

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計畫名稱 : Phloretin 抑制腎臟癌細胞轉移、上皮間質轉化與調控  
\* 細胞骨架蛋白之研究分析  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生：黃晨鉸  
學生計畫編號：MOST 105-2815-C-040-042-B  
研究期間：105 年 07 月 01 日至 106 年 02 月 28 日止，計 8 個月  
指導教授：陳霽霓

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 106 年 03 月 30 日

# 結果報告書

## Phloretin 抑制腎臟癌細胞轉移、

### 上皮間質轉化與調控細胞骨架蛋白之研究分析

計畫編號：105-2815-C-040-042-B

學生：黃晨鉸

指導老師：陳霈霓

- (一) 摘要
- (二) 研究動機與問題
- (三) 文獻回顧
- (四) 實驗結果
- (五) 實驗方法與材料
- (六) 研究方法及步驟
- (七) 討論
- (八) 參考文獻

## (一) 摘要

癌症，在現代社會中愈來愈常見，現在的飲食習慣、生活環境、衛生觀念都影響著人體的健康，癌症也因此成為近年來關注的對象。目前癌症的治療主要分為手術治療、放射治療以及化學治療。在治療上可合併一些天然物，利用天然萃取物作為減緩醫療的副作用，並減少對正常組織細胞的影響。在本次實驗之初步研究結果發現根皮素(Phloretin)能有效抑制腎臟癌細胞的轉移與侵襲能力。Phloretin 主要存在於蘋果、梨等多汁的果皮及根皮，具有很強的抗氧化能力，能去除在皮膚內的自由基，是很常見的化妝品成分，也是一種天然的皮膚美白劑。實驗中選用 786-O-SI3 這株腎臟癌細胞，為了利於之後的活體實驗，所選用的細胞株已經在裸鼠(nude mice)上施打，此裸鼠為經過基因剔除，因此免疫力較弱，使人類的癌細胞較易在裸鼠上進行增生，癌細胞經由皮下注射(subcutaneous injection)變成腫瘤之後再使腫瘤轉化回癌細胞，並重複此步驟三次，以利於強化腎臟癌細胞轉移以及適應的能力，因此名為 786-O-SI3，而所選用的 786-O-SI3 為轉移能力更強的腎臟癌細胞株。利用 MTT assays 探討 Phloretin 對 786-O-SI3 細胞的存活率以及侵襲轉移的能力，並利用 gelatin zymography 與 casein zymography 探討分解細胞外基質的相關蛋白 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、以及 urokinase-type plasminogen activator (u-PA)的活性表現量。實驗結果發現 Phloretin 隨著濃度的增加並不會明顯影響 786-O-SI3 細胞的存活率，卻可以有效的抑制 MMP-2、MMP-9 以及 u-PA 的表現量。而在後續的細胞實驗中，利用細胞傷口癒合實驗(Wound healing assay)分析細胞移動爬行的能力，可以發現 Phloretin 能有效得抑制細胞的爬行能力。為了更進一步分析細胞的移動能力以及侵襲能力，實驗利用細胞侵襲及移動分析(Boyden chamber assay)來證實 Phloretin 對於細胞的侵襲能力也能有效得抑制細胞移動以及侵襲的能力。接著利用細胞與基質的貼附能力實驗分析其貼附力是否會隨著藥物濃度的上升而抑制其貼附能力，以及細胞群落二維分析(2D Colony formation assay)分析細胞形成群落的能力。最後用西方點墨法分析上皮間質轉化以及調控骨架蛋白，了解其 Phloretin 如何抑制腎臟癌細胞 轉移之能力。

關鍵字：腎臟癌、轉移與侵襲能力、基質金屬蛋白水解酵素、細胞傷口癒合實驗、細胞移動以及侵襲能力、細胞貼附能力、西方點墨法

## (二) 研究動機與研究問題

根據衛生所福利部公布，癌症自從民國 71 年起為十大死因之首，每年奪走了 4 萬多人的生命。腎臟癌(renal cell carcinoma)佔全身所有惡性腫瘤的 3%，而依照組成腎臟的不同組織可分為幾種類型的癌症，例如：腎原細胞癌、腎腺癌、腎盂癌。本次實驗所言的腎臟癌主要是指由腎小管上皮細胞病變所衍生出的癌症，使用的細胞株為 786-O-SI3。依據台北榮總醫院泌尿科醫師說明，腎臟癌在任何年齡均有可能發生，但多半發生在 40 歲以後的成年人，以 65-75 歲達到最高峰。一般男性比女性發生機率高，比例為 1.5:1。

近幾年針對在自然界的天然萃取物的研究裡，已經證實對癌症的治療具有著重要的功用。經過篩藥處理最後決定使用 Phloretin，而在本實驗初步研究的實驗結果發現 Phloretin 對於抑制細胞外基質相關的蛋白也有顯著的效果。國人由於飲食型態改變，對於腎臟的傷害也愈來愈嚴重。目前大部分的腎臟癌主要為基因所影響，von Hippel-Lindau (vHL gene)缺乏導致缺氧促進性分子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)表現量增加會影響下游 VEGH 表現增加，進而產生血管大量增生，使腎臟癌迅速生長而變成高度轉移的癌症。通常病人被檢驗出有腎臟癌，在其他組織都已經有被侵襲的現象，也因此腎臟癌的存活率低於其他癌症。

## (三) 文獻回顧與探討

### 1. 腎臟癌

根據台北榮民總醫院公告，腎臟癌佔全身腫瘤的 0.4%~3%，在台灣每年約有 700 例發生。腎臟癌的發病率呈現上升的趨勢，然而腎臟腫瘤的病因至今尚不清楚了解，不過有研究指出腎臟癌細胞與環境汙染物戴奧辛(dioxin)或是菸草相關的致癌物有很大的關係，dioxin 能活化芳香烴受體(aryl hydrocarbon receptor, AhR)的作用途徑，進而影響到下游表現蛋白，上調控了 MMPs 導致癌細胞侵襲的發生(1)。

腎細胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是腎臟癌中最常見的一種類型，在初期發展緩慢，所以幾乎不會出現任何症狀，通常是一直到腫瘤太大而壓迫到其他的器官或是已經出現轉移的症狀才會發現 RCC，不過因為近年因超音波與來愈普及，腎臟癌初期即被發現予以治療。而當腫瘤擴及到器官或是大部分的腎組織被侵犯時，才會開始引起疼痛和血尿的症狀。若癌細胞轉移到腦部會引起神經系統障礙；轉移到肺臟則會有呼吸不順甚至有咳血的症狀發生；針對男性病人若腫瘤壓迫到左腎靜脈會引起陰囊內的精索靜脈曲張，靜脈曲張壓到下腔靜脈會引起雙下肢腫脹。

腎細胞癌主要有五種：乳突細胞、clear cell、嫌色性細胞、集尿管細胞、和其他尚未

被分類的細胞，大約 80% 的病例屬於 clear cell 型腎細胞癌。而在先前已經有研究證實，血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的增加會刺激血管生成，而在缺氧的環境下會刺激 VEGF 的表現。缺氧促進因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)為腫瘤利用增加血管生成而獲得養分的重要媒介(2)。在遺傳相關的致病機轉上，通常以透明細胞型腎癌(clear cell carcinoma)做說明，因為 vHL 基因上的缺陷而無法製造出正常的 vHL 蛋白，導致 HIF-1 無法被分解而進入核內，促使 VEGF 與其他生長因子的轉錄，造成血管大量的增生幫助癌化的過程。而在本實驗所使用的細胞就是 786-O-SI3 腎臟癌細胞，vHL gene 缺乏的 clear cell carcinoma(3)

腎臟癌在治療上，因為正常的腎臟細胞具有排毒的功能，也因此腎細胞癌常有多種的藥物抵抗蛋白(multiple drug resistance protein)的表現，這種蛋白可以將許多化學藥物排出體外，造成化學治療上的表現並不好，在放射線治療的反應也不佳。在手術治療方面也因為腎臟癌是多血管的腫瘤，常有較大的側枝靜脈，手術過程容易出血不好控制，因此常會用 2/3 腎切除術，經過一年後病患的癌症再度復發甚至造成嚴重的血栓，所以手術中還是希望以保留完整器官進行切除為首要條件(4)，根治性的手術性切除包刮了區域性的淋巴結清掃術，可以降低局部腫瘤的復發機率，但這類病人 5 年存活率不超過 5%。

## 2. 癌細胞的侵襲與轉移

影響癌症形成有很多的因素，包括遺傳因素、賀爾蒙、病毒、與各種化學物質和環境致癌物。癌細胞除了生長失控外，並且從原發部位轉向其他周圍的正常組織進而產生侵襲(invasion)的現象，接著進一步經由體內循環系統或淋巴系統進行轉移(migration)至其他的器官。其中癌細胞的轉移是由一連串的過程產生，其中包括癌細胞貼附(adhesion)、侵襲(invasion)和移動(motility)。首先癌細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之結合能力改變，細胞與細胞間的相互作用力產生改變，因此增加了細胞侵襲(invasion)以及移動(motility)能力。接著癌細胞會分泌大量的蛋白酶(proteinase)幫助其本身穿過細胞外基質進而影響到循環系統產生轉移(migration)，經由免疫逃避的反應後貼附在內皮細胞，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，最後再利用血管新生(angiogenesis)作用增生周圍的血管以利於獲取足夠的養分繼續生長。

當癌細胞進行轉移時，癌細胞會藉由分泌蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，導致細胞基質的降解與細胞和細胞間基質的分離，促使癌細胞具有高度的移動能力。與胞外基質分解有關的酵素有 serine proteinase、matrix metalloproteinases (MMPs)、plasminogen

activator (PA)、cathepsins。其中 MMP-9、MMP-2 以及 u-PA 在基底膜破壞扮演著重要的角色，與癌症侵襲及轉移最有關係(5,6)。特別是腎臟癌病患的 MMP-2 表現量高造成腎臟癌細胞高度的轉移，病患的預後都很差(7)。

腎臟癌的轉移途徑可分為直接浸潤、淋巴途徑、血液轉移，肺和骨骼是常見的轉移部位。通常在腫瘤的破裂處都可以測得大量的 MMPs，現已證實被用來作局部的侵襲以及遠處的轉移，幫助癌細胞穿透基底膜進而由血管滲入組織達到轉移的目的(8)。

### 3. 基質金屬蛋白酶(MMPs)

在正常的生理功能中扮演著組織修復、器官形成(9)、神經生長、子宮頸擴張、傷口癒合(10)、血管新生成及細胞凋亡等角色，而病理上則是和組織的纖維化(11)、心血管疾病(12)以及癌細胞的轉移擴散有關(13)。基質金屬水解蛋白酶家族中的 MMP-2 與 MMP-9 具有水解 type IV collagen 基底膜的能力(14)，在許多惡性的腫瘤當中，這些表現量更加明顯。MMPs 與細胞外基質的分解有著很重要的關聯，同時也讓我們更了解上皮間質轉化 (epithelial mesenchymal transition, EMT)的作用過程(15)。

基質金屬蛋白水解酶的表現受到許多不同的訊息傳遞蛋白以及不同的轉錄因子所調控。在一些與發炎反應的現象中，轉錄因子 NF- $\kappa$ B 與 AP-1 會經由調控 cytokine 與 chemokine 轉錄的表現，而這些會影響到基質金屬蛋白水解酶基因的表現。NF- $\kappa$ B 在細胞中是一個非常重要的轉錄因子，抑制 NF- $\kappa$ B 的表現可以降低 MMP-2 與 MMP-9 的表達(16)。在人體也有 MMPs 相關的內生性抑制劑，tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)，MMPs 與 TIMPs 兩者間的平衡取決於細胞外基質(ECM)的分解或是形成(17)。

### 4. 根皮素(Phloretin)

一種取自蘋果或是蘋果樹皮的異黃酮，別名為三羥苯酚丙酮 2,4,6-三羥基-3-(4-羥基苯基)苯丙酮，分子式  $C_{15}H_{14}O_5$ ，是國外近年研發出來的一種新型天然皮膚美白劑。有著很強的抗氧化能力，能有效抑制皮脂腺過度的分泌，可以用來治療分泌旺盛的粉刺，也能抑制黑色素的細胞活性，對皮膚的色斑有很大的改善作用。也有研究顯示，Phloretin 與一些抗氧化劑一起作用在皮膚上可以有效的修復被紫外線所傷害的皮膚(18)。

目前在癌症治療的應用上，發現 Phloretin 對於非小細胞型肺癌(non-small cell lung cancer cells, NSCLC)和腸癌細胞(colon cancer cell)會誘導發生細胞凋亡(apoptosis)的反應，(19,20)。許多研究也肯定 Phloretin 的抗癌特性，在 NSCLC 的研究中也指出 Phloretin 可以有效的降低 Bcl-2，MMP-2 以及 MMP-9 的表現，也發現可以上調控許多與細胞凋亡

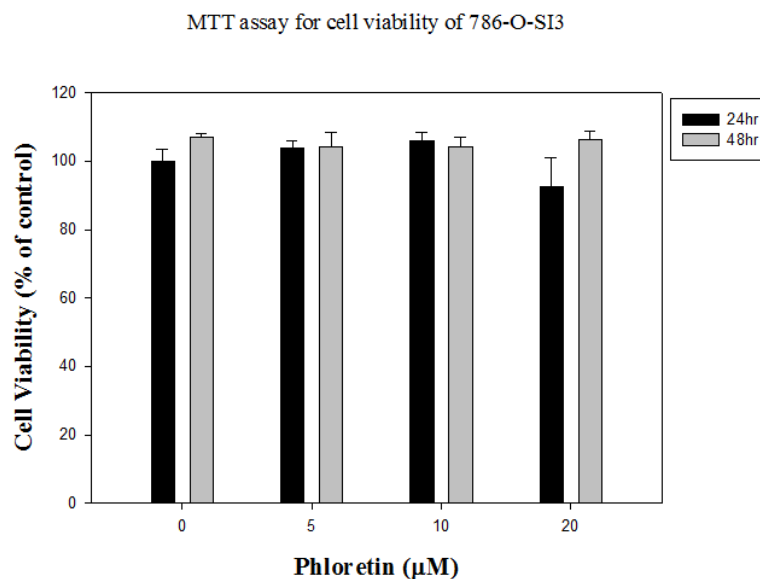
相關的蛋白質 caspases-3 與 caspases-9，更確認 Phloretin 在抑制細胞侵襲以及細胞移動有著很大的影響(21)。而本實驗之初步研究結果發現，在腎臟細胞癌 786-O-SI3 上，Phloretin 並不會對細胞有毒殺性而走向細胞凋亡(apoptosis)的路徑，卻能有效抑制癌細胞所分泌的 MMPs，進而能抑制其轉移與侵襲的能力。

#### (四) 實驗結果

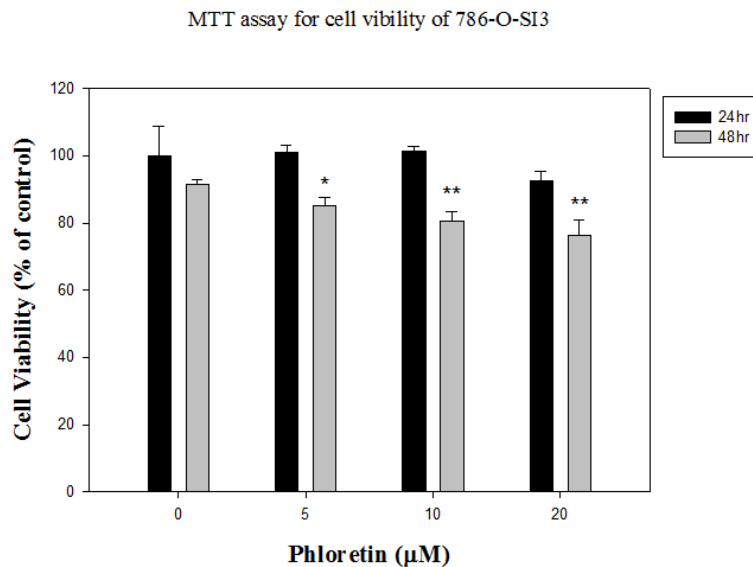
本實驗主要探討藥物抑制腎臟癌細胞轉移與侵襲的能力，因此先利用 MTT assay 分析細胞的存活率，確認細胞在藥物不同濃度的處理下能有 80% 以上的存活率。使用 Free 的培養液與藥物稀釋，加藥處理後分別收取 24 小時以及 48 小時的 sample 進而用 gelatin zymography 與 casein zymography 分析 MMP-9, MMP-2, u-PA 的表現量是否有被 Phloretin 依濃度上升而抑制下降。分析出來的結果與 MTT assay 比較，發現雖然 MMP-9、MMP-2 以及 u-PA 有被抑制而表現量下降，其腎臟癌細胞的存活率還是可以保持在 80% 以上，證實此藥物能有效抑制其細胞分泌之基質金屬蛋白酶，也可推測此藥物對於細胞較沒有毒殺性。如藥物較無毒殺性，對於活體身上其他好的細胞也較沒有影響，其藥物若能有效抑制其轉移，對於癌症的治療也相對變得容易許多。

##### A. MTT assay

【1】下圖為利用含有胎牛血清(FBS)的培養液稀釋 Phloretin 後加入，濃度依序為 0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ 。使用含有胎牛血清的培養液目的是為了模擬在人體一樣具有養分充足的環境，這也可以讓我們知道藥物是否會將人體身上好的細胞造成傷害。實驗結果可以發現細胞的存活率沒有因為藥物的影響而死亡。

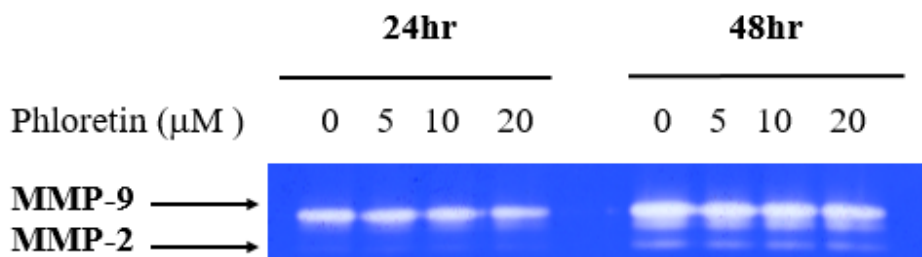


【2】下圖為使用 **Free** 的培養液，為完全不含胎牛血清的培養液，探討的是細胞在沒有養分充足的環境下經過藥物處理是否會影響其存活率，也因為環境中沒有養分，所以細胞會更容易受到藥物的影響。本實驗在經過 24 小時以及 48 小時會收取 sample，並分析其 MMP-9、MMP-2 以及 u-PA 表現量使否有被抑制。實驗結果發現經過 Phloretin 處理後，細胞的存活率有因為藥物濃度的升高而下降，但是其存活率還在 80%以上屬於可以接受的範圍。

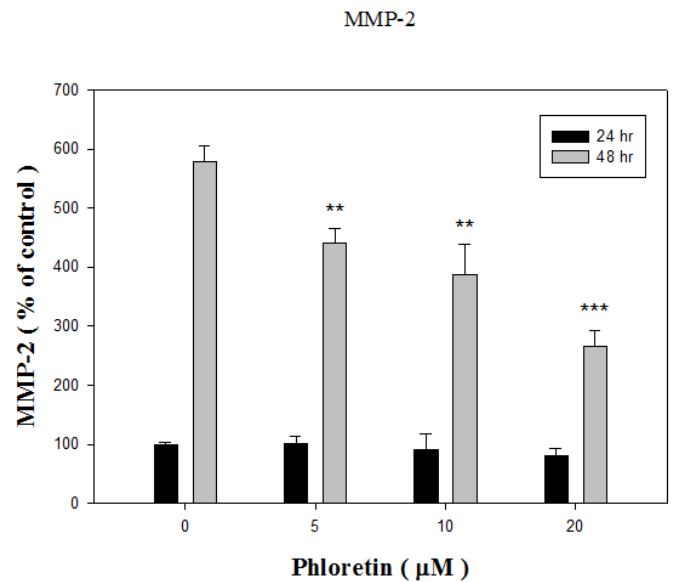
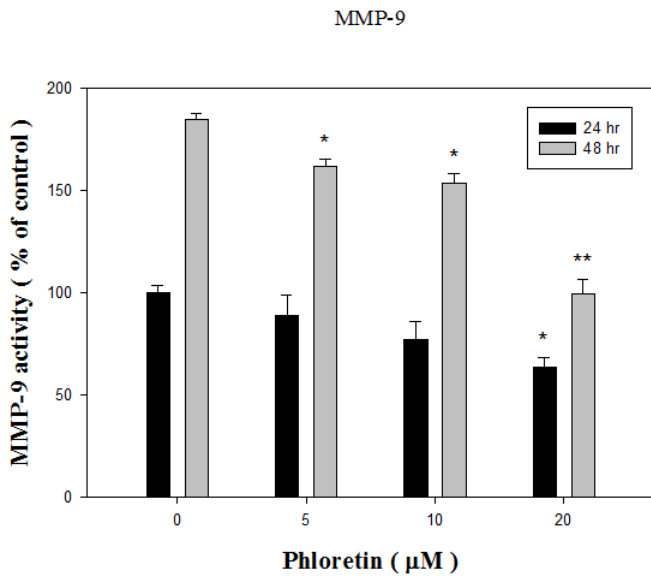


## B. Gelatin zymography and Casein zymography

【1】下圖 gelatin zymography 的分析結果，可以看見經過 24 小時後所收的 sample 跑出來的結果經過濃度由低到高(0, 5, 10, 20 µM)處理發現 MMP-9 以及 MMP-2 有被抑制的現象。而 48 小時的 MMP-9 與 MMP-2 明顯比 24 小時所分泌的量還要多，可是經過藥物由濃度低到高處理，也有抑制的現象。

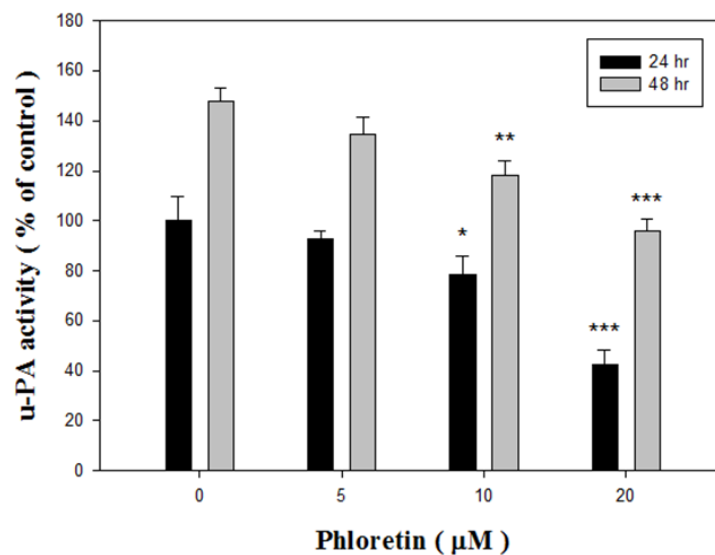
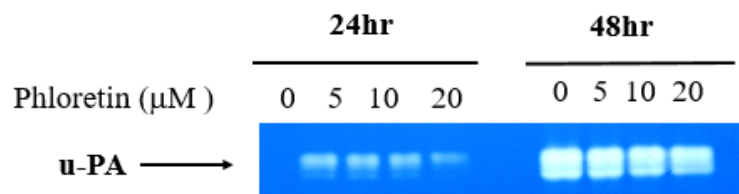






【 2 】 下圖 casein zymography 的分析結

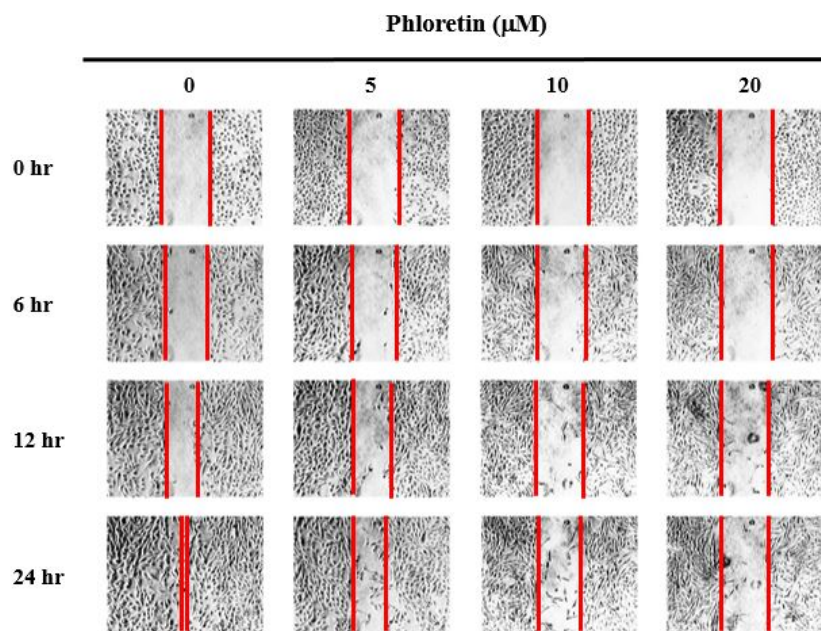
果，plasminogen activator (PA)對 plasminogen 有高度的專一性，因此 PA 可以將 plasminogen 水解成 plasmin，而被活化的 plasmin 具有蛋白水解酵素的功能。PA 中的尿激酶型纖維溶酶原激活物(urokinase-plasminogen activator, u-PA)會與其受體 u-PAR 結合會促進水解 plasminogen 活性，而造成細胞間基質分解，因此癌細胞可藉由調控 u-PA 蛋白的表現調控癌細胞的轉移與侵入。結果顯示 24 小時與 48 小時的 u-PA 表現量都有明顯的下降。



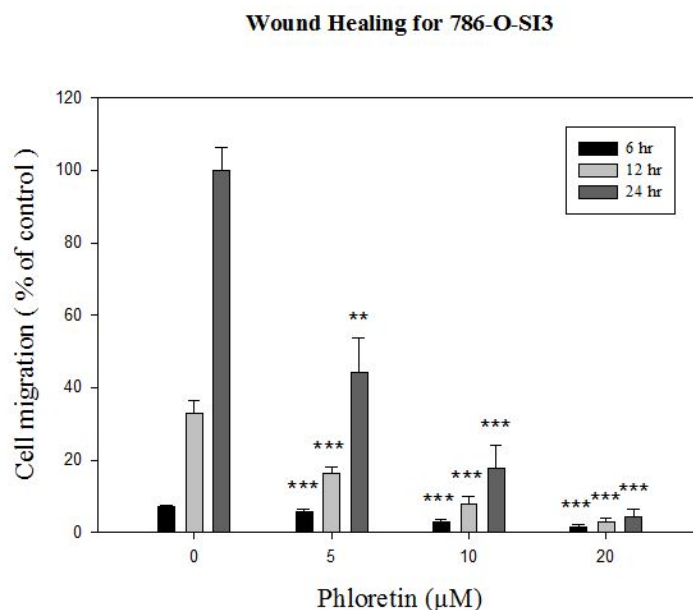
### C. 細胞移動傷口癒合試驗(Migration Wound Healing Assay)

下圖為 Phloretin 濃度低到高(0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ )處理細胞分別為 0, 6, 12, 24 小時，可以清楚的發現隨著時間的增加，濃度 0 的細胞經過 24 小時幾乎都爬行過去了，而濃度 20 的細胞經過了 24 小時幾乎沒有爬行，可以看出此藥物 Phloretin 可以抑制細胞爬行能力。癌細胞的轉移(metastasis)需要侵襲(invasion)及移動(motility)，此實驗主要目的為了顯示此藥(Phloretin)對於腎臟癌細胞(786-O-SI3)的移動能力的抑制。

#### ➤ Wound Healing Assay for 0, 6, 12, 24 hr



#### ➤ Ability of Cell migration

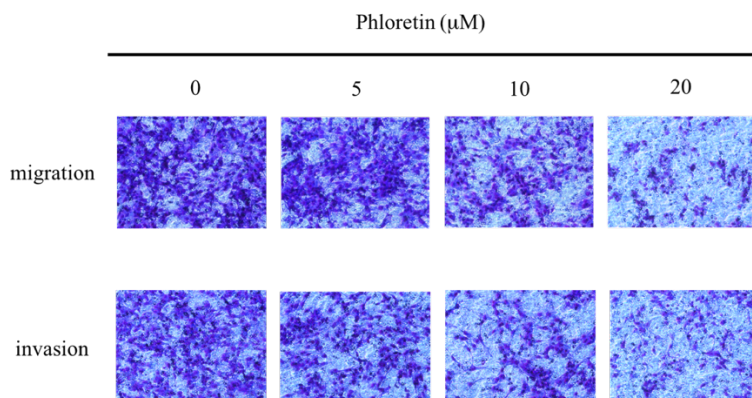


#### D. 細胞移動及侵襲分析(Boyden chamber assay)

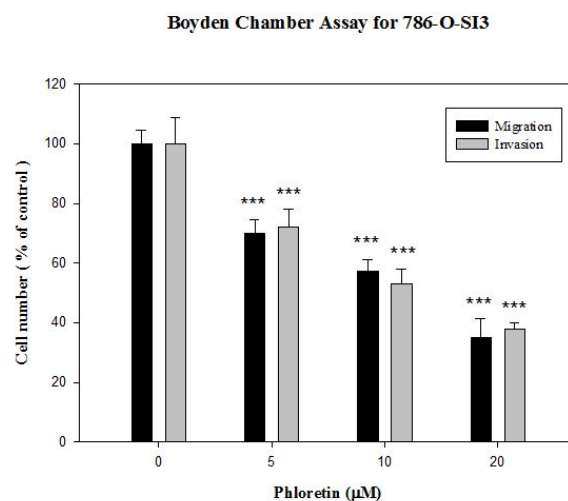
下圖為 Phloretin 對於腎臟癌細胞 786-O-SI3 的影響，可以發現 Phloretin 有效的抑制 786-O-SI3 的移動及侵襲的能力，細胞隨著藥物的濃度升高而漸漸下降。Migration 為移動性的分析，上層細胞為 Free medium，下層細胞為培養過一天的 FBS medium，此動作可以誘使上層細胞通過中間含有很多  $8\ \mu\text{m}$  大小的洞口進入下層的培養液，此實驗可以發現在藥物濃度為  $0\ \mu\text{M}$  時，大部分的細胞都順利通過洞口進入下層 chamber，而藥物濃度  $20\ \mu\text{M}$  的細胞較少通過此洞口，藉此分析細胞的移動能力受到抑制。

Invasion 為細胞的侵襲能力分析，與 migration 不同的地方，為 invasion 的 chamber 不僅有一層  $8\ \mu\text{m}$  大小洞口的薄膜，還會 coating 一層 matrigel 用來模擬細胞的基底膜，癌細胞要進行 EMT 前需要有侵襲基底膜的能力，破壞基底膜進入血管進行轉移。在實驗中也可以發現 invasion 的部分在藥物濃度為  $0\ \mu\text{M}$  時幾乎所有的細胞皆可以侵襲過去，但在藥物濃度為  $20\ \mu\text{M}$  中可以發現大部分細胞的侵襲能力被抑制。

##### ➤ Boyden Chamber Assay with analysis of migration and invasion



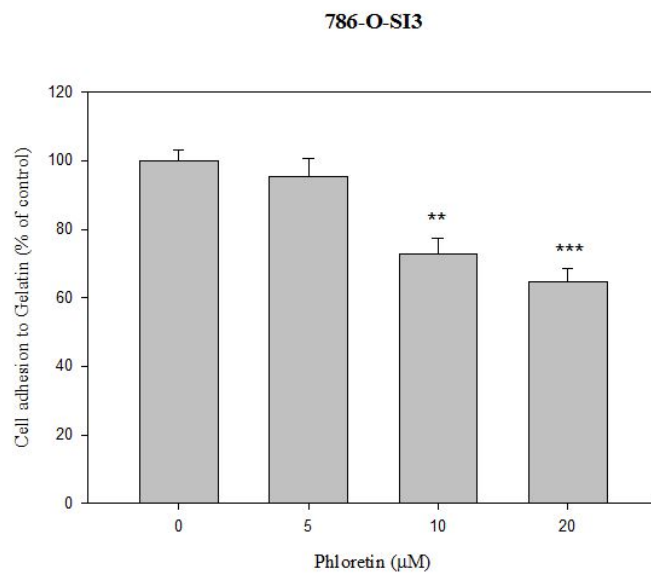
##### ➤ Cell number of migration and invasion cells



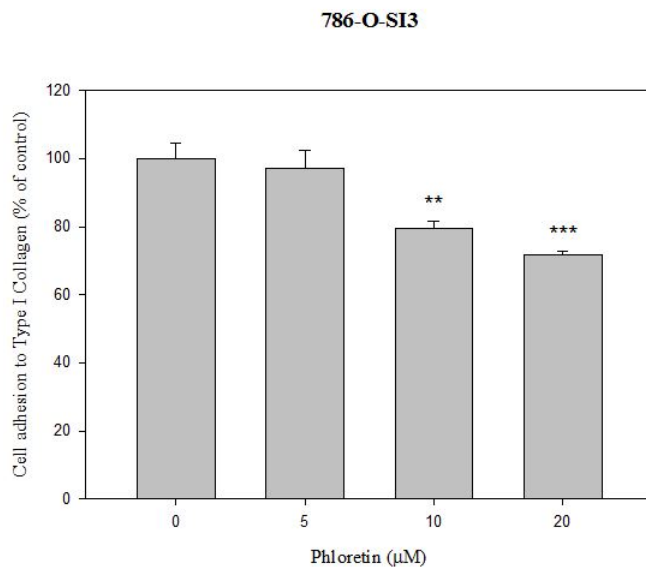
### E. 細胞與基質貼附分析(Cell-matrix adhesion assay)

下圖分別利用兩種基質分別為 Gelatin 及 Type I collagen，用來模擬人體內的基底膜，而此實驗為分析癌細胞貼附在基底膜上的能力。細胞與基質的貼附能力決定了癌細胞是否能順利貼附在欲轉移的組織上，並完成腫瘤間質上皮轉化(mesenchymal-epithelial transition, MET)。而在此實驗中可以發現，隨著藥物濃度的上升，使腎臟癌細胞的貼附能力下降。

#### ➤ Cell adhesion to Gelatin



#### ➤ Cell adhesion to Type I Collagen

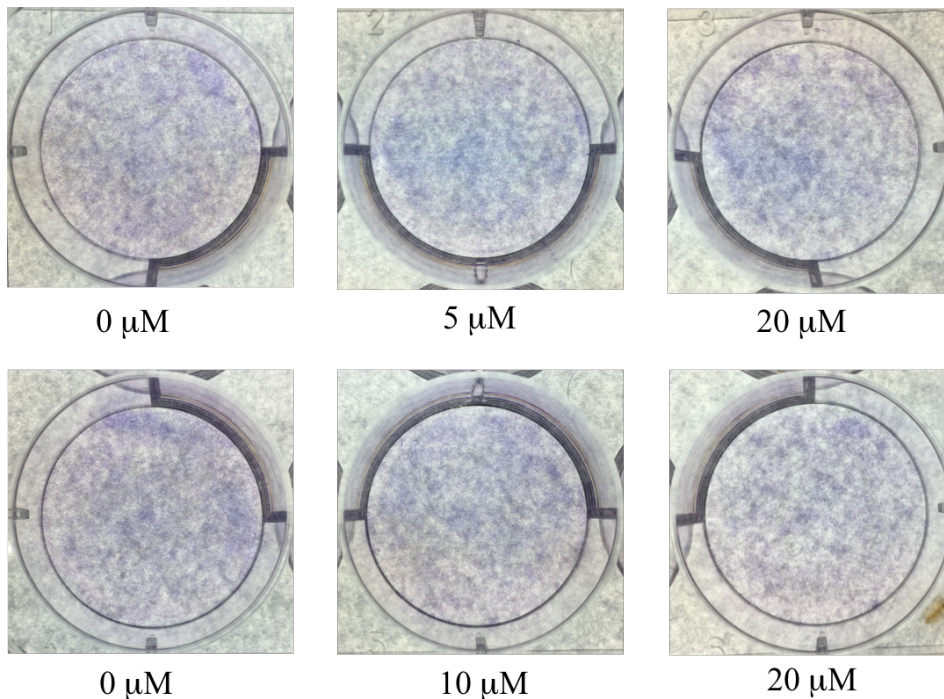


## F. 細胞群聚分析(2D cell colony formation)

下圖為分析細胞的群聚能力，將少量的細胞(約  $0.3 \times 10^4$ )加入培養液中，讓細胞生長約八至九天的時間待控制組至 8 分滿即可將細胞拿出固定染色。在下圖中發現此藥 Phloretin 對於 786-O-SI3 腎臟癌細胞的群聚並沒有太大的抑制效果。

可以推論藥物在癌細胞的移動能力及侵襲能力是能有效抑制的，而在細胞群聚作用中較無法抑制癌細胞形成腫瘤。此藥物在應用層次可推論較屬於抑制 EMT 作用的階段，而對於 MET 作用中，只有細胞的貼附能力有受到藥物影響而降低，對於細胞的群聚作用是較沒有明顯的抑制。

### ➤ Colony Formation with cell culture for 8 days



## G. 西方點墨法(Western Blot)

此 western blot 主要希望能分析 epithelial marker 以及 mesenchymal marker 確認上皮間質轉換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)是否會因為藥物而產生影響。Phloretin 藥物濃度採用 0, 5, 10, 20 μM。

Fibronectin 為細胞外基質中的多醣蛋白，在細胞貼附、細胞生長、細胞移動能力、細胞分化扮演著很重要的角色，而在實驗中發現在藥物濃度為 20 μM 的時候，Fibronectin 的表現量大幅被抑制。

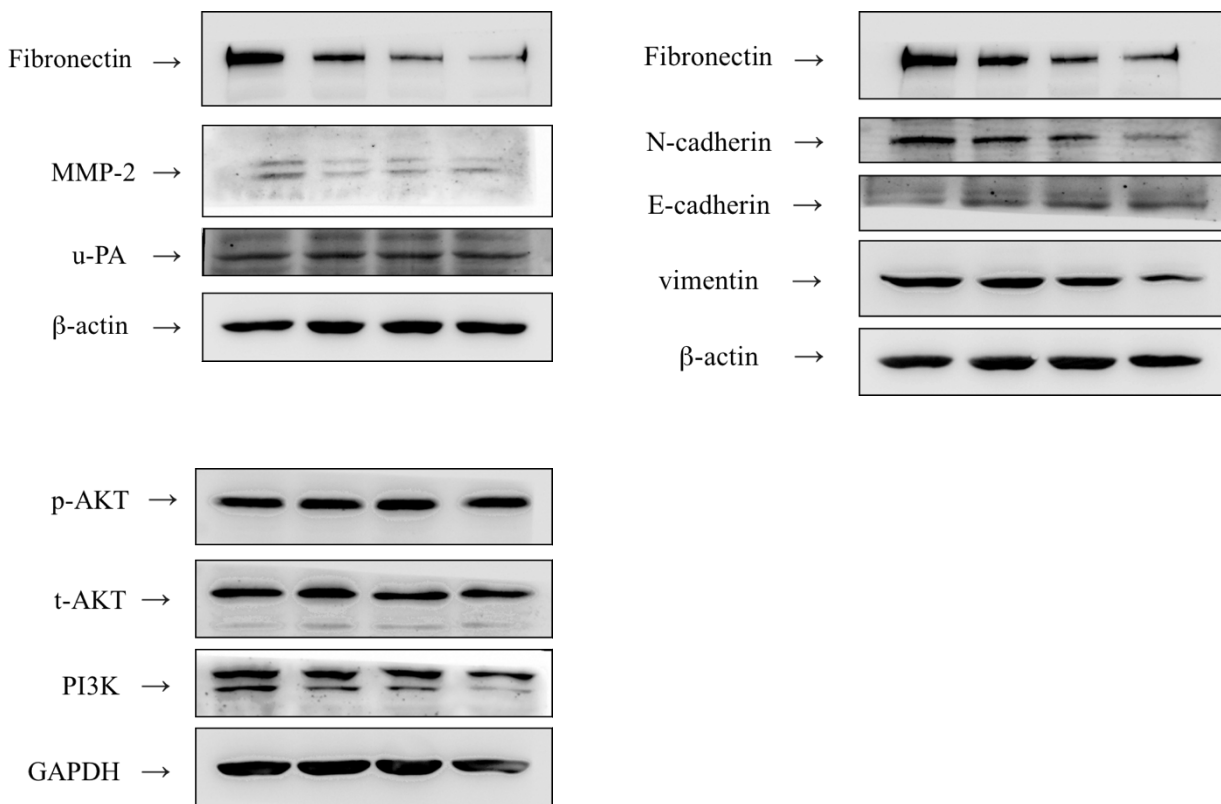
Cadherin 為第一型穿膜蛋白，主要負責細胞與細胞之間的黏合，E-cadherin 為

epithelial marker，在藥物 Phloretin 的處理下可以發現在濃度在 20  $\mu$ M 時，E-cadherin 的表現量有些微的提升。N-cadherin 為 mesenchymal marker，也可以發現 N-cadherin 會因為藥物的處理而減少了表現量。綜合此兩者蛋白質，可以推測藥物對於 EMT 可能有抑制的效果。

Vimentin 為第三型中間型質絲，此蛋白質常常在 mesenchymal cells 中可以發現有大量表現，也是常見的 mesenchymal marker。經過藥物處理後可以發現此蛋白質隨著藥物濃度上升，而有明顯的抑制。

MMP-2，u-PA 等基質金屬蛋白酶原在 western blot 中沒有看到有明顯的效果，但在先前的 zymography 實驗中可以發現 MMP-2 及 u-PA 皆是有下降的，可以推測藥物對於細胞所分泌至細胞膜外的 MMP-2，u-PA 是能有效抑制的，而在細胞內的基質金屬蛋白酶原是不會因為藥物的影響而有抑制的效果。

在 PI3K 及 Akt 中，此兩種蛋白質在多數文獻中可以發現與癌症的行程非常具有相關性，不過在這次實驗中只發現藥物只有影響 PI3K，而沒有抑制到在 PI3K 下游的 Akt 蛋白質，此生化路徑需要進一步釐清。



## (五) 實驗材料與方法

### 1. 繼代培養(subculture)

786-O-SI3 細胞培養在新鮮的 RPMI 培養液中，待細胞長至約九成滿時將舊的細胞培養液吸出，並利用 10mL 的 PBS wash 一次，再以 0.05%、1mL 的 trypsin-EDTA 覆蓋所有的細胞後，放入培養箱約 6 分鐘，用手輕拍打培養皿幫助細胞脫離培養皿，再加入 7mL 含有 10% 胎牛血清(FBS)的培養液抑制 trypsin 活性，收進 15mL 離心管進行離心 12000rpm，5 分鐘之後去除含有 trypsin 的上清液，再使用新鮮的培養液將細胞均勻的打散後經過計數並吸取適量含有細胞的培養液進入新的培養皿進行培養。大約 36-48 小時後會長至九分滿。

### 2. 冷凍細胞(frozen cell)

在 10 公分 dish 培養大約 36~48 小時後的細胞利用 1mL 的 trypsin-EDTA 覆蓋所有的細胞並放入培養箱 6 分鐘的時間，拿出培養箱並用手輕拍打培養皿幫助細胞脫離培養皿，將細胞完全打下後加入約 7mL 含有 10% FBS 的培養液抑制 trypsin 的活性，並收進 15mL 離心管進行離心 12000rpm，此時將抗凍劑 DMSO 140  $\mu$ l 加入含有 10% FBS 的培養液 1.86cc，配製成含有 7% DMSO 的培養液，此時將離心好的細胞上清液清除留下細胞，再將含有 DMSO 的培養液 2cc 將細胞打散，打散均勻後將培養液放入冷凍管，確認冷凍管鎖緊後放入-20 度的冰箱約 30 分鐘後，再將細胞放入-80 度冰箱以保存細胞。

### 3. 解凍細胞(thaw cell)

將已回溫之含有 10% 胎牛血清(FBS)吸取至 10 cm dish，準備好之後將細胞從-80 度冰箱拿出細胞，馬上將細胞放入水浴槽 37 度，將手持著細胞凍管來回攪動，當管內完全解凍，迅速將細胞拿入操作台將瓶蓋外圍過火後打開蓋子，再將管口迅速過火完馬上倒入培養皿內，將細胞搖散後至細胞貼壁後(約 2~5 小時)，更換新鮮培養液，再放回培養箱中培養。

### 4. 細胞存活率分析實驗(MTT assay)

利用具有活性的活細胞會將 MTT reagent 經由粒線體中的 dehydrogenase 作用代謝還原成藍紫色結晶，將 786-O-SI3 細胞株以  $3 \times 10^4$  細胞數/每個 well 分至 24-well 中，經過 37°C 培養至細胞約八分滿時，去除舊的培養液並加藥(0、5、10、20  $\mu$ M)處理 24 小時與 48 小時，之後將 sample 收取(Free medium 的收取，含有胎牛血清培養液(FBS)的直接吸掉)。依序加入以細胞培養液稀釋 10 倍的 MTT reagent，395  $\mu$ l / well，經過兩個小時後把 MTT reagent 吸除，再

以異丙醇(isopropyl alcohol)以 1 mL 將藍紫色結晶溶解，於波長 565 nm 下測定溶解的吸光值，由吸光強度可得知有多少細胞存活。(如果吸光值大於 2，將會再加入 1 mL 異丙醇作稀釋，測出來的結果較為準確。)

#### 5. MMP-2, 9 活性分析, gelatin zymography

將細胞用不含有胎牛血清的培養液(Free medium)與藥物稀釋並加入 24 well 裡面，濃度 (0、5、10、20  $\mu\text{M}$ )處理。將 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片放入含有電泳緩衝液的電泳槽中，24 小時與 48 小時後取出已含有細胞分泌物的細胞培養液(Free medium)，與 5X 染劑 (loading buffer)均勻混和後，注入膠片，再分別以 100V(上層膠)與 140V(下層膠)的電壓進行蛋白分離。結束電泳分離後，以 washing buffer (2.5% Triton X-100 in  $\text{dH}_2\text{O}$ )在室溫下作用 30 分鐘兩次，再將 washing buffer 倒掉。然後加入 reaction buffer (40 mM Tris-HCL pH 8.0, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.01%  $\text{NaN}_3$ ) 在 37°C 恆溫箱中作用 24~36 小時，最後反應完的膠片以 coomassie blue 染色 20~40 分鐘後，進行退染。(染色及脫色依照膠片情況調整作用時間)

#### 6. u-PA 活性分析, casein zymography

製備 8% SDS-PAGE 電泳膠片，並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 plasminogen。加入電泳緩衝液，取 8  $\mu\text{L}$  sample，加入 2  $\mu\text{L}$  loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 100 V 和 140 V 進行電泳分離。約四小時後將膠片拆下，加入 washing buffer 並在室溫下洗 30 分鐘兩次，共一小時。倒掉 washing buffer 後，加入 50  $\mu\text{L}$  的 reaction buffer 在 37°C 的恆溫箱作用 24~36 小時，最後以 coomassie blue 染色 20~40 分鐘，進行退染。

#### 7. 細胞移動傷口癒合試驗(migration wound healing assay)

將日字型 kit 扎實的黏在 6 well 上，將細胞 load 進 kit，一小格為 100  $\lambda$ 、細胞數為  $1.5 \times 10^4$  共兩小格。培養一天後將 kit 垂直拔起，利用 PBS 將中間沒有細胞的部分沖洗乾淨，將死亡的細胞及沒順利貼附的細胞沖除，次數約三到五次。並利用僅含有 1% 的 FBS 的 medium 加入每個 well 約 2 ml。依序時間是用螢光顯微鏡觀察(目鏡 10X、物鏡 4X)拍照，觀察固定位置的傷口癒合狀況，每種細胞與藥物的狀況皆不同，時間需依細胞狀況作調整。

#### 8. 細胞侵襲及移動性分析(Boyden chamber assay)

利用 48 well Boyden chamber 的方法分析 786-O-SI3 細胞的移動能力，lower chamber 為



含有 FBS 的 RPMI 新鮮培養液，將處理藥物 24 小時後的細胞，以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 ( $2.5 \times 10^4$ ) 於 upper chamber (為使用沒有 FBS 的 RPMI 新鮮培養液)，等待細胞移動於 3 小時後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，在室溫晾乾 10 分鐘後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定薄膜，擦掉薄膜之上層的細胞，在 400 倍的顯微鏡下每個 well 隨機取 3 個視野，數取 5 個 well，做有移動過去的細胞數統計。

#### 9. 細胞與基質貼附力分析(Cell-matrix adhesion assay)

首先以 type I collagen 與 gelatin 以滅菌水稀釋 1000 倍混合液在 24-well 培養皿 overnight，隔日將液體吸除可看見此兩類基質在底部形成薄膜。再以不同濃度 Phloretin 處理過的腎臟癌細胞以 trypsin 打下，以  $15 \times 10^4$  / well 的細胞數 subculture 至 24 well 培養皿內。經過 15 分鐘讓細胞順利貼附在 type I collagen 與 gelatin 上，將培養液吸除之後利用 PBS 沖洗掉未成功貼附的細胞，共洗兩次。並以 3.7% para-formaldehyde 固定細胞 30 分鐘後利用 0.1% crystal violet 進行染色 20 分鐘。再利用 PBS 沖洗 4-5 次至染劑乾淨為止。用 30% 醋酸將染色過後的細胞溶出後於波長 550 nm 下測量吸附細胞的比例。

#### 10. 細胞群聚二維分析(2D Colony formation assay)

利用 6 well 培養皿，加入 medium 2 ml / well，並分別種下極少量的細胞約 1000 顆 / well。將細胞加入 medium 後直接加入不同濃度的 Phloretin，並將此 6 well 培養皿放置在培養箱中 6-8 天，每一天皆需觀察細胞形成聚落的數量，當 control 組的腎臟癌細胞至 8 分滿時即可拿出培養箱。利用 para-formaldehyde 固定細胞 30 分鐘，並用 Gimsa 染色 30 分鐘，最後觀察細胞。

#### 11. 西方點墨法(Western blot)

##### (11-1) 細胞萃取液之製備(preparation of the total cell lysates)

將加藥處理過後的細胞拿出，利用 PBS 清洗兩次後確保吸乾，並加入 TD buffer 刮下培養皿內的細胞，收進 eppendorf 加入 NP-40 後並震盪十分鐘，在 4°C 下以 12000rpm 離心十分鐘到十五分鐘，取出上清液加入甘油作為抗凍劑，並存於 -70°C 下保存。

##### (11-2) 蛋白質之定量 (protein quantitation)

主要是利用 Bradford protein assay 的方法，原理為蛋白質可與 Coomassie

brilliant G-250 行成藍複合物，當藍色愈深表示蛋白的含量愈高。測試方法為將已知濃度 BSA (1.6、3.2、4.8、6.4、8.0、9.6、11.2、12.8 $\mu$ g)的蛋白溶液加入五分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595nm 可見光之吸光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之吸光值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

#### (11-3) 樣品製備 (preparation of samples)

在知道樣品的蛋白質濃度後，與含有 $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -MSH)的 5 倍染劑混合均勻，在 80~90°C 的加熱器上加熱 5 分鐘，之後馬上放到冰上靜置 5 分鐘，經快速離心後將樣品注入 SDS-PAGE 電泳膠體內，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分析。

#### (11-4) 電泳膠片的 transfer 與 blocking

將 NC paper 放置在 transfer buffer 中浸潤 5 分鐘，再將膠片疊於 NC paper 上，在大約 4°C 下進行 transfer，以 100V 電壓進行 transfer 一小時，transfer 完後，以 5% 脫脂奶粉在室溫下進行 blocking 1 小時或是放入冷房 overnight。

#### (11-5) 抗體反應 (hybridization)

Blocking 完後加入一級抗體並置於冷房搖晃 overnight。隔天以 TBS+Tween 20 的 wash buffer 沖洗 3 次，每次為 15 分鐘。在加入二級抗體在室溫下作用 1 小時，再以 wash buffer 沖洗 3 次，每次為 15 分鐘。最後以 ECL 冷光螢光顯影系統拍照。

## 12. 統計分析(statistical analysis)

每一試驗為三重複，同樣試驗至少重複執行三次。試驗結果以平均值  $\pm$  標準偏差 (Mean  $\pm$  SD)表示\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  表示統計上具顯著差異。所以數據以電腦統計軟體 SigmaPlot 進行 t-test。

## (六) 研究方法及步驟

### 第一部分：

探討 Phloretin 對 786-O-SI3 腎臟癌細胞存活率的影響，並分析此藥物對 786-O-SI3 的移動與侵襲的能力。利用 gelatin zymography 以及 casein zymography 分析腎臟癌細胞所分泌的 MMP-2, MMP-9, u-PA 是否被 Phloretin 所抑制，並進一步分析抑制其轉移相關的訊息路徑。

## 第二部分：

為了更了解細胞侵襲以及轉移的能力，(a.)會先利用細胞貼附實驗分析細胞的貼附能力，(b.)接下來會利用細胞傷口癒合實驗來去確認細胞的爬行能力，(c.)並使用 48 well Boyden chamber 作細胞移動能力的分析。(d.)最後是細胞侵入性的分析，此分析方法與細胞移動性分析相似，差別在於 cellulose nitrate filter 上面要 coating 一層 matrigel，模擬細胞侵入的過程。

使用 Western blot 探討細胞移動和侵襲能力與 MMP-2，MMP-9，u-PA 分泌之間的關係，建立細胞外基質相關蛋白之間的機轉以及相關作用途徑。使我們能更具體了解 Phloretin 對 786-O-SI3 腎臟癌細胞之上皮間質轉化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相關骨架蛋白的影響，像是 E-cadherin、 $\alpha$ -catenin 的表現量分析以及 Erk1/2 相關的作用途徑，以及腎臟癌的細胞中轉錄因子 NF-kB 與 AP-1 的次單元分析：c-Jun 與 c-Fos。

## 第三部分：

以裸鼠(nude mice)分別於皮下注射(subcutaneous injection)人類腎臟癌細胞 786-O-SI3，以口服(管餵)的方式進行投藥，觀察腫瘤生長大小，並驗證 Phloretin 抑癌功能的重要性。

## (七) 討論

癌症在國內為十大死因之首，造成癌症的原因目前還尚未完全釐清。目前大部分造成癌症的原因是基因突變，導致不正常細胞分裂，而在原發性的腫瘤會透過轉移的方式擴散到身體各個部位，導致癌症的治療非常棘手。

而在腎臟癌細胞中，主要造成的原因為 vHL 基因上的缺陷而無法製造出正常的 vHL 蛋白，導致 HIF-1 無法被分解而進入核內，促使 VEGF 與其他生長因子的轉錄，造成血管大量的增生使癌症迅速惡化。癌症在人體中不容易被注意，當發現得已經是末期，而癌細胞此時已經擴散至全身了，導致死亡率如此居高不下。因此，對於癌症的治療通常著重在抑制癌細胞的不正常增生以及轉移(22)，特別要注意的是，在癌症轉移的過程中，細胞周邊常常伴隨生理狀態的改變，其中包含細胞與細胞外基質 ECM 之間結合能力的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞，及細胞外基質的分解(23)。

本次實驗將 786-O-SI3 腎臟癌細胞處理藥物 Phloretin，來觀察 786-O-SI3 的轉移能力及轉移相關的骨架蛋白是否會因為 Phloretin 的作用而有所改變。先使用了 MTT assay 分析 Phloretin 處理下的癌細胞存活率，結果發現藥物濃度 20 $\mu$ M 以下的 Phloretin 對於 786-O-SI3 是不具有毒殺性的，甚至是使用不含任何胎牛血清的培養液去培養癌細胞，經過加藥後，細胞存活率還可達到 80%以上。確認細胞的存活率後接著利用 Wound Healing Assay 以及

Boyden Chamber Assay 分析細胞的移動能力以及侵襲能力，結果顯示藥物 Phloretin 對於 786-O-SI3 的作用有明顯抑制細胞的爬行能力與侵襲能力，藉由上述實驗可以推論此藥物可能可以抑制癌細胞的轉移能力。當癌細胞要進行轉移的時候，需要藉由分泌一些蛋白水解酶去分解細胞周邊的組織以及細胞外基質，造成細胞與細胞間的基質分離，增加了細胞的移動能力以及侵襲能力，使得癌細胞更容易透過血管而轉移至身體其他的部位。在過去的研究當中，常見的基質金屬蛋白酶原 MMP-9、MMP-2、u-PA 會在很多的惡性腫瘤當中被發現在腫瘤侵襲的附近(24)，而在本次實驗利用 zymography 分析已經分泌出在細胞外的基質金屬蛋白酶，因為癌細胞在進行轉移時需要通過血管，而血管壁中富含 type IV collagen，所以這些基質金屬蛋白酶對於癌細胞轉移扮演著相當重要的角色。而實驗結果顯示藥物 Phloretin 能有效抑制這些癌細胞所分泌至細胞外的基質金屬蛋白酶 MMP-9，MMP-2，u-PA。

接著分析藥物對於癌細胞的貼附能力(cell-matrix adhesion)，貼附能力在癌細胞欲轉移至新的部位時扮演著重要的指標，而實驗結果也發現經過 15 分鐘的時間，癌細胞對於藥物濃度 20  $\mu$ M 的處理，大幅減低了自身的貼附能力。而癌細胞的群聚能力(colony formation)也是一項很重要的指標，決定了癌細胞是否能透過少數的癌細胞而透過群聚作用幫助自身大量的增生，但在實驗結果中發現藥物 Phloretin 對於腎臟癌細胞的群聚能力沒有明顯的作用，可以推測此藥物對於癌細胞的抑制作用目前著重於上皮間質轉換作用(EMT)的步驟，而對於間質上皮轉換(MET)的抑制效果較差，而在未來也希望可以利用 3D colony formation 分析，更進一步探討腎臟癌細胞的癌幹細胞特性。

最後用 western blot 分析癌細胞的細胞質中的蛋白質變化，可以發現經過藥物處理過後，mesenchymal marker 的蛋白質像是 N-cadherin、vimentin、fibronectin 都有了明顯的抑制，而也還原了 epithelial marker 蛋白質像是 E-cadherin 的表現。但對於像是 MMP-2，u-PA 等基質金屬蛋白酶原都沒有明顯的抑制效果，可以推論藥物可能對於細胞內的基質金屬蛋白酶沒有明顯的影響，而主要是抑制已經被癌細胞分泌出細胞外的基質金屬蛋白酶原，而這個現象也可以說明此藥物對於上皮間質轉換還是有著一定的影響力。更詳細的路線像是 PI3K/Akt 目前只有 PI3K 有明顯的抑制，對於 Akt 等蛋白質還需要更進一步分析。在很多論文中也有提到 NF- $\kappa$ B 發炎反應的路徑對於 MMP-9、MMP-2 的分泌量會產生抑制的現象，在未來也希望 Western Blot 能更了解藥物對於細胞質中蛋白的生化途徑後，繼續探討核內的蛋白質變化。

在動物實驗的部分，目前還尚未有明顯的證據可以確認 Phloretin 對於癌細胞的轉移可能有抑制的現象，有待分析出藥物對於癌細胞作用更明確的生化途徑後，才會利用活體實驗分析此藥物對於癌細胞的轉移以及所可能產生的副作用。

## (八) 參考文獻

1. Ishida M<sup>1,2</sup>, Mikami S<sup>3</sup>, Shinojima T<sup>1</sup>, Kosaka T<sup>1</sup>, Mizuno R<sup>1</sup>, Kikuchi E<sup>1</sup>, Miyajima A<sup>1</sup>, Okada Y<sup>4</sup>, Oya M, Activation of aryl hydrocarbon receptor promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma and is associated with poor prognosis and cigarette smoke, *Int J Cancer*. **2015** Jul 15;137(2):299-310
2. Mizukami Y<sup>1</sup>, Kohgo Y, Chung DC, Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis, *Clin Cancer Res*. **2007** Oct 1;13(19):5670-4
3. Struckmann K<sup>1</sup>, Mertz K, Steu S, Storz M, Staller P, Krek W, Schraml P, Moch H, pVHL co-ordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma, *J Pathol*. **2008** Mar;214(4):464-71
4. Linxweiler J<sup>1</sup>, Shayesteh-Kheslat R, Fries P, Schneider G, Janssen M, Ohlmann CH, Stöckle M, Siemer S, Saar M, Organ-Preserving Surgical Treatment of a Horseshoe Kidney Occupied by a Large Renal Cell Carcinoma with Extensive Venous Invasion: A Case Report, *Urol Int*. **2016** Feb 11
5. Hao L<sup>1</sup>, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Luo Y, Jin M, Zhang Y, Guo TB, Matsushima K, Zhang Y, Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer, *Cancer Lett*. **2007** Aug 8;253(1):34-42. Epub **2007** Feb 16.
6. Hsieh YS<sup>1</sup>, 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** May;28(5):977-87. Epub 2006 Nov 20.
7. Cheng HP, Duan YR, Li Y, Li XD, Zhu CY, Chen BP, Clinicopathological Significance of Matrix Metalloproteinase-2 Protein Expression in Renal Cell Carcinoma Patients, *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. **2015** Dec;37(6):353-63.
8. Guan X, Cancer metastases: challenges and opportunities, *Acta Pharm Sin B*. **2015** Sep;5(5):402-18
9. Mescher AL<sup>1</sup>, Neff AW, King MW, Changes in the inflammatory response to injury and its resolution during the loss of regenerative capacity in developing *Xenopus* limbs, *PLoS One*. **2013** Nov 20;8(11):e80477
10. Krejner A<sup>1</sup>, Grzela T<sup>1</sup>, Modulation of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 activity by hydrofiber-foam hybrid dressing - relevant support in the treatment of chronic wounds, *Cent Eur J Immunol*. **2015**;40(3):391-4.
11. Iimuro Y<sup>1</sup>, Brenner DA, Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis, *Pharm Res*. **2008** Feb;25(2):249-58. Epub 2007 Jun 19.
12. Raffetto JD<sup>1</sup>, Khalil RA, Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease, *Biochem Pharmacol*. **2008** Jan 15;75(2):346-59. Epub **2007** Jul 7.
13. Hussaini IM<sup>1</sup>, Trotter C, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, Agi CU, Redpath GT, Fang Z, Leung GK, Lopes MB, Laws ER Jr. Matrix metalloproteinase-9 is differentially expressed in nonfunctioning invasive and noninvasive pituitary adenomas and increases invasion in human pituitary adenoma cell line, *Am J Pathol*. **2007** Jan;170(1):356-65
14. Karousou E<sup>1</sup>, Ronga M, Vigetti D, Passi A, Maffulli N, Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human achilles tendon rupture, *Clin Orthop Relat Res*. **2008** Jul;466(7):1577-82.

15. Mikami S1, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Katsube K, Okada Y. Invasion and metastasis of renal cell carcinoma, *Med Mol Morphol*. **2014** Jun;47(2):63-7.
16. Yoshida M1, Korfhagen TR, Whitsett JA, Surfactant protein D regulates NF-kappa B and matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways, *J Immunol*. **2001** Jun 15;166(12):7514-9
17. Qiao ZK1, Li YL, Lu HT, Wang KL, Xu WH, Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in renal cell carcinoma, *World J Surg Oncol*. **2013** Jan 3;11:1.
18. Oresajo C1, Stephens T, Hino PD, Law RM, Yatskayer M, Foltis P, Pillai S, Pinnell SR, Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin, *J Cosmet Dermatol*. **2008** Dec;7(4):290-7.
19. Min J, Huang K, Tang H, Ding X, Qi C, Qin X, Xu Z, Phloretin induces apoptosis of non-small cell lung carcinoma A549 cells via JNK1/2 and p38 MAPK pathways, *Oncol Rep*. **2015** Dec;34(6):2871-9
20. Park SY1, Kim EJ, Shin HK, Kwon DY, Kim MS, Surh YJ, Park JH, Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by phloretin, *J Med Food*. **2007** Dec;10(4):581-6.
21. Ma L1, Wang R1, Nan Y1, Li W1, Wang Q2, Jin F1, Phloretin exhibits an anticancer effect and enhances the anticancer ability of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by regulating expression of apoptotic pathways and matrix metalloproteinases, *Int J Oncol*. **2016** Feb;48(2):843-53.
22. Berglund P1, Landberg G., Cyclin e overexpression reduces infiltrative growth in breast cancer: yet another link between proliferation control and tumor invasion., *Cell Cycle*. **2006** Mar;5(6):606-9. Epub 2006 Mar 15.
23. Chakraborti S1, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T., Regulation of matrix metalloproteinases: an overview, *Mol Cell Biochem*. **2003** Nov;253(1-2):269-85.
24. Johnsen M1, Lund LR, Rømer J, Almholt K, Danø K. ,Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation, *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct;10(5):667-71.