

中山醫學大學生物化學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Biochemistry,
Chung Shan Medical University

薑黃素抑制 v-Src 癌化細胞的生長及移動

Curcumin inhibits v-Src transformed cells
mitogenesis and migration

指導教授：馬明琪博士 (Ming-Chei Maa, Ph. D.)

研究生：蘇淑琍 (Shu-Li Su)

中華民國九十二年七月 (July, 2003)

目 錄

	頁數
中文摘要	3
英文摘要	4
縮寫檢索表	5
第一章 序論	7
第二章 實驗材料與方法	14
第三章 結果	31
第四章 討論	38
參考文獻	42
圖表	49

中文摘要 (Abstract in Chinese)

薑黃素 (curcumin) 是一個歷史悠久廣為人知的天然食用色素，它具有抗發炎、抗氧化、以及抗癌的效果。在本文研究中，我們發現薑黃素可以抑制 v-Src 的活性，導致 Src 受質 Shc、cortactin、FAK 酪氨酸磷酸化減少。而在我們 in vitro kinase 的實驗裡，我們也証明了薑黃素可直接抑制 Src 的活性。由於 Src 活性的下降，使 Shc 的 Pi-Tyr-317 減少，進而降低 ERK 的活性，抑制 v-Src 癌化細胞的生長。此外，薑黃素也可直接及間接地抑制 FAK 的活性。藉由降低 cortactin 的酪氨酸磷酸化及 FAK 酵素活性，薑黃素更減緩了 v-Src 癌化細胞的移動 (migration)。據我們的所知，這是第一篇有關薑黃素藉由抑制 Src 及 FAK 的酵素活性，進而抑制細胞生長及移動的報導。

英文摘要 (Abstract in English)

Curcumin (diferulonylmethane) is a well-known agent with anti-inflammatory, antioxidant, and anticarcinogenic properties. In this study, we observed that curcumin inhibited the kinase activity of v-Src, which led to a decrease in tyrosyl substrate phosphorylation of Shc, cortactin, and FAK. Our in vitro kinase experiment revealed that the inhibitory effect of curcumin on Src could be direct. Consistent with the abrogation of Src activity was the reduction of Src Tyr-416 phosphorylation, Src-mediated Shc Tyr-317 phosphorylation, decreased ERK activation, and cell proliferation in v-Src transformed cells. Remarkably, curcumin not only exerted its negative effect on FAK via the disappearance of Src-mediated FAK phosphorylation, but also directly inhibited its enzymatic activity. Concurrent to reduced cortactin tyrosyl phosphorylation and FAK kinase activity was the abolishment of v-Src-mediated cell mobility. To our knowledge, this is the first report indicating that curcumin can retard cellular growth and migration via downregulation of Src and FAK kinase activity.

縮寫檢索表 (Abbreviations)

AP-1	Activator protein-1
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylene diaminetetraacetate
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylene glycoltetraacetate
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
HRP	Horse radish peroxidase
kDa	Kilo-dalton
MMP	Matrix metalloproteinases
NC membrane	Nitrocellulose membrane
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Benzylsulfonyl fluoride
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)

Curcumin

薑黃素 (Curcumin) 存在於薑黃中，其在印度及亞洲被應用的歷史超過 6000 年以上。薑黃 (Curcuma) 是一種地下根莖植物，學名為 *Curcuma longa Linn*；從薑黃中提取的薑黃素相對於其他天然色素，由於具有穩定性好、著色力強、色澤鮮亮等特點，故廣泛做為食品的著色劑 (Srimal and Dhawan, 1973; Satoskar et al., 1986; Rao et al., 1993)。此外，其也常被用於治療胸脅刺痛，肩臂痺痛，月經不調，閉經，跌打損傷，經閉，腹部腫塊，跌打腫痛，癰腫等。自 1988 年 Huang 及 Conney 等人首度發現薑黃素可以抑制動物罹患皮膚癌後，相關薑黃素的研究論文迄今已多達一千三百餘篇。在以 AOM (Azoxymethane) 誘導的白鼠大腸癌為模型進行的實驗中，薑黃素被確認除了具有很強預防大腸癌的效果外 (Rao et al., 1995)，同時也能抑制癌細胞的增生。除了具有顯著的抗癌療效外，薑黃素也被發現具有其他諸如：抗發炎、抗老化、抗氧化、抑制 Leukotriene B4 毒素形成等保健功能。

薑黃素類物質的抗癌活性，從根本上來說，也是其抗氧化能力的表現。由於自由基的大量產生或蓄積是致癌的主因之一，故身為多酚類物

質的薑黃素，本身就因具有吸附自由基並還原或降解之的能力而具抗癌效用 (Kunchandy et al., 1990)。研究證實，薑黃素經口服後，為腸道上皮細胞吸收並轉換為 tetrahydrocurcumin; 而 tetrahydrocurcumin 比薑黃素有更強的抗氧化效果。此乃因 tetrahydrocurcumin 在捕捉自由基後，會降解成如 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-propionic acid 之類也是強抗氧化物質的化合物，於是 tetrahydrocurcumin 而具有雙重抗氧化的防禦機制 (Osawa et al., 1995)。研究人員還發現，薑黃素能強烈地抑制酪氨酸酵素活性，而該酵素在酪氨酸合成黑色素的過程中扮演重要角色。由於黑色素的過剩蓄積，是老年色斑形成的主要原因，因此薑黃素在預防及抑制癌症的同時也具有美白抗老化的功能。

過去的文獻報導指出，薑黃素可以透過許多不同的分子機轉來達到抑癌的效果。薑黃素可有效的抑制 AP-1 和 NF- κ B 的訊息傳遞路徑 (Bierhaus et al., 1997; Chen et al., 1998)，也能降低 IKK 的活性，進而防止的 I κ B 的磷酸化以達到抗發炎及抗癌的能力 (Plummer et al., 1999)，更可減少各種 nuclear oncogenes 如：c-jun、c-fos 及 c-myc 的表現。在 SK-Hep-1 細胞中，透過抑制 MMP9，薑黃素證實可以減緩血管增生及 tumor invasion (Lin et al., 1998)。薑黃素也可抑制 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 所誘發的 ornithine decarboxylase (ODC) 活性。而 Nitric oxide synthase (NOS)

會使體內細胞產生不良代謝產物，這些產物會攻擊 DNA 分子引起癌症的產生，薑黃素可降低 NOS 之活性，因而減緩癌症的形成。最後，薑黃素還可以抑制 EGFR 和 Neu 這兩個 tyrosine kinases 的酵素活性 (Korutla et al., 1995; Hong et al., 1999)。Korutla 等已經證明薑黃素會減弱 ligand 誘導的 EGFR 的活化，但卻不影響其蛋白表現。相對的，在 *in vitro* 情況下，薑黃素不僅干擾 Neu 的 autophosphorylation 及 transphosphorylation，而且在 *in vivo* 情況下，它也會促成 Neu 的分解 (Hong et al., 1999)。對某些癌細胞株 (例如 S180 老鼠肉瘤細胞，人類直腸癌細胞 HT-29，人類肝癌細胞 Hep G2，及人類腎癌細胞 293) 言，薑黃素更可促使其凋亡。

Src

c-Src 是一個 60 kDa 非受體型式的 tyrosine kinase，其參與了許多如生長、分化、移動等生理活動。Src 以其 N 端的 Gly-2 進行 myristoylation，而附著於細胞膜內側。Src 的 SH3 domain 可以和富含 proline 的 peptide 結合 (Moran et al., 1990)。SH2 domains 可以與 tyrosyl phosphorylated proteins 結合 (Anderson et al.,

1990)。至於 Src 本身 kinase activity 的調控則深受二個 tyrosine residues 的影響。一為位在 kinase domain 上的 Tyr-416，其自體磷酸化之後，c-Src 的活性會增加 (Smart et al., 1981)；另一為在 regulatory domain 上的 Tyr-527，當其被 Csk (C-terminal Src kinase) 磷酸化後，c-Src 的活性則會下降 (Rosen et al., 1995)。當 c-Src Tyr-527 發生突變或不存在時，c-Src kinase activity 及其癌化細胞的能力都會增加 (Cartwright et al., 1989; Kmiecik and Shalloway, 1987; Piwnica-Worms et al., 1987; Reynolds et al., 1987)。至於 v-Src (viral Src) 是由 Rous sarcoma virus (RSV) 的致癌基因 (*v-src*) 所製造出來的致癌蛋白 (Wyke and Stoker, 1987)。v-Src 與 c-Src 的結構非常類似，但 v-Src 的 C 端以 12 個完全不同的胺基酸取代原本 c-Src C 端上含有 Tyr-527 在內的 19 個胺基酸。因此 v-Src 因少了 Tyr-527 而呈現持續性的活化，進而使正常細胞轉變成癌化細胞 (Hjelle et al., 1988)。也因此，v-Src 可被視為是一個持續性活化的 mutant c-Src。

許多訊號分子例如：focal adhesion kinase、cortactin、Shc 是 Src 的受質 (Kanner et al., 1990; Maa et al., 1992; McGlade et al., 1992)。Shc 為一個 adapter protein，有三個 isoforms，分別為 p46、p52 和 p66。Src 可磷酸化 Shc 於 Tyr-317，而磷酸化的 Shc 集結了

Grb2/SOS complex，活化了 Ras-dependent ERK kinase cascade (Salcini et al., 1994; Wary et al., 1998)。而 cortactin 為一分子量為 80/85 kDa 可和 F-actin 結合並交錯連結的蛋白。Src 磷酸化 cortactin 於 Tyr-421, -466 和 -482 的位置上; 透過磷酸化 cortactin, Src 可以調控細胞架構的重組及細胞的轉移 (Huang et al., 1998)。

FAK

Focal adhesion kinase (FAK) 是一個分子量為 125 kDa 存於細胞質中的 protein tyrosine kinase, 其表現於大多數的組織及細胞中 (Fox et al., 1999; HaNks et al., 1992; Palmer et al., 1999; Schaller et al., 1992)。當 integrin 與細胞外的基質 (extracellular matrix) 接觸後, 細胞內的 FAK 活性上升, 進而與其他訊息分子作用, 影響細胞的生長、發育、黏著、移動, 因此 FAK 被認為在 integrin 所調節的訊息傳遞過程中, 扮演重要的角色。FAK 也是 Src 的受質之一, 因其位於 focal adhesion 而得名 (Parsons et al., 2000; Schlaepfer et al., 1999)。FAK 活化後會自體磷酸化於 Tyr-397, 而 FAK Pi-Tyr-397 可與 Src 的 SH2 domain 結合 (Schaller et al., 1994)。在形成 Src-FAK complex 後, 活化的 FAK-Src complex 可調控下游的訊息傳遞, 影響細胞的延展、移動及存活。與 FAK 結合後 Src 也會更進一步的磷酸化 FAK 於 Tyr-576/577、-863 及 -925。Tyr-576/577、-863 的磷酸化會使 FAK 活化增加造成 Tyr-397 的磷酸化 (Leu and Maa, 2002), 而

FAK Pi-Tyr-925 會與 Grb2-SOS complex 結合，而引發 Ras 的活化，啟動下游 ERK pathway (Schlaepfer et al., 1994)。此外，FAK 會利用 C 端 proline-rich sequence 與 p130^{cas} 的 SH3 domain 結合，活化 p130^{cas}，加速細胞架構的重組以及遷移的能力 (Klemke et al., 1998)。FAK C 端上 focal adhesion target (FAT) sequence 主導 FAK 的位於 focal adhesion (Hildebrand et al., 1993)，而這個區域也可以與二個 focal adhesion 相關的蛋白 paxillin 及 talin 結合 (Chen et al., 1995; Hildebrand et al., 1995)。FAK N 端區域的功能目前尚不清楚。有報導指出在 in vitro 情況下其可與 integrin β subunit 的 cytoplasmic domain 結合 (Schaller et al., 1995)。此外另有報導指出 EGFR 會與此區域作用，但其本質是直接作用或經由其他蛋白則仍待釐清 (Sieg et al., 2000)。

實驗研究動機

酪氨酸的磷酸化在細胞生長、分化及計畫性細胞死亡的調控上都扮演著重要的角色，而且 tyrosine kinase 的過度表現或是其酵素活性的升高皆與人類癌症息息相關。做為一個具防癌、抗癌效果的食用色素，薑黃素目前只知能影響 EGFR 和 Neu 這二種 tyrosine kinases。由於 v-Src 是一個致癌蛋白也是一個 tyrosine kinase，因此我們想知道具有抑癌、抗癌作用的薑黃素可否抑制 v-Src 癌化細胞的生長並探討其抑癌的作用機轉。

第二章 實驗材料與方法 (Materials and Methods)

第一節 實驗材料

A. 細胞株 :

IV5 (C3H10T1/2 cells expressing v-Src)

B. 試劑 :

44.208 mg 的 curcumin 溶於 12 ml DMSO 中。

(curcumin stock conc. = 10 mM)

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 (Pi-Tyr-397) : anti-Tyr-397 phosphorylated FAK polyclonal
antibody

anti-Shc : anti-Shc polyclonal antibody

anti-Shc (Pi-Tyr-317) : anti-Tyr-317 phosphorylated Shc polyclonal
antibody

anti-Src : anti-Src monoclonal antibody

anti-Src (Pi-Tyr-416) : anti- Tyr-416 phosphorylated Src polyclonal
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

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

hydrochloric acid

13. 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 NaHCO_3 溶於 600ml 滅菌 ddH₂O, pH 值以 HCl 調成 7.1, 再加滅菌 dd H₂O 至 1 liter 後, 在 hood 中以 0.22 μm 的濾膜過濾後分裝, 保存於 4°C。

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°C。

3. Penicillin-Streptomycin (10X ; 10000 unit/ml-10000 µg/ml)

每 450 ml 的 DMEM 加 5 ml 的 P-S。

4. L-Glutamine (10X ; 200 mM)

每 450 ml 的 DMEM 加 5 ml 的 L-Glutamine。

5. trypsin-EDTA (10X)

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

6. PBS (10X) 1 liter

NaCl 80 g

NaH₂PO₄·H₂O 12 g

將所需之化學藥品溶於 500 ml dd H₂O 將其 pH 調成 7.4，再加 dd H₂O 至 1 liter 滅菌後保存於 4°C。可用 dd H₂O 稀釋成 1X PBS 之後使用。

7. culture medium 500 ml

DMEM 450 ml

Fetal bovine serum
(final conc. = 10%) 50 ml

10X Penicillin-Streptomycin 5 ml

(final conc. = 0.1X)	
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 μ m 的濾膜過濾，保存於 -20°C。

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 (10% FBS)，置於 CO₂ 培養箱 (37°C，5% CO₂)，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 1 ml 1X trypsin 置於 CO₂ 培養箱 (37°C，5% CO₂) 進行 trypsinization，作用約 5 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 1 ml 1X trypsin 置於 CO₂ 培養箱 (37°C，5% CO₂) 進行 trypsinization 5 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 4×10^5 。
- b. 加入不同濃度的 curcumin，分別培養於 CO₂ 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 H₂O，pH 調成 7.5，再加 dd H₂O 至 500 ml，保存於 4°C。

2. Modified RIPA buffer	1 ml
RIPA	1 ml
200 mM Sodium orthovanadate (final conc.= 1 mM)	5 µl
200 mM EGTA (final conc. = 1 mM)	5 µl
0.5% Aprotinin (final conc. = 0.0025%)	5 µl
200 mM PMSF (final conc. = 1 mM)	5 µl

步驟：

1. 將 medium 吸走，細胞以 1X PBS 清洗兩次，吸乾 PBS。
2. 加入 400 µl 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 rack 上刮動來回數次。
3. 以 4°C、10000rpm，離心 10 分鐘，取上清液到新的 eppendorf，保存於 -80°C。

三、蛋白質濃度測定：

試劑：

1. BSA (1 µg/µl)
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 μl BSA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 到 eppendorfs。
2. 加入不同量的 dd H₂O 到 eppendorfs 中，使其總體積達 800 μl 。
3. 加 200 μl Protein Assay Kit (dye) 到 eppendorfs，以 vortex 混合均勻。
4. 在 sample 的測定上，取 10 μl cell lysates，790 μl dd H₂O，200 μl dye，混合均勻。
5. 採用 Bradford Protein Assay，測在波長 595 nm 下各種不同量之 BSA 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 ² N'-Methylene bisacryamide | 4 g |

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H₂O，再加 dd H₂O 至 500 ml，保存於 4°C。

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

將 Tris-HCl 溶於 350 ml dd H₂O，pH 調成 8.8，再加 dd H₂O 至 500 ml。

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

將 Tris-HCl 溶於 350 ml dd H₂O，pH 調成 6.8，再加 dd H₂O 至 500 ml。

4. 10% APS 10 ml

APS 1 g

將 APS 溶於 8 ml dd H₂O，再加 dd H₂O 至 10 ml，保存於 4°C。

5. Resolving gel (8%) 30 ml

H₂O 15.8 ml

2M Tris-HCl, pH 8.8 6 ml

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

20% SDS 150 μ l

10% APS 150 μ l

TEMED 20 μ l

6. Stacking gel 10 ml

H₂O 8 ml

2M Tris-HCl, pH 6.8 0.625 ml

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

20% SDS 50 μ l

10% APS	50 μ l
TEMED	10 μ 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 H₂O，再加 dd H₂O 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 H₂O，隔絕空氣，待凝膠 (約 20 分鐘)。
4. 將 dd H₂O 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 blot 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 H₂O，再加 dd H₂O 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 H₂O，pH 調成 8.8，再加 dd H₂O 至 500 ml。

3. Blotting buffer	50 ml
10X TBS	5 ml
BSA	1.5 g
Tween 20 (USB)	25 μ l

將所需之化學藥品溶於 35 ml dd H₂O，再加 dd H₂O 至 50 ml。

4. Washing buffer	500 ml
10X TBS	50 ml
Tween 20	500 μ l

將所需之化學藥品溶於 350 ml dd H₂O，再加 dd H₂O 至 500 ml。

步驟：

1. 利用 methanol 浸泡 PVDF transfer membrane 約 10 秒，再以 dd H₂O 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°C 冰箱中 preblotting overnight。隔天，室溫下在 shaker 上 preblotting 30 分鐘 (shaker 擺動速度為 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 擺動速度為 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 擺動速度為 40 rpm)。
6. 加入 10 ml 含 secondary antibody 的 blotting buffer (1:2000)，室溫 blotting 1.5 小時 (shaker 擺動速度為 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 擺動速度為 40 rpm)。
8. 依 membrane 大小 (0.125 ml/cm²)，加入適量的 ECL kit solution I

與 II 等比例的均勻混和液 (Amersham)。在 membrane 與之作用 5 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 μ l 1X TBS 清洗六次，每次 30 分鐘 (置於 4°C)，隔天再以 1X TBS 清洗三次，最後貯存於 1.5 ml 1X TBS，保存於 4°C。

步驟 :

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

七、In vitro kinase assay

試劑:

1. kinase buffer

piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES)	20 mM
ATP	5 μ M
[γ - ³² P] ATP	10 μ Ci
MgCl ₂	10 mM
Mncl ₂	10 mM

步驟:

1. 將蛋白以免疫沉澱法純化下來。
2. 在冰上，與不同濃度的 curcumin 作用 10 分鐘。
3. 之後在室溫加入受質及 kinase buffer 作用 15 分鐘。
4. 離心，去上清液，加入 sample buffer，煮沸 5 分鐘，spin 之後，取上清液直接 loading，跑膠。
5. 最後以自動顯影技術觀察實驗結果。

八、細胞移動性分析 (cell migration assay)

試劑:

- | | |
|-------------------------------------|-------------|
| 1. 48-well Boyden chamber | |
| 2. polycarbonate filter (8 μ m) | |
| 3. fibronectin (1 μ g/ μ l) | 0.6 μ l |
| 4. methanol | 20 ml |
| 5. Giemsa stain reagent | 20 ml |

步驟 :

1. 先將細胞 trypsinize 下來，放入 serum-free DMEM 中。
2. lower chamber 為含有 20 $\mu\text{g/ml}$ fibronectin 的 conditioned medium。
3. 加入 curcumin 濃度不同的 serum-free DMEM 於 lower chamber 中。
4. 之後放上一層 polycarbonate filter (8 μm)。
5. 數 2×10^4 的細胞置於 upper chamber。
6. 放入 5% CO_2 ，37°C 培養箱中，置於 6 小時。
7. 取下薄膜，以甲醇固定 7 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa 染色 1 小時。
8. 最後擦拭掉 non-migratory 細胞，將薄膜固定於載玻片上，在 40X 顯微鏡底下隨機選取視野，做移動細胞數之統計。

第三章 結果 (Results)

一、curcumin 會抑制 v-Src 癌化細胞的生長

許多文獻曾報導，curcumin 為一種有效的抗癌成份，它可以影響包括 tyrosine kinase 在內諸多標的蛋白的活性。已知 curcumin 可以抑制 EGFR 及 Neu 的酵素活性，但其對 Src 的影響則無任何資料可查。為回答這一個問題，我們利用一株 v-Src 癌化的細胞株 (IV5) 進行以下的實驗。首先將 v-Src 癌化細胞 subculture 培養 18 小時後，予以不同濃度的 curcumin (0、10、20、30 μ 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 μ M curcumin 對於 v-Src 癌化細胞的生長有些許的抑制效果 (24、48、72 小時的細胞數目分別為對照組的 62%、69%、65%)；但當 curcumin 濃度為 20 μ M 時，其對 v-Src 癌化細胞則更多的抑制效果 (24、48、72 小時的細胞數目分別為對照組的 40%、34%、31%)；最後當 curcumin 濃度為 30 μ M 時，其對細胞的生長存活都有明顯的抑制效果 (24、48、72 小時的細胞數目分別為對照組的 35%、22%、8%) (Figure 2)。

二、curcumin 抑制 v-Src 癌化細胞總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation

在 curcumin 的刺激之下，v-Src 癌化細胞的生長會受到抑制。雖然

這樣的結果與 curcumin 具抗癌、抑癌的作用相符，但我們好奇的是 curcumin 透過何種分子機轉達到這個目的？由於 tyrosyl phosphorylation 在細胞的生長中扮演著重要的角色，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 (0、10、20、50、100 μ M) 處理細胞，並且在 24 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、50~70 kDa 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 3)。因此接下來，我們想探究 curcumin 作用下會影響哪些蛋白質的 tyrosyl phosphorylation？其分子作用機轉為何？並且此與 curcumin 的抑制 IV5 細胞生長及其他生理活動有何相關性？

三、 curcumin 可以降低 v-Src 的 Tyr-416 自體磷酸化

Src 是一個 60 kDa 的 nonreceptor tyrosine kinase，其與細胞的生長、分化息息相關。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 v-Src 癌化細胞 24 小時之後，細胞總體蛋白質的 tyrosyl phosphorylation 下降，而 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 v-Src 癌化細胞的生長。為了探討這個問題，我們分別利用 0、10、20、50、100 μM 的 curcumin 處理 v-Src 癌化細胞，24 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 及 anti-Src pY-416 antibody 進行 western immunoblotting。從實驗結果中發現，curcumin 並不會影響 Src 蛋白質在細胞中的表現量；但隨著 curcumin 濃度增加則會抑制 Src pY-416。由於 Src Y-416 是 Src 的 autophosphorylation site，故其自體磷酸化的降低反應出 Src 活性的下降 (Figure 4)。

四、curcumin 會抑制 v-Src 的 酵素活性

為了更進一步確認 curcumin 處理下 IV5 細胞內 v-Src 酵素活性的降低，我們將 IV5 癌化細胞以不同濃度的 curcumin 處理 24 小時後，測定其受質 (substrates) tyrosyl phosphorylation 的變化。Cortactin 及 Shc 為已知 Src 的受質。由實驗結果發現，隨著 curcumin 濃度的增加，cortactin 的 tyrosyl phosphorylation 及 Shc-pY-317 會隨之下降 (Figure 5,6)。因此進一步確認了 IV5 細胞在 curcumin 的處理下 v-Src

酵素活性會降低。惟不知 curcumin 有無直接抑制 v-Src 酵素的可能。

五、 curcumin 可以直接抑制 v-Src 酵素活性

IV5 細胞在 curcumin 處理下，cortactin 的 tyrosyl phosphorylation 及 Shc-pY-317 會下降，這意味著 curcumin 可直接或間接降低 Src 酵素活性。為進一步確認前者的可能性，我們收取 IV5 細胞的 cell lysates，以免疫沉澱法將 v-Src 純化出來，並在有無 curcumin 下，加入 [γ - 32 P] ATP 並以 enolase 當作受質。由實驗結果可知，與對照組比較，curcumin 處理後實驗組的 32 P-labeled Src 和 enolase 是減少的 (Figure 7)。這個發現可直接說明 curcumin 可直接抑制 Src 酵素活性。

六、 curcumin 可以抑制 ERK 的 tyrosyl phosphorylation

Src \rightarrow Shc \rightarrow Grb2/SOS \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK 這條訊息傳遞路徑的活化，與細胞生長有關。因為 curcumin 造成 IV5 細胞 Shc-Pi-Tyr 317 的降低，所以接下來我們想知 curcumin 對 IV5 細胞的 ERK 活性有無影響。為了回答這個問題，我們以不同濃度的 curcumin (0、10、20、50、100 μ M) 處理 IV5 癌化細胞 24 小時後，或者以 100 μ M curcumin 刺激 IV5 癌化細胞，然後在不同的時間點 (0、2、4、6、8、10 小時) 收集 cell lysates，並且利用 anti-Pi-ERK1/2 與 anti-ERK2 Ab 進行 western immunoblotting。實驗結果發現， ERK 蛋白表現，並不會受

到 curcumin 的影響；但是 ERK 的 tyrosyl phosphorylation，卻會隨著 curcumin 刺激而逐漸下降 (Figure 8,9)。所以我們認為 curcumin 抑制 v-Src 蛋白活性，同時 Shc 與 ERK 這兩個 v-Src 下游的蛋白活性也會因此而下降。

六、curcumin 可以影響 FAK 的 tyrosyl phosphorylation 及其酵素活性

FAK 是一個分子量為 125 kDa 位於 focal adhesion 的 nonreceptor tyrosine kinase，同時也是 Src 的受質之一。以 curcumin 刺激 IV5 癌化細胞後，會降低細胞內總體蛋白的 tyrosyl phosphorylation，而其中以分子量介於 120~130 kDa 者更為明顯。由於 FAK 分子量界於此區間，故我們想知道 FAK 的 tyrosyl phosphorylation 是否也會因 curcumin 的處理 IV5 細胞而降低？為回答這個問題，我們將不同濃度的 curcumin (0、10、20、50、100 μ M) 處理 IV5 癌化細胞 24 小時後，收集 cell lysates，先以 FAK antibody 進行免疫沉澱 (immunoprecipitation)，而各組的 FAK immunoprecipitates 再經 SDS-PAGE、轉漬到 membrane 上後所得的 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 11*)。

FAK 是一個 tyrosine kinase, 其 Tyr-397 是 FAK 的自體磷酸化的位置, FAK 活化後會與自體磷酸化於 Tyr-397, 而 FAK Pi-Tyr-397 與 Src 的 SH2 domain 結合, 形成 Src-FAK complex 後, Src 會更進一步的磷酸化 FAK 於 Tyr-576/577 及-863, 促使 FAK 再進一步活化因而增加 FAK 的酵素活性。由於 curcumin 處理後的 IV5 癌化細胞其 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 及 FAK Ab 進行 western immunoblotting。從實驗的結果中, 我們看到不管是 dose-dependent 或是 time-dependent 的情況下, FAK Tyr-397 的磷酸化都受到抑制 (*Figure 10, 11*)。因此我們認為 curcumin 作用後, 所造成 v-Src 整體酵素活性的下降, 會使 FAK 的 tyrosyl phosphorylation 及其 autophosphorylation 受到影響。為了進一步確認 curcumin 是否會直接影響 FAK 酵素活性, 我們利用 IV5 細胞收其 cell lysates, 以免疫沉澱法將 FAK 純化出來, 在有無 curcumin 下, 加入 [γ -³²P]ATP 並以 GST-397Y 當作受質。由實驗結果可知, 與對照組比較, 實驗組在 curcumin 的處理下, 隨著 curcumin 濃度的升高, ³²P-labeled FAK 和 GST-397Y 大幅減少。這個發現可說明 curcumin

可直接抑制 FAK 酵素活性 (*Figure 12*)。

七、 curcumin 會抑制 IV5 癌化細胞的 migration 能力

根據文獻指出，FAK 活性的變化會影響癌細胞 metastasis (Klemke et al., 1998)。而 curcumin 刺激 IV5 癌化細胞之後，FAK 的 tyrosyl phosphorylation 及其 autophosphorylation 會明顯受到抑制。這使我們聯想到，IV5 癌化細胞在 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，我們先在 modified Boyden chamber 的 lower chamber 上含有一層 20 μg 的 fibronectin，然後加入 curcumin 濃度不同的 serum-free DMEM 於 lower chamber 中，之後放上一層 polycarbonate filter (8 μm)。接下來我們在 upper chamber 上每個 well 內放入 2×10^4 個細胞，6 小時之後，觀察細胞 migration 的情形。由實驗結果得知，對 upper chamber 的細胞言，其位移到含 fibronectin 之 lower chamber 的細胞數目遠較不含者為多。且在 curcumin 的作用下，IV5 癌化細胞的 migration 能力會隨著 curcumin 濃度的上升而逐漸減少。這些數據顯示 curcumin 對於 IV5 癌化細胞的 migration 的確有抑制效果，且呈 dose-dependent 的現象 (*Figure 13*)。

第四章 討論 (Discussion)

Curcumin 是一種由薑科植物 (*Curcuma longa Linn*) 地下莖所萃取出來的天然成分，它屬於多酚類的化合物，化學名為 Diferuloylmethane，是鬱金粉 (turmeric) 及咖哩 (curry) 中主要的黃色色素，具有抗氧化、抗發炎及預防癌症的功效 (Wargovich et al., 1995, 2000)。

目前所知，Curcumin 可抑制轉錄因子 NF- κ B、AP-1 及 Egr-1，COX-2、LOX、NOS、MMP-9、uPA、TNF、chemokine、cell surface adhesion、cyclin D1 的表現，抑制生長因子接受器 EGFR 及 HER2 及其他包含 JNK 在內 serine/threonine kinases 的活性而具有抑癌功效，可以減少大腸癌、乳癌、肺癌的發生 (Leu and Maa., 2002)。

Tyrosine kinases 參與許多的細胞訊息傳遞，其作用範圍包括了：生長因子與荷爾蒙的生理反應、分泌、淋巴細胞的活化、細胞之間及細胞與細胞之外基質的交互作用、細胞分化及癌化的形成。到目前為止，只知 curcumin 可以抑制 EGFR 和 Neu 這兩個 tyrosine kinases 的酵素活性 (Korutla et al., 1995; Hong et al., 1999)。Korutla 等已經證明 curcumin 抑制 ligand 誘導的 EGFR 的活化，而不是抑制其蛋白表現。相對的，在 *in vitro* 情況下，curcumin 不僅抑制的 Neu autophosphorylation 及 transphosphorylation 而且，在 *in vivo* 情況下，

它也會促成 Neu 的分解 (Hong et al., 1999)。而在我們這次的實驗，我們發現以 curcumin 處理 v-Src 癌化細胞時，其可以減少 v-Src 酵素活性，並降低 Src 受質 Shc, cortactin 及 FAK 的酪氨酸磷酸化。同時，我們也發現 curcumin 可以直接抑制 v-Src 酵素活性。v-Src 酵素活性減弱的結果，降低了 Shc-Y317 的磷酸化及 ERK 的活性。由於 ERK 與 mitogenesis 有關，因此我們認為透過抑制 ERK pathway，curcumin 可以減緩 v-Src 癌化細胞的生長。

Curcumin 抑制 IV5 cells 蛋白質酪氨酸磷酸化的實驗中 (Figure 3)，可看到在分子量 120~130 kDa 之間，蛋白質酪氨酸磷酸化隨著 curcumin 濃度的增加，抑制效果愈來愈明顯，Src 的受質如: FAK, p130^{CAS} 分子量位於此範圍內，而細胞轉移的能力，主要是透過 integrin signaling pathway 以及 Src-FAK complex 所調控 (Ilic et al., 1995)。由於 Src 磷酸化 FAK 後，會造成 FAK kinase activity 的增加，故 curcumin 的抑制 Src 活性所造成 FAK tyrosyl phosphorylation 的下降，會使 FAK 的 kinase activity 降低。這可由 FAK Tyr-397 autophosphorylation 的明顯下降而獲得證實；同時我們也證明了 curcumin 可直接抑制 FAK 的活性。

至於同為 Src 受質之一的 cortactin，其會因 Src 作用而磷酸化於 Tyr-421, -466, -482。而磷酸化的 cortactin 會導致 F-actin cross-linking

activity 的減少而具調控細胞架構重組和細胞轉移的能力 (Huang et al., 1998)。正因為 FAK 的活化和酪胺酸磷酸化的 cortacin 可以調控細胞的轉移，因此我們認為在 curcumin 抑制 Src 及 FAK 活性的同時，細胞的轉移也會受到抑制。的確，在我們的 migration assay，發現 curcumin 會抑制 IV5 cells 的移動，並且呈 dose-dependent 的現象。由此可知，藉由抑制 Src、FAK 的活性，curcumin 不僅可以抑制 IV5 細胞的生長，進而抑制其移動的能力。在癌化過程中 MMP-2 和 MMP-9 的活性跟腫瘤的侵襲與轉移有重要的關係。報導指出 curcumin 能抑制人類肝癌細胞 (SK-Hep-1 cells) 的侵入與轉移，且能抑制其 MMP-9 的活性(Lin et al., 1998)；而我們實驗室也發現 curcumin 能抑制 IV5 cells MMP-2 的活性。因此由這些實驗結果可知除了 Src、FAK 及其受質外，curcumin 也可藉由抑制 MMP-2 與 MMP-9 等 MMP 的活性，有效抑制癌細胞的轉移。

在正常細胞的訊息傳遞中，c-Src 是一個重要的蛋白質。目前有許多證據顯示，c-Src 與大腸癌、乳癌、和肺癌等三個成年人常發生的癌症有關 (Jacqueline et al., 1999)。過去的文獻報導指出，大腸癌細胞中 c-Src 酵素活性常有明顯的上升；並且與正常細胞相比較之下，c-Src 的活性可以增加到 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)。先前，我們實驗室證明了 curcumin 可抑制大腸癌細胞 Caco-2 cells c-Src 的產生 (林宗瑤, 2002)。因此綜合這些實驗結果我們以為做為食品添加物的 curcumin，在食用後不但可以抑制腸道表皮細胞 c-Src 的表現量，同時也可以抑制其酵素活性，有效的抑制大腸直腸癌的發生。惟 curcumin 如何直接抑制 Src 及 FAK 的活性，目前機制仍不清楚，有待進一步探討。

Curcumin 在印度和其他亞洲國家已經被廣泛使用了好幾世紀，在它可以當香料、食品添加物的同時，研究也發現它具有抗氧化、抗發炎、抗癌的效果。由於人類臨床測試指出每天服用高達 10 克的 curcumin 對人體無害 (Aggarwal et al., 2003)，因此 curcumin 的臨床應用也被認為是相對安全的。已有研究報告指出 Src 與 FAK 的過度表現及其活性的增加常與人類罹患癌症有關 (Owens et al., 1995; Biscardi et al., 1999)。因此藉由食品添加物中的 curcumin，癌症病人可以抑制體內腫瘤的生長及轉移而正常人更可以直接並有效地預防體內癌症的形成。

參考文獻 (References)

Aggarwal BB, Kumar A and Bharti AC. (2003) Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23, 363-398.

Anderson D, Koch CA, Grey L, Ellis C, Moran MF and Pawson T. (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science.* 250, 979-982.

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.

Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller M, Mackman N, Ziegler R and Nawroth PP. (1997) The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thrombosis & Haemostasis.* 77, 772-782.

Biscardi JS, Tice DA and Parsons SJ. (1999) c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res.* 76, 61-119.

Bolen JB, Veillette A, Schwartz AM, Deseau V and Rosen N. (1987) Analysis of pp60c-src in human colon carcinoma and normal human colon mucosal cells. *Oncogene Research.* 1, 149-168.

Cartwright C. (1998) Intestinal cell growth control: role of Src tyrosine kinases. *Gastroenterology.* 114, 1335-1338.

Chen YR and Tan TH. (1998) Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene.* 17, 173-178.

Chen HC and Guan JL. (1994) Association of Focal Adhesion Kinase with its Potential Substrate Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 10148-10152.

Fox GL, Rebay I and Hynes RO. (1999) Expression of DFak56, a *Drosophila* homolog of vertebrate focal adhesion kinase, supports a role in cell migration *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA . 96, 14978-14983.

Hanks SK, Calalb MB, Harper MC and Patel SK. (1992) Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. Proc Natl Acad Sci USA. 89, 8487-8491.

Hildebrand JD, Schaller MD and Parsons JT. (1993) Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. J. Cell. Biol. 123, 993-1005.

Hildebrand JD, Schaller MD and Parsons JT. (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. Mol. Biol. Cell. 6, 637-647.

Hjelle B, Liu E and Bishop JN. (1988) Oncogene v-src transforms and establishes embryonic rodent fibroblasts but not diploid human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 85, 4355-4359.

Hong RL, Spohn WH and Hung MC. (1999) Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. Clin Cancer Res. 5,1884-1991.

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, Los 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.

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.

Lin JK and Shoen Yn LS. (2001) Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)*. 25, 59-66.

Kanner SB, Reynolds AB, Vines RR and Parsons JT. (1990) Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 3328-3332.

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

Kmieciak TE and Shalloway D. (1987) Activation and suppression of pp60^{c-src} transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell*. 49, 65-73.

Kunchandy E and Rao MNA. (1990) Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int'l J Pharm*. 38, 239-240.

Kodi SR. (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322-6330.

Korutla L and Cheung JY. (1995) Mendelsohn J. Kumar R. Inhibition of ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation by curcumin. *Carcinogenesis*. 16, 1741-1745.

Leu TH and Maa MC. (2002a) The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr Med Chem –Anti-Cancer Agent*. 2, 357-370.

Leu TH and Maa MC. (2002b) Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *Oncogene* 21, 6992-7000.

- Leu TH and Maa MC. (2003) Functional implication of the interaction between EGF and c-Src. *Frontier in Bioscience*. 8, s28-38.
- Lin LI, Ke YF, Ko YC and Lin JK. (1998) Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion in vitro and suppresses matrix metalloproteinases-9 secretion. *Oncology*. 55, 349-353.
- Maa MC, Wilson LK, Moyers JS, Vines RR, Parsons JT and Parsons SJ. (1992) Identification and characterization of a cytoskeleton-associated, epidermal growth factor sensitive pp60^{c-src} substrates. *Oncogene*. 7, 2429-2438.
- Maa MC and Leu TH. (1998) Vanadate-dependent FAK activation is accomplished by the sustained FAK Tyr-576/577 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 251, 344-349.
- McGlade J, Cheng A, Pelicci G, Pelicci PG and Pawson T. (1992) Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 8869-8873.
- Megan TB and Jonathan AC. (1996) Regulation, substrates and function of src. *BBA*. 1287, 121-149.
- Michael JW. (2001) Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *BBA*. 1540, 1-21.
- Moran MF, Koch CA, Anderson D, Ellis C, England L, Martin GS and Pawson T. (1990) Src homology regions 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 8622-8626.
- Osawa T, Sugiyama Y, Inayoshi M and Kawakishi S. (1995) Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 59, 1609-1612.
- Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET and Cance WG. (1995) Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*. 55, 2752-2755.

Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM and Weed SA. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*. 19, 5606-5613.

Palmer RH, Fessler LI, Edeen PT, Madigan SJ, McKeown M and Hunter T. (1999) DFak56 Is a Novel *Drosophila melanogaster* Focal Adhesion Kinase. *J Biol Chem*. 274, 35621-35629.

Piwnicka-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, Smith AE and Cheng SH. (1987) Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60^{c-src}. *Cell*. 49, 75-82.

Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks R JL, Kaptein A, Farrow S and Howells L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- κ B activation via the NIK/IKK signaling complex. *Oncogene*. 18, 6013-6020.

Rao CV, Rivenson A, Simi B, Zang E, Hamid R, Kelloff GJ, Steele V and Reddy BS. (1995) Enhancement of experimental colon carcinogenesis by dietary 6-phenylhexyl isothiocyanate. *Cancer Res*. 55, 4311-4318.

Rosen N, Bolen JB, Schwartz AM, Cohen P, DeSeau V and Israel MA. (1986) Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues. *J Biol Chem*. 261, 13754-13759.

Rosen MK, Yamazaki T, Gish GD, Kay CM, Pawson T and Kay LE. (1995) Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein. *Nature*. 374, 477-479.

Ruey-Long H, William HS and Mien-Chie H. (1999) Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185^{neu} and also depletes p185^{neu}. *Clin Cancer Res*. 5, 1884-1891.

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

Santibanez JF, Quintanilla M and Martinez J. (2000) Genistein and curcumin block TGF-beta 1-induced u-PA expression and migratory and invasive phenotype in mouse epidermal keratinocytes. *Nutr Cancer*. 37, 49-54.

Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR and Parsons JT. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*. 14, 1680-1688.

Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 372, 786-791.

Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH and Schlaepfer DD. (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell. Biol*. 2, 249-256.

Smart JE, Oppermann H, Czernilofsky AP, Purchio AF, Erikson RL and Bishop JN. (1981) Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc Natl Acad Sci USA*. 78, 6013-6017.

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

Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S and Spiegel S. (1999) Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem*. 274, 35343-35350.

Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C and Giancotti FG. (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 94, 625-634.

Wargovich MJ, Chen CD, Harri C, Yang E and Velasco. (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.

林宗瑤.(2002) 內毒素與薑黃素對大腸癌細胞 (Caco-2) 的影響. 中山醫學大學生物化學研究所碩士論文.

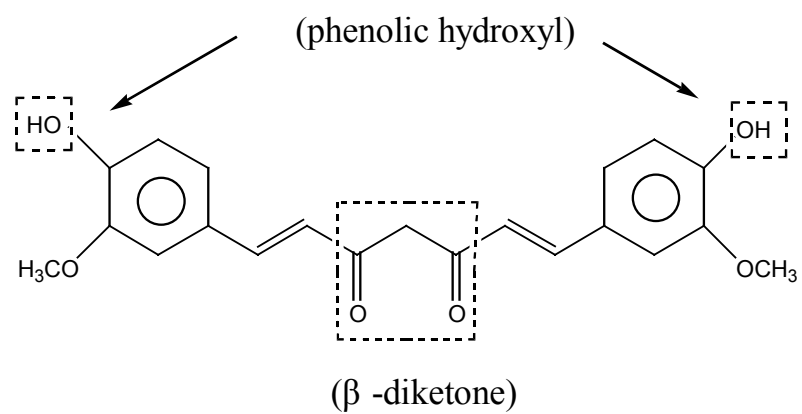


Figure 1. The chemical structure of curcumin. Curcumin is a polyphenolic compound with a β-diketone moiety. It contains two ferulic acid molecules linked via a methylene bridge at the C atoms of the carboxyl groups.

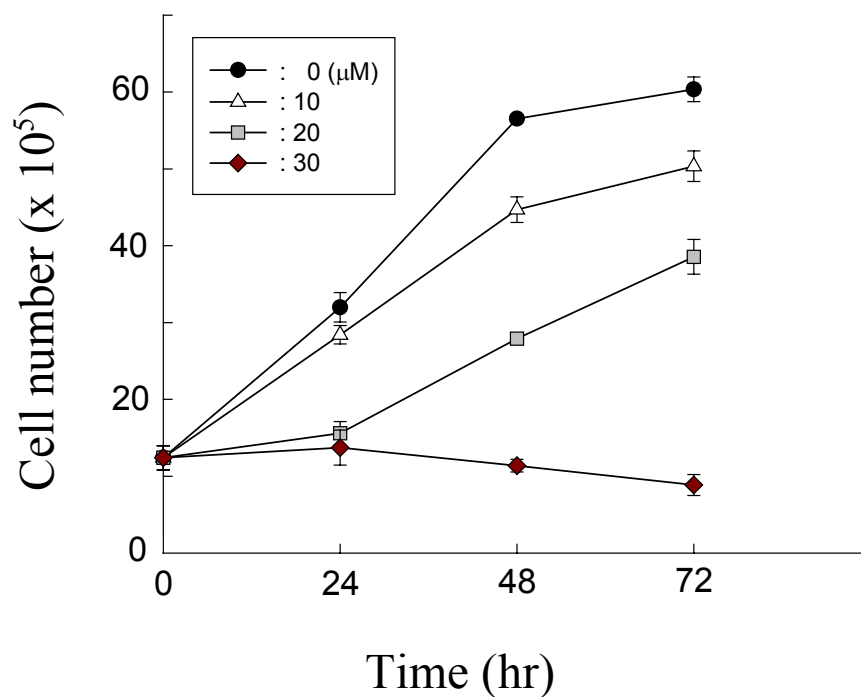


Figure 2. Growth inhibition of IV5 cells by curcumin. IV5 cells (5×10^5) were plated at the beginning. After 18 hrs, cells were incubated with different concentrations of curcumin as indicated for 24, 48 and 72 hrs. Total number of control and curcumin-treated cells were counted and plotted. The results are shown in means \pm S.D. for three independent experiments performed in triplicate.

Cur (μM): 0 10 20 50 100

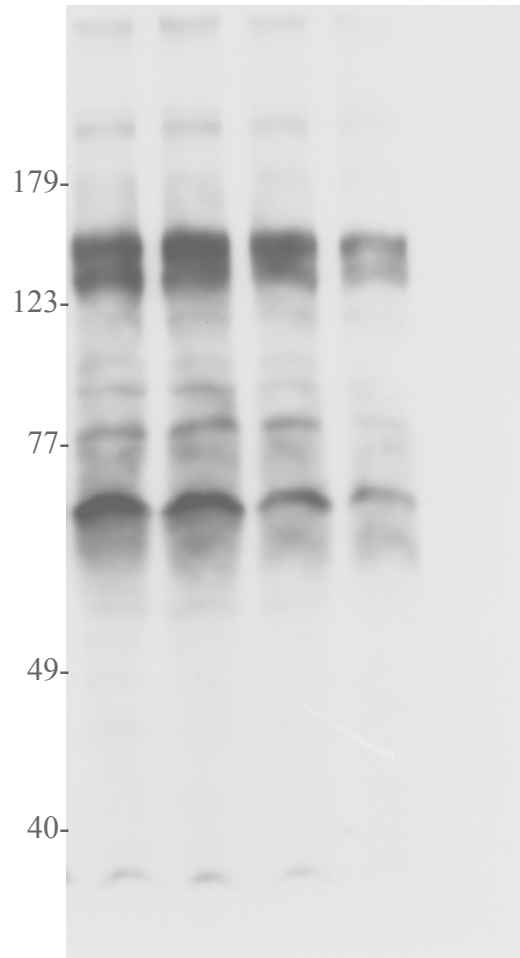


Figure 3. Curcumin treatment led to the reduction of protein tyrosyl phosphorylation in IV5 cells. IV5 cells were treated with various concentrations of curcumin for 24 hr. Equal amounts of lysates (100 μg) from each sample were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-pTyr Ab.

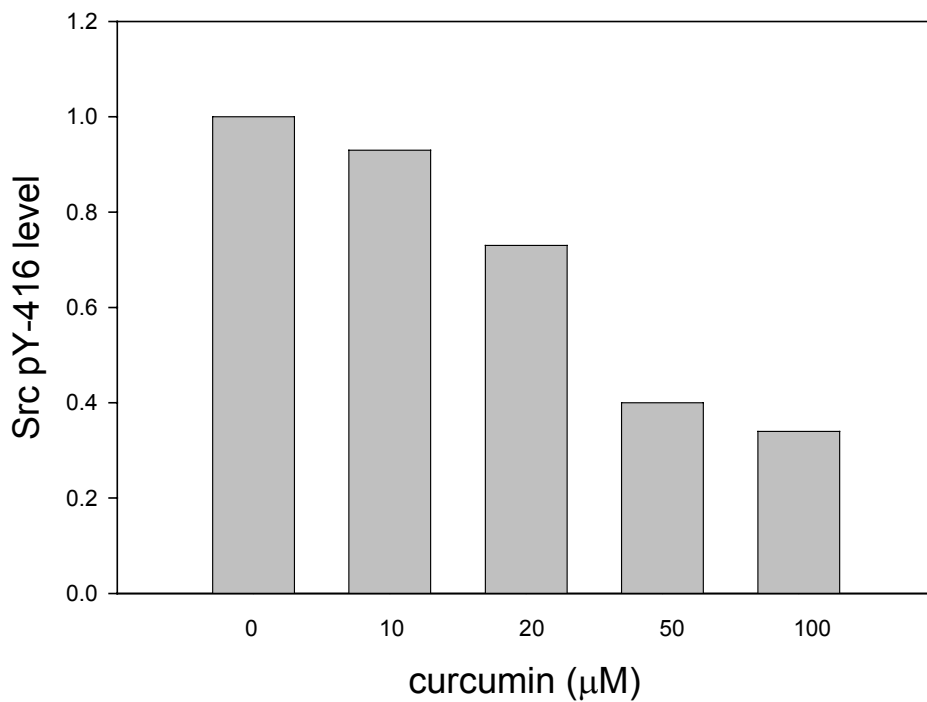
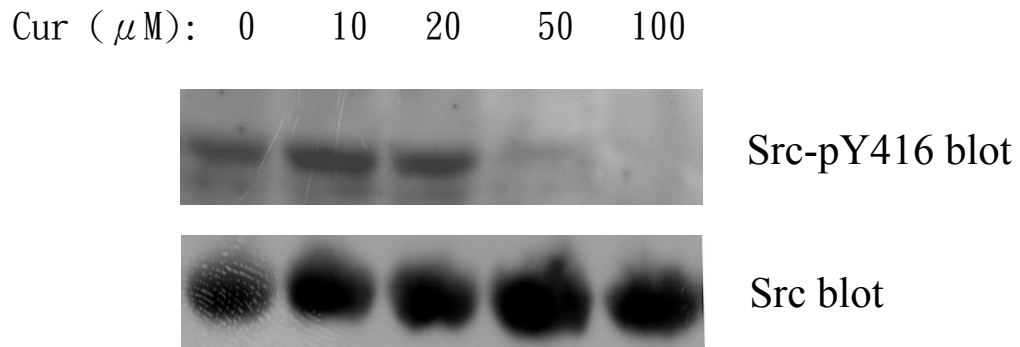
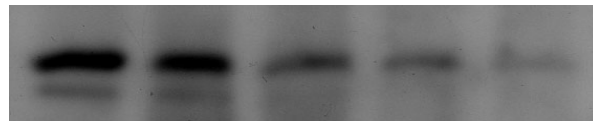
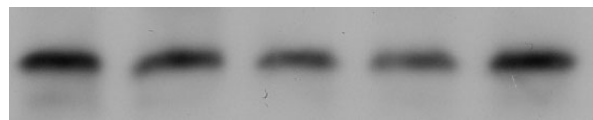


Figure 4. Curcumin inhibited Src activation in IV5 cells. IV5 cells were treated with various concentrations of curcumin for 24 hr. Equal amounts of lysates (100 μg) from each sample were resolved by SDS-PAGE and examined by Western immunblotting with Src and Src-pY-416 antibodies respectively.

Cur (μM): 0 10 20 50 100



cortactin IP/pTyr blot



cortactin IP/cortactin blot

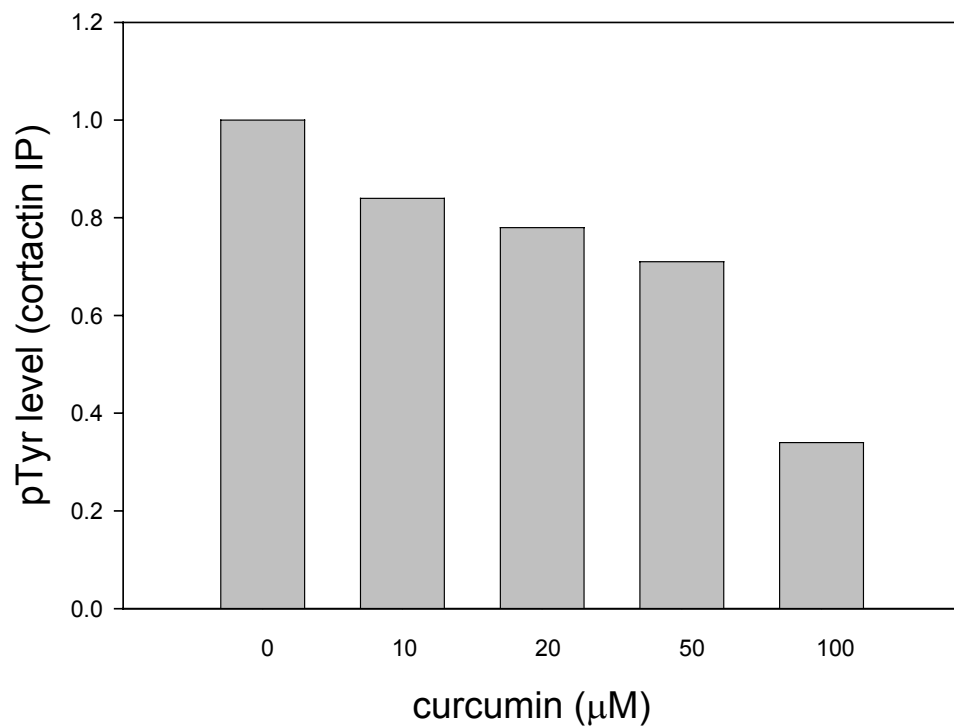


Figure 5. Reduced cortactin tyrosyl phosphorylation in

curcumin-treated IV5 cells. IV5 cells were treated with various concentration of curcumin for 24 hr. Equal amounts of lysates (500 μg) were immunoprecipitated anti-cortactin Ab and analyzed with either anti-pTyr Ab (upper panel) or anti-cortactin Ab (bottom panel).

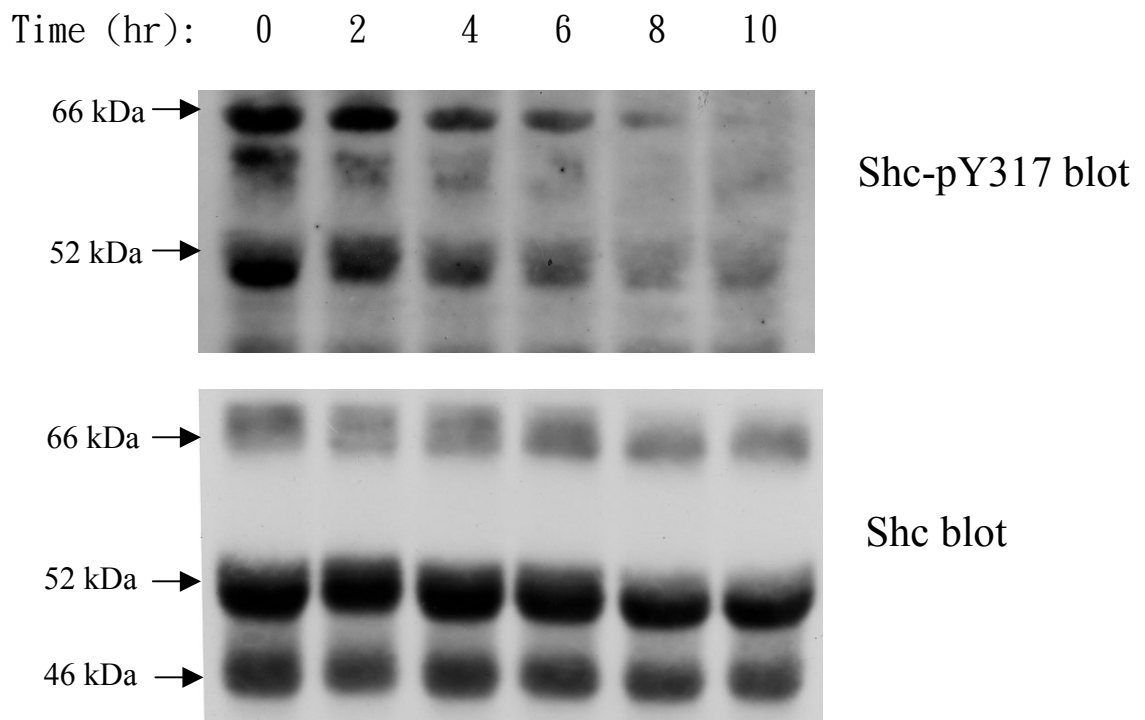


Figure 6. Reduced tyrosyl phosphorylation of Shc in response to curcumin. IV5 cells were treated with curcumin (100 μ M) for different period of time. Equal amounts (100 μ g) of cellular lysates were analyzed directly with anti-Shc-pY-317 and anti-Shc antibodies.

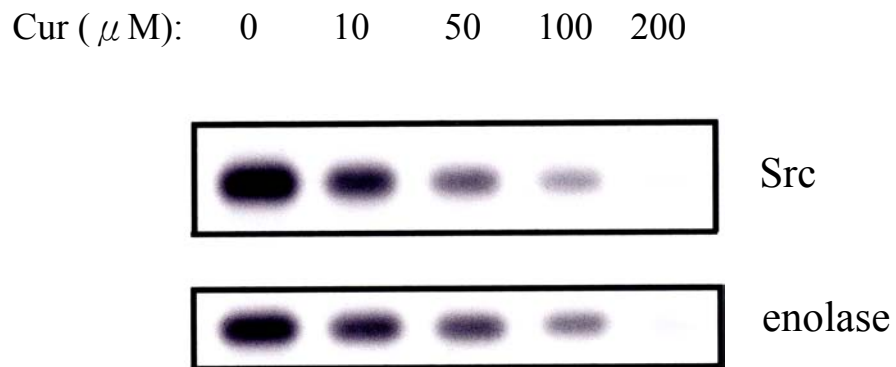


Figure 7. Curcumin can directly inhibit Src kinase activity *in vitro*. The v-Src immunocomplexes derived from IV5 cells were aliquot and incubated with various concentration of curcumin at 4°C for 10 min. Then, v-Src immunocomplexes were subjected to *in vitro* kinase reactions in the presence of enolase. The 32 P-incorporated proteins were analyzed by SDS-PAGE and detected by autoradiography. (provided by Dr. T-H. Leu)

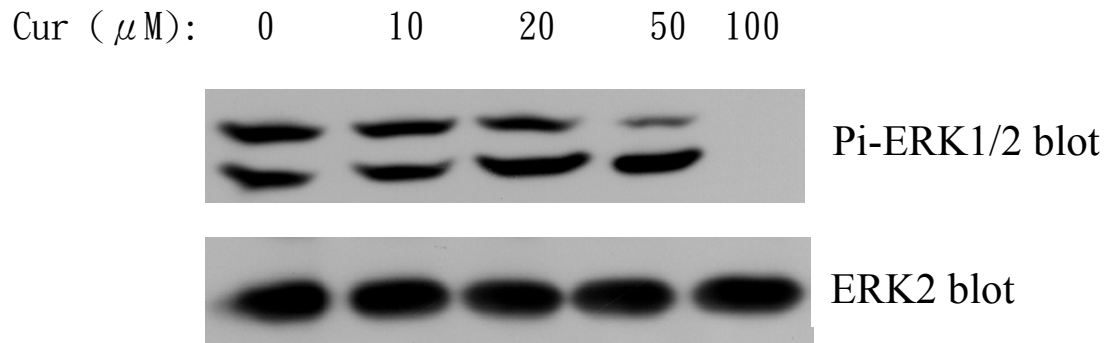


Figure 8. Reduced tyrosyl phosphorylation of ERK in response to curcumin. IV5 cells were treated with various concentrations of curcumin for 24 hr. Equal amounts (100 μg) of cellular lysates were analyzed directly with anti-Pi-ERK1/2 and anti-ERK2 antibodies.

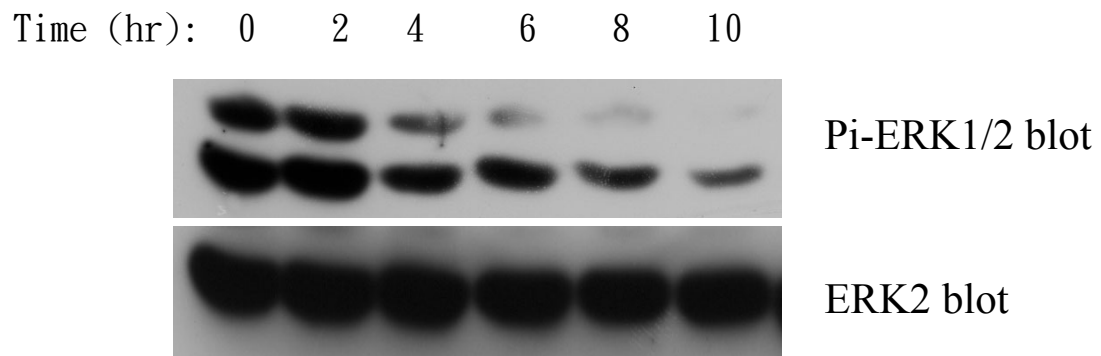


Figure 9. Reduced tyrosyl phosphorylation of ERK in response to curcumin. IV5 cells were treated with curcumin (100 μ M) for different period of time. Equal amounts (100 μ g) of cellular lysates were analyzed directly with anti-Pi-ERK1/2 and anti-ERK2 antibodies.

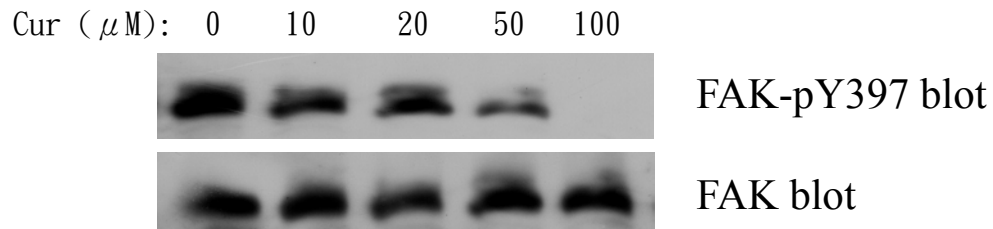


Figure 10. Reduced tyrosyl phosphorylation of FAK in response to curcumin. IV5 cells were treated with various concentrations of curcumin for 24 hr. Equal amounts (100 μ g) of cellular lysates were analyzed directly with anti-FAK-pY-397 and anti-FAK antibodies.

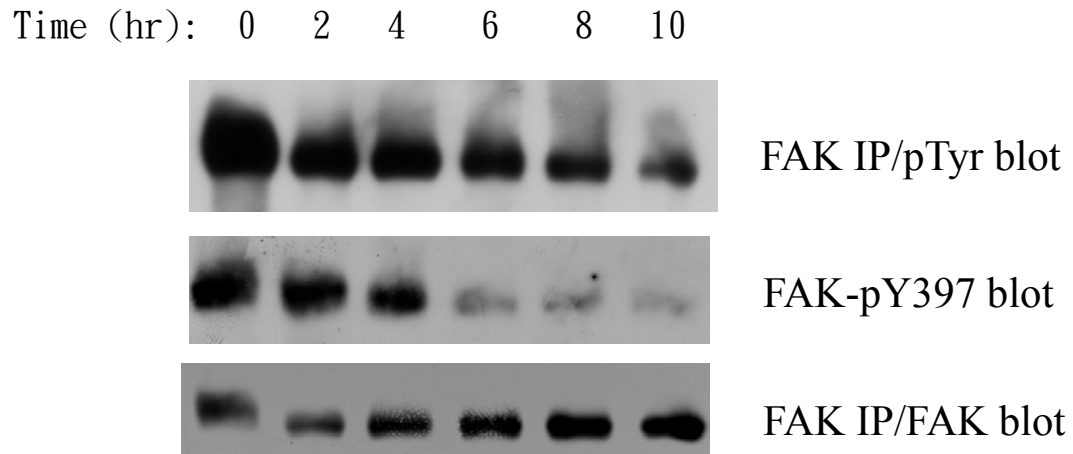


Figure 11. Reduced tyrosyl phosphorylation of FAK in curcumin-treated IV5 cells. Cellular lysates prepared from curcumin-treated or nontreated IV5 cells were immunoprecipitated with anti-FAK antibody. One third of immunoprecipitate was Western immunoblotted with anti-pTyr Ab (upper), anti-FAK Ab (middle), or anti-FAK Pi-Tyr-397 Ab (lower).

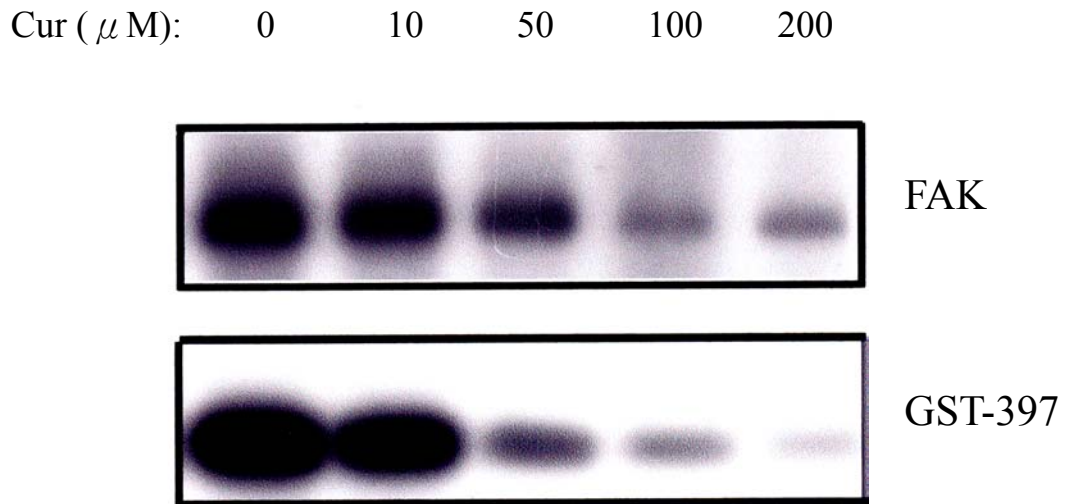


Figure 12. Curcumin can directly inhibit FAK kinase activity *in vitro*.

The FAK immunocomplexes derived from IV5 cells were aliquot and incubated with various concentration of curcumin at 4°C for 10 min. Then, FAK immunocomplexes were subjected to *in vitro* kinase reactions in the presence of GST-397Y. The 32 P-incorporated proteins were analyzed by SDS-PAGE and detected by autoradiography. (provided by Dr. T-H. Leu)

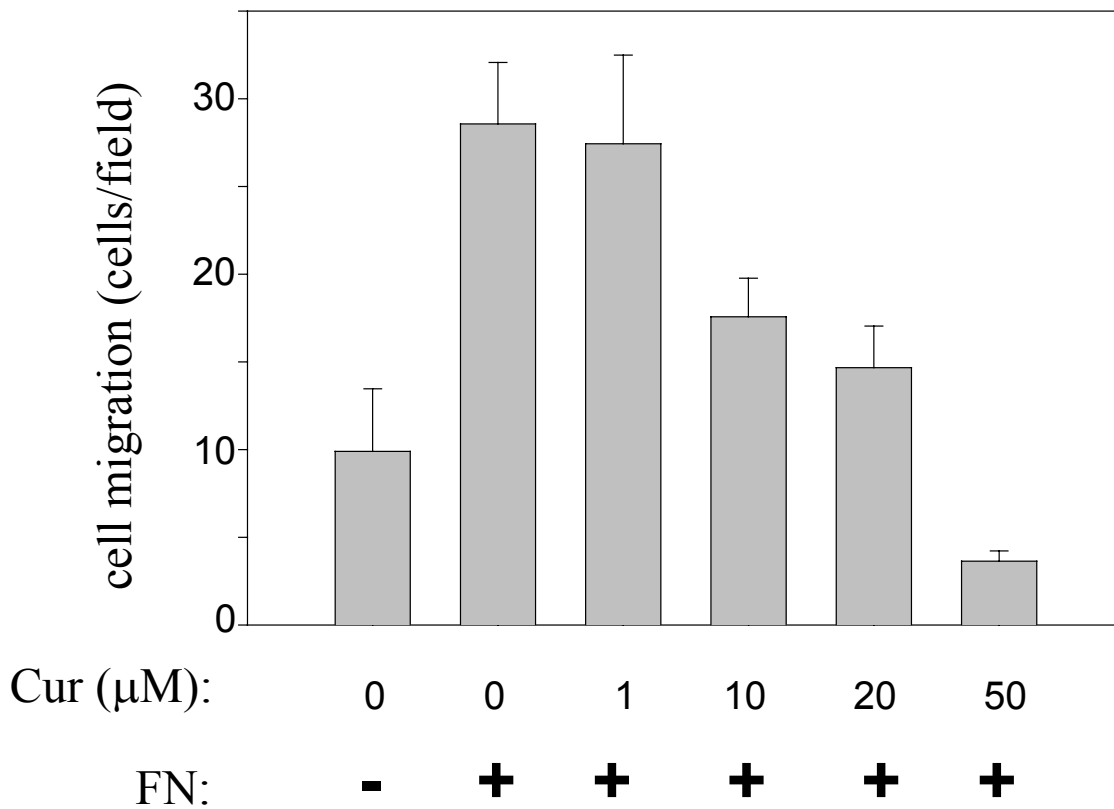


Figure 13. Curcumin reduced cell motility in IV5 cells.

Curcumin-treated or nontreated IV5 cells were allowed to migrate for 6 hr through polycarbonate filters in the presence of fibronectin (20 μg/ml) that acts as a chemoattractant. The migrated cells were determined as described under Materials and Methods. The results are shown in the means ± S.D. of three independent experiments.

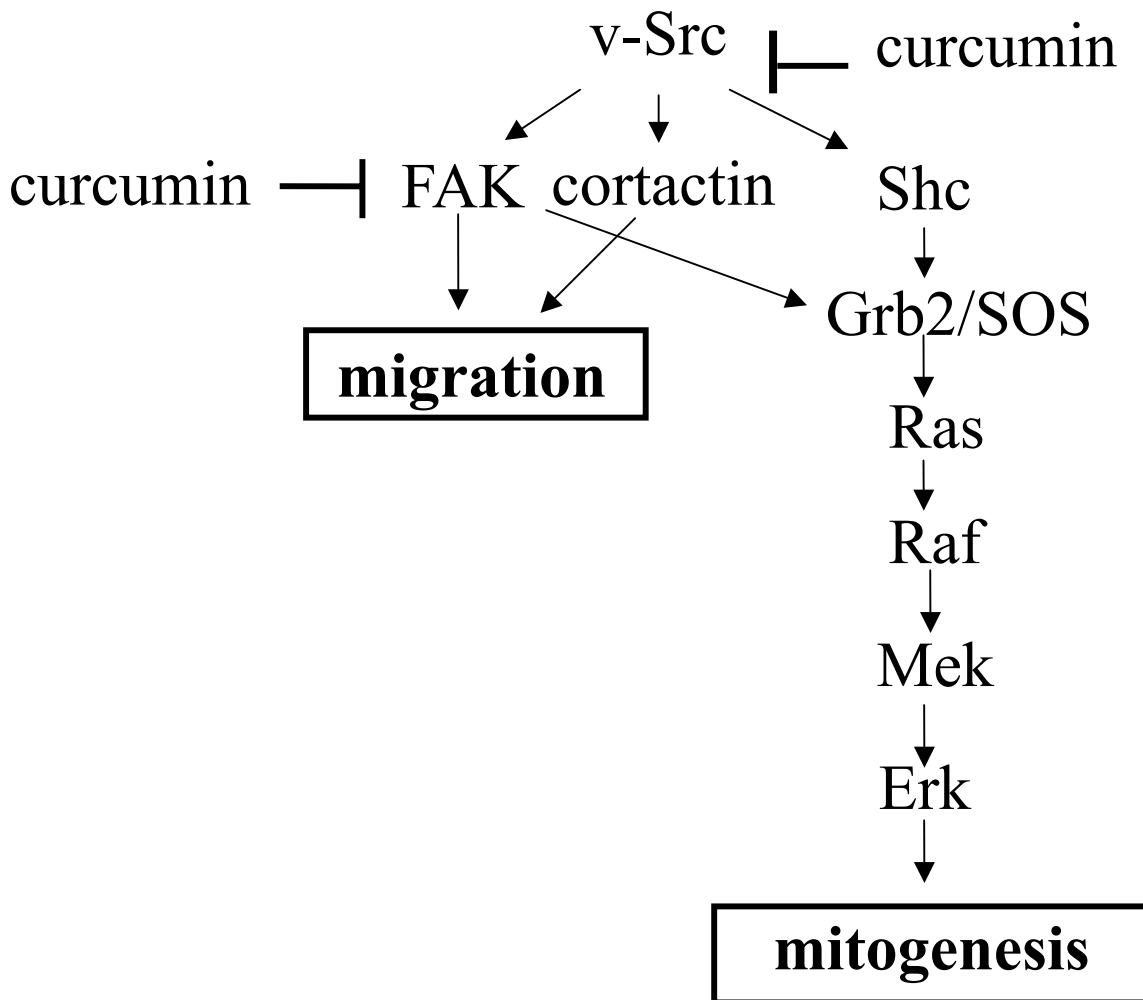


Figure 14. A model for inhibitory effect of curcumin on mitogenesis and migration in v-Src transformed cells.

