



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I632908 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：105123480

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 25 日

(51)Int. Cl. : A61K31/352 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)  
高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：郭柏麟 KUO, PO LIN (TW)；張維安 CHANG, WEI AN (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

ATS 2016 international Conference, May 5, P294, Laricitrin, a Polyphenolic Compound of Red Grape, Inhibits Lung Cancer-Mediated Dendritic Cell Suppression by Decreasing Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：5 共 25 頁

(54)名稱

一種組合物用於製備抑制苯芘誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之藥物的用途

A USE OF A COMPOSITION FOR PREPARING A DRUG FOR INHIBITING A MIGRATION AND AN INVASION OF A LUNG CANCER CELL MEDIADED BY A BENZO(A)PYRENE

(57)摘要

本發明提供一種組合物用於製備抑制苯芘(BaP)誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之藥物的用途，其中該組合物包含一西伯利亞落葉松黃酮(Laricitrin)。

The present invention provides a use of a composition for preparing a drug for inhibiting a migration and an invasion of a lung cancer cell mediated by a Benzo(a)pyrene, wherein the composition comprises a Laricitrin.

指定代表圖：

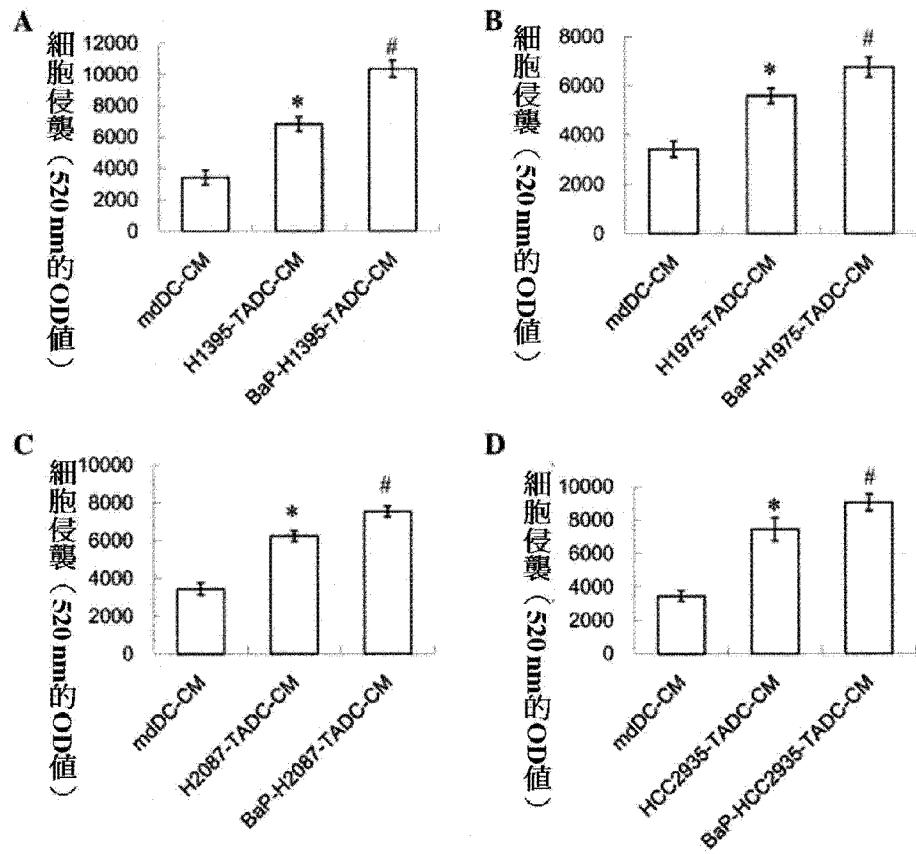


圖 4

I632908

公告本

發明摘要

※ 申請案號：105123480

※ 申請日：105/07/25

※IPC 分類：  
A61K 31/352 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

一種組合物用於製備抑制苯芘誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之藥物的用途/

A USE OF A COMPOSITION FOR PREPARING A DRUG FOR INHIBITING  
A MIGRATION AND AN INVASION OF A LUNG CANCER CELL  
MEDIATED BY A BENZO(A)PYRENE

【中文】

本發明提供一種組合物用於製備抑制苯芘 (BaP) 誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之藥物的用途，其中該組合物包含一西伯利亞落葉松黃酮 (Laricitrin)。

【英文】

The present invention provides a use of a composition for preparing a drug for inhibiting a migration and an invasion of a lung cancer cell mediated by a Benzo(a)pyrene, wherein the composition comprises a Laricitrin.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 4 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

無。



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

一種組合物用於製備抑制苯芘誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之藥物的用途/  
A USE OF A COMPOSITION FOR PREPARING A DRUG FOR INHIBITING  
A MIGRATION AND AN INVASION OF A LUNG CANCER CELL  
MEDIATED BY A BENZO(A)PYRENE

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種組合物用於製備抑制苯芘 (BaP) 誘導的肺癌細胞發展之藥物的用途，其特徵在於包含西伯利亞落葉松黃酮 (Laricitrin) 之該組合物能抑制肺癌細胞的轉移和侵襲。

## 【先前技術】

【0002】 肺癌是全世界癌症死亡率的首要原因，也與其預後較差有關。腫瘤微環境已被證明在癌症發展和耐藥性上是一個重要因素，因為它可能在腫瘤發展和腫瘤侵襲的期間導致免疫反應失調。在腫瘤微環境中，腫瘤相關樹突細胞 (Tumor-associated dendritic cells ; TADCs) 是重要的，因為它們會分泌許多促進肺癌生長、轉移、浸潤和上皮間質轉化 (epithelial to mesenchymal transition) 之因子；其中一個因子，腫瘤相關樹突細胞分泌脂泌素 (lung tumor-associated dendritic cell-derived resistin)，已證實可促進癌症發展。其他肺癌的腫瘤相關樹突細胞因子具有對癌症的發展之協同作用，包括肝素結合表皮生長因數類生長因子 (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor) 和趨化因子 CXCL5。

**【0003】** 莘芘（Benzo(a)pyrene；BaP）是和肺癌有關的致癌的多環芳香烴。BaP 可從香煙、食品和汽車排氣中發現。BaP 會引起 DNA 鍵結物（DNA adduct）的形成，其為生癌作用（carcinogenesis）發生的起源。BaP 亦被證實會上調 Twist 基因而促進 A549 細胞轉移和侵襲。

**【0004】** 黃酮醇（Flavonols）通常以糖苷形式（glycosidic form）存在，也出現在葡萄皮中；因此，它們亦存在於紅葡萄酒中。黃酮醇是類黃酮（flavonoid）的一個子類，具有抗氧化性能，並具有預防心血管疾病的潛在作用。黃酮類化合物亦被證明具有透過粒線體調節路徑以誘發結直腸癌細胞凋亡的潛力。黃酮類也透過誘發細胞週期中 S 和 G2/M 期的停滯來抑制 H460 和 A549 細胞的生長。此外，黃酮類化合物也引起 H460 和 A549 細胞凋亡。西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）是一種黃酮醇，以-3-葡萄糖苷（3-glucoside）的形式為主要存在。

**【0005】** 但至今並無相關研究探討黃酮醇和 BaP 的相關肺癌腫瘤微環境之間的關係。

## 【發明內容】

**【0006】** 本發明證實莘芘（Benzo(a)pyrene；BaP）與肺癌發展有關。如表1所示，顯示本發明所使用的細胞株的背景；原致癌基因BRAF（proto-oncogene B-Raf）突變是造成肺部的非小細胞肺癌和腺癌（adenocarcinoma）的危險因子；而表皮生長因子受體（epidermal growth factor receptor；EGFR）突變亦是腺癌的危險因子；另外女性和男性相比，女性對莘芘的致癌作用更加敏感。因此，比較BaP處理的TADC-CM和各



TADC-CM，可表明BaP-H1395-TADC-CM對促進癌細胞的遷移和侵襲有最顯著增加的效果（增加1.5倍），而與其它細胞株相比增加1.2倍；這個結果可能是因H1395細胞具有最多危險因素，因為它們是從女性吸煙者與BRAF突變所獲得。而每個TADC-CM和mdDC-CM相比，則指出HCC2935-TADC-CM對癌細胞的增生、轉移和侵襲有最為顯著的效果。在HCC2935細胞系來自腺癌的患者的胸水細胞（pleural effusion cells）建立。因此，與其他細胞株相比，HCC2935細胞可能具有增加轉移的潛能。

**【0007】** 是以，本發明證實各種細胞中BaP和肺腫瘤相關單核球衍生樹突細胞（lung tumor-associated monocyte-derived dendritic cell）增加癌症惡化之間的關聯。本發明發現：(i) 暴露於BaP之肺腫瘤相關單核球衍生樹突細胞會透過增加癌細胞的轉移和侵襲，而有助於癌症進展；(ii) 西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）可反轉的BaP所誘導（mediated）的肺癌惡化（如癌細胞的遷移和侵襲）。此外，當暴露於BaP的-H1395-TADC-CM時，H1395細胞株顯示於癌細胞的遷移和侵襲有最顯著的增強。這一結果表明，BaP能夠增加肺癌細胞的轉移和侵襲的可能性，且可被西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）反轉，故本發明未來可進一步發展治療BaP所誘發癌症進展的潛在藥物。

**【0008】** 本文中的用語「一」或「一種」係用以敘述本發明之元件及成分。此術語僅為了敘述方便及給予本發明之基本觀念。此敘述應被理解為包括一種或至少一種，且除非明顯地另有所指，表示單數時亦包括複數。於申請專利範圍中和”包含”一詞一起使用時，該用語「一」可意謂一個或超

過一個。

**【0009】** 本文中術語「細胞」包括複數個細胞，包括其混合物。

**【0010】** 本發明提供一種組合物用於製備抑制苯芘（Benzo(a)pyrene；BaP）誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之藥物的用途，其中該組合物包含一西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）。

**【0011】** 於一具體實施例中，肺癌為轉移性肺癌。在一些實施例中，肺癌處於I期、II期或III期。在一些實施例中，肺癌為非小細胞肺癌（NSCLC）。在一些實施例中，NSCLC為鱗狀細胞癌、腺癌或大細胞癌。在一些實施例中，肺癌為小細胞肺癌（SCLC）。在一些實施例中，肺癌在同源重組DNA修復方面有缺陷。在一些實施例中，肺癌為腫瘤，諸如類癌（典型或非典型類癌）、癌肉瘤、肺母細胞瘤或巨細胞癌或梭狀細胞癌。

**【0012】** 於一具體實施例中，該西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）為黃酮類化合物。該Laricitrin以-3-葡萄糖苷（3-glucoside）的形式表示。

**【0013】** 於另一具體實施例中，該苯芘（Benzo(a)pyrene；BaP）誘導的肺癌細胞的轉移和侵襲之機制是BaP透過促使肺癌細胞分泌一些因子刺激肺腫瘤相關單核球衍生的樹突細胞（lung tumor-associated monocyte-derived dendritic cell），而被刺激的肺腫瘤相關單核球衍生的樹突細胞會分泌一些促進肺癌細胞增生、轉移和侵襲的因子回饋給肺癌細胞，而增強肺癌細胞的增生、轉移和侵襲，加劇肺癌惡化。故該西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）能抑制BaP所引起的肺癌惡化（如加劇肺癌細胞的增生、

轉移和侵襲等)，其中一個抑制路徑是抑制肺癌細胞和肺腫瘤相關單核球衍生的樹突細胞彼此間的刺激因子回饋作用。

**【0014】** 於一具體實施例中，該肺癌細胞的轉移和侵襲是因原致癌基因BRAF (proto-oncogene B-Raf) 突變、表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor ; EGFR) 突變、女性或吸菸所引起。而苯芘 (BaP) 能加劇上述因子 (BRAF、EGFR、女性、吸菸) 所引發該肺癌細胞的轉移和侵襲之效果。

**【0015】** 本文中所使用之樹狀細胞 (dendritic cell ; DC) 係指在淋巴或非淋巴組織中發現之形態類似細胞類型之不同群體之任一成員。

**【0016】** 於一具體實施例中，該西伯利亞落葉松黃酮之有效劑量範圍為0.1至100  $\mu\text{M}$ 。於一較佳具體實施例中，該西伯利亞落葉松黃酮之有效劑量範圍為1至50  $\mu\text{M}$ 。於一更佳具體實施例中，該西伯利亞落葉松黃酮之有效劑量範圍為1至20  $\mu\text{M}$ 。於另一具體實施例中，該西伯利亞落葉松黃酮之有效劑量範圍為1至10  $\mu\text{M}$ 。

**【0017】** 本文中「有效劑量」一詞為一治療劑量可在特定條件下可預防、降低、阻止或逆轉一個體的一症狀的發展，或部分、完全舒緩該個體開始接受治療時於特別情況下已存在的症狀。

**【0018】** 本發明的藥物可進一步包含一醫藥上可接受的載體，在本發明相關領域下習知的治療方式中可透過許多不同途徑施用於一個體。在一些實施例中，該組合物 (包含西伯利亞落葉松黃酮 (Laricitrin)) 及醫藥上

可接受的載體會經由外用、靜脈、肌肉、皮下、局部、口服或吸入施用。該醫藥組合物將會透過消化及循環系統被傳遞到目標處。於一較佳具體實施例中，該藥物之給藥路徑為口服給予。於另一具體實施例中，該個體為動物，較佳為哺乳類，更佳為人類。

**【0019】** 該醫藥組合物進一步包含一種醫藥上可接受的載體。如本文所用術語「醫藥上可接受的載體」為透過特定組合施用及特定方法施用組合物所決定。如本文所用「載體」一詞包含但不局限任何及所有溶劑、分散介質、載具、包衣、稀釋劑、抗細菌和抗真菌劑等滲透和吸收延遲劑、緩衝劑、載體溶液、懸浮液、膠體等。用於醫藥組合物活性物質的這些介質和試劑在本領域中是公知的。除非任何常規介質或試劑與活性成分不相容，其用於治療的組合就需要被考慮。補充的活性成分也可摻入組合物中。術語「醫藥上可接受之」係指分子實體和組合物施用於受試者時不產生過敏或類似的不良反應。以蛋白質作為活性物質的水組合物製備在本領域中是習知的。通常，此組合物被製備為液體溶液、錠劑、膠囊或懸浮液注射劑；亦可製備為可用於注射劑之可溶解或懸浮液之固體形式。

**【0020】** 該組合物（包含西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin））及醫藥上可接受的載體的配製可能經由無菌的水溶液或分散體、水懸浮液、油乳化液、油包乳化液中的水、特定點的乳化液、長停留乳化液、黏性乳化液、微乳液、奈米乳液、微脂粒、微粒、微球、奈米球、奈米顆粒、微汞及數種可持續釋放的天然或合成聚合物。藥學上可接受的載體及P-113修飾勝肽也可配置成氣霧劑、片劑、丸劑、膠囊、無菌粉末、栓劑、洗劑、霜劑、



軟膏劑、糊劑、凝膠、水凝膠，持續遞送器件，或其他可用於醫藥組合物輸送的製劑。

### 【圖式簡單說明】

**【0021】** 圖 1 為各種條件性介質 (conditioned media ; CM) 之生產流程圖。(A) 為 CM (控制組)、H1395-CM、BaP -H1395-CM、H1975-CM、BaP-H1975-CM 、 H2087-CM 、 BaP-H2087-CM 、 HCC2935-CM 和 BaP-HCC2935-CM 的生產流程圖。(B) MDDC-CM、H1395-TADC-CM、BaP-H1395-TADC-CM 、 H1975-TADC-CM 、 BaP-H1975-TADC-CM 、 H2087-TADC-CM 、 BaP-H2087-TADC-CM 、 HCC2935-TADC-CM 和 BaP-HCC2935-TADC-CM 的生產流程圖。BaP：苯芘；mcDC：單核球衍生的樹突細胞 (monocyte-derived dendritic cell)；TADC：腫瘤相關樹突細胞 (Tumor-associated dendritic cells)；IL-4：介白素-4 (interleukin-4)；GM-CSF：粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子 (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)；IFN- $\gamma$ ：干擾素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ )；LPS：脂多醣 (lipopolysaccharide)。

**【0022】** 圖 2 為苯芘 (BaP) 處理的肺癌細胞的條件性介質 (CM) 沒有造成 mdDCs 增強肺癌細胞的增生。(A) 為 BaP-H1395-TADC-CM 和 H1395-TADC-CM 所培養的 H1395 細胞的增生比較圖。(B) 為 BaP-H1975-TADC-CM 和 H1975-TADC-CM 培養的 H1975 細胞的增生比較圖。(C) 為 BaP-H2087-TADC-CM 和 H2087-TADC-CM 培養的 H2087 細胞的增生比較圖。(D) 為 BaP-HCC2935-TADC-CM 和 HCC2935-TADC-CM

培養的 HCC2935 細胞的增生比較圖。該數據以 3 次獨立實驗的平均值±標準偏差 (standard deviation) 表示。 \*p <0.05 : 相對於 mdDC-CM 處理。 BaP : 莘芘； mcDC : 單核球衍生的樹突細胞 (monocyte-derived dendritic cell)； TADC : 腫瘤相關樹突細胞 (Tumor-associated dendritic cells)。

**【0023】** 圖 3 為莘芘 (BaP) 處理的肺癌細胞的條件性介質 (CM) 造成 mdDCs 增強肺癌細胞的轉移。(A) 為 BaP-H1395-TADC-CM 和 H1395-TADC-CM 培養的 H1395 細胞的轉移比較圖。(B) 為 BaP-H1975-TADC-CM 和 H1975-TADC-CM 培養的 H1975 細胞的轉移比較圖。(C) 為 BaP-H2087-TADC-CM 和 H2087-TADC-CM 培養的 H2087 細胞的轉移比較圖。(D) 為 BaP-HCC2935-TADC-CM 和 HCC2935-TADC-CM 培養的 HCC2935 細胞的轉移比較圖。該數據以 3 次獨立實驗的平均值±標準偏差表示。 \*p <0.05 : 相對於 mdDC-CM 處理； #P<0.05 : 相對於 TADC-CM 處理。 BaP : 莘芘； mcDC : 單核球衍生的樹突細胞 (monocyte-derived dendritic cell)； TADC : 腫瘤相關樹突細胞 (Tumor-associated dendritic cells)； OD : 光密度 (optical density)。

**【0024】** 圖 4 為莘芘 (BaP) 處理的肺癌細胞的條件性介質 (CM) 造成 mdDCs 加劇肺癌細胞的侵襲。(A) 為 BaP-H1395-TADC-CM 和 H1395-TADC-CM 培養的 H1395 細胞的侵襲比較圖。(B) 為 BaP-H1975-TADC-CM 和 H1975-TADC-CM 中培養的 H1975 細胞的侵襲比較圖。(C) 為 BaP-H2087-TADC-CM 和 H2087-TADC-CM 中培養 H2087 細胞的侵襲比較圖。(D) 為 BaP-HCC2935-TADC-CM 和 HCC2935-TADC-CM



中培養的 HCC2935 細胞的侵襲比較圖。該數據以 3 次獨立實驗的平均值±標準偏差表示。 \*p <0.05：相對於 mdDC-CM 處理； #P<0.05：相對於 TADC-CM 處理。 BaP：苯芘； mcDC：單核球衍生的樹突細胞（monocyte-derived dendritic cell）； TADC：腫瘤相關樹突細胞（Tumor-associated dendritic cells）； OD：光密度（optical density）。

**【0025】** 圖 5 為 Laricitrin 抑制於肺癌腫瘤微環境中 BaP 誘導的癌症惡化。（A）為 laricitrin 對 TADC-CM 或 BaP-TADC-CM 處理的（i）H1395 細胞和（ii）HCC2935 細胞之增生影響。（B）為 laricitrin 對 TADC-CM 或 BaP-TADC-CM 處理的（i）H1395 細胞和（ii）HCC2935 細胞之轉移影響。（C）為 laricitrin 對 TADC-CM 或 BaP-TADC-CM 處理的（i）H1395 細胞和（ii）HCC2935 細胞之侵襲影響。\*p <0.05：相對於 TADC-CM 處理； #P<0.05：相對於 BaP-TADC-CM 處理。 BaP：苯芘； mcDC：單核球衍生的樹突細胞（monocyte-derived dendritic cell）； TADC：腫瘤相關樹突細胞（Tumor-associated dendritic cells）； OD：光密度（optical density）。

## 【實施方式】

**【0026】** 本發明包括但不限於上述與下開之說明。實施方式則如下範例所示。

## 【0027】 材料與方法

**【0028】** (1) 化學製品：西伯利亞落葉松黃酮（Laricitrin）

(Extrasynthese, GENAY, 法國) 溶解在二甲亞凈 (DMSO；Sigma-Aldrich

公司，聖路易士，密蘇裡州，美國)，並於-20°C下儲存。對照組中培養物含有 0.1%DMSO 的載體溶劑。

**【0029】 (2) 細胞培養物和條件性介質 (CM)**

**【0030】 人類肺癌細胞( human lung adenocarcinoma )H1395、H1975、H2087 和 HCC2935 細胞株 ( 目錄編號分別為 : ATCC CRL-5868 、 ATCC CRL-5908 、 ATCC CRL-5922 和 ATCC CRL-2869 ) 。該些細胞株的特性列於表 1 中。該些細胞株於 RPMI-1640 培養基中培養 ( Thermo Fisher Scientific , Waltham , MA , USA ) ，該培養基含有 10% 胎牛血清 ( Thermo Fisher Scientific ) 。為了獲得各種條件性介質 ( conditioned media ; CM ) ， H1395 、 H1975 、 H2087 和 HCC2935 細胞 ( 每盤  $2 \times 10^6$  個細胞 /100mm ) 以有或無的 10  $\mu\text{M}$  萍芘 ( Benzo(a)pyrene ; BaP ) ( Sigma-Aldrich 公司 ) 處理 6 小時。洗滌並培養 24 小時後，收集以 BaP 處理 H1395 、 H1975 、 H2087 和 HCC2935 細胞的條件性介質 ( 分別為 BaP-H1395-CM ， BaP-H1975-CM ， BaP-H2087-CM 和 BaP-HCC2935-CM ) ( 如圖 1A 所示 ) 。**

**【0031】 表 1 、人類肺癌細胞的背景**

細胞株	組織來源	突變	疾病	性別	抽菸狀態	型態
H1395	肺	BRAF	腺癌第二期	女	抽菸，15 包 / 年	表皮
HCC2935	肺、胸水 ( pleural effusion )	EGFR	腺癌第一期	男	不抽菸	表皮
H2087	肺、淋巴結轉移部位 ( lymph	BRAF	腺癌	男	抽菸，60 包 / 年	像表皮及 / 或圓形



	node metastatic site )					
H1975	肺	EGFR	腺癌	女	不抽菸	表皮

\*1 包等於 20 根菸；BRAF：原致癌基因 BRAF (proto-oncogene B-Raf)；EGFR：表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor)

**【0032】 (3) CD14<sup>+</sup>單核細胞和單核球衍生的樹突細胞的分化之分離**

**【0033】 單核細胞由健康的捐贈者之外周血單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells ; PBMC) 中獲得。利用葡聚糖-泛影葡胺梯度法 (Ficoll-Hypaque gradient) 將單核細胞從血液中分離。CD14<sup>+</sup>單核細胞用 MACS 微型磁珠 CD14<sup>+</sup>單株抗體共軛的磁珠進行純化。透過培養 CD14<sup>+</sup>單核細胞於含有胎牛血清、20 μg/ml 的粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子 (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ; GM-CSF) 及 10 ng/ml 介白素-4 (interleukin-4 ; IL-4) 的 RPMI-1640 培養基中 5 天以產生單核球衍生的樹突細胞 (monocyte-derived dendritic cells ; mdDCs)。在培養第 3 天時，用含有 GM-CSF 及 IL-4 之新鮮培養基替換原先的培養基。為了使樹突細胞成熟，於以干擾素-γ (IFN-γ) 誘發 (priming) 3 小時後，再藉由脂多醣 (LPS ; 100 ng /ml) 刺激未成熟的 mdDCs。**

**【0034】 透過將 CD14<sup>+</sup>單核細胞於含有胎牛血清、GM-CSF 及 IL-4 之 RPMI-1640 培養基中培養，其中該培養基另含有 20%H1395-CM 、 BaP-H1395-CM 、 H1975-CM 、 BaP-H1975-CM 、 H2087-CM 、 BaP-H2087-CM 、 HCC2935-CM 或 BaP-HCC2935-CM ，以產生 H1395-TADCs 、 BaP-H1395-TADCs 、 H1975-TADCs 、 BaP-H1975-TADCs 、 H2087-TADCs 、**

BaP-H2087-TADCs、HCC2935-TADCs 或 BaP-HCC2935-TADCs。以 IFN- $\gamma$  誘發 3 小時後，細胞培養物以 LPS 刺激。接著洗滌，收集上清液並鑑定為 H1395-TADC-CM 、 BaP-H1395-TADC-CM 、 H1975-TADC-CM 、 BaP-H1975-TADC-CM 、 H2087-TADC-CM 、 BaP-H2087-TADC-CM 、 HCC2935-TADC-CM 或 BaP-HCC2935-TADC-CM (如圖 1B 所示)。

#### 【0035】 (4) 細胞增生

【0036】 將細胞接種在 96 孔培養板中。接下來的 24 小時孵育，將細胞用賦形劑 mdDC-CM 或多種 CM 處理 72 小時。於 72 小時培養後，利用水溶性四唑鹽-1 (water-soluble tetrazolium salt-1；WST-1) 分析 H1395-TADC-CM 和 BaP-H1395-TADC-CM 對 H1395 細胞增生的影響、 H1975-TADC-CM 和 BaP-H1975-TADC-CM 對 H1975 細胞增生的影響、 H2087-TADC-CM 和 BaP-H2087-TADC-CM 對 H2087 細胞增生的影響、以及 HCC2935-TADC-CM 和 BaP-HCC2935-TADC-CM 對 HCC2935 細胞增生的影響。藉由預混的 WST-1 細胞增殖試劑 (Clontech 實驗室公司) 來決定細胞增生的程度。然後，H1395、H1975、H2087 或 HCC2935 細胞以賦形劑 (控制組) 或 10  $\mu$ M 的 BaP 處理 6 小時。

#### 【0037】 (5) 細胞轉移和侵襲檢測

【0038】 細胞轉移和侵襲試驗用 QCM<sup>TM</sup>24 孔細胞轉移和侵襲檢測試劑盒 (EMD Millipore 公司) 進行測試。利用 QCM 24 孔細胞轉移測定以定量 H1395-TADC-CM 和 BaP-H1395-TADC-CM 對 H1395 細胞的轉移影響、 H1975-TADC-CM 和 BaP-H1975-TADC-CM 對 H1975 細胞的轉移影響、

H2087-TADC-CM 和 BaP-H2087-TADC-CM 對 H2087 細胞的轉移影響、以及 HCC2935-TADC-CM 和 BaP-HCC2935-TADC-CM 對 HCC2935 細胞的轉移影響。將細胞接種到轉移室和 mdDC-CM，或加入各種 20%濃度的介質到該底部孔來充當化學吸引因子（chemoattractant）反應 24 小時。

**【0039】** 以 QCM 24 孔細胞侵襲測定法定量 H1395-TADC-CM 和 BaP-H1395-TADC-CM 對 H1395 細胞的侵襲影響、H1975-TADC-CM 和 BaP-H1975-TADC-CM 對 H1975 細胞的侵襲影響、H2087-TADC-CM 和 BaP-H2087-TADC-CM 對 H2087 細胞的侵襲影響、以及 HCC2935-TADC-CM 和 BaP-HCC2935-TADC-CM 對 HCC2935 細胞的侵襲影響。上述介質的 20% 濃度作為化學吸引因子反應 48 小時。

**【0040】** 在以上兩種測定處理結束時，細胞於細胞裂解緩衝液中用 CyQuant GR 染料進行染色，在室溫下反應 15 分鐘。利用盤式螢光分析儀（fluorescence plate reader）（設定為 485/520 nm 之激發（excitation）/發射（emission）波長）讀取轉移和侵入細胞的螢光。

#### **【0041】（6）Laricitrin 處理**

**【0042】** 透過將 CD14<sup>+</sup>單核細胞於含有胎牛血清、GM-CSF 及 IL-4 之 RPMI-1640 培養基中培養，其中該培養基另有或沒有 20% 的 H1395-CM、BaP-H1395-CM、HCC2935-CM 或 BaP-HCC2935-CMmdDC72 小時以衍生出 mdDCs、H1395-TADCs、BAP H1395-TADCs、HCC2935-TADCs 或 BaP-HCC2935-TADCs。為了使樹突細胞成熟，以干擾素-γ（IFN-γ）誘發（priming）3 小時後，再藉由 100 ng /ml LPS 刺激未成熟的 mdDCs。mdDCs、

H1395-TADCs 、 BaP-H1395-TADCs 、 HCC2935-TADCs 或 BaP HCC2935-TADCs 用或不用 2  $\mu$ M 的西伯利亞落葉松黃酮 (Laricitrin) 進行預處理 1 小時。接著，以有或沒有 laricitrin 之 mdDC-CM、H1395-TADC-CM、BaP-H1395-TADC-CM 、 HCC2935-TADC-CM 或 BaP-HCC2935-TADC-CM 適當地加入 H1395 或 HCC2935 細胞中，於另外的 72 小時。以 WST-1 測定法評估細胞增生。 H1395 和 HCC2935 細胞接種到頂部的細胞培養盤內槽 (Transwell insert)，而各種 mdDCs 的 CM，如 laricitrin 處理 mdDCs 、 H1395-TADCs ， laricitrin 處理 H1395-TADCs 、 BaP-H1395-TADCs 、 laricitrin 處理的 BaP-H1395-TADCs 、 HCC2935-TADCs 、 laricitrin 處理的 HCC2935-TADCs 、 BaP-H2935-TADCs 或 laricitrin 處理的 BaP HCC2935-TADCs 加入到該底部之槽室作為化學吸引因子反應 24 小時 (轉移測試) 或 48 小時 (侵襲測試)。利用 QCM 24 孔細胞轉移和侵襲測定法定量 H1395 和 HCC2935 細胞的轉移和侵襲能力。

#### 【0043】 (7) 統計分析

【0044】 數據以平均值 $\pm$ 標準誤差 (SE) 表示。使用單因子變異數分析與事後 Tukey 檢定進行統計比較。兩個試驗組的平均值之間顯著差異是透過學生 T 檢定 ( Student's t-test ) 進行分析。P <0.05 代表統計上有顯著差異。

#### 【0045】 結果：

##### 【0046】 (1) BaP 增加肺癌細胞的轉移和侵襲



【0047】 為了探究肺癌腫瘤微環境中苯芘（Benzo(a)pyrene；BaP）對腫瘤發展的影響，因此對 BaP-H1395-TADC-CM、BaP-H1975-TADC-CM、BaP-H2087-TADC-CM 和 BaP-HCC2935-CM 對肺癌腫瘤細胞的增生、轉移及侵襲之影響進行實驗。上述 20%的濃度的條件性介質（conditioned media；CM）可增加肺癌細胞的增生。該增生效果和以 10 μM 的 BaP 處理之 H1395 細胞、H1975 細胞、H2087 細胞或 HCC2935 細胞相似。值得注意的是，當這些細胞用 BaP 處理時，該增生效果沒有增加（如圖 2 所示）。和 H1395-TADC-CM 相比，BaP-H1395-TADC-CM 並沒有增強 H1395 細胞增生（如圖 2A 所示）。而和 H1975-TADC-CM 相比，BaP-H1975-TADC-CM 亦沒有增強 H1975 細胞增生（如圖 2B 所示）。和 H2087-TADC-CM 相比，BaP-H2087-TADC-CM 並沒有增強 H2087 細胞增生（如圖 2C 所示）。和 HCC2935-TADC-CM 相比，BaP-HCC2935-TADC-CM 沒有提高 HCC2935 細胞增生（如圖 2D 所示）。然而，20%濃度的 H1395-TADC-CM、H1975-TADC-CM、H2087-TADC-CM 或 HCC2935-TADC-CM 先前已被指出可誘導肺癌細胞轉移和侵襲，以及 20% 濃度的上述介質可額外增加此效果（如圖 3 和圖 4 所示）。結果發現，與 H1395-TADC-CM 相比，BaP-H1395-TADC-CM 加強 H1395 細胞轉移和侵襲（如圖 3A 和圖 4A 所示）。與 H1975-TADC-CM 相比，BaP-H1975-TADC-CM 增強 H1975 細胞的轉移和侵襲（如圖 3B 和圖 4B 所示）。與 H2087-TADC-CM 相比，BaP-H2087-TADC-CM 增強 H2087 細胞的轉移和侵襲（如圖 3C 和圖 4C 所示）。此外，與 HCC2935-TADC-CM 相比，BaP-HCC2935-TADC-CM 增強 HCC2935 細胞的轉移和侵襲（如圖 3D 和圖 4D 所示）。因此，細胞增

生的效果可能不被增加；但是，以 BaP 處理後可增強對癌細胞的轉移和侵襲的影響。和每個 TADC-CM 與 mdDC-CM 相比，HCC2935-TADC-CM 顯示對癌細胞的增生、轉移和侵襲有最顯著的影響。 BaP 處理的 TADC-CMS 與每個 TADC-CM 處理相比，顯示出 BaP-H1395-TADC-CM 對促進腫瘤細胞轉移和侵襲有最顯著的影響。

**【0048】 (2) Laricitrin 抑制 BaP 所誘發肺癌腫瘤相關單核球衍生之樹突細胞的癌症發展**

**【0049】** 與未用 BaP 處理的細胞株相比，HCC2935-TADC-CM 證明對肺癌細胞的增生、轉移和侵襲最為顯著的效果。然而，BaP -H1395-TADC-CM 對肺癌細胞的轉移和侵襲的作用最強（如圖 3 和圖 4 所示）。因此，HCC2935 和 H1395 細胞株被選定為建立抗於肺癌腫瘤微環境中 BaP 相關癌症惡化之解毒劑的模型。

**【0050】** 評估西伯利亞落葉松黃酮 (Laricitrin) 於 BaP 誘發癌症的發展之影響。如圖 5 所示，雖然 laricitrin 並無法抑制肺癌腫瘤微環境中肺癌細胞的增生（如圖 5A 所示），但可抑制由 H1395-TADC-CM 和 HCC2935-TADC-CM 所誘發的肺癌細胞轉移（如圖 5B 所示）。此外，laricitrin 亦抑制 BaP-H1395-TADC-CM 和 BAP-HCC2935-TADC-CM 所誘發的肺癌細胞侵襲（如圖 5C 所示）。

**【0051】** 本發明適當的描述可以在本文未具體公開的元素或限制下實施。已被用作描述的術語並不是限制。在使用這些術語和除此之外的任何等同物的表達和描述是沒有差別的，但應當認識到本發明內的權利是可



107 年 05 月 25 日替換頁

能修改的。因此，雖然本發明已說明實施例和其他情況，本文中所公開的內容可以被本領域的技術人員進行修飾和變化，並且這樣的修改和變化被認為是在本發明的權利範圍之內。

**【符號說明】**

**【0052】** 無。

**【生物材料寄存】**

無。

**【序列表】** (請換頁單獨記載)

無。

## 申請專利範圍

1. 一種組合物用於製備抑制苯芘 (BaP) 誘導的肺癌細胞的侵襲 (invasion) 之藥物的用途，其中該組合物包含一西伯利亞落葉松黃酮 (Laricitrin)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該西伯利亞落葉松黃酮之有效劑量範圍為 1 至 20  $\mu\text{M}$ 。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該西伯利亞落葉松黃酮之有效劑量範圍為 1 至 10  $\mu\text{M}$ 。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該藥物之給藥路徑為口服給予。

# 圖式

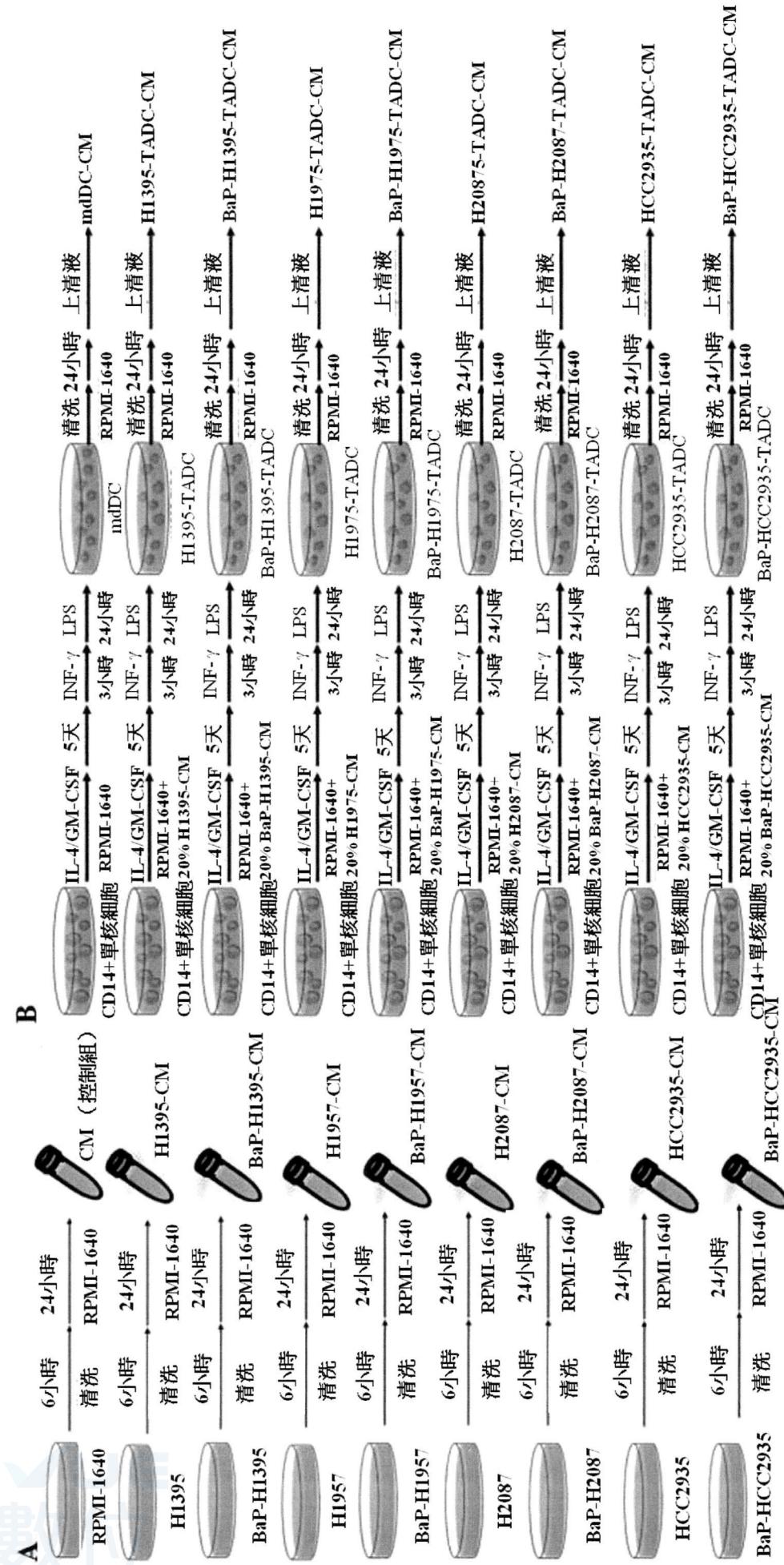


圖 1

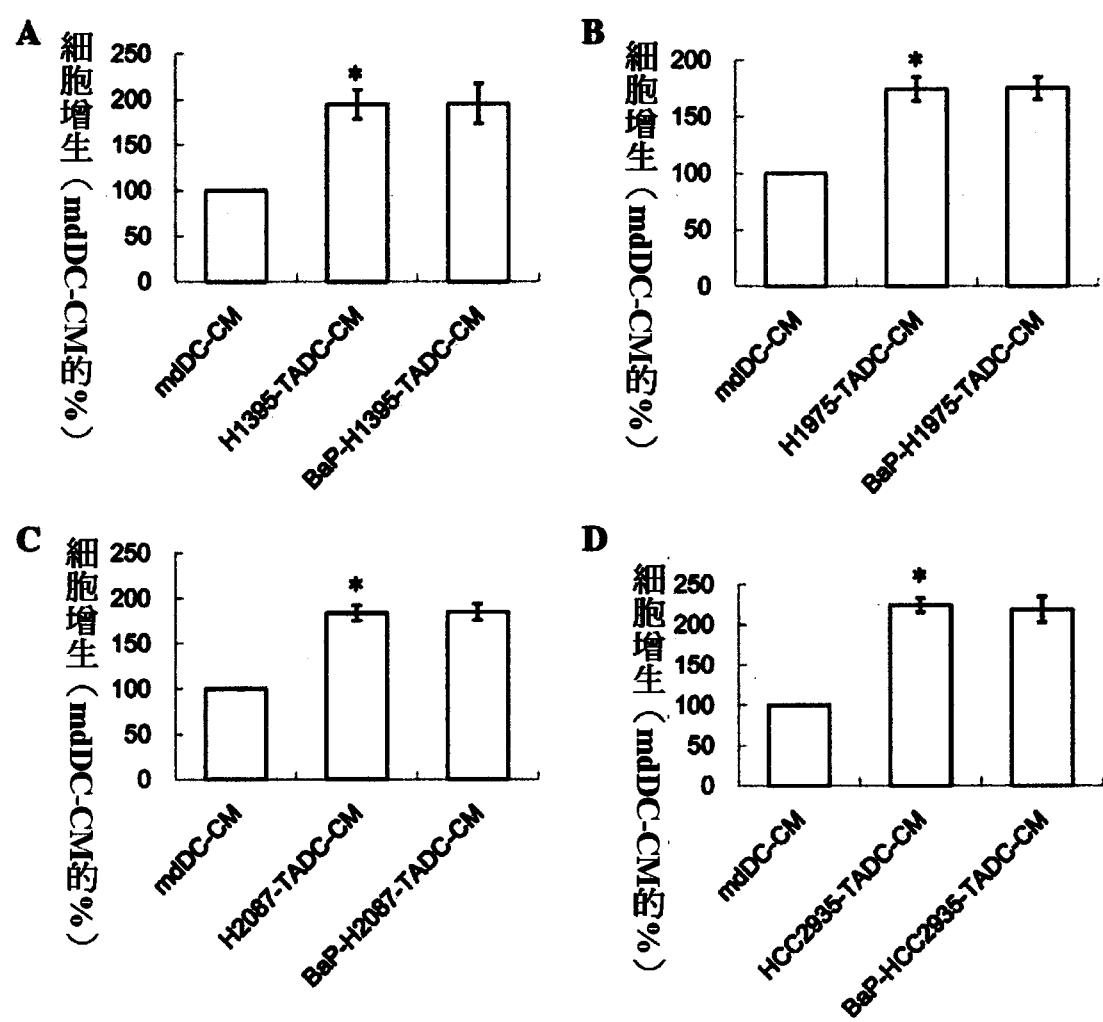


圖 2

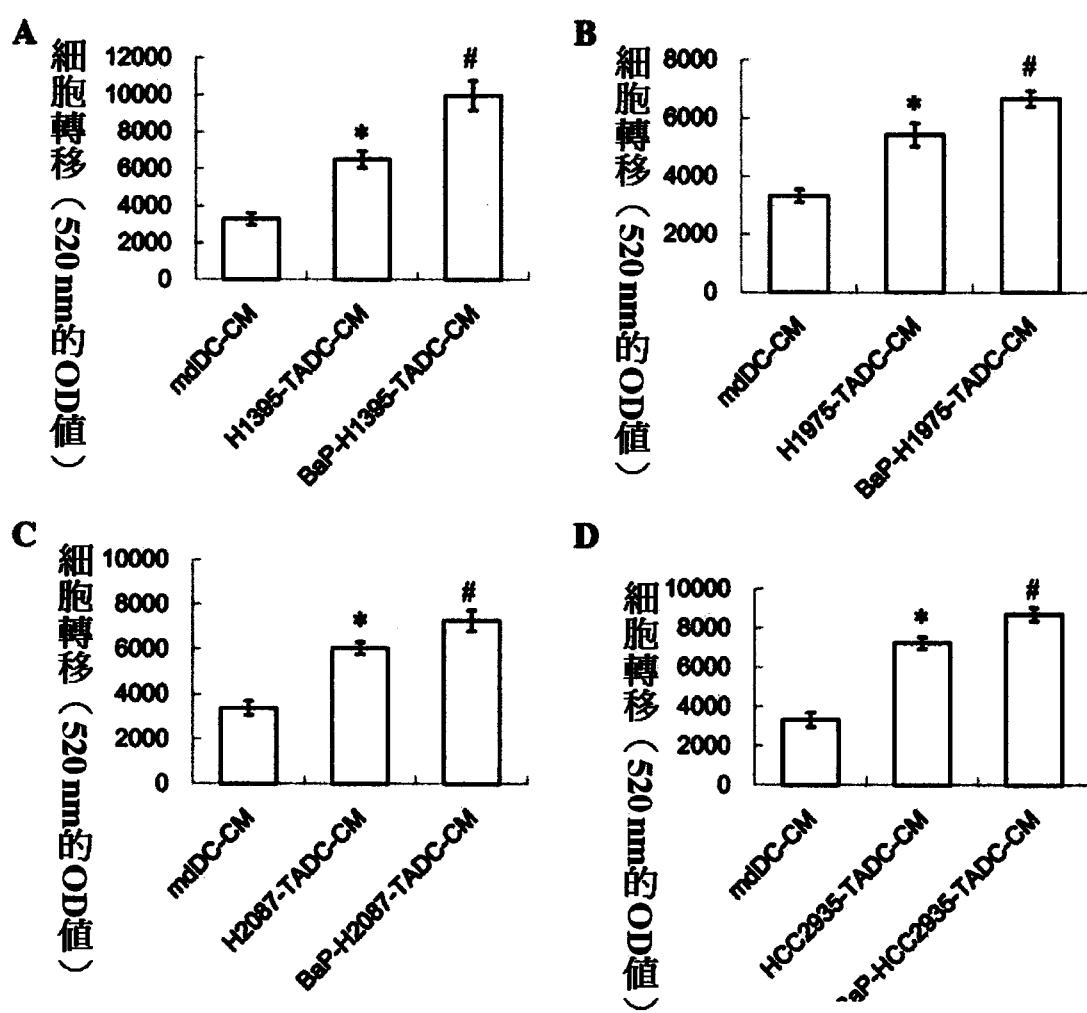


圖 3

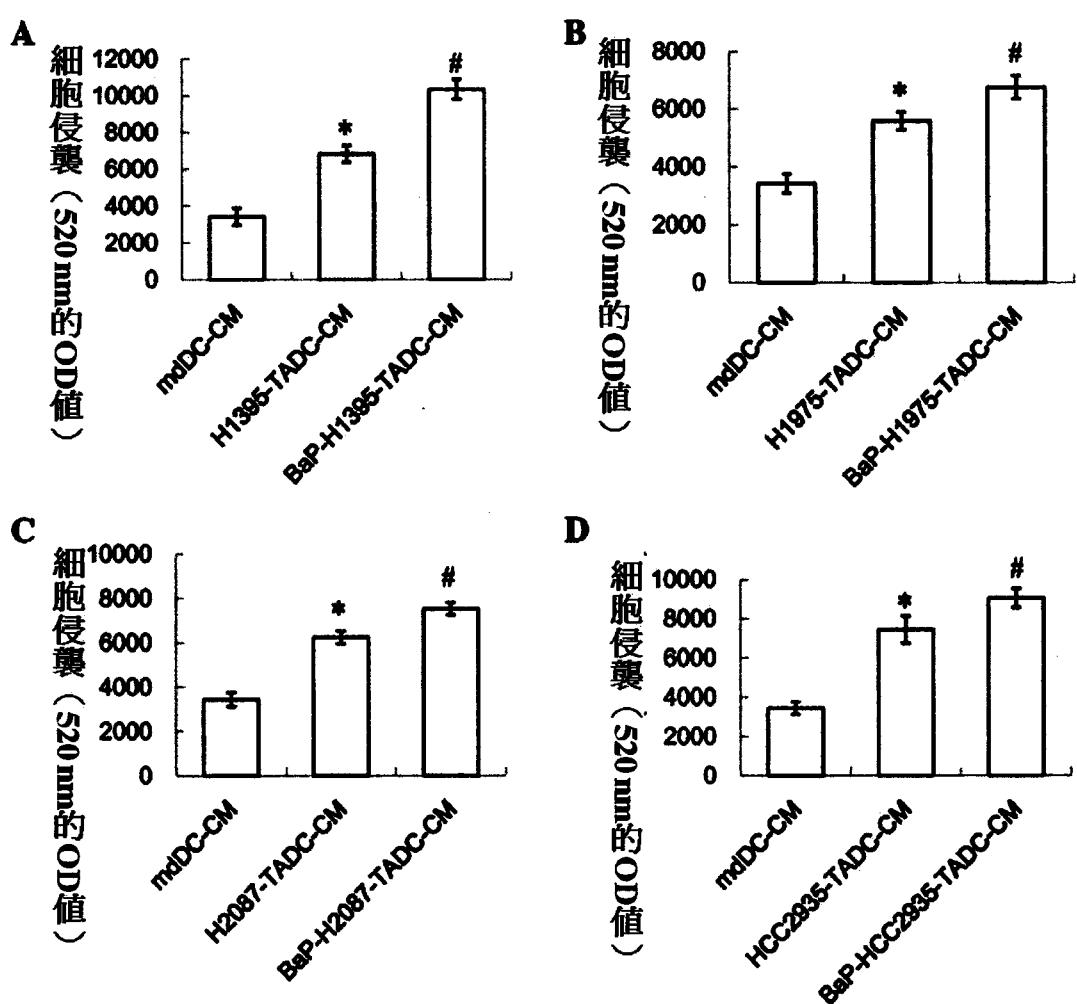


圖 4

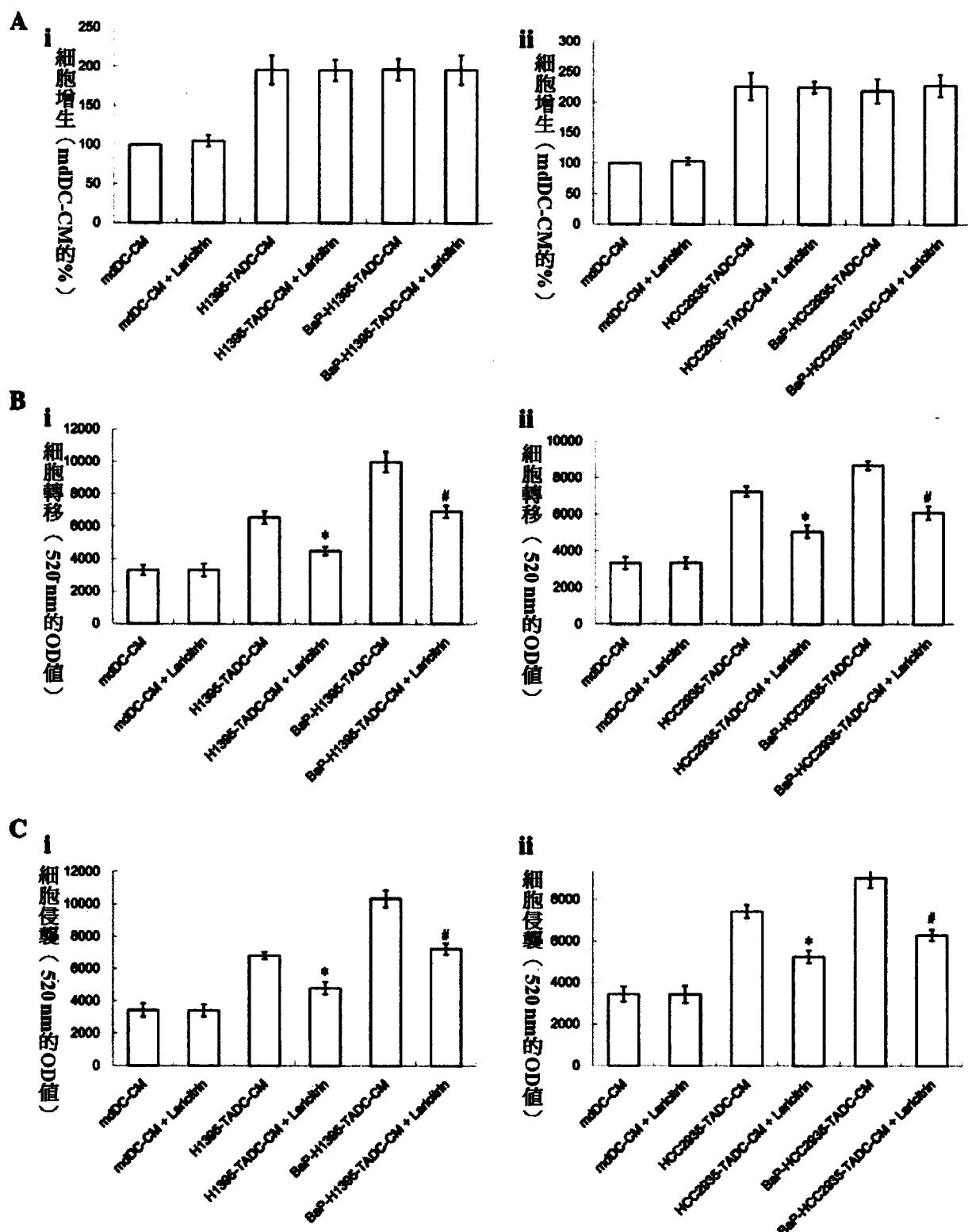


圖 5