

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告

成果報告

以3-D細胞培養模式探討芭樂心葉水萃物對膀胱癌細胞之療效與其癌症逆轉機制

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：96WFD9A00004

執行期間：97年8月1日至100年7月31日

計畫主持人：彭瓊琦

共同主持人：謝秋蘭

計畫參與人員：

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

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

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：中國醫藥大學復健科學系

中華民國九十九年五月二十五日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 以3-D細胞培養模式探討芭樂心葉水草物對膀胱癌細胞 之療效與其癌症逆轉機制

計畫編號：96WFD9A00004

執行期限：97年8月1日至100年7月31日

主持人：彭瓊琦 中國醫藥大學復健科學研究所

### 研究目的

### 前 言

膀胱癌為全球性的健康問題，每年約有 375,000 的病例發生，為泌尿道系統中最常見的惡性腫瘤 (Kumar *et al.*, 2010)。根據行政院衛生署 2008 年針對台灣地區男性癌症死因統計資料顯示，膀胱癌占其中的第十二位的癌症 (行政院衛生署死因統計結果摘要，2008)；此外亦佔女性主要癌症死亡原因的第十三位的癌症 (行政院衛生署死因統計結果摘要，2008)。

近年來關於癌症的研究十分盛行，研究方法可分為 *In vivo* (體內) 和 *In vitro* (體外)。若同時藉由兩種不同方法進行研究，便可進一步確定其影響的功效。因為目前針對癌症的治療大多是使用化學療法、放射線療法，手術切除法等，這些療法不僅會傷害癌細胞，同時也會殺害病人的正常細胞，造成病人食慾不振、掉髮、新陳代謝能力下降等不良的副作用。根據流行病學的統計指出，規律的食用水果及蔬菜，可明顯地降低罹患癌症的危險。蔬果中存在著非常多樣化之防癌物質，例如多酚類化合物 (例如：Polyphenolic acid 及 Flavonoid 等)，這些物質長久以來常富含於飲食中，擔任著預防癌症的角色，因此這些物質被歸納為"癌症化學預防劑"。

目前對腫瘤常用的治療方式為手術、放射線療法及化學療法等，這些治療方式並不能非常有效地治療癌症，常常僅是部份治療或是很快會有癌症復發的情形。此外，放射線和化學療法在治療過程常常引起嚴重的副作用如脫髮、食慾不振、腹瀉、白血球減少導致患者抵抗力小、紅血球減少致貧血、口腔胃腸潰瘍等現象。化療法使用之細胞毒性劑也因藥物本身毒性太強，而使得病人無法忍受更大的劑量，或無法忍受持續的治療而必須中斷化學療法。

近來，越來越多之證據顯示，食物中存在著非常多樣化之防癌物質，而這些物質長久以來隨著飲食，默默的擔任著預防癌症的角色，因此這些物質也被歸納為"癌症化學預防劑"。

傳統中草藥醫學 (Traditional Chinese Herb Medicine, TCM) 在全球的熱潮，造成 140 個以上的國家，超過 300,000 開業醫師以單一治療或搭配其它治療法來使用。中草藥常被提出的作用包括：抗癌、抗病毒活性 (Gutiérrez *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2007)。目前大多數傳統中草藥醫學的

研究都強調要達到細胞週期停滯，細胞死亡的目標 (Chen *et al.*, 2004)。許多中草藥植物中皆含有大量的多酚類化合物，而這些化合物也是在近來許多研究中，被指出具有抗癌的作用，並進而嘗試深入探討其機轉。

由以往的文獻得知阿魏酸(Ferulic acid, FA) 是一個富含在植物細胞壁中的酚酸 (Phenolic acid) 物質，源自於植物合成芳香環氨基酸- Shikimate pathway時的代謝產物(Graf, 1992)。存在於在許多主要農作物中，如麥麩、穀類、柑橘類、香蕉、咖啡、茄子、菠菜及花椰菜等，對不同的疾病皆具有效用，例如：癌症、糖尿病、心血管及神經退化疾病 (Alias *et al.*, 2009)。

本研究主要以 *In vitro* 模式以探討 ferulic acid (FA)如何抑制人類膀胱癌細胞 (T24 cells 和 RT4 cells) 增生與其可能參與的分子機轉。

## 結果與討論

### 一、Ferulic acid 誘發膀胱癌細胞存活之影響(MTT assay)：

從圖1可看出RT4細胞給予ferulic acid 處理後，可發現隨著ferulic acid 劑量的提高，明顯導致細胞數目有明顯下降的趨勢，且生長較不密集。

將RT4細胞 ( $2.5 \times 10^4$  cells/well) 培養於24 well-plate，並以不同濃度之 ferulic acid (0, 0.5, 0.7, 1, 4 mM) 處理 24, 48 和72小時後，進行細胞存活率測定。每個well中添加0.2 mL之MTT，於37 °C反應 3.5小時後吸除MTT之培養基，再以 0.5 mL DMSO 溶解生成之藍紫色沉澱物，於波長570 nm檢測吸光值並計算出細胞存活率，結果如圖2

所示。細胞在24, 48和72小時經不同濃度的0, 0.5, 0.7, 1, 4 mM之ferulic acid處理後，對人類膀胱癌細胞RT4存活率分別有抑制趨勢，死亡率隨著劑量的增加有加劇的現象。以4 mM ferulic acid處理72小時後，RT4細胞出現顯著的死亡，細胞存活率下降至41.20 %。各濃度間與控制組(0 mM)相比均有顯著差異 ( $p < 0.01$ )。由結果推測，ferulic acid可能具抑制 RT4 細胞增生的能力。

另一方面，從圖3可看出T24細胞給予ferulic acid處理後，可發現隨著ferulic acid劑量的提高，明顯導致細胞數目有明顯下降的趨勢，且生長較不密集。

將T24細胞( $2.5 \times 10^4$  cells/well)培養於24 well-plate，並以不同濃度之ferulic acid (0, 0.5, 0.7, 1, 4 mM) 處理 24, 48 和72小時後，進行細胞存活率測定。每個well中添加 0.2 mL之MTT，於37 °C反應3.5小時後吸除MTT之培養基，再以0.5 mL DMSO溶解生成之藍紫色沉澱物，於波長570 nm檢測吸光值並計算出細胞存活率，結果如圖4所示。細胞在24, 48和72小時經不同濃度的0, 0.5, 0.7, 1, 4 mM之ferulic acid 處理後，對人類膀胱癌細胞T24存活率分別有抑制趨勢，死亡率隨著劑量的增加有加劇的現象。以4 mM ferulic acid 處理72小時後，T24細胞出現顯著的死亡，細胞存活率下降至48.79%。各濃度間與控制組 (0 mM) 相比均有顯著差異 ( $p < 0.01$ )。由結果推測，ferulic acid可能具抑制T24細胞增生的能力。

### 二、Ferulic acid 誘發膀胱癌細胞週期之影響(Cell cycle assay)：

流式細胞技術 (flow cytometry) 是指在流體狀態下觀測細胞的一種技術，而流式細胞儀 (flow cytometer) 則是指細胞於流體狀態下移動時，能夠觀測及記錄細胞特質的儀器。

細胞週期運行中，當外在因素造成細胞的 DNA 受損，細胞會有兩條路徑可選擇。第一條路徑為細胞週期會先暫時停止，DNA 馬上進行修補，一旦修補完成，細胞會進入下一時期，繼續走完未完成之細胞週期。另一條路徑則是當細胞無法進行 DNA 修補，則細胞週期可能停在 G1 期或 G2 期，也可能停止於 S 期，停在 G1 期能防止損傷的 DNA 繼續複製，停在 G2 可避免有缺陷的染色體分裂，若是發現有無法彌補的錯誤時，細胞則直接選擇走向凋亡 (Sancar *et al.* 2004)。

圖5為經不同濃度的ferulic acid處理後，膀胱癌細胞RT4之細胞週期變化，表中每個小圖為各濃度的 ferulic acid組別經過Propidium iodide 染色後以流式細胞儀進行偵測，以ModFit LT<sup>®</sup> 3.0軟體來進行分析，紀錄G0/G1、S、G2/M phase 及 sub-G1 比例。藉由 SigmaPlot 10.0及SAS Learning Edition 1.0統計軟體分析，如圖6所示。發現隨著給予 ferulic acid 濃度劑量的增加，RT4細胞G1時期的比例呈現增加的趨勢，經SAS統計分析，在  $p<0.01$ ，除了DMSO組與0 mM組相比無顯著差異；其餘各組與0 mM組相比有顯著差異。S 時期的比例，經SAS統計分析，在  $p<0.01$ ，各組與0 mM 組相比有顯著差異。由實驗結果得知，ferulic acid 對膀胱癌細胞RT4具有抑制其細胞週期的進行，使其發生G1 arrest，進而抑制細胞增生。

圖 7 為經不同濃度的 ferulic acid 處理後，膀胱癌細胞 T24 細胞週期變化，表中每個小圖為各濃度的 ferulic acid 組別經過 Propidium iodide 染色後以流式細胞儀進行偵測，以 ModFit LT<sup>®</sup> 3.0 軟體來進行分析，紀錄 G0/G1、S、G2/M phase 及 sub-G1 比例。藉由 SigmaPlot 10.0 及 SAS Learning Edition 1.0 統計軟體分析，如圖 8 所示。發現隨著給予 ferulic acid 濃度劑量的增加，T24 細胞 G1 時期的比例呈現減少的趨勢，經 SAS 統計分析，在  $p<0.01$ ，除了 DMSO 組與 0 mM 組相比無顯著差異；其餘各組與 0 mM 組相比有顯著差異。G2 時期的比例則呈現增加的趨勢，經 SAS 統計分析，在  $p<0.01$ ，各組與 0 mM 組相比有顯著差異。S 時期的比例，經 SAS 統計分析，在  $p<0.01$ ，除了 DMSO 組與 0 mM 組相比無顯著差異；其餘各組與 0 mM 組相比有顯著差異。Sub G1 時期的比例，經 SAS 統計分析，在  $p<0.01$ ，除了 DMSO 組無顯著增加，其餘各組與 0 mM 組相比有顯著增加。由實驗結果得知，ferulic acid 對膀胱癌細胞 T24 亦具有抑制其細胞週期的進行，使其發生 G2 arrest，進而抑制細胞增生。

### 三、Ferulic acid 誘發膀胱癌細胞粒腺體膜電位之影響 (mitochondria membrane potential assay)：

粒腺體與細胞凋亡的特徵有著高度的相關性，包括：粒腺體膜電位的下降、電子傳遞鏈的瓦解、自由基大量表現，導致氧化磷酸化的產生，釋放細胞凋亡因子 (cytochrome c、AIF、Endo-G)，進而促使下游相關 caspase 路徑活化，導致細胞凋亡。

圖 9 為 T24 細胞經不同濃度的 ferulic acid 處理後，以螢光顯微鏡所拍攝影像圖。從圖中可發現，JC-1 以 J-aggregate 型態聚集在粒線體內，經雷射激發光照射形成紅色螢光，並不隨著所給予的 ferulic acid 的劑量，而影響其粒線體膜電位。

流式細胞儀分析之結果顯示，ferulic acid 對 T24 細胞並無 Sub G1 的出現，與圖 7 相比，確認其粒線體膜電位並不隨著 ferulic acid 劑量增加而造成其膜電位的改變。

由實驗結果得知，ferulic acid 對 T24 細胞不會透過粒線體膜電位改變造成細胞凋亡。

#### **四、Ferulic acid 誘發膀胱癌細胞蛋白酶電泳法之影響 (zymography assay) :**

基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 參與腫瘤轉移過程中的數個步驟，包含有侵入、轉移及血管新生作用，因此 MMPs 在癌細胞的轉移扮演著相當重要的角色 (Curran and Murray, 2000)。

從圖 10 可看出 T24 細胞給予 ferulic acid 處理後，可發現隨 ferulic acid 劑量的提高，active MMP-9 的表現呈現減少的趨勢。

有許多的研究指出 MMP-2 及 MMP-9 與許多癌症腫瘤細胞的轉移有極大的關連性，例如肝癌、乳癌、前列腺癌、膀胱癌、大腸癌...等 (Jimenez *et al.*, 2000; Sier *et al.*, 2000; Ishida *et al.*, 2003; Wass *et al.*, 2003)。實驗顯示，active MMP-9 的表現隨著 ferulic acid 的劑量增加而呈現減少的趨勢。推

測 ferulic acid 可能透過抑制增生、阻滯細胞週期進行，進而抑制癌細胞轉移。

圖表

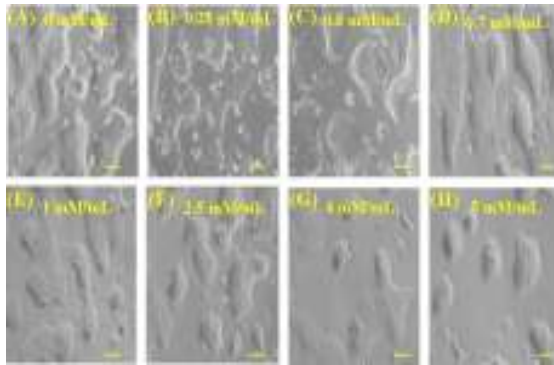


Fig. 1. Light microscopic images of the RT4 cell lines. Cells were incubated with different concentrations of ferulic acid for 72 h. (A. 0 mM, B. 0.25 mM, C. 0.5 mM, D. 0.7 mM, E. 1 mM, F. 2.5 mM, G. 4 mM, H. 5 mM) (magnification 500x, scale bar = 0.1mm)

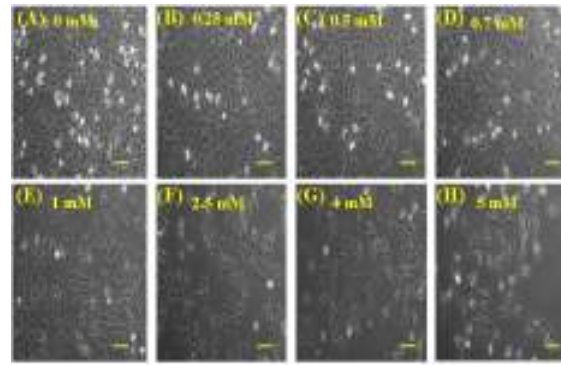


Fig. 4. Light microscopic images of the T24 cell lines. Cells were incubated with different concentrations of ferulic acid for 72 h. (A. 0 mM, B. 0.25 mM, C. 0.5 mM, D. 0.7 mM, E. 1 mM, F. 2.5 mM, G. 4 mM, H. 5 mM) (magnification 500x, scale bar = 0.1mm)

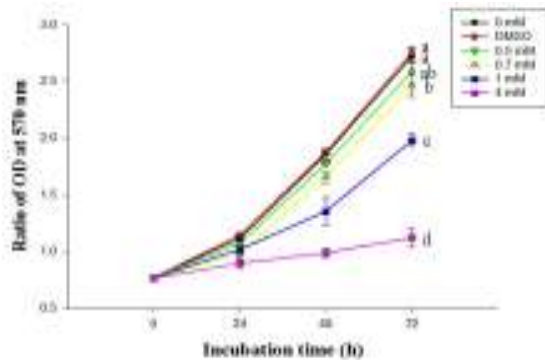


Fig. 2. MTT assay for cell viability of RT4 ( $2.5 \times 10^4$  cells/mL) following treatment with ferulic acid. All values of OD are relative to the OD at 0 h. The ratio of OD at 570 nm are shown for at 24 h intervals during an incubation time of 72 h. RT4 cells treated with DMSO and ferulic acid at 0, 0.5, 0.7, 1, 4 mM, respectively. Results are mean  $\pm$  S.D. for  $n=3$ . Different superscripts (a-d) mean significantly different ( $p < 0.01$ ) with 0 mM at 72 hr.

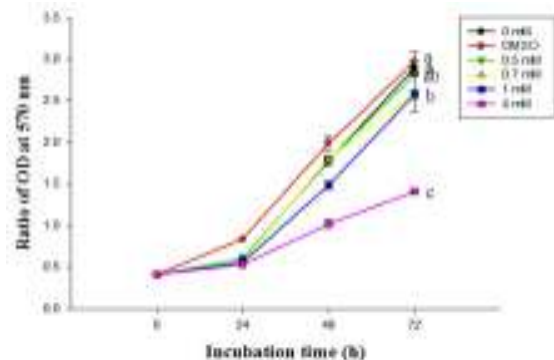


Fig. 3. MTT assay for cell viability of T24 ( $5 \times 10^3$  cells/mL) following treatment with ferulic acid. All values of OD are relative to the OD at 0 h. The ratio of OD at 570 nm are shown for at 24 h intervals during an incubation time of 72 h. T24 cells treated with DMSO and ferulic acid at 0, 0.5, 0.7, 1, 4 mM. Results are mean  $\pm$  S.D. for  $n=3$ . Different superscripts (a-c) mean significantly different ( $p < 0.01$ ) with 0 mM at 72 hr.

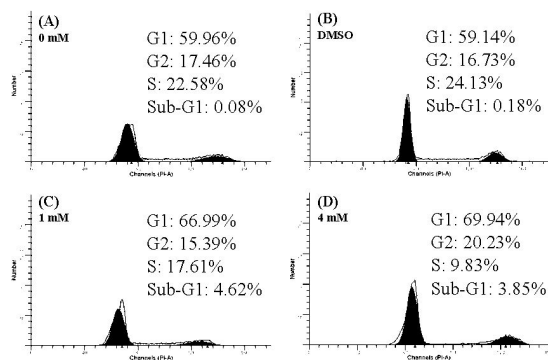


Fig. 5. The flow cytometric analysis of RT4 cells were treated with different concentration of ferulic acid for 72 h as indicated. Significant cell arrest occurs at phase G1 by ferulic acid (A. 0 mM, B. DMSO, C. 1 mM, D. 4 mM).

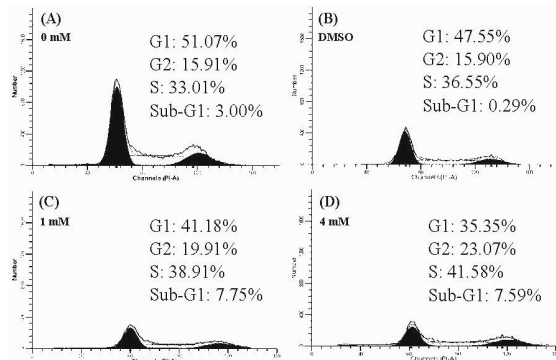


Fig. 7. The flow cytometric analysis of T24 cells were treated with different concentration of ferulic acid for 72 h as indicated. Significant cell arrest occurs at phase G2 by ferulic acid (A. 0 mM, B. DMSO, C. 1 mM, D. 4 mM).

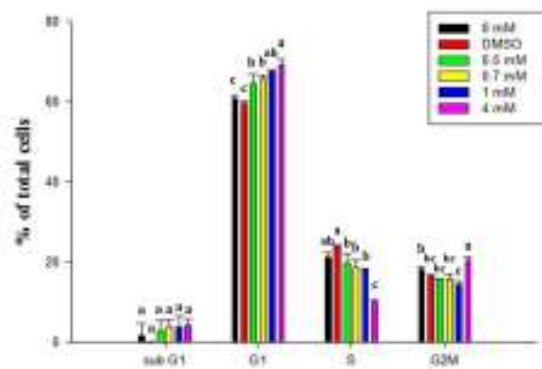


Fig. 6. Cell cycle distribution identified by flow cytometry. RT4 cells were treated with different concentration of ferulic acid for 72 h as indicated. Cell cycle distribution was quantified by ModFIT LT 3.0 software. Results were averaged from triplicate experiments and expressed in mean  $\pm$  S.D.  $n=3$ . <sup>abc</sup>Significantly different ( $p<0.01$ ) from the 0 mM.

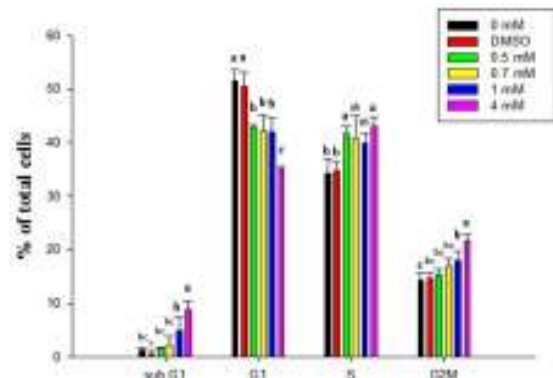


Fig. 8. Cell cycle distribution identified by flow cytometry. T24 cells were treated with different concentration of ferulic acid for 72 h as indicated. Cell cycle distribution was quantified by ModFIT LT 3.0 software. Results were averaged from triplicate experiments and expressed in mean  $\pm$  S.D.  $n=3$ . <sup>abc</sup>Significantly different ( $p<0.01$ ) from the 0 mM.

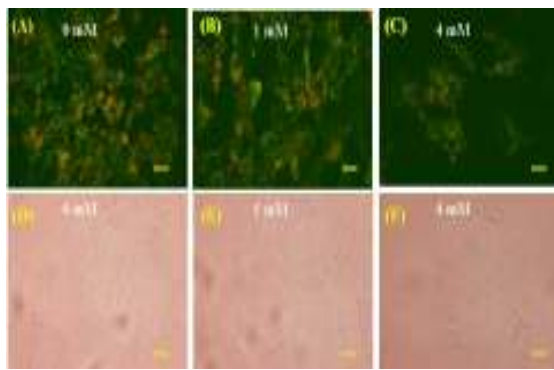


Fig. 9. Fluorescence images of T24 cells stained with JC-1. Cells were incubated with McCoy's 5A medium and ferulic acid (0, 1, 4 mM) for 72 h.

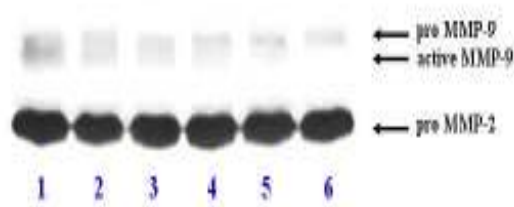


Fig. 10. The zymograms of MMP-2 and MMP-9 on the cell lines. T24 cells were incubated in the presence of c ferulic acid for 72 h. The bands for pro MMP-2 are all observed at 72 h as indicated, while active MMP-9 significant reduced in dose-dependent at 72 h post incubation.

### 結論

MTT法分析經4 mM ferulic acid處理72小時後，對 RT4 和 T24 細胞存活率可降至41.20% 和48.79%。以流式細胞儀分析發現，經 ferulic acid 處理會使RT4細胞和T24細胞之細胞週期分別顯著發生 G1 arrest 和 G2 arrest ( $p < 0.01$ )。Mitochondrial Membrane Potential 和 Gelatin Zymography 分析 ferulic acid 對 T24 細胞之影響，結果顯示，粒腺體膜電位不受影響；active

MMP-9的活性隨劑量增加顯著減少。

### 成果評鑑

在自然的飲食中蘊含了許多具抗癌活性化合物，如何去發現及有效的運用這些化合物，更是研究之主軸。本研究所獲致之成果將瞭解 ferulic acid 對膀胱癌之凋亡作用，將是引領預防保健醫學之必要里程碑，同時亦可作為預防醫學策略及保健食品發展上之參考。

### 參考文獻

- Alias, L.M., Manoharan, S., Vellaichamy, L., Balakrishnan, S. and Ramachandran, C.R., 2009. Protective effect of ferulic acid on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Exp Toxicol Pathol* 61, 205-214.
- Chen, M., Bao, W., Aizman, R., Huang, P., Aspevall, O., Gustafsson, L.E., Ceccatelli, S. and Celsi, G., 2004. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins via nitric oxide synthase: protective role of heme oxygenase-1. *J Infect Dis* 190, 127-135.
- Curran, S. and Murray, G.I., 2000. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36, 1621-1630.
- Graf, E., 1992. Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Radical Bio Med*, 13, 435-448



- Gutierrez, R.M., Mitchell, S. and Solis, R.V., 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 117, 1-27.
- Ishida, H., Murata, N., Tada, M., Okada, N., Hashimoto, D., Kubota, S., Shirakawa, K. and Wakasugi, H., 2003. Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 33, 186-191.
- Jimenez, R.E., Hartwig, W., Antoniu, B.A., Compton, C.C., Warshaw, A.L. and Fernandez-Del Castillo, C., 2000. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control. *Ann Surg* 231, 644-654.
- Kumar, B., Koul, S., Petersen, J., Khandrika, L., Hwa, J.S., Meacham, R.B., Wilson, S. and Koul, H.K., p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res* 70, 832-841.
- Peng, C.C., Chen, K.C., Peng, R.Y., Chyau, C.C., Su, C.H. and Hsieh-Li, H.M., 2007. *Antrodia camphorata* extract induces replicative senescence in superficial TCC, and inhibits the absolute migration capability in invasive bladder carcinoma cells. *J Ethnopharmacol* 109, 93-103.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- Sier, C.F., Casetta, G., Verheijen, J.H., Tizzani, A., Agape, V., Kos, J., Blasi, F. and Hanemaaijer, R., 2000. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin Cancer Res* 6, 2333-2340.
- Waas, E.T., Wobbes, T., Lomme, R.M., DeGroot, J., Ruers, T. and Hendriks, T., 2003. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Br J Surg* 90, 1556-1564.
- 行政院衛生署，統計資訊網，2008，<http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>。