

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

|            |  |
|------------|--|
| 計 畫<br>名 稱 | ：<br>Mentha arvensis抑制人類口腔癌細胞轉移、上皮間質<br>轉化與調控細胞骨架蛋白之研究分析 |
|------------|--|

執行計畫學生：黃湘月

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-036-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：陳霽霓

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生化微生物免疫研究所

中華民國 109年03月30日

# 目 錄

|                |    |
|----------------|----|
| 一、摘要-----      | 1  |
| 二、緒論-----      | 2  |
| 三、研究動機-----    | 3  |
| 四、研究方法及步驟----- | 4  |
| 五、實驗結果-----    | 7  |
| 六、討論-----      | 9  |
| 七、參考文獻-----    | 10 |
| 八、圖表與圖表說明----- | 11 |

## 一、摘要

癌症，至今已居國人十大死因之首三十多年之久，尤其在現代社會中，國人的飲食與生活習慣改變，更是大大增加了罹癌的風險。因此，許多研究也一直著重在癌症相關的醫療上，傳統的癌症療法中，較常見的有手術、化學治療與放射線治療，然而傳統的癌症療法往往會對人體的正常組織造成很大的傷害，且因癌症致死率高的主因為癌細胞的轉移，因此本實驗希望能夠利用天然的萃取物，對癌細胞的侵襲與轉移能力有所抑制，並降低藥物對正常組織的傷害與影響。薄荷具有抗病毒、抗菌、抗發炎等效用，還具有獨特的香氣，被廣泛運用於藥品、食品、飲料及烹飪中，是人們日常生活中常見的一種天然物。而在本實驗之研究結果分析中發現，薄荷 50% 酒精萃取物(*Mentha spicata* ethanol extracts, MSE)能有效抑制人類口腔癌細胞 SAS 的侵襲與轉移能力，我們利用 MTT assay 探討 MSE 對 SAS 的毒殺作用，發現在不同濃度的 MSE 處理下，對 SAS 皆沒有明顯的毒殺作用，隨後利用 zymography，在膠體中包埋 gelatin 與 casein，探討在 MSE 的處理下，SAS 分解細胞外基質相關蛋白的 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 及 urokinase-type plasminogen activator (u-PA) 酵素分泌量，發現隨著加藥濃度的增加，SAS 的酵素分泌量有所下降，接著我們觀察在加藥 24 小時後細胞的型態變化，發現隨著加藥濃度提高，細胞型態上有明顯變化，於是再觀察 SAS 在加藥後不同時間點細胞攤的情況，接著利用 wound healing assay 探討在 MSE 的作用下，SAS 的爬行能力是否受到影響，發現隨著加藥濃度的上升，SAS 的爬行能力受到抑制，再利用 Boyden Chamber 觀察 SAS 的爬行與侵襲能力，發現隨著加藥濃度上升，SAS 的爬行與侵襲能力受到抑制，最後利用 Western blot 探討相關蛋白的訊息傳遞路徑，發現一些蛋白有所變化。綜觀上述研究結果，MSE 對 SAS 的爬行與侵襲能力有所影響，因此 MSE 在未來或許可與一些抗癌藥合併使用，減輕藥物對患者體內正常組織的傷害。

**關鍵字:** 口腔癌、基質金屬蛋白水解酵素、爬行、侵襲

## 二、緒論

### 一、口腔癌

口腔癌為發生在口腔部位之惡性腫瘤的總稱，90%屬於鱗狀上皮細胞癌[1]。口腔包括的部位有唇、頰黏膜（唇和臉頰的內襯）、牙齒、舌頭下方的口腔底部、前三分之二的舌頭、口腔頂部的前面部分（硬顎）、牙齦以及白齒後方的小區域。台灣地區口腔癌好發的部位是舌頭及頰黏膜，通常好發於45歲以上，但也可能發生在任何年齡，且以男性居多。癌症的產生是因為基因不穩定所造成的一種疾病，基因不穩定可能導致基因突變，進而造成致癌基因(Oncogenes)功能的增加或抑癌基因(Tumor suppressor genes)功能的喪失，驅使正常細胞逐漸轉化成癌細胞，此即為「癌化現象(Tumorigenesis)」[2][3]。可能造成口腔癌的危險因子有許多，長期慢性刺激是口腔癌發生的主要成因，包括嚼食檳榔、吸菸、喝酒、蛀牙、不當的假牙、口腔衛生不良以及長期營養不良等，其中以嚼食檳榔為最主要(約9成口腔癌患者有嚼檳榔的習慣)。檳榔子中的檳榔素具有促進副交感神經的作用，在一般劑量下會有發汗、興奮以及增加唾液的功用，所以食用檳榔後，往往會有生津止渴、提神、禦寒等功效，但檳榔素在人體口腔的環境內，會形成數種不同的亞硝胺，其中3-propionitrile是一種很強的致癌物，一般推測這是檳榔造成口腔癌的主要原因。另外，檳榔子內還含有大量的黃樟素，具致癌性，在檳榔子外裹以葉片也會致癌。除此之外，石灰還會使嚼食檳榔後的口腔唾液呈鹼性，釋出自由基，破壞DNA，也可能助長口腔癌的形成。

目前國內口腔癌以口腔鱗狀細胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)最為常見，屬於頭頸鱗狀細胞癌(Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC)的一種，第二常見的是疣狀癌，再接著是未分化癌、小唾液腺癌等，男性及女性的口腔癌大部分都是屬於鱗狀細胞癌。口腔鱗狀細胞癌具有局部破壞性，可侵犯軟組織與骨頭，可沿著神經、淋巴管及血管擴散，並可產生頸部淋巴腺轉移及遠端轉移[4]。

### 二、癌細胞的侵襲與轉移

癌症致死率高的原因之一即是癌細胞在晚期會產生侵襲與轉移的現象。首先生長在原位的癌細胞會釋放分解細胞外基質的蛋白水解酵素，破壞基底膜與周圍組織，接著癌細胞會由原本排列緊密、不易移動的表皮型態轉變成排列鬆散、似紡錘狀、利於爬行及侵襲的間質型態(Epithelial-to-Mesenchymal Transition; EMT)穿過血管或淋巴管，進入血液循環與淋巴循環中，當循環到適合其生長的位置時，癌細胞會再次穿過血管或淋巴管，附著到組織器官上，一開始會形成小到無法察覺的癌細胞群，最後會慢慢長成肉眼可見的腫瘤，此即為癌細胞的侵襲與轉移[5]。而分解細胞外基質相關的蛋白水解酵素包括 serine proteinase、matrix metalloproteinases (MMPs)、plasminogen activator (PA)與

cathepsins，其中 MMP-9, MMP-2 及 u-PA 在癌細胞的侵襲與轉移中扮演了非常重要的角色[6]。

### 三、薄荷

薄荷中含有多種成分，其中薄荷醇是薄荷香味的來源，有明顯的利膽作用；薄荷腦可使氣管產生新的分泌物，易於濃稠厚重的黏液排出，有良好的祛痰止咳作用。薄荷煎劑對單純性皰疹病毒、森林病毒、流行性腮腺炎病毒有抑制作用，對金黃色葡萄球菌、白色葡萄球菌、甲型鏈球菌、乙型鏈球菌、卡他球菌、腸炎球菌、福氏痢疾桿菌、炭疽桿菌、白喉桿菌、傷寒桿菌、綠膿桿菌、大腸桿菌等也有抑制作用[7][8]。在神經系統方面，薄荷還具有調節與鎮定作用，對風濕痛與神經痛有良好的治療效果。除可添加於調味品中增加料理風味，個別使用或與其他香藥草混和作為提神茶，也可拿來驅蟲、殺跳蚤、提神解鬱、消除疲勞、鎮定安神、幫助睡眠、治感冒頭痛、疏風發汗、散熱解毒、健胃消腹脹、消炎止癢、防腐去腥、殺菌、清新空氣。傳統上被用來治療脹氣、消化問題、膽囊問題、咳嗽、促進發汗和治療失眠，薄荷油的提取物則可塗抹於皮膚上以減緩疼痛，薄荷醇作為局部的抗菌劑也被廣泛應用於牙科護理。目前在許多國家也都被用來治療各種疾病，薄荷的提取物與薄荷醇相關的化學物質則被廣泛運用於食品、飲料、止咳藥、面霜與香菸等。

而本實驗所選用的薄荷(*Mentha spicata*)是薄荷屬中的一種，學名留蘭香，又名綠薄荷，其精油中含有 44 種獨特的化合物，其中單萜烯類(monoterpenes)佔 67.2%、單萜烯碳氫化合物(monoterpene hydrocarbons)佔 20.8% [9]，對與阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)相關的主要酵素-乙醯膽鹼酶(cholinesterase)及與體重過重相關的疾病酵素-豬胰脂肪酶(porcine pancreatic lipase)有強大的抑制活性，對犬小芽孢菌(*Microsporum canis*)、紅色毛癬菌(*Trichophyton rubrum*)、鬚毛癬菌(*T. mentagrophytes*)及絮狀表皮癬菌(*Epidermophyton floccosum*)有很強的皮膚抑菌活性，且對耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)生物膜的合成有顯著抑制活性，並對已形成之生物膜的代謝活性與生物質有強大的抑制效果[10]，另外也有研究指出其對三種人類癌細胞系:T47D, HCT-116 及 MCF-7 具有抗癌的效果[9]。

### 三、研究動機

由於現代社會競爭越來越激烈，許多人都面臨著調解自身壓力的難題，在這樣的環境下，越來越多人開始抽菸、喝酒、嚼檳榔以緩解自身壓力，而此種調適的方式最直接造成的結果就是：提高罹患口腔癌的機率。根據衛服部 2016 年的死因統計，口腔癌、口咽癌及下咽癌高居男性腫瘤死亡原因第 4 位(2017 年發表)，在台灣，口腔癌、口咽癌及下咽癌則佔所有男性惡性腫瘤發生率的第 4 位，且有逐年增加的趨勢。目前許多研究皆趨向以中草藥成分來達到對癌細

胞的抑制，我們發現了在薄荷的處理下，SAS 分解細胞外基質相關蛋白的酵素分泌量有所下降，且薄荷對 SAS 並無明顯毒殺作用，因此最後選擇了「薄荷」。薄荷是中草藥的一種，且是在日常生活中很常接觸到的植物。薄荷已被證實具有抗病毒、抗菌及抗發炎的功效，且薄荷還具有一種獨特清新的香氣，也被用來加工添加在許多食品、化妝品與日用品中。因此我們希望能以此種廣泛普及的中草藥，對腫瘤細胞產生抑制，進而做了許多實驗探討薄荷對口腔癌細胞 SAS 的功效。

#### 四、研究方法及步驟

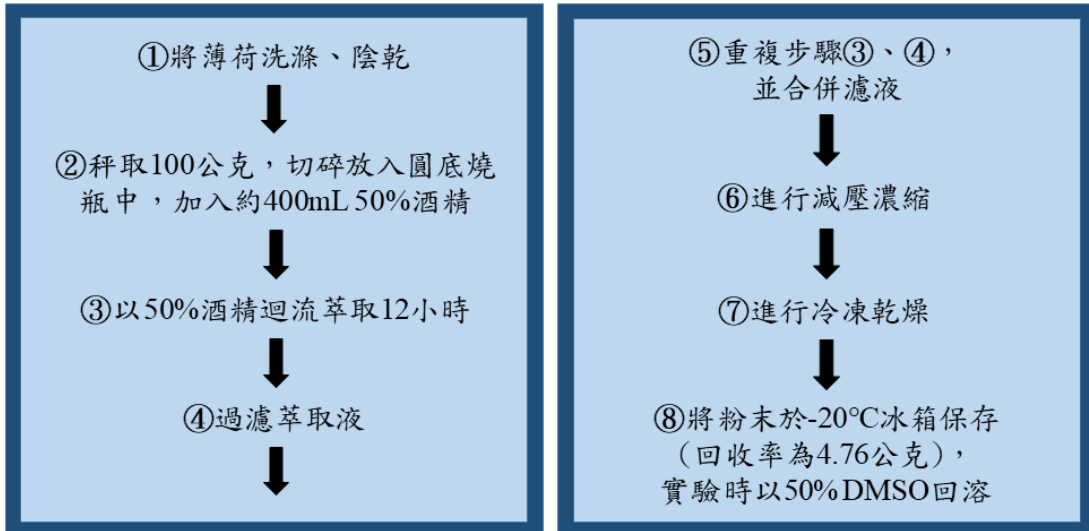
**第一部分：**探討 MSE 對 SAS 的毒殺作用、利用 zymography 在膠體中包埋 gelatin 與 casein，觀察 SAS 在 MSE 處理下，MMP-9、MMP-2 及 u-PA 的分泌量，並進一步做探討。

**第二部分：**進一步觀察 MSE 對 SAS 的型態、爬行與侵襲能力的影響。(a.) 首先拍攝在 MSE 處理 24 小時下 SAS 的細胞型態，(b.) 接著觀察在 MSE 處理 24 小時後細胞攤的情況，(c.) 並觀察在 MSE 處理 0 小時與 24 小時下 SAS 的傷口癒合能力，(d.) 然後利用 Boyden Chamber 作 SAS 爬行與侵襲能力的探討，(e.) 再利用 Western blot 分析 MSE 影響 SAS 侵襲、轉移能力與癌幹特性相關蛋白的相關途徑(例如: Rho family、MAPKs pathway、PI3K/Akt pathway、FAK/Src pathway、CD44、Nanog、E-cadherin、N-cadherin、 $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -catenin、ICAM-1、VCAM-1...等)(f.) 並利用專一性抑制劑證明 MSE 抑制 SAS 侵襲表現是透過何種途徑。

**第三部分：**利用裸鼠(nude mice)以皮下注射(subcutaneous injection)人類口腔癌細胞 SAS 及以口服(管餵)的方式進行投藥，觀察腫瘤生長大小，驗證 MSE 抑癌功能的重要性，再利用四到五週大的免疫缺陷小鼠(SCID mice)以尾靜脈注射方式打入人類口腔癌細胞 SAS  $100 \times 10^4$  細胞數(細胞內含有一載體含 luciferase 基因)，以管餵方式給予 MSE (20 mg/mL)，並利用 IVIS 活體影像系統觀察腫瘤在老鼠體內轉移的情形。

## 實驗材料與方法

### 1. 薄荷之成分萃取



### 2. 繼代培養(subculture)

SAS 培養在含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 新鮮培養液中，待細胞長至約八分滿時，將 10 cm dish 中培養過細胞的培養液移除，以 10mL PBS wash 一次，加入 1mL 的 1 倍 trypsin，輕微搖晃使其均勻覆蓋在細胞上，放入培養箱中反應約 8 分鐘。待反應完畢後從培養箱中拿出培養盤，觀察細胞是否脫落，完全脫落後加入 7mL 培養液終止 trypsin 反應，收進 15mL 離心管將細胞完全打散，吸取少量含有細胞的培養液進行細胞計數，同時將離心管進行離心(200g，5 分鐘)。離心完成後將含有 trypsin 的上清液移除，加入 8mL 新鮮的培養液，將細胞完全打散後，吸取適量含有細胞的培養液至一新的培養盤中(含有新鮮培養液)培養，約 36~48 小時後細胞會長至八分滿。

### 3. MTT assay

利用活細胞會將 MTT reagent 經粒線體中的 dehydrogenase 作用代謝還原成藍紫色結晶的特性，將 SAS 以  $3 \times 10^4$  細胞數/每個 well 分至 24-well 中，待細胞貼盤後，將培養液移除，再將 MSE 與含有 10% FBS 的新鮮培養液混和，以最終濃度 0、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 24 小時後，將含有藥物的培養液移除，加入經 10% FBS 培養液稀釋 10 倍的 MTT reagent，經反應 2 小時後將含有 MTT reagent 的培養液移除，於每個 well 中加入 1mL 異丙醇(isopropanol)將藍紫色結晶溶出，於波長 595 nm 下測定吸光值，即可得知細胞的存活率。

### 4. zymography

將 SAS 以  $3 \times 10^4$  細胞數/每個 well 分至 24-well 中，待細胞貼盤後，將培養液移除，再將 MSE 與不含 FBS (serum-free) 的新鮮培養液混和，以最終濃度 0、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 24 小時(若需加入抑制劑，則於加藥前 2

小時加入最終濃度為 5  $\mu$ M 及 10  $\mu$ M 的抑制劑後再進行加藥)後，收取培養液，與 5 倍染劑均勻混和。製備兩片 8% SDS-PAGE 電泳膠片，一片在其下層膠中加入 0.1% 的 gelatin，另一片在其下層膠中加入 0.2% 的 Casein 與 20  $\mu$ g/mL 的 plasminogen，將兩片電泳膠片放入含有電泳緩衝液的電泳槽中，將事先與染劑混和好的檢體注入膠片中，再分別以 100V(上層膠)與 140V(下層膠)的電壓進行蛋白分離。分離完後，將膠片以 washing buffer (2.5% triton X-100 in ddH<sub>2</sub>O)在室溫下作用 30 分鐘 2 次，加入 reaction buffer (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% NaN<sub>3</sub>) 在 37°C 恆溫箱中作用約 24 小時，最後將反應完的膠片進行染色約 20 分鐘後即可進行退染(染色及脫色時間依膠片情況做調整)。

#### 5. 拍攝細胞型態

拿取四盤 10 cm dish，在每一盤培養盤中以含有 FBS 的培養液種入  $65 \times 10^4$  細胞數，待細胞貼盤後，分別加入最終濃度為 0、25、50、100  $\mu$ g/mL 的 MSE 處理 24 小時後，在顯微鏡下分別以  $4 \times 10$  與  $10 \times 10$  的倍率拍攝細胞型態。

#### 6. 拍攝細胞攤的情況

拿取兩盤 10 cm dish，在每一盤培養盤中以含有 FBS 的培養液種入  $65 \times 10^4$  細胞數，待細胞貼盤後，分別加入最終濃度為 0 與 100  $\mu$ g/mL 的 MSE 處理 24 小時，並另外拿取一盤 24-well，於每一 well 內加入 300  $\mu$ L 最終濃度為 10  $\mu$ g/mL 的 type I collagen 及 type IV collagen 24 小時後，移除盤內多餘液體，將加藥處理 24 小時後的細胞以 trypsin 打下並經過細胞計數，於每一 well 中種入 600  $\mu$ L、 $5 \times 10^4$  的細胞數，並於種入細胞後的第 0 小時、1 小時、3 小時、6 小時、12 小時及 24 小時在顯微鏡下以  $4 \times 10$  的倍率拍攝細胞在不同時間點攤的情況。

#### 7. wound healing assay

將 wound healing kit 固定在 6-well 中，分別於 kit 的每一格內注入 SAS  $1.5 \times 10^4$  細胞數，待其貼盤長滿後，將 kit 垂直向上拔起，於每一 well 內加入 2 mL PBS wash 2~3 次後，再分別加入含有 1% FBS 的新鮮培養液 2 mL，並加入最終濃度為 0、25、50、100  $\mu$ g/mL 的 MSE，在 0 小時與 24 小時以倍率  $4 \times 10$  在顯微鏡下觀察並拍照。

#### 8. Boyden Chamber

在 4 盤 10 cm dish 中以含有 FBS 的培養液種入 SAS  $65 \times 10^4$  細胞數，待其貼盤後分別加入最終濃度為 0、25、50、100  $\mu$ g/mL 的 MSE 處理 24 小時。準備兩組 Boyden Chamber kit，在兩組 kit 的 lower chamber 中，每一 well 皆注入 33  $\mu$ L 含有 10% FBS 的新鮮培養液，並覆上一層 cellulose nitrate filter，再於其中一組中注入 10  $\mu$ L 的 matrigel，模擬人體中的細胞外基質與基底膜。待 matrigel 風乾後，將經過藥物處理 24 小時後的細胞分別以 trypsin 打下並經過細胞計數，於 upper chamber 中每一 well 注入 50  $\mu$ L 含有



1.5×10<sup>4</sup> 細胞數的 serum-free 培養液。經過 24 小時後，利用甲醇固定細胞約 15~20 分鐘，待其風乾後加入 Giemsa 染劑(20 倍稀釋)進行染色，染色完成後利用 ddH<sub>2</sub>O 將 cellulose nitrate filter 上多餘的染劑洗掉，在顯微鏡下以 10×10 的倍率進行拍攝。

#### 9. Western blot

在 12 盤 10 cm dish 中以含有 FBS 的培養液種入 SAS 6×10<sup>4</sup> 細胞數，待其貼盤後置換為不含 FBS (serum-free)的培養液 12 小時後，再置換為含有 FBS 的培養液，同時加入最終濃度分別為 0、25、50、100 µg/mL 的 MSE 處理 24 小時(每一種濃度各 3 盤)，利用核質分離法收取 cell lysate，並對收取下來的蛋白進行定量，經計算後，於每一 well 中注入蛋白量 10mg、總體積 20 µl 的 sample 進行 SDS-PAGE 跑膠，待樣品於膠片中分離後，進行 transfer，將蛋白由膠片轉印至 NC paper 中，利用 Panceau S 將 NC paper 上的蛋白染色，依目標蛋白的分子量大小對 NC paper 進行裁剪，裁剪完後加入 blocking buffer 反應 1 小時，接著加入一抗於 4°C 冷房中搖晃 overnight，再加入二抗反應 45 分鐘~1 小時，最後於每一片 NC paper 中加入 200 µL ECL 進行拍照。

## 五、實驗結果

### A. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 存活率的影響

以不同濃度的 MSE (0、25、50、100 µg/mL)處理 SAS 24 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞存活率。其結果與處理 50% DMSO 的控制組相較，發現 SAS 細胞在不同濃度的 MSE 處理之下無太大的毒殺作用(Fig. 1)。

### B. MSE 抑制人類口腔癌細胞 SAS 分泌 MMP-9 及 MMP-2 蛋白活性表現影響

收取經 MSE 處理(最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL)24 小時後的培養液，利用 zymography(在膠體中包埋 gelatin)分析 SAS 的 MMP-9、MMP-2 分泌量。觀察結果發現經 MSE 處理後，SAS 的 MMP-9、MMP-2 分泌量與處理 50% DMSO 的控制組相比皆有顯著下降(Fig. 2)。

### C. MSE 抑制人類口腔癌細胞 SAS 分泌 u-PA 蛋白活性表現的影響

收取經 MSE 處理(最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL)24 小時後的培養液，利用 zymography(在膠體中包埋 casein)分析 SAS 的 u-PA 分泌量。觀察結果發現經 MSE 處理後，SAS 的 u-PA 分泌量與處理 50% DMSO 的控制組相比有顯著下降(Fig. 3)。

### D. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 型態的影響

以最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL 的 MSE 處理 SAS 24 小時後，

在顯微鏡下以 4×10 及 10×10 的放大倍率拍攝細胞型態。觀察結果發現 SAS 在處理 50% DMSO 的控制組中會有聚成一團一團的現象，細胞形狀因緊密排列而呈現較偏圓形；而加藥濃度 100 µg/mL 的組別中，細胞則成紡錘狀，且較為分散、不易聚成團狀(Fig. 4)。

#### **E. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 貼盤後細胞攤開型態的影響**

以最終濃度為 0 與 100 µg/mL 的 MSE 處理 SAS 24 小時，並在 24-well 底部 coating type I collagen 與 type IV collagen 後，將細胞種入 24-well 中，在顯微鏡下以 4×10 的放大倍率在第 0 小時、1 小時、3 小時、6 小時、12 小時及 24 小時拍攝細胞型態。觀察結果發現 SAS 在貼盤後約 1~3 小時時期，處理 100 µg/mL MSE 的組別細胞相較處理 50% DMSO 的控制組較呈圓形，雖然在隨後的 6~12 小時中控制組與實驗組的細胞型態並無太大差異，但在 24 小時時期即可明顯觀察到處理 100 µg/mL MSE 的組別細胞相較處理 50% DMSO 的控制組呈現較分散且細長、紡錘狀的型態(Fig. 5)，與實驗結果 D (Fig. 4)相符合。

#### **F. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 爬行能力的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL 的 MSE 處理 SAS，在 0 小時與 24 小時以倍率 4×10 的條件在顯微鏡下觀察傷口癒合的情況。觀察結果發現隨著加藥濃度上升，細胞的爬行能力明顯受到抑制(Fig. 6)。

#### **G. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 爬行與侵襲能力的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL 的 MSE 處理 SAS 24 小時後，在顯微鏡下以 10×10 的倍率觀察細胞的爬行與侵襲能力。觀察結果發現隨著藥物濃度的上升，細胞的爬行與侵襲能力皆明顯受到抑制(Fig. 7)。

#### **H. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 之癌症幹細胞特性相關蛋白的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL 的 MSE 處理 SAS 24 小時後，收取細胞質蛋白，以 anti-Nestin、anti-CD44、anti-Oct-4、anti-Sox-2 及 anti-Nanog 的抗體進行 Western blot 分析。觀察結果發現隨著加藥濃度提高，與癌症幹細胞特性相關的 Nestin、CD44、Oct-4、Sox-2 與 Nanog 皆無明顯變化(Fig. 8)。

#### **I. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 之 FAK 訊號傳導路徑相關磷酸化蛋白的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100 µg/mL 的 MSE 處理 SAS 24 小時後，收取細胞質蛋白，以 anti-phospho-FAK (Tyr 397)、anti-phospho-FAK (Tyr 925)、anti-FAK 及 anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析。觀察結果發現隨著加藥濃度提高，p-FAK (Tyr 397)及 p-FAK (Tyr 925)的蛋白表現量皆下降(Fig. 9)。

#### **J. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 之 MAPK 訊號傳導路徑相關磷酸化蛋白影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 MSE 處理 SAS 24 小時後，收取細胞質蛋白，以 anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-phospho-p38、anti-p38、anti-phospho-JNK1/2、anti-JNK1/2 及 anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析(尚未以 anti-phospho-MEK1/2 及 anti-MEK1/2 等抗體進行分析)。觀察結果發現隨著加藥濃度提高，p-ERK1/2 及 p-JNK1/2 的蛋白表現量上升、p-p38 的蛋白表現量下降(Fig. 10)。

#### **K. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 之 EMT 相關骨架蛋白的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 MSE 處理 SAS 24 小時後，收取細胞質蛋白，以 anti-E-cadherin、anti-N-cadherin、anti-Vimentin、anti- $\beta$ -catenin、anti- $\alpha$ -catenin 及 anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析。觀察結果發現隨著加藥濃度提高，E-cadherin 的蛋白表現量上升、N-cadherin 及  $\alpha$ -catenin 的蛋白表現量下降、Vimentin 及  $\beta$ -catenin 的蛋白表現量無明顯變化(Fig. 11)。

#### **L. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 之 Fibronectin 及 PI3K/Akt 訊號傳導路徑蛋白的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 MSE 處理 SAS 24 小時後，收取細胞質蛋白，以 anti-Fibronectin、anti-PI3K 及 anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析(尚未以 anti-phospho-Akt、anti-Akt、anti-phospho-PTEN 及 anti-PTEN 等抗體進行分析)。觀察結果發現隨著加藥濃度提高，Fibronectin 的蛋白表現量下降、PI3K 的蛋白表現量無明顯變化(Fig. 12)。

#### **M. MSE 對人類口腔癌細胞 SAS 之核蛋白表現量的影響**

以最終濃度依序為 0、25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 MSE 處理 SAS 24 小時後，收取細胞核蛋白，以 anti-c-Jun、anti-NF- $\kappa\text{B}$ 、anti-c-Fos、anti- $\beta$ -catenin、anti-Slug 及 anti-C23 的抗體進行 Western blot 分析(尚未以 anti-Twist-1、anti-Snail-1 等抗體進行分析)。觀察結果發現隨著加藥濃度提高，c-Jun 及 Slug 的蛋白表現量下降、NF- $\kappa\text{B}$ 、c-Fos 及  $\beta$ -catenin 的蛋白表現量無明顯變化(Fig. 13)。

## **六、討論**

綜合以上實驗結果，可見 MSE 能夠在對 SAS 無太大毒性的情況下達到抑制 SAS 的爬行與侵襲能力，且對 SAS 的型態有極大的影響，在實驗結果 D (Fig. 4)中可見，SAS 在處理 MSE 後，以巨觀的角度來看，細胞不再聚為明顯的團狀；以單顆細胞的型態來看，細胞也不再呈緊密排列偏圓形的型態，而是呈現較為細長的紡錘狀，雖然在眾多文獻中都認為呈紡錘狀型態的細胞較易發生轉移的現象，但在本實驗中卻發現呈紡錘狀的細胞爬行與侵襲能力是較低的

(可見於實驗結果 F 與 G, Fig. 6 與 Fig. 7), 推測可能是因為藥物的關係導致細胞難以再聚成團狀, 細胞與細胞間貼附的能力下降, 此時細胞為了生存, 試圖伸出觸角想與周圍的細胞進行緊密貼附, 因而發生呈紡錘狀的細胞爬行與侵襲能力卻較弱的現象。合併實驗結果 E (Fig. 5) 來看, 在種入細胞後約 1~3 小時時期可見濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MSE 的組別相較處理 50% DMSO 的組別來說, 細胞較呈圓形; 在 6~12 小時期間, 濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MSE 的組別與處理 50% DMSO 的組別在形態上無太大差異; 最後在 24 小時時期卻明顯發現細胞不再呈現團狀且呈細長紡錘狀, 推測在 6~12 小時期間, 濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MSE 的組別是因為藥物導致細胞與細胞間的貼附能力下降(在 1~3 小時時期細胞呈圓形, 且並非因細胞緊密排列), 此時細胞為因應此種變化, 逐漸伸出觸角試圖與周圍細胞進行緊密貼附, 因而在 6~12 小時期間才會出現看似與處理 50% DMSO 的組別在形態上無太大差異的情況。本實驗結果(實驗結果 E, Fig. 5)除與實驗結果 D (Fig. 4) 相呼應, 對於推測為何 6~12 小時時期濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MSE 的組別型態與處理 50% DMSO 的組別無太大差異的可能原因也與上述對於為何本實驗中呈紡錘狀的細胞爬行與侵襲能力減弱的推測相呼應。

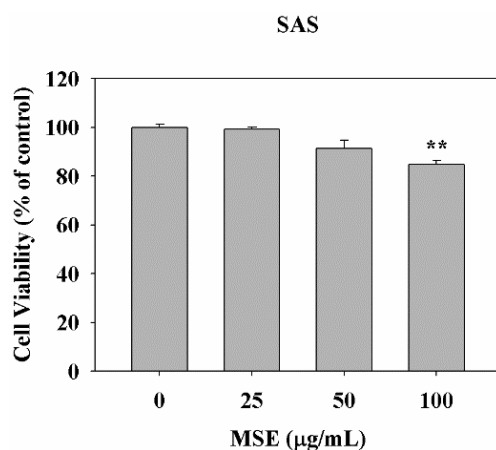
另外在 Western blot 的結果中仍有許多蛋白的表現量尚未進行分析, 因此還未找出確切的路徑並利用相關蛋白的抑制劑驗證路徑。上述對於實驗過程中觀察到的現象造成之可能原因的推測也尚未進一步利用其他實驗證實, 但已知的是 MSE 確實對 SAS 的爬行與侵襲能力造成一定程度的影響, 期望 MSE 未來能與抗癌藥合併使用, 減輕藥物對患者體內正常組織的傷害。

## 七、參考文獻

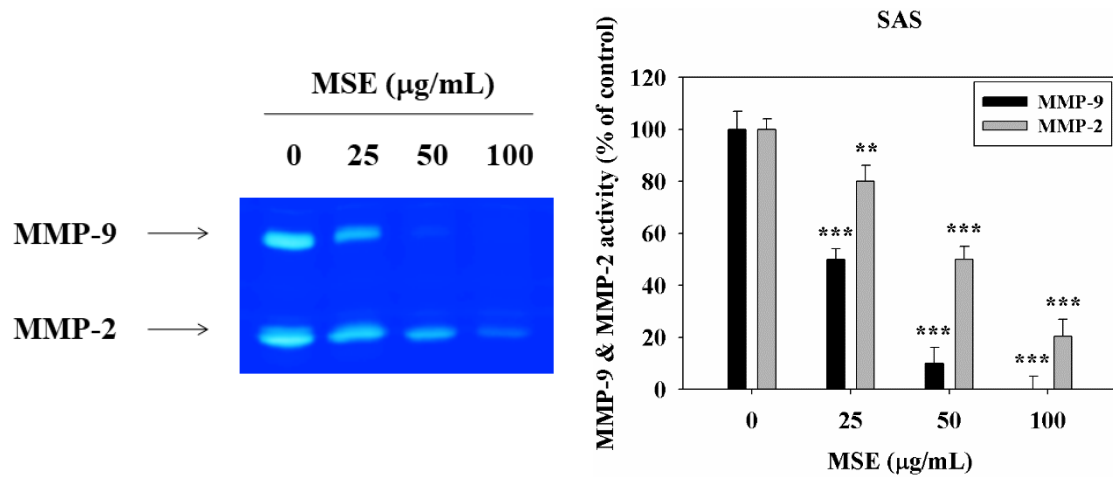
1. Ion Ciuca Marasescu, F.I., et al., Epidemiological and Histopathological Aspects of Tongue Squamous Cell Carcinomas-Retrospective Study. *Curr Health Sci J*, 2018. **44**(3): p. 211-224.
2. Hedberg, M.L., et al., Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs predicts improved patient survival for PIK3CA-altered head and neck cancer. *J Exp Med*, 2019. **216**(2): p. 419-427.
3. Meng, W., et al., Aberrant methylation and downregulation of ZNF667-AS1 and ZNF667 promote the malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Biomed Sci*, 2019. **26**(1): p. 13.
4. Yao, L.X., J. Liu, and L. Xu, MiR-610 functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by directly targeting AGK. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019. **23**(1): p. 187-197.
5. Torres, A., et al., Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A3 Adenosine Receptor activation under hypoxia. *Cancer Lett*, 2019. **446**: p. 112-122.

6. Hwang, H.S., et al., Epithelial-mesenchymal transition as a mechanism of resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma. *Lab Invest*, 2019. **99**(5): p. 659-670.
7. Li, X., L. Huang, and W. Gao, Overexpression of Tripartite Motif Conaining 55 (TRIM55) Inhibits Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cells via Epithelial-Mesenchymal Transition and Matrix Metalloproteinase-2 (MMP2). *Med Sci Monit*, 2019. **25**: p. 771-777.
8. Zaidi, S.F., et al., Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *J Ethnopharmacol*, 2012. **141**(1): p. 403-10.
9. Bardaweel, S.K., et al., Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complement Altern Med*, 2018. **18**(1): p. 201.
10. Ali-Shtayeh, M.S., et al., Biological Properties and Bioactive Components of *Mentha spicata* L. Essential Oil: Focus on Potential Benefits in the Treatment of Obesity, Alzheimer's Disease, Dermatophytosis, and Drug-Resistant Infections. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019. **2019**: p. 3834265.

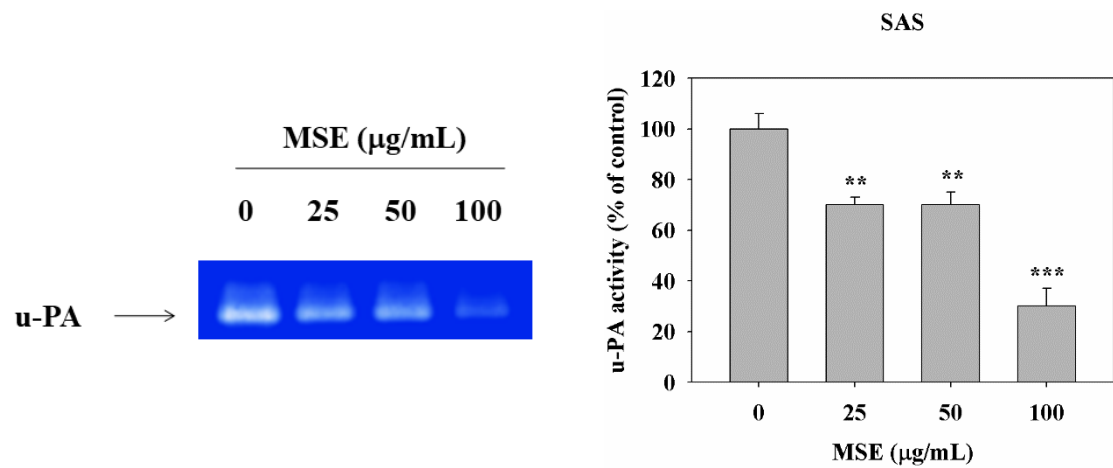
## 八、圖表與圖表說明



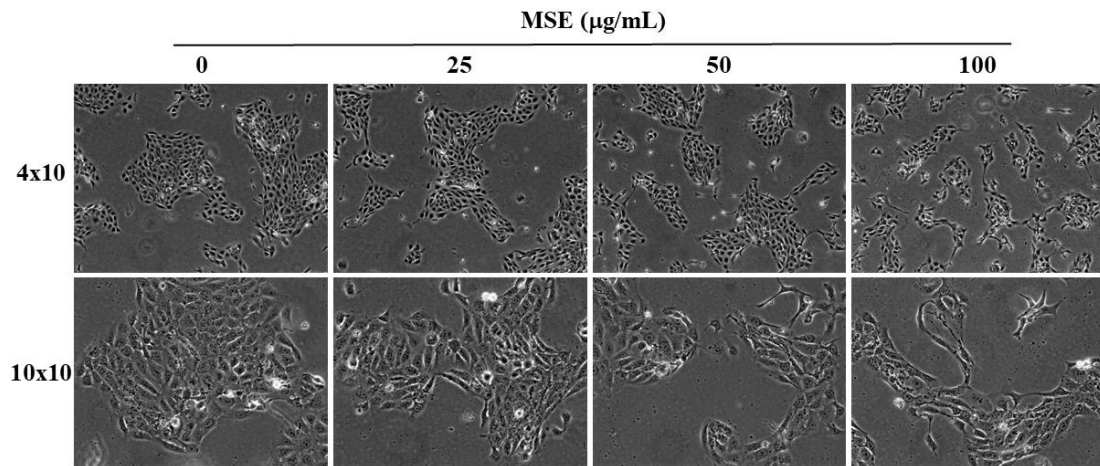
**Fig. 1 The effect of MSE on cell viability.** SAS, human oral cancer cells, were subcultured onto 24-well culture plate with  $3 \times 10^4$  cells per well for 24 hours, and then treated with MSE (0, 25, 50, 100 µg/mL) for 24 hours. Cell viability were determined by MTT assay. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent experiments. Comparisons were performed by t-test (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



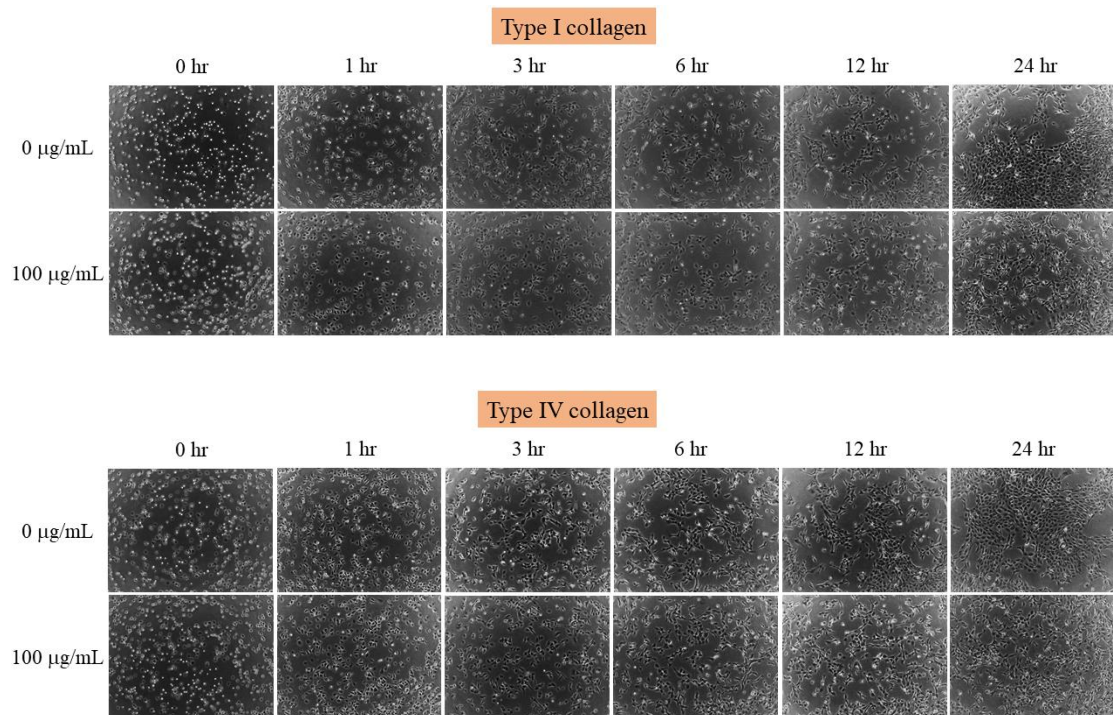
**Fig. 2** Effects of MSE on the activities of MMP-9 and MMP-2. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100 µg/mL of MSE for 24 hours, and then subjected to gelatin zymography to analyze the activities of MMP-9 and MMP-2 on SAS cells, respectively. In each case, the data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent experiments. Comparisons were performed by t-test (\*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ , \*\*\*,  $p<0.001$ ).



**Fig. 3** The effect of MSE on the activities of u-PA. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100 µg/mL of MSE for 24 hours, and then subjected to casein zymography to analyze the activities of u-PA on SAS cells. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent experiments. Comparisons were performed by t-test (\*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ , \*\*\*,  $p<0.001$ ).

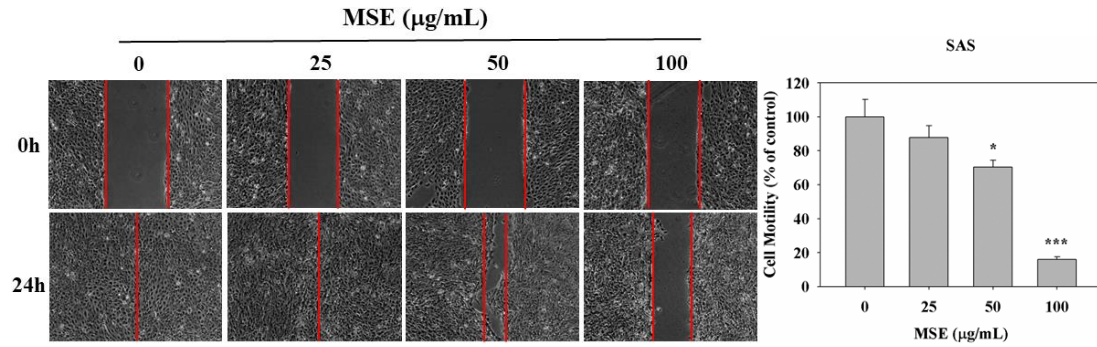


**Fig. 4** Effects of MSE on the cellular morphology of SAS. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MSE for 24 hours. Representative images were photographed with the microscope at 40X and 100X magnification respectively.



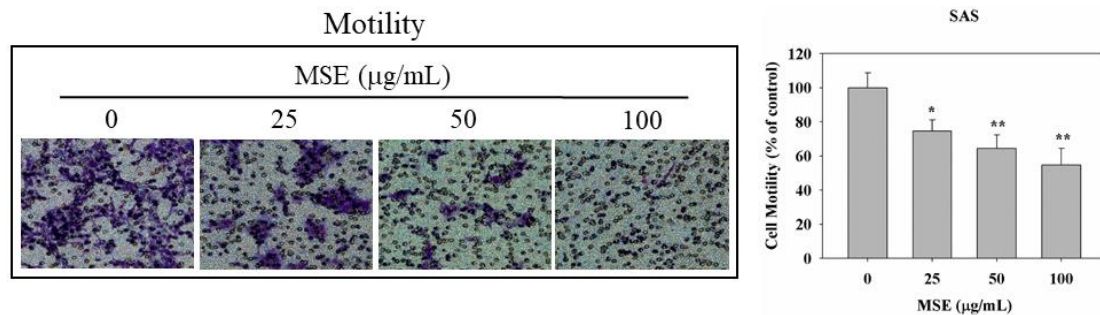
**Fig. 5** Effects of MSE on the morphology of SAS when the cell spread. Type I collagen and type IV collagen (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were coated on the 24-well culture plate for 24 hours. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MSE for 24 hours, and then subcultured onto 24-well culture plate. Representative images were photographed with the microscope at 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours at 40X magnification.



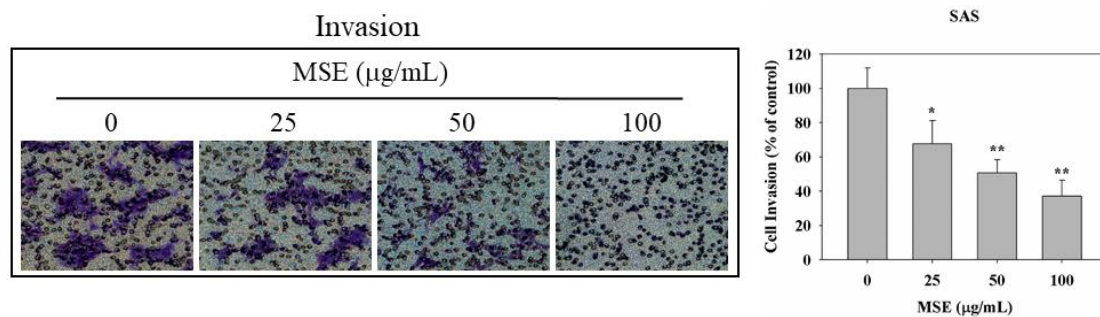


**Fig. 6 Effects of MSE on wound healing assay of SAS.** SAS cells were subcultured into the wound healing kit. After cells were completely full, the kit was removed. Then replaced the culture medium with new culture medium with only 1% FBS. Representative images were photographed at 0 and 24 hours at 40X magnification. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent experiments. Comparisons were performed by t-test (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

(A)



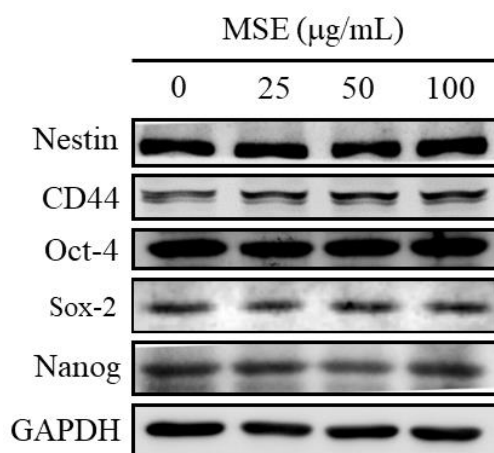
(B)



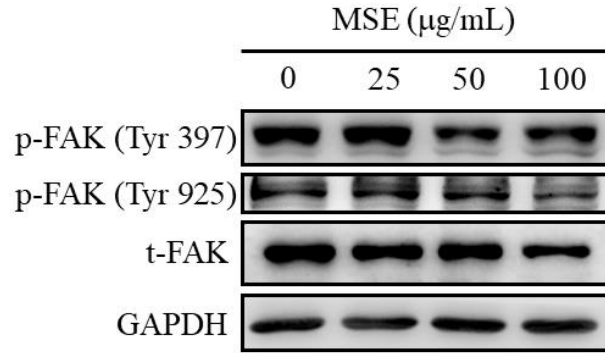
**Fig. 7 Effects of MSE on cell motility and cell invasion ability of SAS.** Cells were treated with MSE (0, 25, 50, 100 µg/mL) for 24 hours, and then subjected to



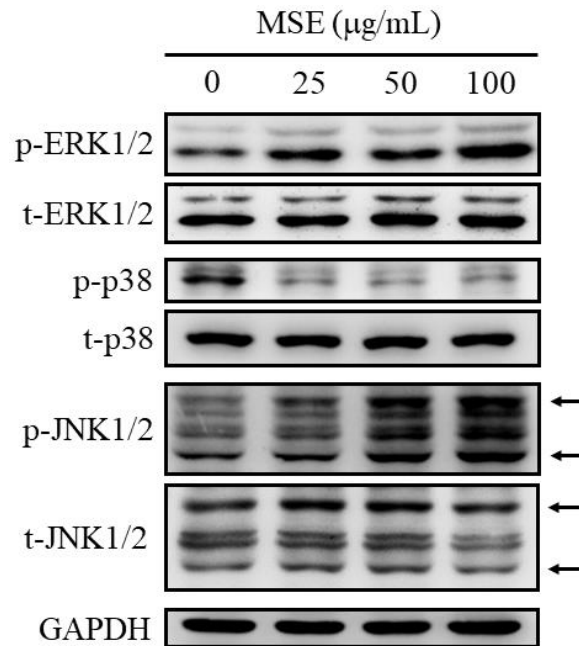
analyze for motility and invasion by Boyden Chamber migration and invasion assay. (A) Migration chamber with 12 mm-pores in the polycarbonate membrane. Representative images of SAS cells on the lower side of the membrane at different time points in the migration assay. Count cell number of cells through the membrane with the microscope in three random fields at 100X magnification. (B) Invasion chamber with 12 mm-pores in the polycarbonate membrane. Representative images of SAS cells on the lower side of the membrane at different time points in the invasion assay. Count cell number of cells through the Matrigel and membrane with the microscope in three random fields at 100X magnification. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent experiments. Comparisons were performed by t-test (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



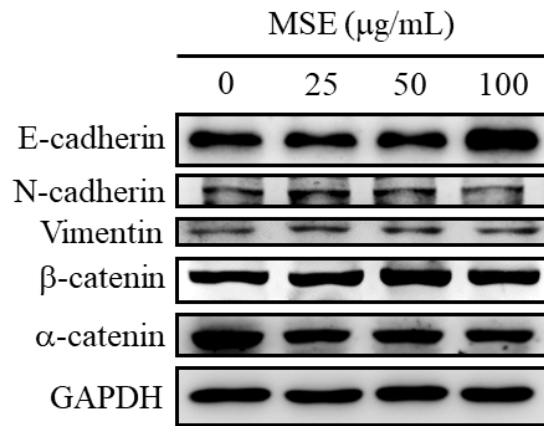
**Fig. 8 Effects of MSE on the Nestin, CD44, Oct-4, Sox-2 and Nanog of SAS.** SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  of MSE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-Nestin, anti-CD44, anti-Oct-4, anti-Sox-2 and anti-Nanog. GAPDH was used as a loading control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.



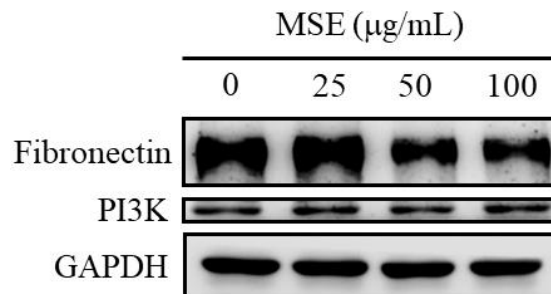
**Fig. 9** Effects of MSE on the phospho-FAK (Tyr 397) and phospho-FAK (Tyr 925) of SAS. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  of MSE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-phospho-FAK (Tyr 397), anti-phospho-FAK (Tyr 925) and anti-FAK. GAPDH was used as a loading control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.



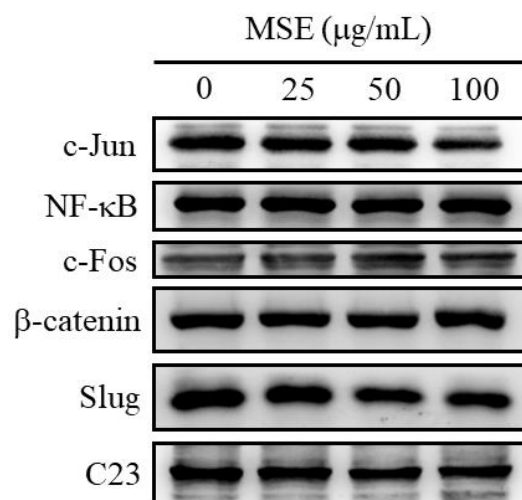
**Fig. 10** Effects of MSE on the phospho-ERK1/2, phospho-p38 and phospho-JNK1/2 of SAS. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  of MSE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-JNK1/2 and anti-JNK1/2. GAPDH was used as a loading control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.



**Fig. 11** Effects of MSE on the E-cadherin, N-cadherin, Vimentin,  $\beta$ -catenin and  $\alpha$ -catenin of SAS. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MSE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-E-cadherin, anti-N-cadherin, anti-Vimentin, anti- $\beta$ -catenin and anti- $\alpha$ -catenin. GAPDH was used as a loading control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.



**Fig. 12** Effects of MSE on the Fibronectin and PI3K of SAS. SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MSE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-Fibronectin and anti-PI3K. GAPDH was used as a loading control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.



**Fig. 13 Effects of MSE on the c-Jun, NF- $\kappa\text{B}$ , c-Fos,  $\beta$ -catenin and Slug of SAS.** SAS cells were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  of MSE for 24 hours, and then cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting with anti-c-Jun, anti-NF- $\kappa\text{B}$ , anti-c-Fos, anti- $\beta$ -catenin and anti-Slug. C23 was used as a loading control. Signals of proteins were visualized with an ECL detection system.