

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 研究積雪草酸抗人類腎臟癌細胞轉移之功效評估及分子 機轉
------------	----------------------------------

執行計畫學生：蔡依倫

學生計畫編號：MOST 109-2813-C-040-017-B

研究期間：109年07月01日至110年02月28日止，計8個月

指導教授：謝逸憲

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

中華民國 110年03月23日

目錄

(一) 研究動機與研究問題.....	1
(二) 文獻回顧與探討	1
一. 腎細胞癌(Renal cell carcinoma)	1
1. 簡介.....	1
2. 腎細胞癌的危險因子.....	2
3. 腎細胞癌的診斷與治療方法	2
二. 積雪草酸(Asiatic acid)	3
三. 腫瘤細胞轉移	3
四. 有絲分裂原活化蛋白酶 MAPK (Mitogen-activated protein kinase). 3	
(三) 實驗架構.....	4
(四) 研究方法與步驟	4
(五) 實驗結果.....	7
(六) 討論.....	12
(七) 參考文獻.....	13

中文摘要

腎細胞癌(Renal cell carcinoma, RCC)是由腎臟近曲小管上皮細胞癌化而來的惡性腫瘤，且因容易發生轉移導致治療的預後非常差。近年來，許多研究證明小分子天然藥物具有抗癌等功效，其中積雪草酸(Asiatic acid)是一種五環三萜分子並在許多過去研究中發現具有抗菌、抗氧化以及抗腫瘤功效。然而 Asiatic acid 對於腎癌細胞的抗癌效用及機轉尚未清楚。因此，為了釐清藥物 Asiatic acid 對於腎癌細胞潛在的抗腫瘤效用，首先我們利用細胞毒性測試以及細胞群落試驗探討 Asiatic acid 對於腎癌細胞株 786-O、A-498、Caki-1、ACHN 以及腎小管正常細胞株 HK2 的細胞毒性或對細胞生長是否有所影響。結果顯示，在劑量 0 - 40 μ M 的 Asiatic acid 處理 24 小時下，對於 HK2 以及腎癌細胞株皆沒有明顯抑制細胞生長。此外，利用 Propidium Iodide (PI) 染色並以流式細胞儀進行分析也發現 Asiatic acid 對於腎癌細胞株的細胞週期分布並無明顯影響。接著，我們進一步利用 Boyden-chamber 及傷口癒合試驗觀察 Asiatic acid 處理是否影響細胞侵襲以及爬行的能力，其結果發現隨著 Asiatic acid 濃度增加，抑制癌細胞爬行和侵襲的能力越明顯。我們進一步分析 Asiatic acid 會抑制基質金屬蛋白酶 MMP-15 蛋白以及 mRNA 表達量。此外，有絲分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 訊息傳遞分析方面也發現 Asiatic acid 會抑制 p38 及 ERK 蛋白磷酸化。為了更確定其作用機制，我們利用 si-RNA 抑制內生性 ERK 及 p38 蛋白表達後，發現 Asiatic acid 能更抑制癌細胞的轉移且 MMP-15 也受到加成性抑制。因此，我們可以初步推斷 Asiatic acid 抑制 ERK 以及 p38 蛋白磷酸化過程進而抑制 MMP-15 的表現量。根據上述結果，Asiatic acid 可作為一種抗腎癌細胞轉移的潛力藥物。

關鍵字：積雪草酸、基質金屬蛋白酶-15 (MMP-15)、ERK、p38、腎細胞癌、轉移

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC), which is a malignant tumor derived from the epithelial cells of the proximal tubule. For those with advanced cancer whose disease progresses despite standard therapy, treatment options are limited and survival is poor. Asiatic acid (AA) is a pentacyclic triterpenoid isolated from *Centella asiatica* (L.) Urban. It has been reported that as potential biological activities and possesses antitumor activities, including lung cancer, cholangiocarcinoma, as well as colon cancer. However, the anticancer effect and molecular mechanisms of AA on RCC is remain unclear. Our findings indicated the cell viability and cell cycle distribution of 786-O, A-498, Caki-1, and ACHN were no influenced by AA treatment. Moreover, AA inhibited migration and invasion of RCC cells, as well as significantly down-regulated mRNA and protein expression of MMP-15 with dose-dependent. The molecular mechanism analysis exhibited that extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38) activation was inhibited, whereas AA combined with siRNA-ERK or siRNA-p38, synergically reduced the migration and invasion of 786-O and A-498 cells, as well as decreased the MMP-15 expression. In conclusion, AA inhibits the metastatic properties of RCC cells via inhibiting p-ERK/p-p38 mediated MMP-15 expression. Based on the above, AA might be developed as a potential anti-metastatic agent for RCC.

Keywords: Asiatic acid, MMP-15, ERK, p38 ; Renal cell carcinoma, metastasis

(一) 研究動機與研究問題

根據國民健康局統計資料顯示，近 10 年來癌症時鐘(每一確診癌症病例所需時間)越來越少。而 107 年統計資料則顯示惡性腫瘤仍為十大死因排名首位，雖然腎癌發生率逐漸下降，十大癌症中排名也相較其他癌症低，但根據 2007 年統計資料指出有七百六十八位國人罹患了腎臟癌，同年因腎臟癌死亡的人數高達五百二十二人，顯示出腎癌呈低發生率但高死亡率的癌症。近十年來，標靶治療是「轉移型或晚期腎細胞癌」病患的標準治療，並成功延長病人的平均存活期將近一倍。雖然目前至今核准用以治療晚期腎細胞癌之標靶藥物達七種之多，有酪氨酸激酶抑制劑--舒癌特及福退癌，mTOR 抑制劑以及 anti-VEGF 抗體-癌思停注射劑(bevacizumab)的使用，但皆具有嚴重的副作用[1]，因此導致受治療的患者容易停止治療而導致預後不佳。因此在治療腎癌的全身性藥物上仍有發展與改進的空間，尤其是針對轉移性的腎細胞癌。多年來，對於 Asiatic acid 已有許多研究，例如:2016 年已被研究出能減少卵巢癌細胞中 CDK2，CDK4 的蛋白表達，使 G0/G1 細胞週期停滯，藉此阻止卵巢癌細胞的生長並誘導其凋亡[2]。然而，Asiatic acid 對於腎癌細胞轉移和侵襲以及其抑癌機制還尚未有研究。因此，本計畫將深入探討 Asiatic acid 對於腎癌細胞的抗癌及抗轉移作用和相關訊息傳遞路徑，並更進一步探討其詳細分子機制。

(二) 文獻回顧與探討

一. 腎細胞癌(Renal cell carcinoma)

1. 簡介

腎臟癌是一種腎臟細胞病變所引發的癌症，可分為腎細胞癌和腎盂癌兩種，而成人的惡性腎臟腫瘤最常見的是腎細胞癌(Renal Cell Carcinoma, RCC)，由腎臟皮質細胞異常增殖所形成的，佔腎臟癌的 92.46%。目前在美國的研究顯示腎臟癌有年輕化的趨勢[3]，而近年來台灣的腎癌患者也連年增加，在任何年齡均也可能發生，但好發於 40 歲至 70 歲，以男性為主，男女性比例約為 1.5:1。而 RCC 在全世界是導致高死亡風險的第七大最常見的惡性腫瘤部位[4]，且罹患率有逐年升高之趨勢，有將近 90%的發生率[5]，每年更以 2%穩定上升。據統計，全世界每年大約有 208,500 人確認罹患腎癌，而有 174,098 例因腎癌死亡[6]，由於腎臟癌細胞初期發展緩慢，且腎臟位於後背部深處，所以初期症狀不明顯，以至於難以發現，往往發現時已經是晚期。再加上腎臟附近血管非常豐富，因此導致腎細胞癌特別容易轉移，當腫瘤擴散到鄰近的器官或大部份的腎組織被侵犯時，才會引起疼痛和血尿的症狀，而形成傳統方法中難以治療的「轉移性腎細胞癌」(Metastatic RCC, mRCC)。雖然對於早期發現的患者五年的存活率可高達 90%，不過一旦有局部侵犯到周邊淋巴組織或血管，五年的存活率降至 60%，如果遠端轉移至肝臟、肺臟、骨頭或腦部等，五年存活率則僅剩 10%。目前治療初期腎癌病患以手術治療為主(76.85%)[7]，晚期則以標靶治療、緩和治療為主，但由於腎細胞癌對於化學治療與放射治療的感受性差，往往造成病人容易停藥，造成預後

不佳。雖然近幾年來有許多標靶藥物上市，但是有藥效、價格高昂及嚴重副作用等問題，導致新增與死亡的病例卻依然有逐年攀升的情況，因此持續研究並尋找新穎標靶藥物來達到抑制癌細胞轉移甚至促使癌細胞死亡是刻不容緩的議題。

2. 腎細胞癌的危險因子

腎臟癌發生的原因至今仍與其它癌症發生的原因一樣未完全清楚，不過下列幾項危險因素已和腎臟癌的發生有關，包括肥胖、高血壓、女性激素的使用、吸菸、藥物濫用、因環境及職業而暴露化學致癌物質、或家族遺傳等有關連[6]。其中，吸菸與腎臟癌的關係已十分確定，而且發生的比率與吸菸的量成正比，據統計，腎臟癌患者中 30%的男性與 24%的女性是直接由吸菸所造成，而男性的吸菸者更容易因這些污染物而導致腎臟癌。此外，長期接受血液透析或接受過腎臟移植者，可能因長期洗腎造成免疫功能下降；或接受腎臟移植時，使用免疫抑制藥物而容易造成腎臟癌的發生。

3. 腎細胞癌的診斷與治療方法

診斷腎臟癌上，血液、尿液的檢查是不可避免的，尿液細胞檢查可發現有癌細胞，血液檢查 67%有貧血、紅血球增多症、血球沉降率增高、肝功能異常，然而大多數腎臟癌早期都無症狀，不僅腎功能方面也可能毫無變化，還只有約 10%的病人會同時具有血尿、腰痛及腹部腫塊三個典型症狀，常常直到腫瘤過大壓迫膀胱，或出現骨頭疼痛或久咳不停等轉移徵兆才會發現。因此，醫學影像檢驗便是最常用的診斷方法，包括：靜脈顯影尿路攝影檢查、超音波檢查、電腦斷層或磁共振造影檢查、動脈血管攝影、針穿刺檢查、同位素骨掃描等方式。病人若早期診斷，對於第一、二、三期的腎臟癌治療，手術切除為最主要的根治性局部治療方式[8]，通常預後較為良好，五年存活率可達 80%。對於不願意或不適合接受手術者，可採用腎臟腫瘤射頻燒灼術、腎臟腫瘤冷凍治療手術、動脈栓塞或局部放射治療等局部治療方式，但這些療法目前還並非腎癌治療的標準療程。對於晚期或轉移性腎細胞癌患者，全身性治療為最主要的治療方式，但因普遍腎細胞癌對化學治療及放射治療的反應較差，治療成效不佳，中位存活期不到 12 個月，五年存活率只有 10-40%間。雖然有免疫治療藥物，其作用為增強病人體內對腫瘤的免疫反應，但是只有約 20%的晚期腎癌患者對干擾素(interferon- α)或介白素(Interleukin-2)的免疫治療有反應，而且常常伴隨嚴重的副作用，毒性相當大，所以西方國家主要的治療方法為標靶治療。以 von Hippel-Lindau(VHL)基因缺失所導致的腎癌為例，其致病機制為缺氧刺激因子增加造成血管增生，因此血管生長因子之受體為治療標靶。[9]現今針對晚期腎細胞癌的治療主要有免疫治療(干擾素(interferon- α)或介白素(interleukin-2))、化學藥物、標靶藥物等治療。第一大類是所謂的抑制多重標靶的口服藥物。這種藥物可以藉由抑制與血管再生有關的酪氨酸激酶(tyrosine kinase)，使腫瘤無法生長。第二大類是抑制其下游訊號傳遞路徑的 mTOR 激酶的藥物，進而減少腫瘤細胞生長和血管新生。台灣的口服腎臟癌標靶藥物有非常多，雖然標靶治療是現今治療趨勢，但副作用以及對特定類型患者有效，仍舊是很大的問題，且使用一段時間後常出現抗藥性。至於針對轉移

性腎細胞癌造成的症狀，則以症狀療法和緩和治療為主。

二. 積雪草酸(Asiatic acid)

Asiatic acid 為一種萃取自積雪草(*Centilla asiatica L.*)的五環三萜分子。目前，已證實其具有許多生物學活性，像是：抗炎、抗菌、抗糖尿病、抗高血脂、神經保護、抗焦慮、抗抑鬱、保肝、保護胰腺和心臟保護[10]，因此常是多種保養品內的成分。2019 年台灣也有發表一篇 Asiatic acid 可以抑制 glutamate 的釋放，降低神經元的興奮性，因此被認為是抗癲癇藥的關鍵機制[11]，而目前也有許多研究發現 Asiatic acid 具抗癌效果，例如誘導膽管癌[12]、大腸癌[13]、卵巢癌[2]和腦癌[14]的細胞凋亡。此外，Asiatic acid 也被證明具有抑制肺癌細胞轉移的效用：2019 年中國研究發現 Asiatic acid 可以抑制細胞轉化生長因子(Transforming Growth Factor- β 1, TGF- β 1)，進而抑制 A549 細胞的侵襲和遷移。此外，Asiatic acid 可提高經 TGF- β 1 處理的 A549 細胞中 E-鈣黏蛋白的 mRNA 及蛋白表現量，並降低 Snail、N-cadherin、vimentin 和 β -catenin 的蛋白表現量，以抑制上皮間質轉化(Epithelial mesenchymal transition, EMT)的發生[15]。從過去文獻顯示，Asiatic acid 確實具有抑制腫瘤細胞轉移的能力，但 Asiatic acid 對於抑制腎細胞癌的相關機轉仍尚待研究，所以對於發生率雖然不高但易轉移且高死亡率極高的腎癌，我們將深入探討此藥物是否具有抑制其轉移的能力。

三. 腫瘤細胞轉移

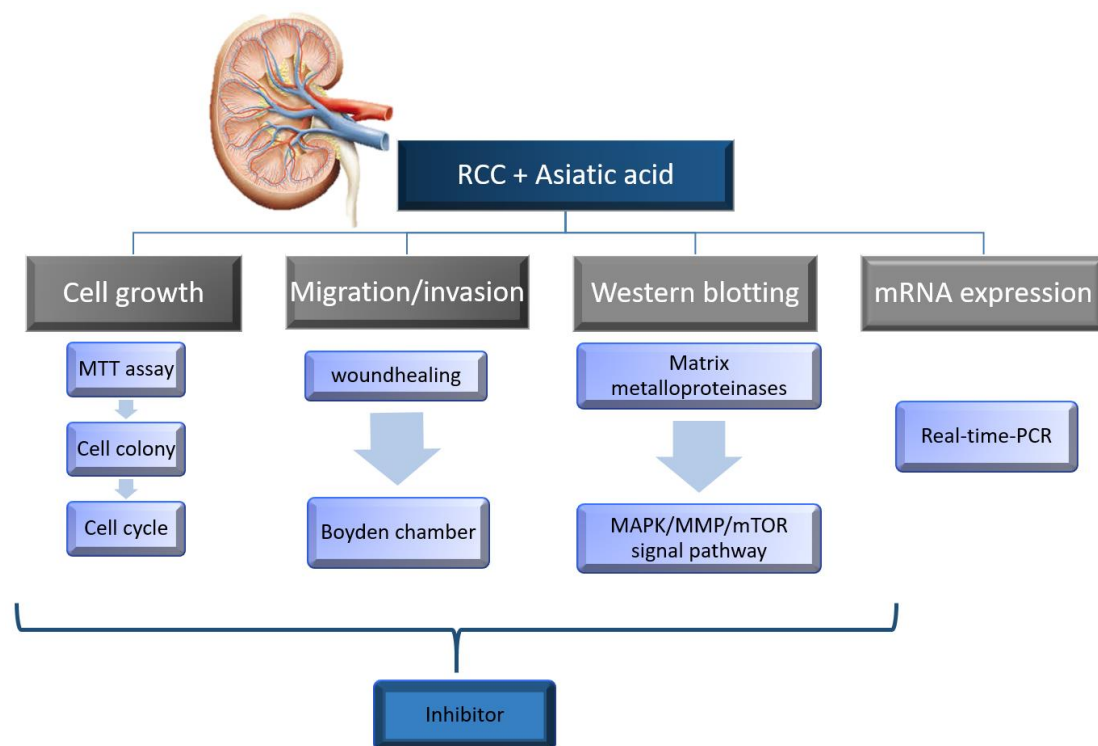
腫瘤細胞在原位成長、多型性發展、血管增生的時候為原位癌，當其開始轉移(metastasis)時，一開始會附著並侵襲(invasion)周邊的基底膜，穿過細胞外基質並遷移(migration)入血管膜。接著與血液中的淋巴細胞產生作用、與血小板形成血栓於血液中運送，然後附著並侵犯血管的基底膜，外滲(extravasation)出細胞外基質，形成新的病灶，稱作轉移癌。在進入血液循環時，會因靜脈壁較易穿破而多由靜脈轉移，因此，在血路轉移(hematogenous metastasis)中，肝臟與肺臟最常被轉移。轉移最重要的步驟就是侵襲和遷移，而侵襲和遷移的標誌就是細胞外基質的降解增加。惡性腫瘤細胞準備開始轉移時，黏附狀態會先改變，再透過上皮細胞黏附的關鍵蛋白 E-cadherin 被 Slug, Snail, Twist 和 ZEB-1 / -2 等轉錄因子下調，使上皮更具滲透性[16]。要破壞基底膜時，會產生細胞外基質(ECM, extracellular matrix)分解酵素，當中被研究最多有基質金屬蛋白水解酵素(MMPs, matrix metalloproteinases)及 PA(Plasminogen activator)，以 MMP-9、MMP-2、MMP-1 分泌量增加，和活化 uPA 與癌症的侵襲和移動最為相關，在一些文獻指出這類的酵素是癌細胞用來做局部侵襲及遠處轉移時，分解基底膜以便細胞達轉移的目的，也是癌細胞轉移的指標[17]。

四. 有絲分裂原活化蛋白酶 MAPK (Mitogen-activated protein kinase)

MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 是細胞訊息傳遞的重要路徑之一，

各路徑之間會透過相互調控，將細胞外訊號傳至細胞質及細胞核以調節細胞功能，包括增殖、基因表達、分化、有絲分裂和細胞凋亡。目前在哺乳類細胞已發現三條並行的 MAPKs 訊息傳遞路徑：ERK1/2、JNK1/2 及 p38。細胞膜上有 Tyrosine kinase receptor 與 G protein，當 Tyrosine kinase receptor 與特異性受體結合後，可使受體形成 dimer 並進行一連串的訊息傳遞。首先活化 Ras，接著透過磷酸化來活化 MAPKKK→活化 MAPKK→磷酸化 MAPK (ERK1/2、JNK1/2 及 p38)。而活化後的 ERK1/2、JNK 和 p38 即可進入細胞核以活化核內轉錄因子如 c-fos、c-Jun、Elk-1、c-myc 和 ATF2，參與細胞增殖與分化的調控。由此可知，MAPK 訊息的失調可能會發生許多生理狀態的改變，包括神經退行性疾病，代謝綜合症和癌症，因此使用合成化合物標靶抑制 MAPK 傳遞訊息將能有效治療癌症[18]。

(三) 實驗架構



(四) 研究方法與步驟

4-1. 細胞培養

人類腎小管上皮細胞株 HK2 以及人類腎癌細胞株 786-O、A-498、Caki-1 以及 ACHN，取自食品工業發展研究所菌種中心國家衛生研究院細胞庫。分別利用 F12/DMEM、RPMI 培養液外加 4.5g/L glucose、10% fetal bovine serum(Biological Industries)、2.2 g/L sodium pyruvate、100 units/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin，及 MEM 外加 10% fetal bovine serum(Biological Industries)、2.2 g/L sodium pyruvate、100 units/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin、NEAA，並培養細胞於 10 cm dish 中，培養條件為 37°C、5% CO₂，每日將細胞置於顯微鏡

下觀察，並定期更換培養液。

4-2. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

為了評估 Asiatic acid 的細胞毒性，利用 MTT 試劑來測定。其方法為：將細胞以每 2×10^4 個細胞/well，接種在 24 well 中培養 24 小時。接著每個 well 各加入不同濃度(0、10、20、30、40、50 μM)的 Asiatic acid，每個濃度重複兩次。各在 24 與 48 小時後，去除上清液後，每個 well 加入 1ml 10%MTT 試劑(5 mg/ml)，放置 4 小時後去除上清液。用異丙醇溶解藍紫色結晶(Formazan)，放到 shaker 上，待其均勻混合溶解後，利用 ELISA reader 以波長 570 nm 讀取吸光值。最後，將不同濃度(0、10、20、30、40、50 μM)與相對的吸光值做成統計圖表。

4-3. 細胞群落實驗(Colony formation assay)

為了試驗 Asiatic acid 是否會影響細胞的長期存活率，利用細胞群落實驗測定之。其方法為：將細胞以 2000 顆/2c.c，接種在 6well 中培養 24 小時。接著每個 well 各加入不同濃度(0、10、20、40 μM)的 Asiatic acid。三天後再換一次藥。待細胞呈現八分滿時，移除培養液，以 PBS 清洗細胞後，加入甲醇靜置 15-20 分鐘以固定細胞。接著將甲醇移除，用 5% Giemsa 染劑過夜染色，而後再用 PBS 清洗染色細胞上多餘的染劑，接著即可拍照觀察，此實驗可評估 Asiatic acid 對細胞長期存活率的影響。

4-4. 細胞週期分析(Flow cytometry analysis)

將 4×10^5 個細胞培養於 6 cm dish 中。以不同濃度(0、10、20、40 μM)的 Asiatic acid 處理細胞，並放入培養箱培養 24 小時。細胞先以 Trypsin 收取，離心後移除上清液，再用 PBS 清洗離心，接著，緩慢加入冰的 75%酒精固定並打散，放置於-20°C固定 3 天。細胞離心至底部，以 PBS 清洗細胞，接著加入 1 ml PI/Triton-100 溶液(0.02 mg/ml Propidium Iodide、0.02 mg/ml RNase 以及 0.1% Triton-100 溶於 PBS 中)並打散細胞，避光染色 30 分鐘，即可進行流式細胞儀分析。

4-5. 傷口癒合實驗(Woundhealing assay)

為了試驗 Asiatic acid 是否會影響細胞的爬行，利用傷口癒合實驗測定之。其方法為：在 6 well plate 中，每個 well 貼上 2 個 Culture-Insert 2 well，每個 Culture-Insert 的 well 中接種 8×10^4 顆細胞，培養 24 小時後，拆除 Culture-Insert 2 well，以光學顯微鏡拍攝 0hr 做為控制組。之後加入不同濃度(0、10、20、40 μM)的 Asiatic acid，8、18 小時後各拍一次照，觀察不同濃度下傷口癒合程度。

4-6. 細胞侵襲與遷移試驗

Boyden chamber 是被設計用來研究細胞受到化學趨向物(chemotaxis)的影響而移動的裝置，可用來檢測細胞侵襲和遷移的能力。此裝置有 48 個孔洞，分成上下兩層，中間夾一片塑膠墊，其實驗方法為：先在下層 chamber 中每孔加入 36 μl 含有胎牛血清的細胞培養液，接著放置一片孔徑大小為 8 μm 的半透膜，再加上塑膠墊、上層 chamber。在上層 chamber 中每孔加入 50 μl 不含胎牛血清的細胞培養基以及不同濃度 Asiatic acid 處理過 24 小時的細胞。18 小時後收集並將半透膜的下層面用甲醇固定 30min，用 5% Giemsa 染劑過夜染色，而後擦掉半透

膜上層面的細胞，用光學顯微鏡拍照(200X)並用軟體計數。此試驗可評估 Asiatic acid 對細胞侵襲與遷移影響。再利用 Boyden chamber 研究細胞侵襲能力，上層 chamber 中每孔 coating 上 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Marix gel (0.5 mg/ml)，用以模擬腫瘤細胞侵襲基底膜與細胞外基質。

4-7. 蛋白萃取及定量

全細胞中抽取蛋白液以分析細胞內的各種蛋白，方法如下：用 PBS 清洗細胞後，加入 Trypsin 將細胞打下來，用含 FBS 的培養液回溶後，收入 1.5ml 微量離心管離心，再用 PBS 清洗離心，最後加入 NETN 以防止蛋白水解，用超音波震碎細胞後，以 13000rpm，4°C 離心 25 分鐘，取上清液。接著使用 Bradford 法測定蛋白質含量：使用 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBG)測定蛋白，其在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色時用 ELISA reader 以波長 595 nm 測量吸光值。將吸光值帶入公式，算出蛋白的濃度並定量後，即可配出需要的樣品。

4-8. 西方墨點法(Western blotting)

要分析的腫瘤轉移相關蛋白可使用西方墨點法，方法如下：樣品以每種 10 μl 置入上膠，下膠為 10% 的 SDS-PAGE 凝膠，用 80V，120 分鐘的速度跑電泳。將 PVDF 膜放入甲醇中活化，用轉印模組以 100V 將蛋白質轉印到膜上。接著利用 Block buffer(40ml 的 TBST (TBS+0.1% Tween-20) + 2mg 的脫脂牛奶)反應 1 小時，再用 TBST 清洗，然後用適當稀釋的一級抗體在 4°C 反應 overnight，而一級抗體分別是購自 Cell Signaling Technology 的 P-ERK(#4370S)，ABclonal 的 MMP-9(#A0289)，GeneTex 的 MMP-2(#42796)以及 Santa Cruz Biotechnology 的 β -actin(#sc-47778)、p38 α/β (#sc-7972)、p-p38(#sc-166182)、JNK(#sc-7345)、p-JNK(#sc-6254)、ERK(#sc-514302)、MMP-1(#sc-58377)、MMP-7(#sc-80205)、MEK1/2(#sc-436)、P-MEK1/2(#sc-7995)、MEK3/6(#sc-960)、P-MEK3/6(#sc-8407)、MEK4(#sc-964)、P-MEK4(#sc-7990)。隔天，用 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘，洗掉未結合的一級抗體，再與適當稀釋的二級抗體反應 1 小時。用 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘，洗掉未結合的二級抗體，之後加入呈色劑，以化學冷光法呈色，呈色出的 band 粗細深淺代表蛋白量的多寡。

4-9. 核酸萃取及定量

將細胞用 TRIzol 收取，加入氯仿靜置 15 分後，用 4°C、1,3000 rpm、15 分鐘將細胞離心分層。取出上層液(RNA)並加入等量 Isopropanol 使其固定，冰至 -20°C 待 1~2 天後，再次用 4°C、1,3000 rpm、15 分鐘將 RNA 離至底部，去除上清液後加入精製酒精(100%)所配置的 75% 酒精並用 4°C、1,3000 rpm 離心 5 分鐘，重複此步驟 2~3 次以將 RNA 清洗乾淨。將酒精清除乾淨剩下底部透明 pallet，用 70°C 加熱板將其烘乾呈透明。加入 50 μl nuclease-free water 並用 70°C 加熱 5 分鐘在冰浴 5 分鐘重複此步驟 2-3 次以回溶 RNA。接著，使用分光光度計測定 RNA 含量並以公式計算。

4-10. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription-PCR)

為了分析 mRNA 的表現量，使用 GoScript™ 逆轉錄混合液 (Promega, MW, USA) 將 total RNA 反轉錄成 cDNA。

4-11. 即時聚合酶連鎖反應 (Real-Time-PCR)

將 RNA 反轉錄成 cDNA 後，使用 Promega-GoTaq® qPCR Master Mixkit 於 PRISM ABI7700 Sequence Detecting System (美國 Applied Biosystems 公司) 上機進行反應，反應結束後使用軟體分析數據。

4-12. 轉染 (Transfection)

為了利用 si-RNA 來抑制特定序列，利用 Transfection 的方法將 si-RNA 送入細胞，方法如下：先將細胞種至 6 cm dish，待 18-24 小時細胞貼盤後，將 si-RNA 和 RNAiMAX 以 1:3 的比例混合，Control 組則是用 serum-free medium 混合 RNAiMAX。每個 dish 加入 200 μ l，並補 serum-free medium 至 3c.c。待至 6 小時後將 serum-free medium 吸掉換成含 FBS 的 medium。隔天即可加藥。

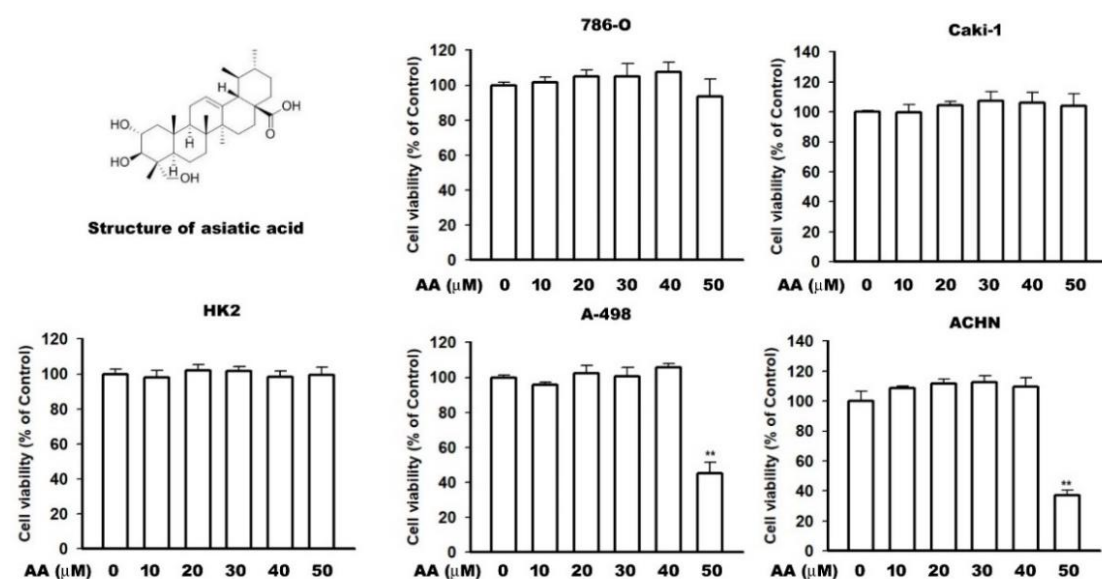
4-13. 統計分析

所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 One-way analysis of variance (One-way ANOVA) 分析。分析結果為 $p < 0.05$ ，統計上具有顯著差異， $p < 0.01$ ，統計上具有極顯著性差異。

(五) 實驗結果

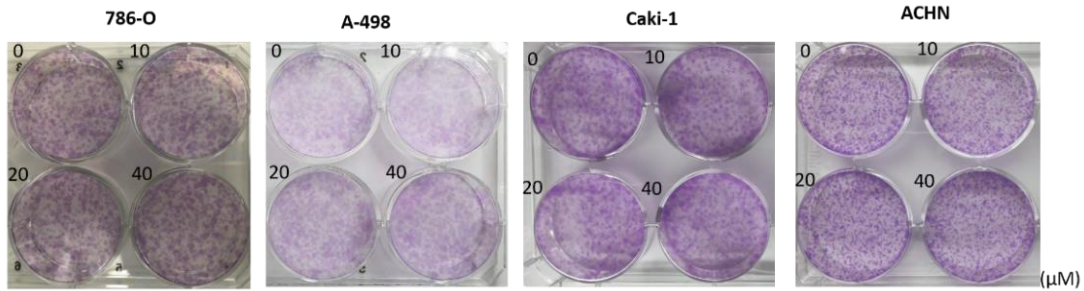
一、探討 Asiatic acid 對人類腎臟癌細胞的細胞存活率和細胞週期分佈的影響。

利用 MTT 試驗評估藥物 Asiatic acid 對腎癌細胞株以及正常腎小管上皮細胞株的毒性，我們分別以 Asiatic acid (0-50 μ M) 處理 24 小時，結果可以發現在 40 μ M 以下，細胞存活率仍在 90% 以上，可知 Asiatic acid 在濃度 40 μ M 以下時對正常細胞 (HK2) 以及腎癌細胞株 (786-O、A-498、Caki-1 和 ACHN) 都不具細胞毒性 (圖一)，因此我們選用 0、10、20、40 μ M 的劑量進行後續實驗。



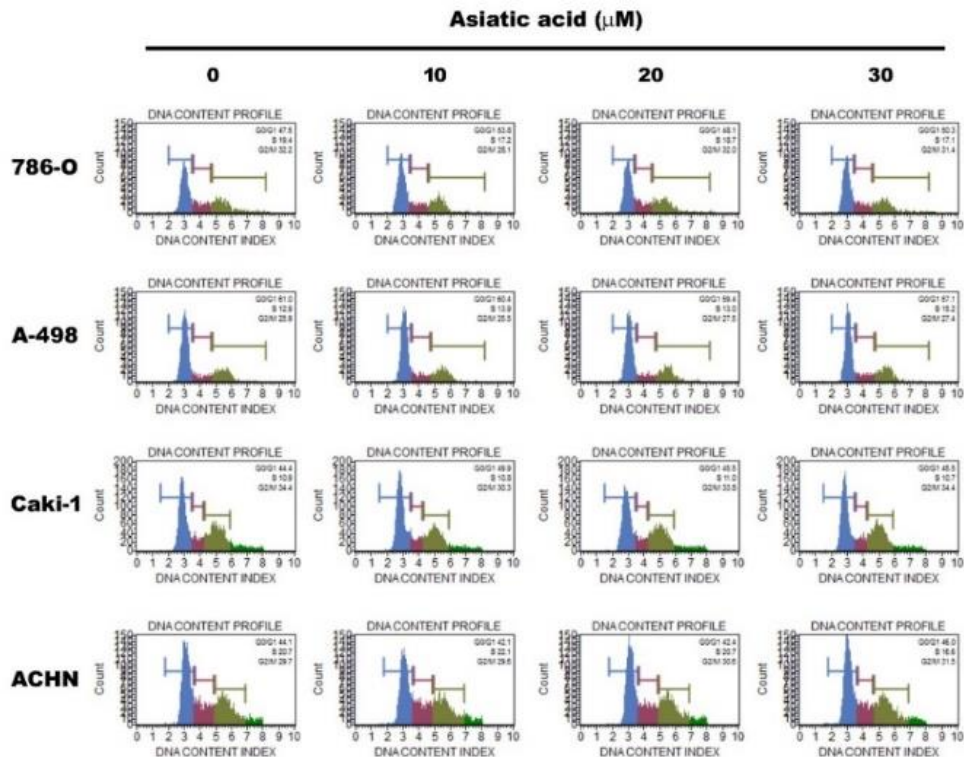
(圖一)

此外透過細胞群落實驗探討藥物 Asiatic acid 是否會影響腎癌細胞株的長期生長。將 786-O、A-498、Caki-1 和 ACHN 分別處理 0, 10, 20 以及 40 μM 的 Asiatic acid，結果發現隨著 Asiatic acid 濃度增加，對於細胞群落生成並不影響(圖二)。



(圖二)

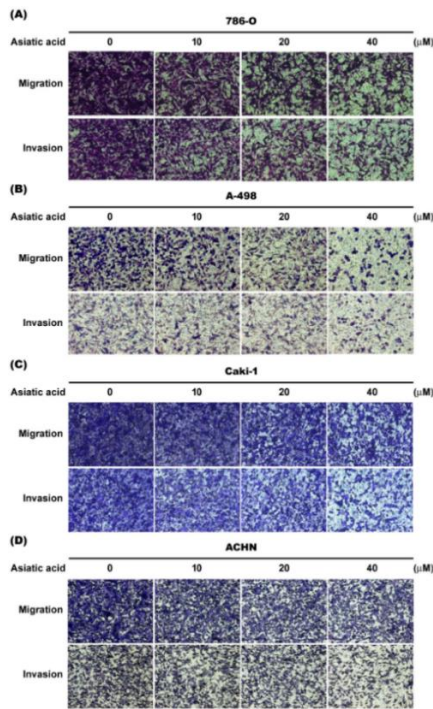
接著利用 PI 染色並以流式細胞儀分析細胞週期分佈，從結果來看可以發現 Asiatic acid 分別處理 786-O、A-498、Caki-1 以及 ACHN 細胞株時，分析結果發現隨著 Asiatic acid 濃度增加，並不會影響細胞週期分佈(圖三)。



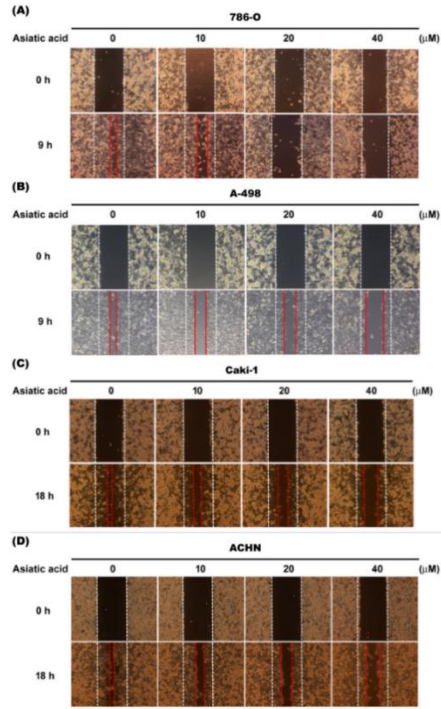
(圖三)

二、探討 Asiatic acid 對人類腎臟癌細胞爬行和侵襲作用的影響。

利用 Boyden Chamber 細胞侵襲 (Invasion) 與遷移 (Migration) 試驗觀察 Asiatic acid 對腎細胞癌細胞 786-O、A-498、Caki-1 以及 ACHN 抑制轉移及侵襲的能力，從結果可以發現 Asiatic acid 濃度越高，抑制轉移效果越明顯(圖四)。此外在傷口癒合試驗結果也發現隨著 Asiatic acid 濃度增加，傷口距離越大，即抑制細胞爬行(圖五)。



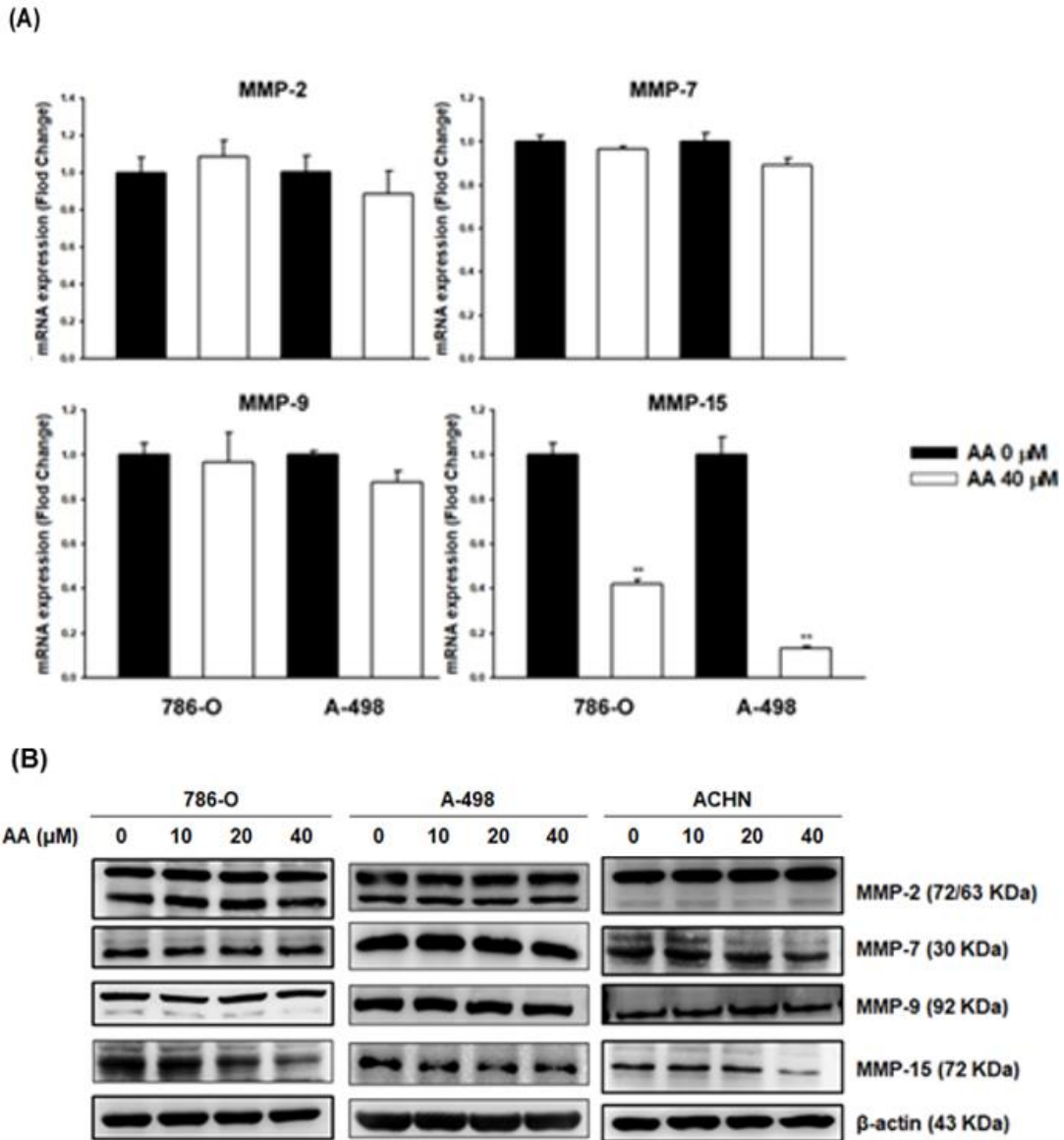
(圖四)



(圖五)

三、探討Asiatic acid對於基質金屬蛋白酶其mRNA以及蛋白表達量影響。

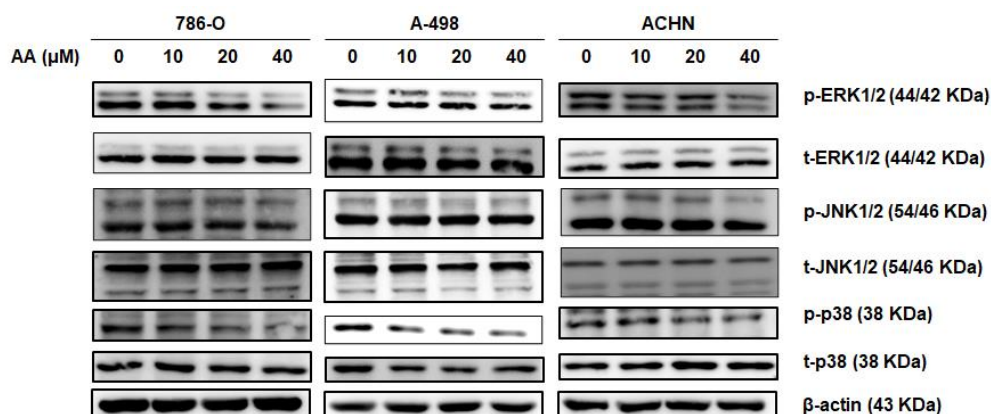
從圖四以及圖五結果可以發現Asiatic acid確實可以抑制腎癌細胞的遠端轉移，而過去文獻指出基質金屬蛋白酶在癌細胞轉移過程中扮演著相當重要的角色，且可作為治療癌細胞轉移的標靶策略之一[19, 20]。此外部分文獻指出，MMP-1, -2, -7, -9, -15等基質金屬蛋白酶在腎癌轉移過程的關鍵蛋白[21-24]。因此，為了探討Asiatic acid是否會抑制MMP相關蛋白進而影響腎癌細胞的轉移，我們進一步利用即時定量PCR (real-time PCR)分析MMP-1, -2, -7, -9, -15等蛋白酶其mRNA的表達。如圖六A所示：將腎癌細胞786-O以及A-498處理Asiatic acid後，可以發現Asiatic acid對於MMP-2, -7以及-9並無明顯的影響，而MMP-1則不如預期般減少反而有所增加。有趣的是，MMP-15在兩株細胞處理Asiatic acid後明顯受到抑制。我們進一步利用西方墨點法進行分析發現，MMP-15蛋白表達狀況也明顯受到抑制，而MMP-1, -2, -7, -9表達狀況則無明顯改變(圖六B)。上述結果可以證實，Asiatic acid主要是抑制MMP-15表達，進而抑制腎癌細胞的轉移。



(圖六)

四、探討Asiatic acid對於有絲分裂原活化蛋白激酶等訊息傳遞路徑蛋白的影響。

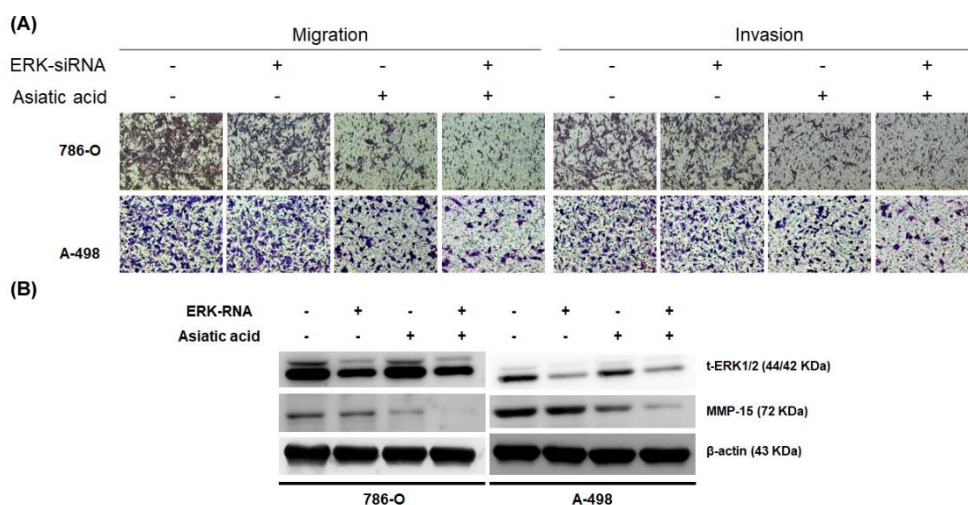
過去文獻明確指出說，透過調控不同 MAPK 路徑 (ERK1/2、JNK1/2 以及 p38)，進而影響腫瘤細胞的移動以及侵襲作用 [25, 26]。因此接著我們將利用西方點墨法進一步釐清 Asiatic acid 是否會透過參與在 MPAK 相關蛋白進而抑制細胞轉移。從西方墨點法結果發現，隨著 Asiatic acid 濃度越高，會抑制 p38 及 ERK 磷酸化的蛋白表現量。反之，JNK1/2 磷酸化蛋白則沒有明顯改變(圖七)。



(圖七)

五、探討ERK蛋白磷酸化對於Asiatic acid抑制腎癌細胞轉移能力的影響。

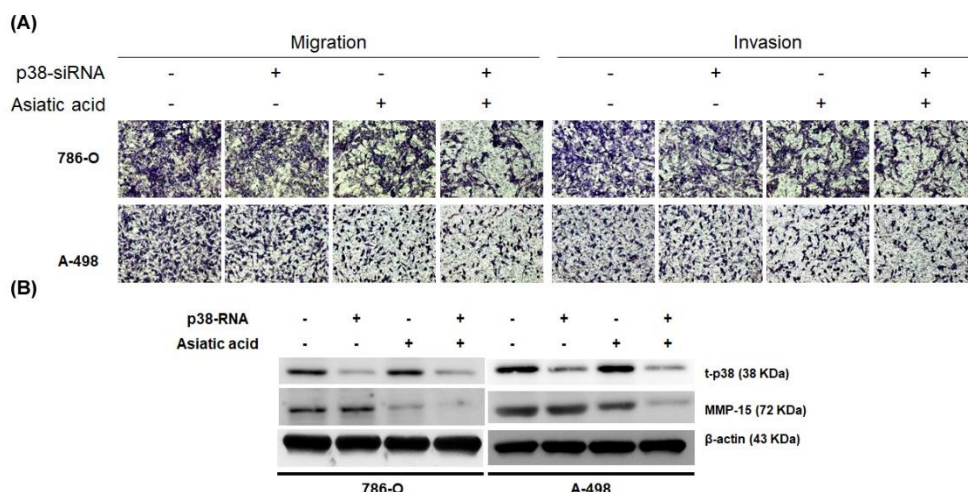
接著我們利用ERK-siRNA抑制內生性ERK基因表達，藉由抑制ERK蛋白表達後，再利用Boyden Chamber細胞侵襲(Invasion)與遷移(Migration)試驗觀察Asiatic acid對腎細胞癌細胞786-O以及A-498抑制轉移及侵襲的能力，從結果可以發現ERK-RNA抑制內生性ERK蛋白表達後與Asiatic acid合併處理下使抑制細胞轉移效果越明顯(圖八A)。同時，Asiatic acid合併ERK-siRNA會更抑制786-O以及A-498細胞中MMP-15蛋白的表現量(圖八B)，以上結果證明Asiatic acid抑制腎癌細胞轉移過程是透過抑制p-ERK的表達，進而調控MMP-15表現狀況。



(圖八)

六、探討p38蛋白磷酸化對於Asiatic acid抑制腎癌細胞轉移能力的影響。

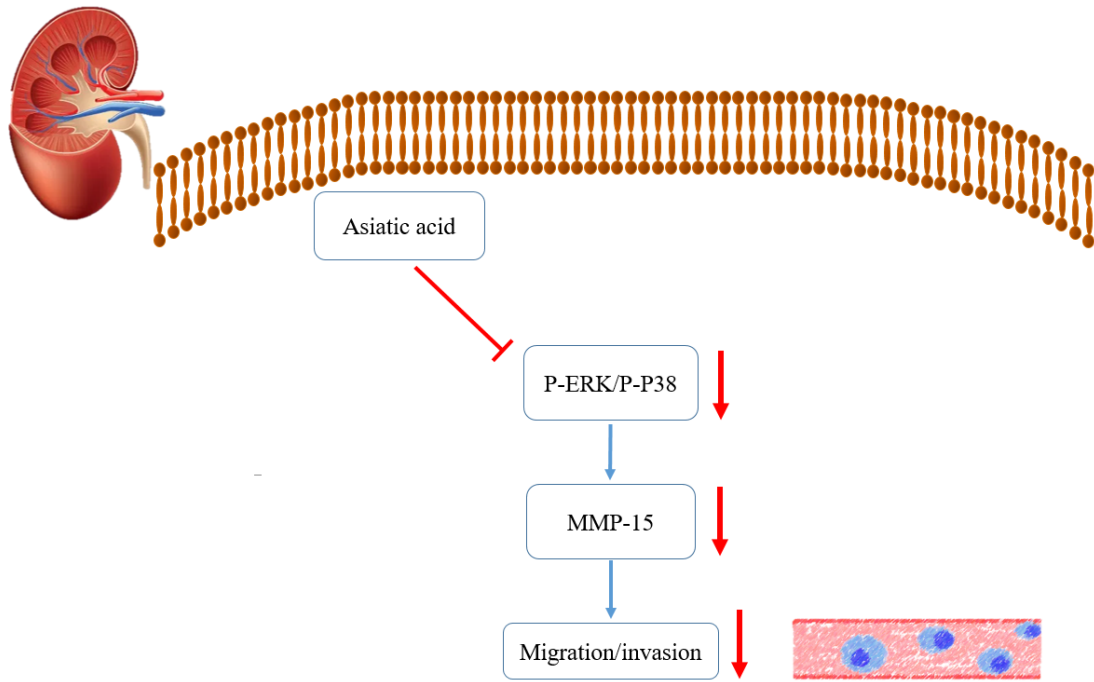
另一方面，我們也透過p38-siRNA抑制內生性p38基因表達。結果也發現p38-siRNA抑制內生性p38蛋白表達後與Asiatic acid合併處理下，抑制MMP-15表達以及細胞轉移效果越明顯(圖九)。上述結果也證實，Asiatic acid藉由抑制p38蛋白磷酸化而影響MMP-15蛋白表達，進而抑制腎癌細胞轉移過程。



(圖九)

(六) 討論

近年來，台灣腎臟癌患者有年輕化的趨勢，且因較難發現所以發現時往往已是晚期。雖然標靶藥物較傳統的化療效果較好，使患者存活率大幅延長，但仍有許多副作用。因此，天然萃取藥物是近年來研究抑癌的新方向。目前已有許多天然藥物抑癌的研究，像是研究天然藥物 Fisetin 可以透過 MEK/ERK 路徑下調 CTSS 和 ADAM9 進而抑制腎細胞癌的增生及轉移[27]。而 Asiatic acid 目前也有許多研究指出具有抑癌的功效，像是：Asiatic acid 會透過 p38 的路徑使 Bax、caspase 3、8、9 上調，進而導致鼻咽癌細胞凋亡[28]。因此，此篇研究計畫利用 Asiatic acid 處理腎細胞癌細胞發現會透過 ERK/p38 路徑下調 MMP-15 來抑制腎細胞癌的轉移。我們利用 MTT assay 及細胞群落試驗發現 Asiatic acid 不會對正常腎臟上皮細胞(HK-2)及腎癌細胞(786-O、A-498、Caki-1、ACHN)產生細胞毒性，也不影響其長期細胞群落生長。接著利用 PI 染色及流式細胞儀分析發現並不會改變其細胞週期。利用 Boyden Chamber 細胞侵襲與遷移試驗、傷口癒合試驗發現 Asiatic acid 會抑制細胞侵襲及爬行。利用西方墨點法分析蛋白後發現 p-ERK 及 p-p38 會下降且下游蛋白 MMP-15 也下降，我們利用 real-time-PCR 來看經由 Asiatic acid 處理後，腎癌細胞 MMP-15 的 mRNA 表現量也有下降的趨勢。為了更確定其分子機制，我們利用 si-RNA 來抑制 ERK 及 p38 的表現並合併 Asiatic acid 處理腎癌細胞，發現 MMP-15 有更抑制的現象，因此證明 Asiatic acid 處理腎細胞癌後，會透過 ERK/p38 的路徑下調 MMP-15 進而抑制癌細胞的轉移及侵襲。



為了更確定其作用機制，未來，我們將使用 MMP-15 的重組蛋白送入細胞中使 MMP-15 大量表現，再處理 Asiatic acid 後，分析是否也同樣產生抑制的效果。接著，我們再進一步利用動物實驗進行尾靜脈注射癌細胞來觀測癌細胞轉移的情形，來驗證 Asiatic acid 在細胞實驗中的結果。希望利用多種方法來驗證 Asiatic acid 抑制腎癌細胞轉移及侵襲的分子機制，使 Asiatic acid 在未來能在臨床腎細胞癌治療上有所進展。

(七) 參考文獻

1. Mytsyk, Y., et al., *Systemic treatment of the metastatic renal cell carcinoma: usefulness of the apparent diffusion coefficient of diffusion-weighted MRI in prediction of early therapeutic response.*
2. Ren, L., et al., *Asiatic acid exerts anticancer potential in human ovarian cancer cells via suppression of PI3K/Akt/mTOR signalling.* Pharm Biol, 2016. **54**(11): p. 2377-2382.
3. Zheng, T., et al., *The long-term rapid increase in incidence of adenocarcinoma of the kidney in the USA, especially among younger ages.* Int J Epidemiol, 2019. **48**(6): p. 1886-1896.
4. Ma, Q., et al., *NKAP promotes renal cell carcinoma growth via AKT/mTOR signalling pathway.* Cell Biochem Funct, 2020. **38**(5): p. 574-581.
5. Falebita, O.A., et al., *Rising incidence of renal cell carcinoma in Ireland.*

6. Lázaro, M., et al., *SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2019)*.
7. Khan, M.I., et al., *Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: Current state and future approaches (Review)*.
8. Jorns, J., et al., *Three-dimensional tumour volume and cancer-specific survival for patients undergoing nephrectomy to treat pT1 clear-cell renal cell carcinoma*. *BJU Int*, 2012. **110**(7): p. 956-60.
9. Del Monte, G., et al., *Interleukin-2 inhalation therapy in renal cell cancer: a case report and review of the literature*. *In Vivo*, 2008. **22**(4): p. 481-8.
10. Islam, M.T., et al., *Anti-Cancer Effects of Asiatic Acid, a Triterpene from Centilla asiatica L: A Review*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020. **20**(5): p. 536-547.
11. Lu, C.W., et al., *Asiatic acid, an active substance of Centella asiatica, presynaptically depresses glutamate release in the rat hippocampus*. *Eur J Pharmacol*, 2019. **865**: p. 172781.
12. Sakonsinsiri, C., et al., *Anti-cancer activity of asiatic acid against human cholangiocarcinoma cells through inhibition of proliferation and induction of apoptosis*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018. **64**(10): p. 28-33.
13. Tang, X.L., et al., *Asiatic acid induces colon cancer cell growth inhibition and apoptosis through mitochondrial death cascade*. *Biol Pharm Bull*, 2009. **32**(8): p. 1399-405.
14. Kavitha, C.V., et al., *Asiatic acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptotic death in glioblastoma multiforme cells both in vitro and in vivo*. *Mol Carcinog*, 2015. **54**(11): p. 1417-29.
15. Cui, Q., et al., *Effect of asiatic acid on epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelium A549 cells induced by TGF- β 1*. *Oncol Lett*, 2019. **17**(5): p. 4285-4292.
16. Pachmayr, E., C. Treese, and U. Stein, *Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology*. *Visc Med*, 2017. **33**(1): p. 11-20.
17. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 563-72.
18. Vališ, K. and P. Novák, *Targeting ERK-Hippo Interplay in Cancer Therapy*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(9).
19. Piperigkou, Z., et al., *Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1731**: p. 325-348.
20. Yadav, L., et al., *Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(3): p. 1085-91.
21. Lu, H., et al., *Imbalance between MMP-2, 9 and TIMP-1 promote the invasion*

- and metastasis of renal cell carcinoma via SKP2 signaling pathways. Tumour Biol, 2014. 35(10): p. 9807-13.*
22. Liao, C.H., et al., *The Contribution of MMP-7 Promoter Polymorphisms in Renal Cell Carcinoma. In Vivo, 2017. 31(4): p. 631-635.*
 23. Piccoli, M.F., et al., *Lack of association between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and risk of renal cell carcinoma. Int Braz J Urol, 2007. 33(5): p. 622-9.*
 24. Chen, Y., et al., *Membrane type-2 matrix metalloproteinases improve the progression of renal cell cancer. Int J Clin Exp Pathol, 2017. 10(10): p. 10618-10626.*
 25. Dehghani, M., et al., *Klotho inhibits EGF-induced cell migration in Caki-1 cells through inactivation of EGFR and p38 MAPK signaling pathways. Oncotarget, 2018. 9(42): p. 26737-26750.*
 26. Tanaka, T., M. Iino, and K. Goto, *Sec6 enhances cell migration and suppresses apoptosis by elevating the phosphorylation of p38 MAPK, MK2, and HSP27. Cell Signal, 2018. 49: p. 1-16.*
 27. Hsieh, M.H., et al., *Fisetin Suppresses the Proliferation and Metastasis of Renal Cell Carcinoma through Upregulation of MEK/ERK-Targeting CTSS and ADAM9. Cells, 2019. 8(9).*
 28. Liu, Y.T., et al., *Asiatic Acid, Extracted from Centella asiatica and Induces Apoptosis Pathway through the Phosphorylation p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cisplatin-Resistant Nasopharyngeal Carcinoma Cells. Biomolecules, 2020. 10(2).*