

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

番茄生物鹼抑制骨癌細胞株轉移及血管新生之機制探討

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 105-2314-B-040-001-
執行期間：105年01月01日至105年10月31日
執行單位：中山醫學大學附設醫院

計畫主持人：楊嘉欣
共同主持人：呂克修、楊順發

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 106 年 01 月 26 日

中文摘要：癌細胞轉移是癌症導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因，而癌細胞轉移已知與多種細胞生理改變密切相關，如改變癌細胞與胞外基質間及基底膜的貼附能力，破壞細胞間的交互作用等。癌細胞之所以能轉移主要是透過癌細胞分泌蛋白水解酶來分解胞外基質，最後導致細胞間基質分離和基底膜的分解，進而使癌細胞轉移及侵襲。番茄生物鹼(Tomatidine)是主要存在於番茄植物中的一種類固醇生物鹼苷類。目前許多研究發現，Tomatidine能夠抑制發炎反應，並具有抗氧化的效果。除此之外，也有研究發現Tomatidine具有抗乳癌、胃癌及肺癌的功能。但是關於Tomatidine在骨肉瘤轉移的相關研究卻完全無任何文獻報導。我們的研究發現Tomatidine在低濃度並不會毒殺細胞，但會抑制骨肉瘤細胞株移行、轉移及侵襲的能力，其機制是透過抑制蛋白水解酶Presenilin 1與訊息傳遞蛋白ERK1/2的磷酸化所調控。綜合以上結果，Tomatidine或許可以應用在預防骨肉瘤的轉移或輔助骨肉瘤的治療上。

中文關鍵詞：番茄生物鹼、骨癌、轉移、蛋白水解酶、早老素1

英文摘要：Metastasis of cancer cells, a primary cause of cancer death and a multiple and intricate processes, may complicate the clinical management and lead to a poor prognosis for cancer patients and has tremendous physical or economical impact to patients or communities. The metastasis of cancer cells are known to be closely related to a variety of cell physiological changes, such as changing the adhesion between cancer cells and extracellular matrix and basement membrane, and destruction the interaction of cells. Secretion of proteases in cancer cells are the most vital ones for degradation of base membrane and therefore deeply involved in cancer invasion and metastasis. Tomatidine, the major steroidal alkaloid glycoside present in the tomato plant, has potent antiinflammatory and anticancer activities. Numerous investigations demonstrated that tomatidine can suppress cancer cell growth and/or inducing apoptosis in breast cancer, gastric cancer and lung cancer. However, the effect of tomatidine on cancer invasion and metastasis of osteosarcoma cell lines and the underlying mechanisms of such effect have not been studies yet. In our preliminary study, U2OS cell lines have been treated with tomatidine and then subjected to assays for cell migration ability. The results showed that tomatidine has no effect on cell viability of osteosarcoma cell and significantly inhibit osteosarcoma cell migration. Tomatidine may suppress the proteinase expression of presenilin 1 and inhibit the signal transduction protein expression of phosphorylation of ERK1/2. In conclusion, tomatidine may be a powerful candidate for a preventive agent against osteosarcoma development and metastasis.

英文關鍵詞：Tomatidine, osteosarcoma, metastasis, proteinase,
Presenilin 1

一、緒論

骨肉瘤(osteosarcoma; OS)是常見的骨惡性腫瘤，好發於青少年，通常發生在長骨的生長板周圍，大多數的骨肉瘤常發生肺部轉移，而肺部轉移是導致骨肉瘤高死亡率的主因，儘管在臨床上已有所改善，但具有轉移和復發的骨肉瘤患者預後仍不良[1]。惡性腫瘤細胞的轉移(metastasis)是癌症病人在臨床治療上預後的一個重要指標；在癌症的分期上，惡性腫瘤細胞的轉移與否也是一個重要的分界。當惡性腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部癌；若惡性腫瘤細胞尚未破壞基底膜(basement membrane)穿出，稱為原位癌(carcinoma in situ)。如果能在此階段進行治療，則治癒率最高。當惡性腫瘤細胞藉由血管、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長成續發性惡性腫瘤，則稱為轉移性癌[2]。大部分原發性的病灶可以由外科手術及其他治療方式將其完全移除，但轉移性癌因已轉移至身體各處，進而造成治療上的困難。

一般而言，惡性腫瘤細胞的擴散轉移需伴隨細胞生理狀態的改變，包含細胞移動(migration)和侵襲(invasion)能力的增加；細胞與細胞間相互作用力的破壞；細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)之間貼附能力(adhesion)的增加；以及細胞外基質的分解。而惡性腫瘤細胞在擴散轉移的過程中，可分為侵襲(invasion)及轉移(metastasis)兩個階段，由惡性腫瘤細胞破壞基底膜後穿過細胞外基質開始，接著侵入到周圍組織，此階段稱之為侵襲，接著惡性腫瘤細胞藉由侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動至遠處的器官組織，此階段稱之為轉移，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管新生(angiogenesis)長成新的腫瘤，惡性腫瘤奪取正常組織器官的養分，而使惡性腫瘤細胞大量增生(proliferation)，造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。當正常細胞轉變成惡性腫瘤細胞時，需要特殊的訊息傳導使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發惡性腫瘤細胞組織周圍血管增生，以供應足夠的養分，另外也提升惡性腫瘤細胞對周圍組織的侵襲和轉移能力[3]。

目前造成惡性腫瘤細胞轉移的機轉尚不是很清楚，可能導因於某些基因的突變造成功能失調，如：Myc、Ras 及 p53 等。當 Myc 基因突變時會造成惡性腫瘤

細胞具有抗凋亡的能力，這主要是因為 Myc 誘發 Bcl-XL 蛋白質的表現[4]。而 Ras 的突變在很多研究證實與惡性腫瘤細胞轉移有關，其可能原因為 Ras-mitogen-activated protein kinases (MAPK) 訊息持續被活化而誘發 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的大量表現，促使惡性腫瘤細胞分解基底膜造成局部的侵襲和遠處的轉移[5-7]。

惡性腫瘤細胞會產生細胞外基質分解酵素，包括有 serine proteinase、matrix metalloproteinases (MMPs)、cathepsins、plasminogen activator (PA)，其中 MMP-2、MMP-9 及 urokinase-type PA (u-PA) 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移能力最有關。惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，在癌症等級增加時某些 MMPs 亦會相對的增加，而 MMPs 具有蛋白分解活性可分解膠原蛋白，在腫瘤破裂的基底膜處可測得大量的 MMPs，現已證實是用於局部侵襲和遠端轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管或淋巴管滲入組織而達轉移之目的[8-13]。

Matrix metalloproteinases (MMPs) 為一群含鋅之蛋白分解酵素，依其作用之受質特性及作用方式可分為五大類，分別是 collagenases、gelatinases、stromlyns、matrilysins 和 membrane type-metalloproteinases (MT-MMPs)，個別參與 ECM 的合成與分解；於正常生理情況下參與胚胎的發育、胚胎的著床、血管生成和組織重建等。自組織分泌出來的 MMPs 為 latent proenzymes，需經過蛋白分解酵素，如 PA 轉換成活化態之後才具有酵素活性；另外，許多證據顯示這些活化後 MMPs 可受內生性組織抑制劑(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)調節而改變其活性，即 MMPs 與 TIMPs 之間的平衡決定 ECM 的分解或堆積，也是惡性腫瘤細胞貼附、移動、侵襲和轉移的主要因素[14-22]。

番茄生物鹼(Tomatidine)是主要存在於番茄植物中的一種類固醇生物鹼苷類[23]。番茄植物中比較廣為人知的是番茄素(Tomatine)。番茄素(Tomatine) 主要來自於番茄 (Solanum lycopersicum L.)，它的結構是由四糖苷(tetrasaccharide) 結合到糖苷配基番茄鹼 (aglycone tomatidine) 上的 3'-OH 位置所形成，未成熟的綠番茄每公斤含有 500 mg 的番茄素，而隨著番茄的成熟，番茄素會被大量

降解，成熟的紅番茄每公斤只有 5 mg 的番茄素[24]。而番茄素包含四個碳水化合物的側鏈，隨著側鏈數量的減少又可分為 β -Tomatine、 γ -Tomatine、 δ -Tomatine 以及番茄生物鹼(Tomatidine)。文獻指出，番茄素及其衍生物對乳癌、胃癌及前列腺癌均有抑制細胞生長的能力[25]。而抑制細胞生長的效果又以含有四個側鏈的番茄素較不含側鏈的 Tomatidine 高出許多。然而番茄素對細胞的毒性不僅表現在癌細胞中，也包含抑制正常肺臟細胞生長的能力，而 Tomatidine 在番茄素衍生物中，對正常細胞則是毒殺性較低。因此，對於低毒性的 Tomatidine 之相關研究越來越多。目前有研究發現，Tomatidine 能夠抑制發炎反應，並具有抗氧化的效果[26, 27]。例如 Tomatidine 可經由阻斷 NF- κ B 及 JNK 訊息傳遞路徑來抑制由細菌內毒素所誘發的一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase)及環氧合酶-2 (cyclooxygenase-2)的表現[26]。而在 ApoE 基因剔除小鼠中也發現 Tomatidine 能有效的降低膽固醇脂醯轉化酶(cholesterol acetyltransferase)活性進而減少動脈粥狀硬化形成[27]。除此之外，在抗癌方面，也有研究指出 Tomatidine 可以抑制人類肺癌細胞株 A549 的基質金屬蛋白水解酶(matrix metalloproteinase, MMP)進而降低癌細胞的侵襲能力[28]。Yan 等人發現，Tomatidine 會透過 ERK 及 PI3K/Akt 訊息傳遞路徑進而影響下游轉錄因子 NF- κ B 的活化，使得 MMP-2/-9 mRNA 的表現量下降進而抑制肺癌細胞株的侵襲能力[28]。雖然 Tomatidine 可抑制惡性腫瘤細胞生長能力，甚至高劑量時可促使惡性腫瘤細胞凋亡的作用已經相當明確[25]。但在化學防癌作用之角色上，如低劑量下 Tomatidine 可否影響 MMPs family、u-PA 或其抑制劑 TIMPs、PA inhibitors (PAIs)之表現，除了上述文獻之外[28]，則完全無其他研究報導。因此，本研究利用 Tomatidine 對骨肉瘤細胞株分析並比較其細胞存活率及細胞移動、侵襲能力抑制作用的效果，並進一步探討其中的詳細機制。

二、研究方法

1. 細胞培養及處理

骨肉瘤細胞株 U2OS 利用 DMEM 培養基加入適量 antibiotics 及 10% FBS 培

養；以不同濃度之 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)於 37°C、5% CO_2 細胞培養箱中培育 24 小時後，取出 conditioned medium 及 cell lysate 進行 zymography 及 Western blotting 分析基質分解相關蛋白 MMPs 及 u-PA 含量或活性及 EMT (Epithelial-mesenchymal transition)、FAK/Src、MAPK 及 Akt 路徑相關蛋白表現。並收取細胞進行 MTT assay、wound healing assay 及 *in vitro* invasion/migration assay。

2. MTT(microculture tetrazolium)分析

本實驗室用 MTT 來測試細胞是否有活性以及是否存活。將骨肉瘤細胞株 U2OS 以 8×10^4 細胞數分至 24 孔盤中，37°C 培養 16 小時，加入 Tomatidine (0-100 μM)處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，再加入 1 mL 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/mL)，待此作用 4 小時之後移除試劑，再以異丙醇將結晶溶出，於 O.D. 563 nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

3. Wound healing 分析

將骨肉瘤細胞株以適當的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後以 tip 劃出傷口並處理不同濃度的 Tomatidine (0-100 μM)，於 12、24 及 48 小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的情況。

4. Cell migration 分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的細胞培養液，將細胞處理 Tomatidine 24 小時後，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(7.5×10^3 cell/well)於 upper chamber，待細胞移動 24 小時後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾後以 Giemsa (1:10)染色 3 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 100 \times 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 wells，作移動細胞數之統計。

5. Cell invasion 分析

將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Matrigel，在 laminar flow

風乾 3-5 小時，再將細胞處理 Tomatidine 24 小時後，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 (7.5×10^3 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 24 小時後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾後以 Giemsa (1:10) 染色 3 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 100× 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 5 個 wells，作侵入細胞數之統計。

6. Gelatin-zymography (gelatinase 活性測試)

首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ L sample 加入 4 μ L 之 5× loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 mL 的 washing buffer (2.5% Triton X-100 in ddH₂O)，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 mL 的 reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時。將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以 densitometer 量化結果。

7. 蛋白質 (protein lysate) 製備

將實驗細胞的培養液去除，使用 4°C PBS 清洗細胞兩次後，加入 PRO-PREP™ 蛋白質萃取溶液 [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM EDTA、1 μ M pepstatin A、1 μ M leupeptin、0.1 μ M aprotinin] (iNtRON Biotechnology Co., Seoul, Korea)，刮取細胞，收集至 1.5 mL eppendorf 中，利用超音波細胞破碎機 Misonic Sonicator 4000 (Qsonica, LLC, Newtown, Connecticut, USA) 震破細胞，再以 13000 rpm 的轉速於 4°C 離心 30 分鐘，吸取上清液到新的 1.5 mL eppendorf，儲存於 -20°C 備用。

8. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量採用 "Bradford's protein assay" 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白質含量越高。測定方法：首先以一系列已知濃度 BSA，加入五分之一體積的 Bradford protein dye

以波長 595 nm 之吸光度作一標準曲線，再以同樣的測定方法測得樣品之 O.D. 值，即可對照標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

9. Western blotting 分析

利用 western blotting 的方法測定 MMPs、u-PA、EMT 及 Presenilin 的蛋白量及與其相關的訊息傳遞蛋白如：FAK/Src pathway、MAPK pathway (ERK1/2、P38 及 JNK1/2)、PI3K/Akt pathway；首先製備 10% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 μ L sample(蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ L 之 5 \times loading buffer，將 sample denature (100 $^{\circ}$ C，10 min)之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下進行蛋白轉漬，將 NC paper 置入冰冷之 transfer buffer 蓋上膠體後裝入 transfer holder，於 4 $^{\circ}$ C 下，以 400 mA 進行轉漬 2 小時，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動 1 小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4 $^{\circ}$ C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS + 0.05% Tween 20)清洗四次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用 2 小時後以 washing buffer 清洗四次，每一次 10 分鐘。最後加入 ECL 進行呈色反應，並以冷光系統紀錄和量化結果。

10. 統計分析

各組實驗數據以平均值加減標準差(mean \pm standard deviation)表示，並以 student's *t*-test 比較組間之差異，統計則以 SPSS 軟體進行分析，各組之間在 *p* 值 <0.05 時才具統計上的顯著差異。

三、結果

1. Tomatidine 對於人類骨肉瘤細胞株 U2OS 細胞存活率的影響

將 U2OS 骨肉瘤細胞以 8×10^4 的細胞數培養在 24 孔培養皿內，培養 16 小時後，給予不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μ M) 處理 24 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率。由結果發現 U2OS 細胞在 Tomatidine 此濃度的處理之下並不會影響細胞的存活率 (Figure 1)。

2. Tomatidine 對於人類骨肉瘤細胞株 U2OS 細胞爬行能力的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後利用傷口癒合模式(wound healing assay)以tip劃出傷口並以此劑量的Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理，於12、24及48小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的情況。結果發現Tomatidine可以明顯抑制U2OS骨肉瘤細胞株的爬行能力(Figure 2)。

3. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS細胞移動與侵入能力的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，給予不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理24小時，以trypsin-EDTA打下所有細胞並用trypan blue重新計算細胞數，然後以固定量的細胞(7.5×10^3 /well)直接load在Boyden chamber的well中，於 37°C 培養箱反應24小時，再分別利用cell migration及cell invasion的分析方法，分別分析其移動和侵入的能力，其結果與未處理Tomatidine之對照組做比較。結果顯示U2OS其移動與侵入能力會隨著Tomatidine濃度增加而降低，代表Tomatidine可以明顯抑制U2OS骨肉瘤細胞株的移動及侵入能力(Figure 3)。

4. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS分泌MMP-9及MMP-2能力的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^4 的細胞數培養在24孔培養皿內，培養16小時後，以serum-starvation的情形下給予不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理24小時後，收取serum-free的medium，以gelatin zymography來分析MMP-9及MMP-2的活性表現。結果顯示，Tomatidine並不會影響U2OS骨肉瘤細胞株MMP-9和MMP-2的蛋白活性(Figure 4)。

5. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其MMP-9、MMP-2、u-PA及其內生性抑制劑TIMP-1、TIMP-2蛋白表現的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，處理不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μM) 24小時，萃取其蛋白質，以anti-MMP-9、anti-MMP-2、anti-u-PA、anti-TIMP-1和anti-TIMP-2的抗體進行Western blotting分析，並以 β -actin的表現量作為internal control。結果顯示Tomatidine也不會影響U2OS骨肉瘤細胞株其MMP-9、MMP-2、u-PA、TIMP-1和TIMP-2的蛋白表現(Figure 5)。

6. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其EMT相關蛋白表現的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，處理不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μ M) 24小時，萃取其蛋白質，以anti-ZO-1、anti-E-cadherin、anti-Fibronectin和anti-Vimentin的抗體進行Western blotting分析，並以 β -actin的表現量作為internal control。結果顯示Tomatidine也不會影響U2OS骨肉瘤細胞株其ZO-1、E-cadherin、Fibronectin和Vimentin的蛋白表現(Figure 6)。

7. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其轉移相關蛋白酶表現的影響

由於Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其我們熟知的MMP-9、MMP-2及u-PA的蛋白表現與EMT相關的蛋白表現皆不受影響，因此，我們使用Protease Array Kits (Cat#ARY021B, R&D systems)來觀察Tomatidine抑制骨肉瘤細胞株轉移可能參與的蛋白酶種類。首先將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，16小時後處理0或100 μ M的Tomatidine 24小時，萃取其蛋白質，接著以Protease Array Kits分析之。結果發現Tomatidine可能會透過Presenilin 1 (PS-1)此水解酶來抑制骨癌轉移(Figure 7)。

8. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其PS-1蛋白表現的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，處理不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μ M) 24小時，萃取其蛋白質，以anti-PS-1的抗體進行Western blotting分析，並以 β -actin的表現量作為internal control。結果顯示Tomatidine使U2OS骨肉瘤細胞株PS-1的蛋白表現量減少(Figure 8)。

9. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其FAK/Src訊息傳遞路徑蛋白表現的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，處理不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μ M) 24小時，萃取其蛋白質，以anti-FAK、anti-p-FAK397、anti-p-FAK925、anti-Src和anti-p-Src的抗體進行Western blotting分析，並以 β -actin的表現量作為internal control。結果顯示Tomatidine不會

影響U2OS骨肉瘤細胞株其FAK、p-FAK397、p-FAK925、Src和p-Src訊息傳遞路徑的蛋白表現(Figure 9)。

10. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其MAPK訊息傳遞路徑蛋白表現的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，處理不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μ M) 24小時，萃取其蛋白質，以anti-ERK1/2、anti-p-ERK1/2、anti-JNK1/2、anti-p-JNK1/2、anti-p38和anti-p-p38的抗體進行Western blotting分析，並以 β -actin的表現量作為internal control。結果顯示Tomatidine不會影響U2OS骨肉瘤細胞株其ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2、p38和p-p38訊息傳遞路徑的蛋白表現，但p-ERK1/2的蛋白表現有隨著Tomatidine濃度增加而有減少(Figure 10)。

11. Tomatidine對於人類骨肉瘤細胞株U2OS其Akt訊息傳遞路徑蛋白表現的影響

將U2OS骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在6 cm培養皿，培養16小時後，處理不同濃度的Tomatidine (0、25、50、75、100 μ M) 24小時，萃取其蛋白質，以anti-Akt和anti-p-Akt的抗體進行Western blotting分析，並以 β -actin的表現量作為internal control。結果顯示Tomatidine不會影響U2OS骨肉瘤細胞株其Akt和p-Akt訊息傳遞路徑的蛋白表現(Figure 11)。

四、討論

綜合以上的結果，我們發現Tomatidine在100 μ M以下的濃度不會造成U2OS骨肉瘤細胞死亡，卻可以明顯抑制U2OS骨肉瘤細胞株的爬行、轉移及侵入能力。而Tomatidine抑制U2OS骨肉瘤細胞轉移不是透過我們以往所熟知的MMPs、u-PA及其內生性抑制劑TIMPs，也不經由EMT路徑所調控，而是藉由影響Presenilin-1此蛋白水解酶所調節，並經由p-ERK1/2訊息傳遞路徑所調控。

Presenilin 1 (PS-1)，由*PSEN1*所編碼而成，是具有泛素表達的多穿膜結構域蛋白(ubiquitously expressed multi-transmembrane domain protein)，主要位於內質網、

高爾基體和質膜。大多數的早發性家族性阿茲海默症是由於*PSEN1*的突變[29-31]。不同於nicastrin (NCT)、anterior pharynx defective-1 (Aph-1)和presenilin enhancer 2 (PS-2)，PS-1功能為 γ -分泌酶複合物的核心催化亞基(core catalytic subunit of the γ -secretase complex)參與裂解一些第一型的穿膜蛋白，包含 β -amyloid precursor protein (APP)、Notch、CD44、Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)、E-cadherin和N-cadherin[32-37]。隨著PS-1/ γ -secretase的裂解，APP的逐漸積累將導致阿茲海默症的進展。最近的研究顯示多種常見的路徑參與阿茲海默症和癌症的發展[38]。PS-1在各種致瘤過程中包括細胞增殖、細胞凋亡和細胞粘附等方面扮演獨特和重要的角色[39,40]。PS-1的功能在各種癌症中依賴於或獨立於 γ -secretase的活性在以前的研究顯示為繁雜甚至有爭議。在頭頸部鱗狀細胞癌中，PS-1正調控epidermal growth factor receptor (EGFR)表現與 γ -secretase裂解無關，然而降低PS-1表現可抑制EGFR-STAT路徑[41]。PS-1蛋白水解活性表現的增加與E-cadherin蛋白水解和核轉位有關，其促進結腸直腸癌的腹膜轉移[42]。然而，乳腺癌和皮膚癌卻是矛盾的結果，PS-1在其中做為腫瘤抑制基因[43,44]。組織特異的微環境在不同的癌症發展可以解釋PS-1看似矛盾的角色。而在非小細胞肺癌中， γ -secretase抑制的治療效果是經由抑制ERK的磷酸化[45]，與我們實驗結果的路徑相同。因此，Tomatidine可能可以用來預防癌症的轉移，期望未來能對癌症的治療有所幫助。

參考文獻

1. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 2008; 466: 2114-30.
2. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52: 255-64.
3. Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000; 25: 482-9.
4. Lin YH, Park ZY, Lin D, Brahmabhatt AA, Rio MC, Yates JR 3rd, Klemke RL. Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *J Cell Biol.* 2004; 165: 421-32.
5. Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, Hirai I, Tanino H, Kokawa Y, Naito Y, Okamura Y, Ota I, Tani N, Matsuura N. Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci.* 2004; 95: 142-8.

6. Lin CW, Chou YE, Chiou HL, Chen MK, Yang WE, Hsieh MJ, Yang SF. Pterostilbene suppresses oral cancer cell invasion by inhibiting MMP-2 expression. *Expert Opin Ther Targets*. 2014; 18: 1109-20.
7. Chien MH, Lin CW, Cheng CW, Wen YC, Yang SF. Matrix metalloproteinase-2 as a target for head and neck cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013; 17: 203-16.
8. MacDougall JR, Matrisian LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1995; 14: 351-62.
9. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36: 128-37.
10. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*. 2002; 21: 2245-52.
11. Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis*. 1997; 17: 221-39.
12. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 2001; 11: S37-43.
13. Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol*. 2000; 50: 71-87.
14. Wick W, Platten M, Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol*. 2001; 53: 177-85.
15. Tester AM, Ruangpanit N, Anderson RL, Thompson EW. MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18: 553-60.
16. Ntayi C, Lorimier S, Berthier-Vergnes O, Hornebeck W, Bernard P. Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. *Exp Cell Res*. 2001; 270: 110-8.
17. Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem*. 2001; 276: 3203-14.
18. Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A. Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res*. 1998; 58: 3743-50.
19. Mitra A, Chakrabarti J, Chattopadhyay N, Chatterjee A. Membrane-associated MMP-2 in human cervical cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2003; 22: 93-100.
20. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015; 44-46: 247-54.
21. Berg G, Schreier L, Miksztowicz V. Circulating and adipose tissue matrix metalloproteinases in cardiometabolic risk environments: pathophysiological aspects. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014; 17: 79-87.
22. Korpi JT, Hagström J, Lehtonen N, Parkkinen J, Sorsa T, Salo T, Laitinen M. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma. *Surg Oncol*. 2011; 20: e18-22.

23. Zimowski J. Enzymatic glycosylation of tomatidine in tomato plants. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 404: 71-80.
24. Medina JM, Rodrigues JC, Moreira OC, Atella G, Souza Wd, Barrabin H. Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110: 48-55.
25. Choi SH, Ahn JB, Kozukue N, Kim HJ, Nishitani Y, Zhang L, Mizuno M, Levin CE, Friedman M. Structure-activity relationships of α -, $\beta(1)$ -, γ -, and δ -tomatine and tomatidine against human breast (MDA-MB-231), gastric (KATO-III), and prostate (PC3) cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 3891-9.
26. Chiu FL, Lin JK. Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF-kappaB and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. *FEBS Lett.* 2008; 582: 2407-12.
27. Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Horlad H, Ikeda T, Nohara T, Takeya M, Nagai R. Tomatidine, a tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting acyl-CoA:cholesterol acyl-transferase (ACAT). *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 2472-9.
28. Yan KH, Lee LM, Yan SH, Huang HC, Li CC, Lin HT, Chen PS. Tomatidine inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cell A549 by reducing matrix metalloproteinases expression. *Chem Biol Interact.* 2013; 203: 580-7.
29. Yu G, Chen F, Levesque G, Nishimura M, Zhang DM, Levesque L, Rogava E, Xu D, Liang Y, Duthie M, George-Hyslop PH, Fraser PE. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem.* 1998; 273: 16470-5.
30. Georgakopoulos A, Marambaud P, Efthimiopoulos S, Shioi J, Cui W, Li H-C, Schütte M, Gordon R, Holstein GR, Martinelli G, Mehta P, Friedrich VL Jr, Robakis NK. Presenilin-1 Forms Complexes with the Cadherin/Catenin Cell-Cell Adhesion System and Is Recruited to Intercellular and Synaptic Contacts. *Molecular Cell.* 1999; 4: 893-902.
31. Group AsDC The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet.* 1995; 11: 219-22.
32. Fraering PC. Structural and Functional Determinants of gamma-Secretase, an Intramembrane Protease Implicated in Alzheimer's Disease. *Curr Genomics.* 2007; 8: 531-49.
33. Das I, Craig C, Funahashi Y, Jung KM, Kim TW, Byers R, Weng AP, Kutok JL, Aster JC, Kitajewski J. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem.* 2004; 279: 30771-80.
34. Murakami D, Okamoto I, Nagano O, Kawano Y, Tomita T, Iwatsubo T, De Strooper B, Yumoto E, Saya H. Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene.* 2003; 22: 1511-6.
35. Rahimi N, Golde TE, Meyer RD. Identification of ligand-induced proteolytic cleavage and ectodomain shedding of VEGFR-1/FLT1 in leukemic cancer cells. *Cancer research.* 2009; 69: 2607-14.
36. Marambaud P, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK, Robakis NK. A

presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *The EMBO journal*. 2002; 21: 1948-56.

37. Boulton ME, Cai J, Grant MB. gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2008; 12: 781-95.
38. Roe CM, Fitzpatrick AL, Xiong C, Sieh W, Kuller L, Miller JP, Williams MM, Kopan R, Behrens MI, Morris JC. Cancer linked to Alzheimer disease but not vascular dementia. *Neurology*. 2010; 74: 106-12.
39. Yun HM, Park MH, Kim DH, Ahn YJ, Park KR, Kim TM, Yun NY, Jung YS, Hwang DY, Yoon DY, Han SB, Hong JT. Loss of presenilin 2 is associated with increased iPLA2 activity and lung tumor development. *Oncogene*. 2014; 33: 5193-200.
40. Liu B, Wang L, Shen LL, Shen MZ, Guo XD, Wang T, Liang QC, Wang C, Zheng J, Li Y, Jia LT, Zhang H, Gao GD. RNAi-mediated inhibition of presenilin 2 inhibits glioma cell growth and invasion and is involved in the regulation of Nrg1/ErbB signaling. *Neuro-Oncology*. 2012; 14: 994-1006.
41. Song X, X R, Cui Z, Chen W, Mao L. Presenilin 1 is frequently overexpressed and positively associates with EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck Oncology*. 2012; 4: 47.
42. Céspedes MV, Larriba MJ, Pavón MA, Álamo P, Casanova I, Parreño M, Feliu A, Sancho FJ, Muñoz A, Manges R. Site-Dependent E-Cadherin Cleavage and Nuclear Translocation in a Metastatic Colorectal Cancer Model. *The American Journal of Pathology*. 2010; 177: 2067-79.
43. Xia X, Qian S, Soriano S, Wu Y, Fletcher AM, Wang XJ, Koo EH, Wu X, Zheng H. Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10863-8.
44. Peltonen Hanna M., H A, Hiltunen Mikko, Kataja Vesa, Kosma Veli-Matti, Mannermaa Arto. γ -Secretase Components as Predictors of Breast Cancer Outcome. *PloS one*. 2013; 8: e79249.
45. Maraver A, Fernandez-Marcos PJ, Herranz D, Cañamero M, Muñoz-Martin M, Gómez-López G, Mulero F, Megías D, Sanchez-Carbayo M, Shen J, Sanchez-Céspedes M, Palomero T, Ferrando A, Serrano M. Therapeutic effect of γ -secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK. *Cancer Cell*. 2012; 22: 222-34.

圖表與圖表說明

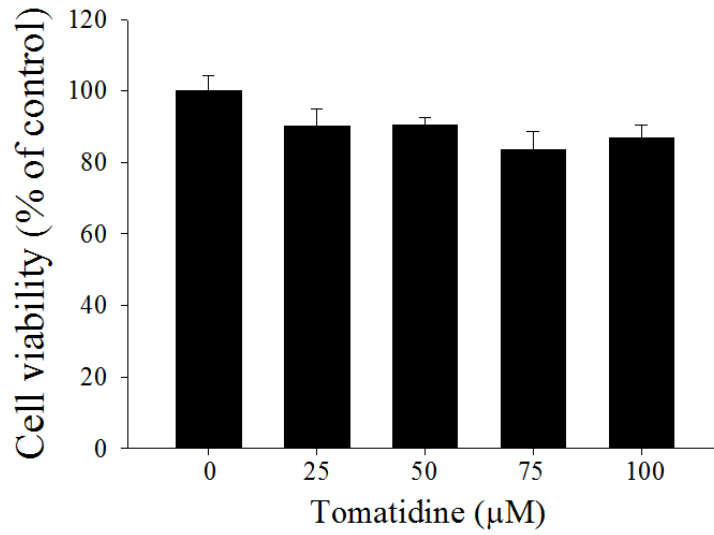


Figure 1. 利用 0-100 μM 濃度的 Tomatidine 處理 U2OS 骨肉瘤細胞，分析其細胞存活率(cell viability)，發現 Tomatidine 在此濃度並不會毒殺細胞。

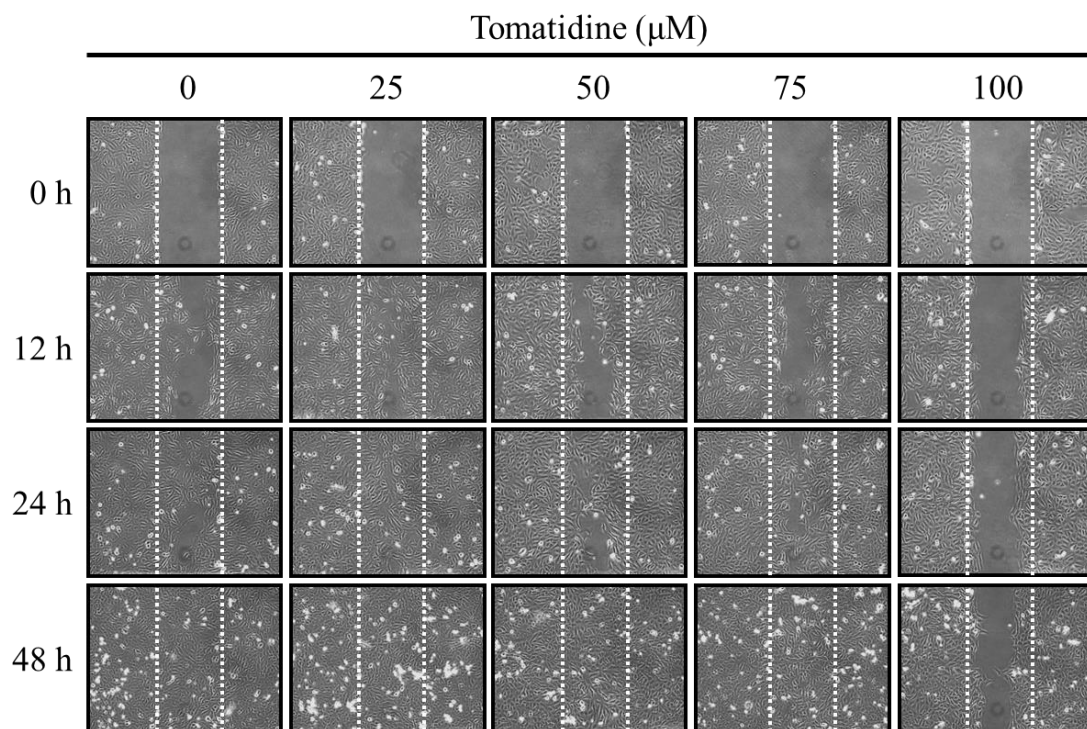


Figure 2. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 12, 24 及 48 小時後，利用傷口癒合模式(wound healing assay)的分析方法，分析其爬行的能力。結果發現 Tomatidine 可以明顯抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株的爬行能力。

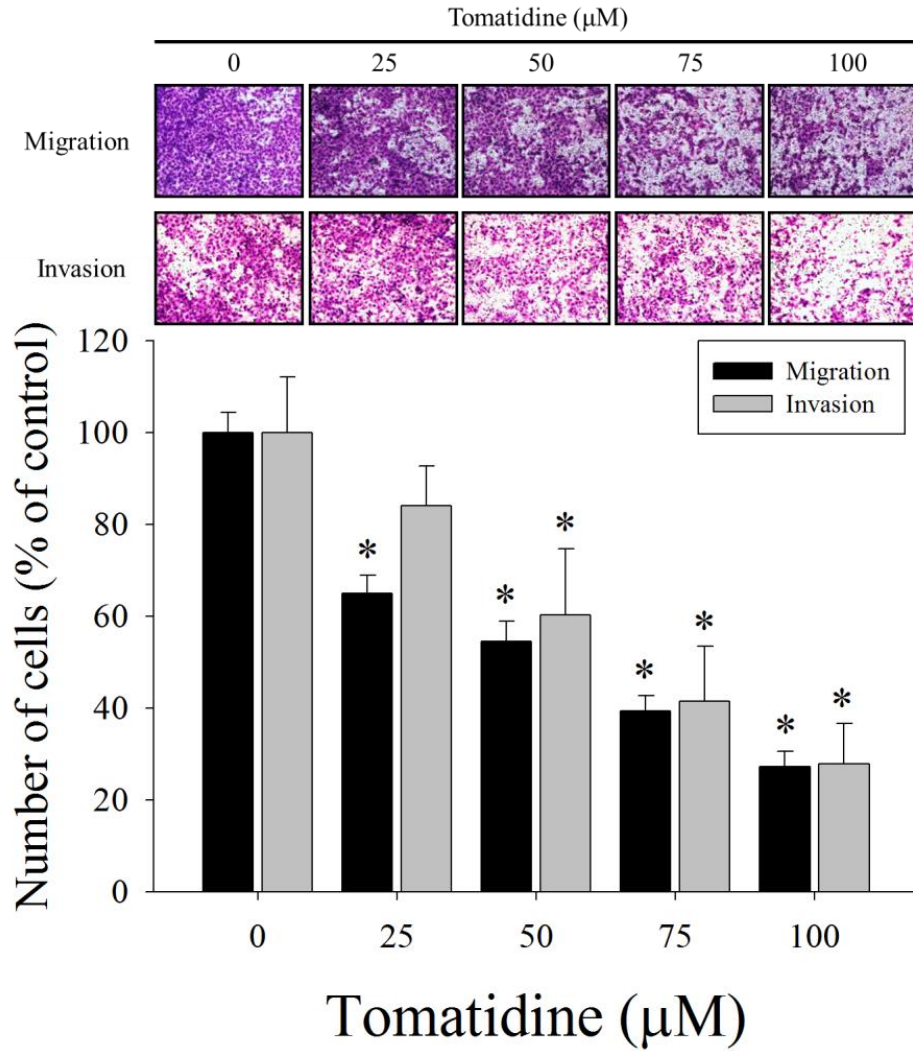


Figure 3. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Boyden chamber 的分析方法，分析其轉移及侵入的能力。結果發現 Tomatidine 可以明顯抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株的轉移及侵入能力。

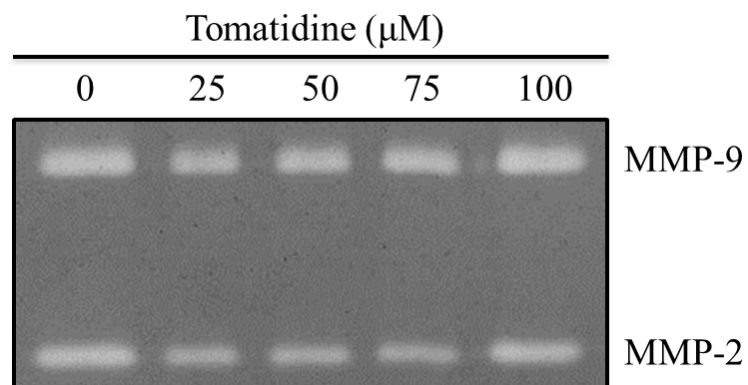


Figure 4. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Zymography 來分析 MMP-9 和 MMP-2 的活性表現，結果顯示 Tomatidine 並不會影響 U2OS 骨肉瘤細胞株 MMP-9 和 MMP-2 的蛋白活性。

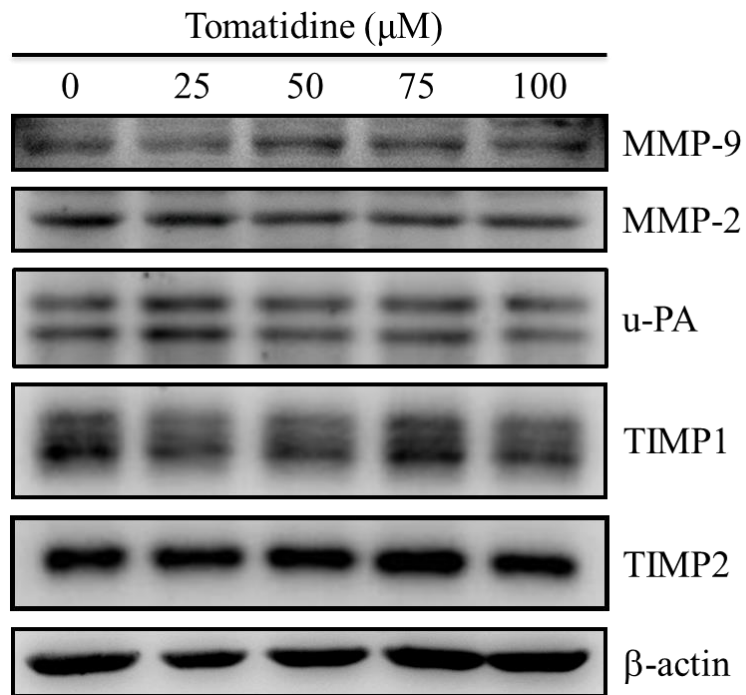


Figure 5. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 MMP-9、MMP-2 及 u-PA 的蛋白表現，結果顯示 Tomatidine 不會影響 U2OS 骨肉瘤細胞株其 MMP-9、MMP-2、u-PA、TIMP-1 和 TIMP-2 的蛋白表現。

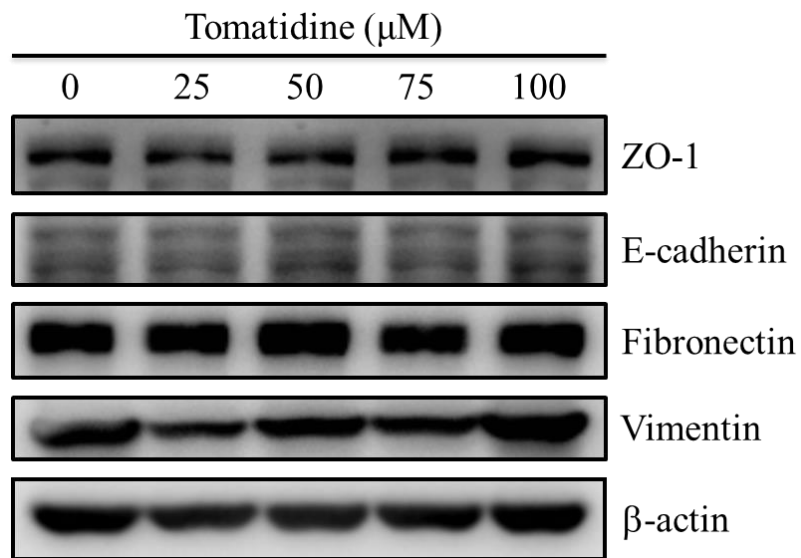


Figure 6. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 EMT 相關的蛋白表現，結果顯示 Tomatidine 不會影響 U2OS 骨肉瘤細胞株其 ZO-1、E-cadherin、Fibronectin 和 Vimentin 的蛋白表現。

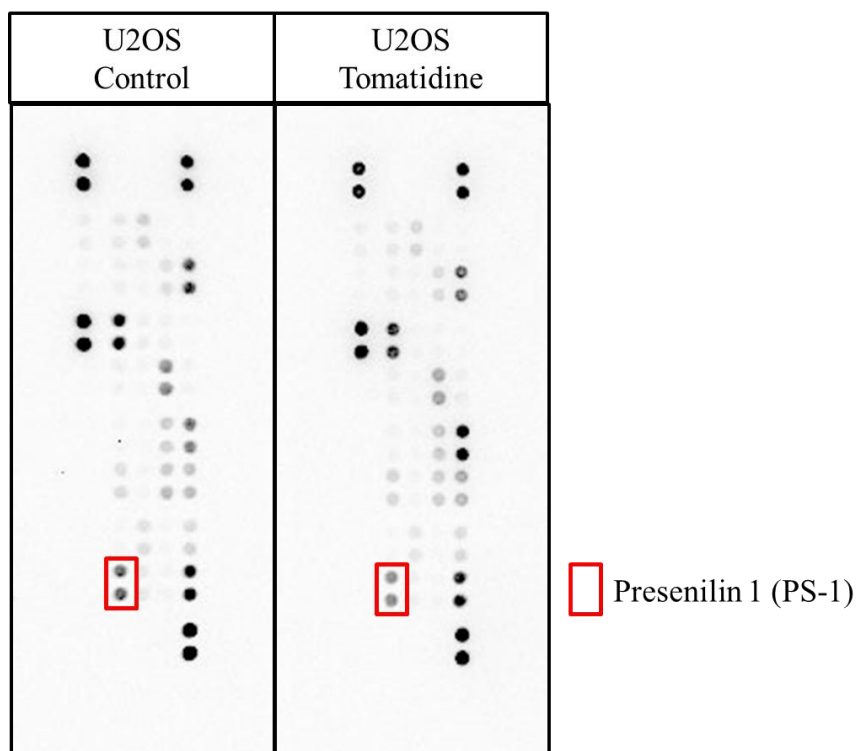


Figure 7. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以 100 μ M 的 Tomatidine 處理 24 小時後，利用 Protease Array Kits (Cat#ARY021B, R&D systems) 觀察 Tomatidine 抑制骨肉瘤細胞株轉移可能參與的蛋白酶種類，結果發現 Tomatidine 抑制骨癌轉移可能會與 Presenilin 1 (PS-1) 此水解酶有關。

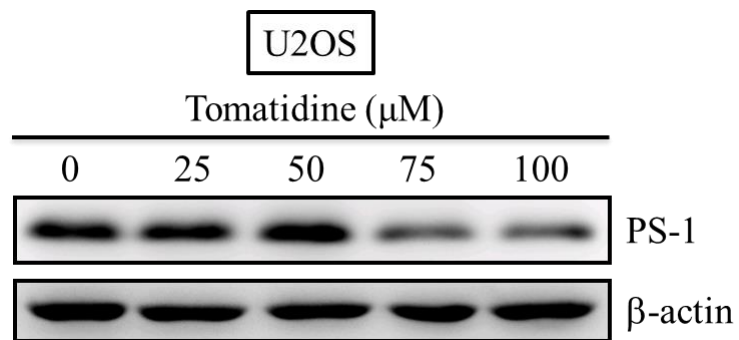


Figure 8. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 Presenilin 1 (PS-1)的蛋白表現，結果顯示 Tomatidine 使 U2OS 骨肉瘤細胞株 PS-1 的蛋白表現量減少。

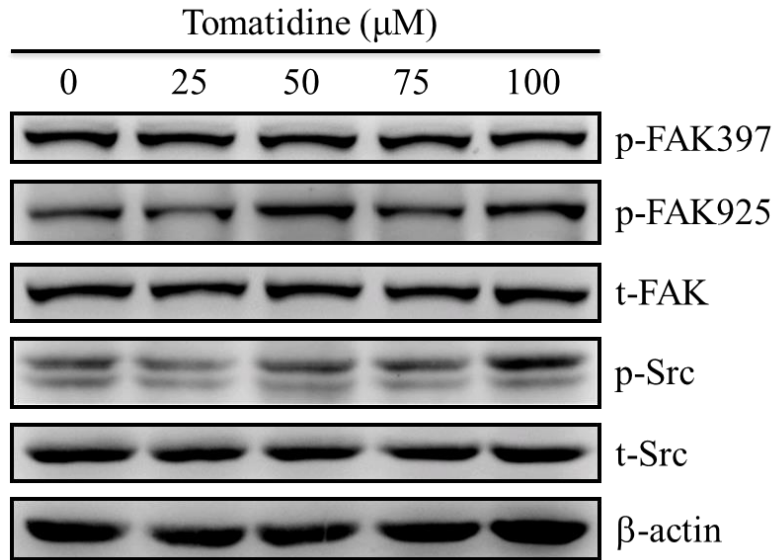


Figure 9. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 FAK/Src 訊息傳遞路徑的蛋白表現，結果顯示 Tomatidine 不會影響 U2OS 骨肉瘤細胞株其 p-FAK397、p-FAK925、FAK、p-Src 和 Src 訊息傳遞路徑的蛋白表現。

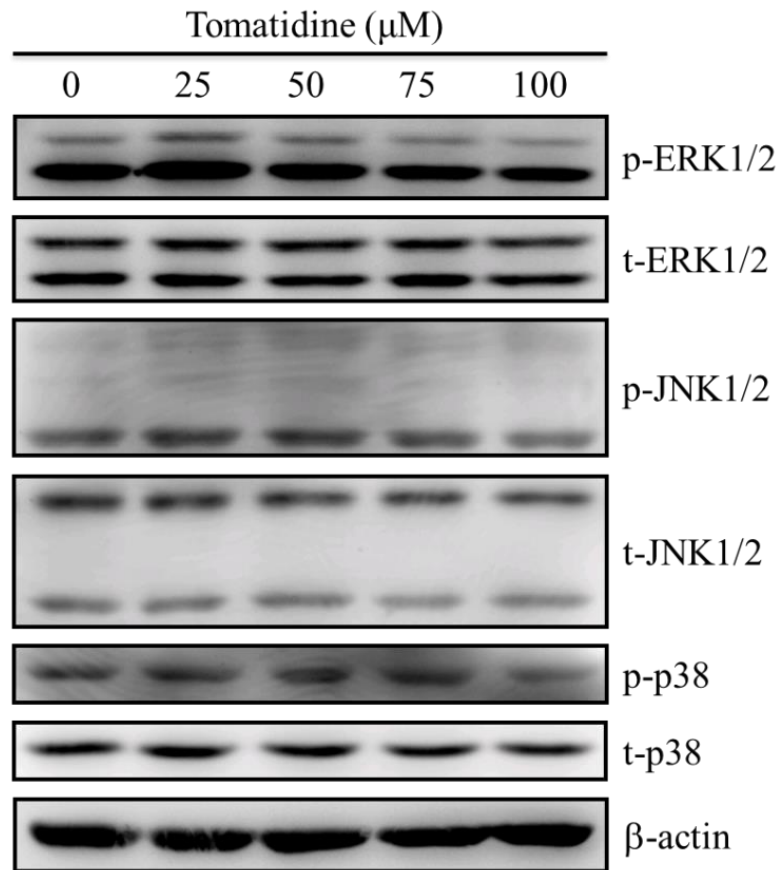


Figure 10. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 MAPK 訊息傳遞路徑的蛋白表現，結果顯示 Tomatidine 不會影響 U2OS 骨肉瘤細胞株其 ERK1/2、p-JNK1/2、JNK1/2、p-p38 和 p38 訊息傳遞路徑的蛋白表現，但 p-ERK1/2 的蛋白表現有隨著 Tomatidine 濃度增加而有減少。

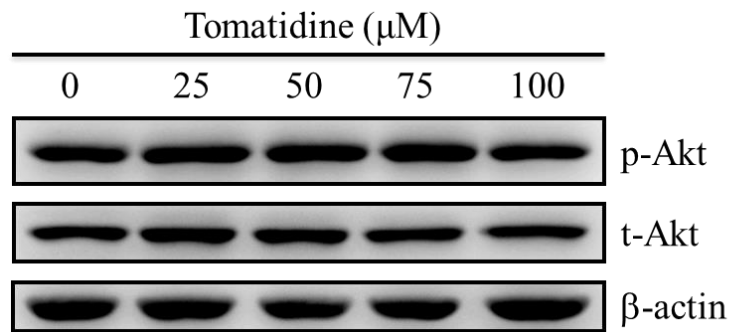


Figure 11. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的 Tomatidine (0、25、50、75、100 μM)處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 Akt 訊息傳遞路徑的蛋白表現，結果顯示 Tomatidine 不會影響 U2OS 骨肉瘤細胞株其 p-Akt 和 Akt 訊息傳遞路徑的蛋白表現。

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：106 年 1 月 26 日

計畫編號	MOST 105-2314-B-040-001-		
計畫名稱	番茄生物鹼抑制骨癌細胞株轉移及血管新生之機制探討		
出國人員姓名	楊嘉欣	服務機構及職稱	中山醫學大學附設醫院 研究員
會議時間	2016/07/09-2016/07/12	會議地點	英國-曼徹斯特
會議名稱	(中文)第24屆歐洲癌症學會 (英文)24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research		
發表題目	(中文) Nobiletin 藉由 NF- κ B 及 CREB 經由 ERK 和 JNK 路徑調控 MMPs 來抑制人類骨肉瘤細胞轉移 (英文) Nobiletin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by NF- κ B-, and CREB-dependent down-regulation of MMPs via ERK and JNK pathway		

一、參加會議經過

7/8 從倫敦前往曼徹斯特。7/9 前往位在市中心的會議地點(Manchester Central Convention Complex) 報到及領取大會議程及摘要手冊，並聆聽演講。7/10 將準備好的論文海報張貼於指定位置。並於會議尚未開始的時間參觀會場內其他相關發表，下午於論文海報張貼處介紹自己的研究成果。

二、與會心得

在會場中除了觀摩展示海報發表的研究內容外，也聆聽多場口頭報告發表。藉由參與國際大型會議，可認識國際上頂尖的研究學者，使我增廣見聞，且透過與學者們的交流，常使我獲得許多寶貴的建議及啟發不同的想法，拓展我的國際觀和視野，著實讓我受益匪淺，獲益良多。

三、發表論文全文或摘要

Introduction: Nobiletin, a polymethoxyflavone, has a few pharmacological activities, including anti-inflammation and anti-cancer effects. However, its effect on human osteosarcoma progression remains uninvestigated. Therefore, we examined the effectiveness of nobiletin against cellular metastasis of human osteosarcoma and the underlying mechanisms.

Material and method: The activities and protein levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were determined by gelatin zymography and western blotting. Transcriptional levels of MMP-2 and MMP-9 were detected by real-time PCR and promoter assays. Furthermore, the binding activity of the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) to the MMP-2 and MMP-9 promoter was analysed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay.

Results: Our results found that Nobiletin significantly decreased motility, migration and invasion as well as enzymatic activities, protein levels and mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 in U2OS and HOS cells. In addition to inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK), the inhibitory effect of nobiletin on the DNA-binding activity of the transcription factor NF- κ B, CREB, and

SP-1 in U2OS and HOS cells. Co-treatment with ERK and JNK inhibitors and nobiletin further reduced U2OS cells migration and invasion.

Conclusion: These results indicated that nobiletin inhibits human osteosarcoma U2OS and HOS cells motility, migration and invasion by down-regulating MMP-2 and MMP-9 expressions via ERK and JNK pathways and through the inactivation of downstream NF- κ B, CREB, and SP-1 signaling pathways. Nobiletin has the potential to serve as an anti-metastatic agent for treating osteosarcoma.

四、建議

希望國內也能多加舉辦此類大型會議，並增加補助出國之經費，讓學者有機會發展國際觀、開拓新視野、培養國際交流的能力。

五、攜回資料名稱及內容

會議議程手冊

六、其他

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2017/01/25

科技部補助計畫	計畫名稱: 番茄生物鹼抑制骨癌細胞株轉移及血管新生之機制探討
	計畫主持人: 楊嘉欣
	計畫編號: 105-2314-B-040-001- 學門領域: 醫工、骨科、幹細胞
無研發成果推廣資料	

105年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：楊嘉欣			計畫編號：105-2314-B-040-001-			
計畫名稱：番茄生物鹼抑制骨癌細胞株轉移及血管新生之機制探討						
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	
		研討會論文		0		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
			專書		0	本
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
其他		0				

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

本研究探討番茄生物鹼抑制骨肉瘤細胞株轉移之機制，因為骨癌的患者其預後差且存活率低，主要原因是骨癌具有高度轉移的特性。因此，利用番茄生物鹼抑制骨肉瘤細胞株轉移是非常重要的。了解其機制，可以利用番茄生物鹼來輔助治療並降低骨癌的轉移能力，可提高骨癌患者的存活率。在學術發展方面為台灣的骨癌相關研究盡一份心力。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）