

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

樟芝活性成分camphorataimide B抑制肝癌之功效評估:以促癌
微核醣核酸為標的,探討癌幹特性、增生、凋亡、侵襲/轉移及
其作用機轉

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-040-007-

執行期間：106年08月01日至107年07月31日

執行單位：中山醫學大學生化微生物免疫研究所

計畫主持人：張雲菁

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：張宴綾
碩士班研究生-兼任助理：蔡欣蓓
碩士班研究生-兼任助理：蔡孟庭
大專生-兼任助理：楊繼勛
大專生-兼任助理：吳玟諭
博士班研究生-兼任助理：鍾岱融

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 107 年 10 月 31 日

中文摘要：牛樟芝(*Antrodia camphorata*)是台灣獨有品種，其菌絲體與子實體已被當作中草藥使用在各種不同的疾病的治療中，而CamB (camphorataimide B)便是由其菌絲體萃取出之馬來酸(maleic acid)衍生物。先前研究顯示，Cam B具有抑制乳癌作用，但在肝癌則有待相關釐清與進一步的調控相關路徑探討。本研究擬利用三株人類肝癌細胞株(HepG2、Hep3B、Huh7)驗證Cam B抑制肝癌生成之作用。利用MTT和BrdU增生實驗分析，結果發現Cam B可以使三株肝癌細胞存活率降低，其中Hep3B效果較為顯著，在濃度大於90 $\mu\text{g/mL}$ 引起死亡。進一步利用流式細胞儀(PI stain)及西方點墨法分析，顯示Cam B誘導人類肝癌細胞株走向細胞凋亡(apoptosis)，且透過活化凋亡路徑相關蛋白(Bax, tBid, cytochrome c, Fas, FasL)表現，反之，抑制Bcl-2與Mcl-1蛋白表現量，可證實Cam B促進細胞凋亡。另一方面，在本計畫中我們同時觀察Cam B對四種不同微核糖核酸(miRNA)的表現，miR-21、miR-224、miR-483 (oncogenic miRNA)和miR-101 (tumor suppressor miRNA)，發現處理Cam B後，Hep3B細胞株中miR-21、miR-224、miR-483的表現會減少，而miR-101則增加。因此，選定miR-483及miR-101進行後續研究。結果發現同時處理Cam B及mature miR-483 (miR-483 mimic)或antagomir-101 (anti-miR-101)，透過調控PKC- α 與p-p38蛋白表現下降及Mcl-1與Cyto. C表現量上升，導致抑制細胞的生長並誘導細胞凋亡產生。綜合以上結果，Cam B透過 miR-483及miR-101誘導肝癌細胞的凋亡，進而達到抑制肝癌生成之作用，推測Cam B極具抗肝癌作用之潛力。

中文關鍵詞：Camphorataimide B (Cam B)、微核糖核酸、細胞凋亡、抗肝癌作用、人類肝癌細胞

英文摘要：Antrodia camphorata, “niu-chang-ku”, is a unique species of fungus found in Taiwan. Both mycelium and fruiting body of *A. camphorata* have been used as traditional and folk medicines in treatment of various diseases. Camphorataimide B (Cam B) is a maleimide derivative from mycelium of *A. camphorata*. A previous study showed that Cam B possessed anti-proliferative effects against MDA-MB-231 breast cancer cells. However, the full range of CamB anti-cancer effects on liver tumors and the underlying mechanisms have not been identified. The objectives of this study were to evaluate the antitumor effects and mechanisms of Cam B on human hepatocellular cancer cell lines (HepG2, Hep3B, Huh7). Initially, the results of MTT and BrdU assays showed that Cam B inhibited the growth and proliferation of the three cell lines particularly in Hep3B cells. We found Cam B can cause Hep3B death at the concentration higher than 90 $\mu\text{g/mL}$. Further, employing flow cytometry (PI stain), we demonstrate that Cam B can induce apoptosis in Hep3B cells. Cam B inhibited the expression of Bcl-2 and Mcl-1, but increased the expression of Bax, tBid, cytochrome c, Fas and FasL. On the other hand, we can comprehensively monitor

oncogenic microRNAs (miRs) (e.g. miR-21, miR-224, miR-483) and tumor suppressor miRs (e.g. miR-101) simultaneously. We observed that the expression of miR-21, miR-224, miR-483 decreased and miR-101 to be increased after treating Hep3B cells with Cam B. Thus, we investigated the role that miRs, specifically miR-483 and miR-101 play in Hep3B cells. The combination of Cam B and mature miR-483 (miR-483 mimic) or antagomir-101 (anti-miR-101) greatly suppresses the growth and induces apoptosis of Hep3B cells. This was associated with decreased expression of PKC- α , p-p38 and increased of Mcl-1, Cyto. c. In summary, miR-101, miR-483, and their networks play critical roles in regulating Cam B-induced apoptosis in the liver cancer. Cam B has a great potential to develop as chemotherapeutic agent for liver cancer.

英文關鍵詞：Camphorataimide B (Cam B), microRNA, apoptosis, anti-hepatocarcinogenesis, human hepatocellular carcinoma cell line

中文摘要

關鍵字：Camphorataimide B (Cam B)、微核糖核酸、細胞凋亡、抗肝癌作用、人類肝癌細胞

牛樟芝(*Antrodia camphorata*)是台灣獨有品種，其菌絲體與子實體已被當作中草藥使用在各種不同的疾病的治療中，而 CamB (camphorataimide B)便是由其菌絲體萃取出之馬來酸(maleic acid)衍生物。先前研究顯示，Cam B 具有抑制乳癌作用，但在肝癌則有待相關釐清與進一步的調控相關路徑探討。本研究擬利用三株人類肝癌細胞株(HepG2、Hep3B、Huh7)驗證 Cam B 抑制肝癌生成之作用。利用 MTT 和 BrdU 增生實驗分析，結果發現 Cam B 可以使三株肝癌細胞存活率降低，其中 Hep3B 效果較為顯著，在濃度大於 90 µg/mL 引起死亡。進一步利用流式細胞儀(PI stain)及西方點墨法分析，顯示 Cam B 誘導人類肝癌細胞株走向細胞凋亡(apoptosis)，且透過活化凋亡路徑相關蛋白(Bax, tBid, cytochrome c, Fas, FasL)表現，反之，抑制 Bcl-2 與 Mcl-1 蛋白表現量，可證實 Cam B 促進細胞凋亡。另一方面，在本計畫中我們同時觀察 Cam B 對四種不同微核糖核酸(miRNA)的表現，miR-21、miR-224、miR-483 (oncogenic miRNA)和 miR-101 (tumor suppressor miRNA)，發現處理 Cam B 後，Hep3B 細胞株中 miR-21、miR-224、miR-483 的表現會減少，而 miR-101 則增加。因此，選定 miR-483 及 miR-101 進行後續研究。結果發現同時處理 Cam B 及 mature miR-483 (miR-483 mimic)或 antagomir-101 (anti-miR-101)，透過調控 PKC- α 與 p-p38 蛋白表現下降及 Mcl-1 與 Cyto. C 表現量上升，導致抑制細胞的生長並誘導細胞凋亡產生。綜合以上結果，Cam B 透過 miR-483 及 miR-101 誘導肝癌細胞的凋亡，進而達到抑制肝癌生成之作用，推測 Cam B 極具抗肝癌作用之潛力。

英文摘要

Keywords: Camphorataimide B (Cam B), microRNA, apoptosis, anti-hepatocarcinogenesis, human hepatocellular carcinoma cell line.

Antrodia camphorata, “niu-chang-ku”, is a unique species of fungus found in Taiwan. Both mycelium and fruiting body of *A. camphorata* have been used as traditional and folk medicines in treatment of various diseases. Camphorataimide B (Cam B) is a maleimide derivative from mycelium of *A. camphorate*. A previous study showed that Cam B possessed anti-proliferative effects against MDA-MB-231 breast cancer cells. However, the full range of CamB anti-cancer effects on liver tumors and the underlying mechanisms have not been identified. The objectives of this study were to evaluate the antitumor effects and mechanisms of Cam B on human hepatocellular cancer cell lines (HepG2, Hep3B, Huh7). Initially, the results of MTT and BrdU assays showed that Cam B inhibited the growth and proliferation of the three cell lines particularly in Hep3B cells. We found Cam B can cause Hep3B death

at the concentration higher than 90 $\mu\text{g/mL}$. Further, employing flow cytometry (PI stain), we demonstrate that Cam B can induce apoptosis in Hep3B cells. Cam B inhibited the expression of Bcl-2 and Mcl-1, but increased the expression of Bax, tBid, cytochrome c, Fas and FasL. On the other hand, we can comprehensively monitor oncogenic microRNAs (miRs) (e.g. miR-21, miR-224, miR-483) and tumor suppressor miRs (e.g. miR-101) simultaneously. We observed that the expression of miR-21, miR-224, miR-483 decreased and miR-101 to be increased after treating Hep3B cells with Cam B. Thus, we investigated the role that miRs, specifically miR-483 and miR-101 play in Hep3B cells. The combination of Cam B and mature miR-483 (miR-483 mimic) or antagomir-101 (anti-miR-101) greatly suppresses the growth and induces apoptosis of Hep3B cells. This was associated with decreased expression of PKC- α , p-p38 and increased of Mcl-1, Cyto. c. In summary, miR-101, miR-483, and their networks play critical roles in regulating Cam B-induced apoptosis in the liver cancer. Cam B has a great potential to develop as chemotherapeutic agent for liver cancer.

前言

一、肝癌

肝臟為人體重要生理代謝及解毒器官，它具有強大修補能力，一般輕微或非持續性之毒性所造成的傷害，可以透過正常的修補機制恢復正常功能，但當持續性的飲酒過量或病毒性持續誘發之肝損傷的狀況下，即有可能誘發慢性肝炎、肝硬化甚至於肝癌而死亡。在台灣，慢性肝炎及肝硬化近年來一直位居十大死亡原因的第六名，且在十大死亡原因第一名的惡性腫瘤病因中，肝癌又常與肺癌、結腸直腸癌並列前茅。肝損傷造成的疾病相當廣泛，大致將其歸類如下：(1)脂肪肝--可在飲食攝取不均，如長期高油脂高熱量飲食或攝取過多酒精引起。(2)肝癌--肝癌有兩種，一種源自肝臟（叫做原發性肝癌primary liver cancer），一種是由身體其他部份擴散到肝臟的（亦稱為續發性肝癌secondary liver cancer）。原發性肝癌原自身體最大的器官肝臟，又名肝腫瘤和肝細胞癌（HCC）是最普通的惡性原發性肝臟腫瘤。(3)肝炎--又可分為一般性發炎、病毒性肝炎、酒精性肝炎。(4)肝硬化--往往是由其他肝損傷疾病所造成的後期病徵。(5)中毒及藥物所引起的肝病。(6)其他肝臟疾病--如原發性膽汁性肝硬化及和細菌性肝膿腫等。目前已經有許多的證據支持，B型肝炎病毒、C型肝炎病毒和肝癌的形成具有極密切的關係，至於化學性致癌源方面，一般認為與芳香胺類(arylamine)、黃麴毒素(aflatoxin B1)有關係[1]，其它被懷疑的肝癌致癌源尚包括：藥物代謝、砷、酒精、肝硬化及吸菸等，均在被研究中。

肝癌是國人致死率極高的癌症之一，且對於肝癌的治療，早期肝癌患者可進行根除性治療，包括肝切除手術、電燒、肝動脈血管栓塞及肝臟移植等。然而，肝癌在初期並無明顯的徵兆，非常容易被忽視，許多患者在發現疾病時，腫瘤已

從原發灶擴散到肝臟其他部位或別的器官。這種晚期肝癌目前無法根除，造成治療上的很大的挑戰。至於藥物療法，目前唯一證實有效的標靶藥物是蕾沙瓦(Nexavar)，但副作用大、藥價昂貴，平均僅能延長壽命兩個多月。近年來研究發現，幾乎所有的腫瘤中都潛伏著極少量的腫瘤幹細胞(cancer stem cells, CSCs)，是腫瘤發生、復發、轉移乃至抗藥性以及治療失敗的根源[2]，許多研究顯示，肝癌中也存在肝癌幹細胞(liver cancer stem cells, LCSCs) [3]，因而CSCs的研究將為腫瘤治療提供新的更有針對性、能更充分地展示腫瘤特性的標的。另一方面，精準醫療(Precision Medicine)是現今一新興醫療方法，其針對個人基因、環境、生活方式差異，給予不同疾病治療及預防模式，目的為了可以從中選出最適合病患的治療方法及藥品，達到治療效果最大化及副作用最小化。雖然如此，但是它仍不能取代現有腫瘤學中成功的領域---預防、診斷、篩選有效方法和治療。因此，尋找新的抗癌藥物或防癌保健食品成為當前開發之目標，在肝癌治療無法突破的狀況下，一些研究希望運用分子醫學技術或天然中草藥植物抗癌或防癌成分之分析研究也是未來努力的新方向。

二、Camphorataimide B (Cam B)

在尋求有效的天然物過程中，有鑒於部分天然物的來源植物或動物有限或極為珍貴，甚至是被列為保育類的物種且在人工培育上有著難以突破的瓶頸，再加上萃取後分離所得到的具有藥效天然物量十分稀少，不敷接下來的各階段活性測試實驗所需要的量，更遑論其用來作為醫療用藥，所以在此就突顯出了有機合成的重要性。經由有機合成的方式來研究如何快速並大量的製備這些具有生物活性的天然物，之後更進一步且多方面的活性測試，使得更多的天然物能夠成為被用來當作治療癌症等疾病的藥物。牛樟芝(*Antrodia camphorata*)菌絲體的活性成分，除了多醣體以外，主要可分為兩大類，包括泛醌類(ubiquinone)化合物以及馬來酸與琥珀酸衍生物(maleic and succinic derivatives)。本計劃便是利用全合成從牛樟芝菌絲體萃取分離得到的馬來酸(maleic acid)及琥珀酸(succinic acid)衍生物---Camphorataimide B (Cam B)。

牛樟芝目前已有許多研究證實其對人體的功效顯著，尤其牛樟芝具有極佳抗癌效果，但是有鑒於牛樟芝的來源有限或極為珍貴致使價格高昂，且由於化學結構的特殊性與其活性提升，泛醌類化合物、馬來酸與琥珀酸衍生物的化學合成一直備受注目，國內的學者與其他國家的研究團隊皆投入全合成、衍生物合成、提升合成產率的相關研究，實驗方法也持續被更新與發表。2004年首次由Nakamura等人從樟芝菌絲體萃取出五種馬來酸(maleic acid)及琥珀酸(succinic acid)的衍生物，發現其一為 camphorataimide B 可抑制 Lewis 肺癌細胞生長[4]。Camphorataimide B 分子式 $C_{19}H_{23}NO_3$ (結構式如下圖)，為一個含 maleimides 的複合物，此合成藥物來自彰化師範大學李衍彰教授實驗室所提供，合成步驟由馬來酸衍生物化合物以先合成其五碳環中心架構，起始物為 succinic anhydride，利用鈹金屬催化 stille 反應，並且利用硼氫氧化鈉以及二價的鎳金屬離子進行選擇性的

還原反應等一連串作用合成。目前研究發現 Cam B 具毒殺及對抗肝炎(anti-HBV)的生物活性[5, 6]。

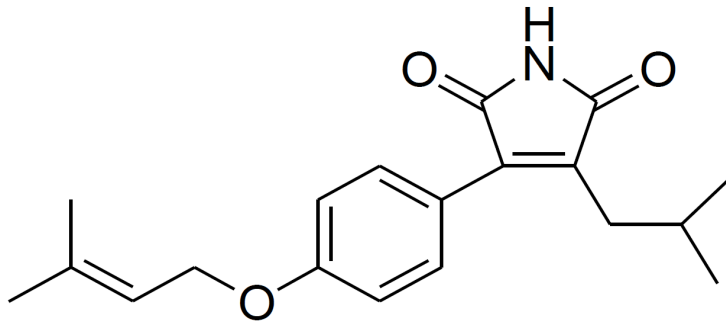


Figure 1. Structure of camphorataimide B (Cam B).

三、細胞凋亡 (apoptosis)

細胞凋亡是當前生物學和醫學領域研究中最熱門的領域之一，隨著科技的進步和時間的推移，細胞凋亡的研究不僅在理論方面產生了重要影響並佔有重要地位，而且為腫瘤等病症的治療開創了良好的應用前景。在正常的生理狀態下，人體細胞必需於增殖 (proliferation)、生長停止 (growth arrest)，以及計畫性細胞死亡 (programmed cell death)，也稱之為細胞凋亡 (apoptosis) 之前維持著動態的平衡，亦即細胞的數目必須經過嚴密的調控，使細胞數目不至於太少或過度增生甚或失控地生長。這種現象可能發生於生理成長階段，如生物體於變態時期之幼體器官退化；另一則是在外力刺激下所引起的細胞反應，如在細胞受到嚴重傷害，禍患有免疫缺乏症候群，及老化或退化疾病出現時。當細胞進行凋謝死亡時，其特徵為細胞核與細胞質會聚合 (condense)、DNA 退化分解或斷裂，而後細胞分裂為數個由細胞膜所包含的凋亡小體 (apoptotic bodies) [7]。一般來說，當淋巴球細胞受到病毒感染、細胞數目過高或發生自體免疫反應時，細胞便會啟動這個程序。但就另一方面來說，不當的活化凋謝死亡程序，卻往往導致諸如 ischemic stroke 與 AIDS 等疾病。其終極的生理意義在於消除多餘的、老化的、已失去功能的或突變的不正常細胞，避免遺傳下去[8]，因而細胞凋亡在生物體中是一個非常重要的角色。許多人類的癌症細胞的確比一些正常的細胞較不會發生凋亡的反應，這一點特別以最具有侵襲性的轉移性癌最為明顯。大部份的正常細胞必須仰賴環境中的特殊因子來維持其存活，此種依賴狀態使得正常細胞在非生理狀態下便不能存活。不過一些轉移性腫瘤細胞卻能克服此種因素，因此可想而知，腫瘤細胞必定具有對抗細胞凋亡的能力。

當細胞受不同刺激而引起細胞凋亡的路徑，目前主要可以分成兩種[9] (i) 粒線體凋亡路徑 (mitochondria pathway)：因粒腺體通透性改變、Bcl-2 家族的參與，而引起粒線體釋出 cytochrome c，使得 cytochrome c 與 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 和 procaspase-9 形成 Apoptosome，procaspase-9 便形成活化態的 caspase-9，進而活化下游 caspase-3/6/7 造成細胞凋亡[10, 11]。(ii) 死亡受體路徑 (death receptor pathway)：藉由活化細胞膜上的死亡受體，引發

caspase-8 的活化，隨即活化下游 caspase-3/6/7 而促成細胞凋亡。到目前為止，與凋亡相關蛋白質可分為三大類：第一類是促進細胞凋亡(pro-apoptosis)的蛋白，如 caspase、Bax、Bak、Bad...等。第二類是抑制細胞凋亡(anti-apoptosis)的蛋白，如 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1；第三類則是造成凋亡蛋白質調控因子，像 DNA ladder nuclease 如：DNA fragmentation factor、caspase-activated Dnase。在正常生理狀況下，細胞藉由第一類與第二類蛋白的互相調節，使細胞維持在平衡狀態；當細胞老化或是受到外來刺激傷害時，便啟動促細胞凋亡(pro-apoptosis)路徑，並抑制細胞凋亡 anti-apoptosis 路徑的發生，使細胞走向凋亡。

研究目的

現今，癌症不僅在台灣而且在全球已成為死亡的主要原因。儘管近年來以手術、放療和化療方式，對腫瘤的治療起到了一定效果，但是癌症發病率仍呈現上升趨勢，且其副作用、抗藥性以及腫瘤轉移嚴重阻礙癌症患者總生存率和生活品質。因而加強對癌症的預防及尋求安全有效的藥物引起人們極大關注。研究顯示，化學預防藥物不僅可用於癌症預防，也可在癌症的治療上發揮作用，但臨床上可應用的化學預防藥物甚少，且其對癌症抑制作用的機制尚未完全清楚。近來大量的研究發現，癌症化學預防藥物可透過調控 miRNAs 及其下游基因的表達發揮抗腫瘤活性作用。因此，這些研究為闡明化學預防藥物對癌症抑制的具體生物學機制提供了新的思路，也為臨床的應用提供了依據。鑑於以上背景，先確認合成的馬來酸衍生物 Camphorataimide B (Cam B)可透過調控癌基因 miR-101 與 miR-483 誘導肝癌細胞凋亡作用，進一步深入探討 Cam B 與 miR 的抗癌作用之詳細機制，證實 Cam B 在預防及治療癌症上具有顯著的臨床應用潛力。

文獻探討

先前研究顯示，Cam B 透過調控 cyclin-A、cyclin-B1 及 COX-2 的表現使細胞週期停滯、抑制癌細胞增生及腫瘤生長而導致延緩乳癌發生[12]。根據 2016 年的報告亦顯示，Cam B 透過 NF- κ B 及 PI3K/AKT 路徑抑制 HIF1- α 表現，而降低癌細胞的轉移作用達到治療乳癌目的[13]。另外，在 miRNA-101 的相關研究方面，Benzothiazole 透過降低 AKT, p38 MAPK, ERK1/2 表現量，引起 HepG2 肝癌細胞的 G1 細胞週期停滯及抑制細胞增生[14]。Xu 等人發現，在 HepG2 肝癌細胞中，miR-101 會促進 cisplatin 所誘發的凋亡作用[15]。雷公藤紅素/蛇藤素(celastrol) 為一種醌甲基化三萜化合物(quinone methide triterpene)，結果證實 miR-101 促進 celastrol 對前列腺癌細胞引起的細胞毒性[16]。再者，許多研究發現 miRNA-483 在 hepatocellular carcinoma (HCC) 中的角色為一腫瘤 miRNA (Oncomir) [17, 18]。Lupini 等人發現，miR-483-3p 在 Hep3B 肝癌細胞中表現量很高，而抑制 miR-483 後使下游凋亡蛋白 caspase3/7 活性增加[17]。5-fluorouracil (5-FU) 是一種抗腫瘤抗代謝物，它是一種氟有機化合物，構造近似於尿嘧啶，常用於臨床抗癌藥物，當 5-FU 處理 HepG2 肝癌細胞後，5-FU 會降低 miR-483-3p 的表現量而促進細胞

凋亡，透過 PUMA 及 CTNNB1 蛋白導致腫瘤體積變小[19]。

研究方法

(1)細胞培養 (cell culture)

本實驗所使用的細胞株來自食品工業發展研究所生物資源保存暨應用中心購買之人類肝癌細胞株 Hep3B、HepG2 與 Huh7。Hep3B 培養於 minimum essential medium (MEM)培養液中，培養液中含 10% fetal bovine serum (FBS)、1.5 g/L sodium bicarbonate、2 mM L-glutamine 與 1 mM penicillin/streptomycin。而 Huh7 培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培養液中，其中含 10% fetal bovine serum (FBS)、2 mM L-glutamine 與 1 mM penicillin/streptomycin。所有細胞均培養在維持 5% CO₂、37°C 的恆溫環境。依細胞生長速度而定，更換培養液的時間及次數，原則上每 2-3 天更換一次。

(2)細胞毒性試驗 (MTT assay)

將人類肝癌細胞株 Hep3B、HepG2 與 Huh7 細胞 (5×10^4 cell/well) 養於 24 well 培養皿中，再以不同濃度的 Cam B 處理 24 小時後，去除舊的培養基(含萃取物)，加入新的培養基和 MTT 試劑 (0.5 mg/mL) 混合，待作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 O.D. 565 nm 下測定溶液吸光值，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在 O.D. 563 nm 下測吸光值的變化。

(3)細胞週期分析 (cell cycle analysis)

將人類肝癌細胞株 Hep3B (1×10^7 cell/10 cm dish) 加入不同濃度的 Cam B 後 24 小時，先以 PBS 清洗數次，再利用 0.5% trypsin-EDTA 與細胞作用，將細胞由培養皿打下，離心去除上清液後，沉澱物利用 PBS 清洗兩次，再分次加入 1 mL 的 70% cold ethanol，置於 -20°C 冰箱中隔夜，以固定細胞。隔天，拿出固定好的細胞離心 (1000 rpm, 5 min) 後，移除上清液，再用冰 PBS 清洗兩次，並且將上清液盡量去除乾淨。最後，每管分別加入 1 mL 之 propidium iodide (PI) mixture (20 µg/mL PI, 20 µg/mL RNase A, 0.1% triton-X 100)，避光靜置室溫 30 分鐘後，用 40 µm nylon mesh 過濾，以避免過大的細胞群塊或雜質阻塞流式細胞儀之樣品吸入孔，把單細胞懸浮液收集在流式細胞儀專用管中。利用 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 系統，以流式細胞儀 (FACSCalibur, BECTON DICKINSON) 分析。

(4)細胞增殖測定 (BrdU assay)

5-溴-2 脫氧尿嘧啶核苷 (deoxyuridine 5-bromo-2 deoxyuridine; BrdU) 是 DNA 胸腺嘧啶核苷的類似物，會替代胸腺嘧啶於細胞週期 S 期 (即 DNA 合成期)，因此可作為標記細胞增殖的數量。將 Hep3B 細胞種於 96 well 的培養盤，加入各種不同濃度的 Cam B，於 37°C 培養 24 小時，使用 BrdU ELISA Kit，加入 10 µl/well BrdU 於 37°C 下作用至少 2 小時，酵素免疫分析儀 (ELISA Reader) 以 450 nm 之波長偵測吸光值，每次實驗皆有三重複並以相對吸光值來計算細胞增生活性。

(5) 西方墨點法 (western blotting)

細胞依實驗需求處理後收集，以trypsin-EDTA將細胞由培養皿打下，以PBS沖洗，加入RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris-base, pH7.5；內含1 mM sodium orthovanadate, 100 µg PMSF, 170 µg/ml leupeptin)，於冰上震盪30分鐘，在4°C下以10000xg離心10分鐘，取上層液定量蛋白，將定量後之蛋白取50 µg，加入等量的Sample Buffer (2 ml 0.5M Tris-HCl pH6.8, 1.6 ml Glycerol, 3.2 ml 10% SDS, 0.8 ml 2-β-mercaptoethanol, 0.4 ml 0.5% bromophenol blue)，以95°C加熱5分鐘，迅速至入冰中冷卻，以離心機將Sample spin down後再loading至每個well中，上層膠以80 V，下層以100 V進行電泳，待電泳結束後進行蛋白質轉漬至nitrocellular (NC) paper上，以5%脫脂牛奶於室溫下作用1小時，以washing buffer (TBS with 0.5% tween-20)沖洗3次，將NC paper置於4°C冰箱中與一級抗體(依實驗所需選定)反應overnight，以washing buffer沖洗3次，再以Horseradish peroxidase conjugated的二級抗體反應1小時，以washing buffer沖洗3次，最後加入Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus反應1分鐘後，以冷光螢光數位影像分析儀(LAS-4000 plus system)觀察並定量。

(6)細胞 RNA 萃取及定量

移走細胞培養液後，在培養細胞的 3 cm dish 中加入 400 µL water/mL NucleoZOL reagent (Macherey-Nagel)室溫作用 5-15 分鐘後，把細胞溶解物打散並轉移至微量離心管，於 4°C 以 12000×g 離心 15 分鐘。取水層(上層無色部分)加入 1 mL 100% isopropanol/mL supernatant，在室溫反應 10 分鐘，再以 12000×g 於 4°C 離心 10 分鐘，此時會在微量離心管底部管壁上形成一層膠狀物，倒掉上清液，以 500 µL 75% ethanol 清洗 pellet 後，再以 4000-8000×g 離心 1-3 分鐘，重複兩次。倒掉溶液後讓 RNA 稍微乾燥(勿至全乾，否則溶解度會降低)，以 20 µl nuclease-free H₂O 將 RNA 回溶後，於 55°C 加熱 10 分鐘提高溶解度。取部分 RNA 以 DEPC.H₂O 稀釋後，利用分光光度計偵測 260 nm 之吸光值並換算稀釋倍數以得到原始 RNA 之濃度。

(7)細胞 RNA 反轉錄 cDNA

以 TaqMan® Small RNA Assays kit (Applied biosystems)進行細胞 RNA 反轉錄，取 5 µg RNA 加入 1 µg oligo (dT)15 primer 及 1 µg random primer 並加 nuclease-free H₂O 至總體積 11 µl，於 70°C 加熱 5 分鐘破壞 2 級結構後，馬上置冰上 5 分鐘，繼續加入 7 µL RT master mix [100 mM dNTPs (with dTTP) 0.15 µL、MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL 1.00 µL、10X Reverse Transcription Buffer 1.50 µL、RNase Inhibitor 20 U/µL 0.19 µL and Nuclease-free water 4.16 µL]、5 µL total RNA (1 to 10 ng per reaction) and 3 µL of 5X RT primer (2.5 µM)，混合均勻後放在冰上，再置入 thermal cycler 中反應完成，最後將產物加入 80 µl DEPC.H₂O 稀釋轉錄完成之 cDNA。

(8)即時聚合酶鏈鎖反應(real-time PCR)分析

以 LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics)進行反應，取 cDNA 加入 6 µl nuclease-free water、10 µl SYBR Green I master mix、1 µl

forward primer (10 μ M)、1 μ l reverse primer (10 μ M)，以 ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)於 95°C加熱 5 分鐘活化反應後、接著進行 35-45 個 cycles 反應(95°C/5 秒、60°C/10 秒、72°C/1 秒)，最後以 melting curves 確認反應物專一性，實驗結果以 LightCycler software 進行分析。

(9) Anti-miRNAs 轉染(transfection)

本實驗使用 AllBio Custom RNA 系統來進行 Cell transfection。開始將 Serum-free Culture medium 或 HBS buffer (pH7.4 150mM NaCl, 20mM HEPES)加至無菌 1.5 mL eppendorf 中，之後再加入 anti-miRs 或 mimic 5~50 pmol 混合均勻；接著拿另一管無菌 1.5 mL eppendorf，同樣加入 Serum-free medium or HBS buffer，再將 T-Pro NTR II Transfection Reagent 1~5 μ l 加入，再將兩管混合均勻後，放置室溫下 15 mins。之後再加入到細胞中，而實驗細胞數為 1×10^6 ，再依照各個細胞不同條件，加入適當濃度的 T-Pro NTR II Transfection 和 anti-miRs 後，在 37°C 5% CO₂ incubator 中放置 18-48 h，之後再以 western 觀察細胞 tranfection 的情形。

(10)統計分析

細胞實驗過程每組皆三重複以上，收集的所有數據以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software,USA)進行Student t-test或One-way analysis of variance分析，以mean \pm SD表示，當p < 0.05以下時表示為統計學上有意義的差異。

結果與討論 (含結論與建議)

依本年度計畫進度，以目前結果分別針對進度項目進行說明如下：

1.利用人類肝癌細胞並處理Cam B，觀察細胞生長狀態。

Hep3B細胞在分別給予不同濃度的Cam B (0, 30, 60, 90, 120 or 150 μ M/mL)，培養24小時後，進行MTT試驗，結果顯示半數致死劑量在濃度約90 μ M/mL (Fig. 1)。除了Hep3B細胞外，我們使用HepG2與Huh7兩株人類肝癌細胞株，亦發現細胞存活率皆有顯著下降的狀況，但其中Hep3B對Cam B敏感度較高，因此後續選用Hep3B細胞株進行實驗。另外，BrdU實驗可看到Cam B抑制Hep3B細胞增生的效果，在處理Cam B (30, 60, 90, 120 μ M/mL)及培養24小時後相較於控制組，分別使Hep3B細胞的增生率降低約78%、36%、12%和6% (Fig. 2)。因此，Cam B除了可以有效抑制肝癌細胞生長外，圖二進一步顯示Cam B亦有效抑制Hep3B細胞的增生作用。

2.將Cam B處理Hep3B細胞，確認細胞週期DNA分佈。

先前已經利用MTT assay觀察，初步可以知道Cam B可減緩Hep3B細胞的生長及增生，使其細胞存活率降低。此現象是否是因細胞的凋亡 (Apoptosis) 而造成，需進一步利用流式細胞儀觀察。利用流式細胞儀定量CamB所造成肝癌細胞凋亡死亡的程度。從PI染色分析的結果顯示，Cam B確實可以造成Hep3B細胞凋亡，並且隨著Cam B劑量增加，凋亡細胞比例有增加的情形，Cam B濃度在30, 60, 90, 120 μ M/mL下，分別造成sub-G1有0.94%、2.39%、4.25%與23.16%的細胞凋

亡(Fig. 3)。

3.將Cam B處理Hep3B細胞，檢查相關蛋白的表現。

利用西方墨點法分析Cam B誘發細胞凋亡相關的蛋白表現，從圖四可知Cam B會抑制Bcl-2及Mcl-1的蛋白表現量，而Bax、tBid、cytochrome c (Cyto. c)、Fas與FasL表現量卻有更為顯著地增加(Fig. 4)。另外，亦發現Cam B使PKC- α 表現量上升與p38磷酸化增加，證實Cam B的確可以造成人類肝癌細胞株Hep3B產生細胞凋亡作用，進而促進癌細胞的死亡，但更進一步的訊息傳遞路徑目前仍在進行中。

4.將CamB處理Hep3B細胞，分析4種不同miRNA的表現。

Cam B處理Hep3B細胞後，分別是濃度由0~120 μ M/mL、時間是24小時，分析miR-21、miR-224、miR-483 (oncogenic miRNA)和miR-101 (tumor suppressor miRNA)四種不同的miR表現，結果發現miR-101隨著處理Cam B 濃度增加表現量會顯著增加，相反的，miR-21、miR-224、miR-483則隨著處理Cam B 濃度增加表現量會顯著下降，因此後續從中選定miR-101與miR-483此兩個miR作為研究標的(Fig. 5)。

5.將Cam B與miR同時處理Hep3B細胞，觀察生長及細胞週期分布。

將Cam B與miR-483 mimic同時處理Hep3B細胞，而後進行MTT試驗及PI染色分析，結果發現Cam B會顯著抑制細胞生長及誘發凋亡，反之，Cam B+miR-483 mimic組則使細胞生長率回復至約80%，凋亡的細胞數也明顯降低，初步證實Cam B之作用是透過miR-483所調控(Fig. 6及7)。

6.將Cam B與miR同時處理Hep3B細胞，確認相關蛋白的表現。

利用西方墨點法進一步確認誘發細胞凋亡相關的蛋白表現，從圖八可知Cam B會促進PKC- α 表現量與p38磷酸化，但Cam B與miR-483 mimic同時處理則會抑制其表現(Fig. 8)。另外，圖九可知Cam B使Mcl-1表現下降Cyto. c表現上升，相反的，Cam B與anti-miR-101同時處理則會使Mcl-1表現上升Cyto. c表現下降(Fig. 9)。以上與圖四結果一致，並且證實Cam B誘導肝癌細胞凋亡作用是透過miR-483及miR-101調控，爾後將確認miR-483其直接調控下游之基因是否為PKC- α 及miR-101是否為Mcl-1，且共同參與在Cam B所誘發的肝癌細胞凋亡之作用。

[1] Bosch, F. X., Ribes, J., Borrás, J., Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis* 1999, 19, 271-285.

[2] Wicha, M. S., Liu, S., Dontu, G., Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006, 66, 1883-1890; discussion 1895-1886.

[3] Ma, S., Chan, K. W., Hu, L., Lee, T. K., *et al.*, Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007, 132, 2542-2556.

[4] Nakamura, N., Hirakawa, A., Gao, J. J., Kakuda, H., *et al.*, Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their

- cytotoxic effects on LLC tumor cell line. *J Nat Prod* 2004, *67*, 46-48.
- [5] Shen, C. C., Yang, H. C., Huang, R. L., Chen, J. C., Chen, C. C., Anti-HBV principle from the culture broth of *Antrodia camphorata* (strain # CCRC-35396). *Journal of Chinese Medicine* 2005, *16*, 57-61.
- [6] Ao, Z. H., Xu, Z. H., Lu, Z. M., Xu, H. Y., *et al.*, Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *J Ethnopharmacol* 2009, *121*, 194-212.
- [7] Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., *et al.*, Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991, *352*, 345-347.
- [8] Reed, J. C., Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol* 1999, *11*, 68-75.
- [9] Riss, T. L., Apoptosis as a biomarker in chemoprevention trials. *Urology* 2001, *57*, 141-142.
- [10] Hengartner, M. O., The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000, *407*, 770-776.
- [11] Danial, N. N., Korsmeyer, S. J., Cell death: critical control points. *Cell* 2004, *116*, 205-219.
- [12] Lin, W. L., Lee, Y. J., Wang, S. M., Huang, P. Y., Tseng, T. H., Inhibition of cell survival, cell cycle progression, tumor growth and cyclooxygenase-2 activity in MDA-MB-231 breast cancer cells by camphorataimide B. *Eur J Pharmacol* 2012, *680*, 8-15.
- [13] Lee, Y. J., Huang, C. C., Lin, W. L., Hung, C. H., *et al.*, Camphorataimide B, a maleimide in mycelium of *Antrodia camphorata*, inhibits progression of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res Front* 2016, *2*, 43-54.
- [14] Pushpavalli, S., Ramaiah, M. J., Srinivas, C., Mukhopadhyaya, D., *et al.*, Effect of Benzothiazole based conjugates in causing apoptosis by Regulating p53, PTEN and MAP Kinase proteins affecting miR-195a and miR-101-1. *Cancer Cell Int* 2011, *11*, 36.
- [15] Xu, Y., An, Y., Wang, Y., Zhang, C., *et al.*, miR-101 inhibits autophagy and enhances cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 2013, *29*, 2019-2024.
- [16] Guo, J., Huang, X., Wang, H., Yang, H., Celastrol Induces Autophagy by Targeting AR/miR-101 in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* 2015, *10*, e0140745.
- [17] Lupini, L., Pepe, F., Ferracin, M., Braconi, C., *et al.*, Over-expression of the miR-483-3p overcomes the miR-145/TP53 pro-apoptotic loop in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016, *7*, 31361-31371.
- [18] Veronese, A., Lupini, L., Consiglio, J., Visone, R., Ferracin, M., Fornari, F., *et al.*, Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res* 2010, *70*,

3140-3149.

[19] Pepe, F., Pagotto, S., Soliman, S., Rossi, C., Lanuti, P., Braconi, C., *et al.*, Regulation of miR-483-3p by the O-linked N-acetylglucosamine transferase links chemosensitivity to glucose metabolism in liver cancer cells. *Oncogenesis* 2017, 6, e328.

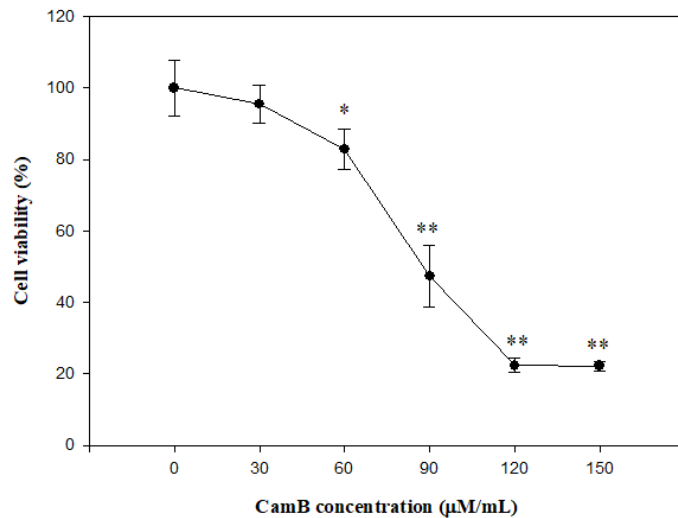


Figure 1. Effects of Cam B on cell viability in Hep3B cells.

Hep3B cells were treated with Cam B at various concentrations (0, 30, 60, 90, 120 or 150 μM/mL) for 24 h. Cell viability was estimated using MTT assay. At the end of the respective treatments, cells were collected after brief trypsinization, and counted using a hemocytometer. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs. untreated control group.

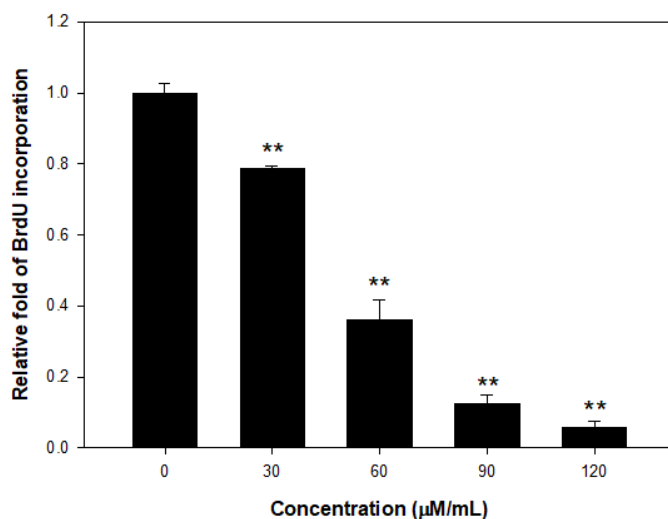


Figure 2. Effects of Cam B on cell proliferation in Hep3B cells.

Hep3B cells were treated with vehicle (control) or Cam B (0-120 μM/mL) for 24 h. Cell proliferation was evaluated using a BrdU-ELISA assay. The values represents an average of three independent experiments \pm SD. ** $p < 0.005$ vs. control.

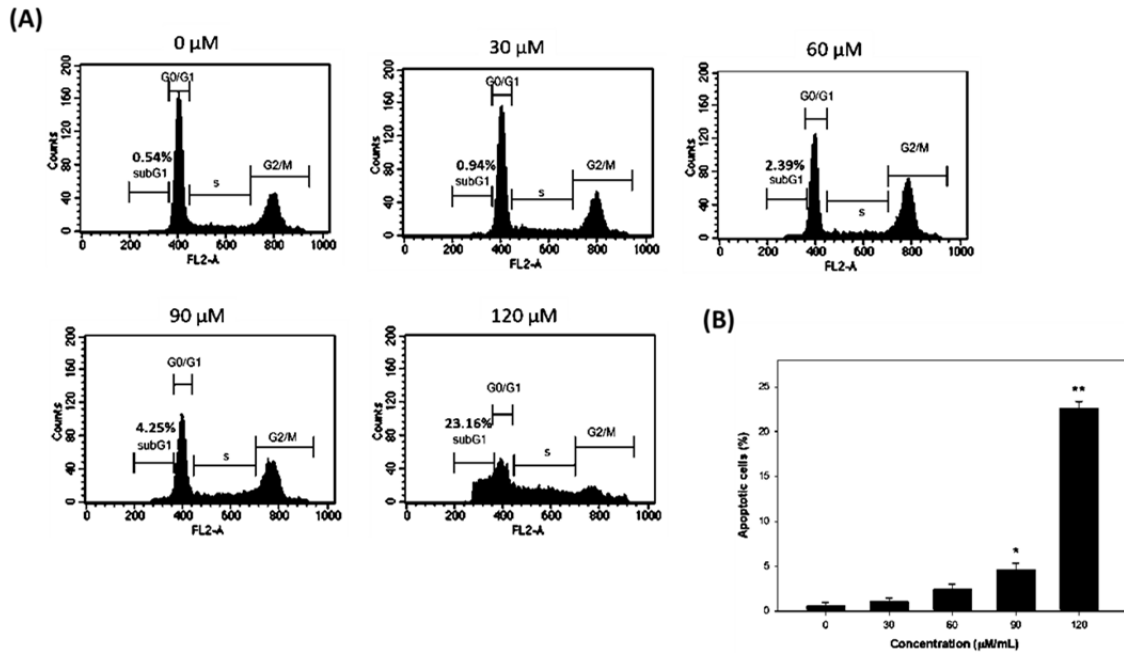
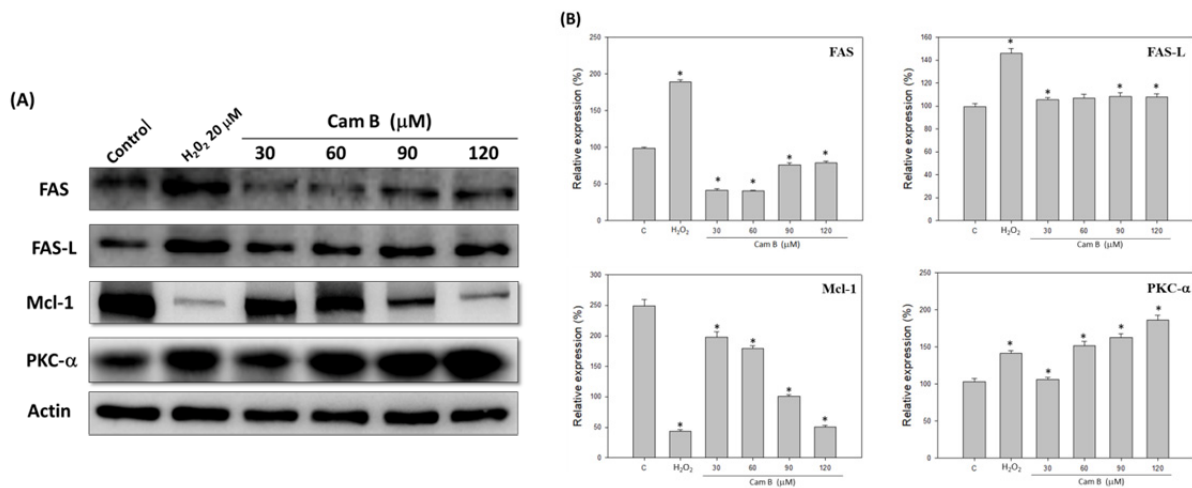


Figure 3. Effect of Cam B on apoptosis in Hep3B cells.

Hep3B cells were treated with applied concentrations of Cam B (0-120 μM/mL) for 24 h and then cells were collected by brief trypsinization (A). Apoptosis was detected by flow cytometric analysis of cells labelled with PI staining. (B) In each case data represent mean ± SD of three observations. *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.



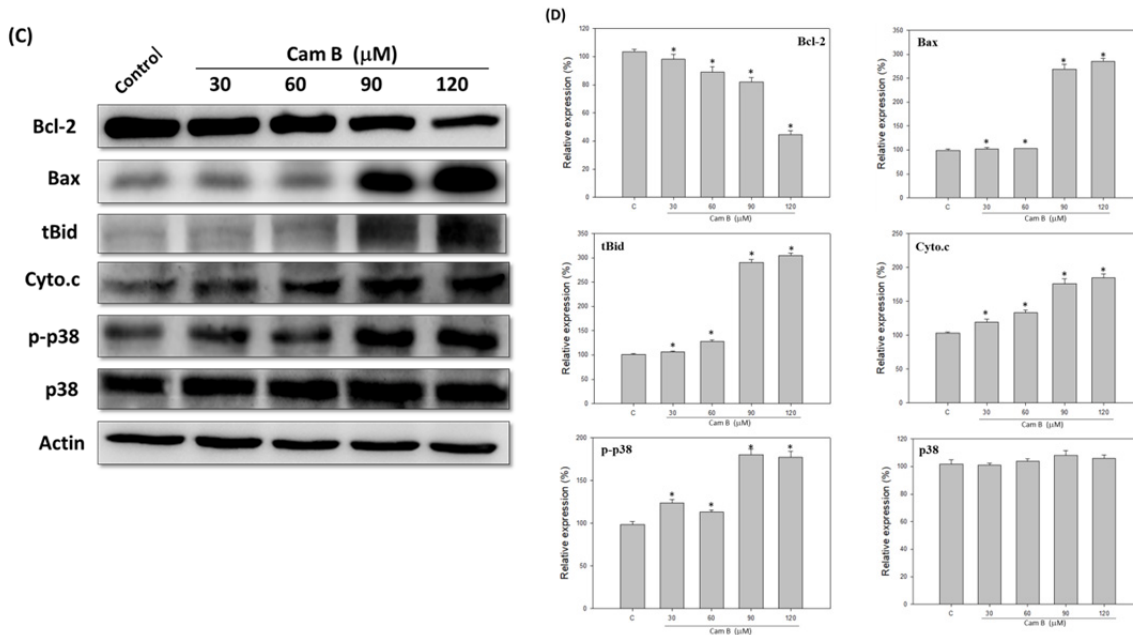


Figure 4. Mechanism of Cam B on apoptosis in Hep3B cells.

(A and C) Total cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE and western immunoblotting. Membranes were then probed with indicated antibodies followed by appropriate secondary antibody and ECL detection. (B and D) In each case data represent mean \pm SD of three observations. H₂O₂ was used as a positive control. *P<0.05 compared with control group.

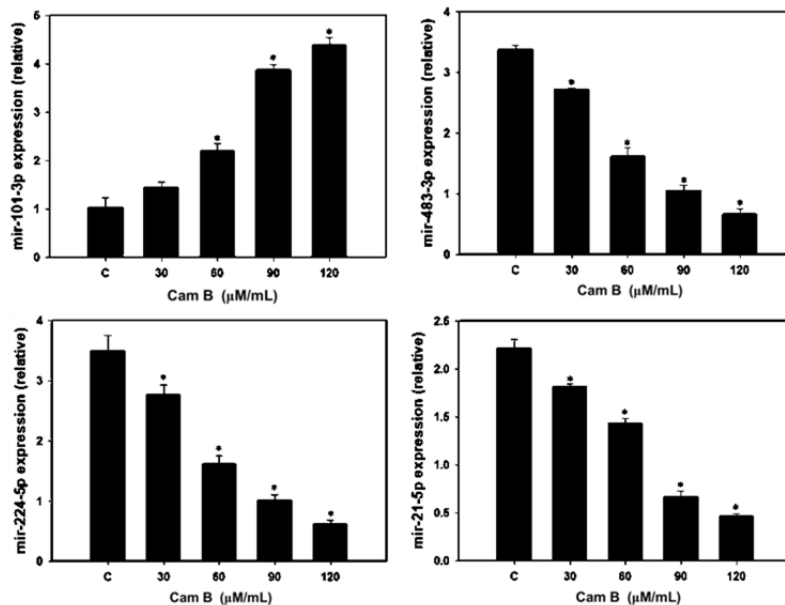


Figure 5: The effect of CamB on expression levels of the microRNAs was validated by quantitative real-time polymerase chain reaction. Fold changes in microRNA expression are expressed as mean \pm standard deviation (n = 3). C, control group; *P < 0.05 versus untreated control group.

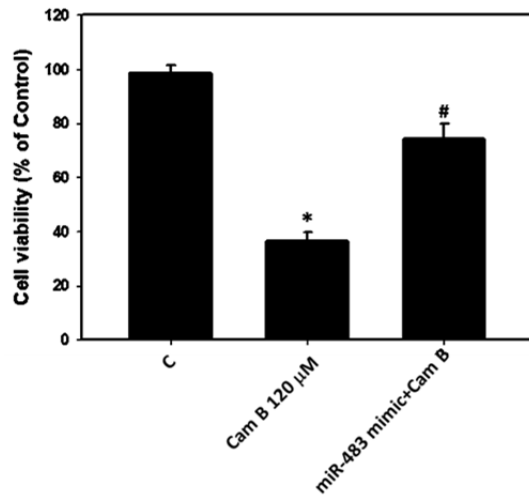


Figure 6. Effects of miR-483 mimic on cell viability in Cam B-treated Hep3B cells. Hep3B cells infected with expressing human miR-483 were compared with the control groups for their proliferation in indicating concentrations of Cam B at 24 h. * $p < 0.05$ compared to the vehicle control, # $p < 0.05$ compared to the Cam B exposure group.

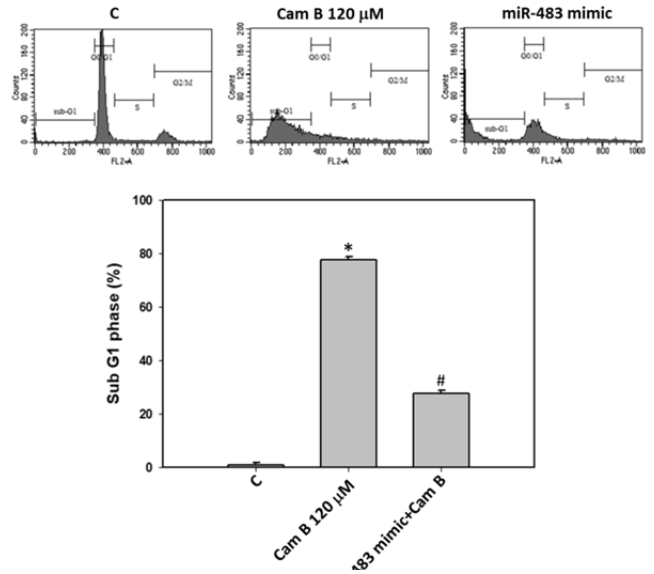


Figure 7. Effects of miR-483 mimic on apoptosis in Cam B-treated Hep3B cells. Hep3B cells were treated with Cam B and/or miR-483 mimic, stained with PI, and analyzed by flow cytometry. * $p < 0.05$ compared to the vehicle control, # $p < 0.05$ compared to the Cam B exposure group.

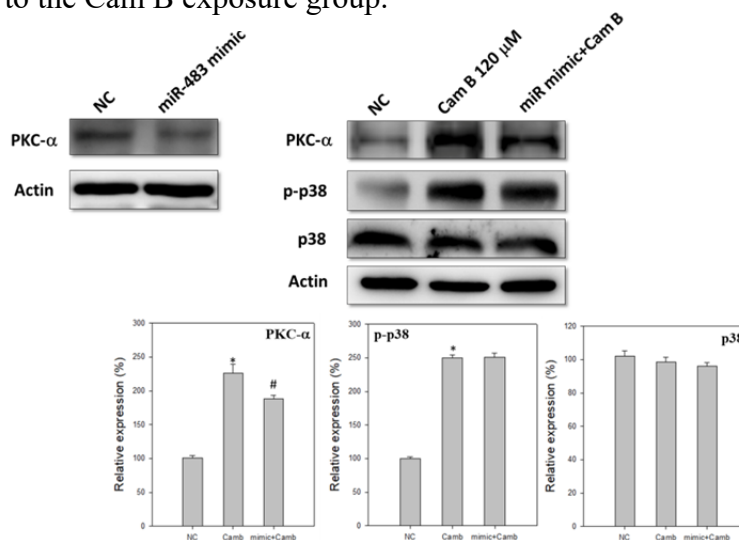


Figure 8. Effects of miR-483 mimic on the levels of PKC- α and p-p38 in Hep3B cells upon Cam B treatment. Western blot analysis of the levels of PKC- α and p-p38 expression after treatment of Hep3B cells with Cam B and/or miR-483 mimic. One of three independent experiments is shown for the western blot analysis. Values are given as means \pm S.D. from each group. * $p < 0.05$ compared to the vehicle control, # $p < 0.05$ compared to the Cam B exposure group.

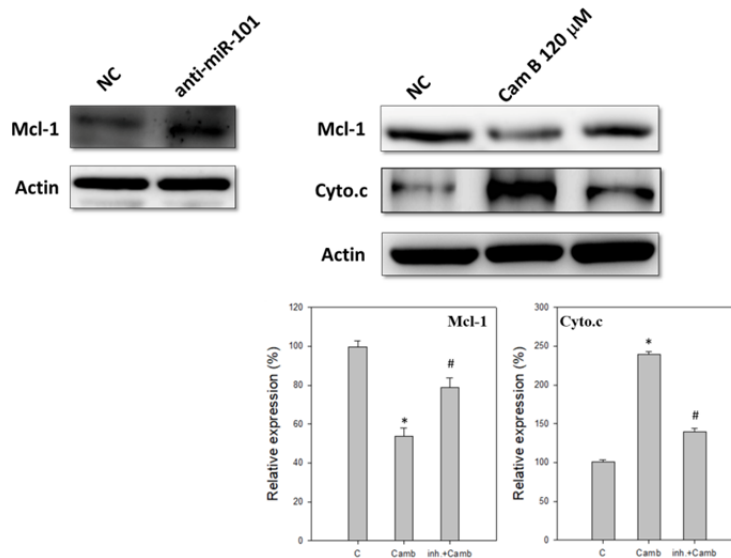


Figure 9. Effects of anti-miR-101 on the levels of Mcl-1 and Cyto. c in Hep3B cells upon Cam B treatment. Western blot analysis of the levels of Mcl-1 and Cyto. c expression after treatment of Hep3B cells with Cam B and/or anti-miR-101. One of three independent experiments is shown for the western blot analysis. Values are given as means \pm S.D. from each group. * $p < 0.05$ compared to the vehicle control, # $p < 0.05$ compared to the Cam B exposure group.

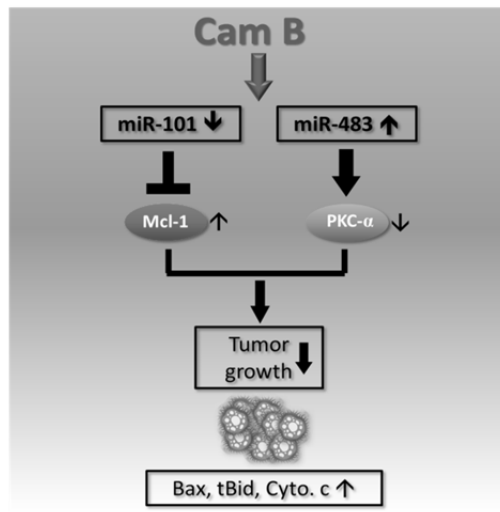


Figure 10. Schematic diagram illustrating the principal mechanism of miR-483 and miR-101 regulates Cam B-mediated apoptosis in Hep3B cells by targeting Mcl-1 and PKC- α signaling pathway.

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：106年11月03日

計畫編號	MOST 106-2320-B-040-007-		
計畫名稱	樟芝活性成分 camphorataimide B 抑制肝癌之功效評估:以促癌微核醣核酸為標的，探討癌幹特性、增生、凋亡、侵襲/轉移及其作用機轉		
出國人員姓名	張雲菁	服務機構及職稱	中山醫學大學 生化微生物免疫研究所 副教授
會議時間	106年10月22日 至 106年10月26日	會議地點	GSCO, Gunsan, Jeonbuk, Korea
會議名稱	(中文)第十屆國際功能性食品大會暨展覽會 (英文) The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods (ISNFF 2017)		
發表題目	(中文) 洛神花抑制黑色素瘤細胞之轉移作用 (英文) Roselle (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) exerts potent anti-metastasis effects in melanoma		

一、參加會議經過

此次獲科技部補助參加於韓國全羅北道群山市舉辦之第十屆國際功能性食品大會暨展覽會 (The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods; ISNFF)，會議自民國 106 年 10 月 22 日至 10 月 25 日，為期四天。本人於 10 月 22 日早上由桃園機場出發直接飛往韓國仁川機場，當天下午到達仁川機場直接住宿於首爾市的飯店，10 月 23 日一早便搭車前往全羅北道群山市，經過兩次轉車終於到達協助舉辦這次國際研討會的會議中心(GSCO)，進行報到程序後，並於當晚參加主辦單位所舉行之晚會。此次會議 10 月 23-25 日為正式會議議程，各國約兩百多位學者齊聚一堂，共

襄盛舉。本次會議論文發表分為論文宣讀及論文海報展示兩種方式，其中海報展示共有 7 場次，所涵蓋之主題約有 30 種不同的領域，本人論文發表方式是以海報展示，於 23 日下午 13 時設置海報，展示時間至 17:40 分結束，除於會場觀摩海報外，特別參與聆聽有興趣之主題演說及解說，其中有位受邀的香港學者 Dr. Zhen-Yu Chen 分享抗氧化食品對於老化之相關性，他提出數種抗氧化物黑米萃取物、藍莓萃取物、蘋果多酚、茶多酚等天然物的確可以延長生存時間，但僅於果蠅或是動物實驗模式，用於人類的功效上則需要更多實驗加以證實。本次會議期間出席學者均熱烈發言討論，收穫不少。另外，期間遇到幾名台灣來的學者林培正與何元順老師，同時也認識黃步敏老師以及被邀請與會演講人王惠民老師，不僅在會議中與學者們參與交流，並且相互分享研究成果。四天的會議結束後，本人於 10 月 26 日下午 4:10 搭機回台，並晚在上 6 點多回到台灣，而結束本人此次的韓國之行。最後，十分感謝科技部的資源與經費補助才能順利參加此次的國際研討會，讓我有機會去與國際接軌以及分享成果的機會，謹致謝忱。

二、 與會心得

這次會議的會場在全羅北道群山市的群山會展中心 GSCO 舉行，這個中心位在當地的海埔新生地，其周邊交通並不發達，雖然提供數班至會場的接駁車，但由 GSCO 會場出發的接駁車只有晚上 9 點一班，或由會議推薦的飯店至會場也只提供一班接駁車，其餘時間要進出只能靠會場提供預約計程車服務，這多少造成前往會場參與會議的麻煩。另外，因這次會議同時包括功能性

食品展覽會，所以，有很多韓國廠商非常大方的提供免費整瓶人蔘液或是苦瓜液相關的保健商品，亦有餅乾等餐點提供，讓與會的大家更能直接的體驗與感受。由於本計畫成果尚未成熟及完整，故先以本人相關研究成果出席參展。

三、發表論文全文或摘要

P2-89

Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Exerts Potent Anti-Metastasis Effects in Melanoma

Yun-Ching Chang, Kai-Hsun Huang, Wei-Ming Chan,
and Chau-Jong Wang

Institute of Biochemistry, Microbiology and Immunology, Medical
College, Chung Shan Medical University, Taiwan

Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae) contain a high level of flavonoids, such as anthocyanins. Previous evidence supports that *Hibiscus* anthocyanins (HAs) reduce tumorigenesis, but the mechanisms by which these HAs inhibit metastasis are poorly understood. We examined the effect of HAs in B16 (mouse melanoma) cells using MTT assay, wound healing assay, gelatin zymography assay, and western blotting. We also conducted an in-vivo migration assay in mice. HAs treatment significantly inhibited the migration of B16 cells under non-cytotoxic concentrations (1 mg/ml). The results further showed that HAs exerted its anti-metastatic effect through blocking the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/Ras family cascade and subsequent matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and -9) expression and its activity. Moreover, the results indicated that HAs could block the lung metastasis of B16 cells as well as the expression of MMP-2/-9 in vivo. Thus, HAs may be a potential candidate for the development of chemotherapeutic agent.

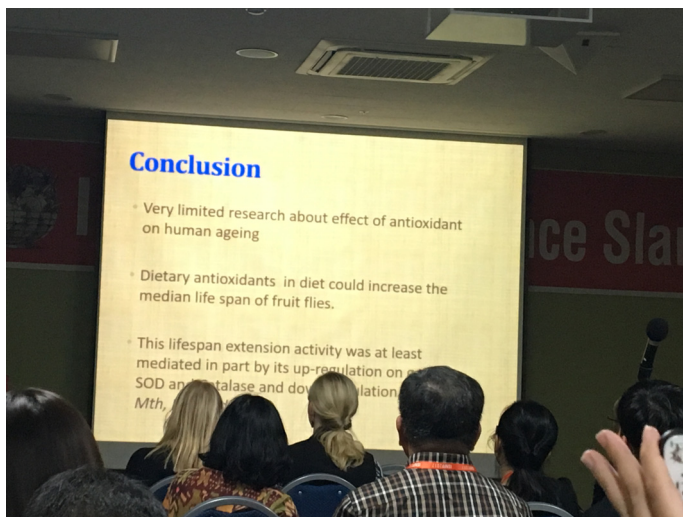
四、建議

無。

五、攜回資料名稱及內容

此次攜回大會議程手冊及論文集一本。

六、其他



106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：張雲菁			計畫編號：106-2320-B-040-007-			
計畫名稱：樟芝活性成分camphorataimide B抑制肝癌之功效評估：以促癌微核醣核酸為標的，探討癌幹特性、增生、凋亡、侵襲/轉移及其作用機轉						
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	
		研討會論文		0		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
專書			0	本		
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		

		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	2	人次	吳玟諭、楊繼勛
		碩士生	3		蔡孟庭、蔡欣蓓、張宴綾
		博士生	1		鍾岱融
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
		其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)	無		

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）

現今，在尋求有效的天然物過程中，有鑒於部分天然物的來源植物或動物有限或極為珍貴，不敷後續各階段活性測試實驗所需要的量，更遑論其用來作為醫療用藥，所以在此就突顯出了有機合成的重要性。經由有機合成的方式來研究如何快速並大量的製備這些具有生物活性的天然物，之後更進一步且多方面的活性測試，使得更多的天然物能夠成為被用來當作治療癌症等疾病的藥物，而Cam B便是利用全合成從牛樟芝菌絲體萃取分離得到的衍生物，因此，未來希望透過動物活體實驗將可證實Cam B具有抑制癌細胞生長的功效及其臨床應用性。目前已達成計畫中預期之進度：完成分析Cam B對肝癌存活的抑制效果及誘發肝癌細胞凋亡作用，並進一步針對微核糖核酸(miR)進行相關研究。目前實驗結果，Cam B誘發肝癌細胞凋亡作用的部份已積極整理並撰寫中，另其他與miR再次驗證的相關實驗也正在進行及整理中。

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）