

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

研究漆黃素誘發 DR5 活化之細胞凋亡和抑制子宮頸癌侵襲
之機制(第 3 年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 100-2313-B-040-001-MY3
執行期間：102 年 08 月 01 日至 103 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：謝逸憲
共同主持人：應宗和
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：薛榮宗

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 103 年 10 月 21 日

中文摘要：子宮頸癌位居全世界女性惡性腫瘤第二位，平均約有百分之八十的癌症病人因癌細胞之轉移而致命，故若能有效抑制癌細胞的轉移及入侵，將可大幅減低癌症的死亡率。因此發展新穎天然藥物來當作癌症預防或是治療藥物是目前最重要的課題。我們每天飲食中都會攝取植物和蔬果類，此類都包含大量的類黃酮成分且人體每天都會消耗1公克以上的類黃酮。漆黃素(Fisetin)是一種類黃酮化合物(flavonoids)家族成員之一，它廣泛地存在各種水果和蔬菜。目前漆黃素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」(off-target effects)與其抗癌療效及抗藥性的產生有密切關係。但是，目前漆黃素與Sorafenib共同作用在人類子宮頸癌細胞的作用機制及動物實驗，至今仍然未知。

我們第一年計畫證實漆黃素會誘導子宮頸癌細胞凋亡透過ERK1/2和caspase-8途徑。為了更深入探討漆黃素在Sorafenib共同作用中扮演角色及臨床應用的可行性。我們首先發現使用漆黃素合併Sorafenib時可以協同增強(synergistic effects)子宮頸癌抑制HeLa細胞生長、走向細胞凋亡、粒線體膜電位(mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi_m$)下降，caspase 3、和9的活化以及poly ADP ribose polymerase (PARP)的活化有關，此一作用與HeLa細胞中ERK1/2、Bax和DR5活化及Bcl-2, Bid, Bim的表現被抑制有相關性。其次，為了證實臨床上的應用，本研究以動物實驗證明Sorafenib合併漆黃素確實可以有效抑制子宮頸癌HeLa細胞腫瘤的形成。綜合以上結論，Sorafenib合併漆黃素是未來一個有潛力的治療方式。

中文關鍵詞：子宮頸癌、漆黃素、sorafenib、細胞凋亡

英文摘要：Cervical cancer, a potentially preventable disease, remains the second most common malignancy in women worldwide, especially cervical cancer threatens all of female. The metastasis (invasion) of cancer cells leads 80% patients died, and inhibition of cancer cells metastasis will markedly decrease the death rate. Therefore, development of novel nature drug or drug

therapy was important topic. The flavonoids are present in almost all higher plants in the normal diet they were consumed more than one gram per day. Fisetin is a naturally occurring flavonoid found in many fruits and vegetables and display a wide range of pharmacological properties including anti-metastatic, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, apoptosis and anti-oxidant effects. 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. However, the molecular mechanism and animal models of sorafenib combination with fisetin in human cervical cancer is presently unknown.

From our first project to found that fisetin can indeed induce the apoptosis of HeLa cells in a dose- and time-dependent manner, and the activation of ERK1/2 and caspase-8/-3, was the major intracellular pathway in charge of the fisetin-induced apoptosis in HeLa cells. In the present study, we sought information for a more in-depth discussion of the role combination of sorafenib and fisetin in human cervical cancer cells in vitro and in vivo, with particular attention to feasibility and clinical applications. In exploring the clinical application of a combination of sorafenib and fisetin, we found that it synergistically inhibited cell growth and induced apoptosis in HeLa cells. The synergistic efficacy was associated with the disruptive mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), activation of caspase-3, -9, and poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage. In addition, induction of Bax, DR5, ERK1/2 activation and suppression of Bcl-2 Bid and Bim expression in HeLa cells. Finally, sorafenib combined with fisetin inhibited tumor growth significantly better than either agent did individually in the HeLa xenograft models. Thus, these data suggest that the combination of fisetin and sorafenib could be a potential therapeutic

strategy against human cervical cancer cells in future.

英文關鍵詞： cervical cancer, fisetin, sorafenib, apoptosis

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)

研究漆黃素誘發 DR5 活化之細胞凋亡和抑制子宮 頸癌侵襲之機制

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 100-2313-B-040 -001 -MY3

執行期間：102/08/01 ~ 103/07/31

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：薛榮宗

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 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 103 年 10 月 20 日

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（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）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），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

近來年 sorafenib 核准治療晚期腎細胞癌、子宮頸癌與肝癌，且 sorafenib 為一新酪胺酸激酶抑制劑可抑制腫瘤生長與血管新生，臨床上病人而言是一種口服耐受性佳有效的藥品，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 fisetin 抑制子宮頸癌生長和誘導凋亡的能力，未來希望 fisetin 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子宮頸癌細胞生長。

目錄

頁次

中文摘要及關鍵詞.....	4
英文摘要及關鍵詞.....	5
報告內容	
前言.....	6
研究目的.....	6
文獻探討.....	6
參考文獻.....	8
方法及材料.....	10
結果與討論.....	12

中文摘要

子宮頸癌位居全世界女性惡性腫瘤第二位，平均約有百分之八十的癌症病人因癌細胞之轉移而致命，故若能有效抑制癌細胞的轉移及入侵，將可大幅減低癌症的死亡率。因此發展新穎天然藥物來當作癌症預防或是治療藥物是目前最重要的課題。我們每天飲食中都會攝取植物和蔬果類，此類都包含大量的類黃酮成分且人體每天都會消耗 1 公克以上的類黃酮。漆黃素(Fisetin)是一種類黃酮化合物(flavonoids)家族成員之一，它廣泛地存在各種水果和蔬菜。目前漆黃素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 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」〔off-target effects〕與其抗癌療效及抗藥性的產生有密切關係。但是，目前漆黃素與 Sorafenib 共同作用在人類子宮頸癌細胞的作用機制及動物實驗，至今仍然未知。

我們第一年計畫證實漆黃素會誘導子宮頸癌細胞凋亡透過 ERK1/2 和 caspase-8 途徑。為了更深入探討漆黃素在 Sorafenib 共同作用中扮演角色及臨床應用的可行性。我們首先發現使用漆黃素合併 Sorafenib 時可以協同增強 (synergistic effects) 子宮頸癌抑制 HeLa 細胞生長、走向細胞凋亡、粒線體膜電位 (mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi_m$) 下降、caspase 3、和 9 的活化以及 poly ADP ribose polymerase (PARP) 的活化有關，此一作用與 HeLa 細胞中 ERK1/2、Bax 和 DR5 活化及 Bcl-2, Bid, Bim 的表現被抑制有相關性。其次，為了證實臨床上的應用，本研究以動物實驗證明 Sorafenib 合併漆黃素確實可以有效抑制子宮頸癌 HeLa 細胞腫瘤的形成。綜合以上結論，Sorafenib 合併漆黃素是未來一個有潛力的治療方式。

關鍵詞：子宮頸癌、漆黃素、sorafenib、細胞凋亡

英文摘要

Cervical cancer, a potentially preventable disease, remains the second most common malignancy in women worldwide, especially cervical cancer threatens all of female. The metastasis (invasion) of cancer cells leads 80% patients died, and inhibition of cancer cells metastasis will markedly decrease the death rate. Therefore, development of novel nature drug or drug therapy was important topic. The flavonoids are present in almost all higher plants in the normal diet they were consumed more than one gram per day. Fisetin is a naturally occurring flavonoid found in many fruits and vegetables and display a wide range of pharmacological properties including anti-metastatic, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, apoptosis and anti-oxidant effects. 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. However, the molecular mechanism and animal models of sorafenib combination with fisetin in human cervical cancer is presently unknown.

From our first project to found that fisetin can indeed induce the apoptosis of HeLa cells in a dose- and time-dependent manner, and the activation of ERK1/2 and caspase-8/-3, was the major intracellular pathway in charge of the fisetin-induced apoptosis in HeLa cells. In the present study, we sought information for a more in-depth discussion of the role combination of sorafenib and fisetin in human cervical cancer cells in vitro and in vivo, with particular attention to feasibility and clinical applications. In exploring the clinical application of a combination of sorafenib and fisetin, we found that it synergistically inhibited cell growth and induced apoptosis in HeLa cells. The synergistic efficacy was associated with the disruptive mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), activation of caspase-3, -9, and poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage. In addition, induction of Bax, DR5, ERK1/2 activation and suppression of Bcl-2 Bid and Bim expression in HeLa cells. Finally, sorafenib combined with fisetin inhibited tumor growth significantly better than either agent did individually in the HeLa xenograft models. Thus, these data suggest that the combination of fisetin and sorafenib could be a potential therapeutic strategy against human cervical cancer cells in future.

Key word: cervical cancer, fisetin, sorafenib, apoptosis

前言

近十年來癌症在國人十大死因排行榜中一直名列前茅，科學家們在癌症的研究上也投注相當多的時間與心力，但截至目前為止仍然有許多問題無法克服，例如抗藥性或癌轉移等問題，雖然相較於以往，在面對各種癌症病人的治療時有多種不同的化療藥物可供選擇，但令人困擾的是即使選擇不同的化學治療藥物，一段時間的投予之後經常同樣會出現所謂抗藥性的問題，以至於藥物無法再有效的殺死癌細胞，因此，研發更有效的抗癌藥物或具有癌症預防效果的藥物是重要的研究方向。子宮頸癌是全球婦女第二常見的癌症(僅次於乳癌)。根據我國衛生署統計資料顯示，近年來每年約有 6,000 多例子宮頸癌新病例，發生率高居婦女癌症的第一位。就死亡率而言，2004 年的統計資料顯示，在台灣每 10 萬婦女人口有近 8.3 人死於子宮頸癌。子宮頸上皮內贅瘤(Cervical intraepithelial neoplasia ; CIN)是一種癌前病變，此種病變有可能進展成侵入性的癌[1]。當子宮頸上皮層分裂和未成熟細胞只佔未超過子宮頸上皮組織下三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤第一期(CIN 1)；若佔未超過上皮組織中三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤第二期(CIN 2)，已至上三分之一時，則稱為子宮頸上皮內贅瘤第三期(CIN 3) [2,3]。在 Bethesda 分類系統裏，低度子宮頸鱗狀上皮內病變(LSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤第一期(CIN 1) (mild dysplasia)，而高度子宮頸鱗狀上皮內病變(HSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤第二期(CIN 2) (moderate dysplasia) 和子宮頸上皮內贅瘤第三期(CIN 3) [包括重度化生不良(severe dysplasia) 和鱗狀上皮細胞原位癌]。類黃酮是屬於天然多酚類並廣泛存在於日常生活蔬果之中，主要存在於柑橘類植物、豆類、蔬菜及藥草類植物之中。在傳統療法中，常被用作抗發炎藥物的成分、抗過敏、抗發炎、抗氧化、抗突變、抗致癌化以及調節酵素活性等[4,5,6]。近來也有許多關於抑制癌化的研究，而參與其中的主要分子機轉，可分為：【一】Preventing carcinogen metabolic activation、【二】Anti-proliferation、【三】Cell cycle arrest、【四】Induction of apoptosis、【五】Promotion of differentiation、【六】Antioxidative activity、【七】Inhibition of angiogenic process [7,8,9]。

研究目的

第一年的研究計畫證實 fisetin 會誘導 HeLa 細胞走向凋亡是透過 ERK1/2 和 caspase-8 途徑[10]，第二年的研究計畫證實 fisetin 會抑制 SiHa 和 caski 細胞轉移是透過 MKK3/6/JNK/NF-kB 來抑制 uPA 表現[11]。綜合以上兩年研究證實 fisetin 會抑制子宮頸癌細胞的腫瘤形成機制。目前子宮頸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 fisetin 與臨床化療藥物和標靶藥物共同作用人類子宮頸癌 HeLa 細胞的分子機制和動物實驗，希望未來 fisetin 可以當作化療輔助性天然物來減緩子宮頸癌病人的副作用和延長壽命

文獻探討

有研究報導指出 Fisetin 對於人類前列腺癌細胞(LNCap)有化學預防作用主要是因為 Fisetin 會調節細胞週期蛋白並且抑制 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑，因而抑制細胞生長[12,13]；同時，fisetin 也會抑制 PC3 細胞移動和侵襲作用，主要透過抑制 JNK 和 AKT 磷酸化來抑制 MMP-2/MMP-9 的表現因而達到抑制細胞移動和侵襲作用[14]。同樣，也有相同報導指出 Fisetin 抑制大腸癌細胞(HT29 細胞)的細胞週期停

留在 G0/G1 時期是透過調節細胞週期蛋白機制[15]。Fisetin 調控細胞凋亡可分為兩種路徑：(1) Fisetin 造成人類胰臟癌細胞走向凋亡途徑是透過 DR3 receptor 來抑制 NF- κ B 的活化路徑[16]；(2) Fisetin 誘導人類大腸癌細胞凋亡主要是抑制 COX2 蛋白表現和 Wnt/EGFR/NF- κ B 訊息傳遞路徑[17]。(3) 肝癌方面的研究指出人類肝癌細胞 SK-Hep1 細胞處理 Fisetin 會造成 DNA 斷裂累積，因而誘導 p53 蛋白增加和 CPP32 活性增加[18]。(4) 膀胱癌方面研究指出 fisetin 會造成細胞週期停留在 G0/G1 期，並且誘導細胞凋亡蛋白 Bax 和 Bak 表現上升；反之，抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 下降，同時也會活化 p53 和抑制 NF- κ B 的活性[19]。(5) fisetin 此外，有研究指出 Fisetin 會調控細胞移動和侵襲能力，舉例來說：Fisetin 會抑制人類肺癌細胞(A549)的移動和侵襲能力是透過抑制 ERK 磷酸化因而造成 uPA 和 MMP-2 的活性下降[20]；有文獻指出 Fisetin 會抑制乳癌細胞侵襲機制是透過 PKC delta/ERK/AP-1 的訊息傳遞路徑，因而減少 MMP-9 分泌造成乳癌細胞侵襲能力下降[21]。以抗氧化方面的研究指出 Fisetin 會減少人類血癌(HL-60)細胞內過氧化物產生，活化內切酶和抑制 Mcl-1 蛋白表現[22]；此外，有研究學者認為 Fisetin 會抑制 TNF 因子、各種發炎因子和致癌物所誘導 NF- κ B 的活化，主要機制是透過抑制 IKK α 活化，導致 NF- κ B 降解和抑制 p65 磷酸化[23]。誘導細胞凋亡：在人類子宮頸癌細胞中，漆黃素會透過 ERK1/2 訊息路徑去活化 caspase-8 和 caspase-3，進而導致細胞凋亡[10]。漆黃素會使黑色素瘤細胞產生細胞毒性，透過自噬作用並伴隨細胞凋亡[24]。漆黃素可以抑制 LMP1-positive 鼻咽癌細胞的移動(migration)、侵襲(invasion)和上皮-間質轉化(epithelial-mesenchymal transition；EMT)，當漆黃素作用癌細胞，會使 epithelial maker(E-cadherin)上升，mesenchymal maker(vimentin)下降[25]。綜合以上的研究證實 Fisetin 會抑制各種腫瘤細胞的生長、侵襲能力和誘導細胞凋亡現象

Sorafenib 屬於酪胺酸激酶抑制劑，抑制細胞內 Raf 阻斷 RAF/MEK/ERK 訊息傳導路徑與細胞表面激酶 (VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β) 之雙重作用，因此可以產生細胞死亡及抑制細胞血管新生。其作用機轉為抑制細胞內 Raf-1 及癌細胞株上野生型 B-Raf 的活性，並可作用於癌細胞表面激酶血管內皮生長因子接受體、血小板生成因子、激素受體 (c-KIT cytokine receptor) 等幾個酪胺酸激酶接受體，抑制 MEK/ERK 磷酸化藉由阻斷 Raf 與 c-KIT 信號傳導路徑，有效達到抑制腫瘤細胞血管新生與增殖。根據臨床試驗數據證實，sorafenib 對於晚期肝癌[26]、腎細胞癌[27]、甲狀腺癌病人[28]具有成功治療癌症的效果。此外因 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。本研究採用漆黃素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子宮頸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. Nasiell K, Roger V, Nasiell M (1986) Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 67: 665-669.
2. (1989) The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 262: 931-934.
3. Ostor AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 12: 186-192.
4. Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R, Villar IC, Wangensteen R, et al. (2004) Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med* 70: 334-341.
5. Hellerstein HK, Orbison JL, Rodbard S, Wilburne M, Katz LN (1951) The effect of rutin in experimental malignant hypertension. *Am Heart J* 42: 271-283.
6. Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C (1998) Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem Toxicol* 36: 617-621.
7. Weber G, Shen F, Prajda N, Yang H, Li W, et al. (1997) Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv Enzyme Regul* 37: 35-55.
8. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, et al. (2001) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 19: 837-844.
9. Casagrande F, Darbon JM (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 61: 1205-1215.
10. Ying TH, Yang SF, Tsai SJ, Hsieh SC, Huang YC, et al. (2012) Fisetin induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through ERK1/2-mediated activation of caspase-8/-caspase-3-dependent pathway. *Arch Toxicol* 86: 263-273.
11. Chou RH, Hsieh SC, Yu YL, Huang MH, Huang YC, et al. (2013) Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One* 8: e71983.
12. Khan N, Afaq F, Syed DN, Mukhtar H (2008) Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis* 29: 1049-1056.
13. Haddad AQ, Fleshner N, Nelson C, Saour B, Musquera M, et al. (2010) Antiproliferative mechanisms of the flavonoids 2,2'-dihydroxychalcone and fisetin in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 62: 668-681.
14. Chien CS, Shen KH, Huang JS, Ko SC, Shih YW (2010) Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Mol Cell Biochem* 333: 169-180.
15. Lu X, Jung J, Cho HJ, Lim DY, Lee HS, et al. (2005) Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr* 135: 2884-2890.
16. Murtaza I, Adhami VM, Hafeez BB, Saleem M, Mukhtar H (2009) Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-kappaB. *Int J Cancer* 125: 2465-2473.

17. Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, Mukhtar H (2009) A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis* 30: 300-307.
18. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, et al. (2002) Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch Toxicol* 76: 351-359.
19. Li J, Cheng Y, Qu W, Sun Y, Wang Z, et al. (2011) Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF-kappa B pathways in bladder cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108: 84-93.
20. Liao YC, Shih YW, Chao CH, Lee XY, Chiang TA (2009) Involvement of the ERK signaling pathway in fisetin reduces invasion and migration in the human lung cancer cell line A549. *J Agric Food Chem* 57: 8933-8941.
21. Lin CW, Hou WC, Shen SC, Juan SH, Ko CH, et al. (2008) Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 29: 1807-1815.
22. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, et al. (2002) Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* 63: 225-236.
23. de Sousa RR, Queiroz KC, Souza AC, Gurgueira SA, Augusto AC, et al. (2007) Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFkappaB expression are affected by fisetin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22: 439-444.
24. Syed DN, Lall RK, Chamcheu JC, Haidar O, Mukhtar H (2014) Involvement of ER stress and activation of apoptotic pathways in fisetin induced cytotoxicity in human melanoma. *Arch Biochem Biophys*.
25. Li R, Zhao Y, Chen J, Shao S, Zhang X (2014) Fisetin inhibits migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of LMP1-positive nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol Med Rep* 9: 413-418.
26. 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.
27. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, et al. (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356: 125-134.
28. Duntas LH, Bernardini R (2010) Sorafenib: rays of hope in thyroid cancer. *Thyroid* 20: 1351-1358.
29. Torres F, Quintana J, Diaz JG, Carmona AJ, Estevez F (2008) Trifolin acetate-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspase-6 and activates the MAPK pathway. *Apoptosis* 13: 716-728.
30. Shin GC, Kim C, Lee JM, Cho WS, Lee SG, et al. (2009) Apigenin-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species and activation of ERK1/2 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Chem Biol Interact* 182: 29-36.
31. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275: 39435-39443.
32. Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC (2006) Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 11: 337-346.
33. Snyder A, Alsaukas ZC, Leventhal JS, Rosenstiel PE, Gong P, et al. (2010) HIV-1 viral protein r induces ERK and caspase-8-dependent apoptosis in renal tubular epithelial cells. *AIDS* 24: 1107-1119.

34. Wilson DJ, Alessandrini A, Budd RC (1999) MEK1 activation rescues Jurkat T cells from Fas-induced apoptosis. *Cell Immunol* 194: 67-77.

研究方法

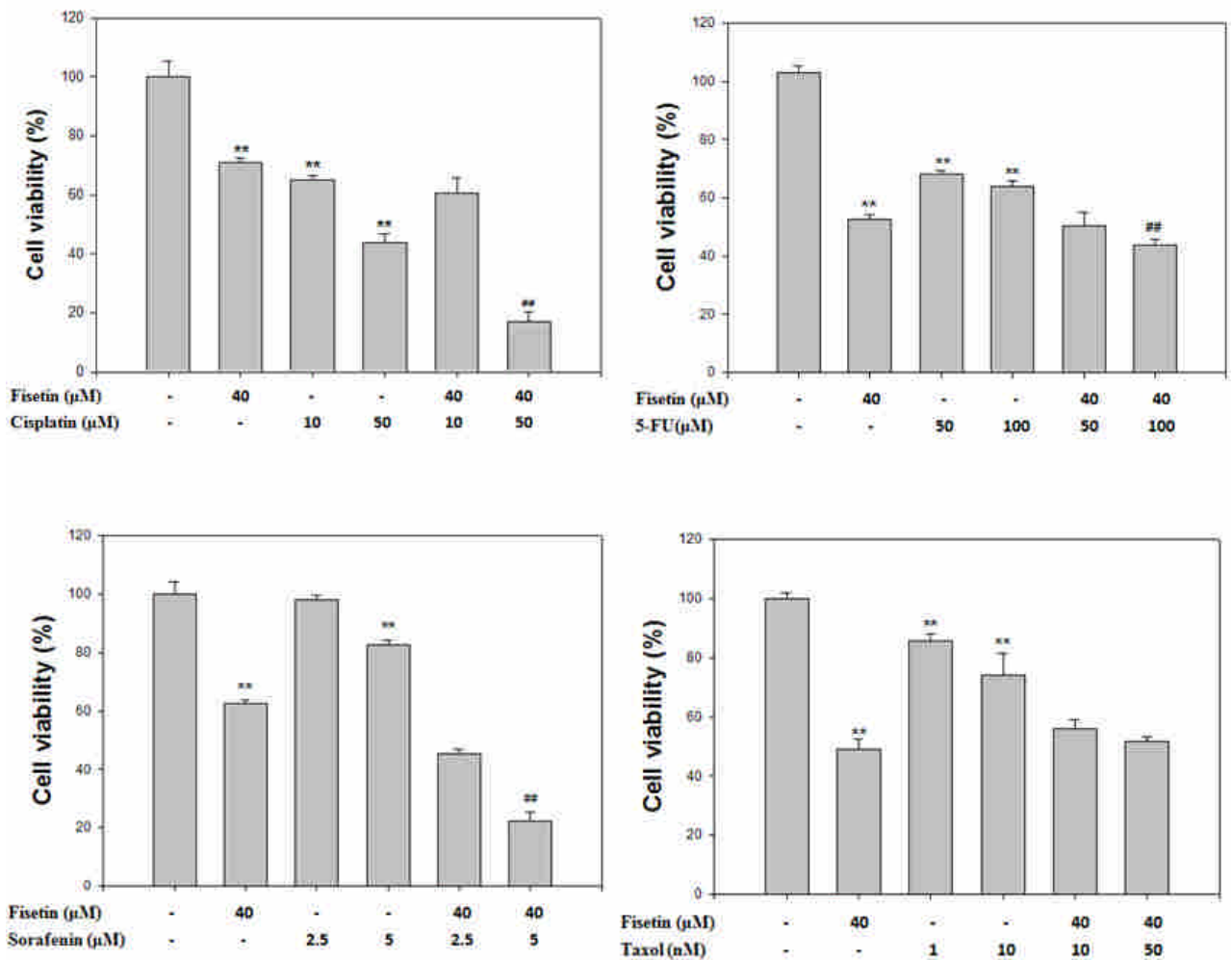
1. 細胞培養及處理:人類子宮頸癌細胞株: HeLa 以 DMEM 培養基培養加入適量 antibiotics 及 10% heat-inactivated FBS。
2. MTT (Microculture tetrazolium) 分析: 本實驗室用來測試細胞是否有活性以及是否存活的方法, 將癌細胞以 $3\sim 5 \times 10^4$ 細胞數分至 24 well 中, 37°C 培養 16 小時後, 處理不同濃度 Fisetin 處理 24 小時後, 去除加藥的細胞培養液, 再加入 1 ml 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/ml), 待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出, 於 O.D. 565 nm 下測定溶液吸光, 由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。
3. Annexin V/PI 雙染實驗: 本實驗是利用美國 BD Biosciences 公司的 Apoptosis Detection kit, 首先在人類子宮癌細胞株中, 分別處理不同濃度的藥物, 24 小時後, 以 PBS 清洗兩次後再加入 1 x Trypsin-EDTA 作用 5 分鐘, 之後加入 5 ml 培養基與之中和 1 x Trypsin-EDTA 作用, 離心 1000 rpm 5 分鐘, 移除上清液, 接著 1 x PBS 清洗兩次, 再加入 100 μl binding buffer (10 mM HEPES/ NaOH、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl_2 、pH 7.4)、5 μl Annexin V 和 5 μl PI (50 $\mu\text{g/ml}$) 於室溫作用 30 分鐘並避光, 上機之前再加入 400 μl binding buffer 混合均勻樣品並過 filter 以避免細胞顆粒過大阻塞儀器, 最後以流式細胞儀 (FACSCalibur flow cytometer) 做分析, 實驗數據以 Cellquest 軟體來做分析。
Cell cycle 分析: 以 60 mm 培養皿培養細胞添加不同濃度 Fisetin, 並處理不同時間後, 將細胞打下, 加入 1 ml 的 70% cold ethanol 以固定細胞, 置於 4°C 中隔夜。移除上清液並分別加入 1 ml 之 propidium iodide mixture (PI stain) 靜置室溫 30 分鐘。用 40 μm nylon mesh 過濾, 以流式細胞儀作分析。
4. Western blotting: 利用 western blotting 的方法測定, caspase-3, caspase-9, PARP, Bcl-2, Bax, Bim, Bad, Bid, DR4, DR5, CHOP, ERK1/2, pERK1/2 及 β -actin 的蛋白量。首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片, 以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後, 將膠拆下後進行蛋白轉漬於 4°C 下, 以 100V 進行轉漬 1 小時之後, 取出 NC paper 加入 blocking buffer, 在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer, 在 4°C 下反應 overnight, 之後 washing buffer 清洗三次。接著再加入二級抗體於 TBS buffer, 於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗三次。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反應, 待 NC paper 上有明顯的 band 出現, 即以水終止反應並晾乾。
5. Cell migration/invasion assay: 利用 48 well Boyden chamber 的分析方法, lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM, 將細胞處理 Fisetin 24 小時後, 以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數, 然後注入固定量的細胞 (1.5×10^4 cell/well 2×10^4 cell/well) 於 upper chamber 或將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 100 g/cm^2 Marix gel (0.5 mg/ml), 待細胞移動 8 小時以後, 取下薄膜, 以甲醇固定細胞 10 分鐘, 風乾 5 分鐘之後, 以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時, 最後固定住薄膜, 擦拭掉薄膜之上層細胞, 在 400 \times 顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野, 數 5 個 well, 作移動細胞數之統計。
6. RT-PCR 分析: RT: 取 5 μg 的 RNA 加入 DEPC-H₂O 17.75 μl , 以 70°C 處理 5 分鐘。加入 0.25 μl RNase

inhibitor (Promega; 40 U/ μ l), 10 μ l 5 \times RT buffer (Promega; 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ 和 10 mM DTT)以及 4 μ l dNTP (Promega; 2.5 mM), 和 5 μ l Oligo dT 後, 於溫度循環機理 42 $^{\circ}$ C, 5 分鐘後加入反轉錄酵素 (Promega) 1 μ l, 繼續在 42 $^{\circ}$ C 反應, 1 小時之後再以 99 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後以 4 $^{\circ}$ C 保存。引子的設計都是參考 Biology Workbench 3.2 網站。Polymerase Chain Reaction: 溫度循環機前處理 94 $^{\circ}$ C, 5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 黏合溫度 1 分鐘, 並於 72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘, 此循環次數視不同 primer 而定, 最後再處理 72 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘, 4 $^{\circ}$ C 保存。DNA 電泳: 加入 DNA marker 和取 10 ml 的 PCR 產物加入 2 ml 的 6 倍 loading dye, 加到電泳膠片。電壓 100 V, 跑電泳膠片 30 分鐘, 於 UV 光下對照 DNA marker 位置, 檢查所要的位置是否有所表現。

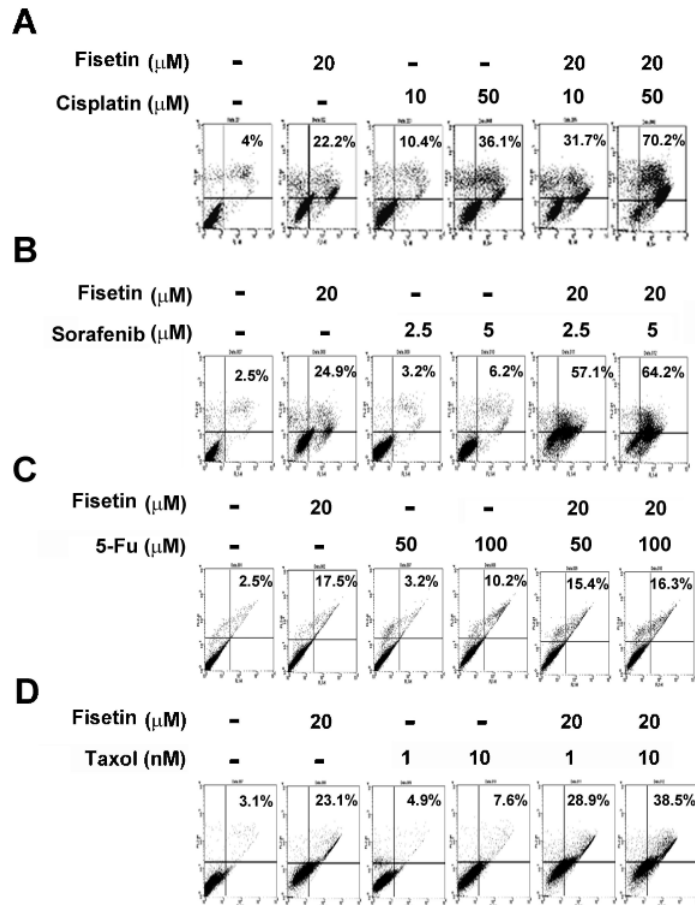
7. 分析 Fisetin 對人類子宮頸癌細胞在活體內(in vivo)生長和轉移情形: 免疫缺陷的小鼠(BALB/c nu/nu mice)接種人類子宮頸癌 HeLa、CaSki 和 SiHa 細胞, 將 $1 \times 10^7/100$ 1 PBS 洗淨的人類癌細胞, 打入老鼠的右後腿動脈附近皮下, 7 天後將接種腫瘤細胞的老鼠隨機分組, 進一步注射或餵食不同濃度 Fisetin, 每天以游標閥尺測量腫瘤長寬, 以 $1/2 \times \text{長} \times \text{寬} \times \text{寬}$ 計算腫瘤體積, 7 週後犧牲老鼠, 取出腫瘤及肺臟以觀察其腫瘤大小、重量, 以評估應用的可行性。
8. 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

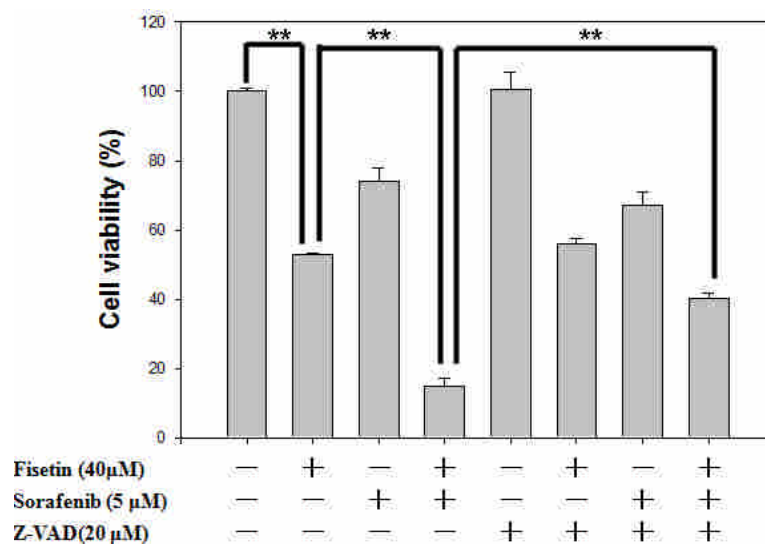
【1】 為了證明漆黃素與四種不同化療藥物之結合作用是否造成 HeLa 細胞凋亡，我們將 HeLa 細胞加入 fisetin (40 μM) 分別與 cisplatin (10 and 50 μM)、5-Fu (50 and 100 μM)、sorafenib (2.5 and 5 μM) 和 Taxol (10 and 50 μM) 共同作用 24 h. 之後以 MTT 方式證實 單一處理 fisetin 會抑制細胞生長，然而共同處理 cisplatin (10 and 50 μM)、5-Fu (50 and 100 μM) 和 sorafenib (2.5 and 5 μM) 24 小時後發現隨著 cisplatin (10 and 50 μM)、5-Fu (50 and 100 μM) 和 sorafenib (2.5 and 5 μM) 濃度增加，會加強 fisetin 抑制 HeLa 細胞生長的現象，但是對於 Taxol 的濃度增加並不會加強 fisetin 抑制 HeLa 細胞生長的現象。此項實驗結果說明漆黃素與化療藥物 cisplatin、5-Fu 和 sorafenib 具有協同抑制子宮頸癌細胞生長的現象



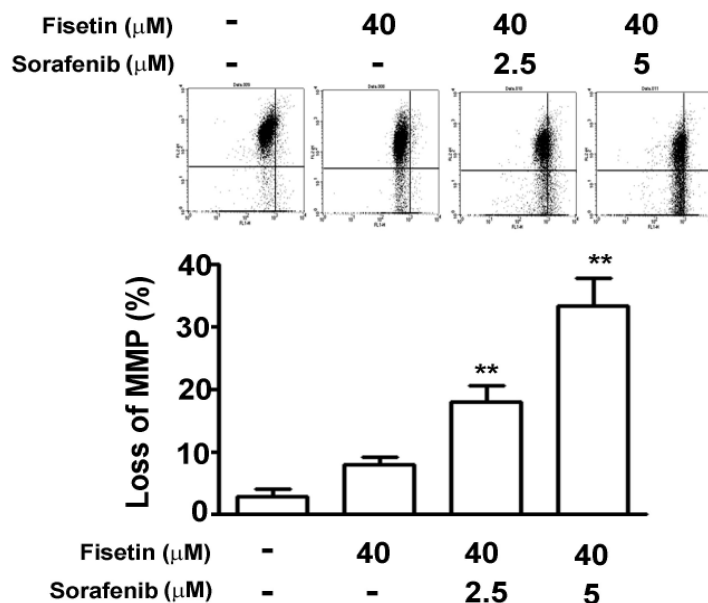
【2】 為了證明 fisetin 與化療藥物抑制細胞生長是透過細胞凋亡途徑，我們利用 flow cytometry 以 Annexin-V/PI 染色來應證。如圖二所示單一加入 fisetin 誘導細胞凋亡約 17.1%~24.9%，fisetin 結合 cisplatin (10 μM cisplatin: 31.7%; 50 μM cisplatin: 70.2%) 隨著劑量增加細胞凋亡越明顯：fisetin 結合 sorafenib (2.5 μM sorafenib: 57.1 μM sorafenib: 64.2%) 隨著劑量增加細胞凋亡越明顯和 fisetin 結合 taxol (1 nM Taxol: 28.9%; 10 nM Taxol: 37.5%)。綜合以上結果說明 fisetin 共同結合 cisplatin、sorafenib 和 Taxol 有明顯誘導細胞凋亡現象。



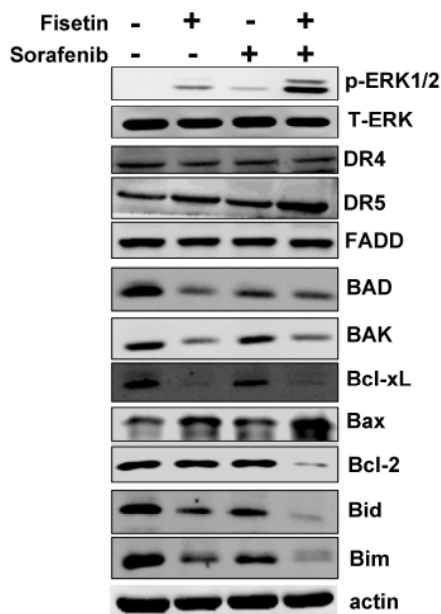
【3】因此本研究採用 sorafenib 為主要模式來探討 fisetin 結合 sorafenib 抑制細胞凋亡機制。此外 fisetin 結合 cisplatin 的研究已有相關研究證實[Mol Cancer Ther. 2011 Feb;10(2):255-68]。本實驗採用 MTT 方式證實單一使用 fisetin 和 sorafenib 都會抑制細胞生長(約抑制 52%和 38%)，fisetin 與 sorafenib 會加強抑制細胞生長，反之加入 pan-caspase 抑制劑就會減緩 fisetin 與 sorafenib 抑制細胞生長的能力，說明 fisetin 和 sorafenib 共同抑制細胞生長是透過細胞凋亡途徑。



【4】接下來本研究想要證實 fisetin 和 sorafenib 共同作用是否會影響粒腺體膜電位改變。本實驗採用 flow cytometry 方式以 JC-1 染色來作證實。實驗結果說明單一使用 fisetin 和 sorafenib 都會造成粒腺體膜電位稍微改變(約 8.5%和 13.2%)，一旦 fisetin 和 sorafenib 共同加入會造成加強粒腺體膜電位改變(約 38.4%)。由此可見，fisetin 和 sorafenib 會影響粒腺體膜電位改變，造成細胞凋亡途徑

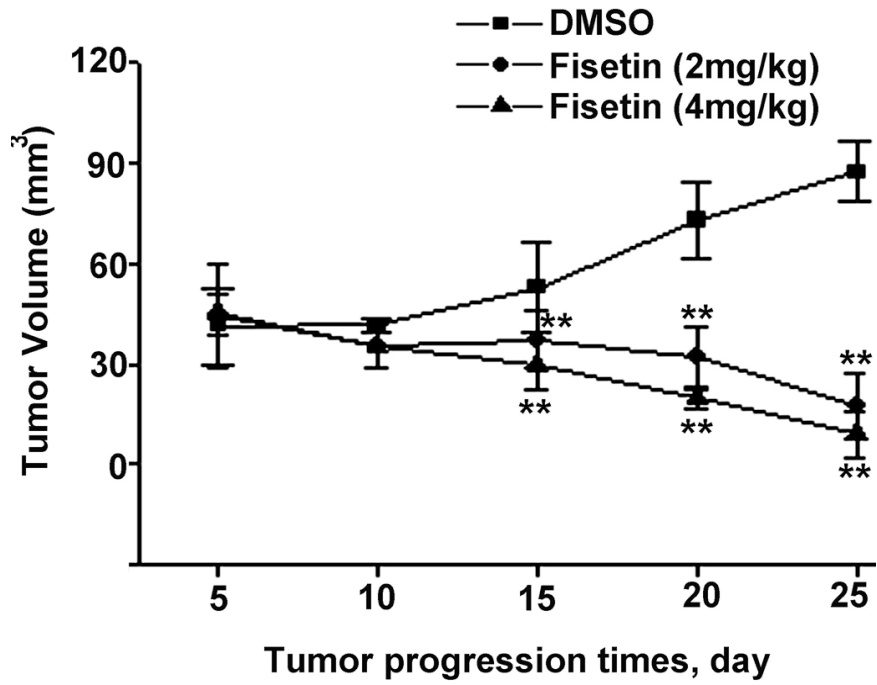


【5】之前第一年的研究證實 fisetin 會誘導 HeLa 細胞走向凋亡是透過 ERK1/2 磷酸化增加(Arch Toxicol. 2012 Feb;86(2):263-73)。因此本研究要證實，fisetin 和 sorafenib 共同作用 HeLa 細胞走向凋亡是否也會經由 ERK1/2 磷酸化增加，同時是否影響粒腺體相關蛋白和細胞死亡接受器途徑。實驗結果證實單一處理 fisetin 會誘導 ERK1/2 磷酸化增加，fisetin 和 sorafenib 共同作用更加誘導 ERK1/2 磷酸化增加。此外單一處理 fisetin 會誘導 DR5 和 Bax 表現增加，抑制 BAD、BAK、Bcl-xL、Bid 和 Bim 蛋白表現；同時處理 fisetin 和 sorafenib 共同誘導 DR5 和 Bax 表現更顯著增加，反之，更加抑制 Bcl-2、Bid 和 Bim 蛋白表現，BAD、BAK、Bcl-xL 則無影響。此項結果說明 fisetin 和 sorafenib 共同誘導細胞凋亡會經由粒腺體相關蛋白(Bax 和 Bcl-2) 和死亡接受器途徑(DR5)。

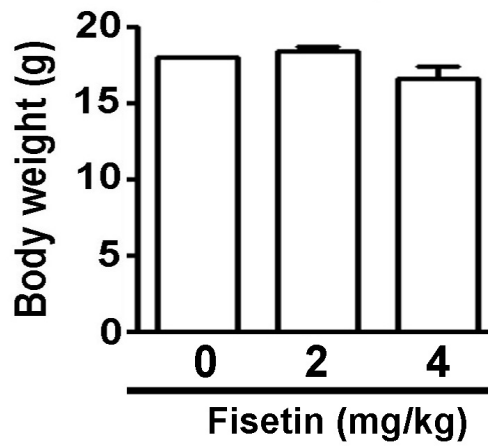


【6】之前第一年的研究證實 fisetin 會誘導 HeLa 細胞走向凋亡，因此本研究要證實 fisetin 是否抑制老鼠腫瘤細胞生長。實驗結果證實隨者 fisetin 的劑量增加，腫瘤細胞有逐漸下降的趨勢(圖六 A)，同時也不影響老鼠體重 (圖六 B)

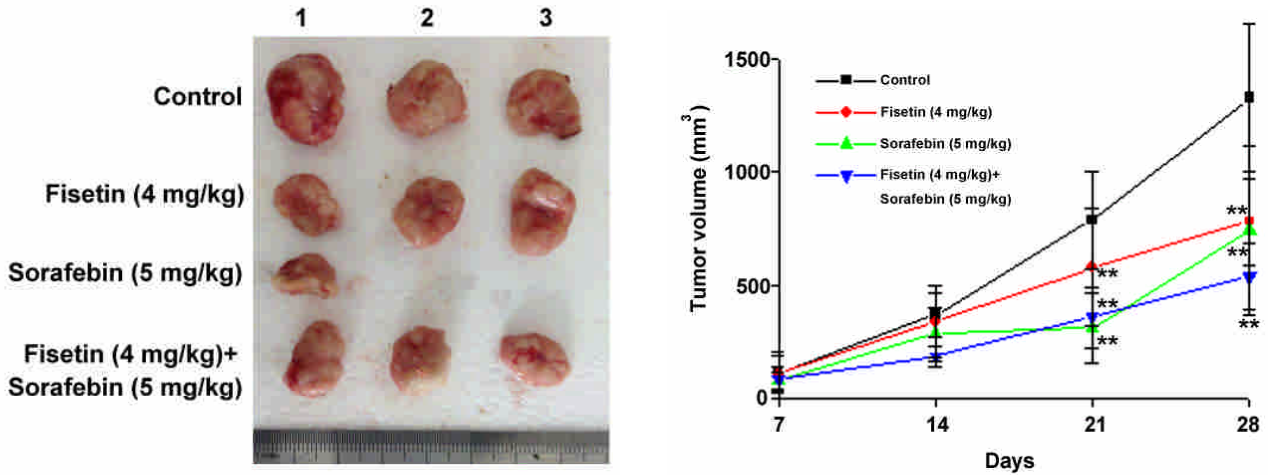
A



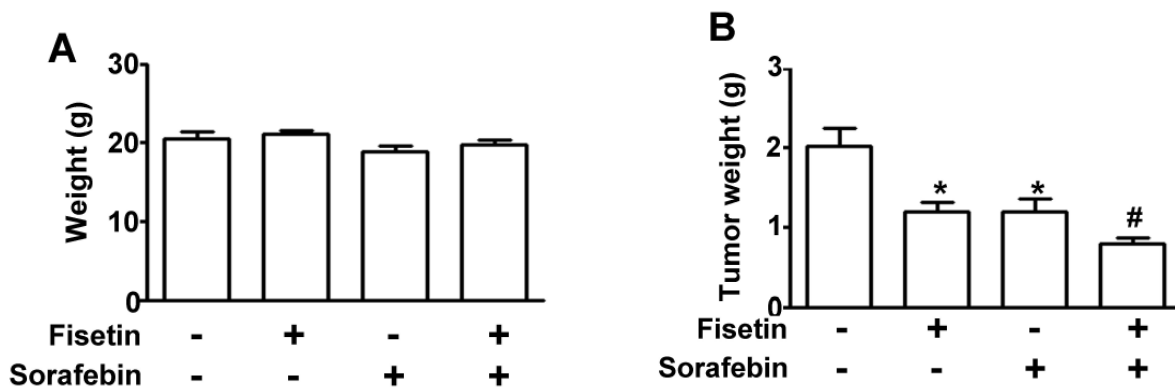
B



【7】為了證實 fisetin 與 sorafenib 有共同抑制 HeLa 細胞腫瘤生成作用，本研究採用 5×10^6 /ml 的 HeLa 細胞注射到裸鼠背部，分別一星期注射兩次 fisetin/sorafenib (100ul/次)和共同注射 fisetin/sorafenib(100ul/次)到裸鼠腹腔，每隔七天測量一次腫瘤大小，總共 28 天整體結果大致說明共同注射 fisetin/sorafenib 會抑制 HeLa 細胞生長，與對照組比較，具有顯著意義。但是此項實驗結果必須重新證實一次，更加確定 fisetin 與 sorafenib 共同作用會達到輔助 sorafenib 的作用，能夠當做化學輔助藥物。



【8】此項結果初步証實分別單一注射 fisetin/sorafenib 或共同注射 fisetin/sorafenib 對於老鼠重量並無影響，同時單一注射 fisetin/sorafenib 會抑制腫瘤生長(Fig 8A)，但是共同注射 fisetin/sorafenib 更能顯著抑制腫瘤生長(Fig 8B)



討論

近年來隨著研究的進步，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。目前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。目前的臨床用藥都是以 cisplatin、5-Fu 和 Taxol 三種化學治療藥物來治療子宮頸癌病患，但是這些藥物都會有臨床上的副作用，因為大多數標靶治療藥物出現此毒性的比率均相當的低。近年來，許多標靶藥物已針對晚期肝細胞癌患者進行臨床試驗。雖然乍看之下反應率並不出色，但相對化學治療明顯較低的毒性，本研究採用肝癌末期專用的標靶藥物 Sorafenib (商品名：Nexavar®、蕾莎瓦®) 來當做治療子宮頸癌的作用，他本身是一種多重激酶抑制劑，會阻斷癌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 (apoptosis)，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。本研究利用 fisetin 與 sorafenib 共同作用希望達到抑制細胞生長同時誘導細胞凋亡，實驗結果證實 fisetin 與 sorafenib 共同作用會誘導 HeLa 細胞走向凋亡途徑，同時會誘導細胞凋亡蛋白 (caspase-3, caspase-9, PARP) 的活化，也會影響粒線體膜電位的平衡，因而影響粒線體膜蛋白 Bcl-2 相關蛋白的表現，此外，我們之前的研究證實 fisetin 誘導 HeLa 細胞凋亡是透過活化 ERK1/2 途徑，同樣的結果也驗證 fisetin 與 sorafenib 共同作用也會誘導 ERK1/2 途徑活化，但是不同之處在於單一處理 fisetin 不會影響粒線體途徑和 caspase-9 途徑，本研究的實驗證實 fisetin 與 sorafenib 共同作用會誘導粒線體途徑和細胞死亡接受器途徑，因此 fisetin 輔助 sorafenib 影響細胞凋亡是透過兩種途徑，此項結果目前並無文獻報導作用在子宮頸癌治療方面。

近年來有文獻報導漆黃素活化 MAPK 的路徑所誘發細胞凋亡現象和一些壓力反應所導致促進有絲分裂反應是扮演一個重要的角色 [23]，根據我們實驗結果顯示漆黃素透過活化 ERK1/2，p38 和 JNK1/2 則無影響。本篇我們處理 MEK 抑制劑 PD98059 可以證實漆黃素誘導細胞凋亡是透過 ERK1/2 活化因而誘導凋亡，此項結果與人類肺癌細胞中槲黃素 (Quercetin) 誘導凋亡以及類黃酮相似物的三葉苜蓿 (Trifolin) [29] 和芹黃素 (apigenin) [30] 中使用 MEK 抑制劑 PD98059 並減緩凋亡的現象相類似。然而 ERK1/2 與 caspase 之間的關係仍是有爭議性的。先前一些文獻指出，ERK1/2 的訊息傳遞是保護的機制並且是抗細胞凋亡的 [31]，還有一些文獻顯示 ERK1/2 的活化與 caspase-8 的活化有關聯的 [32,33]，在 Jurkat 細胞中活化態的 ERK1/2 會抑制 Fas 進而發生細胞凋亡 [34]。相反的，活化的 ERK1/2 也可能造成細胞凋亡，像有文獻報導出 caspase-8 的活化會造成細胞凋亡，而且是依賴 FADD 及 Fas 的形式，此機制的凋亡並不包括 caspase-9 的參與 [32]，但也有其他的文獻指出，HIV-1 的 r 蛋白會誘導腎小管上皮細胞凋亡，是透過 caspase-8、caspase-9 和 t-BID [34]，本實驗是透過 caspase-8 和 caspase-3 誘導細胞凋亡；但是，也有文獻指出有些凋亡機制包括 caspase-9 的參與。而本篇的細胞凋亡機轉有不同於其他研究的結果，其中的原因可能是細胞特異性。此外 ERK1/2 與 caspase-8 之間是直接或間接作用機制目前尚未明瞭，因此我們推測 ERK1/2 活化和 caspase-8 之間可能是透過蛋白質和蛋白質之間交互作用 (protein-protein interaction) 來誘導細胞凋亡，此項推測需要更多的實驗去驗證，未來我們將繼續探討 fisetin 與 sorafenib 誘發的細胞凋亡過程是否透過 ERK1/2，caspase-8 或 DR5 之間的相互作用與分子機轉。

本次動物實驗結果並不理想，原因有兩種，第一種就是本次實驗注射 HeLa 細胞的數目太多，造成對照組腫瘤快速生長，而且此次藥物劑量可能無法完全抑制腫瘤生長，因此腫瘤生長速率與單一處理 fisetin 作用在 HeLa 細胞動物模式的結果有明顯落差。第二種原因，單獨處理 sorafenib 裸鼠只剩一隻，其餘都已死亡，可能原因是劑量太高，造成細胞毒性。但是本研究認為 fisetin 與 sorafenib 共同作用確實可以抑制裸鼠腫瘤變少，因此我們推測 fisetin 未來可以當作 sorafenib 的輔助性天然物。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/10/21

科技部補助計畫	計畫名稱: 研究漆黃素誘發DR5活化之細胞凋亡和抑制子宮頸癌侵襲之機制
	計畫主持人: 謝逸憲
	計畫編號: 100-2313-B-040-001-MY3 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

100 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：100-2313-B-040-001-MY3					
計畫名稱：研究漆黃素誘發 DR5 活化之細胞凋亡和抑制子宮頸癌侵襲之機制							
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%		
	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	1	1	100%		
國外	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	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	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(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。)</p>	<p style="text-align: center;">無</p>
---	--------------------------------------

	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）

近來年 sorafenib 核准治療晚期腎細胞癌、子宮頸癌與肝癌，且 sorafenib 為一新酪胺酸激酶抑制劑可抑制腫瘤生長與血管新生，臨床上病人而言是一種口服耐受性佳有效的藥品，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 fisetin 抑制子宮頸癌生長和誘導凋亡的能力，未來希望 fisetin 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子宮頸癌細胞生長。