

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 探討  $\alpha$ -mangostin 抑制人類腎癌細胞轉移之分子機制  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 王文謙  
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-042-B  
研究期間： 106年07月01日至107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 107年03月29日

## (一) 摘要

腎臟癌在歐美國家相較之下有較高的流行率，而近年來台灣的腎癌患者也連年增加，增加幅度相較於其他癌症都高。另外現代社會不健康的生活習慣，導致好發於中年男子的腎癌而有年輕化的趨勢。腎細胞癌因其轉移速度快，對於化學治療與放射治療的感受性差，往往造成病人預後不佳，另標靶藥物則有藥效與價格高昂等問題，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。果后山竹果中因富含氧雜蒽酮，過去許多研究顯示出具有抗氧化及抗腫瘤的特性，而其衍生物  $\alpha$ -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。然而  $\alpha$ -mangostin 對於腎癌細胞的轉移相關機轉仍然不清楚，因此本計畫將探討  $\alpha$ -mangostin 抑制人類腎癌細胞轉移並深入探討其相關作用機轉。因此，為了釐清藥物  $\alpha$ -mangostin 是否有抑制腎癌細胞轉移的能力，首先我們利用 MTT 試驗證實  $\alpha$ -mangostin 在小於 12  $\mu$ M 的濃度下對於人類腎癌 Caki-1 和 ACHN 細胞株皆不影響細胞生長。接著，我們利用細胞移動及侵襲試驗證明隨著  $\alpha$ -mangostin 濃度增加，會明顯抑制 A498 細胞的侵襲與轉移的能力。接著經由西方點墨法，我們初步得知  $\alpha$ -mangostin 會抑制細胞 MMP-9 的表現但不影響 MMP-2 蛋白表現。另外，我們分析 MAPK 相關蛋白發現  $\alpha$ -mangostin 會抑制 MEK-1 及其下游 ERK1/2 磷酸化，由此推斷  $\alpha$ -mangostin 是透過調控 ERK1/2 磷酸化表現來抑制腎癌細胞轉移。接下來的實驗我們透過 MEK1 磷酸化抑制劑(U0126)處理下，會加成抑制  $\alpha$ -mangostin 所抑制的細胞轉移現象，並影響下游 MMP-9 蛋白的表現。最後，我們從 miRNA database 和 TargetScan 網路搜尋中發現 microRNA-133b 會結合上 MMP-9 的 3'-非轉譯區域(3'-UTR)，進而抑制 MMP-9 蛋白表現。因此我們利用 Real-time PCR 結果也發現， $\alpha$ -mangostin 會誘導 A-498 以及 786-O 細胞中 microRNA-133b 表現，顯示 microRNA-133b 確實會參與在  $\alpha$ -mangostin 所抑制的癌細胞轉移當中。綜合以上結果， $\alpha$ -mangostin 會抑制 RCC 細胞的轉移能力，希望未來  $\alpha$ -mangostin 將成為臨床人類腎臟癌一個新穎治療藥物，期許未來能有重要的臨床應用。

## (二) 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，即國人確診罹癌病患越來越多。2007 年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達到五百二十二人，顯示出腎癌是低發生率但高死亡率的癌症。日前，USFDA 至今核准用以治療晚期腎細胞癌之標靶藥物達七種之多，分別為酪氨酸激酶抑制劑、mTOR 抑制劑以及 anti-VEGF 抗體的

使用，但因治療效果差，導致腎臟癌病人預後不佳。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，山竹果萃取物中的氧雜蒽酮衍生物已有許多研究，衍生物中的  $\alpha$ -mangostin 更是已經被證實具有抑制肝癌、前列腺癌以及大腸直腸癌細胞生長(Carcinogenesis, 2012)並誘導癌細胞細胞凋亡的效果，顯示出氧雜蒽酮衍生物  $\alpha$ -mangostin 具有相當抗癌的能力。因此本計畫將探討  $\alpha$ -mangostin 作用於人類腎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、腎臟癌

##### 1. 簡介

腎癌是一種腎臟細胞病變所引發的癌症，其中，由腎臟細胞異常增殖所形成的腎細胞癌(renal cell carcinoma, RCC)，有將近 90%的發生率[1]，每年更以 2% 穩定上升。其男女患者比例為 2：1，發病高峰年齡為 50~70 歲。然而，近年來有明顯年輕化的趨勢，最年輕的病人不到 15 歲。據統計，全世界每年大約有 208500 人確認罹患腎癌[2]。由於腎臟位於後背部深處，初期病變症狀又不明顯難以發現，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，而形成傳統方法難以治療的「轉移性腎細胞癌」(Metastatic RCC, mRCC)[3]。因此對於早期發現患者五年的存活率可高達 90%，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%。目前治療腎癌病患以手術治療為主(占 76.85%)，標靶治療、緩和治療為輔(各占 7.76%、8.43%)[4]，但新增與死亡的病例卻依然有逐年攀升的情況下，很顯然的，必須有更有效的全身性治療以彌補手術治療的不足—因此研究腎細胞癌轉移機轉以及發展抑制腎癌轉移藥物已為趨勢且必然會越加重要。

##### 2. 腎臟癌危險因子

腎臟癌的發生原因至今尚未完全清楚，不過下列幾項危險因子卻已證實與腎臟癌的發生有關，雖然並非直接致病原因，但這些因子卻會讓罹病機率大幅提升。

2-1. 抽煙：腎臟癌的發生比率與吸菸量成正比，且罹病率男女性皆增加，為非吸菸者的 2~4 倍。據統計有 30%的男性與 24%的女性腎臟癌是直接由吸菸所造成的。

2-2. 環境因素及職業暴露：皮革鞣製業，包括製鞋業與皮革工人，所使用的化學藥劑、石棉、鎘，尤其男性的吸菸者更容易因此而導致腎臟癌。

2-3. 藥物濫用：經常亂服成藥者易增加腎病變機率。

2-4. 染色體異常：有家族性遺傳的 Von-Hippel-Lindou 病患，因其人類第三對染色體短臂上的腫瘤抑制基因(VHL)缺失(3p Deletion)，易合併腎細胞癌發生。

2-5. 腎疾患：腎結石、反復腎感染、自體顯性多囊腎疾病、後天囊腎的洗腎病人、腎臟移植者，都會因腎臟容易病變或免疫力不足導致腎臟癌容易發生[1]。

### 3. 腎臟癌的診斷

在診斷腎臟癌上，血液、尿液的檢查是必不可少的，尿液細胞檢查可發現有癌細胞，血液檢查有貧血、紅血球增多症、血球沉降率增高、肝功能異常[9]，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：靜脈顯影尿路攝影檢查(IVP)可顯示出腫瘤的位置、大小及腎臟型變程度；超音波檢查可測定腫瘤內容物，若為實心則需進行下腔靜脈檢查，看其是否有被癌細胞侵犯；動脈血管攝影目前只對腎動脈血管栓塞有用，對於侵犯範圍過大而無法手術的腫瘤，僅能用於控制腎臟出血；針穿刺檢查則因有針孔轉移腎臟癌細胞的風險而較少被採用[5]。

### 4. 腎臟癌的治療

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除性局部治療方式[5]，且腎細胞癌與肝細胞癌等其他侵略性癌症相比，通常預後較為良好，30%的轉移性腎細胞癌患者平均能存活 7-11 個月。對於小於 4 公分且位置合適的腫瘤，藉由腹腔鏡與機械手臂手術輔助系統，切除部份帶腫瘤之腎臟組織以保留較多腎臟功能，且患術後復原迅速、傷口較為美觀。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[6]。

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有抗性，治療成效不佳，再加上大約又只有20%的晚期腎癌患者對干擾素(interferon- $\alpha$ )或介白素(Interleukin-2)的免疫治療有反應，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[7]。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。至於針對轉移性腎細胞癌造成的症狀，以症狀療法和緩和治療為主，例如

肺轉移造成的呼吸症狀、下腔靜脈侵犯造成的靜脈血栓和下肢水腫，以及全身或局部的疼痛控制，營養、家庭支持等。

## 二、 $\alpha$ -Mangostin

山竹果(*Garcinia mangostana* Linn)為水果之后，產自於越南、泰國、印尼等東南亞地區的熱帶雨林。可食用的雪白色楔狀假種皮有 4~8 瓣，而不可食用的深紫色果皮占了三分之二的重量，卻是當地的傳統藥物，作為防腐劑、抗發炎、抗寄生蟲、解熱、鎮痛用藥以及具有治療創傷、腹瀉及皮膚感染等功效。過去研究顯示，山竹果中含有豐富的氧雜蒽酮(Xanthone)及烯化衍生物，如  $\alpha$ -mangostin、 $\beta$ -mangostin、 $\gamma$ -mangostin，具有很強的生物活性，此類化合物具有抗發炎、抗氧化與抑制微生物生長和腫瘤細胞活性的效果[8, 9]。過去研究顯示出， $\alpha$ -mangostin 會抑制異位腫瘤移植的腫瘤生長以及誘導癌細胞週期停滯[9]。另外， $\alpha$ -mangostin 也同時被證實會誘導人類血癌細胞[10]、乳癌細胞[11]以及大腸癌細胞[12]凋亡現象。更有研究指出  $\alpha$ -mangostin 會誘導粒線體釋放內切酶 G 以及促使 miR-143 表達增加，進而活化 caspase 非依賴型的特殊細胞凋亡機制[13]。近年來， $\alpha$ -mangostin 也發現對於較惡性的腫瘤可以抑制其癌細胞的轉移機轉，例如：

### 前列腺癌

2009 年一篇台灣發表的論文，首度研究利用  $\alpha$ -mangostin 抑制人類前列腺癌 PC-3 細胞轉移的抑制機制，希望能藉此改善前列腺癌病患惡性轉移至骨髓的情況。實驗結果顯示  $\alpha$ -mangostin 是通過抑制 JNK 訊息傳遞路徑來抑制 NF- $\kappa$ B、c-Fos、c-Jun 的活性，進而減少 MMP-2、MMP-9 以及 u-PA 的表達，由此減少癌細胞對細胞外基質的降解，藉此阻止癌細胞的擴散轉移[8]。

### 乳腺癌

2011 年一篇同樣是台灣發表的論文，首度研究了  $\alpha$ -mangostin 抑制經 12-O-佛-13-乙酸酯(TPA)誘導 MMP-2 和 MMP-9 表現的人乳腺癌腺癌 MCF-7 細胞轉移的抑制機制。實驗結果顯示  $\alpha$ -mangostin 經由抑制 ERK1/2 的活性調控，來影響 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 的結合能力，以減少 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表現，藉此夠抑制由 TPA 誘導的細胞黏侵襲與轉移能力。

同年，日本一篇關於乳腺癌的論文是研究  $\alpha$ -mangostin 抗腫瘤生長及遠處轉移的活性，利用在免疫力正常的小鼠異種移植 p53 突變所導致的淋巴結轉移性乳腺癌，以模擬人類乳腺癌患者的情況。研究發現， $\alpha$ -mangostin 會誘導線粒體誘導的細胞凋亡和細胞週期 G1 期停滯；體內與體外實驗也發現  $\alpha$ -mangostin 則都會

導致磷酸化 Akt 下降而影響腫瘤生長與轉移[9]。

### 胰腺癌

2013 年與 2015 年中國各發表了一篇研究  $\alpha$ -mangostin 抑制胰腺癌的論文。

前者研究  $\alpha$ -mangostin 抑制經脂多糖誘導的胰腺癌侵襲能力，藉由抑制細胞 ERK1/2 的磷酸化來減少 MMP-2、MMP-9 的表達，同時增加 E-cadherin 的表現量[14]。後者則研究  $\alpha$ -mangostin 抑制由 ROS 所誘導的 PSC 活化和胰腺癌細胞侵襲。因缺氧會導致 ROS 產量增加，而 ROS 為 HIF-1 $\alpha$  和 GLI1 的上游，因此通過抑制 HIF-1 $\alpha$  的穩定性和 GLI1 的表達，能抑制胰腺癌細胞的侵襲[15]。

從過去文獻顯示， $\alpha$ -mangostin 確實具有抑制腫瘤細胞轉移的能力，但  $\alpha$ -mangostin 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)，一開始附著並侵襲(invasion)周邊的基底膜，經細胞外基質並遷移(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，增生形成新的病灶，稱作轉移癌。在進入血液循環時，會因靜脈壁較動脈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[16]。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[17]。

### 四、MicroRNA

MicroRNA 是一小片段的 RNA 約有 20-22 nucleotide，主要結合在 mRNA 的 3'-UTR 端，進而調控基因的表達。當 microRNA 不完全配對時，會影響基因轉譯過程，進而達到抑制基因的目的。而當完全配對，會形成雙股 RNA，這時候會被視為外來物，進而被降解。過去研究指出，調控 MicroRNA 的表現，會進一步影響癌細胞的轉移及侵襲能力[18]。Mir-30b 會透過抑制 homeobox A1 基因表

現，進而抑制食道癌細胞的轉移[19]。MiR-218 也會透過抑制 CXCR7 基因表現，進而抑制腎癌細胞的生長及轉移的現象[20]。因此，若是能夠藉由藥物去調控特定 miRNA 的表現，或許就能抑制癌症的侵襲與轉移，所以我們想更進一步的探討  $\alpha$ -mangostin 是否會藉由調控 miRNA 的表現進而抑制腎癌細胞的轉移。

#### (四) 研究方法與步驟

##### 1. 細胞培養

人類腎小管上皮細胞株 HK-2 以及人類腎癌細胞株 A498、Caki 以及 Achn，取自食品工業發展研究所菌種中心細胞庫。分別利用 F12/DMEM、MEM 或 RPMI 培養液外加 4.5g/L glucose、10 % fetal bovine serum(Biological Industries)、2.2 g/L sodium bicarbonate、100 units/mL penicillin 和 100  $\mu$ g/mL streptomycin 培養細胞於 10 cm dish 中，培養條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub>，每日將細胞置於顯微鏡下觀察，並定期更換培養液。

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

為了評估  $\alpha$ -mangostin 的細胞毒性，利用 MTT 試劑來測定。其方法為：將細胞以每  $2 \times 10^4$  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、4、8、12、16  $\mu$ M)的  $\alpha$ -mangostin，每個濃度重複三次。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)，再分別取出 200  $\mu$ l 至 96 ELISA 孔盤中，利用 ELISA reader 以波長 573 nm 進行讀取吸光值。最後，將不同濃度(0、4、8、12、16  $\mu$ M)與相對的吸光值畫成統計圖表。

##### 3. 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 中加入每孔 35  $\mu$ l 含有胎牛血清的細胞培養液，接著放置一片孔徑大小為 8  $\mu$ m 的半透膜，再加上塑膠墊、上層 chamber。在上層 chamber 中加入每孔 50  $\mu$ l 不含胎牛血清的細胞培養基以及不同濃度  $\alpha$ -mangostin 處理過 24 小時的細胞。18 小時後收集並分析受到化學趨向物而遷移到下層 chamber 的細胞數：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，用光學顯微鏡拍照並用軟體計數，可評估  $\alpha$ -mangostin 對細胞侵襲與遷移影響。在利

用 Boyden chamber 研究細胞侵襲能力，上層 chamber 中每孔需 coating 上 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Matrigel (0.5 mg/ml)，用以模擬腫瘤細胞侵襲基底膜與細胞外基質。

#### 4. 蛋白萃取及定量

要從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 NETN 以防止蛋白水解，再將細胞從培養皿上刮取下來，收入 1.5ml 微量離心管。用超音波震碎細胞後，以 13000rpm，4°C 離心 30 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(CBB)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，呈色時用分光光度計 OD 595 nm 波長的測量吸光值。先用胎牛血清白蛋白(BSA)作為一種標準蛋白質定量分析試劑，用以做出標準曲線，然後測量蛋白液，再以內插法算出其中蛋白質的含量。

#### 5. 西方墨點法

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 15 $\mu\text{l}$  置入上膠，下膠為 10%的 SDS-PAGE 凝膠，用 80V，150 分鐘的速度跑電泳。將 PVDF 膜上放入甲醇中活化，用轉印模組以 100V 將蛋白質轉印到膜上。接著利用 Block buffer(30ml 的 TBST (TBS+0.1% Tween-20) + 1.5mg 的脫脂牛奶)反應 1 小時，再用 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘，然後用適當稀釋的一級抗體在 4°C 反應 overnight。用 TBST 清洗 10 分鐘/3 次，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 10 分鐘/3 次，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，呈色出的帶的粗細深淺代表蛋白量的多寡。

#### 6. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, real-time PCR or Q-PCR)

將下列物品加入 8 連排 PCR tube 中：ddH<sub>2</sub>O、10  $\mu\text{l}$  的 2X SYBR Green polymerase buffer、0.6  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  的 forward primer 和 10  $\mu\text{M}$  的 reverse primer、1  $\mu\text{l}$  的 cDNA，使總體積 20  $\mu\text{l}$  均勻混合；置入 OneStep real-time PCR 機器中，並依照 SYBR Green 內建系統進行設定。循環溫度如下：Stage1 50°C 反應 2 分鐘；Stage2 95°C 反應 10 分；Stage3 95°C 反應 15 秒、60°C 反應 1 分，共 40 個 Cycle。最後結果輸出以進行分析。

#### 7. 統計分析

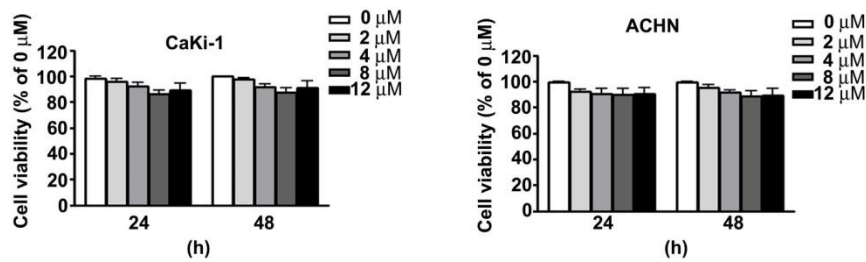


數據以 means±SD 表示。以 SPSS10.0 來評估統計差異。\*為  $p < 0.05$  表示顯著差異，\*\*為  $p < 0.01$  表示極顯著差異。

## (五) 實驗結果與討論

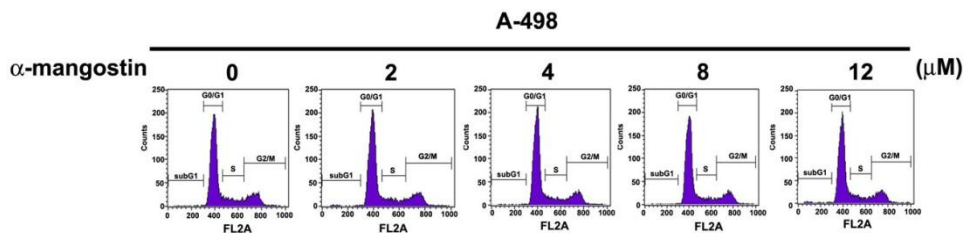
### 探討 $\alpha$ -mangostin 對於人類腎癌細胞的細胞生長

首先觀察  $\alpha$ -mangostin 對於腎癌細胞的細胞毒性，之前我們採用二株腎癌細胞株(Caki-1 和 ACHN)進行研究。首先將  $2 \times 10^4$  個腎癌細胞培養在 24 well 的培養皿中，等待隔天細胞貼盤後，以不同  $\alpha$ -mangostin 濃度(0、2、4、8 和 12  $\mu\text{M}$ ) 做處理，分別作用 24 和 48 小時，再以 MTT 方法來觀察  $\alpha$ -mangostin 對於細胞的毒性。實驗結果發現，實驗所採用的二株腎癌細胞在  $\alpha$ -mangostin 濃度 0、2、4、8 和 12  $\mu\text{M}$ ，處理 24 小時和 48 小時未觀察到  $\alpha$ -mangostin 會造成腎癌細胞的細胞毒性(Fig. 1)，顯示隨著  $\alpha$ -mangostin 濃度增加，並不影響腎癌細胞株(Caki-1 和 ACHN)細胞的存活率。



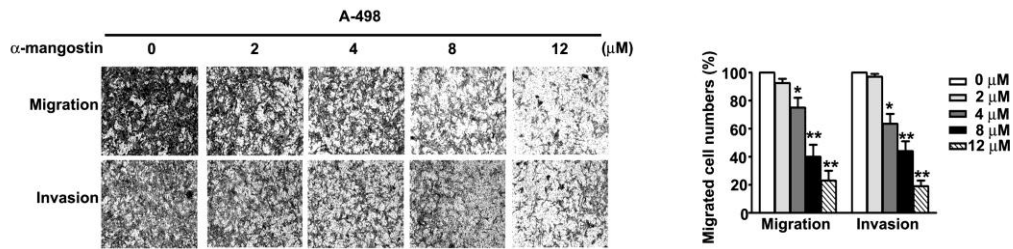
### 探討 $\alpha$ -mangostin 對於人類腎癌細胞週期分布

本實驗進一步證實  $\alpha$ -mangostin 是否會影響人類腎癌細胞週期。於是我們採用 A498 細胞株，並以流式細胞儀分析細胞週期的變化。本實驗利用  $\alpha$ -mangostin 濃度 0、2、4、8 和 12  $\mu\text{M}$  處理 A498 的細胞週期 24 小時後進行觀察。結果顯示出隨著  $\alpha$ -mangostin 濃度提高，細胞週期分佈並無太大差異(Fig. 2)，因此可知  $\alpha$ -mangostin 隨著濃度增加也不會影響 A498 細胞的細胞週期。



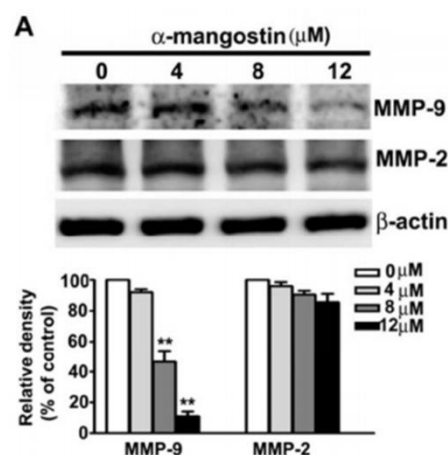
### 探討 $\alpha$ -mangostin 對於人類腎癌移動和侵襲的影響

先前實驗顯示  $\alpha$ -mangostin 本身並不會影響腎癌細胞的存活率及細胞週期，接下來本實驗想要了解  $\alpha$ -mangostin 是否會影響人類腎癌細胞的移動與侵襲。我們用不同濃度的  $\alpha$ -mangostin 處理 A-498 細胞 24 小時，然後利用 Boyden Chamber 分析細胞的遷移和侵襲。結果表明隨著  $\alpha$ -mangostin 濃度提高能顯著抑制 A498 細胞的遷移和侵襲能力。在最高濃度 12 $\mu$ M 時，抑制細胞轉移百分比約為對照組 (0 $\mu$ M) 的 20~30% (Fig.3)。



#### 探討 $\alpha$ -mangostin 對於 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表現

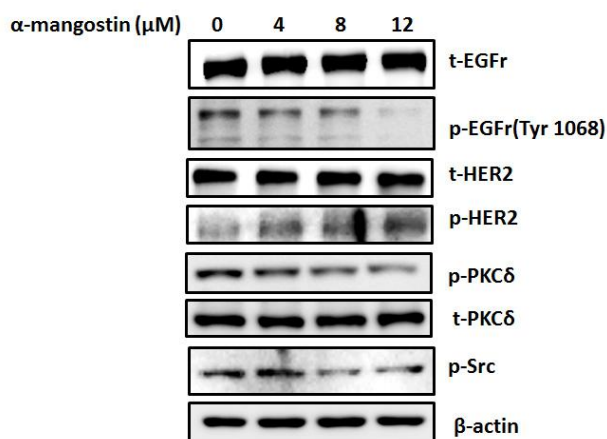
過去研究指出基質金屬蛋白水解酵素 (MMPs, matrix metalloproteinases) 及 PA (Plasminogen activator) 在癌症轉移當中扮演重要角色，其中 MMP-9、MMP-2 和 uPA 與癌症的侵襲和移動最為相關。接下來，我們利用西方點墨法測定實驗來分析 786-O 細胞中  $\alpha$ -mangostin 對 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表現影響，其結果顯示出  $\alpha$ -mangostin 會抑制 MMP-9 的表現，但  $\alpha$ -mangostin 並不影響 MMP-2 的蛋白表現 (Fig.4A)。



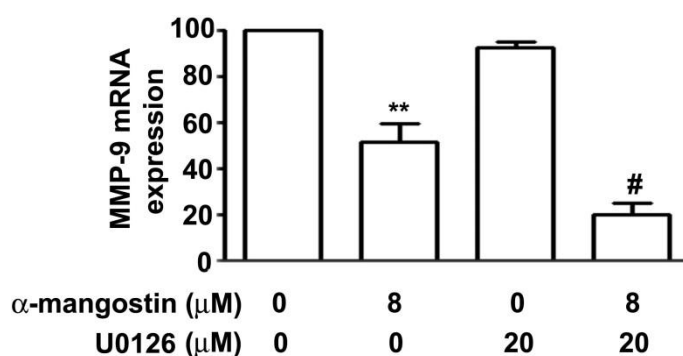
#### 探討 $\alpha$ -mangostin 對於 EGFR 家族和 PKC $\delta$ 和 Src 蛋白和的影響

目前已有許多文獻指出 EGFR 家族與腫瘤細胞的移動和侵襲有關，因此我們

利用西方點墨法探討  $\alpha$ -mangostin 是否會透過參與在 EGFR 家族和下游蛋白 (PKC $\delta$ 和 Src)進而抑制細胞轉移,從西方點墨法發現隨著  $\alpha$ -mangostin 濃度越高,發現 EGFR 磷酸化以及其下游 PKC $\delta$ /Src 磷酸化明顯受到抑制,其 p-HER2 表現增加,但是不影響 PKC $\delta$ 的表現 (Fig.5)。



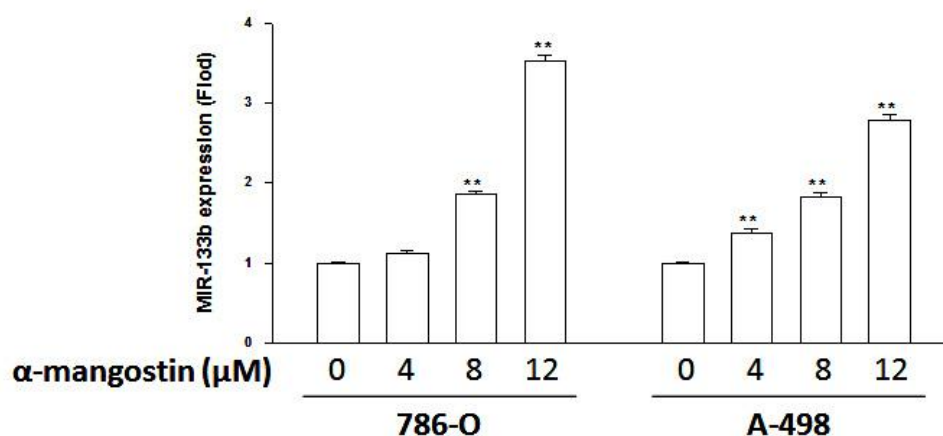
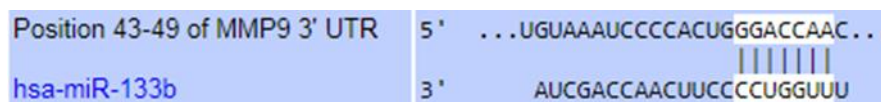
接著我們進一步研究了  $\alpha$ -mangostin 對腎癌細胞轉移和侵襲的影響是否主要透過 MEK1/2 以及 ERK1/2 途徑。U0126 是 MEK 抑制劑, qRT-PCR 結果顯示,  $\alpha$ -mangostin 和 U0126 處理綜合處理下會更加抑制 MMP-9 的 mRNA 表現 (Fig. 6B)。綜合以上結果顯示  $\alpha$ -mangostin 會透過抑制 p-MEK1/2 訊息傳遞路徑, 並且此訊息傳遞路徑在  $\alpha$ -mangostin 抑制腎癌細胞轉移中扮演關鍵的作用。



### 探討 microRNA-133b 參與 $\alpha$ -mangostin 抑制腎癌細胞轉移

過去研究指出, 調控 MicroRNA 的表現, 會進一步影響癌細胞的轉移及侵襲能力[18]。因此我們利用網路搜尋發現, 在 2014 年曾發表, 過度表現 miR-133b 在人類腎臟癌細胞中會進一步與 MMP-9 的 3'-UTR 端結合, 使 MMP-9 表現量下降, 進而抑制癌細胞的生長、轉移以及侵襲能力[21]。因此我們假設  $\alpha$ -mangostin 所抑制腎癌細胞的轉移, 是否會透過 miR-133b 的表現, 進而抑制 MMP-9 蛋白

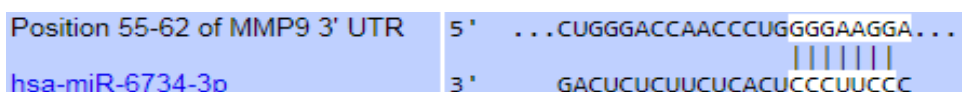
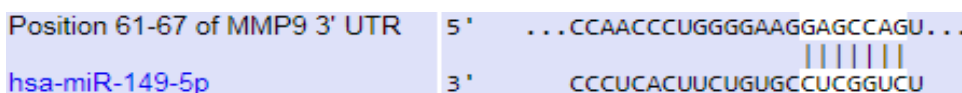
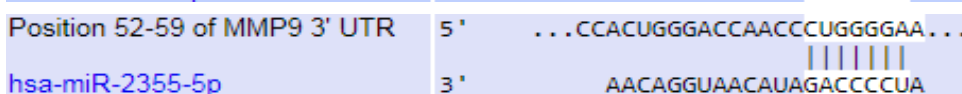
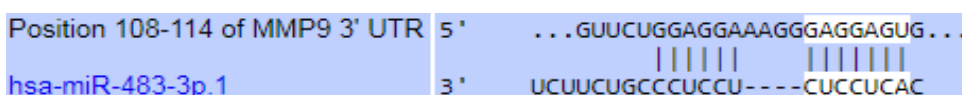
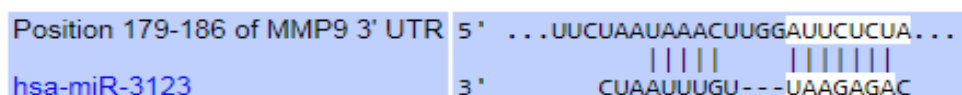
的表現。接著，我們利用 real-time PCR 進一步分析  $\alpha$ -mangostin 是否會誘導 miR-133b 的表現，從結果可以發現隨著  $\alpha$ -mangostin 濃度增加，miR-133b 的表現也隨之增加(Fig.7)。因此我們推測 miR-133b 確實會參與在  $\alpha$ -mangostin 所抑制的腎癌細胞轉移機制當中。



### 探討不同 miRNA 家族對 MMP-9 蛋白表現

我們利用 TargetScan 方式找到 miR-3123、miR-483-3p、miR-2355-5p、miR-149-5p 和 miR-6734-3p 都會 target MMP-9 3'-UTR 端，因此未來會針對這些 miRNA 進行分析了解是否受到  $\alpha$ -mangostin 調控進而抑制細胞侵襲作用。

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
<a href="#">Details</a>	1	86	<a href="#">hsa-miR-3123</a>	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<a href="#">Details</a>	2	66	<a href="#">hsa-miR-483-3p</a>	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<a href="#">Details</a>	3	64	<a href="#">hsa-miR-2355-5p</a>	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<a href="#">Details</a>	4	62	<a href="#">hsa-miR-149-5p</a>	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<a href="#">Details</a>	5	52	<a href="#">hsa-miR-6734-3p</a>	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)



## (六) 參考文獻

1. Falebita, O.A., et al., *Rising incidence of renal cell carcinoma in Ireland*. Int Urol Nephrol, 2009. **41**(1): p. 7-12.
2. Tan, X., et al., *Targeted therapies for renal cell carcinoma in Chinese patients: focus on everolimus*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 313-21.
3. Fisher, R., M. Gore, and J. Larkin, *Current and future systemic treatments for renal cell carcinoma*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(1): p. 38-45.
4. Khan, M.I., et al., *Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: current state and future approaches (review)*. Int J Oncol, 2014. **44**(2): p. 349-63.
5. 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.
6. Breul, J. and J.W. Thuroff, [*Minimally invasive procedures to treat prostate cancer and renal cancer*]. Urologe A, 2015. **54**(2): p. 171.
7. 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.
8. Hung, S.H., et al., *Alpha-mangostin suppresses PC-3 human prostate carcinoma cell metastasis by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and urokinase-plasminogen expression through the JNK signaling pathway*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(4): p. 1291-8.
9. Shibata, M.A., et al., *alpha-Mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen (Garcinia mangostana Linn) reduces tumor growth and lymph node metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer carrying a p53 mutation*. BMC Med, 2011. **9**: p. 69.
10. Matsumoto, K., et al., *Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells*. Bioorg Med Chem, 2004. **12**(22): p. 5799-806.
11. Moongkarndi, P., et al., *Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by Garcinia mangostana (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line*. J Ethnopharmacol, 2004. **90**(1): p. 161-6.
12. Matsumoto, K., et al., *Xanthones induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(21): p. 6064-9.
13. Nakagawa, Y., et al., *Characterized mechanism of alpha-mangostin-induced cell death: caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(16): p. 5620-8.
14. Yuan, J., Y. Wu, and G. Lu, *alpha-Mangostin suppresses*

- lipopolysaccharide-induced invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and increasing E-cadherin expression through extracellular signal-regulated kinase signaling in pancreatic cancer cells.* Oncol Lett, 2013. **5**(6): p. 1958-1964.
15. Lei, J., et al., *alpha-Mangostin inhibits hypoxia-driven ROS-induced PSC activation and pancreatic cancer cell invasion.* Cancer Lett, 2014. **347**(1): p. 129-38.
  16. 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.
  17. Conner, E.A., et al., *HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1.* Carcinogenesis, 1999. **20**(4): p. 583-90.
  18. Betel, D., et al., *The microRNA.org resource: targets and expression.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D149-53.
  19. Li, Q., et al., *miR-30b inhibits cancer cell growth, migration, and invasion by targeting homeobox A1 in esophageal cancer.* Biochem Biophys Res Commun, 2017.
  20. Zhang, S., et al., *Effect of MicroRNA-218 on the viability, apoptosis and invasion of renal cell carcinoma cells under hypoxia by targeted downregulation of CXCR7 expression.* Biomed Pharmacother, 2016. **80**: p. 213-9.
  21. Wu, D., et al., *microRNA-133b downregulation and inhibition of cell proliferation, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase-9 in renal cell carcinoma.* Mol Med Rep, 2014. **9**(6): p. 2491-8.