

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 卷柏, 紫花地丁及欖仁樹抑制人類肺癌細胞 migration/invasion 其作用成分與機轉之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2311-B-040-002-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系生物化學科

計畫主持人：謝易修

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：陳霽霓、蕭永晉  
碩士班研究生-兼任助理：柳尚容

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 96年11月02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

卷柏，紫花地丁及欖仁樹抑制人類肺癌細胞 invasion/migration 其作

用成分與機轉之研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2311-B-040-002

執行期間：95年 8月 1日至 96年 7月 31日

計畫主持人：謝易修

共同主持人：

計畫參與人員：陳霈霓，蕭永晉，柳尚容

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 96年 10月 31日

## 中英文摘要及關鍵詞

肺癌目前已是台灣癌症病人死亡的主要原因之一，而肺癌細胞轉移(metastasis) 是肺癌導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因。而癌細胞的轉移已知與多種細胞生理改變密切相關，如改變癌細胞與胞外基質(extracellular matrix, ECM)間adhesion 的能力，破壞細胞間交互作用 (intercellular interaction) 的力量等。癌細胞之所以能轉移主要是透過癌細胞分泌蛋白分解酵素如 serine proteinases, metalloproteinases (MMPs), cathepsins 以及 plasminogen activator (PA) 分解ECM，最後導致intercellular matrix 分離，進而使癌細胞 motility、migration 及invasion 提昇。

而本實驗室在 94年度衛生署的中醫藥研究計畫-中藥抑制癌細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究-篩選了 57種中藥，發現其中有 6種中藥粗萃取物不會抑制肺 癌細胞株的生長能力，卻可以有效抑制肺癌腫瘤細胞的侵襲及轉移。而我們更進一步利用動物模式，發現這 6種中藥有卷柏 (*Selaginella tamariscina*)、欖仁樹的葉 (*Terminalia catappa* L. leaves) 及紫花地丁 (*Viola yedoensis*) 這 3種中藥粗萃取物可以有效抑制接種在動物身上腫瘤的大小及轉移。

首先，選取人類肺癌細胞 A549 及老鼠肺癌細胞 LLC 探討欖仁樹葉、卷柏及紫花地丁的萃取物 (TCE, STE, and VYE)抑制癌細胞侵襲轉移的效果。結果發現：欖仁樹葉、卷柏及紫花地丁不會影響 A549 細胞的存活，但會降低 LLC 的細胞存活，然而對 A549 及 LLC 細胞的侵襲及移動能力則都具有極顯著的抑制效果。進一步分析與癌症轉移息息相關的蛋白水解酶(MMPs and u-PA)的活性，發現 TCE, STE, and VYE 在 A549 細胞或是 LLC 細胞中，都會抑制細胞所分泌之 MMP 或是 u-PA 之一或同時抑制兩者的活性。然而在分析 TIMP-2 及 PAI-1(MMP-2 及 u-PA 的內生性抑制劑)時，卻只有 STE 可以明顯增加 TIMP-2 及 PAI-1 的蛋白表現。進行完整的動物模式試驗證實 TCE 及 STE 的確可以抑制肺癌細胞在活體內的生長及轉移。此外，也完成了 TCE 及 STE 的 HPLC-mass spectrometry 分析。綜合以上發現，卷柏 (*Selaginella tamariscina*)、欖仁樹的葉 (*Terminalia catappa* L. leaves) 及紫花地丁 (*Viola yedoensis*) 這 3種中藥粗萃取物可有效抑制肺癌細胞的增生及侵襲的能力，因此，或許可作為控制肺癌轉移的輔助治療。

Lung cancer has been the leading cause of cancer death in Taiwan for over a decade. Metastasis of cancer cells, a multiple and intricate process, may complicate the clinical management and lead to a poor prognosis with tremendous impact to patients or communities. In general, metastasis of cancer cells involves multiple processes and various cytophysiological changes, including changed adhesion capability between cells and extracellular matrix (ECM) and damaged intercellular interaction. Degradation of ECM by cancer cells via protease, such as serine proteinases, metalloproteinases (MMPs), cathepsins, and plasminogen activator (PA), may lead to the separation of intercellular matrix to promote the mobility of cancer cells and eventually lead to metastasis.

In our preliminary study, a lung cancer cell line, A549, has been treated with 57 Chinese herbal medicines and then subjected to an assay for cell viability or invasion, and results showed that 6 Chinese herbal medicines was significantly inhibited on cell migration and invasion. Further, to use the animal model to evaluate the impacts by the addition of 6 Chinese herbal medicines and results showed that 3 Chinese herbal medicines including *Terminalia catappa* L. leaves extract (TCE), *Selaginella tamariscina* extract (STE) and *Viola yedoensis* extract (VYE) were significantly inhibited the tumor growth and metastasis.

In this project, despite influence on cell viability, TCE, STE, and VYE markedly inhibited the invasion and motility of A549 cells and LLC cells in the range of 10-100  $\mu$ M. As MMPs and u-PA play a critical role in cancer cell metastasis, we also found that TCE, STE, and VYE could inhibit MMPs or u-PA activities at least one of them or both of them in A549 cells and LLC cells. However, only STE could significantly induce the expression of TIMP-2 and PAI-1 (endogenous inhibitor of MMP-2 and u-PA), whereas TCE and VYE showed lowering or no effect. Consistent with the preliminary animal experiment, the complete animal experiments definitely showed that TCE and STE have the anti-tumor growth and anti-metastatic potentials. In addition, the HPLC-mass spectrometry analysis of TCE and STE has also been done. In conclusion, TCE, STE and VYE perturb the invasion capacities of lung cancer cells, thereby constituting an adjuvant treatment for metastasis control.

**關鍵詞：**卷柏(*Selaginella tamariscina*)、欖仁樹葉(*Terminalia catappa* L. leaves)、紫花地丁(*Viola yedoensis*)、肺癌(lung cancer)、移動/侵襲(motility/invasion)、MMP-2、u-PA

## 報告內容 (包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論)

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【一】細胞移動(motility)和侵襲(invasion)能力的增加;【二】細胞與細胞間相互作用力的破壞;【三】細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間結合能力(adhesion)的增加;以及【四】細胞外基質的分解。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]。

惡性腫瘤細胞會產生細胞外基質分解酵素，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[7-14]。matrix metalloproteinase(MMPs)為一群含鋅之蛋白分解酵素，參與ECM 的合成與分解;於正常生理情況下，參與如胚胎的發育，胚胎的著床，血管生成和組織重建等;自組織分泌出來的MMPs 為latent proenzymes，需經過蛋白分解酵素如PA 轉換成(tissue inhibitor of

metalloproteinases; TIMPs)調節而改變其活性，也就是說MMPs 與TIMPs 之間imbalance 為決定 ECM 分解或堆積的，甚至癌瘤細胞吸附，位移，侵入和轉移的主要因素 [15-26]。

先前文獻報導，中藥具備許多的功效，無論在抗病毒、抗菌、抗發炎、抗過敏、對心血管疾病、預防癌症及抗癌效果外皆有明顯的功效。而本實驗室在94 年度的衛生署中醫藥研究計畫-中藥抑制癌瘤細胞遷移和侵犯作用之系統分析研究-篩選了57 種中藥，發現其中有6 種中藥粗萃取物不會抑制肺癌細胞株的生長能力，卻可以有效抑制肺癌腫瘤細胞的侵襲及轉移。並且也會抑制腫瘤相關的蛋白水解酵素 MMPs 及u-PA 的活性。而我們更進一步利用動物模式發現 6 種中藥粗萃取物中有卷柏 (*Selaginella tamariscina*)、欖仁樹的葉 (*Terminalia catappa* L. leaves) 及紫花地丁 (*Viola yedoensis*) 這 3 種中藥粗萃取物可以有效抑制接種在動物身上腫瘤的大小及轉移。因此本計畫擬進一步利用這 3 種中藥萃取成份進一步探討這 3 種中藥粗萃取物在不同肺癌細胞株中抑制細胞侵襲及轉移的能力，並進一步探討其可能的作用機制。

本計畫進行研究項目有【1】利用MTT、migration/invasion assay 及zymography 分析這 3 種中藥萃取成分對不同肺臟癌瘤細胞(A549、H1355 及H1299 細胞)，其細胞存活、侵襲轉移能力、基質分解相關蛋白酶活性的影響，包括如 MMPs、TIMPs、plasmin、t-PA、u-PA、PAIs 及u-PAR 等。【2】以RT-PCR 及real-time PCR 分析這 3 種中藥萃取成分對不同肺癌細胞其migration/invasion 相關基因表現的影響，包括如 MMPs、TIMPs、plasmin、t-PA、u-PA、PAIs 及u-PAR 等。【3】探討這 3 種中藥萃取成分對不同肺癌細胞其與細胞移動能力有關的訊息傳遞Rho family 及FAK pathway，與基質金屬蛋白水解酶活性有關的訊息傳遞MAPK family 及PI3K/Akt pathway相關蛋白的影響。【4】以動物模式分析這 3 種中藥萃取成分對不同肺臟癌瘤細胞的動物模式，如接種人類肺癌細胞的裸鼠或接種LLC 細胞的C57BL/6 老鼠，其腫瘤大小、重量及轉移至肺部的能力的影響，以評估應用的可行性、

## 研究方法

**1.細胞培養：**A549 肺癌細胞與 LLC 老鼠肺癌細胞分別培養在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培養液中，並外加入 1% penicillin/streptomycin、1mM glutamine，待細胞長滿後以 0.05 的 trypsin-EDTA 將細胞打下，經離心後去除上清液，以新鮮的培養液將細胞打散並繼續培養。

**2. Gelatin Zymography：**將 0.1% Gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將細胞培養後不含胎牛血的培養液與 5xloading dye 均勻混和後，注入膠片中，以 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer (2.5% Triton X-100)在室溫下沖洗 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub>, pH 8.0)在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，最後反應完的膠片以染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

**3. Casein Zymography：**48mg casein + 0.55mg plasminogen 8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將細胞培養後不含胎牛血的培養液與 5x染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下沖洗 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer 在 37°C 恆溫箱中反應 12 小時，最後反應完的膠片以染色液染色 30 分鐘，再以退色液退染，觀看結果。

**4. Cell-Matrix adhesion 分析：**首先以 typeIV collagen (或 gelatin) coating 24well 培養皿整夜，並以含有 2% FBS 的 PBS block 住非專一性的結合 2 小時，再將處理過類黃酮的細胞以 trypsin 打下，記培養至 24well 的培養皿中，30 分鐘後以 PBS 沖洗掉未貼附的細胞，以 0.1% crystal violet 染色，將細胞溶於 0.2% Triton X-100，於 OD<sub>550nm</sub> 下測量吸附細胞的比例。

**5. 細胞移動性分析 (Motility)：**利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM，將細胞處理類黃酮後，A549 細胞 subculture 並計算細胞數，

然後注入固定量的細胞( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ )於 upper chamber，待細胞移動 5 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

**6. 細胞侵入性分析( Invasion ):** 利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，將 cellulose nitrate filters coating 上  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  matrigel，在 Laminar flow 風乾 5 整夜，lower chamber 為含有 10% FCS 的 DMEM，將 A549 細胞處理過類黃酮後，subculture 並計算細胞數，然後注入固定量的細胞( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ )於 upper chamber，待細胞移動 6 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

**7. MTT(Microculture Tetrazolium) 分析:** 本實驗室用來測試細胞是否存活的方法，其原理為有活性的活細胞會將 MTT reagent 經由粒腺體中的 dehydrogenase 作用代謝還原成藍紫色結晶，待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 OD570nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

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

**9. 動物模式:** 在動物模式方面，我們將  $5 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  PBS 洗淨的 Lewis lung carcinoma 癌瘤細胞，打入 C57BL/6 老鼠的 right hind limb，7 天後將接種癌瘤細胞的老鼠隨機分組，進一步餵食適量的 3 種中藥萃取物，5 週後犧牲老鼠，取出腫瘤及肺臟以觀察其腫瘤大小、重量及轉移至肺部的能力，以評估應用的可行性。

**10. 統計分析:** 所有數據以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

## 結果與討論

以不同濃度(0, 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的欖仁樹葉的萃取物(*Terminalia catappa* L. leaves extract, TCE)、卷柏的萃取物(*Selaginella tamariscina* extract, STE)及紫花地丁的萃取物(*Viola yedoensis* extract, VYE)，處理 A549 細胞及 LLC 細胞 24 小時後，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率及利用 Boyden chamber invasion/motility assay 分析細胞的侵襲/移動能力，結果發現，不論是欖仁樹葉的萃取物(TCE)、卷柏的萃取物(STE)及紫花地丁的萃取物(VYE)並不會影響 A549 細胞的存活率。卻會抑制 LLC 細胞的存活率(TCE, **Fig-1**; STE, **Table 1**; VYE, **Fig-10**)。然而對於 A549 細胞及 LLC 細胞的侵入能力及移動能力皆有抑制效果，且抑制效果隨著濃度增加而提高。其中欖仁樹葉的萃取物(TCE)約在  $50 \mu\text{M}$  以上開始出現抑制的效果(**Fig-2**)，卷柏的萃取物(STE) 在  $25 \mu\text{M}$  的濃度即有顯著的抑制效果了(**Table 1**)，而紫花地丁的萃取物(*Viola yedoensis* extract, VYE) 則是在  $10 \mu\text{M}$  以上開始出現抑制的效果(**Fig-11**)。

由先前結果，已經證實欖仁樹葉的萃取物(TCE)、卷柏的萃取物(STE)及紫花地丁的萃取物(VYE)可以有效抑制肺癌細胞 A549 的侵襲及移動能力，且抑制效果有濃度依存性。而

許多證據顯示，基質金屬水解酶-2 (MMP-2)及血漿素原活化劑(u-PA)的活性與癌細胞的吸附，位移，侵入和轉移有關。因此，進一步探討欖仁樹葉的萃取物(TCE)、卷柏的萃取物(STE)及紫花地丁的萃取物(VYE)對A549所分泌MMP-2及u-PA的活性。首先，細胞在serum-starved的情形下處理欖仁樹葉、卷柏及紫花地丁的萃取物 (TCE, STE, and VYE)，收集24小時之medium，以gelatin zymography及casein zymography分析MMP-2及u-PA的活性，並且以MTT assay來定量細胞的存活數作為基準。結果發現，處理欖仁樹葉的萃取物(TCE)對於A549細胞分泌出來的MMP-2及LLC細胞分泌的MMP-9確實有降低的現象(**Fig-3**)；另外，不論是A549或LLC細胞所分泌出來的u-PA也都會隨著處理欖仁樹葉的萃取物(TCE)濃度增加而減少(**Fig-4**)。而卷柏的萃取物(STE)在25 $\mu$ M的濃度下，對A549所分泌的MMP-2及u-PA皆有很明顯的抑制效果；然而對LLC細胞所分泌的MMP-9及u-PA僅有些微的抑制(**Fig-7**)。而紫花地丁的萃取物(VYE)則是對A549細胞所分泌的MMP-2及LLC細胞所分泌的u-PA具有抑制的效果(**Fig-12**)。此外，針對MMP-2及u-PA的內生性抑制劑(TIMP-2及PAI-1)以Western blot分析，發現欖仁樹葉的萃取物(TCE)在A549及LLC細胞造成TIMP-2及PAI-1的蛋白表現下降(**Fig-5**)。卷柏的萃取物(STE)可明顯促進A549細胞的TIMP-2及PAI-1的蛋白表現，但對LLC細胞的TIMP-2及PAI-1的表現無明顯影響(**Fig-8**)。紫花地丁的萃取物(VYE)則是造成A549及LLC細胞的TIMP-2及PAI-1蛋白表現下降(**Fig-13**)。

進一步分析萃取物在活體內的效果，將Lewis lung carcinoma癌瘤細胞，打入C57BL/6老鼠的right hind limb，餵食欖仁樹葉的萃取物(TCE)、卷柏的萃取物(STE)及紫花地丁的萃取物(VYE)，並在餵食的過程中紀錄腫瘤的生長曲線，結果發現，餵食卷柏及欖仁樹葉的萃取物和對照組的老鼠相比較，其腫瘤的生長曲線都有抑制的現象，其中欖仁樹葉及卷柏抑制的效果最為明顯(**Fig-6, Fig-9,**)。餵食3週後犧牲老鼠取出其腫瘤及肺臟，紀錄其腫瘤最終重量及對腫瘤轉移至肺臟數目的影響，結果發現和腫瘤的生長曲線結果相同，餵食欖仁樹葉及卷柏的萃取物會抑制腫瘤轉移至肺臟的數目(**Fig-6, Fig-9,**)。

傳統中藥使用以複方為主，加上中藥成分複雜，所以在研究上受到許多限制，但隨著藥理學的發展，許多中藥的有效成分已被單離和鑑定，對於研究的進行頗有助益。本實驗以HPLC-mass spectrometer分析欖仁樹葉的萃取物(TCE)及卷柏的萃取物(STE)。分別先以HPLC分析並收取main product peak (TCE, 11.13min, **Fig-14a**; STE, 21.3min, **Fig-15a**)。再以mass spectrometer分析其中主要成份之分子量 (TCE, 301.3, **Fig-14b**; STE, 539.3, **Fig-15b**)。

## 參考文獻

1. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52:255-64.
2. Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000; 25: 482-9.
3. Lin YH, Park ZY, Lin D, Brahmabhatt AA, Rio MC, Yates JR 3rd, Klemke RL. Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *J Cell Biol.* 2004; 165: 421-32.
4. Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, Hirai I, Tanino H, Kokawa Y, Naito Y, Okamura Y, Ota I, Tani N, Matsuura N. Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci.* 2004; 95: 142-8.
5. Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997; 32:175-253.
6. Tantivejkul K, Vucenik I, Shamsuddin AM. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: II. Effects on integrins and focal adhesions. *Anticancer Res.* 2003; 23:

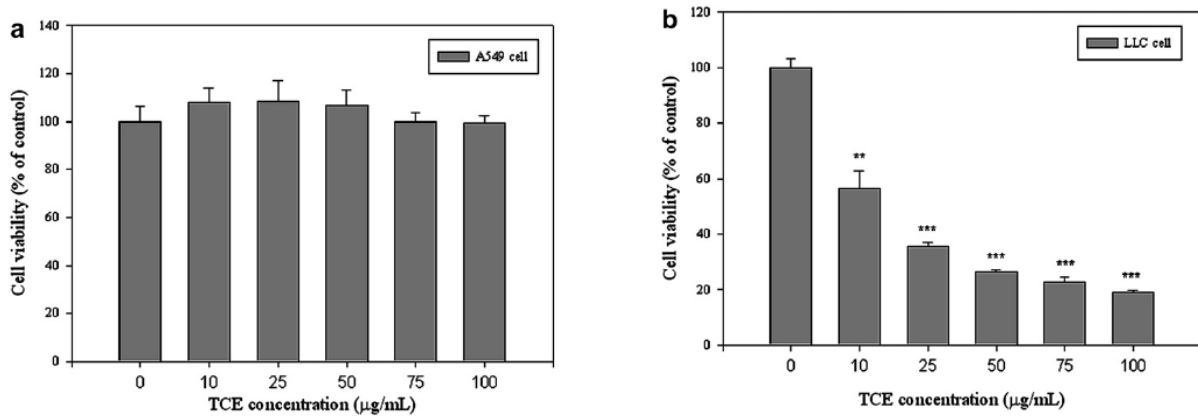
7. MacDougall JR, Matrisian LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995; 14:351-62.
8. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003; 36:128-37.
9. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene.* 2002; 21:2245-52.
10. Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis.* 1997; 17:221-39.
11. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001; 11:S37-43.
12. Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000;50:71-87.
13. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2000; 10:415-33.
14. Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int J Oncol.* 1998;13:893-906.
15. Abecassis I, Olofsson B, Schmid M, Zalcman G, Karniguian A. RhoA. Induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Exp Cell Res.* 2003;291:363-76.
16. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol.* 2001; 53:177-85.
17. Tester AM, Ruangpanit N, Anderson RL, Thompson EW. MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits. *Clin Exp Metastasis.* 2000; 18:553-60.
18. Ntayi C, Lorimier S, Berthier-Vergnes O, Hornebeck W, Bernard P. Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. *Exp Cell Res.* 2001; 270:110-8.
19. Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2(TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem.* 2001; 276:3203-14.
20. Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 1998; 58:3743-50.
21. Ree AH, Bjornland K, Brunner N, Johansen HT, Pedersen KB, Aasen AO, Fodstad O. Regulation of tissue-degrading factors and in vitro invasiveness in progression of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1998; 16:205-15.
22. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer.* 1998; 75:246-53.
23. Mitra A, Chakrabarti J, Chattopadhyay N, Chatterjee A. Membrane-associated MMP-2 in



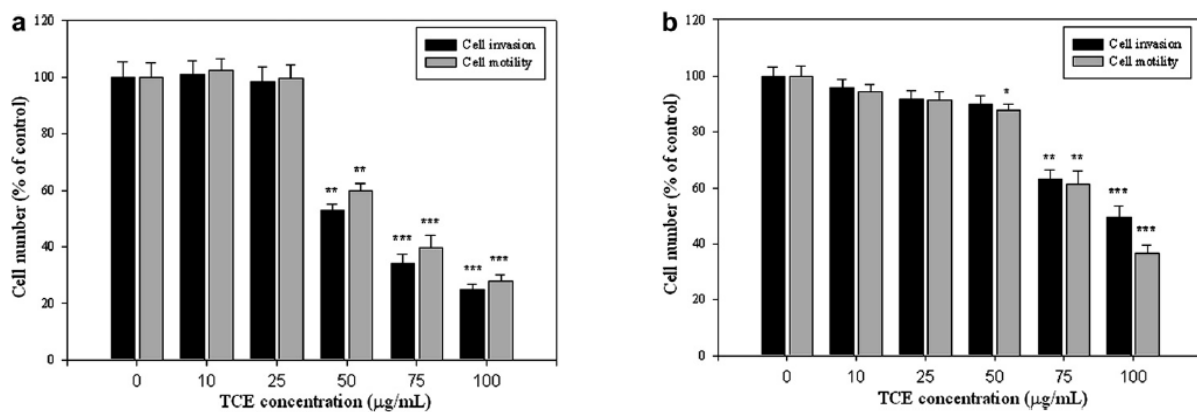
human cervical cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2003; 22:93-100

24. Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Sato H. Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res.* 2003; 63:3364-9.
25. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albini A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol.* 2003; 163:753-62.
26. Munshi HG, Wu YI, Ariztia EV, Stack MS. Calcium regulation of matrix metalloproteinase-mediated migration in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2002;277: 41480-8.

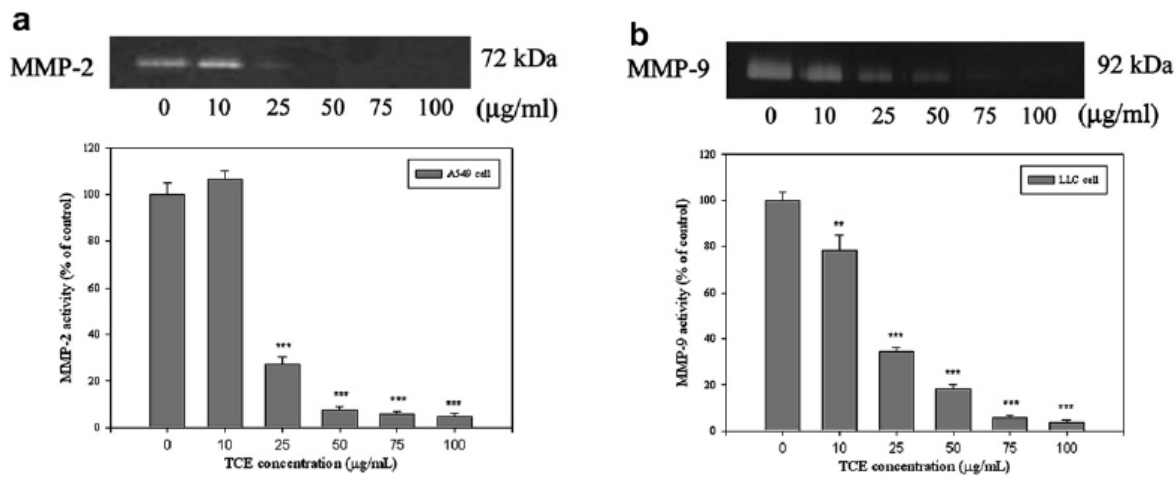
## 附表及附圖



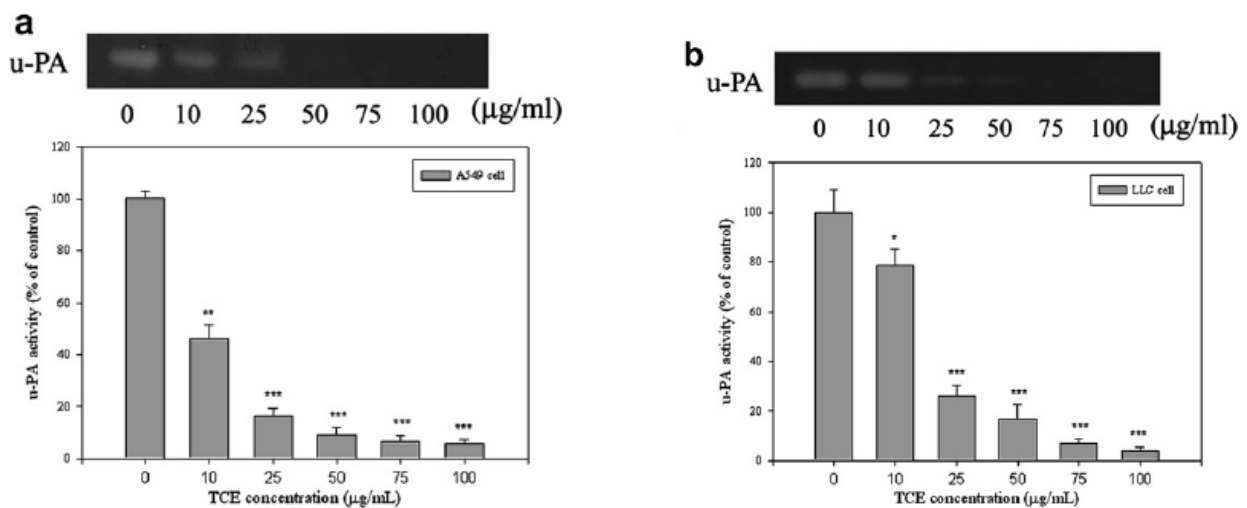
**Fig. 1.** Effect of TCE on the viability of A549 and LLC cells. (a) A549 and (b) LLC cells were treated with 0, 10, 25, 50, 75, or 100 µg/ml of TCE for 24 h before being subjected to a MTT assay for cell viability. (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



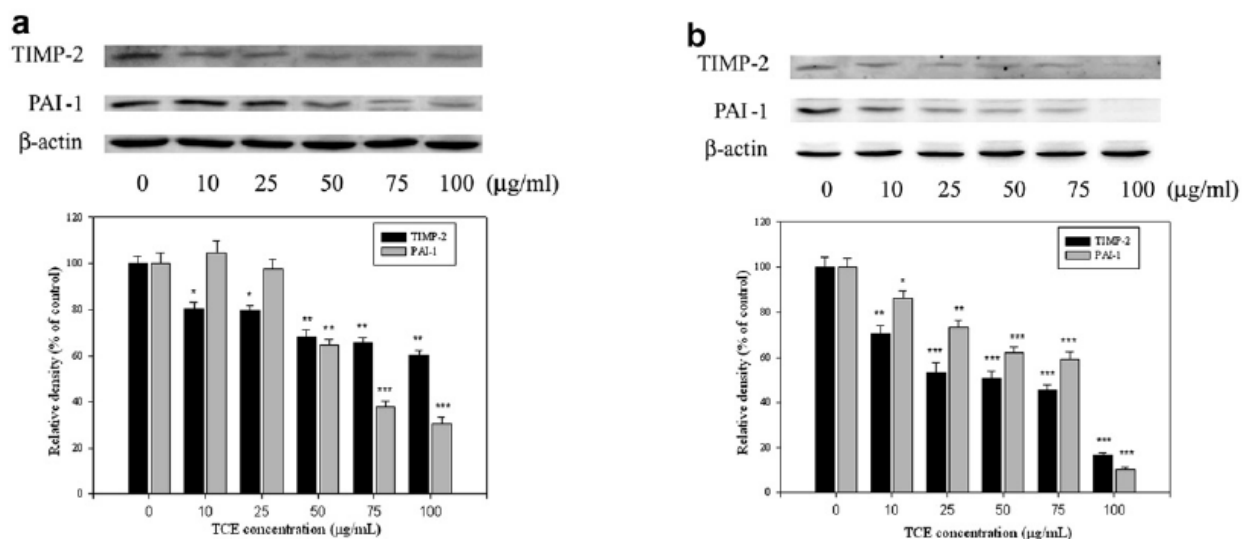
**Fig. 2.** The effects of TCE on cell invasion and motility of A549 and LLC cells. (a) A549 cells and (b) LLC cells were treated with TCE at a concentration of 0, 10, 25, 50, 75 or 100 µg/ml for 24 h, and were then subjected to analyses for invasion and motility. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



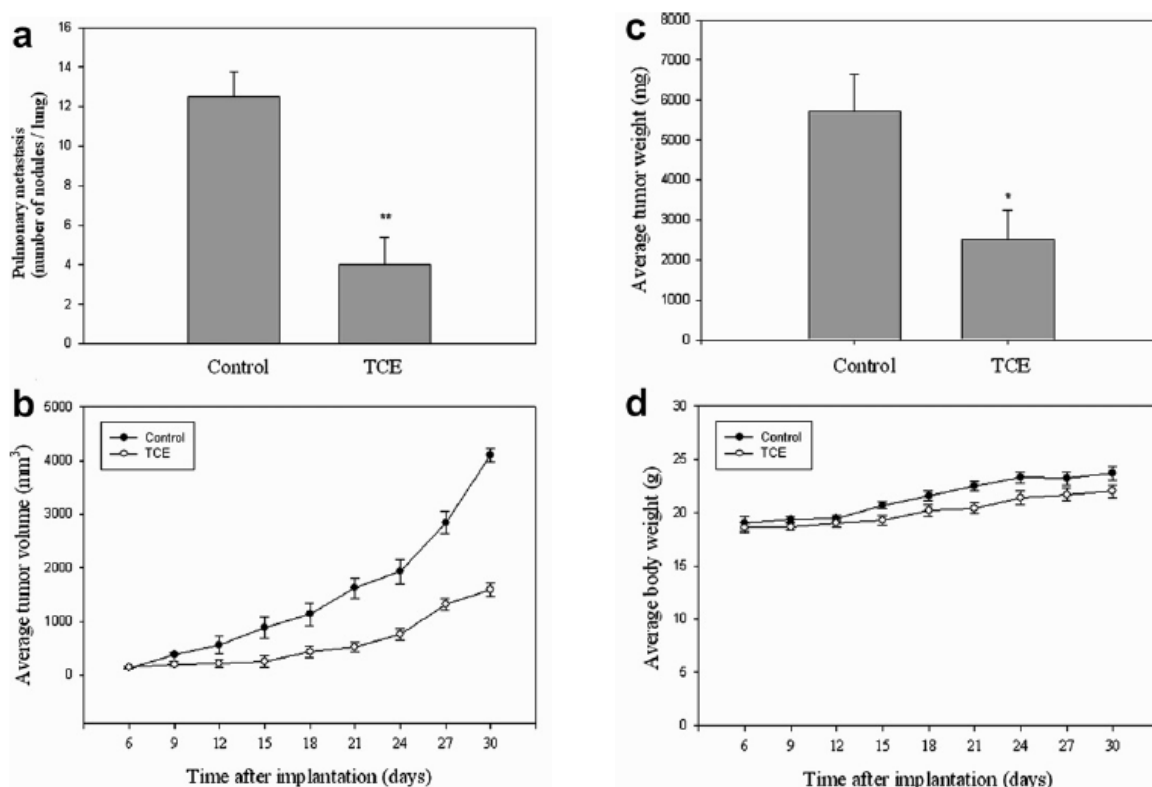
**Fig. 3.** Effects of TCE on the activities of MMP-2 and MMP-9. A549 cells and LLC cells were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100 μg/ml of TCE for 24 h and then subjected to gelatin zymography to analyze the activities of MMP-2 (a) on the A549 cells and MMP-9 (b) on the LLC cells, respectively. (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



**Fig. 4.** Effects of TCE on the activity of u-PA in the conditional medium of A549 and LLC cells. A549 cells (a) and LLC cells (b) were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100 μg/ml of TCE for 24 h and then subjected to casein zymography to analyze the activity of u-PA. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



**Fig. 5.** Effects of TCE on the protein levels of the endogenous inhibitors TIMP-2 and PAI-1. A549 cells (a) and LLC cells (b) were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100  $\mu\text{g/ml}$  of TCE for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-TIMP-2 or anti-PAI-1 antibodies. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

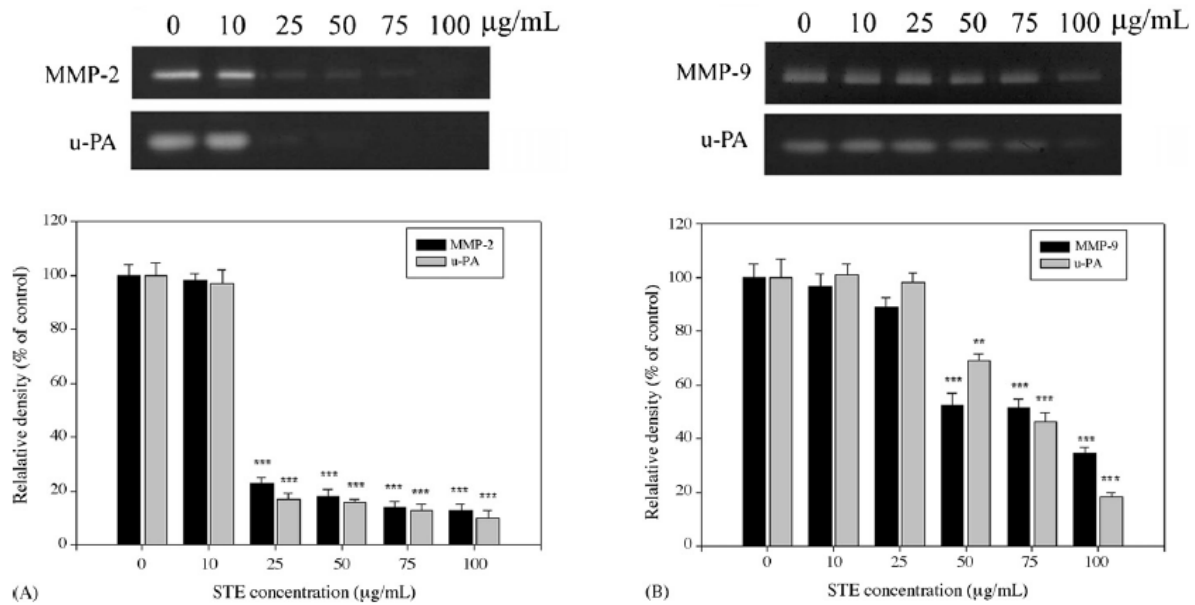


**Fig. 6.** The in vivo anti-metastasis effects of TCE. After subcutaneous implantation of LLC cells, C57BL/6 mice were treated with TCE as described in Section 2 and then analyzed for the number of lung metastasis (a), the growth of tumor (b), the weight of primary tumor (c) and the body weight (d). (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

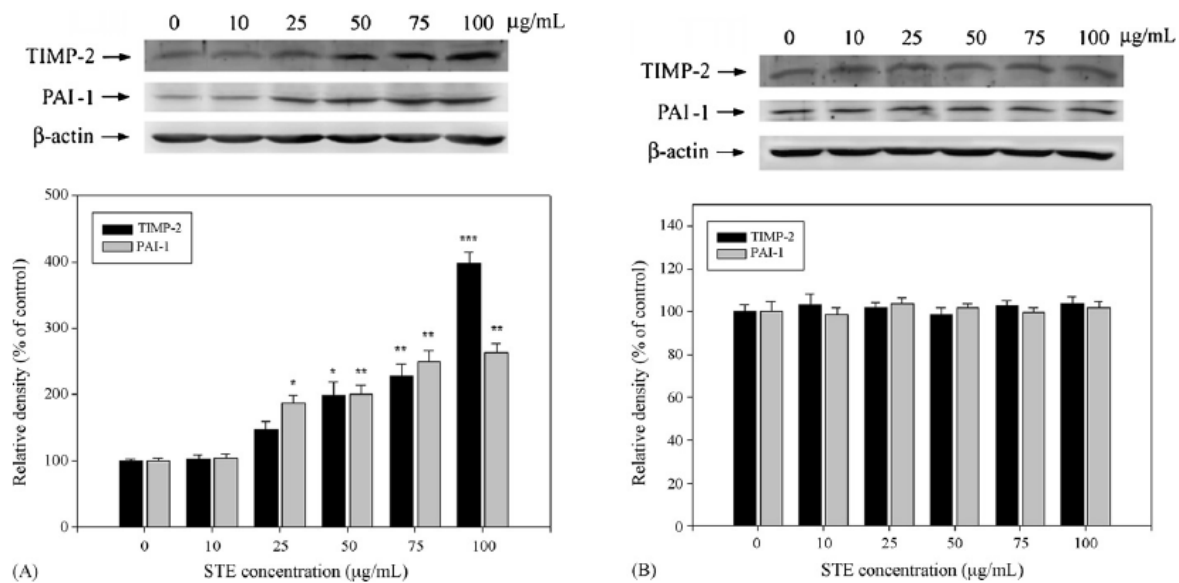
Table 1  
Effects of various STE concentrations on the cell viability, cell invasion and motility of A549 and LLC cells

	Cell viability (% of control)	Cell invasion (% of control)	Cell motility (% of control)
STE concentrations in A549 cell			
10 $\mu\text{g/mL}$	101.91 $\pm$ 1.51	98.41 $\pm$ 2.86	97.29 $\pm$ 3.12
25 $\mu\text{g/mL}$	97.89 $\pm$ 3.93	73.81 $\pm$ 3.63**	76.58 $\pm$ 3.60**
50 $\mu\text{g/mL}$	96.21 $\pm$ 2.39	48.41 $\pm$ 4.19***	49.55 $\pm$ 2.38***
75 $\mu\text{g/mL}$	96.53 $\pm$ 2.19	42.86 $\pm$ 3.63***	43.24 $\pm$ 4.13***
100 $\mu\text{g/mL}$	94.13 $\pm$ 1.86	38.89 $\pm$ 5.20***	38.74 $\pm$ 5.01***
STE concentrations in LLC cell			
10 $\mu\text{g/mL}$	65.24 $\pm$ 1.48***	91.98 $\pm$ 2.95	90.36 $\pm$ 4.51
25 $\mu\text{g/mL}$	56.96 $\pm$ 3.01***	63.68 $\pm$ 4.09**	68.53 $\pm$ 4.39**
50 $\mu\text{g/mL}$	44.01 $\pm$ 1.98***	30.19 $\pm$ 2.87***	29.44 $\pm$ 3.66***
75 $\mu\text{g/mL}$	39.09 $\pm$ 1.67***	20.75 $\pm$ 2.06***	18.78 $\pm$ 2.21***
100 $\mu\text{g/mL}$	22.86 $\pm$ 0.62***	10.85 $\pm$ 1.25***	11.17 $\pm$ 1.83***

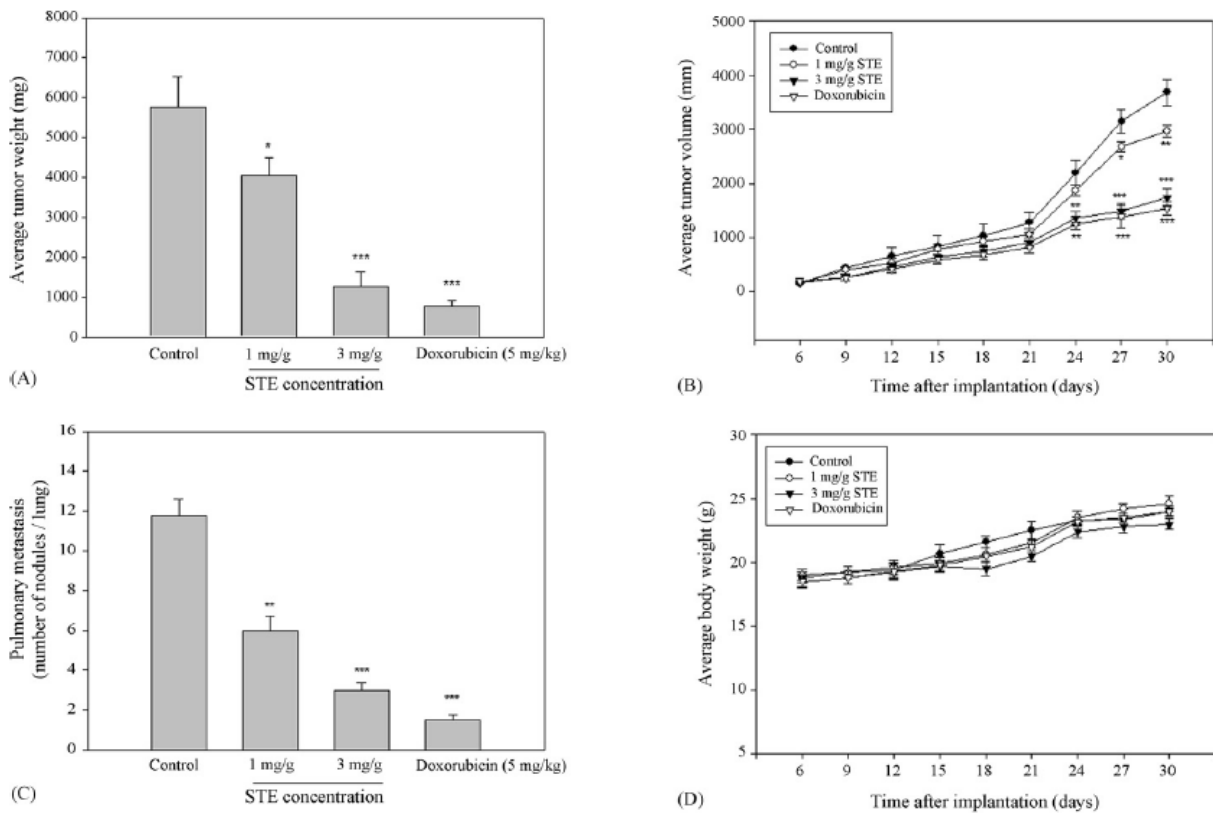
Data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



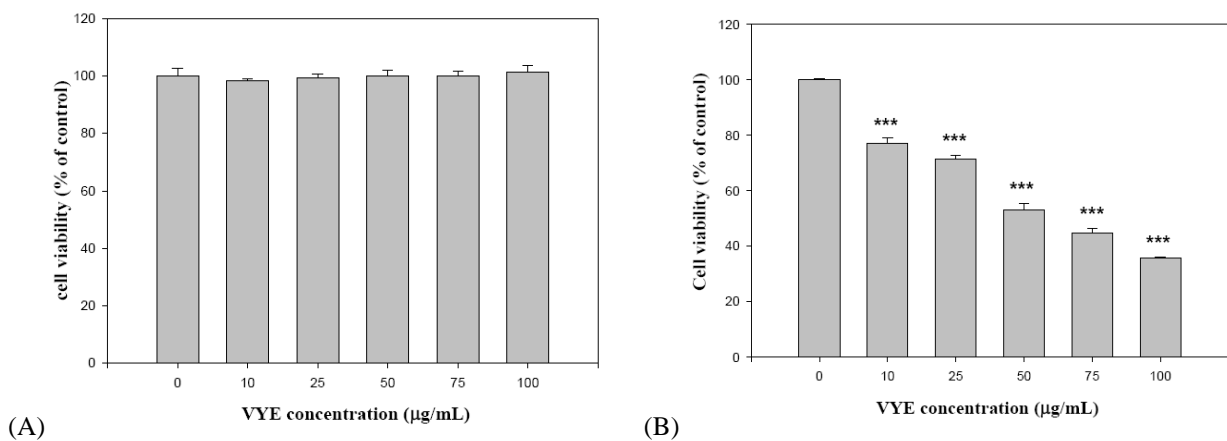
**Fig. 7.** Effects of STE on the activities of MMP-2, MMP-9 and u-PA. A549 cells and LLC cells were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100 µg/mL of STE for 24 h and then subjected to gelatin and casein zymography to analyze the activities of MMP-2 and u-PA (A) on the A549 cells, MMP-9 and u-PA (B) on the LLC cells, respectively. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )



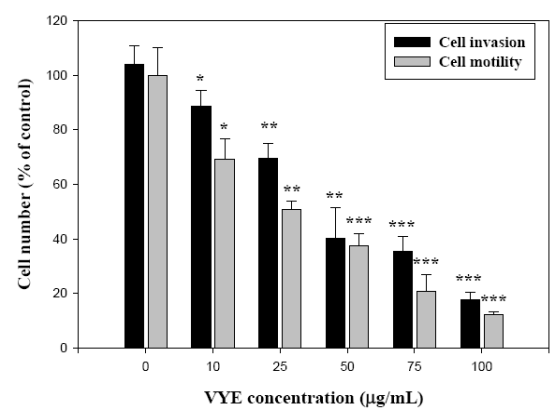
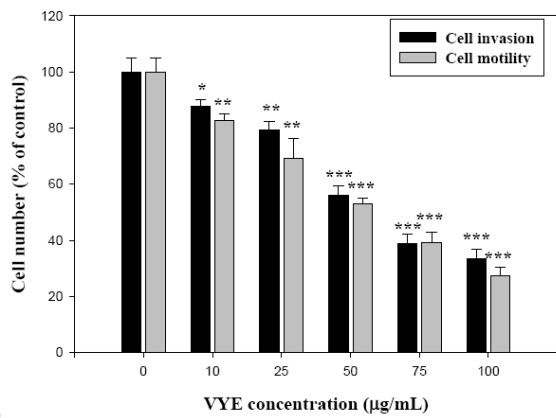
**Fig. 8.** Effects of STE on the protein levels of the endogenous inhibitors TIMP-2 and PAI-1. A549 cells (A) and LLC cells (B) were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100 µg/mL of STE for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-TIMP-2 or anti-PAI-1 antibodies. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )



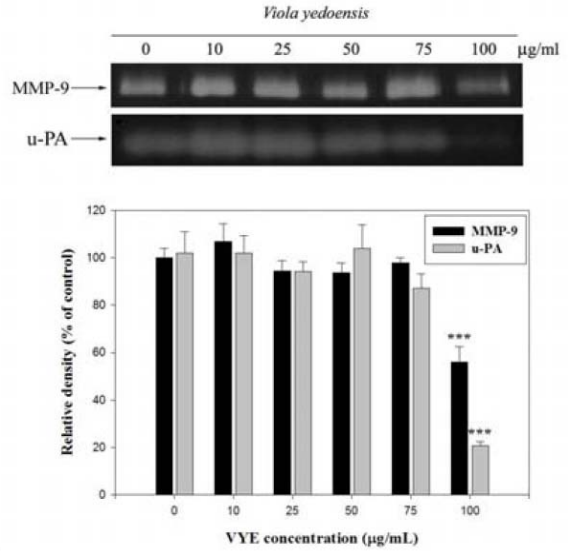
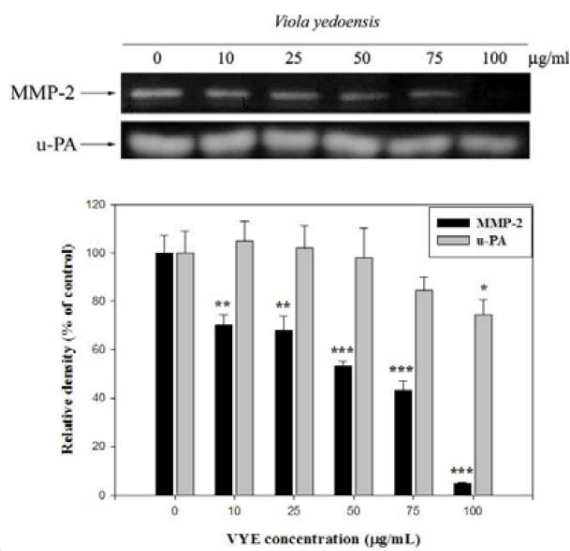
**Fig. 9.** The *in vivo* anti-metastasis effect of STE. After subcutaneous implanting LLC cells, C57BL/6 mice were treated with STE and then analyzed for the number of lung metastasis (A), growth of tumor (B), weight of primary tumor (C), and body weight (D). Data represent the mean±S.D. ( $n=5$ ) (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



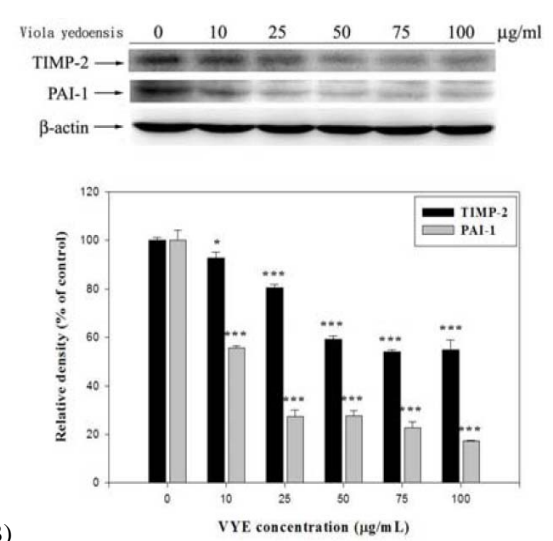
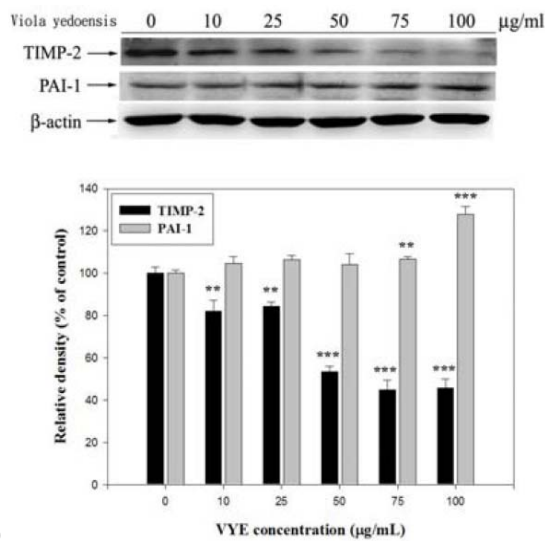
**Fig. 10.** Effect of VYE on the viability of A549 and LLC cells. (a) A549 and (b) LLC cells were treated with 0, 10, 25, 50, 75, or 100 µg/ml of TCE for 24 h before being subjected to a MTT assay for cell viability. (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



(A) (B)  
**Fig. 11.** The effects of VYE on cell invasion and motility of A549 and LLC cells. (a) A549 cells and (b) LLC cells were treated with TCE at a concentration of 0, 10, 25, 50, 75 or 100 lg/ml for 24 h, and were then subjected to analyses for invasion and motility. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

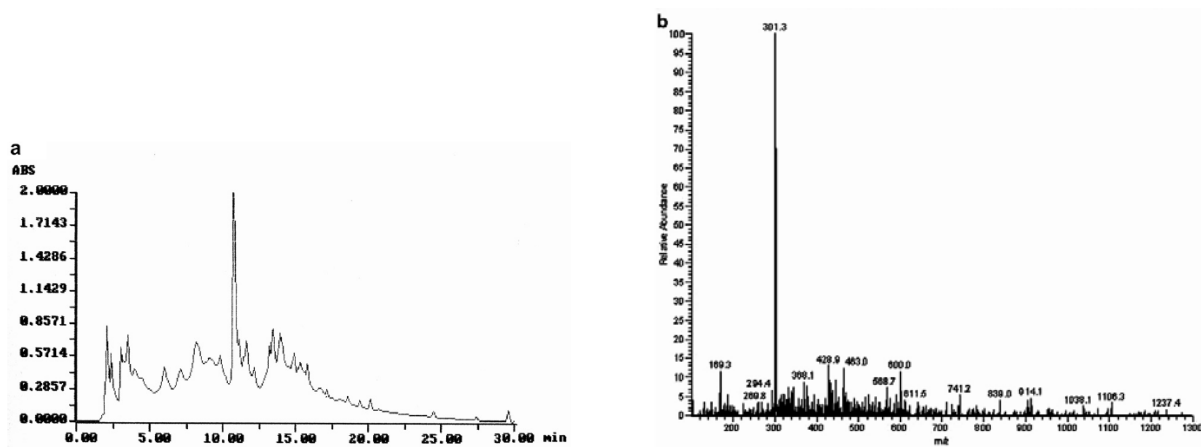


(A) (B)  
**Fig. 12.** Effects of VYE on the activities of MMP-2, MMP-9 and u-PA. A549 cells and LLC cells were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100\_µg/mL of STE for 24 h and then subjected to gelatin and casein zymography to analyze the activities of MMP-2 and u-PA (A) on the A549 cells, MMP-9 and u-PA (B) on the LLC cells, respectively. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

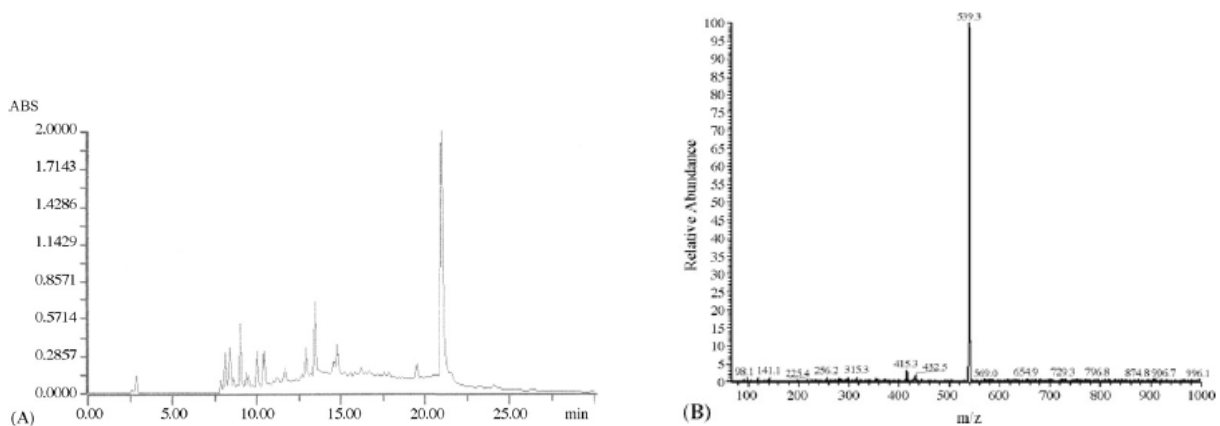


(A) (B)

**Fig. 13.** Effects of VYE on the protein levels of the endogenous inhibitors TIMP-2 and PAI-1. A549 cells (A) and LLC cells (B) were treated with 0, 10, 25, 50, 75 or 100\_ g/mL of STE for 24 h, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-TIMP-2 or anti-PAI-1 antibodies. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )



**Fig. 14.** The chemical profile of TCE was analyzed by HPLC-mass spectrometer. (a) Chromatographic patterns from HPLC analysis (254 nm) of TCE extracts showed peaks corresponding to the retention times (min). (b) The main product peak (with a retention time of 11.13 min as shown in (a)) was then subjected to mass spectrometer.



**Fig. 15.** The chemical profile of STE was analyzed by HPLC-mass spectrometer. (A) Chromatographic patterns from HPLC analysis (254 nm) of STE extracts showed peaks corresponding to the retention times (min). (B) The main product peak (with a retention time of 21.3 min as shown in (A)) was then subjected to mass spectrometer.

計畫成果自評：研究內容與原計畫完全相符、已經達成計畫中所列預期目標、研究成果具學術或應用價值。

#### 已發表論文：

1. Yang, S.F., Chu, S.C., Liu, S.J., Chen, Y.C., Chang, Y.Z., and **Hsieh, Y.S.\*** (2007) Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* 110:483-489. (SCI)
2. **Hsieh, Y.S.**, Yang, S.F., Liu, S.J., Chang, Y.Z., Chen, Y.C., Chiang, C.L., and Chu, S.C.\* (2007) *In vitro* and *in vivo* antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. leaves on lung cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 45:1194-1201. (SCI)