

## 中文摘要 (Abstract in Chinese)

Lipopolysaccharides (LPS ; 內毒素)為格蘭氏陰性菌細胞壁中的成份之一。當人體免疫力下降或手術未癒之病人受到格蘭氏陰性菌嚴重感染時，細菌的 LPS 會經由血液侵犯人體，引發發燒、敗血性休克，甚至是器官衰竭等症狀。由於腸道組織為格蘭氏陰性菌的大本營，因此我們想探討 LPS 對其可能產生的生理反應。在我們的研究中，我們發現 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 會刺激大腸癌上皮細胞 (Caco-2)的生長速率與移動能力。進一步探討其分子機轉，我們觀察到 LPS 會增加 c-Src 蛋白表現，進而使其下游蛋白，Shc 與 Erk 的 tyrosyl phosphorylation 增加，促進細胞生長。此外，另一個 Src 的受質，FAK，其 tyrosyl phosphorylation 也因 LPS 促進 Src 整體活性提高而增加，而這可能與細胞的移動有關。RT-PCR 的實驗結果指出，LPS 促進 c-Src 蛋白量的增加與其 mRNA 的增加有關。

薑黃素 (curcumin)是一種薑科植物 *Curcuma longa* 地下莖，所萃取出來的黃色色素，具有抗發炎、抗氧化，以及抗癌的效果。由於其為食用色素，我們想了解其能否抑制大腸直腸癌並探討其分子機轉。因此，我們選用了一株大腸癌細胞 (Caco-2)，做為實驗材料。從我們的實驗結果，我們發現 curcumin 會抑制癌細胞的生長；同時我們也觀察到一個有趣的現象，那就是 curcumin 會減弱癌細胞 metastasis 的能力。當 Caco-2 細胞以不同濃度的 curcumin 處理時，細胞總體蛋白的酪胺酸磷酸化程度會明顯下降。而此與 c-Src 蛋白表現隨著 curcumin 濃度的增加而遞減相關。另外讓我們感到有趣的是，FAK，

一個在 integrin signaling pathway 上重要的調節蛋白，它的 autophosphorylation state 竟也會隨著 curcumin 濃度的增加而下降。綜合以上的結果，我們推測 curcumin 造成 c-Src 蛋白表現與活性降低以及 FAK 蛋白的活性下降，或許與其抗癌與減緩癌細胞轉移的能力有關。

## 英文摘要 (Abstract in English)

Lipopolysaccharides (LPS ; endotoxin) are cell wall components of most gram-negative bacteria. During severe bacterial infections, as occurred in post-operation or immune suppressed patients, large amounts of LPS may be released into the blood stream and leads to various pathophysiological reactions such as fever, septic shock, and multi-organ failure. Since GI tract is the tissue that exposed to LPS most, we are interested to study its effect on colon epithelial cells. In the study, we observed that 10 µg/ml LPS can enhance the growth rate of Caco-2 cells (colorectal adeno- carcinoma cells), and improve their metastatic ability to migrate on dish coated with collagen. Furthermore, we found that LPS could upregulate the expression of c-Src protein that in turn caused the enhancement of tyrosyl phosphorylation of Shc and ERK and promoted cellular growth. In addition, LPS induced FAK Tyr-397 phosphorylation might attribute to cell mobility.

Curcumin, an active yellow pigment of *Curcuma longa*, possesses anti-inflammatory, antioxidative and anticarcinogenic properties. To delineate its antitumorigenic mechanisms, the colorectal adenocarcinoma cell line, Caco-2, was utilized as the material in our study. Like what has been described in other cells, significant growth inhibition of Caco-2 was detected in the presence of curcumin. At the same time, we also found that curcumin could reduce the metastasis ability of Caco-2 cells. And when the profile of tyrosyl phosphorylated proteins was analyzed, significant reduction of overall tyrosyl phosphorylation was observed in curcumin -treated cells as compared to that in control. Surprisingly, suppression of c-Src expression in response to curcumin was observed

while no change of the expression level of actin was detected. The curcumin-mediated reduction of c-Src expression resulted in the abrogation of c-Src activity as evidenced by reduced tyrosyl phosphorylation of cortactin, a Src substrate. Interestingly, accompanying with downregulation of c-Src in curcumin-treated cells was the reduced tyrosyl phosphorylation and the enzymatic activity of FAK, an important player in integrin signaling. With these findings, we suggested that curcumin-mediated reduction of the expression and activity of c-Src might attribute to curcumin-mediated anticarcinogenic effects.

## 縮寫檢索表 (Abbreviations)

APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary DNA
COX	Cyclooxygenase
DEPC	Diethyl pryocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylene diaminetetraacetate
EGTA	Ethylene glycoltetraacetate
EtBr	Ethidium bromide
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
HRP	Horse radish peroxidase
kDa	Kilo-dalton
mRNA	Messenger RNA
NC membrane	Nitrocellulose membrane
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B

NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Benzylsulfonyl fluoride
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcriptase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH2	Src homology 2
TAE	Tris-acetate/EDTA buffer
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylenediamine
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

## 第一章 序論 ( Introduction )

### Colorectal cancer

在經濟發達的國家，大腸癌的發病率高；但在較落後的發展中國家，大腸癌的發病率就較低，究其因主要與飲食習慣相關。近年來，台灣隨著生活及飲食方式之精緻化，動物性脂肪及蛋白質攝取量逐年增加，而食物纖維的攝取日益減少，大腸直腸癌罹患率也逐年攀升，如今也已成爲癌症死亡原因中第三位，僅次於肝癌與肺癌。

大腸直腸癌之症狀與腫瘤之生長情形和位置非常有關。左側大腸癌症狀包括：直腸出血，大便變細和腹痛；右側大腸癌症狀則以：疲倦和其他與貧血相關之症狀為主。直腸癌症狀包括：排便急迫感以及排便時帶血或粘液。較晚期之大腸直腸癌症狀包括疲倦、厭食和體重減輕。黃疸和右上腹痛可能表示肝侵犯；咳嗽和肋膜積水則可能來自肺部轉移。大腸癌早期發生時不易有自覺症狀，但當有自覺症狀(血便、通便異常、腹漲感、貧血甚至觸摸到腹部硬塊)時，都已非早期癌的階段。

大腸正常黏膜經腺瘤階段進行至癌症，是由一連串致癌與抑癌基因的改變，積聚而成。目前已知在大腸細胞癌化初期，細胞中的抑癌基因 APC 會失去功能，造成細胞不正常的增生；接著 K-Ras 與其它的致癌基因過度表現，細胞會移形轉變為腺瘤；最後抑癌基因 p53 喪失調節作用，腺瘤細胞惡化形成大腸癌細胞。另一方面，先前研究指出在大腸癌細胞中，不只發現 c-Src 活性增加，同時也會發現 c-Src 的受質 FAK，它的蛋白表現量及活性也會增加 (Brunton et al., 1997)。由於 FAK protein 與影響細胞 motility 的能力有關，因此透過

c-Src 的活化，大腸癌的病灶將具有高度轉移的可能性。

## LPS

Lipopolysaccharide (LPS)又稱為內毒素 (endotoxin)，在 1892 年的時候，首先被 Richard Pfeiffer 從霍亂弧菌中分離出來 (Pfeiffer et al., 1892)。由於內毒素含有一段脂質 (lipid) 和一個多聚醣 (polysaccharide)，因此稱其為 lipopolysaccharide。LPS 主要存在於格蘭氏陰性菌的細胞壁中，它可以保護細菌避免被宿主的免疫系統分解 (Rietschel et al., 1992)。當格蘭氏陰性菌被宿主的免疫系統破壞之後，細菌會從細胞壁中釋放出 LPS，造成人體嚴重的發炎反應、水腫、甚至是敗血性的休克 (Nogare et al., 1991)。

LPS 在結構上主要可以分成 3 個部份，最內側是一段由脂肪構成的長鏈結構，稱作 lipid A，這是 LPS 真正會引起人體疾病的部份 (Galanos et al., 1977)。在最外側含有一段具有抗原特異性的多聚醣，稱為 O-antigen，它可以做為臨床上辨識各種不同格蘭氏陰性菌的依據 (Knirel et al., 1990)。至於 core-polysaccharide 則介於兩者之間，以為連接之用 (*figure 1*)(Unger et al., 1981)。

當格蘭氏陰性菌釋放 LPS 進入人體時，體內的單核球與巨噬細胞會接受 LPS 的刺激，然後釋放出細胞激素與 NO，接著引起人體一連串的免疫反應 (Rietschel et al., 1994)。而在單核球與巨噬細胞中所進行的分子機轉，目前已知主要是透過 MAPK pathway 活化下游的 transcription factor (TF) ---- NF- $\kappa$ B 與 AP-1 之後，再由這些 TF 促進細胞激素的大量表現，進而影響細胞狀態的改變 (Lutz et al., 1998)。



在人體中除了單核球與巨噬細胞之外，上皮細胞也具有與 LPS 親和性較高的接受器 (Mayeux et al., 1997 ; Wright et al., 1990)。由於在大腸中含有大量的格蘭氏陰性菌，例如大腸桿菌、幽門螺旋桿菌，因此大腸中的上皮細胞容易受到大量的 LPS 刺激，這樣的結果會促使大腸上皮細胞趨向癌化 (Masayuki et al., 2000)。在 LPS 造成大腸上皮細胞癌化的過程中，LPS 會活化 NF- $\kappa$ B，接著 NF- $\kappa$ B 會刺激 COX-2 大量表現，而 COX-2 則會促進前列腺素的合成，造成細胞持續性發炎，最後導致細胞癌化 (Inoue et al., 1998)。因此，LPS 不僅會引起人體的免疫反應，甚至在長期感染的狀態下，也有可能增加大腸上皮細胞病變的可能性。

## Src

Src 是一個非受體型式的 tyrosine kinase (Levy et al., 1984)，同時它也是一個 oncoprotein。它的分子量為 60 kDa，在人類的 *c-src* 基因及 Rous sarcoma virus 的 *v-src* 基因都會表現 (Stehelin et al., 1976 ; Cross et al., 1985)。在 c-Src protein (cellular Src) 結構中，可以分成 6 個不同的 domain，由 N' 端到 C' 端分別為：SH4 domain (Src homology domain 4)、unique domain、SH3 domain (Src homology domain 3)、SH2 domain (Src homology domain 2)、kinase domain、及 regulatory domain (*figure 3A*) (Resh et al., 1994 ; Megan et al., 1996)。

在這些不同的 domain 當中，他們有各自的功能。目前已知 SH4 domain 上 Gly-2 的位置會進行 myristoylation，協助 c-Src 附著於細胞膜內側 (Courtenidge et al., 1980)。SH3 domain 長度大約為 50 個 amino acids，可以和富含 proline 的 peptide 結合 (Moran et al., 1990)。SH2 domain 長度約為 100 個 amino acids，可以與 tyrosyl phosphorylated 的

蛋白相結合 (Anderson et al., 1990)。而 kinase domain 和 regulatory domain 分別在 416 和 527 的位置, 各自有一個 tyrosine residue (Tyr-416 及 Tyr-527), 它們的磷酸化會影響 c-Src 的活化狀態 (Smart et al., 1981)。當 Tyr-416 自體磷酸化之後, c-Src 的活性會增加 (Smart et al., 1981); 當 Tyr-527 受到 Csk (C-terminal Src kinase) 的磷酸化時, c-Src 的活性則會下降 (Rosen et al., 1995)。

在正常細胞的訊息傳遞中, c-Src 是一個很重要的蛋白。因此, 它與細胞癌化之間的關係也被廣泛的研究。目前有許多證據顯示, c-Src 與三個成年人常發生的癌症有關, 其分別為大腸癌、乳癌、和肺癌 (Jacqueline et al., 1999)。過去的文獻曾指出, 大腸癌細胞中 c-Src 的 kinase activity 常有明顯的上升; 並且與正常細胞相比較之下, c-Src 的活性可以增加至 40 倍之多。另外有一些研究也發現, 大腸癌細胞中 c-Src 活性的增加, 常伴隨著 c-Src 蛋白的增加 (Rosen et al., 1986; Bolen et al., 1987)。這些結果都證明了, 當體內的 c-Src 活性或蛋白量增加時, 會增加罹患大腸癌的機會。

## **FAK**

Focal adhesion kinase (FAK) 是一個分子量為 125 kDa, 位於 focal adhesion 的 tyrosine kinase, 故因而得名 (Parsons et al., 2000; Schlaepfer et al., 1999)。當細胞受到刺激, 常會引發 FAK 的 tyrosine phosphorylation 其活性的增加。這些刺激包括一些生長因子、化學藥劑等。但其中最具有生理意義者, 則是透過外界的 extracellular matrix (ECM) 與細胞膜上的 integrin 結合時所產生的訊息傳遞。也因此 FAK 在 integrin signaling pathway 中, 扮演一個重要的角色 (Michael et al., 2001)。

FAK protein 在它的結構上，有 6 個可以進行 tyrosine phosphorylation 的 tyrosine residues (其分別為 Tyr-397、-407、-576/577、-863 及 -925) (figure 3B)。其中 Tyr-397 是 FAK 的 autophosphorylation site，透過其磷酸化，FAK 可以和 Src family kinase 的 SH2 domain 結合 (Schaller et al., 1994)。而在 kinase domain 上的 Tyr-576/-577，其磷酸化可以增加 FAK 的活性。另外在靠近 C 端的 Tyr-925，其磷酸化會與 Grb2 的 SH2 domain 結合，而引發更下游的 Ras 與 MAPK pathway 的活化 (Schlaepfer et al., 1994)。

過去的文獻已經證明，當細胞受到外界基質的刺激之後，會增加細胞 motility 的能力，而其中調控的分子機轉主要是透過 integrin signal pathway 以及 Src-FAK complex (Ilic et al., 1995)。Integrin 是細胞表面 ECM 的接受器，當 integrin 與細胞外的基質接觸之後，FAK kinase 活性增加，進行 autophosphorylation。Pi-Tyr-tyrosine 397 會與 Src 的 SH2 domain 結合形成一個 complex，而 FAK 可因被 Src 進一步的磷酸化而增加活性。然後 FAK 會利用 C 端 proline-rich sequence 與 p130<sup>cas</sup> 的 SH3 domain 結合，同時再以 Tyr-576/-577 活化 p130<sup>cas</sup>，加速細胞架構的重組以及 migration 的能力 (Klemke et al., 1998)。由此可知 FAK 的活化，對於調控細胞 motility 的能力是很重要的。

## Curcumin

薑黃素 (curcumin) 是一種由薑科植物薑黃 (Zingiberaceae) (*Curcuma longa* Linn) (figure 2A) 地下莖，所萃取出來的天然成份。它的外觀呈黃色、味道辛辣，一般被應用於調味及當作天然食品添加物，例如咖喱、芥菜。除了可做為食用，curcumin 亦含有許多治療與

保健的效果。Curcumin 的化學名稱為 diferuloylmethane，屬於一種多酚類的化合物 (*figure 2B*)；作用與非類固醇類的抗發炎藥 aspirin 相似，可以抑制細菌感染時的發炎反應，但其副作用較小 (Wargovich et al., 1995, 2000；Rosenberg et al., 1998)。curcumin 同時也具有抗氧化的能力，可以捕捉紫外線照射時所造成的自由基，以避免細胞受到攻擊 (Kunchandy et al., 1990)。而高濃度的 curcumin 可以抑制 HIV 病毒中 integrase 的酵素活性，進而影響 HIV 病毒的複製 (Mazumder et al., 1995)。自 1988 年開始，薑黃素在動物模式中，被證實對於皮膚癌具有減緩的效果之後，陸陸續續有許多的研究報告指出 curcumin 具有防癌與抗癌的功效 (Huang et al., 1988, 1992, 1995)。

Aspirin 為一種非類固醇類消炎藥 (NSAIDs)，具有止痛及解熱作用。非類固醇類消炎藥雖然能有效止痛，但是其作用機轉卻也同時抑制了環氧酵素 (cyclo-oxygenase, COX) 的功能。COX 有兩種 isoenzyme，分別為 COX1 與 COX2。COX1 普遍存在於身體細胞，產生前列腺素，維持正常的生理運作；而 COX2 與疼痛發炎有關。非類固醇類消炎藥會同時抑制 COX1 與 COX2 的功能，導致胃壁的前列腺素生成減少，結果引起胃腸道黏膜的損傷，造成消化道潰瘍或胃出血等問題。而 curcumin 可以專一性的抑制 COX2，達到止痛消炎的目的；另一方面對於 COX1 較無影響，因此對於人體不會產生噁心、嘔吐等副作用。

Curcumin 可以抑制 tumor 的 initiation 和 promotion (Huang et al., 1988, 1994；Rao et al., 1995)，同時也可以造成 cancer cell 的 apoptosis (Jiang et al., 1996)。過去的文獻指出，當老鼠長期施打 curcumin 可以抑制由 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 所引發的腫瘤形成，並且減少 DNA 突變的機會 (Keith et al., 1996)。而在飼料中添加

0.5-2.0% curcumin，則可以抑制 rat 或 mice 十二指腸與大腸腫瘤的形成與惡化 (Huang et al., 1994)。

過去的文獻指出，curcumin 可以透過許多不同的分子機轉，達到抑癌的效果。例如在 ML-1a 細胞，一種白血球細胞中，curcumin 可以非常明顯的抑制由 TNF 所引發的 NF- $\kappa$ B 活化 (Sanjaya et al., 1995)。另外針對其他的 transcription factor，例如 AP-1、Egr-1，curcumin 對於它們的活性及結合能力也同樣都有抑制的效果。透過這樣的結果，curcumin 便可以抑制這些 transcription factor 活化下游致病性基因的表現 (McMahon et al., 1996)。在蛋白活化的部份，curcumin 針對 phosphorylation 也會有抑制的效果。以 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 塗抹老鼠皮膚之後，老鼠皮膚細胞中的 protein kinase C (PKC) 會大量活化，並且皮膚上會出現腫瘤。這時如果在老鼠皮膚腫瘤的部位塗抹 curcumin，則會發現老鼠皮膚細胞中的 PKC 活性大量下降，同時皮膚上的腫瘤也會明顯縮小 (Lin et al., 1997；Lu et al., 1994)。Curcumin 除了可以降低蛋白活性之外，同時也可以促進蛋白的降解。在乳癌細胞當中，p185<sup>neu</sup> oncoprotein 會在細胞膜上大量表現，同時活性也會明顯的上升。這時以 curcumin 處理乳癌細胞之後，p185<sup>neu</sup> oncoprotein 的活性會明顯下降；同時 curcumin 也會促進 p185<sup>neu</sup> oncoprotein 與 chaperone 結合，造成 p185<sup>neu</sup> oncoprotein 大量分解 (Ruey et al., 1999)。綜合之前的文獻，可知 curcumin 在藥理學上兼具多種抗癌作用與副作用小的特性，因此可做為一種較不傷人體的抗癌藥物。

## 實驗研究動機

在人類大腸中，有許多格蘭氏陰性菌滋生，所以大腸比其它的組

織器官更容易接觸到 LPS。先前的文獻指出，LPS 與大腸細胞的癌化有直接的影響，但是其中的分子機轉仍未釐清。因此，我們有興趣研究 LPS 到底是透過何種路徑，造成大腸細胞的病變。並且我們也想了解，LPS 是否與大腸癌病灶的轉移有關？另一方面，在食用的生薑當中，含有一種天然的抗癌成份，稱作薑黃素 (curcumin)。我們想了解 curcumin 有無可能抑制大腸癌細胞的生長、移動；如果會的話，我們想進一步了解其中的分子機轉。

## 第二章 實驗材料與方法 ( Materials and Methods )

### 第一節 實驗材料

#### A. 細胞株 :

Caco-2

#### B. 試劑 :

44.208 mg 的 curcumin 溶於 12 ml DMSO 中。

(curcumin final conc. = 10 mM)

25 mg 的 Lipopolysaccharide 溶於 5 ml DMSO 中。

(LPS final conc. = 5 mg/ml)

#### C. 抗體 :

anti-cortactin (4F11) : anti-cortactin monoclonal antibody

anti-ERK : anti-ERK polyclonal antibody

anti-pERK : anti-ERK tyrosine polyclonal antibody

anti-FAK : anti-FAK polyclonal antibody

anti-FAK Tyr-397 : anti-FAK Tyr-397 polyclonal antibody

anti-Shc : anti-Shc polyclonal antibody

anti-Shc Tyr-317 : anti-Shc Tyr-317 polyclonal antibody

anti-Src : anti-Src monoclonal antibody

HRP-protein A : HRP-conjugated protein A

HRP-rabbit anti-mouse antibody

PY20 : HRP-conjugated mouse pTyr monoclonal antibody  
rabbit anti-mouse antibody

D. 實驗儀器 :

名稱	廠牌
Centrifuge	Eppendorf 5415C
Centrifuge	KUBOTA1720
Digital analysis system	Kodak EDAS120
GeneAmp PCR system 2400	Perkin Elmer
Hemocytometer	BOECO
Hoefer semiPhor	Pharmacia Biotech TE70
pH meter	JENCO 6071
Power supply	EPS2A200
Protein-A sepharose beads	Pharmacia
Protein Assay Kit	Bio-Rad
PVDF transfer membrane	NEN
Shaker	TKS RS01
Spectrophotometer	Beckman DU640
Stirrer/Hot plate	CORNING PC640
Vertical slab gel unit	Hoefer SE400
Vortex	GENIE SI-2 G560
Water bath	TKS ZX-400

E. 實驗藥品 :



1. 下列藥品購自 Acors (New Jersey, USA) :  
  
deoxycholate  
sodium orthovanadate
2. 下列藥品購自 American biogenics (New York, USA) :  
  
acrylamide  
bisacrylamide
3. 下列藥品購自 Amersco :  
  
Chloroform  
50X TAE buffer
4. 下列藥品購自 Amersham :  
  
Protein A Sepharose
5. 下列藥品購自 Arch :  
  
Isopropanol
6. 下列器材購自 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) :  
  
gel dryer  
Protein Assay Kit
7. 下列藥品購自 Fisher Scientific (New Jersey, USA) :  
  
acetic acid, glacial  
methanol  
Tween 20
8. 下列藥品購自 Fisons Scientific Equipment (Bishop Meadow Road, England) :  
  
sucrose

sodium chloride

9. 下列藥品購自 Gibco BRL (New York, NY, USA) :

agarose  
ammonium persulfate  
DMEM  
EDTA  
fetal bovine serum  
glycine  
L-Glutamine  
penicillin-streptomycin  
SDS  
Sodium Bicarbonate  
TEMED  
trypsin-EDTA (10X)

10. 下列物品購自 Nunc (Roskilde, Denmark) :

100 X 20 mm petri dish  
60 X 15 mm petri dish  
35 X 10 mm Petri dish  
15 ml conical tube  
50 ml conical tube

11. 下列物品購自 Promega :

5X RT buffer  
dNTP  
Oligo dT  
DTT  
RNase inhibitor  
Reverse transcriptase  
Taq polymerase

12. 下列藥品購自 Sigma (St. Louis, MO, USA) :

2-mercaptoethanol

37% Formaldehyde  
aprotinin  
bromophenol blue  
curcumin  
EGTA  
gelatin  
glycerol  
IGEPAL CA-630  
lipopolysaccharide  
PMSF  
Methanol

13. 下列藥品購自 Tedia (Fairfield, Ohio, USA) :

hydrochloric acid

14. 下列藥品購自美國 USB :

coomassie brilliant blue R-250  
Tris-HCl  
Acryamide  
SDS  
Glycine  
Tween 20

## 第二節 實驗方法

一、 細胞培養 (cell culture) :

試劑 :

1. DMEM 1 liter

將 1 單位的 DMEM powder 和 3.7g 的  $\text{NaHCO}_3$  溶於 600ml 滅菌 dd  $\text{H}_2\text{O}$  , pH 值以 HCl 調成 7.1 , 再加滅菌 dd  $\text{H}_2\text{O}$  至 1 liter 後 ,

在 hood 中以 0.22  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾後分裝，保存於 4 。

2. Fetal bovine serum

回溫之後，分裝到 50ml 無菌離心管，用 parafilm 包覆瓶口，保存於-20 。

3. 10X Penicillin-Streptomycin (10000 unit/ml-10000  $\mu\text{g/ml}$ )

每 450 ml 的 DMEM 加 5 ml 的 P-S。

4. 10X L-Glutamine (200mM)

每 450 ml 的 DMEM 加 5 ml 的 L-Glutamine。

5. 10X trypsin-EDTA

利用稀釋滅菌過的 1X PBS 將 10X trypsin 稀釋成 1X trypsin。

6. 10X PBS 1 liter

NaCl 80 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 12 g

將所需之化學藥品溶於 500 ml dd H<sub>2</sub>O 將其 pH 調成 7.4, 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 1 liter 滅菌後保存於 4 。

可用 dd H<sub>2</sub>O 稀釋成 1X PBS 之後使用。

7. culture medium 500 ml

DMEM 400 ml

Fetal bovine serum 100 ml

(final conc. = 10%)	
10X Penicillin-Streptomycin (final conc. = 0.1X)	5 ml
10X L-Glutamine (final conc. = 0.1X)	5 ml
8. 40% DMSO stock solution	10 ml
DMSO	4 ml
DMEM	6 ml

以 0.22  $\mu$  m 的濾膜過濾，保存於-20 。

9. Freezing medium	10 ml
DMEM medium	5.5 ml
40% DMSO stock solution (final conc. = 10%)	2.5 ml
Fetal bovine serum	2.0 ml

#### 步驟：

1. 將細胞培養於 culture DMEM (20% FBS , 1% P-S , 1% L-Glu) , 置於 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37 , 5% CO<sub>2</sub>) , 當細胞長到 90% confluency 後 , 分盤培養。
2. 細胞分盤 (subculture) --
  - a. 將 medium 吸走 , 以 2 ml 滅菌 1X PBS 沖洗一次 , 吸乾 PBS。
  - b. 加入 2 ml 1X trypsin 置於 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37 , 5% CO<sub>2</sub>) 進行 trypsinization , 作用約 20 分鐘。

c. 加入 8 ml fresh medium 終止反應，上下吸、放數次，直到將細胞均勻打散，並以 1:2 或 1:3 的比例分盤培養。

### 3. 冷凍細胞--

a. 將 medium 吸走，以 2 ml 滅菌 1X PBS 沖洗，吸乾 PBS。(冷凍細胞的前一天必須換 fresh medium。)

b. 加入 2 ml 1X trypsin 置於 CO<sub>2</sub> 培養箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 進行 trypsinization 20 分鐘，以 3 ml culture medium 將細胞打下，並且均勻打散。

c. 將細胞移到 50 ml conical tube, 4 °C、1000 rpm 離心 5 分鐘。

d. 去除上清液，加入 1 ml freezing medium，並移至冷凍管，置於液態氮儲存。

### 4. 細胞生長曲線--

a. 以 6 cm dish 進行分盤並培養 16~18 小時，以 hemacytometer 記數細胞的 seeding number，細胞數大約  $4 \times 10^5$ 。

b. 加入不同濃度的 curcumin ( $\mu\text{M}$ ) 或 LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )，分別培養於 CO<sub>2</sub> 培養箱 24, 48, 72 小時後，以 hemacytometer 記數細胞。最後數據再以 SigmaPlot 軟體統計分析。

## 二、 收集細胞 lysates :

### 試劑 :

1. Lysis buffer (RIPA buffer)	500 ml
NaCl	4.38 g
Tris-HCl	3.0285 g
Deoxycholate	1.25 g

IGEPAL CA-630 5 ml

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O, pH 調成 7.5, 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml, 保存於 4 。

2. Modified RIPA buffer 1 ml

RIPA 1 ml

200 mM Sodium orthovanadate  
(final conc.= 1 mM) 5  $\mu$ l

200 mM EGTA  
(final conc. = 1 mM) 5  $\mu$ l

0.5% Aprotinin  
(final conc. = 0.0025%) 5  $\mu$ l

200 mM PMSF  
(final conc. = 1 mM) 5  $\mu$ l

#### 步驟：

1. 將 medium 吸走，細胞以 1X PBS 清洗兩次，吸乾 PBS。
2. 加入 400  $\mu$ l modified RIPA buffer (6cm dish)，用刮杓把細胞刮下 (冰上操作)，上下沖打細胞，將細胞液置於 eppendorf。接著把 eppendorf 在 rake 上刮動來回數次。
3. 以 4、10000rpm，離心 10 分鐘，取上清液到新的 eppendorf，保存於-80。

#### 三、蛋白質濃度測定：

##### 試劑：

1. BSA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

## 2. Protein Assay Kit

步驟：

1. 以不同濃度的 BSA 畫出蛋白質濃度測定的 standard curve。其方法如下：取 0、5、10、15、20、25、30  $\mu\text{l}$  BSA( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )到 eppendorfs。
2. 加入不同量的 dd H<sub>2</sub>O 到 eppendorfs 中，使其總體積達 800  $\mu\text{l}$ 。
3. 加 200  $\mu\text{l}$  Protein Assay Kit (dye)到 eppendorfs，以 vortex 混合均勻。
4. 在 sample 的測定上，取 10  $\mu\text{l}$  cell lysates，790  $\mu\text{l}$  dd H<sub>2</sub>O，200  $\mu\text{l}$  dye，混合均勻。
5. 採用 Bradford Protein Assay，測各種不同量之 BSA 在波長 595 nm 的吸光值畫出 standard curve，再測 sample 的 O.D. 值，求出 sample 的蛋白質濃度。

## 四、蛋白質電泳 (SDS-PAGE)：

試劑：

- |                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 1. 30% Acryamide/0.8% bisacryamide | 500 ml |
| Acryamide                          | 150 g  |
| N' N'-Methylene bisacryamide       | 4 g    |

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O，再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml，保存於 4 。

- |                           |          |
|---------------------------|----------|
| 2. Tris-HCl (2 M, pH 8.8) | 500 ml   |
| Tris-HCl                  | 121.14 g |



將 Tris-HCl 溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O , pH 調成 8.8, 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml。

3. Tris-HCl (2 M, pH 6.8) 500 ml

將 Tris-HCl 溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O , pH 調成 6.8, 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml。

4. 10% APS 10 ml

APS 1 g

將 APS 溶於 8 ml dd H<sub>2</sub>O , 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 10 ml , 保存於 4 。

5. Resolving gel (8%) 30 ml

H<sub>2</sub>O 15.8 ml

2M Tris-HCl, pH 8.8 6 ml

Acryamide/bis (30%/0.8%) 8 ml

20% SDS 150 µl

10% APS 150 µl

TEMED 20 µl

6. Stacking gel 10 ml

H<sub>2</sub>O 8 ml

2M Tris-HCl, pH 6.8 0.625 ml

Acryamide/bis (30%/0.8%) 1.33 ml

20% SDS	50 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
1M Tris-HCl, pH 6.8	1 ml
SDS	5 g
Sucrose	25 g
Bromophenol blue	10 mg
2-mercaptoethanol	5 ml

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O，再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml，保存於室溫。

步驟：

1. 將兩塊玻璃板、兩條 spacer 及灰色夾組合成一個製膠架，然後利用黑色旋鈕固定在底座。
2. 將下層膠配方所需的藥劑依序加入燒杯，攪拌均勻，利用 pipette 加到電泳槽至適當位置。
3. 加入 1 ml dd H<sub>2</sub>O，隔絕空氣，待凝膠 (約 20 分鐘)。
4. 將 dd H<sub>2</sub>O 倒掉，插入 comb，將上層膠配方所需的藥劑依序加入燒杯，攪拌均勻，利用 pipette 加到電泳槽。
5. 等上層膠凝固之後，將 comb 拿走，倒入上、下層各 200 ml 1X running buffer。
6. 將 sample 和 10X sample buffer (10:1) 混和均勻，稍微 spin 一下，

然後煮沸 5 分鐘。

7. 利用 micropipette , 將 sample 加到 well 內 , 進行膠體電泳法 (50 V、20 mA , 時間 18 小時 ; 200 V、30 mA , 時間 5 小時)。

## 五、 Western blotting analysis :

試劑 :

1. Transfer buffer	500 ml
Tris-HCl	1.5 g
Glycine	7.2 g
SDS	0.5 g
Methanol	100 ml

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O , 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml , 隔夜去除氣泡 , 保存於室溫。

2. 10X TBS	500 ml
Tris-HCl	30.3 g
NaCl	43.83 g

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O , pH 調成 8.8 , 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml。

3. Blotting buffer	50 ml
10X TBS	5 ml
BSA	1.5 g

Tween 20 (USB) 25  $\mu$ l

將所需之化學藥品溶於 35 ml dd H<sub>2</sub>O , 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 50 ml。

4. Washing buffer 500 ml

10X TBS 50 ml

Tween 20 500  $\mu$ l

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H<sub>2</sub>O , 再加 dd H<sub>2</sub>O 至 500 ml。

步驟 :

1. 利用 methanol 浸泡 PVDF transfer membrane 約 10 秒 , 再以 dd H<sub>2</sub>O 浸泡約 5 分鐘。
2. 利用 semi-phor transblotter 將電泳膠中的蛋白質 transfer 到 PVDF transfer membrane (25V、300mA , 1.5 小時)。
3. 將 PVDF membrane 放入 30 ml blotting buffer , 在 4 冰箱中 preblotting overnight。隔天 , 室溫下在 shaker 上 preblotting 30 分鐘 (shaker 擺動速度 5 rpm)。
4. 倒掉 preblotting buffer , 加入 10 ml 含 primary antibody (1:1000) 的 blotting buffer , 室溫下在 shaker 上 blotting 1.5 小時 (shaker 擺動速度 5 rpm)。
5. 以 washing buffer 清洗 membrane 三次 , 50 ml、5 分鐘 ; 50 ml、5 分鐘 ; 100 ml、10 分鐘 (shaker 擺動速度 40 rpm)。
6. 加入 10 ml 含 secondary antibody 的 blotting buffer(1:3000) , 室溫 blotting 1.5 小時 (shaker 擺動速度 5 rpm)。
7. 以 washing buffer 清洗 membrane 五次 , 50 ml、5 分鐘 ; 50 ml、

5 分鐘 ; 100 ml 10 分鐘 ; 150 ml 15 分鐘 ; 150 ml 15 分鐘 (shaker 擺動速度 40 rpm)。

8. 依 membrane 大小 ( $0.125 \text{ ml/cm}^2$ ) , 加入適量的 ECL kit (Amersham) solution I : solution II = 1 : 1 , 作用 1 分鐘後 , 以 X-ray film 感光。

## 六、 免疫沉澱法 (Immunoprecipitation) :

試劑 :

1. Protein A Sepharose beads

Protein A Sepharose CL-4B 0.15 g

1X TBS (滅菌) 10 ml

以滅菌 600 $\mu$ l 1X TBS 清洗六次 , 每次 30 分鐘 (置於 4 $^{\circ}$  ) , 隔天再以 1X TBS 清洗三次 , 最後溶於 1.5 ml 1X TBS , 保存於 4 $^{\circ}$  。

步驟 :

1. 取 5  $\mu$ l antibody , 加入 35  $\mu$ l Protein A Sepharose , 將 eppendorf 置於試管旋轉器 , 在 4 $^{\circ}$  下 , 旋轉 1.5 小時 (旋轉器轉速 12 rpm)。
2. 加入 500 $\mu$ g lysates , 旋轉 1.5 小時 (旋轉器轉速 12 rpm) 後 , 在 4 $^{\circ}$  下 , 離心 5 分鐘 (10000rpm) , 移除上清液 (勿吸到 beads) , 取 600 $\mu$ l RIPA buffer 清洗 Protein A Sepharose beads , 在 4 $^{\circ}$  下 , 離心 5 分鐘 (10000rpm) , 共清洗 3 次。
3. 移除上清液 (勿吸到 beads) , 加 60  $\mu$ l 2X sample buffer , 100 $^{\circ}$  水浴槽煮沸 3 分鐘 , spin 後 , 取上清液直接 loading。

## 七、 萃取 total RNA :

試劑 :

1. RNA extraction reagent 置於 4
2. Chloroform
3. Isopropanol
4. DEPC

1 liter 滅菌水加 1 ml DEPC , 以 1000 : 1 的比例配製成 DEPC H<sub>2</sub>O , 搖晃混合均勻後 , 靜置於抽風櫥 , 靜置 2 個小時以上 , 之後 121 濕滅 30 分鐘。

5. 75% ethanol

取 75 ml 100% ethanol RNA only (Merk) , 加入 25 ml DEPC H<sub>2</sub>O , 配製成 75% ethanol , 置於 -20 。

6. 50X TAE buffer

使用時可用 DEPC H<sub>2</sub>O , 稀釋成 0.5X TAE buffer。

7. 2% agarose gel

0.5X TAE buffer	50 ml
agarose	1 g
滅菌 dd H <sub>2</sub> O	50 ml

將 agarose powder 與 buffer 均勻攪拌，然後以微波爐分段加熱，分別為 30 秒、10 秒、10 秒，使 agarose 完全溶解，倒入 tray，插上 comb 使之凝固。

8. 37% Formaldehyde

9. 4X RNA loading dye

步驟：

1. 將舊的 medium 吸乾，此時千萬不可用 1X PBS wash，直接加入 1 ml RNA extraction reagent ( $1 \times 10^7$ /1 ml) 使細胞溶解，然後將粘稠狀的溶解物移至 15 ml conical tube，靜置室溫反應 5 分鐘。
2. 加入 0.2 ml chloroform，劇烈搖晃 15 秒，然後靜置室溫反應 2 分鐘。之後以 4、12000 rpm 離心 15 分鐘。
3. 離心後，將上清液小心抽出至新的 15 ml conical tube，加入等體積（大約 5 ml）的 isopropanol，然後均勻混和，放置在冰上 4 反應 10 分鐘。之後以 4、12000 rpm 離心 10 分鐘。
4. 將上清液倒掉，可以看到管部底層白色的 pellet，用 cold 1 ml 75% ethanol 沖洗底部 RNA 沉澱物來回數次，接著以 vortex 混合均勻之後以 4、12000 rpm 離心 5 分鐘。
5. 倒掉上清液，利用抽氣 pump 將剩餘的 ethanol 吸乾，然後放入抽氣櫥中，使 RNA 沉澱物變的乾燥透明（約 5 分鐘）依照 pellet 的大小，加入適量的 DEPC H<sub>2</sub>O 均勻混和，60~65 加熱 5 分鐘。
6. 加熱後，用 vortex 震勻，取 1  $\mu$ l RNA 加入 99  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O，利用分光光度儀測量 O.D. 值和 ratio 值（RNA 與 DNA 或非 RNA 物質的比值）。

7. 取 2  $\mu\text{g}$  total RNA (約 2  $\mu\text{l}$ ) , 加入 DEPC H<sub>2</sub>O (3  $\mu\text{l}$ )、 37% formaldehyde (2.5  $\mu\text{l}$ )、 4X RNA loading dye (2.5  $\mu\text{l}$ ) , 混和均勻後以 65 加熱 5 分鐘。然後以 2% agarose gel 和 0.5X TAE buffer 進行電泳 20 分鐘 (100 V)。實驗結束後 , agarose gel 以 EtBr 染色 , 膠內的 RNA 利用貴儀室的數位顯像儀分析結果。

## 八、 RT-PCR :

試劑 :

1. DEPC H<sub>2</sub>O
2. 5X RT buffer
3. dNTP (2.5 mM)
4. Oligo dT (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
5. DTT (0.1 M)
6. RNase inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )
7. Reverse transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )
8. Primers

*c-src* : (PCR 產物為 390 bp)

Forward : 5'-CCAGCTTGCGGATCTTGTAGTGC-3'

Reverse : 5'-CGCTGGCCGGTGGAGTGAC-3'

此 primers 的 PCR 產物 , 可反映出 *c-src* mRNA 的量。

9. 10X PCR buffer



## 10. Taq polymerase (5U/μl)

### 步驟：

1. 取 5 μg total RNA (約 6μl) , 加 26μl DEPC H<sub>2</sub>O , 乾浴槽 70 加熱 5 分鐘後 , 馬上放到冰上。
2. 加入 10 μl 5X RT buffer、 4 μl dNTP (2.5mM)、 1 μl Oligo dT (0.5μg/μl)、 1 μl DTT (1 M)、 1 μl RNase inhibitor (40U/μl) , 水浴槽 42 預熱 5 分鐘。
3. 加入 1 μl reverse transcriptase (200 U/μl) , 水浴槽 42 進行逆轉錄反應 1 小時。
4. 乾浴槽 94 加熱 5 分鐘 , 終止反應 (保存於-20 )。
5. 取 1 μl cDNA、 37.5 μl 滅菌水、 5 μl 10X PCR buffer、 4 μl dNTP (2.5 mM)、 1 μl forward primer (10 μM)、 1 μl reverse primer (10 μM) 0.5 μl Taq polymerase (5 U/μl) , 混和均勻 , 進行PCR 反應 (94 , 5 分鐘後 , 以 94 , 30 秒 ; 60 , 30 秒 ; 72 , 30 秒 , 重複 36 個循環 ; 最後再以 72 反應 5 分鐘)。

## 九、 Cell migration assay :

### 試劑：

1. collagen coating buffer	10 ml
collagen (10mg/ml)	12.5 μl
滅菌 1X PBS	10 ml

取 15 μl stock collagen 加入 6 ml 的 PBS, 將濃度稀釋成 12.5 μg/ml , 用注射管吸取 coating collagen, 打入 filter 中過濾備用。

2. 50% methanol

3. 10% Giemsa stain reagent

步驟：

1. 取 1 ml 配製好的 collagen buffer 放入 3 cm dish 當中，然後把 dish 靜置於 4 冰箱 O/N。
2. 隔日把多餘的 buffer 吸乾，以 1X PBS wash 兩次。
3. 用滅菌夾子夾取白色膠環放入 3 cm dish 中。
4. 將細胞數控制在  $6 \times 10^5$  cell/ml，取 1ml 加入白色膠環中。
5. 蓋上蓋子，把 dish 放在鐵盤，一起置入 incubator O/N。
6. 隔日，把白色膠環拿起用 1X PBS wash，換新的 medium 之後，以 Giemsa stain 觀察 migration 的情形。

### 第三章 結果 ( Results )

#### 一、 LPS 會促進 Caco-2 大腸癌細胞的生長

人體大腸中含有大量的格蘭氏陰性菌，而格蘭氏陰性菌細胞壁中的 LPS 會引起大腸細胞出現發炎或其它的免疫反應 (Nogare et al., 1991)。因此我們想了解，當人類的大腸癌上皮細胞 (Caco-2) 受到 LPS 刺激之後，是否會影響其生長。首先我們將 Caco-2 細胞 subculture 培養 18 小時後，予以不同濃度的 LPS (0、1、5、10  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理 24、48、72、96 小時，並計數細胞，然後畫出其生長曲線。實驗結果發現，在 24 小時的時候 1、5、10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 對於 Caco-2 細胞的生長影響，分別為對照組的 106%、116%、125%；在 48 小時的時候，分別為對照組的 103%、103%、135%；在 72 小時的時候，分別為對照組的 102%、102%、137%；在 96 小時的時候，分別為對照組的 101%、101%、117% (Figure 4)。這意味著不論在哪一個時間點，當 LPS 濃度越高時，越能夠促進 Caco-2 細胞的生長。

#### 二、 LPS 促進 Caco-2 細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation

過去的文獻曾經指出，以 LPS 刺激細胞之後，細胞內許多蛋白的 tyrosyl phosphorylation 活性會大量增加，透過這樣的效果，LPS 會造成細胞不正常的增生。所以我們想知道當 LPS 刺激 Caco-2 細胞之後，Caco-2 細胞中蛋白質的 tyrosyl phosphorylation 是不是也因此受到影響。為了回答這個問題，我們利用 10  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 分別處理

Caco-2 細胞 0、6、12、24、48、72、96 小時之後，收集 cell lysates 並以 anti-pTyr Ab (PY20)進行 western immunoblotting。從實驗的結果來看，在 LPS 刺激 Caco-2 細胞之後，細胞內總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 是增加的，且呈現 time-dependent 的現象 (Figure 5)。這意味著細胞內的 tyrosine kinase activity 會因 LPS 的刺激而活化，因此我們想找出受 LPS 調控的 tyrosine kinase 來。

### 三、 LPS 可以增加 c-Src 的蛋白質表現量

c-Src 是一個 tyrosine kinase，其異常活化與大腸癌的發生有密切關係 (Jacqueline et al., 1999)。在先前的實驗中，我們以 LPS 刺激 Caco-2 細胞 96 小時之後，可以觀察到細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 會隨著 LPS 刺激的時間慢慢增加。由於 c-Src 能促進細胞的增生，所以我們想了解 LPS 是否會藉由增加 c-Src 蛋白表現量或活性，進而促進 Caco-2 細胞的生長。為了回答這個問題，我們將 Caco-2 細胞以 10  $\mu$ g/ml LPS 處理不同時間後 (0、6、12、24、48、72、96 小時) 收集 cell lysates，以 SDS-PAGE 分離蛋白質並 transfer 到 nitrocellulose membrane 上，以 anti-Src antibody 進行 western immunoblotting。從實驗結果發現，LPS 可以增加 Src 蛋白質在細胞中的表現量，而 Src 量的增加會隨著 LPS 刺激時間的增加而增強 (Figure 6)。同時我們也發現 LPS 增加 Src 蛋白表現量與細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation，都有 time-dependent 的現象，似乎二者存有某種程度的相關性。

### 四、 LPS 會增加 c-src mRNA 的表現

當 Caco-2 細胞以 LPS 刺激之後，c-Src 的蛋白表現量會隨著 LPS 刺激的時間慢慢增加。接下來，我們想了解 LPS 是否會透過影響 *c-src* mRNA 的表現，進而導致 c-Src 蛋白表現量的增加？為了回答這個問題，我們選用一組 *c-src* primers (242~260 及 609~631 nucleotides)，藉由 RT-PCR 的方式來判斷 *c-src* mRNA 的量是否受到 LPS 的影響。首先，我們選用不同濃度的 LPS (0、1、5、10  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理細胞，並且在 96 小時後萃取出 total RNA，以 reverse transcriptase 將 total RNA 反轉錄成 cDNA 後，再以 *c-src* primers 進行 PCR 反應。從實驗的結果來看，若以  $\beta$ -actin 表現量作為一個 internal control，Caco-2 細胞在不同 LPS 濃度的刺激下，*c-src* mRNA 的表現量會隨 LPS 濃度之升高而增加 (Figure 7)。因此我們推測 c-Src 蛋白表現量的增加，是緣於 LPS 會促進 *c-src* 的 transcription 而有以致之。

## 五、 LPS 可以影響 Shc 與 ERK 的 tyrosyl phosphorylation

Shc 與 ERK 是位在 c-Src 下游的蛋白，並且具有調控細胞生長的功能。在之前的實驗中，我們發現 LPS 可以促進 c-Src 的表現，因此接著我們想了解在 LPS 刺激之後，位在 c-Src 下游的 Shc 與 ERK，它們的蛋白表現與活性是否受到影響。為了回答這個問題，我們以 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 刺激 Caco-2 細胞，然後在不同的時間點 (0、6、12、24、48、72、96 小時) 收集 cell lysates，並且利用 anti-Pi-Shc (pY317) 與 anti-Shc 和 anti-Pi-ERK 與 anti-ERK Ab 進行 western immunoblotting。實驗結果發現，Shc 與 ERK 兩者蛋白表現，並不會受到 LPS 的影響；但是 Shc Pi-Tyr-317 與 ERK 的 tyrosyl phosphorylation，卻會隨著 LPS

刺激時間的增加而逐漸上升。所以我們認為 LPS 促進 c-Src 蛋白表現量增加的同時，Shc 與 ERK 這兩個 c-Src 下游的蛋白活性也會因此而上升(*Figure 8, 9*)。

## 六、 LPS 可以影響 FAK 的 tyrosyl phosphorylation

FAK 的分子量為 125 kDa，同時也是 Src 的受質之一。以 LPS 刺激 Caco-2 細胞之後，細胞內總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 是增加的，尤其是在分子量介於 120~130 kDa 之間的蛋白，更是明顯。由於 Tyr-397 是 FAK 的 auto-phosphorylation state，故其磷酸化的多寡可以反映出 FAK 的酵素活性；也因此我們想了解細胞在 LPS 的刺激之下，其 FAK 的酵素活性是否會因而增加。為回答這個問題，我們以 10 µg/ml LPS 刺激 Caco-2 細胞，然後在不同的時間點 (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 小時) 收集 cell lysates，並且利用 Pi-Tyr-397 與 anti-FAK Ab 進行 western immunoblotting。實驗結果發現，FAK 的蛋白表現量不會因為 LPS 的刺激而有所變化；但有趣的是，FAK 的 auto-phosphorylation state 卻會隨著 LPS 刺激時間的增加而上升(*Figure 10*)。因此，我們認為在 LPS 促進 c-Src 蛋白表現量增加的同時，LPS 也增加了 c-Src 下游蛋白 FAK 的酵素活性。

## 七、 LPS 會增加 Caco-2 細胞的 migration 能力

LPS 刺激 Caco-2 細胞之後，FAK 的 autophosphorylation 會明顯增加。過去文獻指出，FAK 活性的變化，對於細胞 metastasis 的能力

是有影響的 (Klemke et al., 1998)。因此我們想了解 Caco-2 細胞在 LPS 處理之後，細胞的 migration 能力是否會受到影響？為了回答這個問題，首先我們將 12.5  $\mu\text{g/ml}$  collagen coating 在 culture dish 上，16 ~ 18 小時之後，將多餘的 collagen 移走，然後在 culture dish 中放入白色膠環。加入 collagen coating 的目的是由於當 Caco-2 細胞受到 collagen 的刺激之後，會增加細胞 motility 的能力 (Marc et al., 1992) (Figure 11)。在實驗過程中，我們在白色膠環中種入大約  $3 \times 10^5$  個細胞，並使之靜置 16 ~ 18 小時而黏著在培養盤中。隔天將白色膠環拿除，再分別加入 0、1、5、10  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 刺激，並在 48、96、144 小時的時候觀察細胞 migration 的變化。由實驗結果得知，在加入 LPS 刺激之後，Caco-2 細胞 migration 的距離會隨著 LPS 刺激時間的上升而逐漸增加，顯示 LPS 對於 Caco-2 細胞的 migration 的確有促進的效果，且有 dose-dependent 的現象 (Figure 12)，但就總體而言其影響的程度並不是很明顯 (Figure 13)。

#### 八、 curcumin 會抑制 Caco-2 大腸癌細胞的生長

在過去的許多文獻當中，curcumin 被證實為一種有效的抗癌成份，因此我們想了解當大腸癌細胞受到 curcumin 刺激之後，會有什麼樣的影響。首先我們將 Caco-2 細胞 subculture 培養 18 小時後，予以不同濃度的 curcumin (0、10、30、50  $\mu\text{M}$ ) 處理 24、48、72 小時，並計數細胞，然後畫出其生長曲線。實驗結果顯示，10  $\mu\text{M}$  curcumin 對於 Caco-2 細胞的生長並沒有明顯的抑制效果 (24、48、72 小時的細胞數目分別為對照組的 75%、73%、70%)；但當 curcumin 濃度為 30  $\mu\text{M}$  時，其對 Caco-2 細胞則有較明顯的抑制作用 (24、48、72 小時的細胞數目分別為對照組的 58%、40%、41%)；最後當 curcumin

濃度為 50  $\mu\text{M}$  時，其對細胞則有非常明顯的抑制效果 (24、48、72 小時的細胞數目分別為對照組的 47%、18%、7%) (*Figure 14*)。

## 九、 curcumin 抑制 Caco-2 細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation

在 curcumin 的刺激之下，Caco-2 細胞的生長會受到抑制。雖然這樣的結果與過去的文獻相符，但我們好奇的是 curcumin 透過何種分子機轉來調控這個現象？由於 tyrosyl phosphorylation 與細胞的生長密切相關，因此，首先我們想先了解 curcumin 對細胞內總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 是否有影響。為了回答這個問題，我們利用不同濃度的 curcumin (10、50、100、125、150  $\mu\text{M}$ ) 處理細胞，並且在 12 小時後收集 cell lysates，以電泳 (SDS-PAGE) 分離蛋白質後將電泳膠上的蛋白質 transfer 到 nitrocellulose membrane，然後以 anti-pTyr Ab (PY20) 進行 western immunoblotting。從實驗的結果，我們看到隨著 curcumin 濃度的增加，細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 會隨之下降；另一方面，分子量介於 120~130 kDa、50~70kDa 的蛋白質其 tyrosyl phosphorylation 下降的情形更是明顯，並且呈現 dose-dependent 的現象 (*Figure 15*)。當細胞以 10 或 50  $\mu\text{M}$  curcumin 處理 12 小時後，其總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 並不會明顯降低；但當 curcumin 濃度為 100  $\mu\text{M}$  時，相同的實驗條件會使總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 顯著下降 (*Figure 15*)。因此接下來，我們想探究哪些蛋白質的 tyrosyl phosphorylation 會因 curcumin 的處理而顯著下降？其下降的分子機轉為何？並且此與 curcumin 對細胞生理活性的影響有何相關性？



## 十、 curcumin 可以降低 c-Src 的蛋白質表現量

c-Src 是一個分子量 60 kDa 的 nonreceptor tyrosine kinase, 其在細胞的生長、分化上扮演重要的角色。但當其異常活化時, 通常會導致體內許多不同細胞的癌化。由於 curcumin 處理 Caco-2 細胞 12 小時之後, 細胞總體蛋白質的 tyrosyl phosphorylation 會下降, 而 c-Src 又與細胞的生長調控密切相關, 因此我們想探討 curcumin 有無可能藉由抑制 Src 蛋白表現量或活性, 進而抑制了 Caco-2 細胞的生長。為了回答這個問題, 我們分別利用 50、100、125、150  $\mu$ M 的 curcumin 處理 Caco-2 細胞, 12 小時後收集 cell lysates, 並以 SDS-PAGE 分離蛋白質並 transfer 到 nitrocellulose membrane 上, 以 anti-Src antibody 進行 western immunoblotting。從實驗結果中發現, curcumin 可以抑制 Src 蛋白質在細胞中的表現量, 而抑制的情形是會隨著藥物濃度的增加而增強 (Figure 16); 同時我們也發現 curcumin 抑制 Src 蛋白表現量與其抑制細胞總體蛋白 tyrosyl phosphorylation 的濃度相一致。

## 十一、 curcumin 會降低 *c-src* mRNA 的表現

當 Caco-2 細胞以不同濃度的 curcumin 刺激之後, c-Src 的蛋白表現量會隨著 curcumin 濃度的增加而遞減。接下來, 我們想知道 curcumin 是否會透過影響 *c-src* mRNA 的表現, 進而導致 c-Src 蛋白表現量的降低? 因此我們選用一組 primers, 藉由 RT-PCR 的方式來判斷 *c-src* mRNA 的量是否受到 curcumin 的影響。首先, 我們利用不同濃度的 curcumin (0, 50, 100, 150  $\mu$ M) 處理細胞 12 小時後萃取出 total RNA; 以 reverse transcriptase 將 total RNA 反轉錄成 cDNA, 再以 *c-src*

primers (242~260 及 609~631 nucleotides)進行 PCR 反應。若我們以  $\beta$ -actin 的 mRNA 量做為一個 internal control, 從實驗的結果我們發現 Caco-2 細胞在不同濃度的 curcumin 刺激之下, *c-src* mRNA 的表現量會明顯的下降, 且呈 dose-dependent 的現象 (Figure 17)。因此我們認為藉由影響 c-Src 的 transcription, curcumin 可以抑制 c-Src 的形成。

## 十二、 curcumin 會影響 c-Src 的 tyrosyl phosphorylation

由於 curcumin 作用下的 Caco-2 細胞其 c-Src 蛋白量會降低。因此, 我們懷疑這也是造成細胞內 Src kinase activity 下降的主因。為求證此一假說, 我們採用與先前實驗相同濃度的 curcumin (0, 50, 100, 125, 150  $\mu$ M) 處理 Caco-2 細胞 12 小時後, 測定細胞內整體 Src 的活性。由於 cortactin 是一個 Src 的受質, 故其 tyrosyl phosphorylation 的程度可以做為細胞內整體 Src 活性的指標。由實驗結果發現, 以 50  $\mu$ M curcumin 處理 Caco-2 細胞 12 小時之後, cortactin 的 tyrosyl phosphorylation 並不會受到影響; 不過當其濃度增加至 100  $\mu$ M 時, cortactin 的 tyrosyl phosphorylation 就會明顯下降, 並且隨著 curcumin 濃度的上升, tyrosyl phosphorylation 下降的程度則更加明顯 (Figure 18)。因此我們認為 curcumin 藉由抑制 c-Src 的蛋白質表現量使細胞內整體 c-Src 的 kinase activity 下降。

## 十三、 curcumin 可以影響 FAK 的 tyrosyl phosphorylation

FAK 是一個分子量為 125 kDa, 位於 focal adhesion 的蛋白, 同時

也是 Src 的受質之一。由於 curcumin 處理後的細胞，c-Src 的表現量會下降，連帶地其在細胞內的 kinase activity 也會隨之下降。因此我們有興趣知道因 curcumin 刺激而 tyrosyl phosphorylation 大幅下降，分子量介於 120~130 kDa 之間的蛋白，其中是否有 FAK？為了回答這個問題，我們將不同濃度的 curcumin (0、50、100、125、150  $\mu$ M) 處理 Caco-2 細胞 12 小時後，收集 cell lysates，先以 FAK antibody 進行免疫沉澱 (immuno-precipitation)，而各組的 FAK immunoprecipitates 再經 SDS-PAGE、protein transfer 後所得的 western blot，分別以 anti-FAK 和 anti-pTyr Ab 分析其 FAK 的蛋白量及其 tyrosyl phosphorylation 的程度。由實驗結果知，FAK 的蛋白表現量不會因為 curcumin 的刺激而有所變化；但其 tyrosyl phosphorylation 卻會隨著 curcumin 濃度的上升而跟著下降 (*Figure 19A*)。

FAK 是一個 tyrosine kinase，其 Tyr-397 是 FAK 的 auto-phosphorylation site。透過 FAK 的 auto-phosphorylation site，FAK 與 Src 的 SH2 domain 結合並進一步地被 Src 磷酸化於其 Tyr-576、-577、-863、-925 等處。目前已知 Tyr-576/577 的磷酸化會增加 FAK 的酵素活性。由於 curcumin 處理後的 Caco-2 細胞其 FAK tyrosyl phosphorylation 會大幅降低。因此我們想知道反映 FAK 酵素活性的 Tyr-397 phosphorylation，是否也會因 curcumin 的作用而下降？為回答這個問題，我們直接收集 curcumin 刺激之後的 cell lysates，以 Pi-Tyr-397 Ab 進行 western immunoblotting。從實驗的結果中，我們看到當細胞以 50  $\mu$ M curcumin 刺激 12 小時之後，FAK Tyr-397 的磷酸化並不會受到影響；但是當 curcumin 濃度增加至 100  $\mu$ M 時，FAK

Tyr-397 磷酸化的情形則會明顯的受到抑制 (*Figure 19B*) 因此我們認為 curcumin 作用後，所造成 c-Src 量及整體酵素活性的下降，會使 FAK 的 tyrosyl phosphorylation 及其 autophosphorylation 受到影響。

#### 十四、 curcumin 會抑制 Caco-2 細胞的 migration 能力

根據文獻指出，FAK 活性的變化，對於細胞 metastasis 的能力是有影響的 (Klemke et al., 1998)。而 curcumin 刺激 Caco-2 細胞之後，FAK 的 tyrosyl phosphorylation 及其 autophosphorylation 會明顯受到抑制。這使我們聯想到，Caco-2 細胞在 curcumin 處理之後，細胞的 migration 能力是否會受到影響？為了回答這個問題，首先我們將 12.5  $\mu\text{g/ml}$  collagen coating 在 culture dish 上，16 ~ 18 小時之後，將多餘的 collagen 移走，然後在 culture dish 中放入白色膠環。在實驗過程中，我們在白色膠環中種入大約  $3 \times 10^5$  個細胞，並使之靜置 16 ~ 18 小時而黏著在培養盤中。隔天將白色膠環拿除，再分別加入 0、10、30、50  $\mu\text{M}$  的 curcumin 刺激，並在 48、96、144 小時的時候觀察細胞 migration 的變化。由實驗結果得知，細胞長在有 collagen coating 的培養皿與長在沒有 collagen coating 的培養皿相較之下，長在有 collagen coating 培養皿的細胞有較明顯的 migration (*Figure 20*)；而這結果與先前的文獻是一致的。另外，在加入 curcumin 刺激之後，Caco-2 細胞 migration 的距離會隨著 curcumin 濃度的上升而逐漸減少，顯示 curcumin 對於 Caco-2 細胞的 migration 的確有抑制的效果，且有 dose-dependent 的現象 (*Figure 21*)。

## 第四章 討論 ( Discussion )

人體大腸中寄生著許多格蘭氏陰性菌；而格蘭氏陰性菌細胞壁中含有一種被稱為 lipopolysaccharide (LPS)的成份 (Rietschel et al., 1992)，因此大腸腸壁細胞較諸身體其它部位的表皮細胞易和 LPS 接觸。由於大腸上皮細胞表面，具有與 LPS 親和性較高的接受器 (Mayeux et al., 1997；Wright et al., 1990)，所以我們想知道 LPS 刺激下的大腸上皮細胞，是否是大腸直腸癌的潛在原因之一。為釐清這個問題，因此我們選用一株大腸癌上皮細胞 (Caco-2)來研究 LPS 刺激下，大腸表皮細胞的訊息傳遞路徑，及其生長、移動所受的影響。

我們的實驗結果指出，細胞長期以 10  $\mu$ g/ml LPS 處理其將有增生的現象，且 Caco-2 細胞受到 LPS 刺激之後，細胞內總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 會逐漸的上升，這說明了 LPS 的確會去影響某些 tyrosine kinase 的活性，進而加速 Caco-2 細胞的生長。由於 LPS 刺激下的 macrophage，其細胞中 Src family 的 Lyn Hck 及 c-Fgr 三者 tyrosyl phosphorylation 會上升，進而使 macrophage 大量增生(Stefanova et al., 1993；Beaty et al., 1994)；因此我們懷疑在 LPS 造成大腸表皮細胞增生的過程中，Src family kinase 可能扮演了一個重要的角色。的確，大腸表皮細胞的 c-Src 表現量會隨著 LPS 處理時間的增加而升高；而 RT-PCR 的實驗更證明了 LPS 會增加 *c-src* mRNA 的量。換言之，LPS 可以藉由促進 *c-src* 的轉錄作用，來增加 c-Src 的蛋白量。而 LPS 刺激下，所觀察到 Shc Tyr-317 phosphorylation 及 ERK phosphorylation 的增加，更印證了 Src Shc Grb2/SOS Ras Raf MEK ERK

這條訊息傳遞路徑的活化。由於 c-Src 過量表現會造成細胞癌化 (Jacqueline et al., 1999)，故我們認為 LPS 有可能藉由促進 *c-src* 的轉錄作用增加 c-Src 的蛋白量，進而使 ERK 活化，來促使大腸細胞的癌化。

在 Masayuki 等人的實驗中，他們發現在大腸癌細胞中 LPS 會活化 transcription factor, NF- $\kappa$ B，來促進前列腺素 (PGE<sub>2</sub>) 的合成。由於前列腺素會促進 cell proliferation (Masayuki et al., 2000)，故前列腺素的合成被認為是 LPS 促進大腸直腸癌的原因之一，而本篇實驗結果提供了另一個 LPS 的致癌機轉。這也是為什麼多吃高纖維食物，增加腸胃蠕動，促進排泄以降低罹患大腸癌風險提供了佐證。然而目前我們對於 LPS 如何促進 *c-src* 的轉錄作用並不明瞭，未來的研究可朝找出 c-Src promoter 上的 LPS-response element 及可與之結合的 transcription factor，做進一步的探討。

薑黃素 (curcumin) 是一種由薑科植物 (*Curcuma longa* Linn) 地下莖部份所萃取出來的天然成份。curcumin 與 aspirin 都屬於多酚類的化合物 (polyphenolic compound)，皆具有抗氧化、抗發炎與預防癌症的功效 (Wargovich et al., 1995, 2000)。但是不同於 aspirin 的是 curcumin 對於人體並不會產生非病理性發燒或嘔吐反應的副作用。並且由於 curcumin 可做為天然的食品添加物或調味料，故其經由腸道吸收之後，可以對大腸細胞做最直接的刺激。因此我們嘗試以 curcumin 刺激 Caco-2 細胞後，研究其對於大腸癌細胞生長、移動的

影響及其間所涉及的分子機轉。

之前文獻指出  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M 的 curcumin 可以抑制 L-929 fibrosarcoma 細胞的生長 (Ruby et al., 2000)。在我們的實驗裡，我們發現 10、30  $\mu$ M curcumin 會抑制 Caco-2 細胞的生長；當 curcumin 濃度達 50  $\mu$ M 時，Caco-2 細胞生長會受到抑制，甚至有 apoptosis 的現象出現。這樣的結果，證實了 curcumin 的確具有抑癌的功效，並且針對大腸癌，或許可做為一種有效用藥。

由於 tyrosyl phosphorylation 與生長在內的許多生理現象關係密切，因此我們想探討 curcumin 對 Caco-2 細胞總體蛋白之 tyrosyl phosphorylation 有何影響？結果我們發現細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation 會隨著 curcumin 濃度的升高而下降。由於 Src 過量表達或活性增加常與大腸癌的發生有很高的相關性，因此我們想探討 curcumin 處理下，大腸癌細胞內 Src 的表現情形。由 western-immunoblotting，我們發現 curcumin 刺激下的 Caco-2 細胞之後，其 Src 的蛋白表現會受到抑制，並且呈現 dose-dependent 的現象。而 RT-PCR 更證明了 curcumin 會減少 *c-src* mRNA 的量。亦即 curcumin 可以藉由抑制 *c-src* 的轉錄作用，來減少 c-Src 的蛋白量。c-Src 蛋白量的減少，可以解釋其總體 kinase activity 的降低。因為無論 Shc 或 cortactin (二者皆為 c-Src 的 substrates) tyrosyl phosphorylation 皆會因 curcumin 的處理細胞而下降。Shc Tyr-317 phosphorylation 的降低會進一步使 ERK 活性降低，進而減緩細胞生長。此外，FAK (c-Src 的另

一個受質) tyrosyl phosphorylation 的降低，更佐證了這個發現。由於 c-Src 磷酸化後的 FAK，其 tyrosine kinase activity 會增加。故 curcumin 所造成 FAK tyrosyl phosphorylation 的減少，會使 FAK 的 kinase activity 降低。而這可由 FAK Tyr-397 autophosphorylation 的明顯下降而獲得證明。至今，只有 EGFR 及 Neu 這二種 tyrosine kinase 被指出為 curcumin 的標的蛋白，其活性會因細胞受到 curcumin 處理而下降。但在本篇論文，我們發現另外兩個 tyrosine kinase: c-Src 和 FAK，其活性也會因 curcumin 的作用於細胞而受到抑制。

大腸癌病灶具有很強的轉移能力，這是由於大腸癌細胞具有很強的 migration 能力。而細胞調控 motility 的能力，主要會透過 integrin signaling pathway 以及 Src-FAK complex (Ilic et al., 1995)。因此我們認為在 curcumin 抑制 c-Src 及 FAK 活性的同時，會抑制細胞的 migration。的確，在我們的 migration assay 中，我們發現 curcumin 會抑制 Caco-2 細胞向外延伸，並且有 dose-dependent 的現象。由此可知，curcumin 不僅可以減少 c-Src 的表現達到抑制大腸癌細胞生長的效果，同時也可以減少 c-Src 與 FAK 的活性，進而抑制大腸癌細胞 migration 能力，預防大腸癌病灶的轉移。

LPS 與 curcumin 這兩者的關係有如陰與陽，LPS 會促進大腸癌細胞的癌化，而 curcumin 卻可以抑制大腸癌細胞的增生。過去的實驗也指出，LPS 與 curcumin 對於 transcription factor NF- $\kappa$ B 和 AP-1 的活性都會產生影響，然而他們所產生的影響卻是相反的



(Min-Hsiung et al., 2000 ; Yan-shi et al., 2001 ; Rajeshwari et al., 2001)。同樣的在我們的實驗中也可以觀察到，LPS 與 curcumin 會分別促進與抑制 c-Src tyrosine kinase 與 FAK 的活性。因此我們認為平日飲食不惟多攝取富含纖維的蔬果，增加身體的排泄，減少腸壁細胞受 LPS 刺激的機會；同時飲食中也可添加具抑癌功效的 curcumin 來預防大腸表皮細胞的增生、癌化及病灶的轉移。

## 參考文獻 ( Reference )

Akio T, Carol PG, Richard RA, Stephen KA, Hsing-Jien K, and Donald JF. (1987) DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human *c-src* protein : implications of sequence divergence among *src*-type kinase oncogenes. *Mol Cell Biol.* 7, 1978- 1983.

Amphawan A, Nongnuch V, and Duang B. (1995) Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacology.* 49, 163-169.

Andrew EA, Alan KH , and RL J. (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current Opinion Cell Biol.* 11,737–744.

Anja S, Emmanuelle C, and Allan H. (2001) Lipopolysaccharide-induced activation of  $\beta$ 2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen-activated protein kinase, and the Rap1 GTPase. *Mol Cell Biol.* 21, 438-448.

Anna R, Kira S, Elena M, Ernst-Dietrich K, Armand T, and Alexander T. (1999) Phosphorylation of p125FAK and paxillin focal adhesion proteins in *src*-transformed cells with different metastatic capacity. *FEBS Lett.* 455, 145-148.

Anoop KS, Gurmel SS, Deepa T, and Radha KM. (1996) Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. *Cancer Lett.* 107, 109-115.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, and Juliano RL. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors : the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Therapeut.* 50, 197-263.

Cai H, Jiali L, Christian CH, and Xi Z. (1998) The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Boil Chem.* 273, 25770-25776.

Carla JC. (1999) New insights into the role of serum amyloid P

component, a novel lipopolysaccharide-binding protein. *FEMS Immunol Med Mic.* 26, 197-202.

Christian J, Cynthia AB, Maria PR, Booker J, Acharan SN, David AB, and Balfour S. (1999) Curcumin blocks cytokine-mediated NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- $\kappa$ B kinase activity. *The J Immuno.* 163, 3474-3483.

Christof RH, Datsun AH, and David DS. (2000) Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. *J Boil Chem.* 275, 41092-41099.

Chuang SE, Kuo ML, Hsu CH, Chen CR, Lin JK, Lai GM, Hsieh CY, and Cheng AL. (2000) Curcumin-containing diet inhibits diethyl-nitrosamine induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 331-335.

Conney AH, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Manchand PS, Laskin JD, and Huang MT. (1991) Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul.* 31, 385-389.

Cross FR, Garber EA, and Hanafusa H. (1985) N-terminal deletions in rous sarcoma virus p60Src : effects on tyrosine kinase and biological activities and on recombination in tissue culture with the cellular src gene. *Mol Cell Biol.* 5, 2789-2795.

Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark LH, Reuhl KR and Conney AH. (1994) Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 54, 5841-5847.

Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, and Conney AH. (1991) Inhibitory effects of curcumin *in vivo* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* 51,813-819.

Huang MT, Ma W, Lu YP, Chang RL, Fischer C, Manchand PS, Newmark HL, and Conney AH. (1995) Effect of curcumin,

demethoxycurcumin, bisdemethoxy-curcumin and tetrahydrocurcumin on TPA-induced tumor promotion. *Carcinogenesis* 16, 2493-2497.

Huang MT, Smart RC, Wong CQ, and Conney AH. (1988) Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48, 5941-5946.

Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, and Conney AH. (1992) Inhibitory effect of curcumin on tumor initiation by benzo [a]pyrene and 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 13, 947-954.

Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T, and Aizawa S. (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.

Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ, and Lin JK. (1996) Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer.* 26, 111-120.

Jen-Kun L, and Shoei-Yn LS. (2001) Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B).* 25, 59-66.

Jones RJ, Brunton VG, and Frame MC. (2000) Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer.* 36, 1595-1606.

Keith S, Christopher MD, Matthew W, and Carolyn F. (1996) Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and DMBA-DNA adduct formation by curcumin. *Cancer Lett.* 103, 137-141

Klemke R, Leng J, Molander R, Brooks P, Vuori K, and Cheresch D. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. (1998) *J Cell Biol.* 140, 961-972.

- Knirel YA. (1990) Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol.* 17, 273-304.
- Kodi SR. (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322-6330.
- Kunchandy E, and Rao MNA. (1990) Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int'l J Pharm.* 38, 239-240
- Lata GM, Ramadasan K, Girija K. (1999) Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett.* 141, 159-165.
- Lin JK, Chen YC, Huang YT, and Lin-Shiau SY. (1997) Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem.* 28/29, 39-48.
- Luigina F, and Denise D. (1998) Nitric oxide enhances prostaglandin production in ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Euro J Pharmacology.* 348, 247-256.
- Lu YP, Chang RL, Lou YR, Huang MT, Newmark HL, Reuhl KR, and Conney AH. (1994) Effect of curcumin on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 15, 2363-2370.
- Lutz H, Volker EL-S, Artur JU, Hans-Dieter F, and Ernst TR. (1998) Components of gut bacteria as immunomodulators. *Inter J Food Microbiology.* 41, 141-154.
- Marc DB, Irvin MM, and Joseph AM. (1992) Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest.* 90, 15-23.
- Marcia AW, Jeong HY, Leif EO, and Robert MW. (2001) Cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E<sub>2</sub> production are up-regulated in a rat bladder inflammation model. *Euro J Pharmacology.*

417, 239-248.

Margaret MM, Andreas G, Hudson EA, Simon MP, Matthew SS, and Sally AP. (2000) Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicology Lett.* 112–113, 499–505.

Mary TC, Stacey LH, and Anthony LD. (1996) Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages. *J Boil Chem.* 270, 6824-6829.

Masayuki K, Takashi M, Kenji I, Akihiko U, Yasuo M, Mitsuo K, and Masao T. (2000) Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Oncogene* 19, 1225-1231.

Mazumder A, Raghavan K, Weinstein J, Kohn KW, and Pommier Y. (1995) Inhibition of HIV-1 integrase by curcumin. *Biochem Pharm.* 49, 1165-1170.

McMahon SB, and Monroe J. (1996) The role of early growth response gene-1 (egr-1) in regulation of the immune response. *J Leukoc Biol.* 60, 159–66.

Megan TB, and Jonathan AC. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *BBA.* 1287,121-149.

Michael DS. (2001) Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *BBA.* 1540, 1-21.

Michael JW. (2001) Colon cancer chemoprevention with ginseng and other botanicals. *J Korean Med Sci.* 16, S81-S86.

Min-Hsiung P, Shoen-Yn LS and Jen-Kun L. (2000) Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I $\kappa$ B Kinase and NF $\kappa$ B activation in Macrophages. *Biochem Pharmacol.* 60, 1665–1676.

Mushtaq A, Pandora T, and Russell MM. (1998) Role of activating

Protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem.* 267, 16323-16329.

Otto H, Artur JU, Helmut B, Hans-Dieter F, Ernst TR. (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Mic.* 16, 83-104.

Peter BJ, and Tony H. (2001) Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411, 355- 365.

Rajeshwari M, Susan LS, Ya L, and Salman A. (2001) Impaired activation of AP-1 and altered expression of constituent proteins in rat adrenal during ageing. *Mech Ageing Dev.* 122, 1169-1186.

Rao CV, Rivenson A, Simi B and Reddy BS. (1995) Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res.* 55, 259–266.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, and Brade H. (1994) Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 218, 217-225.

Roberto M, Roberta F, Rekha B, and COLIN JG. (2000) Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Bio Med.* 28, 1303–1312, 2000.

Rosenberg L, Louik C, and Shapiro S. (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma. *Cancer* 82, 2326-2333.

Ruby JA, Tessy TM, and Devarajan K. (2000) L-929 Cells harboring ectopically expressed RelA resist curcumin-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 275, 15601-15604.

Ruey-Long H, William HS, and Mien-Chie H. (1999) Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185<sup>neu</sup> and also depletes p185<sup>neu</sup>. *Clin Cancer*

Res. 5, 1884-1891.

Sanjaya S, and Bharat BA. (1995) Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B Is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). *J Biol Chem.* 270, 24995- 25000.

Scott D, Mary-Anne S, and Keith B. (2001) SRC transcriptional activation in a subset of human colon cancer cell lines. *FEBS Lett.* 487, 367-371.

Shih CA, and Lin, JK. (1993) Inhibition of 8-hydroxydeoxyguanosine formation by curcumin in mouse fibroblast cells. *Carcinogenesis* 14, 709-712.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, and Vogt PK. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature (London)* 260, 170-173.

Sui Z, Salto R, Li J, Craik C, and Ortiz de Montellano PR. (1993) Inhibition of HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. *Bioorg Med Chem.* 1, 415-422.

Tammy LK, and Frank B. (1995) CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide : a review. *Immunopharmacology* 29, 187-205.

Tang-Long S, and Jun-Lin G. (2001) Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett.* 499, 176-181.

Toshihiko K, Ronald L, Vernon ES, Gary JK, Robert BK, Chinthalapally V Rao, and Bandaru SR. (1999) Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res.* 59, 597-601.

Toshiya M, Kayo H, Ayumi Shinohara, Tomomi Maekawa, Yoshio Takeda, and Hidemasa Y. (1999) Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J Agric Food Chem.* 47, 71-77.



Usha RP, and Vijaya MR. (2000) Suppression of transcription factor Egr-1 by curcumin. *Thrombosis Res.* 97, 179-189.

Verde P, Boast S, Franze A, Robbiati F, and Blasi F. (1998) An upstream enhancer and a negative element in the 5' flanking region of the human urokinase plasminogen activator gene. *Nucleic Acids Res.* 16, 10699-716.

Wang LH, Halpern CC, Nadel M, and Hanafusa H. (1978) Recombination between viral and cellular sequences generates transforming sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75, 5812-5816.

Wan-Jr S, Chien-Chang S, Ming-Jaw D, Jun-Chih O, Gene-Hsiang L, and Chang-Ming S. (1998) Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. *J Nat Prod.* 61, 1531-1534.

Wargovich MJ, Chen CD, Harris C, Yang E, and Velasco M. (1995) Inhibition of aberrant crypt growth by non-steroidal anti-inflammatory agents and differentiation agents in the rat colon. *Int J Cancer.* 60, 515-519.

Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE, Velasco M, Woods J, Price R, Gray K, and Kelloff GJ. (2000) Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* 21, 1149-1155.

Yan-Shi G, Mark RH, Xiao DW, and Courtney MT Jr. (2001) Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase -2 expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 276, 22941-22947.

Young-Joon S, Kyung-Soo C, Hyun-Ho C, Seong SH, Young-Sam K, Kwang-Kyun P, and Sang SL. (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutation Res.* 480-481, 243-268.

