

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： Artocarpin對於人類非小細胞肺癌的鈣黏蛋白表現與細胞生長週期之影響
------------	---

執行計畫學生：林冠廷

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-046-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：廖智凱

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系解剖學科

中華民國 109年03月31日

目錄

目錄.....	I
(一) 中文摘要.....	II
(二) Abstract.....	III
(三) 研究動機與目的.....	1
(四) 文獻回顧與探討.....	1
(五) 研究方法及步驟.....	3
(六) 實驗結果.....	5
(七) 討論與結論.....	10
(八) 參考文獻.....	11

(一) 中文摘要

異戊二烯黃酮類 artocarpin 為波羅蜜種植物(*Artocarpus species*)具有活性的酚類萃取物，artocarpin 已被證實對許多種類的癌細胞有著良好的細胞毒殺作用，包括細胞凋亡、細胞自噬死亡及細胞週期的停滯，而抑制腫瘤後續的進展。癌細胞與正常細胞一樣具有黏附接合(adherens junction)而將細胞相互連結，許多文獻中指出黏附接合中的 type 1 鈣黏蛋白(cadherin)包括 E-cadherin 及 N-cadherin 會參與著腫瘤發展，如癌細胞的生長與分化、對化療藥物產生抗性、細胞型態的改變「即上皮細胞-間質細胞轉型(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)」，以及腫瘤的轉移。肺癌的症狀不容易察覺，確診時大多數的患者處於第 III 及 IV 期，此時腫瘤已發生轉移，使得肺癌仍是全世界致死率最高的癌症，雖然在非小型細胞肺癌的研究中發現 artocarpin 可以有效導致肺癌細胞進行細胞凋亡，但對於鈣黏蛋白在此處所扮演的角色仍未被提起及釐清，因此本計畫選用兩種轉移程度不同的人類肺腺癌細胞株 CL1-0 及 CL1-5 探討 artocarpin 與鈣黏蛋白對於肺癌生長的影響，其中 CL1-0 細胞轉移程度較低，主要表現 E-cadherin；而 CL1-5 細胞轉移程度高，主要表現 N-cadherin，而 artocarpin 可以明顯地抑制 CL1-5 的移行。西方轉漬法的結果顯示，細胞以 artocarpin 處理 24 小時之後不會影響 CL1-0 細胞的 E-cadherin 蛋白質表現量，但會顯著地抑制 CL1-5 細胞表現 N-cadherin，ERK 及 JNK 的蛋白質磷酸化會因加入 artocarpin 後明顯的上升，然而僅在加入 ERK 抑制劑 PD98059 可以有效地恢復 artocarpin 抑制 CL1-5 細胞的 N-cadherin 的蛋白質表現量，而 JNK 抑制劑 SP600125 則沒有任何的影響。以 MTT、colony formation 及細胞生長曲線的實驗結果得知 artocarpin 可以影響 CL1-5 細胞的增生，進一步使用流式細胞儀檢測細胞週期與細胞死亡的狀態，結果發現 artocarpin 造成 CL1-5 的細胞週期停滯在 G0/G1 phase，並且細胞凋亡的細胞數目在 artocarpin 處理後有明顯地增加。綜合以上的結果，使我們瞭解 artocarpin 經由 ERK 相關的訊息路徑抑制肺腺癌 CL1-5 細胞表達 N-cadherin，或許藉由這樣的路徑使 CL1-5 細胞的細胞週期停滯，進而導致 CL1-5 細胞進行細胞凋亡。由此可知 artocarpin 對於高度轉移的肺癌細胞具有細胞毒殺性，可作為一種良好的輔助性藥物用以增加肺癌患者的五年存活率。

關鍵字：異戊二烯黃酮、鈣黏蛋白、黏附接合、非小型細胞肺癌、細胞週期、細胞凋亡

(二) Abstract

Artocarpin, an active extract of the *Artocarpus* species, has been proven to have potent cytotoxic effects on human cancer cells, including apoptosis, autophagic cell death and cell cycle arrest. Like normal cells, contacts between adjacent cancer cells are made up of adherens junctions. Growing evidences have demonstrated that type-1 cadherin of adherens junctions, especially E-cadherin and N-cadherin, participate in tumor progression, such as the growth and differentiation of cancer cells, resistance to chemotherapeutics, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and tumor metastasis. Lung cancer is the most lethal cancer in the world because most patients have metastatic tumor in stages III and IV at the time of diagnosis. The main goal of our study is to understand that the effects of artocarpin and cadherin on the growth of lung cancer cells. The study was performed using two human lung adenocarcinoma cell lines, CL1-0 and CL1-5, with different degrees of metastasis. E-cadherin was mainly expressed in low metastatic CL1-0 cells, while N-cadherin was highly expressed in high metastatic CL1-5 cells. The results from western blot analysis showed that CL1-5 cells treated with artocarpin reduces the protein level of N-cadherin. However, there was no change in E-cadherin expression in CL1-0 cells after treatment of artocarpin. To clarify the pathway underlying artocarpin-inhibited N-cadherin expression in CL1-5 cells, we found artocarpin induced a significant increase in levels of phosphorylated ERK (pERK) and JNK (pJNK). The artocarpin-induced downregulation of N-cadherin was prevented by co-treatment of the ERK inhibitor PD98059, but not the JNK inhibitor SP600125. Based on the results of MTT, colony formation, and cell growth curve, artocarpin significantly inhibited the CL1-5 cell proliferation. Moreover, the flow cytometry was used to detect the status of cell cycle and apoptosis of CL1-5 cells treated with artocarpin. These results showed that artocarpin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase and apoptotic cell death. Taken together, our results suggest that artocarpin leads to N-cadherin downregulation via activation of ERK signaling pathway in lung adenocarcinoma CL1-5 cells, which resulting in cell cycle arrest and apoptosis in lung adenocarcinoma CL1-5 cells. These project gives an in-depth insight into the molecular mechanism of artocarpin resulting in cytotoxicity to highly metastatic lung cancer cells. Potential auxiliary use of artocarpin as an antitumor agent targeting N-cadherin may increase the five-year survival rate of lung cancer patients.

Keywords: artocarpin, N-cadherin, adherens junction, lung cancer, cell cycle arrest, apoptosis

(三) 研究動機與目的

鈣黏蛋白 N-cadherin 屬於一種跨膜醣蛋白，能作為相鄰細胞之間的黏附接合，其胞內區域可以調控鏈蛋白 β -catenin 的功能及穩定肌動蛋白相關的細胞骨架。目前已知 N-cadherin 胞外區域的連結也能夠引發訊息傳遞，在肺癌的研究中指出，以 siRNA 及抗體調降 N-cadherin 的表現，會抑制 Akt 及促凋亡蛋白 Bad 的磷酸化而抑制肺癌 PC9/ZD 細胞的存活率(1)。此外，藉由 siRNA 靜默 N-cadherin 的表達，進而抑制 Akt、ERK 及 β -catenin 的訊息路徑導致黑色素瘤細胞的細胞週期停滯在 G1 phase(2)。由此可知 N-cadherin 對於腫瘤的生長扮演舉足輕重的調控角色。先前研究指出 artocarpin 會經由 MAPK 與 Akt 的路徑導致肺癌 A549 細胞凋亡(3)。在結腸直腸癌中，artocarpin 卻會抑制 Akt1 及 Akt2 的激酶活性，透過磷酸化 AMPK 導致人類結腸直腸癌細胞的細胞週期停滯在 G1 phase，而無法增殖的癌細胞便會逐漸走向細胞死亡(4)。雖然 artocarpin 可以促使癌細胞走向自體吞噬細胞死亡或細胞凋亡等細胞程序性死亡而抑制腫瘤的增生，但在非小型肺癌中，artocarpin 影響鈣黏蛋白的表現與細胞週期的成因仍然未知，本計畫使用兩種人類非小細胞肺癌細胞株 CL1-0 及 CL1-5，相較於 CL1-0 細胞，CL1-5 具有高度轉移能力(24)，探討異戊二烯黃酮 artocarpin 對於這兩種不同特性的肺癌細胞生長與增殖的影響，並且藉此深入研究鈣黏蛋白所扮演的角色與其相關的訊息調控機轉。若 artocarpin 能針對高轉移性的癌細胞具有毒殺性，則可在末期病人的治療中作為輔助性藥物，幫助延緩病人病情。

(四) 文獻回顧與探討

1. 肺癌

肺癌是全世界最常見(佔總病例的 11.6%)且最致命的癌症(佔癌症總死亡人數的 18.4%) (5)。2017 年中華民國衛生福利部的資料顯示，位居男性及女性的癌症死因首位的皆為肺癌。病理學上，肺癌的主要類型為非小型細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)，佔肺癌的 85%，又可區分為鱗狀細胞肺癌(squamous cell carcinoma)、肺腺癌(adenocarcinoma)與大型細胞癌(large cell carcinoma)，而另一類為小型細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)，其佔肺癌的 15%，二者臨床表差異甚大，治療方式與預後也不同(6)。

小細胞肺癌為一種惡性的上皮型腫瘤，細胞質少、沒有明顯核仁，細胞分裂快速，可經由淋巴或血液循環系統蔓延至其他器官，超過 90% 的小細胞肺癌患者是老年人或重度吸菸者，得病風險隨着抽菸持續時間和吸菸強度增加而上升，小細胞肺癌較非小細胞肺癌對化學治療和放射治療敏感性高，但其預後通常較差(7)。

非小細胞肺癌細胞分裂與擴散速度較慢，疾病初期的主要治療方式為手術切除，大多數患者被診斷出非小細胞癌症時，多已是疾病末期，以本國為例，依照手術後的分期，第 IV 期的病人約占 40%，即使接受放射線與化學藥物治療，而第 IV 期的五年存活率低於兩成，因此針對癌症轉移的治療是目前研究的主要目標(4)。

2. 黏附接合(adherens junction)

相鄰上皮細胞的接觸面會形成接合(junction)而將細胞相互連結，包括緊密接合(tight junction)、黏附接合(adherens junction)、胞橋小體(desmosome)及間隙接合(gap junction)，這些結構促成上皮細胞的極性並參與細胞分化，協助維持組織型態的完整性(8)。細胞型態形成(morphogenesis)的過程中，黏附接合的組成與穩定性為重要的影響因子，黏附接合主要是由鈣黏蛋白(cadherin)與鏈蛋白(catenin)構成的複合體(9)。典型的鈣黏蛋白(classical cadherin)為一種跨膜醣蛋白，必需有鈣離子的存在，相鄰細胞間的鈣黏蛋白胞外區域才能相互形成 homophilic binding，典型的鈣黏蛋白可分成 type 1 及 type 2 兩種類型，隸屬於 type 1 鈣黏蛋白的 N-cadherin 及 E-cadherin 廣泛研究於腫瘤相關研究，在細胞內，N-cadherin 及 E-cadherin 的胞內區域可以透過鏈蛋白複合體連接至肌動蛋白絲(actin filament)，當肌動蛋白絲重新組裝導致細胞外型變化時，將使黏附接合瓦解，細胞之間的連結變弱，在腫瘤中便會造成癌細胞的移行與侵入(10, 11)。上皮型態的癌細胞具有 E-cadherin，因此細胞間的連結相當緊密，腫瘤的微環境中如果缺乏氧氣並具有一些生長因子如 TGF- β 、EGF 與 HGF 等，會促使癌細胞由上皮型態逐漸地轉變為間質細胞型態，這樣的型態轉換稱為上皮-間質細胞轉型(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，此過程中癌細胞的 E-cadherin 表現量會明顯地下降，而 N-cadherin 表現量則會增加，造成癌細胞間的連結減弱而易傾向於轉移(10, 11)。

在少數的研究中指出 E-cadherin 的存在造成乳癌與前列腺癌對化療藥物不敏感 (12, 13)。然而其他研究中卻發現 E-cadherin 的表達缺失在胃癌與結腸直腸癌才會導致癌細胞對化療藥物產生抗性(14, 15)。針對具化療抗性的肺癌 PC9/ZD 細胞進行分析，發現 N-cadherin 的存在能促使肺癌細胞在化療過程中存活(1)。此外，TGF β 造成乳癌 MCF10A 細胞 E-cadherin 的表現量降低而發生上皮-間質細胞轉型，並且透過 PAPER-3 [Poly(ADP-ribose) polymerase] 增強癌細胞對 etoposide 的化療抗性(16)。N-cadherin 能促使黑色素瘤細胞與其周邊的纖維母細胞及內皮細胞相互作用，進而侵入至血管內，藉由心血管系統轉移至遠端的組織與器官(17, 18)。N-cadherin 的存在除了促使癌細胞的轉移，也可以造成癌細胞的生長及分化(19-21)。

3. 異戊二烯黃酮 artocarpin

Artocarpus 波羅蜜屬植物是一種常綠喬木，在東南亞國家為具有經濟價值且產量極佳的植物，其果實可供食用，亦能提供良好的木材，並且廣泛做為傳統民間藥物，用以治療、腹瀉、潰瘍、條蟲感染(22)。研究發現其二氫甲烷分餾成分中具有高產量的 artocarpin，其化學式為[6-(3-methyl-1-butenyl)-5,2',4'-trihydroxy-3-isoprenyl-7-methoxyflavone] (圖 1)，這種異戊二烯黃酮具有許多生物活性功能(22)。目前對於抗癌的研究指出 artocarpin 具有細胞毒殺性，可以經由自體吞噬細胞死亡(autophagic cell death)的方式降低肝癌 HepG2 與 PLC/PRF/5 細胞株的存活率(23)。在另一個研究中發現 artocarpin 導致結腸直腸癌細胞株產生自體吞噬細胞死亡及細胞凋亡(apoptosis)，進而抑制癌細胞的非貼附性生長(anchorage-independent growth)，以管餵食 artocarpin 能有效地抑制大腸炎誘發小鼠大腸直腸癌化的情況，並增加小鼠的存活率，代表 artocarpin 具有做為結腸直腸癌化學預防劑的潛能(4)。在非小型細胞肺癌與腦癌中也證實 artocarpin 可以促使癌細胞進行細胞凋亡(3, 24)。因此 artocarpin 在抑制腫瘤生長的藥理功能具有舉足輕重的潛能。

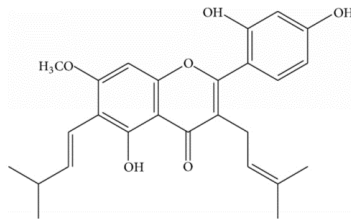


圖 1. 異戊二烯黃酮 artocarpin 的化學結構圖示。

(五) 研究方法及步驟

1. 細胞株的培養

人類非小型肺癌細胞株 CL1-0 及 CL1-5 培養在細胞生長培養液[10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 IU/mL 青黴素(penicillin)、100 µg/mL 鏈黴素(Streptomycin)、2 mM 麩醯胺酸(glutamine)、3.7 g/L 碳酸氫鈉(NaHCO₃)配置於 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)]。將細胞置於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養，每 2 至 3 天更換新的培養液、繼代、分盤或進行實驗。

2. MTT assay

將細胞以密度約為 1×10^4 cells/cm² 種貼於 96 孔盤，待細胞生長貼附後，以不同濃度藥物處理 24 小時；或細胞以密度 5×10^3 cells/cm² 種貼於 24 孔盤中，以相同濃度藥物處理 48、72 小時。待藥物反應終止，於每小格加入 10 mg/ml Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide，處理時間為 4 小時，此過程中會經由粒線體中的 dehydrogenase 作用產生深藍色結晶沉澱物 formazan，接著將每一小格的液體吸除，加入 100 µL 的 DMSO 並且均勻混合用以溶解 formazan，以 ELISA reader 設定波長 570 nm 讀取樣本的吸光值。

3. Cell viability assay

細胞以密度 5×10^3 cells/cm² 種貼於 24 孔盤中，24 小時後加入相同濃度藥物處理，於 0、24、48、72、96 小時加入 trypan blue 染色，並以血球計數盤計數細胞，排除 trypan blue 染上的死細胞進行活細胞數目的量化及生長曲線的繪製。

4. Colony formation assay

將 200 cells 種貼於 35 mm 中，48 小時後加入藥物，經過 7 天後，以 4% paraformaldehyde 於室溫固定 15 分鐘，接著以 0.1% 結晶紫(crystal violet)染色 30 分鐘後，以 PBS 清洗後，觀察並拍照存檔，擷取的影像則以軟體 Image J 進行群落形成的分析。

4. 細胞移動分析(transwell migration assay)

人類肺癌細胞株種貼於 Transwell apparatus 的 upper chamber 中(5×10^4 cells/well)，並加入藥物，於 37°C 二氧化碳培養箱(5% CO₂)中培養 24 小時待細胞穿過 upper chamber 上的 8 µm 孔徑的膜，接著用棉花棒刮除 upper chamber 膜上的細胞，保留遷移到 Transwell apparatus (孔膜的另一側)的細胞，以 PBS 洗滌一次，用 4% paraformaldehyde 於室溫固定細胞 10 分鐘，再以 PBS 洗滌三次後，以 1% 結晶紫染色 15 分鐘，加入 PBS 洗滌並重複三次後，於倒立式顯微鏡下觀察，以單眼相機 canon 700D 擷取影像之後，擷取的影像則以軟體 Imaging J pro plus 進行細胞計數之統計。

5. 流式細胞儀分析(Flow Cytometry)

將細胞以密度 5×10^3 cells/cm² 種貼於35 mm培養皿中，待細胞生長至八分滿進行藥物處理。待藥物反應時間終止，進行二種不同染色：(1) 檢測細胞週期。先以trypsin-EDTA懸浮貼附的細胞，接著加入70% 酒精於-20°C固定1小時後，以含有10 µg/ml RNase A與 20 µg/ml的PI於4°C作用30分鐘，使用FACSCalibur Flow Cytometer分析細胞週期；(2) 檢測細胞存活率。先以trypsin-EDTA懸浮貼附的細胞，接著以7-AAD及annexin V的抗體作用後15分鐘後，於 FACSCalibur Flow Cytometer 評估細胞凋亡的情形。

6. 免疫螢光染色

將人類肺癌細胞株培養於蓋玻片上，以 100% Acetone 於 -20°C 處理 10 分鐘固定細胞，PBS 洗滌三次，吸除 PBS 後加入初級抗體，靜置於 4°C 作用 16 至 18 小時後，再以 PBS 洗滌三次，吸除 PBS 後加入帶有螢光的次級抗體作用於室溫下 60 分鐘，接著以 PBS、0.9% NaCl 各洗二次，用 Gel Mount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma) 封埋，隔夜以指甲油封片，置於螢光顯微鏡下觀察。

7. 蛋白質萃取

人類肺癌細胞株經由藥物處理之後，細胞盤以 PBS 潤洗一遍後，加入 Lysis 緩衝液 [RIPA 緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH7.4、1% NP-40、150 mM NaCl 與 1 mM EDTA)含有蛋白酶抑制劑(1 mM PMSF、1 mM protease cocktail)及磷酸水解酶抑制劑(1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM phosphate protease cocktail)]，以刮板刮下細胞，並且將細胞液收集於 1.5 mL 離心管中，置於冰上萃取 30 分鐘，過程中以震盪器震盪數次，接著離心取上清液即完成蛋白質萃取，取 5 µL 細胞萃取液進行蛋白質濃度的測定(Bio-Rad DC protein assay)。剩餘的細胞萃取液以體積比 3 : 1 加入 4x sample 緩衝液(40% glycerol、20% β-mercaptoethanol、8% SDS、0.012% bromophenol blue 含 250 mM Tris-HCl; pH6.8)混合後，保存於-20°C或進行蛋白質電泳及西方轉漬法。

8. 蛋白質電泳與西方轉漬法

蛋白質萃取液於 100°C 加熱 5 分鐘，以 10% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析之後轉漬於轉漬膜上，轉漬完成後以 5x ponceau S (1% ponceau S、15% sulfosalicylic acid 和 15% trichloroacetic acid) 染色，切下轉漬膜上欲觀察蛋白質的位置，經 blocking solution [5% non-fat milk 或 2.5% BSA in TBST (150mM NaCl、0.1% Tween-20 與 50mM Tris-HCl; pH7.4)] 作用 1 小時後，加入待測蛋白質的初級抗體，於 4°C 搖晃混勻並作用約 16 至 18 小時。接著以 TBST (pH7.4) 洗滌三次每次各十分鐘，再加入二級抗體於室溫作用 1 小時，TBST (pH8.2) 洗滌三次每次各十分鐘，以 NBT/BCIP 呈色或是 Enhanced chemiluminescence (ECL) 於 X 光片顯像的方式進行分析。

9. 生物統計分析

至少取三組以上的實驗數據進行統計，以 one-way ANOVA Dunnett's post-hoc test 或是 Student's t-test 進行差異分析，以 $P < 0.05$ 為顯著差異，統計結果則以平均值±標準差 (mean ± SD) 的表示方式用 GraphPad Prism 5 軟體製作量化圖。

(六) 實驗結果

1. Artocarpin 能夠抑制高度移行能力的人類肺腺癌 CL1-5 細胞株

人類肺腺癌細胞株 CL1-0 與 CL1-5 在相位差倒立式顯微鏡下觀察細胞外型，聚集的 CL1-0 細胞呈現鵝卵狀的上皮細胞型態(圖 2A, CL1-0)，而排列分散的 CL1-5 細胞呈現紡錘狀的間質細胞型態(圖 2A, CL1-5)。為了瞭解這兩株肺腺癌細胞鈣黏蛋白(cadherin)的表現情況，使用西方轉漬法進行蛋白質的分析，結果可知上皮細胞型態的 CL1-0 細胞主要表現 E-cadherin (圖 2B, Lane 1-4, n=4)，而間質細胞型態的 CL1-5 細胞則主要表現 N-cadherin (圖 2B, Lane 5-8, n=4)。

接著以 transwell migration assay 分析 CL1-0 與 CL1-5 細胞的移行能力，結果發現 CL1-5 細胞的移行能力明顯地高於 CL1-0 細胞(圖 2C 及 2D, CL1-0、CL1-5 control)。進一步針對高度移動能力的 CL1-5 細胞以 5 μ M artocarpin 處理之後，結果發現 artocarpin 可以顯著地抑制 CL1-5 細胞的移行 (圖 2C 及 2D, CL1-5 control 及 Artocarpin)。

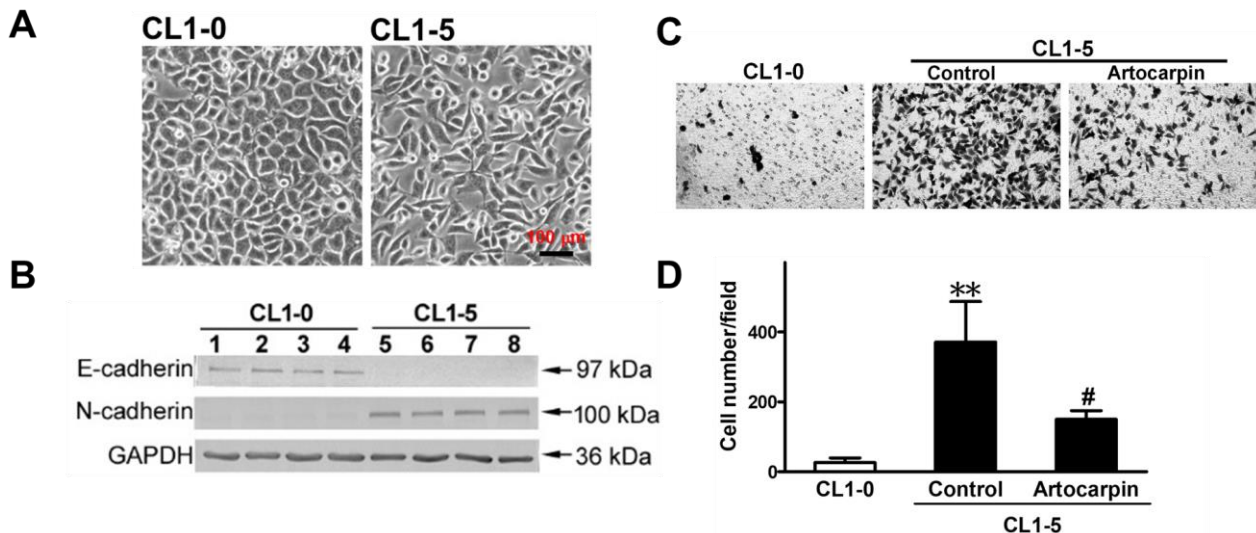


圖 2. 比較 CL1-0 細胞及 CL1-5 細胞的鈣黏蛋白表現量及細胞移行能力。(A)CL1-0 及 CL1-5 細胞於相位差倒立式顯微鏡進行觀察，並拍攝影像。(scale bar = 100 μ m) (B)收集細胞萃取液，經由蛋白質電泳與西方轉漬法分析後，以對抗 E-cadherin 及 N-cadherin 進行呈色反應。GAPDH 為定量控制組。(C)使用 Transwell migration assay 進行細胞移行能力的分析，以結晶紫染色於相位差倒立式顯微鏡擷取影像。(D)統計 Transwell migration assay 中移行細胞的平均數目。(** $P < 0.01$ ，與 CL1-0 比較；# $P < 0.05$ ，與 CL1-5 Control 比較)

2. Artocarpin 抑制 CL1-5 細胞表現 N-cadherin，卻不影響 CL1-0 細胞表現 E-cadherin

加入不同濃度 artocarpin 後，用西方轉漬法分析 E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白質的表現情況。隨著 artocarpin 的濃度增加至 10 μ M，CL1-0 細胞中 E-cadherin 的蛋白質表現量沒有明顯的變化(圖 3A)。而 CL1-5 細胞經由不同濃度的 artocarpin (2、5 或 10 μ M)之後，N-cadherin 的蛋白質表現量明顯地減少(圖 3B)。

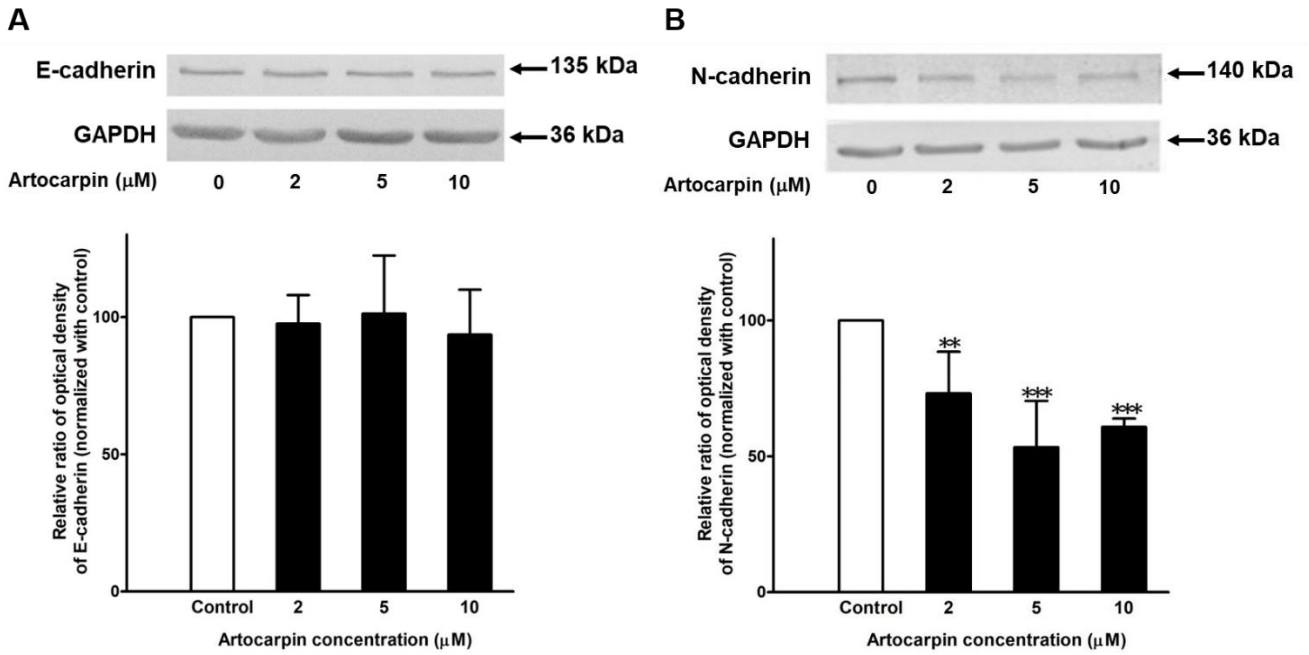


圖 3. 探討 Artocarpin 對 CL1-0 與 CL1-5 細胞鈣黏蛋白的表現之影響。 (A)收集 CL1-0 細胞的細胞萃取液，經由蛋白質電泳與西方轉漬法分析後，以對抗 E-cadherin 進行呈色反應。GAPDH 為定量控制組。(各處理組與控制組之間無顯著差異) (B)收集 CL1-5 細胞的細胞萃取液，經由蛋白質電泳與西方轉漬法分析後，以對抗 N-cadherin 進行呈色反應。GAPDH 為定量控制組。(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Control 比較)

3. Artocarpin 造成 N-cadherin 在 CL1-5 細胞相接處的染色訊號減少

以 N-cadherin 的抗體進行細胞免疫螢光染色並於螢光顯微鏡下觀察 N-cadherin 在 CL1-5 細胞上的分布情形。結果發現，未處理 artocarpin 的 CL1-5 細胞其 N-cadherin 的染色顯著地分布於細胞及細胞相接處的位置(圖 4, Control)。而以 5 μM artocarpin 處理 24 小時後，N-cadherin 在 CL1-5 細胞接合處的染色明顯地扁少，且較不連續分布(圖 4, Artocarpin)。

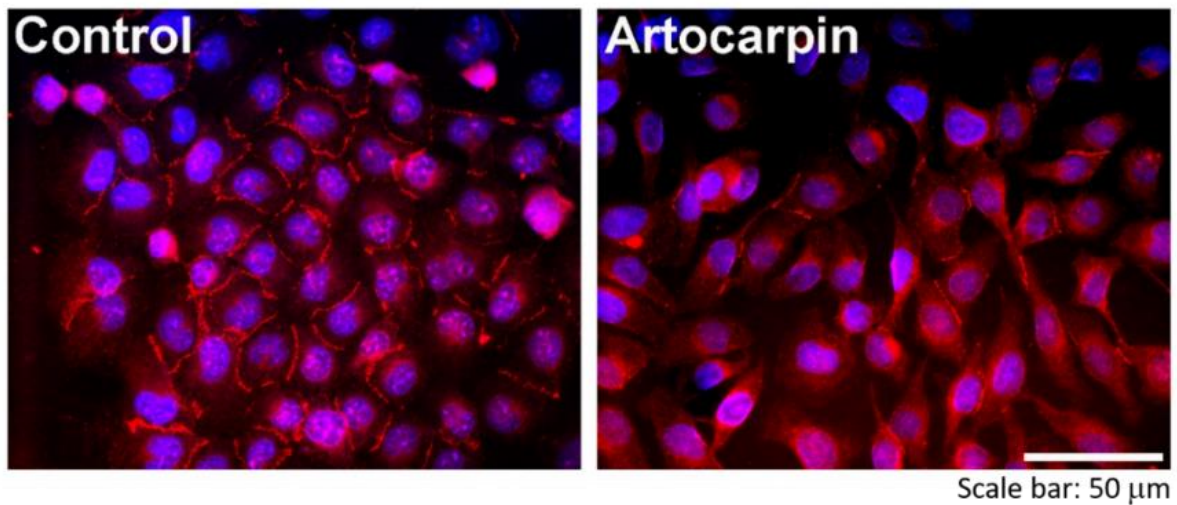


圖 4. Artocarpin 處理 CL1-5 細胞降低 N-cadherin 免疫螢光的染色。 CL1-5 細胞以 N-cadherin 的抗體進行細胞免疫螢光染色(紅色)，DAPI 為細胞核染色的螢光物質(藍色)。(scale bar = 50 μm)

4. Artocarpin 容易造成 CL1-5 細胞產生細胞毒殺性

為了確認 artocarpin 對於上皮性肺癌 CL1-0 細胞及間質性肺癌 CL1-5 細胞是否具有細胞毒性。這兩株細胞以不同濃度 artocarpin 處理 24 小時之後，利用 MTT 方式檢測細胞活性，5、10 及 20 μM artocarpin 皆不會影響 CL1-0 細胞的存活度，必須將濃度提高加至 40 μM 才會抑制細胞的存活度 (圖 5A, CL1-0)。在 CL1-5 組別中，使用 5 及 10 μM artocarpin 皆不影響細胞的存活度，然而當 artocarpin 濃度增加至 20 及 40 μM 則會明顯地抑制細胞的存活(圖 5A, CL1-5)。

另一方面，這兩株細胞以 5 μM artocarpin 分別處理 48 與 72 小時後，進行 MTT 分析，結果發現，CL1-0 組別中無論 48 或 72 小時，其細胞的存活度皆不受到影響(圖 5B、C, CL1-0)。而在 CL1-5 組別中，處理 48 與 72 小時都抑制 CL1-5 的存活度(圖 5B、C, CL1-5)。以上結果顯示 CL1-0 細胞與 CL1-5 細胞皆屬於人類非小型肺癌細胞株，但上皮性肺癌 CL1-0 細胞及間質性肺癌 CL1-5 細胞對於 artocarpin 的抗性仍有顯著地差別。

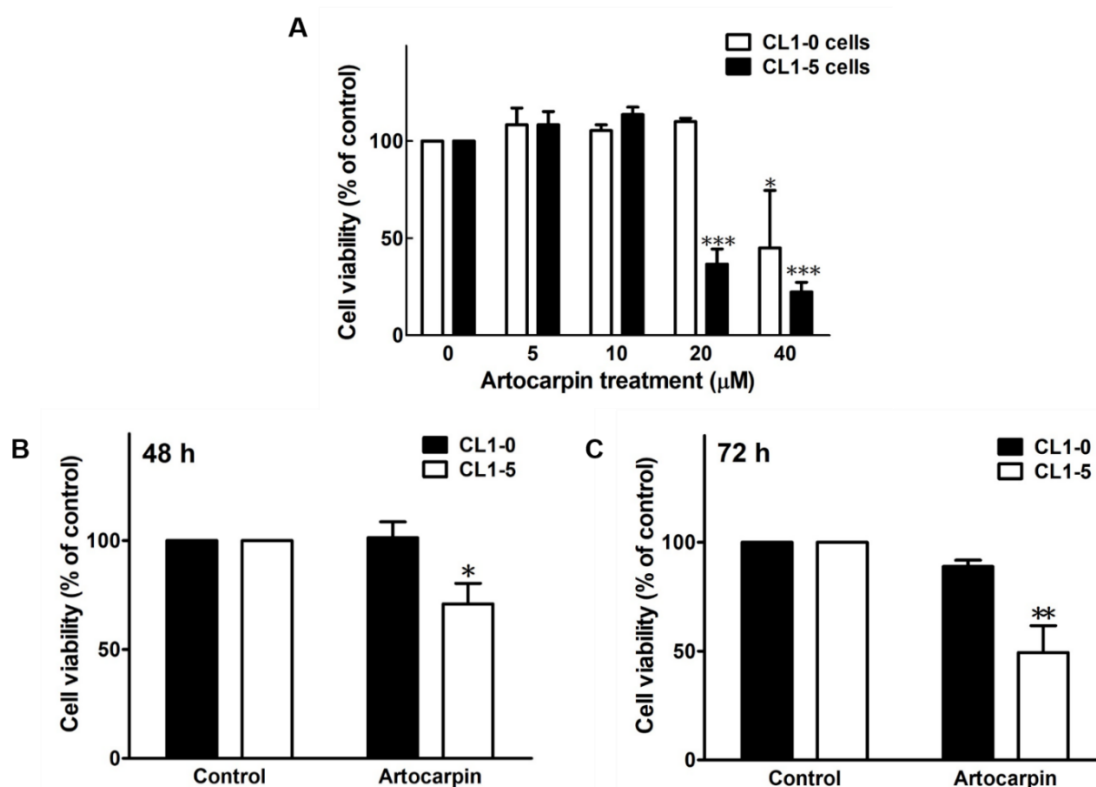


圖 5. Artocarpin 對於人類非小型肺癌細胞株 CL1-0 與 CL1-5 的細胞毒性分析。(A)不同濃度 artocarpin 處理 24 小時後，進行 MTT 的分析。(B)Control 為控制組，CL1-0 及 CL1-5 細胞以 5 μM artocarpin 分別處理 48 小時後，進行 MTT 的分析。(C)Control 為控制組，CL1-0 及 CL1-5 細胞以 5 μM artocarpin 分別處理 72 小時後，進行 MTT 的分析。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

5. Artocarpin 影響 CL1-5 細胞的增殖

CL1-5 細胞以 trypan-blue 染色後排除死亡的細胞，再以血球計數盤計數活細胞的數目用以製作細胞生長曲線。結果顯示，control 組的細胞隨著培養的時間增加，其細胞數目也會逐漸上升，相較於 control 組，5 μM artocarpin 處理的第 2 天，細胞的生長速度上升的比較緩慢，且在處理藥物的第 3 天以後，活細胞的數目顯著地減少(圖 6A)。

另一方面，也使用 colony formation assay 評估 CL1-5 細胞形成聚落的能力，相較於較未處理的組別(Control)，5 μ M artocarpin 組別的群落數目明顯地減少，且細胞群落也比較小(圖 6B、C)。

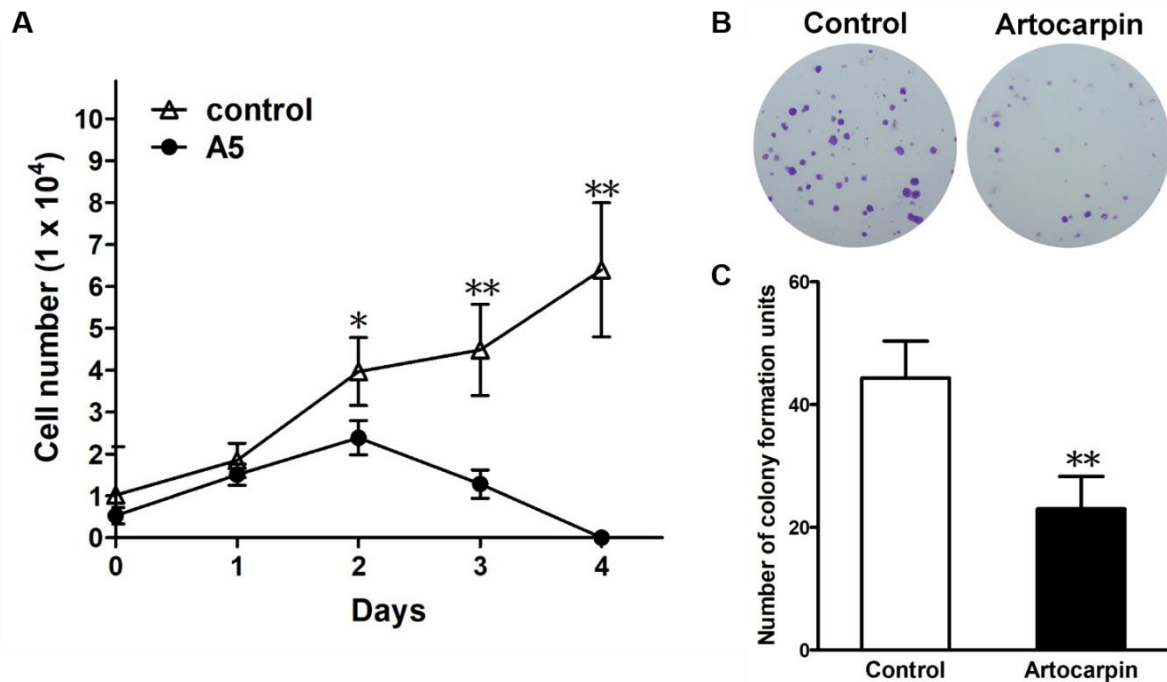


圖 6. Artocarpin 對於 CL1-5 細胞增殖的影響。(A)為 CL1-5 細胞的細胞生長曲線(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。(B)CL1-5 細胞以 colony formation assay 分析形成群落情況。(C)為 colony formation assay 結果的統計分析(** $P < 0.01$)。

6. Artocarpin 影響 CL1-5 細胞的細胞週期，並且導致 CL1-5 細胞進行細胞凋亡

將 CL1-5 細胞進行 PI 染色，於流式細胞儀(FACSCalibur)建立細胞週期的細胞數目比例，以 5 μ M artocarpin 處理 48 小時後，細胞停滯在 G0/G1 phase 的比例上升，顯示 artocarpin 可以抑制 CL1-5 細胞的生長(圖 7A、B 及 C)。

CL1-5 細胞以 5 μ M artocarpin 處理 48 小時後，加入 7-AAD 及 Annexin V 進行雙重染色，於流式細胞儀(FACSCalibur)進行細胞的分類，左下區域(第三象限)為未被 7-AAD 及 Annexin V 染上色的細胞，顯示為正常的存活細胞，其他三個區域(象限)則歸類於處於細胞凋亡的細胞。相較於控制組(Control)，artocarpin 處理的 CL1-5 細胞組別，細胞凋亡的細胞數目比例有明顯地增加(圖 7D、E 及 F)。

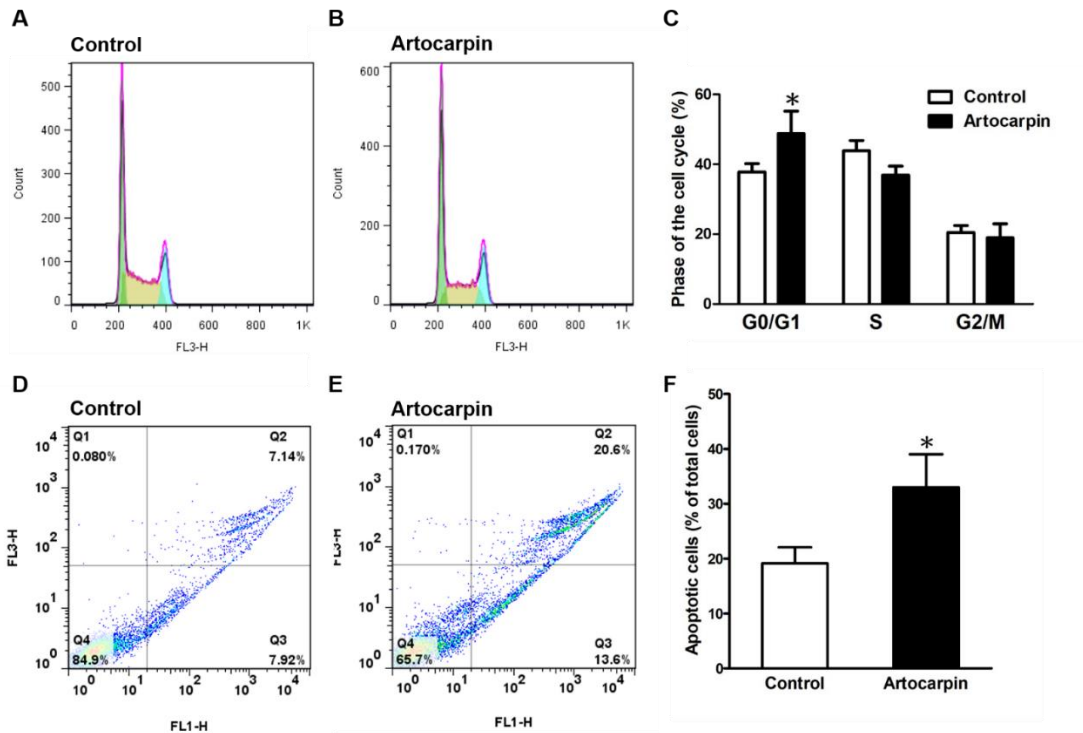


圖 7. 利用流式細胞儀評估 Artocarpin 對於 CL1-5 細胞的細胞週期與細胞凋亡之影響。(A) 未處理 Artocarpin 組別(Control)的細胞週期。(B) 5 μ M artocarpin 處理組(Artocarpin)的細胞週期。(C) 為細胞週期分析結果的統計分析(* $P < 0.05$)。(D) 未處理 Artocarpin 組別(Control)的細胞凋亡分析。(E) 5 μ M artocarpin 處理組(Artocarpin)的細胞凋亡分析。(F) 為細胞凋亡分析的統計結果，顯示出凋亡細胞的比例(* $P < 0.05$)。

7. Artocarpin 促使 CL1-5 細胞 ERK 及 JNK 的磷酸化上升

CL1-5 細胞以 artocarpin (5 μ M) 處理 0、5、15、30、60、180、360 分鐘，以西方轉漬法檢測 ERK 及 JNK 的磷酸化情況。實驗結果發現，artocarpin 刺激 5 至 30 分鐘後磷酸化 ERK (pERK) 的表現量明顯地增加(圖 8A)。另一方面 CL1-5 細胞在 artocarpin 處理 5 至 360 分鐘，都可以觀察到磷酸化 JNK (pJNK) 的表現量明顯地增加(圖 8B)。

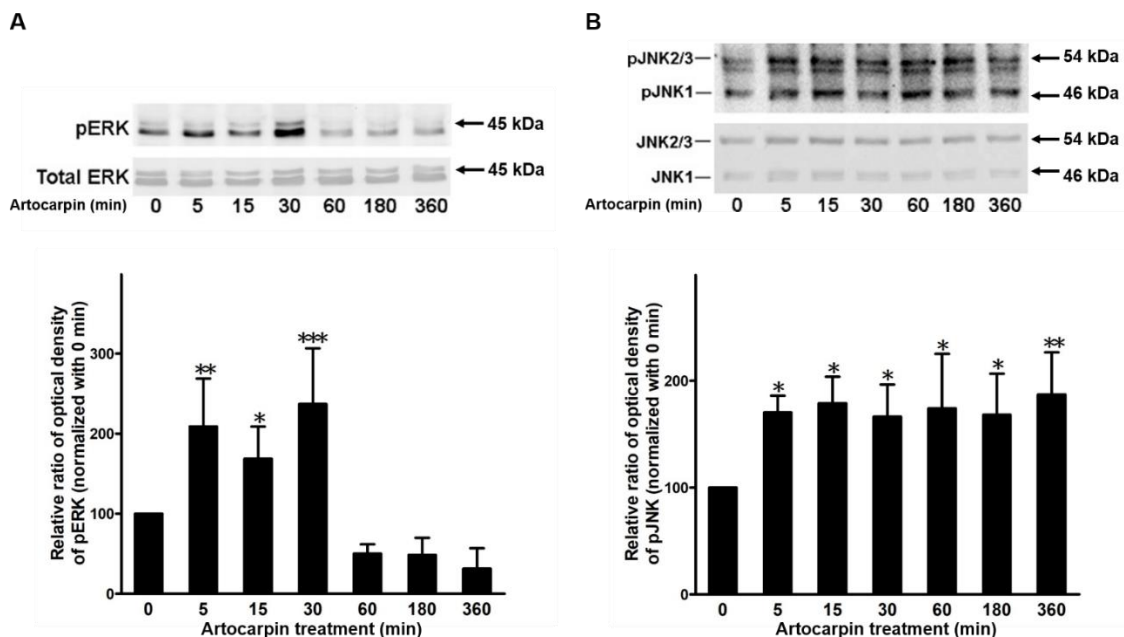


圖 8. 不同時間的 artocarpin 處理影響人類肺腺癌 CL1-5 細胞磷酸化 ERK 及 JNK 的表現量。
 (A)上圖：CL1-5 細胞以 5 μ M artocarpin 處理 0、5、15、30、60、180 及 360 分鐘後，細胞萃取液經由蛋白質電泳與西方轉漬法分析，以對抗磷酸化 ERK (pERK)及整體 ERK (ERK)的抗體進行呈色 ERK 的磷酸化情況。下圖：光學密度量化圖(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。
 (B)上圖：CL1-5 細胞以 5 μ M artocarpin 處理 0、5、15、30、60、180 及 360 分鐘後，細胞萃取液經由蛋白質電泳與西方轉漬法分析，以對抗磷酸化 JNK (pJNK)及整體 JNK (JNK)的抗體進行呈色 JNK 的磷酸化情況。下圖：光學密度量化圖(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

8. ERK 抑制劑 PD98059 防止 artocarpin 抑制 CL1-5 細胞中 N-cadherin 的表現

進一步利用 ERK 抑制劑 PD98059 及 JNK 抑制劑 SP600125 探討何者訊息路徑參與著 artocarpin 抑制 N-cadherin 的表現。實驗結果發現，artocarpin (5 μ M)處理 CL1-5 細胞 24 小時顯著地降低 N-cadherin 的蛋白質表現量(圖 9，artocarpin，lane2)，當預先 1 小時處理 ERK 抑制劑 PD98059 可以有效地防止 artocarpin 所造成 N-cadherin 的表現下降(圖 9，artocarpin+PD98059，lane3)。然而預先處理 JNK 抑制劑 SP600125，或偕同 PD98059 皆無法恢復 N-cadherin 蛋白質的表現量(圖 9，artocarpin+SP600125，lane4 及 artocarpin+PD98059+SP600125，lane5)。

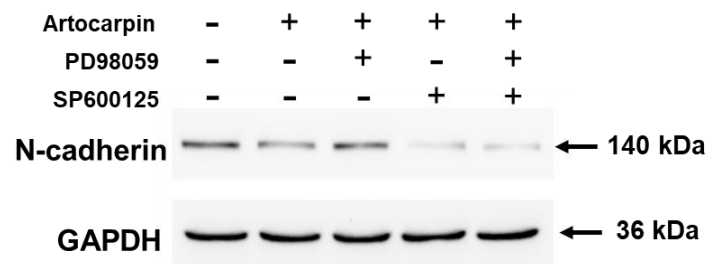


圖 9. ERK 抑制劑 PD98059 防止 artocarpin 降低 CL1-5 細胞 N-cadherin 蛋白質的表現。控制組的 CL1-5 細胞以 DMSO 處理 24 小時，實驗組的 CL1-5 細胞分別以 5 μ M artocarpin 處理 24 小時、50 μ M ERK 抑制劑 PD98059 及 10 μ M JNK 抑制劑 SP600125 預先分別或共同處理 1 小時，再加入 artocarpin 共同處理 24 小時。收集細胞萃取液，經由蛋白質電泳與西方轉漬法分析後，加入 N-cadherin 的抗體進行呈色反應。GAPDH 作為定量控制組。(N=3)

(七) 討論與結論

綜合本計畫的研究成果，我們證實：(1)人類肺腺癌 CL1-0 及 CL1-5 主要表達不同類型的鈣黏蛋白(cadherin)，上皮性的 CL1-0 細胞表現 E-cadherin，而間質性 CL1-5 細胞則主要表現 N-cadherin，且 CL1-5 細胞的移行能力遠高於 CL1-0 細胞；(2)CL1-5 細胞的移行及增值都會受到 artocarpin 抑制，且相較於 CL1-0 細胞，CL1-5 對於 artocarpin 的刺激相當地敏感，低濃度 artocarpin (5 μ M)處理 48 小時即可降低 CL1-5 細胞的活性；(3) Artocarpin 透過活化 ERK 相關訊息路徑以抑制 N-cadherin 的蛋白質表現；(4) Artocarpin 可以抑制 CL1-5 細胞的生長、停滯細胞週期的 G0/G1 期，並且促進 CL1-5 細胞走向細胞凋亡。

在大腸直腸癌的研究中也證實 artocarpin 能夠造成癌細胞的細胞週期停滯在 G0/G1 期(4)，且對於人類非小肺癌細胞具有毒殺性(3)。同樣地，我們的研究中發現 artocarpin 可以抑制 CL1-5 可以促成細胞週期的停滯及細胞凋亡。鈣黏蛋白 N-cadherin 屬於黏附接合的組成蛋白之一，它的表現能促進癌細胞的移行與侵入已受到許多文獻的證實(10, 11)。先前文獻以 siRNA 靜默 N-cadherin 表現證實足以抑制腫瘤細胞的生存(2)。根據這些文獻及我們的研究成果，可以推估 artocarpin 經由活化 ERK 相關訊息路徑以抑制 CL1-5 表達 N-cadherin，使得細胞週期停滯在 G0/G1 phase，進而使細胞凋亡，最終造成 CL1-5 細胞的增殖與生長受到抑制(圖 10)。

肺癌仍是全球癌症病患死亡的主要原因(6)。近七成的肺癌患者初次診斷，癌細胞已發生轉移，既使接受放射線與化學藥物療，而第 IV 期肺癌的五年存活率低於兩成，因此針對癌症轉移的治療是目前研究的主要目標(7-9)。未來，仍需要更多的實驗以進一步釐清 artocarpin 導致 N-cadherin 表現量下降的分子調控機轉，以及 N-cadherin 的表達情況是否會與影響細胞週期與細胞凋亡。期盼 artocarpin 對於高轉移性癌細胞的毒殺性能應用到臨床，在末期病人的治療中作為輔助性藥物，幫助延緩病人病情與增加五年的存活率。

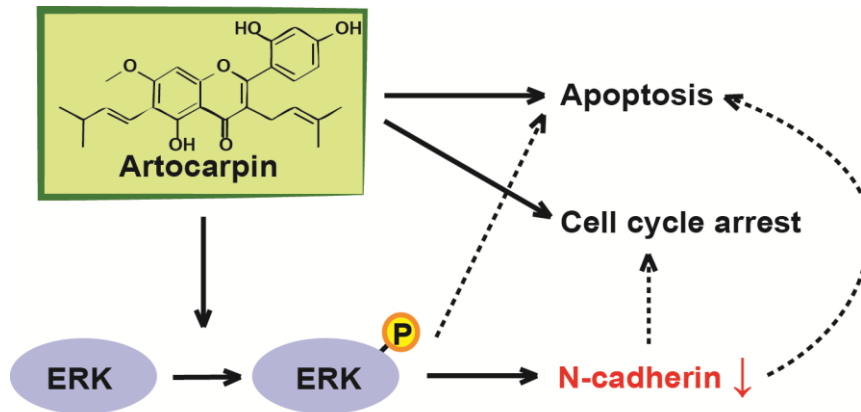


圖 10. Artocarpin 抑制 N-cadherin 表現、細胞週期與促進細胞凋亡模式圖

(八) 參考文獻

1. Yamauchi M, *et al.* (2011) N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am J Cancer Res* 1(7):823-833.
2. Ciolczyk-Wierzbička D, Gil D, & Laidler P (2012) The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines. *Curr Med Chem* 19(1):145-151.
3. Tsai MH, *et al.* (2017) Artocarpin, an isoprenyl flavonoid, induces p53-dependent or independent apoptosis via ROS-mediated MAPKs and Akt activation in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 8(17):28342-28358.
4. Sun G, *et al.* (2017) Chemoprevention of Colorectal Cancer by Artocarpin, a Dietary Phytochemical from *Artocarpus heterophyllus*. *J Agric Food Chem* 65(17):3474-3480.
5. Chu YW, *et al.* (1997) Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(3):353-360.
6. Bray F, *et al.* (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6):394-424.

7. Abe Y & Tanaka N (2016) The Hedgehog Signaling Networks in Lung Cancer: The Mechanisms and Roles in Tumor Progression and Implications for Cancer Therapy. *Biomed Res Int* 2016:7969286.
8. van Meerbeeck JP, Fennell DA, & De Ruyscher DK (2011) Small-cell lung cancer. *Lancet* 378(9804):1741-1755.
9. Siegel R, Naishadham D, & Jemal A (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63(1):11-30.
10. Gloushankova NA, Rubtsova SN, & Zhitnyak IY (2017) Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue Barriers* 5(3):e1356900.
11. Pal M, Bhattacharya S, Kalyan G, & Hazra S (2018) Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis. *Exp Cell Res* 368(2):137-146.
12. Nakamura T, *et al.* (2003) E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. *Int J Mol Med* 12(5):693-700.
13. Druzhkova I, *et al.* (2018) E-Cadherin in Colorectal Cancer: Relation to Chemosensitivity. *Clin Colorectal Cancer*.
14. Chen X, *et al.* (2012) Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Mol Biol Rep* 39(6):6707-6714.
15. Gao H, Lan X, Li S, & Xue Y (2017) Relationships of MMP-9, E-cadherin, and VEGF expression with clinicopathological features and response to chemosensitivity in gastric cancer. *Tumour Biol* 39(5):1010428317698368.
16. Karicheva O, *et al.* (2016) PARP3 controls TGFbeta and ROS driven epithelial-to-mesenchymal transition and stemness by stimulating a TG2-Snail-E-cadherin axis. *Oncotarget* 7(39):64109-64123.
17. Tomita K, *et al.* (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60(13):3650-3654.
18. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, & Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148(4):779-790.
19. Aplin AE, Howe AK, & Juliano RL (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 11(6):737-744.
20. Derycke LD & Bracke ME (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* 48(5-6):463-476.
21. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, & Vandyke K (2018) N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 18(1):939.
22. Jagtap UB & Bapat VA (2010) Artocarpus: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 129(2):142-166.

23. Tzeng CW, *et al.* (2014) Antihepatoma activity of *Artocarpus communis* is higher in fractions with high artocarpin content. *ScientificWorldJournal* 2014:978525.
24. Lee CW, *et al.* (2018) Extracts of *Artocarpus communis* Induce Mitochondria-Associated Apoptosis via Pro-oxidative Activity in Human Glioblastoma Cells. *Front Pharmacol* 9:411.