

科技部補助專題研究計畫報告

探討Dihydromyricetin透過microRNA與腫瘤相關巨噬細胞調控 口腔癌細胞轉移之機制(第3年)

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 106-2314-B-040-011-MY3
執行期間：108年08月01日至109年07月31日
執行單位：中山醫學大學口腔科學研究所

計畫主持人：林巧雯
共同主持人：陳穆寬

計畫參與人員：碩士級-專任助理：莊宜婷

報告附件：出席國際學術會議心得報告

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

中華民國 109 年 10 月 26 日

中文摘要：Dihydromyricetin (DHM)是顯齒蛇葡萄中含量最豐富的黃酮類化合物。已有許多文獻證實DHM具有抗氧化、抗發炎、保肝、調節血糖和抗癌的作用。但目前DHM對於人類口腔癌細胞的抗癌作用機制仍然無相關文獻探討。本研究利用兩株口腔癌細胞株SCC-9及SAS處理不同濃度的DHM，結果發現在不影響細胞存活率下，DHM可以抑制SCC-9及SAS的細胞轉移與侵襲，並與第二型基質金屬蛋白酵素(matrix metalloproteinase-2; MMP-2)有關。此外，我們發現DHM可以透過調控microRNA-29a-3p來影響人類口腔癌細胞的MMP-2活性以及細胞爬行能力，進一步利用miR-29a mimic或miR-29a inhibitor則可以逆轉原本由DHM藥物所抑制的細胞內生性MMP-2之分泌活性，而利用TCGA database分析也發現，頭頸癌病人之mir-29a 表現量在臨床晚期中的表現明顯低於早期(early stage)的頭頸癌病人癌症分期。而在訊息傳遞路徑部分，也發現DHM對於FAK、Src、ERK1/2及p38路徑都具有明顯的抑制效果，而利用了相關路徑的抑制劑(PD98059及SB202190)，也發現處理相關路徑的抑制劑對於口腔癌細胞的轉移作用會有加乘抑制的效果。而最後我們利用動物模式也發現DHM可以有效抑制口腔癌細胞株轉移至肺部的能力，綜合以上結果，DHM或許可以應用在預防口腔癌的轉移或輔助口腔癌的治療。

中文關鍵詞：口腔癌、轉移、第二型基質金屬蛋白酵素、microRNA-29a

英文摘要：Dihydromyricetin (DHM), also called ampelopsin, is the most abundant flavonoid in *Ampelopsis grossedentata*. Recently, numerous studies have reported that DHM possesses multiple biological functions, including anti-oxidation, anti-inflammation, hepatoprotection, glycometabolism regulation, and anti-cancer. However, the anticancer effects and related molecular mechanism of DHM in human oral cancer cells have not been reported. In SCC-9 and SAS oral cancer cell lines, we found that DHM inhibited the migration/invasion in vitro by suppressing matrix metalloproteinase (MMP)-2. Moreover, a microRNA (miR) analysis showed that microRNA-29a-3p was predominantly upregulated after DHM treatment. Inhibition of microRNA-29a-3p by microRNA-29a-3p inhibitor significantly relieved MMP-2 and motility suppression imposed by DHM treatment. Further analyses of The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets revealed negatively correlations of the expression of microRNA-29a-3p with clinical stage in patients with head and neck cancer. Mechanistic investigations found that FAK, Src, Erk1/2 and p38 signaling pathways were involved in DHM-regulated oral cancer migration and MMP-2 expression. Finally, an in vivo study revealed that DHM significantly inhibited SAS oral cancer cell xenograft tumor lung metastasis. In conclusion, our findings provide new insights into the molecular mechanisms that underlie the antimetastatic effect of DHM and thus valuable for the development of treatment strategies for metastatic oral

cancer.

英文關鍵詞：oral cancer, metastasis, matrix metalloproteinase-2,
microRNA-29a

中文摘要

Dihydromyricetin (DHM)是顯齒蛇葡萄中含量最豐富的黃酮類化合物。已有許多文獻證實 DHM 具有抗氧化、抗發炎、保肝、調節血糖和抗癌的作用。但目前 DHM 對於人類口腔癌細胞的抗癌作用機制仍然無相關文獻探討。本研究利用兩株口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 處理不同濃度的 DHM，結果發現在不影響細胞存活率下，DHM 可以抑制 SCC-9 及 SAS 的細胞轉移與侵襲，並與第二型基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase-2; MMP-2)有關。此外，我們發現 DHM 可以透過調控 microRNA-29a-3p 來影響人類口腔癌細胞的 MMP-2 活性以及細胞爬行能力，進一步利用 miR-29a mimic 或 miR-29a inhibitor 則可以逆轉原本由 DHM 藥物所抑制的細胞內生性 MMP-2 之分泌活性，而利用 TCGA database 分析也發現，頭頸癌病人之 mir-29a 表現量在臨床晚期中的表現明顯低於早期(early stage)的頭頸癌病人癌症分期。而在訊息傳遞路徑部分，也發現 DHM 對於 FAK、Src、ERK1/2 及 p38 路徑都具有明顯的抑制效果，而利用了相關路徑的抑制劑 (PD98059 及 SB202190)，也發現處理相關路徑的抑制劑對於口腔癌細胞的轉移作用會有加乘抑制的效果。而最後我們利用動物模式也發現 DHM 可以有效抑制口腔癌細胞株轉移至肺部的能力，綜合以上結果，DHM 或許可以應用在預防口腔癌的轉移或輔助口腔癌的治療。

一、 緒論

根據衛生福利部公布的 104 年十大死因中，惡性腫瘤依舊排名第一。而口腔癌又占男性癌症死亡率的第四位，並且是台灣青壯年發生率最高的癌症。口腔癌的危險因子除了嚼食檳榔、抽菸以及喝酒等危險因子，也與飲食、基因與不良的口腔衛生習慣有關 (Jefferies and Foulkes, 2001; Johnson et al., 2011)。在台灣地區，抽菸、喝酒與嚼檳榔三種習慣都有的人，其罹患口腔癌的機率較一般人高 123 倍之多 (Ko et al., 1995)。據統計約有 90% 口腔癌的患者所罹患的口腔癌為口腔鱗狀上皮癌，主要發生部位以舌部最多，其次為頰黏膜、牙齦、顎、口底部及口唇(Su et al., 2019a; Su et al., 2020; Su et al., 2019b)。而口腔癌的盛行率，在東西方國家因生活及飲食習慣不同，因此差異極大。歐美國家口腔癌發生率不高，但因習慣抽菸與喝酒，口腔癌部位以唇、舌口底較多。而在印度和一些東方國家具有嚼食檳榔習慣，口腔癌的發生機率較高並且多位於舌頭與頰黏膜部位居多 (Angadi and Rao, 2011; Hao and Cheng, 2004; Rao et al., 2013)。

當癌細胞發生轉移時，必須先穿透細胞外基質 (ECM) 到達血管或淋巴管，才能藉由血液或淋巴液來轉移到新的器官，而 ECM 的組成包含 fibronectin、collagen 和 laminin 等，因此癌細胞會藉由產生蛋白水解酵素來分解這些成分，其中基質金屬蛋白水解酶 (matrix metalloproteinases; MMPs) 家族和 urokinase-type plasminogen activator (u-PA) 是癌症中常見的蛋白酶，目前皆已證實參與在癌症侵襲和轉移的過程中 (Chien et al., 2013; Hsiao et al., 2019; Su et al., 2017; Su et al., 2016)。而基質金屬蛋白酶組織抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinases; TIMPs) 及 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 則分別為 MMPs 和 u-PA 的內生性抑制劑，對於體內蛋白酶的平衡扮演重要的角色。當兩者之間失去平衡，則可能造成癌細胞的轉移甚至影響病人的預後 (Deryugina and Quigley, 2006; Duffy et al., 1999; Jiang et al., 2002)。有非常多種類的 MMPs 參與在癌症形成過程中，但 gelatinases 較廣為人重視，主要原因有兩個 (1) 他們過

量表現在許多惡性腫瘤。(2)他們的表現量與活性往往與腫瘤的嚴重程度與較差預後相關(Bjorklund and Koivunen, 2005)。Gelatinases 分成兩種: gelatinase A, 72kDa (MMP-2) 和 gelatinase B, 92kDa (MMP-9)。MMP-2 及 MMP-9, 具有降解基底膜中主要成分 type IV collagen 的能力, 並在許多的惡性腫瘤中會大量分泌。MMP-2 與 MMP-9 量的升高已被發現在許多癌症, 包括乳癌、腦癌、卵巢癌、胰臟癌、大腸癌、膀胱癌、前列腺癌、肺癌與黑色素瘤 (Klein and Bischoff, 2011; Turpeenniemi-Hujanen, 2005)。

DHM 又名 ampelopsin 是從中國南方特有植物顯齒蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*) 中萃取出來的黃酮類化合物(Du et al., 2002)。顯齒蛇葡萄乾燥的嫩莖葉做成的藤茶 (Tengcha), 在民間飲用已有多年歷史, 具有降脂降壓、清熱解毒的效果 (Zhang et al., 2003)。DHM 與從水果、蔬菜萃取出來的黃酮類化合物 myricetin 化學結構相似。許多研究指出 DHM 具有保護肝臟 (Murakami et al., 2004)、抗發炎 (Qi et al., 2012)、抗氧化 (He et al., 2003)、降血糖 (Zhong et al., 2002)以及抗癌 (Zeng et al., 2014; Zhang et al., 2014b) 效果。Wang 等人也發現 DHM 可以抑制人類視網膜色素上皮細胞(human retinal pigment epithelial cell ; RPE cell) 轉移的能力(Wang et al., 2018)。sGao 等人研究指出 DHM 清除 DPPH 自由基的抗氧化能力比食品添加物抗氧化劑第三丁基氫醌 (tertiary-butyl hydroquinone, TBHQ)較佳 (Gao et al., 2009), 而攝取含高抗氧化物質的膳食可降低罹患退化性疾病、心血管疾病與癌症的風險 (Burda and Oleszek, 2001)。DHM 也可藉由活化 AMPK 誘導細胞自噬 (autophagy)而降低老鼠骨骼肌細胞的胰島素阻抗性和內皮細胞受到高血糖誘導的氧化壓力傷害 (Liang et al., 2015; Shi et al., 2015)。臨床試驗中病患服用 DHM 可以降低非酒精性脂肪肝疾病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)胰島素阻抗性, 並降低病患血漿中的 tumor necrosis factor alpha、cytokeratin-18 和 fibroblast growth factor 21 (Chen et al., 2015)。而在抗癌的研究機轉主要分為: (1)誘導細胞凋亡 (Induction of apoptosis): DHM 可以磷酸化 p53 的 serine15 位置造成肝癌細胞透過 p53 依賴的訊息傳遞路徑造成細胞

凋亡 (Zhang et al., 2014a)。(2)抑制癌細胞增生 (Antiproliferation): 在膀胱癌小鼠實驗中, DHM 可以造成細胞週期停滯 (cell cycle arrest), 並且抑制細胞增生 (Zhang et al., 2012)。(3) 抗腫瘤轉移 (Anti-metastatic efficacy): DHM 可以抑制肝癌細胞侵襲並降低其 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 的蛋白表現 (Zhang et al., 2014b)。另外, Chen 等人也發現 DHM 可以抑制膽管癌細胞 (Cholangiocarcinoma Cells) 其侵襲及轉移的能力 (Chen et al., 2020)。(4) 抗血管新生 (Anti-angiogenesis): DHM 可以抑制肝癌細胞的增生與血管新生, 藉由調控 vascular endothelial growth factor 與 basic fibroblast growth factor 的表現 (Gao et al., 2011; Luo et al., 2006)。

微核醣核酸 (MicroRNA) 是一種不會轉譯成蛋白質的小分子核醣核酸, 它可以扮演內源性的核醣核酸干擾作用 (RNA interference), 微核醣核酸能透過轉錄後調控機制來調控標的基因的表現, 並可能具有調控腫瘤抑制基因或治癌基因的功能。有研究指出: 部分 MicroRNA 已被證實與 MMP-2 及 MMP-9 的調控有所相關, 包含了 MicroRNA-125b、MicroRNA-143、MicroRNA-196、MicroRNA-29b、MicroRNA-340 等 (Li and Li, 2013)。在人類喉癌細胞中, MicroRNA-21 能夠調節 MMP-2 的分泌, 進而抑制喉癌細胞 (Hep-2) 的細胞遷移能力 (Qian et al., 2012)。此外, 在肝癌細胞中, MicroRNA-29b 能調控 MMP-2 的分泌進而抑制癌細胞的轉移、侵襲以及腫瘤血管新生 (Fang et al., 2011)。因此, 微核醣核酸的異常表現在影響癌症轉移能力以及預後上可能扮演著重要的角色。

口腔癌的治療方式目前以手術治療為主, 但術後容易復發並產生次發性原位癌, 因此如何避免癌前病變與癌症復發的機會是目前研究的主要方向。化學預防是目前認為能控制癌症的策略之一, 癌症化學預防一般的定義為利用天然或合成的化合物來達到預防、阻斷與逆轉癌化的過程 (Tanaka, 1995; Tanaka, 1997)。藤茶 (Tengcha) 在預防肝損傷方面具有療效, 其中的黃酮類化合物 DHM 應用在抗癌方面也有文獻探討。但目前 DHM 應用在口腔癌的研究仍無相關文獻探討, 因此本實驗室擬 DHM 對口腔癌其轉移的相關探討機制研究。

二、研究方法

1. 細胞培養及處理

口腔癌細胞株 SCC-9、SAS 以 DMEM/F12 培養基培養，然後加入適量 antibiotics 及 10% FBS。於細胞培養箱中培育 24、48 小時後，取出 cell lysate 進行 Western blot、RT-PCR 和 real-time PCR 來觀察下游蛋白酶及訊息傳遞相關分子的表現。

2. Cell migration 分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM/F12，細胞以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後以 1% FBS 的細胞培養液混合細胞注入 upper chamber (1.5×10^4 cells/well)，待細胞移動 16 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 400x 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。

3. Wound healing 分析

將口腔癌細胞株以適當的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，再換成含 0.5% FBS 的 medium 培養 16 小時，以 tip 劃出傷口，0 小時至 48 小時間在顯微鏡下觀察傷口癒合的情況。

4. Gelatin-zymography (MMP-2 活性測試)

首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ l sample，加入 4 μ l loading buffer，將 sample loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下，加入 50 ml 的 washing

buffer，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 ml 的 reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時。將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 min，之後再以退色液退染觀看結果，並以 densitometer 量化結果。

5. 蛋白質 (protein lysate) 製備

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

6. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量採用 "Bradford's protein assay" 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白質含量越高。測定方法：首先以一系列已知濃度 BSA，加入五分之一體積的 Bradford protein dye 以波長 595 nm 之吸光度作一標準曲線，再以同樣的測定方法測得樣品之 O.D. 值，即可對照標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

7. Western blotting 分析

首先製備 10% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 μL sample (蛋白總量 20 μg)，加入 4 μL 之 5× loading buffer，將 sample denature (100°C, 10 min) 之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下進行蛋白轉漬，將 NC paper 置入冰冷之 transfer buffer

蓋上膠體後裝入 transfer holder，於 4°C 下，以 400 mA 進行轉漬 2 小時，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動 1 小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4°C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS + 0.05% Tween 20) 清洗四次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用 2 小時後以 washing buffer 清洗四次，每一次 10 分鐘。最後加入 ECL 進行呈色反應，並以冷光系統紀錄和量化結果。

8. microRNA

將細胞種於 12-well 放置 16 小時後加藥，加藥 24 小時後以 1X PBS 清洗細胞 2 次，加入 Lysis buffer 300 μ l，充分 pipetting 後收集放入 1.5 ml eppendorf。再加入避光的 buffer 30 μ l 並且 vortex 至完全均勻後放冰上 10 分鐘。接著加入氯仿 (取下層) 300 μ l 後 vortex 均勻並離心 10000 rcf-5 分鐘，再加入 375 μ l 100%酒精，pipetting 後吸入 kit 中，加入 wash buffer 700 μ l，倒掉廢液後再加入 500 μ l wash buffer，離心後並甩乾 1 分鐘，加入先前預熱的 95°C Elution buffer，並離心 30 秒。

9. microRNA mimic、inhibitor 轉染

將 microRNA mimic 或 inhibitor negative control 與 microRNA mimic 或 inhibitor 和 lipofectamine 2000 混合 opti-MEM serum medium 之混合液加至培養 24 小時的細胞中，作用 4 小時後將 opti-MEM serum medium 換為含有 FBS 的 medium。

10. DHM 對口腔癌細胞之癌轉移動物模式

將口腔癌細胞 SAS 細胞 (1×10^6 /100 μ l) 打入免疫缺陷的小鼠(BALB/c nu/nu mice)的尾靜脈，將接種癌細胞的小鼠隨機分組，進一步管餵不同濃度 DHM (0, 150 mg/kg, 300 mg/kg)，每三天管餵注射一次，分別作用 8 週後，取出肺臟以觀

察其腫瘤數目及轉移至肺部的能力。

11. 美國癌症基因圖譜計畫 (The Cancer Genome Atlas, TCGA)

美國癌症基因圖譜計畫是由美國癌症研究所 (National cancer institute, NCI) 及國家人類基因組研究所 (National Human Genome Research Institute, HNGRI) 合作在 2006 年發起的大型研究計畫。其目的是希望能透過更全面性，系統性的瞭解惡性腫瘤形成、生長、轉移等過程的分子生物基礎及病理機轉相關的基因體變化，以期促進癌症早期診斷及加速治療發展的脚步，更進一步而或能預防癌症的發生。藉由結合美、加數個大型醫學研究中心對特定癌症大規模地蒐集病人的臨床病歷紀錄和腫瘤及其相對應正常組織樣本，血液樣本，進行全面的基因體資料和整合性的分析，並將此計畫的資料和大部份分析結果公開於網路上，可供世界各地的研究者瀏覽及下載並應用在自己的相關研究中。TCGA 目前確定具有匹配的腫瘤和正常組織有 11000 例，包含 33 種癌症，其中包括 10 種罕見癌症。本研究利用 broad GDAC firehose 網站將 TCGA 資料庫之數據下載並利用統計軟體分析頭頸癌病人其 MMP-2 mRNA 及 microRNA-29a 之表現並分析其與頭頸癌病人之癌症分期之相關性。

12. 組織免疫切片染色 (immunohistochemistry)

取小鼠犧牲後的腫瘤組織以 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 將石臘溶解，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% H₂O₂ 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 ddH₂O 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

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

三、結果

DHM對於人類口腔癌細胞株 SCC-9及SAS 細胞存活率的影響

以MTT assay分析不同濃度之DHM (0、50、100、200 μM)對口腔癌細胞SCC-9及SAS的細胞毒性。處理 24 小時後，將藥物移除，其結果與未處理DHM之對照組作比較。由結果發現SCC-9及SAS細胞在DHM這幾個濃度的處理之下並不會影響細胞的存活率 (Figures 1A and 1B)。

DHM 對人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 細胞爬行能力的影響

將 SCC-9及SAS 口腔癌細胞以 6×10^5 的細胞數培養在6公分培養皿內，培養 16 小時後，在每個孔盤中以200 μL 的tip劃出一道傷痕，再給予不同濃度的DHM (0、50、100、200 μM)，並於 0、12、24、48 小時觀察細胞傷口癒合之能力，並拍照紀錄。Wound healing assay結果顯示，隨著DHM濃度增加，細胞癒合能力逐漸下降 (Figures 2A and 2B)，表示DHM能夠有效抑制口腔癌細胞株SCC-9及SAS的細胞爬行能力。

DHM 對人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 細胞移動及侵襲能力的影響

將SCC-9及SAS口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在6公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的DHM (0、50、100、200 μM)處理 24 小時後，以 trypsin-EDTA 打下細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞數 ($1.6 \times 10^5/\text{well}$) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中於37°C 培養箱反應 24 小時，再利用Boyden chamber migration assay的分析方法，分析其移動能力，其結果與未處理DHM之對照組做比較。結果顯示隨著DHM濃度的增加，其移動能力依DHM濃度由低到高而有下降的趨勢 (Figures 3A-3D)。口腔癌細胞

移動能力會隨著DHM濃度增加而降低，代表著DHM可以有效抑制 SCC-9及SAS細胞的移動及侵襲能力。

DHM 對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 分泌 MMP-2 的影響

由上述結果可知 DHM 具有抑制口腔癌細胞侵襲及移動的能力，因此我們利用 gelatin zymography assay，來觀察造成癌細胞轉移的主要蛋白酶 MMP-2 的表現量，是否會受 DHM 影響。給予不同濃度的 DHM (0、50、100、200 μ M)處理 24 小時後，收集的 medium 進行 zymography 試驗。其結果與未處理 DHM 之對照組做比較。由結果可知，隨著 DHM 濃度增加，其 MMP-2 有明顯的下降 (Figures 4A-4B)，表示 DHM 確實會抑制口腔癌細胞 SCC-9 及 SAS 所分泌的 MMP-2 表現量。

DHM對於人類口腔癌細胞株 SCC-9及SAS 其MMP-2及內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現

將SCC-9及SAS口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在6公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的DHM (0、50、100、200 μ M)處理 24 小時後，萃取其 total cell lysates，以 anti-MMP-2、anti-TIMP-2 的抗體進行 Western blot 分析，並以 β -actin 的表現量作為 internal control。結果顯示 MMP-2 蛋白表現量隨著DHM濃度的增加而遞減，此外，其內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現量隨著DHM濃度增加而上升，結果顯示增加DHM濃度能夠降低 MMP-2 的蛋白表現，且也能透過增加其內生性抑制劑TIMP-2 的表現來達到抑制 MMP-2 的分泌 (Figures 4C-4D)。

Dihydromyricetin對於人類口腔癌細胞株SCC-9及SAS之MMP-2 mRNA表現影響

將口腔癌細胞以 6×10^5 分盤於6 cm培養皿中，16小時後以不含FBS的medium處理不同濃度Dihydromyricetin (0、50、100、200 μ M)，並於24小時後收取RNA，並以RT-PCR與Real-time PCR方法分析其MMP-2的RNA表現。結果顯示其細胞內生性的MMP-2 RNA表現量的確隨著DHM藥物濃度上升而減少 (Figures 5A-5D)。

MicroRNA-29a 對於 DHM 調控人類口腔癌細胞株其 MMP-2 表現量與細胞爬行能力之影響

我們首先利用 miRWalk、microRNA、targetSca 三個網路數據庫來預測其標靶在 MMP-2 基因上的 microRNA，從文氏圖 (Venn diagrams)顯示其三個圓圈重疊處有 6 個共同的元素：分別有 miR-106b-5p、miR-17-5p、miR-29a-3p、miR-29b-3p、miR-29c-3p 以及 miR-338-3p，其中以 miR-29a-3p、miR-29b-3p、miR-29c-3p 所對應的結構為 MMP-2 (Figure 6)。因此我們首先觀察加入 DHM 藥物是否會影響細胞內 miR-29a 的表現，從結果顯示在 SCC-9 及 SAS 兩株細胞中，miR-29a 表現量確實隨著藥物濃度增加而上升 (Figures 7A-7B)。接著我們利用 miR-29a mimic 處理細胞的確觀察到 miR-29a 大量表現，而隨著 miR-29a mimic 的處理下，細胞的內生性 MMP-2 表現受到抑制 (Figures 8A-8B)。此外，我們也利用 miR-29a inhibitor 來反證實驗的結果，發現加入 miR-29a inhibitor 確實有抑制 miR-29a 表現，而我們將 miR-29a inhibitor 與 DHM 藥物共同處理之後，在不影響細胞存活率的條件下，miR-29a inhibitor 確實逆轉了原本由 DHM 藥物所抑制的細胞內生性 MMP-2 之分泌活性 (Figures 9A-9C)。另一方面，在相同處理的條件下，我們

以 Boyden chamber assay 觀察到 miR-29a inhibitor 逆轉了由 DHM 所抑制的細胞爬行能力 (Figure 10)。

頭頸癌臨床病人之 MMP-2 及 mir-29a 之表現與相關性分析

我們進一步利用 broad GDAC firehose 網站將 TCGA 資料庫之數據下載並利用統計軟體分析臨床檢體中癌症病人之 MMP-2 及 mir-29a 之表現與其相關性。結果顯示頭頸癌病人之 mir-29a 表現則明顯低於正常組織之對照組，而 MMP-2 mRNA 表現明顯高於正常組織之對照組 (Figures 11A-11B)。另外利用統計軟體分析頭頸癌病人的 MMP-2 及 mir-29a 之間的相關性，結果顯示癌組織的 MMP-2 及 mir-29a 表現呈現負相關之趨勢 (Figures 11C)。最後我們分析頭頸癌病人之癌症分期與 mir-29a 之間的關聯性，結果顯示在臨床分期及癌症分期中，mir-29a 在晚期中的表現明顯低於早期的頭頸癌病人 (Figures 12A, 12D)，另外 mir-29a 在 T3、T4 其中的表現也明顯低於 T1、T2 期 (Figure 12C, 12F)，但與淋巴結轉移與否並無明顯相關性 (Figures 12B, 12E)。因此，由結果發現在臨床病人中，mir-29a 之表現與頭頸癌病人之癌症分期有所關聯。

DHM 對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 其訊息傳遞蛋白 FAK、Src 與 p38 磷酸化表現之影響

利用 Western blot 方法分析，來探討 DHM 抑制口腔癌細胞 SCC-9 移動及侵襲能力及 MMP-2 的分泌與訊息蛋白之間的相關性。將 SCC-9 口腔癌細胞株以 6×10^5 的細胞數培養在 6 公分的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的 DHM (0、50、100、200 μM) 處理 6 小時後，萃取其 total cell lysates，利用 anti-ERK1/2、anti-phospho-ERK1/2、anti-JNK1/2、anti-phospho-JNK1/2、anti-p38、

anti-phospho-p38、anti-FAK、anti-phospho-FAK、anti-Src、anti-phospho-Src 抗體進行 Western blot 試驗。實驗結果顯示，磷酸化 FAK、Src、ERK1/2、p38 的蛋白表現隨著 DHM 的濃度增加而減少，而 JNK1/2 磷酸化表現則不受到 DHM 的影響 (Figures 13A-13B)。

Dihydromyricetin、PD98059 以及 SB202190 對於人類口腔癌細胞 SCC9 其細胞爬行能力及內生性 MMP-2 分泌活性之影響

將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，給予 MEK/ERK 抑制劑-PD98059 (25 μ M) 以及 p38 MAP kinases 抑制劑-SB202190 (20 μ M) 處理 1 小時，再給予 Dihydromyricetin (0、100 μ M) 處理後以 Wound healing 與 Boyden chamber assay 觀察，從結果發現單獨處理藥物 DHM 的細胞爬行能力受到抑制，但共同處理 PD98059 或 SB202190 的條件下，又比單獨處理藥物的抑制效果更為顯著，顯示出 DHM 透過抑制 FAK、Src、ERK、p38 來影響 MMP-2 活性以及細胞爬行能力 (Figures 14A-14B; Figure 15)。

DHM在動物模式中對於口腔癌細胞株之影響

為了進一步觀察動物模式中，DHM 對與口腔癌生長或轉移能力的影響，我們將口腔癌細胞株 SAS 細胞 (1×10^6 /100 μ l) 打入免疫缺陷的小鼠 (BALB/c nu/nu mice) 的尾靜脈，將接種口腔癌細胞株的小鼠隨機分組，進一步管餵不同濃度的 DHM (0, 150 mg/kg, 300 mg/kg)，每三天管餵注射一次，處理 8 週後，取出肺臟以觀察其腫瘤數目及轉移至肺部的能力。結果發現，處理不同濃度 DHM 的免疫缺陷的小鼠，會明顯抑制其口腔癌腫瘤細胞轉移至肺部的能力 (Figures 16A-16B)，但不影響其小鼠的體重 (Figures 16C)。而取小鼠犧牲後的腫瘤組織，利用組織免

疫切片染色方式也發現腫瘤指標 Ki-67 的確有明顯的下降(Figures 16D) ,但對肝臟、腎臟及脾臟的細胞型態並無明顯的影響(Figures 16E)。

四、結論

本研究發現 DHM 在不影響細胞存活率下，可以抑制 SCC-9 及 SAS 此兩株口腔癌細胞的轉移與侵襲，並與 MMP-2 有關。此外，我們發現 DHM 可以透過調控 microRNA-29a-3p 來影響人類口腔癌細胞的 MMP-2 活性以及細胞爬行能力。而在訊息傳遞路徑部分，也發現 DHM 對於 FAK、Src、ERK1/2 及 p38 路徑都具有明顯的抑制效果(Figures 17)。而最後我們利用動物模式也發現 DHM 可以有效抑制口腔癌細胞株轉移至肺部的能力，綜合以上結果，DHM 或許可以應用在預防口腔癌的轉移或輔助口腔癌的治療。

參考文獻

- Angadi, P.V., and S.S. Rao. 2011. Areca nut in pathogenesis of oral submucous fibrosis: revisited. *Oral and maxillofacial surgery*. 15:1-9.
- Bjorklund, M., and E. Koivunen. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1755:37-69.
- Burda, S., and W. Oleszek. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49:2774-2779.
- Chen, L., Z.S. Yang, Y.Z. Zhou, Y. Deng, P. Jiang, and S.L. Tan. 2020. Dihydromyricetin inhibits cell proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis via regulating miR-21 in Human Cholangiocarcinoma Cells. *Journal of Cancer*. 11:5689-5699.
- Chen, S., X. Zhao, J. Wan, L. Ran, Y. Qin, X. Wang, Y. Gao, F. Shu, Y. Zhang, P. Liu, Q. Zhang, J. Zhu, and M. Mi. 2015. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 99:74-81.
- Chien, M.H., C.W. Lin, C.W. Cheng, Y.C. Wen, and S.F. Yang. 2013. Matrix metalloproteinase-2 as a target for head and neck cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 17:203-216.
- Deryugina, E.I., and J.P. Quigley. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 25:9-34.
- Du, Q., W. Cai, M. Xia, and Y. Ito. 2002. Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns. *Journal of chromatography. A*. 973:217-220.
- Duffy, M.J., T.M. Maguire, E.W. McDermott, and N. O'Higgins. 1999. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *Journal of surgical oncology*. 71:130-135.
- Fang, J.H., H.C. Zhou, C. Zeng, J. Yang, Y. Liu, X. Huang, J.P. Zhang, X.Y. Guan, and S.M. Zhuang. 2011. MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression. *Hepatology*. 54:1729-1740.
- Gao, J., B. Liu, Z. Ning, R. Zhao, A. Zhang, and Q. Wu. 2009. Characterization and Antioxidant Activity of Flavonoid-Rich Extracts from Leaves of *Ampelopsis Grossedentata*. *Journal of Food Biochemistry*. 33:808-820.
- Gao, Q., X. Yang, and M. Ou. 2011. [Effect of serum containing tengcha total flavonoid and dihydromyricetin on proliferation and apoptosis of HepG2 cells].

- Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica.* 36:500-503.
- Hao, S.-P., and M.H. Cheng. 2004. Cancer of the buccal mucosa and retromolar trigone. *Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 15:239-251.
- He, G., F. Du, W. Yang, G. Pei, and Y. Zhu. 2003. [Effects of tengcha flavonoids on scavenging oxygen free radicals and inhibiting lipid-peroxidation]. *Zhong yao cai = Zhongyao cai = Journal of Chinese medicinal materials.* 26:338-340.
- Hsiao, Y.H., S.C. Su, C.W. Lin, Y.H. Chao, W.E. Yang, and S.F. Yang. 2019. Pathological and therapeutic aspects of matrix metalloproteinases: implications in childhood leukemia. *Cancer metastasis reviews.* 38:829-837.
- Jefferies, S., and W.D. Foulkes. 2001. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology.* 37:115-126.
- Jiang, Y., I.D. Goldberg, and Y.E. Shi. 2002. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene.* 21:2245-2252.
- Johnson, N.W., S. Warnakulasuriya, P.C. Gupta, E. Dimba, M. Chindia, E.C. Otoh, R. Sankaranarayanan, J. Califano, and L. Kowalski. 2011. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: causes and solutions. *Advances in dental research.* 23:237-246.
- Klein, T., and R. Bischoff. 2011. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 41:271-290.
- Ko, Y.C., Y.L. Huang, C.H. Lee, M.J. Chen, L.M. Lin, and C.C. Tsai. 1995. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 24:450-453.
- Li, L., and H. Li. 2013. Role of microRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors. *Cancer Biol Ther.* 14:796-805.
- Liang, X., T. Zhang, L. Shi, C. Kang, J. Wan, Y. Zhou, J. Zhu, and M. Mi. 2015. Ampelopsin protects endothelial cells from hyperglycemia-induced oxidative damage by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway. *BioFactors (Oxford, England).*
- Luo, G.Q., S. Zeng, and D.Y. Liu. 2006. [Inhibitory effects of ampelopsin on angiogenesis]. *Zhong yao cai = Zhongyao cai = Journal of Chinese medicinal materials.* 29:146-150.
- Murakami, T., M. Miyakoshi, D. Araho, K. Mizutani, T. Kambara, T. Ikeda, W.H. Chou, M. Inukai, A. Takenaka, and K. Igarashi. 2004. Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and

- ampelopsin. *Biofactors*. 21:175-178.
- Qi, S., Y. Xin, Y. Guo, Y. Diao, X. Kou, L. Luo, and Z. Yin. 2012. Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathways. *International immunopharmacology*. 12:278-287.
- Qian, X., Y. Ren, Z. Shi, L. Long, P. Pu, J. Sheng, X. Yuan, and C. Kang. 2012. Sequence-dependent synergistic inhibition of human glioma cell lines by combined temozolomide and miR-21 inhibitor gene therapy. *Mol Pharm*. 9:2636-2645.
- Rao, S.V.K., G. Mejia, K. Roberts-Thomson, and R. Logan. 2013. Epidemiology of Oral Cancer in Asia in the Past Decade- An Update (2000-2012). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14:5567-5577.
- Shi, L., T. Zhang, X. Liang, Q. Hu, J. Huang, Y. Zhou, M. Chen, Q. Zhang, J. Zhu, and M. Mi. 2015. Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin resistance by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway. *Molecular and cellular endocrinology*. 409:92-102.
- Su, C.W., C.W. Lin, W.E. Yang, and S.F. Yang. 2019a. TIMP-3 as a therapeutic target for cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*. 11:1758835919864247.
- Su, S.C., L.C. Chang, H.D. Huang, C.Y. Peng, C.Y. Chuang, Y.T. Chen, M.Y. Lu, Y.W. Chiu, P.Y. Chen, and S.F. Yang. 2020. Oral microbial dysbiosis and its performance in predicting oral cancer. *Carcinogenesis*.
- Su, S.C., L.C. Chang, C.W. Lin, M.K. Chen, C.P. Yu, W.H. Chung, and S.F. Yang. 2019b. Mutational signatures and mutagenic impacts associated with betel quid chewing in oral squamous cell carcinoma. *Human genetics*. 138:1379-1389.
- Su, S.C., M.J. Hsieh, W.E. Yang, W.H. Chung, R.J. Reiter, and S.F. Yang. 2017. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. *Journal of pineal research*. 62.
- Su, S.C., C.W. Lin, W.E. Yang, W.L. Fan, and S.F. Yang. 2016. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies. *Expert opinion on therapeutic targets*. 20:551-566.
- Tanaka, T. 1995. Chemoprevention of oral carcinogenesis. *European journal of cancer. Part B, Oral oncology*. 31B:3-15.
- Tanaka, T. 1997. Chemoprevention of human cancer: biology and therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 25:139-174.
- Turpeenniemi-Hujanen, T. 2005. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie*. 87:287-297.

- Wang, K., S.F. Yang, Y.H. Hsieh, Y.Y. Chang, N.Y. Yu, H.W. Lin, and H.Y. Lin. 2018. Effects of dihydromyricetin on ARPE-19 cell migration through regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Environmental toxicology*. 33:1298-1303.
- Zeng, G., J. Liu, H. Chen, B. Liu, Q. Zhang, M. Li, and R. Zhu. 2014. Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells. *Oncology reports*. 31:2713-2719.
- Zhang, B., S. Dong, X. Cen, X. Wang, X. Liu, H. Zhang, X. Zhao, and Y. Wu. 2012. Ampelopsin sodium exhibits antitumor effects against bladder carcinoma in orthotopic xenograft models. *Anti-cancer drugs*. 23:590-596.
- Zhang, Q., J. Liu, B. Liu, J. Xia, N. Chen, X. Chen, Y. Cao, C. Zhang, C. Lu, M. Li, and R. Zhu. 2014a. Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism. *Scientific reports*. 4:4628.
- Zhang, Q.Y., R. Li, G.F. Zeng, B. Liu, J. Liu, Y. Shu, Z.K. Liu, Z.D. Qiu, D.J. Wang, H.L. Miao, M.Y. Li, and R.Z. Zhu. 2014b. Dihydromyricetin inhibits migration and invasion of hepatoma cells through regulation of MMP-9 expression. *World journal of gastroenterology : WJG*. 20:10082-10093.
- Zhang, Y.S., Z.X. Ning, S.Z. Yang, and H. Wu. 2003. Antioxidation properties and mechanism of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*. 38:241-244.
- Zhong, Z.X., J.P. Qin, G.F. Zhou, and X.F. Chen. 2002. [Experimental studies of hypoglycemic action on total flavone of *Ampelopsis grossedentata* from Guangxi]. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*. 27:687-689.

圖表與圖表說明

Figure 1

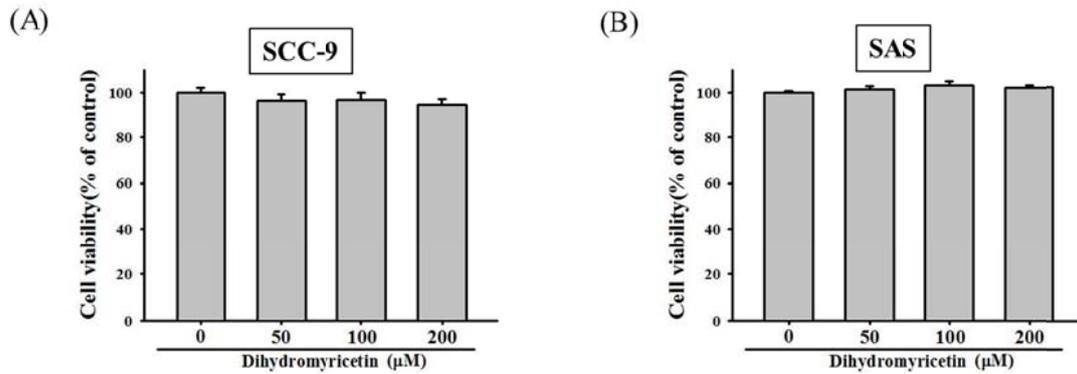


Figure 1. Dihydromyricetin對於人類口腔癌細胞株SCC-9及SAS細胞存活率的影響

將(A) SCC-9及(B) SAS口腔癌細胞以 6×10^4 的細胞數分盤到24孔的培養皿，培養16小時後，給予不同濃度的Dihydromyricetin (0、50、100、200 μM)處理24小時後，將藥物移除，利用MTT assay偵測細胞的存活率，其結果與未處理Dihydromyricetin之對照組做比較。每個實驗至少3重複，結果數據以mean ± SD表示，結果顯示在(0、50、100、200 μM)不同濃度下，Dihydromyricetin對口腔癌細胞株SCC-9及SAS不具毒殺性。

Figure 2

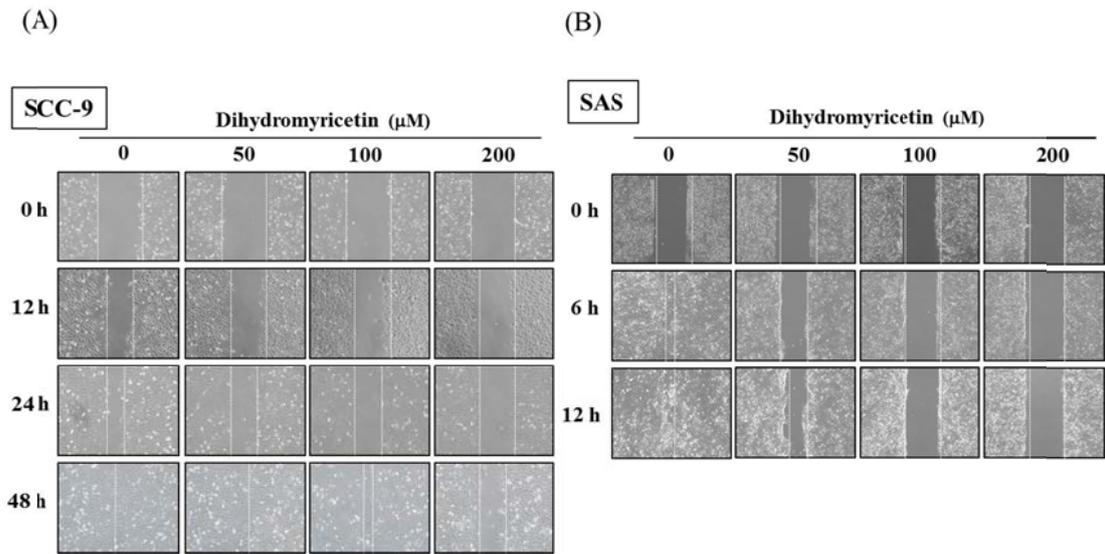


Figure 2. Dihydromyricetin 對人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 細胞爬行能力的影響

將口腔癌細胞株(A)SCC-9 及(B) SAS 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以含有 10% FBS medium 加藥並使用 200 μL tip 劃出傷口並給予不同濃度的 Dihydromyricetin (0、50、100、200 μM) 處理 0、12、24 小時及 48 小時後(SCC-9 細胞) 或處理 0、6 小時及 12 小時後(SAS 細胞)，在顯微鏡下觀察傷口癒合的速度，並拍照記錄。

Figure 3

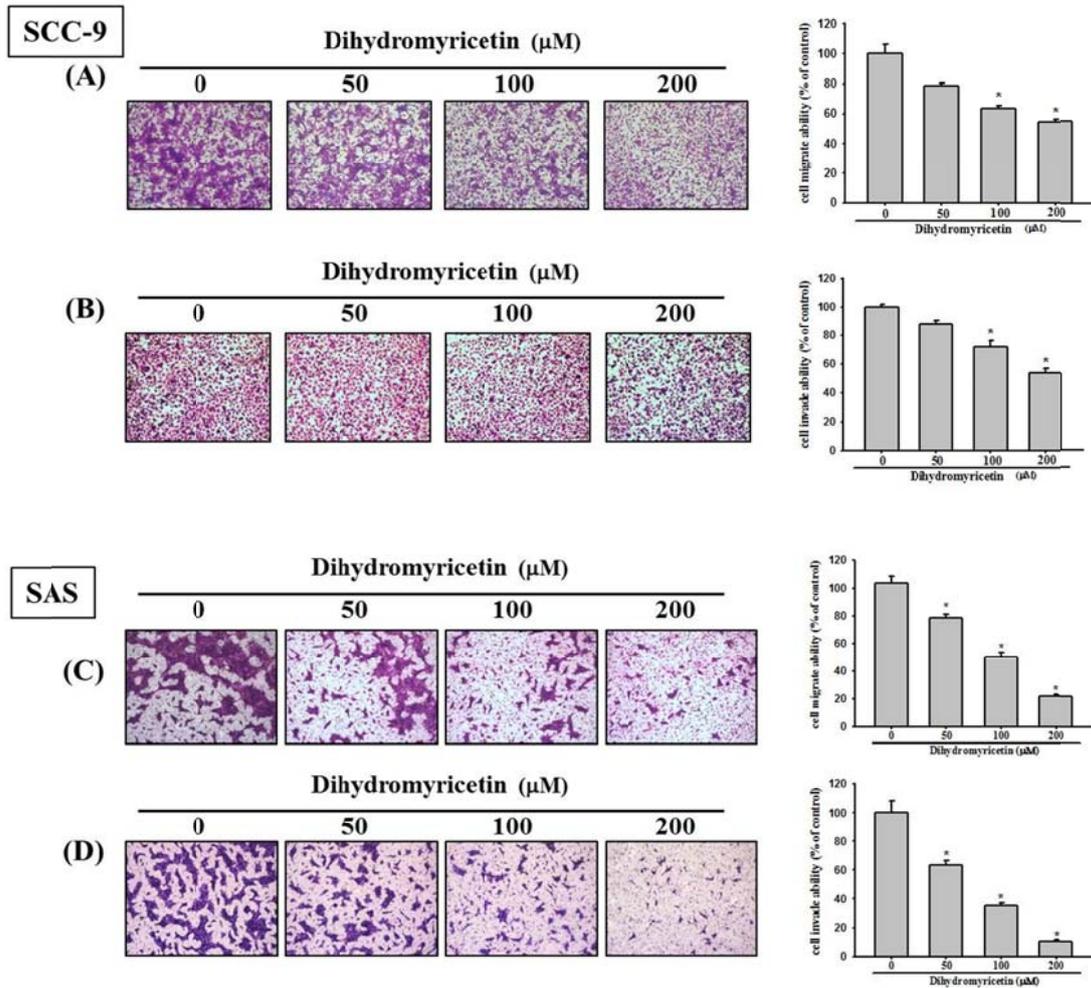


Figure 3. Dihydromyricetin 對人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 細胞爬行及侵襲能力的影響

將口腔癌細胞株 SCC-9(A-B) 及 SAS (C-D) 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以含有 10% FBS medium 加藥以 Boyden chamber migration assay 使癌細胞在 8 μm 的薄膜進行 migration 試驗，之後將薄膜染色，並照相記錄細胞爬行及侵襲能力。

Figure 4

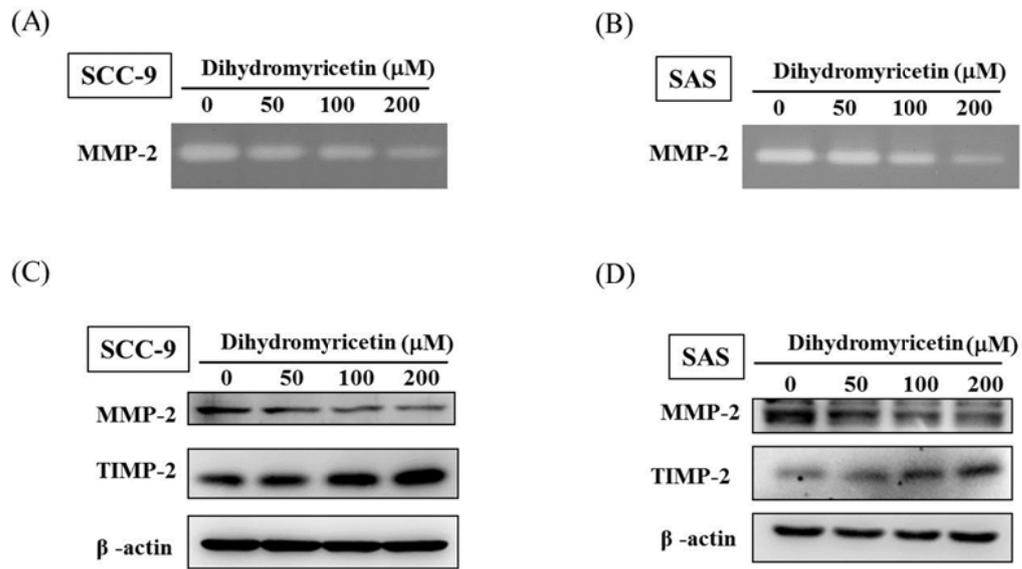


Figure 4. Dihydromyricetin 對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 分泌 MMP-2

及內生性抑制劑 TIMP-2 的蛋白表現影響

將口腔癌細胞(A) SCC-9及(B) SAS以 6×10^4 分盤於24 well培養皿中，16小時後以不含FBS的 medium處理不同濃度Dihydromyricetin (0、50、100、200 μM)，並於24小時後收取medium。以gelatin zymography方法分析其MMP-2之活性。(C-D)以同樣處理條件，收集total cell lysate以Western blot分析MMP-2及TIMP-2 的蛋白表現，並以 β-actin 表現量當作對照比較。

Figure 5

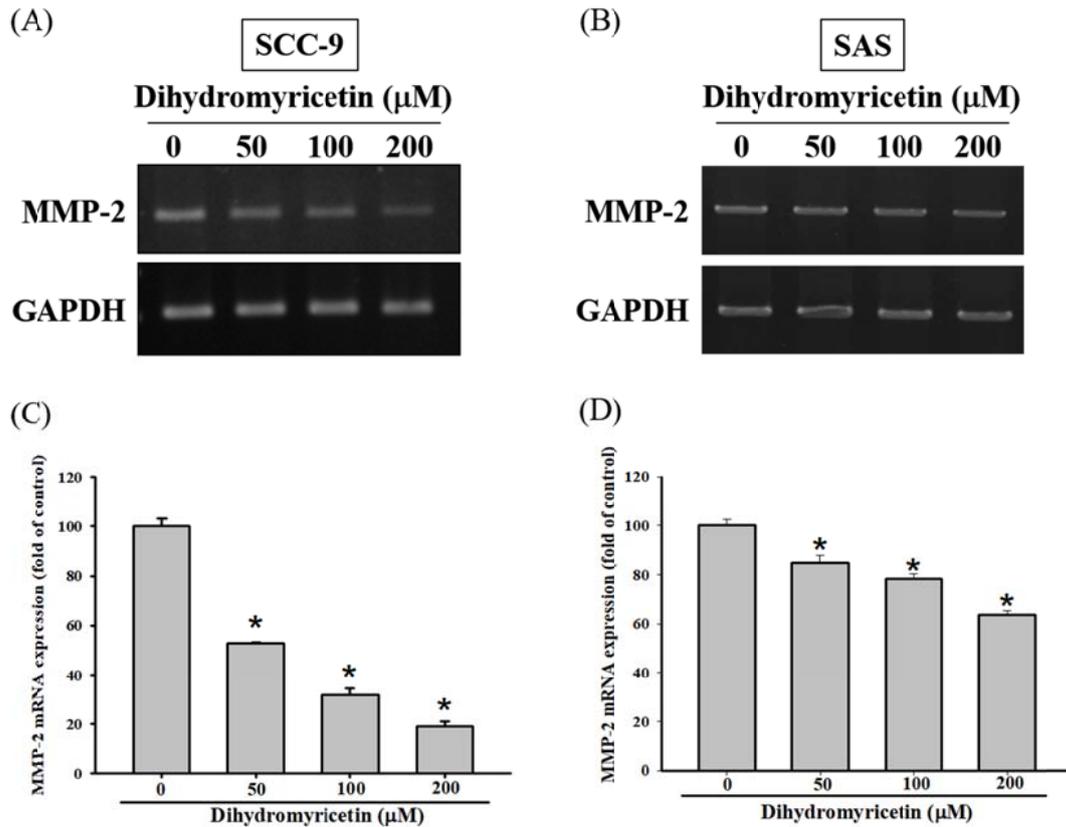


Figure 5. Dihydromyricetin 對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 之 MMP-2 RNA 表現影響

將口腔癌細胞(A) SCC-9 及(B) SAS 以 6×10^5 分盤於 6 cm 培養皿中，16 小時後以不含 FBS 的 medium 處理不同濃度 Dihydromyricetin (0、50、100、200 μM)，並於 24 小時後收取 RNA，並以 RT-PCR 方法分析其 MMP-2 的 RNA 表現。(C-D) 以同樣條件處理細胞後，收取 RNA 並以 Real-time PCR 方法觀察其 MMP-2 的 RNA 表現，並以 GAPDH 表現量當作對照比較。

Figure 6

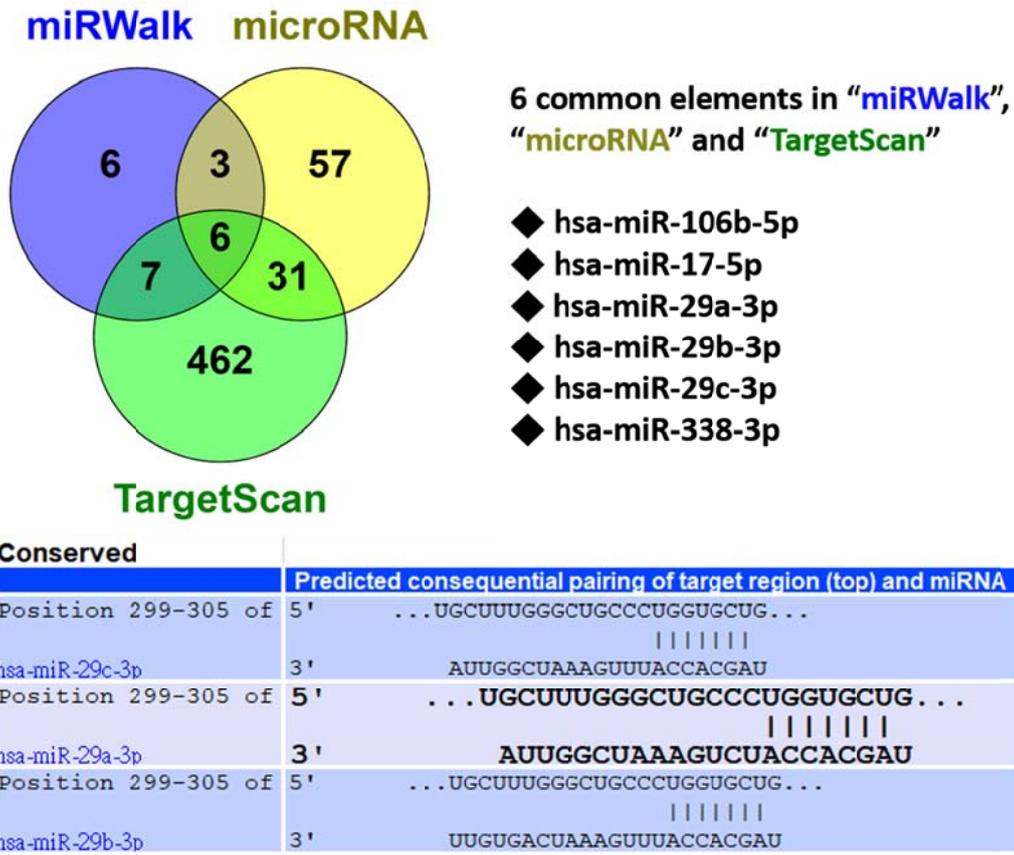


Figure 6. 文氏圖 (Venn diagrams)顯示與 MMP-2 相關之 miRNAs

利用 miRWalk、microRNA、targetSca 三個網路數據庫來預測其標靶在 MMP-2 基因上的 microRNA，從文氏圖 (Venn diagrams)顯示其三個圓圈重疊處有 6 個共同的元素：分別有 miR-106b-5p、miR-17-5p、miR-29a-3p、miR-29b-3p、miR-29c-3p 以及 miR-338-3p，其中以 miR-29a-3p、miR-29b-3p、miR-29c-3p 對應的結構為 MMP-2 基因。

Figure 7

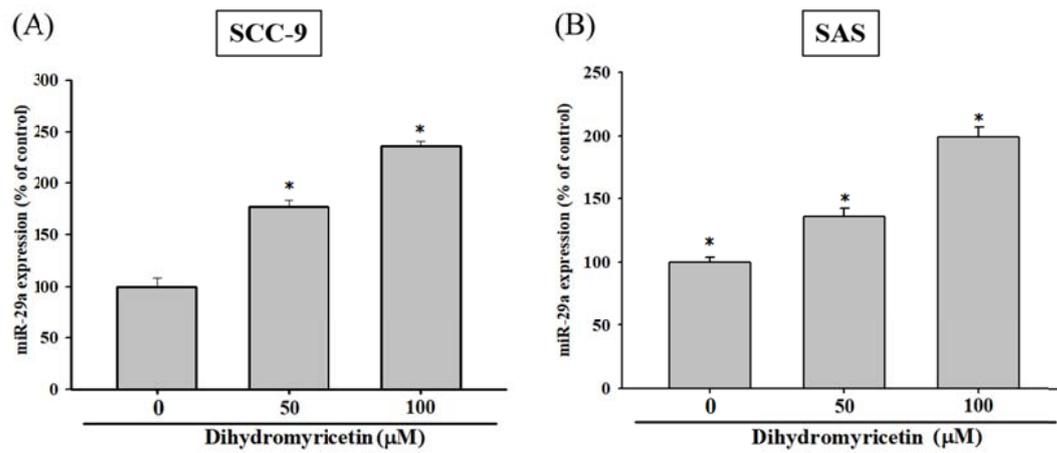


Figure 7. Dihydromyricetin 對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 及 SAS 之 miR-29a 表現之影響

將口腔癌細胞(A) SCC-9 及(B) SAS 以 6×10^5 分盤於 6 cm 培養皿中，16 小時後以不含 FBS 的 medium 處理不同濃度 Dihydromyricetin (0、50、100 μM)，並於 24 小時後收取 microRNA，以 Real-time PCR 方法分析其 miR-29a 的表現。

Figure 8

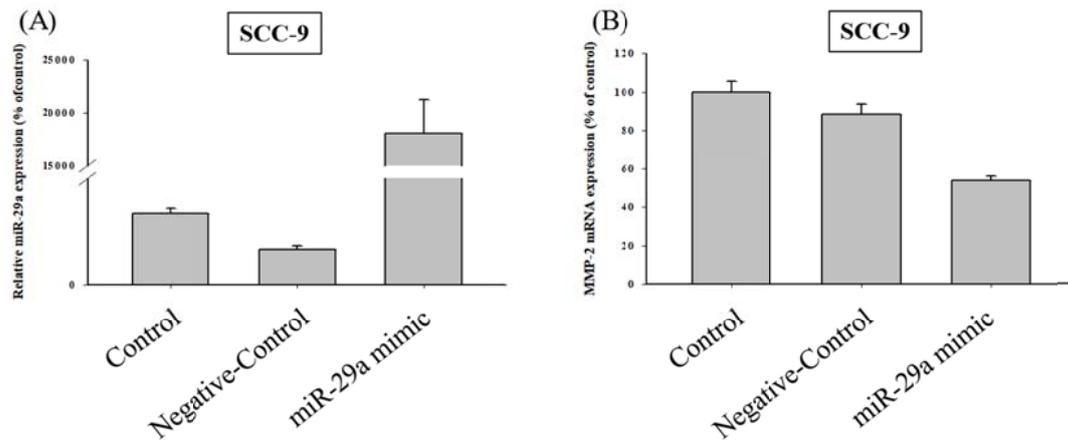


Figure 8. miR-29a mimic 對人類口腔癌細胞 SCC-9 其 miR-29a 以及 MMP-2 RNA 表現之影響

將口腔癌細胞(A) SCC-9 以 6×10^5 分盤於 6 cm 培養皿中，16 小時後以 miR-29a mimic (100 nM) transfect 處理，並於 24 小時後收取 microRNA，以 Real-time PCR 方法分析其 miR-29a 的表現。(B) 以同樣的方式處理細胞後，收取 RNA 並以 Real-time PCR 分析其 MMP-2 表現。

Figure 9

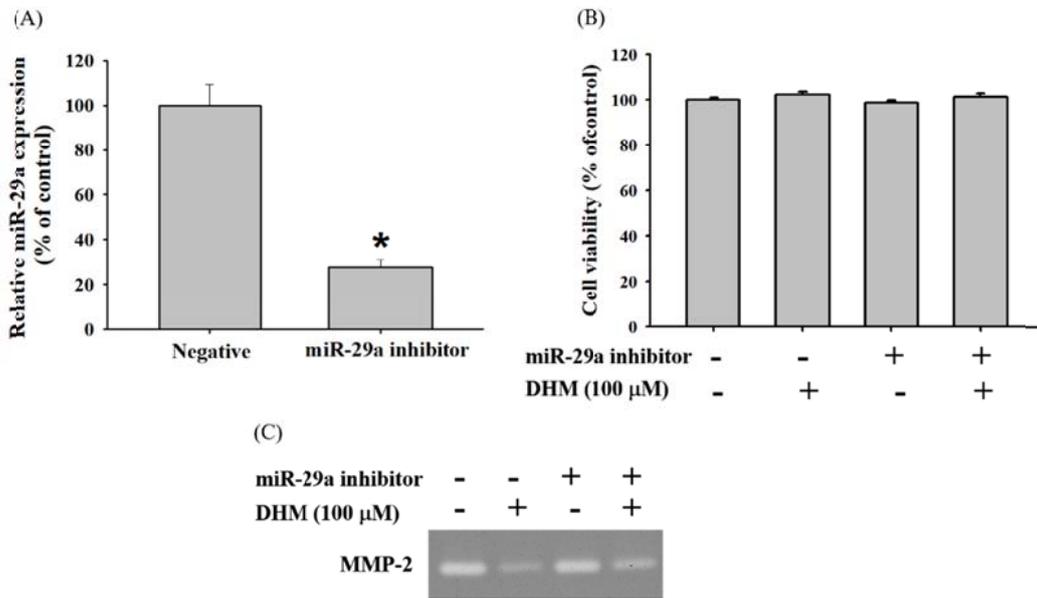


Figure 9. miR-29a inhibitor 對人類口腔癌細胞 SCC-9 其 miR-29a 表現、細胞存活率以及 MMP-2 分泌量表現之影響

將口腔癌細胞(A) SCC-9 以 6×10^5 分盤於 6 cm 培養皿中，16 小時後以 miR-29a inhibitor (20 nM) transfect 處理，並於 24 小時後收取 microRNA，以 Real-time PCR 方法分析其 miR-29a 的表現。(B-C) SCC-9 以 6×10^4 分盤於 24-well 培養皿中，16 小時後以 miR-29a inhibitor (20 nM) transfect 處理，並於 24 小時後加入 Dihydromyricetin (0, 100 μ M)，處理 24 小時後收取 medium，並利用 MTT assay 偵測細胞的存活率以及以 gelatin zymography 方法分析其 MMP-2 之活性。

Figure 10

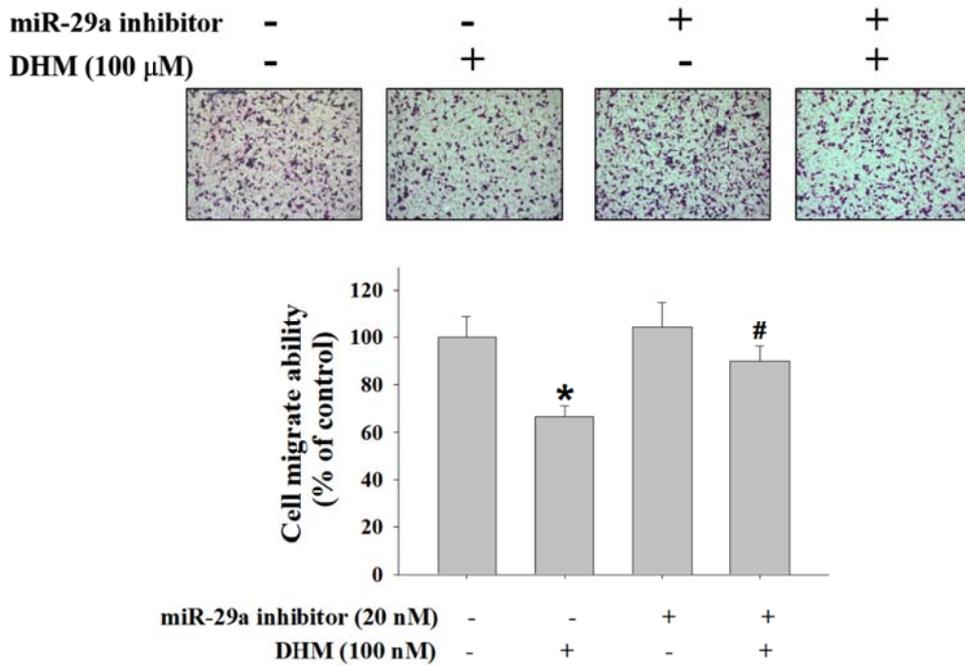


Figure 10. miR-29a inhibitor 與 Dihydromyricetin 對人類口腔癌細胞 SCC-9 其細胞爬行能力之影響

將口腔癌細胞 SCC-9 以 6×10^5 分盤於 6 cm 培養皿中，16 小時後以 miR-29a inhibitor (20 nM) transfect 處理，經過 24 小時後再以 Dihydromyricetin (0, 100 μ M) 處理細胞，並以 Boyden chamber migration assay 使癌細胞在 8 μ m 的薄膜進行 migration 試驗，之後將薄膜染色，並照相記錄細胞爬行及侵襲能力。

Figure 11

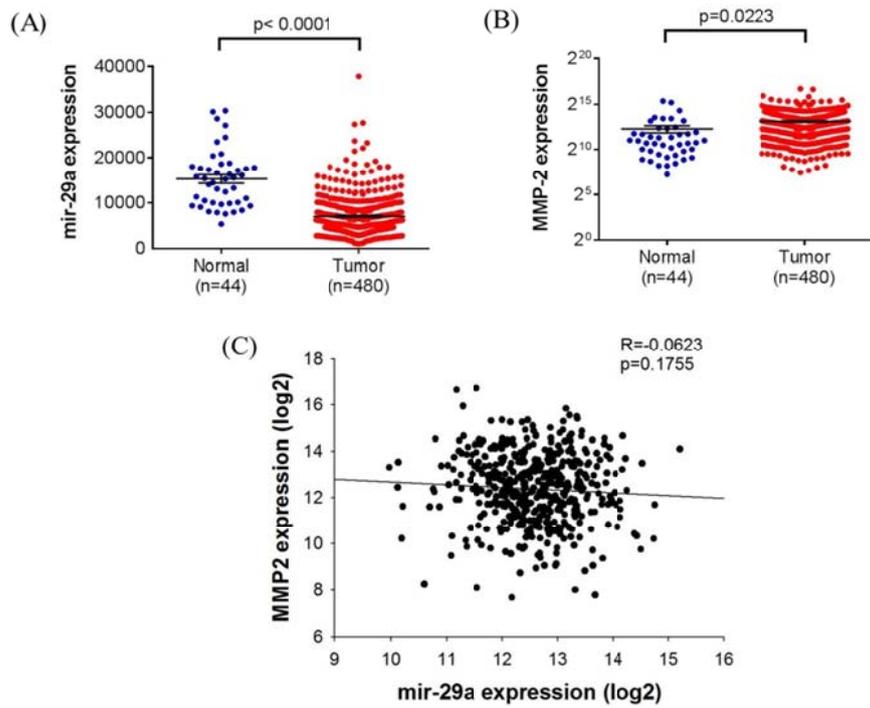


Figure 11. 頭頸癌臨床病人之 MMP-2 及 mir-29a 之表現與相關性分析

利用 broad GDAC firehose 網站將 TCGA 資料庫之數據分析臨床檢體中癌症病人之 MMP-2 及 mir-29a 之表現與其相關性。(A)頭頸癌病人之 mir-29a 表現則明顯低於正常組織之對照組 (B)MMP-2 mRNA 表現明顯高於正常組織之對照組。(C)頭頸癌病人的 MMP-2 及 mir-29a 之間的表現呈現負相關之趨勢。

Figure 12

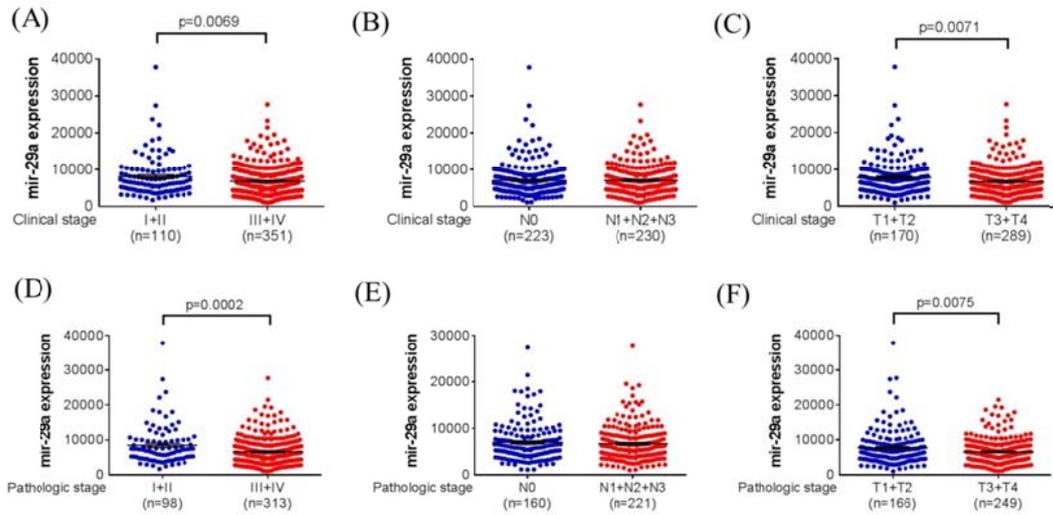


Figure 12.頭頸癌臨床病人之 mir-29a 表現與臨床分期及癌症分期相關性

分析頭頸癌病人之癌症分期與 mir-29a 之間的關聯性，(A) mir-29a mRNA 在臨床期數 (clinical stage)的表現量。(B) mir-29a mRNA 在臨床病人淋巴結轉移的表現量。(C) mir-29a mRNA 在臨床腫瘤大小 (clinical tumor size)的表現量。(D) mir-29a mRNA 在病理期數 (clinical stage)的表現量。(E) mir-29a mRNA 在病理病人淋巴結轉移的表現量。(F) mir-29a mRNA 在病理腫瘤大小 (clinical tumor size) 的表現量。

Figure 13

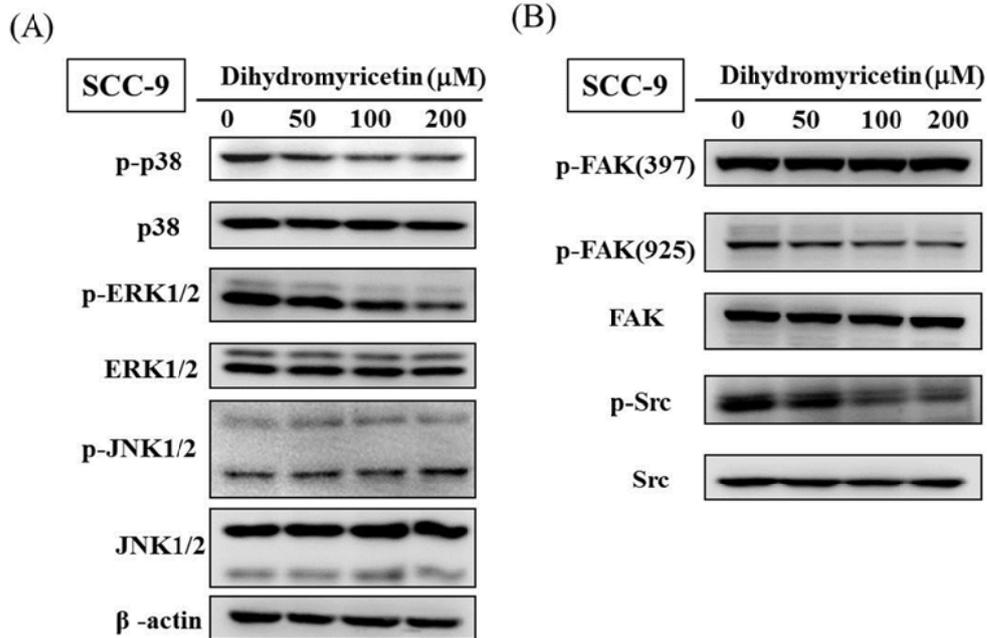


Figure 13. Dihydromyricetin 對於人類口腔癌細胞株 SCC-9 其訊息傳遞蛋白 ERK1/2、JNK1/2、p38、FAK 與 Src 磷酸化表現之影響

將口腔癌細胞株 SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，給予不同濃度的 Dihydromyricetin (0、50、100、200 μM) 處理 6 小時後，收集 total cell lysate 以 Western blot 分析 ERK、p-ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2、p38、p-p38、FAK、p-FAK、Src 與 p-Src 的蛋白表現，並以 β -actin 表現量當作對照比較。

Figure 14

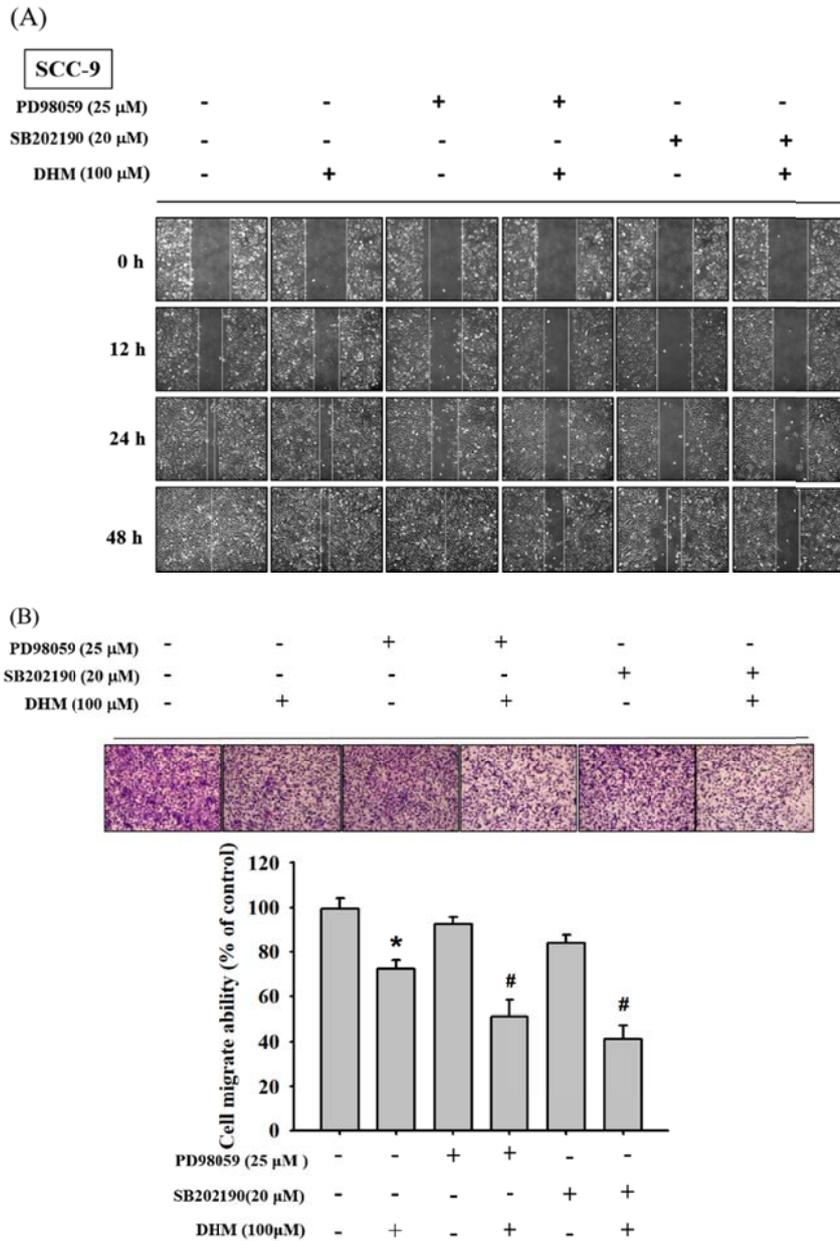


Figure 14. Dihydromyricetin、PD98059 以及 SB202190 對於人類口腔癌細胞 SCC9 其細胞爬行能力之影響

將口腔癌細胞株(A) SCC-9 以 6×10^5 的細胞數分盤到 6 cm 的培養皿，培養 16 小時後，以含有 10% FBS medium 加藥並使用 200 μ L tip 劃出傷口並給予 PD98059 (25 μ M) 以及 SB202190 (20 μ M) 處理 1 小時，再給予 Dihydromyricetin (0、100 μ M) 處理 0、12、24 小時及 48 小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的速度，

並拍照記錄。(B) 以同樣條件處理細胞後，以 Boyden chamber migration assay 使癌細胞在 8 μm 的薄膜進行 migration 試驗，之後將薄膜染色，並照相記錄細胞爬行及侵襲能力。

Figure 15

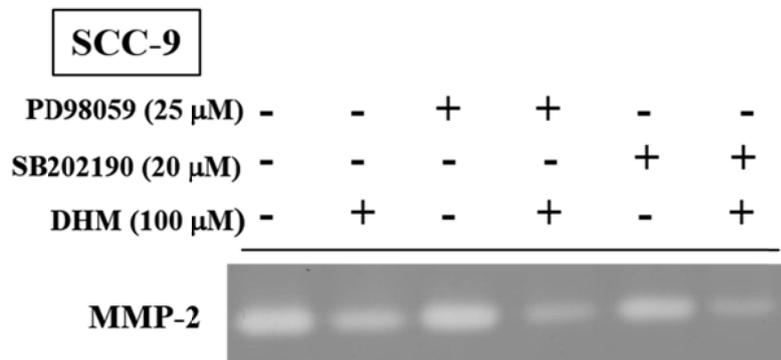


Figure 15. Dihydromyricetin、PD98059 以及 SB202190 對於人類口腔癌細胞 SCC9 其 RNA 分泌之影響

將 SCC-9 以 6×10^4 分盤於 24-well 培養皿中，16 小時後 PD98059 (25 μ M) 以及 SB202190 (20 μ M) 處理 1 小時，再給予藥物 Dihydromyricetin (0、100 μ M)，共處理 24 小時後收取 medium，以 gelatin zymography 方法分析其 MMP-2 之活性。

Figure 16

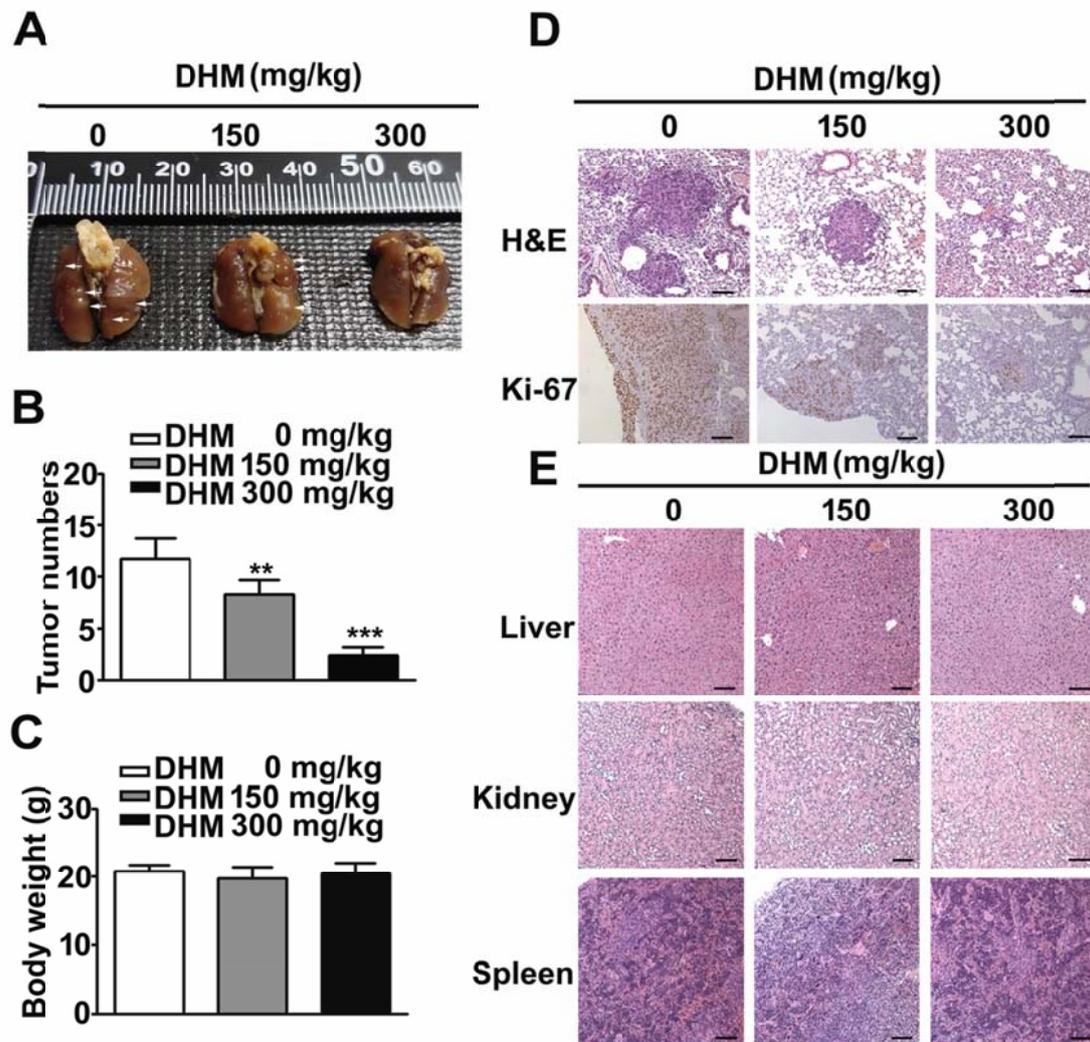


Figure 16. DHM在動物模式中對於口腔癌細胞株之影響

將口腔癌細胞株 SAS 細胞 ($1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$) 打入免疫缺陷的小鼠(BALB/c nu/nu mice)的尾靜脈，將接種口腔癌細胞株的小鼠逢機分組，進一步管餵不同濃度的 DHM (0, 150 mg/kg, 300 mg/kg)，每三天管餵注射一次，處理 8 週後，取出肺臟以觀察其(A-B)轉移至肺部的能力及(C)小鼠的體重。(D)利用組織免疫切片染色方式觀察腫瘤指標 Ki-67 的表現量及(E)肝臟、腎臟及脾臟的細胞型態。

Figure 17

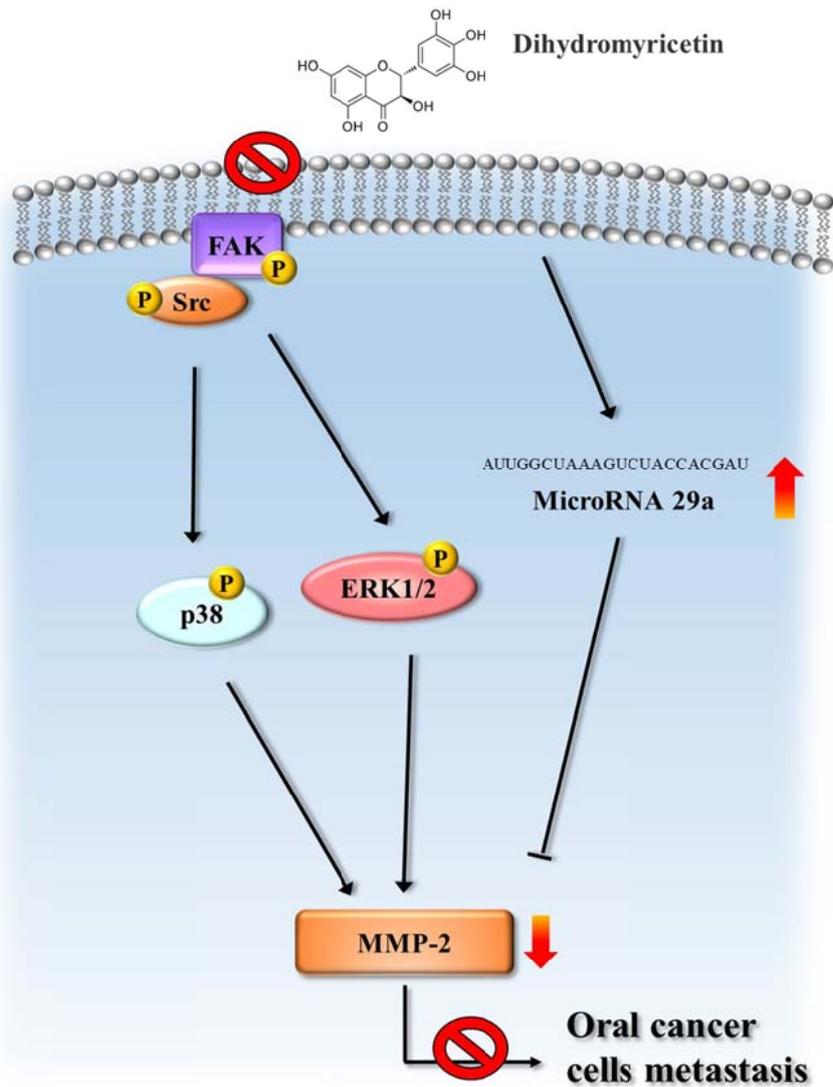


Figure 17. 研究假說概圖

本研究發現 DHM 抑制口腔癌細胞的轉移與侵襲，並與 MMP-2 有關。而在訊息傳遞路徑部分，也發現 DHM 對於 FAK、Src、ERK1/2 及 p38 路徑都具有明顯的抑制效果。此外，我們發現 DHM 可以透過調控 microRNA-29a-3 進而影響人類口腔癌細胞的 MMP-2 活性以及細胞爬行能力。

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

109 年 3 月 10 日

計畫編號	MOST 106-2314-B-040 -011 -MY3		
計畫名稱	探討 Dihydromyricetin 透過 microRNA 與腫瘤相關巨噬細胞調控口腔癌細胞轉移之機制		
出國人員姓名	林巧雯	服務機構及職稱	中山醫學大學口腔科學研究所教授
會議時間	2020 年 2 月 12 日至 2 月 14 日	會議地點	義大利貝爾加莫
會議名稱	(中文) EACR conferences 2020 (A Matter of Life or Death: Mechanisms, Models and Therapeutic Opportunities) (英文) EACR conferences 2020 (A Matter of Life or Death: Mechanisms, Models and Therapeutic Opportunities)		
發表題目	(中文) 去甲氧薑黃素藉由 p38 MAPK-HO-1 路徑誘導口腔鱗狀細胞癌細胞凋亡 (英文) Targeting of the p38 MAPK-HO-1 axis by demethoxycurcumin triggers caspase-mediated apoptotic cell death in oral squamous cell carcinoma cells		

一、參加會議經過

EACR conferences 2020 (A Matter of Life or Death: Mechanisms, Models and Therapeutic Opportunities)會議在義大利貝爾加莫舉行。這場歐洲癌症學會主要是針對細胞死亡及其在癌症的發生、進展和耐藥性治療中的調控為主題進行。貝爾加莫位於米蘭東北方約 40 公里的城市，會議辦在離火車站不遠處的 Centro Congressi Giovanni XXIII 會議中心舉辦。會議分成三天，第一天報到完有簡單的午餐享用，之後第一場演講由英國 Francis Crick Institute 的教授 Sharon Tooze 講解有關 autophagosome 形成的分子機制。內容先由自噬作用與人類疾病的關係，並且介紹自噬作用形成過程與其中參與的調控蛋白例如 ATG 等。下午還有比利時魯汶大學教授 Patrizia Agostinis 的研究介紹，血管內皮細胞的自噬作用有利於黑色素瘤細胞的腫瘤微環境。晚上 6 點至 7 點半是海報參觀時間，許多學者也針對我們的研究內容給了一些建議，例如發現去甲氧薑黃素對口腔鱗狀細胞癌造成 G2/M-phase arrest，也應該測試其對 cell damage 以及 AMPK 造成的影響。隔天的演講主題大多是 senescence 與癌症治療的關係。第三天其中一場演講是美國哥倫比亞教授 Brent Stockwell 介紹了 ferroptosis，一種因為鐵依賴的脂質過氧化引發的新型細胞死亡方式，以及其與疾病的關係。簡單的 summary 之後與大家用完餐後即結束了這次的研討會。

二、與會心得

本次會議雖然規模不大，但藉由一起共用午餐與晚餐，可以增加彼此交流的機會。

三、發表論文全文或摘要

Abstract

Introduction: Curcumin (CUR), a well-known curcuminoid from turmeric extracts, has potent anticancer activities, but it is relatively unstable and largely unabsorbed after oral ingestion. Demethoxycurcumin (DMC) is a CUR analogue with better stability and higher aqueous solubility than CUR after oral ingestion and has potential to treat diverse cancers including oral squamous cell carcinoma (OSCC). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and heme oxygenase (HO)-1 play diverse roles in regulating cancer progression and were reported to participate in the anticancer effects of CUR. However, whether IAP and HO-1 are involved in the anticancer properties of DMC against OSCC remains unclear. The aim of this study was to investigate the anticancer effects and underlying mechanisms of DMC against OSCC.

Material and method: The effect and potential mechanisms of DMC against OSCC were explored by an MTT assay, flow cytometry, immunofluorescence, Western blot assay, apoptosis antibody array, and genetic knockdown by small interfering (si)RNA. The TCGA database was used to investigate the prognosis of DMC-targeted genes.

Results and discussion: DMC was demonstrated to suppress cell proliferation via simultaneously inducing G2/M-phase arrest and cell apoptosis. Mechanistic investigations found that downregulation of cellular IAP 1 (cIAP1)/X-chromosome-linked IAP (XIAP) and upregulation of HO-1 were critical for DMC-induced caspase-8/-9/-3 activation and apoptotic cell death. Moreover, treatment of OSCC cells with DMC induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2, and only inhibition of p38 MAPK significantly abolished DMC-induced HO-1 expression and caspase-8/-9/-3 activation. Furthermore, analyses of clinical datasets revealed that patients with head and neck cancers expressing high HO-1 and low cIAP1 had the most favorable prognoses.

Conclusion: Overall, the current study showed that caspase-dependent apoptosis is induced by DMC through suppressing IAPs and activating the p38-HO-1 axis, which supports a role for DCM as part of a therapeutic approach for OSCC.

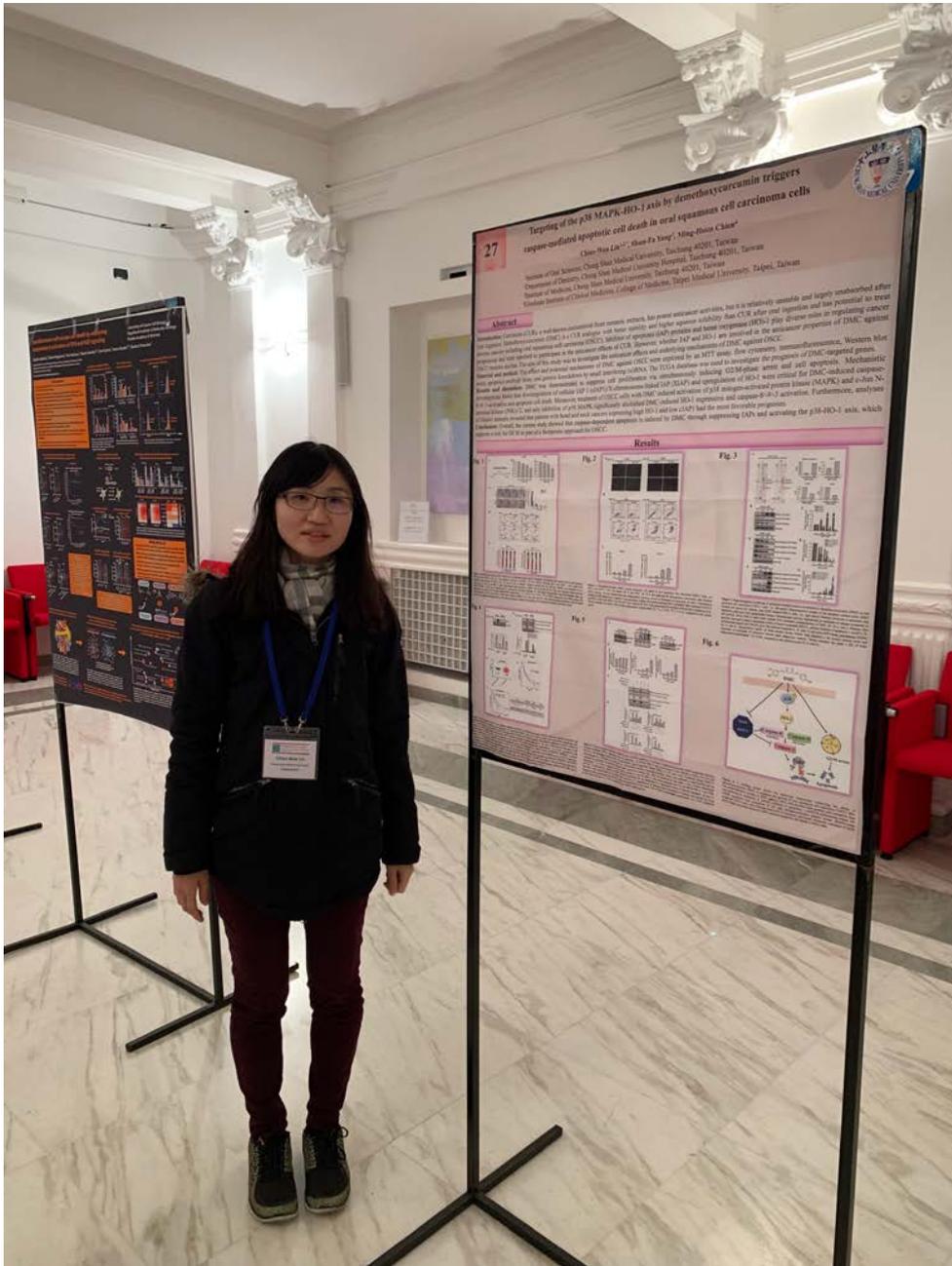
四、建議

此會議場地過於狹小與分散，張貼海報時間太晚

五、攜回資料名稱及內容

會議議程表

六、其他
與會照片



106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林巧雯		計畫編號：106-2314-B-040-011-MY3			
計畫名稱：探討Dihydromyricetin透過microRNA與腫瘤相關巨噬細胞調控口腔癌細胞轉移之機制					
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	
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	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	1		本計畫聘有碩士級專任助理一名。
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	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。			