

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 探討 β -mangostin 抑制人類肝癌細胞轉移之分子機制 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳曼之
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-037-B
研究期間： 105年07月01日至106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，2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 106年03月28日

(一)摘要

肝癌不僅是常見的癌症之一，由於其疾病特性與臨床治療的困難，也是死亡率很高的疾病。在台灣肝癌病患往往因為腫瘤細胞的轉移，而導致發病率及死亡率居高不下。雖然治療肝癌方面已有不錯成效，但往往夾帶著不容小覷的副作用，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。山竹果中富含氧雜蒽酮，許多研究顯示出具有抗氧化及抗腫瘤的特性，而其衍生物 β -mangostin 在過去已被證明具有抗發炎以及促使乳癌細胞凋亡的能力(Journal of Functional Foods. 2014)。但 β -mangostin 在肝癌之研究尚不清楚。本研究計畫目的是深入探討 β -mangostin 對人類肝癌細胞所抑制細胞轉移機轉以及相關訊息傳遞機制。首先，我們利用 MTT assay 來觀察 β -mangostin 對於人類肝癌細胞株(SK-Hep-1、Huh-7 和 HA22T/VGH)是否影響細胞生長。從實驗結果可以發現肝癌細胞在 β -mangostin 處理不同濃度(0、2.5、5、7.5 和 10 μ M)，並不會造成細胞毒性。接著發現隨著 β -mangostin 濃度提高也不影響細胞週期分佈。進一步利用細胞爬行試驗證明隨著 β -mangostin 劑量增加，會抑制三株肝癌細胞的移動及侵襲的能力。透過西方墨點法分析發現， β -mangostin 會透過抑制 MMP9 和 MMP2 蛋白表現，來抑制肝癌細胞的侵襲與轉移。此外我們也證明 β -mangostin 會誘導 ERK 和 JNK 的磷酸化，因此推測 β -mangostin 是透過 MAPK 路徑來調控 MMP9/MMP2 蛋白，進而抑制肝癌細胞的侵襲與轉移。接著本實驗預先處理 ERK 磷酸化抑制劑(PD98059)或 JNK 磷酸化抑制劑(JNKII)，發現 β -mangostin 所抑制肝癌細胞侵襲與轉移的現象有回復情形，另外本實驗也利用 siRNA 分別抑制細胞內生性 ERK 和 JNK 蛋白表現，實驗結果發現預先 transfection si-ERK 或 si-JNK 時，也相同回復 β -mangostin 所抑制的肝癌細胞轉移現象。綜合以上結果， β -mangostin 藉由誘導 ERK 和 JNK 磷酸化進一步抑制 MMP9 和 MMP2，來達到抑制肝癌細胞的侵襲與轉移的效果。藉由本研究的初步結果，未來 β -mangostin 可以投入更多研究，發展成臨床上治療肝癌和對抗癌細胞侵襲藥物。

(二)研究動機與研究問題

根據台灣衛生福利部統計，國人死於肝癌一直是名列前兩名。雖然國內醫療先進，對於相關治療肝癌方法仍是有安全性考量以及相關的副作用。然而文獻報導指出廣泛存在於蔬菜和水果中的天然化合物，例如多酚、類黃酮皆有不錯的抗癌效果，未來可做為癌症的化學預防之用。近年來，山竹果中的氧雜蒽酮衍生物被研究指出具有抗氧化作用，其有助於維持腸道健康、增強免疫機能、抑制自由基，幫助支持軟骨和關節機能，並促進強化季節性呼吸系統。另有研究指出其衍生物 α -mangostin 能有效抑制癌症的生長、轉移、侵襲和誘導細胞凋亡等機制([Acta Pharmacol Sin. 2014](#))。而另一衍生物 β -mangostin 相關研究仍是相當稀少，目前

已知具有抗菌([Drug Des Devel Ther. 2016](#))、抗發炎以及少數抗癌的相關研究。從以上可以知道，氧雜蒽酮衍生物是具有相當抗癌的能力。因此本計畫將探討 β -mangostin 作用於人類肝癌細胞中的生物功能、訊息傳遞和相關基因調控為何，更進一步探討其詳細分子機制。

(三)文獻回顧與探討

一、肝癌(Hepatocellular carcinoma)

1. 簡介

隨著每年台灣罹患癌症的人數逐漸升高，肝癌(Hepatocellular carcinoma)患者的人數更是居高不下。肝病不但身為台灣的國病，肝癌更是位居國人十大癌症死因前兩名，肝癌好發年齡為45到65歲之間，其中有研究指出男性罹患肝癌比率竟為女性6倍；死亡比率則為2倍以上[1]。在台灣，每年有近8000名男性罹患肝癌，平均少活13年，因此預防及治療肝癌儼然是現今相當棘手的問題。

2. 危險因子

肝臟是沉默的器官就是因為它沒有痛覺神經，雖然人類只要四分之一的肝臟，就可以維持正常的生理機能，但因為不容易被察覺，許多肝病患者在發現肝臟有問題時，致癌的病毒及毒素早已侵襲了四分之三以上的肝臟。而造成台灣肝癌盛行的主要危險因子如下[2]：

2-1. 黃麴毒素(Aflatoxin)：為一種具強烈生物毒性的化合物，主要是黃麴黴菌產生的代謝毒物，最喜歡孳生在保存不良的發霉花生、米等穀物上，人類一旦進食黃麴毒素就得由肝臟來負荷代謝。黃麴毒素不但會破壞肝細胞，更導致癌症基因突變。將受感染之食物或純黃麴毒素餵食實驗動物也會發現引起動物產生肝癌的現象[3]。

2-2. 病毒性肝炎的盛行(HBV、HCV)：國人常因忽略病毒性肝炎的篩檢而無法提早預防、治療。由HBV病毒所引起之肝癌佔百分之七十；HCV則佔百分之二十。在1970~1980年代期間，有許多流行病學及病毒分子學家提出強烈證據指出HBV的感染和肝癌有相當密切的關係，但致病機轉尚不明朗，但直至近年，終有研究指出插入到宿主細胞DNA的HBV DNA極可能會引發細胞內致癌基因之活化，進而誘導引發肝癌的形成[4]。

2-3. 肥胖和糖尿病：有研究指出肥胖和糖尿病患所造成之胰島素阻抗會有較高的罹癌風險，甚至有研究發現，糖尿病和一些癌症(肝癌、乳癌、胰臟癌等)有相當的關係，其中肝癌的發生風險更是比一般人更多出兩倍以上之多，糖尿病會經由多種機轉影響腫瘤之形成，像是高胰島素血症。胰島素由胰臟 β 細胞分泌，經肝門靜脈送至肝臟，當肝臟暴露於高濃度之內源

性胰島素中，胰島素和胰島素及類胰島素受體會結合形成複雜的交互作用。而大多數的癌症皆會表現這兩類受體，因此胰島素除了原本的代謝功能外還會有促使癌細胞增生和轉移的作用，也因而提高罹患肝癌的機會。肥胖則會造成脂肪肝，進而促使肝發炎、肝腫脹，最終肝細胞纖維化、肝硬化直至形成肝癌[5]。

2-4. 酗酒和抽菸：酒精被喝進入人體後經代謝會產生有毒的代謝物—乙醛，一旦酗酒過量就很可能造成酒精性脂肪肝、肝纖維化最終走向肝癌。香菸中的成分—尼古丁吸入人體後經肝臟代謝，對肝臟造成極大負擔外也大大提高致癌風險[6]。

3. 治療方法

迄今為止，治療肝癌的方法不外乎式以外科手術的方式予以切除，但僅限於小型肝癌患者(腫瘤小於五公分)，即早期肝癌患者，手術切除對肝癌末期患者相對較無效。除了切除之外尚有栓塞療法、化學療法、腫瘤消融、肝移植等等……其他治療方法[7]。

儘管現已有許多肝癌藥物和治療方式，但卻也伴隨著無可避免的副作用，所以近年來科學家們仍致力於從天然物中萃取出對抗肝癌的有效成分做為更適切的抗肝癌藥物。

二、癌細胞轉移(Metastasis)

當癌細胞越惡化則越可能開始進行轉移擴散(Metastasis)，此時期與罹患癌症病患的存活有著密切的關係。當上皮細胞轉變成癌細胞的初期稱原位癌，此時期的病患的治癒率為最高，但到了後期癌細胞變得更惡化時，會開始藉由血液及淋巴系統轉移到人類其他器官，並開始落地生根，此癌症末期也稱轉移癌[8]。一般而言，細胞轉移的過程牽涉許多細胞生理狀態的改變，包括細胞移動和侵襲的能力增加、細胞與細胞外基質之間的結合能力增加和細胞外基質的分解。而細胞在轉移擴散的過程中，主要分成侵襲與移動，侵襲就是細胞破壞基底膜(basal membrane)侵入周圍的組織，而當細胞穿過基底膜後，開始隨著循環系統而遷移，稱之為移動。當正常細胞轉變成癌細胞時，需要一些訊息傳導使其不斷地不正常增生，跳脫細胞凋亡並誘發細胞周圍血管增生以提供足夠的養分，當養分不足時，癌細胞便開始進行轉移，此時癌細胞較為惡化。癌細胞進行轉移的機制可能與 Myc、Ras 和 p53 這類基因有關，可能是這些基因發生突變造成功能失調，例如 Myc 發生突變使得 Bcl-XL 大量表現，因而造成癌細胞具有抗凋亡的能力[9]。

惡性腫瘤細胞要破壞基底膜時，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 和 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[10]。另有文獻指出，在人類乳癌細胞中 PI3-kinase 可增加 nuclear factor kappa B(NF- κ B)的轉錄活性來促進 MMPs 的活化，進而影響細胞的移動能力 [11]。

上皮間質轉換(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)是指腫瘤在各種因素下導致上皮細胞具有高侵襲以及轉移能力的間質細胞型態過程。EMT 與細胞上皮細胞 marker E-cadherin 表現量降低以及間質細胞 marker N-cadherin 表現量增加有關[12]。轉化生長因子(transforming growth factor- β , TGF- β)是 EMT 主要的誘導因子，TGF- β 活化下游 Smad2 以及 Smad3 蛋白進而促進 EMT。而除了 TGF- β /Smads pathway，另外 Wnt/ β -catenin pathway、PI3K/Akt pathway、以及 mitogen-activated protein kinases MAPK pathway 皆參與在 EMT 機制上[13]。

三、 β -mangostin

山竹果是一種盛產於南洋熱帶地區的植物，不僅可以食用，其果殼也被用來治療皮膚傷口的發炎、下痢[14]。在中國大陸以及印度地區，山竹果一直作為藥用以及保健等用途。將山竹果殼剪碎後經處理可以萃取出大量及多種的氧雜蒽酮(Xanthone)類的化合物。氧雜蒽酮是一類具生物活性的天然化合物，具有許多生物活性性質，像是超強力的抗氧化能力，這種抗氧化能力有助於維持腸道健康、增強免疫能力、幫助抵抗自由基，修復維持軟骨和關節機能，並能夠改善呼吸系統。過去研究已經發現山竹果有超過 68 種以上的氧雜蒽酮化合物，其中 α -mangostin 的生物活性已被證實，對於人類血癌、肝癌、肺癌、乳癌以及大腸直腸癌都具有抑制生長以及促進癌細胞凋亡等作用[15, 16]。而 β -mangostin 相關研究是相當稀少，目前已知 β -mangostin 會抑制 LPS 所誘導的發炎反應，主要透過抑制 COX-2 以及 NF- κ B 蛋白的表現，進而抑制發炎因子 TNF- α 和 IL-6[17]。此外 β -mangostin 也被證實具有抑癌的效果，例如：在人類乳癌細胞中， β -mangostin 會誘導 p53 所調節細胞週期停滯以及促使細胞凋亡。研究發現 β -mangostin 具有相當好的抗發炎及抗癌特性。因此本次研究主要探討 β -mangostin 對於抑制人類肝癌細胞轉移之分子機制。

(四)研究方法及步驟

細胞解凍

將冷凍小管自液態氮桶取出，並於 37°C 水浴槽快速解凍後，將回溶的細胞加入含有培養基的離心管中。進行低速離心(1000 rpm)並移除上清液，以移除 DMSO。再加入培養基將細胞回溶打散後，再移至新的培養皿中，置於 37°C、5%CO₂ 的培養箱中生長，每 2~3 天更換培養基，待長至八分滿後進行繼代培養，觀察細胞生長及型態正常後，即可進行實驗。

細胞培養

人類肝癌細胞株 Huh7、SK-Hep-1 以及 HA22T，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。利用 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(Hyclone)培養液外加 10 % fetal bovine serum(Biological Industries)、3.7 g/L sodium bicarbonate、2mM L-glutamin、100 units/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin 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。

等待細胞貼盤長至八分滿，移除舊的培養基，再以回溫的磷酸緩衝液(phosphate balanced solution, PBS)進行 Wash，加入 1 ml 1x 的 trypsin-EDTA 作用 5-10 分鐘，輕拍 dish 促使細胞懸浮後，再加入新鮮培養基中止 trypsin-EDTA 反應，再移到無菌離心管中進行離心 1000 rpm，5 分鐘。接著去除上清液，以新鮮培養基將細胞打散均勻後，即可依照各實驗需求，計算細胞數進而種至不同培養皿中，以利實驗。

細胞存活率分析(3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay, MTT assay)

分別將細胞株計算 5 x 10⁴ 個細胞培養於 24 well (CELLSTAR®) 中。待 24 小時貼盤後，以不同濃度之 β-mangostin 處理細胞，分別於 24 和 48 小時後，依次移除培養液，隨後更換含有 10% MTT 之培養液，再放置培養箱中作用 4 小時。接著，去除上清液，再加入 1 ml 之異丙醇(isopropanol)，溶解紫色結晶，再分別取出 200 µl 至 96 ELISA 孔盤中，利用 ELISA reader 以波長 573 nm 進行讀取吸光值，由此可知相對的細胞存活率。

細胞週期分析(Flow cytometry analysis)

分別將細胞株計算 4 x 10⁵ 個細胞培養於 6 cm dish(Gene DireX) 中。待 24 小時貼盤後，以不同濃度之 β-mangostin 處理細胞 24 小時，接著收取上清液以及全數細胞，再以 1000 rpm 進行離心 5 分鐘，接著去除上清液，並以冰的 PBS 進行 wash 兩次。去除 PBS 後，再緩慢加入冰的 70% 酒精進行固定，並打散細胞，最後放置於 -20°C overnight。隨後，以 1000 rpm 進行離心五分鐘，再次以 PBS 進行 wash 兩次，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，以及避光染色 30 分鐘。隨後將細胞打散後並以 35 µm 尼龍篩網進行過濾，即可進行流式細胞儀分析。

細胞爬行試驗(Cell migration assay)

分別將細胞株計算 4 x 10⁵ 個細胞培養於 6 cm dish(Gene DireX) 中。待 24 小時貼盤後，以不同濃度之 β-mangostin 處理細胞 24 小時，接著以 1x trypsin-EDTA 收取細胞，並利用 trypan

blue assay 計數細胞數。接著利用 48well Boyden chamber 的分析方法，於 lower chamber 的每個 well 中注入 35 μ l 含有 10% FBS 培養基並覆蓋 cellulose nitrate filters，再組裝上 upper chamber。然後注入 5 \times 10⁴ 細胞數於每個 upper chamber 的 well 中，接著放置於培養箱中作用，待細胞移動 24 小時以後，取下 cellulose nitrate filters，利用 100 % 甲醇固定細胞 30 分鐘，隨後以二次水進行 Wash，再以 Giemsa 染劑(1:20)進行染色 overnight，最後固定 cellulose nitrate filters，擦拭掉其上層細胞，在 400 倍光學顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野進行拍照，再計數爬行細胞數作為移動細胞數之統計。

細胞侵襲試驗(Cell invasion assay)

分別將細胞株計算 4 x 10⁵ 個細胞培養於 6 cm dish(Gene DireX)中。待 24 小時貼盤後，以不同濃度之 β -mangostin 處理細胞 24 小時，接著以 1x trypsin-EDTA 收取細胞，並利用 trypan blue assay 計數細胞數。接著利用 48well Boyden chamber 的分析方法，於 lower chamber 的每個 well 中注入 35 μ l 含有 10% FBS 培養基並覆蓋 cellulose nitrate filters，再組裝上 upper chamber，然後 coating 上 100 μ g/cm² Marix gel (0.5 mg/ml)，置於室溫下約 2 小時，待 Marix gel 凝固後注入 5 \times 10⁴ 細胞數於每個 upper chamber 的 well 中，接著放置於培養箱中作用，待細胞移動 24 小時以後，取下 cellulose nitrate filters，利用 100 % 甲醇固定細胞 30 分鐘，隨後以二次水進行 Wash，再以 Giemsa 染劑(1:20)進行染色 overnight，最後固定 cellulose nitrate filters，擦拭掉其上層細胞，在 400 倍光學顯微鏡底下每個 well 隨機選取 3 個視野進行拍照，再計數爬行細胞數作為侵襲細胞數之統計。

西方點墨法

蛋白萃取和定量

分別將細胞株計數 2 x 10⁶ 個細胞培養於 10 cm dish (GeneDireX)中。待 24 小時貼盤後，以不同濃度之 β -mangostin 處理細胞 24 小時，接著以 1x trypsin-EDTA 收取細胞收取 medium 以及全數細胞，再以 1000 rpm 進行離心 5 分鐘。接著去除上清液，再以 PBS 進行 Wash 兩次，去除上清液後加入 200-300 μ l 的 NETN protein lysis buffer(250mM NaCl、5mM EDTA, pH8.0、50mM Tris-HCl,pH8.0、0.5%NP-40)，接著利用超音波震盪移將細胞震盪破碎。將細胞液移至微量離心管進行離心，12000 rpm/ 30 分鐘。取上清液即為蛋白質液。

利用 Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 進行蛋白定量。首先將標準品 BSA 進行稀釋成 12.8、9.6、6.4、3.2、0 mg/ml。分別將標準品以及待測樣品，分別加入微量離心管中，再加入 Protein Assay Dye 200 μ l，使總體積為 1000 ml。再將標準品及待測樣品以 562 nm 波長下之 ELISA reader 讀取吸光值。畫出標準曲線，推算出樣品蛋白濃度。

樣品配製

取蛋白量 40 μg 至微量離心管中，其餘補 ddH₂O 至固定體積後，再加入 5X loading dye，混合均勻後置於加熱器 100°C，10 分鐘進行 Denature。加熱後將蛋白檢體置於冰上(0-4°C)10 分鐘，再以低速離心機 3000 rpm 進行離心 5 分鐘即可。

架膠

將電泳玻璃洗淨後，並以拭淨紙擦拭乾淨，再組裝於電泳座上固定。下層膠為 separating gel：若要分析大分子量蛋白，需配製 6-10% 膠體；若要分析小分子量蛋白，則需配製 12-15% 膠體。配下層膠時將所需物質(30% acrylamide、1.5 M tris pH8.8、10% SDS、10% APS 以及 TEMED)混合均勻後注入玻璃片中至固定高度，再加入 isopropanol 或 ddH₂O 壓平下膠介面。待下層膠凝固後，去除 isopropanol 或 ddH₂O 後，隨後配製上層膠 stacking gel (30% acrylamide、1.5M tris pH6.8、10% SDS、10% APS 以及 TEMED)注入玻璃片中，並插入齒梳。待上層膠凝固後，拔除齒梳，並以 ddH₂O 將 well 中殘留膠體去除。

SDS-PAGE running

將電泳膠架好後放入電泳槽中，再倒入電泳液(running buffer)至覆蓋整個玻璃。將處理好的蛋白檢體注入每個 well 中，其中一個 well 則加入 protein standard marker 中。連接電泳槽及電源供應器，先以電壓 80V 使蛋白檢體焦集，待蛋白通過上下層膠介面後，即可以電壓 100V 直至所要觀察的目標蛋白分子量分開，才停止電泳。

蛋白轉漬(electrotransfer)

進行轉漬之前，需將濾紙以及轉漬膜(PVDF membrane)浸漬於甲醇中進行活化。接著將膠體自電泳座取下後，放置於上述兩張濾紙上，膠體上再放置 PVDF membrane，再放置兩張濾紙後，利用玻棒趕走各層中的氣泡。接著在最外層分別以海棉片包覆，再次利用玻棒趕走氣泡，最後利用轉漬夾板夾緊後，放入轉漬槽中並維持環境於 4°C 中，連接電源供應器後即可以固定電壓 100V，再依目標蛋白大小進行轉漬 1-2 小時。

免疫墨點法(immuoblot)

將轉漬完的 PVDF membrane 取出後，以 5% blocking buffer 於 4°C 下作用 1 小時。隨後將 blocking buffer 倒掉後，再以 TBS-tween 進行 wash 三次，每次 10 分鐘。加入目標蛋白之一級抗體，均勻覆蓋 PVDF membrane 後於 4°C 下作用 overnight。隨著再以 TBS-tween 進行 wash 三次，每次 10 分鐘，接著換上相對應二級抗體，於室溫下輕輕搖晃反應 1 小時，再以 TBS-tween 進行 wash 三次，每次 10 分鐘。最後利用 ECL 呈色劑，以冷光儀偵測並拍照定量。

si-RNA transfection

siRNA 能與目標 mRNA 的序列完全互補後，對特定的、單一的 mRNA 有作用。因此可合成特定的 siRNA 使特定基因沈默，而探究單一基因的功能或轉譯作用，我們利用化學合成出 siRNA，可直接得到高純度的 siRNA，但 siRNA 的缺點為基因沉默時效較短，大約 3 ~ 7 天無法在細胞中做長效 RNAi 抑制，因此細胞處理 siRNA 後便直接加藥觀察其藥物對於單一基因影響情形為何。第一日將細胞 Huh-7 細胞至於 6cm dish 約六成滿度，並培養於無抗生素的培養液中。隔日製備轉染液將 A 液:50 pmol of Stealth™ RNAi 融於 50 μ l of Opti-MEM 的培養液，之後 B 液:mix Lipofectamine™ 2000 於 Opti-MEM 均勻後放置 15 分鐘，將 A 與 B 液混合均勻後，加入細胞培養盤中，37 °C 培養 16-24 小時後，去除舊的細胞培養液，再加入含有藥物的培養液處理 24 小時。

統計分析

數據以 means \pm SD 表示。以 SPSS10.0 來評估統計差異。*為 $p < 0.05$ 表示顯著差異，**為 $p < 0.01$ 表示極顯著差異。

(五)實驗結果與討論

(一) 探討 β -mangostin 對於人類肝癌細胞存活以及細胞週期分布。

首先觀察 β -mangostin 對於肝癌細胞的細胞毒性，我們採用三株肝癌細胞株(SK-Hep-1、Huh7 和 HA22T/VGH)來進行研究。首先將 2×10^4 肝癌細胞培養在 24 well 的培養皿中，等待隔天細胞貼盤後，以不同 β -mangostin 濃度(0、2.5、5、7.5 和 10 μ M)做處理，分別作用 24 和 48 小時，再以 MTT 方法來觀察 β -mangostin 對於細胞的毒性。實驗結果發現，實驗所採用的三株肝癌細胞在 β -mangostin 濃度 0、2.5、5、7.5、10 μ M，處理 24 小時和 48 小時未觀察到影響肝癌細胞的生長(Fig. 1)，顯示隨著 β -mangostin 濃度增加，並不影響肝癌細胞的生長及存活率。

本實驗進一步證實 β -mangostin 是否會影響人類肝癌細胞週期。於是我們採用與上述實驗相同的三株人類肝癌細胞株(SK-Hep-1、Huh7 和 HA22T/VGH)，並以流式細胞儀分析細胞週期的變化。本實驗利用 β -mangostin 處理不同濃度 0、2.5、5、7.5 和 10 μ M 處理三株細胞株

的細胞週期 24 小時後進行觀察。結果顯示出隨著 β -mangostin 濃度提高，細胞週期分佈並無太大差異(Fig. 2)，因此可知 β -mangostin 隨著濃度增加也不會影響肝癌細胞的細胞週期。

(二) 探討 β -mangostin 對於人類肝癌細胞移動和侵襲的影響

先前實驗顯示 β -mangostin 本身並不會影響肝癌細胞的存活率及細胞週期，接下來本實驗想要了解 β -mangostin 是否會影響人類肝癌細胞的移動與侵襲。首先把三株人類肝癌細胞株 (SK-Hep-1、Huh7、HA22T/VGH) 以 β -mangostin 不同濃度(0、2.5、5、7.5 和 10 μ M) 做處理，24 小時之後以 chamber motility assay 觀察 SK-Hep-1、Huh7、HA22T/VGH 的移動能力，實驗結果發現加入 β -mangostin 的細胞株移動能力受到抑制，且隨著 β -mangostin 濃度越高，細胞移動的程度越少(Fig3A、3B、3C)。同樣以 Chamber materigel assay 處理不同 β -mangostin 濃度(0、2.5、5、7.5 和 10 μ M) 來觀察 SK-Hep-1、Huh7、HA22T/VGH 的細胞侵襲能力是否改變，實驗結果發現加入 β -mangostin 的細胞侵襲狀況也相同受到抑制，且隨著 β -mangostin 的濃度越高，細胞轉移的能力越低(Fig3A、3B、3C)。

(三) 探討 β -mangostin 抑制人類肝癌細胞移動與侵襲的能力是否與影響 MMP2 和 MMP9 蛋白質的表現有關

由於上述實驗顯示了 β -mangostin 可以降低人類肝癌細胞的移動和侵襲，因此我們想進一步了解是否和 β -mangostin 影響了 MMP2 和 MMP9 的表現有關。我們採用西方墨點法來觀察 β -mangostin 對於 MMP2 和 MMP9 的表現是否有影響。實驗結果發現 β -mangostin 會抑制 MMP2 和 MMP9 的表現，且 β -mangostin 的濃度越高，明顯抑制 MMP2 和 MMP9 的蛋白表現(Fig.4A、4B)。

(四) 探討 β -mangostin 抑制人類肝癌細胞移動與侵襲的能力是否與影響 MAPK 路徑之蛋白表現有關

目前已有許多文獻指出 MAPK 路徑與腫瘤細胞的移動和侵襲有關，因此本實驗想要了解 β -mangostin 抑制 SK-Hep-1 和 Huh7 移動與侵襲是否也和 MAPK 路徑相關。首先先將

Huh7 和 SK-Hep-1 兩株細胞培養在 6 公分的培養皿中，隔天細胞貼盤後，再分別處理不同濃度(0、2.5、5、7.5 和 10 μ M)的 β -mangostin 24 小時，接著取出細胞的全蛋白液以西方墨點法來觀察 MAPK 相關蛋白的表現。實驗結果顯示，實驗所使用的 Huh7 和 SK-Hep-1 兩株肝癌細胞，JNK 和 ERK 磷酸化的現象增加，且隨著 β -mangostin 濃度增加，JNK 和 ERK 磷酸化的蛋白表現越多，但是 p38 的磷酸化表現沒有變化(Fig. 5A、5B)，因此推測 β -mangostin 主要是透過誘導 JNK 和 ERK 磷酸化來抑制肝癌細胞的移動與侵襲。

(五) β -Mangostin 抑制肝癌細胞移動與侵襲的能力是透過促進 ERK 磷酸化的途徑

上述實驗證實 β -Mangostin 會誘導 ERK 的磷酸化表現來抑制肝癌細胞移動與侵襲，因此本實驗想要進一步確定 β -Mangostin 減少肝癌細胞移動與侵襲與 ERK 此路徑間的關係。首先先將 Huh7 細胞培養在 6 公分的培養皿中，隔天細胞 8 分滿時，再加入 ERK 抑制劑 PD98059(20 μ M)，處理 2 小時後再加入 β -mangostin(7.5 μ M)處理 24 小時。透過 Chamber motility assay 和 Chamber materigel assay 來觀察細胞的移動和侵襲。實驗結果發現加入 β -mangostin 不管是轉移的細胞數量的結果，都看到細胞的侵襲減少，但是預先加入 p-ERK 抑制劑 PD98059 組別發現卻細胞轉移的現象增加(Fig6A)，因此可以知道 β -mangostin 可能透過促進 ERK 的磷酸化表現來抑制肝癌細胞移動與侵襲，一旦 ERK 被抑制，便會影響 β -mangostin 抑制肝癌細胞侵襲的效果。另一方面本實驗再利用 siRNA 來抑制內源性 ERK 的表現，實驗結果發現和加入 ERK 磷酸化抑制劑 PD98059 一樣，降低了 β -mangostin 抑制細胞轉移的現象(Fig6B)。因此進一步證實 β -mangostin 的確透過促進 ERK 的磷酸化表現來抑制肝癌細胞移動與侵襲，一旦 ERK 被抑制，便會影響 β -mangostin 抑制肝癌細胞侵襲的效果。最後採用西方墨點法分別去觀察 Huh7 加入 β -mangostin、ERK 抑制劑 PD98059 和利用 siRNA 來抑制內源性 ERK 的表現，MMP2 和 MMP9 的蛋白表現是否有變化，實驗結果發現 β -mangostin 促進 ERK 的磷酸化，但加入 ERK 抑制劑 PD98059 或利用 siRNA 來抑制內源性 ERK 的表現後，ERK 磷酸化表現減少，且 MMP2 和 MMP9 蛋白表現量相較於只有加入 β -Mangostin 組則有回復情形(Fig6C、6D)。

(六) β -mangostin 抑制肝癌細胞移動與侵襲的能力是透過促進 JNK 磷酸化的途徑

Fig.5 實驗結果也證實 β -mangostin 誘導 JNK 的磷酸化表現來抑制肝癌細胞移動與侵襲，Fig.6 的實驗也證實了 ERK 和肝癌細胞的轉移與侵襲間的相關性，因此本實驗最後想進一步確定 β -mangostin 減少肝癌細胞移動與侵襲與 JNK 間的關係。首先先將 Huh7 細胞培養在 6 公分的培養皿中，隔天細胞 8 分滿時，再加入 JNK 抑制劑 JNKII (20 μ M)，處理 2 小時後再加入 β -mangostin(7.5 μ M)處理 24 小時。透過 Chamber motility assay 和 Chamber materigel assay 來觀察細胞的移動和侵襲。實驗結果發現加入 β -mangostin 不管是細胞組織學染色或細胞數量的結果，都看到細胞的侵襲減少，但是加入 JNK 抑制劑 JNKII 後卻又使細胞轉移的現象增加(Fig.7A)。因此可以知道 β -mangostin 可能透過促進 JNK 的磷酸化表現來抑制肝癌細胞移動與侵襲。另外，我們利用 siRNA 抑制細胞內生性 JNK，實驗結果發現，抑制內生性 JNK 蛋白表現會回復 β -mangostin 所抑制細胞侵襲的現象(Fig.7B)。最後採用西方墨點法分別去觀察 Huh7 加入 JNKII 和利用 siRNA 來抑制內源性 JNK 的表現，MMP2 和 MMP9 的蛋白表現是否有變化，實驗結果發現 β -mangostin 促進 JNK 的磷酸化，但加入 JNK 抑制劑 JNKII 或利用 siRNA 來抑制內源性 ERK 的表現後，JNK 磷酸化表現減少，且 MMP2 和 MMP9 蛋白表現量相較於只有加入 β -mangostin 組別有回復情形(Fig7C、7D)。因此可以知道 β -mangostin 除了誘導 ERK 的活化，同時也可以透過促進 JNK 的磷酸化表現來抑制肝癌細胞移動與侵襲，一旦 JNK 被抑制，便會影響 β -Mangostin 抑制肝癌細胞侵襲的效果。

(七)結果圖

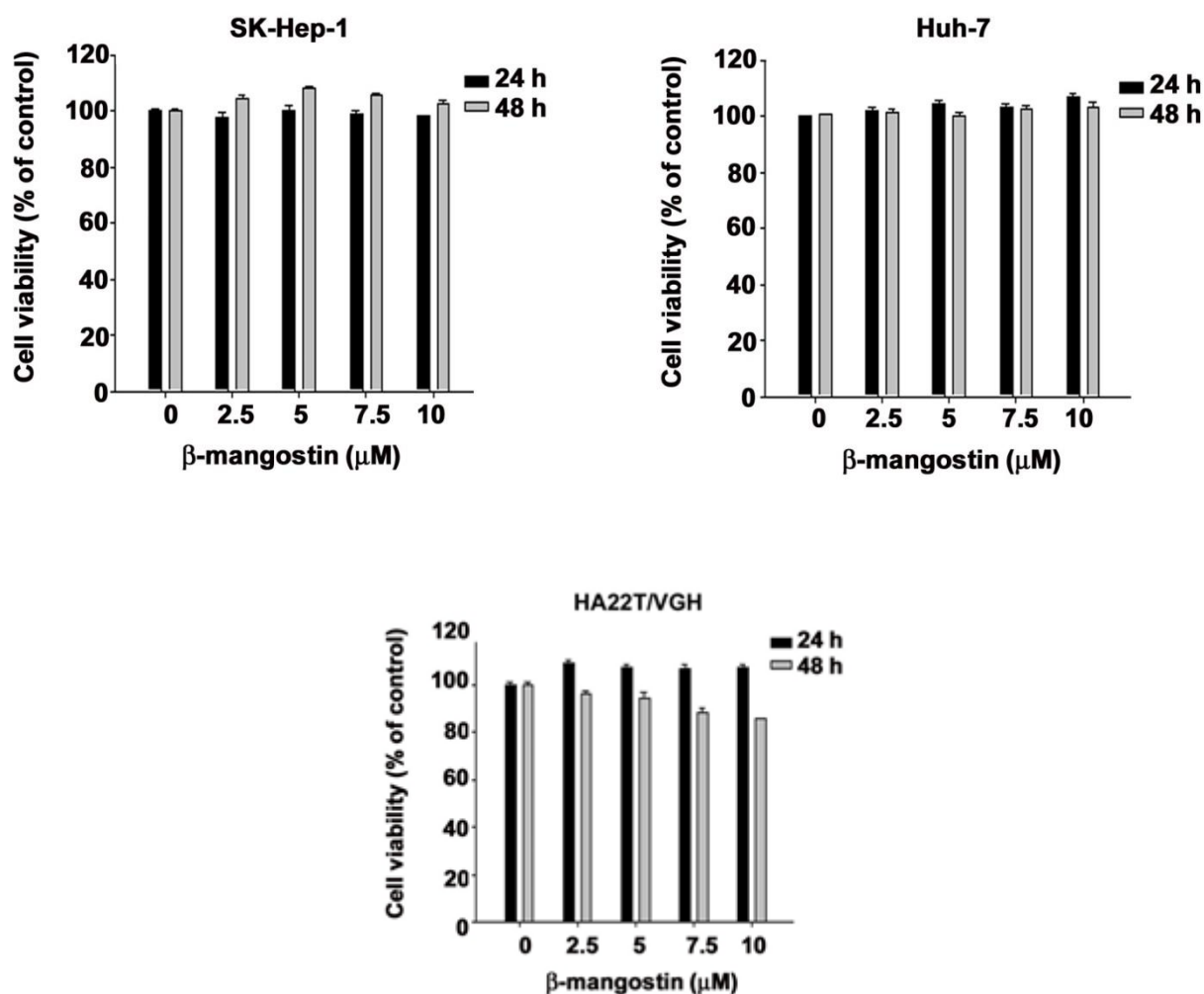


Fig 1. Effect of β-mangostin on the cell viability of human HCC cancer cell(SK-Hep-1 · Huh-7 and HA22T/VGH). These cells were treated with different concentrations of β-mangostin (0, 2.5, 5, 7.5, and 10 μM) for 24 and 48 hrs respectively. Cell viability was determined by the MTT assay. The results were expressed the percentages of cell viability. Data were represented mean±SE of three independent experiments performed in triplicate.

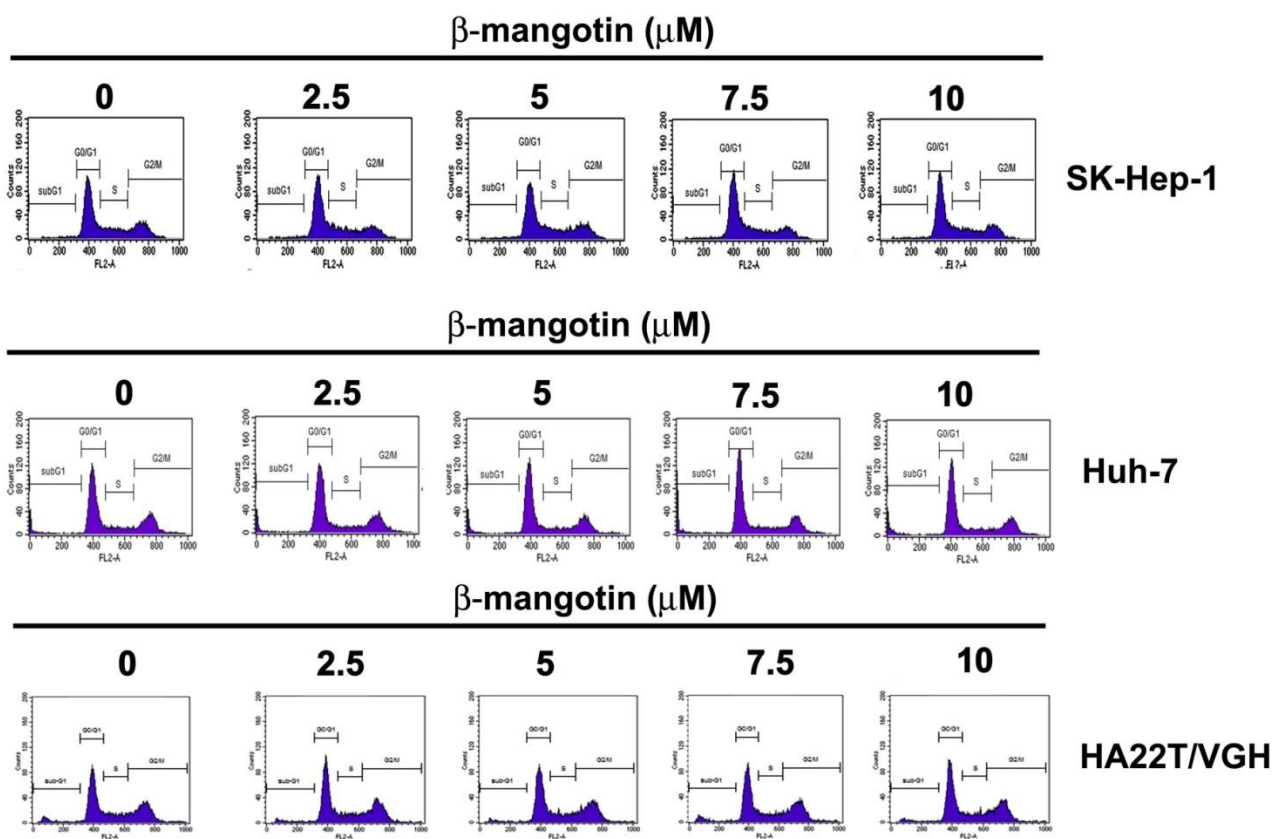


Fig2. Effect of Effect of β -mangostin on the cell cycle of human HCC cancer cell (SK-Hep-1 , Huh-7 and HA22T/VGH). These cells were treated with different concentrations of β -mangostin (0, 2.5, 5, 7.5, and 10 μ M) for 24 hrs respectively. Cell cycle status as determined by flow cytometry. The DNA content was analyzed using flow cytometry. The position of the sub-G1 peak (hypodiploidy) integrated by apoptotic cells, and the G0/G1, S, and G2/M peaks are indicated. The results were expressed the change of cell cycle.

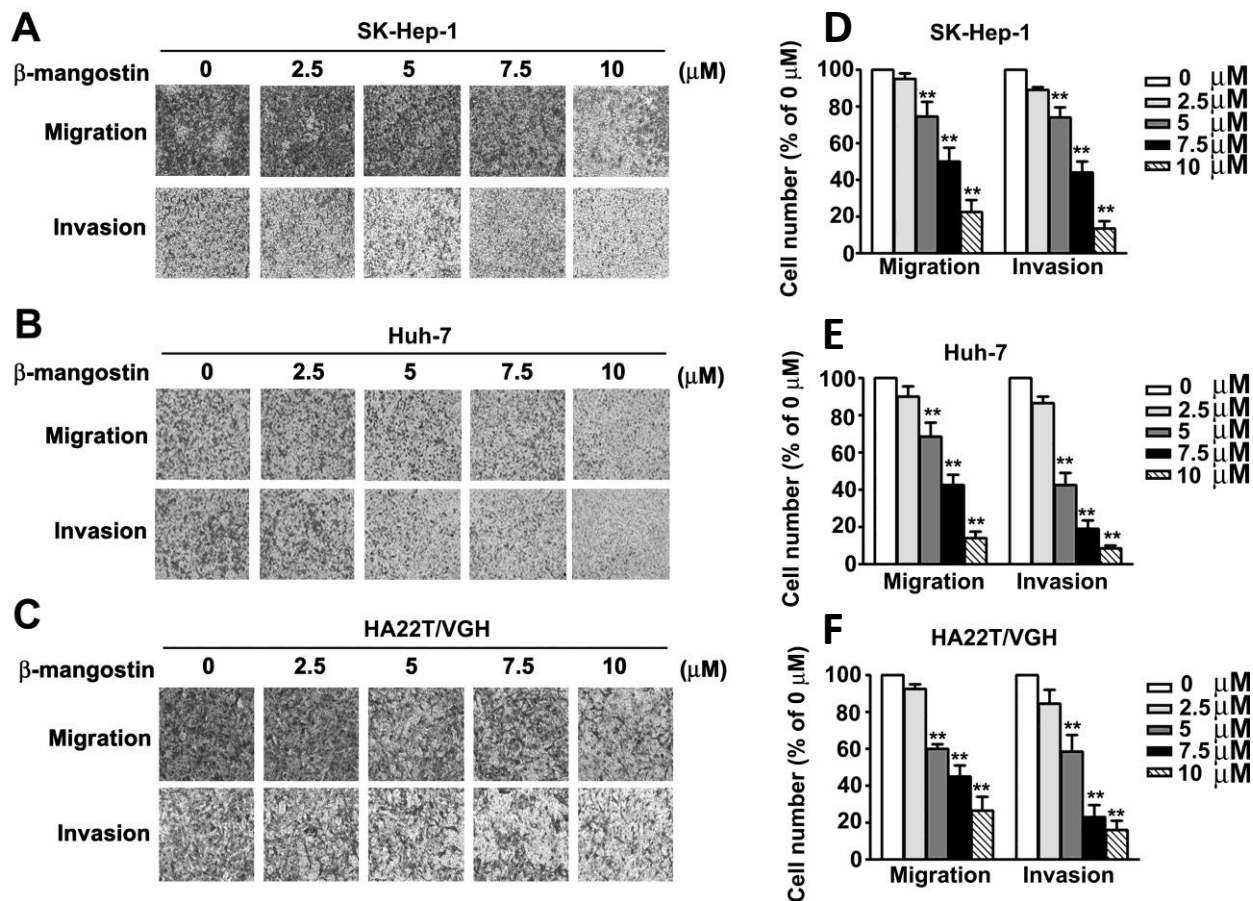


Fig3. Effect of β -mangostin on the migration and invasion of human HCC cancer cell(SK-Hep-1、Huh-7 and HA22T/VGH). These cells were treated with different concentrations of β -mangostin (0, 2.5, 5, 7.5, and 10 μ M) for 24 hrs. The phenomenon of cell migration and invasion as determined by Chamber motility assay and Chamber materigel assay. Data were represented mean \pm SE of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

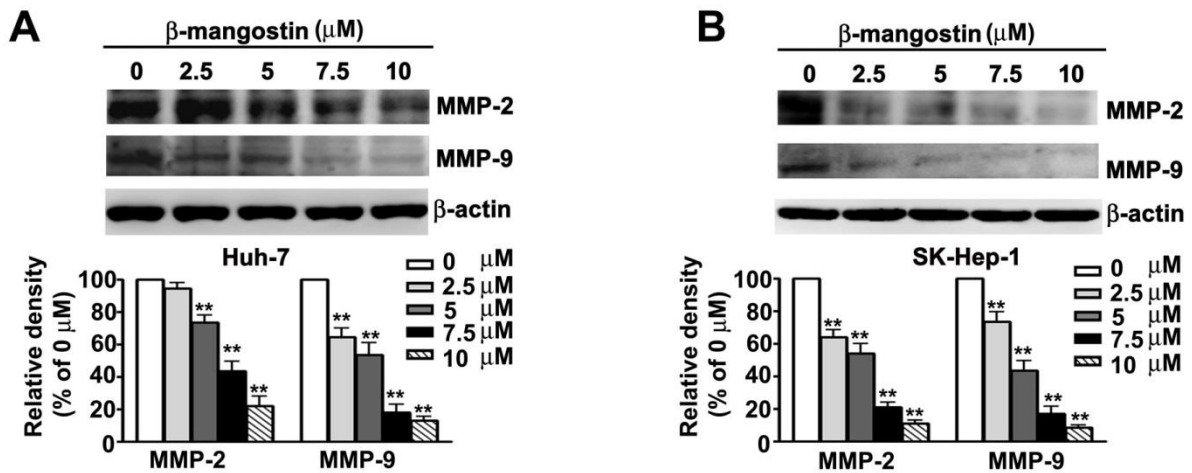


Fig4. Effect of β -mangostin on MMP2 and MMP9 expression of human HCC cancer cell(SK-Hep-1 and Huh-7). Huh-7(A) and SK-Hep-1(B) were treated with different concentrations of β -mangostin (0, 2.5, 5, 7.5, and 10 μ M) for 24 hrs. The protein levels of MMP2 and MMP9 from whole-cell lysates was analyzed by Western blotting. β -actin was used as the loading control. It was determined the protein expressions of MMP2 and MMP9 were subsequently quantified by densitometric analysis. Data were represented mean \pm SE of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

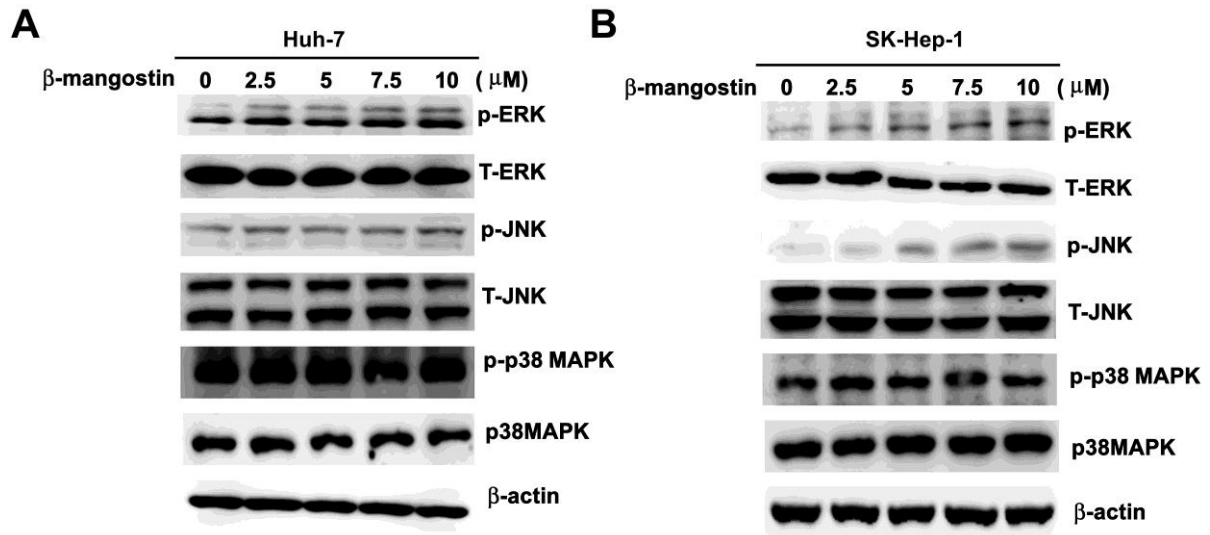


Fig5. Effect of β -mangostin on MAPKs pathway of human HCC cancer cell(SK-Hep-1 and Huh-7). Huh-7(A) and SK-Hep-1(B) were treated with different concentrations of β -mangostin (0, 2.5, 5, 7.5, and 10 μ M) for 24 hrs. The protein levels of p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38 and p38 from whole-cell lysates was analyzed by Western blotting. β -actin was used as the loading control.

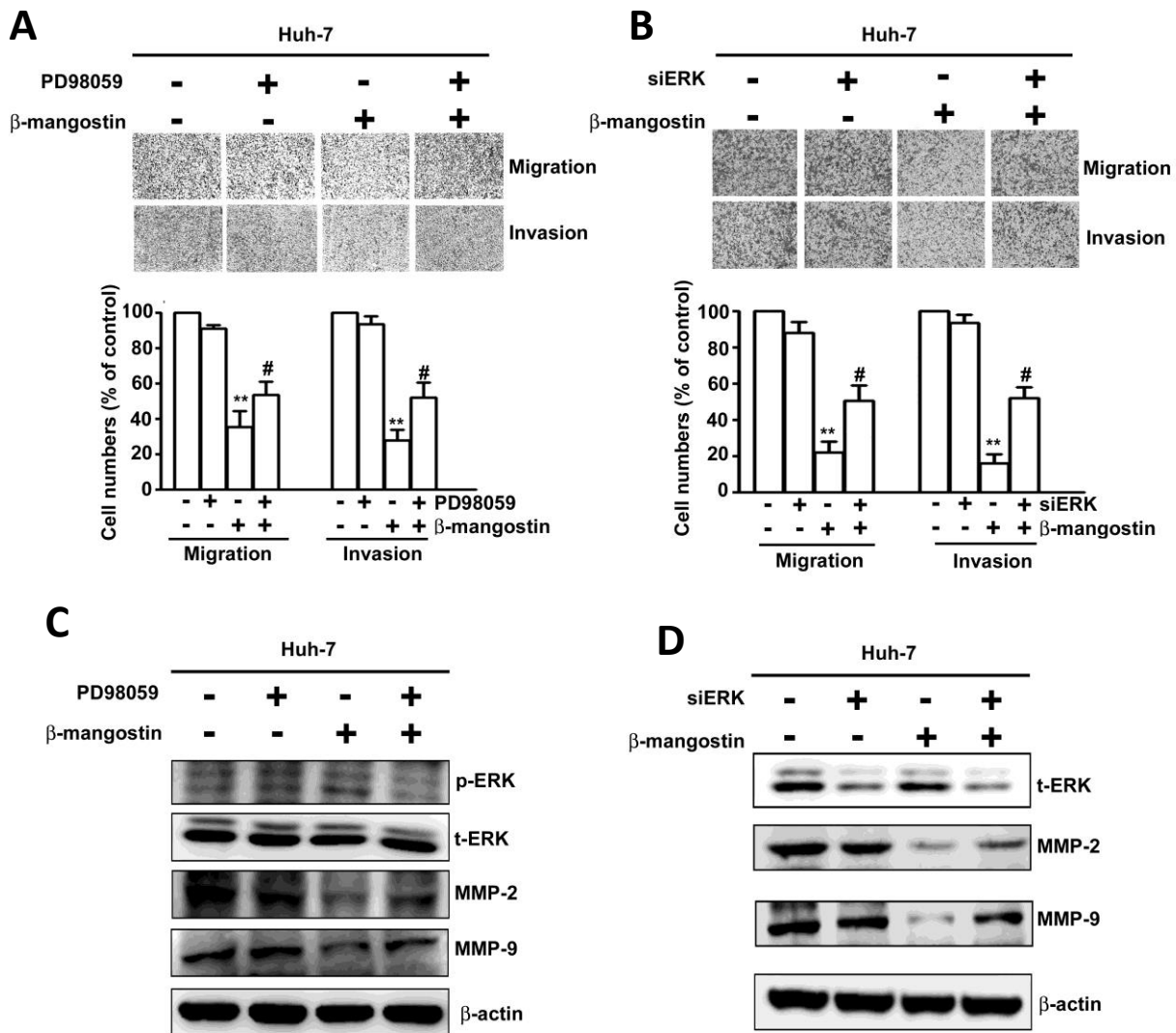


Fig 6. Effect of ERK inhibitor(PD98059)/si-ERK and β -mangostin on migration and invasion of human HCC cancer cell. (A)(B)Huh-7 was plated in 6 cm and pre-treated with PD98059(20 μ M) for 2hrs or si-ERK transfection for 24 hrs respectively. The cells were incubated in the presence or absence of β -mangostin (7.5 μ M). The phenomenon of the cells migration and invasion were determined by chamber migration assay. (C)(D)The expression of p-ERK, ERK, MMP2 and MMP9 were expressed followed by western blot. β -actin was used as loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.# $p < 0.05$ compared with the group of β -Mangostin only.

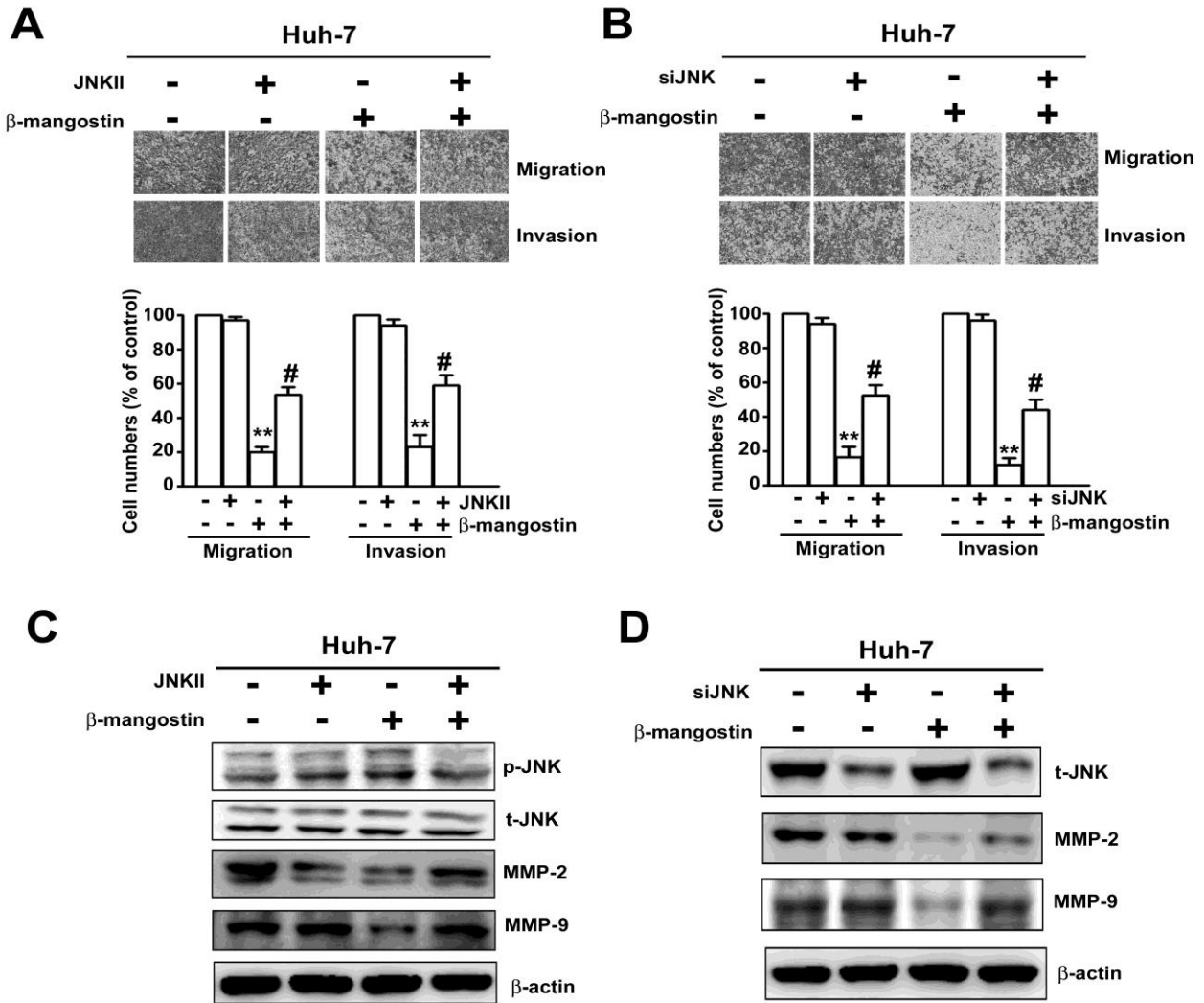


Fig 7. Effect of JNK inhibitor(JNKII)/si-JNK and β -mangostin on migration and invasion of human HCC cancer cell. (A)(B)Huh-7 was plated in 6 cm and pre-treated with JNKII (20 μ M) for 2hrs or si-JNK transfection for 24 hrs respectively. The cells were incubated in the presence or absence of β -mangostin (7.5 μ M). The phenomenon of the cells migration and invasion were determined by chamber migration assay. (C)(D)The expression of p-JNK, JNK, MMP2 and MMP9 were expressed followed by western blot. β -actin was used as loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.# $p < 0.05$ compared with the group of β -mangostin only.

(八) 參考文獻

1. Ng, I.O., et al., *Better survival in female patients with hepatocellular carcinoma. Possible causes from a pathologic approach.* Cancer, 1995. **75**(1): p. 18-22.
2. Wang, C.H., et al., *Current trends and recent advances in diagnosis, therapy, and prevention of hepatocellular carcinoma.* Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(9): p. 3595-604.
3. Morgan, T.R., S. Mandayam, and M.M. Jamal, *Alcohol and hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S87-96.
4. Okita, K., *Clinical aspects of hepatocellular carcinoma in Japan.* Intern Med, 2006. **45**(5): p. 229-33.
5. Miyazaki, T., et al., *Sodium alginate prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and liver carcinogenesis in obese and diabetic mice.* Oncotarget, 2016.
6. Niu, J., et al., *The Epidemiological Investigation on the Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma: A Case-Control Study in Southeast China.* Medicine (Baltimore), 2016. **95**(6): p. e2758.
7. Li, K.Y., L.X. Liu, and D.L. Yin, *[Progress in surgical treatment of hepatocellular carcinoma].* Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2016. **54**(2): p. 148-152.
8. Fumarola, C. and G.G. Guidotti, *Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death.* Apoptosis, 2004. **9**(1): p. 77-82.
9. Overall, C.M. and C. Lopez-Otin, *Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 657-72.
10. Conner, E.A., et al., *HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1.* Carcinogenesis, 1999. **20**(4): p. 583-90.
11. Zeng, W., et al., *CCL20/CCR6 promotes the invasion and migration of thyroid cancer cells via NF-kappa B signaling-induced MMP-3 production.* Exp Mol Pathol, 2014. **97**(1): p. 184-90.
12. Przybylo, J.A. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition: tumor progression at Snail's pace.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(6): p. 1082-8.
13. Foroni, C., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact.* Cancer Treat Rev, 2012. **38**(6): p. 689-97.
14. Kosem, N., et al., *In vivo toxicity and antitumor activity of mangosteen extract.* J Nat Med, 2013. **67**(2): p. 255-63.
15. Chitchumroonchokchai, C., et al., *Xanthones in mangosteen juice are absorbed and partially conjugated by healthy adults.* J Nutr, 2012. **142**(4): p. 675-80.
16. Zhao, Y., et al., *A new antioxidant xanthone from the pericarp of Garcinia mangostana Linn.* Nat Prod Res, 2010. **24**(17): p. 1664-70.
17. Syam, S., et al., *beta Mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages in vitro and carrageenan-induced peritonitis in vivo.* J Ethnopharmacol, 2014. **153**(2): p. 435-45.