

中國醫藥大學中醫學系博士論文

指 導 教 授：林昭庚 教 授

共 同 指 導 教 授：鍾景光 教 授

論 文 題 目

山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌的抗癌  
作用之研究

**Anticancer effects of the water extract of Corni Fructus  
and the constituent gallic acid on human osteosarcoma  
cells**

研究生：廖慶龍

中華民國一〇二年七月二十六日

# 中國醫藥大學博士班研究生 論文指導教授推薦書

中國醫學研究所，廖慶龍君所提之論文:山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌的抗癌作用之研究(題目)，係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

中華民國 102 年 4 月 22 日

# 中國醫藥大學博士班研究生

## 論文口試委員審定書

中國醫學研究所，廖慶龍君所提之論文：山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌的抗癌作用之研究(題目)，經本委員會審議，認為符合博士資格標準。

論文口試委員會

委員

陳光偉

(簽章)

范宗宸

何恆熙

鍾榮光

林昭文

主任

高為德

---

中華民國 102 年 4 月 22 日

## 目 錄

第一章 前言	1
第二章 文獻探討	4
第三章 材料與方法	10
3.1 實驗流程	10
3.2 藥物、細胞株來源與製備	11
3.3 實驗中使用的方法	11
第四章 結果	19
4.1 山茱萸水粗抽使人類骨肉瘤細胞凋亡	19
4.2 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤細胞株抑制轉移	29
4.3 沒食子酸對人類骨肉瘤細胞株抑制轉移	36
第五章 討論	45
第六章 結論	50
參考文獻	51
英文摘要	67

## 圖目錄

圖 3.1 實驗進行流程簡略	10
圖 4.1 人類骨肉瘤細胞經山茱萸水粗抽處理後之細胞活性	19
圖 4.2 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤細胞週期之影響	21
圖 4.3 Comet assay 檢測 DNA 受損的情形	22
圖 4.4 DAPI 染色檢測 DNA 受損的情形	22
圖 4.5 ROS 產生, 鈣離子釋放( $\text{Ca}^{2+}$ )和降低粒線體膜電位	23
圖 4.6 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的影響	24
圖 4.7 加入 Caspase inhibitor	25
圖 4.8 細胞周期停滯與細胞凋亡相關蛋白活性檢測	26
圖 4.9 檢測 AIF 蛋白釋放轉位情形	27
圖 4.10 檢測 Endo G 蛋白釋放轉位情形	28
圖 4.11 檢測 GADD153 蛋白釋放轉位情形	28
圖 4.12 檢測 cytochrome c 蛋白釋放轉位情形	29
圖 4.13 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性的影響	30
圖 4.14 抑制 U-2 OS 細胞移動的實驗 (Wound Healing assay)	31
圖 4.15 抑制 U-2 OS 細胞移動的實驗結果	32
圖 4.16 抑制 U-2 OS 細胞轉移侵入的實驗結果	33
圖 4.17 抑制 U-2 OS MMP-2、MMP-9 的活性的實驗結果	34

圖 4.18	U-2 OS 細胞移動與轉移侵入相關蛋白.....	35
圖 4.19	Western blotting 檢測移動與轉移侵入相關蛋白.....	37
圖 4.20	沒食子酸對 U-2 OS 細胞活性與細胞數目之影響.....	38
圖 4.21	沒食子酸對 U-2 OS 細胞移動及轉移侵入的影響.....	39
圖 4.22	MMPs 活性測定.....	40
圖 4.23	沒食子酸對 U-2 OS 轉移相關蛋白活性和基因表現檢測.....	42
圖 4.24	U-2 OS 細胞株 AKT、IKK 及 PKC 激酶活性下降之表現.....	43
圖 4.25	沒食子酸可能抑制 U-2 OS 細胞株細胞轉移的機轉.....	44



表目錄

表 3.1 本實驗用於 PCR analysis 的 primers.....16



# 山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌的抗癌作用之研究

研究生：廖慶龍

指導教授：林昭庚 教授

共同指導教授：鍾景光 教授

中國醫藥大學 中醫學系博士班

## 摘要

自古以來山茱萸就被傳統中醫使用於治療許多疾病。而本文即是研究山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌的抗癌作用，並探討其作用機轉。

首先在山茱萸水萃抽物方面，結果驗證山茱萸水萃抽物降低人類骨肉瘤癌細胞的存活率，造成細胞的DNA損傷、DNA condensation, 細胞週期G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest和細胞凋亡。山茱萸水萃抽物活化人類骨肉瘤癌細胞內caspase-8, caspase-9 和 caspase-3, 造成ROS 和 Ca<sup>2+</sup>的增加，使粒線體的膜電位差( $\Delta\Psi_m$ )下降。山茱萸水萃抽物也上調caspase-3, caspase-9, Bax, cytochrome c, GRP78, AIF, ATF-6 $\alpha$ , Fas, TRAIL, p21, p27, p16等的protein levels, 使得細胞週期停滯而引起細胞凋亡。同時山茱萸水萃抽物也經由mitochondrial-dependent pathway, 增加AIF, cytochrome c 和 Endo G, 導致細胞凋亡。由上述的結果顯示山茱萸水萃抽物引起人類骨肉瘤癌細胞凋亡，是經由ROS-modulated caspase-dependent 和 -independent pathways.

癌症的轉移是多重因素造成的，且也常使治療更複雜。本研究也探討山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌細胞的抑制腫瘤轉移侵入的作用與其作用機轉。結果顯示山茱萸水萃抽物可經由調控FAK, PKC, SOS1, MKK7, MEKK3, GRB2, NF- $\kappa$ B p65, COX-2, HIF-1 $\alpha$ , PI3K, GRB2, Rho A, ROCK-1, IRE-1 $\alpha$ , p-JNK1/2, p-ERK1/2, p-p38, Ras, p-PERK 和 VEGF的量，也可經由抑制MMP-2 和 -9的活性和蛋白質體表現來抑制人類骨肉瘤癌細胞腫瘤的轉移侵入。在沒食子酸方面，由 Western blotting 可得知GA下降人類骨肉瘤癌細胞內GRB2, PI3K, AKT/PKB, PKC, p38, ERK1/2, JNK, NF- $\kappa$  B p65的蛋白質levels. 由*in vitro* kinase assay得知GA也抑制AKT,



IKK 和 PKC的活性。GA抑制人類骨肉瘤癌細胞的migration 和 invasive能力，也降低MMP-2 and MMP-9的蛋白質、mRNA levels和secreted enzyme的活性。由上述結果顯示GA抑制人類骨肉瘤癌細胞migration 和 invasion的機轉可能經由下調PKC、抑制mitogen-activated protein kinase (MAPK) 和 PI3K/AKT，最後抑制MMP-2 and MMP-9的表現。

綜上所述，山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌細胞有細胞毒殺作用、抑制細胞生長、抑制癌細胞轉移侵入。將來擬進一步研究考量山茱萸可做為治療人類骨肉瘤癌的新選擇方向。

關鍵字:山茱萸,人類骨肉瘤癌,沒食子酸



## 第一章 前言

二十世紀初期人類的主要疾病死亡原因為傳染病，如白喉、上呼吸道感染、肺炎、肺結核等；隨著醫療的進步，傳染病逐漸獲得控制，一些慢性病逐漸成為人類的死亡主因。而近幾年惡性腫瘤更是蟬聯死亡主因的第一名。

惡性腫瘤的成因多樣性，手術治療不一定能完全根治，而其他治療如化療、放射、荷爾蒙治療常有抗藥性或副作用；所以有些學者積極尋求其他的補充替代療法(CAM)，而中醫藥在此CAM的範疇占有極重要的地位，某些狀況甚至是主要的治療選擇。

中醫對癌症的敘述由來已久，早在三千五百多年前的殷墟時期甲骨文字中，中醫就有‘瘤’的記載，由“疒”和“留”組成，意為“疾病，留聚不去”。後來歷代醫家用各種名詞描述類似癌的症候、病名，如腸覃、石瘕、積聚、癥瘕、石癰、石疽等等。周代時設有瘍知專科，掌管腫瘍、潰瘍、金瘍、折瘍等病。元代的丹溪心法中對癌症的病因及症候也有詳細描述。到了明清時期即以癌症統稱惡性腫瘤[1, 2]。

上所述及之各種名詞也不完全等同於現今之癌症，而中醫常常用症候、症狀來描述癌症，如噎膈、脅肋痛、鼓脹、陽黃、陰黃、嘔吐、黑痣、尿血、便血等，而治療時即以八綱辯證、臟腑辯證、經絡辯證等臨床切入。對於腫瘤，最重要的是當然要區分良性和惡性腫瘤；而中醫關於癌症的名詞描述常無法區分是良性或惡性[3]，所以中醫在治療癌症時，須要有一些西醫的診斷思維，尤其是西醫的病理分期，常是臨床診斷、治療追蹤的重要依據。一般良性腫瘤長大比較慢、界線明顯跟周圍組織無沾黏、無轉移性；而惡性腫瘤則相反，長大比較快、界線不明顯跟周圍組織有沾黏、有轉移性。

癌症生成的因素有很多是不明原因的，而有些是證明有相關的，如一些物理因素輻射、放射、電磁輻射，飲食習慣如亞硝酸鹽、紅肉，感染如人類乳突病毒，黃麴毒素等。中醫認為癌症生成的病機有很多理論，如呂玉萍等認為痰、毒、瘀、虛是腫瘤發生發展過程中最常見的病理機制[1, 4]。

認為癌症的發生機理包括正氣不足、邪氣聚之、陰陽失衡、情志內傷、

癌基因理論等。胡凱文,衛月等也對良姓、惡性腫瘤作詮釋[3],他們認為腫瘤生長在機體的內部,所以腫瘤的陰陽消長也影響機體陰陽的偏勝或偏衰。惡性腫瘤陰盛而陽亢,所以生長快且易於走竄,最耗氣血,即是所謂癌症;良性腫瘤則陰盛而陽微,生長較慢而倚伏不移,少傷到氣血,類似於前人所謂的積證。他們也認為惡性腫瘤癌症有與五臟六腑血脈相連、易走竄、奪人氣血等特点。

西醫對於癌症是根據癌症的種類、分期而採取手術、化療、放療、免疫或荷爾蒙等療法;至於中醫藥治療癌症的原則乃臨症時視其病機、辯證論治,而採取不同的治療原則。如駱建平[1]認為癌症的中醫學辨證論治重點在扶正祛邪、對症治療、調七情。而何純陽[5]則強調食療,認為扶脾健胃、增加胃氣使之氣化,是挽救癌病入于膏盲的法寶。

而程德懷[2]認為癌症發生的內在原因是因為人體的正氣不足,氣血不足,真元虛虧,而癌症發生的基本病機則是氣痰凝毒,聚滯血瘀。預防癌症的重要原則要保養正氣,增強免疫力,調整精神情緒,飲食起居正常,保養脾胃。章永紅教授[6]則點出虛與毒是癌症病機的關鍵,也提出扶正攻毒治療惡性腫瘤的大法。吉林梅河口市中醫醫院張德發、楊曉嬌[7]認為中醫藥治療腫瘤的特點在於強調整體觀念、減少放、化療和手術治療的副作用、對工作影響較小、花費較低、副作用小。他們也研究中醫藥治療腫瘤的作用與機制在於抗突變作用、染色體畸變、細胞毒殺作用、抑制腫瘤細胞增殖、誘導細胞凋亡、誘導腫瘤細胞分化、提高免疫功能、逆轉多藥耐藥性、抑制腫瘤血管生長、抗氧化作用等。

Osteosarcoma 骨肉瘤是最常見的原發性惡性骨腫瘤,在小孩子癌症發生率約 2.4% 排名第八,約佔所有骨癌 20%。好發於長骨端,最常見於脛骨、肱骨的上端或股骨的下端。死亡率極高,患病者一年死亡約 1/3。另一個好發族群在老年人併有 Paget's dis 或先前有 irradiation 者。

約 90% 骨肉瘤病患接受 limb-salvage surgery。術前先做化療,術後再看化療對骨肉瘤的治療效果,大於 90% 則繼續原來的治療藥物,不到 90%則更改化療藥物。化療藥物大多是合併有高劑量 methotrexate、intra-arterial cisplatin, ifosfamide with mesna, adriamycin, BCD, etoposide, leucovorin rescue、MTP 等。跟其他癌症治療一樣,化療效果常常出現抗藥

性與副作用，所以臨床醫師積極尋求安全性高、副作用低、有效的替代療法。此時中藥常是被考慮到的選擇。

基於前述中醫中藥治療癌症的原則，強調固本扶正氣，且骨骼肌肉系統腫瘤優先考慮入肝、腎經之藥，所以本篇研究之治療藥物選擇補養藥、入肝、腎經，溫補腎陽之藥 - 山茱萸。

山茱萸是山茱萸科山茱萸屬的落葉小喬木、灌木植物山茱萸的果實。主產於浙江、杭州、安徽等地。別名山萸肉、山萸、肉棗等。常用的處方名為山萸肉、于肉、萸肉等。除了果實生用為生山萸肉外，常用的炮製法為蒸法，乃是將生山萸肉蒸到呈暗紫褐色，然後再曬乾備用。另外的炮製法也有酒山萸肉、炙山萸肉等。也有用果實皮入藥名為棗皮。

山茱萸的組成成份眾多，而組成成份有很多運用於治療疾病。如其重要成分之一沒食子酸，臨床之運用很廣，有抗氧化、抗感染、抗腫瘤等作用。沒食子酸對許多腫瘤都有治療的效果，但其分子機轉未明。本實驗即是嘗試探討山茱萸及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤癌症的抗癌作用之機轉及抑制轉移研究。

因此本論文之研究目的主要在探討山茱萸水粗抽與其成份沒食子酸對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞株產生細胞凋亡及抑制細胞侵入轉移的機制。主要是：(1) 探討山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞株之細胞凋亡及細胞轉移相關路徑的影響。(2) 探討沒食子酸對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞株之轉移相關路徑的影響。由實驗數據結果顯示，山茱萸水粗抽與沒食子酸對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞株之離體試驗可引起細胞凋亡機制及抑制細胞轉移的情形。因此，在未來進一步研究，山茱萸水粗抽與沒食子酸可能用於治療人類骨肉瘤癌症上。

## 第二章 文獻探討

中醫藥用於治療疾病由來已久，在沒有現代西醫的時代，對照顧人類的健康，延續人類的生命有其極大的貢獻地位。即使西方醫學日益發達，中醫藥仍有其存在的意義與價值。中醫藥乃經由辯證論治，選取適當的中藥治療病患。中藥中有一大部分是植物而藥用植物中含有許多的有效組成成分，而這些組成成分中在生物體內亦具有不同之作用。所以傳統中醫藥治療疾病就是利用這些中草藥所具有的各種不同組成成分配伍。根據行政院衛生署統計，惡性腫瘤至 101 年止，近 30 年來始終居於國人十大死因之首。而現今西方醫學的治療惡性腫瘤方法主要可分為手術切除腫瘤、化學藥物治療、放射線治療、賀爾蒙療法以及免疫療法。開刀雖然可立即將腫瘤切除，但有時病患身體狀況不適開刀，且手術也無法完全根除癌細胞，常常需要加上其他輔助療法。而輔助療法中，臨床上使用的化療藥物或放射線治療常具有極大的副作用，在治療期間常常有噁心、嘔吐、掉髮等症狀，也容易因為病患的免疫力下降而造成病人容易遭受感染。且在抑制腫瘤細胞生長的同時，也會影響到體內的正常細胞。因此許多替代療法就有其必要性。中醫藥因其安全性、副作用少廣受大家的接受。近年來由許多研究、探討，使用天然中草藥來做為治療惡性腫瘤的補充替代療法，已有許多種中草藥粗抽物或其組成成分呈現出相當不錯的抗癌效果[8-10]，例如太平洋紫杉醇(Taxol)，文獻指出其對於治療乳癌[11]、攝護腺癌[12]已具相當好的效果。中醫藥經過數千年的應證，證明確有一定的療效，但其治病機理在現今之西方科學有些無法驗證。近年來因藥理、生化及分子醫學的進步使得中草藥的作用及療效不但在臨床應用上更能獲得驗證肯定，對於中醫藥的作用機轉也有更多的探討與實證，在此基礎上也累積了許多治療之法則與實證醫學，使得中醫藥除了有效、安全性高副作用少以外，更多了實證醫學的驗證，可預見中醫藥的臨床運用會更蓬勃發展，尤其在與西醫做互補搭配上，如治療惡性腫瘤，中藥的輔助效果，甚至是當主角都有不錯的效果。

本論文之研究目的主要在探討山茱萸水粗抽與其成份沒食子酸對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞株產生細胞凋亡及抑制癌細胞侵入轉移的機制。山茱

莢性味甘、酸，微溫。入肝、腎經。《神農本草經》：「主心下邪氣，寒熱，溫中，逐寒濕痺，去三蟲。」《湯液本草》：「滑則氣脫，澀劑所以收之，山茱萸止小便利，秘精氣，取其味酸澀以收滑之。」《藥性論》：「止月水不定，補腎氣，興陰道，添精髓，療耳鳴。」

山茱萸的成分複雜，主要含有沒食子酸(gallic acid)、鞣質如山茱萸鞣質 1、2、3(cornus tannin 1,2,3)、番木鱉鹼(loganin)、莫羅忍冬鹼(morroniside)、山茱萸鹼、皂鹼、維生素等。而山茱萸常用來治療許多疾病如泌尿系統、過敏，結核、肝炎、慢性腎炎，筋骨痠痛、氣喘等[13, 14]。而有些研究顯示山茱萸在動物實驗中有抗高血糖、抗微生物的功能。在老鼠動物實驗中對由放射線引起的皮膚損傷，山茱萸也有保護作用[15-24]。

山茱萸富含 (Gallic acid)，沒食子酸(Gallic acid)是一種有機酸，是多酚類化合物，很多自然界的植物都含有沒食子酸。沒食子酸有抗氧化的功能，可增強許多維生素的抗氧化作用[25, 26]。另外沒食子酸也有抗微生物、抗感染的作用[27, 28]。許多文獻顯示沒食子酸有抗腫瘤的作用，能促使人類血癌[29, 30]、乳癌[31, 32]、大腸腺癌[33]、肺癌細胞凋亡[34, 35]；能抑制攝護腺癌細胞分裂[36, 37]、對人類胃癌細胞也有抑制作用[38, 39]。

骨腫瘤是由骨骼肌肉系統長出的腫瘤，由組織病理特性可大略分為良性與惡性。惡性腫瘤由生長源可分為原發性及續發性(轉移性)骨癌兩大類。原發性骨骼肌肉系統惡性腫瘤，如軟骨肉瘤 (Chondrosarcoma)、惡性骨肉瘤 (Osteosarcoma)、依汶氏肉瘤 (Ewing's sarcoma)、巨大細胞瘤 (Giant cell tumor)、纖維肉瘤 (Fibrosarcoma) 等等。原發性骨骼肌肉系統惡性腫瘤通常發生在年紀較輕或是小孩身上。因為骨骼肌肉系統在發育的過程當中，細胞不斷分化、成長、自然凋亡的過程中，如果遇到致癌因子，則分化過程出問題，分化過與不及都可能會產生出癌細胞。續發性或轉移性及多發性骨癌則常見於年紀較長者，因為其他癌症常發生於中年以後，由原發性癌症轉移到骨骼肌肉系統者也常常是年紀較大者。各種癌症都有可能轉移到骨骼肌肉系統，比較常見的有肝癌、肺癌、攝護腺癌、乳癌[40, 41]。

引起原發性骨骼肌肉系統惡性腫瘤的原因包括放射線、遺傳基因缺陷、病毒感染或不明原因。由於放射線會有致癌之風險，所以癌症在做放射治療時的保護措施就很重要。先天性遺傳基因缺陷在原發性骨骼肌肉系

統惡性腫瘤、甚至是其他腫瘤生成的原因也扮演重要的角色，所以基因提早篩檢、診斷是未來努力的方向。骨骼肌肉系統惡性腫瘤像其他腫瘤一樣經常在癌症初期，病患本身症狀並不明顯，直到癌細胞腫瘤浸潤到肌肉、骨骼，出現明顯的症狀疼痛後，檢查之下才知腫瘤已生成或癌細胞已經擴散了[42]。骨骼肌肉系統惡性腫瘤的治療方法，最主要還是以外科手術切除為主，依據腫瘤部位開刀截除患部，必要時人工植入物或人工關節置入。術後依據組織病理分期，再輔以化學藥物治療、放射療法或荷爾蒙療法。由於醫學的進步，許多輔助替代療法的加入，骨骼肌肉系統惡性腫瘤的預後大為改善，經治療後的五年存活率已由過去的百分之十五到二十提高到百分之六十到七十 [43, 44]。

在生物界，為了保持生物族群恆定性，就不免有生、老、病、死的過程。微觀如細胞亦是如此，比如因其重要性，在生物演化中被保留下來的一種細胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)就是一種自然的調節機制。為保持生物族群演化的恆定性，有些細胞免不了走向死亡、凋亡的地步，而細胞的死亡方式主要有兩種：一個是細胞凋亡(Apoptosis)，另一個是細胞壞死(Necrosis)。其中細胞凋亡(Apoptosis)一字乃來自於希臘語文，有死亡、墜落之涵意。死亡是生物演化的調節機制，細胞的生長(growth)和分化 (differentiation)過程是照一定的程序在進行，過與不及都可能造成病變。細胞進行到凋亡或壞死，所形成碎裂的細胞片段或凋亡小體馬上被附近的吞噬細胞分解、清除吃掉。在人類胚胎發育過程中，一些因為演化而廢退的器官、組織也會由細胞進行凋亡而消失或萎縮。因此細胞凋亡或細胞壞死有助於維持生物體演化的恆定性 (homeostasis)的功用[45-47]。引起細胞凋亡的途徑主要分為外在路徑 (Extrinsic pathway)、內在路徑 (Intrinsic pathway)及內質網壓力系統 (Endoplasmic reticulum stress, ER stress)[48, 49]。當細胞受到外在環境變化影響時，內質網或粒線體就會因應變化而產生反應，像是刺激內質網因應壓力反應而釋出鈣離子傳導訊息 ( $Ca^{2+}$  signaling),改變蛋白質體的生物活性,甚至進而造成細胞死亡[50];粒線體膜的穩定性跟細胞的凋亡很有相關性,粒線體膜的滲透性(permeability)的主要調控者為Bcl-2 family protein; Bcl-2家族包括BH1、BH2、BH3、BH4,皆含有Bcl-2 homology (BH) domains.在細胞凋亡時, Bcl-2 family protein會

改變粒線體膜的滲透性,釋放凋亡相關因子(apoptogenic factors)如 cytochrome c、Smac/Diablo到細胞質,而cytochrome c也會經由caspase 路徑活化細胞凋亡相關蛋白而促使細胞死亡;也會釋放 AIF、Endo-G等轉位到細胞核,而引起細胞核的變化.[51]也有研究提出Bcl-2 family protein如何調控粒線體膜的滲透性的機制,乃是經由活化BH3-only proteins或是經由結合活性BAX和BAK[52].由上可知,細胞凋亡中Bcl-2 family protein乃是粒線體路徑的最主要調控者. Bcl-2 family protein在調控細胞凋亡時可分為抑制細胞凋亡(anti-apoptosis)和促進細胞凋亡(pro-apoptosis) [53]。具有抑制細胞凋亡作用的包括bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, adenovirus E1B 19K, EBV BHRF1, Ced-9等。能促進細胞凋亡因子包括:Bim、Bad、Bid、Bax、Bak、Nbk/Bik1, Bcl-xs等,這些因子在細胞走向凋亡時,會移轉到粒線體,改變粒線體膜的通透性,降低粒線體膜電位差,促使細胞凋亡;抑制細胞凋亡因子包括:Bcl-XL,Bcl-2、Bcl-w, Ced-9、Mcl-1等,這些因子可穩定粒線體膜的通透性,抑制cytochrome c釋放,抑制AIF、Endo-G等轉位釋放.Bcl-2 family protein除了經由粒線體路徑來調控細胞凋亡,也可經由內質網壓力系統(Endoplasmic reticulum stress, ER stress)來調控鈣離子傳導訊息( $Ca^{2+}$  signaling)的釋出,進而促進細胞凋亡或抑制細胞凋亡[54].

細胞凋亡若是走外在路徑(extrinsic pathway),就是其細胞膜上的Death receptors (如Fas, TNF receptor, DR4 和 DR3..),和其相對應之ligands 相結合後,將訊息帶入細胞中,傳遞給caspase-dependent pathway,活化caspases,再造成細胞凋亡. 最典型得例子為Fas與Fas Ligand (FasL)的結合,訊息傳遞入細胞中,活化Caspase-8,Caspase-3,再造成細胞凋亡.[55]。

研究顯示,有些藥物會活化Caspase-8、促使Bid分解 (BID cleavage)抑制Bcl-2,再增加Cytochrome c釋放,最後造成細胞凋亡。亦即內在路徑、外在路徑、粒線體路徑皆參予其中[56, 57]。

此機制可藉由磷酸化 eIF2轉譯因子的 次單元以抑制蛋白質的轉譯。另外,也可透過活化ATF6及IRE1的下游路徑提高ER-resident chaperones,如GRP78/BiP、GRP94等基因在轉錄層次上的活性,增加此類蛋白質在細胞內的含量,以協助蛋白質折疊,進而舒緩內質網壓力。

內質網功能最主要是幫助摺疊蛋白質成為穩定的結構合成蛋白質,此



功能最主要在粗超糙內質網(rough ER)進行。而ER stress response 可被視為內質網因應細胞外在環境改變而調整ER capacity的自我調節機制 [58]。有些研究指出，腫瘤細胞內部因為缺乏養分和氧氣，使細胞的內質網聚集大量折疊錯誤(misfolding)或折疊不完全的蛋白質，會產生所謂的內質網壓力(ER stress)，內質網壓力過大時會引起細胞死亡，所以此時就要啟動細胞的存活保護機制，改變一些基因表現和訊息傳遞來紓解此壓力，即所謂未折疊蛋白質反應 unfolded protein response (UPR)。參與UPR的包括提高GRP78/BiP、GRP94等基因的活性，活化inositol requiring enzyme 1 (IRE-1)和activating transcription factor-6 (ATF-6)的下游路徑，活化PKR-like ER kinase (PERK) [59]。可想而知，腫瘤細胞應該比一般正常細胞承受更大的內質網壓力，所以治療腫瘤的藥物就可從抑制保護癌細胞的unfolded protein response (UPR)著眼，甚至也可讓內質網壓力繼續增加而最終引起癌細胞無法承受而凋亡。也可以促使內質網內鈣離子的釋放，再增加粒線體釋放Cytochrome c，而使得細胞凋亡[60]。

有許多研究顯示癌細胞轉移、matrix metalloproteinase (MMPs) 與extracellular matrix degradation等很有相關性[61, 62]。癌細胞要進行侵入(invasion)和轉移(metastasis)去其他器官組織時，MMPs就會由癌細胞釋放出來，將細胞外基質degradation，以利癌細胞轉移[63-69]。MMPs的合成剛開始是不具活性的(inactive zymogens)，等到受其調控因子MMPs inhibitor作用後，才視情況上調或下調其蛋白質的活性，以調控對細胞移動與轉移之影響[70-72]，而臨床上也有依此原理而做出MMPs inhibitor drugs，但有些效果仍不明確[73]。MMPs除了與腫瘤轉移有關外，也與血管新生、胚胎發育、傷口癒合等有關。而其調控機制在tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)，TIMPs直接與MMPs結合，而達到調控抑制MMPs活性的作用[74, 75]。因而TIMPs和MMPs的相關比例就可決定該癌細胞的轉移傾向，甚至可用來預估癌症的組織侵入深度，做為治療前或治療後的一些後續治療決策參考，當然外來致癌因子也是要考量的因素[76-82]。MMPs能分解extracellular matrix而促進癌細胞入侵轉移組織之外，也能調節整個腫瘤組織的生長與分化，有些MMPs與生長因子、接受器(Receptors)或其他調節生長的蛋白有關係。例如在大腸直腸癌的預後評

估中，MMP-14 與alpha-5-beta 1-integrin 的表現有關[83]。在子宮內膜增生中，(MMP)-2、-9 和 vascular endothelial growth factors (VEGF) 與微循環的增加有關連[84]；MMP-3 能裂解釋出heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF)，造成它由細胞釋出，在女性的生殖器官演化中也能與CD44 協同作用[85,86]。MMP-2、7、9 在angiogenesis中與vascular endothelial growth factor (VEGF) 的釋放有相關[87-89]。很多MMPs已經證實和乳癌、大腸直腸癌、肝癌中的EGF receptor有關[90-94]。綜上所述，MMPs與腫瘤的生長、轉移入侵組織有相關，但因每一種癌細胞之特性不同，有些分化生長 (proliferation) 快速，有些易轉移入侵(migration and invasion)正常組織，有些血管增生快速，易由血循轉移。所以不同癌細胞，就有不同的MMPs 活性增加。許多MMPs在某些癌症中發現，例如MMP-11 被報導其量在肺癌 (lung cancer)、大腸癌 (colon cancer) 和乳癌 (breast cancer) 中大量上升，但在non-Hodgkin's lymphomas則沒有增加[95]。MMP-8、9 在大腸直腸癌中增加[96, 97]。MMP-1 在乳癌 (breast cancer) [98, 99]和腦癌 (brain cancer) [100, 101]中大量上升，但在攝護腺癌 (prostate cancer) 中則較少發現[102]，而攝護腺癌則與MMP-2、9、14 較相關[103-105]。因此針對不同的癌細胞而檢測其MMPs的活性，可應用於研究抑制腫瘤生長與轉移。所以本論文是在探討山菜萸水粗抽及其成分沒食子酸在離體試驗 (*in vitro*) 中是否也具有抗骨肉瘤的作用，研究山菜萸水粗抽及其成分沒食子酸之所以導致細胞死亡與抑制細胞轉移方式的相關分子傳遞訊息機轉，進一步探討山菜萸水粗抽與沒食子酸在離體試驗 (*in vitro*) 內的抗癌作用機轉。

### 第三章 材料與方法

#### 3.1 實驗流程

本實驗是在探討山茱萸水粗抽誘導人類骨肉瘤(U-2 OS)產生細胞死亡的相關分子傳遞訊息機轉；也研究山茱萸水粗抽與其組成份沒食子酸誘導人類骨肉瘤(U-2 OS)產生細胞死亡與抑制細胞轉移方式的相關分子傳遞訊息機轉。

實驗進行流程簡略如圖 3.1 所示：

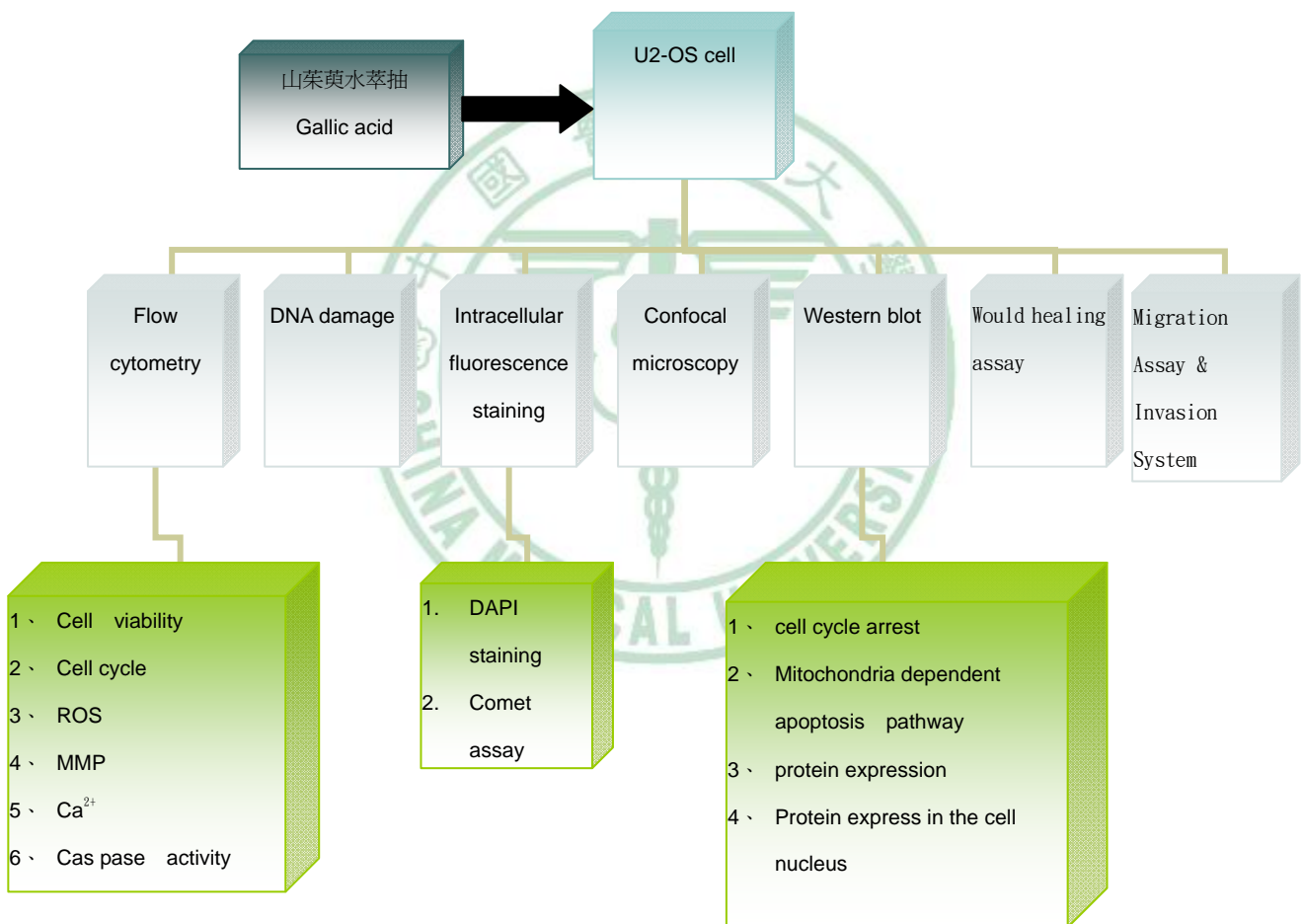


圖 3.1 實驗進行流程簡略

## 3.2 藥物、細胞株來源與製備

### 3.2.1 山茱萸備製

本實驗山茱萸抽提程序：取藥材 100 g，放入三角瓶中，加入 500 mL 去離子水，之後靜置 24 小時，時時震搖。抽氣過濾，收集萃取液，將藥材再置於三角瓶中，加入 500 mL 去離子水，再靜置 24 小時，時時震搖，合併兩次濾液，減壓濃縮到乾為止。以水煎煮後，以減壓濃縮抽乾，製成浸膏。(關於浸膏的溶解度事宜，用 DMSO 無法溶解，用無菌水即可，還可以做浸膏的沒食子酸 HPLC 含量測定)。

### 3.2.2 沒食子酸購買與配製

沒食子酸標準品化合物，購自 Sigma-Aldrich comp.，先以 DMSO 為溶劑配製一管濃度較高(100 mM)的庫存液(stock solution)，以利之後的不同濃度之配製。

### 3.2.3 細胞株購買來源與培養

本實驗使用之細胞株 U-2 OS 為人類骨肉瘤細胞細胞株 (Human bone osteosarcoma cells)，由新竹食品工業研究所 (Food Industry Research and Development Institute) 購得，然後加以培養再用於所有實驗。

細胞株的培養方法是以人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞，培養在 90% McCoy's 5A 培養基，培養基含 10% FBS (Fetal bovine serum)、100 unit/mL streptomycin、100 Units/mL penicillin 與 2 mM L-glutamine。此細胞再依個別實驗需要培養 10 公分細胞培養皿、24-well 與 96-well 細胞培養盤(well plates) 及 75-cm<sup>2</sup> 與 25-cm<sup>2</sup> 細胞培養瓶中，並置於溫度 37°C、5% CO<sub>2</sub>、相對溼度 95% 的無菌培養箱中培養。再以 trypan blue 染色，用血球計數盤計算活細胞數目及存活率(countess Automated Cell Counter)，並控制繼代的細胞數在  $2-5 \times 10^5$  cells/ml [106]。然後加以培養再用於所有實驗使用[107]。

## 3.3 實驗中使用的方法

### 3.3.1 細胞形態(morphology)之探討

人類骨肉瘤 U-2 OS 細胞種植於 12-well plate 中，以不同濃度之山茱萸水粗抽或沒食子酸處理後，以倒立顯微鏡觀察並照相，照相時的視野以對準

培養盤的中央孔為主，比較其形態上的改變以確認其細胞是否有受毒殺 [106, 108]。

### 3.3.2 細胞存活率(viability)之分析

將人類骨肉瘤U-2 OS細胞 ( $1 \times 10^4$  cells/ml) 置於12-well細胞培養皿中，分別以不同濃度之山茱萸水粗抽或沒食子酸處理，培養24及48小時後，收集細胞後，經PI染色以流式細胞儀檢測細胞存活率的情形[107, 109]。

### 3.3.3 細胞週期與凋亡之分析

人類骨肉瘤U-2 OS細胞 ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) 培養於12-well之培養皿中，分別加入不同濃度的山茱萸水粗抽或沒食子酸處理，細胞置於37°C、5% CO<sub>2</sub>、溼度95%之細胞培養箱中培養。收集細胞加入含Hypotonic PI溶液，利用流式細胞儀(波長488 nm的argon ion laser)分析G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, and G<sub>2</sub>/ M phase細胞週期的分布與凋亡之變化，結果以Cell Quest軟體分析計算[107, 109]。

### 3.3.4 彗星試驗 (Comet assay)

將人類骨肉瘤U-2 OS細胞 ( $1 \times 10^4$  cells/ml) 置於12-well細胞培養皿中，分別以不同濃度之山茱萸水粗抽或沒食子酸處理，再以4μM of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 為 positive control group, 離心收集人類骨肉瘤U-2 OS細胞懸浮液至1.5 ml離心管。使細胞懸浮液終體積為300 μl，磨砂載玻片再加入NMA (normal melting agarose) 與85 μl LMA (low melting agarose)於載玻片上，取10 μl細胞懸浮液混合 75 μl LMA加到第一層膠上再蓋上蓋玻片。同時配置 Lysis buffer (100 mM Na<sub>2</sub>EDTA、10 mM Tris、2.5 M NaCl與1% Triton X-100)，將蓋玻片拿掉並置於Lysis buffer中一小時。準備電泳槽並加入Alkaline buffer (0.3 M NaOH與1 mM Na<sub>2</sub>EDTA)置於冰上。將玻片以1×PBS洗滌後，置於alkaline buffer中 20分鐘，再進行DNA電泳30分鐘，取出玻片並以二次水洗滌後，置於Neutral buffer (0.4 M Tris)。然後置放在甲醇中脫水，再加入PI (4 μg/mL)染色，於螢光顯微鏡下觀察彗星尾巴拖尾程度。拖尾程度越嚴重代表DNA損傷愈嚴重，用Comet Score software (Tritek Corp)

來定量。亦即分別比較不同濃度之山茱萸水粗抽或沒食子酸處理對細胞之DNA有不同程度的傷害[108, 109]。

### 3.3.5 細胞型態分析及凋亡細胞測定-DAPI染色

人類骨肉瘤U-2 OS細胞分別以不同濃度之山茱萸水粗抽或沒食子酸處理後，再以4  $\mu\text{M}$  of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 為 positive control group. 用倒立型相位差顯微鏡觀察細胞外型morphology之變化，收集細胞，以1 $\times$  PBS洗滌後，加入4% formal dehyde固定細胞。根據In stiu cell death detection kit (Roche Diagnostics, Fishers, IN, USA)廠商實驗步驟guidline，進行DNA雙股末端斷裂損壞之偵測。加入4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)螢光染劑，於室溫下避免光反應，充分洗淨後，再以倒立螢光顯微鏡觀察細胞核變化[107]。核濃染表示DNA有破壞。

### 3.3.6 活性氧化物質(ROS)、粒線體膜電位( $\Delta\Psi\text{m}$ )及鈣離子( $\text{Ca}^{2+}$ )分析

分別加入山茱萸水粗抽或沒食子酸處理，收集人類骨肉瘤U-2 OS細胞，因不同實驗，re-suspended 在 500  $\mu\text{l}$ 的 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (10  $\mu\text{M}$ )測ROS,用500  $\mu\text{l}$ 的DiOC6 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) 測 $\Delta\Psi\text{m}$ ,以及500  $\mu\text{l}$ 的Fluo-3/AM (2.5  $\mu\text{g/ml}$ )測intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ，染劑反應30分鐘後，離心後以流式細胞儀分析[110]。

### 3.3.7 西方墨點法(Western Blot)分析

#### 3.3.7.1 測試細胞週期和細胞凋亡相關蛋白

將人類骨肉瘤U-2 OS細胞以 $5\times 10^5$  cells/well 的密度種植在6孔培養盤上，用2500  $\mu\text{g/mL}$  山茱萸水粗抽處理0, 6, 12, 24, and 48 小時後，加入lysis buffer(40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA,120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% NP-40)。緩衝液抽取全細胞蛋白質。細胞混合液用超音波震碎細胞二次，每次持續約5秒，接著用100 $^\circ\text{C}$ 沸水煮5-10分鐘，離心(13000 rpm，10分鐘)後收集上清液，並測量蛋白質濃度。各取30  $\mu\text{g}$ 與SDS樣本緩衝溶液混合，利用SDS-PAGE(10% Tris-glycine-SDS-polyacrylamide) 展開後，轉移蛋白質到nitrocellulose membrane PVDF膜上。加入primary antibodies 如(A) caspase-3, caspase-9, Bax, cytochrome c, Bcl-2, Bcl-X, Bid, (B) GRP78, AIF,

Endo G, COX4, caspase-12, Calpain 1, XIAP, ATF-6  $\alpha$ , (C) FasL, XBP-1, TRAIL, PARP, (D) p-p53, p21, p27, p16, Chk2, b-actin。每一個樣本染色、清洗、再以secondary antibody 染色，再做enhanced chemiluminescence(NEN Life Science Products, Boston, MA)。

### 3.3.7.2 人類骨肉瘤細胞移動和轉移侵入(migration and invasion)的相關蛋白研究

將人類骨肉瘤U-2 OS細胞以 $1 \times 10^6$  cells/well 的密度種植在6孔培養盤上，用 $500 \mu\text{g/mL}$  山茱萸水粗抽處理0, 6, 12, 24, and 48 小時後，若是gallic acid 則是 $20$ 或 $40 \mu\text{M}$  (對照組單純使用溶劑DMSO)，收集細胞，用pH 7.4 的ice-cold  $50 \text{ mM}$  potassium phosphate做緩衝溶液(含有  $2 \text{ mM}$  EDTA 和  $0.1\%$  Triton X-100)。離心( $13,000 \text{ rpm}$ ,  $10$ 分鐘) 後收集上清液，並測量蛋白質濃度。轉移蛋白質到nitrocellulose membrane膜上。再用對各種蛋白質具專一性的初級抗體來辨識各蛋白質，如 anti-FAK, PKC, SOS1, MKK7, MEKK3, GRB2, NF- $\kappa\text{B}$  p65, COX-2, HIF- $1\alpha$ , PI3K, GRB2, Rho A, ROCK-1, IRE- $1\alpha$ , p-JNK1/2, p-ERK1/2, p-p38, Ras, p-PERK, MMP-2, MMP-9 和 VEGF,再清洗，再與 secondary antibody反應後，再用 enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences ECL<sup>TM</sup>)偵測。成像用 NIH Image analyzer (NIH, Bethesda, MD)分析[107, 111]。

### 3.3.8 Caspases之活性分析

以山茱萸水粗抽或沒食子酸處理人類骨肉瘤U-2 OS細胞經不同時間點，收集細胞後用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗細胞，加入 $50 \mu\text{l}$  of  $10 \mu\text{M}$  substrate solution caspases-3、-8、-9染劑分別為PhiPhiLux- $G_1D_2$ 、Caspalux - $L_1D_2$ 和Caspalux - $M_1D_2$ ，於 $37^\circ\text{C}$ 中避光反應1小時後，再以 $1 \times \text{PBS}$ 洗滌，以流式細胞儀分析檢測[107, 108]。

### 3.3.9 免疫螢光抗體染色與共軛焦顯微鏡檢測蛋白質轉位

人類骨肉瘤U-2 OS細胞分別加入山茱萸水粗抽或沒食子酸處理後，以甲醇固定後，加入 $0.1\%$  Triton-X 100 於PBS 20分鐘後，加入 $2\%$  BSA 以阻

斷non-specific binding sites。再加入檢測AIF, Endo G, cytochrome c 和 GADD153 (green fluorescence)所需一級抗體(1:100稀釋使用)隔夜後，加入含有螢光Fluorescein isothiocyanate (FITC-conjugated goat anti-mouse IgG at 1:100 dilution)之二級抗體後，並以DNA核酸染劑或是Mitotracker(red fluorescence)進行核或是粒線體染色，並以共軛焦顯微鏡(Leica TCS SP2 Confocal Spectral Microscope)觀察蛋白質轉位的現象[107, 108]。

### 3.3.10 即時定量PCR基因表現分析(Real-time PCR of MMP-2 and -9 mRNA expressions)

人類骨肉瘤細胞放在 6-well plates，且用沒食子酸處理 24 小時，收集細胞，萃取出total RNA，RNA樣本在 42°C reverse-transcribed 30 分鐘 (用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 遵循 protocol of the supplier (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。本實驗所用的primers如表 3.1 所述。使用的系統為Biosystems 7300 Real-Time PCR system。檢測基因表現量用 comparative CT (threshold cycle) method，即Real-Time PCR測產物開始合成(cycle number, Ct值)，基因表含量越高，則產物越早被合成，cycle number 越前面，則Ct值越低。用Ct 值便可比較出何者基因的表現量高。由Ct值可以計算出同一樣品的基因與  $\beta$ -actin表現之Ct 值差異，也就是計算 $\Delta Ct$ 。 $\Delta Ct$ 的數值相差 1，則兩檢體間該基因的表現量相差 2 倍，基因表現量差異為  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  [108, 109]。



表 3.1 本實驗用於PCR analysis 的primers

Primer name	Primer sequence
homo MMP2-F	CCCCAGACAGGTGATCTTGAC
homo MMP2-R	GCTTGCGAGGGAAGAAGTTG
homo MMP7-F	GGATGGTAGCAGTCTAGGGATTA ACT
homo MMP7-R	AGGTTGGATACATCACTGCATTAGG
homo MMP9-F	CGCTGGGCTTAGATCATTCC
homo MMP9-R	AGGTTGGATACATCACTGCATTAGG
homo GAPDH-F	ACACCCACTCCTCCACCTTT
homo GAPDH-R	TAGCCAAATTCGTTGTCATACC

### 3.3.11 細胞移動能力試驗(Wound healing assay)

細胞移動能力試驗是用傷口癒合(Wound healing assay)模型來呈現。將 U-2 OS 以  $5 \times 10^5$  cells/well 的密度種植在 6 孔培養盤上，待貼盤後，以 200  $\mu$ L Tip micropipette tip 筆直的在孔盤中製造傷痕，再以 PBS 洗三次，洗去刮除的細胞，再將培養基換為 1% FBS 的 McCoy's 培養基培養，並加入不同濃度的山菜蕒水粗抽或沒食子酸，在不同時間點以倒立顯微鏡觀察紀錄及照像細胞生長狀態。

### 3.3.12 基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs) 活性測定- Gelatin gel zymographic assay

將以山菜蕒水粗抽或沒食子酸處理的人類骨肉瘤細胞( $5 \times 10^5$  cells/well)培養基上清液取出 5  $\mu$ l 加上 5  $\mu$ l 追蹤染劑，re-suspended 在 non reducing loading buffer 中，於 37°C 下水浴 15 分鐘。將樣品注入以含有 0.1% Gelatin 之 10% SDS-PAGE 膠進行電泳分析(110 volt, 60 分鐘)，電泳後以 re-naturing buffer 2.5% Triton-X 100 洗去追蹤染劑，並以 developing buffer

(50 mM Tris-HCl (pH 7.8) 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl) 37°C培養 16 小時。再以 CBR (Coomassie Brilliant Blue R 250) 染色，並以退染劑 (30% methanol, 10% acetic acid) 退染，再掃描膠片觀察白色區塊。

### 3.3.13 細胞侵襲(Invasion)及轉移(Migration)能力測定

用 Matrigel Cell Migration Assay 和 Invasion System 來表示、研究細胞的轉移、移動能力 [112, 113]。細胞的移動能力是用 transwell (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) cell culture chambers (8 mm pore size; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)。人類骨肉瘤細胞放在 serum-free medium 24 小時，再 trypsinized 後再將細胞放在 serum-free McCoy's 5A medium coating，然後置入 transwell insert (5 x 10<sup>4</sup> cells/well) 的 upper chamber 上。再加入山菜黃水粗抽或沒食子酸，將 10% FBS 加入 lower chamber 靜置 24 到 48 hours。去除 upper chamber 的未移動細胞。而 lower chamber 的移動細胞用 4% formaldehyde 固定，在 2% ethanol 用 2% crystal violet 染色，再用 200 倍的顯微鏡記數細胞數及照像。而 Invasion assay 同上，只是 filter membrane 改用 BioCoat Matrigel invasion kit 的 Matrigel coating。

### 3.3.14 AKT、I $\kappa$ B kinase (IKK) 和 PKC 激酶測定 (AKT, I $\kappa$ B kinase (IKK) and PKC using in vitro kinase assay)

使用 peptide substrates, 包括 KGSGS GRPRTSSFAEG 測 AKT1, KKKKERLLDDRHSGLDSMKDEE 測 IKKa/CHUK 以及 Histone H1 和 lipid activator 測 PKCa, 於 base reaction 緩衝溶液 (20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.02% Brij35, 0.02 mg/ml BSA, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT 和 1% DMSO) 中，所有實驗步驟依照 guideline (Reaction Biology Corp., Malvern, PA, USA)。加入 cofactors (1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 16  $\mu$ g/ml Calmodulin, 和 2 mM MnCl<sub>2</sub>)。再加入不同濃度的沒食子酸 (5, 10, 20, 40 and 80  $\mu$ M in DMSO)。常溫下 120 分鐘，反應物放到 P81 離子交換紙 (Whatman #3698 - 915, Maidstone, England, United Kingdom)，filter 用 0.1% phosphoric acid 洗滌並計算。

### 3.3.15 統計分析

結果以平均值±標準差 (mean ± SD)顯示實驗結果，使用 Student's t-test 來比較實驗組與對照組之統計差異。以 p 值小於 0.05 時認定為有統計上意義，以\*表示；p 值小於 0.01 時，以\*\*表示；p 值小於 0.001 時，以\*\*\*表示。



## 第四章 結果

### 4.1 山茱萸水粗抽使人類骨肉瘤細胞凋亡

#### 4.1.1 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞生長之影響

人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞經不同濃度(250, 500, 1000, 1250, 2000, 2500 和 3000  $\mu\text{g/ml}$ )山茱萸水粗抽處理後，以流式細胞儀與 PI 染色評估山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞活性抑制的作用。從加藥 48 小時開始，結果顯示，山茱萸水粗抽毒殺細胞的效果，是隨其濃度(250, 500, 1000, 1250, 2000, 2500 和 3000  $\mu\text{g/ml}$ ) 增加而漸強。數據以三重覆求得平均值與標準差(圖 4.1)。

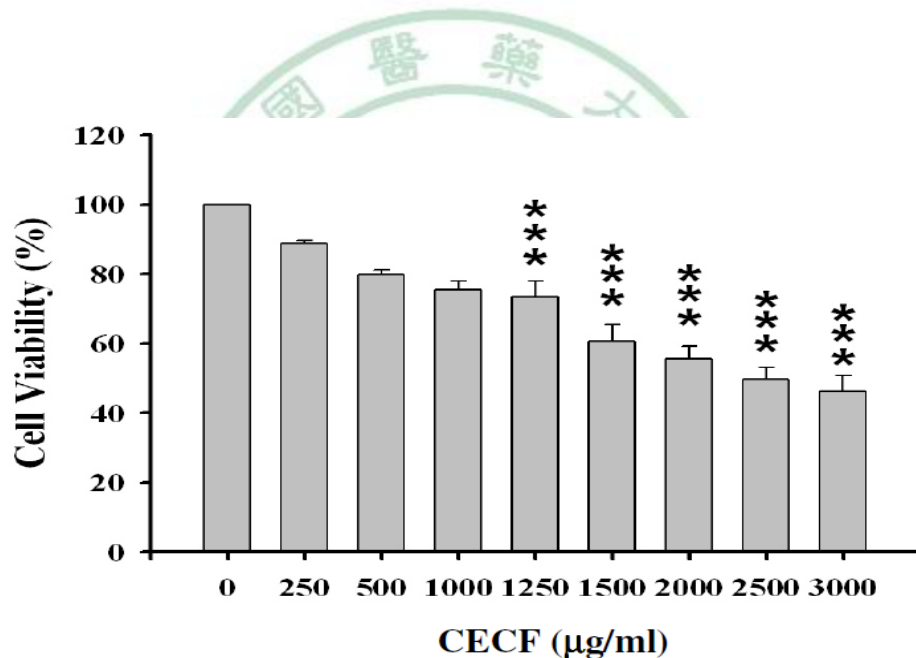


圖 4.1 人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞經山茱萸水粗抽處理後之細胞活性

#### 4.1.2 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞週期之影響

利用流式細胞儀分析細胞內 DNA 含量，藉以判斷細胞週期的分布。當 U-2 OS 細胞以不同濃度(0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g/ml}$ )的山茱萸水粗抽誘導後，DNA 含量可由流式細胞儀圖譜觀察到，不同濃度山茱萸水粗抽處理 48 小時後，sub-G1 期會增加，也經由不同時間點觀察，也有相同的情形。因此，推斷山茱萸水粗抽具有誘導 U-2 OS 產生細胞凋亡的能力。U-2 OS 細胞經山茱萸水粗抽處理 48 小時後，以流式細胞儀檢測細胞週期分析，發現有凋亡細胞(sub-G1 phase)出現(圖 4.2)。

#### 4.1.3 檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株引起 DNA 受損的情形

山茱萸水粗抽以不同濃度(0, 500, 1000, 1500, 2500 and 4000  $\mu\text{g/ml}$ )處理 U-2 OS 細胞，經 48 小時後，收集細胞，利用慧星試驗(Comet assay)及 DAPI 染色情形，觀察細胞受損的情形，在慧星試驗(Comet assay)中可以觀察到，隨著濃度的增加，細胞拖尾的情形愈明顯(圖 4.3)；而 DAPI 染色中隨著濃度的增加，可以觀察到細胞核有凝集的現象(圖 4.4)。

#### 4.1.4 檢測山茱萸水粗抽對U-2 OS細胞株引起ROS產生,鈣離子釋放( $\text{Ca}^{2+}$ )和降低粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi\text{m}$ )分析與檢測

山茱萸水粗抽以 2500  $\mu\text{g/ml}$ 濃度處理U-2 OS細胞，經不同時間之後，收集細胞，檢測ROS、levels of  $\Delta\Psi\text{m}$  和 $\text{Ca}^{2+}$  各以DCFH-DA, DiOC<sub>6</sub> 和 Indo 1/AM為螢光染劑染色，經過流式細胞儀檢測實驗得知，ROS、 $\text{Ca}^{2+}$  在細胞內的表現量經過山茱萸水粗抽處理後，在時間越久有釋放情形(圖 4.5A、C)。膜電位在分子探針在細胞內的表現量，經過不同時間測 6, 12, 24 和 48 小時後，有下降情形(圖 4.5C)。數據以三重覆求得平均值與標準差，並以student's t-test統計分析，\* $p < 0.05$  為有統計意義。

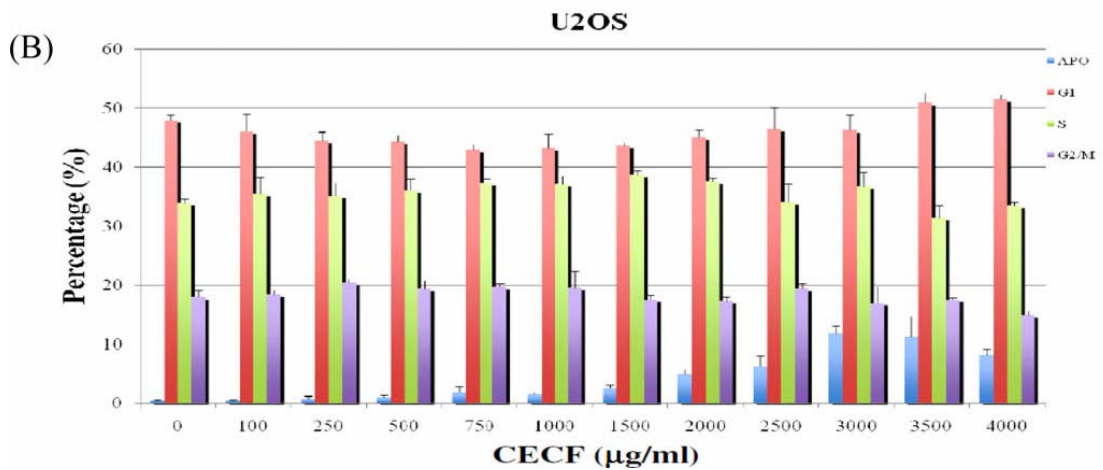
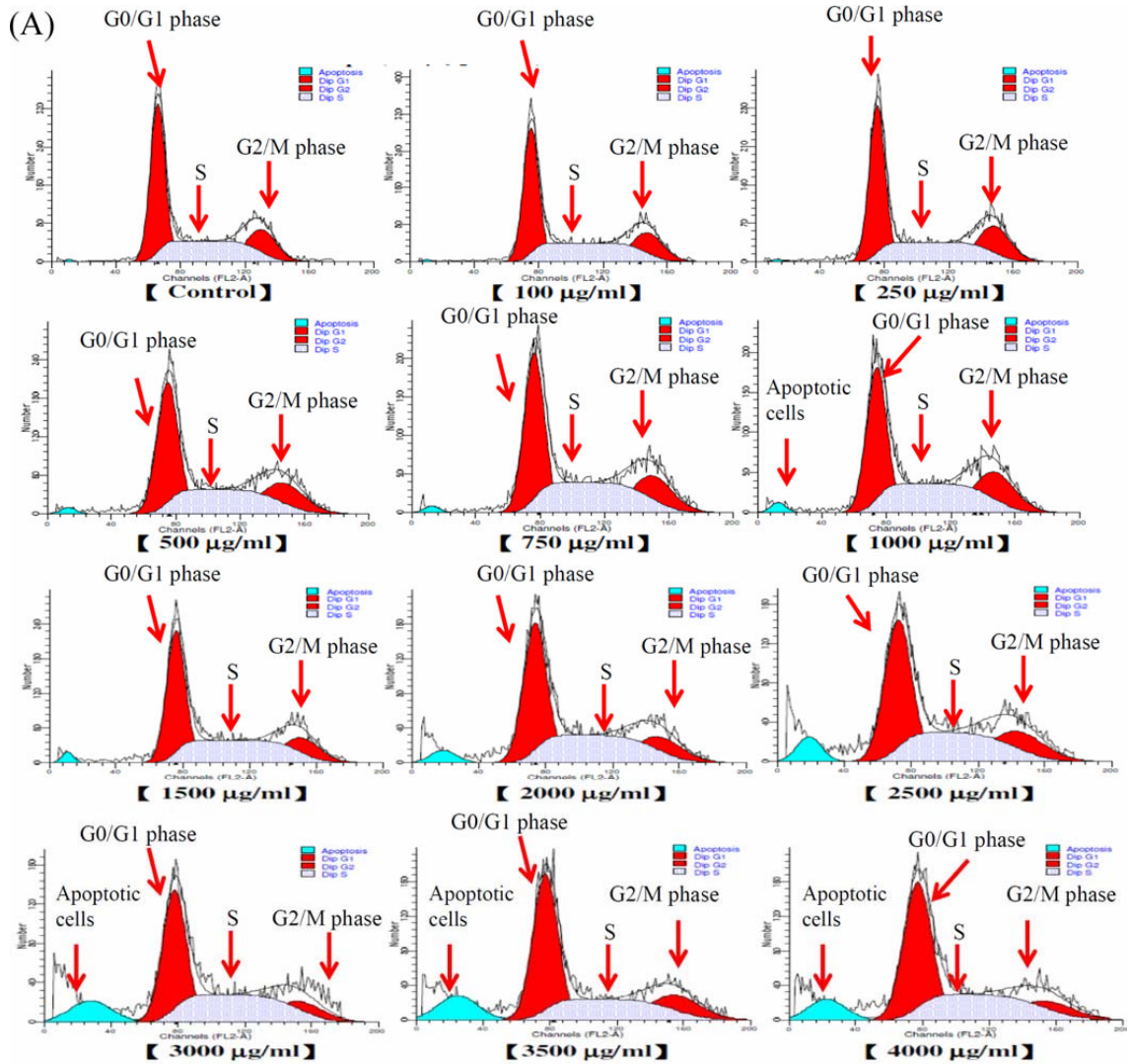


圖 4.2 山菜萹水粗抽對人類骨肉瘤細胞週期之影響  
 山菜萹水粗抽影響 U-2 OS 細胞週期分布與凋亡細胞(sub-G1 phase) 分布，0 小時處理為對照組，\* $p < 0.05$  為統計上有意義。

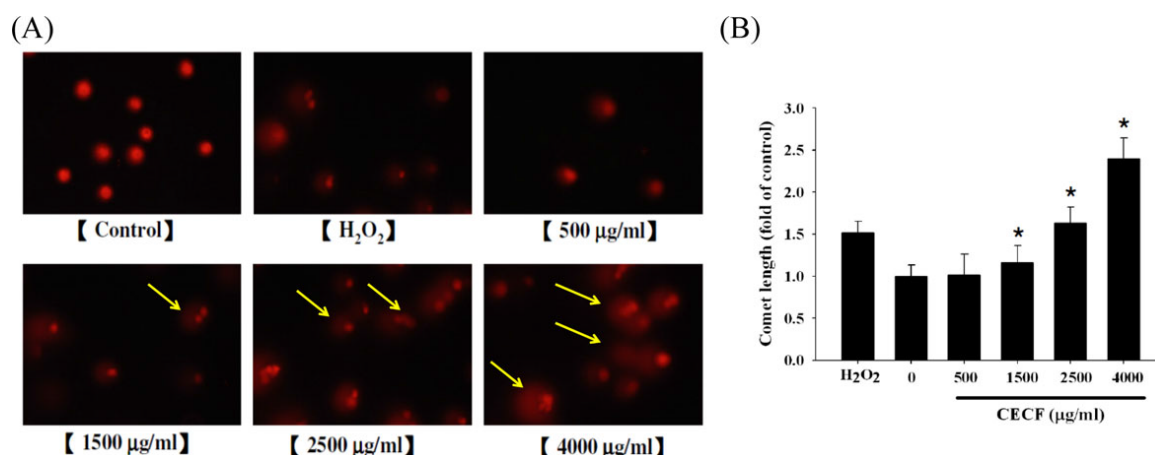


圖 4.3 Comet assay 檢測 DNA 受損的情形

Comet assay 檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株引起 DNA 受損的情形，隨著濃度的增加，細胞拖尾的情形愈明顯，0 小時處理為對照組，\* $p < 0.05$  為統計上有意義。

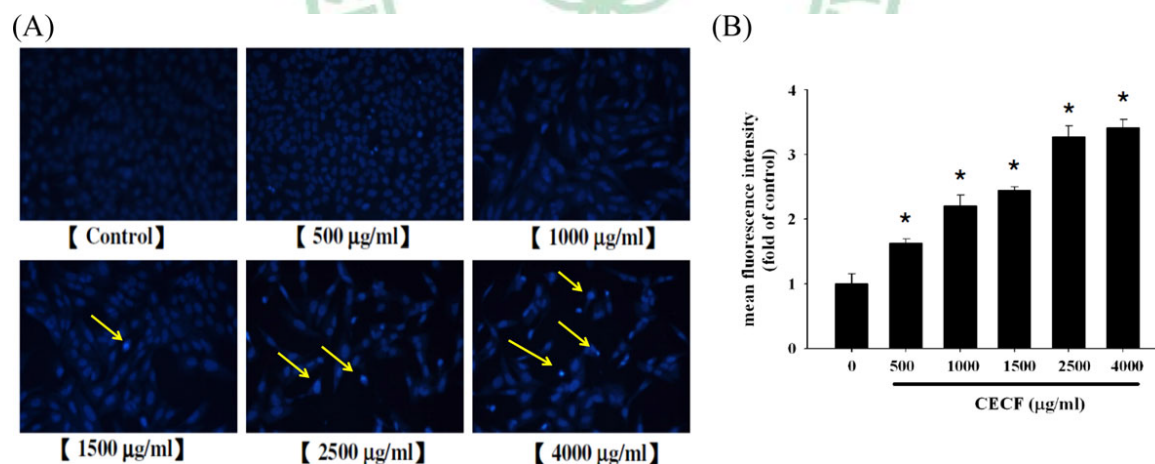


圖 4.4 DAPI 染色檢測 DNA 受損的情形

DAPI 染色檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株引起 DNA 受損的情形，隨著濃度的增加，細胞核濃染的情形愈明顯，0 小時處理為對照組，\* $p < 0.05$  為統計上有意義。

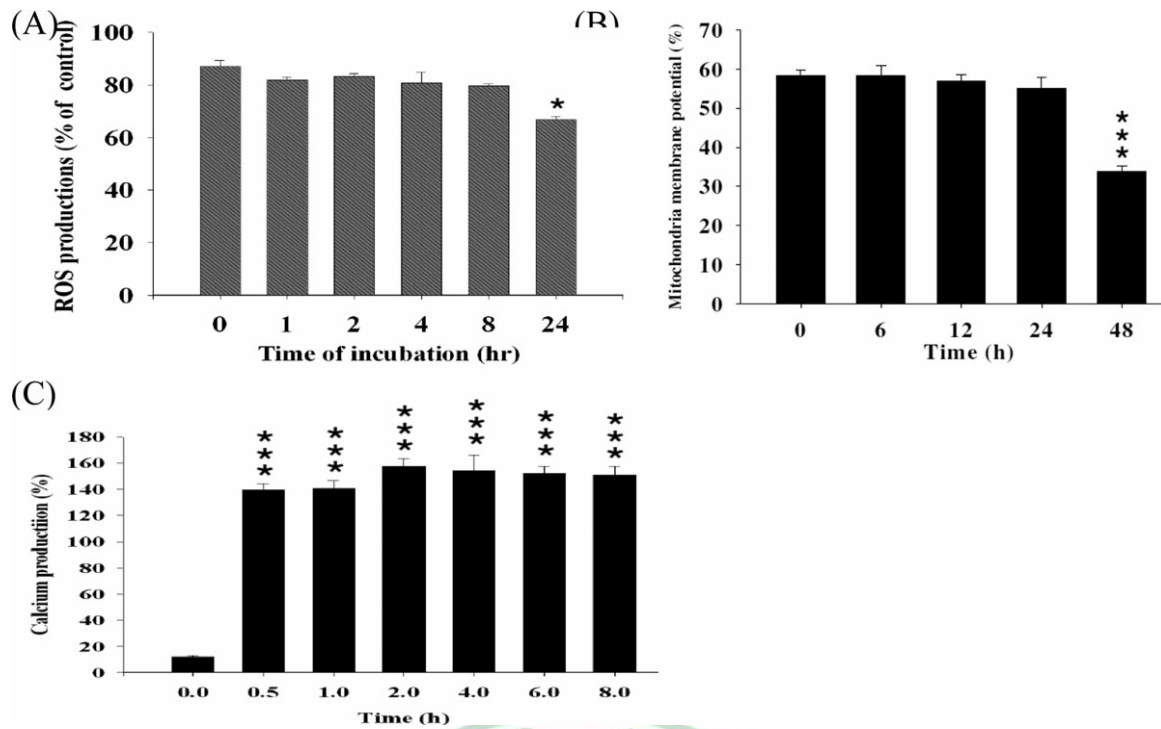


圖 4.5 ROS產生,鈣離子釋放( $\text{Ca}^{2+}$ )和降低粒線體膜電位

檢測山茱萸水粗抽對U-2 OS細胞株引起ROS產生,鈣離子釋放( $\text{Ca}^{2+}$ )和降低粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential,  $\Delta\Psi\text{m}$ )分析與檢測

#### 4.1.5 檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的影響

人類骨肉瘤細胞先用 caspase-3, -8 和 -9 的 inhibitors 先處理,再用 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的山茱萸水粗抽處理,收集細胞染色(caspase-3, caspase-8, 和 caapase-9 各用 PhiPhiLux-G1D1, CaspaLux-L1D2 和 CaspaLux- M1D2),再用流式細胞儀檢測 caspase-3, -8 和 -9 的活性與細胞的活性。由圖 4.6, 以及圖 4.7 加入 caspase inhibitor(caspase-3 的 inhibitor 為 Z-DEVD-FMK, caspase-8 的 inhibitor 為 Z-IETD-FMK, caspase-9 的 inhibitor 為 Z-LEHD-FMK, pan-caspase inhibitor 為 Z-VAD-FMK)的結果得知,山茱萸水粗抽可以增加 caspase-3, caspase-8, 和 caapase-9 的活性;加入 caspase inhibitor 後,山茱萸水粗抽處理細胞活性又增加。由此可知 caspase-3, caspase-8, 和 caapase-9 確實參與影響山茱萸水粗抽處理人類骨肉瘤細胞的凋亡。



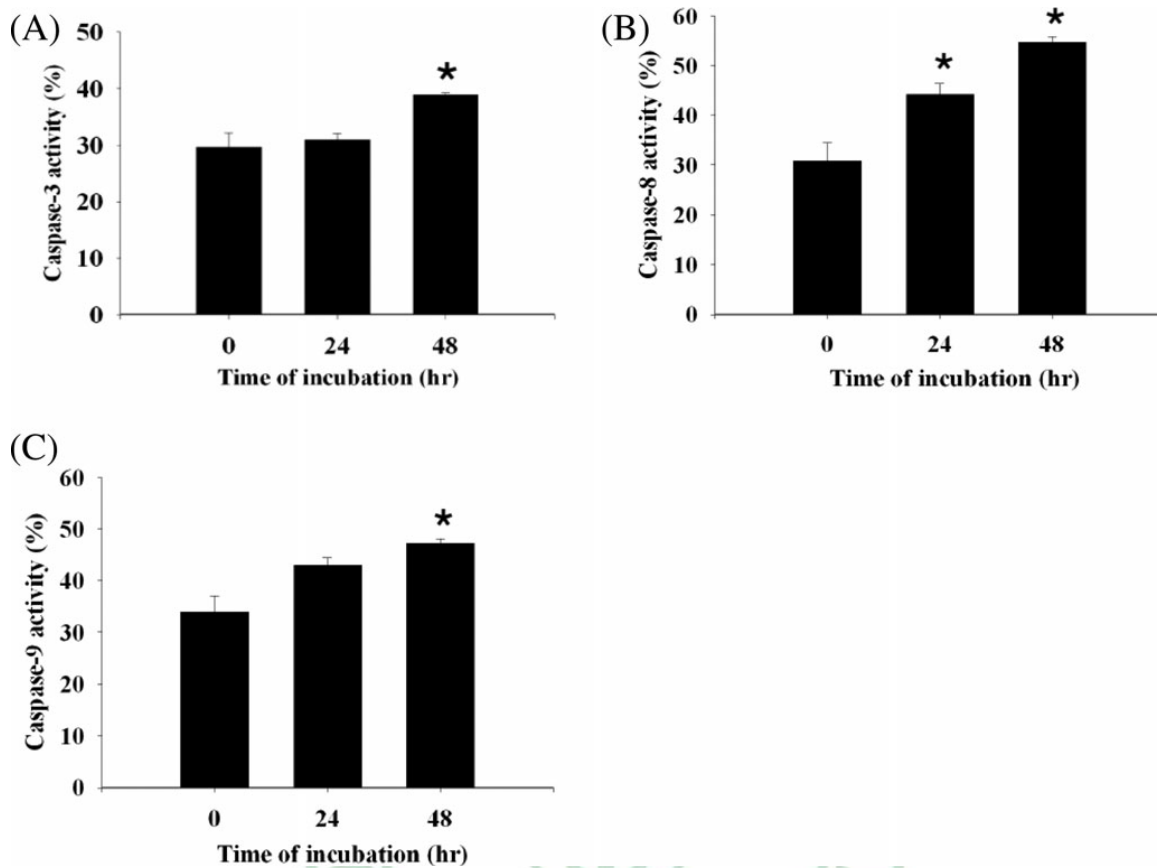


圖 4.6 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的影響  
 檢測山菜萸水粗抽對 U-2 OS 細胞 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的影響。求平均值與標準差，並以統計分析 $*p < 0.05$  為有統計意義。

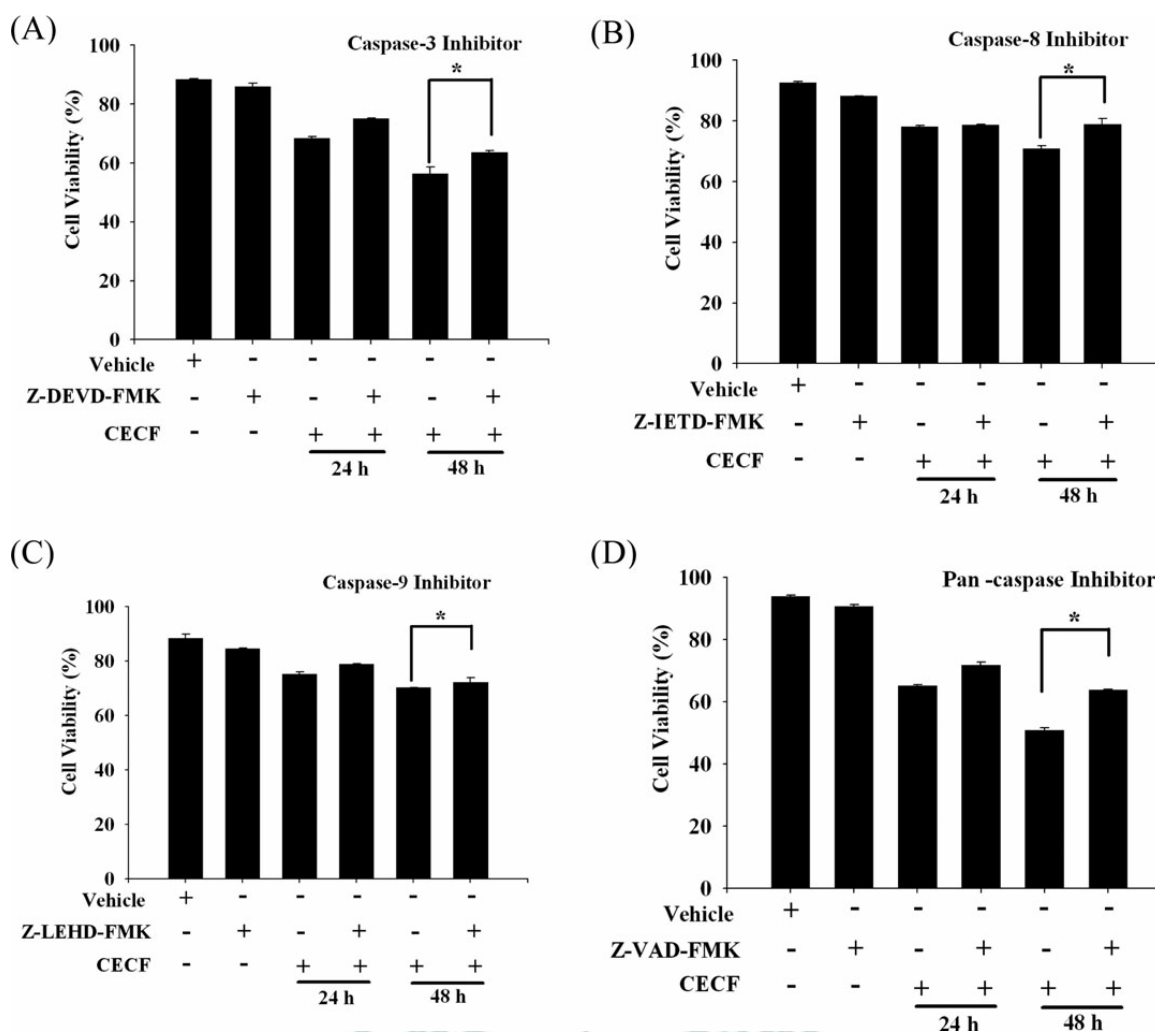


圖 4.7 加入 Caspase inhibitor

檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞 Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 活性的影響(加入 caspase inhibitor)。求平均值與標準差，並以統計分析\* $p < 0.05$  為有統計意義。(0 小時處理為對照組)

#### 4.1.6 檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株藉由西方點墨法分析細胞凋亡相關蛋白活性檢測

山茱萸水粗抽以濃度 2500  $\mu\text{g/ml}$  處理 U-2 OS 細胞，經 6, 12, 24 和 48 小時之後，收集細胞，以西方點墨法檢測得知，細胞經山茱萸水粗抽處理後，對 caspase-3, caspase-9, Bax, cytochrome c, GRP78, AIF, ATF-6 $\alpha$ , Fas, TRAIL, p21, p27, p16 等 protein level 有 up-regulated 的作用。(圖 4.8)

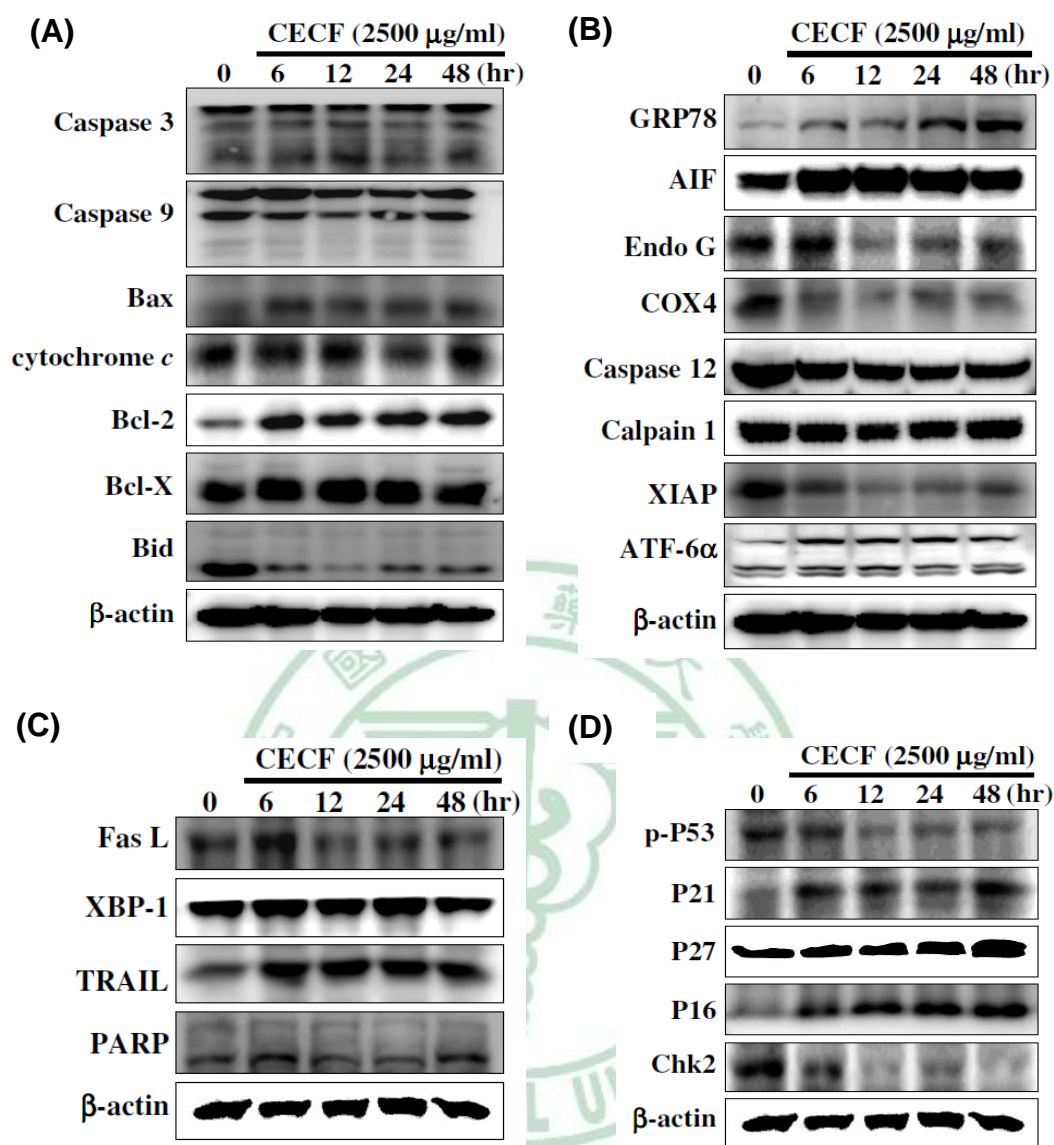


圖 4.8 細胞周期停滯與細胞凋亡相關蛋白活性檢測  
 山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株藉由西方點墨法分析影響細胞週期停滯與細胞凋亡相關蛋白活性檢測

#### 4.1.7 檢測山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株以免疫螢光染色檢測 AIF、Endo G、cytochrome c 和 GADD153 蛋白釋放轉位情形

檢測是否 AIF, Endo G, cytochrome c 和 GADD153 有參與山茱萸水粗抽造成 U-2 OS 細胞凋亡,我們用山茱萸水粗抽以濃度 2500  $\mu\text{g/ml}$  處理 U-2 OS 細胞,經 48 小時之後,收集細胞,以免疫螢光染色檢測,發現 AIF, Endo G, cytochrome c 和 GADD153 有蛋白釋放轉位情形,與對照組比較,在細胞質中皆有增加的情形(圖 4.9~12)

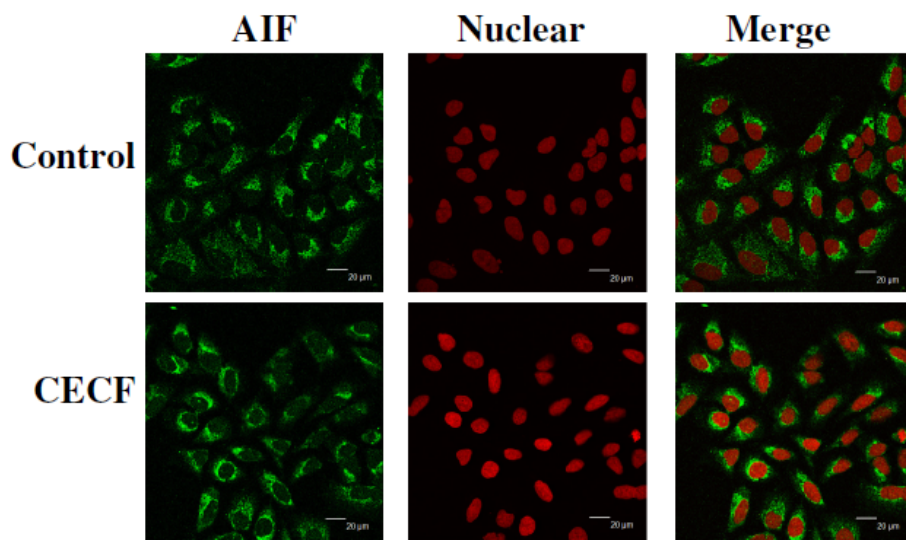


圖 4.9 檢測 AIF 蛋白釋放轉位情形

山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株以免疫螢光染色檢測 AIF 蛋白釋放轉位情形

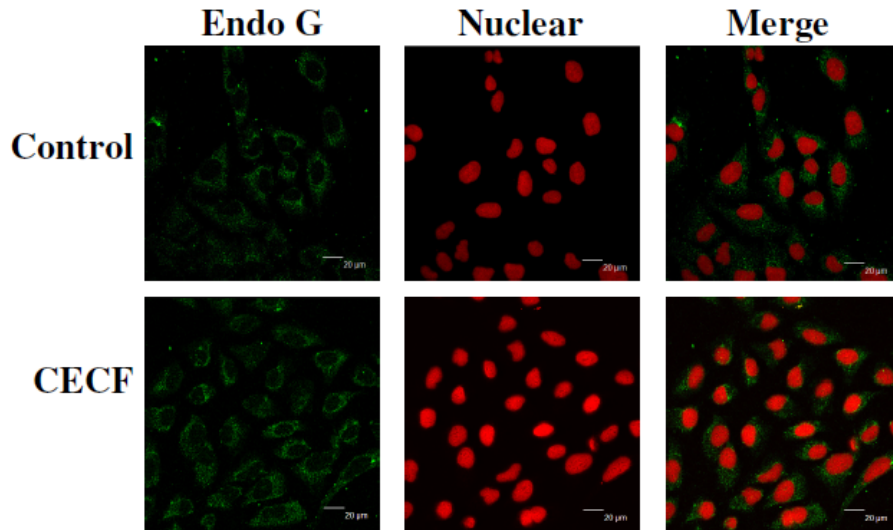


圖 4.10 檢測 Endo G 蛋白釋放轉位情形

山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株以免疫螢光染色檢測 Endo G 蛋白釋放轉位情形

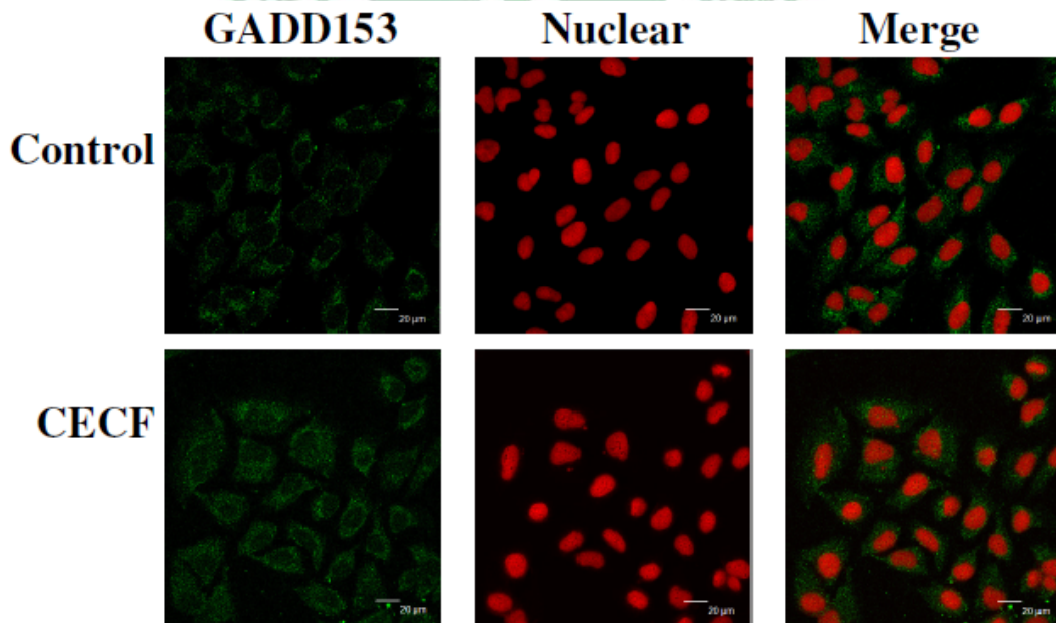


圖 4.11 檢測 GADD153 蛋白釋放轉位情形

山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株以免疫螢光染色檢測 GADD153 蛋白釋放轉位情形

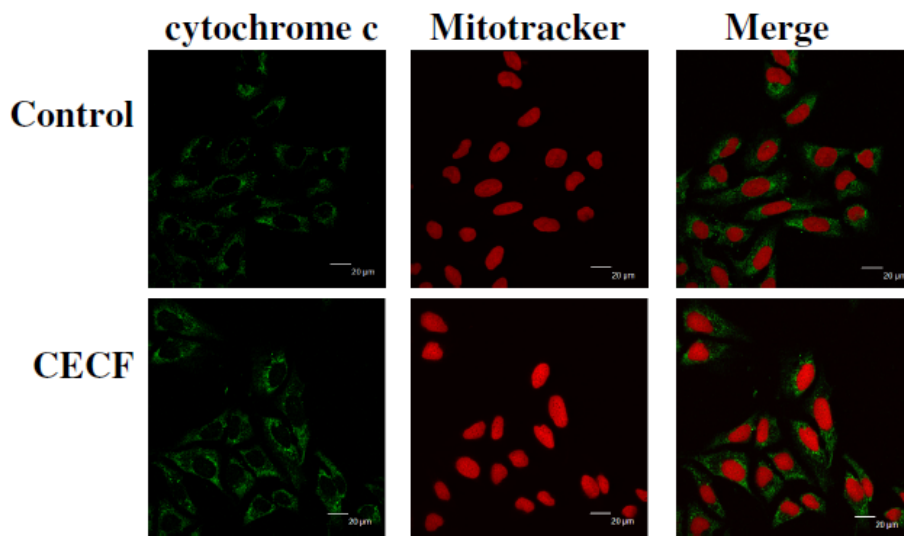


圖 4.12 檢測 cytochrome c 蛋白釋放轉位情形  
 山茱萸水粗抽對 U-2 OS 細胞株以免疫螢光染色檢測 cytochrome c 蛋白釋放轉位情形

#### 4.2 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤細胞株抑制轉移

##### 4.2.1 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性的影響

對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞用不同濃度的山茱萸水粗抽處理(0, 50, 100, 250, 500 and 750  $\mu\text{g/ml}$ ) 24和48 小時,再用流式細胞儀檢測人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性,結果呈現在圖4.13,發現山茱萸水粗抽在濃度500 $\mu\text{g/ml}$ 以前,抑制細胞活性的效果不明顯。

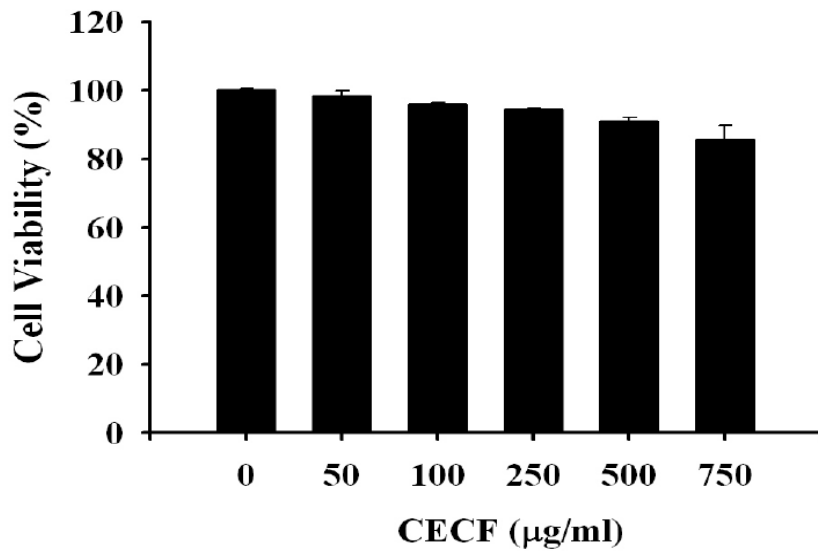


圖4.13 山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性的影響

山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性的影響.與對照組比較,並以統計分析 $*p<0.05$ 為有統計意義。

#### 4.2.2 山茱萸水粗抽抑制 U-2 OS 細胞移動的實驗

本實驗以 Wound Healing assay 觀察細胞經低濃度 (0, 250 和 500 µg/ml) 山茱萸水粗抽，經 24 及 48 小時處理後對人類骨肉瘤癌細胞移動能力之影響。使用較低濃度藥物主要是為了避免濃度太高可能會導致細胞死亡，而影響本實驗的判讀結果。實驗結果發現，在濃度 250 µg/ml 及 500 µg/ml 時山茱萸水粗抽均有抑制 U-2 OS 細胞移動的效果，且此效果與時間、劑量成正相關(圖 4.14)。

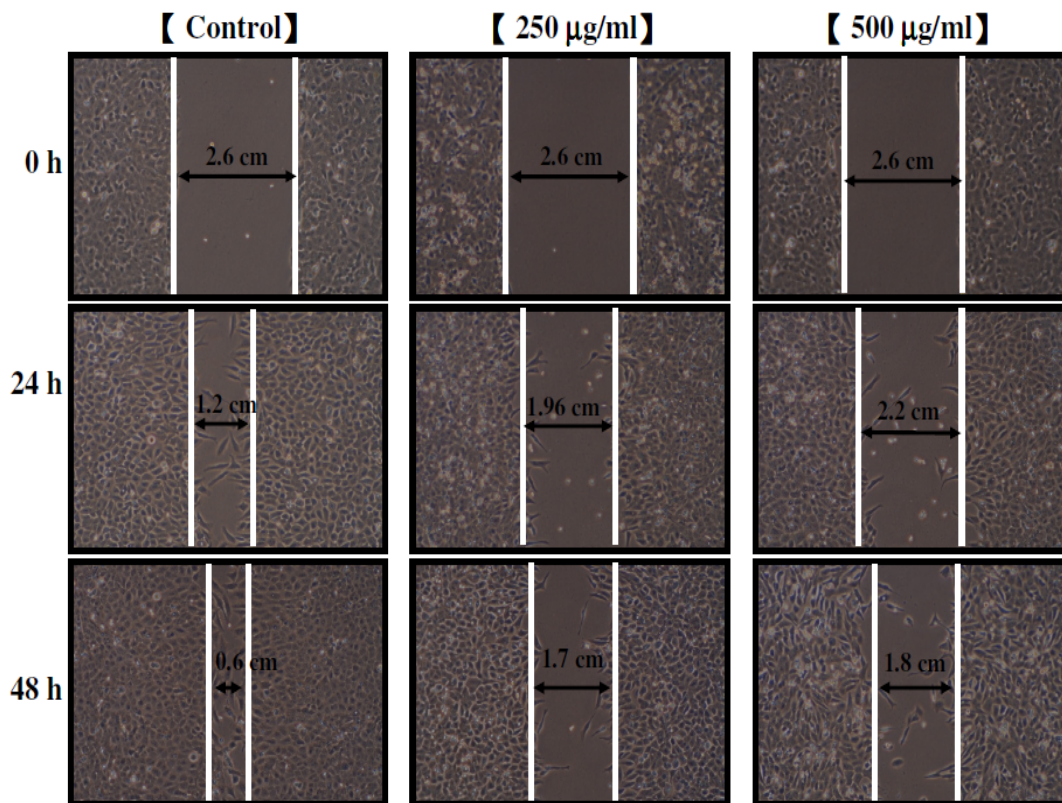


圖4.14 抑制U-2 OS細胞移動的實驗 (Wound Healing assay)  
 山茱萸水粗抽抑制U-2 OS細胞移動的實驗 (Wound Healing assay)

#### 4.2.3 山茱萸水粗抽抑制U-2 OS人類骨肉瘤癌細胞移動與轉移侵入(migration and invasion)的實驗

為檢測山茱萸水粗抽對人類骨肉瘤癌細胞移動與轉移侵入能力之影響，我們將細胞經不同濃度 (0, 250 和 500 µg/ml) 山茱萸水粗抽，經24及48小時處理後，置入 Millicell chambers(如果是細胞移動的實驗用uncoated filter；轉移侵入的實驗用 matrigel-coated filters). 實驗結果呈現在圖4.15、4.16。圖4.15顯示山茱萸水粗抽明顯抑制人類骨肉瘤癌細胞移動的能力。圖4.16 顯示山茱萸水粗抽明顯抑制人類骨肉瘤癌細胞轉移侵入的能力。而此兩項效果與時間、劑量成正相關。



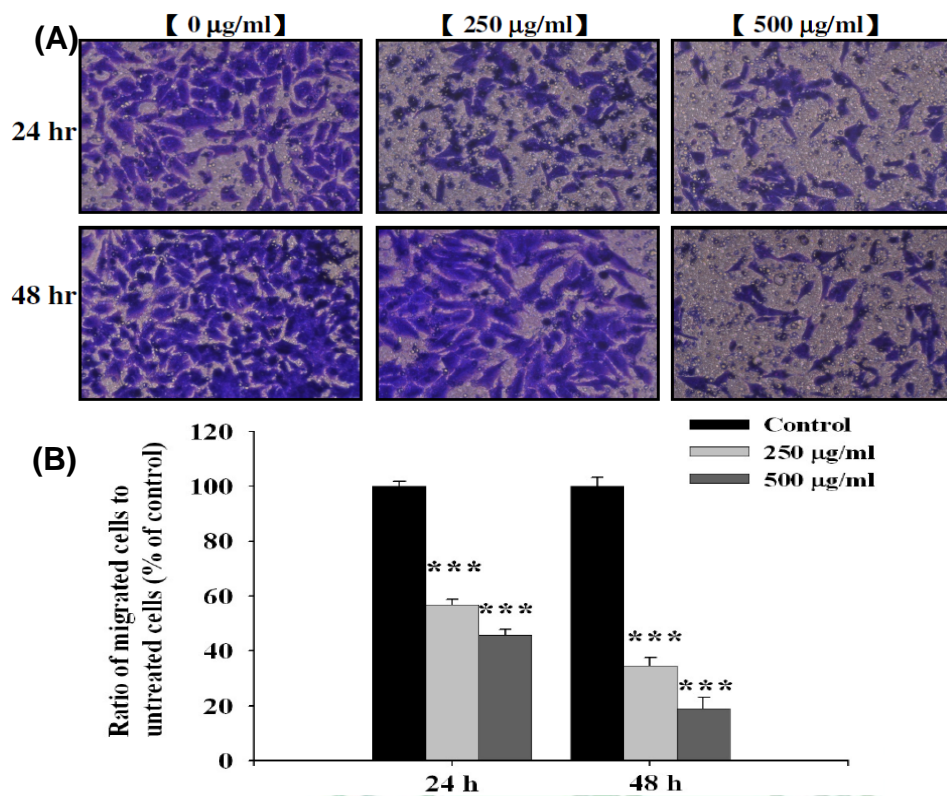


圖4.15 抑制U-2 OS細胞移動的實驗結果

山茱萸水粗抽抑制U-2 OS人類骨肉瘤細胞移動的實驗結果。通過filter的細胞用crystal violet染色、照相計數。用Student's t test分析，實驗組與對照組比較,差異有統計意義 (\* $p < 0.05$ )。

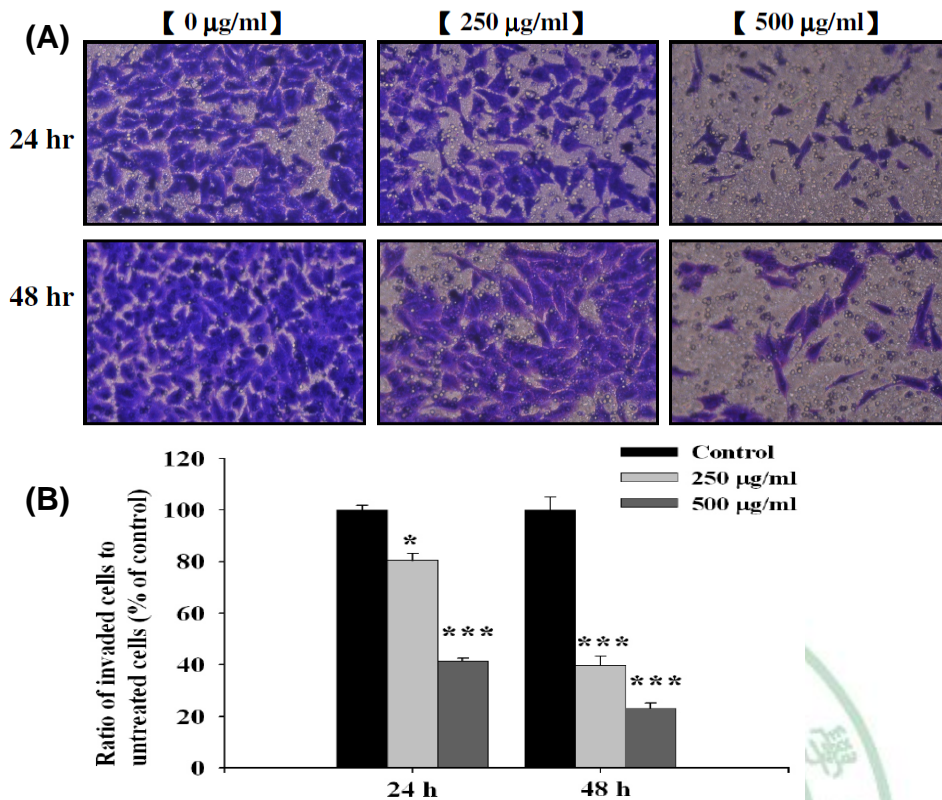


圖4.16 抑制U-2 OS細胞轉移侵入的實驗結果

山菜萸水粗抽抑制U-2 OS人類骨肉瘤癌細胞轉移侵入的實驗結果。通過filter的細胞用crystal violet染色、照相計數。用Student's t test分析，實驗組與對照組比較,差異有統計意義 (\* $p < 0.05$ )。

#### 4.2.4 山菜萸水粗抽抑制 U-2 OS 人類骨肉瘤癌細胞 MMP-2、MMP-9 的活性的實驗 — gelatin zymography.

用 gelatin zymography 來進行山菜萸水粗抽抑制 U-2 OS 人類骨肉瘤癌細胞 MMP-2、MMP-9 的活性的實驗，因為癌細胞轉移時需要基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases)來分解細胞間質 (ECM)，細胞間質分解後，癌細胞才能轉移出去。利用 MMP-2、MMP-9 會分解 gelatin 的特性，MMP-2、MMP-9 活性愈強所分解的 gelatin 就會較多，依 SDS-PAGE 上被分解的白色區塊，來判斷 MMPs 的活性強弱。實驗結果發現，細胞在各種濃度山菜萸水粗抽誘導後，可明顯看到 MMP-9 與 MMP-2 的活性均被抑制 (圖 4.17)。可見 MMP-2、MMP-9 在 U-2 OS 人類骨肉瘤癌細胞中，被山菜萸水粗抽 down-regulated。

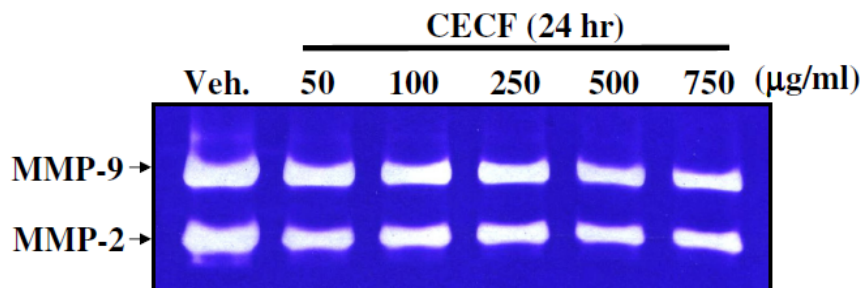


圖4.17 抑制U-2 OS MMP-2、MMP-9的活性的實驗結果

山茱萸水粗抽抑制U-2 OS人類骨肉瘤癌細胞MMP-2、MMP-9的活性的實驗結果。(用densitometric analysis)

#### 4.2.5 山茱萸水粗抽影響U-2 OS人類骨肉瘤癌細胞移動與轉移侵入(migration and invasion)相關蛋白的實驗結果

此實驗是用Immuno-staining和Western blotting西方墨點法來研究癌細胞移動與轉移侵入的相關蛋白，結果呈現在圖4.18、4.19。人類骨肉瘤癌細胞用山茱萸水粗抽處理24小時後，用Immuno-staining 得知NF- $\kappa$ B p65, Rho A 和 ROCK-1等蛋白在細胞質中皆被山茱萸水粗抽抑制(圖4.18)。在Western blotting西方墨點法得知，相關蛋白如FAK, PKC, SOS1, MKK7, MEKK3, GRB2 (圖4.19A), NF- $\kappa$ B p65, COX-2, HIF-1 $\alpha$ , PI3K, GRB2, Rho A, ROCK-1, IRE-1 $\alpha$  (圖4.19B), p-JNK1/2, p-ERK1/2, p-p38, Ras, p-PERK (圖4.19C), MMP-2, MMP-9 and VEGF (圖4.19D)等，在山茱萸水粗抽處理的細胞都比對照組低。

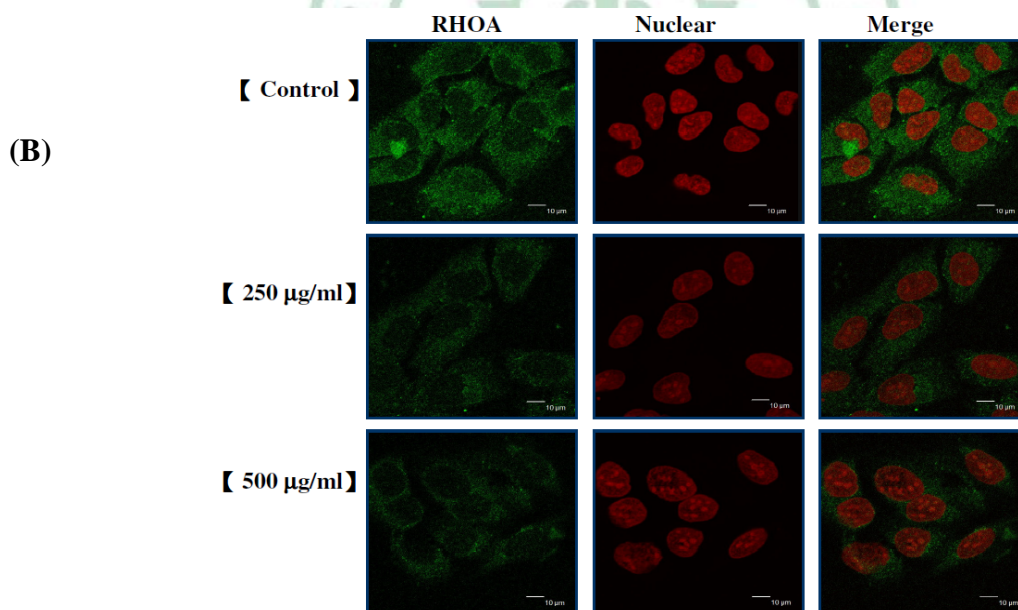
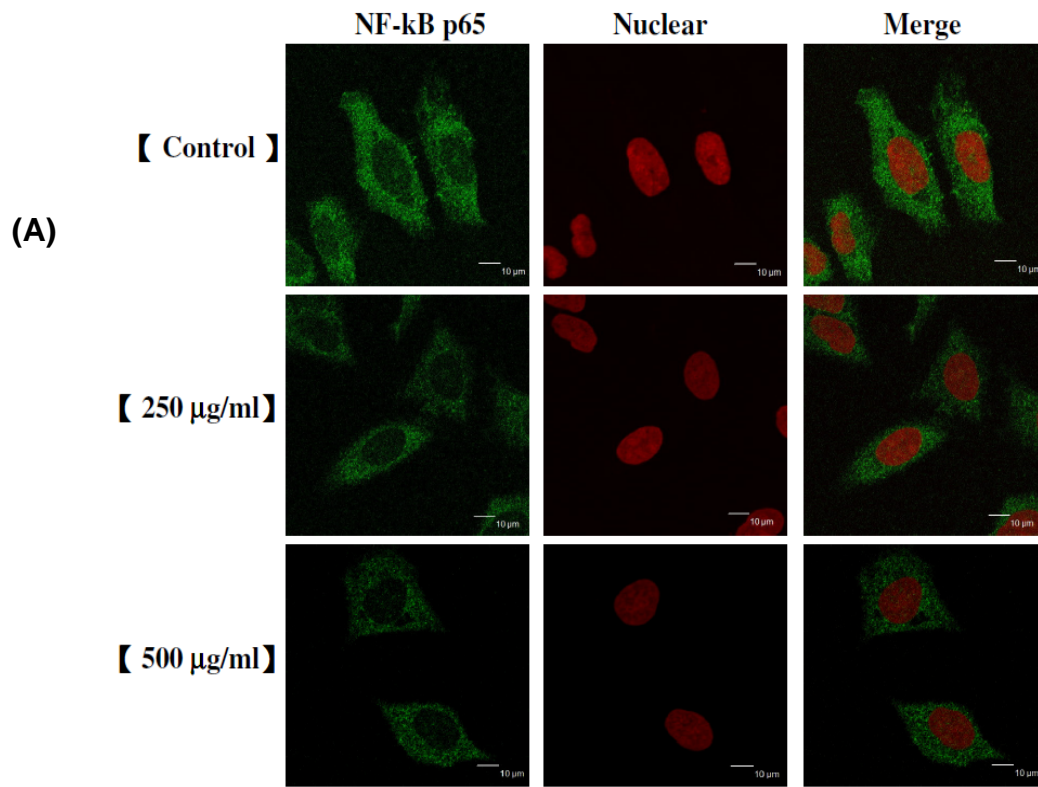


圖4.18 U-2 OS細胞移動與轉移侵入相關蛋白  
 山茱萸水粗抽影響U-2 OS人類骨肉瘤癌細胞移動與轉移侵入(migration and invasion)相關蛋白NF- $\kappa$ B p65, Rho A 和 ROCK-1表現的實驗結果。

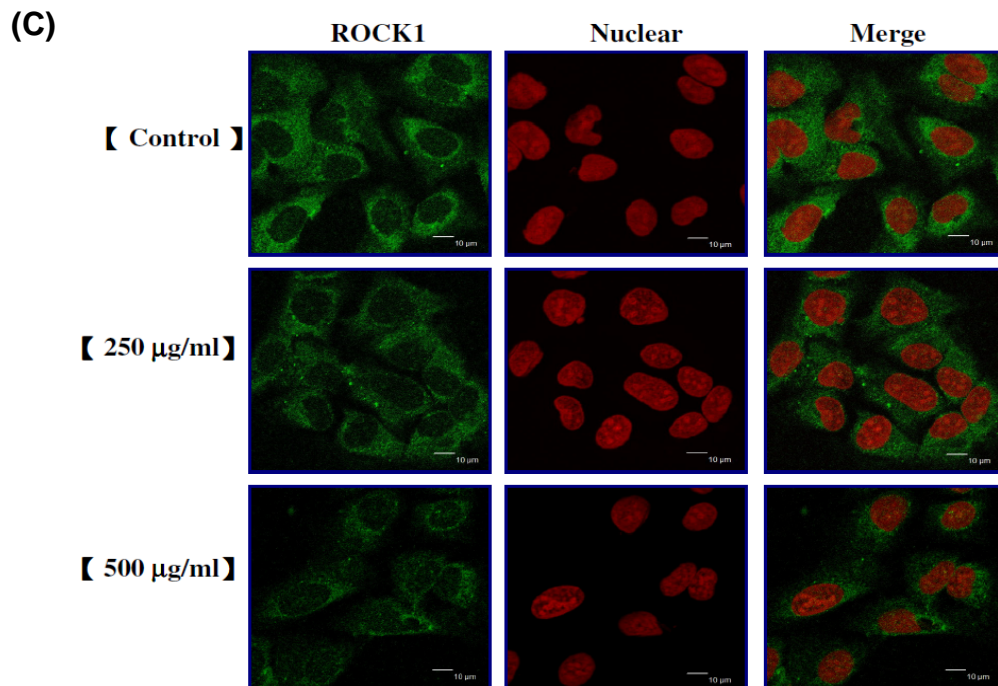


圖4.18 (續)

### 4.3 沒食子酸對人類骨肉瘤細胞株抑制轉移

#### 4.3.1 沒食子酸(Gallic acid)對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性與細胞數目之影響

人類骨肉瘤細胞用各種濃度沒食子酸(5, 10, 20 和 40  $\mu$ M)處理24 和 48小時.收集細胞，用PI exclusion 和流式細胞儀檢測細胞活性。將細胞用 trypan blue 染色，再用Countess Automated Cell Counter (Invitrogen)來計算細胞數目.圖4.20A 顯示用40  $\mu$ M 沒食子酸處理人類骨肉瘤細胞時，細胞活性有下降 (與對照組比較在24和48小時各為86% 和78%.  $p < 0.05$ )。圖4.20B顯示用40  $\mu$ M 沒食子酸處理人類骨肉瘤細胞時，比較0-小時處理的對照組，細胞數目有下降( $p < 0.05$ )。

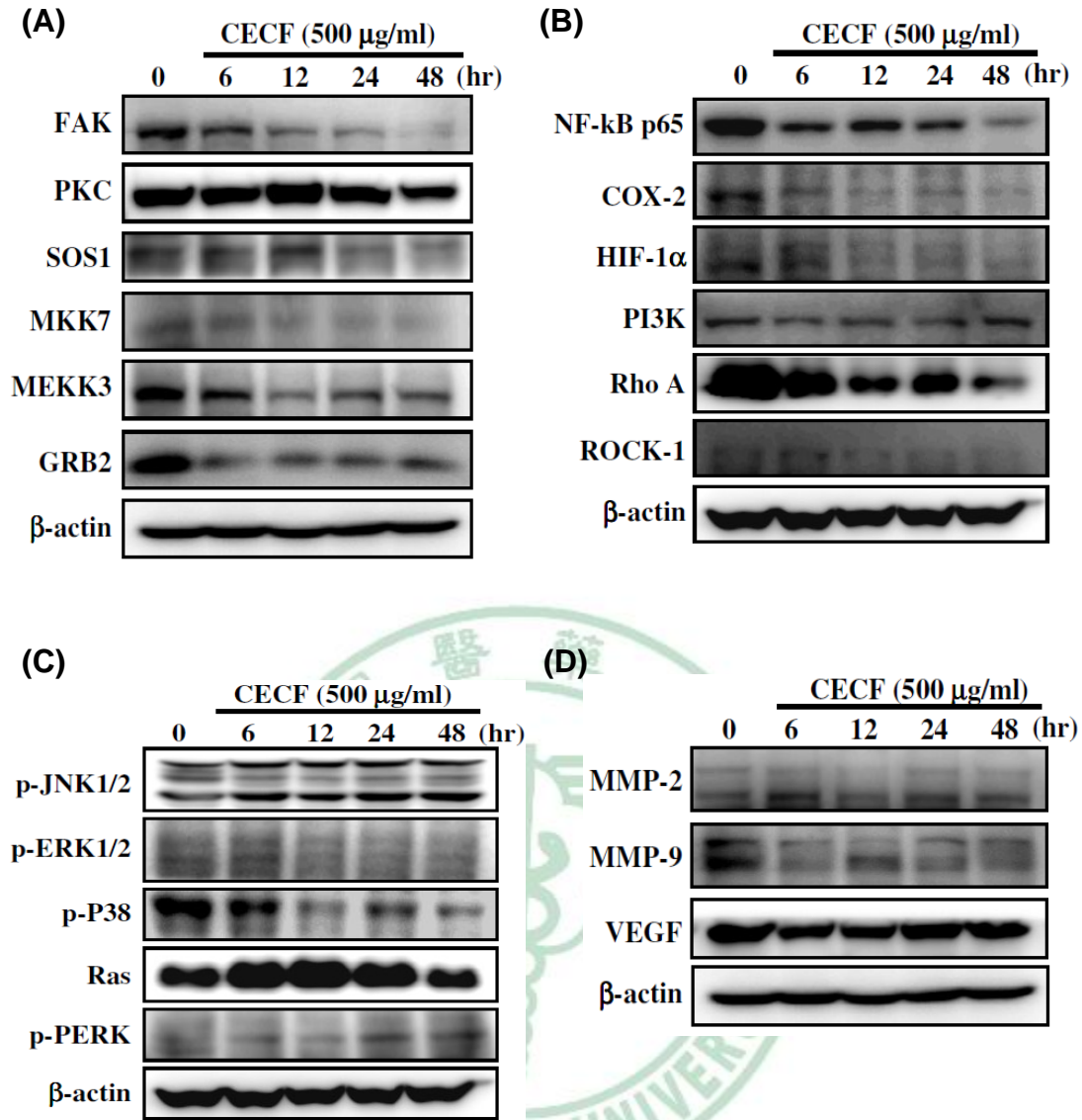


圖4.19 Western blotting檢測移動與轉移侵入相關蛋白

用Western blotting方法檢測山茱萸水粗抽影響U-2 OS人類骨肉瘤癌細胞移動與轉移侵入(migration and invasion)相關蛋白表現的實驗結果。所檢測的蛋白如下:FAK, PKC, SOS1, MKK7, MEKK3, GRB2 (A), NF-κB p65, COX-2, HIF-1α, PI3K, Rho A, ROCK-1 (B), p-JNK1/2, p-ERK1/2, p-p38, Ras, p-PERK (C), MMP-2, MMP-9 和 VEGF (D)。

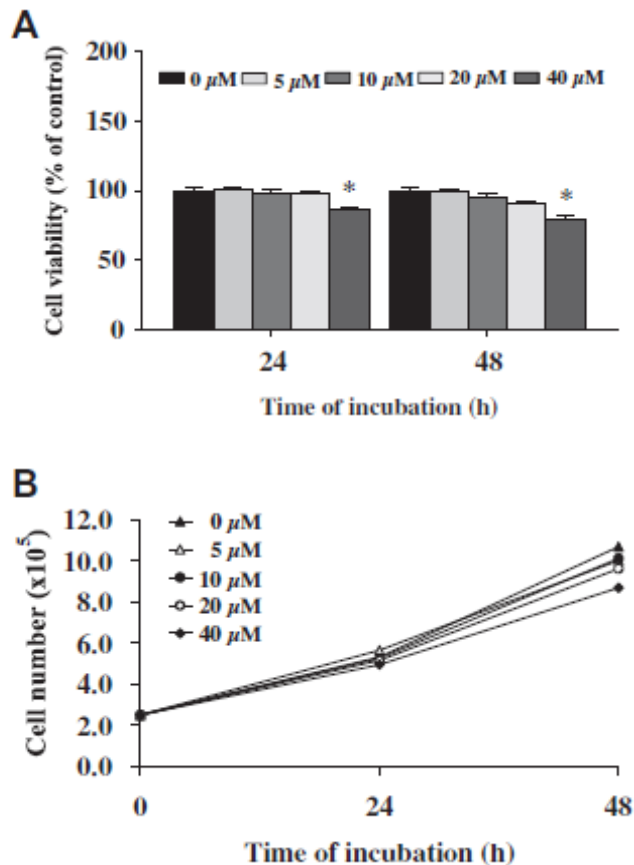


圖4.20. 沒食子酸對U-2 OS細胞活性與細胞數目之影響

沒食子酸(Gallic acid)對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞活性與細胞數目之影響。(A) 細胞活性的下降 (B)細胞數目的下降。

#### 4.3.2 檢測沒食子酸(Gallic acid)對人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞移動(Migration)及細胞轉移侵入(Invasion)的影響

本實驗以 Boyden chamber assay 觀察細胞移動的情形，以沒食子酸，經 24 及 48 小時誘導後對人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞移動及侵入能力之影響。實驗結果發現，在濃度 20 μM 及 40 μM 時沒食子酸均可抑制 U-2 OS 細胞移動及侵入的能力 (圖 4.21)。圖 4.21 A 為 migration assay 實驗結果發現，在濃度 20 μM 及 40 μM 時沒食子酸有抑制細胞移動的能地。而圖 4.21B 數據量化為用濃度 20 μM 及 40 μM 的沒食子酸處理，其抑制率分別為 40 - 84% 和 60 - 92%。圖 4.21C 為 invasion assay 實驗結果發現，對照組在沒有沒食子酸存在時，人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞會由 upper chamber 跑到 lower chamber。再有沒食子酸存在時，此種 invasion 會被抑制。其抑制率

在濃度 20  $\mu\text{M}$  及 40  $\mu\text{M}$  的沒食子酸處理時，其抑制率分別為 60 - 90% 和 66 - 94%。

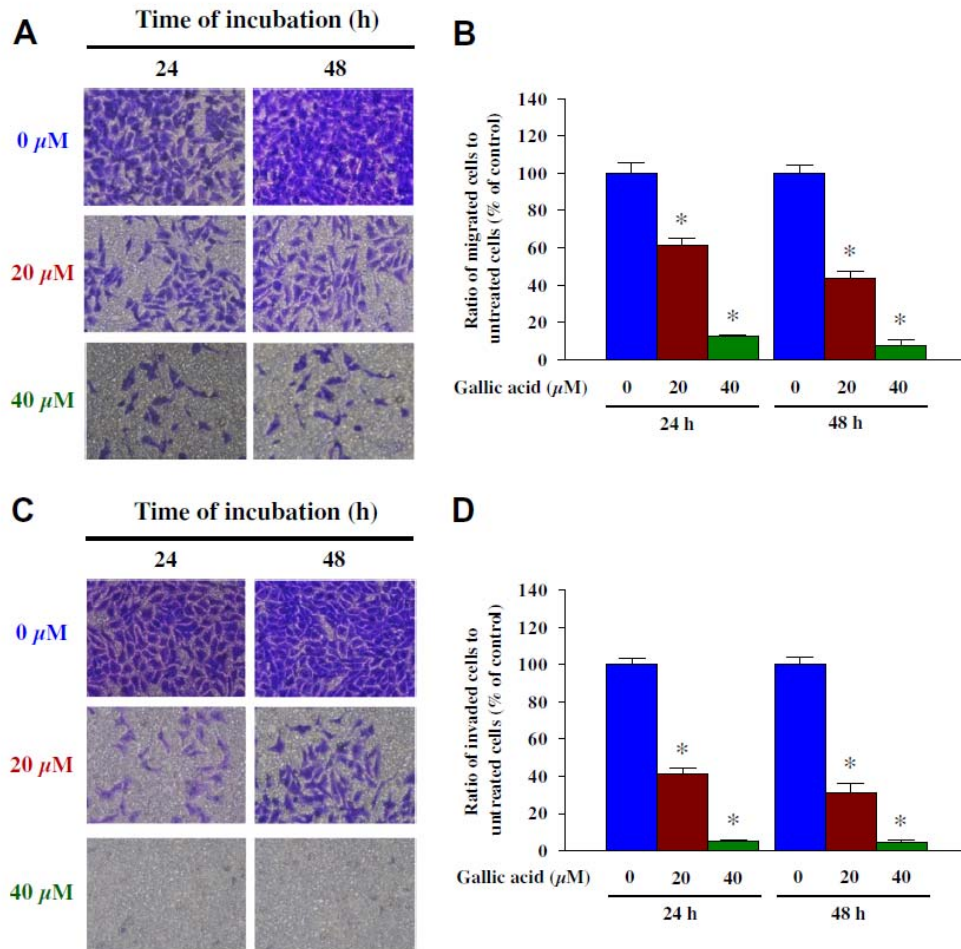


圖4.21 沒食子酸對U-2 OS細胞移動及轉移侵入的影響

檢測沒食子酸(Gallic acid)對人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞移動 (Migration) 及細胞轉移侵入(Invasion)的影響。A、B 為migration assay。C、D為 invasion assay。

### 4.3.3 基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs) 活性測定- Gelatin gel zymographic assay

癌細胞轉移時需要基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases)來分解細胞間質 (ECM)，利用MMP-2、MMP-9會分解gelatin的特性，進行gelatin zymography試驗，活性強所分解的gelatin就會較多，依SDS-PAGE上被分解



的白色區塊，來判斷MMPs的活性強弱。實驗結果發現，細胞在濃度10、20、30及40  $\mu\text{M}$ 的沒食子酸誘導24和48小時後，可明顯看到MMP-9與MMP-2的活性均被抑制(圖4.22)。

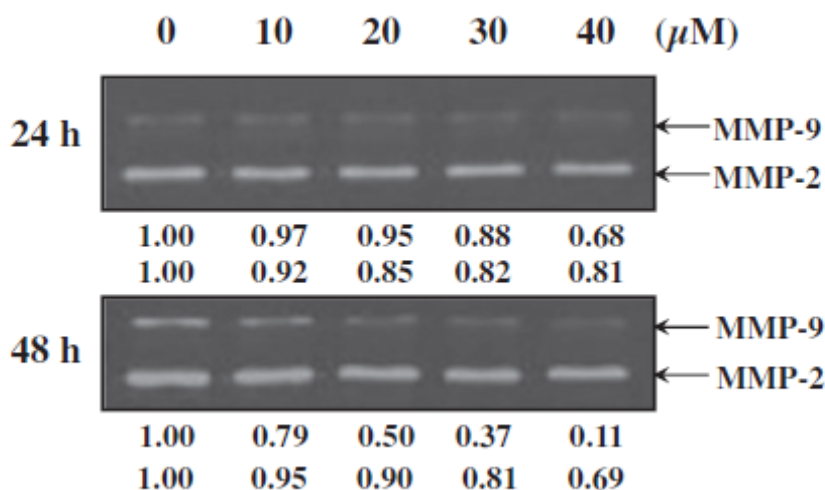


圖4.22 MMPs活性測定

基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs) 活性測定。實驗結果發現，細胞在濃度10、20、30及40  $\mu\text{M}$ 的沒食子酸誘導24和48小時後，可明顯看到MMP-9與MMP-2的活性均被抑制。MMP-9與MMP-2的活性由NIH ImageJ 軟體量化。實驗各做三次求其平均值與標準差。

#### 4.3.4 檢測沒食子酸對 U-2 OS 細胞株藉由西方點墨法分析細胞轉移相關蛋白活性檢測

沒食子酸以濃度20及40  $\mu\text{M}$ 處理人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞，經24小時之後，收集細胞，以西方點墨法檢測得知，人類骨肉瘤細胞經沒食子酸處理後，一些轉移相關蛋白活性被抑制。如 GRB2, PI3K, AKT, PKC, NF- $\kappa$ B p65 (圖4.23 A), p38, ERK1/2, JNK, MMP-2, MMP-9 (圖4.23 B), p-p38, p-ERK1/2 and p-JNK (圖4.23 C)。ERK signaling 可up-regulate MMPs的表現；而沒食子酸可抑制ERK1/2 (圖4.23 B), p-ERK1/2 (圖4.23C) 和 AKT/PKB (圖4.23A), 可知沒食子酸可抑制人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞的 ERK 和 PI3K/AKT signaling pathways 。

p38, JNK, ERK1/2 和 PI3K/AKT 與蛋白質磷酸化有關，由圖4.23C 得知沒食子酸可抑制人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞的p-p38, p-ERK1/2 和

p-JNK。由圖4.23D 得知沒食子酸可抑制人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞MMP-2 和 MMP-9的mRNA表現，且與濃度成正相關。而此又由圖4.22 的gelatin zymographic 和 Western blotting analyses 確認。綜上所述我們可說沒食子酸可抑制人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞MMP-2 和 MMP-9的蛋白質和mRNA 的level表現。

#### 4.3.5. 沒食子酸(Gallic acid)影響人類骨肉瘤(U-2 OS) 細胞AKT/PKB、IKK 及PKC激酶活性下降之表現

U-2 OS細胞經不同濃度沒食子酸(0、5、10、20、40和80  $\mu$ M)處理6小時後，收集細胞，以kinase assay檢測沒食子酸對AKT/PKB、IKK及PKC激酶活性的表現結果呈現在圖4.24。當沒食子酸在濃度為10, 20, 40 and 80  $\mu$ M 時會抑制AKT/PKB活性(圖4.24A)。當沒食子酸在濃度為20, 40 and 80  $\mu$ M 時會抑制IKK活性(圖4.24B)，當沒食子酸在濃度為5, 10, 20, 40 and 80  $\mu$ M時會抑制PKC活性(圖4.24C)。



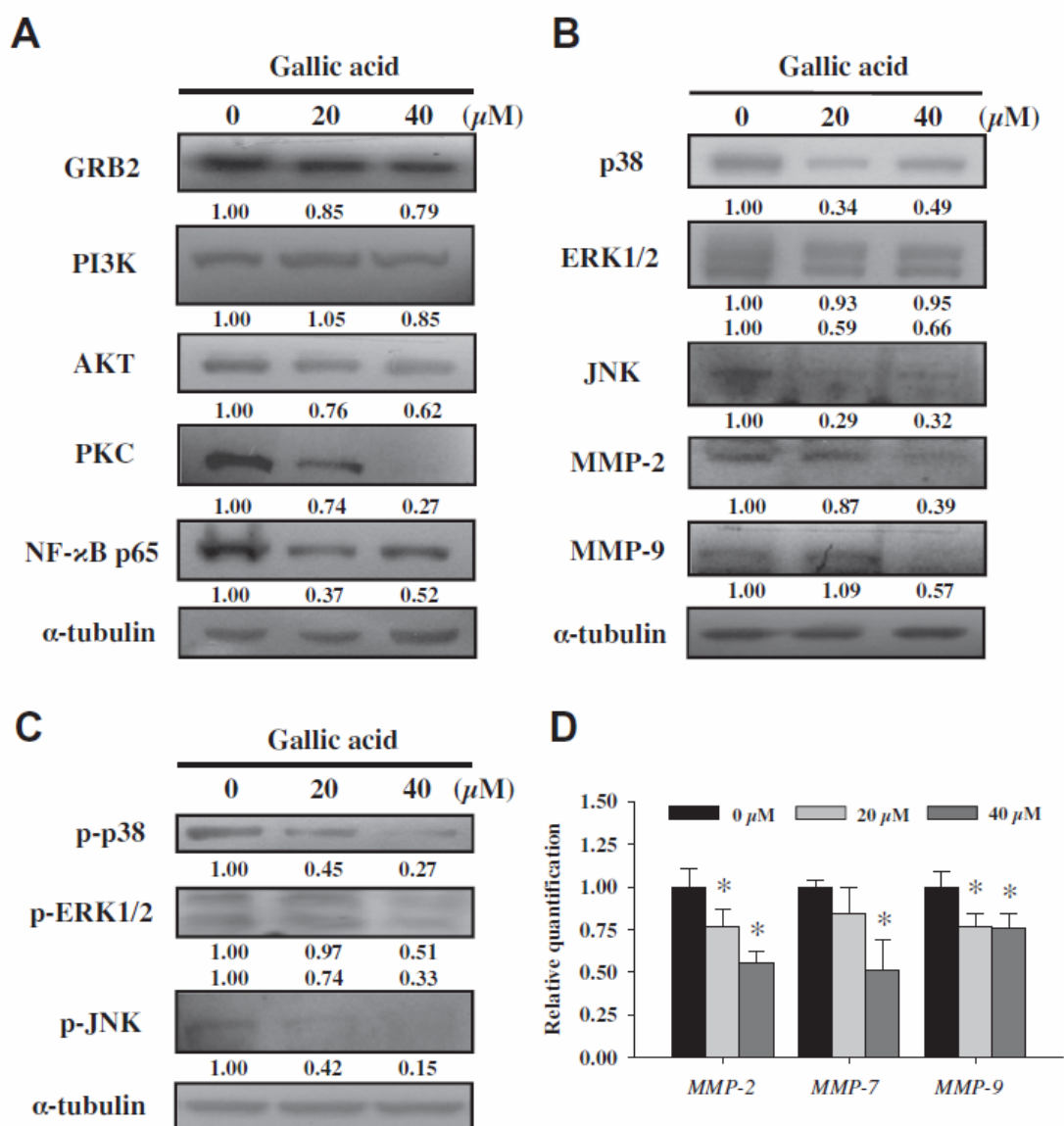


圖4.23 . 沒食子酸對U-2 OS轉移相關蛋白活性和基因表現檢測

沒食子酸對U-2 OS細胞轉移相關蛋白活性和基因表現檢測。我們用 SDS - PAGE 和 Western blotting 檢測(A) GRB2, PI3K, AKT, PKC, NF- $\kappa$ B p65, (B) p38, ERK1/2, JNK, MMP-2, MMP-9, (C) p-p38, p-ERK1/2 和 p-JNK 。 (D) 圖中我們測MMP-2, -7, -9 的基因level 表現，做三次求其平均值  $\pm$  標準差，  $p < 0.05$  為統計有意義。

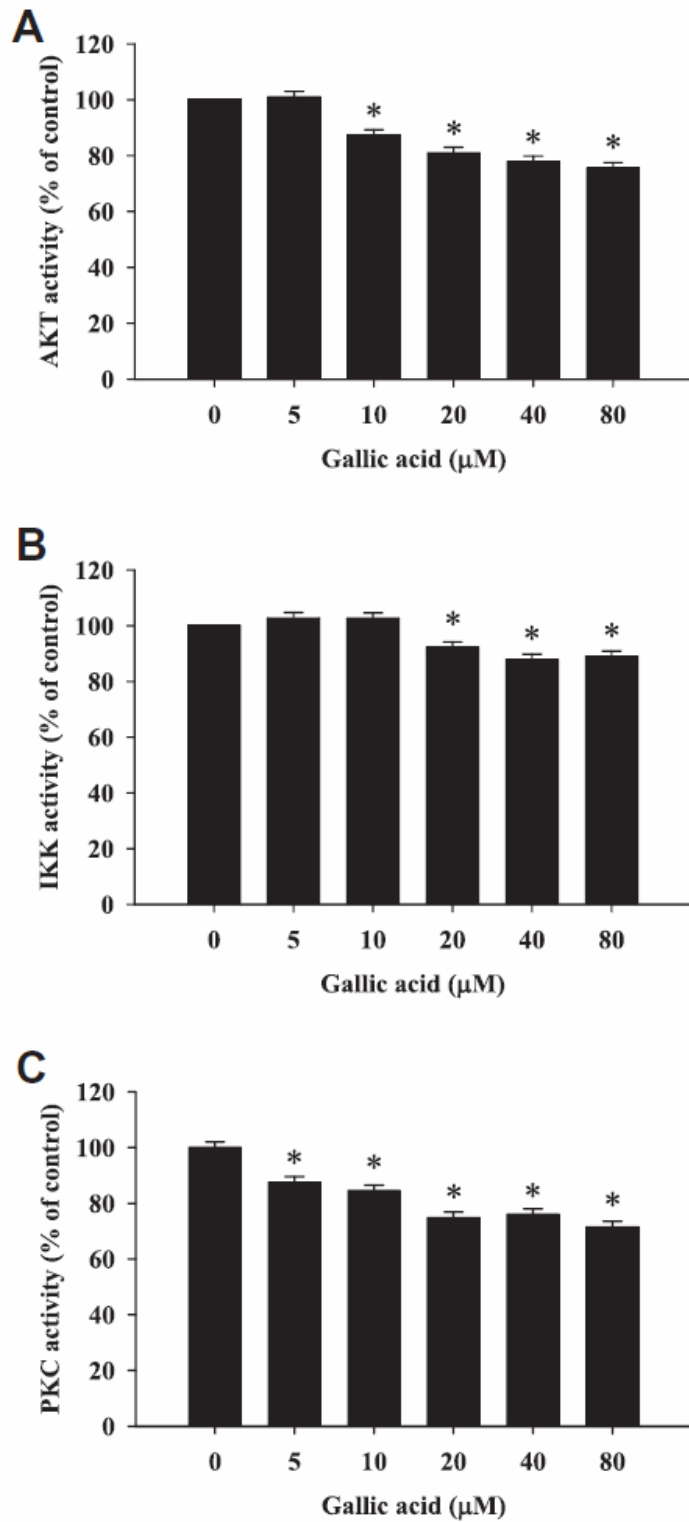


圖4.24 U-2 OS細胞株AKT、IKK及PKC激酶活性下降之表現

沒食子酸(Gallic acid)影響U-2 OS細胞株AKT、IKK及PKC激酶活性下降之表現。不同濃度沒食子酸(0、5、10、20、40和80  $\mu\text{M}$ )處理人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞後，檢測AKT/PKB (A),IKK (B)和 PKC (C)的活性做三次實驗求其平均值  $\pm$  標準差， $p < 0.05$  為統計有意義。

綜合以上所述，我們提出沒食子酸(Gallic acid)可能抑制 U-2 OS 細胞株細胞轉移的機轉(圖 4.25)。

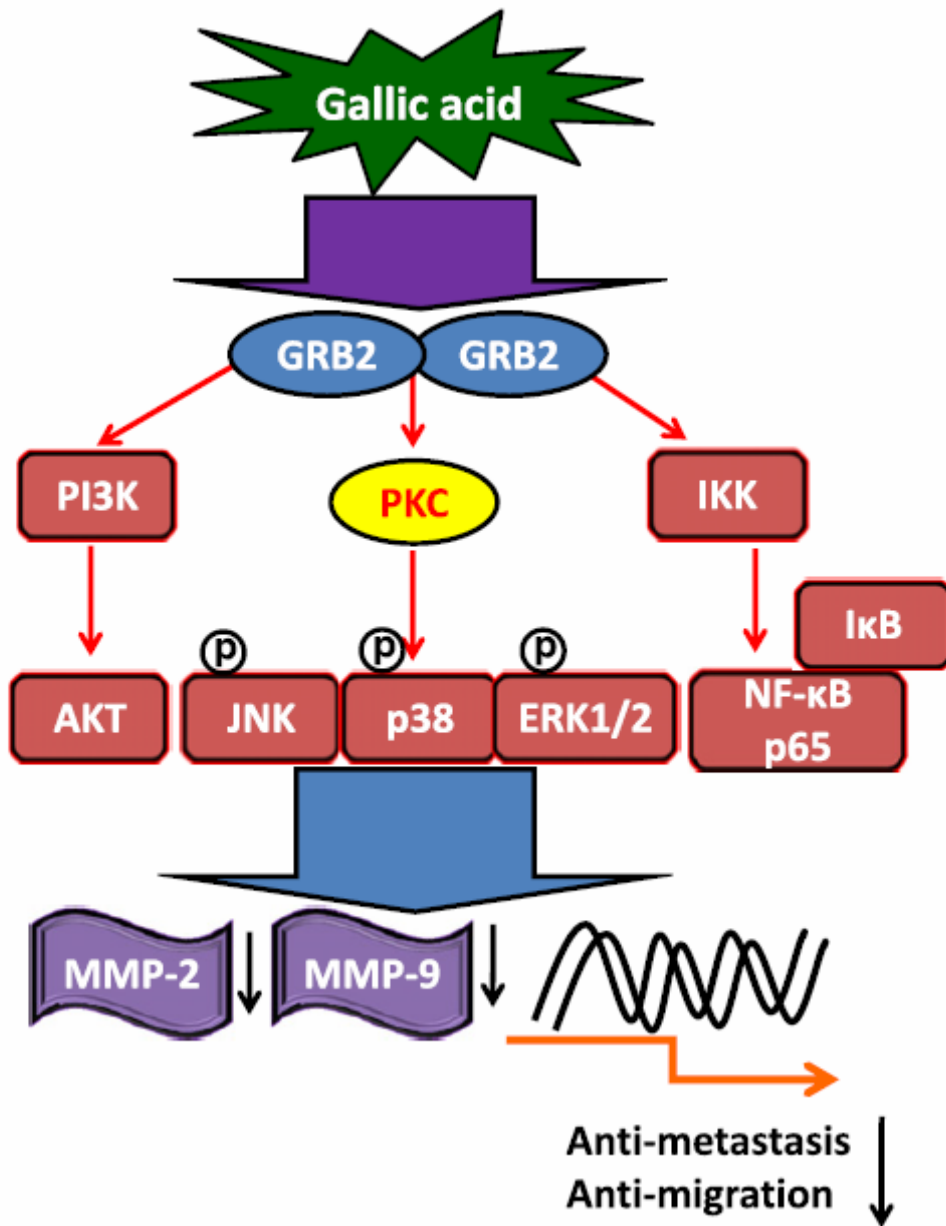


圖 4.25 沒食子酸(Gallic acid)可能抑制 U-2 OS 細胞株細胞轉移的機轉

## 第五章 討論

由山茱萸治療過的U-2 OS 細胞，我們有如下發現：1) 山茱萸水萃抽物引起U-2 OS 細胞的毒殺作用，且隨著濃度越高，效用越強。(圖4.1); 2) 山茱萸水萃抽物造成U-2 OS 細胞的DNA damage 與細胞核濃染，且隨著濃度越高，效用越強。(圖4.3、4.4); 3) 山茱萸水萃抽物造成U-2 OS 細胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest, sug-G1 phase (細胞凋亡)(圖4.2) 此現象是由DAPI staining呈現的(圖4.4); 4) 由流式細胞儀可見山茱萸水萃抽物促使ROS和 Ca<sup>2+</sup> 的產生增加，同時也使粒線體的膜電位差( $\Delta\Psi_m$ )下降(圖4.5); 5) 山茱萸水萃抽物 caspase-3, -8 and -9 的活性增加(圖4.6、4.7); 6) 由Western blotting 可發現山茱萸水萃抽物造成一些protein levels的增加如caspase-3, caspase-9, Bax, cytochrome c, GRP78, AIF, ATF-6 $\alpha$ , Fas, TRAIL, p21, p27, p16而這些蛋白質的增加也促使細胞週期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest 與細胞凋亡(圖4.8)。

如果一種藥物能造成癌細胞凋亡，則此藥物就有可能用來作為治療癌症的藥物[114]。細胞凋亡包括外在和內在路徑(extrinsic and intrinsic pathways) [115-117]，外在路徑包括 specific ligand、surface receptors (CD95/Fas), tumor necrosis factor (TNF) 和 death receptors, 而內在路徑是經由DNA damage, cellular distress, hypoxia 和 cytotoxic agents 等的作用 [116, 118, 119]。近年來也有其他路徑的發現，如endoplasmic reticulum (ER) stress pathway，此路徑是經由粒線體和內質網的交互作用(interaction between the mitochondria and ER) [120-124]。再本研究中，我們用flow cytometry assay 發現山茱萸水萃抽物促使U-2 OS cells的ROS和 Ca<sup>2+</sup> 的產生增加，同時也使粒線體的膜電位差( $\Delta\Psi_m$ )下降(圖4.5) 在許多實驗顯示，ROS在癌細胞的凋亡初期扮演重要的角色[125, 126]。如果一種藥物能使癌細胞粒線體的膜電位差( $\Delta\Psi_m$ )下降，則此藥物就能經由mitochondria-dependent pathway促使粒線體生成釋放AIF, Endo G，再經由caspase-independent pathway [127-130]造成癌細胞的凋亡。如此一來山茱萸水萃抽物造成U-2 OS癌細胞的凋亡經由的路徑包括caspase-dependent 和 caspase-independent pathways。再者，由我們的研究顯示山茱萸水萃抽物增加 pro-apoptotic protein BAX (圖4.8)，減少 anti-apoptotic protein XIAP (圖4.8)。而Bax/Bcl-2的比率與粒線體的膜

電位差( $\Delta\Psi_m$ )有關，Bax/Bcl-2的比率的改變也決定癌細胞走向凋亡或存活。[131-135]. 許多研究顯示，位於粒線體膜上的Bax, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-2, 和 Bid 可改變粒線體膜的通透性，使caspases activation而造成細胞凋亡 [136]. 我們的研究顯示山茱萸水萃抽物促使U-2 OS cells的ROS和  $Ca^{2+}$  的產生增加，同時也使粒線體的膜電位差( $\Delta\Psi_m$ )下降而促使U-2 OS細胞凋亡。抗癌藥物促進癌細胞的ROS generation造成粒線體損傷、癌細胞死亡，所以 ROS的作用可視為一種apoptotic signaling molecule [137, 138].

許多研究顯示山茱萸水萃抽物能引起細胞毒殺作用而造成細胞數目減少。而有些報告山茱萸水萃抽物有抗癌作用[23, 139, 140]. 然而山茱萸水萃抽物對細胞的移動和轉移的功能和機轉並不清楚。所以我們也做了山茱萸水萃抽物抑制人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞移動(圖4.14)和轉移侵入(圖4.15、4.16)的研究。我們用wound healing assay和 Millicell chambers (uncoated或matrigel-coated)來做細胞移動和轉移侵入的實驗，結果顯示山茱萸水萃抽物對人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞的移動和轉移侵入有抑制作用 (圖4.14、4.15、4.16)。另外我們用gelatin zymography assay發現，山茱萸水萃抽物也抑制MMP-2 和 -9 的活性(圖4.17).而此兩種蛋白(MMP-2, -9)在癌細胞的移動和轉移侵入上扮演重要的角色 [141]。也有很多研究報告MMP家族跟腫瘤癌細胞移動和轉移侵入、以及腫瘤的轉移有相關[112, 113, 141, 142]。我們用Western blotting assay來做蛋白質level的檢測，我們發現山茱萸水萃抽物能抑制MMP-2 and -9的蛋白質體表現。我們也發現山茱萸水萃抽物能抑制人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞的FAK level和其下游調控的一些kinases如ERK1/2、JNK 和p38等。有些研究顯示FAK/Src signaling能促進細胞的移動和轉移侵入所以與腫瘤的轉移也有相關[143, 144]。由這些結果得知山茱萸水萃抽物能經由調控FAK/Src和ERK1/2來抑制人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞的轉移。有其他報告如果腫瘤細胞活化其FAK (Tyr 397)/Src (Tyr 416)，就可以將活化的訊號往下傳遞，如PI-3K/AKT 和 Ras/ERK1/2 cascades；而在我們的實驗中，山茱萸水萃抽物可以抑制PI-3K。在加上如圖4.18 所示，山茱萸水萃抽物也可以使NF- $\kappa$ B下降，所以我們認為山茱萸水萃抽物能夠抑制MMP-2和-9的活性是經由ERK1/2MAPK 和 NF- $\kappa$ B 兩個訊息傳遞路徑。

當然需要更多的研究來做佐證。

另外在圖4.19我們又發現山茱萸水萃抽物可由抑制growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), FAK, Src和 Rho，再向下調控抑制MMP-2和-9的活性。此種調控是因為藉由產生FAK/Src complex，使Src能夠磷酸化FAK，再影響到與GRB2的交互作用，進而活化Ras-ERK signaling pathway [145]。而對Rho蛋白的調控也跟腫瘤細胞的轉移有關[146]。由此可見山茱萸水萃抽物能夠有效的抑制人類骨肉瘤(U-2 OS)細胞內的ERK/Rho訊息傳遞。

既然發現山茱萸水萃抽物對U-2 OS cells有抗癌作用，所以我們繼續探討其主成分gallic acid的抗癌與抑制腫瘤轉移的能力。腫瘤轉移是經由一系列的步驟，包括血管新生,細胞attachment, invasion, migration 和細胞proliferation,而其調控機轉是複雜的[147].許多研究也努力發展抑制轉移的藥物，但這些抑制轉移的藥物的效果常是不明確的[147]。

在正常的骨頭中，matrix會被degraded 並且會被新的matrix取代，此過程是藉由骨骼的degradation 和 synthesis協調平衡維持[148]。此過程也需要一些proteolytic enzymes如matrix metalloproteinases (MMPs)[149]. Krupitza et等發現gallic acid對於lymphendothelial cells (LECs) gap formation沒有作用，且對cell migration 也沒有影響[150]。本實驗中，我們使用Boyden chamber assay來量化human osteogenic sarcoma U-2 OS 細胞的 migratory potential，以探討GA對於癌細胞的抗轉移機轉。結果發現GA在*in vitro* 中可抑制U-2 OS細胞的migration 和invasion ability(圖4.21).由我們的實驗結果得知，GA可經由抑制人類骨肉瘤癌細胞的migration和invasion而有抗癌的作用。

MMPs 在腫瘤的血管新生、轉移和刺激ECM分泌釋出生長因子等方面都扮演重要的角色[151, 152].許多實驗驗證抑制MMP的基因表現或是酵素的活性，即可達到預防腫瘤轉移的效果[153].有些報告也發現MMP-2 (72-kDa gelatinase A) 和 MMP-9 (92-kDa gelatinase B)也和癌細胞的invasive metastatic potential有關。近來也發現MMP-2 和 MMP-9存在人類骨肉瘤癌細胞[154, 155].因為GA抑制人類骨肉瘤癌細胞的migration 和



invasion，所以我們認為gallic acid 有抑制腫瘤轉移的效果。以下的一些發現可支持上述說法，首先，gallic acid 可抑制人類骨肉瘤細胞內MMP-2 和 MMP-9的蛋白質活性(圖4.22)，而MMP-2 和 MMP-9對extracellular matrix 有degradation的能力，也影響到癌細胞的migration 和 invasion [153]. 另外沒食子酸也抑制MMP-2 and -9的mRNA levels (圖4.23). 再者，沒食子酸能直接抑制 MMP-2 和 MMP-9 的 protein levels (圖4.23).最後沒食子酸也抑制 ERK1/2 的levels，而ERK1/2在促使腫瘤invasion和 metastasis的ERK signaling pathway扮演key molecules的重要角色。本實驗中gallic acid 也使 AKT and JNK的protein levels下降(圖4.23). 大部分的integrins 活化MAPK 和 PI3K，也造成AKT/PKB的活化[148, 153, 156].我們先用JNK inhibitor (SP600125)預處理人類骨肉瘤細胞，再加入沒食仔酸，而造成MMP-2 and MMP-9 protein levels的下降.我們也發現gallic acid 抑制 AKT/PKB, IKK 和 PKC的levels (圖4.24) 而這些與MMP-2 和 MMP-9 mRNA levels、protein levels(圖4.23) 的抑制有關。上述這些結果都顯示gallic acid 有減少人類骨肉瘤細胞migration的效果。

為了更清楚呈現沒食子酸的抑制癌細胞invasion 和 migration的效果，我們用gelatin zymography assay來偵測人類骨肉瘤細胞內MMP-2 和 MMP-9的活性。結果顯示gallic acid 對MMP-2 和MMP-9的活性有 down-regulated的效果，且是dose-dependent。此結果證明gallic acid 的抑制腫瘤轉移的效果，與抑制人類骨肉瘤細胞轉移的enzymatically degradative processes有關。(圖4.23). 本篇實驗顯示如果gallic acid 釋放到骨骼組織的濃度介於20到40 IM，就有預防骨癌細胞轉移的效果。

本篇研究結果發現，沒食子酸降低PI3K, AKT/PKB, NF- $\kappa$ B, MMP-2 和 MMP-9等的protein levels。而PI3K的活化刺激調控AKT/PKB，而AKT/PKB扮演多種重要的角色，包括cell invasion[157]。沒食子酸也抑制AKT/PKB的活性(圖4.24)且也降低人類骨肉瘤細胞內的PKC, p38 和 JNK的levels (圖4.23). 許多報告顯示PKC的活化能造成蛋白質translocation到細胞膜，再經由MAPK 和 PI3K signaling pathways來調控一些transcription factors 如 NF- $\kappa$ B 或 Sp-1，由此來影響MMP-9的表現[158, 159]. Gallic acid 抑制 PKC的活性(圖4.24)，因此控制NF- $\kappa$ B以調控PI3K/AKT and MAPK (ERK1/2,

p38 and JNK) pathways，此也會參予沒食子酸對 MMP-2 and -9 expression 的抑制和人類骨肉瘤細胞的invasion.也有些研究顯示PI3K活化刺激調控 AKT/PKB，此機轉也扮演一些重要的角色，包括cell invasion [160, 161].有些研究報告發現活化ERK 和 AKT/PKB 也會造成 endometrial cancer 的生成[159].由以上這些研究發現沒食子酸有多重抗腫瘤轉移的功能，且有 cytotoxic effect.因此未來可研發為骨癌的抗癌、抗轉移藥物。



## 第六章 結論

山茱萸水萃抽物經由細胞週期G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest、細胞凋亡，而造成人類骨肉瘤細胞的毒殺作用。而其作用機轉可由粒線體的dysfunction 以活化 caspase-9 和 caspase-3; 也可促使粒線體釋出AIF 和 Endo G; 或是造成 caspase-8活化而引起細胞凋亡; 或是經由ROS 的生成引起細胞凋亡。除此之外，山茱萸水萃抽物也可以抑制人類骨肉瘤細胞的移動和侵入,其機轉主要是藉由調控FAK, PKC, SOS1, MKK7, MEKK3, GRB2, NF- $\kappa$ B p65, COX-2, HIF-1 $\alpha$ , PI3K, GRB2, Rho A, ROCK-1, IRE-1 $\alpha$ , p-JNK1/2, p-ERK1/2, p-p38, Ras, p-PERK 和 VEGF的表現，再進一步抑制人類骨肉瘤細胞內 MMP-2 和 MMP-9的活性和蛋白質體的表現。

山茱萸水萃抽物富含沒食子酸gallic acid，而由本篇研究得知沒食子酸能有效地抑制人類骨肉瘤細胞的 migration 和 invasion, 也驗證其作用的分子機轉。gallic acid 抑制 AKT/PKB, IKK 和 PKC 的活性，且隨著濃度越高效果越強。可能的 signaling pathways 描述在圖4.25，沒食子酸抑制人類骨肉瘤細胞的 migration 和 invasion的機轉可能經由下調PKC, 阻斷MAPK, PI3K/AKT 和 NF- $\kappa$ B pathways，造成抑制 MMP-2 and MMP-9 的結果。

綜上所述，在離體試驗(*in vitro*)中，山茱萸水萃抽物及其成份沒食子酸對人類骨肉瘤細胞有細胞毒殺作用、抑制細胞生長、抑制癌細胞轉移侵入。將來進一步研究考量做生體試驗(*in vivo*)，做動物試驗、甚至人體試驗，以驗證山茱萸是否可做為治療人類骨肉瘤的新選擇方向。

## 參考文獻

1. 駱建平, 癌症的中醫學病因病機及辨證論治 醫學資訊 MEDICAL INFORMATION, 2010 9:2637-2638.
2. 程德懷, 中醫對癌症病因的認識及防治措施 長春中醫藥大學學報 Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2010. 1126 8:511-512.
3. 胡凱文, 衛., 癌症的中醫詮釋及相關病名辨析. 中華中醫藥雜誌, 2011. 26.1.
4. 王文萍, 呂.安.呂., 腫瘤中醫病機各家雜談 環球中醫藥 GlobalTraditionalChineseMedicine, 2010. 13 - 13:225-226.
5. 何純陽, 漫話中醫中藥治療癌症 中國中醫藥現代遠程教育. 8 (16).
6. 馬 瑞, 章., 章永紅教授治療惡性腫瘤經驗探析 福建中醫藥 Fujian Journal of TCM, 2011. 42 (2):26-27.
7. 楊曉嬌, 張., 淺談中醫藥治療腫瘤的作用與機制. Seek Medical And Ask The Medicine, 2012 10 - 9.
8. Talei, D., A. Valdiani, and M.P. Abdullah, An effective protein extraction method for two-dimensional electrophoresis in the anticancer herb (*Andrographis paniculata* Nees.). Biotechnol Appl Biochem, 2013.
9. Liu, Z., L. Ma, and G.B. Zhou, The main anticancer bullets of the Chinese medicinal herb, thunder god vine. Molecules, 2011. 16(6):5283-97.
10. Lesiak, K., et al., Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells in vitro. Melanoma Res, 2010. 20(1): 21-34.
11. Lin, Y.J. and Y.S. Zhen, Rhein lysinate suppresses the growth of breast cancer cells and potentiates the inhibitory effect of Taxol in athymic mice. Anticancer Drugs, 2009. 20(1): 65-72.
12. Li, B.W., et al., [Synergic effects of the combination of VEGF-targeted shRNA and taxol on human prostate cancer DU145 both in vitro and in vivo]. Yao Xue Xue Bao, 2009. 44(3): 296-302.

13. Wu, Y., et al., Extraction, Structure and Bioactivities of the Polysaccharides from Fructus Corni. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 2012.
14. Poon, T.Y., K.L. Ong, and B.M. Cheung, Review of the effects of the traditional Chinese medicine Rehmannia Six Formula on diabetes mellitus and its complications. *J Diabetes*, 2011. 3(3):184-200.
15. Yokozawa, T., et al., Bioactive constituents of Corni Fructus: The therapeutic use of morroniside, loganin, and 7-O-galloyl-D-sedoheptulose as renoprotective agents in type 2 diabetes. *Drug Discov Ther*, 2010. 4(4):223-34.
16. Chen, C.C., et al., Fructus Corni suppresses hepatic gluconeogenesis related gene transcription, enhances glucose responsiveness of pancreatic beta-cells, and prevents toxin induced beta-cell death. *J Ethnopharmacol*, 2008. 117(3): 483-90.
17. Liu, H., et al., Effect of the best compatibility of components in Corni Fructus on WT1 expression in glomerular podocytes of type 2 diabetic rats with early nephropathy. *Am J Chin Med*, 2012. 40(3):537-49.
18. Park, C.H., et al., Protective Effects of Corni Fructus against Advanced Glycation Endproducts and Radical Scavenging. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. 2012:418953.
19. Roh, C. and U. Jung, Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. *Int J Mol Sci*, 2012. 13(2):1710-9.
20. Park, C.H., et al., The effects of corni fructus extract and its fractions against alpha-glucosidase inhibitory activities in vitro and sucrose tolerance in normal rats. *Am J Chin Med*, 2011. 39(2):367-80.
21. Hwang, J.H. and J.D. Kim, Inhibitory effects of corni fructus extract on angiogenesis and adipogenesis. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2011. 15(1):43-51.
22. Tian, Y.F., et al., [Effects of herbal cake-separated moxibustion on the expression of erythrocyte CD58 in different ages of healthy people]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2010. 30(11): 933-5.

23. Kwon, S.H., et al., Apoptotic action of ursolic acid isolated from *Corni fructus* in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010. 20(22):6435-8.
24. Wang, M.Y., et al., Investigation on the morphological protective effect of 5-hydroxymethylfurfural extracted from wine-processed *Fructus corni* on human L02 hepatocytes. *J Ethnopharmacol*, 2010. 130(2):424-8.
25. Jung, S., et al., Effect of dietary mixture of gallic acid and linoleic acid on antioxidative potential and quality of breast meat from broilers. *Meat Sci*, 2010. 86(2):520-6.
26. Ng, T.B., et al., A gallic acid derivative and polysaccharides with antioxidative activity from rose (*Rosa rugosa*) flowers. *J Pharm Pharmacol*, 2004. 56(4):537-45.
27. Alkan, D., et al., Development of flexible antimicrobial packaging materials against *Campylobacter jejuni* by incorporation of gallic acid into zein-based films. *J Agric Food Chem*, 2011. 59(20):11003-10.
28. Boyd, L. and E.G. Beveridge, Antimicrobial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5,-trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia coli* NCTC 5933 with particular reference to n-propyl gallate. *Microbios*, 1981. 30(120):73-85.
29. Chen, Y.J. and L.S. Chang, Gallic acid downregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in human leukemia cells with expressed Bcr/Abl. *Mol Nutr Food Res*, 2012. 56(9): 1398-412.
30. Chandramohan Reddy, T., et al., Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-kappaB inactivation. *Toxicol In Vitro*, 2012. 26(3):396-405.
31. Parihar, S., et al., Gallic acid based steroidal phenstatin analogues for selective targeting of breast cancer cells through inhibiting tubulin polymerization. *Steroids*, 2012. 77(8-9):878-86.
32. Hsu, J.D., et al., Gallic acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell

- MCF-7 through stabilization of p27(Kip1) attributed to disruption of p27(Kip1)/Skp2 complex. *J Agric Food Chem*, 2011. 59(5):1996-2003.
33. Yoshioka, K., et al., Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncol Rep*, 2000. 7(6):1221-3.
  34. Park, W.H. and S.H. Kim, MAPK inhibitors augment gallic acid-induced A549 lung cancer cell death through the enhancement of glutathione depletion. *Oncol Rep*, 2013. 30(1): 513-9.
  35. You, B.R., et al., Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion. *Mol Cell Biochem*, 2011. 357(1-2):295-303.
  36. Liu, K.C., et al., Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. *Oncol Rep*, 2011. 26(1):177-84.
  37. Russell, L.H., Jr., et al., Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependent death in human prostate cancer LNCaP cells. *Anticancer Res*, 2012. 32(5):1595-602.
  38. Ho, H.H., et al., Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-kappaB activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. 266(1):76-85.
  39. Ho, H.H., et al., Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food Chem Toxicol*, 2010. 48(8-9):2508-16.
  40. Eyre R, F.R., Mubwandarikwa E, et al. , Incidence and survival of childhood bone cancer in northern England and the West Midlands, 1981-2002. *Br J Cancer* 2009.
  41. 中華民國兒童癌症基金會, <http://www.ccfroc.org.tw/child/>, 2007.
  42. Mahajan S, J.M., George T. , Osteosarcoma as a second neoplasm after

- chemotherapeutic treatment of hereditary retinoblastoma: a case report. .  
Quintessence Int, 2008.
43. P, A., Surgical management of primary bone cancer. . Bull Acad Natl Med  
2009.
  44. Enneking WF, S.S., Goodman MA. , A system for the surgical staging of  
musculoskeletal sarcoma. . Clin Orthop Relat Res 1980.
  45. H, S., Mechanisms and genes of cellular suicide. Science, 1995.
  46. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, Programmed cell death in animal  
development. Cell, 1997. 88(3):347-54.
  47. Wood W, T.M., Weber R, Camp V, et al., Mesenchymal cells engulf and  
clear apoptosis footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos.  
Development, 2000.
  48. Raffray M, C.G., Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or  
distinct modes of cell death? Pharmacology & therapeutics 1997.
  49. Budihardjo I, O.H., Lutter M, et al, Biochemical pathways of caspase  
activation during apoptosis. Annual review of cell and development  
biology, 1999.
  50. Krebs, J., J. Groenendyk, and M. Michalak, Ca<sup>2+</sup>-signaling, alternative  
splicing and endoplasmic reticulum stress responses. Neurochem Res, 2011.  
36(7):1198-211.
  51. Tsujimoto, Y., Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the  
mitochondria. J Cell Physiol, 2003. 195(2): 158-67.
  52. Llambi, F., et al., A unified model of mammalian BCL-2 protein family  
interactions at the mitochondria. Mol Cell, 2011. 44(4): 517-31.
  53. Adams, J.M. and S. Cory, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.  
Science, 1998. 281(5381):1322-6.
  54. Rong, Y. and C.W. Distelhorst, Bcl-2 protein family members: versatile  
regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. Annu Rev  
Physiol, 2008. 70:73-91.
  55. Ghobrial, I.M., T.E. Witzig, and A.A. Adjei, Targeting apoptosis pathways



- in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 2005. 55(3):178-94.
56. Wajant, H., The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 2002. 296(5573):1635-6.
  57. Anto, R.J., et al., Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*, 2002. 23(1):143-50.
  58. Yoshida, H., ER stress response, peroxisome proliferation, mitochondrial unfolded protein response and Golgi stress response. *IUBMB Life*, 2009. 61(9):871-9.
  59. Shen, J., et al., Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(3):921-32.
  60. Suh, D.H., et al., Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. 1271:20-32.
  61. Hoshino, D., et al., Establishment and validation of computational model for MT1-MMP dependent ECM degradation and intervention strategies. *PLoS Comput Biol*, 2012. 8(4): e1002479.
  62. Wu, X., et al., FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev Cell*, 2005. 9(2):185-96.
  63. Eisenbrand, G., et al., Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytochemistry. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004. 130(11):627-35.
  64. Han, R., Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China. *Stem Cells*, 1994. 12(1):53-63.
  65. Suzuki, K., et al., Indirubin, a Chinese anti-leukaemia drug, promotes neutrophilic differentiation of human myelocytic leukaemia HL-60 cells. *Br J Haematol*, 2005. 130(5):681-90.
  66. Xiao, Z., et al., Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic

- myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma*, 2002. 43(9):1763-8.
67. Kim, S.H., et al., Enhancing effect of indirubin derivatives on 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and all-trans retinoic acid-induced differentiation of HL-60 leukemia cells. *Bioorg Med Chem*, 2006. 14(19):6752-8.
68. Annabi, B., et al., A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2005. 22(5):429-39.
69. Rao, J.S., et al., Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2005. 4(9):1399-408.
70. Kagialis-Girard, S., et al., Inhibition of normal lymphocyte proliferation by Indirubin-3'-monoxime: a multifactorial process. *Leuk Lymphoma*, 2007. 48(3):605-15.
71. Perabo, F.G., et al., Indirubin-3'-monoxime, a CDK inhibitor induces growth inhibition and apoptosis-independent up-regulation of survivin in transitional cell cancer. *Anticancer Res*, 2006. 26(3A):2129-35.
72. Huang, Y. and T.R. Pettus, A Cycloaddition Strategy for Use toward Berkelic Acid, an MMP Inhibitor and Potent Anticancer Agent Displaying a Unique Chroman Spiroketal Motif. *Synlett*, 2008. 9: p. 1353-1356.
73. Sato, H., [Tumor metastasis and MMP inhibitor]. *Clin Calcium*, 2006. 16(4):621- 26.
74. Dave, B.J., A.H. Trivedi, and S.G. Adhvaryu, In vitro genotoxic effects of areca nut extract and arecoline. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1992. 118(4):283-8.
75. Yasumitsu, H., et al., [TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases): their species, functions and effects on tumor metastasis]. *Nihon Rinsho*, 1995. 53(7):1798-804.
76. Zhen, Y., et al., Indirubin-3'-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK. *Oncogene*, 2007.

- 26(44):6372-85.
77. Liu, X.M., et al., Induction of differentiation and down-regulation of c-myc gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo. *Biochem Pharmacol*, 1996. 51(11):1545-51.
  78. Bai, Y. and S. Huang, [Studies on red orpiment induction of NB4 and HL-60 cell apoptosis]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 1998. 19(9):477-80.
  79. Egeblad, M. and Z. Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(3):161-74.
  80. Chang, C. and Z. Werb, The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(11):S37-43.
  81. Jung, S.A., et al., [The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma]. *Korean J Gastroenterol*, 2005. 45(6):401-8.
  82. Kurahara, S., et al., Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck*, 1999. 21(7): 627-38.
  83. Yang, B., et al., Clinicopathological and prognostic significance of alpha5beta1-integrin and MMP-14 expressions in colorectal cancer. *Neoplasma*, 2013. 60(3):254-61.
  84. Zhang, X., C. Qi, and J. Lin, Enhanced expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and vascular endothelial growth factors (VEGF) and increased microvascular density in the endometrial hyperplasia of women with anovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Fertil Steril*, 2010. 93(7): 2362-7.
  85. McCawley, L.J. and L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(5):534-40.
  86. Yu, W.H., et al., CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with

- heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev*, 2002. 16(3):307-23.
87. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. 17: 463-516.
88. Yeh, C.Y., et al., Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrilysin (MMP-7) in T1 adenocarcinoma of the colon and rectum to predict lymph node metastases or distant metastases. *Hepatogastroenterology*, 2011. 58(112):1943-6.
89. Citak, E.C., et al., Role of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), TIMP-1, vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density on the clinicopathological behavior of childhood non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*, 2008. 25(1):55-66.
90. Woessner, J.F., Jr., The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 732:11-21.
91. Fillmore, H.L., T.E. VanMeter, and W.C. Broaddus, Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol*, 2001. 53(2):187-202.
92. Polette, M. and P. Birembaut, Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(11):1195-202.
93. Mimori, K., et al., Coexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and epidermal growth factor (EGF) receptor in colorectal cancer: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(24):8243-9.
94. Sen, T. and A. Chatterjee, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates EGF-induced MMP-9 in breast cancer cells: involvement of integrin receptor alpha5beta1 in the process. *Eur J Nutr*, 2011. 50(6):465-78.
95. Gomez, D.E., et al., Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 1997. 74(2):111-22.

96. Vayrynen, J.P., et al., Serum MMP-8 levels increase in colorectal cancer and correlate with disease course and inflammatory properties of primary tumors. *Int J Cancer*, 2012. 131(4):E463-74.
97. Schwartz, B., et al., Loss of AP-2alpha results in deregulation of E-cadherin and MMP-9 and an increase in tumorigenicity of colon cancer cells in vivo. *Oncogene*, 2007. 26(28):4049-58.
98. Matsumoto, S., et al., Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1354(2):159-70.
99. Kulic, A., et al., Low serum MMP-1 in breast cancer: a negative prognostic factor? *Biomarkers*, 2012. 17(5):416-21.
100. Wang, Y., et al., Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem*, 1999. 274(46):33043-9.
101. Liu, H., et al., The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC Cancer*, 2012. 12:583.
102. Llano, E., et al., Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res*, 1999. 59(11):2570-6.
103. Li, B.Y., et al., Dual androgen-response elements mediate androgen regulation of MMP-2 expression in prostate cancer cells. *Asian J Androl*, 2007. 9(1):41-50.
104. Chinni, S.R., et al., CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate*, 2006. 66(1):32-48.
105. Harrison, G.M., et al., The influence of CD44v3-v10 on adhesion, invasion and MMP-14 expression in prostate cancer cells. *Oncol Rep*, 2006. 15(1):199-206.
106. Tsou, M.F., et al., Benzyl isothiocyanate inhibits murine WEHI-3 leukemia cells in vitro and promotes phagocytosis in BALB/c mice in vivo. *Leuk*

- Res, 2009. 33(11):1505-11.
107. Yang, J.S., et al., MJ-29 inhibits tubulin polymerization, induces mitotic arrest, and triggers apoptosis via cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-2 phosphorylation in human leukemia U937 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. 334(2): 477-88.
108. Chiang, J.H., et al., Danthron, an Anthraquinone Derivative, Induces DNA Damage and Caspase Cascades-Mediated Apoptosis in SNU-1 Human Gastric Cancer Cells through Mitochondrial Permeability Transition Pores and Bax-Triggered Pathways. *Chem Res Toxicol*, 2010.
109. Lu, C.C., et al., Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Mol Nutr Food Res*, 2010. 54(7):967-76.
110. Lu, H.F., et al., Danthron induces DNA damage and inhibits DNA repair gene expressions in GBM 8401 human brain glioblastoma multiforms cells. *Neurochem Res*, 2010. 35(7): 1105-10.
111. Lin, M.L., et al., Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Lett*, 2010. 291(1):46-58.
112. Chueh, F.S., et al., Bufalin-inhibited migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells is carried out by suppression of the matrix metalloproteinase-2, ERK, and JNK signaling pathways. *Environ Toxicol*, 2011.
113. Chen, K.T., et al., The novel synthesized 6-fluoro-(3-fluorophenyl)-4-(3-methoxyanilino)quinazoline (LJJ-10) compound exhibits anti-metastatic effects in human osteosarcoma U-2 OS cells through targeting insulin-like growth factor-I receptor. *Int J Oncol*, 2011. 39(3):611-9.
114. Yu CS, H.A., Lai KC, Huang YP, Lin MW, Yang JS and Chung JG, Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 2012. 28(3):949-954.

115. Yang, J.S., et al., Solanum lyratum Extracts Induce Extrinsic and Intrinsic Pathways of Apoptosis in WEHI-3 Murine Leukemia Cells and Inhibit Allograft Tumor. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. 2012:254960.
116. Lan, Y.H., et al., Activations of Both Extrinsic and Intrinsic Pathways in HCT 116 Human Colorectal Cancer Cells Contribute to Apoptosis through p53-Mediated ATM/Fas Signaling by Emilia sonchifolia Extract, a Folklore Medicinal Plant. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. 2012:178178.
117. Chang, Y.H., et al., Induction of mitotic arrest and apoptosis by a novel synthetic quinolone analogue, CWC-8, via intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human osteogenic sarcoma U-2 OS cells. *Anticancer Res*, 2009. 29(8): 3139-48.
118. Shatnyeva, O.M., et al., Modulation of the CD95-induced apoptosis: the role of CD95 N-glycosylation. *PLoS One*, 2011. 6(5):e19927.
119. Chiu, Y.J., et al., Novel quinazoline HMJ-30 induces U-2 OS human osteogenic sarcoma cell apoptosis through induction of oxidative stress and up-regulation of ATM/p53 signaling pathway. *J Orthop Res*, 2011. 29(9):1448-56.
120. Puthalakath, H., et al., ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 2007. 129(7):1337-49.
121. Szegezdi, E., et al., ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 349(4):1406-11.
122. Shiraishi, H., et al., ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 19): 3958-66.
123. Yoshida, I., et al., Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochem Int*, 2006. 48(8): 696-702.

124. Kawahara, K., M. Mori, and H. Nakayama, [NO-induced apoptosis and ER stress in microglia]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2004. 124(6):399-406.
125. Herrera, B., et al., Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J*, 2001. 15(3):741-51.
126. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000. 5(5):415-8.
127. Xie, J., et al., [Caspase-independent apoptosis induced by arsenic trioxide in human multiple myeloma cell RPMI8226]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2012. 20(1):107-11.
128. Dolai, S., et al., Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in *Leishmania* through Ca<sup>2+</sup>-dependent and caspase-independent mechanism. *J Biol Chem*, 2011. 286(15): 13638-46.
129. Hazawa, M., et al., Caspase-independent apoptosis induction of quorum-sensing autoinducer analogs against chronic myeloid leukemia K562. *Invest New Drugs*, 2012. 30(3): 862-9.
130. Son, Y.O., et al., Apoptosis-inducing factor plays a critical role in caspase-independent, pyknotic cell death in hydrogen peroxide-exposed cells. *Apoptosis*, 2009. 14(6): 796-808.
131. Zaldivar, V., et al., Estradiol increases the Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 2009. 90(3):292-300.
132. Zecchin, K.G., et al., High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via calcineurin pathways. *J Bioenerg Biomembr*, 2007. 39(2):186-94.
133. Salakou, S., et al., Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo*, 2007. 21(1): 123-32.
134. Xu, G., et al., Increased expression ratio of Bcl-2/Bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *Basic Clin*



- Pharmacol Toxicol, 2007. 100(1): 31-5.
135. Del Poeta, G., et al., Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2003. 101(6):2125-31.
136. Martin, B., et al., Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*, 2003. 89(1): 55-64.
137. Thayyullathil, F., et al., Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med*, 2008. 45(10):1403-12.
138. Simbula, G., et al., Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis*, 2007. 12(1):113-23.
139. Choi, W.H., et al., Effects of fraction obtained from Korean Corni Fructus extracts causing anti-proliferation and p53-dependent apoptosis in A549 lung cancer cells. *Nutr Cancer*, 2011. 63(1):121-9.
140. Sun, Z., Y.H. Su, and X.Q. Yue, [Professor Ling Changquan's experience in treating primary liver cancer: an analysis of herbal medication]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2008. 6(12): 1221-5.
141. Toth, M., A. Sohail, and R. Fridman, Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol*, 2012. 878:121-35.
142. Sangle, N.A. and L.J. Layfield, Telangiectatic osteosarcoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2012. 136(5):572-6.
143. Bianchi-Smiraglia, A., S. Paesante, and A.V. Bakin, Integrin beta5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene*, 2012.
144. Shen, J., et al., NNK promotes migration and invasion of lung cancer cells through activation of c-Src/PKC $\alpha$ /FAK loop. *Cancer Lett*, 2012. 318(1):106-13.

145. Bolos, V., et al., The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Onco Targets Ther*, 2010. 3:83-97.
146. Arpaia, E., et al., The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene*, 2012. 31(7):884-96.
147. Fidler, I.J., The organ microenvironment and cancer metastasis.. *Differentiation*, 2002. 70:498–505.
148. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T., Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell Biochem*, 2003. 253:269-285.
149. Duffy, M.J., McGowan, P.M., Gallagher, W.M., Cancer invasion and metastasis: changing views. *J. Pathol.*, 2008. 214: 283-293.
150. Madlener, S., Saiko, P., Vonach, C., Viola, K., Huttary, N., Stark, N., Popescu, R., Gridling, M., Vo, N.T., Herbacek, I., Davidovits, A., Giessrigl, B., Venkateswarlu, S., Geleff, S., Jager, W., Grusch, M., Kerjaschki, D., Mikulits, W., Golakoti, T., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Krupitza, G., Multifactorial anticancer effects of digalloyl-resveratrol encompass apoptosis, cell-cycle arrest, and inhibition of lymphendothelial gap formation in vitro. *Br. J. Cancer* 2010. 102:1361-1370.
151. Everts, V., Delaisse, J.M., Korper, W., Niehof, A., Vaes, G., Beertsen, W., Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J. Cell Physiol*, 1992. 150: p. 221-231.
152. Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D., Werb, Z., How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 2003. 995:109-116.
153. Zhang, L., Shi, J., Feng, J., Klocker, H., Lee, C., Zhang, J., Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic. Dis*, 2004. 7: 327-332.
154. Guruvayoorappan, C., Kuttan, G., . . . . Amentoflavone inhibits experimental tumor metastasis through a regulatory mechanism involving

- MMP-2, MMP-9, prolyhydroxylase, lysyl oxidase, VEGF, ERK-1, ERK-2, STAT-1, NM23 and cytokines in lung tissues of C57BL/6 mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, 2008. 30:711-727.
155. Waas, E.T., Wobbes, T., Lomme, R.M., DeGroot, J., Ruers, T., Hendriks, T., . Br. J. Surg., Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. 2003. 90:1556-1564.
156. Bjornland, K., Flatmark, K., Pettersen, S., Aaasen, A.O., Fodstad, O., Maelandsmo, G.M., Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J. Surg. Res*, 2005. 127: 151-156.
157. Duffy, M.J., The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr. Pharm.*, 2004. Des 10:39-49.
158. Eccles, S.A., Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention. *Int. J. Dev. Biol*, 2004. 48:583-598.
159. Hollborn, M., Stathopoulos, C., Steffen, A., Wiedemann, P., Kohen, L., Bringmann, A., Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 2007. 48:4360-4367.
160. Chung, T.W., Lee, Y.C., Kim, C.H., Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J*, 2004. 18:1123-1125.
161. Zhang, S., Li, Z., Wu, X., Huang, Q., Shen, H.M., Ong, C.N., Methyl-3-indolylacetate inhibits cancer cell invasion by targeting the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.*, 2006. 5:3285-3293.

# **Anticancer effects of the water extract of Corni Fructus and the constituent gallic acid on human osteosarcoma cells**

CHING-LUNG LIAO

Major Professor : JAUNG-GENG LIN

Cooperative Professor : JING-GUNG CHUNG

Graduate Institute of Chinese Medicine, China Medical University

## **A b s t r a c t**

Crude extract of Corni Fructus (CECF) have been used as Traditional Chinese medicine for treatment of variable diseases since long times ago. This study was to investigate the cytotoxic effects and associated mechanisms of CECF on U-2 OS human osteosarcoma cells. Our results demonstrated that CECF induced apoptosis in U-2 OS cells via ROS-modulated caspase-dependent and -independent pathways.

Cancer metastasis is a multifactorial disease which complicates the treatments. In the present study, we investigated the inhibition of migration and invasion of CECF and its constituent - gallic acid (GA) on U-2 OS human osteosarcoma cells. We found that CECF significantly inhibiting the migration and invasion of U-2 OS human osteosarcoma cells by regulating FAK, PKC, SOS1, MKK7, MEKK3, GRB2, NF- $\kappa$ B p65, COX-2, HIF-1 $\alpha$ , PI3K, GRB2, Rho A, ROCK-1, IRE-1 $\alpha$ , p-JNK1/2, p-ERK1/2, p-p38, Ras, p-PERK and VEGF expression and inhibition of MMP-2 and -9 activities and protein expression. We investigated the mechanisms for the inhibition of migration and invasion of GA on human osteosarcoma U-2 OS cells. Proteins level were examined via Western blotting, and the activities of AKT, IKK and PKC were examined by in vitro kinase assay. We also examined the mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 by real-time PCR. These results suggest that potential signaling pathways of GA-inhibited migration and invasion in U-2 OS cells may

be due to down-regulation of PKC, inhibition of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/AKT, resulting in inhibition of MMP-2 and MMP-9 expressions.

In conclusion, Crude extract of Corni Fructus (CECF) and Its constituent - gallic acid (GA) preserve the cytotoxic and anti-metastatic effects on U-2 OS human osteosarcoma cells. So we believe that the CFCE perhaps contains the capability of anti-cancer effects, and could be considered as a new strategy for anti-cancer treatment on U-2 OS human osteosarcoma cells.

Key word: Corni Fructus, osteosarcoma , gallic acid

