

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：表兒茶素沒食子酸酯抑制子宮頸癌細胞轉移與調控細胞骨架蛋白表現之研究分析 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳加馨
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-025-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： 陳霽霓

處理方式： 本計畫可公開查詢

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

目錄

一、中英文摘要及關鍵詞

二、報告內容

1. 前言

2. 研究目的

3. 文獻探討

4. 研究方法

5. 結果與討論

三、參考文獻

四、計畫成果自評

一、中英文摘要及關鍵詞：

本實驗想得知 ECG (表兒茶素沒食子酸酯)對 SiHa cell (子宮頸癌細胞)是否會產生影響，並發現加入 ECG 後可以抑制 SiHa 子宮頸癌細胞生長進而抑制其轉移的能力。首先利用 MTT assay (細胞存活率分析)觀察 ECG 對細胞是否有毒殺性，並發現 ECG 對子宮頸癌細胞不具毒殺性。接著做 Gelatin zymography assay (明膠基質金屬蛋白酶活性測試)、Casein zymography assay (酪蛋白尿激酶型纖維溶酶原激活劑蛋白酶活性測試)與 Time course assay 觀察細胞中 MMP-2 (基質金屬蛋白酶)、U-PA (尿激酶型纖維溶酶原激活劑)的變化，並發現 ECG 會抑制子宮頸癌細胞轉移相關蛋白酶的表現量。Wound healing assay (傷口癒合試驗)與 2D colony formation assay(2D 群落形成分析)觀察細胞的移動力與細胞的增生力，並發現 ECG 會抑制子宮頸癌細胞的移動力與增生力；最後利用 Western Blot (西方墨點法)觀察訊息傳遞路徑中蛋白的表現量，並發現 ECG 對子宮頸癌細胞具有抑制細胞轉移與上皮-間質細胞轉換之能力。

In this study would like to know whether ECG (epicatechin gallate) has the influence on SiHa cell (Cervical cancer cell), and revealed that ECG can inhibit the growth and the capability of metastasis of cell. First we used the MTT assay (cell viability assay) to test whether ECG have the toxicity to SiHa cell, and revealed that ECG does not have the toxicity to the SiHa cell. Then we used Gelatin zymography assay、Casein zymography assay and Time course assay to observe the change of MMP2 and U-PA, and revealed that ECG can inhibit the expression of the metastasis-associated protease. We used wound healing assay and 2D colony formation assay to observe the cell migration and cell proliferation, and revealed that ECG can inhibit the migration and proliferation of SiHa cell. Finally, we used Western Blot to observe the expression of the proteins in the signaling pathway, and revealed that ECG have the inhibition of the cell metastasis and epithelial- mesenchymal transition.

Keyword: Cervical cancer cell, ECG, EMT, metastasis

二、報告內容

(一)、前言：

由之前文獻已知 ECG 對於許多腫瘤細胞都會抑制腫瘤生長和凋亡的功能，但是並未有文獻指出 ECG 對於子宮頸癌細胞的轉移及 EMT 等作用相關機制探討的能力。本研究的主要目標在釐清 ECG 對子宮頸癌細胞的影響並加以探討影響的層次。

(二)、研究目的：

2014 年國人最大死因還是惡性腫瘤為冠，而十大癌症仍是肺癌為首，口腔癌的死亡率則上升至第八名，女性癌症則是有乳癌跟子宮頸癌為主。造成子宮頸癌的原因有很多種，可能是因為飲食習慣、基因突變、太早發生性行為等形成之因素。先前的文獻主要是以 EGCG (表沒食子酸沒食子酸酯)來處理癌細胞，發現 EGCG 藉由抑制癌細胞快速生長需要的酵素和蛋白質，也能抑制癌症擴散轉移很重要的血管增生(angiogenesis)。本實驗想要得知是否 ECG (表兒茶素沒食子酸酯)對癌細胞也具有相同的功效，因此利用 ECG 來處理 SiHa 子宮頸癌細胞

(三)、文獻探討：

子宮頸癌是女性常見的癌症之一，主要是由 HPV (human papillomavirus, 人類乳突病毒)感染而造成，初期通常沒有症狀不易發現，晚期會有不正常的陰道出血、骨盆腔疼痛等症狀。可利用子宮頸抹片檢查，越早發現其治癒率可達到百分之百，若沒有發現其癌前病變，經過五至十年便會形成子宮頸癌。子宮頸癌會透過血液與淋巴轉移至骨盆腔、腎臟、膀胱、直腸，遠端轉移則包括肺臟、肝臟、骨骼、或腦等。本實驗選取具高危險型 HPV：SiHa (human cervical epithelial of squamous cell carcinoma；HPV16)來操作。

ECG (epicatechin gallate, 表兒茶素沒食子酸酯)是兒茶素 (catechin)類物質。兒茶素類物質至少具有 134 種，佔茶多酚 (tea polyphenols)總量的 70%，兒茶素是黃烷-3-醇類的衍生物，可分成兩大類：游離型與酯型，前者包括 EC (epicatechin, 表兒茶素)、EGC (epigallocatechin, 表沒食子兒茶素)，後者包括 ECG (epicatechin gallate, 表兒茶素沒食子酸酯)、EGCG (epigallocatechin gallate/epigallocatechin 3-gallate, 表沒食子酸沒食子酸酯)。兒茶素能有效地清除體內的自由基及活性氧分子，而清除的效率取決於兒茶素的結構中氫氧基(OH)的數量，EC、EGC、ECG 及 EGCG 分別有 5、6、7 及 8 個氫氧基，氫氧基愈多，效率就愈高。已經證實茶多酚與促進人體達到保健功效有密切的關係，具有抗氧化或抗發炎之作用且可抑制癌細胞生長(Maeda-Yamamoto et al., 1999; Shankar et al., 2008; C. S. Yang et al., 2011)許多研究都發現 EGCG 具有抑癌的功能，但是對於 ECG 是否也具有抑癌的功能與其機制跟是否會影響上皮間質轉換都還不太清

楚。

EMT (epithelial- mesenchymal transition，上皮-間質細胞轉換)，是指上皮細胞 (epithelial cell)通過特定程序轉換成間質細胞 (mesenchymal cell)的過程，其主要的特徵包括 Epithelial-cadherin (E-cadherin) 表現量下降，Neuronal-cadherin(N-cadherin)表達的上升(de Herreros et al., 2010; Sarkar et al., 2009)，細胞骨架由角蛋白為主轉化為波形蛋白為主，以及形態上由上皮細胞轉化為具有間充質特徵的細胞等。EMT 的發生可藉由一些分子訊號的傳遞(例如：TGF- β 1、Wnt、EGF) 導致轉錄因子活化(Xiong et al., 2014)，像是 Snail-1、Slug、Twist 等。最初 EMT 被定義為胚胎時期與器官發育現象相關。而近年來有許多文獻指出，EMT 參與癌細胞自良性腫瘤變成轉移性癌細胞的過程，被視為主要的癌化指標之一。

腫瘤是指細胞不正常的增生(proliferation)所造成，癌細胞的轉移擴散往往是造成癌症病人病灶復發致死及最難根治的最主要原因，一般而言，癌細胞的轉移擴散必須伴隨著許多生理狀態的改變，其中包含(1). 細胞與細胞外基質 (extracellular matrix, ECM)之間結合能力(adhesion)的改變，細胞與細胞間相互作用力的破壞；(2).細胞的侵襲(invasion)及移動(motility)能力上升；(3). 細胞骨架的重整；(4).癌細胞分泌大量的蛋白酶(proteinase)，例如:matrix metalloproteinases (MMPs)、urokinase plasminogen activator (u-PA)，造成細胞外基質的分解，使癌細胞會穿過細胞外基質；(5).侵入到循環系統中的血管或淋巴管，經由逃避免疫系統的防護，最後貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官；(6).再經由大量的增生及；(7).血管新生(angiogenesis)作用(8)形成新的腫瘤。癌細胞便藉由奪取正常組織器官的養分而造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡(Kim et al., 2001)。

基質金屬蛋白酶屬於分泌型蛋白，以未活化態基質金屬蛋白酶分泌至細胞外，在生物體內基質金屬蛋白酶的活化調節可以受到自己的催化(autocatalysis)或則藉由一些 urokinase plasminogen activator (u-PA)或 tissue-type plasminogen activator (t-PA)二者啟動一連串的水解反應，將 plasminogen 轉變成 plasmin，這些活化的酶例如：plasmin 或是其他基質金屬蛋白酶將未活化態基質金屬蛋白酶轉變成活化態基質金屬蛋白酶(He et al., 1989; Quemener et al., 2007)。

(四)、研究方法：

1. 細胞培養：

(1). 解凍細胞：

先在培養皿中取好含有 10 % FBS 的培養液，將細胞從液態氮中取出，利用 37°C 水浴槽將細胞解凍，之後將細胞倒入培養皿中，放至含有 5 % CO₂，37°C 培養箱中生長。待細胞貼平後，將含有 DMSO 的培養液吸除，加入新鮮含有 10 % FBS 的培養液，放回培養箱中。

(2).繼代培養：

待細胞長至全滿時，先將原有的培養液吸除，再利用 PBS 清洗過一次後加入 0.05% trypsin-EDTA 放回培養箱中，等待 6 分鐘後利用培養液將細胞打下放入離心管中，離心 1000 rpm,5min 並去除上清液，以新鮮的培養液打散細胞，用顯微鏡數完細胞後將細胞加入新的培養皿中繼續培養。

(3).冷凍細胞：

待細胞長至全滿時，先將原有的培養液吸除，再利用 PBS 清洗過一次後加入 0.05% trypsin-EDTA 放回培養箱中，等待 6 分鐘後利用培養液將細胞打下放入離心管中，離心 1000 rpm,5min 並去除上清液，利用 5 ml 含有 10 % DMSO 的培養液打散細胞，並將細胞以每管分裝 1ml 至入冷凍管內。先將冷凍管置入 -20°C,30min 再置入 -80°C 冷凍 16hr，最後將冷凍管移入液態氮內。

2.細胞存活率分析(MTT assay)：

將細胞培養於 24well 中，培養至六至七滿後，分別處理不同濃度的藥物。24 小時後，移除培養基。將 MTT stock solution(5mg/ml)用培養液稀釋成 1 倍的 working solution，1ml/well，放置培養箱中作用 3 小時，待 MTT 進入細胞作用產生紫色結晶。時間結束後，將含有 MTT 的培養基移除，加入 1ml isopropanol 並用分光光度計設定波長 OD563nm，測量其吸光值，可得細胞相對存活率。

3.細胞傷口癒合試驗 (Wound healing assay):

待細胞長到幾乎全滿時用吸管尖在每一個孔中劃線，其距離約為 80 μ m，用 PBS 洗細胞，最後在加入 0.5% FBS 之培養液培養，每 24 hr 觀察及 48 hr 以乙醇固定 Giemsa 染色並照相，以觀察細胞移動情形。

4.2D colony formation assay:

將細胞培養於 6well 中，再分別處理不同濃度的藥物。7-10 天後，將培養液倒掉利用 PBS 清洗過後，用 paraformaldehyde 將細胞固定，最後再利用 giemsa 染色照相，以觀察細胞生長情形。

5.Gelatin-zymography (gelatinase 活性測試):

首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片，取蛋白總量 20 μ g,進行電泳分離。加入 50 ml 的 washing buffer，在室溫下洗 30 分鐘，加入 50 mL 的 reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時。以 staining buffer 染色 30 分鐘，之後再以退色液退染觀看結果。

6. Casein-zymography (u-PA 活性測試):

首先製備 2% casein-12 μ g/ml plasminogen -10 % SDS-PAGE 電泳膠片，取蛋白總量 20 μ g,進行電泳分離。加入 50 ml 的 washing buffer，在室溫下洗 30 分鐘，加入 50 mL 的 reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時。以 staining buffer 染色 30 分鐘，之後再以退色液退染觀看結果。

7. Time course assay:

將細胞培養於 24well 中，培養至六至七滿後，分別處理相同濃度的藥物。

並在 12、24、36 和 48 小時，收取培養液。再利用培養液去跑電泳膠片，觀察 Gelatin-zymography (gelatinase 活性測試)與 Casein-zymography (u-PA 活性測試)。

8. Western blotting:

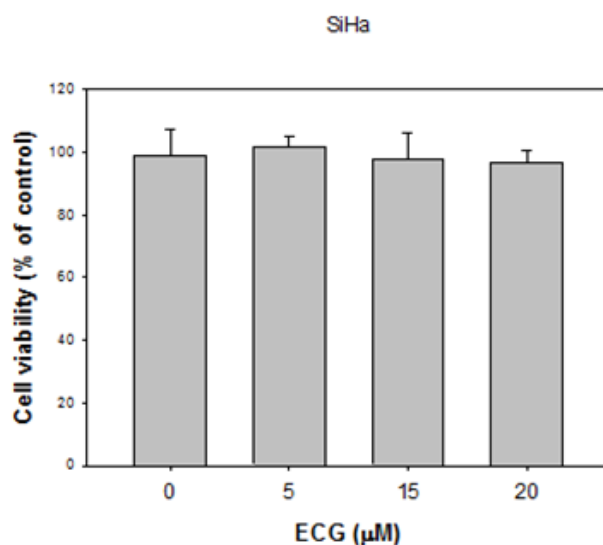
製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，取蛋白總量 20 μ g, denature (95 $^{\circ}$ C，10 min) 之後再 loading 到電泳片中進行電泳分離。進行蛋白轉漬，加入 blocking buffer 一小時，加入一級抗體在 4 $^{\circ}$ C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS+0.05% Tween 20)清洗三次。加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時後以 washing buffer 清洗。最後以 ECL 冷光系統紀錄。

(五)、結果與討論：

首先利用 MTT assay，初步證實 ECG 對於具有高度轉移能力的 SiHa 子宮頸癌細胞隨著不同濃度的增加，經由 24 小時的處理之下不會影響細胞的存活率〈圖一〉。利用 gelatin zymography assay、casein zymography assay 與 gelatin zymography time course assay、casein zymography time course assay，證實 ECG 可抑制 SiHa 子宮頸癌細胞產生的 MMP-2、u-PA 〈圖二〉。

利用 wound healing assay，證實 ECG 可抑制 SiHa 子宮頸癌細胞的移動能力 〈圖三〉。利用 2D colony assay，證實 ECG 隨著不同濃度增加可抑制 SiHa 子宮頸癌細胞的增生 〈圖四〉。

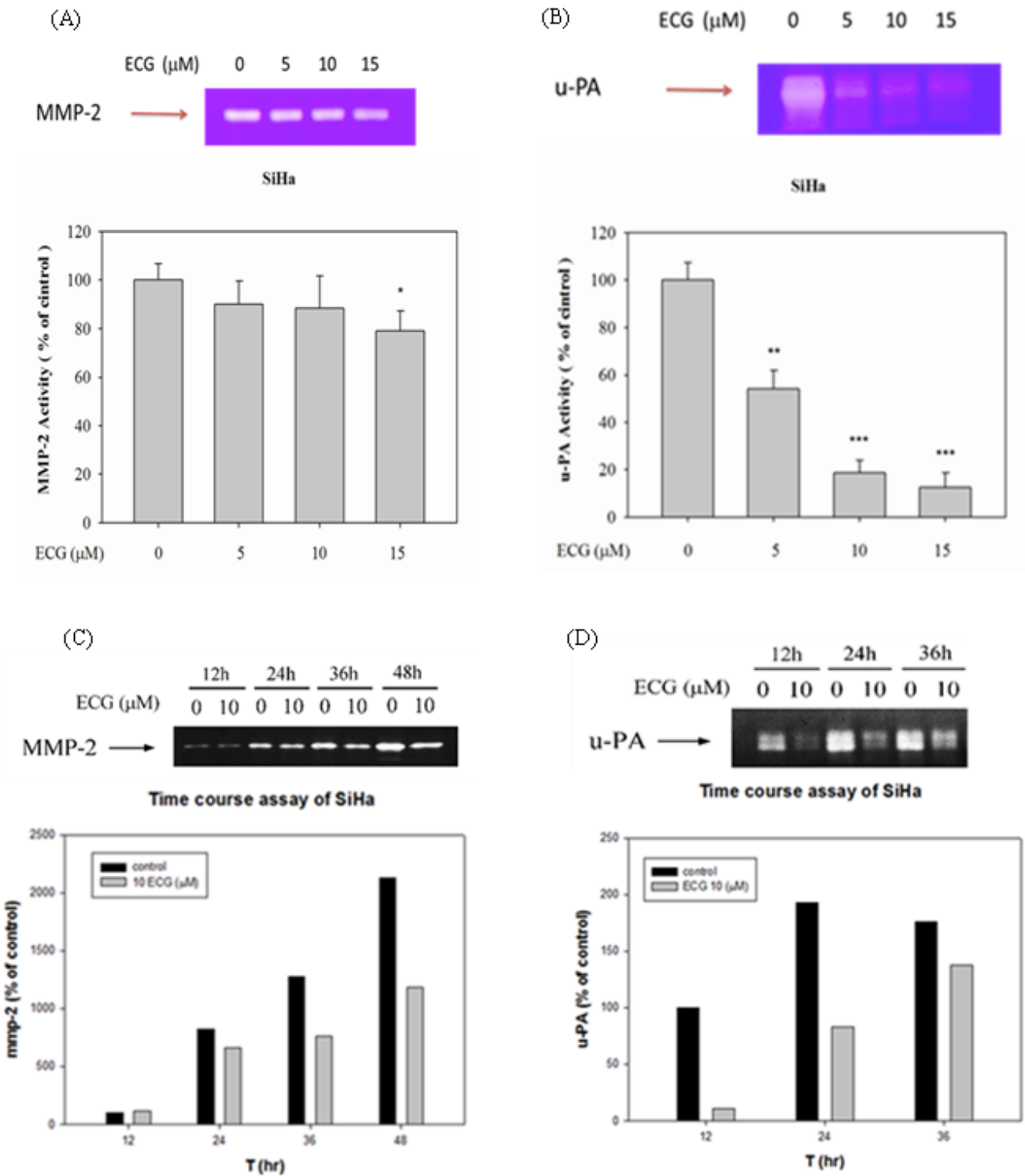
最後利用 western blot 證實 ECG 可抑制由 SiHa 子宮頸癌細胞產生 p-FAK (Tyr 925)、p-FAK (Tyr 397)、t-FAK 的蛋白表現 〈圖五(A)(B)(C)〉。並促進由 SiHa 子宮頸癌細胞產生 TIMP-2 (細胞內 MMP-2 的內生性的抑制劑) 〈圖五(D)〉、E-cadherin (EMT 的 marker) 〈圖五(E)〉的蛋白表現,ECG 可抑制由 SiHa 子宮頸癌細胞產生 MMP-2(與侵襲轉移與 EMT 相關蛋白酶)〈圖五(E)〉fibronectin(EMT 的 marker) 〈圖五(F)〉的蛋白表現，進而反轉上皮間質的轉化(EMT)作用。



〈圖一〉

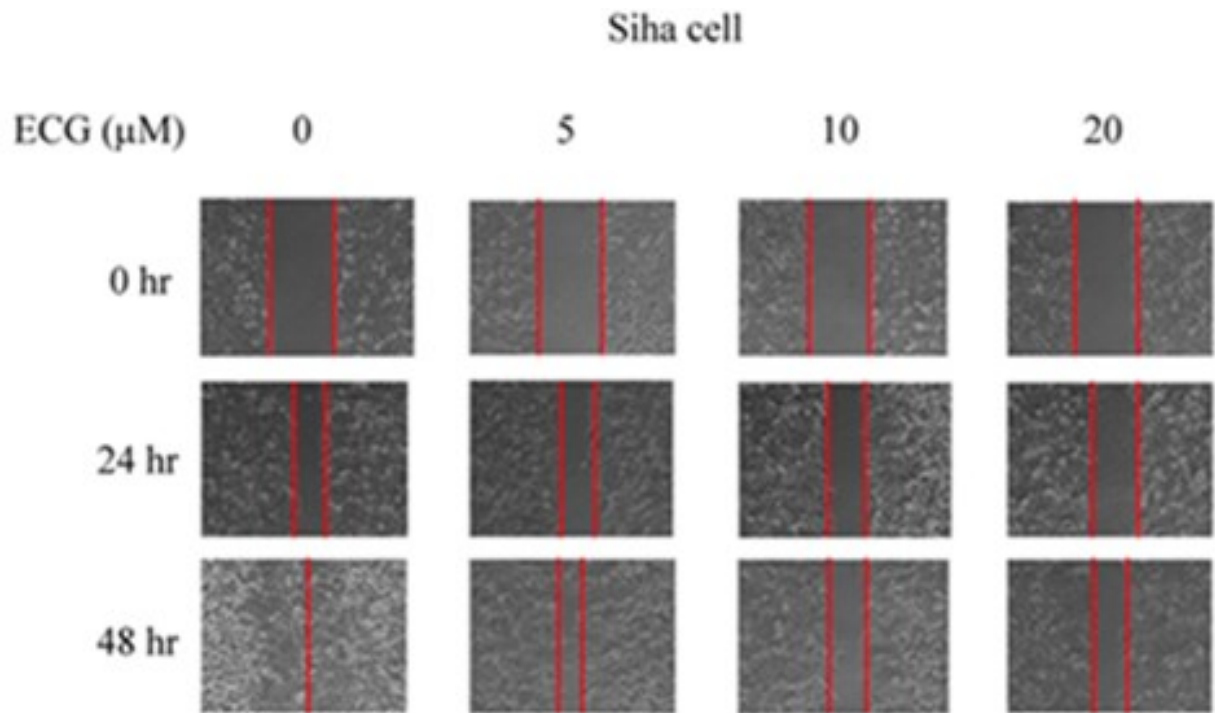
MTT assay 發現 ECG 不具有細胞毒性

癌症是一直是一個很重要的研究領域，在癌症的預防與治療上，大多著重於抑制癌細胞的不正常生長與轉移。而子宮頸癌是女性常見的惡性腫瘤之一，主要的治療方式是以手術和放射線治療為主，但治療的效果有限，即使腫瘤經由手術切除、化學治療與放射治療，依舊難以根治。因此尋找毒性低且更有效率的抗癌藥物是目前主要的研究方向。先前的文獻主要是以 EGCG(表沒食子酸沒食子酸酯)來處理癌細胞，發現 EGCG 能的抑制攝護腺癌、乳癌、卵巢癌、大腸癌、黑色素瘤、皮膚癌、口腔癌、淋巴癌、肺癌、骨癌、胰臟癌、膽管癌及子宮頸癌等。雖然其作用的機制尚未完全被了解，但其主要是藉由抑制癌細胞快速生長需要的酵素和蛋白質，也能抑制癌症擴散轉移很重要的血管增生(angiogenesis)。本實驗想要得知是否 ECG (表兒茶素沒食子酸酯)對癌細胞也具有相同的功效，因此利用 ECG 來處理 SiHa 子宮頸癌細胞，發現 ECG 對細胞不會產生毒殺性且可以有效抑制子宮頸癌細胞的生長與移動能力，並且抑制細胞產生上皮間質的轉化蛋白、fibronectin 蛋白表現與抑制基質金屬蛋白水解酵素活化，本實驗目前只操作細胞實驗階段，往後會繼續往實驗動物階段操作，更進一步的研究 ECG 對活體是否也具有相同的作用或其他的影響。



〈圖二〉

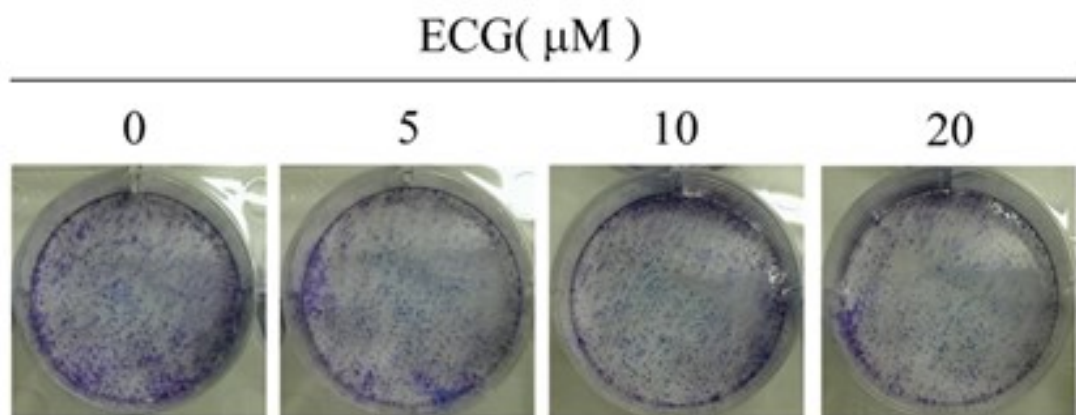
(A) gelatin zymography assay 發現 ECG 可抑制細胞產生的 MMP-2，下圖為其量化圖(*, $P < 0.05$)。(B) casein zymography assay 發現 ECG 可抑制細胞產生的 u-PA，下圖為其量化圖(*, $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。(C) gelatin zymography time course assay 發現 ECG 可抑制細胞產生的 MMP-2，下圖為其量化圖。(D) casein zymography time course assay 發現 ECG 可抑制細胞產生的 u-PA，下圖為其量化圖。



〈圖三〉

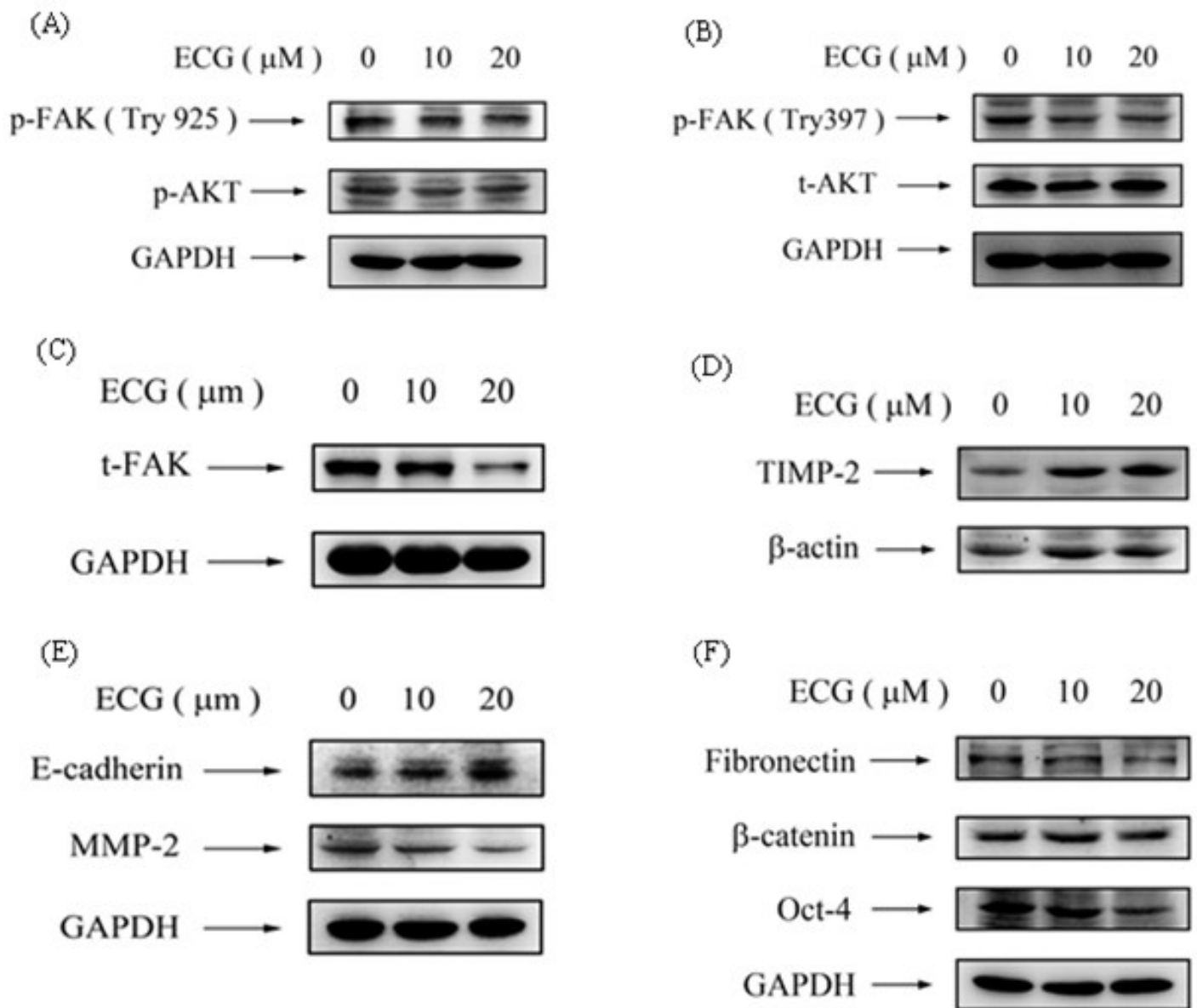
Wound healing assay 發現 ECG 具有抑制細胞移動的能力

SiHa Cell



〈圖三〉

2D colony assay 發現 ECG 會抑制細胞增生

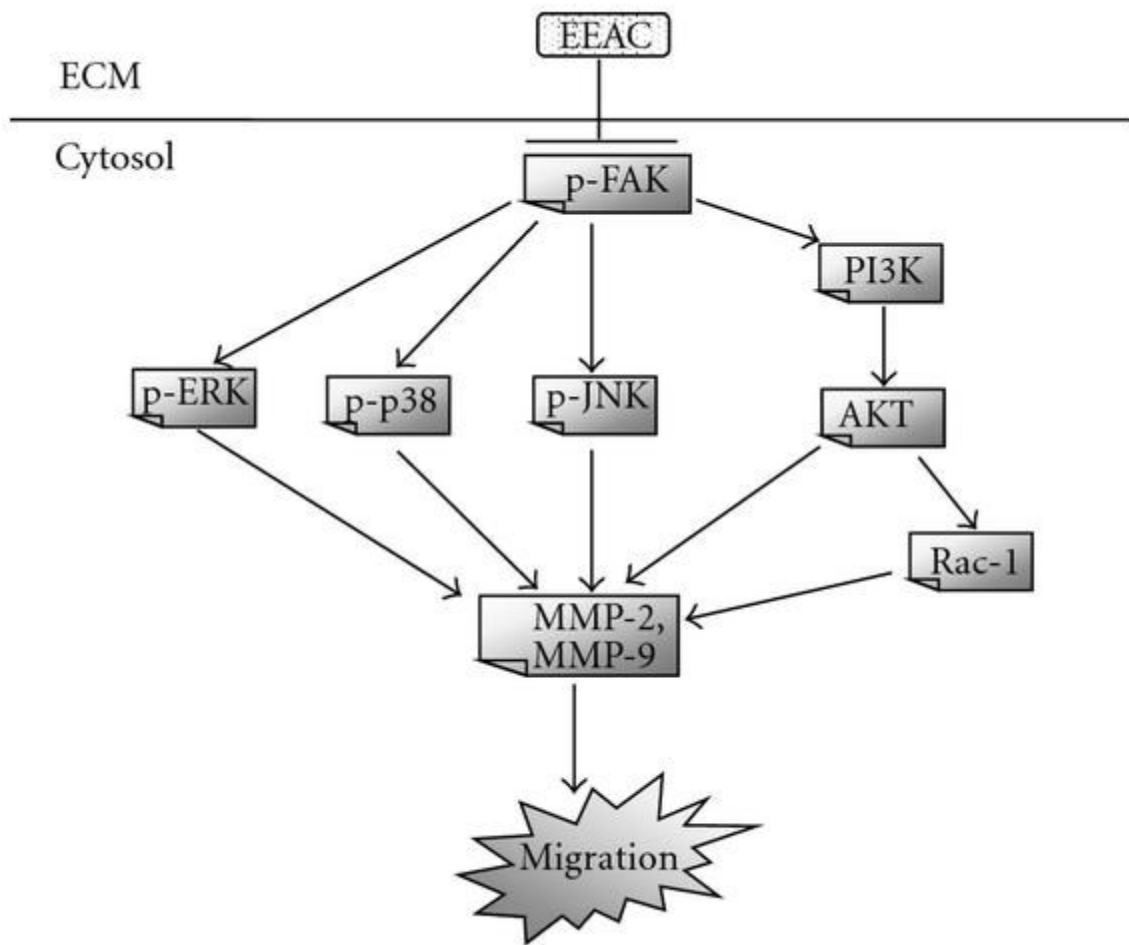


〈圖五〉

western blot 証實 ECG 可抑制細胞產生(A) p-FAK (Tyr 925)、(B) p-FAK (Tyr397)、(C)t-FAK、(E)MMP-2(EMT 相關支蛋白酶)、(F)fibronectin(EMT 的 marker)的蛋白表現：促進細胞產生(D)TIMP-2、(E)E-cadherin(EMT 的 marker)的蛋白表現。

三、參考文獻：

- Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Tahara, N., Tsuji, K., Hara, Y., Isemura, M., 1999. Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem*, 47, 2350-2354.
- de Herreros, A.G., Peiro, S., Nassour, M., Savagner, P., 2010. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 135-147.
- Xiong, L., Wen, Y., Miao, X., Yang, Z., 2014. NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res*, 355, 365-374.
- Kim, D., Kim, S., Koh, H., Yoon, S.O., Chung, A.S., Cho, K.S., Chung, J., 2001. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*, 15, 1953-1962.
- Quemener, C., Gabison, E.E., Naimi, B., Lescaille, G., Bougatef, F., Podgorniak, M.P., Labarchede, G., Lebbe, C., Calvo, F., Menashi, S., Mourah, S., 2007. Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. *Cancer Res*, 67, 9-15.
- Chen YY1, Chou PY, Chien YC, Wu CH, Wu TS, Sheu MJ. ., 2012. Ethanol extracts of fruiting bodies of *Antrodia cinnamomea* exhibit anti-migration action in human adenocarcinoma CL1-0 cells through the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Phytomedicine*, 19,768-78.



〈附圖一〉 FAK-AKT signaling pathway(chen et al., 2012)