

# 整合式生物資訊分析發現紫檀芪可逆轉肝癌細胞對 Sorafenib 的藥物阻抗

唐漢軒<sup>1</sup> 蔡舒評<sup>1</sup> 許琦佩<sup>1</sup> 蘇品仔<sup>1</sup> 蘇純立<sup>1\*</sup>

## Revealing Pterostilbene to overcome Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells through integrated bioinformatics analysis

Han-Hsuan Tang<sup>1</sup>, Shu-Ping Tsai<sup>1</sup>, Chi-Pei Hsu<sup>1</sup>, Pin-Yu Su<sup>1</sup>, Chun-Li Su<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program of Nutrition Science, School of Life Science, National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan

(Received: August 18, 2024. Accepted: October 21, 2024.)

**Abstract** Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer death worldwide. Sorafenib (NEXAVAR®), a multikinase inhibitor, has been approved as one of first-line systemic therapies for patients with HCC; however, its efficacy is compromised by the chemoresistance of the tumor cells. Liver cancer cells acquired resistance to Sorafenib by activating Akt signaling, triggering epithelial-mesenchymal transition, modulating autophagy, and increasing antioxidative capacity. Lowered Akt activation has been reported to enhance autophagy and apoptosis in Sorafenib-resistant HCC. Phytochemical Pterostilbene (PS)-suppressed cancer cell growth and tumor progression were observed via inhibiting cell cycle progression and PI3K-Akt signaling as well as triggering apoptosis and autophagy. Here, through analyzing the transcriptomics data of HCC Huh7 and Sorafenib-resistant Huh7 (Huh7R), the resistance of Huh7R was discovered to be associated with cell cycle, DNA repair, and autophagy. The molecular actions of PS were further identified by querying the transcriptomics profiles deposited in the Connectivity Map database. Indeed, PS-enhanced sensitivity in cell growth inhibition of Huh7R to Sorafenib was exhibited and which was paralleled by reducing Akt activation and inducing autophagy. These data suggest that our unique gene expression-screening platform allows efficient identification of underlying mechanisms of phytochemicals to overcome drug resistance of cancer cells.

**Key words:** Pterostilbene, Sorafenib-resistance, hepatocellular carcinoma

## 前 言

根據國際癌症研究機構 (International Agency for Research on Cancer) 的統計，2022 年肝癌為全世界罹患率第六高的癌症，死亡率為第三高<sup>(1)</sup>。原

發性肝癌中，以肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 最常見，約佔 80%。肝細胞癌主要危險因子包括慢性 B 型及 C 型肝炎感染、黃麴毒素、酒精攝取及非酒精性肝疾病<sup>(2,3)</sup>。即便肝癌罹病率及死亡率在近年皆有明顯改善，末期肝癌患者的五年存活率仍然極低<sup>(4)</sup>。

蕾莎瓦 (Sorafenib®) 為多種受體酪胺酸激酶 (包含 VEGFR1/2/3、PDGFRβ、cKit 及 RET) 及其下游 RAF 激酶的抑制劑，藉此抑制腫瘤生長、血管新生及轉移<sup>(5)</sup>。在末期肝癌患者中，Sorafenib 相較

\* Corresponding author: Chun-Li Su

Address: No. 88, Sec. 4, Ting-Chow Road, Taipei 11677, Taiwan

Tel: 02 7749 1436

Fax: 02 2931 2904

E-mail: chunlisu@ntnu.edu.tw

於控制組可減少 30% 死亡率及延長 2~3 個月壽命<sup>(6,7)</sup>。根據美國國家癌症資訊網 (National Comprehensive Cancer Network; <https://www.nccn.org/>) 指引<sup>(8)</sup>, Sorafenib 為肝癌患者系統性治療 (systemic therapy) 的第一線藥物之一。然而腫瘤細胞隨著療程進展, 可能適應該壓力或篩選出較惡性的細胞, 產生續發性藥物阻抗 (acquired drug resistance)。陳氏等人<sup>(9)</sup> 發現對 Sorafenib 產生續發性阻抗的肝癌細胞, 具有過度活化的 PI3K-Akt 路徑及細胞凋亡功能不全。細胞自噬為一物種高度保留且受調控以維持細胞恆定的機制, 可提供細胞所需的能量以及移除過量或受損胞器與摺疊錯誤蛋白質及病原<sup>(10)</sup>。在生理狀態下基礎細胞自噬維持細胞恆定, 在壓力下細胞自噬會更加活躍<sup>(10)</sup>。Zai 等人<sup>(11)</sup> 發現 Sorafenib 阻抗的肝癌細胞具有 Akt 過度活化且抑制 Akt 可恢復其對 Sorafenib 的敏感度及促進細胞凋亡和細胞自噬。

紫檀芪 (Pterostilbene, PS) 富含於葡萄、花生和莓果。PS 可透過增加促凋亡蛋白表現 (如 BAX、BAD 和 BID) 及降低抗凋亡蛋白表現 (如 BCL-2) 以誘導多種部位腫瘤細胞產生凋亡, 包含乳癌<sup>(12)</sup>、膀胱癌<sup>(13)</sup>、肺癌<sup>(14)</sup>、胰臟癌<sup>(15)</sup> 及胃癌<sup>(16)</sup>。其生長抑制亦伴隨調降 p-Akt<sup>(13,17,18)</sup> 及 G0/G1 細胞週期停滯<sup>(13, 15, 16, 19)</sup>。PS 也可透過抑制 PI3K-Akt-mTOR 和活化 ERK 路徑<sup>(13)</sup> 促進癌症細胞進行細胞自噬。

生物資料庫是從科學實驗、已發表的文獻、高通量實驗技術與計算分析中收集而成的數據庫。這些資料提供的數據包括基因序列、蛋白質結構、生物途徑、蛋白質-蛋白質相互作用、疾病相關訊息等。相較於假說導向 (hypothesis-driven), 使用資料導向 (data-driven) 之實驗設計可以無偏差檢視生物系統中產生之變異, 從中可以發現癌細胞產生抗藥性的原因及探勘藥物未知的作用標的。本篇研究利用轉錄體分析對 Sorafenib 阻抗之肝癌細胞株顯著改變之生物途徑, 再藉由 Connectivity Map (CMap) 分析預測 PS 之作用機轉。

## 材料與方法

### 一、細胞培養

人類肝癌細胞株 Huh7 及 Sorafenib 阻抗 Huh7

(Huh7R) 由林宗哲博士 (國立台灣大學醫學院附設醫院癌醫中心分院) 提供。Huh7R 源自長時間培養於 Sorafenib 的 Huh7 細胞<sup>(9)</sup>。完全培養液為添加去補體胎牛血清 (10%, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)、鏈黴素 (100 mg/L, Sigma, St. Louis, MO, USA) 及盤尼西林 G 鈉鹽 (118 mg/L, Sigma) 的 Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO BRL)。Huh7R 的培養液額外添加 Sorafenib (6 μM, Bayer AG, Leverkusen, Germany)。細胞皆培養於 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 的加濕培養箱。

### 二、Sulforhodamine B (SRB) assay

SRB 在微酸性環境透過 sulfonic 基團與培養皿中的細胞內蛋白質結合, 並藉由鹼性溶劑溶解<sup>(20)</sup>。因 SRB 與蛋白質的結合呈化學計量關係 (stoichiometric), 溶解出的 SRB 愈多, 表示培養皿中細胞質量 (cell mass) 愈多<sup>(20)</sup>。細胞經過一次磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer saline, pH 7.4) 清洗後, 在 4°C 透過 10% 三氯醋酸 (trichloroacetic acid, Sigma) 固定於盤底 1 小時。固定的細胞在超純水清洗及室溫晾乾後, 在室溫培養於 0.1% (w/v) SRB 溶液 (Sigma) 1 小時。染色完的細胞在 1% 醋酸 (Acetic acid, J. T. Baker, Center Valley, PA, USA) 清洗及室溫晾乾後, 在室溫培養於 20 mM Tris 緩衝液 (pH 10, Applichem, Boca Raton, FL, USA) 將 SRB 溶解。溶解出的 SRB 可透過分光光度機 (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA) 讀取在波長 540 nm 的吸光值 (optical density, O.D.)。細胞生長計算公式: 生長 (% 控制組) = (O.D. 藥物組/O.D. 控制組) × 100%

### 三、藥物加乘效應計算

PS 合併 Sorafenib 對於細胞生長抑制的加乘效應以  $q$ -value<sup>(21)</sup> 檢視。 $q = \frac{E_{ab}}{[E_a + E_b(1 - E_a)]}$ ,  $E_{ab}$ 、 $E_a$  和  $E_b$  分別代表合併藥物、 $a$  藥物單獨以及  $b$  藥物單獨的生長抑制率。若  $q < 0.85$ , 屬於拮抗效應;  $0.85 \leq q \leq 1.15$ , 屬於累加效應 (additive effect);  $q > 1.15$  屬於加乘效應<sup>(21)</sup>。

### 四、酸性囊泡 (acidic vacuoles) 染色

Acridine orange 會聚集於細胞內的各種酸性囊泡 (如自噬溶酶體), 累積於囊泡內的濃度增加使

其發散光由綠轉紅<sup>(22)</sup>。因此可透過 acridine orange 測量細胞自噬活性。藥物處理後的細胞在室溫避光培養於 acridine orange 溶液 (150 ng/mL, Sigma) 15 分鐘，接著透過流式細胞儀 (LSRFortessa, Becton Dickson, Lexington, KY, USA) 收集紅色螢光訊號。

## 五、西方墨點法

全細胞蛋白質溶解於添加蛋白酶抑制劑 (0.4%, Sigma) 及磷酸酶抑制劑 (1%, Sigma) 的哺乳類蛋白質萃取劑 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)。加熱變性後的等量蛋白質以聚丙烯胺膠體電泳分離並轉漬於聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride membrane, PVDF; Perkin Elmer, Santa Clara, CA, USA) 上。PVDF 以 5% 脫脂奶阻斷 (blocking) 後，加入一級抗體培養於 4°C 16 小時。清洗後的 PVDF 在室溫培養於帶有 HRP 的二級抗體 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)。最終 PVDF 培養於 ECL substrates (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)，蛋白質的化學冷光訊號由膠體顯像儀 (Universal hood II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 捕捉。蛋白質訊號以 ImageJ 軟體量化。一級抗體包含 anti-Akt、anti-SQSTM1/p62、anti-LC3 與 anti-c-PARP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 及 anti- $\beta$ -actin (Sigma)。

## 六、微陣列及生物途徑分析

Huh7 及 Huh7R 細胞的微陣列資料<sup>(23)</sup>自 Gene Expression Omnibus (GEO) 資料庫 (GSE94550) 取得，並透過 GEO2R 採用 Linear Models for Microarray Analysis 進行 differentially expressed genes (DEGs) 分析<sup>(24)</sup>。將 DEGs (false discovery rate < 0.01, absolute log<sub>2</sub> fold change > 0.25) 上傳至 DAVID 資料庫<sup>(25)</sup> 分析受到改變的 KEGG 生物途徑。

## 七、CMap

透過 CLUE (<https://clue.io/>) 的 Touchstone 功能搜尋「Pterostilbene」，下載與其轉錄體圖譜相似或不相似的干擾物資料。綜合 connectivity score > 85 的基因擾動 (包含 knockdown 和 overexpress) 被定義為作用與 Pterostilbene 相似，為 Pterostilbene 的潛在作用標的。將潛在作用標的上傳至 DAVID 資料庫<sup>(25)</sup> 分析 Pterostilbene 參與的 Kyoto Encyclopedia

of Genes and Genomes (KEGG) 生物途徑。

## 八、統計

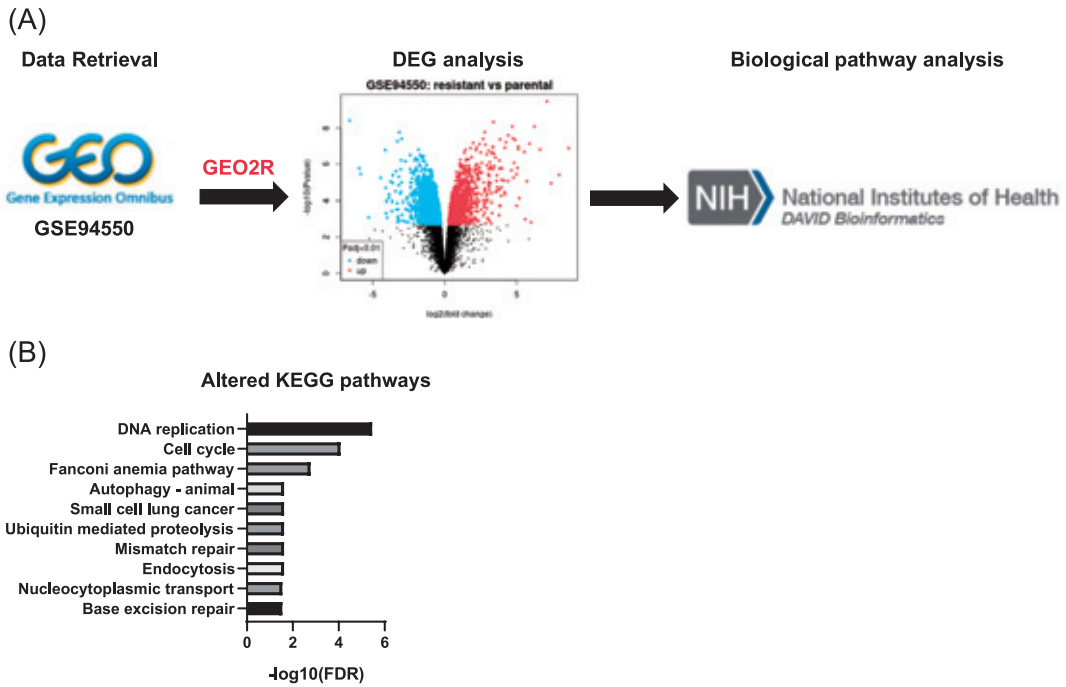
以 SPSS (v.23) 進行統計分析。數值以平均值±標準誤呈現。Student's t-test 或 one-way ANOVA 經 Duncan's multiple range test 事後檢定所得之 *p*-value < 0.05 視為顯著差異。圖表以 GraphPad PRISM (v.8) 或 Excel 製作。

## 結果與討論

### 一、肝癌細胞的 Sorafenib 阻抗與細胞週期、DNA 修復和細胞自噬有關

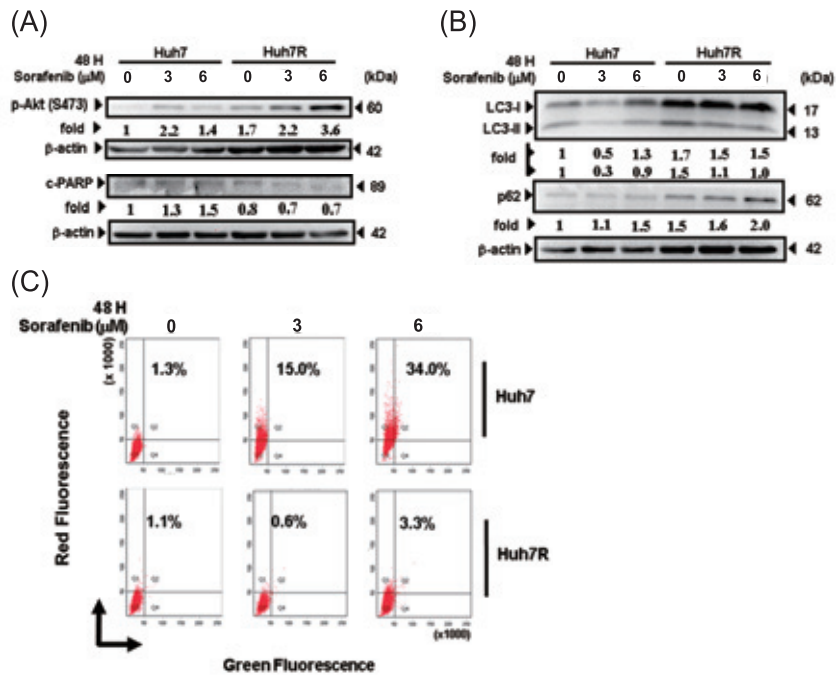
為全面瞭解肝癌細胞在產生 Sorafenib 阻抗後影響的生物途徑，本研究自 GEO 搜尋轉錄體資料 (圖一, A)。GSE94550 採用 Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 platform 分析 Huh7 及 Huh7R 細胞的轉錄體<sup>(23)</sup>。使用 DAVID 資料庫分析 DEGs 所參與的生物途徑，發現 Huh7R 在細胞週期、DNA 修復相關途徑 (如 mismatch repair 和 base excision repair) 及細胞自噬有顯著改變 (圖一, B)。細胞自噬相關基因包含 mTOR 及 PI3K-Akt 路徑基因，顯示 PI3K-Akt-mTOR 途徑可能參與 Sorafenib 阻抗所調控的細胞自噬。細胞實驗結果顯示，在 Sorafenib 處理 48 小時，Huh7R 有較多的 Akt 活化及較少的 cleaved PARP (細胞凋亡的指標；圖二, A)。此外，Huh7R 在 Sorafenib 處理後 LC3-II 沒有明顯變化，但有較多的 p62 累積 (圖二, B) 及較少的酸性囊泡 (圖二, C)，顯示其 autophagic flux 活性較 Huh7 差。

在轉錄體分析中也發現脂肪代謝相關基因在 Sorafenib 阻抗之 Huh7R 細胞顯著增加，雖然這些基因與 Sorafenib 抗藥性尚無直接相關的文獻，但有研究發現脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 和其他脂肪生成酶在 Sorafenib 阻抗的 Huh7R 細胞表現量增加，並且利用脂肪酸合成酶抑制劑—奧利司他 (orlistat) 與 Sorafenib 聯合使用於 Huh7R 細胞，可抑制硬脂醯輔酶 A 去飽和酶 (Stearoyl-CoA desaturase) 及脂肪酸合成酶以克服 Huh7R 細胞的抗藥性<sup>(26)</sup>。奧利司他藥物可調控 Huh7R 細胞的磷酸化 Akt 表現量，因此可能與 PI3K-Akt 路徑有關。PS 經由調控 PI3K-Akt 和細胞自噬路徑改善抗藥性問題，其



圖一 轉錄體分析 Huh7 對 Sorafenib 阻抗的機制

Figure 1. The mechanisms of Sorafenib-resistance in Huh7 cells identified by transcriptomics analysis. (A) Differentially expressed genes (DEGs, FDR < 0.01 and log2 fold change > | 0.25 |) in Huh7R cells (GSE94550) were retrieved from GEO, analyzed with GEO2R, and queried for altered biological pathways via DAVID database. (B) The significantly altered pathways (FDR < 0.05).



圖二 Huh7R 對 Sorafenib 產生細胞凋亡和細胞自噬阻抗

Figure 2. Sorafenib-treated Huh7R cells are resistant to apoptosis and autophagy. Whole cell lysates were collected after treatment with Sorafenib for 48 h. (A) Apoptosis- and (B) autophagy-related proteins were analyzed by Western blotting. (C) Autophagic flux was determined by acridine orange staining and analyzed by flow cytometry.

中機轉可能與脂肪代謝相關。

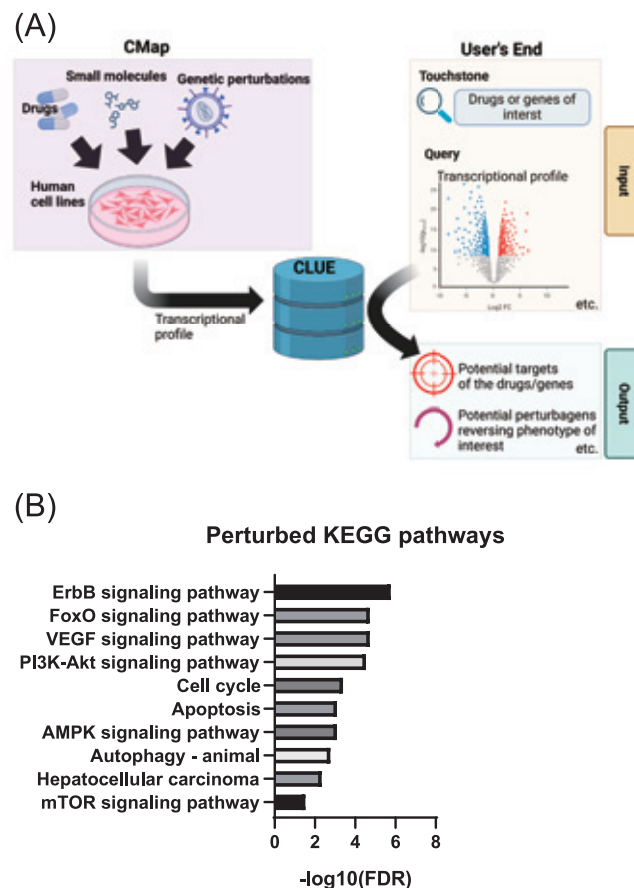
在兩篇大型第三期臨床試驗<sup>(6, 7)</sup>的成功後，Sorafenib 至今仍是肝癌治療的重要藥物之一。然而 Sorafenib 只對少部分的患者有顯著效果，對 Sorafenib 阻抗可分為原發性或續發性<sup>(27)</sup>。其中續發性阻抗是指藥效隨著治療時間增加而減少，其中的原因包含腫瘤細胞活化 PI3K-Akt、JAK-STAT 或 epithelial-mesenchymal transition 路徑<sup>(27)</sup>。我們的轉錄體資料分析結果（圖一, B）與先前研究一致<sup>(13, 15, 16, 19, 28, 29)</sup>。先前研究亦指出抑制 Akt 可以活化 Huh7R 細胞自噬和細胞凋亡<sup>(11)</sup>。因此我們希望能透過合併可抑制 Akt 和活化細胞自噬的藥物逆轉 Sorafenib 阻抗。

## 二、透過整合生物資料庫預測 PS 的作用機轉

常見於蔬果的植化素 PS 在先前已被指出可抑

制癌細胞的 Akt 活化、促進細胞自噬及抑制細胞生長<sup>(13, 17, 18, 30)</sup>。此外 PS 對於正常人類細胞的毒性低<sup>(28)</sup>。本研究想確認 PS 能否強化 Huh7R 對 Sorafenib 的敏感度。首先利用生物資料庫瞭解 PS 的作用機轉。以 CMap 尋找與 PS 有相似（connectivity score >85）轉錄圖譜的基因擾動（圖三, A），共找到 467 個基因（包含 154 個 gene knockdown 及 313 個 gene overexpression），其可視為 PS 的潛在作用標的。將 467 個基因透過 DAVID 資料庫進行 enrichment 分析，找到 117 個生物途徑，包含已知的 PI3K-Akt、細胞週期、細胞凋亡及細胞自噬等（圖三, B），其他預測出的生物途徑都是 PS 可能的作用機轉。其中 PI3K-Akt、AMPK 及 mTOR 為 PS 引發的可能自噬路徑（圖三, B）。

CMap 為一個免費且可互動（上傳及下載資料）的資料庫，其透過人類細胞株的轉錄體相似程



圖三 以生物資料庫預測 PS 作用機轉

**Figure 3.** Revealing mechanisms of PS by bioinformatics analysis. (A) Depiction of the functions of CLUE. The illustration was created with Bio-Render. (B) Predicted targets of PS were searched in CLUE. Biological pathways perturbed by PS was analyzed via DAVID. Selected pathways were shown.

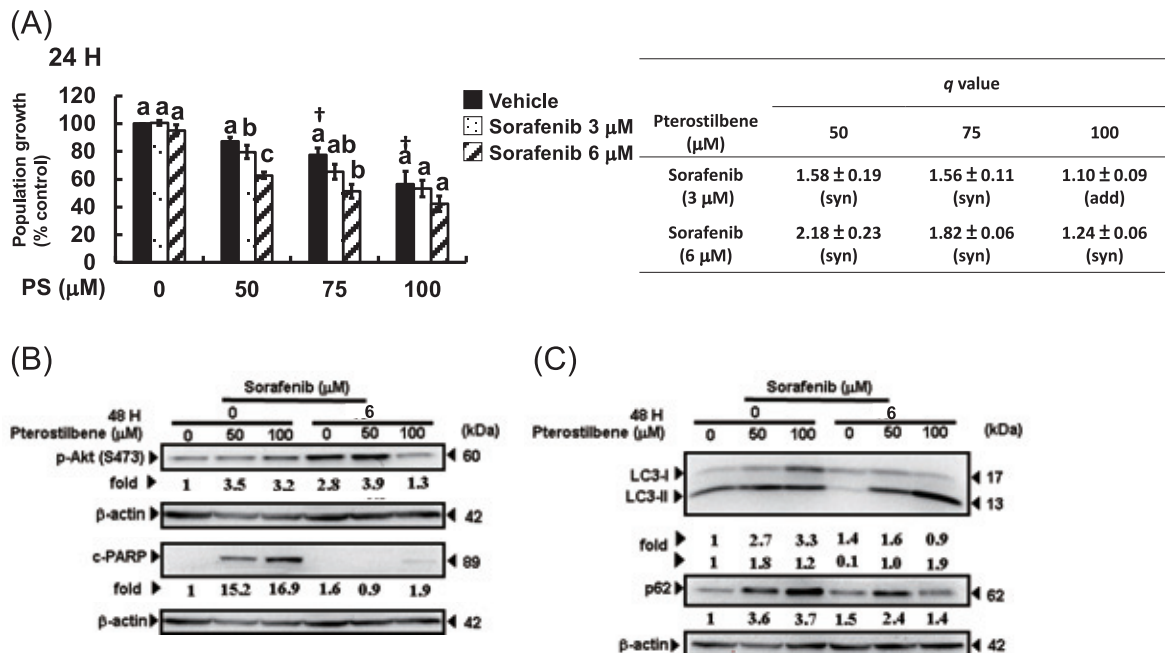
度連結各種生物狀態干擾物 (perturbagens)，包含藥物、小分子化合物、基因擾動以及生理狀態 (如疾病和發育) (31)。Lamb 等人 (32) 首先於 2006 年建立此資料庫，收錄 4 種人類癌細胞株在處理 1,309 種臨床用藥或小分子化合物後的基因轉錄表現。Subramanian 等人 (31) 於 2017 年將資料擴充到近 2 萬種藥物及 9 個核心細胞株，納入基因擾動 (knock down 或 overexpress 5075 個基因)，並使用新穎基因轉錄測量方法-L1000 測量 978 個指標基因 (landmark genes)，產出近 50 萬筆轉錄圖譜。透過 CMap 我們可以預測臨床藥物的未知功能 (老藥新用及毒性)、小分子藥物的作用途徑，甚至是逆轉病理狀態的潛在藥物 (31)。目前 CMap 由美國國家衛生院的 LINCS 計畫資助，使用者可透過 CLUE (<https://clue.io/>) 取得資料。

藉由 CMap 數據庫，來自不同癌症細胞系的轉錄體數據已被應用於推測其它癌症細胞系之分子機制。Uva 等人利用 CMap 發現 PI3K/Akt/mTOR 抑制劑可作為 neuroblastoma 的潛力藥物 (33)。Beck 等人則利用 CMap 發現 HDAC 為 hepatoblastoma 的作用

標的 (34)。藉由來自不同組織細胞的轉錄體數據，我們獨有的基因篩選方法也已成功預測小分子化合物於不同癌症細胞系之生理功能 (35-37)。

### 三、PS 合併 Sorafenib 增加 Huh7R 對 Sorafenib 生長抑制的敏感度與抑制 Akt 及促進細胞自噬有關

本研究也利用細胞實驗證實 PS 可以顯著抑制 Huh7R 細胞生長，且具有劑量依賴性 (圖四, A)。PS (50 μM) 可以顯著增加 Huh7R 對 Sorafenib 敏感度，且屬於加乘效應 (圖四, A)。PS 單獨處理 Huh7R 明顯增加 cleaved PARP，顯示其生長抑制與促進細胞凋亡有關 (圖四, B)。雖然 PS 合併 Sorafenib 沒有明顯增加細胞凋亡 (圖四, B)，卻明顯抑制 Akt 活化 (圖四, B) 及增加 LC3-II 和些微減少 p62 累積 (圖四, C)，顯示 PS 合併 Sorafenib 抑制 Huh7R 的生長可能與細胞自噬活化有關。細胞凋亡與自噬之間會互相拮抗或促進，這與凋亡和自噬涉及的蛋白和多功能調節分子有關，其中自噬可以藉由活化 caspase-8 而促進細胞凋亡 (38)。也有研究指



圖四 PS 合併 Sorafenib 可以改善 Huh7R 對 Sorafenib 的敏感度

**Figure 4.** PS enhances sensitivity of Huh7R cells to Sorafenib. (A) Huh7R cells were treated with Sorafenib in the presence and absence of Pterostilbene (PS) for 24 h. Cell population growth was determined by SRB assay. Data were means ± SEM. † indicates  $p < 0.05$  as compare with the corresponding vehicle control without PS treatment. Means at each concentration of PS without a common letter differ,  $p < 0.05$ . Synergistic effect was determined by  $q$ -value. The values of  $q$  indicate synergism when greater than 1.15, antagonism when smaller than 0.85, and additivity when the value was between 0.85 and 1.15. Whole cell lysates were collected after treatment with Sorafenib in the presence and absence of Pterostilbene (PS) for 48 h. (B) Apoptosis- and (C) autophagy-related proteins were analyzed by Western blotting.

出阻斷 CXCR4/mTOR 信號路徑可以誘導毒殺型細胞自噬而造成細胞死亡及減緩癌細胞的轉移<sup>(39)</sup>。本研究結果指出 PS 合併 Sorafenib 而活化的細胞自噬可能為毒殺型細胞自噬。

PS 與白藜蘆醇 (Resveratrol) 為結構相似的二苯乙烯 (stilbene) 多酚類, 由於 PS 有兩個 methoxyl 基團取代 Resveratrol 的 hydroxyl 基團, 使其生物利用率較 Resveratrol 高<sup>(40)</sup>。此外, PS 在 25-100  $\mu$ M 濃度作用 12 小時不影響正常人類淋巴細胞生長率<sup>(28)</sup>。PS 在肝癌細胞株可透過細胞自噬抑制細胞生長, 而細胞自噬的發生亦可仰賴內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress) 增加, 若合併使用 eIF2a 磷酸酶抑制劑活化內質網壓力可增加細胞凋亡<sup>(30)</sup>。此外, 潘氏等人<sup>(28)</sup> 在肝癌細胞株發現, PS 可抑制 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate 所誘導的轉移及侵襲能力, 可能透過抑制 PI3K-Akt 和 MAPK 路徑抑制 NF-kappaB 和 AP-1 轉錄活性, 進而減少 MMP-9 的蛋白質表現及活性。我們先前在膀胱癌細胞的研究發現, PS 可能透過活化 MEK/ERK 和 Class III PI3K 以及抑制 Class I PI3K/mTOR/p70S6K 調控細胞自噬<sup>(41)</sup>。此外, PS 也會在肝癌細胞透過 ER stress, 增加 eIF2a 磷酸化, 進而增加 ATF4 轉錄活性使得 LC3 轉錄增加<sup>(30)</sup>。先前研究也發現口服給予 PS (每周 2 次, 連續給予 6 周) 可以藉由增加細胞自噬和抑制增生, 減少小鼠異位肝腫瘤的大小<sup>(30)</sup>。研究利用血液生化值指出, PS (腹腔注射 250 mg/kg) 合併 Sorafenib (口服 30 mg/kg) 可有效減少胃癌腫瘤大小, 且對心臟、肝臟以及腎臟無明顯毒性<sup>(42)</sup>, 顯示合併使用的副作用不明顯。先前的試管實驗證實 PS 會抑制 CYP2C8 (CYP450 家族成員之一) 活性, 可能影響其他臨床藥物的代謝<sup>(43)</sup>, 所以必須審慎選擇劑量。另一研究利用病理切片及血液生化值發現, 連續 6 周給予口服 PS (56 mg/kg 或 112 mg/kg) 不影響小鼠體重且對器官 (包含肝臟) 無明顯毒性<sup>(30)</sup>。我們先前研究利用血液生化值也發現 PS 合併 Cisplatin 以及 Gemcitabine 在小鼠中可有效減少異位膀胱癌的大小, 且無明顯肝臟毒性<sup>(41)</sup>。有研究檢測 PS 的安全劑量, 分別餵食小鼠 0、30、300、3000 mg/kg/day 的 PS、斛皮素或是兩者的混合物 28 天, 利用血液生化值發現沒有安全性的疑慮, 其中 3000 mg/kg/day 的高劑量換算成人類的劑量, 約為人類多酚平均攝取量 (25 mg/day) 的 500 倍。這些結果顯示 PS 安全性<sup>(44)</sup>。

## 結 論

本篇研究利用轉錄體分析發現對 Sorafenib 阻抗的 Huh7R 細胞在 DNA 複製及細胞自噬等生物途徑發生改變, 使用 CMap 預測 PS 可能調控 Sorafenib 阻抗相關途徑, 包含細胞自噬、PI3K/Akt 及細胞週期, 最後以細胞實驗驗證 PS 合併 Sorafenib 可能透過活化細胞自噬改善 Huh7R 細胞對 Sorafenib 的敏感度。透過本篇實驗我們得以確認利用生物資料庫發現未知之生物現象的可行性, 有助於未來發現更多疾病之治療標的及老藥新用開發。

## 聲 明

### 一、致謝

感謝衛生福利部雙和醫院葉淇臺研究員提供流式細胞儀。

### 二、資金

科技部 (MOST 106-2320-B-003-006-MY3 及 109-2320-B-003-006-MY3)、國家科學及技術委員會 (NSTC 112-2320-B-003-003-MY3) 及國立臺灣師範大學 (10602)

### 三、作者的貢獻

計畫撰寫、計畫執行監督與完稿審閱: 蘇純立  
實驗執行、生物資訊分析與初稿撰寫: 唐漢軒  
稿件撰寫: 蔡舒評、許琦佩、蘇品仔

### 四、倫理審查並同意參與

本篇不適用

### 五、利益衝突

所有作者均無利益衝突

## 參考文獻

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74:229-63.
2. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2019;156:

- 477-91.e1.
3. Kinsey E, Lee HM. Management of Hepatocellular Carcinoma in 2024: The Multidisciplinary Paradigm in an Evolving Treatment Landscape. *Cancers (Basel)*. 2024;16:666.
  4. Chiang CJ, Lo WC, Yang YW, You SL, Chen CJ, Lai MS. Incidence and survival of adult cancer patients in Taiwan, 2002-2012. *J Formos Med Assoc*. 2016;115:1076-88.
  5. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:835-44.
  6. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009;10:25-34.
  7. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359:378-90.
  8. National Comprehensive Cancer Network. National Comprehensive Cancer Network Guidelines Hepatocellular Carcinoma Version 1.2024. Plymouth Meeting, Pennsylvania: National Comprehensive Cancer Network, 2024.
  9. Chen KF, Chen HL, Tai WT, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;337:155-61.
  10. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell*. 2017;41:10-22.
  11. Zhai B, Hu F, Jiang X, et al. Inhibition of Akt reverses the acquired resistance to sorafenib by switching protective autophagy to autophagic cell death in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2014;13:1589-98.
  12. Wang Y, Ding L, Wang X, et al. Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells. *Am J Transl Res*. 2012;4:44-51.
  13. Chen RJ, Ho CT, Wang YJ. Pterostilbene induces autophagy and apoptosis in sensitive and chemoresistant human bladder cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54:1819-32.
  14. Schneider JG, Alosi JA, McDonald DE, McFadden DW. Pterostilbene inhibits lung cancer through induction of apoptosis. *J Surg Res*. 2010;161:18-22.
  15. Mannal PW, Alosi JA, Schneider JG, McDonald DE, McFadden DW. Pterostilbene inhibits pancreatic cancer in vitro. *J Gastrointest Surg*. 2010;14:873-9.
  16. Pan MH, Chang YH, Badmaev V, Nagabhusanam K, Ho CT. Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in human gastric carcinoma cells. *J Agric Food Chem*. 2007;55:7777-85.
  17. Chang HP, Lu CC, Chiang JH, et al. Pterostilbene modulates the suppression of multidrug resistance protein 1 and triggers autophagic and apoptotic mechanisms in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells via AKT signaling. *Int J Oncol*. 2018;52:1504-14.
  18. Ko CP, Lin CW, Chen MK, Yang SF, Chiou HL, Hsieh MJ. Pterostilbene induce autophagy on human oral cancer cells through modulation of Akt and mitogen-activated protein kinase pathway. *Oral Oncol*. 2015;51:593-601.
  19. Siedlecka-Kroplewska K, Jozwik A, Boguslawski W, et al. Pterostilbene induces accumulation of autophagic vacuoles followed by cell death in HL60 human leukemia cells. *J Physiol Pharmacol*. 2013;64:545-56.
  20. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1:1112-6.
  21. Jin ZJ. About the evaluation of drug combination. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25:146-7.
  22. Thome MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci*. 2016;129:4622-32.
  23. Regan-Fendt K, Li D, Reyes R, et al. Transcriptomics-Based Drug Repurposing Approach Identifies Novel Drugs against Sorafenib-Resistant Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12:2730.
  24. Clough E, Barrett T, Wilhite SE, et al. NCBI GEO: archive for gene expression and epigenomics data sets: 23-year update. *Nucleic Acids Res*. 2024;52:D138-D44.
  25. Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res*. 2022;50:W216-W21.
  26. Shueng PW, Chan HW, Lin WC, Kuo DY, Chuang HY. Orlistat Resensitizes Sorafenib-Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells through Modulating Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2022;23:6501.
  27. Zhu YJ, Zheng B, Wang HY, Chen L. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38:614-22.
  28. Pan MH, Chiou YS, Chen WJ, Wang JM, Badmaev V, Ho CT. Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2009;30:1234-42.
  29. Yang XD, Kong FE, Qi L, et al. PARP inhibitor Olaparib overcomes Sorafenib resistance through reshaping the pluripotent transcriptome in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2021;20:20.
  30. Yu CL, Yang SF, Hung TW, Lin CL, Hsieh YH, Chiou HL. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation accelerates pterostilbene-induced cell death in human hepatocellular carcinoma cells in an ER stress and autophagy-dependent manner. *Cell Death Dis*. 2019;10:418.
  31. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell*. 2017;171:1437-52 e17.
  32. Lamb J, Crawford ED, Peck D, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*. 2006;313:1929-35.
  33. Uva P, Bosco MC, Eva A, et al. Connectivity Map Analysis Indicates PI3K/Akt/mTOR Inhibitors as Potential Anti-Hypoxia Drugs in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)*.



- 2021;13:2809.
34. Beck A, Eberherr C, Hagemann M, et al. Connectivity map identifies HDAC inhibition as a treatment option of high-risk hepatoblastoma. *Cancer Biol Ther.* 2016; 17:1168-76.
  35. Liao SC, Hsu WH, Huang ZY, et al. Bioactivity Evaluation of a Novel Formulated Curcumin. *Nutrients.* 2019;11:2982.
  36. Liao SC, Hsu HW, Chuang KL, et al. Using the Pleiotropic Characteristics of Curcumin to Validate the Potential Application of a Novel Gene Expression Screening Platform. *Nutrients.* 2019;11:1397.
  37. Won S-J, Yen C-H, Hsieh H-W, et al. Using connectivity map to identify natural lignan justicidin A as a NF-kappaB suppressor. *J Functional Foods.* 2017;34:68-76.
  38. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2015; 14:48.
  39. Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, et al. Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells. *European Journal of Cancer.* 2008;44:1022-9.
  40. Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68:593-601.
  41. Chen YT, Huang ZY, Tang HH, et al. Pterostilbene sensitizes cisplatin-resistant human bladder cancer cells with oncogenic HRAS. *Cancers (Basel).* 2020;12:2869.
  42. Zhao T, Wang C, Huo X, He ML, Chen J. Pterostilbene enhances sorafenib's anticancer effects on gastric adenocarcinoma. *J Cell Mol Med.* 2020;24:12525-36.
  43. Albassam AA, Frye RF. Effect of pterostilbene on in vitro drug metabolizing enzyme activity. *Saudi Pharm J.* 2019;27:406-12.
  44. Ruiz MJ, Fernandez M, Pico Y, et al. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J Agric Food Chem.* 2009;57:3180-6.

# 整合式生物資訊分析發現紫檀芪可逆轉肝癌細胞對 Sorafenib 的藥物阻抗

唐漢軒<sup>1</sup> 蔡舒評<sup>1</sup> 許琦佩<sup>1</sup> 蘇品仔<sup>1</sup> 蘇純立<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>國立臺灣師範大學生命科學專業學院營養科學碩士學位學程

(收稿日期：113 年 08 月 18 日。接受日期：113 年 10 月 21 日)

**摘要** 肝癌是全世界主要的癌症死因之一。蕾莎瓦 (Sorafenib®) 為多種激酶抑制劑，是末期肝癌患者第一線用藥之一。許多患者在接受 Sorafenib 治療一段時間後產生藥物阻抗。目前被提出的阻抗機制包含 Akt 過度活化、上皮間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition)、細胞自噬以及抗氧化能力增強。研究指出抑制 Akt 活化可增強 Sorafenib 阻抗肝癌細胞的細胞自噬和凋亡。植化素紫檀芪 (Pterostilbene, PS) 已在多種癌細胞中被證實可透過抑制細胞週期、PI3K-Akt 路徑及促進細胞凋亡和自噬等機制抑制細胞生長及癌化。本篇研究利用對 Sorafenib 阻抗之肝癌細胞的轉錄體數據分析藥物阻抗機轉，發現細胞週期、DNA 修復及細胞自噬參與其中。再利用 Connectivity Map 轉錄體資料庫預測 PS 的作用機轉。我們也合併 PS 及 Sorafenib 處理 Sorafenib 阻抗的 Huh7 肝癌細胞株 (Huh7R)，證實 PS 可抑制 Akt 活化、增強 Huh7R 細胞自噬及改善 Huh7R 對 Sorafenib 生長抑制的敏感度。這些結果證實我們特有的基因分析平台可有效且快速預測植化素之作用機制並改善癌細胞之藥物阻抗。

**關鍵字：**紫檀芪、Sorafenib 阻抗、肝癌

---

\* 通訊作者：蘇純立

通訊地址：11677 台北市文山區汀州路四段 88 號

電話：02-7749-1436

傳真：02-2931-2904

電子郵件：chunlisu@ntnu.edu.tw