

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：棉酚在體外和體內影響口腔癌細胞轉移特性之分子機轉研究 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳郁婷
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-008-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 李宣信

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 105年03月03日

摘要

口腔鱗狀細胞癌目前已成為台灣地區第五大癌症死亡原因，就男性而言更高居第四位。儘管診斷與治療技術方法不斷進步，口腔癌五年存活率於過去幾十年來並無明顯改善。由於癌症之轉移為影響癌患存活率之首要因子，如何控制癌轉移即成為治療之一大重要指標。上皮間質的轉化(epithelial- mesenchymal transition; EMT)是上皮細胞腫瘤癌化時造成侵襲(invasion)和轉移(metastasis)的關鍵。而找尋有效降低轉移力、或增加口腔癌細胞對化療藥物敏感性之藥物為一有效策略之一。癌症幹細胞在以往相關研究中顯示具有自我更新能力並促使腫瘤持續生成，也是癌症化療無法剷除的根源之一。棉花的莖或種子萃取可得到化合物棉酚(Gossypol)，過去學者發現對於抗癌有多方面的發現。本研究經由細胞存活率分析實驗(MTT assay)發現棉酚能有效抑制人類口腔癌幹細胞球體(SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)之增殖能力，且棉酚在濃度為 $10\ \mu\text{M}$ 以下時，對人類正常口腔細胞不產生明顯細胞毒性。棉酚也有效降低體內口腔癌幹細胞標記ALDH1以及CD44的活性表現，以及有效抑制口腔癌幹細胞球體自我更新能力與細胞侵襲能力。綜合上述，驗證棉酚在體外和體內影響對口腔癌細胞轉移特性之實驗，能輔助化學治療藥物之抗癌效果及其分子機制，以提供臨床做為治療口腔鱗狀細胞癌的基礎。

關鍵字：口腔癌、口腔癌幹細胞、棉酚

目錄

摘要	1
文獻回顧與探討	3
材料與方法	6
結果	10
討論	12
參考文獻	14
圖	17

文獻回顧與探討

1. 口腔癌

頭頸鱗狀細胞癌 (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC)，包含口腔鱗狀細胞癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)，頭頸癌可包含四個部位的癌症：口腔、喉咽部、舌下咽部及喉部，其惡性程度於全世界排名第六，而在開發中國家為發生率排名第三的癌症(1; 2)。2006 年期間在台灣 OSCC 已經成為常見癌症中第六名，而男性癌症病患死因中排行第四，每年約有 1560 人死於此疾病(3)。造成 OSCC 的可能原因為嚼食檳榔(4)、抽菸(5)、喝酒(5)。早期 OSCC 的臨床治療方法為手術切除或放射治療，化療及化療與放射治療合併使用已被採用於治療晚期 OSCC 中(6)。雖然隨著醫療技術、診斷的進步，OSCC 似乎受到控制，但長期存活率最多也只能延長十年(3)，而且預後很差，超過 50% 的病患在五年內死於此疾病或其併發症(7)。因此許多學者致力於研究口腔癌的治疗方式及效果。

2. 上皮間質轉換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)

癌細胞在轉移的過程中，會變得更具侵犯力和移行力，進而遠端轉移，轉移的癌細胞會與原位腫瘤脫離細胞間的連結，也會由原本上皮細胞 (epithelial cell) 表面的分子標記細胞特質轉換成間葉細胞 (mesenchymal cell) 的型態，這現象稱為 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)。此轉換過程會導致細胞間的連接消失，細胞骨架重組以及上皮細胞特徵 Epithelial-cadherin (E-cadherin) 表現量下降，Neuronal-cadherin(N-cadherin) 表現量上升 (8)。EMT 過程是由細胞外信號所引發，如膠原蛋白分子之間的相互作用和生長因子，包括轉型生長因子- β (TGF- β)，纖維細胞生長因子 (FGF)，表皮生長因子 (EGF) 和血小板衍生的生長因子 (PDGF) A, B 和 D (9-12)。在另一項研究指出，PC3 細胞藉由 ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) 調控 IGF-1 活化 EMT 的表現 (13)。這些結果顯示 EMT 有助於腫瘤細胞的侵犯。然而相對應於原發性

腫瘤的病理機制 (14)，間葉-上皮轉換 (MET) 具有間葉型態的轉移性腫瘤細胞被認為是進行反向的轉換，為腫瘤遠端轉移的關鍵。最近的研究顯示，具有轉移能力的原發性結腸癌細胞呈現混合性上皮間葉細胞的型態(15)。膀胱癌 TSU-PR1 (T24) 系列的細胞株在體內實驗過程發現，細胞透過全身循環增加轉移的能力 (16)。在前列腺癌，Yates 等人將高度惡性且具有轉移至骨頭能力的前列腺癌細胞株與肝細胞進行共培養，發現 E-cadherin 的表現量上升 (17)。因此，前列腺癌的患者很有可能從原發部位透過 EMT 轉移到遠端，並表現 MET 的特性，(如從 PC3 和 DU145 細胞，分別最初轉移至骨和腦) (14)。因此，近年來研究學者們亦致力於研究促使癌細胞維持在 MET 型態的治療方法，預防轉移癌的發生。

3. 棉酚 (Gossypol)

棉酚，gossypol，分子式 (C₃₀H₃₀O₈)，莫耳質量 518.563g/mol 沸點為 707°C，為黃色的晶體。在二十世紀六零年代被發現是一種存在於棉花的棉籽及棉根皮中的多酚類物質。研究指出棉酚可經由滲透到細胞內，作為一些脫氫酶的抑制劑，並且具有抗氧化、抑制病毒、抗寄生蟲、抗微生物和降低血漿膽固醇等活性。棉酚可從棉籽油中提取或通過化學方法合成得到，進一步研究才發現，棉酚可以透過減少細胞分裂來降低男性精子的活性，可以作為男性口服的避孕藥，然而癌症的發生通常是由於細胞分裂異常所導致的，因此化學家將棉花的莖或種子萃取得到此化合物，研究其抗癌的效果。Gossypol 對於抗癌有多方面的發現，有學者發現 Gossypol 可透過調控 Bcl2 這個 family 誘導癌細胞凋亡。Gossypol 可抑制 HIV 病毒的複製(18)以及作為有效抑制蛋白質激酶 c (PKC) 的一個抑制劑(19, 20)。在 2010 年中有研究提到，Gossypol 可以透過誘導細胞產生 DNA damage 以及活化 p53 這個腫瘤抑制基因並誘導前列腺癌細胞走向凋亡(21)。Gossypol 可透過降低與 Bcl-2 和 Bcl-xL 的蛋白表現，降低前列腺癌細胞轉移的侵襲力(22)。另外 Gossypol 會降低細胞內 GSH, aspartic acid, and FAD 的表現，透過氧化壓力進一步促使卵巢癌細胞(SKOV3)的走向凋亡(23)。透過 ROS-ERK-CHOP

Pathway 來誘導 Death Receptor-5(DR5)，可使大腸癌細胞走向凋亡。有學者進一步使用到臨床上的測試，像是口服棉酚被用來治療腎上腺癌的轉移，讓 21 名患者口服棉酚劑量為 30-70 毫克/天(24)，證實口服棉酚可以用來比較安全地用於治療轉移性腎上腺腫瘤。

4. 癌症幹細胞(cancer stem cells ; CSC)

生命在早期發展時，幹細胞具備強大潛力發展成體內各種細胞，尤其能在許多組織中扮演內部修飾系統，具有自我更新能力(32)。癌症幹細胞又稱癌幹細胞、腫瘤幹細胞，此類細胞被認為有形成腫瘤，產生癌症的潛力，尤其是癌症轉移出去所產生新型癌症的來源。具有與幹細胞相類似的多細胞分化能力。癌症幹細胞是特定腫瘤細胞具有與正常幹細胞相同的能力，具有自我更新、持續分裂、分化的能力，進而能不斷地增殖產出更多癌細胞(25, 26, 28)。癌症幹細胞被認為是造成化療、放射性療法後產生轉移、復發的原因之一(29)。因此希望找出有效抑制癌症幹細胞之藥物，降低腫瘤產生復發或轉移的可能性。

材料與方法

1. 細胞培養及處理 (Cell Culture)

細胞株	培養液
SG-parental 人類正常口腔牙齦角化細胞株	DMEM + 10%FBS + 1%PSA
GNM-parental 人類口腔鱗狀細胞癌細胞株(頸淋巴轉移)	
SAS-parental 人類舌鱗狀細胞癌細胞株	DMEM/F12 + 10%FBS + 1%PSA
OECM-1-parental	RPMI + 10%FBS + 1%PSA
GNM-sphere	DMEM/F12 + 1%N2-supplement + b-FGF + EGF + 1%PSA
SAS-sphere	
OECM-1-sphere	
	Methylcellulose + DMEM/F12 + 1% N2-supplement + b-FGF + EGF + 1%PSA

1-1. Sphere cells(癌症幹細胞球體)

6 well plate 先各加入 1-2C.C. 的 Methylcellulose + DMEM/F12 + 1%

N2-supplement + b-FGF + EGF + 1%PSA 做為避免細胞貼附的基底層，拆下

parental cells 後以 PBS 洗掉血清，取約 5×10^5 cells 加入培養液混合(DMEM/F12

+ 1%N2-supplement + b-FGF + EGF + 1%PSA)，37 °C 培養箱一周後形成球體型

態 (sphere) 之癌症幹細胞。

2. 細胞存活分析 (Microculture tetrazolium Assay ; MTT Assay)

本實驗室用來測試細胞是否有活性以及是否存活的方法，將癌細胞以 2×10^4 - 5×10^4 細胞數種至 96well 中， 37°C 培養箱培養至細胞滿度 8 分滿，以不同濃度 Gossypol (0、2.5、5、10、20、40 μM) 處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液。避光，加入與培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent，培養箱作用 3 小時之後移除上清液，每 well 加入 200 μl DMSO，放置 shaker 搖晃 10 分鐘，於 O.D. 570 nm 下測定溶液吸光值，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

3. 幹細胞繼代實驗 (Secondary Sphere Formation Assay)

癌症幹細胞球體經 trypsin 處理打散成單顆細胞，6 well plate 每格加入 5×10^4 顆細胞，計算培養液需混合棉酚濃度 (0、2.5、5 μM) 之體積，總體積每格 2c.c.，至於 37°C 培養箱培養一週，利用顯微鏡攝影 sphere 細胞之再生成量，實驗二重複。

4. 流式細胞儀之幹細胞特性分析 (Flow Cytometry)

3-1. 染 ALDH1 :

口腔癌幹細胞生成一個禮拜後，分種至 60mm dishes 貼附，每盤 5×10^5 - 2×10^6 顆細胞。待細胞貼附 9 成滿進行加藥 (Gossypol: 0、2.5、5 μM) 處理 24 小時，取下細胞 (control-no stain 每管取 1×10^6 ; stain 每管取 5×10^5)，加入 PBS wash 離心去掉上清液 → 避光，每個 stain 管加入 1c.c. ALDEFLUOR™ Assay Buffer 回溶細胞 → no stain 先加 5 μl DEAB (ALDH1 inhibitor) → stain 管加入 5 μl substrate ALDH1 → mix 後取 0.5c.c. 至 no stain → 37°C 水浴槽避光反應 1 小時 (每 10 分鐘搖晃一次) → 離心去上清液 → 取 ALDEFLUOR™ Assay Buffer 回溶 (500 μl no stain; 350 μl stain) → 過 filter → 操作 Flow 儀器進行分析

3-2. 染 CD44 :

口腔癌幹細胞生成一個禮拜後，分種至 60mm dishes 貼附，每盤 5×10^5 - 2×10^6 顆細胞。待細胞貼附 9 成滿進行加藥(Gossypol: 0、2.5、5 μ M)處理 24 小時，取下細胞(control : no stain 每管取 1×10^6 ; stain : 0、2.5、5 μ M 每管取 5×10^5)，加入 PBS wash 離心去掉上清液→避光，加 100 μ M 0.1%BSA 回溶，stain 管加入 CD44(CD44 : 0.1%BSA=1 : 500) →4°C shake 30 分鐘→加入 0.5C.C. 0.1%BSA 終止反應→離心→取 0.1%BSA 回溶(500 μ l no stain; 350 μ l stain)→過 filter →操作 Flow 儀器進行分析。

5. 軟瓊脂細胞群落生成試驗 (Soft agar colony formation assay)

將 agar 以 PBS 配製成 3% 後，放入微波爐加熱溶解，以滅菌鍋或是置於沸水中隔水加熱 20 分鐘，以達到滅菌效果，趁凝固前分裝到 1.5 ml 離心小管。實驗前需稀釋製備上、下層 agar，上層含有 0.3% agar、15% FBS 以及含 1% PSA 的細胞培養液。下層 agar 則含有 0.5% agar、15% FBS 以及含 1% PSA 的細胞培養液。操作步驟為先使用 6-well 培養盤製備下層 agar，每 well 加入 1 ml，倒入時應避免氣泡產生，可放入培養箱待下層凝固後，隔天再製備上層。在 well 與 well 之間加入適量 PBS，保持 agar 濕潤。加入已製備完成的上層膠混合 5×10^4 個細胞/well，放回 37°C 細胞培養箱，14 天後可觀察到細胞群落。每格加入 0.05% 結晶紫 (crystal violet) (Sigma-ALDRICH) 0.5 ml 染色 15 分鐘，利用顯微鏡觀察細胞群落，每個觀察五個視野，平均值為細胞形成群落能力，每次實驗各組皆做 3 重複。

6. 細胞侵襲試驗 (Cell invasion assay)

實驗進行前將轉移盤上層鋪上 Matrigel™ (BD Pharmingen, NJ, USA)，將每樣品取 5×10^5 個細胞與不含血清的培養液 250 μ l 加入轉移盤 (Transwell®，

8 μm pore size, polycarbonate membrane, Corning® Costar) 之上層盤中，並於下層盤加入 750 μl 含有 10% FBS 的培養液，放入細胞培養箱培養。24 小時後，將轉移盤取出，用 PBS 清洗 2 次，並以 PBS 沾濕的棉花棒將上層盤內未移行的細胞清除，以 MeOH 固定細胞，放置 4°C 冰箱 15 分鐘，再用 crystal violet 染細胞 1 小時。用 PBS 清洗數次，自然風乾後以顯微鏡 100 X 視野觀察，每個膜取 5 個視野，平均值為細胞相對侵襲能力，每次實驗各組皆做 2 重複。

結果

1. 棉酚降低口腔癌幹細胞自我更新能力

癌症幹細胞在過去研究中已發現具有自我更新、持續分裂、分化的能力 (28)，將口腔癌症細胞株 (SAS、OECM-1、GNM) 以 6 well plate 與無血清培養液培養一週 (下層：Methylcellulose+DMEM/F12+1%N2-supplement+b-FGF+EGF+1%PSA；上層：DMEM/F12+1%N2-supplement+b-FGF+EGF+1%PSA)，三株癌細胞皆能培養出具有生成幹細胞球體 (sphere) 細胞能力的癌症幹細胞。為驗證棉酚對癌症幹細胞自我更新之抑制效果，加入不同濃度棉酚(0、2.5、5、10、20、40 μM)處理 24 小時，發現棉酚能有效抑制人類口腔癌幹細胞球體(SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)之增殖能力，且棉酚在濃度為 10 μM 以下時，對人類正常口腔細胞不產生明顯細胞毒性 (圖一)。癌症幹細胞增生的首要條件來自於其自我生成更新 (30)，利用幹細胞繼代培養，以無血清培養液培養癌症幹細胞球體(SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)，培養液混合棉酚濃度(0、2.5、5 μM)之體積，培養一週後，發現棉酚能有效抑制癌症幹細胞球體之再生成能力(圖二)。研究指出癌症幹細胞能在體內轉移可能係因其不貼附生長特性，以軟瓊脂擬為細胞生長環境，可觀察不貼附生長聚落的形成狀況(32)，為探討口腔癌幹細胞球體 (SAS-sphere、OECM-1-sphere) 是否可以非貼附型態於體外實驗生長，加入不同濃度之棉酚 (0、2.5、5 μM) 混合於培養液與軟瓊脂 14 天，發現棉酚有效抑制癌症幹細胞不貼附生長之能力 (圖三)。

2. 棉酚降低口腔癌幹細胞標記 ALDH1、CD44 活性表現

乙醛脫氫酶，ALDH1 (Aldehyde Dehydrogenases 1) 在幹細胞中被發現，亦可做為癌症幹細胞的標記，具高度表現活性(32, 33)。將三種口腔癌幹細胞球體 (SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)，分別以不同濃度 (SAS-sphere、GNM-sphere : control、2.5 μM 、5 μM ；OECM-1-sphere : control、5 μM 、10 μM)

之棉酚作用 24 小時，再以 ALDEFLUOR 測試 ALDH1⁺ 表現之細胞，no stain 組加入 DEAB(ALDH 抑制劑)做為對照，以流式細胞儀分析癌症幹細胞具有 ALDH1 表現所占比例，結果顯示隨著棉酚濃度上升，具 ALDH1⁺ 表現之細胞數量下降 (圖四)。過去研究發現 CD44 參與細胞增殖、遷移、血管生成以及細胞膜上蛋白質之對接信號，這些性質是正常細胞生長的必要因子，但也同時與癌細胞有關，動物實驗發現以 CD44 做癌症標靶能明顯抑制腫瘤持續惡化(34)。本實驗選取口腔癌幹細胞球體 (SAS-sphere)，分別以不同濃度 (SAS-sphere:control、2.5 μ M、5 μ M) 之棉酚作用 24 小時，以流式細胞儀分析癌症幹細胞具有 CD44 表現，所占比例隨棉酚濃度上升表現細胞數逐漸下降 (圖五)。

3. 棉酚抑制癌症幹細胞之侵襲能力

上皮間質轉換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)通常會在早期癌症腫瘤中被發現，會發生 E-cadherin 表現量下降、間質細胞增加、細胞間隙分解失去連結 (8)。越來越多研究證明上皮間質轉換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)不僅與腫瘤侵襲性和轉移具有關聯性，並且發現這些細胞具有癌症幹細胞特性，皆為造成腫瘤復發原因之一，因此也被視為一種腫瘤起始細胞 (14, 15, 16, 35)。本研究以無血清培養液培養癌症幹細胞球體 (SAS-sphere、GNM-sphere、OECM-1-sphere)，不同濃度之棉酚 (0、2.5、5 μ M) 加入培養於有 Matrigel 轉移盤(Transwell)上盤，48 小時後觀察發現棉酚有效抑制癌症幹細胞之侵襲能力。

討論

口腔癌目前普遍的治療方法有化學治療、腫瘤切除以及合併前兩種方法進行治療，而仍經常會產生復發的狀況，不僅預後不佳，副作用也可能嚴重影響患者的生活品質。過去許多研究顯示棉酚對於抗癌有多方面的發現：學者發現棉酚過調控 Bcl2 這個 family 誘導癌細胞凋亡。Gossypol 可抑制 HIV 病毒的複製(18)。可做為有效抑制蛋白質激酶 c (PKC) 的一個抑制劑(19, 20)。棉酚透過誘導細胞產生 DNA damage 以及活化 p53 這個腫瘤抑制基因並誘導前列腺癌細胞走向凋亡(21)。此外棉酚亦可降低細胞內 GSH, aspartic acid, and FAD 的表現，透過氧化壓力進一步促使卵巢癌細胞(SKOV3)的走向凋亡(23)。透過 ROS-ERK-CHOP Pathway 來誘導 Death Receptor-5(DR5)，可使大腸癌細胞走向凋亡。也有學者臨床測試發現口服棉酚可用於治療轉移性腎上腺腫瘤(24)。而癌症幹細胞則是目前癌症治療中無法剷除的，且同時具備自我更新、分化以及低貼附的能力，是癌症復發的原因之一(25, 26, 28, 29)。綜合上述，本研究使用棉酚來探討對口腔癌幹細胞的抑制成效，結果顯示棉酚能降低口腔癌幹細胞(SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)自我更新能力及再生能力、有效抑制癌症幹細胞(SAS-sphere、OECM-1-sphere)不貼附生長之能力，且棉酚在濃度為 $10 \mu\text{M}$ 以下時，對人類正常口腔細胞不產生明顯細胞毒性。文獻指出 ALDH 與 CD44 在頭部和頸部鱗狀細胞癌之癌症幹細胞具有標記作用(36)，本研究發現棉酚降低口腔癌幹細胞(SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)標記 ALDH1 活性表現以及有效降低口腔癌幹細胞(SAS-sphere)標記 CD44 活性表現。

過去許多學者指出 EMT 有助於腫瘤細胞的侵犯。上皮間質轉換(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)通常會在早期癌症腫瘤中被發現，會發生 E-cadherin 表現量下降、間質細胞增加、細胞間隙分解失去連結(8)。EMT 過程是由細胞外信號所引發，如膠原蛋白分子之間的相互作用和生長因子，包括轉型生長因子- β (TGF- β)，纖維細胞生長因子 (FGF)，表皮生長因子 (EGF)

和血小板衍生的生長因子 (PDGF) A, B 和 D (9-12)。越來越多研究證明上皮間質轉換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 不僅與腫瘤侵襲性和轉移具有關聯性，並且發現這些細胞具有癌症幹細胞特性，皆為造成腫瘤復發原因之一，因此也被視為一種腫瘤起始細胞 (14, 15, 16, 35)。也有研究顯示，具有轉移能力的原發性結腸癌細胞呈現混合性上皮間葉細胞的型態 (15)。膀胱癌 TSU-PR1 (T24) 系列的細胞株在體內實驗過程發現，細胞透過全身循環增加轉移的能力 (16)。Yates 等人將高度惡性且具有轉移至骨頭能力的前列腺癌細胞株與肝細胞進行共培養，發現 E-cadherin 的表現量上升 (17)。因此，前列腺癌的患者很有可能從原發部位透過 EMT 轉移到遠端，並表現 MET 的特性，(如從 PC3 和 DU145 細胞，分別最初轉移至骨和腦) (14)。因此，近年來研究學者們亦致力於研究促使癌細胞維持在 MET 型態的治療方法，預防轉移癌的發生。亦有文獻指出棉酚可透過降低與 Bcl-2 和 Bcl-xL 的蛋白表現，降低前列腺癌細胞轉移的侵襲力 (22)。綜合上述，本研究取棉酚加入癌症幹細胞 (SAS-sphere、GNM-sphere、OECM-1-sphere) 發現棉酚對癌症幹細胞之侵襲能力有抑制效果，推論在未來需更進一步去探討抑制癌症幹細胞 EMT 過程中的特性以及其相關機制。

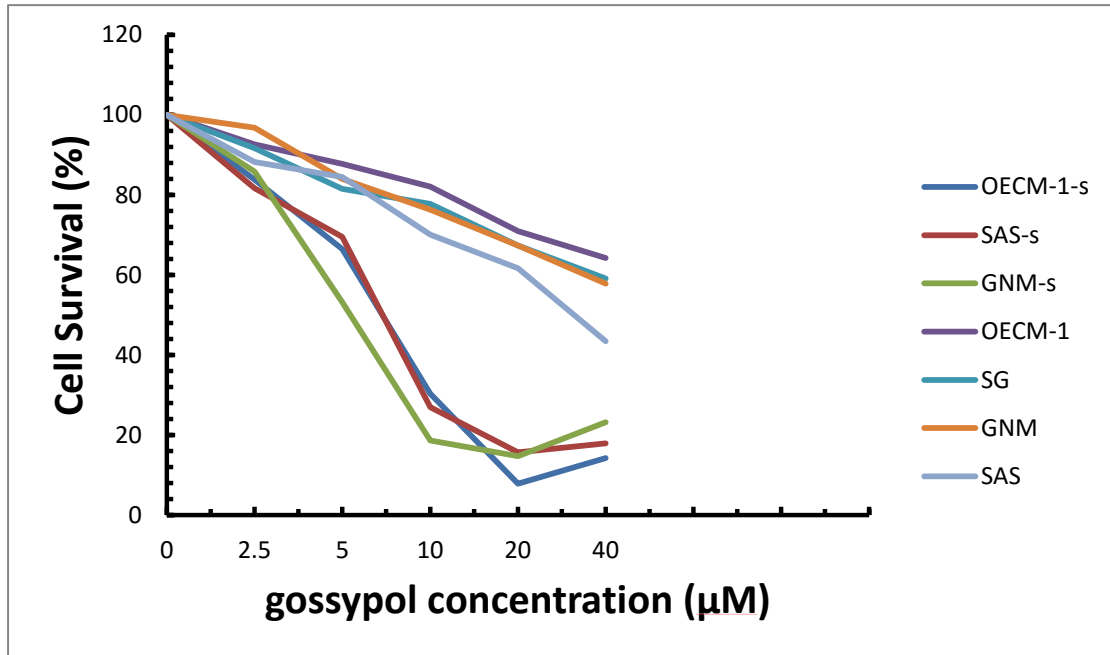
參考文獻

1. Chen YJ, Lin SC, Kao T, Chang CS, Hong PS, Shieh TM, Chang KW: *Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma. J Pathol* 2004;204:326-332
2. Pentenero M, Gandolfo S, Carrozzo M: *Importance of tumor thickness and depth of invasion in nodal involvement and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. Head Neck* 2005;27:1080-1091
3. Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, Lu YC, Li HF, Cheng AJ: *Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. Cancer Sci* 2008;99:1507-1514
4. Ho PS, Ko YC, Yang YH, Shieh TY, Tsai CC: *The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: an endemic betel quid chewing area. J Oral Pathol Med* 2002;31:213-219
5. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H: *Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. Clin Investig* 1992;70:320-327
6. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J, Cooper J: *Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. N Engl J Med* 2003;349:2091-2098
7. Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Chen IH, Huang SF, Cheng AJ, Yen TC: *Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. Ann Surg Oncol* 2008;15:915-922
8. Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP: *Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. Clin Exp Metastasis* 2007;24:587-597
9. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N: *Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1532-1542
10. Fischer AN, Fuchs E, Mikula M, Huber H, Beug H, Mikulits W: *PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. Oncogene* 2007;26:3395-3405
11. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG: *Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney Int* 2002;61:1714-1728
12. Yang L, Lin C, Liu ZR: *P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. Cell* 2006;127:139-155

13. Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, Liu T, Simons JW, O'Regan RM: *Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cancer Res* 2008;68:2479-2488
14. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW: *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol* 2007;213:374-383
15. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T: *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10356-10361
16. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED: *Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. Cancer Res* 2006;66:11271-11278
17. Yates CC, Shepard CR, Stolz DB, Wells A: *Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. Br J Cancer* 2007;96:1246-1252
18. Polsky, B.; Segal, S. J.; Baron, P. A.; Gold, J. W.; Ueno, H.; Armstrong, D., *Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol. Contraception* 1989, 39, 579-87.
19. Teng, C. S., *Gossypol-induced apoptotic DNA fragmentation correlates with inhibited protein kinase C activity in spermatocytes. Contraception* 1995, 52, 389-95.
20. Xiao, D. M.; Zhou, W. H.; Zhang, Y. H.; Wang, X. L.; Zhu, B.; Zhang, J. B.; Yang, G. D.; Chen, H. C., [Comparison between the effects of (-)- and (+)-gossypol on protein kinase C and protein kinase A]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 1993, 28, 494-8.
21. Volate, S. R.; Kawasaki, B. T.; Hurt, E. M.; Milner, J. A.; Kim, Y. S.; White, J.; Farrar, W. L., *Gossypol induces apoptosis by activating p53 in prostate cancer cells and prostate tumor-initiating cells. Molecular cancer therapeutics* 2010, 9, 461-70.
22. Huang, Y. W.; Wang, L. S.; Dowd, M. K.; Wan, P. J.; Lin, Y. C., (-)-Gossypol reduces invasiveness in metastatic prostate cancer cells. *Anticancer research* 2009, 29, 2179-88.
23. Wang, J.; Jin, L.; Li, X.; Deng, H.; Chen, Y.; Lian, Q.; Ge, R., *Gossypol induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress. Molecular bioSystems* 2013, 9, 1489-97.

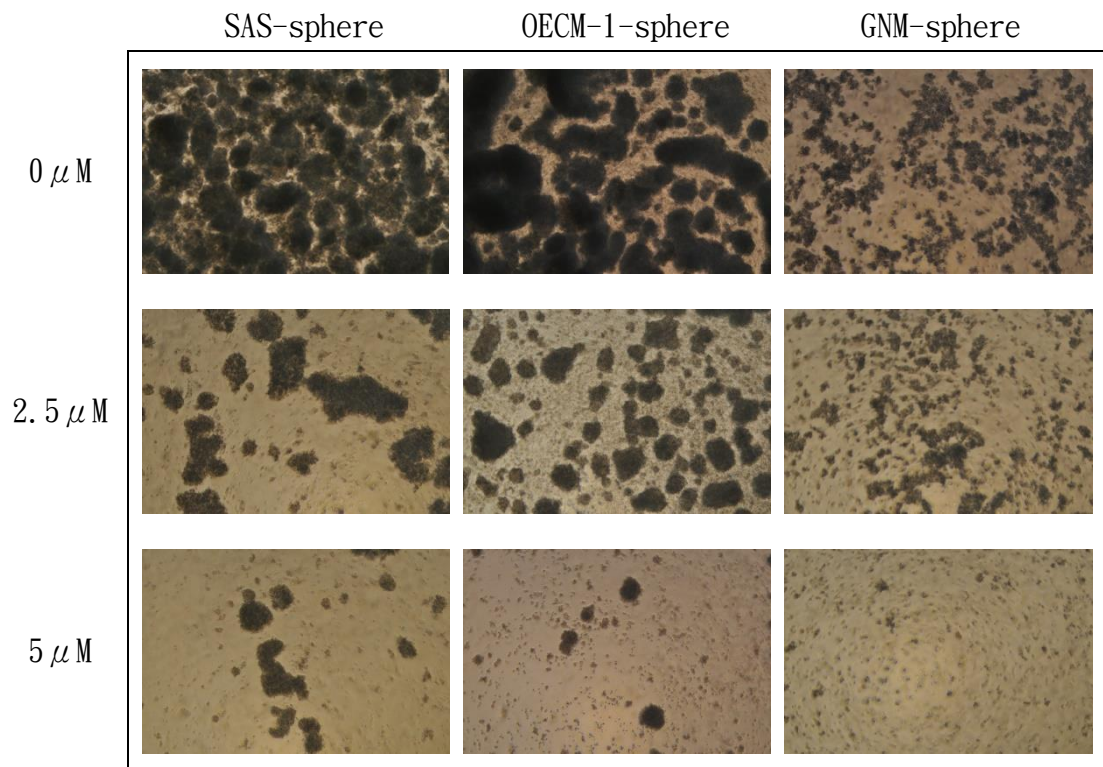
24. Flack, M. R.; Pyle, R. G.; Mullen, N. M.; Lorenzo, B.; Wu, Y. W.; Knazek, R. A.; Nisula, B. C.; Reidenberg, M. M., *Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer. The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1993, 76, 1019-24.
25. Prud'homme GJ: *Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. Curr Pharm Des* 2012;18:2838-2849
26. Kim YS, Farrar W, Colburn NH, Milner JA: *Cancer stem cells: potential target for bioactive food components. J Nutr Biochem* 2012;23:691-698
27. Li Y, Wicha MS, Schwartz SJ, Sun D: *Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. J Nutr Biochem* 2011;22:799-806
28. L Vermeulen¹, MR Sprick¹, K Kemper¹, G Stassi² and JP Medema^{*,1}: *Cancer stem cells – old concepts, new insights. Cell Death and Differentiation* 2008;15, 947–958
29. Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM: *Cancer Stem Cells and Stemness Markers in Oral Squamous Cell Carcinomas. Asia Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014;15,8549-8556
30. Visvader JE: *Cells of origin in cancer. Nature* 2011;469,314-322
31. Al-Hajj M1, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells* 2003;100: 3983–3988
32. Fuchs E & Segre JA: *Stem cells: a new lease on life. Cell* 2000;Vol.100:143-155
33. Mieog JS, de Kruijf EM, Bastiaannet E, Kuppen PJ, Sajet A, de Craen AJ, Smit VT, van de Velde CJ, Liefers GJ: *Age determines the prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase-1 in breast cancer. BMC Cancer* 2012; Vol.12, No.:42
34. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y: *CD44 in cancer. Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39:527-79
35. Dejuan Kong, Yiwei Li, Zhiwei Wang and Fazlul H. Sarkar: *Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? Cancers* 2011;3,716-729
36. Sudha Krishnamurthy, Zhihong Dong, Dmitry Vodopyanov, Atsushi Imai, Joseph I. Helman, Mark E. Prince, Max S. Wicha, and Jacques E. Nör: *Endothelial Cell-Initiated Signaling Promotes the Survival and Self-Renewal of Cancer Stem Cells. Cancer Res* 2010;70,9969-78

圖



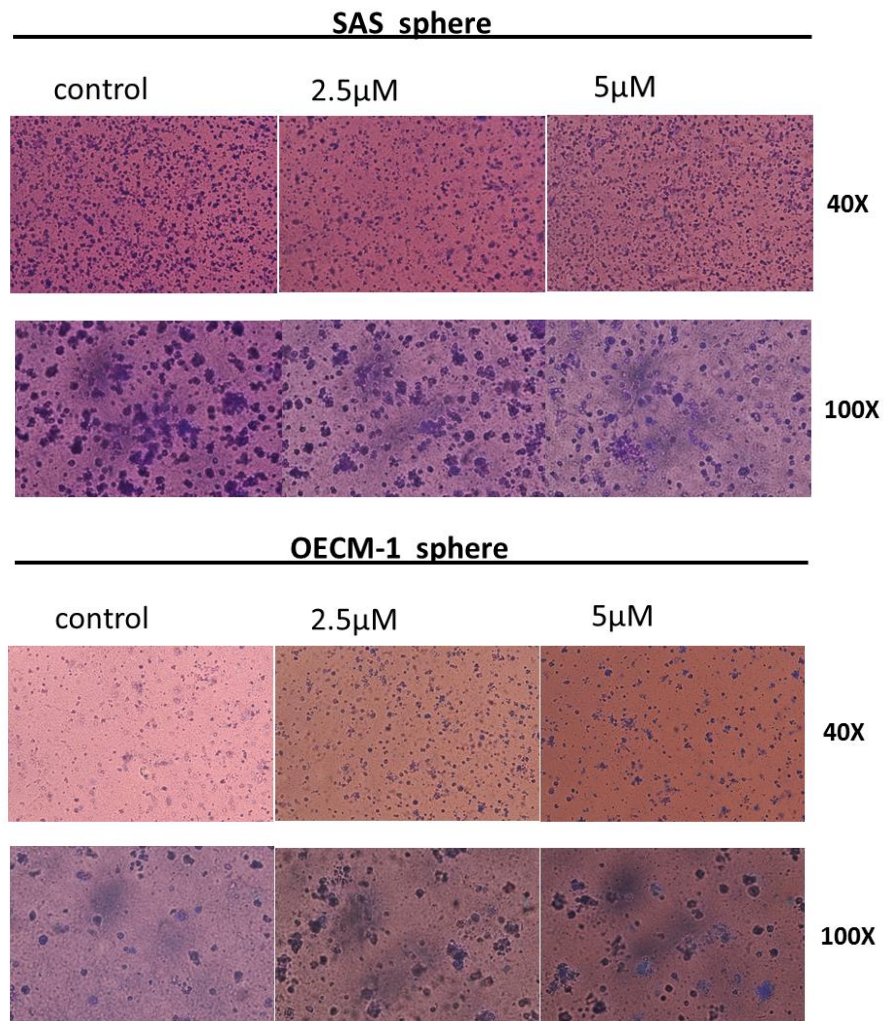
圖一、不同濃度之棉酚處理 24 小時之細胞存活率

將人類口腔正常細胞株 (SG)、口腔癌細胞株 (GNM、SAS、OECM-1)、口腔癌幹細胞 (GNM-s、SAS-s、OECM-1-s)，以不同濃度 Gossypol (0、2.5、5、10、20、40 μM) 處理 24 小時，再以 MTT 分析法測吸光值得細胞存活率。每個濃度數值以平均值及平均值之標準差顯示，視對照組 (gossypol concentration = 0 μM) 為百分比基準 (100%) 與不同濃度之實驗組比較。



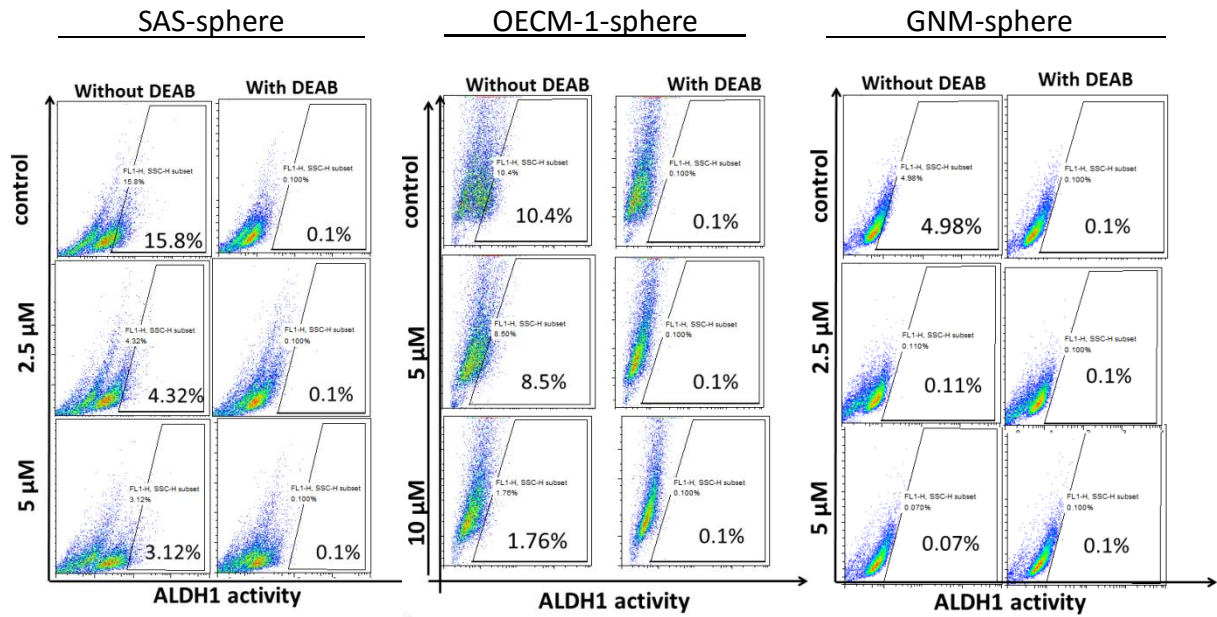
圖二、棉酚對口腔癌幹細胞自我更新能力之影響

以無血清培養液培養癌症幹細胞球體(SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere)，培養液混合棉酚濃度(0、2.5、5 μ M)之體積，培養一週後，利用顯微鏡攝影sphere細胞之再生成量，細胞再生能力隨棉酚濃度上升而下降。



圖三、口腔癌幹細胞以棉酚處理後軟瓊脂細胞群落生成之差異

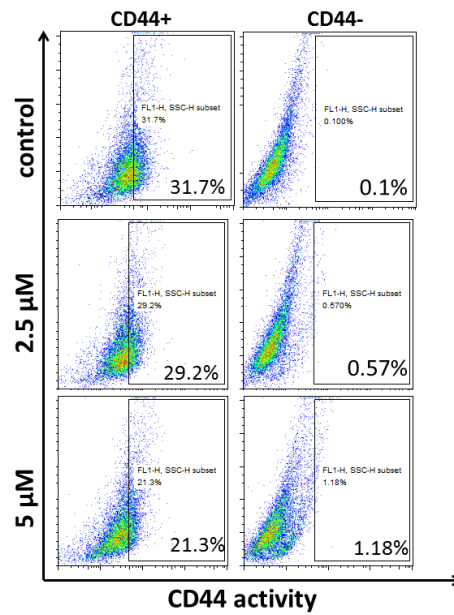
無血清培養液培養口腔癌幹細胞球體 (SAS-sphere、OECM-1-sphere)，加入不同濃度之棉酚 (0、2.5、5 μ M) 混合於培養液與軟瓊脂 14 天，觀察細胞群落生成之差異。



圖四、棉酚降低口腔癌幹細胞標記 ALDH1 活性表現

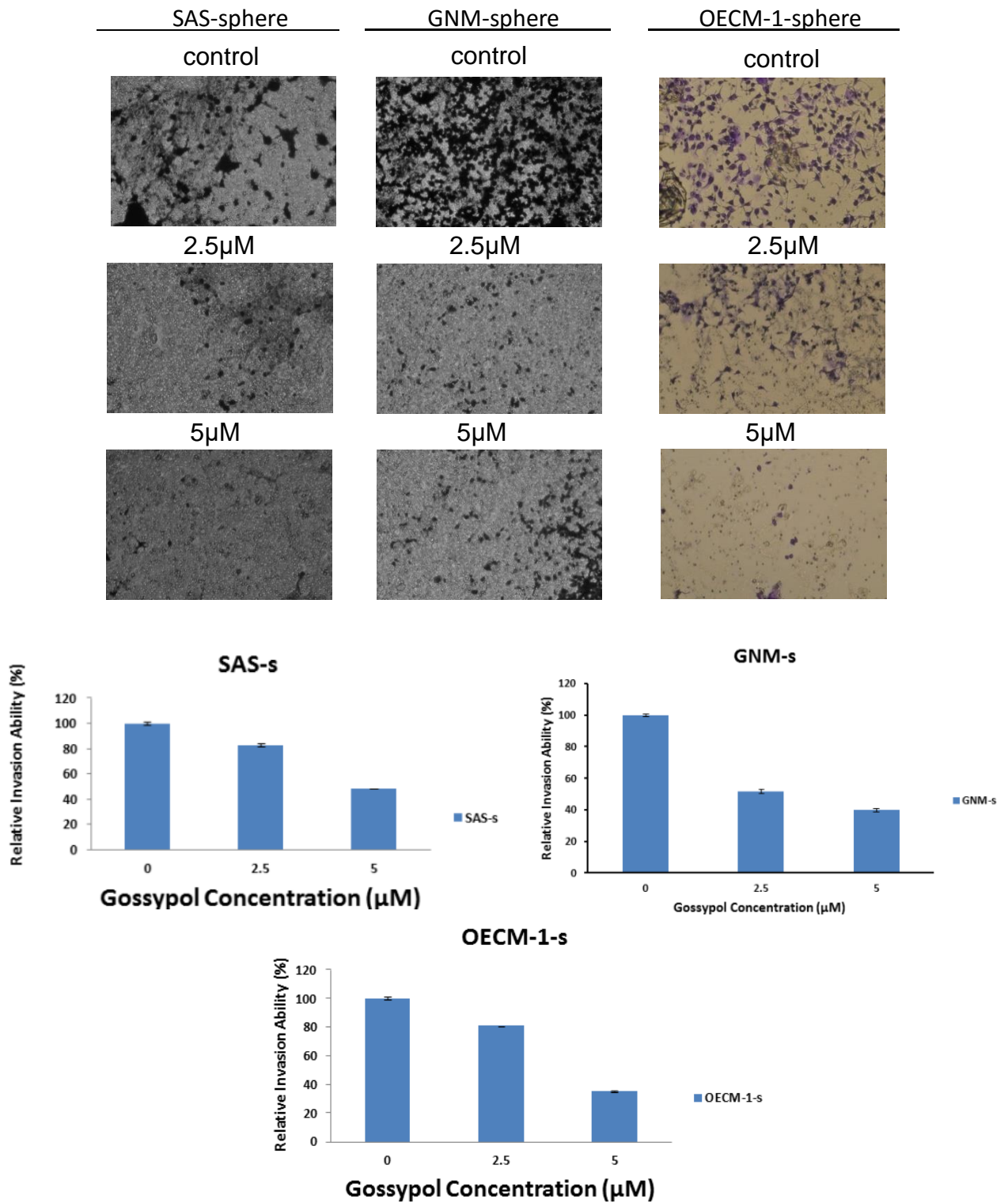
將三種口腔癌幹細胞球體 (SAS-sphere、OECM-1-sphere、GNM-sphere) 從無血清培養液種入 6mm dish 貼附約 9 成滿, 分別以不同濃度 (SAS-sphere、GNM-sphere : control、2.5 μ M、5 μ M ; OECM-1-sphere : control、5 μ M、10 μ M) 之棉酚作用 24 小時, 再以流式細胞儀分析癌症幹細胞具有 ALDH1 表現所占比例, 以百分比呈現。上圖梯形面積以加有 DEAB 為未表現之細胞基準來進行比較。

SAS-sphere



圖五、棉酚降低口腔癌幹細胞標記 CD44 活性表現

口腔癌幹細胞球體 (SAS-sphere) 從無血清培養液種入 6mm dish 貼附約 9 成滿，分別以不同濃度 (SAS-sphere: control、2.5 μ M、5 μ M) 之棉酚作用 24 小時，再以流式細胞儀分析癌症幹細胞具有 CD44 表現所占比例。



圖六、棉酚抑制癌症幹細胞之侵襲能力

以無血清培養液培養癌症幹細胞球體(SAS-sphere、GNM-sphere、OECM-1-sphere)，不同濃度之棉酚(0、2.5、5 µM)加入培養於有Matrigel轉移盤(Transwell)上盤，48小時後觀察癌症幹細胞之侵襲能力。