



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

瘦體素在人類前列腺癌細胞
調節細胞移動及 $\alpha\beta 3$ Integrin 表現的探討

Leptin Mediates Cell Migration and $\alpha\beta 3$ Integrin
Up-regulation in Human Prostate Cancer Cells

指導教授：湯智昕 博士

研究生：游欣珊

中華民國九十八年六月十日

目錄

縮寫表	III
中文摘要	V
英文摘要	VIII
第壹章 緒論	01
第一節 前列腺癌	02
第二節 轉移	15
第三節 Integrins	19
第四節 瘦體素	25
第貳章 材料與方法	31
第一節 實驗材料	32
第二節 實驗方法	33
第三節 統計分析	36
第參章 結果與討論	37
第一節 結果	38
第二節 討論	43
第肆章 結論	47
參考文獻	48
圖表	54

圖表目錄

Fig. 1. Prostate and bladder, sagittal section. -----	04
Fig. 2. The gleason grading system. -----	07
Fig. 3. The main steps in the formation of a metastasis. -----	17
Fig. 4. A complex family. -----	24
Fig. 5. Leptin-directed migration of human prostate cancer cells involves up-regulation of $\alpha v \beta 3$ integrins. -----	54
Fig. 6. Leptin-directed chemoinvasion of human prostate cancer cells involves up-regulation of $\alpha v \beta 3$ integrins. -----	56
Fig. 7. OBRI activation is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human Prostate cancer cells. -----	58
Fig. 8. IRS-1 pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. -----	60
Fig. 9. PI3K pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. -----	62
Fig. 10. Akt pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. -----	64
Fig. 11. Leptin induces cells migration and integrin up-regulation through NF-κB. -----	66
Fig. 12. Leptin induces cells migration and integrin upregulation through NF-κB. -----	68
Fig. 13. Leptin induces cells migration and integrin up-regulation through NF-κB. -----	70
Fig. 14. Schematic presentation of the signaling pathways involved in Leptin-induced migration and integrins expression of prostate cancer cells. -----	72



AgRP	<u>Agouti-related peptide</u>
α-MSH	<u>α-melanocyte-stimulating hormone</u>
AR	<u>Androgen receptor</u>
BBB	<u>Blood-brain barrier</u>
CNS	<u>Central nervous system</u>
DRE	Digital rectal examination
ECM	Extracellular matrix
FBS	Fetal bovine serum
IKK	IκB kinase
IRS	Insulin receptor substrate
JAK2	Janus kinase 2
NF-κB	Nuclear factor-kappaB
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPY	Neuropeptide Y
ODN	Oligodeoxyribonucleotide
PBS	Phosphate-buffered saline
PCOS	Polycystic ovary syndrome
PDTC	Pyrrolidine dithiocarbamate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIN	<u>Prostatic intraepithelial neoplasia</u>
PSA	Prostatic specific antigen
RGD	Arginine-Glycine-Aspartic acid peptides
SERMs	<u>Selective estrogen receptor modulator</u>
siRNA	Small-interference RNA
TPCK	N-tosylphenylalanylchloromethyl- ketone
VEGF	Vascular endothelial growth factor

中文摘要
(Abstract in Chinese)



摘要

瘦體素(Leptin)是由肥胖基因所產生的賀爾蒙蛋白並與肥胖有關，藉著新陳代謝的協同作用、飲食行為、能量平衡及神經內分泌的反應來調節體重。此外，瘦體素也被發現存在於許多腫瘤細胞中，並在一些細胞型中表現出促使細胞分裂及血管新生的活性。前列腺癌是男性除了皮膚癌以外最常見的癌症，並且其致死率在全球排名第二。Integrins 是哺乳類細胞中主要的黏著因子，並且與癌細胞的轉移有十分密切的相關。在本研究中，我們發現瘦體素會增加人類前列腺癌細胞株(PC3、DU145 及 LNCaP)的轉移能力及腫瘤細胞(PC3)上 α_v 及 β_3 integrin 的表現。當我們給予前列腺癌細胞 Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)抑制劑(Ly294002)、Akt 抑制劑、Nuclear factor-kappaB (NF- κ B)抑制劑(PDTC)及 I κ B protease 抑制劑(TPCK)後，從細胞移行實驗(Migration assay)及流式細胞技術分析(Flow cytometric analysis)皆會降低由瘦體素所誘導的移行現象及 integrin 向上調節(up-regulation)的表現。而將 insulin receptor substrate (IRS)-1 small-interference RNA 或 IKK α , IKK β , p85 及 Akt 的 dominant-negative mutant 轉殖入前列腺癌細胞株(PC3)中也能降低瘦體素之作用。而將瘦體素加入前列腺癌細胞株(PC3)後，從西方墨點法分析(Western blot analysis)實驗中可知，瘦體素會刺激 IRS-1、PI3K、Akt、I κ B kinase α/β (IKK α/β)、I κ B α 、p65 Ser⁵³⁶

磷酸化及 κ B-luciferase 活化。此外，我們也在其他前列腺癌細胞株 (DU145 及 LNCaP) 中發現了相似的訊號傳遞路徑參予在其中。總和來看，我們的結果發現瘦體素是藉由 IRS-1、PI3K、Akt 及 NF- κ B 的訊號傳遞路徑，造成 $\alpha\beta$ 3 integrins 的表現增加且造成前列腺癌細胞的轉移

。



英文摘要
(Abstract in English)



Abstract

Leptin, the product of the obese gene that is closely associated with obesity and it plays an important role in the regulation of body weight by coordinating metabolism, feeding behavior, energy balance, and neuroendocrine responses. In addition, leptin has been found in many tumor cell lines and has been shown to have mitogenic and angiogenic activity in a number of cell types. Prostate cancer is the most common cancer excluding skin cancer in men and the second leading cause of cancer-related death worldwide. Integrins are the major adhesive molecules in mammalian cells, and has been associated with cancer cells metastasis. In this study, we found that leptin increased the migration and the expression of $\alpha\beta3$ integrin in human prostate cancer cells (PC3). Leptin-mediated migration and integrin up-regulation was attenuated by PI3K inhibitor (Ly294002), Akt inhibitor, NF- κ B inhibitor (PDTC), and I κ B protease inhibitor (TPCK). Transfection of cells with insulin receptor substrate (IRS)-1, small-interference RNA or dominant-negative mutant of IKK α , IKK β , p85 and Akt also inhibited the potentiating action of leptin. Stimulation of PC3 cells with leptin induced IRS-1 phosphorylation, PI3K phosphorylation, I κ B kinase α/β (IKK α/β) phosphorylation, I κ B phosphorylation, p65 Ser⁵³⁶ phosphorylation, and κ B-luciferase activity. In addition, we also found that the similar signaling pathways involved in the other prostate cancer cells (DU145 and LNCaP). Taken together, our results suggest that leptin enhances the migration of prostate carcinoma cells by increasing $\alpha\beta3$ integrin expression through the IRS-1/PI3K/Akt and NF- κ B signal transduction pathways.

第壹章 藥緒論

(Introduction)



第一節 前列腺癌

前列腺為男性生殖系統中的一種腺體，前列腺癌是一種在前列腺處發生腫瘤的疾病。當前列腺細胞若發生基因突變導致增生失控即會成為癌症。這些惡性的細胞也有可能發生轉移侵入身體其他的部位，尤其是骨頭及淋巴節。前列腺癌可能會造成疼痛、排尿困難、勃起功能不全等症狀。而其他的症狀也可能在後期中逐漸出現。(Din *et al.*, 2009)

前列腺癌的發生率是遍佈全世界的，其中美國的發生率最高，其次是歐洲，東南亞的發生率最低。從年齡層來說，前列腺癌好發於五十歲以上的男性，而且在男性中是很普遍的一種癌症。許多男性得到前列腺癌後並不會有任何症狀，也不會進行治療，並且不會因為前列腺癌而死亡。這是因為在大部分的病例中，前列腺癌的生長速度十分緩慢，而且這些症狀的影響大部分是六十歲以上才會出現。因此，病患的死因大部分為心臟或心血管疾病、肺炎或其他疾病，與前列腺癌並無直接相關。基因及飲食習慣在前列腺癌的發展中扮演很重要的角色(Mistry *et al.*, 2007)。

前列腺癌可從其症狀、健康檢查、前列腺抗體篩檢(Prostatic specific antigen, PSA)或是組織切片檢查的結果診斷出來。雖然目前對於 PSA 篩檢仍有些疑慮，但在檢測時仍是十分有用的方法。當發現疑似罹患

前列腺癌的個案時，會更進一步進行前列腺組織切片檢查來確定病人是否罹患前列腺癌。接著會進行電腦斷層掃描及骨頭掃描，來觀察前列腺癌是否已經擴散。

前列腺癌的治療方式主要為手術及放射線治療，其他治療方式還包括賀爾蒙療法、化學療法、質子治療(proton therapy)、冷療手術(cryosurgery)及高能量聚焦超音波治療(high intensity focused ultrasound HIFU)也可依照臨床上個案的狀況及疾病的發展不同而搭配使用。

第一項 前列腺的介紹

前列腺是男性生殖系統中的一個腺體，屬外分泌腺。其主要功能分泌和儲存前列腺液，它分泌的前列腺液，含有抗菌因子保護尿道，每天以 0.5-2 ml 的量，經過前列腺腺管後會排到後尿道，隨尿液排出體外。前列腺內存有一定量前列腺液並可與精子混合成精液。在解剖學、化學和生理學上前列腺的構造因物種而有差異。一個健康的人類男性其前列腺的大小較核桃略大一點，位於骨盆腔的底部：膀胱之下，尿道之上；恥骨的後方及直腸的前方(Fig. 1)。

人類男性的尿道除了供排泄尿液之外，另一個功能是射精時精液的出口。精液包含了精子和液狀物，其中約有 10%-30%是來自前列腺所製造，前列腺體也包含了平滑肌組織，可幫助射精。

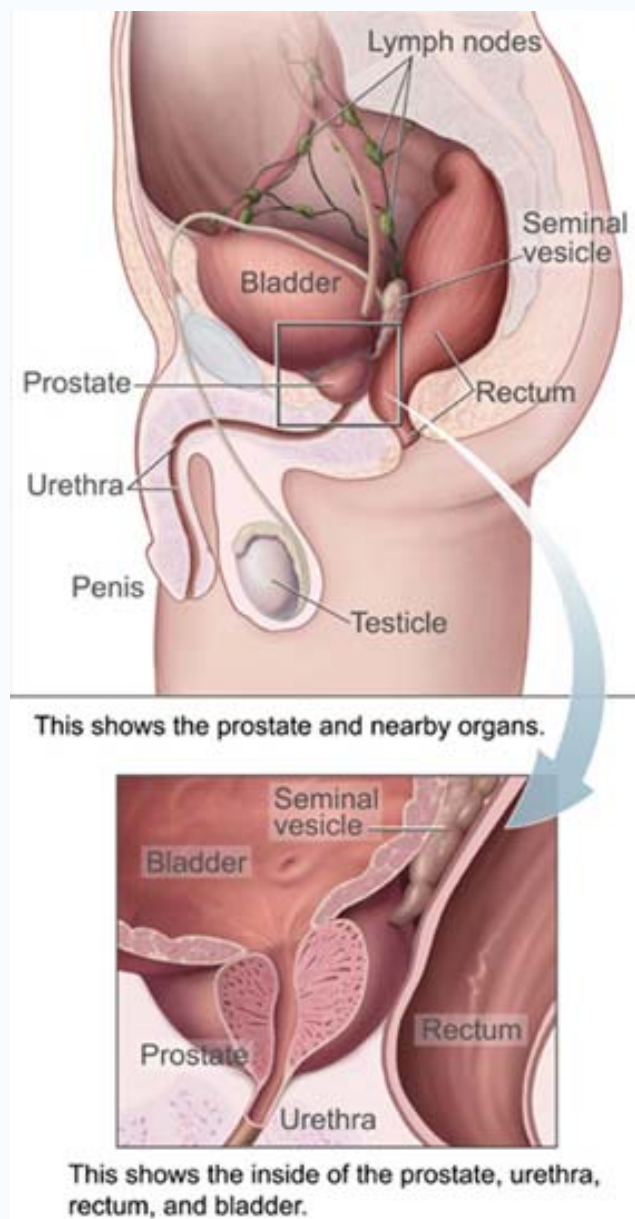


Fig.1. [Prostate](#) and [bladder](#), sagittal section.

(US government agency National Cancer Institute)

第二項 前列腺癌的分級

前列腺癌的狀況可以根據觀察其分期和其擴散程度來評估。知道其分期後即可以定義其預後，並在選擇治療方式時有很大的幫助。前列腺癌的分級系統可分為臨床分期及病理分期兩種。

臨床分期中最常見的系統為 1997 AJCC 版本 TNM (即 Tumor/Nodes/Metastases 的縮寫)系統。它的組成包含：腫瘤的大小、侵入淋巴節的數目以及其他轉移的比例。在 TNM 系統中分期的依據最重要的差別為：依照癌細胞是否被限制在前列腺的區域而區分，臨床的 T1 期及 T2 期癌細胞仍只有出現在前列腺的區域；當到了 T3 期及 T4 期癌細胞即會擴散到身體其他的部位中。有幾種測試可以用來尋找癌症擴散的證據，其中包括：利用斷層掃描來評估骨盆內的擴散；骨頭掃描來評估骨頭中的擴散，以及直腸內螺旋磁振造影檢查(MRI)可以評估前列腺包膜(prostatic capsule)及儲精囊(seminal vesicle)的狀況。其中骨頭掃描可以進一步顯示出：在骨頭轉移的部位，骨頭密度增加所造成之成骨作用的發生。

前列腺癌的病理分期是利用前列腺組織切片檢查。病理學家會在顯微鏡下觀察檢體，若組織中出現癌細胞，病理學家會依照其分級紀錄。在知道如何做治療的選擇前，需知道一個與攝護腺癌病理分級有

關的格里森分級系統(Gleason grading system)。格里森分級系統是將腫瘤標本置於顯微鏡下，依據它們分化的成熟度來分類為 1~5 級，分化最成熟的為 1 級，分化最不成熟的為 5 級。但考慮攝護腺癌的多發性，為能客觀的評估出疾病的預後，因此有了 Gleason score 的評估方式，它是先找出攝護腺癌組織切片中，先評估病灶面積最大的格里森級數，再評估第二大病灶的格里森級數，把這兩個級數加起來，就等於這個病人的 Gleason score，Gleason score 在 7 以上的病人預後明顯比 Gleason score 在 6 以下的病人來的差(Fig. 2)。

影響切片分級判定的因素很多，例如：標本的大小、不同病理學家評估的差異、荷爾蒙治療及放射線治療。目前公認經直腸超音波引導下系統性切片，左右各至少三片，在高格里森級數時，切片病理報告的預測值及術後病理報告最為接近。

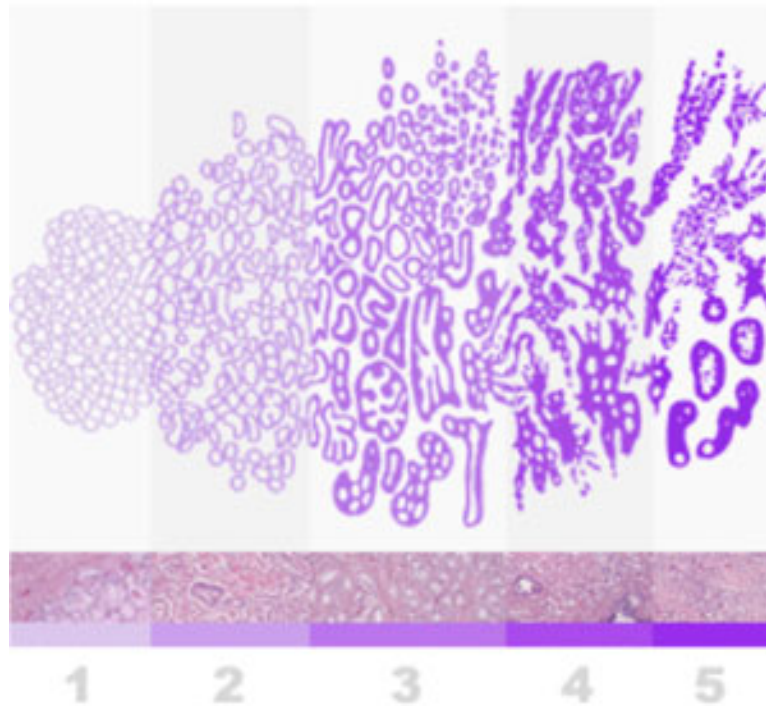


Fig.2. The gleason grading system

- Grade 1: Cells resemble normal prostate tissue, and they are well differentiated. The tiny glands of the prostate are round, have defined edges, and are packed tightly. The tumour is not expected to grow quickly.
- Grade 2: Cells are less normal looking and less well differentiated. The glands are still round but are loosely packed with less distinct edges.
- Grade 3: The cells are moderately differentiated. The glands are larger with irregular shapes and spacing. Their edges are badly defined and show infiltration.
- Grade 4: The cells are poorly differentiated. Glands are of different sizes and shapes, and they are fused together in masses or chains.
- Grade 5: The cells are very strange looking and poorly differentiated. Glands are not really discernable, and the tissue appears composed of solid cellular sheets, single cells, or nests of tumour.

第三項 前列腺癌的症狀

早期的前列腺通常是沒有症狀的，通常是在例行的健康檢查時通過 PSA 的診斷才會發現。有時前列腺癌也是會造成一些類似前列腺肥大所造成的症狀，其中包括：頻尿、夜間多尿、排尿困難、尿流細小、血尿、排尿痛等。前列腺癌也可能會造成性功能障礙，例如勃起困難、射精時會疼痛等。

前列腺癌發展時，有時會更進一步的擴散到身體的其他部分，這可能會造成一些其他的症狀出現。當前列腺癌發生骨轉移時，會引起骨頭的疼痛，通常是出現在脊椎骨的部位、骨盆或是肋骨。癌症的擴散也會蔓延到如大腿骨的部位。當癌症擴散到脊椎骨時會壓迫到脊髓，造成腿部無力、下肢癱瘓以及大小便失禁等症狀。另外，還可能出現病理性骨折及貧血等症狀。

第四項 前列腺癌的發生原因

前列腺癌發生的特定原因至今仍是未知數。與男性罹患前列腺癌有關的風險因子包括：年齡、基因、運動、飲食習慣、生活方式、藥物治療還有其他的因子。其中最初級的風險因子為年齡(Hsing *et al.*, 2006)。通常 45 歲以下的男性很少罹患前列腺癌，但超過 45 歲後的罹患率便變得十分常見，在臨床上平均的罹患年齡為 70 歲(Hankey *et al.*,

1999)。但有很多人在罹患前列腺癌時並不知道自己得病。在中國、德國、以色列、牙買加、瑞典及烏干達一些男性的驗屍報告中，約有 30% 的人在其 50 歲時罹患前列腺癌；而約有 80% 的人在其 70 歲時是處於罹患前列腺癌的狀態(Breslow *et al.*, 1977)。2005 年時，在美國約有 230,000 個新病例，其中有 30,000 個病歷死於前列腺癌(Jemal *et al.*, 2005)。

1. 基因

基因在前列腺癌的發展中也是個重要的風險因子，在某些人種中會有較高的罹患率。在美國，黑人的罹患率高於白人及西班牙人，並且其致死率也較高(Odedina *et al.*, 2009)。若一男子的兄弟或父親有罹患前列腺癌，那麼他罹患前列腺癌的風險是一般人的兩倍。在北歐的雙胞胎研究顯示出，罹患前列腺癌的原因中約有 40% 的機率與本身基因有關(Lichtenstein *et al.*, 2000)。但目前並不清楚究竟是哪個基因導致前列腺癌的發生，應該有許多不同基因參予在其中。目前只知道，與女性的卵巢癌及乳癌有關的 BRCA1 及 BRCA2 基因也和前列腺癌有關(Struewing *et al.*, 1997)。

2. 飲食

食物、維他命及礦物質的攝取量也與前列腺癌的發生有關。當維他命 E 及礦物質硒缺乏時，會增加罹患前列腺癌的風險。在 2007 年有研究指出對於茄紅素能降低前列腺癌罹患率抱持存疑的態度。當血液中維他命 D 的濃度較低時也可能會增加前列腺癌發生的風險，這可以延伸到：較少暴露在紫外線下的人其身體中維他命 D 的合成也會較少，進而增加罹患前列腺癌的風險(Schulman *et al.*, 2001)。

3. 藥物治療

前列腺癌的發生與藥物治療、醫療檢查及身體檢查條件也有相關，當生活中使用抗發炎藥物，如：aspirin、ibuprofen 或 naproxen 時，可能會降低前列腺癌的發生(Jacobs *et al.*, 2005)。使用降膽固醇藥物，如 statin 時，可能增加前列腺癌的罹患率。尤其，當受到性傳染病的感染，如：衣原菌感染、淋病或梅毒時，可能也會增加風險(Dennis *et al.*, 2002)。另外，肥胖(Calle *et al.*, 2003)及血中睪丸激素的濃度較高者(Gann *et al.*, 1996)也會增加前列腺癌的發生率。2007 年五月份的研究顯示出：在越戰中曾經暴露於生化農藥 Agent Orange 的老兵，其手術後前列腺的復發率高達 48%。

第五項 前列腺癌的病理生理學

前列腺癌在歸類上屬於腺狀上皮細胞癌(adenocarcinoma)，或是腺癌(glandular cancer)，始於當前列腺細胞突變為癌細胞時，通常會從周邊的範圍開始出現癌化現象。首先，在正常的細胞中會出現一小塊如癌症或是前列腺表皮層新生的區域(PIN)，雖然尚未 PIN 即是癌症的先驅物，但它與癌症確有相關。接著，這些細胞會開始增生並沿著前列腺組織間質開始擴散，形成腫瘤。最後，腫瘤會長大至足以侵入週遭器官，如：輸精管或是直腸；腫瘤細胞也可能發展成進入血流及淋巴系統中流動。前列腺細胞已經被認定為惡性的腫瘤，因為它具有侵入人體其他部分的能力。這種過程即被稱為轉移(metastasis)，前列腺癌最容易轉移到骨頭、淋巴結、直腸及膀胱等部位。

第六項 前列腺癌的診斷

通常當病患出現前列腺癌的症狀，或是掃描檢查發現前列腺癌風險增加時，會提供侵入式治療以進一步確認。合併肛門指診(DRE)與前列腺抗體篩檢(PSA)是目前早期偵測前列腺癌最常進行的檢查。美國癌症協會建議 50 歲以上男性每年應該接受上列檢查，以早期發現前列腺癌。當以上檢查出現異常時，即會提供病患進行經直腸超音波引導切

片檢查。其它醫學影像診斷也能幫助判別前列腺癌是否發生，例如：
骨骼掃描、電腦斷層及磁振造影檢查等。

第七項 前列腺癌的預防

從流行病學的研究證據來看，降低前列腺癌發生率的規則包括攝取含有礦物質硒、維他命 E、茄紅素及大豆等食物。當血液中維他命 D 的濃度較高時，也能有預防的效果。從大豆發酵及其他來源所得的雌激素，也有預防前列腺癌的效果([Strom et al., 1999](#))。選擇性雌激素受體調節劑 [toremifene](#) 在早期的試驗中也有效果([Price et al., 2006](#))。另外兩種阻斷睪丸激素轉變為二氫睪酮的藥物：[finasteride](#) 及 [dutasteride](#) 也同樣有效果。但這些藥物的預防效果還在試驗的階段，並且它們最主要的治療目標也並不是預防前列腺癌。

綠茶多酚也可能有預防的效果([Lee et al., 2006](#))，雖然許多臨床研究指出它其實沒有效果([Kikuchi et al., 2006](#))。在一份 2006 年的研究中指出：綠茶抽出物有可能預防高風險的病人罹患前列腺癌([Bettuzzi et al., 2006](#))。最近發表在 [National Cancer Institute](#) 的研究指出每週服用七次以上綜合維他命可以降低前列腺癌的發生([Lawson et al., 2007](#))。但這篇研究無法確切的指出是哪種維他命所造成的效果。另外，花椰菜等十字花科的植物也具有預防的效果([Kirsh et al., 2007](#))。

第八項 前列腺癌的治療

前列腺癌的治療包括：每天主動調查其身體狀況、手術、放射線治療、高能量聚焦超音波治療(HIFU)、化學療法、冷療手術、荷爾蒙治療或是合併治療。通常根據前列腺癌的分期、格里森分數及 PSA 的層級來選擇治療方式。另外，根據病患的年齡、身體狀況及病患對副作用的接受度不同，對於療法的選擇也有不同的考量。

第九項 前列腺癌的細胞模型

科學家們已經建立幾種前列腺癌的細胞株用來調查與前列腺癌相關的機制，LNCaP、PC3 及 DU145 是最常使用的前列腺癌細胞株。LNCaP 細胞株是從轉移至人類淋巴結的前列腺癌所取得；PC3 及 DU145 則是分別從轉移至骨頭及腦部的前列腺癌所取得。LNCaP 細胞株會表現雄激素受體(AR)，但在 PC3 及 DU145 細胞株中表現較少或甚至不表現 AR。AR 是由雄激素所活化的轉錄因子，屬於類固醇細胞核受器家族(steroid [nuclear receptor](#) family)。前列腺會依據 AR 所調節的雄激素訊號而生長，在前列腺癌的生長中 AR 所扮演的角色也一樣重要。LNCaP 細胞株的分化是屬於雄激素依賴型(androgen-dependent)；但 PC3 及 DU145 細胞株則是屬於非雄激素依賴型(androgen-independent)。當前列腺癌細胞在病患中生長時，通常會伴隨著 AR 表現的增加([Ford et](#)

[al., 2003](#))。而雄激素有時似乎也會影響非雄激素依賴型的細胞株

([Kokontis et al., 1994](#))。



第二節 轉移

轉移(Metastasis 或是 Metastatic disease)，有時會縮寫成 mets，是指當疾病從一個器官或某個部份擴散到其他非週遭的器官或部位。只有惡性腫瘤及傳染病才有轉移的能力([Podsypanina et al., 2008](#))。癌細胞可能會從原生腫瘤中滲出或溢出，進入淋巴系統或是血管中，通過血流的循環會在停在身體其他正常的組織中開始生長。轉移是惡性腫瘤的特點之一，許多腫瘤或是癌症具有轉移的能力。當腫瘤發生轉移時，新生的腫瘤即稱為 *secondary* 或 *metastatic* 腫瘤，並且會與原發處腫瘤相似。舉例來說：如果乳癌轉移至肺臟，則次級腫瘤即為異常的乳房細胞，並非異常的肺臟細胞。這個轉移到肺臟的細胞及稱作轉移的乳癌(metastatic breast cancer)而非肺癌。

第一項 轉移分布的模式及部位

轉移的腫瘤在後期的癌症中十分常見，轉移會經由血液或淋巴管擴散，有時兩者都有參予。最常見的轉移部位為：肺臟、肝臟、腦部及骨頭，這顯示出腫瘤有轉移到特定器官的傾向。這是在 1889 年由 Stephen Paget 所提出一個種子與土壤(seed and soil)的理論。在轉移發生過程中腫瘤細胞(像種子)與特定的微環境(microenvironments)(像土壤)之間有一種相對作用。腫瘤的進行不是只有腫瘤細胞一方有改變，相

對一方微環境也是有所改變才會造成腫瘤的進行(Fig. 3)。這種相對作用的恆定性會影響腫瘤的生長、血管新生、侵犯及轉移([Fidler et al., 2003](#))。例如：前列腺癌細胞通常會轉移至骨頭；結腸癌容易轉移到肝臟；胃癌常會轉移至女性的卵巢，稱為克魯根堡氏瘤([Krukenberg tumor](#))。通常癌細胞在原本生長區域外即很難生存，因此它們常會尋找與原生腫瘤有相似環境的位置發生轉移。例如：乳癌細胞會從母乳堆積鈣離子，轉移至骨骼組織時也會從骨骼中堆積鈣離子。惡性的黑色素瘤會擴散至腦部，大概是因為中樞的神經組織與黑色素的形成都是從胚胎中相同細胞而來的原因。癌細胞也會擴散至原生腫瘤旁的淋巴結，雖然這樣的擴散不大能算為轉移，但可當作有更嚴重的預後的一個訊息。經過淋巴管的傳送是癌症散播首先的途徑，除了上述的途徑之外，有時癌症也會直接擴散到胸腔或是腹腔的位置。

第二項 轉移相關因子

癌症從原生腫瘤經由血管或是淋巴系統擴散到其他部位是一個相當複雜的過程。為了達到轉移的目的，惡性的細胞會從原生腫瘤離開，並降解組成細胞外間質(ECM)的蛋白質，使得腫瘤與鄰近的組織分開。藉由降解這些蛋白質，細胞可以離開 ECM 並流出原生腫瘤處，如：口腔癌通常會經過淋巴系統轉移至頸部的淋巴結中(Fig. 3)。身體也有各

種不同抵抗轉移的機制，來抵抗轉移的發生(Yoshida BA *et al.*, 2000)。

癌症學家的研究多專注在轉移發生所需的條件，他們發現其中最需要的即是血管網絡的生成，稱為腫瘤血管新生(angiogenesis)(Weidner N *et al.*, 1991)。並且他們也找到一些抑制腫瘤血管新生的因子，可以藉此預防轉移的發生。

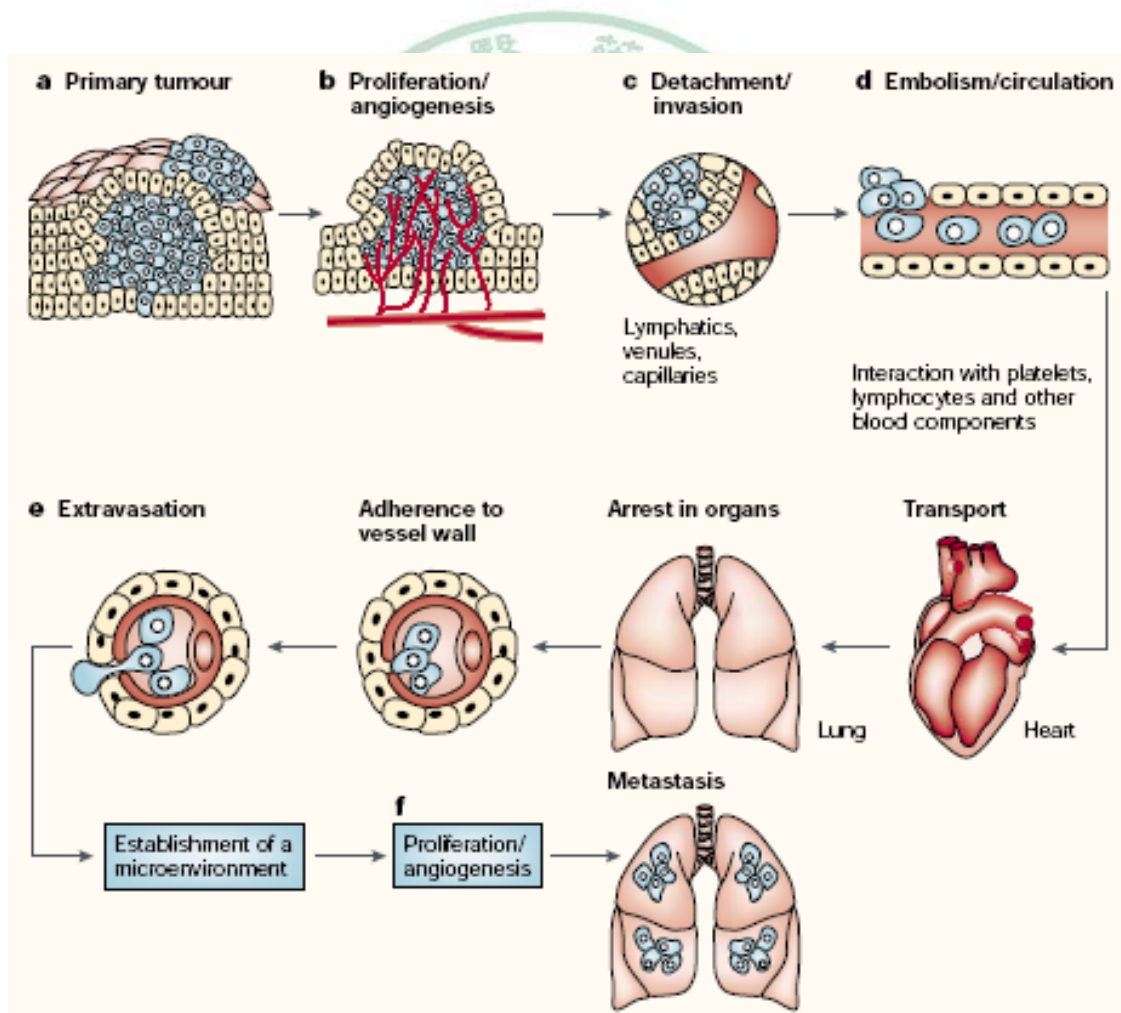


Fig. 3. The main steps in the formation of a metastasis

Fig. 3. The main steps in the formation of a metastasis

a. Cellular transformation and tumour growth. Growth of neoplastic cells must be progressive, with nutrients for the expanding tumour mass initially supplied by simple diffusion. **b.** Extensive vascularization must occur if a tumour mass is to exceed 1–2 mm in diameter. The synthesis and secretion of angiogenic factors establish a capillary network from the surrounding host tissue. **c.** Local invasion of the host stroma by some tumour cells occurs by several parallel mechanisms. Thin-walled venules, such as lymphatic channels, offer very little resistance to penetration by tumour cells and provide the most common route for tumour-cell entry into the circulation. **d.** Detachment and embolization of single tumour cells or aggregates occurs next, most circulating tumour cells being rapidly destroyed. After the tumour cells have survived the circulation, they become trapped in the capillary beds of distant organs by adhering either to capillary endothelial cells or to subendothelial basement membrane that might be exposed. **e.** Extravasation occurs next — probably by mechanisms similar to those that operate during invasion. **f.** Proliferation within the organ parenchyma completes the metastatic process. To continue growing, the micrometastasis must develop a vascular network and evade destruction by host defences. The cells can then invade blood vessels, enter the circulation and produce additional metastases. (Adapted from Mundy, 2002)

第三節 Integrins

Integrins 是調節細胞與組織間附著的接受器，它們也會扮演細胞訊號傳遞的角色，它們也與細胞的形狀、運動及細胞週期的調節有關。基本上，integrin 會告知細胞周遭的環境，使得細胞能即時對周遭環境做出反應。Integrin 不止能啟動由內而外的訊號傳遞，它們也能啟動由內而外的反應。因此，它們從 ECM 傳遞訊息的能力與透露細胞外狀況的能力都很好，可以迅速並靈活的順應環境的改變。例如：血小板的凝血功能等。

Integrin 有很多種不同的形式，並且在許多細胞的表面上也同時存在著不同形式的 integrin。在所有的動物中，integrins 的存在是十分重要的，從無脊椎動物海綿到哺乳類動物中都有發現 integrins 的存在。而 integrin 在人類的研究上也廣泛的被討論。除此之外，integrins 也會與其他相關的蛋白質一同調節細胞與細胞或是細胞與間質間的相互作用及傳達訊息。

第一項 Integrins 的結構

Integrin 皆以二聚體的形式存在，包括 α (alpha)及 β (beta)兩個不同的次單位。在哺乳類動物中已經發現存在 19 種 α 鏈及 8 種 β 鏈；果蠅的基因組裡只有 5 種 α 鏈及 2 種 β 鏈；在線蟲體內只表現 2 種 α 基因

及 1 種 β 基因 ([Humphries et al., 2000](#))。 α 及 β 次單位中都包含兩個個別分開的尾端，它們會穿過質膜並且具有一些小的細胞質功能區塊 (small cytoplasmic domains) ([Nermut et al., 1988](#))。此外，一些不同的次單位具有不同異構物的型態，例如： $\beta 1$ 就存在著四種異構物。藉著 α 及 β 次單位不同的組合，可產生 24 種不同的 integrins (Fig. 4) ([Hynes et al., 2002](#))。

Integrin 的次單位會跨過質膜並通常具有 40 到 70 個氨基酸的小功能區塊。但 $\beta 4$ 是個例外，它具有 1088 個氨基酸大小的功能區塊，是目前已知細胞膜上的最大的蛋白質功能區塊。在質膜外 α 及 β 鏈約長 23 nm，每個鏈的 N 端約長 5nm 並具有與 ECM 配位體接合的區域。Integrin 次單位的分子量大概是 90 到 160 千道爾； β 次單位具有四個半胱胺重複的序列，並且 α 及 β 次單位都會與一些二價的陽離子結合。 α 次單位的作用目前仍是未知數， β 次單位就比較多人探討，至少它會直接參與一些配位體與 integrins 的接合作用。

Integrins 的分類有許多種，例如：有些 α 鏈中存在額外的結構成分 (structural element) 嵌入 N 端，這類型的 integrin 即稱為 alpha-A domain，(因為它與溫韋伯氏因子 ([von Willebrand factor](#)) 蛋白內找到的 A-domains 具有類似的結構)。Integrins 除了會帶著這個 domain 接合到膠原蛋白

(collagens)上，也能當作細胞與細胞間的黏著分子。

1. 高解析結構

雖然目前已有許多研究，但 integrins 高解析的結構對科學家們仍是一種挑戰：膜蛋白基本上很難被單獨純化出來，而且 integrins 為巨大、複雜並高糖基化的物質。低解析度的 integrins 影像可以由電子顯微鏡獲得；也可由間接的方式：例如利用超高離心及放射光來調查 integrins 溶液的性質，可得到片段的高解析結晶結構；使用核磁共振 (NMR) 可得到 integrin 單鏈的結構。研究指出，integrins 會折疊成倒 V 的形狀，並且在細胞膜附近會有與配位體接合的位置。更重要的是：這種結構也被發現在 integrins 與具有 RGD 序列的小配位體接合的時候。科學家相信，當這些序列交互作用時，可以當作 ECM 影響細胞生理的初級開關以調節細胞的行為。

Integrins 的結構會影響到配位體的結合和訊號的傳遞，配位體的接合位置通常會朝向 integrins 的 C 端，即是從細胞膜顯露出來的區域。它與細胞膜呈直角，並與 ECM 的部分交叉接合的很好。事實上，確切的角度目前並不清楚，有研究假設它們顯示出來的樣子像小棒棒糖的結構，而這種結構與膜蛋白的作用也息息相關。

目前的假設是，integrins 會改變形狀使得配位體位置移動，變成更

容易進入細胞表面的位置；並且啟動細胞內的訊息傳遞。使用 integrins 的抗體可以證實以上的理論：這些抗體只能辨認已與配位體接合或活化的 integrins，這些抗體可以清楚的顯示出平時 integrins 形狀的改變。

第二項 Integrins 的功能

Integrins 有兩個最主要的功能，分別是：將細胞附著於細胞間質上及從細胞間質傳遞訊號給細胞。但它們也與許多其他生理的活性有關。包括：與病毒的接合，例如：引起呼吸道感染的腺病毒([adenovirus](#))、伊科病毒(Echo viruses)、漢他病毒(Hanta viruses)及口蹄疫病毒([foot and mouth disease](#) viruses)與細胞的接合；另外也跟免疫功能及細胞移動能力有關。Integrins 最特別的功能是在醣蛋白受體 GPIIbIIIa 分子中被發現的，在血小板的表面存在一種 integrin，在凝血的過程中可以使血小板與纖維組織交叉結合在一起，這種使纖維從原本無黏著性到具有黏性的轉換是一種既快速又明確的控制方式。

1. 將細胞附著於細胞間質上

Integrins 會連結細胞外的 ECM 及細胞內的細胞骨架（特別是細微絲），而 integrins 會接合在哪個配位體上端看其 α 及 β 鏈的形式。在 integrins 及配位體中間還存在著 [fibronectin](#)、[vitronectin](#)、[collagen](#) 及 [laminin](#) 等物質。細胞與 ECM 的接合是構成多細胞生物體重要的條件，

integrins 並不只扮演勾子的角色，並可給細胞與周遭環境有關的及時訊號。當一些生長因子(如：VEGF、EGF 及其他因子)的接受器產生訊號時，integrins 會執行一些細胞的生理作用，例如：細胞的附著、移動、死亡或是分化。細胞的附著是藉著形成細胞黏著複合體，其中包含 integrins 及許多細胞質的蛋白質(如：[talin](#)、[vinculin](#)、[paxillin](#) 及 [alpha-actinin](#))，這些細胞黏著複合體會附著在機動蛋白的細胞骨架上，以執行附著的功能。Integrins 的另一個重要的作用是與細胞移行有關，細胞會穿過 integrins 附著在基底層上，在移動的過程中細胞會往前與基底層產生新的附著，同時離開背後的基底層。當從基底層脫離後，integrins 分子便會藉著胞飲作用([endocytosis](#))回到細胞內，藉著胞飲作用的循環可將他們輸送回細胞表面。這種方式可以使 integrins 被重複的使用，並使得細胞可藉著新的附著不斷地往前。

2. 從細胞間質傳遞訊號給細胞

Integrins 在細胞訊號的傳遞中扮演重要的角色。它與 ECM 分子的連結可以產生訊號，經由蛋白質激酶會間接並暫時的釋放至 integrin 分子的尾端，並由直接刺激 ECM 結合而改變 integrins 的形狀。通常其傳遞的訊號多與細胞生長、細胞存活、細胞分化及細胞凋亡有關。

第四節 瘦體素

瘦體素(leptin)是一個 16 千道爾的蛋白質荷爾蒙在調節能量的攝入與消耗中扮演關鍵的角色，包括食慾與 新陳代謝的調節。瘦體素是由脂肪細胞所獲得的一種很重要的蛋白質([Brennan et al., 2006](#))。

第一項 瘦體素的發現

瘦體素是在 1994 年由 Friedman 的研究團隊在由 [Jackson Laboratory](#) 於 1950 年養殖出先天肥胖的 ob/ob 老鼠身上所發現的 ob 基因產物。ob/ob 老鼠與體重正常的老鼠比較明顯缺乏瘦體素，而在另一種品系的肥胖老鼠—db/db 老鼠體內瘦體素量卻有較高的瘦體素含量。

第二項 瘦體素的合成

瘦體素是傳遞身體脂肪含量的信息到下視丘的賀爾蒙，當身體脂肪過多時，體內白色脂肪組織會分泌較多的瘦體素，使得瘦體素的濃度增加。瘦體素主要作用在下視丘的瘦體素接受器，造成 Neuropeptide Y(NPY)減少，當下視丘所分泌的 NPY 減少，交感神經系統的活性則會增加，於是增加棕色脂肪組織的產熱作用；另一方面 NPY 減少後，會食減少物的攝取量，食物攝取量減少之後，胰島素分泌會因此而減少，最後造成脂肪的合成也會減少。除了白色脂肪組織之外，棕色脂

肪組織、胎盤、卵巢、骨骼肌、胃、乳房上皮細胞、骨髓、腦垂體及肝臟也會製造少量的瘦體素(Margetic *et al.*, 2002)。

第三項 瘦體素的功能

在 1996 年時，Considine 的研究團隊發現在人類肥胖者中瘦體素濃度比較高，且瘦體素的含量與體脂肪量呈現正相關的關係，因此人類的肥胖症是與 db/db 老鼠的情形較類似。db/db 老鼠是因為體內缺乏瘦體素接受器因此瘦體素的濃度較高，但是到目前為止在人類身上，並未發現肥胖基因突變或瘦體素接受器基因突變。瘦體素除了參與以上反應外，也逐漸被發現會直接作用在其他非神經性細胞中。最近幾年科學家特別注意到瘦體素與腫瘤生成、血管生成及腫瘤轉移也有很大的相關。在許多組織中可以發現不同型式的瘦體素接受器(OBR)，其中長鏈的 OBR (OBRl)多表現在下視丘，而短鏈的 OBR(OBRs)多表現在血腦障壁的微血管中。當瘦體素結合在 OBRl 上會活化 janus kinase 2 (JAK2)，然後啟動下游訊號傳遞及轉錄因子的活化。當瘦體素接受器藉著活化 JAK2 後，可使 Insulin receptor substrate (IRS)蛋白磷酸化並造成 IRS-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)訊號傳遞路徑的啟動。近幾年的研究發現，體重的增加與許多部位的癌症致死率上升有相關。先前的研究顯示出：在停經後的婦女中，子宮內膜癌、腎癌、結腸癌及

乳癌的致死率皆與肥胖有正向的關係。

1. 肥胖訊號

至今為止，瘦體素及胰島素是目前僅知與肥胖訊號的作用有關的物質。一般來說：瘦體素濃度會依照脂肪細胞的比例在體內循環，也會進入中樞神經系統(CNS)。在腦部的神經元中存在著瘦體素的接受器，藉由作用在下視丘的接受器可以調節能量的攝入及消耗(Williams *et al.*, 2009)。

2. 食慾控制

瘦體素會與在弓狀核的 NPY 神經元結合降低神經元的作用。當身體攝取足夠的食物或是有飽足感時，瘦體素訊號會傳遞至腦部。在某些少數人當中會發生瘦體素基因突變的現象，會造成對食物的需求一直持續進而造成肥胖，若給予治療用重組的人類瘦體素即能成功的改善以上的狀況(Taleb *et al.*, 2007)。瘦體素的作用是藉著抑制神經元(NPY 及 AgRP)的活性，並增加神經元分泌 α -MSH 的表現。NPY 是調節食慾的一個關鍵因子，當給予實驗動物注射少量的 NPY 進入腦部時會刺激食慾，但若選擇性的破壞實驗動物的 NPY 神經元則會導致實驗動物有厭食的現象。另外， α -MSH 對於飽足感是個重要的調節因子， α -MSH 對於腦部的作用就如瘦體素對於人體的作用是相同的原理。

3. 循環系統

瘦體素及瘦體素接受器對免疫系統中 T 細胞的作用的調節已在動物實驗上被證明，瘦體素會對肥胖病人潛在的動脈硬化症具有調節其免疫反應的作用 (Taleb *et al.*, 2007)。另外，瘦體素與血管新生 ([angiogenesis](#)) 及血管內皮生長因子 (VEGF) 也非常有相關。

4. 肺部表面活性劑的活性

在胎兒的肺臟在擴張時，可藉著形成肺泡上皮細胞而造成 [PTHrP](#) 分泌作用以誘導肺泡的纖維母細胞生成瘦體素。由間質而產生的瘦體素會反過來作用在上皮細胞的受體素接受器，將其運載到肺泡第二型上皮細胞 (alveolar type II pneumocytes)，並誘導肺泡第二型上皮細胞之肺部表面活性劑的表現 (Torday *et al.*, 2006)。

5. 繁殖

在老鼠中，公鼠及母鼠的生殖力也與瘦體素有關；但在人類方面瘦體素的影響較少。在哺乳動物中 (例如：人類)，女性的排卵週期與能量的平衡 (體重減輕或體重增加) 及能量的消耗 (運動多寡) 有關。當能量處於不足的状态或能量消耗量太高時，排卵週期即會停止，而月經也會停止，因此瘦體素在女性的生殖來說只扮演著間接的角色。

身體的脂肪細胞在正常的條件之下，通常瘦體素的產生及釋放會保持一種平衡的狀態，但瘦體素也能透過胎盤產生(Zhao *et al.*, 2004)。瘦體素的濃度會在懷孕期及分娩後增高，在胎兒的胎衣及子宮組織中也有瘦體素的表現(Moynihan *et al.*, 2006)。另外，也有證據顯示瘦體素也與妊娠劇吐(Aka *et al.*, 2006)、多囊性卵巢症候群(PCOS) (Cervero *et al.*, 2006)有關，另外在 2007 年的研究也指出下視丘的瘦體素濃度也與骨頭生成有關(Iwaniec *et al.*, 2007)。

第四項 瘦體素阻抗及肥胖

雖然瘦體素會傳達降低食慾的訊號，但通常來說肥胖的人血液中會有較高的瘦體素濃度(Considine *et al.*, 1996)。對瘦體素發生阻抗作用的人，通常對胰島素也具有阻抗的作用。身體對瘦體素的不敏感會造成體內持續高的瘦體素濃度，而導致肥胖加劇。

第五項 瘦體素作用的機轉

瘦體素的作用與六種接受器有關，包括：一個長型異構物(OBRI：Ob-Rb)及五個短型異構物(OBRs：Ob-Ra、Ob-Rc、Ob-Rd、Ob-Re、Ob-Rf)。OBRI 是唯一能參與細胞內 Jak-Stat 及 MAPK 訊號傳遞路徑的接受器，並表現在下丘腦核中。瘦體素如何通過血腦障壁(BBB)的機轉目前並不清楚，可能是因為血腦障壁的某些部位位於中突([median](#)

[eminence](#))與 NPY 神經元十分靠近的原因。一般認為，瘦體素能進入腦部的脈絡叢，它裡面的瘦體素接受器即能表現，並且當作傳輸的機制。一旦瘦體素與瘦體素接受器接合，即能活化 stat3，stat3 即會磷酸化進入核中，並有可能使得基因的表現改變，其基因表現最主要的影響為下調節內生性大麻鹼(endocannabinoids)的表現，進而使得食慾降低。瘦體素在細胞內也有其他不同的路徑，但目前的研究較少。

我們假設瘦體素可能具有調節人類前列腺癌細胞的移動能力及 integrin 的表現。在本研究中，我們發現瘦體素會增加人類前列腺癌細胞的移動能力及 $\alpha\beta3$ integrin 的表現。此外，OBRI 接受器、IRS-1、PI3K、Akt 及 nuclear factor- κ B (NF- κ B)的訊號傳遞路徑參與在由 leptin 調控增加前列腺癌細胞的轉移過程當中。

第貳章 材料與方法
(Materials and Methods)



第一節 實驗材料

Anti-mouse 及 anti-rabbit IgG-conjugated horseradish peroxidase , rabbit polyclonal antibodies 如 : phosphotyrosine residues (PY20) 、 p85 、 Akt 、 phospho-Akt (Ser⁴⁷³) 、 IRS-1 、 I κ B kinase (IKK) 、 phospho -I κ B α 、 I κ B α 、 p65 、 IRS-1 及 control siRNA 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 。 Rabbit polyclonal antibody specific 如 : IKK α / β phosphorylated at Ser^{180/181} 、 p65 phosphorylated at Ser⁵³⁶ 購自 Cell Signaling and Neuroscience (Danvers, MA) 。 Ly294002 、 Akt inhibitor 、 PDTC 及 TPCK 購自 Calbiochem (San Diego, CA) 。 A selective α v β 3 integrin antagonist cyclic RGD (cyclo-RGDfV) peptide 及 the cyclic RAD (cyclo-RADfV) peptide 購自 Peptides International (Louisville, KY) 。 Human leptin 購自 PeproTech (Rocky Hill, NJ) 。 Mouse monoclonal antibody specific for α v β 3 integrin 購自 Chemicon (Temecula, CA) 。 NF- κ B luciferase plasmid 購自 Stratagene (La Jolla, CA) 。 p85 及 Akt dominant- negative mutants 由 Dr. W.M. Fu (National Taiwan University) 所提供 。 IKK α (KM) and IKK β (KM) mutants 由 Dr. H. Nakano (Juntendo University, Tokyo, Japan) 所提供 。 pSV- β -galactosidase vector , luciferase assay kit 購自 Promega (Madison, WI) 。 其它化學藥品皆購自 Sigma–Aldrich (St Louis, MO) 。

第二節 實驗方法

一、細胞培養(Cell culture)

本實驗所使用之人類前列腺癌細胞株(PC3, DU145 及 LnCaP)購自 American Type Culture Collection。前列腺癌細胞使用含 10% Fetal bovine serum (FBS)、1% penicillin/streptomycin 的 RPMI-1640 培養液，靜置於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱中培養。

二、細胞移行實驗(Migration assay)

細胞移行實驗使用 Transwell (Costar, Corning Life Sciences, Acton, MA; pore size, 8 μ M)，並將其置放於 24 孔盤中。在執行細胞移行實驗前，細胞會預先使用不同的抑制劑包括：Ly294002、Akt inhibitor、PDTC、TPCK 或 vehicle control (0.1% dimethyl sulfoxide)處理 30 分鐘。將約 2×10^4 個細胞與 200 μ l 無添加血清的 RPMI-1640 培養液置放於 transwell 的上層；300 μ l 含 1% FBS 及 leptin 的培養液置放於 transwell 的下層。24 孔盤靜置於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱內培養 16 至 18 小時，然後用 1% formaldehyde 固定 5 分鐘並用 0.05% crystal violet 染色 15 分鐘。上層的細胞使用棉花棒將其移除，並且用 PBS 清洗，移行至下層貼附的細胞可在顯微鏡底下觀察，並計算其數量。每次實驗皆為三重複，並重複操作此實驗至少三次以上。在每次的實驗中，移行的細胞

數量需藉由細胞存活實驗(cell viability assay) 的結果調整，以校正由 leptin 所引起的細胞增生效應。(正確的細胞移行數量 = 計數細胞移行的數量/細胞存活百分比)(Chu *et al.*,2007；Huang *et al.*, 2007)。

三、流式細胞技術分析(Flow cytometric analysis)

將人類前列腺癌細胞株 PC3 先分盤培養於 6 孔盤中。實驗前先以 PBS 溶液清洗，再以 37°C 的 trypsin 將細胞自培養盤中分離。接著使用含 1% paraformaldehyde 的 PBS 溶液中固定十分鐘，固定完畢後用 PBS 溶液清洗並將細胞與不同的 mouse anti-human antibody against integrin (1:100)一起置放於 4°C 培養 1 小時。然後將細胞再次用 PBS 溶液洗淨，並將細胞與接有 fluorescein isothiocyanate-conjugated 的 goat anti-rabbit secondary IgG (1 : 100 ; Leinco Tec., St Louis, MO) 一起培養 45 分鐘，然後使用流式細胞技術進行實驗，並使用 FACS Calibur 及 CellQuest software (BD Biosciences , San Jose, CA)分析(Tang *et al.*, 2006)。

四、西方墨點法分析(Western blot analysis)

首先準備細胞的溶解液及蛋白，接著用 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電泳分離 並轉移到 Immobilon polyvinylidene difluoride membranes 上。在室溫下用 4% BSA 阻斷非專一結合 1 小時，然後使用 p85, p-Akt, Akt, p-IKK, IKK, p-p65 或 p65 的 rabbit

antihuman antibodies against (1:1000)在室溫下作用 1 小時。經過三次清洗，隨後與 donkey anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000) 於室溫下培養 1 小時。實驗結果所發之化學冷光可藉著使用 Kodak X-OMAT LS film (Eastman Kodak, Rochester, NY)顯示出來。

五、轉染實驗及報導基因分析(Transfection and Reporter Gene Assay)

將人類前列腺癌細胞株 PC3 先分盤培養於 12 孔盤中，當其長到八分滿時，利用 Lipofectamine 2000 (LF2000; Invitrogen)進行轉染實驗。將含有 1 μ g κ B-luciferase plasmid 及 1 μ g DNA plasmid 的 serum free 培養液混合 5 分鐘，再將其與含有 2 μ l Lipofectamine 2000 的培養液混合 30 分鐘，隨後加入細胞內。轉染 24 小時後，再將細胞與含有 leptin 的培養液一同培養，24 小時將培養液移除並用冰的 PBS 溶液清洗。取 100 μ l 的 reporter lysis buffer (Promega)加入 12 孔盤的每個孔內作用，並將細胞從孔壁上刮下。將懸浮的細胞液經由 5 分鐘 13,000 rpm 的轉速離心分離後，收取上清液。在每 20 μ l 的細胞上清液中約含有等量(20-30 μ l)的蛋白，取出 20 μ l 的細胞上清液置放於不透光的 96 孔盤中，將等體積的螢光受質(luciferase subatrate)加入細胞上清液中，樣品所發出的冷光會透過 Luminometer 被偵測出來。

第三節 統計分析

統計分析(Statistics)

所有獲得的實驗數據皆以平均值±標準差(means±S.E.M.)，並藉由 Student's *t* test 來評估實驗組及控制組間重要的差異。當 *p* 值大於 0.05 時才具有顯著意義。



第參章 結果與討論
(Results and Discussion)



第一節 結果

Leptin 造成前列腺癌細胞的轉移

在先前的研究指出 leptin 能直接刺激人類癌細胞的轉移及侵入。本實驗我們選擇三株不同的前列腺癌細胞株(PC3、DU145 及 LNCaP)來研究 leptin 與前列腺癌細胞轉移的關係。當我們分別給予細胞不同濃度的 leptin，作用 16 至 18 小時，可以使得三株前列腺癌細胞的轉移情形增加。當濃度在 0.3 μM 時 LNCaP 的移行能力即表現出顯著的差異；而濃度到達 1 μM 時 PC3 及 DU145 細胞株也有顯著差異(Fig. 5)。

Leptin 增加前列腺癌細胞上 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins 的表現

有研究顯示在人類的癌細胞中 αv 及 β3 integrin 有明顯的表現(Sun *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007)，於是我們假設 integrins 可能參與在 leptin 誘導前列腺癌細胞的轉移過程中。藉由流式細胞技術分析顯示，給予細胞 leptin 刺激後會增加癌細胞膜上 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins 的表現，而在 α2 、 α5 、 β1 及 $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ integrins 則沒有顯著的影響(Fig. 6A)。為了再次驗證 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins 是否參與在 leptin 誘導前列腺癌細胞的轉移過程，我們將細胞給予 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 抗體及 RGD peptide 進行細胞移行實驗(Migration assay)，實驗結果指出由 leptin 所誘導的癌細胞轉移明顯被抑制，但給予 RAD peptide 的細胞則沒有影響(Fig. 6B)。由此可知，leptin 是經由調控增加

$\alpha\beta3$ integrins 的表現來增加前列腺癌細胞的轉移。

Leptin 經由 OBRI 接受器進入細胞影響前列腺癌細胞的轉移

Leptin 需要藉由與特殊的接受器(OBR)交互作用才能誘發其功能，而 OBR 接受器又分為 long isoform (OBRI)及 short isoform (OBRs)。我們實驗室之前的報告發現 leptin 增加軟骨肉瘤轉移是經由 OBRI (REF)，為了證明 OBRI 是否參予，我們將 OBRI siRNA 轉染入前列腺細胞株(PC3)中，分別進行細胞移行實驗(Fig. 7A)及流式細胞技術分析(Flow cytometric analysis) (Fig. 7B)，結果顯示當細胞被轉染入 OBRI siRNA 後其移行能力及 $\alpha\beta3$ integrins 的表現皆會被抑制。因此，我們可以得知 leptin 是經由活化 OBRI 接受器的訊號傳遞而造成前列腺癌細胞(PC3)的轉移。

IRS-1/PI3K、Akt 訊號傳遞路徑參與在由 leptin 調控增加前列腺癌細胞的轉移中

已有研究指出 leptin 的活化是經由 JAK2 訊息的活化及 STAT3 的磷酸化，或是其他傳遞路徑如：IRS-1 及 PI3K。因此我們直接利用西方墨點法來觀察在給予細胞 leptin 後 IRS-1 的磷酸化表現。當給予 PC3 細胞株 leptin 10 分鐘後，IRS-1 的磷酸化即有顯著的變化(Fig. 8A)。因此，我們使用 IRS-1 siRNA 來進一步調查 IRS-1 的活化與 leptin 調控增

加前列腺癌細胞轉移的訊息傳遞路徑的關係。當前列腺癌細胞 PC3 被轉染入 IRS-1 siRNA 24 小時後進行細胞移行實驗(Migration assay) (Fig. 8B)及流式細胞技術分析(Flow cytometric analysis)，PC3 細胞株的移行能力及 $\alpha v\beta 3$ 的向上調節作用皆被抑制(Fig. 8C)。由此可知 IRS-1 在 leptin 調控增加前列腺癌細胞轉移的訊息傳遞路徑中是較為重要的。接著我們觀察 leptin 是否能活化 IRS-1 關鍵的下游因子 PI3K:當給予 PC3 細胞株 leptin 10-120 分鐘後會增加 PI3K 的次單位 p85 的磷酸化(Fig. 9A)，隨後即能觀察到其下游因子 Akt 的磷酸化(Fig. 10A)。當前列腺癌細胞 PC3、DU145 及 LNCaP 被加入 PI3K 抑制劑(Ly294002)與 Akt 抑制劑或是轉染 p85 與 Akt mutant 於 PC3 細胞 24 小時後可觀察到前列腺癌細胞株 PC3 的移行能力及 $\alpha v\beta 3$ 的向上調節作用皆有很顯著被抑制的現象(Fig. 9&10B)。以上實驗結果指出，IRS-1/PI3K、Akt 訊號傳遞路徑參與在由 leptin 調控增加前列腺癌細胞的轉移當中。

NF- κ B 訊號傳遞路徑參與在由 leptin 調控增加前列腺癌細胞的轉移中

之前的研究指出 NF- κ B 轉錄因子參與在 leptin 誘發的細胞轉移中是必要的。為了證明 NF- κ B 訊號傳遞路徑是否參與在由 leptin 調控增加前列腺癌細胞的轉移中，我們給予細胞 I κ B α protease 抑制劑 TPCK (1 μ M)及 NF- κ B 抑制劑 PDTC (10 μ M)後，發現除了前列腺癌細胞株 PC3

的移行能力有降低的現象外(Fig. 11A)， $\alpha\beta3$ 的向上調節作用現象也明顯的被抑制(Fig. 11B)。因此，驗證 NF- κ B 轉錄因子參與在由 leptin 誘發前列腺癌細胞株 PC3 的轉移路徑中。接著我們研究 leptin 誘發 NF- κ B 產生活性的上游因子與前列腺癌細胞株 PC3 轉移的關係：首先，當給予 PC3 細胞株 leptin 後，能使細胞質中 IKK α/β 的磷酸化增加(Fig. 12A)；接著我們轉染 IKK α 及 IKK β mutant 入 PC3 細胞 24 小時後，進行細胞移行實驗(Migration assay)後，前列腺癌細胞株 PC3 的移行能力即被明顯的抑制(Fig. 12B)。因此，IKK α/β 的活化是參與在由 leptin 調控增加前列腺癌細胞的轉移中。當給予 PC3 細胞株 leptin 後，也能使細胞質中 I κ B α 的磷酸化隨著時間而增加。先前的研究即顯示出 p65 Ser⁵³⁶ 的磷酸化會增加 NF- κ B 的轉錄活化(Transactivation)，當我們給予 PC3 細胞株 p65 的抗體後，即可觀察到 p65 的磷酸化現象(Fig. 12A)。為了直接觀察前列腺癌細胞被給予 leptin 後 NF- κ B 活性的變化，我們將前列腺癌細胞轉染入 κ B-luciferase 當作 NF- κ B 活性的指示因子。實驗結果顯示，當給予前列腺癌細胞株 PC3 24 小時 leptin 後，會增加 κ B-luciferase 的活性，此外，Ly294002、Akt 抑制劑、PDTC 及 TPCK 皆能降低由 leptin 所誘發的 NF- κ B 活性(Fig. 13C)；將 PC3 細胞株一同轉染入 OBR1-siRNA (Fig. 13A)、IRS1-siRNA(Fig. 13B)、p85/Akt/IKK α /IKK β mutant (Fig. 13D)也能抑制 NF- κ B 促進因子的活

性。綜合以上結果來看，OBRI 接受器的活化、IRS-1、PI3K 及 Akt 訊息傳導路徑在 leptin 誘發前列腺癌細胞 NF- κ B 活化是需要的。



第二節 討論

肥胖是罹患前列腺癌的風險之一，而瘦體素是與肥胖十分相關的物質。瘦體素的功能除了與新陳代謝、能量消耗和食慾控制的功能之外，之前的研究顯示出瘦體素的表現也會增加人類腫瘤細胞的生成及轉移，但是關於人類前列腺細胞的入侵機制尚未清楚(Gainsford *et al.*, 1996) (Vona-Davis *et al.*, 2007)。本研究顯示出瘦體素誘導細胞移行的其中一個機制是經由 $\alpha\beta3$ integrins 調節訊號傳遞，並且是經由活化 OBRI 接受器、IRS-1、PI3K、Akt 及 NF- κ B 的訊息傳遞路徑(Fig. 14)。

瘦體素是屬於組織介素(Cytokine)的一員(Campfield *et al.*, 2000)，而且在之前的研究中已發現人類前列腺癌細胞會表現 OBRI 及 OBRs 兩種接受器(Bergström *et al.*, 2001) (Ishikawa *et al.*, 2004)，但關於其在人體中的表現，仍是尚未釐清的部份。

Integrins 連接細胞外基質與細胞內骨架，並且與分子細胞傳遞以及調節細胞內的生理功能，包括：附著(adhesion)、訊號傳遞(signaling)、細胞的運動(motility)、細胞的生存(survival)、基因的表現、細胞生長和細胞分化(Giancotti *et al.*, 1999)。當我們進行流式細胞分析實驗後發現瘦體素會增加在轉移中扮演重要角色的 $\alpha\beta3$ integrins 之表現。因此，我們使用 $\alpha\beta3$ integrins 的抗體來探討 $\alpha\beta3$ integrins 作用並發現它會

抑制瘦體素所造成的細胞移行現象。而且，當我們給予細胞 RGD 及 RAD 進行細胞移行實驗時，給予 RGD 的細胞其瘦體素誘導的移行能力也受到抑制，但給予 RAD 的細胞並無影響。這結果進一步的証實 $\alpha\beta3$ 的確是參與在由瘦體素調控增加前列腺癌細胞的轉移的過程中。

一般來說，當瘦體素與 OBRI 接受器結合後，緊接著會活化 JAK2 然後導致 STAT-3 的活化(Peto *et al.*, 2001)。瘦體素接受器除了經由活化 JAK2 的路徑外，還能造成 IRS 蛋白的磷酸化，並能刺激 IRS-PI3K 訊號傳遞路徑的啟動(Szanto *et al.*, 2000)。我們使用 IRS-1 的 siRNA 來測定 IRS-1 在傳導路徑中扮演的角色，發現 IRS-1 siRNA 對於瘦體素誘導的細胞移行能力及 integrins 的調節有抑制的作用，這顯示出 IRS-1 是參與在瘦體素誘導前列腺癌細胞移行的過程中。之前的研究也顯示出，瘦體素會增加 IRS-1 及 PI3K 次單位 p85 的磷酸化(Zhao *et al.*, 2000)。

當我們先給予細胞 PI3K 的抑制劑 Ly294002 後，實驗結果發現 Ly294002 對於瘦體素所誘導的細胞移行能力有明顯的抑制作用。而使用 p85 的 dominant-negative mutant 進行實驗後，也發現其瘦體素所誘導的細胞移行能力及 $\alpha\beta3$ integrins 的表現皆被抑制，這結果進一步的證實 PI3K 參與在由瘦體素調控增加前列腺癌細胞的轉移的過程中。

PI3K 的活化會造成下游標的物 Akt 的磷酸化，Akt 在調節細胞生長、細胞分化、細胞附著及發炎反應中扮演重要的角色(Hirsch *et al.*, 2000)。本篇中我們證明使用 Akt 抑制劑時，瘦體素所誘導的細胞移行能力及 integrins 的表現皆會被明顯的抑制。此外，dominant-negative Akt mutant 的使用也會造成瘦體素所誘導的細胞移行能力及 integrins 的表現被抑制，所以在人類前列腺癌細胞中 Akt 是會被瘦體素活化的。這結果指出，藉由 Akt 的活化可證明 IRS-1/PI3K 這條訊息傳遞路徑參予在由瘦體素調控增加前列腺癌細胞的轉移的過程中。

已有研究指出，NF- κ B 的活化與 integrins 的表現及腫瘤的轉移有關(Wen *et al.*, 2006)。在本研究我們證明，瘦體素所誘導的細胞移行能力及 integrins 的表現會被 NF- κ B 的抑制劑：PDTC 及 TPCK 所抑制，顯示出 NF- κ B 的活化可能與瘦體素所刺激造成的細胞移行能力及 integrins 的表現有關。在非活化的狀態下，NF- κ B 通常會被 I κ B 抑制蛋白控制在細胞質內，但被刺激後(例如 TNF- α)，I κ B 蛋白的次單位 IKK 複合體隨後即會被磷酸化，接著即會被 26S 降解酶所降解。最後，NF- κ B 會被釋放入核內，進而活化基因的表現(Vermeulen *et al.*, 2003)。在之前的實驗我們發現當給予前列腺癌細胞株 PC3 瘦體素後，會增加 IKK、I κ B α 及 p65 的磷酸化。當我們使用 κ B-luciferase 短暫的轉染入細胞當作測試 NF- κ B 活性的指示劑時，我們發現瘦體素也會誘導增加 NF- κ B

的活性。在本研究我們發現瘦體素所誘導的 IKK 及 p65 磷酸化會被 PI3K 的抑制劑 Ly294002 及 Akt 抑制劑所抑制，這結果顯示 PI3K 及 Akt 會透過活化 IKK α/β 造成 p65 的磷酸化，並增加 NF- κ B 的轉錄活性。

我們的研究得到的結果指出：瘦體素增加 $\alpha\beta$ 3 integrins 的活性是經由 OBRI-、IRS1-、PI3K-、Akt-、IKK α/β -及 NF- κ B-訊息傳遞路徑所造成的，並且進而增加人類前列腺癌細胞的細胞移行能力(Fig. 14)。此外，瘦體素誘導之訊號傳的路徑的發現可以幫助我們了解人類前列腺癌細胞轉移的機制，這或許可以引導我們在未來發展出更有效的治療方法。



結論

在本研究中我們得到了關於瘦體素誘導前列腺癌細胞移行的新機制是藉由上調節 αv 及 $\beta 3$ integrins。瘦體素會增加細胞的移行能力及 $\alpha v \beta 3$ integrins 的表現是經由活化 IRS1、PI3K、Akt、IKK α/β 及 NF- κ B 訊息傳遞路徑(Fig. 14)。



參考文獻

(References)



- Aka N *et al.* Leptin and leptin receptor levels in pregnant women with hyperemesis gravidarum. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006 Aug; 46(4):274-7.
- Bergström A *et al.* Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer.* 2001 Feb 1; 91(3):421-30.
- Bettuzzi S *et al.* Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J Urol.* 2003 Nov; 170(5):1817-21.
- Brennan AM *et al.* Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006 Jun; 2(6):318-27.
- Breslow N *et al.* Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer.* 1977 Nov 15; 20(5):680-8.
- Calle EE *et al.* Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003 Apr 24; 348(17):1625-38.
- Campfield LA *et al.* Central mechanisms responsible for the actions of OB protein (leptin) on food intake, metabolism and body energy storage. *Front Horm Res.* 2000; 26:12-20.
- Cervero A *et al.* The role of the leptin in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006 Jun; 18(3):297-303.
- Considine RV *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996 Feb 1; 334(5):292-5.
- Dennis LK *et al.* Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology.* 2002 Jul; 60(1):78-83.
- Din OS *et al.* Palliative prostate radiotherapy for symptomatic advanced prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2009 May 21.
- Fidler IJ *et al.* The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun; 3(6):453-8.

Ford OH 3rd *et al.* Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol.* 2003 Nov; 170(5):1817-21.

Gainsford T *et al.* Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10; 93(25):14564-8.

Gann PH *et al.* Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Aug 21; 88(16):1118-26.

Giancotti FG *et al.* Integrin signaling. *Science.* 1999 Aug 13; 285(5430):1028-32.

Hankey BF *et al.* Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jun 16; 91(12):1017-24.

Hirsch E *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 2000 Feb 11; 287(5455):1049-53.

Hsing AW *et al.* Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006 May 1; 11:1388-413.

Humphries MJ *et al.* Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28(4):311-39.

Hynes RO *et al.* Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002 Sep 20; 110(6):673-87.

Ishikawa M *et al.* Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 1; 10(13):4325-31.

Iwaniec UT *et al.* Central leptin gene therapy corrects skeletal abnormalities in leptin-deficient ob/ob mice. *Peptides.* 2007 May; 28(5):1012-9.

Jacobs EJ *et al.* A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal

- anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 6; 97(13):975-80.
- Jemal A *et al.* Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005 Jan-Feb; 55(1):10-30.
- Kikuchi N *et al.* Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. *Br J Cancer.* 2006 Aug 7; 95(3):371-3.
- Kirsh VA *et al.* Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Aug 1; 99(15):1200-9.
- Kokontis J *et al.* Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. *Cancer Res.* 1994 Mar 15; 54(6):1566-73.
- Lawson KA *et al.* Multivitamin use and risk of prostate cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer Res.* 1994 Mar 15; 54(6):1566-73.
- Lee AH *et al.* Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Apr; 6(4):507-13.
- Lichtenstein P *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13; 343(2):78-85.
- Margetic S *et al.* Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Nov; 26(11):1407-33.
- Moynihan AT *et al.* Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Aug; 195(2):504-9.
- [Mistry T](#) *et al.* Obesity and prostate cancer: a role for adipokines. [Eur Urol.](#) 2007 Jul;52(1):46-53. Epub 2007 Mar 26.
- Nermut MV *et al.* Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *EMBO J.* 1988 Dec 20; 7(13):4093-9.

[Odedina FT](#) *et al.* Prostate cancer disparities in Black men of African descent: a comparative literature review of prostate cancer burden among Black men in the United States, Caribbean, United Kingdom, and West Africa. *Infect Agent Cancer*. 2009 Feb 10;4 Suppl 1:S2.

Peto J *et al.* Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*. 2001 May 17; 411(6835):390-5.

Podsypanina K *et al.* Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science*. 2008 Sep 26; 321(5897):1841-4.

Price D *et al.* Toremifene for the prevention of prostate cancer in men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia: results of a double-blind, placebo controlled, phase IIB clinical trial. *J Urol*. 2006 Sep; 176(3):965-70; discussion 970-1.

Schulman CC *et al.* Nutrition and prostate cancer: evidence or suspicion? *Urology*. 2001 Sep; 58(3):318-34.

Strom SS *et al.* Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. *Nutr Cancer*. 1999; 33(1):20-5.

Struewing JP *et al.* The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1997 May 15; 336(20):1401-8.

Szanto I *et al.* Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Nature*. 2001 May 17; 411(6835):390-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29; 97(5):2355-60.

Taleb S *et al.* Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Dec; 27(12):2691-8.

Torday JS *et al.* Up-regulation of fetal rat lung parathyroid hormone-related protein gene regulatory network down-regulates the Sonic Hedgehog/Wnt/betacatenin gene regulatory network. *Pediatr Res*.

2006 Oct; 60(4):382-8.

Vermeulen L *et al.* Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 2003 Mar 17; 22(6):1313-24.

Vona-Davis L *et al.* Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Jun; 14(2):189-206.

Weidner N *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3; 324(1):1-8.

Wen XZ *et al.* Frequent epigenetic silencing of the bone morphogenetic protein 2 gene through methylation in gastric carcinomas. *Oncogene.* 2006 Apr 27; 25(18):2666-73.

Williams KW *et al.* From observation to experimentation: leptin action in the mediobasal hypothalamus. *Am J Clin Nutr.* 2009 Mar; 89(3):985S-990S.

Yoshida BA *et al.* Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Nov 1; 92(21):1717-30.

Zhao AZ *et al.* Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14; 275(15):11348-54.

Zhao J *et al.* Leptin receptor expression increases in placenta, but not hypothalamus, during gestation in *Mus musculus* and *Myotis lucifugus*. *Placenta.* 2004 Sep-Oct; 25(8-9):712-22.

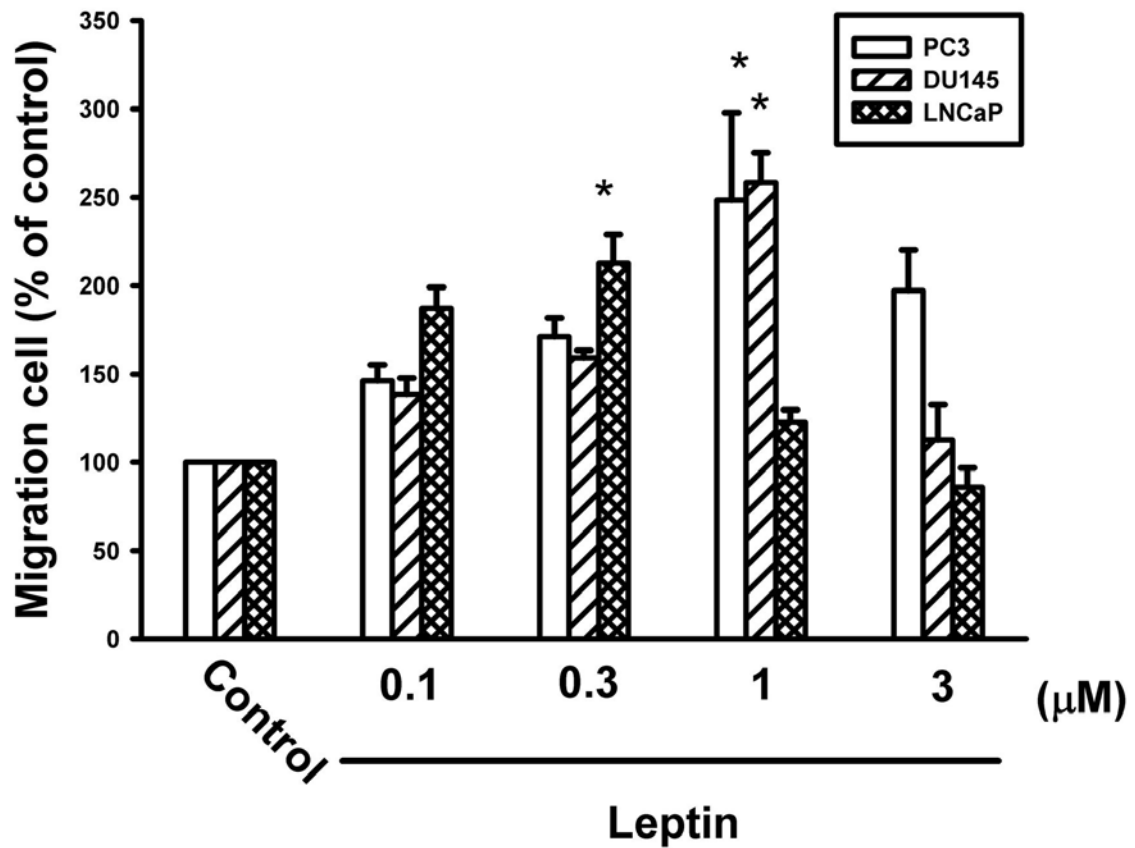
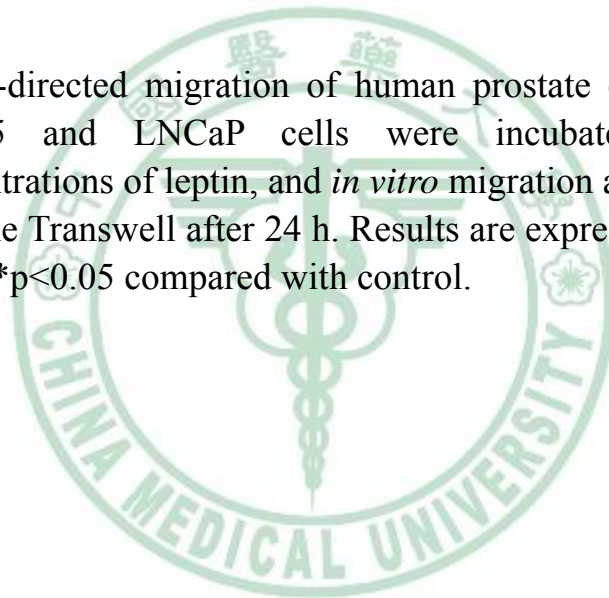


Fig. 5. Leptin-directed migration of human prostate cancer cells.

Fig. 5. Leptin-directed migration of human prostate cancer cells. PC3, DU145 and LNCaP cells were incubated with various concentrations of leptin, and *in vitro* migration activities measured with the Transwell after 24 h. Results are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with control.



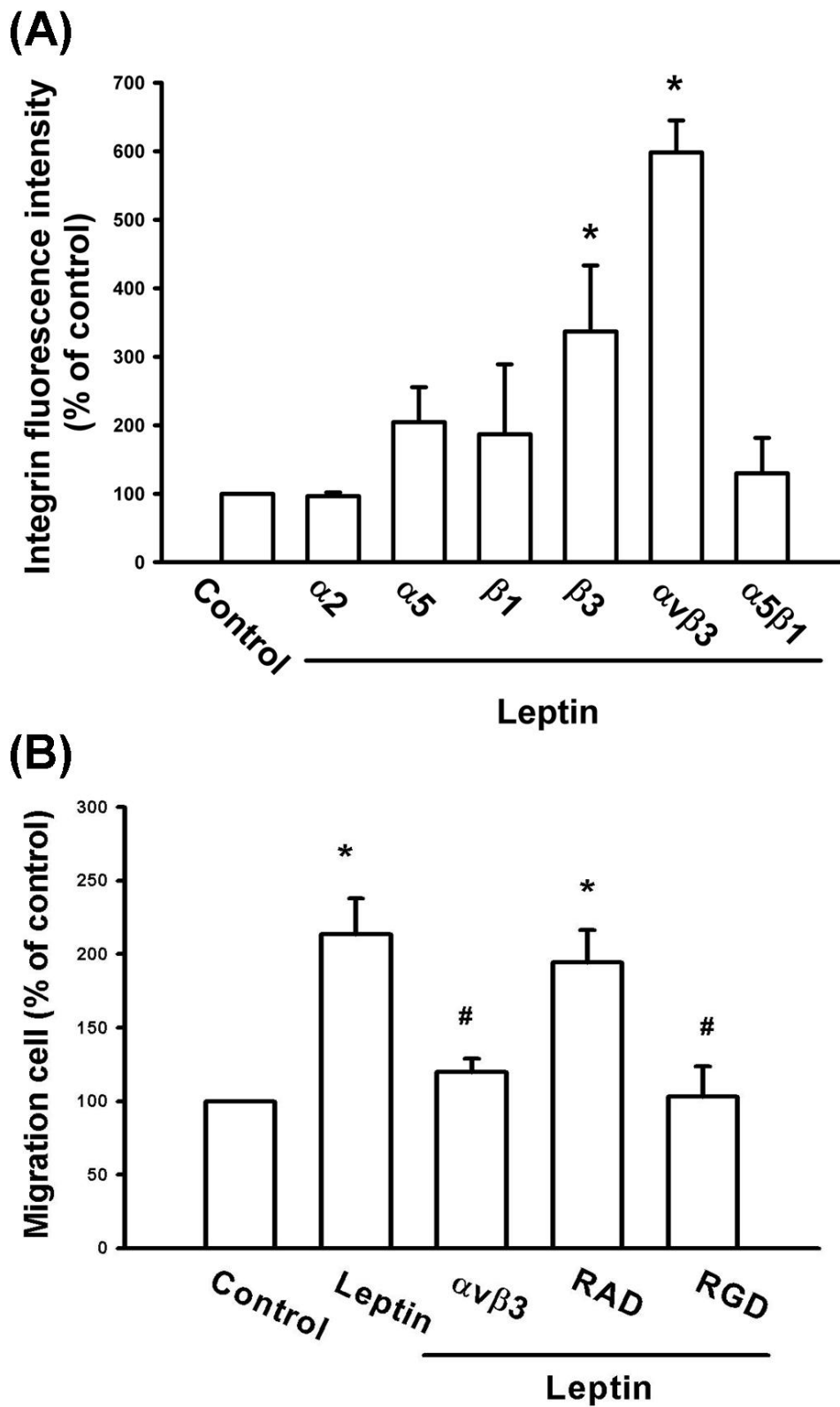


Fig. 6 . Leptin-directed chemoinvasion of human prostate cancer cells involves up-regulation of $\alpha v\beta 3$ integrins

Fig. 6. Leptin-directed chemoinvasion of human prostate cancer cells involves up-regulation of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins. (A) PC3 cells were incubated with leptin $1\mu\text{M}$ for indicated time intervals, and the cell surface expression of α2 , α5 , β1 , β3 , $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ or $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ integrin were determined using flow cytometry. (B) PC3 cells were pretreated with $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ monoclonal antibody (10ng/ml), cyclic RGD (100nM) or cyclic RAD (100nM) for 30min followed by stimulation with leptin $1\mu\text{M}$. The *in vitro* migration activity measured after 24 h showed that $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ monoclonal antibody and cyclic RGD but not cyclic RAD could inhibit the activity. Results are expressed as the mean \pm SEM. * $p<0.05$ compared with control; # $p<0.05$ compared with leptin-treated group.

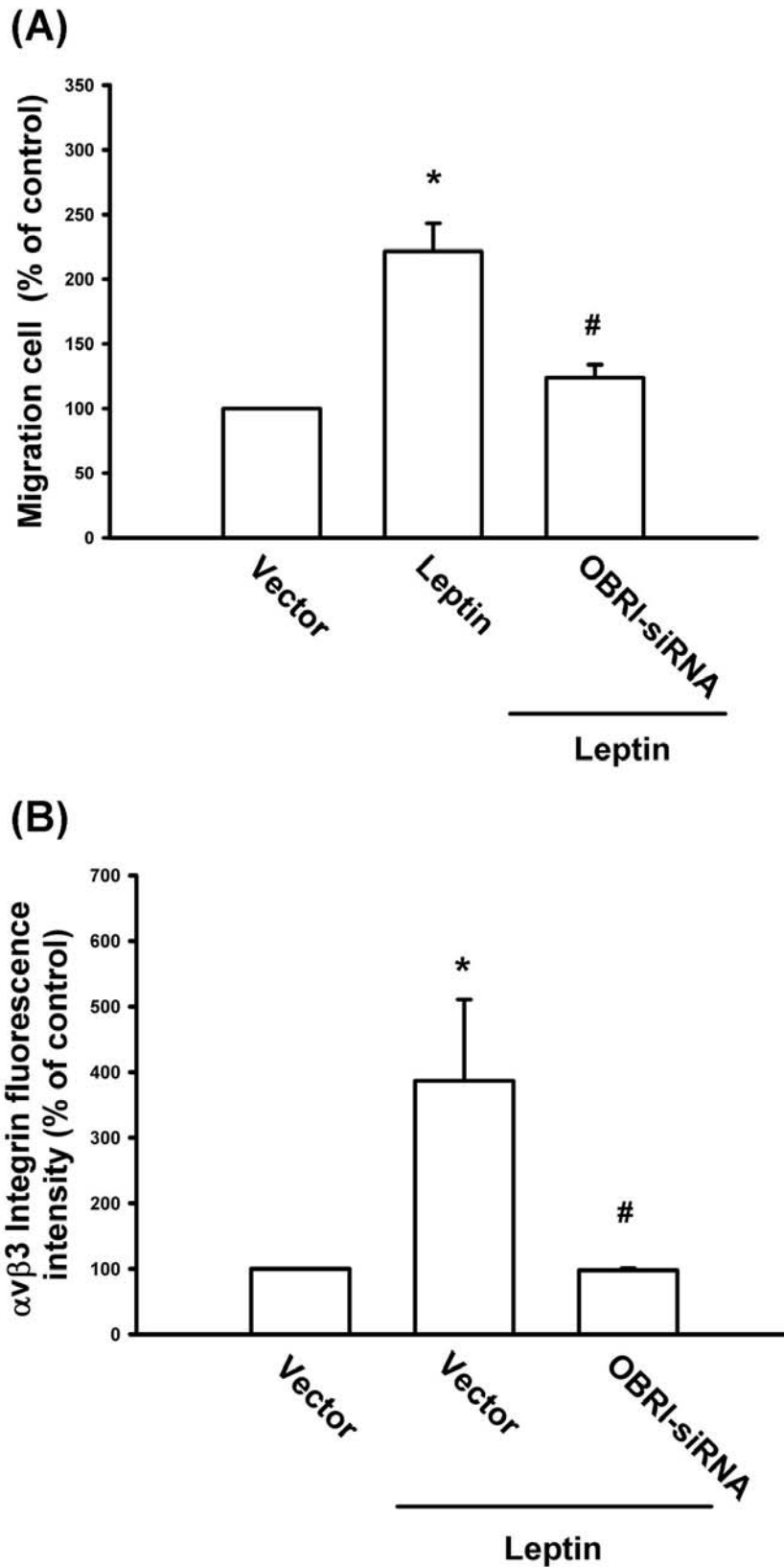


Fig. 7. OBRI activation is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells.

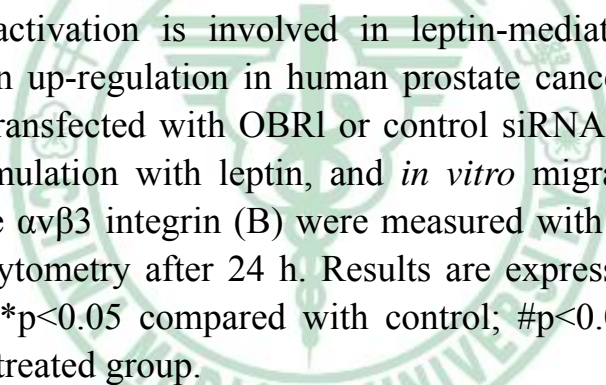


Fig. 7. OBRI activation is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. PC3 cells were transfected with OBRI or control siRNA for 24 h followed by stimulation with leptin, and *in vitro* migration (A) and cell surface $\alpha v\beta 3$ integrin (B) were measured with the Transwell and flow cytometry after 24 h. Results are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with leptin-treated group.

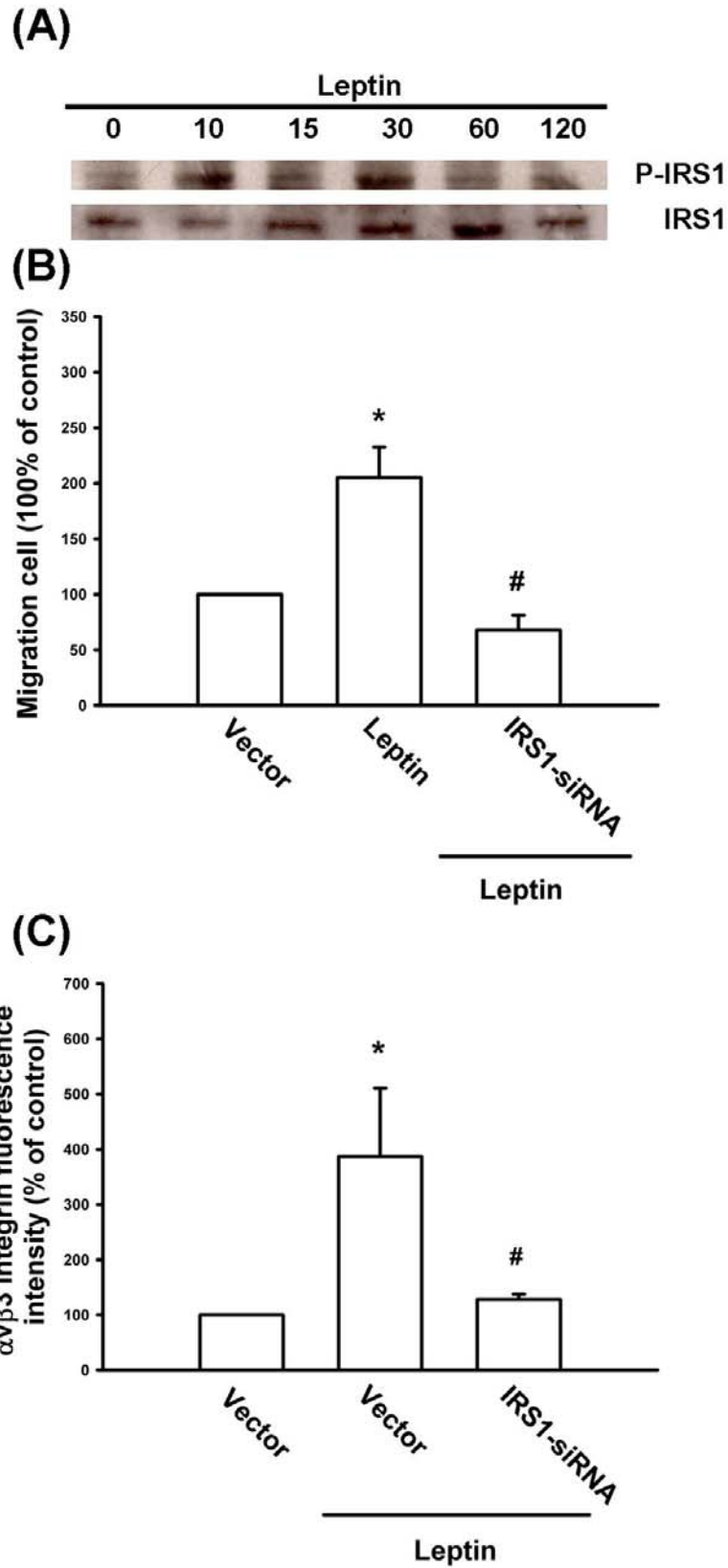


Fig. 8. IRS-1 pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells.

Fig. 8. IRS-1 pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. **(A)** PC3 cells were incubated with leptin for indicated time intervals and IRS1 phosphorylation was examined by Western blot analysis. Cells were transfected with IRS-1 or control siRNA for 24 h followed by stimulation with leptin, and *in vitro* migration **(B)** and cell surface $\alpha\beta 3$ integrin **(C)** were measured with the Transwell and flow cytometry after 24 h. Results are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ compared with leptin-treated group.

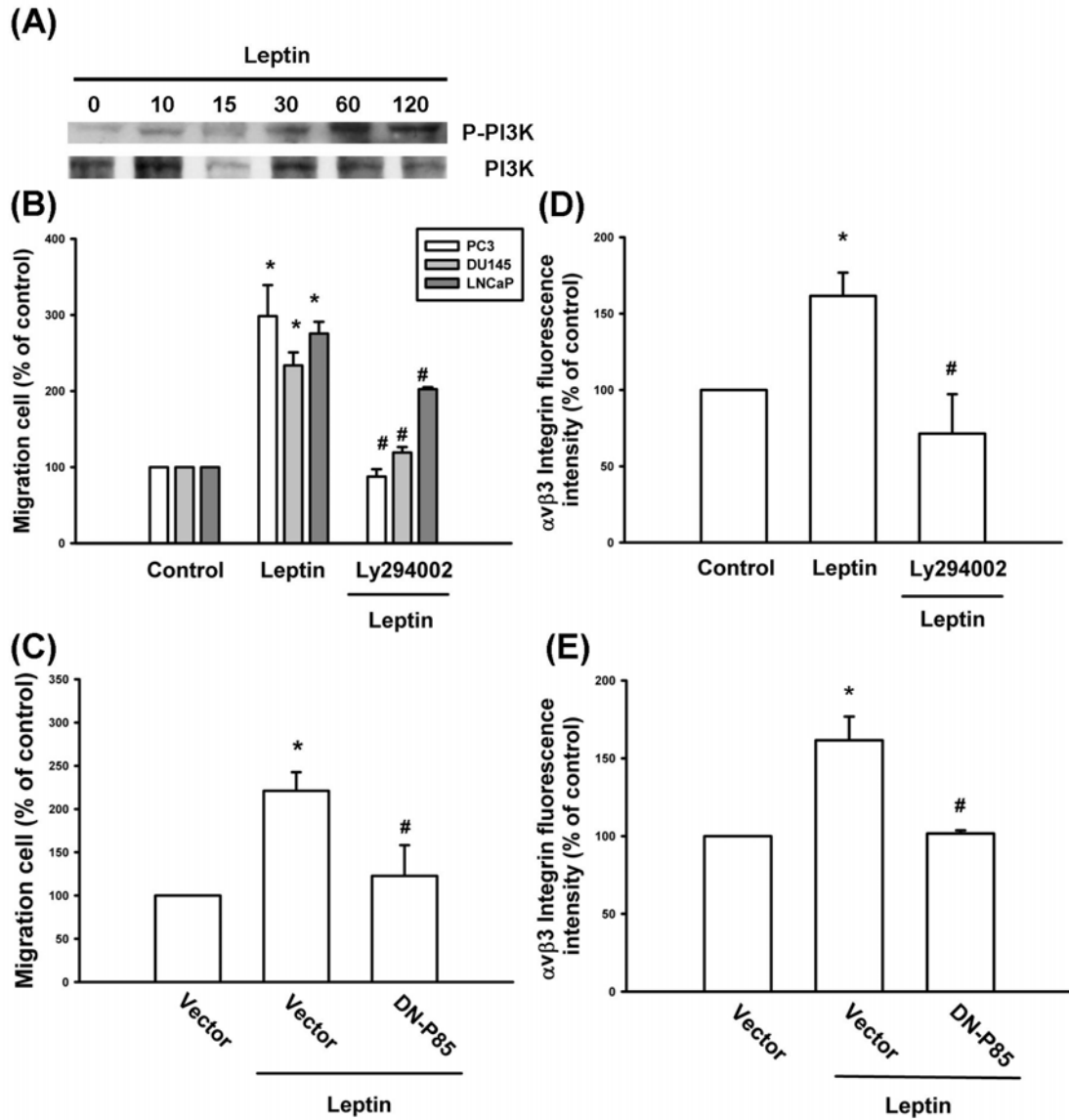


Fig. 9. PI3K pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells.

Fig. 9. PI3K pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. (A) PC3 cells were incubated with leptin for various time intervals and pp85 phosphorylation was examined by western blot analysis. (B) PC3, DU145 and LNCaP Cells were pretreated for 30 min with Ly294002 (10 μ M) and (C) PC3 cells transfected with dominant-negative (DN) mutant of p85 for 24 h followed by stimulation with leptin, and *in vitro* migration were measured with the Transwell after 24 h. (D&E) PC3 Cells were pretreated for 30 min with Ly294002 and transfected with dominant-negative (DN) mutant of p85 for 24 h followed by stimulation with leptin, and cell surface α v β 3 integrin were measured by flow cytometry. Results are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with leptin-treated group.

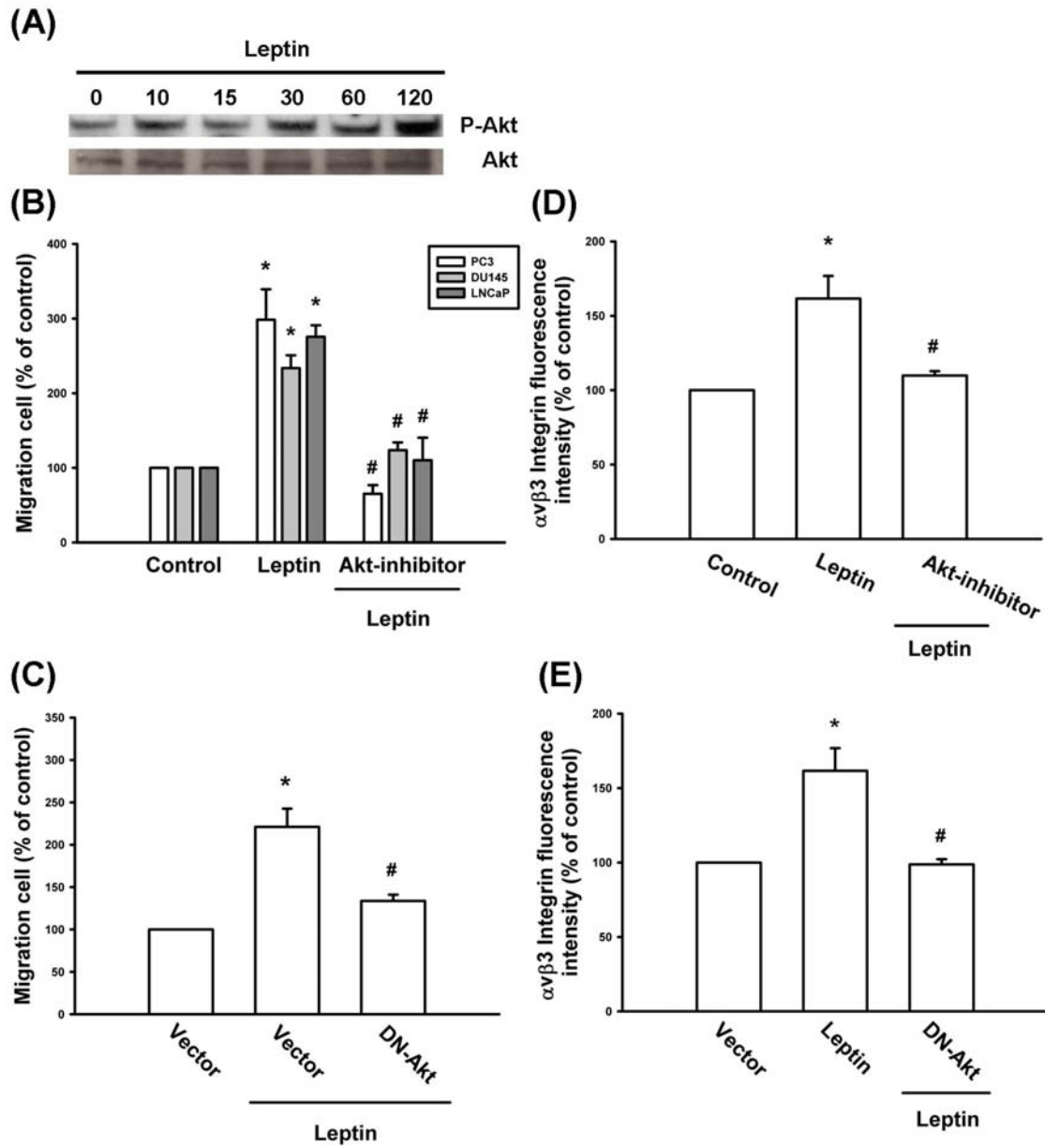


Fig. 10. Akt pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells.

Fig.10. Akt pathway is involved in leptin-mediated migration and integrin up-regulation in human prostate cancer cells. (A) PC3 cells were incubated with leptin for various time intervals, and Akt phosphorylation was determined by immunoblotting using phospho-Akt-specific antibody. (B) PC3, DU145 and LNCaP cells were pretreated for 30 min with Akt inhibitor (20 μ M) and (C) PC3 cells transfected with dominant-negative (DN) mutant of Akt for 24 h followed by stimulation with leptin, and *in vitro* migrations were measured with the Transwell after 24 h. (D&E) PC3 cells were pretreated for 30 min with Akt inhibitor and transfected with dominant-negative (DN) mutant of Akt for 24 h followed by stimulation with leptin, and cell surface α v β 3 integrin were measured by flow cytometry. Results are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with leptin-treated group.

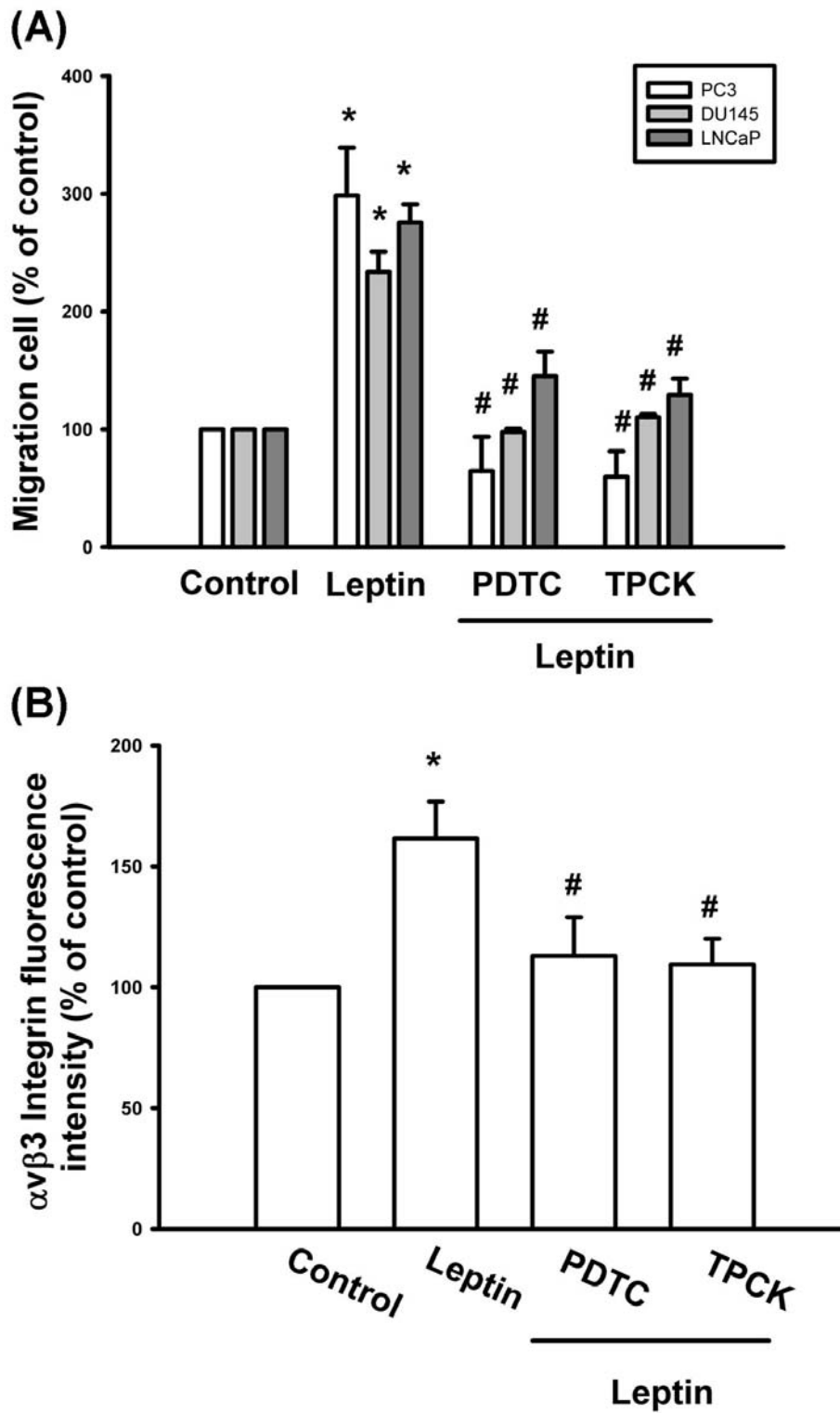


Fig. 11. Leptin induces cells migration and integrin up-regulation through NF- κ B.

Fig. 11. Leptin induces cells migration and integrin up-regulation through NF- κ B. (A) PC3, DU145 and LNCaP cells were pretreated for 30 min with PDTC (10 μ M) or TPCK (1 μ M) followed by stimulation with leptin, and *in vitro* migration was measured with the Transwell after 24 h. (B) PC3 cells were pretreated for 30 min with PDTC (10 μ M) or TPCK (3 μ M) followed by stimulation with leptin for 24 h, and the cell surface α v β 3 integrin was measured by flow cytometry. Results are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with leptin-treated group.

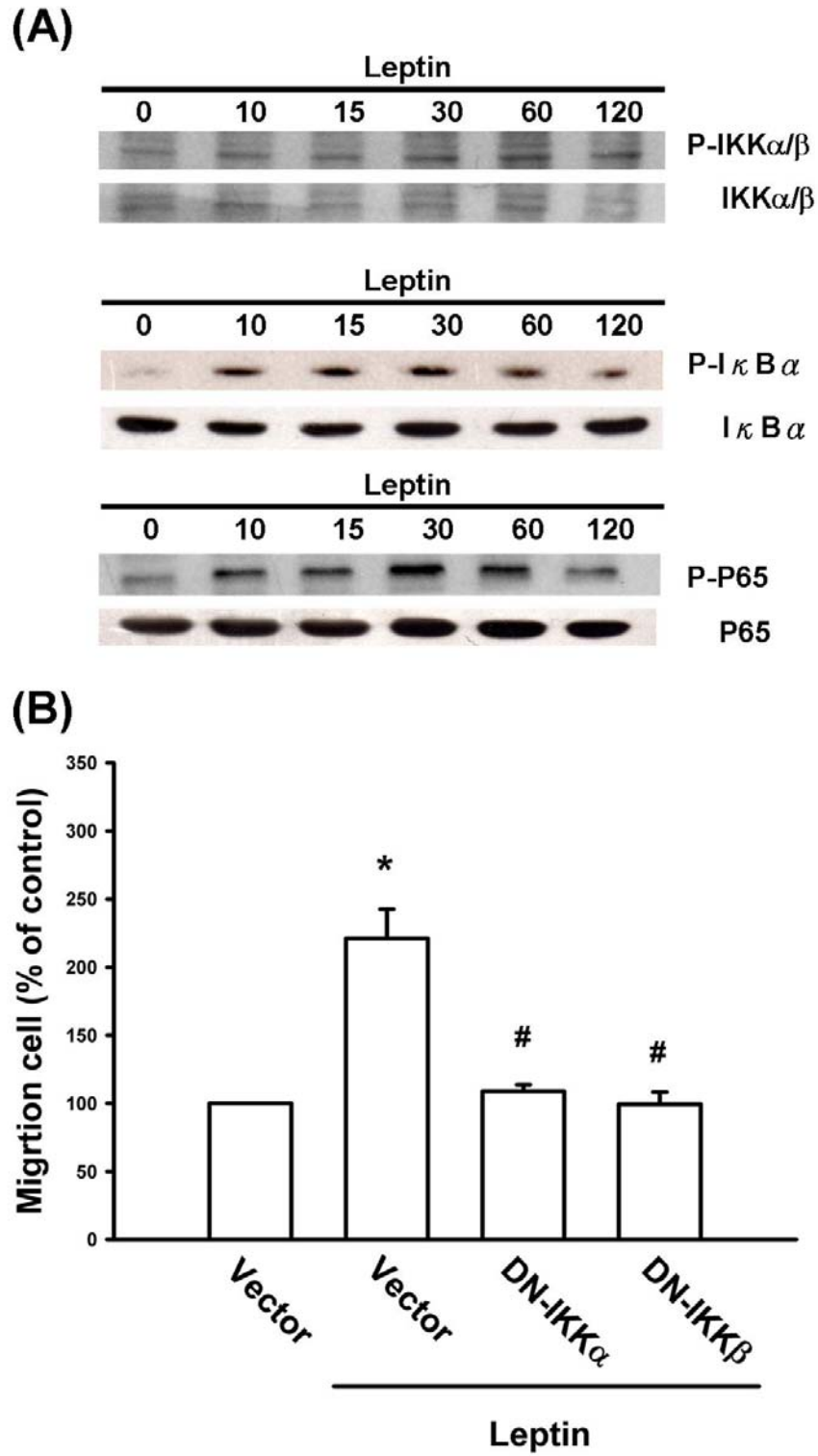


Fig. 12. Leptin induces cells migration and integrin up-regulation through NF- κ B.

Fig. 12. Leptin induces cells migration and integrin up-regulation through NF- κ B. (A) PC3 cells were incubated with leptin for indicated time intervals, and p-IKK α/β , p-I κ B α and p-p65 expression was determined by western blot analysis. (B) PC3 cells were transfected with dominant-negative (DN) mutant of IKK α or IKK β for 24 h followed by stimulation with leptin, and *in vitro* migration were measured with the Transwell after 24 h. Results are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with leptin-treated group.

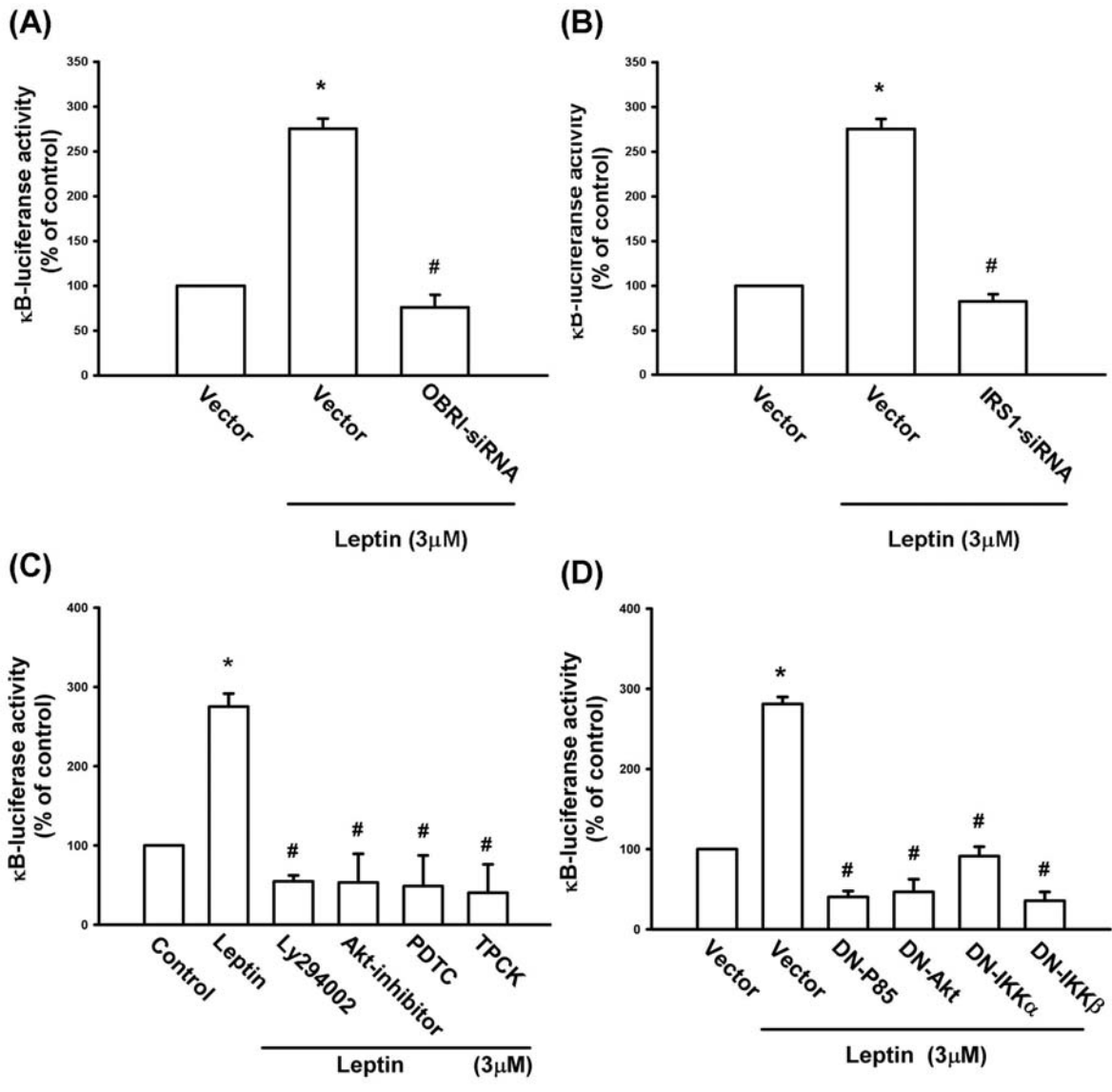


Fig. 13. Leptin induces cells migration and integrin upregulation through NF-κB.

Fig. 13. Leptin induces cells migration and integrin upregulation through NF- κ B. (A&B) PC3 cells transiently transfected with κ B-luciferase plasmid for 24 h and then co-transfection with OBRI-siRNA, IRS-1-siRNA, and (C) pretreated with Ly294002, Akt inhibitor, PDTC and TPCK for 30 min or (D) co-transfection with p85, Akt, IKK α and IKK β mutant, before incubation with leptin for 24 h. Luciferase activity was measured, and the results were normalized to the β -galactosidase activity. Results are expressed as the mean \pm SEM. * p <0.05 compared with control; # p <0.05 compared with leptin-treated group. μ

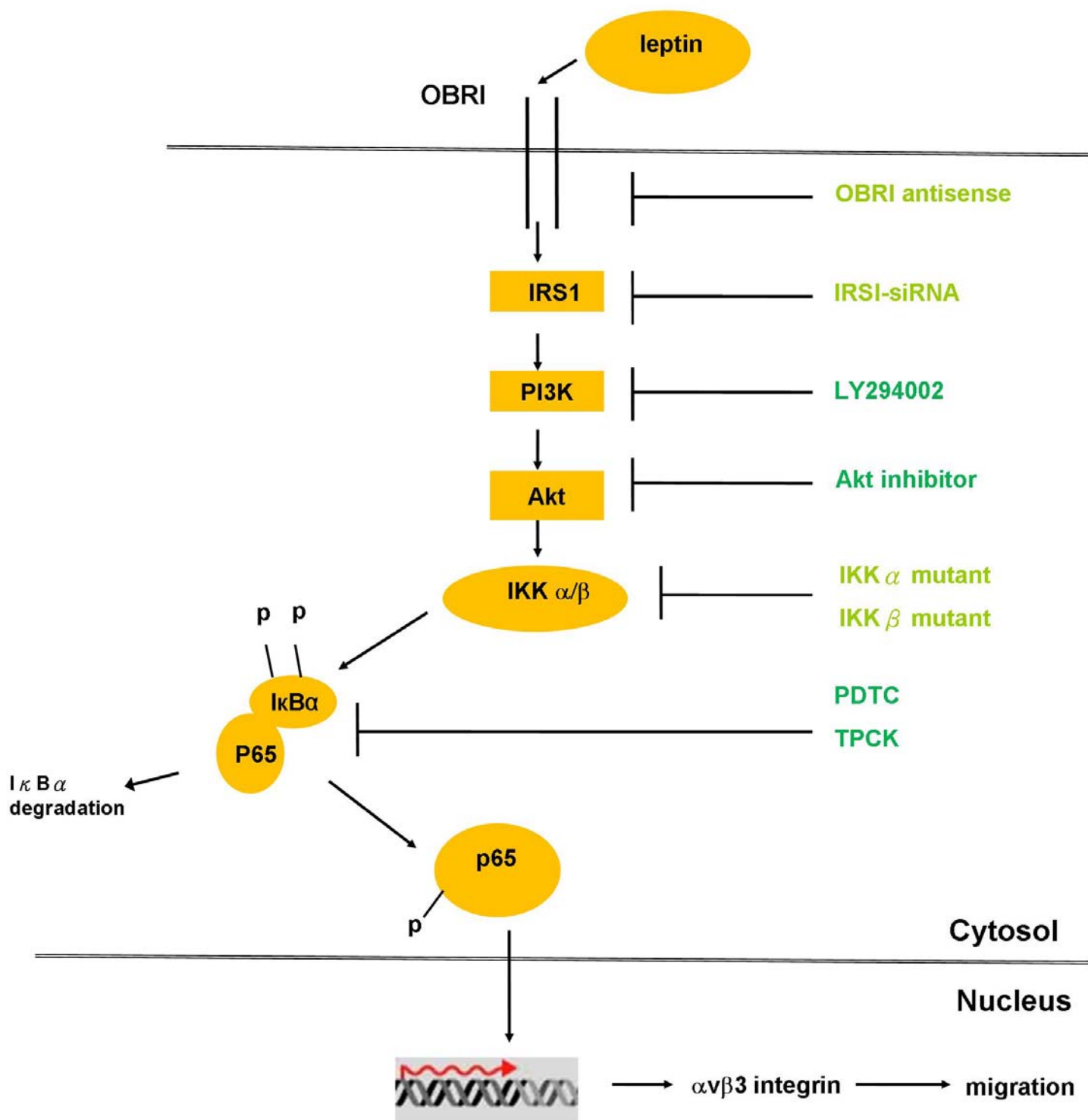


Fig. 14. Schematic presentation of the signaling pathways involved in leptin-induced migration and integrins expression of prostate cancer cells.

Fig. 14. Schematic presentation of the signaling pathways involved in leptin-induced migration and integrins expression of prostate cancer cells. Leptin activates PI3K and Akt pathway , which in turn induces IKK α/β phosphorylation, p65 Ser⁵³⁶ phosphorylation, and NF- κ B activation, which leads to α v β 3 integrins expression and increases the migration of human prostate cancer cells.