

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 研究甘草查爾酮A抑制人類肝癌細胞侵襲與上皮細胞-間質細胞 轉換之分子機制(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 101-2313-B-040-001-MY3  
執行期間：103年08月01日至104年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

計畫主持人：謝逸憲  
共同主持人：應宗和  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳筱昀  
                  博士班研究生-兼任助理人員：林主亮  
                  博士班研究生-兼任助理人員：林佳良

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 26 日

中文摘要：根據流行病學統計，肝癌在全球上係致死率排行第五名的癌症，由於有不良的預後結果和缺乏有效的治療方式，造成肝癌的高死亡率。肝癌患者往往會被診斷出癌細胞有轉移的症狀，而死於早期及遠端轉移發生。轉移是由一連串步驟所串連組成，包括細胞黏著、細胞外基質降解、細胞移行與侵襲。因此，能對抗轉移相關步驟的物質，就可能可以用來防止腫瘤細胞發生轉移，並增加癌症患者生存的機會。甘草查爾酮A(Licochalcone A)是甘草成分中最具有活性的化合物，且本身也是estrogenic 且屬於黃酮類分子。目前甘草查爾酮A 被發現的生物功能中包括：抗轉移、抗癌、抗發炎、抗氧化和細胞凋亡等多重功用。Sorafenib是一個針對晚期肝癌的標準治療藥物，也是第一個被證實可以有效地提升晚期肝癌存活率的藥物。Sorafenib最早是在一個發展Raf磷酸激酶抑制劑的計畫中被發展出來的藥物，然而過去的許多研究指出，Sorafenib有許多「標靶外作用」與其抗癌療效及抗藥性的產生有密切關係。

之前的研究證實甘草查爾酮A會專一性抑制JNK1/2磷酸化；同時加入JNK1/2抑制劑(SP600125)會加強甘草查爾酮A抑制u-PA蛋白和mRNA表現。同時也觀察到甘草查爾酮A也會抑制JNK上游蛋白MKK4磷酸化，但不影響MKK3/6磷酸化。我們利用siRNA-MKK4和甘草查爾酮A共同抑制uPA蛋白表現，同時也會抑制肝癌細胞移動和侵襲能力。本研究主要利用人類肝癌細胞株SK-Hep-1與Huh-7為實驗材料，探討甘草查爾酮A結合sorafenib影響肝癌細胞侵襲與轉移的分子機制。本實驗中發現甘草查爾酮A結合肝癌晚期標靶藥物Sorafenib，發現兩者藥物合併處理對於肝癌細胞的侵襲與轉移能力皆更顯著被抑制，同時也抑制MKK4/JNK/uPA途徑。綜合以上結論，sorafenib有潛力可以當作肝癌的治療標的，或者是療效以及預後的參考，而Sorafenib合併使用甘草查爾酮A也是一個有潛力的治療方式，冀望未來有機會發展為治療肝癌晚期的新策略。

中文關鍵詞：肝癌、甘草查爾酮A、細胞移動、細胞侵襲、尿激酶型血纖維蛋白溶解酶原活化因子、索拉非尼

英文摘要：epatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer-caused death in the world. The poor prognosis and effectiveness of treatment method cause high mortality of HCC. Licochalcone A is the main active compound of the licorice species *Glycyrrhiza inflata*, and is an estrogenic flavonoid with anti-metastatic, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-angiogenic, anti-oxidant and apoptosis effects. Sorafenib is a drug for standard systemic therapy in patients with advanced HCC (hepatocellular carcinoma), and it is also the first drug with survival benefits. Although sorafenib was originally designed as a specific Raf kinase inhibitor, we and other investigators have found many off-target effects of sorafenib that may have significant implications regarding its anti-tumor activity and resistance mechanisms of sorafenib in HCC cells. From our previously results, LicA specifically inhibited phosphorylation of JNK1/2, and inhibition of JNK1/2 by

JNK1/2 inhibitor significantly enhanced the Licochalcone A-inhibited u-PA activity, protein and mRNA expression. LicA also inhibit phosphorylation of MKK4, LicA combined siMKK4 were significantly inhibits uPA protein and mRNA expression, and it's also reduced HCC cell migration and invasion. In exploring the clinical application of a combination of sorafenib and LicA, we found that it synergistically inhibited cell migration and invasion in HCC cells. The synergistic efficacy was associated with the suppression of phosphorylation of MKK4/JNK and downregulation of uPA expression in HCC cells. In conclusion, the results indicate sorafenib combined with LicA could be of potential therapeutic value in the future.

英文關鍵詞：Hepatocellular carcinoma; migration; invasion; Sorafenib; urokinase plasminogen activator

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

## 研究甘草查爾酮 A 抑制人類肝癌細胞侵襲與上皮 細胞-間質細胞轉換之分子機制

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2313-B-040 -001 -MY3

執行期間：103/08/01 ~ 104/07/31

執行機構及系所：醫學系生化學科

計畫主持人：謝逸憲

共同主持人：應宗和

計畫參與人員：林佳良、林主亮

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，  
(請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中 華 民 國 104 年 10 月 26 日

## 目錄

頁次

中文摘要及關鍵詞.....	3
英文摘要及關鍵詞.....	4
報告內容	
前言.....	5
研究目的.....	6
文獻探討.....	6
參考文獻.....	8
方法及材料.....	12
結果與討論.....	17

## 中文摘要

根據流行病學統計，肝癌在全球上係致死率排行第五名的癌症，由於有不良的預後結果和缺乏有效的治療方式，造成肝癌的高死亡率。肝癌患者往往會被診斷出癌細胞有轉移的症狀，而死於早期及遠端轉移發生。轉移是由一連串步驟所串連組成，包括細胞黏著、細胞外基質降解、細胞移行與侵襲。因此，能對抗轉移相關步驟的物質，就可能可以用來防止腫瘤細胞發生轉移，並增加癌症患者生存的機會。甘草查爾酮 A(Licochalcone A)是甘草成分中最具有活性的化合物，且本身也是 estrogenic 且屬於黃酮類分子。目前甘草查爾酮 A 被發現的生物功能中包括：抗轉移、抗癌、抗發炎、抗氧化和細胞凋亡等多重功用。Sorafenib 是一個針對晚期肝癌的標準治療藥物，也是第一個被證實可以有效地提升晚期肝癌存活率的藥物。Sorafenib 最早是在一個發展 Raf 磷酸激酶抑制劑的計畫中被發展出來的藥物，然而過去的許多研究指出，Sorafenib 有許多「標靶外作用」與其抗癌療效及抗藥性的產生有密切關係。

之前的研究證實甘草查爾酮 A 會專一性抑制 JNK1/2 磷酸化；同時加入 JNK1/2 抑制劑(SP600125)會加強甘草查爾酮 A 抑制 u-PA 蛋白和 mRNA 表現。同時也觀察到甘草查爾酮 A 也會抑制 JNK 上游蛋白 MKK4 磷酸化，但不影響 MKK3/6 磷酸化。我們利用 siRNA-MKK4 和甘草查爾酮 A 共同抑制 uPA 蛋白表現，同時也會抑制肝癌細胞移動和侵襲能力。本研究主要利用人類肝癌細胞株 SK-Hep-1 與 Huh-7 為實驗材料，探討甘草查爾酮 A 結合 sorafenib 影響肝癌細胞侵襲與轉移的分子機制。本實驗中發現甘草查爾酮 A 結合肝癌晚期標靶藥物 Sorafenib，發現兩者藥物合併處理對於肝癌細胞的侵襲與轉移能力皆更顯著被抑制，同時也抑制 MKK4/JNK/uPA 途徑。綜合以上結論，sorafenib 有潛力可以當作肝癌的治療標的，或者是療效以及預後的參考，而 Sorafenib 合併使用甘草查爾酮 A 也是一個有潛力的治療方式，冀望未來有機會發展為治療肝癌晚期的新策略。

**關鍵詞：**肝癌、甘草查爾酮 A、細胞移動、細胞侵襲、尿激酶型血纖維蛋白溶解酶原活化因子、索拉非尼

## 英文摘要

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer-caused death in the world. The poor prognosis and effectiveness of treatment method cause high mortality of HCC. Licochalcone A (LicA) is the main active compound of the licorice species *Glycyrrhiza inflata*, and is an estrogenic flavonoid with anti-metastatic, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-angiogenic, anti-oxidant and apoptosis effects. Sorafenib is a drug for standard systemic therapy in patients with advanced HCC (hepatocellular carcinoma), and it is also the first drug with survival benefits. Although sorafenib was originally designed as a specific Raf kinase inhibitor, we and other investigators have found many off-target effects of sorafenib that may have significant implications regarding its anti-tumor activity and resistance mechanisms of sorafenib in HCC cells.

From our previously results, LicA specifically inhibited phosphorylation of JNK1/2, and inhibition of JNK1/2 by JNK1/2 inhibitor significantly enhanced the LicA-inhibited u-PA activity, protein and mRNA expression. LicA also inhibit phosphorylation of MKK4, LicA combined siMKK4 were significantly inhibits uPA protein and mRNA expression, and it's also reduced HCC cell migration and invasion. In exploring the clinical application of a combination of sorafenib and LicA, we found that it synergistically inhibited cell migration and invasion in HCC cells. The synergistic efficacy was associated with the suppression of phosphorylation of MKK4/JNK and downregulation of uPA expression in HCC cells. In conclusion, the results indicate sorafenib combined with LicA could be of potential therapeutic value in the future.

**Key word: Hepatocellular carcinoma; migration; invasion; Sorafenib; urokinase plasminogen activator**

## 前言

### 肝癌

根據世界衛生組織(WHO) 的最新統計,肝癌是全球第六大常見的癌症,也是癌症死亡的第三位原因,佔所有癌症的 7%,肝癌發生的模式有一個明確的地理分佈,在發病率高的國家,如亞洲與非洲國家[1]。開發中國家肝癌成為一個很大的醫療負擔。根據中華民國衛福部國民健康署的資料顯示,台灣肝癌治療領先亞洲,近年來在醫界共同努力之下,2015 年在台灣肝癌發生率排名已從榜首降到第二名,惡性腫瘤患者死亡中排名第二。台灣每年約有 8 千個新增肝癌病例,每年約有 7 千人死於肝癌[2]。肝癌的發生率隨著年齡而增加,大約在 70 歲達到一個高峰,另外有研究指出男性罹患肝癌的機率比女性還要高[3],至今原因不明,推測與性別間基因差異與生活習慣有關人類肝細胞癌本身是一種多元誘因的疾病,可能與以下幾點因素有關:(1) 肝硬化:肝硬化可能是肝癌的前兆,也可能是造成肝癌之原因,任何原因造成肝硬化之後均有機會變化成肝癌[4]。(2) 肝毒性物質:能使肝臟受損之毒性物質,其中最具代表性是由黴菌所產生的黃麴毒素。台灣由於溫度高、濕度大,黴菌易滋生,而食物中如稻米、玉米、花生等,是較易被黴菌污染而產生黃麴毒素[5]。(3) 肝炎病毒 (HBV 及 HCV): 肝癌的成因與肝炎病毒的感染與肝硬化最有關係。其中 B 型肝炎病毒與 C 型肝炎病毒的感染是肝癌形成之最重要元兇;在台灣,肝癌患者約有 80%曾感染 B 型肝炎,而非 B 型肝炎的肝癌病患則約有 60%曾感染 C 型肝炎[6]。西方國家肝癌患者則是 B 型肝炎約 20%,其餘都是由 C 型肝炎造成肝癌[7]。(4) 抽煙和喝酒因子:香煙中的尼古丁在肝臟分解,會造成肝臟的負擔[8];此外患者因飲酒過量,也會造成肝臟的負擔增加,因而影響肝功能,進一步演變脂肪肝、酒精性肝炎,甚至肝硬化最後導致肝癌的形成[9]。綜合以上幾點原因可以得知整個肝癌的形成可能包含不同的致癌物(抽煙、喝酒、黃麴毒素)、肝炎病毒(HBV、HCV) 的侵襲及肝硬化的因素,都可能造成肝癌的形成[10]。腫瘤細胞的侵襲與轉移( Cell invasion and metastasis )

### 腫瘤細胞的侵襲與轉移( Cell invasion and metastasis )

惡性腫瘤(malignant cancer)是指有侵襲 (invasion) 和轉移(metastasis) 能力的癌細胞,除了生長失控外,還會局部侵入週遭正常的器官組織(primary organ),甚至經由體內循環系統或淋巴系統轉移到身體其他器官組織[11]。腫瘤形成與轉移是一連串複雜調控步驟,包含(1)腫瘤細胞從原發部位發生並黏附於基底膜、(2)腫瘤細胞自我分泌刺激間質細胞產生蛋白水解酶,溶解基底膜與破壞胞外基質、(3)腫瘤細胞進入血管並透過血液循環進入目標器官、(4)在目標器官形成轉移性腫瘤[12]。當腫瘤直徑大於 0.5 mm 時,由於無法再藉由擴散作用由周圍細胞與環境中獲得足夠養分,此時腫瘤細胞變會釋放血管生長刺激因子,促使新生血管在腫瘤細胞周圍增生,經由血液提供養分以維持癌細胞存活,血管新生不僅提供癌細胞充足的營養,同時也提供癌細胞擴散至其他組織的另一條管道[12]。依據腫瘤轉移伴隨著細胞生理狀態的改變,包括:增加細胞移動與侵襲能力、破壞細胞與細胞間相互作用力及細胞外基質的分解異常。當細胞移動時細胞會向前伸出偽足,使細胞表面受體與細胞外基質黏合,尾端的細胞表面受體再被蛋白水解酶水解,使細胞能夠向前移動[13]。而侵襲與移動相似,但侵襲必須通過細胞外基質(extracellular matrix ECM)或基底膜 (basement membrane)。一個完整的侵襲過程包含三步驟:(1) 腫瘤細胞需貼附在週遭的 ECM,(2)腫瘤細胞分泌 matrix-degrading enzymes,(3) 腫瘤細胞穿過基質層等作用方式[14]。此時的細胞外基質(extracellular Matrix)是負責執行細胞間支持與固定、調節細胞間訊息與溝通及組織的修復。組成分包括細胞組織間隙的結締組織和基底膜[15]。基底膜主要成分為 collagen、lammin、heparin sulfate、chondroitin sulfate 及 entactin[16,17]。這些分子的分解有利於腫瘤細胞的侵襲與轉移。然而腫瘤細胞降解細胞外基質時會產生基質金屬蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMPs),以



利降解細胞外基質及基底膜，促進了惡性腫瘤的侵襲與轉移[18]

## 尿激酶型血纖維蛋白溶解酶原活化因子(urokinase-type plasminogen activator, uPA)

uPA 是具有 serine 的蛋白水解酵素，含有 kringle domain、EGF-like repeats domain 及 catalytic domain 等區域。可將 plasminogen 水解成 plasmin，活化的 plasmin 會清除血管中所堆積的 fibrin，另外也在生理與病理中扮演重要的角色[19]，主要影響有：細胞增生、細胞凋亡、細胞移動與侵襲、及血管新生等作用[20]。當 uPA 與細胞表面的 uPAR 結合時，會促進癌細胞生長，另外在血管平滑肌細胞及 stroma cell，亦會看到促進血管新生，當 uPA 受到內生性抑制劑 plasminogen activator inhibitor type1-2(PAI-2) 抑制後，可以證實抑制腫瘤細胞的生長與轉移[21]。根據臨床資料指出乳癌、肺癌、大腸直腸癌病人的 uPA 表現量較高者，相較於表現量低的病人其存活率較差[22,23]。

## 研究目的

第一年的研究計畫證實 LicA 會抑制肝癌細胞侵襲是透過 MKK4/JNK/NF-kB 途徑[24]，第二年的研究計畫證實 LicA 在人類肝癌中透過 TGF- $\beta$ 1 抑制 AKT 磷酸化和抑制 EMT 相關表現的途徑進而抑制肝癌細胞移動和侵襲能力。綜合以上兩年研究證實 LicA 會抑制肝癌細胞的侵襲形成機制。目前肝癌的化療或標靶治療藥物的產生是藉由攻擊腫瘤細胞與異常分裂及生長密切相關的目標，來抑制腫瘤細胞的增生和移動。大部分的傳統細胞毒性化學治療藥物常是針對一般腫瘤細胞生長調控的機轉，同時也會傷害到正常細胞，因此對於癌細胞的專一性較差。許多體內平時即需不時增生的組織，例如骨髓造血細胞及消化道上皮細胞，就會一併受到細胞毒性化學治療藥物的影響，因此第三年研究是著重 LicA 與標靶藥物共同作用人類肝癌細胞的分子機制和動物實驗，希望未來 LicA 可以當作化療輔助性天然物來減緩肝癌病人的副作用和延長壽命

## 文獻探討

甘草(Glycyrrhiza uralensis Fisch)，屬於豆科多年生草本植物，是一種具有補脾益氣，清熱解毒，潤肺止咳等多功能的中藥材。中醫界對甘草的評價是具有增強免疫、保肝、抗癌及抗糖尿病等療效。甘草內含大量黃酮類成分，其中 LicA 為主要成分之一，目前一些生化研究報告顯示 LicA 常被用作抗發炎藥物的成分、抗過敏、抗氧化和抗致癌化等作用[25,26]。近年來有許多關於 LicA 抑制癌症的學術研究其中的主要分子機轉，可分為：(1) Anti-proliferation、(2) Induce autophagy、(3) Induction of apoptosis、(4) Antioxidative activity、(5) Antimetastatic 和 (6) Antiangiogenic 等作用。根據研究報導指出 LicA 是甘草成分中最具有活性的化合物，且本身也是 estrogenic 屬於黃酮類分子，並且具有抗腫瘤和抗發炎能力。文獻指出 LicA 會誘發人類前列腺 PC3 細胞和胃癌細胞凋亡因而造成細胞週期停留[27,28]。LicA 也會誘導 MCF-7 細胞和 HL-60 血癌細胞的 PARP 活化，減少 Bcl-2 和 Bax 比值下降[29]。之前文獻證實 LicA 具有抗發炎的功効主要是透過抑制 NF-kB 和 AP-1 的活化途徑[30]，此種發炎反應與腫瘤血管新生有關。同時也有研究報告顯示 LicA 抑制內皮細胞移動和平滑肌細胞增生，造成 ERK1/2 活性下降和減少 Rb 磷酸化，因而導致細胞週期停留[31]。此外，以老鼠模式證實 LicA 可以保護 LPS 誘導內毒素的產生因而抑制發炎反應和 ROS 產生，主要是透過 NF-kB 途徑[32]。同時以 BALB/c mice 注射老鼠細胞 CT-26 cells 產生肝癌細胞轉移現象可以處理 Lic (30 mg/kg body weight) 的方式來抑制腫瘤形成和抑制細胞增生指標(PCNA、 $\beta$ -catenin, COX-2, and iNOS)，也能夠抑制發炎蛋白的表現。另外，LicA 抑制肝癌細胞

轉移也會抑制MMP-9 的產生[33]。此外本實驗室研究也證實LicA抑制人類肺癌細胞侵襲作用是透過抑制AKT磷酸化因而抑制MMP-1和MMP-3的表現[34]，同時本研究也證實LicA會誘導子宮頸癌細胞凋亡和自噬作用，若抑制細胞自噬作用會增強細胞凋亡途徑[35]。因此LicA 能夠有效當做抗腫瘤、抗發炎和誘導凋亡的藥物。但是，LicA 對於人類肝癌細胞的增生和侵襲的作用分子機制至今尚不清楚，本研究希望LicA 未來可當做抗肝癌的天然藥物，以達到治療肝癌效果和減少死亡率的藥物

Sorafenib (商品名：Nexavar®、蕾莎瓦®) 是一種新穎酪氨酸激酶抑制劑，Sorafenib 是近年來核准治療晚期腎臟癌和肝癌之臨床標靶藥物[36]。主要作用機轉是透過抑制腫瘤細胞內 Raf 蛋白，因而阻斷下游蛋白 MEK/ERK 途徑，同時也會阻斷 VEGF-2/VEGF-3/PDGFR 之雙重作用機制，阻斷腫瘤細胞及血管內皮細胞生長有關的訊息傳導過程，而直接引發肝癌細胞的細胞凋亡，同時抑制腫瘤血管增生，藉此減少血液供給、及減緩癌細胞的生長[37]。此外，臨床數據也顯示 Sorafenib 能夠延長晚期肝癌病人存活時間[38]。使用 Sorafenib 實驗組存活時間為 6.5 個月，而對照組則為 4.2 個月。臨床上，使用 Sorafenib 的病人約有 45-60%會出現手足皮膚反應(handfoot skin reactions)，更有 5-11%的病人是第三級以上的較嚴重反應[38]。表現症狀通常從手足末梢的針刺或灼熱感開始，繼而發生紅斑，常見初始部位是足底的受力處及指尖靠近指甲處。紅斑可能增厚、變硬甚至形成水泡。除此之外，腹瀉、掉髮、疲倦也是較常出現的副作用[38]。文獻指出 Sorafenib 抑制人類肝癌 HepG2 和 PLC/PRF/5 細胞的生長和誘導細胞凋亡的作用劑量約 4.5  $\mu\text{M}$ ~ 6.3  $\mu\text{M}$ ，Sorafenib 也抑制 RAF/MEK/ ERK 之途徑，造成 Sorafenib 誘導肝癌細胞凋亡是經由抑制 eIF4E 的磷酸化和 Mcl-1 表現[39]。此外 Sorafenib (10 和 30 mg/kg)處理 PLC/PRF/5 細胞生成的腫瘤動物實驗證實隨著 Sorafenib 濃度增加會逐漸抑制腫瘤形成[40]。因 sorafenib 為口服劑型且耐受性佳，可因此提高病人服藥順從性，繼而提升病人的生活品質。本研究採用 LicA 對於許多癌細胞除了具有誘導細胞凋亡，停止細胞週期，而且可以有效去抑制細胞移動與侵襲，未來可以當作 sorafenib 的輔助性化療藥物來抑制肝癌病人的腫瘤細胞生長，同時也可以減緩 sorafenib 的藥物毒性並且延長病人壽命。

## 參考文獻

1. De Pas T, Curigliano G, Masci G, Catania C, Comandone A, et al. (2002) Phase I study of twelve-day prolonged infusion of high-dose ifosfamide and doxorubicin as first-line chemotherapy in adult patients with advanced soft tissue sarcomas. *Ann Oncol* 13: 161-166.
2. Forner A, Llovet JM, Bruix J (2012) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379: 1245-1255.
3. Giannitrapani L, Soresi M, La Spada E, Cervello M, D'Alessandro N, et al. (2006) Sex hormones and risk of liver tumor. *Ann N Y Acad Sci* 1089: 228-236.
4. Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M (2011) Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25: 281-290.
5. Wu HC, Santella R (2012) The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 12: e7238.
6. Chen LP, Zhao J, Du Y, Han YF, Su T, et al. (2012) Antiviral treatment to prevent chronic hepatitis B or C-related hepatocellular carcinoma. *World J Virol* 1: 174-183.
7. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
8. Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM (1982) Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3997-4001.
9. Ceni E, Mello T, Galli A (2014) Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol* 20: 17756-17772.
10. Farazi PA, DePinho RA (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6: 674-687.
11. Drappatz J, Norden AD, Wen PY (2009) Therapeutic strategies for inhibiting invasion in glioblastoma. *Expert Rev Neurother* 9: 519-534.
12. Friedl P, Alexander S (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147: 992-1009.
13. Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374.
14. Friedl P, Gilmour D (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 445-457.
15. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM (2010) Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 22: 697-706.
16. Riching KM, Cox BL, Salick MR, Pehlke C, Riching AS, et al. (2014) 3D collagen alignment limits protrusions to enhance breast cancer cell persistence. *Biophys J* 107: 2546-2558.
17. Li Y, Liu H, Huang YY, Pu LJ, Zhang XD, et al. (2013) Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase. *Int J Mol Med* 31: 1234-1242.
18. Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB (1986) Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47: 487-498.
19. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72: 1-22.
20. Han B, Nakamura M, Mori I, Nakamura Y, Kakudo K (2005) Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer (Review). *Oncol Rep* 14: 105-112.
21. Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, et al. (1995) Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest* 96:

2593-2600.

22. Skelly MM, Troy A, Duffy MJ, Mulcahy HE, Duggan C, et al. (1997) Urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: relationship with clinicopathological features and patient outcome. *Clin Cancer Res* 3: 1837-1840.
23. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, et al. (2002) Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94: 116-128.
24. Tsai JP, Hsiao PC, Yang SF, Hsieh SC, Bau DT, et al. (2014) Licochalcone A suppresses migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells through downregulation of MKK4/JNK via NF-kappaB mediated urokinase plasminogen activator expression. *PLoS One* 9: e86537.
25. Zhai L, Blom J, Chen M, Christensen SB, Kharazmi A (1995) The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2742-2748.
26. Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, et al. (1993) Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2550-2556.
27. Fu Y, Hsieh TC, Guo J, Kunicki J, Lee MY, et al. (2004) Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 263-270.
28. Xiao XY, Hao M, Yang XY, Ba Q, Li M, et al. (2011) Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Lett* 302: 69-75.
29. Rafi MM, Rosen RT, Vassil A, Ho CT, Zhang H, et al. (2000) Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid. *Anticancer Res* 20: 2653-2658.
30. Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Mashino T, Tago K, Inoue H, et al. (2009) Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF-kappaB p65 in LPS signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 9: 499-507.
31. Park JH, Lim HJ, Lee KS, Lee S, Kwak HJ, et al. (2008) Anti-proliferative effect of licochalcone A on vascular smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull* 31: 1996-2000.
32. Chu X, Ci X, Wei M, Yang X, Cao Q, et al. (2012) Licochalcone a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 60: 3947-3954.
33. Kim JK, Shin EK, Park JH, Kim YH (2010) Antitumor and antimetastatic effects of licochalcone A in mouse models. *J Mol Med (Berl)* 88: 829-838.
34. Huang HC, Tsai LL, Tsai JP, Hsieh SC, Yang SF, et al. (2014) Licochalcone A inhibits the migration and invasion of human lung cancer cells via inactivation of the Akt signaling pathway with downregulation of MMP-1/-3 expression. *Tumour Biol* 35: 12139-12149.
35. Tsai JP, Lee CH, Ying TH, Lin CL, Hsueh JT, et al. (2015) Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells. *Oncotarget* 6: 28851-28866.
36. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, et al. (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359: 378-390.
37. Chaparro M, Gonzalez Moreno L, Trapero-Marugan M, Medina J, Moreno-Otero R (2008) Review article: pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 1269-1277.

38. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, et al. (2009) Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 10: 25-34.
39. Wiesenauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, Schmidt CM (2004) Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 198: 410-421.
40. Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM (2006) Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma--an updated analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 23: 1535-1547.
41. Webb CP, Vande Woude GF (2000) Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol* 50: 71-87.
42. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991) Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51: 5054s-5059s.
43. Tryggvason K, Hoyhtya M, Salo T (1987) Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 907: 191-217.
44. Lempinen M, Lyytinen I, Nordin A, Tervahartiala T, Makisalo H, et al. (2013) Prognostic value of serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Med* 45: 482-487.
45. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, et al. (1997) Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer* 74: 482-491.
46. Chu SC, Chiou HL, Chen PN, Yang SF, Hsieh YS (2004) Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Mol Carcinog* 40: 143-149.
47. Rosenthal EL, Johnson TM, Allen ED, Apel IJ, Punturieri A, et al. (1998) Role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in epidermal growth factor- and scatter factor-stimulated invasion of carcinoma cells. *Cancer Res* 58: 5221-5230.
48. Sehgal I, Forbes K, Webb MA (2003) Reduced secretion of MMPs, plasminogen activators and TIMPS from prostate cancer cells derived by repeated metastasis. *Anticancer Res* 23: 39-42.
49. Foekens JA, Buessecker F, Peters HA, Krainick U, van Putten WL, et al. (1995) Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* 55: 1423-1427.
50. Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF (2008) Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest* 118: 3943-3953.
51. Broers B, Helbling B, Francois A, Schmid P, Chuard C, et al. (2005) Barriers to interferon-alpha therapy are higher in intravenous drug users than in other patients with acute hepatitis C. *J Hepatol* 42: 323-328.
52. Wang F, Ke ZF, Wang R, Wang YF, Huang LL, et al. (2014) Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) promotes osteosarcoma cell invasion through the JNK/c-Jun/MMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 452: 933-939.
53. Sugioka Y, Watanabe T, Inagaki Y, Kushida M, Niioka M, et al. (2004) c-Jun NH2-terminal kinase pathway is involved in constitutive matrix metalloproteinase-1 expression in a hepatocellular carcinoma-derived cell line. *Int J Cancer* 109: 867-874.

54. Patel A, Sun W (2014) Molecular targeted therapy in hepatocellular carcinoma: from biology to clinical practice and future. *Curr Treat Options Oncol* 15: 380-394.
55. Chen YL, Lv J, Ye XL, Sun MY, Xu Q, et al. (2011) Sorafenib inhibits transforming growth factor beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology* 53: 1708-1718.
56. Zhang W, Sun HC, Wang WQ, Zhang QB, Zhuang PY, et al. (2012) Sorafenib down-regulates expression of HTATIP2 to promote invasiveness and metastasis of orthotopic hepatocellular carcinoma tumors in mice. *Gastroenterology* 143: 1641-1649 e1645.
57. Huang CS, Lyu SC, Hu ML (2012) Synergistic effects of the combination of beta-ionone and sorafenib on metastasis of human hepatoma SK-Hep-1 cells. *Invest New Drugs* 30: 1449-1459.
58. Theysohn JM, Schlaak JF, Muller S, Ertle J, Schlosser TW, et al. (2012) Selective internal radiation therapy of hepatocellular carcinoma: potential hepatopulmonary shunt reduction after sorafenib administration. *J Vasc Interv Radiol* 23: 949-952.
59. Kim YB, Jeung HC, Jeong I, Lee K, Rha SY, et al. (2013) Mechanism of enhancement of radiation-induced cytotoxicity by sorafenib in colorectal cancer. *J Radiat Res* 54: 52-60.
60. Deng L, Ren Z, Jia Q, Wu W, Shen H, et al. (2013) Schedule-dependent antitumor effects of 5-fluorouracil combined with sorafenib in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 13: 363.

## 研究方法

1. 細胞培養：SK-Hep-1 和 Huh-7 細胞培養於 DMEM 細胞培養液含有 10% fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml penicillin G 和 100  $\mu$ g/ml glutamine。人類正常肝細胞 THLE-2 培養於 BEGM Bullet 套組 (CC3170)，包含 gentamycin/Amphotericin (GA)、Epinephrine、5 ng/mL EGF、70 ng/mL Phosphoethanolamine 和 10% 胎牛血清。並置於 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 培養箱。當細胞生長密度至 80 %時，移去原有的細胞培養液，並以 PBS 沖洗三次，加入 1ml 0.02% trypsin-EDTA 將培養皿於 37°C 反應 5 分鐘，使細胞自盤底脫離，再加入 10 ml 細胞培養液與 trypsin-EDTA 進行中和反應，並吸至 15 cc 離心管抽吸打散，離心 1500 g，五分鐘，去除上清液，之後加入新的細胞培養液打散細胞，然後再取適量的細胞數置入新的細胞培養皿中，放回細胞培養箱繼續培養。
2. 細胞存活率分析 (MTT assay)：將 4 x 10<sup>4</sup> 個/well 的細胞培養於 24 well 中，於 24 小時後，並處理不同濃度 LicA(10  $\mu$ M)或 sorafenib (2.5 或 5  $\mu$ M)作用 24 小時，移除細胞培養液，然後將 10 倍 MTT (5 mg/ml) 溶液稀釋成 1 倍的 MTT(0.5mg/ml)，每一個 well 加入 1 ml，作用 4 小時，待 MTT 溶液進入細胞內作用產生紫色結晶，然後將含有 MTT 溶液的培養基移除，再加入 1 ml 的異丙醇 (isopropanol)，作用約 5 分鐘，然後以分光光度計 (Spectrophotometer) 設定波長 570 nm 測量，讀取吸光值，因此可得細胞相對存活率。
3. 細胞移動實驗：將肝癌細胞以 3x10<sup>5</sup> /ml 培養於 6 cm 培養皿，待細胞長至 7~8 分滿，即可配置不同濃度藥物處理 24 小時。Boyden chamber 下層加入 DMEM 培養液(10% 胎牛血清) 50  $\mu$ l/well，隨即蓋上 10  $\mu$ m polycarbonate filter，霧面朝下，蓋上橡膠軟片和 Boyden chamber 上層蓋，上層加入 5x10<sup>4</sup> cell/well 細胞液(不含 FBS)，HA22T/VGH 和 Huh-7 細胞移動作用 12 小時及 SK-Hep-1 細胞移動作用 8 小時後，將 polycarbonate filter 從 chamber 中取出，並浸泡甲醇 10 分鐘來固定細胞，風乾 5 分鐘之後，再利用 5% Giemsa 染色 1 小時，之後用棉花沾溼清水輕輕將背面擦拭乾淨，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 400X 光學顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 4 個 well，作移動細胞數之統計。
4. 細胞侵襲實驗：將肝癌細胞以 3x10<sup>5</sup> /ml 培養於 6 cm 培養皿，待細胞長至 7~8 分滿，即可配置不同濃度藥物處理 24 小時。Boyden chamber 下層加入 50  $\mu$ l/ml DMEM 培養液(10% 胎牛血清)，隨即蓋上 10  $\mu$ m polycarbonate filter 浸泡在 0.1%的 Matrigel 溶液，霧面朝下，蓋上橡膠軟片和 Boyden chamber 上層蓋，放置 4 小時後，上層加入 5x10<sup>4</sup> cell/well 細胞液(不含 FBS)，HA22T/VGH 和 Huh-7 細胞移動作用 24 小時及 SK-Hep-1 細胞移動作用 16 小時後，將 polycarbonate filter (含 0.1 mg/ml Matrigel)從 chamber 中取出，並浸泡甲醇 10 分鐘來固定細胞，風乾 5 分鐘之後，再利用 5% Giemsa 染色 1 小時，之後用棉花沾溼清水輕輕將背面擦拭乾淨，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 400X 光學顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野，數 4 個 well，作移動細胞數之統計。
5. uPA 活性分析 (casein zymography): uPA 會將 Plasminogen 分解成 plasmin，利用 casein zymography (含有 plasminogen) 用來分析 uPA 的酵素活性。首先將肝癌細胞以 2x10<sup>4</sup>/ml 培養於 24 well 培養盤，待細胞長至 7~8 分滿，即可配置不同濃度藥物與不含血清之 DMEM 培養液作用 24 小時後，將培養細胞的條件培養基 (conditioned medium) 抽起來放進微量離心管中，離心 1500 g，5 min，取上清液並保存在 -20°C。配膠方式為，將 0.1 % casein、8 % SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽，把培養細胞的條件培養基 (conditioned medium) 與 5X 染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以電壓 80 伏特和 120 伏特的進行電泳分離，電泳結束後把膠片取出並以 2.5 % Triton X-100 進行清洗，在室溫搖晃 30 分鐘，共清洗兩次，之後加入 Reaction buffer [40 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM CaCl<sub>2</sub>·0.01 % NaN<sub>3</sub>]在 37°C 恆溫箱中反應 16~20 小時，反應完後的膠片以 Coomassie Blue 染色 3 小

時，再以退染液退色觀察其 uPA 的活性。

6. 免疫螢光染色法：利用共軛焦顯微鏡來直接觀察細胞內蛋白螢光訊號以及蛋白質座落的位置。首先將  $2 \times 10^4$ /well 的細胞數培養至共軛焦顯微鏡 Kit 培養皿中，隔天細胞貼盤後，去除上清液，以 PBS 清洗細胞兩次，再加入可以蓋過細胞體積之 4% PFA (Paraformaldehyde) 室溫下作用 10 分鐘，以 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1 ml 含有 0.1% Triton X-100 之 PBS 清洗細胞每次 3 分鐘，重覆清洗三次。再以 2% (w/v) BSA 在室溫下 blocking 2 小時，加入一級抗體(MMP-9、uPA、NF- $\kappa$ B(p65)) 在 4 °C 下作用 16 小時。隔天以 1 × PBST 清洗，每次 10 分鐘，清洗 3 次。之後加入二級抗體 ( DAPI 和 Dylight ) 在室溫下作用 2 小時。先用螢光顯微鏡觀察是否有染到，若是沒染到就繼續染，如有染到以 1 × PBST 清洗，每次 10 分鐘，清洗 3 次。最後利用共軛焦顯微鏡觀察其細胞內之蛋白質的螢光訊號與座落位置。
7. 蛋白質萃取(Whole protein extraction): 人類肝癌細胞株以 PBS 緩衝溶液清洗二次，然後加入 0.2 ml lysis buffer [ 150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM Tris-Cl pH 8.0、0.5% Nonidet P-40、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、10 mM NaF、2  $\mu$ g/ml aprotinin、1 mM PMSF ] 並採用括杓將細胞括下來且置入微量小管，然後採用超音波震盪儀作用 1 分鐘放置冰上作用 5 分鐘的方式重複十次，作用完全後離心(12000 g, 4°C, 15 分鐘)，取出上清液並轉移到另一個微量小管。此時得到全細胞萃取液，然後放入 -80°C 保存。
8. 分離細胞質和細胞核蛋白：首先將人類肝癌細胞株以 PBS 緩衝溶液清洗二次，並且放置冰上 10 分鐘，然後加入 1 ml buffer I [ 10 mM Hepes (pH 7.9)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.5 mM dithiothreitol、0.2 mM PMSF、10 mg/ml leupeptin 和 0.5% (v/v) Nonidet P40]，並採用 7ml 研磨棒作用 30 次後，且置入微量小管離心(2000 g, 4°C, 5 分鐘)，取出上清液，為細胞質蛋白。離心後的沉澱物再加入 buffer B [20 mM Hepes (pH 7.9)、25% glycerol、420 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM EDTA、0.5 mM dithiothreitol、0.2 mM PMSF 和 10 mg/ml leupeptin ] 作用，然後採用超音波震盪儀作用 1 分鐘放置冰上 1 分鐘的方式，此種方式重複十次後，離心 ( 14000 g, 4°C, 15 分鐘 )，取出上清液為細胞核蛋白，然後放入 -80°C 保存。
9. 蛋白質的定量：採用 Bradford protein assay 方法，其原理是蛋白質可與 coomassie brilliant blue G-250 會與蛋白質結合形成藍色複合物的特性，顏色會從紅色轉變成為藍色，此時在波長 OD595 nm 下，會有較高的吸光值，以便偵測。藍色越深表示蛋白質濃度越高。這個方法的優點為 G-250 與蛋白質結合所需的時間很短，且方便又靈敏，也可使用微量滴定盤進行分析，可減低試劑用量，方便大量樣本的操作。首先我們先將一系列已知濃度的 BSA 加入五分之一體積的 Bradford protein dye，於分光光度計波長 OD595 nm 下偵測其吸光值，並做出標準曲線，再以同樣的方式測得樣品的吸光值，即可依據標準曲線換算得樣品之蛋白濃度。以相同蛋白質濃度進行分裝，首先以全蛋白萃取液 (25  $\mu$ g) 加入 5 × 的樣品緩衝液 ( 5×sample buffer )，其含有 SDS 與  $\beta$ -mecaptoethanol，可促使蛋白質變性且有破壞雙硫鍵的能力，均勻混和後於 100 °C 下作用 10 分鐘，再迅速置入冰浴中，之後離心 10000 g、30 秒，目的將加熱時所產生的水蒸氣離心下，以避免影響濃度之差異性，最後插入冰上冷卻並保存於 -20°C。
10. 西方墨點法 (Western blotting)：首先將全細胞萃取液(30  $\mu$ g)加入 5X Treating buffer 混勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴中，再進行 SDS-聚丙烯胺板膠電泳分析。SDS-聚丙烯胺板膠電泳之上層膠體為 4% Stacking gel，下層膠體為 10% Separating gel。將做好之板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液(0.02 M Tris-base、0.192 M Glycine 和 0.1% SDS)注滿上下電泳槽，然將處理過的蛋白樣品溶液加入板膠上所形成的 U 型槽中，以 140 伏特進行電泳。電泳結束後進行蛋白轉移，將膠體進入冰冷之轉漬緩衝



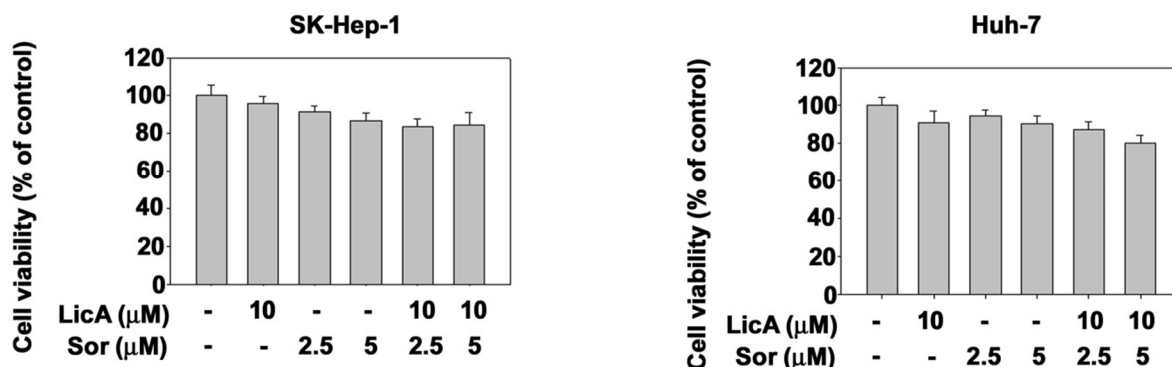
液(0.02 M Tris-base、0.192 M Glycine 和 20 % methanol) 5 到 10 分鐘，將膠體平鋪在兩張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，此時將預先浸濕 PVDF 蓋在膠體上面，依次在覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻棒輕趕其間的氣泡後裝入 Transfer Holder，然後置於 Electrotransfer Tank (內含轉漬緩衝液)於 4°C 下，進行 0.1 V 電轉移，電轉移過夜之後，取出消化纖維紙浸入 1% BSA 的 Blocking buffer (w/v) 緩衝液(1 % BSA、0.9 % (w/v) NaCl、100 mM Tris-base 和 0.1% Tween 20)，在室溫下搖晃一個小時。然後加入 1 級抗體於 5 ml 含 1% (w/v) BSA 之緩衝液，與消化纖維紙在 4°C 反應置隔天，之後以清洗緩衝液(0.9 % (w/v) NaCl、100 mM Tris-base 和 0.1 % Tween 20 pH=7.4)清洗兩次，每一次 10 分鐘，最後再清洗一次到掉即可。接著再進一步加入 2 級抗體含 1% (w/v) BSA 之 10 ml 緩衝液，於室溫作用一個小時，然後以清洗緩衝液清洗兩次，每一次 10 分鐘，最後再清洗一次到掉即可。最後以 ECL 呈色試劑來做呈色。

11. 分析 LicA 結合 sorafenib 對肝癌細胞在活體內(*in vivo*)轉移情形：免疫缺陷的小鼠(BALB/c *nu/nu* mice) 尾靜脈注射人類肝癌細胞(SK-Hep-1)，將  $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  PBS 洗淨的人類癌細胞，以尾靜脈注射方式注入，2 個月分析腫瘤細胞轉移到肺臟的現象，取出腫瘤及肺臟以觀察其腫瘤大小、重量，以評估應用的可行性，並作組織免疫染色與 HE stain。將 BALB/c 小鼠取下來之腫瘤作組織切片分析其血管生成情形，並作組織免疫染色與 HE stain。
12. 組織免疫切片染色 (immunohistochemistry)：取老鼠犧牲後的腫瘤以 10% 福馬林固定處理，再以低至高濃度之酒精及以二甲苯脫水，然後以石臘固定包埋，以 4 mm 的厚度作切片，固定於玻片上，接著放入烘箱中以 37°C overnight 將石臘熔解，然後再以二甲苯進行脫臘，利用高至低濃度酒精進行復水，並以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除內生性過氧化酶再以 PBS buffer 處理，使其具有滲透性。接著以胎牛血清處理而阻止一些非特異性抗原的結合，20 分鐘後將水吸乾，然後在室溫下加入一級抗體一小時後，以 PBS wash 二次來移除未結合之抗體，接著再加入二級抗體(含有 biotin)作用一小時後，以 PBS wash 二次，再加入 ABC solution(含有 avidin)，在室溫下作用 45 分鐘，再以 PBS wash 二次，接著以 substrate buffer 進行染色，大約 10 分鐘後一起中止反應再以 hematoxylin 染色(細胞核)，再利用 ddH<sub>2</sub>O 洗去多餘的染色液。最後以酒精脫水，將封片膠滴入玻片上以蓋玻片覆蓋著，在顯微鏡下觀察褐色分布的結果。
13. 統計分析：所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA)進行 one-way analysis of variance(one-way ANOVA)分析。

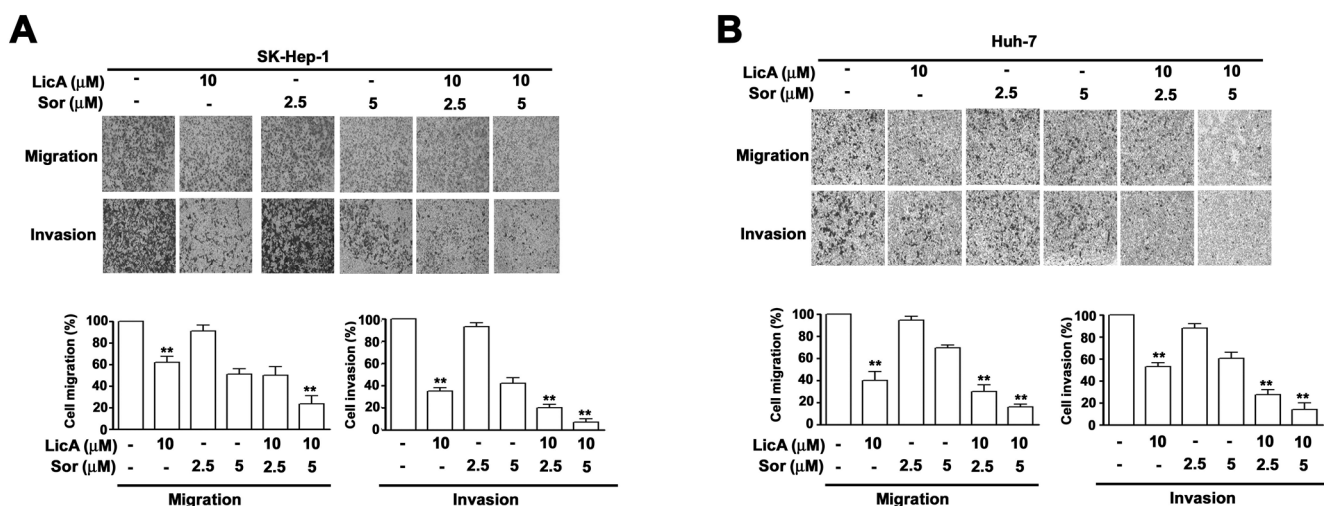
## 實驗結果

【1】為了證明 LicA 與標靶藥物 Sorafenib 之結合作用是否造成兩株肝癌細胞(SK-Hep-1 和 Huh-7)侵襲作用，我們將 SK-Hep-1 和 Huh-7 細胞加入 LicA (10  $\mu$ M)與 sorafenib (2.5 and 5  $\mu$ M)共同作用 24 小時之後以 MTT 方式證實 單一處理 LicA 不會抑制兩株肝癌細胞生長，然而共同處理 sorafenib (2.5 and 5  $\mu$ M) 24 小時後發現也不會隨著 sorafenib (2.5 and 5  $\mu$ M)濃度增加，因而抑制兩株肝癌細胞生長的現象，此項實驗結果說明 LicA 與 sorafenib 不具有共同抑制肝癌細胞生長的現象。

圖一

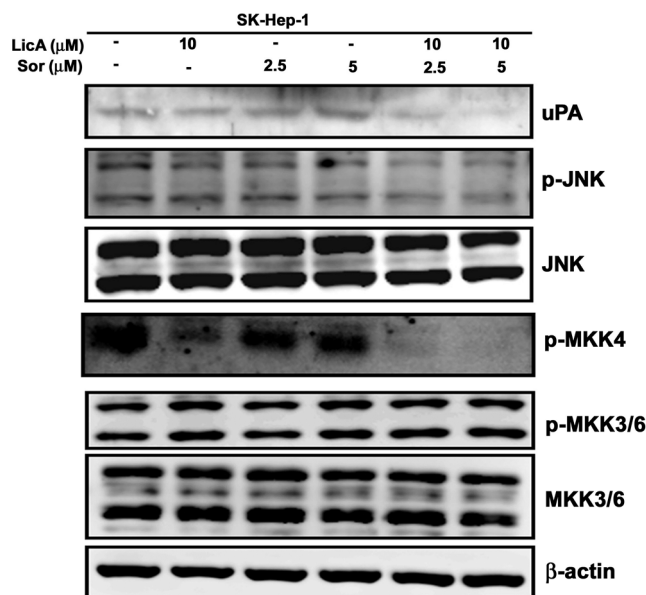


【2】為了證明 LicA 與 sorafenib 是否抑制細胞侵襲作用，我們利用 in vitro migration 和 invasion 方式來應證。如圖二所示單一加入 LicA 抑制 SK-Hep-1 細胞移動約抑制 40.2%，LicA 結合 sorafenib 抑制 SK-Hep-1 細胞移動 (2.5  $\mu$ M sorafenib: 54.3%; 5  $\mu$ M sorafenib: 76.1%)，單一加入 LicA 抑制 SK-Hep-1 細胞侵襲約抑制 35.6%，LicA 結合 sorafenib 抑制 SK-Hep-1 細胞侵襲 (2.5  $\mu$ M sorafenib: 76.1%; 5  $\mu$ M sorafenib: 89.3%);單一加入 LicA 抑制 Huh-7 細胞移動約抑制 57.1%，LicA 結合 sorafenib 抑制 SK-Hep-1 細胞移動 (2.5  $\mu$ M sorafenib: 62.3%; 5  $\mu$ M sorafenib: 80.4%)，單一加入 LicA 抑制 Huh-7 細胞侵襲約抑制 45.6%，LicA 結合 sorafenib 抑制 Huh-7 細胞侵襲 (2.5  $\mu$ M sorafenib: 78.4%; 5  $\mu$ M sorafenib: 90.7%)。綜合以上結果說明 LicA 共同結合 sorafenib 有明顯抑制肝癌細胞侵襲作用。

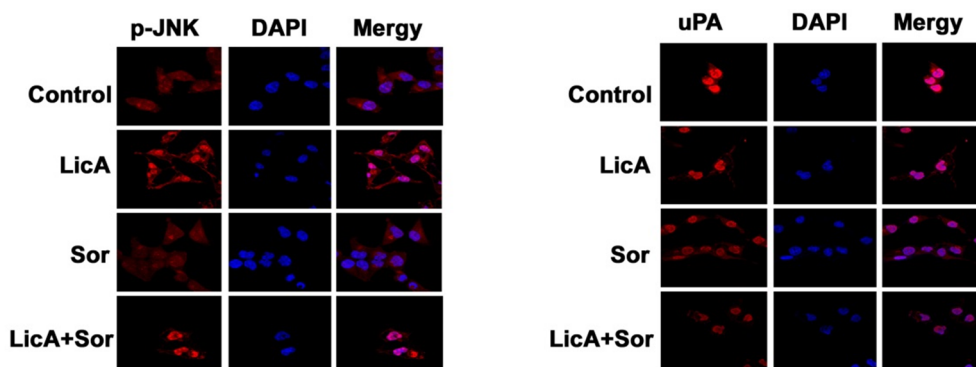


【3】因此本研究要證實 LicA 和 sorafenib 共同作用 SK-Hep-1 細胞抑制侵襲作用是否也會經由 JNK 和 MKK4 磷酸化減少。實驗結果證實單一處理 LicA 會抑制 JNK 磷酸化，LicA 和 sorafenib 共同作用更加

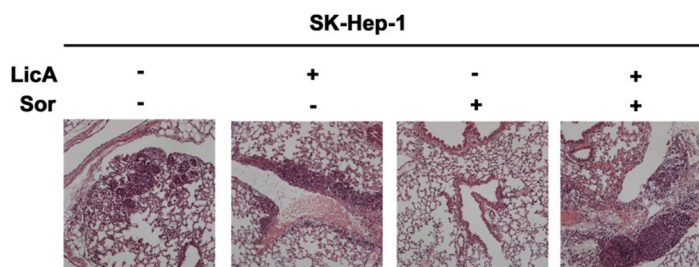
抑制 JNK 和 MKK4 磷酸化。同時也會抑制 uPA 蛋白表現(圖三)。



【4】同時採用免疫螢光方式也證明實驗結果證實單一處理 LicA 會抑制 JNK 磷酸化，LicA 和 sorafenib 共同作用更加抑制 JNK 和 MKK4 磷酸化。同時也會抑制 uPA 蛋白表現(圖四)。



【5】接下來我們採用 LicA 和 sorafenib 分別或共同以尾靜脈注射方式來證明，此實驗結果並無成功，因為單一利用 SK-Hep-1 細胞注射老鼠尾靜脈並無將 SK-Hep-1 細胞轉移到肺臟，所以證實老鼠肺臟並無轉移現象 (圖五)，未來可能要重新選擇細胞來做研究



## 討論

腫瘤細胞生長與轉移，必須依賴新生血管提供額外的養分以提供新的腫瘤細胞生長，此種現象會

造成腫瘤遠方轉移從不同血管擴散，造成腫瘤細胞從原發處穿越血管壁，進入血液後循環到達遠方器官處[41]。當腫瘤細胞在新接種處附著，和滋生新血管形成且將附近原有的細胞基質破壞，開闢出空間容許新血管生長，此時需要多種基質蛋白酵素(matrix metalloproteinases)和 uPA 的存在。許多研究指出肝內轉移性惡性腫瘤細胞內含有大量 MMPs 和 uPA，都是與肝癌細胞轉移有直接的關係[42]。因此如何利用藥物或合併使用臨床藥物來防止肝癌細胞無法利用 MMPs 和 uPA，因而抑制肝癌細胞無法轉移將是未來降低肝癌死亡率的一大課題之一。文獻指出轉移擴散的癌細胞中，癌細胞藉由蛋白質水解酵素來分解細胞外基質，導致細胞與細胞間基質的分離，促使癌細胞具有移動性，腫瘤細胞為了要通過富含 type IV collagen 的血管壁順利進行轉移，會分泌大量的 MMP-2、MMP-9 及 uPA 來降解細胞基底膜[43]。許多文獻指出基質金屬蛋白酶 MMP-9 會大量表現在惡性腫瘤中，例如：肝癌[44]、乳癌[45]、肺癌[46]、子宮頸癌[47]和前列腺癌[48]。另外 uPA 是分泌型酵素，必須藉由與 uPAR 的結合才具有較強的蛋白水解酶活性，進而造成細胞外基質的分解，被認為與腫瘤細胞轉移有關係 [49]。一些文獻證實 JNK1/2 磷酸化與肝癌有關係，文獻指出利用 cDNA 生物晶片分析 41 個肝癌病人檢體 mRNA 表現，證實其中有 23 個肝癌病人會大量表現 JNK1/2 [50]，此項實驗結果也應證 50% 的中國大陸肝癌患者會大量表現 JNK1/2 [51]，同時也證實 JNK1/2 磷酸化增加與 HBV 肝癌患者有直接的相關性[134]。因此 JNK1/2 磷酸化增加是肝癌的生物指標蛋白。過度表現 AEG-1 會增加骨肉瘤細胞侵襲作用，同時會誘導 JNK/c-Jun/MMP-2 的活化路徑[52]。有文獻指出人類肝癌細胞和組織會大量表現 MMP-1 和 JNK1/2 磷酸化，此種現象是 JNK1/2 磷酸化增加來活化 c-jun 結合到 MMP-1 啟動子造成肝癌細胞侵襲能力增強[53]。Licochalcone A 抑制人類肝癌細胞侵襲能力是經由抑制 MKK4/JNK 表現導致 uPA 表現下降[24]。根據以上的研究說明 JNK1/2 活化調控肝癌侵襲之機制。

目前研究發現，肝癌的生長可能和血管新生有關。一般認為癌細胞血管新生的目的在於向宿主吸收養份，可透過新生的血管轉移至其他部位。因此使用可抑制血管新生的藥物治療，能阻斷讓癌細胞生長的訊息，並可切斷其增生的血管，使癌細胞無法獲取養分，不能再繼續分裂生長，並減少轉移的現象。對於有肝癌遠端轉移之病人，目前治療方式以全身性化學治療是唯一積極治療選項，但肝癌細胞常具有多種藥物之抗藥性，同時併存有肝硬化，因此全身性化學治療造成細胞毒性和身體產生的極大副作用，同時也造成肝癌病人死亡率逐漸增加。因此本研究選擇標靶藥物(Sorafenib)合併使用 LicA 來探討抑制肝癌轉移之機制。標靶治療藥物藉由攻擊腫瘤細胞與異常分裂與生長密切相關的目標，來抑制腫瘤細胞的增生。相對於細胞毒性化學治療，標靶治療藥物的作用目標，則是與細胞癌化過程或癌細胞增生有關的分子或是酵素。因此標靶治療藥物的專一性，均較傳統化學治療藥物為優，且一般細胞毒性化學治療藥物治療晚期肝細胞癌時最常發生的骨髓毒性而言，大多數標靶治療藥物出現此毒性的比率均相當的低[54]。Sorafenib 是美國拜耳股份有限公司的專利藥，經美國食品藥物管理局核可用於治療腎細胞腎癌 (Renal cell carcinoma) 及肝癌 (Hepatocellular carcinoma)，於 2012 年 8 月 1 日，台灣健保局通過健保給付 Sorafenib 為肝癌和腎癌之標靶藥物。Sorafenib 的作用機轉是不會造成細胞直接性的毒殺作用，而是針對抑制腫瘤細胞的轉移作用。第三期大型臨床研究證實標靶治療藥物 Sorafenib 可有效延長晚期 HCC 患者的存活期，以亞太地區而言，包含台灣、中國和韓國地區，實驗證實使用 Sorafenib 實驗組平均存活率為 6.5 個月，而對照組(採用安慰劑)的平均存活率為 4.2 個月[38]。此外有研究發現 Sorafenib 能夠抑制 TGF- $\beta$  誘導的肝實質細胞上皮間質轉換現象和誘導細胞凋亡。同時利用 CCl<sub>4</sub> 誘導肝纖維化的小鼠模型，發現餵食 Sorafenib 的小鼠，能夠有效減少動物體內細胞上皮間質轉換現象和誘導細胞凋亡，進而改善和修復小鼠的肝纖維化現象，此種現象說明為 Sorafenib 不僅可以抑

制肝癌細胞轉移，另一方面也可以改善肝纖維化[55]。利用肝癌動物模式中証實 Sorafenib 抑制肝癌細胞轉移是透過抑制 HTATIP2 和 JAK-STAT3 訊息途徑[56]。

腫瘤致癌途徑並非單一成因，常極為複雜，腫瘤細胞又會復發，因此發展合併治療方式是未來使用標靶治療藥物可能的方向。化療、放射療法及標靶藥物，可以組合成多種不同的治療方式，尋找最適合的治療方式[150]。本研究利用 LicA 合併使用 Sorafenib 的治療組合，發現兩者合併使用並不會抑制高度轉移肝癌細胞(SK-Hep-1 和 Huh-7)的生長速率，但是會明顯加成性抑制肝癌細胞的移動和侵襲能力。此種治療組合方式也驗證 Sorafenib 合併處理化療藥物、放射療法或天然物的模式。(1)結合天然物治療方式:文獻顯示 Sorafenib 結合 $\beta$ -ionone 在人類 SK-Hep-1 細胞中,發現抑制 FAK 磷酸化與 Rac1 蛋白表現,進而抑制 MMP-2 與 MMP-9 表現,而達到抑制癌細胞的侵襲與轉移[57]。(2) 結合放射療法：Sorafenib 結合放射性療法，可延長肝癌病人的壽命從 7.8 個月延長至 15.7 個月 [58]。Sorafenib 可以當作輻射增敏劑，因為 Sorafenib 以協同作用的方式增強大腸直腸癌的輻射敏感度，造成腫瘤細胞週期停滯(G2/M 期)，並抑制 cyclin B1 表現，達到抑制大腸癌細胞生長之功效 [59]。(3)結合臨床化療藥物：Sorafenib 合併使用 5-FU 治療肝癌 MHCC97H 和 SMMC-7721 細胞發現兩者合併使用會抑制 cyclin D1 和 RAF/MEK/ERK 和 STAT3 訊息路徑，此種現象造成細胞週期停留 G1 期，因而抑制達到抗肝癌生長功效 [60]。因此未來的研究將會著重在以肝癌細胞之動物模式探討 LicA 合併處理 Sorafenib 是否會抑制肝癌細胞轉移到肺臟，同時也會採用蛋白酵素生物晶片方式來分析 LicA 合併處理 Sorafenib 是否會抑制其它相關轉移蛋白的表現，因而探討其分子機制。

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/17

科技部補助計畫	計畫名稱: 研究甘草查爾酮A抑制人類肝癌細胞侵襲與上皮細胞-間質細胞轉換之分子機制
	計畫主持人: 謝逸憲
	計畫編號: 101-2313-B-040-001-MY3      學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

101年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：謝逸憲		計畫編號：101-2313-B-040-001-MY3				計畫名稱：研究甘草查爾酮A抑制人類肝癌細胞侵襲與上皮細胞-間質細胞轉換之分子機制	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明： 如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	2	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
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。）		此項研究結果說明晚期肝癌病人服用sorafenib和LicA會共同抑制肝癌轉移能力，希望未來能夠將LicA當作輔助sorafenib的藥物，減緩sorafenib的副作用，因而達到治療肝癌病人轉移的現象					

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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100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）

肝癌患者往往會被診斷出癌細胞有轉移的症狀，而死於早期及遠端轉移發生。轉移是由一連串步驟所串連組成，包括細胞黏著、細胞外基質降解、細胞移行與侵襲。因此，能對抗轉移相關步驟的物質，就可能可以用來防止腫瘤細胞發生轉移，並增加癌症患者生存的機會。Sorafenib（商品名：Nexavar<sup>®</sup>、蕾莎瓦<sup>®</sup>）是一種新穎酪氨酸激酶抑制劑，近年來核准治療晚期腎臟癌和肝癌之臨床標靶藥物，因為sorafenib 本身是標靶藥物也會有一些細胞毒性的現象，同時單一服用會造成病人生理副作用大，因此本研究利用天然物成分 甘草查爾酮A抑制肝癌細胞移動和侵襲的能力，未來希望甘草查爾酮A結合sorafenib 在治療反應率上有更好的治療效果，以提高病人的存活率和抑制肝癌細胞轉移現象，並且減少副作用達到抑制轉移之成效。