促使其 target gene；Fas 和 FasL 表現增加(60-62)。因此我們在本篇中也觀察了細胞經 SNWE 和 SNPE 處理後之細胞內 MAPK 家族磷酸化情形。但結果與先前文獻相異，我們發現無論是在 SNWE 或 SNPE 的處理下 MAPK (ERK-p、JNK-p 和 p38-p) 家族的活化情形皆不受影響。為了更進一步確認此結果，我們也用了此三種蛋白的專一性抑制劑來反證。所得結果亦證明 SNWE 和 SNPE 誘導 HepG2 細胞凋亡不走 MAPK 調控路徑。此外，也有文獻指出 P53 轉錄因子亦可促進 Fas 的轉錄(63)，且在 2000 年的文獻發現，由 Fas 誘導的腸癌細胞凋亡必需依賴 p53 來調控(64)。因此我們下一步可以朝這個方向去做進一步探究，看是否 p53 參與在 SNWE 及 SNPE 誘導的細胞凋亡。由於引發細胞凋亡的原因很多，因此除了 Fas/FasL 路徑之外，其他調控細胞凋亡的路徑也十分多樣化。例如 ROS 的累積或 ER stress 等都可引發細胞凋亡。且有研究證實，不論是大量 ROS 堆積或 ERstress 都可藉由破壞粒線體膜電位及引發 caspases 的活化來達到促進細胞凋亡的目的(65)。因此，雖然本實驗結果顯示 MAPK 並不參與 SNWE 與 SNPE 誘導的細胞凋亡，但其可能透過其他訊息路徑來調控，而這個部份仍需繼續做探討。

在過去研究癌症相關原因時發現，在許多的腫瘤細胞中都發現到細胞週期相關蛋白過度活化的情形。例如在肝癌、肺癌、胃癌及腸癌細胞中發現調控 G1 時期的 cyclins 蛋白過度表現(66-68)。而最近的研究則發現神經膠質瘤細胞中，調控 G2/M 期的 CDC2/cyclinB1 蛋白有異常大量表現的情形(69)。由這些報告可知，無論是細胞週期的哪個環節出錯，都會使細胞過度增生而產生癌化。因此，目前已有許多報告指出，抑制癌細胞細胞週期的進行也是許多抗癌藥抑制腫瘤生長的方法之一。所以在本篇研究中，特別利用 PI 染色觀察了低劑量的 SNWE 及 SNPE 是否對 HepG2 之細胞週期有影響。結果發現在處理此兩種萃取物的低劑量條件下，皆能誘導 HepG2 細胞週期停滯在 G2/M 時期。而我們也在低劑量的 SNPE 處理後觀察與細胞週期 G2/M 停滯有關之調控蛋白，結果顯示隨著 SNPE 處理的劑量增加能明顯抑制 CDC25C 蛋白的表現。而從過去文獻可知，CDC25C 蛋白的主要功能為促進細胞由 G2 進入 M 期的重要調控因子(37)，所以由此結果判斷 SNPE 能抑制 CDC25C 表現而進一步促進 HepG2 細胞週期停滯於 G2/M 時期。過去文獻發現，許多藥物可透過促進 CHK1/2 激酶在 CDC25C 蛋白特殊位子上接上磷酸根，使 CDC25C 被 14-3-3 蛋白結合上，使 CDC25C 無法進入核內而導致週期停滯(70)。而本實驗只做出了初步的結果，所以往後可針對 CDC25C 蛋白的調控做深入的探討。

我們另外發現一個有趣的事，由於我們在 MTT 的實驗結果顯示，SNPE 所造成的 HepG2 細胞半致死劑量為 0.8 mg/ml，但從 flow 的結果中卻看到在 1.5 mg/ml 的 SNPE 劑量才有將近一半的細胞出現於 subG1 時期，而 DNA 斷裂情形也是在處理 1.5 mg/ml 的 SNPE 劑量時才出現，因此我們便試圖尋找造成此差異性之可能性。由於過去文獻證實除了細胞凋亡的機制之外，亦存在另一種細胞程

序性死亡方式，即為細胞自噬作用。而細胞自噬的一個明顯特徵為細胞中會出現許多大小不一的囊泡，這是由於細胞自噬其中胞器而產生的現象，而此現象也出現在以 SNPE 處理 HepG2 後，我們接著以西方點末法來分析 LC-3 蛋白(參與自噬作用的必需蛋白)，結果發現 SNPE 的處理的確會促進 LC-3 蛋白的表現。因此我們合理懷疑，SNPE 除了誘導 HepG2 走向細胞凋亡外，也可能同時引發了細胞的自噬作用。

自古到今，將龍葵用於治療疾病的例子屢見不鮮。除此之外，在中草藥豐富的中國，更有報告指出龍葵或其複方可用於輔助治療多種惡性腫瘤。由此可見，龍葵的確在抗癌的方面上具有一定的功效。但現今社會多注重科學證據，因此為了肯定龍葵的神奇功效，已有許多科學家紛紛證實了龍葵中的成分確實具有抗癌之功效。

綜合本篇的研究結果得知，龍葵水萃取物及多酚萃取物經可以誘導肝癌細胞 HepG2 之細胞週期停滯於 G2/M 時期，此外亦可促進細胞凋亡。本研究結果除了更加奠定龍葵於抗癌上的功效，也期許能提供治療及預防肝癌的一個新方向。

參考文獻

王泳 抗癌中藥的臨床應用. 中醫藥研究, 16: 20, 2000

徐榮源 C型肝炎與肝癌. 國防醫學, 27: 189-192, 1998.

1. Lee, C. C., Liu, J. Y., Lin, J. K., Chu, J. S., and Shew, J. Y. p53 point mutation enhanced by hepatic regeneration in aflatoxin B1-induced rat liver tumors and preneoplastic lesions. *Cancer Lett*, 125: 1-7, 1998.
2. Morgan, T. R., Mandayam, S., and Jamal, M. M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127: S87-96, 2004.
3. Shieh, Y. S., Nguyen, C., Vocal, M. V., and Chu, H. W. Tumor-suppressor p53 gene in hepatitis C and B virus-associated human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 54: 558-562, 1993.
4. El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L., and Reddy, K. R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 134: 1752-1763, 2008.
5. Sultana, S., Perwaiz, S., Iqbal, M., and Athar, M. Crude extracts of hepatoprotective plants, *Solanum nigrum* and *Cichorium intybus* inhibit free radical-mediated DNA damage. *J Ethnopharmacol*, 45: 189-192, 1995.
6. Prashanth Kumar, V., Shashidhara, S., Kumar, M. M., and Sridhara, B. Y. Cytoprotective role of *Solanum nigrum* against gentamicin-induced kidney cell (Vero cells) damage in vitro. *Fitoterapia*, 72: 481-486, 2001.
7. Lin, H. M., Tseng, H. C., Wang, C. J., Lin, J. J., Lo, C. W., and Chou, F. P. Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl(4)-induced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact*, 171: 283-293, 2008.
8. Zakaria, Z. A., Gopalan, H. K., Zainal, H., Mohd Pojan, N. H., Morsid, N. A., Aris, A., and Sulaiman, M. R. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* chloroform extract in animal models. *Yakugaku Zasshi*, 126: 1171-1178, 2006.
9. Moundipa, P. F. and Domngang, F. M. Effect of the leafy vegetable *Solanum nigrum* on the activities of some liver drug-metabolizing enzymes after aflatoxin B1 treatment in female rats. *Br J Nutr*, 65: 81-91, 1991.
10. Nadeem, M., Dandiya, P. C., Pasha, K. V., Imran, M., Balani, D. K., and Vohora, S. B. Hepatoprotective activity of *Solanum nigrum* fruits. *Fitoterapia* 68: 245-251, 1997.
11. Saijo, R., Murakami, K., Nohara, T., Tomimatsu, T., Sato, A., and Matsuoka, K. [Studies on the constituents of *Solanum* plants. II. On the constituents of the immature berries of *Solanum nigrum* L. (author's transl)]. *Yakugaku Zasshi*, 102: 300-305, 1982.

12. Hu, K., Kobayashi, H., Dong, A., Jing, Y., Iwasaki, S., and Yao, X. Antineoplastic agents. III: Steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta Med*, *65*: 35-38, 1999.
13. Son YO, K. J., Lim JC, Chung Y, Chung GH, Lee JC. Ripe fruit of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem Toxicol.*, *41*: 142-148, 2003.
14. Lee, S. J., Oh, P. S., Ko, J. H., Lim, K., and Lim, K. T. A 150-kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. has cytotoxic and apoptotic effects by inhibiting the effects of protein kinase C alpha, nuclear factor-kappa B and inducible nitric oxide in HCT-116 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, *54*: 562-572, 2004.
15. Heo KS, L. S., Ko JH, Lim K, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF-kappaB and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells. *Toxicol In Vitro.*, *18*: 755-763, 2004.
16. Lin, H. M., Tseng, H. C., Wang, C. J., Chyau, C. C., Liao, K. K., Peng, P. L., and Chou, F. P. Induction of autophagy and apoptosis by the extract of *Solanum nigrum* Linn in HepG2 cells. *J Agric Food Chem*, *55*: 3620-3628, 2007.
17. JB, H. *Methods in plant biochemistry. I: plant phenolics*. London: Academic Press, 1989.
18. Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., and Remesy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother*, *56*: 276-282, 2002.
19. Yoon, J. H. and Baek, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*, *46*: 585-596, 2005.
20. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, *79*: 727-747, 2004.
21. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, *18*: 427-442, 2007.
22. Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Buysman, M. N., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., de Vries, J. H., and Katan, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett*, *418*: 152-156, 1997.
23. Nigdikar, S. V., Williams, N. R., Griffin, B. A., and Howard, A. N. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr*, *68*: 258-265,

- 1998.
24. Robak, J. and Gryglewski, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, *37*: 837-841, 1988.
 25. Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C., and de la Lastra, C. A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*, *67*: 1399-1410, 2004.
 26. Hibasami, H., Achiwa, Y., Fujikawa, T., and Komiya, T. Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res*, *16*: 1943-1946, 1996.
 27. Kemberling, J. K., Hampton, J. A., Keck, R. W., Gomez, M. A., and Selman, S. H. Inhibition of bladder tumor growth by the green tea derivative epigallocatechin-3-gallate. *J Urol*, *170*: 773-776, 2003.
 28. Brusselmans, K., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., and Swinnen, J. V. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer*, *106*: 856-862, 2003.
 29. Horie, N., Hirabayashi, N., Takahashi, Y., Miyauchi, Y., Taguchi, H., and Takeishi, K. Synergistic effect of green tea catechins on cell growth and apoptosis induction in gastric carcinoma cells. *Biol Pharm Bull*, *28*: 574-579, 2005.
 30. Chen, C., Shen, G., Hebbar, V., Hu, R., Owuor, E. D., and Kong, A. N. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, *24*: 1369-1378, 2003.
 31. Yang, G. Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J., and Yang, C. S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, *19*: 611-616, 1998.
 32. Kuo, P. L. and Lin, C. C. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci*, *10*: 219-227, 2003.
 33. Johnson, D. G. and Walker, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *39*: 295-312, 1999.
 34. MacLachlan, T. K., Sang, N., and Giordano, A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, *5*: 127-156, 1995.
 35. Mudryj, M., Devoto, S. H., Hiebert, S. W., Hunter, T., Pines, J., and Nevins, J. R. Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*, *65*: 1243-1253, 1991.

36. Reed, S. I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl*, 18: 69-73, 1994.
37. Lobrich, M. and Jeggo, P. A. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer*, 7: 861-869, 2007.
38. Takizawa, C. G. and Morgan, D. O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 658-665, 2000.
39. Hutchins, J. R. and Clarke, P. R. Many fingers on the mitotic trigger: post-translational regulation of the Cdc25C phosphatase. *Cell Cycle*, 3: 41-45, 2004.
40. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1: 3-11, 1997.
41. Kamesaki, H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol*, 68: 29-43, 1998.
42. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
43. Williams, G. T. Apoptosis in the immune system. *J Pathol*, 173: 1-4, 1994.
44. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462, 1995.
45. Saraste, A. and Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45: 528-537, 2000.
46. Fumarola, C. and Guidotti, G. G. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*, 9: 77-82, 2004.
47. Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76: 959-962, 1994.
48. Bratton, S. B., MacFarlane, M., Cain, K., and Cohen, G. M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 256: 27-33, 2000.
49. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 269-290, 1999.
50. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157, 1996.
51. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. Smac, a mitochondrial protein

- that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, *102*: 33-42, 2000.
52. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, *397*: 441-446, 1999.
 53. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, *412*: 95-99, 2001.
 54. Donovan, M. and Cotter, T. G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta*, *1644*: 133-147, 2004.
 55. Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, *476*: 118-123, 2000.
 56. Harris, M. H. and Thompson, C. B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ*, *7*: 1182-1191, 2000.
 57. Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., and Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, *17*: 3237-3245, 1998.
 58. Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, *74*: 49-139, 1998.
 59. Johnson, G. L. and Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, *298*: 1911-1912, 2002.
 60. Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B., and Claret, F. X. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, *278*: 19245-19256, 2003.
 61. Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F., and Gulbins, E. Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J Biol Chem*, *272*: 22173-22181, 1997.
 62. Jia, L., Yu, W., Wang, P., Li, J., Sanders, B. G., and Kline, K. Critical roles for JNK, c-Jun, and Fas/FasL-Signaling in vitamin E analog-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Prostate*, *68*: 427-441, 2008.
 63. Xie, P., Tian, C., An, L., Nie, J., Lu, K., Xing, G., Zhang, L., and He, F. Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively

- regulates its downstream genes. *Cell Signal*, 2008.
64. Petak, I., Tillman, D. M., and Houghton, J. A. p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*, 6: 4432-4441, 2000.
 65. Orrenius, S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, 39: 443-455, 2007.
 66. Donnellan, R. and Chetty, R. Cyclin E in human cancers. *Faseb J*, 13: 773-780, 1999.
 67. Zhang, Y. J., Jiang, W., Chen, C. J., Lee, C. S., Kahn, S. M., Santella, R. M., and Weinstein, I. B. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 196: 1010-1016, 1993.
 68. Leach, F. S., Elledge, S. J., Sherr, C. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res*, 53: 1986-1989, 1993.
 69. Chen, H., Huang, Q., Dong, J., Zhai, D. Z., Wang, A. D., and Lan, Q. Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, 8: 29, 2008.
 70. Deep, G., Singh, R. P., Agarwal, C., Kroll, D. J., and Agarwal, R. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene*, 25: 1053-1069, 2006.

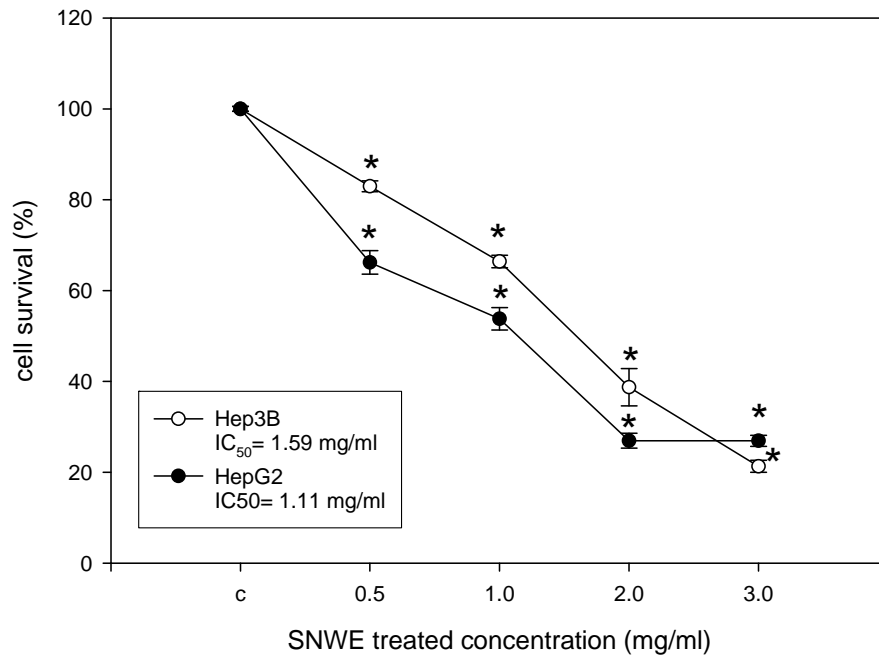
第一年

- 實驗結果附圖 -

Cell lines	IC₅₀ (mg/ml)
AGS	1.58
HL60	1.38
HepG2	1.11
Hep3B	1.59
A549	>3
H1299	>3
MCF7	>3
MDA231	>3
KB	>3

Table 1. The effects of SNWE on cell viability of various cells (AGS, HL60, HepG2, Hep3B, A549, H1299, MCF7, MDAMB231 and KB cells). Cultured cells were treated with or without SNWE under different concentrations (0~3 mg/ml) for 24 hrs. Cell viability was analyzed by MTT assay. The results are expressed as mean±SD, n=3.

(A)



(B)

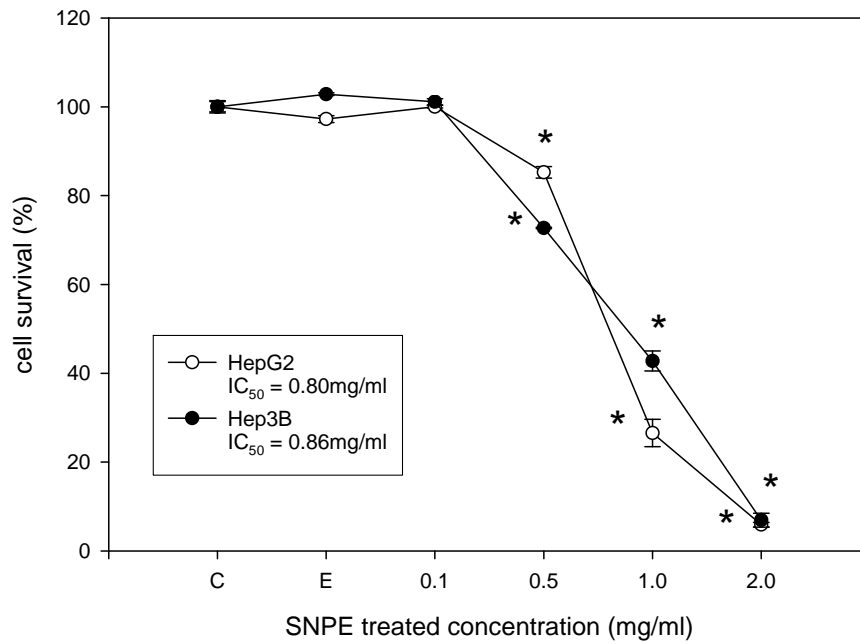
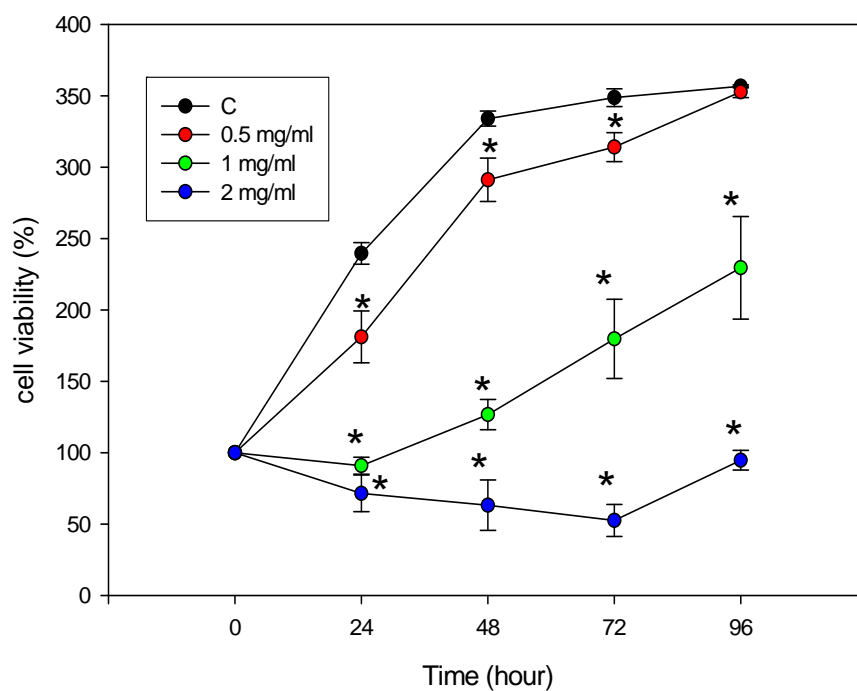


Figure 1. Viability of hepatocarcinoma cell treated with SNWE and SNPE. Cultured HepG2 and Hep3B cells were treated with or without SNWE (A) or (B) SNPE under different concentrations for 24 hrs. Cell viability was analyzed by MTT assay. The results are expressed as mean±SD, n=3. *, p < 0.01 as compared to control group.

(A)



(B)

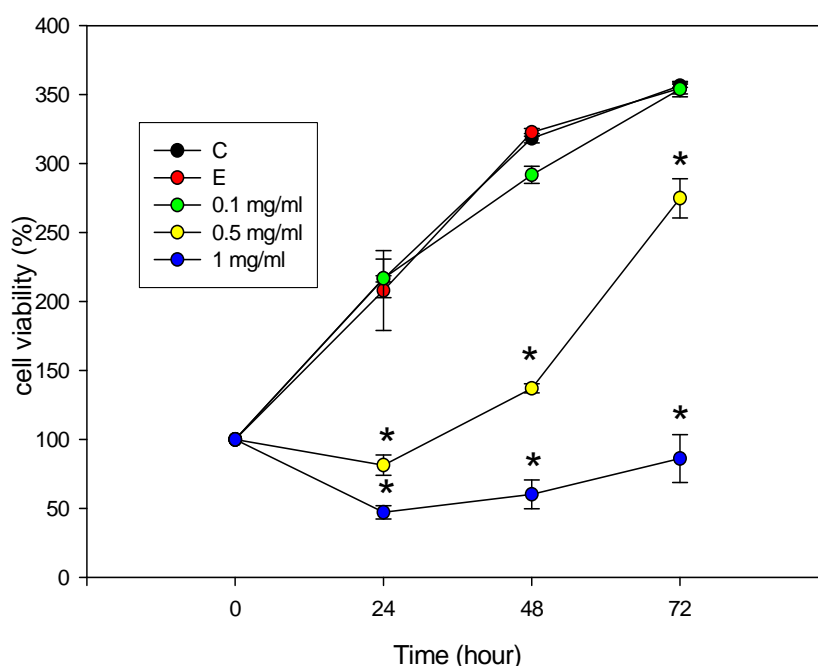


Figure 2. Viability of hepatocarcinoma cell treated with SNWE and SNPE. (A) Cultured HepG2 cells were treated with or without SNWE or (B) SNPE under different concentrations for 24, 48, 72 and 96 hrs. Cell viability was analyzed by MTT assay. EtOH as a reagent control. The results are expressed as mean \pm SD, n=3. *, p < 0.01 as compared to control group.

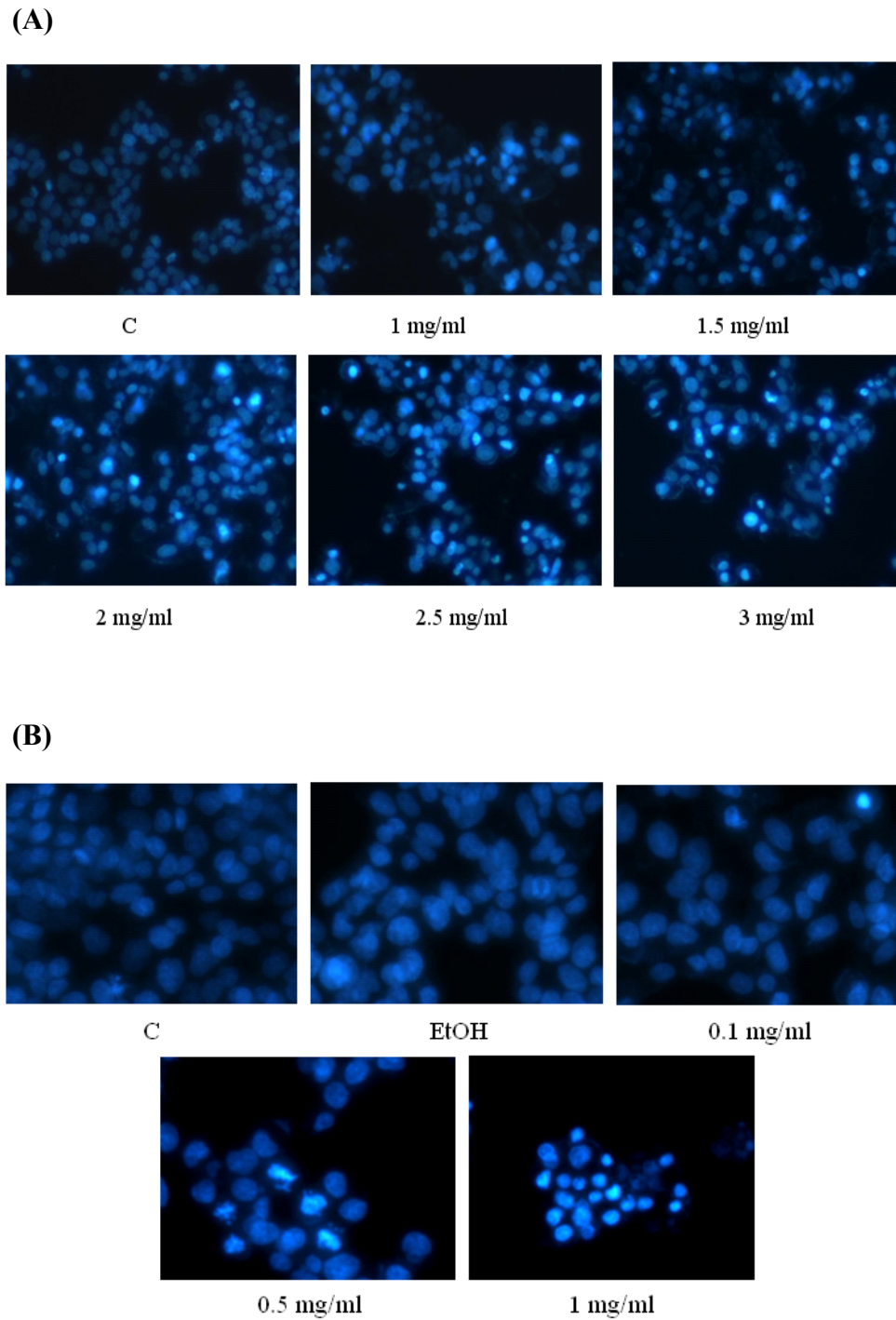
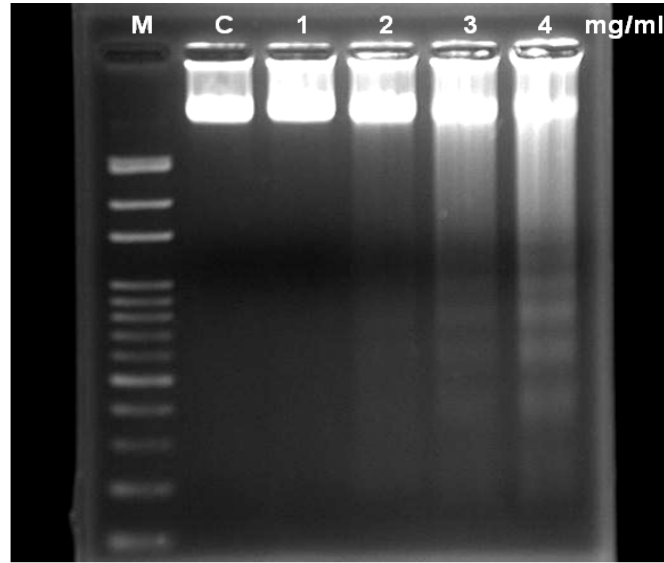


Figure 3. Morphology of HepG2 cell treated with SNWE and SNPE. HepG2 cells were treated with or without (A) SNWE in 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/ml (B) SNPE in 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml for 24 hrs. EtOH as a reagent control. The apoptotic cells were assayed by DAPI stain.

(A)



(B)

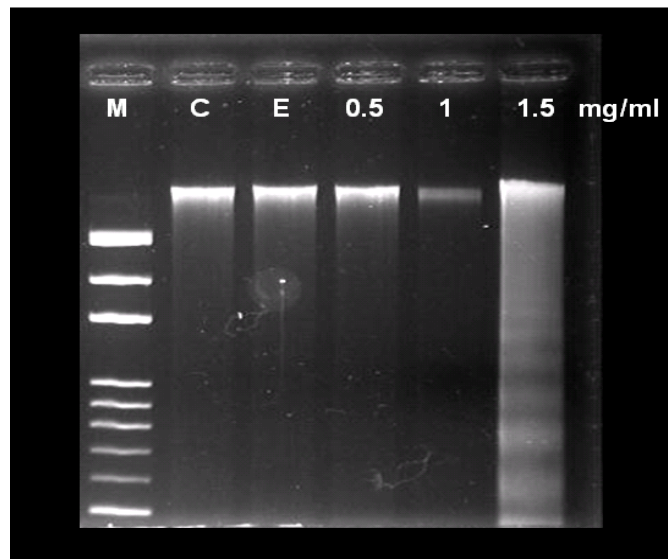


Figure 4. Electrophoresis of DNA fragments in HepG2 cell treated with (A) SNWE (B) SNPE in indicated concentration. Genomic DNA was isolated from HepG2 cells (3×10^5 cells/6 well) treated with various concentrations of SNWE(0~4 mg/ml) and SNPE (0 ~ 1.5 mg/mL) for 24 hrs. The level of DNA fragmentation was evaluated by electrophoresis on agarose gel and stained with ethidium bromide which was photographed under UV light. EtOH as a reagent control.

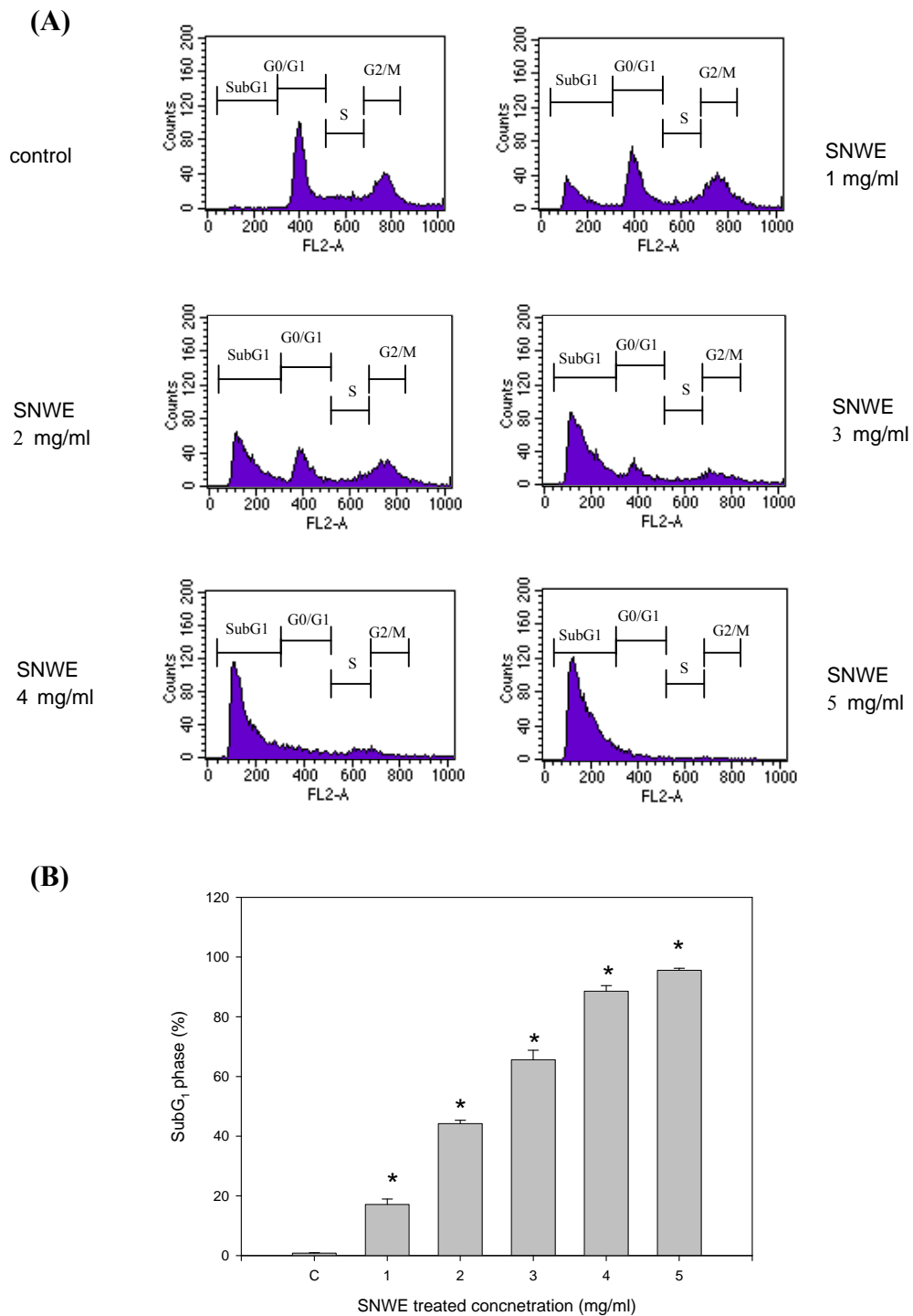


Figure 5. Effect of SNWE induced apoptosis and cell cycle progress in HepG2 cells. (A) Cultured cells were treated with or without SNWE in 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/ml for 24 hrs Cell cycle was analyzed by flow cytometry. (B) Quantitative assessment of the percentage of HepG2 cells in Sub G₁, as indicated by propidium iodide (PI), and represent the average of three independent experiments \pm SD, n=3. *, p<0.01 compared with control.

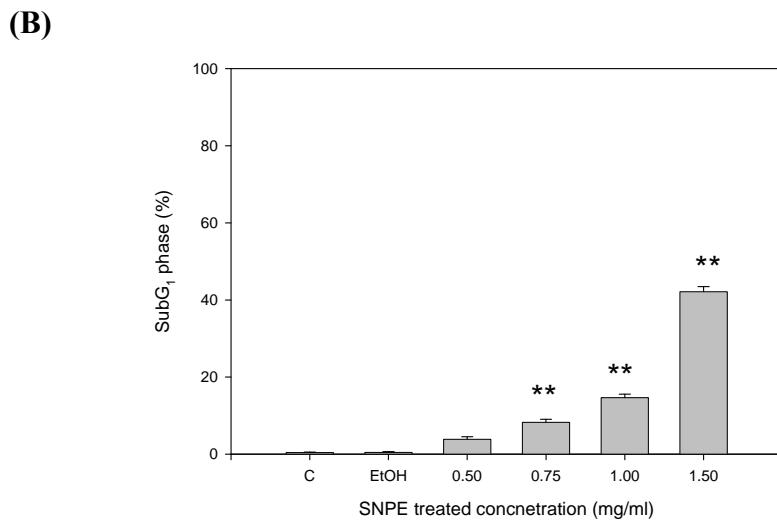
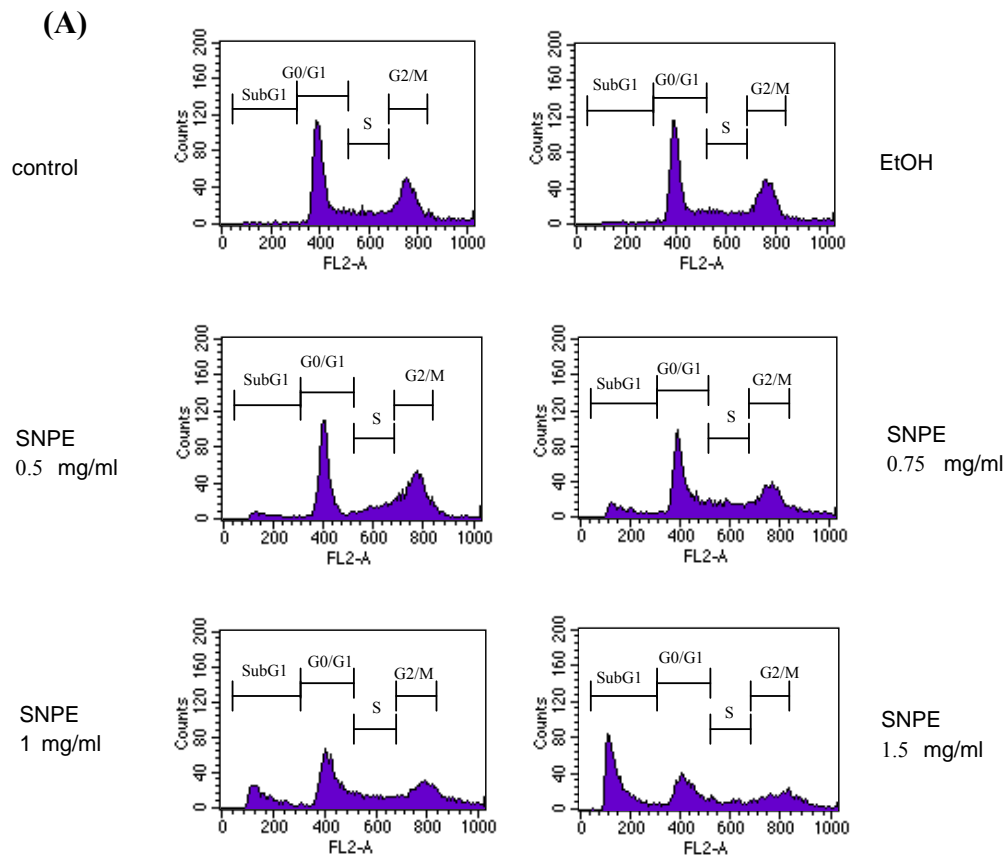
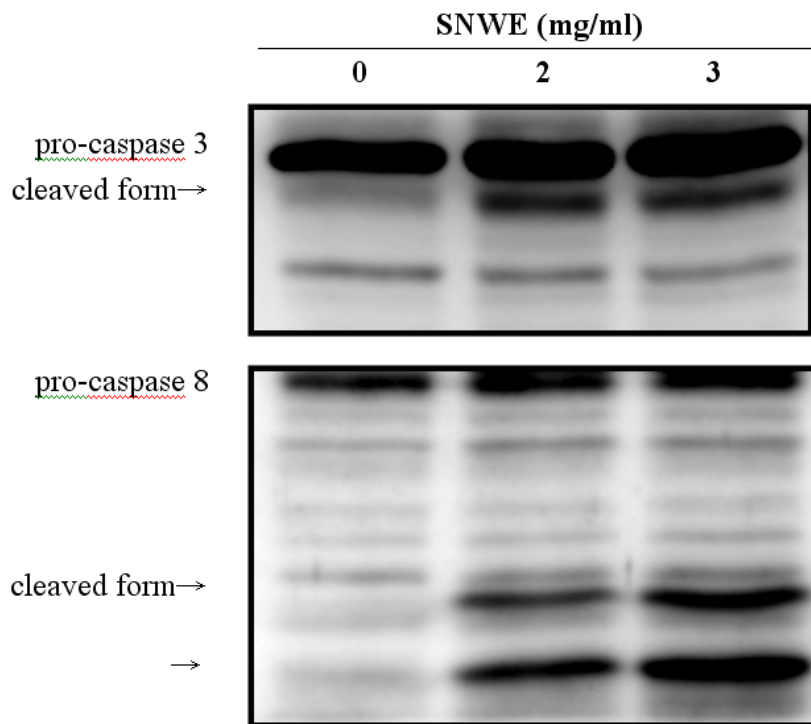


Figure 6. Effect of SNPE induced apoptosis and cell cycle progress in HepG2 cells. (A) Cultured cells were treated with or without SNPE in 0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 mg/ml for 24 hrs. EtOH as a reagent control. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. (B) Quantitative assessment of the percentage of HepG2 cells in Sub G₁, as indicated by propidium iodide (PI), and represent the average of three independent experiments \pm SD, n=3. *, p<0.001 compared with control.

(A)



(B)

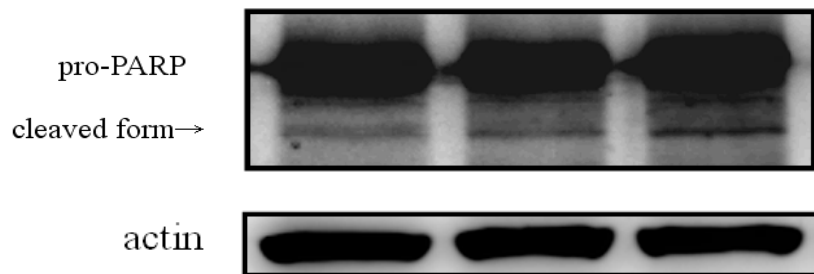


Figure 7. Involvement of caspase-3, caspase-8 and PARP in SNWE-induced apoptosis in HepG2 cells. Cultured cells were treated with or without SNWE (0, 2 and 3 mg/ml) for 20 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against caspase-3, caspase-8 and PARP. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

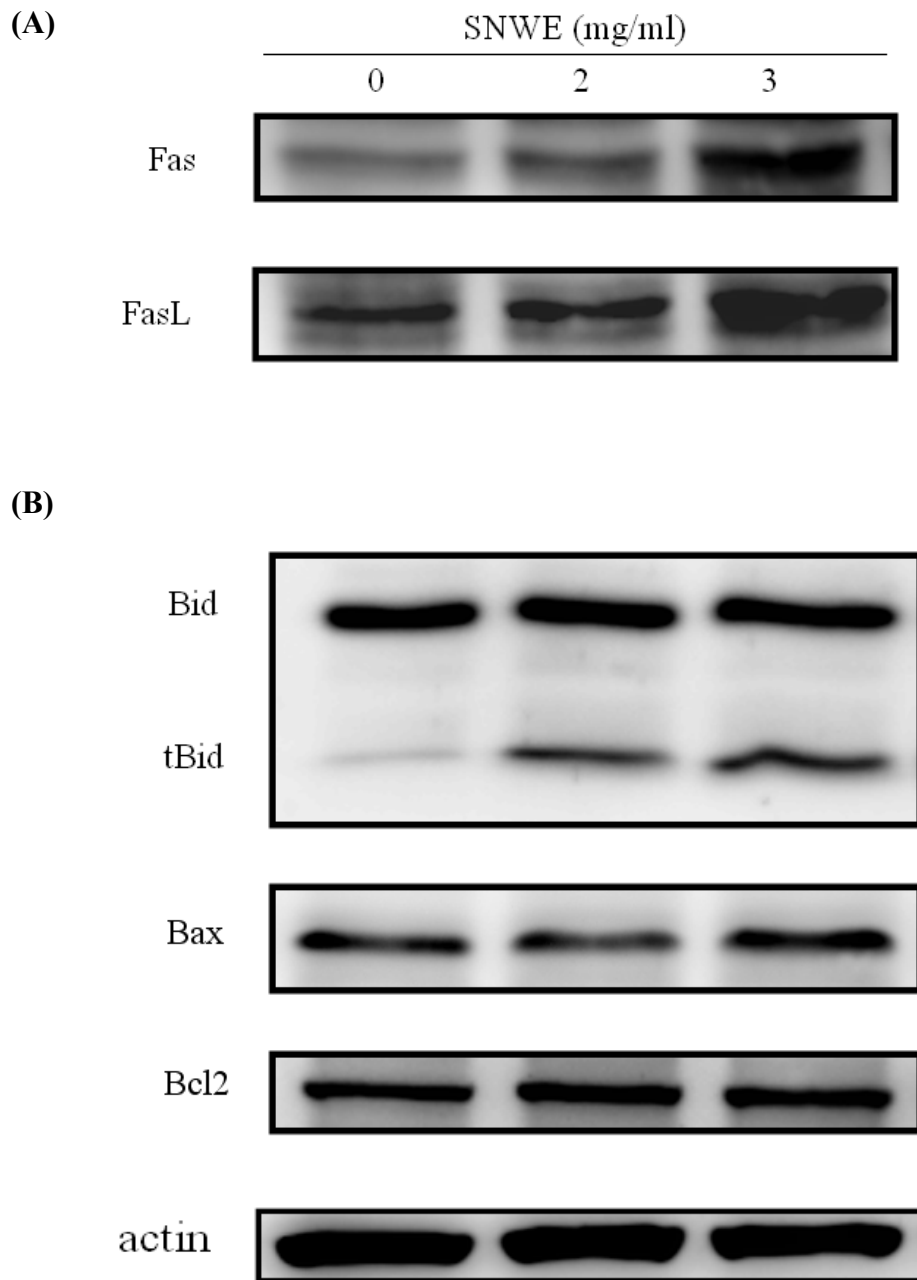


Figure 8. Immunoblot analysis of the expression of (A) Fas, FasL and (B) Bcl-2 family (Bid, Bax and Bcl-2) in HepG2 cells treated with SNWE. Cultured cells were treated with or without SNWE (0, 2 and 3 mg/ml) for 20 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against Fas, FasL, Bid, Bax and Bcl-2. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

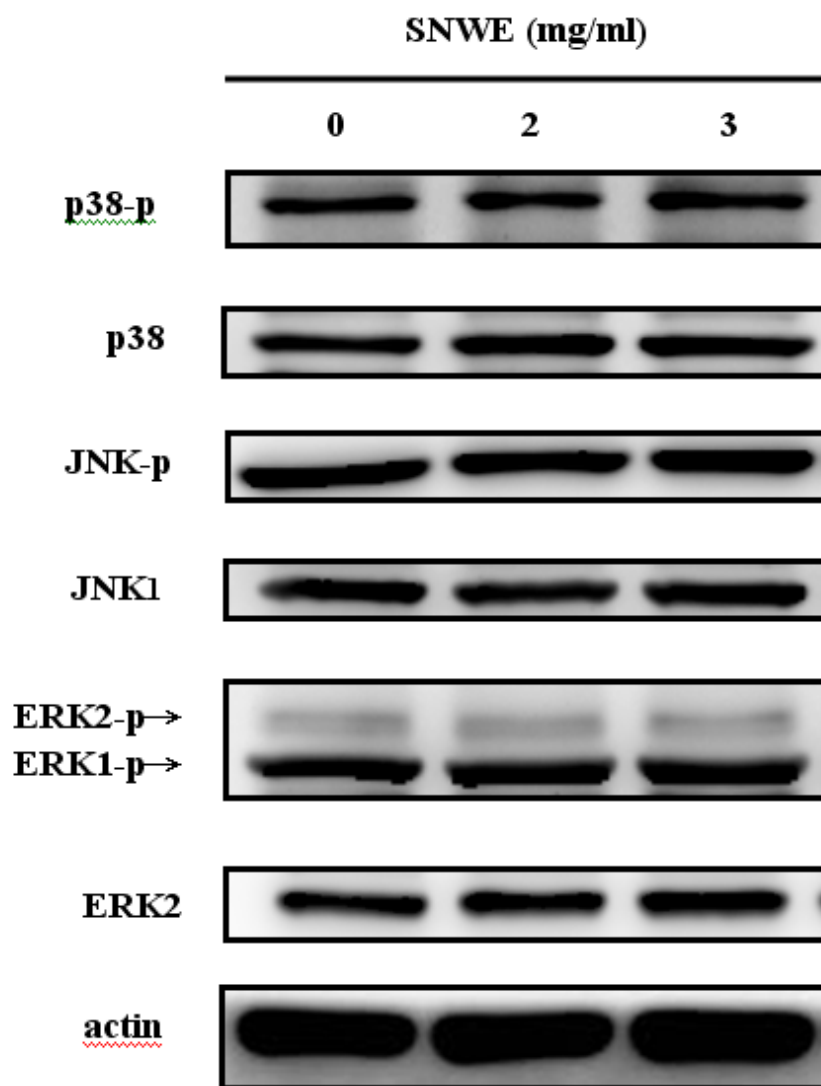


Figure 9. Immunoblot analysis of the expression of apoptosis-related proteins :MAPK (mitogen-activated protein kinase) family (p38-p 、JNK-p 、ERK-p) in HepG2 cells treated with SNWE . Cultured cells were treated with or without SNWE (0, 2 and 3 mg/ml) for 6 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with specific antibodies. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

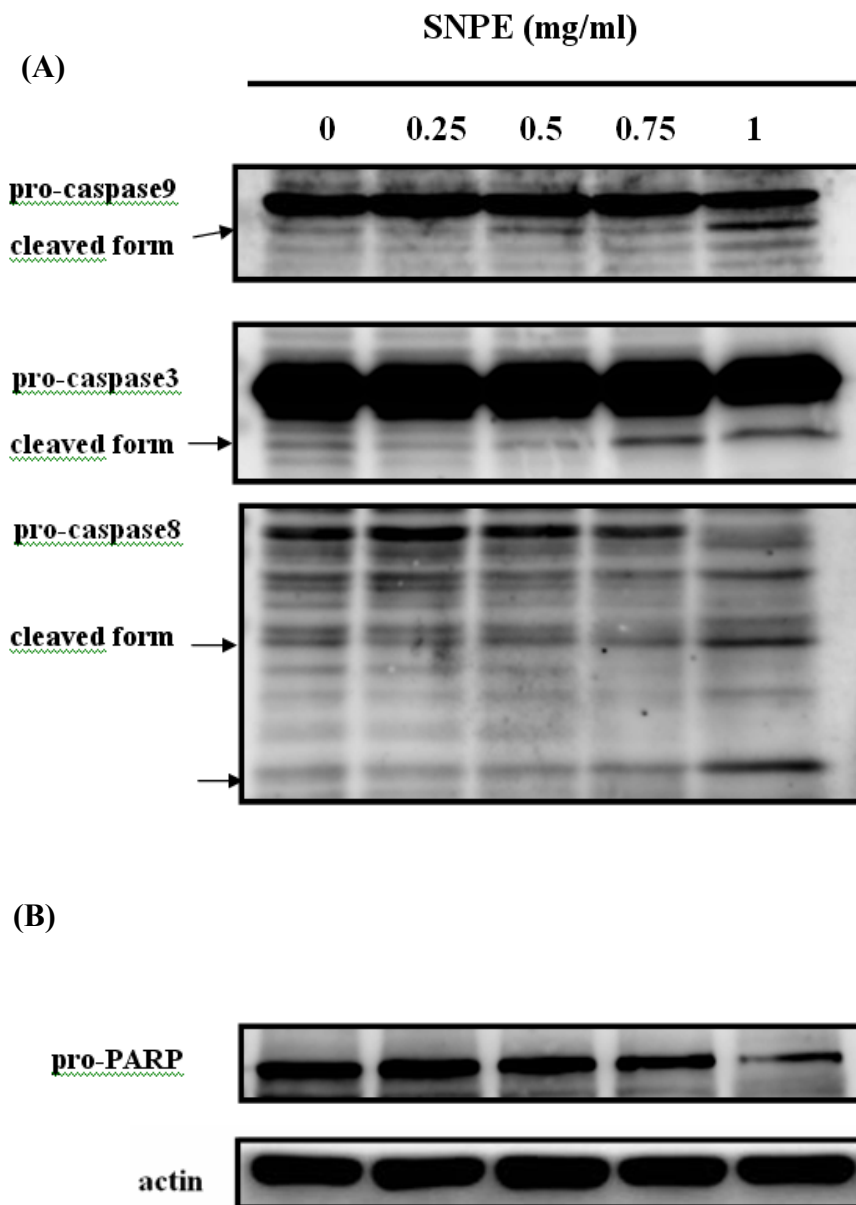


Figure 10. Involvement of caspase-3, caspase-9, caspase-8 and PARP in SNPE-induced apoptosis in HepG2 cells. Cultured cells were treated with or without SNPE (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml) for 6 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against caspase-3, caspase-8 and PARP. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

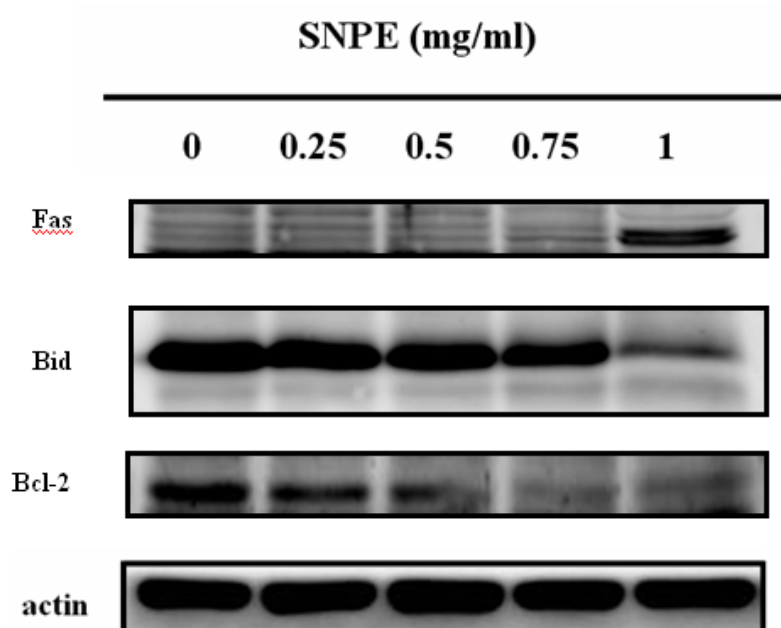


Figure 11. Immunoblot analysis of the expression of Fas, Bid and Bcl-2 in HepG2 cells treated with SNPE. Cultured cells were treated with or without SNPE (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against Fa, Bid and Bcl-2. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

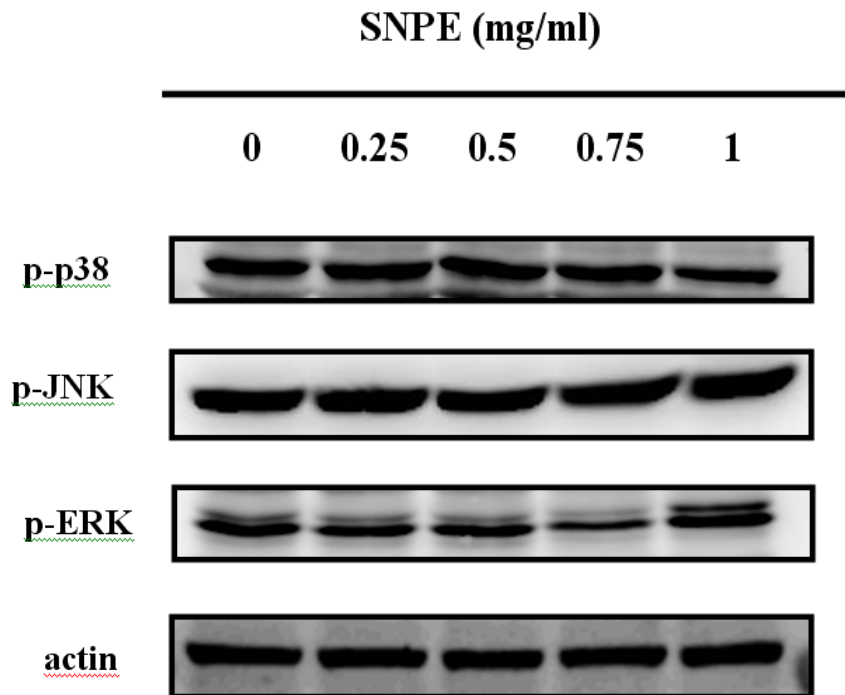


Figure 12. Immunoblot analysis of the expression of apoptosis-related proteins : MAPK (mitogen-activated protein kinase) family (p38-p 、 JNK-p 、 ERK-p) in HepG2 cells treated with SNWE . Cultured cells were treated with or without SNPE (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml) for 6 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with specific antibodies. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

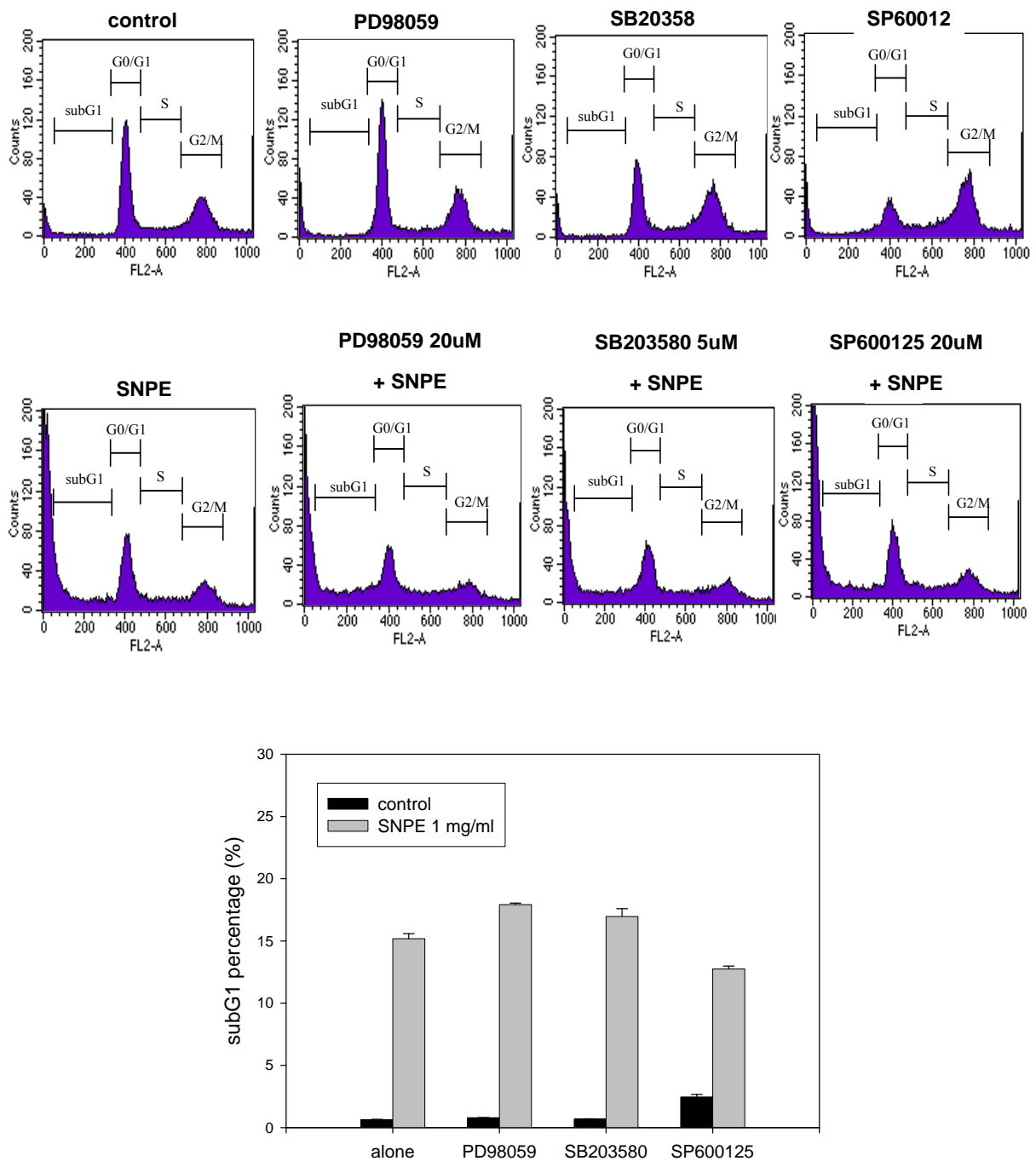


Figure 13. Effect of MAPKs inhibitor on SNPE-induced apoptosis in HepG2 cells. One hour prior to the addition of 1 mg/ml SNPE, HepG2 cells were treated with MAPK inhibitors, PD98059 (20µM), SB203580 (5µM) and SP600125 (20µM), then further incubated for 24 h. HepG2 cells were harvested and cell cycle profiles were obtained by staining with propidium iodide (PI).

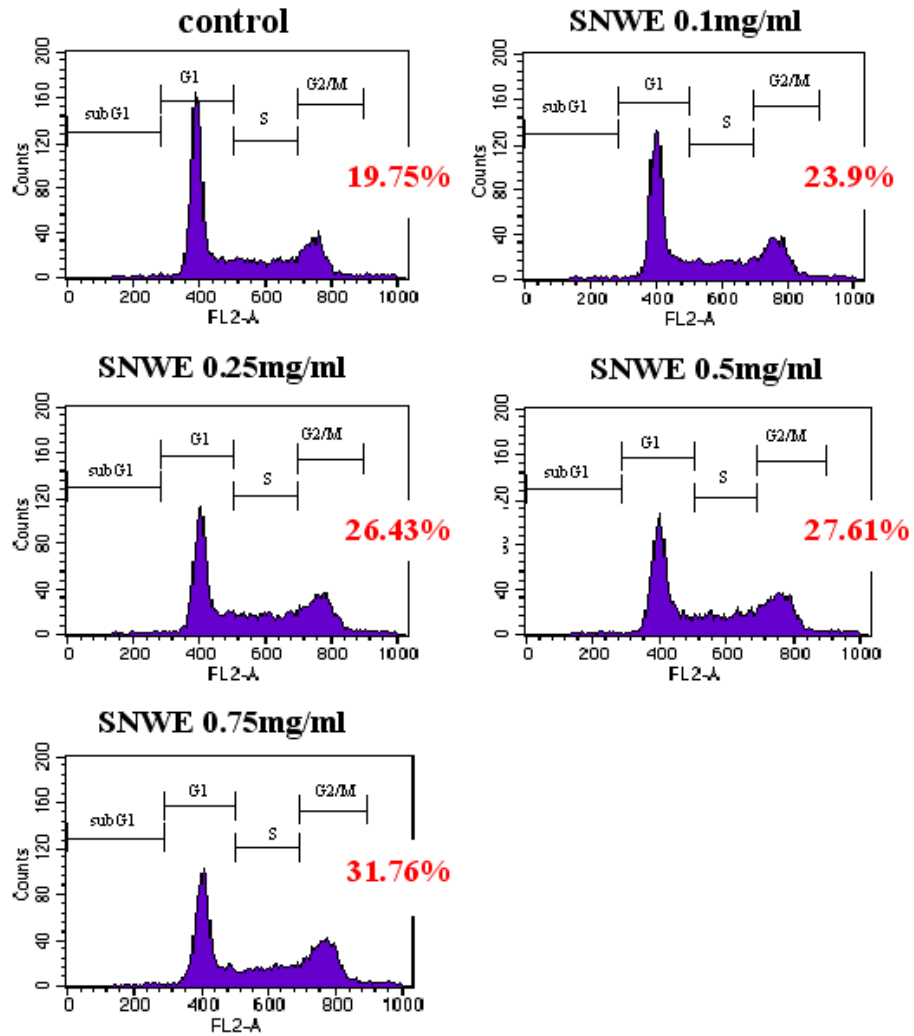


Figure 14. SNWE inhibits the growth of HepG2 cells through cell-cycle arrest in G2/M phase. Cultured cells were treated with SNWE in 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mg/ml for 24 hrs. HepG2 cells were harvested and cell cycle profiles were obtained by staining with propidium iodide (PI).

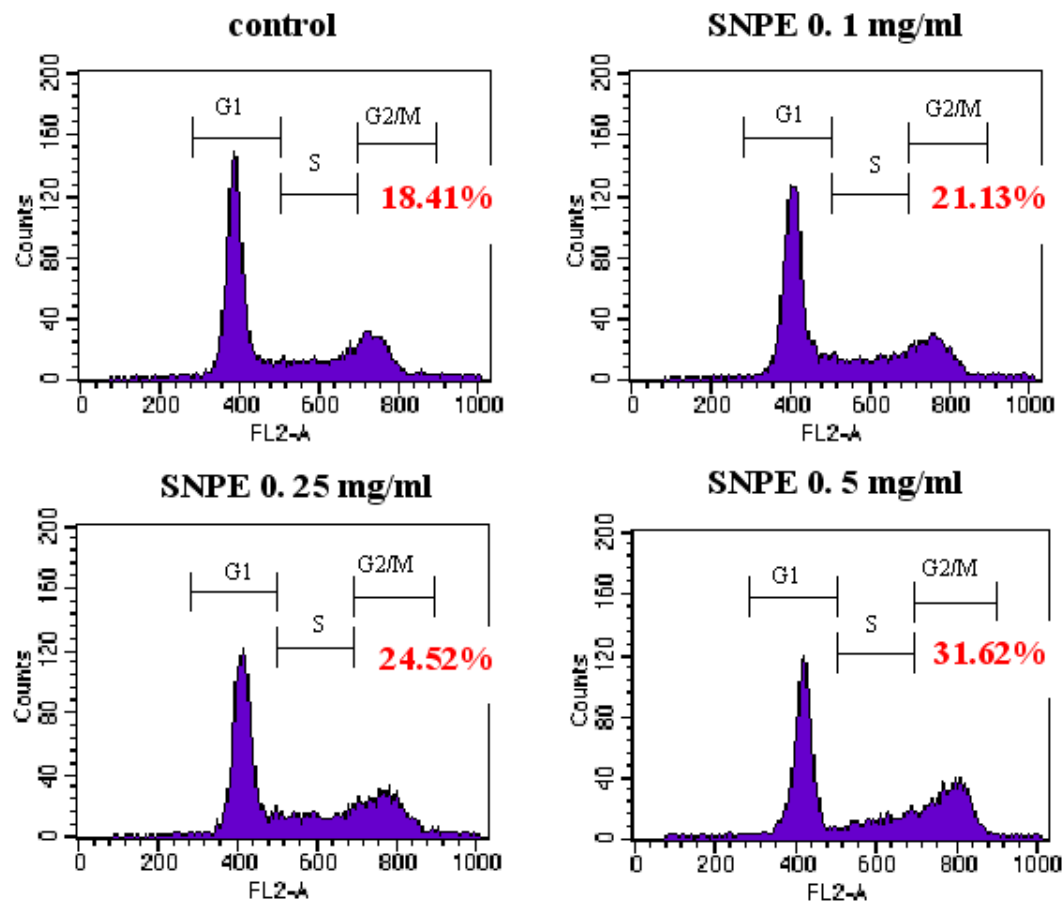


Figure 15. SNPE inhibits the growth of HepG2 cells through cell-cycle arrest in G2/M phase. Cultured cells were treated with SNPE in 0, 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml for 24 hrs. HepG2 cells were harvested and cell cycle profiles were obtained by staining with propidium iodide (PI).

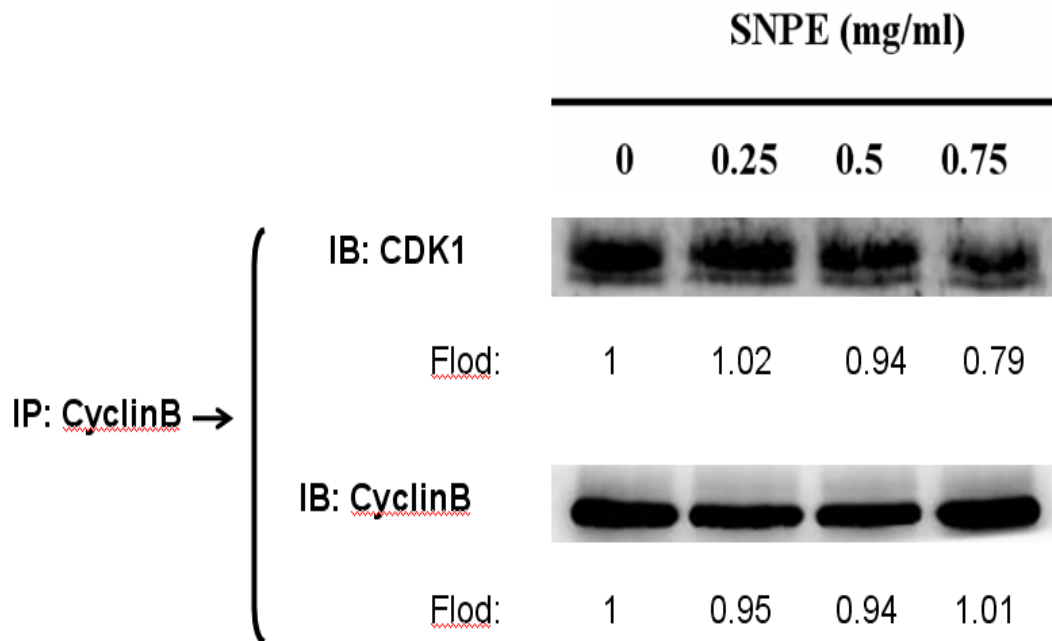


Figure 16. The binding effect of CyclinB and CDK1 in HepG2 cells treated with SNPE. Cultured cells were treated with SNPE in 0, 0.25, 0.5, 0.75 mg/ml for 24 hrs. Cell extracts were immunoprecipitated with cyclinB antibody. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-polyacrylamide gel and by immunoblotting with anti-CDK1 and anti-cyclinB antibodies.

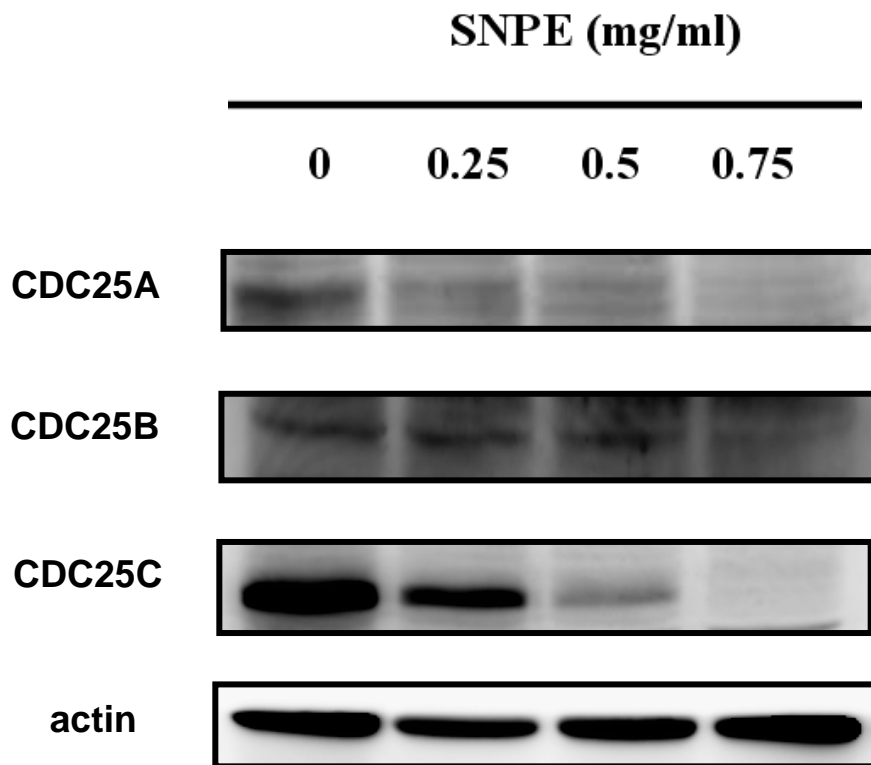
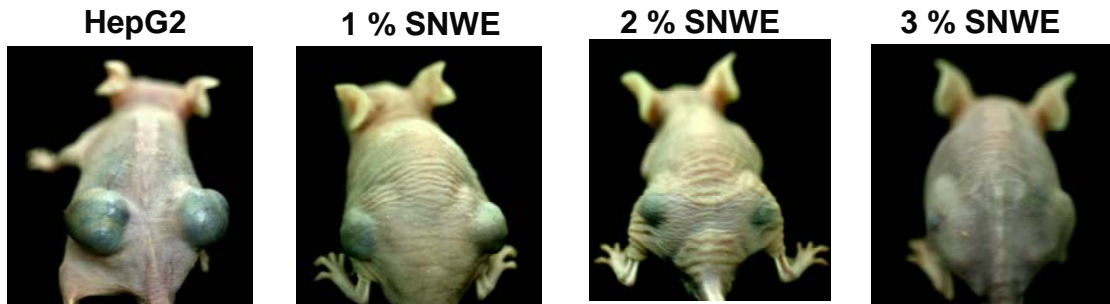
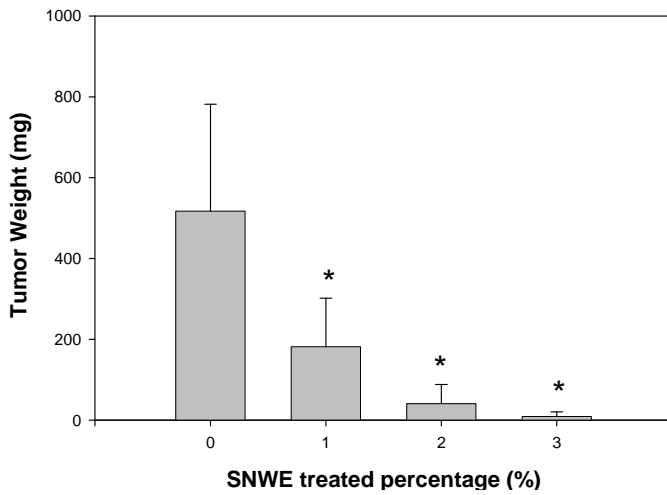


Figure 17. Decrease CDC25A、CDC25B and CDC25C proteins expression in HepG2 treated with SNPE. Cultured cells were treated with or without SNPE (0, 0.25, 0.5 and 0.75 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with specific antibodies. Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

(A)



(B)



(C)

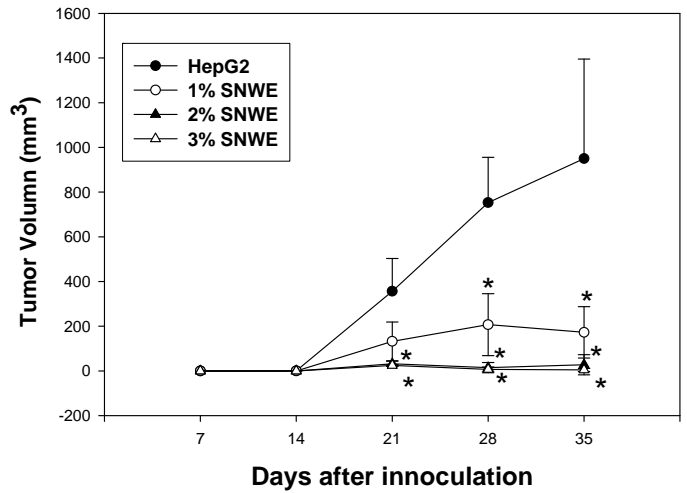
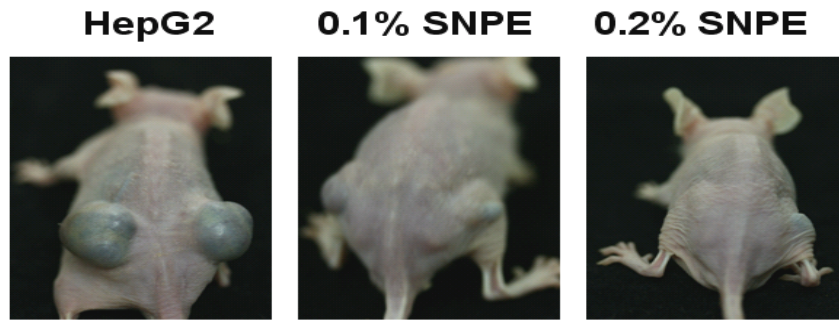
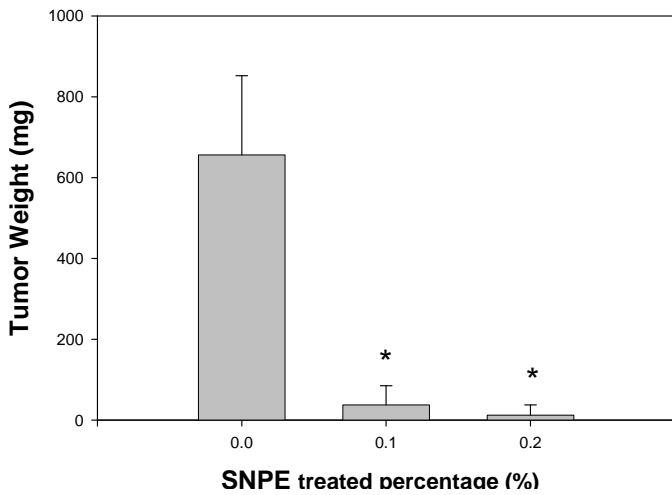


Figure 18. Effects of oral SNWE feeding on HepG2 hepatic tumor xenograft growth in athymic nude mice. Five million HepG2 cells were s.c. injected in the both flank of each mouse to initiate ectopic tumor growth. Different percentage of SNWE feeding by gavage started after 7 days of tumor cell injection and continued for 28 days. (A) The photographs and (B) Tumor weights of athymic nude mice at 35 days after tumor inoculation. *, $p < 0.01$, compared with the HepG2 only group. (C) Tumor volumns of athymic nude mice at indicative day after tumor inoculation.

(A)



(B)



(C)

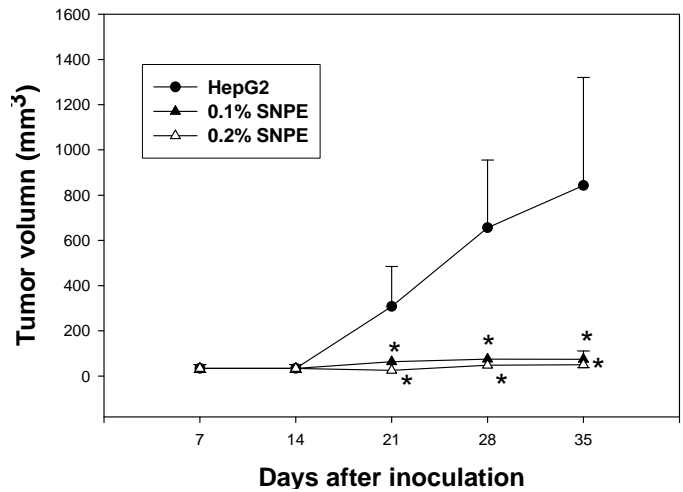


Figure 19. Effects of oral SNPE feeding on HepG2 hepatic tumor xenograft growth in athymic nude mice. Five million HepG2 cells were s.c. injected in the both flank of each mouse to initiate ectopic tumor growth. Different percentage of SNWE feeding by gavage started after 7 days of tumor cell injection and continued for 28 days. (A) The photographs and (B) Tumor weights of athymic nude mice at 35 days after tumor inoculation. *, $p < 0.01$, compared with the HepG2 only group. (C) Tumor volumes of athymic nude mice at indicative day after tumor inoculation.

「保健食品」研究開發計畫 第二年度報告

龍葵萃取物抑制以 AAF 誘導大鼠

肝纖維化及肝癌

***Solanum nigrum* L. extract inhibits
AAF-induced liver fibrosis and liver cancer in
rats**

中文摘要

癌症預防工作已成為世界性趨勢，因此尋找可靠且有效之化學預防物質實為目前重要工作。本實驗室先前發現龍葵(*Solanum nigrum*)具有抑制癌細胞生長之能力，另外也利用九種不同的人類腫瘤細胞，分析其中對於龍葵較具有感受性的細胞株，結果發現，在肝癌細胞中具有高度的感受性(HepG2 與 Hep3B)，顯示龍葵萃取物確實具有抑制肝癌之潛力，因此本研究擬深入探討龍葵萃取物(SNWE)對於抑制化學性致癌物質(2-acetylaminofluorene, AAF)誘導實驗動物肝癌產生之作用及其中相關之分子機制。首先我們以 AAF 在五個月處理下，誘導大鼠產生肝纖維化之模式，評估 SNWE 之作用，因肝纖維化是肝癌發展早期的一項重要指標，藉由在 SNWE 處理之下，觀察大鼠肝纖維化減緩之程度。由肝臟外觀可以發現，SNWE 有效地減緩肝臟纖維化的趨勢，而由肝臟的重量變化也可以發現，SNWE 具有阻止肝臟異常腫大的情形，其中 SNWE 也能夠有效降低血中肝發炎指標 GOT、GPT 及 γ -GT 的上升，而在 AAF 誘導下，實驗動物的死亡率，也因為有 SNWE 的加入，而有明顯地回升。我們也同時進行 AAF + NaNO₂ 在長時間誘導之模式下，誘導動物自發性產生肝癌之試驗當中，可以進一步評估 SNWE 抑制肝癌發生之效用，並利用免疫染色(IHC)，確定所誘發出來的肝癌，結果發現 SNWE 處理的組別的確可抑制肝癌的發生，並配合分析肝臟中相關之解毒酵素 GST、HO-1 的表現與活性變化，及進一步分析其中之相關分子機轉，以了解 SNWE 的作用機制。

英文摘要

Liver cancer is one of the most frequent human cancers worldwide. Therefore the liver cancer research gradually is also important in chemoprevention. Solanum nigrum L. water extract (SNWE) had report many item of anti- cancers. In this study, we found that dietary administration of SNWE (1%, 2%) had makerly suppressed AAF-induced liver cirrhosis and liver cancer in wistar rats. On the other hand, we observed the serum levels of some important enzymes in liver such as ALT, AST, α -FP and γ -GT which were decreased by SNWE treatment after AAF-induced. Further we analysed the change by western blotting, immunohistochemistry, EMSA and some enzyme activities like GST α , GST μ , GST π and HO-1. Remarkably, SNWE increase detoxifying enzyme in AAF-induced liver and reduce liver of the damage. In summary, our data support that SNWE had exhibited antitumor potential of HCC in rats.

文獻探討

一、肝臟與肝癌的發展

1.1 肝臟的介紹

【位置與構造】

肝臟是人類最大器官，位於腹腔的右上方，其構造可分左右兩葉，右葉較大、占肝臟的五分之三，其中有兩大血管通往肝臟，分為肝動脈和門靜脈，肝臟由門靜脈得到來自消化道的營養物質，而肝臟本身的氧氣需求來自心臟輸送至肝動脈，提供肝細胞的吸收。由於大量血管貫穿其中使得血容量是非常豐富，大約人體總量的 14%。從顯微鏡下來看，肝是由許多肝小葉的單位集中而成的，肝小葉是肝臟的基本單位，約為 0.7~2 mm³ 大小的六角柱形，一個肝小葉約由 50 萬個肝細胞所構成，裡頭流動著來自兩個不同血管系統，不同性質的血液，其一由肝動脈帶著大量的氧氣流入，另一種則是來自消化道與脾臟進入靜脈(又稱門脈)且富含養份的靜脈血。

【功能】

肝臟的功能主要負責體內的解毒及新陳代謝作用，這也是他最重要的工作，其它尚有製造血漿蛋白、抗凝血物質、膽汁以及促進免疫作用。在代謝部分，肝可儲存體內多餘葡萄糖形成肝醣，及分解肝醣，提供細胞的需求，維持體內血糖的平衡，另外可儲存分解脂質、蛋白質，提供人體所需的能量必須營養物質。在解毒作用方面，肝臟能將酒精、藥物及致癌物，分解成無毒或毒性較輕的物質，再由尿道或膽汁排出體外。

1.2 肝癌

【肝癌的形成】

肝癌的形成是緩慢且不亦被發現的，通常主因是由慢性肝炎導致肝硬化，進而形成肝癌。肝炎指的是肝臟發炎及肝細胞損傷，其形成可分為病毒性肝炎、藥物性肝炎、酒精性肝炎，而肝臟的發炎反應過於嚴重，以致於超越肝細胞的修復能力時，此時星狀細胞會被活化，促使纖維母細胞(myofibroblast) 的大量表現，分泌大量的膠原蛋白(Collagen)、彈力蛋白質(Elastin)、醣蛋白(glycoprotein)、蛋白聚糖(proteoglycan)、玻尿酸(hyaluronan)等，將受損的肝細胞圍繞，減少受損區域的工作，增加修復時間，待修復完畢時在以 MMPs 將纖維組織瓦解，使肝臟回復至正常狀態。然而當肝臟持續受損，MMPs 分解的速度低於纖維組織的形成，造成纖維組織持續存在，長久影響之下，由於肝細胞被大量纖維組織圍繞，使得肝功能下降並破壞血管結構，導致肝臟變硬、變形，產生肝硬化。由於硬化的肝臟無法回復、清除外來的有毒物質甚至是致癌物，在加上肝臟部分基因失去功能時，便會導致肝臟癌化，形成肝癌。

【肝癌的治療】

目前肝癌的治療方式可分為手術切除、局部注射和放射治療。而通常患肝癌的病人 80%是具有肝硬化的，而在手術上欲要保留足夠的肝臟行使肝功能，因此更加重了手術切割的困難度，通常預後效果目前尚未達到理想。而利用局部注

射是利用將藥物、酒精等直接打入肝癌細胞內，導致肝癌細胞壞死的治療，通常適用於小於 3 公分大小的腫瘤，且須重複施打。而使用放射治療是利用 X 光或其他高能量射線來殺死癌細胞，然而也會殺死臨近的正常細胞，進而造成副作用等影響。

二、肝臟的解毒作用

肝臟中解毒作用可分為 phase I 和 phase II，此又可稱為生物轉化途徑，當有害物質 (例如:化學物、致癌物) 進入人體內時，會先由 phase I (cytochrome P450s) 的途徑將有害物質以氧化、還原、水解等代謝方式，改變它的極性直接排出體外，或由 phase I 代謝出的有毒物質進入 phase II，藉由和不同的酵素結合，藉由增加毒物的水溶性，以便排除體外。

三、解毒酵素與癌症關係

3.1 GSTs

麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase, GST)，是phase II 酵素的一種，主要存在細胞質當中，它可中和毒素，協助身體排出致癌物質。而GST有許多種基因型，可分為alpha、mu、pi、theta、sigma、zeta、kappa、omega (1)，其中又以alpha、mu 和pi 族在體內較多。GST- α 在目前研究發現對抗癌藥物具有抗藥性，有研究指出GST- α 可對抗脂質的過氧化作用(2)，另外有文獻指出在大白鼠中GST- α 是結抗AFB1所造成肝臟毒性的重要角色(3)。GST- μ 也與部分抗癌藥物有抗藥性，最新的研究也發現consuming broccoli (花椰菜) 和GST- μ 的互相影響會改變攝護腺發炎和癌症形成的路徑(4)。GST- π 在正常肝臟中是不會表現，研究指出GST- π 可做為化學毒性及癌症形成的蛋白標記(5)。在正常的肝細胞當中可發現大量的GST- α ，而GST- μ 含量其次，而GST- π 偵測不到(6)。

3.2 Nrf2 在癌症化學預防之角色

Nuclear factor-erythroid 2 related factor (Nrf2) 是屬於 basic leucine zipper 的轉錄因子，它會結合至 antioxidant response (ARE) (7)進行相關基因的轉錄，ARE 所調控的下游蛋白表現，這些蛋白表現在解毒、抗癌、抗氧化方面扮演重要角色 (8, 9)，像 glutathione-S-transferase (GST)、hemo oxygenase 1 (HO1) (10)，這些酵素在對抗癌症中扮演重要的角色。而 Nrf2 對 ARE 是解毒及抗氧化表現中不可或缺的轉錄因子，在研究發現在缺乏 Nrf2 的小鼠，以 N-acetyl-4-aminophenol (APAP) 誘發肝毒性中，會大幅降低 phase II 酵素以及抗氧化酵素，並降低小鼠存活率 (11)。另外的研究也發現 Keap1- Nrf2-ARE 所調控的訊息表現，在肝癌的化學預防扮演重要角色(12)。

3.3 MAPK 傳遞路徑調控解毒酵素

MAPK pathways 為細胞內重要訊息傳遞路徑，其成員包含 ERK1/2、JNK1-3、p38 等，當細胞受到外界刺激如:生長素、賀爾蒙和化學預防試劑 (chemopreventive agents) 作用下，藉著 MAPK pathways 活化下游路徑，進行細胞生長、分化或死亡反應。化學預防試劑誘導 MAPK pathways 更與 phase II 解毒酵素表現有關 (附圖一)。另外也有文獻指出 MAPKs 為 Nrf2 的上游蛋白激酶

(13)。以及 ERK1/2 和 p38 為 Nrf2 的上游調控(14)。

3.4 PI3K 和 PKC 對解毒酵素的影響

PI3K 是一種 Receptor tyrosine kinase (RTK)，為一種重要細胞間信號傳導介質，可影響多種細胞的增殖、分化和抗凋亡反應，有文獻指出 PI3K 為 Nrf2 上游重要的調控者(15)。另外研究指出在 Caco-2 細胞中 PI3K/Akt 可調控細胞內 phase II 酵素的轉譯(16)。而 Nrf2 的調控者尚有 PKC (13)，在十字花科植物中已有研究說明 isothiocyanates 可經由 MAPK、PI3K 及 PKC 路徑活化 Nrf2，進而啟動 ARE 反應，提升 phase II 解毒酵素的表現(17)。

四、龍葵

4.1 龍葵的基本介紹

學名： *Solanum nigrum* L.

別名：黑甜仔菜、黑鬼仔菜、烏子茄、水茄、苦菜。

物種分類

植物界 Plantae、木蘭植物門(開花植物或被子植物 Magnoliophyta、木蘭綱(雙子葉植物)Magnoliopsida、茄目 Solanales、茄科 Solanaceae、茄屬 *Solanum*。莖：莖直立，多分枝，高 50~100 公分。葉：葉互生有柄，卵形至長橢圓形有波狀邊緣。花：夏季開花，頂生，有 4~10 朵花，花梗下垂；花冠是白色，5 裂；雄蕊 5 花藥，頂端有 2 孔開裂；子房 2 室，花柱長，基部有絨毛。果：直徑約 0.8~1 公分，未成熟的綠色果實有毒性，成熟後是烏黑剔透的漿果，一般人最愛採食它的漿果，滋味略酸甜可口。分佈：一年生草本，於南北半球的熱帶和溫帶都可見到其身影，分布範圍相當地廣泛；在台灣於各地平原、農耕地、山區丘陵地皆可發現。用途：民間有取其幼苗、嫩葉炒熟食用，也有取其成熟的果實食用。莖葉有解熱、利尿、解毒之效，也可外敷腫毒及跌打損傷等。成分：全草含甾類生物鹼：茄邊鹼(澳洲茄邊鹼，Solamargine， $C_{45}H_{73}O_{15}N$)、茄解鹼(澳洲茄鹼，Solasonine， $C_{45}H_{73}O_{16}N$)、茄微鹼(Solavilline， $C_{50}H_{81}O_{20}N$)、茄達鹼(Solasodamine， $C_{51}H_{82}O_{20}N$)、糖苷類、醣蛋白、多酚及皂苷。

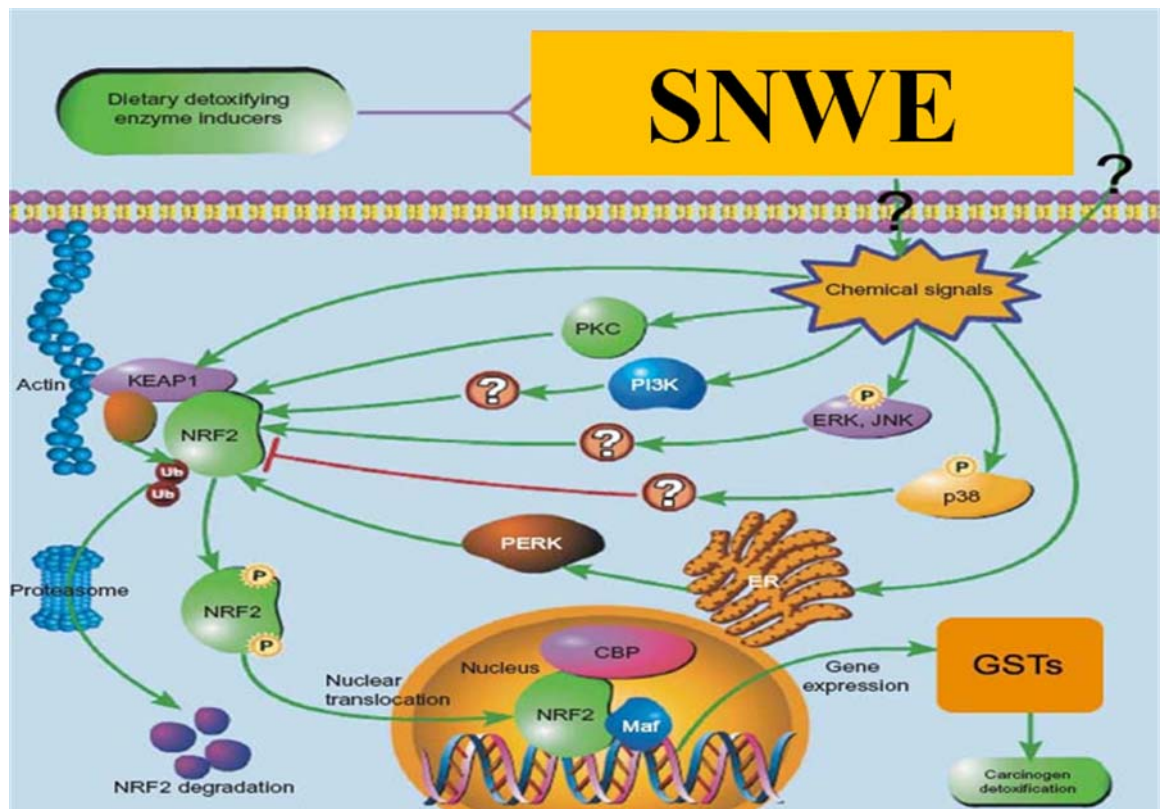
4.2 龍葵的醫學功能

1. 防止自由基所造成的 DNA 傷害(18, 19)
2. 具有保肝作用，可保護肝臟免於四氯化碳誘導的肝損傷(20, 21)
3. 誘導氮氧化物的產生(22)
4. 在 TPA 所刺激的乳癌細胞 MCF-7 中，能抑制細胞內轉錄因子 NF- κ B 和 AP-1 與 DNA 結合的活性(23)
5. 在墨西哥的傳統醫學中已被視為鎮定神經之藥物(24)
6. 具有抑制小鼠肉瘤 S-180 的活性(25)
7. 抑制乳癌細胞 MCF-7 的生長及誘導細胞凋亡(26)
8. 降低膽固醇(27)
9. 用於肝炎、肺癌、膀胱癌治療(28-31)
10. 輔助腫瘤治療(32, 33)

11. 抑制腸癌乙烷轉移酶活性(34)
12. 在 2005 年文獻提到，龍葵可提升 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT) 與 glutathione peroxidase (GPx) 之解毒抗氧化酶表現(27)

另外本研究室初步結果顯示：

13. 龍葵水萃取物促進肝癌細胞 HepG2 死亡，及增加 GST Mu 之表現及降血脂作用。綜合以上結果可歸納出龍葵具有【1】抗氧化；【2】抗發炎；【3】抑制癌症發生率；【4】護肝作用；及【5】降血脂之功能。



附圖一

研究目的

在步調快速、競爭激烈的社會，加上飲食中的不均衡、過營養及食物或環境中致癌物質的加成下，肝病已成為現代文明病，而其中又以肝癌治癒率最低。根據行政院衛生署統計，在台灣自民國84年開始，肝臟相關疾病便有高死亡率，持續到2007年為止肝炎占國人死亡的第六名，肝癌為男性癌症死亡的第一名、女性為第二名。由於肝臟神經分布的少，只分布在肝臟外層膜的表面，因此當肝臟中的腫瘤沒大到壓迫到神經的情況，是難以發現的，往往病患發現時治癒的機會是非常渺茫的。又由於目前化學預防的盛行，已有許多研究者投入利用中藥草預防癌症發生的行列，而本實驗室先前發現民間藥草-龍葵，對於肝癌細胞是較具有敏感性的，因此接著想觀察在大白鼠肝癌的動物模式下，龍葵是否可預防肝癌的發生。

研究方法

一、龍葵水萃取物(SNWE) 的製備

稱取 825 公克龍葵乾品，將稍微清洗龍葵後修剪成較小片段，加水至覆蓋龍葵，靜置隔夜。將靜置隔夜之龍葵熬煮至沸騰後悶煮 40 分鐘，重複上述動作 3 次，將取得之汁液過濾去除雜質後，放置於烘箱中乾燥去除水分，在將乾燥後之萃取物磨碎分裝，所得到的粉末即為龍葵水萃取物之乾燥粉末(SNWE)，而後將其避光並冰在-20°C 冰箱存放。後續之實驗進行均以此龍葵水萃取物乾燥粉末配製進行。

二、誘導大鼠肝纖維化、肝癌之動物模式

此誘導大鼠肝臟硬化、肝細胞癌動物模式是根據本實驗室先前所建立之研究方法進行，分為**模式一：誘導大鼠肝纖維化**。以五週大之 Wistar 公鼠飼養於室溫下，適應環境至六週大後，再進行分組。將大白鼠(150 ± 10 g / body weight) 隨機分成 4 組，每一組數量 10 隻老鼠。其中第一組為正常控制組(normal group)，第二組為 2-acetylaminofluorene (AAF) 誘導組(induced group)，第三、四組為餵食龍葵水萃取物(SNWE) 之試驗組。第二~四組每天以 0.03% AAF 均勻混合於飼料中，而第三、四組老鼠飼料中除了含 0.02% 外，分別在飼料中添加 1% SNWE、2% SNWE 持續餵食 5 個月。**模式二：誘導大鼠肝細胞癌**。以五週大之 Wistar 公鼠飼養於室溫下，適應環境至六週大後，再進行分組。將大白鼠(150 ± 10 g / body weight) 隨機分成 4 組，每一組數量 10 隻老鼠。其中第一組為正常控制組(normal group)，第二組為 2-acetylaminofluorene (AAF) + NaNO₂ 誘導組(induced group)，第三、四組為餵食龍葵水萃取物(SNWE) 之試驗組。第二~四組每天以 0.02% AAF + 0.2%NaNO₂ 均勻混合於飼料中，而第三、四組老鼠飼料中除了含 0.02% AAF + 0.2%NaNO₂ 外，分別在飼料中添加 1% SNWE、2% SNWE 持續餵食 6 個月。**模式三：SNWE 的毒性測試**。五週大之 Wistar 公鼠飼養於室溫下，適應環境至六週大後，再進行分組。將大白鼠(150 ± 10 g / body weight) 隨機分成 4 組，每一組數量 10 隻老鼠。其中第一組為正常控制組(normal group)，第二、三、四組為餵食龍葵水萃取物(SNWE) 之試驗組，分別為 1% SNWE、2% SNWE 及 3% SNWE 均勻混合於飼料中。持續餵食 28 天。每天觀察老鼠健康狀況，觀察體重、飲食是否正常。以上實驗過程，若有動物不幸於療程中死亡，除紀錄存活率，並立即進行屍體解剖，待實驗結束時，將實驗動物犧牲並進行解剖，取其血液、肝臟組織及腎臟組織，分別以浸泡於 10% 福馬林保存及放置-80°C 冷凍，以進行各項分析。

三、血液分析

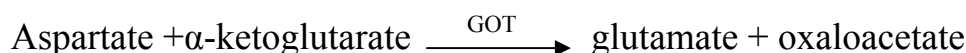
3.1 血清生化分析

使用生化自動分析儀測定，分析項目包含：

1. 麩氨酸草醋酸轉氨基酵素(GOT, AST)

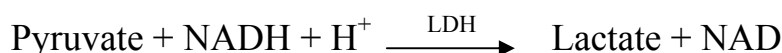
GOT 在催化把 aspartate 的 amino group 轉移到 α -ketoglutarate 上而轉變成 glutamate 和 oxaloacetate。此 oxaloacetate 在 NADH 的存在下受 malate

dehydrogenase 的催化還原成 malate，同時把 NADH 氧化成 NAD，在波長 340 nm 下測量由 NADH 氧化成 NAD 所減少的吸光度和 GOT 的活性成正比。



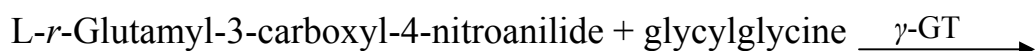
2. 麩氨酸焦葡萄糖轉氨基酵素(GPT, ALT)

GPT 在催化把 alanine 的 amino group 轉移到 α -ketoglutarate 上而轉變成 glutamate 和 pyruvate。此 pyruvate 在 NADH 的存在下受 lactate dehydrogenase 的催化還原成 lactate，同時把 NADH 氧化成為 NAD，在波長 340 nm 下測量由 NADH 氧化成 NAD 所減少的吸光度和 GPT 的活性成正比。



3. 丙麩氨轉肽酶 (γ -GT, Gamma-Glutamyl Transpeptidase)

利用 L-r-Glutamyl-3-carboxyl-4-nitroanilide 基質，經 γ -GT 作用，產生黃色的 5-amino-2-nitrobenzolidide，以 410 nm 比色，而測得 γ -GT 的活性。



L-r-glutamylglycyl glycine + 5-amino-2-nitrobenzolidide (yellow color) .

4. 胎兒蛋白 (AFP, α -fetoprotein)

胎兒蛋白是母親懷孕時，胎兒所製造的一種蛋白質，但出生後既消失。胎兒蛋白目前是檢查肝癌的一種最重要指標。會造成胎兒蛋白升高的腫瘤除了肝癌以外，卵巢或睪丸的生殖細胞腫瘤也有可能。而肝臟發炎後，因肝細胞再生也會有胎兒蛋白上升的情況，但會隨著發炎消退而降低。

5. 其餘尚有乳酸去氫(LDH)、 γ -麩氨醯轉移(γ -GT)、總膽固醇(T-cholesterol)、三酸甘油脂、總蛋白、白蛋白、球蛋白、總膽紅素(T-bilirubin)、葡萄糖、血中尿素氮(BUN)、肌酸酐、尿酸、鈉、鉀、氯、鈣、磷。

3.2 血液分析

使用全自動血液分析儀，分析項目包含：

紅血球計數、血紅素、血球容積、平均紅血球容積(MCV)，平均紅血球血紅素濃度(MCHC)，平均紅血球血紅素量(MCH)、血小板計數、白血球計數及分類、凝血時間(PT)、活化部分凝血活時間(APTT)。

四、肝組織病理切片及染色

分析肝臟纖維化及肝癌較直接的方法便是組織切片，以觀察 SNWE 是否有減緩肝纖維化及肝癌的程度。老鼠犧牲後，迅速取一小部分肝組織，置於 10% 福

馬林中固定，倒去福馬林後以 TBA 脫水，接著浸蠟、包埋，將石蠟包埋的組織切片以 fresh xylene 浸泡 30 分鐘後再以 fresh xylene 浸泡 1 分鐘，目的為脫蠟。接著再以 100% EtOH 浸泡 3~5 分鐘 2 次，95% EtOH 浸泡 3~5 分鐘 1 次，85% EtOH 浸泡 3~5 分鐘 1 次，70% EtOH 浸泡 3~5 分鐘 1 次，ddH₂O 浸泡 3~5 分鐘 1 次，目的為 rehydration。接著在做些前處理，首先用 sodium citrate buffer (0.1 M citrate buffer, 0.1 M sodium buffer in ddH₂O) 煮沸 15 分鐘，放置室溫自然冷卻，再用 3% H₂O₂ (in methanol) 浸泡 10 分鐘後以 PBS 清洗 3 次，目的為幫細胞打洞，再用 blocking solution (BSA 2 mg/ml) 室溫下作用 20 分鐘，以 primary antibody (goat anti-human cyr61 antibody 1:50) 在 4 °C 作用 12~16 小時後，以 PBS 清洗 3 分鐘 4 次，在加入 secondary antibody (biotin labeled antibody 1:500) 於室溫下作用 1 小時後以 PBS 清洗 3 分鐘 4 次，再用 DAB 於室溫下呈色 3-10 分鐘後以 ddH₂O 清洗 5 分鐘，再用 hematoxylin 染 10 秒鐘後以 ddH₂O 清洗，最後加上蓋玻片。

五、肝臟中解毒酵素測定

肝癌主要分為病毒性肝癌與非病毒性肝癌或稱為化學性肝癌兩大類。化學物質的入侵並累積在肝臟中為致癌的主因，若能將化學物質有效的代謝，便可降低癌症的發生率。近年來有許多學者致力於 Glutathione-S-transferase (GST) 與癌症相關性之研究，由於 GST 的代謝方式通常是生物不活化作用，因此毒性物質或致癌物一旦成為 GST 受質被代謝後，並不會被活化成毒性更強的物質，所以 GST 活性的高低被認為在抑制癌症發生的機制中扮演著重要的角色。

將保存在-80°C 的老鼠肝臟取出，加入適量之 homogenization buffer，以組織研磨機進行均質，將均質後組織液於 4 °C 以 39000 rpm 離心 30 分鐘，吸取上清液即含有肝臟解毒酵素之萃取液，取 1.5 ml GSH substrate buffer 及 1.5 ml CDNB substrate buffer 置入石英管中，再加入 20 µl 之萃取液，迅速混合均勻，在 340 nm 下，反應 3 分鐘，並測定 OD 值變化，以公式換算活性之變化量。

六、大鼠肝臟中之蛋白萃取

取 0.1 g 大鼠肝臟組織切碎後，加入 1 ml 的低張溶液 A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF) 進行均質化，加入 80 µl 的 10% NP-40 混合後，靜置 2 分鐘，離心 14000 g, 2 分鐘，取上清液即為細胞質萃取物(cytosolic fraction)。沉澱物再以 500 µl 的溶液 A 加上 40 µl 的 10% NP-40 後，離心 14000 g, 2 分鐘後去上清液，沉澱物再加入溶液 B (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 20% glycerol) 混合，靜置 10 分鐘，離心 14800 g, 5 分鐘，此時之上清液即包含核蛋白之萃取物，置於-70°C 冰箱保存。

七、西方點墨法 (western blotting)

7-1. 蛋白質定量

利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 下有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。首先以 BSA (bovine serum

albumin) 為蛋白質標準溶液，以換算個樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。取 30 μ l 細胞萃取液加入 1 ml 的 Coomassie blue，在室溫下反應 1 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化。

7-2. 鑄膠

將電泳玻璃片洗淨，擦拭乾淨後，用厚度約 1.00 mm 或 1.50 mm 之 spacer 為間隔裝好電泳片，並架到電泳座上固定，若欲做小分子量之蛋白，則配置 12% 的下層 separating gel；若做大分子量蛋白，則配製 8% 或 10% 的 separating gel。配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5 公分處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配置上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離 stacking gel，待上層膠凝固後，抽出齒梳，用二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將樣品加到 well 中。

7-3. 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

首先將電泳液(running buffer) 倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後，持續加入新的電泳液直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽以回收的電泳液補至蓋過電導線為止。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 伏特的電壓跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電壓為 100 伏特，當色帶跑至底線時才停止電泳。

7-4. 蛋白質樣本之轉漬 (electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經轉漬液(transfer buffer) 潤濕過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同之硝化纖維紙(硝化纖維紙也需事先經轉漬液浸濕)，再放上兩張經轉漬液浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板(內含海綿襯墊)夾緊，放入轉漬槽中，同時要將轉漬槽放在冰上，以固定 300 毫安培轉漬 2 個小時。

7-5. 免疫墨點法 (immunoblotting)

轉漬完後將硝化纖維紙取出，用 TBS buffer 漂洗數分鐘，再以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用。之後，倒掉 blocking buffer，再以 TBS-tween 漂洗三次 10 分鐘。換上一級抗體，置於 4 $^{\circ}$ C 下，作用 12~16 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘。接著，換上二級抗體，於室溫下溫和作用 1 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘。最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

研究結果

SNWE 抑制肝纖維化之作用

SNWE 之萃取

稱取 825 公克龍葵，將之熬煮至沸騰後悶煮 40 分鐘，所取得之汁液過濾去除雜質後，放置於烘箱中乾燥去除水分，在將乾燥後之萃取物磨碎分裝，所得到的粉末即為龍葵水萃取物之乾燥粉末(SNWE)，約得 87.78 克龍葵萃取物。因此龍葵水萃取物(SNWE) 之產率有 10.91 %。

老鼠體重變化

每隔四周以電子秤測量每隻老鼠之重量，並記錄之，接著以 SigmaPlot 軟體進行統計，分析老鼠在實驗期間體重變化，發現以 AAF 誘導的組別(AAF, induced group)，其體重有明顯的下降，隨著處理的時間的增加，與正常組(normal group) 之差距也越來越大，約下降 33 ~ 44%，顯示大鼠個體之生長代謝確實有受到 AAF 之誘導而有所改變，而在給予 2% 的 SNWE 之組別，其體重雖有回復的趨勢，但仍予正常組有所差異，顯示 AAF 所誘導的肝損害相當嚴重(Fig. 1A)。

SNWE 對肝臟重量影響

老鼠犧牲後取肝臟並秤其重量紀錄之，將每組中肝臟重量除以體重再乘以 100% 後表示，以 SigmaPlot 統計軟體分析，結果發現 AAF 處理組別的肝臟與體重比率明顯高於正常組別，顯示其中之肝臟確實有因為 AAF 的刺激下而造成相當程度的破壞，進而有不正常肥大的情形，約有 3 倍的增加，而在同時給予 AAF 和 2% 的 SNWE 之組別中，有明顯降低肝臟的比重約 20%，顯示其肝功能有回復的趨勢，也說明了 SNWE 具有保護肝臟之能力(Fig. 1B)。

SNWE 對血液中肝發炎指標的影響

GOT 主要存在於肝臟、心肌、肌肉，紅血球之內也有，GPT 則主要存在於肝細胞內。當這些細胞因為壞死而破壞之後，細胞內的 GOT，GPT 就會釋出到血液中，所以肝炎、心肌梗塞、肌肉發炎或溶血時，GOT 值都可能上升；同樣的，GPT 值上升，大概就可以說是肝發炎所導致。而 γ -GT 是一種分解蛋白質的酵素，主要存在於肝和腎組織。有少部份存在於脾臟、攝護腺和心臟。 γ -GT 常用於檢驗肝膽道系統方面的疾病，也是偵測膽汁鬱積性肝疾病的敏感指標。AFP 是目前檢查肝癌中最重要之指標。另外，肝發炎後，因肝細胞過度增生也會有 AFP 上升的情況，但會隨著發炎反應之消退而降低。

由結果顯示，AAF 確實有造成肝臟之受損，使得相關之肝發炎指標的上升，明顯地有 GOT、GPT 與 γ -GT 皆有約 50% 的增加，但是在餵食 2% SNWE 之下，SNWE 有效降低血液中 GOT、GPT、 γ -GT 數值，皆近似於正常組之數值，另一方面，2% 之 SNWE 也顯著地降低了 AFP 的數值，根據上述結果，再一次說明 SNWE 所具有的保護肝臟，避免肝損傷之能力(Fig. 2)。

AAF 誘導大鼠肝損傷之存活率

在整個動物實驗過程，有許多大鼠因受到 AAF 的刺激下，造成肝臟之過度損傷而死亡，將以紀錄後換算相關存活率，可發現到，在 AAF 的誘導下，在第

二週即有 20% 的大鼠因受不了刺激而死亡，但是在伴隨 1% 的 SNWE 的餵食下，有效延緩大鼠死亡的時間，且在 AAF 刺激後三、四週，誘導組之大鼠僅剩下 60%，但是在餵食 1% SNWE 的組別之大鼠，卻已無死亡的發生，更有效的是 2% 之 SNWE 組別，待至實驗末期均沒有鼠體之死亡，顯示了 SNWE 確實具有保護肝臟，避免 AAF 化學性傷害的刺激並有效延長大鼠壽命之能力(Fig. 3)。

肝臟外觀變化與病理切片之結果

由大鼠之肝臟可以發現，在經過 AAF 的刺激之後，肝臟明顯出現眾多的大小不同之不正常結節，明顯有纖維化之現象，但是在經過 SNWE 的處理之後，肝臟有顯著地好轉之趨勢，已不再有明顯的結節出現，說明了 SNWE 具有保護肝臟之效用(Fig. 4)。

在 H&E stain 結果，可觀察到以 AAF 單獨處理的誘導組別跟正常組相比，在血管或中央靜脈周圍有大量的纖維增生，且有明顯地空泡化之現象，而給予 1% SNWE 處理有效減緩纖維增生的情形，組織中空泡化程度也明顯減少，在劑量提高到 2% 的 SNWE 組別時，其纖維化情形更明顯受到抑制，血管或中央靜脈周圍之空泡也更少，顯示肝臟確實有逐漸好轉(Fig. 5)。

肝纖維化誘導率

進行組織病理學的比較時，將肝纖維化區分為以下五個級：“0”代表正常肝組織；“+”代表有膠原的增生，但沒有在中央靜脈或門脈區有放射狀纖維增生；“++”代表在中央靜脈和門脈區二者間，形成不完全的纖維增生；“+++”代表具有完整的放射纖維，並將肝實質分割成許多節片斷，但此中隔尚很薄；“++++”代表具有完整的放射纖維，具有厚度，亦即完全的肝硬化。由統計之結果可以得到，AAF 確實成功誘導大鼠之肝臟纖維化達 100%，其輕度纖維化有 20%，而中低程度之纖維化有最多為 40%，而重度纖維化甚至有肝硬化的各有 20%，由結果得知，在伴隨 1% SNWE 的處理下，有效控制 80% 的大鼠產生低程度之纖維化，更有效的是在 2% 的 SNWE 處理下，甚至有 20% 大鼠之肝臟是近乎正常，沒有纖維化的，再一次驗證 SNWE 之保護肝臟，避免纖維之效果(Table 1)。

SNWE 抑制肝癌之作用

老鼠體重變化

每隔四周以電子秤測量每隻老鼠之重量，並記錄之，接著以 SigmaPlot 軟體進行統計，分析老鼠在實驗期間體重變化，發現以 AAF 誘導的組別(AAF, induced group)，其體重有明顯的下降，而在給予 1%、2% 的 SNWE 之組別，其體重雖有回復的趨勢，但仍予正常組有所差異(Fig. 6A)。

SNWE 對肝臟重量影響

老鼠犧牲後取肝臟並秤其重量紀錄之，將每組中肝臟重量除以體重再乘以 100% 後表示，以 SigmaPlot 統計軟體分析，結果發現 AAF 處理組別的肝臟與體重比率明顯高於正常組別，顯示其中之肝臟確實有因為 AAF 的刺激下而造成相當程度的破壞，進而有不正常肥大的情形，約有 5 倍以上的增加，而在給予

1% 和 2% 的 SNWE 之組別中，有明顯降低肝臟的比重約 1.5~1.6 倍，顯示其肝功能有回復的趨勢，也說明了 SNWE 具有保護肝臟之能力(Fig. 6B)。

SNWE 對血液中肝發炎指標的影響

由結果顯示，AAF 確實有造成肝臟之受損，使得相關之肝發炎指標的上升，明顯地有 GOT、GPT 與 γ -GT 皆有約 50~66% 的增加，但是在餵食 1%SNWE 及 2% SNWE 之下，皆有效降低血液中 GOT、GPT、 γ -GT 數值，近似於正常組之數值，另一方面，2% 之 SNWE 也顯著地降低了 AFP 的數值，根據上述結果，再一次說明 SNWE 所具有的保護肝臟，避免肝損傷之能力(Fig. 7)。

AAF 與 NaNO₂ 誘導大鼠肝損傷之存活率

在 AAF 的誘導下，在第四週即有 10% 的大鼠因受不了毒性刺激而死亡，但是在伴隨 1% 的 SNWE 的餵食下，有效延緩大鼠死亡的時間，且在 AAF 刺激後十二週，誘導組之大鼠僅剩下 70%，但是在餵食 1% SNWE 的組別之大鼠，卻已無死亡的發生，更有效的是 2% 之 SNWE 組別，待至實驗末期均沒有大鼠之死亡，顯示了 SNWE 確實具有保護肝臟，避免 AAF 化學性傷害的刺激並有效延長大鼠壽命之能力(Fig. 8)。

肝臟外觀變化與病理切片之結果

由大鼠之肝臟可以發現，在經過 AAF 的刺激之後，肝臟明顯出現許多不正常的大腫塊，但是在經過 SNWE 的處理之後，肝臟有顯著地好轉之趨勢，已不再有明顯腫塊出現，說明了 SNWE 具有保護肝臟之效用(Fig. 9)。

在 H&E stain 結果，可觀察到以 AAF 和 NaNO₂ 單獨處理的誘導組別跟正常組相比，出現兩種明顯相異的細胞型態，在誘導組中可發現到有不正常細胞的浸潤，此細胞型態的核質比跟臨近肝細胞比較大，且有不規則排列現象，經由病理科判斷為 HCC (hepatocellular carcinoma)。而給予 1% SNWE 處理有效減 HCC 發生的情形，而發現有纖維化組織圍繞肝小節的情形，在給予 2% 的 SNWE 組別時，已大幅降低 HCC 的發生，肝纖維化的程度也有緩和的情形，顯示肝臟確實有逐漸好轉(Fig. 10)。

腫瘤發生率

進行組織病理學的比較時，除了計算肝臟纖維化程度之外，也計算了誘導出肝臟腫瘤的比率。在本動物實驗模式中，發現 AAF+NaNO₂ 誘導出現兩種形式的癌症發生，包含肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)以及惡性肉瘤(sarcama)，由統計之結果得知，AAF + NaNO₂ 確實誘導大白鼠之肝臟腫瘤達 80%，在伴隨 1% SNWE 的處理下，將肝臟腫瘤發生率降低為 40%，更有效的是在 2% 的 SNWE 處理下，更降低腫瘤發生率為 20%，再一次驗證 SNWE 之保護肝臟，避免肝癌之效果(Tab. 2)。

SNWE 保護肝臟之作用機制

SNWE 促進肝臟解毒酵素 GST- α 、GST- μ 表現

GST 為重要的解毒酵素，其活化可降低致癌物對細胞的傷害，在實驗中發

現給予 AAF 的刺激下，跟正常組別比起，GST- α 、GST- μ 分別降低了 61.4%及 62.8% (Fig. 11A, B)，另外同時給予 1% SNWE 和 2% SNWE 處理下，皆提升了 2.4~3.5 倍之多 (Fig. 11A, B)。而 GST- π 的變化各組間較無意義 (Fig. 11C)。

SNWE 對 Nrf2 表現之影響

由於 Nrf2 調控重要的解毒酵素表現，因此我們也觀察 Nrf2 的蛋白變化，結果發現經由 AAF 處理的組別跟 control 組比較 Nrf2 降低了 82.1% (Fig. 12)，而給予 1% SNWE 和 2% SNWE 處理下，皆提升了 3.5 倍之多 (Fig. 12)。顯示回復調控解毒酵素相關蛋白的表現。

PI3K、MAPKs 蛋白表現之分析

PI3K、MAPKs 蛋白為解毒酵素重要調控者、亦是 Nrf2 上游調控者，實驗結果發現 PI3K 有明顯變化，在 AAF 組別中 PI3K 跟 control 組比起明顯降低約 50% (Fig. 13)，而給予 1% SNWE 及 2% SNWE 處理，發現 PI3K 大幅提高並超越 control 組別 (Fig. 13)。而 MAPK pathway 蛋白表現中，p-ERK1/2 各組間無明顯變化，p-JNK 在 2% SNWE 跟 AAF 組比較有明顯上升。

SNWE 對抗氧化酵素表現之影響

除了觀察解毒酵素外，我們也分析抗氧化酵素是否也會受影響，在 AAF 處理組別中，發現 GPx、SOD-1 和 catalase 表現大幅的降低，分別降低了 76%、22.1% 及 62.7% (Fig. 14)，同時給予 1% SNWE 處理組別可提高 1.5~2.3 倍之多，而在同時給予 2% SNWE 處理組別也可提高 1.4~2.7 倍 (Fig. 14)，顯示 SNWE 可回復抗氧化酵素，提供肝臟的保護。

SNWE 的毒性測試

SNWE 對體重與臟氣的影響

為觀察 SNWE 本身是否會造成肝臟的毒性，在實驗中也單給 SNWE 餵食大鼠，進行 28 天的毒性測試。結果可發現在 control、1% SNWE、2% SNWE 和 3% SNWE 組別中，大鼠體重皆無明顯差異 (Fig. 15)。龍葵水草物處理組別，大鼠肝臟、腎臟、脾臟、心臟與生殖腺比重均與對造組無明顯差異 (Fig. 17, 18)。將其組織進行病理切片之檢查，也沒有因龍葵水草物處理所引起的病理學變化。

SNWE 對肝、腎功能的影響

而肝功能指數除了雌鼠 2% SNWE 與 3% SNWE 在 AST 有明顯的降低，以及在 total protein 方面，龍葵水草處理組中雄鼠皆有明顯降低，其餘 ALT、ALP、 γ -GT 及 Albumin 皆不具劑量與毒性之正相關性 (Tab. 3)。而腎功能指數 BUN、CRE 與 total bilirubin 中皆不具劑量與毒性之正相關性 (Tab. 4)。顯示在本實驗中給予 SNWE 的劑量是不會造成肝臟的損傷。

血液學變化

在處理龍葵水草物，不管是血球數目 (RBC、WBC、PLT)，白血球的分類檢查 (Lymph、Eosinphil、Seg)，血球濃度、量 (MCV、MCH、MCHC)，血球容積及色素含量 (Hb、Ht)，皆不具劑量與毒性之正相關性 (Tab. 5)。

血清生化活性學變化

分析血清中的生化活性，包含 glucose 及血清離子 Na、Cl、K、Ca 及 P，結果龍葵水草處理組與對造組相比，皆無明顯變化 (Tab. 6)。

SNWE 促進肝臟解毒酵素 GST- μ 的活化

在分析解毒酵素的表現中發現，SNWE 可促進 GST- α 、GST- μ 的蛋白表現，因此接著觀察解毒酵素是否活化。以單餵食 SNWE 的大鼠來進行觀察，實驗結果觀察到 GST- μ 有明顯被活化的情形，在正常肝臟中 GST- μ 的活化是呈現負值 (Fig. 19)，顯示無 GST- μ 的活化態，給予 1% SNWE 有些微的提升，而給予 2% SNWE 及 3% SNWE 皆明顯提升 GST- μ 的活化 (Fig. 19)，此說明了 SNWE 的確可誘導解毒酵素 GST- μ 的活化，進而保護肝臟。

討論

癌症的發展通常是緩慢的，而其中肝癌的發生更是需要經年累月的醞釀，有的甚至是十多年之久，然而肝癌的早期，甚至肝臟損傷、肝炎、肝硬化直到肝癌皆無明顯症狀，因此很少能早期發現，有效果的治療。近年化學預防(chemoprevention)為癌症預防的重點研究之一，加上一些天然萃取物抑制癌細胞生長的發現，使得在對抗癌症的競賽中，增添了一些優勢。其中解毒酵素在化學預防扮演重要角色，它可藉由 sulfation、acetylation、glucuronidation 及 glutathioylation 等反應，增加毒物或致癌物水溶性，排除體外，因此可做為對抗癌症的策略之一。目前研究發現，一些天然蔬菜、水果可提供體內不同抗氧化能力(35)，並且有預防癌症發生的功效(36, 37)。民間雜草龍葵已有研究指出可促進抗氧化之表現(27)，及用於肝炎、肺癌、膀胱癌治療(28-31)。而本實驗也發現水萃取龍葵可抑制肝癌發生，停滯在肝纖維化狀態，並進一步發現水萃取龍葵可提升解毒酵素及抗氧化酵素的表現，達到預防或降低肝細胞癌的發生。

龍葵水萃取物(SNWE) 保肝動物模式之選擇

為了誘導大鼠肝細胞癌，使用了先前實驗室所建立的模式，此模式乃建立大鼠肝臟的新生性結節(38)，再加以修改。AAF 在老鼠實驗中是有效的致癌物，它主要標的雄性老鼠的肝臟，因此常用於老鼠肝癌模式中的致癌藥物³⁹，而化學治癌物必須經由活化才有作用，而 AAF 被 cytochrome P-450 活化後，會形成 N-hydroxy-AAF 的中間產物，它可直接和 DNA 作用，產生 N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-fluorene，造成基因的突變。有研究指出將 AAF 加 NaNO₂ 經亞硝化作用(nitrosation)可產生更強烈的致突變原(mutagen)，而且能和胺基酸及 DNA 作用(40)。因此本研究以 AAF 誘導大鼠肝纖維化，AAF + NaNO₂ 誘導大鼠肝癌，誘導期間持續進行 AAF 或 AAF + NaNO₂ 誘導，同時給予 SNWE 進行保肝效果之評估。

龍葵水萃取物(SNWE) 抗纖維化之研究

在本實驗肝纖維化、肝硬化模式中，龍葵水萃取物可明顯降低肝發炎指數、肝臟癌化指標 (γ -GT 及 AFP)與肝臟比重，但以 2% SNWE 較有效，而 1% SNWE 較無影響，並且在大鼠體重方面，水萃取龍葵無明顯回覆大鼠體重趨於正常，其原因推論為給致癌藥物時間過長，導致大鼠肝臟造成過於嚴重纖維化，然而為達肝癌之程度。雖然造成嚴重的纖維化，但給予水萃取龍葵的組別，在纖維化程度計算方面，仍可降低過於嚴重的纖維化甚至是肝硬化，將肝臟先受損程度降低至輕微纖維化，而 2% SNWE 組別更有 20% 的老鼠肝臟正常，而大鼠存活率在 1% SNWE 及 2% SNWE 組別中皆明顯提高，顯示龍葵可趨緩嚴重肝纖維化並降低老鼠的死亡率。

龍葵水萃取物(SNWE) 抗肝癌之研究

肝細胞癌大部分為分化良好的細胞，病理切片觀察下似正常肝細胞，但其細胞核較大，形狀較圓，細胞質多而呈粒狀嗜伊紅性。而實驗病理切片結果發現的確誘導出肝細胞癌，然而也誘導出惡性肉瘤的發生，這些腫瘤可能藉由癌細胞

轉移及不同來源的情況發生。總觀龍葵處理的組別，在病理觀察方面，皆降低肝臟腫瘤的發生，存活率也明顯提高。

龍葵水萃取物(SNWE) 保肝之機制

在 2005 年文獻提到，龍葵可提升 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) 之解毒抗氧化酵素表現(27)。而本實驗也發現龍葵水萃取物可誘發 GST- μ 的活化，而有多篇文獻指出 GST- μ 的活化在防癌方面占重要角色，在結腸腺癌中，GST- μ 表現明顯的降低(41)，另外研究指出在人類結腸腫瘤中偵測不到 GST- μ 而 GST- π 卻是增加的，而 GST- α 在多數腫瘤是較無變化的(42-45)。在肺癌方面，有研究者取 175 個肺癌病人，以 polymerase chain reaction (PCR) 的技術分析，發現到有 104 位病人 GST- μ 基因是缺乏的(46)。而本實驗結果在單給致癌物刺激的肝臟中，GST- μ 的表現確實是明顯降低的。以上結果說明在肝臟的癌化過程中，GST- μ 也許為扮演對抗癌細胞的重要角色之一，而龍葵萃取物確實可提高其表現與活性，進而保護肝臟免於致癌物質的攻擊。接著實驗也發現調控 GST- μ 的轉錄因子 Nrf2，在給予龍葵水萃取物組別有明顯提高。而 Nrf2 上游調控因子 PI3K (15)，在給予龍葵水萃取物組別也有明顯提高。為探討其路徑，在未來可在細胞實驗中，給予肝癌細胞 PI3K 抑制劑，進而觀察 Nrf2 與 GST- μ 的表現情形。

參考文獻

1. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001, 482, 21-6
2. Singhal SS, Saxena M, Ahmad H, Awasthi S, Haque AK, Awasthi YC. Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isozymes against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1992, 299, 232-241
3. Hayes JD, McLeod R, Ellis EM, Pulford DJ, Ireland LS, McLellan LI, Judah DJ, Manson MM, Neal GE. Regulation of glutathione S-transferases and aldehyde reductase by chemoprotectors: studies of mechanisms responsible for inducible resistance to aflatoxin B1. *IARC Sci Publ* 1996, 139, 175-87
4. Traka M, Gasper AV, Melchini A, Bacon JR, Needs PW, Frost V, Chantry A, Jones AM, Ortori CA, Barrett DA, Ball RY, Mills RD, Mithen RF. Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. *PLoS ONE.* 2008, 3, 25-68
5. Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Mol Cell Biochem* 2003, 253, 319-37
6. Ahmad H, Singhal SS, Saxena M, Awasthi YC. Characterization of two novel subunits of the alpha-class glutathione S-transferases of human liver. *Biochim Biophys Acta.* 1993, 1161, 333-6
7. Myhrstad MC, Husberg C, Murphy P, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JO, Kolstø AB. TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochim Biophys Acta.* 2001, 1517, 212-9
8. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med.* 2004, 7, 385-94
9. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2005, 7, 385-94
10. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of anti-oxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004, 36, 199-207
11. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci.* 2001, 59, 169-77
12. Yates MS, Kensler TW. Keap1 eye on the target: chemoprevention of liver cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2007, 28, 1331-42
13. Keum YS, Jeong WS, Kong AN. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res.* 2004, 555, 191-222.

14. Zipper LM, Mulcahy RT. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci.* 2003, 73, 124-34.
15. Kang KW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95, 53-66
16. Jakubíková J, Sedlák J, Mithen R, Bao Y. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol.* 2005, 69, 1543-52
17. Keum YS, Jeong WS, Kong AN. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res.* 2004, 555, 191-202.
18. Sultana et al: Crude extracts of hepatoprotective plants, *Solanum nigrum* and *Cichorium intybus* inhibit free radical-mediated DNA damage. *J. Ethnopharmaol.* 1995, 45, 189-92.
19. Prashanth et al: alpha-Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. *Fitoterapia.* 2001, 72, 686-8.
20. Jindal, V.K. and Patel, N.B: Some pharmacological activities of aqueous and alcoholic extracts of *Cichorium intybus* Linn. *Indian J. Pharmacol.* 1975, 7, 104-8
21. Saxena, A. and Garg, N.K: Effect of Liv-52 on hepatic enzymes. *Indian J. Exp Biol* 1979, 17, 662-8.
22. An, H.J., Kwon, K. B. et al: *Solanum nigrum* produces nitric oxide via nuclear factor-[kappa]B activation in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Cancer Prev* 2005, 14, 345-50.
23. Heo, K. S., Lee, S. J., Ko, J. H., Lim, K. and Lim, K. T: Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF- κ B and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells. *Toxicol.* 2004, 18, 755-63.
24. Perez et al: Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit, J. *Ethnopharmacol* 1998, 62, 43-8.
25. Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H: Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxicol.* 2001, 39, 1045-53
26. Son, Y.-O., Kim, J., Lim, J.-C., Chung, Y., Chung, G.-H., Lee, J.-C: Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem. Toxicol* 2003, 41, 1421-8.

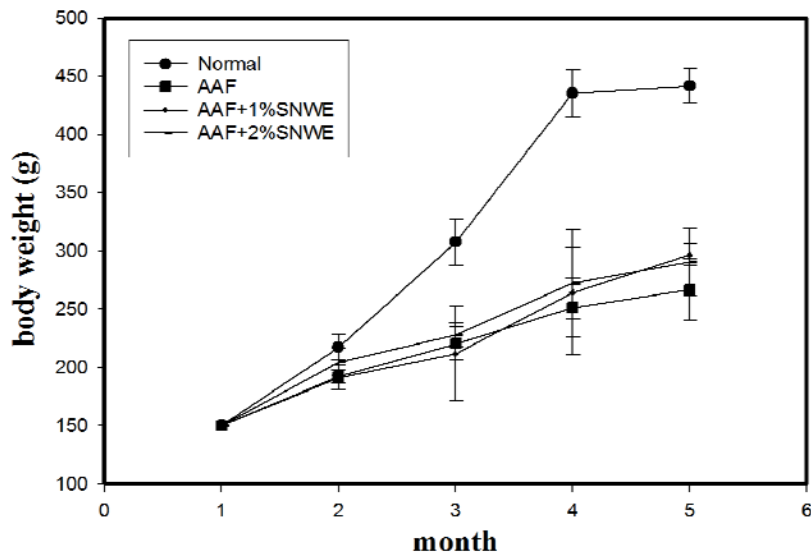
27. Lee, S.J., Ko, J.H., Lim, K. and Lim, K.T: 150 kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne enhances activities of detoxicant enzymes and lowers plasmic cholesterol in mouse. *Pharmacol. Res.* 2005, 51, 399-408
28. 呂翠霞等: 山東中醫藥大學學報 1999 ; 23 : 224 。
29. 王云啟: 遼寧中醫雜誌 2002;15:101 。
30. 羅開明等: 右江醫學 1999; 27 : 105 。
31. 張書元等: 華北煤炭醫院學報 2000; 2 : 380 。
32. 王泳: 中醫藥研究 2000;16:20 。
33. 陸克勤: 中國醫刊 2000;35 : 51 。
34. 蘇進成等: *J. Chin. Med* 2003;1:151 。
35. Heber D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J Postgrad Med.* 2004, 50, 145-9.
36. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992, 18, 1-29
37. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control.* 1991, 2, 325-57.
38. Teebor GW, Becker FF. Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-Fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 1971, 3, 1-3.
39. Miller EC, Miller JA, Enomoto M. The comparative carcinogenicities of 2-acetylaminofluorene and its n-hydroxy metabolite in mice, hamsters, and guinea pigs. *Cancer Res.* 1964, 24, 2018-31.
40. Lin JK, Yen JY, Chang HW, Lin-Shiau SY. N-nitrosophenacetin: its synthesis, characterization, mutagenicity, and teratogenicity. *J Natl Cancer Inst.* 1984, 72, 864-9
41. Barker HJ, Alpert LC, Compton CC, Maslen A, Kirby GM. Loss of glutathione S-transferase (GST) mu phenotype in colorectal adenocarcinomas from patients with a GSTM1 positive genotype. *Cancer Lett.* 2002, 177, 65-74.
42. M.L. Clapper, S.J. Hoffman, K.D. Tew, Glutathione S-transferases in normal and malignant human colon tissue, *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1096, 209-16
43. Ranganathan S., Tew K.D. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases alpha, mu, and pi in normal tissue and carcinomas from human colon, *Carcinogenesis.* 1991;12:2383-2387
44. Moorghen M., Cairns J., Rorrester L.M., Hayes J.D., Hall A., Cattan A.R., Wolf C.R., Harris A.L., Enhanced expression of glutathione S-transferases in colorectal carcinoma compared to non-neoplastic mucosa. *Carcinogenesis* 1991, 12, 13-7
45. Waziers I., Cugnenc P.H., Berger A., Leroux J.P., Beaune P.H.,

- Drug-metabolizing enzyme expression in human normal, peritumoral and tumoral colorectal tissue samples, *Carcinogenesis* 1991, 12, 905-9
46. Sun G, Pi J, Zheng Q. The study of GST mu gene deletion as the hereditary marker for susceptibility to lung cancer. *Lung cancer* 1995, 1, 167-9

第二年

- 實驗結果附圖 -

(A)



(B)

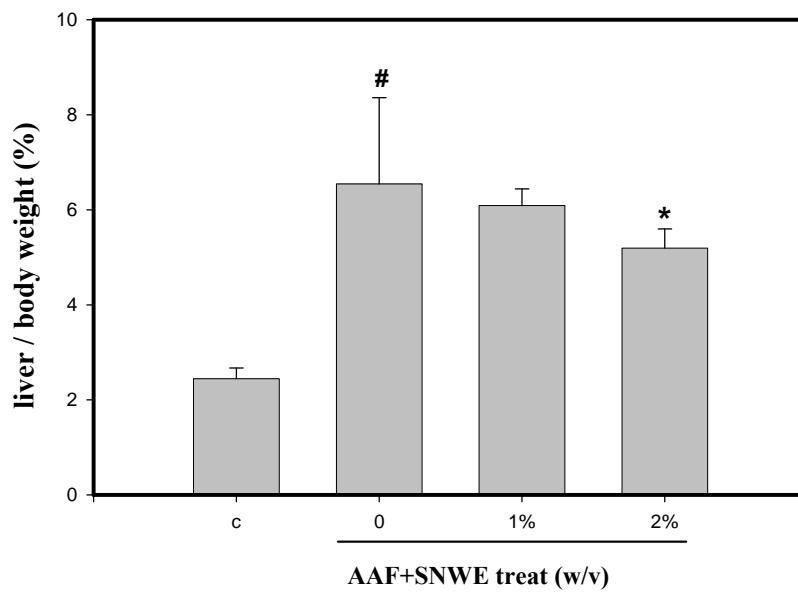


Figure. 1. The body weight and liver weight change of the animals in experiment. The figure shows the average body weight in different groups of male Wistar rat (A). The value was means \pm SD. SNWE inhibited liver weight increased (B). The value was means \pm SD. #, $p < 0.01$ compared with normal group; *, $p < 0.01$ compared with AAF-treated group.

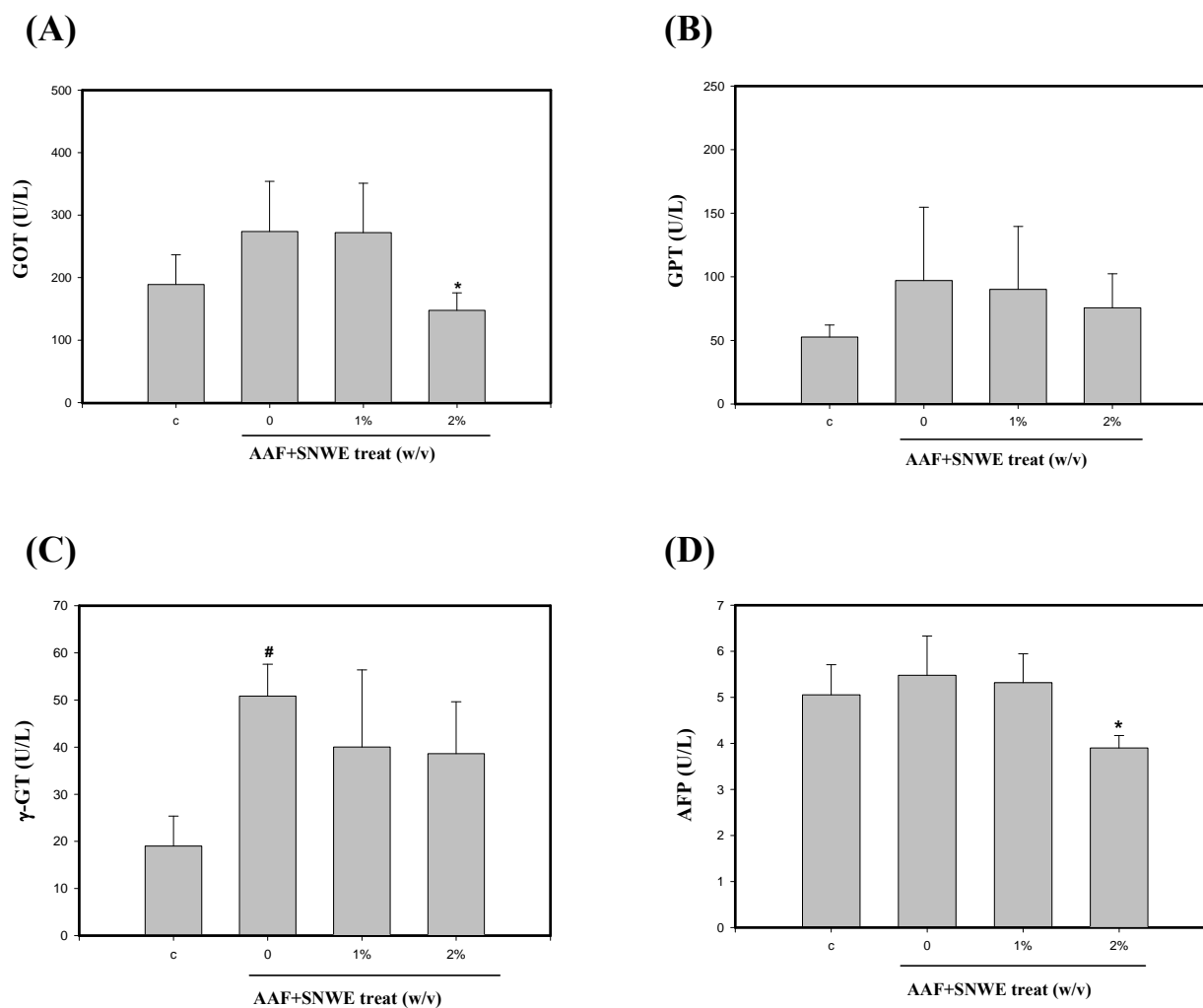


Figure. 2. SNWE protection against AAF-induced increases in the activities of GOT (A), GPT (B), γ -GT (C) and AFP (D). The value was means \pm SD. #, $p < 0.01$ compared with normal group; *, $p < 0.01$ compared with AAF-treated group.

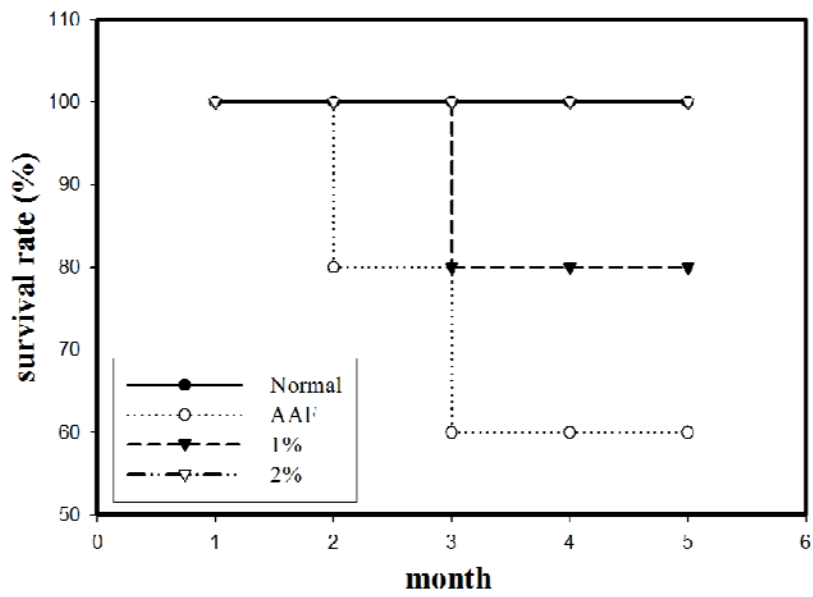


Figure. 3. Cumulative survival curve showing that treatment with SNWE significantly raised the lifespan.

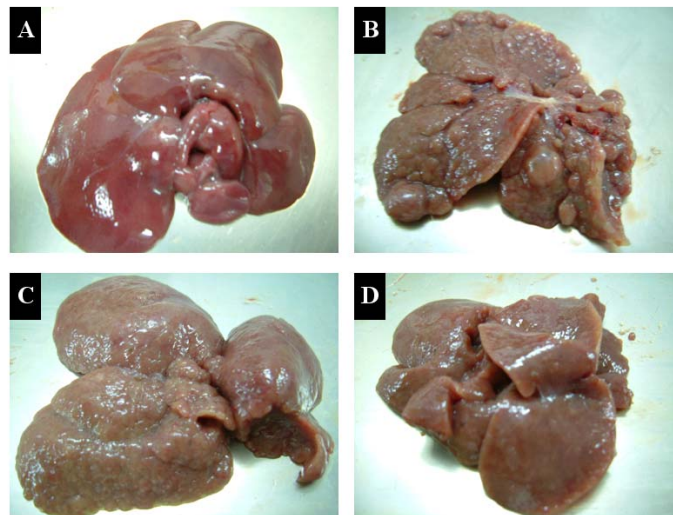


Figure. 4. Effects of SNWE on AAF-induced liver morphology of rats. (A) normal; (B) AAF; (C) AAF + 1% SNWE; (D) AAF + 2% SNWE.

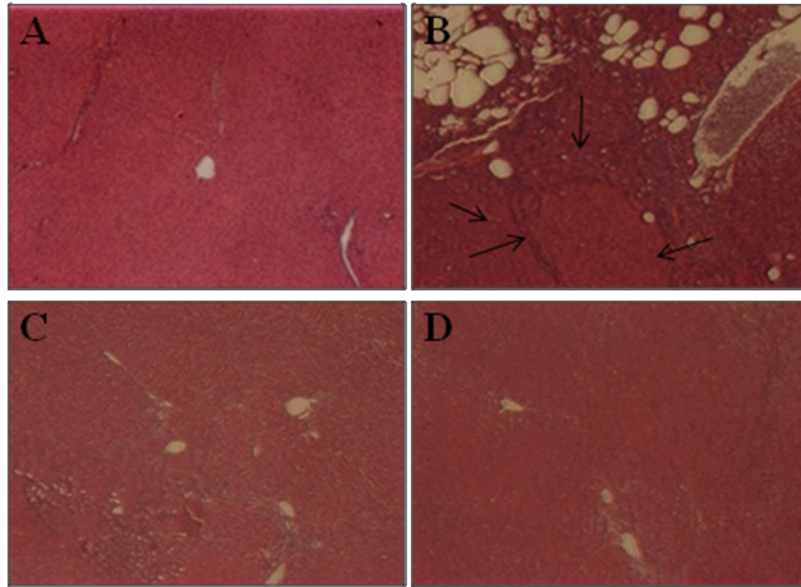


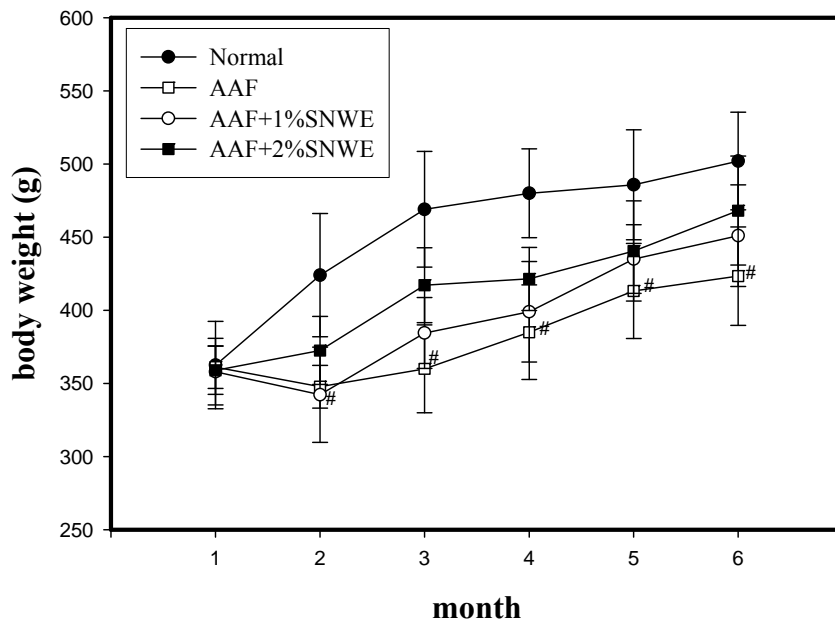
Figure 5. Effects of SNWE on AAF-induced histological changes in the livers of rats. (A) normal; (B) AAF; (C) AAF + 1% SNWE; (D) AAF + 2% SNWE. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin. 400x. Statistical analysis were summary in table 1.

Table 1. Scoring systems for hepatic fibrosis

Group	Fibrosis score ^a				
	0	+	++	+++	++++
Normal	100%				
AAF		20%	40%	20%	20%
AAF + 1% SNWE		80%	20%		
AAF + 2% SNWE	20%	60%	20%		

a, means the normal liver; +, means slightly liver fibrosis; ++, means moderate liver fibrosis; +++, means complete liver fibrosis; +++++ means serious liver fibrosis or liver cirrhosis.

(A)



(B)

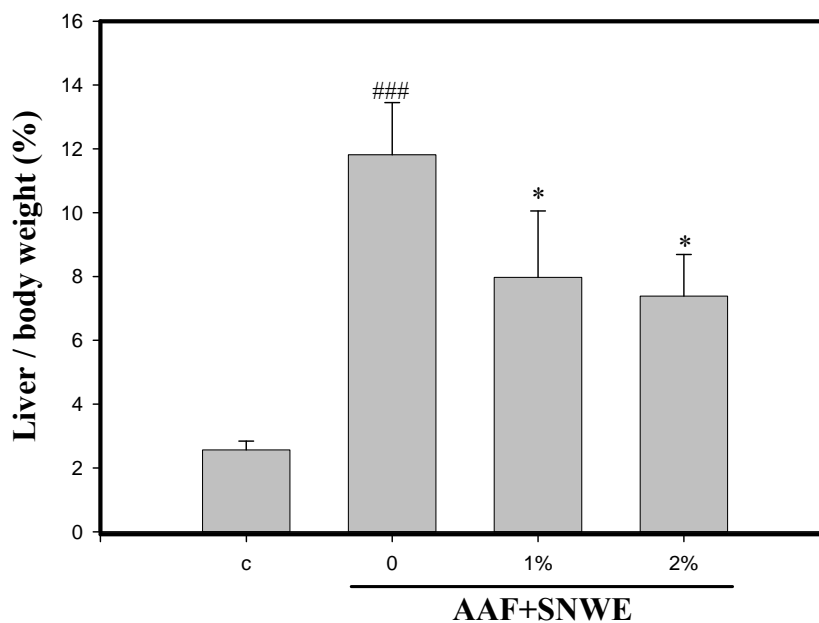


Figure. 6. The body weight and liver weight change of the animals in experiment.

The figure shows the average body weight in different groups of male Wistar rat (A).

The value was means + SD. SNWE inhibited liver weight increased (B). The value

was means \pm SD. #, $p < 0.01$ compared with normal group; *, $p < 0.01$ compared with

AAF-treated group.

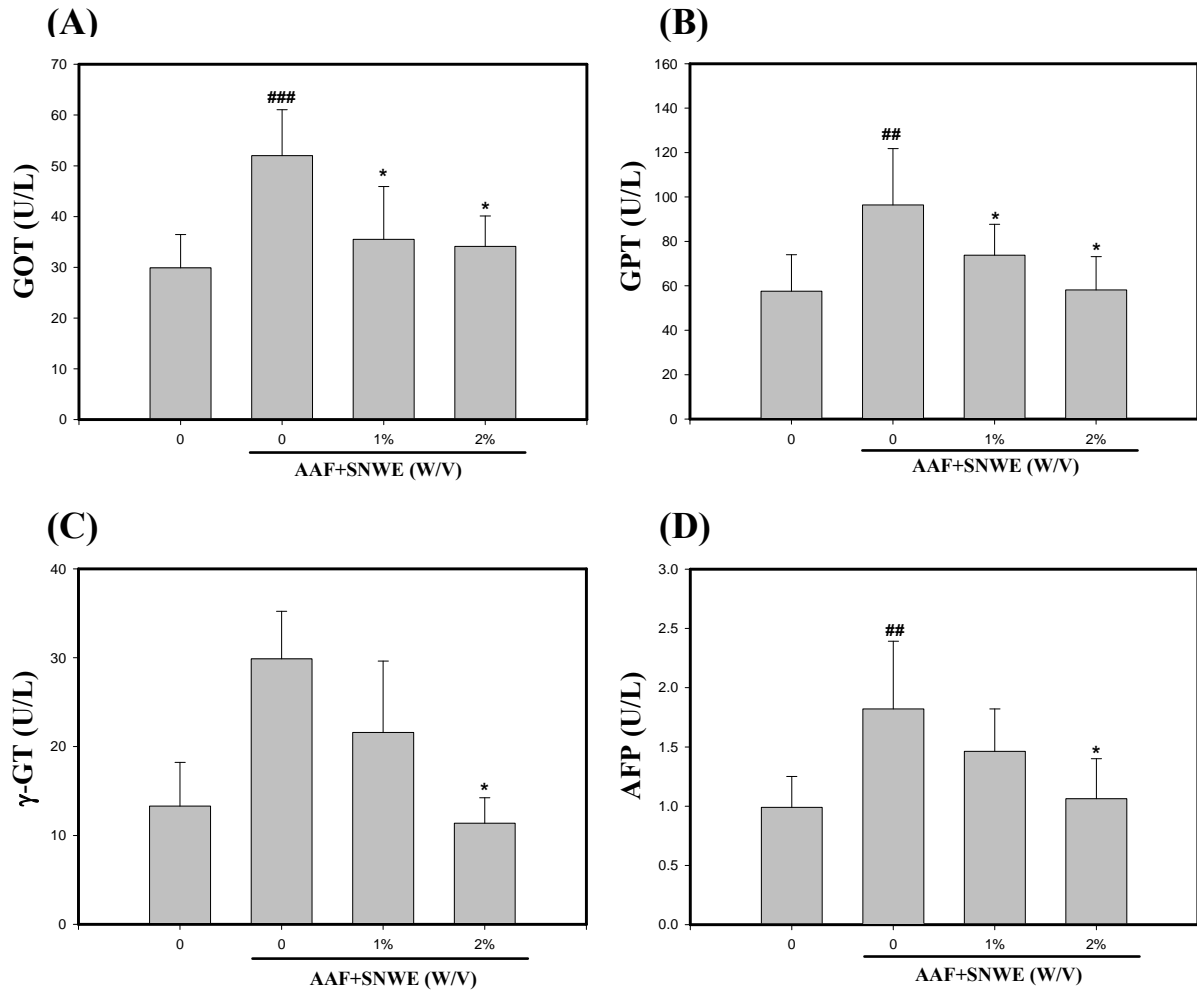


Figure. 7. SNWE protection against AAF-induced increases in the activities of GOT (A), GPT (B), γ -GT (C) and AFP (D). The value was means \pm SD. #, $p < 0.01$ compared with normal group; *, $p < 0.01$ compared with AAF-treated group.

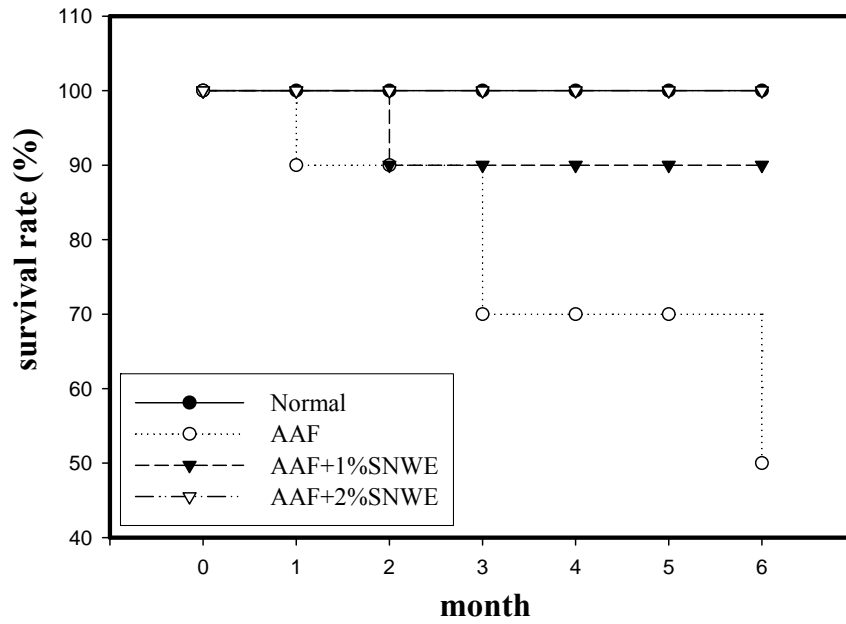


Figure 8. Cumulative survival curve showing that treatment with SNWE significantly raised the lifespan.

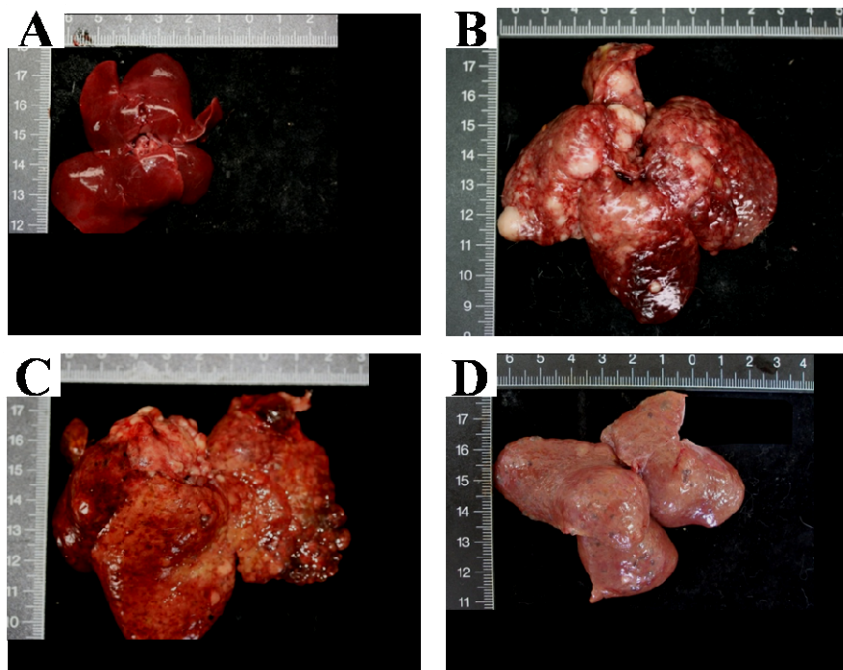


Figure 9. Effects of SNWE on AAF-induced liver morphology of rats. (A) normal; (B) AAF; (C) AAF + 1% SNWE; (D) AAF + 2% SNWE.

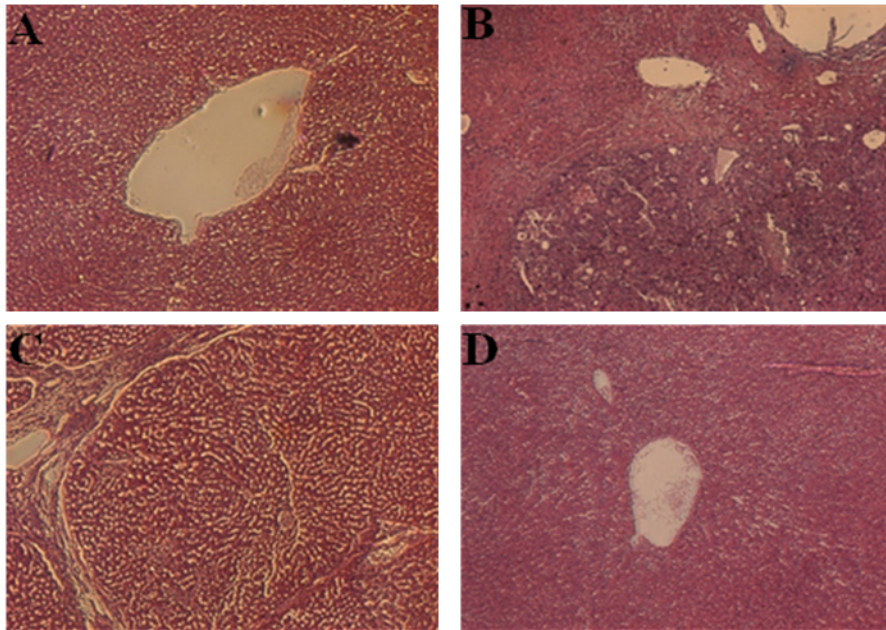


Figure. 10. Effects of SNWE on AAF-induced histological changes in the livers of rats. (A) normal; (B) 0.02% AAF + 0.2% NaNO₂; (C) 0.02% AAF + 0.2% NaNO₂ + 1% SNWE; (D) 0.02% AAF + 0.2% NaNO₂ + 2% SNWE. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin (400x). Statistical analysis was summary in Tab. 2.

Table. 2. Scoring systems for hepatic fibrosis and liver cancer.

Group	Fibrosis score ^a					tumor ^b
	0	+	++	+++	++++	
Normal	100%					
AAF		20%				80%
AAF+1%SNWE			20%	40%		40%
AAF+2%SNWE		20%	40%	20%		20%

a, means the normal liver; +, means slightly liver fibrosis; ++, means moderate liver fibrosis; +++, means complete liver fibrosis; ++++ means serious liver fibrosis or liver cirrhosis.

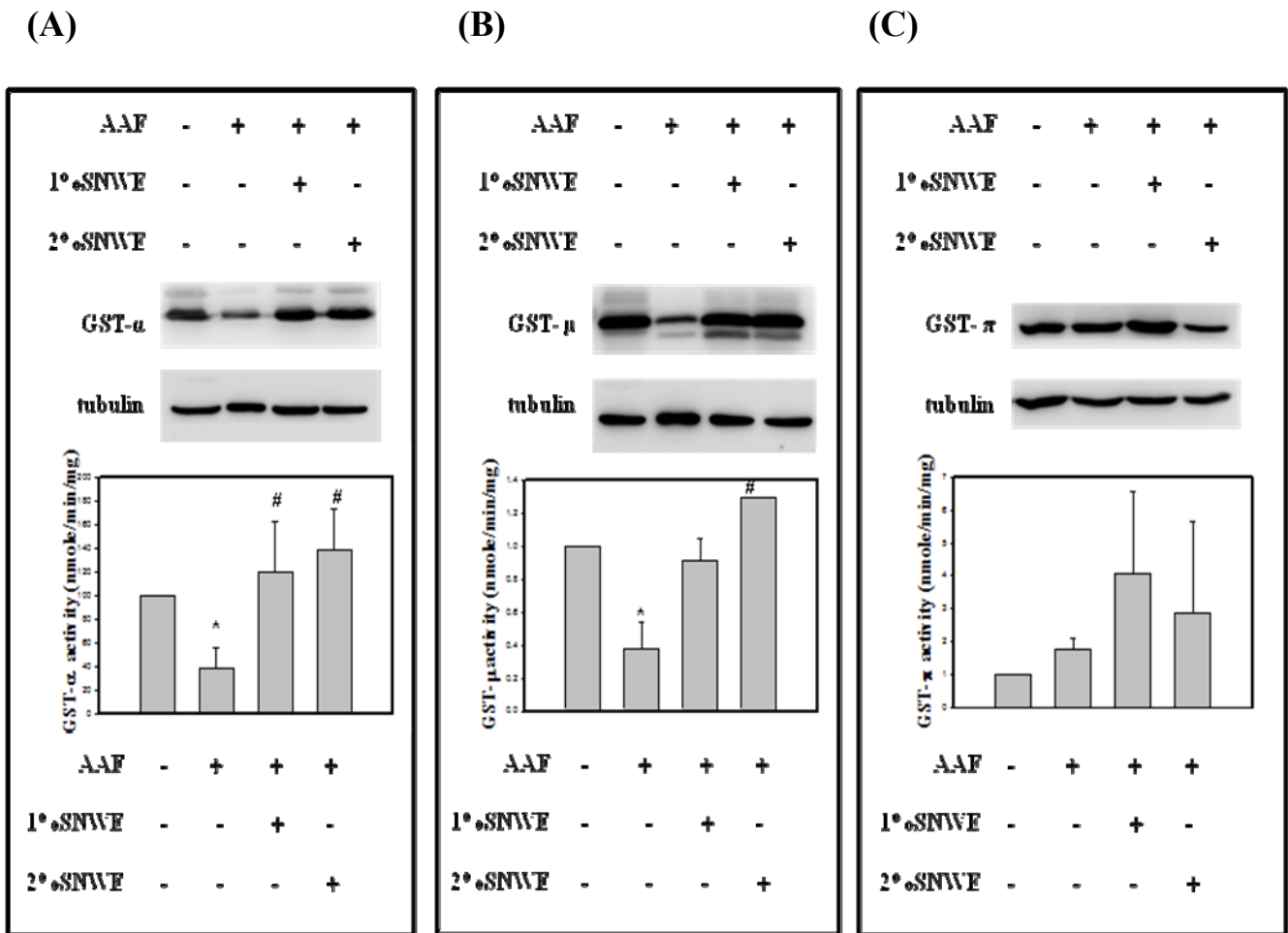


Fig. 11. Effects of SNWE on GSTs expression in rats with hepatic fibrosis. The liver tissue extracts of control group, AAF group, AAF + 1%SNWE group, AAF + 2%SNWE group, were subjected to Western blot to analysis GST A1 (A), GST Pi (B) and GST Mu (C) expression. The levels of these proteins were subsequently quantitated by densitometric analysis with that of control being 100%. Data were presented as mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ compared with control. # $p < 0.05$ compared with AAF.

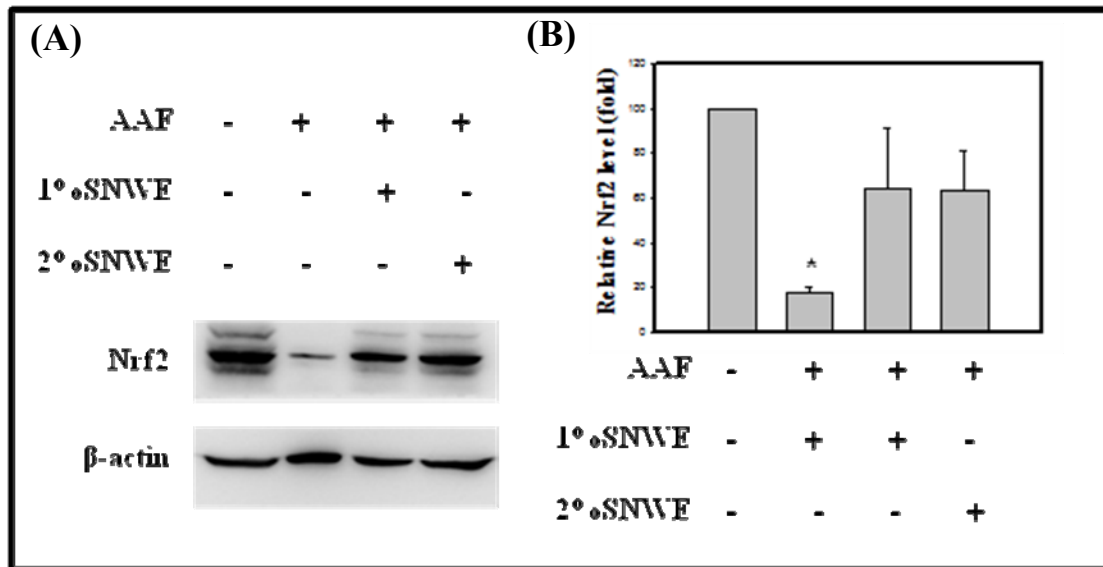


Fig. 12. Effects of SNWE treatment on Nrf2 expression. (A) Immunoblot analysis of the expression of Nrf2 on rats treated with different groups (normal, AAF, AAF+1%SNWE, AAF+2%SNWE). These proteins were detected by anti-Nrf2 antibody, and (B) the result were represented by using an ECL system, and represent the average of three independent experiments \pm SD. * $p < 0.05$ compared with control.

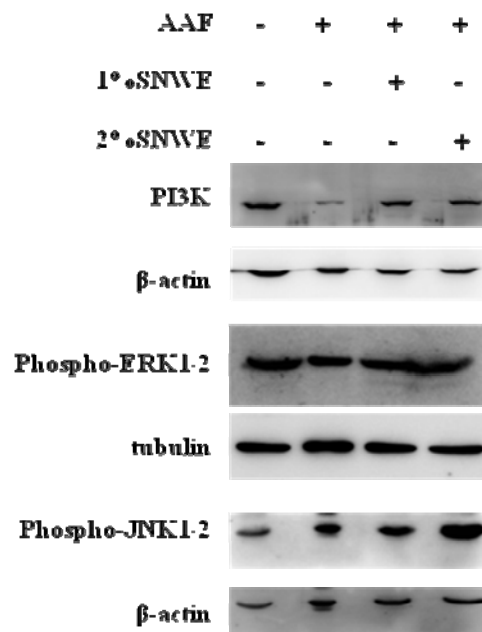


Figure 13. Effects of SNWE on PI3K, p-ERK1/2 and p-JNK1/2 expression in rats with hepatic fibrosis. The liver tissue extracts of control group, AAF group, AAF + 1%SNWE group, and AAF + 2%SNWE group were subjected to Western blot to analysis PI3K, p-ERK1/2 and p-JNK1/2 expression. Data were presented as mean \pm SD from three independent experiments.

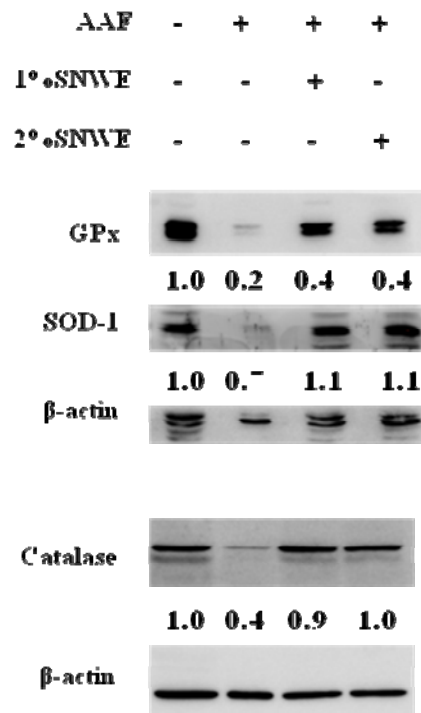


Figure 14. Effects of SNWE on GPx, SOD-1 and Catalase expression in rats with hepatic fibrosis. The liver tissue extracts of control group, AAF group, AAF + 1%SNWE group, and AAF + 2%SNWE group were subjected to Western blot to analysis GPx, SOD-1 and Catalase expression. Data were presented as mean \pm SD from three independent experiments.

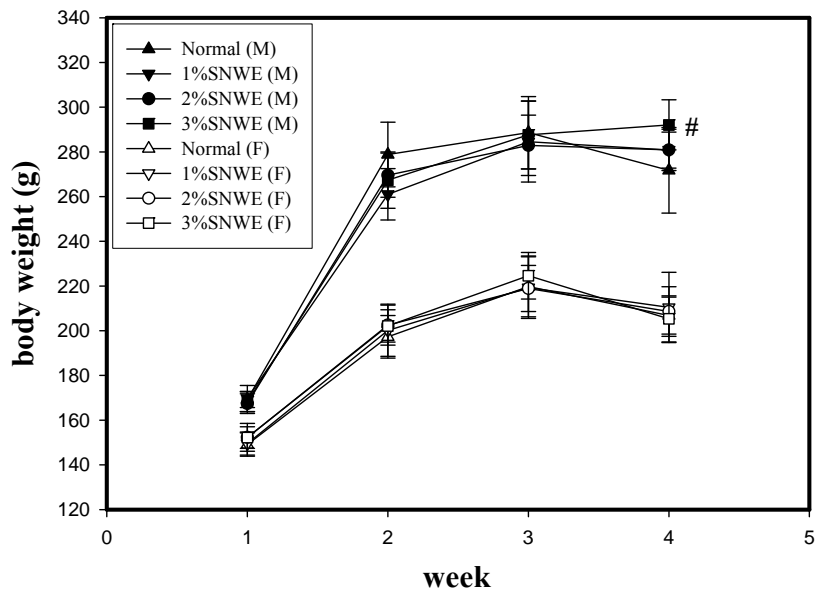


Figure. 15. The body weight of the animals in experiment. The figure shows the average body weight in different groups of Wistar rat. The value was means \pm SD. #, $p < 0.01$ compared with normal group.

Table. 3. Serum biochemistry changes of liver function in rats treated with SNWE for 28 days ^a

Dose	ALT (U/L)	AST (U/L)	T.protein (g/dL)	ALP (U/L)	γ-GT (U/L)	Albumin (g/dL)
Male						
Control	42.6 \pm 9.0 ^b	111.0 \pm 26.6	6.6 \pm 0.2	111.2 \pm 10.7	10.8 \pm 4.6	4.2 \pm 0.1
1 ^o SNWE	41.7 \pm 6.0	108.9 \pm 19.9	7.1 \pm 0.1 [*]	113.0 \pm 8.7	7.7 \pm 2.0	4.4 \pm 0.1
2 ^o SNWE	23.6 \pm 4.6	51.6 \pm 5.0	7.2 \pm 0.1 [*]	85.3 \pm 9.8	11.6 \pm 3.9	4.3 \pm 0.1
3 ^o SNWE	26.7 \pm 4.9	83.5 \pm 13.8	7.2 \pm 0.1 [*]	83.9 \pm 11.2	10.8 \pm 3.9	4.2 \pm 0.1
Female						
Control	33.6 \pm 9.6	87.6 \pm 5.7	7.0 \pm 0.2 [*]	181.6 \pm 7.9	10 \pm 2.5	4.2 \pm 0.1
1 ^o SNWE	25 \pm 5.6	73.7 \pm 9.3 ^c	6.3 \pm 0.1	169.4 \pm 4.3	9.2 \pm 2.7	3.8 \pm 0.1
2 ^o SNWE	23.6 \pm 9.5	49.7 \pm 8.2 ^{***}	6.9 \pm 0.2	161.7 \pm 4.9	8.5 \pm 4.8	4.0 \pm 0.1
3 ^o SNWE	27.3 \pm 5.5	57.3 \pm 11.5 ^{**}	6.7 \pm 0.2	166.1 \pm 4.8	8.6 \pm 2.2	3.8 \pm 0.2

a. ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatase; γ -GT: Gamma Glutamyl Transpeptidase

b. Data expressed as mean \pm SD.

c. *: Significant difference between control and treated group at $p < 10^{-6}$, ** $p < 10^{-7}$ compared with control, *** $p < 10^{-8}$ compared with control

Table. 4. Serum biochemistry changes of kidney function in rats treated with SNWE for 28 days ^a

Dose	BUN (mg:dL)	CRE (mg:dL)	T. bilirubin (mg:dL)
Male			
	^b		
Control	11.1+1.5	0.75+0.1	0.90+0.1
1° SNWE	10.5+1.4	0.77+0.1	0.74+0.1
2° SNWE	9.5+1.4	0.66+0.1	0.66+0.2
3° SNWE	10.0+1.5	0.63+0.1	0.79+0.1
Female			
Control	8.9+1.4	0.59+0.1	0.66+0.1
1° SNWE	9.5+0.9	0.64+0.1	0.68+0.1
2° SNWE	9.3+1.5	0.60+0.1	0.64+0.2
3° SNWE	8.7+1.3	0.61+0.1	0.66+0.1

a. BUN: blood urea nitrogen: CRE: Creatine kinase

b. Data expressed as mean+SD.

Table. 5. The changes of hematological parameter in rats treated with SNWE for 28 days^a

Dose	RBC' (10⁷·ul)	WBC' (10³·ul)	Hb (g·dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)
Male						
Control	7.3±0.4	12.5±1.6	14.9±0.3	44.8±1.6	61.2±2.4	20.4±0.9
1° SNWE	8.3±0.3	14.2±1.0	15.8±0.6	46.7±1.1	56.6±1.5	19.2±0.4
2° SNWE	8.0±0.3	14.2±1.1	15.5±0.5	45.8±1.7	57.0±2.0	19.3±0.6
3° SNWE	7.7±0.1	14.3±1.4	14.8±0.2	44.0±1.0	57.1±1.7	19.2±0.3
Female						
Control	7.5±0.2	10.0±0.7	14.6±0.4	43.7±1.4	58.2±2.6	19.5±0.5
1° SNWE	7.4±0.2	9.7±0.5	14.4±0.2	43.0±0.6	58.0±1.5	19.4±0.5
2° SNWE	7.6±0.2	10.6±1.1	14.6±0.1	43.2±0.6	56.9±1.3	19.2±0.4
3° SNWE	7.5±0.2	11.0±1.1	14.5±0.2	43.3±1.0	57.5±1.0	19.2±0.2
Dose	MCHC' (%)	PLT (10³·ul)	Lymph (%)	Monocyte (%)	Eosinphil (%)	Seg (%)
Male						
Control	33.4±0.6	757.6±77.6	27.9±4.5	4.6±1.6	1.4±0.5	66.1±4.5
1° SNWE	33.9±0.8	1041.7±149.2	32.6±2.5	4.3±1.5	1.9±1.1	61.7±2.9
2° SNWE	33.9±0.4	1035.7±133.7	30.6±3.6	4.0±1.2	1.7±0.8	64.2±3.7
3° SNWE	33.6±0.6	785.9±45.4	29.7±3.9	4.4±1.2	2.3±1.1	63.8±2.2
Female						
Control	33.5±1.0	871.3±99.4	32.7±2.7	4.8±0.9	1.9±1.0	60.6±2.8
1° SNWE	33.5±0.4	1000.4±136.7	35.9±3.1	4.5±1.4	2.1±1.0	57.9±3.4
2° SNWE	33.8±0.4	978.9±72.8	33.4±4.3	3.6±1.3	1.5±0.8	61.8±5.7
3° SNWE	33.4±0.6	885.7±114.9	34.4±3.4	4.7±1.8	2.1±1.4	59.2±4.1

a. RBC: Red blood cell; WBC: White blood cell; Hb: Hemoglobin; Ht: Hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular hemoglobin. MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration. PLT: Platelet.

b. Data expressed as mean±SD.

Table. 6. Serum biochemistry changes of rats treated with SNWE for 28 days

Dose	Glucose (mg dL)	Na (mEq L)	Cl (mEq L)	K (mEq L)	Ca (mg·dl)	P (mg·dl)
Male						
Control	99.9+14.6 ^a	143.4+2.7	108.0+4.9	5.1+0.2	9.8+0.5	5.0+0.3
1 ^o SNWE	72.7+8.6	141.3+2.3	106.6+6.5	4.6+0.2	9.6+0.6	5.2+0.3
2 ^o SNWE	78.4+3.8	144.2+2.1	110.1+6.1	4.6+0.2	9.9+0.3	5.0+0.4
3 ^o SNWE	93.3+5.6	144.3+2.6	111.7+3.5	4.5+0.1	9.5+0.4	4.6+0.2
Female						
Control	85.4+3.9	143.7+2.5	110.9+4.7	4.4+0.2	9.7+0.5	4.7+0.2
1 ^o SNWE	80.3+4.1	143.8+1.9	113.8+4.1	4.6+0.1	9.6+0.6	4.7+0.1
2 ^o SNWE	89.5+15.4	144.6+2.5	111.0+5.1	4.5+0.1	9.6+0.3	4.6+0.1
3 ^o SNWE	100.5+16.4	144.6+2.0	112.2+2.7	4.6+0.1	9.6+0.3	4.6+0.1

a. Data expressed as mean+SD.

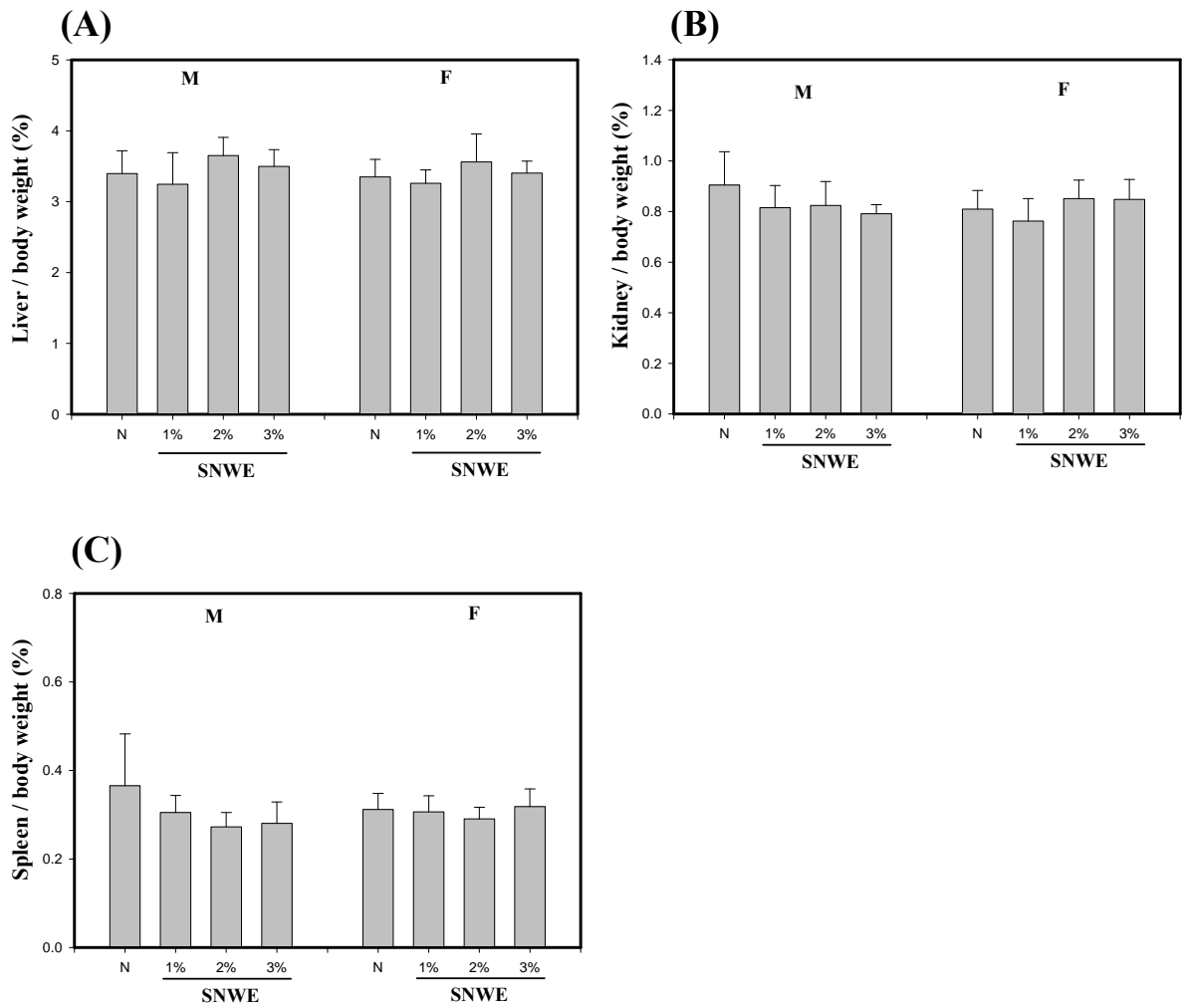
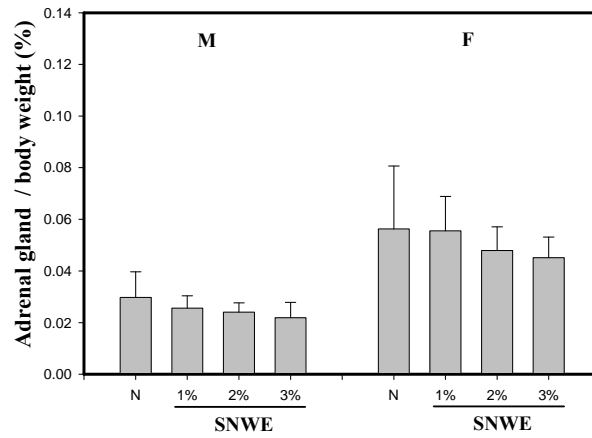


Figure. 16. The liver weight, kidney weight and spleen weight change of the animals in experiment. The figure shows the average liver weight (A), kidney weight (B) and spleen weight (C) in different groups of Wistar rat. The value was means \pm SD.

(A)



(B)

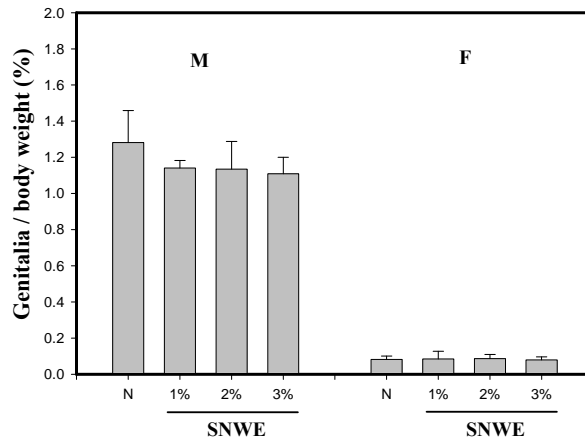


Figure. 17. The adrenal gland weight and genitalia weight change of the animals in experiment. The figure shows the average adrenal gland weight (A), genitalia weight (B) in different groups of Wistar rat. The value was means \pm SD.

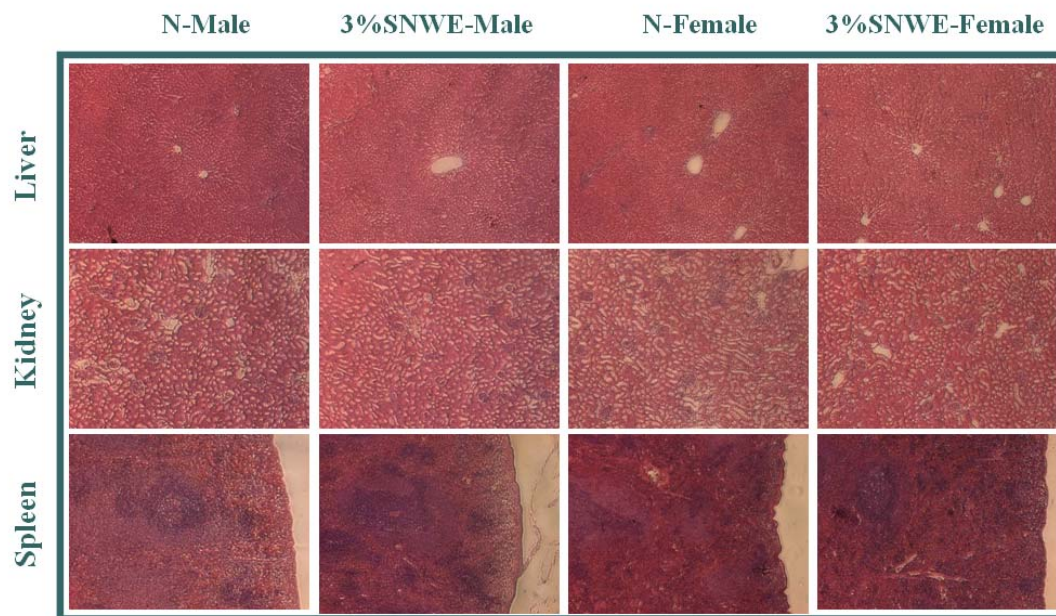


Figure. 18. Effects of SNWE on histological changes in rats. Liver, kidney and spleen sections were stained with hematoxylin and eosin. 400x.

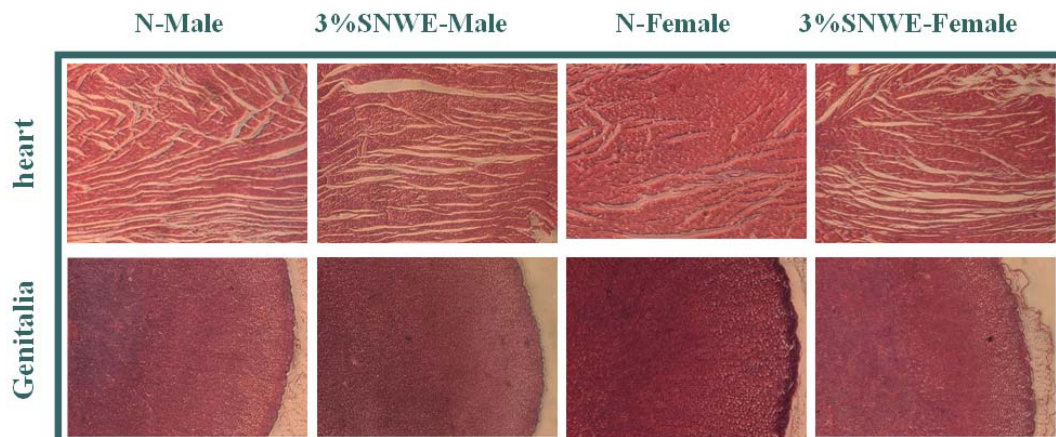


Figure. 19. Effects of SNWE on histological changes in rats. heart and Genitalin sections were stained with hematoxylin and eosin. 400x.

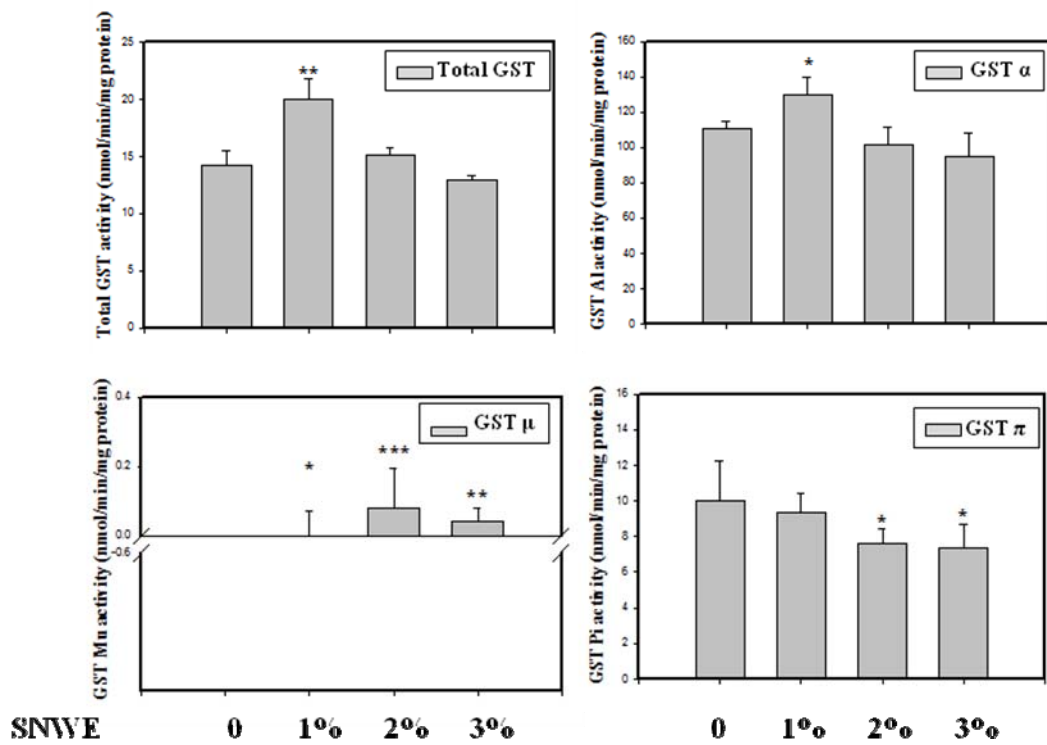


Figure 20. Effects of SNWE on hepatic total GST, GST A1, GST Pi, and GST Mu activity in rats. The data were presented as means \pm SD, n=6. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.005 as compared with the control group.

「保健食品」研究開發計畫 第三年度第一部分報告

龍葵萃取物及多酚抑制肝癌細胞轉
移之機轉及降低血管新生之作用

Solanum nigrum water extract and polyphenol-rich
extract suppress the migration and invasion in
human hepatocarcinoma cell

中文摘要

癌細胞的轉移擴散(metastasis) 往往是癌症病人在臨床治療上預後的一個重要指標，若能有效抑制癌細胞的轉移，將有助於延長癌症病患之壽命。龍葵在台灣民間俗稱烏子仔菜，屬野生植物，材料隨手可得，在前兩年的研究成果中已證實，龍葵確實具有抑制肝癌細胞生長、降低肝纖維化與肝癌之發生率的作用，適合發展為降低肝癌發生率之保健食品。而本篇中更証實，龍葵萃取物(SNWE 與 SNPE) 能夠有效抑制肝癌細胞的移行作用、浸潤作用，透過分析相關蛋白的表現發現，龍葵萃取物(SNWE 與 SNPE)能夠降低 PKC α 的表現，影響下游 p38 的磷酸化，進而影響細胞的移行作用。為了證明 PKC α 在龍葵萃取物抑制肝癌細胞轉移之重要性，我們以 PKC α 的抑制劑證實，抑制 PKC α 的活性確實能夠影響細胞之移動能力；而送入持續活化態的 PKC α 也證實能夠減少龍葵萃取物對於肝癌細胞的影響。最後利用不同的癌細胞證實，龍葵萃取物抑制癌細胞之轉移，並不侷限於肝癌細胞 HepG2。另一方面，在腫瘤細胞誘發雞胚胎尿囊膜產生血管新生作用試驗証實 SNPE 能夠抑制癌細胞週遭所誘發之血管聚集，同時，腫瘤細胞在實驗動物體內所誘發的血管新生作用試驗發現，SNPE 能夠抑制腫瘤內血紅素的數量，也證實龍葵萃取物確實具有抑制腫瘤細胞所誘導之血管新生作用。總括所有的結果可以說明，龍葵萃取物確實能夠抑制肝癌細胞的轉移，並影響腫瘤細胞所誘發的血管新生作用之產生，極適合發展為減緩癌症行程(process) 之保健食品。

關鍵詞：癌細胞轉移、龍葵萃取物、血管新生作用

英文摘要

Metastasis is one of the most complicated and major pathologic processes responsible for poor prognosis of cancer patients. Studies of the molecular mechanisms for these processes are important for developing more effective antimetastatic strategies. *Solanum nigrum L.* is a common herb that grows wildly and abundantly in open fields. In this study, we have demonstrated that the water extract of *Solanum nigrum L.* (SNWE) and polyphenol-rich extract of *Solanum nigrum L.* (SNPE) suppressed TPA-induced HepG2 cell migration and invasion. To investigate the mechanisms of inhibited migration by SNWE and SNPE, we observed that SNWE and SNPE could reduce the PKC α -p38 pathway, Rho GTPase family and integrin signal pathway. Overexpression of constitutively active PKC α may restore the inactivation of p38 and the attenuation of cell migration by SNWE and SNPE. This study may have valuable implications for developing new therapies for clinical patient.

前言

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，且對人體造成極大的傷害。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) 已被廣泛的應用為化學防癌物質(chemopreventive agents)，而龍葵目前已知之醫學功能有1.防止自由基所造成的DNA傷害，2.具有保肝作用，可保護肝臟免於四氯化碳誘導的肝損傷，3.誘導氮氧化物的產生，4.在TPA 所刺激的乳癌細胞MCF-7 中，能抑制細胞內轉錄因子NF- κ B 和AP-1 與DNA 結合的活性，5.在墨西哥的傳統醫學中已被視為鎮定神經之藥物，6.具有抑制小鼠肉瘤S-180 的活性，7.抑制乳癌細胞MCF-7 的生長及誘導細胞凋亡，8.降低膽固醇；中國大陸亦有多項醫學功能的報導，包括9.用於肝炎、肺癌、膀胱癌治療，10.輔助腫瘤治療，11.抑制腸癌乙烷轉移酶活性，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龍葵萃取物，分離其中富含之多酚以探討其對人類癌細胞之作用，及其中抗癌之分子機制。

目前世界上許多研究單位發現，癌細胞與正常細胞差別之一為無法進行一般細胞之凋謝死亡作用，因此生長無法控制，因此本研究首先探討龍葵成份及多酚促進癌細胞凋謝死亡及停止細胞週期、抑制惡化轉移、血管新生等作用，並探討其中之分子機制，進一步以動物模式探討其致癌作用及作用之機轉，俾以發展為降低癌症發生或減緩癌症行程(process) 之健康食品。

文獻探討

一、癌細胞的侵襲與轉移

癌細胞的轉移擴散(metastasis) 往往是癌症病人在臨床治療上預後的一個重要指標，在癌症的分期上，癌細胞的轉移擴散與否也是一個重要的分界，當腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部或原位癌。如果能在此階段進行治療則治癒率最高。當腫瘤細胞藉由血液、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長程續發性惡性腫瘤，就稱為轉移性癌(1)。大部分的原發性的病灶可以由外科手術及其他治療方式將其移除，但是轉移性癌因已擴散至身體各處，造成治療上的困難。一般而言，癌細胞的轉移擴散必須伴隨著細胞生理狀態的改變，其中包含了【1】細胞移動(motility) 和侵襲(invasion) 能力的增加;【2】細胞與細胞間相互作用力的破壞;【3】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM) 之間結合能力的增加(adhesion); 以及【4】細胞外基質的分解。而癌細胞的轉移擴散是由癌細胞穿過細胞外基質開始，緊接著侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管的新生成(angiogenesis)，奪取正常組織器官的養分而使癌細胞大量增生(proliferation) 造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。而癌細胞在轉移擴散的過程中，可分為侵襲(invasion) 及轉移(migration) 兩個階段，其中腫瘤細胞破壞基底膜(basal membrane) 以侵入周圍組織，便稱之為侵襲，而癌細胞藉由侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，便稱之為轉移。當正常細胞轉變成癌症細胞時，需要特殊的訊息傳導使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發癌細胞組織周圍血管增生以供應足夠的養分另外提升癌細胞對周圍組織的侵潤和轉移(2)。造成癌細胞轉移的機轉並不是很清楚，可能導因於某些基因的突變造成功能失調，如 Myc、Ras 及 p53 等。當 Myc 基因突變時會造成癌細胞具有抗凋亡的能力，這主要是因為 Myc 誘發 Bcl-XL 蛋白質的表現(3)。而 Ras 的突變在很多研究證實與腫瘤細胞轉移有關，其可能原因為 Ras-MAPK 訊息持續被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的大量表現，促使腫瘤細胞分解基底膜造成轉移(4-6)。p53 為轉錄因子它具調節細胞週期、幫助 DNA 修復以及引發不正常細胞凋亡防止細胞癌化(3)。造成腫瘤細胞轉移的另一種機轉是因生長因子及其受體過度表現或活化，常見的有 FGF、EGF、IGF、HGF、PDGF 等(7)。在此情況下，生長因子的訊息傳遞路徑會被持續性的激活，因而提高細胞生長速率、轉移及抗凋亡能力等。惡性腫瘤細胞會產生胞外基質分解酵素，包括有 serine proteinase、metalloproteinases (MMPs)、cathepsins、plasminogen activator (PA)，其中 MMP-9、MMP-2 及 u-PA 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移最有關。惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，在癌症等級增加時某些 MMPs 亦會相對的增加，而 MMPs 具有蛋白分解活性可分解膠原蛋白，在腫瘤破裂的基底膜處可測得大量的 MMPs，現已證實是用來作局部侵襲和遠處轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管滲入組織而達轉移之目的。

二、肝癌

癌症(惡性腫瘤)已長年佔據台灣十大死亡原因的第一名，而近年來肝癌又在癌症主要死亡原因中排行第二名(8)，根據流行病學統計結果指出：肝癌主要發生於東南亞、中國大陸沿海區域及撒哈拉沙漠以南之非洲國家，並且造成全球每年死亡人數至少達一百萬人(9)。

肝癌大致可分為原發性肝癌與轉移性肝癌兩種，原發性肝癌依組織型態學主要又可分成：肝細胞癌及膽管細胞癌；其中以肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, 簡稱 HCC) 所佔比例最高，因此是一般肝癌最常見的種類。

就目前已知肝癌的可能危險因子包括：B 型肝炎(10)、或 C 型肝炎病毒(11) 造成之慢性感染及肝硬化、代謝性及酒精性慢性肝病、肝毒性物質如黃麴毒素(12) 之暴露、肝硬化、家族有肝癌病人(13)、有肝病的既往史、紅血球 Rh 系統 c 抗原陽性等，此外，免疫機轉的缺陷、營養不良、感染、長期酗酒、服用過量藥物如類固醇、荷爾蒙、動情素及先天性新陳代謝之缺陷等，亦有報告和肝癌有關。

目前治療肝癌的方法包括化學療法、放射療法及外科手術法，為主要治療癌症的方向，但這些療法均為病患帶來了另一項沉重的負擔，如：化學療法，易產生嚴重的藥物毒性如：骨髓抑制、出血性膀胱炎...等；放射線療法，會造成正常細胞的傷害；外科手術法無法完全根除癌細胞。這些種種的副作用，導致病患在接受這些抗癌療法後，除了要承擔這些副作用外，又得面臨癌症隨時復發的可能性(14)。因此，找出新的抗癌藥物、新的治療方式，藉由誘發癌細胞分化或促使癌細胞重回正常的生長控制、及重新啟動喪失的程式凋亡反應(programmed cell death-apoptosis)，或阻止癌細胞進一步擴散，皆為目前研究之方向。

三、龍葵 (*Solanum nigrum*)

龍葵始載於《唐本草》。原名龍葵、又名苦菜。《圖經本草》名苦葵、老鴉眼睛草。《本草綱目》名水茄、天泡草。李時珍謂：『療癰疽腫毒』。龍葵為茄科植物，葉片為卵形帶有波狀邊緣，莖直立，多分枝，夏季開花，頂生，有 4~10 朵花，花梗下垂；花冠是白色，5 裂；雄蕊 5 花藥，頂端有 2 孔開裂；子房 2 室，花柱長，基部有絨毛。未成熟的綠色果實有毒性，成熟後就不具毒性，是烏黑剔透的漿果，一般人喜愛採食，滋味酸甜可口。全草含甾類生物鹼：茄邊鹼(澳洲茄邊鹼, Solamargine, $C_{45}H_{73}O_{15}N$)、茄達鹼(Solasodamine, $C_{51}H_{82}O_{20}N$)、茄解鹼(澳洲茄鹼, Solasonine, $C_{45}H_{73}O_{16}N$)、茄微鹼(Solavilline, $C_{50}H_{81}O_{20}N$)、醣苷類、醣蛋白、多酚及皂苷。入肺、胃、膀胱經。苦，寒。有小毒。龍葵在台灣民間俗稱烏子仔菜，屬野生植物，為農田雜草，民間有取其幼苗，嫩葉炒熟當菜食用，也有取其成熟的果實食用，也有取幼苗或嫩葉搗碎外敷消癰疽腫毒、跌打瘀傷。龍葵萃取物在動物實驗中具有抗發炎的效果(15-17)，傳統中藥多用於：清熱、解毒、活血、消腫。在中國大陸有相當多篇關於龍葵的基礎與臨床的研究報告，但大多是以含有龍葵之複方為主要的研究方向。龍葵及含有龍葵之複方被廣泛地用在各種晚期的惡性腫瘤及惡性腫瘤的術後治療當中，目前已知，龍葵或含有龍葵之複方對於胃癌(18-20)、肺癌(21, 22)、膀胱癌(23)等皆有顯著地療效，

但是多以含龍葵之複方為主，至於其中有效成分是否為龍葵卻沒有肯定的答案，且其中是透過何種路徑，來達到抑制腫瘤生長或延緩惡化的機制也並沒有說明。

研究目的

近年來由於飲食習慣及環境改變的種種因素，導致了許多慢性病的高發生率，而其中癌症的致病機轉不外乎與自由基及過氧化物的生成有關。目前許多研究趨向以探討天然物中所含的成份，是否具有預防疾病發生之功能為目的，而如何藉由中草藥之特性與發展，提升對於腫瘤的治療與預防，將是值得我們深入討論的議題，現今癌症的治療方式，大多採用手術摘除、放射線治療或是投予化學藥物，皆會對人體造成極大的傷害，及伴隨著相當程度的副作用。現今許多研究趨向以天然藥物來達到其治療的目的，因此本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成份，希望可以由攝取食品來達到預防腫瘤發生之目的。龍葵在台灣民間俗稱黑甜仔，在南部及東部常取其葉子炒熟當菜食用，在傳統與現代的科學記名有多項的醫學功能，包括治療肝炎、癌症、降血脂、抗氧化、抑制突變、保護DNA 修補功能、增加解毒等，然而其生物活性及醫學作用仍有待進一步探討，故希望藉由本研究能夠進一步探討及確認其醫學功能，做為發展為健康食品之依據。

研究方法

1. 龍葵水萃取物(SNWE) 的製備

稱取 825 公克龍葵，將稍微清洗龍葵後修剪成較小片段，加水至覆蓋龍葵，靜置隔夜。將靜置隔夜之龍葵熬煮至沸騰後悶煮 40 分鐘，重複上述動作 3 次，將取得之汁液過濾去除雜質後，放置於烘箱中乾燥去除水分，在將乾燥後之萃取物磨碎分裝，所得到的粉末即為龍葵水萃取物之乾躁粉末(SNWE)，得到產率為 10.64%，其中約含有 20.07% 的多酚成份，14.92% 的多醣體以及 4.81% 的蛋白質(Tab. 1)，而後將其冰在-20°C 冰箱存放。後續之實驗進行均以此龍葵水萃取物乾燥粉末配製進行。在進行各種細胞實驗操作時，由 SNWE 配置成的各濃度溶液均需先經 0.22 μm filter (MILLEX[®]-HA) 過濾除菌方可進行細胞實驗。

2. 龍葵多酚萃取物(SNPE) 的製備

稱取 100 克乾燥龍葵粉末，以 300 毫升甲醇溶液浸泡，水浴 50°C，3 小時後過濾收集，連續 3 次，將濾液進行減壓濃縮乾燥，加 50°C，500 毫升二次水溶解，將濃縮之溶液加入 200 毫升己烷移除色素，取水層(下層)加入 180 毫升乙酸乙酯萃取後取上層溶液，連續萃取 3 次，進行減壓濃縮乾燥，最後加 250 毫升二次水溶解，冰在-70°C 放置隔夜，再經真空冷凍乾燥機乾燥為粉末，所得到的粉末即為多酚，產率為 2.31%，其中約含有 58.36% 的多酚成份，11.32% 的多醣體以及 5.37% 的蛋白質(Tab. 1)。另可稱重以配取不同濃度龍葵多酚萃取物(SNPE) 溶液。

3. 細胞培養(cell culture)

本實驗所使用的細胞自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之人類肝癌細胞—HepG2 cells。細胞解凍後培養於含有 10% Fetal bovine serum、1.5 g/L Sodium bicarbonate、4 mM glutamine、1 mM Penicillin -Streptomycin 的 modified Eagle's medium 培養液中。將培養箱設定 5% CO₂、37°C 的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。

5. 細胞移動性分析(migration assay)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，在 lower chamber 中含有 50 nM TPA 的培養液，用以誘導 HepG2 細胞移動(migration)；將事先處理不同劑量的 SNWE 或 SNPE 的細胞以 trypsin-EDTA 打下，用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞(5×10^4) 於 upper chamber，待細胞移動 24 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 100 \times 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 5 個視野，數 4 個 well，作移動細胞數之統計。

6. 細胞侵入性分析(invasion assay)

利用 48 well Boyden chambe 的分析方法，事先在薄膜上處理 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel，並在 laminar flow 風乾 3~5 小時(視天氣而定)，lower chamber 為含有 50 nM TPA 的培養液，將事先處理不同劑量的 SNWE 或 SNPE 的細胞以 trypsin-EDTA 打下，並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞(5×10^4) 於 upper chamber，待細胞移動 24 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 100×顯微鏡底下每個 well 隨機選取 5 個視野，數 4 個 well，作移動細胞數之統計。

7. 抑制人類肝癌細胞遷移機制之探討

與細胞遷移有關之蛋白有 PKC α 、p38、ERK1/2 等。故分析 SNWE 與 SNPE 所抑制細胞遷移的路徑，將有助於我們釐清其相關機轉。

7-1. 西方點墨法(western blotting)

7-1-1. 細胞溶解物 (cell lysate) 之製備

將培養皿內培養液吸走，以 PBS 沖洗細胞二次，細胞收集起後，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer)，及蛋白質水解酶抑制劑，在 4 °C 下震盪 30 分鐘，4 °C 高速離心 10,000× g，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -70°C。取定量之 whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入 5 倍追蹤染劑 (loading dye)，混合均勻，以 100 °C 加熱 10 分鐘，再迅速置於冰上，即可。

7-1-2. 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

首先將電泳液 (running buffer) 倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後，持續加入新的電泳液直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽以回收的電泳液補至蓋過電導線為止。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 伏特的電壓跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電壓為 100 伏特，當色帶跑至底線時才停止電泳。

7-1-3. 蛋白質樣本之轉漬 (electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經轉漬液 (transfer buffer) 潤濕過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同之硝化纖維紙 (硝化纖維紙也需事先經轉漬液浸濕)，再放上兩張經轉漬液浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板(內含海綿襯墊)夾緊，放入轉漬槽中，同時要將轉漬槽放在冰上，以固定 300 毫安培轉漬 2 個小時。

7-1-4. 免疫墨點法 (immunoblotting)

轉漬完後將硝化纖維紙取出，用 TBS buffer 漂洗數分鐘，再以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用。之後，倒掉 blocking buffer，再以 TBS-tween 漂洗三次 10 分鐘。換上一級抗體，置於 4 °C 下，作用 12~16 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘。接著，換上二級抗體，於室溫下溫和作用 1 小時，再以 TBS-tween buffer 漂洗三次 10 分鐘。最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測。

7-2. 轉殖 (transfection)

感謝中山醫學大學 生化暨生物科技研究 劉哲育教授所提供之持續活化態之 PKC α 之質體 DNA (constitutively active PKC α)。於 60 mm 的培養皿中，種 1.5×10⁶/2ml 的 HepG2 細胞，並以完整 MEM medium (含有 10% 的 FBS 及 1% PS、200 mM L-glutamine、100 mM NEAA、100 mM Sodium Pyruvate)，培養 24 小時後作基因轉殖。

準備兩個滅過菌的 1.5 ml 離心管，每一管各加入 0.5 ml 不含抗生素及血清之培養液，其中一管加入 8 μ g 的 DNA，另一管加入 10 μ l 的 LIPOFECTAMINE reagent。將這兩管混合在一起，充分混合均勻(利用 tip 吸放至少 60 次以上，增

加碰撞機率)。然後在室溫靜置 45 分鐘，讓 DNA 和 liposome 形成 complex。

此時將細胞培養液置換成 2 ml 同樣不含抗生素及血清之 MEM medium，放入 37°C 的培養箱中備用。

當 DNA 和 liposome 作用時間到時，即先將 dish 中的細胞培養液去除，加入 0.8 ml 不含抗生素及血清的培養液 (HepG2) 及 DNA 和 liposome 所形成之複合體 complex (利用剪去尖端的 1 ml tip 吸起)，放入 37°C 的培養箱中培養，進行基因轉殖。

轉殖經過 6 小時後，換掉含有藥劑的培養液，加入 2 ml 含有 10 % FBS 之完整生長培養液，依實驗需要在不同時間點收細胞，後續做西方點墨法(western blotting) 或細胞移動能力分析(migration assay)。

8. 血管新生作用

癌細胞的轉移(metastasis) 對於腫瘤的發展非常重要，也是決定癌症病患死亡率與發病率的主因，轉移可定義為癌細胞離開原來的腫瘤(primary tumor)，移動到鄰近的血管中，至其他組織或器官形成第二腫瘤(secondary tumor)；而血管新生作用(angiogenesis)在這過程中扮演一個相當重要的步驟。新血管的形成主要就是提供第二腫瘤所需的養分，在這期間癌細胞會存活於循環系統中，直到進入微血管，穿透血管壁，侵入附近的組織，之後不斷增殖，而形成一個新的腫瘤塊。

8-1. 腫瘤細胞誘發雞胚胎尿囊膜產生血管新生作用試驗

[Tumor angiogenesis assay using chicken chorioallantoic membrane (CAM)]

為了探討龍葵萃取物血管新生作用的影響，我們首先利用雞胚胎外層所佈滿細小微血管的尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM) 作為研究平台，再利用腫瘤細胞誘使微血管的產生聚集，伴隨SNPE 的加入，藉以觀察SNPE 是否具有抑制血管新生作用之功效。

取人類肝癌細胞HepG2 1×10^7 cell/ml 以PBS作成細胞懸浮液，再加入50% (v/v) 的Matrigel 充分混合均勻，再選擇加入加入不同劑量的SNPE 後，於雞胚胎的尿囊膜上滴入30 μ l 的體積，連續培養四天後，觀察並計數細胞團塊週遭所產生的血管數量，以評估SNPE 對於血管新生作用之影響。

8-2. 裸鼠體內血管新生作用試驗 (Matrigel plug assay)

取人類肝癌細胞HepG2 5×10^6 cell/ml 以PBS 作成細胞懸浮液，再加入50% (v/v) 的Matrigel 充分混合均勻，再選擇加入不同劑量的SNPE。將五週大之裸鼠以每組五隻為單位隨機分為四組，分別為單獨Matrigel 的控制組，於裸鼠的下背部兩側單獨注入400 μ l 的Matrigel 與200 μ l 的PBS；HepG2 誘導組，於裸鼠兩側注入400 μ l Matrigel 與200 μ l HepG2 細胞的混合液；以及兩個SNPE 加藥組，於裸鼠兩側注入400 μ l Matrigel、200 μ l HepG2 細胞與0.25 mg/ml 或0.5 mg/ml 之SNPE 的混合液。在完成注射動作後，以正常飼料餵食15天後犧牲，觀察腫瘤細胞週遭的血管新生情形。接著將腫瘤以PBS 浸泡，將腫瘤中之血紅素溶出，以13200 rpm 離心10 分鐘後取上清液20 μ l，加入1 ml的Drabkin's reagent 試劑 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 避光反應15 分鐘，於540 nm 下測定吸光值，定量出血紅素的變化，藉以評估腫瘤中血管新生的情形。

9. 統計分析

試管外及細胞實驗過程每組皆三重複以上，採用 Student's t-test 統計分析，凡 $p < 0.05$ 以下時表示為有意義的差異。

研究結果

細胞移動性分析

本試驗是採用 Boyden chamber 的分析方法來觀察 SNWE 或 SNPE 抑制肝癌細胞移行(migration)的能力。由於人類肝癌細胞本身之移動性較低，選用一般的誘導物質(如：血清)，並不能有效地誘導肝癌細胞出現移行現象。根據文獻指出，TPA 能夠有效提升 HepG2 細胞的移行能力，故後續實驗選用 50 nM TPA 作為誘導物質，藉以評估龍葵萃取物抑制肝癌細胞之移行作用，甚至侵入性能力分析(24)。故先以 MTT 試驗，找出 SNWE 與 SNPE 對於 HepG2 細胞的毒性劑量，再選以小於半致死劑量之劑量作為後續研究之標準(Fig. 1)。結果發現，隨著事先處理 SNWE 或 SNPE 濃度的增加，細胞移行的能力有顯著地下降趨勢，因此證實了 SNWE 與 SNPE 確實具有抑制肝癌細胞移行能力的效用(Fig. 2-3)。由以上結果推論，SNPE 抑制 HepG2 細胞移行的效果比 SNWE 要來的有效，且選用的劑量皆低於 SNWE，所以可以得知 SNWE 之所以可以抑制細胞移行之主要成分，可能就是多酚。

細胞侵入性分析

本試驗除採用 Boyden chamber 的分析方法外，尚利用了額外鋪設 metrigel，增加細胞移行的困難度，藉此來觀察細胞是否具有更為強烈的移動能力(或稱浸潤現象，invasion)，故可由此來評估 SNWE 或 SNPE 抑制肝癌細胞浸潤的能力。結果發現，隨著事先處理的 SNWE 或 SNPE 濃度增加，細胞浸潤到 chamber 下層的數目有減少的趨勢，因此證實 SNWE 與 SNPE 確實具有抑制肝癌細胞浸潤能力的效用(Fig. 4)。由結果中可發現，SNPE 抑制 HepG2 細胞浸潤的效果明顯優於 SNWE，且有效劑量顯著低於 SNWE，所以可以得知 SNPE 具有抑制肝癌細胞移行能力，甚至能夠抑制更為惡化的浸潤現象。而在 Fig. 3 中也可得知，原本在 SNWE 濃度為 1 mg/ml 時，就可有效抑制 HepG2 細胞的移行現象，但是在評估 SNWE 的抑制細胞浸潤能力時，同一濃度卻沒有辦法有效地減少細胞浸潤的數目，顯示 SNWE 雖然對於細胞的移行能夠有效地抑制，但是對於細胞展現更為強烈的浸潤現象時，卻會失去其抑制之效果(Fig. 4)。

抑制人類肝癌細胞遷移機制之探討

由於之前的實驗結果證實，龍葵萃取物(SNWE 與 SNPE)皆能夠有效地抑制 TPA 所誘導的移行作用，甚至浸潤作用，因此我們接下來進一步分析龍葵萃取物抑制肝癌細胞遷移之作用，是透過影響哪些蛋白之變化。TPA 是一種已知的促癌劑，也已被證實會透過活化 PKC α 蛋白調控細胞之生理作用(25)。故本機制探討中，皆以 50 nM 之 TPA 處理，並加入不同劑量之 SNWE 或 SNPE，經過 24 小時後，收集細胞蛋白萃取物，以西方點墨法觀察細胞內蛋白質的變化。首先我們先觀察龍葵萃取物對於 TPA 誘導後 PKC α 的變化，結果發現，龍葵萃取物確實能夠降低 PKC α 的表現量，無論是 SNWE 或是 SNPE 皆發現能夠有效抑制 PKC α 的表現，且有呈現劑量依賴性(dose-dependent)的趨勢(Fig. 5)。接著我們觀察位於 PKC α 下游的蛋白 MAPK 家族成員，MAPK 家族成員主要有 ERK1/2、p38 與

JNK1/2，皆已被證實與許多細胞的遷移作用有密切相關(26)。於是我們觀察 MAPK 家族成員之變化，發現 SNWE 能夠降低 p38 蛋白的磷酸化表現，但是卻對於其他的 ERK 或 JNK 成員之磷酸化變化沒有影響(Fig. 6 A)；同樣的，SNPE 也能夠對 p38 的磷酸化現象有所降低，但是也對 ERK1 的磷酸化現象有所抑制，可是同樣也對 JNK 的磷酸化現象沒有影響(Fig. 6 B)。而龍葵萃取物是否僅透過如此的訊息傳遞就能夠影響肝癌細胞的轉移，尚待進一步的研究，是否還有其他更上游的蛋白有受到其調控，也需要更進一步的分析。

PKC α 的抑制劑降低 HepG2 細胞的遷移作用

為了確認 PKC α 在細胞遷移作用中扮演一個重要的角色，龍葵萃取物也是透過降低 PKC α 的表現量，進而抑制 HepG2 細胞的移行作用，所以使用不同的 PKC α 抑制劑，有 Go-6983 (29)、Ro-32-0432 (30)，藉由不同的 PKC α 抑制劑觀察，是否抑制 PKC α 的活性確實能夠降低細胞的移行作用。結果顯示，抑制劑皆能夠有效降低 HepG2 細胞的移行數目(Fig. 7)，此一結果也符合龍葵萃取物(SNWE 或 SNPE) 的發現。

持續活化態 PKC α 減低龍葵萃取物抑制 HepG2 的移行作用之效果

進一步要確認 PKC α 蛋白對於龍葵萃取物抑制細胞移行作用之重要，因此我們在 HepG2 細胞內送入持續活化態的 PKC α ，以西方點墨法確認持續活化態的 PKC α 送入之效果，因為此一 construct 之設計原理是僅保留 PKC α 的 kinase domain 部位，故出來的產物較小，僅有 50 kDa (Fig. 8 A)(32)。成功在細胞中表現持續活化態的 PKC 並不會受到龍葵萃取物的加入而有所變化(Fig. 8 B)，因此我們接著觀察送入此以持續活化態的 PKC 是否會影響龍葵萃取物對於細胞內蛋白質表現量的調控。結果發現，持續活化態的 PKC 能夠有效減低 SNWE 與 SNPE 對於 ERK1 的磷酸化調控，而且持續活化態的 PKC 也能夠降低 SNWE 對於 p38 磷酸化的影響，但是卻無法完全減低 SNPE 對於 p38 磷酸化的抑制(Fig. 8 C)，顯示 SNPE 尚可能有透過其他的機制去影響 p38 的磷酸化。接著我們陸續觀察持續活化態的 PKC α 是否能夠確實地減低 SNWE 與 SNPE 對於肝癌細胞的遷移作用之影響，結果發現，在細胞遷移試驗中可以得知。持續活化態的 PKC α 確有提高在 SNWE 處理下的肝癌細胞遷移之數目，但是 SNPE 卻仍具有相當程度的抑制細胞遷移之效果，意味著 SNPE 並不是僅靠調控 PKC α 蛋白的表現而去抑制肝癌細胞的移行作用(Fig. 9)。

龍葵萃取物對於抑制其他種類的癌細胞移行作用之效果

為了進一步確認龍葵萃取物抑制癌細胞之能力，我們選用其他不同種類的癌細胞進行細胞移動性分析，以 SNWE 或 SNPE 事先處理乳癌細胞(MDA-MB-231) 與腸癌細胞(HT-29) 後，經過 24 小時，同樣以 TPA 誘導誘導癌細胞產生遷移之作用，24 小時後，計數遷移的細胞數目，結果發現，龍葵萃取物確實具有抑制癌細胞轉移之能力，其中以 SNWE 對於 MB-231 的效果最為顯著，而 SNPE 則對 HT-29 的效果最好(Fig. 10)，顯示龍葵萃取物對於其他種類的癌細胞具有相似之作用，再一次證實龍葵萃取物具有抑制癌細胞轉移之能力。

龍葵多酚萃取物抑制血管新生作用

腫瘤細胞誘發雞胚胎尿囊膜產生血管新生作用試驗

[Tumor angiogenesis assay using chicken chorioallantoic membrane (CAM)]

因此我們接著觀察對於抑制效果較為顯著的龍葵多酚萃取物(SNPE) 對於血管新生作用的影響。結果發現，在雞胚胎的血管新生作用試驗中，單獨的Matrigel 雖然會誘導微量的血管新生作用，可是可以清楚地看出在有肝癌細胞HepG2 的加入之後，其細胞團塊週遭所誘發的血管新生作用更為顯著，而隨著SNPE 0.25 mg/ml 與0.5 mg/ml 的加入，HepG2 細胞團塊週遭所誘發的血管數量皆有顯著地減少約19.81% 與44.00% (Fig. 11)。

裸鼠體內血管新生作用試驗 (Matrigel plug assay)

腫瘤細胞以皮下注射於裸鼠活體動物中，觀察腫瘤細胞所誘導之血管新生作用，伴隨著不同劑量的SNPE 加入，評估SNPE 對於血管新生作用的影響。結果發現，單獨的Matrigel 並不能引起血管新生作用之產生，這點與CAM 試驗中有所不同，但是在有癌細胞HepG2 的腫瘤中，明顯可以看到腫瘤遍佈暗紅色的團塊，顯示腫瘤當中富含豐富的紅血球，意味著癌細胞確實有誘發血管新生作用之產生，而在有加入SNPE 的藥劑組中，隨著SNPE 的劑量的增加，可以明顯看到腫瘤中的暗紅色區塊的減少，暗示SNPE 具有抑制血管新生作用之功效(Fig. 12)。利用Drabkin's reagent 試劑將腫瘤中的血紅素定量，評估SNPE 對於癌細胞所誘發的血管新生作用之影響。根據結果顯示，腫瘤中確實富含血紅素，意味著血管新生作用之旺盛，而在加入SNPE 之後，0.25 mg/ml 的劑量即降低了腫瘤中72.61% 的血紅素數量，而0.5 mg/ml 的SNPE 更顯著地減少97.08% 的血紅素數量，顯示SNPE 確實具有抑制腫瘤細胞所誘發的血管新生作用之能力(Fig. 13)。

討論

龍葵萃取物抑制癌細胞之轉移

癌細胞的轉移作用在癌症發展過程當中扮演相當重要的角色，因此探討天然萃取物對於癌細胞的轉移作用之影響，實為目前研究癌症發展之重要方向。在前兩年的研究成果中已證實，龍葵確實具有抑制肝癌細胞生長、降低肝纖維化與肝癌之發生率的作用，適合發展為降低肝癌發生率之保健食品。在本篇報告中，顯示龍葵萃取物具有抑制肝癌細胞轉移作用之能力。由本篇研究的初步結果可以得知，龍葵萃取物具有抑制肝癌細胞轉移之能力，SNWE 在低劑量 0.2 mg/ml 時就能夠抑制肝癌細胞的移行數目，但是再分析進一步的侵潤作用時，卻似乎失去其抑制的效果，顯示細胞的移行作用(migration) 與侵潤作用(invasion) 之中尚有某些特殊的機制存在，影響著細胞這兩種相似卻又不相同的生理作用，若能找出其中之路徑變化，相信對於了解癌症之研究將更進一步；不同於 SNWE，SNPE 在低劑量 0.2 mg/ml 時對於肝癌細胞的移行、侵潤作用皆有相當程度的抑制效果，而在本篇的結果也可顯示 SNPE 之抑制效果卻有比 SNWE 要來的好，但是不管是 SNWE 或是 SNPE，似乎也擁有抑制其他種類的癌細胞轉移之可能，但是所調控之路徑機制是否相同，尚需要更進一步的證明。在研究龍葵萃取物抑制肝癌細胞轉移之路徑機制時，雖然發現 SNWE 與 SNPE 對於 PKC α 及其下游的 MAPK 家族有所調控，但是否有其他的調控機制需要再更進一步去證實，如以龍葵萃取物所影響蛋白的時間點變化，搭配抑制劑或大量表現特定蛋白的載體(overexpression construct)，說不定可以推斷出這些路徑的先後順序，將有助於幫助我們了解龍葵萃取物對細胞移行作用之影響。

龍葵萃取物抑制血管新生作用

過去的研究成果已顯示，龍葵萃取物確實具有抑制肝癌細胞的生長，促進肝癌細胞產生細胞凋亡或細胞週期停滯等現象；而在化學性誘導肝癌產生之動物模式中，也證實龍葵萃取物具有抑制肝癌發生率之功效；而目前的研究結果也顯示，龍葵萃取物似乎也具有抑制腫瘤細胞所誘導之血管新生作用之發生，意謂龍葵萃取物對於減緩癌症之發生確實具有一定之功效。

參考文獻

1. Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2: 563-572, 2002.
2. Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2: 657-672, 2002.
3. Conner, E. A., Teramoto, T., Wirth, P. J., Kiss, A., Garfield, S., and Thorgeirsson, S. S. HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis*, 20: 583-590, 1999.
4. Zhang, Y., Thant, A. A., Machida, K., Ichigotani, Y., Naito, Y., Hiraiwa, Y., Senga, T., Sohara, Y., Matsuda, S., and Hamaguchi, M. Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res*, 62: 3962-3965, 2002.
5. Webb, C. P., Taylor, G. A., Jeffers, M., Fiscella, M., Oskarsson, M., Resau, J. H., and Vande Woude, G. F. Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene*, 17: 2019-2025, 1998.
6. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49: 4682-4689, 1989.
7. Giatromanolaki, A. Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 21: 4373-4382, 2001.
8. 行政院衛生署台灣地區死亡原因歷年統計資料. 2006.
9. Okuda, K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 32: 225-237, 2000.
10. Merican, I., Guan, R., Amarapura, D., Alexander, M. J., Chutaputti, A., Chien, R. N., Hasnian, S. S., Leung, N., Lesmana, L., Phiet, P. H., Sjalfoellah Noer, H. M., Sollano, J., Sun, H. S., and Xu, D. Z. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol*, 15: 1356-1361, 2000.
11. Okuda, K., Fujimoto, I., Hanai, A., and Urano, Y. Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res*, 47: 4967-4972, 1987.
12. Jackson, P. E. and Groopman, J. D. Aflatoxin and liver cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 13: 545-555, 1999.
13. 何康潔 有計劃的細胞凋亡 (apoptosis): 其存在、機轉及與疾病的關係。 *當代醫學*, 23: 785-789, 1996.
14. 李權益, 高藪嫻. 分子醫學: 愛滋病、癌症、老年癡呆症. 1997.
15. 楊再義 台灣植物名彙. 1138, 1982.
16. 李時珍 本草綱目. 明.
17. 蔣廷錫 草木典下冊. 164: 43, 1998.
18. 歐鈺萍 胃癌的中醫中藥中西醫結合治療研究進展. *廣西醫學*, 20: 392-396, 1998.
19. 陳飛松, 任蜀兵, 李春梅, 劉晉生, 郭培元, 危北海, 施波, 傅招娣, 雷小紅.

- 中藥龍方抑制實驗性胃腫瘤的作用. 世界華人消化雜誌, 7: 898-899, 1999.
20. 周蘭, 尹蓮芳. 治療胃癌的經驗. 遼寧中醫雜誌, 26: 242, 1999.
 21. 張書元, 李長春, 李洪奎, 白龍沖劑聯合 CAP 方案治療晚期肺癌臨床觀察. 華北煤炭醫學院學報, 2: 380, 2000.
 22. 羅開明, 沈立平, 張嵐. 中西醫結合治療中晚期肺癌 14 例. 右江醫學, 27: 105-106, 1999.
 23. 雷相明 中西醫結合治療膀胱腫瘤術後 30 例. 中國民間療法, 12: 16, 1999.
 24. Wu, W. S., Tsai, R. K., Chang, C. H., Wang, S., Wu, J. R., and Chang, Y. X. Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell HepG2. *Mol Cancer Res*, 4: 747-758, 2006.
 25. Wen-Sheng, W. ERK signaling pathway is involved in p15INK4b/p16INK4a expression and HepG2 growth inhibition triggered by TPA and Saikosaponin a. *Oncogene*, 22: 955-963, 2003.
 26. Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M. D. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*, 117: 4619-4628, 2004.
 27. Evers, E. E., Zondag, G. C., Malliri, A., Price, L. S., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer*, 36: 1269-1274, 2000.
 28. Guo, W. and Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 816-826, 2004.
 29. Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H. J., and Johannes, F. J. Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett*, 392: 77-80, 1996.
 30. Wilkinson, S. E., Parker, P. J., and Nixon, J. S. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J*, 294 (Pt 2): 335-337, 1993.

第三年

- 實驗結果附圖 -
第一部份

Table 1. Dry Weight, Polyphenol, Polysaccharide, and Protein Content of Water Extract of SNWE

	SNWE (%)	SNPE (%)
Yield	10.64 ± 2.10	2.31 ± 0.05
Polyphenol	20.07 ± 0.69	58.36 ± 0.11
Polysaccharide	14.92 ± 1.33	11.32 ± 0.91
Protein	4.81 ± 0.42	5.37 ± 0.55

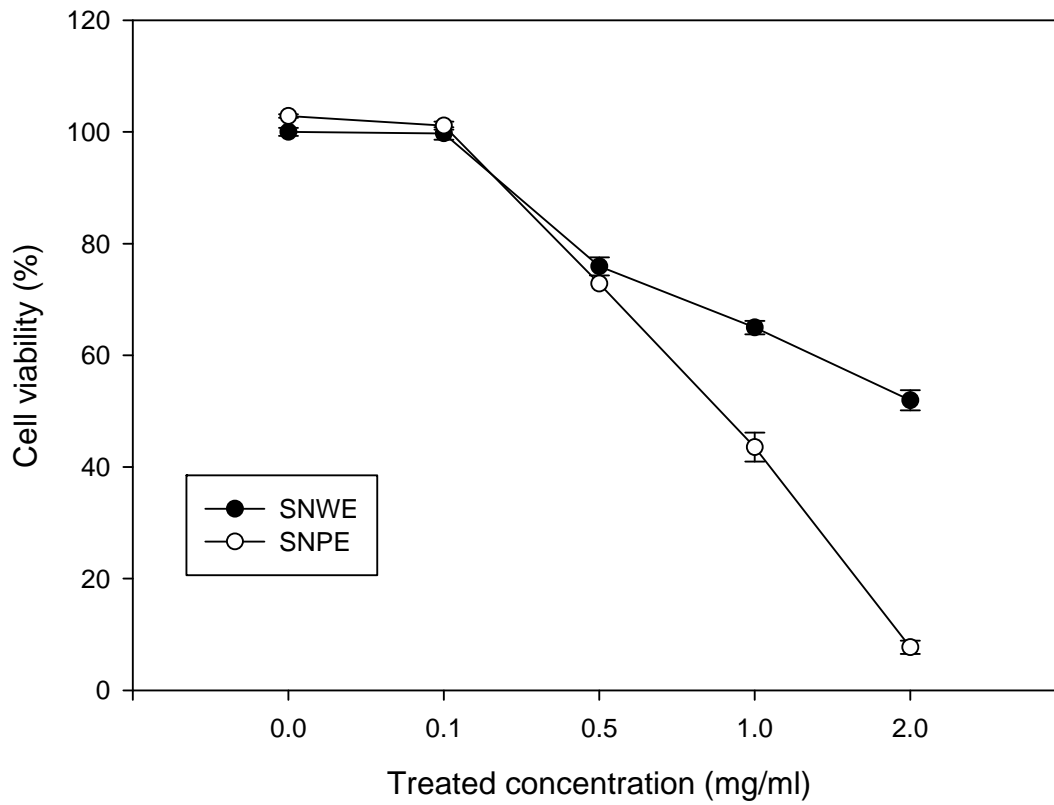


Fig. 1. The cytotoxicity effects of SNWE or SNPE on human hepatocarcinoma cell line. HepG2 cell was incubated with different concentration SNWE or SNPE (0.1 ~ 2 mg/ml) in 37°C for 24 hrs. The data were means \pm SD for three replicates per treatment.

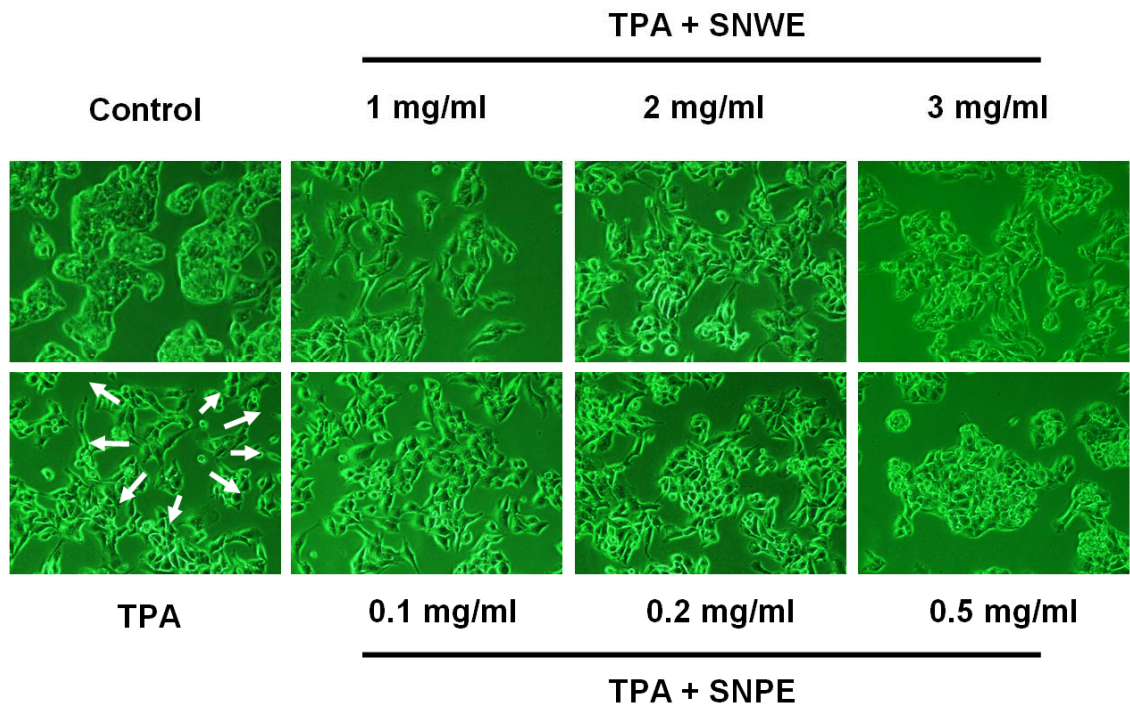
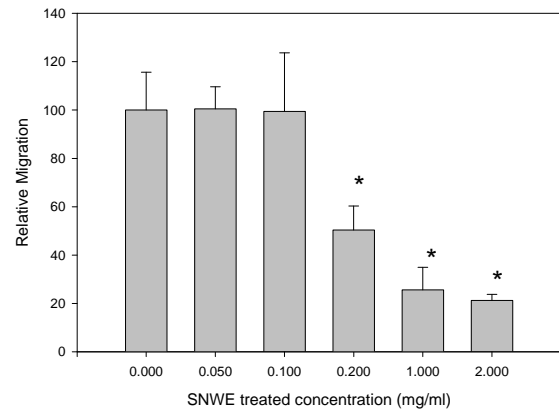
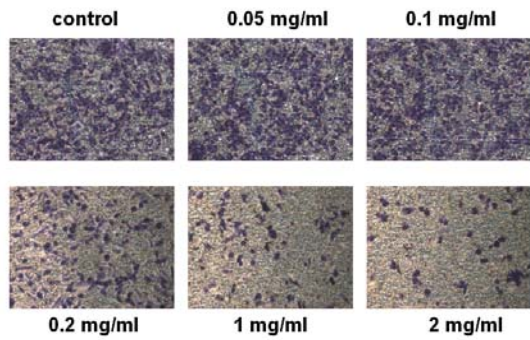


Fig. 2. SNWE and SNPE inhibit TPA-induced scattering of hepatoma cells. HepG2 cells were untreated (control) or treated with 50 nM TPA (TPA) coupled with various doses of SNWE or SNPE for 24 hrs. EMT-like morphology change of HepG2 cell was observed under a light microscope. The arrow showed the cell scattering by TPA induced. The cells were photographed under x100 magnification. Representative of at least three experiments.

(A)



(B)

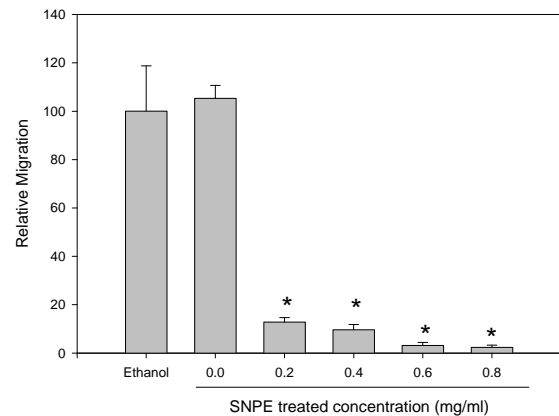
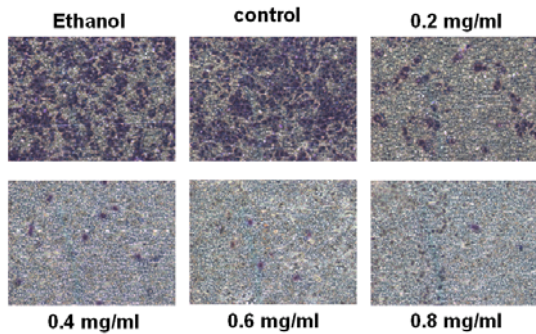
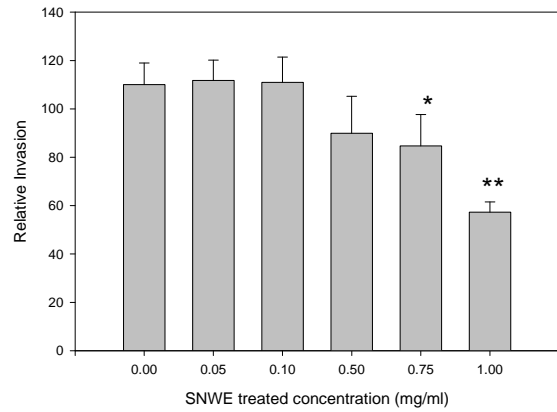
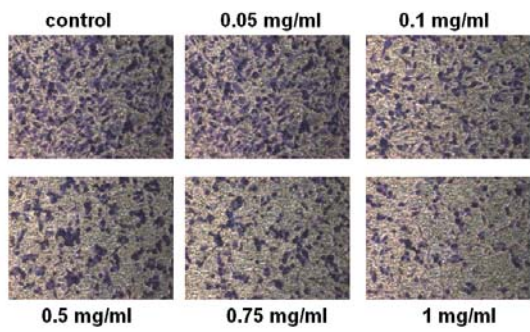


Fig. 3. SNWE and SNPE inhibited TPA-induced migration in hepatoma cells.

HepG2 cells were pre-treated with various doses of SNWE or SNPE for 24 hrs. Cells (5×10^4) were seeded onto the upper chamber for 24 hrs. The TPA (50 nM) was applied to the lower chamber as a chemoattractive agent. Cells that had migrated or invaded to the lower surface of the membranes were counted under a light microscope. Relative quantitation of the migrated cells was done. The migration of TPA-treated samples was taken as 100% in each experiment. Each result was obtained from average of at least three separate experiments. The migratory effect inhibited by SNWE or SNPE was analyzed by t test.

(A)



(B)

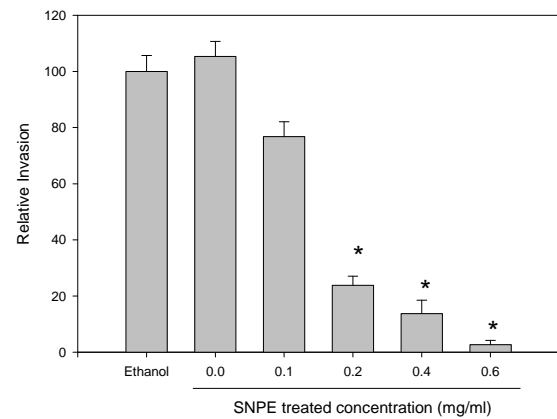
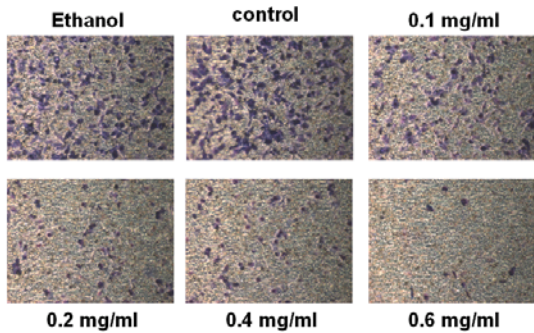
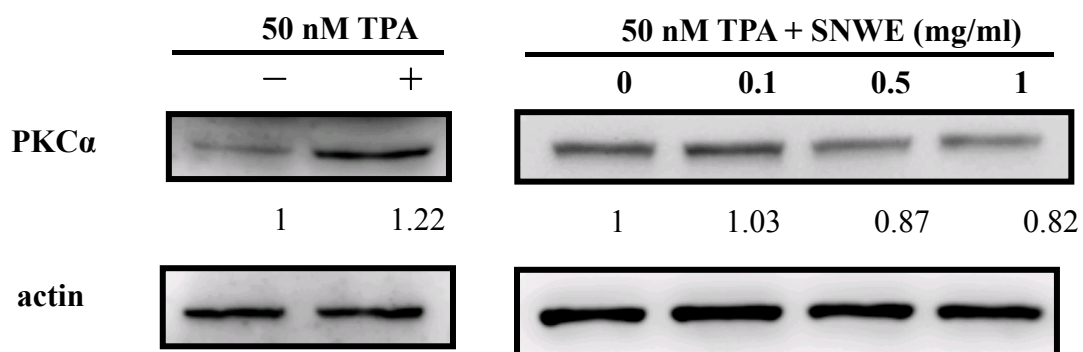


Fig. 4. SNWE and SNPE reduced TPA-induced invasion in hepatoma cells.

HepG2 cells were pre-treated with various doses of SNWE or SNPE for 24 hrs. Cells (5×10^4) were seeded onto the upper chamber consisting of 8- μ m pore-size filters coated with Matrigel basement membrane matrix for 24 hrs. The TPA (50 nM) was applied to the lower chamber as a chemoattractive agent. Cells that had migrated or invaded to the lower surface of the membranes were counted under a light microscope. Relative quantitation of the migrated cells was done. The migration of TPA-treated samples was taken as 100% in each experiment. Each result was obtained from average of at least three separate experiments. The migratory effect inhibited by SNWE or SNPE was analyzed by t test.

(A)



(B)

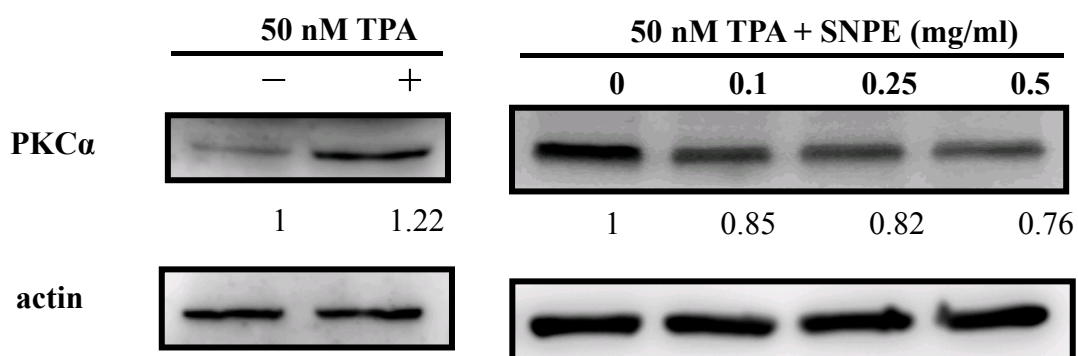


Fig. 5. SNWE and SNPE reduced PKC α protein expression in human hepatocarcinoma cells. SNWE and SNPE reduced the expression of PKC α in hepatocarcinoma HepG2 cells. The HepG2 cells were treated with 50 nM TPA coupled with SNWE or SNPE for 24 hrs. After the cells were harvested, western blot analyses were done with anti- PKC α and actin antibodies as described in the Materials and Methods. Results from a representative experiment are shown. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to actin

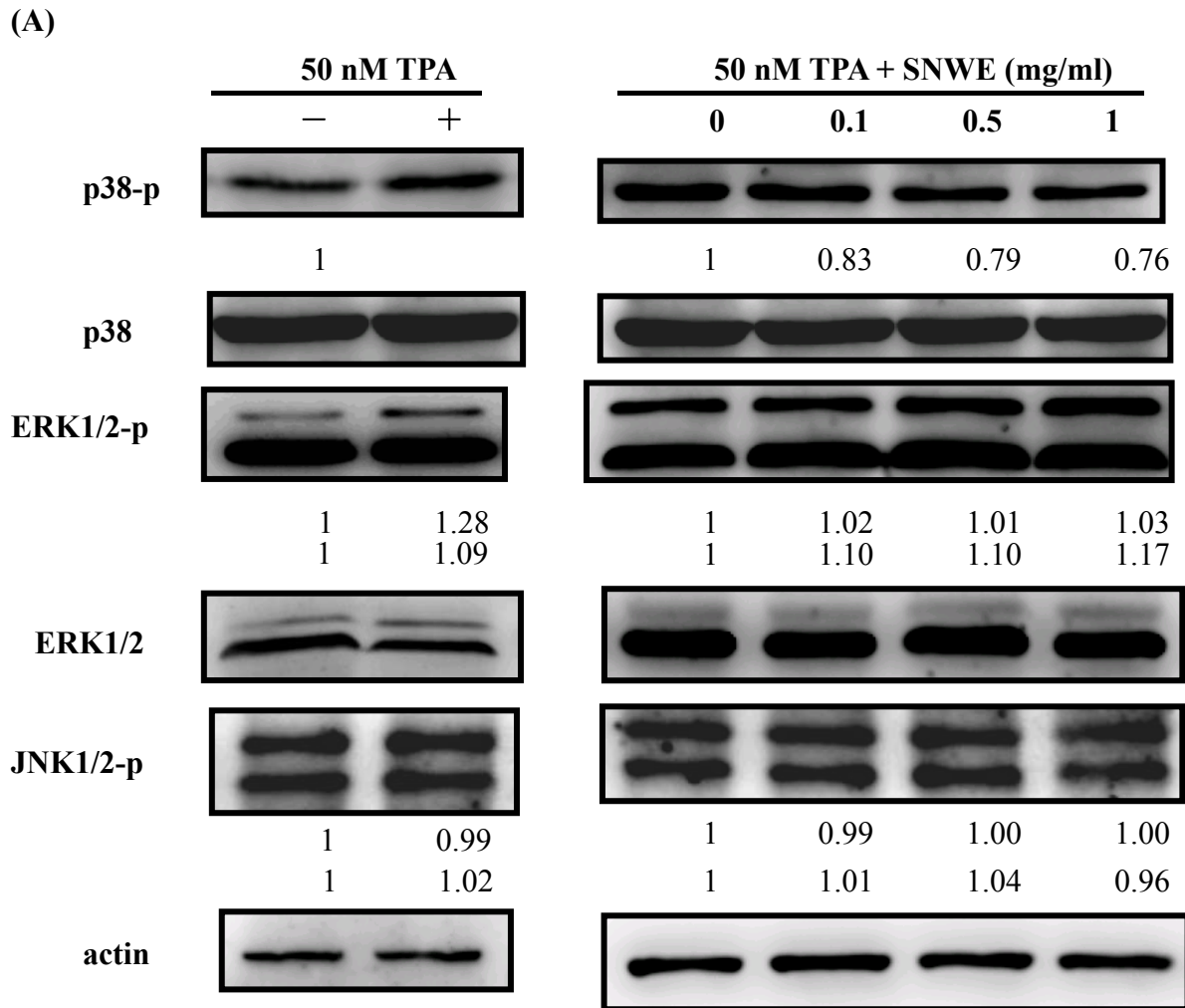


Fig. 6. (A) SNWE reduced the protein levels of MAPK family on human hepatocarcinoma cells. SNWE reduced the expression of phosphor-p38 in hepatocarcinoma HepG2 cells. The HepG2 cells were treated with 50 nM TPA and various concentration of SNWE for 24 hrs. After the cells were harvested, western blot analyses were done with anti- MAPK family and actin antibodies as described in the Materials and Methods. Results from a representative experiment are shown. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to actin.

(B)

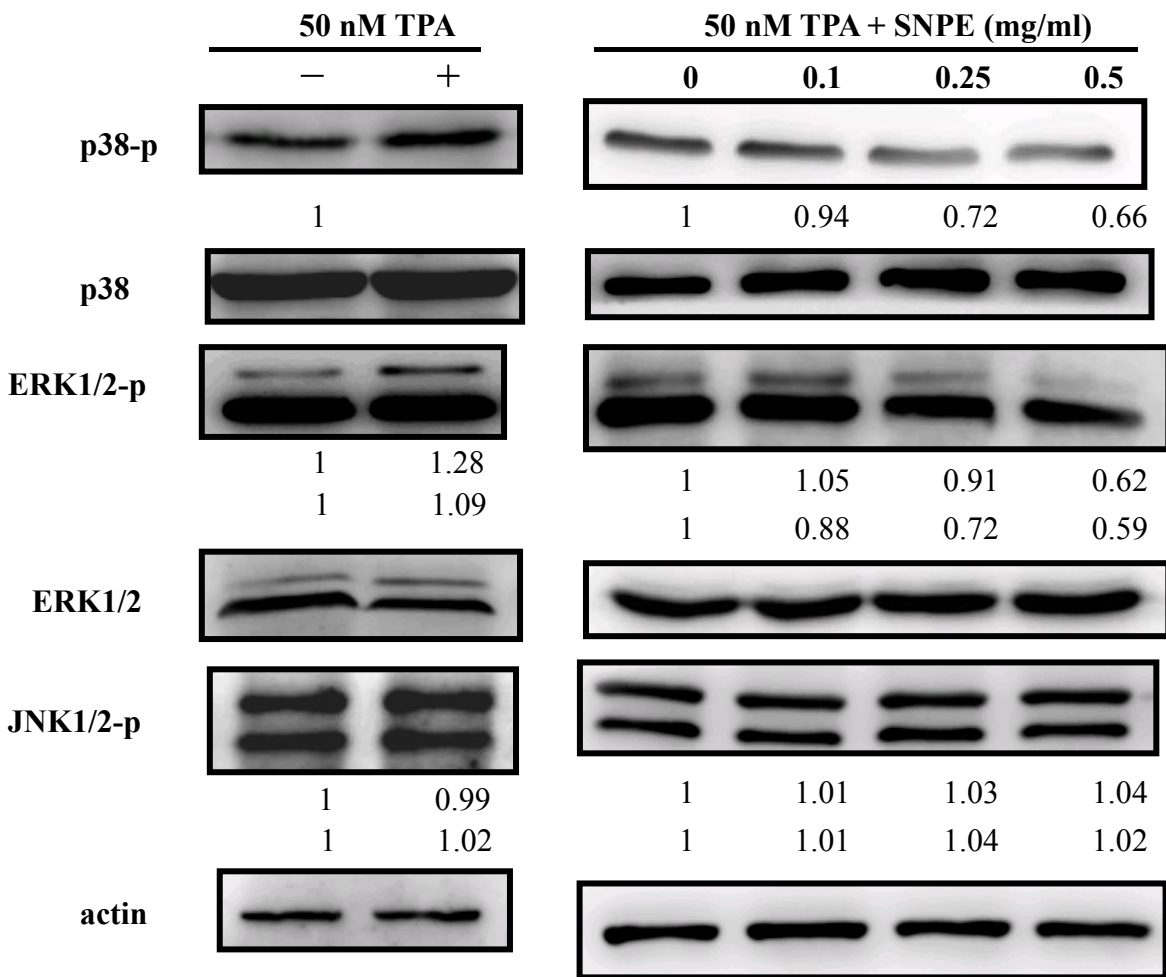


Fig. 6. (B) SNPE reduced the protein levels of MAPK family on human hepatocarcinoma cells. SNPE reduced the expression of phosphor-p38 in hepatocarcinoma HepG2 cells. The HepG2 cells were treated with 50 nM TPA and various concentration of SNPE for 24 hrs. After the cells were harvested, western blot analyses were done with anti- MAPK family and actin antibodies as described in the Materials and Methods. Results from a representative experiment are shown. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to actin.

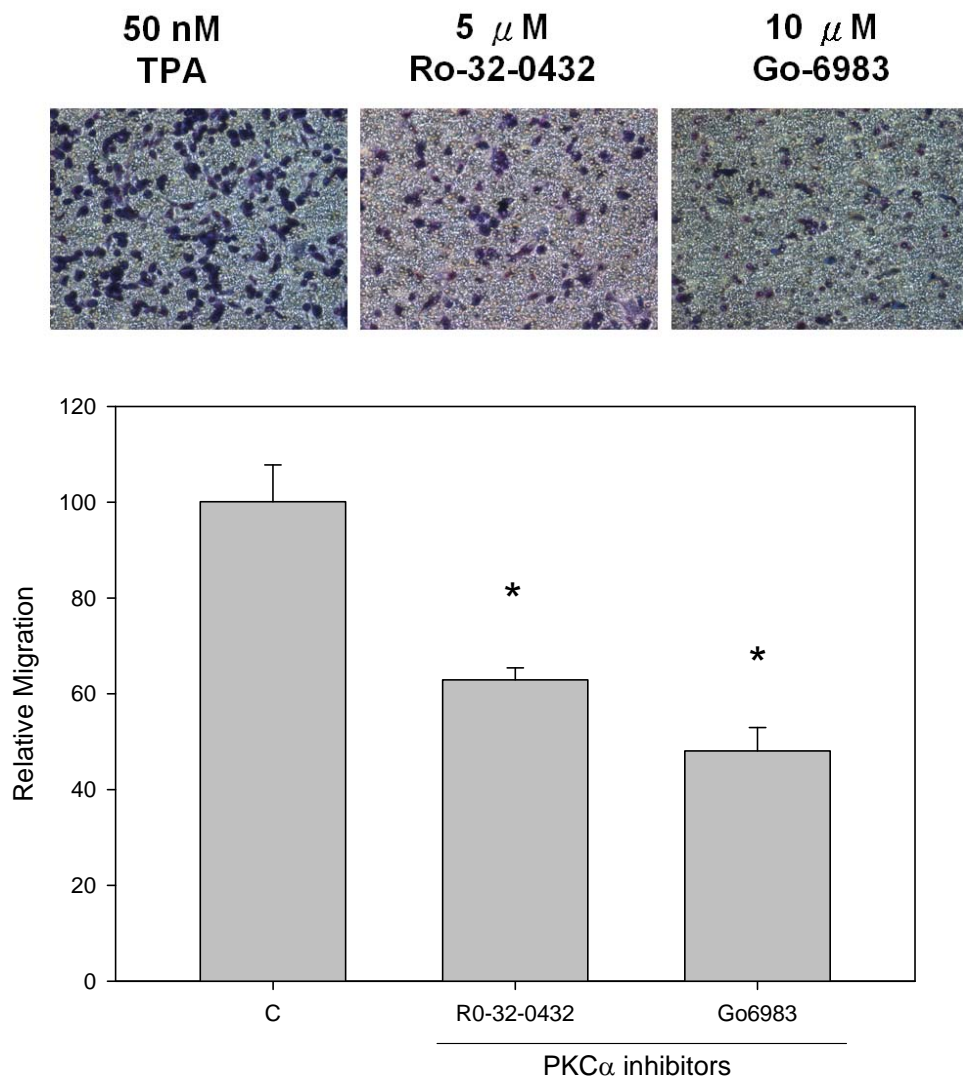
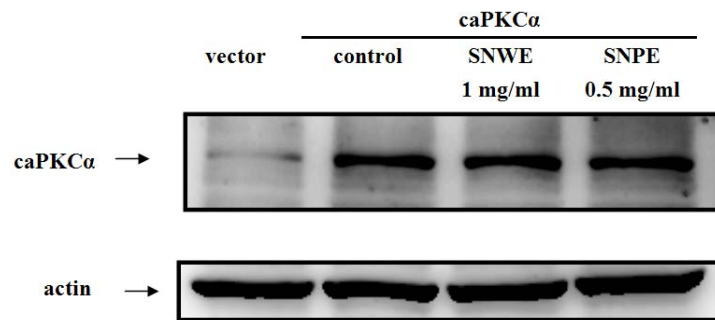


Fig. 7. The inhibition of PKC α inhibitors on TPA-induced migration in human hepatocarcinoma cells. HepG2 cells were treated with 50 nM TPA coupled with PKC inhibitor Ro-32-0432 5 μ M or Go-6983 10 μ M or none for 24 hrs. Relative quantitation of the migrated cells was done. The migration of TPA-treated samples was taken as 100% in each experiment. Each result was obtained from average of at least three separate experiments. The migratory effect inhibited by PKC α inhibitors were analyzed by t test ($P < 0.0001$).

(A)



(B)

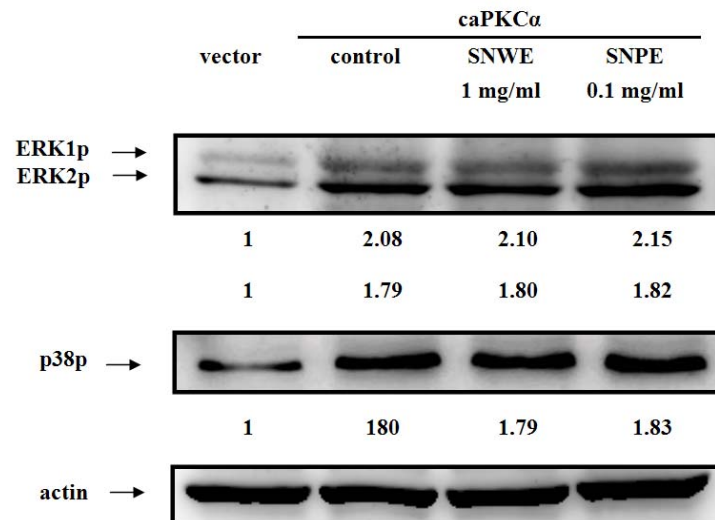


Fig. 8. SNPE reduced phosphorylation of ERK and p38 by constitutively active PKC α in HepG2 cell. (A) HepG2 cells were transfected with 8 μ g of vector (denoted as vector) or active PKC α plasmid (denoted as caPKC α) in 60 mm dish for 24 hrs and (B) subsequently treated with SNWE 1 mg/ml or SNPE 0.5 mg/ml for 24 hrs. (C) Cells were lysed for western blotting to detect the expression of phosphor-ERK and phosphor-p38. Results from a representative experiment are shown. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to actin.

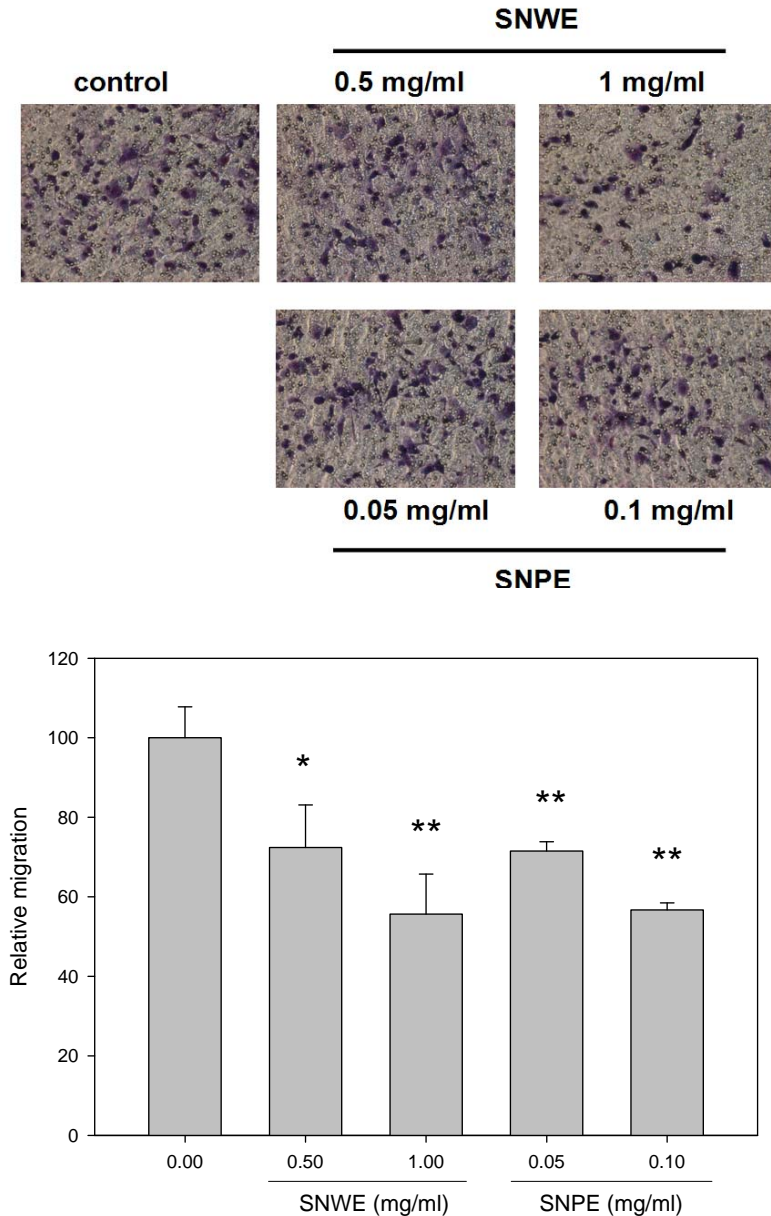


Fig. 9. SNWE and SNPE reduced migration of HepG2 cell by constitutively active PKC α . HepG2 cells were transfected with constitutively active PKC α plasmid in 60 mm dish for 24 hrs. Transfected cells were pre-treated with SNWE or SNPE or not for 24 hrs. Cells (5×10^4) were seeded onto the upper chamber for 24 hrs. Cells that had migrated to the lower surface of the membranes were counted under a light microscope. Relative quantitation of the migrated cells was done. The migration of cells which were transfected with constitutively active PKC α plasmid as induced control. Each result was obtained from average of at least three separate experiments. The migratory effect inhibited by SNWE or SNPE were analyzed by t test.

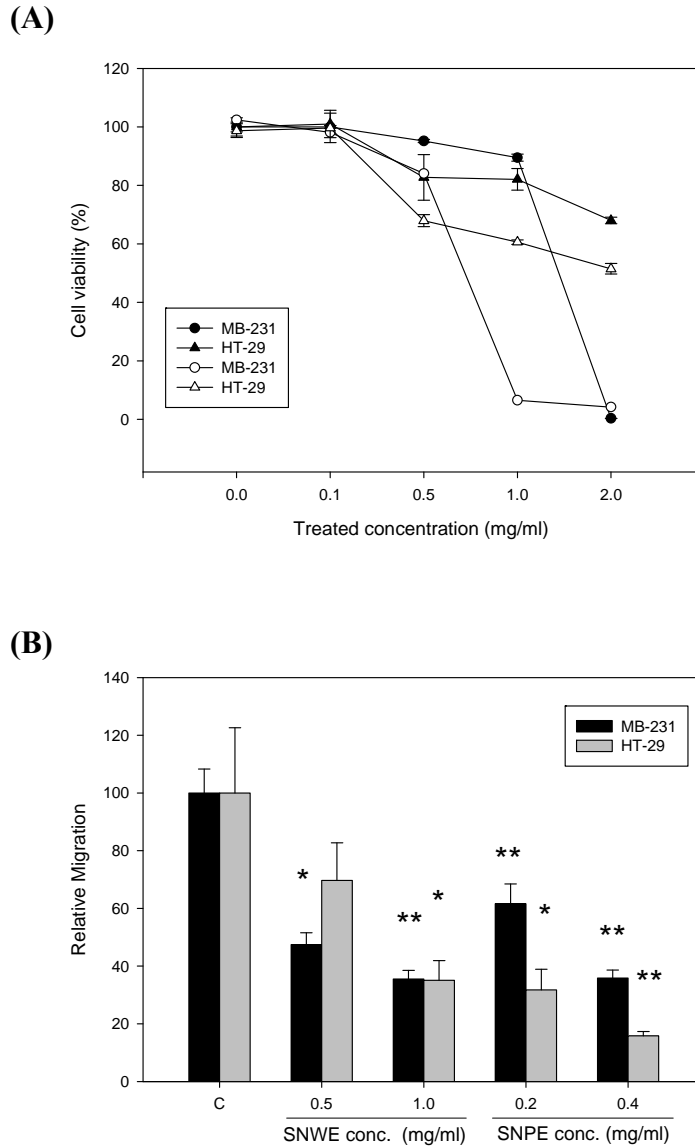


Fig. 10. SNWE and SNPE reduced different kinds of cancer cell migration by TPA-induced. (A)The cytotoxicity effects of SNWE and SNPE on different kinds of cancer cells. (B)The inhibitory effects of TPA-stimulated migration were inhibited by SNWE and SNPE. (A)Cancer cells were incubated with different concentration SNWE or SNPE (0.1 ~ 2 mg/ml) for 24 hrs. (B)Analysis of the migratory response of various cancer cells to TPA (50 nM) was performed using the 48 microchemotaxis chamber assay as described in "Materials and Methods." Cells were pre-treated with various doses of SNWE or SNPE for 24 hrs. Cells were induced migration by 50 nM TPA for 24 hrs. Relative quantitation of the migrated cells was done. The data are expressed as the percentage of migration \pm SD relative to TPA-stimulated migration. The results are representative of at least three independent experiments. *, $p < 0.01$, was compared with TPA induced control. **, $p < 0.005$, was compared with TPA induced control.

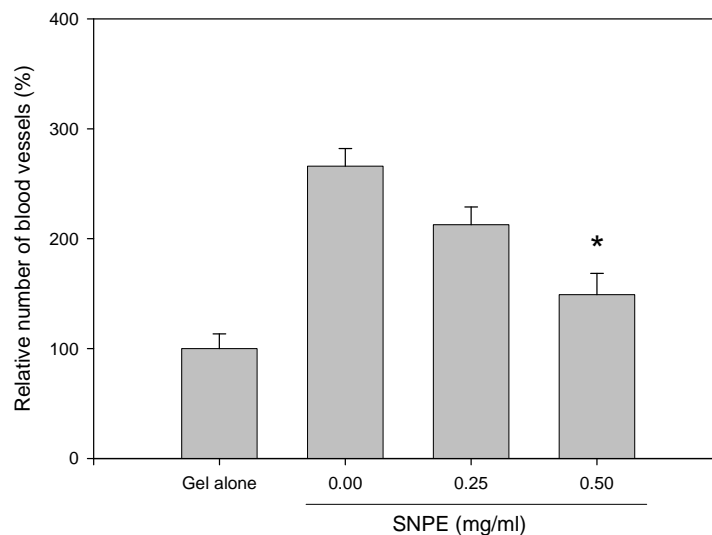
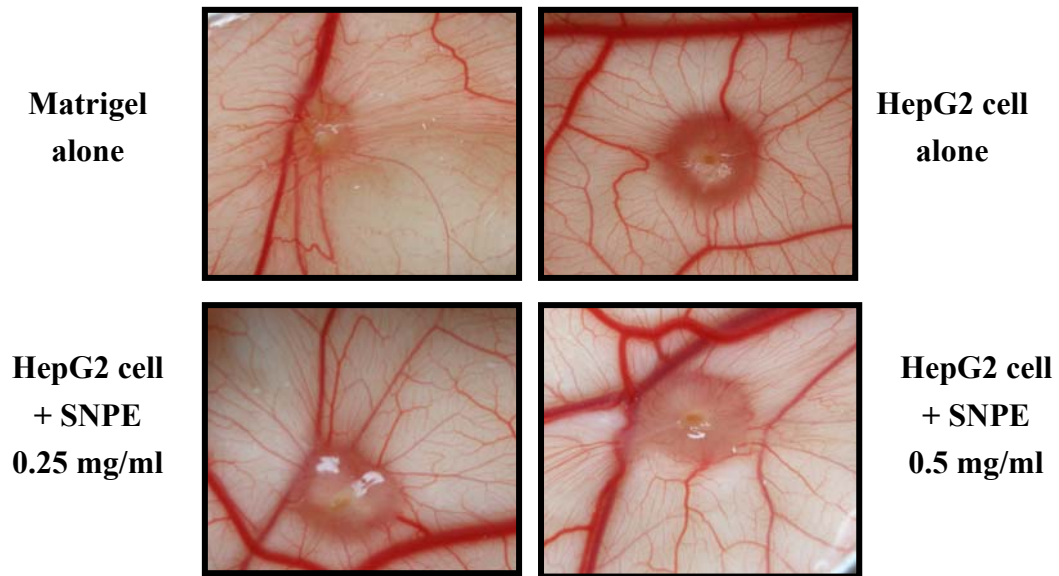


Fig. 11. SNPE inhibited in vivo tumor angiogenesis. (A) SNPE inhibited tumor angiogenesis in the CAM model. HepG2 cells were harvested, and re-suspended in PBS at 1×10^7 cells/ml. Aliquots of the cells (15 μ l) were mixed with 15 μ l of Matrigel in the absence or presence of SNPE as indicated. The cell mixture was implanted onto the CAM of a 9-day-old chick embryo to grow tumor. The total blood vessels around the Matrigel were counted at 4 days after the implantation. The pictures are representatives of each treatment. (B) Quantification of blood vessels on the CAM. The number of blood vessels was normalized to that of Matrigel alone, and the data was the mean \pm SD from two independent experiments (n= 4). *, Indicated significant difference when the blood vessel number was compared to that of the cells without SNPE ($p < 0.05$).

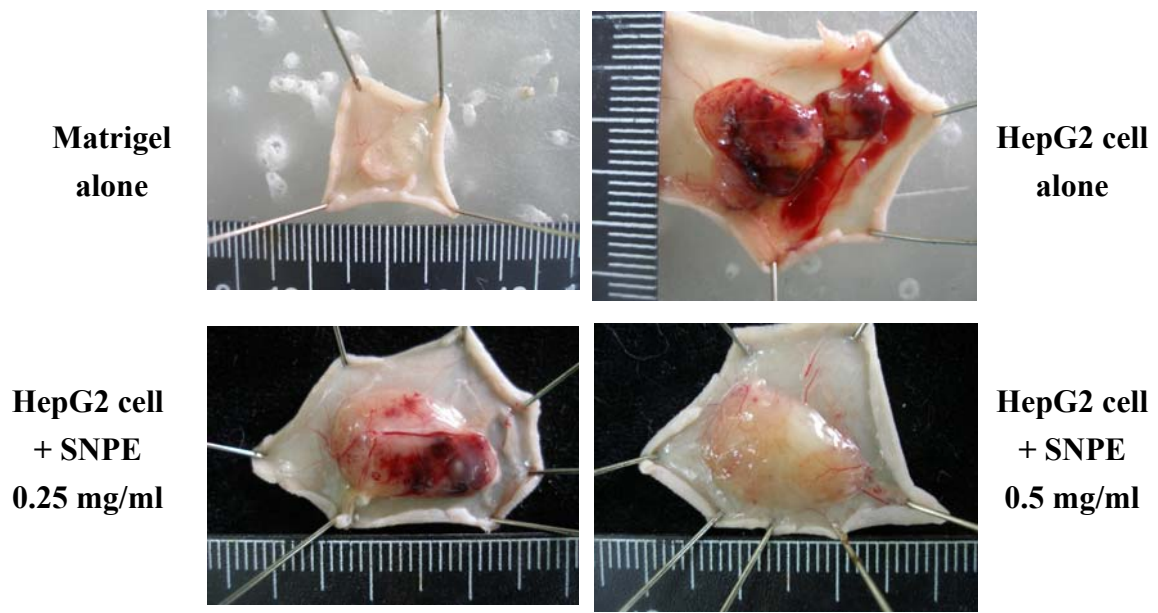


Fig. 12. SNPE inhibited tumor angiogenesis in nude mice model. HepG2 cells were re-suspended in PBS at 1×10^7 cells/ml, and aliquots of the cells (0.2 ml) were mixed with 0.4 ml of growth-factor-reduced Matrigel in the absence or presence of SNPE at 0.25 mg/ml or at 0.5 mg/ml. The HepG2 cells with Matrigel were injected subcutaneously into the both sites of female nude mice, respectively. The nude mice were euthanized in 15 days, respectively, after the implantation. The Matrigel plugs were removed from the mice. The photos are representative Matrigel plugs.

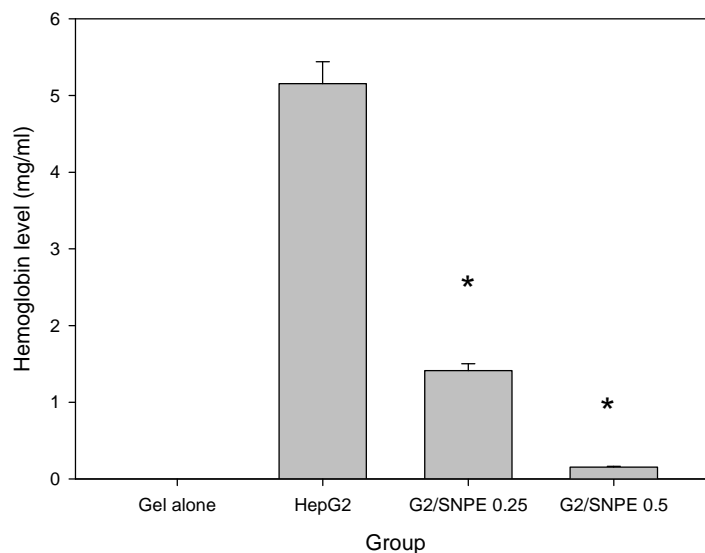
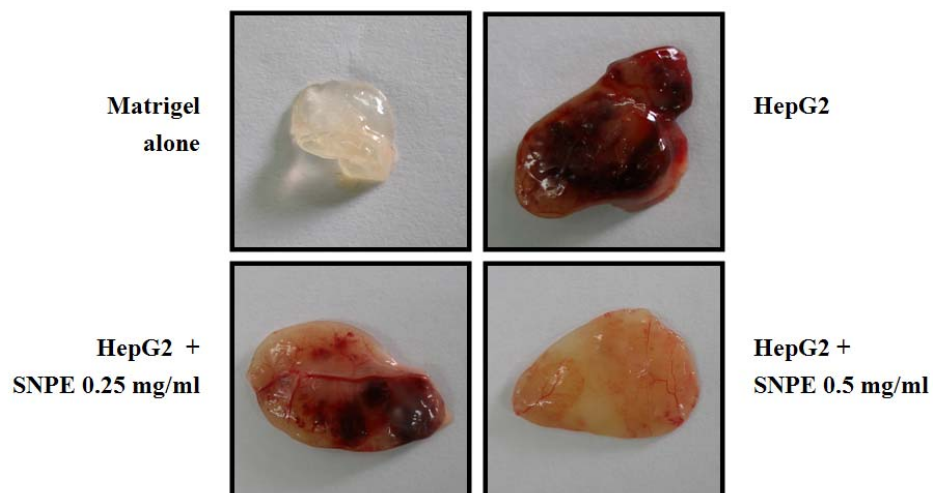


Fig. 13. SNPE inhibited tumor angiogenesis in nude mice model. HepG2 cells were re-suspended in PBS at 1×10^7 cells/ml, and aliquots of the cells (0.2 ml) were mixed with 0.4 ml of growth-factor-reduced Matrigel in the absence or presence of SNPE at 0.25 mg/ml or at 0.5 mg/ml. The HepG2 cells with Matrigel were injected subcutaneously into the both sites of female nude mice, respectively. The nude mice were euthanized in 15 days, respectively, after the implantation. (A) The Matrigel plugs were removed from the mice. The photos are representative Matrigel plugs. (B) Hemoglobin levels of Matrigel plugs. Hemoglobin levels in the supernatant were quantified with Drabkin's reagent kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The data are mean \pm SD from replicate experiments ($n = 5$). *, Indicated significant difference when the hemoglobin content was compared to that of the control ($p < 0.0005$).

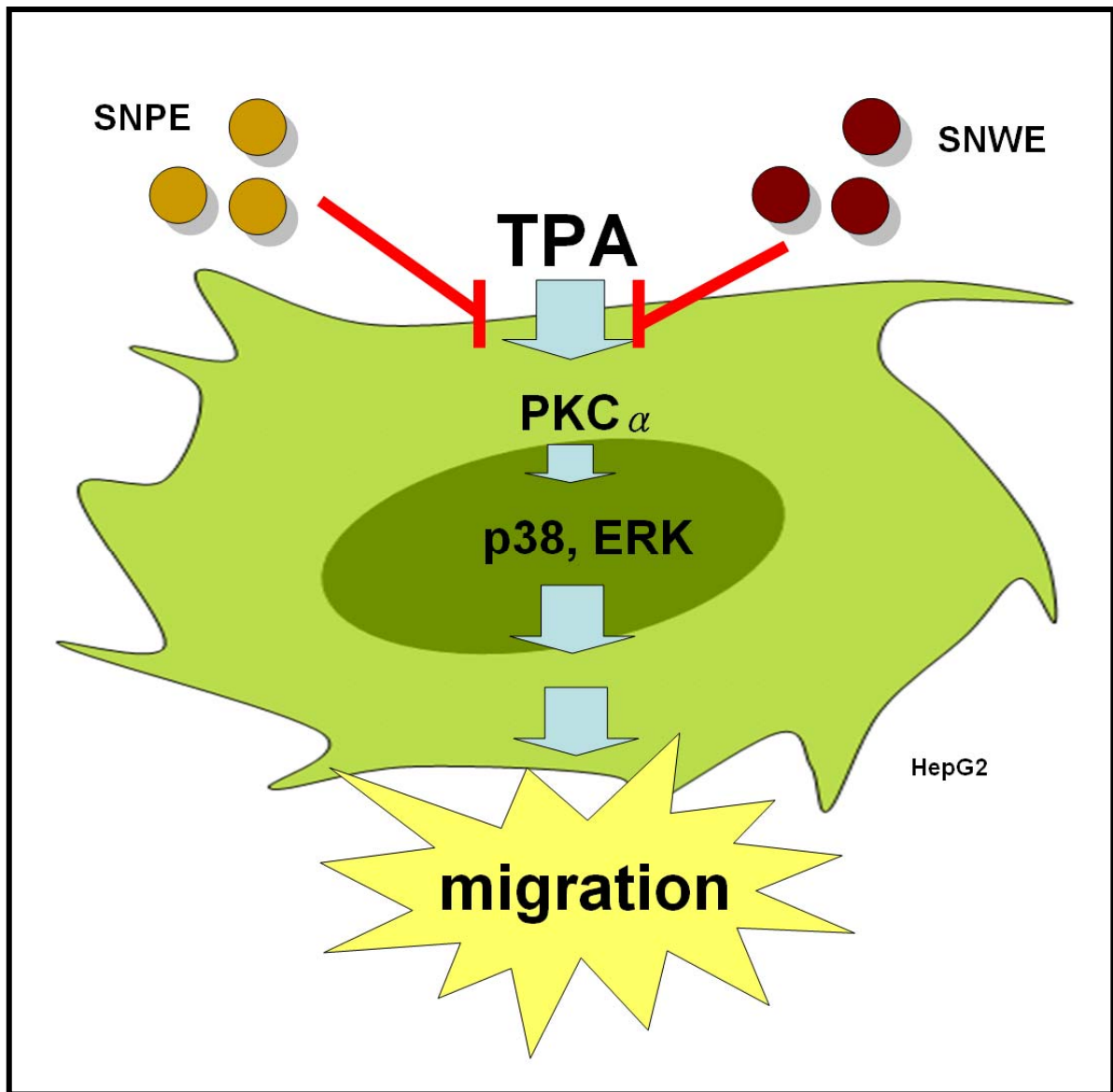


Fig. 14. Schematic model of SNWE and SNPE inhibiting migration in HepG2. SNWE and SNPE were shown to be capable of inhibiting TPA induced migration through the mechanism suppression of PKC α /p38, ERK signaling. However, the cross-link between these three signaling is poorly understood.

龍葵萃取物及多酚抑制癌細胞轉移
之機轉及降低血管新生之作用

Solanum nigrum water extract and polyphenol-rich
extract suppress the metastasis and angiogenesis
in melanoma cell

中文摘要

龍葵，為茄科植物分布於全球的耕地。在民間用於清熱解毒消腫，在醫學功能上已被證實具有抗氧化、抗發炎、護肝作用之功效。本篇研究目的是觀察龍葵水萃物(SNWE) 及龍葵多酚萃取物(SNPE) 是否能夠抑制腫瘤的轉移及與其密不可分之血管新生作用。首先，利用細胞毒性實驗、傷口癒合、移動分析、MMP 電泳實驗來觀察 SNWE 及 SNPE 是否可以在 *in vitro* 抑制 B16-F1 細胞轉移，結果顯示在不殺死細胞的前提下處理 SNWE 及 SNPE 後，細胞傷口癒合及移動能力明顯變差，而 MMP-2 及 MMP-9 的表現量也是降低。進一步以西方墨點法分析與轉移相關的蛋白，實驗數據顯示 Ras、PI3K/Akt、NF- κ B、PKC α 、PKC δ 、JNK-p、P38-p 蛋白表現量皆明顯下降。此外，與細胞骨架有關的蛋白 RhoA、CDC42 在處理 SNWE 後其表現量也隨之降低。接著以動物模式驗證龍葵抑制腫瘤轉移的作用，以尾靜脈注射的方式將 B16-F1 細胞打入鼠體內並同時餵食 SNWE，發現腫瘤轉移到肺臟或其他臟器的情形有得到改善，而腫瘤的生長也明顯受到抑制。接著透過雞胚胎實驗及 Plug assay，證實 SNWE 及 SNPE 皆能抑制血管新生作用。從以上的結果，推測龍葵具有降低腫瘤轉移及抗血管新生作用的潛力。

關鍵字：黑色素瘤；轉移；PI3K/Akt；NF- κ B；PKC；龍葵

英文摘要

前言

根據行政院衛生署統計資料顯示，台灣地區主要死亡原因中，惡性腫瘤自民國 71 年至今，為國人十大死亡原因之首位。平均每 3 分 42 秒就有 1 人死亡，國人整體平均壽命持續延長，男性達 75.5 歲、女性 82 歲，比起去年又延長了 0.03 歲與 0.29 歲。不過，惡性腫瘤已經連續 27 年蟬聯十大死因之首，依序為心臟疾病、腦血管疾病、肺炎與糖尿病、意外事故、慢性下呼吸道疾病、慢性肝病及肝硬化，第九名是自殺、第十名是腎病。平均每 13 分 30 秒就有 1 人死於癌症，故癌症堪稱為國人頭號殺手。傳統治療癌症的方式包括：手術切除、化療和放射線治療，然而，這些療法通常會伴隨著副作用的產生或是切除的不徹底。所以找出適當治療癌症的方法，仍是許多研究致力的目標。黑色素細胞是皮膚上的光受體(photoreceptor)，可分泌黑色素(melanin) 保護它周圍的其他細胞，包含上皮細胞及角質細胞。為提高存活率，除細胞本身的特質外，周邊的上皮細胞和角質細胞也會分泌一些因子給黑色素細胞使用，使其大量表現 Bcl-2 家族成員。由於黑色素瘤細胞是如何由黑色素細胞轉變而成的作用機轉尚未清楚，況且黑色素本身的特性而易導致黑色素瘤細胞不易死亡，因此目前黑色素瘤尚無良好的致癌藥物。近年來，皮膚黑色素細胞瘤的發生率逐年增加，且在皮膚相關癌症的死亡率中佔了相當大的比例。2009 年衛生署統計資料顯示，不分年齡及性別，黑色素細胞瘤皆有機會發生，且轉移迅速，常對化學治療有很強的抵抗性，在治療上往往困難重重。而治療黑色素瘤的方法分為四種：外科切除、化療、放射線治療以及生物性療法(或稱免疫療法)，但往往會引起病患嚴重的副作用，甚至有致死的危險性。因此從天然植物中尋找有效抗癌又安全的草藥複方或化合物儼然成為近年來的熱門話題之一。

文獻探討

龍葵(*Solanum nigrum* L.) 簡介

一. 背景介紹

龍葵(*Solanum nigrum* L.) 始載於《唐本草》。原名龍葵、又名苦菜。《圖經本草》名苦葵、老鴉眼睛草。《本草綱目》明水茄、天泡菜。物種分類: 植物界 Plantae、木蘭植物門(開花植物或被子植物) Magnoliophyta. 木蘭綱(雙子葉植物) Magnoliopsida. 茄目 Solanales. 茄科 Solanaceae. 茄屬 *Solanum*。而龍葵在台灣民間則又稱為黑甜仔菜、黑鬼仔菜、烏子茄, 屬野生植物, 為農田雜草, 民間有取其幼苗, 嫩葉炒熟當菜食用。莖葉有解熱、利尿、解毒之效, 也可外敷及跌打損傷等。

二. 型態

龍葵屬野生植物, 生於田邊、菜園、路邊、荒地、坡地陰濕肥沃的草地上, 分布於全國, 為一年生草本, 於南北半球的熱帶和溫帶都可見到其身影, 分布範圍相當廣泛。根: 圓錐形, 淡黃色, 多分枝, 者根常木化。莖: 直立, 多分支, 高 50~100 公分, 基部有時木質化, 有縱直稜線, 沿稜被細毛。葉: 葉互生有柄, 葉片卵形或近菱形, 長 4~10 公分, 寬 3~6 公分, 先端漸尖或鈍尖, 基部寬楔形, 下延至葉柄, 全緣或有疏波狀齒, 無毛或被疏毛。花: 夏季開花, 傘形聚繖花序頂生, 有 4~10 朵花, 花梗下垂, 花冠白色, 鐘形, 5 裂; 雄蕊 5 花藥頂端 2 孔開裂; 子房 2 室, 花柱長, 基部有絨毛。果: 直徑約 0.8~1 公分, 未成熟的綠色果實有毒性, 成熟後是烏黑剔透的漿果, 基部有宿萼。一般人最愛採食它的漿果, 滋味略酸甜可口。

三. 產地

台灣全島、蘭嶼、綠島、小琉球、金門、馬祖。

四. 成分

龍葵全草含苷類甾體生物鹼, 約 0.04%, 龍葵鹼(茄鹼 solanine)澳洲茄明鹼(茄達鹼 solasodamine), 澳洲茄邊鹼(茄邊鹼 solamargine), 澳洲茄鹼(茄解鹼 solasonine)。龍葵鹼水解後的苷元是龍葵胺(solanidine), 其餘各鹼水解後的苷元是澳洲茄胺(solasodine), 還含龍葵定鹼。龍葵葉和未成熟果實所含生物鹼比莖和成熟果實較多。成熟果實僅有微量配糖生物鹼。葉、莖和全植物含澳洲茄邊鹼量最高。在果實生成期所含澳洲茄邊鹼量最高。此外, 尚含皂苷, 其苷元為萆薢皂苷元(diosgenin) 和替告皂苷元(tigogenin); 並含維生素 A 類物質和維生素 C, 龍葵漿果的提出物中還含有酯、羧基化合物、甾醇、酚性化合物等, 其主要成分為黃色不飽和酯。

五. 龍葵醫學功能

1. 防止自由基所造成的 DNA 傷害(1, 2)
2. 具有保肝作用, 可保護肝臟免於四氯化碳誘導的肝損傷(3, 4)
3. 誘導氮氧化物的產生(5)
4. 在 TPA 所刺激的乳癌細胞 MCF-7 中, 能抑制細胞內轉錄因子 NF- κ B 和 AP-1

- 與 DNA 結合的活性(6)
5. 在墨西哥的傳統醫學中已被視為鎮定神經之藥物(7)
 6. 具有抑制小鼠肉瘤 S-180 的活性(8)
 7. 抑制乳癌細胞 MCF-7 的生長及誘導細胞凋亡(9)
 8. 降低膽固醇(10)；另外中國大陸亦有多項醫學功能的報導，包括(9)
 9. 用於肝炎、肺癌、膀胱癌治療(11-14)
 10. 輔助腫瘤治療(15, 16)
 11. 抑制腸癌乙烯轉移酵素活性(17)

另外在本實驗室初步結果顯示：

龍葵水萃取物促進肝癌細胞 HepG2 死亡，及增加 GST Mu 之表現及降血脂作用。綜合以上結果可歸納出龍葵具有【1】 抗氧化；【2】 抗發炎；【3】 抑制癌症發生率；【4】 護肝作用；及【5】 降血脂之功能。

癌細胞之惡化轉移侵襲

癌症即是惡性腫瘤，為一種疾病。它是由控制細胞生長增殖機制的失常而引起。癌細胞除了生長失控外，還會局部侵入週遭正常組織甚至經由體內循環系統或淋巴系統轉移到身體其它部份。然而癌症的發生為一多重步驟性的致癌過程 (carcinogenesis)，分為起始期 (initiation phase) 為一快速且不可逆的階段，主要由於細胞內的核酸發生突變所致；促進期 (promotion phase) 是由於一些致癌原的作用，造成基因異常所致；進展期 (progression phase) 為癌細胞開始侵犯鄰近正常組織，而轉移到其他組織或器官。一般而言，癌細胞的轉移擴散往往是造成癌症病人病灶復發致死的主要原因。然而癌細胞的轉移擴散必須伴隨著細胞生理狀態的改變。其中包含了細胞與細胞間基質之相互作用力的改變，細胞與細胞間結合能力的破壞，細胞間基質的分解；緊接著癌細胞會穿過細胞間基質，侵襲浸潤 (invasion) 到循環系統或淋巴系統轉移 (metastasis) 到達新的組織器官，在透過血管新生 (angiogenesis) 的方式來供給癌細胞養分。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損，最後導致癌症病人的死亡。

在轉移擴散的過程中，癌細胞藉由蛋白質水解酵素來分解細胞間基質的組成蛋白質，導致細胞與細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性。以上皮細胞為例，細胞癌化至轉移侵入的過程，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，而轉型後的癌細胞不受細胞生長增殖機制所調控便大量的增生。增生後的癌細胞會分泌胞外蛋白質水解酵素，來分解基底膜及細胞間基質，最後藉由循環系統以轉移到新的組織器官，然後在開始大量增生。

然而有些學者認為腫瘤細胞藉由上皮間質 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) 而獲得侵犯能力進而變成侵犯性腫瘤 (18)。上皮間質化可造成細胞結構上短暫改變，此改變可讓細胞的移動力增強。在發育的過程中，上皮間質化被嚴密的調控，而上皮間質化伴隨的型態發生 (morphogenetic events) 和大規模組織重整 (tissue reorganization) 有關。對於癌化的細胞，上皮間質化造成癌細胞間黏附力下降並降低細胞極性，同時，這些癌細胞表現出一些間質化細胞結構蛋白，增強

了細胞的移動力(19)。

血管新生作用

血管新生作用是指由已存在的血管生成新血管的過程，而血管新生作用在正常生理發育及病理過程中，皆扮演重要的角色。在正常生理情形下，血管新生作用僅發生於胚胎發育、女性排卵週期和傷口癒合方面，受到嚴密的調控及作用短暫。而體內血管新生作用失去平衡時，會造成一些病理現象的產生，當缺乏血管新生作用時，會造成傷口癒合不全、冠狀動脈局部缺血等疾病；然而，過度的血管新生作用，則與糖尿病視網膜病變、類風濕性關節炎、腫瘤的生長及轉移等有密不可分的關係(20)。血管新生作用經由一連串的反應所構成的，對於腫瘤血管新生作用而言，在腫瘤剛形成時，癌細胞本身或結締組織，會分泌許多血管生成因子(例如: VEGF, CTGF...等)，這些血管生成因子會與鄰近的血管內皮細胞上之接收器進行結合，當內皮細胞受到刺激時，會分泌蛋白質分解酵素將血管基底膜與細胞外基質分解，並且內皮細胞會朝向分泌血管生成因子的方向移動，新合成的毛細血管會進一步分化，形成管狀結構(tube formation)，並使血液於內部流動，最後與血管平滑肌細胞共同形成一新的血管，而完成血管新生作用。

研究目的

於行政院衛生署公佈「2009年國人死大死因」統計結果發現，惡性腫瘤已連續蟬連28年榜首，平均每13分30秒就有1人死於癌症，故癌症堪稱為國人頭號殺手。癌症的形成是透過許多複雜且多重的過程，然而其中形成的原因只有少數被了解，治療上的阻礙造成治療的效果有限。而目前常見的癌症治療中不外乎是化學治療或搭配一些抗癌藥物的使用，但通常會引發病人產生嚴重的傷害及副作用，甚至有致死的危險性。目前許多研究趨向以天然藥物來達到抑制癌細胞的增長與惡化，例如：Turmeric extract (curcumin)(21)，Cruciferous vegetables (sulforaphane)(22)，Tea (catechins)(23)，Mulberry (anthocyanins)(24)已被廣泛的應用為 chemopreventive agents，因此本實驗室也致力於開發可食用之天然物中之 chemopreventive agents，希望能藉由健康食品的攝取來達到降低及預防癌症發生的功效。龍葵已被證實具有抗發炎、護肝、抗腫瘤生長之醫學功效，但其中的有效成分及作用機轉尚未研究完全。近年有文獻提出龍葵萃取物中含有豐富之多酚，且多酚已被證實確實具有抗癌效果。因此探討龍葵水萃取物及其中之多酚對於癌細胞之作用和其中抗癌之分子機制。

研究方法

1. 龍葵水萃物(SNWE) 及多酚萃取物(SNPE) 之製備

1-1. SNWE 之製備

秤取龍葵全株乾品825 公克。清洗龍葵後將其修剪成較小的片段，用大約 5000 ml 的水浸泡覆蓋龍葵靜置隔夜。將靜置隔夜龍葵加熱至沸騰再悶煮 40 分鐘，將藥液倒出另放。藥材再加 5000 ml 的水加熱等沸騰，再悶煮 40 分鐘，將藥液倒出另放。藥材再加5000 ml的水加熱等沸騰，再悶煮 40 分鐘，將藥液倒出另放。共取得 3 次萃取液，將3次所得藥液混合後以粗過濾的方式去除雜質。再置於 90 °C 的 Water Bath中，濃縮成膏狀。將膏狀物再置於 70°C 的烘箱中，烘乾成乾品。所得約為 79 g 乾品，產率為 9.55%。將乾品磨碎後分裝，存放在-20°C。在進行各種細胞實驗操作時，以滅菌水完全溶解SNWE 粉末，配成stock濃度(100 mg/ml)，須先經過 0.45 µm filter過濾，在透過0.22 µm filter過濾除菌方可進行實驗。

1-2. SNPE 之製備

將 100 g SNWE 粉末，以 300 ml 甲醇浸泡攪拌，在 50°C 的 water bath 中萃取 3 小時過濾，連續五次，收集濾液。於減壓濃縮乾燥，而後以 50°C，500 ml 二次水溶解，再將濃縮之溶液加入 200 ml 己烷移除色素，取水層(下層)再加入 180 ml 乙酸乙酯反應，連續 3 次，在進行減壓濃縮乾燥，最後在加入 100 ml 二次水溶解，冰在-70°C 兩天然後冷凍乾燥為粉末，所得乾品約為 2.44 g，產率為 2.44%，存放在-20°C。在進行各種細胞實驗操作時，以含 50%酒精之滅菌水完全溶解龍葵多酚粉末，配成 stock 濃度(200 mg/ml)，須先經過 0.45 µm filter 過濾，在透過 0.22 µm filter 過濾除菌方可進行實驗。

2. 細胞培養 (cell culture)

2-1. 細胞株 (cell line)

本實驗所使用之細胞株購於食品工業研究所，詳細資料如下：

cell line	tissue	中文名稱	培養基
mouse melanoma	melanoma	老鼠黑色素	DMEM/ high
B16-F1		瘤細胞	glucose

培養環境: 將培養箱設定 5% CO₂、37°C 的恆溫環境，根據細胞生長的速度定期更換培養液。

2-2. 解凍細胞

以老鼠黑色素瘤細胞為例，將含有 B16-F1 細胞的冷凍管由液態氮桶快速置於 37°C 的 water bath 中，快速解凍兩分鐘後將管內的細胞液移入含有培養液的離心管中，隨後以轉速 1000 rpm 離心 5 分鐘，去除含有 DMSO 的上清液，以含有胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的新鮮培養液將細胞均勻打散注入培養皿中 (25T flask)，置於 5% CO₂、37°C 的恆溫環境中培養。

2-3. 繼代培養

將老鼠黑色素瘤細胞 B16-F1 培養於含有 4 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium

biocarbonate、0.1 mM non-essential amino acid、1.0 mM sodium pyruvate、4.5 g/L glucose 以及 10% fetal bovine serum 的 Dulbecco's modified Eagle's medium 培養液中。置於 5% CO₂、37°C 的恆溫環境中培養，根據細胞生長的速度定期更換培養液。待細胞長至八~九分滿後，利用 1x trypsin-EDTA 於 37°C 培養箱中作用六分鐘讓細胞脫落，利用 medium 終止反應，隨後離心 1000 rpm; 5 分鐘，去除上清液，以新鮮的培養液將細胞打散均勻並繼續培養。

2-4. 凍細胞

將老鼠黑色素瘤細胞 B16-F1 以 1x trypsin-EDTA 於 37°C 培養箱中作用六分鐘讓細胞脫落，利用 medium 終止反應，隨後離心 1000 rpm; 5 分鐘，去除上清液，在以含有 93% medium; 7% DMSO 的培養液將細胞打勻，爾後分裝到冷凍管中，再將冷凍管放入裝有異丙醇(isopropanol) 的冷凍保存盒中隨即置於-80°C 冰箱中待至隔天，最後將冷凍管移入液態氮桶內。

3. 細胞毒性測試 (MTT assay)

本實驗是應用於測試細胞是否具有活性、存活的方法。其原理是在有活性的活細胞會將 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) 經由粒腺體中 succinate dehydrogenase 作用代謝還原為藍紫色結晶(formazan)，之後再以異丙醇(isopropanol) 將結晶溶出，並於 OD563 nm 下測其吸光值，在正常的狀況下，Formazan 生成量與活細胞數成正比，因此可根據光密度 OD 值推測出活細胞的數目。由於死的細胞中不含 succinate dehydrogenase，因此加入 MTT 不會有反應。若溶液的吸光值有降低的話，表示細胞有死亡的現象發生，故可以藉此方法來判定細胞存活與死亡的情形。

調整細胞 B16-F1 濃度約為 1×10^5 cell/ml，以 1 ml 之細胞沖至 24 well microtiter plate 培養，加入不同濃度的 SNWE、SNPE，反應 24 小時，移除 medium (含藥)，加入新的 medium (不含藥)和 MTT (0.5 mg/ml) 37°C、5% CO₂ 反應 2 小時，移除 medium，加入異丙醇將結晶溶出，在 563 nm 下測定溶液吸光。

4. 傷口癒合試驗分析 (wound healing assay)

將 B16-F1 黑色素瘤細胞種於 6-well 的 plate 中(8×10^5 cell/well)待至全滿後，每個 well 以 100 μ l 的 Tip 劃出兩道傷口，以 PBS 洗滌兩次。並在每個 well 加入不同濃度的 SNWE and SNPE (0 ~ 0.5 mg/ml)。觀察 0、24 小時傷口癒合情形。

5. 細胞移動性分析 (Boyden chamber assay)

主要是偵測細胞的移動性，係透過 48-well chamber 來分析，lower chamber 為含有正常 10% FBS 之培養液。待細胞處理 SNWE 及 SNPE (0 ~ 0.5 mg/ml) 培養 24 小時後，先以 PBS 沖洗兩次，在用 trypsin-EDTA 將細胞打下並計算細胞數，然後以不含 FBS 之培養液回溶固定量的細胞數(5×10^5 cell/well)並且注入於 upper chamber，待細胞移動 8 小時後，取下薄膜，以甲醇固定(或甲醇:冰醋酸 = 1:2)細胞 30 分鐘，於室溫下風乾，以 Giemsa : ddH₂O (v/v, 1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機挑選視野，作移動細胞之計數。

6. Gelatin-zymography

將 0.1% Gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝溶液的電泳槽中。將細胞加藥培養後，以不含胎牛血的培養液培養 48 小時，之後再與 5×染劑均勻混合後，注入膠片中，分別以 70V 與 100V 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 分鐘兩次，最後在加入 reaction buffer 在 37°C 恆溫中反應 16~20 小時，最後反應完的膠片以染色液染色 1 小時，再以退色液退染，觀察結果。

7. 西方點墨法 (western blot)

7-1. 細胞溶解物之製備

收集 SNWE 與 SNPE 處理之細胞，將培養皿內的培養液吸取後，以 PBS 沖洗兩次，刮取細胞並加入 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, pH 7.5) 以及蛋白酵素抑制劑 (100 mM sodium orthovanadate, 10 mM leupeptin, 100 mM PMSF)，在 4°C 下振盪 2 小時，之後再以 4°C，以 12000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液至 eppendorf 中並存於 -20°C。

7-2. 蛋白質之定量

蛋白質的定量是採用 Bradford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入五分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595 nm 可見光之吸光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 OD 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

【註】BSA 標準曲線配置：將 8 mg/ml 的 BSA 依序稀釋的方式，稀釋成 1.6、1.2、0.8、0.4、0.2 mg/ml 的 BSA，在各取 30 μ l 並加入 1 ml 的 Coomassive blue，在室溫下搖晃反應 1 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化，畫出標準曲線。

7-3. 樣品配置

取定量之蛋白質 (80 ng)，以 ddH₂O 補水至固定體積後加入 5X Loading dye 混合均勻並以 100°C 加熱 10 分鐘，在迅速放入 -20°C 冰箱冷卻 5 分鐘，隨後以 8000 rpm 離心 5 分鐘即可。

7-4. 鑄膠

將電泳玻璃洗淨擦拭後，利用玻璃厚度 0.75 mm 或 1.00 mm 組裝好電泳片，架到電泳座上固定，若欲分析大分子之蛋白，則配置 8~10% 的下層 separating gel；若欲分析小分子之蛋白，則配置 12~15% 的下層 separating gel。將下層 separating gel 混合液注入玻璃片中至固定高度，並加入 30% 酒精將下膠壓平，待 30~40 分鐘膠凝後，將酒精倒掉用去離子水稍作清洗並吸乾去離子水。隨後將配置好的上層 stacking gel 混合液注入，插上電泳齒梳，待 15 分鐘上膠凝後，拔除齒梳，以去離子水將殘留在 well 中的上膠清除，若殘留的很嚴重，則在利用針頭將剩餘的殘膠挖除。在將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中。

7-5. SDS-PAGE

首先將新的 running buffer 倒入電泳槽內槽中並蓋過最內側之玻璃上緣，外

槽以回收的 running buffer 補至蓋過電導線。再把處理好的蛋白質樣品小心注入 well 中，切勿使樣品漂溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker。樣品 loading 完後，連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70 V 的電壓跑過 stacking gel，直到色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，在調整電壓為 100 V，當色帶跑至底線時才停止電泳。

7-6. 蛋白質樣品之轉漬 (electrotransfer)

當電泳完畢後取出膠體，截除多餘的上膠，將膠體置於兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙上，膠體上面在放上與膠體大小略同之硝化纖維紙(硝化纖維紙也須事先經 transfer buffer 潤濕)，在放上兩張也經 transfer buffer 浸濕過的濾紙，並用玻棒趕走夾雜在各層之間的氣泡，最後用含有海綿襯墊的夾板夾緊，放入轉漬槽中，槽中須放入冰盒，以固定電壓 100 V 轉漬 90 分鐘，中間換一次冰盒(視玻璃厚度決定，越厚轉漬時間越長)。

7-7. 免疫墨點法 (immunoblot)

轉漬完後將硝化纖維紙取出，利用紅色染劑(ponceau's solution) 觀察所要蛋白的位置並剪下，用 TBS buffer 漂洗數分鐘，直到硝化纖維紙上看不到紅色染劑，再以 5% blocking buffer (脫脂奶)於室溫下作用 1 小時。倒掉 blocking buffer，再以 TBS-Tween 漂洗三次每次 10 分鐘。隨後加入一級抗體，於 4°C 下作用 overnight。隔天再以 TBS-Tween 漂洗三次每次 10 分鐘。接著換上二級抗體，於室溫下作用 1 小時，再以 TBS-Tween 漂洗三次每次 10 分鐘。最後將 ECL substrate 覆蓋整個硝化纖維紙，以冷光儀分析。

8. 免疫螢光染色 (F-actin immunofluorescence stain)

於 6-well dish 中種入 2×10^5 cell/well 細胞，長至約 5~6 分滿以不同濃度的藥物做處理。24 小時後，以 1X PBS 清洗 2 次，然後加入 2% formalin 固定，室溫 10 分鐘後，移除固定液，以 1X PBS 清洗 2 次，之後加入 0.1% Triton-X，室溫約 30 分鐘，再以 1X PBS 清洗 2 次移除 0.1% Triton-X 後，最後加入 500 ng/ml phalloidin – TRITC 染色液於室溫並避光作用 80 分鐘，接著清洗乾淨，以避免染色液殘留，則可置於螢光顯微鏡下觀察並拍照。另外在 500 ng/ml phalloidin – TRITC 的染色液中加入 DAPI (v/v, 1:10000) 於螢光顯微鏡下觀察，用以標定細胞核的位置。

9. 預先處理 PKC α 抑制劑對 B16-F1 細胞遷移作用之影響

B16-F1 細胞預先處理三種 PKC α 抑制劑 [Go-6983, 5 μ M(25), Ro-320432, 10 μ M(26), Rottlerin, 5 μ M(27)] 之後，培養細胞 24 小時，利用細胞移動性分析來偵測。

10. 裸鼠實驗

實驗所用隻五週大裸鼠(BALB/cAnN-Foxn1nu/CrlNarl) 購買於國家動物實驗中心，飼養於中山醫學大學實驗動物中心之 IVC (individually ventilated cage) 室，控制房內溫度在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，溼度為 $65 \pm 5\%$ ，光照與黑暗時間各為 12 小時。

10-1. 血管新生試驗

實驗設計: 將 400 μ l 的 matrigel 混合 1×10^6 in 200 μ l 的 B16-F1 細胞, 混合均勻。以老鼠下背部皮下注射的方式(左右兩側皆注射)打入鼠體內以誘導腫瘤的形成。將實驗組別分成四組, 每籠五隻, 分別是控制組(matrigel alone)、對照組(induced group) 及兩組給予龍葵水草物(SNWE 0.5%, 1%)。給藥組於施打完細胞後以餵食的方式投飲 SNWE, 每隻每日四克, 連續餵食 14 天。兩周實驗結束後, 以二氧化碳灌注進行犧牲取其腫瘤。將取下的腫瘤泡在 phosphate buffer saline (PBS) overnight, 隔天以 14000 rpm 離心 10 分鐘, 吸取上清液, 隨後加入 Drabkin's reagent kit (使用前先將粉末以 1000 ml 去離子水泡置), 在 540 nm 下測定溶液吸光。

10-2. 腫瘤生長試驗

與血管新生試驗步驟相同, 14 天後觀察注射部位腫瘤生長的情形。兩周實驗結束後, 以二氧化碳灌注進行犧牲取其腫瘤秤重並拍照紀錄。

11. 雞胚胎尿囊絨膜試驗 (chicken chorioallantoic membrane ; CAM)

本實驗是利用七天大的雞胚胎, 於雞蛋的氣室端(頓端)及測邊各取的壓力被尿囊膜佔據, 及形成測邊人工氣室。隨後將人工氣室上的蛋殼小心剝離(注意避免傷害尿囊膜及其血管), 最後將孔洞以保鮮膜覆蓋並將雞胚胎培養在溫度 37°C、溼度 55% 的培養箱培養 24 小時待尿囊膜乾(這樣才不會在滴入細胞時, 因膜未乾而使得細胞散掉)。

實驗設計: 將 15 μ l 的 matrigel 混合 2.25×10^5 in 15 μ l 的 B16-F1 細胞, 混合均勻, 直接滴在雞胚胎尿囊膜上。將實驗分為五組, 分別是控制組(matrigel alone)、對照組(B16-F1 alone) 及三組加藥組, 是分別滴入 matrigel、B16-F1 細胞懸浮液與 0.1、0.2、0.3 mg/ml SNWE 和 SNPE 之混合液。完成實驗後再以保鮮膜緊緊覆蓋, 將雞胚胎置於培養箱中繼續培養, 於 3 天後觀察滴入位置(微突)血管新生情形, 並計數圍繞在細胞周圍的血管數。

12. 癌症轉移之動物實驗

12-1. 動物處理

將黑色素瘤細胞(mouse melanoma cell B16-F1) 細胞數 1×10^6 , 以尾靜脈注射的方式打入五週大 C57BL/6 小黑鼠體內。分為六組, 每組 8 隻, A 組為正常組、B 組只單單處理 SNWE、C-F 組分別將 B16-F1 細胞 1×10^6 以尾靜脈注射至小鼠體內(C, B16-F1 alone; D, B16-F1+0.5% SNWE; E, B16-F1+1% SNWE; F, B16-F1+2% SNWE) 以餵食的方式給予藥物。觀察各組別是否黑色素瘤細胞有轉移到肺臟、肝臟或其他器官的能力。且透過腹腔注射的方式觀察腹腔內腫瘤生長的情形。實驗過程中, 若有動物不幸於療程中死亡, 除紀錄其存活率, 並立即行屍體解剖, 待至實驗結束亦將存活的動物犧牲並進行解剖, 臟器秤重, 並觀察各臟器 melanoma 轉移情形, 最後以 western blotting 探討其機制。

12-2. 分析項目

12-2-1. 組織病理切片及組織染色 (Hematoxylin & Eosin, H&E stain)

將老鼠犧牲後, 快速取一部份臟器, 至於 10% 福馬林中固定, 製成病理切

片。然後利用 H&E stain 方法，進行組織染色，觀察 melanoma 浸潤情形。

12-2-2. 體重及飲食

體重及飲食的變化量最可直接觀察到實驗老鼠的生長情形及生理狀態，故每隔一周紀錄其老鼠體重及每天紀錄飲食量的變化，最後以統計分析之。

13. 統計分析 (statistical analysis)

各項數據皆以 mean±SD 表示。利用 Student t-test Unpaired 來評估統計差異。P < 0.05 表示具有顯著差異。

研究結果

SNWE 及 SNPE 對 B16-F1 細胞之毒性測試

將老鼠黑色素瘤細胞 B16-F1 加入不同劑量的 SNWE 及 SNPE 培養 24 小時後，利用 MTT 之細胞毒性測試法觀察細胞存活的情形。結果顯示，經過 24 小時，推算出 SNWE 的半致死量為 0.87 mg/ml；SNPE 半致死量為 0.81 mg/ml (Fig. 1A, 1B)。但必須篩選出 SNWE 及 SNPE 對於 B16-F1 細胞生長之無顯著影響的濃度，排除 SNWE 及 SNPE 影響細胞生長之因素，以進行細胞移動與侵襲之試驗分析。

SNWE 及 SNPE 對 B16-F1 細胞移動能力之影響

侵襲性是癌細胞惡性的重要表現型之一，並且也認為在轉移過程中扮演關鍵的角色。首先，利用傷口癒合試驗(wound-healing assay) 測試 SNWE、SNPE 影響 B16-F1 細胞之移動能力情形。結果發現：B16-F1 細胞暴露在濃度 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml 之 SNWE 與 SNPE 培養 24 小時，單純只有 B16-F1 的組別，24 小時後傷口變小。從量化圖得知，細胞在 0.2 mg/ml SNWE 處理下可達約抑制 20% 之傷口癒合，提高濃度至 0.5 mg/ml 則傷口癒合抑制作用約 60% (Fig. 2A)；SNPE 在濃度 0.2 mg/ml 約抑制 40% 之傷口癒合，提高濃度至 0.5 mg/ml 則傷口癒合抑制作用約 70%，細胞幾乎沒有移動。兩種藥物抑制結果呈現 dose-dependent (Fig. 2B)。另外利用 Boyden chamber assay 驗證 SNWE、SNPE 確實能影響 B16-F1 細胞之移動能力。結果發現：因為實驗最後一個步驟是以 Giemsa 染色，有穿透濾膜的細胞會被染上紫色，單單只有 B16-F1 細胞的組別被染上紫色的區塊較多顯示穿透濾膜的細胞較多從量化圖得知，細胞在 0.2 mg/ml SNWE 處理下細胞移動情形可達超過 30% 被抑制(Fig. 3A)；SNPE 細胞在 0.2 mg/ml SNWE 處理下細胞移動情形可達超過 40% 被抑制，且皆呈現濃度依賴性(Fig. 3B)。

SNWE 及 SNPE 對 B16-F1 細胞 MMPs 活性之影響

由 Fig. 3 證實 SNWE、SNPE 能抑制 B16-F1 細胞移動能力又 MMP-2 和 MMP-9 為 gelatinase，能夠分解 gelatin，參與細胞外基質的分解機制，因此利用 gelatin-zymography 測定 MMP-2、MMP-9 的酵素活性來了解細胞對細胞外基質的分解能力。由實驗結果發現：lane 1 為血清作為 marker，lane 2 是不加藥物的對照組，lane 3~7 為處理不同劑量。結果得知，不加 SNWE、SNPE 的對照組其 MMP-2 和 MMP-9 分泌量很多，但隨著處理的劑量增加，對於 B16-F1 所分泌的 MMP-2、MMP-9 有顯著的抑制作用。在 SNWE 最高濃度 0.5 mg/ml 分別抑制 MMP-2、MMP-9 的活性表現 0.48 及 0.56 倍；而 SNPE 同樣在最高濃度 0.5 mg/ml 分別抑制 MMP-2、MMP-9 的活性表現 0.54 及 0.77 倍(Fig. 4A, 4B)。

SNWE 及 SNPE 抑制 B16-F1 細胞轉移之機制

由前面的結果可以得知 SNWE、SNPE 能有效抑制 B16-F1 細胞移動能力，因此進一步利用 western blotting 來分析其機轉。在黑色素細胞中 Ras 與 c-AMP 訊號的平衡是維持細胞增生與分化的關鍵，當 Ras mutation 或 overexpression，伴隨而來的是 c-AMP dysregulation (28)，且 Ras 能促使腫瘤細胞增生而造成癌症惡

化並能促進癌細胞侵襲與轉移能力(29)，顯現出 Ras 對於黑色素瘤細胞的重要性。而 Ras 下游有 PI3K/Akt、ERK 等，而此路徑是癌化進行之重要機制，且已知 NF- κ B 的活化是會受到 Akt 的調控(30, 31)，在細胞質中一旦與 I κ B 分離，轉運到核內會促進癌細胞的增生與轉移。以西方墨點法分析 Ras 蛋白與 PI3K、Akt 磷酸化及 NF- κ B 蛋白表現，在劑量 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml SNWE 處理 24 小時，可以發現 Ras、PI3K、Akt-p、NF- κ B 的蛋白表現量皆隨著 SNWE 處理的濃度增加，其表現量隨之減少(Fig. 5A)；而 PKC 家族在其他文獻同樣的也指出是會促進細胞的遷移(32-34)。結果發現，SNWE 能夠抑制 PKC α 、PKC δ 的蛋白表現量且呈現劑量依賴性的趨勢(Fig. 5B)。然而在 2009 年的文獻指出(35)，是透過調控 PKC-MAPK 的路徑來抑制黑色素瘤細胞的遷移及侵襲的能力。隨後觀察位於 PKC 下游的蛋白 MAPK 家族成員，MAPK 家族成員主要有 ERK1/2、p38 與 JNK1/2，皆被證實與許多細胞的遷移作用有密切相關(36)。觀察 MAPK 家族成員之變化，結果發現 SNWE 能夠降低 p38 及 JNK 蛋白磷酸化的表現，ERK 磷酸化則沒有影響(Fig. 5B)。另一方面，觀察透過調控細胞骨架影響細胞遷移作用的蛋白 Rho GTPase 家族，RhoA、Rac1 和 CDC42 為關鍵的調控因子，主要參與對細胞型態改變，細胞與基質黏附及細胞骨架重組的調控，調節腫瘤細胞的侵襲轉移過程(37-40)。結果顯示，SNWE 可以降低 RhoA 及 CDC42 的蛋白表現，呈現劑量依賴性的趨勢，卻對 Rac1 沒有影響(Fig. 5C)。為了更進一步探討 SNWE 抑制細胞遷移的機制，一樣利用西方墨點法來觀察細胞中的蛋白表現情形。其結果顯示，以 SNPE 處理細胞後與 SNWE 是透過相同的路徑(Fig. 6A-C)。

SNPE 對 B16-F1 細胞骨架改變的影響

在顯微鏡底下觀察正常培養的 B16-F1 細胞，其外觀型態類似橢圓形的外觀且細胞之間緊密的結合在一起。經由調控細胞骨架與細胞的生長及侵犯有關，因此以 TRITC-phalloidin 的 F-actin 染色，研究 SNPE 對癌細胞轉移時經由細胞骨架改變產生釘狀偽足的型態上變化的影響，結果發現，單純只有細胞的情形下細胞呈現伸長的情形，並且在細胞邊緣形成與細胞移動有關的釘狀(spike) 偽足 filopodia，然而在處理 SNPE 後，會隨著濃度的增加減少細胞擴張拉伸的情況同時釘狀偽足的數目也越來越少，細胞邊緣也呈現較圓滑的型態(Fig. 7)

PKC α 抑制劑降低 B16-F1 細胞的移動能力

由 Fig. 5B 發現 PKC α 的表現量確實有下降，所以在此加入了不同的 PKC α 抑制劑，分別為 Go-6983、Ro-320432 與 Ruttlerin，藉由三種不同的 PKC α 抑制劑觀察，是否抑制 PKC α 的活性能夠降低細胞的移行作用。結果顯示，三種抑制劑皆能夠降低 B16-F1 細胞的移行數目(Fig. 8)，此結果也符合前面 SNWE 及 SNPE 的發現(Fig. 3)。

SNWE 對於血管新生作用之影響

血管新生(angiogenesis) 不但是正常生理變化中(如生長、傷口癒合)所必有的過程，也是腫瘤得以生長擴大、轉移的關鍵之一。因此在本篇論文中利用了裸鼠

及雞胚胎絨毛膜的模式來觀察 SNWE 是否會影響血管新生的情形。由(Fig. 9A)的實驗結果可以發現同時注射 Matrigel 與 B16-F1 組別的腫瘤，其顏色較單獨注射 Matrigel 還要深(深紅代表血管多)且因為有細胞牽引血管過來故有血管交錯縱橫在腫瘤中，測其血紅素值大約是 5 mg/ml，而在處理 SNWE 後，餵食 0.5%、的血紅素值降低超過一半；而 1% SNWE 其血紅素值更是下降到 1 mg/ml 以下(Fig. 9B)。另外亦觀察到一個有趣的現象，在餵食 0.5% SNWE 條件下即能明顯抑制裸鼠皮下腫瘤的體積及重量，而隨著餵食劑量增加至 1% 腫瘤抑制效果更好，重量約小了三倍(Fig. 9C)。由先前的裸鼠試驗可以證實 SNWE 能降低腫瘤血管新生作用。接著再利用雞胚胎絨毛模試驗來加以驗證結果是否互相吻合。結果發現：在滴入 Matrigel 與 B16-F1 細胞混合液組別中，突起部分周圍的血管分布情形與單獨滴入 Matrigel 比較下有明顯增多的趨勢，表示 B16-F1 細胞會誘導血管新生作用，然而在有處理 SNWE 及 SNPE 的組別中則可以發現突起周圍血管分布的情形會隨著處理的濃度增加而減少(Fig. 10A)，而其量化圖是計數細胞周圍的血管(Fig. 10B)。

SNWE 對癌症惡化轉移之動物模式之影響

將 B16-F1 細胞以尾靜脈注射的方式打入 C57BL/6 鼠體內，實驗歷經 21 天，若有動物不幸於療程中死亡，立即行屍體解剖，實驗結束亦將存活的動物犧牲進行解剖。結果發現：與正常對照組相比，B16-F1 誘導組可發現肺臟上充滿黑色素瘤細胞(melanoma) 群落，在肝臟、腎臟及腸間道上也有發現黑色素瘤細胞群落(箭頭所指處)，推測為 melanoma 惡性轉移之現象。至於在 0.5% SNWE 組從外觀上發現肺臟惡化的情形與誘導組差異不大，而在肝臟、腎臟及腸間道上同樣也觀察到黑色素瘤細胞群落；不過隨著餵食的劑量增加，肺臟惡化的嚴重度有減緩的現象，在餵食 1% SNWE 組在外觀上已有明顯的改善，而 2% SNWE 組在小腸間已無發現黑色素瘤細胞群落(Fig. 11A-B)。量化肺臟上黑色素瘤細胞的群落數及其他臟器上腫瘤的轉移率，結果發現：正常對照組因為沒有注射 B16-F1 細胞所以看不到肺臟有腫瘤的形成，而 B16-F1 誘導組在每隻每個肺臟上平均約有 155 個細胞群落，0.5% SNWE 組肺臟上約少了 25 個細胞群落有 130 個左右，在統計學上已具有顯著的差異，1% SNWE 組肺臟上平均約有 85 個細胞群落，至於 2% SNWE 組肺臟上平均少了一半以上的細胞群落約只剩下 70 個(Fig. 11C)。再將肺進行 H&E stain，在正常對照組的肺切片圖中，可以觀察到有空泡的地方是肺泡，B16-F1 誘導組切片中可以發現有深色濃染的區塊都是癌細胞，形成 tumor nest 腫瘤巢，整片肺的內部空間幾乎被癌細胞佔滿，大大小小的 tumor nest 都有，在癌細胞的周圍也可觀察到由 B16-F1 細胞所釋放的 melanin。不過隨著餵食的計量越高，從 1% SNWE 組肺泡被癌細胞填塞的比例變少看的見肺泡的區塊變多了不僅如此連 tumor nest 的大小都有縮小的現象，而 2% SNWE 組則是更加的明顯(Fig. 11D)。在此動物實驗模式中，結果發現 B16-F1 誘導組以及 SNWE 組腫瘤發生率(tumor incidence)為 100%。而在其他臟器方面 B16-F1 誘導組有六隻轉移到肝臟及腎臟(2/8)，0.5% SNWE 組有四隻轉移到肝及腎臟(4/8)而 1% SNWE 組則

是有三隻轉移到肝及腎臟(3/8)，那麼在 2% SNWE 組只剩下一隻老鼠有轉移到肝臟(1/8)但有兩隻轉移到腎臟(2/8) (Fig. 12)。由上述結果可說明 SNWE 能夠有效降低惡化轉移之動物腫瘤發生率以及轉移能力與甚至抑制腫瘤之生長。

SNWE 對於惡化轉移之動物飲食、體重與存活率分析

飲食攝取量(Fig. 13A) 及體重(Fig. 13B) 改變為評估動物健康徵兆的指標之一。所以在實驗的過程中紀錄及老鼠犧牲後之生理特徵進行統計。結果顯示，在正常對照組及毒性測試組在實驗的過程中體重是持續增加，飲食量也都維持在一隻一天吃約 4 g。不過第二週開始，B16 誘導組的老鼠體重明顯降低，進入第十七天，B16 誘導組的飲食量開始減少，原本一隻老鼠一天約吃 4 g 的飼料到實驗結束前誘導組的老鼠一天只剩下吃 1 g 多，少了大約三倍的量；而 0.5%、1%、2% SNWE 組，也是從第二週開始，老鼠的體重明顯減低，至於飲食量方面則是大約進入第十九天，餵藥組食慾才開始下滑。從統計圖上發現，隨著餵食 SNWE 的劑量越高，老鼠的飼料攝取量是增加的。統計此動物實驗模式各組的死亡率如下所述：正常對照組全部存活到 21 天，而 B16 誘導組則是陸續死了兩隻老鼠，而其他未死亡的老鼠呈現較虛弱的模樣；SNWE 組的老鼠在實驗的過程中都只死掉一隻，不過 0.5% SNWE 組的老鼠也是呈現精神萎靡，至於 1%、2% SNWE 組的老鼠大部分維持正常的活動。由上述可推測：SNWE 確實能抑制黑色素瘤細胞惡化轉移而增進 C57BL/6 小鼠的存活及身體狀態(Fig. 13C)。

SNWE 對惡化轉移之動物血清中 MMPs 活性及相關蛋白表現之影響

利用 gelatin-zymography 分析 SNWE 對惡化轉移之動物血清中 MMPs 活性表現之影響。於 Fig.4A 證實 SNWE 對於 B16 細胞所分泌的 MMP-2、MMP-9 有顯著的抑制作用，同樣的在動物體內得到證實。在動物血清中，SNWE 能夠抑制 B16 所分泌的 MMP-2、MMP-9 之活性表現(Fig. 14A)。另外，利用西方墨點法分析在 B16 細胞實驗中證實：參與在 SNWE 抑制細胞移動侵襲之蛋白(Ras、Akt-p、NF- κ B、PKC α) 表現，B16 誘導組增加 Ras 表現量和 Akt 磷酸化；以及對於 NF- κ B 和 PKC α 蛋白有抑制作用。初步結果與細胞實驗相互印證(Fig. 14B)。

討論

本研究的終旨及貢獻 (1) 提出龍葵成份為新的 chemopreventive agents ; (2) 說明其中的抗癌機轉 ; (3) 提供龍葵抑制動物致癌及轉移作用之功效。

侵襲與轉移是惡性腫瘤的重要特徵，主要也是造成病患死亡的主因。科學家對於腫瘤轉移機制歷經多年的研究，對於這一複雜病理過程已有了更深入的認識。發現並證實與腫瘤轉移高度相關的基因成為當前腫瘤轉移機制研究的熱點，因為這些基因及其產物可能成為腫瘤抗轉移治療新標的或是患者癒後的重要指標；並且研發具有抑制癌症轉移效果的藥物或是化學防癌物質也是另一重要的研究方向。龍葵，含有生物鹼、醣蛋白、多醣體以及酚酸等數種功能性成分，在許多文獻中已證實龍葵中的生物鹼、醣蛋白、多醣成分具有殺死癌細胞之作用。相較之下，龍葵中的多酚成分則少為人所探討。因此本文欲深入探討化學防癌物質-龍葵水萃(SNWE) 及其多酚萃取物(SNPE) 抑制癌細胞轉移之分子機制。

在以 MTT 試驗來分析 SNWE 及 SNPE 對於黑色素瘤細胞 B16-F1 是否會產生細胞毒性。發現 SNWE 對於 B16-F1 細胞需 0.87 mg/ml 即達半致死劑量，而 SNPE 對於 B16-F1 細胞達半致死劑量為 0.81 mg/ml，較 SNWE 來的低一些，因此可知多酚成分對癌細胞的毒殺性較強。黑色素瘤細胞因本身具有一些不易死亡的優勢特質(抗凋亡蛋白表現的較多)，所以治療不易。由於 SNWE 半致死劑量相近於 SNPE，顯示出 SNWE 中除了多酚外還有其他成分可能造成毒殺細胞的功能。許多文獻中已證實龍葵中的生物鹼、醣蛋白、多醣成分具有殺死癌細胞之作用，在 SNWE 中初步排除是生物鹼的影響(實驗室日前的 data)。然而多酚的結構非常複雜且目前已發現 8000 種以上的酚類化合物，依其碳骨架及化學結構不同可分為四大類：(1) 類黃酮(flavonoid)，(2) 酚酸(phenolic acid)，(3) 二苯乙烯(stilbene)，(4) 木質酚素(lignan)。四類中以類黃酮在食物中量最多，其又可依鍵結方式不同分成六類：flavones、flavonols、flavanones、flavanols、anthocyanidines、isoflavones。究竟是哪一種成分為主要的毒殺功能，尚待日後更進一步的分析，並藉由純化合物來進行實驗分析與本篇結果互作對照。

在癌症轉移擴散的過程中，癌細胞藉由 MMP 來分解細胞間基質的組成蛋白質，導致細胞與細胞間基質分離，促使癌細胞具有移動性，同時 MMP 也在腫瘤的血管新生上扮演重要的角色。此外血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 與纖維細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF) 會經由誘導 MMP-1、MT1-MMP 及 uPA 的表現及活化 MMP-2 來促進腫瘤的血管新生，而 MMP-9 也能藉由調節 VEGF 造成直腸癌血管新生作用。從過去的研究指出龍葵能夠降低血管新生作用。而我們的研究證實了 SNWE 及 SNPE 也具有抑制 B16-F1 細胞 MMP 的活性和血管新生作用。

近年來研究發現，small GTPase family 在多種惡性腫瘤中高度表達，並和腫瘤的發生、侵襲和轉移密切相關。且從過去的研究指出 PI3K/Akt 路徑與細胞生存、抗凋謝死亡、血管新生及癌細胞惡化侵襲有關，PI3K/Akt 路徑會啟動 NF- κ B 之活化，且許多細胞外分解基質的蛋白酶都受到 NF- κ B 的調控。在 2004 年 Jiang

等人提出 Ras/PI3K/Akt 是癌症惡性轉移侵襲的重要機制之一，更清楚定位這些細胞移動侵襲相關因子的角色。而在 2009 年的文獻指出，是透過調控 PKC-MAPK 的路徑來抑制黑色素瘤細胞的遷移及侵襲的能力，依循此脈落探討且活化 MAPK 訊息傳遞路徑，結合至 MMPs 基因啟動子(promoter) 上的 AP-1 及 ETS 轉錄因子，誘發調控 MMPs 的轉錄表現。

另一方面，觀察透過調控細胞骨架影響細胞遷移作用的蛋白 Rho GTPase 家族，RhoA、Rac1 和 CDC42 為關鍵的調控因子，主要參與對細胞型態改變，細胞與基質黏附及細胞骨架重組的調控，調節腫瘤細胞的侵襲轉移過程。SNWE 和 SNPE 可以降低 RhoA 及 CDC42 的蛋白表現。然而同樣為 Rho GTPase 家族的 RhoB 現今已也有證據指出是執行與 RhoA 完全相反的功能，缺乏 RhoB 的表現會促進癌細胞的侵襲與遷移能力。在 SNWE 及 SNPE 的處理下蛋白是沒有變化的(data not show)。在利用三種不同種類的 PKC α 抑制劑試驗中，這三種不同的抑制劑，雖然都是具有抑制 PKC α 活性之作用，但是對於不同 type 的 PKC 之感受度皆有所不同，但根據結果顯示三種抑制效果相近，而 Ruttlerin 對於 PKC δ 的敏感度又比 PKC α 要高，是不是也暗示著 PKC δ 的重要性。綜合以上結果，我們推測 SNWE 及 SNPE 可能是透過 Ras/PI3K/Akt/NF- κ B 和 PKC/MAPK (p38, JNK) 路徑進一步影響了 MMPs 的表現而造成細胞移動能力的降低，也可能是透過影響細胞骨架蛋白 RhoA 與 CDC42，進而減緩細胞的移動能力。在研究龍葵萃取物抑制癌細胞轉移之路徑機制時，雖然發現三條不同的路徑，看似不相關的路徑，彼此之間是否有 cross-link，可能需要再更進一步去驗證。

從傷口癒合實驗的結果不僅能夠觀察細胞的遷移作用，同樣的也能觀察細胞的增生，而 PI3K/Akt 與 PKC 對於細胞增生的關係十分密切，的確在處理 SNWE 與 SNPE 後蛋白表現量是降低的。先前在建立動物的腫瘤轉移模式中，有透過皮下注射的方式將 B16-F1 細胞打入鼠體內並餵食龍葵，實驗結果顯示：隨著餵食劑量增加，皮下的腫瘤大小與重量皆有獲得改善，並在裸鼠血管新生試驗中也意外發現相同的現象，初步證實龍葵能抑制癌細胞的增生，減緩腫瘤的生成。而龍葵抑制動物體內的黑色素腫瘤惡化，是否是透過抑制血管新生作用，或是上有其他機制，而與本篇中抑制癌細胞轉移的機制有無關聯有需進一步的驗證。

從 1949 到今日，龍葵用於疾病的例子屢見不鮮。除此之外，在中草藥豐富的中國，更有報告指出龍葵或其複方可用於輔助減緩多種惡性腫瘤，由此可知，龍葵的確在抗癌方面上具有一定的功效。綜合本文 in vitro 和 in vivo 的研究結果得知，SNWE 及 SNPE 可以抑制血管新生作用，進一步影響了腫瘤的轉移。SNWE 及 SNPE 抑制癌細胞轉移與血管新生可以作為佐證龍葵抗癌之作用，也說明龍葵確實適合發展為降低癌症發生率之保健食品。

參考文獻

1. Sultana et al., (1995) Crude extracts of hepatoprotective plants, *Solanum nigrum* and *Cichorium intybus* inhibit free radical-mediated DNA damage. *J. Ethnopharmacol.*, 45, 189-92.
2. Prashanth et al., (2001) alpha-Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. *Fitoterapia*, 72, 686-8.
3. Jindal, V.K. and Patel, N.B. (1975) Some pharmacological activities of aqueous and alcoholic extracts of *Cichorium intybus* Linn. *Indian J. Pharmacol.*, 7, 104-108.
4. Saxena, A. and Garg, N.K. (1979) Effect of Liv-52 on hepatic enzymes. *Indian J. Exp Biol.*, 17, 662-668.
5. An, H.J., Kwon, K. B. et al., (2005) *Solanum nigrum* produces nitric oxide via nuclear factor-[kappa]B activation in mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Cancer Prev.*, 14, 345-350.
6. Heo, K. S., Lee, S. J., Ko, J. H., Lim, K. and Lim, K. T. (2004) Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF- κ B and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells. *Toxicol. In Vitro*, 18, 755-763.
7. Perez et al. (1998) Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit, *J. Ethnopharmacol.*, 62, 43-48.
8. Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H. (2001) Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 1045-1053.
9. Son, Y.-O., Kim, J., Lim, J.-C., Chung, Y., Chung, G.-H., Lee, J.-C. (2003) Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 1421-1428.
10. Lee, S.J., Ko, J.H., Lim, K. and Lim, K.T. (2005) 150 kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne enhances activities of detoxicant enzymes and lowers plasmic cholesterol in mouse. *Pharmacol. Res.*, 51, 399-408.
11. 呂翠霞等，1999，*山東中醫藥大學學報*，23：224。
12. 王云啟，2002，*遼寧中醫雜誌*，15：101。
13. 羅開明等，1999，*右江醫學*，27：105。
14. 張書元等，2000，*華北煤炭醫院學報*，2：380。
15. 王泳，2000，*中醫藥研究*，16：20。
16. 陸克勤，2000，*中國醫刊*，35：51。
17. 蘇進成等，2003，*J. Chin. Med.*，14：151。
18. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(6): p. 442-54.

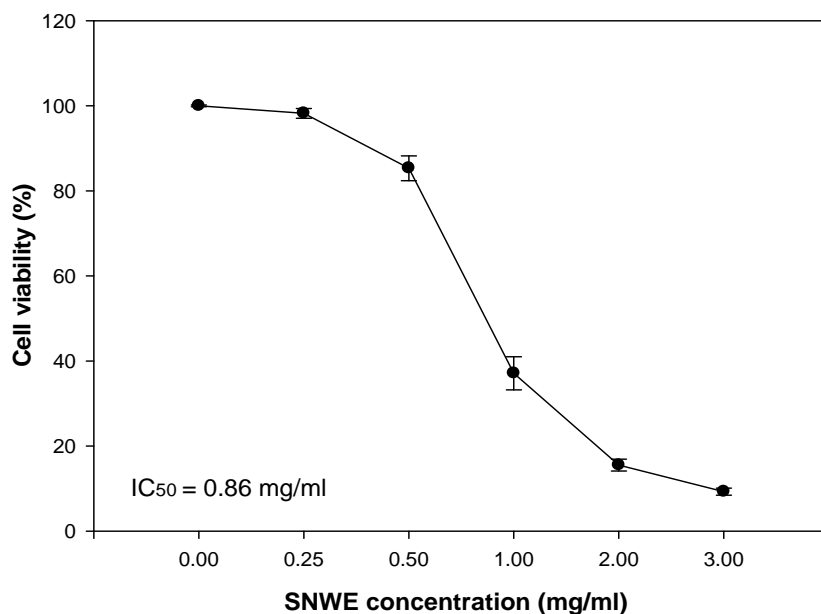
19. Arias, A.M., Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell*, 2001. 105(4): p. 425-31.
20. Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995. 1(1): p. 27-31.
21. Kim, H.I., et al., Curcumin inhibition of integrin (alpha6beta4)-dependent breast cancer cell motility and invasion. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2008. 1(5): p. 385-91.
22. Campas-Baypoli, O.N., et al., [Sulforaphane (1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane) content in cruciferous vegetables]. *Arch Latinoam Nutr*, 2009. 59(1): p. 95-100.
23. Demeule, M., et al., Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2002. 2(4): p. 441-63.
24. Huang, H.P., et al., Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on melanoma metastasis involved in the Ras/PI3K pathway. *J Agric Food Chem*, 2008. 56(19): p. 9286-93.
25. Gschwendt, M., et al., Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett*, 1996. 392(2): p. 77-80.
26. Manuela Banzi, Gianluca Aguiari, Viky Trimi, Alessandra Mangolini, Paolo Pinton, Ralph Witzgall, Rosario Rizzuto, Laura del Senno. Polycystin-1 promotes PKC α -mediated NF- κ B activation in kidney cells. Elsevier Inc. 2006
27. Bianchini, F., et al., Expression of a metastatic phenotype in IFNs-primed/TNFalpha-activated B16 murine melanoma cells: role of JAK1/PKCdelta signal transduction factors. *Clin Exp Metastasis*, 2006. 23(3-4): p. 203-8.
28. Dumaz, N., et al., In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res*, 2006. 66(19): p. 9483-91.
29. Khosravi-Far, R., et al., Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(11): p. 6443-53.
30. Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature*. 401, 86-90, 1999.
31. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor require the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 401,82-5, 1999.
32. Bressler E, Qi Y, Roztocil E, Nicholl SM, Davies MG; University of Rochester. UROKINASE-INDUCE SMOOTH MUSCLE CELL MIGRATION REQUIRES PKC-alpha AND PKC-delta ISOFORM.
33. Carpenter AC, Alexander JS. Endothelial PKC delta activation attenuates neutrophil transendothelial migration. *Inflammation research*, 2008 No.5.

34. Chaohong LI, Florian wernig, Michael leitges, Yanhua HU and Qingbo XU. Mechanical stress-activated PKC δ regulates smooth muscle cell migration. The FASEB Journal. 2106-2108, Vol.17, 2003.
35. Hiroshi Matsuoka, Masanobu Tsubaki, Yuzuru Yamazoe, Mitsuhiko Ogaki, Takao Satou, Tatsuki Itoh, Takashi Kusunoki. Tamoxifen inhibitor tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. Elsevier Inc. 2009.
36. Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M. D. MAP kinase and cell migration. J Cell Sci, 117 : 4619-4628, 2004.
37. Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS, Der CJ. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinase is required for Ras transformation. Mol Cell Biol. 15, 6443-53, 1995.
38. Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. Cancer Lett. 171, 1-10, 2001.
39. Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, Der CJ. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathway. Mol Cell Biol. 17, 1324, 1997.
40. Whitehead IP, Abe K, Gorski JL, Der CJ. CDC42 and FGD1 cause distinct signaling and transforming activities. Mol Cell Biol. 18, 4689-97, 1998.

第三年

- 實驗結果附圖 -
第二部份

(A)



(B)

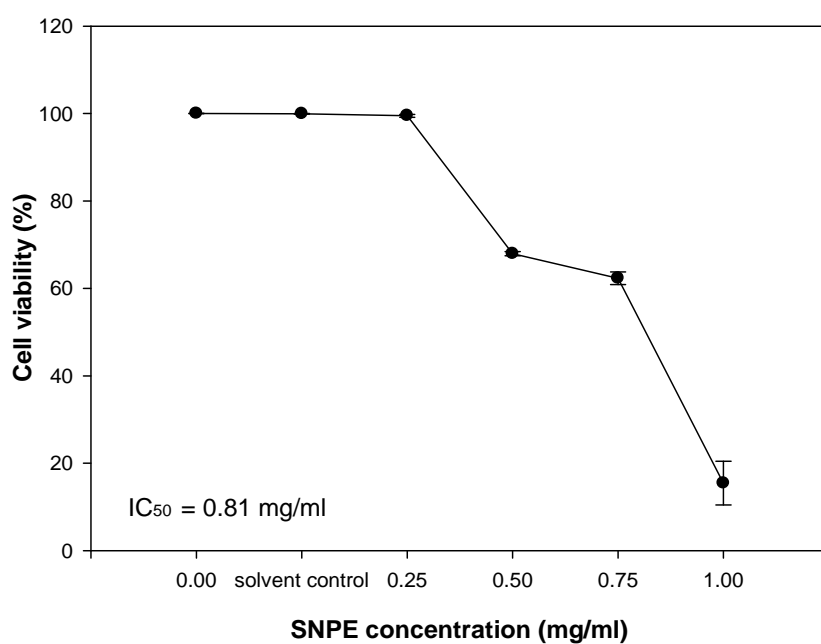
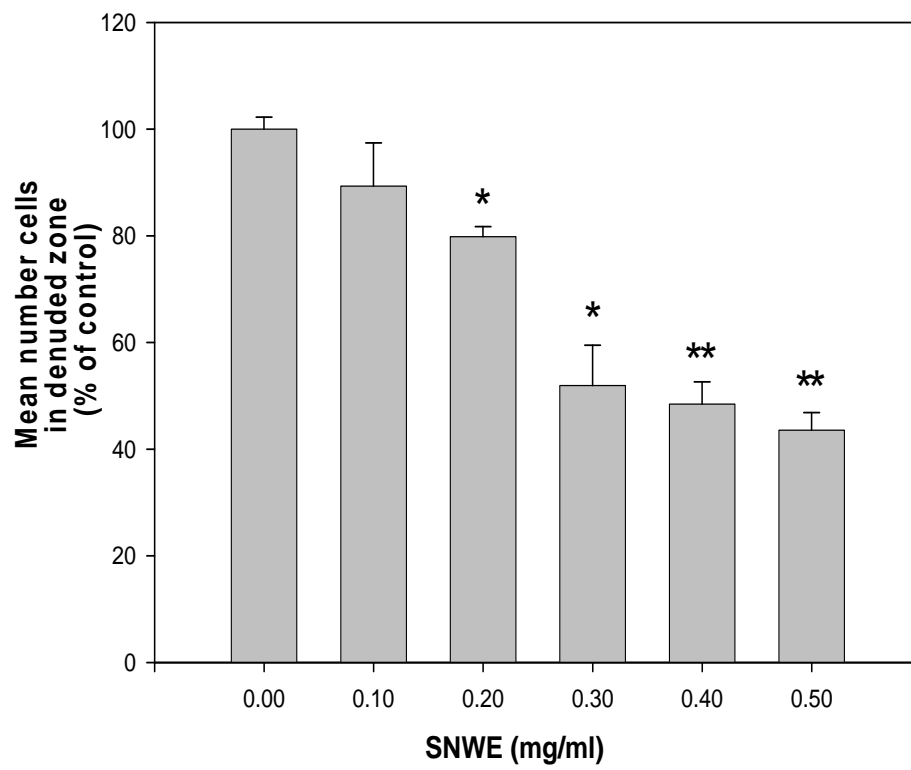
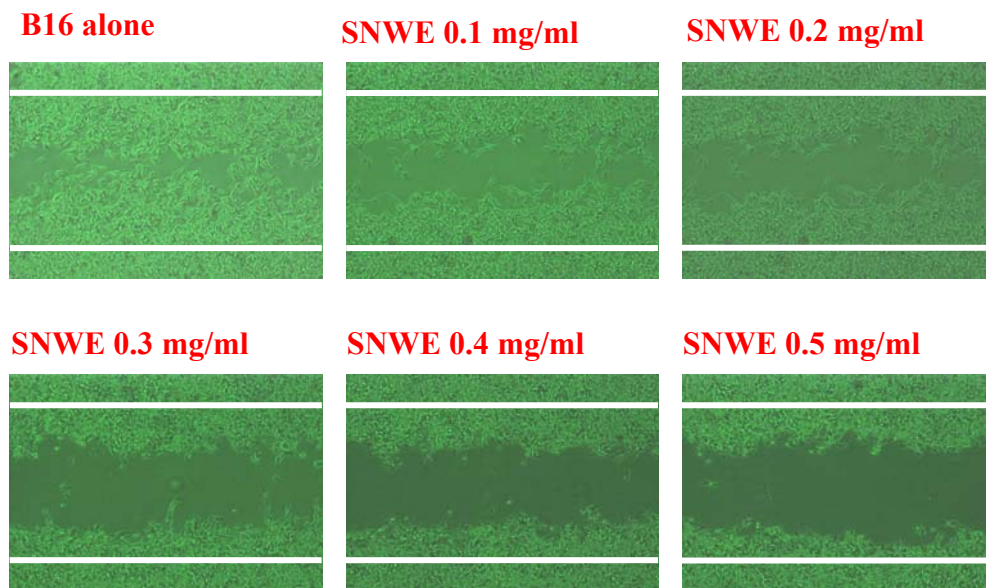


Figure 1. Effect of SNWE and SNPE on the viability of B16-F1 cells. B16-F1 cells (1×10^5 cells/ml) were treated with various concentrations of (A) SNWE and (B) SNPE for 24 hrs. The viability of the cells was determined by MTT assay. The survival cell number was directly proportional to formazan, which was measured spectrophotometrically at 563 nm.

(A)



(B)

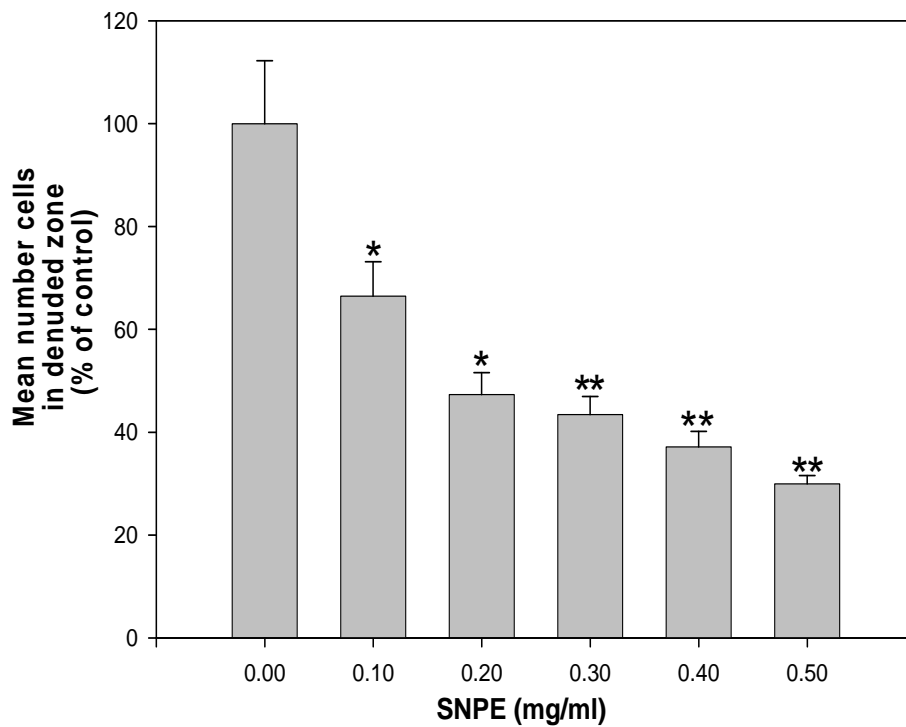
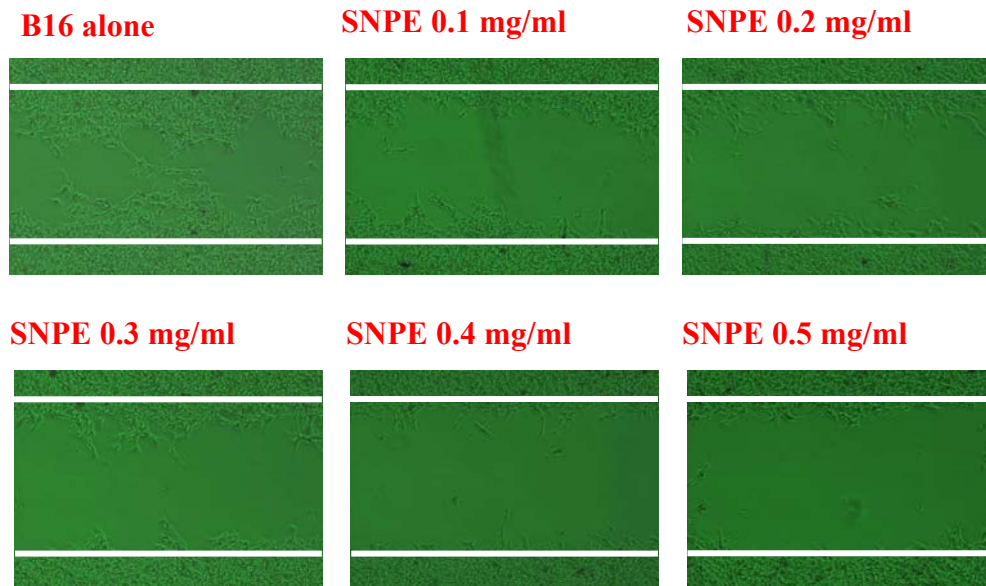
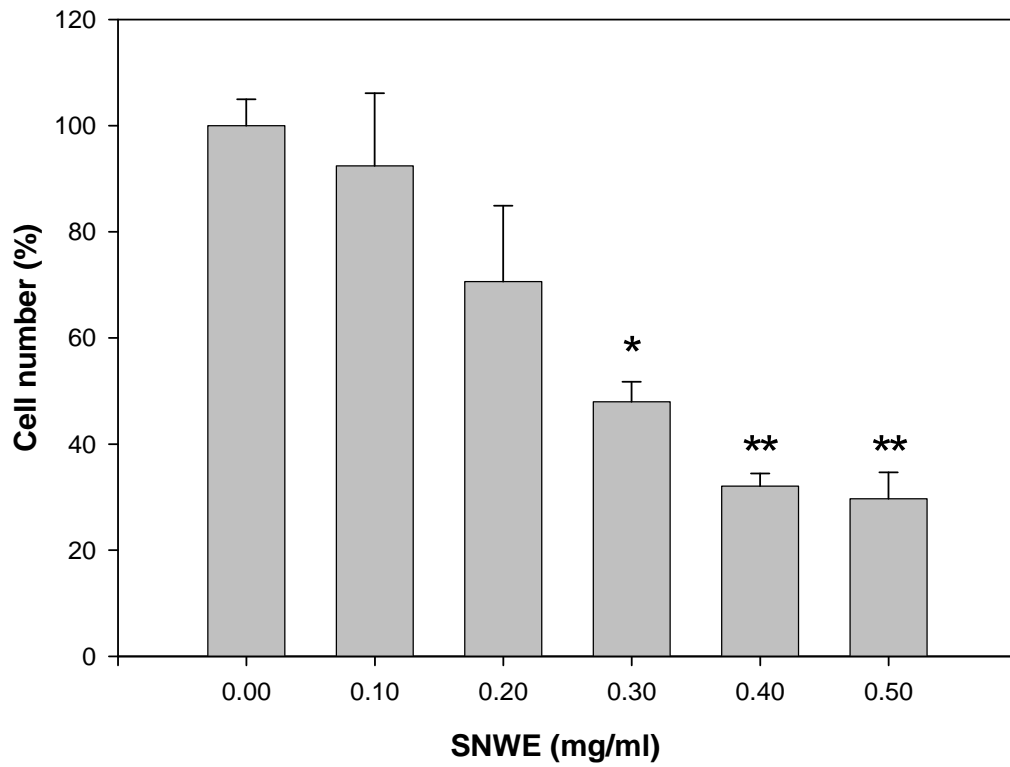
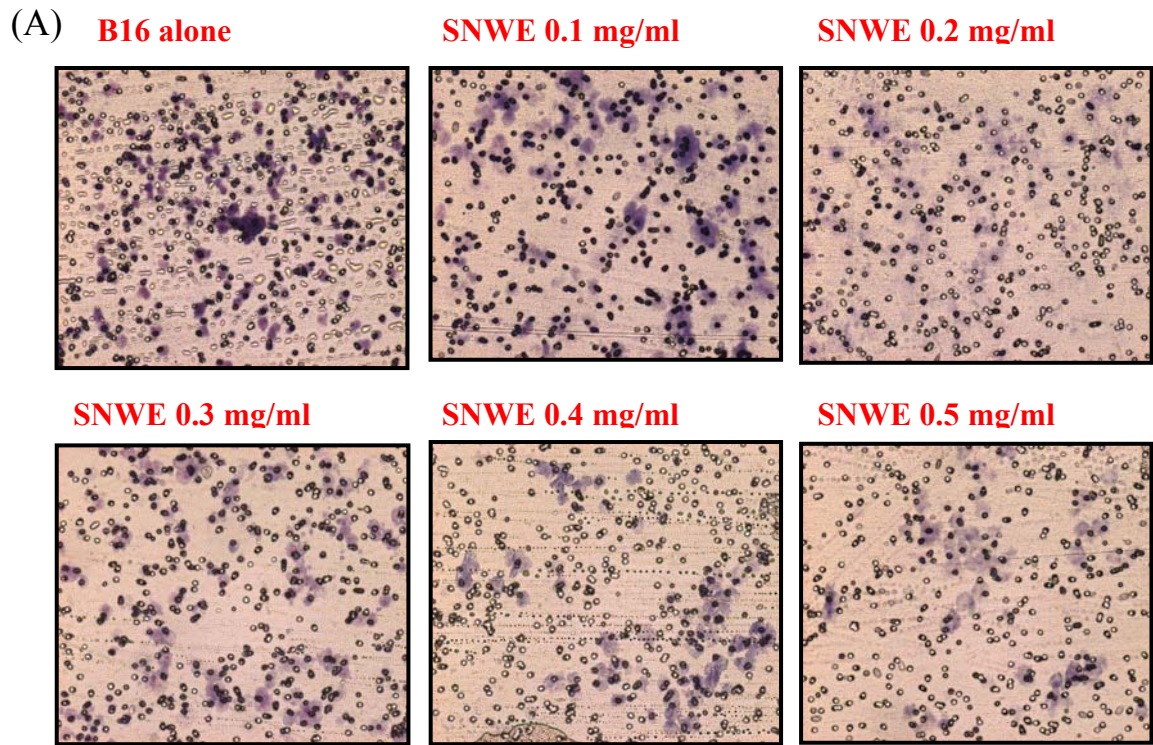


Figure 2. Effect of SNWE and SNPE on the motility of B16-F1 cells. Cell monolayers were treated with various concentrations (0~0.5 mg/ml) of (A) SNWE and (B) SNPE for 24 hrs. Representative photomicrographs of the denuded zone 24 hrs after scraping in the non- or SNWE- and SNPE-treat groups. The number of cells in the denuded zone was quantified by inverted microscopy. Quantitative assessment of the average number of the cells in the denuded zone was expressed as the mean. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.005$, compared with the untreated control.



(B)

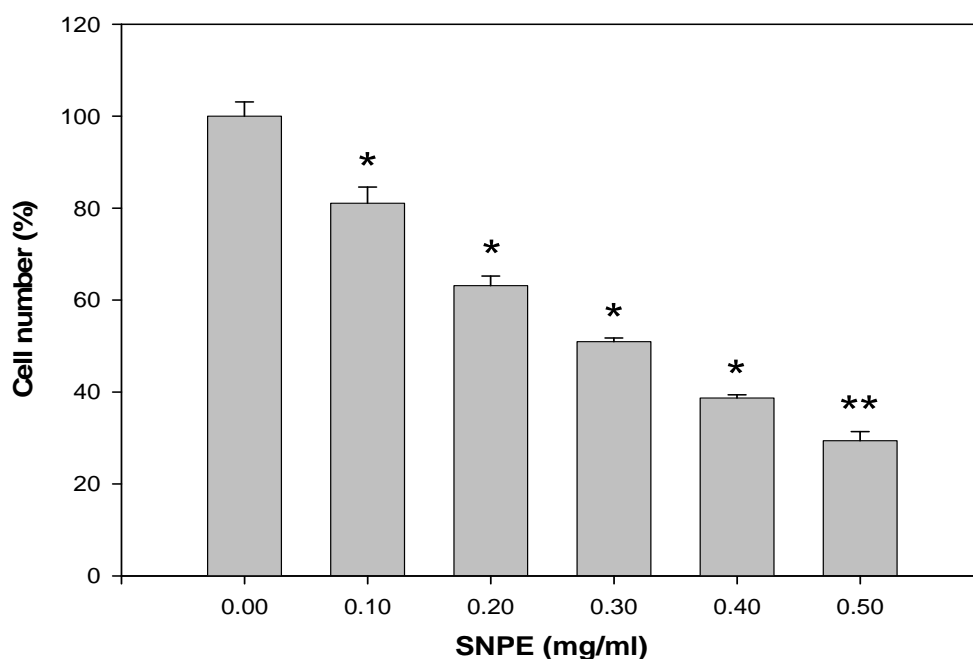
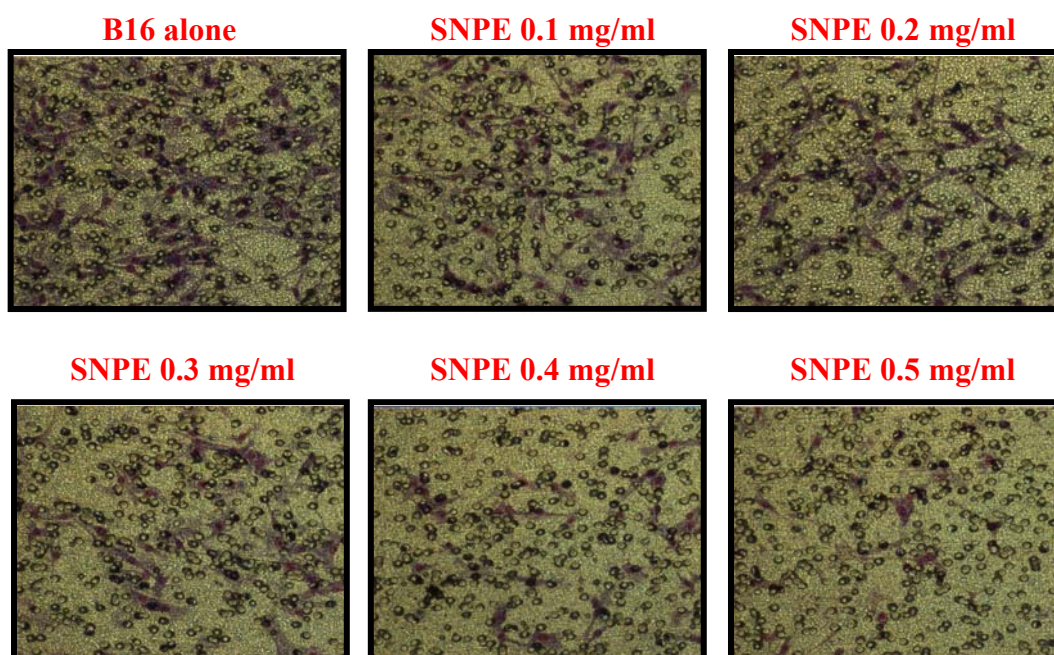
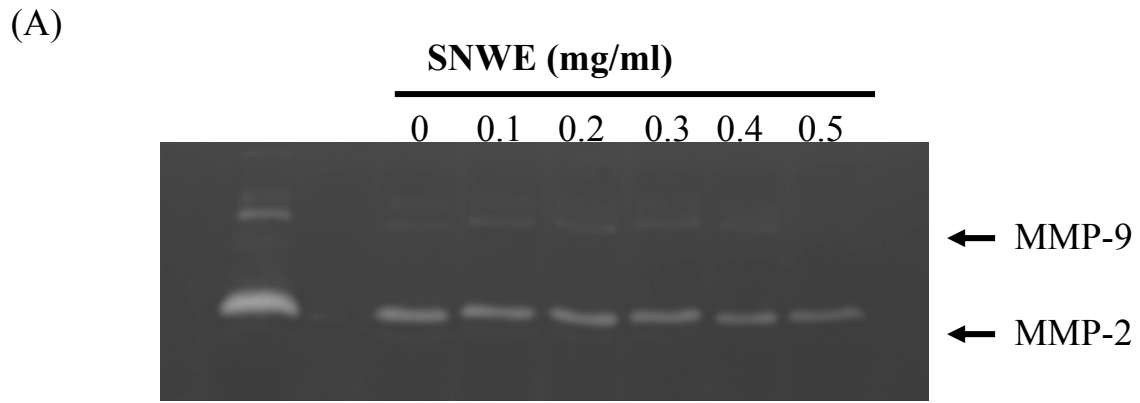
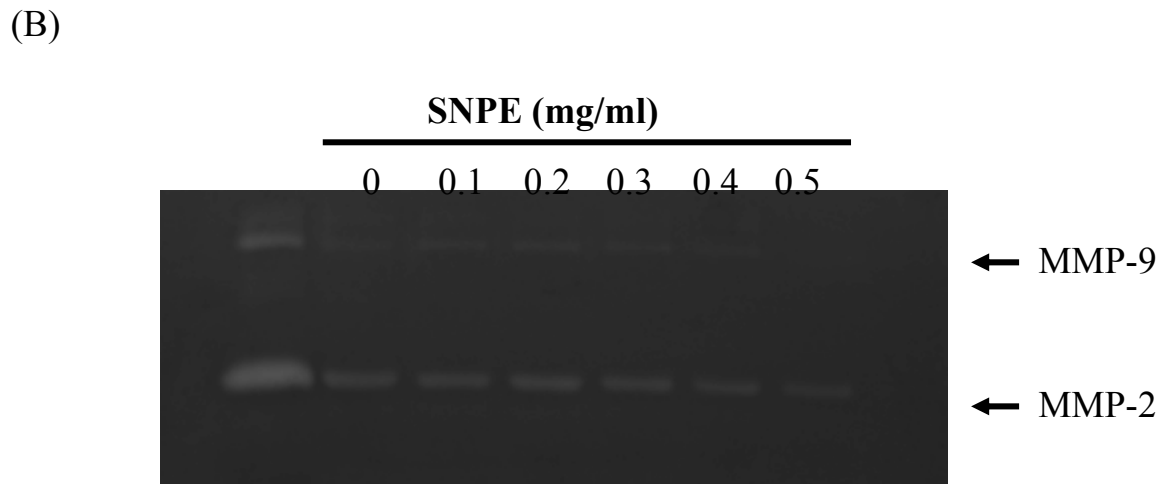


Figure 3. Effect of SNWE and SNPE on migration of B16-F1 cells. B16-F1 cells were pre-treated with various concentrations (0~0.5 mg/ml) of (A) SNWE and (B) SNPE for 24 hrs. Cell migration was measured by Boyden chamber for 8 hrs with polycarbonate filter (pore size, 8 μ m). Migration ability of B16-F1 cells were quantified by counting the number of cells that invaded the under side of the porous polycarbonate membrane under microscopy and represents the average of three experiments. *, p < 0.01 and **, p < 0.005 compared with the untreated control.



	1	1.1	1.12	1.1	0.93	0.52	
Fold							MMP-9
	1	0.88	0.80	0.72	0.48	0.44	MMP-2



	1	0.87	0.85	0.74	0.53	0.46	
Fold							MMP-9
	1	0.86	0.87	0.74	0.47	0.23	MMP-2

Figure 4. Effect of SNWE and SNPE on MMP-2/MMP-9 activity of B16-F1 cells. Cells were treated with various concentrations (0~0.5 mg/ml) of (A) SNWE and (B) SNPE for 24 hrs. The conditioned media were collected, and MMP-2/MMP-9 activities were determined by gelatin zymography. MMP-2/MMP-9 activities were quantified by densitometer analysis.

(A)

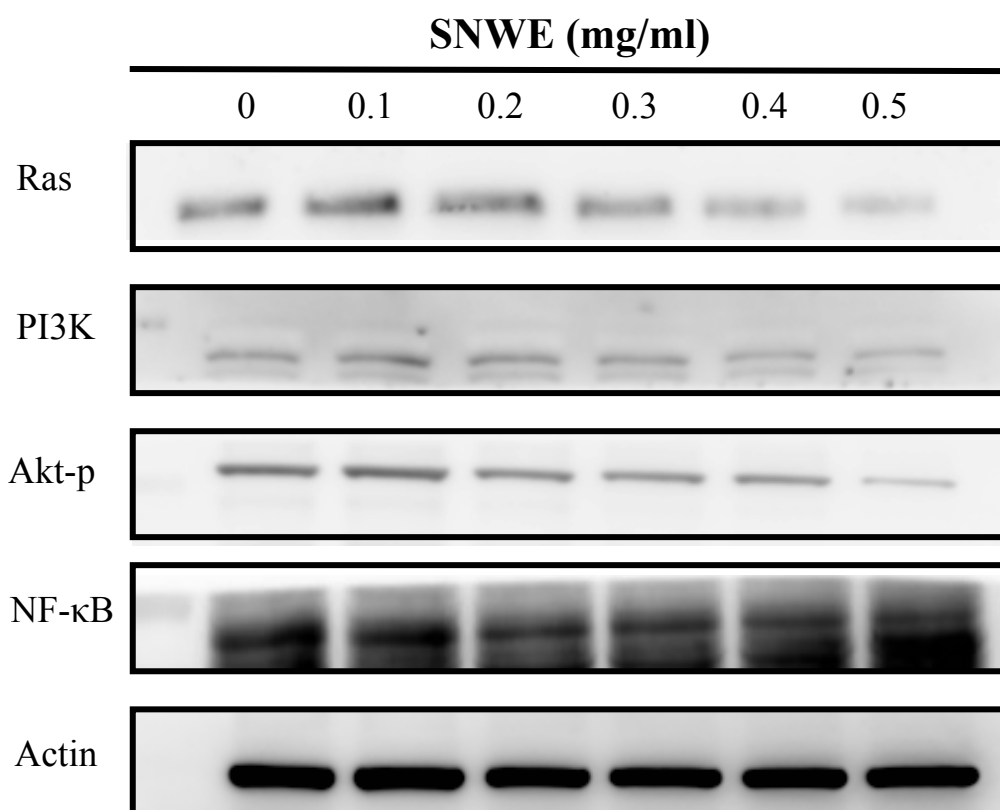


Figure 5A. Immunoblot analysis of the expression of Ras, PI3K, Akt-p, NF-κB in B16-F1 cells treated with SNWE. Culture cells were treated with or without SNWE (0~0.5 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total protein were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against Ras, PI3K, Akt-p, NF-κB . Western blot analysis of β-actin was used as an internal control.

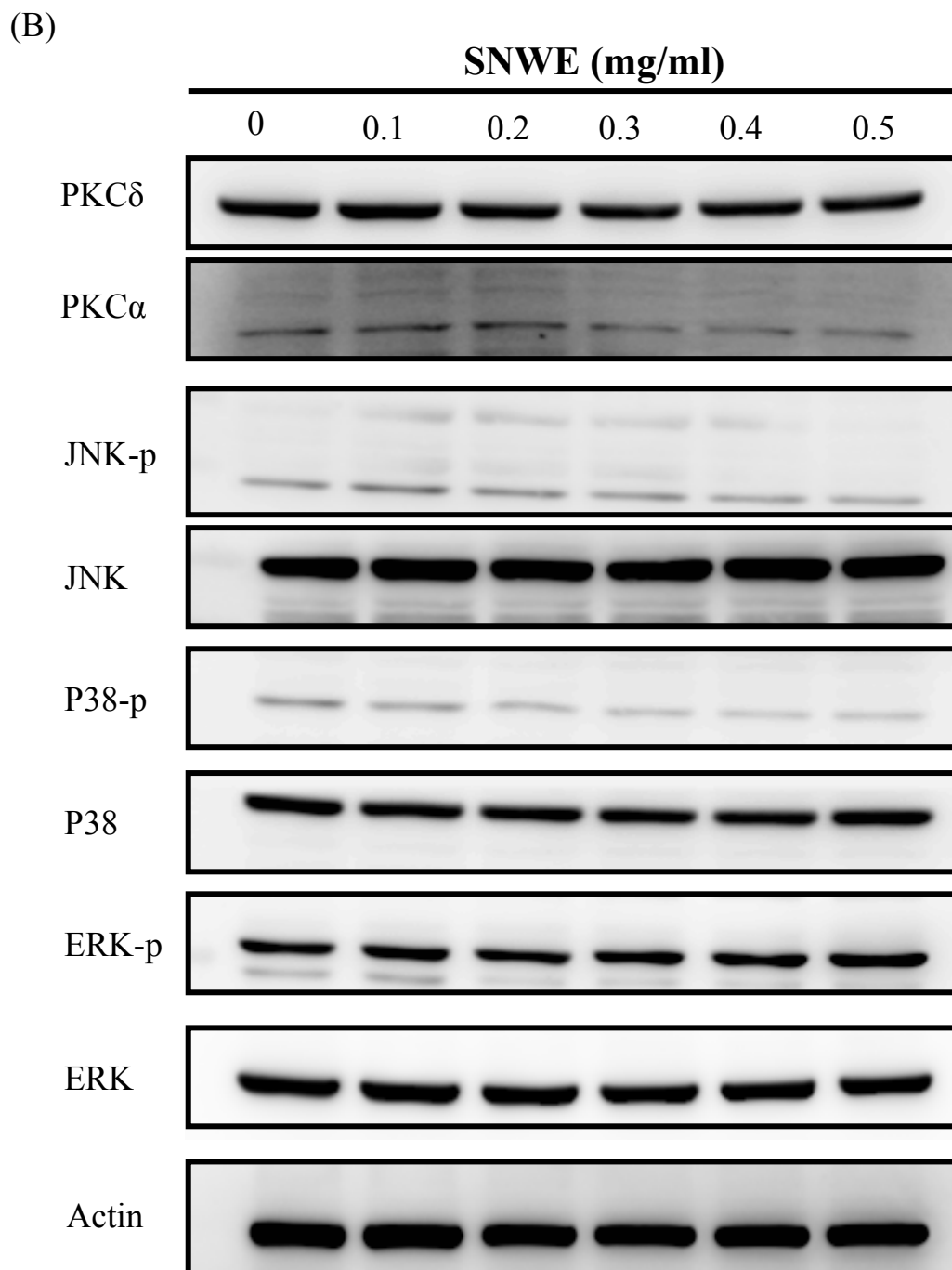


Figure 5B. Immunoblot analysis of the expression of PKC α · δ , JNK, P38, ERK in B16-F1 cells treated with SNWE. Culture cells were treated with or without SNWE (0~0.5 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total protein were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against PKC α · δ , JNK, P38, ERK . Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

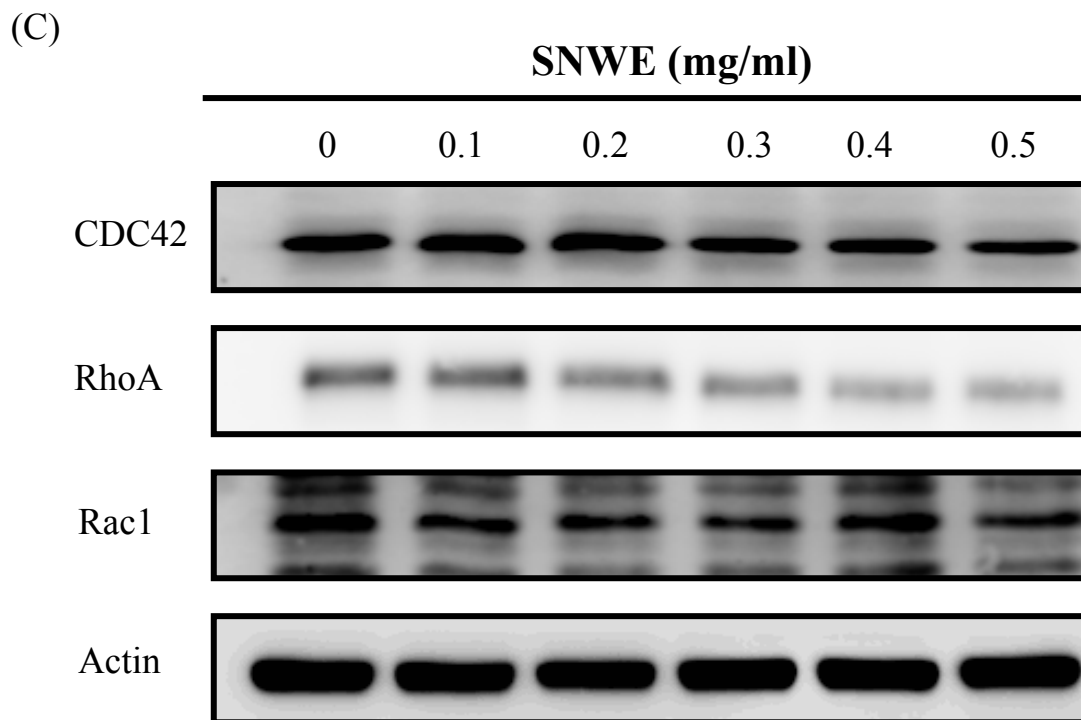


Figure 5C. Immunoblot analysis of the expression of CDC42, RhoA, Rac1 in B16-F1 cells treated with SNWE. Culture cells were treated with or without SNWE (0~0.5 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total protein were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against CDC42, RhoA, Rac1 . Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

(A)

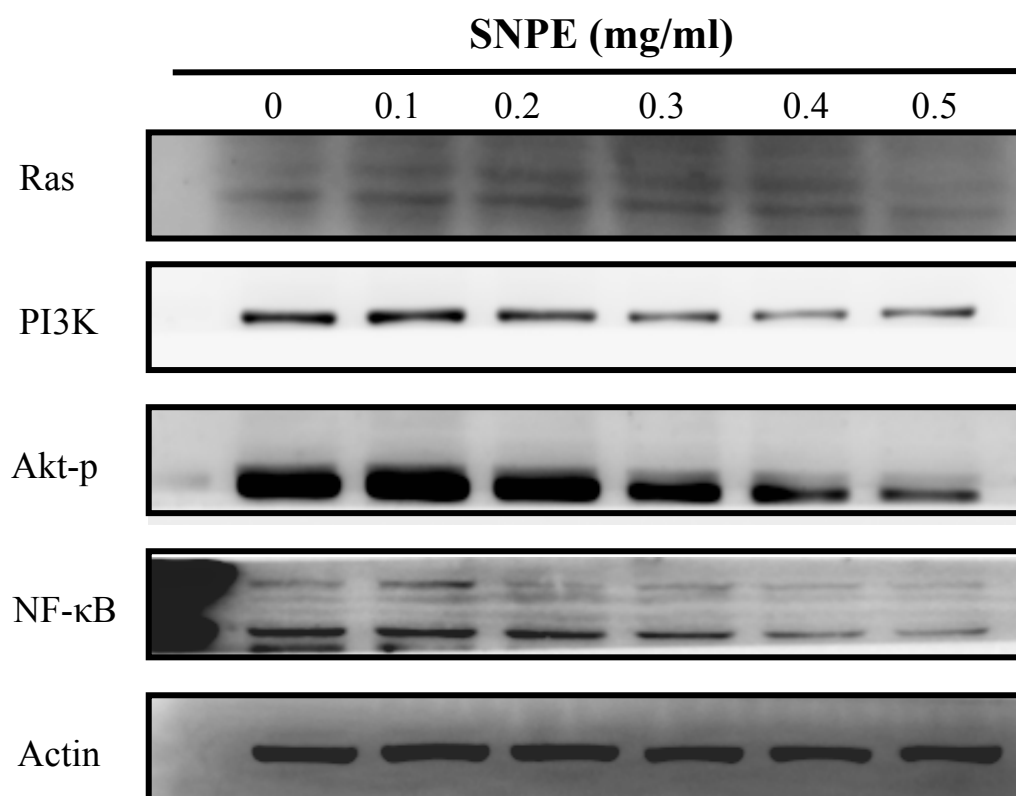


Figure 6A. Immunoblot analysis of the expression of Ras, PI3K, Akt-p, NF-κB in B16-F1 cells treated with SNPE. Culture cells were treated with or without SNPE (0~0.5 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total protein were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against Ras, PI3K, Akt-p, NF-κB . Western blot analysis of β-actin was used as an internal control.

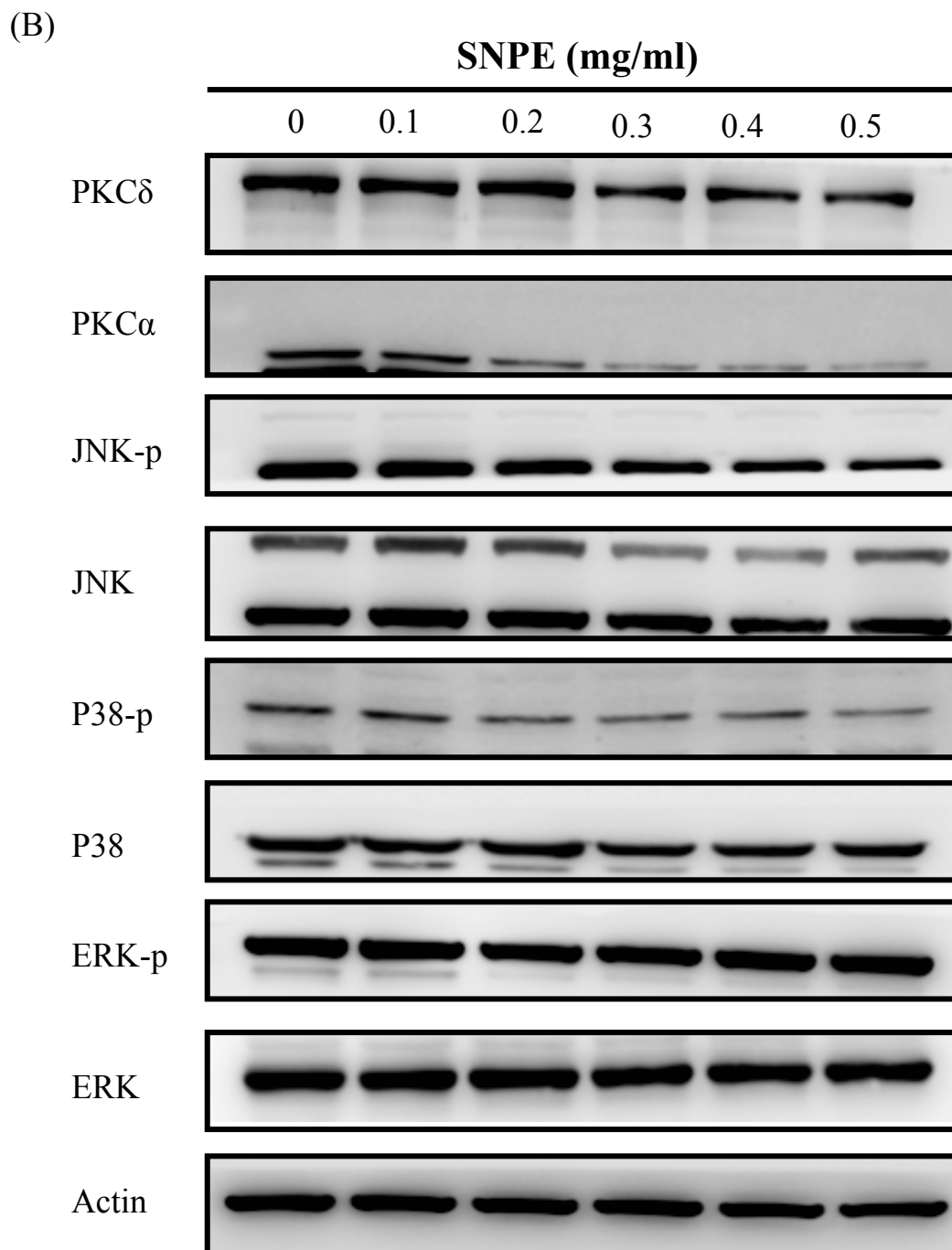


Figure 6B. Immunoblot analysis of the expression of PKC α · δ , JNK, P38, ERK in B16-F1 cells treated with SNPE. Culture cells were treated with or without SNPE (0~0.5 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total protein were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against PKC α · δ , JNK, P38, ERK . Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

(C)

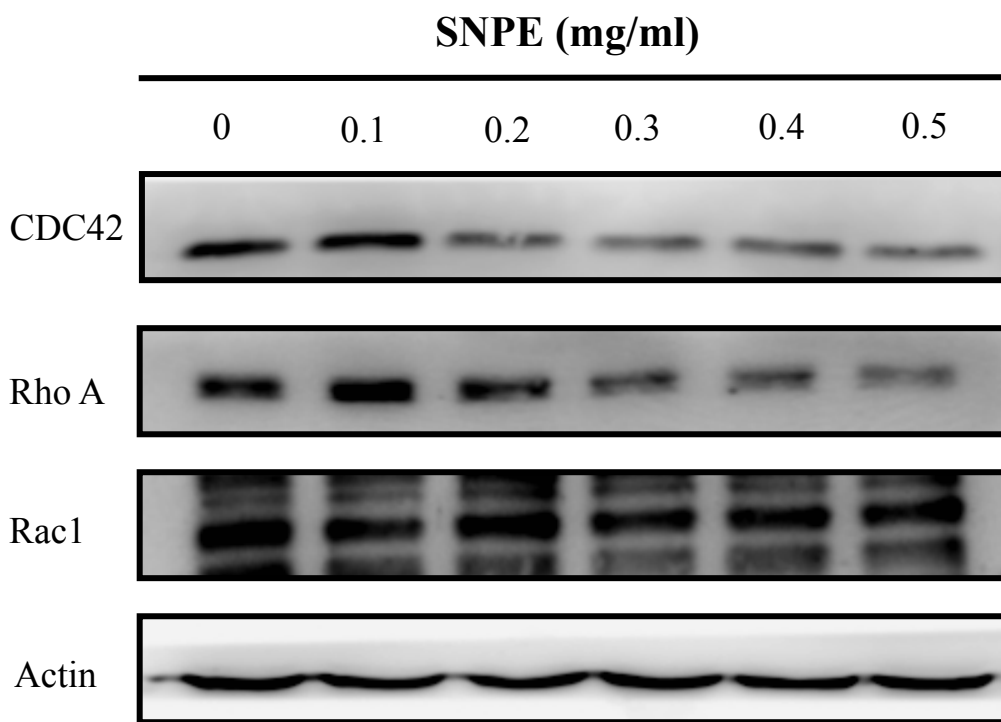
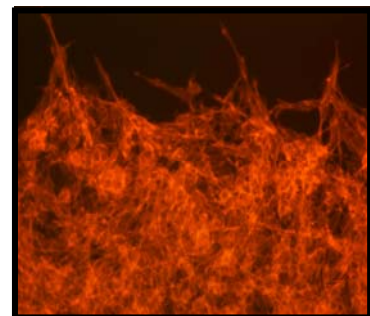
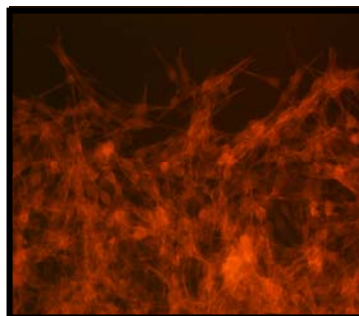
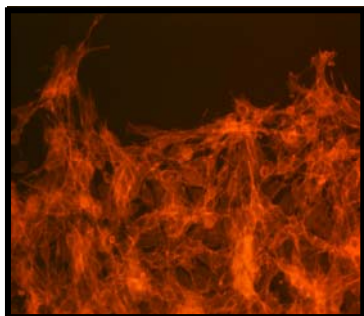
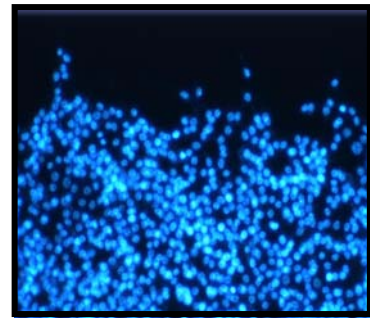
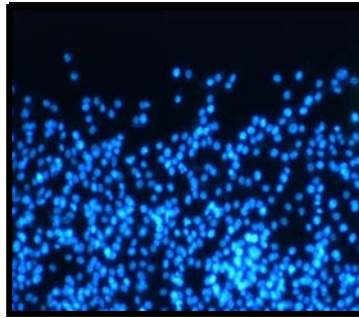
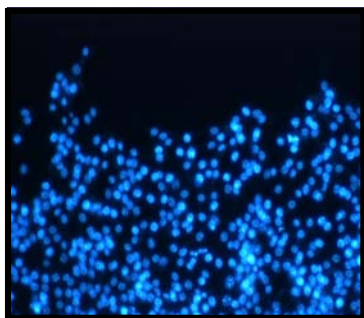
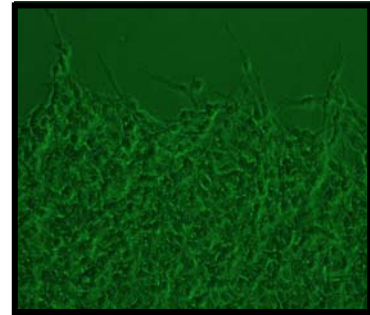
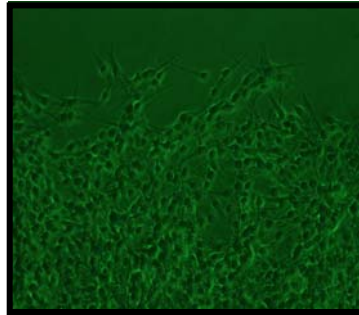
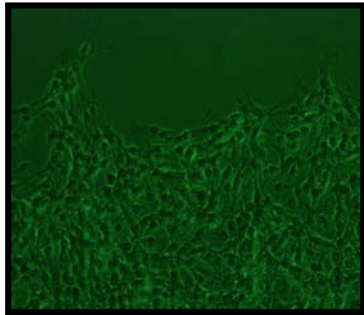


Figure 6C. Immunoblot analysis of the expression of CDC42, RhoA, Rac1 in B16-F1 cells treated with SNPE. Culture cells were treated with or without SNWE (0~0.5 mg/ml) for 24 hrs. After treatment, whole cell extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total protein were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western hybridization was performed with antibodies against CDC42, RhoA, Rac1 . Western blot analysis of β -actin was used as an internal control.

B16

SNPE 0.1 mg/ml

SNPE0.2 mg/ml



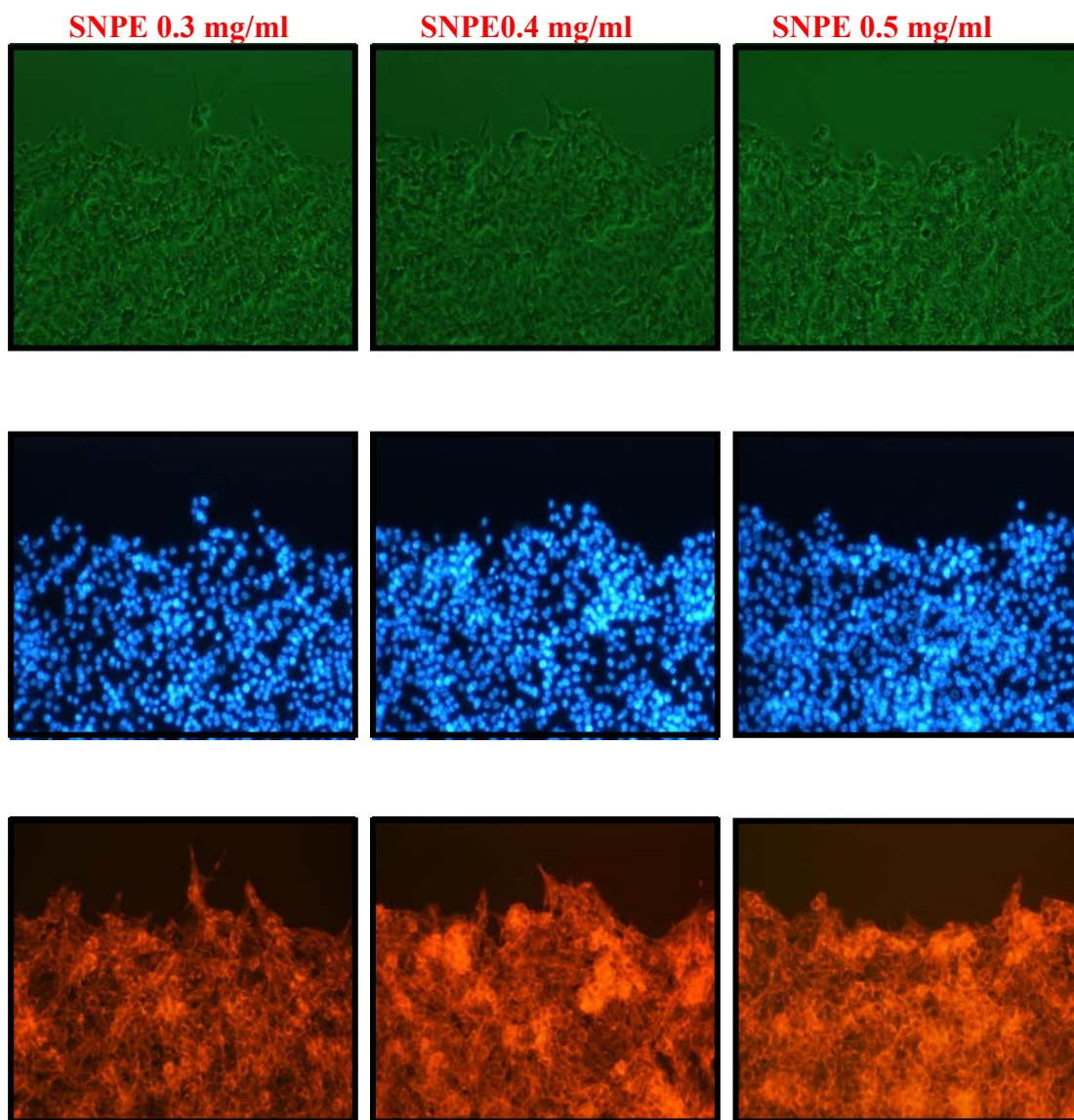


Figure 7. Effect of SNPE on cytoskeleton change of B16-F1 cells.

B16-F1 cells were treated without or with SNPE (0~ 0.5 mg/ml) for 24 hrs, and F-actin polymerization was visualized by TRITC-phalloidin and observed under fluorescence microscope.

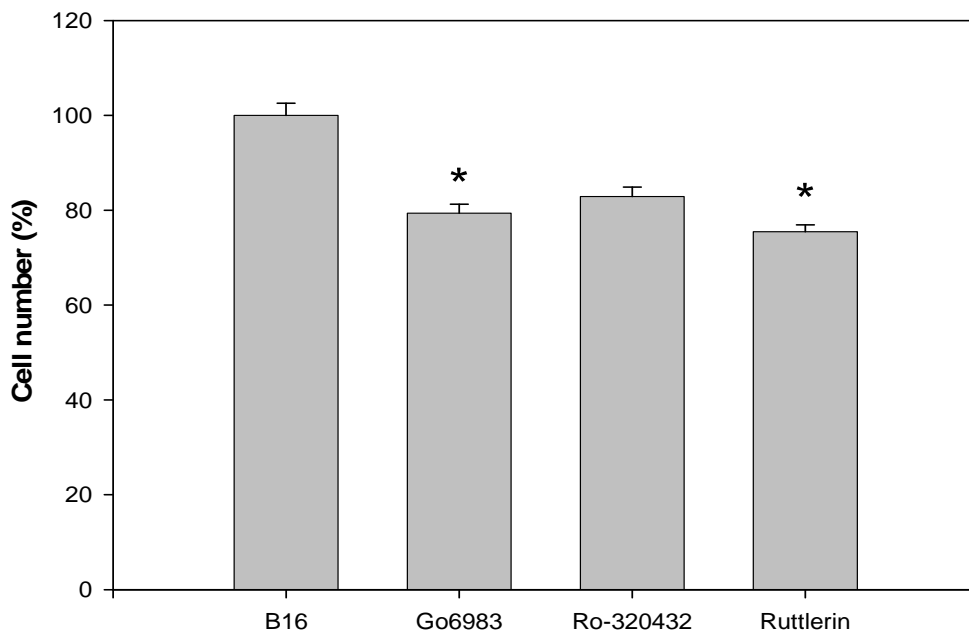
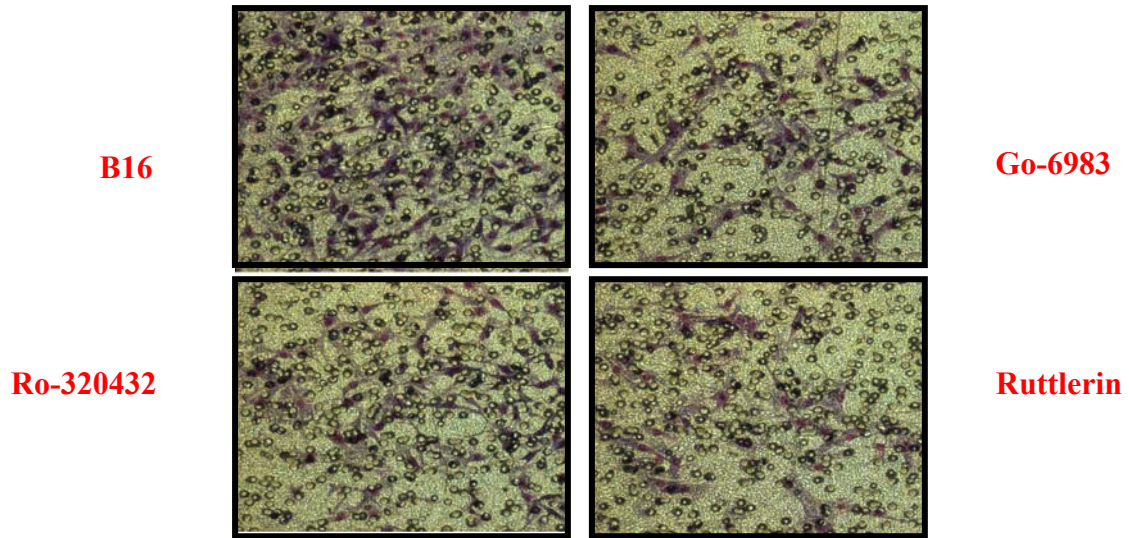
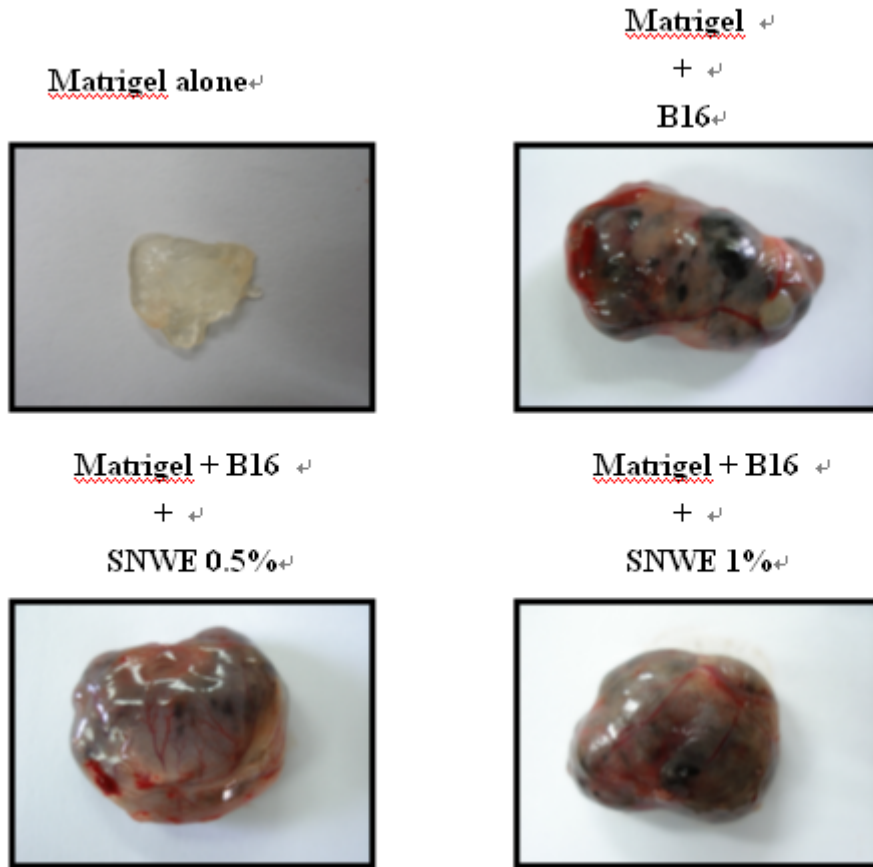


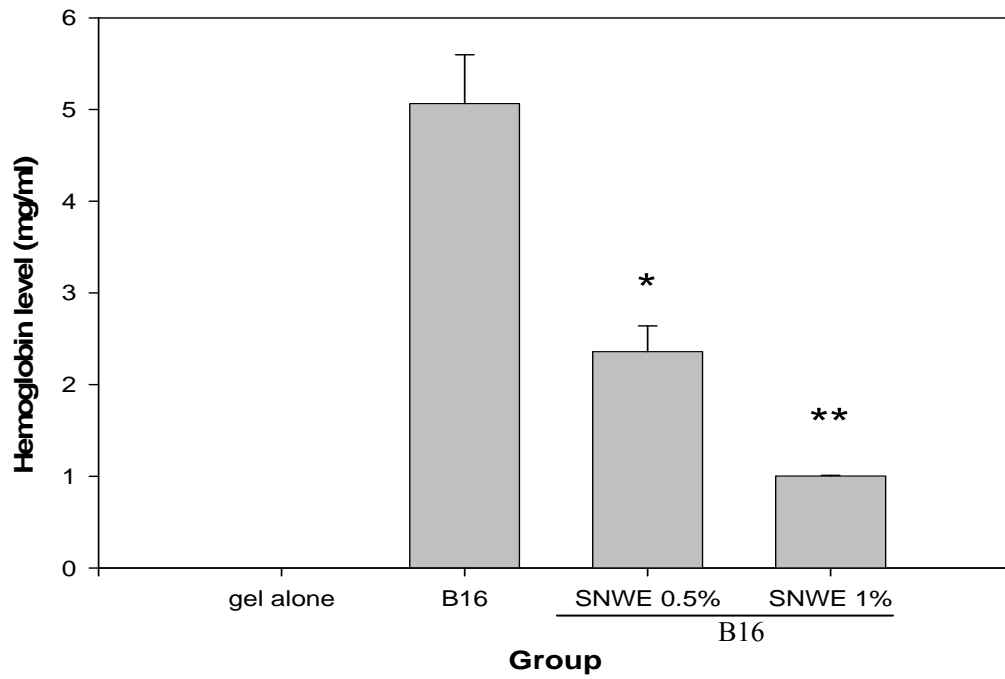
Figure 8. The inhibition of PKC inhibitors reduced B16-F1 migration.

B16-F1 cells were treated with PKC inhibitor Go-6983 5 μ M or Ro-320432 10 μ M or Ruttlerin 5 μ M or none for 24 hrs. Cell migration was measured by Boyden chamber for 8 hrs with polycarbonate filter. Migration ability of B16-F1 cells were quantified by counting the number of cells that invaded the under side of the porous polycarbonate membrane under microscopy and represents the average of three experiments. *, $p < 0.05$ compared with the untreated control.

(A)



(B)



(C)

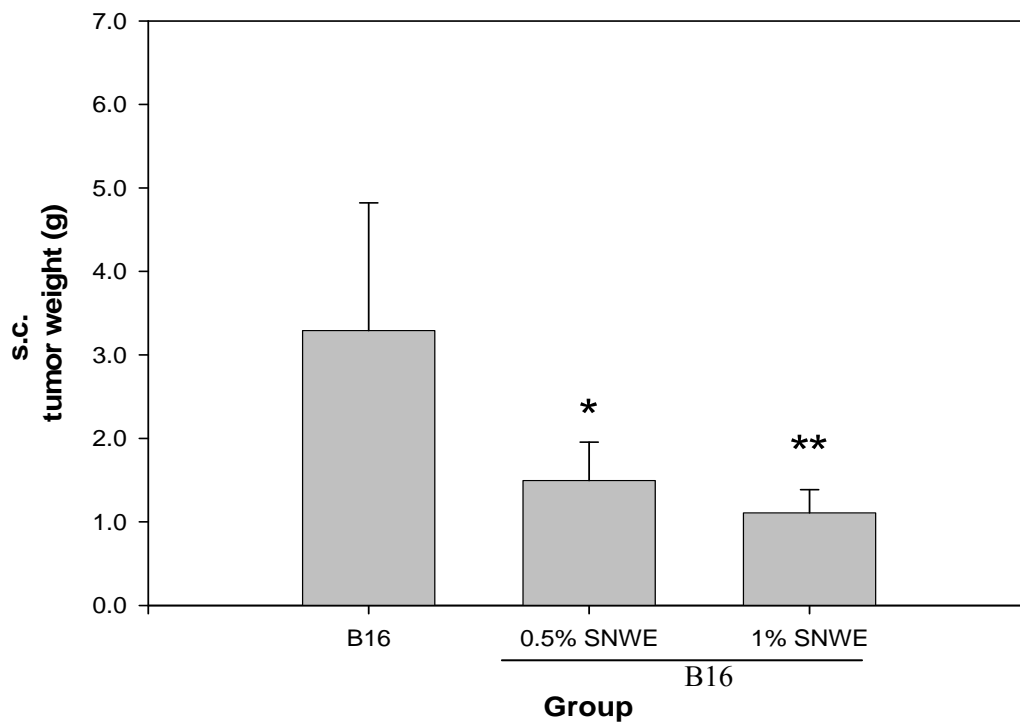
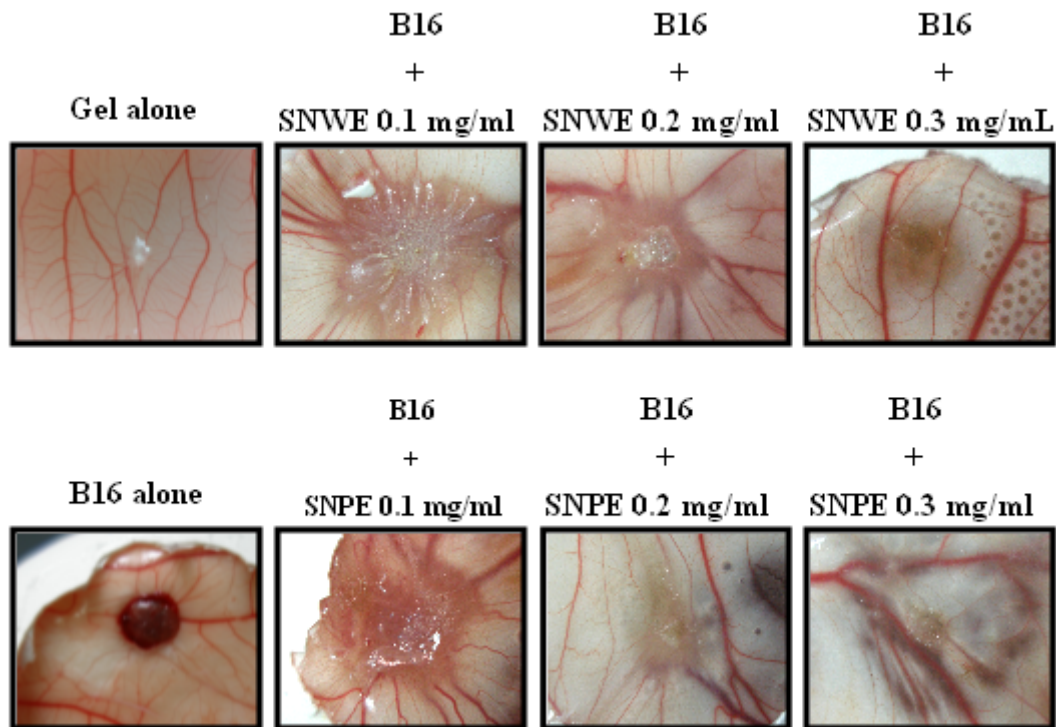


Figure 9. SNWE inhibited tumor angiogenesis in nude mice model.

(A) B16 cells were re-suspended in serum-free medium at 5×10^6 cells/ml, and aliquots of the cells (0.2 ml) were mixed with 0.4 ml of Matrigel. Dietary administration of SNWE or not. Nude mice were euthanized in 14 days. The Matrigel plugs were removed from the mice. The photos are representative Matrigel plugs. (B) Hemoglobin levels of Matrigel plugs. Hemoglobin levels in the supernatant were quantified with Drabkin's reagent kit. The data are mean \pm SD from replicate experiments (n = 10). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 indicated significant difference when the hemoglobin content was compared to that of the control. (C) Final tumor weight of the mice in experiment. 5×10^6 cell/ml B16 expressing melanoma clones were s.c. inoculated into the nude mice (n = 10) and analyzed for final tumor weights on day 14 by tumor excision and weighing. *, p < 0.01 and **, p < 0.005 compared with the control.

(A)



(B)

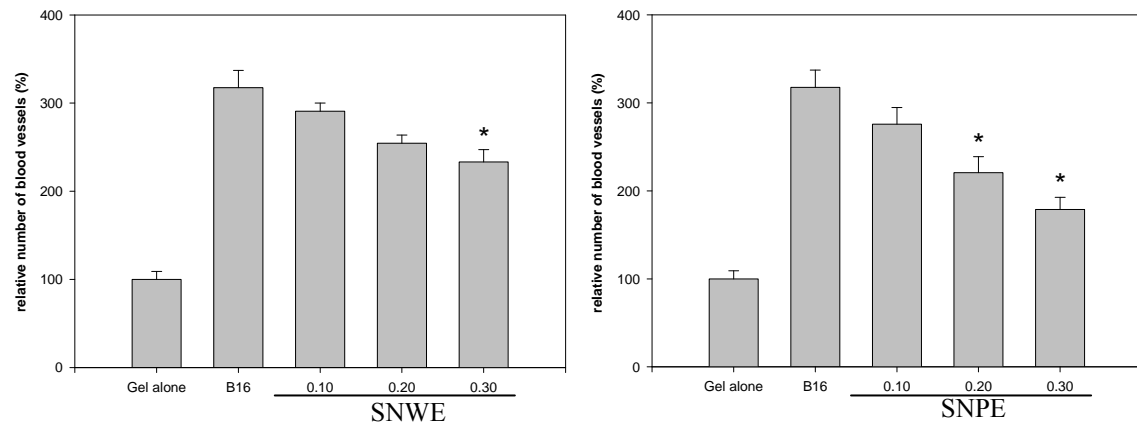
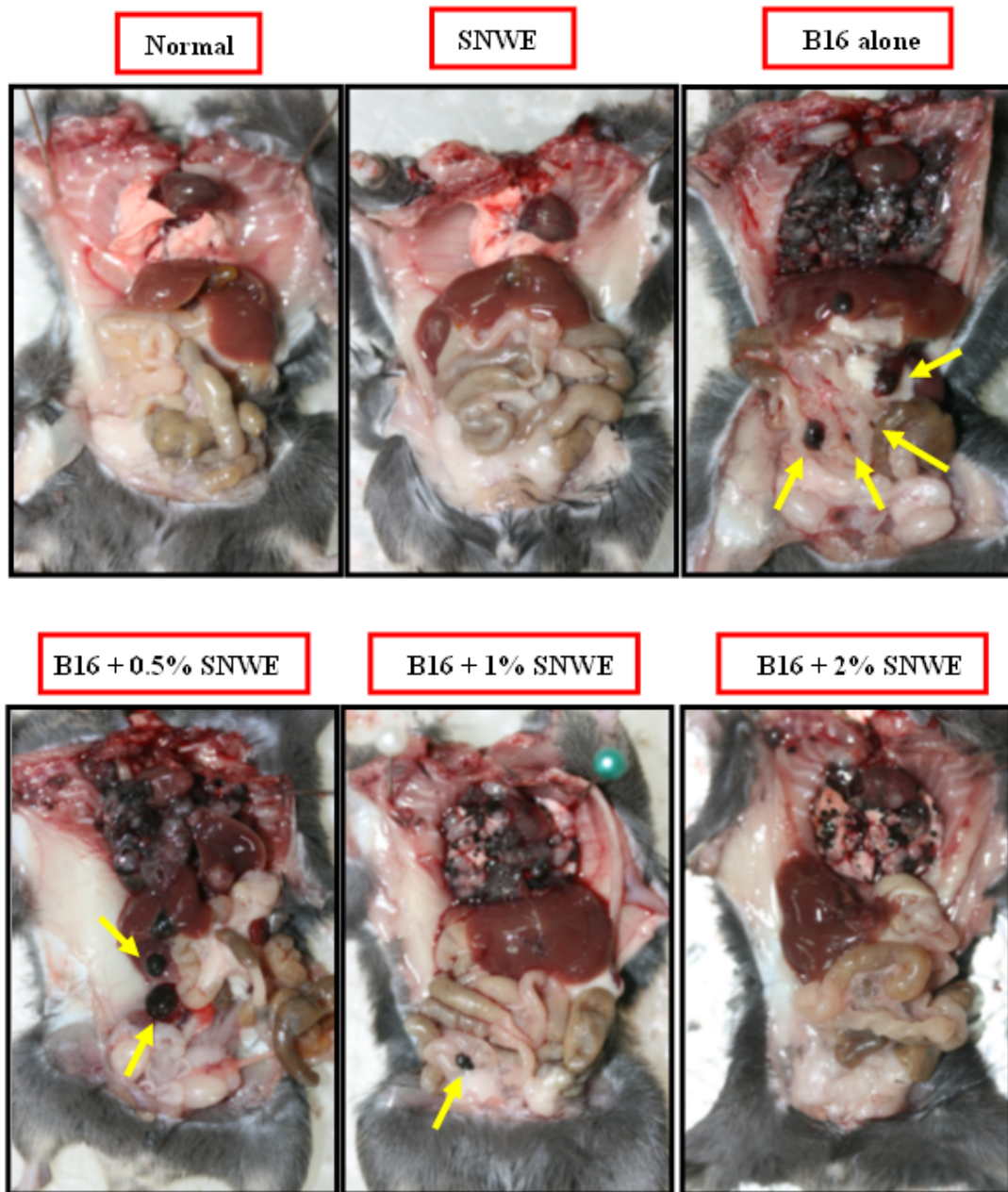


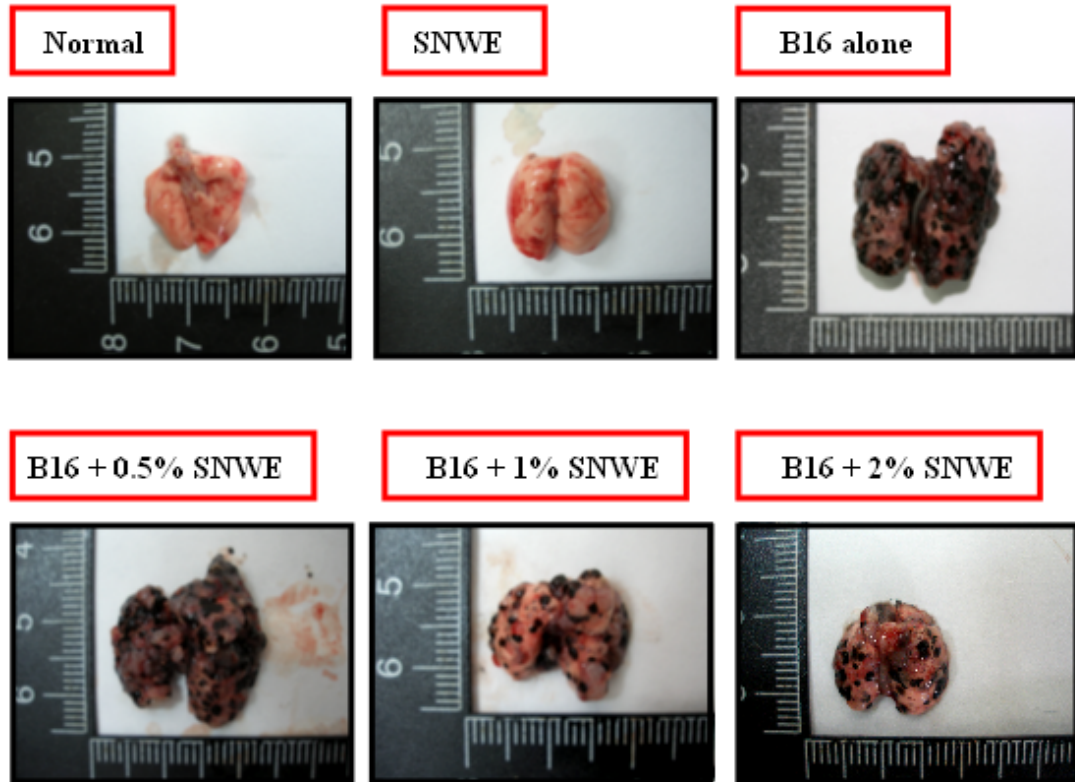
Figure 10. SNWE and SNPE inhibited tumor angiogenesis in the CAM model.

(A) B16-F1 cells were harvested, re-suspended in serum-free medium at 1.5×10^7 cell/ml. Aliquots of the cells ($10 \mu\text{l}$) were mixed with $10 \mu\text{l}$ of growth-factor-reduced Matrigel in the and absence or presence of SNWE and SNPE as indicated. The cell mixture was implanted onto the CAM of a 8-day-old chick embryo to grow tumor. The total blood vessels around the Matrigel were counted double-blindly under a microscope 3 days after the implantation. The pictures are representatives of each treatment.

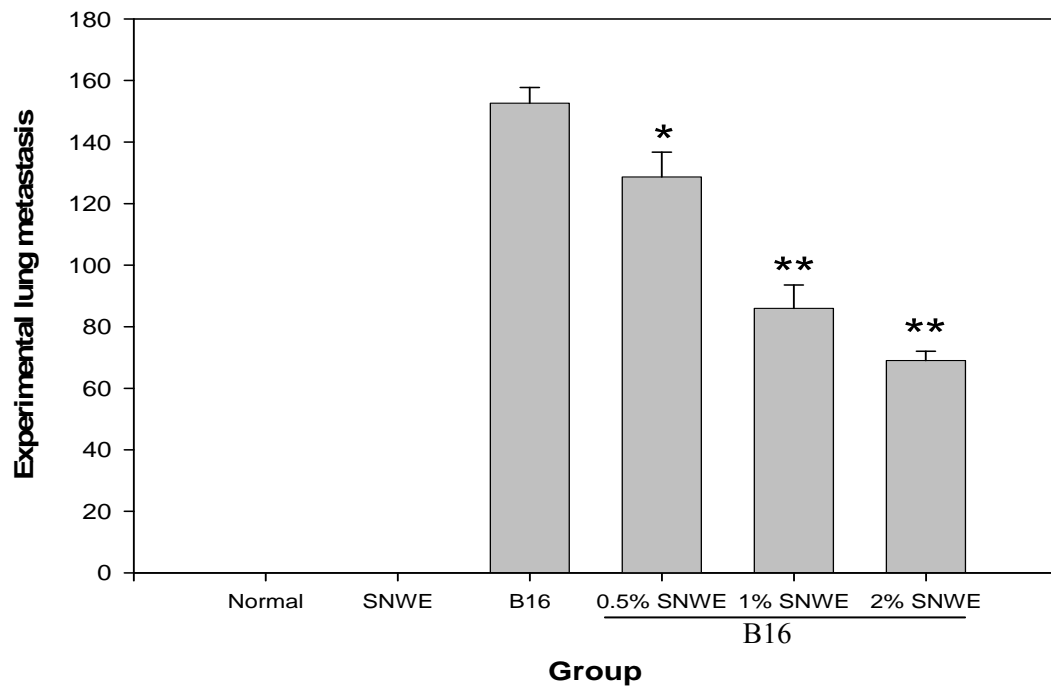
(A)



(B)



(C)



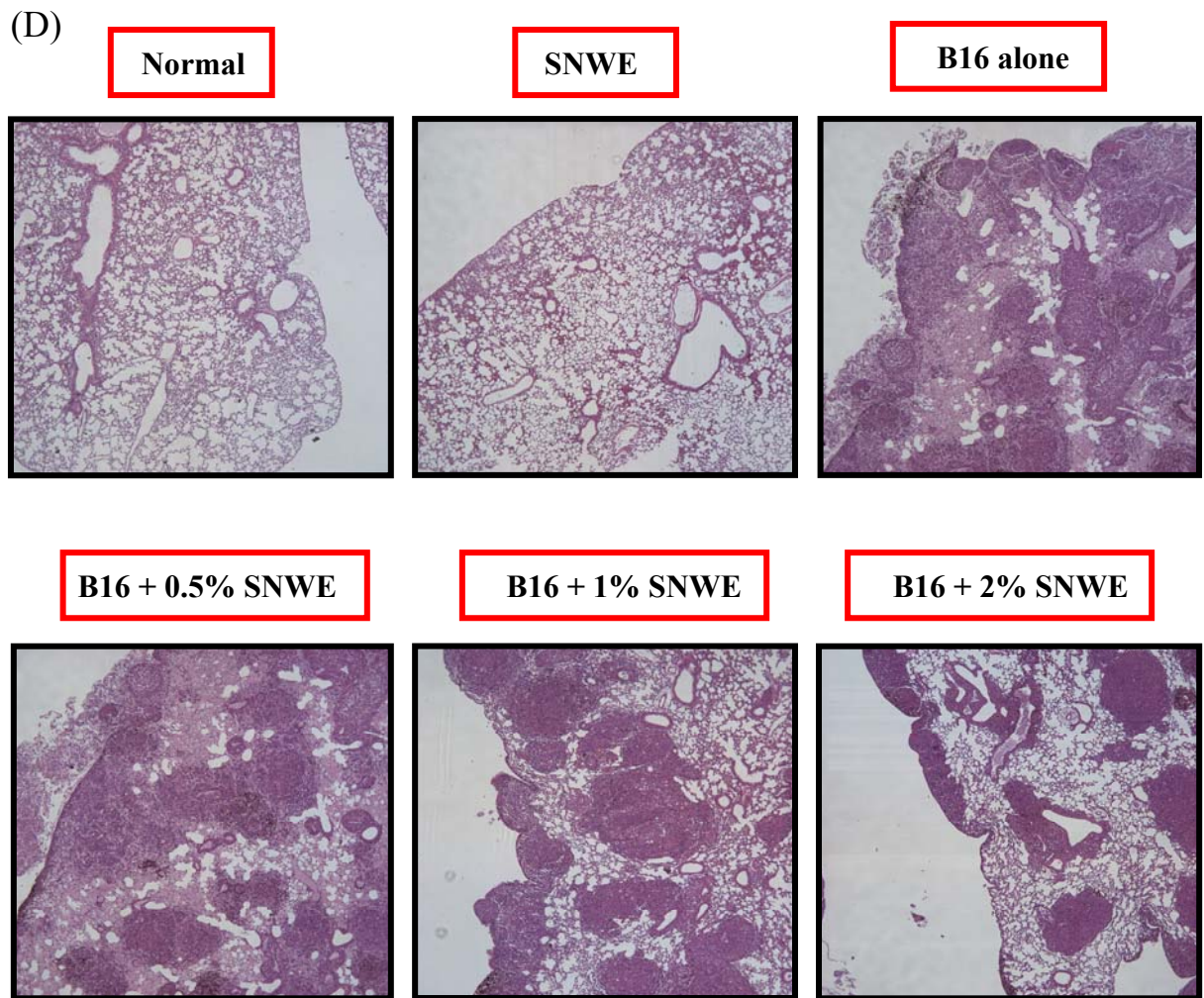
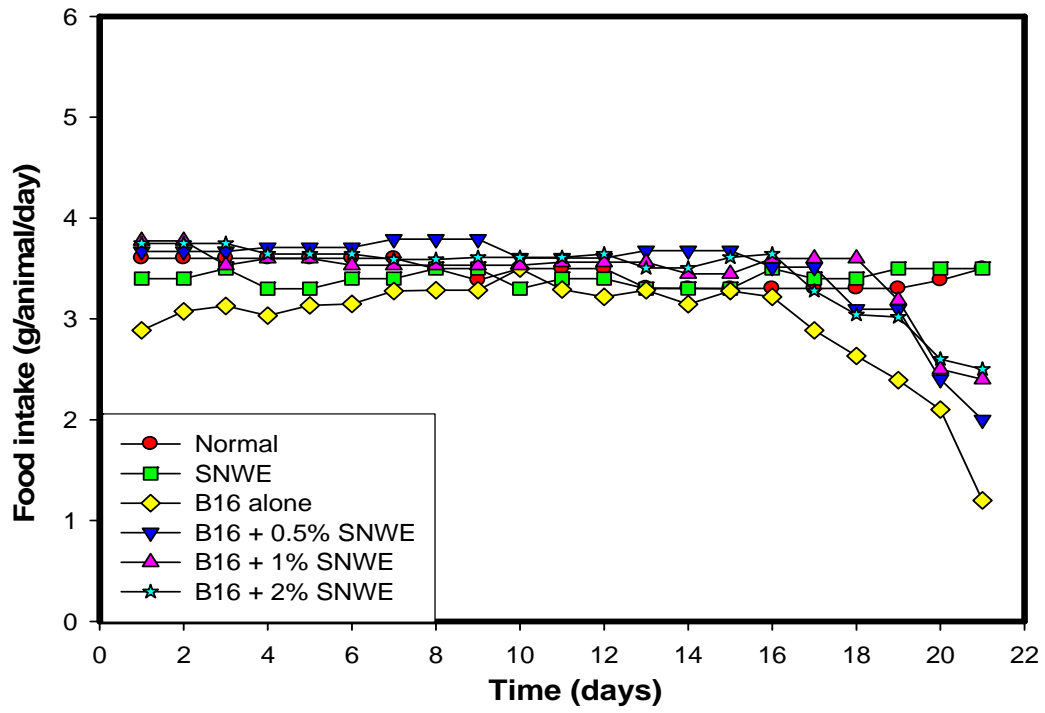


Figure 11. Effects of SNWE on melanoma metastasis. A total of 10^6 of the B16-F1 melanoma cells were injected into the lateral tail vein of C57BL/6 mice. The experimental groups were treated with SNWE, which were given dietary administration for 21 days, every day with total doses of 0.5%, 1% and 2%. (A) The ribcage and ventral view of Normal, only SNWE, only B16, SNWE-treated B16. The arrow indicates that metastasis nodules growing in the abdominal cavity were counted and photographed at day 21. (B) A comparison of reproductive metastasis nodules of lungs in different mice group. (C) Mice were sacrificed and the number of experimental lung metastases was counted. (D) Histopathological analysis (H&E stain) of the lungs from B16-treated mice.

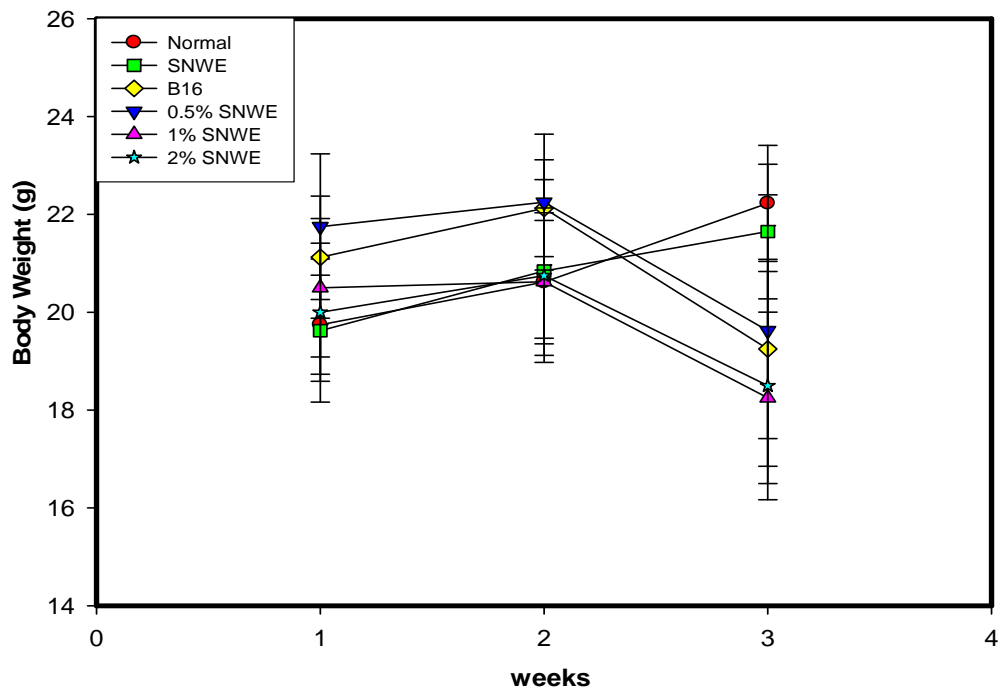
Groups	No. of mice	Incident of metastasis		
		Metastasis to the lung	liver	kidney
Normal	8	0/8	0/8	0/8
B16 alone	8	8/8	6/8	6/8
B16 + 0.5% SNWE	8	8/8	4/8	4/8
B16 + 1% SNWE	8	8/8	3/8	3/8
B16 + 2% SNWE	8	8/8	1/8	2/8

Figure 12. Effects of SNWE on the incident of tumor and melanoma metastasis.

(A)



(B)



(C)

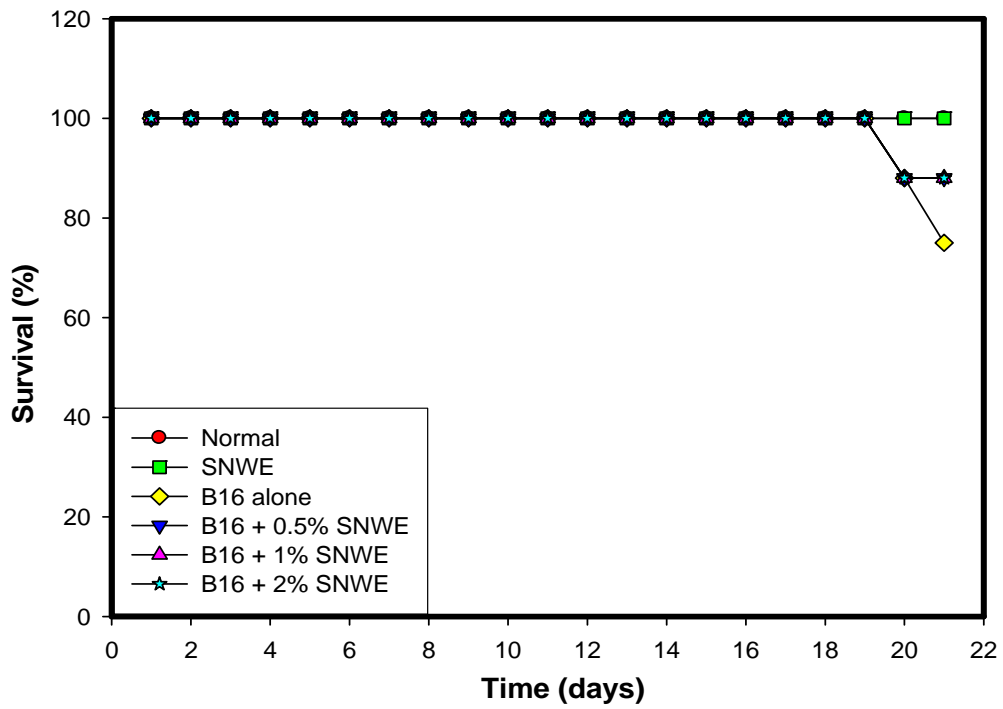


Figure 13. (A) The food intake, (B) body weight and (C) survival curve of the animals in experiment. Food intake every day record one times, body weight every 1 week record one times ; survival curve showing that treatment with or without SNWE decreased the lifespan.

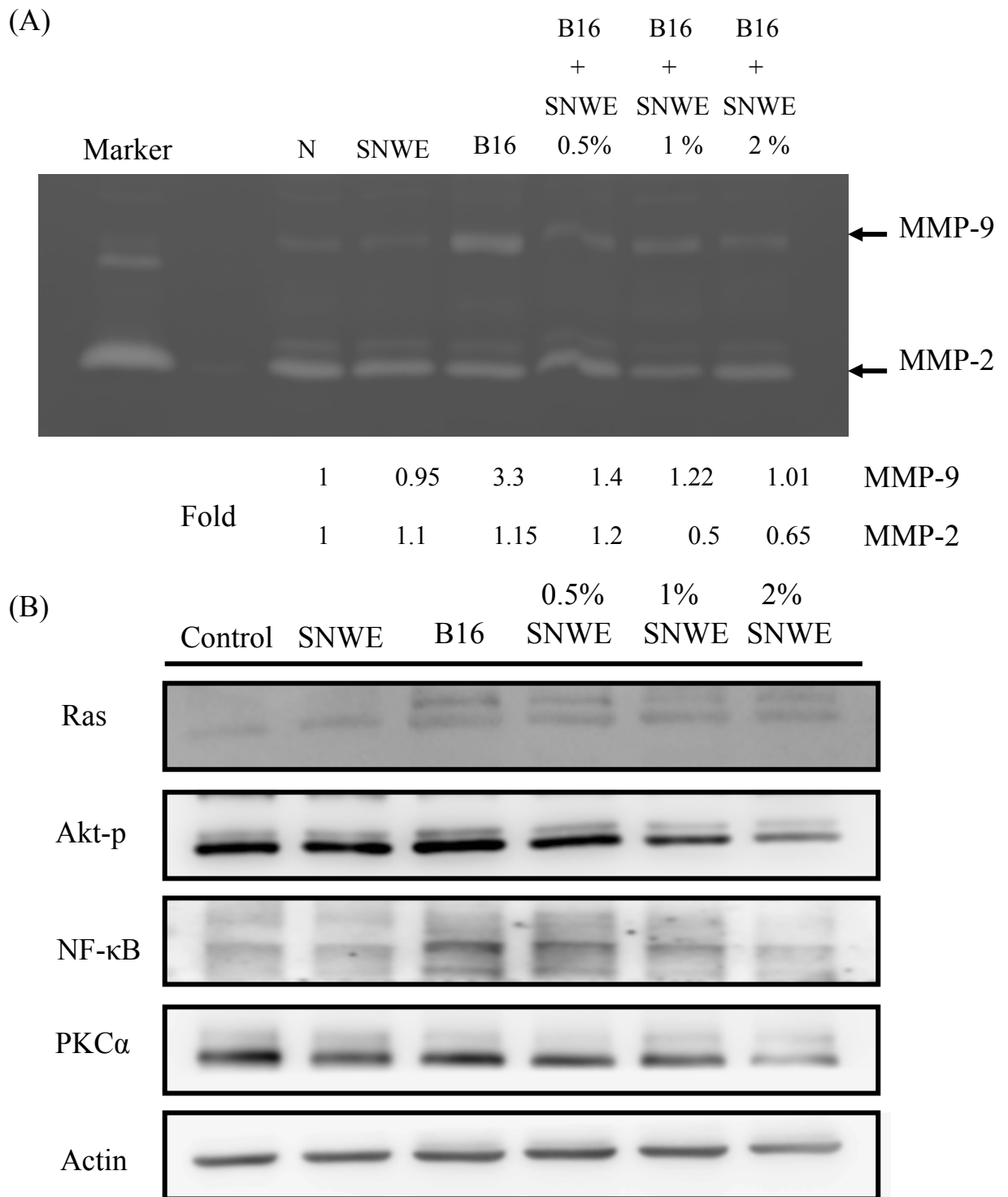


Figure 14. Effects of SNWE on MMP activity of serum and relative protein of metastasis in the mouse model. (A) The serum of control, B16, 0.5%, 1%, 2% SNWE-treat groups were subject to gelatin-zymography to analyze the activities of MMP-2, 9 as described in Material and methods. (B) The cellular levels of Ras, Akt-p, NF-κB and PKCα were analyzed by Western blot. β-actin served as internal control.

本計畫已有相關期刊論文發表

1. Hui-Mei Lin, Hsien-Chun Tseng, **Chau-Jong Wang**, Charng-Cherng Chyau, Ko-Kaung Liao, Pei-Ling Peng and Fen-Pi Chou, 2007. Induction of autophagy and apoptosis by the extract of *Solanum nigrum* Linn in HepG2 cells. **J. Agric. Food Chem.** 55, 3620-3628.
2. Hui-Mei Lin, Hsien-Chan Tseng, **Chau-Jong Wang**, Jing-Jing Lin, Chia-Win Lo and Fen-Pi Chou, 2008 Hepatoprotective effect of SNE against CCL₄-induced oxidative damage in rats. **Chem. Biol. Interact.**, 171, 283-293.
3. Jeng Dong Hsu, Shao-Hsuan Kao, Chang-Che Tu, Yi-Ju Li and **Chau-Jong Wang**, 2009. *Solanum nigrum* L extract inhibits 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis through overexpression of glutathione S-transferase and antioxidant enzymes. **J. Agric. Food Chem.**, 57, 8628-8634.
4. Mon-Yuan Yang, Li-Sung Hsu, Chiung-Huei Peng, Yuan-Shong Shi, Cheng-Hsun Wu, and **Chau-Jong Wang**, 2009. Polyphenol rich-extracts from *Solanum nigrum* attenuated PKC α -mediated migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* (In submit)
5. Hsueh-Chun Wang, Pei-Jun Chung, Mon-Yuan Yang, and **Chau-Jong Wang**, 2009. Polyphenol rich-extracts from *Solanum nigrum* human hepatocellular carcinoma cells apoptosis and cell cycle arrest. *Food Chem. Toxicol.* (In submit)