

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 以 Gallic acid 及 Gallic acid 衍生物調節 CD44 抑制 \*  
\* 名稱 : 腸癌的轉移作用 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 顏安廷  
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-028-B  
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月  
指導教授： 王朝鐘

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 105年03月29日

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

以 Gallic acid 及 Gallic acid 衍生物調節 CD44 抑制腸癌的轉移作用  
Gallic acid and methyl derivatives inhibit colon cancer metastasis  
via downregulating CD44 signals in vitro and in nude mice

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2815-C-040 -028 -B

執行期間：2015 年 7 月 1 日至 2016 年 2 月 28 日

執行機構及系所：中山醫學大學生物化學暨微生物免疫研究所

計畫主持人：王朝鐘 教授

共同主持人：

計畫參與人員：顏安廷

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，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

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考否 是，\_\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 年 月 日

## 中文摘要

大腸癌是佔所有因癌症死亡的第三位，與其他癌症相比較如肺癌；大腸癌及結腸癌透過定期篩檢是可以預防的。若是在早期發現的大腸癌，其致死率可達 90%。因此，如何治療大腸癌及探討大腸癌可能致病原因，為目前臨床上重要的研究方向。現今大腸癌的治療方式以手術切除為主，化學治療為輔；但大腸癌後期的存活率較低，且腸癌細胞易轉移。此外，合併傳統化學藥物治療會產生嚴重的副作用等，使病人的復發率提高。因此，開發新型藥物用以輔助治療、延緩或抑制癌症發展是必須的。近年來，對於天然抗癌藥物的研究日益蓬勃，其中沒食子酸 (GA) 為天然具有抗氧化能力的多酚類，可在五倍子、漆樹、金縷梅、茶葉、橡樹皮等植物中發現，且被證實對癌細胞有毒性反應，但並不會傷害正常細胞。本計畫欲針對 GA 對於抑制大腸癌細胞 DLD-1 的轉移作用先進行 MTT assay，使用 DLD-1 腸癌細胞株加入 GA、3-OMGA、4-OMGA 處理，分析 DLD-1 的存活率。接者測試 GA 及其衍生物對於 DLD-1 在細胞轉移上的影響，而為了釐清分子機制，本計畫將藉由 CD44 的訊息路徑以及細胞骨架蛋白 Src signaling pathway 是否會因 GA 及其衍生物達到抑制腸癌的轉移；並利用動物實驗確認 DLD-1 及其衍生物是否能夠抑制腸癌細胞在體內轉移的能力。希望將來能應用於化學預防上，並發展成為新藥。

## 英文摘要

Colon cancer is the third most common type of cancer making up about 10% of all cases. It is more common in developed countries, and is less common in women than men. Accumulating evidence have indicates that the importance of compounds derived from nature products to treat human disease. Gallic acid (GA) is a natural compound found in edible plant food and green tea, which is reported to be antifungal, antioxidant, and show cytotoxicity against cancer cells. In this study, we investigated the effect of GA on colon carcinoma, and the inhibitory effect of metastasis. First, we treated GA and its methyl derivatives 3-OMGA, 4-OMGA with colon cancer cell line DLD-1 to detecte the cytotoxicity , migration, and invasion of DLD-1 cell and the result showed that GA and its derivatives inhibit the colon cancer mobility significantly. Following, we conducted Western blot to clarify the molecular mechanism, and we revealed that GA reduced the mesenchymal markers, such as N-cadhrin and vimentin and the specificity inhibition of Src pathway involved in downregulated CD44. Furthermore, In vivo experiment showed that GA reduced the tumor size and metastatic tumor in nude mice. Collectively, this studied indicated that GA could be a nature drug though downregulated CD44 expression and its pathway to inhibit colon cancer metastasis.

## 背景

### 一、大腸直腸癌(colorectal cancer, CRC)

在台灣地區，大腸癌發生、死亡人數，每年呈快速增加的趨勢，是所有癌症發生及死亡的第三位，根據衛生福利部最新統計結果資料也顯示出 101 年新發生癌症人數及排名中大腸癌連續七年高居國人十大癌症首位。在在強調大腸癌對國人健康造成的威脅，同時亦顯示出現代人不良的生活習慣包括飲食均衡和生活作息的失衡。大腸及直腸是消化道的末端，廣義的大腸包括迴腸與盲腸交界處的迴盲瓣直至結腸和末端的直腸。結腸依次又可分段為盲腸、升結腸、橫結腸、降結腸及乙狀結腸等，長約 120 至 140 公分。大腸的生理功能主要為吸收食物殘渣中的水分和電解質的再吸收並形成糞便(feces)。大腸的構造由內到外分為黏膜層、肌肉層和漿膜層等。附著在腸壁外的則是腸繫膜，內含血管、淋巴管神經及許多淋巴腺。其中黏膜層是由單層柱狀細胞(columnar cell)、黏膜細胞(mucous cell)、幹細胞(stem cell)以及內分泌細胞(endocrine cell)構成。其中黏膜細胞是生命力及其旺盛的細胞，隨時有許多的細胞死亡、脫落以及新生。死亡與脫落的細胞便會與腸道的細菌殘體、食物才渣混合而構成糞便排出體外；若是黏膜細胞長期受到環境中致癌因子的刺激而導致基因突變，並不斷累積導致細胞無限制的增生，最終導致癌症發生。而普遍被認為的環境危險因子包括潰瘍性結腸炎患者、年齡的增長、家族性遺傳病史以及曾接受過大腸直腸息肉切除或大腸癌切除手術者等等。

大腸癌是直腸結腸癌的統稱，其行程是大腸壁黏膜細胞經過一連串基因的突變聚積而成，由正常黏膜經過腺瘤階段發展成癌症。根據研究統計結果指出，從正常大腸直腸黏膜變成大腸直腸腺性息肉平均所需時間約為十年，而從腺性息肉轉變成為大腸癌則需五年時間。大腸癌發生的部位可能遍及大腸的任何部位，其中以乙狀結腸及直腸較多；且腫瘤可直接侵犯到鄰近器官或轉移到身體的其他部位，例如由橫結腸擴散至胃或是經由淋巴及血液循環擴散到其他器官，其中最常見轉移的部位為肝臟，其次為肺臟。近十幾年來，針對大腸直腸癌相關藥物的開發及其致癌的分子機轉之相關研究相當的多元廣泛。因此，目前研究較著重於在大腸癌惡化之前期剔除或抑制會導致細胞癌化的危險因子，亦在良性息肉癌化之前給予適當的處理，以達到下降國人大腸癌罹患率以及降低死亡率之風險。

### 二、癌細胞的轉移及相關蛋白

#### 腫瘤轉移(Meatastasis)

癌症是由於細胞基因經過一連串的突變累積而導致不受控制的過度增生造成的，而癌化卻是一連串繁複且難以回復的過程。其中關鍵之一便是致癌基因 (oncogene) 的開啟，以及抑癌基因 (tumor suppressor gene) 受到抑制或突變，而一種癌症的形成往往需要多種致癌基因及抑癌基因功能發生改變，才可能導致轉移。在原位的癌細胞生長過程中需要大量氧氣及養分的供給以維持腫瘤的形成，而促進周邊環境產生缺氧、發炎的反應並加之環境致癌因子刺激更加加快癌症的產生。癌細胞會因為缺氧的關係釋放出血管新生刺激因子如 VEGF (vascular endothelium growth factor) 等，刺激內皮細胞進行血管新生 (angiogenesis)，使得癌細胞能夠透過血液循環系統侵犯到其他組織器官，形成轉移型態的癌症。癌細胞會透過上述作用不斷循環、重複轉移浸潤體內正常組織器官，使細胞正常功能受到影響進而導致患者多重器官衰竭死亡。

## 上皮變間質型的轉換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT)

上皮細胞和間質細胞為生物體的兩種基本構成單位，在生物體中兩種細胞型態會因為時期發展不同而相互轉換並且維持著恆定關係。上皮細胞通常為具有極性的一群細胞，並且需要藉著黏附因子決定其坐落的位置，上皮細胞同時也維持著細胞間的連接。間質細胞則是與上皮相反的一群細胞，間質細胞具有高活動能力並能在細胞間質間自由活動的細胞，也不需要依附黏附因子。由上皮細胞轉變成間質細胞的過程便稱為 EMT；反之則稱為 MET。惡性腫瘤所至的絕大部分死亡都是因為腫瘤出現轉移。原發性的腫瘤細胞當遠離原發腫瘤的部位。惡性腫瘤要擴散到整個生物體，首先必須越過或繞過鄰近細胞；腫瘤細胞透過重塑細胞骨架 (cytoskeleton) 以及通過細胞質膜 (plasma membrane) 表面的蛋白質，附著於其他細胞和細胞外基質 (extracellular matrix)，使上皮細胞失去其極性，轉換成一種間質細胞表型，被認為是腫瘤轉移過程中的關鍵。其過程主要是藉由轉錄因子 Snail、Slug 或 Twist 等分子抑制細胞結合蛋白 E-cadherin，導致癌細胞間結合減弱。細胞間的結合力破壞，使細胞能向前爬行 (migration)，直到遇見了一層厚厚的蛋白質及糖蛋白，稱為基底膜 (basement membrane)。為了穿過基底膜，惡性腫瘤細胞必須分泌間質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteases) (MMP) 分解基底膜，使腫瘤細胞穿過基底膜，侵襲 (invasion) 到循環系統或是淋巴系統內，最後穿破血管及淋巴管，腫瘤細胞便可轉移到全身其他組織器官；腫瘤細胞大量的增殖並且導致血管新生 (angiogenesis)。於是腫瘤細胞會經由血管新生得到正常器官的養分，腫瘤器官持續增生病使正常器官耗弱，最終導致病人死亡。

## 黏附因子 CD44

淋巴球欲回到淋巴組織或淋巴器官的過程，稱為 homing。以 anti-CD44 mAb

將骨髓中 CD44<sup>+</sup>細胞中合消耗，發現其移行到胸腺之能力明顯被抑制。因此可知對移行至胸腺之 progenitor cell，CD44 是重要的 homing receptor。學者認為其作用機制是淋巴組織中 HEV 的內皮細胞表現的 addressin 蛋白分子與淋巴球上表現的 CD44 進行作用，透過彼此所帶有的特定黏附分子而產生黏附，使得淋巴球能順利回到淋巴組織中。

CD44 主導細胞間及細胞與細胞間質之交互作用。除了 CD44 之主要 ligand-玻尿酸，目前已知 CD44 還可黏附其他細胞間質，如:collagen、fibronectin、lamine 及 CS 等，另外飛細胞間質蛋白質，如:mucosal vascular addressin、MHC class II invariant chain 等，亦為 CD44 之 ligand。就結構而言，CD44 利用包含有正電之胺基酸序列與帶負電之玻尿酸作用。CD44 基因 exon 的表現數越多，可提供之 glycosylation site 越多；相對而言，對玻尿酸的親合度越差。因此，可知 CD44 與玻尿酸結合的親和力主要受到 exon alternative splicing 及 glycosyltransferase enzyme 表現之影響。

當 CD44 與玻尿酸在細胞表面結合時，玻尿酸會被內吞至細胞內，稱之為內化作用(internalization);細胞藉著溶小體產生的水解(lysosomal hyaluronidase)來分解玻尿酸。因此 CD44 可能包含在玻尿酸水解代謝作用中，可增加細胞移除細胞間質之能力，促進移行細胞的 locomotion。在腫瘤的位置會有玻尿酸累積及 CD44 主導細胞間與細胞間質作用，因此 CD44 在腫瘤形成過程，包含癌症的轉移，扮演相當重要的角色。在許多分化較差，癌症分期較晚期的癌細胞有大量 CD44 的表現，所以近年來 CD44 被認為可能與癌細胞的瀰漫轉移及不良的預後有關。此外，玻尿酸刺激之訊息路徑也發現有 c-Src kinase、Ras、Protein Kinase C (PKC)、及 I $\kappa$ B Kinase 1、2 之參與，因此 CD4 確實具訊息分子之功能。

### 三、沒食子酸

近年來研究學者多致力於發現植物和中草藥等天然食材中萃取物的成份，其中可能存在具有生理活性並且有抑制癌細胞和抗腫瘤生長之化合物。根據文獻指出，酚類化合物具有化學預防之功效並可作為預防癌症發生之有效物質，其可能的作用機制包括清除氧化自由基之抗氧化特性以及調控細胞內特定訊息傳遞有關。其中沒食子酸(Gallate acid, 3,4,5-trihydroxy-benzoic acid)之化學式為 C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>COOH，IUPAC 命名為 3,4,5-三羥基苯甲酸，為水解型單寧的基本單苯環結構，結構如圖一。沒食子酸易溶於水、醇和醚；具有酚及羧酸的性質。而由於沒食子酸的鹼性鈣鹽具有防腐劑功能，因此也常被用於製藥工業上。

沒食子酸主要以游離及化合狀態存在，通常會與一些蛋白質及多醣體形成複合體，進而引起生物活性。沒食子酸本身為一很強的抗氧化劑，並普遍存在於各種綠色植物、蔬菜及水果中，其中尤以葡萄的種子與果皮、茶葉、五倍子等含

量較高。許多文獻提出沒食子酸的生理活性包括：抑制細胞增生、抗氧化、抗真菌、抗細菌、抗過敏、促進血管收縮、產生基因毒性及抑制 DNA breaking activity 等。另外對於蛋白質有沉澱作用，與皮膚、粘膜的潰瘍面接觸後，其組織蛋白質即被凝固，造成一層被膜而呈收斂作用；腺細胞的蛋白質被凝固引起分泌，產生粘膜乾燥，神經末梢蛋白質的沉澱，可呈微弱的局部麻醉現象。沒食子酸可與若干金屬、生物鹼或類形成不溶解化合物，因而用作解毒劑。此外，對於小腸有收斂作用，可減輕腸道炎症，制止腹瀉。除此之外，沒食子酸具有抗菌的作用因其具有廣譜抗菌作用，體外試驗證明，五倍子煎劑對金黃色葡萄球菌、乙型溶血性鏈球菌、肺炎雙球菌以及傷寒、痢疾、炭疽、白喉、變形、綠膿桿菌、羊毛樣小孢子菌、紅色毛癬菌、新型隱球菌均有明顯抑制作用，對綠膿桿菌、斯密氏痢疾桿菌的抑制作用尤其強。

過去亦有研究指出，沒食子酸能夠有效抑制包括肝癌、血癌、胃癌、前列腺癌及肺癌等多種癌症。除抑制癌細胞之外，實驗證實沒食子酸更可對於多數慢性病初期所表現出組織纖維化病症的纖維細胞進行毒殺，對於血管硬化、肝硬化或肺纖維化等慢性疾病具有治療的潛力。

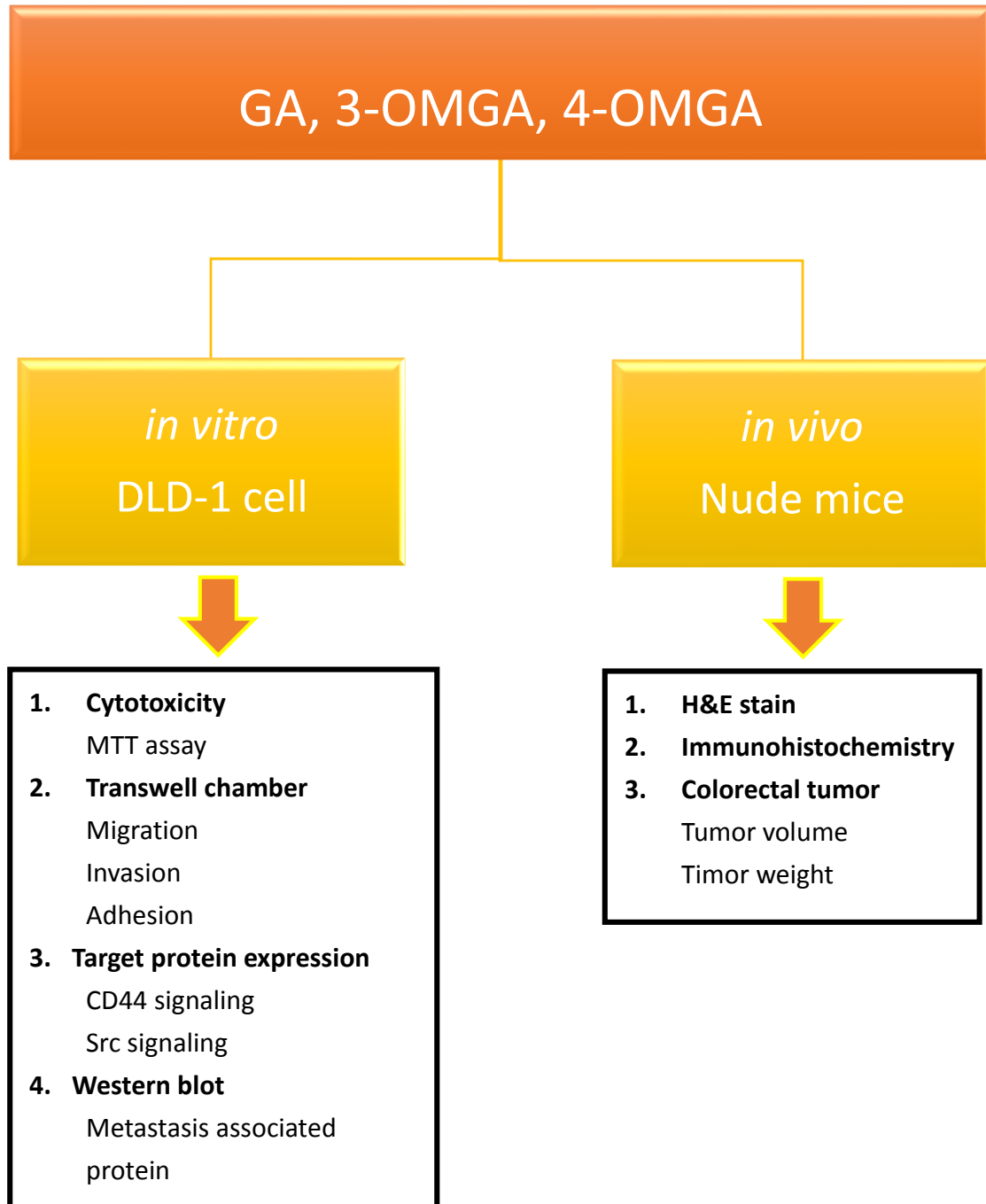


## 研究動機

隨著科技的進步以及生活水平日漸提升，生活品質也大幅提升，雖然提高了現代人在生活上的方便性，卻也出現了飲食失衡、生活規律紊亂的現象，而導致文明病日漸猖獗。其中大腸直腸癌便是近年來快速竄升的文明病之一，並且長年位於台灣癌症死因的前三名，不僅僅影響到病人的健康，對於生活品質也有劇烈的影響，導致生活品質的降低。

本實驗室致力於探討與開發天然物中所含的特殊成份，期望可藉由攝取天然食品來達到預防腫瘤發生之目的，而沒食子酸為一種普遍存在於各類綠色植物及水果中的酚類化合物，根據文獻中指出沒食子酸對於纖維化以及癌細胞部分會產生較強之毒性，並進一步達到殺死癌細胞之功效。已是否具有治療腫瘤的發生或治療腫瘤轉移之功能為研究目的，沒食子酸對於腸癌細胞轉移的轉移是否具有功效，以及其中可能的基至為何，目前尚未十分清楚，因此本研究將進行一連串的實驗深入討論

## 實驗架構



## 實驗材料與方法

### 藥品試劑

1. 購自美國 SIGMA 公司化學公司：MTT (Thiazolyl blue)、gallic acid (GA)、Anti-goat igG、Anti-Mouse igG、Anti-Rabbit igG、p-Aktser473 antibody。
2. 購自 Cell signaling：CD44、p-src、Met、p-Met、p-FAK antibody。
3. 購自 Santa Cruz：Akt (sc-5298)、c-src (sc-5266)、Rac-1 (c-14)、Rho A (26c4) antibody。
4. 購自美國 GIBCORBRL 公司：Dulbecco' s phosphate-Buffered saline (PBS)
5. 購自美國 MERCK 公司：Glycerol, Sodium dodecyl sulphate (SDS)
6. 購自美國 FISHER 公司：1-Butanol, Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

### 實驗方法

#### 4-1 沒食子酸(GA)製備

取 Gallic acid 和水混和均勻至完全溶解後，配製成多管濃度為 100mM，曲其中一管再分別稀釋成 50mM、10mM。

#### 4-2 人類腸癌細胞培養

人類腸癌細胞株 DLD-1 來自新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC)。DLD-1 培養於 RPMI 1640 medium 中，並依照 BCRC 所提供之培養條件添加 2 mM L-glutamine、4.5 g/L glucose、10mM HEPES、1 mM sodium pyruvate 90%以及 10% fetal bovine serum (FBS)，培養箱設定 5% CO<sub>2</sub>，37 °C 的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。

#### 4-3 細胞毒性測試(Cytotoxicity assay)

利用活細胞能經由粒線體 dehydrogenase 的作用，將 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)代謝還原成紫色結晶，再以分光光度計在波長 563nm 測量。再以量化的比色方法來分析細胞的存活率及增殖率。由吸光直的多寡可得知細胞的存活數目，然而死亡細胞無法進行上述作用，因此若溶液吸光直降低的話，表示細胞無法代謝 MTT 藥劑或是死亡的情形。將腸癌細胞 DLD-1 (2×10<sup>5</sup> cell/well) 培養於 24 well culture plate，加入不同濃度的 GA (0、50、100、200mg/ml) 處理 24 及 48 小時後，移除舊的培養基(含 GA)，換入新的培養基和 MTT (0.5 mg/ml)反應 3

小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長 563 nm 下測定吸光值的變化。

#### 4-4 傷口癒合實驗(Wound healing)

將 DD-1 細胞培養在 6-well 培養盤中，待細胞生長至全滿之後，與用滅過菌之 100  $\mu$ l tip 在每個 well 中劃出 3 至 5 條直線傷口，接者利用 PBS 沖洗兩次後隨即換上含不同 GA 濃度之培養液，分別為 0, 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml，在 37°C 培養 24 及 48 小時，分別於 0、12、24、48 小時在顯微鏡下觀察並記錄傷口癒合的情形，每個 well 拍九張影像。藉此了解不同濃度之 GA 對傷口癒合的影響。

#### 4-4 人類腸癌細胞移動性分析(Migration assay)

為測試細胞的轉移性(migration)的實驗，利用 transwell chamber kit 分析，將 DLD-1 腸癌細胞株培養於 10cm dish 中，處理不同時間及劑量 GA 後，先用 PBS 沖洗，再用 EDTA-trypsin 將細胞打下來並計算細胞數量。在 lower chamber 加入含有 20%FBS 的 medium，然後以不含 FBS 的 medium 回溶固定量的細胞(105 cell/well) 並且加到 upper chamber 中，待細胞移動 48 小時之後，取下薄膜並用 4%paraformaldehyde 將細胞固定 10-15 分鐘，風乾後使用 Giemsa:ddH<sub>2</sub>O(1:19)染色，最後擦式薄膜上層細胞，在顯微鏡下隨機選擇視野觀察細胞爬行的情況，並計數做分析。

#### 4-5 人類腸癌細胞侵入性分析(Invasion assay)

為測試細胞的侵襲性(invasion)的實驗，利用 transwell chamber kit 分析，先在 transwell chamber 中注入 10  $\mu$ l/well matrigel basement membrane matrix (200  $\mu$ g/ml) 放入 incubator 2 至 4 小時進行風乾。

將 DLD-1 細胞處理不同時間及劑量 GA 後，先用 PBS 沖洗，再用 EDTA-trypsin 將細打下來並計算細胞數量。lower chamber 加入含有 20%FBS 的 medium，然後以不含 FBS 的 medium 回溶固定量的細胞(105 cell/well) 並且加到 upper chamber 中，待細胞移動 48 小時之後，取下薄膜並用 4%paraformaldehyde 將細胞固定 10-15 分鐘，風乾後使用 Giemsa:ddH<sub>2</sub>O(1:19)染色，最後擦式薄膜上層細胞，在顯微鏡下隨機選擇視野觀察細胞爬行的情況，並計數做分析。

#### 4-6 西方點墨法(Western blotting)

將人類腸癌細胞株以  $2 \times 10^6$  cell/100mm dish 中加入含有不同濃度的 GA 處理 24 及 48 小時後，以 PBS 沖洗細胞二次，收集細胞，加入 RIPA buffer，及蛋白質水解酶抑制劑(Proteinase inhibitor)，在 4°C 下震盪 2 小時，4°C 高速離心 12,000 rpm，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -20°C。取定量之 whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入 5 倍追蹤染劑

(loading dye)，混合均勻，以 95~100 °C 加熱 15 分鐘，再迅速置於冰上，隨後進行 SDS-PAGE，完畢後將膠體取出，轉漬到硝化纖維紙，用 TBS buffer 漂洗，以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用，換上一級抗體和二級抗體作用，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測，觀察 CD44 及癌細侵犯擴散相關蛋白，如:Src、FAK、Paxillin 等表現量之變化

#### 4-7 動物移植性腫瘤實驗(tumorigenic assay)

本實驗將由國家實驗動物中心購入之裸鼠，以每四隻實驗裸鼠為一籠，在整個實驗過程當中實驗動物都維持待在無菌過濾隻飼養環境中。飲水以高溫高壓滅菌過厚的一次水餵之。接著以同一批實驗動物分成兩組，分別為以 GA 加藥處理過的 DLD-1 細胞，與未使用寵理的 DLD-1 細胞，以皮下注射的方式，接種相同數量的人類腸癌細胞，並使其在體內生長，並模擬癌細胞轉移的過程。接著持續追蹤腫瘤大小以及動物平均存活天數。最終將實驗動物犧牲，並測量其體重、原發部位以及轉移部位腫瘤體積和重量。

#### 4-8 伊紅染色法(H&E stain)

以給予 CO<sub>2</sub> 的方式將裸鼠犧牲後，將腸道取出後以生理食鹽水清洗去除穢物，再以 10% neutral buffered formalin 溶液固定，之後再依次將組織脫水，方法如下，先以 PBS 緩衝溶液於 4°C 浸泡 30 分鐘，然後在室溫下換為 50%酒精繼續浸泡 30 分鐘並重複兩次。等待組織完全脫水後，將組織於室溫中以 100%xyline:paraffin 為 1:1 的溶液中，於 60°C 浸泡 45 分鐘，再將組織置於 paraffin 20 分鐘並重複三次，最後將組織固定於石蠟冷凝進行滲蠟至隔日，將滲蠟之組織進行切片後，利用紫蘇木與伊紅染色(Hematoxylin and Eosin stain)，分析癌細胞在各組織中轉移與侵犯之程度。染色步驟如下，脫蠟之後，以紫蘇木染劑作用 2-10 分鐘，在以二次水清洗，接著使用 0.5%溶液染色約 1-5 秒，浸入氫水中(在 1000ml 的水滴入氫水 3-4 滴)，於流水中清洗至少 15 分鐘。以 0.5%伊紅染劑染色 2-3 分鐘，再以 80%、90%、95%酒精清洗，依序加入絕對酒精：二甲苯(比例為 1:1)30 秒，二甲苯：木鱉油(比例為 4:1)，二甲苯(I)與二甲苯(II)中各 30 秒，以二甲苯使切片透明，封片後再以顯微鏡觀察。

#### 4-9 免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry)

以給予 CO<sub>2</sub> 的方式將裸鼠犧牲後，將腸道取出後以生理食鹽水清洗去除穢物，再以 10% neutral buffered formalin 溶液固定，之後再依次將組織脫水，方法如下，先以 PBS 緩衝溶液於 4°C 浸泡 30 分鐘，然後在室溫下換為 50%酒精繼續浸泡 30 分鐘並重複兩次。等待組織完全脫水後，將組織於室溫中以 100%xyline:paraffin 為 1:1 的溶液中，於 60°C 浸泡 45 分鐘，再將組織置於 paraffin 20 分鐘並重複三次，最後將組織固定於石蠟冷凝進行滲蠟至隔日，

將滲蠟之組織進行切片。將取下之樣本剩餘蠟塊與抗體送至本校病理科幫忙進行免疫組織化學染色，取回切片後於顯微鏡下觀察在不同劑量的 GA 及其衍生物處理之下 CD44、CTGF 以及 Src signaling pathway 中 FAK 表現量變化。

#### 4-10 統計分析

所有 *in vivo* 或 *in vitro* 之實驗分析，皆為獨立操作並重複三次以上，並以 student's t-test 作為統計分析，凡  $p < 0.05$  時表示為有意義的差異。

## 實驗結果

### 沒食子酸對人類腸癌細胞毒性之影響

首先為了解沒食子酸對於人類腸癌細胞的影響為何，因此我們採用人類腸癌細胞 DLD-1 作為材料。選用該細胞的原因為 DLD-1 細胞生長模式較像旁側延展成紡錘狀並且會堆疊，可呈現完整的細胞型態。為了解沒食子酸是否對 DLD-1 細胞產生毒性，我們以不同濃度的沒食子酸(50-200  $\mu$ M)處理 48 小時之後，使用 MTT 測試沒食子酸對 DLD-1 細胞存活率的影響。由 Fig. 2 之 MTT assay 結果得知 GA、3-OMGA、4-OMGA 的處理之下並不會明顯的影響 DLD-1 細胞的存活率；由於本實驗之設計為細胞轉移之情形，因此選用不具有細胞毒性之劑量進行往後的實驗。

### 沒食子酸對人類腸癌細胞增生之影響

為測試 GA 是否影響 DLD-1 細胞傷口癒合的能力，我們利用 wound healing assay 測試在處理不同濃度之 GA 的 DLD-1 細胞並持續記錄 48 小時之後之傷口癒合能力。能夠從 Fig. 3 結果中發現在處理 100  $\mu$ M GA、3OMGA、4OMGA，經過 48 小時之後，與 control 組相較之下，傷口癒合的能力明顯受到抑制，而統計圖表中也顯示出其中又以 GA 在處理 48 小時之後抑制傷口癒合的效果最為顯著。

### 沒食子酸對人類腸癌細胞轉移及侵襲之影響

為測試沒食子酸是否能對人類腸癌細胞之轉移能力造成影響，我們將人類腸癌細胞 DLD-1 在經過 100  $\mu$ M GA、3OMGA、4OMGA 分別處理 48 小時之後探討腸癌細胞轉移及侵犯的能力。首先利用 transwell assay 的實驗測試 GA、3OMGA、4OMGA 影響細胞移動的能力，從實驗結果 Fig.3 中能看到經過 48 小時的加藥處理後，DLD-1 細胞爬行的能力與 control 組別相較下有明顯受到抑制的情形。其中又尤以 GA 處理之後的效果最為顯著，因此往後之實驗便以 GA 作為主要的藥物作處理。另外在量化的結果中亦說明了沒食子酸降低了 DLD-1 細胞移行與侵犯的能力。

### 沒食子酸抑制細胞轉移訊息傳遞路徑

接下來為更進一步探討沒食子酸對於人類腸癌細胞 DLD-1 是如何作用，因此我們使用西方點墨法進行細胞內分子機制的探討。將人類腸癌細胞出理不同濃度

之 GA 48 小時之後，以 western blot 分析細胞內蛋白質的變化，在 Fig. 4 結果中可以看到細胞膜表面的黏附因子 CD44 及 Met 磷酸化表現量會隨著 GA 濃度上升而受到抑制。另一方面我們在磷酸化 Met 受 GA 抑制的性況下探討沒食子酸對於下游的 focal adhesion signaling 相關蛋白質表現量以 western blot 做觀察；可以從結果 Fig. 6 中看到磷酸化 FAK、磷酸化 Paxillin 以及磷酸化 src 表現量都隨著 GA 劑量的提高而有明顯的下降。接著我們想要進一步探討 FAK 下游調控細胞骨架及型態的 Rho family 相關蛋白質是否也受到影響。在 Fig. 7 的 western blot 結果中也能得到在加藥處理後 Rho B 表現量上升以及磷酸化 Akt 下降的情形。因此我們能夠推測沒食子酸會透過抑制細胞膜黏附因子 CD44 的表現，進而使 CD44 下游調控路徑，包括 Met 及其下游的 focal adhesion signaling，以及 Akt 下游 small G protein 中 Rho family 相關蛋白質的表現量，進而達到改變細胞骨架以及抑制細胞轉移的目的。

### 異體腫瘤移植實驗

為了更進一步評估沒食子酸在體內抑制癌細胞轉移之程度，我們選用免疫缺乏之裸鼠做為模擬癌細胞在體內轉移的動物模式，我們分別將處理過與未處理過沒食子酸的 DLD-1 細胞，以皮下注射的方式接種在裸鼠身上，並做持續的觀察及記錄。將小鼠犧牲，取出腸道後可觀察裸鼠腸道中有許多大小不一且外規呈不規則形狀的腫瘤黏附在腸道的表面；然而在處理過 GA 的組別中腫瘤數目及大小則有明顯的改善 Fig. 7A，將腸道上腫瘤取下之後，腫瘤的總數量上也因為 GA 的處理而有明顯差異 Fig. 7B。同時我們也觀察到未經 GA 處理的 DLD-1 細胞有較嚴重的肝臟轉移情形 Fig. 7C。接下來將取下之肝臟逕行病理切片染色，從結果中可觀察到肝臟組織中形成許多腫瘤細胞的浸潤，而並非僅僅是肝臟表面所能看見的腫瘤，說明了 DLD-1 腸癌細胞可能是透過血液循環或淋巴系統轉移至肝臟。Fig. 8。另外針對特定蛋白在腫瘤組織中的表現程度，我們也使用 IHC 做染色，解果中顯示在處理過 GA 的 DLD-1 細胞後呈現的組織中 CD44、p-FAK 以及 p-Met 表現量皆有明顯下降，Fig. 9。



## 討論

在過去 20 年中，大腸癌的發生率及造成的死亡率逐年提高，早已成為威脅國人健康的癌症之一；若是能在早期發現癌細胞的存在，便可大幅增加治癒的機會。隨著科學家對於癌症致病機轉的了解及科技不斷進步，抗癌藥物也隨時代推陳出新，亦為治療大腸癌帶來了一線曙光。標靶藥物在過去 10 年中已成為治療癌症的新趨勢，並且可以與傳統化學治療藥物共同成為第一線用藥，且若是透過基因篩檢的方式預測治療效果，則更能使藥物發揮最大的效益，提供醫生對原先較惡化的轉移性大腸癌病人有效提高對腫瘤的控制性，並可望降低藥物對正常組織器官造成的傷害，而得以進行手術切除。根據文獻指出，沒食子酸已被證實對許多疾病的治療有成效，因此本實驗變欲進一步探討沒食子酸對於腸癌細胞的轉移是否具有抑制的功效。

在先前的研究中曾指出，中藥材中的五倍子主成分中含有沒食子酸(Gallic acid)、樹脂、蠟質、澱粉、脂肪等達 50%至 70%，其中 GA 便具有抑制黑色素瘤細胞之轉移作用、抑制前列腺癌細胞轉移，以及本實驗室先前研究過的抑制胃癌轉移之功效，在我們的實驗結果 Fig. 4 中發現，GA 確實具有抑制人類腸癌細胞 DLD-1 爬行的能力。接下來的實驗中我們繼續探討沒食子酸透過何種訊息傳遞路徑抑制人類腸癌細胞 DLD-1 的轉移能力，在 Fig. 4 western blot 的結果中發現 GA 可以有效抑制 DLD-1 細胞中 CD44 以及 Met 磷酸化的表現。除此之外，下游與調控細胞骨架相關蛋白如 Paxillin、FAK 及 Src 表現量皆因為 GA 作用受到抑制。先前亦有許多文獻指出，細胞骨架的改變與癌細胞的轉移存在高度的關聯性，確實在 FAK 下游的 Rho family 蛋白表現中可以發現 Rho B 在處理 GA 後有明顯的上升。此外，在動物實驗結果 Fig. 7 也證實將處理 GA 之後的 DLD-1 細胞注射至裸鼠皮下後，轉移至肝臟的癌細胞大小及數目有明顯的減少；在未來的實驗中為了更進一步模擬癌細胞轉移的過程，我們會利用偉靜脈注射的方式作為腸癌細胞透過血液循環轉移至肺臟的模式；另外以注射腸癌細胞至肝門竟辦的方式更準確的模擬轉移至肝臟的情形。另一方面在對於人類腸癌細胞 DLD-1 的操作上會試以 knockdown CD44 的方法或是利用 database 的方法，找尋直接對 CD44 作用之 micro RNA 並加入抑制劑作處理，觀察 CD44 及下游相關蛋白表現量是否確實受到抑制。

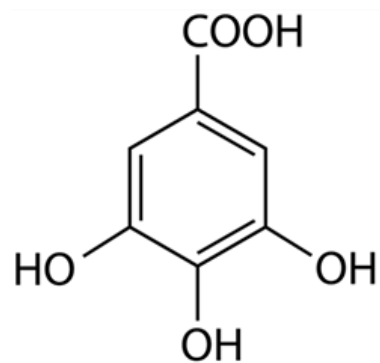
綜合以上實驗，可以證實沒食子酸在對細胞及動物體沒有毒性的劑量使用下，能夠有效抑制人類腸癌細胞 DLD-1 生長及轉移的能力，在未來或許能夠使用 Gallic acid 作為治療腸癌的藥物與現行之標靶藥物合併使用，以達到最佳治療效果。

## 參考文獻

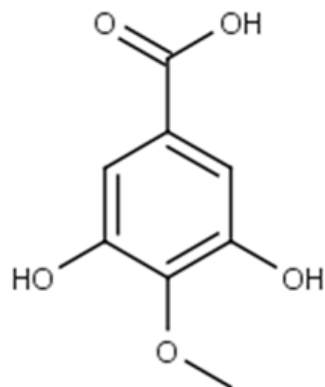
- 1 最近國外單寧酸、沒食子酸應用研究動態 [J]. 林業科技通訊, 1995, 2:36.
- 2 Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2012 Mar 15;72(6):1504-17.
- 3 A role for CD44 in breast cancer cell invasion and metastasis by redistribution of matrix metalloproteinase-9 expression.
- 4 Perspectives of CD44 targeting therapies. *Arch Toxicol.* 2015 Jan;89(1):3-14.
- 5 Gallic acid inhibits the metastasis of colon cancer cells in mice
- 6 The flavonoid-rich extract from *Nelumbo Nucifera* leave Inhibits Obesity factor induced breast cancer metastasis
- 7 The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med.* 2011 Feb;17(2):211-5.
- 8 Delivery of CD44 shRNA/nanoparticles within cancer cells: perturbation of hyaluronan/CD44v6 interactions and reduction in adenoma growth in *Apc Min/+ MICE*. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):12432-46.
- 9 Study of the expression of *Cks1* in human non-small cell lung cancer tissues and cell lines and its inhibition by siRNA
- 10 The use of siRNA, ribozyme and DNAzyme for gene silencing and biotechnology development
- 11 RNA interference targeting *CXCR7* gene inhibits proliferation and migration of colon cancer cell line SW1116
- 12 Part I *Morus alba* leaves extract prevents atherosclerosis development Part II Inhibitory effects of *Nelumbo Nucifera* leaf extract on human breast carcinoma MCF-7 cells
- 13 Studies on the anti-cancer activity and mechanisms of flavone
- 14 Apple polyphenol inhibits colon carcinoma metastasis via disrupting Snail binding to focal adhesion kinase
- 15 CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer.* 2010 May;46(7):1271-7.
- 16 Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic

- regulation mediated by miRNAs. *Int J Oncol.* 2015 Apr; 46(4): 1491 - 1497.
- 17 Gallic acid induces apoptosis and inhibits cell migration by upregulating miR-518b in SW1353 human chondrosarcoma cells. *Int J Oncol.* October 30, 2013
  - 18 The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Mol Carcinog.* 2014 Jun;53(6):432-9.
  - 19 Maintenance of the stemness in CD44+ HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Research* Volume 12, Issue 1, January 2014, Pages 86 - 100
  - 20 Impaired DICER1 function promotes stemness and metastasis in colon cancer *Oncogene.* 2014 Jul 24; 33(30): 4003 - 4015.

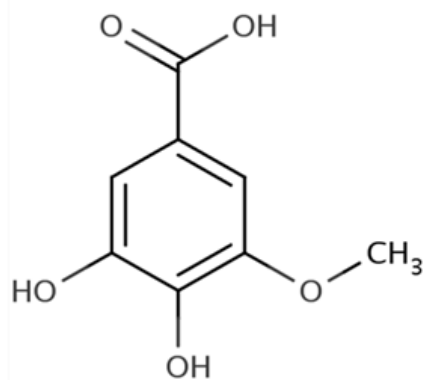
## 實驗圖表與說明



3,4,5-trihydroxybenzoic acid ( GA )

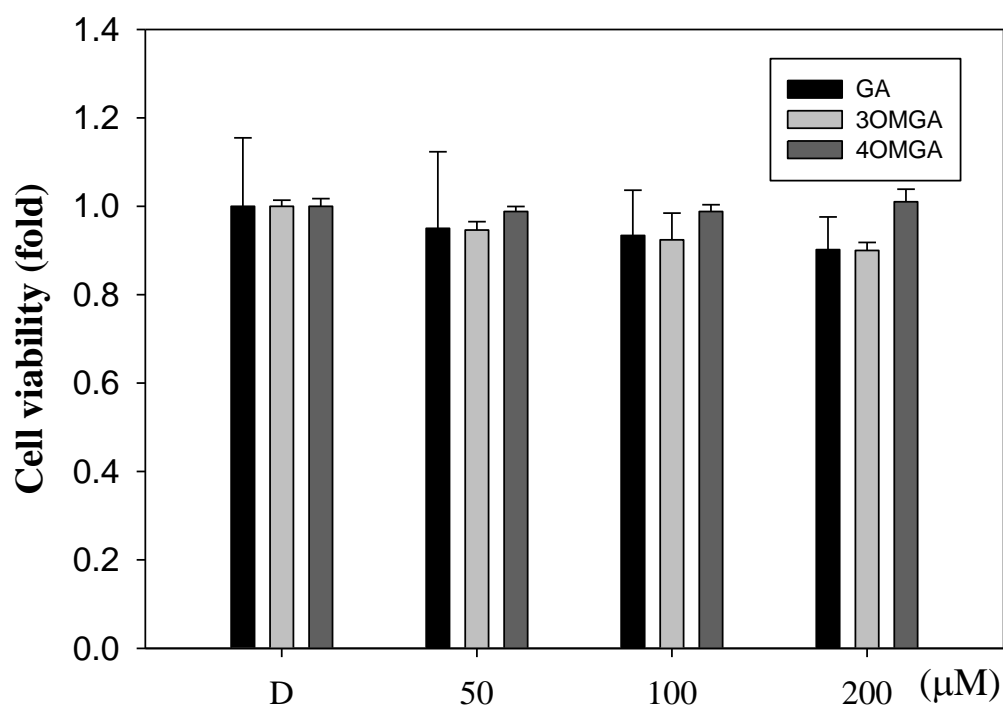


3,5-Dihydroxy-4-methoxybenzoic acid ( 3OMGA )



3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzoic acid ( 4OMGA )

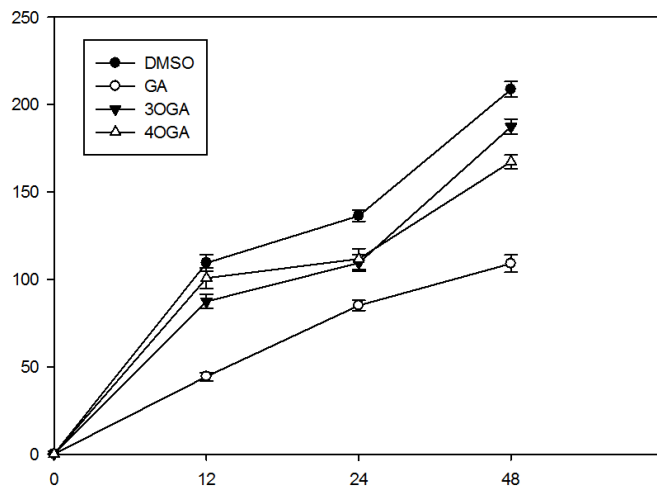
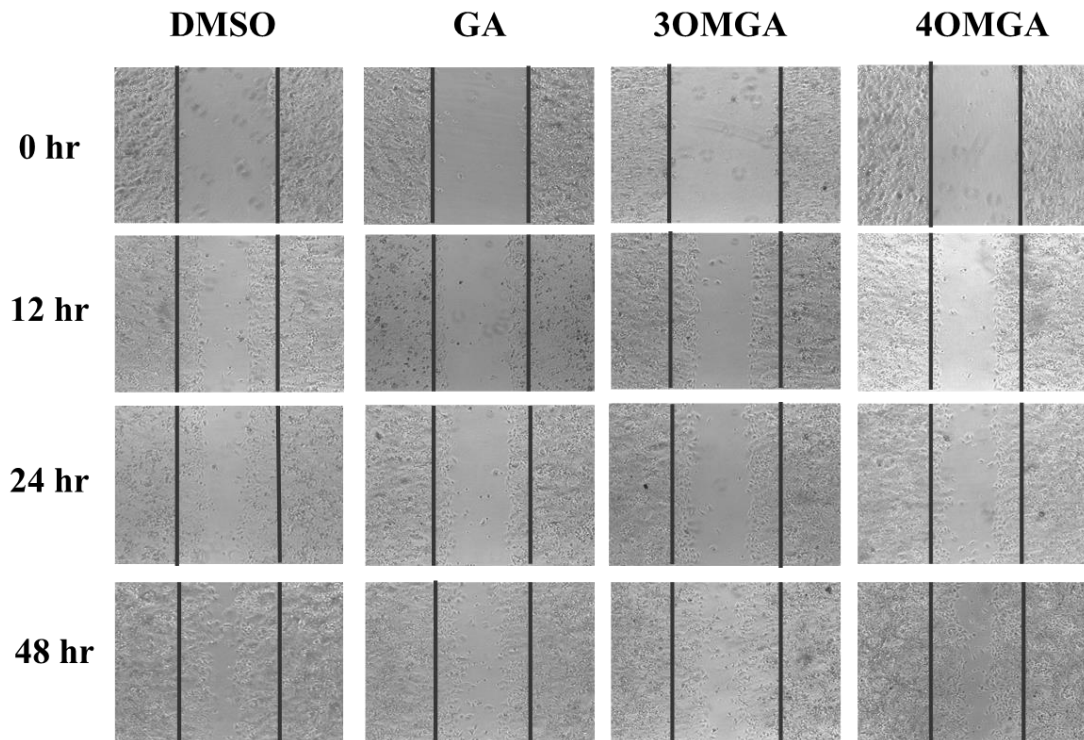
**Fig.1. Structure of methyl GA derivatives.**



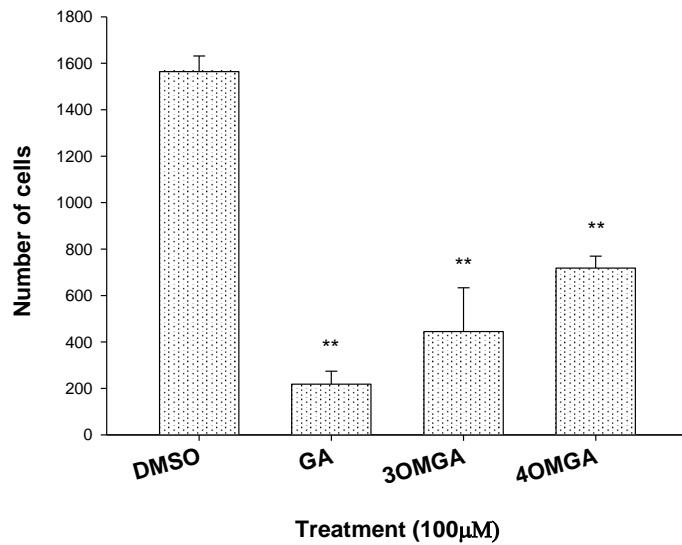
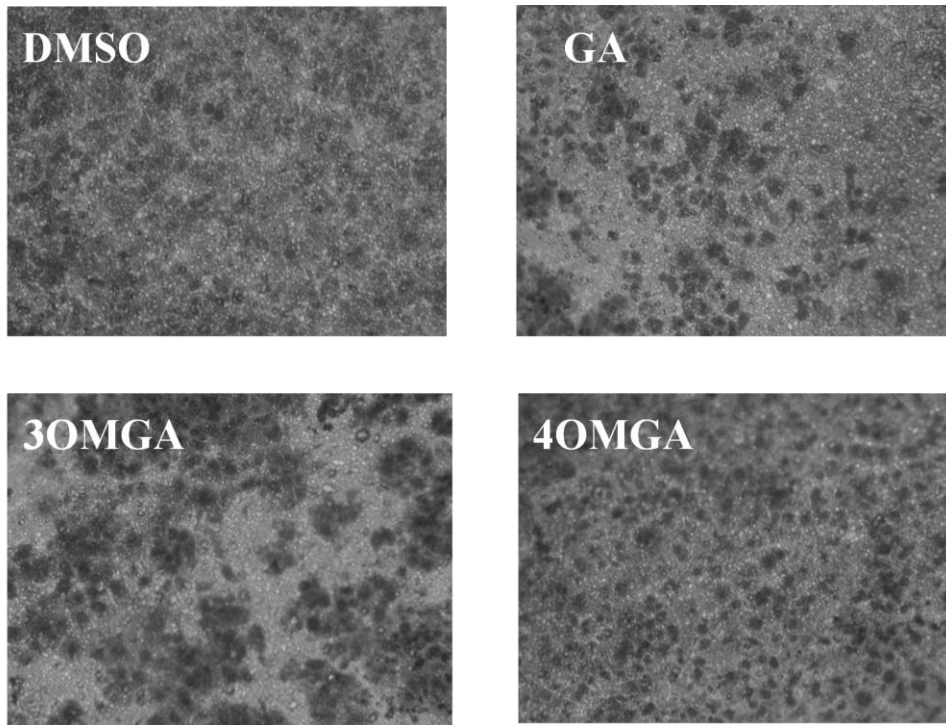
**Fig.2 Cell viability of cells treated with methyl GA derivatives.**

Cultured cell were treated with or without GA、3OMGA、4OMGA under different concentrations for 48 h. Cell viability was analyzed by MTT assay. The result represents the average of three independent experiment  $\pm$  SD.

\*P < 0.05, \*\*P < 0.005 compared with the control.

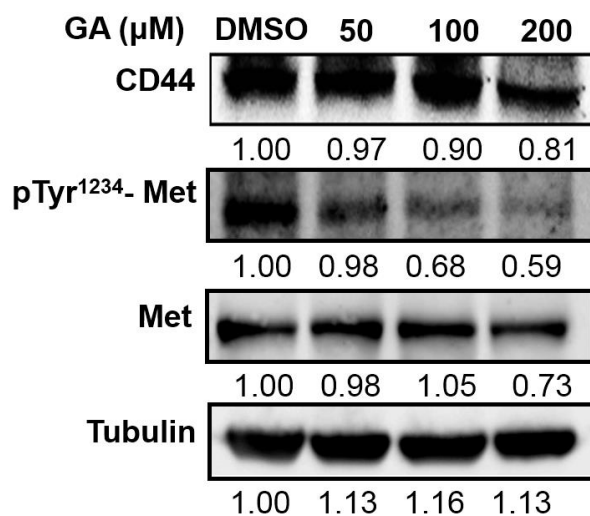


**Fig.3 Effect of GA 、3OMGA 、4OMGA inhibited DLD-1 cells on wound-healing ability.** Monolayers of DLD-1 cells treated with GA 、3OMGA 、4OMGA at 100 $\mu$ M or without were scraped and the number of cells in the denuded zone (i.e., wound) was quantitated after 48hr under a light microscopy.



**Fig.3 Methyl GA derivatives inhibit DLD-1 cells by migration assay .**

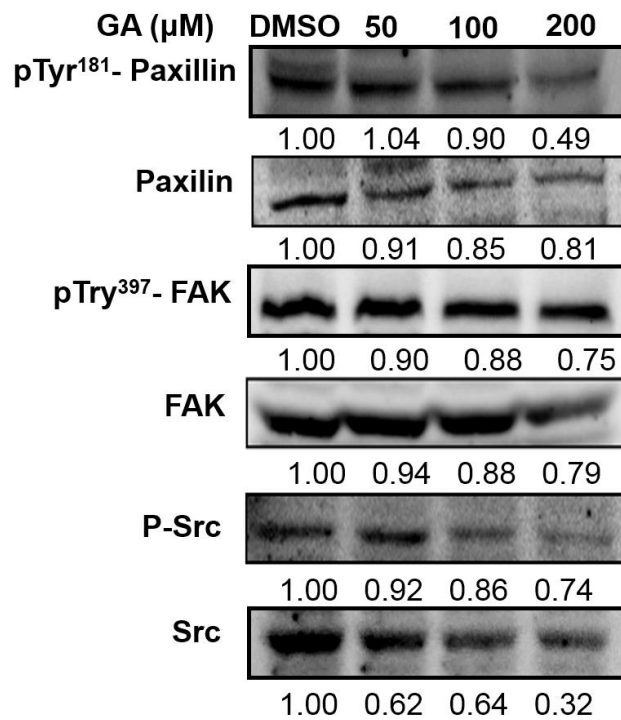
DLD-1 cells are seeded in the top chamber of the transwell after treated GA、3OMGA、4OMGA at 100 µM. Chemoattractant is placed in the bottom chamber. DLD-1 cells migrate through the small pores in the transmembrane in response to chemoattractant.



**Fig.4 GA dose-dependent inhibited metastatic protein level.**

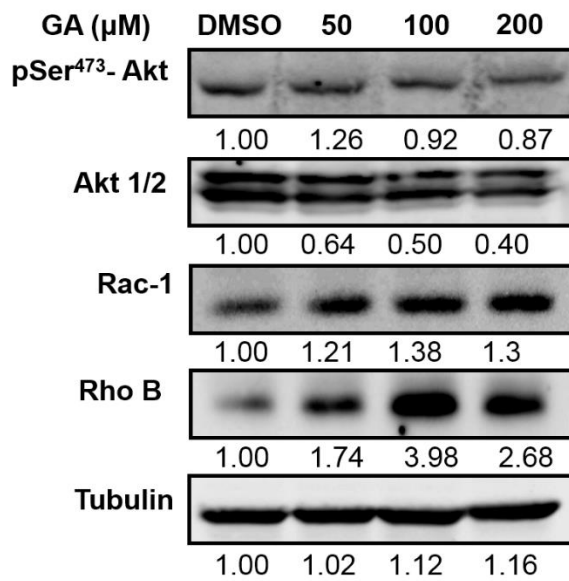
DLD-1 cells treated with GA at (D、50 $\mu\text{M}$ 、200 $\mu\text{M}$ ) for 48 hrs, cell lysates were to analysis the protein expression of CD44, Met and tubulin by Western blot. tubulin was used as a loading control.





**Fig.5 GA dose-dependent inhibited focal adhesion signaling protein level.**

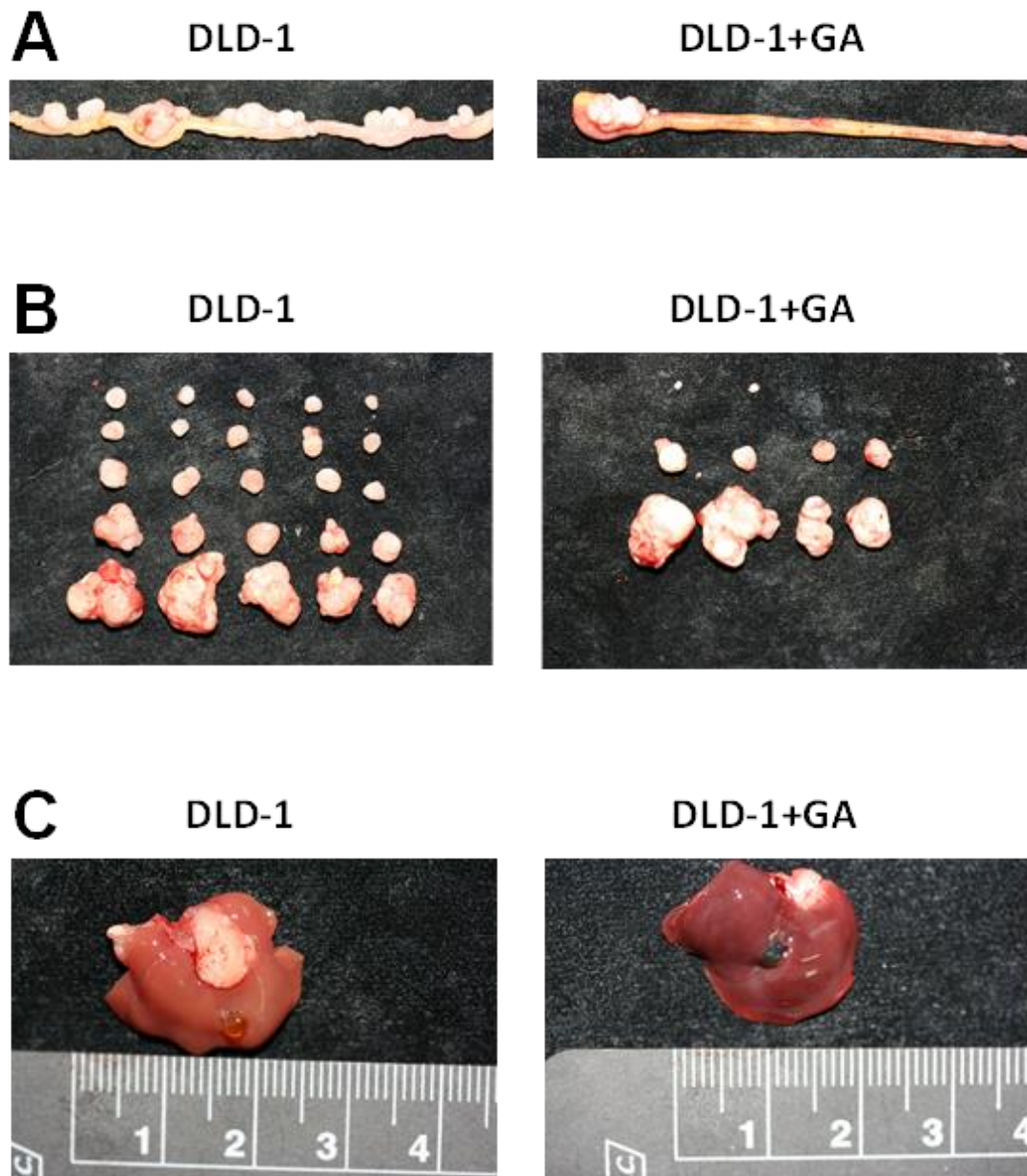
DLD-1 cells treated with GA at (D、50  $\mu\text{M}$ 、200  $\mu\text{M}$ ) for 48 hrs, cell lysates were to analysis the protein expression of p-Src, FAK, Paxillin and tubulin by Western blot. tubulin was used as a loading control.



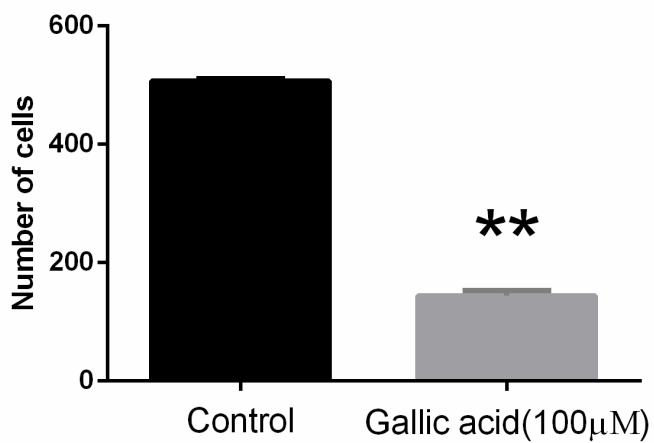
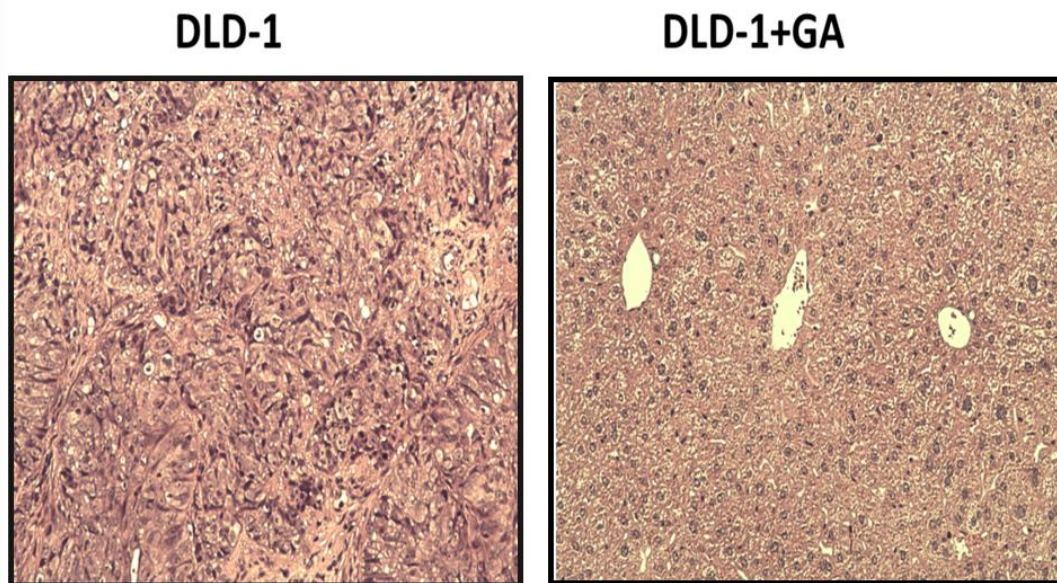
**Fig.6 GA dose-dependent inhibited metastatic protein level.**

DLD-1 cells treated with GA at (D、50 $\mu$ M、200 $\mu$ M) for 48 hrs, cell

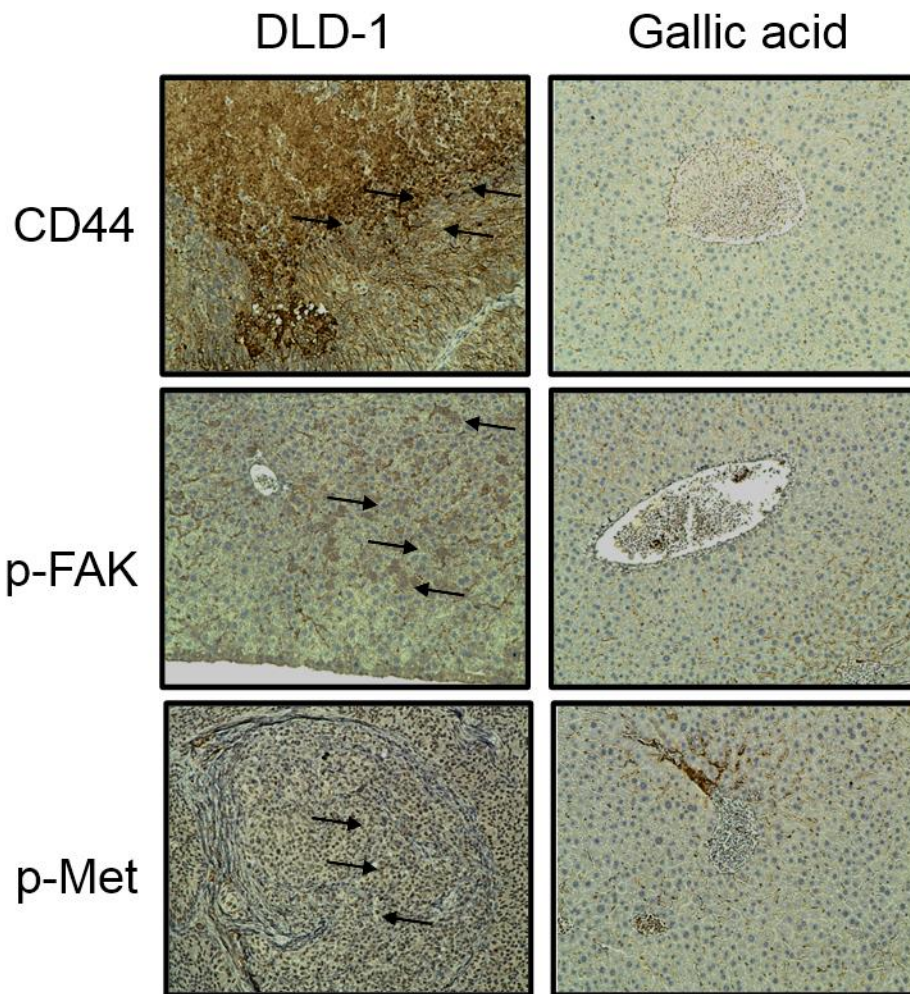
lysates were to analysis the protein expression of CD44,Src,p-Src,FAK,Paxillin and  $\beta$ -actin by Western blot.  $\beta$ -actin was used as a loading control.



**Fig.7 GA expression in metastatic colon cancer.** Nude mice were ip with DLD-1 colon cancer cell and treated with GA or not and examined by microscope at 100x. (A) The large intestine of nude mice (B) The tumor number of large intestine (C) The metastatic tumor in Liver

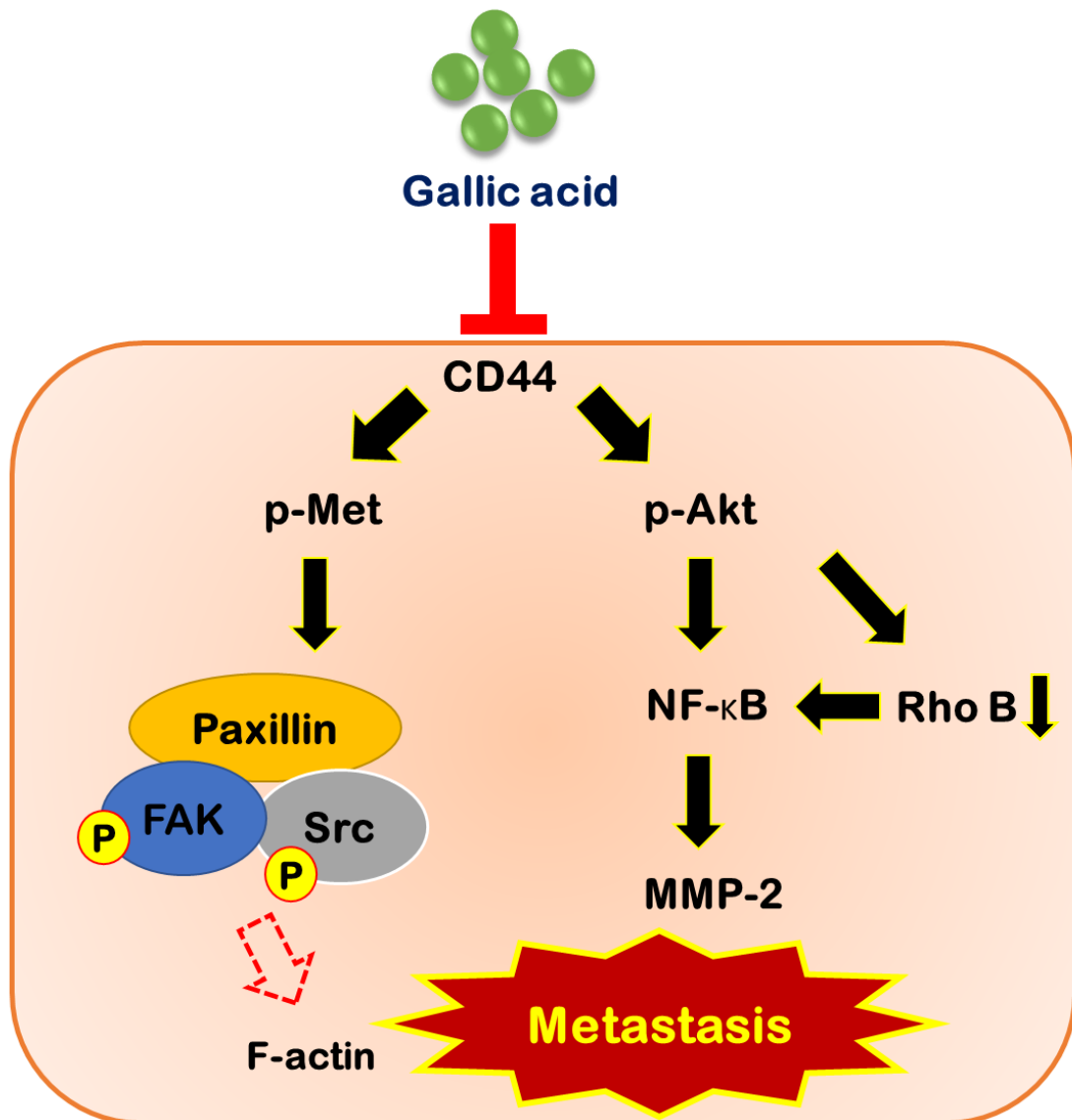


**Fig.8 H&E stain tissue sections in metastatic colon cancer.** Nude mice were ip with DLD-1 colon cancer cell and treated with GA or not. Representative images of H&E stain in liver tumors The sections were stained examined by microscope at 100x.



**Fig.9 GA reduced CD44/ FAK /Met-P expression in metastatic colon cancer.** Nude mice were ip with DLD-1 colon cancer cell and treated with GA or not. Representative images of *immunohistochemistry* in liver tumors. The sections were stained with anti-CD44, anti-FAK or anti-Met-p and examined by microscope at 100x.

## SUMMARY



## 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

沒食子酸在對細胞及動物體沒有毒性的劑量使用下，能夠有效抑制人類腸癌細胞 DLD-1 生長及轉移的能力，在未來或許能夠使用 Gallic acid 作為治療腸癌的藥物與現行之表把藥物合併使用，以達到最佳治療效果。