

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 子計畫六：肺正常和癌症組織中的轉移酵素表現和受 curcumin 的影響(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC93-2745-B-039-003-URD

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中國醫藥大學微生物學科

計畫主持人：鍾景光

共同主持人：張建國

計畫參與人員：鍾景光、張建國、陳柔、楊鈞隆、黃宣榜

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 26 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

提昇私校研發能量專案計畫-癌症的基礎與臨床研究-子計畫六:肺  
正常和癌症組織中的轉移酵素表現和受 curcumin 的影響(1/3)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2745-B-039-003-URD

執行期間：2004 年 8 月 1 日至 2005 年 7 月 31 日

計畫主持人：鍾景光

共同主持人：張建國

計畫參與人員：陳柔亘(研究生)、楊鈞隆(研究生)、黃宣榜(大學生)

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫  
及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學微生物學科/中國醫藥大學醫學研究所

中華民國 94 年 5 月 26 日

關鍵詞：、MMPs、TIMP、侵入轉移、curcumin

### 肺的正常組織和癌組織中基質轉移酶的表現和受到 curcumin 的影響

很多癌細胞會轉移到其他器官，造成這些器官形成變異的腫瘤，這現象稱為癌細胞的入侵和轉移。在人類很多的癌症中 Matrix Metalloproteinase (MMPs) 已經被證實可能為癌細胞的入侵和轉移其他組織的媒介者，基質轉移酶被合成 e-酶之後接著被分泌進入細胞基質或插入細胞質上作為先前酶後再由移去先前脂解才能成為活性酶。MMPs 和其組織內的抑制劑 (Tissues inhibitors of metalloproteinase: TIMPs) 同時調節細胞外和其他組織的包外蛋白質，這些因子如細胞生長因子和其接受器，然後這些相關基因 (MMPs 和 TIMPs) 的改變普遍發生於大多數的癌症中。肺癌是台灣國人男性和女性最主要制死因子之一，由於缺乏完整的報導有關國人肺正常和癌組織中 MMP 和 TIMP 這些基因的表現，本計劃的目的就是去檢測肺正常和癌症組織中檢測 MMPs 及 TIMPs 及其基因的表現有無異常和相關蛋白質的量有否改變同時也利用體外 (In Vitro) 和體內 (In Vivo) 這些轉移相關酵素是否受 Curcumin 的影響。因為文獻已經報導有很多藥劑促進這些基因的表現，我們利用定量 PCR 及 DNA 定序來找出相關基因的表現並利用統計分析來檢測肺癌細胞轉移與這些基因的關聯性。我們利用流式細胞儀 (Flow cytometry) 和西方墨點法 (Western blotting) 分析及定量癌細胞轉移酵素 (MMPs 和 TIMPs) 的情形。指出相關基因是否受 Curcumin 影響而抑制肺癌細胞在體內的轉移。

## 英文摘要

Keywords : Matrix metalloproteinase (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), invasion, metastasis, curcumin.

## Summary

Many cancer cells are able to migrate to other organs then to cause malignant tumors in these organs were called invasion and metastasis. A group of matrix metalloproteinases (MMPs) have been implicated as possible mediates of invasion and metastasis in some cancers. MMPs are synthesized a e-enzyme and are secreted into the extracellular matrix or inserted into the plasma memberane on pro-enzyme upon the proteolytic remoral of prepeptide. It is well documented that MMPs and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) regulate proteolysis of the extracellular matrix and other extracellular proteins, including growth factors and their receptors. However, the aberrant expression of these genes (MMPs and TIMPs) is common in most cancers. Lung cancer is one of major death for man and women in Taiwan. There is no available information to address these genes expression and effects in lung normal and cancer tissues from Chinese population in Taiwan. Our objective of this proposal is to investigate MMPs, TIMPs and both associaten genes with proteins were constitutely expressed in lung normal and cancer tissues. We also use curcumin for selecting agent to examine the effects of curcumin on MMPs and TIMPs in in vitro and in vivo. It is well known those that could be up-regulated by a number of agents known to effect MMP and TIMP expression in other cell systems. Therefore, we will profile the RNA and proteins levels of MMP and TIMP in lung normal and cancer tissues using quantitative PCR, Western blotting and flow cytometry, with the aim of identifying novel expression patterns, potential bi-directional relationship and effects of curcumin on RNA and protein levels that enhance lung tumor aggressiveness and metastasis.

## (一) 近五年內主要研究成果說明。(連續性計畫申請時，應檢附上年度研究進度報告)

本人過去 5 年中研究有關人類各種癌組織及相關癌細胞株中 N-acetyltransferase 的表現、活性、基因表現、差異及受中草藥及成份的影響，同時也檢測微生物如細菌和黴菌等此酵素的表現及受中草藥成份的影響。

經由利用 Flow cytometry Western blotting 和 PCR、DDRT PCR、M PCR、Immunoblotting、cDNA 晶片等方法來作實驗。同時也檢測中草藥對癌細胞株的影響(細胞毒性、細胞增生、細胞週期和相關週期的停滯(cell cycle wrest)、細胞計劃性死亡，其相關基因的表現及相關訊號傳遞之路線包含相關蛋白及該基因的表現)、mRNA 等，這些結果已發表在國外 SCI 雜誌中最近發表有關 Baicalenin 引起人類血癌細胞計劃性死亡及相關機轉【1】。最近也由上面敘述的方法研究人類肺癌組織因而找到新的蛋白酶在肺癌細胞膜之表面與該癌細胞之訊息傳遞(Signal Transduction)有相關聯，這結果刊登於 Cancer Research 的雜誌中【2】，因而受到各國學著的重視，目前仍在持續研究最近更發現此蛋白與肺癌細胞的抗藥訊號傳遞有關聯，此種新的相關路線，其他學著未有任何報導，因而已在重複檢測中，不久將來將可發表於國外知名雜誌。最近更收邀擔任國際 SCI 雜誌 In Vivo 的編輯委員，目前也同時積極進行癌症細胞轉移(Metastasis)的機制及無相關訊息傳遞造成轉移及相關基因表現的研究，因而提出本研究計劃檢測國人肺正常和癌組織中轉移酵素的分布和能受到 curcumin 的影響因而找出抑制轉移的機轉。本人研究室一定能在預定時間內如期完成。

## (二) 研究計劃及背景

癌症是國人重要的死亡因素之一，肺癌又是目前國人男性和女性排名死亡的第一位，因而每年死於癌症的人口與日劇增，由於很多癌細胞俱轉移分化(Differentiation)之特性所以使癌症在治療上更加困難，與癌細胞轉移有關的最重要現象是基質 extracellular matrix(EMC)的降解【3-5】，因為基質降解是各種癌細胞轉移侵入其他組織及器官的必經程序，然而學者報告已經指出 EMC 的降解卻受控於其相關蛋白分解酶 proteolytic enzymes 的活化及 metalloproteinases (MMPs)【6,7】的調控。EMC 降解之酵素中最大的族群為 MMPs，目前已知 MMPs 最少包含了 23 種酵素(MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-14,-15,-16,-17,-19,-20,-21,-23,-24,-25,-26,-27,-28),各具有降解不同癌細胞中所特有 EMC 之 proteinaceous components 成分【5,8】，然而這些相關酵素分別在很多不同癌細胞中陸續被發現。這酵素首先被合成時為非活性酵素，需靠其他相關酵素來將其 pro-peptide 降解後方俱活性(active-enzymes)，利用 MMPs 對於 EMC 之調控可將 EMC 斷碎成數個成份。

另一方面文獻報導也指出許多不同的癌細胞會產生許多相同或類似的生理特徵，如刺激本身癌細胞增生、增加血管的增生、原位癌的的入侵等，但在各種癌細胞中這些相關的生理現象其正確的機轉及相關作用目前卻發現不盡相同因而抗癌及預癌的作用更加困難。不論如何凡舉所有惡性腫瘤拿來進一步分析與相關的正常組織做比較結果發現該癌組織中其所含之 MMPs 皆高於正常組織。但各癌組織中所表現之 MMPs 之種類及程度的多寡卻因不同的癌症有所差異，舉例而言 MMP-1 則大量表現於乳癌【9】及腦瘤【10】之中，但並不出

現於前列腺癌之中【11】，而 MMP-3 則大量出現於乳癌之中【9】但並不出現於前列腺癌及腦瘤之中【12】，更值得一提的是 MMP-11 大量表現於乳癌、肺癌及大腸癌之中，並不出現於淋巴腫瘤【13】，故 MMPs 種類之分佈和量之多寡之測定因隨著器官或組織或其他相關癌主織的不同而有所不同，但是目前其與 MMPs 有關的 TIMPs 之測定是否隨著器官和組織的不同而有所不同，仍待進一步的研究。

此 MMPs 酵素受控的程度亦受其 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs)( 四種 TIMP-1,-2,-3,-4)之活性及其基因表現的影響【14】。更值得一提的是最近文獻報導已經指出 TIMPs 及 MMPs 之間的不平衡是導致癌細胞轉移(Metastasis)及侵入(Invasion)其他主織和器官的關鍵之一。最近學者也指出 TIMPs 及 MMPs 目前已知是由癌細胞所製造，並非移至巨噬細胞、單核球、成纖維細胞等【3,4】，而是受控於數個調控因子引起自體、周圍和隨血液循環到其他主織和器官中(autocrine ,paracrine,endocrine)而這些調控因子有些卻來自於致癌環境中。

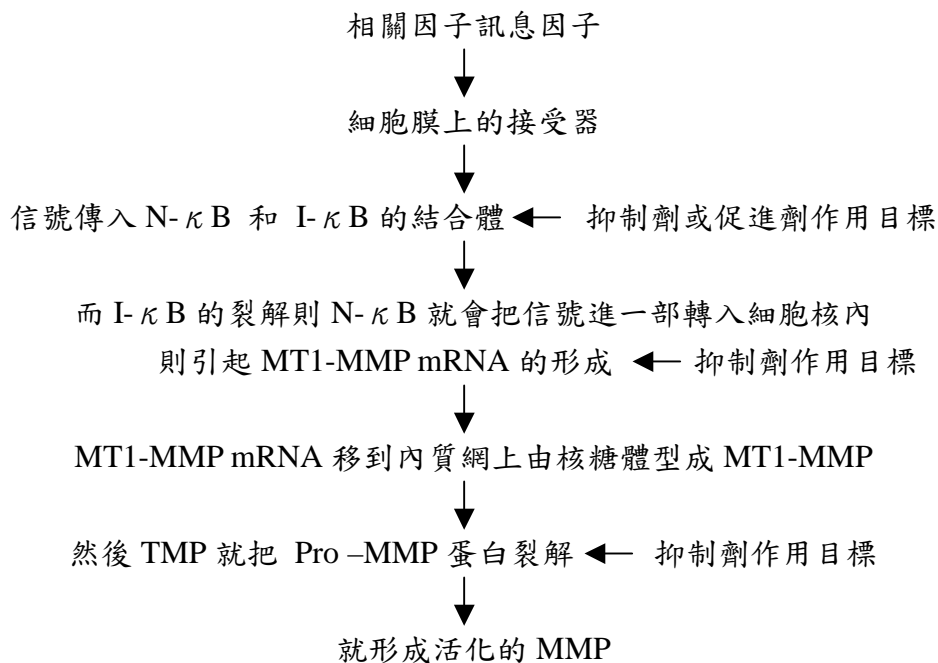
最近文獻指出 MMPs 除了與癌細胞之轉移及侵入其他組織及器官有關外，其另一功能即是調控癌細胞之生長(Growth)，舉例而言許多 MMPs 可組斷生長因子(Growth factor)，相關接受器(Receptor)，及生長相關之蛋白。MMP3 可組斷 Heparin-binding growth factor，並將釋出於細胞膜外【15】。MMP9 在 angiogenesis 時釋放出血管表皮生長因子。故 MMPs 可調控細胞週圍之環境，其扮演癌細胞在組織中生長及抑制之角色【16】。在許多癌症如腦瘤、乳癌中已有學著報導 MMPs 可受細胞外 matrix metalloproteinase 刺激而生成【17,18】。

在上皮細胞增生的過程中，EMC 的降解是一必須的過程，在其血管增生的早期，MMPs 扮演一重要的角色，MMPs 的抑制引起抑制血管增生劑的活化及相對的促進其活性【19】，更值得注意的是有許多研究反而已證實腫瘤細胞在生長及血管增生的過程中發現其 MMPs 活性的量是被抑制的【20-22】，因而最近有關 MMPs 的抑制劑又更受到學著們的重視。相對的許多 MMPs 的抑制被證明是與癌細胞增生有關，例如引起增生在早期的 angiogenesis 過程中，MMPs 則擔任重要的任務，因而引起更多學者的注意有關抑制 MMPs 的抑制劑，也就是說找尋有關 MMPs 的抑制劑進而讓抑制劑能進一步抑制 angiogenesis 則該抑制劑也就是有 anti-ogenesis 的作用【19】。

由於過去數年來一些文獻已報導人工合成的 MMPs 抑制劑能抑制相關癌症的 angiogenesis 和生長【20-22】雖然這些有關 MMPs 抑制劑 (MMPs Inhibitors) 已被證實能經由抑制 angiogenesis 而達到減少癌細胞轉移的功效，反而也有學者發現有些 MMPs 的抑制劑(MMPIs) 給於病人之後其結果卻有不良的副作用【23-24】，故本研究主要檢測國人肺正常和癌組織中 MMPs 酵素的種類和其分佈的量做比較，同時也與其他固定的癌比較，相生差異，接著在 in vitro 做肺癌細胞轉移有否受 curcumin 的抑制欲利用由老鼠體中由化學致癌物所引起的肺癌在該其轉移至到及肝臟而這些轉移過程中是否受到 curcumin 的影響；由以上結論可知抑制劑可能影響 MMPs 之基因及蛋白質表現的階段，而這些可能抑制過程呈現於圖一所示，同時我們也測定 curcumin 是否影響 MMPs 的 mRNA、蛋白質的表現及 MMPs 的活性。另一方面我們實驗的重點在於檢測 curcumin 是否影響 N- $\kappa$ B 及 I- $\kappa$ B 之基因表現，其作用及流程呈現於圖二中。圖二中所顯示抑制劑可能其作用與標的階段位置，因為 MMPs 及 TIMPs 的釋放取決於 N- $\kappa$ B 及 I- $\kappa$ B 的表現與否。



圖一 MMP 形成過程中可能藥物作用而抑制其表現



圖二 N- $\kappa$ B 和 I- $\kappa$ B 可能功能途徑及抑制劑抑制目標

## References

1. Li, Y. C., Tyan, Y. S., Kuo, H. M., Chang, W. C., Hsia, T. C. and Chung, J. G. Baicalein induced in vitro apoptosis undergo caspases activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food and Chem Toxicol.* 42: 37-43, 2004.
2. Chung, J. G., Yeh, K. T., Wu, S. L., Hsu, N. Y., Chen, G. W., Yeh, Y. W. and Ho, H. C. Novel transmembrane GTPase of non-small cell lung cancer identified by mRNA differential display. *Cancer Res.* 61: 8873-8879, 2001.
3. Egeblad, M. and Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 163-176,2002.
4. Chang, C. and Werb, Z. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 11: S37-S43, 2002.
5. McCawley, L. J. and Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13: 534-540, 2001.
6. Egeblad, M. and Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 163-176,2002.
7. Chang, C. and Werb, Z. The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 11: S37-S43, 2002.
8. Stemlich MD, and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 463-516, 2001.
9. Brummer, O., Athar, S., Riethdorf, L., Loning, T., and Herbst, H. Matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch.*, 435: 566-573, 1999.
10. Nakagawa, T., Kubota, T., Kabuto, M., Sato, K., Kawano, H., Hayakawa, T., and Okada, Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J. Neurosurg.* 81: 69-77, 1994.
11. Pajouh, M.S., Nagle, R. B., Breathmach, R., Finch, J. S., Brawer, M. K., and Bowden, G. T. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 117: 144-150, 1991.
12. Vince, G. H., Wagner, S., Pietsch, T., Klein, R., Goldbrunner, R. H., Roosen, K, and Tom, J. C. Heterogeneous regions expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17: 437-445, 1999.
13. Kossakowska, A. E., Huchcroft, S. A., Urbanski, S. J., and Edwards, D. R. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinoma and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br. J. Cancer.* 73: 1401-1408, 1996.
14. Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.*, 74: 111-122, 1997.
15. Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A., and Klagsbrun, M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site.



- J. Biol. Chem.,272: 31730-31737, 1997.
16. Berger, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.*, 2: 737-744, 2000.
  17. Caudroy, S., Polette, M., Tournier, J. M., Burlet, H., Toole, B., Zucker, S., and Birembaut, P. Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesion. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 1575-1580, 1999.
  18. Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B. P., Yokogami, K., Okada, Y., Goya, T., Koono, M., and Wakisaka, S. Expression of emprin (CD147), as cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int. J. Cancer.* 88: 21-27, 2000.
  19. Riedel, F., Gotte, K., Schwalb, J., Bergler, W., Hormann, K. Expression of 92-Kda type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 17: 1099-1105, 2000.
  20. L.Lozonechi, M. Sunamura, M. Kobari, S. Egawa, L. Ding, S. Matsuno, Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinaseinhibitor, KB-R7785, in two tumor models, *Cancer Res.*59(1999)1252-1258.
  21. R. Maekawa, H. Maki, H. Yoshida, K. Hojo, H. Tanaka, T. Wada, N. Uchida, Y. Takeda, H. Kasai, H. Okamoto, H. Tsuzuki, Y. Kambayashi, F. Watanabe, K. Kawada, K. Toda, M. Ohtani, K. Sugita, T. Yoshioka, Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenyl sulfonylphenylalanine hydroxamic acid(BPHA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor, *Cancer Res.* 59(1999)1231-1235
  22. G. Taraboletti, A. Garofalo, D. Belotti, T. Drudis, P. Borsotti, E. Scanziani, P.D. Brown, R. Giavazzi, Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, *J. Natl. Cancer Inst.* 87(1995)293-298.
  23. Wojtowicz-Praga, S., Low, J., Marshall, J., Ness, E., Dickson, R., Barter, J., Sale, M., McCann, P., Moore, J., Cole, A., and Hawkins, M. J. Phase I trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in patients with advanced cancer. *Invest. New Drugs.* 14: 193-202, 1996.
  24. Wojtowicz-Praga, S., Torri, J., Johnson, M., Steen, V., Marshall, J., Ness, E., Dickson, R., Sale, M., Ramussen, H. S., Chiodo, T. A., Hawkins, M. J. Phase I trial of Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 16: 2150-2156, 1998.

### (三) 研究方法、進行步驟及執行進度

本研究計劃分為三部份，第一部份人體肺正常和癌組織中 MMPs 和 TIMPs 的表現檢測。第二部分人類肺癌細胞在 In Vitro 轉移有否受 Curcumin 的影響及找出其抑制的機轉。第三部份則利用動物模式作為 Curcumin 在 In Vivo 影響肺癌細胞的轉移。

#### 第一部份

##### 人類肺正常和癌組織的實驗

國人肺癌組織由中國醫藥大學附設醫院人體實驗委員會提供。再經由 RNA 和作 PCR (如 E. 所列, primer 則如第二部分所列的 primer) 然後也進一步做 DNA 定序將由生技公司協助。最後再做進一步比較, 分析找出差異和找出關聯性。

#### 第二部分

##### 1. 人類肺癌細胞株 (A549)

人類肺癌細胞 (A549) 購由新竹食品科學研究所。肺癌細胞先放入 75 cm<sup>3</sup> 培養瓶, 養於含有 10% 胎牛血清 (購於 Gibco BRL, Grand Island, NY)、2% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml penicillin 和 10mg/ml streptomycin) 的 DMEM medium (購於 Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO), 放入 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。得大量細胞產生後, 將做下面實驗。

##### 2. 活細胞的測定

肺癌細胞數以每 well 5×10<sup>5</sup> cells 種植入 12 well plate 培養 24 小時, 然後分別加入不同濃度的 curcumin, 而控制組以 DMSO 當 solvent, 接著放入於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養不同的時段。利用 trypan blue exclusion 的方法來檢測 cell viability。首先, 先取 10 μl 的細胞懸浮液加入 40 μl 的 trypan blue 混和均勻, 使用血球計數器來計算被染色 (死細胞) 與沒被染色 (活細胞) 的細胞數目。同時利用流式細胞計數儀來加以分析比較。

##### 3. 分析肺癌細胞入侵和轉移受 curcumin 的影響

肺癌細胞的侵入活性以 Chemotaxicell chamber (購於 Kurabo Inc.) 來檢測。第一, 將濾紙覆蓋於 1 μg 的 fibronectin 上, 接著在室溫下自然風乾。第二, 將已風乾的 membrane Matrigel (購於 Collaborative Research Co.) 置於濾紙 (購於 5 μg/50 μl/filter) 上, 然後在室溫下自然風乾。接著以 PBS 沖洗濾紙, 後風乾。至於 migration assay, 將濾紙覆蓋於 1 μg 的 fibronectin 上, 而此濾紙不需要覆蓋 membrane Matrigel。第三, 用有無加入 curcumin 的 1×10<sup>5</sup> cells/100 μl 細胞數三重複, 放入上層的 chamber 中, 培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中。培養 6 小時後的細胞拿來作 migration assay, 培養 24 小時後的細胞拿來作 invasion assay。入侵或轉移的細胞定量以 crystals violet staining method 來測定。

##### 4. MMPs; TIMMP; N-κB 和 I-κB 在肺癌細胞的表現有否受 Curcumin 的影響

抽取培養 24 小時加入有無 50  $\mu$ M Curcumin 的肺癌細胞 total RNA，依據 Qiagen Rneasy Mini Kit 的 protocol 處理。抽取出來的 total RNA (1.5  $\mu$ g)，0.5  $\mu$ g oligo-dT primer 和含有 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 的滅菌去離子水混和均勻，放入微離心管，其總體積為 12.5  $\mu$ l。接著將全部的混和物以 70°C, 10 分鐘加熱，後冷卻至少 1 分鐘。接下來的步驟皆與反轉錄的步驟一樣 (First-strand cDNA synthesis kit, Novagen)。其反轉錄出來的產物可來當作 PCR 的模板。當放大目標 cDNA 時，他的所有產物總體積為 50  $\mu$ l，內含有：1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP mix、20 pmoles primer (如下所列 primer)，而此 cDNA 的模板是經由 50 ng 的 total RNA 與 2 units 的 DyNAzyme DNA Polymerase 所合成。這些 primer 設計來自於基因銀行。Primer 的序列如下：

Name	Primer	Primer length (bp)	Amplicon length (bp)	Sequence
MMP1	Forward	24	121	GAGGAAATCTTGCTCATGCTTTTC
	Reverse	19		TGAGCCGCAACACGATGTA
MMP2	Forward	20	102	TGCGGTTTTCTCGAATCCAT
	Reverse	21		GGAGTCCGTCCTTACCGTCAA
MMP3	Forward	19	151	GACTCGGTTCCGCCTGTCT
	Reverse	24		AAAGGACAAAGCAGGATCACAGTT
MMP7	Forward	23	151	CCAAATAGCCCAAATGGACTTC
	Reverse	22		CTTTGCCCCACATGTTTAAAGC
MMP8	Forward	20	101	GCCATCCCTTCCAACCTGGTA
	Reverse	22		CATAGCCACTCAGAGCCCAGTA
MMP9	Forward	21	130	AGACCTGGGCAGATTCCAAAC
	Reverse	15		GAAGGCGCGGGCAA
MMP10	Forward	22	121	TTGGTCACTTCAGCTCCTTTCC
	Reverse	22		GCTTTCTCAATGGCAGAATCAA
MMP11	Forward	18	152	CCCGCAACCGACAGAAGA
	Reverse	21		CGTCACATCGCTCCATACCTT
MMP12	Forward	22	141	GCCTCTCTGCTGATGACATACG
	Reverse	21		TTCCACGGTAGTGACAGCAT
MMP13	Forward	20	131	CACGATGGCATTGCTGACAT
	Reverse	22		TGGGCATCTCCTCCATAATTTG
MMP14	Forward	19	130	TCAAGGAGCGCTGGTTCTG
	Reverse	23		AATTTGCCATCCTTCCCTCTCGTA
MMP15	Forward	18	101	TGGTCTGCCCGGTGACAT
	Reverse	20		CCAGGTTTCGCTTCTCGAAAG
MMP16	Forward	20	101	TTCGTCGAAAGCGATATGCA
	Reverse	25		AGTCTCAGGGTCTCCTACTTTTGGGA
MMP17	Forward	21	101	GTGGCTAAGCAGGTTTCGGTTA
	Reverse	20		ACTGCTGCATGGCTGTGATG

MMP19	Forward	23	101	AAGTCCCCTGTTCAAGGCATAC
	Reverse	22		GAATGCCCATCACTGTCCCTTA

Name	Primer	Primer length (bp)	Amplicon Length (bp)	Sequence
MMP 20	Forward	21	123	CCATCCATCCCTGACCTCTGT
	Reverse	20		TCCTGTCCGCAAGTGAACCT
MMP 21	Forward	22	121	ACTTTGACGACGACGAGCACTT
	Reverse	21		GATCCCGTCCTGTAGGTGTGA
MMP 23	Forward	19	151	AGGGCAGGAACGTGACCTT
	Reverse	16		ACGGCGTTGGCGATGA
MMP 24	Forward	21	106	ACCGGTGTGTTGGATCAGACA
	Reverse	20		GGGCATAGCGCTTGTTCCTC
MMP 25	Forward	22	119	CTGACATGGAGGGTACGTTCTT
	Reverse	22		TCATGAAATGTGAGGCCTGACT
MMP 26	Forward	20	101	TGGAGCAATGTGACCCCTTT
	Reverse	20		AAGGGCCAACCATCTTCATG
MMP 27	Forward	22	101	AAATAGATGCAGCCGTCTGTGA
	Reverse	21		TTTGTCCATGGTTTGGGTCAT
MMP 28	Forward	22	121	CCAAAATGAGGGCGTAAGAAACG
	Reverse	15		ACGGCGCCCCGAACT
TIMP 1	Forward	20	88	TGTTGGCTGTGAGGAATGCA
	Reverse	20		CTGGTCCGTCCACAAGCAAT
TIMP 2	Forward	17	101	ACCCGCAACAGGCGTTT
	Reverse	24		GATAGGGTTGCCATAAATGTCGTT
TIMP 3	Forward	20	126	CCCCATGTGCAGTACATCCA
	Reverse	20		GCACAGCCCCGTGTACATCT

TIMP 4	Forward	21	101	TCTGAACTGTGGCTGCCAAAT
	Reverse	20		GCTTTCGTTCCAACAGCCAG

#### NF- $\kappa$ B Primer

Forward: GATGAATATGTGTGTATCCG

Reverse: TTTGTTGTGCTTGAGAACC

#### I- $\kappa$ B Primer

Forward: CATGTTTCACACACACAATCAGC

Reverse: GGAGTAGGAGACTTTCACAAGTGG

### 5. 利用流式細胞儀測定人類肺癌細胞之蛋白質的 MMPs 及 TI-MMPs

利用流式細胞儀(購於 Becton Dickinson FACS Calibur) 及單株抗體來測定人類肺癌細胞(colo 205)內之 MMPs。利用不同濃度之 curcumin(0.5、5、25、50、100  $\mu$ M)培養 24 小時的細胞來檢定細胞內 MMPs。將細胞收集後 wash 二次, 再加入 100  $\mu$ l 1% formaldehyde 靜置 5 分鐘, 後再加入 100  $\mu$ l 99% methanol 混和靜置 30 分鐘。每株細胞株利用內含 0.1% BSA 之 PBS 清洗 3 次, 然後再加入含 0.1% triton X-100 之 PBS (內含 0.1% sodium citrate) 100  $\mu$ l, 置於冰上 45 分鐘。細胞再清洗 3 次, 加入單株抗體於 4°C 下反應 2.5 小時, 再利用內含 0.1% BSA 之 PBS 清洗 3 次。清洗後的細胞加入 FITC - labeled secondary antibody (goat anti-mouse IgG; Jackson ImmunoResearch; Laboratories, West Grove, PA, USA) 於 4°C 下反應 30 分鐘, 利用 PBS 清洗 3 次後使用流式細胞儀分析。

### 6. 西方點墨法測定人類肺癌細胞之 MMPs、TIMPs、NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B

肺癌細胞數以每 well  $1 \times 10^7$  cells 種植入 6 well plate 分別加入不同濃度的 curcumin 後培養 24 小時。收集細胞並離心後移除培養液, 再利用 PBS 清洗。加入 100  $\mu$ l triple detergent buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150mM NaCl, 0.02% Na<sub>3</sub>N, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 100  $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A) 溶解細胞。將樣本均質化後, 於冰上培養 20 分鐘, 離心 1200g 10 分鐘。利用 Bradford assay 檢測懸浮液的蛋白質濃度。利用 12% SDS-polyacrylamide gels 將蛋白進行分析並轉印用 polyvinylidene difluoride membranes, polyvinylidene difluoride membranes 利用 PBS 清洗三次 (內含 0.04% Tween-20(PBST)), 在室溫之下與 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody 於 5% 牛乳中進行結合 2 小時, 而後利用 PBS 清洗並用 ELC detection system (Amersham Piscatway, NJ) 進行分析, ImageQuant image 加以定量。

### 7. cDNA 微陣雜交法 (c DNA Microarray hybridization)

利用 Qiagen Rneasy Mini Kit 抽取經 50  $\mu$ M curcumin 處理過之人類肺癌細胞 RNA, 所有的 RNA 將反轉錄成 c DNA, 同時進行標定, 將標有螢光之 c DNA 與微陣上 c DNA 進行雜交。藉由螢光的強度加以測定及定量 (Asia BioInnovatuons Corporation, Taipei, Taiwan), 用以評估 curcumin 對於肺癌細胞的 MMPs、TIMPs、NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B 之影響。

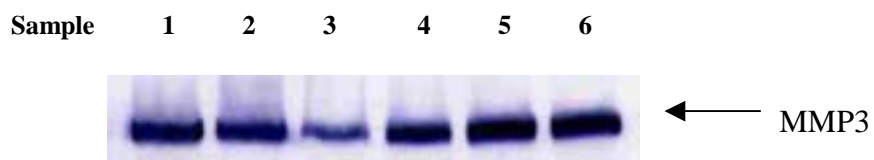
### 第三部份 體內試驗

利用動物模式來評估 curcumin 對於肺癌細胞增生和轉移的抑制將 150 g 的 SD rats 分為五組(每組十隻老鼠)進行餵食;第一組:不餵食、第二組:控制組, 餵食 100  $\mu$ l DMSO、第三組:餵食 10  $\mu$ M 的 curcumin、第四組:餵食 100  $\mu$ M 的 curcumin、第五組:餵食 500  $\mu$ M 的 curcumin; 每組老鼠注射肺癌的 inducer, 每週一次, 持續 6 個月。6 個月後, 犧牲老鼠, 取出各部器官, 檢視是否有肺癌細胞增生及轉移。所有動物實驗處理皆遵照中國醫藥大學動物中心之條例。我們實驗最主要證明 curcumin 對於鼠體中抑制肺癌 inducer 引起肺癌細胞的變化及其轉移 Curcumin 抑制動物體內肺癌之 MMPs, 此實驗是利用犧牲動物後抽取出肺癌組織之 RNA。然後測定 MMPs 基因及蛋白質的表現過程如上所示。

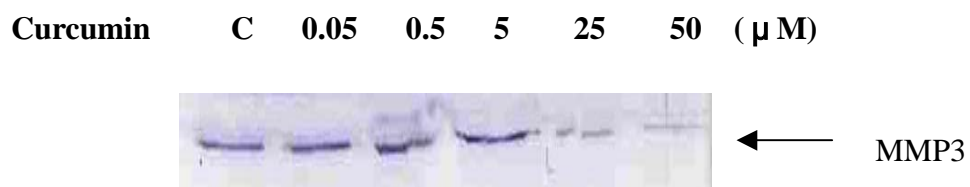
#### 提出子計劃的原因

提出此研究計劃的主要原因及其背景, 本實驗室已經利用早期萃取經由肺癌病人癌組織的檢體, 經由 lysis buffer 抽取蛋白質並由分光光度儀的吸光值來定量這些蛋白質, 利用西方點墨法及生技公司取得對抗 MMPs 的初級抗體而經由二級抗體染色所得六個病人肺癌組織皆有呈現 MMP3 的表現, 如圖三所示。其量依不同病人而有差異, 但每人肺癌細胞組織中卻有 MMP3 的表現; 同時我們也利用肺癌細胞株(A549)分別有無加入不同濃度 curcumin, 經由培養 24 小時收集細胞再利用 lysis buffer 萃取細胞之蛋白質利用西方點墨法檢測確實可看到隨著 curcumin 濃度上升其 MMPs 的表現相對降低, 結果呈現如圖四, 同時為了進一步有關 MMP 基因表現有否受影響, 我們也事先用 NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B 抗體檢測結果也顯示 curcumin 確實可影響 NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B 的表現如圖五所示, 本實驗室也利用 PCR 的方式利用上面所列之 primer, 例如 MMPs 作 PCR 來檢測 curcumin 影響人類肺癌細胞株 A549 MMPs 基因表現, 結果如圖六顯示 curcumin 可降低 MMPs 之基因表現, 此與蛋白測定相一致。

由於先前初步實驗結果已發現檢測有關人類肺癌組織 MMPs 的表現對 curcumin 能抑制肺癌細胞株 MMPs 表現, 因而產生值得研究之本計劃。



圖三 人類肺癌組織 MMP3 表現



圖四 curcumin 影響人類肺癌細胞株 A549 MMP3 之表現



圖五 curcumin 影響人類肺癌細胞株 A549 NF-κB 之表現

#### (四). 預期完成之工作項目及成果

##### 甲. 預期完成之工作項目。

###### 第一年

完成檢測國人肺癌和正常組織的 Matrix Metalloproteinase 的表現及其相關基因之變化和這些基因相關之蛋白質的表現。找出這些改變與癌細胞轉移的關聯性以及國外學者所發表的結論，相關研究成果論文撰寫及發表於國際雜誌。

###### 第二年

完成項目如下

1. 檢測 Curcumin 對人類肺癌組織中 Matrix metalloproteinase 酵素活性和 TIMPs 的影響
2. 檢測 Curcumin 對人類肺癌細胞轉移及該細胞內對 Matrix metalloproteinase 的影響  
相關研究成果論文撰寫及發表於國際雜誌。

###### 第三年

完成項目如下

1. 利用肺癌 Inducer 引發老鼠肺癌之產生
2. 利用餵食含 Curcumin 之老鼠來檢測老鼠肺癌轉移的影響及相關機轉，相關研究成果論文撰寫及發表於國際雜誌。
3. 經由本研究的所抽取之 RNA 所作之 PCR，可得到國人肺癌的 MMPs 和 TIMPs 分部之表現，在經由統計和臨床病人資料可作為癌症轉移原因之探討。
4. 經由 DNA 之定序得知這些病人的 MMPs 和 TIMPs 是否有基因的突變，這些病人是否又合病人癌症轉移有直接的相關聯。

##### 乙. 對於學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻

經由本研究之結果可的到國人肺正常及癌組織中 MMPs 表現差異（相關蛋白的量、基因表現差異）及人體內轉移的程度進一步與世界其他人群相比較，然後可得到相關的肺癌轉移的預知。由於在動物體內 curcumin 抑制肺癌細胞轉移的了解可提共臨床病人可使用 curcumin 達到抑制肺癌轉移的效果, 最後開發 curcumin 相關之藥物以達預防肺癌轉移之目的及推廣其商業價值。

##### 丙. 對於參與之工作人員，預期可獲之訓練

研究生及參與相關的研究人員可由實驗中可習得癌細胞之培養、轉移 PCR 之技術、及西方點墨法、流式細胞儀之相關知識及技術和統計分析比較的訓練。



## 第一年期中報告

# 利用 PCR 和 DNA 定序檢測在台灣華人正常和癌組織中 Matrix Metalloproteinase 的表現

### 人類肺正常和癌組織的實驗

國人肺癌組織由中國醫藥大學附設醫院人體實驗委員會提供。再經由 RNA 和作 PCR(如下所列的 primer) 然後也進一步做 DNA 定序將由生技公司協助。最後再做進一步比較, 分析找出差異和找出關聯性。

### MMPs ; TIMMP ; N- $\kappa$ B 和 I- $\kappa$ B 在肺癌細胞的表現

抽取肺癌 samples total RNA, 依據 Qiagen Rneasy Mini Kit 的 protocol 處理。抽取出來的 total RNA (1.5  $\mu$ g), 0.5  $\mu$ g oligo-dT primer 和含有 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 的滅菌去離子水混和均勻, 放入微離心管, 其總體積為 12.5  $\mu$ l。接著將全部的混和物以 70°C, 10 分鐘加熱, 後冷卻至少 1 分鐘。接下來的步驟皆與反轉錄的步驟一樣 (First-strand cDNA synthesis kit, Novagen)。其反轉錄出來的產物可來當作 PCR 的模板。當放大目標 cDNA 時, 他的所有產物總體積為 50  $\mu$ l, 內含有: 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP mix、20 pmoles primer (如下所列 primer), 而此 cDNA 的模板是經由 50 ng 的 total RNA 與 2 units 的 DyNAzyme DNA Polymerase 所合成。這些 primer 設計來自於基因銀行。Primer 的序列如下:

Name	Primer	Primer length (bp)	Amplicon length (bp)	Sequence
MMP1	Forward	24	121	GAGGAAATCTTGCTCATGCTTTTC
	Reverse	19		TGAGCCGCAACACGATGTA
MMP2	Forward	20	102	TGCGGTTTTCTCGAATCCAT
	Reverse	21		GGAGTCCGTCCTTACCGTCAA
MMP3	Forward	19	151	GACTCGGTTCCGCCTGTCT
	Reverse	24		AAAGGACAAAGCAGGATCACAGTT
MMP7	Forward	23	151	CCAAATAGCCCAAATGGACTTC
	Reverse	22		CTTTGCCCCACATGTTTAAAGC
MMP8	Forward	20	101	GCCATCCCTTCCAACCTGGTA
	Reverse	22		CATAGCCACTCAGAGCCCAGTA
MMP9	Forward	21	130	AGACCTGGGCAGATTCAAAC
	Reverse	15		GAAGGCGCGGGCAAA
MMP10	Forward	22	121	TTGGTCACTTCAGCTCCTTTCC
	Reverse	22		GCTTTCTCAATGGCAGAATCAA
MMP11	Forward	18	152	CCCGCAACCGACAGAAGA
	Reverse	21		CGTCACATCGCTCCATACCTT
MMP12	Forward	22	141	GCCTCTCTGCTGATGACATACG

	Reverse	21		TTCCCACGGTAGTGACAGCAT
MMP13	Forward	20	131	CACGATGGCATTGCTGACAT
	Reverse	22		TGGGCATCTCCTCCATAATTTG
MMP14	Forward	19	130	TCAAGGAGCGCTGGTTCTG
	Reverse	23		AATTTGCCATCCTTCCTCTCGTA
MMP15	Forward	18	101	TGGTCTGCCCGGTGACAT
	Reverse	20		CCAGGTTTCGCTTCTCGAAAG
MMP16	Forward	20	101	TTCGTCGAAAGCGATATGCA
	Reverse	25		AGTCTCAGGGTCTCCTACTTTTGGA
MMP17	Forward	21	101	GTGGCTAAGCAGGTTTCGGTTA
	Reverse	20		ACTGCTGCATGGCTGTGATG
MMP19	Forward	23	101	AAGTTCCCCTGTTCAAGGCATAC
	Reverse	22		GAATGCCCATCACTGTCCCTTA

Name	Primer	Primer length (bp)	Amplicon Length (bp)	Sequence
MMP 20	Forward	21	123	CCATCCATCCCTGACCTCTGT
	Reverse	20		TCCTGTCCGCAAGTGAACCT
MMP 21	Forward	22	121	ACTTTGACGACGACGAGCACTT
	Reverse	21		GATCCCGTCCTGTAGGTGTGA
MMP 23	Forward	19	151	AGGGCAGGAACGTGACCTT
	Reverse	16		ACGGCGTTGGCGATGA
MMP 24	Forward	21	106	ACCGGTGTGTTGGATCAGACA
	Reverse	20		GGGCATAGCGCTTGTTTCTC
MMP 25	Forward	22	119	CTGACATGGAGGGTACGTTCTT
	Reverse	22		TCATGAAATGTGAGGCCTGACT
MMP 26	Forward	20	101	TGGAGCAATGTGACCCCTTT
	Reverse	20		AAGGGCCAACCATCTTCATG
MMP 27	Forward	22	101	AAATAGATGCAGCCGTCTGTGA
	Reverse	21		TTTGTCCATGGTTTGGGTCAT
MMP	Forward	22	121	CCAAAATGAGGCGTAAGAAACG

28				
	Reverse	15		ACGGCGCCCCGAACT
TIMP 1	Forward	20	88	TGTTGGCTGTGAGGAATGCA
	Reverse	20		CTGGTCCGTCCACAAGCAAT
TIMP 2	Forward	17	101	ACCCGCAACAGGCGTTT
	Reverse	24		GATAGGGTTGCCATAAATGTCGTT
TIMP 3	Forward	20	126	CCCCATGTGCAGTACATCCA
	Reverse	20		GCACAGCCCCGTGTACATCT
TIMP 4	Forward	21	101	TCTGAACTGTGGCTGCCAAAT
	Reverse	20		GCTTTCGTTCCAACAGCCAG

#### NF- B Primer

Forward: GATGAATATGTGTGTATCCG

Reverse: TTTGTTGTGCTTGAGAACC

#### I- B Primer

Forward: CATGTTTCACACACACAATCAGC

Reverse: GGAGTAGGAGACTTTCACAAGTGG

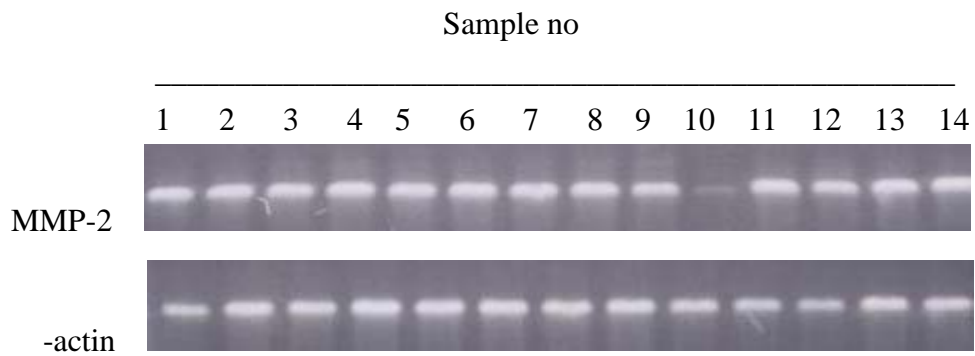
#### 初步結果

初步結果如下圖(Fig 1A, B and C) PCR 顯示，經由所有列出的 MMP primer 配合由肺癌組織所抽出的 RNA 做 PCR 跑膠後發現，人類肺癌組織含有 MMP-2, MMP-3, MMP-9。結果在不同的組織有不同的表現量。雖然大部分檢體的 MMP 是相同的，但是 MMP-2 與 MMP-3 和 MMP-9 各分別比對後，再進一步做 DNA 定序結果如下圖(Fig2A, B, C and D)所列。發現在這些檢體中有不同 sequence 這些結果是值得進一步探討。

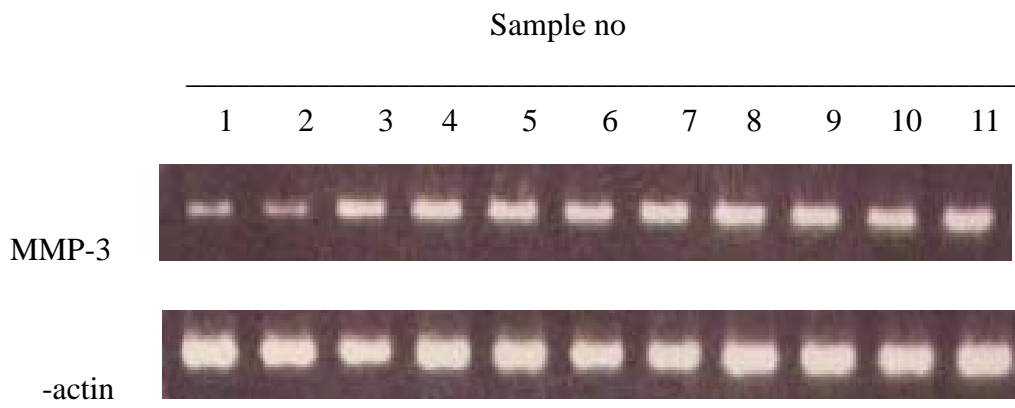
## Primary Results

Fig. 1A

PCR



1B



1C

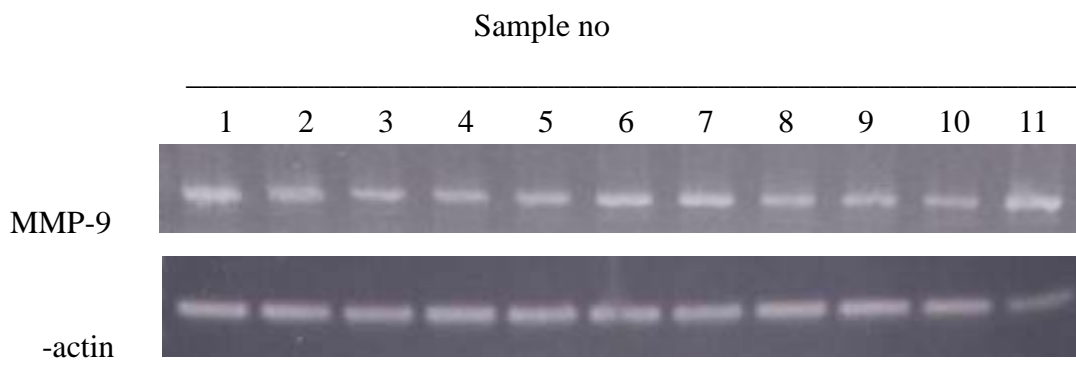
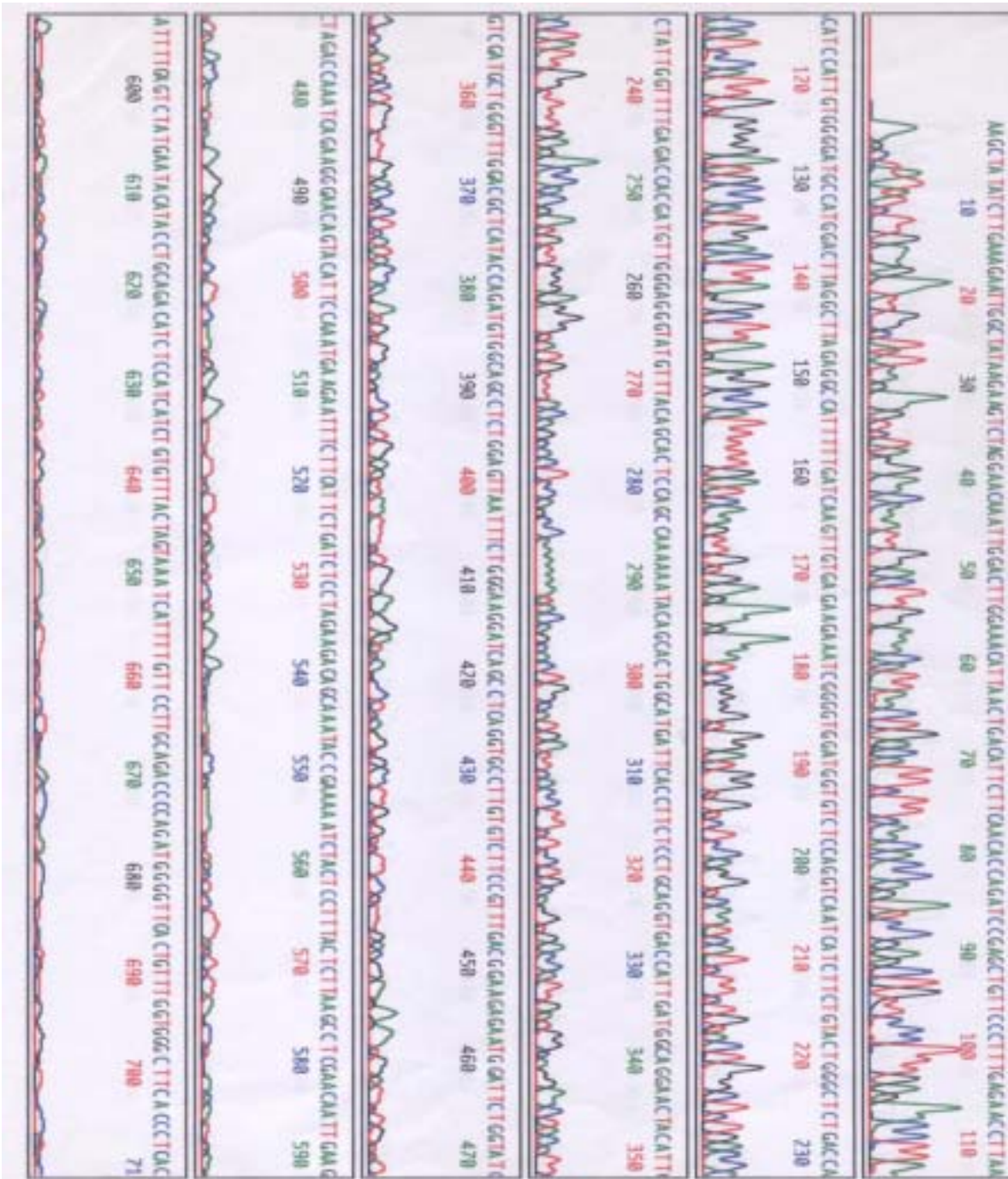


Fig. 2A

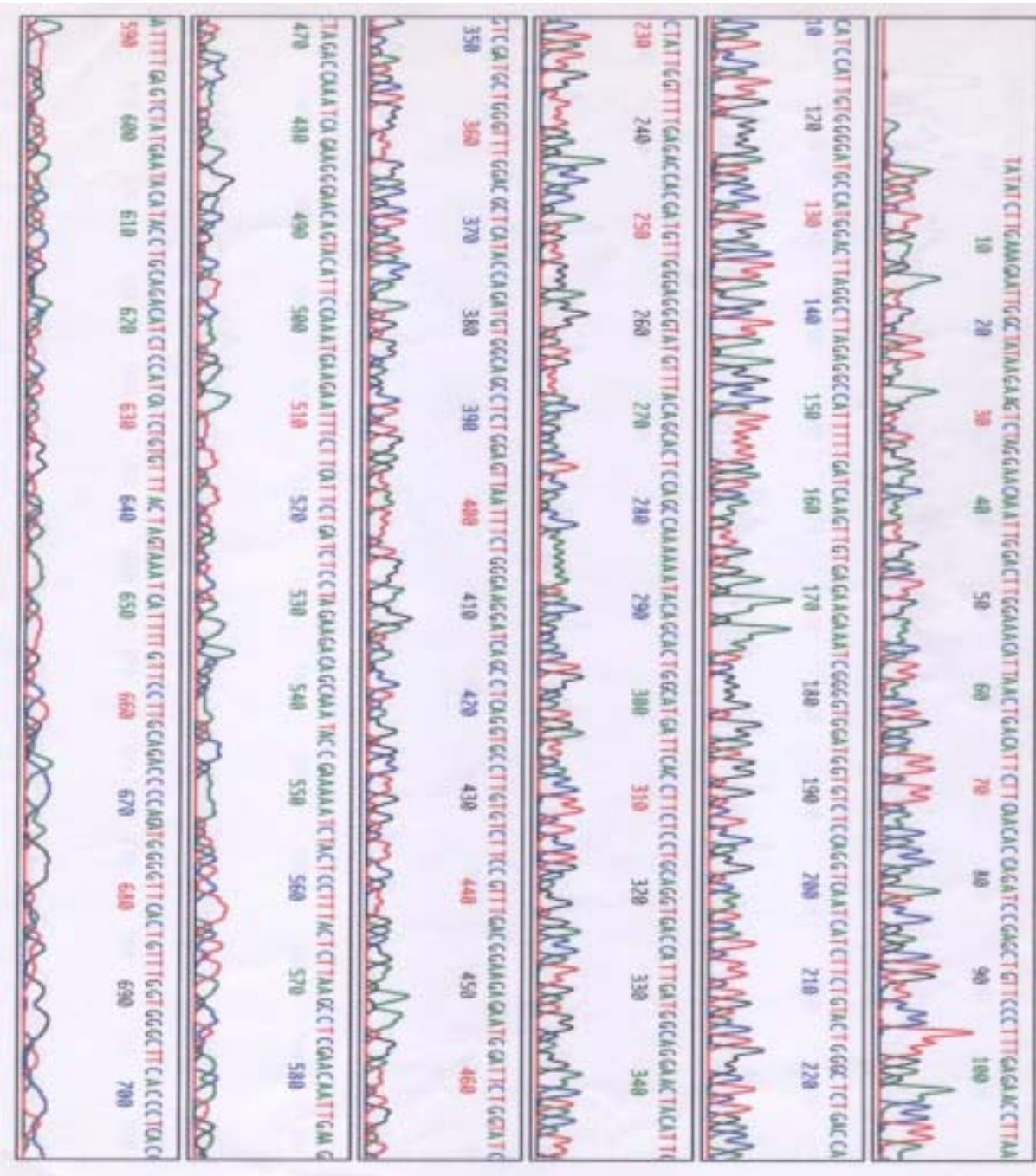
Representative sequences of MMP-2 from 1 sample

#10



2B  
Representative sequences of MMP-7 from 2 samples

#1



2C

Representative sequences of MMP-7 from 2 samples

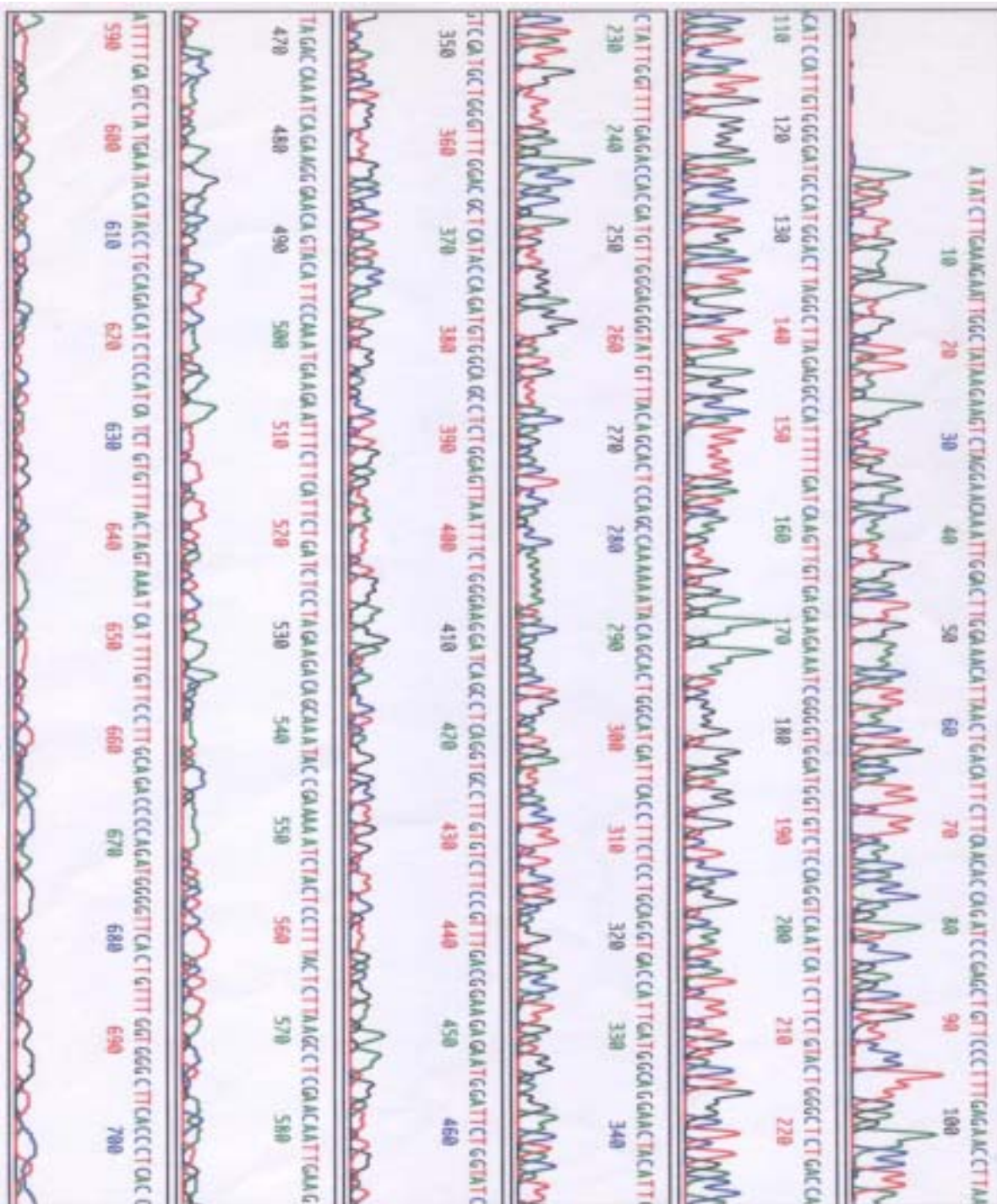
#2



2D

Representative sequences of MMP-9 from 2 samples

#1

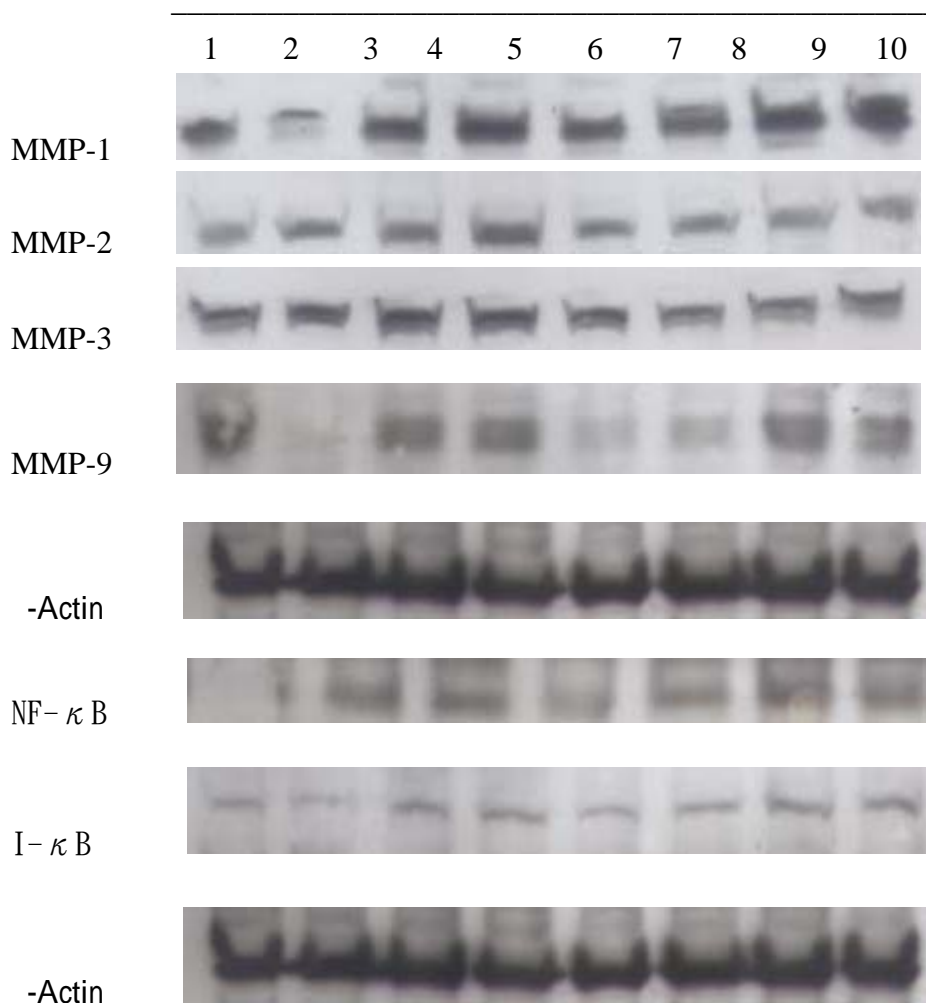




### 西方點墨法測定人類肺癌細胞之 MMPs、TIMPs、NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B

肺癌細胞數以每 well  $1 \times 10^7$  cells 種植入 6 well plate 分別加入不同濃度的 curcumin 後培養 24 小時。收集細胞並離心後移除培養液，再利用 PBS 清洗。加入  $100 \mu\text{l}$  triple detergent buffer (50 mM Tris-Cl [pH8.0], 150mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  phenylmethylsulfonyl fluoride,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A) 溶解細胞。將樣本均質化後，於冰上培養 20 分鐘，離心 1200g 10 分鐘。利用 Bradford assay 檢測懸浮液的蛋白質濃度。利用 12% SDS-polyacrylamide gels 將蛋白進行分析並轉印用 polyvinylidene difluoride membranes, polyvinylidene difluoride membranes 利用 PBS 清洗三次 (內含 0.04% Tween-20(PBST))，在室溫之下與 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody 於 5% 牛乳中進行結合 2 小時，而後利用 PBS 清洗並用 ELC detection system (Amersham Piscatway, NJ) 進行分析，ImageQuant image 加以定量。

Sample no



經由西方墨點法利用抗體(由 PCR 已經先前找出檢體有 MMP 的表現及發現各檢體間的 MMP-1, -2, -3, 和-9 在人類肺癌組織)來進一步檢測各樣品 MMP 的表現則依其結果發現表現量之間也差異很大。同樣有關 NF- $\kappa$ B 和 I- $\kappa$ B 也有相類似的情形，目前正在進一步的利用這些方法及檢測相關檢體。以便所得結果作進一步定量及統計分析。

### **cDNA 微矩陣 雜交法 (c DNA Microarray hybridization)**

利用 Qiagen Rneasy Mini Kit 抽取經人類肺癌 RNA，所有的 RNA 將反轉錄成 c DNA，同時進行標定，將標有螢光之 c DNA 與微矩陣上 c DNA 進行雜交。藉由螢光的強度加以測定及定量用以評估肺癌細胞的 MMPs、TIMPs、NF- $\kappa$ B、I- $\kappa$ B 之 mRNA 量。

此方法研究目前正在進行中，相信在 7 月中就有完整的結果。