

國立臺灣大學工學院應用力學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Applied Mechanics

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

槲皮素對肝癌的影響

The effect of Quercetin in hepatocellular carcinoma



陳界甫

Jie-Fu Chen

指導教授：陳兆勛 博士

Advisor: Chao-Hsun Chen, Ph.D.

中華民國一零一年七月

July, 2012

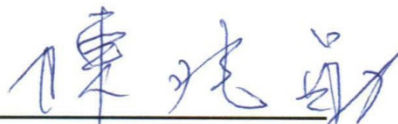
國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書


槲皮素對肝癌的影響

The effect of Quercetin in hepatocellular carcinoma

本論文係陳界甫君（學號：R99543060）在國立臺灣大學應用力學研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 7 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳兆勛 
(指導教授)

賴信志 

戴明泓 

所 長

張建成 

致謝

本論文研究過程中，承蒙吳師 陳兆勛教授悉心指導，詳細的修改與校閱指正，以及國立中山大學生物醫學所 戴明泓老師和其博士班學生 儲天輝學長在研究上的建議，使得本文得以順利完成。另外還要感謝 戴明泓老師以及長庚大學醫檢系 賴信志教授撥冗參加本人的碩士學位考試，並給予肯定。在此獻上最衷心的敬意與感謝。

此外，在台大研究所求學期間，有歡笑也有淚水，感謝同是奈米複材實驗室的同學 徐東陞、陳文祥、陳忠澤，我們互相學習、互相勉勵及互相支持，一同在求學過程中成長茁壯。另外也要感謝我大學時的摯友 簡齊毅、康肇元的一路支持與陪伴，最後要感謝父母的栽培和不曾間斷的關愛。謹將本文獻給所有愛護我的人。



摘要

肝癌在全世界是一種常見的癌症之一，在台灣也是導致許多癌症病患的死亡原因。為了提高肝癌病人的存活率，或降低手術過後的復發率，尋找有效的抗癌藥物是重要並且需要的。而廣泛存在於植物界的槲皮素因為具有抗癌變及抗增生的效果，且有強大的抗氧化能力以及在細胞訊號傳導、細胞週期、細胞凋亡的調控上有一定的能力而受到注意。本研究目的是希望藉由相關實驗，來觀察槲皮素是否能抑制人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7，並以基因晶片做檢測分析，針對被調控到且會影響細胞增殖生長、細胞週期、細胞移動及細胞凋亡的基因做進一步探討，闡明槲皮素抑制人類肝癌細胞的藥理機制。此實驗以人類肝癌細胞株 Hep3B 及 Huh7 為材料進行體外培養，以各濃度槲皮素對細胞進行 Proliferation、Colony formation、Wound-healing 及 Flow cytometry 實驗，並以槲皮素影響效果較顯著的 Huh7 作進一步微陣列分析。實驗結果顯示，Hep3B 及 Huh7 在 48 小時槲皮素濃度分別為 500、50 μ M 時，開始有顯著抑制細胞增殖效果；在濃度 50、10 μ M 時，顯著抑制細胞菌落發展；在同樣濃度 100 μ M 時，經過 12 小時就開始有顯著抑制細胞移動效果以及濃度分別在 50、10 μ M 能分別誘導 Hep3B、Huh7 產生細胞凋亡，且對細胞週期 G1 phase 都有阻滯效果，以上實驗效果都與槲皮素濃度成正相關；在來從進一步的 Huh7 微陣列分析實驗結果發現，槲皮素能調控 Cell apoptosis、Cell cycle、Cell migration 相關基因，而這些受到調控的基因可能參與了 Apoptosis pathway、JAK/STAT、PI3K/AKT、MAPK/ERK pathway。而這些被影響調控的基因以及所參與的訊號傳導路徑就是槲皮素能夠抑制癌細胞生長增殖生長、細胞週期、細胞移動以及誘導凋亡背後最強而有力的證據。未來槲皮素或許可用於臨床上治療肝癌之輔助治療藥物，提高肝癌病人的存活率、降低化療藥物所產生的副作用以及降低手術過後的復發率。

關鍵詞：肝癌、槲皮素、細胞凋亡、細胞週期、基因晶片

Abstract

Hepatocellular carcinoma is one of the common cancers in the world, it is also the main reason that makes people die in the cancer. To increase the survival rate or reduce the recurrence rate, it is necessary and important to find those efficacious anti-cancer drugs. Quercetin is common existing in plant with great effect of anti-carcinogenesis and anti-proliferation. It also has good capability on anti-oxidant. Besides, Quercetin has been noticed by the abilities on effecting cell signal transduction and regulating of cell cycle and inducing cell apoptosis. The purpose of this research is trying to observe whether Quercetin can inhibit HCC cell growth by several experiments. Moreover, to find that the mechanism of inhibiting the proliferation, growth, cell cycle, migration and inducing apoptosis on HCC cell by Quercetin, we used microarray so that we can analyze the suppression effect on HCC cell by gene expression. This experiment uses HCC cell line- Hep3 and Huh7 as the materials in vitro culture, and different concentrations of Quercetin are using on experiments of Proliferation, Colony formation, Wound-healing and Flow cytometry. Huh7 is used on microarray analysis due to the better influence on Quercetin as well. Experiment results show that Hep3B and Huh7 have significantly inhibiting proliferation when the concentration of Quercetin is 500, 50 μ M on 48 hours; it also shows inhibition on colony formation while the concentration is 50, 10 μ M. And Quercetin has good inhibition effect on cell migration after 12 hours when the concentration is 100 μ M, and it can also induce Hep3B, Huh7 apoptosis and arrest G1 phase in cell cycle when the concentration is 50, 10 μ M. All effect by Quercetin during the experiments is depending on the concentrations of Quercetin. Moreover, the experiment of microarray analysis for Huh7 also shows that Quercetin can regulate the gene relative to Apoptosis, cell cycle and migration. And these gene regulated by Quercetin may be involve Apoptosis pathway and several signal

transduction pathway : JAK/STAT 、PI3K/AKT 、MAPK/ERK pathway. All the effect on signal transduction pathway or gene regulated by Quercetin are the strong evidence that Quercetin can inhibit the growing of cancer cells 、arrest cell cycle 、suppress cell migration and induce the apoptosis of cancer cells. Perhaps people can use Quercetin on clinical medicine for curing liver cancer, increase the survival rate and also decrease the side effect and recurrence rate.

Keywords : Hetapocellular carcinoma, Quercetin, Apoptosis, Cell cycle, Microarray



目錄

第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	3
一、 肝癌	3
二、 槲皮素	6
三、 細胞凋亡	10
四、 細胞週期	14
五、 基因晶片	17
第三章 材料和方法	20
一、 實驗材料	20
1. 細胞培養	20
2. 細胞計數	22
3. 藥物處理	23
4. Alamar Blue cell viability reagent	23
5. 流式細胞儀	25
6. Affymetrix® Human Genome U219 Array	26
二、 實驗方法	27
1. Cell proliferation assay	27
2. Colony formation assay	27
3. Wound-healing assay	28
4. Flow cytometry assay	28
5. Microarray analysis	29

第四章 結果	31
一、 Cell proliferation assay	31
二、 Colony formation assay	32
三、 Wound-healing assay	32
四、 Flow cytometry assay	33
五、 Microarray analysis	34
第五章 討論	36
第六章 結論	41
參考文獻	62



圖目錄

FIG. 1 Two major apoptotic pathways in mammalian cells.	12
FIG. 2 人類肝癌細胞株.....	20
FIG. 3 血球計數器	22
FIG. 4 血球計數器上的方格	22
FIG. 5 Resazurin 還原成 Resorufin	24
FIG. 6 Resorufin 的吸光度與放射螢光光譜	24
FIG. 7 AlamarBlue protocol	24
FIG. 8 細胞經雷射光激發產生的散射光及螢光	25
Fig. 9 槲皮素對 Hep 3B 的 Proliferation assay 結果.....	42
Fig. 10 槲皮素對 Huh 7 的 Proliferation assay 結果.....	43
Fig. 11 槲皮素對 Hep 3B 的 Colony formation assay 結果	44
Fig. 12 槲皮素對 Huh 7 的 Colony formation assay 結果.....	45
Fig. 13 槲皮素對 Hep 3B 的 Wound-healing assay 結果	46
Fig. 14 槲皮素對 Huh 7 的 Wound-healing assay 結果.....	47
Fig. 15 槲皮素對 Hep 3B 的 Flow cytometry assay 結果	48
Fig. 16 槲皮素對 Huh 7 的 Flow cytometry assay 結果.....	49
Fig. 17 RNA Electropherogram	50
Fig. 18 RNA Purity test	51
Fig. 19 aRNA Quality Control.....	51
Fig. 20 Microarray Image of Huh7-0 μ M.....	52
Fig. 21 Microarray Image of Huh7-50 μ M.....	53
FIG. 22 槲皮素對肝癌調控兩倍以上基因之影響	61

表目錄

Table. 1 槲皮素上調 2 倍以上 Apoptosis 相關基因	54
Table. 2 槲皮素下調 2 倍以上 Apoptosis 相關基因	56
Table. 3 槲皮素上調 2 倍以上 Cell cycle 相關基因	57
Table. 4 槲皮素下調 2 倍以上 Cell cycle 相關基因	58
Table. 5 槲皮素上調 2 倍以上 Migration 相關基因	59
Table. 6 槲皮素下調 2 倍以上 Migration 相關基因	60



第一章 前言

自民國七十一年起，癌症死亡率已連續三十年位居國人十大死因之首位（行政院衛生署，2012）。而肝細胞癌(hetapocellular carcinoma；HCC)更為我國男性與女性癌症死亡原因的第一及第二位。肝癌一般分為原發性肝癌與轉移性肝癌兩種，原發性肝癌是指由肝臟內的細胞經由癌化而形成惡性腫瘤，轉移性肝癌則是由其他器官的癌細胞經由轉移到肝臟而形成。原發性肝癌通常與慢性肝炎所造成的肝硬化有關，而有80%是因為B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)所導致，另外，暴露於致癌因子，或者吸菸、喝酒也會引起肝癌的產生。目前治療肝癌最有效的方法，是透過手術摘除腫瘤，但對於腫瘤較大或多發性的肝癌，卻有一定的手術治療限制。在經過手術摘除腫瘤後，肝癌的復發率也是相當高。因此，為了提高肝癌病人的存活率，或降低手術過後的復發率，尋找有效的抗癌藥物是重要並且需要的。近年來研究發現，大部分的抗癌藥物均以造成癌細胞走向細胞凋亡路線為其藥理作用，而開發可選擇性促進癌細胞凋亡的藥物是目前抗癌藥物研究的新方向。可運用分子醫學如癌細胞與正常細胞在訊息傳遞上的差異來開發新的分子藥理學作用機轉，透過改變癌細胞訊號傳導的狀態以調節基因表達，抑制細胞增殖或誘導腫瘤細胞凋亡，標靶藥物對於腫瘤的治療，被認為是合理而且有希望的策略。

槲皮素是一個典型的黃酮化合物(flavonoid)，廣泛存在於植物界。因為具有抗癌變及抗增生的效果，且有強大的抗氧化能力以及在細胞訊號傳導、細胞週期、細胞凋亡的調控上有一定的能力，而受到注意。而根據諸多文獻顯示，槲皮素可以透過不同的機制來達到抑制癌症的效果，包括抗氧化作用、抑制會活化致癌物的酵素、訊息傳遞途徑的修正、和受體及一些蛋白質的交互作用。近年來研究發現，大部分的抗癌藥物均以造成癌細胞走向細胞凋亡路線為其藥理作用，而開發可選擇性促進癌細胞凋亡的藥物是目前抗癌藥物研究的新方向。槲皮素可以透過

影響細胞凋亡路徑上的受體誘導細胞凋亡，例如誘導肺癌細胞的 death receptor 5(DR5)表達，造成癌細胞毒殺，或是抑制表皮生長因子受體表達，抑制大腸癌細胞生長及誘導凋亡；也可以透過調控細胞凋亡路徑上的基因，例如透過 Survivin 和 Bcl-2 蛋白下調和 p53 上調，激活 caspase-3 和 caspase-9，增加 Bax 易位到粒腺體膜，誘導凋亡；除了促進凋亡路徑上的表達，也可以抑制 AKT、ERK 生存訊號的表達，阻止細胞生長。

隨著人類基因體研究計畫展開後，傳統的核酸分子雜交技術所花費的時間與效率早已不足以應付大量基因訊息的產生。隨著半導體技術的進步，人們也提出了結合生物科技和半導體技術的構思。1990 年代，史丹佛大學結合了探針固相原位合成技術(in situ synthesis)和照相平版印刷技術(Photolithography)，首先製造出世界上第一張基因晶片，可以一次同時分析大量的基因資訊。基因晶片擁有高統計輸出量、操作容易、分析信賴度及精確性高、使用檢體樣品少、應用範圍廣可獲得整體性的實驗數據等優越特性，解決了傳統操作技術繁雜、耗時耗工、低效率之不足。

本研究目的是希望藉由細胞增殖、菌落發展、細胞移動及細胞凋亡實驗，來觀察槲皮素是否能抑制人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7，並以基因晶片做檢測分析，選擇兩倍上調與兩倍下調的基因作 Ontology 分析，以 Biological process 與 Molecular function 的分組，從中挑選與 Apoptosis、Cell cycle、Migration 有關的基因做初步探討。瞭解基因可能參與的訊號傳導途徑及所造成的生物功能影響，闡明槲皮素對人類肝癌細胞抑制增殖生長、細胞週期、細胞移動及促進凋亡背後的藥理機制。

第二章 文獻回顧

一、 肝癌

肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)在全世界是一種常見的癌症之一，在台灣也是導致許多癌症病患的死亡原因[1]。根據行政院衛生署之相關數據顯示，自民國七十一年起至今惡性腫瘤一直居於十大國人死因之首位，其中肝癌又為國內癌症病患死亡肇因之第一或第二名。根據流行病學研究調查統計，肝癌發生之相關危險因子有性別差異、地理區佈、慢性肝炎感染與否及生活形態等。在性別方面，男性較女性為罹患肝癌之高危險群；而以地理分佈觀之，東南亞、南非及一些西非國家有較高之罹患率；另開發中的國家有較高於已開發國家二至三倍的肝癌罹患率；在慢性肝炎方面如病毒性的 B 型及 C 型肝炎感染；生活形態方面如酗酒、抽煙或化學致癌物的攝入，如黃麴毒素[2][3]，均為使肝癌罹患率提高之危險因子。肝癌一般分為原發性肝癌與轉移性肝癌兩種，原發性肝癌是指由肝臟內的細胞經由癌化而形成惡性腫瘤，轉移性肝癌則是由其他器官的癌細胞經由轉移到肝臟而形成。原發性肝癌通常與慢性肝炎所造成的肝硬化有關，而有 80%是因為 B 型肝炎病毒(HBV)、C 型肝炎病毒(HCV)所導致[4]。感染 B 型肝炎或 C 型肝炎之後，有一部份人變成慢性肝炎，慢性肝炎再演變為肝硬化，最後再形成肝癌[5][6]。

致癌因素

1. B 型、C 型肝炎病毒

肝炎的發生會長期不斷地破壞肝臟組織，使肝臟逐漸纖維化，並經由再生而形成肝硬化，在此發炎、硬化的過程中，肝細胞的複製及再生發生了問題，因而產生肝癌細胞。B 型肝炎的患者約有 15~40%會發展成肝硬化或肝癌[7]，在台灣，臨床上有八成以上的肝癌病人曾經被 HBV 所感染[8]。HBV 為 DNA 病毒曾有研究發現 B 型肝炎病毒的 DNA 會嵌入宿主基因中，可能因此導致宿主 DNA 受損

或影響宿主的基因表現而引發肝癌[9]。HCV 為 RNA 病毒，一般認為 HCV 造成肝細胞癌化的主因為 HCV 的病毒蛋白。許多研究指出 HCV 的病毒蛋白能透過調控細胞內的訊息傳導途徑來抑制細胞死亡與增加細胞生長[10][11]。

2. 黃麴毒素 (aflatoxins)

黃麴毒素主要是由真菌黃麴菌(*Aspergillus flavus*)及寄生麴菌(*Aspergillus parasiticus*)所產生的代謝產物[12]。台灣因氣候潮濕，儲藏不良的花生、玉米等是黴菌的溫床。在許多的動物實驗中已證實黃麴毒素可以引發動物的腫瘤[13]。

3. 酗酒

過度飲用含酒精的飲料會引發酒精性肝炎與肝硬化。而 B 型與 C 型肝炎病毒帶原的病患飲用酒類則會增加 2 到 4 倍罹患肝癌的機率[14]。

4. 其他因素

服用過量類固醇、動情素或荷爾蒙，還有抽煙及受到化學物質暴露等等，曾被指出與肝癌有關[15]。



治療方法

其治療方法不外乎手術切除、肝臟移植、化學藥物治療、免疫治療、放射線治療、冷凍治療、基因治療、肝動脈栓塞、酒精局部注射等[16][17]。目前治療肝癌最有效的方法，是透過手術摘除腫瘤，但對於腫瘤較大或多發性的肝癌，卻有一定的手術治療限制。在經過手術摘除腫瘤後，肝癌的復發率也是相當高[18]。肝臟移植仍是目前治療肝癌的方法中，五年存活率最好的[19]，但不是每個肝癌病患都可以等到相符合的肝臟可以做移植。而化學治療是將一些抗癌藥物利用靜脈注射的方式使其進入全身循環而殺死癌細胞。5-fluorouracil(5-FU)和 carboplatin 目前為治療肝癌上廣泛使用的化療藥物。5-FU，類似尿嘧啶(uracil)的相似物，是一種抗代謝物[20]。而 carboplatin 能引起 DNA 的破壞造成毒殺細胞的效果[21]。但是這些用於高劑量治療的抗癌藥物，會造成腫瘤細胞的抗藥性及嚴重的副作用。1995)；

肝動脈栓塞與局部酒精注射則受限於肝腫瘤的大小與分布，另外病人的肝功能必須正常才會有較好的療效[22][23]。

因此，為了提高肝癌病人的存活率，或降低手術過後的復發率，尋找有效的抗癌藥物是重要並且需要的。可運用分子醫學如癌細胞與正常細胞在訊息傳遞上的差異來開發新的分子藥理學作用機轉，透過改變癌細胞訊號傳導的狀態以調節基因表達，抑制細胞增殖或誘導腫瘤細胞凋亡，標靶藥物對於腫瘤的治療，被認為是合理而且有希望的策略。天然植物抗癌或防癌成分之研究也是未來努力的新方向。本文目的在於探討存廣泛存在於植物界的槲皮素，在抑制人類肝癌細胞過程中之藥理機轉，尋找在癌細胞在訊號傳導中被調控的基因，闡明槲皮素在抗癌方面的作用機制。



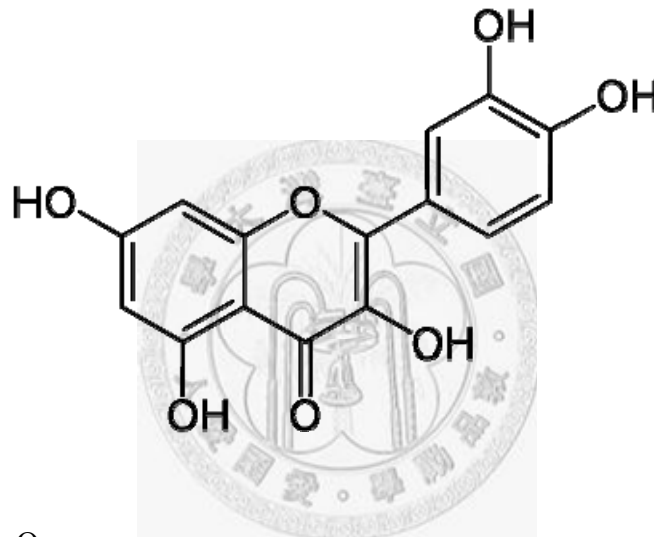
二、 槲皮素

化學名

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one

3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone

結構



分子式： $C_{15}H_{10}O_7$

分子量：302.24 g/mol

簡介

槲皮素(Quercetin)是一個典型的黃酮化合物(flavonoid)，廣泛存在於植物界。黃酮類化合物為多酚類化合物，主要由 diphenylpropane ($C_6-C_3-C_6$)當作基本骨架。槲皮素對預防癌症來說是一種具有吸引力的自然化合物，因為具有抗癌變及抗增生的效果，且有強大的抗氧化能力以及在細胞訊號傳導、細胞週期、細胞凋亡的調控上有一定的能力。槲皮素通常當作苷元(glycoside)，有相當多的量可以被消化道吸收並進行後續代謝轉換[24]，在腸子吸收後會轉變為 glucuronide/sulfate

conjugates，這些代謝產物可在血管循環系統中發現。而槲皮素的代謝產物 glucuronide 也被證實在人類肺癌細胞株 NCI-H209 中，能透過促凋亡蛋白的上調以及抗凋亡蛋白的下調來促進細胞凋亡，抑制癌細胞的增殖[25]。槲皮素及其他相關黃酮類化合物廣泛存在於水果及蔬菜，因具有淺力的抗癌特性而受到注意。他們可以透過不同的機制來達到預防癌症的效果，包括抗氧化作用、抑制會活化致癌物的酵素、訊息傳遞途徑的修正、和受體及一些蛋白質的交互作用[26][27][28]。

抑癌機制

1. 與受體交互作用

槲皮素可與一些受體發生交互反應，特別是芳烴受體(aryl hydrocarbon receptor，AhR)，AhR 負責調控與可活化致癌前驅物的 CYP1 家族的基因表現[29]，被認為與肺癌的發展及大腸癌有關[30]。Death receptor 與細胞凋亡路徑有關，槲皮素可以誘導肺癌細胞 death receptor 5(DR5)表達，造成癌細胞的毒殺[31]。ErbB 蛋白家族，又稱表皮生長因子受體(EGFR)家族，過度的 ErbB 訊號與各種腫瘤的形成有關，槲皮素能降低 ErbB2 和 ErbB3 的表達，抑制大腸癌細胞(HT-29)的生長和誘導凋亡[32]。

2. 影響訊息傳導途徑

許多研究報告指出，槲皮素與相關類黃酮化合物在與癌變過程中的訊號傳導途徑有很大的關係。包括細胞週期的調控、細胞凋亡、發炎和血管新生。例如，槲皮素誘導肝癌細胞 HepG2 凋亡是透過兩種途徑，粒腺體途徑及抑制細胞生存訊號途徑 Akt/ERK[33]。在人類白血病細胞(HL60)中能誘發 DNA 的裂解，Bax 的上調以及 Bcl-2 的下調[34]。Cyclooxygenase-2(COX-2)的異常表達和發炎及腫瘤形成有重要的關係，過度的表達已被證明在一些癌症的侵襲有高度正相關[35]。槲皮素在乳腺癌細胞(MDA-MB-231)中透過抑制 p300 訊號，抑制 COX-2 的表達和 PGE2

的產生以及 COX-2 啟動子的活性，且在 primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)可顯著抑制由血管內皮生長因子(VEGF 165)所誘導的血管新生[36]。Phospholipase D (PLD)被認為與細胞增殖、腫瘤生成有關，而槲皮素能透過誘導 Phospholipase D1(PLD1)的下調及抑制 metalloproteinase-2 (MMP-2)活性，抑制人類神經膠質瘤(U87 glioma cells)的細胞增殖及入侵[37]。槲皮素還能透過抑制 Leptin、Leptin receptor protein, Leptin mRNA and Leptin receptor mRNA 的表達，抑制人類胃癌細胞(MGC-803)的細胞增殖。許多研究都可以證明槲皮素確實可以透過各種不同的機制來達到預防癌症的效果。

槲皮素與肝癌

槲皮素加上 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)能加速對 TRAIL-resistant 的肝癌細胞凋亡，透過顯著上調 DR5(TRAIL 的 death receptor)的 mRNA 和蛋白水平，及下調 cFLIP(caspase 8 抑制劑)的蛋白水平，提高了 TRAIL 在各種肝癌細胞中的敏感性，促進肝癌細胞的凋亡[38]。槲皮素也可以加上加上重組的腺病毒載體(表達 p53, GM-CSF and B7-1 的基因)，讓抑制肝癌細胞(BEL-7402, HuH-7 and HLE)增殖效果更佳[39]。除了透過細胞凋亡 Death Receptor 途徑外，槲皮素也可以透過促進細胞凋亡粒腺體途徑，透過 caspase-3 和 caspase-9 的激活，增加 Bax 易位到粒腺體膜，誘導細胞凋亡，以及抑制 Akt and extracellular regulated kinase (ERK)生存訊號，讓槲皮素能依劑量依賴性的誘導 HepG2 死亡[40]。還可以透過 Survivin 和 Bcl-2 蛋白下調和 p53 上調，促使細胞凋亡[41]。而在抑制細胞週期方面，用流式細胞儀分析發現細胞週期 G0/G1 phase 增加，S phase 下降，subG0/G1 上升，槲皮素對肝癌細胞(HA22T/VGH and HepG2)有劑量依賴性的抑制效果，且 annexin V 增加，加上化療試劑 paclitaxel 對肝癌細胞造成凋亡的效果更好[42]。在動物實驗方面，利用 NDEA(誘導大鼠肝癌)加上槲皮素，發現槲皮素是通過減少氧化應激和減少抗氧化劑活性，發揮其在肝癌上的預防作用[43]。槲皮素目前也被拿

來搭配治療肝癌的化療藥物使用，例如化療藥物 5-fluorouracil (5-FU) and carboplatin 會使 Hsp27、Hsp40 上調，因此搭配槲皮素(熱休克蛋白 Hsp27、Hsp40 抑制劑)，用 western blot 分析發現 pro-caspase 3 水平降低。兩者聯合能有效增加對 HepG2 與 Hep3B 的毒殺[44]。槲皮素還可以加上 2-methoxyestradiol(hormonal agents)，增加 annexin V 的 binding，造成 MnSOD RNA 的上升，對肝癌細胞 (HA22T/VGH and HepG2)有最佳的毒殺作用[45]。除了搭配化療藥物，也可以搭配 roscovitine(CDK 抑制劑)，透過抑制 Akt pathway 下調 caspase3、caspase9，增加對 HepG2、Hep3B 的凋亡效果[46]。另一方面，Wnt pathway 的突變及失調可能導致許多疾病，在癌變過程中扮演重要角色，槲皮素在 Huh7 扮演 Wnt 抑制劑的角色，針對 Wnt 下游負責傳遞訊號的 β catenin 作抑制[47]。



三、 細胞凋亡

在多細胞生物中，細胞的死亡有兩種不同的形式：第一類是 Necrosis(細胞壞死)，第二類是 Apoptosis(細胞凋亡)。Necrosis 主要是因為外在因素如局部貧血、高熱以及物理、化學損傷和生物的侵襲，造成細胞極速死亡而結束其生命。

Apoptosis 又稱為程序性的細胞死亡，它是用來描述伴隨細胞死亡的一系列形態學上特定的變化[48]。在希臘文中 apoptosis 為樹葉或花瓣凋落的意思[49]。它是指像秋天樹葉凋謝一樣，細胞在一定的生理或病理條件下，遵循自身的程序，自己結束生命的過程，最後細胞脫落離體或裂解為若干凋亡小體(apoptotic bodies)而被其他細胞吞噬。

形態特徵

細胞凋亡的形態特徵與細胞壞死的形態特點不同。細胞壞死的形態特徵首先是膜通透性增加，細胞外形發生不規則變化，內質網擴張，核染色質不規則的位移，進而粒線體及核腫脹，溶酶體破壞，細胞膜破裂，胞質外溢。這種細胞死亡過程常常引起炎症反應[50]。而細胞凋亡，是細胞內在的有規律的機制引起。主要是受細胞本身之 DNA 調控而作用，主要目的在消除老化、受傷及 DNA 受到破壞的細胞。當細胞收當凋亡訊號時，細胞首先變圓，與周圍細胞脫離，胞質濃縮，內質網擴張成泡狀病與細胞膜融合，粒線體無大變化，核染色質密度增高成半月形，並凝聚在核膜周邊，核仁裂解，核固縮，進而細胞膜內陷將細胞自行分割為多個外膜包裹，內含物不外洩的的細胞凋亡小體。由於這種過程不導致溶酶體及細胞膜破裂，沒有細胞內含物外洩，固不引起炎症反應。生化特徵為細胞核內的 DNA 會被核酸內切酶分解 180-200bp(base pair)，細胞膜上的 PS 磷脂(Phosphatidyl serine)外翻，這是讓巨噬細胞辨識細胞凋亡的訊息，當此訊息出現時，巨噬細胞會進行吞噬作用吞噬 apoptotic bodies[51]。與壞死(necrosis)程序最大的區別在於細胞

凋亡並不會引起周圍組織的發炎[52]。

訊號傳導路徑

細胞凋亡傳導路徑主要分為兩條(如 Fig. 1)[53]：第一條是 Death receptor pathway，第二條是 Mitochondrial Pathway。而細胞凋亡最後的訊息傳遞最後都是會匯集到 caspase 蛋白來執行細胞自我凋亡。Caspase 蛋白(Cysteine-Aspartate Specific ProteASES)屬於 cysteine protease 蛋白家族，在哺乳動物主要是以沒有活性的 pro-enzyme (zymogen)形式存在，當 caspase 受到 pro-apoptotic 訊息刺激時，其結構會發生改變而變成有活性的 caspase[54]。已活化的 caspase 會切斷細胞內的結構蛋白質，也會破壞某些參與代謝的酵素和訊息傳遞的蛋白質。Caspase 大致上可分為兩類：一類為執行者(effector)，如 caspase-3、6、7，它們可直接降解(degradation)結構蛋白和功能蛋白，引起凋亡，但不能通過自我催化，或自我剪接的方式活化；另一類為啟動者 (initiator)，如 caspase-8、9，當細胞受到凋亡訊息後，能透過自我剪接的方式活化，然後引起 caspase 連鎖反應，如 caspase-8 可依次活化 caspase-3、6、7[55]。

1. Death receptor pathway

Death receptor pathway 是由胞外腫瘤壞死因子(TNF)家族的配體如 TNF- α 、FasL/CD95L、TWEAK、TRAIL 與細胞膜上的受體結合(分別是 TNF-R、Fas/CD95、DR3、DR4/5)。配體與受體結合後會活化細胞膜下的 death domain，開始吸引 FADD(Fas-Associated protein with Death Domain)或 TRADD(Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein)，FADD 又會繼續吸引 pro-caspase 8 來結合形成複合物，稱為 death-inducing signaling complex，DISC。pro-caspase 8 在 DISC 中局部濃度升高，會開始自我剪接並活化成 caspase 8，活化的 caspase 8 釋放到胞質中啟動 caspase 的級聯反應，激活下游的 caspase 3，caspase 3 則會切割 ICAD/CAD complex，使兩者分開，讓 CAD 切割 DNA 形成降解導致細胞凋亡。而

活化的 caspase 8 能使胞質中的 Bid 斷裂成 tBid，tBid 會轉移到粒腺體上，誘導粒腺體釋放 cytochrome C 進入胞質，開啟 Mitochondrial Pathway，有效增加了細胞凋亡的訊號。

2. Mitochondrial Pathway

Mitochondrial Pathway 除了由 Death receptor pathway 活化的 Bid 傳遞凋亡訊息，另一條受控於 Bcl-2 家族蛋白 (B cell lymphoma-2)。Bcl-2 家族蛋白群依據 Bcl-2 homology domain (BH) 的不同可大致區分為：(1) antiapoptotic proteins (包括：Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、mcl-1)；(2) proapoptotic proteins (包括：Bax、Bcl-Xs、Bad、Bak、Bid)[56]。當 Bad 收到凋亡訊息，會被釋放出來與抗凋亡蛋白因子 Bcl-2 結合。若促進凋亡蛋白多於抗凋亡蛋白時，粒線體膜會形成孔洞，在粒線體內的 cytochrome C 會從中釋出。釋出的 cytochrome C 會與 Apaf-1 結合，並吸引 pro-caspase 9 剪接活化出 caspase 9，結合並漸漸形成 apoptosome，caspase 9 又會吸引 pro-caspase 3 剪接活化出 caspase 3，從而誘導細胞凋亡。

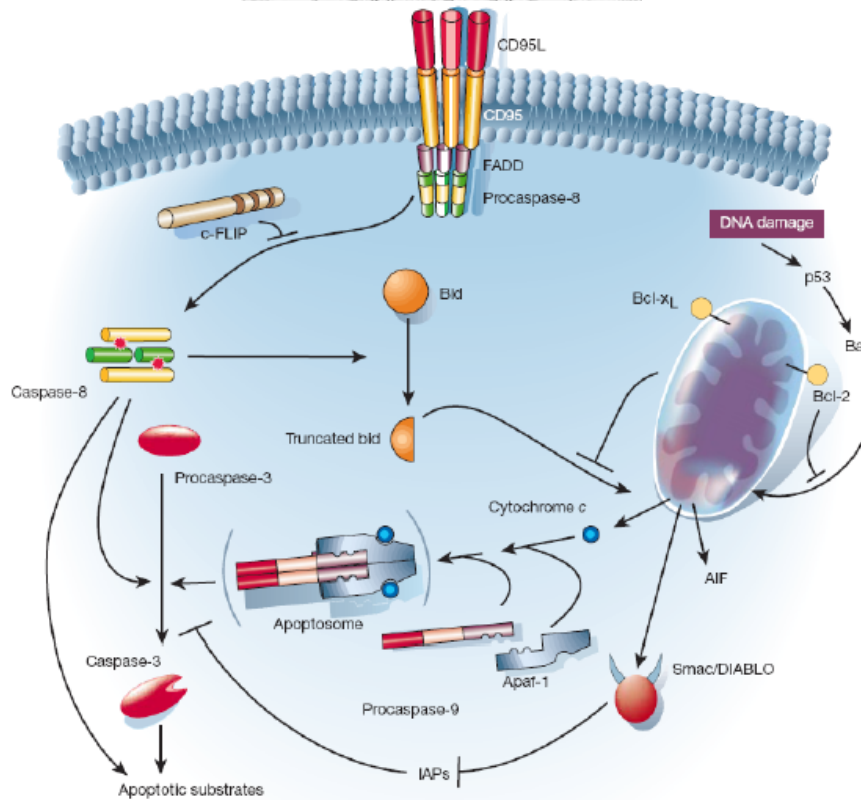


Fig. 1 Two major apoptotic pathways in mammalian cells.

細胞凋亡除了受到 Death receptor pathway 及 Mitochondrial Pathway 的基因調控外，p53 也是一個很重要的調控因子。p53 是一種分子量 53kDa 的轉錄因子，位於人體第 17 對染色體上。在正常的情況下，p53 的表現量很低，但當 DNA 異常時，p53 蛋白及轉錄活動明顯增加，並刺激 p21 蛋白的表現，使細胞停留在 G0/G1 期而不能進入 S 期，以進行 DNA 修補[57]，直至 DNA 修復後才進入正常的週期。若 DNA 損傷嚴重無法修補時，則誘發細胞走向凋亡途徑，防止細胞癌化，因此 p53 有腫瘤抑制基因之稱。

大多數抗癌藥物，如拓撲異構酶抑制劑、抗代謝物和激素拮抗劑等，都可在不同類型的腫瘤細胞中誘導細胞凋亡。抗癌藥物的療效不僅取決於這些藥物與各自特意靶細胞的相互作用，也取決於這些藥物誘導細胞凋亡的能力。因此，腫瘤細胞對細胞凋亡的敏感性是決定化療效果的關鍵因素，如何在治療中促進腫瘤細胞凋亡已成為新的化療目標和篩選抗癌新藥的標準。



四、 細胞週期

細胞增殖是細胞生命的一個基本特徵，單細胞生物(細菌和酵母)以此來繁衍後代，而多細胞生物(如高等真核生物)通過細胞增殖完成個體發育。細胞增殖與機體的生長、在生、修復、細胞凋亡腫瘤發生都有密切關係，它也是細胞分化形成組織、器官、系統的基礎。細胞生長到一定階段開始分裂，細胞分裂後產生的新細胞生長增大，此後又平均的分裂成兩個遺傳性相同的子細胞。這種周而復始的生長分裂週期稱為細胞週期(Cell Cycle)。換言之，細胞週期是指親代細胞分裂結束到子代細胞分裂結束所經歷的過程，而這個過程所需的時間稱為細胞週期時間。細胞週期基本任務就是確保 DNA 在合成期(S phase)時有確實複製一次，以及兩個相同的染色體在有絲分裂期(M phase)時有被平均的分配到子細胞中[58]。

細胞週期與檢查點

細胞週期可分為間期(Interphase)和有絲分裂期(Mitosis)。間期又可分為三個時期：G1(Gap1 phase)、S(Synthesis phase)、G2(Gap2 phase)。當細胞進入 G1 期時，細胞代謝活化，複製所需胞器以及一些細胞質的組成，以供下一階段複製染色體使用。細胞在檢查過大小、生長因子和 DNA 後，即通過 G1 checkpoint，進入 S 期開始進行 DNA 複製。複製完後進入 G2 期，此時細胞已具有兩倍的遺傳物質，並為有絲分裂期作準備。當細胞確定 DNA 完全複製後，即通過 G2 checkpoint，並進入有絲分裂期(M phase)。細胞在有絲分裂期時，進行核裂(染色體分離)和質裂(細胞質分裂)。細胞在 M 期時，也有一個 checkpoint，稱為 Spindle assembly checkpoint，主要檢查染色體是否附著在紡錘體上。Checkpoint 對細胞週期調控相當重要，在 G1 和 G2 checkpoint 時發現 DNA 受損或複製不完全，細胞就會進入 G0 期，暫時停止分裂，待 DNA 修補完後在進入下一個時期。若細胞週期失去調控，造成染色體變異，導致部分基因流失、重組，往往會演變成癌細胞，無限制的分裂形成腫

瘤。另外，細胞週期也受到生長環境(如細胞密度)的影響。當培養基長滿細胞後，細胞即進入 G0 期，不會進行分裂，若去除其中一些細胞，細胞又會開始進入細胞週期直到長滿。

調控因子

在細胞週期中除了受到 checkpoint 調控[59]之外，還受到兩個關鍵調控因素，週期素(Cyclin)和週期素依賴激酶(cyclin dependent kinase, Cdk)[60]。這是由 2001 年諾貝爾生理醫學獎得主利蘭·哈特威爾(Leland Hartwell)、保羅·納斯(Paul Nurse)和蒂莫·漢特(Timothy Hunt)的研究所發現。

1. 週期素 (Cyclin)

在 1983 年時，學者藉由蛙卵與海膽的研究，發現了一些會隨著細胞週期進行而分解又出現的蛋白質，濃度在有絲分裂前增加，有絲分裂後消失，由於這種蛋白質周期性的出現，因此將它命名為週期素 cyclins (指週而復始出現的蛋白質)[61]，之後許多學者紛紛展開對週期蛋白的研究，在不同的生物體中分離出數十種的週期蛋白。目前已發現的週期素有數十餘種，如酵母細胞中 Cln1、Cln2、Cln3 及哺乳動物細胞中的 Cyclin A、B、C、D、E、F 及 H 等。依據它們在細胞週期中調控階段的不同分別歸為(1)G1 期週期素(G₁ cyclins 或 START cyclins)，如 Cyclin C、D、E，(2)M 期週期素(mitotic cyclins)，如 Cyclin A、B。而 Cyclin H 則會和 CDK 7 形成一具有酵素活性的複合物，進而活化 cdc 2 (CDK1) 及 CDK2。在週期素分子中都含有一段高度保守的氨基酸序列稱為 cyclin box，負責辨認不同的 cyclin-dependent kinases (CDKs)並與之結合，才能在調控細胞週期中發揮作用。

2. Cyclin-dependent kinases (CDKs)

Cyclin-dependent kinases (CDKs)是一群蛋白激酶家族，會和特殊的Cyclin 結合而活化。目前已知共有10種CDKs 被發現，分別是cdc 2 (CDK1)、CDK2、CDK3、

CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8、CDK8、CDK10。在真核細胞中，藉由連續的訊息，經過活化，與隨後一系列特殊的Cyclin-CDK 複合物(Cyclin-CDK complex)來調控細胞週期進行，讓細胞增生。例如，Cyclin D 與CDK4 形成之複合體與G1 期的進行有關，Cyclin D 的表現及其與CDK2 的結合則是與細胞進入S 期相關；Cyclin A與CDK2 主導了S 期的進行，而Cyclin B 與CDK1 則和細胞進入M 期的調控有關。

細胞週期與癌細胞

由於細胞週期是一相當複雜的過程，因此小心且綿密的調控乃細胞分裂是否成功的保證，如果此一調控機制在任一環節失去控制，細胞即可能發生不正常之生長調節、未成熟分裂，甚且影響到後續的細胞生理及細胞代謝，也可能導致個體特定細胞數不正常增生，或許因此導致腫瘤之發生[62]。對大部分癌細胞而言，它們在檢查點的調控作用通常是有缺陷的[63]。還有p53 的突變在癌細胞中也是很常見[64]。一旦這些調控的蛋白質表現異常，導致癌細胞不受控制，則會不斷地進行細胞週期而增殖分裂。因此，在抑癌機轉方面，槲皮素如何影響癌細胞之細胞週期，用於癌症之預防與治療之可能方向，調控細胞週期之機轉、細胞週期素(cyclin)或細胞週期素依賴激酶(cyclin dependent kinases, Cdk)表現如何受到調控以及抑制癌症活性物質在細胞週期中扮演之角色等之探討，都是此實驗的研究課題。

五、 基因晶片

生物體中基因的表現千變萬化，在瞭解生命體的生理發育，病理發展過程中，扮演一個非常重要的角色。人體約有 38,500 個基因，隨著人類基因體研究計畫展開後，傳統的核酸分子雜交技術所花費的時間與效率早已不足以應付大量基因訊息的產生。隨著半導體技術的進步，人們也提出了結合生物科技和半導體技術的構思。在 1980 年代，Bains 將短的 DNA 片對固定在支持物上，藉由雙股 DNA 分子雜交(Hybridization)進行序列測定[65]。1990 年代，史丹佛大學結合了探針固相原位合成技術(in situ synthesis)和照相平版印刷技術(Photolithography)，首先製造出世界上第一張基因晶片[66]，可以一次同時分析大量的基因資訊，解決了傳統操作技術繁雜、耗時耗工、低效率之不足。

基因晶片之分類

依據基因探針點印固定於晶片表面方法的不同，可分成兩種，一種是原位合成(in situ)的基因晶片，又稱寡核苷酸晶片(oligonucleotide chip)[67]，在晶片的特定部位合成寡核苷酸而製成。第二種是先合成 DNA，再由機器點印(printing)到晶片上。

第一種原位合成技術又分為兩類。(一)光引導原位合成技術(light-directed in situ synthesis)[68]。由史丹佛大學發明，Affymetrix 公司採用。製作方式是利用光罩蝕刻(Photolithography)的方式，進行核苷酸的合成，將長度約 25 個鹼基的核苷酸合成在約一平方公分大小的晶片上。(二)壓電打印法(piezoelectric printing)。其方法是用噴墨打印機將特定種類的四種鹼基合成試劑噴印到晶片的預定區域上，然後再沖洗、去保護，進行寡核苷酸合成的下一個步驟[69]。第二種晶片外合成探針，是先用分子生物學技術合成探針，在利用機械打點法點印到晶片上去[70]。

基因晶片之原理

基因晶片之原理，是將大量已之基因序列之基因探針，依照特定排列方式，固定在載體，然後將特殊標記處理後之檢體 RNA 與基因晶片上之探針進行雜交 (hybridization)。DNA 四種鹼基 A、T、C、G 會根據鹼基配對法則，AT 與 TA、CG 與 GC 配對，雜交訊號強弱代表基因表現強度。最後由電腦及分析軟體，對數以萬計的基因進行表現量分析。不論是細胞生命週期、生化調控路徑等基礎研究，還是藥物研發中對於藥物作用位置的篩選，臨床的疾病診斷預測，癌症基因的檢測等，都是基因晶片可以應用的範圍[71][72][73]。

Affymetrix 晶片介紹

Affymetrix 公司乃是寡核苷酸微陣列晶片的先驅，他們的晶片，有多項特有的設計，較以往傳統的微陣列晶片，有更準確的實驗結果，將其特點分別敘述如下：

1. 光罩蝕刻法(Photolithography)

過去微陣列晶片需依賴自己實驗室持有的有限基因樣本作為基因探針，數量及品質有時候不能完全符合實驗要求。光罩蝕刻法可自行設計探針，在一小晶片中探究生命體所有基因變化。

2. 探針組(Probe Set)的採用

在生物演化上表現的基因常會出現類似轉錄樣本，以往在實驗室有限的基因樣本中所選擇的探針，其專一性及代表性不夠，造成非專一性雜交，容易高估訊號表現量，影響到分析結果的可信度。因此，採用多個探針來偵測基因的表現與否變成為可以減少訊號錯誤的一個方式。

3. 完美配對及不完美配對探針設計(Design of perfect match/mismatch probe pairs)

設計一對獨特的 25 mer 寡核苷酸探針，其中一個是完全與 Target sequence 互補的完美配對，另一個則是除了第 13 個核苷酸不互補配對外其餘序列與 Target

sequence 互補配對。此種設計可針對每一個點均有相對的陰性控制點，作背景值計算，提高探針的靈敏性及特異性，尤其在檢測低表現量時更能增加訊號判斷的正確性。

本實驗利用基因晶片高統計輸出量、操作容易、分析信賴度及精確性高、使用檢體樣品少、應用範圍廣可獲得整體性的實驗數據等優越特性[74-79]，探討人類肝癌細胞在槲皮素作用下，細胞的基因表現影響及其作用機轉。



第三章 材料和方法

一、 實驗材料

1. 細胞培養

Cell line

人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7，如 Fig. 2 左為 Hep3B；右為 Huh7。

(ATCC，由國立中山大學生醫所戴明泓老師提供)

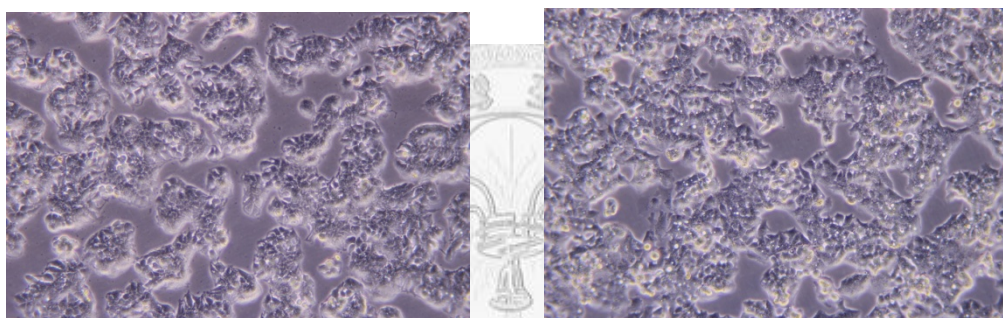


Fig. 2 人類肝癌細胞株

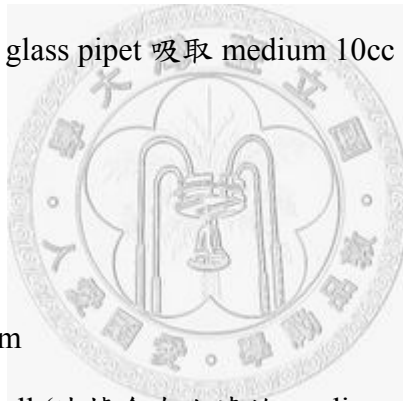
Medium

DMEM+10%CS+1%(penicillin +streptomycin)+1% L-glutamine

1. 將血清瓶經高壓滅菌釜滅菌及烘箱烘乾後放入 Laminar flow 開 UV 殺菌。
2. 使用量筒裝入 1 公升三次水，並加入 13.4g DMEM、3.7g NaHCO_3 、5.98g Hepes Acid Free，放在 Stirrer 上開啟自動攪拌。
3. 使用 PH meter 調溶液 PH 值為 7
4. 在血清瓶上裝 Filter 過濾剛泡好的 DMEM 溶液，分裝至血清瓶各 450ml
5. 加入 50ml(10%) CS、5ml(1%)(penicillin +streptomycin)、5ml(1%) L-glutamine，放入 4°C 冰箱

解凍培養

1. 用 pipet 吸取 medium 10cc 至 dish
2. 將細胞從-80°C冰箱取出(含有 medium 及 DMSO)，放入恆溫水槽 37°C下解凍變液體
3. 加入 1cc 細胞(Hep3B p20，Huh7 p19)至 dish，稍微搖晃，用顯微鏡觀察細胞呈現懸浮，放入 incubator(37°C，95% air +5%CO₂) 24hr
4. 從培養箱取出前天培養細胞的 dish
5. 用 suction 吸乾 medium，glass pipet 吸取 PBS 10cc，加入 dish(對 wall)，稍微搖晃(洗掉死細胞)
6. 用 suction 吸乾 PBS，glass pipet 吸取 medium 10cc 加入 dish(對 wall)，放入 incubator



繼代培養

1. 用 suction 吸掉 medium
2. 先用 10ml PBS wash cell (洗掉含有血清的 medium，因為血清會降低 trypsin 作用)，用 suction 吸乾
3. 加入 trypsin 1ml 至 dish，shake 後放入 incubator 2-3 min，取出並拍打
4. 加入 5ml medium 至 dish，在用 pipet 吸起放入離心管(共有 6ml)
5. 將兩管離心管對秤放入離心機，1500rpm，5min
6. 用 5ml PBS wash dish，suction 吸乾，加入 10ml medium 至新 dish
7. 離心管離心後，用 suction 吸乾上清液
8. 加入 500μl medium 至離心管，並拍散(subculture 1：5)
9. 從離心管吸取 100μl 加至新 dish，放入 incubator 繼續 maintain cell，剩餘細胞實驗用

細胞冷凍

1. 用 trypsin 將細胞打下
2. 置入離心機離心 1500rpm，5min，吸乾上清液
3. 加入 4.5ml CS 及 0.5ml(10%) DMSO
4. 分裝各 1ml 至冷凍管，冰在 -80°C 冰箱

2. 細胞計數

1. 96 well 的其中 3 孔各加入 100 μl trypan blue(稀釋用)，稀釋時取 100 μl 未知濃度 cell，在孔中吸放 10 次，為一次稀釋，連續二個孔作吸放動作為第二次稀釋，連續三個孔作吸放動作就是三次稀釋
2. 放入血球計數器(如 Fig. 3)，在顯微鏡下計算在 4 個 4 \times 4 方格(如 Fig. 4)內的總細胞數



Fig. 3 血球計數器

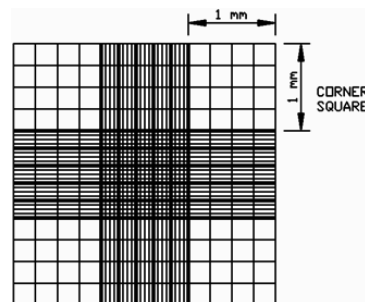


Fig. 4 血球計數器上的方格

$$\text{Cell counting formula: } \frac{\text{計數器上 cell 數目}}{4} \times 2^{\text{稀釋次數}} \times 10^4 = \text{cell 個數} / \text{cc}$$

3. 藥物處理

槲皮素(Sigma, St Louis, USA)

1. 加入 0.3g 的槲皮素至離心管
2. 加入 DMSO 至 10cc，振動至溶解，濃度為 0.1M(stock solution)
3. 分裝各 1ml 至 ependorf(避光小 tube)，共 10 瓶，冰在 -20°C 冰箱

4. Alamar Blue cell viability reagent

Introduction

細胞健康狀況有很多種方法可以監測。細胞膜的完整性，DNA 合成，DNA 含量，酶的活性，ATP 的存在，和細胞減少的這些狀況，被稱為細胞活力和細胞死亡的指標。作為一個細胞健康指示劑，AlamarBlue 細胞活性試劑能測量各種人類、動物細胞株、細菌、植物、真菌的增殖(proliferation)能力。Resazurin，為 AlamarBlue® 試劑的活性成分，是一種無毒，細胞滲透性化合物，顏色是藍色的，幾乎無螢光。一旦進入細胞，Resazurin 會被還原成 resorufin，顏色是紅色，高度螢光性的一種化合物。活的細胞會不斷的將 Resazurin 還原成 resorufin，增加螢光性以及顏色的變化。

AlamarBlue® 細胞活性試劑用於評估細胞活力。只需添加 AlamarBlue® 試劑 10% 的 sample 量(即，加入 10µl AlamarBlue® 試劑至 100µL 的 sample)，送至 37 度 C 培養箱 1-4 小時。較長的時間有較高的敏感性，而且並不會損害細胞健康。所產生的螢光可用 fluorescence spectrophotometer 讀取，或是用 spectrophotometer 讀取 AlamarBlue® 試劑的吸光度。最後，繪出螢光強度(或吸光值)與濃度的關係圖。



Fig. 5 Resazurin 還原成 Resorufin

AlamarBlue®作為一個細胞活性及增值的指示劑，透過 resazurin 變成 resorufin(如 Fig. 5)；Resazurin，一個無螢光性的染料透過活細胞的還原反應變成紅色且高度螢光性的 resorufin(如 Fig. 6)。產生的螢光量與活細胞數量呈正比。

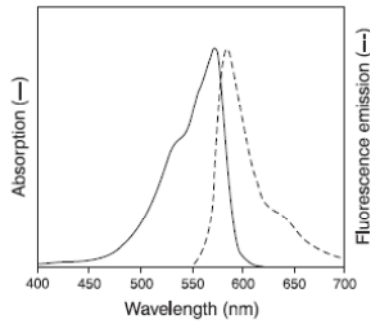
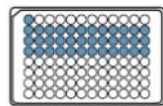


Fig. 6 Resorufin 的吸光度與放射螢光光譜

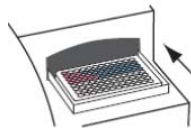
Protocol



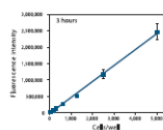
1. add reagent to cells



2. incubate 1-4hrs at 37C



3. read fluorescence(or absorbance)



4. process data

Fig. 7 AlamarBlue protocol

5. 流式細胞儀

流式細胞技術(flow cytometry)是指在流體狀態下觀測細胞的一種技術，而流式細胞儀(flow cytometer)則是指細胞於流體狀態下移動時，能夠觀測及記錄細胞特質的儀器。flow cytometry 技術主要是為了快速偵測一顆接著一顆流動於液體水柱中的顆粒或細胞，當細胞被雷射光機發後，會產生 $0.5\sim 5^\circ$ 之前散射光(forward scatter, FSC)及 $15\sim 150^\circ$ 之側散射光(side scatter 或 right-angle scatter 或 SSC)。由於入射光的波長小於螢光的波長，因此由光的波長及強度變化，即可測出顆粒的大小(與 FSC 成正比)，顆粒性(與 SSC 成正比)。當顆粒本身帶有螢光物質(fluorochrome)，或被帶有螢光物質的抗體或被其它螢光物質染上的話，則會產生波長不等的螢光(如 Fig. 8)。Propidium iodide(PI)是核酸染劑，若單一細胞中核酸含量愈高，則與此類螢光物質結合的量也愈高，因而受雷射激發後產生的螢光強度也就愈強。利用此性質，可用來決定核酸量因凋零死亡時核酸量減少的變化或瞭解細胞分裂週期(cell cycle)的變化。

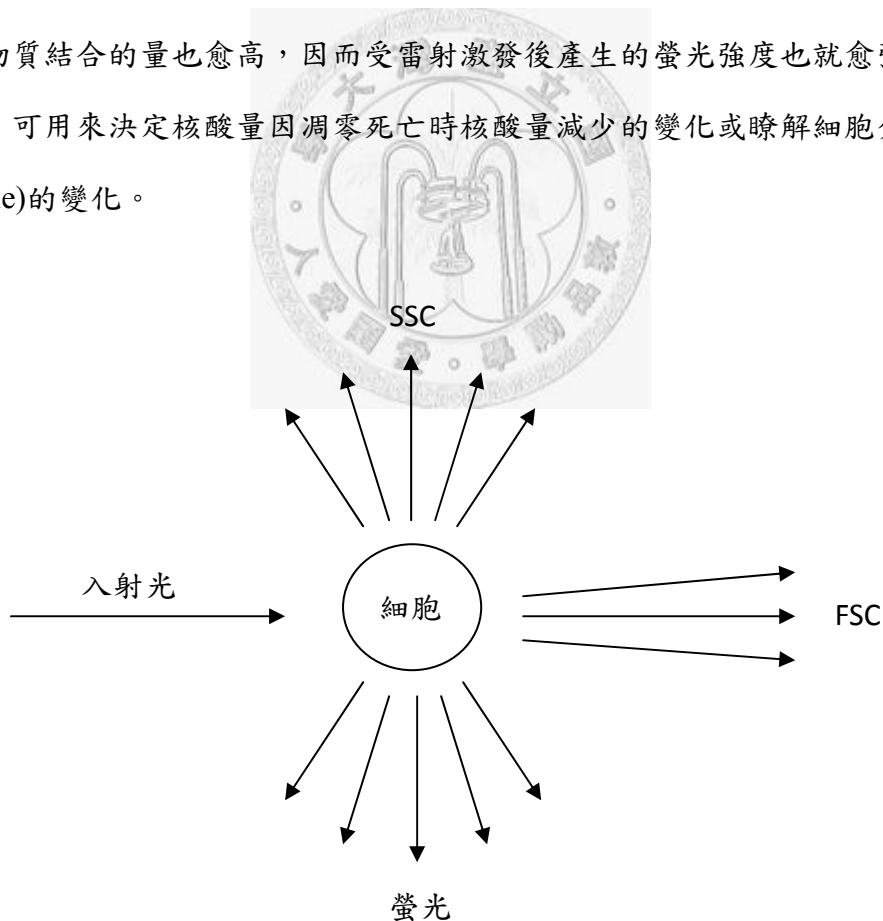


Fig. 8 細胞經雷射光激發產生的散射光及螢光

6. Affymetrix® Human Genome U219 Array

Introduction

Affymetrix® Human Genome U219 Array 擁有 49,411 個探針組，探針長度為 25 mer。是一個易於使用，低成本，且在人類全基因表達分析中最流行，最廣泛使用的基因晶片。此晶片是專門為 GeneAtlas® System 所設計，此系統結合了低成本、簡單的工作流程、易用性、優異的性能，同時配合工業標準基因表達陣列設計。這些人類全基因組表達陣列全面覆蓋在一個方便的格式，可同時處理四個樣本，這種格式也降低了基因晶片處理的複雜性。

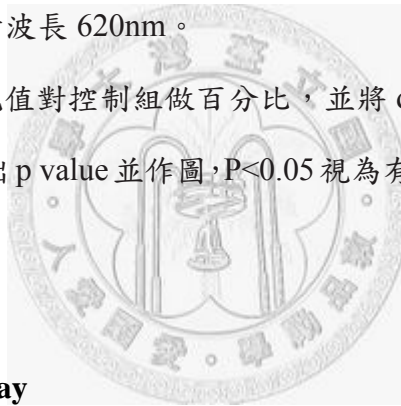
特點如下：

1. 最多引用一數以千計的研究使用此晶片的設計。
2. 方便的格式—在最少手動操作陣列的情況下，可同時處理四種樣本。
3. 高轉錄覆蓋—9 至 10 個探針對一個轉錄因子，能得到高準確的表達。
4. 高重複性—訊號的 correlation 等於或大於 95%。
5. 高敏感性—以 1：100,000 檢測超過 70%的 RNA 轉錄因子。

二、 實驗方法

1. Cell proliferation assay

- (1) 將人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7 分別種入 96 孔盤(Nunc, Denmark), 每孔 50 λ 的 medium 包含 5000 個細胞, 放入 37°C、5%CO₂ 的 incubator 至貼壁生長。
- (2) 待細胞貼壁後加入 50 λ 不同濃度槲皮素的 medium(0、20、100、200、400、1000 μ M), 使之各孔藥物濃度為 0、10、50、100、200、500 μ M。
- (3) 經過 24、48、72hr 後, 用顯微鏡(Olympus)觀察並拍照。之後在各孔各加入 10 λ 的 Alamar Blue, 放入 incubator 4-6hr 反應至變色。
- (4) 利用 Elisa Reader(Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)讀取吸光值, 測量波長 570nm、參考波長 620nm。
- (5) 將各濃度讀取的吸光值對控制組做百分比, 並將 data 表示成 mean \pm SD, 在與控制組做 t-test 求出 p value 並作圖, P<0.05 視為有顯著意義>(*表示 P<0.05; **表示 P<0.001)。



2. Colony formation assay

- (1) 將人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7 分別種入 6 孔盤(Nunc, Denmark), 每孔 3000 個細胞, 放入 37°C、5%CO₂ 的 incubator 至貼壁生長。
- (2) 待細胞貼壁後吸掉 medium, 加入不同濃度槲皮素的 medium(0、1、5、10、50、100 μ M)。
- (3) 經過 10 天培養後, 吸乾 medium, 各孔各加入 1cc Crystal violet (Sigma, USA), 固定細胞並染色, 放置 2-3hr 後用水沖洗並晾乾。
- (4) 計算每個 well 被染色的 colony 數目, 將 data 表示成 mean \pm SD, 在與控制組做 t-test 求出 p value 並作圖, P<0.05 視為有顯著意義>(*表示 P<0.05; **表示 P<0.001)。

3. Wound-healing assay

- (1) 將人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7 分別種入 6 孔盤(Nunc, Denmark)，每孔 1×10^6 個細胞，放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的 incubator 至貼壁生長。
- (2) 待細胞長至滿盤後，吸乾 medium，使用無菌的 pipet 10 λ tip(gilaon, Inc.:Middleton, WI)的尖端，在貼滿單層細胞的 well 底盤畫上十字，刮起在附著在底盤的細胞，進行 wound 的動作。加入 PBS 清洗被刮起的細胞及碎片，並重複兩次清洗。
- (3) 小心加入不同濃度槲皮素的 medium(0、10、50、100 μM)，以免細胞被沖起。利用顯微鏡觀察細胞移動情形，並在 0、12、24、36、48 hr 時拍照。
- (4) 將照片中 wound 的寬度進行量化，將 data 表示成 mean \pm SD，在與控制組做 t-test 求出 p value 並作圖， $P < 0.05$ 視為有顯著意義>(*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.001$)。



4. Flow cytometry assay

- (1) 將人類肝癌細胞株 Hep3B、Huh7 分別種入 6 孔盤(Nunc, Denmark)，每孔 2×10^5 個細胞，放入 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的 incubator 至貼壁生長。
- (2) 加入不同濃度槲皮素的 medium(0、10、50、100 μM)培養。48 小時用 trypsin 收集細胞，以離心機 1500rpm/5 分鐘去除上清液，加入 PBS 清洗細胞，以 4°C 離心機 2000rpm/5 分鐘去除 PBS，加入冰冷的 70% ethanol 冰在 -20°C 冰箱。
- (3) 24 小時以 4°C 離心機 2000rpm/5 分鐘去除 ethanol，加入 PBS 清洗細胞，以 4°C 離心機 2000rpm/5 分鐘去除 PBS。
- (4) 避光加入 staining solution 1ml，staining solution：1% Triton X-100 (Sigma; St. Louis, MO)，0.1 mg/ml RNase A (Sigma; St. Louis, MO)，4g/ml propidium iodide (PI) (Sigma; St. Louis, MO)。

- (5) 利用 Cell Lab Quanta™SC Flow Cytometer (Beckman Coulter)分析不同 DNA 含量的細胞分佈情形。
- (6) 將 data 表示成 mean±SD，在與控制組做 t-test 求出 p value 並作圖，P<0.05 視為有顯著意義。

5. Microarray analysis

因從前面四個實驗 Proliferation Assay、Colony formation assay、Wound-healing assay 及 Flow cytometry assay 結果得知，同樣濃度的槲皮素對 Huh7 不管在抑制細胞增殖、抑制細胞菌落發展、抑制細胞移動、抑制細胞週期以及促進細胞凋亡的效果均比 Hep3B 佳；而且槲皮素在濃度 50 μ M 時，對 Huh7 細胞增殖、菌落發展、細胞移動、細胞週期和細胞凋亡均已經有顯著的效果，因此此實驗選擇槲皮素濃度為 50 μ M，細胞株為 Huh7 作微陣列分析(槲皮素濃度 0 μ M 為控制組，濃度 50 μ M 為實驗組)，並對分析完後有被調控的基因，選擇兩倍上調與兩倍下調的基因作 Ontology 分析，以 Biological process 與 Molecular function 的分組，從中挑選與 Apoptosis、Cell cycle、Migration 有關的基因做初步探討。

- (1) 首先先將人類肝癌細胞株 Huh7 種入 10cm dish，約 2×10^6 個細胞，放入 37°C、5%CO₂ 的 incubator 至貼壁生長。
- (2) 加入不同濃度槲皮素的 medium(0、50 μ M)培養。48 小時用 trypsin 收集細胞，以離心機 1500rpm/5 分鐘去除上清液，加入 PBS 清洗細胞，以 4°C 離心機 2000rpm/5 分鐘去除 PBS，加入 1mL Trizol 放置 4°C 冰箱 overnight。

(以下交給賽亞基因科技公司)

- (3) 細胞萃取 RNA 後，以 Agilent 2100 Bioanalyzer electropherogram 測試 RNA 品質。
- (4) 加入 poly-A RNA contols，在加入 T7 oligo(dT)引子，合成包含 T7 啟動子序列

的第一股 cDNA。

- (5) 把單股 cDNA 轉換成轉錄用雙股 DNA 模板，合成第二股 cDNA。
- (6) 利用雙股 cDNA 模板，產生大量 biotin-modified aRNA 的複製，此為擴增步驟。
- (7) 擴增完後去除雜質，改善 biotin-modified aRNA 的穩定度，純化 aRNA。
- (8) 將標記的 aRNA 進行切割，準備作為基因晶片雜交用的 target，進行雜交。



第四章 結果

一、 Cell proliferation assay

目前許多中草藥開發成為抗癌藥物之研究，其初步大量篩選皆是利用此方法。以細胞體外培養的方式，可以簡便的篩選藥物對腫瘤細胞具毒性的物質。首先將細胞種植在 96 孔盤，不含槲皮素的培養液當作控制組，在含有各濃度的槲皮素的培養液培養 24、48、72 小時，讓細胞生長並用顯微鏡觀察。利用 AlamarBlue 試劑在 570nm 量測吸光值，以評估細胞的存活度。從結果可以發現槲皮素能有效抑制細胞的增殖，並呈現劑量依賴性。我們將讀取的吸光值做統計分析，各個劑量的數據均表示成 mean±SD，並與控制組作 t-test， $P < 0.05$ 視為有顯著意義(*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.001$)。

Fig. 9 (A)、Fig. 10 (A)分別代表 Hep3B、Huh7 在槲皮素各濃度(0、10、50、100、200、500 μ M)培養 48 小時顯微鏡下(10X)的情形。從照片中可以很明顯看出槲皮濃度越高，Hep3B 和 Huh7 的細胞增殖抑制效果越明顯。Fig. 9 (B)、Fig. 10 (B)分別代表槲皮素濃度與 Hep3B、Huh7 細胞存活度的關係圖。從圖中可以發現兩株細胞的存活度都與槲皮素劑量呈現依賴性的關係，濃度越高，細胞存活度越低。Hep3B 在槲皮素濃度 200 μ M、72hr 開始有顯著效果(存活度 86.9%)，濃度 500 μ M 時，在三個時間點 24、48、72hr 皆有明顯效果(存活度 72.7、57.13、46.8%)，尤其在 72hr 效果最為顯著。而 Huh7 在槲皮素濃度 50 μ M、24 及 48hr 即開始有顯著效果(存活度 87.9、80.9%)，濃度在 100、200、500 μ M 時，在三個時間點(24、48、72hr)皆有明顯效果(100 μ M 三個時間點存活度分別為 82.6、73.9、96.4%；200 μ M 三個時間點存活度分別為 75.9、72.9、86.9%；500 μ M 三個時間點存活度分別為 72.6、54.9、46.8%)，尤其在 200 μ M，48、72hr 以及 500 μ M，24、48、72hr 效果最為顯著。相較之下，槲皮素對 Huh7 的細胞增殖整體抑制效果較 Hep3B 佳。

二、 Colony formation assay

在此方法中，目的是在研究槲皮素對人類肝癌細胞株 colony 形成的能力。首先將細胞種植在六孔盤，不含槲皮素的培養液當作控制組，在含有各槲皮素濃度的培養液中生長十天，使細胞菌落發展。發現槲皮素能有效抑制細胞的菌落生長，並呈現劑量依賴性。我們將 Colony 的數目做量化統計分析，各個劑量的數據均表示成 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ，並與控制組作 t-test， $P < 0.05$ 視為有顯著意義(*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.001$)。

Fig. 11 (A)、Fig. 12 (A)分別代表 Hep3B、Huh7 在槲皮素各濃度(0、1、5、10、50、100 μM)，被 Crystal violet 所染色的 Colny 影像圖。從圖中可以看出槲皮素濃度越高，兩株細胞形成的 colony 數目就明顯越少。而 Fig. 11 (B)、Fig. 12 (B)分別代表 Hep3B、Huh7 的 colony 數目與槲皮素濃度的關係圖。從圖中可以發現，藥物濃度越高，Hep3B 及 Huh7 的 colony 的數目就越少，表示藥物槲皮素的濃度跟形成 colony 的數目呈現一定依賴性的關係。濃度在 0、1、5、10、50、100 μM 時 colony 數分別為 302、296、288、283、224、129 個。而 Hep3B 在藥物濃度 50 μM 時有顯著抑制細胞 colony 的形成效果(占控制組 74.1%)，藥物濃度為 100 μM 時最為顯著(占控制組 42.7%)，對控制組而言減少一半以上的 colony 形成。而 Huh7 效果較 Hep3B 好，濃度在 0、1、5、10、50、100 μM 時 colony 數分別為 246、237、234、214、190、76 個。在 10、50 μM 即有顯著效果(占控制組 86.9、77.2%)，一樣在藥物濃度為 100 μM 時最為顯著(占控制組 30.8%)，跟控制組相比，只剩下三分之一不到的 colony 形成。

三、 Wound-healing assay

此方法簡單，便宜，是最直接研究體外細胞移動的方式。這種方法模擬體內傷口癒合中的細胞移動情形。目的是在研究槲皮素對人類肝癌細胞株 migration 的

能力。首先將細胞種植在六孔盤，等待其長滿後，用 tip 的尖端在單層細胞上建立一個傷口，加入各濃度的槲皮素，並在細胞移動過程中定期觀察照相，並比較圖像，量化細胞移動速率做統計分析。數據均表示成 mean±SD，實驗組(100μM)與控制組作 t-test，P<0.05 視為有顯著意義(*代表 P<0.05；**代表 P<0.001)。

Fig. 13 (A)、Fig. 14 (A) 分別代表 Hep3B、Huh7 在槲皮素濃度 100μM 與控制組傷口寬度與時間(0、24、48hr)的影像圖。從圖中可以發現，Hep3B 及 Huh7 在 48 小時，控制組與實驗組在傷口的寬度上都有些微差距，但 Huh7 較為明顯，表示槲皮素對兩株細胞均有抑制細胞移動之效果，而且對 Huh7 抑制效果較好。Fig. 13 (B)、Fig. 14 (B) 分別代表 Hep3B、Huh7 在槲皮素各濃度(0、10、50、100μM)與時間(0、12、24、36、48hr)與寬度的關係圖。從關係圖中可以發現，濃度 100μM，Hep3B 在四個時間點與控制組的距離為 12、27.8、24.78、22.9%；Huh7 為 13.1、16.3、30、34.9%。槲皮素對兩株細胞同樣在濃度 100μM、12 小時即有顯著抑制細胞移動效果，36 及 48 小時效果最為顯著。

四、 Flow cytometry assay

Propidium iodide(PI)是核酸染劑，若單一細胞中核酸含量愈高，則與此類螢光物質結合的量也愈高，因而受雷射激發後產生的螢光強度也就愈強。此實驗目的就是利用此性質，用螢光強度來決定核酸量因凋零死亡時核酸量減少的變化，來判斷細胞是否正處於細胞凋亡狀態，以及了解槲皮素對整個細胞週期調控的影響。首先將 Huh7 種植在六孔盤，加入各濃度槲皮素(0、10、50、100μM)，培養 48 小時將細胞打下，用 Cold Ethanol fix overnight，在加入 PI 染劑，用流式細胞儀分析。數據均表示成 mean±SD，並將實驗組與控制組作 t-test，P<0.05 視為有顯著意義(*代表 P<0.05；**代表 P<0.001)。

Fig. 15 (A)、Fig. 16 (A)分別為槲皮素對 Hep3B、Huh7 經流式細胞儀分析後各 phase 的分佈圖。其中 Pre-G0 phase 代表細胞正處於細胞凋亡狀態。槲皮素濃度 0、

10、50、100 μ M 時，Hep3B 在 Pre-G0 phase 分別為 1.4%、1.68%、2.88%、5.02%，Huh7 為 9.37%、28.06%、60.93%、67.69%。在 G1 phase 方面，槲皮素濃度 0、10、50、100 μ M 時，Hep3B 分別為 61.44%、56.7%、56.05%、53.14%；Huh7 為 44.13%、30.06%、11.77%、11.22%。在 S phase 方面，槲皮素濃度 0、10、50、100 μ M 時，Hep3B 分別為 14.86%、14%、14.03%、13.81%；Huh7 為 16.87%、10.87%、6.15%、5.63%。在 G2/M phase 方面，槲皮素濃度 0、10、50、100 μ M 時，Hep3B 分別為 23.4%、28.53%、28.07%、29.69%；Huh7 為 29.63%、31.39%、21.63%、15.99%。整體來看，槲皮素的濃度提高會造成 Pre-G0 phase 的上升，G1、S phase 的減少，表示槲皮素對兩株細胞均有濃度與凋亡率、G1 phase、S phase 的依賴關係。由 Fig. 15(B)、Fig. 16(B) 可得知槲皮素對 Hep3B 在濃度 50 μ M 開始有促進細胞凋亡顯著效果，在 100 μ M 有抑制 G1 phase 效果。而 Huh7 在濃度 10 μ M 時就有細胞凋亡顯著效果，50、100 μ M 的效果更好，以及在濃度 10 μ M 以上可顯著抑制 G1 phase，在濃度 50 μ M 以上可顯著抑制 S phase。

五、 Microarray analysis

基因晶片，是近年來生命科學研究的一大利器。它可經由一次實驗，得到生物體所有基因表現量的數據。本實驗目的在於，由基因表現的觀點來探討槲皮素對人體肝癌細胞的基因變化，瞭解槲皮素對人類肝癌細胞能有效抑制背後的藥理機轉。首先先將人類肝癌細胞株 Huh7 種植在 10cm dish，加入濃度 50 μ M 的槲皮素培養 48 小時(濃度 0 μ M 當作控制組)，在將細胞打下加入 Trizol 後送至賽亞基因科技公司作 RNA 萃取及微陣列分析。

Fig. 17 為控制組與實驗組萃取出來的 RNA 電泳圖。圖中 18S 與 28S RNA 的 band 清晰明顯。而且在 Fig. 18 圖中控制組與實驗組的 RIN(RNA Integrity Number) 值高達 9.8 及 9.5(10 為 RNA 完整性最好、.0 為最差)，表示萃取出來的 RNA 的品

質很高，完整性佳。Fig. 19 為 Labeled aRNA 的 Quality 檢測，控制組於實驗組 OD 260/280 值分別為 1.95、1.97(需介於 1.8—2.0)，濃度分別為 1.5463 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、1.3198 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。Fig. 20 及 Fig. 21 分別為控制組(Huh7-0)與實驗組(Huh7-50)雜交完後微陣列的影像。

基因晶片的數據十分龐大，為減低分析的複雜度，兼顧通盤了解槲皮素對於人類肝癌細胞的機轉，我們選擇兩倍上調與兩倍下調的基因作 Ontology 分析，以 Biological process 與 Molecular function 的分組，從中挑選與 Apoptosis、Cell cycle、Migration 有關的基因做初步探討。Table. 1 為槲皮素上調 2 倍以上 Apoptosis 相關基因，被調控的基因分別為 IGFBP3、CAV1、FOSL1、LGALS1、PMAIP1、ETS1、C8orf4、SOX4、TNFRSF12A、EGLN3、SOS1、SERPINE1、TNFSF9、TNFRSF21、SOCS2、PHLDA2、BCL2L11、ANGPTL4、GCLC、BEX2、IER3、SH3RF1、BIRC3、GCLM、ADM、DUSP6、BIK、MCL1、DUSP6、BMP2、KRT20、DUSP6、MAX、SQSTM1、ABR、AMIGO2、DDIT3、SOD2、PHLDA1、TSPO、EPHA2、FOXC1、NR4A1、FGF2、TNFRSF10A、DFFA、F3、TGFA。Table. 2 為槲皮素上下調 2 倍以上 Apoptosis 相關基因，被調控的基因分別為 IGF2、B4GALT1、MAGED1、PRLR、PCSK9、PLG、TNFSF10、F7、KNG1、LCN2、COL2A1、GSN、FAM3B。Table. 3 為槲皮素上調 2 倍以上 Cell cycle 相關基因，被調控的基因分別為 CYP1A1、CDKN2B、C13orf15、FOSL1、ETS1、DST、RGS2、NEDD9、CDKN1C、BEX2、PLK2、BMP2、DDIT3、TRNP1、FOXC1、FGF2、NOLC1。Table. 4 為槲皮素下調 2 倍以上 Cell cycle 相關基因，被調控的基因分別為 CASC5、MCM6、G0S2。Table. 5 為槲皮素上調 2 倍以上 Cell migration 相關基因，被調控的基因分別為 IGFBP3、TNFRSF12A、SERPINE1、SERPINE2、TUBB2B、JAG1、HBEGF、CTGF、ITGA2、VCAN、EPHA2、CEACAM1、FOXC1、FGF2、TRIB1、F3。Table. 6 為槲皮素下調 2 倍以上 Cell migration 相關基因，GAB1、AMOT、IGF2、B4GALT1、SUN2、APOA1、F7、APOA1、VTN。

第五章 討論

隨著基因體研究的盛行，以及愈來愈繁雜的基因體資料，生物學家們於是需要一個工具，可以系統性的整合基因的資料，基因的產物，甚至是基因所具備的功能。在這種需求下，Gene Ontology[80][81]就誕生了。為了統整各個生物基因體資料，方便互相溝通比對，瞭解生物體共通的運作法則，它提供了一個統一的字彙結構來描述基因的三個層面：Molecular Function、Biological Process 和 Cellular Component。Molecular Function 是以分子的角度，描述基因產物的活動，例如催化 (catalytic activity) 或轉錄調控 (transcription regulator activity) 等；Biological process 則是描述在細胞內發生的，可以定義開始和結束的事件或行動；Cellular Component 表示細胞的某個部分或位置，該分支裡面的字彙用來描述基因在細胞的哪個位置發揮它的功能。應用此資料庫，我們可快速的歸納基因晶片的資料，做初步機轉探討。對於槲皮素作用於 Huh7 的微陣列分析結果，我們首先採取 2 倍上調與 2 倍下調以上的基因作 ontology 分析，以 Biological process 與 Molecular function 的分組，從中挑選與 Apoptosis、Cell cycle、Migration 有關的基因做初步討論。

有關癌症與細胞凋亡的相關研究，顯示癌症的發生是由於癌細胞無法正常的進行細胞凋亡 (apoptosis)，造成漫無止境的大量增生，而妨礙到正常的細胞生理機能，因此細胞凋亡、不受控制的增生與癌症關係成為相當熱門的研究課題。在槲皮素影響 Apoptosis 的兩倍上調基因裡，最突出的基因為 IGFBP3，上調了 8.53 倍，其基因產物為類胰島素生長因子結合蛋白 3 (insulin-like growth factor binding protein 3)，Lee KW 等人發現，IGFBP3 藉由與 retinoid X receptor-alpha (RXRalpha) 結合後，RXRalpha 的結合伙伴核受體 Nur77 會迅速從細胞核易位到粒腺體啟動凋亡級聯反應，造成 caspase 的激活[82]，誘導細胞產生凋亡。另外上調 7.52 倍的 CAV1 及 2.23 倍的 SOD2，Trimmer C 等人發現這兩個基因在基質微環境 (stromal microenvironment) 中有腫瘤抑制功能。缺乏 CAV1 的成纖維細胞會促進乳癌細胞 (MDA-MB-231) 的腫瘤生長，而 SOD2 的過度表達可以抑制缺少 CAV1 的成纖維細

胞的促進腫瘤影響[83]。Han F 等人發現，CAV1 的過度表現會抑制 EGFR-MAPK pathway，造成抑制細胞的侵襲和促進細胞凋亡[84]。另外槲皮素上調 2.05 倍的 BMP2 在骨骼及軟骨發育中扮演一個重要的角色，有研究顯示此基因可抑制胃癌細胞的增殖以及造成 CDK4 的下調，讓癌細胞在細胞週期 G1 phase 受到阻滯[85]。此外在 Apoptosis 兩倍上調基因裡，發現槲皮素也參與了 Apoptosis signal transduction pathway 的調控，在 Death Receptor Pathway 中上調腫瘤壞死因子配體 TNFSF9，腫瘤壞死因子受體 TNFRSF12A、TNFRSF21(Death receptor 6)、TNFRSF10A(Death receptor 4)；在 Mitochondrial Pathway 中上調促凋亡基因 PMAIP1(NOXA)、BCL2L11(BIM)、BIK，最終都會導致 caspase 的激活，產生及聯反應，造成細胞凋亡。而由我們實驗四 Flow cytometry assay 結果 Fig. 16 可以證明槲皮素的確能促進細胞凋亡，Fig. 16 (A)表示槲皮素在濃度 0、10、50、100 μ M 時，細胞凋亡率分別為 9.37%、28.06%、60.93%、67.69%，從 Fig. 16 (B)可知槲皮素在 10 μ M 即有顯著促進細胞凋亡效果，50、100 μ M 效果更顯著。

在槲皮素影響 Apoptosis 兩倍下調中最突出的基因為 PRLR，下調了 4.63 倍。PRLR 其基因產物為催乳素受體(Prolactin receptor)，屬於 Cytokine receptor 家族成員，會與催乳素(Prolactin)作用當作跨膜受體。當催乳素與受體結合後，會誘導激活以下三個途徑：JAK / STAT 途徑、MAPK /ERK 途徑和 PI3K/Akt 途徑[86]。JAK/STAT 及 MAPK /ERK 途徑訊號途徑是透過細胞膜傳送細胞外的化學訊號到細胞核內 DNA 上的基因啟動子，啟動 DNA 的轉錄，影響細胞功能如生長、分化[87]。PI3K/AKT 途徑中，透過激活 AKT，通過對其下游的靶蛋白進行磷酸化而發揮其抗凋亡的作用，如 AKT 能通過磷酸化 Bcl-2 家族成員 BAD 阻止凋亡，還有可以磷酸化 mTOR，讓細胞生長、增殖，此外還能透過對 NF- κ B 和 P53 的間接作用影響細胞存活[88]。Granado-Serrano 等人發現，槲皮素能透過調控 Akt、ERK 生存訊號途徑，讓槲皮素能依劑量性的抑制細胞增殖[40]。因此我們推測槲皮素藉由下調 PRLR，減少 JAK / STAT 途徑、MAPK /ERK 途徑和 PI3K/Akt 途徑的激活，抑制

細胞的生長、增殖以及抗凋亡效果。而由我們的實驗一 Cell proliferation 結果 Fig. 10 可以證明槲皮素的確可以抑制細胞增殖，從 Fig. 10 (B)可知槲皮素在 50 μ M 經過 24、48 小時開始有顯著抑制細胞增殖的效果(細胞存活度分別為 87.9、80.9%)；而實驗二 Colony formation assay 結果 Fig. 12 可以證明槲皮素確實可以抑制細胞生長，從 Fig. 12 (B)中可發現，槲皮素在 10、50 μ M 即有顯著抑制細胞生長效果(細胞 colony 占控制組 86.9、77.2%)，100 μ M 效果更好(細胞 colony 占控制組 30.8%)。

細胞增殖是細胞生命的一個基本特徵。細胞生長到一定階段開始分裂，細胞分裂後產生的新細胞生長增大，此後又平均的分裂成兩個遺傳性相同的子細胞。這種周而復始的生長分裂週期稱為細胞週期(cell cycle)。一旦這些調控細胞週期的蛋白質表現異常，導致癌細胞不受控制，則會不斷地進行細胞週期而增殖分裂。在槲皮素影響 Cell cycle 的兩倍上調基因裡，最突出的基因為 CYP1A1，上調了 41 倍，其基因產物為 cytochrome P450 超家族蛋白成員，為代謝酵素之一，CYP1A1 的表達由特定的細胞質受體 Aryl hydrocarbon receptor(AhR)介導。戴奧辛 (dioxin, TCDD) 是目前已知最能活化 CYP1A1 的物質之一，戴奧辛首先與 AhR 結合而使得 heat-shock protein 90 被釋放。此複合物接著與 aryl hydrocarbon receptor nuclear transferase (ARNT) 結合，此構造便可進入細胞核並進一步與特定的 DNA (xenobiotic regulatory element) 結合，一旦複合物與 xenobiotic regulatory element 結合後，其他的蛋白質 (活化者蛋白等) 便可來到 cytochrome P450 基因的啟動子，使 cytochrome P450 的基因轉錄成 RNA，進而產生 CYP1A1 酵素。而 Jarry H 等人發現，AhR 有抗增生的效果，透過 AhR 的激活能抑制前列腺癌細胞的生長 [89]。F.P. Guengerich 等人也發現槲皮素確實能與 AhR 交互作用 [29]。因此我們推測 CYP1A1 的增加是由於槲皮素對 AhR 的激活，而 AhR 的激活抑制肝癌細胞的生長。

在 Cell cycle 的兩倍上調基因裡，槲皮素對 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor(CDKI)也有調控作用。CDKI 在細胞週期中有類似水壩的功能，不同的

CDKI 在細胞週期的不同控制點(如 G1 和 G2 phase)與 CDK 單獨結合，或與 Cyclin/CDK 複合物相結合，形成不同的屏障。新合成的 Cyclin 不僅與特定的 CDK 結合，而且也與特定的 CDKI 結合，從而使 CDK 失去激酶活性，或使 Cyclin/CDK 複合物成無活性狀態，直至在含量上 Cyclin/CDK 複合物超過 CDKI 時，過多的 Cyclin/CDK 就促使細胞進入週期中下一個階段。其中，被槲皮素上調的 CDKN2B，會與 CDK4 或 CDK6 形成複合物避免被 Cyclin D 激活，造成 G1 phase 阻滯[90]；另一個被上調基因 CDKN1C，其基因產物會藉由結合 G1 Cyclin/CDK 的複合物，也可以造成細胞週期在 G1 phase 的阻滯[91]。而由我們的實驗四 Flow cytometry assay 結果 Fig. 16 (B)可以證明，槲皮素在 0 μ M 時 Huh7 的 G1 phase 占 44.13%，10 μ M 時 G1 phase 占 30.06%，對細胞週期 G1 phase 已經開始有顯著的阻滯效果，50 μ M、100 μ M 效果更加顯著，G1 phase 只剩 11.77%、11.22%。

腫瘤細胞的轉移擴散(metastasis)往往是癌症病人在臨床治療上預後的一重要指標，在癌症的分期上，癌細胞的轉移擴散與否也是一個重要的分界，當腫瘤細胞僅生長發病於局部位置，稱為局部或原位癌。如果能在此階段進行治療則治癒率最高。當腫瘤細胞藉由血液、淋巴管等方式轉移到人體其他部位生長程續發性惡性腫瘤，就稱為轉移性癌[92]。癌細胞的轉移擴散是由癌細胞穿過細胞外基質(extracellular matrix, ECM)開始，緊接著侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管的新生成(angiogenesis)，奪取正常組織器官的養分而使癌細胞大量增生(proliferation)造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。而癌細胞在轉移擴散的過程中，可分為侵襲(invasion)及轉移(migration)兩個階段，其中腫瘤細胞破壞基底膜(basement membrane)以侵入周圍組織，便稱之為 invasion，而癌細胞藉由侵入到循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動，便稱之為 migration。在槲皮素影響 Cell migration 的兩倍上調基因裡，最突出的基因為 IGFBP3，上調了 8.53 倍。有研究顯示 IGFBP3 與 cell migration 有關，

P.L. Torng 等人發現，在卵巢癌中，IGFBP3 可抑制 migration，侵襲(invasion)和轉移(metastasis)[93]。Lujia Gribben 等人發現 IGFBP3 的過度表達可減少子宮內膜癌細胞(HEC-1-A、HEC-1-B)移動速率(migration rate)[94]。另外 Cell migration 的兩倍下調最突出的基因為 VTN(vitronectin)，vitronectin 為細胞外基質中的一個元素。癌細胞中的 integrin 受體與細胞外基質蛋白 vitronectin 的結合已被證明與癌症的轉移有關，Integrin 受體包括 alpha V beta 1、alpha V beta 3、alpha V beta 5[95]。John E Bartsch 等人發現 vitronectin 會增加乳癌細胞(MDA-MB-435、MDA-MB-231)的轉移性(metastasis)，而且透過對 vitronectin 受體的 alpha V beta 3、alpha V beta 5 拮抗劑，可以抑制乳癌細胞的 migration[96]。因此我們推測槲皮素透過下調 vitronectin，減少與 Integrin 受體的結合達到抑制 Cell migration，而且由我們的實驗三

Wound-healing assay 結果 Fig. 14 可以證明槲皮素的確能有效抑制細胞的 migration。從 Fig. 14 (B)中可知，槲皮素在 100 μ M 作用 12 小時下，即開始有顯著抑制 migration 的效果(與控制組相差 13.1%)，36、48 小時效果更加顯著(與控制組相差 30、34.9%)。

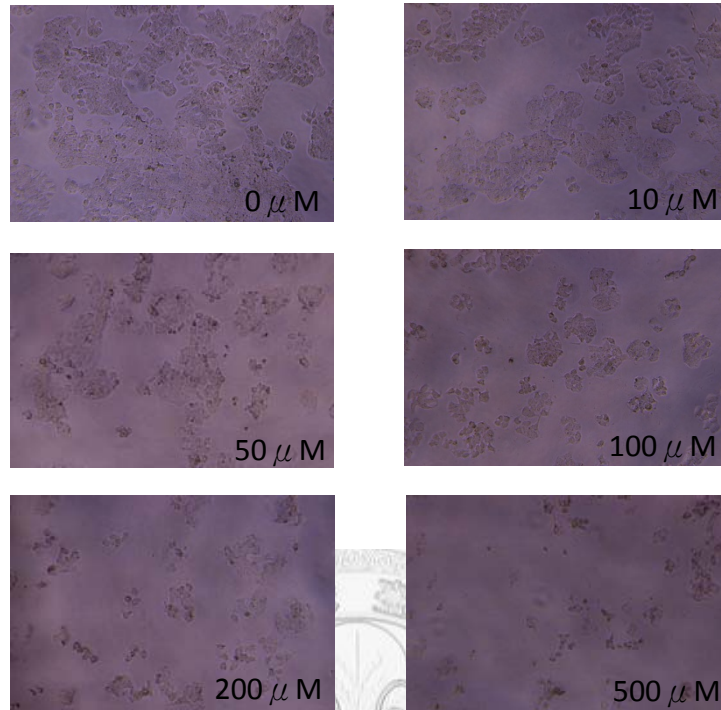
這些被影響調控的基因以及所參與的訊號傳導路徑就是槲皮素能夠抑制癌細胞生長增殖、細胞週期、細胞移動以及誘導凋亡背後最強而有力的證據。綜合以上討論槲皮素所調控的基因繪成 Fig. 22。槲皮素透過上調 IGFBP3、TNFSF9、TNFRSF12A、TNFRSF21、TNFRSF10A、PMAIP1、BCL2L11、BIK 促進細胞凋亡；下調 PRLR 及上調 CYP1A1、CAV1、SOD2、BMP2 抑制細胞增殖生長；上調 CDKN2B、CDKN1C 抑制細胞週期；上調 IGFBP3 及下調 VIN 抑制細胞移動。從圖中我們就可以很清楚的了解槲皮素對 Huh 7 調控的基因以及所影響的生物功能。

第六章 結論

於體外培養實驗顯示槲皮素對人類肝癌細胞株 Hep3B 與 Huh7 的存活度、菌落發展、移動皆有明顯抑制效果，而且抑制率與處理的濃度與時間呈正相關。在經由 PI 染色經流式細胞儀分析出槲皮素對兩株細胞皆可誘導凋亡，且可以造成細胞週期 G1 phase 的阻滯，而且都與濃度有依賴性關係。其中，又以 Huh7 效果較佳。而經由調控細胞本身的基因，使癌細胞自身進行細胞凋亡，是現今研究藥物抗癌作用的重要方向。因此我們進一步以 Huh7 作微陣列分析，發現槲皮素能調控 Cell apoptosis、Cell cycle、Cell migration 相關基因，而這些受到調控的基因可能參與了 Apoptosis pathway、JAK/STAT、PI3K/AKT、MAPK/ERK pathway。而這些被影響調控的基因以及所參與的訊號傳導路徑就是槲皮素能夠抑制癌細胞生長增殖、細胞週期、細胞移動以及誘導凋亡背後最強而有力的證據。但槲皮素是否對正常組織細胞有毒害作用，仍宜進一步研究。



A.



B.

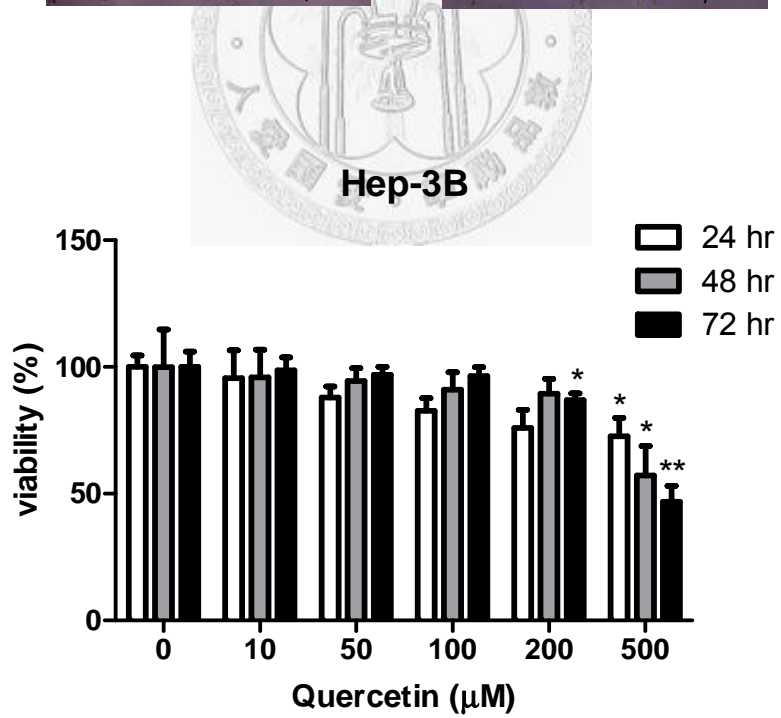
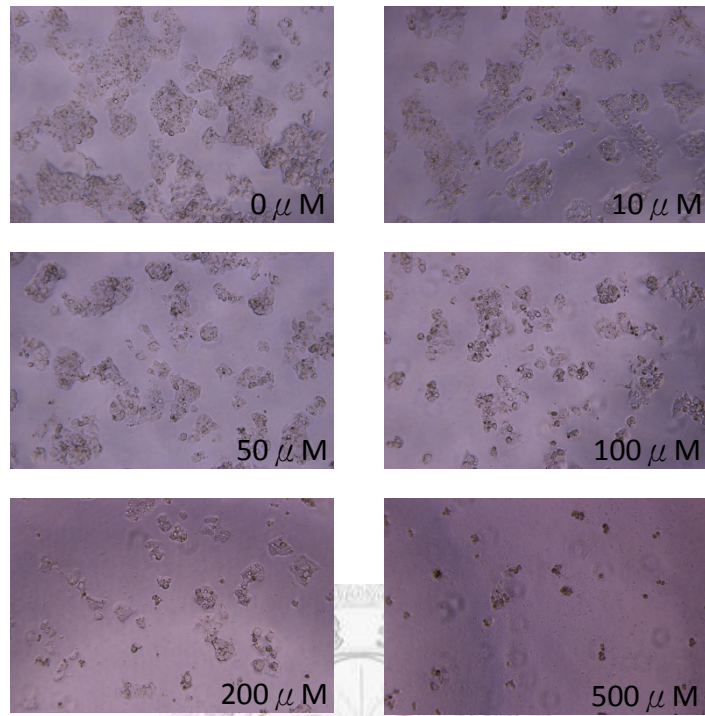


Fig. 9 槲皮素對 Hep 3B 的 Proliferation assay 結果

A.



B.

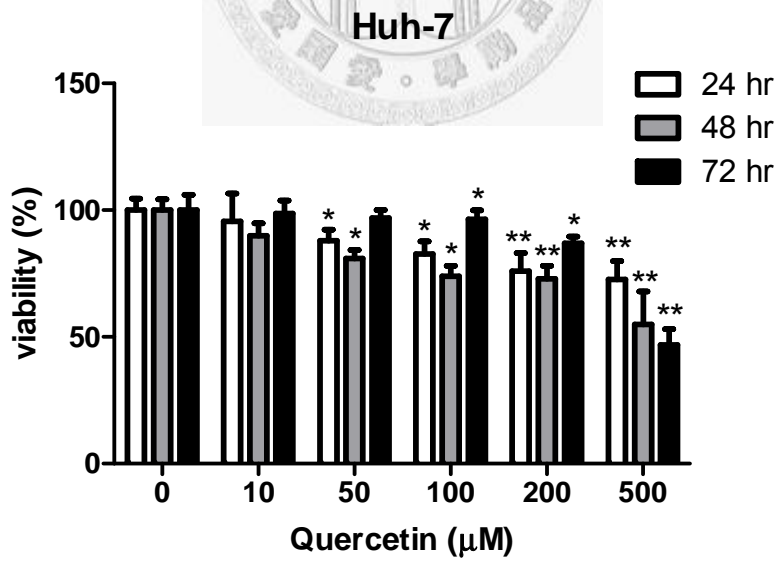
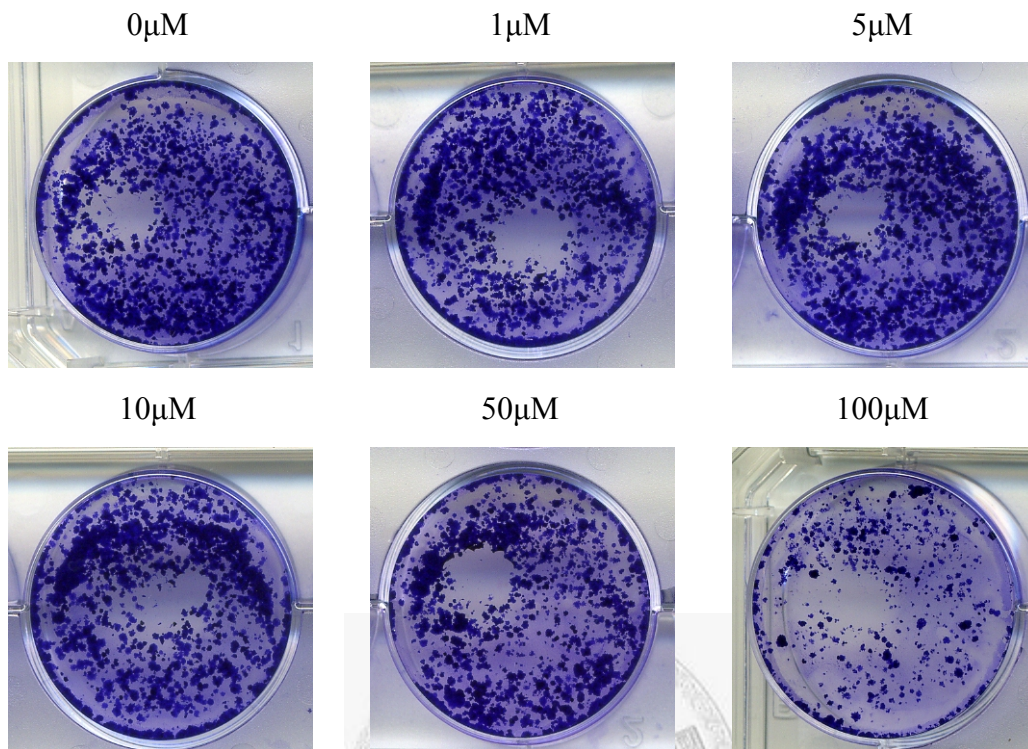


Fig. 10 槲皮素對 Huh 7 的 Proliferation assay 結果

A.



B.

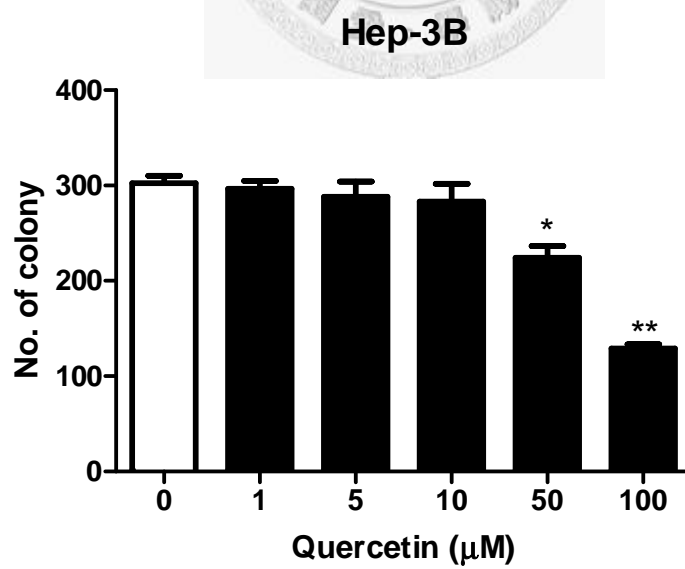
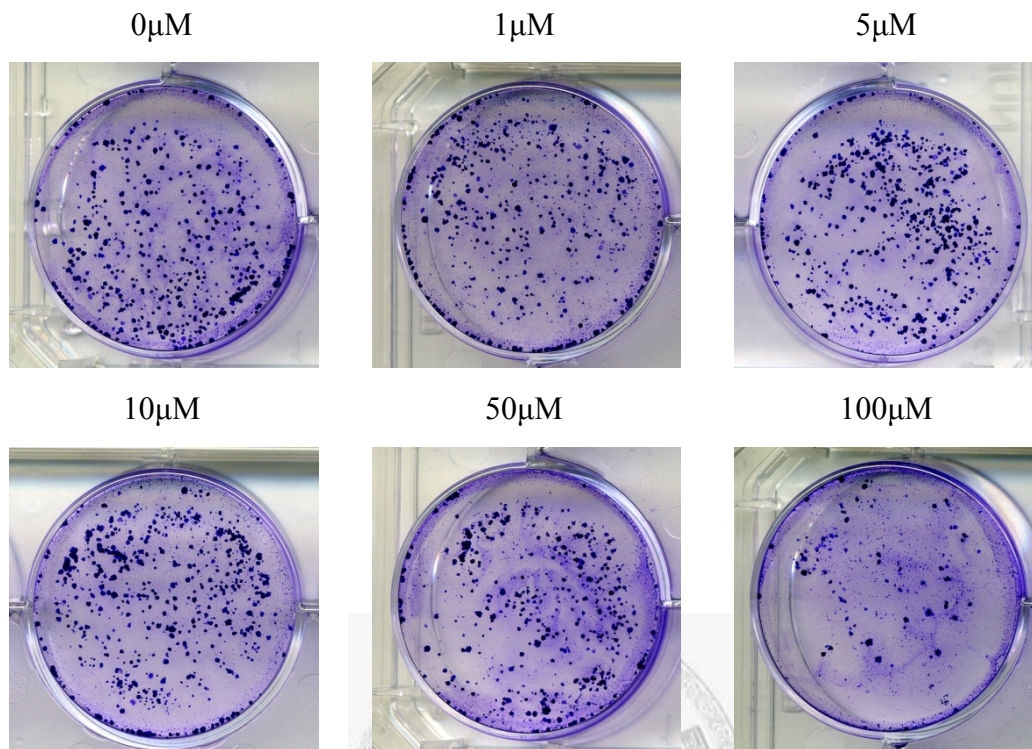


Fig. 11 槲皮素對 Hep 3B 的 Colony formation assay 結果

A.



B.

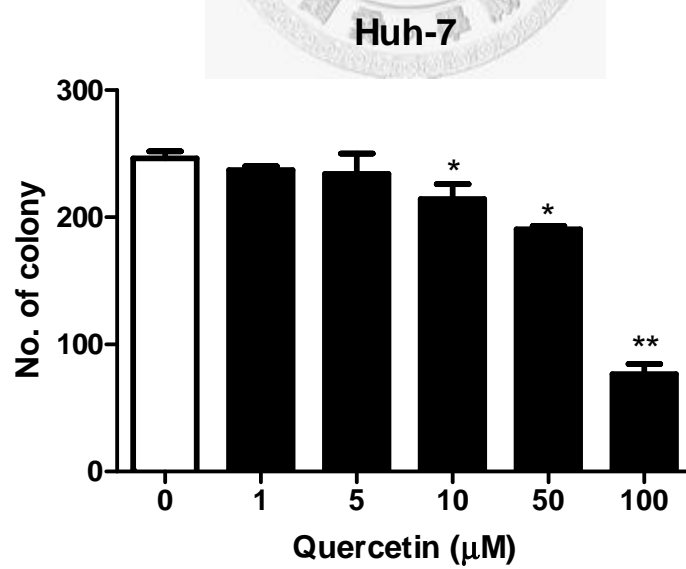
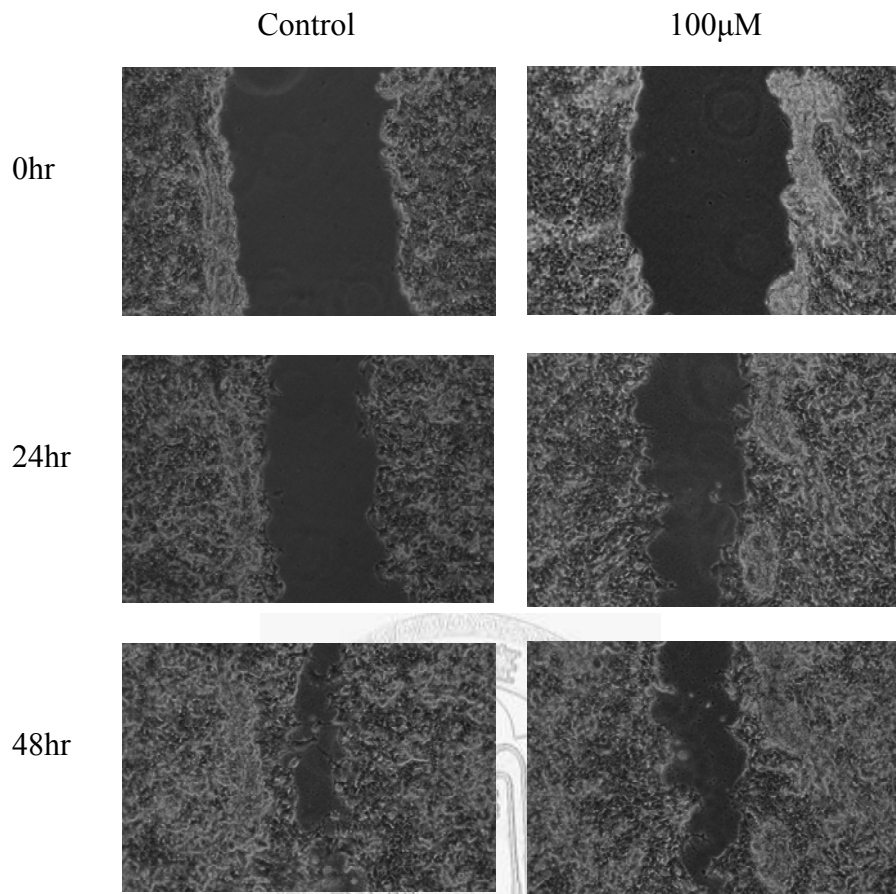


Fig. 12 槲皮素對 Huh 7 的 Colony formation assay 結果

A.



B.

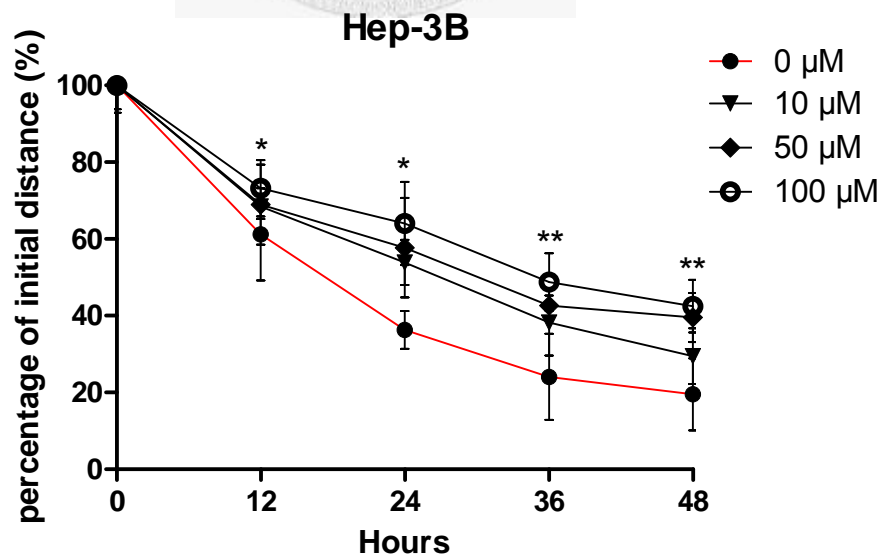
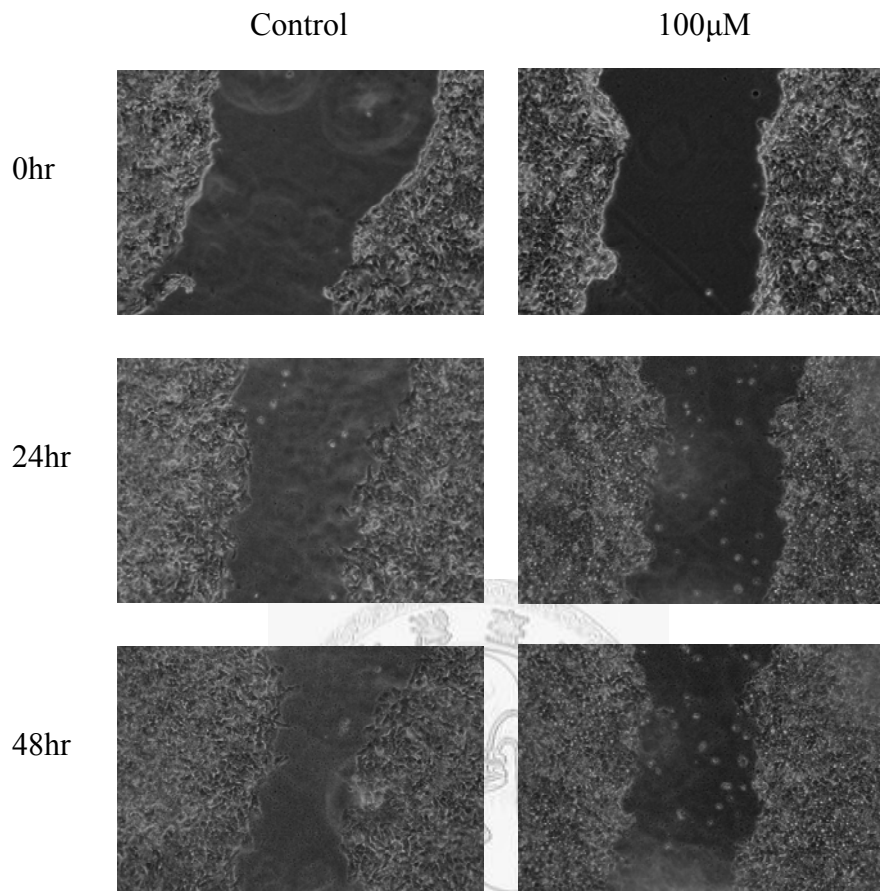


Fig. 13 槲皮素對 Hep 3B 的 Wound-healing assay 結果

A.



B.

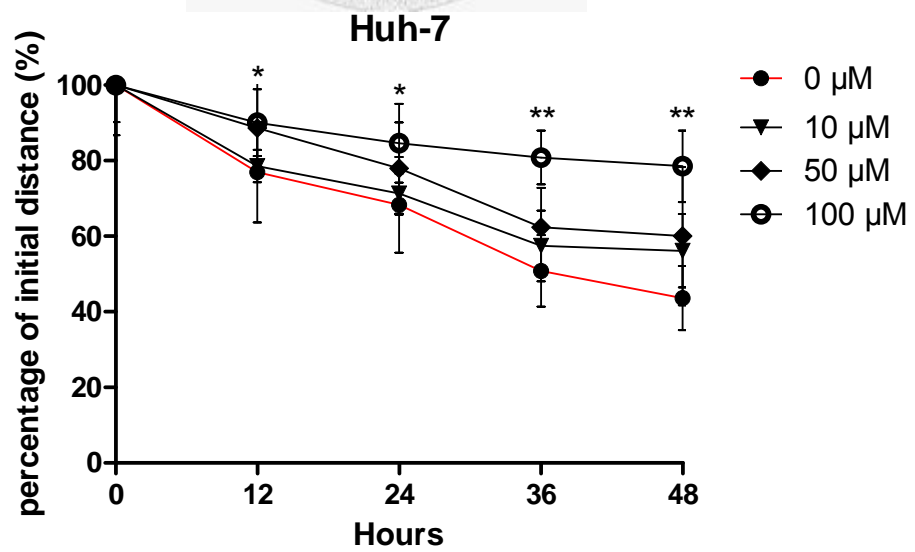
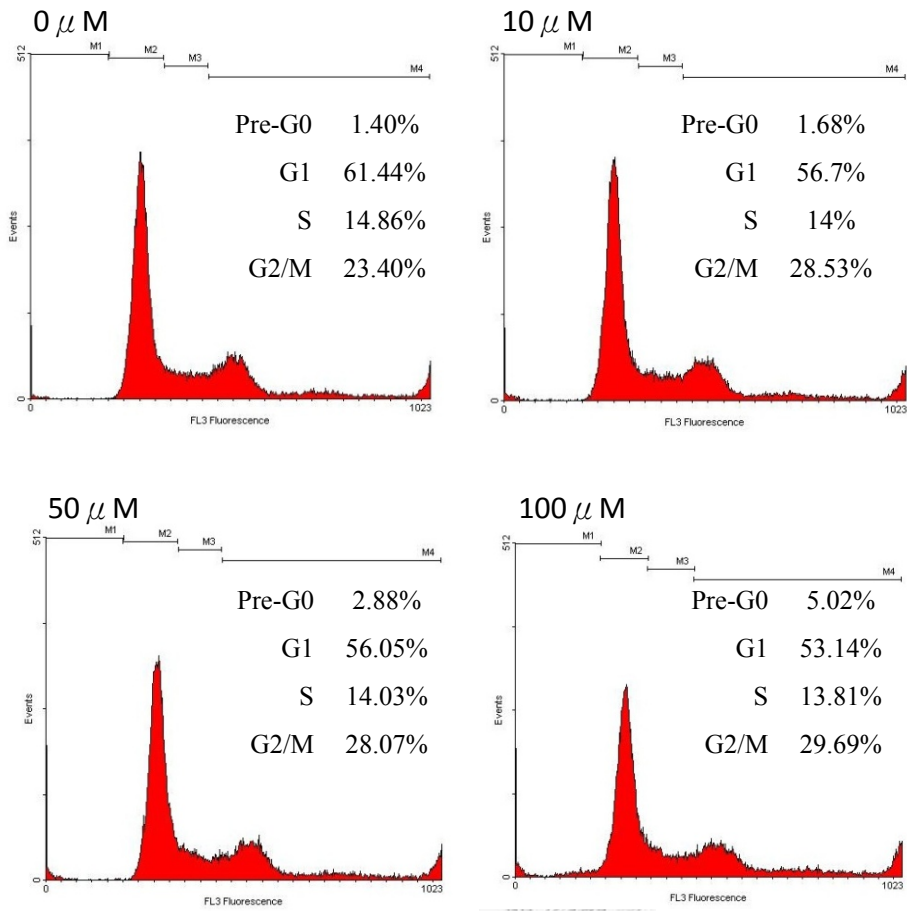


Fig. 14 槲皮素對 Huh 7 的 Wound-healing assay 結果

A.



B.

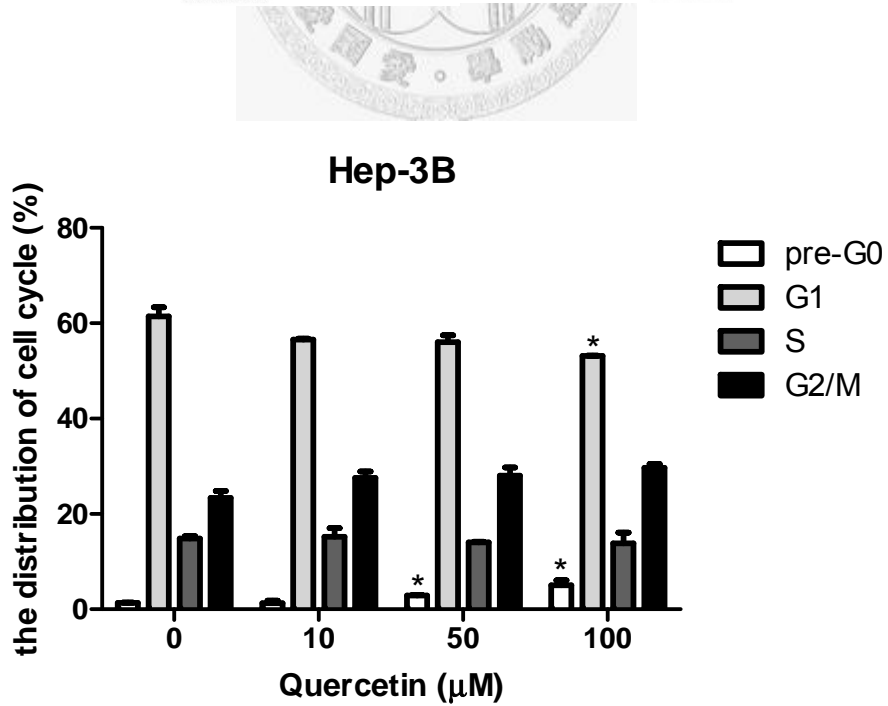
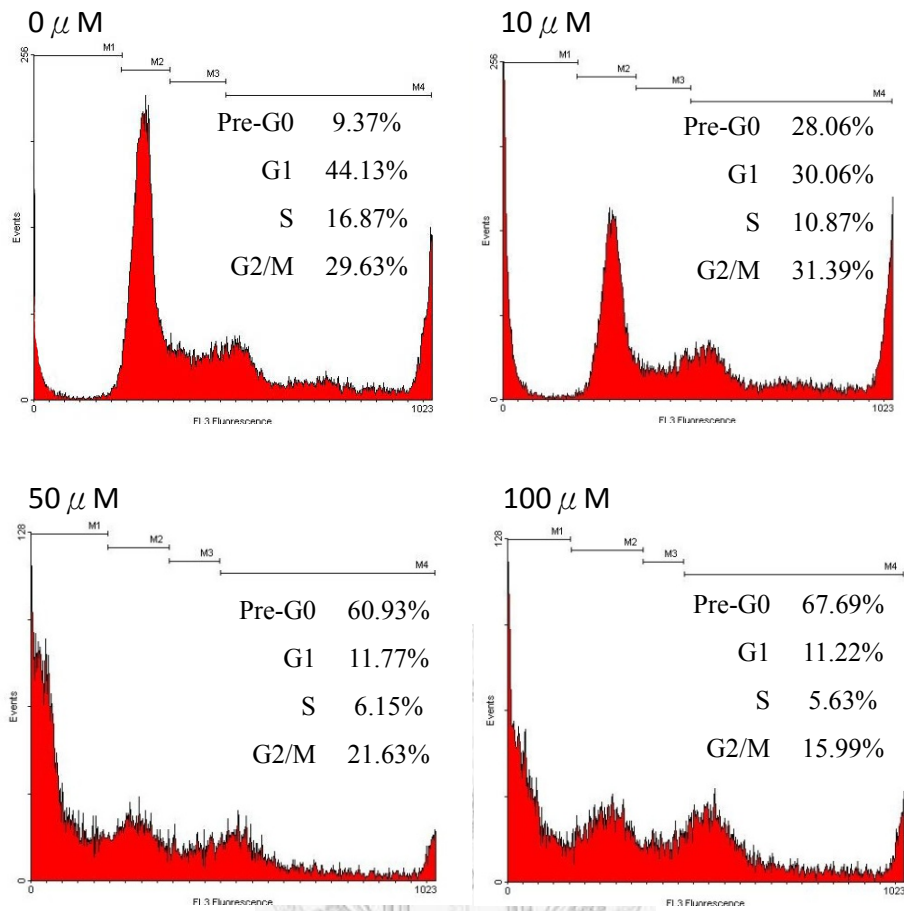


Fig. 15 槲皮素對 Hep 3B 的 Flow cytometry assay 結果

A.



B.

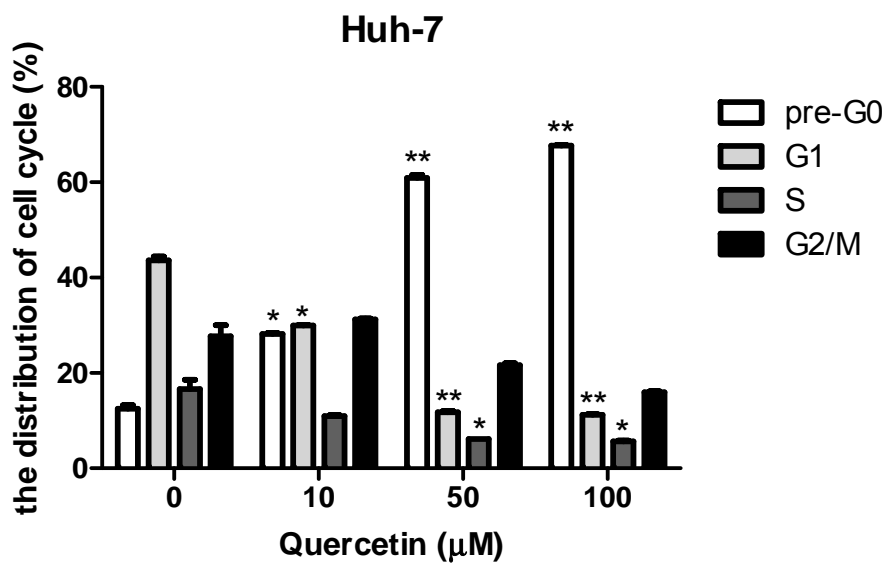
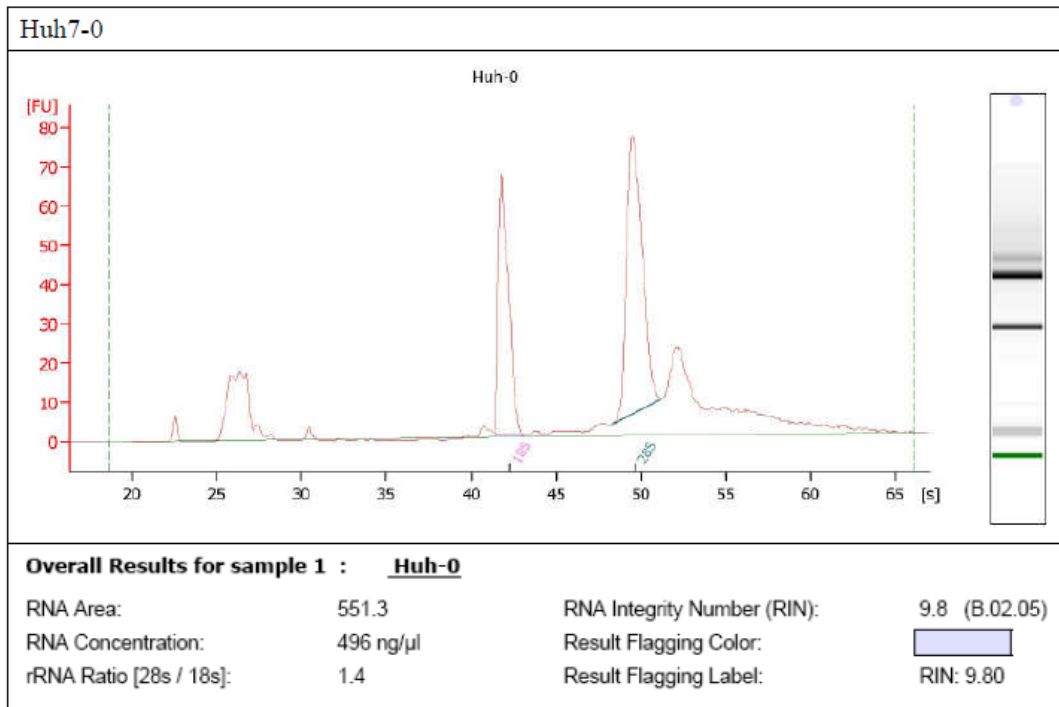


Fig. 16 槲皮素對 Huh 7 的 Flow cytometry assay 結果

A.



B.

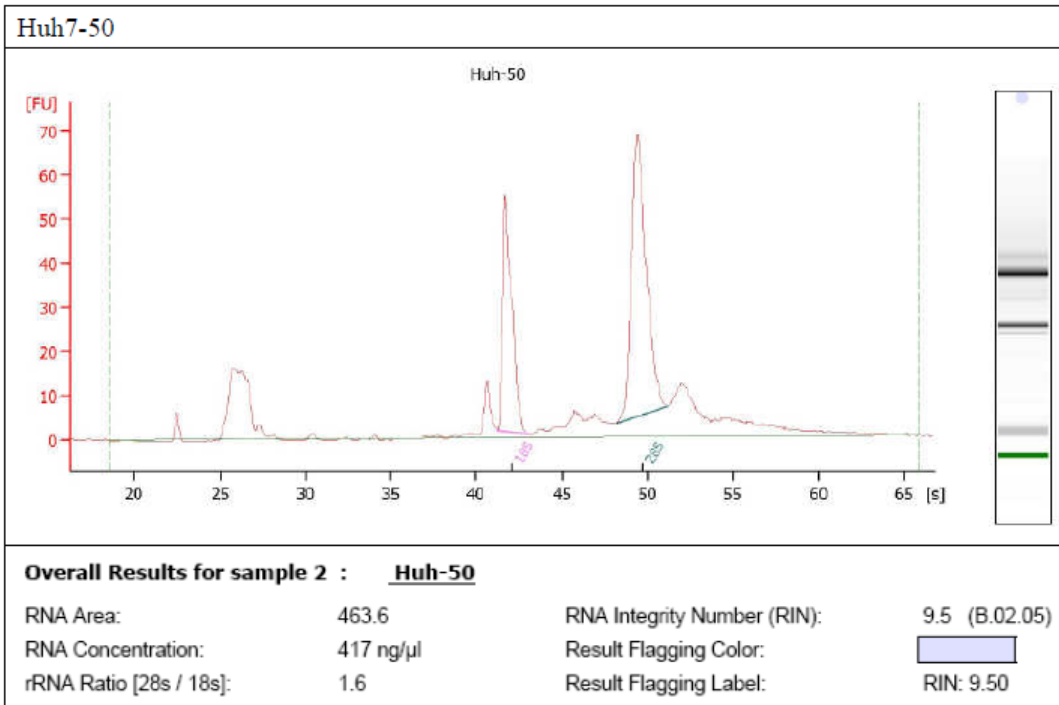


Fig. 17 RNA Electropherogram

Sample ID	rRNA Ratio (18S/28S)	RIN(≥ 7)	Approval (passed ○; not passed ⊙)
Huh7-0	1.4	9.8	○
Huh7-50	1.6	9.5	○

Fig. 18 RNA Purity test

Sample ID	260/280 Ratio	Yield aRNA (μg)	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Huh7-0	1.95	77.315	1.5463
Huh7-50	1.97	65.99	1.3198

Fig. 19 aRNA Quality Control

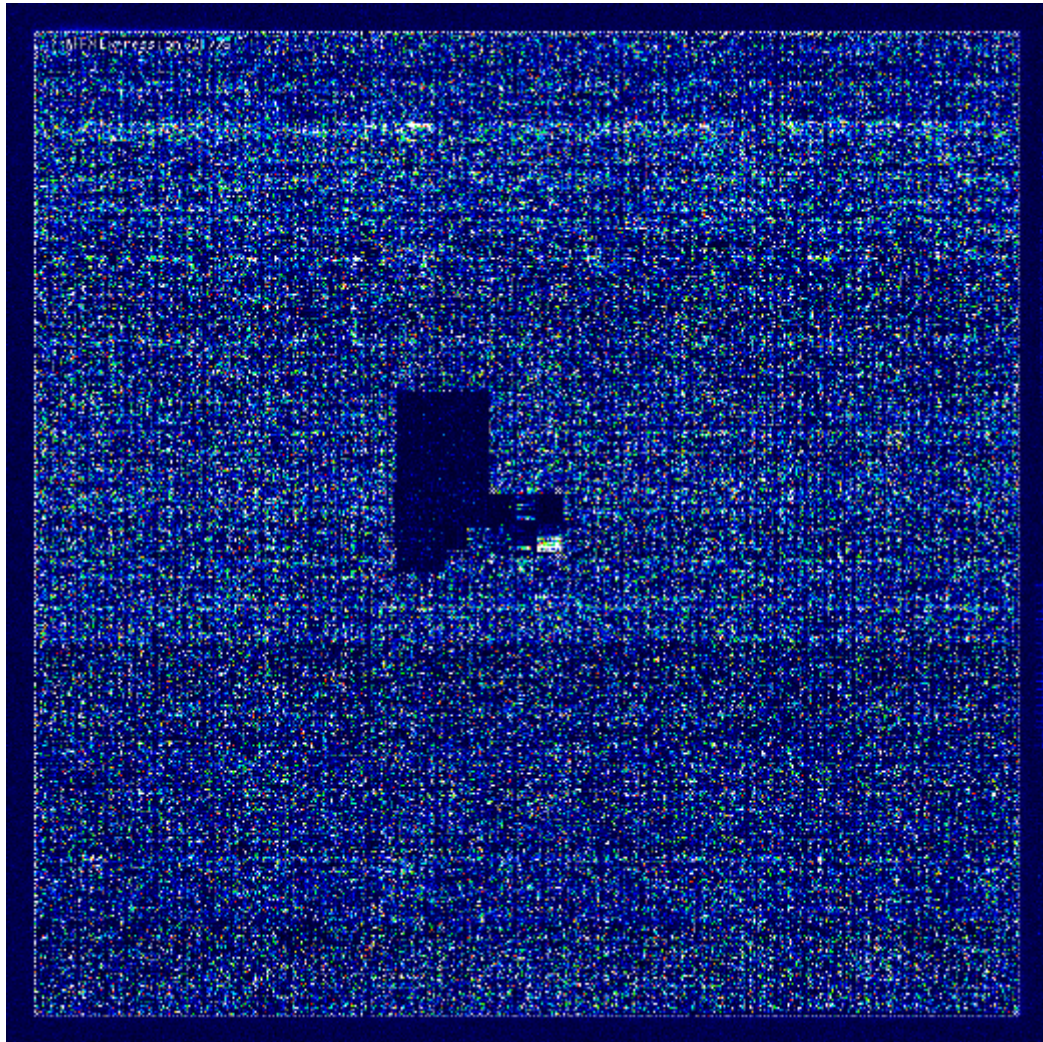


Fig. 20 Microarray Image of Huh7-0 μ M

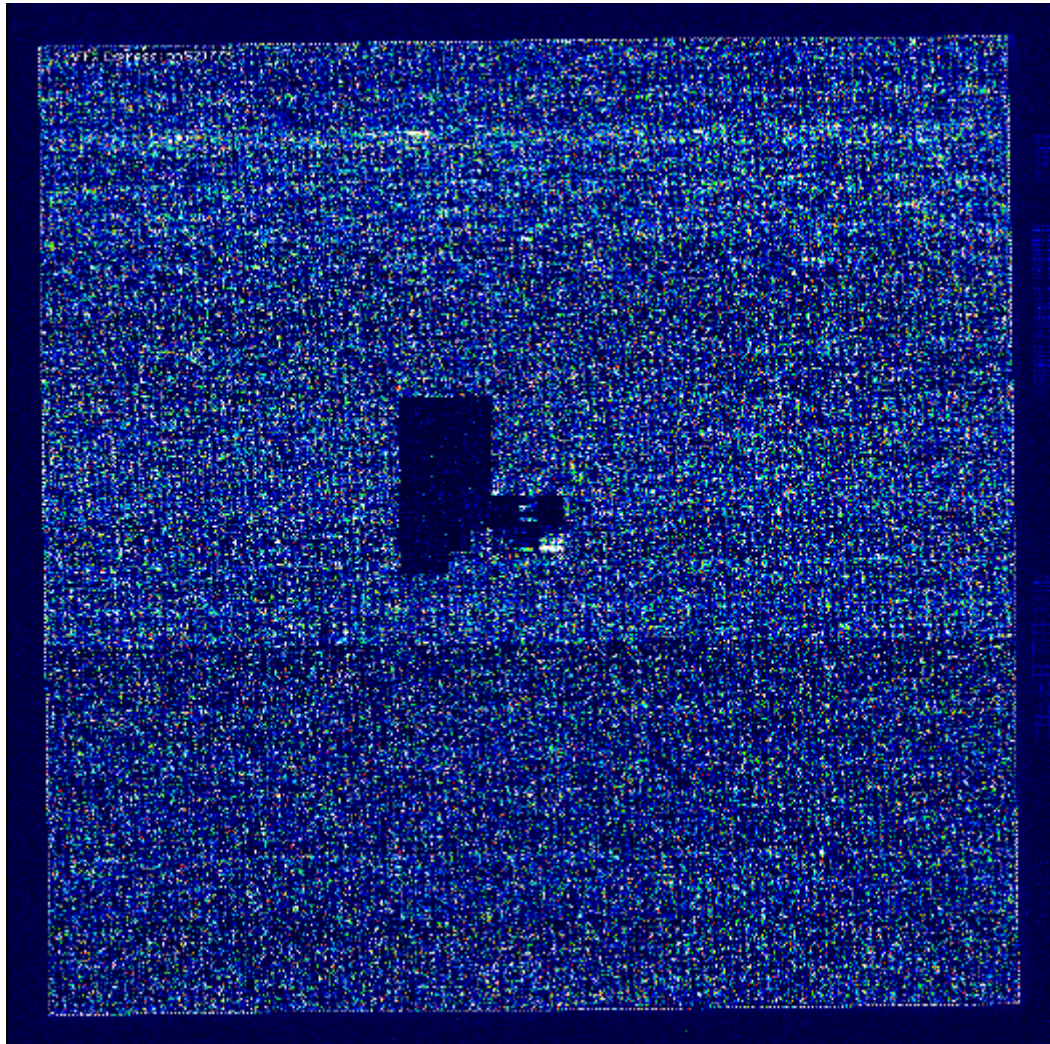


Fig. 21 Microarray Image of Huh7-50 μ M

Table. 1 槲皮素上調 2 倍以上 Apoptosis 相關基因

Probe set ID	Fold Change	Gene Symbol	Gene Title
11721135_s_at	8.529575	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
11745716_s_at	7.518425	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
11757013_x_at	6.66736	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
11724478_s_at	6.635093	FOSL1	FOS-like antigen 1
11743721_at	5.264238	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1
11724509_a_at	5.261465	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
11715584_a_at	5.2361	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
11745715_a_at	5.2361	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
11722300_a_at	5.1266	ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
11758013_s_at	4.623961	C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4
11719560_at	3.94031	SOX4	SRX (sex determining region Y)-box 4
11749912_x_at	3.815804	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
11745020_a_at	3.809818	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
11757444_a_at	3.729503	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
11757741_s_at	3.726325	SOX4	SRX (sex determining region Y)-box 4
11719561_s_at	3.712212	SOX4	SRX (sex determining region Y)-box 4
11720895_at	3.712153	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
11719563_a_at	3.442046	SOX4	SRX (sex determining region Y)-box 4
11746856_a_at	3.403543	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
11720893_s_at	3.386426	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
11719562_at	3.254333	SOX4	SRX (sex determining region Y)-box 4
11735140_at	3.247645	TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
11724510_at	3.246409	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
11732111_a_at	3.194133	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
11735148_a_at	3.185452	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2

11753764_s_at	2.973458	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
11715636_a_at	2.913104	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
11720892_at	2.910785	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
11733852_at	2.903024	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
11720894_a_at	2.856612	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
11744005_at	2.831379	PHLDA2	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2
11758525_s_at	2.787428	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4
11735895_at	2.718528	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
11716630_a_at	2.681959	ANGPTL4	angiopoietin-like 4
11729218_a_at	2.617395	GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
11719559_at	2.603281	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4
11718848_a_at	2.574455	BEX2	brain expressed X-linked 2
11720062_s_at	2.550963	IER3	immediate early response 3
11732258_s_at	2.50339	SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1
11722850_a_at	2.456144	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
11723490_at	2.453442	GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
11722851_at	2.449578	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
11756406_x_at	2.441296	ADM	adrenomedullin
11716710_a_at	2.424333	ADM	adrenomedullin
11741980_a_at	2.368236	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
11722953_a_at	2.362908	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
11715487_a_at	2.357741	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
11744618_a_at	2.354836	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
11743497_at	2.332931	BMP2	bone morphogenetic protein 2
11728308_at	2.316016	KRT20	keratin 20
11722049_a_at	2.304052	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
11733721_s_at	2.29962	MAX	MYC associated factor X
11721307_at	2.2893	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1

11727031_a_at	2.287505	SQSTM1	sequestosome 1
11758096_s_at	2.26137	ABR	active BCR-related gene
11744435_a_at	2.259063	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
11737334_a_at	2.254038	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2
11758347_s_at	2.24551	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
11760293_at	2.225731	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
11760574_x_at	2.213248	FOSL1	FOS-like antigen 1
11724479_x_at	2.213247	FOSL1	FOS-like antigen 1
11721305_a_at	2.195017	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
11716614_a_at	2.170143	TSPO	translocator protein (18kDa)
11717619_at	2.157585	EPHA2	EPH receptor A2
11723489_at	2.146754	GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
11753509_a_at	2.119162	FOXC1	forkhead box C1
11717994_a_at	2.107053	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
11757058_x_at	2.099774	TSPO	translocator protein (18kDa)
11722852_s_at	2.096262	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
11725039_at	2.07976	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
11739654_at	2.065813	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
11726261_at	2.064348	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
11743498_at	2.04893	BMP2	bone morphogenetic protein 2
11721291_a_at	2.043232	F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
11728302_at	2.010742	TGFA	transforming growth factor, alpha

Table. 2 槲皮素下調 2 倍以上 Apoptosis 相關基因

Probe Set ID	Fold Change	Gene Symbol	Gene Title
11753726_s_at	2.07266	IGF2 /// INS-IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) /// INS-IGF2 readthrough transcript
11716156_a_at	2.081212	B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1

11715506_a_at	2.115146	MAGED1	melanoma antigen family D, 1
11723503_at	2.174532	PRLR	prolactin receptor
11723499_a_at	2.200205	PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
11720476_a_at	2.224233	PLG	plasminogen
11747952_x_at	2.254609	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
11757585_x_at	2.266559	MAGED1	melanoma antigen family D, 1
11732883_a_at	2.284978	F7	coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)
11750241_x_at	2.288738	KNG1	kininogen 1
11729957_x_at	2.299128	KNG1	kininogen 1
11757634_a_at	2.344522	LCN2	lipocalin 2
11758400_s_at	2.457638	IGF2 /// INS-IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) /// INS-IGF2 readthrough transcript
11757309_a_at	2.467029	COL2A1	collagen, type II, alpha 1
11739129_at	2.60618	KNG1	kininogen 1
11757403_x_at	2.61538	PLG	plasminogen
11723329_a_at	2.649464	GSN	gelsolin
11746278_a_at	2.657396	PLG	plasminogen
11732500_a_at	2.69326	FAM3B	family with sequence similarity 3, member B
11729956_a_at	2.843686	KNG1	kininogen 1
11723502_at	3.202358	PRLR	prolactin receptor
11723501_at	4.632973	PRLR	prolactin receptor

Table. 3 槲皮素上調 2 倍以上 Cell cycle 相關基因

Probe set ID	Fold Change	Gene Symbol	Gene Title
11726536_at	41.57895	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
11754154_a_at	34.58197	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
11736163_a_at	10.32515	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
11726508_a_at	7.216049	CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)

11717582_a_at	7.125227	C13orf15	chromosome 13 open reading frame 15
11724478_s_at	6.635093	FOSL1	FOS-like antigen 1
11722300_a_at	5.1266	ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
11727655_s_at	4.899151	DST	dystonin
11745119_a_at	3.325725	DST	dystonin
11715757_a_at	3.300005	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
11730320_a_at	3.210985	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
11763718_x_at	3.197018	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
11718848_a_at	2.574455	BEX2	brain expressed X-linked 2
11763717_a_at	2.534772	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
11755161_s_at	2.53051	PLK2	polo-like kinase 2
11743497_at	2.332931	BMP2	bone morphogenetic protein 2
11758347_s_at	2.24551	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
11728825_at	2.245451	TRNP1	TMF1-regulated nuclear protein 1
11760574_x_at	2.213248	FOSL1	FOS-like antigen 1
11724479_x_at	2.213247	FOSL1	FOS-like antigen 1
11753509_a_at	2.119162	FOXC1	forkhead box C1
11725039_at	2.07976	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
11715696_a_at	2.076052	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
11743498_at	2.04893	BMP2	bone morphogenetic protein 2

Table. 4 槲皮素下調 2 倍以上 Cell cycle 相關基因

Probe Set ID	Fold Change	Gene Symbol	Gene Title
11741225_a_at	2.11023	CASC5	cancer susceptibility candidate 5
11732998_at	2.190715	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6
11744219_at	2.409857	G0S2	G0/G1 switch 2

Table. 5 槲皮素上調 2 倍以上 Migration 相關基因

Probe set ID	Fold Change	Gene Symbol	Gene Title
11721135_s_at	8.529575	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
11749912_x_at	3.815804	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
11745020_a_at	3.809818	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
11746856_a_at	3.403543	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
11757643_x_at	3.3835	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
11741679_x_at	3.3835	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
11725298_x_at	3.360676	TUBB2B	tubulin, beta 2B
11741680_a_at	3.20275	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
11751994_s_at	3.146375	JAG1	jagged 1
11757442_a_at	3.127637	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
11719898_s_at	3.027778	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor
11751993_a_at	2.962844	JAG1	jagged 1
11715636_a_at	2.913104	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
11715440_a_at	2.891378	CTGF	connective tissue growth factor
11715441_a_at	2.645948	CTGF	connective tissue growth factor
11743618_at	2.62056	ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
11715442_s_at	2.595395	CTGF	connective tissue growth factor
11758598_s_at	2.570114	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
11755009_s_at	2.497325	VCAN	versican
11743617_at	2.4912	ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
11717619_at	2.157585	EPHA2	EPH receptor A2

11742207_a_at	2.152009	VCAN	versican
11723282_a_at	2.128121	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
11753509_a_at	2.119162	FOXC1	forkhead box C1
11725039_at	2.07976	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
11716048_at	2.049249	TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)
11721291_a_at	2.043232	F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)

Table. 6 槲皮素下調 2 倍以上 Migration 相關基因

Probe Set ID	Fold Change	Gene Symbol	Gene Title
11731636_a_at	2.012438	GAB1	GRB2-associated binding protein 1
11739351_a_at	2.04038	AMOT	angiomin
11753726_s_at	2.07266	IGF2 /// INS-IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) /// INS-IGF2 readthrough transcript
11716156_a_at	2.081212	B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1
11748048_a_at	2.091869	SUN2	Sad1 and UNC84 domain containing 2
11758353_s_at	2.130501	APOA1	apolipoprotein A-I
11747982_a_at	2.158572	GAB1	GRB2-associated binding protein 1
11741340_a_at	2.197163	GAB1	GRB2-associated binding protein 1
11749479_a_at	2.219954	SUN2	Sad1 and UNC84 domain containing 2
11732883_a_at	2.284978	F7	coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)
11758197_s_at	2.366571	APOA1	apolipoprotein A-I
11757734_x_at	2.377166	APOA1	apolipoprotein A-I
11758400_s_at	2.457638	IGF2 /// INS-IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) /// INS-IGF2 readthrough transcript
11757900_a_at	2.482448	VTN	vitronectin

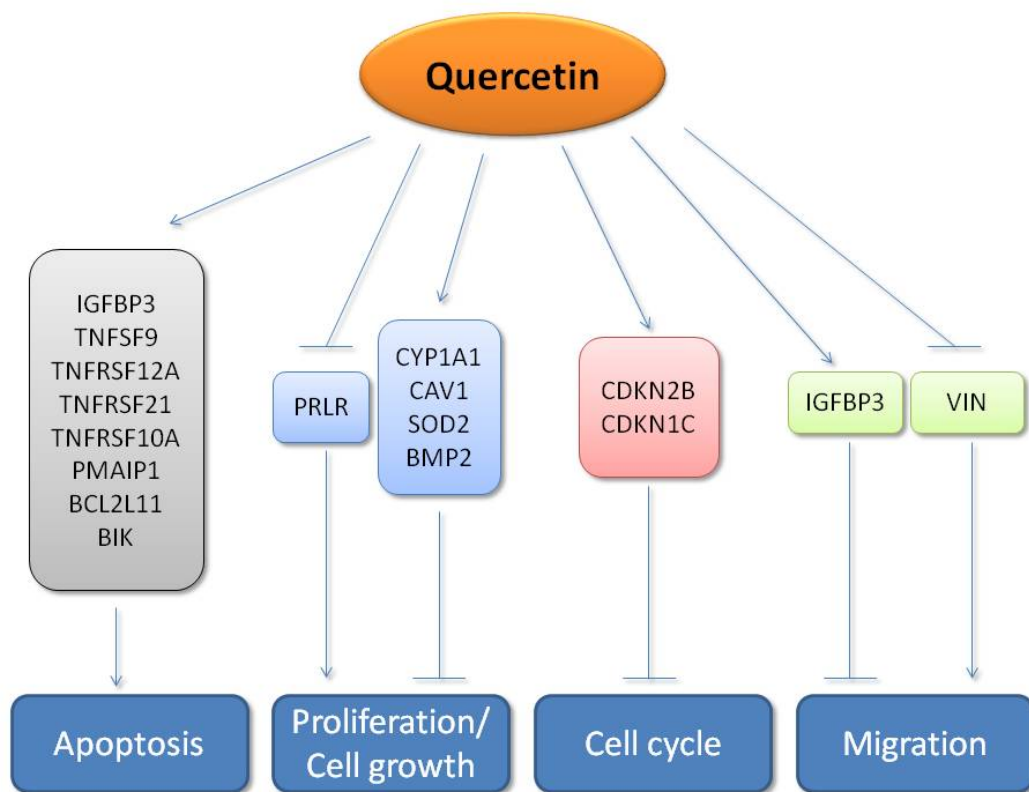


Fig. 22 槲皮素對肝癌調控兩倍以上基因之影響

參考文獻

- [1] Vital Statistic: Taipei T, ROC: Department of Health, Executive Yuan, Health statistics of the Republic of China, 2005.
- [2] Bosch, F. X., J. Ribes and J. Borrás. 1999. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin. Liver Dis.*, 19: 271-285.
- [3] Chen, C. J., M. H. Yu and Y. F. Liaw. 1997. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol Hepatol.*, 12: 294-300.
- [4] Thomas, M.B., and Zhu, A.X. (2005). Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 23, 2892-2899.
- [5] Takano, S., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tagawa, M. & Omata, M. (1995). Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology* 21, 650-5.
- [6] Chu, C. M. (2000). Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 15 Suppl, E25-30.
- [7] Lok, A.S. (2002). Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 346, 1682-1683. Lok, A.S. (2002). Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 346, 1682-1683.
- [8] Liu, C.J., and Kao, J.H. (2007). Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma:
- [9] epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc* 70, 141-145. Shafritz DA and Kew MC. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1: 1-8, 1981
- [10] Kwun, H.J., Jung, E.Y., Ahn, J.Y., Lee, M.N., and Jang, K.L. (2001). p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 82, 2235-2241.

- [11] Florese, R.H., Nagano-Fujii, M., Iwanaga, Y., Hidajat, R., and Hotta, H. (2002). Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 90, 119-131.
- [12] Ehrlich, K.C., and Cotty, P.J. (2002). Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 174-178.
- [13] Sell, S. (2003). Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer. *Cancer Res* 63, 7553-7562.
- [14] La Vecchia, C. (2007). Alcohol and liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 16, 495-497.
- [15] El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clinics in Liver Disease* 5: 87-107, 2001
- [16] Fong, Y. and L. H. Blumgart. 1996. Surgical therapy of liver cancer. In: Zakim, D., T.D. Boyer, eds. *Hepatology: a textbook of liver disease*. 3rd ed. p1548-1564. Saunders, Philadelphia
- [17] Tanikawa, K. 1994. Noninvasive treatment for hepatocellular carcinoma. In: Nishioka, K., H. Suzuki, S. Mishiro and T. Oda, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. p774-777. Springer-Verlag. Tokyo
- [18] Tang ZY: Hepatocellular carcinoma—cause, treatment, and metastasis. *World J Gastroenterol* 7, 445–454, 2001
- [19] Yoo, H.Y., Patt, C.H., Geschwind, J.F., and Thuluvath, P.J. (2003). The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 21, 4329-4335.
- [20] Upadhyay AK, Singh S, Chhipa RR, Vijaykumar MV, Ajay AK, Bhat MK. Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells

to carboplatin and 5-fluorouracil: Involvement of Akt, NFκB and Bcl-2. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216:177-85.

- [21] Singh S, Upadhyay AK, Ajay AK, Bhat MK. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced cervical carcinoma: A novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Letters* 2007; 581:289-95.
- [22] Camma, C., Schepis, F., Orlando, A., Albanese, M., Shahied, L., Trevisani, F., Andreone, P., Craxi, A., and Cottone, M. (2002). Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: meta-analysis of randomized controlled trials. *Radiology* 224, 47-54.
- [23] Vilana, R., Bruix, J., Bru, C., Ayuso, C., Sole, M., and Rodes, J. (1992). Tumor size determines the efficacy of percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 16, 353-357.
- [24] K. Murota, S. Shimizu, H. Chujo, J.-H. Moon, J. Terao, Efficiency of absorption and metabolic conversion of Quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2, *Arch. Biochem. Biophys.* 384 (2000) 391–397.
- [25] J.H. Yang, T.C. Hsia, H.M. Kuo, P.D. Chao, C.C. Chou, Y.H. Wei, J.G. Chung, Inhibition of lung cancer cell growth by Quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis, *Drug Metab. Dispos.* 34 (2006) 296–304.
- [26] M.C. Canivenc-Lavier, M.F. Vernevault, M. Totis, M.H. Siess, J. Magdalou, M. Suschetet, Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver, *Toxicology* 114 (1996) 19–27.
- [27] H. Shih, G.V. Pickwell, L.C. Quattrochi, Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer, *Arch. Biochem. Biophys.* 373 (2000) 287–294.
- [28] Y.J. Moon, X. Wang, M.E. Morris, Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and

- carcinogen metabolism, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 187–210.
- [29] F.P. Guengerich, T. Shimada, Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes, *Chem. Res. Toxicol.* 4 (1991) 391–407.
- [30] Y.J. Moon, X. Wang, M.E. Morris, Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 187–210.
- [31] W. Chen, X. Wang, J. Zhuang, L. Zhang, Y. Lin, Induction of death receptor 5 and suppression of surviving contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by Quercetin in non-small cell lung cancer cells, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2114–2121.
- [32] W.K. Kim, M.H. Bang, E.S. Kim, N.E. Kang, K.C. Jung, H.J. Cho, J.H. Park, Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 155–162.
- [33] A.B. Granado-Serrano, M.A. Martín, L. Bravo, L. Goya, S. Ramos, Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2), *J. Nutr.* 136 (2006) 2715–2721.
- [34] J. Duraj, K. Zazrivcova, J. Bodo, M. Sulikova, J. Sedlak, Flavonoid 槲皮素, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants, *Neoplasma* 52 (2005) 273–279.
- [35] Kang CH, Chiang PH, Huang SC. Correlation of COX-2 expression in stromal cells with high stage, high grade, and poor prognosis in urothelial carcinoma of upper urinary tracts. *Urology*.2008;72:153–157
- [36] Xiao X, Shi D, Liu L, Wang J, Xie X, et al. (2011) 槲皮素 Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis through Inactivation of P300 Signaling. *PLoS ONE* 6(8): e22934. doi:10.1371/journal.pone.0022934

- [37] Mi Hee Park, Do Sik Min, Quercetin-induced downregulation of phospholipase D1 inhibits proliferation and invasion in U87 glioma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412 (2011) 710–715
- [38] Jin YK, Eun HK, Seok SP, Jun HL, Taeg KK and Kyeong SC. Quercetin Sensitizes Human Hepatoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis Via Sp1-Mediated DR5 Up-Regulation and Proteasome-Mediated c-FLIPS Down-Regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 105:1386–1398 (2008)
- [39] Ming Shi, Fu-Sheng Wang, Zu-Ze Wu. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9(1):73-78
- [40] Granado-Serrano et al. Quercetin Induces Apoptosis via Caspase Activation, Regulation of Bcl-2, and Inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK Pathways in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *J. Nutr.* 136: 2715–2721, 2006.
- [41] Jun Tan, Bochu Wang, and Liancai Zhua. Regulation of Survivin and Bcl-2 in HepG2 Cell Apoptosis Induced by Quercetin. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* – Vol. 6, 1101–1110(2009)
- [42] Yuh-Fang Chang, Chin-Wen Chi, and Jane-Jen Wang. Reactive Oxygen Species Production Is Involved in Quercetin-Induced Apoptosis in Human Hepatoma Cells. *NUTRITION AND CANCER*, 55(2), 201–209
- [43] Hung X, Zhang J. Effect and mechanism of Quercetin in the treatment of transplanted hepatic cancer in nude mice. *Chinese Journal of General Surgery*(2008). Vol17(7) 663-667
- [44] Aanchal Sharma, Ankur Kumar Upadhyay, Manoj Kumar Bhat. Inhibition of Hsp27 and Hsp40 potentiates 5-fluorouracil and carboplatin mediated cell killing

in hepatoma cells. *Cancer Biology & Therapy* 8:22, 2104-2111; 15 November, 2009

- [45] Y.-F. CHANG et al. Quercetin Induces Oxidative Stress and Potentiates the Apoptotic Action of 2-Methoxyestradiol in Human Hepatoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 61(5), 735–745
- [46] Aanchal Sharma, Manoj KB. Quercetin-Induced Cell Death by Roscovitine Is Akt Dependent and p53 Independent in Hepatoma Cells. *Integrative Cancer Therapies* 10(4) NP4–NP14
- [47] A. Hsieh et al., Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/b-catenin signaling, *Cancer Lett.* (2010), doi:10.1016/j.canlet.2010.09.018
- [48] Kerr, J.F.R., Wvllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implic ations in tissue kinetics. *British. Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- [49] Raff,MC.Social controls on cell survival and cell death.*Nature* 1992:356:397-399
- [50] Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V., 1994. Apoptosis, it's significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013–2025.
- [51] Gerald Karp.*Cell and Molecular Biology*.1999:688-690
- [52] G.P.Studyiaski;*Cell Growth and Apoptosis*.,1996.
- [53] Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- [54] Kohler, C., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J. Immunol. Methods* 265, 97–110.
- [55] Mohapatra, S., Chu, B., Zhao, X., Pledger, E.J., 2005. Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells.

Cancer Research 65, 7717–7723.

- [56] Martin, L.J., Price, A.C., KaiSeries, A., Shaikh, A.Y., Liu, Z., 2000. Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death. *Int. J. Mol. Med.* 5, 3–13.
- [57] Lundberg, A. S., Weinberg, R. A. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer.* **1999**, 35, 1886-1894.
- [58] K. A. Heichman and J. M. Roberts, *Cell* 79, 557 (1994); J. Wuarin and P. Nurse, *ibid.* 85, 785 (1996).
- [59] Stephen J. Elledge (6 December 1996). "Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis". *Science* **274** (5293): 1664–1672
- [60] Nigg EA (June 1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle". *Bioessays* **17** (6): 471–80
- [61] Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D and Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-96, 1983
- [62] Funk JO. 1999. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 19: 4772-4780.
- [63] Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-8, 1989
- [64] Prives C and Hall PA. The p53 pathway. *Journal of Pathology* 187: 112-26, 1999
- [65] Bains W, Smith GC : A Novel Method for Nucleic Acid Determilation. *J theor Biol.* 1988 ; 135: 303-307.
- [66] Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D: Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical synthesis. *Science* 1991; 251: 767-773.
- [67] Fodor SPA, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adam CL: Multiplexed

- biochemical assays with biological chips. *Nature* 1993; 364:555-556.
- [68] Fodor SPA: Massively parallel genomics, *Science* 1997; 277:393-394.
- [69] Marshall A, Hodgson J: DNA chips: An array of possibilities. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(1):27-31.
- [70] Shalon D, Smith SJ, Brown PO: A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* 1996; 6: 639-645
- [71] Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, et al: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genet.* 2000; 24: 236-244.
- [72] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 14863-14868.
- [73] DeRisi JL, Lyer VR, Brown PO: Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997; 278: 680-686.
- [74] Knudsen steen : A Biologist's Guide to analysis of DNA microarray data. Technical University of Denmark. 2002; 20-96.
- [75] Kulkarni AV, Williams NS, Lian Y, Wren JD, Mittelman D, Pertsemliadis A, Garner HR. ARROGANT: An application to manipulate large gene collections . *Bioinformatics* 2002 ;18(11):1410-7.
- [76] Lee HM, Greeley GH Jr, Englander EW. : Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats . *Mech. Ageing. Dev.* 2001 ; 122(4):355-71.
- [77] Li L, Weinberg CR, Darden TA, Pedersen LG. : Gene selection for sample classification based on gene expression data: study of sensitivity to choice of

- parameters of the GA/KNN method ◦ *Bioinformatics* 2001 Dec;17(12):1131-42.
- [78] Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, Nakamura Y. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas ◦ *Oncogene* 2002 ;21(26):4120-8.
- [79] M.Cuzin : DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics◦ *Transfus. Clin. Biol.* 2001; 8 : 291-6.
- [80] The Gene Ontology (GO) Consortium. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. *Nat. Genet*, Vol. 25, pp 25-29. 2000.
- [81] The Gene Ontology (GO) Consortium. Creating the Gene Ontology Resource: Design and Implementation. *Genome Res.*, Vol. 11, pp 1425-1433. 2001.
- [82] Lee KW, Ma L, Yan X, Liu B, Zhang XK, Cohen P. Rapid Apoptosis Induction by IGFBP-3 Involves an Insulin-like Growth Factor-independent Nucleomitochondrial Translocation of RXR α /Nur77. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):16942-8
- [83] Casey Trimmer, Federica Sotgia, Diana Whitaker-Menezes, Renee M Balliet, Gregory Eaton, Ubaldo E Martinez-Outschoorn, Stephanos Pavlides, Anthony Howell, Renato V Iozzo, Richard G Pestell, Philipp E Scherer, Franco Capozza, Michael P Lisanti. Caveolin-1 and mitochondrial SOD2 (MnSOD) function as tumor suppressors in the stromal microenvironment: A new genetically tractable model for human cancer associated fibroblasts. *Cancer Biol Ther.* 2011 February 15; 11(4): 383–394.
- [84] Han F, Gu D, Chen Q, Zhu H. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas.* 2009 Oct;38(7):766-74.

- [85] Zhang J, Ge Y, Sun L, Cao J, Wu Q, Guo L, Wang Z. Effect of bone morphogenetic protein-2 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Int J Med Sci.* 2012;9(2):184-92.
- [86] Acosta JJ, Munoz RM, Gonzalez L, et al. Src mediates prolactin-dependent proliferation of T47D and MCF7 cells via the activation of focal adhesion kinase/Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Mol Endocrinol.* 2003;17(11):2268–2282.
- [87] Aaronson DS, Horvath CM (May 2002). "A road map for those who don't know JAK-STAT". *Science* 296 (5573): 1653–5
- [88] Jeong SJ, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Park HU, Brady JN. Activated AKT regulates NF- κ B activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* 2005; 24: 6719-6728
- [89] Jarry H, Thelen P, Christoffel V, Spengler B, Wuttke W. Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP. *Phytomedicine.* 2005 Mar;12(3):178-82
- [90] Entrez Gene: CDKN2B cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
- [91] Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (March 1995). "p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene". *Genes & Development* 9 (6): 650–62.
- [92] Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52:255-264.
- [93] P.L. Torng, Y.C. Lee, C.Y. Huang, J.H. Ye, Y.S. Lin, Y.W. Chu, S.C. Huang, P.

Cohen, C.W. Wu, C.T. Lin, Y.C. Lee, C.Y. Huang. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) acts as an invasion-metastasis suppressor in ovarian endometrioid carcinoma. *Oncogene*, 27 (2008), pp. 2137–2147

[94] Lujia Gribben, Robert C. Baxter, Deborah J. Marsh. Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits migration of endometrial cancer cells. *Cancer Letters* 317 (2012) 41–48.

[95] B. Felding-Habermann, D.A. Cheresh. Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5 (1993), p. 864

[96] John E. Bartsch, Edgar D. Staren, Hubert E. Appert, Adhesion and Migration of Extracellular Matrix-Stimulated Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* 110, 287–294 (2003)

