

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : Hinokitiol 抑制乳癌幹細胞血管擬態的研究 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 郁芸
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-048-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 張文瑋

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 103年03月29日

題目:扁柏醇抑制乳癌幹細胞血管擬態的研究

(一) 摘要

從既有血管生成出新血管是腫瘤發展和轉移的重要步驟。當腫瘤生長超出臨界大小時，腫瘤組織氧氣與營養物質的提供和代謝物的清除，只單靠周圍組織滲透已經不能滿足其生長的需要。因此，在缺氧的情形下，腫瘤內的低氧誘導因子(hypoxia inducible factor, HIF-1 α)表現會增強，並促使內皮細胞生長因子表現，誘使周邊的內皮細胞以出芽的方式生成新的微血管，稱為血管新生，能提供腫瘤養分供應[1, 2]。此外，癌細胞可以形成類似血管內皮細胞的管狀結構，稱為血管擬態，是形成腫瘤內血管系統的另一項機制之一。近年來有研究指出，乳癌細胞內的CD133+類癌症幹細胞具有血管擬態行為[3]；我們實驗室過去利用細胞內乙醛去氫酶(aldehyde dehydrogenase)活性分離乳癌幹細胞(ALDH+)，也發現乳癌細胞的血管擬態能力主要來自於乳癌幹細胞，非乳癌幹細胞之乳癌細胞此種能力相對非常微弱[4]。本研究想藉由此技術了解調控乳癌幹細胞血管擬態行為的分子機制。上皮生長因子受體(epidermis growth factor receptor)是ErB家族的成員，其受體屬於酪胺酸激酶，參與細胞生長的調控，在人類惡性實質固態瘤中有高度表現。上皮生長因子受體的訊息傳導路徑通常與細胞的增生、分化、黏附、轉移和細胞凋亡相關。pEGFR已被證實與肺癌的預後治療效果不佳有關，但在乳腺癌方面尚未得到充分研究[5]。扁柏醇(Hinokitiol)具有抗癌的潛力，在此我們利用體外管狀結構生成測試將乳癌細胞以扁柏醇處理後，觀察其血管擬態行為是否受到影響，結果發現經適量濃度的扁柏醇處理，乳癌細胞在matrigel中形成管狀結構的能力完全消失，同時也發現以扁柏醇處理過的乳癌細胞在西方墨點法的結果顯示EGFR和pEGFR蛋白表現量有降低的趨勢，因此，本研究想要探討扁柏醇如何調控EGFR，進而影響癌幹細胞的血管擬態行為，以作為後續製藥的參考。

(二) 研究目的

癌症幹細胞(Cancer stem cell)是指具有自我複製、更新及分化能力性質的癌細胞，這類癌細胞會形成腫瘤進而衍生出癌症。腫瘤轉移(Metastasis)，是指癌細胞侵入鄰近組織或遠端器官的現象，並且是癌症致死的主因。而腫瘤的轉移與腫瘤內血管系統有關，腫瘤的血管系統主要透過內皮細胞的血管新生(angiogenesis)或癌細胞進行血管擬態(vasculogenic mimicry)來建立。近年來有研究指出，乳癌細胞內的CD133+類癌症幹細胞具有血管擬態行為；我們的初步結果也發現ALDH+乳癌幹細胞具有良好血管擬態活性，並可能與上皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor, EGFR)的訊息有關。扁柏醇(Hinokitiol)為萃取自台灣扁柏之天然小分子化合物，已知具有抑菌、防腐的特性，並有相關研究指出其具抗癌的潛力。本研究計畫欲了解扁柏醇對乳癌幹細胞之血管擬態活性的影

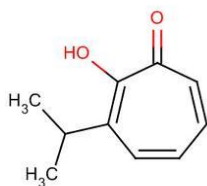
響及其分子機制。研究目標包含(1)扁柏醇是否能抑制乳癌幹細胞之血管擬態行為；(2)扁柏醇是否能抑制 EGFR 的表現及其作用機轉；(3)利用 shRNA 剔除 EGFR 基因表現是否能降低血管擬態活性；(4)扁柏醇影響 EGFR 表現是透過轉錄亦或是轉譯的分子機轉。透過本研究計畫，我們將能明瞭扁柏醇對於乳癌幹細胞之血管擬態行為的影響以及其分子機制，作為臨床應用前期的參考。

(三) 文獻回顧與探討

乳腺癌，在台灣女性的十大惡性腫瘤中排名第四，並有逐年上升的趨勢。乳腺癌，是從乳房乳腺管細胞或腺泡細胞經由不正常的分裂所形成的一種惡性腫瘤。近來研究發現，只有少部分的細胞有能力形成新的腫瘤，具有發展成癌症的潛力，特別是隨著癌症轉移出去之後，產生新型癌症的來源。而這類細胞就是我們所稱的癌症幹細胞(cancer stem cell, CSC)[6]。當腫瘤大小長到約 2mm^3 時，氧氣與營養的供應會受限。因此，腫瘤為了要繼續成長會轉化成血管的模式，並吸引周邊的內皮細胞以出芽的方式生成新的微血管。這個過程是受到各種新血管生長因子的調控，而新血管生成是為了使腫瘤更進一步的向外生長[7]。

新血管生成的可能性有三種：(1)癌幹細胞吸引周邊內皮細胞釋放新血管生長因子，形成新血管。(2)癌幹細胞自己本身分化成血管組織。(3)癌幹細胞形成血管擬態(Vasculogenic Mimicry)或是鑲嵌式血管(Mosaic Vessel)的模式來提升物質交換面積[1]。血管擬態是指腫瘤細胞模仿內皮細胞排列成血管的行為，在其他研究指出，可以利用模擬 3D 環境的 matrigel 培養黑色素瘤類癌幹細胞，可以獲得類似血管的構造[8]。

扁柏醇(Hinokitiol；beta-thujaplicin；4-isopropyltropolone)是由台灣扁柏所萃取出的一種具有 tropolone 結構的結晶酸性化合物。



扁柏醇之結構

扁柏醇已知具有抑菌、防腐的特性。因能抑制皮膚黑色素和牙齒牙菌斑的形成而常見於在化妝品的添加及口腔的保健[9]。其它研究指出扁柏醇具有抑制癌細胞增生的能力。研究發現僅需微量的扁柏醇即可降低口腔中致病菌及口腔鱗狀細胞癌的生長活性，並且不會對正常的口腔角質細胞造成傷害[10]。在前列腺細胞癌中，扁柏醇會干擾雄激素(androgen)受體的訊息傳遞，使得細胞增生遭抑制[11]。

上皮生長因子受體(epidermis growth factor receptor)是 ErB 家族的成員，其受體屬於酪胺酸激酶，參與細胞生長的調控，在人類惡性實質固態瘤中有高度表現。EGFR 受體的結合和二聚化會使其磷酸化，產生活化態 phosphorylated

EGFR(pEGFR)，而活化後的 EGFR 會促進 Ras/MAPK、PI3K/Akt 和 phospholipase-C/PKC 等傳導途徑展開一連串的訊息傳遞。這些傳導路徑通常與細胞的增生、分化、黏附、轉移和細胞凋亡相關。pEGFR 已被證實與肺癌的預後治療效果不佳有關，在乳腺癌方面也有相關研究[5]，但 EGFR 訊號對於癌細胞的血管擬態行為的研究則尚不清楚。

(四) 研究方法及步驟

(1) 研究設計

本研究預計利用自乳癌幹細胞建立之乳癌細胞株(AS-B244)，首先以體外管狀結構生成 (In vitro tube formation assay) 測試扁柏醇是否具有抑制乳癌幹細胞血管的擬態的能力，透過不同成分培養基的實驗，推測扁柏醇經由抑制上皮生長因子受體(EGFR)，進而降低新血管生成。扁柏醇抑制 EGFR 的分子機制有三個可能路徑：

(1)透過影響轉錄作用:可利用 qPCR 技術觀察 EGFR 的 mRNA 表現量是否因扁柏醇處理而降低。若有，可接著探討扁柏醇是否影響特定轉錄因子的作用，而抑制 EGFR 的表現

(2)透過蛋白分解途徑:先利用 cyclohexamide 進行蛋白質穩定度測試(protein stability assay)，以了解扁柏醇是否影響 EGFR 之蛋白質穩定性。若有，可進一步探討扁柏醇是否誘導 EGFR 進行泛素化作用(ubiquitination)，使得 EGFR 經由蛋白酶體(proteasome)分解。

(3)透過影響轉譯作用:可透過 qPCR 觀察扁柏醇是否可誘導特定 miRNA 的表現量(miR-542-5p or miR-133b)；再利用 miRNA inhibitor 觀察當抑制特定 miRNA 表現時，是否能抑制扁柏醇的作用，以了解扁柏醇抑制血管擬態行為是否與 miRNA 有關。

(2)實驗方法

細胞培養

由乳癌細胞建立的乳癌幹細胞(AS-B244)，以培養基 MEM α (含 10% 胎牛血清、5 μ g/ml insulin、1 μ M glutamine、1 μ M sodium pyruvate、100 μ g/ml penicillin/streptomycin)培養於 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO $_2$ 之培養箱。

藥劑

Hinokitiol 以 EtOH 溶解成高濃度溶液(100mM)，保存於-20 $^{\circ}$ C。

MG132 以 DMSO 溶解成高濃度溶液(50mM)，保存於-20 $^{\circ}$ C。

體外管狀結構生成測試(In vitro tube formation assay)

Coating

Matrigel是一種可溶性的基底膜基質。在室溫下，可自動聚集產生類似於哺乳動物細胞基底膜的生物活性基質材料。

將15孔的 μ -slide(ibidi)覆上一層10 μ l濃度為8mg/ml的 matrigel，置於37°C、5% CO₂培養箱內等待matrigel凝固。

Seeding

將經由hinokitiol處理過的細胞種植在已覆蓋matrigel之微孔內，每一個微孔種入的細胞量為 2.25×10^4 ，種入細胞液體積為40 μ l。放入37°C、5% CO₂培養箱內進行培養，隨後每兩小時進行拍照記錄，以10X物鏡進行拍攝，每個微孔拍攝三個視野，總共記錄至8小時。以ImageJ軟體分析數據，再以下列公式計算新血管生成指數(Angiogenesis potential)：

$$\text{新血管生成指數} = (\text{總微管長})^2 \times (\text{團聚面積}) \times (\text{分支點/結構微管長})$$

西方墨點法(Western Blot Analysis)

使用BCA_{TM} Protein Assay Reagent kit測定蛋白質濃度，以BSA作為蛋白質濃度之標準曲線，使用全波長酵素免疫分析儀讀取560nm波長數值，並換算細胞裂解液之總蛋白濃度。

每組樣品以20 μ g/lane的蛋白質總量進行SDS-PAGE蛋白質電泳，並轉漬到PVDF膜上。以5%的脫脂牛奶進行blocking 1小時，再以特定一級抗體於4°C過夜培養(GAPDH(MDBio Inc.) at a 1:2000 dilution，p-EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.) at a 1:500 dilution，EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.) at a 1:500 dilution)。隔日以接合過氧化酶之二級抗體(Pierce)於室溫中反應1小時，再加入冷光顯影劑，以冷光照相儀(FusionSL, Vilber Lourmat)擷取冷光訊號。進行EGFR之泛素化分析，則先以anti-EGFR抗體進行免疫沉澱後，將沉澱之蛋白質以SDS-PAGE分離以及轉漬到PVDF膜，再以anti-ubiquitin抗體(Genetex)進行偵測。

定量 PCR (quantitative PCR)

本研究預計利用定量聚合酶鏈鎖反應測量細胞內mRNA與微小RNA的表現，方法簡要如下：利用Triol Reagent(Invitrogen)將細胞裂解後，加入等體積之絕對酒精，再以Quick-RNA MiniPrep試劑(Zymo Research)抽取細胞總RNA。隨後以1 μ g總RNA與RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)進行cDNA翻轉，若為量測mRNA表現，則以Oligo d(T)作為引子(Fermentas)，若為量測微小RNA，則以Bulge-loopTM miRNA qRT-PCR內之RT引子作為cDNA引子(Phalanx Biotech)。取10ng之cDNA，利用SYBR Green定量聚合酶鏈鎖反應試

劑進行各基因或微小 RNA 之定量。

蛋白質穩定度分析(protein stability assay)

將細胞以 3×10^5 cells/well 植入 6-well-plate 中，並處理 50 μ g/ml cyclohexamide 以及 0.1%EtOH 或 10 μ M hinokitiol，隨後每 3 小時收取細胞裂解液直到 12 小時。經蛋白質定量後，取 20 μ g 總蛋白量，以西方點墨法偵測 EGFR 的表現，並以定量軟體分析訊號，以了解 EGFR 降解 50%所需的時間是否因扁柏醇處理而有所改變。

MG132 (proteasome inhibitor)

在 6-well-plate 中植入 3×10^5 cells/well，以 0.1%EtOH 或 10 μ M hinokitiol 共同加入 0.1%DMSO 或 2 μ M MG132，經 24 小時後收取細胞裂解液。經蛋白質定量後，取 20 μ g 總蛋白量，以西方點墨法偵測 EGFR 或活化態 pEGFR 的表現，並以定量軟體分析訊號。

shRNA knockdown EGFR

shRNA lentivirus production: The lentivirus were obtained from RNAi Core of Research Center of Clinical Medicine, National Cheng Kung University Hospital.

No.	Clone ID	Cloning vector	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Relative virus titer
1	TRCN0000039634	pLKO.1	1.89	2.10	5.1x10 ⁶ /ml
2	TRCN0000121067	pLKO.1	1.88	2.15	3.6x10 ⁶ /ml
3	TRCN0000121068	pLKO.1	1.83	2.25	4.1x10 ⁶ /ml
4	TRCN0000010329	pLKO.1	1.84	2.05	3.5x10 ⁶ /ml

The protocol is described below-293T cells were cotransfected with 5 μ g packaging plasmid (pCMV Δ R8.91), 0.5 μ g envelop plasmid (pMD.G) and 5 μ g pLKO.1 shRNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen) for 6hrs. After 24hrs, the supernatants containing viral particles were harvested and filtered through 0.45 mm filters.

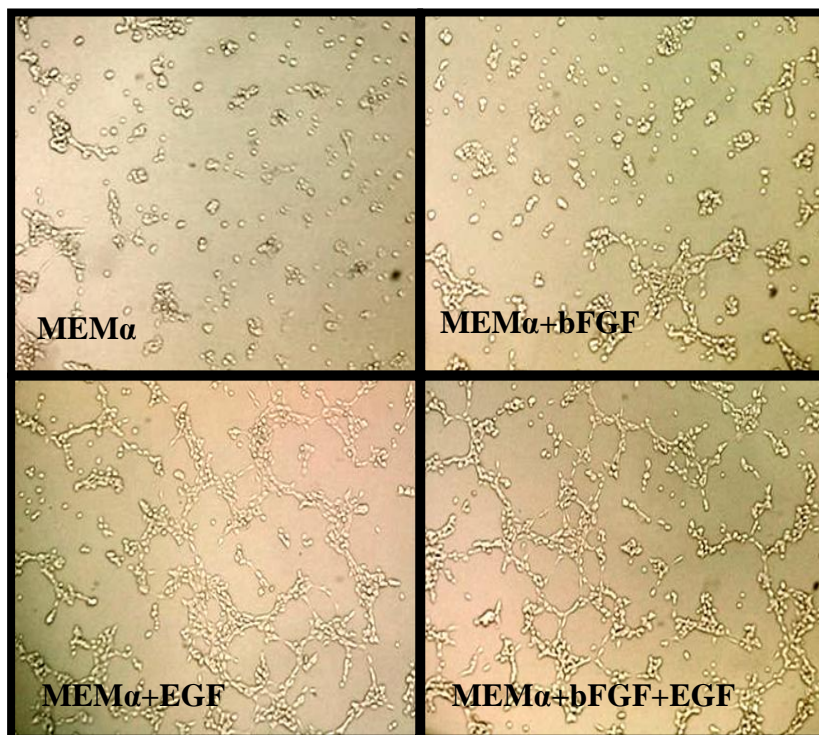
(五) 結果

1. bFGF與EGF對乳癌細胞AS-B244之血管擬態行為的影響

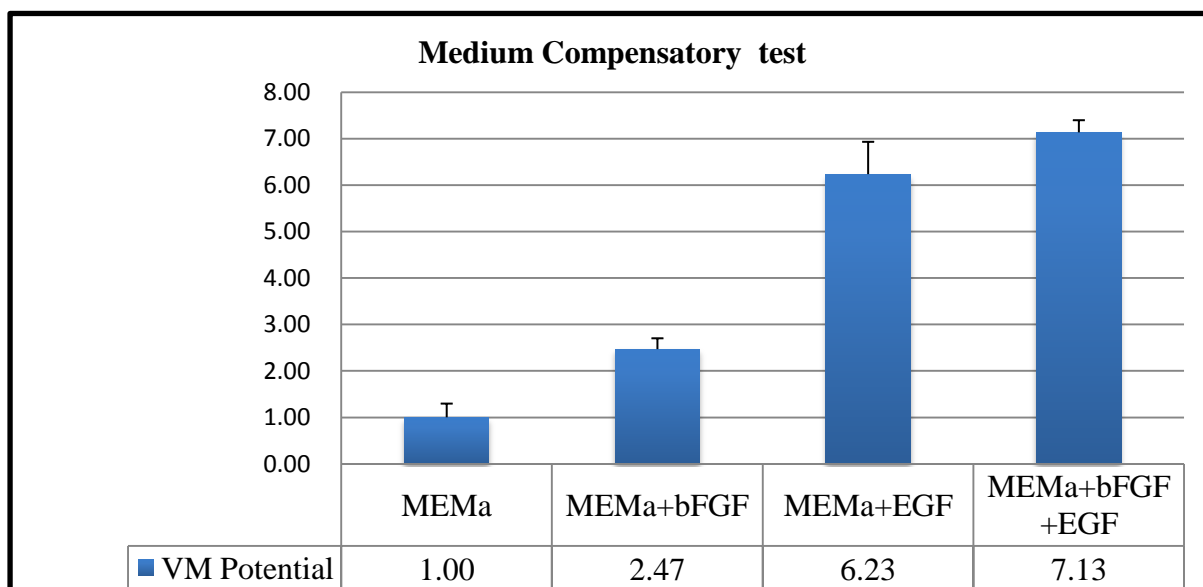
由於我們使用培養內皮細胞之培養基進行癌細胞血管擬態行為測試，而此種特殊培養基內含鹼性纖維母細胞生長因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)與上皮生長因子(EGF)，因此我們想知道這兩種生長因子對於乳癌細胞

AS-B244之血管擬態行為的影響。以培養癌細胞的培養基(MEM α)作為對照，從圖一可以發現，在培養癌細胞的培養基(MEM α)中，其血管擬態行為明顯降低；而當加入EGF時，可以明顯增加管狀結構的形成，顯示EGF可調控乳癌細胞的血管擬態行為。

(A)



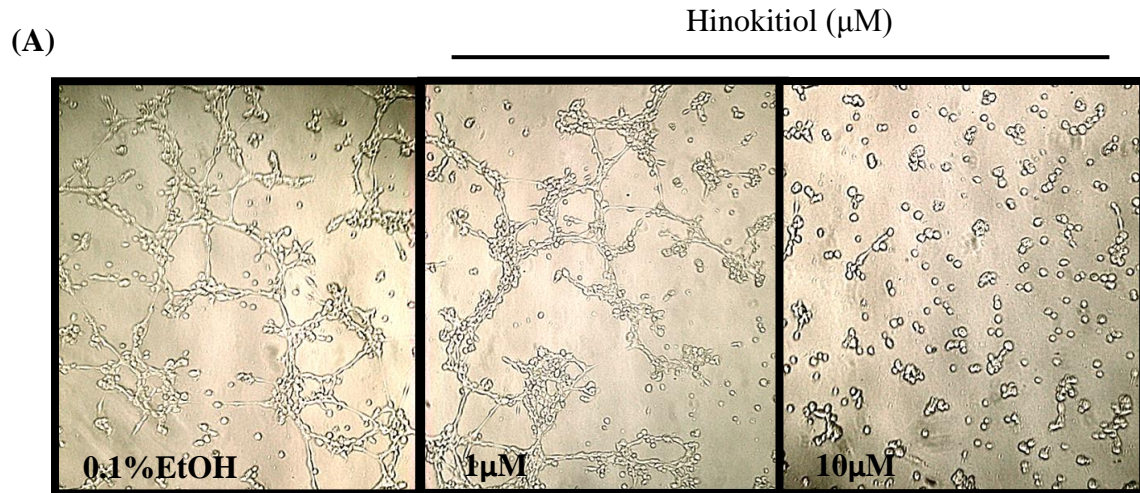
(B)



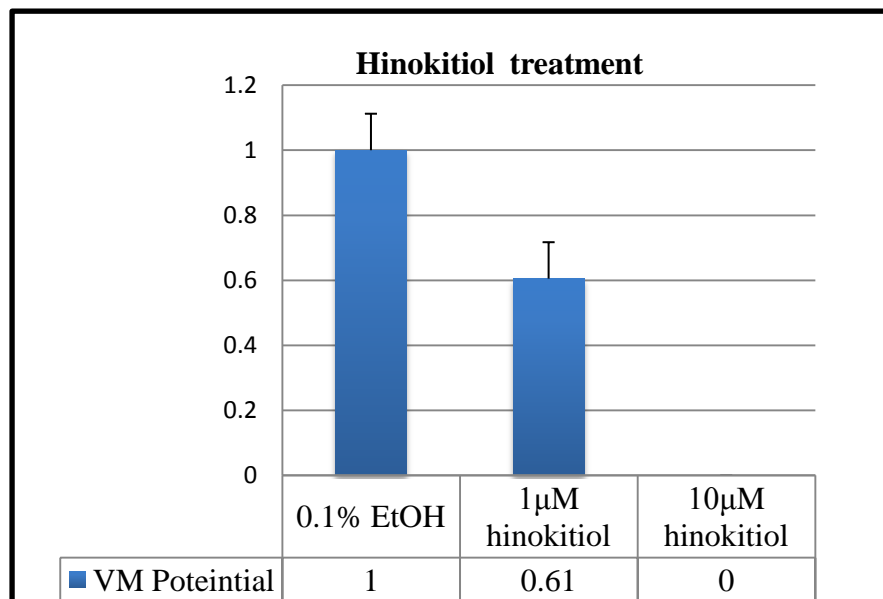
圖一、不同成分培養基對乳癌細胞 AS-B244 血管擬態的影響。(A)拍攝於六小時、Matrigel 濃度為 8mg/ml。每一個微孔種入的細胞量為 2.25×10^4 。(B)將血管擬態生成指數(Vasculogenic Mimicry potential)量化後的結果。

2. 扁柏醇對乳癌細胞AS-B244之血管擬態行為的影響

接著，我們利用扁柏醇處理乳癌細胞AS-B244，並進行癌細胞血管擬態行為測試。從圖二我們發現，隨著扁柏醇劑量的提高，對乳癌細胞的血管擬態行為抑制效果越好。



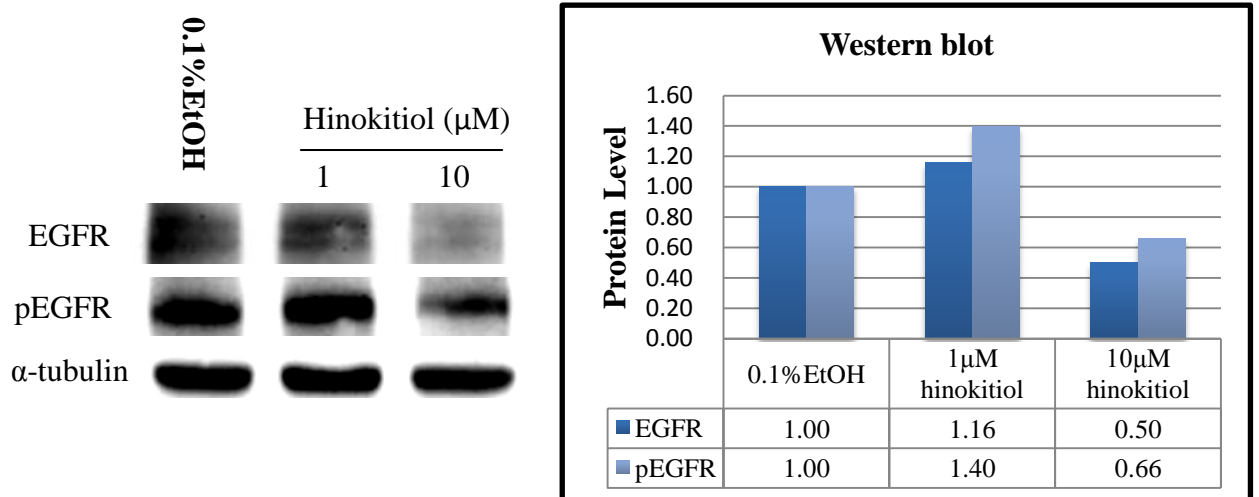
(B)



圖二、經由不同濃度的扁柏醇(hinokitiol:1 or 10 μM)處理乳癌細胞 AS-B244 後，對其血管擬態的影響。(A)拍攝於八小時、Matrigel 濃度為 8mg/ml。每一個微孔種入的細胞量為 2.25×10^4 ，以 0.1%EtOH 當作對照。(B)將血管擬態生成指數 (Vasculogenic Mimicry potential) 量化後的結果。

3. 西方點墨法

進一步以西方墨點法偵測 AS-B244 細胞中，EGFR 與其活化態 pEGFR 的蛋白質表現量是否會因扁柏醇處理而有所改變。如圖三所示，EGFR 和 pEGFR 蛋白的表現量隨著濃度的增加有減少的趨勢。

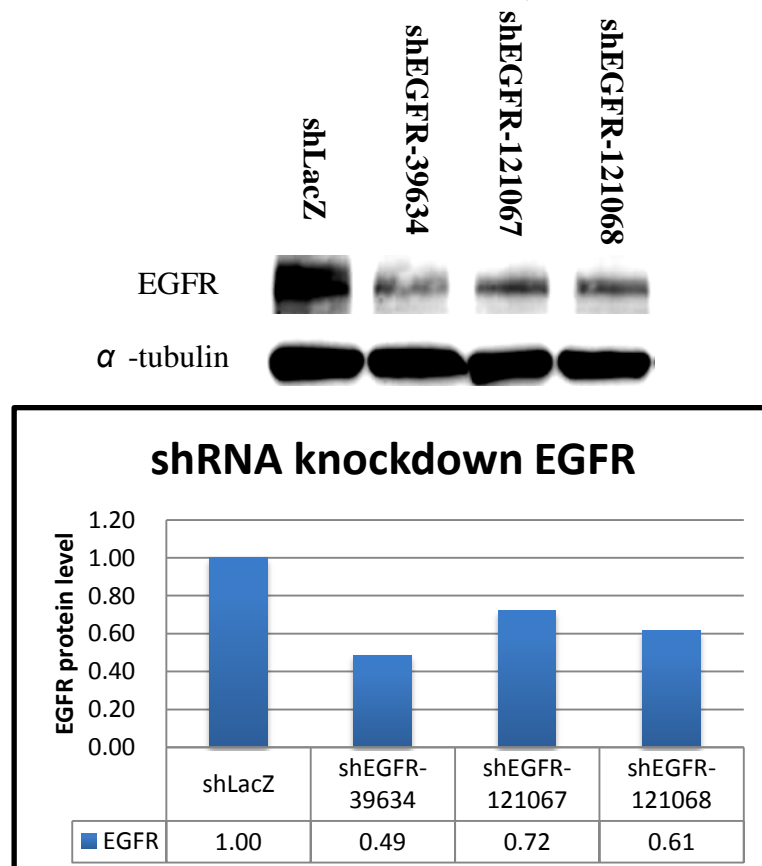


圖三、不同濃度hinokitiol處理AS-B244細胞株後，EGFR的蛋白質表現量。圖左為pEGFR或EGFR量化後的結果，以0.1% EtOH處理之細胞為100%。

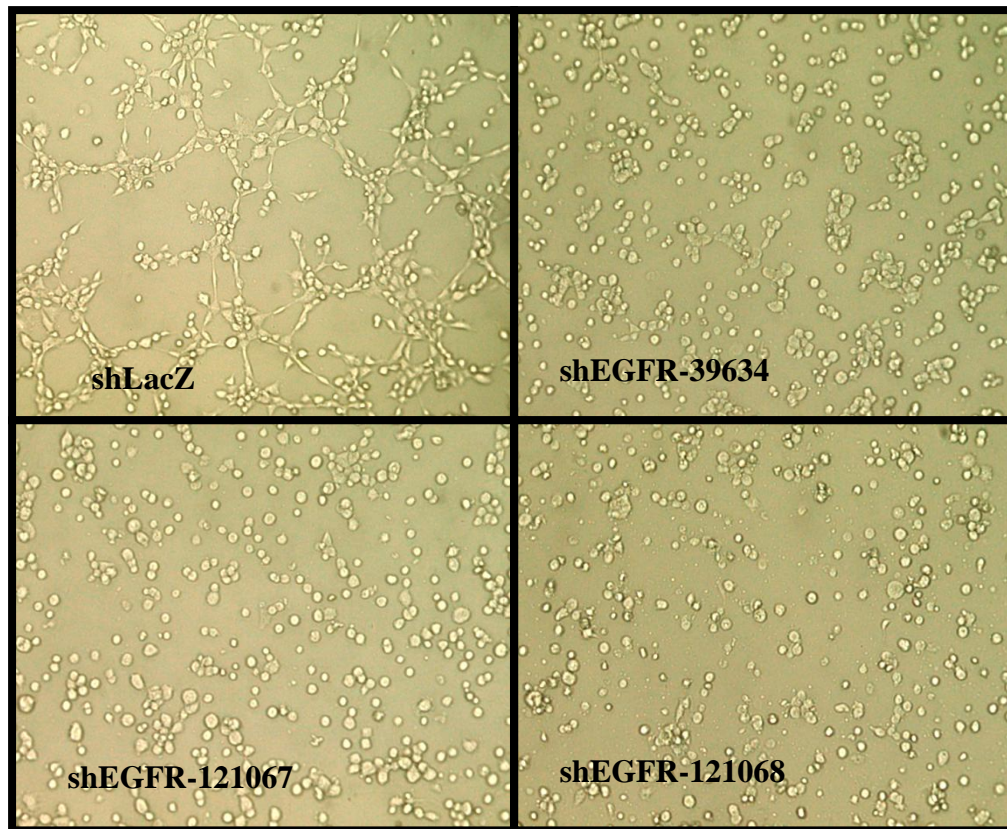
4. 利用 shRNA 剔除 EGFR 基因表現是否會影響 AS-B244 乳癌細胞形成血管擬態的能力

為了證實 EGFR 對於 AS-B244 乳癌細胞形成血管擬態的重要性，利用 shRNA 剔除 EGFR 基因後，進行體外管狀生成測試。如圖四(B)所示，一旦 EGFR 的基因經剔除，AS-B244 形成血管擬態的能力明顯受到抑制。

(A)



(B)

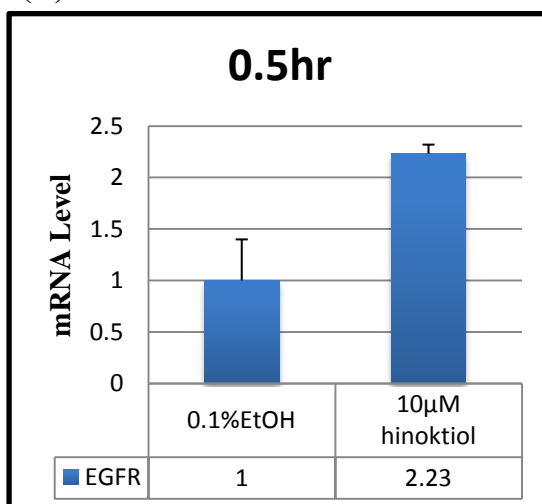


圖四、(A)以 shRNA 剔除 EGFR 基因，導致 EGFR 蛋白表現量下降。(B)利用體外管狀生成測試觀察以 shRNA 剔除 EGFR 基因的 AS-B244 細胞形成血管擬態的能力。

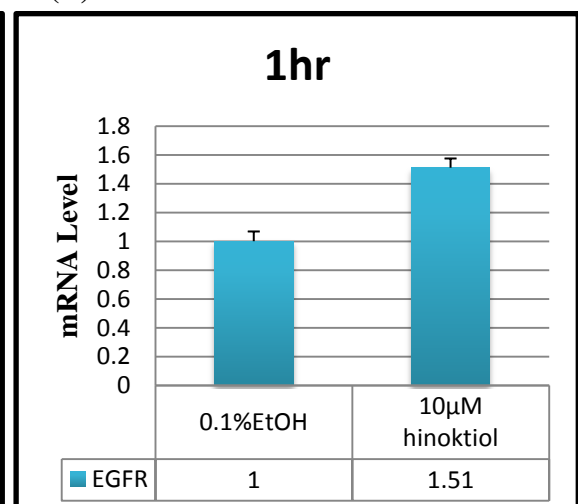
5. 以定量 PCR 觀察，經扁柏醇處理後，AS-B244 乳癌細胞 EGFR 的 mRNA 表現量是否受到影響

經上述的實驗得知，扁柏醇會抑制 AS-B244 乳癌細胞的 EGFR 蛋白表現量，進而抑制了 AS-B244 形成血管擬態的能力。因此，我希望藉由定量 PCR 的技術找出扁柏醇抑制 AS-B244 乳癌細胞株 EGFR 表現的分子機制。結果如圖五，分別以扁柏醇處理 AS-B244 乳癌細胞 0.5、1、24 小時，EGFR 的 mRNA 表現量並沒有如預期般受到抑制。

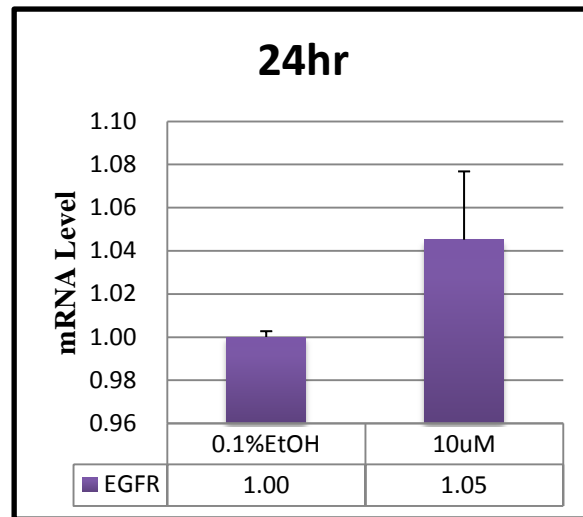
(A)



(B)



(C)

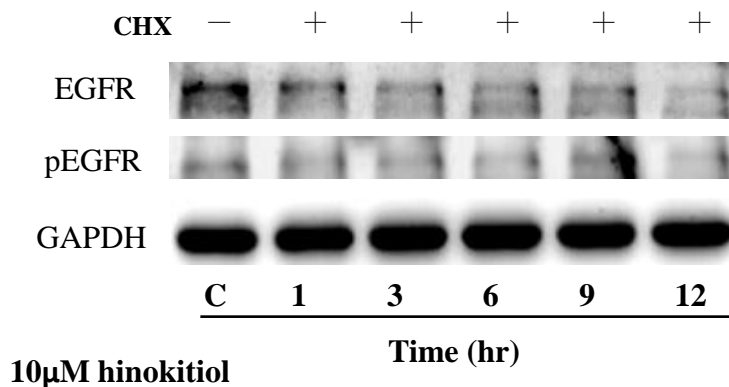


圖五、以0.1%酒精與10 μ M Hinokitiol處理AS-B244細胞株後，EGFR的mRNA表現量。(A)經扁柏醇處理0.5hr (B) 1hr (C) 24hr。

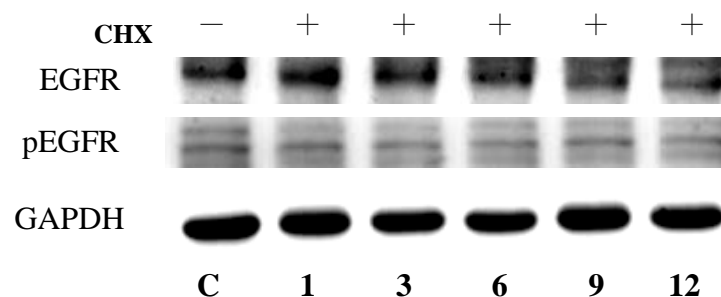
6. 利用蛋白質穩定度試驗觀察，扁柏醇抑制EGFR蛋白表現量的分子機制是否是透過提前EGFR蛋白的半衰期

利用定量PCR得到的實驗結果發現，扁柏醇並沒有抑制AS-B244乳癌細胞EGFR的mRNA表達，所以扁柏醇不是透過抑制EGFR的轉錄機制而達到降低AS-B244乳癌細胞的血管擬態。接著，要探討的是經扁柏醇處理AS-B244乳癌細胞過後，EGFR的蛋白半衰期是否會提前。蛋白質穩定度試驗的結果觀察到EGFR的蛋白降解50%所需的時間並沒有因扁柏醇處理而提前，實驗結果顯示扁柏醇抑制EGFR並不是透過其蛋白轉譯。

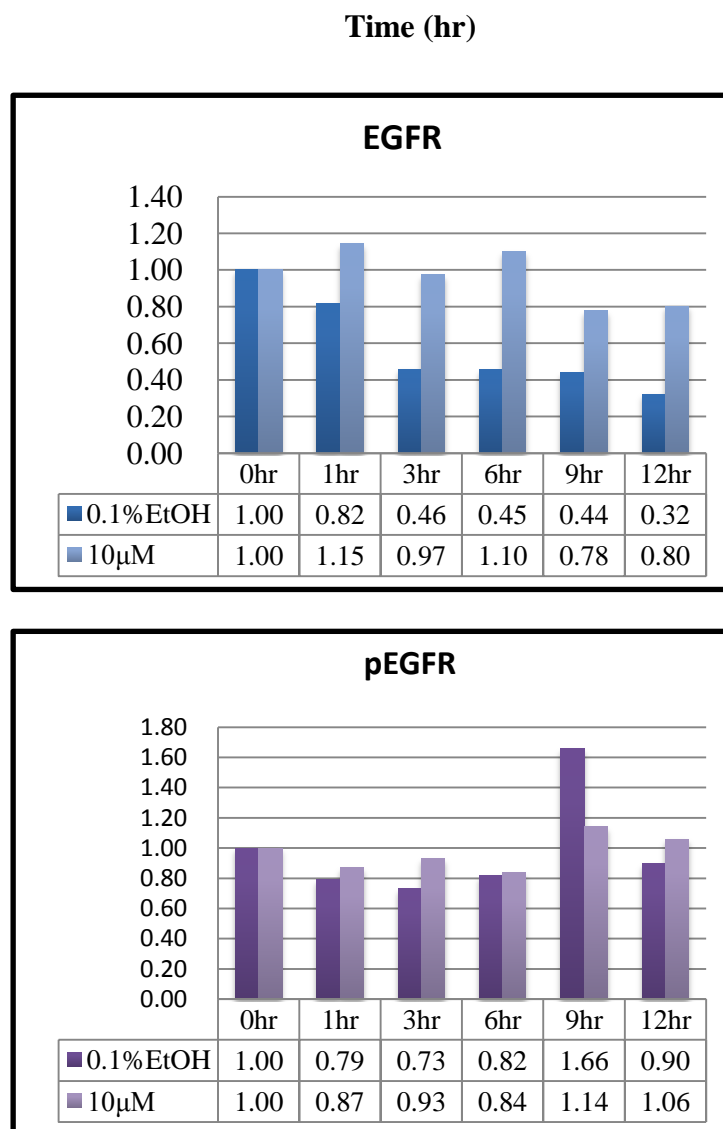
(A) 0.1%EtOH



10 μ M hinokitiol



(B)

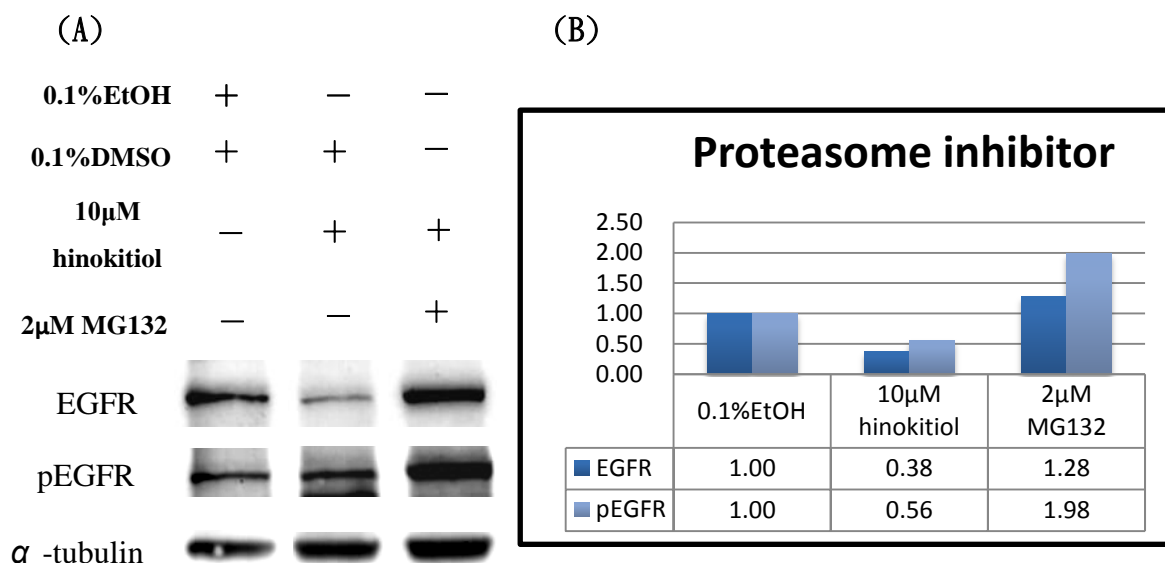


圖六、(A)加入 50 μ g/mL CHX，分別在 1、3、6、9、12 小時後收下細胞，並跑 wesetern blot，觀察經扁柏醇處理的 AS-B244 乳癌細胞 EGFR 蛋白半衰期的情形。(B)為 EGFR 以及 pEGFR 量化的結果，分別以 0.1%EtOH 和 10 μ M 扁柏醇在 0 小時收下的細胞蛋白作為對照組。

7. 加入蛋白酶體抑制劑(MG132)對扁柏醇抑制 AS-B244 乳癌細胞 EGFR 蛋白表現的影響

經過定量 PCR 及蛋白質穩定度測試等實驗後，發現扁柏醇抑制 AS-B244 乳癌細胞的分子機制，既不是在 EGFR 轉錄的階段抑制 mRNA 合成，也不是提前 EGFR 蛋白的半衰期，使 EGFR 表現量下降。但是從前述的實驗結果發現，以扁柏醇處理過的 AS-B244 乳癌細胞 EGFR 之蛋白表現量確實有下降，所以實驗方向朝轉譯後修飾去探討。MG132 是一種蛋白酶體抑制劑，在此實驗中發現，經扁

柏醇處理的 AS-B244 細胞共同加入 MG132，原本降低的 EGFR 蛋白表現量有回升的趨勢。



圖七、(A)經扁柏醇處理的 AS-B244 細胞共同加入 MG132(以 DMSO 稀釋)後，EGFR 蛋白質表現量。(B) pEGFR 及 EGFR 蛋白質質量化圖，以 0.1%EtOH+0.1%DMSO 為對照組。

(六) 結果與討論

藉由扁柏醇的處理將能有效降低乳癌幹細胞在 matrigel 上形成管狀結構的潛力，甚至失去新血管生成的能力，並且在蛋白的表現量也會降低。定量聚合酶鏈鎖反應無法找出與 EGFR 相關之 mRNA 或微小 RNA。在蛋白質穩定度試驗中，仍無法觀察到扁柏醇對 EGFR 蛋白的影響，但以扁柏醇處理過的 AS-B244 乳癌細胞 EGFR 之蛋白表現量確實有下降，所以實驗方向改由轉譯後修飾去探討。MG132 為蛋白酶體抑制劑，加入經扁柏醇處理的 AS-B244 細胞後，發現原本蛋白表現量受扁柏醇抑制而降低的 EGFR 竟有被回復的現象，推測扁柏醇抑制 EGFR 是透過增加蛋白酶體的活性來達到抑制 EGFR 表現，進而影響 AS-B244 細胞株形成血管擬態的能力。

轉譯後修飾(post-translational modifications; PTMs)大概可分為五種 [14]，其中與蛋白酶體有關的是泛素-蛋白酶體系統(ubiquitin-proteasome system; UPS)。後續可利用免疫沉澱探討泛素是否因扁柏醇的加入而增加，進而證實扁柏醇是透過活化蛋白酶體達到降低 AS-B244 乳癌細胞形成血管擬態的能力。

(七) 參考文獻

1. Hillen F, Griffioen AW. **Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond.** *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec;26(3-4):489-502.
2. Gabellini C, Del Bufalo D, Zupi G. **Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis.** *Oncogene.* 2006 Aug 28;25(38):5326-32.
3. Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong XY, Zhao N, Liu N. **CD133(+) cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer.** *Oncogene.* 2013 Jan 31;32(5):544-53. doi: 10.1038/onc.2012.85. Epub 2012 Apr 2.
4. Hung-Chun Hsieh./ **mechanical investigation of neovasculogenesis potential of breast cancer stem cells.**/ Master Thesis, Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University.
5. Christina Magkou¹, Lydia Nakopoulou, Christina Zoubouli, Kanelina Karali, Irene Theohari, Panagiotis Bakarakos and Ioanna Giannopoulou. **Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas.** *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R49. doi: 10.1186/bcr2103. Epub 2008 Jun 3.
6. Elena Monzani & Caterina AM La Porta. **Targeting Cancer Stem Cells to Modulate Alternative Vascularization Mechanisms.** *Stem Cell Rev.* 2008 4:51–56.
7. Femke Hillen, Arjan W., Griffioen. **Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond.** *Cancer Metastasis Rev.* 2007 26:489–502.
8. Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L. M., Pe'er, J., et al. **Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry.** *American Journal of Pathology.* 1999 155, 739–752.
9. Liu S, Yamauchi H. **Hinokitiol, a metal chelator derived from natural plants, suppresses cell growth and disrupts androgen receptor signaling in prostate carcinoma cell lines.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 8;351(1):26-32. Epub 2006 Oct 10
10. Zhu YJ, Qiu L, Zhou JJ, Guo HY, Hu YH, Li ZC, Wang Q, Chen QX, Liu B. **Inhibitory effects of hinokitiol on tyrosinase activity and melanin biosynthesis and its antimicrobial activities.** *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2010 Dec;25(6):798-803. doi: 10.3109/14756360903476398. Epub 2010 Jun 28.
11. Shih YH, Chang KW, Hsia SM, Yu CC, Fuh LJ, Chi TY, Shieh TM. **In vitro antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines.** *Microbiol Res.* 2013 Jan 10. pii: S0944-5013(12)00146-2. doi: 10.1016/j.micres.2012.12.007.

12. Yamaguchi G, Takanashi M, Tanaka M, Fujita K, Ohira T, Kuroda M, Ikeda N. **Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer.** Biochem Biophys Res Commun. 2012 Apr 6;420(2):411-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.008. Epub 2012 Mar 9.
13. Liu L, Shao X, Gao W, Zhang Z, Liu P, Wang R, Huang P, Yin Y, Shu Y. **MicroRNA-133b inhibits the growth of non-small-cell lung cancer by targeting the epidermal growth factor receptor.** FEBS J. 2012 Oct;279(20):3800-12. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08741.x. Epub 2012 Sep 11
14. Yonathan Lissanu Deribe¹, Tony Pawson² & Ivan Dikic¹. **Post-translational modifications in signal integration.** nature structural & molecular biology.2010 June. Volume17.Number 6