

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

***N*-acetylcysteine 藉由活化轉錄抑制因子 HBP1  
抑制口腔癌上皮生長因子受體的訊息傳遞**

*N*-acetylcysteine (NAC) inhibits EGFR Signaling  
through Induction of the Transcriptional Factor HBP1  
in Oral Cancers

研究生：洪筱琪 撰 Hsiao-Chi Hung

指導教授：黃俊瑩 博士 Chun-Yin Huang, Ph. D

中華民國九十八年六月

June, 2009

## 目錄

縮寫對照表 .....	I
摘要 .....	III
Abstract .....	IV
第一章、前言 .....	1
第二章、文獻探討 .....	2
一、口腔癌 (Oral Cancer) .....	2
I. 介紹 .....	2
II. 病理特徵 .....	2
III. 口腔癌發生過程 .....	4
IV. 口腔癌之危險因子 .....	4
V. 口腔癌分期 .....	6
VI. 口腔癌與 EGFR .....	8
二、上皮生長因子受體 (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR) .....	9
I. 介紹 .....	9
II. 上皮生長因子受體之訊息傳遞 .....	10
III. EGFR 磷酸化位點 .....	12
IV. EGFR 與氧化壓力 .....	14
V. EGFR 與 HBP1 .....	14
三、HBP1 (HMG (High-mobility group)-Box Protein 1) .....	16
I. 介紹 .....	16

II. HBP1 轉錄因子調控細胞生長.....	16
i. HBP1 與 RB.....	17
ii. HBP1 與 p38 MAPK.....	18
iii. HBP1 抑制 Wnt 訊息傳遞路徑.....	19
iv. HBP1 抑制 NADPH 氧化酶之次單位 p47 <sup>phox</sup> 的表現.....	20
III. HBP1 與癌症.....	21
四、NAC (N-acetyl-L-cysteine).....	22
I. 介紹.....	22
II. NAC 與 GSH.....	22
III. NAC 與癌症.....	23
i. NAC 與抗突變.....	23
ii. NAC 與抗氧化.....	23
iii. NAC 對粒線體的影響.....	23
iv. NAC 與 DNA 的修復.....	23
v. NAC 抑制基因毒性以及細胞的轉型.....	23
vi. NAC 調節基因表現以及訊息傳遞路徑.....	24
vii. NAC 抑制腫瘤細胞的增生與形成.....	24
IV. NAC 與 EGFR.....	24
五、RNA 干擾術 (RNA interference ; RNAi).....	25
I. 介紹.....	25
II. 原理.....	25
III. 應用.....	26
六、實驗目的與動機.....	27

第三章、材料與方法.....	28
一、實驗設計.....	28
二、實驗藥品與儀器.....	29
三、細胞培養 (Cell Culture).....	32
I. 細胞株及細胞培養條件.....	32
II. 試劑配製.....	32
III. 繼代培養.....	33
IV. 細胞冷凍.....	33
四、細胞生長率 (Growth) 與存活率 (Viability) 測定.....	34
I. 原理.....	34
II. 試劑配製.....	34
III. 細胞型態觀察.....	34
IV. 實驗步驟.....	34
五、細胞週期 (Cell Cycle) 分析.....	36
I. 原理.....	36
II. 試劑配製.....	36
III. 實驗步驟.....	37
六、ROS (Reactive Oxygen Species) 測定.....	38
I. 原理.....	38
II. 試劑配製.....	38
III. 實驗步驟.....	38
七、蛋白質萃取.....	39

I. 原理.....	39
II. 試劑配製 .....	39
III. 實驗步驟.....	39
八、蛋白質定量.....	40
I. 原理.....	40
II. 標準曲線製備 .....	40
III. 實驗步驟.....	40
九、西方點墨法 (Western Blotting) .....	42
I. 原理.....	42
II. 試劑配製 .....	42
III. 實驗步驟.....	46
十、質體 (Plasmid) 的製備.....	47
I. 原理.....	47
II. 使用的質體 (乾燥).....	48
III. 實驗步驟.....	48
十一、HBP1 knockdown 之 HSC-3 細胞株 – 利用 RNAi 干擾技術.....	50
I. 原理.....	50
II. 實驗步驟 .....	50
十二、萃取 RNA – 使用 RNeasy® Mini Kit (QIAGEN).....	52
I. 原理.....	52
II. 試劑配製 .....	52
III. 實驗步驟.....	52

十三、RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) – 使用 SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit (invitrogen) .....	54
I. 原理 .....	54
II. 試劑配製 .....	54
III. 實驗步驟 .....	54
十四、冷光酵素報導基因分析法 – Luciferase Gene Reporter Assay .....	56
I. 原理 .....	56
II. 實驗步驟 .....	56
十五、統計分析 .....	57
第四章、結果 .....	58
一、NAC 抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長 .....	58
I. NAC 抑制 HSC-3 生長 .....	58
II. NAC 抑制 cyclinD1 表現使細胞週期停滯於 G1 期 .....	58
二、NAC 誘發 HBP1 的表現且抑制 EGFR 訊息傳遞路徑 .....	60
I. NAC 增加 HBP1 蛋白質與 mRNA 的表現 .....	60
II. NAC 抑制 EGFR 訊息傳遞路徑 .....	61
三、NAC 抑制 p47 <sup>phox</sup> 的表現且抑制細胞內 ROS 的產生 .....	62
I. NAC 抑制 p47 <sup>phox</sup> 的表現 .....	62
II. NAC 抑制細胞內 ROS 的產生 .....	62
四、HBP1 調控 EGFR 與下游 Akt 的活化 .....	63
I. HBP1 knockdown 增強 EGFR、Akt 及 ERK 的活性 .....	63

II. HBP1 knockdown 增強 EGF 誘發的 EGFR 訊息傳遞路徑 .....	63
五、NAC 藉由調控 HBP1 的表現而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑.....	65
I. HBP1 knockdown 減緩 NAC 對 HSC-3 口腔癌細胞的生長抑制.....	65
II. HBP1 knockdown 減緩 NAC 對 EGF 誘發之 EGFR 訊息傳遞路徑的抑制	65
第五章、討論.....	88
第六章、結論.....	94
參考資料.....	95



## 圖目錄

圖 2-1 口腔癌的發生過程 .....	4
圖 2-2 上皮生長因子受體結構圖 .....	10
圖 2-3 ErbB 接受體與其配體 .....	11
圖 2-4 上皮生長因子受體的訊息傳遞 .....	12
圖 2-5 標準的 EGFR 訊息傳遞路徑與磷酸化位點 .....	13
圖 2-6 HBP1 結構圖 .....	16
圖 2-7 HBP1 調控細胞週期 .....	17
圖 2-8 HBP1 為 p38 MAPK 路徑之作用目標 .....	18
圖 2-9 HBP1 標的基因-Wnt .....	19
圖 2-10 p47 <sup>phox</sup> 之啟動子 .....	20
圖 2-11 HBP1 調控 NADPH 氧化酶 .....	20
圖 2-12 正常 HBP1 與突變的 HBP1 結構 .....	21
圖 2-13 Cysteine 與 NAC 之結構 .....	22
圖 2-14 RNAi 之作用原理 .....	26
圖 4-1 HSC-3 細胞 EGFR 過度表現且 HBP1 表現較低 .....	67
圖 4-2 NAC 抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長 .....	68
圖 4-3 NAC 抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長以細胞型態觀察 .....	69
圖 4-4 NAC 使 HSC-3 口腔癌細胞的細胞週期停滯於 G1 期 .....	70
圖 4-5 NAC 使 TW-206 口腔癌細胞的細胞週期停滯於 G1 期 .....	71
圖 4-6 NAC 抑制 cyclin D1 的活化 .....	72



圖 4-7 NAC 增加 HBP1 蛋白(A) 與 mRNA(B) 的表現.....	73
圖 4-8 NAC 增加 -2kb HBP1 啟動子的表現.....	74
圖 4-9 NAC 抑制 EGFR 蛋白(A) 與 mRNA(B) 表現.....	75
圖 4-10 NAC 抑制 Akt 活化與誘導 ERK 磷酸化.....	76
圖 4-11 NAC 抑制 EGF 所誘導的 EGFR 訊息傳遞路徑.....	77
圖 4-12 NAC 抑制 p47 <sup>phox</sup> mRNA 表現.....	78
圖 4-13 NAC 增加曲線左移現象抑制細胞內 ROS 的生成.....	79
圖 4-14 NAC 抑制細胞內 ROS 的生成以量化圖顯示.....	80
圖 4-15 建立 HBP1 knockdown 細胞株.....	81
圖 4-16 HBP1 的含量影響 EGFR、Akt 以及 ERK 磷酸化.....	82
圖 4-17 HBP1 的含量影響 EGF (time course) 誘發的 EGFR 傳遞路徑.....	83
圖 4-18 HBP1 的含量影響 EGF (dose dependent) 誘發的 EGFR 傳遞路徑.....	84
圖 4-19 HBP1 的含量影響 NAC 對 HSC-3 細胞的生長.....	85
圖 4-20 HBP1 的含量影響 NAC 對 HSC-3 細胞的生長以細胞型態觀察.....	86
圖 4-21 HBP1 的含量影響 NAC 對 EGFR 訊息傳遞路徑.....	87

## 表目錄

表 2-1 民國 95 年全國男性與 25 - 44 歲男性癌症發生率之比較.....	3
表 2-2 全球口腔癌發生及死亡情形 .....	3
表 2-3 口腔癌分期 .....	7
表 5-1 人類癌症中 Akt 的變異種類.....	93



## 縮寫對照表

縮寫	全名
ADH	alcohol dehydrogenase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
AML	acute myeloid leukemia
AJCC	American Joint Committee of Cancer
AR	amphiregulin
BSA	bovine serum albumin
BTC	betacellulin
CDK	cyclin dependent kinase
DCIS	ductal carcinoma in situ
DEPC	diethylpyrocarbonate
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EREG	epiregulin
ERP	epiregulin
EtBr	ethidium bromide
FASC	flow cytometry
FsaL	Fas ligand
GSH	glutathione
H <sub>2</sub> DCF-DA	2,7-dichlorofluorescein diacetate
HB-EGF	heparin-binding EGF
HBP1	HMG-box protein 1
HMG	high-mobility group

IARC	international agency for research on cancer
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NAC	N-acetylcysteine
NNK	4-methylnitrosamino-1-3- pyridyl-1-butanone
NNN	N-nitrosornicotine
NRG	neuregulins
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons
PBS	phosphate buffer saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PTP	protein tyrosine phosphatase
RB	retinoblastoma
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA inference
ROS	reactive oxygen species
RTK	receptor tyrosine kinases
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SH2	Src-homology 2
TGF- $\alpha$	transforming growth factor- $\alpha$
VEGF	vascular endothelial growth factor

---

## 摘要

全球最常發生的癌症中口腔癌排名第五，而死亡率卻是所有癌症中最高的。行政院衛生署調查發現，台灣口腔癌的發生率逐年增加，更是台灣男性所罹患的主要癌症中，發生和死亡情形增加最快者。儘管治療口腔癌方式已逐年提升，但其預後存活率仍然偏低。免疫組織化學檢查顯示，55%-100% 的頭頸部癌症患者中，表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor; EGFR) 呈現過度表現，且伴隨著預後不良、腫瘤分化不良以及低存活率的問題。因此，有效控制 EGFR 的活化顯然是治療口癌症重要之課題。之前研究發現，轉錄抑制因子 HBP1 (HMG box protein 1) 可藉由對氧化還原平衡的調控，而抑制乳癌細胞 EGFR 的訊息傳遞。所以，尋找具有抑制 EGFR 活性的自然生物活性物質成為目前研究焦點之一。而 NAC (*N*-acetylcysteine)，麩胱甘肽 (Glutathione; GSH) 的前驅物，具有抗發炎、抗突變和抗癌功效，同時，NAC 亦可抑制 EGFR 活性，但其機制尚未清楚。因此，我們假設 NAC 藉由活化 HBP1 來抑制 EGFR 訊息傳遞路徑而抑制口腔癌細胞生長。結果顯示，NAC 誘導 HSC-3 口腔癌細胞中 HBP1 的表現，並抑制 EGFR 活性，導致細胞生長停滯在 G1 期。同時，NAC 也抑制了 NADPH 氧化酶次單位 p47<sup>phox</sup> 的表現，而減少細胞內活性氧物質 (Reactive oxygen species; ROS) 的生成。為了更進一步了解 HBP1 在 NAC 抑制 EGFR 和細胞生長的角色，我們利用 RNAi 技術建立 HBP1 表現穩定降低的 HSC-3 細胞株。結果發現，HBP1 表現降低時呈現較強的 EGFR 路徑活化，同時，也減弱了 NAC 對 EGF-EGFR 訊息路徑和生長的抑制。我們希望此研究的結果提供對轉錄因子 HBP1 調控 EGFR 訊息傳遞路徑的分生機制有更深入的認識，更重要地是，提供 HBP1 將來應用在口腔癌防治上重要調控標的有力的證據。

## Abstract

Oral cancer is the fifth most frequent cancer worldwide while its mortality rate is the highest among all cancers. In Taiwan, the incidence of oral cancer increases yearly, especially in men. Despite the therapy stratagem has been advanced dramatically, the prognosis of survival rate is still relatively low. Immunohistochemical examination showed over-expressed EGFR staining in 55% to 100 % of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). EGFR overexpression is associated with poor prognosis, tumor differentiation, and consequently poor survival. Hence, finding compounds that can efficiently inhibit the EGFR signaling pathway has become a promising strategy in oral cancer therapy. NAC (*N*-acetylcysteine), known as an anti-inflammatory factor, has anti-EGFR function, but the mechanism is still unclear. Therefore, we hypothesized that NAC inhibits EGFR signaling pathway through induction of the transcription factor HBP1 in oral cancer. We chose HSC-3 oral cancer cell line as the study model due to the fact that HSC-3 has abundant EGFR expression but relatively low HBP1 expression. As results, we showed that NAC induces HSC-3 cells arrest in G1 accompanied with decreased cyclin D1 and EGFR activation. More importantly, HBP1 expression was induced in HSC-3 cells by NAC treatment in a dose-dependent manner. Moreover, NAC also inhibited the gene expression of p47<sup>phox</sup>, one of the NADPH oxidase subunit, and thereby suppressed ROS generation in oral cancer. Further, to test if NAC inhibits EGFR activation through induction of HBP1, we employed HBP1 shRNA to knockdown

endogenous HBP1 gene in HSC-3 cells. Results indicated that HBP1 reduction leads to higher EGF-stimulated EGFR and downstream Akt activation than the control one. The most importantly, HBP1 knockdown abolished NAC-inhibited EGFR activation. Thus, our results may support the transcription factor HBP1 as a future biomarker and therapeutic target in oral cancer stratagem.



## 第一章、前言

口腔癌 (Oral cancer) 在全球最常發生的癌症中排名第五，但死亡率卻是所有癌症中最高的。行政院衛生署調查發現，癌症目前居國人十大死因首位，其中口腔癌位居男性癌症死亡排名的第五位，而以癌症發生率來看，口腔癌亦高居男性癌症發生率的第五位。口腔癌的發生與嚼食檳榔、吸菸、喝酒等有密切關係，根據統計，約 90% 口腔癌病人有嚼食檳榔的習慣，台灣男性嚼食檳榔比率則高達 16%；隨著嚼食檳榔人口的增加，預期口腔癌發生率將會持續上升。

免疫組織化學檢查顯示，在頭頸部癌症中大約有 55%-100% 的患者，上皮生長因子受體 (Epidermal Growth Factor; EGFR) 有過度表現的情形，且伴隨著預後不良、腫瘤分化不良以及低存活率的問題。EGFR 以及其突變型 (EGFR variant III) 已知在許多腫瘤細胞過度表現，尤其是口腔癌。由此可知，對於治療口腔癌，EGFR 扮演著革命性的角色。我們先前研究發現，轉錄抑制因子 HBP1 (HMG box protein 1) 可藉由對氧化還原平衡的調控，而抑制乳癌細胞 EGFR 的訊息傳遞，但 HBP1 在口腔癌調控的角色尚未被探討。

已有研究顯示，NAC (*N*-acetylcysteine) 具有調節身體體內氧化還原平衡的能力，而且是一個有效的自由基清除劑，有許多研究證實，NAC 具有抗癌抗腫瘤的效果。因此，也開始有許多研究發現 NAC 能透過許多不同的機制來達到抑制癌症的發生。同時，NAC 亦有抑制 EGFR 活化，但其機制尚未完全清楚。

本研究主要是探討 NAC 是否藉由活化 HBP1 來抑制 EGFR 的訊息傳遞路徑。希望此研究將提供轉錄因子 HBP1 為一個治療口腔癌的重要標的，對於口腔癌的防治有進一步的貢獻。



## 第二章、文獻探討

### 一、口腔癌 (Oral Cancer)

#### I. 介紹

自民國七十一年起，癌症躍居國人十大死因之首，而其發生率與死亡率逐年增加，而在十大癌症死亡率中口腔癌排名第七位，若單以男性而言，則位居第五，近十年內，台灣每年罹患口腔癌的人數從1千7百位增加為4千7百位；死亡人數則從約1千位增加為2千2百位，成長幅度皆相當大，是台灣男性所罹患的主要癌症中，發生和死亡情形增加最快者。此外，25-44歲的男性癌症中，口腔癌發生率為第一位，且平均死亡年齡才只有55歲，比其他癌症早10歲以上。另外，在國際癌症研究總署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 2003年研究報告也顯示，全球每年罹患口腔癌人數約計有27萬人(男性17萬、女性10萬)，死亡人數約計有13萬人(男性8萬人、女性5萬人)。

#### II. 病理特徵

口腔癌一般界定發生範圍為口唇到扁桃腺之前，包括唇、舌、口底、口蓋、頰黏膜、齒槽黏膜、齒齦、白齒後三角區、上顎竇、硬顎、軟顎、扁桃腺、喉嚨後壁及下咽部。從組織學上區分，包括鱗狀上皮細胞癌、疣狀癌、肉瘤、腺樣囊狀癌、腺癌、惡性多形性腺瘤、惡性淋巴瘤、黏液表皮樣癌、惡性黑色素瘤、骨瘤、脂肪肉瘤等，上述癌症中以鱗狀上皮細胞癌所占的比率最高。口腔癌的好發部位在美國與其他已開發國家均位於舌部，其次是唇部與口底<sup>(1)</sup>，但是，在其他開發中國家，則是因生活習慣不同而好發於不同的部位。在台灣行政院衛生署的統計中，以舌癌占的比例最多，其次為頰癌與齒齦癌。

表 2-1 民國 95 年全國男性與 25-44 歲男性癌症發生率之比較

順位	全國男性			25-44 歲男性		
	原發部位	個案數	粗發生率	原發部位	個案數	粗發生率
1	肝及肝內膽管	7,167	53.7	口腔、口咽及下咽	1,214	30.1
2	結腸及直腸	5,793	42.7	肝及肝內膽管	728	18.2
3	肺、支氣管及氣管	5,756	41.5	結腸及直腸	406	10.2
4	口腔、口咽及下咽	4,879	35.9	鼻咽	356	8.95
5	攝護腺	3,073	21.9	肺、支氣管及氣管	214	5.25

資料來源：中華民國行政院衛生署，2006

表 2-2 全球口腔癌發生及死亡情形

國家/地區	男性		女性	
	發生人數	死亡人數	發生人數	死亡人數
全球	175,916	80,736	98,373	48,723
發展程度較高區域	64,830	22,422	26,311	8,259
發展程度較低區域	111,011	58,282	72,022	38,438

資料來源：GLOBOCAN 2002 database, IARC

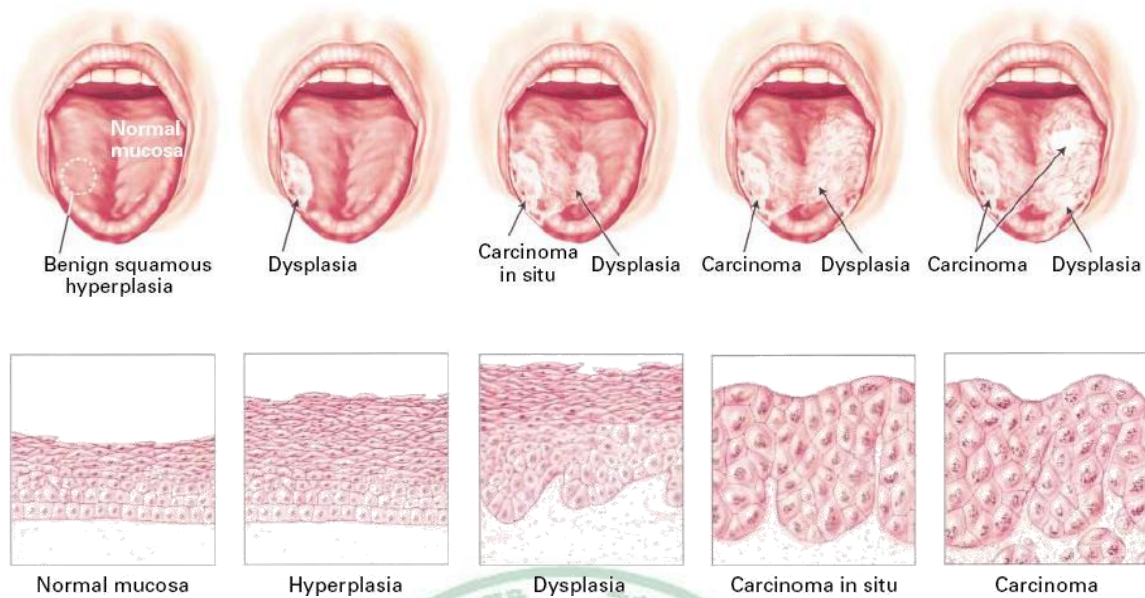


圖 2-1 口腔癌的發生過程

資料來源：(2)

### III. 口腔癌發生過程

事實上，口腔癌的形成是一種多階段的變化，起初，正常口腔黏膜細胞開始產生異常的鱗狀細胞增生，而形成潰瘍、白斑、紅斑及疣狀上皮增生等癌前期徵兆。然而，經由長期發炎或食物毒性刺激而造成細胞嚴重變異，使細胞不斷的增生，因細胞增生太快而使表面營養不足，則會產生腫瘤處表面的潰瘍，造成原位性口腔癌的發生。進一步當口腔癌轉移到淋巴時，常會在頸側觸摸到固定無痛的腫大淋巴結，癌細胞最後會轉移至肺、肝及骨髓等全身部位。

### IV. 口腔癌之危險因子

造成口腔癌的危險因子往往是多元的，對於口腔的慢性刺激是造成口腔癌的重要因素，然而，其他地區性的特異生活習慣或是個人內因性因子的影響，也是口腔癌發生的主要原因。以下為口腔癌之危險因子：

### 嚼食檳榔

國際癌症研究總署 (IARC) 已證實檳榔子具有致癌性，且已發表公布檳榔子為第一類致癌物<sup>(3)</sup>。尤其，在東南亞地區嚼食檳榔明顯增加頭頸部癌症的罹患率<sup>(4,5)</sup>，一半以上的口腔癌病人有嚼食檳榔的習慣<sup>(6)</sup>。檳榔致癌之原因，主要是嚼食檳榔會使口腔暴露於許多生物鹼與多酚類化合物之中，而多酚類化合物在鹼性的環境下，所釋放出的活性氧物質會使口腔細胞的細胞膜產生脂質過氧化，或是直接造成 DNA 的改變或是斷裂，而產生基因毒性。此外，唾液中生物鹼在亞硝酸鹽的存在下，經過硝化作用後產生的衍生物也會對細胞具有基因毒性與致突變性<sup>(7-9)</sup>。

### 吸菸/嚼食菸草

吸菸一直是造成頭頸部癌症的重要因素，約有四分之一的口腔癌發生原因是吸菸<sup>(10)</sup>。另外，在動物實驗以及臨床實驗證實，嚼食菸草也具有致癌的效果，而且呈現劑量關係<sup>(11,12)</sup>。這樣的結果歸咎於，菸草中含有亞硝胺，例如，4-甲基亞硝胺基-1-3-吡啶基-1-丁酮 (4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone; NNK)、N-亞硝基尼古丁 (N-nitrosornicotine; NNN) 以及多環芳香族碳氫化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAH)，這些物質會使 DNA 造成變異，造成口腔癌的發生<sup>(13,14)</sup>。尤其，合併吸菸與喝酒或是合併嚼食菸草與喝酒，更大幅地增加罹患口腔癌的風險<sup>(15)</sup>。

### 飲酒

Seitz 等學者指出，飲酒會增加罹患口腔癌的風險且呈現劑量關係，事實上，每天喝 4-5 個酒精飲料單位的酒，造成口腔癌的風險比沒飲酒的人高出 2-3 倍以上<sup>(16,17)</sup>。哺乳類動物中，主要代謝酒精的酵素為乙醇脫氫酶 (alcohol dehydrogenase; ADH)，當酒精進入人體吸收後，乙醇脫氫酶將酒精轉化為乙醛，再由乙醛脫氫酶 (aldehyde dehydrogenase; ALDH) 代謝成不具毒性的乙酸，最後變成二氧化碳跟水排出體外。由於在酒精代謝過程中所產生的乙醛具有毒性，當過量的長期酗酒會導致乙醛堆積

在口腔黏膜上，使口腔上皮細胞 DNA 發生變異，進而造成口腔癌的發生<sup>(16, 18)</sup>。

## V. 口腔癌分期

口腔癌的臨床分期除了靠視診、觸診外，有時也須藉助電腦斷層或核磁共振檢查才得以完整。口腔癌分期的主要目的在確立治療方式的選擇，評估預後及比較不同治療方式的結果。依據美國癌症聯合委員會 (American Joint Committee; AJCC) 系統將口腔癌分期為三個階段，原位腫瘤的大小(T)、頸部淋巴結轉移與否 (N) 以及是否有遠方轉移(M)。口腔癌一般較容易轉移的部位除了頸部淋巴結外還包括肺臟、肝臟及骨骼。以下為口腔癌的分期：

0 期：原位癌腫瘤細胞侷限於口腔黏膜上皮內。

I 期：腫瘤的最長徑小於或等於 2 公分，且無頸部淋巴結或遠方轉移。

II 期：腫瘤的最長徑大於 2 公分但不大於 4 公分，且無頸部淋巴結或遠方轉移。

III 期：腫瘤的最長徑大於 4 公分或已轉移到同側頸部一個淋巴結，此淋巴結之最長徑不超過 3 公分。

IV 期：

IVA - 腫瘤侵犯鄰近的組織 (穿過骨外層，深入深層肌肉、上頷竇、皮膚)

IVB - 頸部淋巴結轉移的數目超過一個 (不論是在原發病灶的同側、對側或是兩側都有)、或是淋巴結的最大徑已經超過 3 公分。

IVC - 已發生遠方轉移。

表 2-3 口腔癌分期

	Tumor (T)	Node (N)	Metastasis (M)
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
Stage IVA	T4a	N0-2	M0
	T1-3	N2	M0
Stage IVB	T4b	any N	M0
	any T	N3	M0
Stage IVC	any T	any N	M1

資料來源：(19)

註： Tis – 原位性癌 (Carcinoma in situ)

T1 – 腫瘤最大直徑  $\leq 2$  公分

T2 – 腫瘤最大直徑  $\geq 2$  公分，但  $\leq 4$  公分

T3 – 腫瘤最大直徑  $\geq 4$  公分

T4a – 腫瘤侵入鄰近的組織

T4b – 腫瘤侵入咀嚼間隙、翼突板或是顱底

N0 – 無頸部淋巴結轉移

N1 – 與腫瘤同側的頸部淋巴結轉移，轉移瘤最大直徑  $\leq 3$  公分

N2 – 與腫瘤同側的頸部淋巴結轉移，轉移瘤最大直徑  $\geq 3$  公分，但  $\leq 6$  公分

N3 – 頸部淋巴結轉移，轉移瘤最大直徑  $\geq 6$  公分

M0 – 無遠方轉移

M1 – 有遠方轉移

## VI. 口腔癌與 EGFR

在非小細胞性肺癌、乳癌以及卵巢癌等癌症中都發現 EGFR 都有過度表現的情形<sup>(20-22)</sup>，然而，口腔癌也不例外<sup>(23)</sup>。大約 90%-100% 的口腔癌患者，EGFR 皆有過度的表現的情形，而造成口腔癌預後不佳及存活率低的問題<sup>(24, 25)</sup>。

學者進一步發現，在口腔上皮癌前期細胞轉變為口腔癌細胞時，EGFR 特別地過度活化<sup>(26)</sup>。然而，不同的頭頸部部位的腫瘤中，EGFR 的表現也不盡相同，例如，在咽部及口腔的腫瘤中比喉部的腫瘤有較高的 EGFR 表現<sup>(27)</sup>。此外，頭頸部癌症中，其他 ErbB 家族的成員也有過度表現的情形，HER2 (3%-29%)、HER3 (21%) HER4 (26%)<sup>(28)</sup>。事實上，EGFR、HER2 與 HER4 的過度表現出現在侵襲癌及原位癌上，而 HER3 的過度表現只出現在侵襲癌中<sup>(29)</sup>。

在 2004 年，Weinberger 等學者指出，EGFR 可從細胞膜轉位置細胞核中成為轉錄因子<sup>(30, 31)</sup>，然而，在口咽部癌細胞的免疫組織染色中發現，EGFR 同時存在於細胞核與細胞質中，也與先前研究推論有相似之處，特別的是，這些帶有細胞核 EGFR 過度表現的病患，卻有較高的原位癌復發性與存活率低<sup>(32)</sup>。

總而言之，雖然治療口腔癌的方式已提升，但存活率仍然偏低，為所有癌症中死亡率最高。再加上 EGFR 的表現與口腔癌呈現密切相關性，所以 EGFR 對口腔癌的影響不容忽視。

## 二、上皮生長因子受體 (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR)

### I. 介紹

上皮生長因子受體是一種橫跨細胞膜的受體，屬於 ErbB 家族，基因落在第七號染色體上 7p12.1-12.3 的位置，含有 28 個表現區域 (exon)，基因體序列 (genomic sequence) 長度約為 188 kb，而 mRNA 長度約 5.6 kb，蛋白質為 1210 個胺基酸組成，分子量為 170 kDa。具有受體酪胺酸激酶 (receptor tyrosine kinases ; RTKs) 的活性，為許多訊息傳遞路徑之首，參與調控細胞增生、存活、黏附、遷移及分化<sup>(33, 34)</sup>。上皮生長因子受體家族共包含四種不同的受體，分別為 EGFR (HER1)、HER2、HER3 與 HER4，EGFR 是最早被發現的受體。這些受體結構依所在位置分為三個部分，細胞外介質結合區 (extracellular ligand-binding domain)、穿透細胞膜區 (transmembrane domain)、細胞內區 (intracellular domain) 以及尾部 C 端自體磷酸化區域 (COOH-terminal domain)<sup>(34)</sup>。在正常的細胞中，上皮生長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) 廣泛分佈於所有組織中，微量的 EGF 與其受體 EGFR 結合後，就能刺激細胞週期進行，使細胞生長及分化，維持細胞正常的代謝功能。另外，正常的細胞中的 EGFR 表現非常微弱，且多半呈現不活化狀態，僅供維持細胞一般正常生長。一般而言，當細胞受損時，游離的 EGF 就會自然的聚集，與其受體結合後，促進下游訊息傳遞路徑，增加生物活性等，使細胞分裂、增殖以、分化及修復後再生。



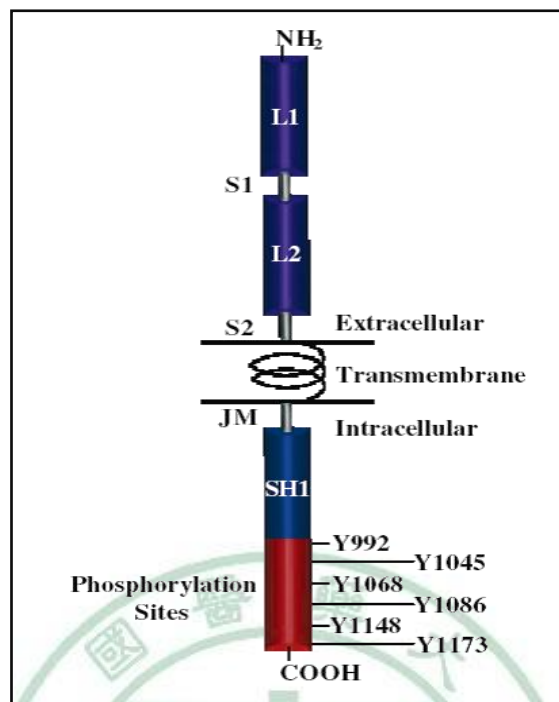


圖 2-2 上皮生長因子受體結構圖

資料來源：(33)

## II. 上皮生長因子受體之訊息傳遞

ErbB 家族四個成員 EGFR、HER2、HER3 與 HER4 是典型的受體酪胺酸激酶，具有細胞外配體結合位點、單次 $\alpha$ -螺旋跨膜區以及胞漿蛋白酪胺酸激酶結構區。當 ErbB 受體與配體結合時會發生結構改變，然而，ErbB 受體能夠識別特定的配體，意謂著不同配體與相同之 ErbB 受體結合後會使不同的酪胺酸殘基發生磷酸化，同時，ErbB 受體具有配體選擇性，而選擇性的激活下游不同的訊息傳遞路徑以及溶酶體降解路徑<sup>(35, 36)</sup>。而其中上皮生長因子 (epidermal growth factor; EGF)、轉化生長因子 (transforming growth factor; TGF- $\alpha$ )、雙調蛋白 (amphiregulin; AR) 以及表原 (epigen; EPG) 易與 EGFR 結合。另外， $\beta$ 細胞素 (betacellulin; BTC)、肝素結合性表皮生長因子 (heparin-binding EGF; HB-EGF) 以及表皮調節素 (epiregulin; EPR) 易

與 EGFR 及 HER4 結合。而神經調節素 (neuregulins ; NRG) 家族的配體，NRG-1、NRG-2、NRG-3 和 NRG-4 可與 HER3 及 HER4 結合，但不會與 EGFR 結合<sup>(37)</sup>。當配體與受體結合後，會使受體成為同質雙元體 (homodimer) 或異直雙元體 (heterodimer) 的形式，並活化受體酪胺酸激酶，使受體尾端的酪胺酸殘基 (tyrosine residues) 磷酸化<sup>(38)</sup>。而被磷酸化的酪胺酸殘基會被含有 Src 同源體 2 (Src-homology 2 domains ; SH2) 的蛋白質結合，例如，Grb2、Shc 以及 PLC $\gamma$ ，進而活化下游的訊息傳遞<sup>(39,40)</sup>。EGFR 主要活化的下游訊息傳遞路徑包括，Ras-Raf-MEK-ERK1/2、STAT3 以及 STAT5，這些路徑作用於調控基因轉錄、細胞週期 G1-S 期與細胞的增生、分化<sup>(41,42)</sup>；然而，PI3K-Akt-mTOR 路徑則與細胞存活及抗細胞凋亡有關<sup>(43-45)</sup>。

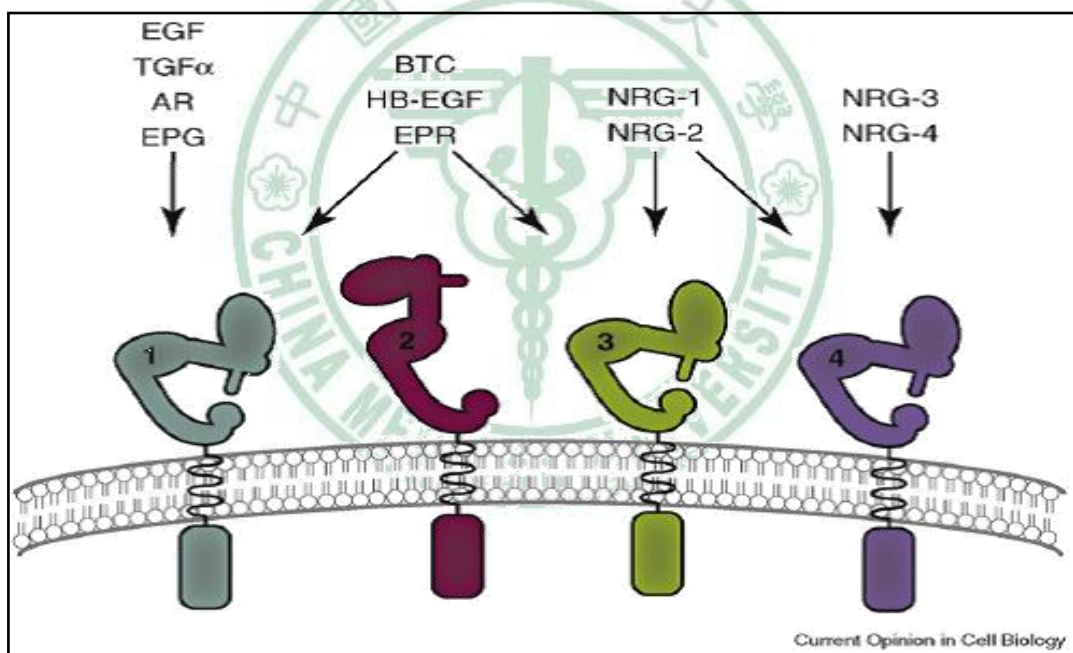


圖 2-3 ErbB 接受體與其配體

資料來源：(37)

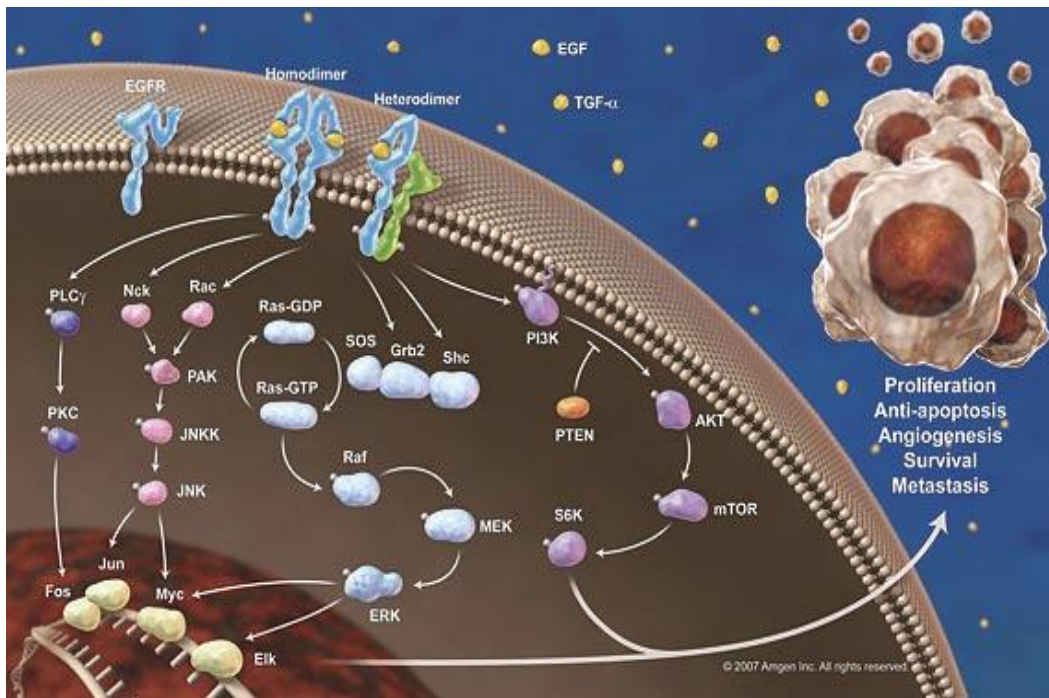


圖 2-4 上皮生長因子受體的訊息傳遞

資料來源：<http://www.bio-itworld.com/issues/2008/april/amgen.html>

### III. EGFR 磷酸化位點

EGFR 酪胺酸磷酸化位點位於細胞內區的尾部 C 端自體磷酸化區域，約 194 個胺基酸位置<sup>(46)</sup>。在體內實驗中，有五個 EGFR 自體磷酸化位點已被確定，分別為三個主要磷酸化位點，Tyr<sup>1068</sup>、Tyr<sup>1148</sup> 和 Tyr<sup>1173</sup>；另外，還有兩個次要的磷酸化位點，Tyr<sup>992</sup> 以及 Tyr<sup>1086</sup>。然而，隨著這些磷酸化位點的不同，所活化下游的路徑也有區別<sup>(46-49)</sup>。以下為常見位點及其作用之介紹：

#### Tyr<sup>845</sup>

當此位點磷酸化時，穩定 EGFR 活化環，且保持其活性，提供與其他蛋白質結合，使 c-Src 磷酸化，活化 Shc-Grb2-Sos-Ras-MAPK 路徑，進而促使細胞增生與腫瘤的形成<sup>(50-52)</sup>。

Tyr<sup>992</sup>

可與含有 SH2 區的 PLC $\gamma$  結合，而促使 PLC $\gamma$  活化，水解 PIP<sub>2</sub> 而生成 PI<sub>3</sub>，進而造成鈣離子的釋放，此外 PLC $\gamma$  的活化也與細胞存活及侵襲能力有關<sup>(53,54)</sup>。

Tyr<sup>1045</sup>

此位點磷酸化後，會生成與 c-CBL 的接合位點，而導致泛素化 (ubiquitination) 與 EGFR 的降解作用<sup>(55,56)</sup>。

Tyr<sup>1068</sup>、Tyr<sup>1086</sup>

與輔助蛋白 Grb2 的 SH2 區結合後，活化下游 Sos-Ras-MAPK 訊息傳遞路徑，調節細胞增生與分化<sup>(57)</sup>。

Tyr<sup>1148</sup>、Tyr<sup>1173</sup>

此位點磷酸化後，會生成與 SHC 鷹架蛋白的接合位點，而參予 MAPK 路徑與 p85-PDK-Akt 路徑<sup>(58)</sup>。

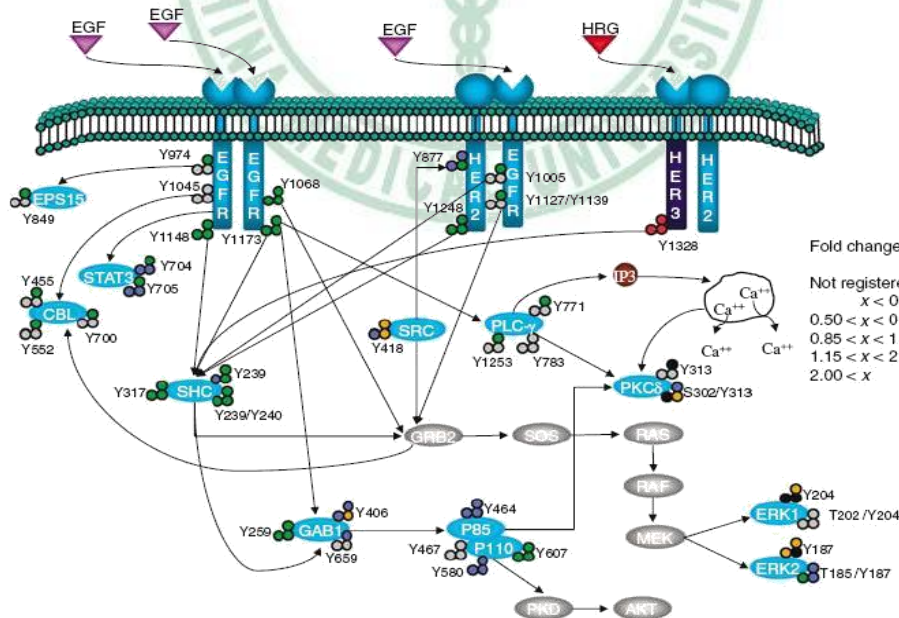


圖 2-5 標準的 EGFR 訊息傳遞路徑與磷酸化位點

資料來源：(59)

#### IV. EGFR 與氧化壓力

Bae 等學者指出，血小板源生長因子 (platelet-derived growth factor ; PDGF) 以及 EGF 等配體的刺激可使細胞短時間內產生活性氧物質，而與受體酪胺酸激酶-Ras 的路徑有關<sup>(60, 61)</sup>。當配體與受體結合使酪胺酸激酶活化後，伴隨著 SOS (Son of sevenless ; Ras- specific guanine exchange factor) 表現，而與受體酪胺酸激酶及 Grb2 形成複合體，接著促進 Ras 上的 GDP 轉換為 GTP，並轉位至細胞膜上，進而活化 NADPH 氧化酶之 Rac 的表現，促使超氧化物及其他活性氧物質的產生<sup>(62)</sup>。

另一方面，刺激配體而產生的活性氧物質，除了增加細胞內氧化壓力外，也同時可藉由抑制蛋白質酪胺酸水解酶 (protein tyrosine phosphatase ; PTP) 的活化來調節受體酪胺酸激酶的磷酸化，而扮演著訊息傳遞的角色<sup>(63, 64)</sup>。而受體酪胺酸激酶與 PTP 此兩酵素的作用互相結抗，對於調控細胞酪胺酸的磷酸化扮演著重要的角色<sup>(65, 66)</sup>。當細胞處於氧化壓力下，可調節蛋白的半胱胺酸殘基 (cysteine residues)，形成穩定的 Cys-SOH 結構<sup>(67)</sup>，將 PTP 上的半胱胺酸殘基轉變成穩定的氧化態結構，抑制了 PTP 的活性，而無法阻斷受體酪胺酸激酶的促磷酸化及 EGFR 的訊息傳遞路徑<sup>(68-70)</sup>。因此，EGFR 的活化與 ROS 的產生有關，而其結果更導致 EGFR 訊息傳遞路徑的持續進行，這樣的惡性循環，造成了細胞增生。

#### V. EGFR 與 HBP1

由上述得知，當 EGFR 受到生長因數刺激後，會使細胞質內的 Ras 活化，進而活化 NADPH 氧化酶，增加細胞中 ROS 的生成<sup>(71, 72)</sup>。而生成的 ROS 會抑制細胞質中的 PTPase (Protein Tyrosine Phosphatase) 的活化，進而也刺激 EGFR 訊息傳遞路徑，造成細胞週期的進行，促進細胞增生<sup>(73, 74)</sup>。

然而，NADPH 氧化酶為細胞內活性氧化物生成的重要酵素複合體，其次單位 p47<sup>phox</sup> 之啟動子上含有 HBP1 之 DNA 結合序列，進而抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄作用。

使 NADPH 氧化酶無法活化而降低超氧化物的生成<sup>(75)</sup>。在本實驗室先前的研究發現，HBP1 藉由抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄，影響細胞內氧化還原的平衡，進而抑制 EGFR 的活性。

在口腔癌中 EGFR 通常有過度表現的情況，但是，由於 EGFR 的自體磷酸化位點位於細胞質面，當突變的 EGFR 持續不斷是自發性磷酸化時，更造成口腔癌的惡化以及預後不良。因此，尋找另一種可由細胞內調控 EGFR 活化的新途徑將可彌補或協同目前用於抑制 EGFR 藥物的功效，進而更有效治療 EGFR 異常表現的相關癌症。或許，能藉由直接調控 HBP1 的活性，而抑制因 EGFR 過度表現而造成的訊息傳遞路徑活化，則 HBP1 在口腔癌的治療與預防上扮演重要的角色。



### 三、HBP1 (HMG (High-mobility group) - Box Protein 1)

#### I. 介紹

HBP1 為一個轉錄抑制因子，屬於 HMG (high-mobility group) 家族的成員，大小約 513 個胺基酸，其結構包含，HMG-box DNA 結合區 (HMG-box DNA binding domain)、抑制區 (repression domain)、RB 結合區 (RB binding domain) 以及 p38 結合區 (p38 binding domain)。

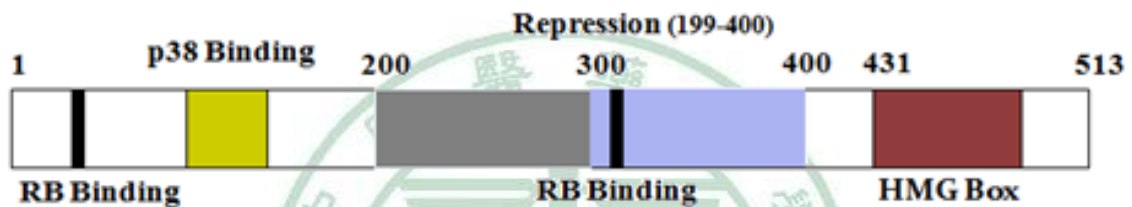


圖 2-6 HBP1結構圖

資料來源：(76)

#### II. HBP1 轉錄因子調控細胞生長

HBP1 最早被發現於大鼠的腦部，而基本功能為抑制酵母菌其鉀離子運輸缺陷之突變，成為鉀離子通道缺陷的補充劑<sup>(77)</sup>，然而，有趣的是，鉀離子通道與細胞分化及癌症的發展有顯著的相關性<sup>(78)</sup>。隨後，有關 HBP1 調控細胞生長週期與癌症的研究相繼出現。

在 1998 年，Dr. Yee 等學者指出，HBP1 可以抑制細胞週期，而抑制細胞的增生，而在肌肉細胞中，當細胞週期停滯的情況下，HBP1 的活化會促使肌肉細胞分化<sup>(79)</sup>。然而，在 HBP1 過度表現的細胞中，可誘導細胞週期停滯在 G1/S 期<sup>(80)</sup>。因此，在細胞及動物的細胞週期實驗確立了 HBP1 在調控 G1 期發展的角色。這樣的發現，也顯示出 HBP1 藉由抑制細胞週期的活化因子，進而抑制細胞增生。

更重要的是，HBP1 具有抑制細胞週期的功能，也表示 HBP1 具有抑制腫瘤發展的潛在功能。HBP1 調控癌症的路徑大致上分為兩種，第一，HBP1 可抑制 Wnt 訊息傳遞路徑的標的基因。HBP1 與癌症的第二個連結，則是透過 p38 MAPK 訊息傳遞路徑的調控。

### i. HBP1 與 RB

HBP1 對於抑制細胞增生的功能與 RB (retinoblastoma) 對細胞分化與 G1 期的調控相似<sup>(76)</sup>。RB 家族 (RB、p107、p130) 中，RB 與 p130 被認為是調控細胞週期與細胞分化的主要因子<sup>(81,82)</sup>。然而，p107 在細胞分化中的功能還尚未清楚，但是在增生的細胞中卻發現有 p107 的表現，這樣的發現與 HBP1 只特定對 p130 與 RB 交互作用的結果有一致性。在 1997 年，Paulson 等學者發現，在過度表現 HBP1 的情況下，會抑制細胞週期 G1/S 期的進行<sup>(83)</sup>，且在肝細胞再生模式中，當基因轉植小鼠的肝臟 HBP1 表現增加時，也能延遲 G1 期的發展<sup>(84)</sup>。而其作用機轉簡述如下，當 RB 被細胞素 (cyclin) 與 CDK (cyclin dependent kinase) 磷酸化後，會促使 RB 與 E2F 分離，進而釋放 E2F 而使細胞週期得以進行。HBP1 可與 RB 及 p130 作用，抑制細胞週期 G1 期的進行，促進細胞分化<sup>(79,81,85)</sup>。

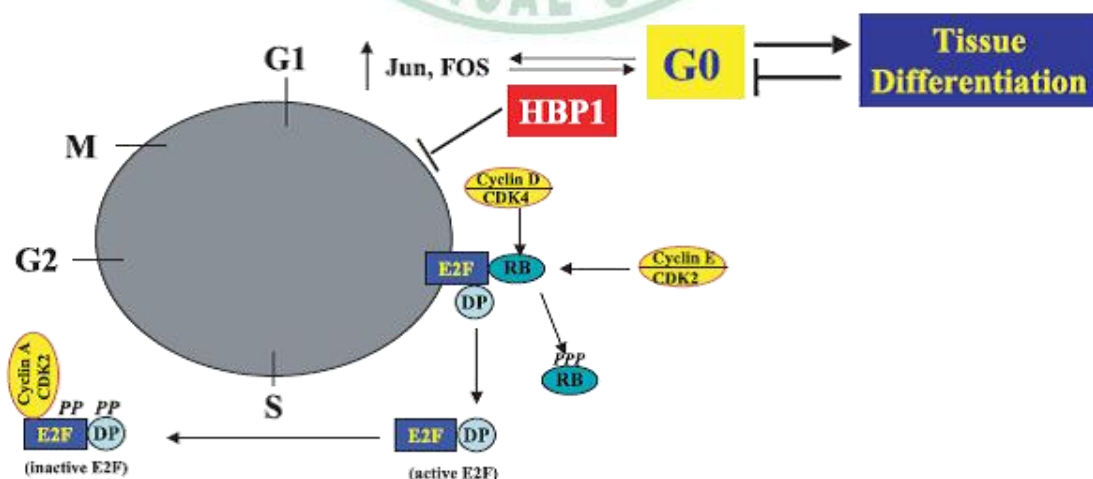


圖 2-7 HBP1 調控細胞週期

資料來源：(76)



## ii. HBP1 與 p38 MAPK

當 p38 MAPK 路徑活化時，參與細胞凋亡及造成胞週期停滯，具有抑制腫瘤的作用，然而，p38 MAPK 的活性喪失與癌症的發生有關<sup>(76)</sup>。另外，CDK 抑制者 p21 是抑制細胞週期 G1 期進行的重要因子，而其作用機轉為阻斷 CDK 的活性。在不同的肝細胞再生模式中都指出，HBP1 與 p21 皆能阻斷細胞週期 G1 期的進行<sup>(79, 86)</sup>。在 2002 年，Kim 等學者發現，p38 MAPK 可作用於 p21 的磷酸化位點上 (Ser190)，而增加 p21 蛋白的穩定性<sup>(87)</sup>。另外 p38 MAPK 的接合位點 (aa 81-125) 與 p38 MAPK 的磷酸化位點 (Ser 401)，皆在 HBP1 蛋白中被發現，而 p38 MAPK 可增加 HBP1 蛋白的穩定性，進而造成細胞週期 G1 期的停滯<sup>(88)</sup>。所以 p38 MAPK 可藉由直接調控 p21 與 HBP1 來達到抑制腫瘤作用與抑制細胞週期 G1 期的進行<sup>(76)</sup>。

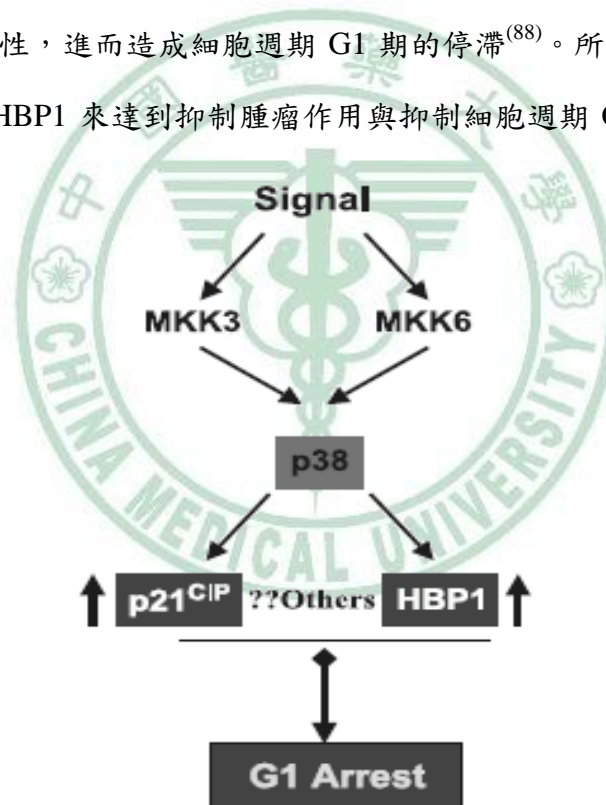


圖 2-8 HBP1 為 p38 MAPK 路徑之作用目標

資料來源：(76)

## iii. HBP1 抑制 Wnt 訊息傳遞路徑

Wnt 的訊息傳遞與乳癌、直腸癌及其他癌症的發生有關<sup>(89, 90)</sup>。當 Wnt 訊息傳遞路徑持續活化時，抑制細胞內  $\beta$ -catenin 的裂解，而增加其穩定性，使  $\beta$ -catenin 在細胞質裡堆積後，並轉位至細胞核中與 Tcf/Lef 轉錄因子形成複合體，促進下游基因表現，例如，cyclinD1 以及 c-myc，進而促使細胞異常增生而導致癌化<sup>(90)</sup>。然而，HBP1 可藉由與 Lef/Tcf 競爭結合到 cyclin D1 以及 c-myc 之啟動子上，降低基因的轉錄作用<sup>(91)</sup>，進而抑制細胞增生、侵襲及轉移的能力。

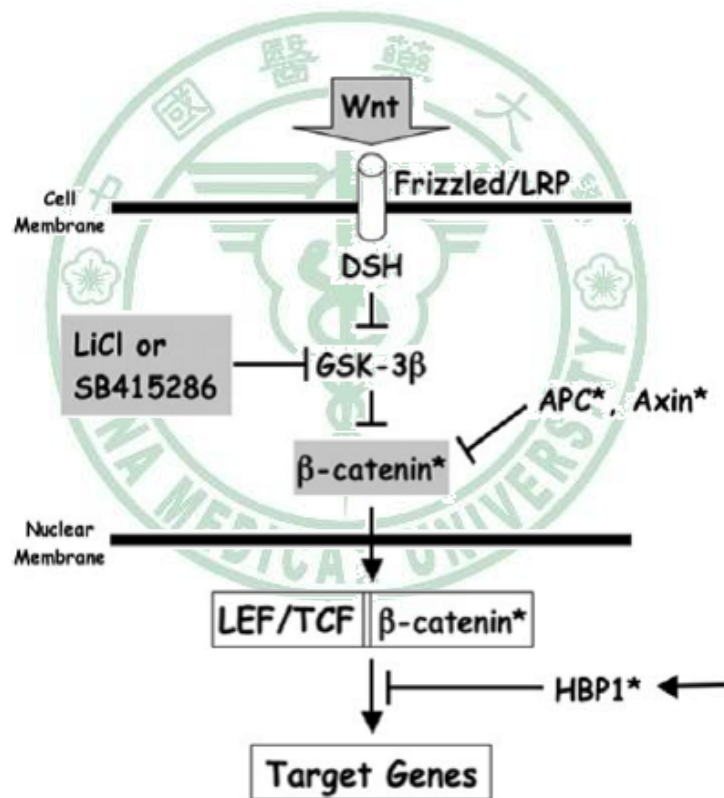


圖 2-9 HBP1 標的基因-Wnt

資料來源：(91)

iv. HBP1 抑制 NADPH 氧化酶之次單位 p47<sup>phox</sup> 的表現

NADPH 氧化酶為細胞內活性氧化物生成的重要酵素複合體，其次單位 p47<sup>phox</sup> 的啟動子 -1243 至 -1318 處上含有 HBP1 之 DNA 結合序列，且有實驗證實，HBP1 可藉由結合至啟動子上來抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄，使 NADPH 氧化酶無法活化而降低超氧化物的生成<sup>(75)</sup>。然而，在本實驗室先前的研究發現，HBP1 藉由抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄，影響細胞內氧化還原的平衡，進而抑制 EGFR 的活性。

圖 2-10 p47<sup>phox</sup> 之啟動子

資料來源：(75)

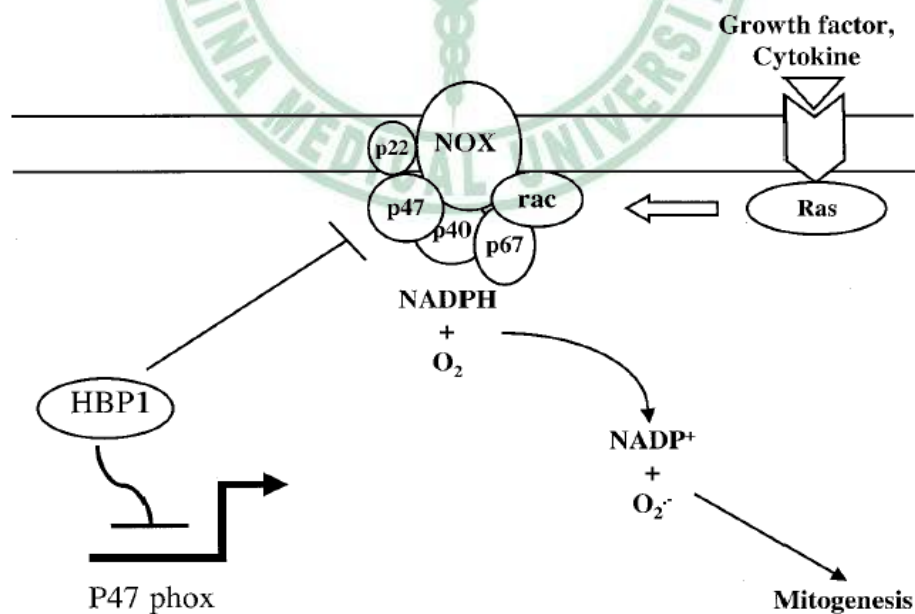


圖 2-11 HBP1 調控 NADPH 氧化酶

資料來源：(75)

### III. HBP1 與癌症

在 2001 年，Lin 等學者發現，人類骨髓細胞、B 淋巴細胞及一些非骨髓細胞中有較高的 HBP1 表現，與骨髓細胞的分化完全有關。然而，原位性乳癌 (ductal carcinoma in situ ; DCIS) 及急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia ; AML) 中，HBP1 轉錄因子常有突變的情形發生。在骨髓細胞中，HBP1 可抑制腫瘤生長且促進骨髓細胞的分化完全，抑制紅白血病細胞的生長<sup>(92)</sup>。此外，在原位性乳癌中，HBP1 可以抑制細胞週期的進行、抑制 wnt 訊息傳遞路徑以及抑制標的基因 *cyclinD1* 與 *c-myc*，進而抑制乳癌細胞的增生。另一方面，當細胞中 HBP1 表現降低時，會增加乳癌的侵襲及轉移的能力<sup>(93)</sup>。而在本實驗室先前的研究也發現，轉錄抑制因子 HBP1 可以經由氧化還原的調控，進而抑制乳癌細胞配體依賴型之 EGFR 訊息傳遞路徑。事實上，在口腔癌中 EGFR 通常有過度表現的情況，且尚未有研究探討 HBP1 與口腔癌的關係，若能藉由直接調控 HBP1 的活性，而抑制因 EGFR 過度表現而造成的訊息傳遞路徑活化，則 HBP1 在口腔癌的治療與預防上扮演重要的角色。

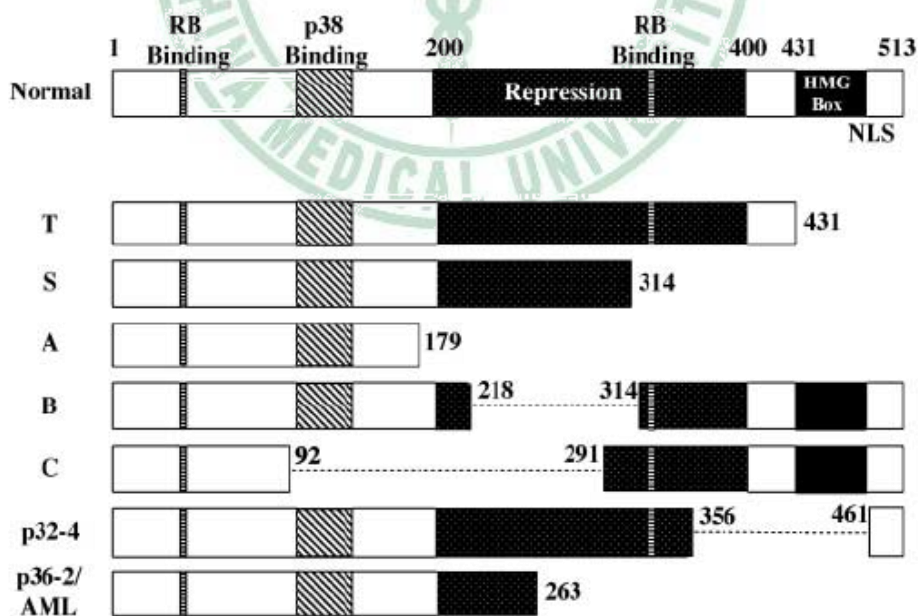


圖 2-12 正常 HBP1 與突變的 HBP1 結構

資料來源：(93)

#### 四、NAC (*N*-acetyl-L-cysteine)

##### I. 介紹

NAC 為 L-半胱氨酸 (L-Cysteine) 中的胺基 (NH<sub>2</sub>) 上加一個乙醯基 (Acetyl; -CO-CH<sub>3</sub>)，而其乙醯基的功能可以使口服的胱氨酸更容易消化吸收。而其結構中的含硫基團可以產生抗氧化的功能。NAC 是麩胱甘肽 (Glutathione; GSH) 的前驅物，所以，NAC 的攝取可增加體內 GSH 的含量。



圖 2-13 Cysteine 與 NAC 之結構

資料來源：<http://www.benbest.com/nutrceut/NAC.html>

##### II. NAC 與 GSH

GSH 是由穀氨酸 (Glutamic acid)、半胱氨酸 (Cysteine) 以及甘氨酸 (Glycine)，三個胺基酸在細胞內連結而成，基本上，GSH 存在全身體內所有的細胞中，許多重要器官的運作都需要靠 GSH 的幫助，也是人體內最主要的抗氧化酵素。另外，組成 GSH 的三種胺基酸中，甘氨酸與穀氨酸可由食物中得到足夠的來源，然而，食物中以及體內的半胱氨酸來源稀少，則限制了 GSH 的合成，因此，半胱氨酸才是決定 GSH 合成的關鍵。單一補充 GSH 並無法提高體內 GSH 的含量，因為 GSH 幾乎無法進入細胞中，儘管補充 GSH 後，亦會被胃蛋白酶消化分解，變成胺基酸，對於 GSH 的合成並無幫助。然而，決定 GSH 合成關鍵的半胱氨酸，並非為人體必

需胺基酸，是可由其他胺基酸轉換而得，但因半胱胺酸的結構並不穩定，吸收率及轉換為 GSH 的效率不高。而 NAC 為半胱胺酸的前驅物，所以補充 NAC 就可以立即提高體內 GSH 的含量。

### III. NAC 與癌症

最早於 1960 年，已有實驗證明，對於治療呼吸性疾病上，NAC 廣泛地被使用作為化痰藥物<sup>(94-96)</sup>。1984 年後，NAC 抗癌抗腫瘤的效果陸續被研究證實，例如，肺癌、皮膚癌、頭頸部癌症、乳腺癌以及肝癌<sup>(97, 98)</sup>。而 NAC 的抗癌能力，著重在於氧化還原平衡狀態及 ROS 的調節<sup>(97)</sup>。以下為 NAC 調控癌細胞生長的主要生理功能：

- i. NAC 與抗突變：NAC 可以直接減低突變物質的破壞、阻斷原突變物的代謝以及與亞硝酸鹽結合並抑制亞硝基化反應 (nitrosation reaction)<sup>(99-101)</sup>。
- ii. NAC 與抗氧化：NAC 具有捕捉活性氧物質、抑制 COX-1 所誘導致癌物的活化以及抑制 COX-2 的表現以及抑制發炎反應及病毒誘導的脂質過氧化<sup>(102-104)</sup>。
- iii. NAC 對粒線體的影響：增加 complex I、IV 以及 V 的活性並且抑制依年紀降低的氧化磷酸化反應<sup>(105)</sup>、增加 ATP 的含量<sup>(106)</sup>、抑制粒線體 DNA 的附合物 (adducts) 的形成<sup>(107)</sup>、預防粒線體膜電位的降低<sup>(108)</sup>以及減少粒線體突觸的蛋白質破基含量<sup>(109)</sup>。
- iv. NAC 與 DNA 的修復：抑制自發性的突變與基本的 DNA 修復有關<sup>(110)</sup>、修正 DNA 的低甲基化情形<sup>(111)</sup>以及保護細胞核酵素，例如，PARP，以及增強 DNA 的修復功能<sup>(112)</sup>。
- v. NAC 抑制基因毒性以及細胞的轉型：抑制突變以及 DNA 的損傷、抑制化學物誘導的細胞轉型以及保護遺傳細胞的變異<sup>(113)</sup>。

- vi. NAC 調節基因表現以及訊息傳遞路徑：轉錄後修飾增加 p53 的表現<sup>(114)</sup>、抑制 RB 蛋白的磷酸化進而抑制細胞生長<sup>(115)</sup>、抑制 *c-fos* 以及 *c-jun* 的活化<sup>(116)</sup>、抑制轉錄因子 AP-1 的活化以及結合能力、抑制轉錄因子 NF $\kappa$ B 的活化以及細胞核的轉位<sup>(117, 118)</sup>、促進 ERK-MAPK 的磷酸化<sup>(119)</sup>、誘導 *p16(INK4a)* 以及 *p21(WAF/CIP1)* 的基因表現，延長細胞週期 G1 期<sup>(120)</sup>。
- vii. NAC 抑制腫瘤細胞的增生與形成：抑制血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 的分泌以及抑制肺癌的惡化及形成。另外，NAC 可抑制 TPA 所誘發的 cyclin D1 與 DNA 合成以及透過 p38 MAPK 路徑而抑制不正常的細胞週期進行<sup>(121, 122)</sup>。

#### IV. NAC 與 EGFR

先前有研究指出，NAC 可以藉由降低細胞內 ROS 的產生，而誘導 PTP 的活化，進而抑制 EGF 的雙聚體化以及 EGFR 活化<sup>(123)</sup>。另外本實驗室先前研究指出，NAC 顯著地抑制 EGFR 以及下游 Akt 的活化情形，然而其抑制 EGFR 訊息傳遞路徑的機制尚未清楚。在本實驗室先前的研究發現，HBP1 藉由抑制 *p47<sup>phox</sup>* 的轉錄，影響細胞內氧化還原的平衡，進而抑制 EGFR 的活性。Zhang 等學者發現，NAC 可以抑制 NADPH 氧化酶次單位 Rac、gp91<sup>phox</sup> 以及 *p47<sup>phox</sup>* 的表現與活化<sup>(124)</sup>。這樣的結果顯示，NAC 與轉錄抑制因子 HBP1 的功能有類似之處，皆可以調控 *p47<sup>phox</sup>* 的表現以及 EGFR 訊息傳遞路徑，針對於此，本實驗中將探討 NAC 對 HBP1 的影響。

## 五、RNA 干擾術 (RNA interference ; RNAi)

### I. 介紹

RNAi 最早於 1990 年時被發現，起初欲想將查爾酮合酶 (chalcone synthase) 的基因轉殖於矮牽牛花中，希望能藉由增加一套基因而使花色更鮮豔。結果卻發現轉殖的基因沒有表現，且造成原本存在的基因失去功能而出現白花，當時稱此現象為「共同抑制 (co-suppression)」。直到 1998，Fire 與 Mello 在線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 中也發現類似的 RNA 干擾現象，並首度被稱為 RNAi。在 2001 年初，Thomas Tuschl 首先證明了在哺乳動物細胞中，亦可以使用 RNAi 來抑制特定基因的表現，因此 RNAi 技術也由植物延伸到了哺乳類動物，對於其機制也有了更深入的了解。然而到 2006 年時，RNAi 技術也透過諾貝爾獎受到肯定<sup>(125)</sup>。

### II. 原理

RNAi (RNA interfering) 是利用細胞內的雙股 RNA 所引發的基因降解作用。長鏈的雙股 RNA 先經由 Dicer (一種 RNase) 將其切割成多個小段，每段約 19~25 nt，稱為小干擾 RNA (small interfering RNA)，也就是所謂的 siRNA。siRNA 會被細胞質中的核糖核酸誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex ; RISC) 辨識並結合，使雙股的 siRNA 解開，形成 sense 與 antisense 兩個單股的 RNA，並將其中的正義股 (sense) 分解，保留反義股 (antisense)。而保留的反義股則會引導 RISC，利用其序列專一性找到目標 mRNA，之後 mRNA 會被 RISC 切斷，使其無法轉譯為蛋白質，因此標的基因的表現遭受抑制且失去其功能<sup>(125-127)</sup>。



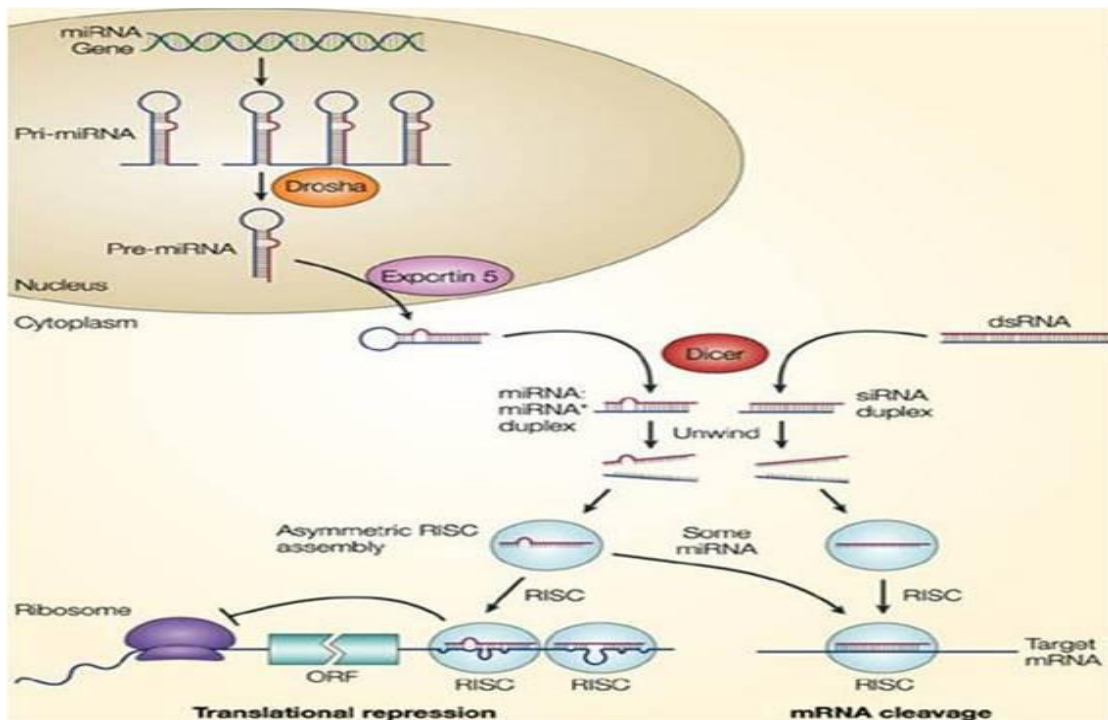


圖2-14 RNAi 之作用原理

資料來源：(126)

### III. 應用

RNAi 技術的應用相當廣泛，在生物醫學方面，因為 RNAi 技術可以非常的快速且有效地抑制基因的表現，然而，許多疾病與癌症的發生是因為特定基因表現異常或過度表現，藉由 RNAi 技術來有效抑制這些異常或過度活化的基因。理論上說，若能關閉致病基因的表達，則達到治療疾病與癌症的效果。在動物實驗中已證明，可以透過 RNAi 的方法抑制導致血膽固醇升高的基因；病毒性疾病，眼疾，心血管代謝性疾病等方面的臨床試驗也正在進行中。因此，透過 RNAi 技術的基因「默化」機制，將病毒的複製或致病機轉關閉，未來將可應用於治療癌症、病毒感染甚至預防疾病的發生。

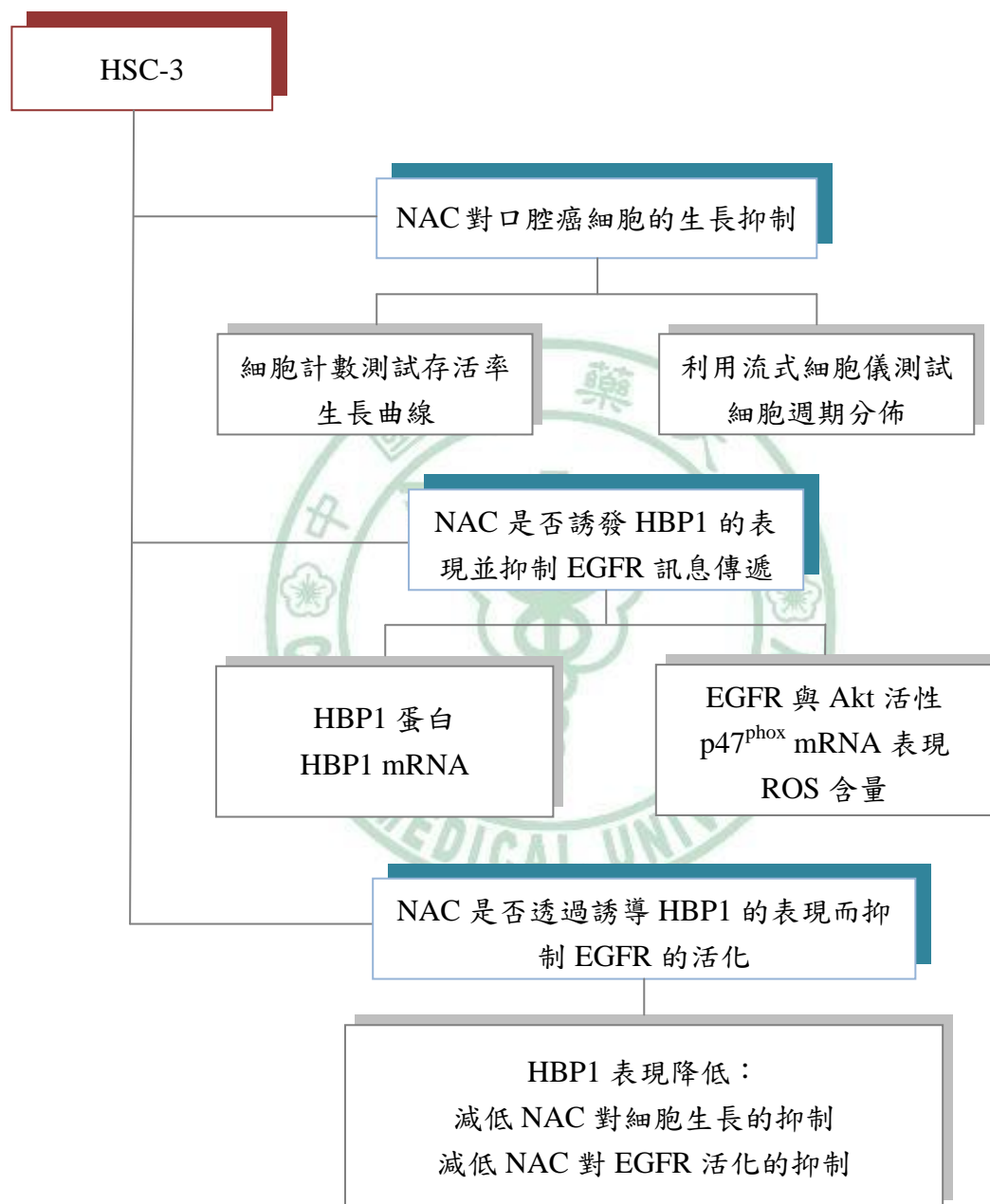
## 六、實驗目的與動機

全世界口腔癌的發生率逐年增加，且其預後存活率仍然偏低。然而，大約有 55~100% 的口腔癌患者，其 EGFR 有過度表現的情形，而且也造成口腔癌預後不佳及存活率低的問題。EGFR 以及其突變型 (EGFR variant III) 已知在許多腫瘤細胞過度表現，尤其是口腔癌。由此可知，對於治療口腔癌，EGFR 扮演著革命性的角色。我們先前研究發現，轉錄抑制因子 HBP1 (HMG box protein 1) 可藉由對氧化還原平衡的調控，而抑制乳癌細胞 EGFR 的訊息傳遞，但 HBP1 在口腔癌調控的角色尚未被探討。

已有研究顯示，NAC (*N*-acetylcysteine) 具有調節身體體內氧化還原平衡的能力，而且是一個有效的自由基清除劑，有許多研究證實，NAC 具有抗癌抗腫瘤的效果。因此，也開始有許多研究發現 NAC 能透過許多不同的機制來達到抑制癌症的發生。同時，NAC 亦有抑制 EGFR 以及下游 Akt 活化，但其機制尚未完全清楚。本研究主要是探討 NAC 是否藉由活化 HBP1 來抑制 EGFR 的訊息傳遞路徑。希望此研究將提供轉錄因子 HBP1 為一個治療口腔癌的重要標的，對於口腔癌的防治有進一步的貢獻。

### 第三章、材料與方法

#### 一、實驗設計



## 二、實驗藥品與儀器

藥品：

	名稱	廠牌	儲藏溫度
<b>A</b>	Acrylamide	Genepure	4°C
	Agarose	AMRESCO®	室溫
	Ampicillin	Bio Basic Inc.	4°C
	Ammonium Persulfate	J. T. Baker	室溫
<b>B</b>	$\beta$ -mercaptoethanol	J. T. Baker	室溫
	Bovin Serum Album	USBiological	4°C
	Bromophenol Blue	Bio Basic Inc	室溫
<b>D</b>	Deoxycholate	Sigma	室溫
	DMSO	Sigma	室溫
	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	4°C
	Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 Ham (1:1)	Gibco	4°C
	Dual light	Applied Biosystems	4°C
<b>E</b>	ECL	PerkinElmer	4°C
	EDTA	J. T. Baker	室溫
	Ethanol	東華化工	室溫
	Etidium Bromide	Genepure	4°C

**F**

	Fetal Bovine Serum	Gibco, USA	-20°C
	FuGENE <sup>®</sup> 6	Roche	4°C
<b>G</b>			
	Glycine	USBiological	室溫
<b>I</b>			
	Isopropanol	Sigma	室溫
<b>L</b>			
	L-Glutamine	Gibco	-20°C
	Lipofectamine <sup>™</sup> 2000	invitrogen	4°C
	Lucigenin	Sigma	4°C
	Luria Bertani medium	Himedia	室溫
	Luria Bertani Agar	Himedia	室溫
<b>N</b>			
	NaCl	AMRESCO <sup>®</sup>	室溫
	N-acetylcysteine	sigma	4°C
<b>O</b>			
	OPTI-MEM <sup>®</sup> I	Gibco	4°C
<b>P</b>			
	10x PBS	UniRegion Bio-Tech	室溫
	Penicillin/Streptomycin	Gibco	-20°C
	Phosphatase Inhibitors Cocktail	Sigma	-20°C
	Polybrene	Sigma	-20°C
	Protease Inhibitors Cocktail	Sigma	-20°C
	Protein Assay Dye Reagent Contrate	BioRad	4°C
	Puromycin	Sigma	-20°C

## S

SDS	Merck	室溫
Sodium Bicarbonate	Sigma	室溫

## T

50x TAE	UniRegion Bio-Tech	室溫
TEMED	J. T. Baker	室溫
Tris-base	USBiological	室溫
Triton X-100	J. T. Baker	室溫
Trypsin	Gibco	-20°C
Tween 20	Showa	室溫

儀器：

名稱	廠牌
倒立式顯微鏡	Olympus
離心機	Sigma
微量離心機	DENVILLE
iCycler	BioRad
Multimage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Mupid® -2 plus electrophoresis	ADVANCE
CLC-110 chemiluminescence detector	TOHOKU
CLC-10 CL counter	TOHOKU
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad
Mini-PROTEAN® 3 Cell	BioRad
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	BioRad

### 三、細胞培養(Cell Culture)

資料來源：(128-130)

#### I. 細胞株及細胞培養條件

人類口腔癌細胞株 HSC-3 以及 SCC-4, 分別受贈自楊新玲教授與鍾景光教授實驗室, 將細胞培養於含有 10% Fetal Bovine Serum 與 1% Antibiotic Antimycotic 之 DMEM/F12 中, 置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱內培養, 每隔 2~3 天更換一次培養液, 當細胞長至八分滿時即進行繼代培養。

HEK-293T 人類胚胎腎臟上皮細胞株以及人類口腔癌細胞株 TW-206, 分別受贈自賴志河教授與鍾景光教授實驗室, 將細胞培養於含有 10% Fetal Bovine Serum 與 1% Antibiotic Antimycotic 之 DMEM 中, 置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱內培養, 每隔 2~3 天更換一次培養液, 當細胞長至八分滿時即進行繼代培養。

#### II. 試劑配製

##### DMEM/F12

Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 Ham (1:1) 取一包粉末, 內含 15 mM HEPES buffer、L-glutamine、pyridoxine hydrochloride 溶於 800 ml 的無菌水中, 加入 1.2 g NaHCO<sub>3</sub> (Sigma)。溶解後調整 pH 值至 7.1-7.2 之間, 再加入 10% FBS (Fetal bovine serum) 以及 1% Antibiotic Antimycotic, 混合後將體積定量至 1000 ml。最後將配好之溶液移至無菌操作台中, 以 0.22 μm 血清瓶專用無菌過濾膜過濾, 保存於 4°C。

##### DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 粉末溶於 800 ml 的無菌水中, 加入 1.5 g NaHCO<sub>3</sub> (Sigma), 溶解後調整 pH 值至 7.1-7.2 之間, 再加入 10% FBS (Fetal bovine serum) 以及 1% Antibiotic Antimycotic, 混合後將體積定量至 1000 ml。最後

將配好之溶液移至無菌操作台中，以 0.22  $\mu\text{m}$  血清瓶專用無菌過濾膜過濾，保存於 4°C。

#### 1× 磷酸緩衝液(phosphate-buffer saline ; PBS)

由 10× PBS (UniRegion Bio-Tech) 中取出 100 ml 溶在 900 ml 的二次水中，再經 121°C、30 分鐘高壓滅菌後使用並放於室溫備用。

### III. 繼代培養

將培養盤中之培養液吸除後，加入 10 ml 滅過菌之 PBS 清洗 1 至 2 次。加入 1 ml trypsin-EDTA，放入 37°C 培養箱中培養 5 分鐘後，於倒立顯微鏡下觀察細胞是否全數脫落。確定細胞完全脫落後，加入 10 ml 培養液中和 trypsin 的作用，並將細胞液取出放入 15 ml 離心管中，以 1000 rpm 速度離心 5 分鐘後，去除上清液，加入適量的培養液將細胞打散後，取 40  $\mu\text{l}$  細胞懸浮液與等量之 trypan blue 溶液混合均勻，用細胞計數器 (hemocytometer) 計數細胞數，依實驗需要之細胞密度均勻的分至培養盤中，置於 37°C、5%  $\text{CO}_2$  之培養箱內培養。

### IV. 細胞冷凍

將生長狀態良好的細胞之培養液吸除後，加入 10 ml 滅過菌之 PBS 清洗 1 至 2 次。加入 1 ml trypsin-EDTA，放入 37°C 培養箱中培養 5 分鐘後，於倒立顯微鏡下觀察細胞是否全數脫落。確定細胞完全脫落後，加入 10 ml 培養液中和 trypsin 的作用，並將細胞液取出放入 15 ml 離心管中，以 1000 rpm 速度離心 5 分鐘後，去除上清液，每管加入 2 ml 含有 7% DMSO 的培養液，分裝 1 ml 至冷凍保存管中，先放入 4°C 冰箱裡 10 分鐘後，移至 -20°C 放置 30 分鐘後，之後放到 -80°C 中 24 小時，最後移至液態氮中保存。



## 四、細胞生長率 (Growth) 與存活率 (Viability) 測定

資料來源：(131,132)

### I. 原理

正常細胞由於細胞膜完整，遇到加入 trypan blue 染劑時，則不會被染色，呈現亮點為活細胞；反之，死細胞或是受損的細胞則因細胞膜通透性已被破壞，染劑可進入細胞內加以染色，成為藍色細胞。細胞生長率亦稱為 subconfluent，也就是將細胞種到未全滿的階段，加入藥物試劑反應，確認是否會抑制細胞生長；細胞存活率亦稱為 confluent，也就是將細胞種到全滿的階段，加入藥物試劑反應，確認藥物是否對細胞具有毒性的分析方法。

### II. 試劑配製

#### 100 mM NAC

分子量為 163.2，取 0.4896 g 之 NAC (sigma)，加入 20 ml 滅過菌之 PBS，調整 pH 值至 7.0 後，用 PBS 定量至 30 ml，移至無菌操作台，以 0.22  $\mu\text{m}$  的濾膜過濾後放置 -20°C 儲存。

### III. 細胞型態觀察

在 6 孔盤中種下  $5 \times 10^5$  顆的 HSC-3 細胞，等至細胞貼附後，加入不同濃度的 NAC 處理 12、24 及 48 小時後。以倒立式顯微鏡 (phase microscope) 觀察細胞型態並拍攝存檔。

### IV. 實驗步驟

#### 細胞生長率分析

在 6 孔盤中種下  $3 \times 10^5$  顆的 HSC-3 細胞，等至細胞貼附後，加入不同濃度的

NAC 處理 12、24 及 48 小時，將細胞以 trypsin-EDTA 打下後，取細胞懸浮液中的 50  $\mu\text{l}$  再加上 100  $\mu\text{l}$  的 trypan blue，混合均勻後，以血球計數器來計算未被染色的 HSC-3 細胞數目。

#### 細胞存活率分析

在 6 孔盤中種下  $5 \times 10^5$  顆的 HSC-3 細胞，等至細胞貼附後，加入不同濃度的 NAC 處理 12、24 及 48 小時，將細胞以 trypsin-EDTA 打下後，取細胞懸浮液中的 50  $\mu\text{l}$  再加上 100  $\mu\text{l}$  的 trypan blue，混合均勻後，以血球計數器來計算未被染色的 HSC-3 細胞數目。

#### 細胞計數

將細胞懸浮液與 trypan blue 按比例體積混合，取出 20  $\mu\text{l}$  混合液注入血球計數盤凹槽中，於倒立式顯微鏡下觀察計數。計算計數盤中上下共十大方格中細胞總數後除以十，乘以稀釋倍數，最後再乘以  $10^4$  (血球計數盤每一方格的體積為  $10^{-1} \text{ mm}^3$ )，及為每毫升中細胞懸浮液之細胞數。

## 五、細胞週期 (Cell Cycle) 分析

資料來源：(133)

### I. 原理

細胞週期大致可分為四個不同時期，G1 phase、G2 phase、S phase 以及 M phase。由於各時期的 DNA 含量不同，通常正常細胞的 G1/ G0 期具有二倍體細胞的 DNA 含量 (2N)，而 G2/ M 期具有四倍體細胞的 DNA 含量 (4N)，而 S 期的 DNA 含量介於二倍體和四倍體之間。因此，利用 PI (propidium iodide) 染細胞核中的核酸，再射入特定波長的雷射光，激發光的強弱即反映出細胞內核酸的多寡，將細胞週期各時相區分為 G1/ G0 期、S 期和 G2/ M，並可通過特殊軟體計算各時期的百分率。

### II. 試劑配製

#### Propidium Iodine (PI) 染劑

Component	Stock solution	Final solution	Volume
Propidium Iodine	100 µg/ml	4 µg/ml	40 µl
Triton X-100	10 %	1 %	100 µl
RNase A	100 mg/ml	0.5 mg/ml	5 µl
PBS	-	-	855 µl
total volume			1 ml

#### 70% 酒精

取出 99.8% 分生專用酒精，用二次水稀釋至 70%。

#### 1× 磷酸緩衝液(phosphate-buffer saline ; PBS)

由 10× PBS (UniRegion Bio-Tech) 中取出 100 ml 溶在 900 ml 的二次水中，再經 121°C、30 分鐘高壓滅菌後使用並放於室溫備用。

### III. 實驗步驟

#### 固定細胞

在 6 孔盤中種下  $4 \times 10^5$  顆 HSC-3 細胞，等至隔日細胞貼附後，以 10 ml PBS 清洗，換置 serum starvation 之培養液培養 24 小時後，加入不同濃度的 NAC 後 24 小時，以 PBS 清洗後再經 trypsin-EDTA 反應 5 分鐘刷下，離心 (1000g, 5 分鐘) 之後倒掉上清液，將細胞完全打散後，再以 10 ml 之 PBS 清洗離心。倒掉上清液，將細胞打散後，以  $-20^{\circ}\text{C}$  冰的 70% 酒精進行細胞固定步驟 (以慢速震盪，緩慢將 3 ml 酒精滴入)，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。

#### 流式細胞儀分析

固定結束後隔天，將樣品從  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱取出後離心 (1000g, 5 分鐘) 去除酒精。將細胞完全打散，加入 10 ml 的 PBS 清洗 1 次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 500  $\mu\text{l}$  (視細胞數目增減) 的 PI 染劑，用 1 ml pipette 在 15 ml 離心管中抽取數次後，將細胞移於絹布製的篩子過濾到 FACS 專用管，避光並置於冰上反應 30 分鐘。最後以流式細胞儀 (Flow cytometry; FAC) 進行樣品分析，每一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 10000 顆細胞，數據以 Modfit LT<sup>®</sup> 軟體進行處理分析，每個實驗組皆重複三次。

## 六、ROS (Reactive Oxygen Species) 測定

資料來源：(134)

### I. 原理

2,7-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) 是一種脂溶性染劑，本身具有螢光且可以通透細胞膜，進入細胞可以與細胞內的乙醯脂酶 (esterases) 結合形成非螢光性的DCFH，之後被 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化成具螢光性的 DCF。藉此使用流式細胞儀來評估細胞內 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的濃度變化，以分析細胞內ROS的生成量。

### II. 試劑配製

#### 10 mM H<sub>2</sub>DCF-DA 染劑

分子量為 487.3，取 4.873 mg 之 H<sub>2</sub>DCF-DA，加入 1 ml 已滅菌的 PBS，實驗時再用已滅菌的 PBS 稀釋成 10 μM。

### III. 實驗步驟

將  $4 \times 10^5$  細胞種至培養皿中，經過 24 小時細胞貼附，分別給予不同濃度的 NAC 培養 30 分鐘以及 1、6、12、24、48 小時後，將上清液抽掉，以 10 ml 之 PBS 清洗，加入 trypsin-EDTA 反應 5 分鐘後刷下，離心 (1000g，5 分鐘)，倒掉上清液，利用手指用力彈管壁使細胞完全打散，再以 10 ml 之 PBS 清洗離心。倒掉上清液，再利用手指用力彈管壁使細胞完全打散後，在每個離心管中加入 500 μl 的 10 μM H<sub>2</sub>DCF-DA，用 1 ml pipette 在 15 ml 離心管混合均勻後，將細胞移於絹布製的篩子過濾到 FACS 專用管，全程避光並置於 37°C 水浴 30 分鐘，最後以流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 進行樣品分析。

## 七、蛋白質萃取

資料來源：(135)

### I. 原理

利用細胞刮除法使細胞破碎以及利用高滲蛋白裂解液讓細胞溶漲破裂，使蛋白溶解變性並抑制蛋白酶活性使蛋白穩定，再利用超高速離心，收集上清液提取總蛋白。

### II. 試劑配製

#### RIPA buffer

Component	Concentration
NaCl	150 mM
Tris buffer	10 mM
EDTA	5 mM
SDS	0.1%
Triton X-100	1%
Deoxycholate	1%

### III. 實驗步驟

10 公分培養盤中的細胞以 PBS 清洗過後，加入 100  $\mu$ l RIPA buffer (含 protease inhibitors cocktail 與 phosphatase inhibitors cocktail)，以細胞刮勺將細胞刮下，放到 eppendorf，置於冰上 30 分鐘。之後 cell lyste 以 12000 rpm 轉速離心 15 分鐘後，取上清液，放至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存使用。

## 八、蛋白質定量

資料來源：(135)

### I. 原理

蛋白質定量分析是根據 Bradford protein-binding assay 的原理所設計，利用 Coomassie Brilliant Blue 會與蛋白質結合的特性，在與蛋白質結合後，其顏色會從紅色轉變成為藍色，此時在 595 nm 波長下，會有較高的吸收。藉由比對 BSA 標準品的定量標準曲線，即可換算出待測樣品的蛋白質濃度。

### II. 標準曲線製備

Concentration	BSA(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	二次水	Bio Red Dye
0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0 $\mu\text{l}$	800 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 $\mu\text{l}$	780 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40 $\mu\text{l}$	760 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60 $\mu\text{l}$	740 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	80 $\mu\text{l}$	720 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{l}$	700 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
total volume			1 ml

### III. 實驗步驟

利用二次水分別配製 0、2、4、6、8、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 蛋白標準溶液 800  $\mu\text{l}$ ，震盪均勻後，再加入 200  $\mu\text{l}$  protein assay dye (Bio-Red)，均勻混和靜置室溫 5 分鐘。放入分光光度計讀取波長 595 nm 的吸光值，藉由 595 nm 的吸光值作為標準曲線，分析最佳標準迴歸直線，求出此線的方程式，

當此直線的迴歸分析結果之  $R^2 > 0.998$  時，此直線方程式的值始可信。得知最佳標準迴歸直線後，將取 1  $\mu\text{l}$  的待測蛋白質溶液加入 799  $\mu\text{l}$  二次水，震盪均勻後，再加入 200  $\mu\text{l}$  protein assay dye，均勻混合後，室溫下反應 5 分鐘後測吸光值，再以樣品所測的結果扣除背景值後，帶入方程式即可求得蛋白質的濃度。





## 九、西方點墨法 (Western Blotting)

資料來源：(135)

### I. 原理

Western bolt 採用的是聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)，被檢測物是蛋白質，探針是一級抗體 (Primary antibody)，顯色用標記的二級抗體 (Secondary antibody)，介面活性劑，SDS 可將蛋白變性並使其分子表面均勻佈上一層負電荷，接通電源後，使帶負電的蛋白分子向正極移動，分子量大者泳動率小，相反地，分子量小者泳動率大。梯度電泳使用由稀到濃的梯度膠體，膠體中的孔徑由上到下逐漸變小，樣本中分子量越小的分子就可跑的越下面，因此可說是依分子量的大小來分離的。經過 SDS-PAGE 分離蛋白樣本後，轉移到固相載體 (如：PDVF膜) 上，固相載體以非共價鍵型式吸附蛋白質，且能保持電泳分離的蛋白分子及其生物學活性不變。以固相載體上的蛋白質作為抗原，與對應的一級抗體發生免疫反應，再與酶或同位素標記的二級抗體反應，最後經過顯色或顯影來檢測電泳分離的蛋白表現。

### II. 試劑配製

#### 鑄膠

4×Lower Tris

Component	Concentration
Tris-base (1.5 M)	36.34 g
SDS (0.4%)	0.8 g
ddH <sub>2</sub> O	X ml
pH	8.8
total volume	200 ml

## 4×Upper Tris

Component	Concentration
Tris-base (0.5 M)	12.11 g
SDS (0.4%)	0.8 g
ddH <sub>2</sub> O	X ml
pH	6.8
total volume	200 ml

## APS (0.1 g/ml)

Component	Concentration
Ammonium persulfate (10%)	1 g
ddH <sub>2</sub> O	X ml
total volume	10 ml

## Running and stacking gel

Stock solution	5% running gel	8% running gel	10% running gel	4% stacking gel
40% Acylamide	1 ml	1.6 ml	2 ml	0.4 ml
Upper Tris (4×)	-	-	-	1 ml
Lower Tris (4×)	2 ml	2 ml	2 ml	-
Water	5 ml	4.4 ml	4 ml	2.6 ml
APS	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
total volume				8.044 ml

跑膠

## 10× running buffer

Component	Concentration
Tris-base (0.25 M)	30.3 g
Glycine (1.9 M)	144 g
SDS (1%)	10 g
ddH <sub>2</sub> O	X ml
pH	8.6
total volume	1000 ml

轉印

## 10× Transfer buffer

Component	Concentration
Tris-base (0.25 M)	30 g
Glycine (1.9 M)	144 g
ddH <sub>2</sub> O	X ml
pH	8.3
total volume	1000 ml

免疫染色

## 10× Tris-base buffer saline

Component	Concentration
Tris-base (0.2 M)	0.2 M
NaCl (1.4 M)	80 g
ddH <sub>2</sub> O	X ml
pH	7.6
total volume	1000 ml

## TBS/T

Component	Concentration
10× TBS	100 ml
Tween 20 (0.1%)	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml
total volume	1000 ml

## 抗體

Antibody	Source	Brand
HBP1	goat	Cell signaling
EGFR	Rabbit	Cell signaling
p-EGFR (Tyr 1045)	Rabbit	Cell signaling
p-EGFR (Tyr 1086)	Rabbit	Cell signaling
Akt	Rabbit	Cell signaling
p-Akt (Ser 473)	Rabbit	Cell signaling
ERK1	Rabbit	Santa cruz
p-ERK1/2	Mouse	Abcame
p21	Rabbit	Cell signaling
p38 $\alpha$	Rabbit	Santa cruz
cyclinD1	Mouse	Santa cruz
$\alpha$ -tubulin	Rabbit	Abcame

### III. 實驗步驟

膠體的配製依蛋白質分子量的大小而決定配製成 5、8、10 % 的 SDS-PAGE。待鑄好的 SDS-PAGE 組合放置電泳槽中，倒入適量的 1× running buffer。將製備好的蛋白樣品 (40-50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 以及標準品小心加入於固定於垂直電泳槽內的 stacking gel 的 well 內，以避免 sample 溢出，先以 90 伏特電壓跑 4 % stacking gel，20 分鐘後，調整電壓至 100 - 120 伏特，約跑 2-3 小時，即完成蛋白分離。

轉印時，先將 PVDF 膜與 3M 濾紙裁剪與膠片大小相同。將轉漬夾打開後，黑色面朝下，依序放上海棉墊、濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 膜 (先用 100% 甲醇濕潤 2 分鐘、再放於 transfer buffer 中浸潤)、濾紙，最後放上一片海棉墊，確定其緊密貼合後，將轉印夾慢慢地合起來，放到轉印槽中，倒入 1× transfer buffer，以 400 mA 電流轉印 1 - 2 小時，使蛋白質轉印到 PVDF 膜上。

轉印完成的 PVDF 膜以 5% 脫脂牛奶 (TBS/T 配製) 進行 blocking 1 小時後，以 TBS/T 清洗 5 分鐘 3 次後，加入適當稀釋倍數之一級抗體反應 overnight。將一級抗體以 TBS/T 清洗 5 分鐘 3 次後，依不同的一級抗體，加入特異作用的二級抗體反應 1 小時，再以 TBS/T 清洗 5 分鐘 3 次，以感光試劑 Western lightening chemiluminescence reagent plus 進行呈色反應，利用 LAS-4000 mini FUJIFILM 冷光影像系統分析。

## 十、質體 (Plasmid) 的製備

資料來源：(136)

### I. 原理

將外來DNA的質體經轉型作用 (Transformation)，轉入勝任細胞 (Competent cells) 中，利用熱休克法 (Heat Shock) 讓細胞壁成份改變而使 DNA 可順利進入細胞中作用，使細胞之遺傳性發生改變，藉由寄主細菌的系統來達成複製或進行基因表現的目的。抽取質體 DNA 的方法有很多種，本實驗室使用市售的 QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit 以及 QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit 來做質體的製備。其作用原理來自於鹼性溶解法，細菌以 NaOH 及 SDS 分解，並使蛋白質及 DNA 變性，繼之以酸中和。因此，小分子質體 DNA 在中和後恢復原態，但大部份的細菌染色體 DNA 則無法完全復原而與 SDS-K<sup>+</sup> 所形成之複合物一起沉澱，可以離心去除，而上清液中所含的質體利用陰離子交換樹脂 (Anion-Exchange Resin)，在低鹽情況下使質體 DNA 吸附在帶正電荷的濾膜上，減少 RNA、蛋白質、染劑以及小分子量之雜質的殘留，再利用高濃度的鹽類緩衝液將質體 DNA 溶出後，最後再利用酒精將鹽類去除後以異丙醇將其沉澱下來。另外，將分離下來的質體，以不同限制酵素作用，經電泳分離 DNA 片段後，比較各 DNA 片段之分子量，用以檢定所分離到的質體之正確性。

## II. 使用的質體 (乾燥)

Name	Relevant characteristics
pLKO	shRNA empty vector control
pLKO-HBP1#76	shRNA against HBP1
VSVG	VSV-G pseudotyped lentivirus
PLP1	structural and replication proteins are
PLP2	required to produce the lentivirus

質體來源：Dr. Yee Lab, MA, USA  
(購自：Sigma, Invitrogen)

## III. 實驗步驟

轉型 (Transformation)

將 DH5 $\alpha$  competent cells (ECOS 101 ; Yeastern Biotech) 自 -80°C 取出後回溫，取 30  $\mu$ l 至 eppendorf 中，加入 3 $\mu$ l 質體 DNA 後置於冰上 10 分鐘後，將含有質體 DNA 及 competent cells 之 eppendorf 放入 42°C 水浴 45 秒，立即放回冰上 2 分鐘。接著，加入 300  $\mu$ l 之 Luria Bertani medium，放入 37°C 培養箱，以 100 rpm 速度震盪培養 1 小時，取 200 $\mu$ l 混合液均勻塗抹在含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 之 Luria Bertani Agar 上，置於 37°C 培養箱 24 小時。

挑選菌落

以滅菌過的牙籤輕輕刮起培養皿上單一菌落，連同牙籤一起放入含有 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 之 Luria Bertani medium 的培養管中，再度放入 37°C 培養箱，以 200 rpm 速度震盪培養 24 小時。

質體小量製備

將上述培養 24 小時之菌體離心 15 分鐘 (6000g, 4°C) 後，將上清液倒掉，加

入300  $\mu$ l Buffer P1 後震盪均勻後，加入 300  $\mu$ l Buffer P2，上下搖勻 4~6 次後，置於室溫下 5 分鐘。接著再加入 300  $\mu$ l Buffer P3，混勻後放置冰上 5 分鐘後，離心 10 分鐘（最大轉速，4°C），保留上清液。QIAGEN-tip 20 先以 1 ml Buffer QBT 通過 column 之後，再加入前述之上清液，待其全部通過 column 後，以 2 ml Buffer QC 清洗 2 次，接著再以 0.8 ml Buffer QF 將 DNA 溶出至 eppendorf 中，加入 0.56 ml Isopropanol 後離心 30 分鐘 (13000 rpm, 4°C)。之後，小心地將上清液抽掉，以 1 ml 70% 酒精清洗，離心 10 分鐘 (10000 rpm, 4°C)，將上清液抽掉，剩餘的 DNA pellet 使其乾燥 5~10 分鐘後，以 50  $\mu$ l 二次水將其溶解，保存於 -20°C。

#### 電泳分析

以 37°C 水浴 24 小時後，每管加入 6 倍的 DNA loading dye 混合均勻，再以含有 0.26 % 之 EtBr 之 1% Agarose 跑膠，並以 Multimage™ Light Cabinet 分析影像並儲存。

#### 質體大量製備

將上述培養 overnight 之菌體離心 15 分鐘 (6000 g, 4°C) 後，將上清液倒掉，加入 10 ml Buffer P1 後震盪均勻後，加入 10 ml Buffer P2，上下搖勻 4~6 次後，置於室溫下 5 分鐘。接著再加入 10 ml Buffer P3，混勻後放置冰上 20 分鐘後，離心 30 分鐘（最大速度，4°C），保留上清液。QIAGEN-tip 500 先以 10 ml Buffer QBT 通過 column 之後，再加入前述之上清液，待其全部通過 column 後，以 30 ml Buffer QC 清洗 2 次，接著再以 15 ml Buffer QF 將 DNA 溶至 eppendorf 中，加入 10.5 ml 之 isopropanol 後離心 30 分鐘 (13000 rpm, 4°C)。之後，小心地將上清液抽掉，以 5 ml 70% 酒精清洗，離心 10 分鐘 (10000 rpm, 4°C)，將上清液抽掉，剩餘的 DNA pellet 使其乾燥 5~10 分鐘後，以 200  $\mu$ l 二次水將其溶解，保存於 -20°C。



## 十一、HBP1 knockdown 之 HSC-3 細胞株 – 利用 RNAi 干擾技術

資料來源：(137)

### I. 原理

RNAi (RNA interfering) 是利用細胞內的雙股 RNA 所引發的基因降解作用。長鏈的雙股 RNA 先經由 Dicer (一種 RNase) 將其切割成多個小段，每段約 19~25nt，稱為小干擾 RNA (small interfering RNA)，也就是所謂的 siRNA。siRNA 會被細胞質中的核糖核酸誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex; RISC) 辨識並結合，使雙股的 siRNA 解開，形成 sense 與 antisense 兩個單股的 RNA，並將其中的正義股 (sense) 分解，保留反義股 (antisense)。而保留的反義股則會引導 RISC，利用其序列專一性找到目標 mRNA，進而將其降解。利用反轉錄病毒 knockdown 感染宿主細胞，並將其 DNA 嵌入細胞染色體 DNA 中的能力。當反轉錄病毒侵入細胞後，反轉錄病毒的單股 RNA 鏈即反轉錄為雙股的 DNA，進而嵌入 DNA 中成為前驅病毒，前驅病毒可以整合到宿主染色體中任意位置。

### II. 實驗步驟

#### 轉染 293T 細胞

10 cm 培養皿中種下  $3 \times 10^6$  的 293T 細胞。隔夜後，將 60  $\mu$ l 的 Lipofectamine™ 2000 與 serum free medium 室溫反應 5 分鐘後，等待時刻將 35.5  $\mu$ g 質體 DNA，pLKO 與 pLKO - HBP1#76，室溫反應 15 分鐘，將混合液慢慢滴入 293T 細胞中，放置到培養箱中，24 小時後，更換 7 ml 一般的培養液，繼續放到培養箱培養 24 小時。

#### 感染目標細胞

將 7 ml 的培養液取出後，以 0.45  $\mu$ m filter 過濾後，加入 8  $\mu$ g/ml polybrene，將

培養液倒入欲感染之 HSC-3 細胞中培養 5 小時。之後再以相同的步驟取得培養液並放置培養箱培養 3 小時後，換成一般的培養液培養。

### 抗生素篩選

待 HSC-3 細胞長滿之後，使用含有 0.5  $\mu\text{g/ml}$  puromycin 之培養液，以 1:10、1:200、1:2000 與 1:20000 的稀釋倍數進行分盤。分盤後前 3 天須每天更換培養液，之後則是按照一般細胞培養方式每 2~3 天更換一次培養液。

篩選約 1 個多星期之後，若細胞長出一個個肉眼可見之 colony，即可進行挑選。利用沾有 trypsin 的 colonizing disc 覆蓋在單一個 colony 上約 1 分鐘，再將 colonizing disc 放至含有培養液的 6 孔盤中培養，待細胞長滿後即可移至 10 cm dish 繼代培養，並抽取 RNA 以做鑑定。



## 十二、萃取 RNA – 使用 RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)

資料來源：(138)

### I. 原理

利用胍硫氰酸鹽 (guanidine-thiocyanate) 使細胞溶解，蛋白質變性並立即破壞胞器所釋放之 RNase 的活性，而只保持完整的 RNA，當 RNA 流經矽膠膜 (silica-based membrane) 時，在高鹽緩衝液沖洗下，使 RNA 選擇性的吸附在膜上，其他雜質可被洗去。然後逐漸降低鹽濃度洗脫，最後用無 RNase 的 DEPC 水將 RNA 溶出。

### II. 試劑配製

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

每 1 L 的二次蒸餾水加入 1 mL 的 DEPC (diethylpyrocarbonate)，此一步驟需在抽氣櫃內操作，同時放入攪拌磁石，於室溫攪拌 over-night，此過程 DEPC 可破壞水中 RNase 的活性，因殘存的 DEPC 會破壞 RNA 上之含氮鹽基，所以需經高壓殺菌釜滅菌四十分鐘，將水中之 DEPC 蒸發帶走才能使用 (攪拌及滅菌時血清瓶蓋不可旋緊)。

#### 70 % DEPC 乙醇

取出 99.8% 分生專用酒精，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 稀釋至 70%，為避免 RNase 的污染，操作時需戴口罩與手套，將其配製好的 70 % DEPC 乙醇放置到不含 RNase 的 50ml 離心管中儲存。

### III. 實驗步驟

細胞實驗處理過後的 HSC-3 用 trypsin 刷下後，加入 10 ml PBS 離心 5 分鐘 (1000 rpm)，將上清液抽掉，加入 700µl RLT buffer 與 7µl β-mercaptoethanol 後混勻，

使其通過 20 G 的針頭至少 5 次，並加入 700 $\mu$ l 70% 酒精後混勻。取 700 $\mu$ l 至 RNeasy spin column (放在 2 ml collection tube 上) 後離心 15 秒 (10000 rpm)，將下層的液體倒掉後，再將剩下的 700  $\mu$ l 至 RNeasy spin column 後離心 15 秒 (10000 rpm)，將下層的液體倒掉。加入 700  $\mu$ l RW1，離心 15 秒 (10000 rpm) 後將下層的液體倒掉。加入 500 $\mu$ l RPE，離心 15 秒 (10000 rpm)，將下層液體倒掉後，再加入一次 RPE，離心 2 分鐘 (10000 rpm)。將 column 放到空的 2ml collection tube 裡，離心 1 分鐘 (13000 rpm)，接著換到 1.5 ml collection tube，加入 30  $\mu$ l RNase-free water，離心 1 分鐘 (10000 rpm)，再加入一次 30  $\mu$ l RNase-free water，離心 1 分鐘 (10000 rpm)後，即可將 RNA 放到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。



### 十三、RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) – 使用 SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit (invitrogen)

資料來源：(139)

#### I. 原理

將 RNA 的反轉錄 (reverse transcription) 和 cDNA 的聚合酶鏈式擴增 (polymerase) 相結合的技術。技術原理簡單的來說是將一段待測的 RNA 序列經反轉錄酶的作用轉錄成 cDNA，再利用 PCR 技術將基因片段以幾何級數倍增的方式增加到數十萬倍，所形成的 PCR 基因產物經 Ethidium bromide (EtBr) 的化學物質作用，EtBr 會與 DNA 嵌合，經紫外燈照射時會發出肉眼可見的螢光，即在電泳膠片上會呈現具有特定分子量的 PCR 基因片段的產物。

#### II. 試劑配製

##### Primers

名稱 (human)	序列	產物大小
18S	Forward 5-GTCTGTGATGCCCTTAGATG-3	234 bp
	Reverse 5-AGCTTATGACCCGCACTTAC-3	
HBP1	Forward 5-ATCATCTCCTGTACACATCATAGC-3	523 bp
	Reverse 5-CATAGAAAGGGTGGTCCAGCTTAC-3	
EGFR	Forward 5-CGCAAGTGTAAGAAGTGCGAA-3	93 bp
	Reverse 5-CGTAGCATTATGGAGAGTGAGTCT-3	
p47 <sup>phox</sup>	Forward 5-GTACCCAGCCAGCACTATG-3	520 bp
	Reverse 5-CCTGGCTTTGCTTTCATCTG-3	

#### III. 實驗步驟

將 RNA、primer 與試劑混合後，放入 PCR 專用之小管中，放入 iCycler，設定

以下之反應條件即可。反應完成後，每管加入 6 倍之 DNA loading dye，再以含有 0.26 % 之 EtBr 之 1% Agarose 跑膠，並以 Multimage™ Light Cabinet 分析影像並儲存。

## Reaction mixture

Component	Volume
2x Reaction Mix	12.5 $\mu$ l
Template RNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Forward primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Reverse primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
SuperScript™ III RT/Platinum® <i>Taq</i> Mix	0.5 $\mu$ l
DEPC-H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
total volume	25 $\mu$ l

## Reaction protocol

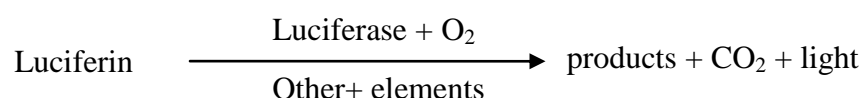
Temperature	Time	Cycle
cDNA synthesis		
55°C	30 min	1
Denaturation		
94°C	2 min	1
PCR amplification		
94°C	15 s	
55°C	40 s	40
68°C		
Final extension		
68°C	45 s	
68°C	5 min	1
4°C	$\infty$	

## 十四、冷光酵素報導基因分析法 – Luciferase Gene Reporter Assay

資料來源：(140)

### I. 原理

生物發光現象是 Luciferin 在 Luciferase 的催化下進行氧化反應所產生。其反應方程式如下：



### II. 實驗步驟

#### 轉染

以 lipofectamine™ 2000 轉染 0.4 μg HBP1 -2kb promoter 和 0.2 μg RSV-β-gal internal control 質體至 24 孔盤中的 293T 細胞，24 小時後，依實驗需求給予不同濃度的藥物，再放置培養箱培養 24 小時後，以冷光分析儀分析 Luciferase 活性。

#### 樣品製備

使用 4°C 的 PBS 清洗細胞兩次，加入 25μl Lysis buffer (含有 0.5 mM DTT) 於 24 孔盤中，在 4°C 搖晃機上 30 分鐘，將細胞刷下放置 eppendorf 中，離心 2 分鐘 (11800 rpm，室溫)，抽取上清液置於新的 eppendorf，即可將待測樣品放到 -80°C 冰箱中保存。

#### 分析

在 24 孔盤中加入 12.5μl buffer A 後，取 5μl 的待測樣本到待測孔中，放置冰上 10 分鐘，等待時間配置 buffer B (galacton-plus substrate : bufferB = 1 : 100)，加入 50μl buffer B 後，立即測量 Luciferase 活性。置室溫 30 分鐘後，加入 50μl Accelerator II，立即測量 β-galactosidase 活性。

## 十五、統計分析

實驗結果均以平均值  $\pm$  標準差 (Mean  $\pm$  SD) 表示，利用 Student's t test 或 Duncan's multiple range test 比較組間差異。數據之統計均須確定為常態分布，否則轉型為對數值 (Log)。數據以單向雙方分析 (One way ANOVA) 檢定組間差異之顯著性，統計比較以  $p < 0.05$  為具有顯著之差異。統計分析係以 SAS 軟體 (SAS 8.2, Cary, NC, USA) 分析。





## 第四章、結果

### 一、NAC 抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長

為了選擇適當的實驗模式，首先，我們檢視三株口腔癌細胞株 TW-206、HSC-3 和 SCC-4 中 EGFR 和 HBP1 的表現情形。由於本實驗的主要目的之一是檢測 NAC 是否可以誘導 HBP1 的表現，所以，實驗細胞株的選擇最好是 HBP1 表現量低，當 NAC 刺激造成的 HBP1 表現增加會較明顯；同時，我們希望實驗細胞株是 EGFR 過度表現的，以便 NAC 抑制 EGFR 活性的偵測。圖 4-1 顯示，TW-206 及 HSC-3 細胞株呈現 EGFR 過度表現的情形，而 HBP1 的 mRNA 和蛋白質表現在 HSC-3 細胞株則低於其它二株細胞株。因此，本實驗選用 HSC-3 口腔鱗狀細胞癌為研究之細胞株。

#### I. NAC 抑制 HSC-3 生長

首先，我們檢測 NAC 對 HSC-3 細胞的生長影響；當 HSC-3 細胞給予 0、5、10、15 及 30 mM 等不同濃度的 NAC，12、24 及 48 小時後，利用細胞計數方式計算 HSC-3 細胞之存活率以及利用倒立式顯微鏡觀察細胞型態的變化。由圖 4-2 結果顯示，NAC 抑制 HSC-3 細胞生長的效果隨其濃度的增加而更為顯著，尤其，給予 30 mM NAC，48 小時後，HSC-3 細胞的細胞數目明顯低於 24 小時時，顯示，此時的 NAC 不但抑制了 HSC-3 細胞的生長，同時也造成了細胞的死亡。倒立式顯微鏡觀察拍攝的細胞型態顯現相同的結果 (圖 4-3)。

#### II. NAC 抑制 cyclin D1 表現使細胞週期停滯於 G1 期

由以上的結果得知，NAC 顯著抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長。因此，我們進一

步了解，NAC 是否藉由影響細胞週期的改變而造成抑制細胞生長的作用。當給予 HSC-3 細胞 0、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用流式細胞儀分析細胞週期的變化。圖 4-4 顯示，30 mM NAC 顯著增加細胞週期 G1 期的細胞百分比，相對地，S 期的細胞百分比不論在 15 或 30 mM NAC 組皆明顯下降，另外，NAC 也有明顯增加細胞凋亡的細胞數目。此結果顯示，NAC 抑制 HSC-3 細胞週期進行而停滯於 G1 期，以及增加細胞的凋亡，造成細胞生長受到抑制。因此，我們進一步確認 NAC 造成細胞週期 G1 期停滯的重要標的。然而，在 TW-206 細胞株中也有發現同樣的情形。當給予 TW-206 細胞 0、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用流式細胞儀分析細胞週期的變化。圖 4-5 顯示，隨著 NAC 濃度的增加，顯著增加細胞週期 G1 期的細胞百分比，相對地，S 期的細胞百分比不論在 15 或 30 mM NAC 組皆明顯下降。當給予 HSC-3 細胞 0、5、10、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，12 及 24 小時後，利用西方點墨法檢測 G1 期相關調控因子 cyclin D1 與 p21 的蛋白表現。圖 4-6 的結果指出，不論在 NAC 處理 12 或 24 小時，p21 的表現並無顯著性的影響，然而，給予 HSC-3 細胞 30 mM NAC，12 及 24 小時後，即顯著地抑制了 cyclin D1 的蛋白表現。可見，NAC 造成細胞週期停滯於 G1 期的主要原因之一是透過對 cyclin D1 的表現抑制，進而抑制 HSC-3 口腔癌細胞的生長。

## 二、NAC 誘發 HBP1 的表現且抑制 EGFR 訊息傳遞路徑

細胞生長週期 G1 期的進行受到生長訊息路徑關鍵性的調節，尤其是 EGF-EGFR 路徑，而 G1 期調控因子 cyclin D1 更是此訊息傳遞路徑的重要下游基因，同時，也是 HBP1 調控 G1 期的標地基因 (*c-myc*、*cyclin D1*)。所以，我們假設 NAC 抑制 cyclin D1 的表現而造成 G1 期生長停滯是經由對 EGFR 活性的抑制和 HBP1 表現的誘發。

### I. NAC 增加 HBP1 蛋白質與 mRNA 的表現

以上結果得知，NAC 能抑制細胞週期 G1 期的進行，這與 HBP1 表現增加時，使得細胞週期停滯於 G1 期並伴隨著 cyclin D1 表現抑制的結果相似，因此我們檢視 NAC 是否會促進 HBP1 的表現。當給予 HSC-3 細胞 0、5、10、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 及 48 小時後，利用西方點墨法觀察 HBP1 的蛋白表現。圖 4-7 顯示，隨著 NAC 的給予濃度增加，不論 12、24 或 48 小時，HBP1 的蛋白表現量顯著地隨之增加。為了瞭解 NAC 增加 HBP1 蛋白的表現是否是透過對其轉錄作用的調節，我們檢測 NAC 對 HBP1 mRNA 表現和 HBP1 promoter 活性的影響。當給予 HSC-3 細胞 0、5、10、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用 RT-PCR 觀察 HBP1 mRNA 變化。如圖 4-7 結果，隨著 NAC 的濃度增加，增加了 HBP1 mRNA 的表現。另外，在 293T 細胞中轉染 HBP1 -2kb promoter 和 RSV- $\beta$ -gal internal control 質體後，利用冷光酵素報導基因分析法分析 HBP1 啟動子是否被活化。圖 4-8 結果顯示，給予 30mM NAC，24 小時後，可增加 HBP1 啟動子的活性。由上述結果得知，NAC 透過增加 HBP1 的轉錄作用，而增加 HBP1 蛋白的表現。

## II. NAC 抑制 EGFR 訊息傳遞路徑

接著，我們檢視 NAC 調控 EGFR 訊息傳遞路徑的情形。當給予 HSC-3 細胞 0、5、10、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 及 48 小時後，利用西方點墨法觀察 EGFR、Akt 以及 ERK 的活性。圖 4-9 與 4-10 顯示，不論在 NAC 處理 12、24 或 48 小時後，隨著 NAC 的濃度增加，顯著地抑制 EGFR 與 Akt 的磷酸化。有趣地，我們意外觀察到 EGFR 的總量也受到 NAC 的影響而逐漸減少。同時，隨著 NAC 的濃度增加，磷酸化 ERK 的表現亦有增加趨勢。因上述觀察到，NAC 抑制 EGFR 的蛋白總量，所以，我們利用 EGFR 專一的 primers 進行 RT-PCR 觀察 NAC 對 EGFR mRNA 的影響。圖 4-9 結果顯示，給予 30mM NAC，24小時後，明顯抑制 EGFR mRNA 的表現。此結果顯示，NAC 抑制 EGFR 的活化路徑及其下游 Akt 的活性，相對地，NAC 活化 ERK 可能與 NAC 造成的細胞凋亡有關。

進一步地，我們觀察 NAC 是否抑制 EGF 所誘導的 EGFR 訊息傳遞路徑。當給予 HSC-3 細胞 0、5、10、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC 和 serum starvation 24 小時後，以 10 ng/ml 的 EGF 刺激 15 分鐘後，並以西方點墨法觀察 EGFR、Akt 以及 ERK 的蛋白表現。圖 4-11 結果得知，serum starvation 造成 EGFR 的不活化，EGF 的刺激明顯增加 EGFR 的磷酸化表現，而 NAC 隨著濃度增加而顯著抑制 EGFR、Akt 以及 ERK 的活化。由此可知，不論是否給予 EGF 刺激，NAC 皆能抑制 EGFR 的活性。

### 三、NAC 抑制 p47<sup>phox</sup> 的表現且抑制細胞內 ROS 的產生

生長因子誘導的生長促進，通常伴隨著細胞膜上 NADPH 氧化酶的活化和細胞內短暫的 ROS 增加，這時的 ROS 增加相信是延長生長訊息路徑的重要因素。因此，NADPH 氧化酶複合體組成成員的表現以及相對 ROS 產生的下降，將導致生長遲緩。有鑑於此，我們於本實驗目的中，檢測 NAC 對 NADPH 氧化酶成員 p47<sup>phox</sup> 表現和 ROS 的影響。

#### I. NAC 抑制 p47<sup>phox</sup> 的表現

Paulson 等學者發現，HBP1 可藉由結合至 p47<sup>phox</sup> 啟動子而抑制其轉錄，抑制 NADPH 氧化酶活性而降低超氧化物的生成<sup>(75)</sup>。在此觀察 NAC 是否抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄作用。當給予 HSC-3 細胞 0、5、10、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用 RT-PCR 觀察 p47<sup>phox</sup> mRNA 的表現。圖 4-12 顯示，給予 30mM NAC，24 小時後，明顯降低 p47<sup>phox</sup> 的 mRNA 表現量。顯示，NAC 可藉由對 p47<sup>phox</sup> 的抑制而減少細胞內 ROS 的生成，進而抑制 EGFR 訊息路徑的活化。

#### II. NAC 抑制細胞內 ROS 的產生

由於 NAC 具有很好的抗氧化性，可有效調節細胞內氧化還原平衡狀態，而由上一結果顯示，NAC 抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄作用，而 p47<sup>phox</sup> 為 NADPH 氧化酶的次單位之一，我們預期 NAC 將減少細胞內 ROS 的產生。當給予 15 和 30 mM 之不同濃度 NAC，0.5、1、3、6、12 以及 24 小時後，利用流式細胞儀分析 ROS 的生成量。圖 4-13 與 4-14 結果顯示，不論給予 15 或 30 mM 的 NAC，3 小時後，皆明顯抑制細胞內 ROS 的生成而使圖形有左移現象。綜合以上所述，NAC 抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄，進而抑制體內 ROS 的生成。

#### 四、HBP1 調控 EGFR 與下游 Akt 的活化

我們之前的研究發現，在乳癌細胞株 MDA-MB-231 中，HBP1 具有調節 EGFR 訊息傳遞路徑的功能，但在其它癌細胞，則尚不清楚。所以，我們假設，同樣 EGFR 過度表現的口腔癌細胞，HBP1 應具有相同之自製能力。

##### I. HBP1 knockdown 增強 EGFR、Akt 及 ERK 的活性

為了觀察 HBP1 在 HSC-3 細胞中對 EGFR 訊息傳遞路徑的影響，我們利用 RNAi 的技術，建立 HBP1 表現降低的穩定細胞株 (knockdown stable line)。我們將帶有 HBP1 shRNA 與空載體 (empty vector) 的質體，利用反轉錄病毒感染的方式帶入 HSC-3 口腔癌細胞中，之後以嘌呤黴素 (puromycin) 來篩選 HBP1 knockdown 的穩定細胞株。再以 RT-PCR 方式確認細胞中 HBP1 的 mRNA 表現。圖 4-15 顯示，不同的 HBP1 knockdown 細胞株呈現不同的 HBP1 mRNA 表現量，其中，我們選擇 HBP1 降解程度不一樣的 A 與 H 細胞株作為本次實驗的細胞株，以檢視 HBP1 的生理功能。圖 4-16 顯示，當 HBP1 knockdown 時，與控制組比較，皆有增強 EGFR、Akt 以及 ERK 的蛋白磷酸化。

##### II. HBP1 knockdown 增強 EGF 誘發的 EGFR 訊息傳遞路徑

緊接著，我們分別在 serum starvation 後給予控制組與 HBP1 knockdown 組細胞 10ng/ml 之 EGF 刺激 0、5、15、30、60 以及 120 分鐘，或是以 0、5、10、30、50 以及 70 ng/ml 之 EGF 刺激 15 分鐘後，以西方點墨法觀察 EGFR 與其下游 Akt 的表現。圖 4-17 顯示，以 EGF 刺激後，隨著時間的變化，HBP1 knockdown 細胞皆出現比控制組較強的 EGFR 與其下游 Akt 的磷酸化。相同地，不同濃度之 EGF 刺激也有相同之結果，圖 4-18 結果顯示，隨著 EGF 刺激濃度的增加，與控制組比較，

HBPI knockdown 細胞明顯呈現較強的 EGFR 與其下游 Akt 的磷酸化。有趣的是，我們發現，在沒有給予 EGF 刺激的情況下，控制組與 HBPI knockdown 組中，Akt 的磷酸化表現異常增加，尤其，HBPI knockdown 組又顯著高於控制組，顯示著，HSC-3 細胞株可能有 Akt 的突變而造成其異常的持續活化，而 HBPI 似乎具有非透過 EGFR 而調控 Akt 活性的能力。綜合以上結果得知，HBPI 可以負調控 EGF EGFR 與其下游 Akt 的訊息活化路徑。



## 五、NAC 藉由調控 HBP1 的表現而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑

上述結果顯示，NAC 和 HBP1 分別具調控 HSC-3 細胞中 EGFR 和細胞生長的功能，而且，NAC 可以誘發 HBP1 的表現，但並未證實 HBP1 直接參與 NAC 抑制的 EGFR 和細胞生長。為此，我們比較 HBP1 knockdown 和控制組的 HSC-3 細胞，NAC 抑制 EGFR 活化和細胞生長的情形。如果 NAC 抑制 EGFR 和細胞生長部份是透過 HBP1，我們假設，HBP1 的降解將減緩 NAC 的抑制效能。

### I. HBP1 knockdown 減緩 NAC 對 HSC-3 口腔癌細胞的生長抑制

為了觀察 NAC 是否透過調控 HBP1 而抑制口腔癌細胞的生長，我們給予控制組和 HBP1 knockdown 細胞 0、5、10、15、20 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用細胞計數方式觀察細胞之存活率以及利用倒立式顯微鏡觀察細胞型態的變化。圖 4-19 顯示，在不同濃度的 NAC 處理下，HBP1 knockdown 細胞的存活率高於控制組，尤其在 30 mM NAC 組，HBP1 knockdown 細胞組的存活率顯著高於對照組。同樣地，圖 4-20 的倒立式顯微鏡拍攝細胞型態顯現相同的結果。由以上結果得知，NAC 透過對 HBP1 的調控而達到對 HSC-3 口腔癌細胞的生長抑制。

### II. HBP1 knockdown 減緩 NAC 對 EGF 誘導之 EGFR 訊息傳遞路徑的抑制

為了觀察 NAC 是否透過調控 HBP1 而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑，我們於 serum starvation 時，給予控制組與 HBP1 knockdown 細胞 0、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，以 10ng/ml 的 EGF 刺激 15 分鐘，以西方點墨發觀察 EGFR 的活化表現。圖 4-21 顯示，控制組中 NAC 能顯著抑制 EGF 所誘發的 EGFR 的磷酸化。綜合以上所述，當 HBP1 表現降低時能減緩 NAC 對 EGFR 訊息傳遞路徑的抑制，也間接證實 NAC 抑制口腔癌細胞生長的機轉，是藉由活化轉錄抑制因子



HBP1，抑制 p47<sup>phox</sup> 的表現，以及減少細胞內 ROS 的產生，進而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑，達到抑制口腔癌細胞生長。



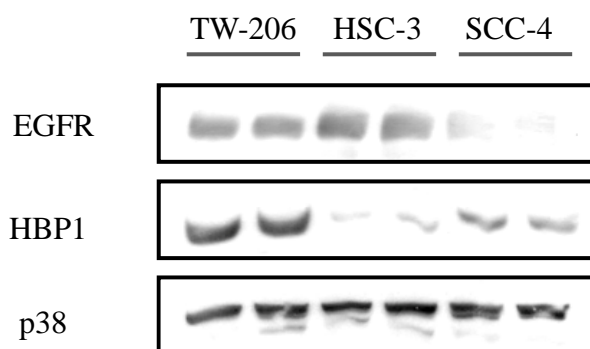


圖 4-1 HSC-3 細胞 EGFR 過度表現且 HBP1 表現較低。三種不同口腔癌細胞株 TW206、HSC-3 以及 SCC-4，待細胞長滿後即萃取總蛋白，利用西方點墨法分析 EGFR 與 HBP1 的蛋白表現，p38 為 internal control，此實驗至少重複兩次。

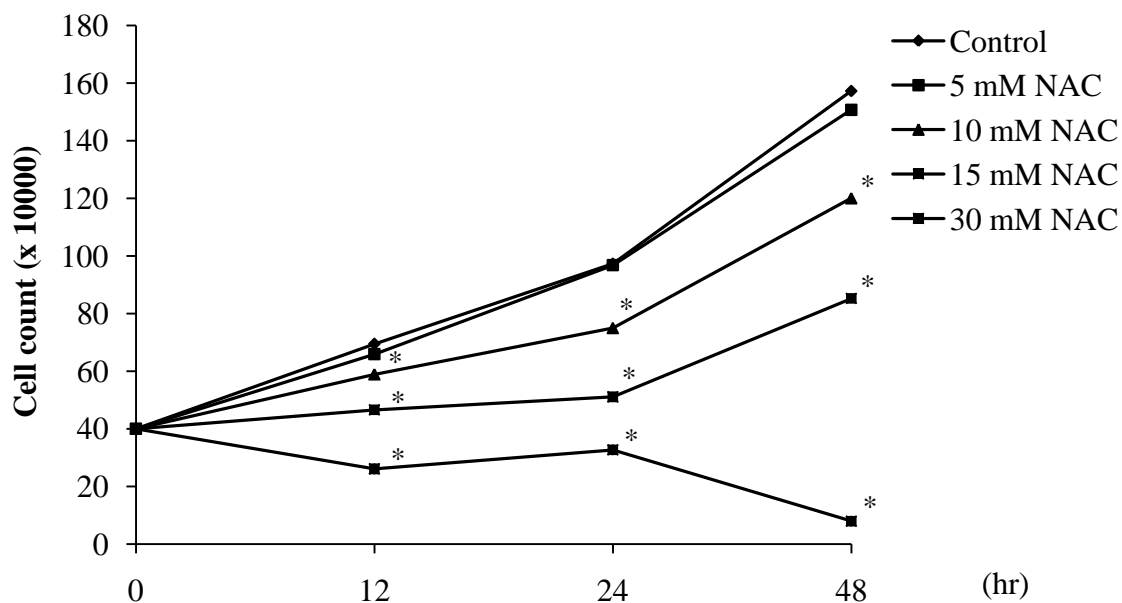


圖 4-2 NAC 抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長。HSC-3 細胞給予 0-30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 以及 48 小時後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以細胞計數方式觀察 HSC-3 細胞之存活率。數據結果以 mean + SD 值表示，\*  $p < 0.05$  v.s. Control，此實驗至少重複兩次。

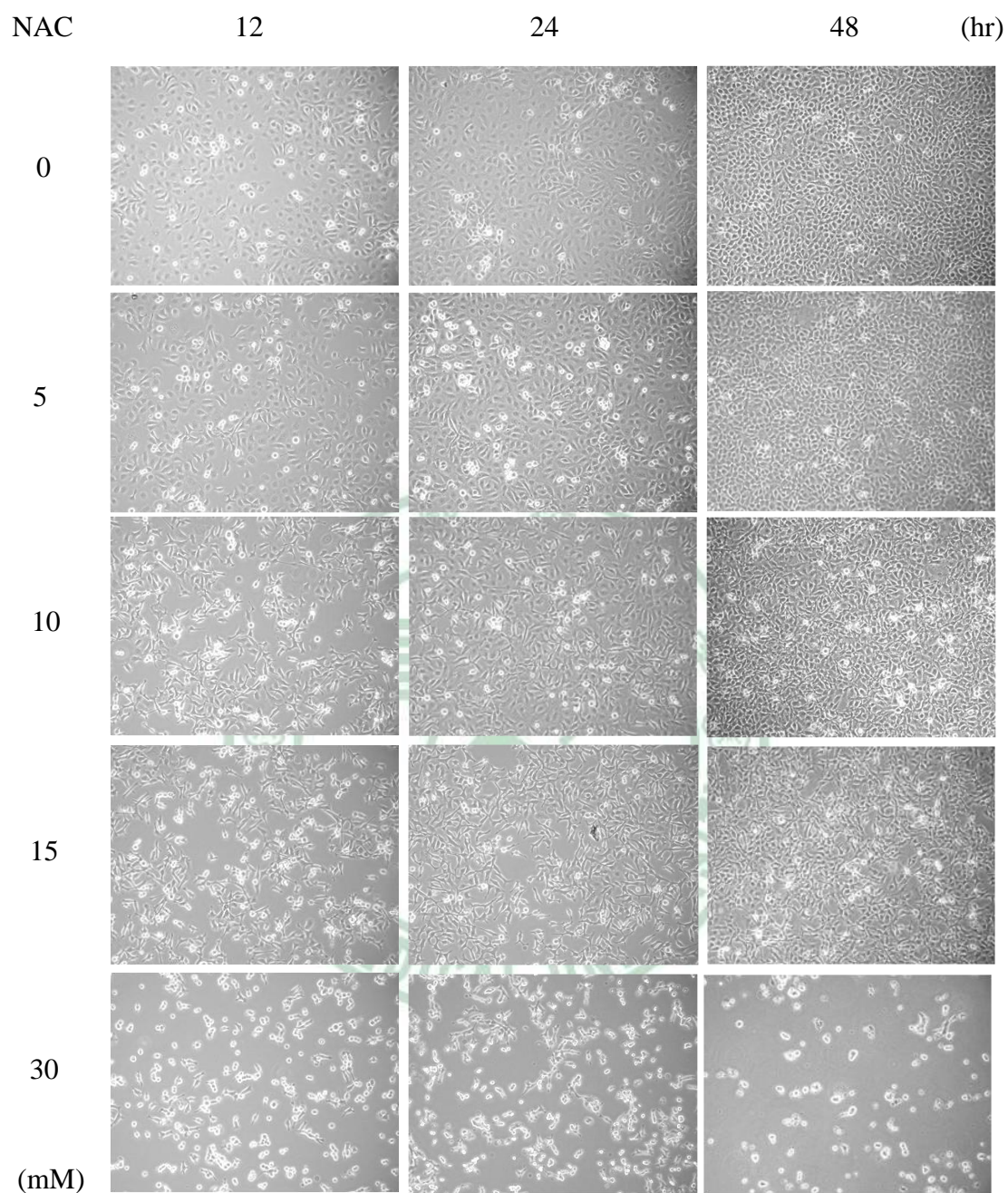


圖 4-3 NAC 抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長以細胞型態觀察。HSC-3 細胞給予 0-30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 以及 48 小時後，利用倒立式電子顯微鏡觀察細胞型態的變化，此實驗至少重複兩次。

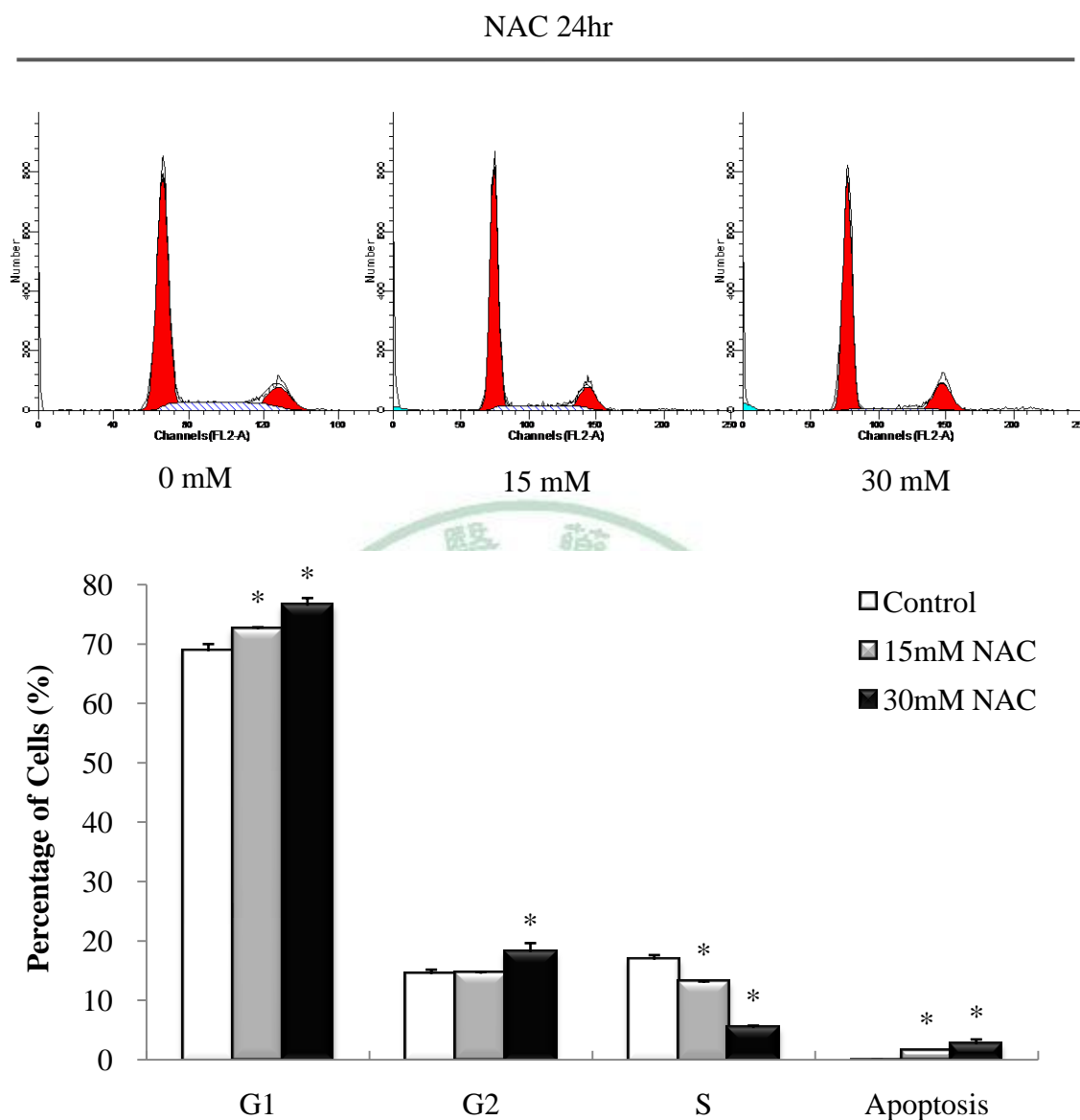


圖 4-4 NAC 使 HSC-3 口腔癌細胞的細胞週期停滯於 G1 期。HSC-3 細胞給予 0、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用 trypsin 將細胞打下以酒精固定 24 小時，加入 PI 染劑以流式細胞儀與 Modfit LT<sup>®</sup> 軟體分析細胞週期的變化。數據結果以 mean+SD 值表示，\*  $p < 0.05$  v.s.Control，此實驗至少重複兩次。

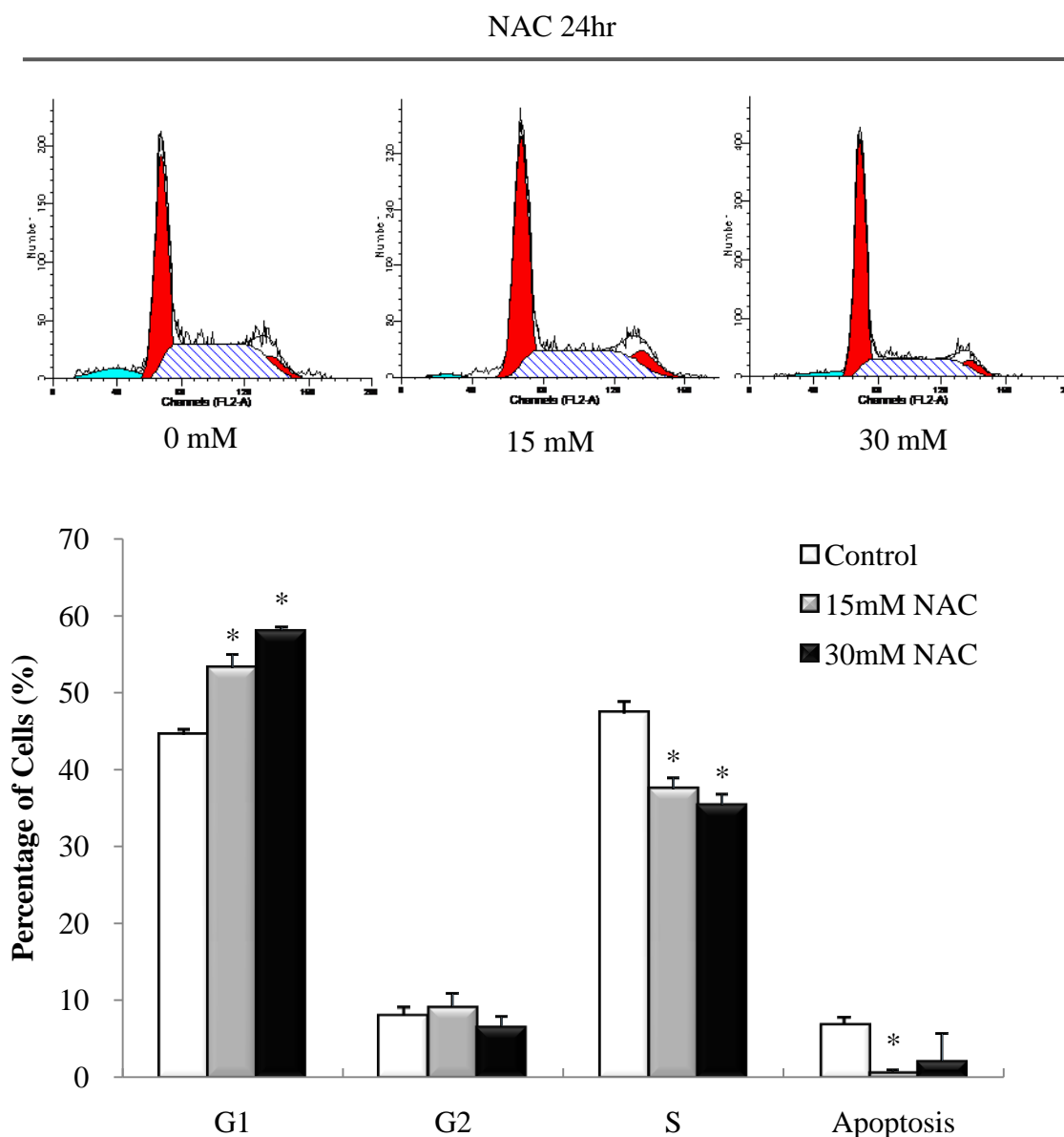


圖 4-5 NAC 使 TW-206 口腔癌細胞的細胞週期停滯於 G1 期。TW-206 細胞給予 0、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用 trypsin 將細胞打下以酒精固定 24 小時，加入 PI 染劑以流式細胞儀與 Modfit LT<sup>®</sup> 軟體分析細胞週期的變化。數據結果以 mean+SD 值表示，\* $p < 0.05$  v.s.Control，此實驗至少重複兩次。

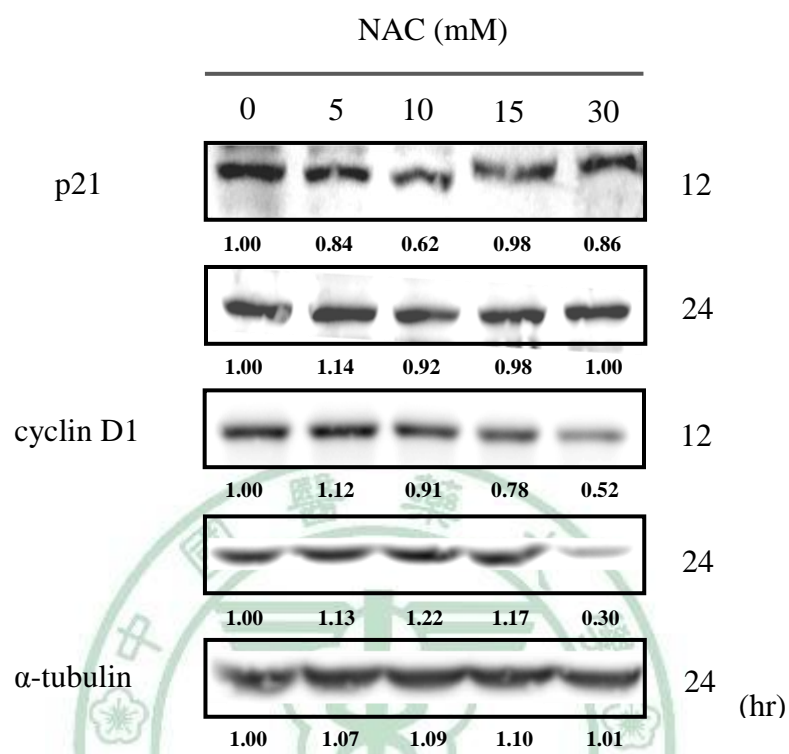


圖 4-6 NAC 抑制 cyclin D1 的活化。HSC-3 細胞給予 0-30 mM 不同濃度之 NAC，12 及 24 小時後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法分析 cyclin D1 與 p21 的蛋白的表現，此實驗至少重複兩次。

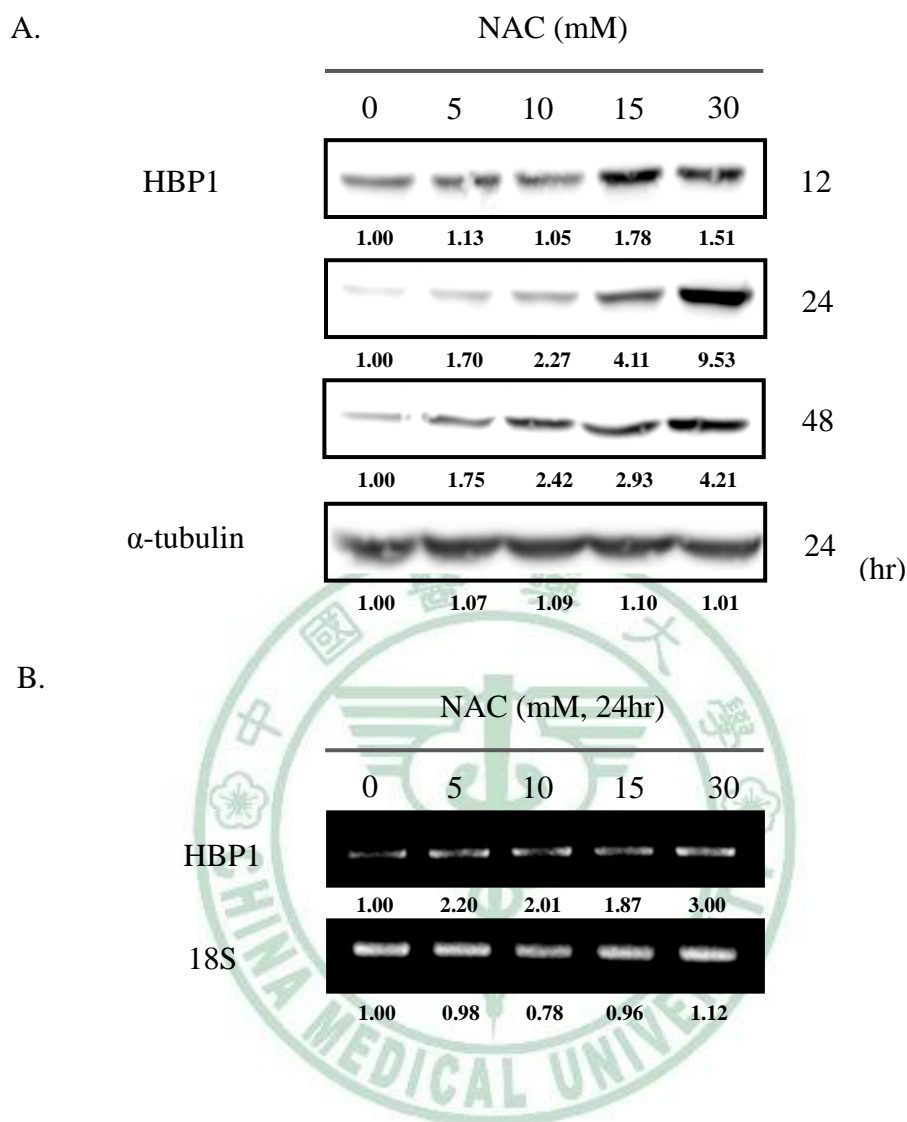


圖 4-7 NAC 增加 HBP1 蛋白(A) 與 mRNA(B) 的表現。HSC-3 細胞給予 0-30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 和 48 小時後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法分析 HBP1 的蛋白表現，或是利用 RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN) 萃取總 RNA 再以 RT-PCR 分析 HBP1 mRNA 表現，此實驗至少重複兩次。



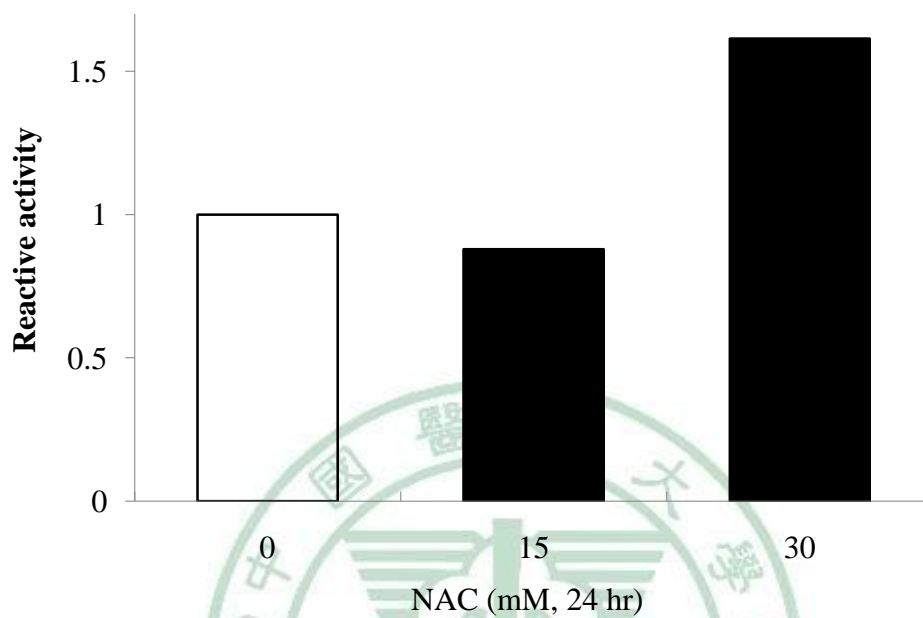


圖 4-8 NAC 增加 -2kb HBP1 啟動子的表現。利用轉染試劑 Lipofectamine™ 2000 將 HBP1 -2kb 啟動子與 RSV- $\beta$ -gal 質體轉染至 293T 細胞中，利用冷光分析儀分析 Luciferase 活性，此為單次的實驗結果。

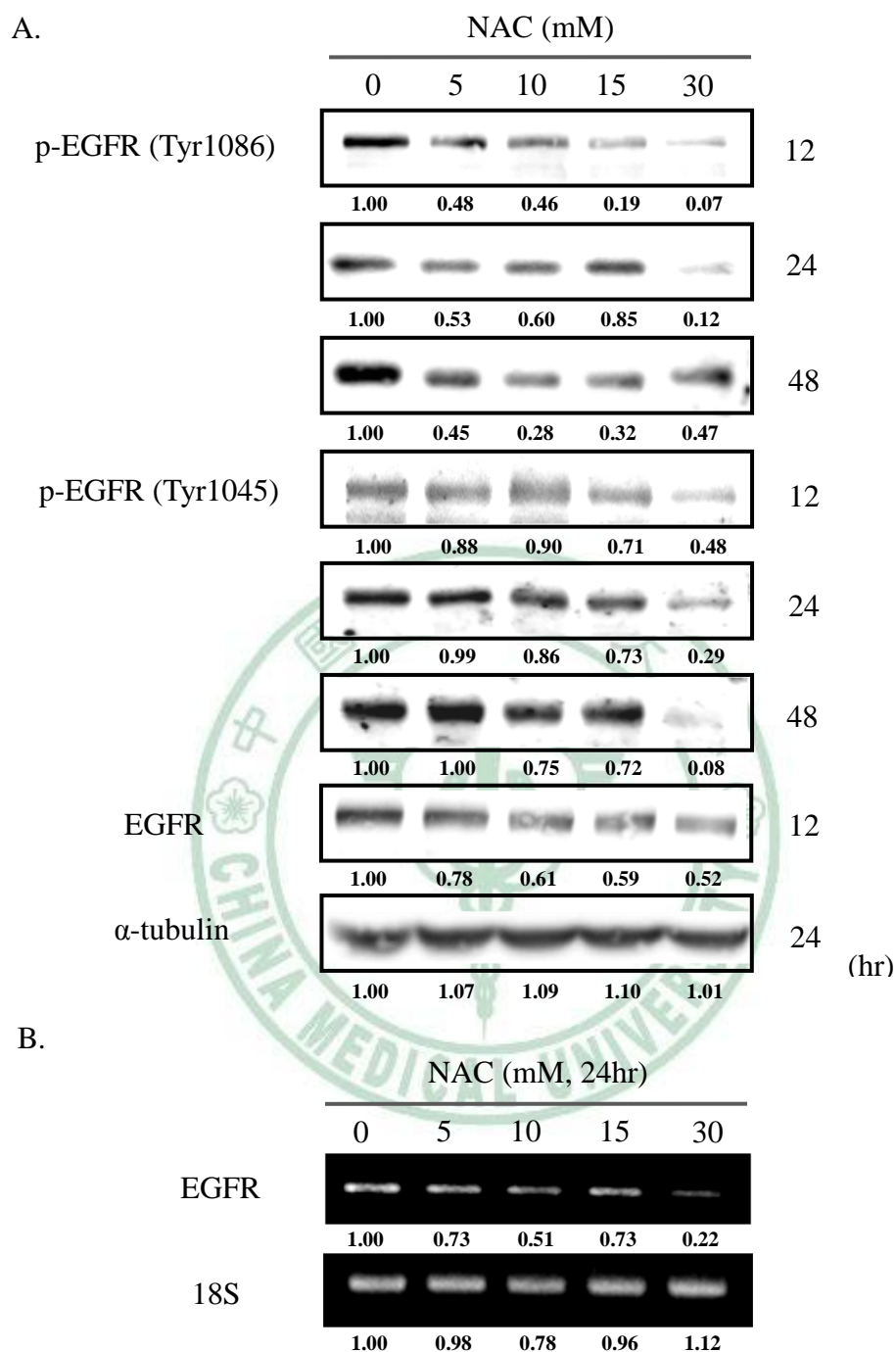


圖 4-9 NAC 抑制 EGFR 蛋白(A) 與 mRNA(B) 表現。HSC-3 細胞給予 0-30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 和 48 小時後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法分析 EGFR 的蛋白表現，或是利用 RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN) 萃取總 RNA 再以 RT-PCR 分析 EGFR mRNA 表現，此實驗至少重複兩次。

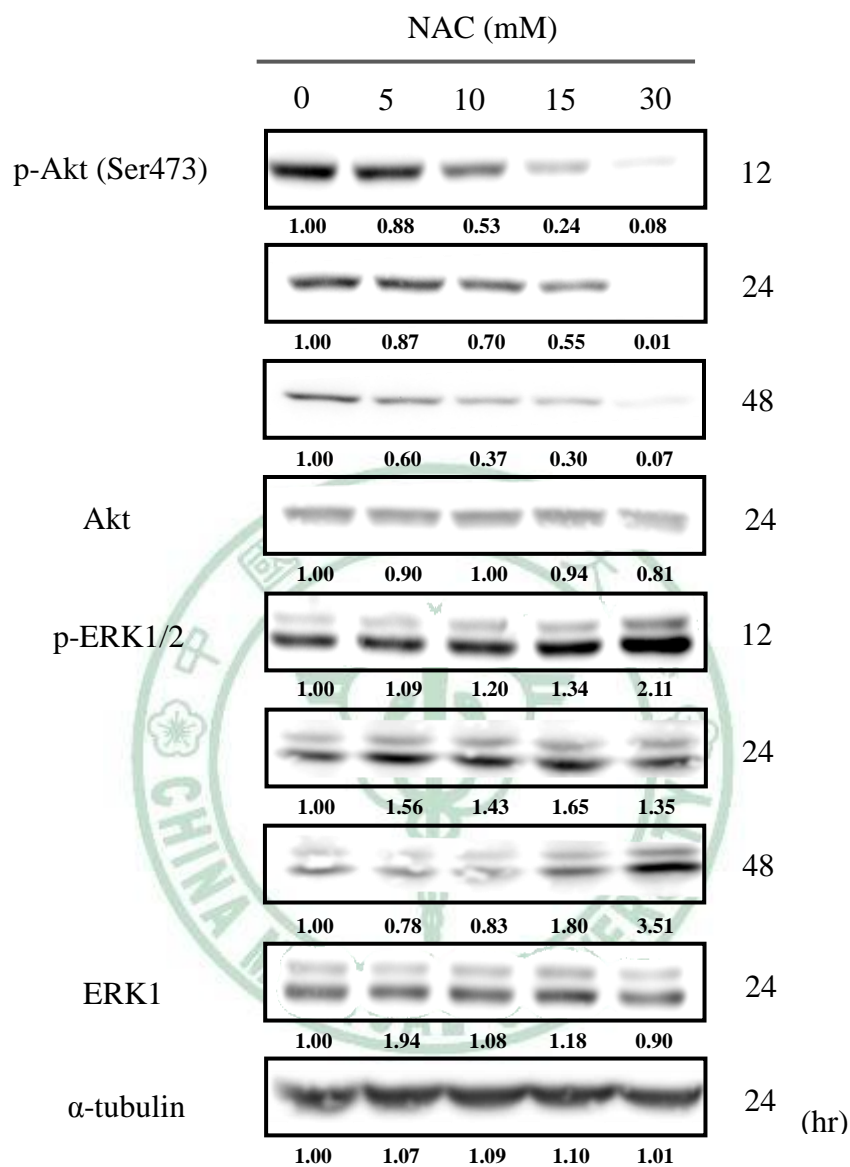


圖 4-10 NAC 抑制 Akt 活化與誘導 ERK 磷酸化。HSC-3 細胞給予 0-30 mM 不同濃度之 NAC，12、24 和 48 小時後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法分析 Akt 與 ERK 的蛋白表現，此實驗至少重複兩次。

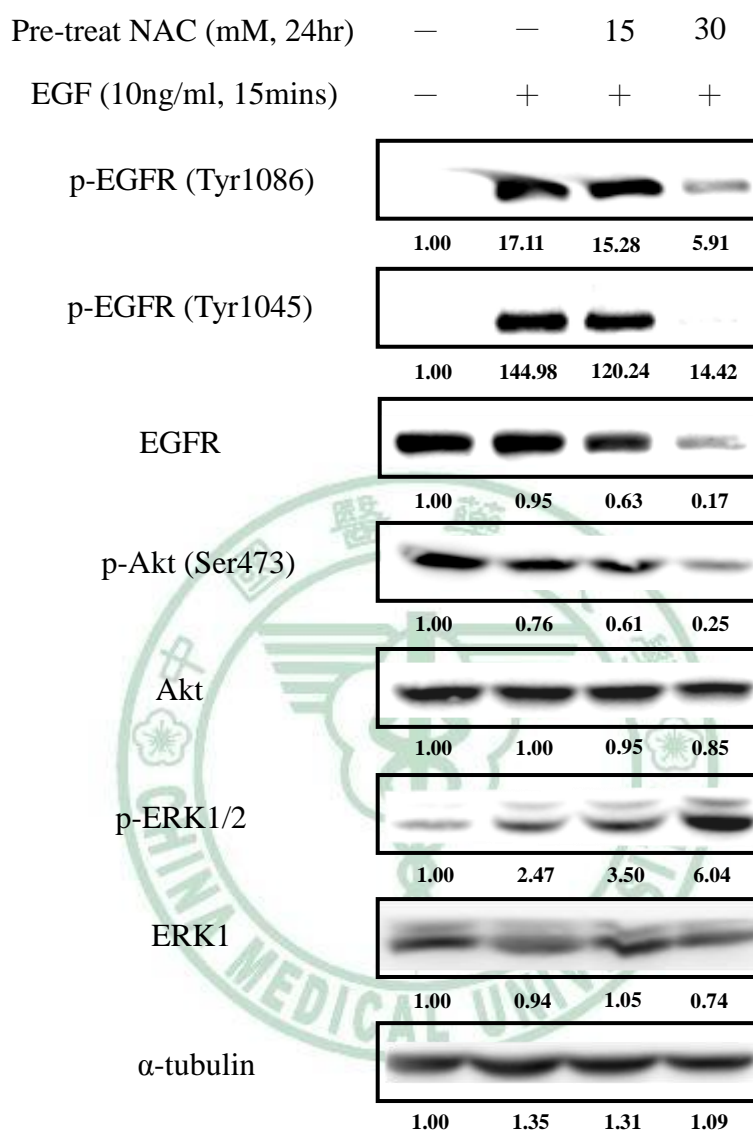


圖 4-11 NAC 抑制 EGF 所誘導的 EGFR 訊息傳遞路徑。給予 HSC-3 細胞 0-30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，再給予 10 ng/ml 之 EGF 刺激 15 分鐘，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法觀察 EGFR、Akt 以及 ERK 的蛋白表現，此實驗至少重複兩次。

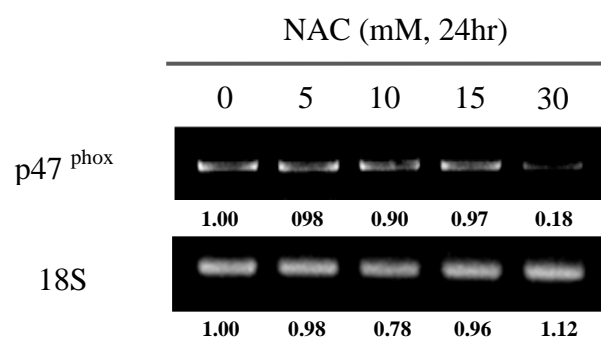


圖 4-12 NAC 抑制 p47<sup>phox</sup> mRNA 表現。給予 HSC-3 細胞 0-30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用 RNeasy<sup>®</sup> Mimi Kit (QIAGEN) 萃取總 RNA 再以 RT-PCR 分析 p47<sup>phox</sup> mRNA 表現，此實驗至少重複兩次。

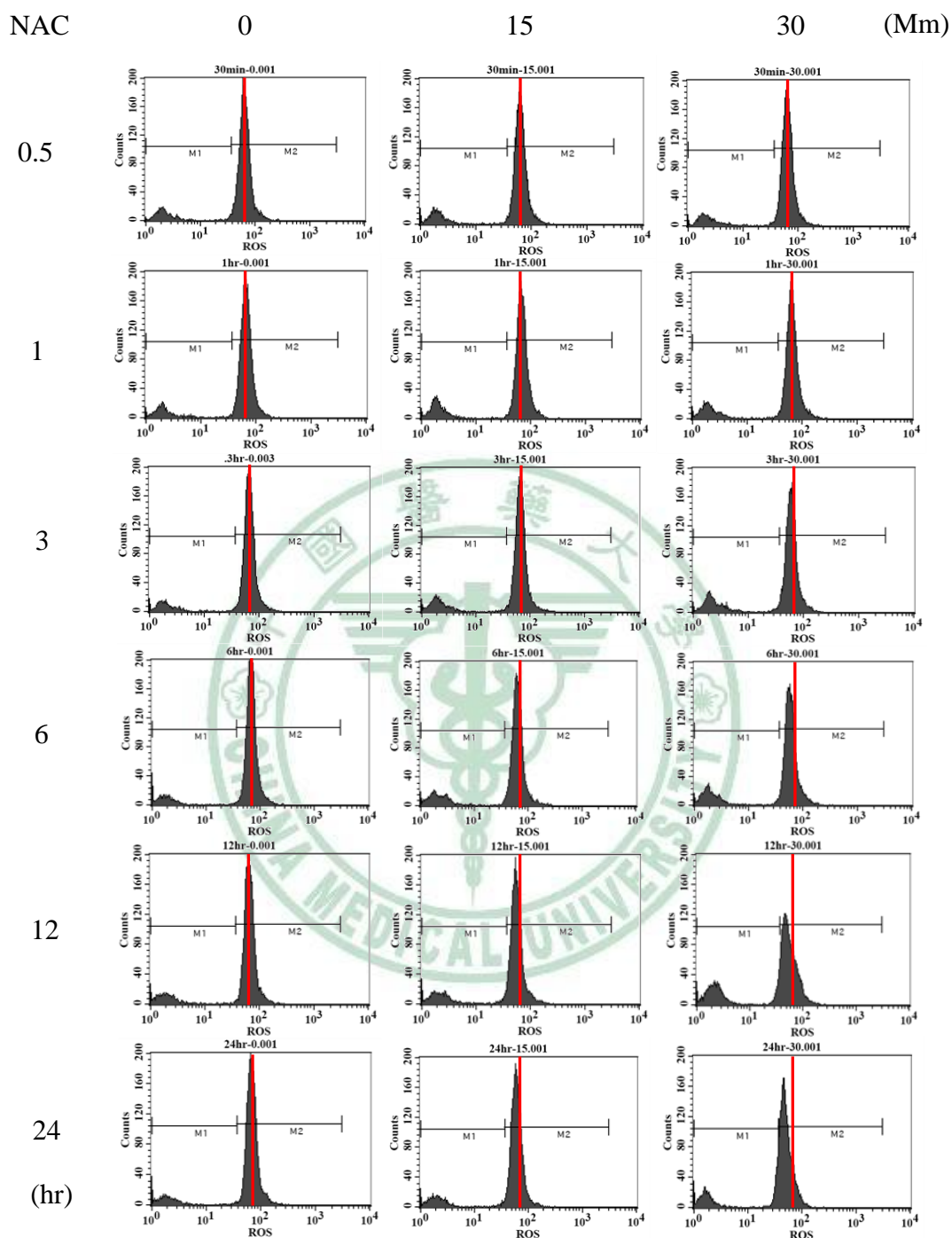


圖 4-13 NAC 增加曲線左移現象抑制細胞內 ROS 的生成。HSC-3 細胞給予 15 與 30mM 不同濃度之 NAC，0.5、1、3、6、12 及 24 小時後，加入  $H_2DCF$ -DA 染劑以流式細胞儀分析細胞內 ROS 的變化，此實驗至少重複兩次。

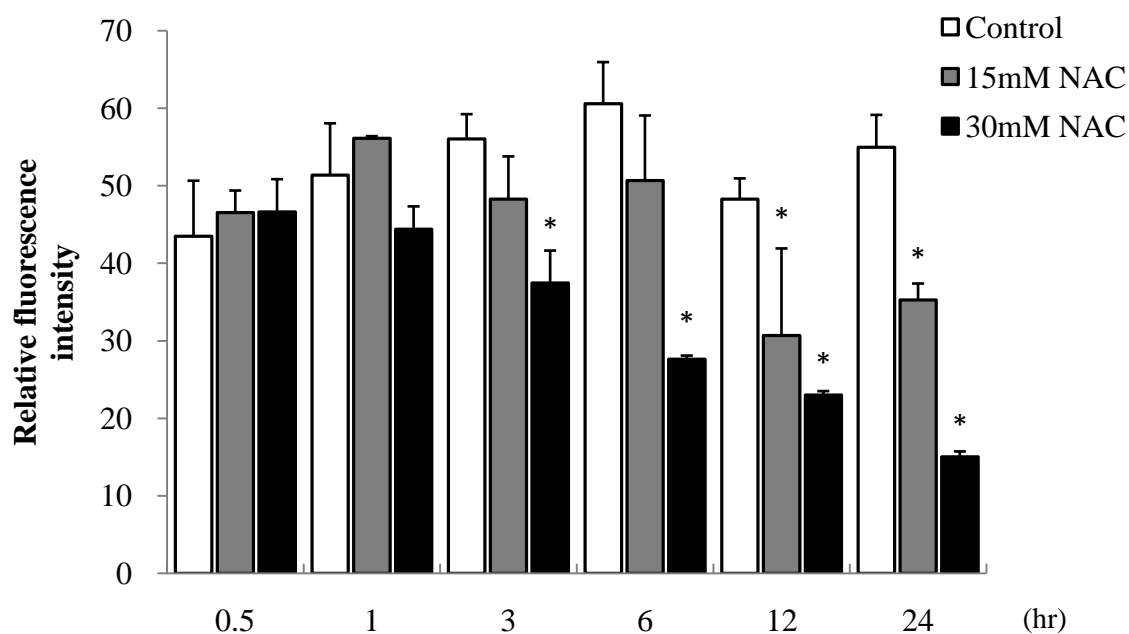


圖 4-14 NAC 抑制細胞內 ROS 的生成以量化圖顯示。HSC-3 細胞給予 15 與 30mM 不同濃度之 NAC，0.5、1、3、6、12 及 24 小時後，加入 H<sub>2</sub>DCF-DA 染劑以流式細胞儀分析細胞內 ROS 的變化，以量化圖顯示。數據結果以 mean+SD 值表示，\* $p < 0.05$  v.s.Control，此實驗至少重複兩次。

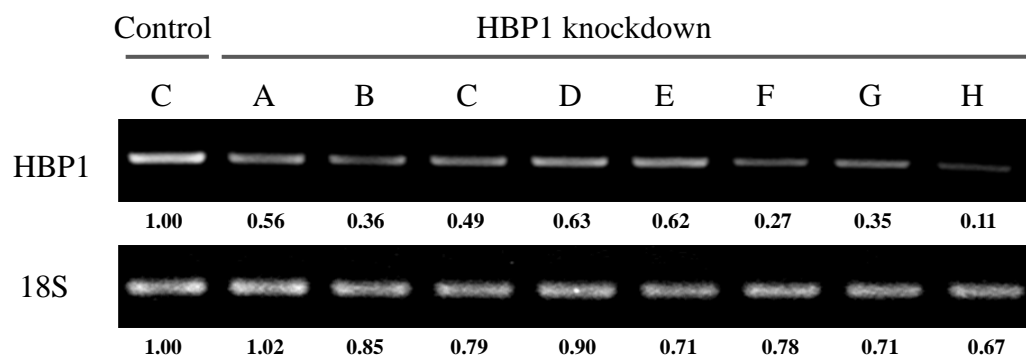


圖 4-15 建立 HBP1 knockdown 細胞株。利用轉染試劑 Lipofectamine™ 2000 將 pLKO-HBP1 #76 以及空載體 pLKO 分別轉染至 293T 細胞中，48小時後，收集上清液，加入 polybrene 倒入欲感染的 HSC-3，待細胞長滿後以 0.5  $\mu\text{g/ml}$  之 puromycin 篩選，挑出控制組與 HBP1 knockdown 穩定細胞株，再利用 RT-PCR 分析 HBP1 mRNA 表現量，18S 為 internal control，此實驗至少重複兩次。



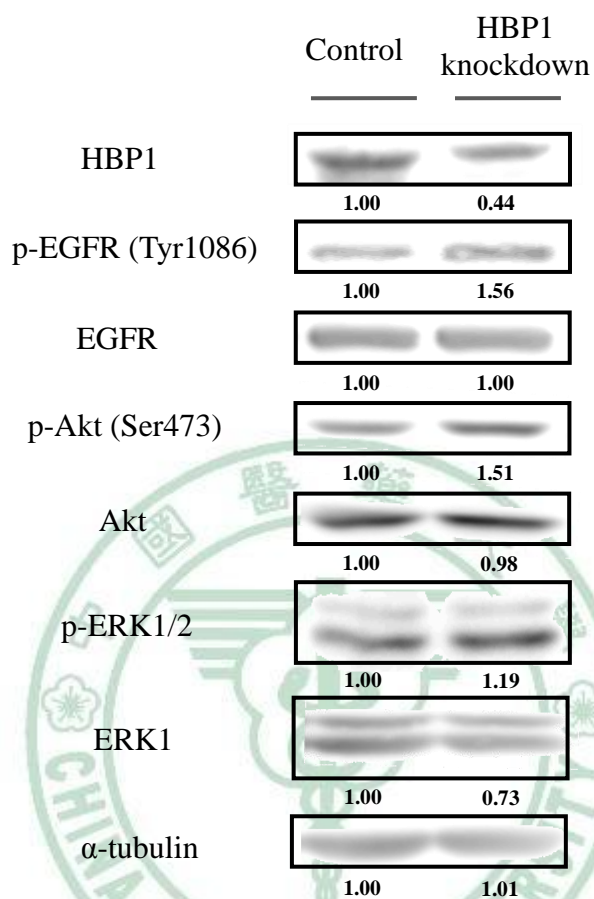


圖 4-16 HBP1 的含量影響 EGFR、Akt 以及 ERK 磷酸化。利用 Lipofectamine™ 2000 將 pLKO-HBP1 #76 以及空載體 pLKO 分別轉染至 293T 細胞中，48小時後，收集上清液，加入 polybrene 倒入欲感染的 HSC-3，待細胞長滿後以 0.5  $\mu$ g/ml 之 puromycin 篩選，挑出控制組與 HBP1 knockdown 穩定細胞株。待細胞長滿後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法觀察 EGFR、Akt 以及 ERK 的蛋白表現，此實驗至少重複兩次。

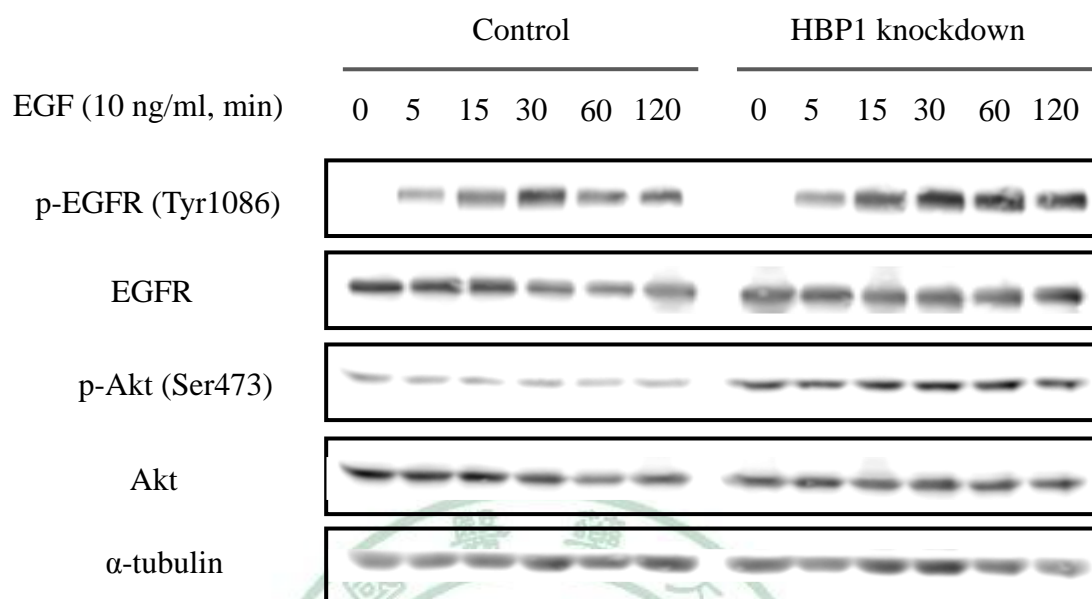


圖 4-17 HBP1 的含量影響 EGF (time course) 誘發的 EGFR 傳遞路徑。給予控制組與 HBP1 knockdown 組細胞 10ng/ml 之 EGF 刺激於 0、5、15、30、60 以及 120 分鐘後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法觀察 EGFR 與下游 Akt 的蛋白表現，此實驗至少重複兩次。

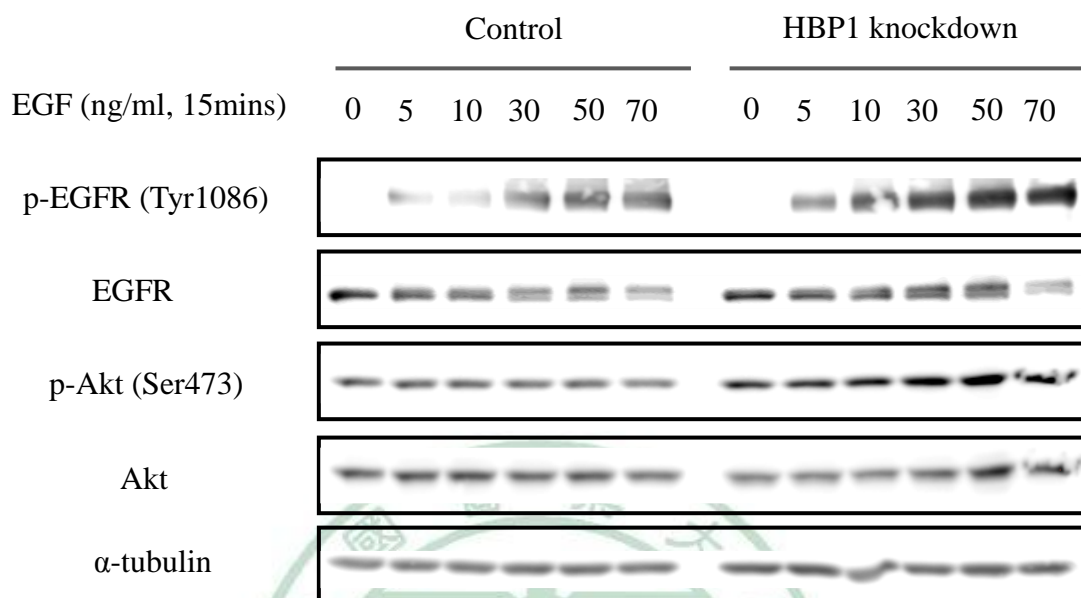


圖 4-18 HBP1 的含量影響 EGF (dose dependent) 誘發的 EGFR 傳遞路徑。控制組與 HBP1 knockdown 組細胞，以 0、5、10、30、50 以及 70 ng/ml 之 EGF 刺激 15 分鐘後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法觀察 EGFR 與下游 Akt 的蛋白表現，此實驗至少重複兩次。

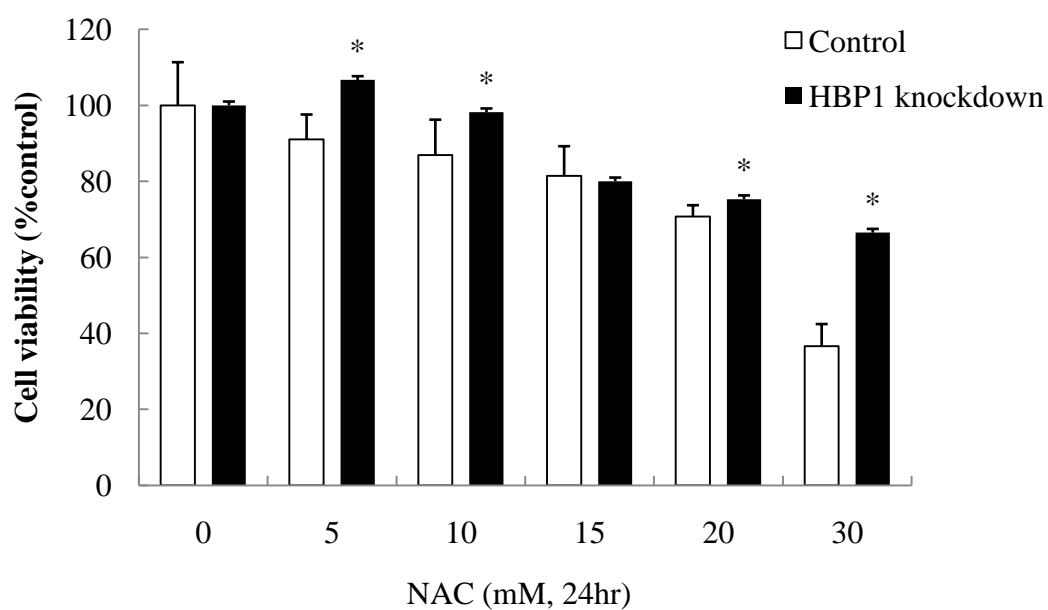


圖 4-19 HBP1 的含量影響 NAC 對 HSC-3 細胞的生長。給予控制組細胞與 HBP1 knockdown 細胞 0-30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以細胞計數方式觀察 HSC-3 細胞之存活率。數據結果以 mean + SD 值表示，\*  $p < 0.05$  v.s. Control，此實驗至少重複兩次。

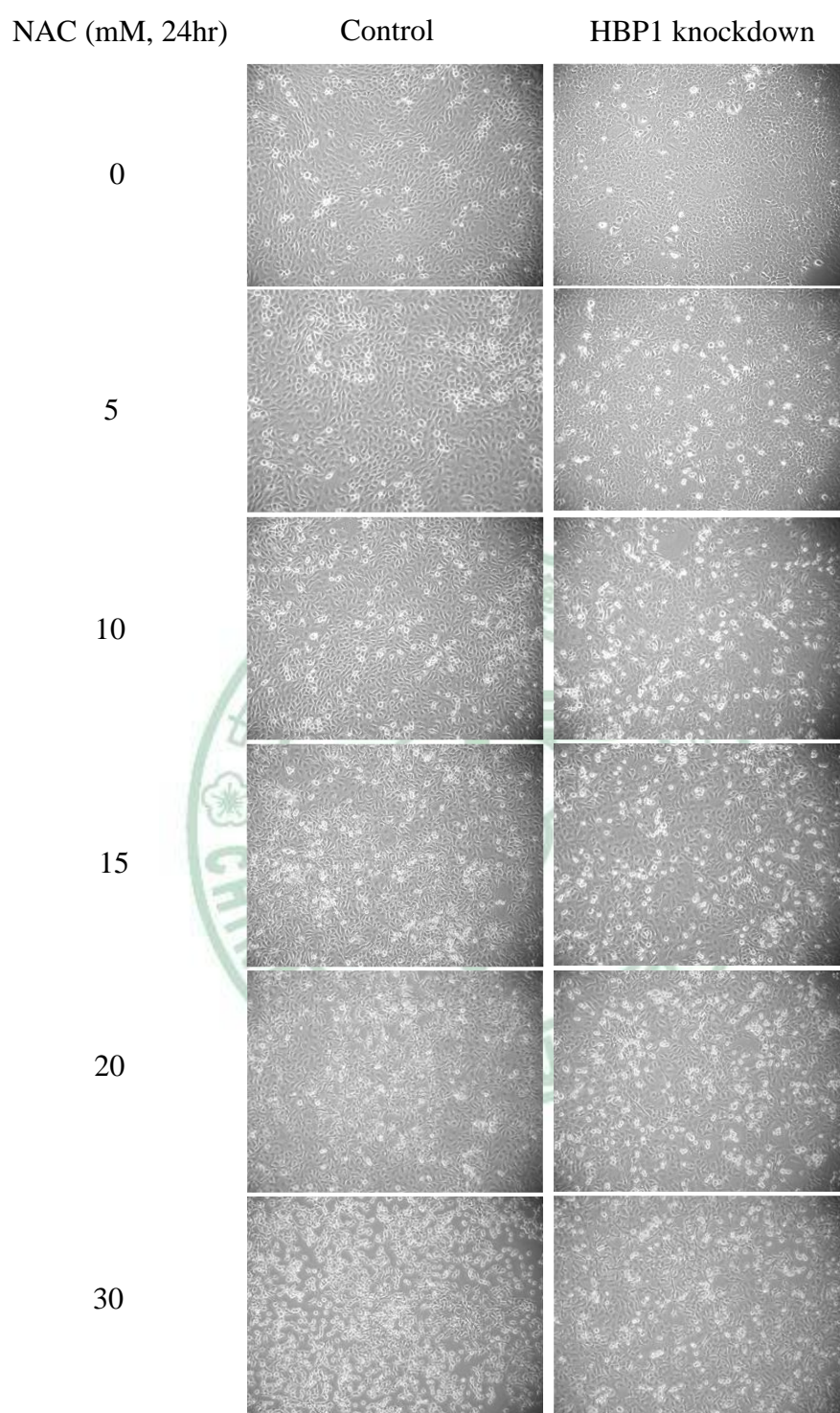


圖 4-20 HBP1 的含量影響 NAC 對 HSC-3 細胞的生長以細胞型態觀察。給予控制組細胞與 HBP1 knockdown 細胞 0-30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，利用倒立式顯微鏡拍攝細胞型態，此實驗至少重複兩次。

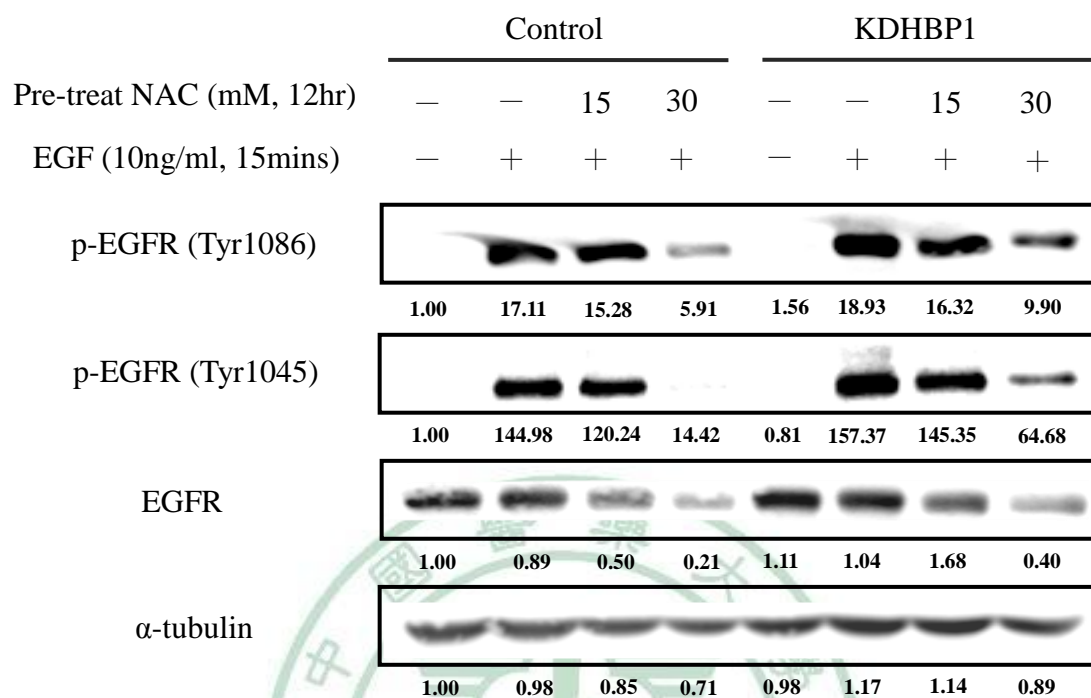


圖 4-21 HBP1 的含量影響 NAC 對 EGFR 訊息傳遞路徑。給予控制組細胞與 HBP1 knockdown 細胞 0、15 及 30 mM 不同濃度之 NAC，24 小時後，再給予 10ng/ml 之 EGF 刺激 15 分鐘後，利用 trypsin 將細胞打下萃取總蛋白以西方點墨法觀察 EGFR 的蛋白表現。

## 第五章、討論

本篇研究主要是探討 NAC 是否可藉由活化 HBP1 來抑制口腔癌 EGFR 的訊息傳遞路徑。實驗結果發現，NAC 可抑制 cyclin D1 的表現而使細胞週期停滯於 G1 期，當我們繼續探討可能的調節路徑時發現，NAC 誘導了 HBP1 的活化且伴隨著對 EGFR 訊息傳遞路徑的抑制，進而抑制 HSC-3 口腔癌細胞生長。而且，當我們利用 RNAi 的技術降低細胞中 HBP1 的表現後，如我們假設的，減緩了 NAC 所造成的細胞生長抑制，也減緩對 EGF 所刺激的 EGFR 訊息傳遞路徑的抑制。這些結果顯示，HBP1 在 NAC 調控 EGFR 和細胞生長的機制上扮演重要的角色。

EGFR 過度表現的情形在非小細胞性肺癌及乳癌等癌症中都被發現<sup>(20-22)</sup>，然而，口腔癌也不例外<sup>(23)</sup>。大約 90%-100% 的口腔癌患者，EGFR 皆有過度的表現的情形，而造成口腔癌預後不佳及存活率低的問題<sup>(24, 25)</sup>。EGFR 的異常活化會促進細胞的異常增生與細胞凋亡的抑制，當 EGFR 活化後，會經由 PI3K/Akt 訊息傳遞路徑而抑制促細胞凋亡因子的活化，例如，FOXO 家族、Bad、caspase 9，以及抑制抗腫瘤因子 GSK 3 和 p21 的活性，這樣的結果會造成細胞生長異常而促使腫瘤的發生<sup>(141)</sup>。目前，雖然已有藥物針對 EGFR 或是其它成員的單株抗體，例如，cetuximab，可以與 EGFR 受體結合，進而競爭抑制配體的作用<sup>(142)</sup>。但是，由於 EGFR 的自體磷酸化位點位於細胞質面，當突變的 EGFR 持續不斷的自發性磷酸化時，這些藥物就無法發揮效用，因此，尋找另一種可由細胞內調控 EGFR 活化的新途徑將可彌補或協同目前用於抑制 EGFR 藥物的功效，進而更有效治療 EGFR 異常表現的相關癌症。

HBP1 為一個轉錄抑制因子，具有調節細胞週期的功能，同時也具有抑制腫瘤發展的潛在功能。在原位性乳癌及急性骨髓性白血病中，轉錄因子 HBP1 有表現過

少或突變的情形發生<sup>(92)</sup>。同時，HBPI 可抑制 wnt 訊息傳遞路徑以及其標的基因 *cyclin D1* 與 *c-myc* 的表現，進而抑制原位性乳癌的細胞週期進行和生長<sup>(93)</sup>，由此可知，HBPI 在癌症的調控上可能是一重要的抑癌基因。本研究中，我們觀察三種不同的口腔癌細胞株，TW206、HSC-3 以及 SCC-4，以細胞特性來說，TW-206 為原位性鼻咽癌，不具有轉移性；HSC-3 為轉移性舌癌，具轉移性，另外，SCC-4 屬於原位性舌癌，無轉移性。在此三中不同口腔癌中測試 HBPI 的表現量。結果發現，HSC-3 細胞株的 HBPI 含量較其它細胞株低，且伴隨著 EGFR 過度表現的情形，而且，細胞培養時，我們也發現此細胞株的生長速度來的較其它細胞株快，然而，HSC-3 本身的細胞特性為三株口腔癌細胞中最具有侵襲及轉移能力的。此外，當 HBPI knockdown 時，也被發現會增加乳癌的侵襲及轉移的能力<sup>(93)</sup>。所以，HBPI 表現低可能與 HSC-3 口腔癌的惡化與轉移性有關。至於，造成 HSC-3 細胞株 HBPI 表現量低的原因，可能與 HBPI 啟動子過度甲基化有關，因為，已有研究顯示抑癌基因啟動子上 CpG 小島的過度甲基化與腫瘤的發生有密切關連，而 HBPI 啟動子的甲基化狀況與其相對癌症發生的關連性研究也正在進行中。

NAC 是 GSH 的前驅物，最早於 1960 年，在呼吸性疾病的治療上，NAC 廣泛地被使用作為化痰藥物<sup>(94)</sup>。1984 年後，NAC 在抗癌、抗腫瘤的效能陸續被研究證實，例如，肺癌、頭頸部癌症、乳腺癌以及肝癌。而 NAC 的抗癌能力，著重在於調節癌細胞內氧化還原平衡狀態<sup>(97)</sup>。此外，NAC 亦能藉由活化 CDK 抑制因子和抑制 *cyclin D1* 表現，進而使細胞週期停滯於 G1 期，抑制了癌細胞的增生<sup>(120)</sup>。本研究也同樣發現，隨著 NAC 濃度增加，HSC-3 口腔癌細胞生長顯著地被抑制，流式細胞儀結果亦證實，NAC 顯著地抑制細胞週期 G1 期的進行，伴隨著細胞凋亡的增加。蛋白表現分析結果，我們也發現 NAC 可抑制 *cyclin D1* 的蛋白表現，然而，對 CDK 抑制因子 p21 則無顯著性的影響。顯示，NAC 誘導 *p21<sup>(WAF/CIP1)</sup>* 基因表現



的現象，可能因細胞株而有所不同。

在正常細胞中，生長因子刺激下，短暫的 ROS 生合成與細胞內生長訊息傳遞的活化有直接關係，同時，也有研究指出，ROS 大量地存在於許多癌症細胞中<sup>(143)</sup>，可能由於 ROS 產生的氧化壓力使 DNA 損害，增加了基因體的不穩定性，導致癌細胞的增生<sup>(144)</sup>。Bae 等學者指出，當細胞受到 EGF 與 PDGF 等生長因子刺激時，細胞內 superoxide 的含量會增加，尤其，這些 ROS 的產生會誘導細胞內一些蛋白質上的酪胺酸磷酸化，例如 EGFR，進而活化 EGFR 訊息傳遞路徑<sup>(121, 145)</sup>。先前有研究指出，NAC 可以藉由降低細胞內 ROS 的產生，而誘導 PTP 的活化，進而抑制 EGF 的雙聚體化以及 EGFR 活化。另外，本實驗室先前研究指出，NAC 顯著地抑制 EGFR 以及下游 Akt 的活化情形，而且 NAC 也可以抑制 NADPH 氧化酶次單位 gp91<sup>phox</sup> 以及 p47<sup>phox</sup> 的轉錄與活化<sup>(124)</sup>。NADPH 氧化酶為細胞內生長因子誘發 superoxide 生成重要之酵素複合體，其次單位 p47<sup>phox</sup> 的啟動子 -1243 至 -1318 處上含有 HBP1 之 DNA 結合序列，且實驗證實，HBP1 可藉由結合至啟動子上而抑制 p47<sup>phox</sup> 的轉錄，使 NADPH 氧化酶無法活化而降低超氧化物的生成<sup>(75)</sup>，進而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑。本研究發現，隨著 NAC 濃度增加，顯著活化 HBP1 的啟動子、增加 HBP1 的基因表現，相對地，有效抑制 EGFR 以及下游 Akt 的活性，並伴隨著細胞內 p47<sup>phox</sup> 的表達降低和 ROS 的產生下降。然而，隨著 NAC 濃度增加，顯著活化蛋白質的表現，但對 HBP1 mRNA 並沒有與蛋白質呈現相對性的結果，這樣的結果顯示，NAC 可能透過轉譯作用的修飾以及增加蛋白的穩定性，而造成此現象的發生，但也需更多實驗來證實這樣地假設。有趣的是，NAC 活化 HBP1 啟動子的發現，顯示 HBP1 可能是一個對氧化還原相對敏感的基因，其啟動子上應該存有特定的氧化還原敏感區，而這個區域的定位，將來可利用 luciferase 報導基因接連不等區域的 HBP1 啟動子試驗得到解答。

另外，我們也意外地發現，NAC 不但抑制其 EGFR 磷酸化，且也抑制 EGFR 的蛋白總量 (如圖 4-9、4-11、4-21)，然而，我們利用 EGFR 專一的 primers 進行 RT-PCR 觀察 NAC 對 EGFR mRNA 的影響。結果顯示，NAC 顯著地抑制 EGFR mRNA 的表現，而抑制 EGFR 的生合成。由此可知，NAC 抑制亦 EGFR 蛋白總量的原因，可能透過抑制 EGFR 的生合成，但是對於 NAC 是否參與 EGFR 蛋白的降解，還需要再進一步的探討。

MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) 家族扮演著第二傳訊者的角色，負責將細胞表面接受到的訊息傳送到細胞核中，家族主要的成員為 ERK、JNK 和 p38 MAPK，主要參與細胞增生、分化以及細胞凋亡的調節<sup>(146)</sup>。JNK 與 p38 MAPK<sup>(147)</sup> 的活化通常與細胞分化和凋亡有關，相對地，ERK 的活化促進細胞存活，然而，近年來，研究陸續發現，ERK 也參與細胞凋亡的調控<sup>(148, 149)</sup>。Su 等學者指出，細胞凋亡的發生可藉由 ERK 活化下游 JNK 及 p38 MAPK 之訊息傳遞路徑，同時，其它研究也指出，ERK 所誘導的細胞凋亡中，不一定會透過活化 JNK 路徑<sup>(150, 151)</sup>。ERK 的參與細胞凋亡調節可以用來解釋我們的實驗結果；NAC 隨著濃度的增加，顯著地誘導 ERK 的活化，加上，流式細胞儀分析結果顯示，細胞凋亡的情形亦隨之明顯，而且，細胞型態也有皺縮的現象。然而，在本篇研究中，我們尚未探討 NAC 誘導細胞凋亡的功能，也許，未來我們可以仔細探究，採用 ERK 專一性抑制劑或 ERK 的活性突變基因模式，證實 ERK 的活化是 NAC 誘發細胞凋亡反應的重要調控者。

當 HBP1 表現降低時，EGF 依賴的 EGFR 與其下游 Akt 的活化增強了，此結果間接證實，HBP1 參與對 EGFR 訊息傳遞的調節。然而，有趣地，我們觀察到，在沒有給予 EGF 刺激的 serum starvation 時，HSC-3 中 Akt 本身的活性就很高。我們推測，HSC-3 的 Akt 可能有突變的情形發生。在許多癌細胞中，已經發現 Akt 有

過度表現的情況(表5-1)，例如，乳癌、頭頸部癌、卵巢以及攝護腺癌等<sup>(152)</sup>。在頭頸部癌症中，EGFR/Ras/PI3K 訊息傳遞路徑最常發生變異；在 5%-90% 的患者中，EGFR 通常過度表現，另外，Ras 蛋白的過度表現與突變也經常被偵測到<sup>(153)</sup>，同時，在 40% 的病患中，也出現 PI3KCA 基因的異常活化，這些變異相信與下游 Akt 的過度活化有關。事實上，在 20%-60% 的頭頸部癌症患者中，也已發現有 Akt 過度活化的情形<sup>(154)</sup>，有趣的是，在組織微陣列分析中發現，無 EGFR 過度表現的頭頸部癌症患者中，有 50% 的病例仍然有 Akt 過度表現的情形<sup>(155)</sup>，顯示，Akt 的過度表現似乎是口腔癌的另一重要課題。我們的結果(圖 4-17 和 4-18)發現，在沒有給予 EGF 的 serum starvation 下，HBP1 knockdown 組出現比對照組較高的磷酸化 Akt 表現，顯示，HBP1 似乎可以不用透過對 EGFR 而直接調控 Akt 的活性，但這樣的假設需更多的實驗證據來支持。Yao 等學者指出，在 K562 前骨髓性白血病細胞中，HBP1 過度表現時會增加 Fas L (Fas ligand) 的表現，且促進細胞凋亡<sup>(156)</sup>。然而，在本研究中指出，HBP1 表現降低時減緩 NAC 對 HSC-3 口腔癌細胞的生長抑制，且在細胞型態上減少細胞死亡的情形發生，或許 HBP1 在細胞凋亡中也扮演著重要的角色，未來我們也可進一步探討，HBP1 與細胞凋亡的機轉。

本篇研究中，利用 RNAi 降解 HBP1 的表現後，減緩 NAC 對 HSC-3 口腔癌細胞的生長抑制，且減緩 NAC 對 EGFR 訊息傳遞路徑的抑制。然而，同先前所述，NAC 降低 EGFR 蛋白質總量的結果，也在 HBP1 knockdown 後有類似的發現，但是，當 HBP1 knockdown 後給予 NAC 再加入 EGF 刺激 15 分鐘時，與控制組相比，HBP1 knockdown 似乎有減緩 NAC 造成 EGFR 蛋白總量以及磷酸化的抑制，雖然如此，NAC 抑制 EGFR 蛋白總量的影響還需更多的實驗證明來支持。不論如何，綜合以上實驗結果證實，NAC 可以透過對細胞內 HBP1 的活化進而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑，藉由這樣的抑制機轉可以大大的改善口腔癌患者 EGFR 過度活化的情

形，抑制口腔癌的惡化，進而提升存活率及改善預後狀況。值得一提的是，本篇將是第一個探討 HBP1 在口腔癌角色的研究，此次的實驗雖然僅限於 HSC-3 細胞株，但 HBP1 本身及參與 NAC 調控 EGFR 和細胞生長的角色相當明確，儘管如此，我們計畫未來將此實驗應用在動物試驗上，將 HBP1 knockdown 的口腔癌細胞株轉植到老鼠，並給予 NAC 以觀察癌細胞生長情形，希望我們的口腔癌實驗結果，隨同 HBP1 在乳癌和白血病的證據，使 HBP1 能早日運用為癌症發生的重要指標和防治的標地基因。

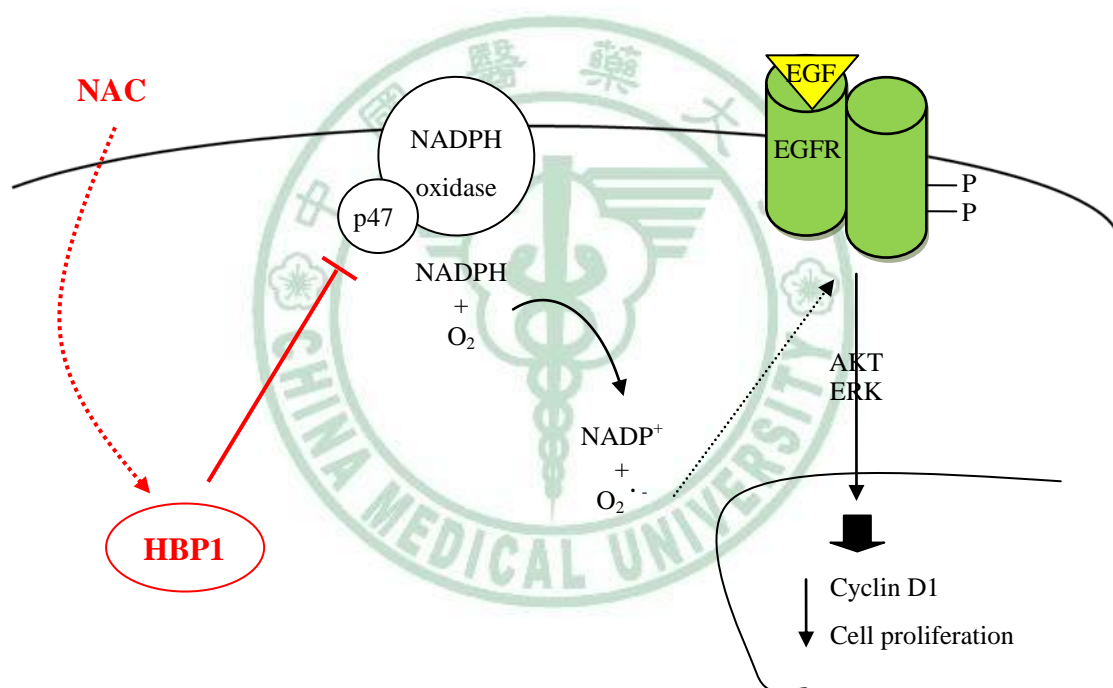
Isoform	Tumor	Alteration
Akt1	breast	Over-activation
	Ovary	Over-activation
	Prostate	Over-activation
	Head and neck	Over-activation
Akt2	Breast (ER+)	Over-activation
	Head and neck	Amplification Over-activation
	Ovary	Amplification Over-activation
	Thyroid	Over-activation
	Pancreas	Over-activation
Akt3	Breast (ER-)	Amplification Over-activation

表 5-1 人類癌症中 Akt 的變異種類

資料來源：(138)

## 第六章、結論

本實驗結果證實，NAC 可透過活化轉錄抑制因子 HBP1，抑制 NADPH 氧化酶次單位 p47<sup>phox</sup> 的表現，也伴隨著抑制細胞內 ROS 產生，進而抑制 EGFR 訊息傳遞路徑，且抑制 cyclin D1 的表現，使細胞週期停滯於 G1 期，達到抑制口腔癌細胞 HSC-3 的生長。



## 參考資料

1. Shiboski CH, Shiboski SC and Silverman SJ. Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; 28: 249-256.
2. Forastiere A, Koch W, Trotti A and Sidransky D. Head and neck cancer. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 1890-1900.
3. Chen YU, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, Lu YC, Li HF and Cheng AJ. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Science* 2008; 99: 1507-1514.
4. Sankaranarayanan R, Duffy SW, Padmakumary G, Day NE, Krishan Nair M. Risk factors for cancer of the buccal and labial mucosa in Kerala, southern India. *Journal of Epidemiol Community Health* 1990; 44: 286-292.
5. Sankaranarayanan R, Duffy SW, Padmakumary G, Day NE, Padmanabhan TK. Tobacco chewing, alcohol and nasal snuff in cancer of the gingiva in Kerala, India. *British Journal of Cancer* 1989; 60: 638-643.
6. Chang KC, Su IJ, Tsai ST, Shieh DB, Jin YT. Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesion in Taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. *Oncology* 2002; 63: 362-369.
7. Nair J, Ohshima H, Croisy AFM and Bartsch HBS. Tobacco-specific and betel nut-specific N-nitroso compounds: occurrence in saliva and urine of betel quid chewers and formation in vitro by nitrosation of betel quid. *Carcinogenesis* 1985; 6: 295-303.

8. Nair U J, Floyd RA, Nair J, Bussachini V, Friesen M and Bartsch H. Formation of reactive oxygen species and of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA in vitro with betel quid ingredients. *Chemico-Biological Interactions* 1987; 63: 157-169.
9. Stich H, and Anderson F. The involvement of reactive oxygen species in oral cancers of betel quid/tobacco chewers. *Mutation Research* 1989; 214: 47-61.
10. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C and Curado MP. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Journal of the National Cancer Institute* 2007; 99: 777-789.
11. Rodu B and Jansson C. Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2004; 15: 252-63.
12. Warnakulasuriya KAAS and Ralhan R. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco – a review. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2007; 36: 63-77.
13. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 733-744.
14. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *International Agency for Research on Cancer* 2004; 83.
15. Subapriya R, Thangavelu A, Mathavan B, Ramachandran CR, Nagini S. Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a

- case-control study. *European Journal of Cancer Prevention* 2007; 16: 251–256.
16. Seitz HK and Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7: 599–612.
17. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F and Bouvard V. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncology* 2007; 8: 292–293
18. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncology* 2009; 45:340–350.
19. Chen YU, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, Lu YC, Li HF and Cheng AJ. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Science* 2008; 99: 1507–1514.
20. Fujino S, Enokibori T and Tezuka N. A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer* 1996; 32: 2070-2074.
21. Chen A, Yang R, Zhang H and Song H. The relationship of EGFR and VEGF mRNA expression in ovarian carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2009; 6: 100-103.
22. Salomon DS, Brandt R, Ciardello F and Normanno N. Epidermal growth Factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1995; 19: 183–232.
23. Santini J, Formento JL and Francoual M. Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 1991; 13: 132–139.



24. Dassonville O, Formento JL and Francoual M. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1993; 11: 1873-1878.
25. Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Semrau R, Stenner M, Drebber U, Wedemeyer I, Hoffmann TK, Guntinas-Lichius O and Klussmann JP. Survivin and epidermal growth factor receptor expression in surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008; 10: 1318-1324.
26. Shin DM, Ro JY and Hong WK. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Research* 1994; 54: 3153-3159.
27. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ and Schuurin E. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Research* 1998; 18: 4793-4800.
28. Kalyankrishna S and Jennifer R. Grandis. Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24: 2666-2672.
29. Bei R, Pompa G and Vitolo D. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; 195: 343-348.
30. Weinberger PM, Yu Z and Haffty BG. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 5684-5691.
31. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annual Review of Biochemistry* 1987; 56: 881-914.

32. Psyrri A, Yu Z and Weinberger PM. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 5856-5862.
33. Bazley LA and Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12: 17–27.
34. Beier I, Dusing R, Vetter H and Schmitz U. Epidermal growth factor stimulates Rac1 and p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2008; 196: 92-97.
35. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N and Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current Opinion Cell Biology* 1999; 11: 184-189.
36. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signaling systems. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999; 20: 408-412.
37. Hynes NE and MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 2009; 21: 1–8.
38. Cabodi S, Moro L, Bergatto E, Boeri Erba E, Di Stefano P, Tarone G and Defilippi P. Integrin regulation of epidermal growth factor (EGFR) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochemical Society Transactions* 2004; 32: 438-442.
39. Blinov ML, Faeder JR, Goldstein B and Hlavacek WS. A network model of early events in epidermal growth factor receptor signaling that accounts for combinatorial

complexity. *BioSystems* 2006; 83:136-151.

40. Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, Kwiatkowski DJ, Lauffenburger DA, Murphy-Ullrich JE and Wells A. EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLC $\gamma$  signaling pathway. *Journal of Cell Science* 1998; 111: 615-24.
41. Xie W, Paterson AJ, Chin E, Nabell LM and Kudlow JE. Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development. *Molecular Endocrinology* 1997; 11: 1766-1781.
42. Chan SK, Hill ME and Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* 2006; 11: 3-11.
43. Sibilina M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M and Holcman M. The epidermal growth factor receptor: From development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007; 75: 770-787.
44. Ciardiello F and Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine* 2008; 358: 1160-1174.
45. Charest A, Wagner J, Jacob S, McGlade CJ, Tremblay ML. Phosphotyrosine-independent binding of SHC to the NPLH sequence of murine protein-tyrosine phosphatase-PEST. evidence for extended phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction domain recognition specificity. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 8424-8429.

46. Downward J, Parker P and Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 1984; 311: 483–485.
47. Hsuan JJ, Totty N and Waterfield MD. Identification of a novel autophosphorylation site (P4) on the epidermal growth factor receptor. *Biochemical Journal* 1989; 262: 659–663.
48. Margolis B, Li N, Koch A, Mohammadi M, Hurwitz DR, Zilberstein A, Ullrich A, Pawson T and Schlessinger J. The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *European Molecular Biology Organization Journal* 1990; 9: 4375-4380.
49. Walton GM, Chen WS, Rosenfeld MG and Gill GN. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 1750–1754.
50. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 8335-8343.
51. Cooper JA and Howell B. The when and how of Src regulation. *Cell* 1993; 73: 1051-1054.
52. Hubbard SR, Wei L, Ellis L and Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 1994; 372: 746-754.
53. Hernandez M, Barrero MJ, Crespo MS and Nieto ML. Lysophosphatidic Acid Inhibits

Ca<sup>2+</sup> Signaling in Response to Epidermal Growth Factor Receptor Stimulation in Human Astrocytoma Cells by a Mechanism Involving Phospholipase C[gamma] and a G[alpha]i Protein. *Journal of Neurochemistry* 2000; 75: 1575-1582.

54. Alessandro R and Kohn EC. Signal transduction targets in invasion. *Clinical & Experimental Metastasis* 2002; 19: 265–273.
55. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S and Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Molecular Cell* 1999; 4: 1029-1040.
56. Ettenberg SA, Keane MM, Nau MM, Frankel M, Wang LM, Pierce JH, Lipkowitz S. cbl-b inhibits epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene* 1999; 18: 1855-1866.
57. Rojas M, Yao S and Lin YZ. Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 27456-27461.
58. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N and Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999; 20: 408-412.
59. Wolf-Yadlin A, Kumar N, Zhang Y, Hautaniemi S, Zaman M, Kim HD, Grantcharova V, Lauffenburger DA and White FM. Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. *Molecular Systems Biology* 2006; 2: 54.

60. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB and Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 217-221.
61. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K and Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-299.
62. Zhao C, Du G, Skowronek K, Frohman MA and Bar-Sagi D. Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to ras activation by sos. *Nature Cell Biology* 2007; 9: 706-712.
63. Harris AL, Nicholson S and Sainsbury R. Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 1992; 11: 181-187.
64. Blanchetot C, Tertoolen LG and den Hertog J. Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress. *European Molecular Biology Organization Journal* 2002; 21: 493-503.
65. Chiarugi P and Cirri P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences* 2003; 28: 509-514.
66. Babior BM. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16: 42-47.
67. Xu D, Rovira II, Finkel T. Oxidants painting the cysteine chapel: Redox regulation of PTPs. *Developmental Cell* 2002; 2: 251-252.

68. den Hertog J, Groen A and van der Wijk T. Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 2005; 434: 11-15.
69. Meng TC, Fukada T and Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular Cell* 2002; 9: 387-399.
70. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion Cell Biology* 2003; 15: 247-254.
71. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der SJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T and Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997; 275: 1649-1652.
72. Joneson T and Bar-Sagi D. A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 17991-17994.
73. Xu Y, Tan LJ, Grachtchouk V, Voorhees JJ and Fisher GJ. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase- $\kappa$  regulates epidermal growth factor receptor function. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 42694-42700.
74. Sauer H, Wartenberg M and Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiology Biochemistry* 2001; 11: 173-186.
75. Berasi SP, Xiu M, Yee AS and Paulson KE. HBP1 repression of the p47 $phox$  gene: Cell cycle regulation via the NADPH oxidase. *Molecular & Cellular Biology* 2004; 24: 3011-3024.
76. Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, Rieger-Christ K, Summerhayes I, Berasi SP, Kim J, Huang CY and Zhang X. The HBP1 transcriptional repressor and the p38

- MAP kinase: Unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 2004; 336: 1-13.
77. Lesage F, Hugnot JP, Amri EZ, Grimaldi P, Barhanin J and Lazdunski M. Expression cloning in the K<sup>+</sup> transport-defective yeast and regulation of HBP1, a new putative HMG transcriptional regulator. *Nucleic Acids Research* 1994; 22: 3685-3688.
78. Chen MD, Zhang L, See X, Koch LH, Yen CM, Tong C, Spiegel JJ, Nguyen L, Servoss KC, Peng A, Pei Y, Marks L, Lowe JR, Hoey S, Jan T, McCombie LY, Wigler LR and Powers HM. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* 2003; 3: 297-302.
79. Shih HH, Tevosian SG and Yee AS. Regulation of Differentiation by HBP1, a Target of the Retinoblastoma Protein. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18: 4732-4743.
80. Tevosian SG, Shih HH, Mendelson KG, Sheppard KA, Paulson KE and Yee AS. HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. *Genes & Development* 1997; 11: 383-396.
81. Classon M, Kennedy BK, Mulloy R and Harlow E. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2000; 97: 10826-10831.
82. Classon M, Salama S, Gorka C, Mulloy R, Braun P and Harlow E. Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2000; 97: 10820-10825.
83. Tevosian SG, Shih H, Mendelson KG, Sheppard KA, Paulson KE, Yee AS. HBP-1: a new transcriptional repressor that is targeted of the retinoblastoma family. *Genes*



*Development* 1997; 11: 383-396.

84. Shih HH, Xiu M, Berasi SP, Sampson EM, Leiter A, Paulson KE and Yee AS. HMG box transcriptional repressor HBP1 maintains a proliferation barrier in differentiated liver tissue. *Molecular & Cellular Biology* 2001; 21: 5723-5732.
85. Sekkali B, Szabat E, Ktistaki E, Tolaini M, Roderick K, Harker N, Patel A, Williams K, Norton T and Kioussis D. Human high mobility group box transcription factor 1 affects thymocyte development and transgene variegation. *The Journal of Immunology* 2005; 175: 5203-5212.
86. Wu H, Wade M, Krall L, Grisham J, Xiong Y, Van Dyke T. Targeted in vivo expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 halts hepatocyte cell cycle progression, postnatal liver development, and regeneration. *Genes & Development* 1996; 20: 245-260.
87. Kim GY, Mercer SE, Ewton DZ, Yan Z, Jin K and Friedman E. The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 29792-29802.
88. Xiu M, Sampson E, Huang CY, Davis RJ, Paulson KE and Yee AS. The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 MAP kinase pathway in cell cycle regulation. *Molecular & Cellular Biology* 2003; 23: 8890-8901.
89. Bienz M and Clevers H. Linking colorectal cancer to wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320.
90. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* 2000; 14: 1837-1851.
91. Kim J, Zhang X, Rieger-Christ KM, Summerhayes IC, Wazer DE, Paulson KE and

- Yee AS. Suppression of wnt signaling by the green tea compound (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in invasive breast cancer cells. requirement of the transcriptional repressor HBP1. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 10865-10875.
92. Lin KM, Zhao WG, Bhatnagar J, Zhao WD, Lu JP, Simko S, Schueneman A and Austin GE. Cloning and expression of human HBP1, a high mobility group protein that enhances myeloperoxidase (MPO) promoter activity. *Leukemia* 2001; 15: 601-612.
93. Paulson KE, Rieger-Christ K, McDevitt MA, Kuperwasser C, Kim J, Unanue VE, Zhang X, Hu M, Ruthazer R, Berasi SP, Huang CY, Giri D, Kaufman S, Dugan JM, Blum J, Netto G, Wazer DE, Summerhayes IC and Yee AS. Alterations of the HBP1 Transcriptional Repressor Are Associated with Invasive Breast Cancer. *Cancer Research* 2007; 67: 6136-6145.
94. Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC and Tramer MR. The effect of oral *N*-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *European Respiratory Journal* 2000; 16: 253-262.
95. De Flora S, Grassi C and Carati L. Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term *N*-acetylcysteine treatment. *European Respiratory Journal* 1997; 10: 1535-1541.
96. De Flora S, Izzotti A, D'Agotini F and Balansky RM. Mechanisms of *N*-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001; 22: 999-1013.
97. De Flora S, Bennicelli C, Serra D, Izzotti A and Cesarone CF. Role of glutathione and

*N*-acetylcysteine as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Absorption and Utilization of Amino Acids* 1989; 3: 19-53.

98. De Vries N and De Flora S. *N*-Acetyl-L-cysteine. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 17: 270-278.

99. De Flora S, Balansky R, Bennicelli C, Camoirano A, D'Agostini F, Izzotti A, Cesarone CF, Ioannides C and Lewis DFV. Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: role in primary prevention. *Basic Life Sciences* 1993; 61: 1-16.

100. De Flora S, Cesarone CF, Balansky RM, Albini A, D'Agostini F, Bennicelli C, Bagnasco M, Camoirano A, Scatolini L, Rovida A and Izzotti A. Chemopreventive properties and mechanisms of *N*-acetylcysteine. The experimental background. *Journal of Cellular Biochemistry* 1995; 58: 33-41.

101. D'Agostini F, Balansky RM, Camoirano A and De Flora S. Interactions between *N*-acetylcysteine and ascorbic acid in modulating mutagenesis and carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 2000; 88: 702-707.

102. Chinery R, Beauchamp RD, Shyr Y, Kirkland SC, Coffey RJ and Morrow JD. Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Research* 1998; 58: 2323-2327.

103. Yan Z, Subbaramaiah K, Camilli T, Zhang F, Tanabe T, McCaffrey TA, Dannenberg AJ and Weksler BB. Benzo(a) pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 18: 4949-4955.

104. Davreux CJ, Soric I, Nathens AB, Watson RW, McGilvray ID, Suntres ZE, Shek PN and Rotstein OD. N-Acetylcysteine attenuates acute lung injury in the rat. *Shock* 1997; 8: 432-438.
105. Miquel J, Ferrandiz ML, De Juan E, Sevilla I and Martinez M. N-Acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. *The European Journal of Pharmacology* 1995; 292: 333-335.
106. Palmero M, Bellot JL, Castillo M, Garcia-Cabanes C, Miquel J and Orts A. An in vitro model of ischemic-like stress in retinal pigmented epithelium cells: protective effects of antioxidants. *Mechanisms of Ageing and Development* 2000; 114: 185-190.
107. Balansky R, Izzotti A, Scatolini L, D'Agostini F and De Flora S. Induction by carcinogens and chemoprevention by N-acetylcysteine of adducts to mitochondrial DNA in rat organs. *Cancer Research* 1996; 56: 1642-1647.
108. Banzet N, Francois D and Polla BS. Tobacco smoke induces mitochondrial depolarization along with cell death: effects of antioxidants. *Redox Report* 1999; 4: 229-236.
109. Banaclocha MM, Hernandez AI, Martinez N and Ferrandiz ML. N-Acetylcysteine protects against age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain Research* 1997; 762: 256-258.
110. De Flora S, Bennicelli C, Rovida A, Scatolini L and Camoirano A. Inhibition of the 'spontaneous' mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104. *Mutation Research* 1994; 307: 157-167.
111. Lertratanangkoon K, Orkiszewski RS and Scimeca JM. Methyl- donors deficiency

- due to chemically induced glutathione depletion. *Cancer Research* 1996; 56: 995-1005.
112. Cesarone CF, Menegazzi M, Scarabelli L, Scovassi AI, Giannoni P, Izzo R, Suzuki H, Izzotti A, Orunesu M and Bertazzoni U. Protection of molecular enzymes by aminosulfhydryls. *Anticarcinogenesis and Radiation Protection* 1991; 2: 261-268.
113. Steele VE, Kelloff GJ, Wilkinson BP and Arnold JT. Inhibition of transformation in cultured rat tracheal epithelial cells by potential chemopreventive agents. *Cancer Research* 1990; 50: 2068-2074.
114. Liu M, Pelling JC, Ju J, Chu E and Brash DE. Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. *Cancer Research* 1998; 58: 1723-1729.
115. Nargi JL, Ratan RR and Griffin DE. p53-independent inhibition of proliferation and p21(WAF1/Cip1)-modulated induction of cell death by the antioxidants N-acetylcysteine and vitamin E. *Neoplasia* 1999; 1: 544-556.
116. Janssen YM, Heintz NH and Mosman BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogene expression by asbestos is ameliorated by N-acetyl-L-cysteine in mesothelial cells. *Cancer Research* 1995; 55: 2085-2089.
117. Kamata H, Tanaka C, Yagisawa H, Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E and Hirata H. Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 33018-33025.
118. Ho E, Chen G and Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF $\kappa$ B

- activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999; 13: 1845-1854.
119. Li WQ, Dehnade F and Zafarullah M. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 275: 789-794.
120. Liu M, Wikonkal NM and Brash D. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G1 prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1869-1872.
121. Huang TS, Duyster J and Wang JY. Biological response to phorbol esters determined by alternative G1 pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1995; 92: 4793-4797.
122. Kurata S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 23413–23416.
123. Kamata H, Shibukawa Y, Oka SI and Hirata H. Epidermal growth factor receptor is modulated by redox through multiple mechanisms. Effects of reduction and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267: 1933-1944.
124. Zhang L, Fujii S, Igarashi J and Kosaka H. Effects of thiol antioxidant reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hypertensive dahl salt-sensitive rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 37: 1813–1820.
125. Hunter CP. Gene silencing: Shrinking the black box of RNAi. *Current Biology* 2000; 24; 10: 137-140.
126. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation.

*Nature Reviews Genetics* 2004; 5: 522-531.

127. Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes & Development* 1999; 13: 139-141.
128. Muraoka K, Okumura K, Kitajo H, Kato H and Arisue M. Chemokine Receptor Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma : Correlation with Growth Factor- and Cytokine mediated Cell Migration *in vitro*. *Oral Science International* 2007; 4: 73-85.
129. Rodrigo KA, Rawal Y, Renner RJ, Schwartz SJ, Tian Q, Larsen PE and Mallery SR. Suppression of the tumorigenic phenotype in human oral squamous cell carcinoma cells by an ethanol extract derived from freeze-dried black raspberries. *Nutrition Cancer Journal* 2006 ; 54(1): 58–68.
130. Matsuda JJ, Filali MS, Volk KA, Collins MM, Moreland JG and Lamb FS. Overexpression of CLC-3 in HEK293T cells yields novel currents that are pH dependent. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2008; 294: 251-262.
131. Xiao D, Zeng Y, Choi S, Lew KL, Nelson JB and Singh SV. Caspase-dependent apoptosis induction by phenethyl isothiocyanate, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent, is mediated by Bak and Bax. *Clinical cancer research* 2005; 11: 2670-2679.
132. Lee YT, Don MJ, Hung PS, Shen YC, Lo YS, Chang KW, Chen CF and Ho LK. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer letters* 2005; 223: 19-25.
133. Chang MC, Chan CP, Wang YJ, Lee PH, Chen LI, Tsai YL, Lin BR, Wang YL and Jeng JH. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is

associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicology and applied pharmacology* 2007; 218: 143-151.

134. Ding Y, He LR, Cao KJ, Lu Y, Gu LQ and Fu LW. Apoptosis of human carcinoma of mouth floor KB cells and multidrug resistant KBv200 cells induced by azide methyl anthraquinone derivative. *Acta pharmaceutica Sinica* 2005; 40: 22-26.
135. Pan C, Yan M, Yao J, Xu J, Long Z, Huang H and Liu Q. Aurora kinase small molecule inhibitor destroys mitotic spindle, suppresses cell growth, and induces apoptosis in oral squamous cancer cells. *Oral oncology* 2008; 44: 639-645.
136. Chang GN, Chen ES and Ho KC. Molecular Cloning and Expression of a Phase I Flagellin Gene from *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Taiwania* 2007; 52: 201-209.
137. Gotoh C. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 354: 591-597.
138. Olsnes C, Stavang H, Olofsson J and Aarstad HJ. TNF-alpha is secreted by monocytes in transit to become macrophages, but not by peripheral blood monocytes, following OK-432 (lyophilized *S. pyogenes*) stimulation. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007; 66: 684-693.
139. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss A A and Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 1997; 22: 130-138.
140. Hollenberg AN. Functional antagonism between CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  and Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  on the Leptin Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 5283-5290.



141. Buffin-Meyer B, Crassous PA, Delage C, Denis C, Schaak S and Paris H. EGF receptor transactivation and PI3-kinase mediate stimulation of ERK by alpha(2A)-adrenoreceptor in intestinal epithelial cells: A role in wound healing. *European Journal of Pharmacology* 2007; 574: 85-93.
142. Ciardiello F and Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine* 2008; 358: 1160-1174.
143. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine* 1995; 18: 775-794.
144. Jackson AL and Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research* 2001; 477: 7-21.
145. Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A and Rhee SG. Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 10527-10531.
146. Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G and Saile B. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. *Liver International* 2008; 28: 546-557.
147. Tuyt LM, Dokter WH and Birkenkamp K. Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 4893-902.
148. Iles KE, Dickinson DA and Wigley AF. HNE increases HO-1 through activation of the ERK pathway in pulmonary epithelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*

2005; 39: 355-64.

149. Ruffels J, Griffin M and Dickenson JM. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *European Journal of Pharmacology* 2004; 483: 63-173.
150. Su JL, Lin MT and Hong CC. Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signalling pathway in human leukaemia HL-60 cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1-10.
151. Soh Y, Jeong KS and Lee IJ. Selective activation of the c-Jun Nterminal protein kinase pathway during 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12. *Cellular and Molecular Pharmacology* 2000; 58: 535-41.
152. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol* 2008; 23: 1269-1278.
153. McDonald JS, Jones H, Pavelic ZP, Pavelic LJ, Stambrook PJ and Gluckman JL. Immunohistochemical detection of the H-ras, K-ras, and N-ras oncogenes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 1994; 23: 342-346.
154. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS and Gonzalez MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 2005; 114: 242-248.
155. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN and Papadimitrakopoulou VA. Akt activation correlates with adverse

outcome in tongue cancer. *Cancer* 2005; 104: 2430-2436.

156. Yao CJ, Works K, Romagnoli PA and Austin GE. Effects of overexpression of HBP1 upon growth and differentiation of leukemic myeloid cells. *Leukemia* 2005; 19: 1958-1968.



## 謝誌

回顧過去兩年的研究生活，真是充實的一段日子，雖然辛苦但一路走來並沒有後悔，反而覺得成長很多。沒實驗基礎的我，在老師及學長姐的指導下，讓我在學習的過程中很快的進入狀況，在許多失敗過程中，記取教訓，找尋方法解決問題，也是我在兩年裡慢慢摸索的心得。當然也少不了貴人的指點，及家人同學們的鼓勵，讓我順利地兩年完成研究所的學位。

首先，要感謝我的父母及兄弟姐妹，對我的包容及關懷，特別是我姐姐—筱筑，沒有她我可能會搞砸我的生活。另外，感謝黃俊瑩老師，當老師的學生，是一種福氣，老師給我的空間及對我的包容，我都感恩在心。也很幸運的能在老師的帶領下，到國外開開眼界，我想這兩年就不虛此行了。感謝小孟學姐在國外時的照顧，也教我學習如何獨立；前毅學弟的幫忙，也讓我能在實驗中喘口氣；亞帆同學的理智分析及一針見血的個性，也讓我成長不少；珮璇學妹，在我們之中扮演著重要的調庭者，真是辛苦了；感謝研二的同學們，依婷、康妮、玉玲、彬鈞、永麟、寬穗、金旺、欣茹、孟菡學妹，沒有他們實驗上的指導與協助，我的實驗應該無法如期完成；殷家的筱菁與泓道，謝謝你們帶給我兩年來的歡笑；感謝聖爸學長，在研一時的幫助，我永遠銘記在心；影響我研究生生活最大的冠瑜，感謝你對我的付出及等待；最後，感謝好夥伴豐姿，兩年裡我們曾快樂過、爭執過、歡笑過也傷心過，謝謝您兩年對我的容忍以及協助我大大小小的事情，沒有你，兩年的日子是枯燥乏味的。

另外還要感謝口試委員，陳玉華與楊新玲老師，謝謝您繁忙中撥空閱讀論文，也在口試中提出論文不足的地方，第一次寫論文的我，確實很多地方沒有注意，不過感謝口試委員的提醒，讓我的論文能更完整的呈現。

若沒有大家的幫忙、大家的提點、大家的扶持、及沒有大家的歡笑淚水，我會如兩年前的今日一樣，沒有成長，沒有蛻變，謝謝大家給了我美好的回憶，謝謝！