

中國醫藥大學  
醫學檢驗生物技術學系碩士班  
碩士學位論文

WISP-1 在人類口腔鱗狀細胞癌之爬行中所扮演的角色

**The role of WISP-1 in cell motility in human oral squamous cell  
carcinoma cells**

指導教授：莊淨媛副教授

**Jing-Yuan Chuang, Ph.D**

共同指導教授：湯智昕教授

**Chih-Hsin Tang, Ph.D**

研究生：張安辰

**An-Chen Chang**

中 華 民 國 一 百 零 二 年 七 月

# 目錄

|   |    |
|---|----|
| 目錄.....   | 1  |
| 附圖目錄.....   | 3  |
| 附表目錄.....   | 4  |
| 中文摘要.....   | 5  |
| 英文摘要.....   | 6  |
| 第一章 文獻討論.....   | 8  |
| 第一節 人類口腔鱗狀細胞癌(Human oral squamous cell carcinoma) ..... | 8  |
| 第二節 轉移(Metastasis).....                                 | 12 |
| 第三節 細胞黏附分子(Cell adhesion molecule;CAM).....             | 15 |
| 第四節 CCN family.....                                     | 22 |
| 第二章 研究動機.....   | 26 |
| 第一節 研究背景.....   | 26 |
| 第二節 研究目的.....   | 27 |
| 第三章 材料與方法.....  | 28 |
| 第一節 實驗設備與材料.....  | 28 |
| 第二節 實驗方法.....   | 33 |
| 第四章 結果.....   | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 第一節 WISP-1 促進人類口腔鱗狀細胞癌的爬行.....                             | 42 |
| 第二節 ICAM-1 參與在 WISP-1 調節人類口腔鱗狀細胞癌的爬<br>行中.....             | 42 |
| 第三節 ASK1 參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的<br>表現.....          | 44 |
| 第四節 JNK 和 p38 訊息路徑參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行<br>及 ICAM-1 的表現..... | 45 |
| 第五節 AP-1 參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表<br>現.....          | 45 |
| 第六節 WISP-1 和 ICAM-1 的表現跟口腔癌病患的腫瘤分期的<br>相關性.....            | 47 |
| 第五章 結論.....  | 48 |
| 第六章 討論.....  | 49 |
| 第七章 參考文獻.....  | 54 |
| 第八章 圖表與圖表說明.....   | 59 |

## 附圖目錄

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1 This is oral cancer that affects men more than women. . . . .   | 10 |
| Fig. 2 The process of oral cancer growth ,migration and metastasis. . . .  | 11 |
| Fig. 3 Metastasis is a complex, multistep process. . . . .   | 14 |
| Fig. 4 Major families of cell-adhesion molecules (CAMs). . . . .   | 17 |
| Fig. 5 Molecular interactions that mediate immune cell adhesion to<br>airway epithelial cells, transepithelial cell migration, and retention<br>at the airway lumen. . . . . | 18 |
| Fig. 6 The integrin superfamily. . . . .   | 20 |
| Fig. 7 Recombinant CCN constructs. . . . .   | 24 |
| Fig. 8 Molecular interactions through modular domains of CCN<br>protein. . . . .   | 25 |

## 附表目錄

Table. 1 Integrins in cancer progression. . . . . 21



## 中文摘要

人類口腔鱗狀細胞癌(Oral squamous cell carcinoma ; OSCC)具有高度侵襲及惡性轉移的能力。WISP-1(WNT1-inducible signaling pathway protein 1)是 CCN 家族(Cyr61, CTGF, Nov)中的一員，屬於細胞外基質蛋白，然而 WISP-1 對人類口腔鱗狀細胞癌的影響尚未有文獻報導，我們發現 WISP-1 促進人類口腔鱗狀細胞癌爬行及細胞黏附因子(Intercellular adhesion molecule-1 ; ICAM-1)的表現，前處理 integrin  $\alpha v \beta 3$  單株抗體能顯著地抑制 WISP-1 誘導細胞爬行及 ICAM-1 的表現；另一方面，利用 ASK1(Thioredoxin)、JNK(SP600125)和 p38(SB203580)的抑制劑可抑制 WISP-1 增加細胞爬行的能力及 ICAM-1 的表現，且細胞經由 WISP-1 的刺激下，ASK1、JNK 和 p38 的磷酸化表現增加；此外，WISP-1 亦可促進 AP-1 活化，利用 integrin  $\alpha v \beta 3$  單株抗體和 ASK1、JNK 及 p38 的抑制劑能降低 WISP-1 調節 AP-1 活化，而且我們也發現 WISP-1 和 ICAM-1 的表現跟口腔鱗狀上皮細胞癌的腫瘤分期有相關性。綜合以上結果，WISP-1 促進 ICAM-1 表現是經由 integrin  $\alpha v \beta 3$  及 ASK1、JNK/p38 和 AP-1 的訊息傳導，進而造成人類口腔鱗狀細胞癌的爬行。

## 英文摘要

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has a tendency to migrate and metastasize. WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP-1) is a cysteine-rich protein that belongs to the Cyr61, CTGF, Nov (CCN) family of matrix cellular proteins. The effect of WISP-1 on human OSCC cells, however, is unknown. Here, we showed that WISP-1 increased cell migration and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in OSCC cells. Pretreatment of cells with integrin  $\alpha v \beta 3$  monoclonal antibody (mAb) significantly abolished WISP-1-induced cell migration and ICAM-1 expression. On the other hand, WISP-1-mediated cell motility and ICAM-1 upregulation were attenuated by apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) inhibitor (Thioredoxin), c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) inhibitor (SP600125), and p38 inhibitor (SB203580). The stimulation of cells with WISP-1 increased ASK1, JNK, and p38 phosphorylation. Furthermore, WISP-1 also enhanced activator protein 1 (AP-1) activation, and the integrin  $\alpha v \beta 3$  mAb, and ASK1, JNK, and p38 inhibitors reduced WISP-1-mediated AP-1 activation. Moreover, WISP-1 and ICAM-1 expression correlated with the tumor stage of patients with OSCC. Taken together, our results indicate that WISP-1

enhances the migration of OSCC cells by increasing ICAM-1 expression through the  $\alpha v \beta 3$  integrin receptor and the ASK1, JNK/p38, and AP-1 signal transduction pathways.





## 第一章 文獻討論

### 第一節 人類口腔鱗狀細胞癌 (Human oral squamous cell carcinoma)

目前口腔癌在世界上的發生率不斷地增加，屬於全球癌症盛行率排名第六的癌症，約佔所有癌症的 4% (Furness., etal. 2001)，然而在台灣，依據衛生署的統計，口腔癌在國人十大癌症死因中第五名，且為國人頭頸部癌症的第一名。

口腔癌為口腔內組織細胞惡化所形成的腫瘤，與口腔長期受到刺激而產生細胞變性有密切的關係，其中以嚼食檳榔為最主要的原因，其它如：吸菸、喝酒、梅毒、口腔衛生不良、長期食用過熱、太辣等刺激性的食物、製作不當的假牙與牙套... 都是造成口腔癌的可能原因，國內許多醫學中心的研究統計也發現，高達八至九成以上的口腔癌患者有嚼食檳榔的習慣。在國際上，歐美及日本等地區，口腔癌的發生率都很低，他們的致癌危險因子，主要是菸與酒；相對的，在檳榔文化盛行的地區，如台灣、印度、斯里蘭卡、中國湖南、東南亞地區等，口腔癌的發生率都居高不下(Fig. 1)。

口腔癌病理種類分為：鱗狀上皮細胞癌 (Squamous cell carcinoma ; SCC)、疣狀癌 (Verrucous carcinoma)、腺樣囊癌 (Adenoid cystic carcinoma)、黏液表皮樣癌 (mucoepidermoid carcinoma)，90% 以

上為鱗狀上皮細胞癌，且預後差(Lee., et al. 2002)，另外有些全身性癌症亦有可能轉移至口腔，包括消化道癌症、乳癌、肺癌、肝癌、攝護腺癌、多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤等。

目前口腔癌的分期是依據原發腫瘤大小(T)、頸部淋巴結轉移之有無(N)、是否有遠隔轉移(M)的 TNM 系統來決定，所以可區分為五期(Fig. 2)：

第零期：癌化細胞生長於口腔黏膜上皮內。

第 I 期：腫瘤最大直徑小於或等於 2 公分，無頸部淋巴結轉移。

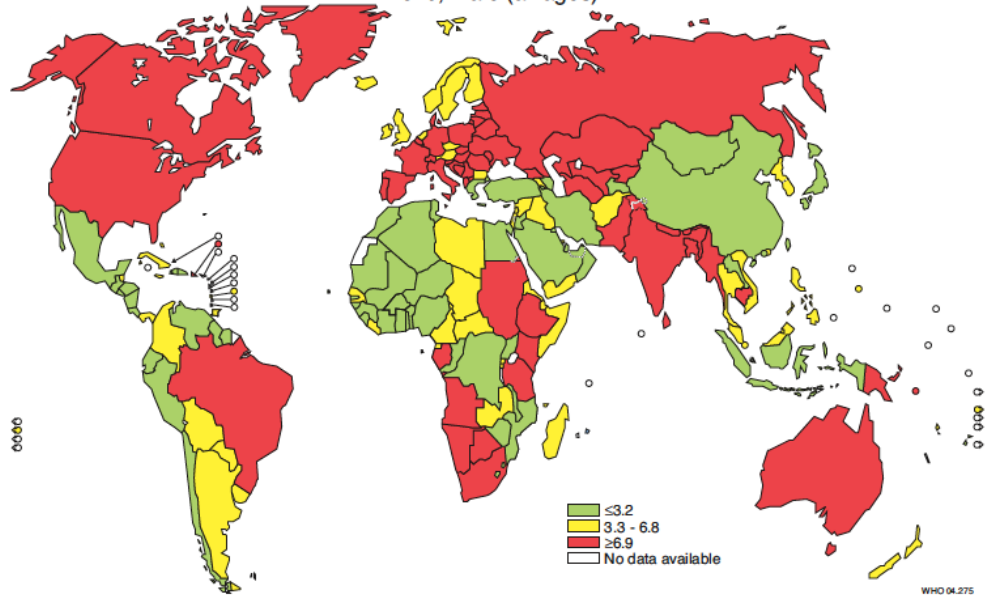
第 II 期：腫瘤最大直徑於 2 至 4 公分，無頸部淋巴結轉移。

第 III 期：腫瘤最大直徑大於 4 公分，已侵入鄰近組織且轉移至淋巴結，可觸摸到頸部腫大淋巴結。

第 IV 期：腫瘤除了侵犯鄰近組織和轉移至淋巴結外，已有轉移至遠端器官。

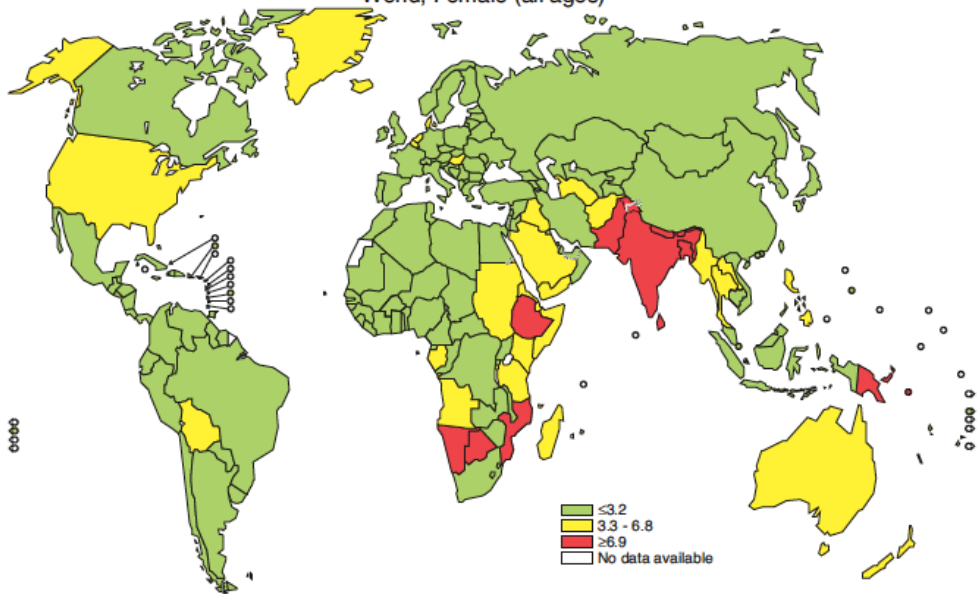
口腔癌的治療大多以手術切除為主，再以放射線治療和化學藥物治療輔助，多數口腔癌是因多重原因所引發，且口腔癌有區域癌化的特性，導致口腔內膜有不同程度的病變，所以預後情況普遍不佳(Lo., et al. 2003)；所以早期發現及治療是相當重要的，希望藉由科學研究進一步了解口腔癌的分子機轉，尋找降低口腔癌發生及轉移的原因，並發展成有效地輔助療法。

**Incidence of oral cavity cancer (ICD-10: C00-C08)**  
 Age-standardized rate (ASR) per 100 000 world standard population  
 World, Male (all ages)



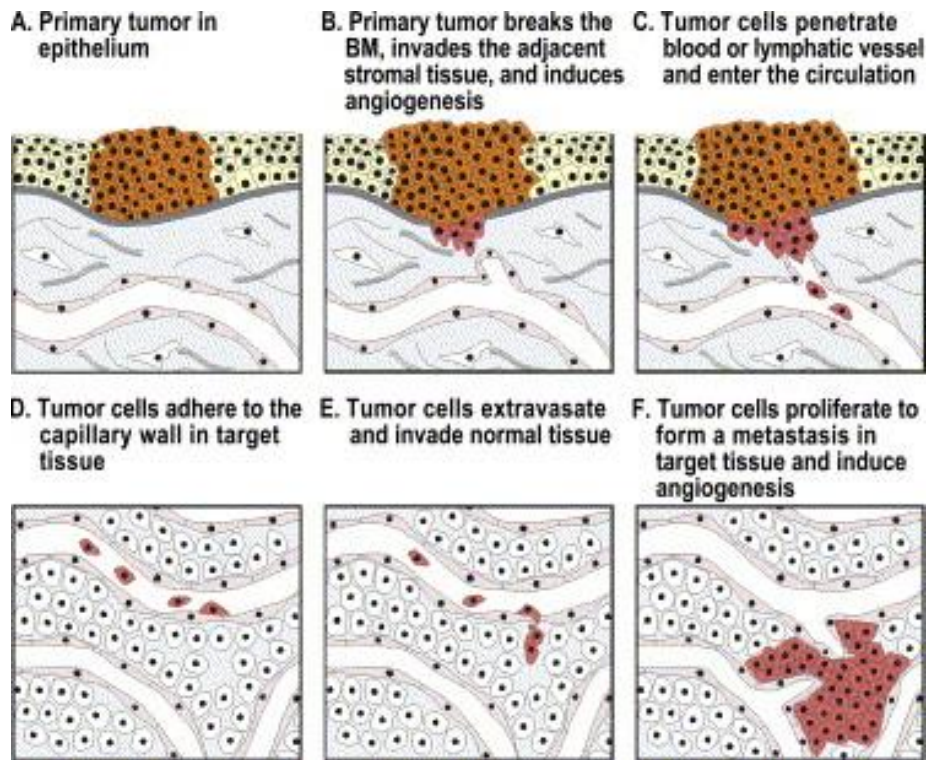
The designations employed and the presentation of material on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dashed lines represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement  
 Source: GLOBOCAN 2002 International Agency for Research on Cancer <http://www.depd.b.iarc.fr/globocan/globocan2002.htm>

**Incidence of oral cavity cancer (ICD-10: C00-C08)**  
 Age-standardized rate (ASR) per 100 000 world standard population  
 World, Female (all ages)



The designations employed and the presentation of material on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dashed lines represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement  
 Source: GLOBOCAN 2002 International Agency for Research on Cancer <http://www.depd.b.iarc.fr/globocan/globocan2002.htm>

**Fig. 1 This is oral cancer that affects men more than women.**  
 The top map shows the incidence of oral cancer in males worldwide while the bottom map shows female oral cancer incidence. (Oral cancer foundation)



**Fig. 2 The process of oral cancer growth ,migration and metastasis. BM, basement membrane. (Risto Ala-aho, 2005)**

## 第二節 轉移 (Metastasis)

腫瘤最初是由一個正常的細胞變成的，這個變化過的細胞，在生長及分化的過程中，不受到個體內一般控制系統的影響，因此不正常分裂、增殖而形成一塊良性或惡性的腫瘤；惡性腫瘤在已開發國家中，一直是導致人類死亡的死因之一，惡性腫瘤之所以可怕，不在於腫瘤組織會不受控制地增殖，而在於它除了會在原發病灶附近造成破壞之外，更會產生遠端轉移，所以多數癌症患者並不是在癌症發生初期就死亡，通常在惡性腫瘤轉移到其他器官後，才因許多併發症而死亡。

轉移是指腫瘤細胞從原始發生的部位經由侵入循環系統，轉移到身體其他部位繼續生長的過程，也稱做惡性轉移，因為通常良性腫瘤並不會產生遠端轉移，也因為癌細胞轉移到身體各部位，治療上變的更為困難，幾乎不可能使用外科手術切除根治，多半只能用大範圍的放射治療或化療來抑制已轉移的癌細胞繼續擴散生長。事實上癌症病患的死亡常是在發生遠端轉移之後，由於癌細胞轉移到身體各重要器官持續生長，影響身體正常功能而導致死亡，所以一般遠端轉移的發生與否，常被視作癌症患者病程的嚴重程度以及治療效果的指標。

惡性腫瘤轉移過程為：

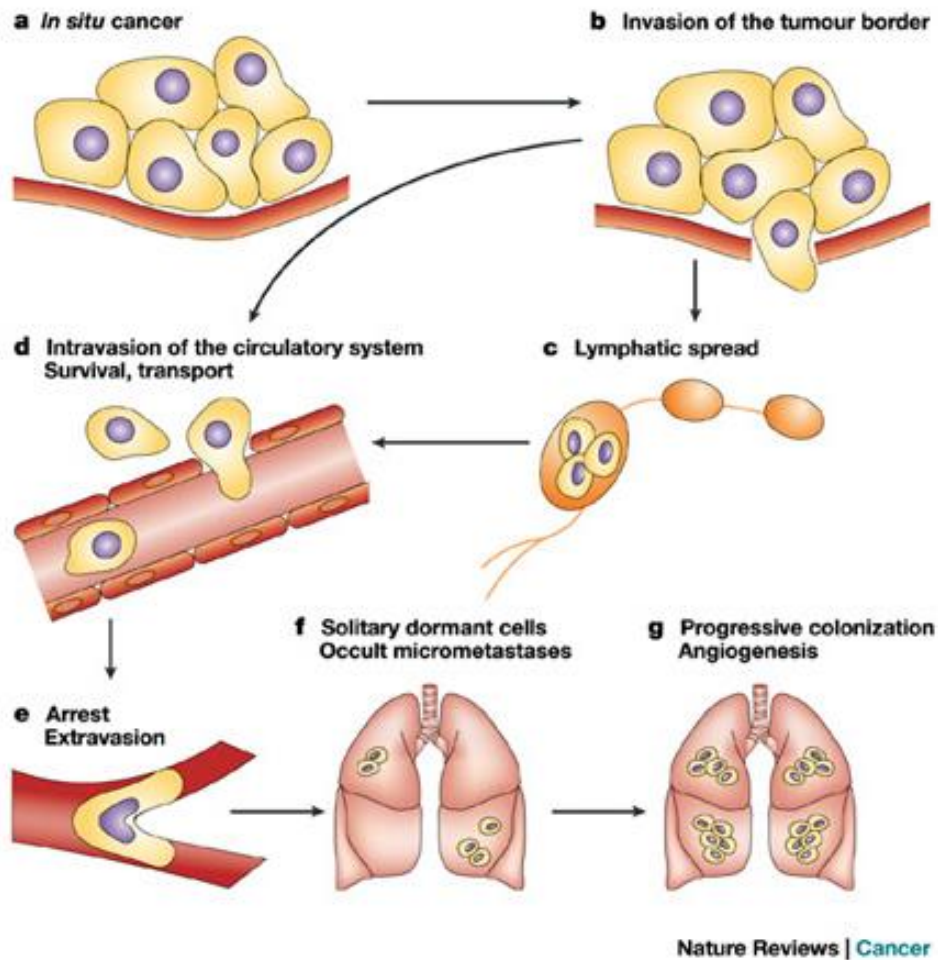
(一)腫瘤細胞不正常地增生。

(二)癌細胞增生後導致腫瘤生長空間不足，且養分及氧氣不夠，使得

腫瘤細胞分泌酵素來分解細胞外基質，藉此入侵鄰近組織，且進行血管新生以便獲得更多養分。

(三)癌細胞進入血管和淋巴循環系統，並躲過人體免疫系統攻擊，順利轉移至遠端器官(Fig. 3)。

惡性腫瘤生長及轉移過程需經多重步驟，與正常組織相比，大多數腫瘤均為生長速度較快的組織，需要很多血液來供應癌細胞生長所需的養分及氧氣，因此許多腫瘤會分泌出各種不同的血管新生因子，包括：血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor；VEGF)、纖維母細胞生長因子(Epidermal growth factor；EGF)等(Darash-Yahana, et al. 2004; Miralerm., et al. 2001)，來促進血管內皮細胞的增殖並往腫瘤移動，使得血管長到腫瘤裡面去，有助於惡性腫瘤生長之外，也有助其產生轉移，因此惡性腫瘤在繁複的生長過程中需要多種細胞激素、生長因子和酵素的作用，而這些細胞激素目前也被用為部分癌症的分子標靶治療(Barrett-Lee., et al. 2005)，因此了解參與轉移過程中的細胞激素、生長因子和酵素是重要的，且具有臨床意義。



**Fig. 3 Metastasis is a complex, multistep process.**

A schematic of the metastatic process, beginning with **a** an *in situ* cancer surrounded by an intact basement membrane. **b** Invasion requires reversible changes in cell–cell and cell–extracellular-matrix adherence, destruction of proteins in the matrix and stroma, and motility. Metastasizing cells can **c** enter via the lymphatics, or **d** directly enter the circulation. **e** Survival and arrest of tumour cells, and extravasation of the circulatory system follows. **f** Metastatic colonization of the distant site progresses through single cells, which might remain dormant for years, to occult micrometastases and **g** progressively growing, angiogenic metastases. (Steeg, 2003)

### 第三節 細胞黏附分子 (Cell adhesion molecule ; CAM)

幫助細胞與細胞之間及細胞與細胞外基質之間相互作用的分子，且參與細胞的識別、活化、信號傳導、細胞的增殖和分化及細胞的伸展與移動，細胞黏附分子可大致分為四類(Fig. 4)：鈣黏素(Cadherin)、選擇素(Selectin)、免疫球蛋白超家族(Immunoglobulin superfamily)、整合素(Integrin)，目前已知不同種類的細胞黏附分子皆有參與在腫瘤生長及轉移中(Makrilia N., et al. 2009)，接著深入介紹以下兩種細胞黏附分子：

#### (一) 細胞間黏附分子-1 (Intercellular adhesion molecule -1; ICAM-1)

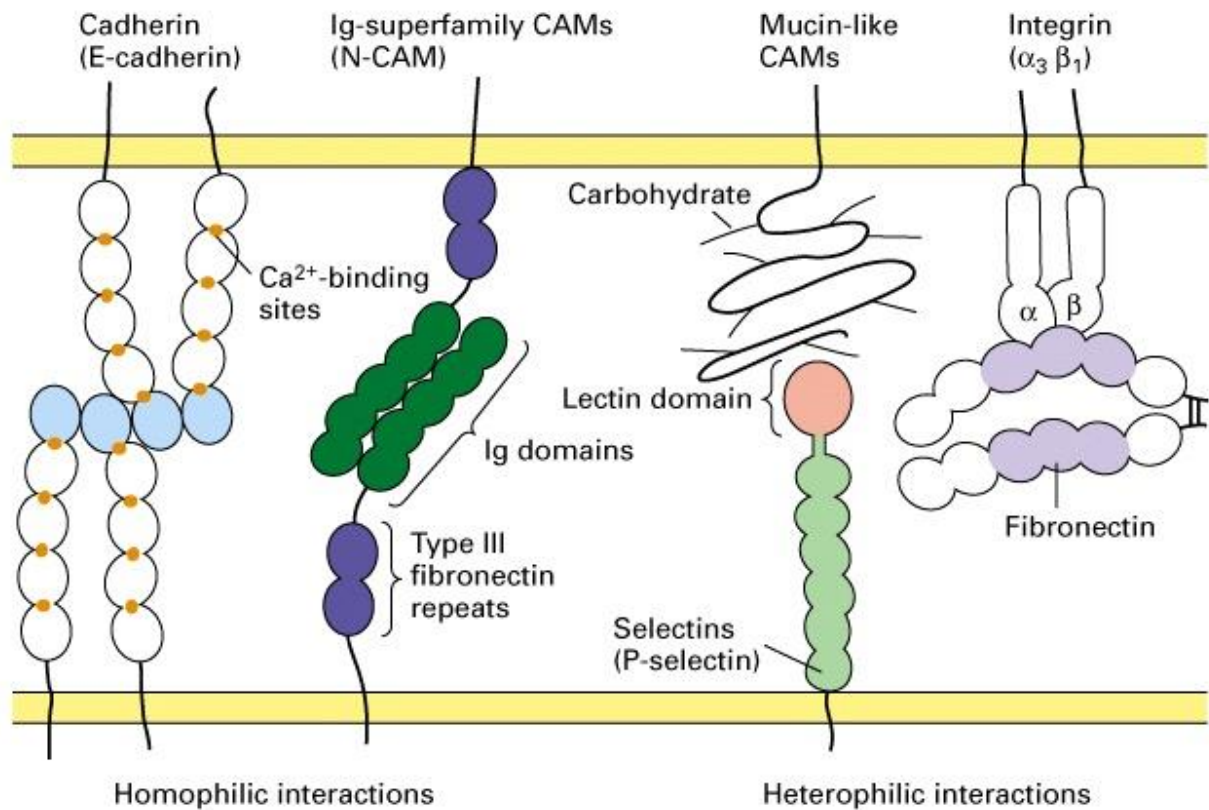
ICAM-1 為免疫球蛋白超級家族成員之一，亦稱為 CD54，通常表現在白血球和內皮細胞表面；當細胞受到發炎刺激時，內皮細胞及免疫細胞會大量表現 ICAM-1 (Borghi., et al. 2000)，免疫細胞上的 membran-bound integrin 接受器跟 ICAM-1 結合後，可讓免疫細胞緊密黏附到內皮細胞，使得免疫細胞外滲至組織進行免疫作用(Fig. 5)。

ICAM-1 是一種黏附分子，參與細胞的移動、侵入、細胞外基質重新排列及細胞骨架重組，進而改變細胞的黏附性(Desgrosellier and Cheresch, 2010)；另一方面，ICAM-1 也會表現在不同型態的腫瘤細胞且活化細胞內訊息傳遞，增加腫瘤細胞的移動性、侵襲及轉移作用，在轉移癌症病患的研究中發現 ICAM-1 表現量會增加，如：胃癌、口



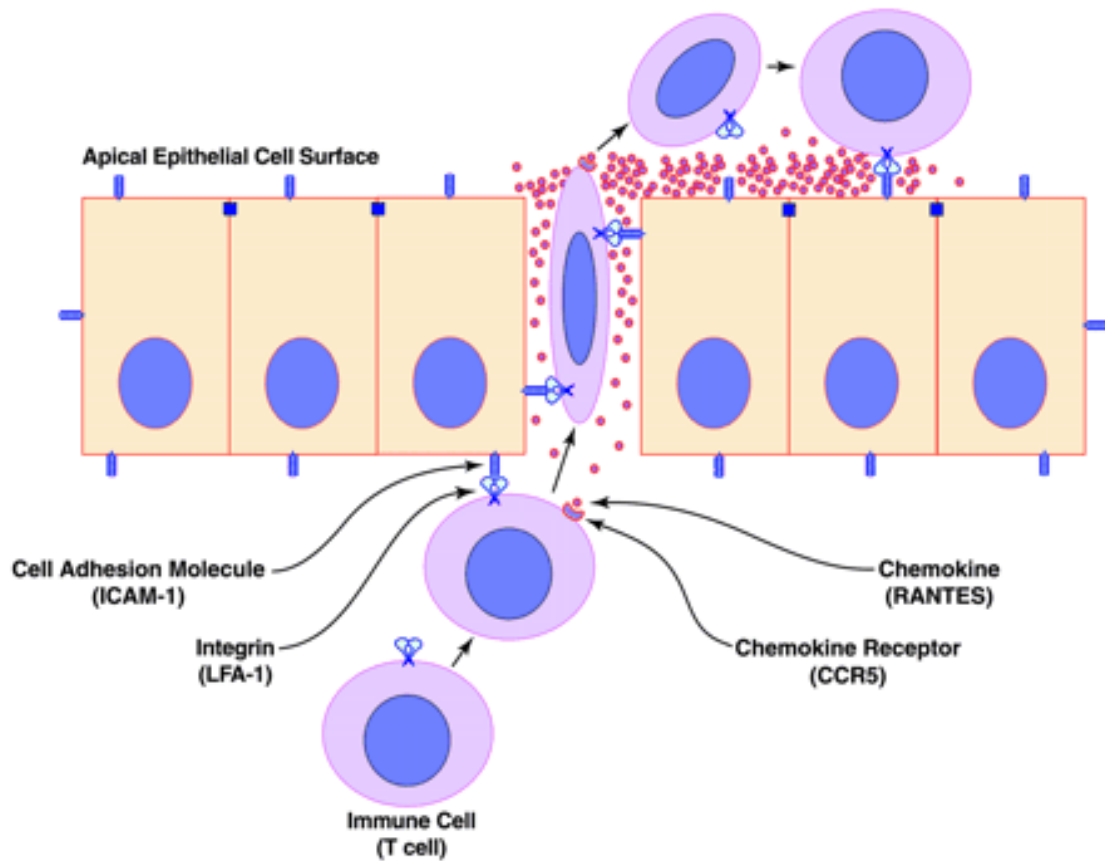
腔癌、胰腺癌和乳癌(Maruo., et al. 2002; O'Hanlon., et al. 2002; Tempia-Caliera., et al. 2002; Yu Usami., et al. 2013), 而在體外實驗中則發現抑制 ICAM-1 的表現會阻止肺癌侵襲其它組織(Huang., et al. 2004), 在黑色素瘤的細胞膜上亦發現ICAM-1的存在, 而利用 ICAM-1 抗體抑制黑色素瘤細胞膜上的 ICAM-1 後, 黑色素瘤的生長受影響(Niina Veitonmäki., et al. 2013), 因此, 可知 ICAM-1 參與癌細胞生成及轉移, 並具有潛力成為治療癌症的標靶藥物。





**Fig. 4 Major families of cell-adhesion molecules (CAMs)**

Cadherin and the immunoglobulin (Ig) superfamily of CAMs mediate homophilic cell-cell adhesion. For cadherin, calcium binding to sites (orange) between the five domains in the extracellular segment is necessary for cell adhesion; the N-terminal domain (blue) causes cadherin to dimerize and to bind cadherin dimers from the opposite membrane. The Ig superfamily contains multiple domains (green) similar in structure to immunoglobulins and frequently contain type III fibronectin repeats (purple). In a heterophilic interaction, the lectin domain of selectins binds carbohydrate chains in mucin-like CAMs on adjacent cells in the presence of  $Ca^{2+}$ . The major cell-matrix adhesion molecule, integrin, is a heterodimer of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. They bind to the cell-binding domain of fibronectin, laminin, or other matrix molecules. (Lodish., et al. 2000)

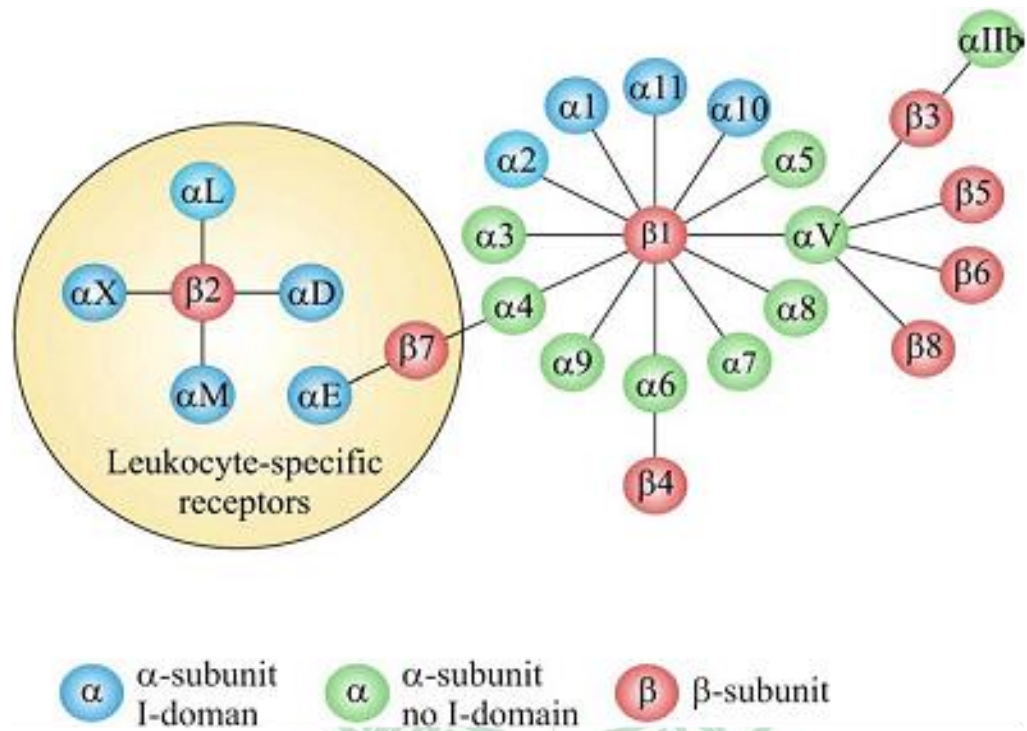


**Fig. 5 Molecular interactions that mediate immune cell adhesion to airway epithelial cells, transepithelial cell migration, and retention at the airway lumen. (Michael J., et al. 2001)**

## (二) 整合素 (Integrin)

Integrin 是細胞表面一類重要且兼具黏附和信號轉導功能的受體，由  $\alpha$  及  $\beta$  兩種次單位以非共價鍵結成異質雙體(Heterodimer)，在脊椎動物中已發現  $\alpha$  次單位有 18 種、 $\beta$  次單位有 8 種，兩種次單位會相互配合組成，目前至少有 24 種 integrin 被發現(Gang Niu., et al. 2011)(Fig. 6)， $\alpha$  及  $\beta$  兩種次單位組合成不同型的 integrin 可做為細胞和細胞或細胞和細胞外基質的橋樑，藉此傳遞訊息至細胞內，調控細胞的貼附、遷移和分化等(Hynes, 1992; Serini., et al. 2006)。

Integrin 與許多疾病的發生有關，其中與癌症息息相關，integrin 可調控細胞外基質，藉此增加腫瘤的侵襲能力，而且在乳癌中也發現到 integrin 的表現，可以讓腫瘤細胞具有抵抗凋亡的能力(Weaver., et al. 2002)，所以已經有許多文獻提到 integrin 跟腫瘤有相關性，目前已知 integrin 促使腫瘤轉移主要是藉由增加腫瘤細胞的爬行、增生及存活(Jay S. Desgrosellier ,David A. Cheresh, 2010)，而且在不同癌症中會有不同的 integrin 表現(Table. 1)。目前一些研究認為調控 integrin 和細胞間的交互作用，可以影響癌細胞的發展，依據先前的研究中，亦發現 integrin 會大量表現在口腔癌細胞裡，並且促進口腔癌細胞的爬行及侵襲(Li HX., et al. 2013)，因此 integrin 被認為是具有潛力成為治療癌症的標靶藥物。



**Fig. 6 The integrin superfamily.**

The integrins can be subdivided according to their  $\beta$  chains but note that some  $\alpha$  chains can combine with several  $\beta$  chains. 24 different integrins are present in humans. (Gang Niu., et al. 2011)

| <b>Tumor type</b>             | <b>Integrins expressed</b>                  | <b>Associated phenotypes</b>   |
|-------------------------------|---|--|
| Ovarian                       | $\alpha4\beta1$<br>and<br>$\alpha v\beta3$  | Increased peritoneal metastasis ( $\alpha4\beta1$ )<br>and tumour proliferation ( $\alpha v\beta3$ ) |
| Cervical                      | $\alpha v\beta3$<br>and<br>$\alpha v\beta6$ | Decreased patient survival   |
| Glioblastoma                  | $\alpha v\beta3$<br>and<br>$\alpha v\beta5$ | Both are expressed at the tumour-normal tissue margin and have a possible role in invasion           |
| Non-small-cell lung carcinoma | $\alpha5\beta1$                             | Decreased survival in patients with lymph node-negative tumours                                      |
| Colon                         | $\alpha v\beta6$                            | Reduced patient survival   |

**Table1 . Integrins in cancer progression.** (Jay S. Desgrosellier ,David A. Cheresh, 2010)

## 第四節 CCN family

CCN(Cyr61, CTGF, Nov)家族命名源自於前三個成員的第一個字母縮寫，為相似結構的蛋白所組成，其成員包含六種蛋白：

- (一)CCN1 (Cystenine rich 61, CYR 61)
- (二)CCN2 (Connective tissue growth factor, CTGF)
- (三)CCN3 (Nerphroblastoma overexpressed, NOV)
- (四)CCN4 (Wnt-inducible secreted protein-1, WISP-1)
- (五)CCN5 (Wnt-inducible secreted protein-2, WISP-2)
- (六)CCN6 (Wnt-inducible secreted protein-3, WISP-3)

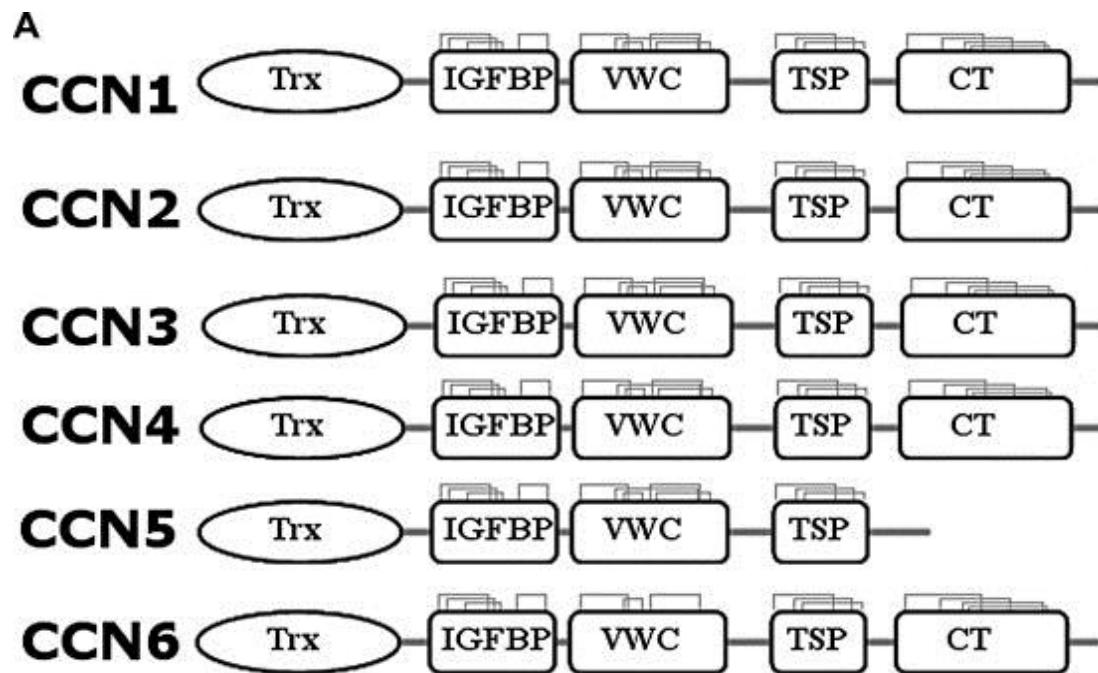
CCN 家族為細胞外基質蛋白，可被生長因子、細胞激素或細胞壓力所誘發，進而影響細胞內訊息傳導，所以和很多重要生理功能的調節有關，包括細胞的分化、生長、凋亡以及和細胞外基質的附著、血管新生與腫瘤生成(Bigstock, 1999; Katsube., et al. 2009; Lau and Lam, 1999; Perbal, 2001)；CCN 蛋白在結構上具有極高的同源性，所以才被歸類為同一家族，主要由四個相似結構所組成(Fig. 7)：

- (一)Insulin-like growth factor binding protein-like module (IGFBP)
- (二)Von Willebrand factor type C repeat module (VWC)
- (三)Thrombospondin type-1 repeat module (TSP-1)
- (四)Cysteine-knot-containing module (CT)

根據 CCN 蛋白不同的結構可以跟不同的蛋白質結合，例如：VWC 及 TSP-1 結構可以跟細胞膜上的 integrin 結合，把 integrin 當成是接受器並與其結合，藉此傳遞訊細至細胞內，調控細胞作用(Fig. 8)。

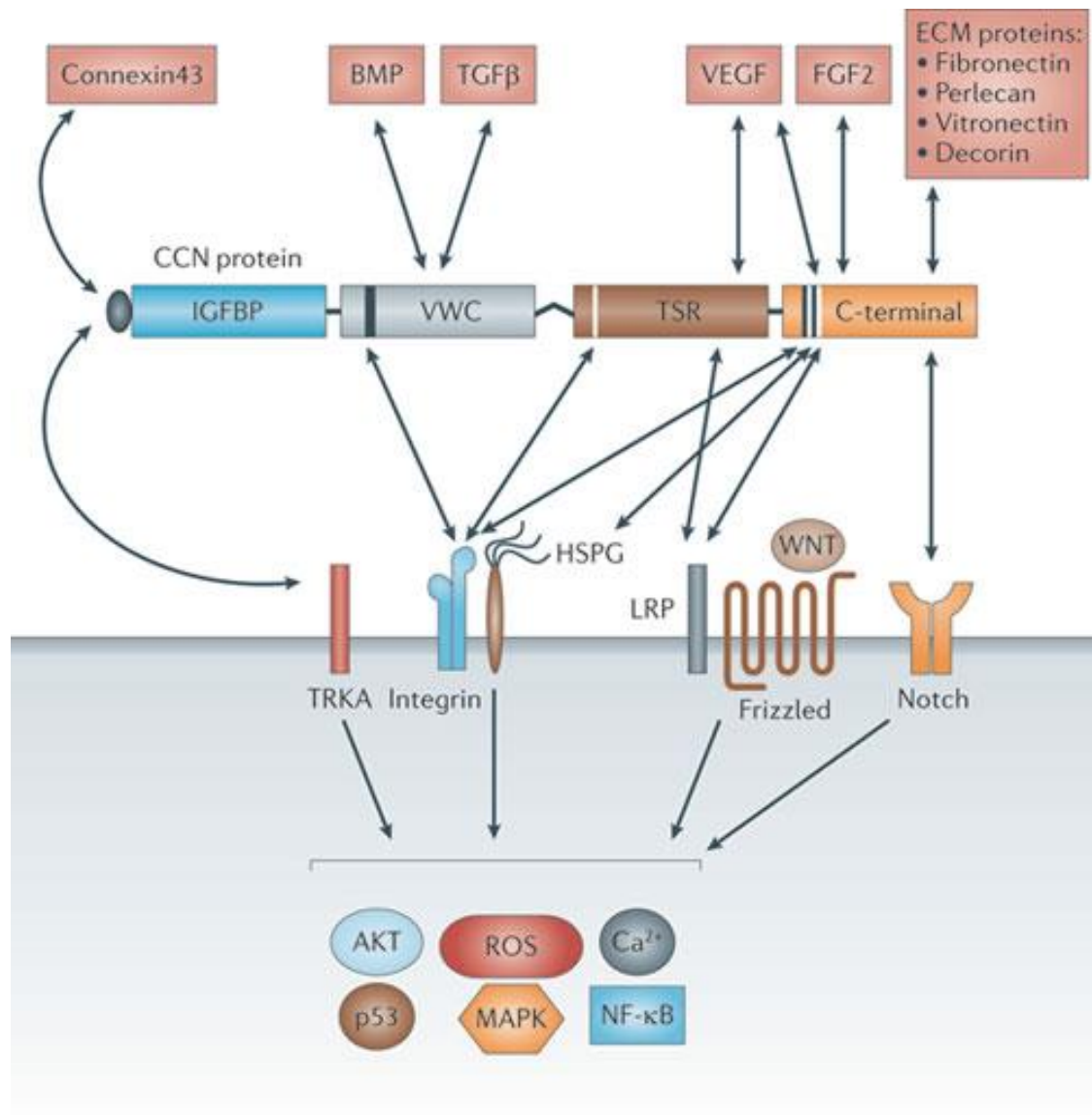
WISP-1(WNT1-inducible signaling pathway protein 1)為 CCN 家族中的一員，具有促進細胞增生、影響細胞黏附、刺激細胞爬行、促進有絲分裂及細胞外基質的形成等功能。在先前研究中，WISP-1 過度表現在許多癌症中，包括：乳癌、肺癌、大腸癌及軟骨肉瘤等(Perbal., et al. 2008 ; Chen PP., et al. 2007 ; Sin., et al. 2009 ; Hou CH., et al. 2011)，進而影響惡性腫瘤的生長，所以 WISP-1 被定義為 oncogene，目前也已證實 WISP-1 在癌症的侵入及轉移中扮演重要的角色(Tang Q., et al. 2011 ; Hou CH., et al. 2011 ; Chen PP., et al. 2007)。





**Fig. 7 Recombinant CCN constructs.**

A schematic diagram of the six recombinant CCN constructs illustrating the thioredoxin (Trx) tag and the four CCN domains. The conserved disulphide bonds in each module are also shown. (Kenneth P., et al. 2011)



**Fig. 8 Molecular interactions through modular domains of CCN proteins.** (Joon-Il Jun and Lester F. Lau , 2011)

## 第二章 研究動機

### 第一節 研究背景

近年來癌症已經成為國人十大死因之首，由於台灣人喜好吃檳榔、喝酒及抽菸，所以易造成口腔上皮細胞病變進而轉為口腔癌細胞，口腔癌若不能早期治療，其致死率相當高；口腔癌為發生在口腔的惡性腫瘤之總稱，可出現在口腔的任何部位，包括唇、舌、口腔底、頰黏膜、齒齦、硬顎部、白齒後區及顎部，口腔癌中最常見的為口腔鱗狀細胞癌(OSCC)，其具有高度侵襲臉部骨頭和轉移到頸部淋巴結(Lyons and Jones, 2007)，且口腔癌亦可轉變為轉移能力強的惡性腫瘤，有鑑於此，如能了解口腔癌的分子機轉，並使其入侵及轉移能力下降，便可發展有效地輔助治療。

在腫瘤微環境中，腫瘤與其周圍細胞的溝通是非常重要的，附近的纖維細胞或內皮細胞可產生許多的細胞因子和細胞激素(Kaseda K., et al. 2013)，進而影響腫瘤生長，在腫瘤發展中扮演重要的角色；某些腫瘤細胞亦可自分泌某些細胞因子刺激自身生長，或抑制宿主對其免疫反應，從而促進腫瘤生長。據文獻報導，許多癌症細胞會過度表現 WISP-1，包括乳癌、肺癌、大腸癌及軟骨肉瘤等(Perbal., et al. 2008；Chen PP., et al. 2007；Sin., et al. 2009；Hou CH., et al. 2011)，且 WISP-1 與癌症預後不佳及存活率有關。WISP-1 是細胞分泌型蛋

白，屬於 CCN 家族的一員(Bork, 2003)，參與多種生理機制，如：促進內皮細胞血管新生、增加細胞的移動或調節細胞間的傳遞；WISP-1 亦可做為 integrin 的配體(ligand)，透過與 integrin 的結合，傳遞訊息至細胞內。

目前已證實 WISP-1 在癌症的侵入及轉移中扮演重要的角色 (Tang Q., et al. 2011 ; Hou CH., et al. 2011 ; Chen PP., et al. 2007)，然而 WISP-1 是否影響口腔癌的轉移仍未有文獻報導，所以本論文將探討 WISP-1 對口腔癌細胞爬行能力的影響。

## 第二節 研究目的

探討 WISP-1 對口腔癌細胞爬行能力的影響及其調控機制。

(一)WISP-1 對於人類口腔癌細胞爬行能力的影響。

(二)WISP-1 是否藉由調控 ICAM-1 的表現，進而促進口腔癌細胞爬行。

(三)探討 WISP-1 誘導口腔癌細胞的訊息傳遞路徑。

## 第三章 材料與方法

### 第一節 實驗設備與材料

#### (一) 儀器設備

1. 可見光/紫外光分光光度計 (Beckman Coulter, USA)
2. 微量吸管
3. 紫外光燈箱 (Gel analysis system, UK)
4. 即時聚合酶連鎖反應器 (Applied Biosystems Inc, USA)
5. 多功能分光光度計 (Muti-spectrophotometer)
6. 細胞培養箱
7. 離心機 (Thermo)
8. 超音波震盪器 (Misonix)

#### (二) 實驗試劑與材料

##### (1) 細胞培養試劑

1. DMEM (Sigma-Aldrich, USA)
2. DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, USA)
3. Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA)
4. Gentamycin (Invitrogen, USA)
5. Trypsin (Gibco, USA)
6. DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

7. Penicillin/Streptomycin (P/S) (Gibco, USA)

(2) 細胞移行分析 (Migration assay)

1. Transwell (Costar, NY)
2. Formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)
3. 0.05% crystal violet (Sigma-Aldrich, USA)

(3) 即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-Time PCR)

1. TRIzol (MDBio Inc, USA)
2. DEPC water (MDBio Inc, USA)
3. MMLV kit (Invitrogen Corporation, USA)
4. Isopropanol (J.T.Baker, Europe)
5. Chloroform (Sigma-Aldrich, USA)
6. OligodT (MDBio Inc, USA)
7. ICAM-1 primer (MDBio Inc, USA)
8. GAPDH primer (MDBio Inc, USA)

(4) 細胞轉染 (Transfection)

1. Lipofectamine (Mirus Bio, USA)
2. c-Jun siRNA (Santa cruz, USA)

3. control siRNA (Santa cruz, USA)

(5) 染色質免疫沉澱法 (Chromatin Immunoprecipitation)

1. 37% Formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)

2. 1M Glycine

3. SDS lysis buffer

4. Protein A/G (Millipore, USA)

5. Low salt immune complex buffer

6. High salt immune complex buffer

7. Lizl salt immune complex buffer

8. TE buffer

9. Elution buffer

10.5M NaCl

11.RNase A (Thermo, USA)

12.0.5M EDTA

13.1M Tris-HCl

14.Protease K

15.Gel/PCR DNA Isolation system kit (VioGENE, USA)

16.ICAM-1 primer (MDBio Inc, USA)

17.Agarose LE (MDBio Inc, USA)



18.TBE solution

19.c-Jun 抗體 (Santa cruz, USA)

(6) 西方墨點法 (Western blot)

1. Acrylamide (MDBio Inc, USA)

2. BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Thermo, USA)

3. 0.5M Tris-HCl

4. 1.5M Tris-HCl

5. PMSF

6. Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

7. NaF

8. Tween 20 (AMRESCCO, USA)

9. Glycine (Sigma-Aldrich, USA)

10.Tetramethylethylenediamine (TEMED)(Sigma-Aldrich, USA)

11.ECL kit (Millipore, USA)

12.Western blot develop & fix (Kodak, USA)

13.PVDF membrane (Millipore, USA)

(7) 抗體 (Antibody)

1. ICAM-1 (Santa cruz, USA)





2. WISP-1 (Santa cruz, USA)
3.  $\beta$ -Actin (Santa cruz, USA)
4. pASK1/ASK1 (Cell signal, USA)
5. pp38/p38 (Santa cruz, USA)
6. pJNK/JNK (Santa cruz, USA)
7. p-c-Jun/c-Jun (Santa cruz, USA)
8. Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa cruz, USA)
9. Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa cruz, USA)



## 第二節 實驗方法

### (1) 細胞培養 (Cell culture)

實驗使用細胞株為人類口腔鱗狀上皮細胞癌 SCC4 以及 Cal 27，屬於貼附型細胞。培養在含有 10% 胎牛血清(FBS)及 1% 抗生素 Penicillin 和 Streptomycin 的 DMEM/F-12 培養液，環境為 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱，約 2~3 天繼代培養一次。

繼代培養:將培養皿中細胞培養液吸除，加入 3~5 ml 的 PBS (Phosphate buffered saline)(0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.02% KCl、0.8% NaCl、0.21% NaHPO<sub>4</sub>)緩衝液沖洗兩次，加入 1ml 的 Trypsin 至於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱作用 2~3 分鐘，待細胞變圓後並輕拍培養皿幫助細胞脫落，加入適量培養液均勻混和，種入細胞培養皿中。

解凍細胞:將細胞由液態氮桶取出，置於 37°C 水浴槽迅速回溫，將細胞取出並且和 5ml 的細胞培養液混和，置於 15ml 離心管，以 1200rpm 離心 10 分鐘後，將上清液吸除，加入適量培養液均勻混和，放入 10 公分細胞培養皿中，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱培養。

### (2) 細胞爬行分析 (Cell migration assay)

細胞爬行分析是利用 transwell (Costar, Corning Life Science, Acton, MA; pore size 8 μm) 24 孔盤為材料。在 transwell 上層加入處理過抑制劑或抗體 30 分鐘的 2x10<sup>4</sup> 細胞，在下層放置 300 μl 含有 1% FBS

培養液，並加入 30 ng/ml WISP-1，之後放至 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱 16~18 小時，將上下層培養液吸除，以 3.7% 福馬林固定 15 分鐘，PBS 清洗後用 0.05% crystal violet 染色 30 分鐘後，再以 PBS 清洗，用棉花棒擦拭上層細胞，即可利用顯微鏡觀察並計數爬行過的細胞數，將計得數量進行統計分析。

### (3) 傷口癒合檢測 (Wound healing assay)

研究細胞移動能力的方法，模擬傷口形成時細胞移動的狀態，藉此方法觀察細胞移動到人造傷口的能力。將細胞培養在 6 孔盤，放至細胞培養箱培養 24 小時，利用黃色 tip 刮一條直線於 6 孔盤上，形成人造傷口，接著換新的培養液並加入不同濃度的 WISP-1，利用顯微鏡拍攝細胞狀況，然後將 6 孔盤放至培養箱培養 16 小時，再用顯微鏡拍攝細胞狀況，計數細胞爬行的顆數，將計得數量進行統計分析。

### (4) 細胞侵犯分析 (Cell invasion assay)

將含有 polycarbonate membrane 的 transwell 置於 24 孔盤，加入 30~50 µl matrigel 於 polycarbonate membrane 上，待 matrigel 凝固後，將 2 萬顆細胞與無 FBS 的培養液混合並種於 transwell 上，而 24 孔盤裡則加入含有 1% FBS 培養液與不同濃度的 WISP-1，之後放至 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱 16~18 小時，將上下層培養液吸除，以 3.7% 福馬林

固定 15 分鐘，利用棉花棒將上層 matrigel 清除，以 PBS 清洗後用 0.05% crystal violet 染色 30 分鐘後，再以 PBS 清洗，用棉花棒擦拭上層細胞，即可利用顯微鏡觀察並計數爬行過的細胞數，將計得數量進行統計分析。

#### (5) 免疫螢光實驗 (Immunofluorescence)

免疫螢光實驗是根據抗原抗體反應的原理，在螢光色素物質結合抗體的幫助下，使特異的抗原抗體複合物 (Antigen-antibody complex) 顯現在細胞中。將細胞培養在玻片上，並經由 WISP-1 處理 2 小時之後，吸去培養液並加入 3.7% 福馬林固定細胞 10 分鐘，接著用 PBS 清洗兩次，加入 0.25% triton-X100 將細胞膜打洞，作用 5 分鐘後以 PBS 清洗兩次，加入稀釋 50 倍的一級抗體(c-Jun)反應 1 小時，以 PBS 清洗兩次，接著利用帶有螢光的二級抗體避光反應 1 小時，以 PBS 清洗兩次，最後加入 DAPI 染細胞核，反應 5 分鐘，再以 PBS 清洗兩次，將玻片取出並利用 mount solution 於載玻片上進行封片，利用 zeiss fluorescence microscope 拍攝。

#### (6) 即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-Time PCR)

Quantitative Real-Time PCR 是利用專一的 primer 在 PCR 過程中發螢光，利用螢光探測系統來偵測每個循環所釋放出來的螢光量，進

而推算每個循環產生的產物。將 6 孔細胞培養皿盤中加入 500  $\mu$ l TRIzol，作用 5~10 分鐘後移至 1.5ml 的微量離心管中，加入 100  $\mu$ l Chloroform 震盪 1 分鐘，並置於室溫 5 分鐘，於 4°C、13200 rpm 離心 15 分鐘，取上清液置新的微量離心管中，再加入 500  $\mu$ l isopropanol alcohol 並溫和混和後靜置室溫 10 分鐘，於 4°C、13200 rpm 離心 10 分鐘，此時可見 RNA 沉澱在管底，吸除上清液後加入 1ml 75% 過濾酒精，輕晃幾下後以 4°C、7500 rpm 離心 5 分鐘，最後移除酒精，風乾；加入 10~30  $\mu$ l DEPC 水，回溶 RNA，存於 -80°C 冰箱。

將 RNA 利用 Beckman DU-800 UV/Visible spectrophotometer 測 RNA 濃度，將定量完的 RNA 利用 MMLV kit 將 RNA 轉成 cDNA，取出 1  $\mu$ l cDNA 加入 1  $\mu$ l primers 及 5  $\mu$ l 2x supermix，然後補 DEPC 水至 20  $\mu$ l，將樣本至於 Applied Biosystem StepOne 進行 95°C 10 分鐘，95°C 15 秒，60°C 1 分鐘，共 40 個循環。所得相對值即為我們所求與控制組相差倍數。

Primer 序列:

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) :

(Forward) 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

(Reverse) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

ICAM-1 :

(Forward) 5'-AAAGCTATGTATGTATGTGCTGCAT-3'

(Reverse) 5'-AACCGAGAGAACCTTCCTTTTTAT-3'

(7) 染色質免疫沉澱法 (Chromatin Immunoprecipitation)

其原理為福馬林在 DNA 與蛋白質交互作用時產生共價鍵結，再利用超音波震盪將 DNA 打斷成小片段，之後利用抗體進行免疫沉澱，接著將 DNA 與蛋白質分離，得到 DNA 再進行 PCR 反應，即可知道 DNA 和蛋白質間交互作用。

將 SCC4 細胞株前處理抑制劑 30 分鐘，隨後加入 WISP-1(30 ng/ml) 作用 1 小時，加入 135  $\mu$ l 的 37% 福馬林在室溫下作用 10 分鐘，之後加入 500  $\mu$ l 1M glycine 5 分鐘，藉此停止福馬林作用，吸除細胞培養液後，以 PBS 清洗兩次，並加入 500  $\mu$ l SDS lysis buffer 作用 10 分鐘，將細胞刮取下來後進行超音波震盪，以 13200rpm 離心 10 分鐘，取上清液，分別取 50  $\mu$ l 當作 input、另取 450  $\mu$ l 加入 15  $\mu$ l protein A/G 和 10  $\mu$ l 的 c-Jun 抗體作用 24 小時。將樣品以 13200rpm 離心 1 分鐘後去除上清液，依序加入 Low salt immune complex buffer、High salt immune complex buffer、Lizl salt immune complex buffer 及 TE buffer 各 500  $\mu$ l，分別均勻搖晃後以 13200rpm 離心 1 分鐘後去除上清液，最後加入 200  $\mu$ l 的 Elution buffer 室溫作用 30 分鐘，以 13200rpm 離

心 1 分鐘後取上清液。

Input 和 IP 樣品加入 8  $\mu$ l 5M NaCl，65°C 加熱反應 4~5 小時；  
接著加入 1  $\mu$ l RNase A 在 37°C 作用 30 分鐘，最後加入 4  $\mu$ l 0.5M  
EDTA、8  $\mu$ l 1M Tris-HCl 及 1  $\mu$ l Protease K 在 45°C 作用 1~2 小時。

接著利用 Gel/PCR DNA Isolation system 的 kit 來萃取 DNA，將  
萃取出來的 DNA 進行 PCR，PCR 條件為 7  $\mu$ l DNA、2  $\mu$ l primers、0.5  $\mu$ l  
10mM dNTP、1.5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ l 10x buffer 及 1  $\mu$ l Taq，總體積加水  
至 20 $\mu$ l，進行 94°C 20 秒，54°C 30 秒，72.3°C 30 秒，共 40 個 PCR  
循環完後進行 DNA 電泳，以 UV 燈照射，將實驗結果以照相系統拍  
下。

ICAM-1 promoter primer 序列：

(Forward) 5'-GCAGCCTGGAGTCTCAGTTT-3'

(Reverse) 5'-GCTGCAGTTATTTCCGGACT-3'

(8) 西方墨點法 (Western blot)

藉由抗原抗體的原理來分析特定的蛋白質。樣品經由 SDS-PAGE  
電泳分離後再轉印到硝酸纖維膜上，接著以標記的抗體結合。細胞經  
不同的藥物處理，37°C 培養箱反應後，移除細胞培養液，以 PBS 清  
洗兩次，加入 100  $\mu$ l lysis buffer 將細胞溶解，將細胞刮取至微量離心

管中，於 4°C、13200 rpm 離心 15 分鐘，取出上清液並測蛋白質濃度。將樣品注入 SDS-PAGE 中分離蛋白質，接著轉印至 PVDF 膜上，把 PVDF 膜至於含有 10% 脫脂奶粉的 TBS-T 的 blocking buffer 中作用 1 小時，然後依序用一級抗體以及二級抗體作用 1 小時，加入 ECL 顯像，將 PVDF 膜放在底片夾中以底片感光。

#### (9) 細胞轉染 (Transfection)

將細胞培養在 6 孔盤中培養一天，利用 lipofectamine 轉染法，各分別取適量的 DNA 質體或 siRNA(總質量 2 ug/well)於微量離心管中，加入 50 ul 的 serum-free DMEM/F12，並另外準備含有 4ug/well 的 lipofectamine 於 50 ul 的 serum-free DMEM/F12，兩組靜置 5 分鐘後，兩者相混和反應 30 分鐘，將 6 孔盤中原有的培養液吸除，加入 900 ul 的 serum-free DMEM/F12 與 100 ul 的質體混和液，置於 37°C 培養箱培養 16~24 小時，再依實驗所需做處理。

#### (10) 免疫化學組織染色 (Immunohistochemistry staining)

將組織玻片置於 60°C 烘箱，烘片 20 分鐘，接下來進行脫蠟反應，將玻片置於 xylene 中，兩次各反應 5 分鐘，之後將玻片放至 100% ethanol，兩次各反應 5 分鐘，接著 95% ethanol，兩次各反應 3 分鐘，然後 85% ethanol 反應 3 分鐘，最後 75% ethanol 反應 3 分鐘，將玻片



放至二次水反應 1 分鐘，為了幫助組織結構修復，所以將玻片放入煮沸的 citrated buffer 15 分鐘，然後以自來水沖洗 10 分鐘，接著利用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 10 分鐘，protein block 反應 10 分鐘，加入一級抗體 (WISP-1 或 ICAM-1) 於室溫下反應 2 小時，然後加入二級抗體反應 30 分鐘，接著利用 DAB 將帶有抗體的組織進行呈色作用，避光反應 3~5 分鐘，最後用蘇木紫(hematoxylin)進行細胞(核)染色，之後於自來水下沖洗 10 分鐘並放至烘箱 15 分鐘，最後進行封片。

#### (11) 組織微陣列 (Tissue microarray)

購買自 US Biomax，其提供全球種類最多 1759 種以上選擇，分類依據包含器官、腫瘤、型態分期，可應用於對多種腫瘤的多種基因表達進行分析，也可對從正常組織、癌前病變、良性腫瘤到惡性腫瘤的發展過程中某些基因變化的動態過程進行連續的觀察，還可應用於腫瘤的早期診斷、預後分析及藥物篩選等。本研究購買人類口腔鱗狀細胞癌的組織微陣列切片，其型號為 OR601a，將此組織微陣列切片進行免疫組織染色，染 WISP-1 及 ICAM-1 蛋白，並統計這兩種蛋白與腫瘤分期有無相關性。

#### (12) 統計方法

每個實驗均進行三次以上獨立試驗，實驗結果以 mean ± S.D 表

示，以 ANOVA 及 Student's *t* test 進行數據分析， $p < 0.05$  於統計上表示有顯著差異。



## 第四章 結果

### 第一節 WISP-1 促進人類口腔鱗狀細胞癌的爬行

已經有研究指出 WISP-1 可以刺激癌細胞爬行及侵入鄰近組織 (Chen, P.P., et al, 2007; Xie, D., et al, 2004)，然而 WISP-1 影響人類口腔鱗狀細胞癌的爬行仍未有研究報導，為了探討 WISP-1 跟人類口腔鱗狀細胞癌的爬行能力是否有關，所以我們利用 Transwell assay 檢測癌細胞爬行的能力，結果顯示人類口腔鱗狀上皮癌細胞株 (SCC4 和 CAL27) 在 WISP-1 的誘導下，癌細胞爬行能力增加 (Fig. 9A)，此外，利用 Wound healing assay 檢測細胞爬行的能力，給予 WISP-1 不同濃度刺激細胞 16 小時之後，發現 SCC4 爬行能力會隨著 WISP-1 的濃度上升而增加 (Fig. 9B)；另外，我們亦發現 WISP-1 可促進 SCC4 侵襲能力增加 (Fig. 9C)。由以上結果顯示，WISP-1 可以促進人類口腔鱗狀上皮癌細胞的爬行。

### 第二節 ICAM-1 參與在 WISP-1 調節人類口腔鱗狀上皮癌細胞的爬行

我們想探討 WISP-1 如何促進人類口腔鱗狀上皮癌細胞的爬行，所以利用即時聚合酶連鎖反應檢測不同基因的表現，當細胞經由 WISP-1 處理後，我們發現 ICAM-1 mRNA 的表現增加 (Fig. 10A)，根據先前文獻指出，ICAM-1 的表現增加會促進人類口腔鱗狀上皮癌細

胞的爬行及轉移(Yang,S.F., et al, 2010),所以我們假設 ICAM-1 會參與在 WISP-1 調節人類口腔鱗狀上皮癌細胞的爬行,首先我們給予不同濃度的 WISP-1 蛋白至細胞培養液裡,利用西方墨點法及即時聚合酶連鎖反應檢測 ICAM-1 蛋白及 mRNA 的表現,我們發現無論是 ICAM-1 蛋白及 mRNA 的表現都會隨著 WISP-1 處理的濃度上升而增加表現(Fig. 10B-C),接著,我們更進一步利用 ICAM-1 siRNA 檢驗 ICAM-1 是否有參與在 WISP-1 調節癌細胞爬行,將 ICAM-1 siRNA 轉染至癌細胞裡,結果可以有效地抑制 ICAM-1 蛋白表現以及降低 WISP-1 調節癌細胞爬行(Fig. 10D),為了更加確定 WISP-1 可以調節 ICAM-1 的表現及癌細胞的爬行,所以我們利用病毒感染細胞的方式,將 WISP-1 shRNA 送至 SCC4 裡,利用西方墨點法顯示,當細胞的 WISP-1 蛋白表現下降時,ICAM-1 蛋白表現亦下降了(Fig. 10F),接著一樣用此細胞利用 Transwell assay 檢測癌細胞爬行的能力是否有改變,結果顯示癌細胞 WISP-1 下降時,癌細胞爬行能力也下降了(Fig. 10E)。根據以上結果得知 WISP-1 調節人類口腔鱗狀上皮癌細胞的爬行必須透過增加 ICAM-1 的表現。

WISP-1 已知可以跟細胞膜上的 integrin 結合,藉此傳遞訊息至細胞內並調控細胞功能(Brigstcok,D.R, 2003),所以細胞前處理 WISP-1 後,利用 Real-time RT PCR 檢測不同 $\alpha$ 及 $\beta$ 次單元的 mRNA 表現,結

果確定 $\alpha v$ 及 $\beta 3$ 的 mRNA 表現有增加的現象(Fig. 10G)，所以預先給予 integrin  $\alpha v\beta 3$ 單株抗體至細胞內處理 30 分鐘，可以有效地降低 WISP-1 促進癌細胞的移行及 ICAM-1 的表現(Fig. 10H-J)。所以，WISP-1 促進人類口腔鱗狀細胞癌的爬行及 ICAM-1 的表現必須透過 integrin  $\alpha v\beta 3$ 。

### 第三節 ASK1 參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現

Apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)是 MAPKKK 家族的其中一員，參與在 mitogen-activated protein kinase 訊息路徑裡(Lu,K.W., et al, 2011)，且 ASK1 已被證實可以參與在腫瘤細胞的爬行及轉移裡(Sun,Y., et al, 2002)。我們假設 ASK1 也許有參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行，結果顯示，前給予 ASK1 抑制劑(Thioredoxin)至細胞裡，可有效地抑制 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現(Fig. 11A-C)；此外，將 ASK1 shRNA 轉染至癌細胞內，亦可抑制 WISP-1 調節癌細胞的移行及 ICAM-1 的表現(Fig. 11A-D)。給予細胞 WISP-1(30 ng/ml)處理不同時間點，發現 ASK1 在 Thr<sup>845</sup>位點有磷酸化現象(Fig. 11E)，且前處理 integrin  $\alpha v\beta 3$  單株抗體至細胞內可抑制 WISP-1 增加 ASK1 磷酸化(Fig. 11F)。因此，WISP-1 透過 integrin  $\alpha v\beta 3$  和 ASK1 訊息路徑來增加癌細胞爬行及 ICAM-1 表現。

#### **第四節 JNK 和 p38 訊息路徑參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現**

ASK1 屬於 MAPKKK 家族的一員，且可活化下游的 JNK 和 p38 訊息路徑(Tan,T.W., et al, 2009 ; K Tobiume., et al. 2001)，所以我們給予細胞 JNK(SP600125)和 p38(SB203580)的抑制劑前處理 30 分鐘，發現可以有效地降低 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現(Fig. 12A-C)，更進一步地確認 JNK 和 p38 訊息路徑有參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行，我們利用西方墨點法檢測 JNK 和 p38 蛋白磷酸化的表現，結果顯示，細胞處理 WISP-1 不同時間點時，JNK 和 p38 蛋白在 30 分鐘有最高磷酸化的表現(Fig. 12D)，接著我們想探討 integrin  $\alpha\beta_3$ 、ASK1 和 JNK 及 p38 之間上下游的關係，所以前處理 integrin  $\alpha\beta_3$  單株抗體或 ASK1 抑制劑(Thioredoxin)，結果發現可以抑制 WISP-1 調節 JNK/p38 蛋白磷酸化(Fig. 12E)。根據以上結果顯示，WISP-1 透過 integrin  $\alpha\beta_3$  接受器、ASK1 和 JNK/p38 訊息路徑促進人類口腔鱗狀細胞癌的爬行及 ICAM-1 的表現。

#### **第五節 AP-1 參與在 WISP-1 調節癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現**

根據先前的研究指出，activator protein 1 (AP-1)活化可以調節人類口腔癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現(Min R., et al, 2012)。首先用

AP-1 抑制劑(Curcumin 和 Tanshinone)前處理至細胞裡，結果發現 WISP-1 調節癌細胞爬行及 ICAM-1 表現的能力下降了(Fig. 13A-C)，接下來利用西方墨點法、染色質免疫沉澱法以及免疫螢光法，檢測 AP-1 是否有被活化，所以利用 c-Jun siRNA 轉染至細胞裡，降低 c-Jun 表現後發現可以抑制 WISP-1 誘導癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現(Fig. 13A&B)，且外加 WISP-1 處理不同時間點下，可以清楚發現 c-Jun 蛋白有磷酸化現象(Fig. 13D)，此外，給予 integrin  $\alpha\beta3$  單株抗體、ASK1 抑制劑(Thioredoxin)、p38 抑制劑(SB203580 和 JNK 抑制劑(SP600125)，可以抑制 WISP-1 調控 c-Jun 蛋白磷酸化(Fig. 13E)。

ICAM-1 在-284 至-279 的位置為 AP-1 結合位置，可以調控 ICAM-1 基因的表現，接下來我們想了解 c-Jun 在 WISP-1 的刺激之下是否會結合到 AP-1 結合位，並促進 ICAM-1 的表現，所以我們做了 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 的實驗，結果顯示細胞在 WISP-1 的處理下，可以誘導 c-Jun 入核並結合到 AP-1 結合位上調控 ICAM-1 表現，然而給予上游抑制劑後，可以有效地抑制 c-Jun 入核和結合到 AP-1 結合位(Fig. 13F&G)。綜合以上結果，這些資料顯示 WISP-1 透過 integrin  $\alpha\beta3$  接受器、ASK1 和 JNK/p38 訊息路徑促進 c-Jun 活化並入核調節 ICAM-1 表現，藉此調控人類口腔鱗狀細胞癌的爬行。

## 第六節 WISP-1 和 ICAM-1 的表現跟口腔癌病患的腫瘤分期有相關性

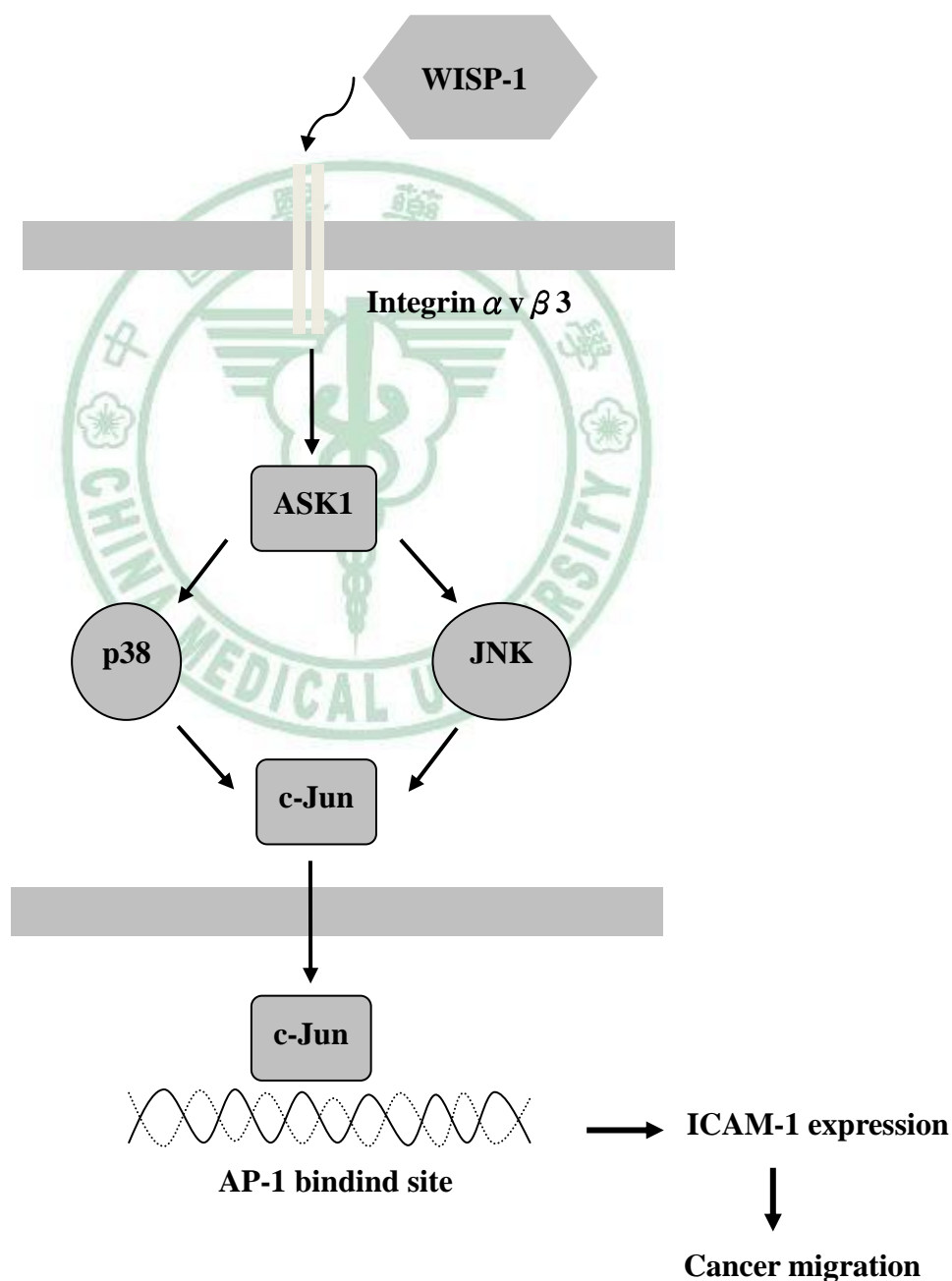
我們將口腔癌病患的組織微陣列切片進行免疫組織染色，染 WISP-1 及 ICAM-1 蛋白，結果發現 WISP-1 和 ICAM-1 在腫瘤組織裡的表現比正常組織多(Fig. 14A-C)，此外，WISP-1 及 ICAM-1 的高度表現跟腫瘤分期有相關性，隨著病患腫瘤分期的增加，WISP-1 和 ICAM-1 在腫瘤組織裡的表現也有增加的現象(Fig. 14A-D)。結論，WISP-1 和 ICAM-1 的表現跟口腔癌病患的腫瘤分期有相關性。





## 第五章 結論

本研究證明 WISP-1 會增加人類口腔鱗狀上皮細胞癌的移行能力，WISP-1 會透過 integrin  $\alpha v \beta 3$ 、ASK1、p38/JNK 訊息路徑傳遞訊息，促進轉錄因子 c-Jun 入核調控 ICAM-1 的表現，進而影響人類口腔鱗狀上皮癌細胞的移行能力；在未來可作為口腔癌轉移的指標。



## 第六章 討論

口腔癌絕大部分是由上皮細胞惡化所形成的腫瘤，少部分是由小唾液腺體惡化所形成的腺癌，口腔癌的發生和嚼檳榔、抽煙、喝酒息息相關，這些致癌因子會讓口腔形成白斑或紅斑甚至惡化成口腔癌；口腔癌屬於高度侵蝕與高度轉移至頸部淋巴結的癌症，當口腔癌發生轉移時，無法利用手術切除，使得治療更加困難，且病人癒後能力也較差(Alvi and Johnson, 1997)，所以探討口腔癌細胞的分子機制越顯重要。

近幾年有文獻指出 WISP-1 跟許多腫瘤的生成有密切關係，在乳癌及肺癌的研究中發現，如有 WISP-1 過度表現在腫瘤細胞裡，則顯示口腔癌有較高的侵襲能力且病人癒後效果較差(Perbal., et al. 2008 ; Sin., et al. 2009 ; D Xie., et al. 2001)，但是，WISP-1 跟口腔癌之間的關係仍不清楚。在本文研究中發現，我們證實 WISP-1 藉由促進 ICAM-1 的表現而增加口腔癌細胞的爬行，而且 WISP-1 誘導 ICAM-1 的表現量上升是經由活化 integrin  $\alpha v \beta 3$ 、ASK1、p38/JNK 和 AP-1 訊息路徑。

WISP-1 為 CCN 家族中的成員之一，與細胞增生、黏附、爬行和腫瘤生長有關，在乳癌、肺癌及軟骨肉瘤等癌症中，發現 WISP-1 會大量表現且和腫瘤惡性程度呈正比。在本篇研究中，我們利用

Migration assay 證明 WISP-1 會促進口腔癌細胞(SCC4 及 CAL27)的爬行(Fig. 9A-B)，我們利用組織微陣列亦發現口腔癌組織有較高的 WISP-1 表現，且 WISP-1 的表現跟腫瘤分期呈正相關(Fig. 14)，由於組織微陣列中口腔癌病患只含 3 例有淋巴結轉移，且沒有遠端轉移的病患，所以導致日後分析 TNM 跟 WISP-1 及 ICAM-1 是否有相關性時，則無法進行統計。

ICAM-1 屬於免疫球蛋白家族中的一員，主要由五個 extracellular immunoglobulin G-like domains 和一個 short cytoplasmic tail 所組成，與細胞骨架蛋白相關聯(Diamond., et al.1991)，多種研究指出 ICAM-1 對於細胞的移動性和侵襲能力中扮演重要角色(Chen., et al. 2010)，且已被指出跟腫瘤生成及轉移有關(Jay S. Desgrosellier ,David A. Cheresh, 2010)。我們發現 WISP-1 可以促進 ICAM-1 的表現增加(Fig. 10A-C)，且 WISP-1 調節口腔癌細胞爬行需依賴 ICAM-1 的幫忙(Fig. 10D)，此外，利用病毒感染細胞的方式，將 WISP-1 shRNA 送至 SCC4 裡，將 SCC4 裡的 WISP-1 剷除表現，顯示細胞的 WISP-1 蛋白表現下降時，ICAM-1 蛋白表現也下降，而且口腔癌細胞爬行能力亦降低了(Fig. 10E-F)。根據目前結果顯示，口腔癌細胞或許會自分泌 WISP-1 來幫助癌細胞本身的爬行，不過我們的研究還無足夠證據證明此現象，所以之後可以利用免疫組織染色去染口腔癌組織切片有無

integrin  $\alpha v \beta 3$  的表現，而且也可以檢測口腔癌細胞是否有表現較高的 WISP-1 mRNA，進而補強實驗數據，證明癌細胞會自分泌 WISP-1。

Integrin 為細胞膜上的蛋白，可以跟細胞外基質結合，調節細胞黏附、訊息傳遞和細胞移動，Integrin 已知可以做為 CCN 蛋白的接受器，且 WISP-1 已知可以結合至 integrin  $\alpha v \beta 3$  並增加細胞爬行 (Brigstock, D.R., 2003)。在本篇研究中，細胞前處理 WISP-1 後，利用 Real-time RT PCR 檢測不同  $\alpha$  及  $\beta$  次單元的 mRNA 表現，結果確定  $\alpha v$  及  $\beta 3$  的 mRNA 表現有增加的現象 (Fig. 10G)，此外預先給予 integrin  $\alpha v \beta 3$  單株抗體至細胞內處理 30 分鐘，抑制 WISP-1 跟 integrin  $\alpha v \beta 3$  結合，結果口腔癌細胞爬行能力下降 (Fig. 10H)，表示 integrin  $\alpha v \beta$  在 WISP-1 誘導癌細胞爬行及 ICAM-1 表現中扮演相當重要的角色。

ASK1 參與在 mitogen-activated protein kinase 訊息路徑裡 (Lu, K.W., et al, 2011)，且 ASK1 已被證實可以參與在腫瘤細胞的爬行及轉移裡 (Sun, Y., et al, 2002)。根據本次研究，WISP-1 可以誘導 ASK1 磷酸化 (Fig. 11E)，再者，ASK1 shRNA 拮抗 WISP-1 誘導細胞爬行能力以及 ICAM-1 的表現 (Fig. 11A-B)，這些結果顯示 WISP-1 調節口腔癌細胞爬行需透過 ASK1 的活化；目前已知 ASK1 會活化下游的 p38 及 JNK 蛋白，所以我們認為 p38/JNK 訊息路徑有參與在 WISP-1 調節口腔癌細胞爬行及 ICAM-1 表現裡，利用 JNK (SP600125) 和

p38(SB203580)的抑制劑前處理 30 分鐘，可以有效地抑制 WISP-1 調節口腔癌細胞爬行及 ICAM-1 的表現(Fig. 12)，綜合以上結果，WISP-1 促進 ICAM-1 表現及幫助口腔癌細胞爬行需經由 integrin  $\alpha\beta 3$ 、ASK1、p38/JNK 訊息路徑。

根據先前的研究指出，AP-1 活化可以調節人類口腔癌細胞的爬行及 ICAM-1 的表現(Min R., et al, 2012)，在本篇研究中，細胞轉染 c-Jun siRNA 後，可以抑制細胞爬行的能力以及 ICAM-1 的表現，接著利用染色質免疫沉澱法證實 WISP-1 可促進 c-Jun 和 ICAM-1 啟動子上的 AP-1 結合位結合，而細胞前處理 integrin  $\alpha\beta 3$  單株抗體、ASK-1 和 p38/JNK 抑制劑 30 分鐘後，可有效地抑制 c-Jun 和 AP-1 結合(Fig. 13)。由以上結果證實，WISP-1 藉由促進 c-Jun 活化並入核結合至 ICAM-1 promoter 的 AP-1 位置上，藉此來增加 ICAM-1 的表現，進而有利於人類口腔癌細胞的爬行，所以 WISP-1 促進癌細胞爬行及 ICAM-1 表現需經由 integrin  $\alpha\beta 3$ 、ASK1、p38/JNK 以及 AP-1 訊息路徑。

本研究已證實在人類口腔癌細胞中 WISP-1 會透過 integrin  $\alpha\beta 3$ 、ASK-1、p38/JNK 信息傳遞路徑以及轉錄因子 c-Jun 調控 ICAM-1 的表現，進而增加人類口腔癌細胞的爬行，之後可以做動物實驗，確定在活體實驗中亦得到跟細胞實驗相同的結果，動物實驗可

分為兩組：(1)正常口腔癌細胞組 (2)WISP-1 剔除的口腔癌細胞組，分別將這兩組口腔癌細胞打入老鼠體內，觀察期腫瘤生長情形，如果 WISP-1 剔除的口腔癌細胞組其腫瘤生長受抑制，則可表示腫瘤的生長需要 WISP-1 的幫助；在我們的研究發現 ICAM-1 對於腫瘤轉移具有重大的關聯性，假使研發 ICAM-1 的抑制劑，也許可以抑制人類口腔癌的轉移，希望透過本研究的訊息路徑機制在人類口腔癌有很大的幫助。



## 第七章 參考文獻

1. Alvi, A., *et al.* (1997) Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck*, 19, 500-05.
2. Lyons, A.J., *et al.* (2007) Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 36, 671-9.
3. Holbourn, K.P., *et al.* (2008) The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 461-73.
4. Chen, P.P., *et al.* (2007) Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS ONE*, 2, e534.
5. Brigstock, *et al.* (1999) The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine reviews*, 20, 189-206.
6. Greenberg, J.S., *et al.* (2003) Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer*, 98, 508-15.
7. Pennica, D., *et al.* (1998) WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Science*, 95, 14717-22.
8. Perbal, B. (2001) NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Molecular Pathology*, 54, 57-79.
9. Kleer, C.G., *et al.* (2004) WISP3 (CCN6) is a secreted tumor-suppressor protein that modulates IGF signaling in inflammatory breast cancer. *Neoplasia*, 6, 179-85.
10. Xu, L., *et al.* (2000) WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev*, 14, 585-95.
11. Kleer, C.G., *et al.* (2002) WISP3 is a novel tumor suppressor gene of inflammatory breast cancer. *Oncogene*, 21, 3172-80.
12. Huang, W.C., *et al.* (2004) Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel alpha-methylene-gamma-butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis*, 25, 1925-34.
13. Desgrosellier, J.S., *et al.* Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10, 9-22.
14. Thomas, G.J., *et al.* (2001) Cell adhesion molecules and oral cancer. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 12, 479-98.

15. Xie, D., *et al.* (2004) Levels of expression of Cyr61 and CTGF are prognostic for tumor progression and survival of individuals with gliomas. *Clinical Cancer Research*, 10, 2072-81.
16. Gupta, G.P., *et al.* (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-95.
17. Lu, K.W., *et al.* (2011) Gypenosides inhibits migration and invasion of human oral cancer SAS cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 -9 and urokinase-plasminogen by ERK1/2 and NF-kappa B signaling pathways. *Human & experimental toxicology*, 30, 406-15.
18. Makrilia, N., *et al.* (2009) Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Investigation*, 27, 1023-37.
19. Lawson, C., *et al.* (2009) ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*, 61, 22-32.
20. Zimmerman, T., *et al.* (2008) Inhibitors targeting the LFA-1/ICAM-1 cell-adhesion interaction: design and mechanism of action. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 2128-39.
21. Duperray, A., *et al.* (1997) Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 435-41.
22. Lin, Y.M., *et al.* (2013) IL-6 promotes ICAM-1 expression and cell motility in human osteosarcoma. *Cancer letters*, 328, 135-43.
23. Chen, Z., *et al.* (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes and Development*, 9, 1586-97.
24. Rosette, C., *et al.* (2005) Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 26, 943-50.
25. Tsai, M.S., *et al.* (2002) Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene*, 21, 8178-85.
26. Sampath, D., *et al.* (2001) Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86, 1707-15.
27. Grothey., *et al.* (1998) Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *British Journal of cancer*, 77, 801-7.
28. van de Stolpe, A., *et al.* (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Molecular Medicine*, 74, 13-33.



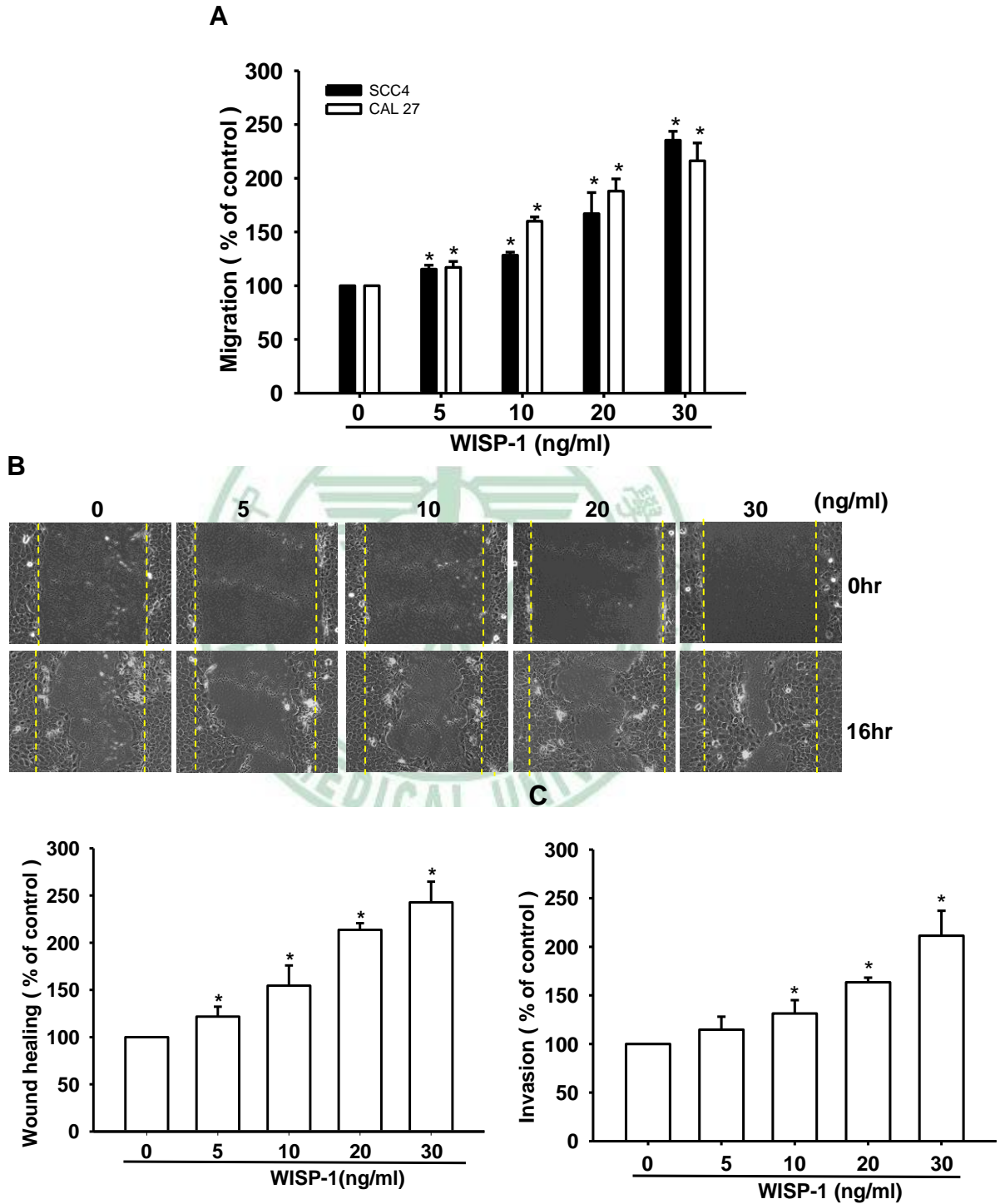
29. Lin, M.T., *et al.* (2004) Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *The Journal of biological chemistry*, 279, 24015-23.
30. Tzeng, H.E., *et al.* (2013) Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma. *Biochemical pharmacology*, 85, 531-40.
31. Tsou, H.K., *et al.* (2013) HGF and c-Met interaction promotes migration in human chondrosarcoma cells. *PloS one*, 8, e53974.
32. Wu, M.H., *et al.* (2012) Endothelin-1 promotes MMP-13 production and migration in human chondrosarcoma cells through FAK/PI3K/Akt/mTOR pathways. *Journal of cellular physiology*, 227, 3016-26.
33. Tang, C.H., *et al.* (2010) The CCL5/CCR5 axis promotes interleukin-6 production in human synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*, 62, 3615-24.
34. Huang, C.Y., *et al.* (2012) Thrombin induces epidermal growth factor receptor transactivation and CCL2 expression in human osteoblasts. *Arthritis and rheumatism*, 64, 3344-54.
35. Fong, Y.C., *et al.* (2012) CCN6 enhances ICAM-1 expression and cell motility in human chondrosarcoma cells. *Journal of cellular physiology*, 227, 223-32.
36. Hou, C.H., *et al.* (2011) WISP-1 increases MMP-2 expression and cell motility in human chondrosarcoma cells. *Biochemical pharmacology*, 81, 1286-95.
37. Yang, S.F., *et al.* (2010) Prostaglandin E2/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 285, 29808-16.
38. Brigstock, D.R. (2003) The CCN family: a new stimulus package. *The Journal of endocrinology*, 178, 169-75.
39. Croci, S., *et al.* (2004) Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression decreases the survival and myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer research*, 64, 1730-6.
40. Mantovani, A., *et al.* (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology today*, 13, 265-70.
41. Coussens, L.M., *et al.* (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.
42. Sun, Y., *et al.* (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry*, 277, 49212-9.
43. Zhang, R., *et al.* (2003) AIP1 mediates TNF-alpha-induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3. *J Clin Invest*, 111, 1933-43.

44. Chen, L.M., *et al.* (2011) RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 112, 933-41.
45. Takeda, K., *et al.* (2008) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, 199-225.
46. Bork., *et al.* (2003) The CCN family of proteins: structure–functionrelationships. *Trends in Biochemical Sciences*, 10, 461-73.
47. Tan, T.W., *et al.* (2009) Cyr61 increases migration and MMP-13 expression via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK and AP-1-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Carcinogenesis*, 30, 258-68.
48. Lodish.,*et al.* (2000) Cell-Cell Adhesion and Communication.*Molecular Cell Biology*. 4th edition.
49. KasedaK., *et al.* (2013) Identification of intravascular tumor microenvironment features predicting the reurrence of p-stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Science*, 10,461-73.
50. Makrilia N.,*et al.* (2009) Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer.*Cancer Investigation*,27,1023-37.
51. Michael J., *et al.* (2001) Immunity, Inflammation, and Remodeling in the Airway Epithelial Barrier: Epithelial-Viral-Allergic Paradigm. *Physiological Reviews*, 82, 119-46.
52. Gang Niu., *et al.* (2011) Why Integrin as a Primary Target for Imaging and Therapy. *Theranostics*, 1, 30-47.
53. Jay S. Desgrosellier., *et al.* (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10, 9-22 .
54. Min R.,*et al.* (2012)Toll-like receptor-9 agonists increase cyclin D1 expression partly through activation of activator protein-1 in human oral squamous cell carcinoma cells.*Cancer science*, 103, 1938-45.
55. Li HX., *et al.* (2013) Expression of  $\alpha\beta6$  integrin and collagen fibre in oral squamous cell carcinoma: association with clinical outcomes and prognostic implications. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42, 547-56.
56. Yu Usami., *et al.* (2013) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *International Journal of Cancer*, 133, 568-78.
57. Tang Q., *et al.* (2011) Expression and prognostic value of WISP-1 in patients with endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 37, 606-12.

58. Niina Veitonmäki., et al. (2013) A Human ICAM-1 Antibody Isolated by a Function-First Approach Has Potent Macrophage-Dependent Antimyeloma Activity In Vivo. *Cancer cell*, 23, 502-15.

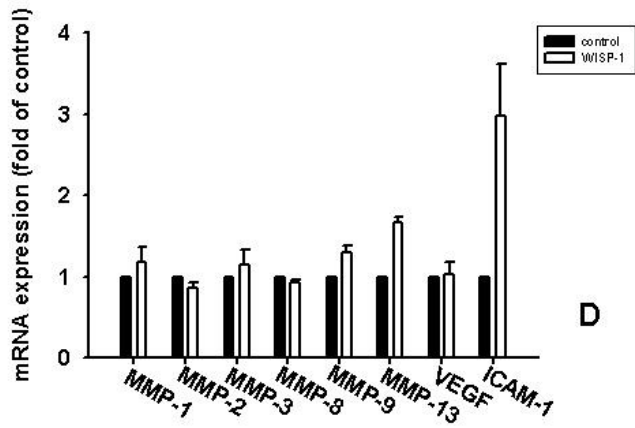
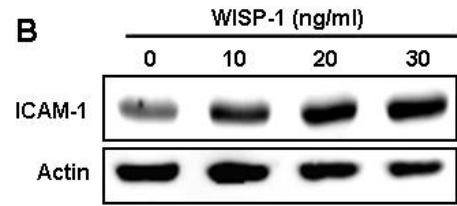
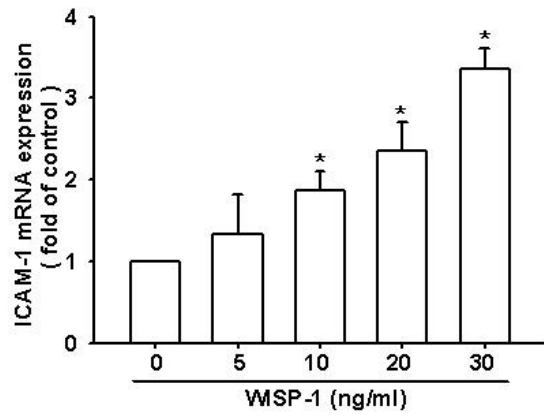
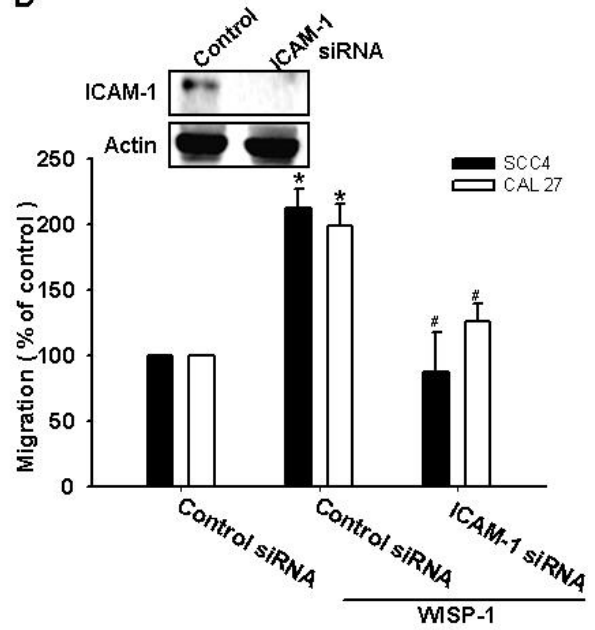
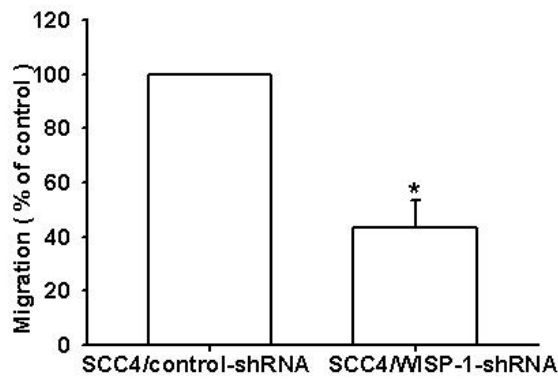
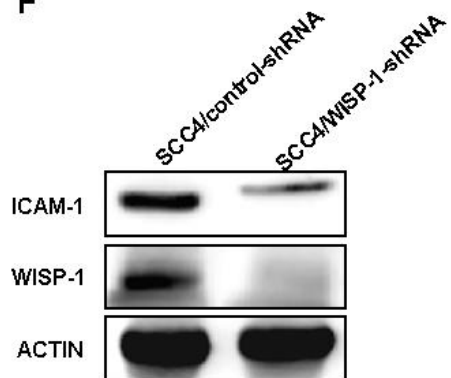


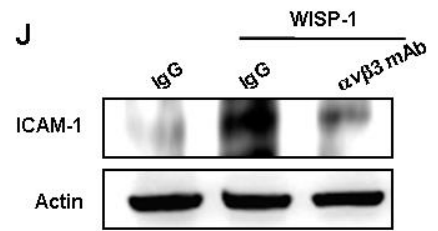
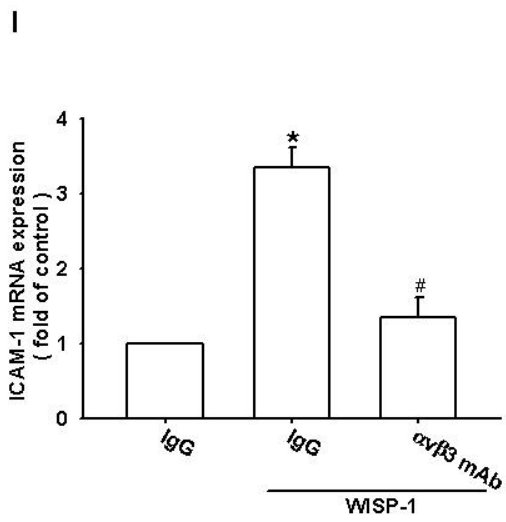
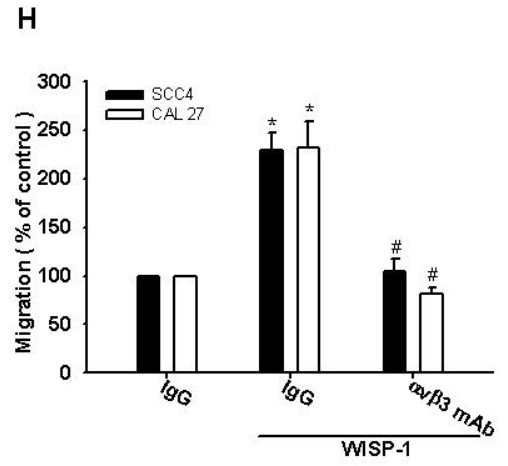
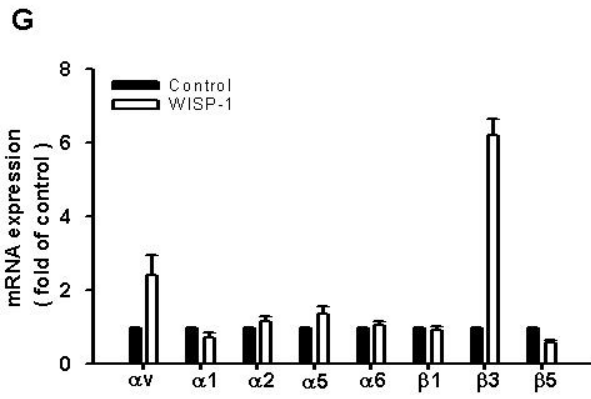
## 第八章 圖表與圖表說明



**Fig. 9 WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP-1) induces the migration activity of human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells.**

(A) Cells were incubated with various concentrations of WISP-1, and the *in vitro* migration activity was measured with the Transwell assay after 24 h. (B) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for 16 h, and the wound-scratching assay was performed. (C) SCC4 cells were incubated with various concentrations of WISP-1, and the invasion activity was measured with the Transwell assay after 24 h. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM); \*,  $p < 0.05$  compared with the control; #,  $p < 0.05$  compared with the WISP-1-treated group.

**A****B****C****D****E****F**



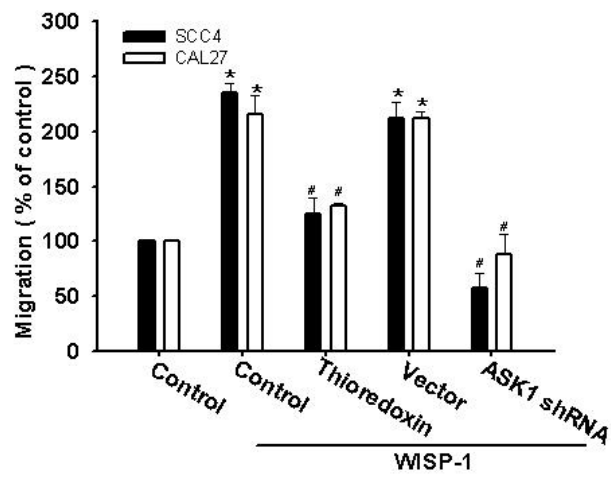
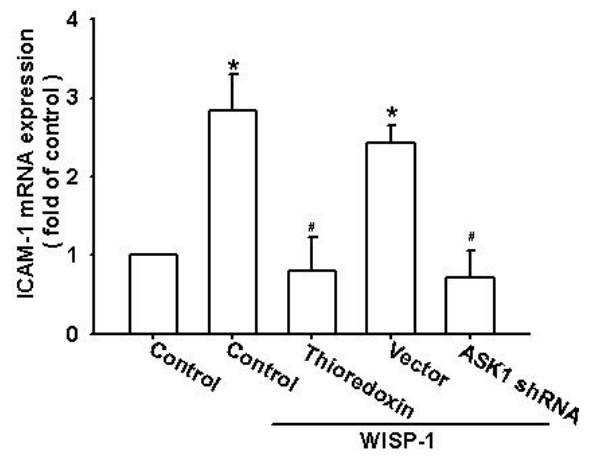
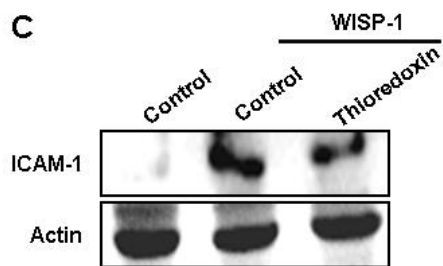
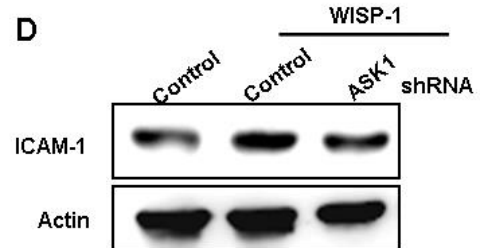
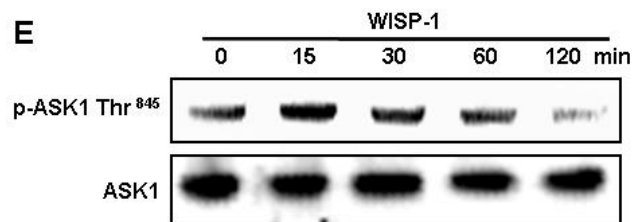
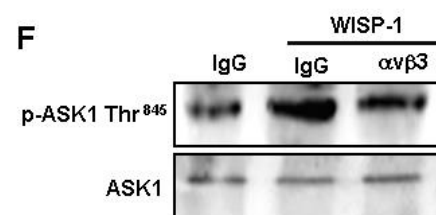
**Fig. 10 WISP-1 increases cell migration and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through the  $\alpha v\beta 3$  integrin receptor.**

(A) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for 24 h, and different gene expression was examined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). (B-C) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for 24 h, and ICAM-1 expression was examined by western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). (D) Cells were transfected with ICAM-1 small interfering RNA (siRNA) for 24 h, followed by stimulation with WISP-1. The *in vitro* migration activity was measured with the Transwell assay. (E-F) The protein levels and migratory activity of WISP-1 and ICAM-1 in SCC4/control short hairpin RNA (shRNA) and SCC4/WISP-1 shRNA cells were examined by western blotting and the Transwell assay. (G) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for 24 h, and subunits expression were examined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). (H-J) Cells were pretreated with  $\alpha v\beta 3$  monoclonal antibody (mAb) for 30 min followed by stimulation with WISP-1. The *in vitro* migration activity and ICAM-1 expression were measured with the Transwell assay, qPCR, and western blotting. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0.05$



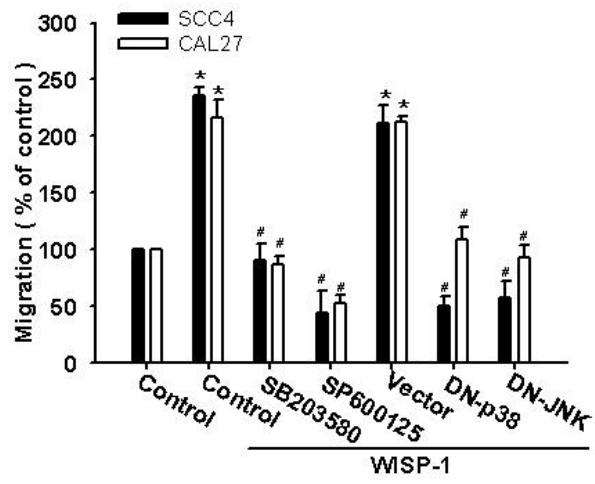
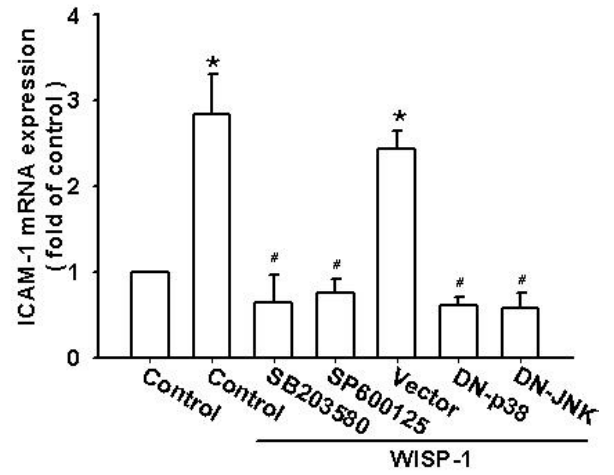
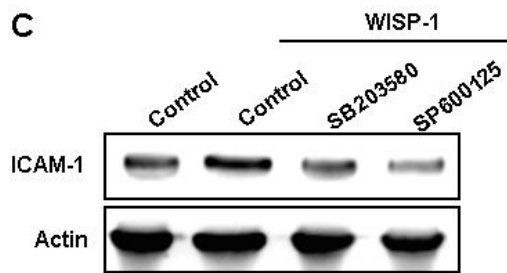
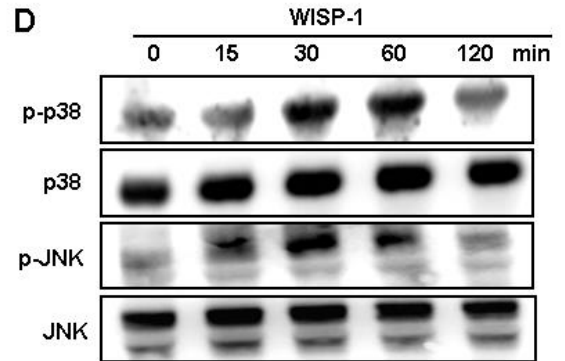
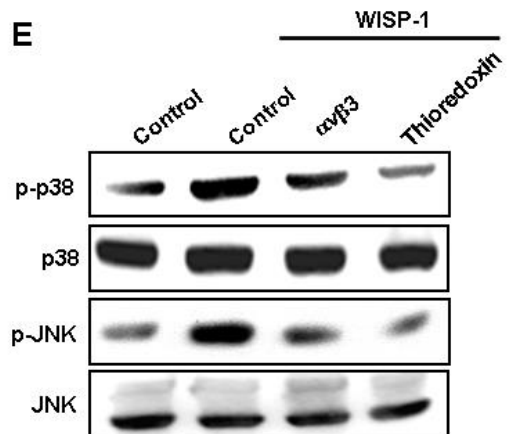
compared with the control; #,  $p < 0.05$  compared with the WISP-1-treated group.



**A****B****C****D****E****F**

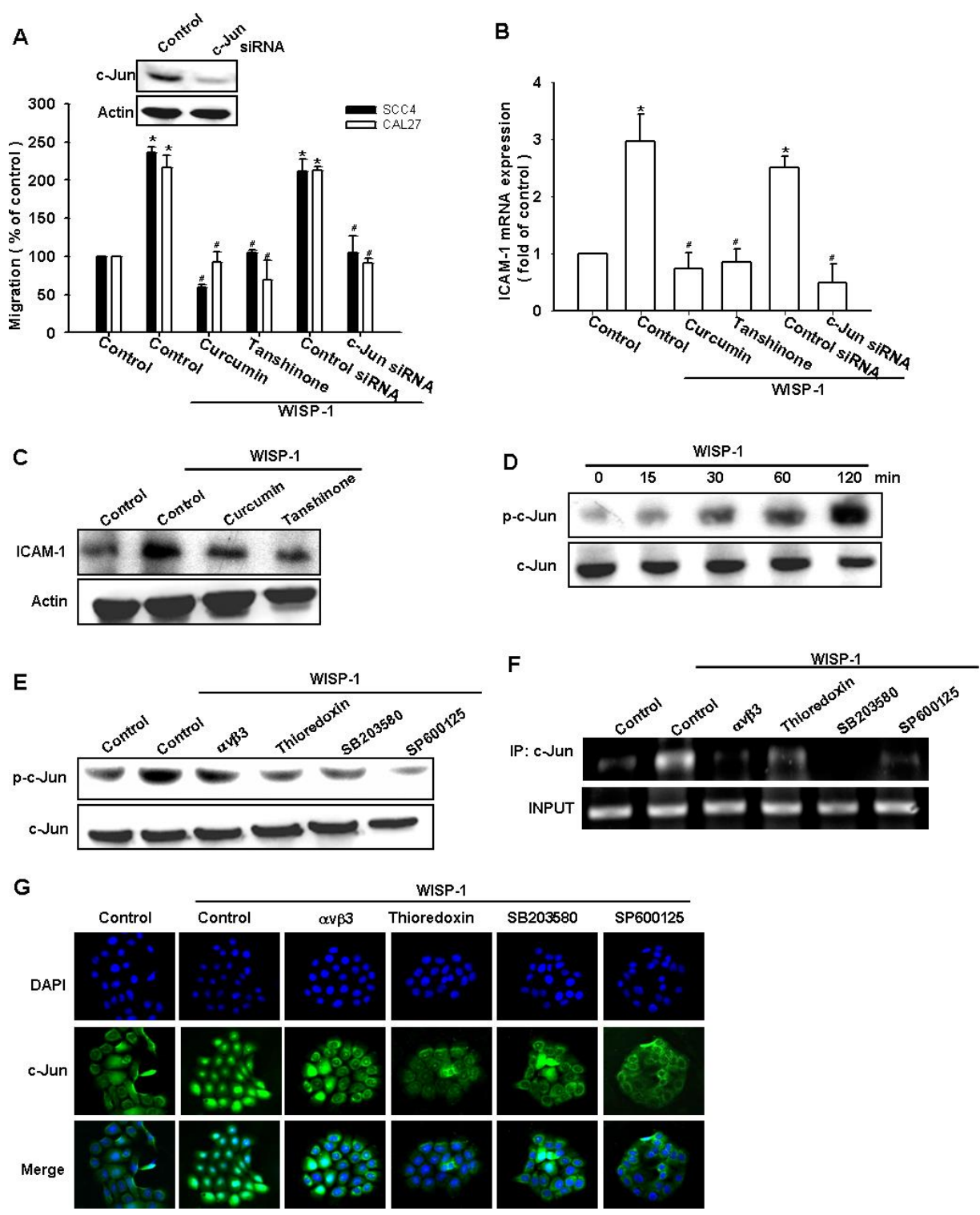
**Fig. 11 Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is involved in WISP-1–induced migration and ICAM-1 expression.**

(A–D) Cells were pretreated for 30 min with thioredoxin(200 ng/mL) or transfected with ASK1 shRNA for 24 h and stimulated with WISP-1. The *in vitro* migration and ICAM-1 expression were measured by the Transwell assay, qPCR, and western blotting. (E) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for the indicated time intervals, and ASK1 phosphorylation was examined by western blotting. (F) SCC4 cells were pretreated for 30 min with  $\alpha v\beta 3$  mAb and stimulated with WISP-1 for 15 min; ASK1 phosphorylation was determined by western blotting. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0.05$  compared with the control; #,  $p < 0.05$  compared with the WISP-1–treated group.

**A****B****C****D****E**

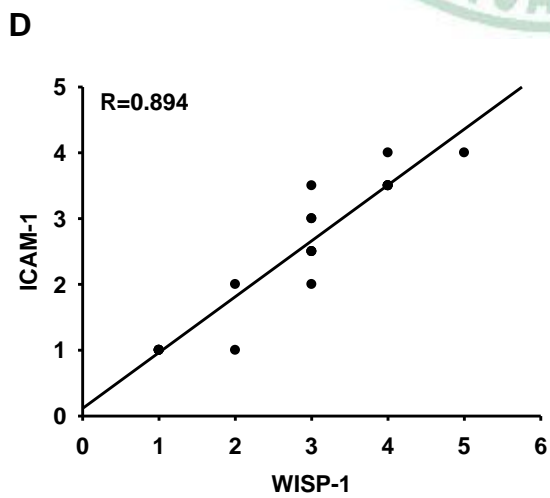
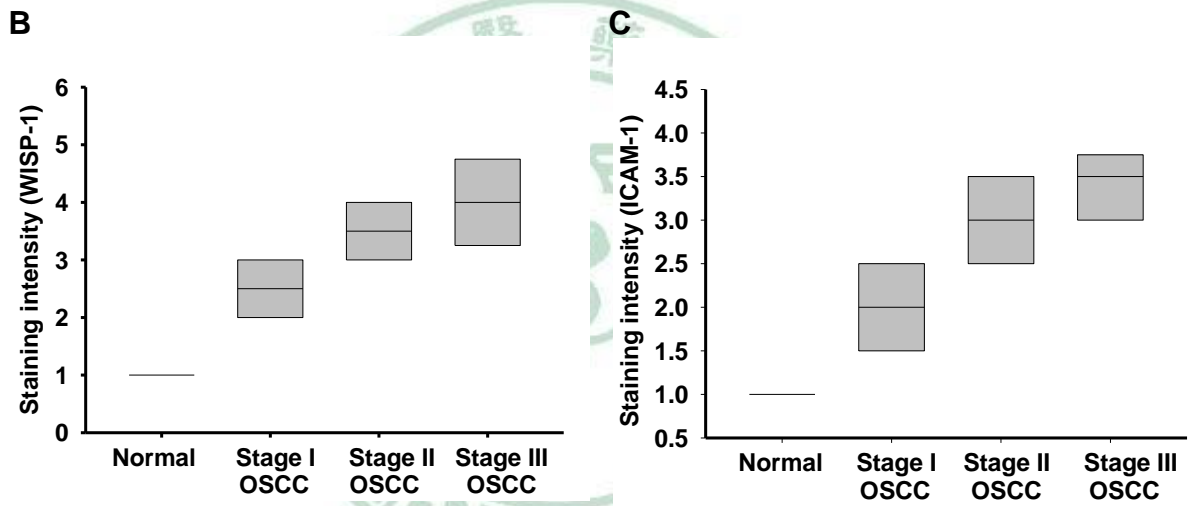
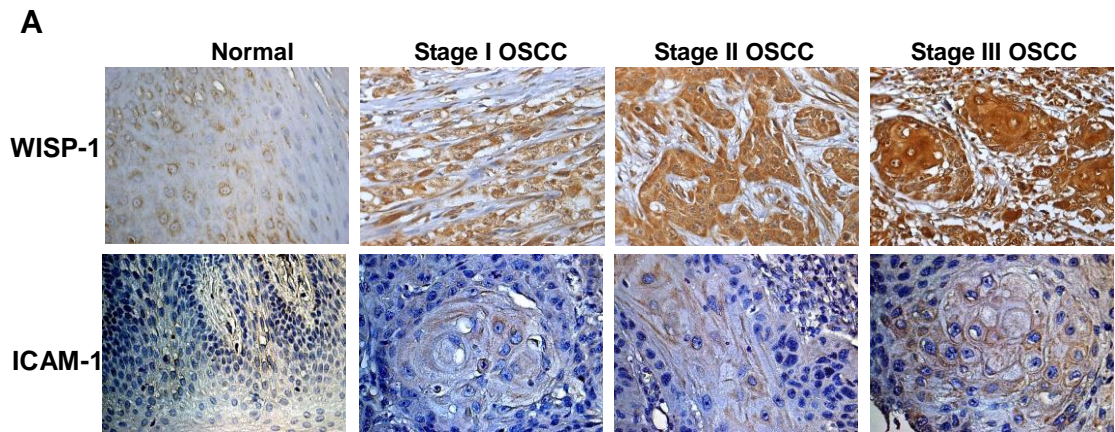
**Fig. 12 WISP-1 increases cell motility and ICAM-1 expression through the c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) and p38 pathways.**

(A–C) Cells were pretreated for 30 min with SB203580 (10  $\mu$ M) and SP600125 (10  $\mu$ M) or transfected with dominant negative (DN) mutants of p38 and JNK for 24 h followed by stimulation with WISP-1. The *in vitro* migration and ICAM-1 expression were measured by the Transwell assay, qPCR, and western blotting. (D) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for the indicated time intervals, and p38 and JNK phosphorylation was examined by western blotting. (E) SCC4 cells were pretreated for 30 min with  $\alpha$ v $\beta$ 3 mAb or thioredoxin for 30 min followed by stimulation with WISP-1 for 60 min, and JNK and p38 phosphorylation was determined by western blotting. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0.05$  compared with the control; #,  $p < 0.05$  compared with the WISP-1–treated group.



**Fig. 13 Activator protein 1 (AP-1) is involved in WISP-1–mediated migration in human OSCC cells.**

(A–C) Cells were pretreated for 30 min with curcumin and tanshinone or transfected for 24 h with c-Jun siRNA followed by stimulation with WISP-1 for 24 h. Their *in vitro* migration and ICAM-1 expression were measured by the Transwell assay, qPCR, and western blotting. (D) SCC4 cells were incubated with WISP-1 for the indicated time intervals, and c-Jun phosphorylation was examined by western blotting. (E–G) SCC4 cells were pretreated for 30 min with  $\alpha v\beta 3$  mAb, thioredoxin, SB203580, or SP600125 for 30 min followed by stimulation with WISP-1 for 120 min. The c-Jun phosphorylation, c-Jun binding to the AP-1 element, and c-Jun translocation into the nucleus was determined by western blotting, chromatin immunoprecipitation, and immunofluorescence. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0.05$  compared with the control; #,  $p < 0.05$  compared with the WISP-1–treated group.





**Fig. 14 WISP-1 and ICAM-1 expression correlates with the tumor stage of patients with OSCC.**

Immunohistochemistry of WISP-1 (A-B) and ICAM-1 (A-C) expression in normal and OSCC tissue. The correlation and quantitative data are shown in (D).

