

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

Thymoquinone抑制腎臟癌細胞之腫瘤癌化、細胞增生、血管新生、轉移與上皮-間質轉換機制、誘發細胞自體吞噬凋亡及調節標靶療效之細胞與動物研究

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 104-2314-B-040-011-  
執行期間：104年08月01日至105年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：張泓榮  
共同主持人：謝易修、許立松  
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：陳雅文  
大專生-兼任助理人員：張雅閔  
大專生-兼任助理人員：陳加馨

中華民國 105 年 08 月 26 日

中文摘要：百里醜(TQ)是黑種草油(*Nigella sativa*)的主要成分。過去研究發現，百里醜在不同的癌細胞株有抑制生長之作用，但其是否會影響腎臟癌細胞的轉移目前還不清楚。而在本實驗中，我們要利用百里醜探討其對於786-0-SI3此腎細胞癌細胞株的轉移(migration)和侵襲(invasion)能力之影響、以及其作用轉制。腎臟癌在早期可以毫無症狀，一直到腫瘤太大而壓迫到其它器官或是已轉移才出現症狀，而癌症也隨著其轉移能力越強死亡的機率也就越高。本實驗會先以 MTT assay 檢測百里醜濃度0  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  對其腎臟癌細胞有無毒殺作用。接著再以細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay)、細胞移動實驗(Boyden chamber Migration assay)以及傷口癒合實驗(wound healing assay)去觀察786-0-SI3 的細胞侵襲以及細胞移動的能力。在實驗的結果下證實0  $\mu\text{M}$  - 20  $\mu\text{M}$  的百里醜對786-0-SI3並無毒殺作用，且低濃度10  $\mu\text{M}$  及20  $\mu\text{M}$ 的百里醜，在24小時處理之下，786-0-SI3 細胞侵襲(invasion)以及轉移(migration)能力有明顯被抑制的現象。再以gelatin zymography assay 去觀察投予百里醜濃度0 - 20  $\mu\text{M}$  的786-0-SI3 其MMP-2 以及u-PA 的活性有顯著被抑制的現象。以cell-matrix 貼附能力實驗方法，證實隨著百里醜濃度的提升786-0-SI3 貼附於collagen (type I and IV)能力有下降的趨勢。這些結果都說明了百里醜會去抑制786-0-SI3 爬行轉移的能力。所以我們進而使用西方墨點法(Western blot)去觀察786-0-SI3 在加藥處理後其蛋白質的變化，實驗結果隨百里醜濃度的上升其p-ERK、p-Src、p-paxilin 178、PI3K有顯著被抑制的現象。最後，我們使用10 ng/mL 的TGF- $\beta$  去誘導786-0-SI3 使其細胞間質化後，利用細胞移動實驗(Boyden chamber Migration assay)、免疫螢光染色以及gelatin zymography assay 等分析方法，去觀察百里醜對786-0-SI3的影響，結果也顯示由TGF- $\beta$  所誘導786-0-SI3 細胞轉移(migration)、侵襲(invasion)能力以及細胞間質化的作用有明顯被抑制的現象，且MMP-2 以及u-PA 活性有顯著被抑制的現象。因此，在抑制腎臟癌細胞轉移以及侵襲，百里醜具有潛在的治療效果。

中文關鍵詞：百里醜(TQ)、腎細胞癌、侵襲、轉移、MMP-2、u-PA

英文摘要：Thymoquinone (TQ) is the major active component of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. Previous studies showed that TQ can inhibit various of cancer cell growth, but its mechanism is not yet clear. The aim of this study was to investigate the possible effects of TQ in inhibit on the invasion and migration of 786-0-SI3 renal cell carcinoma (RCC) cells. Kidney cancer (renal cell cancer) signs and symptoms, including include blood in the urine, pain, fever, weight loss, etc. It is noteworthy that kidney cancer may have no symptoms at an early stage, until the tumor is too large and oppression have been transferred to other organs or cancer cell metastasis to other organ, the stronger the higher the probability of death. In this study, we use MTT assay to detect that dose-dependent (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$ ) cytotoxicity effects of TQ on renal

cell carcinoma cell lines 786-0-SI3. The 786-0-SI3 cell lines were treated with TQ up to 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M for a defined period and then subjected to Boyden chamber invasion assay, Boyden chamber motility assay, wound healing assay, gelatin zymography assay, and cell adhered to collagen (type I and IV) assay to examine the impacts of TQ. The results showed significant inhibition of cell invasion and migration, and TQ decreased matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and u-PA. In Western blot, we found that TQ decreased p-ERK, p-Src, p-paxillin 178 and PI3K. Finally, we treated with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) to induce 786-0-SI3 cell line epithelial-mesenchymal transition (EMT), then used Boyden chamber migration assay, immunofluorescence staining and gelatin zymography assay to examine the impacts of TQ in 786-0-SI3 cell lines. The results showed significant inhibition of cell invasion and migration, and TQ decreased MMP-2 and u-PA. In conclusion, TQ inhibited the invasion of renal cancer cells and may have potential use as a chemopreventive agent against RCC metastasis.

英文關鍵詞：Thymoquinone , renal cell carcinoma , MMP-2 , u-PA

## 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

Thymoquinone 抑制腎臟癌細胞之腫瘤癌化、細胞增生、血管新生、轉移與上皮-間質轉換機制、誘發細胞自體吞噬凋亡及調節標靶療效之細胞與動物研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2314-B-040-011-

執行期間：104年8月1日至105年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫研所

計畫主持人：張宏榮

共同主持人：謝易修、許立松

計畫參與人員：陳雅雯、張雅閔、陳加馨

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 \_\_\_\_ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

## 一 中英文摘要

### 1. 中文摘要

百里醜(TQ)是黑種草油(*Nigella sativa*)的主要成分。過去研究發現，百里醜在不同的癌細胞株有抑制生長之作用，但其是否會影響腎臟癌細胞的轉移目前還不清楚。而在本實驗中，我們要利用百里醜探討其對於 786-0-SI3 此腎細胞癌細胞株的轉移(migration)和侵襲(invasion)能力之影響、以及其作用轉制。腎臟癌在早期可以毫無症狀，一直到腫瘤太大而壓迫到其它器官或是已轉移才出現症狀，而癌症也隨著其轉移能力越強死亡的機率也就越高。本實驗會先以 MTT assay 檢測百里醜濃度 0  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M 對其腎臟癌細胞有無毒殺作用。接著再以細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay)、細胞移動實驗(Boyden chamber Migration assay)以及傷口癒合實驗(wound healing assay)去觀察 786-0-SI3 的細胞侵襲以及細胞移動的能力。在實驗的結果下證實 0  $\mu$ M - 20  $\mu$ M 的百里醜對 786-0-SI3 並無毒殺作用，且低濃度 10  $\mu$ M 及 20  $\mu$ M 的百里醜，在 24 小時處理之下，786-0-SI3 細胞侵襲(invasion)以及轉移(migration)能力有明顯被抑制的現象。再以 gelatin zymography assay 去觀察投予百里醜濃度 0 - 20  $\mu$ M 的 786-0-SI3 其 MMP-2 以及 u-PA 的活性有顯著被抑制的現象。以 cell-matrix 貼附能力實驗方法，證實隨著百里醜濃度的提升 786-0-SI3 貼附於 collagen (type I and IV)能力有下降的趨勢。這些結果都說明了百里醜會去抑制 786-0-SI3 爬行轉移的能力。所以我們進而使用西方墨點法(Western blot)去觀察 786-0-SI3 在加藥處理後其蛋白質的變化，實驗結果隨百里醜濃度的上升其 p-ERK、p-Src、p-paxilin 178、PI3K 有顯著被抑制的現象。最後，我們使用 10 ng/mL 的 TGF- $\beta$  去誘導 786-0-SI3 使其細胞間質化後，利用細胞移動實驗(Boyden chamber Migration assay)、免疫螢光染色以及 gelatin zymography assay 等分析方法，去觀察百里醜對 786-0-SI3 的影響，結果也顯示由 TGF- $\beta$  所誘導 786-0-SI3 細胞轉移(migration)、侵襲(invasion)能力以及細胞間質化的作用有明顯被抑制的現象，且 MMP-2 以及 u-PA 活性有顯著被抑制的現象。因此，在抑制腎臟癌細胞轉移以及侵襲，百里醜具有潛在的治療效果。

關鍵字:百里醜(TQ)、腎細胞癌、侵襲、轉移、MMP-2、u-PA

細胞間質化

### Abstract

Thymoquinone (TQ) is the major active component of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. Previous studies showed that TQ can inhibit various of cancer cell growth, but its mechanism is not yet clear. The aim of this study was to investigate the possible effects of TQ in inhibit on the invasion and migration of 786-0-SI3 renal cell carcinoma (RCC) cells. Kidney cancer (renal cell cancer) signs and symptoms, including include blood in the urine, pain, fever, weight loss, etc. It is noteworthy that kidney cancer may have no symptoms at an early stage, until the tumor is too large and oppression have been transferred to other organs or cancer

cell metastasis to other organ, the stronger the higher the probability of death. In this study, we use MTT assay to detect that dose-dependent ( $0 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  and  $20 \mu\text{M}$ ) cytotoxicity effects of TQ on renal cell carcinoma cell lines 786-0-SI3. Thne 786-0-SI3 cell lines was treated with TQ up to  $0 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  and  $20 \mu\text{M}$  for a defined period and then subjected to Boyden chamber invasion assay, Boyden chamber motility assay, wound healing assay, gelatin zymography assay, and cell adhered to collagen (type I and IV) assay examine the impacts of TQ. The result was showed significant in inhibition of cell invasion and migration, and TQ decreased matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and u-PA. In Western blot, we found that TQ decreased p-ERK, p-Src, p-paxillin 178 and PI3K. Final, we treated with TGF- $\beta$  ( $10 \text{ ng/mL}$ ) to induced 786-0-SI3 cell line epithelial-mesenchymal transition (EMT), then used Boyden chamber migration assay, Immunofluorescence staining and gelatin zymography assay to the impacts of TQ in 786-0-SI3 cell lines. The result was showed significant in inhibition of cell invasion and migration, and TQ decreased MMP-2 and u-PA. In conclusion, TQ inhibited the invasion of renal cancer cells and may have potential use as a chemopreventive agent against RCC metastasis.

Keywords : Thymoquinone ( TQ ), renal cell carcinoma (RCC), MMP-2 , u-PA , EMT , invasion , migration

## 二前言

### 背景:

近十年來癌症在國人十大死因排行榜中一直名列前茅，科學家們在癌症的研究上也投注相當多的時間與心力，但截至目前為止仍然有許多問題無法克服，例如抗藥性與癌轉移等問題，雖然相較於以往，在面對各種癌症病人的治療時有多種不同的藥物可供選擇，但令人困擾的是即使選擇不同的化學治療藥物或標靶藥物，一段時間的投予之後經常同樣會出現所謂抗藥性的問題，以至於藥物無法再有效的殺死癌細胞，因此，研發更有效的抗癌藥物或具有癌症預防效果的藥物是重要的研究方向。在腎臟癌治療上，在臨床除標靶藥物治療上，目前腎臟癌針對轉移性的第一線口服用藥物Sutent (紓癌特)，其機制與血管內皮生長因子受體(VEGFR)有關及拮抗VEGFR的方式，第二線用藥抑制酪胺酸激酶區的藥物 (簡稱TKI) Axitinib。另一類為mTOR信號通路抑制劑Afinitor(癌伏妥)，腎臟癌標靶以Sutent 與Axitinib兩類藥物為主要基底用藥，然而使用這兩類標靶藥物總伴隨著許多副作用，Sutent 具有、噁心、腹瀉、手足症候群、血球下降等狀況；Axitinib 副作用則是有噁心、疲倦、下痢、聲音啞啞、反胃、高血壓等。因此目前許多研究趨向以天然物成份如多酚類等天然物合併抗癌藥物的使用，期望能達到加乘抗癌藥物的作用，降低藥物的使用濃度，減低副作用的產生，降低病人的不適。上皮-間質轉化(EMT)參與癌細胞自良性腫瘤變成轉移性癌細胞的過程，被視為主要的癌化指標之一，在具有高度惡性轉移能力的癌細胞中，發現其皆具有EMT的現象。腫瘤組織中細胞的異質性引發癌症幹細胞(cancer stem cells, CSCs)存在可能性。研究顯示只有少部份的細胞具備腫瘤生長、復發及轉移的能力，這些細胞稱為癌幹

細胞。為此，利用一些天然化合物驗證腎臟癌幹細胞對腎臟癌化之重要性，及抑制癌細胞EMT現象，對未來癌症治療，或許是一個很好的方向。本計畫以thymoquinone合併抗癌標靶藥物(Sutent及Axitinib)的使用，期望能加強抗癌藥物的療效，降低抗癌藥物的濃度，達到輔助治療的效果。

### 一、腎臟癌

腎臟癌在成人臟器癌症中佔了 1~3%，並且有 85% 的腎臟癌病患為年紀較長者 (50~70 歲)，其中又以男性比女性多(2:1)。目前每年約有近800位患者被診斷出罹患腎臟癌。常見的腎臟癌型態分別有：透明細胞癌(clear cell carcinoma)，乳頭狀癌(Papillary carcinoma)和嫌色腎細胞癌(Chromophobe renal cell carcinoma)。腎臟癌的起源是由腎臟內的腎小管上皮細胞長出來的癌瘤，通常是一個圓形或橢圓形的腫塊。若腫瘤小於7公分，屬於早期，通常尚未轉移。腎臟癌晚期會向外侵犯到腎臟外圍的組織或是局部的淋巴結，若發生遠處轉移，則會出現在淋巴結、肺部、肝臟和骨骼等組織(Mickisch, 2002)。由於腎臟癌容易經由血管轉移到病患身體的其他部位，所以有 25% 的腎臟癌病患會出現遠端轉移病症，平均五年存活率是 45%，而在沒有遠端轉移症狀下，五年存活率則是70%。在各種人類癌症當中，腎臟癌的根治必須經由化學治療加上手術切除(Bernards and Weinberg, 2002)。由於腎細胞癌對化學治療的反應並不太好，且大多起因於特定基因 (von Hippel-Lindau, VHL) 異常表現，使得血管不正常增生進而引發癌症，因此相關的血管生長因子則成為治療的主要標靶。然而，化學療法會對人體造成強烈的副作用與傷害，殺死癌細胞的同時對正常細胞也會有傷害，而且放射線治療的效果對於腎臟癌而言並沒有良好的效果。另一方面，切除手術又必須切除整個腎臟、一段輸尿管和腎上腺及包圍著腎臟的脂肪組織。因此目前許多研究偏向以天然物成份，如多酚酸或黃酮類等天然物合併抗癌藥來使用，期望能減少化療或標靶藥物對人體造成的傷害，達到輔助治療、抑制癌細胞惡化的效果。

### 二、癌症的轉移(metastasis)及腫瘤生成(tumorigenesis)

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

### 三、上皮細胞的上皮-間質轉化 (epithelial- mesenchymal transition, EMT)

細胞 EMT 是指從上皮細胞型態(epithelial cell)轉變成間葉細胞(mesenchymal cell)型態的一種特殊過程，其主要的特徵包括 Epithelial-cadherin (E-cadherin)表現量下降，Neuronal-cadherin(N-cadherin)表達的上升，細胞骨架由角蛋白為主轉化為波形蛋白為主，以及形態上由上皮細胞轉化為具有間充質特徵的細胞等。EMT 的發生可藉由一些分子訊號的傳遞(例如: Wnt、EGF)導致轉錄因子活化，像是 Snail-1、Slug、Twist 等。最初 EMT 被定義為胚胎時期與器官發育現象相關。而近年來有許多文獻指出，EMT 參與癌細胞自良性腫瘤變成轉移性癌細胞的過程，被視為主要的癌化指標之一，已有許多文獻指出在具有高度惡性轉移能力的癌細胞與癌症幹細胞中，發現其皆具有 EMT 的現象，此外 EMT 也被指出與細胞抗藥性有關(Zhang et al.)。當 EMT 發生時，細胞間的連接會消失包括 adherens junctions 和 desmosomes，細胞骨架會重組，基質會被溶解，上皮細胞塑性的特徵 E-cadherin、 $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -catenin

表現量會降低，間葉細胞塑性特徵 N-cadherin、Fibronectin、Vimentin 表現量會增加，這種變換使腫瘤細胞喪失細胞與細胞間連接，促使癌細胞侵襲與轉移(de Herreros et al., 2010; Sarkar et al., 2009)。

### 三 Thymoquinone的抗癌與相關研究

Thymoquinone (百里醜、瑞香草醜)是一種從植物萃取出來的化合物，是從廣泛生長於地中海、中歐、西亞等地的果黑種草(*Nigella sativa*)種籽萃取物中所發現。果黑種草種籽又名黑色茴香(Kalonji)，是回教醫學中一種的常用藥材，可以驅風止痛、補腎健腦、利尿、發汗、健胃、治療哮喘等，具有很高的藥用價值，研究中還指出果黑種草種籽在降脂、降糖等多方面也具有一定功效，而 thymoquinone 即為果黑種草種籽中的主要成分。近年來，西方的醫學研究中也發現 thymoquinone 也具有許多特殊的功效，如：抗口腔細菌、抗氧化、抗發炎(Woo et al.)和防止腐敗的能力。動物實驗中發現 thymoquinone 則能提升疼痛耐受性、抗癲癇和保護大鼠腦部海馬迴神經元不受缺氧傷害(Al-Majed et al., 2006)。而在癌症治療方面的研究上，thymoquinone 則可以降低處理抗癌藥物 cisplatin 和 doxorubicin 時對於心臟、肝臟和腎臟所造成的毒性傷害(al-Shabanah et al., 1998)並且也擁有抗前胃癌、腸癌(Gali-Muhtasib et al., 2008)、乳癌(Woo et al.)、口腔癌(Chu et al., 2014)等腫瘤以及抑制前列腺癌生長的能力。2008 年的實驗中則發現，thymoquinone 可抑制 histone deacetylase (HDAC) 的活性，並顯示具有殺死胰臟癌細胞株的能力，而 p53、Bax、bcl-2 和 p21 基因都會受到 thymoquinone 的處理而變化。

### 三研究目的

在正常細胞中，具有細胞自噬(autophagy)與細胞(apoptosis)等計畫性細胞死亡(programmed cell death)機制以維持正確的細胞數量並去除異常之細胞，但癌細胞會產生許多突變而對細胞凋亡產生抗性，所以是否可以利用細胞自噬達到治療癌症的效果，相當值得探討。在高度轉移的癌細胞中長發現細胞具有 EMT 的現象，且 EMT 高度現象的癌細胞中其細胞抗藥性也明顯增加。癌幹細胞理論指出癌幹細胞會透過自我更新造成腫瘤新生且透過分化能力形成腫瘤異質性。因此癌症幹細胞觀點可應用於癌症臨床治療。由於幹細胞或癌幹細胞均具有新生(self-renewal)和分化(differentiation)的能力，目前對於幹細胞和癌幹細胞調控其分化或是維持新生，都是利用蛋白質生長因子或是血清來達成。對於小分子化學結構物是否也能達到幹細胞或癌幹細胞的調控，目前為止並不清楚。利用小分子化學結構物來調控癌幹細胞有底下的優點：1. 小分子藥物可以快速的抑制或是啟動分子調控機制，且其效果通常是可逆的。2. 可利用小分子化合物可調整藥物濃度的方式，利用不同濃度調控其作用方式。3. 更進一步，若是藥物結構設計得當，一種小分子化合物有時可以調控多種不同蛋白作用。因此，小分子化學結構物用於癌幹細胞或幹細胞的調控，有機會成為未來的主流。由於癌幹細胞在體外培養的過程中，有可能會走向細胞新生或分化，若是能利用小分子化合物讓癌幹細胞走向分化或抑制癌幹細胞新生，輔以化療藥物的使用，或許有機會提升癌症的治癒率。因此能針對腎臟癌症幹細胞及腎臟癌細胞若能抑制其侵襲轉移(metastasis)、細胞增生(proliferation)、血管新生(angiogenesis)、上皮細胞的上皮-間質轉化(EMT)或是進一步促進細胞死亡(autophagy 及 apoptosis)，或許可以進一步合併臨床標靶藥物應用在腎臟癌的輔助治療，降低抗癌藥物的用藥量，減低病人的副作用。

### 四文獻探討

Al-Majed, A.A., Al-Omar, F.A., and Nagi, M.N. (2006). Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 543, 40-47.

al-Shabanah, O.A., Badary, O.A., Nagi, M.N., al-Gharably, N.M., al-Rikabi, A.C., and al-Bekairi, A.M. (1998). Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *J Exp Clin Cancer Res* 17, 193-198.

Bernards, R., and Weinberg, R.A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418, 823.

Chu, S.C., Hsieh, Y.S., Yu, C.C., Lai, Y.Y., and Chen, P.N. (2014). Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation-dependent apoptosis and LC3-II activation-dependent autophagy. *PloS one* 9, e101579.

de Herreros, A.G., Peiro, S., Nassour, M., and Savagner, P. (2010). Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 135-147.

Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., Kuester, D., Krueger, S., El-Hajj, Z., Diestel, A., Evert, M., El-Najjar, N., Peters, B., Jurjus, A., *et al.* (2008). Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *J Cell Mol Med* 12, 330-342.

Kim, D., Kim, S., Koh, H., Yoon, S.O., Chung, A.S., Cho, K.S., and Chung, J. (2001). Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1953-1962.

Mickisch, G.H. (2002). Multimodality treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Expert review of anticancer therapy* 2, 681-685.

Sarkar, F.H., Li, Y., Wang, Z., and Kong, D. (2009). Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir* 64, 489-500.

Woo, C.C., Kumar, A.P., Sethi, G., and Tan, K.H. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol*.

Woo, C.C., Loo, S.Y., Gee, V., Yap, C.W., Sethi, G., Kumar, A.P., and Tan, K.H. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR-gamma pathway. *Biochem Pharmacol* 82, 464-475.

Zhang, Z., Zhu, F., Xiao, L., Wang, M., Tian, R., Shi, C., and Qin, R. Side population cells in human gallbladder cancer cell line GBC-SD regulated by TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 31, 749-755.

## 五研究方法

### 1. 細胞存活率分析 ( MTT assay )

本實驗是藉由粒線體氧化還原能力來測試細胞是否有活性以及是否存活的方法，利用 MTT assay 方法使有活性的活細胞會利用 MTT reagent [ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromide ] 中 tetrazolium 經由粒線體中的 lactate dehydrogenase 作用代謝還原成紫色 formazan 結晶，先吸去培養 786-O-SI3 腎臟癌細胞的培養液，再加入 5 mL PBS 搖晃均勻後吸去 PBS，接著加入 800  $\mu$ L trypsin，培養 6 分鐘後加入 8 mL 培養液中止 trypsin 反應，用玻璃 pipette 沿 dish 沖下細胞接著離心 1000 rpm，5 分鐘後去除上清液用 10 mL 培養液打散 pellet 後，分成 24 well 以  $3 \times 10^4$  細胞數分至 6 cm dish 中，加入百里醜(TQ) (0、5、10、20  $\mu$ M) 處理，37  $^{\circ}$ C 培養 24 小時後再加入 1 mL 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/mL)，待此作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，以螢光顯微鏡於 0.D. 563 nm 下測定溶液吸光，由吸光強

度可得知存活的細胞數多寡。

## 2. 細胞數計算 (trypan blue exclusion assay)

先吸去培養 786-0-SI3 細胞株的培養液，再加入 5 mL PBS 搖晃均勻後吸去 PBS，連續清洗二次後，接著加入 800  $\mu$ L trypsin，培養 6 分鐘後加入 8 mL 培養液中止 trypsin 反應，用玻璃 pipette 沿 dish 沖下細胞主要目的是將細胞打散，將打散的細胞移到離心管中，並加入 10 mL 培養液稀釋避免細胞數目過高，取細胞懸浮液 100  $\mu$ L 和 10  $\mu$ L trypan-blue，混合均勻後，取出 10  $\mu$ L 混合過後的細胞懸浮液放到細胞計數盤 (haemocytometer) 上計數，死細胞會被染成藍色，以活細胞數與死細胞數量的百分比來比較，看細胞總數中活細胞佔有的數量，算出 9 大格中的 4 格內活細胞數 (N 值)，N 值除 4 再乘 2 (稀釋倍數)  $\times$  10<sup>4</sup> (細胞懸浮液量)，既為 10 mL 細胞總數。

## 3. 細胞移動性分析 (Boyden chamber motility assay)

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法來分析細胞移動性。lower chamber 為含有 10 % FBS 的 DMEM，上層及下層則以 cellulose nitrate membrane 隔開。將處理藥物 24 小時後的細胞以 0.05 % 的 trypsin-EDTA 打下，並用 trypan blue 計算活細胞數量，然後注入固定量的細胞 (1.5  $\times$  10<sup>4</sup>/well) 於 upper chamber，待細胞移動 24 小時以後，取下 cellulose nitrate membrane，以甲醇固定 membrane 上的細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (稀釋 20 倍) 染色 16 小時，最後固定 membrane，擦拭掉上層的細胞 (亦為未爬行之細胞)。以目鏡 10 X、物鏡 10 X 的條件在顯微鏡底下，隨機選取多個視野，進行移動細胞數之統計。

## 4. 細胞侵入性分析 (Boyden chamber invasion assay)

分析方法與細胞移動性分析相同，差別只在於 cellulose nitrate filter 上要 coating 一層 matrigel (100  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)，且在使用前須先風乾兩個小時。將處理藥物 12 小時後的細胞以 0.05 % 的 trypsin-EDTA 打下，並用 trypan blue 計算細胞數 (存活之細胞)，然後注入固定量的細胞 (1.5  $\times$  10<sup>4</sup>) 於 upper chamber，待細胞移動 24 小時以後，取下 cellulose nitrate filter，以甲醇固定 filter 上的細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (稀釋 20 倍) 染色 16 小時，最後固定 membrane 於 10 公分之 petri-dish 上，擦拭掉上層之細胞 (亦為未侵襲之細胞)。以目鏡 10 X、物鏡 10 X 的條件在顯微鏡底下，隨機選取多個視野，進行移動細胞數之統計。

## 5. 細胞傷口癒合分析 (wound healing assay, migration)

將 culture-insert 固定在 6 well 中，將 786-0-SI3 腎臟癌細胞，以 1.0  $\times$  10<sup>4</sup>/well 細胞數分至每個 culture-insert 中，37 °C 培養 24 小時後，將 6 well 中的 culture-insert 取下，以 PBS buffer 洗淨死亡的細胞，再加入僅含有 1 % 血清的培養液含有不同濃度的百里醌 (TQ) (0、5、10、20  $\mu$ M)，在 0 及 24 小時以目鏡 10 X、物鏡 4 X 的條件在顯微鏡下觀察固定位置的傷口癒合狀況，記錄並拍照，並將照片彙整成圖。

## 六結果與討論

### 1. 百里醌 (TQ) 對 786-0-SI3 腎臟癌細胞的存活率之影響

將 786-0-SI3 腎臟癌細胞分別種到 24 well 的培養皿中，培養其 24 小時。接著，進行百里醌

(TQ)不同劑量的加藥處理(0、5、10、20  $\mu\text{M}$ )。再經過 24 小時之後，利用 MTT assay 分析百里醜(TQ)對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞存活率之影響，結果發現百里醜(TQ)濃度為 0 - 20  $\mu\text{M}$  時，對於 786-0-SI3 腎癌細胞株無毒殺作用 (Fig. 1)。

## 2. 百里醜 (TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 invasion 能力之影響

將 786-0-SI3 腎臟癌細胞培養 16 個小時之後，進行百里醜(TQ)不同劑量的加藥處理(0、5、10、20  $\mu\text{M}$ )。經過 24 小時之後，利用細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay)分析發現，有加入 10  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  百里醜(TQ)的 786-0-SI3 細胞株，其細胞侵襲(invasion)能力有明顯被抑制之效果 (Fig. 2)。

## 3. 百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 motility 能力之影響

在進行細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay)的同時，也一起進行細胞移動實驗(Boyden chamber motility assay)，一樣將 786-0-SI3 腎臟癌細胞培養 16 個小時之後，進行百里醜(TQ)不同劑量的加藥處理(0、5、10、20  $\mu\text{M}$ )，經過 24 小時之後，其 786-0-SI3 腎臟癌細胞運動(motility)能力之結果與細胞侵襲(invasion)能力一樣(Fig. 2)，有加入 10  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  百里醜(TQ)的 786-0-SI3 細胞株，其細胞運動(motility)能力有明顯被抑制之效果 (Fig. 3)。

## 4. 百里醜 (TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 migration 能力之影響

將 786-0-SI3 腎臟癌細胞培養 16 個小時之後，分別加 0  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  的百里醜(TQ)，進行傷口癒合實驗(wound healing assay)。經過 24 小時之後，其結果可以發現加入 20  $\mu\text{M}$  百里醜(TQ)的 786-0-SI3 細胞株，其移動(migration)能力有明顯被抑制之現象 (Fig. 4)。

## 5. 百里醜(TQ) 對 786-0-SI3 腎臟癌細胞的 MMP-2 活性之影響

利用 gelatin zymography assay 去觀察百里醜(TQ)對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞所分泌 MMP-2 的活性之影響。其結果可以發現隨著百里醜(TQ)添加濃度增加，786-0-SI3 腎臟癌細胞所分泌 MMP-2 的活性有明顯被抑制之效果 (Fig. 5)。

## 6. 百里醜(TQ) 對 786-0-SI3 腎臟癌細胞的 u-PA 活性之影響

利用 casein zymography assay 去觀察百里醜(TQ)對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞所分泌 u-PA 的活性之影響。其結果與 gelatin zymography assay 一樣，隨著百里醜(TQ)添加濃度增加，786-0-SI3 腎臟癌細胞所分泌 u-PA 的活性有明顯被抑制之效果 (Fig. 6)。

## 7. 百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞對於第 I 型 collagen

黏附能力之影響

利用細胞會黏附於第 I 型 collagen 的能力實驗，去觀察加入 0  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  的百里醜(TQ) 24 小時後，對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞黏附(adhered)能力之影響。結果發現百里醜(TQ)的添加，對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞黏附(adhered)能力有抑制之效果 (Fig. 7)。

## 8. 百里醜 ( TQ )對 786-0-SI3 腎臟癌細胞對於第 IV 型 collagen

黏附能力之影響

與細胞會黏附於第 I 型 collagen 的能力實驗方法相同，利用第 IV 型 collagen 去觀察加入百里醜(TQ) 24 小時後，對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞黏附(adhered)能力之影響。其結果發現百里醜(TQ)的添加，不管是在第 I 或 IV 型 collagen 情況底下，對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞黏附(adhered)於能力有明顯之抑制效果 (Fig. 8)。

#### 9. 百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 p-ERK 的活性之影響

利用西方墨點法(Western blot)觀察百里醜(TQ)對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞的訊息傳遞路徑之影響。結果顯示百里醜(TQ)可抑制 ERK 磷酸化(phosphate-extracellular regulated protein kinases; p-ERK) (Fig. 9)。

#### 10. 百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 p-AKT 及 t-AKT 的活性之影響

利用西方墨點法(Western blot)觀察百里醜(TQ)對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞的訊息傳遞路徑之影響。結果顯示百里醜 (TQ)對於 p-AKT 及 t-AKT 之活性無顯著影響 (Fig. 10)。

#### 11. 百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 p-Src、p-paxilin 178 及 PI3K 的活性之影響

利用西方墨點法(Western blot)觀察百里醜(TQ)對於 786-0-SI3 腎臟癌細胞的訊息傳遞路徑之影響。結果顯示百里醜 (TQ)可抑制 p-Src、p-paxilin178 及 PI3K 蛋白之表現 (Fig. 11)。

#### 12. 786-0-SI3 腎臟癌細胞經過 TGF- $\beta$ 誘導其間質化，百里醜 (TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 motility 能力之影響

利用細胞運動實驗(Boyden chamber motility assay)，觀察百里醜(TQ)對於經過間質化的 786-0-SI3 腎臟癌細胞，其 motility 能力的影響。首先將 786-0-SI3 腎臟癌細胞培養 16 個小時之後，再加入 TGF- $\beta$  10 ng/mL，2 小時後，進行百里醜(TQ)不同劑量的加藥處理(0、5、10、20  $\mu$ M)，經過 24 小時之後，有加入 10  $\mu$ M 及 20  $\mu$ M 百里醜(TQ)的 786-0-SI3 腎臟癌細胞，其由 TGF- $\beta$  所誘導的運動(motility)能力有明顯被抑制之現象 (Fig. 12)。

#### 13. 786-0-SI3 腎臟癌細胞經過 TGF- $\beta$ 誘導其間質化，百里醜 (TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞 invasion 能力之影響

利用細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay)觀察百里醜(TQ)對於經過間質化的 786-0-SI3 腎臟癌細胞，其 invasion 能力的影響。將 786-0-SI3 腎臟癌細胞培養 16 個小時之後，再加入 TGF- $\beta$  10 ng/mL 後，進行百里醜(TQ)不同劑量的加藥處理(0、5、10、20  $\mu$ M)，經過 24 小時之後，有加入 10  $\mu$ M 及 20  $\mu$ M 百里醜(TQ)的 786-0-SI3 腎臟癌細胞，其由 TGF- $\beta$  所誘導的侵襲(invasion)能力有明顯被抑制之現象 (Fig. 13)。

#### 14. 786-0-SI3 腎臟癌細胞經過 TGF- $\beta$ 誘導其間質化，百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞的 MMP-2 活性之影響

利用 gelatin zymography assay 觀察百里醜(TQ)對於經過 TGF- $\beta$  10 ng/mL 誘導間質化的 786-0-SI3 腎臟癌細胞所分泌 MMP-2 的活性之影響。其結果可以發現有加入 20  $\mu$ M 百里醜 (TQ)，由 TGF- $\beta$  所誘導 786-0-SI3 腎臟癌細胞所分泌 MMP-2 的活性有明顯被抑制之效果 (Fig. 14)。

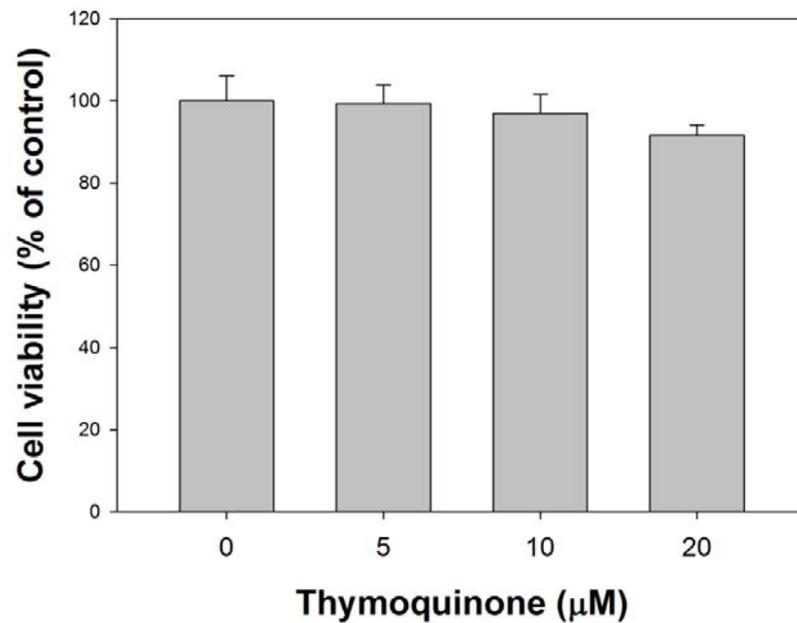
#### 15. 786-0-SI3 腎臟癌細胞經過 TGF- $\beta$ 誘導其間質化，百里醜(TQ)對 786-0-SI3 腎臟癌細胞的

## u-PA 活性之影響

利用 casein zymography assay 觀察百里醌(TQ)對於經過 TGF- $\beta$  10 ng/mL 誘導間質化的 786-O-SI3 腎臟癌細胞所分泌 u-PA 的活性之影響。其結果可以發現百里醌(TQ)對於抑制由 TGF- $\beta$  所誘導的 786-O-SI3 腎臟癌細胞所分泌 u-PA 的活性有顯著性差異 (Fig. 15)。

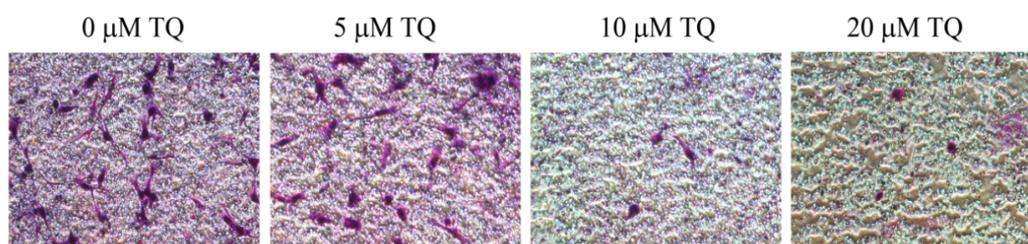
## 16. 百里醌(TQ)對於 786-O-SI3 腎臟癌細胞間質化之影響

將 786-O-SI3 腎臟癌細胞加入 TGF- $\beta$  10 ng/mL 誘導其間質化，再加入 20  $\mu$ M 的百里醌(TQ)，經過 24 小時之後，利用免疫螢光染色實驗觀察 786-O-SI3 腎臟癌細胞其細胞型態之變化。其結果可以發現百里醌(TQ)可抑制 786-O-SI3 腎臟癌細胞其 F-actin 受 TGF- $\beta$  誘導使其細胞間質化的作用 (Fig.16 )。

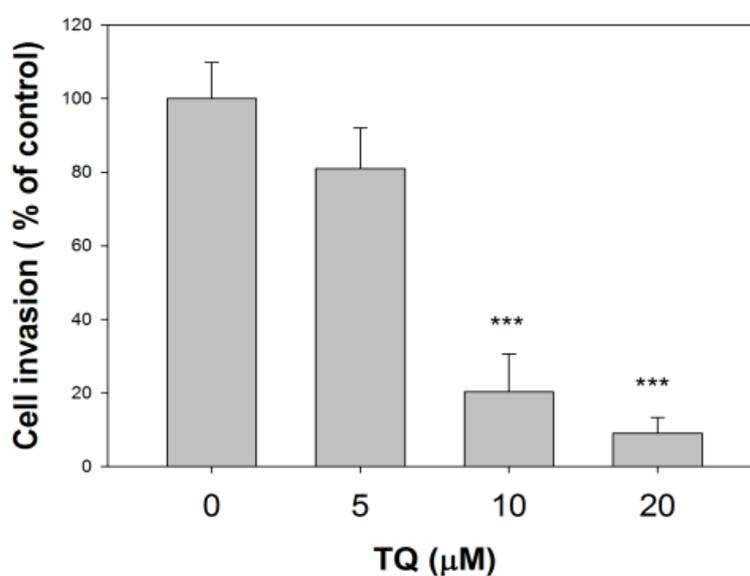


**Figure 1.** 利用 MTT 實驗檢測百里醌(TQ)濃度為 0  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M 對其 786-O-SI3 腎臟癌細胞有無毒殺作用。在實驗的結果下，證實 thymoquinone 濃度 0  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M 對 786O-SI3 無毒殺作用。

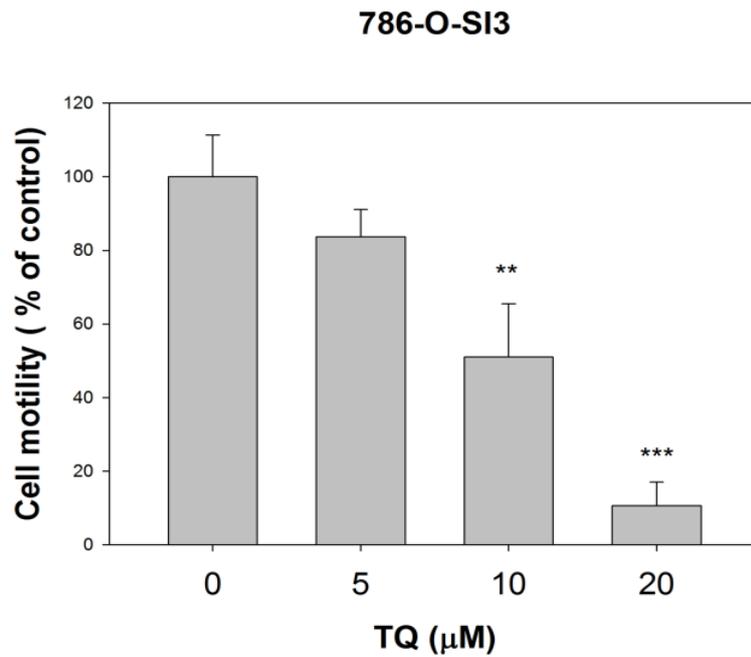
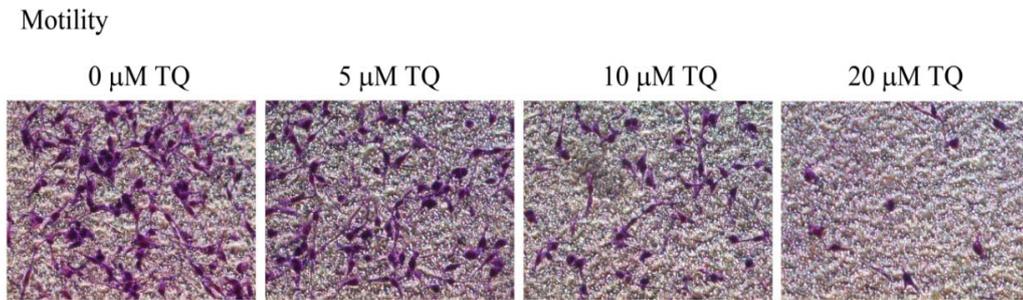
Invasion



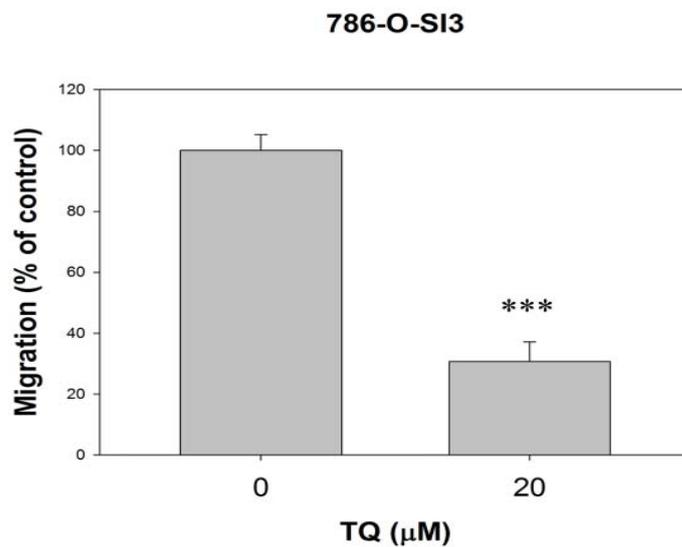
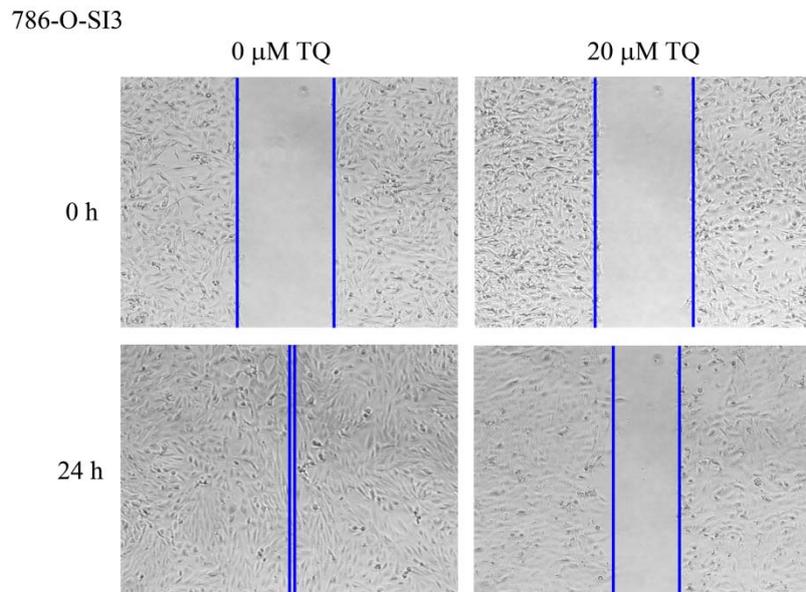
786-O-SI3



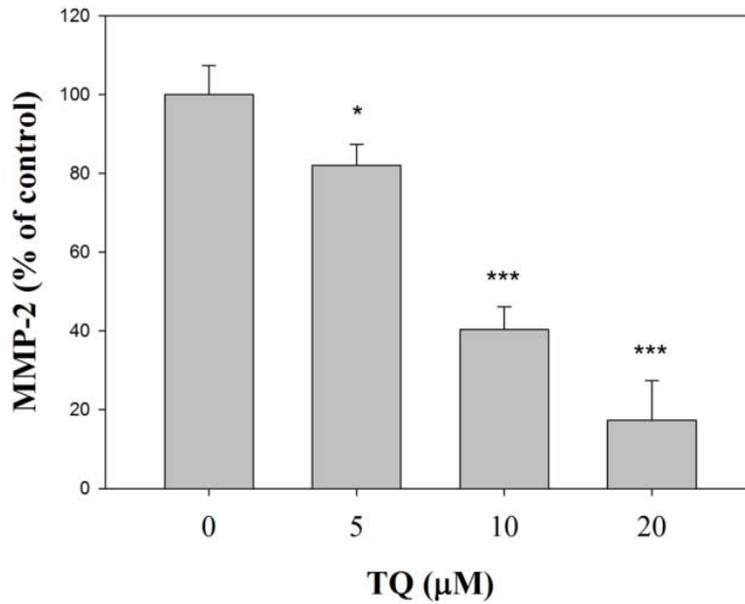
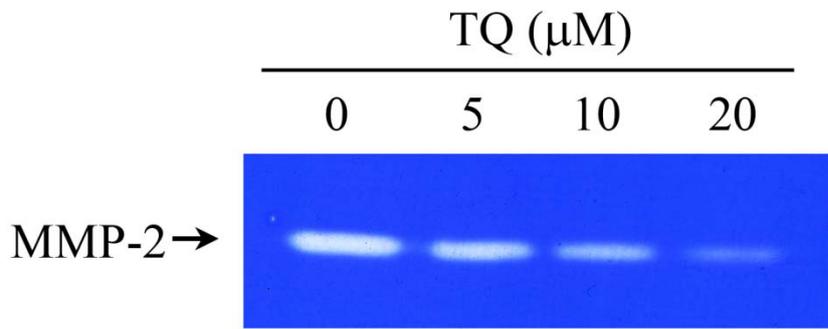
**Figure 2.** 利用細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay) ，證實低濃度百里醜 (TQ) ( 濃度為 10 μM 及 20 μM ) 24 小時處理之下 786-O-SI3 腎臟癌細胞侵襲 (invasion)能力有明顯被抑制的現象，下圖為其量化圖。 (\*\*\*) $p < 0.001$



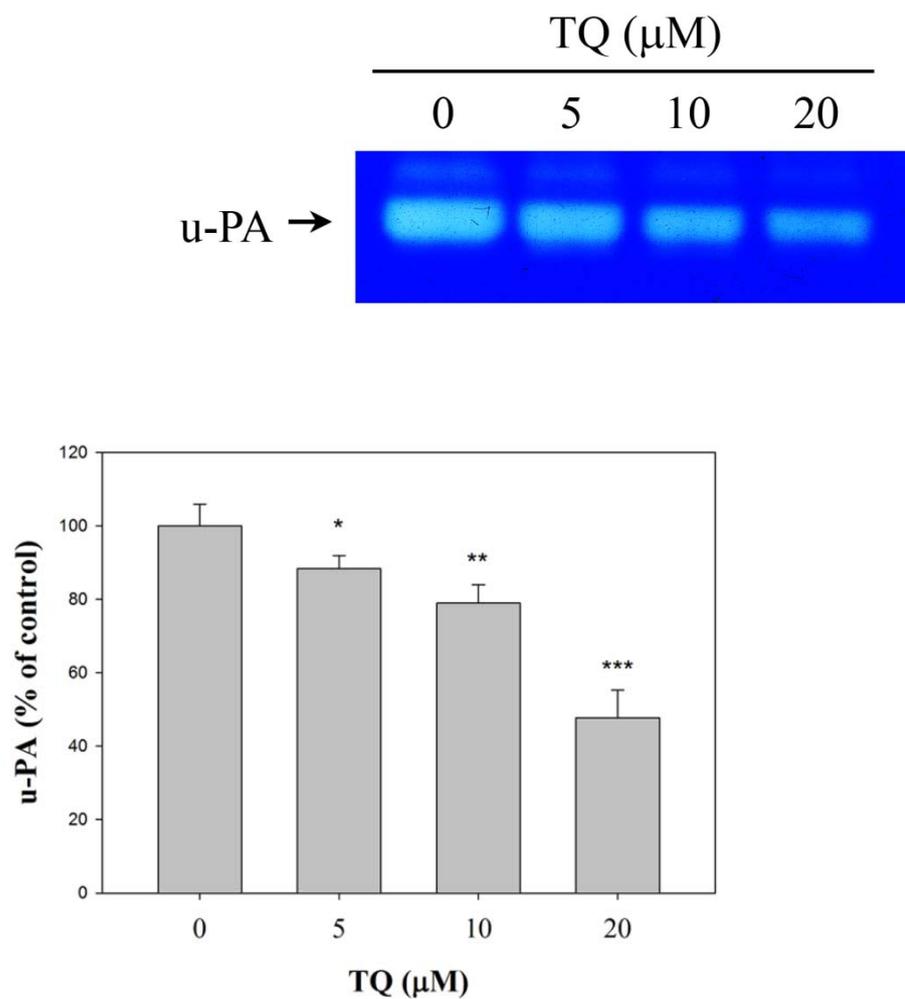
**Figure 3.**利用細胞移動實驗(Boyden chamber motility assay) , 證實低濃度百里醜(TQ)( 濃度為 10  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  )在 24 小時處理之下, 786-O-SI3 腎臟癌細胞運動(motility)能力有明顯被抑制的現象, 下圖為其量化圖。 (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ )



**Figure 4.** 利用傷口癒合實驗(wound healing assay)，證實處理 24 小時百里醜(TQ)在 20  $\mu\text{M}$  濃度下對於 786-O-SI3 腎臟癌細胞移動(migration)能力有明顯被抑制的現象，下圖分別為 24 小時其量化圖。(\*\*\*  $p < 0.001$ )

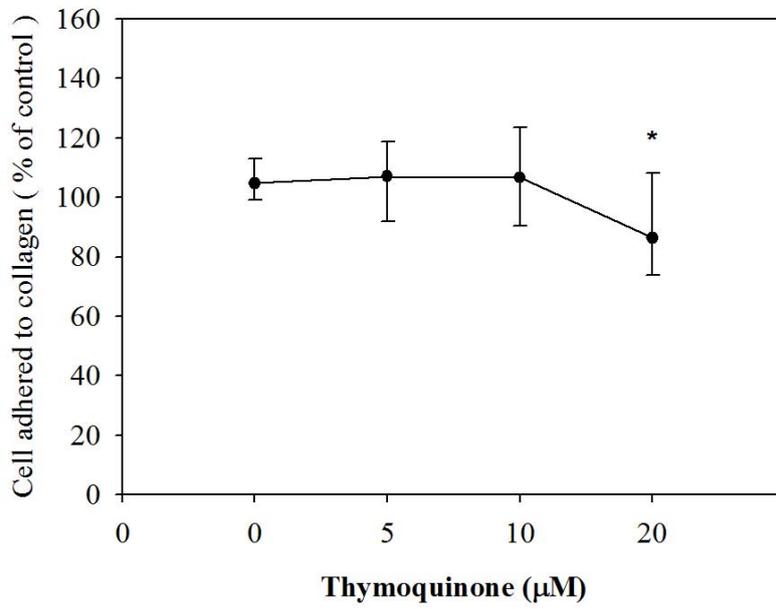


**Figure 5.** 以 gelatin zymography assay，證實百里醜(TQ) 24 小時處理之下 786-O-SI3 腎臟癌細胞其 MMP-2 活性有顯著被抑制的現象。



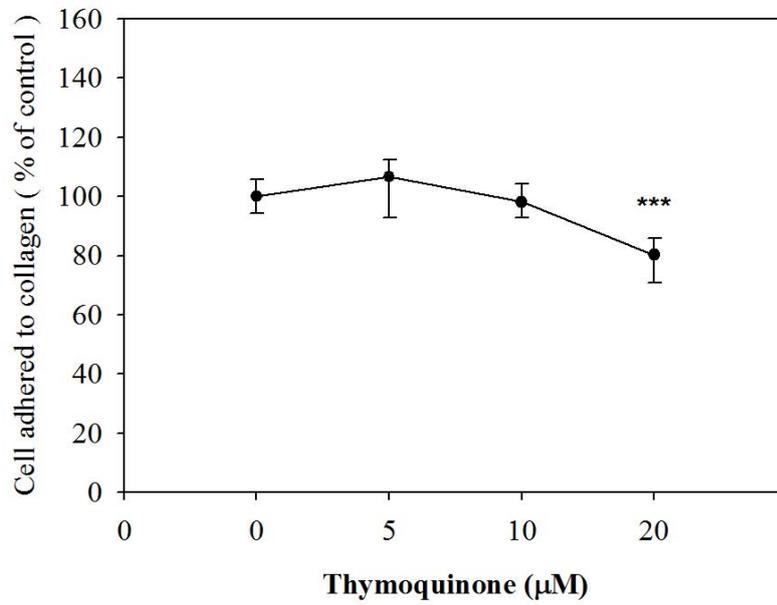
**Figure 6.** 以 casein zymography assay，證實百里醌(TQ) 24 小時處理之下 786-O-SI3 腎臟癌細胞其 u-PA 活性有顯著被抑制的現象。

### Type I collagen

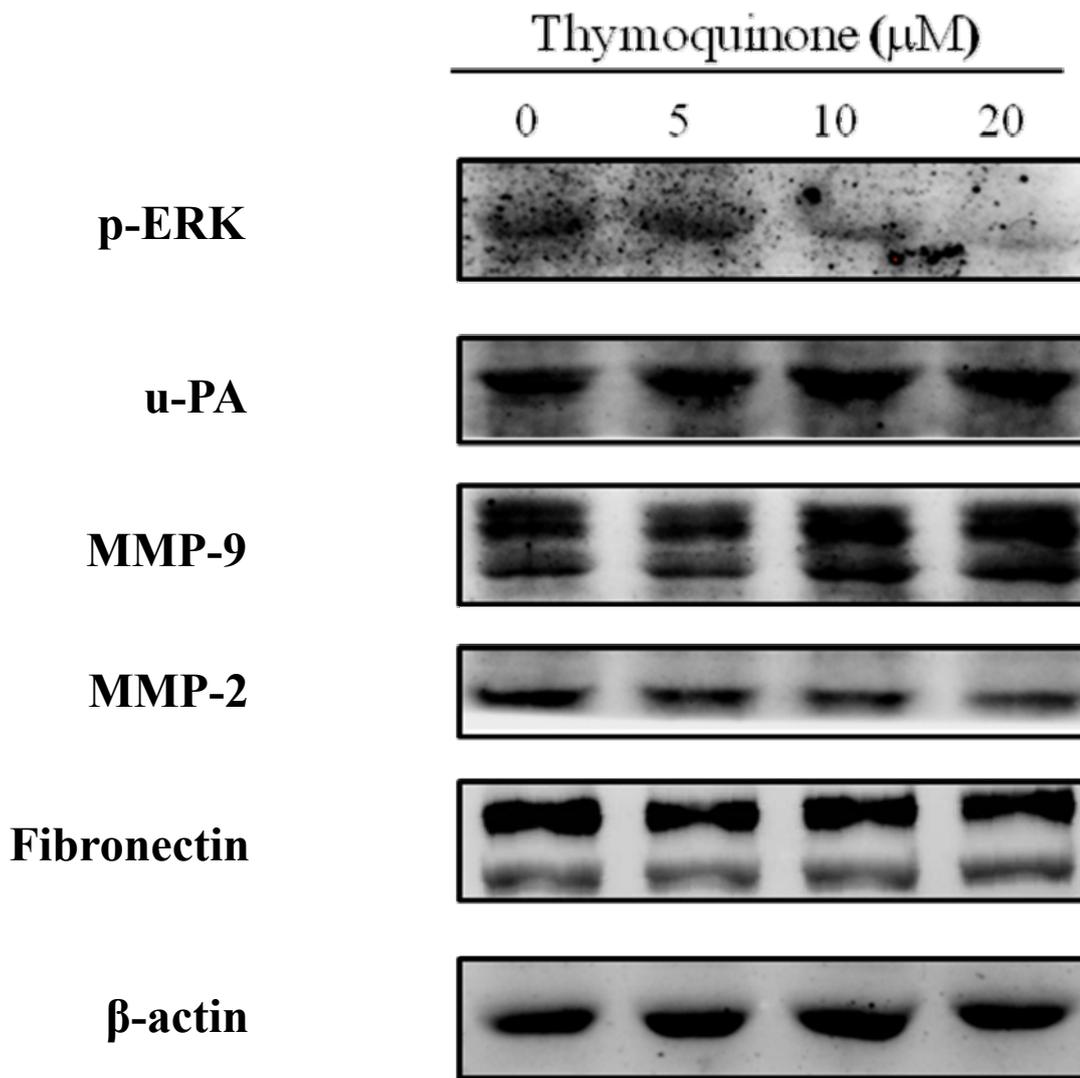


**Figure 7.**以 Cell adhered to collagen (type I)的能力，說明百里醌(TQ) 24 小時處理之下 786-O-SI3 腎臟癌細胞在 collagen (type I)其 adhered 的能力有被抑制的現象。

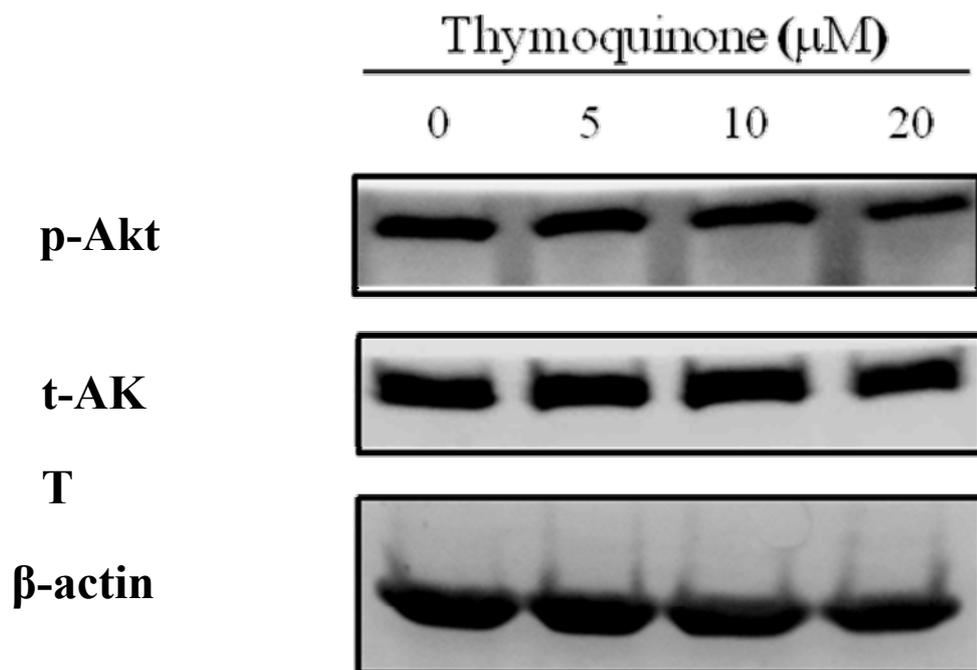
### Type IV collagen



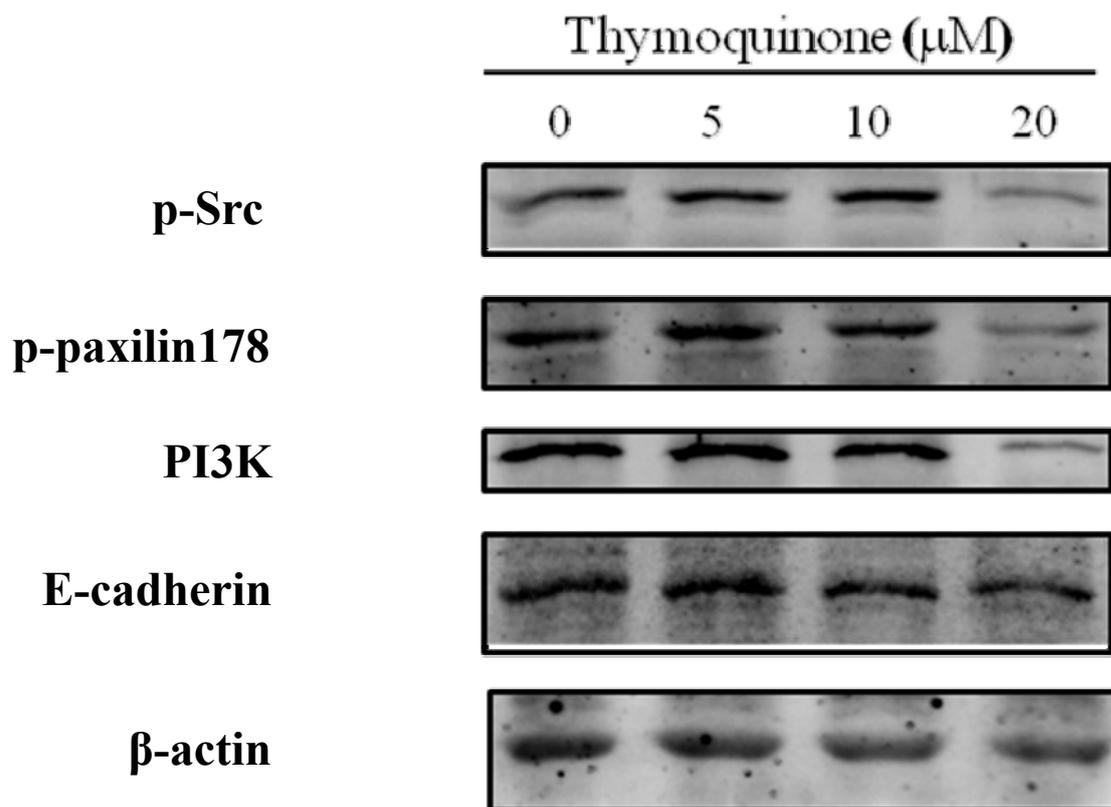
**Figure 8.** 以 Cell adhered to collagen (type IV) 的能力，說明百里醌(TQ) 24 小時處理之下，786-O-SI3 腎臟癌細胞在 collagen (type IV)其 adhered 的能力有被抑制的現象。



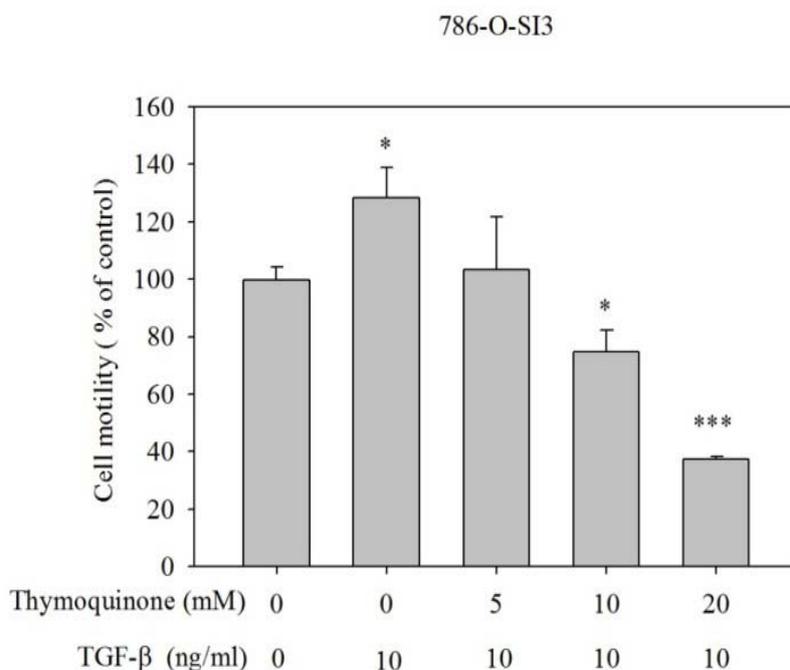
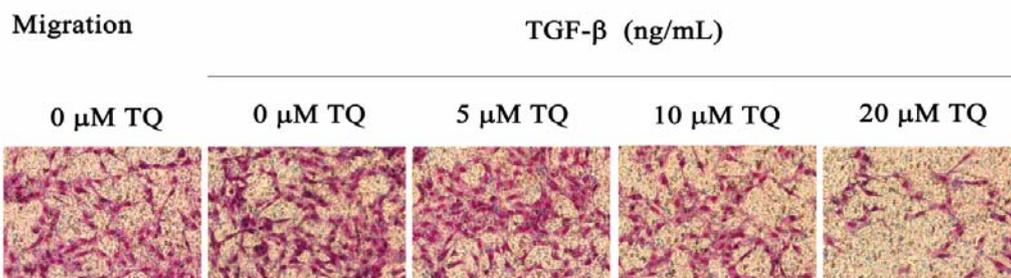
**Figure 9.** 利用西方墨點法(Western blot)證實百里醌(TQ) 24 小時處理之下，其濃度為 10  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  時，786-O-SI3 腎臟癌細胞其 p-ERK 有顯著被抑制的現象。



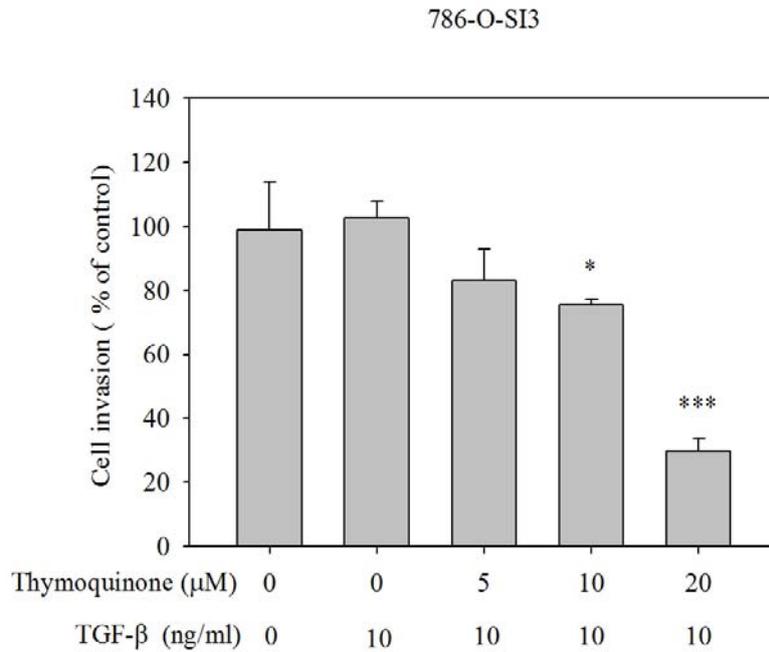
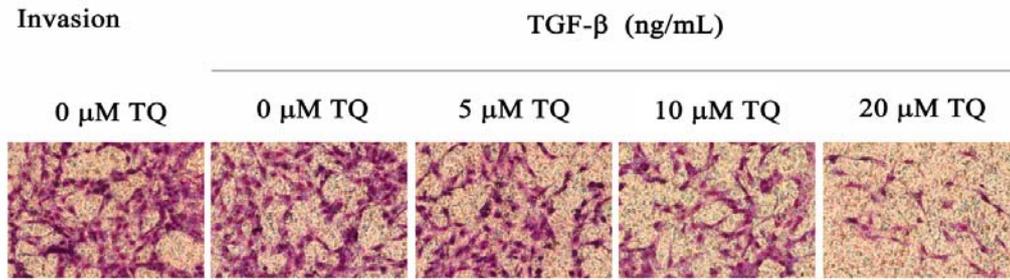
**Figure 10.** 利用西方墨點法(Western blot) 證實百里醌(TQ) 24 小時處理之下，786-O-SI3 腎臟癌細胞其 p-AKT、t-AKT 無顯著被抑制的現象。



**Figure 11.** 利用西方墨點法(Western blot)證實百里醌(TQ) 24 小時處理之下，百里醌(TQ)濃度為 20  $\mu\text{M}$  時，786-O-SI3 腎臟癌細胞其 p-Src、p-paxilin 178、PI3K 有顯著被抑制的現象。

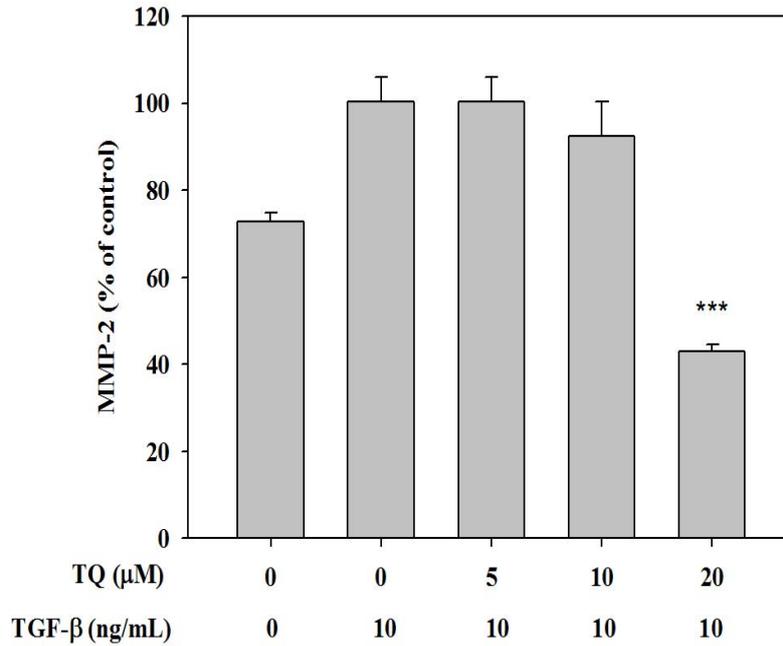
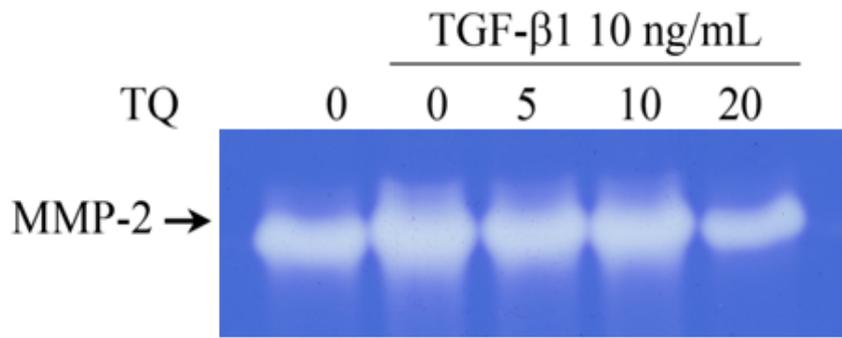


**Figure 12.** 利用細胞移動實驗(Boyden chamber motility assay) ，在加入 TGF- $\beta$  10 ng/mL 下，其低濃度百里醌(TQ) (10  $\mu$ M 及 20  $\mu$ M) 24 小時處理之下， 786-O-SI3 腎臟癌細胞移動(motility)能力有明顯被抑制的現象，下圖為其量化圖。( \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

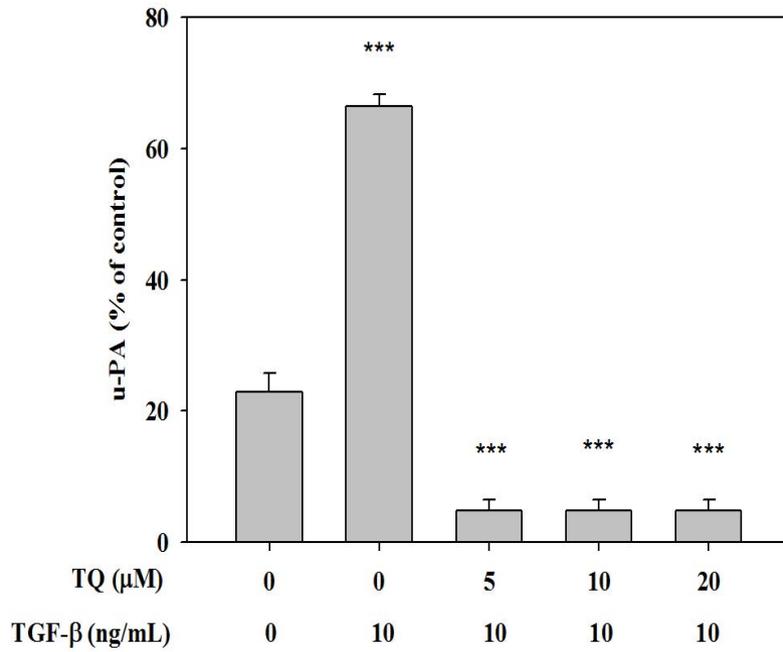
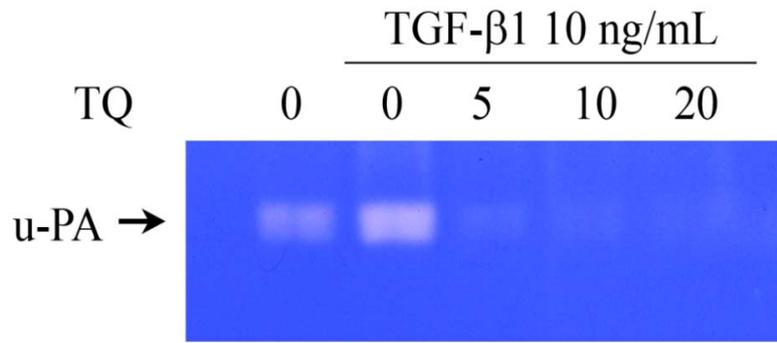


**Figure 13.** 利用細胞侵襲實驗(Boyden chamber invasion assay) ，在加入 TGF- $\beta$  10 ng/mL 下，其低濃度百里醌(TQ) (10  $\mu$ M 及 20  $\mu$ M) 24 小時處理之下 786-O-SI3 腎臟癌細胞侵襲(invasion)能力有明顯被抑制的現象，下圖為其量化圖。

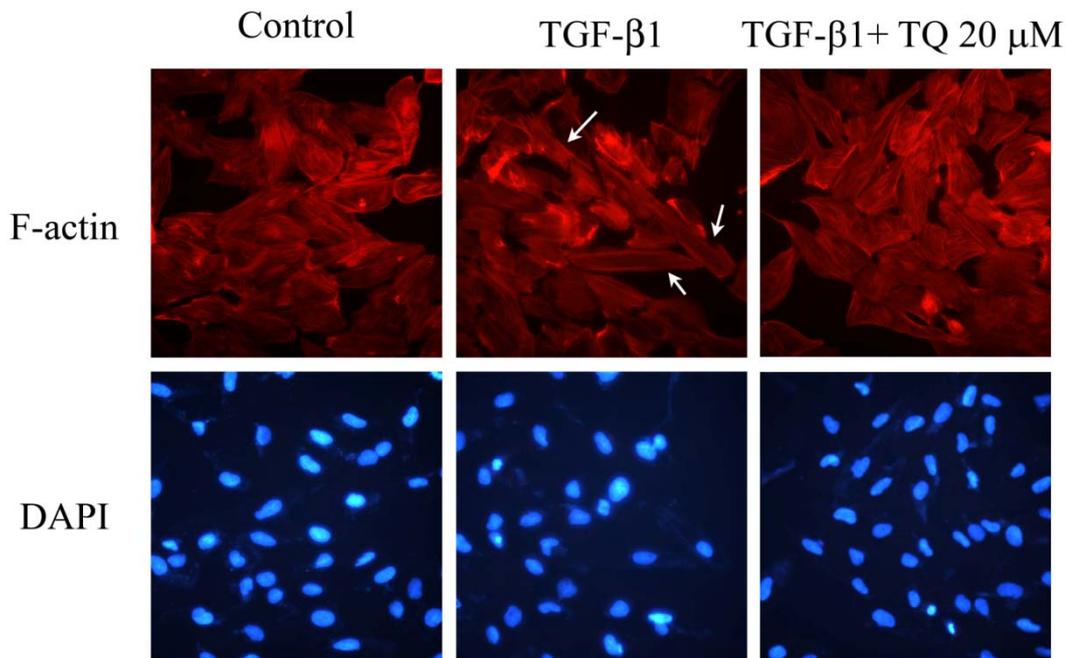
(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ )



**Figure 14.** 以 gelatin zymography assay，證實再加入 TGF-β 10 ng/mL 誘導後，再經過百里醌(TQ) 24 小時處理之下，786-O-SI3 腎臟癌細胞 MMP-2 活性有顯著被抑制的現象。



**Figure 15.** 以 casein zymography assay，證實再加入 TGF-β 10 ng/mL 誘導後，再經過 百里醌(TQ) 24 小時處理之下，u-PA 活性有顯著被抑制的現象。



**Figure 16.** 以免疫螢光染色實驗，證實再加入 TGF- $\beta$  10 ng/mL 誘導後，再經過百里醌(TQ) 24 小時處理之下，786-O-SI3 腎臟癌細胞其 F-actin 受 TGF- $\beta$  誘導使其細胞間質化的作用有被抑制的現象。



# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/08/26

科技部補助計畫	計畫名稱: Thymoquinone抑制腎臟癌細胞之腫瘤癌化、細胞增生、血管新生、轉移與上皮-間質轉換機制、誘發細胞自體吞噬凋亡及調節標靶療效之細胞與動物研究
	計畫主持人: 張滋榮
	計畫編號: 104-2314-B-040-011- 學門領域: 腎臟
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：張滄榮			計畫編號：104-2314-B-040-011-				
計畫名稱：Thymoquinone抑制腎臟癌細胞之腫瘤癌化、細胞增生、血管新生、轉移與上皮-間質轉換機制、誘發細胞自體吞噬凋亡及調節標靶療效之細胞與動物研究							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	
			研討會論文		0		
專書			0	本			
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			

		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	2	人次	
		碩士生	1		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)		目前已達成計畫中預期之進度：完成分析thymoquinine對腎臟癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對子宮頸癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前thymoquinine抑制腎臟癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表，其他細胞珠的相關實驗如：血管新生作用，也正在進行及整理中。關於探討thymoquinine的抗癌細胞轉移及抑制EMT及血管新生的效果及機制。未來希望透過動物活體實驗我們將證實thymoquinine具有抑制癌細胞轉移的功效及應用性			

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析thymoquinine對腎臟癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對腎臟癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前 thymoquinine抑制腎臟癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理並以投稿至期刊雜誌社等待發表，其他細胞株的相關實驗如：血管新生作用，也正在進行及整理中。關於探討thymoquinine的抗癌細胞轉移及抑制EMT及血管新生的效果及機制。未來希望透過動物活體實驗我們將證實thymoquinine具有抑制癌細胞轉移的功效及應用性。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

說明：（以150字為限）

在抑制腎臟癌細胞轉移以及侵襲，百里醜具有潛在的治療效果。