



中國醫藥大學
生物科技學系碩士班
碩士學位論文

尋找 LYF-17 標的蛋白及其影響 microRNAs
表現之研究

A study on the target proteins and microRNAs expression
profiles of LYF-17

指導教授：魏宗德 博士

研究生：吳佳真

中華民國九十八年七月

總目錄

總目錄.....	I
表目錄.....	III
圖目錄.....	IV
縮寫表.....	VI
誌謝.....	VIII
主題一：利用化學蛋白質體學研究 LYF-17 抑制人類乳癌細胞株 MDA-MB-435 增生標的蛋白	
目錄(一).....	X
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 前言.....	3
第二章 材料與方法.....	17
第三章 研究結果.....	32
第四章 討論.....	34
第五章 結論.....	36

主題二：LYF-17 藉由誘導 miR-200c 和 miR-141 的表現抑制人類乳癌細胞
胞上皮-間質轉化

目錄(二).....	XII
中文摘要.....	39
英文摘要.....	40
第一章 前言.....	41
第二章 材料與方法.....	53
第三章 研究結果.....	70
第四章 討論.....	76
第五章 結論.....	79
參考文獻.....	96

表目錄

主題一：利用化學蛋白質體學研究 LYF-17 抑制人類乳癌細胞株
MDA-MB-435 增生標的蛋白

表 1-1：新藥研發、臨床試驗及上市審查流程、IND (Investigational New
Drug) 試驗中新藥、NDA (New Drug Application) 新藥上市審查申請.....4

表 1-2、LYF-17 與其他臨床用藥測試癌細胞以及正常細胞的 IC50 濃度...16

表 1-3、LYF-17 的標的蛋白.....38

主題二：LYF-17 藉由誘導 miR-200c 和 miR-141 的表現抑制人類乳癌細
胞上皮-間質轉化

表 2-1、上皮細胞與間質細胞的差異性.....47

表 2-2、EMT 的相關標記.....50

表 2-3、LYF-17 與其他臨床用藥測試癌細胞以及正常細胞的 IC50 濃度...52

圖目錄

主題一：利用化學蛋白質體學研究 LYF-17 抑制人類乳癌細胞株
MDA-MB-435 增生標的蛋白

圖 1-1:先導藥物開發流程.....	5
圖 1-2:LYF-17 結構式以及分子量.....	7
圖 1-3:台灣地區民國 97 年十大死亡原因.....	10
圖 1-4:台灣地區歷年惡性腫瘤死亡率與死亡人數趨勢圖.....	10
圖 1-5:蛋白質體學之研究範疇.....	12
圖 1-6:台灣地區 97 年癌症死亡率.....	16
圖 1-7:細胞計數盤.....	22
圖 1-8:二維電泳結果.....	37

主題二：LYF-17 藉由誘導 miR-200c 和 miR-141 的表現抑制人類乳癌細胞
上皮-間質轉化

圖 2-1: microRNA 在生物體內所扮演的調控角色.....	44
圖 2-2: 上皮細胞轉型成間質細胞的過程.....	46
圖 2-3: 調節 EMT 的相關蛋白因子.....	48
圖 2-4: 台灣地區 97 年癌症死亡率.....	52
圖 2-5: 細胞計數盤.....	58

圖 2-6:LYF-17 影響 microRNAs 表現量的結果.....	80
圖 2-7:以西方墨點法評估 EMT 相關蛋白表現量之變化.....	83
圖 2-8:LYF-17 對乳癌細胞遷移影響(Wound-healing assay).....	85
圖 2-9:以 Transwell 評估 LYF-17 對乳癌細胞侵入性的影響.....	86
圖 2-10:LYF-17 對人類乳癌細胞形態的影響.....	88
圖 2-11:以 Transwell 探討人類乳癌細胞轉染 microRNA inhibitor 對細胞 侵入性的影響.....	89
圖 2-12:以動物實驗來探討 LYF-17 對腫瘤轉移的影響.....	92



縮寫表

2-DE : Two-Dimensional Gel Electrophoresis

2-PN : 2-phenylnaphthyridin-4-ones

APS : Ammonium persulphate

ACN : Acetonitrile

BSA : Bovine serum albumin

DTT : 1,4-Dithiothreitol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture
F-12(Ham) (1:1)

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EMT : Epithelial to mesenchymal transition

EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid

ECL : Enhanced chemiluminescence

FBS : Fetal Bovine Serum

IAA : Iodoacetamide

ITP : Inhibition of tubulin polymerization

ICB : Inhibition of colchicines binding

LC/MS-MS : Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer

MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight

MTT : 3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

PBS : Phosphate buffer saline

PVDF : Polyvinylidene difluoride

PI : Isoelectric point

SDS : Sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

TGF β 2 : Transforming growth factor- β 2

TBST : Tris-Buffered Saline Tween-20

TEMED : N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine

Tris : Tris(hydroxymethyl) aminomethane

TCA : Trichloroacetic acid

TE : Trypsin-EDTA

ZEB1 : Zinc finger E-box binding homeobox 1

誌謝

充實的研究所生涯，終於告一段落，雖然辛苦但是值得，最後也擁有一個快樂的結局。回想這兩年一路走來，做了些什麼？學到了些什麼？成長進步多少？答案是：做了不少，學到更多，成長進步呈現正向爬升趨勢。

而我能夠擁有這麼大的收穫，這一切都要感謝許多人的提攜與幫助。首先衷心感謝恩師 魏宗德 老師在實驗過程中細心指導，總是不厭其煩的教導我做事情的正確觀念，您的督促與諄諄教誨，讓我受益匪淺。此外，承蒙口試委員 郭盛助 老師、高銘欽 老師、高振益 老師、陳威仁 老師在百忙之中撥冗指教並提供寶貴意見，使論文更趨完善，在此謹呈誠摯之謝意。

特別要感謝系上每一位老師對我們在課業、實驗及生活上的指導及教誨，以及第一屆系上畢業的學長姐留下來的學習經驗傳承，加上第二屆生物科技研究所的全體同學，彼此間的相互照應和照顧，都給予我很大的幫助。另外也要感謝蛋白質體學中心的欣儀 學姐、姸欣 學姐、玉晴 學姐，在質譜儀方面的大力幫忙；感謝貴重儀器室戴如淳 組長在儀器與相關技術方面訊息的大力相助；感謝中興大學濟鴻 學長在動物實驗方面的幫助；感謝傑文 學長在拍transwell方面的協助；感謝同學俊賢 出借冷光儀；感謝蔡士彰 老師以及同學聖峯 在microRNAs實驗方面的大力協助。

同時我也要感謝魏家實驗室的助理群薇至姐姐、范姐、卉瑩學姐、思樺學姐，不管在儀器上的操作或是實驗操作上的技巧，都提供資助幫助我實驗順利進行，此外，實驗室的學弟學妹群嘉群、昆謀、尚杰、宜禎、威鴻、清彤、詩婷、育彥、宸旻、俊宏、佳君、苧博及其他實驗室成員，有他們在實驗室的一天，充滿歡笑之餘，會更讓人實驗進行無後顧之憂，可以衝衝衝！

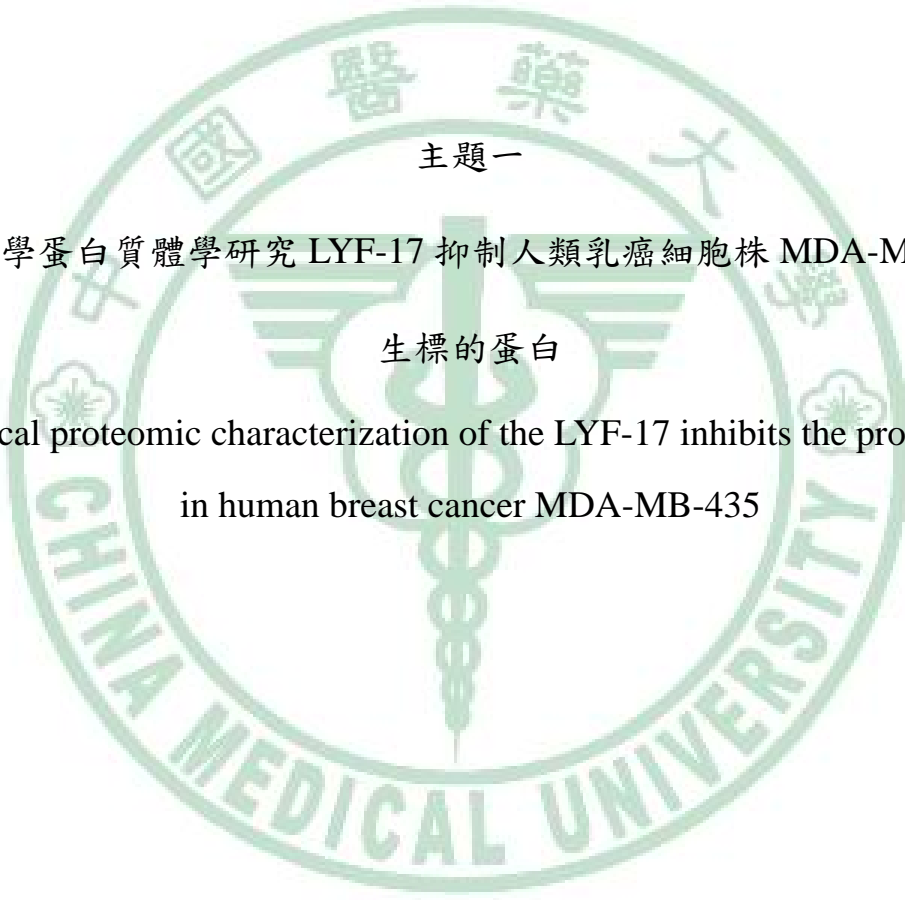
還有我的朋友們：欣珏、書甄、佳利、雅宏、JGB的全體成員等等，感謝各位充實我的碩士生活，並不吝給我幫助、鼓勵與關懷，支持我要堅持理想。

最後，感謝我最愛的家人，爸爸、媽媽、弟弟、爺爺、奶奶...等，有你們全力的支持，讓我研究所兩年完全沒有後顧之憂。要感謝的人非常多，不管是家人、戰友、街友、摯友、飯友、知心好友等等，真的非常感謝您們出現在我的生涯當中，並且大力的支持與幫助。此論文有你們的支持才得以完成，願你們一起分享這份喜悅及成果。

吳佳真謹致於

中國醫藥大學 生物科技學系研究所

中華民國九十八年七月



主題一

利用化學蛋白質體學研究 LYF-17 抑制人類乳癌細胞株 MDA-MB-435 增

生標的蛋白

Chemical proteomic characterization of the LYF-17 inhibits the proliferation
in human breast cancer MDA-MB-435

目錄(一)

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 前言.....	3
第一節 新藥開發.....	3
第二節 LYF-17 藥物介紹.....	6
第三節 癌症的探討.....	8
第四節 蛋白質體學.....	11
壹、 概述.....	11
貳、 蛋白質體學的發展及應用.....	12
參、 蛋白質二維凝膠電泳.....	13
肆、 質譜儀.....	14
第五節 研究目的.....	15
第二章 材料與方法.....	17
第一節 實驗材料.....	17
壹、 細胞株.....	17
貳、 實驗藥物(LYF-17)來源.....	17
參、 藥品試劑.....	17
肆、 主要器材儀器.....	18

第二節 實驗方法.....	20
壹、 細胞株培養與繼代.....	20
貳、 冷凍細胞活化.....	20
參、 細胞冷凍保存.....	21
肆、 細胞計數.....	22
伍、 細胞存活率分析.....	23
陸、 細胞總蛋白收集與定量.....	24
柒、 二維膠體電泳.....	25
第三章 研究結果.....	32
第一節 LYF-17 對MDA-MB-435 細胞株的半數抑制濃度(IC ₅₀).....	32
第二節 利用化學蛋白質體學的方法找出 LYF-17 的標的蛋白(target protein).....	32
第四章 討論.....	34
第五章 結論.....	36

中文摘要

LYF-17 屬於 2-PN 的延伸化合藥物，這類藥物在之前的文獻報導中發現可以抑制微管聚合等功用。

化學蛋白質體學可以被用來確認生物體的標的蛋白並且應用它們於藥物的發現及發展。在此我們利用相關的完善技術與方法去快速地確認藥物的標的蛋白，以及探討藥物的發展。在生物體訊息路徑中，蛋白質與 LYF-17 的互相影響是一個重要的關鍵點，LYF-17 的加入會影響到許多不同的重要蛋白質。因此，我們利用色層分析法、二維電泳以及質譜儀來確認 LYF-17 在人類乳癌細胞株 MDA-MB-435 中會影響到那些標的蛋白質。由我們的結果可以發現 LYF-17 的標的蛋白有：Protein disulfide isomerase family A member 3(PDIA3)、zinc finger protein、beta-site APP-cleaving enzyme 2(BACE2)、T cell receptor alpha(TCRA)、CD44、dysferlin、Ribosomal protein 及 Microtubule-associated protein 1B(MAP1B) 等。

關鍵字: LYF-17；化學蛋白質體學；色層分析法；二維電泳；質譜儀

Abstract

LYF-17 is a kind of 2-PN to spread out extends the thing. Many beneficial properties have been attributed to 2-PN, including inhibition of tubulin polymerization etc.

A fundamental goal of chemical proteomics is to identify target proteins for bioactive small molecules and then apply them to drug discovery and development as valid and druggable targets. Here, we introduce integrated technologies for the rapid identification of target proteins, methodologies for validating them as druggable targets, and applications of chemical proteomics in drug discovery and development. Protein interaction with LYF-17 is a critical step in the effects of LYF-17 on the regulation of various key proteins involved in signal transduction. We have identified a novel molecular target of LYF-17 using affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis, and mass spectrometry for protein identification. We found the spots of interest were identified as the Protein disulfide isomerase family A, member 3(PDIA3) ; zinc finger protein ; beta-site APP-cleaving enzyme 2(BACE2) ; T cell receptor alpha(TCRA) ; CD44 ; dysferlin ; Ribosomal protein and Microtubule-associated protein 1B (MAP1B).

Keywords: LYF-17 ; Chemical proteomic ; affinity chromatography ; two-dimensional electrophoresis ; mass spectrometry

第一章 前言

第一節 新藥開發

生物技術領域的應用範圍非常廣泛，其中最重要的應用之一是在新藥的開發方面。一個藥物的發展過程主要有兩個重要階段：(a)早期發展階段：確認藥物的標的蛋白質和尋找能改變目標(target)的藥物；(b)臨床試驗：需經廣泛並且昂貴的測試以及獲得政府機關的認同。

傳統上，大多數的藥物篩選，皆是透過直接觀察細胞或是動物經由投藥後的表現型態。許多知名的傳統藥物如嗎啡、阿斯匹靈及胰島素，雖然已使用多年，但其藥理的作用機制及其「藥物標的」(drug target) (如特定的接受器或是酵素)，亦是近年來才得以釐清。雖然目前已經確定的「藥物標的」數目仍然不多，然而，現代生命科學領域的快速進展，特別是人類基因體的定序計劃已完成，使得愈來愈多的「藥物標的」被推測、發現及證實。如何利用已知的、或大膽假設之「藥物標的」制定藥物篩選之策略，在近年來，已漸漸形成一門很專精的學問。反過來說，透過化合物之篩選及藥物的研發過程，也是驗證有潛力之「藥物標的」最有效且最具說服力的方法。

新藥開發需要長時間及大量資金的投入(Dickson and Gagnon, 2004)，是一個複雜但循序漸進、富於邏輯的過程，新藥的安全性、有效性必須最終經過臨床試驗加以證實(DiMasi et al., 2003) (表1-1)。新藥研

發中的非臨床研究部分包括藥物化學、藥理學、毒理學及藥物動力學等的研究結果，可以為該研究藥品的臨床使用，提供有效性和安全性的參考，且可提供第一次使用於人的安全初始劑量的依據。儘管如此，後續臨床研究的結果不如預期的現象，仍十分常見。進入臨床試驗的藥品，平均只有1/10 最後可以上市，所以，臨床試驗是新藥研發中不可或缺的一環。本篇實驗主要著重於發展的前期部分，尋找新藥標的和藥物安全性及生物活性的試驗。

表1-1：新藥研發、臨床試驗及上市審查流程、IND (Investigational New Drug) 試驗中新藥、NDA (New Drug Application) 新藥上市審查申請。

流程		目的	試驗樣本及數目
Drug discovery		尋找新藥標的	實驗室、細胞株及動物
Pretrial		安全性、生物活性試驗	實驗室及動物試驗
IND		FDA審查資料	
臨床 試驗	Phase I	安全性及劑量確認	20-80名健康志願者
	Phase II	有效性及副作用	100-300名病患志願者
	Phase III	有效性確認及長期使用反應監測	1000-3000名病患志願者
NDA		申請上市送FDA審查	
Phase IV		上市後長期安全性監視	

經由篩選的天然物或化學合成的有機化合物，或是因為觀察到藥物的副作用而發現先導化合物 (Lead compound) 是特定標的之新藥開發的第一步。而幾乎所有的藥物都是由先導藥物的產生，皆需要不同專業領域間的充分合作，如藥物學、生物化學、分子生物學、化學及工程等各

領域的整合(DiMasi et al., 2003) (圖1-1)。由於大多數先導化合物的生物活性不夠強、標的選擇性不佳、缺乏良好的藥物動力學性質---吸收、分佈、代謝與排泄 (ADME) 或是具有毒性，所以必須先經過先導化合物最佳化 (optimization) 的步驟，方能得到活性強、選擇性佳、具備良好藥物動力學性質且安全的候選藥物以供進一步的臨床試驗。

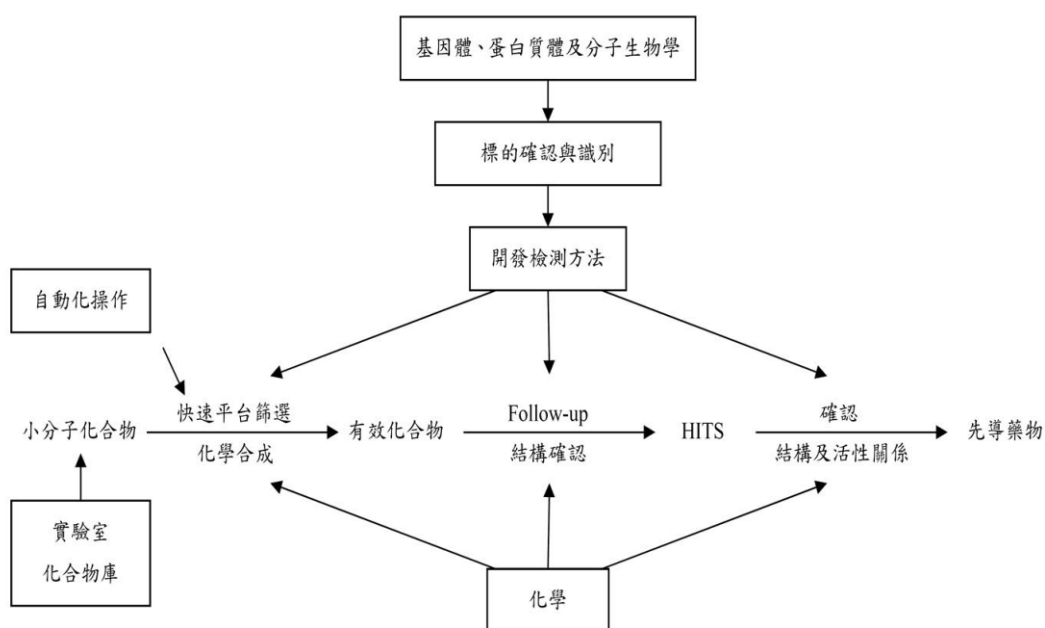
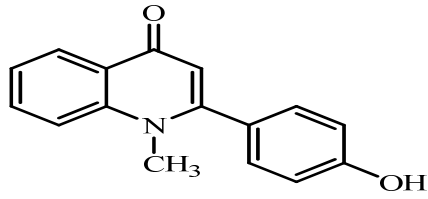


圖1-1：先導藥物開發流程。小分子化合物經由一系列利用基因體、蛋白質體、分子生物及化學方法，再進行篩選、修飾及確認過程後進而產生先導藥物。

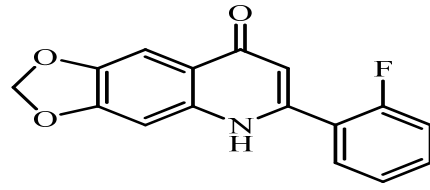
以現代生物技術進行藥物開發，首先面臨的問題是「藥物標的」之選擇與確認，而大多數的「藥物標的」是與疾病相關的蛋白質，很多藥物的藥理作用機制即在於調節「藥物標的」的生物活性；然而，亦有些藥物是藉由調節與疾病相關之基因表現的能力，而產生藥物治療的效果。

第二節 LYF-17 藥物介紹

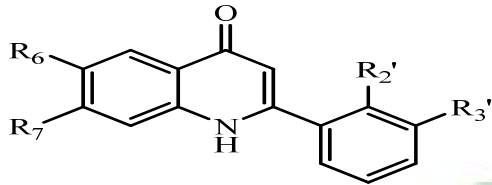
LYF-17 為本校藥化所郭盛助教授利用成大化學系吳天賞教授所分離出來的天然 reevesianine-A 為先導藥物(lead compound) ，並與美國北卡大學李國雄教授之研究團隊合作，設計並合成一系列 monosubstituted 2-phenyl-4-quinolone 類衍生物，經由細胞毒性測試 (cytotoxicity) 、微管聚合作用的抑制(inhibition of tubulin polymerization)及秋水仙鹼黏合的抑制(inhibition of colchicines binding)等測試，綜合這些測試以及委託美國 NCI 以 COMPARE program 方式探討結果得知其作用機轉與秋水仙鹼 (colchicine)相近，是一類化學結構新穎的 antimitotic agents，之後郭教授陸續合成了更多的類緣化合物，例如 multiple-substituted 2-phenylquinolin-4-ones (2-PQ)、2-phenylnaphthyridin-4-ones (2-PN)、2-phenylquinazolin-4-ones (2-PZ) 及 tetrahydro-2-phenylquinolin-4-ones (2-PQ-H2)等等，建立了這些化合物之化學結構與抗微管活性的關係。同時也發現不少化合物在 in vitro 試驗中呈現相當強的細胞致毒活性，頗具開發潛能，可以說創立了一類新型的 antimitotic agents，以下是 reevesianine-A、2-PQ、2-PN、2-PZ 及 2-PQ-H2 的結構。



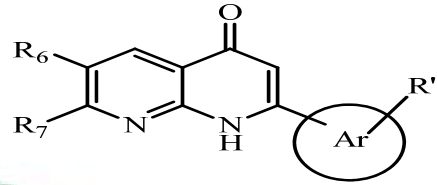
Reevesianine-A



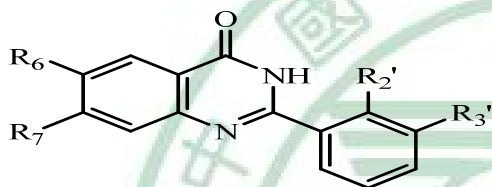
CHM-1



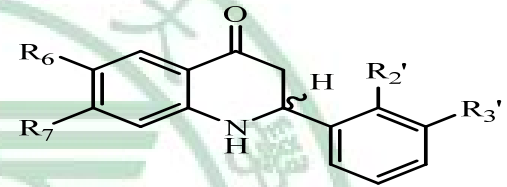
2-PQ



2-PN

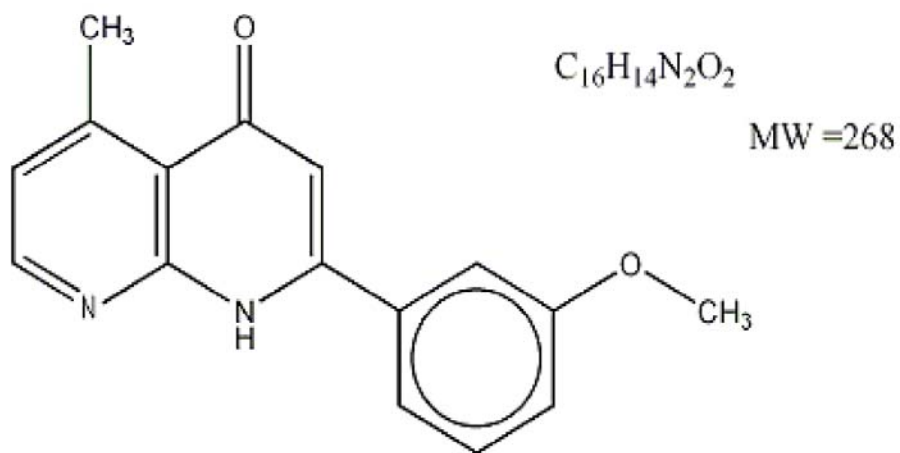


2-PZ



2-PQH₂

LYF-17 的結構式如圖 1-2，屬於 2-PN 的延伸化合藥物，也就是說 LYF-17 的先導藥物是 2-PN。



LYF-17

$C_{16}H_{14}N_2O_2$

MW = 268

圖 1-2：LYF-17 結構式以及分子量。

第三節 癌症的探討

癌症的形成原因非常複雜，為一多步驟過程。Hanahan及Weinberg歸納出六點參與癌症形成的重要轉變：(a)自我供給生長訊息(self-sufficiency)；(b)對於抑制細胞生長訊息的去敏感化(insensitivity to growth-inhibitory signal)；(c)躲避細胞程序性死亡(evasion of programmed death)；(d)去除對於生長能力的限制(limitless replicative potential)；(e)維持血管新生的能力(sustain angiogenesis)；(f)產生侵襲組織以及轉移至它處的能力(tissue invasion and metastasis)；癌細胞會藉由血管侵襲其他身體器官，造成遠處轉移、引起併發症(Hanahan and Weinberg, 2000)。

癌細胞的轉移在整個癌症的進程中佔有極重要的一環，癌細胞藉由蛋白酶來分解細胞間質並侵入周邊正常組織，穿透血管壁或淋巴管壁(intravasation)，隨著血流或淋巴液移行至遠處器官，再利用黏附因子與血管內皮產生黏附，利用蛋白酶穿透血管壁，侵入周邊正常組織，形成第二病灶。學者也指出當癌細胞產生移行時，integrin及玻尿酸接受器(hyaluronan receptor)-CD44所主導之黏附關係對腫瘤的生長及瀰漫扮演關鍵性的角色(Bartolazzi et al., 1994; Gunthert et al., 1991; Varner and Cheresch, 1996)。

癌症是一種非常複雜的疾病，基本上，癌症在型態上可分為兩大類：一大類是固體腫瘤，例如常見的肝癌、肺癌、乳癌等；另一類則是血液腫瘤，如白血病、多發性骨髓瘤等。而腫瘤的形成，是指細胞內的細胞核基因發生突變，使得細胞異常地增生，進而演變成腫瘤。腫瘤又可分為良性及惡性腫瘤，前者生長緩慢，與周圍組織界限分明，不會發生轉移，大致而言，對於人體健康危害較小；後者生長迅速，侵入血液或淋巴腺，並能藉此轉移至身體各部位，破壞正常器官的功能，妨礙身體的正常運作。

而近年來根據行政院衛生署統計，癌症一直是國人十大死因之首惡(圖1-3)(行政院衛生署, 2009)，每年約有三萬多人死於癌症，而每年新增的癌症病例也將近六萬人(圖1-4)(行政院衛生署, 2009)。癌症的發生目前還無法完全證實，可能是和各種環境因素、遺傳因子有關，或者是兩者交互作用所形成，儘管醫療技術已隨著現代科技發展而進步，但癌症仍是一個難以對抗的棘手疾病，因此當今世界上許多的科學家們都致力於癌症方面的研究。

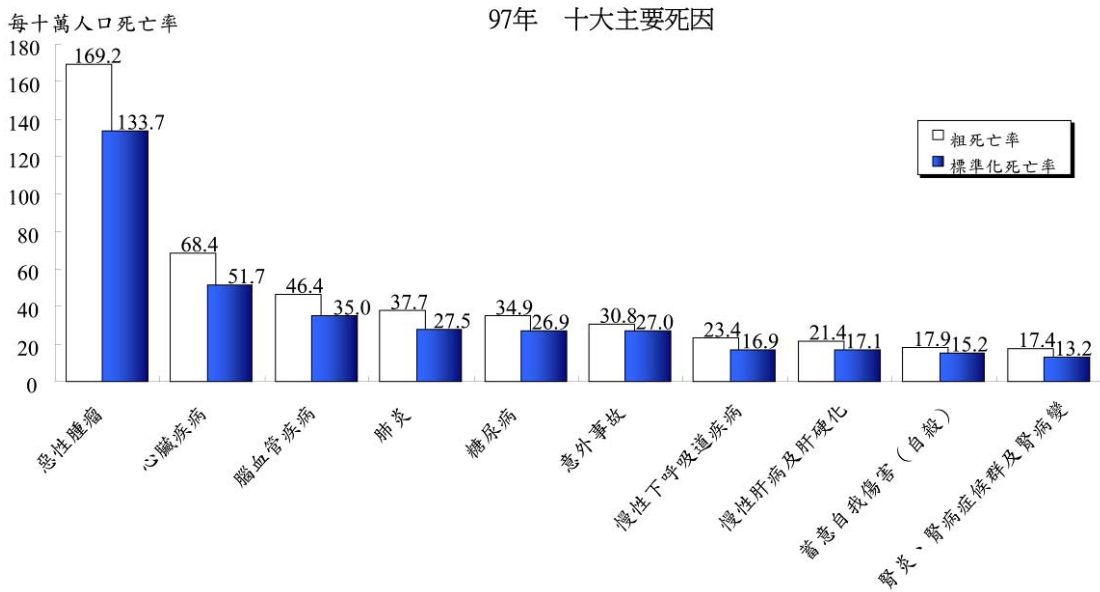


圖 1-3：台灣地區民國 97 年十大死亡原因。〈資料來源：行政院衛生署〉

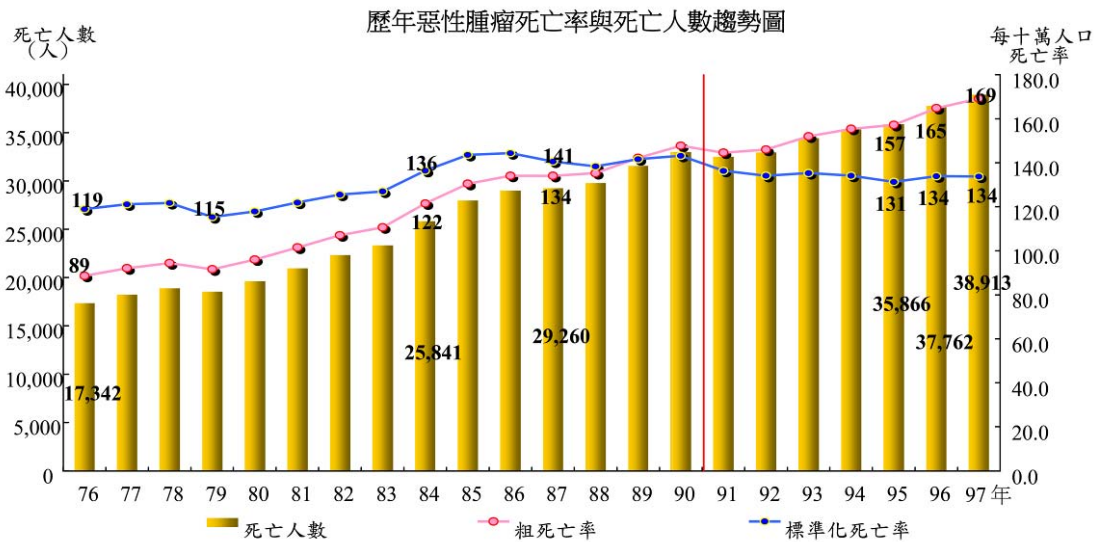


圖 1-4：台灣地區歷年惡性腫瘤死亡率與死亡人數趨勢圖。

〈資料來源：行政院衛生署〉

第四節 蛋白質體學

壹、概述

生物體內進行反應的單位以蛋白質為主，並非核酸，所以要了解生命的奧秘，首先就要對蛋白質有深入的了解。蛋白質體(proteome)這個集合名詞最早是在 1994 年的 Siena 二維電泳會議(Siena 2-D Electrophoresis Meeting, 1995)中，由威爾金斯(Marc Wilkins)及其同事首次提出，用來表達某生物中根據所有基因體所表現出來之所有蛋白質的集合總稱。蛋白質體學是研究多種蛋白質組成的系統，蛋白質體學的焦點，放在「系統」的行為，而不是「單一組成」的行為(Daniel, 2002)。

蛋白質體要比基因體複雜許多，舉例來說，人類約有 30,000 到 40,000 個基因，但經由轉錄後剪切及轉譯後修飾將可能產生數十萬種以上不同種類的蛋白質。此外，由於蛋白質本身扮演非常多層面的角色，其主要的概念意涵與研究內容亦隨之相當廣泛，包括：蛋白質身分鑑定、蛋白質之同形體(isoform)分析、蛋白質之修飾鑑定、蛋白質之動態表現量測定、蛋白質之大量表現、蛋白質之折疊立體結構、蛋白質與蛋白質間之交互作用、蛋白質與其他分子間之交互作用、蛋白質複合物之組合、蛋白質之生化活性、蛋白質之分佈位置等。正由於蛋白質具有多層面的基礎研究與應用價值，蛋白質體學研究之範疇可區分為許多次主題(圖 1-5)。

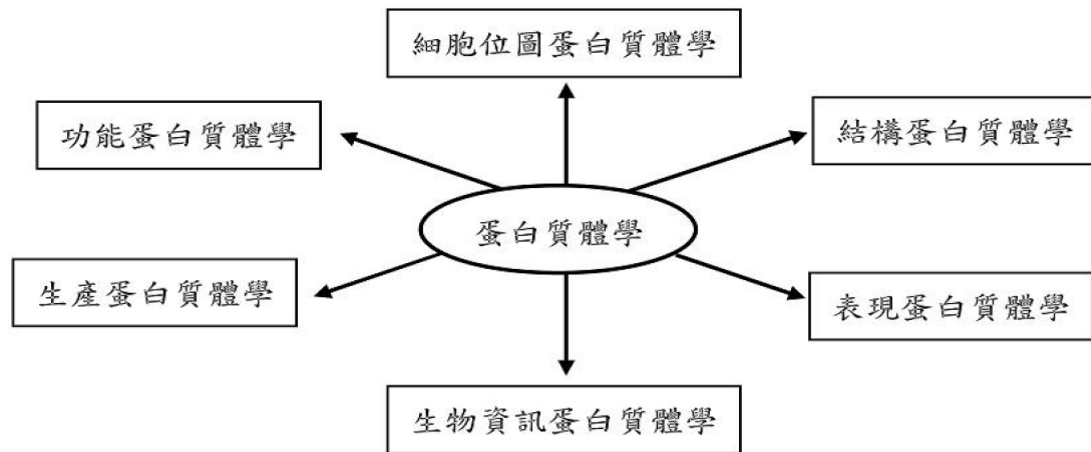


圖 1-5：蛋白質體學之研究範疇。

貳、蛋白質體學的發展及應用

質譜分析蛋白質技術以及電腦功能的不斷開發與創新，高效能鑑定蛋白質成為實際可行，而使得蛋白質體學能夠蓬勃發展，因而正式進入了「後基因體時代-蛋白質體學開始」的階段，為 21 世紀生物科技最主要的研究趨勢。

利用蛋白質體學技術能在短時間內大規模分析樣品內眾多蛋白質身份，日前已經有越來越多的研究人員開始將此技術利用於基礎及臨床醫學上。研究人員可從蛋白質體學角度來探討某兩種樣本之間(如發病組織與正常組織、腫瘤與非腫瘤、致病菌與非致病菌、處理同一藥物前後或處理不同藥物，或利用瓊脂糖凝膠(Sepharose)(接上親和性介質再接上藥物)其整體蛋白質表現之狀況，及背後所隱含的意義與分子作用機轉，而找出導致疾病發生的可能原因、藥理機制等等。

參、蛋白質二維凝膠電泳

蛋白質體學的研究方法，主要包括：待測蛋白質的分離(A analytical protein separations)，蛋白質的分解(Protein digestion)，質譜儀的分析，和 database 的搜尋(Mass spectrometry analysis and database searching)。目前蛋白質體研究最普遍使用的實驗方式是結合二維凝膠電泳與質譜儀，常見的有介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀(Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight/Mass Spectrometry；MALDI-TOF/MS)及液相層析串聯質譜儀(Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry；LC-MS)。

1975 年 O'Farrell 首先發展出利用蛋白質二維凝膠電泳(Two-Dimensional Electrophoresis；2-DE)技術分離大腸桿菌中的蛋白質。其第一維等電點聚焦乃是利用蛋白質具不同等電點之特性，使蛋白質在 pH 梯度膠中移動分離，接著第二維 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)則再將蛋白質依其分子量大小作分離。當時 O'Farrell 分離出約 1100 個蛋白質染色點，且具有相當好的再現性(O'Farrell, 1975)。二維凝膠電泳無疑為分離成份複雜的蛋白質樣品的一個強而有力的工具。

肆、質譜儀

質譜儀的分析是蛋白質體學研究當中極為重要的一環。90 年代末期，質譜儀離子源的發展有了重要突破，Koichi Tanaka 以介質輔助雷射脫附游離法 (MALDI)，以及 John B. Fenn 以電灑法 (electrospray ionization, ESI)(Banks et al., 1994)，分別成功的偵測到蛋白質分子，開啟了蛋白質研究分析的新紀元。至於質譜儀器本身也不斷被研發改良，提高了蛋白質分析的解析度(resolution)、精確性(accuracy)、質量範圍(mass range)，以及分析通量(throughput)等。因應分析需求的不同，可將質譜儀串聯使用，並且與多種離子源做搭配。

Cleveland 等人，於 1977 年首先提出胜肽質量指紋圖譜(peptide mass fingerprinting, PMF)的概念(Cleveland et al., 1977)。但直到 1993 年，才由 Henzel 等人以介質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀(MOLDI-TOF MS)配合電腦資料庫搜尋演算，證實能以 PMF 進行蛋白質身份之鑑定(Henzel et al., 1993)。

第五節 研究目的

乳癌是女性最常見的惡性腫瘤，幾乎占有所有惡性腫瘤的 1/3。根據近年來衛生署統計資料顯示，女性乳癌在台灣主要癌症死亡原因中已躍居第四位(圖 1-6)(行政院衛生署, 2009)。儘管近年來醫療診斷技術不斷的改進，女性對乳房問題的注重、健康照護者支持早期診斷等觀念的更新，不過，乳癌的死亡率卻沒有太大的改善。因此找出正確、適當治療乳癌的方法絕對是刻不容緩的事，而對於癌症的預防及抗癌藥物的開發、篩選更是在癌症醫學值得去注視及探討的。由於目前臨床上用於抗癌的化學療法、放射線療法所產生的副作用多不勝舉，病人在治療期間免疫功能差容易感染、生理機能失調等。因此若能研發出副作用低並且能有效率地治癒乳癌的新藥是癌症醫學治療的一大福音。

一個新藥開發的過程雖然很冗長，不過經由初步的藥物毒性的測試結果，與其他臨床用藥比較過後，LYF-17 針對乳癌細胞的毒殺性只需要極低的藥量濃度就可以達到 IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration)(表 1-2)，且這樣的藥量濃度對於正常的細胞沒有明顯的毒殺性，這樣的結果顯示LYF-17 有機會取代現有的臨床用藥。本研究希望以蛋白質體學的方式來找出LYF-17 的標的蛋白(target protein)，以此為基礎，希望在不久的將來能將LYF-17 應用在臨床乳癌的治療。

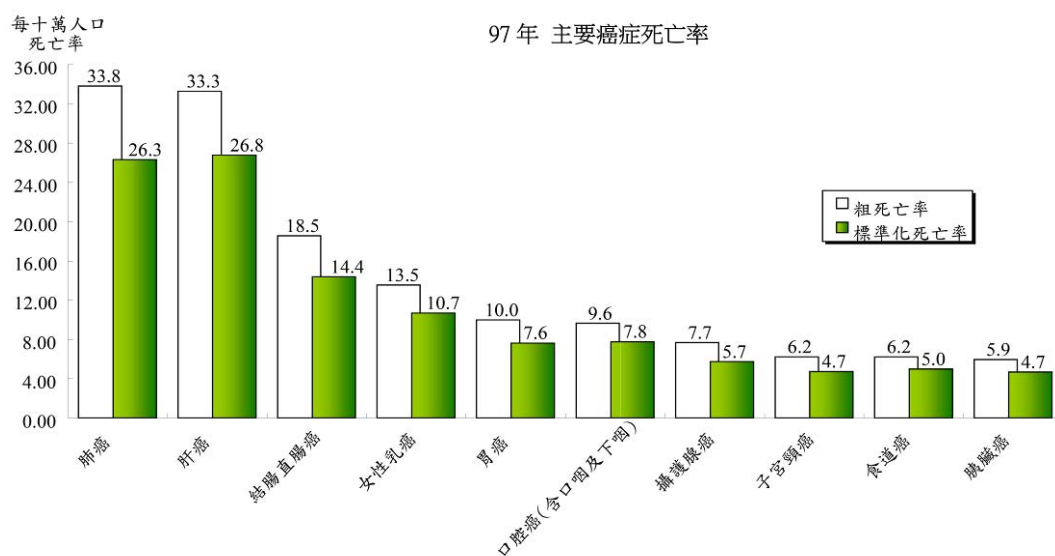


圖 1-6：台灣地區 97 年癌症死亡率。〈資料來源：行政院衛生署〉

表 1-2、LYF-17 與其他臨床用藥測試癌細胞以及正常細胞的 IC_{50} 濃度。

Cell line:MDA-MB-435

Drug \ Time	24hr (IC_{50})	48hr (IC_{50})	72hr (IC_{50})
LYF-17	115.5 nM	66.8 nM	55.2 nM
doxorubin	>200 nM	162.26 nM	81 nM
colchicine	57.3 nM	16.66 nM	11.33 nM
Taxol	31 nM	7.5 nM	6.58 nM

Cell line:HBL-100

Drug \ Time	24hr (IC_{50})
LYF-17	511 nM
doxorubin	688 nM
colchicine	526 nM
Taxol	726 nM

第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

壹、細胞株

MDA-MB-435 (乳癌細胞轉移能力較強的細胞株)(Khaldoyanidi et al., 2003; Zen et al., 2008)：由癌症生物學研究所洪明奇教授實驗室所贈，China Medical University (Taichung, Taiwan)

貳、實驗藥物(LYF-17)來源

LYF-17 得自於藥物化學研究所郭盛助教授實驗室，China Medical University (Taichung, Taiwan)

參、藥品試劑

1. Acetone (MERCK, USA)
2. APS (USB, USA)
3. Acetonitrile (MERCK, USA)
4. Acetic acid (MERCK, USA)
5. Glycerol 99% (Riedel-deHaen, USA)
6. HCL 10N (Riedel-deHaen, USA)
7. Phenyl methane sulfonyl fluoride(PMSF) (Sigma, USA)
8. Sodium phosphate(Na_2HPO_4) (J.T.Baker, USA)
9. Sodium acetate (calblochen, USA)
10. Sodium bicarbonate (Sigma, USA)
11. Sodium orthovanadate(Na_3VO_4) (Sigma, USA)

12. Sodium dodecyl sulfate(SDS) (Sigma, USA)
13. Sodium hydroxide(NaOH) (Riedel-deHaen, USA)
14. TRIS-HCL (J.T.Baker, USA)
15. Sodium thiosulfate($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (MERCK, USA)
16. Sodium carbonate(Na_2CO_3) (MERCK, USA)
17. Urea (MERCK, USA)
18. DTT (MERCK, USA)
19. IAA (MERCK, USA)
20. CNBr-activated SepharoseTM4B (奇異, USA)
21. Ethanol (MERCK, USA)
22. Methanol (默克, Germany)
23. Bradford (BIO-RAD, USA)
24. FBS (GIBCO, USA)
25. Trypsin (GIBCO, USA)
26. TCA (Sigma, USA)
27. Protein maker (Femantas, USA)

肆、 主要器材儀器

1. 離心機(AvantiTM30 centrifuge, Beckman Coulter, USA)
2. 去離子水製造機(Minipore, USA)
3. 蛋白質轉漬電泳套組(BIO-RAD. USA)
4. 微量天平(GR-200 ; A&D, Japan)
5. 正立式光學顯微鏡 (ZEISS, Germany)

6. ELISA reader (ANTHOS-2020, Salzbrug, Austria)
7. Power supply (Hoefer, San Francisco, CA, USA)
8. SDS-PAGE 電泳槽套組 (BIO-RAD, USA)
9. Vortex-genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES, NY, USA)
10. 蛋白質掃描儀分析系統 (U MAX, USA)
11. 細胞培養皿 (CORNING, USA)
12. 酸鹼值測定計 (C831 ; Consort, UK)



第二節 實驗方法

壹、細胞株培養與繼代

HBL-100：培養於90%的DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)，包含有10%的FBS (fetal bovine serum)、1%青黴素與鏈黴素的混合抗生素 (100X stock solution：Penicillin 50 U/ml；Streptomycin 50 µg/ml，Gibco)

MDA-MB-435：培養於90%的DMEM/F12，包含有10%的FBS (fetal bovine serum)、1%青黴素與鏈黴素的混合抗生素 (100X stock solution：Penicillin 50 U/ml；Streptomycin 50 µg/ml，Gibco)

上述細胞株皆培養於5%CO₂，恆溫37°C的細胞培養箱中，每隔48小時以trypsin-EDTA(0.05% trypsin與2.5 mM EDTA)將細胞打散，以1×10⁶個細胞數分種於新的10公分培養皿中做繼代培養。

貳、冷凍細胞活化

原理：冷凍細胞活化原則為快速解凍，如此可避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞死亡。細胞經由解凍後培養數日，並繼代二至三代，待細胞恢復原有活性，使細胞生長或其特性恢復正常時才作為細胞實驗的樣本。

步驟：將操作環境及細胞所需之培養基準備完善後，並將培養基至於37°C的水浴槽中回溫，回溫後噴以70%酒精後，擦拭並移入無菌操作

台內。自液態氮中取出冷凍小管，首先檢查蓋子是否旋緊（由於熱脹冷縮的過程，此時蓋子容易鬆脫）並迅速移入 37°C 的水浴槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內完全融化，此時注意水浴槽之水面不要接觸蓋口之接合面，以降低污染發生。完全融化後，以 70% 酒精擦拭冷凍小管外部，並將移入無菌操作台內。先取出解凍之細胞懸浮液置入培養容器內，再緩慢加入培養基(稀釋比例為 1:10)，混合均勻，放入CO₂細胞培養箱培養，並在解凍後次日更換培養基。

參、細胞冷凍保存

原理：將健康細胞繼代後存放於液態氮中以供應實驗所需之細胞。欲冷凍保存之細胞需為生長良好（long phase）且存活率高之狀態，約為 80% ~90% 緻密度。DMSO 應為試劑級等級，且無菌無色（0.22 micro FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品）。冷凍保存之細胞濃度： 1×10^6 cells/ml。冷凍保護劑濃度為 5% ~10% DMSO。

步驟：冷凍前一日更換半量或全量的培養基，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液（使用前配製）：將 DMSO 加入新鮮的培養基中，最後濃度為 5%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液（約 0.1 ml）計算細胞濃度及冷凍前存活率。離心，除去上清液，依細胞數的數量加入適量的冷凍保存液，使細胞濃度為 1×10^6 cells/ml，混合均勻，分裝於

標示清楚之冷凍保存管中 (1 ml/vial)。冷凍保存方法：冷凍管置於-80°C 16~18 小時 (或隔夜)，最後以液氮槽長期儲存。

肆、細胞計數

原理：細胞計數是利用trypan blue染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因為細胞膜完整，因此染料無法滲入而不會呈色。計算數目是利用細胞計數盤，細胞計數盤一般有兩個chamber，每個chamber中細刻成九個 1 mm^2 大正方形其中九宮格周圍的正方形再細刻 16 小格，深度均為 0.1 mm 。當chamber上方蓋上玻片後，每各大正方形的體積為 $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{ ml}$ 。使用時，計數上、下chamber各 5 個大正方形內 (四的角落和中央區域) 之細胞數總和，除以 10，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每ml中的細胞數。(如圖 1-7)。

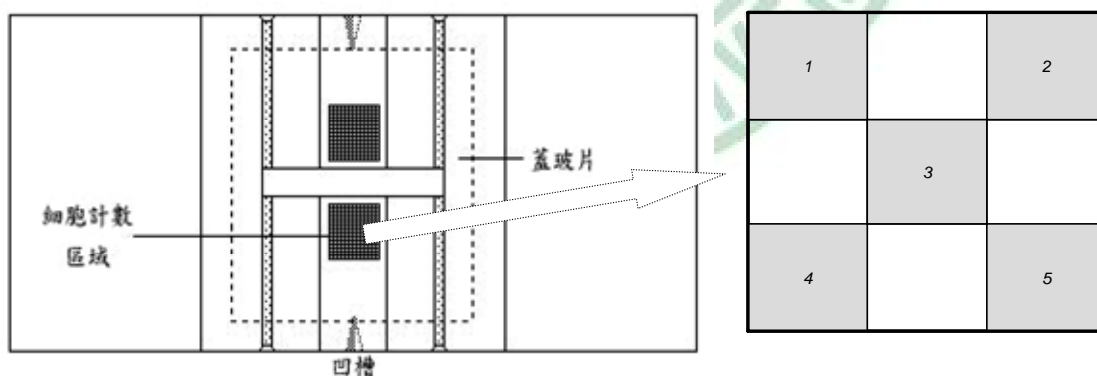


圖 1-7：細胞計數盤

步驟：首先將舊的培養基吸出，接著以 10 ml 1X PBS 緩衝液 (pH 7.4) 清洗兩次，清洗完後加入 1 ml 的 0.05% trypsin-EDTA 約 3~5 分鐘 (於細

胞培養箱中反應)，再加入 3 ml 10% FBS-DMEM 中斷 trypsin 作用，將培養皿內的細胞液移置離心管中以離心轉 1500 rpm 5 分鐘將細胞離心下來，除去上清液後加入適量的培養基，均勻的將細胞與培養基混合均勻並取出 100 μ l 的細胞懸浮液與 10 μ l trypan blue (0.4% trypan blue) 混合均勻於 1.5 ml 微量離心管中。將蓋玻片蓋於細胞計數盤上，取混合液 10 μ l 於 chamber 上方凹槽加入，接著在倒立式顯微鏡下觀察及計數。在計數之時，細胞若位於線上，則只計上限與右線(或計下線與左線之細胞)。

伍、細胞存活率分析

本篇論文所採用的方法為MTT試驗(MTT assay)。原理如下述，MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)進入細胞內而被粒線體內膜上的琥珀酸去氫酶 (Succinate dehydrogenase on Mitochondrial inner membrane)給還原成MTT，不溶於水，呈現紫色針狀結晶；因為只有在活細胞中其粒線體才有活性，因此只有活細胞才會生成結晶，在結晶完全形成之後，會結在細胞上造成細胞死亡，再用DMSO溶出結晶，用595 nm的波長在ELISA reader下讀取吸光值。

細胞以 2×10^4 /well種於24孔盤中，24小時後，換成含有指定濃度指定藥物的培養液(一個孔0.5 ml)，培養24小時後，加入MTT試劑 (MTT 2 mg/ml 溶於PBS中) 反應3小時待結晶形成，將24孔盤中的培養液與試劑

吸乾，加入500 μ l的DMSO溶解結晶，取200 μ l溶解液至96孔盤中以590 nm之波長在ELISA reader下讀取吸光值。

陸、細胞總蛋白收集與定量

細胞以 1×10^6 個種植於10公分培養皿中，待16~20小時細胞貼附後，給予指定劑量的LYF-17並培養指定的時間於細胞培養箱中。待處理後，將各組別的細胞用trypsin-EDTA打下連同培養液一起收集至15 ml離心管中，離心1500 rpm、5分鐘。去除上清液，加入1 ml PBS將細胞打散，離心1500 rpm、5分鐘。將上清液倒乾，加入1 ml PBS將細胞打散並轉到1.5 ml eppendorf，離心12000 rpm、1分鐘。用微量吸管確實吸乾上清液，收集的細胞可存放於-80 $^{\circ}$ C冰箱一個月備用。

將收集的細胞加入適量的lysis buffer (10% glycerol ; 1% Triton X-100 ; 137 mM NaCl ; 10 mM NaF ; 1 mM EGTA ; 5 mM EDTA ; 1 mM sodium pyrophosphate ; 20 mM Tris-HCl, pH 7.9 ; 100 mM β -glycerophosphate ; 1 mM sodium orthovanadate ; 0.1% SDS ; 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/ml leupeptin)置於冰上，每10分鐘震盪一次(以"vortex 9"速度震盪)。待震盪三次後，再以超音波震盪1分鐘，最後離心12000 rpm、30分鐘、4 $^{\circ}$ C。以微量吸管吸取上清液，收集於新的eppendorf中，此上清液即為細胞總蛋白(total protein)。當總蛋白質定量

後，以每管50 μ g的蛋白質分裝儲存於-20 $^{\circ}$ C備用。

蛋白質定量，以Bio-Rad Protein Assay Dye來測定。其原理簡述如下，Bio-Rad Protein Assay Dye中酸性的Coomassie[®] Brilliant BlueG-250會與蛋白質結合，而蛋白質濃度不同會使溶液顏色呈現不同程度的變化，通常蛋白濃度介於0~20 μ g/ml時，溶液顏色將會由棕紅色轉灰黑色，最後變成深藍色。取稀釋的Bio-Rad Protein Assay Dye (1:4 Milli Q水) 1 ml分別加入0、1、2、4、6、8、10 μ l的BSA (Bovine serum albumin 2 mg/ml)，混合均勻後，取200 μ l之混合液至96孔盤，以595 nm之波長在ELISA reader 下讀取吸光值，並以此七點對應之吸光值建立檢量線 (回歸系數須大於0.995才可採用)。取待定量之蛋白質液2 μ l混合於1 ml稀釋的Bio-Rad Protein Assay Dye，取200 μ l之混合液至96孔盤，以595 nm之波長在ELISA reader下讀取吸光值，並以建立好的檢量線換算蛋白質濃度。

柒、二維膠體電泳

(A) 蛋白樣品前處理

原理：TCA 為一強酸溶液，當其跟蛋白質溶液混合時，可瞬間改變蛋白質的 pH 值而達到蛋白質的等電點 (PI)，因而使蛋白質沉澱析出。

步驟：利用 50% TCA溶液 (含 20mM DTT*) 以 1:4 比例加入蛋白質樣品萃取液中，在-20 $^{\circ}$ C下將蛋白質溶液沉澱 45 分鐘以上(最好隔夜)。

接著在 4°C 下，以 13000 rpm 的轉速離心 15 分鐘，去除上清液，重複此步驟 2 次，得到蛋白質沉澱物。再將 -20°C 的丙酮 (acetone) 加入蛋白質沉澱物中並離心 (13000rpm、15 分鐘、4°C)，重複此步驟 3~5 次，之後靜置在室溫下讓丙酮自然揮發 (不可使蛋白質沉澱物變至白色)。在室溫下，加入適量的回溶液 (rehydration buffer) 將沉澱的蛋白質回溶，接著將蛋白質回溶液以 13000 rpm 的轉速，離心 20 分鐘，取上清液為蛋白質溶液，進行等電點電泳分析。

註：*表示在使用前才加入

(B) 等電點聚膠電泳分析 (iso-electric focusing, IEF)

原理：利用蛋白質等電點不同的特性，使用具有 pH 值梯度分布的 IPG strip 膠條將蛋白質做分離。

步驟：以二次水潤洗聚焦盤 (focusing tray) 數次，再以拭鏡紙擦乾聚焦盤的每一個內槽 (well) 及電極線。吸取蛋白質溶液 125 μ l，平均置入聚焦盤的槽內 (盡量注入兩邊電極以內的位置且注意不可有氣泡)。將 IPG strip 膠條 (pH 3-10, 7 公分) 的保護膜迅速撕去，膠面向下，膠條依電極的方向，小心覆蓋在溶液上，注意不可有氣泡。吸取約 1 ml 礦物油 (mineral oil)，注滿膠條的上面，防止等電點聚焦過程中，蛋白質回溶液蒸發而乾掉燒焦。蓋上蓋子，將聚焦盤置於 IEF Cell 上之正確位置 (注

意正負極擺放位置)，設定程式進行等電點聚膠電泳。IEF Cell 的參數設定如下：

R (rehydration) : 50 V、12 hr

Step1: 250 V、15 min

Step2: 4000 V ↗ 2 hr

Step3: 4000 V ↗ 20000 Vhr

Step4: 500V/hold

(C) strip 膠條平衡

原理：利用平衡液將 IEF 過程中的尿素 (urea)、CHAPS 及礦物油去除，並利用 DTT (dithiothreitol) 進行還原作用將蛋白質內的雙硫鍵打斷，而 IAA (iodoacetamide) 則將蛋白質雙硫鍵被打斷的地方進行烷化作用，避免雙硫鍵再接回，進而增加蛋白質溶解性，使其更有利於 SDS 與蛋白質結合形成 SDS-蛋白質複合物。

步驟：以二次水潤洗拋棄式水合盤數次，再以拭鏡紙擦乾水合盤的每一個內槽 (well)。將 strip 膠條取出，用拭鏡紙將背膠面的礦物油擦去，再將 strip 膠條以二次水潤洗 1~2 次，把背膠面的水及殘餘的礦物油使用拭鏡紙大致去除，然後將 strip 膠條的膠面朝上放入拋棄式水合盤中，注入 2.5 ml 平衡液 I (equilibration buffer I)，於迴旋式震盪器上搖晃 20 分鐘。再將 strip 膠條取出，用拭鏡紙將背膠面的平衡液 I 擦去，然後將 strip 膠

條面朝上的放入拋棄式水合盤中的另一個 well 中，注入 2.5 ml 平衡液 II (equilibration buffer II)，於迴旋式震盪器上搖晃 20 分鐘。

(D) SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

原理：利用電泳所造成的三種物理效應（樣品濃縮效應、分子篩效應及電荷效應）將蛋白質依據分子量差異而分離。

1. 樣品濃縮效應：

(a) 凝膠孔徑不連續性：

在電場作用下，利用凝膠孔徑的不同使蛋白質顆粒泳動所遇到的阻力也不同，因而在上下二層孔徑不連續性的凝膠交接處，蛋白質樣品會被壓縮成很窄的區帶。

(b) 緩衝液中的離子成分及凝膠 pH 值的不連續性：

凝膠中的氯化氫 (HCl) 可解離出氯離子 (Cl^-)，因其帶負電，所以在電場作用下會不斷的向正極移動，且因在電場中遷移率快，因此會走在最前面；在電極緩衝液中的 glycine (甘胺酸)，其在 pH 8.8 的環境下易解離出甘胺酸根 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$)，但在 pH 6.8 時，glycine 解離度卻很小 (僅有 1- 0.1%)，因而在電場中遷移很慢；而 SDS-蛋白質複合物因也是帶負電荷，因此也是向正極移動，但其有效遷移率 (有效遷移率 = $m\alpha$ ， m 為遷移率， α 為解離度) 卻是介於氯離子與甘胺酸根離子之間，因此蛋白

質樣品夾在氯、甘胺酸根離子界面之間被濃縮。

(c) 電位梯度的不連續性：

由於氯離子的遷移率最大，就會很快超過蛋白質，因此在氯離子後面，形成一個離子濃度低的區域即低導電區。因為 $E=I/\eta$ (E 為電位梯度， I 為電流強度， η 為導電率)。 E 與 η 成反比，所以低電導區就有了較高的電位梯度。而電位梯度的高低與電泳速度的快慢有關，因為 $v=me$ (v 為電泳速度， E 為電位梯度， m 為遷移率)，因此這種高電位梯度使蛋白質和甘胺酸根離子在氯離子後面加速移動。當氯離子和甘胺酸根離子的移動速度相等時，在它們之間會形成一個穩定而又不斷向正極移動的界面，而由於蛋白質的有效遷移率恰好介於快、慢離子之間，因此也就聚焦在這個移動的界面附近，被濃縮形成一個狹小的中間層。

2. 分子篩效應

分子量或分子大小和形狀不同的蛋白質通過一定孔徑的分離膠時，因受阻滯的程度不同而表現出不同的遷移率。分子量小且為球形的蛋白質所受阻力小，移動快，走在前面；反之，分子量大的蛋白質則阻力大，移動慢而走在後面，因此透過凝膠的分子篩作用將各種蛋白質分成各自的區帶。

3. 電荷效應

因每種蛋白質所帶淨電荷不同，而有不同的遷移率。表面電荷越多，則遷移率越快而走在前面。

步驟：在 strip 膠條平衡步驟完成之前，事先將覆蓋膠(overlay agarose) 用微波爐加熱，使之溶解，同時將配置好的 10% 聚丙烯醯胺之下層膠鑄入鑄膠台，緩緩加入 95% 酒精除去氣泡並壓平膠之上緣，約等 30 分鐘待膠體凝固。待 strip 膠條平衡完成後，將膠片的酒精層倒出並盡量以拭鏡紙吸乾，再換入水層加入該空隙裝中，接著將 strip 膠條滑入膠片上緣空隙中 (strip 膠條與膠片接觸處，不可有氣泡)，然後小心將水層倒出 (strip 膠條仍需緊貼於膠片上緣)，吸取約 1 ml 的覆蓋膠注入膠片上緣空隙中，放置於 4°C 中幫助覆蓋膠凝固。待覆蓋膠凝固後，將膠片架設到電泳槽中，加入跑膠用之緩衝液 (running buffer)，以固定電壓 100 V、90 分鐘進行電泳步驟。

(E) 蛋白質銀染反應 (silver stain)

原理：利用蛋白質分子上的羧基 (COO^-) 會與銀銨錯離子結合，而銀離子在酸性環境中會被還原為金屬銀，因此可將蛋白質呈現棕至黑色。

步驟：將完成電泳分析的膠片取出，小心的置於玻璃染缸中，以二次水潤洗膠片 1~2 次後，準備進行染色。於染缸中加入固定液 (fixative

solution)，以迴轉式震盪器搖晃30分鐘，接著再置換成二次水，潤洗膠片2~4次，每次20分鐘。然後加入50 ml銀染反應試劑（silver reaction solution）顯色至點（spot）的出現（顯色的時間依蛋白質濃度而定），倒掉銀染反應試劑，加入終止液（stop solution）反應15分鐘，終止顯色反應。再置換成二次水，潤洗膠片2次，每次5分鐘。最後可將膠片置於二次水中，保存於4°C。

(F) 二維電泳膠影像掃描、分析

將膠片放在掃描器上，使用軟體 PDQuest 7.1.0 進行掃描及分析。水平的方向代表等電點值，由左至右增加，垂直的方向為分子量大小，由上至下減少。

(G) 蛋白質鑑定

將送往明欣生物科技公司做出的二維膠體電泳結果中，挑選出經由藥物接到的相關蛋白點（spot），強度為前二十強者，以微量尖頭吸管（tip）將點切割下來，分別收集在裝有二次水的微量離心管中，送中國醫藥大學蛋白質體學中心做質譜分析（LC/MS-MS）鑑定，並經由MATRIX SCIENCE的Mascot Search 比對MS/MS的鑑定結果。

第三章 研究結果

第一節 LYF-17 對MDA-MB-435 細胞株的半數抑制濃度(IC₅₀)

利用MTT assay，LYF-17 對MDA-MB-435 細胞株的IC₅₀、LYF-17 對正常細胞HBL-100 細胞株的IC₅₀，以及其他臨床用藥針對這兩株細胞株的IC₅₀，如表 1-2 所示。由此可看出，投予LYF-17 對於MDA-MB-435 的IC₅₀ 與其他臨床用藥互相比較發現只要低濃度就可對MDA-MB-435 達到抑制效果與臨床用藥的效果差不多，另外，針對正常細胞HBL-100 投予LYF-17 之後，此細胞株的IC₅₀與其他臨床用藥互相比較後，反倒是最低的濃度就達到抑制正常細胞生長，不過，由於投予LYF-17 對於MDA-MB-435 的IC₅₀ 比針對正常細胞HBL-100 的濃度還要低，也就是當我們對乳癌細胞MDA-MB-435 投予半數抑制濃度時，對於正常細胞的影響較小，由以上的實驗得知LYF-17 或許可以發展成為新的抗癌藥物。

第二節 利用化學蛋白質體學的方法找出 LYF-17 的標的蛋白(target protein)

本實驗目的是希望藉由化學蛋白質體學的方式去探討 LYF-17 的標的蛋白。首先將 LYF-17 接到 Sepharose (CNBr Sepharose-4B)上，之後再利用凝膠過濾法 (gel filtration)，也稱為排阻層析 (exclusion chromatography)、凝膠層析 (gel chromatography) 或分子篩層析 (molecular sieve chromatography) 來分離出蛋白，接著利用二維電泳的結果(圖 1-8)，

從二維電泳膠上 424 個蛋白質點中先挑選出強度較強的前二十個蛋白質點切取下來，作膠體內蛋白質水解(In-gel digestion)，用 MALDI-TOF 分析，經過 MASCOT 資料庫比對，得到八個不同的蛋白質(詳見表 1-3)，這幾個蛋白質極有可能是 LYF-17 的標的蛋白。



第四章 討論

近年來在生命科學界，以積極進行全面性的基因功能解析研究，蛋白質體學因蘊而生，此門學問所涵蓋的範圍很廣，其中的主要目標之一，是以快速的方式進行系統性的蛋白質分析。

因此，利用此技術，首次先從二十個蛋白質點中篩選出八個與藥物之間相互作用的蛋白質。可預測，若經由等電點 pH 梯度膠種類的改變，SDS-PAGE 膠體比例的調整，2-DE→MALDI-TOF→MASCOT 將能近乎全方面的篩選出被 LYF-17 所聯結上的各種蛋白質。但是，蛋白質體學研究方式所帶來的大量結果數據及相關資訊的分析處理和判讀，甚至比實驗操作本身更為艱難費時。並且，2-DE→MALDI-TOF→MASCOT 研究結果必須配合其他實驗方式，例如 western blotting，Q-PCR，螢光染色等，以驗證 2-DE 結果及推論。

從二維凝膠電泳開始一直到 MASOCT 資料庫比對是一連串環環相扣的實驗操作，當中任一步驟的差錯都可能造成樣品汙染或最後數據判讀的困擾。在本實驗中，利用 CNBr-Sepharose 4B 接上藥物，利用膠體分離法過濾出與 LYF-17 有相互結合的蛋白質，這樣的實驗結果與其他蛋白質體學研究方法比較起來，會沒有相對的蛋白質點可以選擇挖取跟比較，只能憑藉蛋白質點的強度來做選取。

這些蛋白質點經 MALDI-TOF→MASCOT 分析後，會因為人為設定

模式的不同，相同的序列卻會比對出不同的蛋白質。加上資料庫會不定期的更新，有可能這一個月分析比對出來的蛋白質，幾個月後再去比對，卻發現序列比對上有更相似的蛋白質，導致最初始的蛋白就因此而被取而代之。雖然，蛋白質體學研究方法可以很快速的進行系統性的蛋白質分析，不過與藥物相互作用的蛋白準確性，除了勤奮搜尋資料庫外，其餘就得依賴其他實驗方式來幫助驗證了。

分析出來的八個點中，CD44 與癌症轉移之關係非常密切。腫瘤形成之過程與一些正常生理反應非常相似，如胚胎發育、傷口的癒合等，都需要細胞的增殖與細胞的移行。在這些位置會有玻尿酸的累積及 CD44 主導之細胞間與細胞間質作用，因此 CD44 在腫瘤形成過程(包含癌症的轉移)，扮演相當重要的角色。CD44 除了是一個細胞外基質成份(如：玻尿酸)的接受器(Aruffo et al., 1990)，也參與了一些細胞反應，包括：淋巴球的 homing (Goldstein et al., 1989)、細胞的移動 (Svee et al., 1996; Thomas et al., 1992)以及癌症的轉移和侵入(Gunthert et al., 1991; Svee et al., 1996; Takahashi et al., 1999; Yu and Stamenkovic, 1999)等等。往後抗癌的研究，或許可以著重於這個蛋白質去進行探討。

第五章 結論

由實驗結果可得知，LYF-17 結合到的標的蛋白有：Protein disulfide isomerase family A, member 3(PDIA3)；zinc finger protein；beta-site APP-cleaving enzyme 2(BACE2)；T cell receptor alpha(TCRA)；CD44；dysferlin；Ribosomal protein；Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)。

藉由蛋白質相關功能及介紹的搜尋，得知這些蛋白質在某些機制中扮演一重要的角色。例如：CD44 在癌症轉移時，主導細胞之間非常重要的黏附關係，對腫瘤的生長及轉移扮演關鍵性的角色；Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)則是與 Microtubule 組成有相關的蛋白，它是一個主要存在於神經元和神經膠質細胞中的細胞骨架蛋白。可以穩定神經細胞的樹狀突的延長和參與動態形態結構，例如：微管、微絲。也可藉由磷酸化影響微管穩定性去調控微絲、微管(Riederer, 2007)。跟前面 LYF-17 藥物介紹的部份，LYF-17 對於微管聚合作用的抑制(inhibition of tubulin polymerization)方面或許有相關聯。往後，或許可從這兩方面著手去探討藥物 LYF-17 對相關機制的影響。

Sample name : LYF-17 strip=13cm pH=3 pH=3-10 loading= ? μ g SDS-PAGE = 12 % pH=10

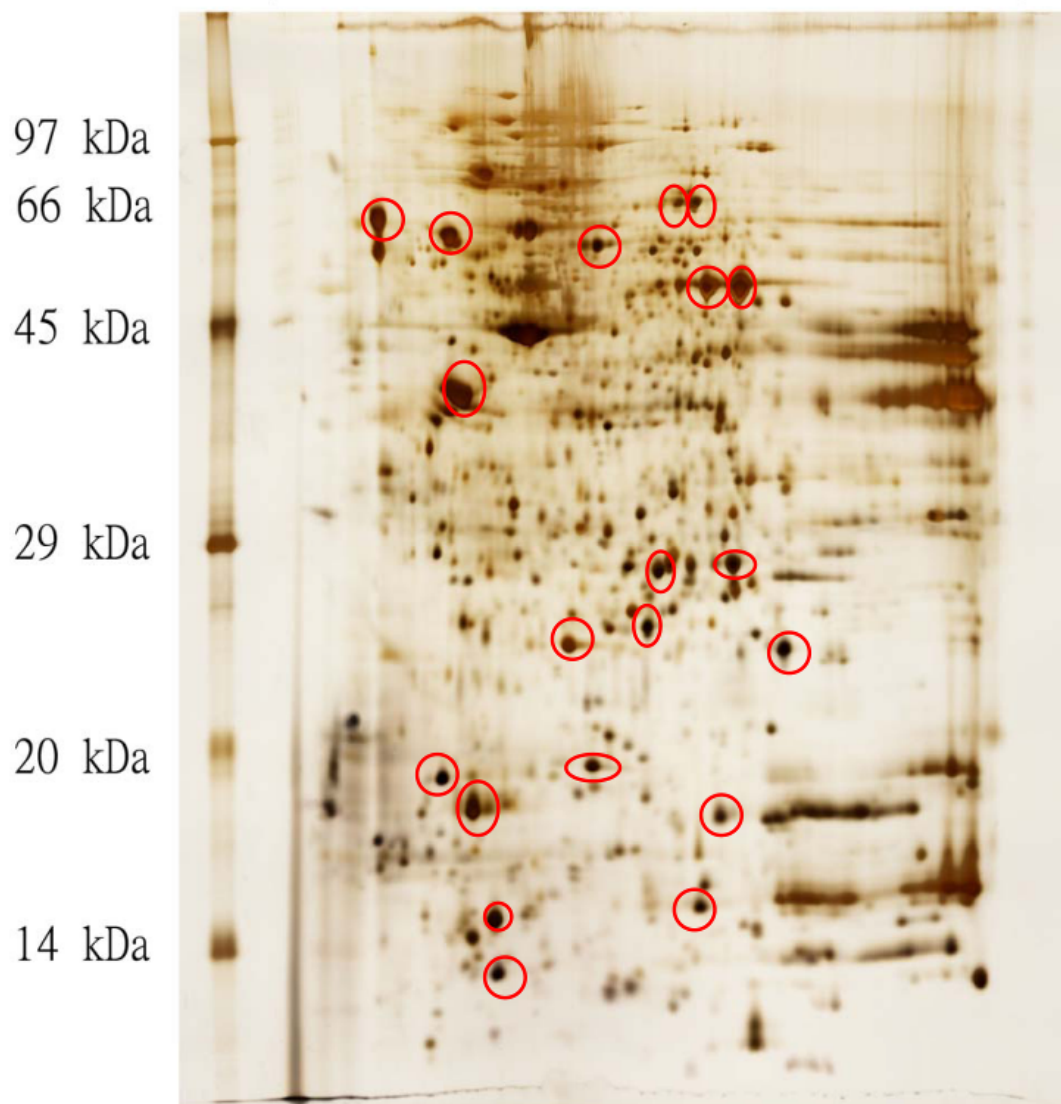



圖 1-8：二維電泳結果。利用 CNBr Sepharose-4B 與 LYF-17 相互聯結作用，抽取 MDA-MB-435 的 total protein，經過 TCA/Acetone 蛋白質沉澱純化後，進行一維等電點聚焦(13 公分 pH3-10 梯度膠)與藥物有結合反應的蛋白，再藉由二維電泳以及 MALDI-TOF 分析，即可得知相關蛋白。表 1-3 為經過 MASCOT 資料庫比對之後，與 LYF-17 有相互作用的標的蛋白。

表 1-3、LYF-17 的標的蛋白。

<p>Protein disulfide isomerase family A, member 3 (PDIA3) -has protein disulfide isomerase activity</p>
<p>zinc finger protein -a DNA-binding protein domain</p>
<p>beta-site APP-cleaving enzyme 2(BACE2) -is a human gene -a protease known to be an important enzyme involved in the cellular pathways that some believe lead to Alzheimer's disease</p>
<p>T cell receptor alpha chain (TCRA) -a molecule found on the surface of T lymphocytes -a heterodimer consisting of an alpha and beta chain in 95% of T cells</p>
<p>CD44 -a cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions, cell adhesion and migration</p>
<p>Dysferlin -protein linked with skeletal muscle repair</p>
<p>Ribosomal protein - is any of the proteins that, in conjunction with rRNA, make up the ribosomal subunits involved in the cellular process of translation</p>
<p>Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) -is a human gene -are thought to be involved in microtubule assembly, which is an essential step in neurogenesis</p>



主題二

LYF-17 藉由誘導 miR-200c 和 miR-141 的表現抑制人類乳癌細胞上皮-間

質轉化

LYF-17 Inhibits EMT via the Induction of miR-200c and miR-141 in Human
Breast Cancer Cells

目錄(二)

中文摘要.....	39
英文摘要.....	40
第一章 前言.....	41
第一節 microRNAs 的介紹.....	41
第二節 上皮細胞轉型成間質細胞 (epithelial to mesenchymal transition, EMT).....	45
第三節 研究目的.....	51
第二章 材料與方法.....	53
第一節 實驗材料.....	53
壹、 細胞株.....	53
貳、 實驗藥物(LYF-17)來源.....	53
參、 實驗動物來源.....	53
肆、 藥品試劑.....	54
伍、 抗體.....	55
陸、 主要器材儀器.....	56
第二節 實驗方法.....	57
壹、 細胞株培養與繼代.....	57
貳、 冷凍細胞活化.....	57

參、 細胞冷凍保存.....	58
肆、 細胞計數.....	59
伍、 細胞存活率分析.....	60
陸、 細胞總蛋白收集與定量.....	61
柒、 蛋白質之電泳分析(SDS-PAGE).....	62
捌、 西方墨點法(Western blotting).....	63
玖、 細胞 RNA 的抽取.....	64
壹拾、 反轉錄即時定量聚合酶鏈反應(real-time PCR).....	65
壹拾壹、 細胞遷移能力分析.....	66
壹拾貳、 SCID mice 腫瘤誘發模式 (SCID mice xenograft model).....	69
第三章 研究結果.....	70
第一節 LYF-17 對MDA-MB-435 細胞株的半數抑制濃度(IC ₅₀).....	70
第二節 LYF-17 對乳癌細胞 MDA-MB-435 的 microRNAs 的影響.....	70
第三節 LYF-17 對人類乳癌細胞 MDA-MB-435 的胞內調控 EMT 蛋 白質之影響.....	71
第四節 LYF-17 對乳癌細胞遷移影響.....	72
第五節 LYF-17 對乳癌侵入能力的影響.....	72
第六節 LYF-17 對人類乳癌細胞形態的影響.....	73

第七節 LYF-17 對轉染 microRNA inhibitor 的人類乳癌細胞侵入能力的影響(transwell assay).....	74
第八節 LYF-17 對原位腫瘤誘發模式的影響.....	74
第四章 討論.....	76
第一節 藥物改變 microRNAs 的探討.....	76
第二節 EMT 與 miR-141 和 miR-200c 的探討.....	77
第五章 結論.....	79



中文摘要

MicroRNAs(miRNAs)在 mRNA 的轉錄和蛋白質的表現中扮演重要的角色。最近，miRNAs 在許多癌症細胞中的功能是可以作為抑癌基因或是致癌基因。許多相關研究迅速地興起，並且指出特定的 miRNAs 在人類癌症上也許扮演一個角色。因此，我們想測試 LYF-17 是否可以改變人類乳癌細胞 miRNA 的表現量。我們發現在投予 LYF-17 之後，會使 miR-200c 和 miR-141 表現量上升，進而影響到 ZEB1 蛋白，進一步調節上皮細胞轉型成間質細胞 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 的轉換。EMT 現象會導致腫瘤容易轉移，調控 EMT 的相關蛋白因子包含：E-cadherin 和 Vimentin。在投予 LYF-17 治療以後，我們發現 miR-200c 和 miR141 過度表現會導致 ZEB1 和 Vimentin 的蛋白表現量減少，而 E-cadherin 的蛋白表現量則會上升。

關鍵字: microRNAs；上皮細胞轉型成間質細胞；腫瘤轉移

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) have been reported that they play important roles in mRNA transcription and protein expression. Recently, miRNAs function as either tumor suppressor genes or oncogenes in many cancer cells. Evidence is emerging rapidly that specific miRNAs might play a role in human cancer pathogenesis. In the current study, we test whether LYF-17 could alter the miRNA expression profiles. We found that LYF-17 induced the expression of miR-200c and miR-141 that regulated epithelial to mesenchymal transition (EMT) by targeting ZEB1. EMT facilitates tissue remodelling during embryonic development and is viewed as an essential early step in tumour metastasis. E-cadherin and Vimentine are target protein for EMT. After treatment of LYF-17, we could show that overexpression of miR-200c and miR-141 led to reduce expression of ZEB1 and Vimentin. However, overexpression of miR-200c and miR-141 led to induce expression of E-cadherin, and the other candidate genes in undifferentiated cancer cells.

Keywords: microRNAs ; epithelial to mesenchymal transition (EMT) ; metastasis

第一章 前言

第一節 microRNAs的介紹

小分子的 RNA 干擾現象(RNA interference ; RNAi) 可分為兩種機制 (Filipowicz, 2005; Filipowicz et al., 2005; He and Sontheimer, 2004; Nakahara and Carthew, 2004)，一種是 miRNA (microRNA) 傳遞路徑 (pathway)，另一種是 siRNA (small interfering RNA) 傳遞路徑。兩種傳遞路徑都會造成 mRNA 的蛋白質轉譯受阻 (translation repressor) 或 mRNA 裂解 (mRNA cleavage)。在 1993 年，miRNA 最早證實在線蟲 (*Caenorhabditis elegans* ; *C.elegans*) 生物體內 (Lee et al., 1993)，所表現單股 short hairpin RNA，而造成基因沈寂 (gene silencing)，當時稱這現象為「anti-sense RNA-RNA interaction」。1998 年，證實了由體外送入雙股 RNA(dsRNA)而造成 siRNA 現象 (Fire et al., 1998)，於是才提出 RNA 干擾現象(RNAi)這名詞。由於前人實驗證明 RNA 干擾現象的方法不同，故 RNA 干擾現象可由內生性 (Endogenous) 或外生性 (Exogenous) 的小分子 RNA 所引起，一般將 miRNA 的機制歸類為內生性所引起的基因沈寂，siRNA 則為外生性所引起的基因沈寂。

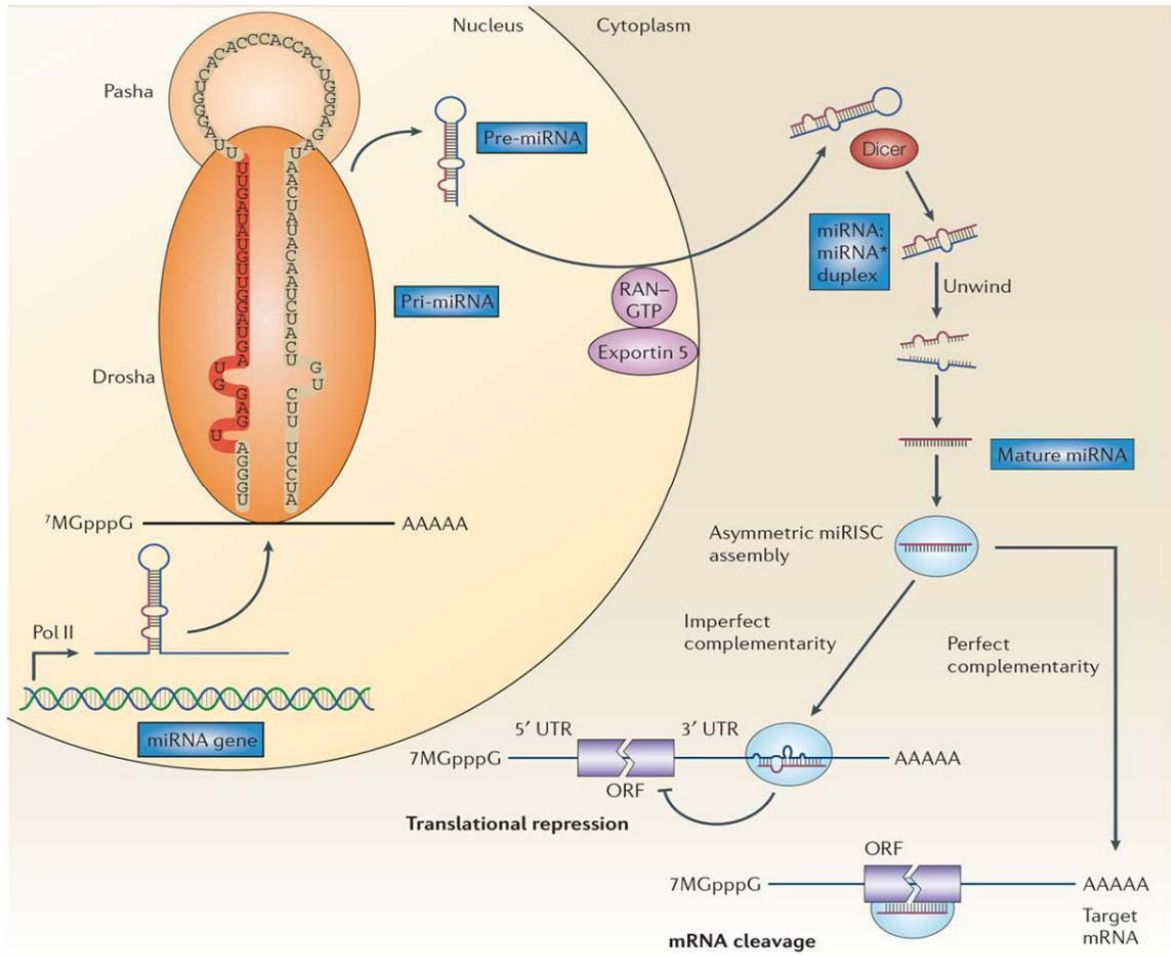
miRNA 為小片段髮夾型 (hairpin)，且為非轉譯成蛋白的 RNAs，為生物體內一種內生性機制，普遍存在於動物、植物及病毒中 (Barad et al., 2004; Murchison and Hannon, 2004; Pfeffer et al., 2004)。miRNA 的表現所

造成的 RNA 干擾現象，造成轉譯受阻或 mRNA 裂解，此機制又稱為轉錄後的基因沈寂(Post-Transcriptional Gene Silencing；PTGS)；另一種機制則會進到細胞核內，造成 DNA 核蛋白的甲基化(Histone methylation)(van der Valk et al., 2003)此種機制又稱為轉錄基因沈寂(Transcriptional Gene Silencing；TGS)。因 RNA 直接造成 DNA methylation (RNA-directed DNA methylation；RdDM)在植物(Cao et al., 2003)及動物(Kawasaki et al., 2004)都已被證實。

Lin-4 miRNA 最早被發現在線蟲體內，在幼蟲(Larval)發育時期(L1~L2 stage)調控線蟲發育有關(Lee et al., 1993)。經證實 *lin-4* 為非轉譯蛋白的 RNA (non-coding RNA；ncRNA)，經轉錄 (transcription) 後發現兩段約 61 核苷酸長的前導微核糖核酸 (precursors miRNA) 和 21 核苷酸長的成熟微核糖核酸(mature miRNA)的 RNA，並且會與七個 mature miRNA 結合核糖核酸誘導沈寂複合體 (RNA-induced silencing complex；RISC) 結合 (binding) 在 3'UTR 介於 ORF 至 poly A 之間不同的位置，並且 miRNA 與 target mRNA 會有不完全互補現象，以達到抑制 *lin-14* 及 *lin-28* 兩個基因無法轉譯成蛋白質的效果(Wightman et al., 1993)。西元 2000 年第二個 miRNA *lethal-7* (*let-7*) 在 *C.elegans* 體內被發現(Reinhart et al., 2000)，*let-7* 參與幼蟲發育時期(L3~L4)，經證實 *let-7* 扮演著負向調控的角色，會抑制 *lin-41* 及 *hbl-1* 基因的表現(Abrahante et al., 2003; Lin

et al., 2003; Slack et al., 2000)。

在生物體中的細胞核內有多個 Pri-miRNA (primary microRNA) 會被 RNA 聚合酶 II 所轉錄出來並帶 CAP 結構及 Poly(A) tails，相關文獻指出 pri-miRNA 有可能會被其它的 RNA 聚合酶所轉錄出來，例如會大量轉錄小片段的 RNA 以及 tRNA 的聚合酶 III，目前文獻的引用，還是以 RNA 聚合酶 II 為最多，可信度也較高。被 RNA 聚合酶 II 轉錄出來的 pri-miRNA 會形成單股 shRNA (short hairpin RNA)，之後會被 Drosha (RNase III family) 酵素所辨認，繼續修飾成大約 70 個核苷酸長的 Pre-miRNA (Precursors microRNA)，且在 3' 端未轉譯區域會有凸出約兩個核苷酸長。經 Drosha 所修飾的 Pre-miRNA 會被 Exportin 5 Protein 輸出到細胞質外，並由 Dicer (RNase III family) 酵素所辨認，並切掉環 (loop) 位置只剩下約 22 核苷酸長的 dsRNA，dsRNA 將會被解螺旋 (unwind) 成為單股 RNA 稱為成熟 miRNA (mature miRNA)，另一股 RNA 將會被裂解 (degradation)，mature miRNA 會與核糖核酸誘導沈寂複合體 (RNA-induced silencing complex; RISC) 結合，RISC 跟單股 RNA 結合稱為 miRNA (miRNA ribonucleoprotein)，miRNA 會針對下游的 mRNA 3' 端未轉譯區域結合多個位置，會造成轉譯受阻或 mRNA 裂解 (Esquela-Kerscher and Slack, 2006)。(圖 2-1)



Nat Rev Cancer 2006;6(4):259-69.

圖 2-1：microRNA 在生物體內所扮演的調控角色。

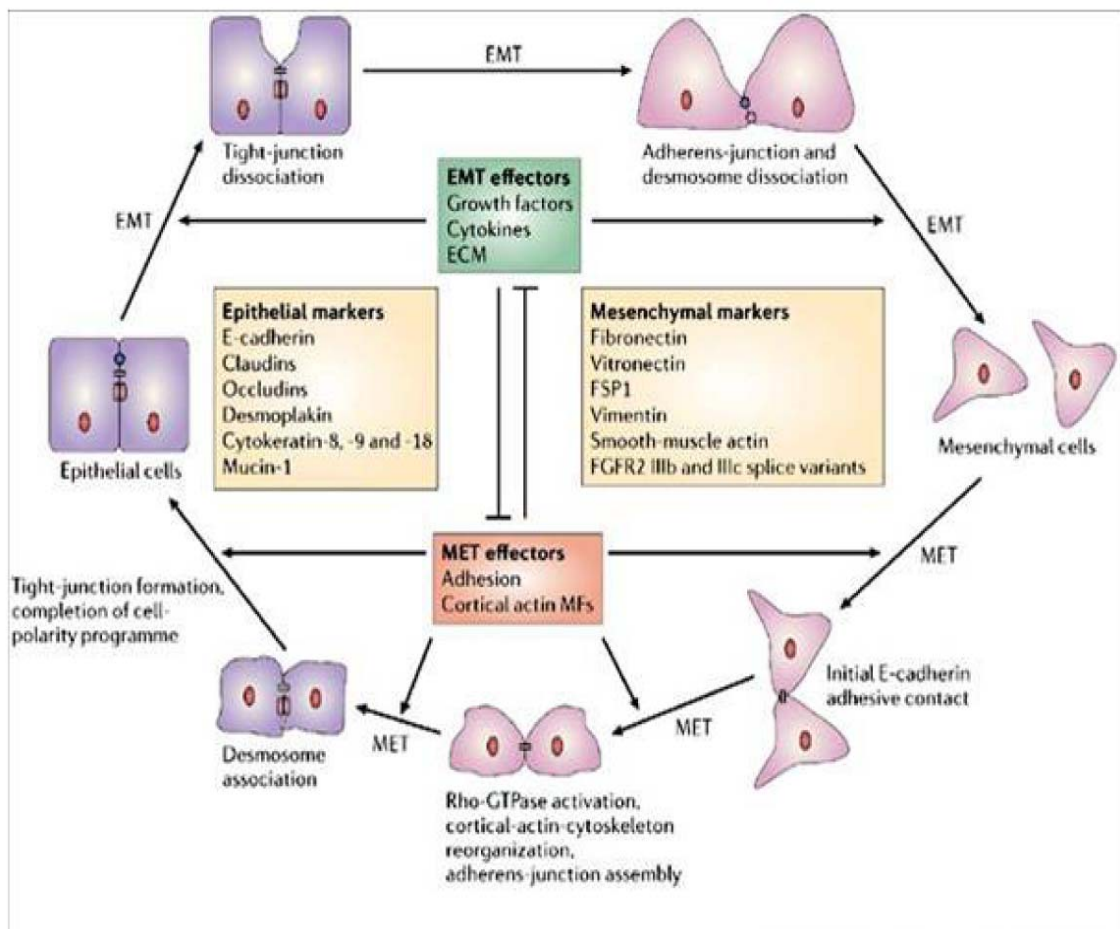
第二節 上皮細胞轉型成間質細胞 (epithelial to mesenchymal transition, EMT)

癌症每年均高居國內十大死因的榜首，絕大多數(約 90%)的癌症病患因腫瘤細胞局部性侵犯周邊組織或是因腫瘤發生轉移而致死，因此瞭解轉移的機轉是現今很重要的研究課題。

正常細胞利用黏附分子 (adhesion molecule) 固定在基底膜上，而細胞會藉由改變其細胞表面黏附分子與週邊組織細胞與細胞間質 (extracellular matrix) 之間的黏附關係，使彼此之間不再牢固的黏附，而較易脫離原發病灶 (primary site) 進而發生轉移；而癌細胞膜上E-cadherin表現量的多寡與週邊細胞黏附的正常功能成正比，過去研究發現大部分的上皮癌細胞 (epithelial cancer cells) 都有E-cadherin表現量降低的現象 (Christofori and Semb, 1999)。另外，歷年來的研究指出癌細胞藉著一些黏附因子的改變，進而促使其脫離原病灶處或固定於第二病灶(Fogar et al., 1997; Lukashev and Werb, 1998)。

腫瘤為了成功轉移，本身會運用各種策略，除了血管新生作用之外，還有其它機轉，比如由上皮細胞轉型成間質細胞 (epitheilial-to-mesenchymal transition, EMT) 以更具有侵犯(invasiveness) 和移行(migrate)的能力，進而遠處擴散(dissemination)，並且具備適應各種不同環境轉換不同細胞形態的高度可塑能力(圖 2-2)(Thiery and

Sleeman, 2006)。轉移的細胞會與原腫瘤脫離細胞間的連結，也會由原本上皮細胞 (epithelial cell) 的表面的分子標記及細胞特質轉換成間質細胞 (mesenchymal cell) 的型態，如表 2-1 所列，這現象稱為 EMT (Yilmaz et al., 2007)。



Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7(2):131-42.

圖 2-2：上皮細胞轉型成間質細胞的過程。

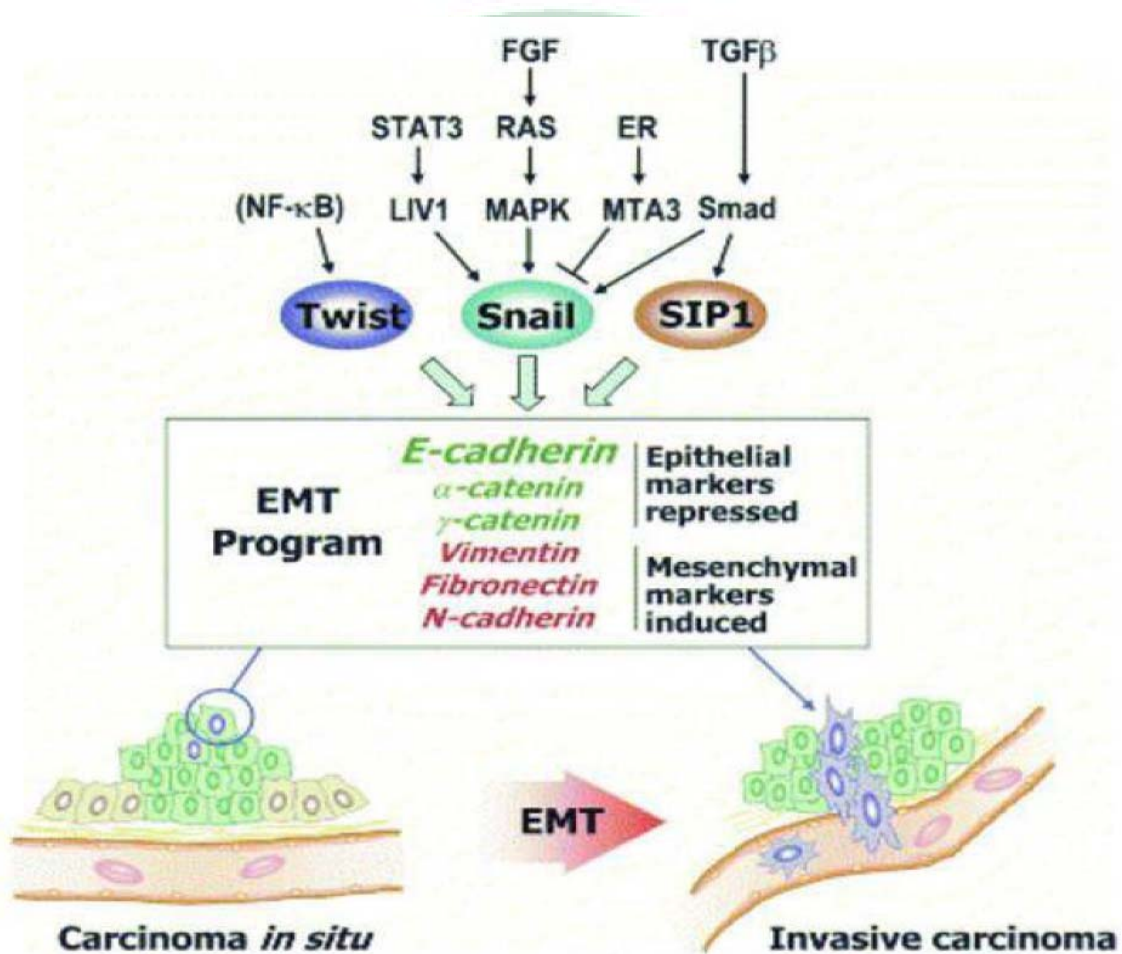
表 2-1、上皮細胞與間質細胞的差異性

上皮細胞		間質細胞	
表面分子標記	細胞特質	表面分子標記	細胞特質
E-cadherin	Epithelial	N-cadherin	Fibroblastic
Cytokeratins	Nonmotile	Vimentin	Motile
ZO-1	Noninvasive	NCAM	Invasive
Occludin	Anoikis (apoptosis triggered by lack of attachment to a substrate)	Snail	Scattering
Desmoplakin	Polarized	Twist	Anoikis resistance
		Fibronectin	Low proliferation
		MMP-2, -3, -9	Nonpolarized
		Integrin $\alpha_v\beta_6$	

Trends Mol Med 2007; 13: 535-41

EMT 作用發生於多種生理、病理過程，如胚胎發育、傷口癒合、腫瘤轉移的早期階段(Thiery, 2002)。1980 年代早期，EMT 被認為是胚胎發育過程中一項重要的特徵，尤其是動物胚胎發育的關鍵步驟，舉凡囊胚形成，組織和器官生成例如神經管、心臟、骨骼肌肉系統或者周邊神經系統甚至發生在人體內組織的修復皆需仰賴 EMT 的發生。時至今日亦有越來越多的證據指出 EMT 甚至在許多腫瘤發展的過程中扮演了一個重要的角色(Kang and Massague, 2004; Tsukamoto et al., 2007; Yilmaz et al., 2007; Zvaifler, 2006)。

EMT 的發生主要是指表皮細胞失去極性以及細胞和細胞接觸的特性，並且發生細胞骨架重組的現象。在此過程中細胞的型態會發生改變，表皮細胞標記分子（例如細胞-細胞黏附蛋白 E-cadherin）表達降低，而間質細胞標記分子（例如：Vimentin）表達升高而使得細胞具有移動的特性（圖 2-3）。(Kang and Massague, 2004)



Arthritis Res Ther 2006;8(3):210

圖 2-3：調節 EMT 的相關蛋白因子。

上皮型鈣依賴性黏附蛋白 (E-cadherin)是一種鈣依賴性的，具有細胞與細胞黏附特徵的黏附分子，它主要功能為主導同種細胞間的黏附反應並擔負起上皮細胞細胞骨架之支撐作用，因此，它的表達程度及功能狀態直接影響腫瘤細胞的脫落與再黏附。當 E-cadherin 活性正常時，腫瘤細胞不易從原處變型轉移，而 E-cadherin 失去活性時便導致細胞極性的喪失且細胞間黏附作用下降而促使了腫瘤細胞的轉移。幾個在胚胎發生過程中可引發 EMT 的重要轉錄因子(表 2-2)包括 Snail(Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Guaita et al., 2002; Kang and Massague, 2004; Nieto, 2002; Yook et al., 2005)、Twist(Kang and Massague, 2004)、SIP1 (ZEB-2)(Comijn et al., 2001; Gregory et al., 2008)都曾被報導過可抑制 E-cadherin 之基因表現。

表 2-2、EMT 的相關標記

Proteins that increase in abundance N-cadherin Vimentin Fibronectin Snail1 (Snail) Snail2 (Slug) Twist Goosecoid FOXC2 Sox10 MMP-2 MMP-3 MMP-9 Integrin $\alpha v \beta 6$
Proteins that decrease in abundance E-cadherin Desmoplakin Cytokeratin Occludin
Proteins whose activity increases ILK GSK-3 β Rho
Proteins that accumulate in the nucleus β -catenin Smad-2/3 NF- κ B Snail1 (Snail) Snail2 (Slug) Twist
In vitro functional markers Increased migration Increased invasion Increased scattering Elongation of cell shape Resistance to anoikis

J Cell Biol 2006;172(7):973-81.

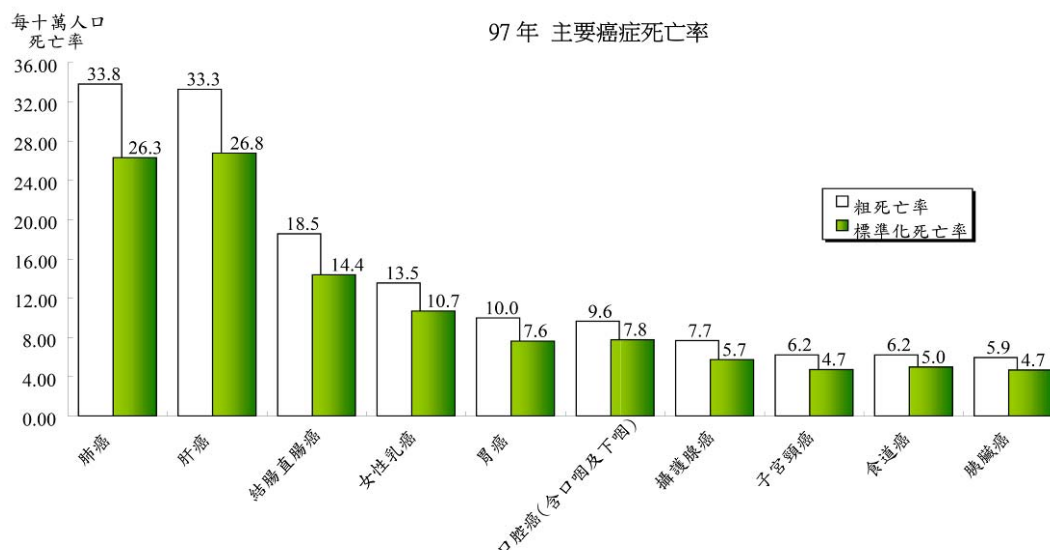
第三節 研究目的

乳癌是女性最常見的惡性腫瘤，幾乎占有所有惡性腫瘤的 1/3。根據近年來衛生署統計資料顯示女性乳癌在台灣主要癌症死亡原因中已躍居第四位(圖 2-4)(行政院衛生署, 2009)。儘管近年來醫療診斷技術不斷的改進，女性對乳房問題的注重、健康照護者支持早期診斷等觀念的更新，不過，乳癌的死亡率卻沒有太大的改善。因此找出正確、適當治療乳癌的方法絕對是刻不容緩的事，而對於癌症的預防及抗癌藥物的開發、篩選更是在癌症醫學值得去注視及探討的。由於目前臨床上用於抗癌的化學療法、放射線療法所產生的副作用多不勝舉，病人在治療期間免疫功能差容易感染、生理機能失調等。因此若能研發出副作用低並且能有效率地治癒乳癌的新藥是癌症醫學治療的一大福音。

一個新藥開發的過程雖然很冗長，不過經由初步的藥物毒性的測試結果，與其他臨床用藥比較過後，LYF-17 針對乳癌細胞的毒殺性只需要極低的藥量濃度就可以達到 IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration)(表 2-3)，且這樣的藥量濃度對於正常的細胞沒有較大的毒殺性，這樣的確是有機會取代現有的臨床用藥。

加上近年來陸續發現，內生性的 microRNAs 調控許多機制，於是我們希望以藥物對於乳癌細胞中的哪些 microRNAs 有影響(Tavazoie et al.,

2008)，進一步去加強研發 LYF-17 對抗乳癌細胞的重要性，希望在不久的將來能將 LYF-17 應用在臨床乳癌的治療。



附註：標準化死亡率係以 W.H.O.2000年世界標準人口數為基準。

圖 2-4：台灣地區 97 年癌症死亡率。〈資料來源：行政院衛生署〉

表 2-3、LYF-17 與其他臨床用藥測試癌細胞以及正常細胞的 IC₅₀ 濃度。

Cell line:MDA-MB-435

Drug \ Time	24hr (IC ₅₀)	48hr (IC ₅₀)	72hr (IC ₅₀)
LYF-17	115.5 nM	66.8 nM	55.2 nM
doxorubin	>200 nM	162.26 nM	81 nM
colchicine	57.3 nM	16.66 nM	11.33 nM
Taxol	31 nM	7.5 nM	6.58 nM

Cell line:HBL-100

Drug \ Time	24hr (IC ₅₀)
LYF-17	511 nM
doxorubin	688 nM
colchicine	526 nM
Taxol	726 nM

第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

壹、細胞株

MDA-MB-435 (乳癌細胞轉移能力較強的細胞株)(Khaldoyanidi et al., 2003; Zen et al., 2008)：由癌症生物學研究所洪明奇教授實驗室所贈，China Medical University (Taichung, Taiwan)

MCF-7 (乳癌細胞沒有轉移能力的細胞株)(Zen et al., 2008)：ATCC Number, HTB-22

HBL-100 (不完全屬於正常細胞，是偏向比較 normal 的乳房細胞)

MDA-MB-231 (乳癌細胞轉移能力較強的細胞株)(Khaldoyanidi et al., 2003; Zen et al., 2008)：ATCC Number, HTB-26

貳、實驗藥物(LYF-17)來源

LYF-17得自於藥物化學研究所郭盛助教授實驗室，China Medical University (Taichung, Taiwan)

參、實驗動物來源

SCID mice 購買自於財團法人國家實驗研究院實驗動物中心 (Taipei, Taiwan)

肆、藥品試劑

1. APS (USB, USA)
2. Dimethyl sulfoxide (J.T.Baker ; Sigma, USA ; 景明化工, 台灣)
3. Acetic acid (MERCK, USA)
4. 2-Propanol (Fluka, USA)
5. Triton χ -100 (Sigma, USA)
6. Tween-20 (Sigma, USA)
7. Glycerol 99% (Riedel-deHaen, USA)
8. HCL 10N (Riedel-deHaen, USA)
9. Coomassie brilliant blue (J.T.Baker, USA)
10. Gelatin (SIGMA, USA)
11. Phenyl methanesulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, USA)
12. Sodium phosphate (Na_2HPO_4) (J.T.Baker, USA)
13. Sodium acetate (calbiochem, USA)
14. Sodium bicarbonate (Sigma, USA)
15. Sodium azide (NaN_3) (Riedel-deHaen, USA)
16. Sodium orthovanadate (Na_3VO_4) (Sigma, USA)
17. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma, USA)
18. Sodium hydroxide (NaOH) (Riedel-deHaen, USA)
19. TRIS-HCL (J.T.Baker, USA)
20. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (MERCK, USA)
21. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (MERCK, USA)
22. Ethanol (MERCK, USA)
23. Methanol (默克, Germany)
24. Bradford (BIO-RAD, USA)

25.FBS (GIBCO, USA)

26.Trypsin (GIBCO, USA)

27.Protein maker (Femantas, USA)

28.脫脂奶粉 (安佳, New Zealand)

29.primer、RT master mix 及其相關試劑 (Applied Biosystems(ABI), USA)

30.miR-141 inhibitor、miR-200c inhibitor、siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent (Applied Biosystems(ABI), USA)

31.96 Detection Plate (Thermo, USA)

伍、抗體

1. 一級抗體

(a) Anti-ZEB1(E-20) (sc-10572 ; SENTA CRUZ, USA)

(b) Anti-Vimentin (ab8978 ; abcam, UK)

(c) Anti-TGF beta2 (ab36495 ; abcam, UK)

(d) Anti-E-Cadherin (610181 ; BD, USA)

(e) Anti-β-actin (A5441, SIGMA, USA)

2. 二級抗體

(a) Rabbit anti-goat IgG HRP (ab6741 ; abcam, USA)

(b) Rabbit anti-mouse IgG HRP (A9044, SIGMA, USA)

陸、 主要器材儀器

1. 離心機(AvantiTM30 centrifuge, Beckman Coulter, USA)
2. 去離子水製造機(Minipore, USA)
3. 蛋白質轉漬電泳套組(BIO-RAD, USA)
4. 微量天平(GR-200 ; A&D, Japan)
5. 正立式光學顯微鏡 (ZEISS, Germany)
6. ELISA reader (ANTHOS-2020, Salzbrug, Austria)
7. Power supply (Hoefer, San Francisco, CA, USA)
8. SDS-PAGE 電泳槽套組 (BIO-RAD, USA)
9. Vortex-genie 2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES, NY, USA)
- 10.細胞計數器 (MARIENFELD)
- 11.細胞培養皿 (CORNING, USA)
12. Transwell® Permeable Supports (COSTAR, USA)

第二節 實驗方法

壹、細胞株培養與繼代

HBL-100&MCF-7：培養於90%的DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)，包含有10%的FBS (fetal bovine serum)、1%青黴素與鏈黴素的混合抗生素 (100X stock solution：Penicillin 50 U/ml；Streptomycin 50 µg/ml，Gibco)

MDA-MB-435&MDA-MB-231：培養於90%的DMEM/F12，包含有10%的FBS (fetal bovine serum)、1%青黴素與鏈黴素的混合抗生素 (100X stock solution：Penicillin 50 U/ml；Streptomycin 50 µg/ml，Gibco)

上述細胞株皆培養於5%CO₂，恆溫37°C的細胞培養箱中，每隔48小時以trypsin-EDTA(0.05% trypsin與2.5 mM EDTA)將細胞打散，以1×10⁶個細胞數分種於新的10公分培養皿中做繼代培養。

貳、冷凍細胞活化

原理：冷凍細胞活化原則為快速解凍，如此可避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞死亡。細胞經由解凍後培養數日，並繼代二至三代，待細胞恢復原有活性，使細胞生長或其特性恢復正常時才作為細胞實驗的樣本。

步驟：將操作環境及細胞所需之培養基準備完善後，並將培養基至

於 37°C 的水浴槽中回溫，回溫後噴以 70% 酒精後，擦拭並移入無菌操作台內。自液態氮中取出冷凍小管，首先檢查蓋子是否旋緊（由於熱脹冷縮的過程，此時蓋子容易鬆脫）並迅速移入 37°C 的水浴槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內完全融化，此時注意水浴槽之水面不要接觸蓋口之接合面，以降低污染發生。完全融化後，以 70% 酒精擦拭冷凍小管外部，並將移入無菌操作台內。先取出解凍之細胞懸浮液置入培養容器內，再緩慢加入培養基(稀釋比例為 1:10)，混合均勻，放入 CO₂ 細胞培養箱培養，並在解凍後次日更換培養基。

參、細胞冷凍保存

原理：將健康細胞繼代後存放於液態氮中以供應實驗所需之細胞。欲冷凍保存之細胞需為生長良好 (long phase) 且存活率高之狀態，約為 80% ~90% 緻密度。DMSO 應為試劑級等級，且無菌無色 (0.22 micro FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品)。冷凍保存之細胞濃度： 1×10^6 cells/ml。冷凍保護劑濃度為 5% ~10% DMSO。

步驟：冷凍前一日更換半量或全量的培養基，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液（使用前配製）：將 DMSO 加入新鮮的培養基中，最後濃度為 5%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液（約 0.1 ml）計算細胞濃度及冷凍前存活率。離心，除去上清液，依細胞數的數量加

入適量的冷凍保存液，使細胞濃度為 1×10^6 cells/ml，混合均勻，分裝於標示清楚之冷凍保存管中（1 ml/vial）。冷凍保存方法：冷凍管置於 -80°C 16~18 小時（或隔夜），最後以液氮槽長期儲存。

肆、細胞計數

原理：細胞計數是利用 trypan blue 染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因為細胞膜完整，因此染料無法滲入而不會呈色。計算數目是利用細胞計數盤，細胞計數盤一般有兩個 chamber，每個 chamber 中細刻成九個 1 mm^2 大正方形其中九宮格周圍的正方形再細刻 16 小格，深度均為 0.1 mm。當 chamber 上方蓋上玻片後，每各大正方形的體積為 $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ ml}$ 。使用時，計數上、下 chamber 各 5 個大正方形內（四的角落和中央區域）之細胞數總和，除以 10，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每 ml 中的細胞數。（如圖 2-5）。

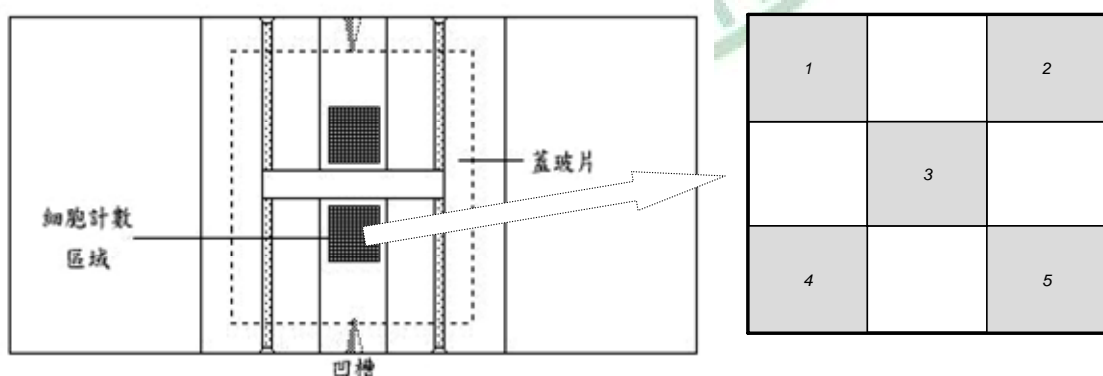


圖 2-5：細胞計數盤

步驟：首先將舊的培養基吸出，接著以 10 ml 1X PBS 緩衝液 (pH 7.4)

清洗兩次，清洗完後加入 1 ml 的 0.05% trypsin-EDTA 約 3~5 分鐘（於細胞培養箱中反應），再加入 3 ml 10% FBS-DMEM 中斷 trypsin 作用，將培養皿內的細胞液移置離心管中以離心轉 1500 rpm 5 分鐘將細胞離心下來，除去上清液後加入適量的培養基，均勻的將細胞與培養基混合均勻並取出 100 μ l 的細胞懸浮液與 10 μ l trypan blue（0.4% trypan blue）混合均勻於 1.5 ml 微量離心管中。將蓋玻片蓋於細胞計數盤上，取混合液 10 μ l 於 chamber 上方凹槽加入，接著在倒立式顯微鏡下觀察及計數。在計數之時，細胞若位於線上，則只計上限與右線（或計下線與左線之細胞）。

伍、細胞存活率分析

本篇論文所採用的方法為MTT試驗(MTT assay)。原理如下述，MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)進入細胞內而被粒線體內膜上的琥珀酸去氫酶 (Succinate dehydrogenase on Mitochondrial inner membrane)給還原成MTT，不溶於水，呈現紫色針狀結晶；因為只有在活細胞中其粒線體才有活性，因此只有活細胞才會生成結晶，在結晶完全形成之後，會結在細胞上造成細胞死亡，再用DMSO溶出結晶，用595 nm的波長在ELISA reader下讀取吸光值。

細胞以 2×10^4 /well種於24孔盤中，24小時後，換成含有指定濃度指定藥物的培養液(一個孔0.5 ml)，培養24小時後，加入MTT試劑 (MTT 2

mg/ml 溶於PBS中) 反應3小時待結晶形成，將24孔盤中的培養液與試劑吸乾，加入500 μ l的DMSO溶解結晶，取200 μ l溶解液至96孔盤中以590 nm之波長在ELISA reader下讀取吸光值。

陸、細胞總蛋白收集與定量

細胞以 1×10^6 個種植於10公分培養皿中，待16~20小時細胞貼附後，給予指定劑量的LYF-17並培養指定的時間於細胞培養箱中。待處理後，將各組別的細胞用trypsin-EDTA打下連同培養液一起收集至15 ml離心管中，離心1500 rpm、5分鐘。去除上清液，加入1 ml PBS將細胞打散，離心1500 rpm、5分鐘。將上清液倒乾，加入1 ml PBS將細胞打散並轉到1.5 ml eppendorf，離心12000 rpm、1分鐘。用微量吸管確實吸乾上清液，收集的細胞可存放於-80 $^{\circ}$ C冰箱一個月備用。

將收集的細胞加入適量的lysis buffer (10% glycerol ; 1% Triton X-100 ; 137 mM NaCl ; 10 mM NaF ; 1 mM EGTA ; 5 mM EDTA ; 1 mM sodium pyrophosphate ; 20 mM Tris-HCl, pH 7.9 ; 100 mM β -glycerophosphate ; 1 mM sodium orthovanadate ; 0.1% SDS ; 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/ml leupeptin)置於冰上，每10分鐘震盪一次(以"vortex 9"速度震盪)。待震盪三次後，再以超音波震盪1分鐘，最後離心12000 rpm、30分鐘、4 $^{\circ}$ C。以微量吸管吸取上清液，收集於新的

ependorf中，此上清液即為細胞總蛋白(total protein)。當總蛋白質定量後，以每管50 μ g的蛋白質分裝儲存於-20 $^{\circ}$ C備用。

蛋白質定量，以Bio-Rad Protein Assay Dye來測定。其原理簡述如下，Bio-Rad Protein Assay Dye中酸性的Coomassie[®] Brilliant BlueG-250會與蛋白質結合，而蛋白質濃度不同會使溶液顏色呈現不同程度的變化，通常蛋白濃度介於0~20 μ g/ml時，溶液顏色將會由棕紅色轉灰黑色，最後變成深藍色。取稀釋的Bio-Rad Protein Assay Dye (1:4 Milli Q水) 1 ml分別加入0、1、2、4、6、8、10 μ l的BSA (Bovine serum albumin 2 mg/ml)，混合均勻後，取200 μ l之混合液至96孔盤，以595 nm之波長在ELISA reader 下讀取吸光值，並以此七點對應之吸光值建立檢量線 (回歸系數須大於0.995才可採用)。取待定量之蛋白質液2 μ l混合於1 ml稀釋的Bio-Rad Protein Assay Dye，取200 μ l之混合液至96孔盤，以595 nm之波長在ELISA reader下讀取吸光值，並以建立好的檢量線換算蛋白質濃度。

柒、蛋白質之電泳分析(SDS-PAGE)

實驗所使用的電泳裝置為Bio-Rad 蛋白質電泳槽，待鑄膠裝置組合後，先加入分離膠體溶液 (separating gel)，再加入酒精將上層膠壓平，待凝固後倒掉酒精並擦拭乾後加入集膠溶液 (stacking gel)，插上齒梳，待膠體凝固後置於電泳槽中，注入電泳緩衝液 (running buffer)。取50 μ g蛋

白質樣本加入其1/5體積的 6X sample loading dye，混勻後在99°C加熱5分鐘後，迅速置於冰上再注入樣本槽。先以80V進行電泳，待藍色染劑跑到分離膠體時，將電壓調整為110V繼續電泳，直到藍色染劑跑到膠體底部，關閉電源將膠體取出。

捌、西方墨點法(Western blotting)

實驗所使用的電泳裝置為Bio-Rad 濕式電泳轉漬槽，取出跑好的SDS-PAGE後，切除集膠體部份，膠片浸在轉漬緩衝液 (Transfer buffer) 中。取轉印紙 (硝化纖維紙nitrocellulose paper)切成膠片大小，用甲醇浸潤，先鋪上三張濕潤的3M濾紙，後鋪上濕潤的轉印紙，疊上已濕潤的膠片，再鋪上三張濕潤的3M 濾紙。(注意！過程需趕走氣泡)，轉印紙那面位向正極，膠片那面位向負極，以70V轉印3小時。之後，將轉印紙放入1X TBST含5%脫脂牛奶，室溫搖盪1小時，以填塞沒有蛋白質轉印上去的空間。倒掉進行Blocking的牛奶，加入第一次抗體 (1：1000 稀釋)，置於室溫搖擺1~2小時或放置4°C 隔夜 (超過12小時)。倒掉第一次抗體或回收重覆使用，以1X TBST清洗5分鐘三次。再加入第二次抗體 (1：2000 稀釋)，置於室溫搖擺1~2小時。倒去二次抗體，轉印紙以1X TBST清洗5分鐘三次。最後將轉印紙浸泡於ECL試劑 (Enhanced chemiluminescence)反應1分鐘，再將轉印紙以透明投影片夾住，黏貼固定於壓片夾 (cassette)

中，在暗房操作以X-ray film (Kodak)感光得蛋白質訊號。

玖、細胞 RNA 的抽取

(A) 均質化(Homogenization)

將已經長滿細胞的細胞培養皿(Petri dish)中的細胞培養液吸去，DPBS清液沖洗一次之後吸去，把細胞培養皿倒置於擦手紙上，使殘餘液體滴下，再加入1.2 ml TRIZOL均勻的潤濕細胞，進行細胞裂解(cell lysis)，然後用pipette將cell lysate反覆抽吸數次，再將cell lysate移到eppendorf，靜置5分鐘。

(B) 相分離(phase separation)

靜置5分鐘之後，加入240 μ l chloroform，震盪15秒，離心12000 rpm，30分鐘，4 $^{\circ}$ C，然後用P200 pipetment小心將水層(最上層)移到新的eppendorf。

(C) RNA沉澱

取600 μ l IPA加入水層，混合，4 $^{\circ}$ C靜置30分鐘之後，離心12000 rpm，30分鐘、4 $^{\circ}$ C，使用P200 pipetment移除上清液，之後延著eppendorf管壁輕輕加入-20 $^{\circ}$ C預冷的75%乙醇(in RNase-free H₂O)，輕輕搖晃eppendorf，使pellet晃動，然後移除上清液。

(D) RNA回溶

將pellet及管壁上殘留的液體吹乾(不要全乾，會不好回溶)，然後用30~50 μ l RNase-free H₂O將pellet回溶(輕輕pipette數次)。

(E) RNA品質控制(quality control)

利用分光光度器檢測(Spectrophotometric analysis)--- $A_{260}/A_{280}=1.9\sim 2.1$

(F) RNA含量(quantity)檢測

利用分光光度器檢測之後，取 A_{260} 的數據去計算含量
--- $A_{260}\times 40\times \text{Dilution factor}=\text{___ ng}/\mu\text{l RNA}$

壹拾、反轉錄即時定量聚合酶鏈反應(real-time PCR)

首先配製RT master mix，配法及取量如下：

100mM dNTPs(with dTTP) 0.15 μ l

MultiScribe™ Reverse Transcriptase(50U/ μ L) 1 μ l

10X Reverse Transcription Buffer 1.5 μ l

RNase Inhibitor(20U/ μ L) 0.19 μ l

Nuclease-free water 4.16 μ l

將配好的RT master mix 7 μ l加入3 μ l的primer、5 μ l的RNA sample(10ng)混合均勻後，放置冰上5分鐘。放入PCR機器中，以16°C 30分鐘、42°C 30分鐘、85°C 5分鐘去反應，最後將已轉為cDNA的sample儲存於4°C冰箱。接

下來配置real-time PCR所需reagent，配法及取量如下：

TaqMan MicroRNA Assay(20X) 1 μ l

Product from RT reaction(Minimum 1 : 15Dilution) 1.33 μ l

TaqMan 2X Universal PCR Master Mix 10 μ l

Nuclease-free water 7.67 μ l

將以上reagent混合好後，置入96 Detection Plate中，封上封膜後使用ABI PRISM 7900機器去偵測，反應步驟如下：

Step	HOLD	CYCLE(40 cycles)	
		Denature	Anneal/Extend
Time	10 min	15 sec	60 sec
Temp($^{\circ}$ C)	95	95	60

壹拾壹、細胞遷移能力分析

(A)Transwell assay

原理：Transwell 的上 (transwell inserts)、下 (lower chamber) 兩層之間具有一層膜 (膜上具有孔洞)，將待測之細胞培養液或藥物注入下層，再種置待測細胞於上層 (膜的上方)，培養欲試驗的時間，觀察細胞移動至膜的另一側的情況，藉此判別藥物對細胞遷移的影響是正趨向性 (吸引) 或負背離性 (抑制)。

步驟：本次實驗採用Corning的24 well Transwell (8 μ m polycarbonate membrane)。先於10公分細胞培養皿中以10%胎牛血清的DMEM培養

MCF-7 細胞株和 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培養 MDA-MB-435 和 MDA-MB-231 細胞株，待細胞株皆生長至 7~8 分滿度時，將培養基去除，各別加入 10 ml 1X PBS 緩衝液 (pH=7.4) 清洗兩次後，加入 10 ml 不含胎牛血清的 DMEM (serum-free medium) 培養 MCF-7 以及加入 10 ml 不含胎牛血清的 DMEM/F12 (serum-free medium) 培養 MDA-MB-435 和 MDA-MB-231，各別培養 24 小時，將培養基去除，再以 10 ml 1X PBS 緩衝液 (pH=7.4) 清洗兩次後，加入 1 ml 的 trypsin-EDTA 作用 3~5 分鐘 (於細胞培養箱中反應)，再加入 3 ml serum-free medium 中斷 trypsin 作用，將培養皿內的細胞液移置離心管中，以離心轉速 1500 rpm、5 分鐘將細胞離心下來，除去上清液後加入適量的 serum-free medium，利用 pipette 以抽吸方式將細胞打散，取 100 μ l 的細胞懸浮液到 transwell inserts 中，並於 lower chamber 內加入 600 μ l 的 NIH3T3 細胞的培養基 (內含 10% 胎牛血清以及 NIH3T3 細胞分泌液)，培養 24 小時後，加入 50 nM 的實驗藥物 LYF-17 到 transwell inserts 中，培養待觀察的時間點之後，取出 Transwell 的 transwell inserts 並將液體去除，將 transwell inserts 置入 1X PBS 緩衝液 (pH=7.4) 清洗兩次後，改置入 10% 的 Formaldehyde 中，反應 15~30 分鐘後，使用 1X PBS 緩衝液 (pH=7.4) 清洗兩次，再將其置入 Coomassie Brilliant Blue 染劑中，反應 1 小時後，以 1X PBS 緩衝液 (pH=7.4) 清洗兩次後去除多餘染劑，並用沾溼的棉花棒擦去未遷移至膜的另一側的細胞，將 transwell inserts 置

入退染液(甲醇：水：醋酸=5:4:1)中清洗數次，晾乾，以照相顯微鏡擷取結果並計算有遷移至膜的另一側的細胞數。遷移率(migration ratio ,%) = [有遷移的樣品組細胞數 / 有遷移的控制組細胞數] × 100%。

(B) Wound-healing assay

其操作方法參考 Liang et al.及 Rodriguez et al.所寫。此方法由於簡單、節省成本並且可以模擬在體內(*in vivo*)細胞遷移的狀況，因此創傷癒合(Wound-healing assay)此方法廣為大家所使用。

原理：創傷癒合(Wound-healing assay)試驗也稱做 Scratch assay。這兩種名稱都表示了此方法之操作。其中“Scratch”表示“抓”之意，即利用 tip 在種滿的細胞上刮一條直線，來製造一條空隙，之後隨著時間點拍照紀錄，來觀察細胞受藥物刺激後，其遷移能力是否受到影響。

步驟：簡單的說，當細胞培養至將近全滿時，以細胞繼代培養的方式將細胞從 10 公分培養皿中利用 trypsin-EDTA 打下，並取 2×10^5 細胞數至 24 well 培養盤中，接著放置培養箱於 37°C、5% CO₂ 培養 24 小時之後，將上清液吸掉(不要吸的太乾，細胞容易死掉)，接著以 pipette 裝上 tip(為吸取 200µl 時所使用的 tip)，於 Well 中間劃一條直線，接著加入 1X PBS 清洗掉刮起的細胞，之後再加入含有 1% FBS 的培養基 500µl(含或不含藥物)，放置 37°C、5% CO₂ 的培養箱培養，並依造實驗時間點的不同，於倒立式顯微鏡下觀察並拍照紀錄。

壹拾貳、 SCID mice 腫瘤誘發模式 (SCID mice xenograft model)

原理：SCID 為 Severe Combined Immune Deficiency (嚴重混合免疫缺陷) 之縮寫。80 年代，Bosoma 等人在小鼠近親品系 C.B-17 觀察到隱性的 SCID 症候群遺傳突變(Shultz, 1991)，其特徵為喪失成熟 B 與 T 淋巴球之功能，另外也缺乏由放射線或化學物質誘發之 DNA 雙股斷裂的修補能力，由於 SCID 小鼠嚴重地缺乏免疫及修補能力，進而使不同種類之人類癌細胞株利於在 SCID 小鼠中生長。此模式之優點在於利用 SCID mice 作為載體以提供模擬人類腫瘤生長之情形。

步驟：利用皮下注射的方式，將 2×10^6 顆 MDA-MB-435 的癌細胞注入 SCID mice 的乳腺部位，使得老鼠可以在體內乳腺部位長出腫瘤，待生成的腫瘤體積到達約 $\sim 200 \text{mm}^3$ 時，開始靜脈注射不同劑量的實驗藥物 LYF-17，藥物注射四週之後犧牲老鼠，觀察體內腫瘤的轉移情形。

第三章 研究結果

第一節 LYF-17 對MDA-MB-435 細胞株的半數抑制濃度(IC₅₀)

利用MTT assay，LYF-17 對MDA-MB-435 細胞株的IC₅₀、LYF-17 對正常細胞HBL-100 細胞株的IC₅₀，以及其他臨床用藥針對這兩株細胞株的IC₅₀，如表 2-3 所示。由此可看出，投予LYF-17 對於MDA-MB-435 的IC₅₀ 與其他臨床用藥互相比較發現只要低濃度就可對MDA-MB-435 達到抑制效果與臨床用藥的效果差不多，另外，針對正常細胞HBL-100 投予LYF-17 之後，此細胞株的IC₅₀與其他臨床用藥互相比較後，反倒是最底的濃度就達到抑制正常細胞生長，不過，由於投予LYF-17 對於MDA-MB-435 的IC₅₀ 比針對正常細胞HBL-100 的濃度還要低，也就是當我們對乳癌細胞MDA-MB-435 投予半數抑制濃度時，對於正常細胞的影響較小，由以上的實驗得知LYF-17 或許可以發展成為新的抗癌藥物。

第二節 LYF-17 對乳癌細胞 MDA-MB-435 的 microRNAs 的影響

本實驗目的是藉由明欣生物科技公司所執行的 TaqMan® Human MicroRNA 系統分析資料中，去挑選出乳癌細胞 MDA-MB-435 投予濃度 50 nM 的 LYF-17 之後受到影響的 microRNAs，從其中挑選出變化量較大的 microRNAs，利用 real-time PCR 再次確認 LYF-17 影響到的 microRNAs 的表現量(圖 2-6)。接續結果，並且進一步搜尋參考相關文獻，

發現 LYF-17 影響到的 microRNAs 中，包含 miR-200c 和 miR-141 是可以調控 epithelial to mesenchymal transition (EMT)現象的關鍵因子(Burk et al., 2008)。

第三節 LYF-17 對人類乳癌細胞 MDA-MB-435 的胞內調控 EMT 蛋白質之影響

從藥物 LYF-17 對 microRNAs 的影響，進一步深入到癌細胞的遷移能力以及侵入性的影響，發現這一系列的結果都與 epithelial to mesenchymal transition (EMT)現象有關連。EMT 即是上皮的癌細胞 (epithelial cancers)利用轉變成間質(mesenchymal)型態的細胞來進行侵入 (invasion)和轉移(metastasis)(Brabletz et al., 2005; Christofori, 2006; Lee et al., 2006; Thiery and Sleeman, 2006)。因此抑制了 EMT 的情形，就可以間接阻止癌細胞惡化，提升藥物 LYF-17 的治癒療效。從相關文獻中得知，microRNAs 會影響 EMT 的情況，而影響 EMT 現象的相關蛋白有 ZEB1、TGF β 2、E-cadherin (Epithelial markers)、Vimentin (Mesenchymal markers)(Burk et al., 2008; Gregory et al., 2008)。其中 ZEB1 和 TGF β 2 會被 microRNA-200 family 給抑制(Burk et al., 2008)，而 TGF β 2 可間接調控 E-cadherin 和 Vimentin，兩者皆可進一步抑制了癌細胞 EMT 和侵入的情形。因此本實驗的目的就是利用西方墨點法去確認乳癌細胞投予藥物

LYF-17 之後，按照不同的時間點以及不同的藥物劑量，來觀察這些相關蛋白是不是也會如同其他文獻研究一樣有所影響。目前結果顯示，投予 LYF-17 之後，的確有部分如預期的影響到相關蛋白的表現量：ZEB1 及 Vimentine 的蛋白質表現量被抑制；E-cadherin 的蛋白質表現量上升。(圖 2-7)。

第四節 LYF-17 對乳癌細胞遷移影響

細胞遷移現象在抗癌發展的機轉中，扮演了相當重要的角色。癌細胞的遷移會導致藥物治療效果降低，使癌症病患不易治癒。本實驗的目的是探討LYF-17 是否會藉由影響microRNAs，進一步影響到細胞的遷移情形。首先將MDA-MB-435 和MDA-MB-231 兩株細胞株各別種 2×10^5 至 24 well 中，待培養 24 小時後，抽掉上清液，並以 200 μ l 的tip 於well 中間劃一條線，製造一個空隙，之後以 1X PBS 清洗，並加入control 組及給藥組(1% FBS、1% FBS+50 nM LYF-17)，最後於 0、12、24、48、72 小時在顯微鏡下觀察，並拍照紀錄(圖 2-8)。結果發現，加入LYF-17 之後，確實抑制了乳癌細胞的遷移情況，而MDA-MB-435 細胞株的抑制效果更甚。

第五節 LYF-17 對乳癌侵入能力的影響

癌細胞侵入能力在抗癌發展的研究中，也扮演了相當重要的角色。癌細胞容易侵入正常的細胞而擴大癌細胞範圍，使得病症越來越嚴重，

而導致藥物治療效果降低，使癌症病患不易治癒。本實驗的目的是進一步用 Transwell 去觀察 LYF-17 是否也可以抑制乳癌細胞的侵入性。實驗結果顯示(圖 2-9)，LYF-17 可以抑制轉移能力以及侵入性能力高的乳癌細胞 MDA-MB-435(Khaldoyanidi et al., 2003; Zen et al., 2008)。

第六節 LYF-17 對人類乳癌細胞形態的影響

本實驗目的是想要得知LYF-17 對於容易轉移的兩株細胞株 MDA-MB-435 和MDA-MB-231 的細胞型態是否有所影響。當細胞株的細胞型態比較偏向紡錘體形狀也就是所謂間質細胞型態，此狀況下的細胞株較容易轉移。首先，取 2×10^5 細胞數至 10 cm 培養盤中，細胞貼附之後先拍照記錄，接著投予 50 nM 的LYF-17，放置 37 °C 培養箱培養，每三天換新的培養液並且一併加藥，然後拍照記錄細胞型態，觀察至細胞完全長滿培養盤。結果發現，MDA-MB-435 在投予藥物之後，隨著時間的增長，型態改變的效果越明顯，轉移能力也因細胞型態的改變而降低；MDA-MB-231 在投予藥物之後，型態上也有被改變，不過或許是因為細胞株生長的速度以及轉移能力不一樣，MDA-MB-231 觀察到第九天，整個培養皿完全長滿，因此降低了LYF-17 針對此株細胞型態的改變。(圖 2-10)

第七節 LYF-17 對轉染 microRNA inhibitor 的人類乳癌細胞侵入能力的影響(transwell assay)

本實驗的目的主要是加強佐證 LYF-17 是否真的直接影響到 miR-200c 和 miR-141 的表現量，進而改變人類乳癌細胞的轉移以及侵入的情形。所以，藉由轉染入 miR-200c 抑制劑和 mir-141 抑制劑去抑制 miR-200c 和 miR-141 的表現量，觀察人類乳癌細胞的轉移以及侵入能力是否因此而無法被 LYF-17 抑制。首先，將人類乳癌細胞分別轉染入 30 nM miR-141 inhibitor 和 30 nM miR-200c inhibitor，在轉染後，將細胞放置 37 °C 培養箱培養 8-24 小時即可做試驗處理(轉染後得在 72 小時內完成試驗)，若因為轉染試劑的影響而導致細胞大量死亡，則換入新的培養液。接著以 Transwell 觀察人類乳癌細胞在轉染過後，LYF-17 是否也可以抑制人類乳癌細胞的侵入性。實驗結果顯示(圖 2-11)，轉染之後，投予 LYF-17 卻使得可以抑制人類乳癌細胞的轉移能力以及侵入性能力的效果降低。表示，LYF-17 對於 miR-200c 和 mir-141 的表現量是真的有直接的影響。LYF-17 確實可以促使 miR-200c 和 mir-141 表現量上升，進而調控 EMT 的相關因子(包含：E-cadherin、Vimentin 和 ZEB1)。

第八節 LYF-17 對原位腫瘤誘發模式的影響

此實驗的目的主要是探討 LYF-17 在原位腫瘤誘發的動物實驗中所得

到的實驗結果，是否與LYF-17 治療乳癌細胞株的結果相同。首先利用原位注射的方式，將 2×10^6 顆MDA-MB-435 注入SCID mice的乳腺部位，使得老鼠可以在體內乳腺部位長出腫瘤。待生成的腫瘤體積到達約 $\sim 200\text{mm}^3$ 時，開始對老鼠進行靜脈注射，注入不同劑量的實驗藥物LYF-17(500 ug/Kg、1 mg/Kg、5 mg/Kg)治療，藥物注射四週之後犧牲老鼠，觀察體內腫瘤的轉移情形。實驗結果(圖 2-12)發現，LYF-17 隨著劑量的增加，抑制腫瘤轉移到其他器官的效果越好。轉移到肝臟的腫瘤數，也隨著LYF-17 劑量的增加有變少的趨勢。加上注射LYF-17 之後，觀察老鼠的體重結果發現，無論劑量的高低，對於老鼠的體重沒有太大的影響。綜合上述結果顯示，LYF-17 對於動物實驗有抑制腫瘤轉移的效果，注射此藥物之後對於動物本身較無害，證實LYF-17 或許可以成為有潛力的抗癌新藥。

第四章 討論

第一節 藥物改變 microRNAs 的探討

正常的細胞在體內互相的溝通並且調節細胞中的分化以及生長。細胞生長或多或少地淘汰老舊的細胞。當癌症發生時，正常細胞會跳脫原有的細胞週期控制，使得其成長與生長失去控制，這一些跳脫控制的機制非常複雜，不過可以大略歸類為幾點，第一、某些調控細胞週期的因子自身基因突變(gene mutation)。第二、某些癌症抑制基因(tumor suppressor gene)，或是原始致癌基因(proto-oncogene)被破壞或是產生突變。這些步驟都是癌症上發展上不可或缺的兩個步驟。

當以上兩個基因被破壞時，就會產生癌症。更嚴重甚至於癌症便會離開原有腫瘤產生處(primary tumor site)遷移至其他組織以及器官，這種情形就是所為的轉移(metastasis)。

然而，近年來，在細胞中開始發現具有調節這些基因能力的 RNAs 稱作微核糖核酸(microRNA)為一類新的小核糖核酸，具有反向調節基因的功能(Tavazoie et al., 2008)。microRNA 在臨床試驗上是調控不同的生物學過程，包括發展、細胞增殖、分化和細胞凋亡。這些作用的調控主要是藉由抑制重要的標的基因表現。經 microRNAs 去默化轉錄的標的基因會發生抑制標的蛋白的合成或者切斷同源標的 mRNAs 的情況。重要地，未來個人化的醫學和癌症治療，microRNAs 也許為癌症診斷和治療提供

有用的診斷和預斷標誌並且擔當潛在的治療目標或工具。

從古至今，化學療法在癌症上常被應用，前人研究指出，在胰臟癌研究中，薑黃素透過許多細胞的訊息路徑去有效的抑制腫瘤生長和促進細胞凋亡。其他前人研究則是去探討薑黃素是否有改變胰臟癌細胞 microRNAs 的表現量。利用微陣列實驗表示，結果顯示薑黃素確實調控了一些 microRNAs 的表現量。進一步，藉由 real-time PCR 去確立微陣列實驗顯示出來的 microRNA 的結果。(Sun et al., 2008)

以上的相關文獻研究顯示，藥物除了可以直接針對細胞訊息路徑做調控，也可以經由對 microRNAs 表現量的改變，進一步去搜尋相關的標的蛋白或標的基因，發現不一樣的調控機制。在本論文研究中 LYF-17 也是去探討改變 microRNAs 表現量的結果，接著從 microRNAs 表現量的不同，讓我們發現 miR-200c 和 miR-141 是調控 EMT 情形的重要標的。因此就可進一步去應證相關標的蛋白是否也有所改變，一步一步的探討相關機制。

第二節 EMT 與 miR-141 和 miR-200c 的探討

在細胞發展初期，EMT 是一個關鍵的過程 各種各樣的組織和器官的形成例如神經系統冠、心臟，肌肉骨骼系統和周邊緊張系統。然而，在成熟時期，細胞僅保留部份能力接受轉變成 EMT。惡性的乳房腫瘤細

胞初期的活動狀況就像 EMT 情形一樣，有非常好的移行力和侵襲性的能力(Cowin and Welch, 2007; Jo et al., 2009; Lou et al., 2008)。EMT 與癌症緊緊的相關連，這個過程分子的調節將會擔當治療癌症的關鍵。

在 EMT 發展初期，EMT 的相關標記會有所變化，例如：E-cadherin 下降和 Vimentin 上升。在相關文獻中發現，在卵巢癌中，發現 miR-200 家族是細胞中一個特別的標記，miR-200 家族的表現會使 E-cadherin 表現量上升並且使 Vimentin 的表現量下降。miR-200 可以直接地調節 E-cadherin 的 mRNA 轉錄去抑制 ZEB1 和 ZEB2。然而，異常的 miR-200 的表現量會導致 E-cadherin 在癌細胞中的表現量上升並且降低了癌細胞的移行能力。相反地，抑制 miR-200 會降低 E-cadherin 的表現量，增加 Vimentin 的表現量，並且誘導 EMT 的情形產生。

以前的研究將 miR-200 家族(包含 miR-200a/200b/429 和 miR-200c/141) 與上皮細胞型態以及 ZEB 家族連結在一起。在細胞初期生長時，發現 miR-200 家族的表現會使得組織中上皮細胞型態的細胞變多，並且抑制 ZEB1 和 ZEB2 的表現量。另外，別的研究指出，ZEB 家族與 EMT 以及轉移有關連性。(Cochrane et al., 2009; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008)

綜合前人研究，與本論文研究的結果相同，miR-200 家族的表現量會影響到 EMT 相關標的蛋白 ZEB1、E-cadherin 及 Vimentin 的表現量。

第五章 結論

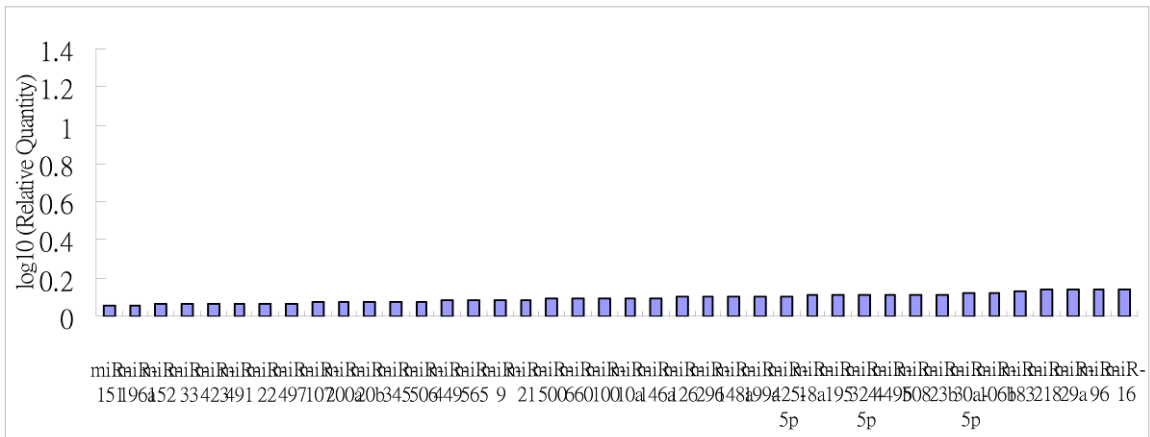
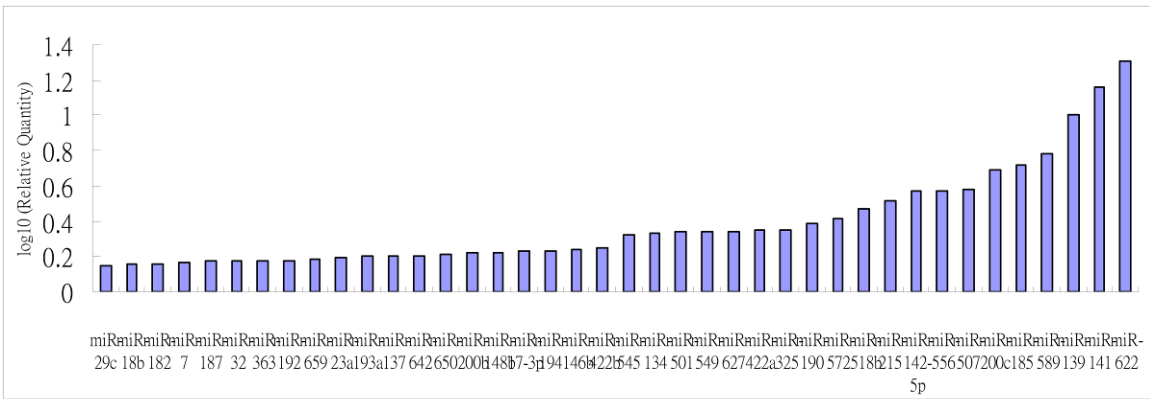
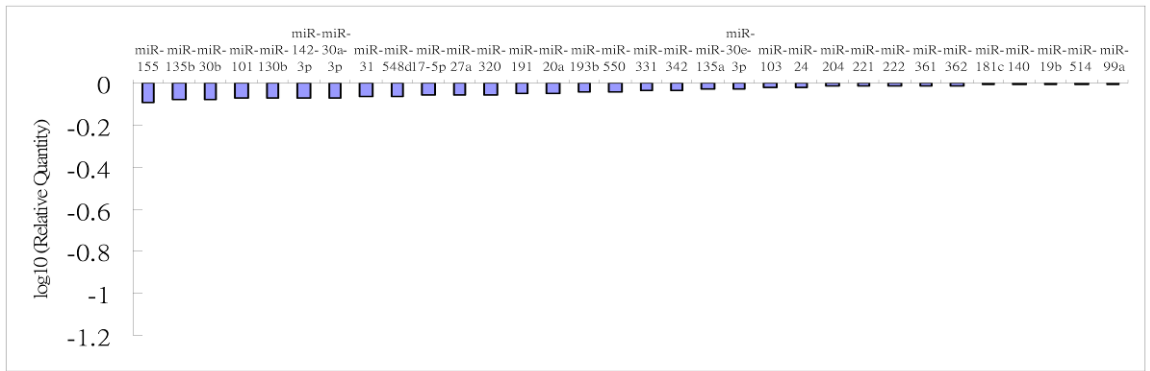
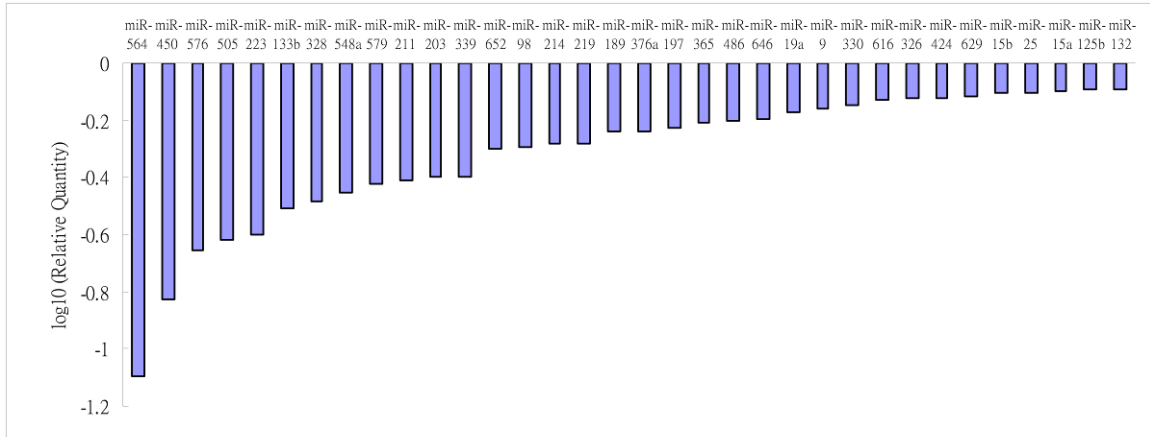
由實驗結果可得知，LYF-17 可以抑制乳癌細胞的轉移，是藉由調控 miR-200c 和 miR-141 的表現量，使其上升，進而去抑制 ZEB1 並且影響 EMT 相關蛋白，導致 E-cadherin 的蛋白表現量上升和抑制 Vimentin 的蛋白表現量。進而使得 EMT 情形無法得到擴散。

LYF-17 新藥開發的結果，除了，可以抑制乳癌細胞的轉移外，另一方面，LYF-17 在動物實驗中對動物身體的體重影響不大，對於正常細胞的毒殺效果劑量也偏低。

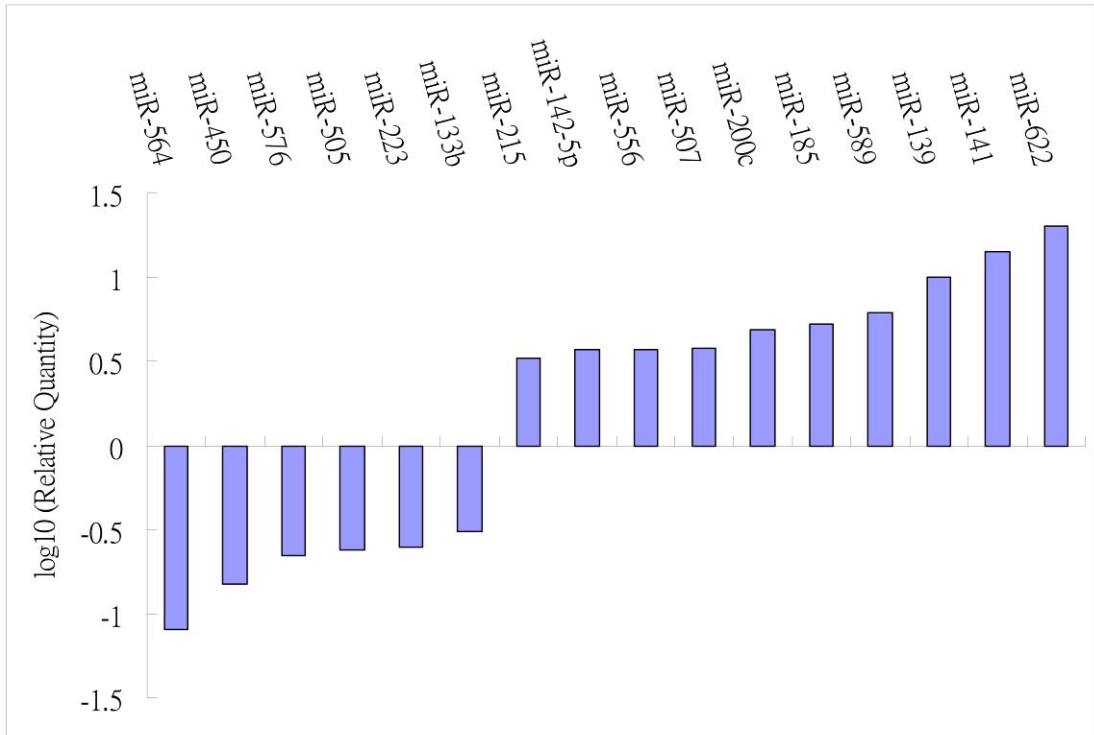
此外，相關文獻中發現，癌症在轉移時，integrin 及 CD44 所主導的黏附關係是很重要的，對腫瘤的生長及轉移也扮演關鍵性的角色。由此文獻的參考，可使我們主題一和主題二關連性增加，往後或許可以觀察表面黏附因子 CD44 在乳癌細胞中的表現與 EMT 的相關標記蛋白做個比較。

綜合上述結論及大量的文獻可知，EMT 的機制非常複雜，這當中還有許多尚未被探討的 pathway 和 microRNAs，而我們的結果可以被當作一個初步的指標，並且，透過瞭解相關途徑可以提供未來腫瘤轉移可能的治療方向，已期許 LYF-17 將來在治療或預防癌症方面，有潛力成為一個新的抗癌藥物。

(A)



(B)



(C)

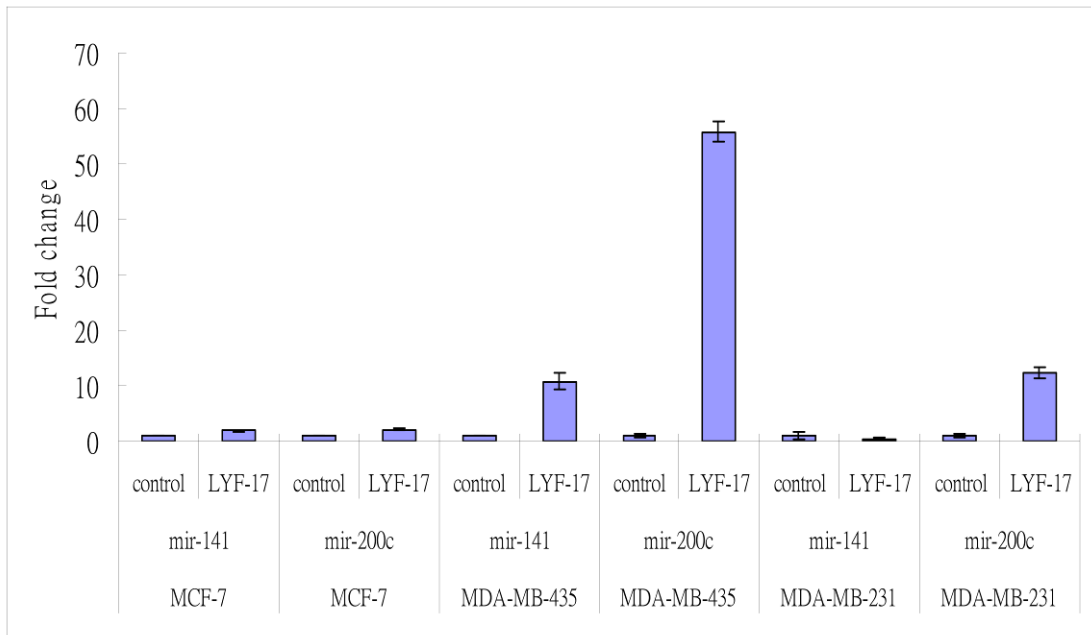
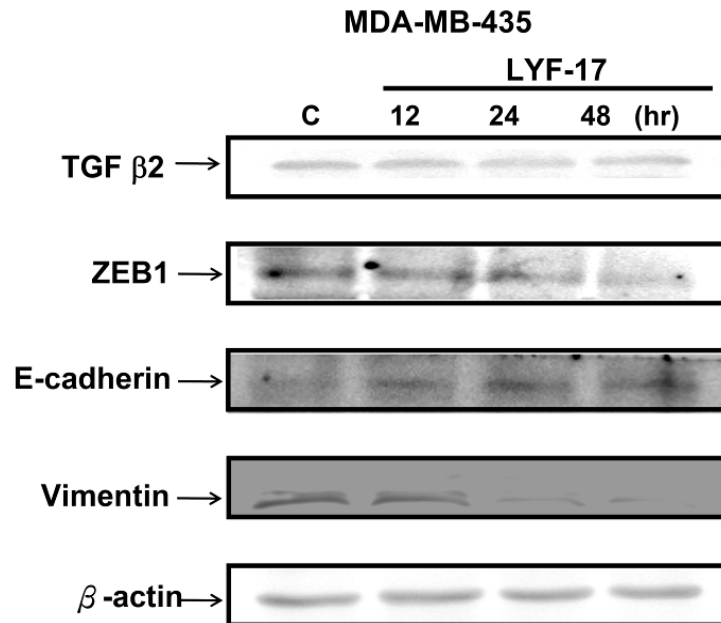


圖 2-6：LYF-17 影響 microRNAs 表現量的結果。將人類乳癌細胞投予 50 nM 的 LYF-17，24 小時之後，收集所有細胞並抽出 RNA，經反轉錄 PCR，使得 RNA 轉成 cDNA，再以 real-time PCR 分析出來的結果。(A) 利用 TaqMan MicroRNA Assays 分析，得到投予 50 nM 的 LYF-17 的 MDA-MB-435 細胞株中有被影響到的 microRNAs。(B)將 A 圖中變化量較大的 microRNA 挑出，並搜尋這些 microRNA 的相關資料及文獻。(C) 由前人研究得知，變化量較大的 miR-200c 和 miR-141(屬於 miR-200 family)，是有關轉移的調控因子，因此再利用 real-time PCR 分析不同乳癌細胞株(乳癌細胞轉移能力強弱：MDA-MB-231>MDA-MB-435>MCF-7)中投予 50 nM 的 LYF-17 之後，miR-200 family 的表現量在 MDA-MB-435 的細胞株中，有非常明顯的上升。

(A)



(B)

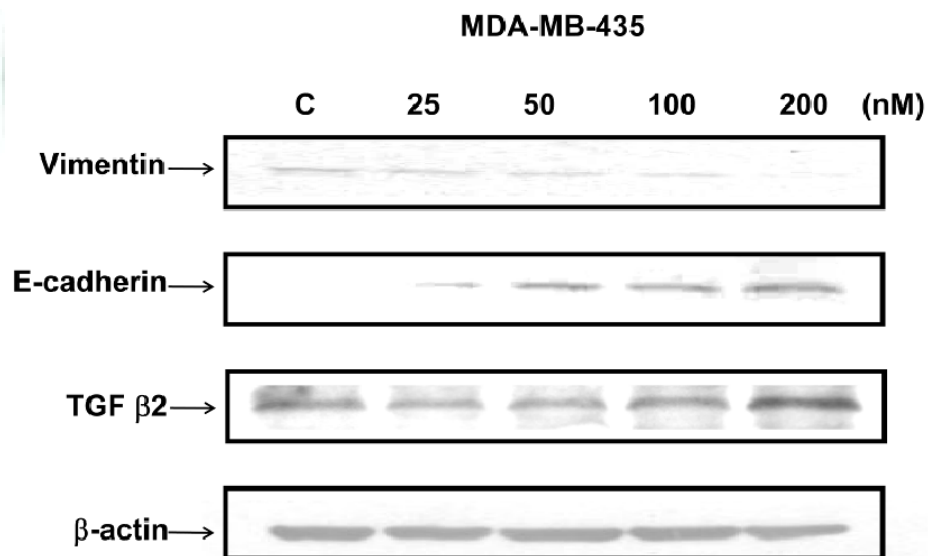


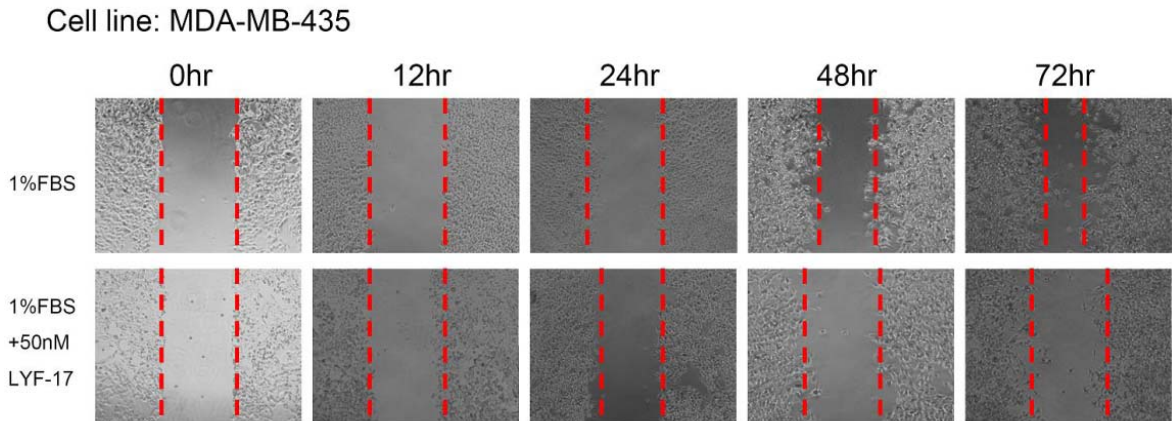
圖 2-7：以西方墨點法評估 EMT 相關蛋白表現量之變化。

(A)MDA-MB-435 投予 50 nM LYF-17 後，在不同的時間點下收集蛋白質以西方墨點法評估，與 control 組比較後發現，LYF-17 會使 MDA-MB-435 中的 ZEB1 和 Vimentin 的蛋白量受到抑制；E-cadherin(細胞黏附因子) 的

蛋白量則是上升。(B) MDA-MB-435 投予不同劑量的 LYF-17(0、25、50、100、200 nM)，處理 24 小時之後，收集蛋白質以西方墨點法評估，與 control 組比較後發現，LYF-17 會使 MDA-MB-435 中的 Vimentin 蛋白量受到抑制；E-cadherin(細胞黏附因子) 的蛋白量則是上升。



(A)



(B)

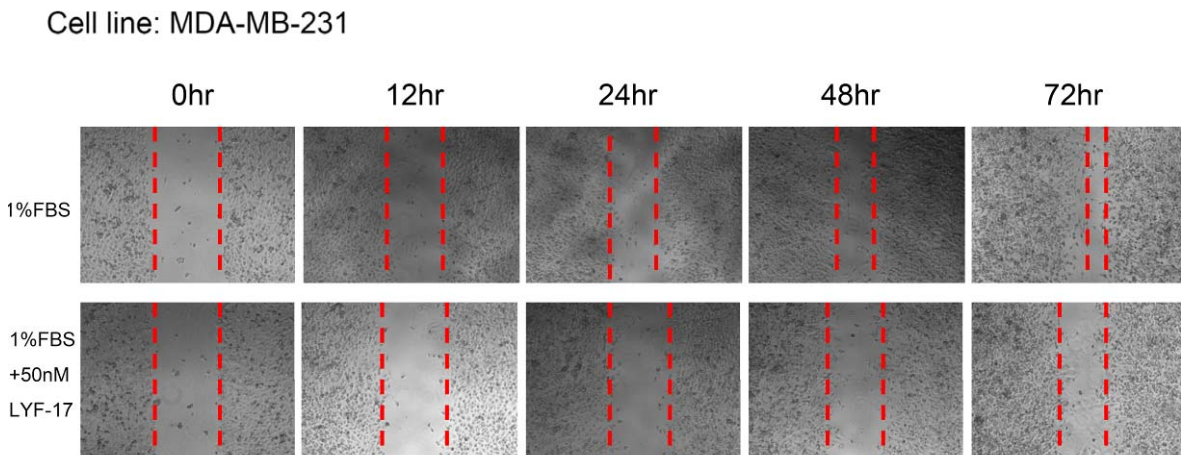


圖 2-8：LYF-17 對乳癌細胞遷移影響(Wound-healing assay)。從西方墨點法評估得到的結果得知，LYF-17 可以抑制促進 EMT 作用的相關蛋白質，因此，想藉由觀察細胞遷移情形來得知 EMT 是否有被 LYF-17 抑制。

(A)MDA-MB-435 投予 50 nM 的 LYF-17 之後，細胞遷移的情形與 control 組(1% FBS)相比較，遷移的情形有被抑制。(B)MDA-MB-231 投予 50nM 的 LYF-17 之後，細胞遷移的情形與 control 組(1% FBS)相比較，遷移的情形也有被抑制。不過抑制效果沒有 MDA-MB-435 好，可能原因是 MDA-MB-231 這株細胞的轉移能力太強，所以抑制效果反被牽制。

(A)

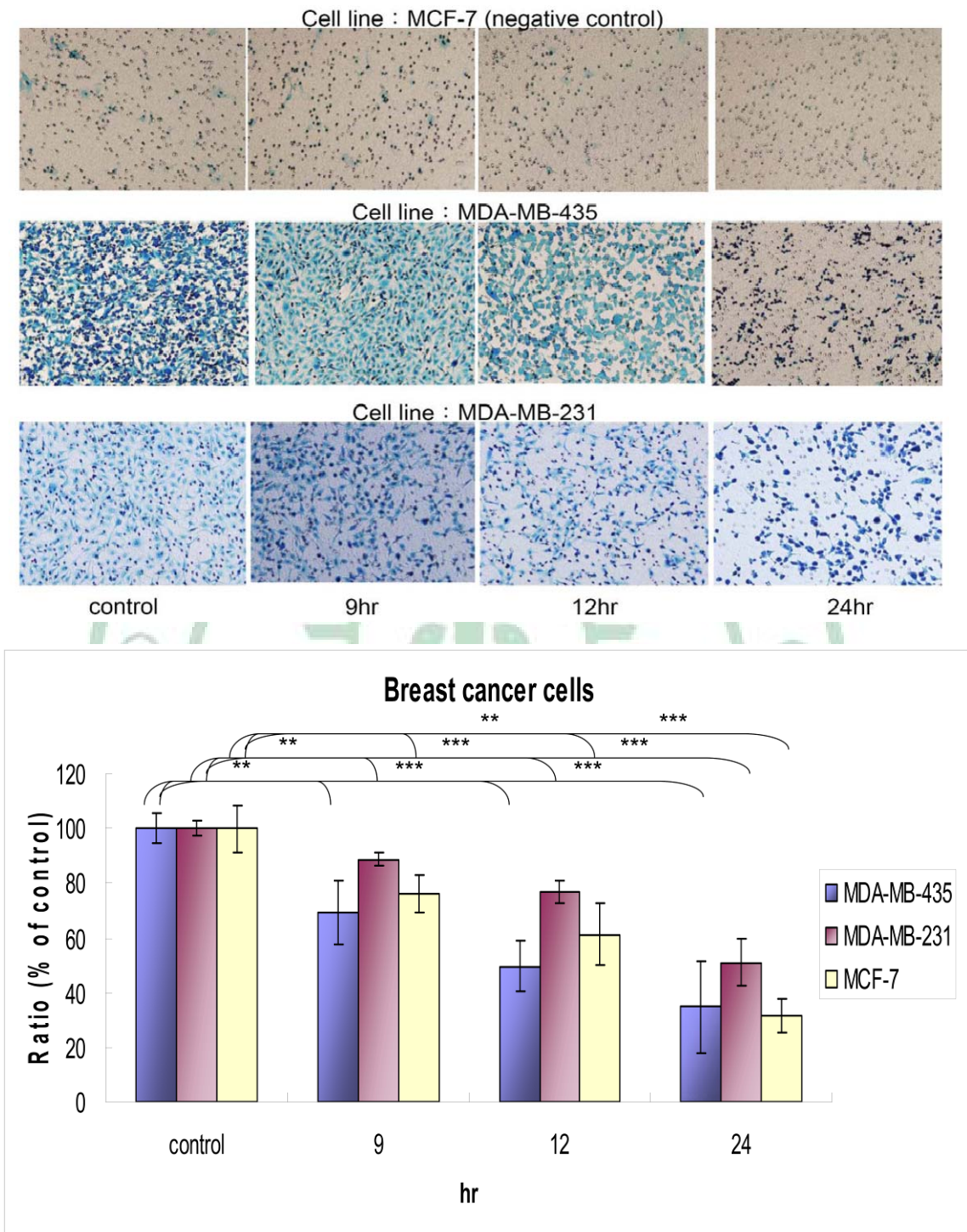


圖2-9：以Transwell評估LYF-17對乳癌細胞侵入性的影響。癌細胞具有遷移以及侵入性，容易轉移到其他器官。藉由遷移試驗結果得知，人類乳癌細胞投予50 nM 的LYF-17之後，抑制了癌細胞的遷移能力，因此，想

要觀察另一方面的侵入性是否也可以被LYF-17抑制。transwell上層培養乳癌細胞，下層為NIH3T3的細胞液(內含許多生長因子，可以誘導細胞侵入性能力)。(A)乳癌細胞投予LYF-17之後，在不同時間點下(0、9、12、24小時)，經由固定、染色、退染的步驟，收集結果並拍照紀錄(顯微鏡倍數為200X)。結果顯示，投予50 nM的LYF-17隨著時間的增加，抑制乳癌細胞侵入性能力的效果越明顯。(B)同一個well取三個以上不同視野拍下來的結果，平均之後所做出來的量化圖>(* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



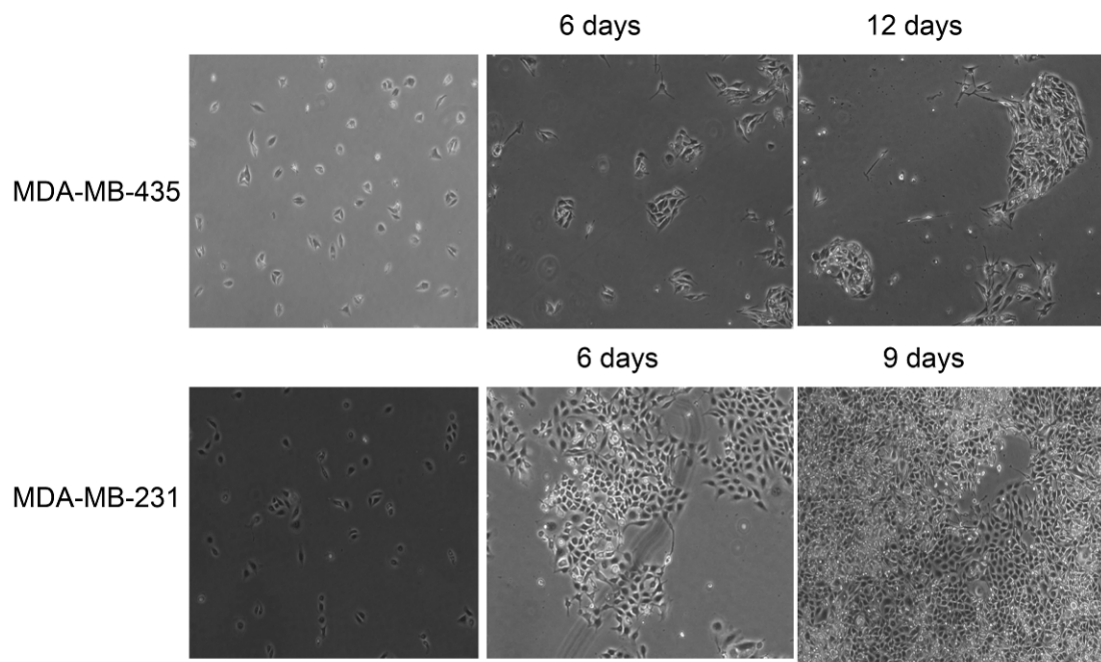
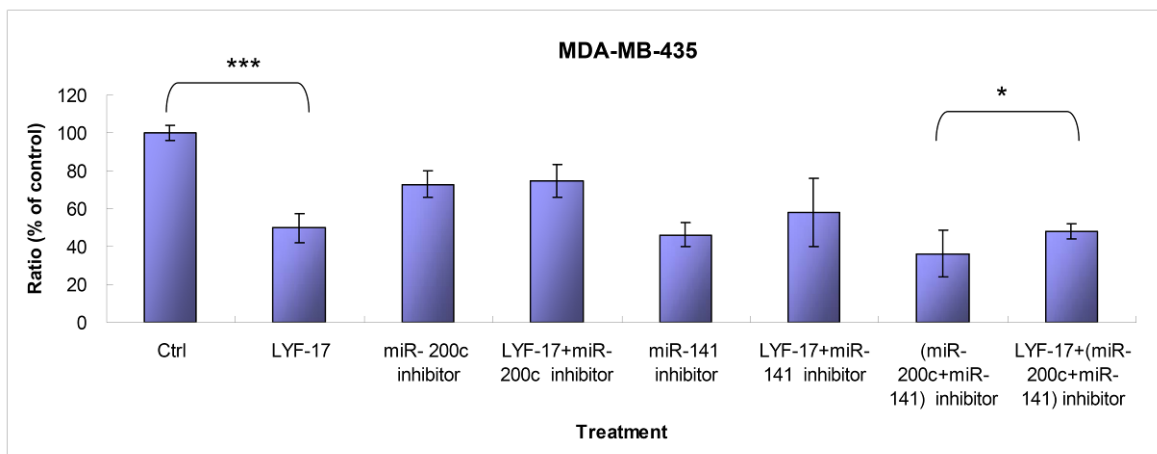
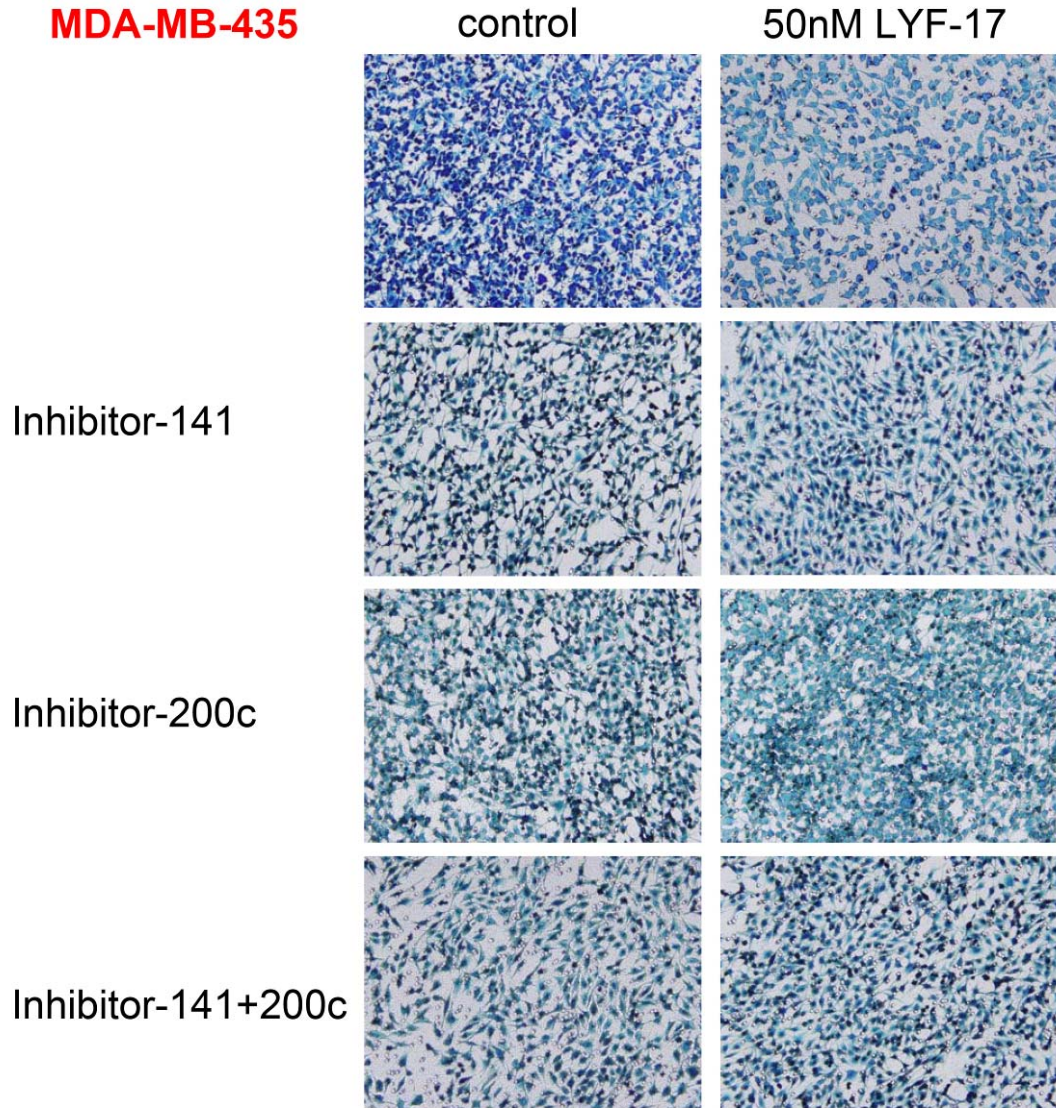


圖 2-10：LYF-17 對人類乳癌細胞形態的影響。MDA-MB-435 和 MDA-MB-231 皆屬於間質細胞型態且轉移能力較強的細胞株。每隔三天換上有加藥(50 nM LYF-17)的培養液，並拍照記錄細胞型態。

(A)



(B)

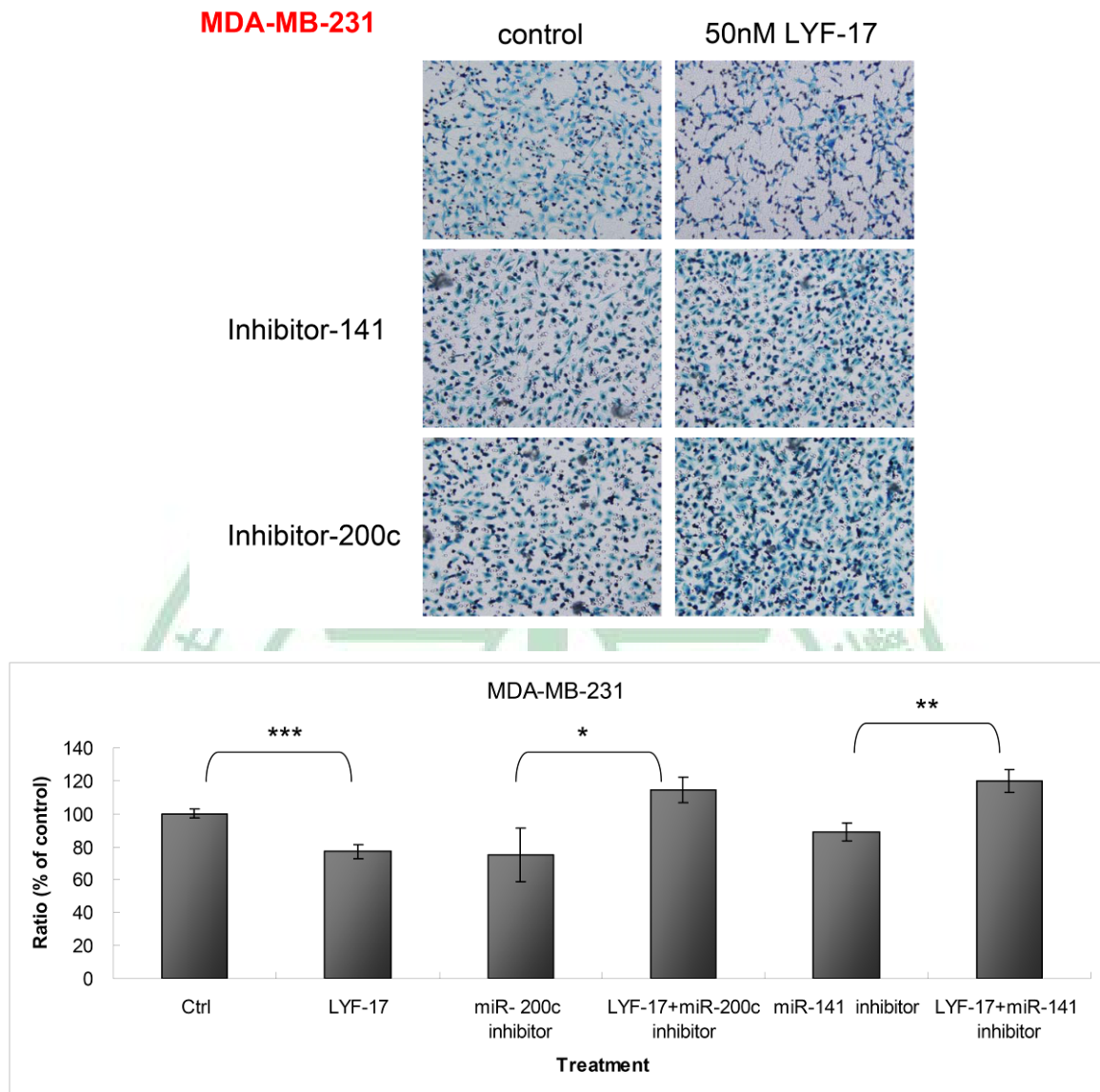
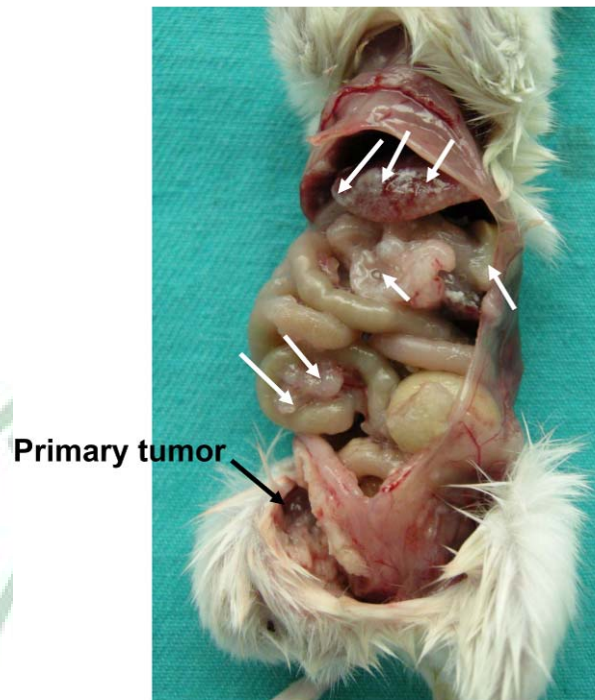


圖 2-11：以 Transwell 探討人類乳癌細胞轉染 microRNA inhibitor 對細胞侵入性的影響。前面的研究結果指出，LYF-17 會影響到 miR-200c 和 miR-141，也有相關研究指出 miR-200c 和 miR-141 會藉由調節相關蛋白抑制 EMT(Park et al., 2008)。本實驗為了要更確立 LYF-17 的確是直接影響到這兩個 microRNAs，所以將乳癌細胞轉染 microRNA inhibitor 之後，用 transwell 去觀察細胞侵入的情形，看是否與未轉染的有著相反的結果

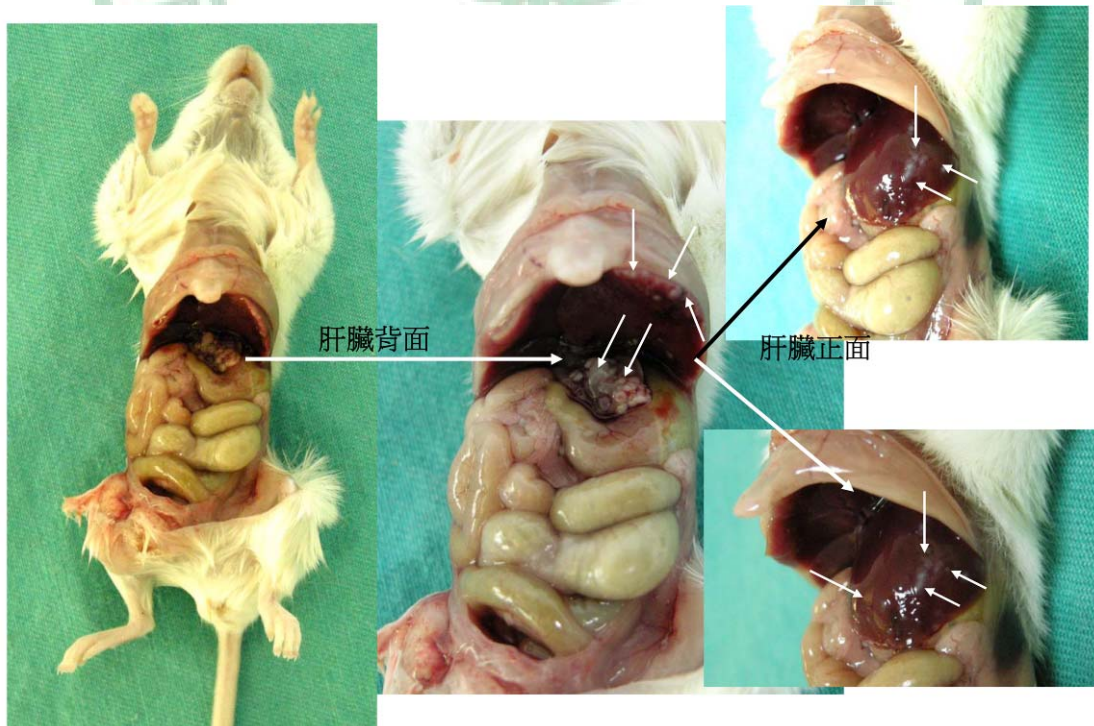
出現，藉此反證。(A) (B)轉染後的 MDA-MB-435 和 MDA-MB-231 與未轉染的細胞相互比較後發現，有轉染的細胞在投予 LYF-17 之後，侵入性的能力反而增加。結果證實，LYF-17 真的有影響到 miR-200c 和 miR-141。
(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)



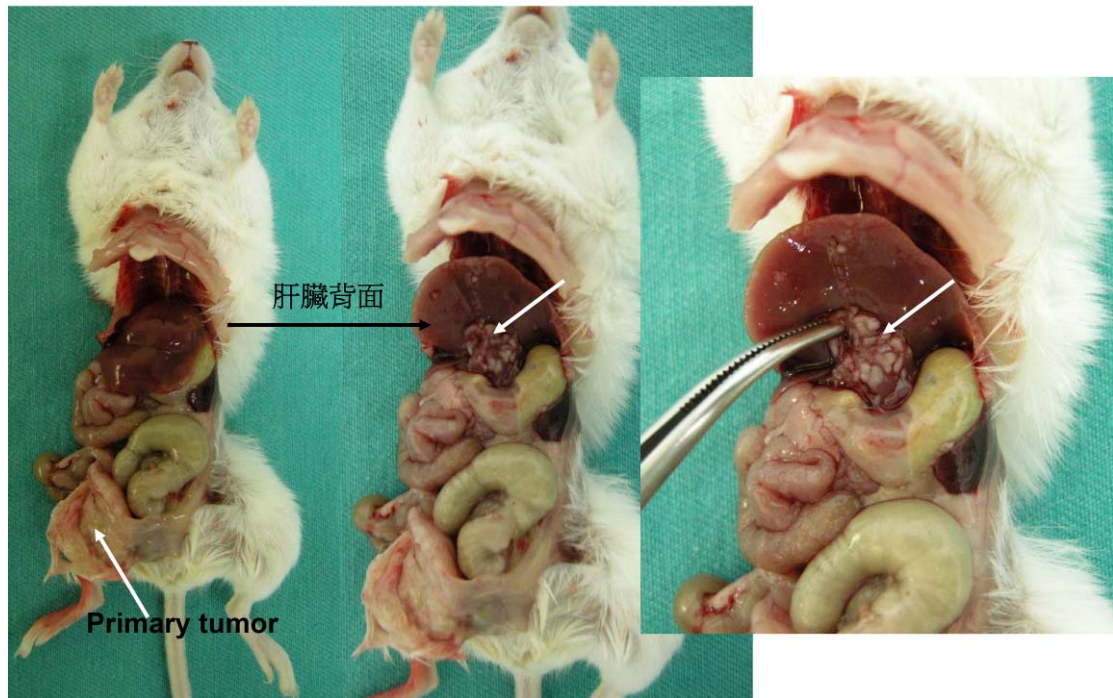
(A)



(B)



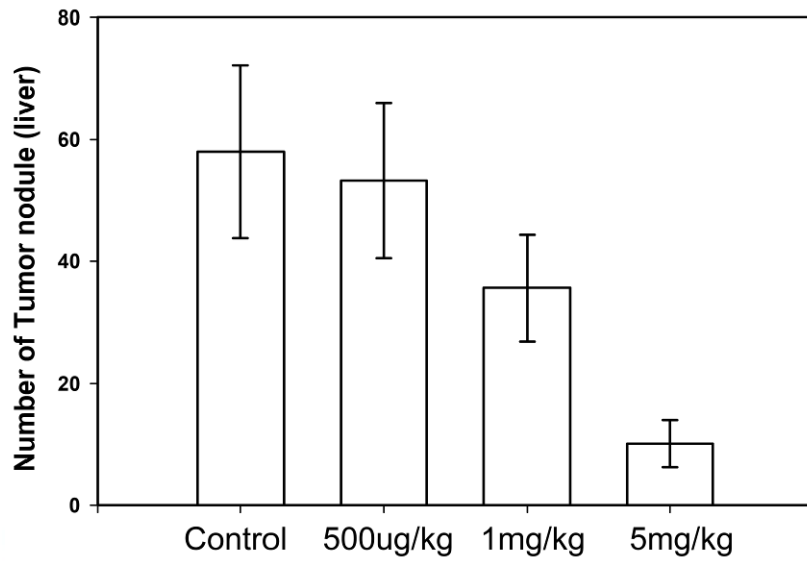
(C)



(D)



(E)



(F)

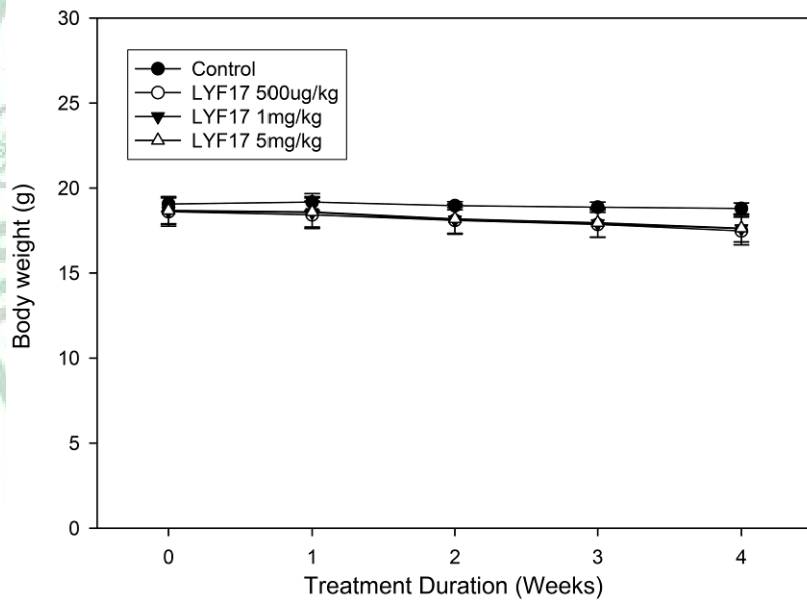


圖2-12：以動物實驗來探討LYF-17對腫瘤轉移的影響。利用原位注射的方式，將 2×10^6 顆MDA-MB-435注入SCID mice的乳腺部位，使得老鼠可以在體內乳腺部位長出腫瘤。待生成的腫瘤體積到達約 $\sim 200\text{mm}^3$ 時，開始對老鼠進行靜脈注射，注入不同劑量的實驗藥物LYF-17(500ug/Kg、1 mg/Kg、5 mg/Kg)治療，藥物注射四週之後犧牲老鼠，觀察體內腫瘤的轉

移情形。(A)control組：原位注射乳癌細胞後，四週後犧牲的結果。白色箭頭為癌細胞擴散轉移的器官(B)注入500ug/Kg劑量的LYF-17，犧牲後的結果，與control組相比較，顯示轉移的地方減少了。(C) 注入1 mg/Kg劑量的LYF-17，犧牲後的結果，與control組以及前一組劑量相互比較，轉移的地方指剩下肝臟背面。(D) 注入5 mg/Kg劑量的LYF-17，犧牲後的結果，發現腫瘤的轉移情形大部份都被抑制了。(E) 轉移到肝臟的腫瘤數統計，結果得知，轉移的腫瘤數隨著LYF-17劑量的提高而被抑制。(F)注射不同劑量的LYF-17對於老鼠的體重沒有太大的影響。



參考文獻

1. Abrahante, J.E., Daul, A.L., Li, M., Volk, M.L., Tennessen, J.M., Miller, E.A., and Rougvie, A.E. (2003). The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell* 4, 625-637.
2. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313.
3. Banks, J.F., Jr., Shen, S., Whitehouse, C.M., and Fenn, J.B. (1994). Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest. *Anal Chem* 66, 406-414.
4. Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., *et al.* (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 14, 2486-2494.
5. Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.
6. Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A., and Stamenkovic, I. (1994). Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 180, 53-66.
7. Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat*

Cell Biol 2, 84-89.

8. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 744-749.
9. Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 9, 582-589.
10. Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
11. Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M., and Jacobsen, S.E. (2003). Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 13, 2212-2217.
12. Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444-450.
13. Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
14. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252, 1102-1106.
15. Cochrane, D.R., Spoelstra, N.S., Howe, E.N., Nordeen, S.K., and Richer, J.K. (2009). MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores

- sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther.*
16. Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278.
 17. Cowin, P., and Welch, D.R. (2007). Breast cancer progression: controversies and consensus in the molecular mechanisms of metastasis and EMT. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12, 99-102.
 18. Daniel, H. (2002). Genomics and proteomics: importance for the future of nutrition research. *Br J Nutr* 87 *Suppl* 2, S305-311.
 19. Dickson, M., and Gagnon, J.P. (2004). Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 3, 417-429.
 20. DiMasi, J.A., Hansen, R.W., and Grabowski, H.G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22, 151-185.
 21. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
 22. Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122, 17-20.
 23. Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-341.
 24. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

25. Fogar, P., Basso, D., Pasquali, C., De Paoli, M., Sperti, C., Roveroni, G., Pedrazzoli, S., and Plebani, M. (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* *17*, 1227-1230.
26. Goldstein, L.A., Zhou, D.F., Picker, L.J., Minty, C.N., Bargatze, R.F., Ding, J.F., and Butcher, E.C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* *56*, 1063-1072.
27. Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* *10*, 593-601.
28. Guaita, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A.G., and Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* *277*, 39209-39216.
29. Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Hausmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* *65*, 13-24.
30. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
31. He, Z., and Sontheimer, E.J. (2004). "siRNAs and miRNAs": a meeting report on RNA silencing. *RNA* *10*, 1165-1173.
32. Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by

- molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5011-5015.
33. Jo, M., Lester, R.D., Montel, V., Eastman, B., Takimoto, S., and Gonias, S.L. (2009). Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell-signaling. *J Biol Chem*.
 34. Kang, Y., and Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-279.
 35. Kawasaki, H., Wadhwa, R., and Taira, K. (2004). World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. *Differentiation* 72, 58-64.
 36. Khaldoyanidi, S.K., Glinsky, V.V., Sikora, L., Glinskii, A.B., Mossine, V.V., Quinn, T.P., Glinsky, G.V., and Sriramarao, P. (2003). MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J Biol Chem* 278, 4127-4134.
 37. Korpala, M., Lee, E.S., Hu, G., and Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283, 14910-14914.
 38. Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E.W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973-981.
 39. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

40. Lin, S.Y., Johnson, S.M., Abraham, M., Vella, M.C., Pasquinelli, A., Gamberi, C., Gottlieb, E., and Slack, F.J. (2003). The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell* 4, 639-650.
41. Lou, Y., Preobrazhenska, O., auf dem Keller, U., Sutcliffe, M., Barclay, L., McDonald, P.C., Roskelley, C., Overall, C.M., and Dedhar, S. (2008). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Dev Dyn* 237, 2755-2768.
42. Lukashev, M.E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 8, 437-441.
43. Murchison, E.P., and Hannon, G.J. (2004). miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 16, 223-229.
44. Nakahara, K., and Carthew, R.W. (2004). Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol* 16, 127-133.
45. Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166.
46. O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
47. Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22, 894-907.
48. Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., *et al.* (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736.
49. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C.,

- Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
50. Riederer, B.M. (2007). Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull* 71, 541-558.
51. Shultz, L.D. (1991). Immunological mutants of the mouse. *Am J Anat* 191, 303-311.
52. Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669.
53. Sun, M., Estrov, Z., Ji, Y., Coombes, K.R., Harris, D.H., and Kurzrock, R. (2008). Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7, 464-473.
54. Svec, K., White, J., Vaillant, P., Jessurun, J., Roongta, U., Krumwiede, M., Johnson, D., and Henke, C. (1996). Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. *J Clin Invest* 98, 1713-1727.
55. Takahashi, K., Eto, H., and Tanabe, K.K. (1999). Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int J Cancer* 80, 387-395.
56. Tavazoie, S.F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L., and Massague, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451, 147-152.

57. Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.
58. Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
59. Thomas, L., Byers, H.R., Vink, J., and Stamenkovic, I. (1992). CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 118, 971-977.
60. Tsukamoto, H., Shibata, K., Kajiyama, H., Terauchi, M., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2007). Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 107, 500-504.
61. van der Valk, J.C., van den Oord, E.J., Verhulst, F.C., and Boomsma, D.I. (2003). Genetic and environmental contributions to stability and change in children's internalizing and externalizing problems. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 42, 1212-1220.
62. Varner, J.A., and Cheresch, D.A. (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8, 724-730.
63. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
64. Yilmaz, M., Christofori, G., and Lehenbre, F. (2007). Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med* 13, 535-541.
65. Yook, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Fearon, E.R., and Weiss, S.J. (2005). Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor *snail*. *J Biol Chem* 280, 11740-11748.

66. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13, 35-48.
67. Zen, K., Liu, D.Q., Guo, Y.L., Wang, C., Shan, J., Fang, M., Zhang, C.Y., and Liu, Y. (2008). CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS ONE* 3, e1826.
68. Zvaifler, N.J. (2006). Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 8, 210.
69. 行政院衛生署 (2009). 十大死亡原因. 資料來源網址：
http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=10642&class_no=440&level_no=3

