

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : Thymoquinone 透過調控上皮-間質相互轉換特性作為 *
* 名稱 : 抑制子宮頸癌轉移及化學輔助性療法之研究 *
* ***** *

執行計畫學生：周巧玲

學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-013-B

研究期間：102年07月01日至103年02月28日止，計8個月

指導教授：陳霽霓

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：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

中華民國

103年04月01日

行政院國家科學委員會補助

大專學生研究計畫研究成果報

計畫名稱: **Thymoquinone 透過調控上皮-間質相互轉換特性作為
抑制子宮頸癌轉移及化學輔助性療法之研究**

Thymoquinone regulates through epithelial-mesenchymal
transition to suppress metastasis with adjuvant chemotherapy
in Cervical Cancer

執行計畫學生：周巧玲

學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-013-B

研究期間：102年7月1日至103年2月底止,計8個月

指導教授：陳霽霓

處理方式(請勾選)：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：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University

中華民國

102年

2月

28日

目錄

中文摘要.....	3
前言.....	4
文獻回顧與討論.....	5
實驗材料與方法.....	8
實驗方法.....	17
實驗結果.....	20
討論.....	23
圖表與圖表討論.....	24

中文摘要

在臨床上顯示，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，故若能有效抑制癌細胞的轉移及入侵，將可大幅減低癌症的死亡率。上皮間質的轉化(epithelial-mesenchymal transition; EMT)是上皮細胞腫瘤癌化時造成侵襲(invasion)和轉移(metastasis)的關鍵。有許多文獻指出在具有高度惡性轉移能力的腫瘤細胞與癌症幹細胞中，發現其皆具有 EMT 特性的現象。因此，發展新穎天然藥物來當作癌症預防或是治療藥物是目前最重要的課題。本實驗室初步分析研究結果發現百里醌(thymoquinone; TQ)能明顯抑制人類子宮頸癌細胞(SiHa)的增生能力，並抑制癌細胞之移動(migration)能力，並降低由 TGF- β (促進癌細胞 EMT 的重要因子)所誘導上升 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)的活性。從 invasion assay 實驗中證實在 thymoquinone 的處理下，降低人類子宮頸癌細胞(SiHa)受到 TGF- β 所誘導上升的侵襲能力。從免疫螢光染色實驗中證實，在 thymoquinone 處理下，可使人類子宮頸癌細胞(SiHa)維持在 epithelial phenotype。從 Western blot 中證實，在 thymoquinone 處理下，N-cadherin(mesenchymal marker)蛋白表現降低、E-cadherin(epithelial marker)蛋白表現上升，p-paxillin(Tyr118)、p-paxillin(Ser178)、p-FAK(Tyr397)、p-FAK(Tyr925)蛋白表現下降，而 transcription factors sip-1、snail-1、slug 蛋白表現下降。從動物實驗中證實，thymoquinone 明顯抑制了人類子宮頸癌細胞(SiHa)轉移到肺部的情形。

關鍵字： 癌症轉移、上皮間質轉化、子宮頸癌、細胞侵襲

前言

上網從衛生署統計報告發現，台灣每年有 2000 例新增的子宮頸癌患者，大約有 950 人因為子宮頸癌而過世。而有 80% 發現得病時已經是侵犯性的子宮頸癌。由於現在大力的推廣子宮頸癌抹片篩檢，子宮頸癌的死亡率已漸漸的有逐年下降的趨勢。婦癌中心的統計資料顯示出子宮頸原位癌數目已經是侵犯性子宮頸癌的 2 倍，而且有一年一年增加的趨勢。子宮頸癌發生的原因和第一次性經驗年齡過早、多位性伴侶、性傳染病史、抽煙的婦女以及免疫系統的缺陷有關係（如愛滋病患或帶原者）、高危險群人類乳突病毒感染。常見的症狀像是不正常的陰道出血、兩次月經中間有不正常的出血、性行為之後陰道出血，也有一些人會分泌物變多。子宮頸癌轉移的途徑是經由血液和淋巴的轉移，會擴散到骨盆腔、腎臟、膀胱、直腸，較遠的轉移則包括肺臟、肝臟、骨骼、大腦等等。對於子宮頸癌來說，是個非常適合篩檢的癌症，它的癌症前期階段相當的長，是有足夠時間去充分篩檢的，如果定期去做子宮抹片檢查的話，其治癒率其實並不會很低。但是和國外篩檢率高達百分之七十到八十相比，台灣婦女的篩檢率卻只有在百分之二十五到三十五之間，很明顯顯示出台灣婦女接受篩檢比率偏低，而通常藥物治療對晚期病灶的治療效果並不是很高，但是藥物及放射治療共同使用是被肯定的治療方法，治療效比單獨使用放射線的效果還要好很多，且活率也比較高，所以找尋更有效用的藥物去配合物理性治療是重要的。Thymoquinone (TQ)，是來自黑種草油 (*Nigella sativa*) 種籽的部份，黑種草油本身含有微量的精油成份在裡頭，主要是酚類結構-百里香醌 Thymoquinone，路易斯安那州紐奧良市杜蘭大學醫學院的研究人員證明了-百里香醌 是可以抑制一些高度惡化的前列腺癌 (PCa) 細胞株在 *in vitro* 的生長的。從以上資料指出 Thymoquinone 在前列腺癌細胞株中有抑制效果，但其作用途徑並不清楚。故在此計畫中，使用 Thymoquinone 藥物看其對子宮頸癌 (SiHa) 細胞株是否有一定的抑制效果，並觀察其調控路徑為何。

文獻回顧與探討

【1】子宮頸癌

子宮頸癌大部份都是經由人類乳突病毒(HIV)所引起，當病毒侵入子宮頸表皮後，會使子宮頸表皮細胞形成癌前病變，初期病患並無症狀，需經由抹片檢查來篩選出這種癌前病變。前病變治癒率幾乎可以達到百分之一百。如果癌前病變沒有接受子宮頸圓錐狀切除手術的治療，經過 5 到 10 年會演變成子宮頸癌。子宮頸癌轉移常見部位是經由血液及淋巴轉移，會擴散到骨盆腔、腎臟、膀胱、直腸，遠端轉移則包括肺臟、肝臟、骨骼、或腦等。子宮頸上皮內贅瘤(cervical intraepithelial neoplasia ; CIN)是一種癌前病變，此種病變有可能進展成侵入性的癌。當子宮頸上皮層分裂和不成熟細胞只佔未超過子宮頸上皮組織下三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤第一期(CIN 1)；若佔未超過上皮組織中三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤第二期(CIN 2)，已至上三分之一時，則稱為子宮頸上皮內贅瘤第三期(CIN 3)¹³。在 Bethesda 分類系統裡，低度子宮頸鱗狀上皮內病變(LSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤第一期(CIN 1) (mild dysplasia)，而高度子宮頸鱗狀上皮內病變(HSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤第二期(CIN 2) (moderate dysplasia) 和子宮頸上皮內贅瘤第三期(CIN 3) [包括重度化生不良(severe dysplasia) 和鱗狀上皮細胞原位癌]。大部份子宮頸上皮內贅瘤 CIN 1 都會消退，然而有些子宮頸上皮內贅瘤 CIN 2 和 CIN 3 則會持續或進展下去。而也有證據顯示罹患 CIN2 及 CIN3 的時間越長，子宮頸上皮內贅瘤的惡化程度及轉變成子宮頸癌的比例就愈高¹³。本實驗選取兩株具高危險型 HPV：SiHa (human cervical epithelial of squamous cell carcinoma ; HPV16)及 HeLa (human cervical adenocarcinoma ; HPV18)，在處理百里醜與是否可以有效的抑制人類子宮頸癌侵入能力、移動性、EMT 及血管新生作用，並進一步探討其分子機轉。

【2】癌症的轉移及腫瘤生成

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¹²。

【3】上皮細胞的上皮-間質轉化 (epithelial- mesenchymal transition, EMT)

細胞 EMT 是指從上皮細胞型態(epithelial cell)轉變成間葉細胞(mesenchymal cell)型態的一種特殊過程，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，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-1、Wnt、EGF)導致轉錄因子活化，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。已有許多文獻指出在具有高度惡性轉移能力的癌細胞與癌症幹細胞中，發現其皆具有 EMT 的現象²⁰。當 EMT 發生時，細胞間的連接會消失包括 adherens junctions 和 desmosomes，細胞骨架會重組，基質會被溶解，上皮細胞塑性的特徵 E-cadherin、 α -catenin、 β -catenin 表現量會降低，間葉細胞塑性特徵 N-cadherin、Fibronectin、Vimentin 表現量會增加，這種變換使腫瘤細胞喪失細胞與細胞間連接，促使癌細胞侵襲與轉移^{7, 14}。癌細胞在轉移的過程中，會變得更具侵犯力和移行力，進而遠端轉移，轉移的癌細胞會與原位腫瘤脫離細胞間的連結，也會由原本上皮細胞 (epithelial cell) 表面的分子標記細胞特質轉換成間葉細胞 (mesenchymal cell) 的型態，這現象稱為 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)。此轉換過程會導致細胞間的連接消失，細胞骨架重組以及上皮細胞特徵 Epithelial-cadherin (E-cadherin) 表現量下降，Neuronal-cadherin (N-cadherin) 表現量上升⁴。EMT 過程是由細胞外信號所引發，如膠原蛋白分子之間的相互作用和生長因子，包括轉型生長因子- β (TGF- β)，纖維細胞生長因子 (FGF)，表皮生長因子 (EGF) 和血小板衍生的生長因子 (PDGF) A, B 和 D^{1, 8, 15, 18}。在另一項研究指出，PC3 細胞藉由 ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) 調控 IGF-1 活化 EMT 的表現¹⁰。這些結果顯示 EMT 有助於腫瘤細胞的侵犯。然而相對應於原發性腫瘤的病理機制¹¹，間葉-上皮轉換 (MET) 具有間葉型態的轉移性腫瘤細胞被認為是進行反向的轉換，為腫瘤遠端轉移的關鍵。最近的研究顯示，具有轉移能力的原發性結腸癌細胞呈現混合性上皮間葉細胞的型態⁵。膀胱癌 TSU-PR1 (T24) 系列的細胞株在體內實驗過程發現，細胞透過全身循環增加轉移的能力⁶。在前列腺癌，Yates 等人將高度惡性且具有轉移至骨頭能力的前列腺癌細胞株與肝細胞進行共培養，發現 E-cadherin 的表現量上升¹⁹。因此，前列腺癌的患者很有可能從原發部位透過 EMT 轉移到遠端，並表現 MET 的特性，(如從 PC3 和 DU145 細胞，分別最初轉移至骨和腦)¹¹。

【4】、百里醌(Thymoquinone)的抗癌與相關研究

Thymoquinone (百里醌、瑞香草醌)是一種從植物萃取出來的化合物，是從廣泛生長於地中海、中歐、西亞等地的果黑種草(*Nigella sativa*)種籽萃取物中所發現。果黑種草種籽又名黑色茴香(Kalonji)，是回教醫學中一種的常用藥材，可以驅風止痛、補腎健腦、利尿、發汗、健胃、治療哮喘等，具有很高

的藥用價值，研究中還指出果黑種草種籽在降脂、降糖等多方面也具有一定功效，而 thymoquinone 即為果黑種草種籽中的主要成分。近年來，西方的醫學研究中也發現 thymoquinone 也具有許多特殊的功效，如：抗口腔細菌、抗氧化、抗發炎¹⁶和防止腐敗的能力。動物實驗中發現 thymoquinone 則能提升疼痛耐受性、抗癲癇和保護大鼠腦部海馬迴神經元不受缺氧傷害²。而在癌症治療方面的研究上，thymoquinone 則可以降低處理抗癌藥物 cisplatin 和 doxorubicin 時對於心臟、肝臟和腎臟所造成的毒性傷害³並且也擁有抗前胃癌、腸癌⁹、乳癌¹⁷等腫瘤以及抑制前列腺癌生長的能力。2008 年的實驗中則發現，thymoquinone 可抑制 histone deacetylase (HDAC) 的活性，並顯示具有殺死胰臟癌細胞株的能力，而 p53、Bax、bcl-2 和 p21 基因都會受到 thymoquinone 的處理而變化。

Preliminary Studies

由之前文獻已知 thymoquinone 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 thymoquinone 對於子宮頸癌細胞的轉移及 TGF- β 所誘導 EMT 等作用相關機制探討的能力。本研究的主要目標在釐清 thymoquinone 對子宮頸癌細胞的影響並加以探討影響的層次。

本實驗室初步實驗已證實 thymoquinone (TQ) 可抑制子宮頸癌細胞 (SiHa) 的移動能力；thymoquinone (TQ) 也可抑制由 TGF- β 所誘導癌細胞產生的 MMP-2。

實驗材料與方法

一. 藥品試劑

聯工化學試藥公司	<ol style="list-style-type: none"> 1. Triton X-100、 2. Methanol、 3. Acetic acid、 4. Phenol 5. Formaldehyde 6. Potassium chloride
景明化工股份有限公司	<ol style="list-style-type: none"> 1. Acetic acid glacial
AbD seroTec	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mycoplasma removal agent
abcam	<ol style="list-style-type: none"> 1. Phosppho-p38
AbIO	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tween-20
BD	<ol style="list-style-type: none"> 1. E-cadherin 2. PI3K 3. β-catemin 4. E-cadherin 5. phospho-FAK (Tyr397) 6. NF-κB 7. Matrigel basement membrane matrix
Biosource	<ol style="list-style-type: none"> 1. total-p38
Cell Signaling	<ol style="list-style-type: none"> 1. c-Jun 2. c-Fos 3. phospho-Src 4. phospho-FAK (Tyr925)

	<ol style="list-style-type: none"> 5. total GSK3 6. phospho- GSK3 7. β-catenin 8. ZEB1 9. ZO-1
Fermentas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prestained protein ladder
Gene Tex	<ol style="list-style-type: none"> 1. Twist
Gibco-BRL	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fetal bovine serum (FBS) 2. F12K medium 3. Trypsin-EDTA 4. DMEM medium powder 5. Trypan Blue stain (0.4%)
Halocarbon	<ol style="list-style-type: none"> 1. Isoflurane, USP
Invitrogen	<ol style="list-style-type: none"> 1. total-Akt 2. phospho-Akt 3. phospho-ERK1/2 4. total-ERK1/2
Merck	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 2. SDS 3. Glycine 4. Glycerol 5. Natriumhydrogenphosphate
Millipore	<ol style="list-style-type: none"> 1. Total-paxillin 2. Phospho-paxillin(Y118) 3. Phospho-paxillin(S178) 4. Slug
plus one	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bromophenol Blue
Santa Cruz	<ol style="list-style-type: none"> 1. β-actin

	<ol style="list-style-type: none"> 2. total-FAK 3. N-cadherin 4. Vimentin 5. GAPDH 6. C23 7. Histone-H1 8. Snail
Sigma	<ol style="list-style-type: none"> 1. Acrylamide 2. N,N-methylene-bis-acrylamide 3. Calcium chloride 4. Bovine serum albumin 5. gelatin 6. β-mercaptoethanol 7. N,N,N',N',-tetramethyl- ethylenediamine 8. Sodium chloride 9. Giemsa 10. Sodium pyruvate 11. paraformaldehyde
SouthernBiotech	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dapi Fluoromount-G
Stressgen	<ol style="list-style-type: none"> 1. Total-Src
TLDIA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Triton X-100
T-Pro Biotechnology	<ol style="list-style-type: none"> 1. Western blot Stripping buffer
USB	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ammonium persulphate 2. Sodium bicarbonate 3. Sodium dodecyl sulfate 4. Sodium azide 5. Phenylmethyl sulfonyl fluoride

	6. Coomassie brilliant blue R-250 7. Amido Black 8. HEPES 9. L-Glutamine 10. MTT 11. ammonium persulfate 12. Penicillin G Sodium 13. Streptomycin Sulfate 14. Tris
--	--

二. 實驗設備

英文名稱 (中文名稱)	廠牌 (型號)
Boyden chamber	Neuro Probe
Centrifuge (離心管離心機)	KU130TA 2420
Chamber slide	Lab-TekII
CO ₂ incubator (二氧化碳培養箱)	Themol (Model 310)
chamber slide (8 well glass slide)	Lab-Tek II
Confocal(倒立型雷射掃描共軛焦顯微鏡)	ZEISS (LSM 510 META)
Dry bath incubator (乾式加熱器)	Fisher Scientific
Dry bath incubator (乾式加熱器)	MULTI-BLOK
Electrophoresis documentation and analysis system 120(13cm×17cm)(電泳分析系統)	Kodak
Fast photon Luminometer(快速光子冷光儀)	Tropix(TR717)
High-performance Liquid Chromatography(高壓液相層析儀)	Waters HPLC(600 pump/2484 UV、visble Detector

High-speed Micro Centrifuge (高速離心機)	Hitachi (CF15RX)
Horizontal gel electrophoresis apparatus (水平式電泳槽)	Cosmo (Mupid-2)
Hybridization oven (雜交烘箱)	(OH-800)
HPLC pump	waters 600
HPLC UV/Visible detector	waters 2489
HPLC controller	waters 600
HPLC In-Line Degasser AF	waters AF
Heat stir 加熱攪拌器	CORNING (PC420D)
ImageQuant LAS 4000 mini(冷光儀)	GE
Inverted microscope (倒立顯微鏡)	EVOS AMG
Inverted microscope (倒立顯微鏡)	OLYMPUS (CKX41)
IVIS(活體光學影像攝影系統)	Caliper Lumina II
Laminar flow (無菌無塵操作台)	NUAIR (type A/B3)
Luminescence/Fluorescence Imaging System (冷光 呈色系統)	FUJIFILM (LAS-400)
Micro Centrifuge (微量離心機)	Eppendorf (5415D)
Microscope Cover glasses (顯微鏡蓋玻片)	Deckgläser
Sartorius stedim (離心機)	biotech
Orbital shaker (水平震盪器)	TKS (OS701)
Power supply (電源供應器)	Bio-Rad (Model 200/2.0)
pH meter (酸鹼度計)	Jenco microcomputer
Precision balance (精密天秤)	AND GX-1000
Precision balance (精密天秤)	Precisa 180A

Shaker (振盪器)	TKS RS01
Spectrophotometer (分光光度計)	HITACHI (U-1900)
Stericup & steritop	Millipore
Syringe with needle (針筒包含針頭)	TERUMO
Thermal cycler (聚合酶鏈反應器)	Applied Biosystems
Vertical gel electrophoresis apparatus (直立式電泳槽)	OWL P-1
Vortex (振盪器)	Genie SI-2
Vortex (振盪器)	Spire mixer 5100
Water bath (恆溫水浴槽)	Firstek Scientific B205 TKS WB201

三. 緩衝液及溶液

1. SDS-PAGE 製備: separating gel (12 mL)

SDS-PAGE 的下層膠依實驗需求分為 10%及 12.5%兩種 acrylamide 濃度。配置下層膠時，將 4.2 mL 的 dH₂O 加上 4.1 mL acrylamide (30% acrylamide-0.8% N, N' methylene-bis-acrylamide)、3 mL 的 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)及 0.6 mL ammonium persulfate (10 mg/mL)及 120 μ L 10%的 SDS 後，混合均勻，最後再加入 10 μ L TEMED，再次混合均勻並快速注入架好的直立式膠台座中約三分之二的位罝，再以水填滿膠台，靜置約 40 分鐘待下層膠凝固。

2. 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE (substrate SDS-PAGE)製備: separating gel (12 mL)

Substrate SDS-PAGE 與一般 SDS-PAGE 不同處在於 bis - acrylamide 的濃度提高至 1.2%，與多加入了明膠(gelatin)。配置下層膠時，將 4.5 mL 的 ddH₂O 加上 3.25 mL acrylamide (30% acrylamide-1.2% N, N' methylene-bis-acrylamide)、3 mL 的 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.6 mL ammonium persulfate (10 mg/mL)、0.6 mL gelatin (2%)及 120 μ L 10%的 SDS 後，混合均勻，最後再加入 10 μ L TEMED，再次混合均勻並快速注入架好的直立式膠台座中約三分之二的位置，再以水填滿膠台，靜置約 40 分鐘待下層膠凝固。

3. 4% stacking gel 製備 (5mL)

上層膠的 acrylamide 濃度較低，主要目的為樣本聚集之用。而 SDS-PAGE 與 substrate SDS-PAGE 的差別在於 bis-acrylamide 的濃度，前者濃度為 0.8%，後者則為 1.2%。配置上層膠時，首先加入 2.7 mL ddH₂O、0.7 mL acrylamide、1.3 mL Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 6.8)、0.25 mL ammonium persulfate (10 mg/mL)及 50 μ L 10% SDS，混合均勻後，再加入 10 μ L TEMED 混和完畢，倒入膠台中並插上 comb。插入 comb 時，需注意是否有氣泡產生，靜置約 40 分鐘待上層膠凝固。

4. Running buffer 製備 (1000 mL)

秤量 3.0 g tris-base 及 14.7 g glycine，倒入已盛裝好 900 mL ddH₂O 的量桶，溶解後，再加入 10 mL 10% SDS，最後補水至 1000 mL 並攪拌均勻。

5. Zymography washing buffer 製備(Triton X-100 (2.5%) 4000 mL)

先以 5 L 的量筒取 3000 mL 的 ddH₂O，放入 stir bar 攪拌，接著用量筒取 100 mL 的 Triton X-100 慢慢地加入 3000 mL 的 ddH₂O 中，以免 Triton X-100 沉澱在量桶底部，最後則利用剩餘的水沖洗盛裝 Triton X-100 之量桶，並倒入 5 L 量桶中補體積至 4000 mL。

6. Zymography reactivation buffer 製備

預先分別配製高濃度的 2 M Tris-HCl、pH 8.0、1 M CaCl₂及 1% NaN₃溶液，置於 4°C 冰箱備用。在使用時，取 1 mL 的 2 M Tris-HCl、pH 8.0、0.5 mL 的 1 M CaCl₂及 0.5 mL 的 1% NaN₃，使其最終濃度

為 Tris-HCl 40 mM, CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0.01%, 最後補水至 50 mL 並混合均勻備用。

7. Staining solution 製備 (500 mL)

秤量 1.25 g Coomassie brilliant blue R-250 及 0.5 g amido black, 倒入已盛裝好 227 mL 的甲醇的量桶。溶解後, 再加入 46 mL 的冰醋酸, 而此過程需在冰浴中進行。最後再加入 227 mL 的 dH₂O 混合均勻, 置於室溫備用。

8. Destaining solution 製備 (1000 mL)

首先加入 50 mL 的甲醇加入 875 mL 的 dH₂O 混合均勻, 再加入 75 mL 的醋酸配製成含有 5% 甲醇及 7.5% 醋酸的褪色液。

9. Transfer buffer 製備 (4000 mL)

秤量 6 g 的 Tris-base 和 28.6 g 的 glycine, 倒入已盛裝 3200 mL dH₂O 的量桶, 溶解後再加入 800 mL 的甲醇。存放 4 °C 備用。

10. TBS buffer (pH 7.4) 製備 (1000 mL)

秤量 1.33 g Tris-base 以及 9 g NaCl, 倒入已盛裝好 900 mL ddH₂O 的量桶。溶解後使用 6 N HCl 滴定至 pH 值等於 7.4, 再補 ddH₂O 至 1000 mL。

11. Washing buffer 製備 (TBST; pH 7.4)

量取 2000 mL TBS buffer 後, 利用 pipetman 緩慢地吸取 1 mL 的 Tween-20。由於 Tween20 具有濃稠的性質, 故需一邊攪拌一邊加入。

12. Blocking buffer 配置 (50 mL)

Blocking buffer 為 5% 的脫脂奶粉。先秤 2.5 g 的脫脂奶粉 (安佳脫脂奶粉), 加入 50 mL 的 TBS-T

buffer 中溶解。

13. TD buffer 製備 (10 ml)

取 1 M 的 $MgCl_2$ 20 μ L 再取 1 M 的 Tris-HCl pH 8.0 250 μ L 於 10 mL 量筒中，最後補 ddH₂O 到 10 mL，即可。

14. BL buffer 製備 (10 ml)

取 1 M 的 LiCl 20 μ L 再取 1 M 的 Tris-HCl pH 8.0 100 μ L，再加入 2 mL 的 100% Glycerol 於 10 mL 量筒中，最後補 ddH₂O 到 10 mL，即可

15. Lysis buffer 製備 (1 mL)

實驗前，取 1 mL (依實驗需求改變) RIPA buffer 或 TD、BL buffer，加入 10 μ L PMSF (1 mM)、10 μ L Na_3VO_4 (1 mM) 及 2 μ L leupeptin (1 mM)，混和後置於冰上備用。

實驗方法

1. 細胞培養 (cell culture)

解凍細胞 (thaw cell)

在無菌操作台裡，使用 10 cm 培養皿盛裝好 10 mL DEME 培養液(內含 10% 胎牛血及 1% penicillin / streptomycin)備用。由液態氮桶中取出 SiHa 細胞株的冷凍管，立即使用 37 °C 水浴槽解凍，解凍後利用 pipetman 吸取細胞液至已準備好的 10 cm 培養皿。放入 37 °C 含 5% CO₂ 的培養箱中 8 至 12 小時，待細胞貼附後更換新鮮的培養液，再放回培養箱中培養。

繼代培養(subculture)

當細胞長滿後，將舊的培養液吸除，利用 10 mL PBS 清洗兩次。接著加入 1 mL 0.05% trypsin-EDTA，並使之覆蓋所有細胞。放入培養箱中五至十分鐘，並輕輕拍打培養皿幫助細胞能完全脫離培養皿。加入 9 mL 培養液制抑 trypsin 活性，經 1000 rpm 離心 5 分鐘後，去除上清液，以新鮮的培養液將細胞打散並繼續培養之。

冷凍細胞(freeze cell)

利用與繼代培養相同的方法將細胞打下後，用 3 mL 冷凍細胞培養液(7%DMSO 溶於細胞培養液，混合後以 0.2 μ m 針筒過濾器過濾，等待其降至常溫後使用)沖散離心後的 pellet，以每個冷凍管 1 mL 將細胞移到冷凍管中，再將冷凍管置於 -20 °C 冷凍 30 分鐘，置於 -80 °C 冷凍 16 小時，最後將冷凍管移至液態氮桶內。

2. 西方點墨法 (Western blot)

i. 細胞溶解物之製備 (produce cell lysate)-核質分離

將培養皿內的培養液吸取後，以 PBS 沖洗兩次，刮取細胞並加入 TD buffer、蛋白酵素抑制劑以及界面活性劑 NP-40，在 4°C 下刮振兩次每次間格 10 分鐘。在 4°C 下，以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液加入 Glycerol 並存於 -20°C (質蛋白)。再將沉澱物加入 BL buffer 以及蛋白酵素抑制劑，在 4°C 下振盪 1 小時，破除細胞核膜後，在 4°C 下，以 12000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上清液存於 -20°C (核蛋白)。

ii. 蛋白質之定量

蛋白質的定量是利用 Bradford protein assay 方法，此方法的原理是 Coomassie brilliant blue G-250 可與蛋白質形成藍色複合物，蛋白質越多則顏色越深，最後以分光光度計 (波長：595 nm) 偵測。先以一系列已知濃度 BSA (1.6、3.2、4.8、6.4、8.0、9.6、11.2、12.8 g/mL) 的蛋白溶液，加入 200 μ L 的 Bradford protein dye，再以 ddH₂O 補體積到 1 mL，偵測吸光質並畫出標準曲線。接者以同樣的方法配置未知濃度的蛋白溶液，利用吸光質與標準曲線及內插法的方式算出蛋白濃度。

iii. 樣品的製備與電泳

取等量的蛋白質樣品，加入含有 β -MSH 的 5 倍濃度染劑混和均勻。在 95 °C 下加熱 5 分鐘後，置於 4 °C 的碎冰中 3 分鐘，經過快速離心後，將樣品注入 SDS-PAGE 電泳膠內，接者分別以 100 V 做 stacking 與 140 V spreading 的動作，以電源供應器提供電壓進行電泳分分離。

iv. 電泳膠片的轉漬與 blocking

將 NC paper 置於 transfer buffer 中浸潤 5 分鐘，再將膠片放置於 NC paper 上。在 4°C 下，以 100 V 電壓進行轉漬 1.5 小時。轉漬完後，以 5% 脫脂奶粉在室溫下進行 blocking 1 小時。

v. 一級與二級抗體的雜交

blocking 完成後，以 TBS-T buffer 沖洗 4 次各 10 分鐘，加入一級抗體並置於冷房中搖晃反應 16 個小時，然後以 TBST buffer 沖洗 4 次各 10 分鐘，再加入二級抗體並在室溫下作用 1 小時，接者以用 TBST buffer 沖洗 2 次各 10 分鐘。最後以冷光螢光顯影系統 (mini LAS-4000) 拍照。

3. 於免疫缺陷小鼠中觀察腫瘤轉移實驗 (Measurement of tumor metastasis in immuno-deficiency)

向國家實驗動物中心訂購小鼠, 將出生至第四周的免疫缺陷小鼠(C. B17/Icr-*Prkdc*^{scid}/Cr1Narl), 於小鼠尾靜脈施打 SiHa 細胞 $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$, 並與 matrix gel 做混打(Cell:matrix gel=4:1), 並將小鼠飼養於中山醫學大學 SDF 之動物房內, 將老鼠區分為 control 組(餵油)、低濃度組(10mg/kg/day) 以及高濃度組(20mg/kg/day), 並於管餵 102 天後, 拍攝 IVIS。

4. 統計分析 Analysis of Variance (ANOVA)

所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。

實驗結果

一. Thymoquinone 對 SiHa 細胞之 FAK 訊號傳遞路徑相關磷酸化蛋白的影響

將 SiHa 細胞處理不同濃度的 thymoquinone(0、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 72 小時後、TGF- β 誘導 48 h 後, 收集其 cell lysates, 以 anti-phospho-FAK (Tyr397)、anti-phospho-FAK(Tyr925)、anti-FAK、anti-phospho-paxillin(Tyr118)、anti-phospho-paxillin(Ser178)、anti-paxillin 及 anti- β -actin、的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 FAK (Tyr397)、paxillin(Tyr118)、FAK(Tyr925)、paxillin(Ser178) 蛋白的磷酸化蛋白表現量會隨著 TGF- β 誘導後上升、而隨著 Thymoquinone 的濃度提高而減少 TGF- β induction 情況 (Fig1)。

二. Thymoquinone 對 SiHa 細胞之 EMT 相關骨架蛋白的影響

將 SiHa 細胞處理不同濃度 thymoquinone(0、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 72 小時以及 TGF- β 誘導 48 小時之後, 收集其 cell lysates 並做核質分離, 以 anti-E-cadherin、anti-N-cadherin、anti-Vimentin、anti- β -catenin、anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現上皮細胞的特徵 E-cadherin 的表現量在 TGF- β 誘導的情況下表現量下降而隨著 thymoquinone 的濃度上升而增加, 而間葉細胞的特徵 N-cadherin、Vimentin 表現量在 TGF- β 誘導的情況下表現量上升而隨著 thymoquinone 的濃度上升表現量下降 (Fig2)。

三. Thymoquinone 對 SiHa 細胞之轉錄因子的影響

將 SiHa 細胞處理不同濃度 thymoquinone(0、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 72 小時以及 TGF- β 誘導 48 小時之後，收集其 cell lysates 並做核質分離，以 anti-snail、anti-slug、anti-sipl、anti-c23 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現轉錄因子表現量在 TGF- β 誘導的情況下表現量上升而隨著 Thymoquinone 的濃度上升表現量下降(Fig3)。

四. Thymoquinone 抑制 SiHa 之侵襲能力

利用 Boyden chamber assay 的方式確認 thymoquinone 對於 TGF- β 1 誘導人類子宮頸癌細胞移動及侵入能力的影響。將 thymoquinone 以不同濃度(0、10、20 μM) 與 TGF- β 1 (5 ng/mL) 處理 SiHa 細胞 24 小時後，細胞以 trypsin-EDTA 打下來，以 trypan blue 計算細胞數，取出以固定量的細胞 ($1.5 \times 10^4/\text{well}$) 直接 loading 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 19 小時，然後再利用 modified Boyden chamber coating type IV collagen 的分析。結果顯示，其受 TGF- β 1 誘導 SiHa 的入侵能力會隨著處理 Thymoquinone 濃度增加而降低，表示 Thymoquinone 可以抑制 SiHa 與 HeLa 細胞的侵入能力(Fig4)。

五. 利用活體影像系統觀測活體內腫瘤轉移情形

將帶有 luciferase 的基因(1×10^6)的 SiHa 細胞以尾靜脈方式打入四周大的小鼠，以管餵方式進行給藥 (oil、TQ10、20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)，並於期間每天測量體重，並於 102 及 133 天進行拍攝。以腹腔注射方式給予老鼠 luciferin(150 mg/kg)，待 30 分鐘後進行拍攝，可明顯看到管餵 thymoquinone 組別相較於控制組，其光學訊號明顯較弱，老鼠體重無明顯變化，明顯的抑制癌細胞轉移情形(Fig 5、6、7)。

六. 利用正立螢光顯微鏡觀察 Thymoquinone 對 SiHa 子宮頸癌細胞之骨架蛋白的影響

將子宮頸癌細胞 SiHa 種於 8well 之 chamber slide 中，每一個 well 的細胞數為 1×10^4 /mL，放入 37 °C 培養箱培養 16 小時，移去培養液，加藥處理 48 小時 thymoquinone 不同濃度(0、10、20 μ M) 並共同處理 TGF- β 1 (5ng/ml) 培養 48 小時後。固定細胞，接著加入 500 μ L 的 0.5% Triton X-100 (in PBS) (Sigma) 在室溫下將細胞進行穿孔。加入 500 μ L 的 1% BSA in PBS，降低抗體非專一性的結合。加入一級抗體 anti-F-actin，於 4°C 培養 overnight，以 PBS 清洗 4 次，一次 5 分鐘，最後以 mounting buffer 固定並加上玻片(含 DAPI)，接著以正立螢光顯微鏡觀察進行拍攝，結果發現，單純處理 TGF- β 1 的組別其細胞型態從原本的上皮鱗狀細胞誘導成具有突觸的細胞型態，然而透過 Thymoquinone 的合併處理下，細胞型態有效的被 reverse 成上皮鱗狀細胞(Fig 8)。

討論

從 Fig1 的圖片顯示出，p-paxillin(Ser178)的表現受到 TGF- β 誘導後，蛋白表現量明顯上升，在受到 thymoquinone 作用下，蛋白表現量降低，同樣其下游蛋白 p-FAK(Tyr925)蛋白也有相同的情況，但卻也發現 p-paxillin(Tyr118)及其下游蛋白 p-FAK(Tyr397)也有相同的情況，故將繼續了解在藥物作用下，最主要是影響哪個 pathway。從 Fig 2 的圖片顯示，epithelial maker 的表現，在 TGF- β 誘導後，蛋白表現下降，但在 Thymoquinone 的作用下，蛋白表現有 reverse 的情形，而從 mesenchymal marker 的表現中，在 TGF- β 誘導後，蛋白表現上升，但在藥物處理下，蛋白有受到抑制的情況，從此可看出 thymoquinone 對於維持 epithelial phenotype 有一定的影響性。從 Fig 3 可以看到在給予 thymoquinone 可以看到一些轉錄因子相關蛋白的下降像是 snail、slug、sip-1。從 Fig4 利用 Boyden chamber 進一步驗證 thymoquinone 是否可以抑制人類子宮頸癌細胞(SiHa)之侵襲能力。從 Fig5、6、7 活體動物中，人類子宮頸癌(SiHa)轉移到肺部的情形，在 thymoquinone 的服用下，轉移情形有受到抑制，也從體重量化表發現藥物並不影響小鼠的體重，未來也想將動物犧牲後取其肺部，看其肺部腫瘤的生長狀況是否和活體攝影有相同的結果。從 Fig 8 免疫螢光染色染細胞中的 F-actin 發現，在 TGF- β 誘導下，從鱗狀上皮細胞的型態轉變成較具突觸且較為細長的細胞型態，但在 thymoquinone 的作用下細胞型態有較 reverse 為原來鱗狀上皮細胞的型態，有此發現此藥物對於細胞的 epithelial phenotype 的維持有一定的重要性。

在發現癌症的復發率如此高，以及術後不佳的情況，往往和癌細胞的轉移機制有很大的關係，癌症的 epithelial-mesenchymal transition 往往使治癒率大大降低，在搭配或學傳統化療藥物將癌細胞殺死的同時，若能同時抑制其轉移的情形，對於術後復原會有相當大的幫助。

圖表與圖表說明

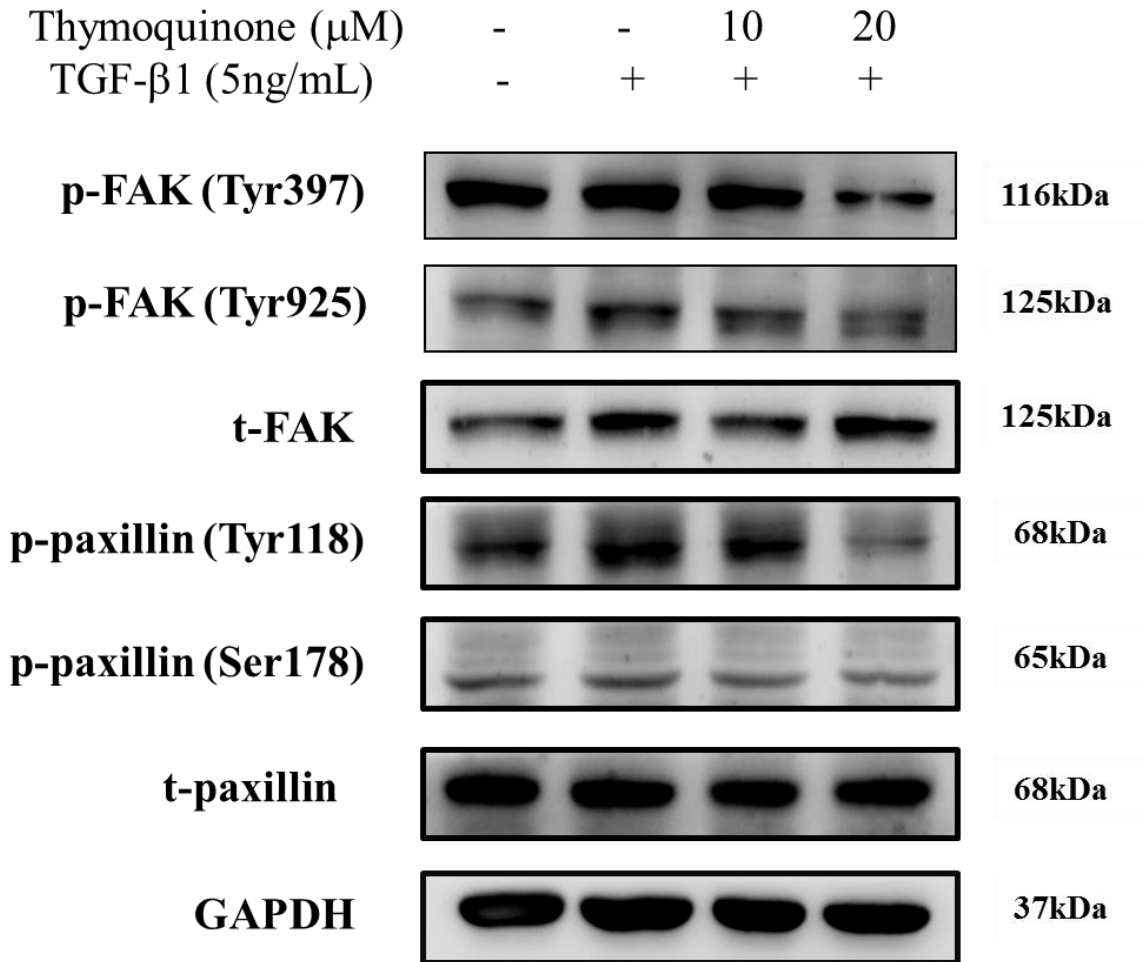


Fig. 1. SiHa cells were treated with thymoquinone at indicated concentrations for 72 h and TGF- β treated 48 h, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. The phosphorylation paxillin(Tyr118)、phosphorylation paxillin(Ser178) protein and phosphorylation FAK(Tyr397)、phosphorylation FAK(Tyr925) protein, expression levels was increased when TGF- β induces only, then expression levels was decreased with thymoquinone. Related proteins were analyzed by Western blotting.

Thymoquinone (μM)	-	-	10	20
TGF- β 1 (5ng/mL)	-	+	+	+

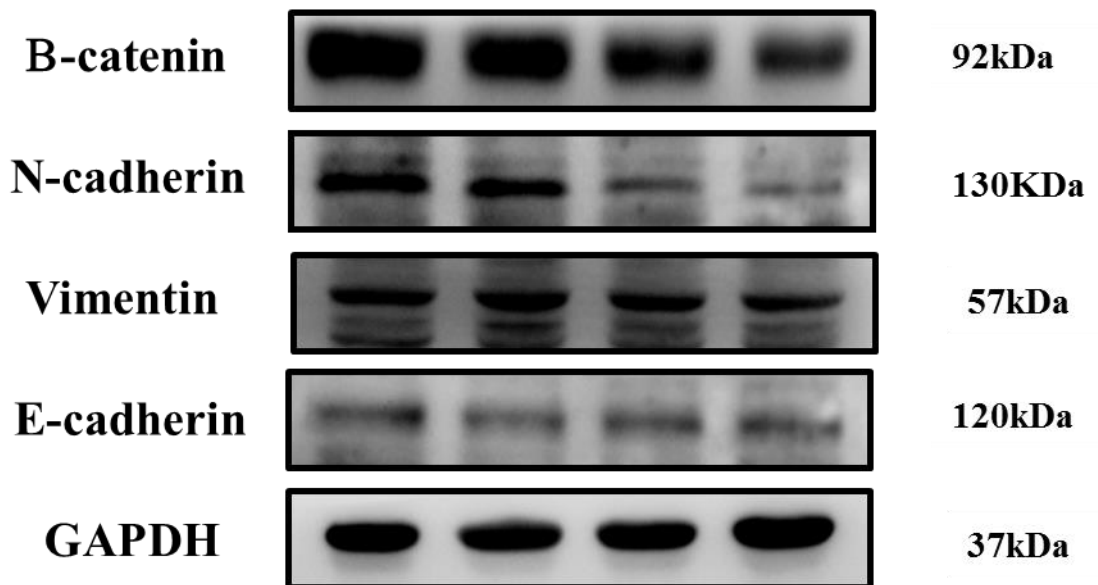


Fig.2. SiHa cells were treated with thymoquinone at indicated concentrations for 72 h and TGF- β treated 48 h, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. E-cadherin, epithelial marker decreased when TGF- β only, then expression levels was increased with thymoquinone treated; N-cadherin and Vimentin, mesenchymal markers increased when TGF- β only, then expression levels was decreased with thymoquinone treated. Related proteins were analyzed by Western blotting.

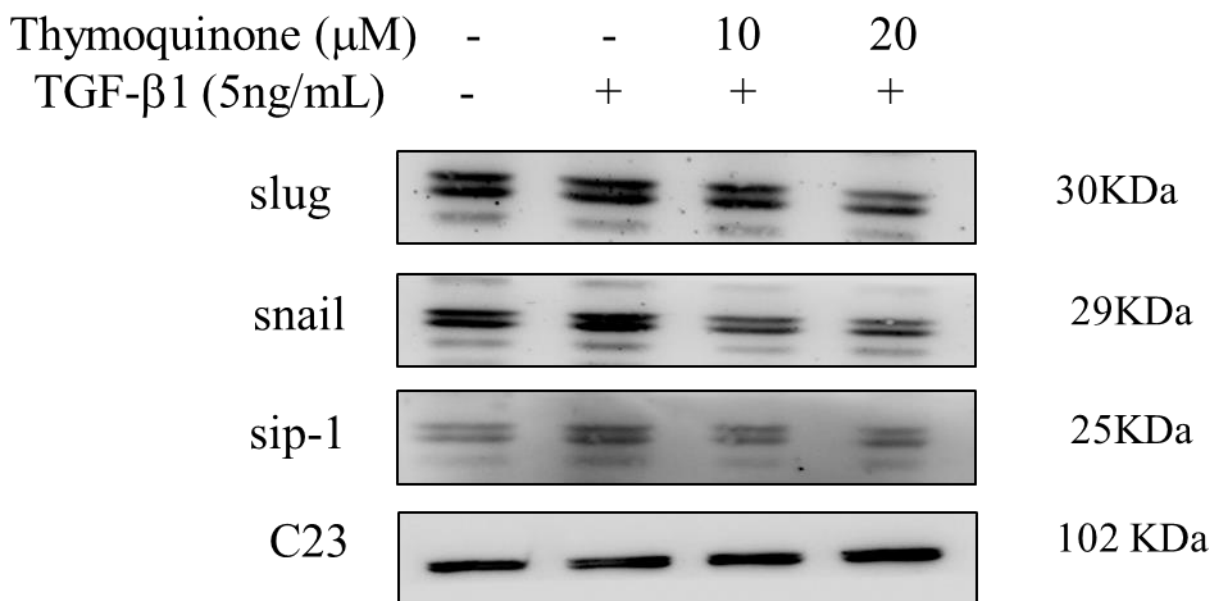
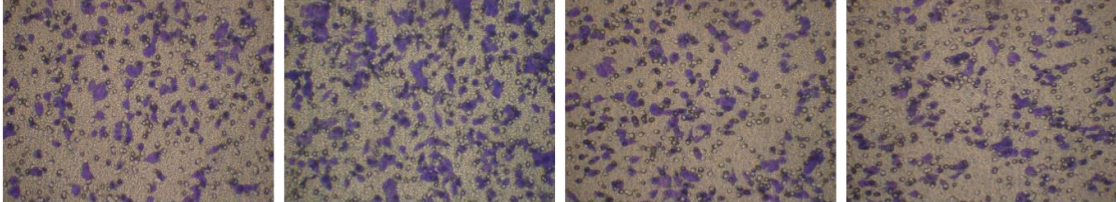


Fig.3. SiHa cells were treated with thymoquinone at indicated concentrations for 72 h and TGF- β treated 48 h, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. E-cadherin, epithelial marker decreased when TGF- β only, then expression levels was increased with thymoquinone; slug, sip11 and snail, transcription factors increased when TGF- β only, then expression levels was decreased with thymoquinone. Related proteins were analyzed by Western blotting.

Thymoquinone (μM)	-	-	10	20
TGF- β 1 (5ng/ml)	-	+	+	+



SiHa

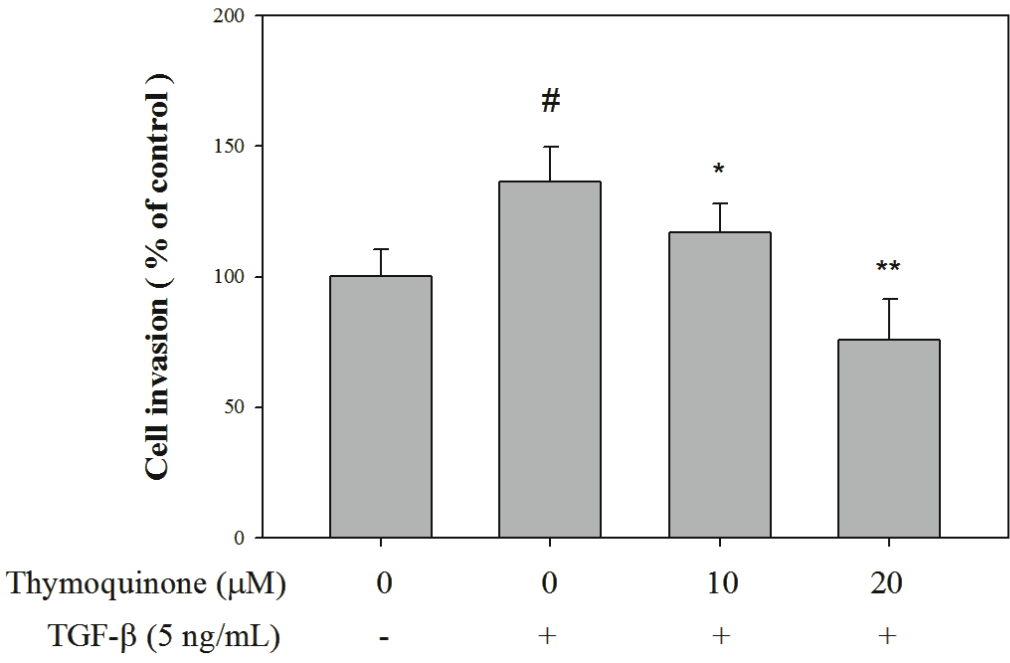


Fig.4. Thymoquinone suppression of invasion induced by TGF- β 1 with Boyden chamber. Invasion Chamber with 12 mm-pores in their polycarbonate membrane had been coated by matrix gel. Count cell number of cell through the membrane with the microscope in ten random fields at 100X magnification. Data represent mean \pm SD of least 3 independents experiments. Statistical significance (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; #, $P < 0.05$) was checked using one-way ANOVA.

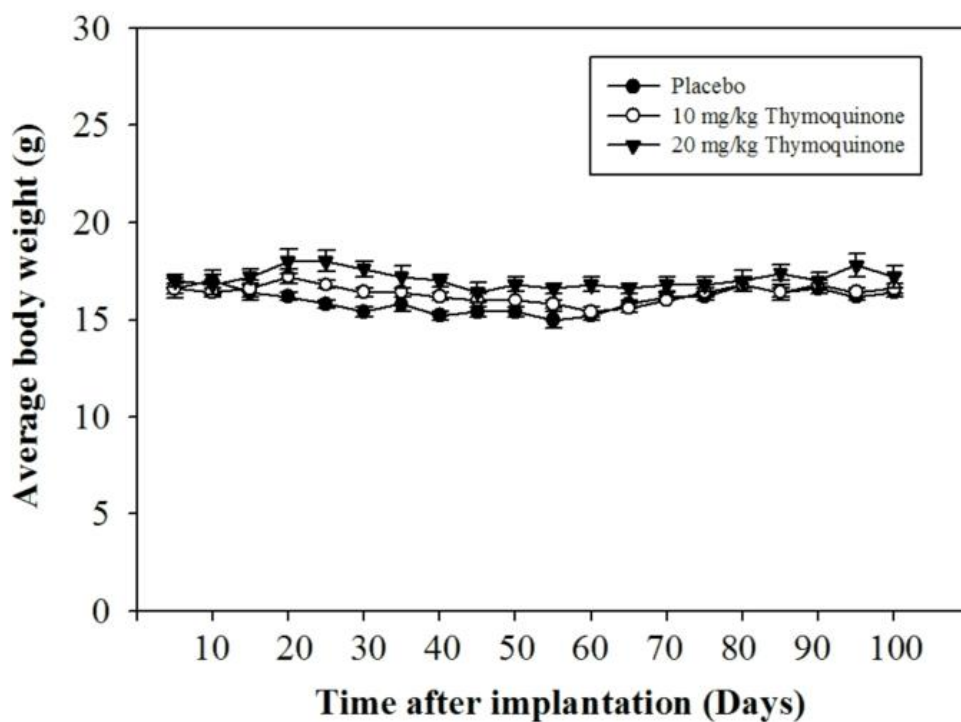


Fig. 5. Body weight changes after the treatment thymoquinone (10 mg/kg/day, 20 mg/kg/day, 102 days) by oral gavage on female immuno-deficient nude mice (BALB/c AnN.CgFoxn nu /Cr1 Nar1 mice)with SiHa cells.

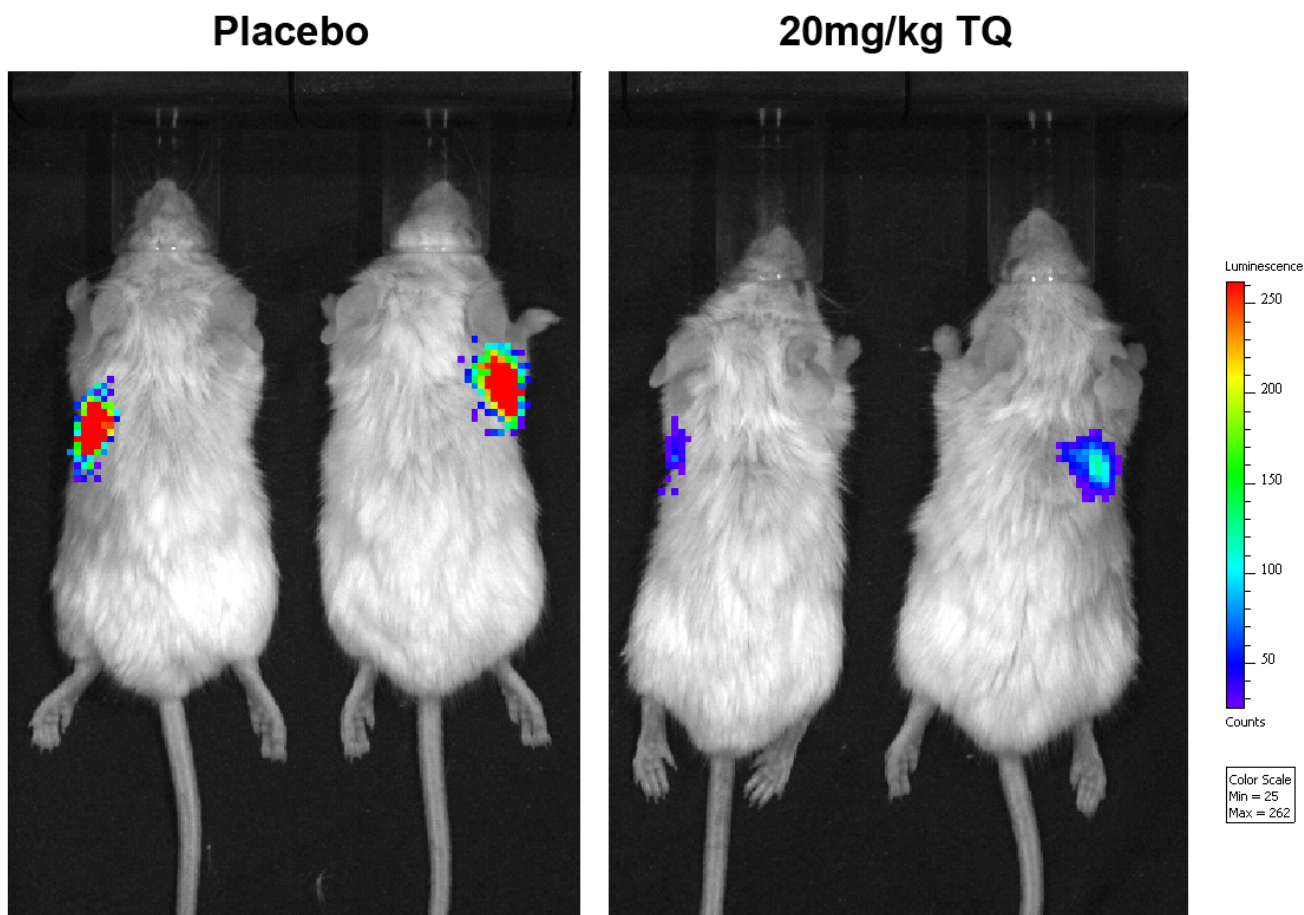


Fig.6. SiHa Bioluminescence over time after tail vein injected with IVIS image of luciferase-expressing SiHa cells. SiHa cells were injected into the tail veins of 4-week-old female immuno-deficient nude mice (BALB/c AnN.CgFoxn nu /Cr1 Nar1 mice. After injection of SiHa cells, Mice were administered thymoquinone(20 mg/kg/day) or Placebo by oral gavage for 102 days.

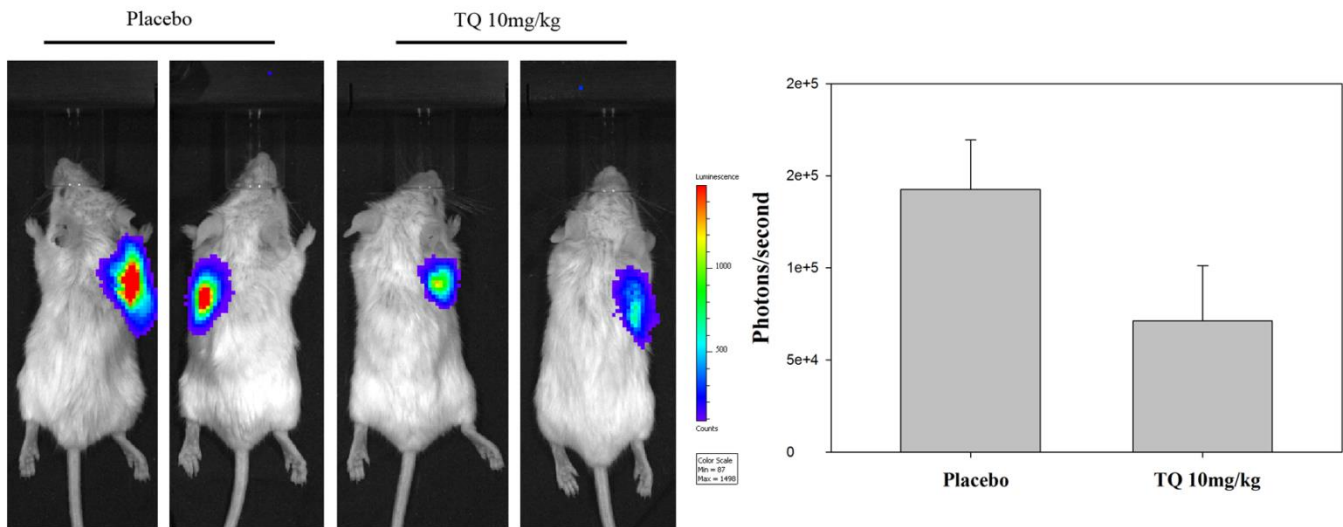


Fig. 7. SiHa Bioluminescence over time after tail vein injected with IVIS image of luciferase-expressing SiHa cells. SiHa cells were injected into the tail veins of 4- week-old female immuno-deficient nude mice (BALB/c AnN.CgFoxn nu /Cr1 Nar1 mice. Aher injection of SiHa cells, Mice were administered thymoquinone(20 mg/kg/day) or Placebo by oral gavage for 133 days.

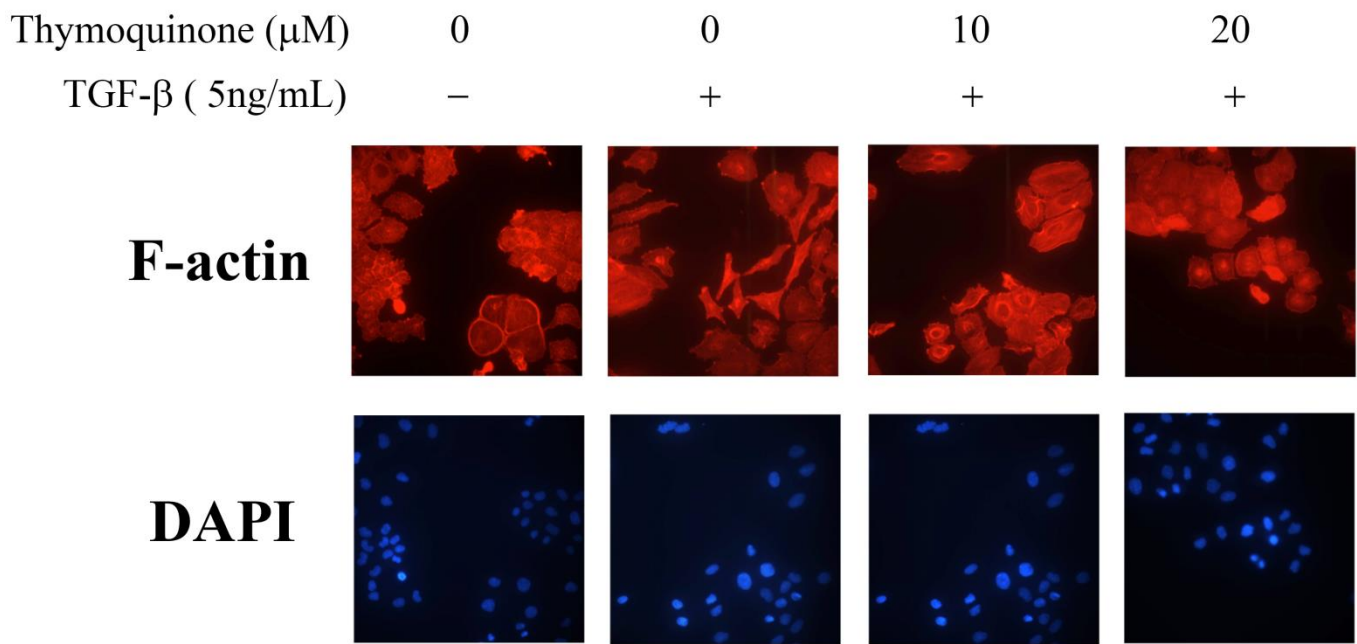


Fig. 8. Effects of thymoquinone treated with or without TGF- β 1 on cell cytoskeleton. SiHa cell was treated thymoquinone for 48 h and co-stimulation with TGF- β (5 ng/mL), then assessed immunofluorescence images for F-actin and DAPI