

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	: 探討地骨皮甲素A抑制肝癌細胞轉移之分子機制
------------	-------------------------

報 告 類 別 : 成果報告
執行計畫學生 : 呂宇哲
學生計畫編號 : MOST 110-2813-C-040-059-B
研 究 期 間 : 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月
指 導 教 授 : 邱慧玲

處 理 方 式 : 本計畫可公開查詢

執 行 單 位 : 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中 華 民 國 111年03月29日

摘要

肝癌在台灣癌症死亡率排名中僅次於肺癌，西元 2019 年有近 7000 人死於肝癌，由於肝癌早期難以診斷，當確診時多是末期，而肝癌末期治療又十分困難，多數只能化療但其副作用非常強烈，且無顯著效果，因此我們著重研發腫瘤標靶藥物。近年來中草藥研究特別關注，因此，本計畫中我們選用地骨皮甲素 (Kukoamine A)。地骨皮甲素是一種精胺生物鹼，具有抗氧化，抗發炎功效，但其抗癌功能仍無研究著述。因此，若能針對高風險族群或確診患者開發天然中草藥萃取物作為保健食品，輔予主要治療模式，對患者大有裨益。首先，為了測試 Kukoamine A 對於肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 細胞株 Sk-hep-1 與 PLC/PRF/5 是否具有細胞毒性，MTT assay 結果顯示，Kukoamine A 有效抑制部分 HCC 細胞株生長，高劑量效果顯著，Colony formation assay 結果顯示 Kukoamine A 抑制細胞長期增生，經由細胞週期實驗發現 Sk-hep-1 有 G2/M phase arrest。從 Boyden chamber assay 發現 Kukoamine A 有效抑制 Sk-hep-1 與 PLC/PRF/5 的轉移和侵襲能力，進一步用西方墨點法確認 Kukoamine A 抑制癌細胞轉移相關蛋白如金屬蛋白水解酵素 MMP-2 與 MMP-9 蛋白表現量。為了釐清 Kukoamine A 對訊息傳遞路徑影響，因此我們測試 MAPK 相關蛋白 (ERK, JNK, p38) 活性且發現 P-ERK 蛋白表現量上升。綜合以上，Kukoamine A 有效減低 MMP-2 與 MMP-9 蛋白表現量且其上游訊息傳遞機制可能是 ERK 蛋白活化，因而抑制肝癌細胞轉移能力，然其詳細機制仍待驗證。

英文摘要

hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of primary liver cancer and the third leading cause of cancer mortality worldwide¹. The mortality of HCC is high because of potential curative treatments being effective only at the early disease stages² and drug resistance being developed. Therefore, novel effective therapeutic strategies are urgently required. So we focus on the development of tumor-targeted drugs. In recent years, Chinese herbal medicine research has paid special attention. Therefore, we choose Kukoamine A in this project. Kukoamine A is a spermine alkaloid, which has anti-oxidation and anti-inflammatory effects, but its anti-cancer function has not been researched yet. Therefore, if natural Chinese herbal extracts can be developed as health foods for high-risk groups or diagnosed patients, and supplemented with the main treatment mode, it will be of great benefit to patients.

First, in order to test whether Kukoamine A is cytotoxic to Hepatocellular carcinoma (HCC) cell Sk-hep-1 and PLC/PRF/5, MTT assay results show that Kukoamine A effectively inhibits the growth of some HCC cell. The dose effect is significant. The Colony formation assay results show that Kukoamine A inhibits long-term cell proliferation. Through cell cycle experiments, we found that Sk-hep-1 has G2/M phase arrest. It was found from Boyden chamber assay that Kukoamine A effectively inhibited the metastasis and invasion of Sk-hep-1 and PLC/PRF/5. It was further confirmed by Western blotting that Kukoamine A inhibited cancer cell metastasis-related proteins such as metalloproteinase MMP-2 and MMP-2. MMP-9 protein expression level. To clarify the influence of Kukoamine A on the message transmission pathway, we tested the activity of MAPK-related proteins (ERK, JNK, p38) and found that the expression of P-ERK protein increased. In summary, Kukoamine A effectively reduces the expression of MMP-2 and MMP-9 proteins and its upstream message transmission mechanism may be the activation of ERK protein, thus inhibiting the metastasis ability of liver cancer cells. However, its detailed mechanism remains to be verified.

I. 研究動機與研究問題

根據衛生福利部統計顯示，國內罹患惡性腫瘤病患比例年年上升；108 年死因調查分析，因惡性腫瘤死亡人數為 5 萬 232 人，占有所有死亡人數 28.6%，而其中又有 18.8% 死於肝癌，排名第二，僅次於肺癌 22.8%。造成肝癌死亡率高主因為早期難確診與晚期治療难度大，缺乏有效前期早期診斷方式；受癌症特性影響，腫瘤早期患者基本無典型症狀。肝臟代償功能強大、內部無痛覺神經，即便肝癌進入發展期，患者可能無感，加上目前肝癌主要治療方式為化療與肝臟移植，然而化療效果不佳且副作用大，從中草藥中找尋有效、安全的藥物是近年熱門研究，希望可以找出殺死或抑制癌細胞增生藥物。地骨皮甲素(Kukoamine A)，是一種天然精胺衍生物，存在於枸杞、番茄、馬鈴薯，為有效的穀胱甘醯亞精胺還原酶(trypanothione reductase)抑制劑，被認為是開發新型抗癌藥物候選之一，因此本次計畫將深入探討 Kukoamine A 對於 HCC 細胞生物功能、訊息傳遞和相關基因影響，並進一步探討其詳細分子機制。

II. 文獻回顧與探討

一、肝癌

1. 簡介

根據世界衛生組織統計，肝癌是全球第六大癌症。肝癌(Liver cancer)是指發生於肝臟的惡性腫瘤，也可能從其他部位轉移到肝臟，稱為肝轉移瘤，其比例比肝臟原生性的腫瘤更高。肝癌的主要原因是 B 型肝炎、C 型肝炎或是酒精造成的肝硬化。其他原因包括黃麴毒素(Aflatoxin B1)、非酒精性脂肪肝疾病及肝吸蟲等。肝癌可分為肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)、肝內膽管癌(Intrahepatic cholangiocarcinoma, iCCA)、乾細胞合併膽管癌、纖維板層肝細胞癌，約 9 成為肝細胞癌[1]，大部分小型肝癌幾乎沒有特殊臨床症狀，只有輕微倦怠、腹部不舒服等，當患者自己摸到腹部腫塊，且有倦怠、體重減輕時，病人絕大多數已為末期，存活率低。

2. 危險因子

造成肝癌的危險因子很多，如 B、C 型肝炎、黃麴毒素(Aflatoxin B1)、酒精過量[2]。肝炎病毒感染會影響 DNA 甲基化、miRNA 和活化細胞增生相關訊息傳遞路徑而使細胞癌化[3]；黃麴毒素則是由含有黃麴菌(*Aspergillus flavus*)的食物產生，黃麴毒素代謝物對 DNA 有高親和力[4]，可接在 DNA 上導致 DNA 斷裂進而造成突變，當突變發生在 P53 等癌症相關基因上時造成細胞癌化；酒精過量會讓肝臟產生過多乙醛(acetaldehyde)，氧化壓力上升造成肝臟細胞內質網壓力上升進而導致肝細胞受損，長久下來將會演變成肝硬化，一定機率下引發肝癌[5]。

3. 診斷方法

肝癌診斷最常使用方式是為檢測血清甲型胎兒蛋白(α -fetoprotein)含量，但其對早期肝癌靈敏度及專一性不高，近期發現甲型胎兒蛋白配合其他標記物如 AFP-L3(Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of α -fetoprotein)

和 DCP(des- γ -carboxyprothrombin)可提高靈敏度和專一性，再配合超音波掃描，是目前常用準則，當超音波發現腫瘤時，使用電腦斷層、核磁共振及穿刺檢測來了解腫瘤情況[6]。

4. 治療方式

目前肝癌主要治療方式為化療與肝臟移植，但肝臟捐贈遙遙無期，化療治療效果有限且副作用強，因此極度需要針對癌症的標靶藥物。Sorafenib，為小分子藥物的蛋白激酶抑制劑[7]，經證實可有效抑制腫瘤細胞增生和血管新生，另一標靶藥物則是一種抗 VEGF-A 單株抗體，對大腸癌、肺癌、乳癌等的治療藥物[8]。早期治療可使用肝臟切除手術、肝臟移植或燒灼手術、中期則建議進行肝動脈栓塞化療、晚期則建議用 Sorafenib 治療、末期則建議支持性療法。

二、癌症轉移

癌細胞轉移是指部分癌細胞離開原腫瘤器官並移動到其他器官，癌細胞先繞過周圍的細胞然後透過重組骨架蛋白並延伸細胞再透過金屬蛋白水解酵素 (matrix metalloproteinases, MMPs) 穿透上皮細胞與內皮細胞間的基底膜侵犯腫瘤外組織之胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 與血管管壁，使癌細胞最終得以內滲進入循環系統[9, 10]。癌細胞的轉移是目前治療癌症所遭遇到最大的困難，即便透過手術切除腫瘤，轉移到其他部位的癌細胞仍可能復發產生新的腫瘤，甚至導致病人死亡。因此它被當成是評斷癌症發展程度以及治療難度的重要指標。轉移需要入侵循環系統，過程十分複雜。當腫瘤擴大到一定的程度時，勢必會需要更多的養分與氧氣，故 hypoxia-inducible factor 2- α 會使血管生成因子 (VEGF, angiopoietin-2 與 PDGF) 過度表現[11]。進而生成新的微血管來提供腫瘤所需的養分。然而這些微血管會比正常的組織脆弱許多，不但管壁細胞稀少且到處都是縫隙，使得部分脫離腫瘤的癌細胞能夠透過遷移與侵襲進入微血管，並順著循環系統到達身體其他重新形成新的腫瘤[12]。以肝癌為例，最常見的轉移為肝內轉移，癌細胞透過肝門靜脈轉移到該地其他區域；而肝外轉移的目標多為肺臟，骨頭或淋巴結等器官[13, 14]。

三、金屬蛋白水解酵素(MMPs)

是一系列鋅依賴性內肽酶(zinc-dependent endopeptidases)能降解細胞外基質 (ECM) 的酵素，過去文獻指出利用 MMPs 的抑制劑或上調 MMPs 基因表現等方式，得到 MMPs 的多寡會直接影響腫瘤細胞的侵襲[15]。其中在癌細胞研究中又以 MMP-2 & MMP-9 研究最為透徹。因為 MMP-2 & MMP-9 同屬於 IV 型膠原酶，能降解基底膜在癌細胞侵入時扮演重要角色[16]。MMP-2 & MMP-9 除了參與血管基底膜的降解，同時也參與血管新生過程中 ECM 的重塑，是調控血管新生非常重要的角色。故血管內皮細胞受到 VEGF 刺激會分泌大量 MMP-2 & MMP-9 來水解周圍 ECM 並降解血管基底膜使其內皮細胞可以向外延生，新生的內皮細胞會在被降解的 ECM 孔隙中增生，進而形成一個有效的微血管網[17]。之前有文獻指出若是抑制 MMPs 的產生也能夠間接地降低 VEGF 的表現[18]。

四、地骨皮甲素(Kukoamine A)

地骨皮為曬乾枸杞根部，是一種中國傳統藥草，通常用於治療肺熱、冷血，降低血壓等心血管系統作用。地骨皮降壓作用與中樞有關，還可阻斷交感神經末梢及直接舒張血管，與降血糖作用及解熱作用。地骨皮甲素(Kukoamine A, KukA)是一種萃取自地骨皮(Cortex lycii radices)的精胺(Spermine, SPM)與二氫咖啡酸(dihydrocaffeic acid, DHCA)結合物，具有活潑生物活性。Kukamine A具有抗氧化，抗發炎等作用[19]，但其抗癌活性尚不清楚。近年研究顯示Kukamine A處理多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)有效抑制癌細胞增殖、促進細胞凋亡、細胞週期G0/G1 Phase阻斷、癌細胞轉移減少與GBM細胞生長受到明顯抑制[20]等。

III. 研究方法及步驟

細胞培養

肝癌細胞株 Sk-hep-1 和 PLC/PRF/5 分別以 DMEM 外加 10% fetal bovine serum、100 units/mL penicillin 和 100 μ g/mL streptomycin、2.2 g/L sodium pyruvate、Non-Essential Amino Acids Solution 與 MEM 外加 10% fetal bovine serum、100 units/mL penicillin 和 100 μ g/mL streptomycin、2.2 g/L sodium pyruvate、Non-Essential Amino Acids Solution 培養液培養細胞於 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，定期更換培養液。

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

將 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 各 50000 個細胞/well，接種在 24-well plate(CELLSTAR®)中培養 24 小時。接著，每個 well 加入不同濃度(0、20、40、60、80、100 μ M)Kukoamine A。放置 24 小時後，去除上清液，每個 well 再加入 1mL MTT 試劑(0.5mg/ml)，放置 3 小時後移除上清液。用 0.8mL 異丙醇(isopropanol)溶解藍紫色結晶(Formazan)，再利用 ELISA reader 以波長 570 nm 讀取吸光值。最後將不同濃度吸光值畫成統計圖表。

Colony formation assay

將 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 分別以 2000 和 1000 個細胞/well 接種在 6-well plate(CELLSTAR®)中培養 24 小時。接著每個 well 加入不同濃度(0、5、10、15、20 μ M)的 Kukoamine A。藥物作用 7 天後加入 2 mL 甲醇固定 30 min，用 10% Giemsa 染劑過夜染色，結果照相。

細胞週期分析(Flow cytometry analysis)

將 700000 個細胞培養於 6 cm dish 中，以不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A 處理細胞 24 小時，以 trypsin 收取並緩慢加入冰 70%酒精固定，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 X-100 溶液(0.02 mg/mL Propidium Iodide、0.02 mg/mL RNase 及 0.1% Triton X-100 溶於 PBS)並打散細胞，避光染色 30 分鐘，即可進行流式細胞儀分析。

細胞侵襲與遷移試驗

下層 chamber 中每 well 加入 35 μ L 含有胎牛血清細胞培養液，接著放置一片孔徑大小為 8 μ m 的半透膜，再加上塑膠墊、上層 chamber，在上層 chamber 中每 well 加入 50 μ L 不含胎牛血清細胞培養液及不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A 處理過 24 小時的 Sk-hep-1 和 PLC/PRF/5 細胞。24 小時後將半透膜的下面用甲醇固定 20 分鐘，用 5% Giemsa 染劑過夜染色，再用光學顯微鏡拍照。利用 Boyden chamber 研究細胞侵襲能力時，需在上層 chamber 每孔先加入 10 μ L Matrix gel，用以模擬腫瘤細胞侵襲之細胞外基質。

蛋白萃取及定量

將 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 接種 700000 個細胞在 6 cm dish，培養 24 小時後，加入不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A。藥物處理 24 小時後，用 PBS 清洗細胞，加入 Trypsin 使細胞脫落，再加入含有蛋白酶抑制劑的 Lysis Buffer 反應 10 分鐘，接著使用超音波震盪震碎細胞，13000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心 25 分鐘，上清液即為蛋白萃取液。以 Bradford 法測定蛋白質含量，使用 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBG)蛋白定量，CBG 在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則呈藍色。分光光度計 OD 595 nm 波長測量吸光值，再用胎牛血清白蛋白(BSA)作為標準蛋白質定量試劑藉此做出標準曲線，然後測量蛋白液，最後以內插法算出蛋白質含量。

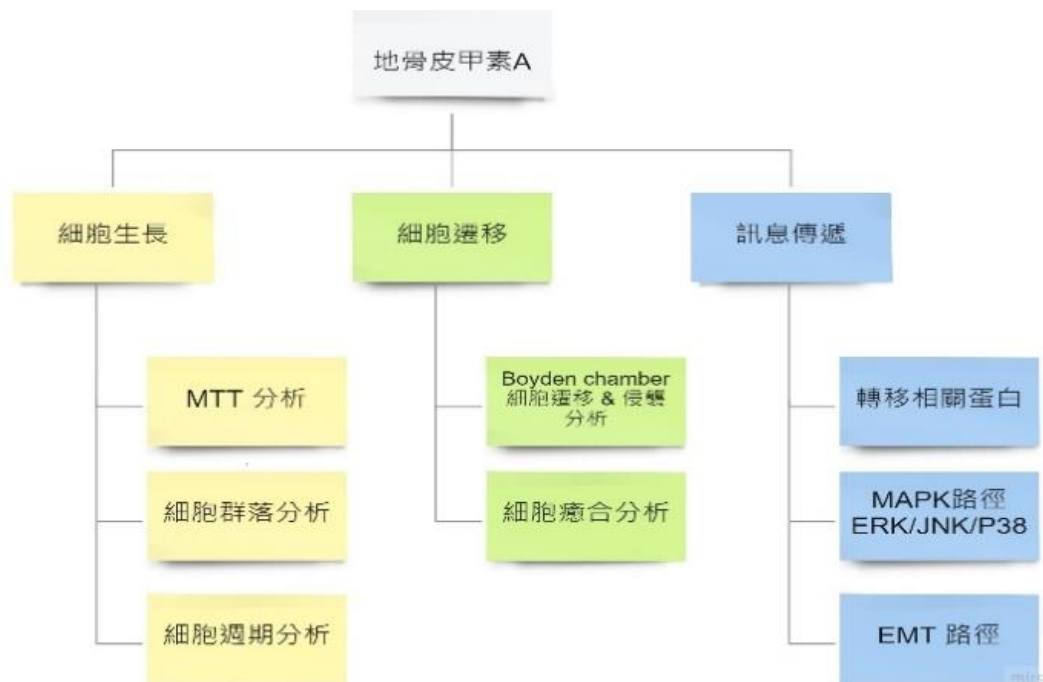
西方墨點法

依所欲分析蛋白分子量大小決定配製膠體濃度。以 1 M Tris pH=6.8、1.5 M Tris pH=8.8、30 % acrylamide、10 % SDS、10 % APS 及 TEMED 配膠。將樣品 10 μ L 置入上膠，以 100 V、30 分鐘電泳接著以 90 V、90 分鐘電泳結束。取下電泳膠體，放置於圖畫紙、棉布與 PVDF 構成轉夾板，以三明治夾法、100 V 轉漬 120 分鐘，取出 PVDF 膜放於 Blocking buffer(40 mL 的 TBS Tween-20 + 2 g 脫脂奶粉)1 小時，TBST 清洗 3 次、每次 10 分鐘，加入稀釋 1000 倍一級抗體 4 $^{\circ}$ C 過夜反應。隔天用 TBST 清洗 3 次、每次 10 分鐘，加入稀釋 10000 倍二級抗體反應 1 小時，再用 TBST 清洗 3 次、每次 10 分鐘。之後加入 ECL 呈色劑，以化學冷光法呈色並分析。

細胞附著實驗

將 700000 個細胞培養於 6 cm dish 中，以不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A 處理細胞 24 小時，算 30 萬個細胞噴接種於 6 well dish 中，將細胞放回培養箱中靜置 15~30 分鐘，等待約 8 到 9 成 control 的細胞貼盤後去除上清液，每個 well 再加入 2mL MTT 試劑(0.5mg/ml)，放置 3 小時後移除上清液。用 1~2mL 異丙醇(isopropanol)溶解藍紫色結晶(Formazan)，再利用 ELISA reader 以波長 570 nm 讀取吸光值。最後將不同濃度吸光值畫成統計圖表。

IV. 結果



初期實驗規劃

【初期目標一】:探討 Kukoamine A 是否影響肝癌細胞株 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 增生與其毒性。

Q1: 利用 MTT 實驗，將 Kukoamine A 以不同濃度(0、10、20、40 μ M)處理 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5，探討藥物對於不同細胞株毒性影響。

Q2: 利用 Colony formation assay，將不同濃度 Kukoamine A 處理 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5，分別探討藥物對於細胞長期存活率影響。

Q3: 利用 PI 染色與流式細胞儀分析 Kukoamine A 是否影響肝癌細胞株 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 的細胞週期分佈。

【初期目標二】:探討 Kukoamine A 是否抑制 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 細胞遷移和侵襲。

Q4: 利用 cell migration & invasion assay 分析不同濃度 Kukoamine A 處理 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5，分別探討藥物對於細胞遷移和侵襲影響。

【初期目標三】:探討 Kukoamine A 抑制肝癌細胞轉移機轉及訊息傳遞路徑。

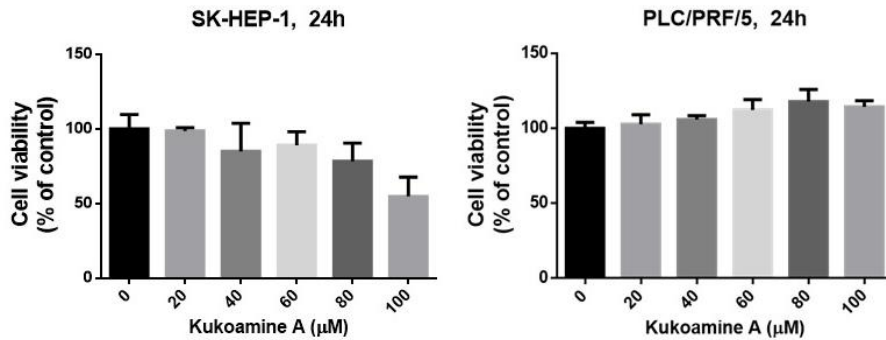
Q5: 利用西方墨點法分析 Kukoamine A 是否影響金屬蛋白水解酵素表現量(如 MMP-9 & MMP-2)。

Q6: 利用西方墨點法分析是否因藥物調控 MAPK 相關蛋白(ERK, JNK, p38)磷酸化或者 AKT 等訊息傳遞路徑。

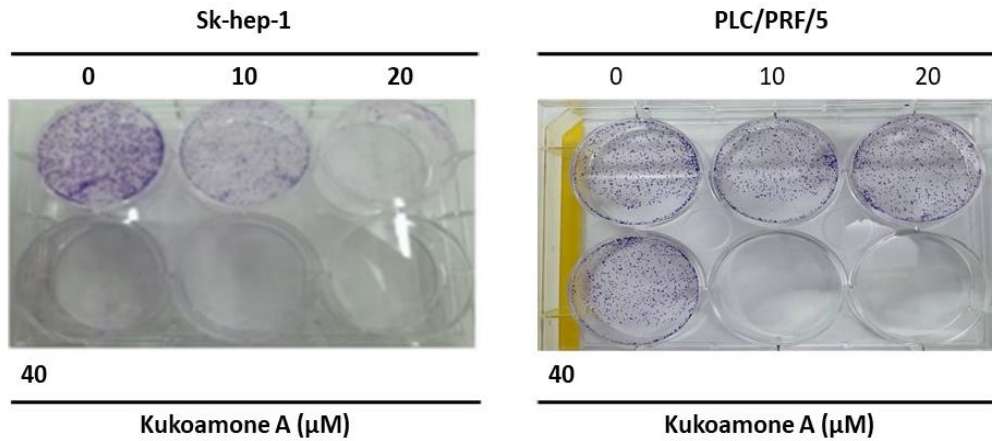
初期實驗結果

A. 利用 MTT 試驗評估藥物 Kukoamine A 對肝癌細胞株 Sk-hep-1 及 PLC/PRF/5 毒性。結果顯示，隨著 Kukoamine A 濃度升高，Sk-hep-1 細胞存活率下降而

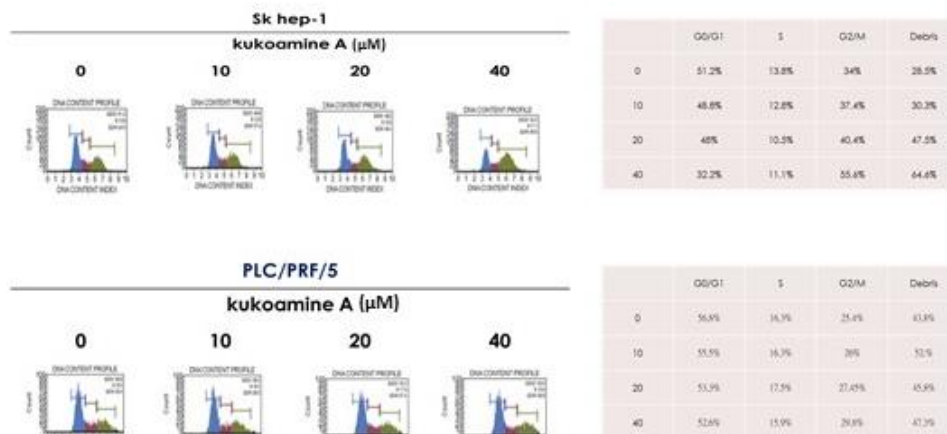
PLC/PRF/5 無明顯變化，可知 Kukoamine A 對 Sk-hep-1 具有細胞毒性，高劑量效果顯著而 PLC/PRF/5 無顯著效果。



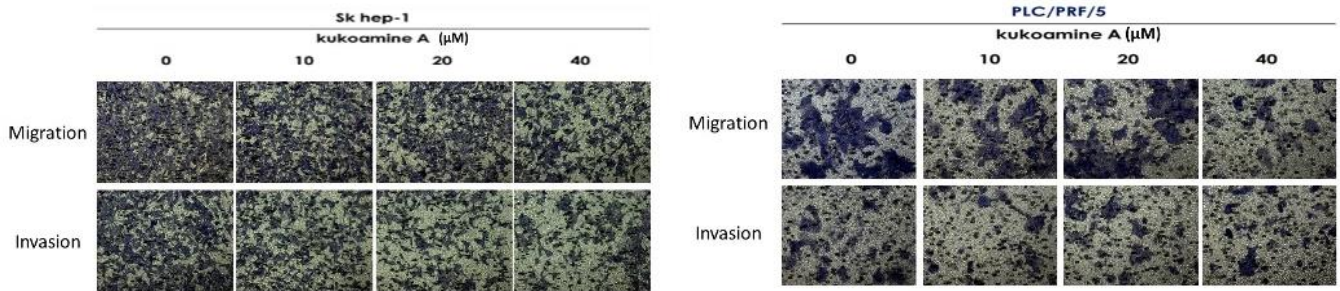
B. 利用 Colony formation assay 評估 Kukoamine A 對 Sk-hep-1 和 PLC/PRF/5 長期毒性。初步結果顯示，隨著 Kukoamine A 濃度升高，Sk-hep-1 細胞株長期細胞增生下降而對 PLC/PRF/5 的長期毒性則無顯著效果。



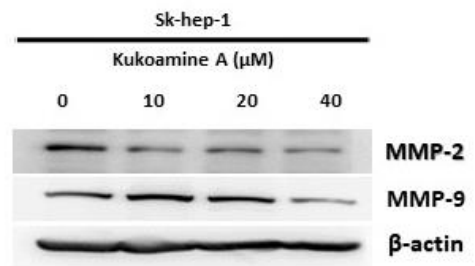
C. 利用細胞週期分析(Flow cytometry analysis)來分析不同濃度(0、10、20、40 μM)的 Kukoamine A 處理會不會影響肝癌細胞株 Sk-hep-1 和 PLC/PRF/5 的細胞週期，結果顯示 Kukoamine A 會造成 Sk-hep-1 的 G2/m Phase 上升而對 PLC/PRF/5 的細胞週期則無顯著影響。



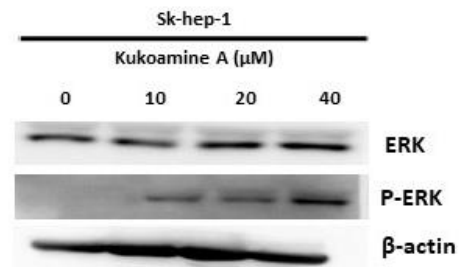
D. 利用 Boyden Chamber 細胞遷移和侵襲實驗分析不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A 對於抑制細胞轉移和侵襲能力，從結果得知隨著劑量提升，Sk-hep-1 與 PLC/PRF/5 的轉移和侵襲抑制效果越加明顯。



E. 利用西方墨點法分析不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A 處理 Sk-hep-1 之金屬蛋白酶，發現 MMP-2 & MMP-9 的表現量下降。

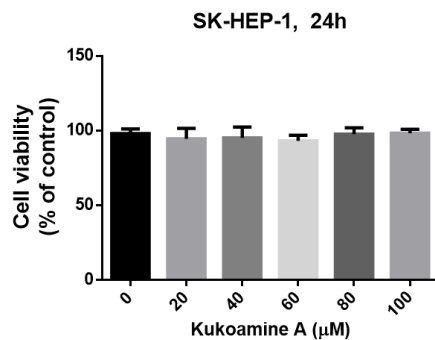


F. 利用西方墨點法分析經不同濃度(0、10、20、40 μ M)Kukoamine A 處理的 Sk-hep-1 之 MAPK 相關蛋白(ERK、JNK、p38)磷酸化或者 AKT 等訊息傳遞路徑，初步發現 ERK 磷酸化受到影響，結果顯示 P-ERK 的蛋白表現量上升。

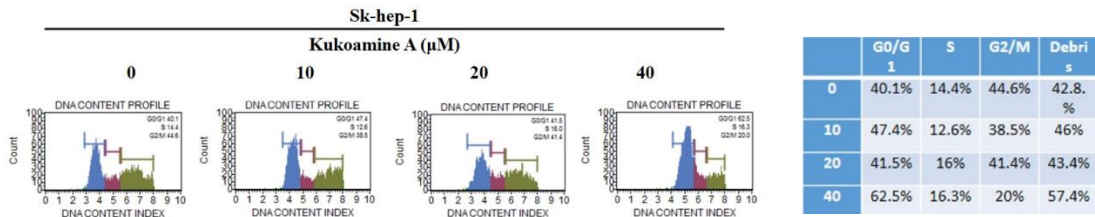


重測後實驗結果

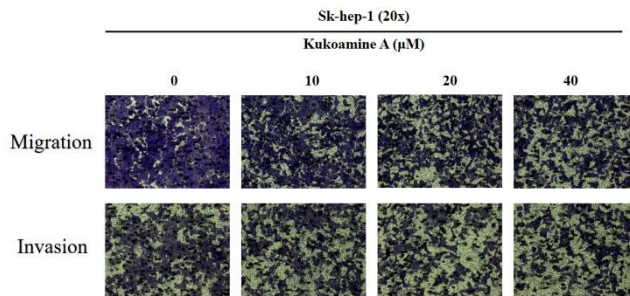
A. 再次利用 MTT 試驗評估藥物 Kukoamine A 對肝癌細胞株 Sk-hep-1 毒性。結果顯示，隨著 Kukoamine A 濃度升高，Sk-hep-1 細胞存活率並沒有變化與，原先結果不符。



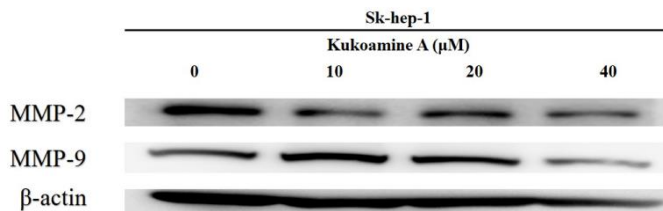
B. 再次利用細胞週期分析(Flow cytometry analysis)來分析不同濃度(0、10、20、40 μ M)的 Kukoamine A 處理會不會影響肝癌細胞株 Sk-hep-1 細胞週期，結果顯示 Kukoamine A 並不會造成 Sk-hep-1 細胞週期的變化與原先結果不符。



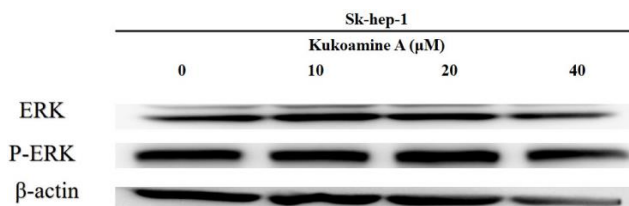
C. 再次利用 Boyden Chamber 細胞遷移和侵襲實驗分析不同濃度(0、10、20、40 μM)Kukoamine A 對於抑制細胞轉移和侵襲能力，從結果得知隨著劑量提升，依然會抑制 Sk-hep-1 轉移和侵襲，與原先結果相符。



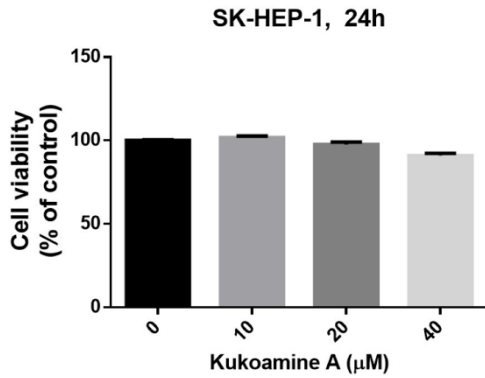
D. 再次利用西方墨點法分析不同濃度(0、10、20、40 μM)Kukoamine A 處理的 Sk-hep-1 之金屬蛋白水解酵素，發現 MMP-2 & MMP-9 的蛋白表現量均不再下降，與原本不符。



E. 再次利用西方墨點法分析經不同濃度(0、10、20、40 μM)Kukoamine A 處理的 Sk-hep-1 之 MAPK 相關蛋白(ERK、JNK、p38)磷酸化訊息傳遞路徑，ERK 磷酸化並不再受到影響，結果顯示 P-ERK 的蛋白表現量沒有變化與原先不符



F. 裡用細胞附著實驗分析不同濃度(0、10、20、40 μM)Kukoamine A 理的 Sk-hep-1 之附著能力有無受到藥物影響，結果顯示 Kukoamine A 並不會對 Sk-hep-1 之附著能力造成影響



V. 討論

肝癌在台灣癌症死亡率排名中僅次於肺癌，肝癌在早期難以被發現在晚期時更是難以治療，早期發現受到其疾病特性難以解決因此尋找新的標靶藥物成為了未來的希望，本計畫中我們選用地骨皮甲素(Kukoamine A)一種精胺生物鹼，具有抗氧化，抗發炎功效，但其抗肝癌功能仍無研究著述。

本次實驗途中因 Sk-hep-1 細胞繼帶老化，在更換新的 Sk-hep-1 細胞株後須加入 NEAA 於培養液中，但在先前開時研究計畫前並無加入，導致實驗在更換細胞株前後可能會有不一致的結果，所以就先將原本以做出結果的實驗重新驗證一次是否會有再現性，但很遺憾的是大部份的實驗結果都受到了影響原先在 MTT Assay 中隨著劑量的升高細胞本應該會死亡，但重作後卻沒有，在分析 Sk-hep-1 細胞週期時本應在 G2/m Phase 上升從而導致細胞死亡，但重作後細胞週期沒有任何變化，也映照了 MTT assay 之結果，但幸運的是 Kukoamine A 對 Sk-hep-1 細胞的遷移和侵襲仍有影響，隨著藥物濃度的上升對其抑制的效果有顯著的影響，但路徑不再確定是否仍是透過 MAPK pathway 磷酸化來影響金屬蛋白水解酵素從而導致抑制 Sk-hep-1 細胞的遷移和侵襲，需要等待之後在做近一步的確認。

那造成前後結果差異巨大的最可能原因，大多細胞可以通過葡萄糖胺分解，糖酵解或 TCA cycle 合成非必需氨基酸(NEAA)，當這些氨基酸濃度水準較低時，細胞需要在培養基中消耗更多的葡萄糖和谷氨醯胺並產生很多的副產物，而這些副產物可能會因此影響到細胞的生長。所以將 NEAA 加到細胞培養液中可以減少這些細胞製造非必需氨基酸的副作用。因此推測可能就是因為起初沒有加入 NEAA 造成細胞的生長受到副產物的影響，老化得比較快且細胞株也較不健康，在受到藥物影響下才會有比較顯著的影響，甚至是讓細胞死亡。

未來希望可以先確定 Kukoamine A 抑制 Sk-hep-1 細胞轉移和侵襲能力的完整路徑並按照原計畫繼續研究

- 1.利用西方墨點法分析 Sk-hep-1 是否因 Kukoamine A 調控 MAPK 相關蛋白(ERK、JNK、p38)磷酸化等訊息傳遞路徑。
- 2.透過西方墨點法與 qRT-PCR 分析 Kukoamine A 是否影響 EMT 相關蛋白與基因(E-cadherin、N-cadherin、Slug、Snail 等)表現量。
- 3.透過核質蛋白分離以及免疫螢光染色分析藥物 Kukoamine A 是否影響肝癌之轉

移相關轉錄因子(transcription factor)。

4.利用 Tube formation assay 來觀察 Kukoamine A 是否影響血管新生。

5.利用抑制劑驗證 Kukoamine A 影響 Sk-hep-1 細胞轉移機

VI. 參考文獻

1. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
2. Aravalli, R.N., E.N. Cressman, and C.J.J.A.o.t. Steer, *Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update*. 2013. **87**(2): p. 227-247.
3. Hamid, A.S., et al., *Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention*. 2013. **5**(4): p. 1087-1092.
4. Wu, H.C. and R.J.H.m. Santella, *The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma*. 2012. **12**(10 HCC).
5. Ji, C.J.I.j.o.h., *New insights into the pathogenesis of alcohol-induced ER stress and liver diseases*. 2014. **2014**.
6. Song, P., W. Tang, and N.J.T.G.C. Kokudo, *Serum biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma*. 2014, 2014. **3**(2): p. 103-105.
7. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. 2004. **64**(19): p. 7099-7109.
8. Shojaei, F.J.C.I., *Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives*. 2012. **320**(2): p. 130-137.
9. Lee, D.C., et al., *Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis*. 2008. **68**(11): p. 4210-4220.
10. Truant, S., et al., *Tumour biology of colorectal liver metastasis is a more important factor in survival than surgical margin clearance in the era of modern chemotherapy regimens*. 2015. **17**(2): p. 176-184.
11. Papetti, M. and I.M.J.A.J.o.P.-C.P. Herman, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. 2002. **282**(5): p. C947-C970.
12. Zetter, B.R.J.A.r.o.m., *Angiogenesis and tumor metastasis*. 1998. **49**(1): p. 407-424.
13. Tang, Z.-Y.J.W.j.o.g., *Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis*. 2001. **7**(4): p. 445.
14. Wu, H., et al., *Pure transcatheter arterial chemoembolization therapy for intrahepatic tumors causes a shrink in pulmonary metastases of hepatocellular carcinoma*. 2015. **8**(1): p. 1035.
15. Deryugina, E.I., J.P.J.C. Quigley, and m. reviews, *Matrix metalloproteinases and*

- tumor metastasis*. 2006. **25**(1): p. 9-34.
16. Määttä, M., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis*. 2000. **6**(7): p. 2726-2734.
 17. Zheng, H., et al., *Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma*. 2006. **26**(5A): p. 3579-3583.
 18. Chetty, C., et al., *MMP-2 alters VEGF expression via α V β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells*. 2010. **127**(5): p. 1081-1095.
 19. Funayama, S., et al., *Structure of kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinense* root barks*. 1980. **21**(14): p. 1355-1356.
 20. Wang, Q., et al., *Kukoamine A inhibits human glioblastoma cell growth and migration through apoptosis induction and epithelial-mesenchymal transition attenuation*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 36543.

VII. 需要指導教授指導

1. 研究的方向與目標: 訂定研究目標並討論可行的研究方向及相關的實驗。
2. 文獻回顧的搜索: 了解實驗目標, 並學習使用現有的網路資源以查詢相關資料, 例如: EndNote、Pubmed 等文獻查詢方式。
3. 實驗儀器的操作與使用: 學習與熟悉實驗所需的儀器, 例如: 西方墨點法的一系列儀器、流式細胞儀、PCR 等儀器。
4. 實驗方法使用: 學習與熟悉實驗方法, 例如: 細胞培養、Boyden chamber assay 等實驗。
5. 實驗結果判讀與整理: 學習如何判讀及整理實驗結果, 並與指導教授討論未來的可行性。
6. 成果發表與展現: 學習如何整理實驗結果, 以有條理、有系統性的方式做成果展現。