

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

口腔黏膜下纖維化症與口腔癌新穎生物標誌開發及有效治療之 轉譯研究(3/3)

計畫類別：整合型計畫
計畫編號：MOST 105-2632-B-040-001-
執行期間：105年08月01日至106年07月31日
執行單位：中山醫學大學牙醫學系（所）

計畫主持人：張育超
共同主持人：余承佳、余權航、楊順發
計畫參與人員：碩士級-專任助理：莊宜婷
碩士級-專任助理：郭宇薇
學士級-專任助理：賴芝庭
博士班研究生-兼任助理：游惠捷

中華民國 106 年 10 月 23 日

中文摘要：流行病學研究指出，臺灣地區口腔黏膜下纖維化症及口腔癌發生率與嚼食檳榔有密切關係。根據衛生署癌症登記報告指出，口腔癌在臺灣男性十大癌症中死亡率與發生率皆位居第四位，口腔癌年增率也是臺灣地區年增率最高之癌症。其特性為容易復發及轉移，五年內存活率極低，因此尋找新穎生物標誌及有效療法將提供臨床很大的幫助。本整合型計畫，以四個子計畫進行以下的研究，(1). 口腔黏膜下纖維化症之纖維母細胞與口腔癌細胞交互作用之分子機轉探討：結果發現處理 OECM-1 及 FaDu 處理 Oral submucous fibrosis (OSF) 的細胞培養液 (condition media; CM)，可明顯促進 OECM-1 及 FaDu 細胞之侵襲能力，並發現培養過 OSF 的培養液其 IL-6、Eotaxin、G-CSF、IP-10、MCP-1 的表達量有明顯增加。(2). 天然化合物在口腔癌抗轉移與誘導凋亡效果的開發及其作用機轉之探討：結果發現，覆盆子萃取物可以抑制口腔癌的侵襲及轉移作用，並透過抑制 MMP-2 的表現。(3). 標靶口腔癌幹細胞特性研究：幹源標誌臨床意義、反轉化療放療抗性、與治療標的之研發：結果發現，長期利用檳榔鹼處理口腔上皮細胞可增強癌幹細胞標記 ALDH1 表現量、癌幹細胞球體自我更新能力、幹細胞表面標記 CD44 表現及幹細胞轉錄因子，並與 miR-145 有關。(4). 5-胺基酮戊酸奈米化光動力療法於口腔癌前病變及口腔癌治療應用性及其作用機轉之探討：結果發現，5-胺基酮戊酸奈米微粒光動力治療可增強抑制癌細胞增生率、細胞轉移力、細胞侵襲性、及細胞群落形成能力。

中文關鍵詞：口腔黏膜下纖維化症、口腔癌、天然化合物、口腔癌幹細胞、5-胺基酮戊酸奈米化光動力療法

英文摘要：Oral submucous fibrosis (OSF) is a chronic progressive scarring disease which has been considered as pre-cancerous condition of oral mucosa. In Taiwan, there are two million people who have the areca quid chewing habit, which has been suspected to elevate the incidence of oral premalignant lesions; about 80% of all oral cancer deaths are associated with this habit. Because of the higher incidence

rate of oral cancer in Taiwan, to investigate the carcinogenesis of oral cancer is urgent and the molecular mechanisms will provide useful knowledge in prevention, diagnosis, and therapy. The integrated project is organized with four sub-projects (1) Molecular mechanisms of the interplay between oral submucous fibrosis-derived fibroblasts and oral cancer. We found that cytokine activation in oral cancer cells in the presence of oral submucous fibrosis condition media can promote oral cancer migration. (2) The study of natural compounds discovery and anti-oral cancer effect on metastasis and apoptosis. We found that Raspberry extract (Rubus idaeus extract, RIE) inhibited the migration and invasion ability of SCC-9 cells via MMP-2 expression. (3) Research on targeting cancer stem cells: clinical significance of stemness signature, reversal chemoradio-resistance, and therapeutic targets development. We found that miR-145 mediates arecoline-induced tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of CD44 and epithelial-mesenchymal transition. (4) Therapy application and molecular mechanisms of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA)-based nanoparticle for oral pre-cancer lesions and oral cancer. We found that 5-aminolevulinic acid (ALA)-based nanoparticle-PDT reduced self-renewal property and stemness signatures expression (Oct4) in sphere-forming cancer stem cell.

英文關鍵詞： Oral submucous fibrosis, oral cancer, Raspberry extract, oral cancer stem cell, 5-aminolevulinic acid (ALA)-based nanoparticle

Figure 1

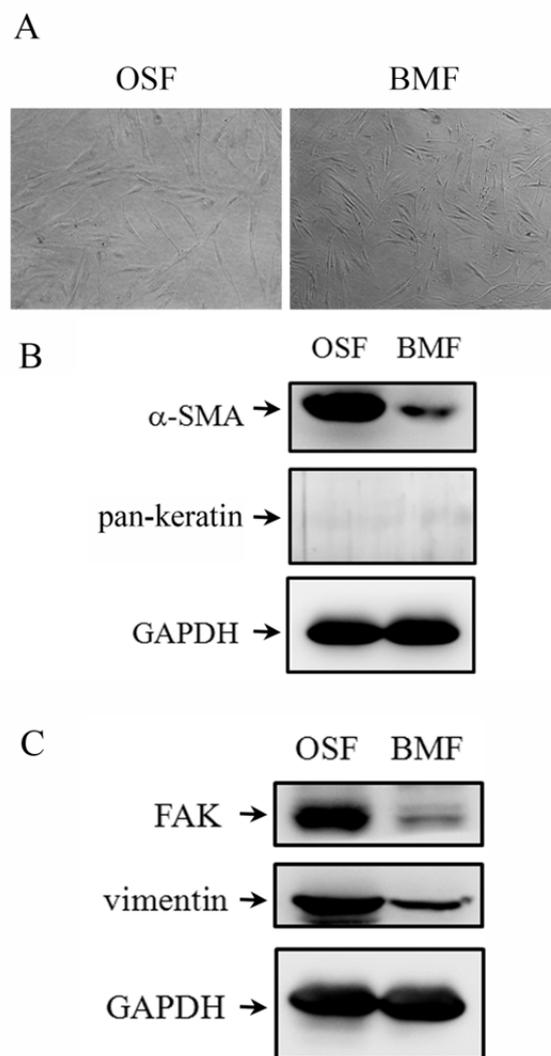


Figure 1 (A) Paired OSF and BMF cells were isolated from clinical OSCC tissue, and Western blot was used to analyze the expression of (B) α -SMA (a carcinoma-associated fibroblast (CAF) marker), pan-keratin (an epithelial cell marker), and (C) vimentin (a fibroblast marker).

Figure 2

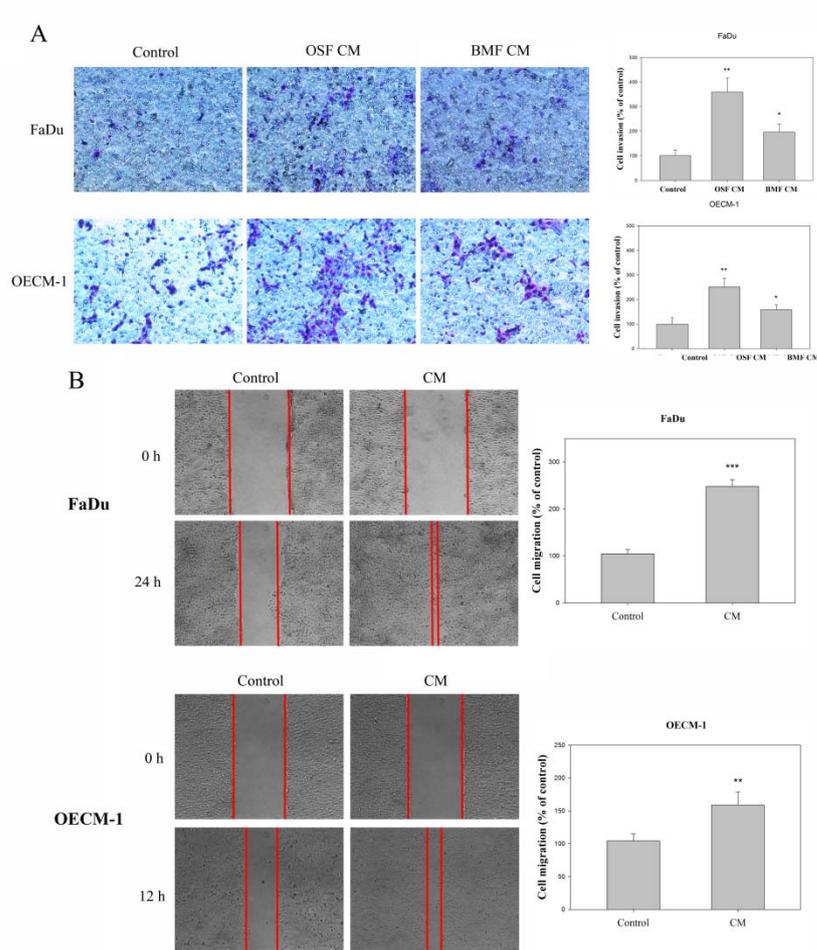


Figure 2 OSFs increase invasion and migration of FaDu and OECM-1 cells. The effects of condition media (CM) of OSF on cell invasion and migration of human oral cancer cell lines. (A) FaDu and OECM-1 cells were treated with CM of OSF for 24 h by cell invasion assay. (B) FaDu and OECM-1 cells were treated with CM of OSF by wound healing assay. Results were statistically evaluated by using one-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Results from 3 repeated and separated experiments were similar.

Figure 3

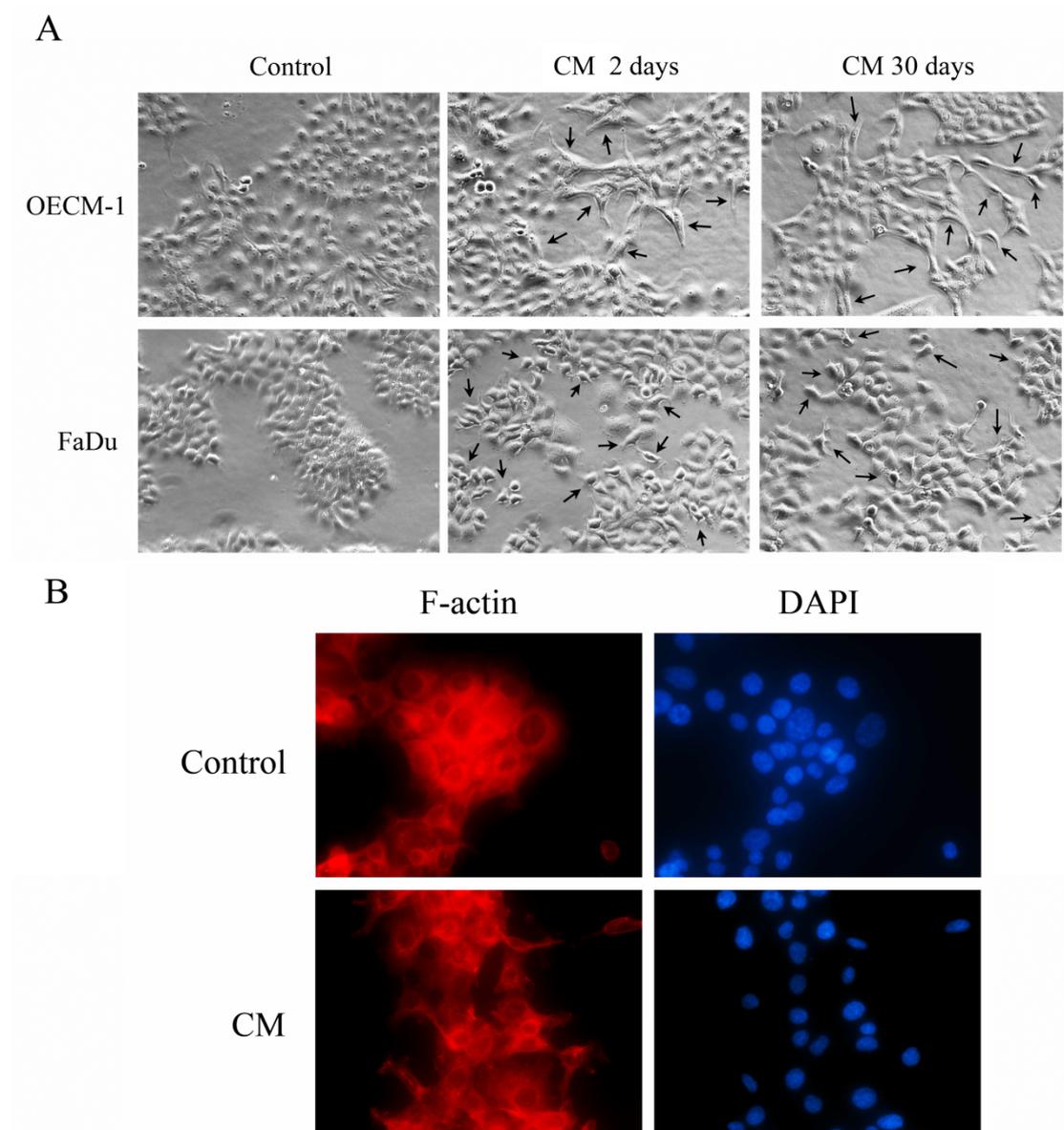


Figure 3 The effect of CM of OSF on cell morphology in oral cancer cells. OE1CM-1 and FaDu cells were treated with CM of OSF for 2 days and 30 days. (A) Phase image of cells (100 \times). (B) Immunofluorescence staining of FaDu cells (treated with CM of OSF for 30 days) with Texas-568 phalloidin to visualize the actin cytoskeleton.

Figure 4

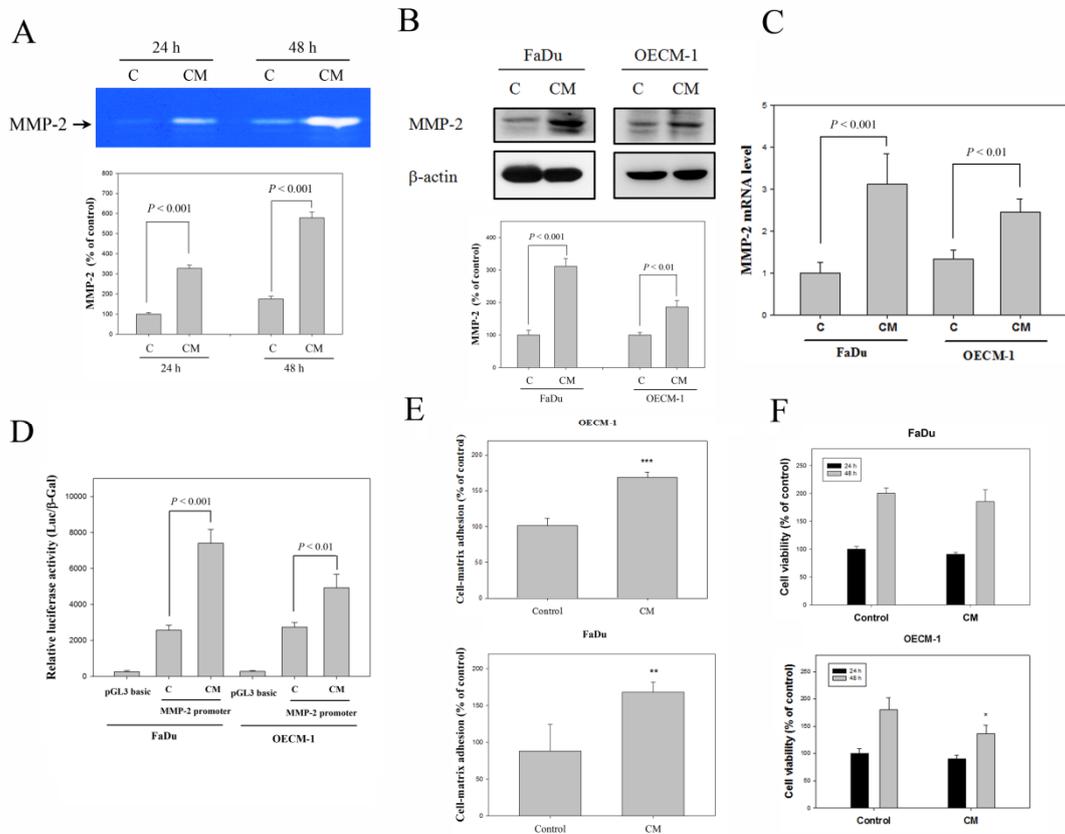


Figure 4 The effect of OSF on MMP-2, cell-matrix adhesion and cell viability of oral cancer cells. (A) FaDu cells were treated with CM of OSF for 30 days, and then condition media (for 24 h and 48 h) were collected for analysis of MMP-2 by gelatin zymography. (B) Western blot analysis of the protein expression of MMP-2 with β -actin being an internal control in FaDu and OECM-1 cells after 30 days of treatment with CM. (C) MMP-2 mRNA expression of FaDu and OECM-1 after 30 days of treatment with CM by real-time PCR. (D) Luciferase activity was measured in transiently transfected FaDu and OECM-1 cells using pGL3-MMP-2 after 30 days of treatment with CM. (E) Cell-matrix adhesion was measure in FaDu and OECM-1 after 30 days of treatment with CM. (F) FaDu and OECM-1 cells were treated with CM for 24 and 48h by MTT assay. The quantitative data were presented as means \pm SD of three independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Figure 5

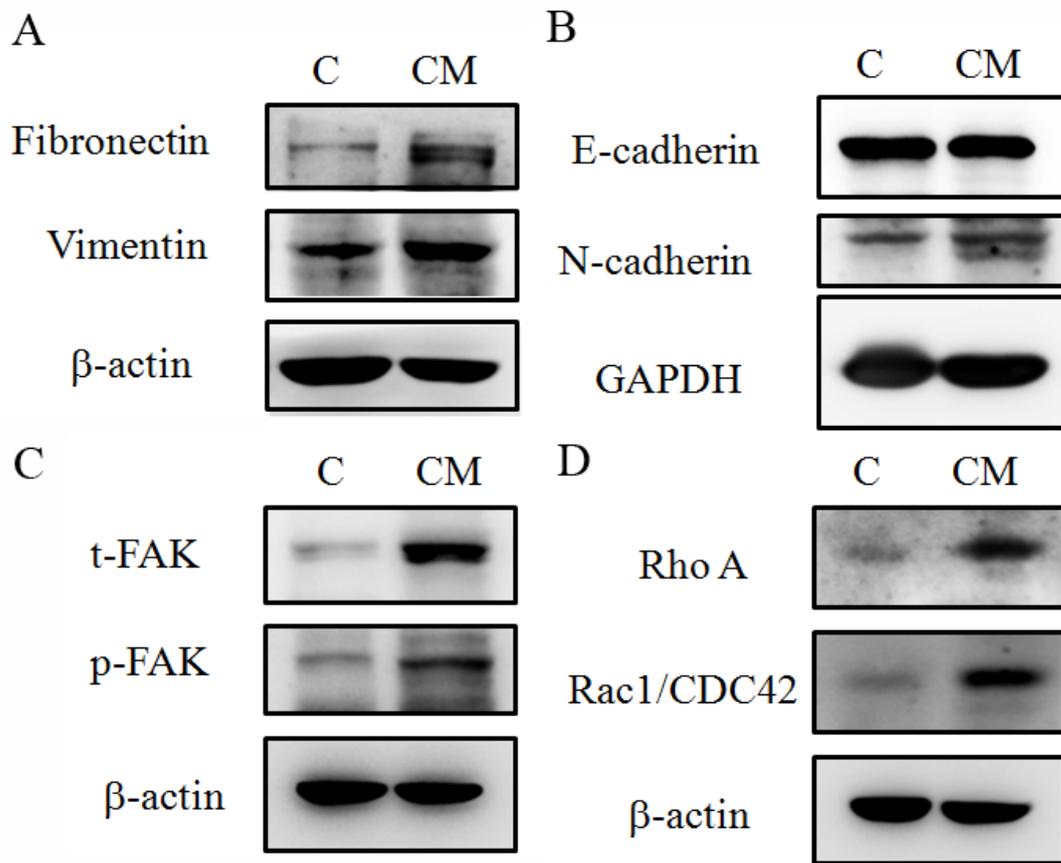


Figure 5 The effects of OSF on the cytoskeleton related protein in human oral cancer cells. FaDu cells were treated with CM of OSF for 30 days, and then cell lysate were then subjected to Western blot analysis. (A) Fibronectin and vimentin with β -actin being an internal control. (B) E-cadherin and N-cadherin with GAPDH being an internal control. (C) t-FAK, p- FAK, (D) Rho A and Rac1/CDC42 with β -actin being an internal control.

Figure 6

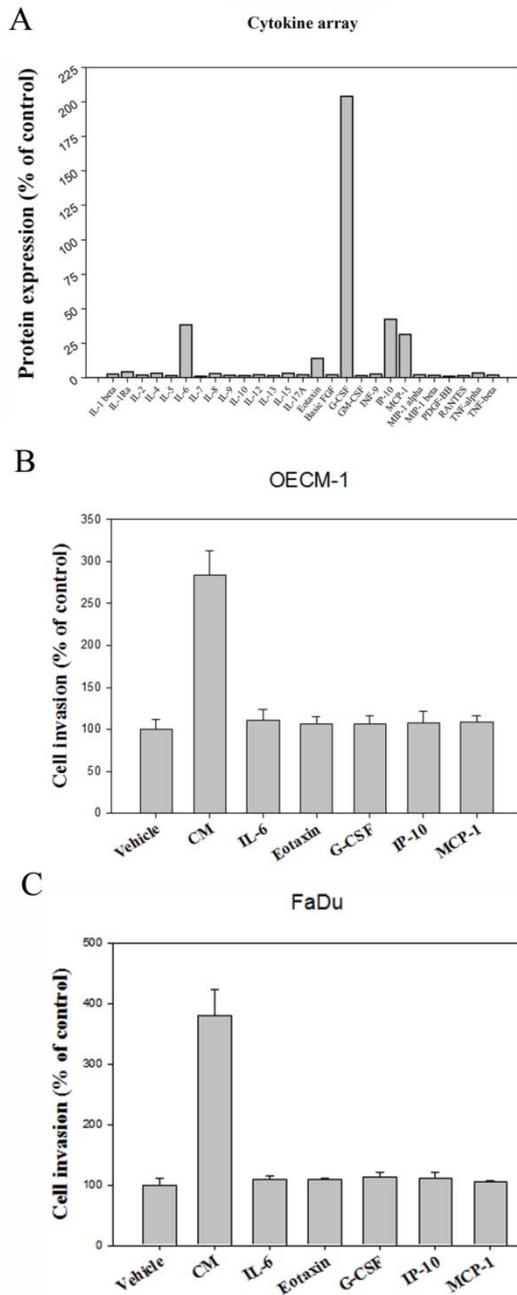


Figure 6 27-Plex cytokine analysis of CM of OSF (A) cytokines from OSF were analyzed using a Bio-Plex Pro human cytokine 27-plex assay. CM was collected from OSF and was analyzed for 27 different cytokines. Five cytokine were found at levels greater than the control media. IL-6, Eotaxin, G-CSF, IP-10 and MCP-1 were used to induce the invasion on OECM-1(B) and FaDu (C) cells. CM was used as a positive control. There was no significant difference among these five cytokine on cell invasion of OECM-1 and FaDu cells.

將 Oral submucous fibrosis (OSF) 的細胞培養液 (condition media; CM) 與 DMEM 培養液以 cytokine array 分析其 OSF 細胞分泌的細胞激素，結果發現培養過 OSF 的培養液其 IL-6、Eotaxin、G-CSF、IP-10、MCP-1 的表達量有明顯增加(Figure 6A)。OECM-1(Figure 6B)細胞及 FaDu (Figure 6C)處理 CM、IL-6、Eotaxin、G-CSF、IP-10、MCP-1 之後以 Transwell invasion assay 分析細胞的侵襲能力，處理 IL-6、Eotaxin、G-CSF、IP-10、MCP-1 的 cytokine 的組別細胞侵襲能力則是沒有明顯改變。(這五個 CYTOKINE 都沒有效果所以又在使用 R&D 的 array)

Figure 7

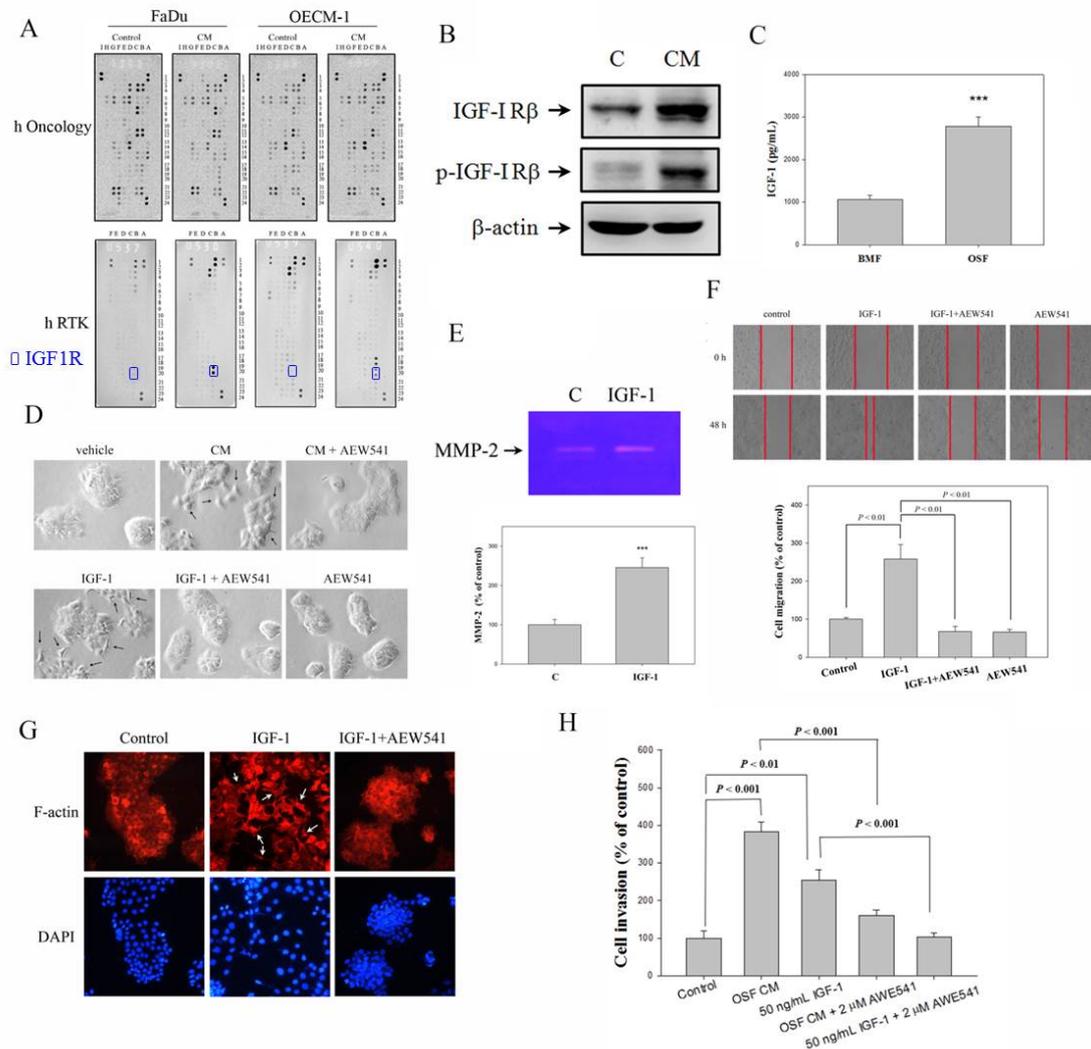


Figure 7 The effect of IGF-1 on cell morphology, MMP-2 and invasion in oral cancer cells. (A) FaDu and OECM-1 cells were treated with CM of OSF for 30 days and the cell lysates were used to detect difference in 84 cancer-related proteins by human oncology array and phosphorylation of 49 different receptor tyrosine kinases by human phosphor-RTK array (both from R&D system). (B) FaDu cells were treated with CM of OSF for 30 days, and then cell lysate were then subjected to Western blot analysis to detect IGF-1R β and p-IGF-1R β with β -actin being an internal control. (C) CM was collected from OSF and was analyzed for IGF-1 ELISA kit. (D) FaDu cells were treated with CM and 50 ng IGF-1 with or without 2 μ M NVP-AEW541 and cells were imaged with a microscope (100 \times). (E) FaDu cells were treated with 50ng/mL IGF-1 for 30 days, and then condition media (for 24 h) were collected for analysis of MMP-2 by gelatin zymography. (F) FaDu cells were treated with IGF-1 with or

without AEW541 by wound healing assay. (G) Immunofluorescence staining of FaDu cells (treated with or without IGF-1 or NVP-AEW541 for 30 days) with Texas-568 phalloidin to visualize the actin cytoskeleton. (H) FaDu cells were treated with CM and 50 ng/mL IGF-1 with or without 2 μ M NVP-AEW541 by cell invasion assay.

將口腔癌細胞 OECM-1 及 FaDu 分別處理 Oral submucous fibrosis (OSF) 的細胞培養液 (condition media; CM) 30 天之後，將處理過 CM 的細胞與 control 細胞以 Protein Oncology array 及 RTK array 分析處理過 CM 的細胞其細胞內蛋白表現量的變化(Figure 7A)。結果在處理 CM 的組別 Angiopoietin-like 4、CXCL8/IL-8、Serpine B5/Maspin、VEGF、EGF R、IGF-1 R、EphA2、DDR1 上升；Dkk-1 下降。未來還需要進一步研究。

Figure 8

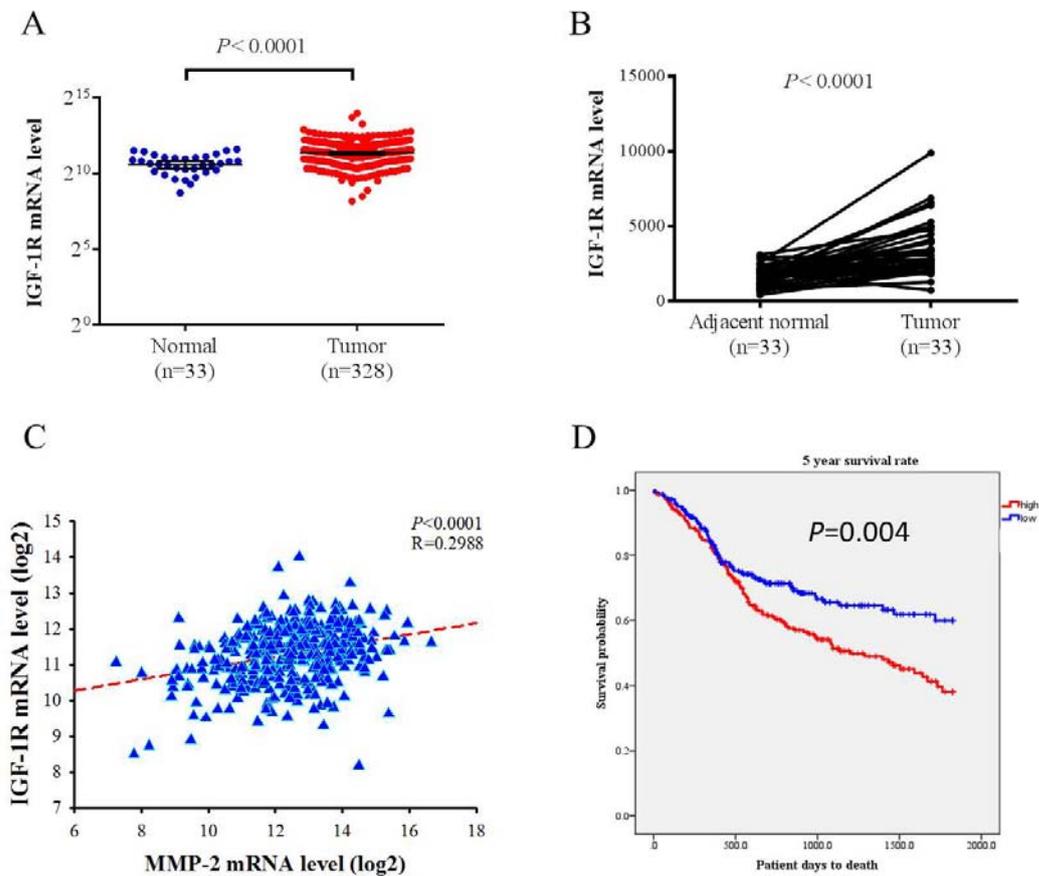


Figure 8 Levels of IGF-1R are increased in oral squamous cell carcinoma samples. (A) The expression of IGF-1R in normal and oral squamous cell carcinoma from The Cancer Genome Atlas (TCGA) Data Portal. (B) Relative expression of IGF-1R in 33 pairs of oral squamous cell carcinoma tumor tissues and their corresponding adjacent non-cancerous tissues. (C) The correlations among mRNA levels of MMP-2 and IGF-1R in oral squamous cell carcinoma. A significant correlation was found between MMP-2 and IGF-1R (Spearman rank correlation coefficient $r = 0.2988$, $P < 0.0001$). (D) An overall survival curve was produced for patients with high (red lines) and low (blue lines) IGF-1R mRNA expression levels using the Kaplan-Meier method. The p values were determined using a log-rank test.

子計畫二：天然化合物在口腔癌抗轉移與誘導凋亡效果的開發及其作用機轉之探討

癌細胞轉移(metastasis)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(extracellular matrix, ECM)間及基底膜(basement membrane)的貼附(adhesion)能力,破壞細胞間交互作用(intercellular interaction)的力量等。癌細胞之所以能轉移主要是透過癌細胞分泌蛋白分解酵素,如: matrix metalloproteinases (MMPs)分解胞外基質,最後導致 intercellular matrix 分離和基底膜的分解,進而使癌細胞 migration 及 invasion 提昇。而在這些水解酵素中, MMP-2、MMP-9 及 urokinase-type PA (u-PA)在癌細胞 migration 及 invasion 過程中扮演著最重要的角色。目前已有多種中藥已被確認具有抗發炎,抗過敏及抗癌的活性,且其中具有生物活性的有效成份,部分已被單離並經分析鑑定。中藥成份如覆盆子萃取物對癌症所引起的諸多症狀的治療能有所助益,已是眾所皆知的事實,而中藥的抗癌有效成份之作用機轉,常為有效地促使癌細胞凋亡及抑制癌細胞增生,但對其抑制侵襲及轉移作用和其詳細機制方面的研究還很少。因此,本子計劃將利用覆盆子及銀合歡萃取物,觀察此萃取物抑制口腔癌細胞侵襲轉移能力及其相關機制。

實驗結果

1. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞 (SCC-9)之細胞存活率影響

將口腔癌細胞 (SCC-9 cells) 以 7×10^4 /well 的細胞量均勻分至 24 孔盤中,培養約 16 小時後。給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24 小時後,將藥物移除,利用 MTT assay 偵測細胞的存活率 (Figure 1)。結果顯示 SCC-9 細胞在這些濃度的處理下並不會影響細胞的存活率。因此覆盆子萃取物會以 0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的濃度進行後續的實驗。

2. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 移動能力之影響

為了觀察覆盆子萃取物對於 SCC-9 細胞爬行能力的影響，我們首先利用 wound healing 實驗來分析。將 SCC-9 口腔癌細胞以 5.5×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以物理方式利用 tip 劃出一道傷口並給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理後，在不同的時間點 (0、12、24、48 hr) 利用顯微鏡觀察傷口癒合的情況並拍照記錄，其結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較。結果顯示 SCC-9 細胞的移動能力在不同的時間點會隨著覆盆子萃取物濃度的增加而明顯受到抑制 (**Figure 2A**)。而將 48 小時的細胞爬行結果進行量化，由圖表可發現其細胞移動能力依覆盆子萃取物濃度由低到高分別為對照組的 77.25、42.49、27.47、15.45% (**Figure 2B**)，其差異性具有統計學上的意義。

3. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 細胞轉移能力之影響

接著以 migration assay 再次確認覆盆子萃取物對於口腔癌細胞 SCC-9 爬行能力的影響。將 SCC-9 以 5×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理後，於 37°C 培養處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，先以 $1 \times \text{PBS}$ 清洗細胞兩次，再以 trypsin-EDTA 打下所有細胞，並用不含 FBS 的細胞培養液中止反應，再計數細胞後取出固定的細胞數，利用 Boyden chamber assay (cell migration assay) 的分析方法，進行 16 小時反應後，觀察 SCC-9 的爬行能力，其結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較。結果顯示 SCC-9 細胞的爬行能力會隨著覆盆子濃度增加而受到抑制 (**Figure 3A**)，經由量化圖表後可清楚發現其細胞爬行能力依覆盆子萃取物濃度由低到高分別為對照組的 95.91、79.51、65.58、60.25% (**Figure 3B**)，其差異性具有統計學上的意義。

4. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 細胞侵襲能力之影響

Invasion assay 相較 migration assay 的差別為 invasion assay 必須事先 coating 上一層 matrigel 以模擬細胞外基質，利用觀察細胞通過 matrigel 到達薄膜上的數目來分析覆盆子萃取物對於 SCC-9 口腔癌細胞侵襲能力的影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以 5×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$) 處理後，於 37°C 培養處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，先以 $1 \times \text{PBS}$ 清洗細胞兩次，再以 trypsin-EDTA 打下所有細胞，並用不含 FBS 的細胞培養液中止反應，再計數細胞後取出固定的細胞數，利用 Boyden chamber coating type IV collagen assay (cell invasion assay) 的分析方法，進行 48 小時反應後，觀察 SCC-9 細胞的侵襲能力，其結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較。結果顯示 SCC-9 細胞的侵襲能力會隨著覆盆子濃度增加而受到抑制 (Figure 4A)，經由量化圖表後可清楚發現其細胞侵襲能力依覆盆子萃取物濃度由低到高分別為對照組的 93.47、76.98、62.54、52.58% (Figure 4B)，且差異性具有統計學上的意義。

5. 覆盆子萃取物對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 分泌 MMP-2 的能力

由上述的實驗已知覆盆子萃取物可以有效抑制 SCC-9 的移動及侵襲能力，因此為了探討覆盆子萃取物對於抑制 SCC-9 細胞的轉移能力是否與轉移相關的金屬基質蛋白水解酶 MMP-2 有關聯。首先我們利用 gelatin zymography assay 來分析 MMP-2 的分泌表現，將 SCC-9 細胞以 7×10^4 cells/well 的細胞量均勻分至 24 孔盤細胞培養皿中，培養約 16 小時後，給予不同濃度的覆盆子萃取物為 0、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ ，置於 37°C 含 5% CO_2 的細胞培養箱，處理 24 小時後並收集細胞培養液以進行實驗分析 MMP-9 及 MMP-2 的表現，結果顯示 SCC-9 口腔癌細胞並不會分泌 MMP-9，而隨著覆盆子萃取物濃度的增加，其細胞所分泌 MMP-2 的活性有 dose-dependent 的抑制作用 (Figure 5A)。將其量化後的結果也可清楚發現 MMP-2 會隨著覆盆子濃度增加而減少分泌 (Figure 5B)。

6. 覆盆子萃取物影響人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其 MMP-2 及其內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現

將 SCC-9 口腔癌細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿內，培養 16 小時後，處理不同濃度的覆盆子萃取物 0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24 小時後，萃取其 total cell lysates，以 anti-MMP-2 和 anti-TIMP-2 的抗體進行 western blot 分析，並以 β -actin 的表現量作為 internal control。結果顯示 MMP-2 的蛋白表現量隨著處理覆盆子萃取物濃度的增加而遞減，而 MMP-2 內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現量也有顯著的變化，隨著覆盆子濃度的增加而減少表現 (Figure 6A)。將其結果量化後，也可清楚得知 MMP-2 及 TIMP-2 的蛋白表現 (Figure 6B)。由於有文獻指出覆盆子萃取物對於肺癌細胞株 (A549) 的影響為可以透過抑制 EMT 的轉換以達到抑制癌細胞的轉移 ((Hsieh et al., 2013)。因此我們利用 western blot 分析 E-cadherin 及 vimentin 蛋白表現，結果顯示 E-cadherin 及 vimentin 的蛋白表現量均不受覆盆子萃取物濃度不同的影響而變化 (Figure 6C)。量化後的結果即可清晰發現 E-cadherin 及 vimentin 蛋白表現皆不會變化 (Figure 6D)。

7. 覆盆子萃取物影響人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其 MMP-2 在細胞內的變化

將 SCC-9 細胞株以 0.7×10^4 /well 的細胞數均勻分至 chamber slide，培養 16 小時後，每 well 各加入 200 μL 含有覆盆子萃取物濃度為 0、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的新鮮培養液，作用 24 小時即可取出進行後續的實驗步驟。結果在細胞免疫染色法 (Immunocytochemistry) 實驗中發現帶有綠色螢光的 MMP-2 表現會因為覆盆子萃取物的濃度增加而螢光強度減弱 (Figure 7)。

8. 覆盆子萃取物影響人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其 MMP-2 的 mRNA 的表現

將 SCC-9 細胞以 5.5×10^5 細胞數培養在 6 公分的培養皿內，培養 16 小時後，處理不同濃度的覆盆子萃取物 0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，細胞與藥物作用 12 小時後，萃取其 total RNA，利用 RT-PCR 的方法分析，並以 GAPDH 的表現量作為 internal control。結果顯示，SCC-9 細胞在不同濃度的覆盆子萃取物處理下，其 MMP-2 mRNA 的表現量隨著處理覆盆子萃取物濃度的增加而有下降 (Figure 8A)。接著再利用 Real-time PCR 的方法可以更精準的確認 MMP-2 mRNA 的表現情形，由 (Figure 8B) 中可以發現 SCC-9 細胞確實在處理不同濃度的覆盆子萃取物後 MMP-2 mRNA 的表現會依濃度低到高而有遞減趨勢，且具有統計學上的意義。

9. 覆盆子萃取物對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其 MMP-2 的表現其訊息傳遞蛋白 ERK1/2、JNK1/2 與 p38 磷酸化表現之影響

為了探討覆盆子萃取物抑制 SCC-9 口腔癌細胞移動及侵襲能力及 MMP-2 的分泌與訊息蛋白之間的相關性，於是利用 western blot 方法分析。將 SCC-9 細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿內，培養 16 小時後，處理不同濃度的覆盆子萃取物 0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，經過 24 小時後，萃取其 total cell lysates，並且利用 anti-ERK1/2、anti-JNK1/2、anti-p38 抗體進行實驗，而在觀察磷酸化蛋白方面則收取加藥後 6 小時的 total cell lysates，再以 anti-phospho-ERK1/2、anti-phospho-JNK1/2、anti-phospho-p38 抗體進行 western blot。實驗結果顯示，在磷酸化的 ERK1/2、JNK1/2 和 p38 中，磷酸化的 ERK 的蛋白表現有隨著覆盆子萃取物的濃度增加而有減少，而磷酸化的 JNK1/2 及磷酸化的 p38 蛋白表現並不會受到覆盆子萃取物的影響 (Figure 9)。

10. 覆盆子萃取物對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其轉移相關蛋白 FAK、Src 磷酸化表現之影響

同樣利用 western blot 方法分析，將 SCC-9 細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿內，培養 16 小時後，處理不同濃度的覆盆子萃取物 0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，經過 24 小時後，萃取其 total cell lysates，以 anti-FAK 與 anti-Src 的抗體進行分析，同樣在觀察磷酸化蛋白方面以收取細胞加藥後 6 小時的 total cell lysates，利用 anti-phospho-FAK (Tyr925)、anti-phospho-FAK (Y397) 及 anti-phospho-Src 進行實驗，由結果顯示 Src 蛋白的磷酸化會因為覆盆子萃取物的濃度增加明顯減少，而 FAK 蛋白在 Tyr925 這個位置的磷酸化也會隨著覆盆子萃取物的濃度增加而逐漸下降 (Figure 10).

11. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 分泌 MMP-2 的能力

我們利用 gelatin zymography assay 來分析處理 ERK1/2 抑制劑(U0126) 後 MMP-2 的分泌表現，將 SCC-9 細胞以 7×10^4 cells/well 的細胞量均勻分至 24 孔盤細胞培養皿中，培養約 16 小時後，事先 pre-treat 10 μM 的 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 1 小時後，再與覆盆子萃取物 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共同處理 23 小時後並收集細胞培養液以進行實驗分析 MMP-2 的表現，結果顯示在覆盆子萃取物 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 共同處理下所分泌的 MMP-2 較其單獨處理覆盆子萃取物 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 細胞所分泌 MMP-2 更有抑制作用 (Figure 11A)。將其量化後的結果也可發現 MMP-2 在共同處理覆盆子萃取物與 ERK1/2 抑制劑時具有加乘效果(Figure 11B)。

12. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 移動能力之影響

為了觀察覆盆子萃取物與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 共同作用後對於 SCC-9 細胞爬行能力的影響，我們利用 wound healing 實驗來分析。將 SCC-9 口腔癌細胞以 5.5×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，事先

pre-treat 10 μ M ERK1/2 抑制劑 (U0126) 一個小時後，利用 tip 刮出一道傷口並給予覆盆子萃取物濃度為 (0、50 μ g/mL) 共同處理後，在不同的時間點 (0、12、24、48 hr) 利用顯微鏡觀察傷口癒合的情況並拍照記錄，其結果與未處理 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 之對照組做比較。結果顯示在有處理 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 及覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 共同作用下，SCC-9 細胞的移動能力較單獨處理覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 有更明顯的抑制效果 (Figure 12A)。而將 48 小時的細胞爬行結果進行量化，由圖表可發現其細胞移動能力在共同處理覆盆子萃取物與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 相較於單獨給予覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 大約降低了 25%，具有更佳的抑制效果 (Figure 12B)，其差異性具有統計學上的意義。

13. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 細胞轉移能力之影響

接著以 migration assay 觀察共同處理覆盆子萃取物與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 對於口腔癌細胞 SCC-9 爬行能力的影響。將 SCC-9 以 5×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，事先 pre-treat 10 μ M 的 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 1 小時後，再與覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 共同處理 23 小時後進行實驗，利用 Boyden chamber assay (cell migration assay) 的分析方法，反應 16 小時後，觀察 SCC-9 的爬行能力，結果顯示在覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 共同處理下細胞的爬行能力較其單獨處理覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 更有抑制作用 (Figure 13A)，在量化圖表中也可發現其細胞轉移能力在共同處理覆盆子萃取物與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 相較於單獨給予覆盆子萃取物 (50 μ g/mL) 大約減少了 17%，具有加乘抑制的效果 (Figure 13B)，其差異性具有統計學上的意義。

14. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 影響人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其 MMP-2 蛋白之影響

將 SCC-9 口腔癌細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿內，培養 16 小時後，處理不同濃度的覆盆子萃取物 0、50 $\mu\text{g}/\text{m}$ 與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 共同作用 24 小時後，萃取其 total cell lysates，以 anti-MMP-2 的抗體進行 Western blot 分析，並以 β -actin 的表現量作為 internal control。結果顯示 MMP-2 的蛋白表現量在共同處理覆盆子萃取物與 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 相較於單獨加藥的表現量有明顯的加乘效果，使 MMP-2 表現減少的更多 (**Figure 14A and Figure 14B**)。另外在細胞免疫染色法 (Immunocytochemistry) 實驗中也發現其 MMP-2 在 SCC-9 細胞中的表現會因為覆盆子萃取物共同處理 ERK1/2 抑制劑 (U0126) 後而受到更顯著的抑制效果 (**Figure 14C**)。

15. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞存活率的影響

以 MTT assay 分析不同濃度之銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 對口腔癌細胞 SCC-9 的細胞毒性。處理 24 小時後，將藥物移除，其結果與未處理銀合歡萃取物之對照組作比較。濃度由低到高的存活率分別為對照組的 95.4%、101.2%、100.7%、95.8% (**Figure 15**)。因此，由結果發現 SCC-9 細胞在銀合歡萃取物這幾個濃度的處理之下並不會影響細胞的存活率。

16. 銀合歡萃取物對人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞爬行能力的影響

將 SCC-9 口腔癌細胞以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 16 小時後，在每個孔盤中以 200 μL 的 tip 劃出一道傷痕，再給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，並於 0、6、12、24、48 小時觀察細胞傷口癒合之能力，並拍照紀錄。Wound healing assay 結果顯示，隨著銀合歡萃取物濃度增加，細胞癒合能力逐漸下降 (**Figure 16A、B**)，表示銀合歡萃取物能夠有效抑制口腔癌細胞株 SCC-9 的細胞爬行能力。

17. 銀合歡萃取物對人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞移動能力的影響

將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24 小時後，以 trypsin-EDTA 打下細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞數 ($1.6 \times 10^5/\text{well}$) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中於 37°C 培養箱反應 24 小時，再利用 Boyden chamber migration assay 的分析方法，分析其移動能力，其結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較。結果顯示隨著銀合歡萃取物濃度的增加，其移動能力依銀合歡萃取物濃度由低到高而有下降的趨勢 (Figure 17A、B)。口腔癌細胞移動能力會隨著銀合歡萃取物濃度增加而降低，代表著銀合歡可以有效抑制 SCC-9 細胞的移動能力。

18. 銀合歡萃取物對人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞侵襲能力影響

將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24 小時後，先在 well 上方 coating matrigel 4 小時後，以 trypsin-EDTA 打下細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞數 ($1.6 \times 10^5/\text{well}$) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中於 37°C 培養箱反應 48 小時，再分別利用 Boyden chamber invasion assay 分析方法，分析其侵襲的能力，其結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較。結果顯示，其侵襲能力隨銀合歡萃取物濃度增高而下降 (Figure 18A、B)。綜合 Figure 17、18 的結果代表銀合歡可以有效抑制 SCC-9 細胞的移動與侵襲能力。

19. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 分泌 MMP-2 的影響

由上述結果可知銀合歡萃取物具有抑制口腔癌細胞侵襲及移動的能力，因此我們利用 gelatin zymography assay，來觀察造成癌細胞轉移的主要蛋白酶 MMP-2 的表現量，是否會受銀合歡萃取物影響。給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24 小時後，我們將 MTT 試驗所收

集的 medium 進行 zymography 試驗。其結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較。由結果可知，隨著銀合歡萃取物濃度增加，其 MMP-2 下降比例濃度由低到高為: 94.4%、91.0%、80.3%、55.9% (Figure 19A、B)，表示銀合歡萃取物確實會抑制口腔癌細胞 SCC-9 所分泌的 MMP-2。

20. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 其 MMP-2 及內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現

將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理 24 小時後，萃取其 total cell lysates，以 anti-MMP-2、anti-TIMP-2 的抗體進行 western blot 分析，並以 β -actin 的表現量作為 internal control。結果顯示 MMP-2 蛋白表現量隨著銀合歡萃取物濃度的增加而遞減，此外，其內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現量隨著銀合歡萃取物濃度增加而上升，結果顯示增加銀合歡萃取物濃度能夠降低 MMP-2 的蛋白表現，且也能透過增加其內生性抑制劑 TIMP-2 的表現來達到抑制 MMP-2 的分泌 (Figure 20)。

21. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 其訊息傳遞蛋白 ERK1/2、JNK1/2 與 p38 磷酸化表現之影響

同樣利用 western blot 方法分析，來探討銀合歡萃取物抑制口腔癌細胞 SCC-9 移動及侵襲能力及 MMP-2 的分泌與訊息蛋白之間的相關性。將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理 6 小時後，萃取其 total cell lysates，利用 anti-ERK1/2、anti-phospho-ERK1/2、anti-JNK1/2、anti-phospho-JNK1/2、anti-p38 和 anti-phospho-p38 抗體進行 western blot 試驗。實驗結果顯示，磷酸化 ERK1/2、p38 的蛋白表現隨著銀

合歡萃取物的濃度增加而減少，而磷酸化 JNK1/2 蛋白表現則不受到銀合歡萃取物的影響 (Figure 21)。並以 β -actin 的表現量作為 internal control。

22. 銀合歡萃取物與 ERK1/2 及 p38 抑制劑對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 分泌 MMP-2 的影響

由上述結果可知銀合歡萃取物具有抑制口腔癌細胞 SCC-9 其 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化表現，因此我們再次利用 gelatin zymography assay，來觀察造成癌細胞轉移的主要蛋白酶 MMP-2 的表現量，是否確實經由 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化的路徑來達到調控 MMP-2 的表現。將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，使用不含 FBS 培養液分別加入 ERK1/2 抑制劑-U0126(10 μ M)、p38 抑制劑-SB202190(20 μ M)，待抑制劑處理 1 小時後，於加入 U0126 及 SB202190 兩組抑制劑的培養孔給予相同濃度的銀合歡萃取物(20 μ g/mL)，條件依序為銀合歡 0 μ g/mL、銀合歡 20 μ g/mL、U0126 10 μ M、U0126 10 μ M+銀合歡 20 μ g/mL、SB 202190 20 μ M、SB 202190 20 μ M +銀合歡 20 μ g/mL，共處理 24 小時後我們將 MTT 試驗所收集的 medium 進行 gelatin zymography assay，其結果與單獨處理 20 μ g/mL 銀合歡萃取物之對照組做比較。實驗結果顯示，單獨加入銀合歡萃取物相較於加入 ERK1/2 抑制劑與銀合歡萃取物結合的結果，下降比例為 21.71%，表示其抑制劑與藥物 combine 具有顯著抑制 MMP-2 的效果。相同的結果也可以看到加入 p38 抑制劑與藥物結合後相較於單獨加入銀合歡萃取物，下降比例為 14.56%，同樣具有顯著抑制 MMP-2 的效果(Figure 22)。結果表明銀合歡萃取物確實可以透過抑制 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化表現來調控 MMP-2 的分泌。

23. 銀合歡萃取物與 ERK1/2 及 p38 抑制劑對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞爬行能力影響

再次利用 Wound healing assay，將 SCC-9 口腔癌細胞以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 16 小時後，使用含 10%FBS 培養液分別加入 ERK1/2 抑制劑-U0126 (10 μ M)、p38 抑制劑-SB202190 (20 μ M)，待抑制劑處理 1 小時後，於加入 U0126 及 SB202190 兩組抑制劑的培養孔給予相同濃度的銀合歡萃取物 (20 μ g/mL)，條件依序為銀合歡 0 μ g/mL、銀合歡 20 μ g/mL、U0126 10 μ M、U0126 10 μ M+銀合歡 20 μ g/mL、SB 202190 20 μ M、SB 202190 20 μ M+銀合歡 20 μ g/mL，共處理 24 小時後，在每個孔盤中以 200 μ L 的 tip 劃出一道傷痕，並於 0、6、12、24、48 小時觀察細胞傷口癒合之能力，並拍照紀錄。其結果與單獨處理 20 μ g/mL 銀合歡萃取物之對照組做比較。結果顯示，單獨加入銀合歡萃取物相較於加入 ERK1/2 抑制劑與銀合歡萃取物結合的結果，下降比例為 33.28%，表示其抑制劑與藥物 combinand 具有顯著抑制細胞爬行的效果。相同的結果也可以看到加入 p38 抑制劑與藥物結合後相較於單獨加入銀合歡萃取物，細胞爬行下降比例為 45.82 % (Figure 23)。結果表明銀合歡萃取物確實可以透過抑制 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化表現來抑制細胞爬行的能力。

24. 銀合歡萃取物與 ERK1/2 及 p38 抑制劑對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞移動能力的影響

上述結果可知銀合歡萃取物經由抑制口腔癌細胞 SCC-9 其 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化表現的路徑，因此我們再次利用 Boyden chamber migration assay 分析是否確實經由 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化的路徑來達到調控其移動的能力。將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，使用含 10%FBS 培養液分別加入 ERK1/2 抑制劑-U0126 (10 μ M)、p38 抑制劑-SB202190 (20 μ M)，待抑制劑處理 1 小時後，於加入 U0126 及 SB202190 兩組抑制劑的培養孔給予相同濃度的銀合歡萃取物 (20 μ g/mL)，條件依序為銀合歡 0 μ g/mL、銀合歡 20 μ g/mL、U0126 10 μ M、U0126 10 μ M+銀合歡 20 μ g/mL、SB 202190 20 μ M、SB 202190 20 μ M +銀合歡 20 μ g/mL，

共處理 24 小時後，以 trypsin-EDTA 打下細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞數 (2×10^5 /well) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中於 37°C 培養箱反應 24 小時，再進行染色拍照記錄其移動的能力，其結果與單獨處理 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 銀合歡萃取物之對照組做比較。實驗結果顯示，單獨加入銀合歡萃取物相較於加入 ERK1/2 抑制劑與銀合歡萃取物結合的結果，下降比例為 20.82%，表示其抑制劑與藥物結合後具有顯著抑制細胞移動的能力。另外也可以看到加入 p38 抑制劑與藥物結合後相較於單獨加入銀合歡萃取物，細胞爬行下降比例為 18.17% (**Figure 24**)。結果表明銀合歡萃取物確實可以透過抑制 ERK1/2、p38 的蛋白磷酸化表現來抑制細胞移動的能力。

Figure 1

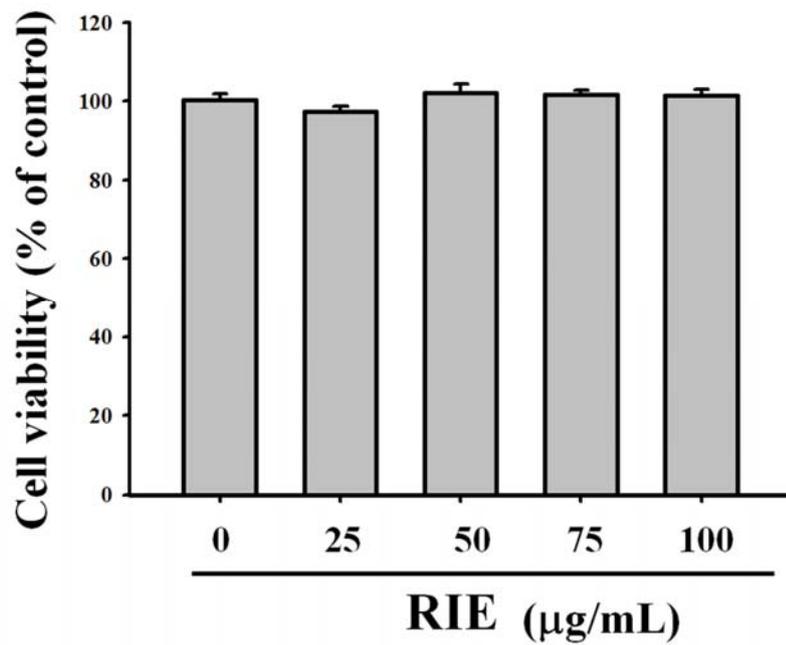
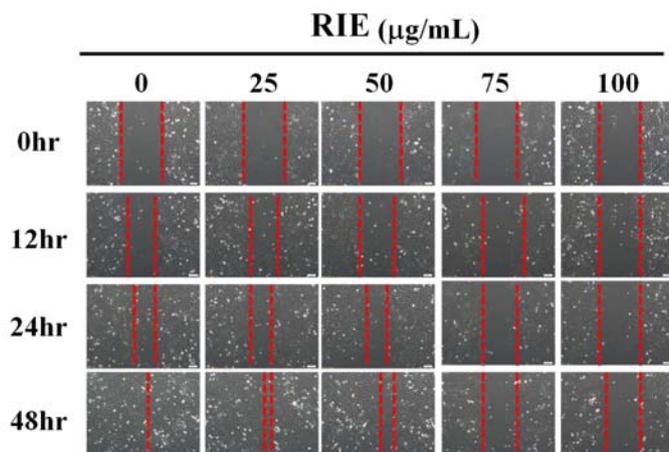


Figure 1. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 的作用之細胞存活率。將 SCC-9 口腔癌細胞以 7×10^4 的細胞數分盤到 24 孔的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 µg/mL) 處理 24 小時後，吸取掉含藥物的上清液，利用 MTT assay，經過 4 小時後以異丙醇將紫色結晶析出，並分析其吸光值以偵測細胞的存活率，其結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較。每個實驗至少 3 重複，結果數據以 mean \pm SD 表示。

Figure 2

(A)



(B)

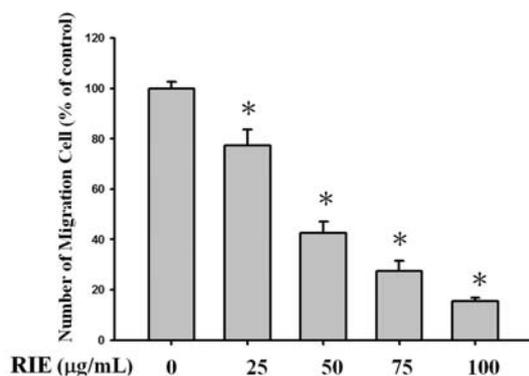
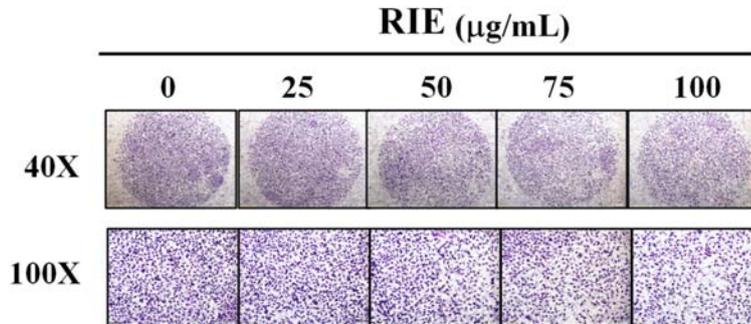


Figure 2. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 細胞爬行能力之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以 5.5×10^5 的細胞數分盤到 6cm 的培養皿，培養 16 小時後，以 200µL 的 tip 分別劃出一道軌跡並給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 µg/mL)，處理藥物後在不同的時間點(0、12、24、48 hr) 分別照相，並在顯微鏡下觀察傷口癒合的速度 (A)，其結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較 (B) 為其量化的結果。

Figure 3

(A)



(B)

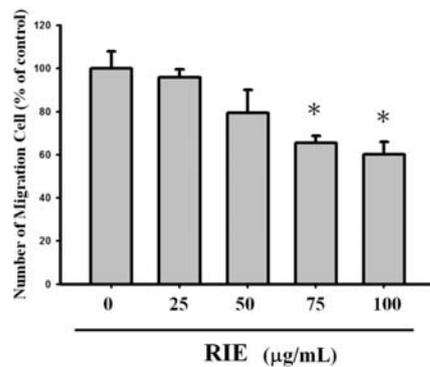
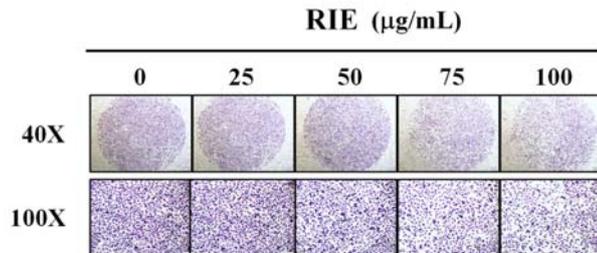


Figure 3. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 細胞轉移能力之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 µg/mL) 處理 24 小時後，利用 Boyden chamber assay (cell migration assay) 的分析方法，使細胞在 8 µm 的薄膜進行轉移，16 小時後將薄膜染色，在顯微鏡下拍照以計算爬過的細胞數量，分析細胞移動的能力 (A)。其量化的結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較，每個實驗至少 3 重複，結果數據以 % 表示 (B) (*, $p < 0.05$)。

Figure 4

(A)



(B)

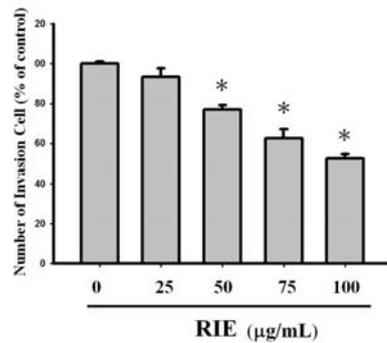
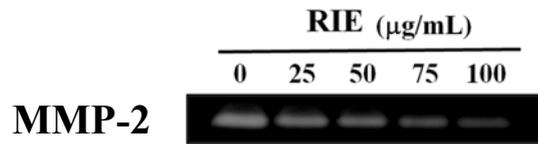


Figure 4. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 細胞侵襲能力之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 µg/mL) 處理 24 小時後，利用 matrigel-coated Boyden chamber assay (cell invasion assay) 的分析方法，使細胞在 8 µm 的薄膜進行轉移，48 小時後將薄膜染色，在顯微鏡下拍照以計算爬過的細胞數量，分析細胞的侵襲能力 (A)。其量化的結果與未處理覆盆子萃取物之對照組做比較，每個實驗至少 3 重複，結果數據以 % 表示 (B) (*, $p < 0.05$)。

Figure 5

(A)



(B)

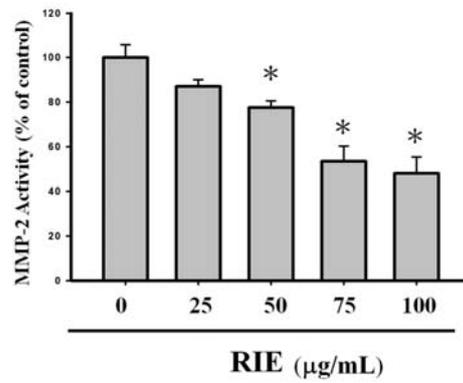


Figure 5. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 分泌 MMP-2 酵素活性之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24 小時後，收集 conditioned medium 以 gelatin zymography 分析 MMP-2 的活性 (A)，每個實驗至少 3 重複，其量化結果數據以 % 表示 (B) (*, $p < 0.05$)。

Figure 6

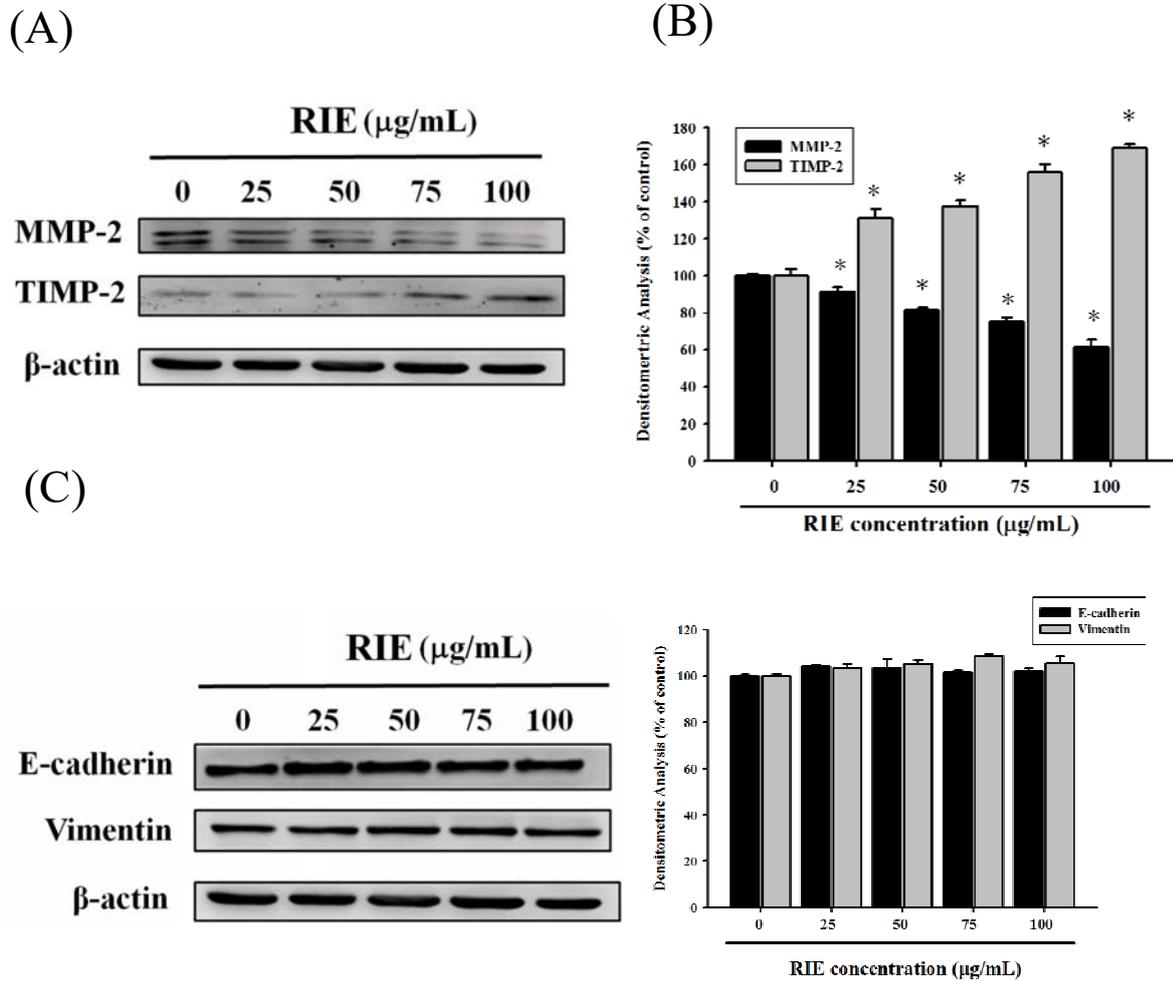


Figure 6. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 相關蛋白表現之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞株以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 μ g/mL) 處理 24 小時後，收集 total cell lysate 以 Western blot 分析 MMP-2 和 TIMP-2 的蛋白表現，以 β -actin 表現量當作對照比較 (A)。將 MMP-2、TIMP-2 的表現，每個實驗至少 3 重複，量化結果數據以 % 表示 (*, $p < 0.05$) (B)。(C) 以 western blot 分析加藥後 EMT (epithelial-mesenchymal transition) 相關蛋白表現的影響，以 β -actin 表現量當作對照比較。(D) 將 E-cadherin、Vimentin 的表現，每個實驗至少 3 重複，量化結果數據以 % 表示。

Figure 7

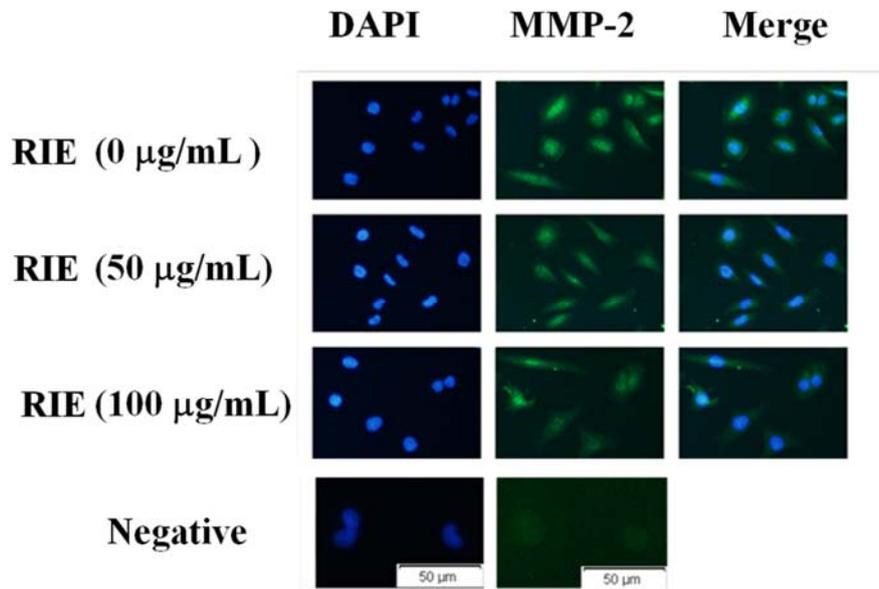
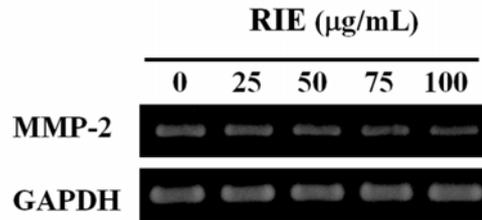


Figure 7. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 之 MMP-2 蛋白表現影響。將 SCC-9 口腔癌細胞株以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24 小時後利用細胞免疫染色法 (Immunocytochemistry) 觀察給予覆盆子萃取物後 MMP-2 在細胞內變化情形。

Figure 8

(A)



(B)

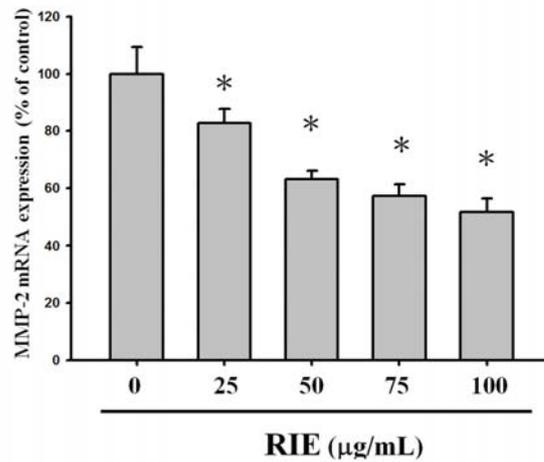


Figure 8. 覆盆子萃取物對於人類口腔癌細胞株 (SCC-9) 其 MMP-2 mRNA 表現之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞株以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 µg/mL) 處理 12 小時後，萃取出 total RNA，利用 RT-PCR 及 Real-time PCR 的方法分析 (A) RT-PCR MMP-2 mRNA 的表現 (B) Real-time PCR MMP-2 mRNA 的表現，並以 GAPDH 的表現量作為 internal control，每個實驗至少 3 重複，結果數據以 % 表示(*, $p < 0.05$)。

Figure 9

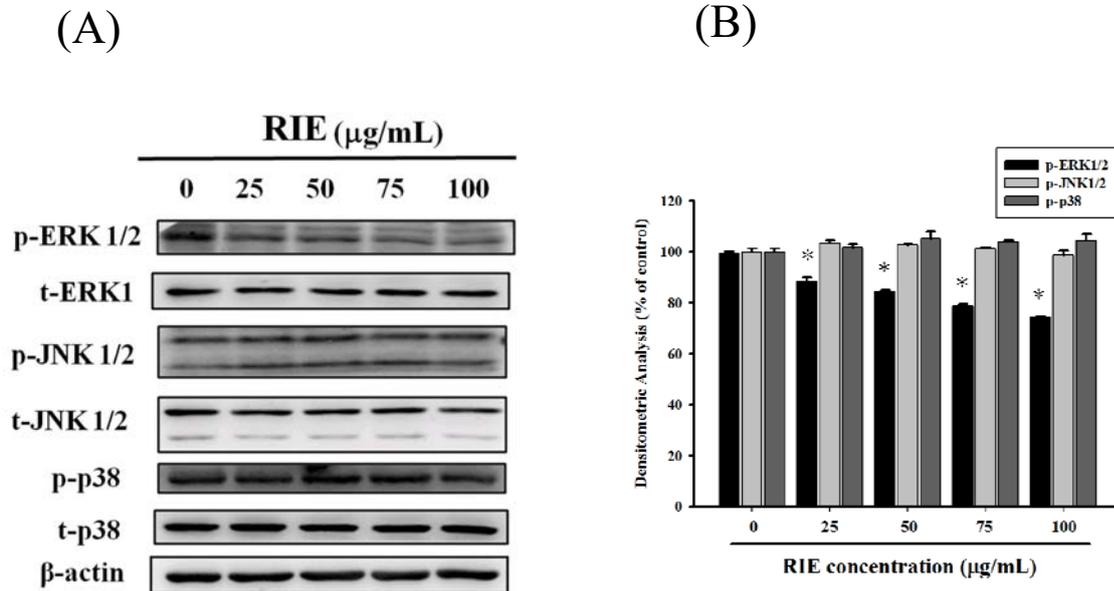
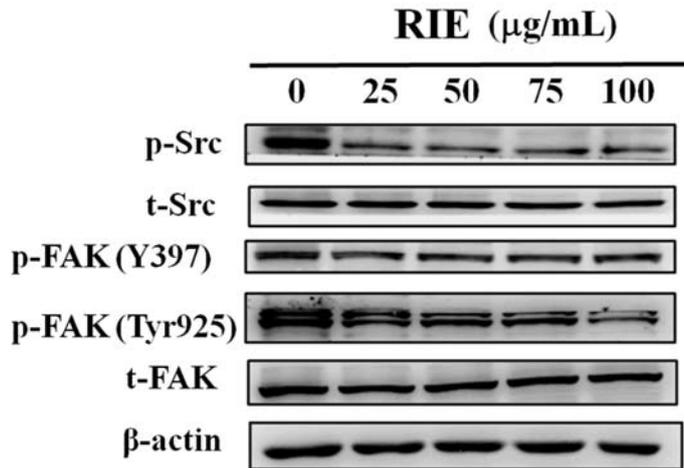


Figure 9. 覆盆子萃取物對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其MMP-2的表現其訊息傳遞蛋白 ERK1/2、JNK1/2 與 p38 磷酸化表現之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞株以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$)，分別處理6及24小時後，萃取其 total cell lysates，以 Western blot 分析 ERK1/2、JNK1/2、p38 及其磷酸化的蛋白表現，並以 β -actin 表現量當作對照比較 (A)。將 ERK1/2、JNK1/2、p38 磷酸化的蛋白表現量化，每個實驗至少 3 重複，量化結果數據以 % 表示 (*, $p < 0.05$) (B)。

Figure 10

(A)



(B)

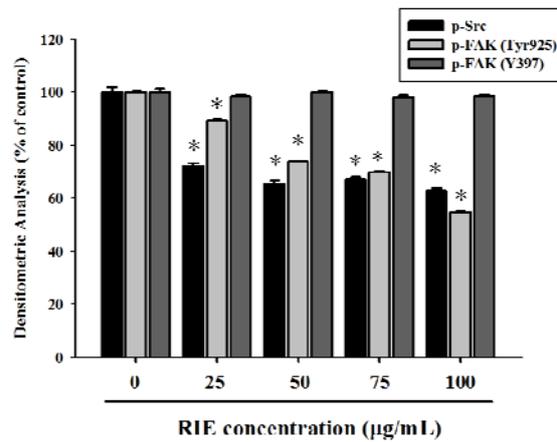
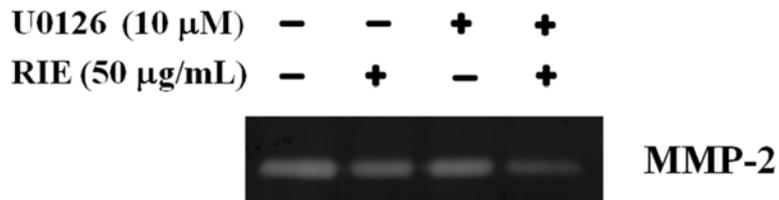


Figure 10. 覆盆子萃取物對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其轉移相關蛋白FAK、Src 磷酸化表現之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞株以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$)，分別處理6及24小時後，萃取其 total cell lysates，以 western blot 分析 FAK、Src 及其磷酸化的蛋白表現，並以 β -actin 表現量當作對照比較。

Figure 11

(A)



(B)

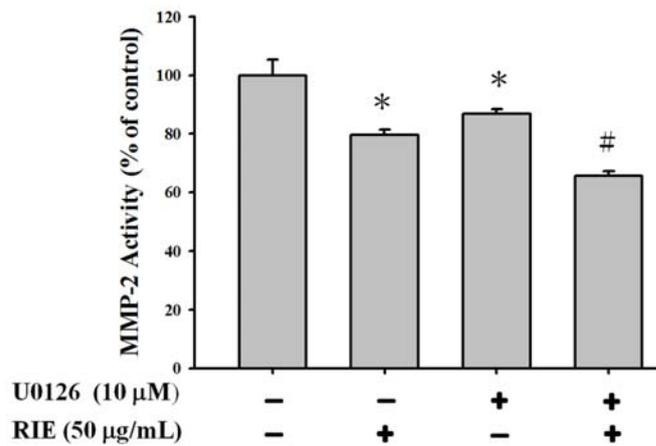


Figure 11. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 對於抑制人類口腔癌細胞 (SCC-9) 分泌 MMP-2 的能力。將 SCC-9 口腔癌細胞以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、50 μ g/mL) 與 U0126 共同處理 24 小時後，收集 conditioned medium 以 gelatin zymography 分析 MMP-2 的活性(圖 A)，每個實驗至少 3 重複，其量化結果數據以 % 表示(圖 B)，其共同處理藥物及抑制劑的 MMP-2 表現量相對於單獨加藥的差異度以 # 表示(#, $p < 0.05$) (*, $p < 0.05$)。

Figure 12

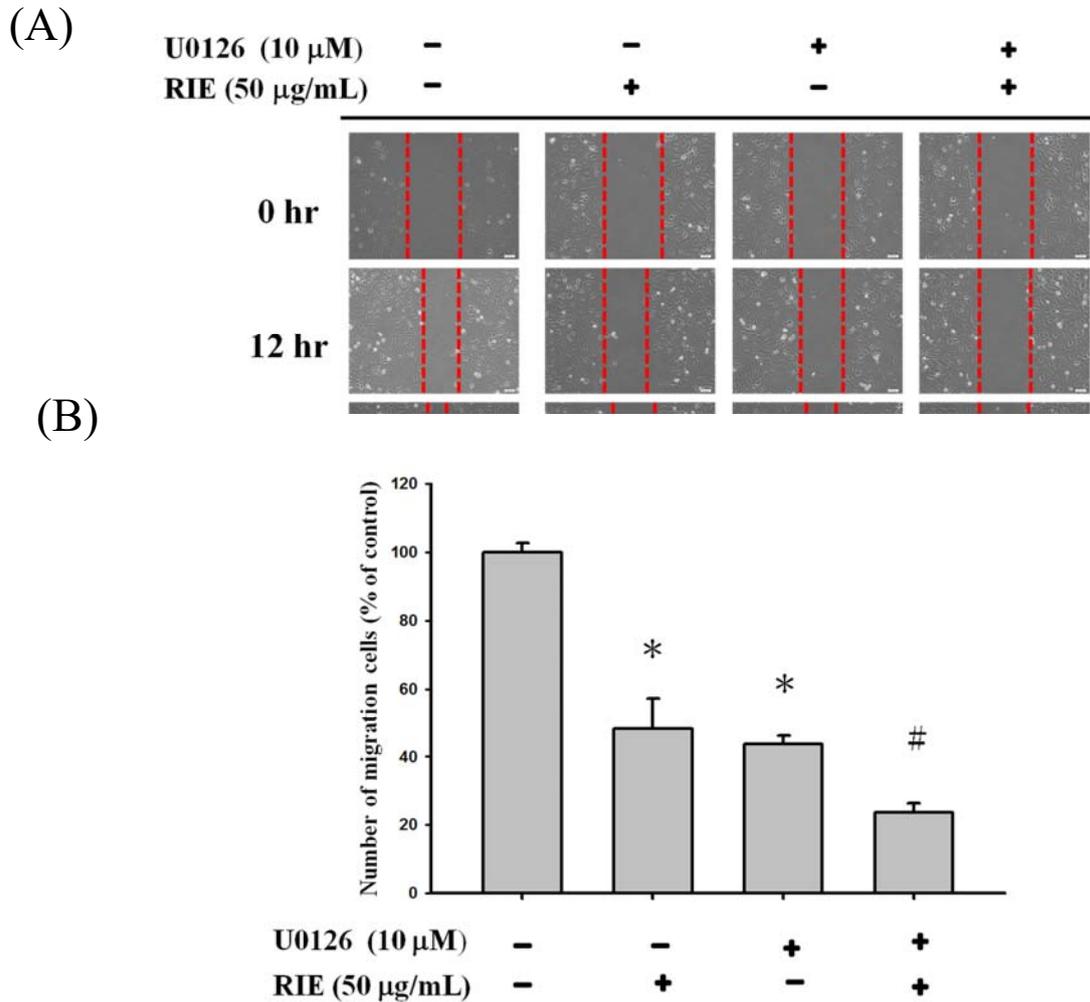
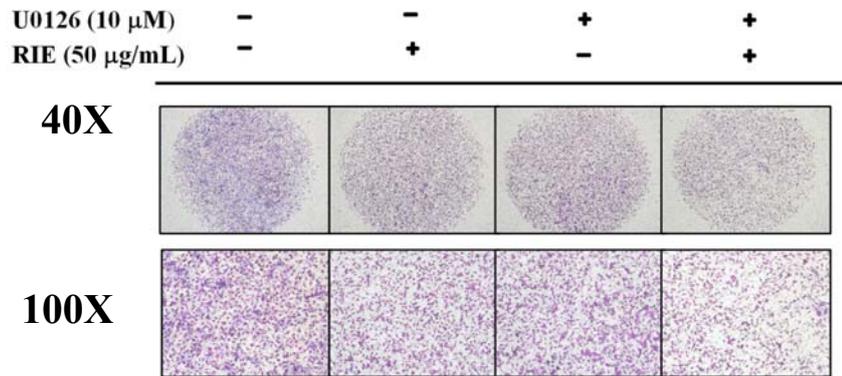


Figure 12 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 移動能力之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以 5.5×10^5 的細胞數分盤到 6cm 的培養皿，培養 16 小時後，以 200 μ L 的 tip 分別劃出一道軌跡並給予不同濃度的覆盆子萃取物 (0, 50 μ g/mL) 及 U0126 共同處理藥物後，在不同的時間點 (0, 12, 24, 48 hrs) 分別照相，並在顯微鏡下觀察傷口癒合的情形(圖 A)，量化結果數據以 % 表示(圖 B)，其共同處理藥物及抑制劑的爬行細胞數相對於單獨加藥的差異度以 # 表示(#, $p < 0.05$) (*, $p < 0.05$)。

Figure 13

(A)



(B)

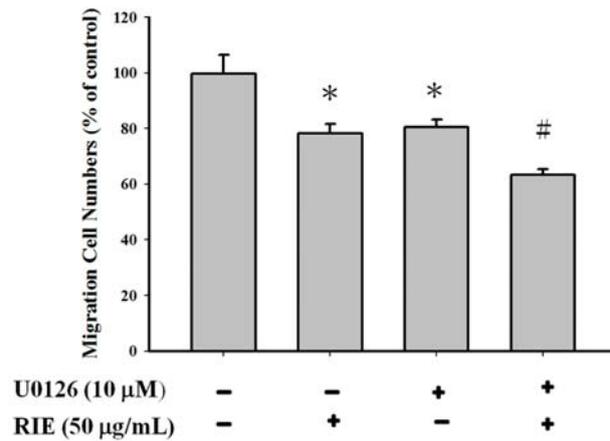


Figure 13. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 對於人類口腔癌細胞 (SCC-9) 細胞轉移能力之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、50 μ g/mL) 與抑制劑共同處理 24 小時後，利用 Boyden chamber assay (cell migration assay) 的分析方法，使細胞在 8 μ m 的薄膜進行轉移，16 小時後將薄膜染色，在顯微鏡下拍照以計算爬過的細胞數量，分析細胞移動的能力(圖 A)。其量化的結果與量化結果數據以 % 表示(圖 B)，其共同處理藥物及抑制劑的爬行細胞數相對於單獨加藥的差異度以 # 表示 (#, $p < 0.05$) (*, $p < 0.05$)。

Figure 14

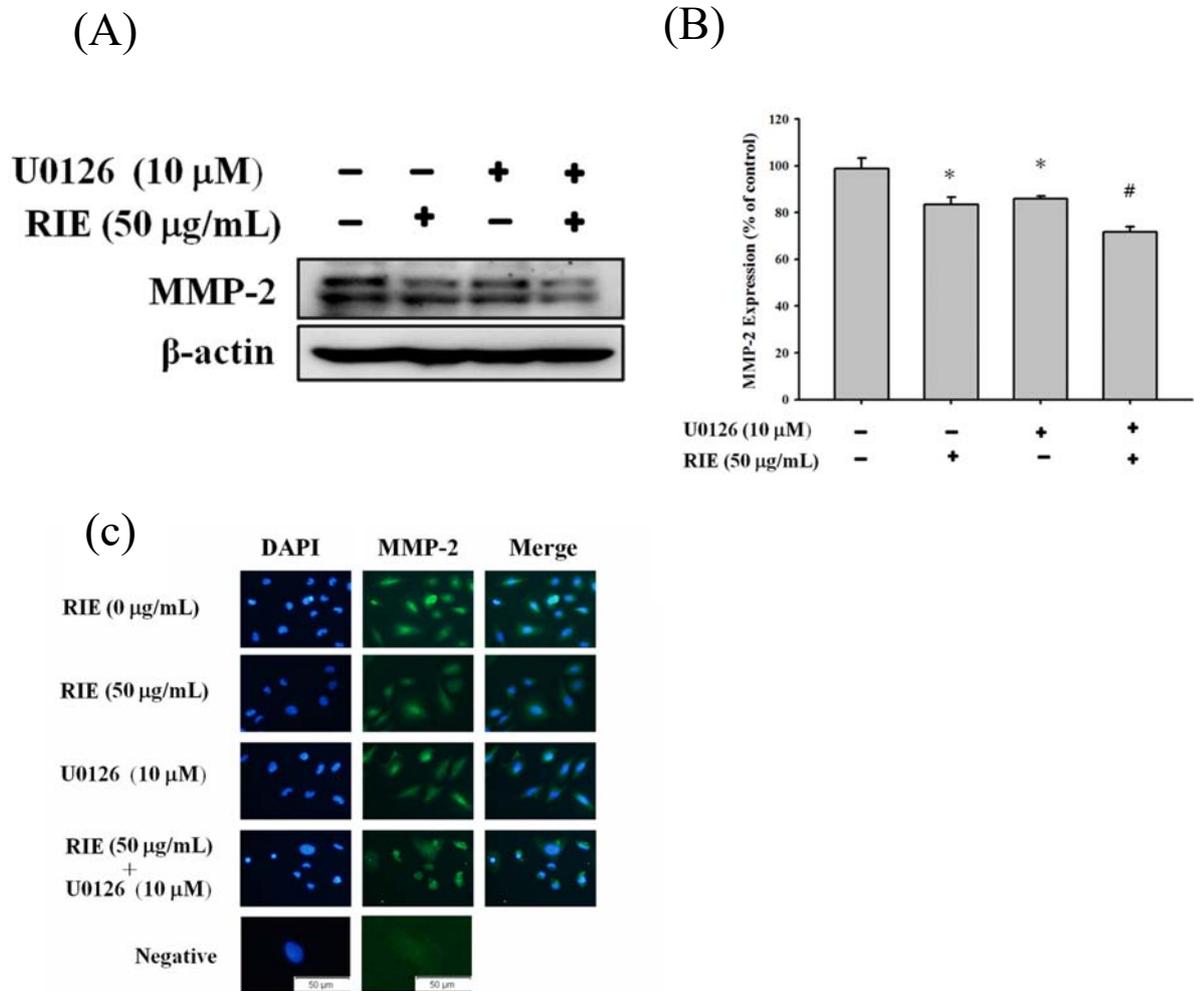


Figure 14. 覆盆子萃取物與 ERK1/2 蛋白抑制劑 (U0126) 影響人類口腔癌細胞 (SCC-9) 其 MMP-2 蛋白之影響。將 SCC-9 口腔癌細胞株以不同濃度的覆盆子萃取物 (0、50 μ g/mL) 與抑制劑共同處理 24 小時後，收集 total cell lysate 以 Western blot 分析 MMP-2 的蛋白表現，以 β -actin 表現量當作對照比較 (圖 A)。 (圖 B) 利用細胞免疫染色法 (Immunocytochemistry) 觀察給予覆盆子萃取物 (0、50 μ g/mL) 與抑制劑共同處理後 MMP-2 的表現情形。

Figure 15

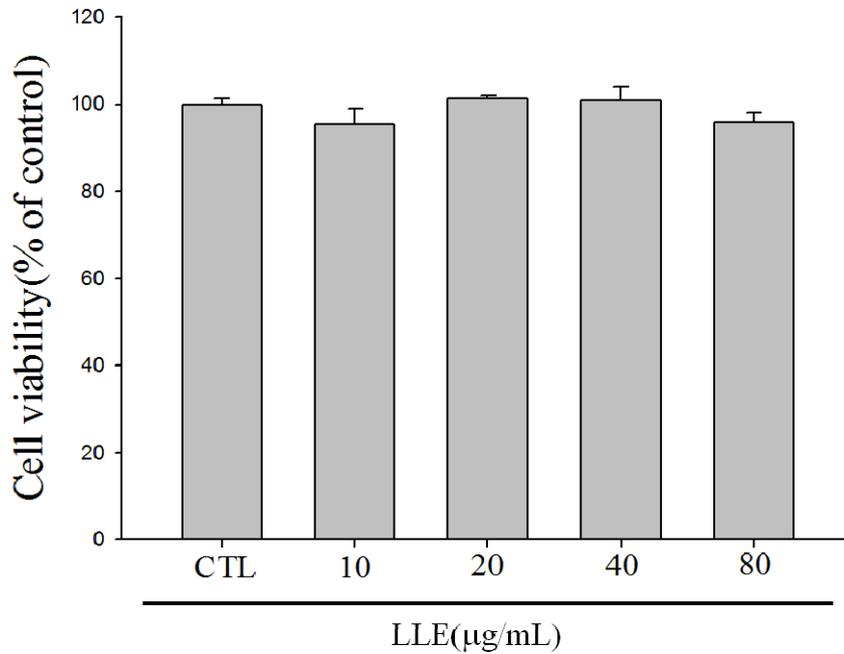


Figure 15. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞存活率的影響

將 SCC-9 口腔癌細胞以 6×10^4 的細胞數分盤到 24 孔的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理 24 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率，其結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較。每個實驗至少 3 重複，結果數據以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，結果顯示在 0、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同濃度下，銀合歡萃取物對口腔癌細胞株 SCC-9 不具毒殺性。

Figure 16

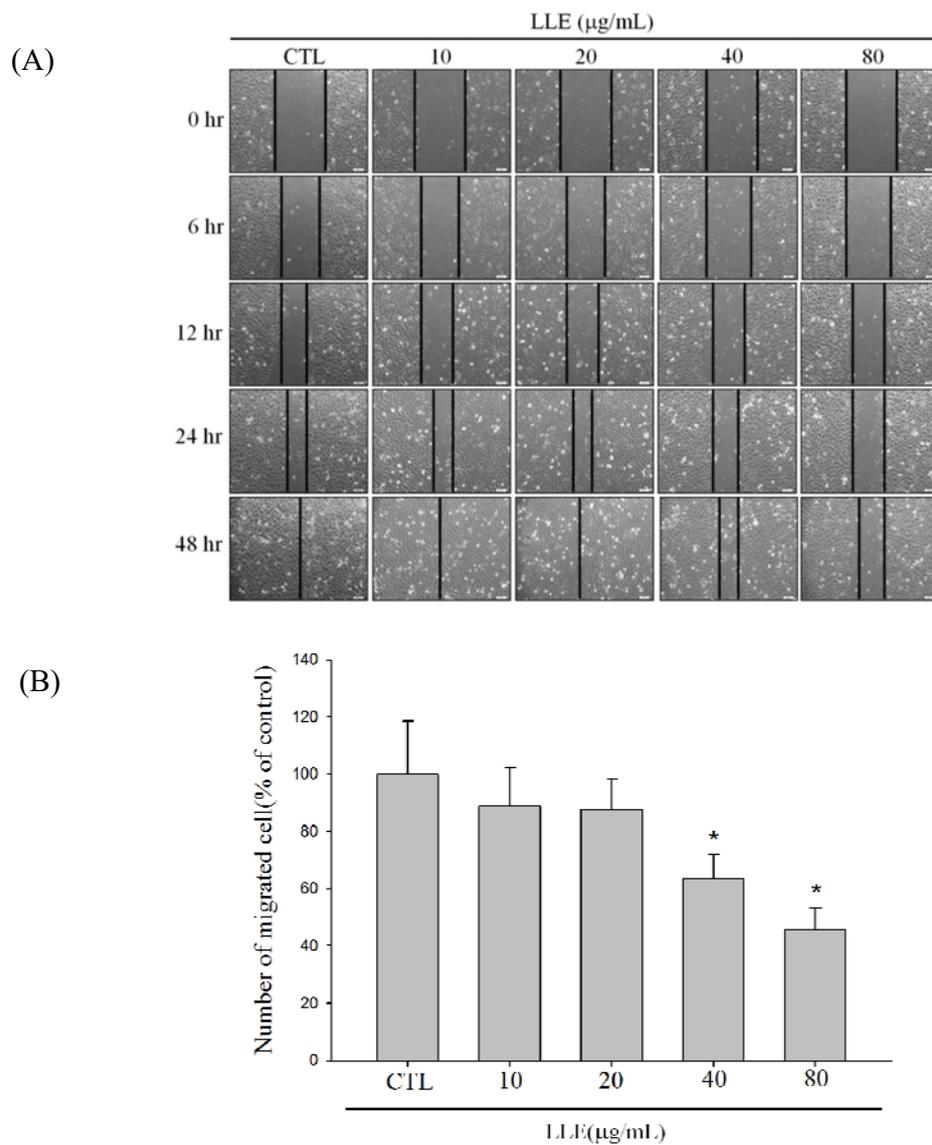
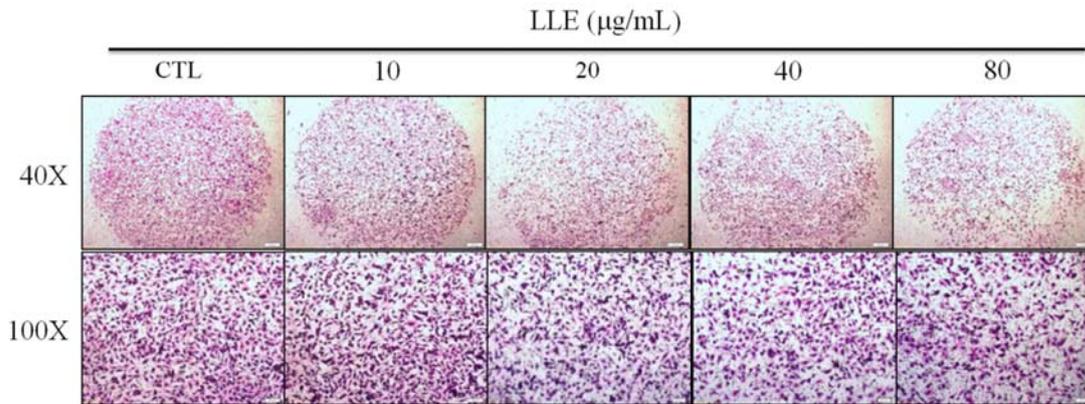


Figure 16. 銀合歡萃取物對人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞爬行能力的影響

(A)將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以含有 10% FBS medium 加藥並使用 200µL tip 劃出傷口並給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 µg/mL) 處理 0、6、12、24 小時及 48 小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的速度，並拍照記錄。(B)其量化結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較。(*, $p < 0.05$ 與對照組 control 比較)

Figure 17

(A)



(B)

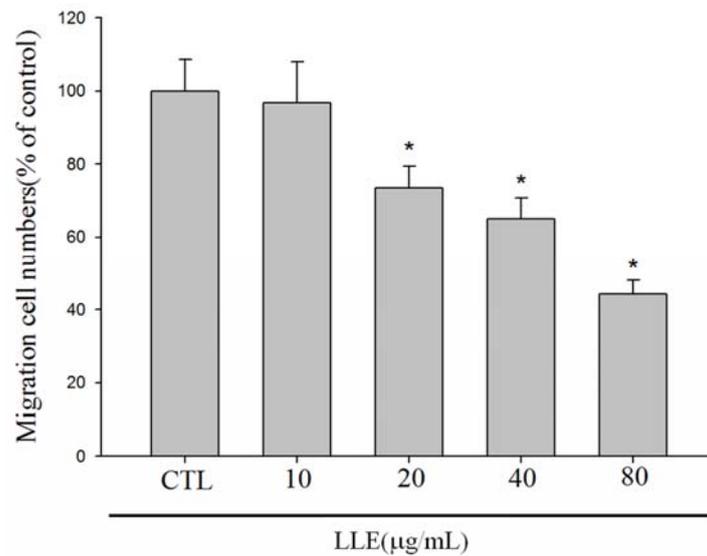


Figure 17. 銀合歡萃取物對人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞移動能力的影響

(A)將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以含有 10% FBS medium 加藥以 Boyden chamber migration assay 使癌細胞在 $8 \mu\text{m}$ 的薄膜進行 migration 試驗，之後將薄膜染色，並照相記錄細胞爬行能力。(B)其量化結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較，每個實驗至少 3 重複。(*, $p < 0.05$ 與對照組 control 比較)

Figure 18

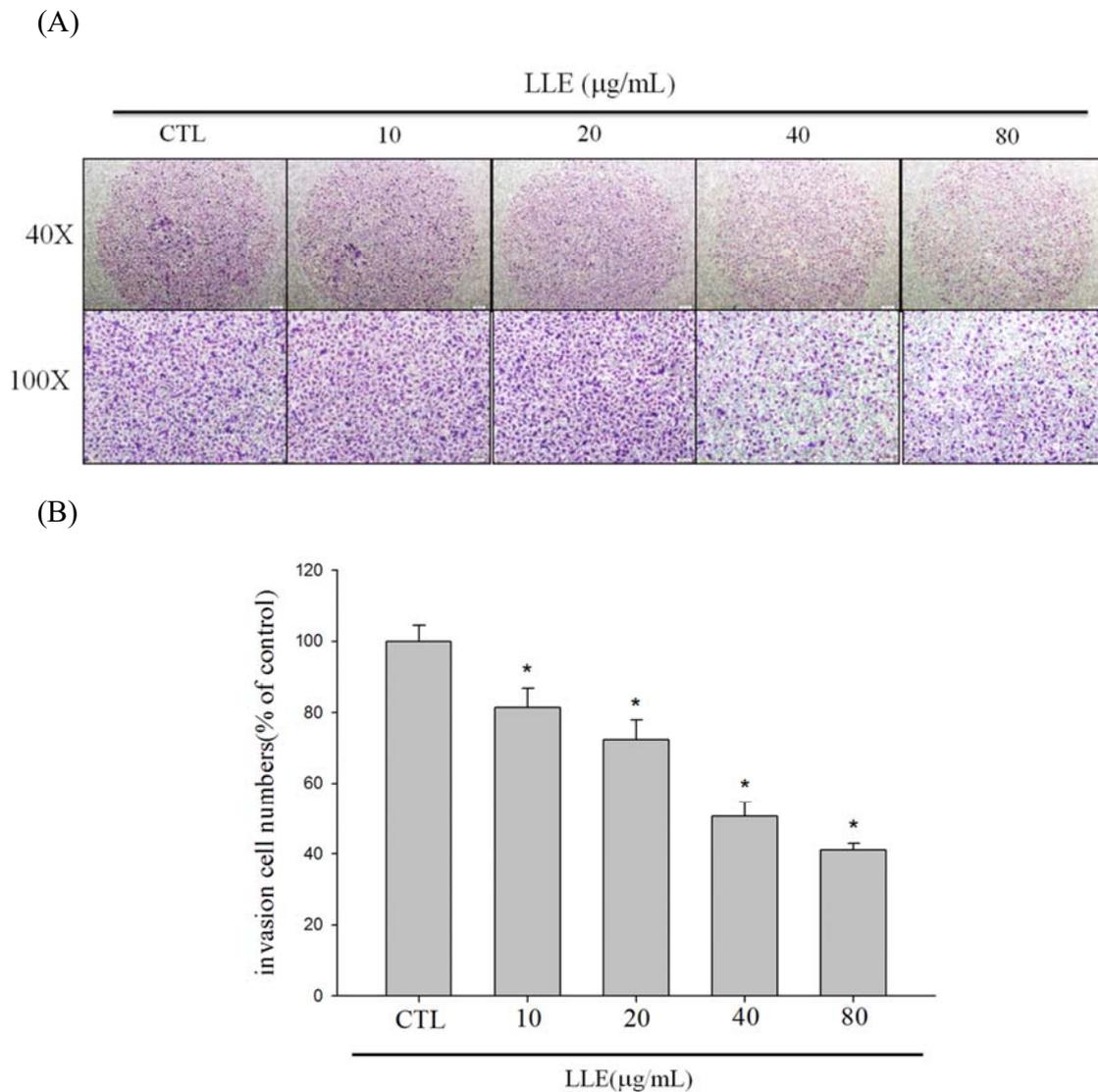
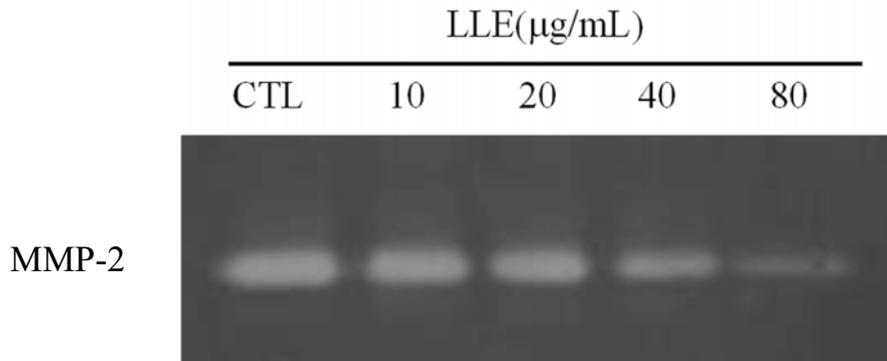


Figure 18. 銀合歡萃取物對人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞侵襲能力影響

(A)將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以含有 10% FBS medium 加藥後，首先在實驗前 4 小時加入 matrigel 模擬 ECM，接著使癌細胞在 8 μ m 的薄膜進行 invasion 試驗，之後將薄膜染色，並照相記錄細胞爬行能力。(B)其量化結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較，每個實驗至少 3 重複。(*, $p < 0.05$ 與對照組 control 比較)

Figure 19

(A)



(B)

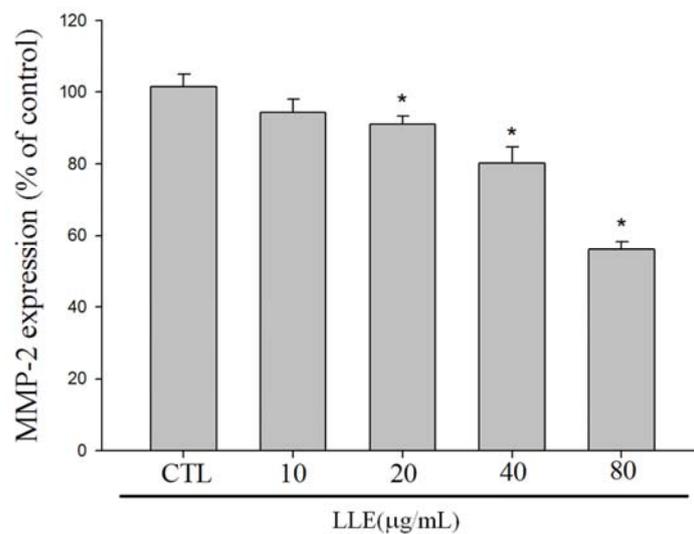


Figure 19. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 分泌 MMP-2 的影響

(A)將口腔癌細胞 SCC-9 以 6×10^4 分盤於 24 well 培養皿中，16 小時後以不含 FBS 的 medium 處理不同濃度銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$)，並於 24 小時後收取 medium。以 gelatin zymography 方法分析其 MMP-2 之活性。(B)其量化結果與未處理銀合歡萃取物之對照組做比較，每個實驗至少 3 重複。(*, $p < 0.05$ 與對照組 control 比較)

Figure 20

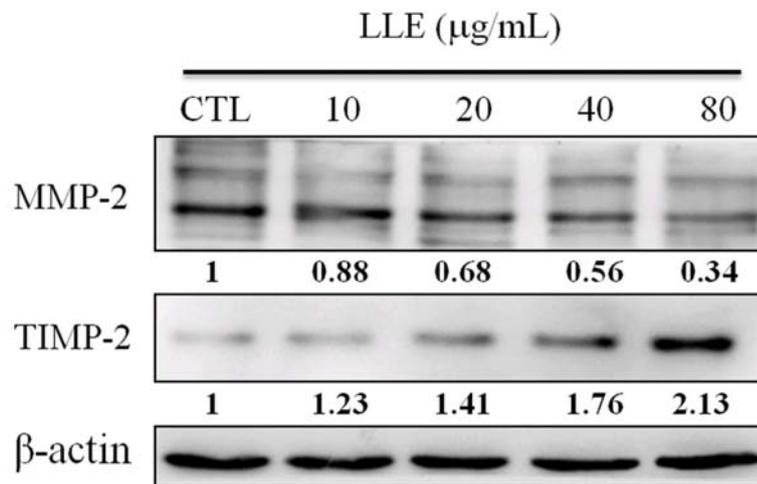


Figure 20. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 其 MMP-2 及內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現影響

將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24 小時後，收集 total cell lysate 以 western blot 分析 MMP-2 及 TIMP-2 的蛋白表現，並以 β -actin 表現量當作對照比較。

Figure 21

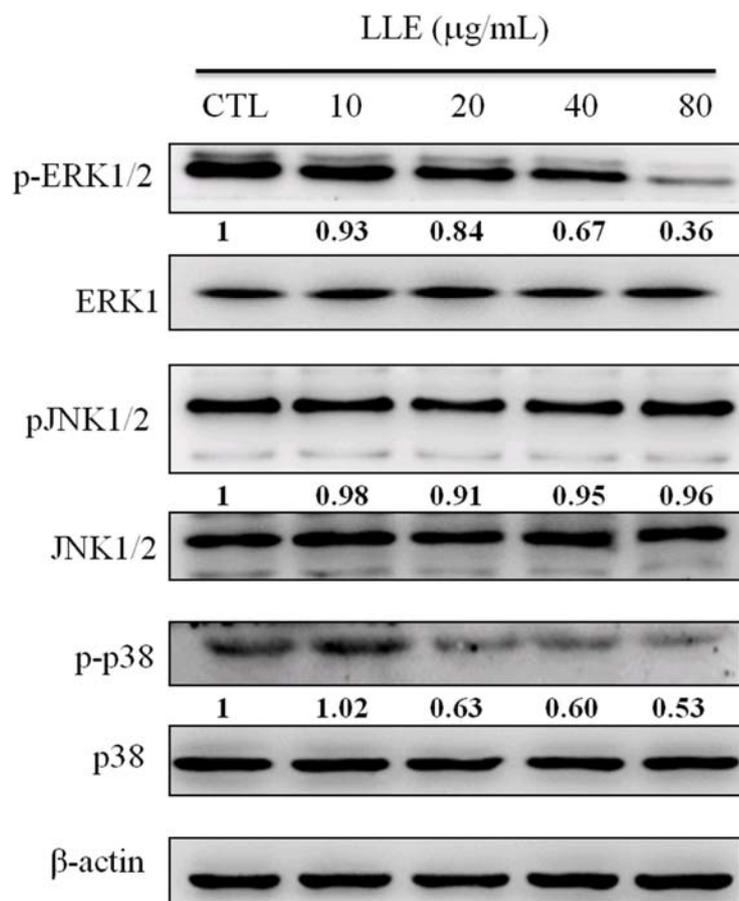


Figure 21. 銀合歡萃取物對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 其訊息傳遞蛋白 ERK1/2、JNK1/2 與 p38 磷酸化表現之影響

將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的銀合歡萃取物 (0、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 處理 6 小時後，收集 total cell lysate 以 Western blot 分析 ERK、p-ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2、p38 和 p-p38 的蛋白表現，並以 β -actin 表現量當作對照比較。

Figure 22

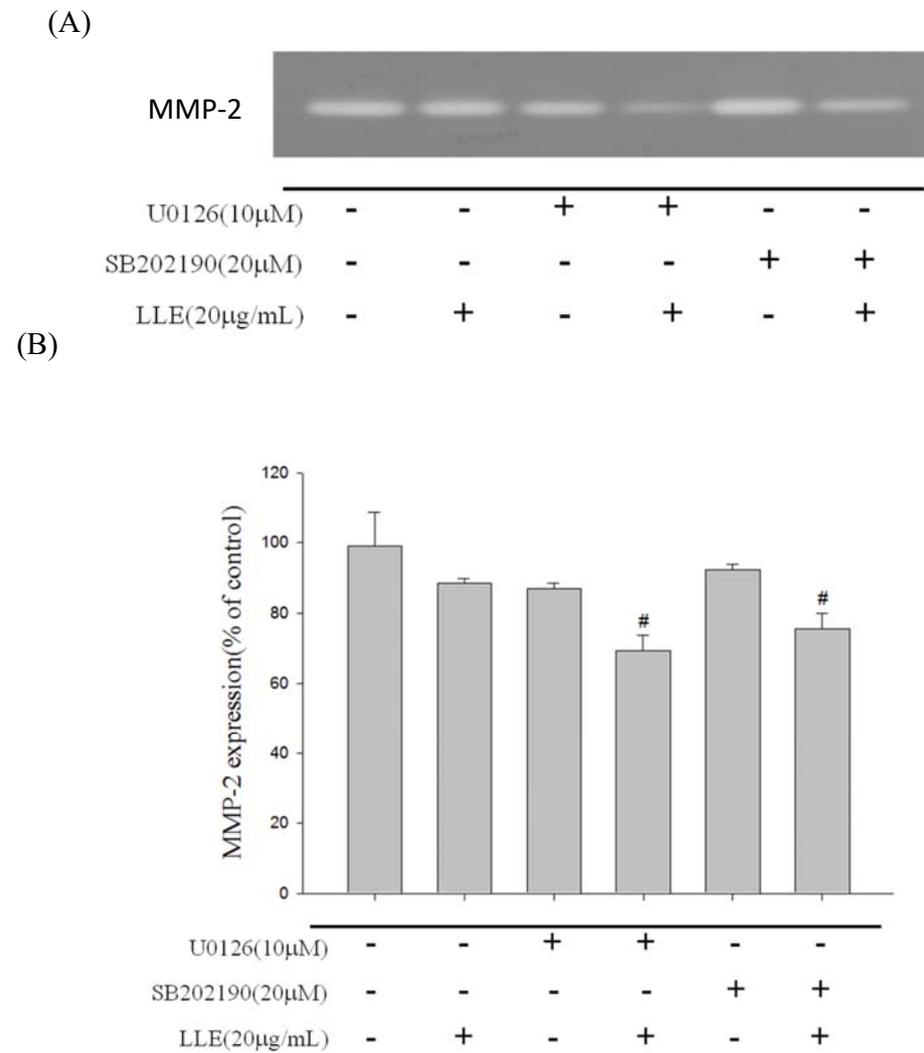
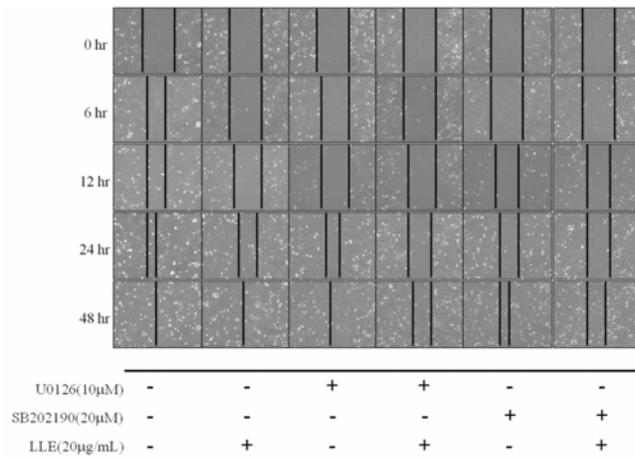


Figure 22. 銀合歡萃取物與 ERK1/2 及 p38 抑制劑對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 分泌 MMP-2 的影響

(A) 將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，使用含 10%FBS 培養液分別加入 ERK1/2 抑制劑-U0126(10 μM)、p38 抑制劑-SB202190 (20μM) 條件依序為 0、20、U0126、U0126+LLE、SB202190、SB202190+LLE，經抑制劑處理 1 小時後，給予相同濃度的銀合歡萃取物 (20 μg/mL) 處理 23 小時後，將 MTT 試驗所收集的 medium 進行跑膠。(B) 其量化結果與單獨處理 20 μg/mL 銀合歡萃取物之對照組做比較。(#, $p < 0.05$ 與單獨加入銀合歡萃取物對照比較)

Figure 23

(A)



(B)

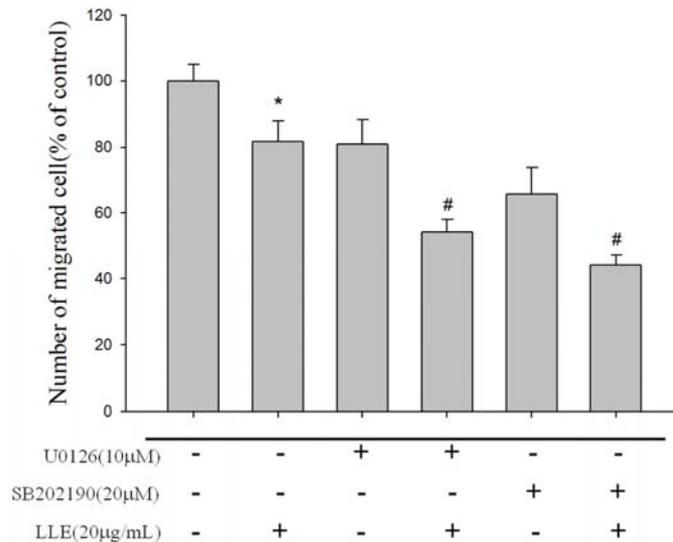
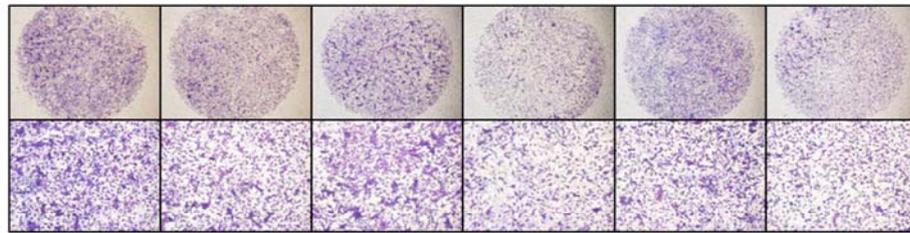


Figure 23. 銀合歡萃取物與 ERK1/2 及 p38 抑制劑對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞爬行能力影響

(A)將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，使用含 10%FBS 培養液分別加入 ERK1/2 抑制劑-U0126 (10 μ M)、p38 抑制劑-SB202190(20 μ M) 條件依序為 0、20、U0126、U0126+LLE、SB202190、SB202190+LLE，經抑制劑處理 1 小時後，給予相同濃度的銀合歡萃取物(20 μ g/mL)處理 23 小時後，處理 0、6、12、24 小時及 48 小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的速度，並拍照記錄。(B)其量化結果與單獨處理 20 μ g/mL 銀合歡萃取物之對照組做比較。(*, $p < 0.05$ 與 control 組對照比較；#, $p < 0.05$ 與單獨加入銀合歡萃取物對照比較)

Figure 24

(A)



U0126(10 μ M)	-	-	+	+	-	-
SB202190(20 μ M)	-	-	-	-	+	+
LLE(20 μ g/mL)	-	+	-	+	-	+

(B)

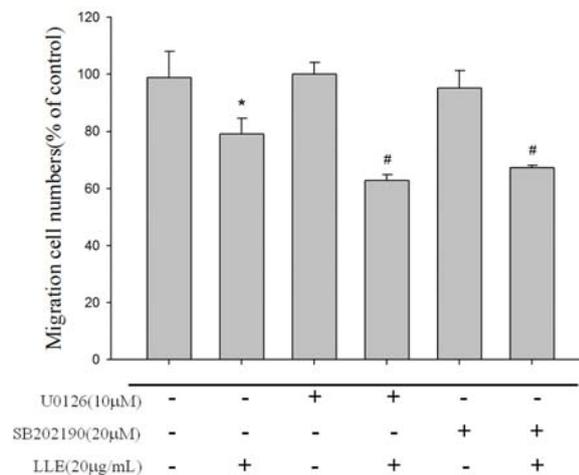


Figure 24. 銀合歡萃取物與 ERK1/2 及 p38 抑制劑對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 細胞移動能力的影響

(A)將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，使用含 10%FBS 培養液分別加入 ERK1/2 抑制劑-U0126 (10 μ M)、p38 抑制劑-SB202190 (20 μ M) 條件依序為 0、20、U0126、U0126+銀合歡、SB202190、SB202190+銀合歡，經抑制劑處理 1 小時後，給予相同濃度的銀合歡萃取物(20 μ g/mL) 處理 23 小時後，以 Boyden chamber migration assay 使癌細胞在 8 μ m 的薄膜進行 migration 試驗，之後將薄膜染色，並照相記錄細胞爬行能力。(B)其量化結果與單獨處理 20 μ g/mL 銀合歡萃取物之對照組做比較。(*, $p < 0.05$ 與 control 組對照比較；#, $p < 0.05$ 與單獨加入銀合歡萃取物對照比較)

子計畫三：標靶口腔癌幹細胞特性研究：幹源標誌臨床意義、反轉化療放療抗性、與治療標的之研發

(一) 研究計畫之背景及目的

近年來，在體外實驗中，證明了數量少的亞群細胞具有形成癌細胞群落的能力(1)；在活體內移植實驗中，在老鼠身上需要注射 10^5 - 10^6 顆癌細胞才具備形成腫瘤的能力(2)，這些發現顯示似乎並非每一顆癌細胞都具有生成腫瘤的能力。目前研究發展出兩個主要的模型來描述癌症發展的過程。隨機模式指每顆癌細胞具有相同的生長和分裂的潛力，都能促進腫瘤的生長(1)。科學家提出了另一個模型假說，指出在癌症中有一亞群細胞具有腫瘤生長不受控制的特性，並兼具幹細胞自我更新能力以及分化能力的趨使下，由不同表現行的癌細胞所構成，也就是癌症中所謂的癌症幹細胞(cancer stem cells, CSCs)，或是稱為腫瘤起始細胞(tumor initiating cells, TICs)才可以生成腫瘤(3)。惡性腫瘤來自幹細胞的概念源自於150年前一位德國的病理學家Robert Virchow已有的一種假說，他觀察到胚胎與腫瘤組織上具有相似的情形，如細胞核質比例非常高。此理論稱之為“embryonal rest”假說，意指成人組織中含有胚胎的殘餘，通常處於休眠狀態，但在生命週期晚期可能會激活變成癌細胞(2)。因此，目前定義癌症幹細胞在腫瘤中具有自我更新能力(self-renewal)可以形成新的腫瘤的細胞，及維持腫瘤異質性(1)，是主要造成癌細胞產生抗藥性及癌細胞轉移惡化的一個主要原因，造成口腔癌病人復發及難以根治。因此，若要完全消除腫瘤並防止其復發，癌症幹細胞將是最重要的標靶。癌症幹細胞對口腔癌的起始及化療阻抗性之角色已被證實(4-6)，臨床方面，口腔癌癌症幹細胞標記與腫瘤惡性程度呈正相關性，可用來當做口腔癌患者存活率之預後指標(7)。癌症幹細胞模式不只有在基礎癌症研究上具有重大的意義在臨床癌症治療也具有重要的意涵。因此針對癌症幹細胞的新標靶治療法的研發，將有助於口腔癌病患對傳統化療藥物之不適，期待能提昇化療敏感性及病患存活率。故本子計畫第一部分探討長期檳榔鹼處理對口腔上皮細胞癌幹細胞特性影響，並探討其微核醣核酸表現，是否可作為口腔癌幹細胞之標靶治療之可行性(已發表於 [Oncotarget. 2016;7\(51\):84072-84081](#))。第二部分探討癌幹細胞表面標記CD133對口腔癌幹細胞子族群細胞化療抗藥性影響(已發表於 [Head Neck. 2016;38 :E231-8](#).)

(二) 研究結果

第一部分：

2.1 口腔上皮細胞長期暴露於檳榔素能增加癌幹細胞標記醛脫氫酶活性

醛脫氫酶 (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) 被發現在幹細胞與癌症幹細胞中有高度活性(56)，因此去研究探討檳榔素是否影響口腔上皮細胞中ALDH之比例。將口腔上皮細胞SG及FaDu處理不同濃度之檳榔素(0 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 及10 $\mu\text{g/mL}$)長期處理三個月，並利用流式細胞儀進行分析醛脫氫酶活性表現。結果顯示SG及FaDu在檳榔素的長期作用下，能明顯增加醛脫氫酶活性表現並呈現濃度依賴(圖一)。

2.2 口腔上皮細胞長期暴露於檳榔素能增加口腔癌幹性

為進一步檳榔素是否具有促進癌幹細胞自我更新之特性，利用無血清培養液以及低貼附性材質之培養皿進行培養，SG及FaDu兩株口腔上皮細胞在長期檳榔素處理下皆能增殖並形成幹細胞球體(sphere)。然而自我更新是維持癌症幹細胞增生的首要要件，經過繼代培養，檳榔素更能增進SG及FaDu其幹細胞球體的大小和數量(圖二)。研究顯示在口腔癌病理組織中胚胎幹細胞標記Nanog、Oct-4、Sox2。與癌症幹細胞的形成機制及病理意義相關(55)，因此

本研究利用西方墨點法探討檳榔素是否影響口腔癌幹細胞相關標記之表現量。研究發現長期處理檳榔素能增加 SG 和 FaDu 細胞的 Nanog、Oct-4、Sox2 蛋白表現量(圖三)。證實長期處理檳榔素會增加口腔上皮細胞的癌幹細胞特性。

2.3 口腔上皮細胞長期暴露於檳榔素能促進其活體(in vivo)及體外(in vitro)之腫瘤生成能力

腫瘤轉移是造成癌症死亡的主因，癌細胞透過血液、淋巴管等方式轉移而續發成惡性腫瘤，癌症幹細胞於癌轉移扮演重要角色。本研究想更進一步探討長期處理檳榔素是否會影響口腔上皮細胞移動及侵襲能力。研究發現相較於控制組，發現長期暴露於檳榔素之SG及FaDu口腔上皮細胞的爬行能力(圖四)及侵襲能力(圖五)明顯上昇。接著觀察兩株口腔上皮細胞之軟瓊脂細胞群落生成之差異，與控制組相比，發現長期處理檳榔素有效增加SG及FaDu之細胞群落形成能力(圖六)。在活體動物實驗方面，將長期處理檳榔素的FaDu和未處理檳榔素的控制組FaDu打入裸鼠背上皮下，觀察腫瘤生長情況。經過 25 天的觀察，使用非侵入式活體分子影像系統(Caliper IVIS system)進行分析，發現長期處理檳榔素的FaDu細胞會造成裸鼠腫瘤生成，控制組則無法產生腫瘤(圖七)。腫瘤生長曲線圖如圖七所示，由此得知檳榔素促進腫瘤生成能力具有顯著意義。顯示長期處理檳榔素會增加口腔上皮細胞其活體外及活體內的致癌力。

2.4 口腔上皮細胞長期暴露於檳榔素能增進上皮間質轉換過程

EMT 過程已被證實與癌幹細胞特性高度相關。發現長期處理檳榔素後，會造成口腔上皮細胞型態從原本的角狀型態變成拉長的細胞型態，利用西方墨點法觀察長期檳榔素處理會增加間葉型態標記蛋白表現量如 snail、slug、twist 和 vimentin 的表現量，而抑制上皮標記 E-cadherin 的蛋白表現量(圖八)。

2.5 檳榔素長期暴露能抑制口腔上皮細胞之微型 RNA microRNA-145 表現

已有許多文獻指出微型 RNA 及其標的基因會調控癌症幹細胞特性，可作為良好的治療方式(55)。因此本研究欲探討檳榔素長期處理口腔上皮細胞之相關微型 RNA，使用不同濃度之檳榔素(0 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 及 10 $\mu\text{g/mL}$)處理 SG 及 FaDu 長達三個月。再利用微型 RNA 微陣陣(microarray)分析，軟體分析結果顯示，相較於未處理檳榔素的控制組，長期處理檳榔素會抑制 miR-145 的表現。接著以微型 RNA 的反轉錄聚合酶鏈鎖反應證實檳榔素的確會調控 miR-145 表現量，隨著檳榔素濃度增加，口腔上皮細胞之 miR-145 的表現隨之減少(圖九)。

2.6 過度表現微型 RNA miR-145 可降低檳榔素誘發之癌幹細胞特性及體外致癌力

由上述實驗得知檳榔素可能透過抑制 miR-145 表現促進口腔上皮細胞的癌幹性及腫瘤化，因此我們想探討增加 miR-145 表現是否能反轉檳榔素所造成的影響。首先建構 miR-145 過度表現的病毒載體並送進長期處理檳榔素的 SG 與 FaDu 中，以以微型 RNA 的反轉錄聚合酶鏈鎖反應確認 miR-145 在細胞中過度表現(圖十)，再利用西方墨點法觀察，發現 miR-145 過度表現會減少被檳榔素所誘發的 Oct4、Sox2 蛋白量(圖十)。miR-145 過度表現也會抑制被檳榔素所增加的幹細胞球體形成能力(圖十一)。此外，miR-145 過度表現還會降低檳榔素所誘發的軟瓊脂細胞群落形成能力(圖十二)和侵襲力(圖十三。)因此證實 miR-145 會抑制檳榔素所誘發的癌症幹細胞特性。

2.7 微型 RNA miR-145 可直接調控 Oct4 及 Sox2

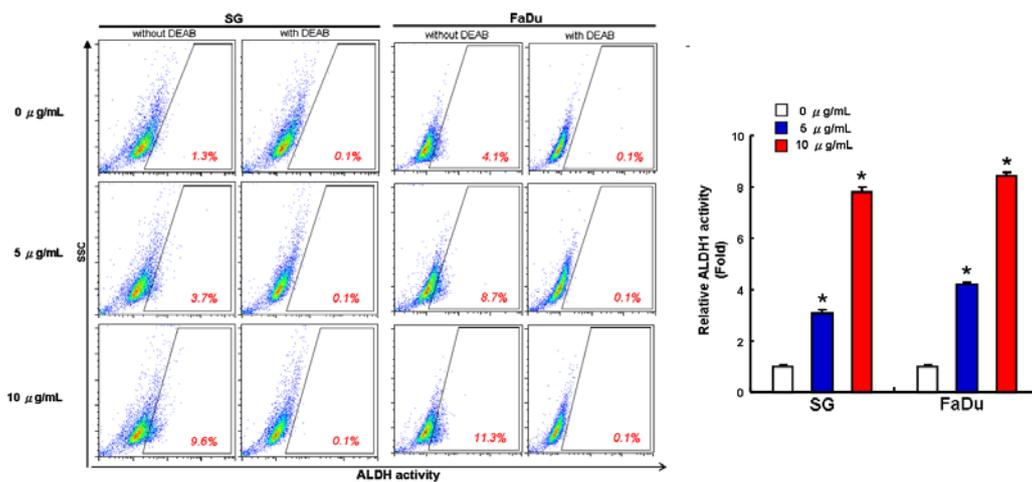
先以 Target Scan Human 網站 (<http://www.targetscan.org/>) 預測 miR-145 之標靶基因，選取 Oct4 及 Sox2 作為實驗目標，並可得 Oct4 及 Sox2 基因之 3'UTR 序列(野生型, wide type)，將此序列改變成不配對序列(突變型, mutant type)(圖十四)。利用 Luciferase assay 可確認

Oct4 及 Sox2 是否為 miR-145 之標靶基因。實驗發現，miR-145 會抑制野生型 Oct4、Sox2 的表現量，對突變型 Oct4、Sox2 則無抑制效果(圖十四)。代表 Oct4、Sox2 的確是 miR-145 的標靶基因，由上述結果可知 miR-145 直接調控 Oct4、Sox2。

2.8 過度表現 miR-145 可降低檳榔素誘發之活體腫瘤生成能力

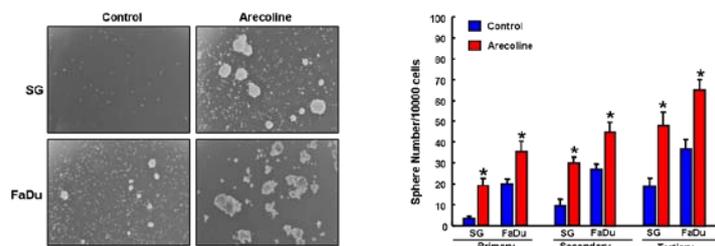
已知過度表現 miR-145 可衰減檳榔素所誘發的癌幹細胞特性及體外腫瘤生成能力，進一步想探究過度表現 miR-145 對檳榔素誘發之活體腫瘤生成力影響。將長期處理檳榔素的 FaDu 打入裸鼠兩側背上皮下，等兩個禮拜後腫瘤長到約一定大小，再每三天打入控制組病毒載體或 miR-145 過度表現病毒載體，等一個月後觀察腫瘤大小。一個月後使用非侵入式活體分子影像系統(Caliper IVIS system)進行分析，相對於控制組，檳榔素所誘發的腫瘤會被 miR-145 抑制(圖十五)。可將 miR-145 視為新的治療標的，以期為口腔癌治療拓展新方向。

圖表



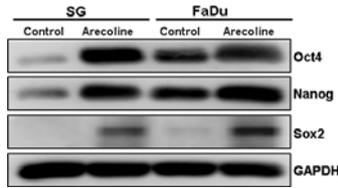
圖一、長期檳榔素處理口腔上皮細胞可增強癌幹細胞標記 ALDH1 表現量

利用流式細胞儀分析口腔上皮細胞株(SG 及 FaDu)在不同濃度(5 μg/mL 及 10 μg/mL)檳榔素三個月長期處理後之 ALDH1 表現量。 *代表 p<0.05



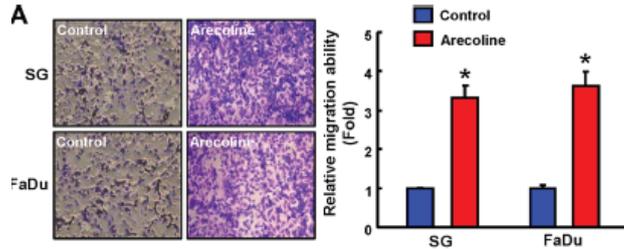
圖二、長期檳榔素處理口腔上皮細胞可增強癌幹細胞球體形成能力

長期檳榔素處理口腔上皮細胞利用癌幹細胞球體實驗進行繼代培養，觀察癌症幹細胞自我更新之能力。*代表 p<0.05。



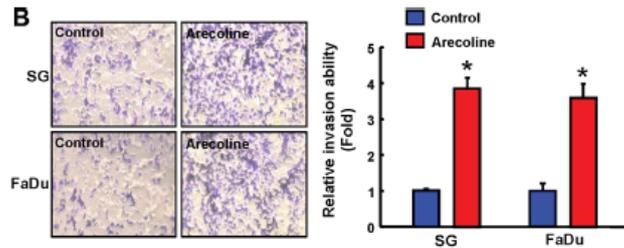
圖三、長期檳榔素處理口腔上皮細胞之 Oct4、Nanog、Sox2 之蛋白質表現增加

西方墨點法分析長期檳榔素處理口腔上皮細胞 SG 與 FaDu 之幹細胞轉錄因子如(Nanog、Oct4、Sox2)蛋白質表現量，GAPDH 蛋白質作為控制組。



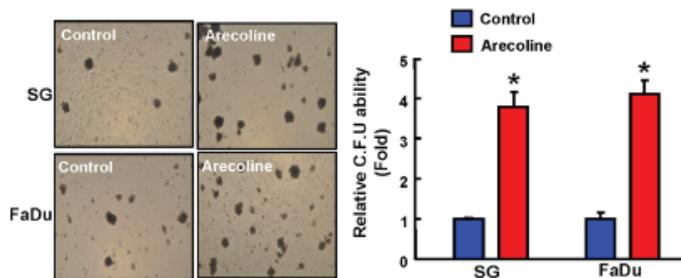
圖四、長期檳榔素處理口腔上皮細胞之細胞爬行能力

長期檳榔素處理口腔上皮細胞培養於轉移盤(transwell)上盤，經過 24 小時培養，檳榔素能增加細胞的爬行能力。*代表 $p < 0.05$ 。



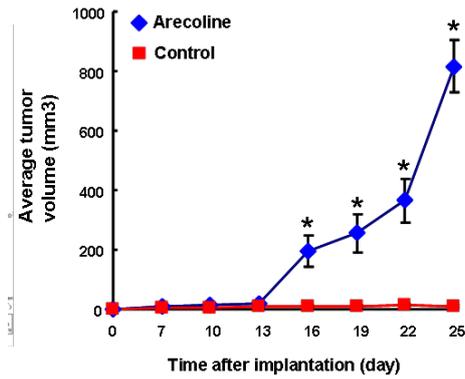
圖五、長期檳榔素處理口腔上皮細胞之細胞侵襲能力

長期檳榔素處理口腔上皮細胞培養於鋪有 matrigel 轉移盤(transwell)上盤，經過 48 小時培養，檳榔素能促進細胞的侵襲能力。*代表 $p < 0.05$ 。



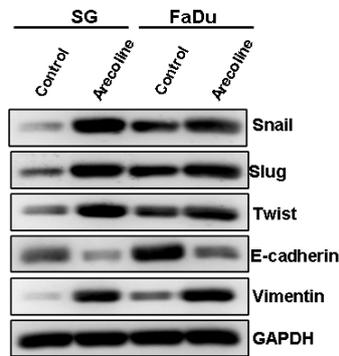
圖六、長期檳榔素處理口腔上皮細胞之軟瓊脂細胞群落生成差異

長期檳榔素處理口腔上皮細胞培養於培養液與軟瓊脂混合的物質上十四天後，檳榔素能提升細胞群落生成能力。*代表 $p < 0.05$ 。



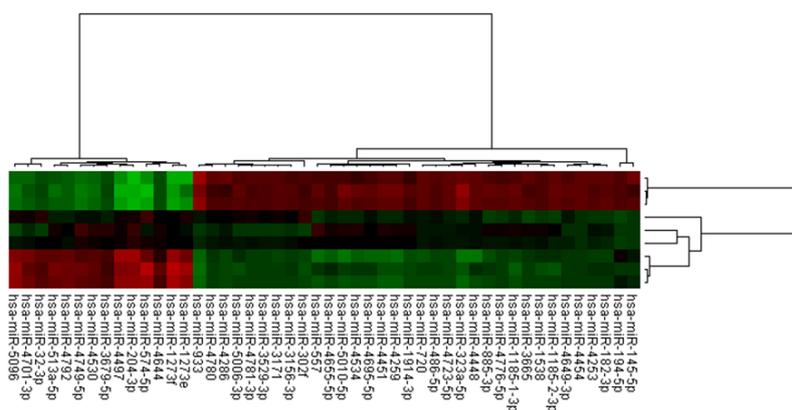
圖七、長期檳榔素處理口腔上皮細胞之活體腫瘤生成力評估

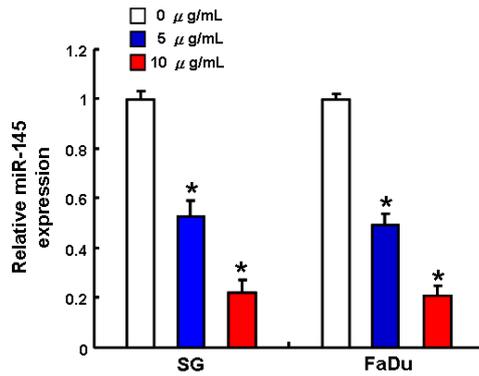
利用異種移植將長期檳榔素處理口腔上皮細胞打於裸鼠皮下，使用非侵入式活體分子影像系統(Caliper IVIS system)進行分析並觀察腫瘤生成能力。



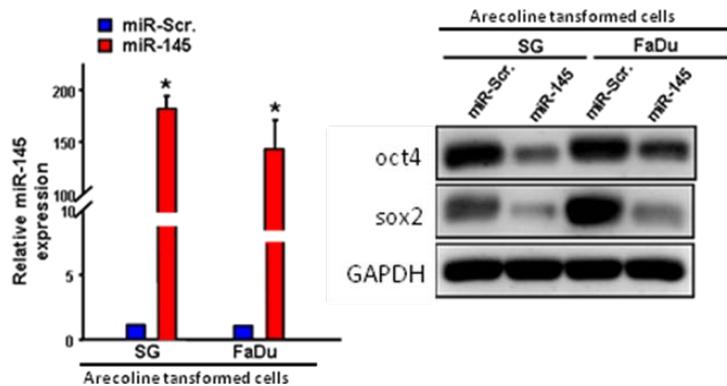
圖八、長期檳榔素處理口腔上皮細胞之上皮間質轉換過程標記表現量

利用西方墨點法分析長期檳榔素處理口腔上皮細胞之上皮間質轉換過程標記如(Snail、Slug、Twist、E-cadherin 及 Vimentin)蛋白質表現量，GAPDH 蛋白質作為控制組。



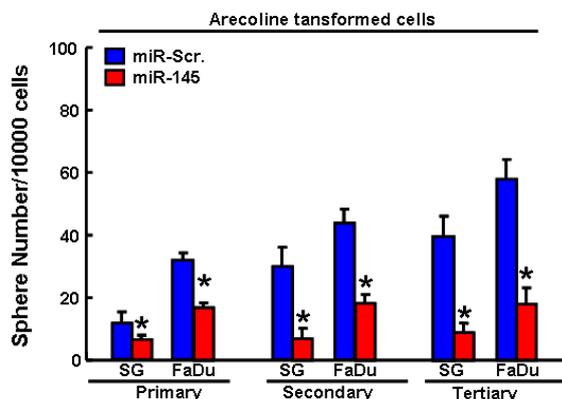


圖九、利用微型 RNA 微矩陣分析長期檳榔素處理口腔上皮細胞之 miR-145 表現量降低
 不同濃度(5 μg/mL 及 10 μg/mL)檳榔素三個月長期處理口腔上皮細胞 SG 及 FaDu，利用微型 RNA 微矩陣及聚合酵素鏈鎖反應分析細胞中 microRNA-145 的表現。數值分析利用 Student's t-test 分析。*代表 p<0.05。



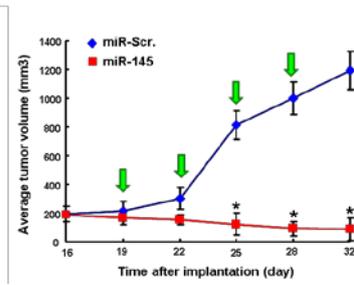
圖十、miR-145 過度表現可降低檳榔素誘發之 Oct4 及 Sox2 表現量

以慢病毒過度表現 miR-145 於口腔上皮細胞 SG 及 FaDu，利用微核糖核酸聚合酵素鏈鎖反應分析細胞中 microRNA-145 的表現。利用西方墨點法分析過度表現 miR-145 之長期處理檳榔素口腔上皮細胞之 Oct4 及 Sox2 蛋白表現量，GAPDH 蛋白質作為控制組。



圖十一、miR-145 過度表現可降低檳榔素誘發之癌幹細胞球體形成能力

以慢病毒過度表現 miR-145 於長期處理檳榔素口腔上皮細胞 SG 及 FaDu，利用癌幹細胞球體實驗評估自我更新之能力。數值以平均值(標準差)顯示，數值分析利用 Student's t-test 分析。

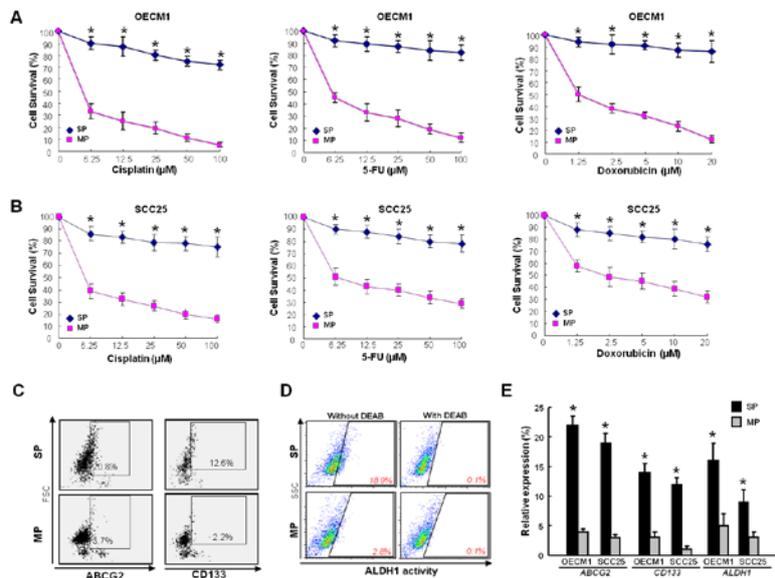


圖十五、miR-145 過度表現可降低檳榔素誘發活體腫瘤生成能力

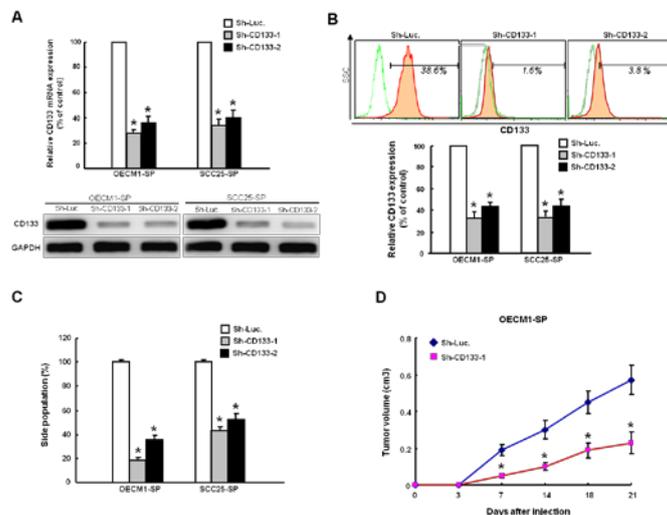
利用裸鼠異種移植模式將長期處理檳榔素的 FaDu 打入裸鼠皮下，以 miR-145 進行治療，並觀察腫瘤生成能力。並使用非侵入式活體分子影像系統 (Caliper IVIS system) 進行分析。

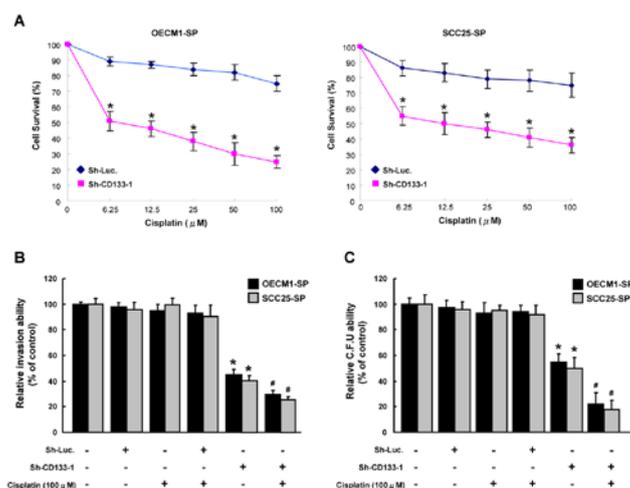
第二部分：

2.9. 口腔癌子族群癌幹細胞具備抗藥性特性且高度表現 CD133 及抗藥性標記 ABCG2



2.10. 降低 CD133 表現可降低子族群細胞及活體腫瘤生成力及增進子族群細胞對化療藥物敏感性





參考文獻:

1. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer*. 2008;8:755-68.
2. Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature reviews Cancer*. 2005;5:311-21.
3. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*. 2009;324:1670-3.
4. Yu CC, Tsai LL, Wang ML, Yu CH, Lo WL, Chang YC, et al. miR145 targets the SOX9/ADAM17 axis to inhibit tumor-initiating cells and IL-6-mediated paracrine effects in head and neck cancer. *Cancer research*. 2013;73:3425-40.
5. Lo JF, Yu CC, Chiou SH, Huang CY, Jan CI, Lin SC, et al. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. *Cancer research*. 2011;71:1912-23.
6. Yu CC, Chen YW, Chiou GY, Tsai LL, Huang PI, Chang CY, et al. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumourigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. *Oral oncology*. 2011;47:202-10.
7. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14:4085-95.

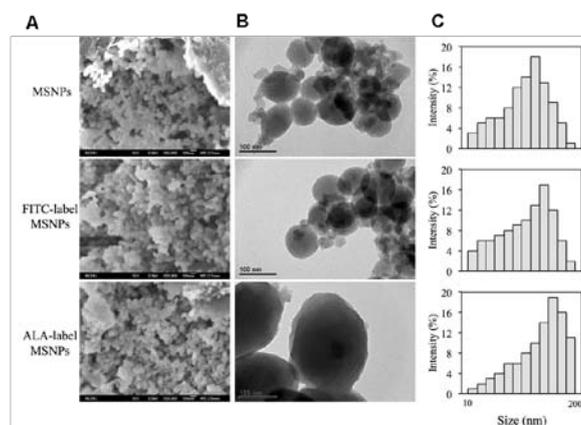
子計畫四：5-胺基酮戊酸奈米化光動力療法於口腔癌前病變及口腔癌治療應用性及其作用機轉之探討 (一) 研究計畫之背景及目的

奈米藥物包括藥物直接奈米化和奈米藥物載體系統。奈米藥物粒徑小、表面積大，物理、化學和生物學性都比較高，與傳統藥物相比，能有效提高藥效，降低不良反應，為目前生醫研究的熱門議題(1)。藥物經奈米化後，其物理化學性質如飽和溶解度、溶出速度、晶型、顆粒表面疏水親水性，物理響應性如光、電、磁場響應性、pH 敏感性、溫度敏感性等，以及生物特性如分子親和力發生改變，進而影響藥物的吸收、代謝和排泄等動力學特性，甚至達到緩釋/控釋與標靶傳輸的釋放功能(2-4)。現在常用的奈米藥物載體系統如下：(一): Solid lipid nanoparticles (SLN，固體脂質奈米顆粒)。(二):

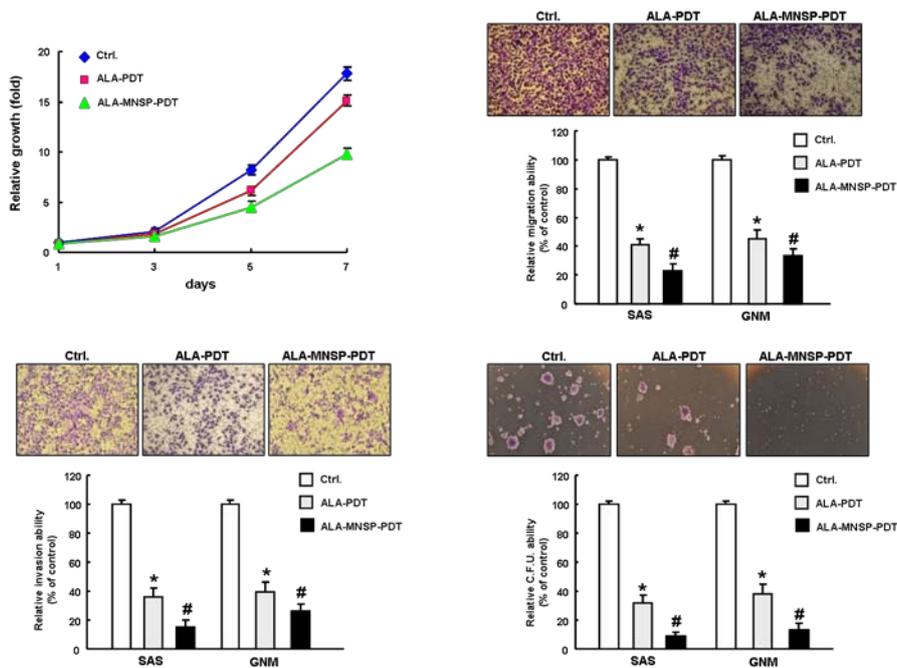
Microemulsion (ME, 微乳)。(三): Polymer nanoparticles (聚合物奈米顆粒)。(四): Polymeric micelles (高分子微胞)。(五): Nanoliposome (奈米微脂體)。(六): Dendrimers (樹狀大分子)。(七): Nanosuspension (奈米懸浮液)。整體而言, 奈米藥物的優勢可歸類為以下幾點: 增強藥物靶向性、更準確的針對特定組織或器官給藥、增強緩控釋性(提高藥物生物利用度、增加藥物穩定性、高療效低毒性、建立新的給藥途徑及減少副作用)。光動力治療(Photodynamic therapy)為新穎的癌症治療方式。光動力療法最主要的二個原素為光和光感物質(5)。施行此種療法時, 患者通常先需服用一種光感物質製劑, 讓腫瘤細胞吸收此種光感物質後, 再以特殊波長的光, 照射腫瘤細胞, 加以激發及殺死腫瘤細胞。當腫瘤組織中的光感物質以特殊波長的光加以激發時, 光會將其能量轉移至氧分子, 導致形成活性氧物質, 此活性氧物質即可將腫瘤細胞直接殺死, 或可破壞腫瘤中的血管系統, 形成血栓, 造成腫瘤細胞壞死 (5)。也有學者認為光動力治療, 可以激發人體的免疫系統, 以進一步殺死腫瘤細胞。5-氨基酮戊(5-aminolevulinic acid, ALA) 為新研發的第二代光感藥物 (photosensitizer)。ALA 光動力治療可以成功的用於診斷及治療人體的癌症或癌前病變。根據過去學者之研究, 利用 ALA 之光動力治療, 可用於治療食道癌、膀胱癌, 皮膚癌和口腔癌 (5-10)近年來奈米藥物應用於疾病治療及診斷已是全球熱門趨勢, 本計畫欲利用奈米藥物結合光動力治療, 期待應用於口腔癌防治。

(二) 研究結果

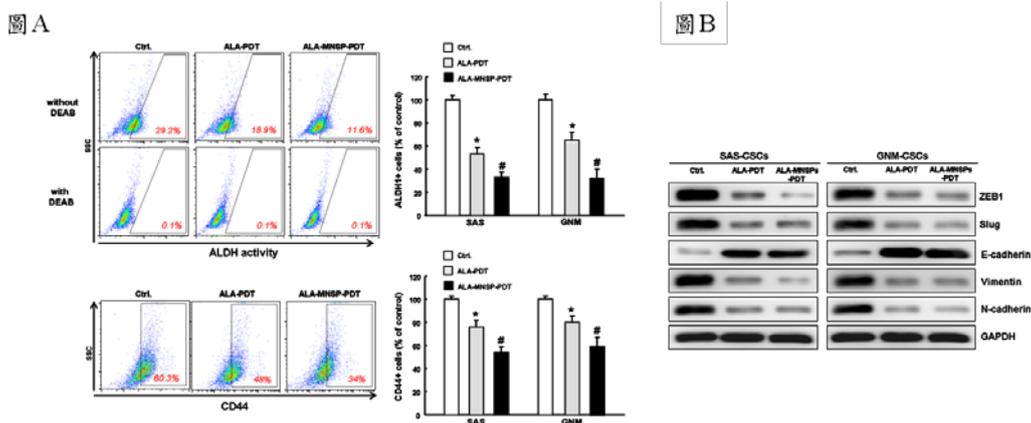
2.1. 5-氨基酮戊酸奈米微粒製備。奈米微粒使用(A)掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscope, SEM) 及穿(B)透視電子顯微鏡 (Transmission electron microscope, TEM) 分析其微結構, 再利用(C)動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS) 分析其粒徑分布。



2.2. 5-氨基酮戊酸奈米微粒光動力治療可增強抑制癌細胞增生率、細胞轉移力、細胞侵襲性、及細胞群落形成能力



2.4. 5-氨基酮戊酸奈米微粒光動力治療可增強抑制癌幹細胞(ALDH1 及 CD44)標記及上皮間質轉化標記表現



參考文獻:

- Rosen H, Abribat T. The rise and rise of drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:381-5.
- Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:2177-202.
- Moshfeghi AA, Peyman GA. Micro- and nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:2047-52.
- Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today.* 2003;8:1112-20.
- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews Cancer.* 2003;3:380-7.
- Chen HM, Chen CT, Yang H, Kuo MY, Kuo YS, Lan WH, et al. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Oral oncology.* 2004;40:630-7.
- Chen HM, Yu CH, Tu PC, Yeh CY, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Lasers in surgery and medicine.* 2005;37:114-22.

8. Lin HP, Chen HM, Yu CH, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Topical photodynamic therapy is very effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythroleukoplakia. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2010;39:624-30.
9. Yu CH, Lin HP, Chen HM, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Comparison of clinical outcomes of oral erythroleukoplakia treated with photodynamic therapy using either light-emitting diode or laser light. *Lasers in surgery and medicine*. 2009;41:628-33.
10. Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. *Oral oncology*. 2008;44:595-600.

105年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：張育超		計畫編號：105-2632-B-040-001-				
計畫名稱：口腔黏膜下纖維化症與口腔癌新穎生物標誌開發及有效治療之轉譯研究(3/3)						
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	8	篇	1. Environ Toxicol. 2017 Mar;32(3):1037-1046. 2. Environ Toxicol. 2017 Jun;32(6):1765-1774. 3. Environ Toxicol. 2017 Oct 6. doi: 10.1002/tox.22489. [Epub ahead of print] 4. Oncotarget. 2016 Dec 20;7(51):84072-84081. 5. Head Neck. 2016 Apr;38 Suppl 1:E231-8. 6. J Formos Med Assoc. 2016 May;115(5):311-7. 7. J Oral Pathol Med. 2015 Nov;44(10):823-30. 8. Oncotarget. 2015 Sep 15;6(27):24002-16.	
		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	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權	0			
		營業秘密	0	件		
		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		3		計畫之執行 收集資料	
	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）

1. Environ Toxicol. 2017 Mar;32(3):1037-1046.

2. Environ Toxicol. 2017 Jun;32(6):1765-1774.

3. Environ Toxicol. 2017 Oct 6. doi: 10.1002/tox.22489. [Epub ahead of print]

4. Oncotarget. 2016 Dec 20;7(51):84072-84081.

5. Head Neck. 2016 Apr;38 Suppl 1:E231-8.

6. J Formos Med Assoc. 2016 May;115(5):311-7.

7. J Oral Pathol Med. 2015 Nov;44(10):823-30.

8. Oncotarget. 2015 Sep 15;6(27):24002-16.

發表相關論文8篇 有助於口腔黏膜下纖維化症與口腔癌新穎生物標誌開發及治療之轉譯研究

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）