

編號：CCMP95-RD-212

抗肝癌方劑之資源開發與作用機轉之探討：傳統方劑對人類肝癌細胞之體內及體外抑制增生、腫瘤入侵、血管新生作用和誘發細胞程式死亡機制之探討(2-2)

林俊清

高雄醫學大學

摘要

本研究目標乃從生命科學發展迅速的分子生物學理論與傳統中國醫藥方劑之作用相互配合，深入探索其抗肝癌之活性機轉，如此不僅可增加西方醫學對中國醫藥作用的接受度，並賦與中國醫藥複方藥效的現代化意義。癌症目前為威脅人類健康的頭號敵人，雖然全世界各國都投入大量的資源進行研究，但目前仍有許多困難仍需克服：其中包括許多化療藥物上不能完全殲滅癌症細胞。再者，對於一些具轉移性及複發性的癌細胞會發展出高度的抗藥性，造成治療的失敗。除此，透過血管新生的作用，癌細胞會隨血行轉移至他處，而造成癌細胞的快速擴散進而造成病人的死亡。

細胞移行活性以QCM™ 24-well Cell Migration Assay和傷口癒合試驗分析。細胞入侵能力以BD BioCoat Tumor Invasion System分析。MMP和VEGF分泌量以ELISA分析。MMP活性以Gelatin zymography分析。各種蛋白質表現以Western blot分析。AP-1活性以EMSA和report plasmid分析。基因以siRNA做阻斷。動物血管新生作用以Matrigel Plug Angiogenesis Assay初步結果發現散腫潰堅湯和黃連解毒皆可抑制肝癌細胞株Hep G2和PLC/PRF/5的腫瘤入侵(invasion)作用情形，且散腫潰堅湯比黃連解毒的作用更明顯。接續以散腫潰堅湯與黃連解毒湯的單味組成其所含的純化物(pure compound)在濃度50 μ M時對肝癌細胞株Hep G2和PLC/PRF/5的腫瘤入侵(invasion)作用。篩選成分黃芩(Baicalin)、黃芩素(Baicalein)、漢黃芩素(Wogonin)、小蘗鹼(Berberine)、黃連鹼(Coptisine)、去羥梔子甘(Geniposide)、龍膽苦苷(Gentiopicroside)、柴胡皂甙 d (Saikosaponin d)、甘草酸(Glycyrrhizic acid)、光甘草定(Glabridin)、

薑黃素(Curcumin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)、白樺脂酸(Betulinic acid)、葛根素(Puerarin)、芍藥甘(Paeoniflorin)、芍藥內酯苷(Albiflorin)。其中包括黃芩素(Baicalein)、薑黃素(Curcumin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)、光甘草定(Glabridin)等具有明顯的抑制肝癌腫瘤入侵(invasion)作用。其中又以光甘草定(Glabridin)效果最佳。因此以光甘草定(Glabridin)做深入之探討。

光甘草定可以有效抑制肝癌細胞株HepG2和PLC/PRF/5肝癌細胞的移行和入侵，且具有劑量依賴的效果。再者，研究亦證實光甘草定不但可有效抑制和癌細胞轉移的相關MMP-9的表現及活性，亦可降低和血管新生相關分子VEGF的表現。在分子機轉方面，光甘草定會抑制ERK1/2的活化，並降低其下游分子Elk-1由細胞質轉位至細胞核中及抑制Elk-1在細胞核內的磷酸化。透過抑制ERK1/2的活化，光甘草定也會抑制AP-1轉錄因子的DNA結合能力及促進基因轉錄活性。再者，當細胞以siRNA技術將ERK2做部分阻斷時，發現ERK siRNA的轉殖可加強光甘草定對肝癌細胞的移行和入侵的抑制效果，因此推論光甘草定是透過抑制ERK1/2的活化進而將低肝癌細胞的移行和入侵。最後，本研究亦以Matrigel plug angiogenesis assay分析光甘草定在動物體內是否具有抑制血管新生。結果發現，光甘草定可效抑制PLC/PRF/5引起血管新生以及腫瘤的生長。因此本計畫證實甘草活性組成光甘草定具可潛在價值開發為抗肝癌轉移的有效化合物。

關鍵字：glabridin、ERK1/2、腫瘤入侵、移行

Number: CCMP95-RD-212

The Mechanism of the Anti-proliferative, Anti-invasive, Anti-angiogenesis and Apoptotic Effects of Traditional Chinese Medicinal Prescription (TCMP) in Human Liver Cancer Cells in Vitro and in Vivo.

(2-2)

Chun-Ching Lin

Kaohsiung Medical University

ABSTRACT

The incidence of cancer is increasing worldwide and it is the single most common cause of deaths in both developed and developing countries. Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal malignancies, and is also one of the four most prevalent malignant diseases of adults in China, Taiwan, Korea, and sub-Africa. Several etiologic factors have been classified as high-risk factor in association with HCC, including exposure to aflatoxin B₁, and infection with hepatitis B virus and hepatitis C virus. Our laboratory focuses on the integration of traditional Chinese traditional medicines (CTM) with molecular biology to further study the active mechanism their anti-liver cancer activity. This allows a better appreciation of CTM in the modern era and also a better understanding of its underlying potential for therapy, thus increasing its acceptance in Western medicine.

Cell migration was assessed by QCM™ 24-well Cell Migration Assay and Scratch wound–healing assay. Cell invasion was assessed by BD BioCoat Tumor Invasion System. The expression of MMP and VEGF was assessed by ELISA. The MMP activity was determined by zymography. The activity of AP-1 was measured by EMSA and report plasmid transfection. The knockdown of ERK was carried out by siRNA transfection.

In this plan, we first found that San Zhong Kui Jian Tang (散腫潰堅湯) had

inhibitory effect on breast cancer cells invasion. Therefore, we assessed various active constituent of San Zhong Kui Jian Tang ingredients, including baicalin, bicalcin, wogonin, berberine, coptisine, geniposide, gentiopicoside, saikosaponin d, curcumin, oleanolic acid, puerarin, paeoniflorin, albiflorin and glabridin. From preliminary research and screening, glabridin exhibited a significant effect on liver cancer invasion.

Next, we focus on the anti-migration and anti-invasion effect of glabridin, a flavonoid obtained from licorice, in the two human liver cancer cell lines Hep G2 and PLC/PRF/5. Treatment with glabridin decreased the cancer migration and invasion of the liver cancer cells in a dose dependent manner. This effect was strongly associated with a concomitant decrease in either the level or activity of MMP-9 and VEGF. Glabridin inhibited both the activation and activity of ERK1/2

following a decrease of Elk-1 phosphorylation in the nuclei. In addition, glabridin also decreased the DNA binding and transcriptional activity of AP-1. Inhibition of ERK2 expression by specific ERK2 siRNA reinforces glabridin-mediated inhibition of cancer migration and invasion. More importantly, glabridin also exhibited an inhibition effect on angiogenesis in a Matrigel plug angiogenesis assay. Our results indicate that glabridin inhibits the activation of ERK1/2/AP-1, and may provide a molecular basis for drug development in the prevention and treatment of cancer.

Keywords: glabridin, invasion, migration, ERK1/2

壹、前言

本計畫依據行政院衛生署中醫藥委員會九十五年研究重點，研究項目一、1-1；研究目的為將生命科學發展迅速的系統生物學與中醫藥之作用相互配合，如此可增加西方醫學對中醫藥作用的接受度，以達中醫藥現代化的目標，並將中醫藥推廣到世界各國，進一步促進全球人類的健康。

根據世界衛生組織的統計，全球約有一百萬人死於與肝癌相關的病症¹。在臺灣，從民國八十年起，每年約有五千人死於肝癌，其中在女性的致死惡性疾病中排名第二，在男性則更高居第一名²。除此，根據研究報告指出，B型肝炎病毒表面抗原的帶原者罹患肝癌的機率比非帶原者高出二百二十三倍³，而依據台灣官方的統計，台灣至少有三百萬人為B型肝炎的帶原者²，因此肝癌乃為傷害國人健康的頭號殺手之一。肝癌是一種實質性的惡性腫瘤，罹患此一疾病的高危險群以45歲以上的中年人為主，在初期並無特殊的徵兆，病人會出現上腹部不舒服、

食慾差、容易疲勞等，當摸到有硬塊時，通常已進入病程的晚期了。目前，臨床上肝癌的治療仍以手術為主，必須注意的是若病人合併有肝硬化、嚴重黃疸或腹水等大都不能開刀，所以大多數的病人並不適用以外科切除的方式治療；再者，以手術切除後的病人其復發率約有40%。因此，以侵入性的治療方式處理仍無法很有效的對抗此一疾病。在化學藥物的治療上亦面臨了瓶頸，肝癌對於現行使用的抗癌藥其敏感性都不高，治療效果通常也不佳，且以肝動脈灌注化學藥物治療時所引起的副作用最大⁴。所以，尋求一個能有效且安全的治療藥物或是能預防手術後再發的有效藥物乃當務之要。在天然藥物的研究上，過去幾年已發現一些可抗肝癌的方劑、生藥及其純化成分等，如小柴胡湯、lanostanoids、baicalein、solamargine、10-hydroxycamptothecin等⁵⁻⁹，但是部分成果仍處在一些初步的研究，尤其是在機轉的建立上仍有許多的未知，不過對於天然藥物的開發仍是孕育新藥產生的最大搖籃。在

carcinogenesis的過程中，腫瘤的轉移至第二個生長處是重要的步驟也是致命的原因之一。在肝癌的病人，腫瘤的侵入(invasion)和轉移(metastasis)也是病人癒後最重要的指標。腫瘤轉移至他處生長需經過許多步驟：包括腫瘤細胞脫離原生處並穿透局部的基質(stroma)進入血管或淋巴管。並與遠端的內皮細胞層(endothelia)粘連及進行外滲(extravasation)、開拓(recolonization)和伸展(expansion)^{5,6}。破壞細胞外間質(extracellular matrix; ECM)和底層細胞膜(basement membrane;

BM)為腫瘤入侵和轉移的第一個步驟，在此階段，腫瘤細胞會分泌蛋白質酵素系統(proteolytic enzyme systems)，包括基質金屬蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)和與尿激酶系統(urokinase plasminogen activator; uPA system)等⁷。MMPs為zinc-dependent endopeptidases，可以協力破壞ECM和BM。目前研究確認約有21種人類的MMPs，數種MMP尤其是MMP-2 (Gelatinase-A)和MMP-9 (Gelatinase-B)已經被證實和肝癌的增生(proliferation)、侵入(invasion)和轉移(metastasis)有極大的關係性⁸。除此之外，圍繞在癌症細胞周圍新生的血管也需要MMP的作用促使ECM進行改建(remodeling)。因此抑制MMP的分泌或活性可以作為抑制腫瘤惡化的策略之一⁹。

血管新生(angiogenesis)意指形成新的血管，此一過程參與許多生理如器官的生長發育、傷口的癒合和生殖等^{80,81}。但其也和許多病理現象有極大的有關，包括關節炎、腫瘤生長和轉移等^{10,11}。除此，一般認定在血管新生為腫瘤生長、入侵和轉移必要的過程，因此，抑制血管新生可能可以有效的抑制腫瘤的生長入侵和轉移^{12,13}。Solid tumors在直徑2至3mm時仍不需要額外的血液補充，但是隨著腫瘤的長大需要更多氧氣、養分的提供以及廢物的移除時就會啟動血管新生的機制。血管新生的啟動與否須視內生性血管新生抑制者(inhibitors)和血管新生刺激者(stimulators)的平衡而定^{14,15}。能刺激血管新生的生長因子包括vascular endothelial growth factor (VEGF)、fibroblast growth factor (FGF)、platelet-derived growth factor以及因為缺氧而活化的hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)^{14,15}。其中HIF-1活化後會進一步的調控更多血管新生促進因子的表現¹⁶。其他如血管新生相關的oncogene包括Ras signaling和腫瘤抑制因子p53也會促進血管新生^{14,15}。而許多血管新生抑制因子則包含一些，antiangiogenic peptides，hormone代謝物和細胞凋亡的相關調控分子等。抑制腫瘤血管新生的分為兩大類：第一類是作用於腫瘤細胞，抑制腫瘤細胞分泌血管新生的促進因子進而減緩血管新生。第二種則是直接的影響血管內皮細胞，包括影響內皮細胞的增生、移動和血管網絡的形成。相較於血管內皮細胞，腫瘤細胞基因的不穩定性及變異性可能造成抗藥性出現。因此，目前已開發直接作用於血管內皮細胞藥物為首要^{17,18}。

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)為reticuloendotheliosis (Rel) family protein所組成的transcriptional factor，已經被證實參予調控許多細胞的生理活性，包括發炎反應、免疫調節、細胞的存活、增生、凋亡等^{19,20}。NF- κ B 也被證實和癌症的invasion和metastasis有極大的關係性^{19,20}。Rel family可分為兩種subfamily protein，第一種包括Rel A、Rel B

和c-Rel。另一種則包括NF- κ B1 (p105)和NF- κ B2(p100)。在正常的情況下，inhibitor of κ B (I- κ B) protein會與NF- κ B結合使NF- κ B侷限於細胞質中而其活性受到抑制。但是當細胞受到刺激，包括cytokines、pathogen、stress等，I κ B kinase (IKK)會將I- κ B磷酸化而使I- κ B被代謝掉而失去抑制NF- κ B的能力。游離出的NF- κ B隨即由細胞質轉位至細胞核，並進一步的影響許多基因的表現。NF- κ B對於細胞凋亡的調控扮演多重的角色^{19,20}。一方面已有文獻證實它會透過增加許多antideath factor如FLIC、antiproapoptotic Bcl-2 protein (A1/BFL1、Bcl-XL)、c-IAP的表現而抑制細胞凋亡²¹。另一方面，也有文獻證明NF- κ B亦可能透過增加death receptor Fas、Fas ligand和TRAIL的表現而促進apoptosis的發生^{22,23}。除了對細胞凋亡的影響，NF- κ B也被證實參與腫瘤的增生、invasion、metastasis和angiogenesis。NF- κ B會增加cyclinG和cyclinD的表現而促使細胞週期的演進。另外，NF- κ B也會透過家數種chemokines如IL-8、MMPs和VEGF的分泌進而促使腫瘤侵入、轉移及血管新生^{24,25}。Mitogen-activated protein kinases (MAPK)為evolutionarily conserved enzyme，當細胞受到一些外來的刺激如growth factors、DNA damage、cytokines、oxidant stresses、UV light、anticancer drugs和osmotic shock時，活化的MAPK family protein可透過一系列的訊息傳遞而影響細胞基因表現、運動、代謝、分化、增生和死亡^{26,27}。在傳統上，MAPK包括三大家族成員，分別是JNKs (c-Jun NH₂-terminal protein kinases)、p38s和ERKs (extracellular signal-regulated kinases)。不同的MAPK家族存在不同的次分類：JNKs family包含JNK1、JNK2和JNK3；p38s family包含p38 α 、p38 β 、p38 γ 和p38 δ ；ERKs family則包括ERK1和ERK2。近來研究又發現第4個MAPK成員：BMK1 (ERK/big MAP kinase)或稱ERK5，其包含ERK7和ERK8²⁸。MAPK的活化具有一定的過程，且皆藉由磷酸化的系統而調節其活性。MAPK乃受MAPKKs (MAPK kinase；或稱MKK)的磷酸化而活化，而MAPKKs則是經由MAPKKKs (MAPKK kinase或稱MKKK)進行磷酸化而活化，MAPKKKs最主要是透過細胞膜上接受器(receptor)的刺激而活化²⁸。MAPKs調控細胞的生理反應亦是在其特定受質的serines和threonines進行磷酸化而使之活化或不活化。這些受質包含各種enzyme、transcription factor、co-factor、細胞骨骼以及MAPK下游的訊息傳遞分子等（如MAPK-activated protein kinase (MAPKAPKs)）^{26,28}。現行研究一般認為JNKs和p38s主要由cellular stress所活化，並參與啟動細胞的死亡機制^{29,30}。相反的，ERKs則由mitogenic stimuli和生長因子(growth factor)所活化，主要參與促進細胞

增生，對抗細胞死亡訊息的傳遞^{29, 31}。但是，依照細胞種類、cellular stimuli、細胞的環境等因素的不同會使各種MAPK在細胞的生理功能上產生不同的影響。JNKs目前已經被證實可以透過幾個機制誘發細胞進行細胞凋亡。活化的JNKs可以將tumor suppressor gene p53磷酸化，因此抑制p53與Mdm2的結合而延緩p53的代謝並延長p53啟動細胞凋亡或細胞週期停滯的活性⁶⁷。活化的JNKs也會將Bcl-2和Bcl-X_L磷酸化，因此降低Bcl-2和Bcl-X_L與Bax的結合能力而抑制這些蛋白質(proteins)的antiapoptotic effect^{32,33}。相對於proapoptotic effect, JNKs也被證明其具oncogenic activity。JNKs藉由磷酸化的作用可以活化及延長c-jun和ATF-2 transcription factor的半衰期，進而啟動及延長Ras和Src等相關的cell transformation機制³²。活化的JNK亦可將Bad磷酸化，因而抑制Bad的proapoptotic effect³²。如同JNKs，p38s也被證實在細胞的死亡和存活上扮演雙面的角色。在肝癌細胞，受v-Src所活化的p38會藉由調節cyclin D的作用而增加細胞的增生³⁴；p38也會透過活化NF- κ B使腫瘤細胞產生抗藥性^{35,36}。相對的，數種cellular stress如anticancer agent、UV radiation、oxidative stresses、ceramides和growth factor deprivation等皆透過活化p38s而抑制細胞週期的演進或啟動細胞凋亡³⁷。在細胞凋亡的啟動方面，p38可以藉由磷酸化的機制抑制Bcl-X_L、growth factors receptor的功能，提升p53和Fas ligand的作用促使細胞進程序性死亡³⁷。ERKs主要受到一些mitogenic stimuli 或 growth factors所活化，其訊息傳遞路徑多與促進細胞週期的演進、細胞的增生以及細胞的存活有關，因此多被推論具有oncogenic potential³⁸。但是亦有許多文獻證明ERK1/2參與許多apoptosis誘導劑所啟動的細胞凋亡機制，包括taxol、resveratrol和quercetin等^{39,40}。因此，不論是JNKs、p38s或是ERKs，在細胞的生死皆扮演雙重角色，其相關聯結的訊息和影響最終結果的因子仍需進一步的研究。

本計畫預計以兩個階段開發出三種抗肝癌的治療藥物策略：第一階段以直接性腫瘤毒殺的方劑為主，探討該方劑對於肝癌細胞的細胞週期及細胞凋亡誘導之效，並深入探討其對細胞週期調控(包括p53、p21、cyclins、cdks)、細胞凋亡啟動(包括Bcl-2 family protein、caspases)以及相關細胞存活機制(包括NF- κ B)的影響。第二階段則是發展有效抑制腫瘤入侵和轉移的藥物，並深入探討藥物對於和腫瘤入侵、血管新生相關因子如MMPs、VEGF的影響及相關訊息傳遞包括MAPK和NF- κ B的影響。

貳、材料與方法

一、傳統中藥方劑之組成及來源

- (一) 散腫潰堅湯《蘭室秘藏》 昆布2.5g、黃柏4g、知母2.5g、栝樓根2.5g、桔梗2.5g、三稜1.5g、莪朮1.5g、連翹1.5g、黃連1g、黃芩4g、葛根1.5g、升麻1.5g、柴胡2.5g、當歸尾1g、甘草1.5g、龍膽草2.5g、白芍1g。
- (二) 黃連解毒湯《外台秘要》 黃連6g、黃芩6g、黃柏6g、山梔子6g。

二、傳統中藥方劑之製備

將各個方劑(200g)，分別用一公升的沸水煮沸達二小時然後過濾，如此重覆三次且合併三次濾液，經減壓濃縮後再以真空冷凍乾燥，計算產率。分別放入瓶內且置於微電腦除濕保管箱，以備每次實驗所需。

三、傳統中藥方劑抗肝癌之分子機轉研究

(一)細胞培養

人類肝癌細胞Hep G2、PLC/PRF/5和Hep 3B培養於DMEM培養液中。其含10%牛血清(Fetal calf serum)及含100units/ml penicillin G、100 μ g/ml streptomycin和0.25 μ g/ml amphotericin B，培養在37 $^{\circ}$ C與5% CO₂的培養箱內。每三天更換一次培養基溶液，當長至培養瓶單層長滿(confluent)，便做繼代培養(subculture)。實驗期視實驗目的，以血球計數器計算細胞數，再取細胞數目作分析。

(二)細胞移行(migration)分析

Cell migration以QCM™ 24-well Cell Migration Assay分析。將細胞懸浮serum-free的MEM後種於上層well。經過overnigh的培養後，加入藥物並加入20%FBS為誘導物。經12小時後，以螢光儀檢測被calcein acetoxymethylester標定的細胞數。另外，細胞的移行能力亦以傷口癒合試驗做分析。將以無血清處理過的PLC/PRF/5細胞種於24 well plate，使之呈現全滿狀態，隔天以yellow tip刮出一條直線。經PBS沖洗後，加入藥物。連續培養24小時後於顯微鏡下拍照。

(三)細胞侵入試驗

Cell invasion的分析以BD Biocoat invasion system完成。將細胞懸浮serum-free的MEM後種於上層well。經過overnigh的培養後，加入藥物並加入cancer invasion的誘導物。12小時後，以螢光儀檢測

被calcein acetoxymethylester 標定的細胞數。

(四) 藥物對MMP-2、MMP-9和VEGF蛋白質表現分析 細胞以藥物處理

後，收集細胞上清液。在事先coated有抗人類MMP-2、MMP-9和VEGF蛋白的單株抗體的96well盤的每一個well中加入100 μ l peroxidase-labeled detection antibodies以及適當稀釋的細胞上清液100 μ l，置於室溫下2小時後，以washing buffer清洗3次，再加入100 μ l substrate solution至每個well中，於室溫下暗室中反應10-30分鐘。最後加入100 μ l stop solution終止反應，並以ELISA reader(450nm)定量分析。

(五) Gelatin zymography

將濃縮處理後的細胞上清液放入nondenaturing 10% polyacrylamide gels含1mg/mL gelatin分離。待分離完成後將gel放入zymography buffer於37 $^{\circ}$ C反應overnigh Gel再以Coomassie brilliant blue染色，最後結果以電泳照相系統做紀錄。

(六) 各種蛋白質的表現分析

1. 細胞蛋白質含量測定

配置0.1mg/ml的BSA(Bovine serum albumin)，在每個Well內分別加入0、6、12、18、24、30、36、42 μ l的BSA後，再加入240、234、228、222、216、210、204、198 μ l的去離子水，最後在各Well中加入Dye reagent blue，於室溫靜置5分鐘後以波長595nm由ELISA reader分析。即得0、2、4、6、8、10、12、14 μ g/ml的標準曲線。得到標準曲線後，則加入2 μ l細胞萃取液，再加入238 μ l去離子水及60 μ l Dye reagent solution，於室溫作用5分鐘，以ELISA reader(592nm)定量分析。

2. SDS-PAGE電泳之偵測

將細胞取下，以冰PBS洗二次後，立即加入Lysis buffer(0.32M sucrose、20mM Tris-HCl、pH7.5、2mM EDTA、5mM EGTA、50 μ g/ml Leupeptin、0.2mM PMSF、0.1% α -Mercaptoethanol)，用超音波震碎機(sonicator)將細胞均質化，再以800g，4 $^{\circ}$ C離心15分鐘，則得上清液為細胞質層，沉澱物為細胞膜層。另將細胞膜層加入含1%NP-40之Lysis buffer後，經超音波震碎機均質化，使沉澱物溶解即可。得到的蛋白質取50-100 μ g加入定量Sample buffer(0.5M Tris-HCl、pH6.8、Glycerol、10% SDS、2- α -Mercaptoethanol、0.05% Bromophenol blue)及10% α -Mercaptoethanol後加熱100 $^{\circ}$ C，5分鐘，再依序加到各Well中。

將電壓設定在66伏特進行電泳，待SDS-PAGE中的染劑跑出SDS-PAGE後則關掉電源。

3. SDS-PAGE上之蛋白質轉移到PVDF membrane

PVDF membrane需浸潤在Transfer buffer (20mM Tris-base、Glycin、0.1% SDS、10% Methanol)內備用。將SDS-PAGE層覆蓋於PVDF上，並在其上下各加二張3mm Filter paper，使成似“三明治”(sandwich)夾層狀。將“三明治”(sandwich)夾層置於Transfer buffer中，電流設定在53微安培3小時完成，然後取出。

4. 西方點漬法(Western blotting)

PVDF membrane加入適量Blocking buffer (5%脫脂奶於TBS-T 20mM Tris-base、137mM Sodium chloride、Hydrochloric acid、0.1% Tween-20內)於4°C下進行Blocking一夜，之後以Washing buffer (TBS-T)連續洗30分鐘(5分鐘6次)，然後加入稀釋好的Primary antibody均勻覆蓋在PVDF membrane上作用2小時，而後再以Washing buffer持續洗30分鐘。再將Secondary antibody稀釋到合適濃度，均勻倒在PVDF membrane上反應1小時。最後再以Washing buffer洗30分鐘，再加入Detection buffer 1分鐘，待略乾後壓片、洗片即可完成。

(七) 藥物對於NF- κ B活性的評估

1. 以EMSA測定NF- κ B DNA binding activity

[核蛋白的抽取]

經藥物處理過的細胞收集後以Hypotonic buffer溶解細胞膜後以14000rpm離心30秒分離出細胞核。沉澱物加入complete lysis buffer培養30分鐘後離心，取的隻上輕液即為nuclear extraction。以上述蛋白質定量方法訂出蛋白質濃度。

[Electrophoretic mobility shift assays; EMSA]

取5 μ g核蛋白，加入biotin-labeled DNA probe並與reaction buffer於室溫下反應30分鐘後以8% polyacrylamide gel分離。待轉印至nylon paper後以UV進行cross-link 10分鐘。接下來經block→Wash→加入HRP-conjugate→Wash步驟後，以ECL反應並於X ray-film上感光得到最後結果。

2. report plamsin transfection

利用liposome將pAP-1-luc vectors和Renilla luciferase reporter vector (phRL-TK)轉殖入細胞後加入藥物處理。將細胞lysis，其冷光反應以dual-luciferase reporter assay system完成分析。

(八) RK基因的knockdown

利用liposome 轉殖control oligonucleotide 或ERK2的siRNA阻斷其表現。再加入藥物繼續培養至所需時間後，分別測定特定分子的表現。

(九) nude mice (in vivo)之血管新生抑制作用分析 將Matrigel、

PLC/PRF/5/matrixgel和PLC/PRF/5/matrixgel/50 μ M Glabridin混合液打入nude mice背部，使angiogenesis plug於nude mice連續生長15天。實驗組和控制組各15隻。每天測量腫瘤大小及老鼠體重。實驗終了取出老鼠內臟及angiogenesis plug加以秤重。

參、結果

一、黃連解毒湯和散腫潰堅湯及其活性組成對肝癌細胞株入侵能力的抑制作用

本計畫第一年的研究結果發現散腫潰堅湯與黃連解毒湯對肝癌細胞株Hep G2與PLC/PRF/5具有增生抑制作用，因此第二年的計畫即篩選散腫潰堅湯與黃連解毒湯在濃度500 μ g/ml時對肝癌細胞株Hep G2和PLC/PRF/5的腫瘤入侵(invasion)作用情形。結果發現，散腫潰堅湯比黃連解毒抑制肝癌腫瘤入侵(invasion)作用更明顯(圖一A)。接續以散腫潰堅湯與黃連解毒湯的單味組成其所含的純化物(pure compound)在濃度50 μ M時對肝癌細胞株Hep G2和PLC/PRF/5的腫瘤入侵(invasion)作用。從組成分析上，黃連解毒湯的組成分別為黃芩、黃連、黃柏、梔子。而散腫潰堅湯的組成分別為黃芩、黃連、黃柏、龍膽、柴胡、甘草、莪朮、連翹、葛根、白芍、栝樓根、知母、桔梗、昆布、荊三稜、當歸、升麻。實驗結果發現，黃芩所含之純化物(pure compound)：黃芩(Baicalin)、黃芩素(Baicalein)、漢黃芩素(Wogonin)；黃連所含之純化物(pure compound)：小蘗鹼(Berberine)、黃連鹼(Coptisine)；黃柏所含之純化物(pure compound)：小蘗鹼(Berberine)以及梔子所含之純化物(pure compound)：去羥梔子苷(Geniposide)等，以黃芩素(Baicalein)具有明顯的抑制肝癌腫瘤入侵(invasion)作用(圖一B)。而接續又篩選了龍膽所含之純化物(pure compound)：龍膽苦苷(Gentiopicroside)；柴胡所含之純化物(pure compound)：柴胡皂甙d (Saikosaponin d)；甘草所含之純化物(pure compound)：甘草酸(Glycyrrhizic acid)、光甘草定(Glabridin)；莪朮所含之純化物(pure compound)：薑黃素(Curcumin)；連翹所含之純化物(pure compound)：齊墩果酸(Oleanolic acid)、白樺脂酸(Betulinic acid)；葛根所含之純化物(pure compound)：葛根素(Puerarin)；白芍所含之純化物(pure compound)：芍藥甘(Paeoniflorin)，芍藥內酯苷(Albiflorin)等，以薑黃素(Curcumin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)、光甘草定(Glabridin)等具有明顯的抑制肝癌腫瘤入侵(invasion)作用(圖一C)。但是，除了光甘草定(Glabridin)外，其餘的活性成分皆無法抑制兩株細胞內生性的入侵活性。因此以光甘草定(Glabridin)做深入之探討。

二、Glabridin對肝癌細胞株HepG2和PLC/PRF/5腫瘤的移行和入侵能力的抑制作用

首先針對glabridin對HepG2和PLC/PRF/5細胞移行能力的影響。結果發現，Glabridin有效抑制20% FBS造成的Hep G2和PLC/PRF/5的移行能力，並呈現dose-dependent的效果(圖二A)。除此之外，利用傷口癒合試驗，Glabridin有效抑制PLC/PRF/5的移行能力，並呈現dose-dependent的效果(圖二B)接下來評估光甘草定(Glabridin)對腫瘤移行和入侵(invasion)作用抑制。結果發現光甘草定(Glabridin)無論是對Hep G2和PLC/PRF/5皆具有劑量—效應的抑制腫瘤細胞的移行作用(圖二C)。在Hep G2，光甘草定(Glabridin)在濃度20 μ M時即產生抑制效果。對PLC/PRF/5則在劑量10 μ M就具有意義性的抑制效果。

三、Glabridin對MMP-2、MMP-9以及VEGF分泌的影響

結下來分析glabridin腫瘤細胞移行、入侵和血管新生分子MMP-2、MMP-9和VEGF的影響。首先評估glabridin對於HepG2和PLC/PRF/5細胞之增生抑制作用。結果發現，glabridin對於HepG2和PLC/PRF/5細胞之增生並無明顯之抑制作用(圖三A)。結果發現。在20% FBS的存在下，glabridin降低Hep G2細胞分泌MMP-9(圖三B)。同時，glabridin也會抑制MMP-2的分析(圖三C)。再者，以zymograpgy分析，在20% FBS的存在下，發現glabridin也會降低MMP-9的活性(圖三E)。相對的。在PLC/PRF/5細胞，20% FBS的MMP-9誘導效果不佳。因此無論是控制組或是加藥組，MMP-9的濃度在PLC/PRF/5細胞相較於Hep G2都偏低。

在血管新生分子VEGF方面，glabridin會降低20% FBS所誘導的VEGF分泌(圖三D)。

四、Glabridin對NF- κ B路徑的影響

在分子機轉方面，首先分析glabridin對NF- κ B路徑的影響。結果發現，無論是在HepG2或是PLC/PRF/5細胞，glabridin對於細胞核和細胞質內的NF- κ B皆無影響。另外，glabridin對於I- κ B的表現也無法產生有意義的作用。因此，根據以上結果推論glabridin並不影響NF- κ B路徑(圖四)。

五、Glabridin對MAPK路徑的影響

接下來分析glabridin對MAPK路徑的影響。結果顯示，無論是在HepG2或是PLC/PRF/5細胞，glabridin會降低ERK1/2的磷酸化。但相對的，glabridin對於兩株細胞株的JNK和p38的磷酸化則無影響。另外，glabridin對原型的JNK、p38和ERK1/2的表現則無影響(圖五A)。

由於glabridin降低ERK1/2的活化(磷酸化)，所以進一步分析glabridin是否影響ERK1/2下游因子Elk-1的磷酸化。結果發現，無論是在HepG2或是PLC/PRF/5細胞，glabridin皆會降低細胞核中磷酸化的Elk-1的量，因此確立glabridin不但會抑制ERK1/2的活化，也會降低ERK1/2下游因子Elk-1的磷酸化(圖五B)。

接下來進一步以in vitro kinase assay分析glabridin對ERK1/2的活性是否有影響。結果發現，無論是在HepG2或是PLC/PRF/5細胞，glabridin皆會降低ERK1/2受質elk-1的磷酸化。因此確認glabridin不但會影響ERK1/2的活化，也會影響其活性(圖五C)。

六、Glabridin對轉錄因子AP-1的影響

由於glabridin會影響ERK1/2的活化及活性，因此進一步分析glabridin是否會影響轉錄因子AP-1的DNA結合能力和基因轉錄活性。由(圖六A)結果顯示，無論是對Hep G2和PLC/PRF/5，glabridin會降低轉錄因子AP-1的DNA結合能力。並具有時間效應。

再者，由(圖六B)的結果顯示，glabridin也同時會降低兩株細胞株AP-1的基因轉錄活性。並同時具有劑量效應。

七、ERK1/2在galbridin活性之角色

由於研究發現glabridin會降低ERK1/2的活化及活性。並減少AP-1的活性。因此接下來，利用siRNA阻斷ERK2的表現已確立ERK1/2在glabridin抑制腫瘤移行和入侵能力所扮演角色。細胞轉殖ERK2 siRNA後以western blot的方式確立轉殖效力。結果發現，ERK2 siRNA產生約50%的knockdown效果(圖七A)。

接下來分析當ERK被阻斷後對藥物的影響。首先在抑制腫瘤細胞移行方面。在control siRNA轉殖組，glabridin會抑制20% FBS所誘導的細胞移行。而當ERK2被knockdown後，可加強glabridin對細胞移行的抑制效果(圖七B)。

類似的，在腫瘤細胞入侵方面，在control siRNA轉殖組，glabridin

bridin會抑制20% FBS所誘導的細胞入侵而當ERK2被knockdown後，則可加強glabridin對細胞入侵的抑制效果(圖七C)。

八、Glabridin之in vivo抗血管新生活性

最後進行in vivo活性評估。將40 μ M的galbridin加入PLC/PRF/5/Matrixgel混合液打入老鼠背部。結果發現，相較於打入PLC/PRF/5/matrixgel的混合液，glabridin可以有效的抑制PLC/PRF/5細胞在裸鼠身上所造成的血管新生抑制作用(圖八A)。

再者，以秤重方式亦發現glabridin也會降低PLC/PRF/5細胞在裸鼠身上的生長(圖八B)。因此，確認glabridin在in vivo的條件下仍具有抑制血管新生及腫瘤生長的活性。

肆、討論

肝癌是台灣最常見的惡性腫瘤之一²⁻⁴。本研究中首度發現黃連解毒湯和散腫潰堅湯可以有效的抑制肝癌細胞株Hep G2和PLC/PRF/5細胞的入侵。另外，分析各組成的活性成分也發現baicalein和glabridin皆能抑制肝癌細胞的入侵。其中，glabridin的效果優於baicalein，且其同時具又抑制肝癌細胞移行之能力。因此，進一步深入探討glabridin的活性及分子機轉。

目前在臨床上，腫瘤的移行和轉移是造成癌症病人難以治療及造成病人死亡的最主要因素⁴¹⁻⁴³。因此，抑制腫瘤細胞移行、入侵和轉移也成為抗癌藥物發展的重要標的之一⁴²。在癌細胞移行及入侵基底膜的過程中，MMP-9扮演重要的角色^{44,45}。MMP-9可以水解破壞細胞基底膜及水解活化許多促進癌症細胞生長的因子。因此，MMP-9被認為是腫瘤病人預後的指標之一^{46,47}。研究結果顯示，glabridin不但會抑制MMP-9的分泌，也會抑制MMP-9的活性。再者，glabridin同時也會降低血關新生因子VEGF2的分泌。因此進而降低肝癌細胞HepG2和PLC/PRF/5的移行和入侵能力。

ERK1/2路徑已經被證實參與腫瘤細胞的移行、入侵和轉移⁴⁸⁻⁵⁰。ERK1/2可透過活化許多和腫瘤轉移以及血關新生因子的，其中及包含MMP-9和AP-1。許多研究亦發現抑制ERK1/2的活性可降低多種腫瘤細胞移行、入侵和轉移的能力，其中包含肝癌⁵¹⁻⁵³。活化的ERK1/2可透過影響下游因子-AP-1轉錄因子進而調控多種和腫瘤細胞轉移的分子表現^{52,53}。AP-1是由c-Jun和c-Fos家族蛋白複合而成的轉錄因子。AP-1的活性受到幾種機制的調控，包括c-Jun或c-Fos蛋白的磷酸化、不同c-Jun或c-Fos蛋白的組合以及和不同的co-factor結合等⁵⁴⁻⁵⁶。目前有多個研究發現，抑制AP-1可以有效的降低腫瘤的移行、入侵和轉移。因此，AP-1也被視為要務開發的標的之一⁵⁶。本研究結果發現，glabridin能抑制ERK1/2的活性和活化，並且同時降低細胞核中Elk-1的磷酸化。再者，研究結果也顯示glabridin亦可同時降低AP-1的DNA結合及基因轉錄活性。更甚之，受AP-1所調控的基因產物，包括MMP-9和VEGF也受到抑制。更甚之，以siRNA阻斷ERK2的表現也會強化glabridin抑制HepG2和PLC/PRF/5移行和入侵的活性。因此綜合以上結果，無論是在Hep G2和PLC/PRF.5細胞，glabridin皆可藉由將低ERK1/2/AP-1路徑而降低腫瘤細胞地移行和入侵能力。

在in vivo的試驗中發現glabridin會抑制PLC/PRF/5細胞所誘導的血管新生作用，並同時降低腫瘤的生長。因此確定glabridin在in vivo的條件下也會降低腫瘤血管新生和腫瘤的生長。

伍、結論與建議

本研究結果切確證明甘草活性成分glabridin可有效的抑制肝癌細胞之移行、入侵和血管新生。其中glabridin主要是透過幾種機制：(a)藉由抑制ERK1/2的活化及活性藉由降低Elk-1磷酸化；(b)抑制AP-1的DNA 結合活性和基因轉錄活性而降低細胞存活訊息的傳遞；(c)降低腫瘤入侵因子MMP-9和血管新生相關因子VEGF的分泌。除此，由於nude mice的結果也證明glabridin可以有效的抑制腫瘤在裸鼠身上所造成的血管新生作用及腫瘤的生長，因此證明glabridin在in vivo的條件下亦具有抑制腫瘤生長的活性。因此，更進一步的人體實驗以及相關的實驗可更深入評估glabridin在臨床的使用價值和安全性。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號CCMP95-RD-212提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Beaugrand M. Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 20(1): 65-71.
2. 中華民國行政院衛生署網站：<http://www.doh.gov.tw>
3. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2(8256): 1129-33.
4. Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992; 15(5): 948-63.
5. Wittekind C, Neid M. Cancer invasion and metastasis. *Oncology*. 2005; 69 Suppl 1: 14-6.
6. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*. 2005 Jul 15; 65(14): 5991-5.
7. Morgan H, Hill PA. Human breast cancer cell-mediated bone collagen degradation requires plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity. *Cancer Cell Int*. 2005 Feb 8; 5(1): 1.
8. Grieu F, Li WQ, Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Dec; 88(3): 197-204.
9. Mannello F, Tonti G, Papa S. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005 Jun; 5(4): 285-98.
10. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*. 2006; 57: 1-18.
11. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15; 438(7070): 967-74.
12. Jung CR, Hwang KS, Yoo J, Cho WK, Kim JM, Kim WH, Im DS. E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nat Med*. 2006 Jul 2.
13. Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Feb; 63(4): 449-68.
14. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005 May 15; 65(10): 3967-79.
15. Tandle A, Libutti SK. Antiangiogenic therapy: targeting vascular endothelial growth factor and its receptors. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2003 Jan; 1(1): 41-8.

16. May D, Itin A, Gal O, Kalinski H, Feinstein E, Keshet E. Ero1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer. *Oncogene*. 2005 Feb 3; 24(6): 1011-20.
17. Pasquier E, Honore S, Braguer D. Microtubule-targeting agents in angiogenesis: Where do we stand? *Drug Resist Updat*. 2006 Feb-Apr; 9(1-2): 74-86.
18. Zhong H, Bowen JP. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr Med Chem*. 2006; 13(8): 849-62.
19. Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res*. 2005 Jan; 123(1): 158-69.
20. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*. 2005 Jan; 30(1): 43-52.
21. Aggarwal BB, Takada Y. Pro-apoptotic and anti-apoptotic effects of tumor necrosis factor in tumor cells. Role of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Cancer Treat Res*. 2005; 126: 103-27.
22. Legembre P, Barnhart BC, Zheng L, Vijayan S, Straus SE, Puck J, Dale JK, Lenardo M, Peter ME. Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep*. 2004 Nov; 5(11): 1084-9.
23. Kim HS, Chang I, Kim JY, Choi KH, Lee MS. Caspase-mediated p65 cleavage promotes TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2005 Jul 15; 65(14): 6111-9.
24. Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal BB. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaBalpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29; 280(17): 17203-12.
25. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 2004 Sep; 6(3): 203-8.
26. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002 Dec 6; 298(5600): 1911-2.
27. Olson JM, Hallahan AR. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2004 Mar; 10(3): 125-9.
28. Edmunds JW, Mahadevan LC. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J Cell Sci*. 2004 Aug 1; 117 (Pt 17): 3715-23.

29. Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, Huang W, Chang WC, Chang YS, Chen CC, Lai MD. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5; 279(45): 46384-92.
30. Xiao D, Choi S, Johnson DE, Vogel VG, Johnson CS, Trump DL, Lee YJ, Singh SV. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene*. 2004 Jul 22; 23(33): 5594-606.
31. Park MT, Choi JA, Kim MJ, Um HD, Bae S, Kang CM, Cho CK, Kang S, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12; 278(50): 50624-34.
32. Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res*. 2005 Jan; 15(1): 36-42.
33. Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004 Sep 8; 24(36): 7879-87.
34. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005 Jan; 15(1): 11-8.
35. Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Seternes OM, de Witte P, Vandenheede JR, Piette J, Agostinis P. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26; 278(52): 52231-9.
36. Yu C, Rahmani M, Almenara J, Sausville EA, Dent P, Grant S. Induction of apoptosis in human leukemia cells by the tyrosine kinase inhibitor adaphostin proceeds through a RAF-1/MEK/ERK- and AKT-dependent process. *Oncogene*. 2004 Feb 19; 23(7): 1364-76.
37. Olson JM, Hallahan AR. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2004 Mar; 10(3): 125-9.
38. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004 Feb; 18(2): 189-218.
39. Bacus SS, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP, Keyomarsi K, Yarden Y, Seger R. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene*. 2001 Jan 11; 20(2):

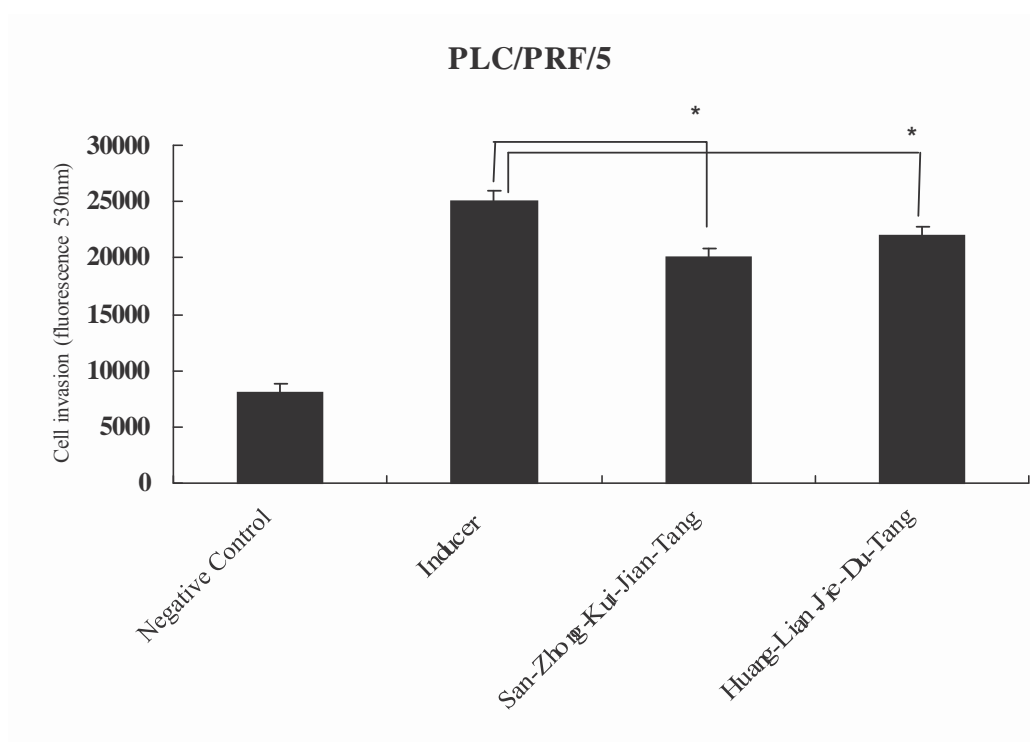
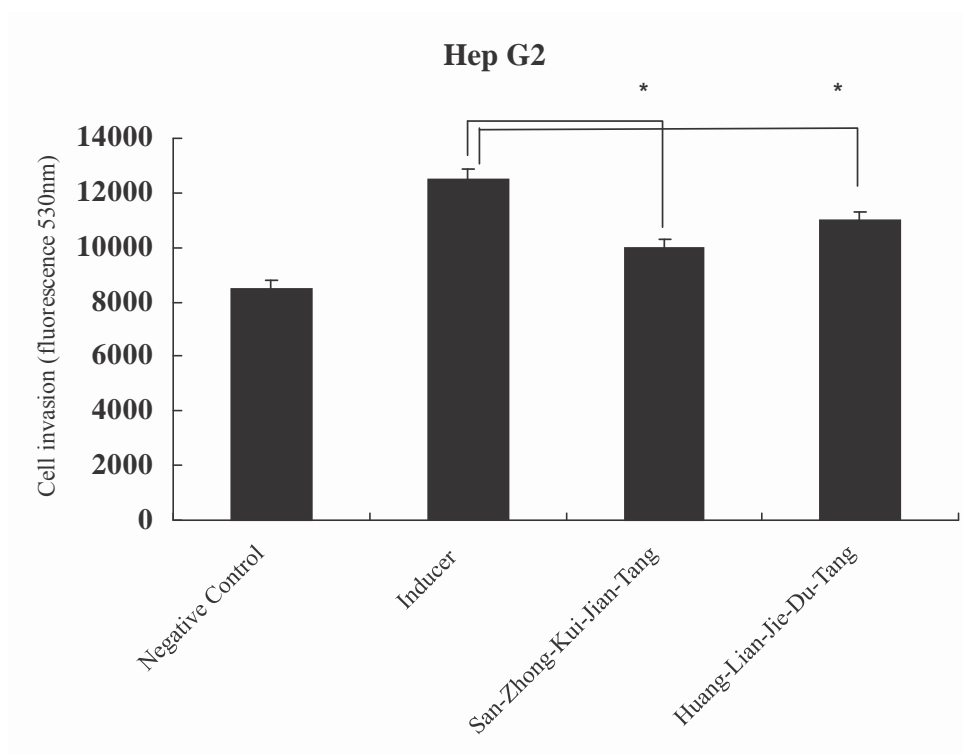
- 147-55.
40. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 2001 Feb 15; 61(4): 1604-10.
 41. Wittekind C, Neid M. Cancer invasion and metastasis. *Oncology.* 2005; 69 Suppl 1: 14-6.
 42. López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 800-8.
 43. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 424-32.
 44. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008; 214: 283-93.
 45. Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24: 1058-62.
 46. Sun MH, Han XC, Jia MK, Jiang WD, Wang M, Zhang H, Han G, Jiang Y. Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5931-7.
 47. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA; Marimastat Pancreatic Cancer Study Group. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3447-55.
 48. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 252-8.
 49. Zhang S, Li Z, Wu X, Huang Q, Shen HM, Ong CN. Methyl-3-indolylacetate inhibits cancer cell invasion by targeting the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3285-93.
 50. Cho HJ, Kang JH, Kwak JY, Lee TS, Lee IS, Park NG, Nakajima H, Magae J, Chang YC. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1104-10.
 51. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is

- involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2007; 67: 2497-507.
52. Xu L, Fukumura D, Jain RK. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J Biol Chem* 2002; 277: 11368-74.
 53. Weng CJ, Chau CF, Hsieh YS, Yang SF, Yen GC. Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1. *Carcinogenesis* 2008; 29: 147-56.
 54. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007 Mar 15; 67(6): 2497-507.
 55. Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene* 2007; 26: 1-10.
 56. El-Dahr SS, Dipp S, Baricos WH. Bradykinin stimulates the ERK Elk-1 Fos/AP-1 pathway in mesangial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: F343-52.
 57. Hsieh YS, Chu SC, Yang SF, Chen PN, Liu YC, Lu KH. Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2. *Carcinogenesis* 2007; 28: 977-87.
 58. López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 800-8.
 59. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 424-32.
 60. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008; 214: 283-93.
 61. Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24: 1058-62.
 62. Sun MH, Han XC, Jia MK, Jiang WD, Wang M, Zhang H, Han G, Jiang Y. Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5931-7.
 63. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA; Marimastat Pancreatic Cancer Study Group. Marimastat as first-line therapy for patients

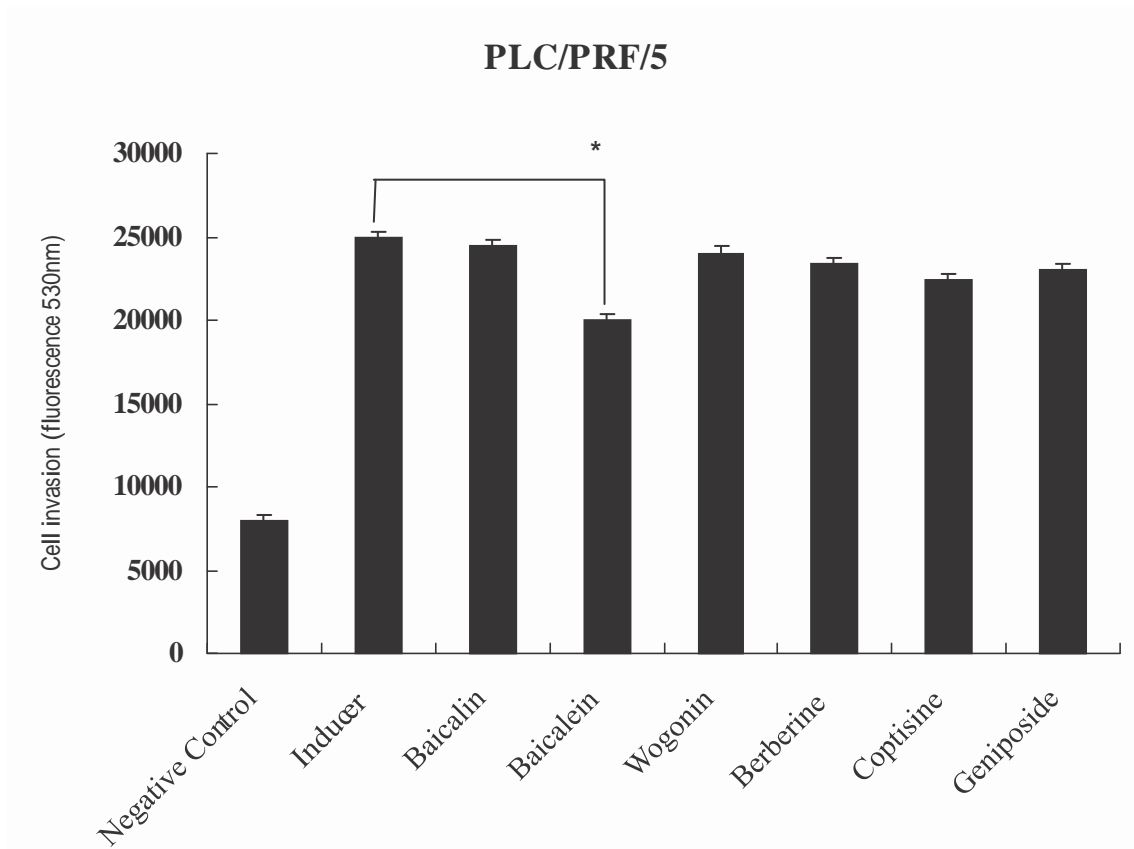
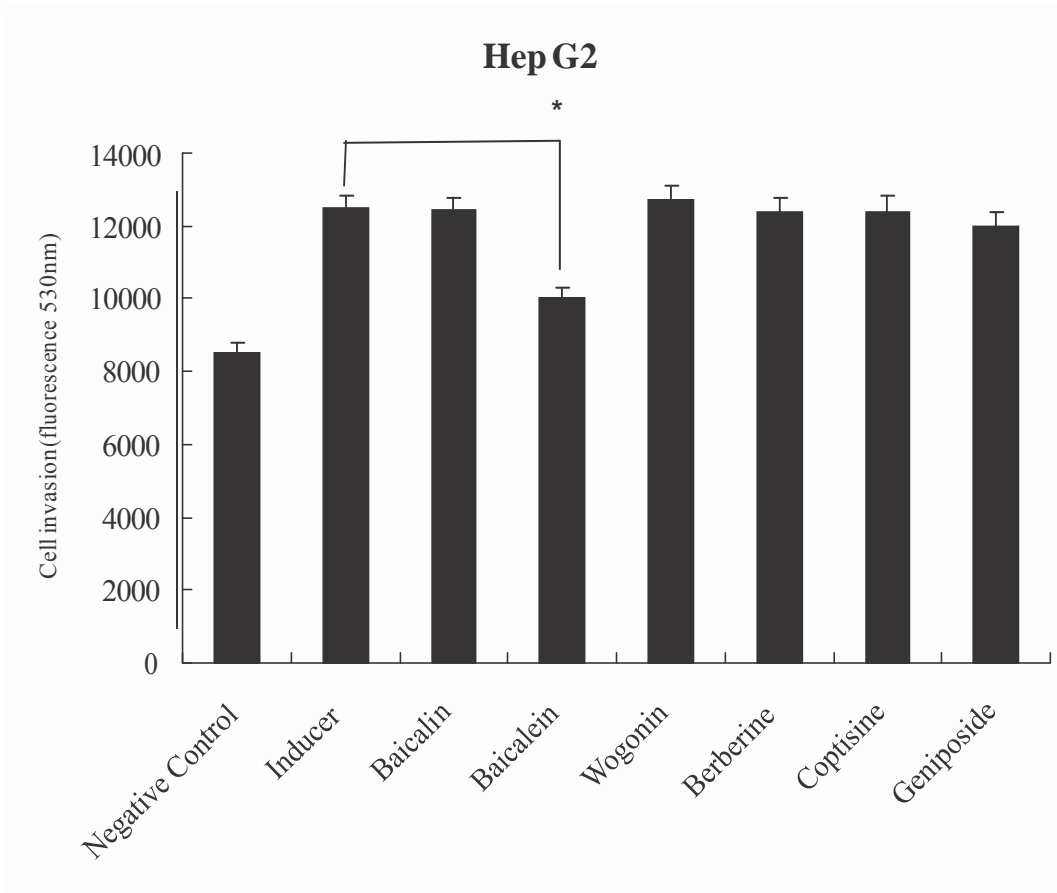
- with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3447-55.
64. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 252-8.
 65. Zhang S, Li Z, Wu X, Huang Q, Shen HM, Ong CN. Methyl-3-indolylacetate inhibits cancer cell invasion by targeting the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3285-93.
 66. Cho HJ, Kang JH, Kwak JY, Lee TS, Lee IS, Park NG, Nakajima H, Magae J, Chang YC. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1104-10.
 67. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2007; 67: 2497-507.
 68. Xu L, Fukumura D, Jain RK. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J Biol Chem* 2002; 277: 11368-74.
 69. Weng CJ, Chau CF, Hsieh YS, Yang SF, Yen GC. Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1. *Carcinogenesis* 2008; 29: 147-56.
 70. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, Anania FA. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007 Mar 15; 67(6): 2497-507.
 71. Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene* 2007; 26: 1-10.
 72. El-Dahr SS, Dipp S, Baricos WH. Bradykinin stimulates the ERK Elk-1 Fos/AP-1 pathway in mesangial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: F343-52.
 73. Hsieh YS, Chu SC, Yang SF, Chen PN, Liu YC, Lu KH. Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2. *Carcinogenesis* 2007; 28: 977-87.

柒、圖表

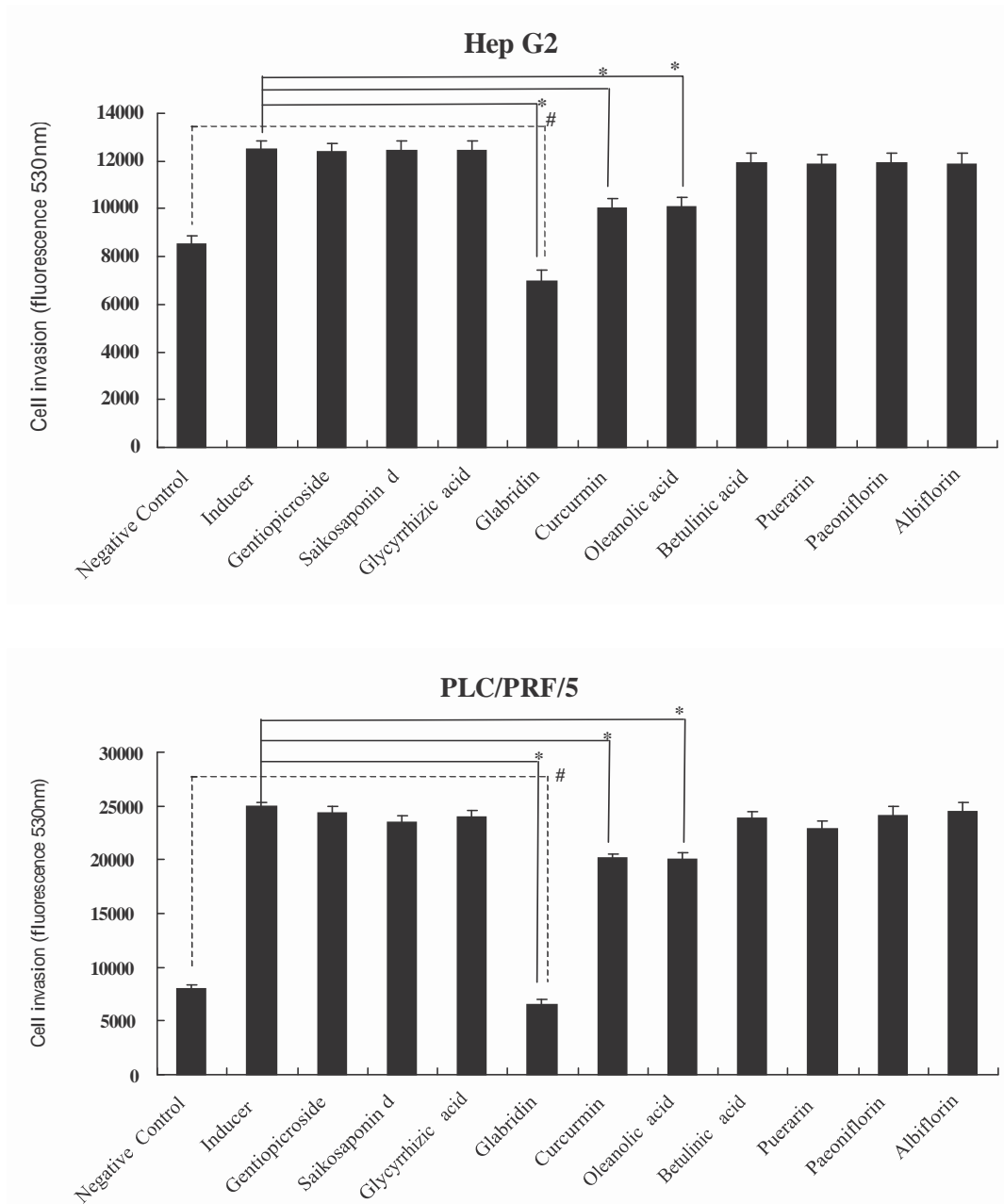
A.



B.

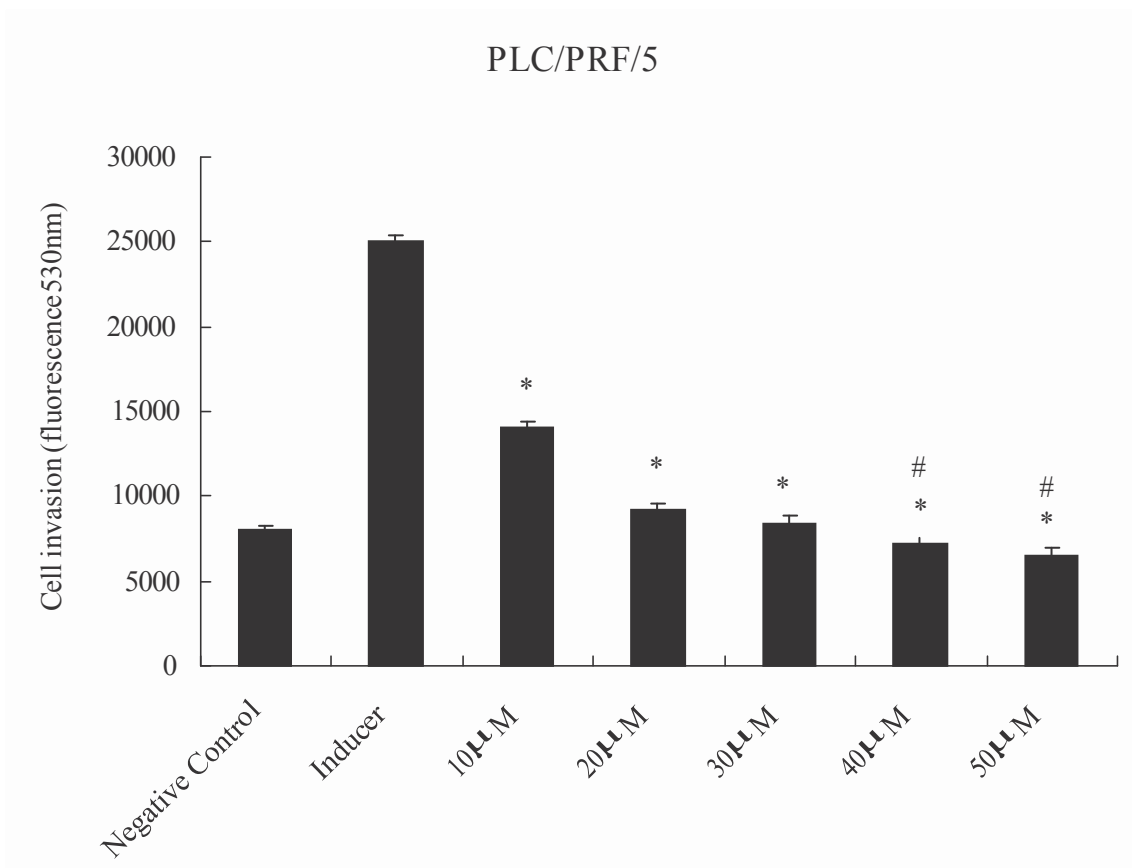
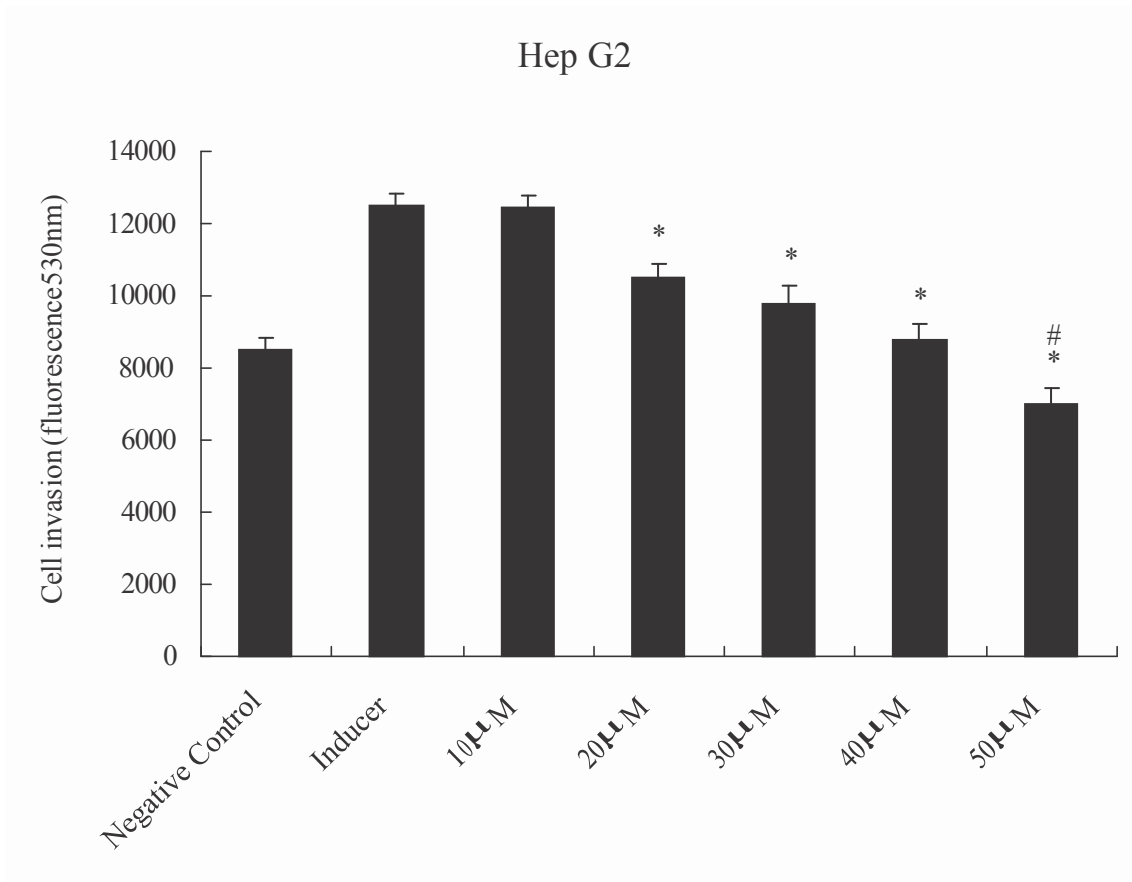


C.

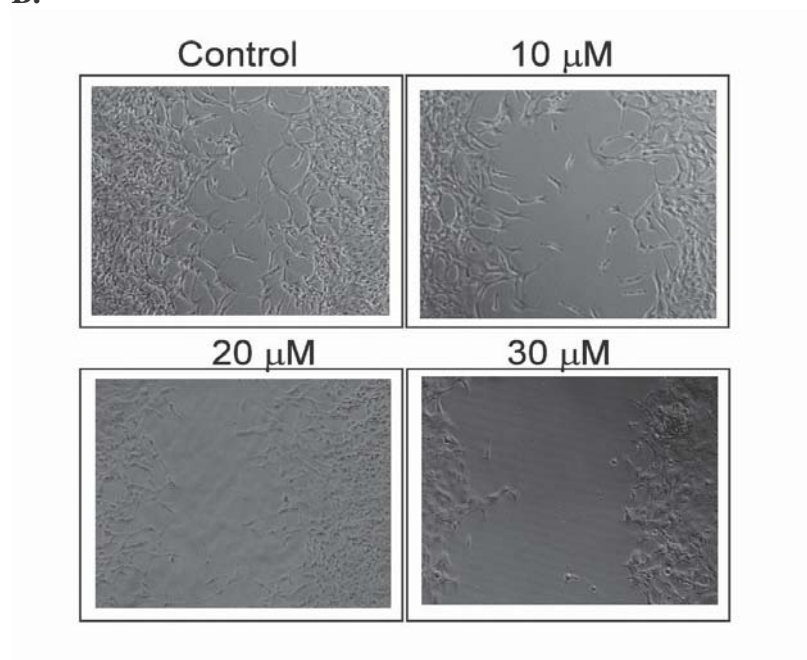


圖一 傳統方劑及其活性組成之抗肝癌細胞入侵作用。(A)黃連解毒湯抑制Hep G2和PLC/PRF/5入侵作用；(B)黃連解毒湯活性成制Hep G2和PLC/PRF/5入侵作用；(C)散腫潰堅湯抑制HepG2和PLC/PRF/5入侵作用細胞增生。結果表現為之平均(mean) 標準偏差(S.D.)。每次實驗皆為三重複(n=3)。*代表實驗組和控制組具有統計學上之差異(p<0.05)。

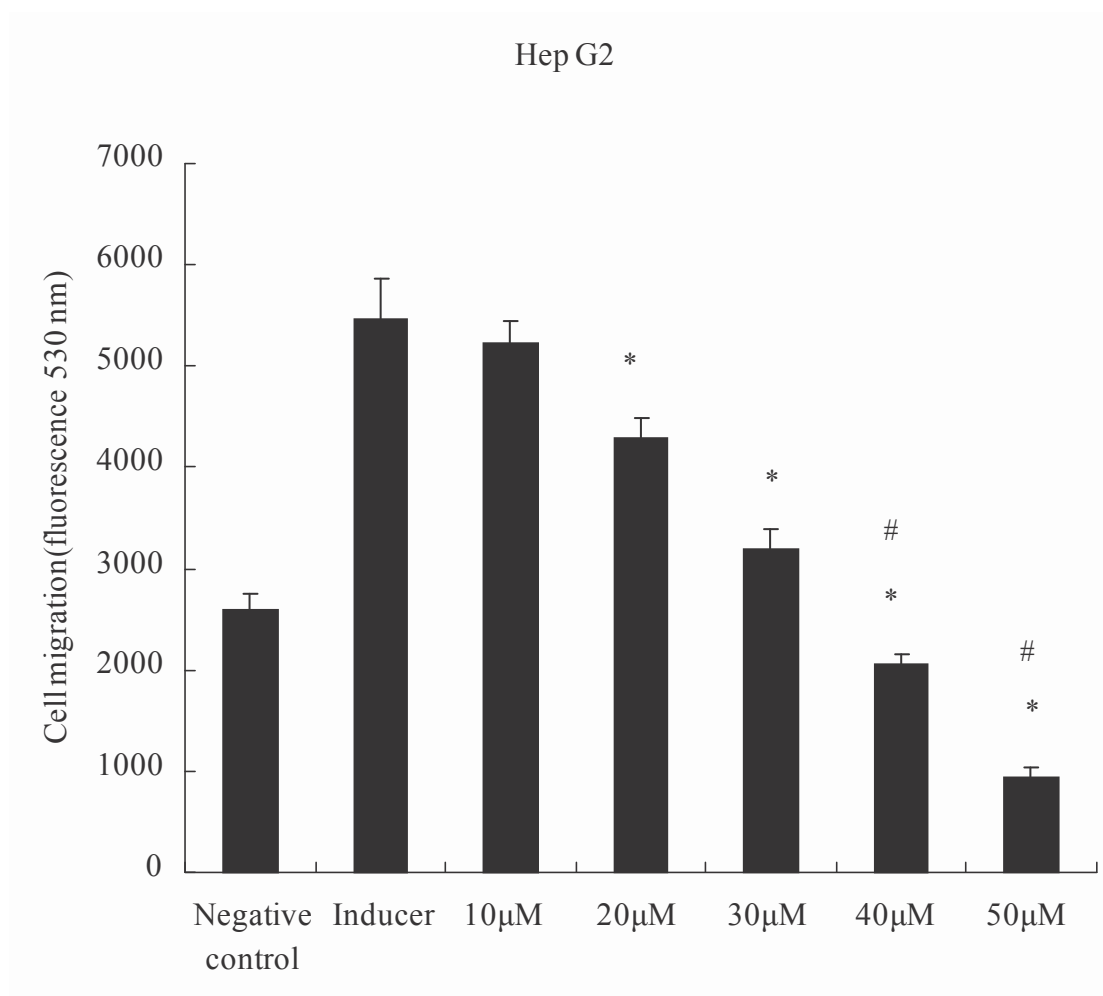
A.

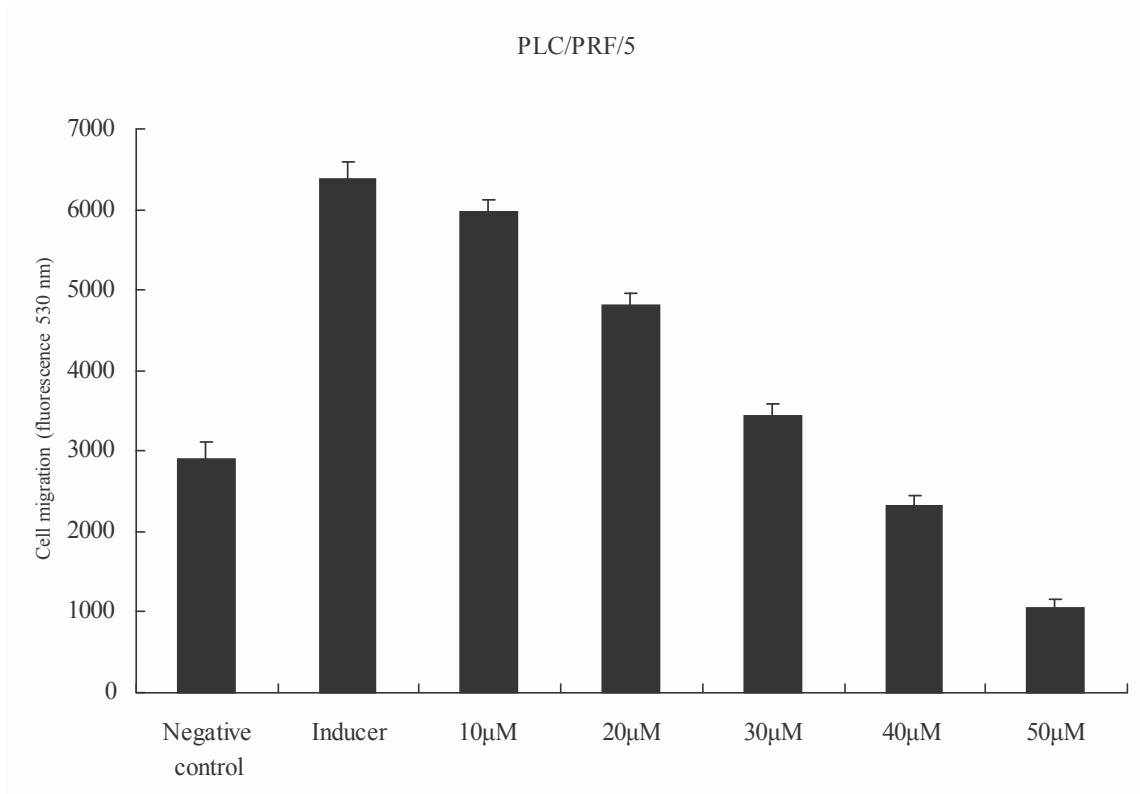


B.



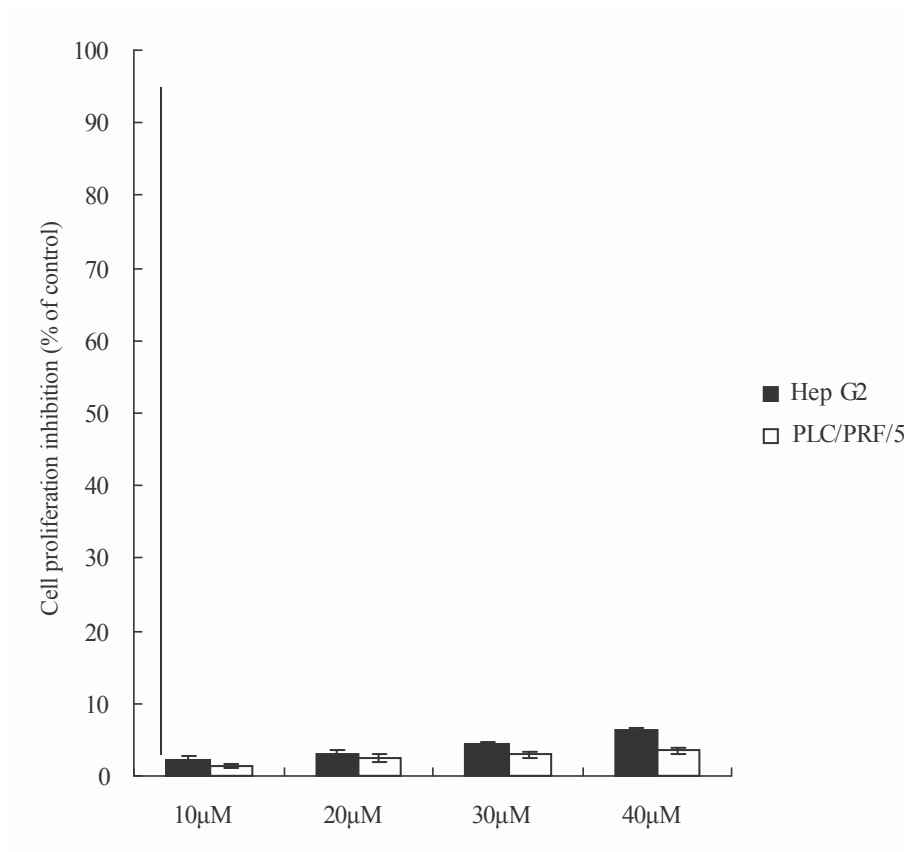
C.



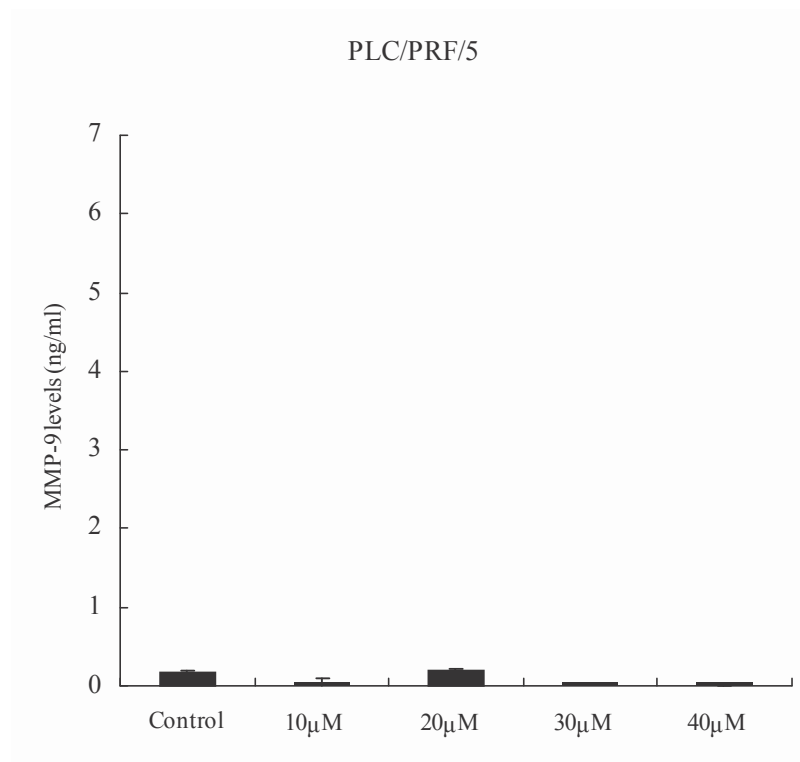
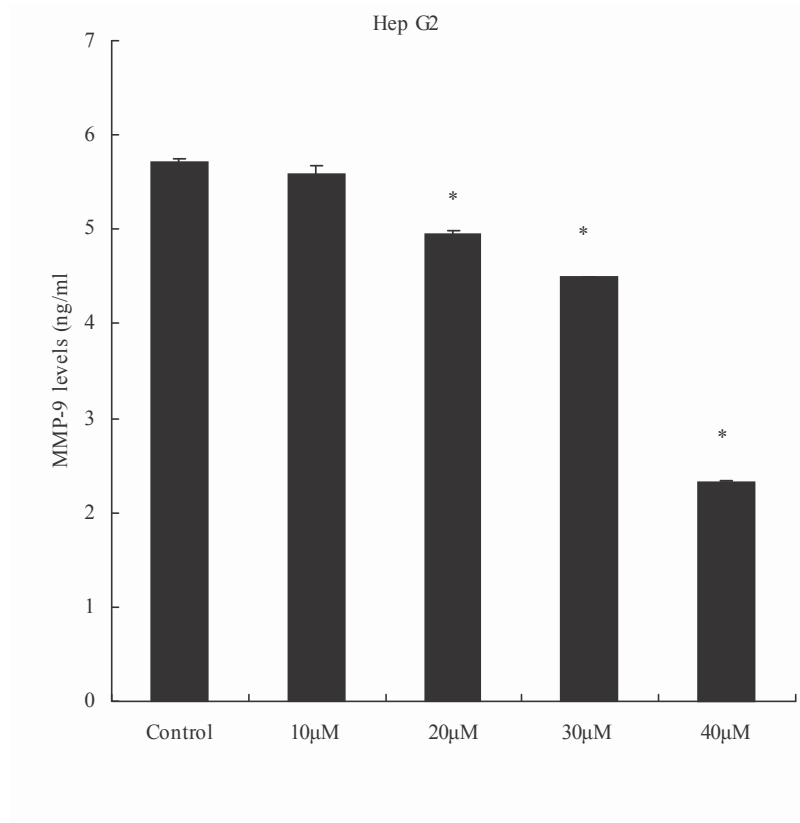


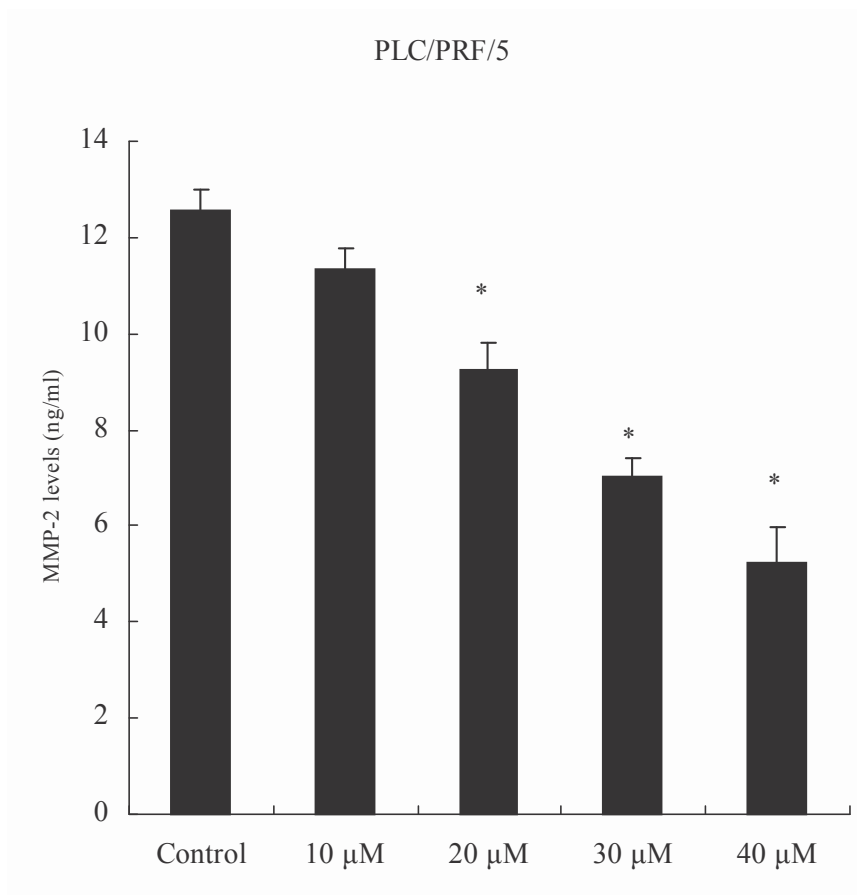
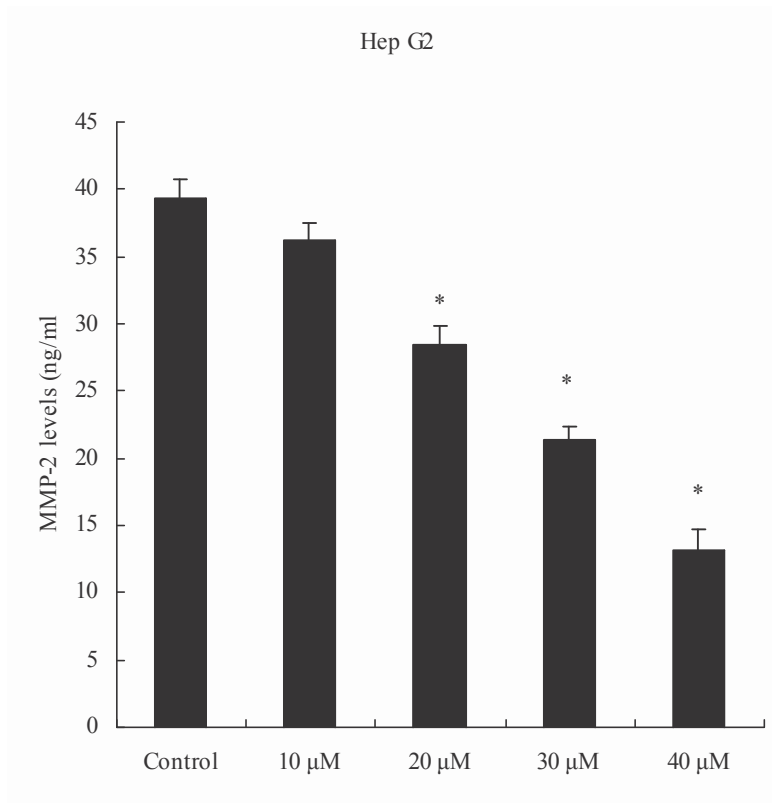
圖二 Glabridin對肝癌細胞株移行及入侵能力之抑制作用。(A) Glabridin抑制20% FBS所造成的Hep G2和PLC/PRF/5移行。(B)利用傷口癒合試驗分析glabridin對PLC/PRF/5細胞移行之分析。(C) Glabridin抑制20% FBS所造成的Hep G2和PLC/PRF/5入侵。數據統圖。結果表現為之平均(mean) 標準偏差(S.D.)；*代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複($n=3$)。

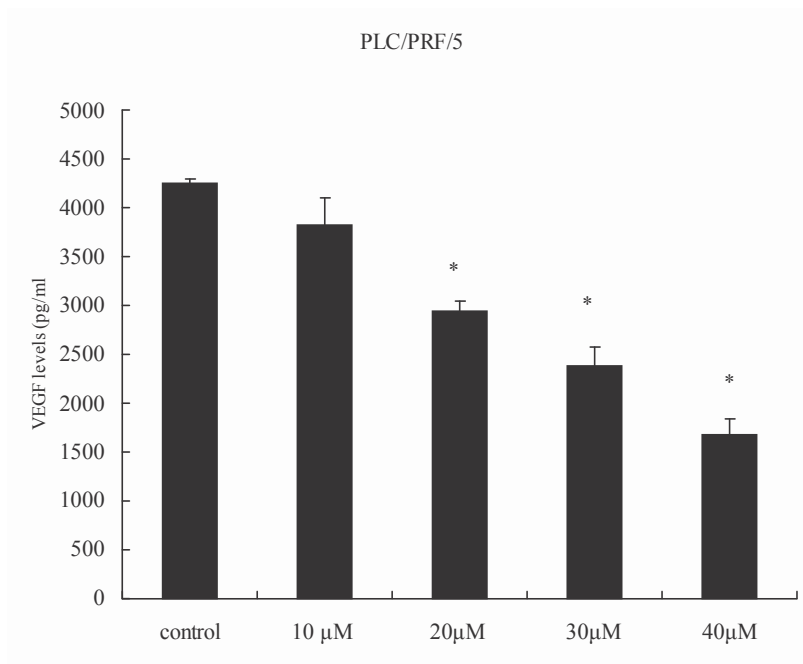
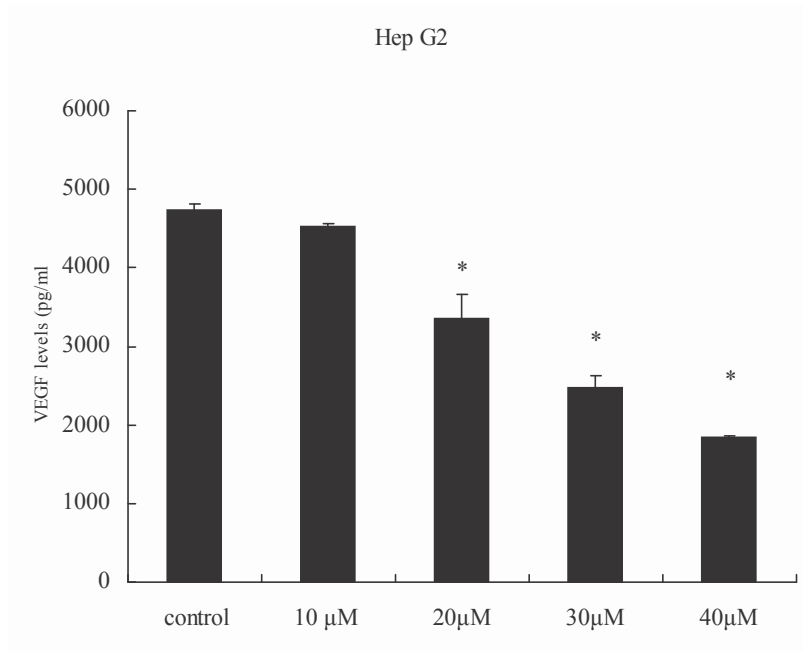
A.



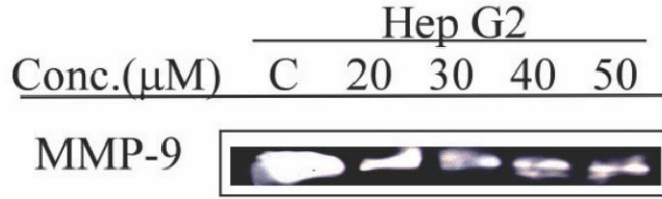
B.



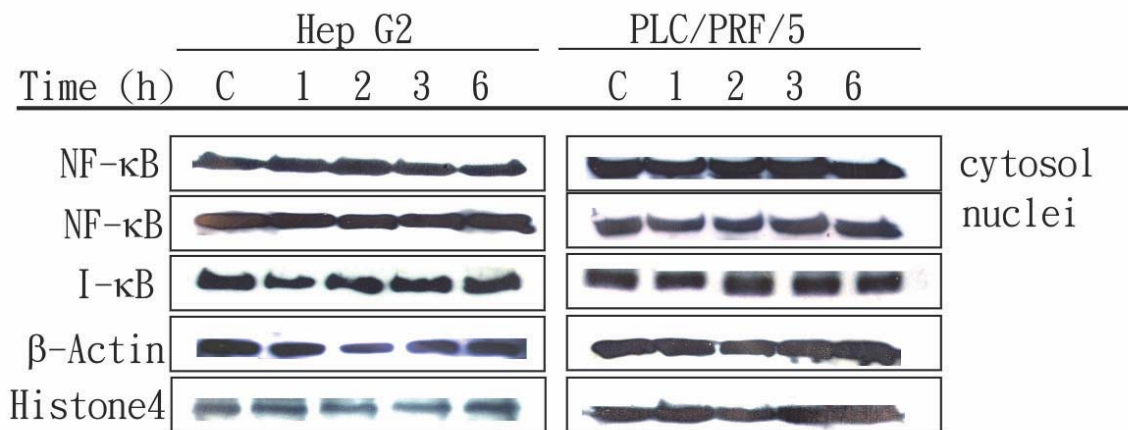




E.

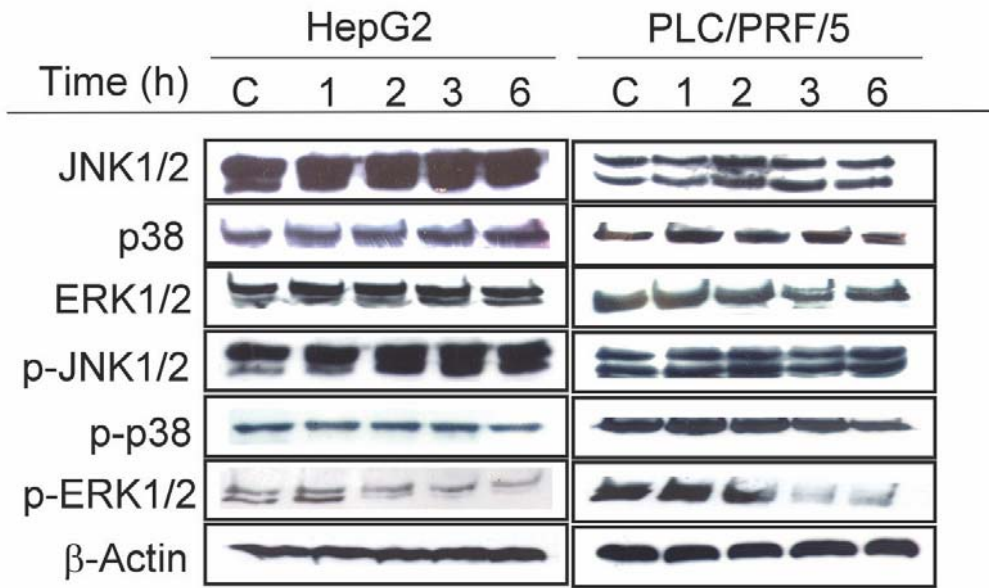


圖三 Glabridin對肝癌細胞株MMP-9和VEGF之抑制作用。(A) Glabridin抑制20% FBS所造成的MMP-9分泌作用。(B) Glabridin抑制20%FBS所造成的MMP-2分泌作用。(C) Glabridin抑制20%FBS所造成的VEGF分泌作用。(D) Glabridin抑制MMP-9的活性。結果表現為之平均(mean) 標準偏差(S.D.)；*代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複($n=3$)。



圖四 Glabridin對NF- κ B路徑的影響。每次實驗皆為三重複($n=3$)。

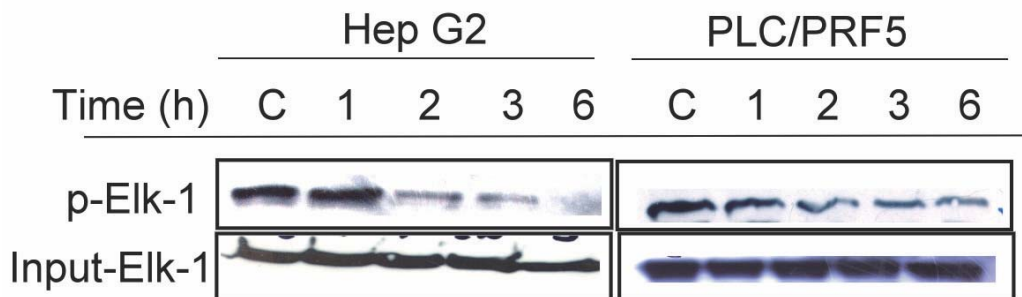
A.



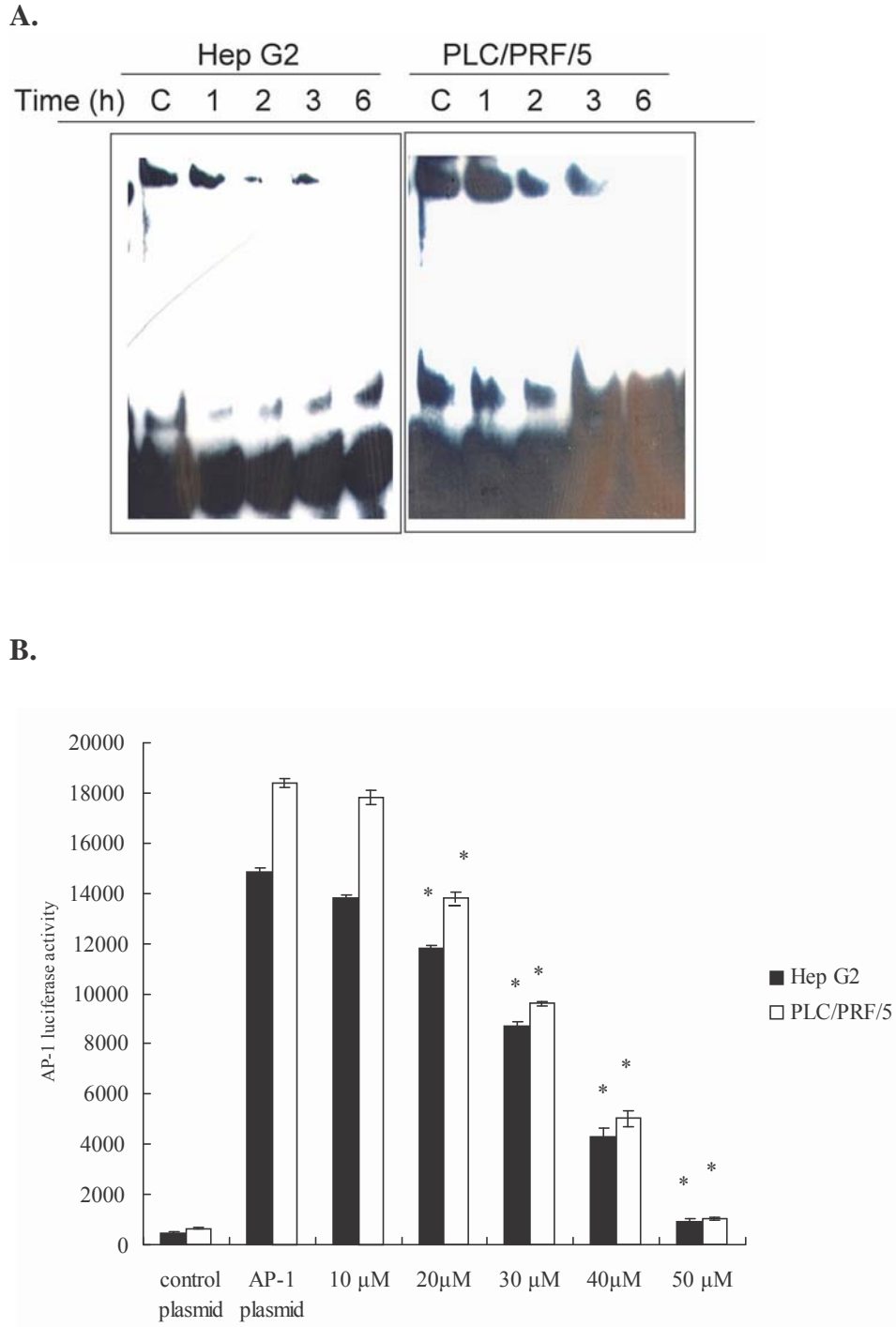
B.



C.

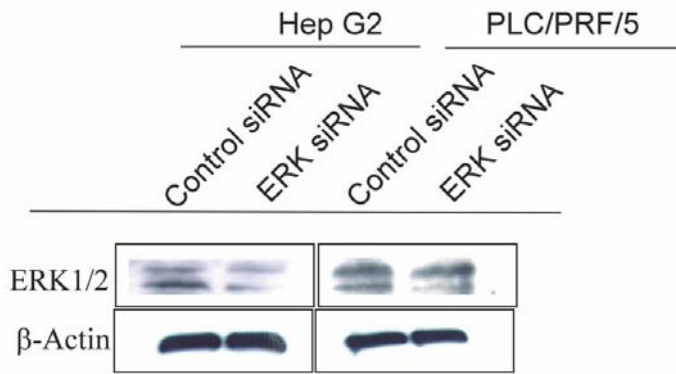


圖五 Glabridin對MAPK路徑的影響。(A) Glabridin抑制ERK1/2的磷酸化。(B) Glabridin降低細胞核內Elk-1的磷酸化。(C) Glabridin降低ERK1/2的活性。每次實驗皆為三重複(n=3)。

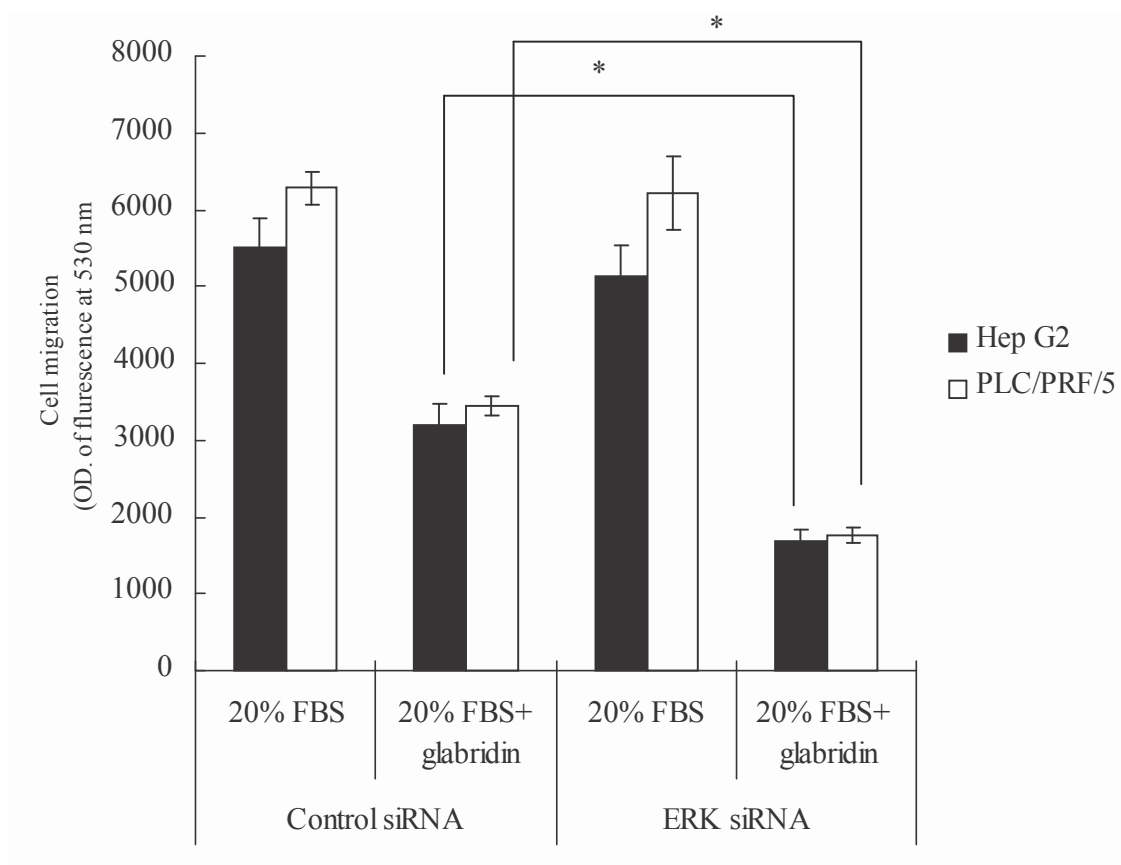


圖六 Glabridin降低轉錄因子AP-1的DNA結合能力及基因轉錄活性。(A)以EMSA分析glabridin對AP-1DNA結合能力的影響。(B)以reporter plasmid transfection分析glabridin對AP-1基因轉錄活性的影響。結果表現為之平均(mean) 標準偏差(S.D.); *代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複($n=3$)。

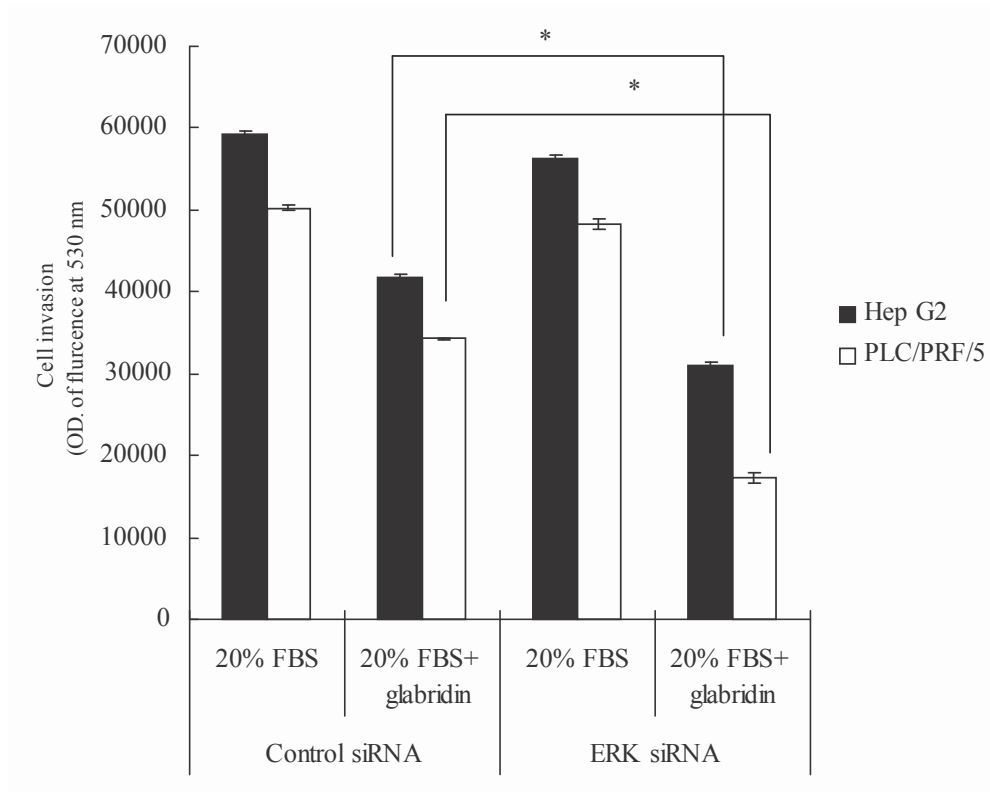
A.



B.

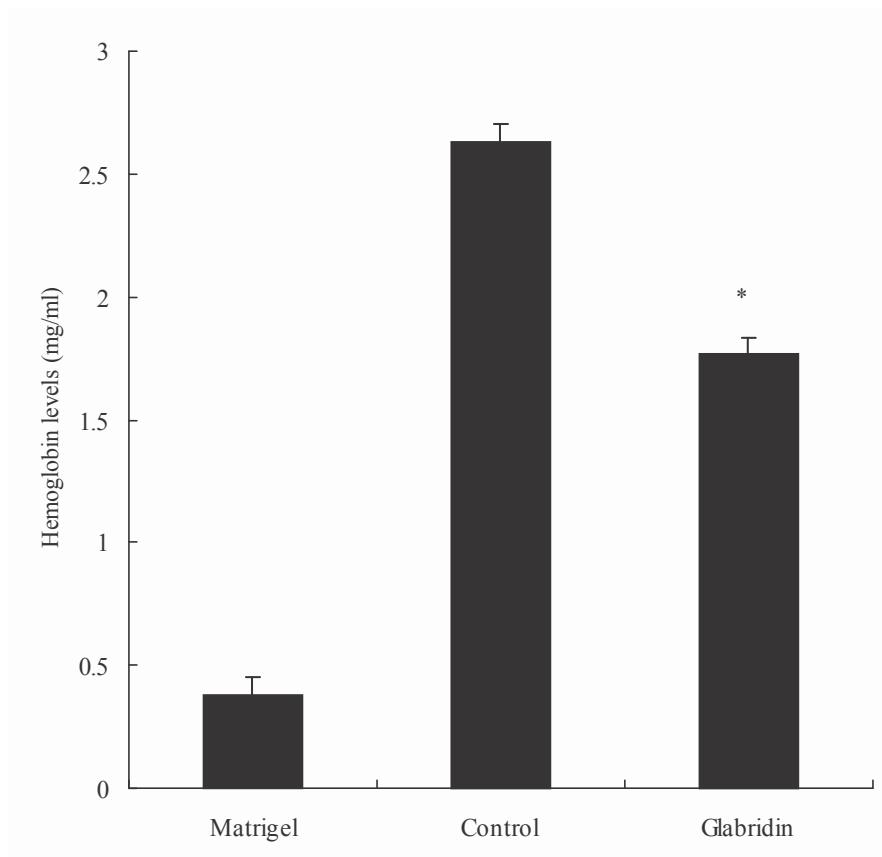
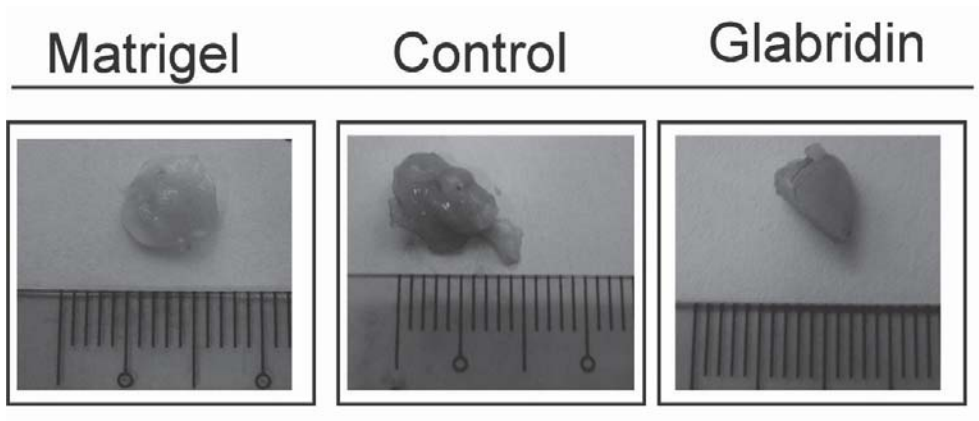


C.

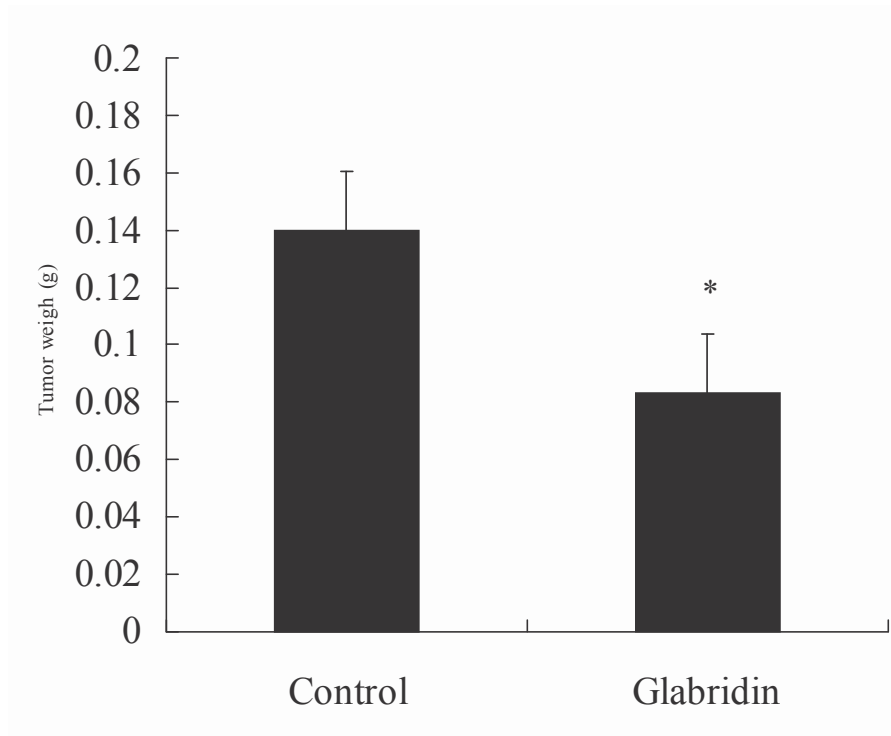


圖七 ERK1/2在galbridin活性之角色。(A) ERKsiRNA抑制ERK蛋白的表現。(B) ERK蛋白抑制後加強galbridin對肝癌細胞移行的抑制活性。(C) ERK蛋白抑制後加強galbridin對肝癌細胞入侵的抑制活性。結果表現為之平均(mean) 標準偏差(S.D.)；*代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複($n=3$)。

A.



B.



圖八 Glabridin抑制PLC/PRF/5所造成的血管新生作用。(A) Glabridin抑制裸鼠的血管新生。(B) ERK蛋白抑制後加強glabridin對肝癌細胞移行的抑制活性。(C) ERK蛋白抑制後加強glabridin對肝癌細胞入侵的抑制活性。結果表現為之平均(mean) 標準偏差(S.D.)；*代表實驗組和控制組具有統計學上之差異($p < 0.05$)。每次實驗皆為三重複($n=3$)。

