

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

棉酚抑制肺癌及子宮頸癌細胞之上皮-間質轉化、侵襲轉移與血管新生作用表現機制之相關研究(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 103-2313-B-040-003-MY3  
執行期間：105年08月01日至106年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生化微物免疫研究所

計畫主持人：謝易修  
共同主持人：陳霽霓、許立松  
計畫參與人員：碩士級-專任助理：謝淑卿  
碩士級-專任助理：涂玉貞  
博士後研究-博士後研究：林敬尹

中華民國 106 年 09 月 21 日

中文摘要：臨床數據顯示，癌細胞的轉移往往是造成癌症病人病灶復發致死的最主要原因，故若能有效抑制癌細胞的轉移及侵襲作用，將可大幅降低癌症的死亡率。上皮間質的轉化(epithelial-mesenchymal transition; EMT) 與腫瘤血管新生(angiogenesis)作用是上皮細胞腫瘤癌化時造成侵襲(invasion)和轉移(metastasis)的關鍵。有許多文獻指出在具有高度惡性轉移能力的腫瘤細胞中，發現其皆具有EMT特性的現象。棉酚(gossypol)已知的生物活性包括：抗攝護腺癌轉移、誘導癌細胞死亡、抗氧化和抑制病毒等多重功用。但是，棉酚針對於人類子宮頸細胞癌與肺癌的作用機制、EMT現象與血管新生作用，至今仍然不清楚。在本研究中使用棉酚對兩株子宮頸癌細胞進行研究(SiHa細胞和HeLa細胞)，觀察棉酚是否具有抗轉移，抗血管生成，抗腫瘤以及回復EMT的作用。將SiHa與HeLa細胞分別處理TGF- $\beta$ 1及棉酚，使用Western blot檢測棉酚對子宮頸癌轉移和上皮與間質轉化(EMT)的影響。吸取培養過細胞的培養液，分別針對基質金屬蛋白酶(MMPs)與尿激酶型纖溶酶原激活物(u-PA)進行酵素活性的測試。進一步利用Western blot來研究棉酚透過何種分子機制包括MAPK、FAK/Src和PI3K/Akt訊號傳遞路徑影響的腫瘤轉移和EMT。透過細胞侵襲實驗，隨著棉酚濃度增加，可以降低由TGF- $\beta$ 1所誘導SiHa細胞和HeLa細胞的侵襲的能力。於子宮頸癌酵素活性分析也顯示出棉酚可以降低由TGF- $\beta$ 1所誘導的u-PA和MMP-2的活性。另外棉酚也可以抑制TGF- $\beta$ 1所誘導的EMT，結果證實，棉酚可以減少侵襲力和回復子宮頸癌細胞EMT、p-ERK1/2以及p-Smad3的表現同時還原TGF- $\beta$ 1所減少SiHa細胞的E-cadherin蛋白表現。利用免疫螢光染色分析，可觀察到棉酚可以回復TGF- $\beta$ 1處理下子宮頸癌細胞型態的改變。此外針對肺癌細胞株(A549及H1299)，以MTT assay, 隨著劑量和時間的增加，證實棉酚不影響抑制人類肺癌細胞的細胞存活率。透過細胞侵襲實驗，隨著棉酚濃度增加，可以降低A549細胞和H1299細胞的侵襲的能力。酵素活性分析也顯示出棉酚可以降低A549細胞和H1299細胞的u-PA和MMP-2及TGF- $\beta$ 1所誘導MMP-2的活性。免疫螢光染色分析，可觀察到棉酚可以回復TGF- $\beta$ 1所誘導肺癌細胞型態的改變。Western Blot assay證實棉酚可抑制p-Src、p-FAK及p-ERK1/2。此外並成功建立pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] A549細胞。最後，透過尾靜脈注射免疫缺陷小鼠的活體實驗來驗證棉酚可以抑制宮頸子宮頸癌及肺癌細胞轉移到肺部的能力以及抑制腫瘤增生。從以上的實驗結果得知，棉酚可

中文關鍵詞：棉酚；肺癌細胞；子宮頸癌；癌症轉移；侵襲；上皮間質轉化

英文摘要：Metastasis, the major cause of cancer death and various treatment strategies have targeted on preventing the occurrence of metastasis, is a multi-step process involving change of cytoskeleton, cell adhesion and proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM), essential to achieving cell motility. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells is considered pre-requisite for acquiring invasive/migratory phenotype, and subsequent metastasis. It has been showed gossypol that may have potentially beneficial effects, including anti-

metastasis of prostate cancer, induction of cancer cell death, anti-oxidant and anti-bacterial effects. However, the effects molecular mechanism of gossypol in human lung cancer or cervical carcinoma are presently unknown. The metastasis of cervical cancer is the most prevalent cause of patient death, and various treatment strategies have targeted the prevention of the occurrence of metastasis. In this study, anti-metastasis, anti-tumor effects and reversion of EMT were investigated using gossypol on cervical cancer cell lines (SiHa and HeLa) and lung cancer cell lines (A549 and H1299). Gossypol reverses the TGF- $\beta$ 1 induced conformation change (mesenchymal type) using immunofluorescence assay in SiHa cells. Gossypol reversed transforming growth factor- $\beta$ 1-induced EMT and caused upregulation of epithelial markers such as E-cadherin and inhibited mesenchymal markers such as N-cadherin, Rho A, Rho B, PI3K, Foxo1 A and p-Smad 3. A549 and H1299 cells were treated with gossypol to determine the effect on cell proliferation by MTT assay. To examine the inhibitory effect on the cell invasion and migration, Boyden chamber invasion assay and wound healing assay were performed. We examined the effect of gossypol on factors of cancer metastasis and epithelial to mesenchymal transition (EMT) by Western Blot. Condition media of cells were subjected to gelatin zymography and casein zymography to investigate the expression of matrix metallo

英文關鍵詞：gossypol, lung cancer, cervical cancer, metastasis, invasion, EMT

行政院國家科學委員會補助專題  
研究計畫

期中進度報  
告  
期末報告

棉酚抑制肺癌及子宮頸癌細胞之上皮-間質轉化、侵襲轉移與血管新  
生作用表現機制之相關研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC NSC103-2313-B-040-003-MY3

執行期間：103年 8月 1日至 106年 7月 31日

執行機構及系所：中山醫學大學生化所

計畫主持人：謝易修中山醫學大學 生化所

共同主持人：陳霈霓中山醫學大學 生化科

許立松 中山醫學大學 生化所

計畫參與人員：林敬尹 謝淑卿 黃晨鉸 陳信宇 涂玉禎

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查

詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否

是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，  
(請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送) 公開查  
詢

中 華 民 國 106年 8月 2日

## 中英文摘要

### (一) 計畫中文摘要

臨床數據顯示，癌細胞的轉移往往是造成癌症病人病灶復發致死的最主要原因，故若能有效抑制癌細胞的轉移及侵襲作用，將可大幅降低癌症的死亡率。上皮間質的轉化 (epithelial-mesenchymal transition ; EMT) 與腫瘤血管新生 (angiogenesis) 作用是上皮細胞腫瘤癌化時造成侵襲 (invasion) 和轉移 (metastasis) 的關鍵。有許多文獻指出在具有高度惡性轉移能力的腫瘤細胞中，發現其皆具有 EMT 特性的現象。棉酚 (gossypol) 已知的生物活性包括：抗攝護腺癌轉移、誘導癌細胞死亡、抗氧化和抑制病毒等多重功用。但是，棉酚針對於人類子宮頸細胞癌與肺癌的作用機制、EMT 現象與血管新生作用，至今仍然不清楚。在本研究中使用棉酚對兩株子宮頸癌細胞進行研究 (SiHa 細胞和 HeLa 細胞)，觀察棉酚是否具有抗轉移，抗血管生成，抗腫瘤以及回復 EMT 的作用。將 SiHa 與 HeLa 細胞分別處理 TGF- $\beta$ 1 及棉酚，使用 Western blot 檢測棉酚對子宮頸癌轉移和上皮與間質轉化 (EMT) 的影響。吸取培養過細胞的培養液，分別針對基質金屬蛋白酶 (MMPs) 與尿激酶型纖溶酶原激活物 (u-PA) 進行酵素活性的測試。進一步利用 Western blot 來研究棉酚透過何種分子機制包括 MAPK、FAK/Src 和 PI3K/Akt 訊號傳遞路徑影響的腫瘤轉移和 EMT。透過細胞侵襲實驗，隨著棉酚濃度增加，可以降低由 TGF- $\beta$ 1 所誘導 SiHa 細胞和 HeLa 細胞的侵襲的能力。於子宮頸癌酵素活性分析也顯示出棉酚可以降低由 TGF- $\beta$ 1 所誘導的 u-PA 和 MMP-2 的活性。另外棉酚也可以抑制 TGF- $\beta$ 1 所誘導的 EMT，結果證實，棉酚可以減少侵襲力和回復子宮頸癌細胞 EMT、p-ERK1/2 以及 p-Smad3 的表現同時還原 TGF- $\beta$ 1 所減少 SiHa 細胞的 E-cadherin 蛋白表現。利用免疫螢光染色分析，可觀察到棉酚可以回復 TGF- $\beta$ 1 處理下子宮頸癌細胞型態的改變。此外針對肺癌細胞株 (A549 及 H1299)，以 MTT assay, 隨著劑量和時間的增加，證實棉酚不影響抑制人類肺癌細胞的細胞存活率。透過細胞侵襲實驗，隨著棉酚濃度增加，可以降低 A549 細胞和 H1299 細胞的侵襲的能力。酵素活性分析也顯示出棉酚可以降低 A549 細胞和 H1299 細胞的 u-PA 和 MMP-2 及 TGF- $\beta$ 1 所誘導 MMP-2 的活性。免疫螢光染色分析，可觀察到棉酚可以回復 TGF- $\beta$ 1 所誘導肺癌細胞型態的改變。Western Blot assay 證實棉酚可抑制 p-Src、p-FAK 及 p-ERK1/2。此外並成功建立 pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] A549 細胞。最後，透過尾靜脈注射免疫缺陷小鼠的活體實驗來驗證棉酚可以抑制宮頸子宮頸癌及肺癌細胞轉移到肺部的能力以及抑制腫瘤增生。從以上的實驗結果得知，棉酚可以減少子宮頸癌細胞侵襲同時也可以回復人子宮頸癌細胞的被 TGF- $\beta$ 1 所誘導的 EMT。

關鍵詞：棉酚；肺癌細胞；子宮頸癌；癌症轉移；侵襲；上皮間質轉化

## **Abstract**

Metastasis, the major cause of cancer death and various treatment strategies have targeted on preventing the occurrence of metastasis, is a multi-step process involving change of cytoskeleton, cell adhesion and proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM), essential to achieving cell motility. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells is considered pre-requisite for acquiring invasive/migratory phenotype, and subsequent metastasis. It has been showed gossypol that may have potentially beneficial effects, including anti-metastasis of prostate cancer, induction of cancer cell death, anti-oxidant and anti-bacterial effects. However, the effects molecular mechanism of gossypol in human lung cancer or cervical carcinoma are presently unknown. The metastasis of cervical cancer is the most prevalent cause of patient death, and various treatment strategies have targeted the prevention of the occurrence of metastasis. In this study, anti-metastasis, anti-tumor effects and reversion of EMT were investigated using gossypol on cervical cancer cell lines (SiHa and HeLa) and lung cancer cell lines (A549 and H1299). Gossypol reverses the TGF- $\beta$ 1 induced conformation change (mesenchymal type) using immunofluorescence assay in SiHa cells. Gossypol reversed transforming growth factor- $\beta$ 1-induced EMT and caused upregulation of epithelial markers such as E-cadherin and inhibited mesenchymal markers such as N-cadherin, Rho A, Rho B, PI3K, Foxo1 A and p-Smad 3. A549 and H1299 cells were treated with gossypol to determine the effect on cell proliferation by MTT assay. To examine the inhibitory effect on the cell invasion and migration, Boyden chamber invasion assay and wound healing assay were performed. We examined the effect of gossypol on factors of cancer metastasis and epithelial to mesenchymal transition (EMT) by Western Blot. Condition media of cells were subjected to gelatin zymography and casein zymography to investigate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA). The molecular mechanisms of gossypol mediated cancer metastasis and EMT were further investigated by Western blotting analysis including MAPK and FAK/Src signaling pathways. Gossypol inhibits the viability of human lung carcinoma cells in a dose- and time-dependent manner. By cell invasion assay, gossypol reduces the invasion of A549 and H1299 cells in a concentration-dependent manner. Zymography assay has shown gossypol reduces the activities of u-PA and MMP-2. Gossypol inhibits cell migration of A549 and H1299 cells. Gossypol reverses the TGF- $\beta$ 1 induced conformation change (mesenchymal type) using immunofluorescence assay

in A549 cells. Finally, gossypol was evidenced by its inhibition on the tumor growth and metastasis of SiHa and A549 cells via cancer cell xenografted nude mice and tail vein injection scid mice mode, respectively. Taken together, these results suggested that gossypol could reduce the invasion and reverse EMT in human cervical cancer cells.

**Keywords:** gossypol, lung cancer, cervical cancer, metastasis, invasion, EMT

## 報告內容

### 【1】背景

行政院衛生署 2012 年 5 月 25 日公布民國 101 年國人十大死因，「惡性腫瘤」連續 31 年蟬聯十大死因之首，平均每 12 分 2 秒就有一人死於癌症。其中癌細胞的轉移往往是造成癌症病人病灶復發致死的主因，惡性腫瘤可藉由血液或淋巴系統轉移到身體其他的臟器，因此縱使腫瘤經由手術切除或化學治療後，依舊難以根治，因此許多學者致力於研究癌症新的治療方法，但在臨床治療上截至目前為止仍有許多問題無法克服，例如：癌細胞轉移與抗藥性等問題，一段時間的投予之後經常同樣會出現所謂抗藥性的問題，以致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。根據世界衛生組織的統計結果，近二十年來全世界的癌症死亡率正快速上升，其中以肺癌的死亡率增加最快且為癌症致死的第一名，每年約有九十幾萬人死於肺癌，且肺癌平均五年存活率低於 13.7%。此外，子宮頸癌是全球婦女第二常見的癌症(僅次於乳癌)。根據我國衛生署統計資料顯示，就死亡率而言，2012 年的統計資料顯示，在台灣每 10 萬婦女人口有近 669 人死於子宮頸癌。上皮-間質轉化(Epithelial-mesenchymal transition ; 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。癌症的發生為一多步驟性的致癌過程，因此能夠在任一時期阻斷癌細胞的進程者，皆為我們尋找天然抗癌藥物的重要目標。因此目前許多研究趨向以天然物成份如多酚類或黃酮類等天然物合併抗癌藥物的使用，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。因此能針對子宮頸癌及肺癌細胞若能抑制其侵襲轉移(metastasis)、上皮細胞的上皮-間質轉化(EMT)、細胞增生(proliferation)、血管新生(angiogenesis)或是進一步促進細胞死亡(apoptosis)或細胞自噬(autophagy)作用，或許可以合併化學抗癌藥物應用在子宮頸癌與肺癌的輔助治療。

### 【2】子宮頸癌

癌症的發生與暴露於環境中化學性、物理性及病毒性致癌因子的量有直接的關係。這些致癌因子會經由基因突變而導致正常細胞癌化。2011 年約有 3292 子宮頸癌新病例。八十四年提供子宮頸抹片篩檢後，死亡率約下降六成。子宮頸癌大部份都是經由人類乳突病毒(HIV)所引起，當病毒侵入子宮頸表皮後，會使子宮頸表皮細胞形成癌前病變。如果癌前病變沒有接受子宮頸圓錐狀切除手術的治療，經過 5~10 年則會進展成子宮頸癌。子宮頸癌轉移多由淋巴或血液轉移，擴散到直腸、骨盆腔、膀胱、腎臟；遠端轉移則包括肝臟、骨骼、肺臟或腦等。子宮頸上皮內贅瘤(cervical intraepithelial neoplasia ; CIN)是



一種癌前病變，此種病變可能進展成侵入性的癌。當子宮頸上皮層分裂和不成熟細胞佔未超過子宮頸上皮組織下三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤第一期(CIN 1)；若佔未超過上皮組織中三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤第二期(CIN 2)，已至上三分之一時，則稱為子宮頸上皮內贅瘤第三期(CIN 3) [1]。在Bethesda 分類系統裏，低度子宮頸鱗狀上皮內病變(LSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤第一期(CIN 1) (mild dysplasia)，而高度子宮頸鱗狀上皮內病變(HSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤第二期(CIN 2) (moderate dysplasia) 和子宮頸上皮內贅瘤第三期(CIN 3) [包括重度化生不良(severe dysplasia)和鱗狀上皮細胞原位癌]。大部份子宮頸上皮內贅瘤CIN 1 都會消退，然而有些子宮頸上皮內贅瘤CIN 2 和CIN 3 則會持續或進展下去。而也有證據顯示罹患CIN2 及CIN3 的時間越長，子宮頸上皮內贅瘤的惡化程度及轉變成子宮頸癌的比例就愈高[1]。本實驗選取三株具高危險型HPV：CaSki (human cervical epidermoid carcinoma；HPV16)，SiHa (human cervical epithelial of squamous cell carcinoma；HPV16)，HeLa (human cervical adenocarcinoma；HPV18)，並處理gossypol觀察是否可以有效的抑制人類子宮頸癌侵入能力、增生、移動性、EMT及血管新生作用或是進一步誘導其走向死亡，並進一步探討其分子機轉。本實驗選取三株具高危險型HPV感染之子宮頸癌細胞株：CaSki (human cervical epidermoid carcinoma；HPV16)，SiHa (human cervical epithelial of squamous cell carcinoma；HPV16)，HeLa (human cervical adenocarcinoma；HPV18)，再處理gossypol與是否可以有效的抑制人類子宮頸癌侵入能力、移動性、EMT、細胞凋亡、細胞自噬及血管新生作用，並進一步探討其分子機轉。

## 肺癌

據世界衛生組織的統計發現，近二十年來全世界的癌症死亡率正快速上升，其中以肺癌的死亡率增加最快，每年約有九十幾萬人死於肺癌，而且肺癌平均五年存活率低於13.7%。2012 年的統計資料顯示，在台灣每10 萬人口有近8587人死於肺癌，佔癌症總死亡百分比19.7%。根雖然現今科技日新月異，治療技術不斷進步，但對於肺癌的治癒能力仍然相當的低，在癌症病患當中，癌症的轉移仍是肺癌致死的主因。肺癌通常分成兩大類型：小細胞肺癌與非小細胞肺癌。小細胞肺癌多發生於男性且與抽菸息息相關，佔全部肺癌的12%到25%，小細胞肺癌生長得很快，且很容易擴散到其它器官；非小細胞肺癌比小細胞肺癌常見，佔全部肺癌的75%到88%，另外根據腫瘤細胞的型態可分成三種：腺癌、鱗狀細胞癌及大細胞癌。肺癌之轉移，常見依序為腦、腎上腺、肝、骨骼及腎，對於肺癌發生的真正原因，目前尚未完全明瞭，但對於導致肺癌之危險因素:如抽煙、空氣污染及遺傳因子已有相當的了解。找出肺癌發生的真正原因是研究癌發生學者努力的方向，其中可能致肺癌之危險因素包括遺傳因子及外來因素等已有

部分瞭解，但是促使肺癌之生成及轉移的各種因素及機制的探討仍是極欲了解的領域[2, 3]。

### **【3】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[4]。

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

細胞 EMT 是指從上皮細胞型態(epithelial cell)轉變成間葉細胞(mesenchymal cell)型態的一種特殊過程，其主要的特徵包括 Epithelial-cadherin (E-cadherin)表現量下降，Neuronal-cadherin (N-cadherin)表達的上升，細胞骨架由角蛋白為主轉化為波形蛋白為主，以及形態上由上皮細胞轉化為具有間充質特徵的細胞等。EMT 的發生可藉由一些分子訊號的傳遞(例如：TGF- $\beta$ 、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[5]。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  $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -catenin、E-cadherin 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[6,7]。

### **【5】血管新生作用 (angiogenesis)**

血管新生原本是正常生理變化中(如:生長、傷口癒合)所必需有的過程，但腫瘤剛形成的時後，癌細胞亦是利用此一途徑取得營養。血管新生的特徵包括基底膜的降解、蛋白酶活性增加、血管內皮細胞的移行、增生和管狀形成(tube formation)。血管新生對於腫瘤的生長、浸潤及轉移是必須的[8]。有研究指出一

一旦腫瘤超過1-2 mm<sup>3</sup>時，必須藉由血管新生來獲取營養，並且排除代謝的廢物，使腫瘤繼續成長，而一旦腫瘤內新生血管形成後則進入血管期(vascular phase)，腫瘤可快速生長到1-2 cm<sup>3</sup> [9]，隨後癌細胞會透過血液或淋巴轉移到第二器官或組織，這過程稱為轉移 (metastasis)。當腫瘤的大小至一定體積時，細胞內的含氧度會大大的減少，導致缺氧的情形產生，此時HIF-1，會增加表現促使腫瘤發生血管生成[10]，HIF-1 $\alpha$  會在細胞質之中累積以及轉移 (translocation) 到細胞核中，進而 HIF-1 $\alpha$  會和 HIF-1 $\beta$  以及 p300/CBP (CREB-binding protein) 等 co-activators 結合在一起，之後作用在hypoxia-response elements (HRE)上，促使下游基因表現，例如:血管生成因子(VEGF)，增加無氧酵素的代謝，血管擴張，促進紅血球生成素與細胞凋亡有關的基因的誘導。

### 【6】棉酚 (Gossypol)

棉酚，gossypol，分子式 (C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>)，莫耳質量為518.563g/mol沸點為707°C，為黃色的晶體。在二十世紀六零年代被發現是一種存在於棉花的棉籽及棉根皮中的多酚類物質。研究指出棉酚可經由滲透到細胞內，作為一些脫氫酶的抑制劑，並且具有抗氧化、抑制病毒、抗寄生蟲、抗微生物和降低血漿膽固醇等活性。棉酚可從棉籽油中提取或通過化學方法合成得到，進一步研究才發現，棉酚可以透過減少細胞分裂來降低男性精子的活性，可以作為男性口服的避孕藥，然而癌症的發生通常是由於細胞分裂異常所導致的，因此化學家將棉花的莖或種子萃取得到此化合物，研究其抗癌的效果。Gossypol對於抗癌有多方面的發現，有學者發現Gossypol可透過調控Bcl2這個family誘導癌細胞凋亡。Gossypol可抑制HIV病毒的複製[11]以及作為有效抑制蛋白質激酶c (PKC)的一個抑制劑[12,13]。在2010年中有研究提到，Gossypol可以透過誘導細胞產生DNA damage以及活化p53這個腫瘤抑制基因並誘導前列腺癌細胞走向凋亡[14]。Gossypol可透過降低與Bcl-2和Bcl-xL的蛋白表現，降低前列腺癌細胞轉移的侵襲力[15]。另外Gossypol會降低細胞內GSH, aspartic acid, and FAD的表現，透過氧化壓力進一步促使卵巢癌細胞(SKOV3)的走向凋亡[16]。透過ROS-ERK-CHOP Pathway來誘導Death Receptor-5(DR5)，可使大腸癌細胞走向凋亡。有學者進一步使用到臨床上的測試，像是口服棉酚被用來治療腎上腺癌的轉移，讓21名患者口服棉酚劑量為30-70毫克/天[17]，證實口服棉酚可以用來比較安全地用於治療轉移性腎上腺腫瘤。綜合上述，顯示棉酚確實可以利用多種方式來抑制癌細胞的增生及轉移並促進細胞凋亡。但是針對棉酚是透過哪些機轉進一步抑制癌細胞轉移並沒有十分了解，此外，棉酚是否會影響子宮頸癌及肺癌細胞的侵襲轉移到目前為止並無文獻報導，對於棉酚是否影響細胞上皮間質轉換(EMT)及細胞自噬(autophagy)的現象，也並不清楚。

## 2 Materials and Methods

### 實驗材料與方法

**1. 內皮細胞成管作用 (Capillary-like tube formation assay)** 將 0.4 ml/well 的 Matrigel (10 mg/ml) 鋪敷於 96 well 的培養皿上於 37°C 凝固 1 小時，每個 well 加入 20,000 個 HUVECs cell (由食品工業研究所購得)，分別加入不同濃度的 Gossypol，在 37°C 培養 6 小時，細胞經甲醇固定，於顯微鏡下觀察管狀結構的形成。

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

**3. EMSA (gel shift assay kit) 分析** 取其 10 微克的核蛋白與 100 pmole 已標定 Biotin 之 DNA 片段。製備 6% native gel，用 80 volt 約跑 120 分鐘，將膠卸下之後進行將 DNA 轉漬，於 4°C 下，以 350 mA 進行轉漬 2 小時之後，nylon membrane 以 UV cross linker，使用 PIERCE detection kit 顯像，以 X 光底片感光後即可。

**4. Luciferase 活性測定** 構築 luciferase/reporter gene plasmid (pGL3)，以 Jet pet 送入癌細胞中，細胞萃取液 20 $\mu$ l 經由 TD-20/20 Luminometer 冷光儀器進行分析，以  $\beta$ -galactosidase 當 internal control。

**5. Transient transfection** 短暫性的轉殖(transient transfection)細胞的轉殖作用是利用 Jet pet，將載體送入細胞內。

**6. Cell migration 分析** 利用 Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的 DMEM，將細以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (於 upper chamber，待細胞移動 8 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞，風乾之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，在 400 $\times$ 顯微鏡底下作移動細胞數之統計。

**7. Cell invasion 分析** 將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 100 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Marix gel (0.5 mg/ml)，在 laminar flow 風乾 3~5 小時，其後方法同前一項 cell migration 分析，而培養細胞移動時間則延長為 20 小時。

**8. 細胞傷口癒合試驗 (Wound healing assay)** 待細胞長到幾乎全滿時用吸管尖在每一個孔中劃線，其距離約為 80  $\mu$ m，用 PBS 洗細胞，最後在加入 0.5% FBS

之培養液培養，每 24 hr 觀察 48 hr 及 96 hr 以乙醇固定 Giemsa 染色並照相，以觀察細胞移動情形。

**9. Gelatin-zymography (gelatinase 活性測試)** 首先製備 0.1 % gelatin-8 % SDS-PAGE 電泳膠片,取蛋白總量 20 $\mu$ g,進行電泳分離。加入 50 ml 的 washing buffer, 在室溫下洗 30 分鐘, 加入 50 mL 的 reaction buffer, 於 37 °C 溫箱下反應 12 個小時。以 staining buffer 染色 30 min, 之後再以退色液退染觀看結果

**10. Casein-zymography (u-PA 活性測試)** [首先製備 10 % SDS-PAGE 電泳膠片, 並且在其下層膠加入 2% 的 casein 及 12 % 的 plasminogen, 其他步驟同上。

## 結果

### 棉酚對人類子宮頸癌細胞存活率的影響

不同濃度的棉酚(0、2、4、10  $\mu$ M), 溶於DMSO中, 處理SiHa與HeLa細胞24、48 小時後, 利用MTT assay偵測細胞的存活率。其結果與處理50% DMSO的控制組作比較, 發現在SiHa與HeLa細胞, 給予棉酚10  $\mu$ M 48小時後下會些微影響細胞的存活率(Fig. 1)。

### 棉酚抑制人類子宮頸癌細胞爬行能力(wound healing assay)

將SiHa與HeLa細胞以固定的細胞數( $1.5 \times 10^4$ /well) loading至6 well之culture-insert kit裡放入 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培養箱, 等待細胞貼附製well上後, 將culture-insert kit 取下, 並以PBS buffer洗淨未完整貼附的細胞, 再加入1% 血清的細胞培養液, 以不同濃度的棉酚(0、2、4、10  $\mu$ M)處理SiHa與HeLa細胞, 在顯微鏡下 (目鏡 10 倍、物鏡 4倍) 觀察SiHa與HeLa細胞於固定位置的傷口癒合狀況, 並且分別在0、48小時拍照記錄, 結果發現48小時的時間點下, 加藥處理的組別比control組的細胞比較起來, 爬行能力確實明顯受到抑制(Fig. 2)。

### 棉酚抑制人類子宮頸癌細胞侵入及移動能力

進一步以 Boyden chamber assay 的方式, 確認棉酚對於人類子宮頸癌細胞移動及侵入能力的影響。將棉酚以不同濃度(0、2、4、10 $\mu$ M)處理 SiHa 與 HeLa 細胞 24 小時後, 將細胞以 trypsin-EDTA 打下來, 以 trypan blue 計算細胞數, 取出以固定量的細胞( $1.5 \times 10^4$ /well)直接 loading 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 20 小時。結果顯示, 其侵 SiHa 與 HeLa 細胞的入能力會隨著處理棉酚濃

度增加而降低，表示棉酚可以抑制 SiHa 與 HeLa 細胞的侵入能力。另外，也利用了 Boyden chamber motility assay 觀察棉酚對於 SiHa 與 HeLa 細胞移動能力的影響。看到 loading 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 16 與 19 小時後，子宮頸癌細胞 motility 能力確實有受到抑制。(Fig. 3、4)。

#### **棉酚抑制人類子宮頸癌細胞分泌MMP-2、u-PA**

將  $3.5 \times 10^4$ /mL 的 SiHa 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿，接著在 serum-starved 的情形下，處理不同濃度的棉酚(0、2、4、10 $\mu$ M) 24、48 小時，收集 24-well 裡的培養液，以 Gelatin zymography 來分析 MMP-2 的表現；Casein zymography 來分析 u-PA 的表現。結果發現，處理棉酚的細胞分泌的 MMP-2 與 u-PA 確實有降低的現象(Fig. 5、6)

#### **棉酚對SiHa人類子宮頸癌MMP-2、u-PA、ERK、FAK及Src蛋白磷酸化的影響**

將 SiHa 細胞處理不同濃度的棉酚(0、2、4、10 $\mu$ M) 48 小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-MMP-2、anti-u-PA、anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-RhoA、anti- $\beta$ -catenin、anti-Src、anti-FAK-Tyr397、anti-Cytokerin 18、anti-u-PA、anti-claudin-1、anti-slug、anti- $\beta$ -actin 及 anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 p-ERK1/2、p-Src、FAK-Tyr397、Cytokerin 18、claudin-1、MMP-2、RhoA、u-PA、 $\beta$ -catenin 與轉錄因子 slug 皆會隨著棉酚的濃度提高而減少 (Fig. 7、8、9、10)。

#### **利用正立螢光顯微鏡觀察棉酚與TGF- $\beta$ 1對人類子宮頸癌SiHa細胞之骨架蛋白的影響**

將人類子宮頸癌細胞 SiHa 種於 8well 之 chamber slide 中，每一個 well 的細胞數為  $1.5 \times 10^4$  /mL，放入 37 °C 培養箱反應 16 小時，吸掉培養液，加入棉酚給予濃度 10 $\mu$ M 並共同處理 TGF- $\beta$ 1 48 小時。經過 48 小時的培養，使用 4% paraformaldehyde 固定細胞，接著加入 500 $\mu$ L 的 0.5% Triton X-100 (in PBS) 在室溫下將細胞進行穿孔。加入 500 $\mu$ L 的 1% BSA in PBS，降低抗體非專一性的結合。加入 phalloidin 於 4°C 培養 overnight，以 PBS 清洗 4 次，一次 5 分鐘，最後

mounting buffer 固定並加上玻片(含 DAPI)，接著以正立螢光顯微鏡觀察進行拍攝，結果發現，在單純處理 TGF- $\beta$ 1 的組別 F-actin 大量堆積在細胞膜上且型態有明顯突觸狀的形成，在看到給予棉酚的組別雖然有某些細胞有 F-actin 的堆積但在型態上來說突觸狀有明顯減少。因此棉酚能夠有效的將間質外觀 reverse 成為上皮細胞的型態(Fig. 11)。

#### **棉酚抑制TGF- $\beta$ 1誘導的人類子宮頸癌細胞侵入及移動能力**

利用 Boyden chamber assay 的方式，確認棉酚對於 TGF- $\beta$ 1 誘導人類子宮頸癌細胞移動及侵入能力的影響。將棉酚以不同濃度(0、2、4、10 $\mu$ M)與 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) 處理 SiHa 與 HeLa 細胞 24 小時後，將細胞以 trypsin-EDTA 打下來，以 trypan blue 計算細胞數，取出以固定量的細胞( $1.5 \times 10^4$ /well)直接 loading 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 19 與 20 小時。結果顯示，其受 TGF- $\beta$ 1 誘導 SiHa 與 HeLa 細胞的入侵能力會隨著處理棉酚濃度增加而降低，表示棉酚可以抑制 SiHa 與 HeLa 細胞的入侵能力。另外，也利用了 Boyden chamber motility assay 觀察棉酚對於 SiHa 與 HeLa 細胞移動能力的影響。看到 loading 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 18 小時後觀察發現和侵入能力的影響有相同的結果(Fig.1 2、13)。

#### **棉酚抑制TGF- $\beta$ 1誘導的人類子宮頸癌細胞分泌的MMP-2活性**

將  $3.5 \times 10^4$ /mL 的 SiHa 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿，接著在 serum-starved 的情形下，處理不同濃度的棉酚(0、2、4、10  $\mu$ M)與合併處理 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL)24、48 小時，收集 24-well 裡的培養液，以 Gelatin zymography 來分析 MMP-2 的表現。結果發現，在 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL)所誘導的 MMP-2 有受到棉酚不同濃度處理下而降低 (Fig. 14)。

#### **棉酚對TGF- $\beta$ 1誘導的SiHa人類子宮頸癌細胞的Cell Proliferation、Rho family及EMT相關蛋白的影響**

將 SiHa 細胞處理 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL)與不同濃度的棉酚(0、2、4、10  $\mu$ M) 48

小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-ERK1/2、anti-u-PA、anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-phospho-ERK1/2、anti-RhoA、anti-RhoB、anti-E-cadherin、anti-Smad3、anti-phospho-Smad3、anti-Foxo1A、anti-snail 及 anti-GAPDH 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 p-ERK1/2、RhoA、RhoB、N-cadherin、PI3K、 $\beta$ -catenin、p-Smad3、snail 與 Foxo1A 在單獨處理 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) 時，其蛋白表現量都有上升，在合併棉分不同濃度處理的情況下，蛋白表現量有明顯減少代表著棉分可以抑制其蛋白的表現量。另外在 E-cadherin 的部份，在單獨處理 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) 時，其蛋白表現量確實有明顯的減少，在合併棉分處理的情況下，蛋白表現反而明顯的上升，表示了棉分可以去抑制 TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) 誘導 EMT 相關現象(Fig. 15)。

#### **棉酚對人類肺癌細胞存活率的影響**

不同濃度的棉酚溶於 DMSO 中，處理 A5498 與 H1299 細胞 24、48 小時後，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率。其結果與處理 DMSO 的控制組作比較，發現在 A549 與 H1299 細胞，給予棉酚 10  $\mu$ M 48 小時後下會些微影響細胞的存活率 (Fig. 16)。

#### **棉酚抑制人類肺癌細胞爬行能力(wound healing assay)**

將 A549 與 H1299 細胞以固定的細胞數( $1.5 \times 10^4$ /well) loading 至 6 well 之 culture-insert kit 裡放入 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱，等待細胞貼附製 well 上後，將 culture-insert kit 取下，並以 PBS buffer 洗淨未完整貼附的細胞，再加入 1% 血清的細胞培養液，以不同濃度的棉酚處理 A549 與 H1299 細胞，在顯微鏡下 (目鏡 10 倍、物鏡 4 倍) 觀察細胞於固定位置的傷口癒合狀況，並且分別在 0、8、24 小時拍照記錄，結果發現 24 小時的時間點下，加藥處理的組別比 control 組的細胞比較起來，爬行能力確實明顯受到抑制(Fig. 17)。

#### **棉酚抑制人類肺癌細胞侵入及移動能力**



進一步以 Boyden chamber assay 的方式，確認棉酚對於人類肺癌細胞移動及侵入能力的影響。將棉酚以不同濃度處理 A549 與 H1299 細胞 24 小時後，將細胞以 trypsin-EDTA 打下來，以 trypan blue 計算細胞數，取出以固定量的細胞( $1.5 \times 10^4$ /well)直接 loading 在 modified Boyden chamber 的 well 中反應 20 小時。結果顯示，其侵入能力會隨著處理棉酚濃度增加而降低，表示棉酚可以抑制細胞的侵入能力 (Fig. 18)。

#### **棉酚抑制人類肺癌細胞分泌MMP-2、u-PA**

將  $3.5 \times 10^4$ /mL 的 A549 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿，接著在 serum-starved 的情形下，處理不同濃度的棉酚 24、48 小時，收集 24-well 裡的培養液，以 Gelatin zymography 來分析 MMP-2 的表現；Casein zymography 來分析 u-PA 的表現。結果發現，處理棉酚的細胞分泌的 MMP-2 與 u-PA 確實有降低的現象(Fig. 19)

#### **棉酚對人類肺癌MMP-2蛋白的影響**

將 A549 與 H1299 細胞處理不同濃度的棉酚 24 小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-MMP-2、的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 MMP-2 會隨著棉酚的濃度提高而減少 (Fig. 20)。

#### **棉酚對人類肺癌Src蛋白磷酸化的影響**

將 A549 與 H1299 細胞處理不同濃度的棉酚 24 小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-p- Src、的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 p-Src 會隨著棉酚的濃度提高而減少 (Fig. 21)。

#### **棉酚對SiHa人類子宮頸癌MMP-2、u-PA、ERK、FAK及Src蛋白磷酸化的影響**

將 A549 細胞處理不同濃度的棉酚 24 小時之後，收集其 cell lysates，以 anti-phospho-ERK1/2、anti-ERK1/2、anti-FAK-Tyr397、anti-FAK 的抗體進行 Western blot 分析。實驗結果發現 p-ERK1/2、p-FAK-Tyr397 皆會隨著棉酚的濃度提高而減少 (Fig. 22)。

### **棉酚抑制TGF-β1誘導的人類肺癌細胞分泌的MMP-2活性**

將 A549 與 H1299 細胞 subculture 在 24-well 的培養皿，接著在 serum-starved 的情形下，處理不同濃度的棉酚與合併處理 TGF-β1 (10 ng/mL) 24、48 小時，收集 24-well 裡的培養液，以 Gelatin zymography 來分析 MMP-2 的表現。結果發現，在 TGF-β1 (5 ng/mL) 所誘導的 MMP-2 有受到棉酚不同濃度處理下而降低 (Fig. 23)。

### **利用正立螢光顯微鏡觀察棉酚與TGF-β1對人類肺癌A549細胞之骨架蛋白的影響**

將人類子宮頸癌細胞 A549 種於 8well 之 chamber slide 中，每一個 well 的細胞數為  $1.5 \times 10^4$  /mL，放入 37 °C 培養箱反應 16 小時，吸掉培養液，加入棉酚給予濃度 10 μM 並共同處理 TGF-β1 48 小時。經過 48 小時的培養，使用 4% paraformaldehyde 固定細胞，接著加入 500 μL 的 0.5% Triton X-100 (in PBS) 在室溫下將細胞進行穿孔。加入 500 μL 的 1% BSA in PBS，降低抗體非專一性的結合。加入 phalloidin 於 4 °C 培養 overnight，以 PBS 清洗 4 次，一次 5 分鐘，最後 mounting buffer 固定並加上玻片(含 DAPI)，接著以正立螢光顯微鏡觀察進行拍攝，結果發現，在單純處理 TGF-β1 的組別 F-actin 大量堆積在細胞膜上且型態有明顯突觸狀的形成，在看到給予棉酚的組別雖然有某些細胞有 F-actin 的堆積但在型態上來說突觸狀有明顯減少。因此棉酚能夠有效的將間質外觀 reverse 成較為上皮細胞的型態 (Fig. 24)。

### **棉酚抑制TGF-β1誘導的人類肺癌細胞侵入及移動能力**

利用 Boyden chamber assay 的方式，確認棉酚對於 TGF-β1 誘導人類肺癌細胞移動及侵入能力的影響。將棉酚以不同濃度與 TGF-β1 (10 ng/mL) 處理 A549 與 H1299 細胞 24 小時後，將細胞以 trypsin-EDTA 打下來，以 trypan blue 計算細胞數，取出以固定量的細胞 ( $1.5 \times 10^4$  /well) 直接 loading 在 modified Boyden chamber

的 well 中反應 19 與 20 小時。結果顯示，其受 TGF- $\beta$ 1 誘導細胞的入侵能力會隨著處理棉酚濃度增加而降低 (Fig. 25)。

#### **表達 pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro]載體於 A549 肺癌細胞中**

成功轉殖 pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro]載體於 A549 細胞中(Fig. 26)。

**利用正立螢光顯微鏡觀察棉酚與TGF- $\beta$ 1對人類肺癌A549細胞之vimentin的影響**

接著以正立螢光顯微鏡觀察進行拍攝，結果發現，在單純處理 TGF- $\beta$ 1 的組別 vimentin 大量表達在細胞中，在看到給予棉酚的組別 vimentin 有明顯減少(Fig. 27)。

#### **表達 pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro]載體於 SiHa 子宮頸癌細胞中**

成功轉殖 pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro]載體於 A549 細胞中(Fig. 28)。

**利用活體影像系統觀察 SiHa 腫瘤在活體內生長情形**

以四周大的裸鼠右後肢皮下打入  $8 \times 10^6$  人類子宮頸癌細胞 SiHa，利用管餵方式給予棉酚(Placebo、10 mg/mL、20 mg/mL)，並於第 23 天進行拍攝。以復腔注射方式給予老鼠 luciferin (200 mg/kg)，等待 20 分鐘後進行拍攝。可明顯看到管餵棉酚的組別，相較於控制組其光學訊號明顯較弱(Fig. 29)。

**棉酚影響 SiHa 人類子宮癌細胞在裸鼠體內腫瘤型態大小及重量之影響。**

以四周大的裸鼠右後肢皮下打入  $8 \times 10^6$  人類子宮頸癌細胞 SiHa，在期間每天測量體重及腫瘤生長大小，利用管餵方式給予棉酚(Placebo、10 mg/kg、20 mg/kg)，在期間每天測量體重及腫瘤生長大小，持續 43 天之後將老鼠犧牲取下腫瘤，將腫瘤秤重並記錄。從結果圖看到，在給予棉酚的組別腫瘤大小相對於給予安慰劑的組別有比較小。從腫瘤秤重克數量畫圖也可以看到給於棉酚的組別腫瘤重量也相對較小(Fig. 30)。從平均的老鼠體重圖看到在給予棉酚的期間，藥物對於老鼠體重並不會有太大的影響(Fig.31A)。在每天測量的腫瘤體積統計

圖也可以看到在給予棉酚的組別，腫瘤生長的情形相對於餵食安慰劑的組別，有較低的趨勢。從這樣的實驗可以得知，棉酚確實會去抑制子宮頸癌在體內的增生(Fig.31B)。

#### **棉酚影響 SiHa 子宮頸癌細胞在免疫缺陷小鼠(SCID mice)體內腫瘤轉移之影響**

以4周大的免疫缺陷小鼠(SCID mice)以尾靜脈注射的方式打入  $1 \times 10^6$  細胞數的人類子宮頸癌 SiHa(含 luciferase)細胞，以管餵方式給予棉酚(Placebo、20 mg/kg)，在第131天利用 IVIS 活體影像系統觀察種留在體內轉移的情形，發現位棉酚的組別其螢光訊號明顯就於控制組來的弱許多。在管餵第133後將老鼠犧牲，從結果圖看到給予棉酚確實能夠有效抑制子 SiHa 轉移到肺部的情形(Fig. 32)。

#### **利用活體影像系統觀察 A549 腫瘤在活體內生長情形**

以四周大的裸鼠右後肢皮下打入人類肺癌細胞 A549，利用管餵方式給予棉分(Placebo、10 mg/kg、20 mg/kg)。利用管餵方式給予棉酚(Placebo、10 mg/kg、20 mg/kg)，在期間每天測量體重及腫瘤生長大小，之後將老鼠犧牲取下腫瘤，將腫瘤秤重並記錄。從結果圖看到，在給予棉酚的組別腫瘤大小相對於給予安慰劑的組別有比較小，從平均的老鼠體重圖看到在給予棉酚的期間，藥物對於老鼠體重並不會有太大的影響，在每天測量的腫瘤體積統計圖也可以看到在給予棉酚的組別，腫瘤生長的情形相對於餵食安慰劑的組別，有較低的趨勢(Fig. 33)。從腫瘤秤重克數量畫圖也可以看到給於棉酚的組別腫瘤重量也相對較小(Fig. 34)。

#### **棉酚影響 A549 肺癌細胞在免疫缺陷小鼠(SCID mice)體內腫瘤轉移之影響**

以4周大的免疫缺陷小鼠(SCID mice)以尾靜脈注射的方式打入  $1 \times 10^6$  細胞數的人類肺癌 A549(含 luciferase)細胞，以管餵方式給予棉酚(Placebo、10 mg/kg、

20 mg/kg)，利用 IVIS 活體影像系統觀察種留在體內轉移的情形，發現位棉酚的組別其螢光訊號明顯就於控制組來的弱許多。從結果圖看到給予棉酚確實能夠有效抑制子 A549 轉移到肺部的情形(Fig. 35)。

### 結果及討論

子宮頸癌與肺癌轉移的途徑是經由血液及淋巴轉移，會擴散到身體各部位也是造成癌症病人死亡主要原因。針對子宮頸癌及肺癌的增生及轉移的治療是必須且迫切的。本實驗想利用棉酚看是否能夠抑制子宮頸癌及肺癌的轉移，首先使用 MTT assay，先觀察處理棉酚子宮頸癌細胞後的細胞型態，藉由細胞內琥珀酸脫氫酶還原 tetrazolium 的能力，可以得知在棉分處裡 24 小時的情況下對細胞並沒有毒殺的作用。但在 48 小時高濃度對細胞增生卻有些許的抑制。再來用人為的方式模擬製造出傷口，而稱之為傷口癒合實驗(wound healing assay)，觀察細胞爬行的能力，從結果發現棉酚在濃度 2 $\mu$ M 時就可以抑制 SiHa 與 HeLa 這兩株子宮頸癌細胞的爬行能力。接下來進一步用 Boyden chamber motility、Boyden chamber invasion 來觀察子宮頸癌細胞的移動與侵襲能力，結果發現棉酚在不同濃度情形下不僅可以去抑制細胞移動的能力還包括細胞將解 Matrigel 的能力。

當細胞想要侵入周邊組織時，通常會分泌一些蛋白分解酶來達到分解細胞周邊組織與細胞外基質(ECM)的目的，來誘導血管新生。而癌細胞就可以進一步透過血管或者淋巴系統來達到轉移的目的。而 MMP-2,9 在腫瘤轉移中的扮演角色，主要還是因為分解細胞外基質的能力，為腫瘤細胞創造出更多的發展空間。因此本實驗將利用 Gelatin Zymography assay，將金屬基質蛋白酶的受質胞埋在 SDS-PAGE 中，讓酵素與受質反應有足夠時間反應過後，來觀察在給予棉酚的同時是否可以去影響子宮頸癌 MMP 的表現。然而從實驗結果發現在給予棉酚的情況下確實可以去抑制 SiHa 細胞 MMP-2 分泌量。然而過去也有文獻指出 u-PA 是一種似纖溶酶的絲氨酸蛋白水解酶，由腫瘤細胞或其他細胞分泌，分泌時為無活性的單鏈酶結構，他與腫瘤細胞膜上的 u-PA receptor 結合并激活成雙鏈活性 u-PA，活性 u-PA 能將纖溶酶原(plasminogen)激活成纖溶酶(plasmin)，而 plasmin 能夠降解細胞外基質和基底膜成分，如纖維蛋白原、纖維連接素、蛋白多糖等，這種蛋白降解作用最終導致腫瘤細胞發生侵襲和轉移。因此利用 Casein Zymography assay，來看棉酚是否可以影響

細胞內 u-PA 的分泌量，由實驗結果得知棉酚確實可以去降低 HeLa 細胞所分泌的 u-PA 表現。

由過去的文獻指出 Rho A 是調控細胞黏附的重要因子，換言之，Rho A 對於腫瘤細胞侵犯正常細胞具有相當的必要性。然而在其他文獻也提到 Wnt 的訊號傳遞路徑在 EMT 的過程當中扮演很重要的角色。以及 p-ERK1/2 他是一個蛋白質基酶 (protein-serine/threonine kinases) 可以去調節細胞黏附、細胞增生、存活、分化等等的功能。因此本研究發現在利用棉分處理 SiHa 子宮頸癌細胞，可以發現 MMP-2、RhoA、p-ERK1/2、及 Wnt signaling pathway 相關蛋白表現量有明顯減少。

TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor beta 1) 是一個能協助腫瘤細胞侵犯鄰近的組織，透過刺激細胞間質的製造及血管的新生，同時促進腫瘤細胞的分化，抑制自體的免疫功能，以利腫瘤組織的進一步生長及轉移。TGF- $\beta$ 1 為 EMT 的主要調控者，其訊號藉由一般的 Smad3-dependent 或 Smad3-independent 的路徑，來共同增強 EMT，這些路徑也會導致一些轉錄因子的活化，像是 Snail、Slug、Twist、SIP、ZEB1 等等。因此本實驗利用 TGF- $\beta$  來誘導 SiHa 子宮頸癌細胞，觀察其細胞型態是否與原本的鱗狀上皮細胞有所差異以及給予棉分之後觀察其結果。結果圖看到在單純處理 TGF- $\beta$  的組別細胞型態呈現紡錘狀，且有明顯突觸的形成，反觀看到合併棉酚的組別其細胞則能被回復成較為鱗狀上皮細胞的形 (Fig.8) 態。接下來利用一連串的實驗來證明棉酚是否可以去抑制 TGF- $\beta$  所誘導的子宮頸癌細胞 EMT 的現象。從 Boyden chamber motility、Boyden chamber invasion 來觀察子宮頸癌細胞的移動與侵襲能力。從結果圖看到在單純處理 TGF- $\beta$  時，子宮頸癌細胞移動與侵襲能力以及 MMP-2 的活性都有明顯的上升，但隨著棉酚這藥物的處理，可以去抑制 TGF- $\beta$  所誘導的子宮頸癌細胞移動與侵襲能力以及 MMP-2 的活性。

由於 TGF- $\beta$  是一個很重要的生長因子，因此有很多文獻指出 TGF- $\beta$  與 TGF- $\beta$  的 receptor 結合後會去活化細胞質內一些下游的 Smad 蛋白像是 Smad2 與 Smad3，當 Smad2 與 Smad3 被活化之後會與 Smad4 形成複合體 (complex)，進而轉錄細胞核內。進入到核內之後，這些 Smad 複合體具有轉錄因子的功能，會去結合在 DNA 上當做 co-activators 與 co-repressors 結合在 TGF- $\beta$  的啟動子區域或者調節一些轉路因子的基因上，總而言之 TGF- $\beta$ 1 此生長因子與其的 receptor 結合後會去活化 Smad 蛋白之外還有可能走其他路徑去活化

p38、JNK、Ras/Erk、PI3K/Akt、與一些 small GTPases 像是 RhoA 與 CDC42。因此本實驗有看 在給予 TGF- $\beta$  之後以及合併棉酚處理後對於細胞內蛋白表現量的影響。從結果圖可以看到單純處理 TGF- $\beta$  1 時 p-ERK、RhoA、RhoB、 $\beta$ -catenin、p-Smad3、Foxo1A、Snail 的蛋白表現量都有上升，在給予棉酚之後其蛋白表現量都有下降。另外在細胞骨價蛋白的部份，單純處理 TGF- $\beta$  1 時 E-cadherin 蛋白表現量有下降，在給予棉酚之後其蛋白表現量卻因為加藥濃度不同而逐漸上升。

我們進一步利用動物實驗來驗證細胞實驗的結果，將裸鼠皮下打入 SiHa(含 Luciferase)細胞株且管餵 23 天的老鼠做 IVIS 影像系統觀測，可以看到腫瘤生長情形在給予棉的情況下螢光強度有明顯較弱的趨勢，在管餵 43 天後將細胞犧牲，取下裡鼠皮下的腫瘤發現，給予棉的組別跟餵食安慰劑的組別腫瘤具有更明顯的差異。接下來利用尾靜脈注射的方式將 SiHa(含 Luciferase)細胞株打入免疫缺陷小鼠(SCID mice)中，也是利用管餵的方式給予棉酚，在餵食第 131 天時利用 IVIS 活體影像系統去觀測腫瘤在老鼠體內轉移的情形。從結果圖可以看到在餵食安慰劑的組別螢光訊號相對較餵食棉酚的組別強，從定量圖上也看到相同結果。因此我們將老鼠犧牲取出肺部，觀察其型態。從結果圖看到確實給予棉分組別 SiHa 轉移到肺部的情形有明顯受到抑制。

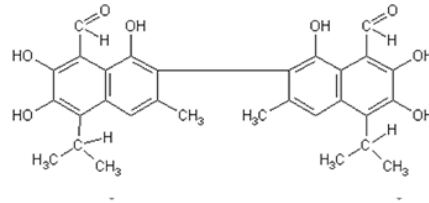
總和以上的實驗結果可以得知，在給予棉酚的情況下可以去影響子宮頸癌的爬行、轉移、侵襲之能力，然而在生長因子的誘導下，也可以發現棉酚可以去抑制誘導下更具侵襲之能力，這些在活體實驗上也得知相同的結果，因此我們可以認為棉酚在抑制子宮頸癌轉移的部份是有效果的。

#### **成果自評表：**

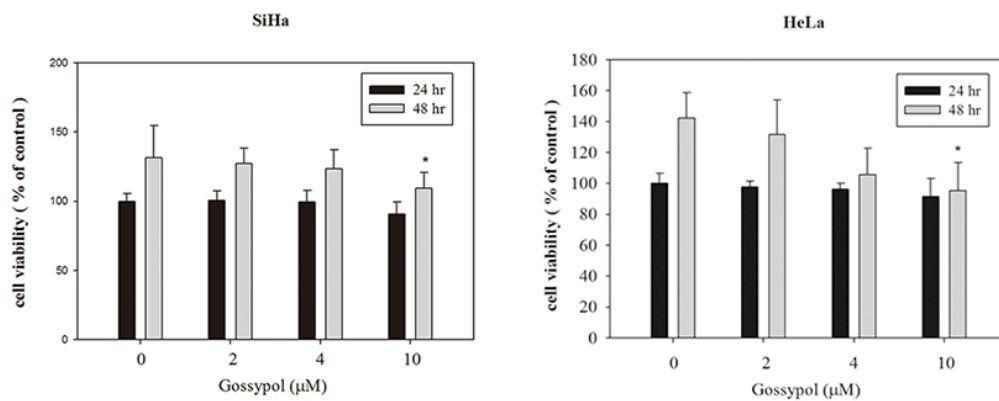
目前已達成計畫中預期之進度：完成分析棉酚對子宮頸及肺癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對肺癌及子宮頸癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前 棉酚抑制 SiHa 子宮頸癌及 A549 肺癌細胞侵襲轉移的部份已積極整理並已投稿至期刊雜誌社等待發表，其他細胞珠的相關實驗如:血管新生作用，關於探討蛇果草的抗癌細胞轉移及抑制 EMT 及血管新生的效果及機制也正在進行及整理中。

## 圖表

A

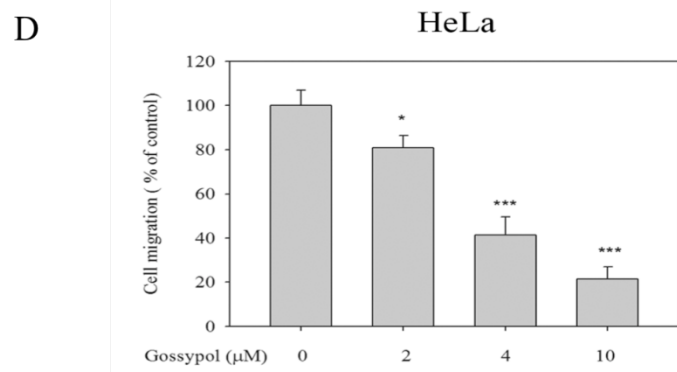
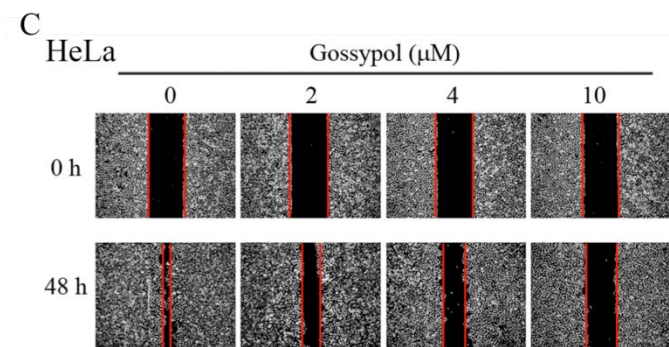
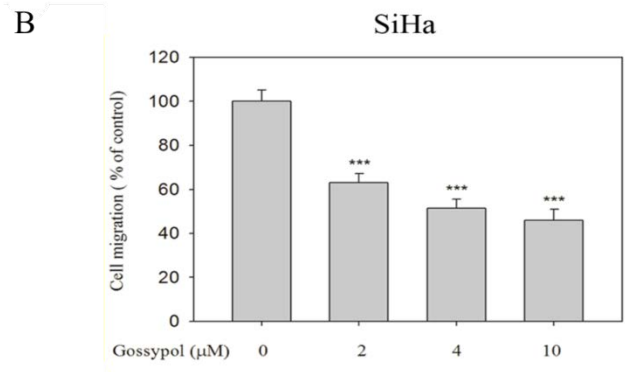
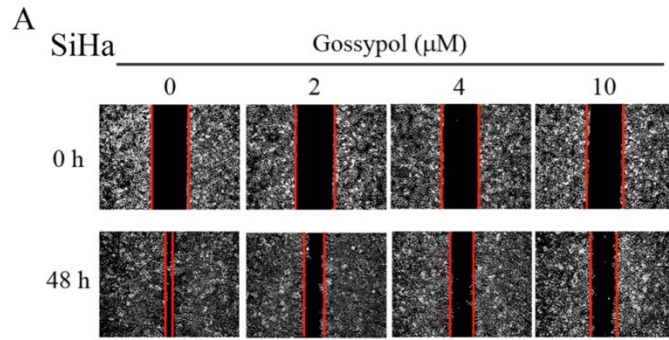


B



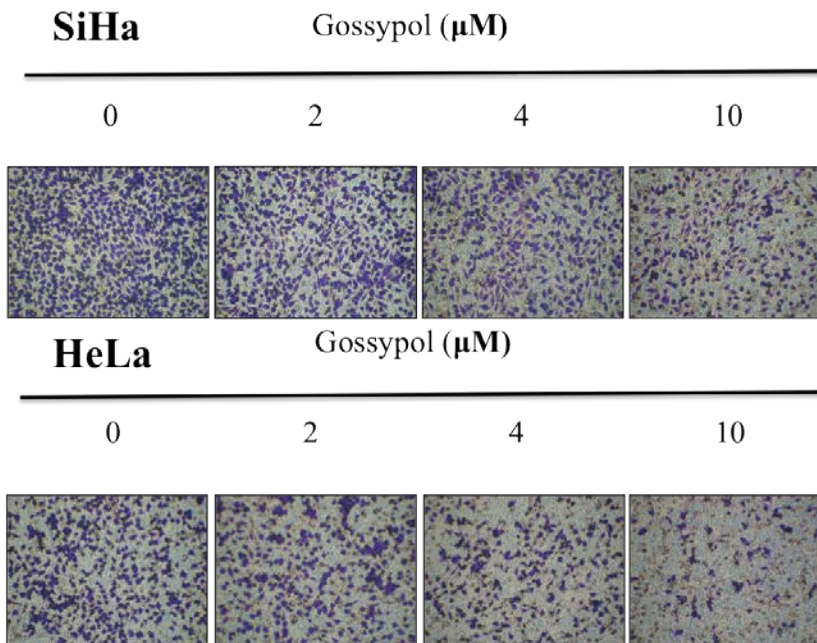
**Fig.1** The effect of gossypol on cell viability. (A) The chemical structure of Gossypol. (B) Cervical cells, SiHa and HeLa were treated with Gossypol (0, 2, 4 and 10 μM) for 24 and 48 hours and then subjected to MTT assay for cell viability. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).



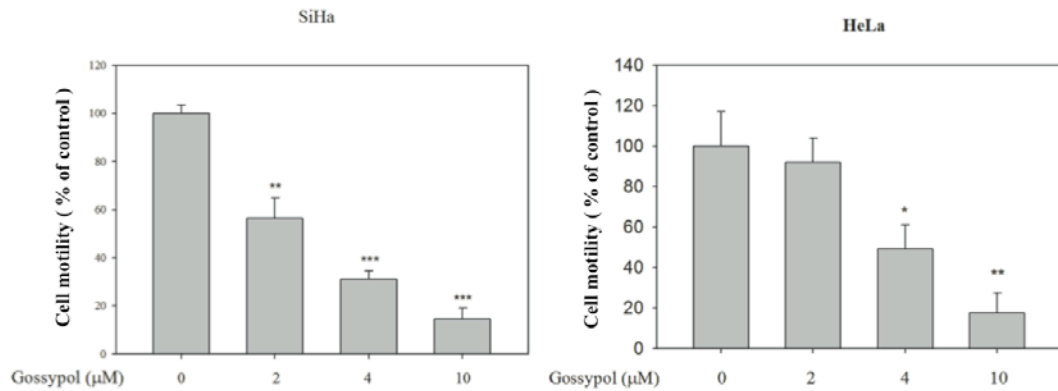


**Fig.2** The effect of gossypol on cell migration. (A) Cells were subjected to analyze for cell migration by wound healing assay. Gossypol decreased cell migration capability with respect to the experimental control consisting of only solvent by wound-healing assay on SiHa cells. Representative fields were photographed at 0 and 48 hours (40X). (B) Cell migration was determined. Data represent mean  $\pm$ SD from 3 independent experiments. [Cell migration %=(migration length/wound healing) x 100%] Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independent experiments. Statistical significance(\*,  $P<0.05$  ; \*\*,  $P<0.01$  ; \*\*\*,  $P<0.001$ ) was checked using one-way ANOVA. (C) Cells were subjected to analyze for cell migration by wound healing assay. Gossypol decreased cell migration capability with respect to the experimental control consisting of only solvent by wound-healing assay on HeLa cells. (D) Determined migration ability of SiHa was subsequently quantified with that of control being 100% (without gossypol for 24 h). Data represent mean  $\pm$ SD from 3 independent experiments. [Cell migration %=(migration length/wound healing) x 100%] Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independent experiments. Statistical significance (\*,  $P<0.05$  ; \*\*,  $P<0.01$  ; \*\*\*,  $P<0.001$ ) was checked using one-way ANOVA.

A

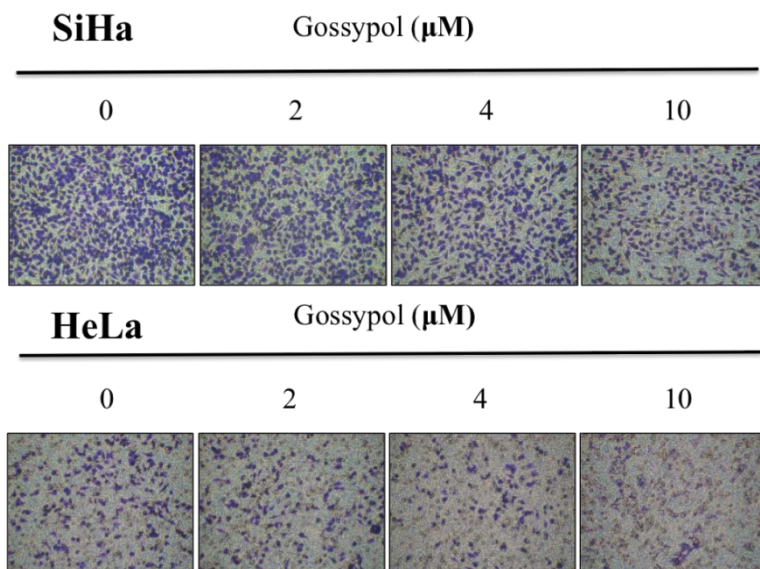


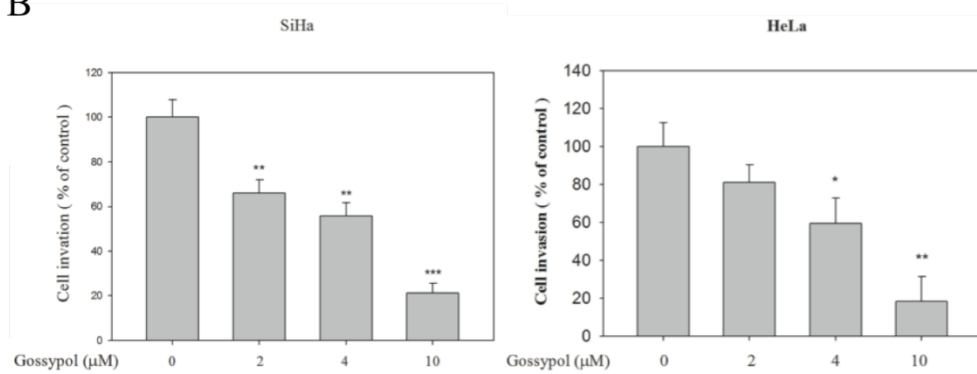
B



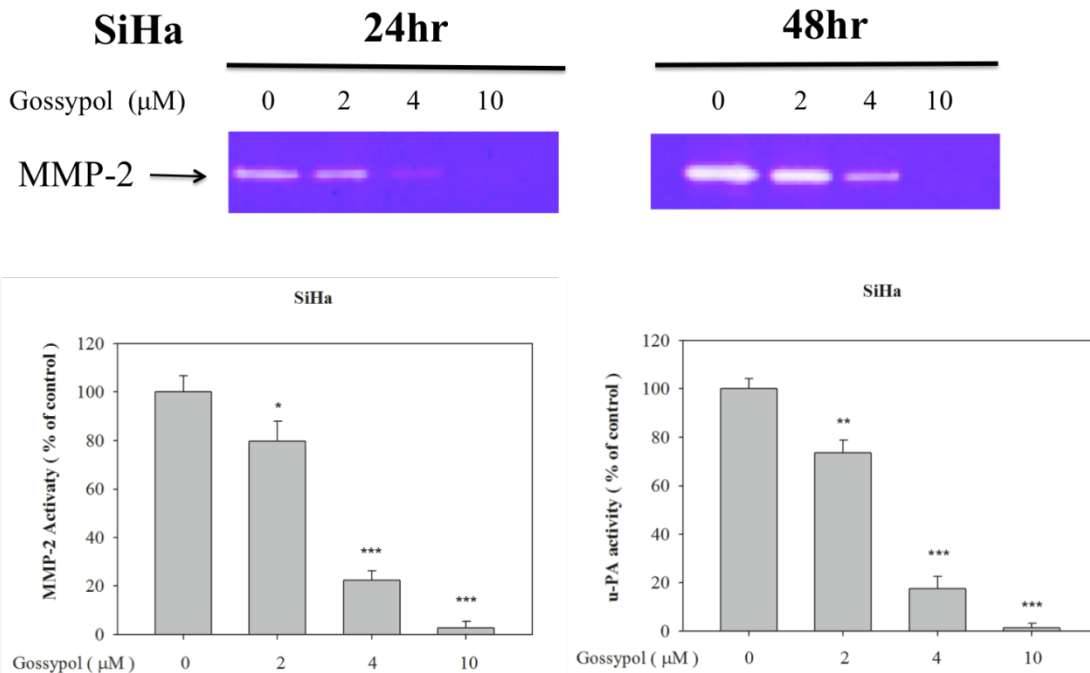
**Fig. 3** The effect of gossypol on cell motility ability of cervical. Cells were treated with Gossypol for 24 hours, and then subjected to analyze for motility by Boyden chamber migration assay. (A) Migration Chamber with 12 mm-pores in their polycarbonate membrane. Representative images of SiHa and HeLa cells on the lower side of membrane at different time point in the motility assay. (B) Count cell number of cell through the membrane with the microscope in ten random fields at 100X magnification. Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independents experiments. Statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ) was checked using one-way ANOVA.

A

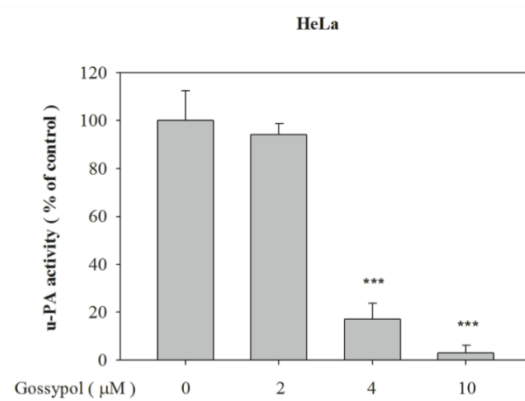
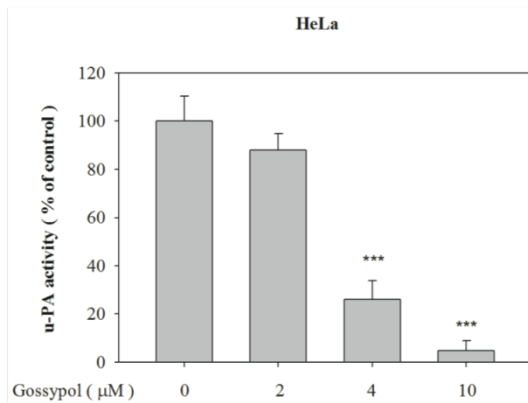
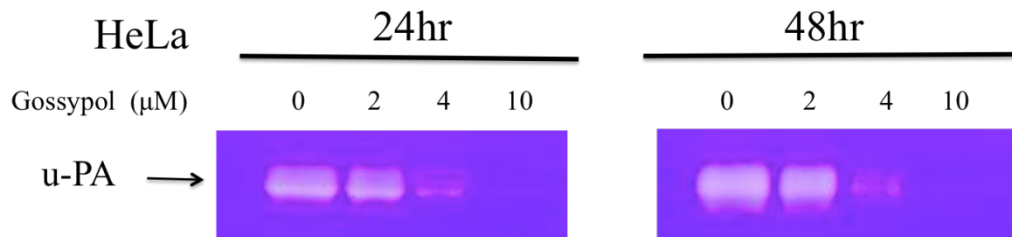
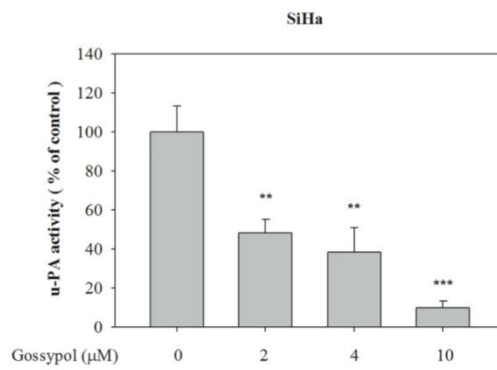
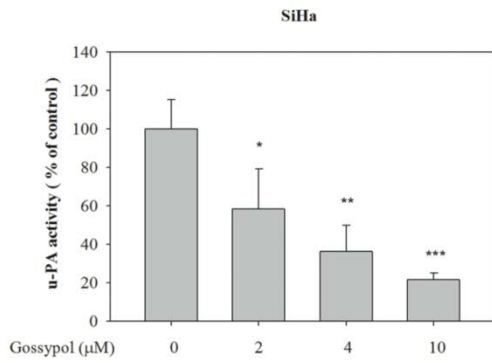
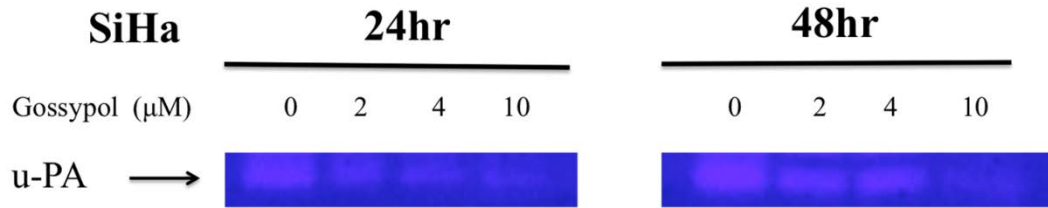


**B**

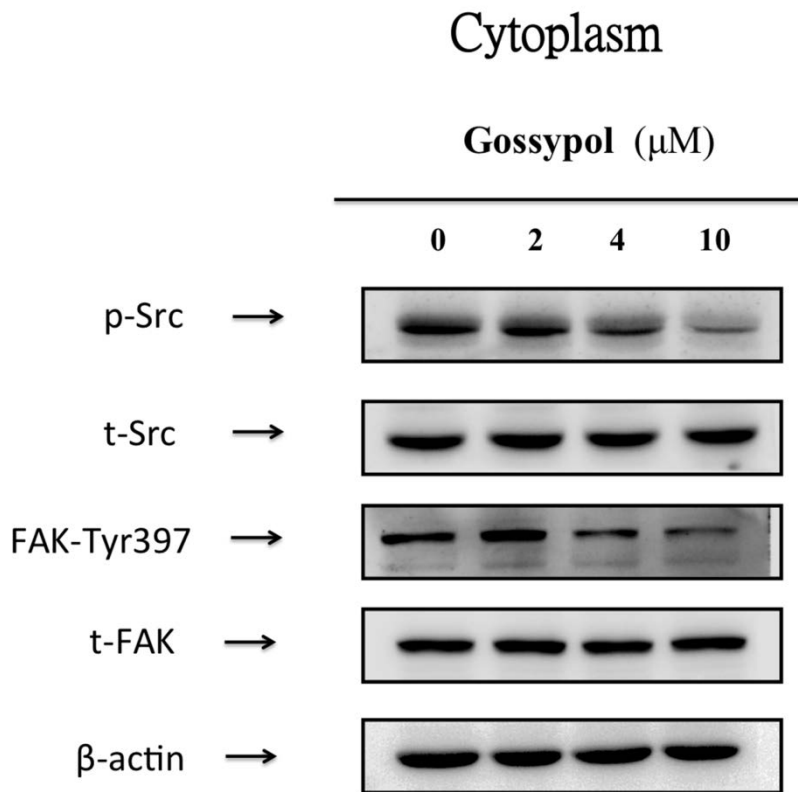
**Fig.4** TheEffect of gossypol on cell invasion ability of cervical. Cells were treated with Gossypol for 24 hours, and then subjected to analyze for invasion by Boyden chamber invasion assay. (A) Invasion Chamber with 12 mm-pores in their polycarbonate membrane had been coated by matrix gel. Representative images of SiHa and Hela cells on the lower side of membrane at different time point in the invasion assay. (B) Count cell number of cell through the membrane with the microscope in ten random fields at 100X magnification. Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independents experiments. Statistical significance (\*, $P<0.05$ \*\*, $P<0.01$  ; \*\*\*, $P<0.001$ ) was checked using one-way ANOVA



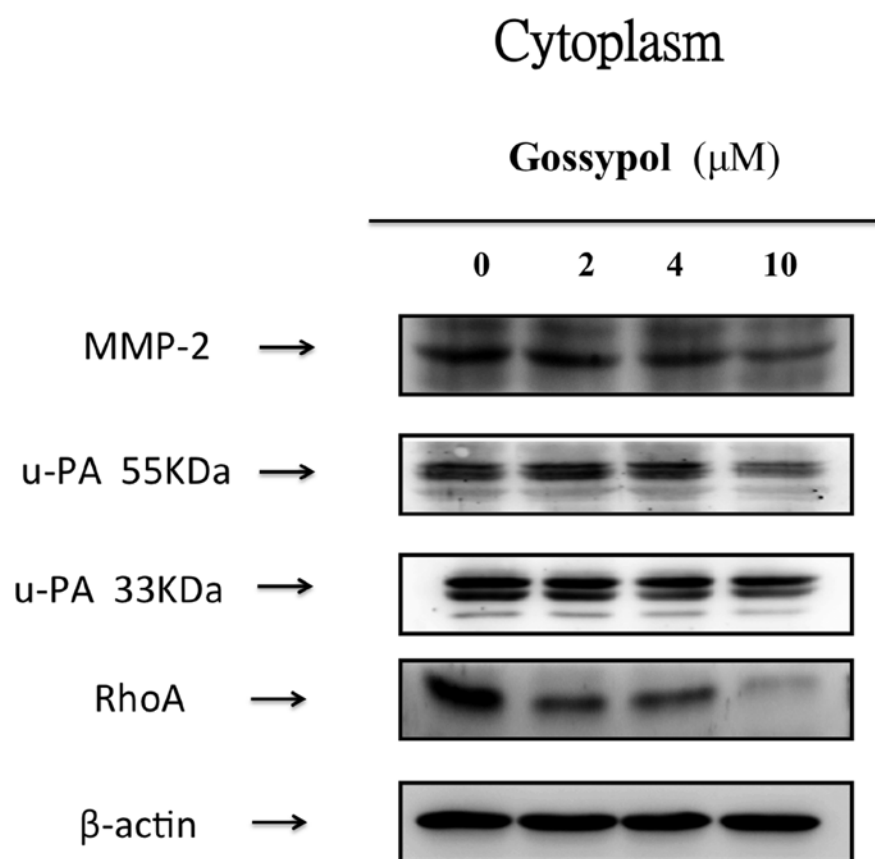
**Fig.5** The Effect of gossypol on the SiHa cell. SiHa were treated with Gossypol (0.2.4.10 $\mu$ M) for 24 and 48 hours, and then subjected Gelatin zymography analyze the activities of MMP-2. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*, $P$ <0.05; \*\*,  $P$ <0.01; \*\*\*, $P$ <0.001).



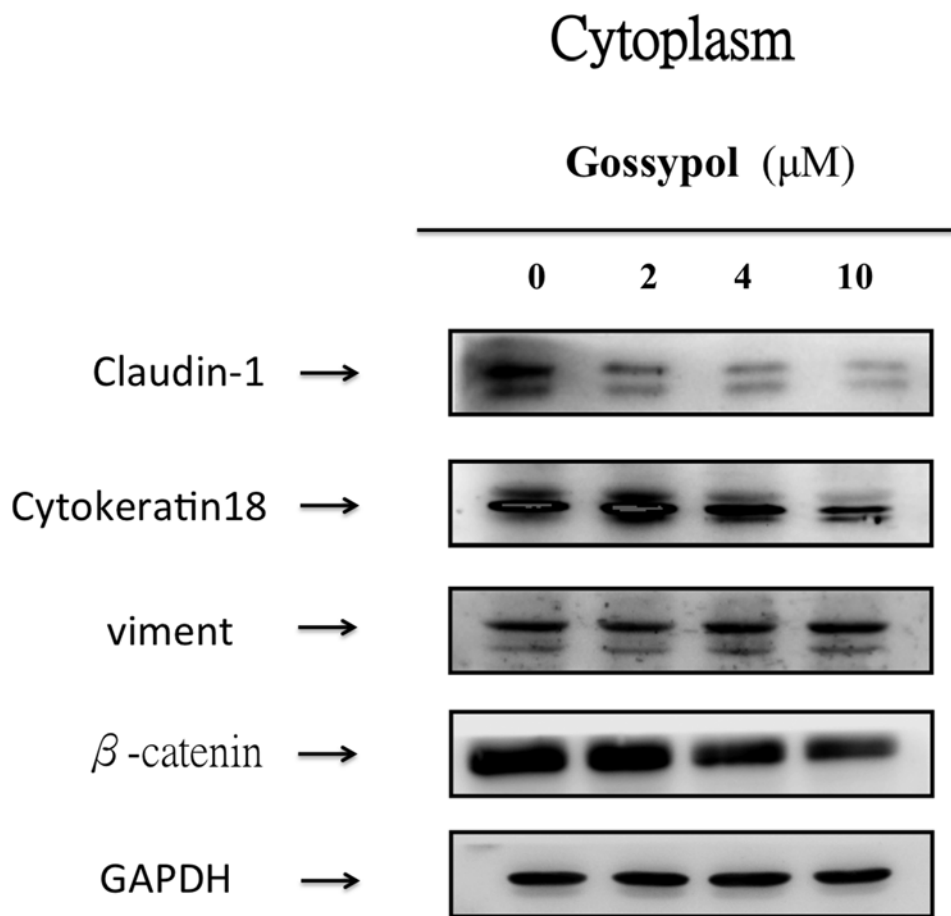
**Fig.6** The Effect of gossypol on the SiHa and HeLa cell. SiHa and HeLa were treated with gossypol (0.2.4.10  $\mu\text{M}$ ) for 24 and 48 hours, and then subjected Casein zymography analyze the activities of u-PA. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).



**Fig. 7** SiHa cells were treated with gossypol at indicated concentrations for 48 hours, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. Gossypol decreased the activity of p-Src, FAK-Tyr397 in SiHa cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.

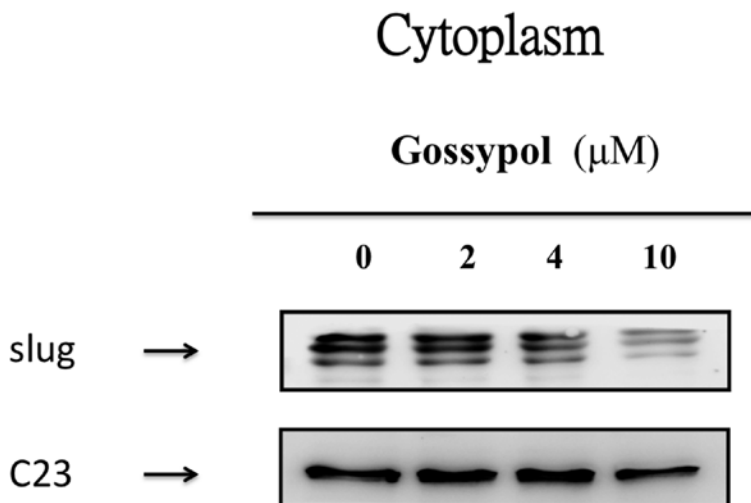
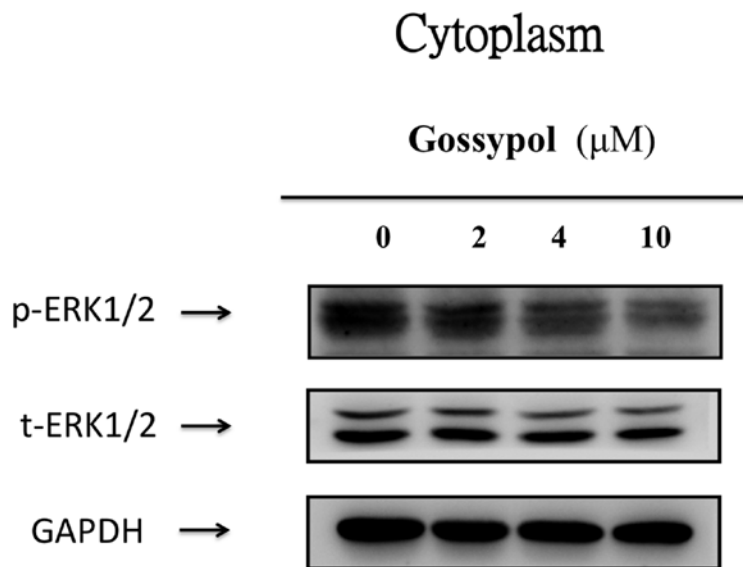


**Fig. 8** SiHa cells were treated with gossypol at indicated concentrations for 48 hours, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. Gossypol decreased the activity of MMP-2, u-PA 55KDa, RhoA in SiHa cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.



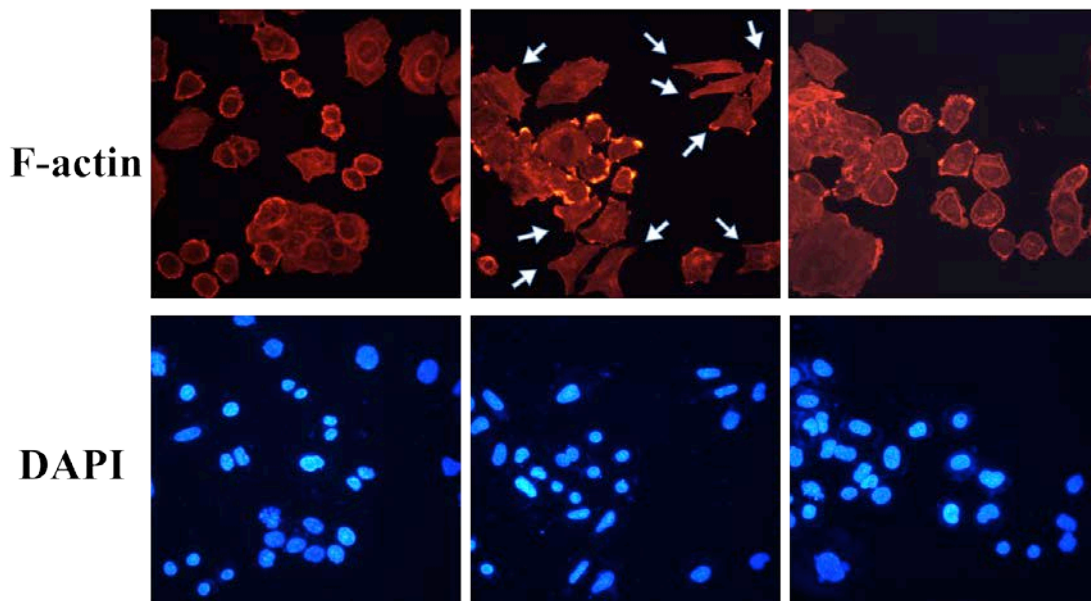
**Fig. 9** SiHa cells were treated with gossypol at indicated concentrations for 48 hours, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. Gossypol decreased the activity of Claudin-1, Cytokeratin 18,  $\beta$ -catenin in SiHa cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.



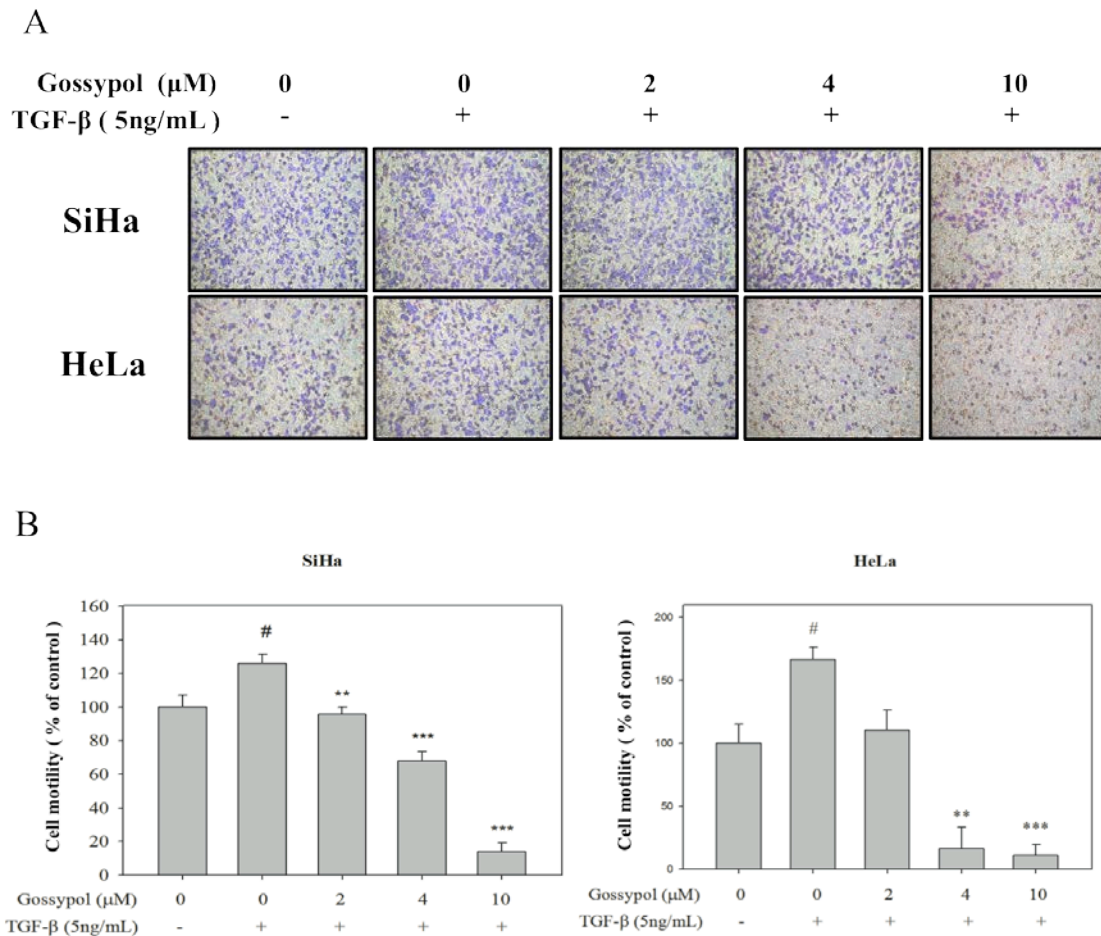


**Fig.10** SiHa cells were treated with gossypol at indicated concentrations for 48 hours, cell lysates prepared from SiHa cells at various concentration points. Gossypol decreased the activity of p-ERK1/2 and decreased expression of transcription factor such as slug in SiHa cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.

Gossypol ( $\mu\text{M}$ )	—	—	+
TGF- $\beta$ (5ng/mL)	—	+	+

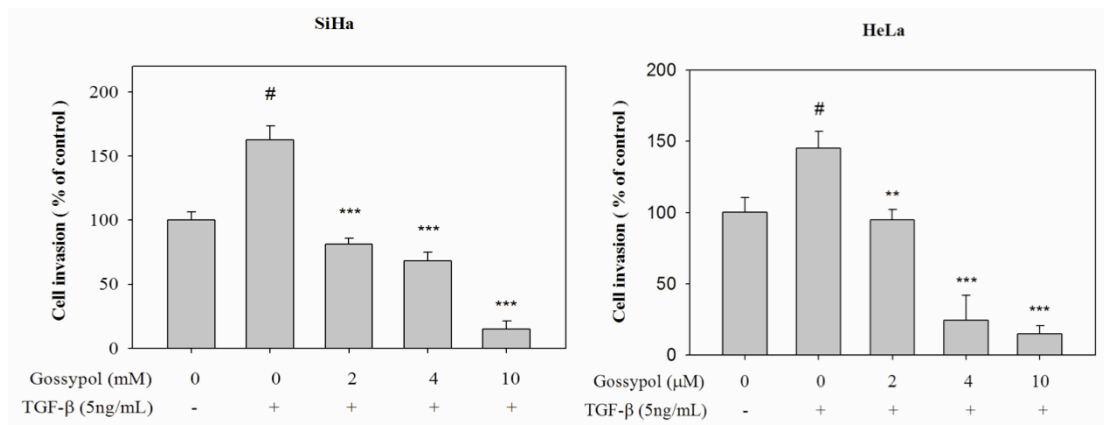
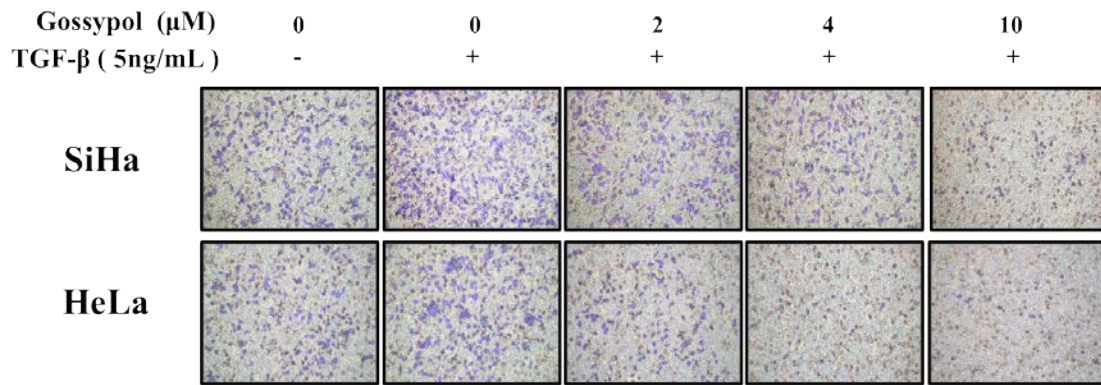


**Fig. 11 Effects of gossypol with or without TGF- $\beta$ 1-induced on cell cytoskeleton.** SiHa cell was treated gossypol for 48 hours and co-stimulated with TGF- $\beta$ 1 (5ng/mL), then assessed immunofluorescence images for F-actin and DAPI.

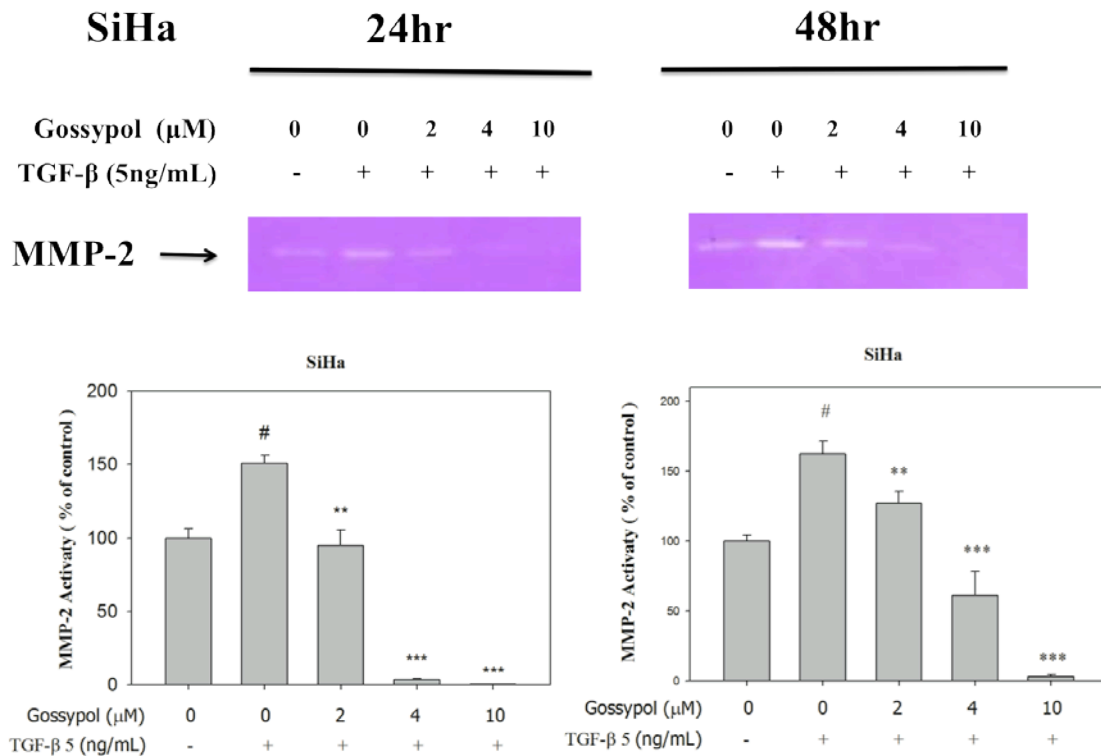


**Fig. 12** The Effect of TGF- $\beta$ -induced on cervical cell motility with Boyden chamber. Cells were treated with Gossypol for 24 hours and co-stimulated with TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) then subjected to analyze for motility by Boyden chamber migration assay. (A) Migration Chamber with 12 mm-pores in their polycarbonate membrane. Representative images of SiHa and HeLa cells on the lower side of membrane at different time point in the motility assay. (B) Count cell number of cell through the membrane with the microscope in ten random fields at 100X magnification. Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independent experiments. Statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; #,  $P < 0.05$ ) was checked using one-way ANOVA.

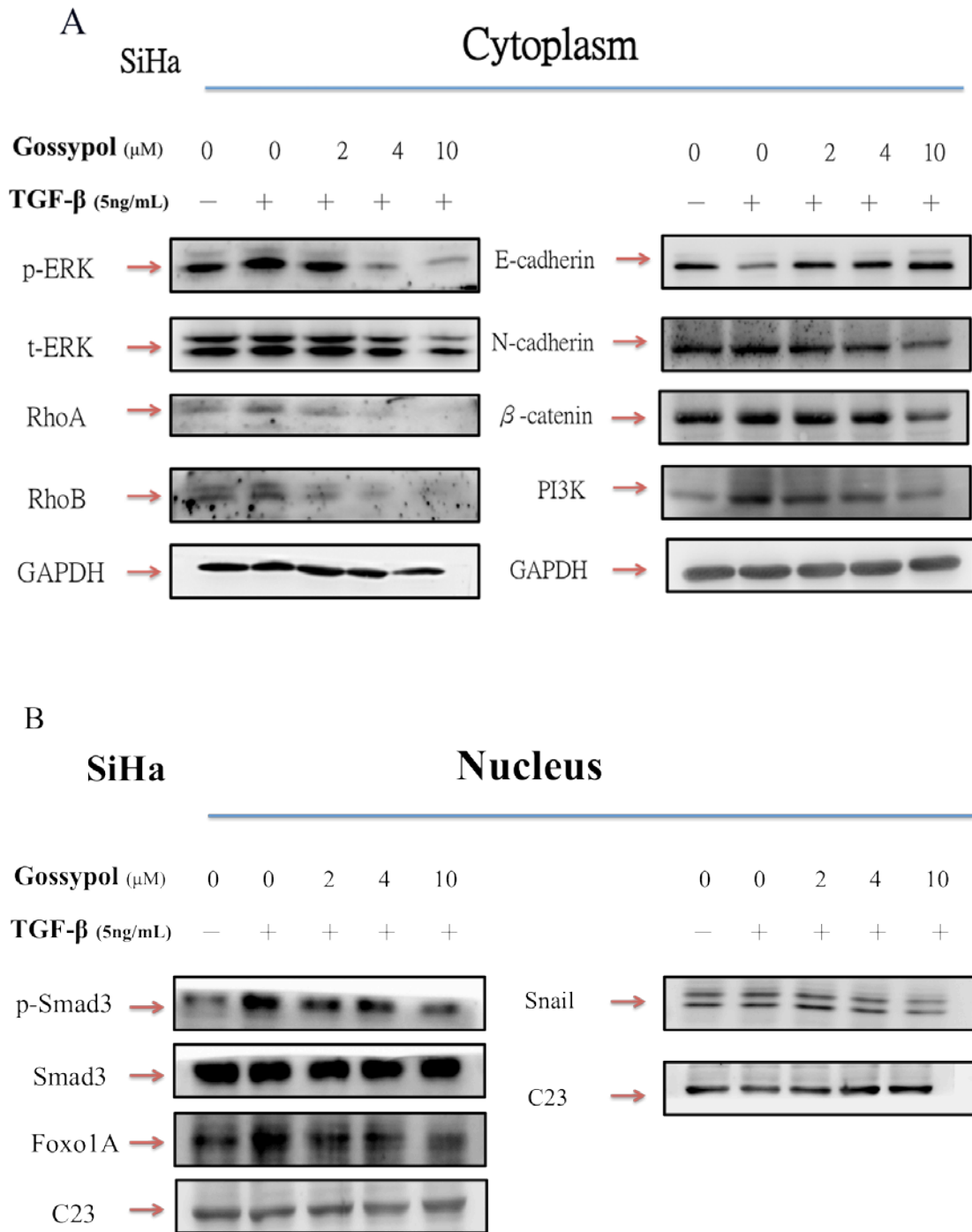
A



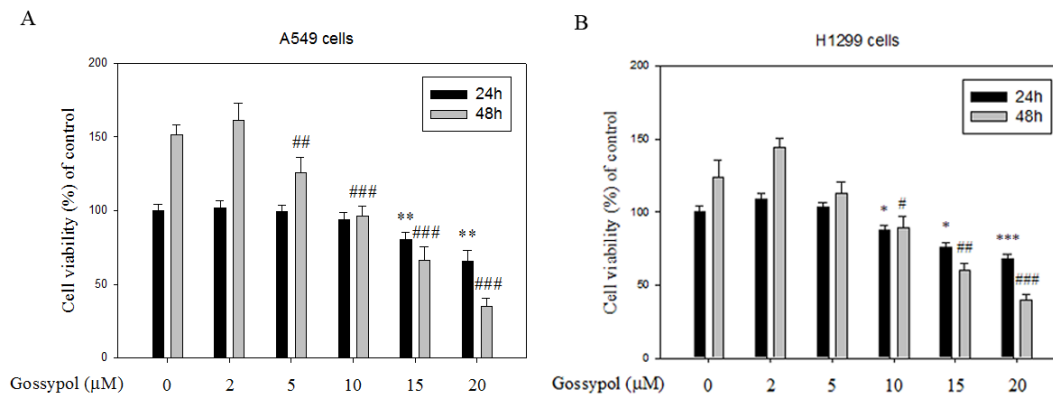
**Fig. 13 The effect of TGF- $\beta$ 1-induced on cervical cell invasion with Boyden chamber.** Cells were treated with gossypol for 24 hours and co-stimulated with TGF- $\beta$ 1 (5ng/mL) then subjected to analyze for invasion by Boyden chamber migration assay. (A) Invasion Chamber with 12 mm-pores in their polycarbonate membrane had been coated by matrix gel. Representative images of SiHa and HeLa cells on the lower side of membrane at different time point in the invasion assay (B) Count cell number of cell through the membrane with the microscope in ten random fields at 100X magnification. Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independents experiments. Statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; #,  $P < 0.05$ ) was checked using one-way ANO



**Fig. 14** The inhibition effect of gossypol on TGF- $\beta$ 1-induced MMP-2 expression of SiHa cells. SiHa were treated with gossypol (0, 2, 4, 10 $\mu\text{M}$ ) and co-stimulated with TGF- $\beta$ 1 (5ng/mL) for 24 and 48 hours, and then subjected Gelatin zymography analyze the activities of MMP-2. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*, $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*, $P < 0.001$ ; #,  $P < 0.05$ ).

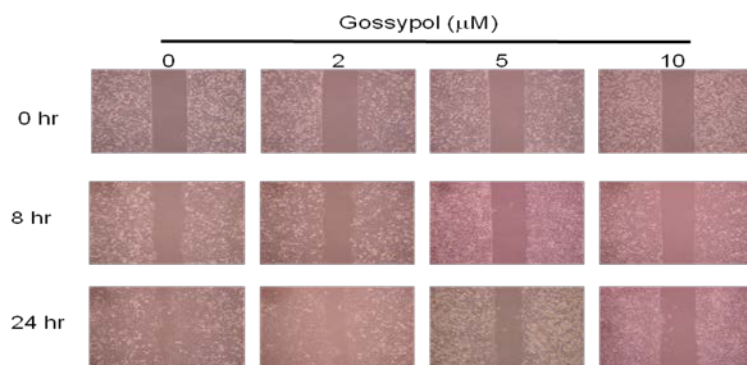


**Fig 15.** SiHa cell were treat in various concentrations of gossypol for 48 hours and the cell lysates were subjected by Westen bolt. (A) In cytoplasm, p-ERK, RhoA, RhoB,  $\beta$ -catenin were induced by TGF- $\beta$ 1(5ng/mL) and protein expression had been decrease by co-treated with Gossypol. (B) Nucleus extracts were subjected with p-Smad3, Smad3, Foxo1A, Snail and C23 as an internal control. Signals of protein were visualized with ECL detection system.

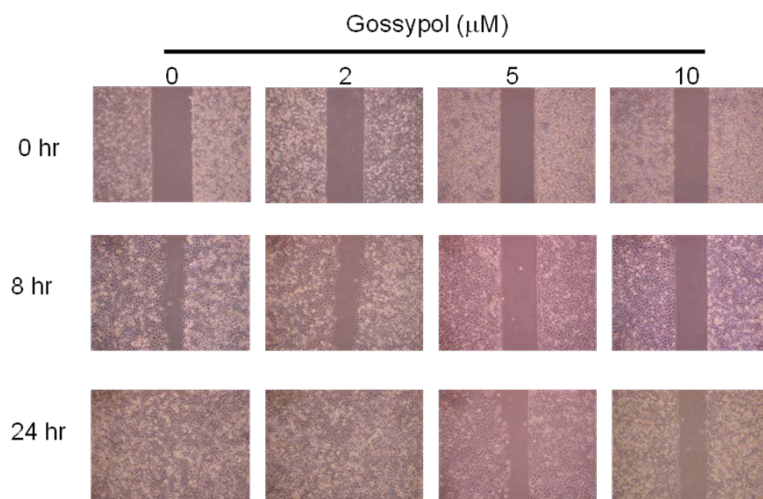


**Fig. 16** The effect of gossypol on cell viability. (A) A549 and (B) H1299 were treated with Gossypol (0, 2, 5, 10, 15 and 20 μM) for 24 and 48 hours and then subjected to MTT assay for cell viability. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*, $P$ <0.05; \*\*,  $P$ <0.01; \*\*\*, $P$ <0.001; #, $P$ <0.05; ##,  $P$ <0.01; ###, $P$ <0.001).

(A)



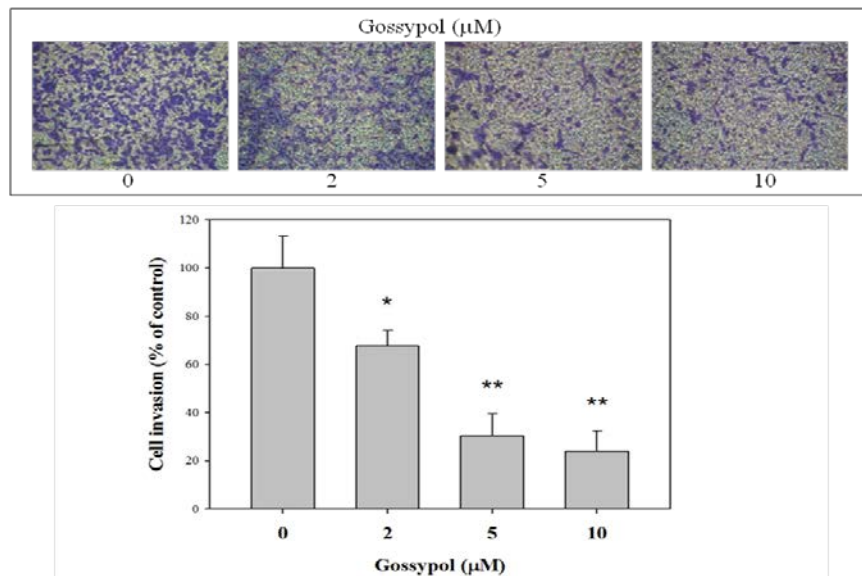
(B)



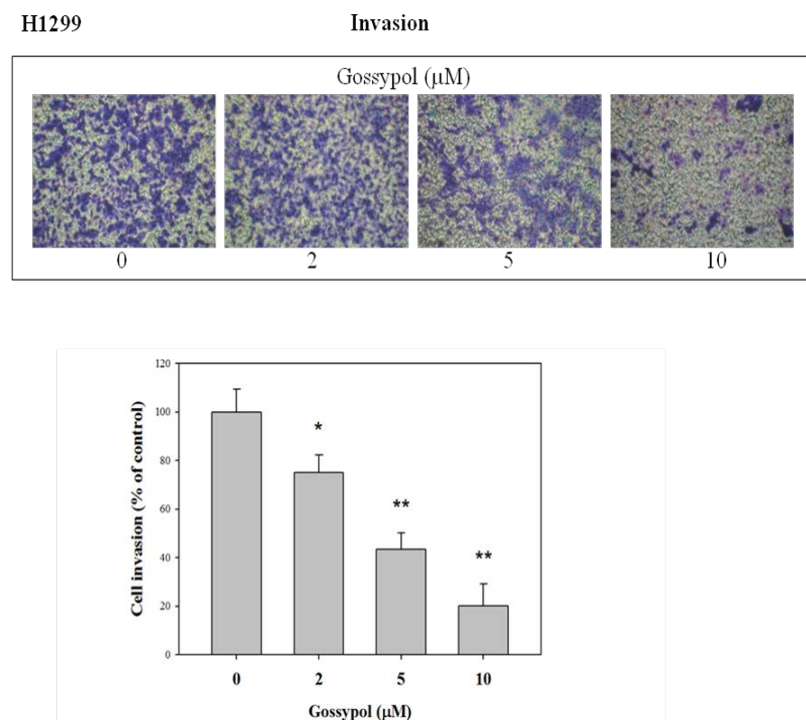
**Fig.17** The effect of gossypol on cell migration in lung cancer A549 and H1299 cells. (A) A549 and (B) H1299 Cells were subjected to analyze for cell migration by wound healing assay. Gossypol decreased cell migration capability with respect to the experimental control consisting of only solvent by wound-healing assay. Representative fields were photographed at 0, 8 and 48 hours.



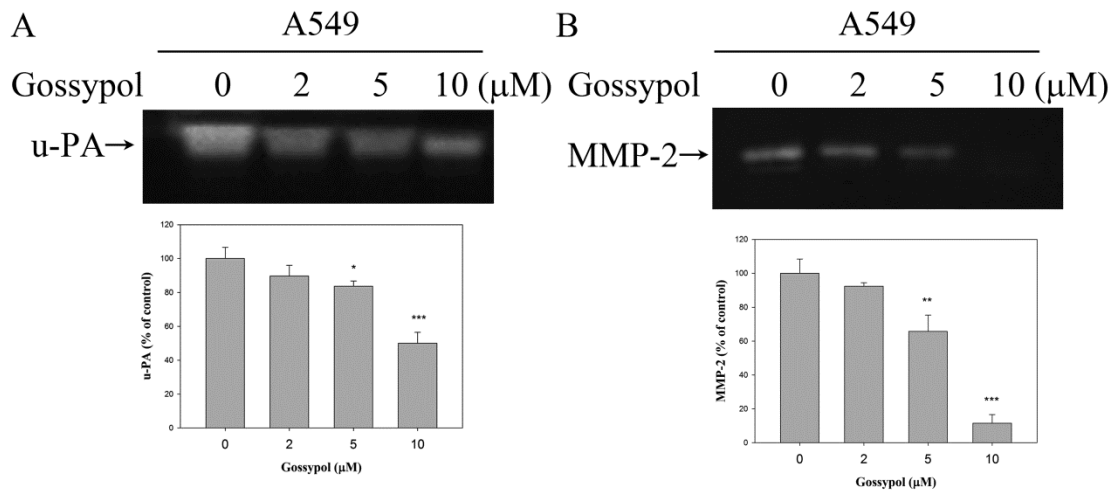
(A)



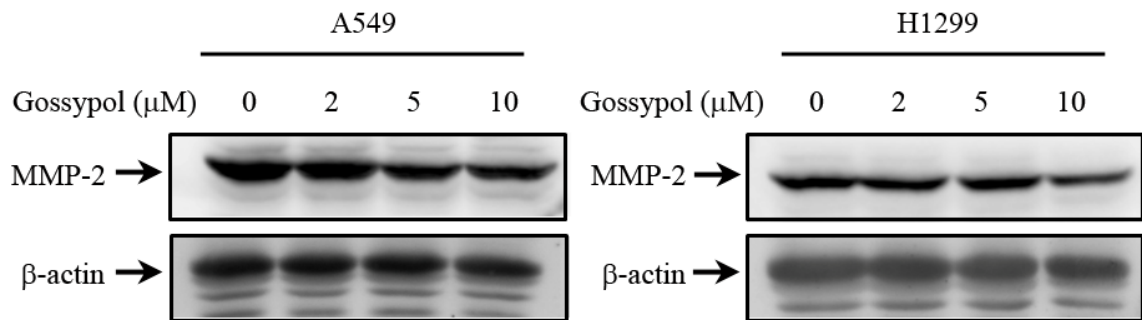
(B)



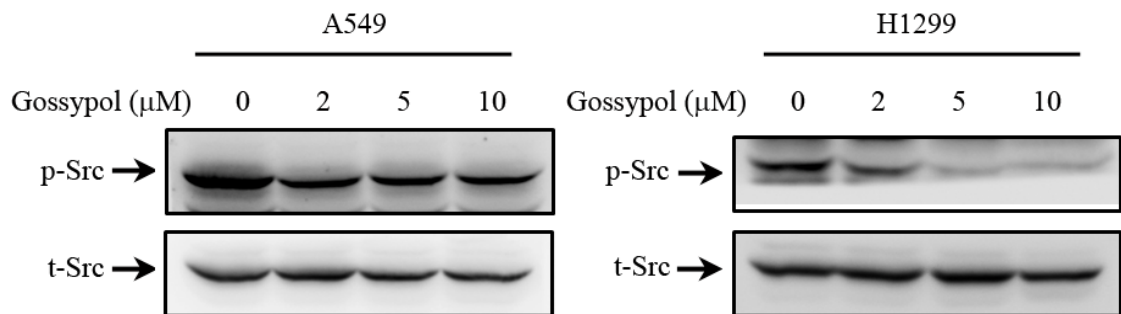
**Fig. 18** The effect of gossypol on cell invasion ability of lung cancer A549 and H1299 cells. Cells were treated with Gossypol for 24 hours, and then subjected to analyze for invasion by Boyden chamber assay. Invasion Chamber with 8 mm-pores in their polycarbonate membrane. Representative images of (A) A549 and (B) H1299 cells on the lower side of membrane at different time point in the motility assay. Count cell number of cell through the membrane with the microscope in ten random fields at 100X magnification. Data represent mean  $\pm$ SD of least 3 independents experiments. Statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ) was checked using one-way ANOVA.



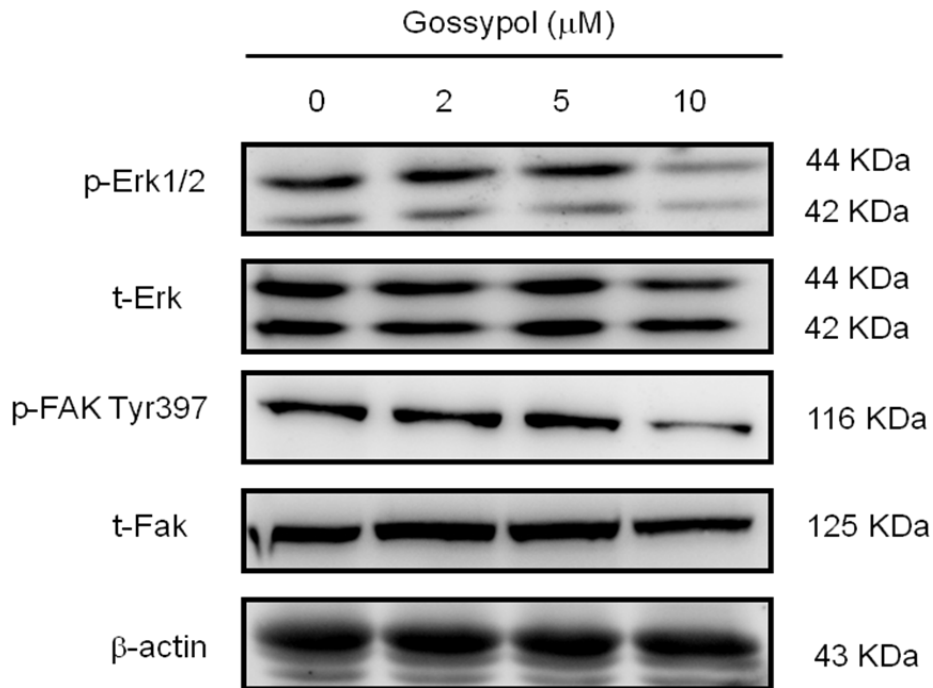
**Fig. 19** The Effect of gossypol on the activities of u-PA and MMP-2. Cells were treated with Gossypol (0, 2, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours, and then subjected Gelatin and Casein zymography analyze the activities of (A) u-PA and (B) MMP-2. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).



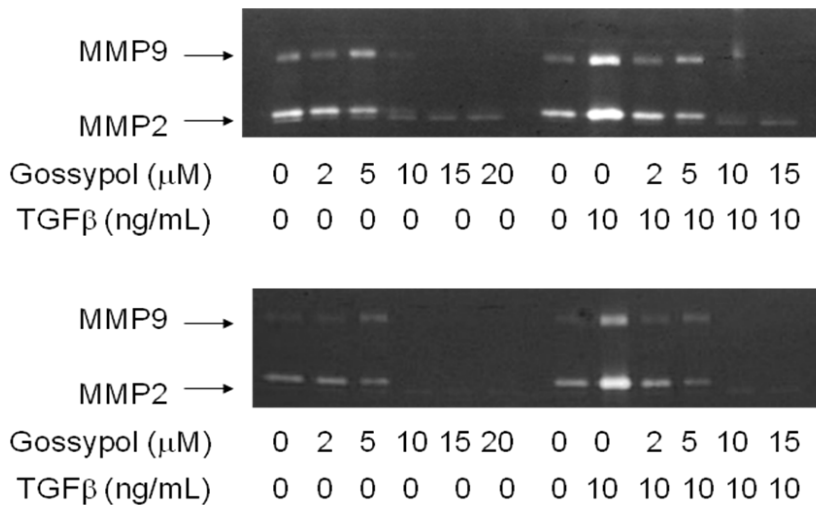
**Fig.20** The Effect of gossypol on the MMP-2 expression. A549 and H1299 were treated with gossypol (0, 2, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ) for 24 and 48 hours, and then subjected Western Blotting. Data represented the mean  $\pm$ SD of at-least three independent, comparisons were performed by *t*-test (\*, $P$ <0.05; \*\*,  $P$ <0.01; \*\*\*, $P$ <0.001).



**Fig.21** A549 and H1299 cells were treated with gossypol at indicated concentrations for 24 hours. Gossypol decreased the activity of p-Src of A549 and H1299 cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.

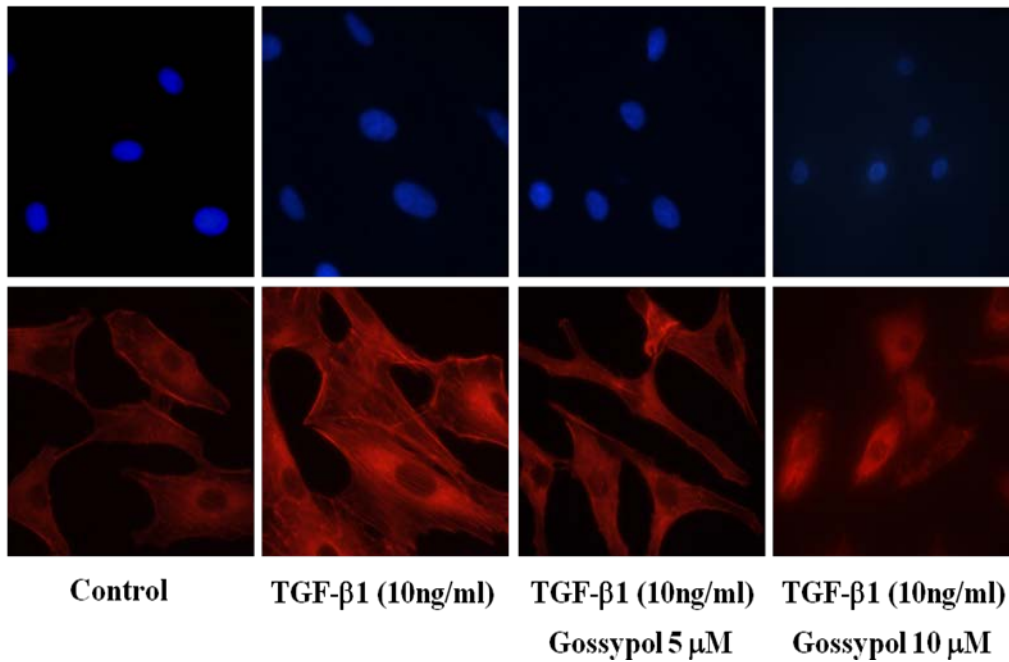


**Fig.22** A549 cells were treated with gossypol at indicated concentrations for 24 hours. Gossypol decreased the activity of p-ERK1/2 and p-FAK in A549 cells. Related proteins were analyzed by Western blotting.



**Fig. 23** The inhibition effect of gossypol on TGF- $\beta$ 1-induced MMP-2 expression of A549 cells. Cells were treated with gossypol (0, 2, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{M}$ ) and co-stimulated with TGF- $\beta$ 1 (5ng/mL) for 24 and 48 hours, and then subjected Gelatin zymography analyze the activities of MMP-2.

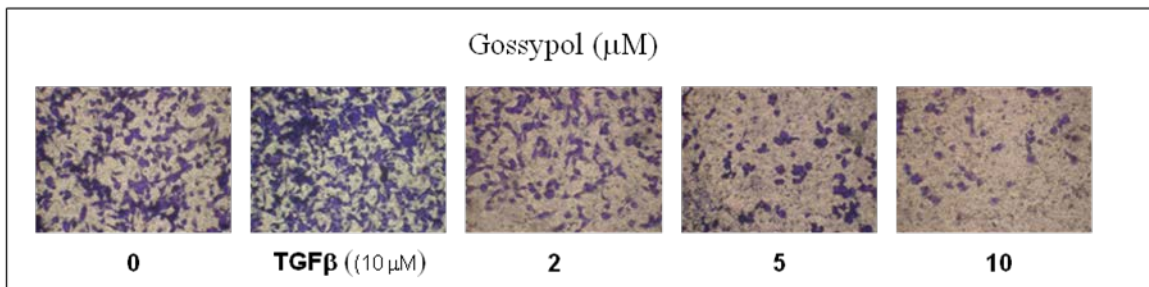
A549 (1x10<sup>4</sup>)



**Fig.24 Effects of gossypol with or without TGF-β1-induced on cell cytoskeleton.** A549 cell was treated gossypol for 48 hours and co-stimulated with TGF-β1 (10 ng/mL), then assessed immunofluorescence images for F-actin and DAPI.

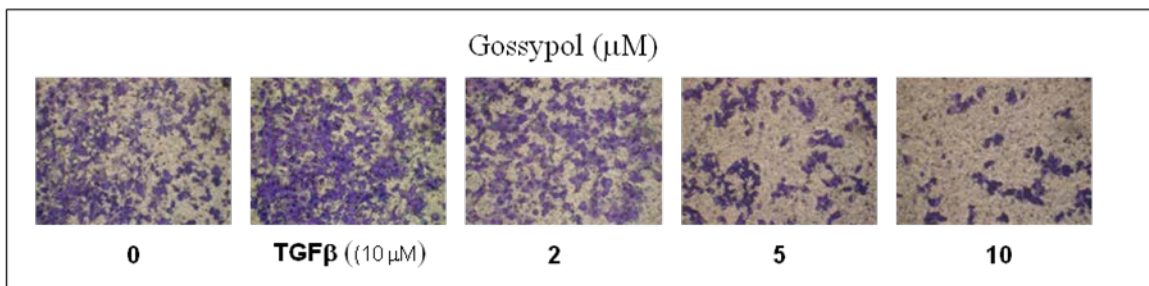
A549

Invasion



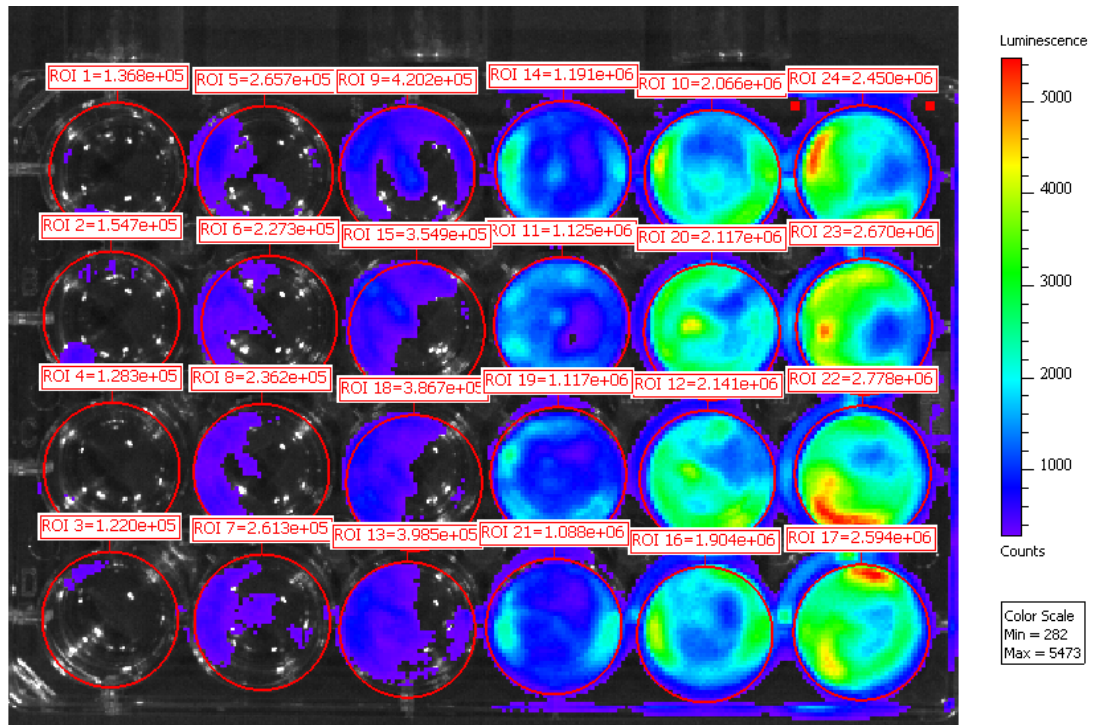
H1299

Invasion

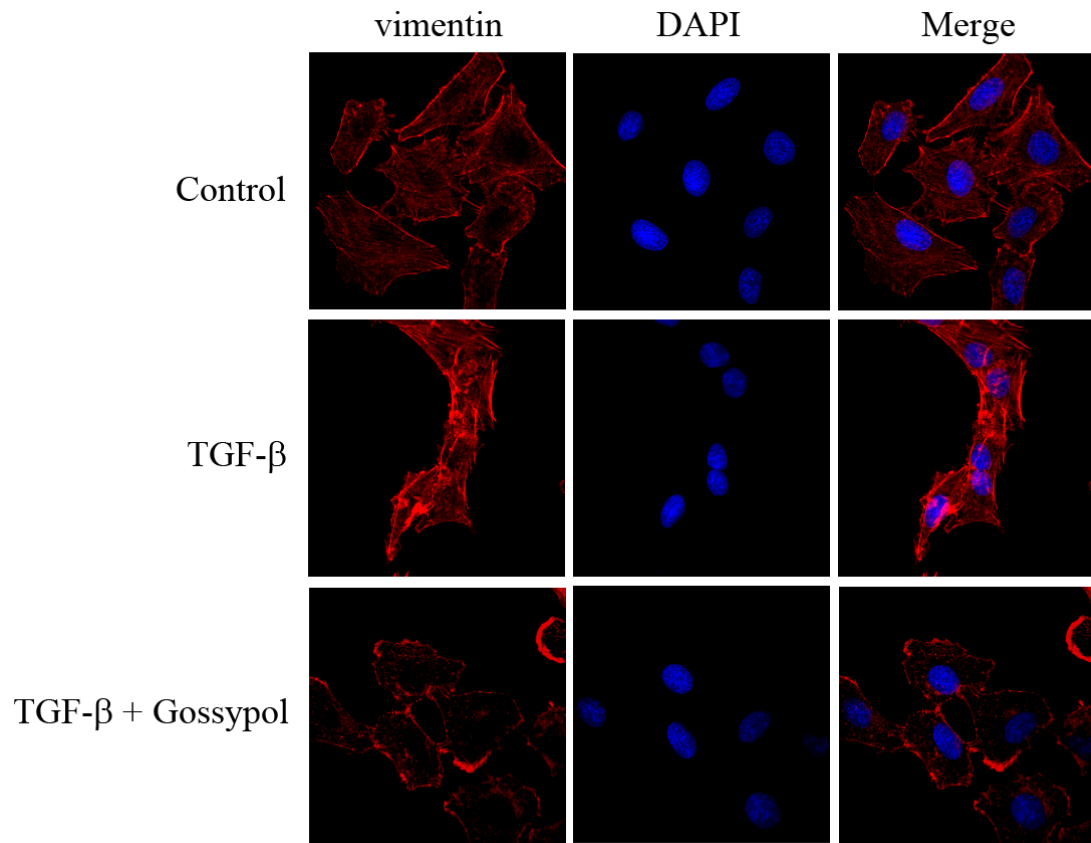


**Fig.25 Effects of gossypol with or without TGF-β1-induced on cell invasion.** A549 and H1299 cells were treated gossypol for 24 hours and co-stimulated with TGF-β1

(10ng/mL), then assessed cell invasion by Boyden chamber invasion assay.

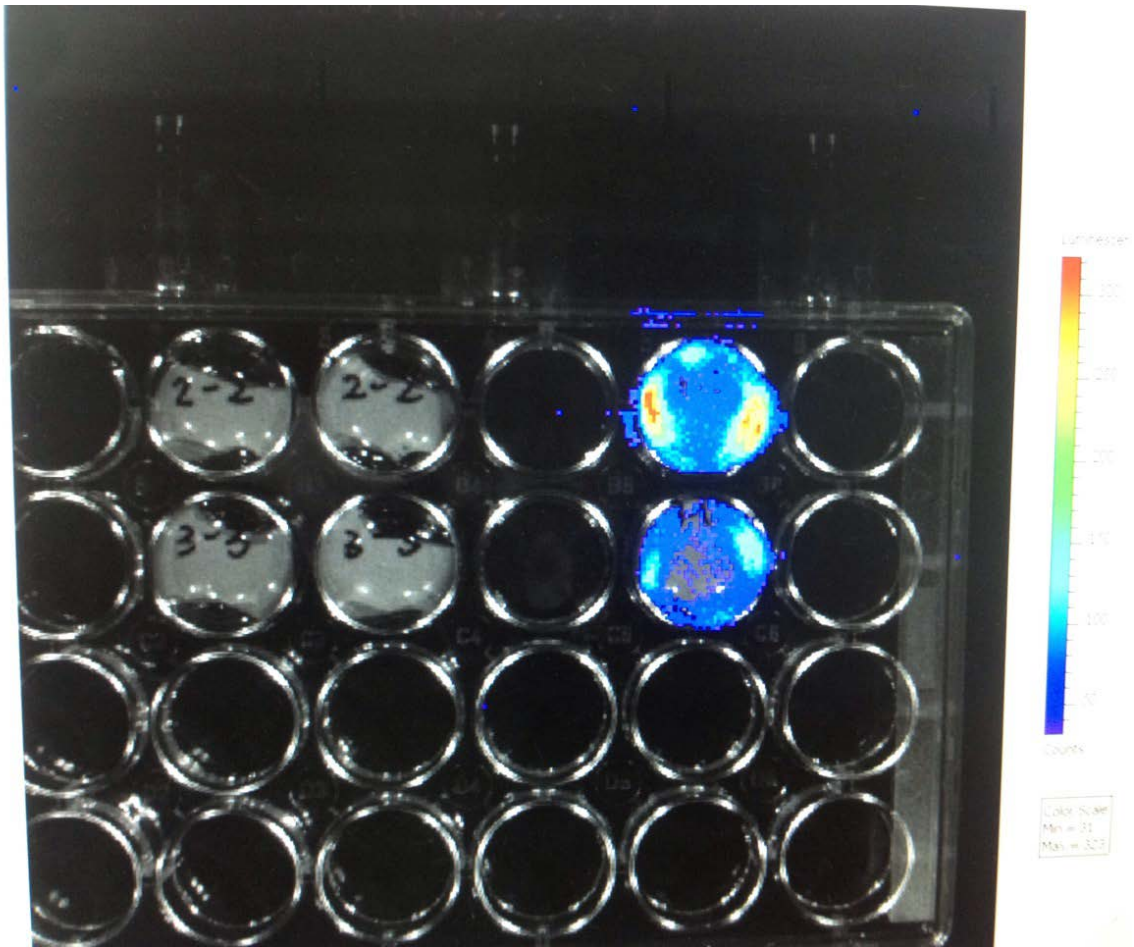


**Fig 26.** Measurement of luciferase activity using the IVIS. A bacterial expression vector with the pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] was transformed into A549 cells to produce the pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] protein. Luciferase activity in A549 cells was externally detected and quantified using a sensitive light imaging system.



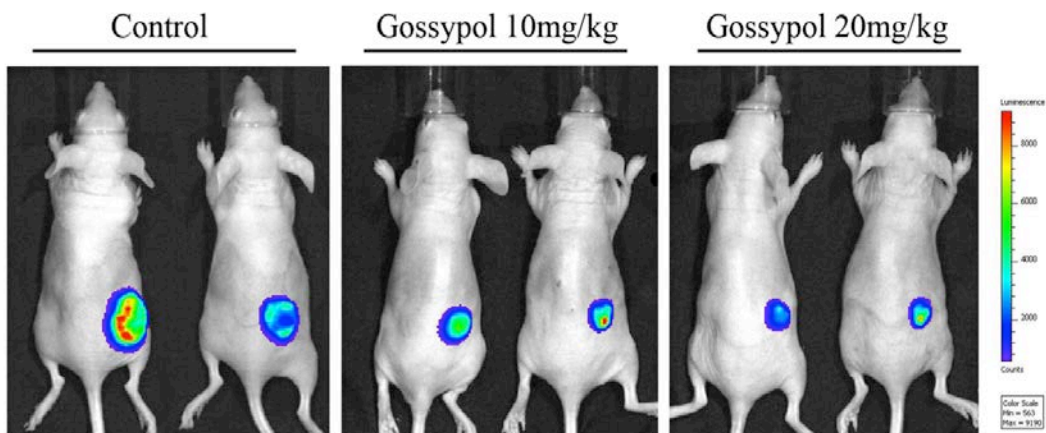
**Fig 27. Effects of gossypol with or without TGF-β1-induced on vimentin expression.** A549 cell was treated gossypol for 48 hours and co-stimulated with TGF-β1 (10 ng/mL), then assessed immunofluorescence images for vimentin and DAPI.





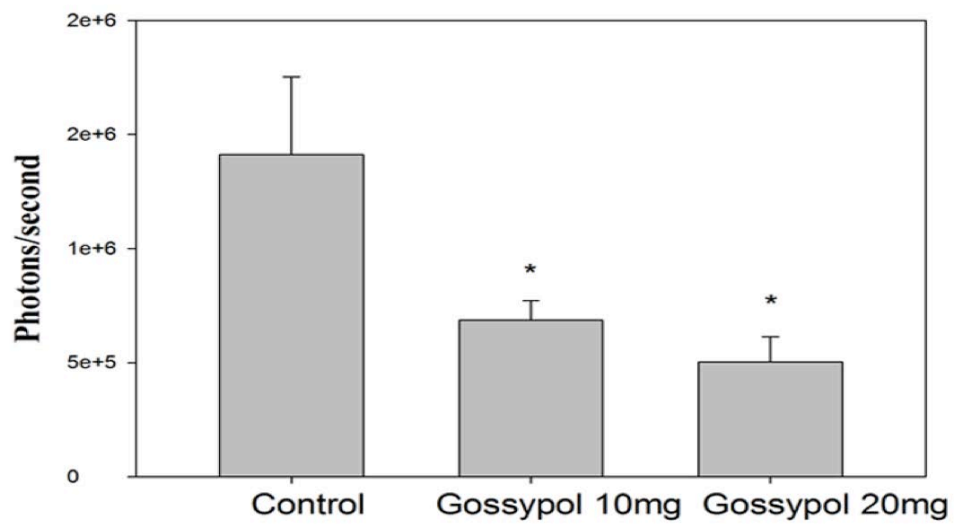
**Fig 28.** Measurement of luciferase activity using the IVIS. A bacterial expression vector with the pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] was transformed into SiHa cells to produce the pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] protein. Luciferase activity in SiHa cells was externally detected and quantified using a sensitive light imaging system.

A





B



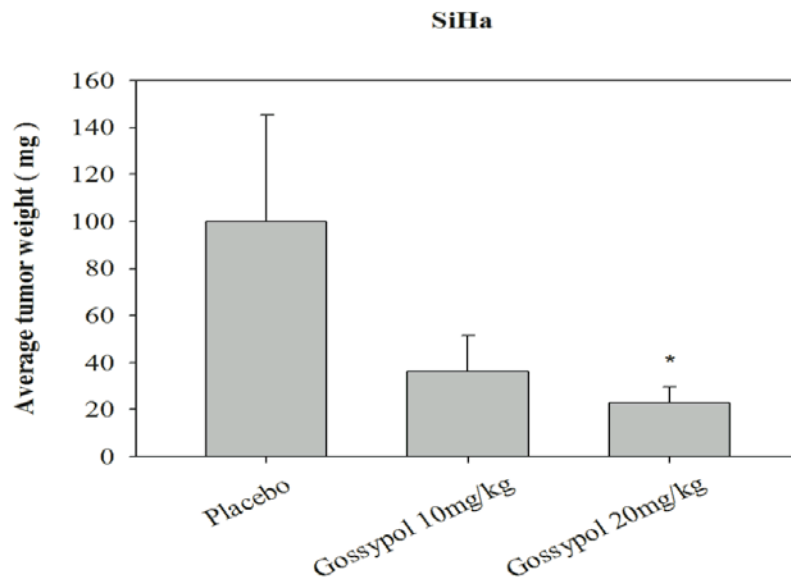
**Fig 29.** SiHa cells were transplanted subcutaneously into the front axilla of the BALB/c nude mice. (A) Bioluminescence IVIS images of luciferase-expressing SiHa cells, and (B) Quantify graph, \*  $P < 0.05$ ,  $n = 3$  independent experiments.

A

Placebo      10 mg/kg      20 mg/kg

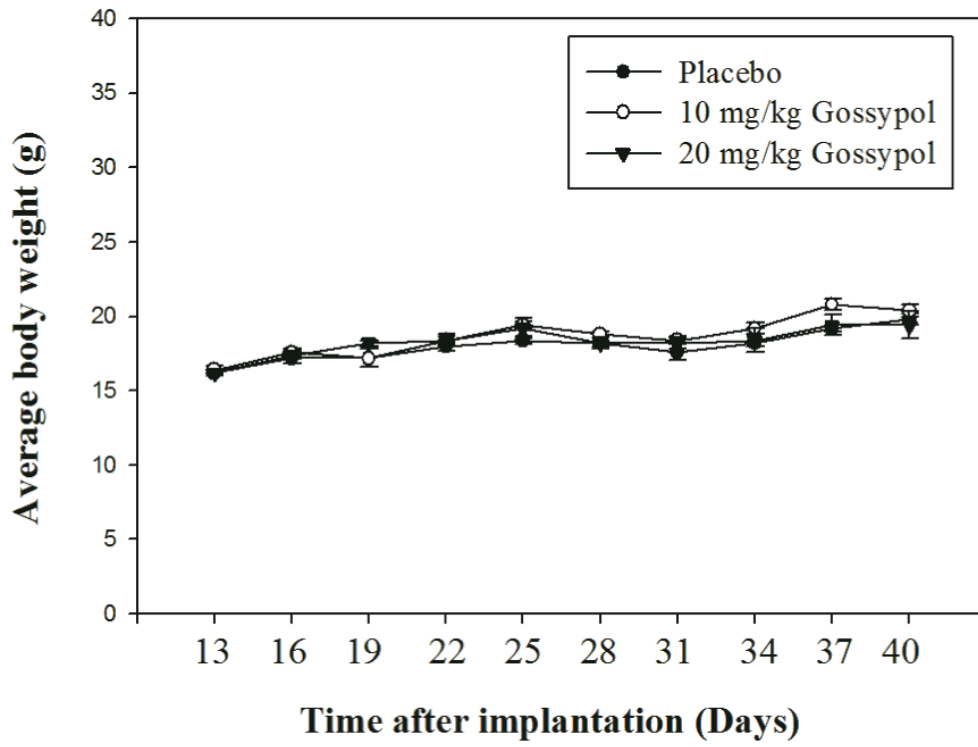


B

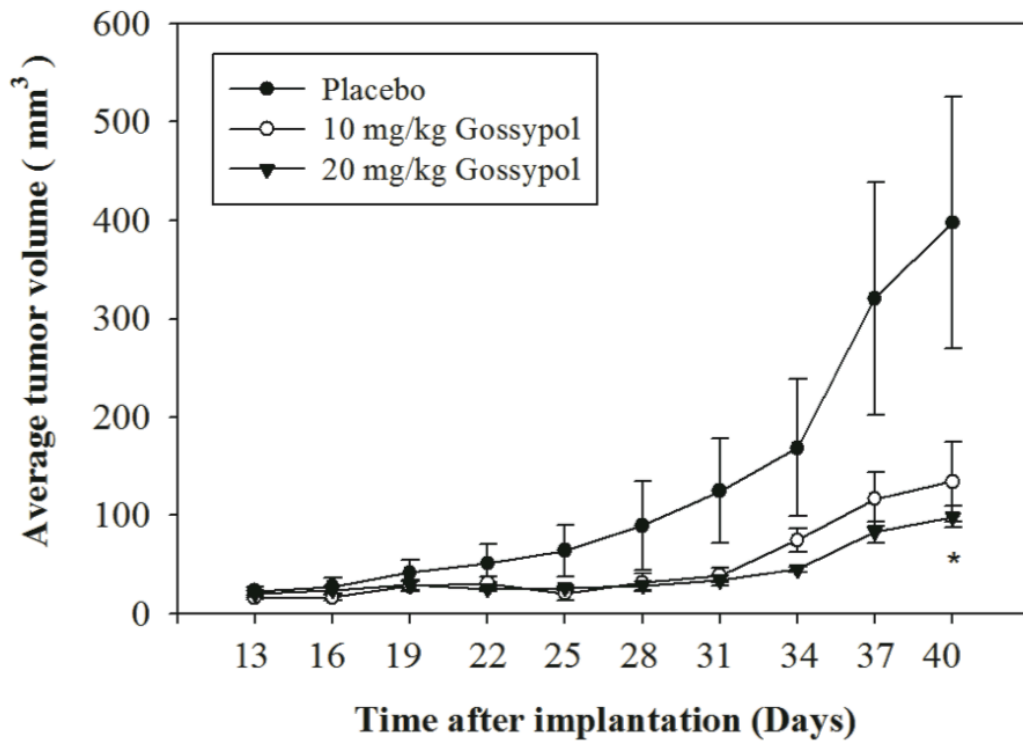


**Fig.30** Effects of Gossypol on tumor growth in vivo. (A)After 43 days, mice were sacrificed and then removed the tumor from mice. (B) The average tumor weight Statistics by three different tumors. \*  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ .

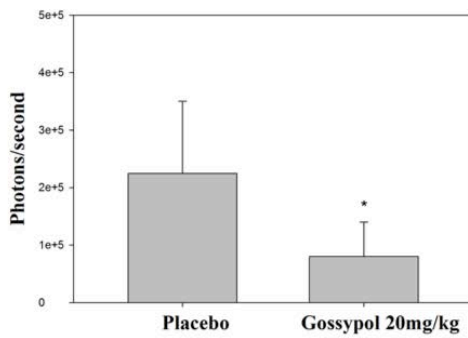
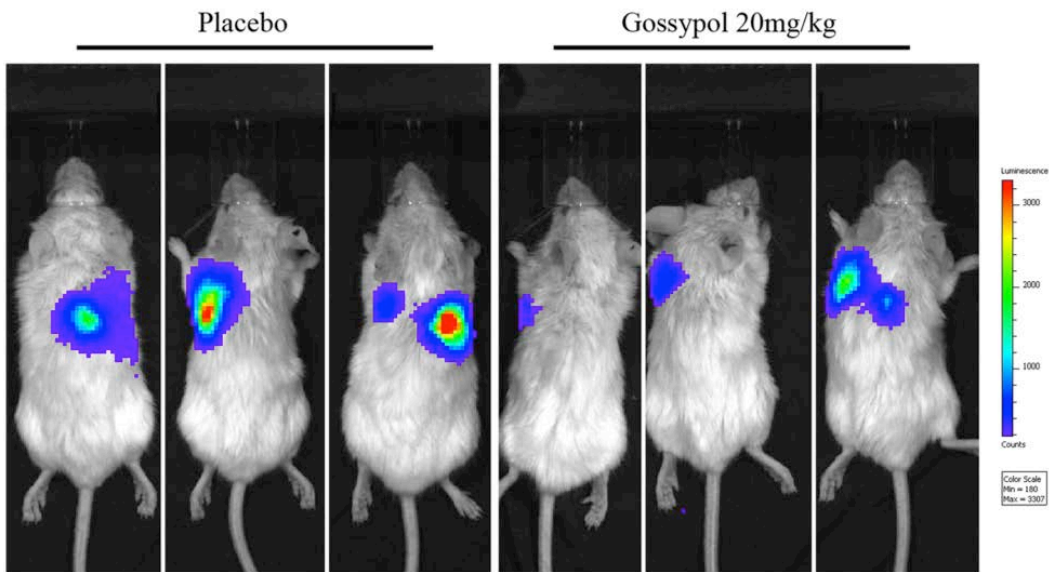
A



B

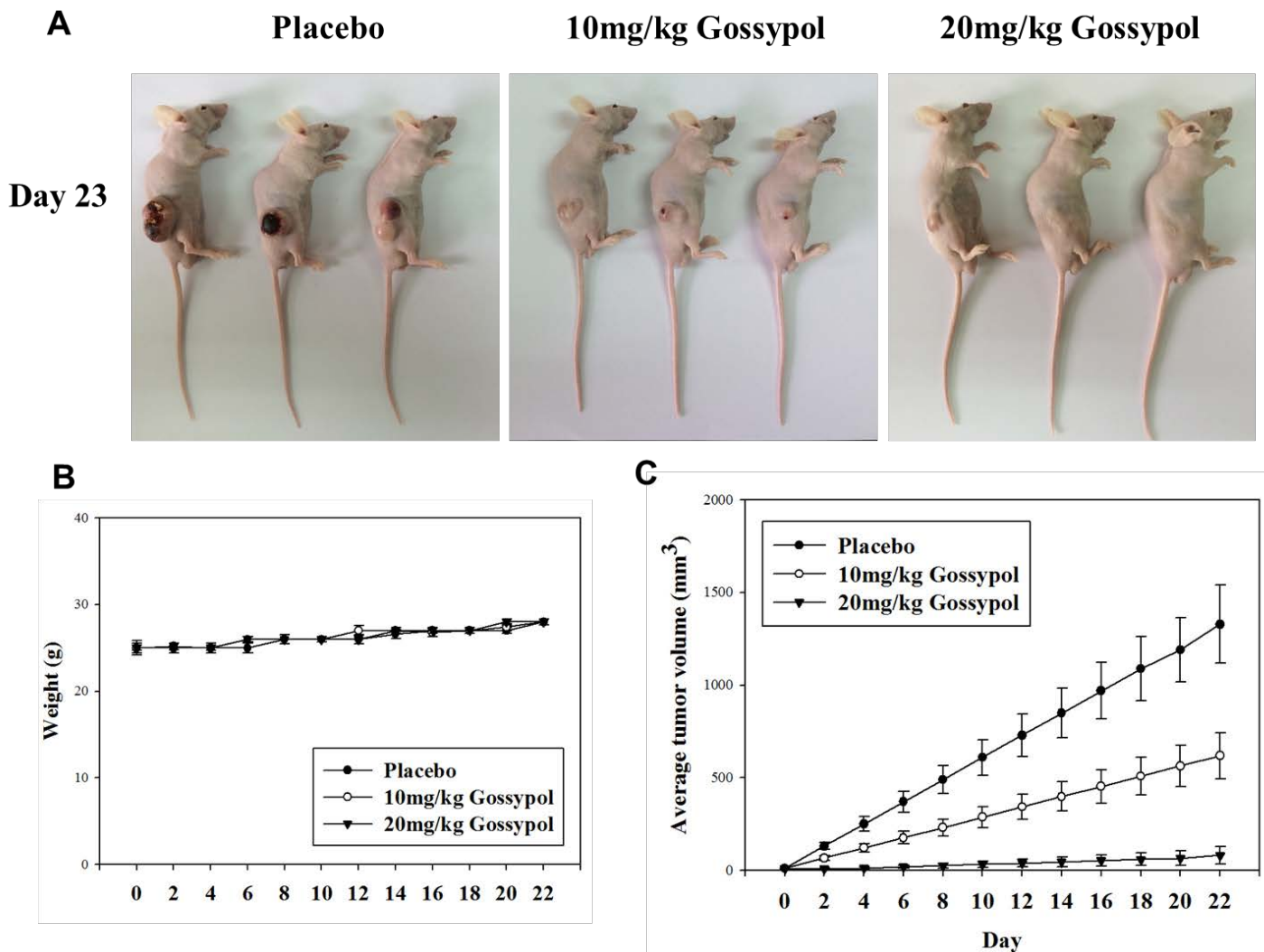


**Fig. 31** Effects of Gossypol in average body weight and average tumor volume. (A) Human SiHa xenografts were established by subcutaneous injection of  $8 \times 10^6$  in 0.1 mL of PBS into the backs of nude mice. After the tumors achieved  $50 \text{ mm}^3$ , the mice (five animals per group) were fed by oral gavage with Gossypol suspended in water given it daily. (B) Tumor growth was significantly reduced in mice treated with Gossypol for 43 days as compared with Placbo.

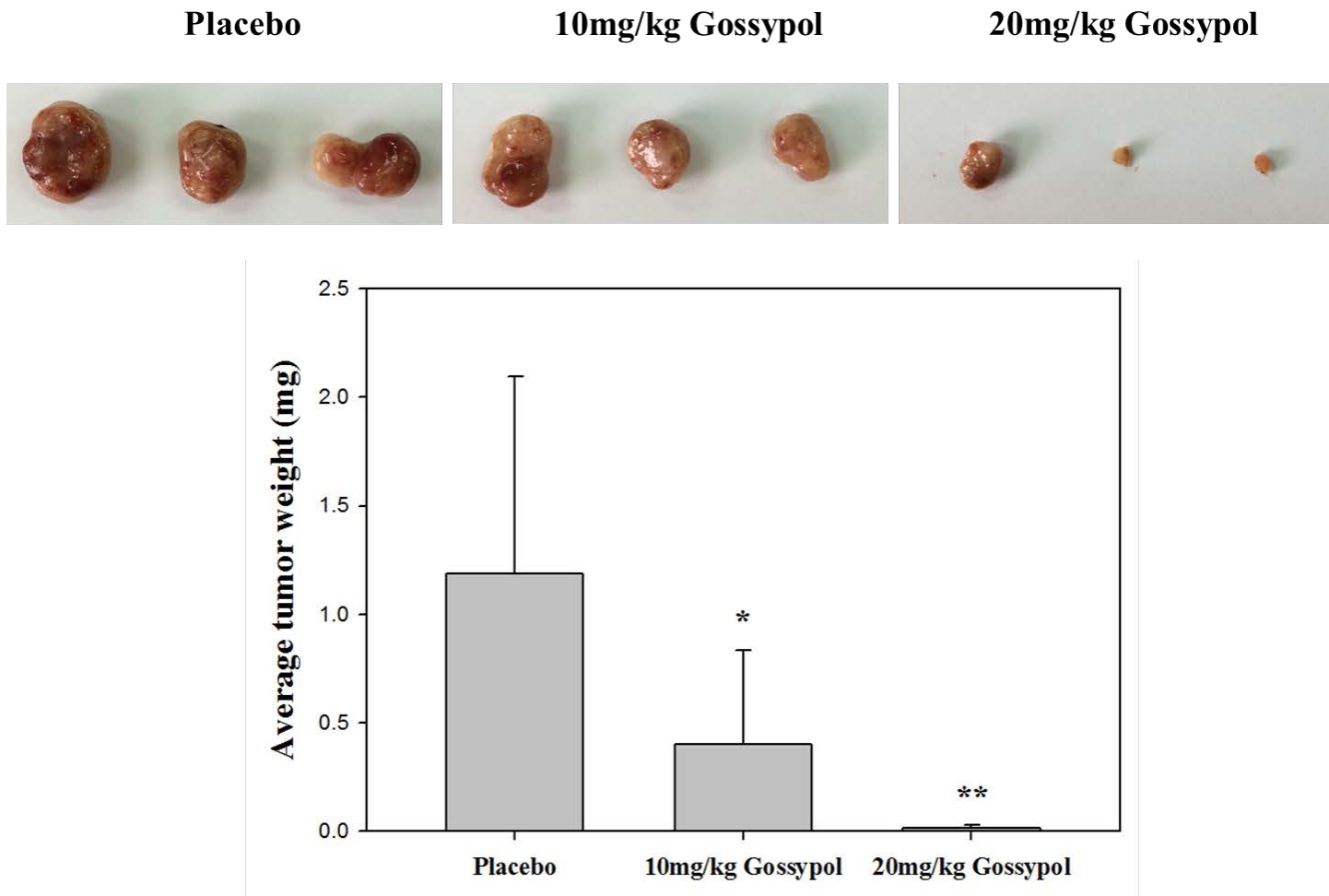


**Fig 32.** Suppression of lung metastasis on SiHa cell by Gossypol. SiHa Bioluminescence over time after tail vein injected with IVIS image of luciferase-expressing SiHa cells. SiHa cells were injected into the tail veins of 4- week-old female immuno-deficient scid mice ( *C.B17/IcrPrkdc<sup>SCID</sup>/CrI Nar1* ). After injection of

SiHa cells, Gossypol ( 20mg/kg/day ) and Placebo alone were administered oral gavage for 131 days. After 133 days, mice were sacrificed and then removed the lung from mice.



**Fig 33.** Effects of Gossypol on A549 tumor growth in vivo. (A) morphology of mice. (B) The average mice body weight (C) The average tumor volume.



**Fig 34.** A549 cells were transplanted subcutaneously into the front axilla of the BALB/c nude mice. (A)After 22 days, mice were sacrificed and then removed the tumor from mice. (B) The average tumor weight Statistics by three different tumors. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .  $n = 3$ .

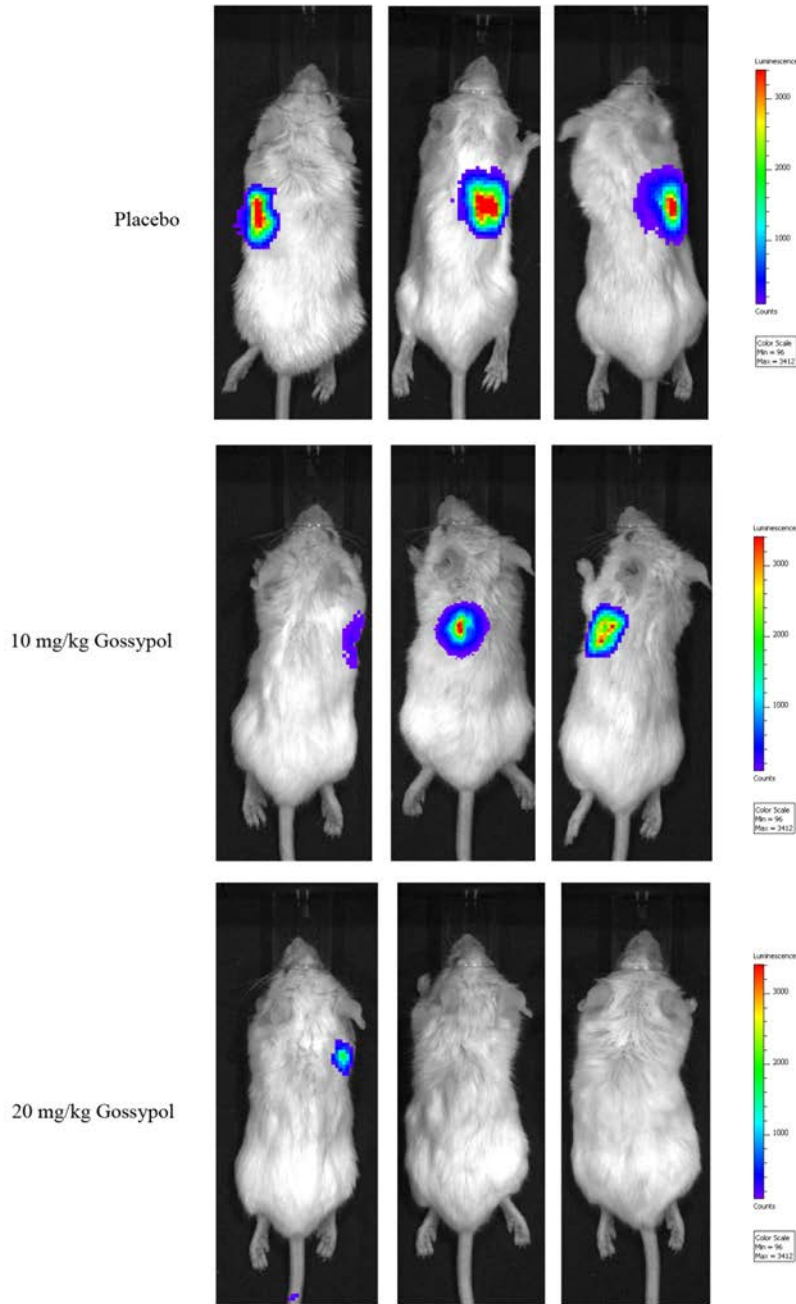


Fig 35. Suppression of lung metastasis on A549 cell by Gossypol. A549 Bioluminescence over time after tail vein injected with IVIS image of luciferase-expressing SiHa cells. A549 cells were injected into the tail veins of 4- week-old female immuno-deficient scid mice ( C.B17/IcrPrkdc<sup>SCID</sup>/CrI Narl ). After injection of A549 cells, Gossypol ( 10mg/kg/day and 20mg/kg/day ) and Placebo alone were administered oral gavage.

## 5、計畫成果及自評

目前已達成計畫中預期之進度：完成分析 gossypol 對子宮頸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 gossypol 抑制 SiHa 及 HeLa 子宮頸癌細胞與肺癌 A549 及 H1299 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。關於探討棉酚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棉酚具有抑制癌細胞轉移的功效及應用性。

## References

- [1] Ostor AG, Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review, *Int J Gynecol Pathol.* 1993; 12: 186-192.
- [2] Cox G, Jones JL, Walker RA, Steward WP, O'Byrne KJ, Angiogenesis and non-small cell lung cancer, *Lung Cancer.* 2000; 27: 81-100.
- [3] Rintoul RC, Sethi T, The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer, *Lancet Oncol.* 2001; 2: 437-442.
- [4] Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, et al., Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production, *FASEB J.* 2001; 15: 1953-1962.
- [5] Liu N, Xu Y, Sun JT, Su J, Xiang XY, Yi HW, et al., The BH3 mimetic S1 induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells although it activates autophagy, *Oncol Rep.* 2013; 30: 2677-2684.
- [6] de Herrerros AG, Peiro S, Nassour M, Savagner P, Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression, *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010; 15: 135-147.
- [7] Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D, Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis, *Minerva Chir.* 2009; 64: 489-500.
- [8] Pang X, Yi Z, Zhang X, Sung B, Qu W, Lian X, et al., Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid inhibits prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis, *Cancer Res.* 2009; 69: 5893-5900.
- [9] Folkman J, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 4-6.
- [10] Harada H, Kizaka-Kondoh S, Li G, Itasaka S, Shibuya K, Inoue M, et al., Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance, *Oncogene.* 2007; 26: 7508-7516.
- [11] Polsky B, Segal SJ, Baron PA, Gold JW, Ueno H, Armstrong D, Inactivation of human immunodeficiency virus in vitro by gossypol, *Contraception.* 1989; 39: 579-587.
- [12] Teng CS, Gossypol-induced apoptotic DNA fragmentation correlates with inhibited protein kinase C activity in spermatocytes, *Contraception.* 1995; 52: 389-395.
- [13] Xiao DM, Zhou WH, Zhang YH, Wang XL, Zhu B, Zhang JB, et al., [Comparison between the effects of (-)- and (+)-gossypol on protein kinase C and protein kinase A], *Yao Xue Xue Bao.* 1993; 28: 494-498.
- [14] Volate SR, Kawasaki BT, Hurt EM, Milner JA, Kim YS, White J, et al., Gossypol induces apoptosis by activating p53 in prostate cancer cells and prostate tumor-initiating cells, *Mol Cancer Ther.* 2010; 9: 461-470.
- [15] Huang YW, Wang LS, Dowd MK, Wan PJ, Lin YC, (-)-Gossypol reduces invasiveness in metastatic prostate cancer cells, *Anticancer Res.* 2009; 29: 2179-2188.
- [16] Wang J, Jin L, Li X, Deng H, Chen Y, Lian Q, et al., Gossypol induces apoptosis in ovarian cancer cells through oxidative stress, *Mol Biosyst.* 2013; 9: 1489-1497.
- [17] Flack MR, Pyle RG, Mullen NM, Lorenzo B, Wu YW, Knazek RA, et al., Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer, *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76: 1019-1024.

103年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：謝易修			計畫編號：103-2313-B-040-003-MY3				
計畫名稱：棉酚抑制肺癌及子宮頸癌細胞之上皮-間質轉化、侵襲轉移與血管新生作用表現機制之相關研究							
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	培養兩位大專生臨時工
		碩士生	2		培養兩位碩士級臨時工
		博士生	1		培養一位博士後研究員
		博士後研究員	0		
		專任助理	2		培養兩位碩士及專任助理
	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。)					

## 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）

論文已整理並投稿等待文章被接受

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：完成棉酚對子宮頸癌及肺癌存活以及侵襲轉移的抑制效果，並進一步針對肺癌及子宮頸癌細胞進行相關研究。上述之實驗結果，目前棉酚抑制SiHa子宮頸癌與A549肺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。關於探討棉酚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棉酚具有抑制血管新生的功效及應用性。

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）