

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第一名

052014

以 SLC35C1 探討蛋白質糖基化－在甲狀腺癌惡性程度及與骨髓細胞交互作用的角色

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 陳品榕	蔡任圃

關鍵詞：甲狀腺癌、岩藻糖糖基化、噬骨細胞

得獎感言

在未知中前行

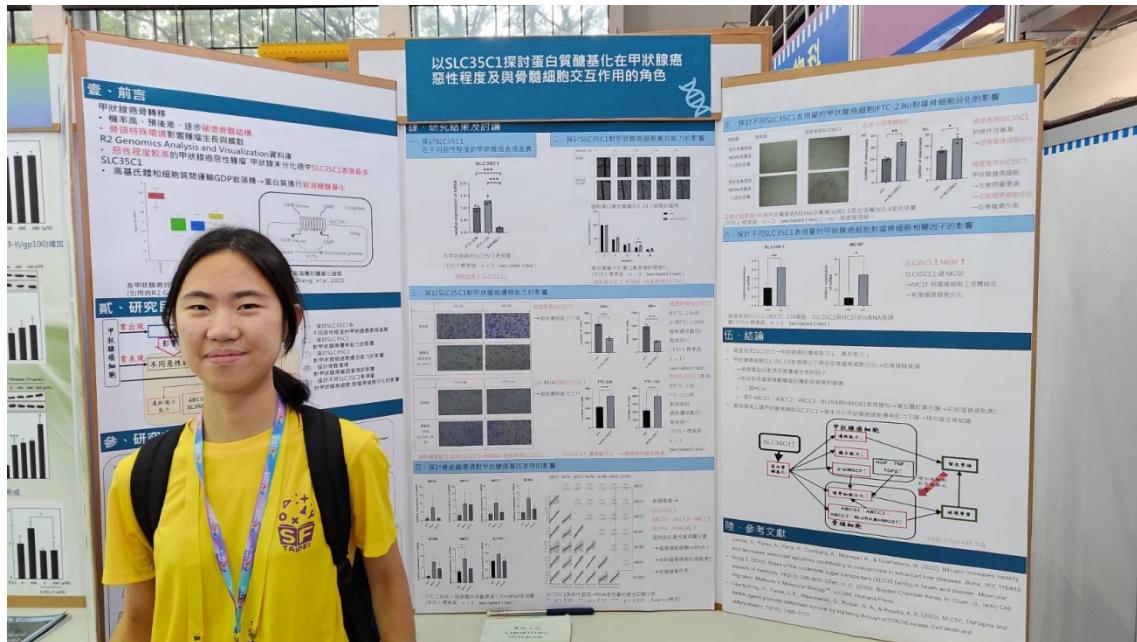
在參與科學研究與科展過程中，我深深體會到科學不僅是理論與實驗的結合，更是一場持續的探索與追尋。在這次科展是一條充滿挑戰與驚喜的學習之旅。一路走來，有許多人需要感謝，也經歷了許多刻骨銘心的時刻，這些都將成為我人生中寶貴的記憶。

首先，我要感謝我的指導教授在實驗設計、數據分析上的幫助，教導我正確的實驗方法和思維模式。我學會了如何從一個想法，一步步轉化為嚴謹的實驗設計，如何從一個失敗，找到下一次成功的線索。感謝實驗室的學姊不厭其煩的說明每個實驗細節與原理，陪著我一次次的練習。感謝指導老師陪著我一步步的分析數據、比對文獻、修改報告，在我遇到困難、信心動搖時，給予我最堅定的支持，讓我明白科學的道路從來不是一帆風順，但每一個挫折都是通往成功的墊腳石。感謝我的父母，當我因為實驗不順利而感到沮喪時，他們的安慰與建議讓我重拾信心與動力，當我疲憊不堪時，是他們默默的陪伴讓我感到溫暖。感謝我的朋友們，他們在我需要幫助時伸出援手，分享彼此的學習經驗，讓我在這段旅程中不感到孤單。同時，也要感謝科展主辦單位及評審老師，提供我們這個展示成果與交流想法的平台。

科學研究是一場與未知不斷交手、在失敗與突破間反覆拉扯的長途旅行。從最初確立研究主題、設計實驗，到一次次的實驗，面對過實驗結果與預期相差甚遠的挫折。然而，正是這些過程，讓我學會了如何面對失敗，如何接受不完美的結果，並擁有一次次願意再站起來的勇氣。

我想對自己與對想參加科展的人說，科學的道路充滿挑戰，但每一個挑戰都是成長的機會。不要害怕犯錯，因為每一次失敗都是為了下一次成功鋪路。相信自己，保持對科學的好奇，勇敢探索未知的領域，你一定能找到屬於自己的答案。

最後，再次感謝本次科展的機會，它不僅讓我收穫了知識，認識了許多志同道合的朋友，更重要的是，它讓我在這段旅程中重新認識自己。這段經歷將是我人生中難忘的回憶，也將成為我未來繼續前行的動力！



參展照片

摘要

本研究探討 GDP-岩藻糖轉運蛋白(**SLC35C1**)的表現，對甲狀腺癌細胞遷移和癒合能力的影響，並探討甲狀腺癌細胞與骨髓細胞的交互作用。結果顯示，**SLC35C1** 在高惡性程度的甲狀腺癌中表現較低，且其表現量越高，遷移與癒合能力越低。我們發現癌細胞 **SLC35C1** 的活性增加，在骨骼環境中可提升 **ABCG1**、**ABCC2**、**ABCC3**、**BLVRA** 與 **HMOX1** 表現增加，增加膽紅素代謝，抑制噬骨細胞凋亡，進而促進了噬骨作用，加重了骨質的破壞。我們也發現 **SLC35C1** 可透過上調 **MCSF** 來促進噬骨細胞的分化並透過影響膽紅素代謝抑制噬骨細胞凋亡。根據這些結果，可推測骨組織可能透過上調甲狀腺癌細胞的 **SLC35C1**，將未分化的癌細胞留在骨骼，並促進噬骨細胞作用，分解骨質，在甲狀腺癌骨轉移中扮演關鍵角色。

壹、前言

一、研究動機與文獻探討

甲狀腺是位於頸部正中偏下方的一個重要內分泌器官，緊鄰喉頭的甲狀軟骨和環狀軟骨。其構造由左右兩葉腺體組成，透過中央的峽部連接。甲狀腺的主要功能是分泌甲狀腺素(T3 和 T4)，這些荷爾蒙對維持人體正常的生理運作至關重要。它們負責調節新陳代謝，影響血壓、心跳、體溫以及體重等功能，並受到腦下垂體分泌的甲狀腺刺激素(*thyroid-stimulating hormone, TSH*) 調控，以維持內分泌系統的穩定。然而，隨著現代生活方式和環境的變化，甲狀腺的健康問題逐漸受到重視，其中甲狀腺癌的發生率尤為引人關注。甲狀腺癌雖然多數情況下預後良好，且長期存活率高於其他癌症，但根據國內相關統計，其發病率有逐年上升的趨勢，目前已成為十大常見癌症之一。

癌細胞的骨轉移(*Metastatic Bone Cancer*)是指癌細胞從原發部位脫離，透過血液或淋巴系統轉移並在骨骼中生長形成新的腫瘤的過程。甲狀腺癌患者發生骨轉移的機率相對其他癌症高(表一)，也有較差預後。癌細胞的骨轉移會逐步破壞骨骼結構，進而引發多種症狀，常見的初期症狀包括骨痛及病理性骨折，隨著病情發展，根據受影響的骨骼部位，不同的症狀也會陸續出現。例如，當癌細胞轉移至骨盆時，可能導致尿失禁；若波及四肢骨骼，則可能出現手臂或腿部的無力感。骨轉移的另一個嚴重後果是骨質被破壞後，骨中的鈣離子釋放到血液中，導致高鈣血症。早期高鈣血症會使腎臟濃縮尿液的能力下降，造成多尿、夜尿、口乾、食欲減退及容易疲倦等症狀。隨著病情惡化，可能出現腸胃道症狀，包括噁心、嘔吐、便秘及腸絞痛等。若高鈣血症未能及時控制，還可能導致更為嚴重的併發症，例如意識混亂、心律不整，甚至昏迷。這些症狀顯示了骨轉移對患者生活品質及健康的巨大影響，需及早診治與管理。目前的治療方式包括症狀緩解、疾病修飾和結構保護、修復。在症狀緩解方面，常見的做法是使用系統性止痛藥(如阿片類藥物)和抗炎藥物(如非類固醇抗炎藥)。對於骨轉移的疾病修飾治療，包含使用抗吸收劑(如唑來膦酸和地諾單抗)，可延遲和減少骨相關事件的發生。而放射性碘(*Radioactive Iodine, RAI*)治療對於甲狀腺癌的骨轉移效果有限，尤其是在 RAI 不敏感的情況下。因此，對於這些患者，可能需要考慮其他系統性治療方法，如多激酶抑制劑(*multitargeted kinase inhibitors, MKI*)和其他靶向治療。但大都數的治療方式都有副作用，且無法根本解決問題(Jurado, et al., 2022)。

表一 各種癌症發生骨轉移的發生率(Suva, et al., 2011)。

Primary tumor type	Postmortem incidence of bone metastasis (%)
Breast	73
Prostate	68
Thyroid	42
Lung	36
Renal	35
Melanoma	35
Head and neck	12
Gastrointestinal tract	5
Ovarian	0.1

骨髓組織一直被認為是富含生長因子的特殊微環境，非常適合轉移性腫瘤細胞的定植與生長。在骨形成過程中，成骨細胞會分泌多種生長因子，並將這些因子嵌入骨基質中。腫瘤細胞則藉由釋放如巨噬細胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)和核因子 kappa B 配體受體活化劑(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)等因子(Glantschnig, et al., 2003)，直接促進噬骨細胞的活化，導致骨基質分解，釋放出更多促進腫瘤生長的因子。這種相互作用形成了一個惡性循環，進一步推動腫瘤的擴散與骨質的破壞。然而，甲狀腺癌患者骨轉移的高發生率與潛在性分子相互作用的關連性，一直未被深入研究。我們將積極地去探討這類癌細胞偏好骨轉移的誘因。

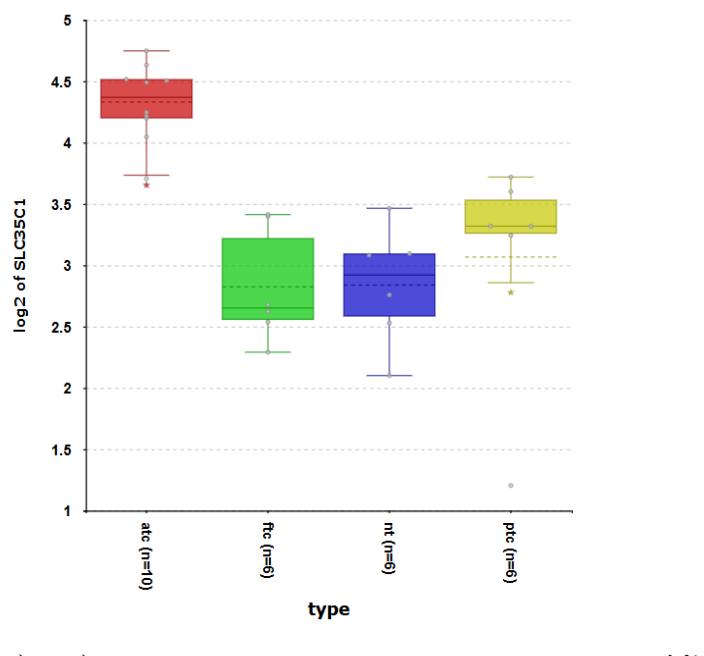
甲狀腺癌依其性質與惡性程度，可分成以下幾類，整體趨勢顯示，高分化的癌症類型不僅發病比例高，且長期存活率良好；而分化程度較低的癌症雖然較少見，但預後明顯較差。(周，2018)(表二)：

- (一)、甲狀腺濾泡癌(Follicular Thyroid Carcinoma, ftc)：淋巴腺擴散較少；肺部、骨骼擴散較多
- (二)、甲狀腺乳頭癌(Papillary Thyroid Carcinoma, ptc)：淋巴腺擴散較多；肺部、骨骼擴散較少
- (三)、甲狀腺未分化癌(Anaplastic Thyroid Carcinoma, atc)：最難治療且存活期最短的甲狀腺癌，惡性程度最高
- (四)、髓質癌(Medullary Carcinoma, nt)：較罕見

表二 各甲狀腺癌的發病比例與十年存活率(周，2018)。

	發病比例	十年存活率
高分化甲狀腺腫瘤		
• 乳頭狀腫瘤	78.2%	93%
• 濾泡狀腫瘤	15.9%	83%
未分化癌	4.3%	9%
髓樣癌	1.6%	78%
其他	< 1%	-

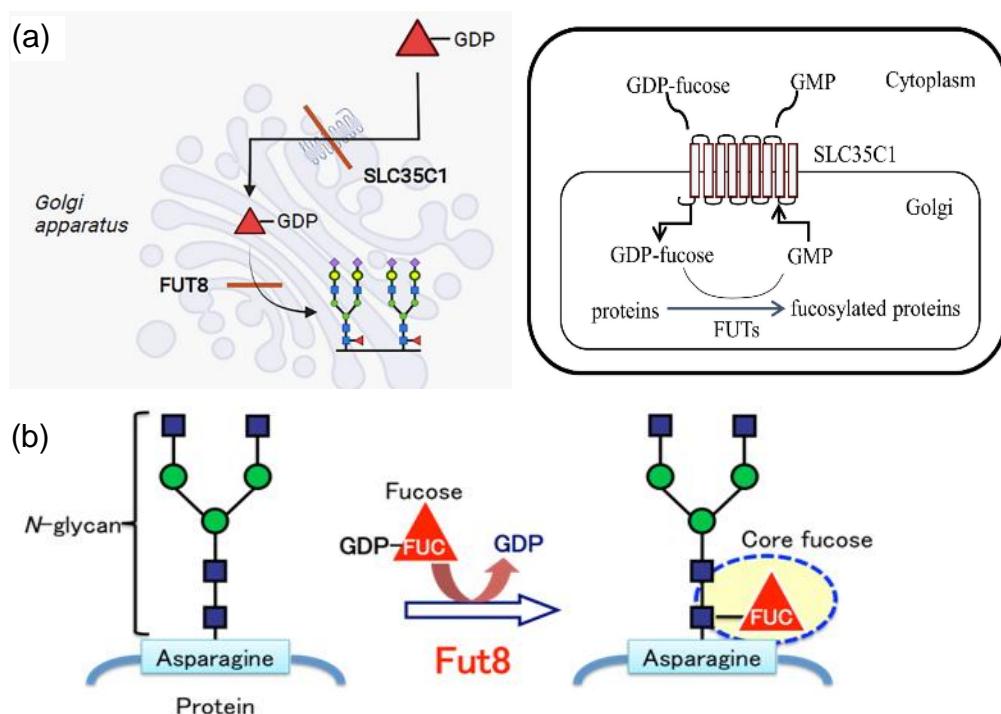
其中，透過 R2 Genomics Analysis and Visualization 資料庫依據臨床實驗統計資料，歸納推論出 SLC35C1 在惡性程度較高的甲狀腺癌惡性腫瘤—甲狀腺未分化癌(atc)中表現最多(達統計差異)(圖一)。



圖一 各甲狀腺癌的 SLC35C1 表現量($p = 1.62e-05$, ANOVA)
(引用自 R2 Genomics Analysis and Visualization 資料庫)。

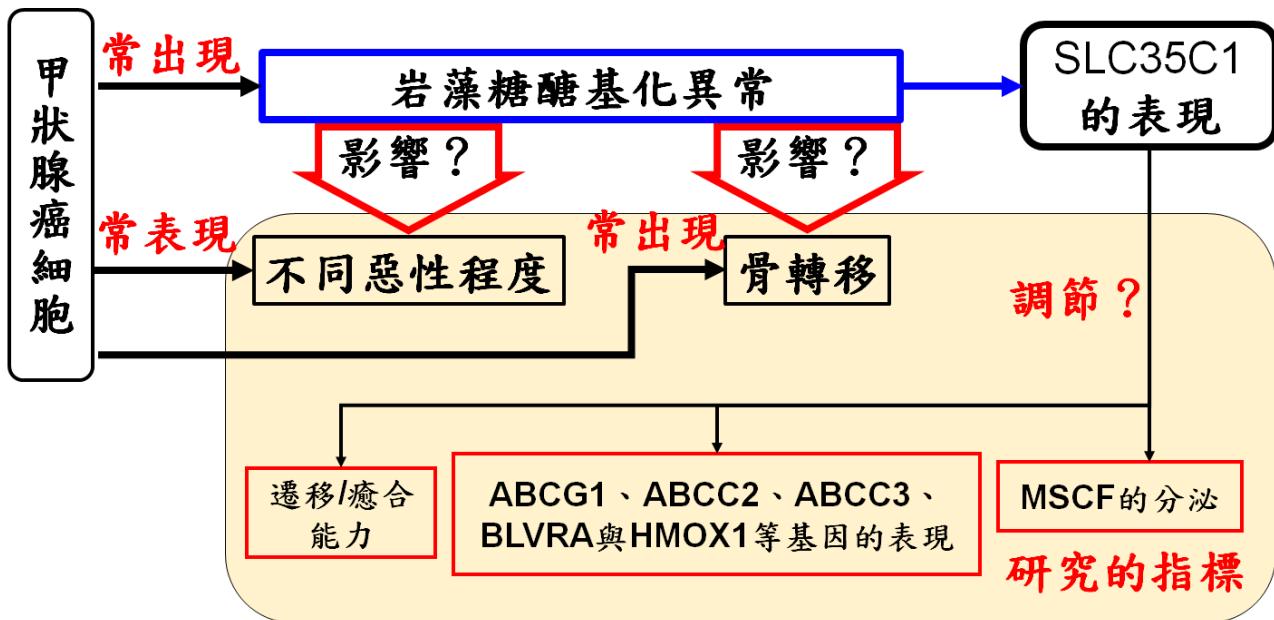
SLC35C1 的代號來自溶質載體家族 35 成員 C1(solute carrier family 35 member C1, SLC35C1)，也稱為 GDP-岩藻糖轉運蛋白(GDP-fucose transporter)。SLC35C1 在高基氏

體和細胞質間運輸 GDP-岩藻糖(GDP-Fucose)，運輸至高基氏體內的岩藻糖可作為受質(圖二 a)，參與蛋白質、脂質和蛋白聚糖的醣基化(Glycosylation)過程，反應所產生的 GMP 再由 SLC35C1 運輸回細胞質(Song, 2013)。醣基化是生物分子合成機制中的一種蛋白質轉譯後修飾，而岩藻糖醣基化廣泛存在於脊椎動物、植物、細菌，岩藻糖醣基化對許多細胞間交互作用與信號傳遞的過程至關重要。癌細胞除唾液酸(Sialic acid)醣化過度表現外，岩藻糖醣基化的異常表現也同樣與癌症有關。核心岩藻糖基化由岩藻糖轉移酶 8 (fucosyltransferase, FUT8)驅動，該酶催化 α 1,6-岩藻糖添加到 N-糖的最內層 GlcNAc 殘基上(圖二 b)。FUT8 在癌症中經常上調，並在免疫逃逸、抗體依賴的細胞毒性(ADCC)以及 TGF- β 、EGF、 α 3 β 1 整合素和 E-鈣黏蛋白的調控中發揮關鍵作用(Song, 2013)。因此本實驗欲透過岩藻糖轉移酶，調控蛋白質的醣基化程度，探討對甲狀腺癌惡性程度與骨轉移所扮演的角色(圖三)，一窺甲狀腺癌與骨骼中富含生長因子的獨特環境，是否產生未被發現的交互作用。



圖二 (a). SLC35C1 作為 GDP-岩藻糖轉運蛋白，將 GDP-岩藻糖運送至高基氏體後，再透過岩藻糖轉移酶 8(FUT8)，進行岩藻糖的醣基化過程(左圖引用自：Boyer, et al., 2022；右圖引用自：Zhang, et al., 2023)。

(b).核心岩藻糖基化示意圖(引用自：Song, 2013)。



圖三 本研究的研究架構示意圖(作者自繪)。

二、研究目的

- (一) 探討 SLC35C1 在不同惡性程度的甲狀腺癌表現差異
- (二) 探討 SLC35C1 對甲狀腺癌遷移能力的影響
- (三) 探討 SLC35C1 對甲狀腺癌細胞癒合能力的影響
- (四) 探討骨骼環境對甲狀腺癌基因表現的影響，包含：ABCG1、ABCC2、ABCC3、HMOX1、BLVRA 與 BLVRB 等
- (五) 探討不同 SLC35C1 表現量的甲狀腺癌細胞對噬骨細胞分化的影響
- (六) 探討不同 SLC35C1 表現量的甲狀腺癌細胞對噬骨細胞相關因子(MCSF)的影響

貳、研究設備及器材

一、實驗材料

- (一) DMEM/F12 培養液、MEM α 培養液、胎牛血清、PS 抗生素、PBS 緩衝液、Trypsin、酒精、Trypan Blue、Itraconazole、DMSO、NucleoZOL、DEPC ddH₂O、isopropanol、Random Hexamer、RT buffer、RNase inhibitor、RT ase、dNTP、ddH₂O、Syber Green、SLC35C1 primer、 β -actin primer、ABCG1 primer、HMOX1 primer、ABCC2 primer、ABCC3 primer、BLVRA primer、BLVRB primer、RANKL、MCSF、RBC lysis buffer、Fixation solution(25% Citrate solution、8% PFA、67% acetone)、TRAP

solution(1.8 ml ddH₂O、20 ul Naphtol、80 ul Acetate、40 ul Tartrate、20 ul sodium Nitrite、20 ul Fast green)、Preserve solution(Glycerin/PBS 1:1)、cystal violet

(二)、以下是已被研究出與骨骼環境相關基因：

- 1.三磷酸腺苷結合匣轉運蛋白 G1(ABCG1)：ABCG1 可能在通過 Wnt/β-連環蛋白和 AMPK 信號通路調節成骨生成中發揮重要作用(*Zhou, et al., 2020*)。
- 2.三磷酸腺苷結合匣轉運蛋白 C2(ABCC2)：肝臟中將膽色素由膽汁方向排到腸道(*van der Schoor, et al., 2015*)。
- 3.三磷酸腺苷結合匣轉運蛋白 G1(ABCC3)：肝臟中將膽色素排到血液中(*van der Schoor, et al., 2015*)。
- 4.血紅素加氧酶 1(HMOX1)：將血紅素轉化為膽綠素，參與前列腺癌與骨骼間的通訊(*Anselmino, et al., 2020*)
- 5.膽綠素還原酶 A(BLVRA)：將膽綠素還原成膽紅素。
- 6.膽綠素還原酶 B(BLVRB)：將膽綠素還原成膽紅素。

二、實驗設備及器材

10cm/6cm 培養皿、微量吸管、微量吸管尖、生物安全櫃、電動吸管、玻璃吸管、50cc/15cc/1.5cc 離心管、離心機、試管架、500mL/250mL 樣品瓶、封口膠膜、剪刀、酒精噴瓶、擦手紙、實驗手套、培養箱、細胞計數儀、顯微鏡、六孔盤、十二孔盤、二十四孔盤、九十六孔盤、微量離心管架、冰桶、RNA 濃度測定機、PCR 管、熱循環儀、PCR 反應管、PCR 機、transwell、濾網、剪刀、針頭、燒杯、棉花棒、鑷子、計時器。

三、研究對象

(一)、FTC-236 源自於人類甲狀腺濾泡癌(follicular thyroid cancer, FTC)，屬於貼附型細胞。本實驗使用 DMEM/F12+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養，每隔 2~3 天繼代一次。

(二)、FTC-133 源自於人類甲狀腺濾泡癌，屬於貼附型細胞。本實驗使用 DMEM/F12+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養，每隔 2~3 天繼代一次。

(三)、ARO82-1 源自於人類甲狀腺未分化癌，屬於貼附型細胞。本實驗使用 DMEM/F12+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養，每隔 2~3 天繼代一次。

(四)、利用轉染技術過度表現 SLC35C1 (T-pro 轉染試劑、pDONR221-
SLC35C1_STOP 質體，質體來源:實驗室提供)，並加入抗生素篩選。增加表現的
FTC-236 源自於人類甲狀腺濾泡癌，屬於貼附型細胞。本實驗使用
DMEM/F12+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養，每隔 2~
3 天繼代一次。

(五)、源自小鼠骨髓的噬骨細胞，未分化前屬於懸浮型細胞，分化後屬於貼附型細胞，
本實驗使用 MEMα+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養。

參、研究過程或方法

一、細胞繼代

- (一)、將培養皿傾斜，吸出培養基，加入可覆蓋培養皿底部的 PBS，輕晃後將液體吸出。
- (二)、加入可覆蓋培養皿底部的 Trypsin 後，放入培養箱中 3~5 分鐘，使原先貼合在盤子底部的細胞與盤底分離。
- (三)、加入適量培養基沖刷盤底並將細胞混和均勻，倒入離心管，以 1000rpm 離心 3 分鐘。
- (四)、去除上清液。回溶在 1mL 培養基混合均勻後，取適量養在培養基中。
- (五)、培養於 37°C 細胞培養箱，培養箱維持 5% 二氫化碳含量。

二、骨髓細胞與條件培養基共培養

- (一)、FTC-236 培養在 10 公分盤，等貼盤完全後更換新的細胞的培養液，24 小時後培養液收集起來，存放在-20°C 冰箱內。
- (二)、以細胞培養液 MEM-Alpha 培養骨髓細胞，骨髓細胞來自小鼠的股骨與脛骨，由實驗室提供。
- (三)、離心 5 分鐘，吸掉上清液後加入 RBC Buffer 5 ml。
- (四)、離心 5 分鐘，藉以移除紅血球。

(五)、吸掉上清液後，以 10ml 的 MEM-Alpha 回溶。

(六)、在含有 5% CO₂的 37°C的恆溫培養箱中培養。

(七)、隔天以 Trypan Blue 計數細胞，依照適當濃度將細胞種在 96 孔細胞招養盤中，並加入蒐集的 FTC-236 細胞培養液共培養。

三、RNA 萃取與定量反轉錄 PCR(RT-qPCR)

(一)、將細胞培養液吸乾後，以 PBS 洗淨 1 次。

(二)、加入適當體積的 NucleoZOL，將細胞移至 eppendorf 內。

(三)、加入 DEPC 水並搖晃，於適溫下靜置 5-8 分鐘。

(四)、將離心機預冷至 4 度後，再進行離心。

(五)、取上清液至新的 eppendorf 內，加入等量的 Isopropanol，並均勻混合，於適溫下靜置 10 分鐘後再離心。

(六)、將上清液移除，加入冰 75% 酒精做清洗，接著離心，再將上清液移除後加入適當的 DEPC 水回溶。

(七)、取出 RNA 以 MMLV Reverse Transcription Kit (Protech Technology Enterprise) 在 PCR 反應儀合成 cDNA。cDNA 製備完成後即可冰在-20 度冰箱保存。

(八)、使用 2% QPCR SyGreen Blue Mix Lo-ROX kit。將溶液配製好，分別為 2X QPCR SyGreen Blue Mix、Forward primer、Reverse primer、DEPC 水，再加入 cDNA。

(九)、啟動聚合酶連鎖反應程式，並調整適當時間與溫度。基因表現則以 B-actin 做為標準值。

四、抗酒石酸酸性磷酸酶染色(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)

(一)、細胞以 100ul 的 PBS 洗滌一次。

(二)、以 4% Paraformaldehyde 50ul 於室溫放置 5 分鐘固定，再以 250wl 去離子水清洗 3 次。

(三)、使用 TRAP Staining Kit(Cosmo bio Co,LTD)染色：將組套內的 Chromogenic Substrate 溶在 5ml 的 Tartrate-containing Buffer 中，再各加入 100wl，放置於 37°C，5% CO₂ 中培養持續 20 分鐘至 30 分鐘。

(四)、於顯微鏡下觀察染色是否成功，成功染上(TRAP positive)的細胞為蝕骨細胞。

(五)、以去離子水清洗，即可終止反應。再以 1:1 的 PBS、甘油(glycerol)配置固定液以固定細胞。

五、細胞計數

- (一)、將細胞以 Trypsin 沖下後，離心(1200rpm,5 分鐘)，再將上清液移除。
- (二)、在細胞中加入適當體積的 culture medium，均勻打散後取 20ul 的液體與 20ul 的 TrypanBlue。均勻混合後即可進行細胞記數。

六、研究過程

- (一)、探討 SLC35C1 在不同惡性程度的甲狀腺癌表現差異。

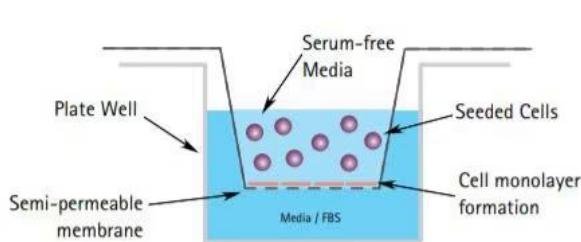
分別將 FTC-236、FTC-133、ARO82-1 培養在 10cm 培養皿，待細胞生長至培養皿七八分滿，利用 Trypsin 收下細胞，透過即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-qPCR)來分析其 mRNA 中的 SLC35C1 表現。

- (二)、探討 SLC35C1 對甲狀腺癌遷移能力的影響

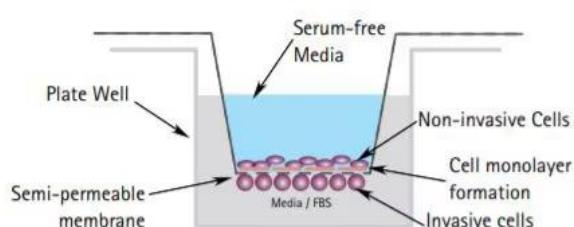
1. 過度表現 SLC35C1 對甲狀腺癌遷移能力的影響

利用 Transwell 法測量細胞的遷移能力(圖四)，在 24 孔盤加入 DMEM/F12+5% 胎牛血清、放上 transwell、加入無血清培養基並依照適合的密度分別種下過度表現與正常表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞(表三)。24 小時後收下第一批樣本並進行染色，48 小時後收下第二批樣本並進行染色(圖五)。本實驗透過 crystal violet 將 transwell 上的膜染色，在顯微鏡下拍攝照片，每格三張，計算被染上的細胞個數，判斷細胞的遷移能力，被染上的細胞個數越多者代表遷移能力越好。

1. Load cell suspension into plate well insert



2. Invading cells migrate and attach to bottom of membrane. Non-invading cells remain above



圖四 Transwell 示意圖：細胞放入 Transwell，待穿過膜上的孔，再計算細胞數
(引用自：Chen, 2005)。

表三 SLC35C1 增加表現對 FTC-236 遷移能力影響 24 孔盤配置。

	24 小時	48 小時
對照組	FTC-236	FTC-236
實驗組	FTC-236(過度表現 SLC35C1)	FTC-236(過度表現 SLC35C1)



圖五 SLC35C1 增加表現對 FTC-236 遷移能力影響的實驗流程圖(作者自繪)。

2. 以 si-RNA 抑制 SLC35C1 表現對甲狀腺癌遷移能力的影響

加入 si-RNA 抑制 FTC-236、FTC-133 的 SLC35C1(表四)。後續步驟同上(圖六)。分析細胞的遷移能力。si-RNA 序列為：5'-UAUCCGAAACUCUUGAUCCtt-3'，長度: 19 nt。

表四 抑制 SLC35C1 表現對 FTC-236 遷移能力影響 24 孔盤配置。

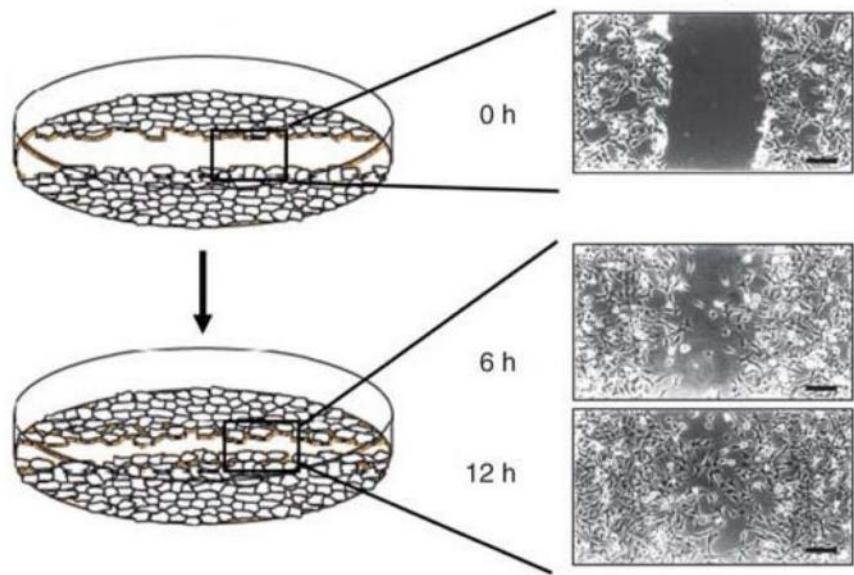
	FTC-236	FTC-133
對照組	FTC-236	FTC-133
實驗組	FTC-236(抑制 SLC35C1 表現)	FTC-133(抑制 SLC35C1 表現)



圖六 抑制 SLC35C1 表現對 FTC-236 遷移能力影響的實驗流程圖(作者自繪)。

(三)、探討 SLC35C1 對甲狀腺癌細胞癒合能力的影響

將 SLC35C1 表現量不同的 FTC-236 養在 3.5 公分盤，待細胞滿盤後劃出線性缺口(圖七)，以即時影像觀測觀察細胞癒合情況 24 小時(圖七、圖八)。



圖七 癒合實驗示意圖(引用自：Moreno-Bueno, *et al.*, 2009)。



圖八 SLC35C1 增加表現對 FTC-236 細胞癒合能力影響的實驗流程圖(作者自繪)。

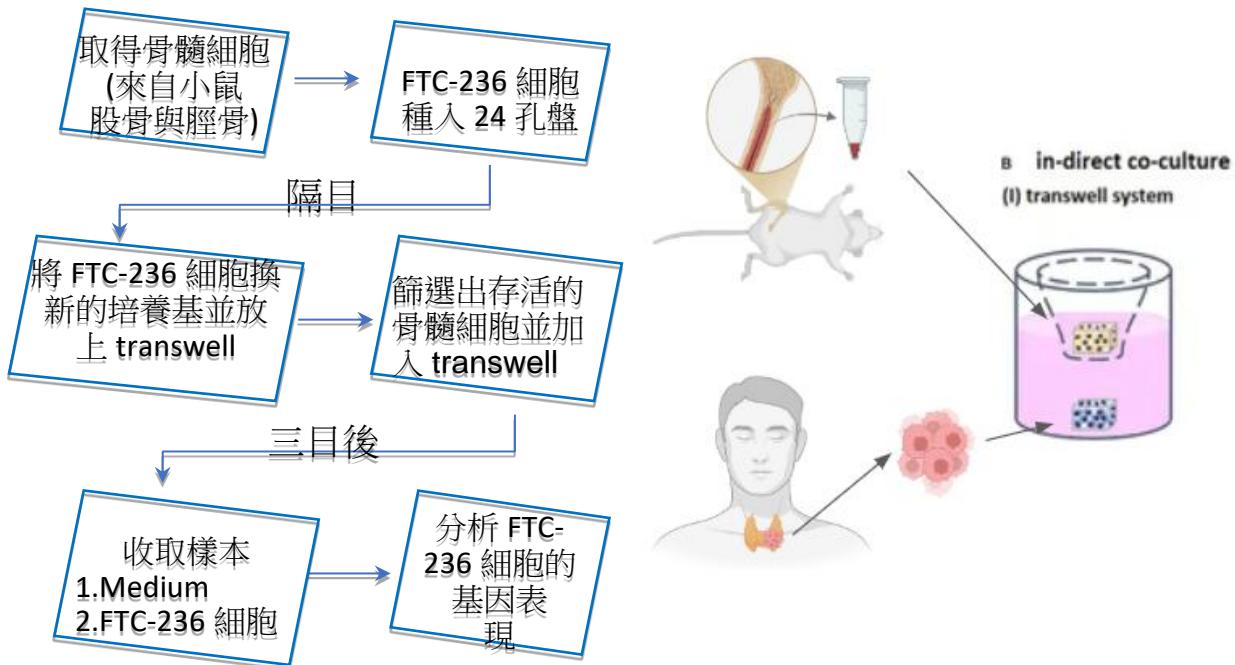
(四)、探討骨骼環境對甲狀腺癌基因表現的影響

ABCC2、ABCC3、HMOX1、BLVRA、BLVRB 與血紅素代謝有關，而血紅素代謝產物膽紅素可抑制噬骨細胞行細胞凋亡(Jurado, *et al.*, 2022)，因此我們想探討甲狀腺癌是否會被骨骼環境影響這些基因的表現。

實驗方法是將骨髓細胞液，透過 RBC Buffer 去除紅血球，使用 MEMα+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養一天(圖九)。

同日將 FTC-236 細胞種在 24 孔盤，待其貼附。隔日將 FTC-236 換新的 DMEM/F12+5% 胎牛血清、放上 transwell 並於其中加入骨髓細胞，放回含有 5% CO₂ 的 37

°C的恆溫培養箱培養 3 天。收取 FTC-236 細胞與培養基。本實驗透過即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-qPCR)來分析其 mRNA 中的基因表現。



圖九 將 FTC-236 與小鼠骨髓細胞共培養的實驗流程圖(作者自繪)。

(五)、探討不同 SLC35C1 表現量的甲狀腺癌細胞對噬骨細胞分化的影響

依照適合的密度，在 24 孔盤中種下 SLC35C1 表現量不同的 FTC-236 細胞，待 24 小時後收下其培養基作為條件培養基。

將骨髓細胞以 RBC lysis buffer 去除紅血球，使用 MEMα+5% 胎牛血清在含有 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱中培養一天。

隔日依照適合的密度在 96 孔盤種下骨髓細胞，並依照 1:1、1:3 的比例混合條件培養基與 MEMα 培養基，加入 96 孔盤。接著加入 50ng/ml RANKL 與 20ng/ml MCSF 促進噬骨細胞分化(圖十)。兩日後幫細胞換新的培養基，條件與先前相同。再一日即可收取樣本並進行染色。

在本實驗中，使用來自小鼠的骨髓細胞，以不同條件培養基與 MEMα 培養基混合後進行培養，評估甲狀腺癌細胞是否會透過其分泌物影響噬骨細胞的分化能力。

條件培養基分別來自兩種 FTC-236 甲狀腺癌細胞：

一為未經基因改造的對照組細胞 (Ctr.)

另一為過度表現 SLC35C1 的實驗組細胞 (Over.)

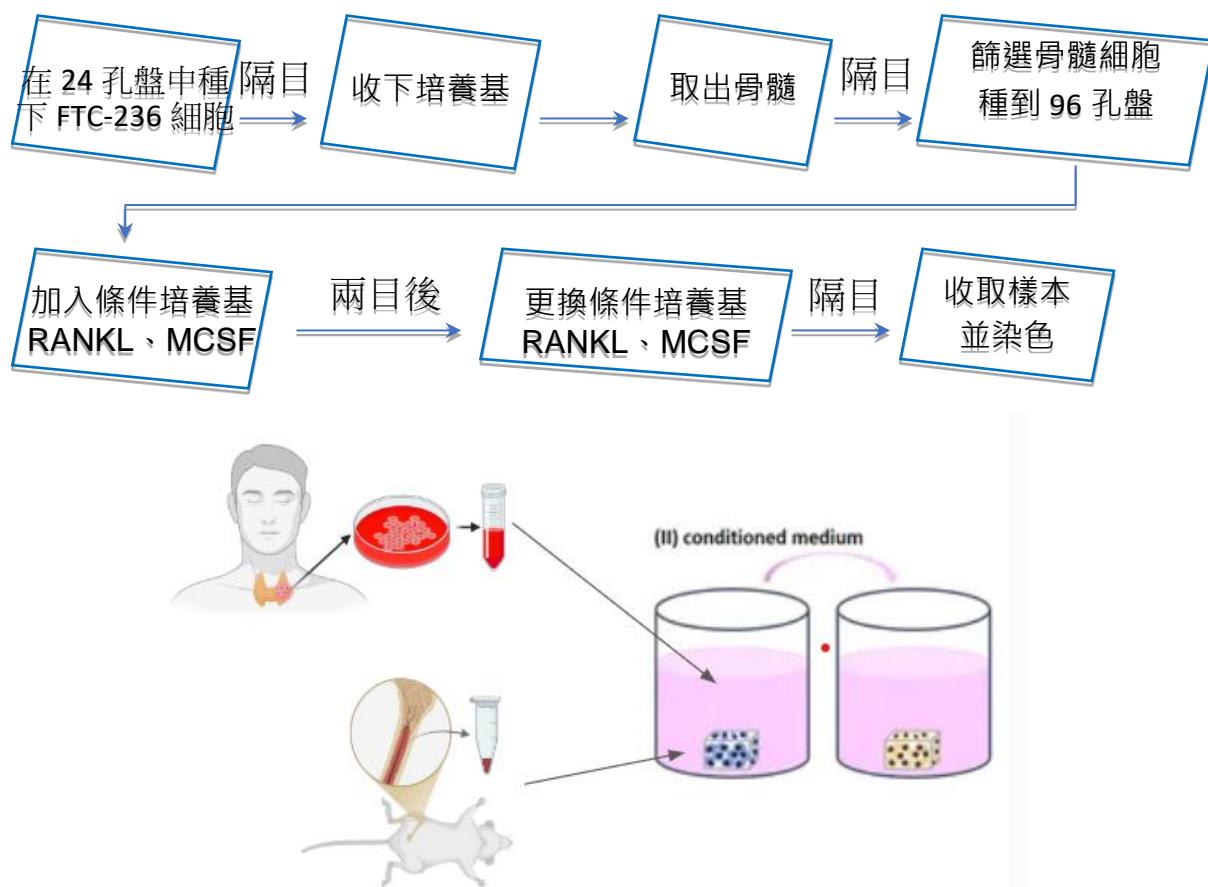
這些條件培養基與 **MEMα** 培養基混合後，共設計出以下五個組別：

1. **MEMα** 培養基單獨使用 (M)：作為空白對照組，用以評估條件培養基是否具有額外影響。
2. 對照組條件培養基與 **MEMα** 培養基以 1:3 的比例混合 (Ctr. : M = 1:3)
3. 過度表現 **SLC35C1** 的條件培養基與 **MEMα** 培養基以 1:3 的比例混合 (Over. : M = 1:3)
4. 對照組條件培養基與 **MEMα** 培養基以 1:1 的比例混合 (Ctr. : M = 1:1)
5. 過度表現 **SLC35C1** 的條件培養基與 **MEMα** 培養基以 1:1 的比例混合 (Over. : M = 1:1)

為確保實驗數據的可靠性與統計效力，每一組皆進行三重複 (triplicate) 培養與觀察。

註：**MEMα** 培養基為骨髓生長所用的培養基；條件培養基為已與甲狀腺癌共培養後的培養基。為避免環境劇烈改變造成骨髓細胞死亡，將兩者以適當比例(**MEMα** 培養基:條件培養基=1:1 或 1:3)混合，達到既能觀察條件培養基對骨髓細胞的影響又不會使其死亡。

本實驗利用噬骨細胞活性酵素抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase; TRAP)染色，被染色的細胞即為已分化成功的噬骨細胞。透過計算被染上的細胞個數，可得知不同 **SLC35C1** 表現量的甲狀腺癌細胞對噬骨細胞分化的影響。



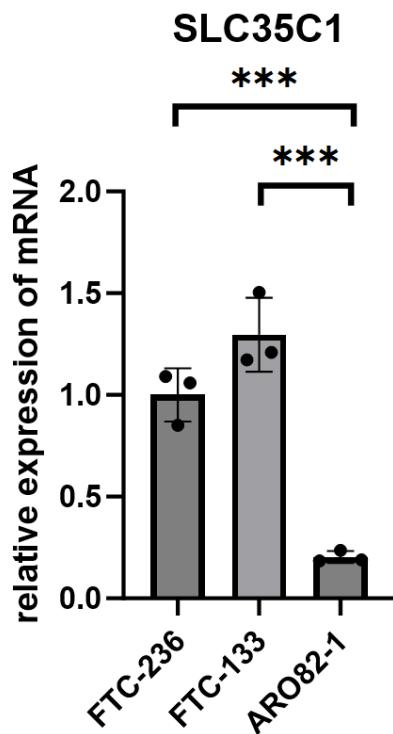
圖十 噬骨細胞以條件培養基培養的實驗流程圖(作者自繪)。

(六)、探討不同 **SLC35C1** 表現量的甲狀腺癌細胞，對噬骨細胞相關因子(MCSF)的影響
分別將 **FTC-236**、**FTC-236** 過度表現 **SLC35C1** 的細胞培養在 10cm 培養皿，待細胞
生長至培養皿七八分滿，利用 **Trypsin** 收下細胞，透過即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-
qPCR)來分析其 mRNA 中的 MCSF 表現。

肆、研究結果

一、探討 **SLC35C1** 在不同惡性程度的甲狀腺癌表現差異

在不同惡性程度的甲狀腺癌細胞中，**SLC35C1** 的表現量為 **FTC-133** 大於 **FTC-236**，
FTC-236 又大於 **ARO82-1**(圖十一)，代表甲狀腺濾泡癌的 **SLC35C1** 表現量大於甲狀腺未分
化癌。也就是說，較為惡性的甲狀腺未分化癌，**SLC35C1** 表現量低於較不惡性的甲狀腺濾
泡癌。



圖十一 各甲狀腺癌的 **SLC35C1** 表現量(作者自繪)。

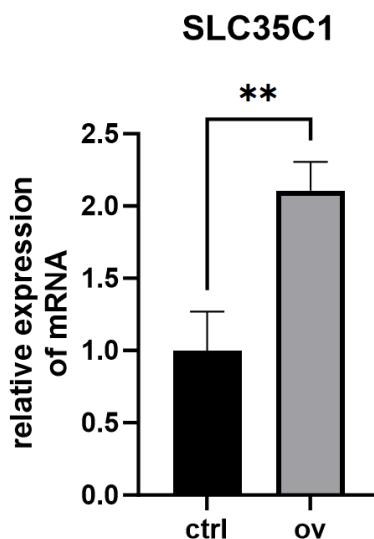
(平均 \pm 標準誤， $n = 3$ ，two-tailed t-test)。

(* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.005$)

二、探討 SLC35C1 對甲狀腺癌遷移能力的影響

(一)、SLC35C1 增加表現對 FTC-236 遷移能力影響

利用轉染技術過度表現 SLC35C1(圖十二)，再進行遷移能力實驗，結果顯示，過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 遷移細胞數，在 24 小時和 48 小時都較對照組少(表五)，分別量化細胞數量並進行統計分析，過度表現 SLC35C1 的 FTC-236，遷移細胞數量確實有下降的現象(圖十三)。

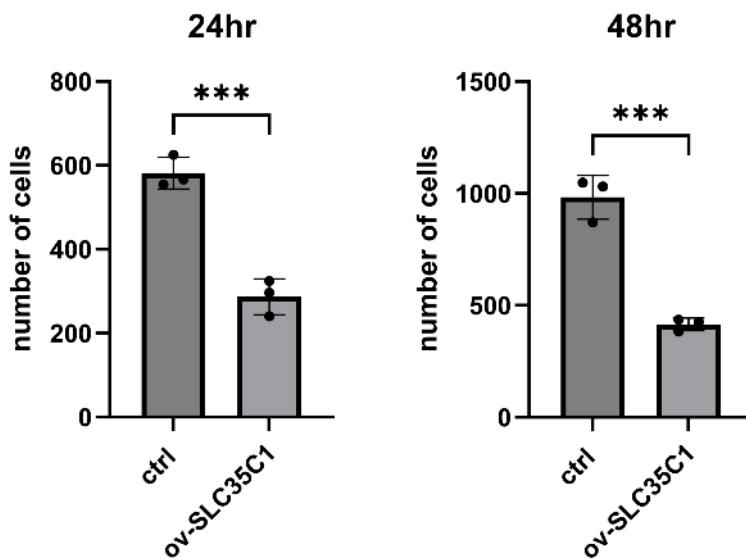


圖十二 利用轉染技術過度表現 SLC35C1 與原來細胞基因表現比較(作者自繪)。

(ctrl:正常的 FTC-236 細胞；ov: 利用轉染技術過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞)。(平均 \pm 標準誤， $n = 3$ ，two-tailed t-test)。

表五 過度表現 SLC35C1 後，細胞遷移 24 小時與 48 小時在顯微鏡下的觀察結果。
(作者拍攝)

	24 小時	48 小時
對照組		
實驗組 (過度表現 SLC35C1)		



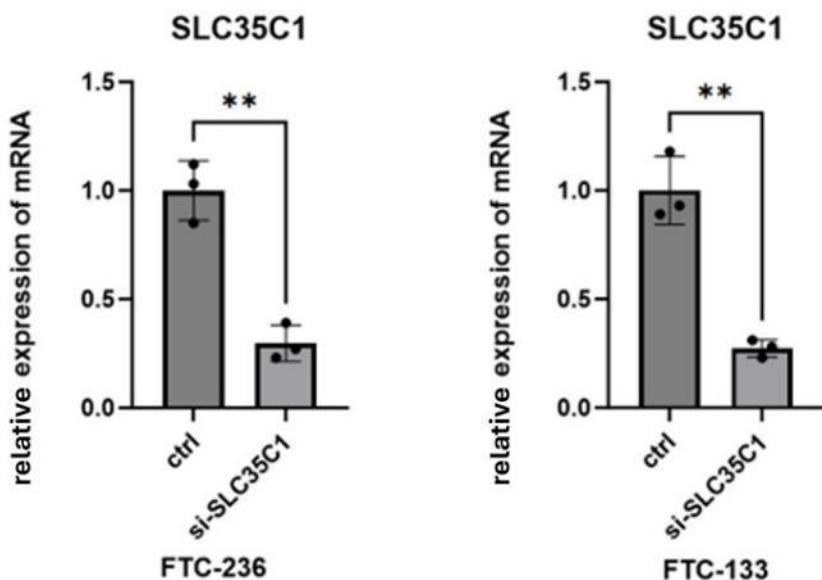
圖十三 過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 與正常 FTC-236 的細胞遷移數目/每張照片

(作者自繪) (平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)。

(ctrl:正常的 FTC-236 細胞；ov: 利用轉染技術過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞)。

(二)、以 si-RNA 抑制 SLC35C1 表現對甲狀腺癌遷移能力的影響

以 si-RNA 抑制 SLC35C1 表現(圖十四)，再進行遷移能力實驗，結果顯示，抑制 SLC35C1 表現的 FTC-236 和 FTC-133 遷移細胞數在 24 小時都較對照組多(表六)，分別量化細胞數量並進行統計分析，抑制 SLC35C1 的 FTC-236、FTC-133 遷移細胞數量確實有上升的現象(圖十五)。



圖十四 加入 si-RNA 抑制 SLC35C1 與原來細胞基因表現比較(作者自繪)

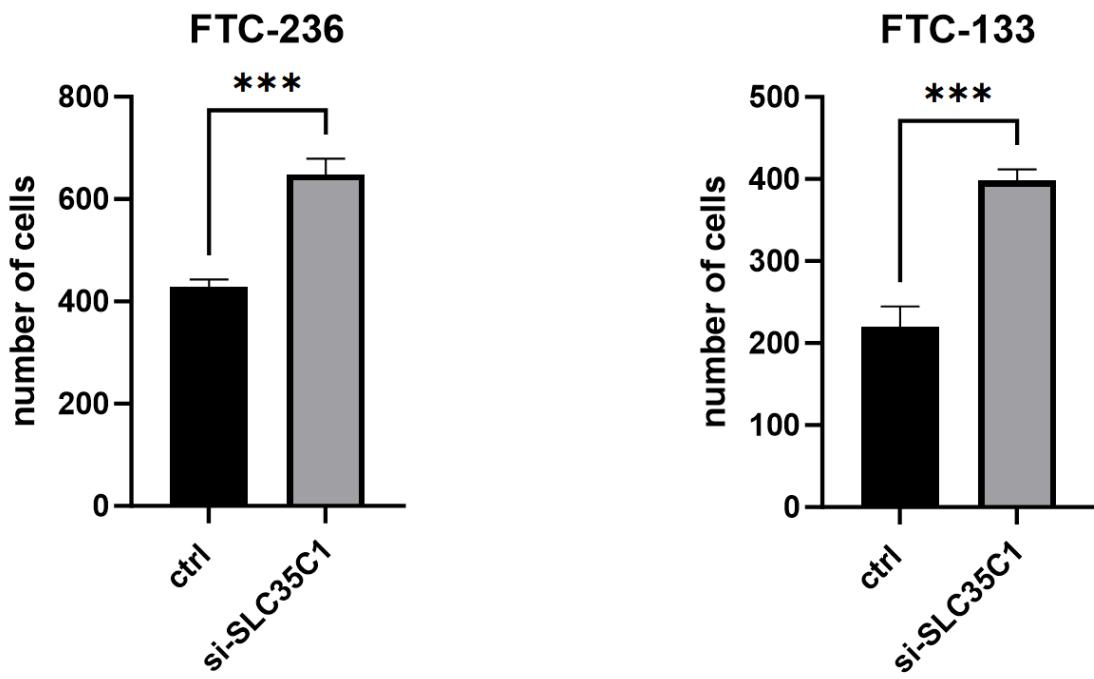
(平均 \pm 標準誤， $n = 3$ ，two-tailed t-test)

(ctrl:正常的 FTC-236、FTC-133 細胞；si: 以 si-RNA 抑制 SLC35C1 表現 SLC35C1 的 FTC-236、FTC-133 細胞)。

表六 抑制 SLC35C1 表現後，細胞遷移 24 小時在顯微鏡下的觀察結果。

(作者拍攝)

	FTC-236	FTC-133
對照組		
實驗組 (抑制 SLC35C1 表 現)		

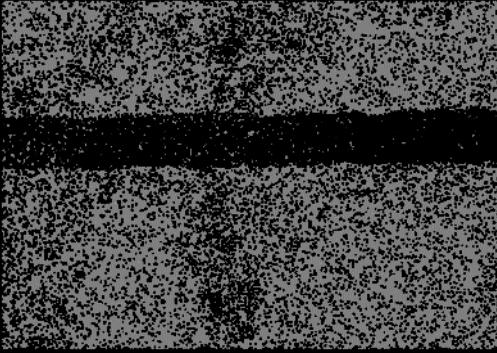
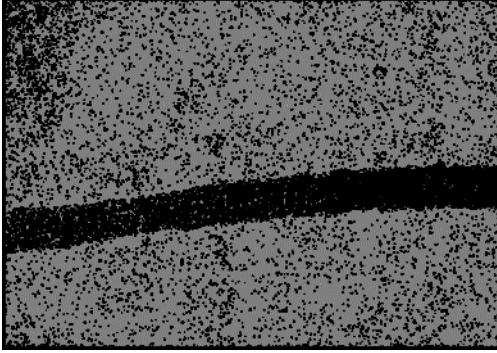
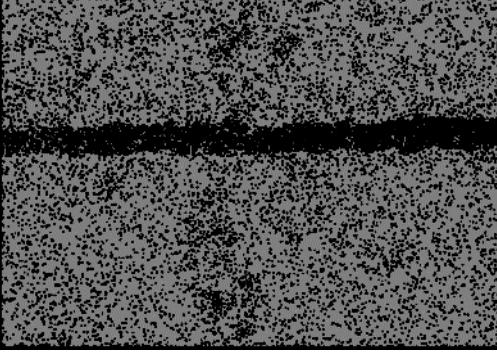
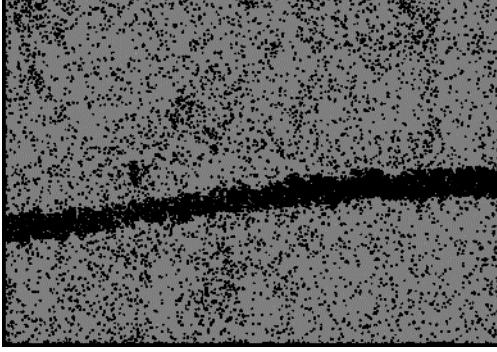
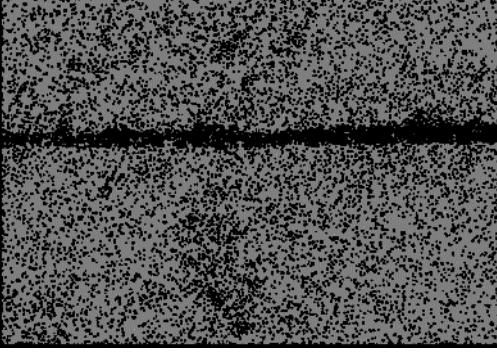
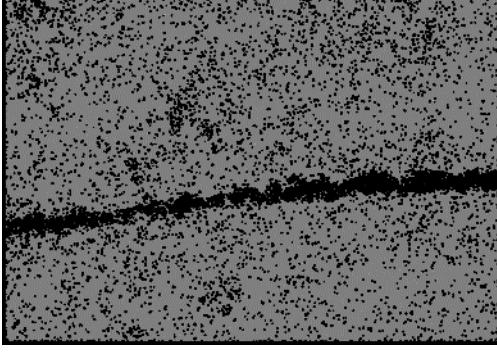
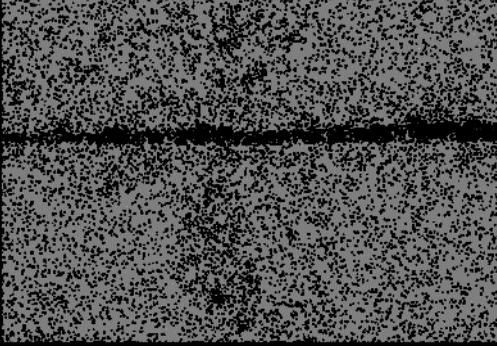
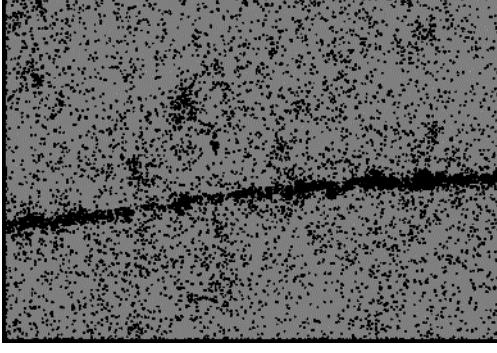


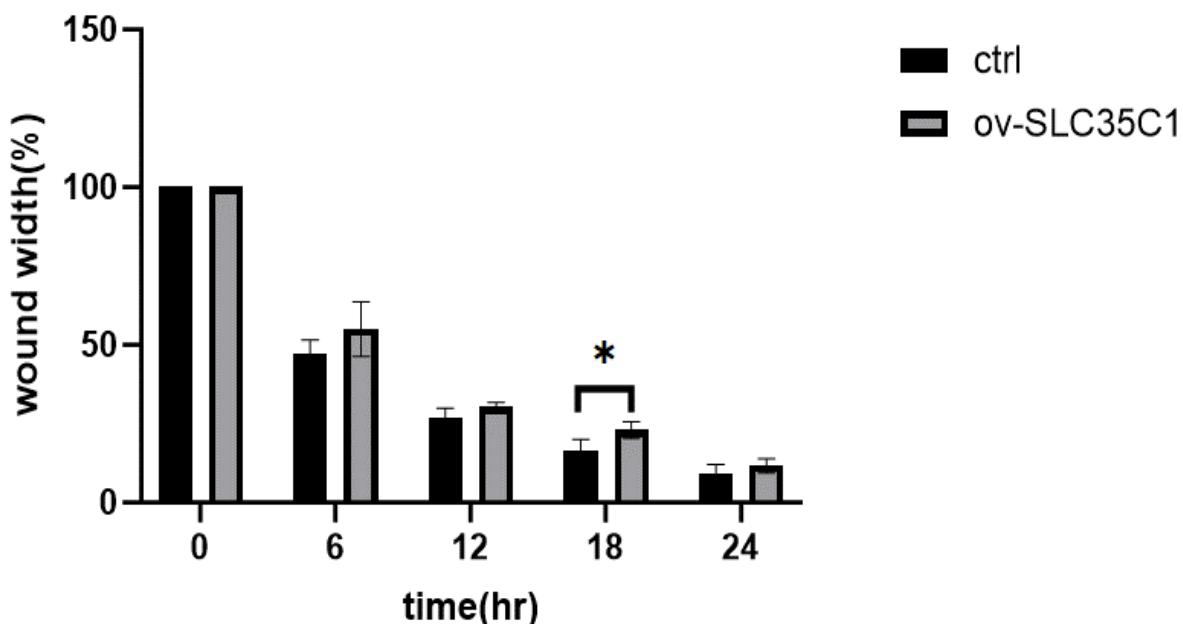
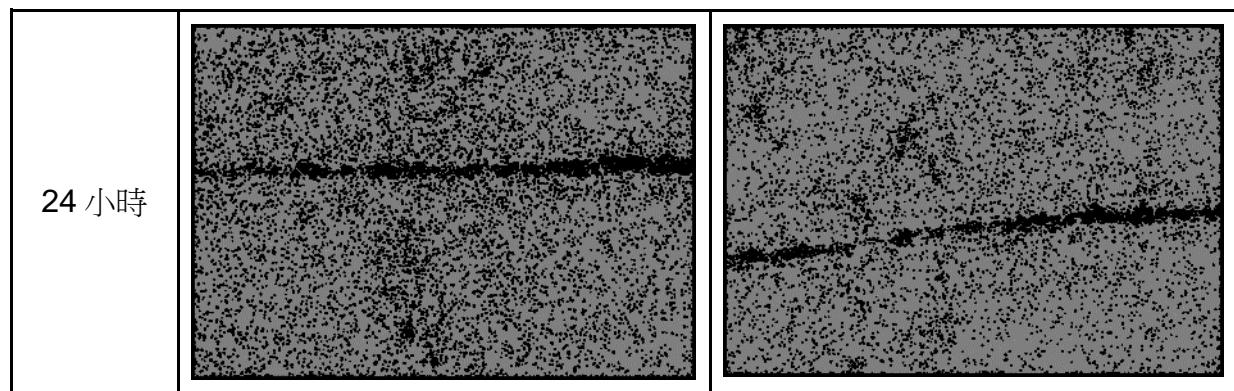
圖十五 抑制 SLC35C1 表現的 FTC-236、FTC-133 與正常 FTC-236、FTC-133 的細胞遷移
 數目/每張照片(作者自繪) (平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)。
 (ctrl:正常的 FTC-236、FTC-133 細胞；si: 以 si-RNA 抑制 SLC35C1 表現
 SLC35C1 的 FTC-236、FTC-133 細胞)。

三、探討 SLC35C1 對甲狀腺癌細胞癒合能力的影響

在癒合能力的實驗中，計算癒合實驗中的傷口寬度(表七)，過度表現 SLC35C1 的甲狀腺癌細胞，傷口寬度大於對照組，表示其癒合能力小於對照組(圖十六)。

表七 細胞傷口癒合實驗在 0-24 小時間的觀察(作者拍攝)。

	對照組	實驗組 (過度表現 SLC35C1)
0 小時		
6 小時		
12 小時		
18 小時		



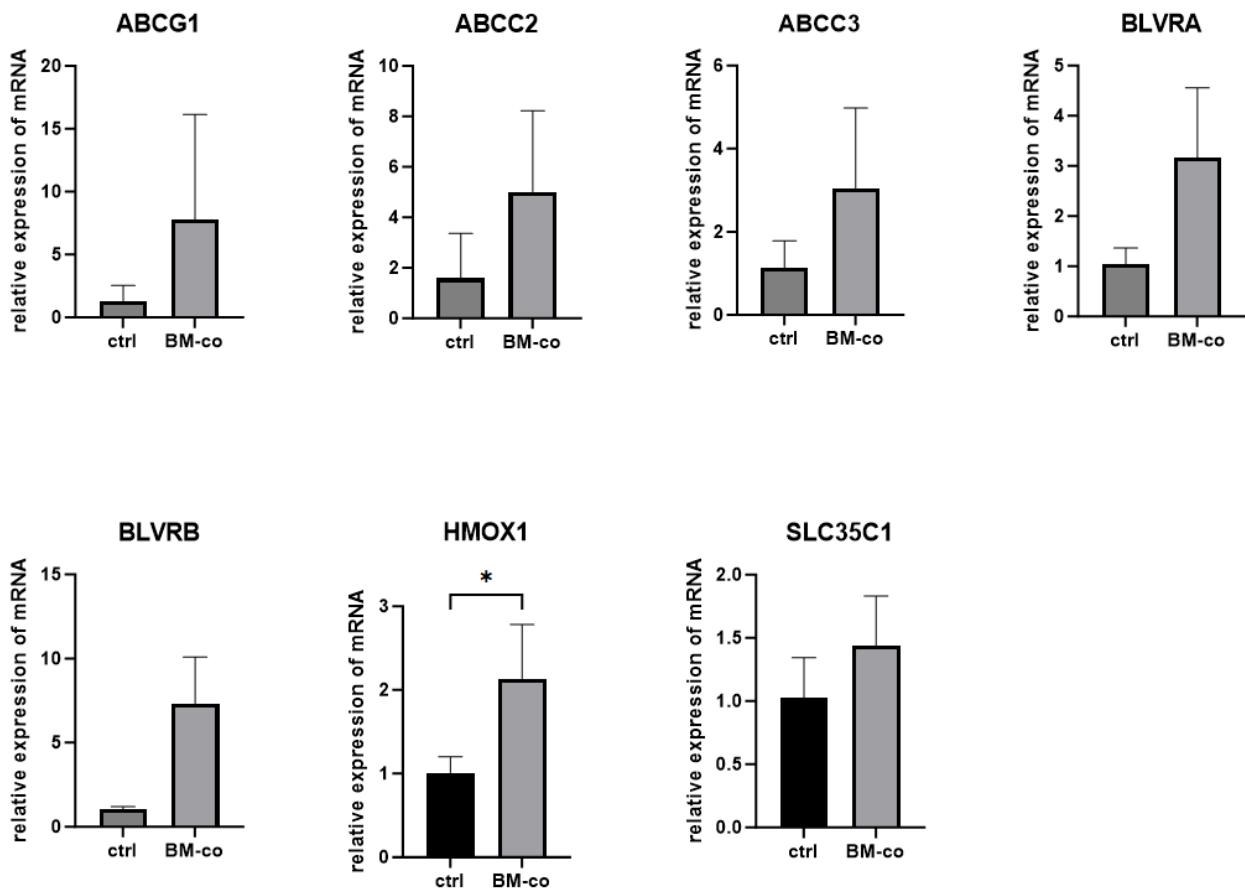
圖十六 癒合實驗中的傷口寬度隨時間變化(平均 \pm 標準誤， $n = 3$ ，two-tailed t-test)。

縱軸：細胞傷口寬占原傷口寬的百分比，橫軸：劃出線性缺口後所經歷時間。(作者自繪) (ctrl:正常的 FTC-236 細胞；ov: 利用轉染技術過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞)。(* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.005$)。

四、探討骨組織環境對甲狀腺癌基因表現的影響

甲狀腺癌細胞(FTC-236)在與小鼠骨髓細胞共培養的環境下，比較甲狀腺癌細胞 ABCG1、ABCC2、ABCC3、BLVRA、BLVRB、SLC35C1、HMOX1 等基因的 mRNA 表現量，實驗結果發現各組 mRNA 皆較對照組增加，但只有 HMOX1 組達到統計上的顯著差異(圖十八)。分析 SLC35C1 與其他各基因的 mRNA 表現量，線性回歸分析結果發現，

ABCG1、ABCC2、ABCC3、BLVRA 與 HMOX1 的表現皆與 SLC35C1 呈正相關，且達統計上的顯著差異(圖十九)。

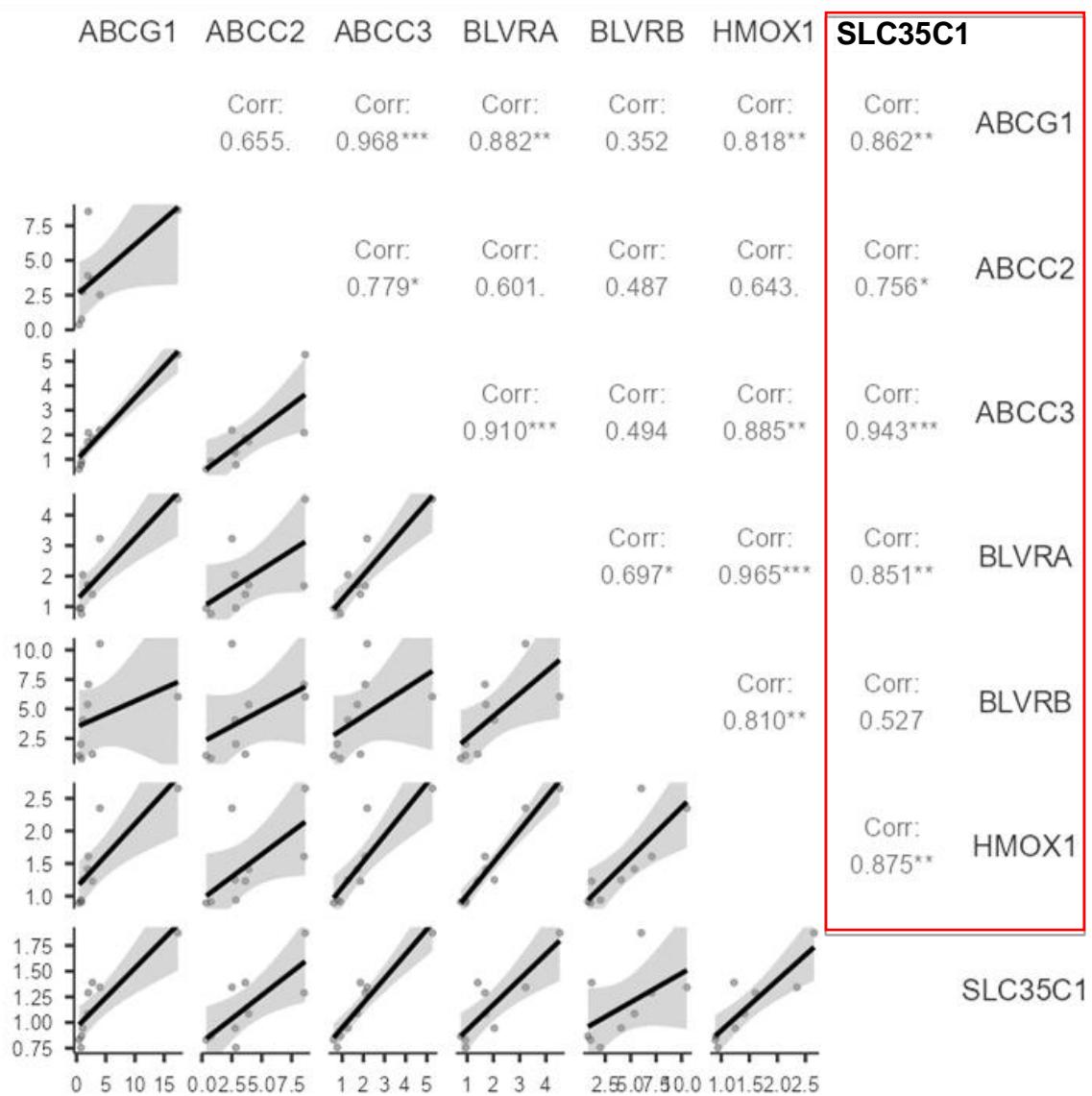


圖十八 FTC-236 在小鼠骨髓共培養環境下的 mRNA 表現量(作者自繪)

(平均 \pm 標準誤， $n = 3$ ，two-tailed t-test)。

(ctrl:正常的 FTC-236 細胞；BM-co: 與骨髓細胞共培養的 FTC-236 細胞)。

(* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.005$)。

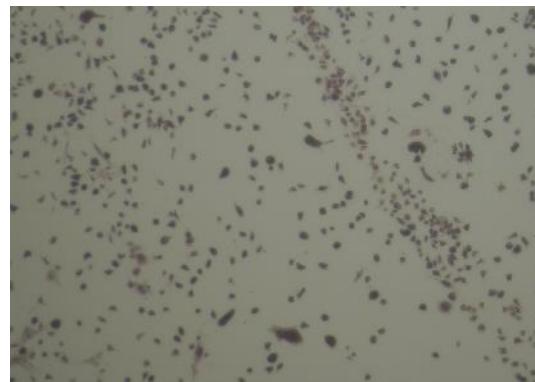


圖十九 SLC35C1 與其他基因 mRNA 表現量的線性回歸分析 (作者自繪)
(使用 jamovi 軟體) (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.005$, Pearson 檢定)

五、探討不同 SLC35C1 表現量的甲狀腺癌細胞(FTC-236)對噬骨細胞分化的影響

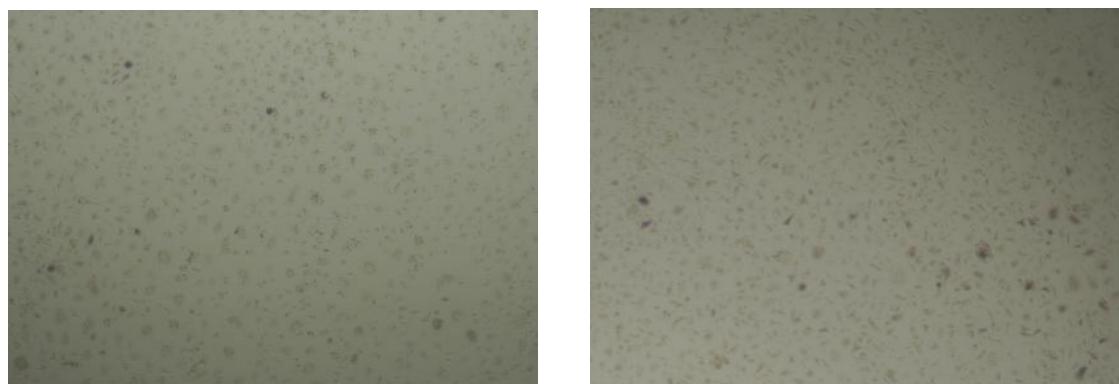
圖二十為 FTC-236 甲狀腺癌細胞與正常小鼠骨髓培養時的細胞型態照片。

若甲狀腺癌細胞(FTC-236)過度表現 SLC35C1，所產生的條件培養基，可促進較多的噬骨細胞分化，無論骨髓細胞是否表現 SLC35C1 (圖二十一、圖二十二)。



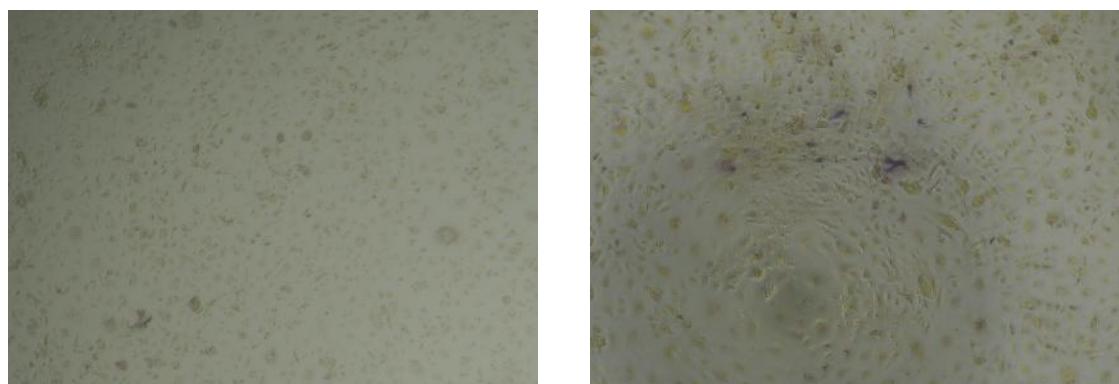
圖二十 FTC-236 與正常小鼠骨髓(flf)共培養的細胞型態(作者拍攝)。

(一)、正常小鼠骨髓以條件培養基與 MEM α 培養基 1:3 混合培養



圖二十一 正常小鼠骨髓以條件培養基與 MEM α 培養基 1:3 混合培養染色後的細胞型態照片
(作者拍攝)。左圖：對照組；右圖：FTC-236 過度表現 SLC35C1。

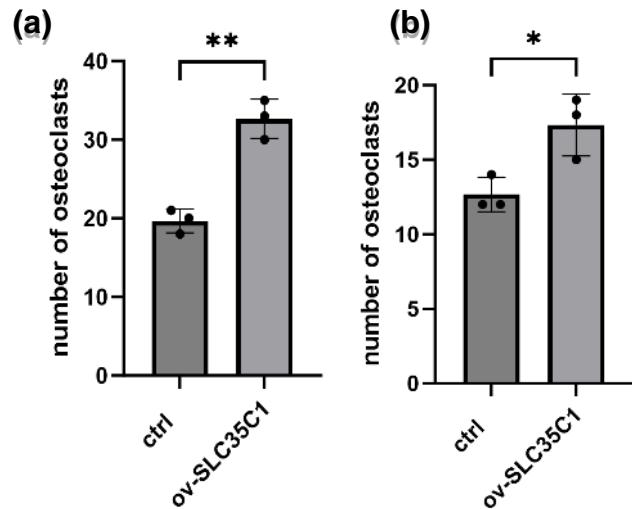
(二)、正常小鼠骨髓以條件培養基與 MEM α 培養基 1:1 混合培養



圖二十二 正常小鼠骨髓以條件培養基與 MEM α 培養基 1:1 混合培養染色後的細胞型態照片
(作者拍攝)。左圖：對照組；右圖：FTC-236 過度表現 SLC35C1。

(三)、統計結果

分別量化細胞數量並進行統計分析，在用過度表現 **SLC35C1** 的條件培養基的噬骨細胞分化數量確實有上升的趨勢(圖二十三)。



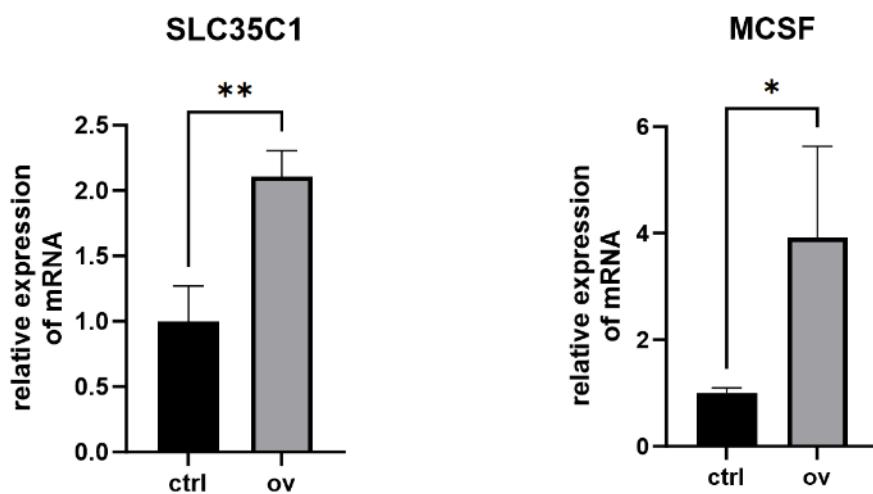
圖二十三 正常小鼠骨髓條件培養基與 MEMα 培養基(a)與 1:1 混合培養(b)1:3 混合培養

(作者自繪) (平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)。ov：過度表現組。

(ctrl:正常的 FTC-236 細胞；ov: 利用轉染技術過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞)。

六、探討不同 SLC35C1 表現量的甲狀腺癌細胞對噬骨細胞相關因子的影響

過度表現 SLC35C1 的 FTC-236，其 MCSF 的 mRNA 表現量增加(圖二十四)。此外，兩組 RANKL 都因表現量太少而無法測得。



圖二十四 過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞，SLC35C1 與 MCSF 的 mRNA 表現量

(作者自繪) (平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)。

(ctrl:正常的 FTC-236 細胞；ov: 利用轉染技術過度表現 SLC35C1 的 FTC-236 細胞)。

伍、討論

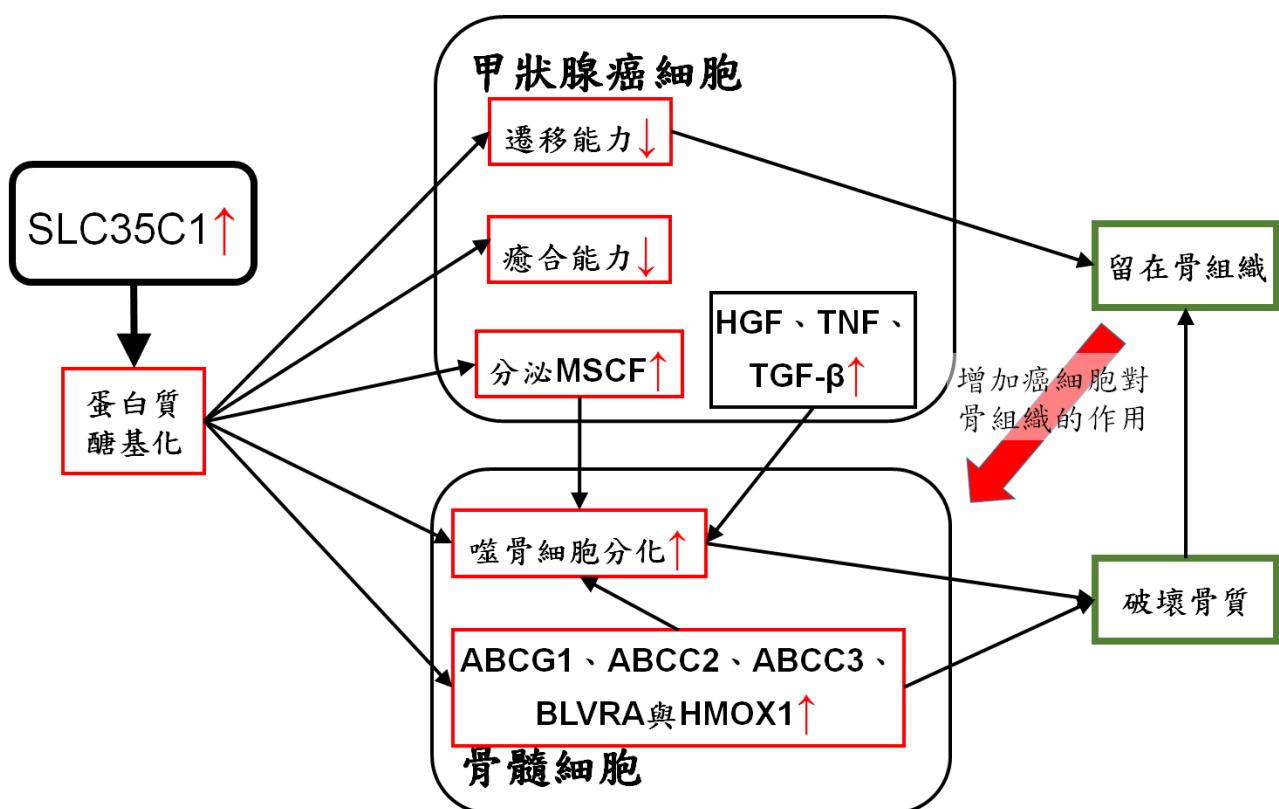
在探討 **SLC35C1** 在不同惡性程度的甲狀腺癌表現差異的實驗中，我們發現，在越惡性的甲狀腺癌細胞，**SLC35C1** 的表現量較少，這與我們在臨床資料庫得到的結論相反，目前仍在研究細胞實驗與臨床結果的差異。而我們也發現過度表現 **SLC35C1**，會使細胞的遷移能力與癒合能力下降。說明岩藻糖基化可能會使細胞的遷移能力下降，但癒合能力下降。

骨侵犯是甲狀腺癌的重要特色，約 70%的甲狀腺癌患者在發現骨轉移後的四年內死亡，表明骨轉移的預後非常不良，甲狀腺癌細胞的骨轉移通常是以蝕骨性病變的形式出現，腫瘤細胞會導致骨質的破壞而非形成新的骨質。腫瘤細胞可以通過釋放多種細胞因子和生長因子來改變骨微環境，這些因子包括肝細胞生長因子(HGF)、腫瘤壞死因子(TNF)和轉化生長因子 β (TGF- β)等，這些因子促進腫瘤的生長和轉移。腫瘤細胞可以刺激破骨細胞的活化，導致骨質疏鬆和骨轉移的形成，這一過程被稱為“惡性循環”，即腫瘤細胞的存在促進了骨的破壞，而骨的破壞又釋放出更多的生長因子，進一步促進腫瘤的生長。

關於甲狀腺癌細胞與骨骼微環境的互動(圖二十五)，我們透過骨髓共培養，模擬甲狀腺癌轉移到骨骼時的情況，發現骨骼環境會使甲狀腺癌 **SLC35C1** 的 mRNA 表現量有上升的趨勢，但因為標準差太大而未達統計差異，骨骼環境可能增加岩藻糖基化，而岩藻糖基化改變了細胞甲狀腺癌細胞所釋出的物質。也說明骨環境會使甲狀腺癌細胞遷移與癒合能力下降，不再繼續轉移。過度表現 **SLC35C1** 甲狀腺癌細胞所製造出的環境，會使骨骼中噬骨細胞分化增加，加速侵蝕骨骼，也會釋放出更多促進腫瘤生長的因子，腫瘤繼續一邊增加岩藻糖基化一邊釋出相關因子，促進腫瘤生長與骨蝕，這種相互作用形成了一個惡性循環，進一步推動腫瘤的擴散與骨質的破壞。後續結果顯示過度表現 **SLC35C1** 的甲狀腺癌 **MCSF** 的 mRNA 表現量上升，也驗證了 **SLC35C1** 可能透過上調 **MCSF**，使 **MCSF** 與噬骨細胞上受體結合，刺激噬骨細胞分化。透過進一步分析發現 **ABCG1**、**ABCC2**、**ABCC3**、**BLVRA** 與 **HMOX1** 的表現皆與 **SLC35C1** 呈正相關，**ABCG1**、**ABCC2**、**ABCC3**、**BLVRA** 與 **HMOX1** 協助血紅素代謝成膽紅素，而文獻中提到膽紅素增加了與噬骨細胞有關的 miRNA 的表達，抑制噬骨細胞的細胞凋亡，增加其生存能力，更進一步促進了噬骨作用(Susana Jurado, 2022)。說明 **SLC35C1** 也可能透過增加膽紅素代謝，抑制噬骨細胞凋亡，以另個路徑促進了噬骨作用，加重了骨質的破壞。

綜合以上，我們提出一個解釋：**SLC35C1** 表現下降，使甲狀腺癌細胞遷移能力增加（更為惡性），但在骨環境中，會刺激其 **SLC35C1** 表現量上升，而使更多岩藻糖醣基化，使甲狀腺癌細胞遷移能力下降，不再繼續轉移，同時岩藻糖醣基化也上調 **MCSF**，使腫瘤細胞排出更多 **MCSF** 與噬骨細胞上受體結合，刺激噬骨細胞分化分解骨基質。岩藻糖醣基化同時也上調 **ABCG1**、**ABCC2**、**ABCC3**、**BLVRA** 與 **HMOX1**，促進膽紅素代謝，制噬骨細胞凋亡，進而促進了噬骨細胞分解骨基質，製造骨骼特殊環境。這些說明了岩藻糖與岩藻糖醣基化作為腫瘤與骨微環境互動中的關鍵因子。

而由上述所延伸出的問題：骨組織是否會想辦法讓未分化的細胞留在骨髓？未分化癌細胞到骨骼後是否能維持高侵襲力，還有待討論。



圖二十五 **SLC35C1** 的過度表現對癌細胞與骨環境互動的調節關係(作者自繪)。

陸、結論

- 一、過度表現 **SLC35C1** 會降低甲狀腺癌的遷移能力。
- 二、過度表現 **SLC35C1** 會降低甲狀腺癌的增加癒合能力。
- 三、甲狀腺癌細胞 **SLC35C1** 透過上調 **MCSF** 促進噬骨細胞分化，加速侵蝕骨骼，骨質釋放出更多促進腫瘤生長的因子，這種相互作用形成了一個惡性循環，進一步推動腫瘤的擴散與骨質的破壞。
- 四、以骨髓共培養模擬骨微環境會上調甲狀腺癌細胞 **SLC35C1**，使未分化甲狀腺癌細胞遷移能力下降，不再繼續轉移，繼續侵蝕骨骼。
- 五、**SLC35C1** 的活性增加，在骨骼環境可提升 **ABCG1**、**ABCC2**、**ABCC3**、**BLVRA** 與 **HMOX1** 表現增加，增加膽紅素代謝，抑制噬骨細胞凋亡，進而促進了噬骨作用，加重了骨質的破壞。
- 六、未來發展方向與應用
 - (一)、探討骨骼環境的岩藻糖含量變化，如何影響甲狀腺癌的 **SLC35C1** 表現
 - (二)、探討甲狀腺癌在骨組織中的遷移能力
 - (三)、探討甲狀腺癌膜上的糖蛋白如何影響其惡性程度
 - (四)、透過更了解 **SLC35C1** 與岩藻糖醣基化與甲狀腺癌的骨轉移的關係，提供研究方向與可能的治療方法。

柒、參考資料及其他

- Anselmino, N., Starbuck, M., Labanca, E., Cotignola, J., Navone, N., Gueron, G., Zenclussen, A. C., & Vazquez, E. (2020). Heme oxygenase-1 is a pivotal modulator of bone turnover and remodeling: Molecular implications for prostate cancer bone metastasis. *Antioxidants & redox signaling*, 32(17), 1243–1258.
<https://doi.org/10.1089/ars.2019.7879>
- Chen, H. C. (2005). Boyden chamber assay. In: Guan, JL. (eds) Cell Migration. Methods in Molecular Biology™, vol 294. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:015>
- Glantschnig, H., Fisher, J. E., Wesolowski, G., Rodan, G. A., & Reszka, A. A. (2003). M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell death and differentiation*, 10(10), 1165–1177.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401285>
- Jurado, S., Parés, A., Peris, P., Combalia, A., Monegal, A., & Guañabens, N. (2022). Bilirubin increases viability and decreases osteoclast apoptosis contributing to osteoporosis in advanced liver diseases. *Bone*, 162, 116483.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116483>
- Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F., & Cano, A. (2009). The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature protocols*, 4(11), 1591–1613.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.152>
- R2 Genomics Analysis and Visualization 資料庫：<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>
- Song Z. (2013). Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 590–600.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.004>
- Suva, L. J., Washam, C., Nicholas, R. W., & Griffin, R. J. (2011). Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Endocrinology*, 7(4), 208–218. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.227>
- van der Schoor, L. W., Verkade, H. J., Kuipers, F., & Jonker, J. W. (2015). New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 11(2), 273–293.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2015.981152>

- Wang, T. Y., Liu, C. L., Chen, M. J., Lee, J. J., Pun, P. C., & Cheng, S. P. (2015). Expression of haem oxygenase-1 correlates with tumour aggressiveness and BRAF V600E expression in thyroid cancer. *Histopathology*, 66(3), 447–456.
<https://doi.org/10.1111/his.12562>
- Zhang, Y., Zhang, N., Song, W., Yousuf, S., & Li, W. (2023). Ablation of the GDP-fucose transporter suppresses lung cancer cell proliferation and migration by reducing expression of PD-L1. *Journal of Cancer*, 14(17), 3295–3308.
<https://doi.org/10.7150/jca.84652>
- Zhou, L., Sun, S., Zhang, T., Yu, Y., Xu, L., Li, H., Wang, M., & Hong, Y. (2020). ATP-binding cassette g1 regulates osteogenesis via Wnt/β-catenin and AMPK signaling pathways. *Molecular biology reports*, 47(10), 7439–7449.
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05800-0>

周倩明，2018年12月，甲狀腺癌：認識甲狀腺癌的特性、治療及跟進。香港防癌協會。

【評語】052014

本研究主要著眼於分析 GDP-岩藻糖轉運蛋白 (SLC35C1) 在甲狀腺癌細胞惡性度與轉移相關行為 (如遷移與癒合能力)，以及與骨髓來源噬骨細胞相關功能的分子調控。本研究主題新穎且具醫學臨床意義，具醫學研究潛力，但仍有一些意見與建議如下：

1. 膽紅素增加導致噬骨細胞不凋亡的機制並無直接實驗佐證 (例如 miRNA 表現量未驗證)。
2. SLC35C1 在資料庫高惡性度表現高，但細胞層級反而發現高惡性細胞表現低，值得更深入機轉探討 (如上游調控、mRNA 穩定性等)。
3. 未來若能導入小鼠異種移植 (Xenograft Model) 或骨轉移模型進一步觀察，將大幅提升應用性與可信度。
4. 部分數據重覆數與統計顯著性略低：n=3 基本合格，但標準差若過大或趨勢不明確，應提高樣本、嚴格數據處理。
5. 下游機制驗證深度仍可提升：除 qPCR 外，若能加入蛋白層級、活性分析，甚至嘗試抑制下游如 MCSF、BCG1、HMOX1 等，呼應實驗邏輯會更完整。
6. 甲狀腺癌本身具有多種亞型，且腫瘤細胞可能存在高度的異質性。本研究和後續討論未提及 SLC35C1 在不同亞型甲狀腺

癌中的表現和作用是否存在差異，這可能會影響結果的普遍性。

作品海報

以SLC35C1探討蛋白質醣基化在甲狀腺癌 惡性程度及與骨髓細胞交互作用的角色



壹、前言

甲狀腺癌骨轉移

• 機率高、預後差、逐步破壞骨骼結構

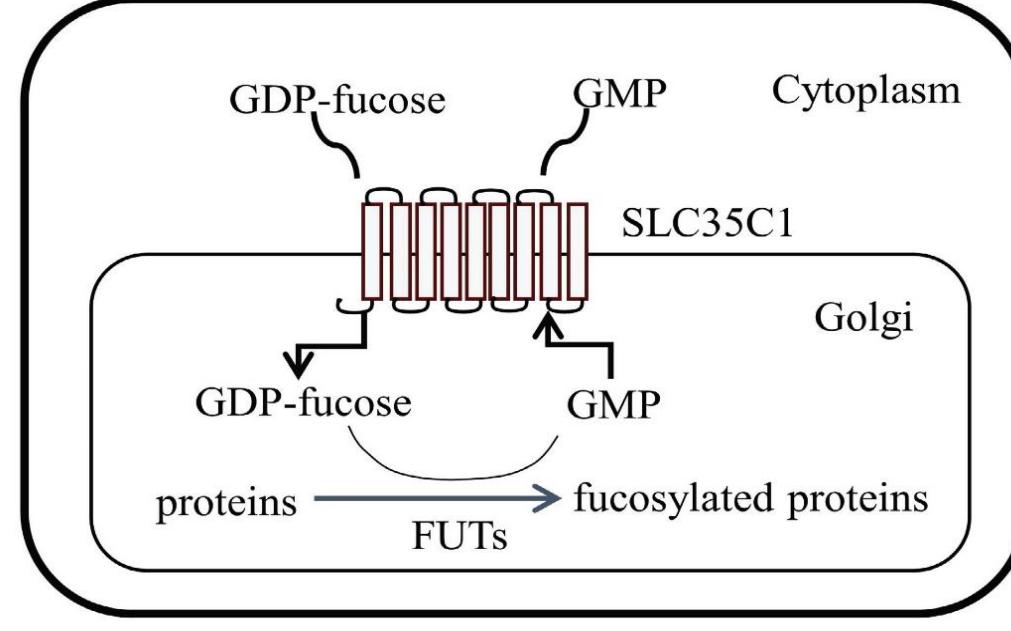
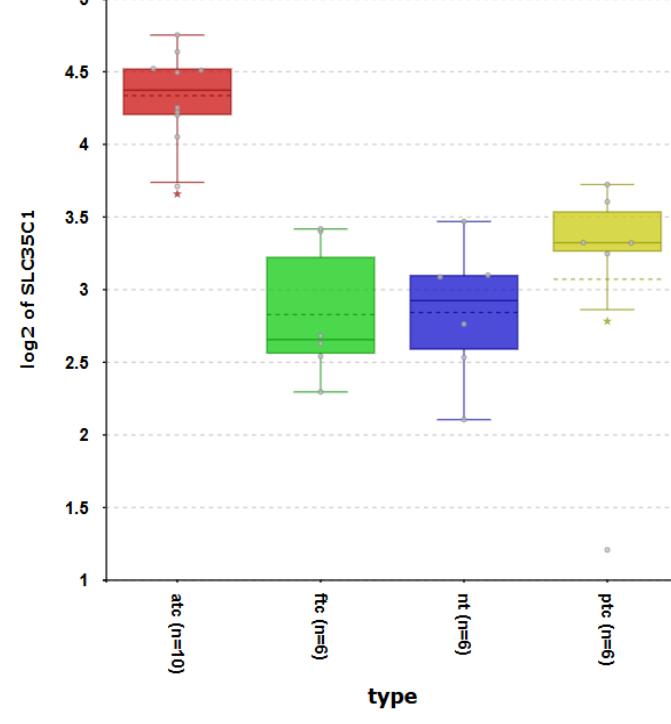
• 骨頭特殊環境影響腫瘤生長與擴散

R2 Genomics Analysis and Visualization資料庫

• 惡性程度較高的甲狀腺癌惡性腫瘤—甲狀腺未分化癌中 **SLC35C1** 表現最多

SLC35C1

• 高基氏體和細胞質間運輸GDP岩藻糖→蛋白質進行**岩藻糖糖基化**

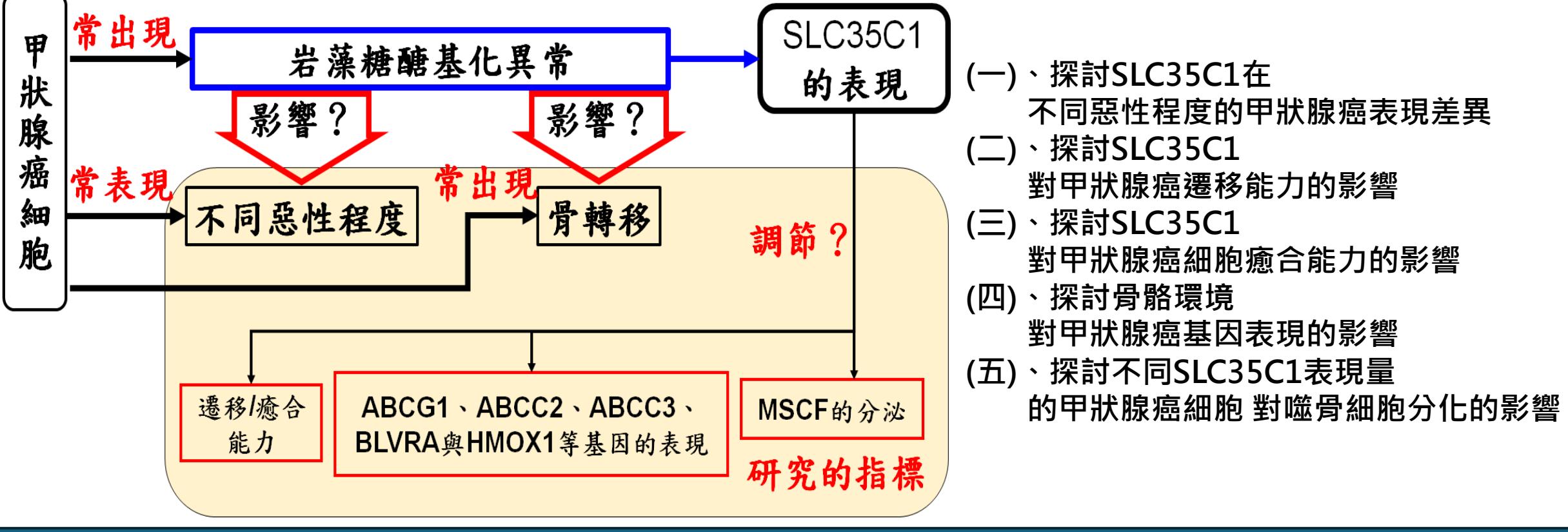


岩藻糖的糖基化過程
(Zhang, et al., 2023)

各甲狀腺癌的SLC35C1表現量

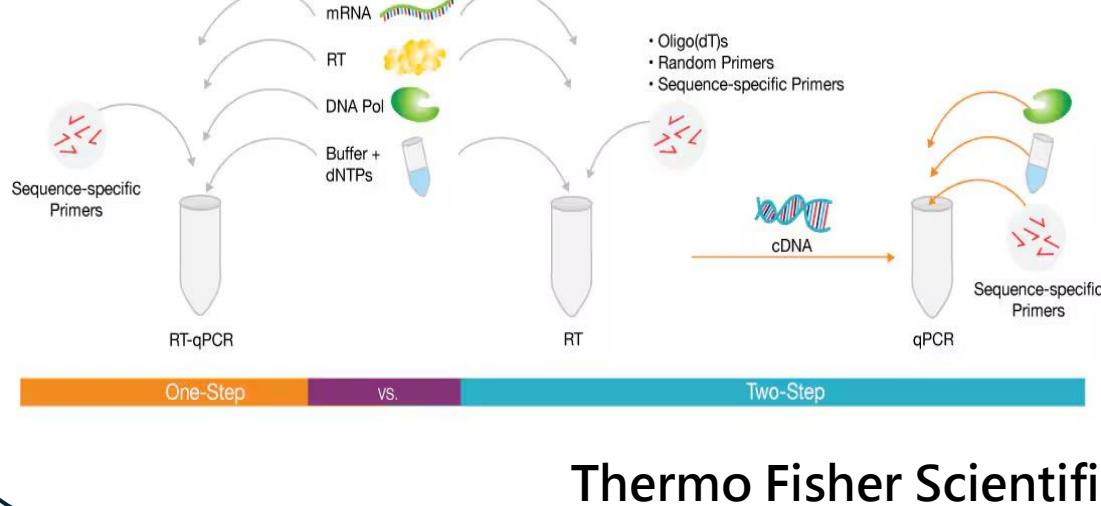
(引用自R2 Genomics Analysis and Visualization資料庫)

貳、研究目的

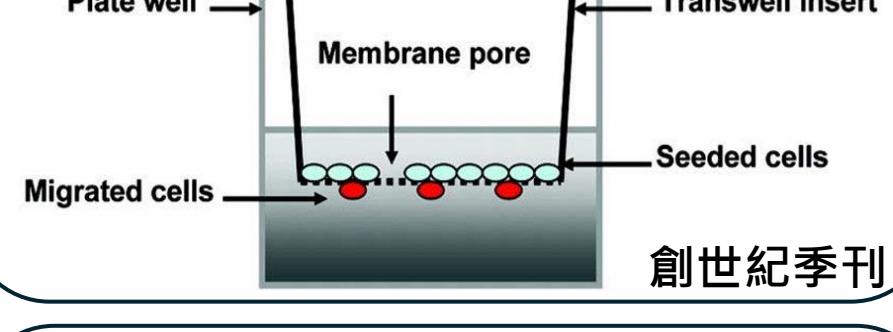


參、研究方法及過程

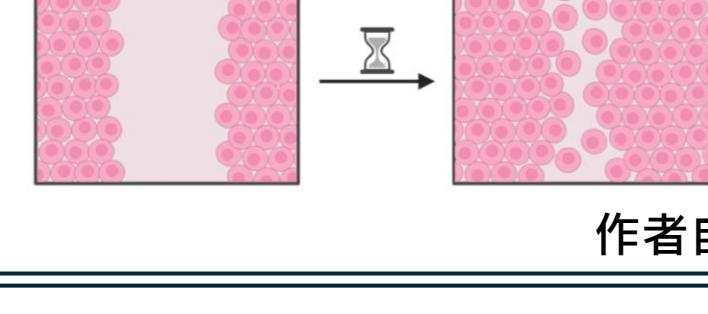
定量反轉錄PCR (RT-qPCR)



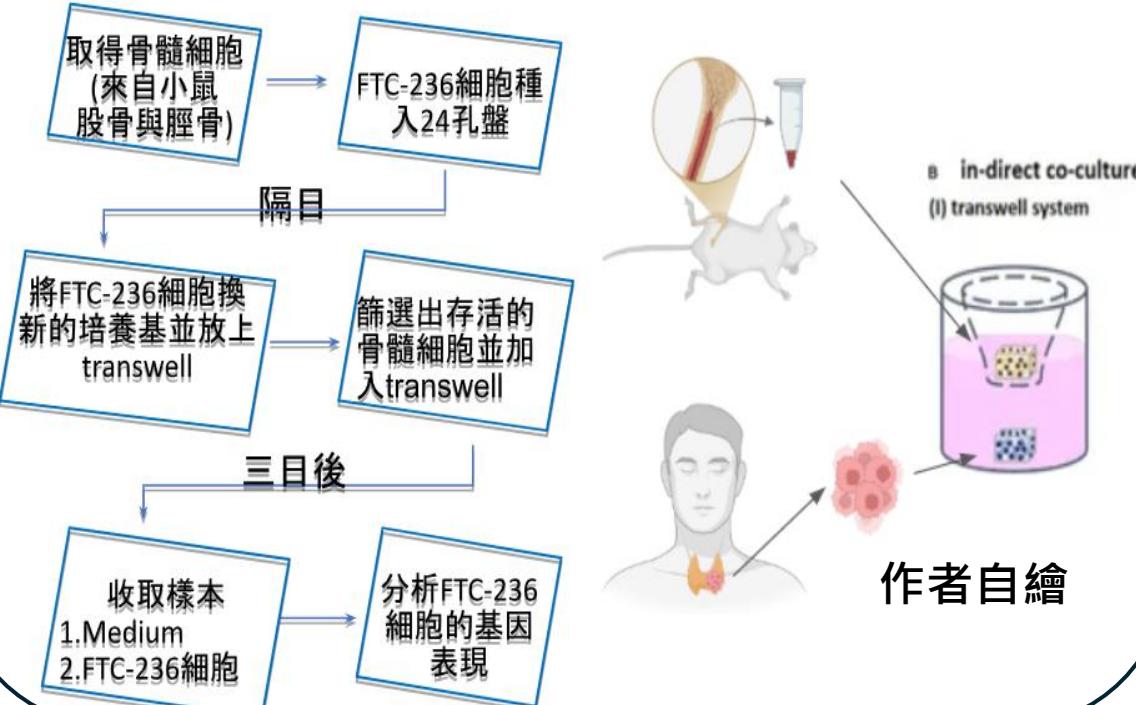
探討細胞遷移能力



探討細胞癒合能力



探討骨頭環境對甲狀腺癌基因表現的影響

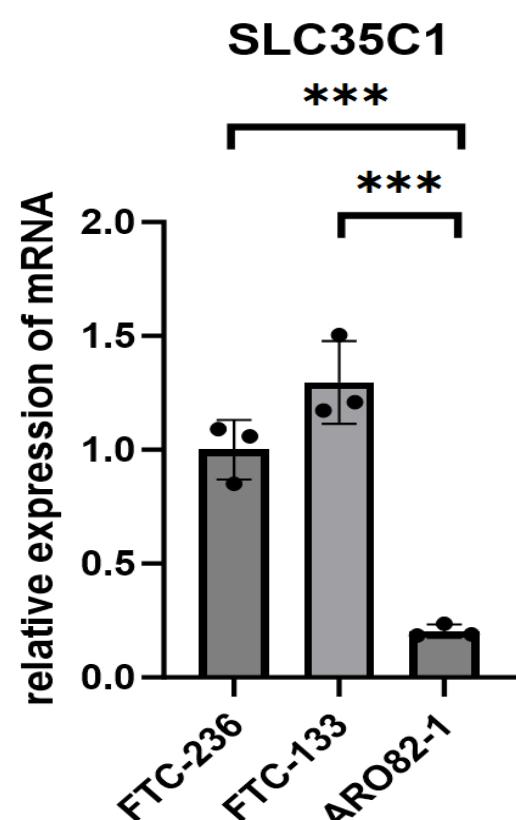


探討甲狀腺癌細胞對噬骨細胞分化的影響



肆、研究結果及討論

一、探討SLC35C1在不同惡性程度的甲狀腺癌表現差異

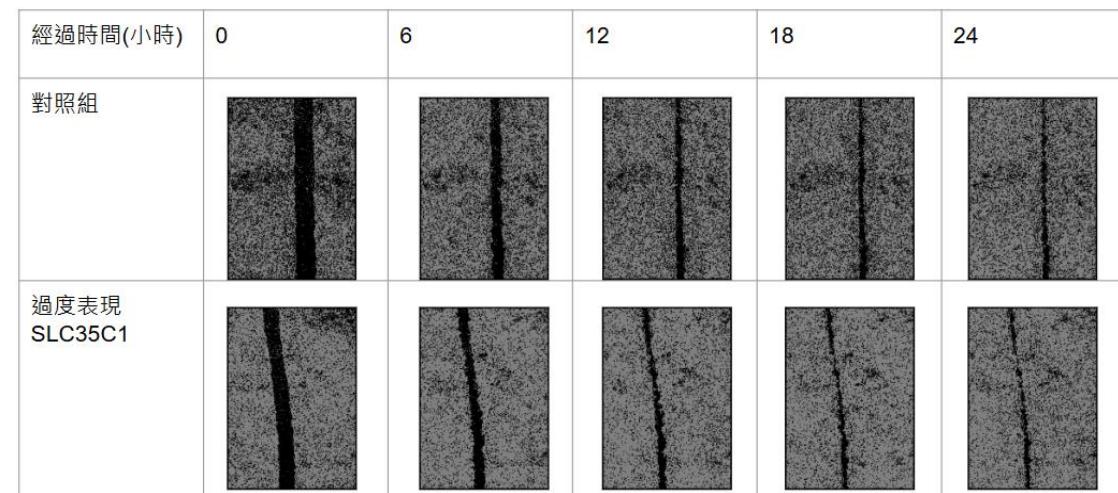


各甲狀腺癌的SLC35C1表現量

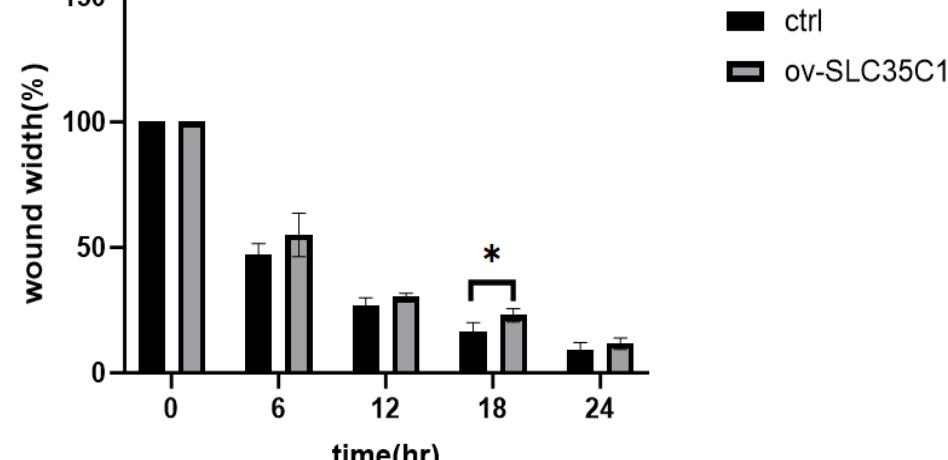
(平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)

惡性程度 \uparrow SLC35C1 \downarrow

二、探討SLC35C1對甲狀腺癌細胞癒合能力的影響



細胞傷口癒合實驗在0-24小時間的觀察

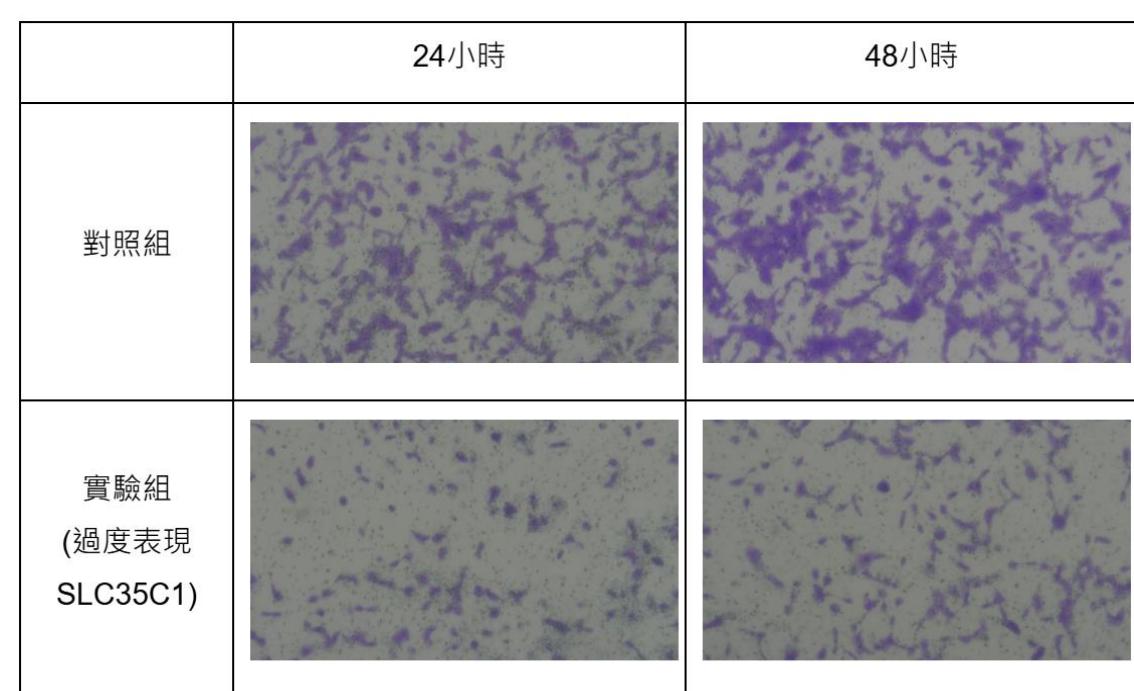


癒合實驗中的傷口寬度隨時間變化

(平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)

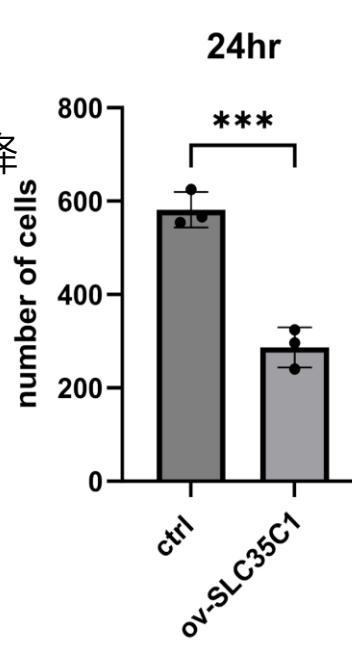
細胞癒合能力:對照組 > 過度表現SLC35C1

三、探討SLC35C1對甲狀腺癌遷移能力的影響



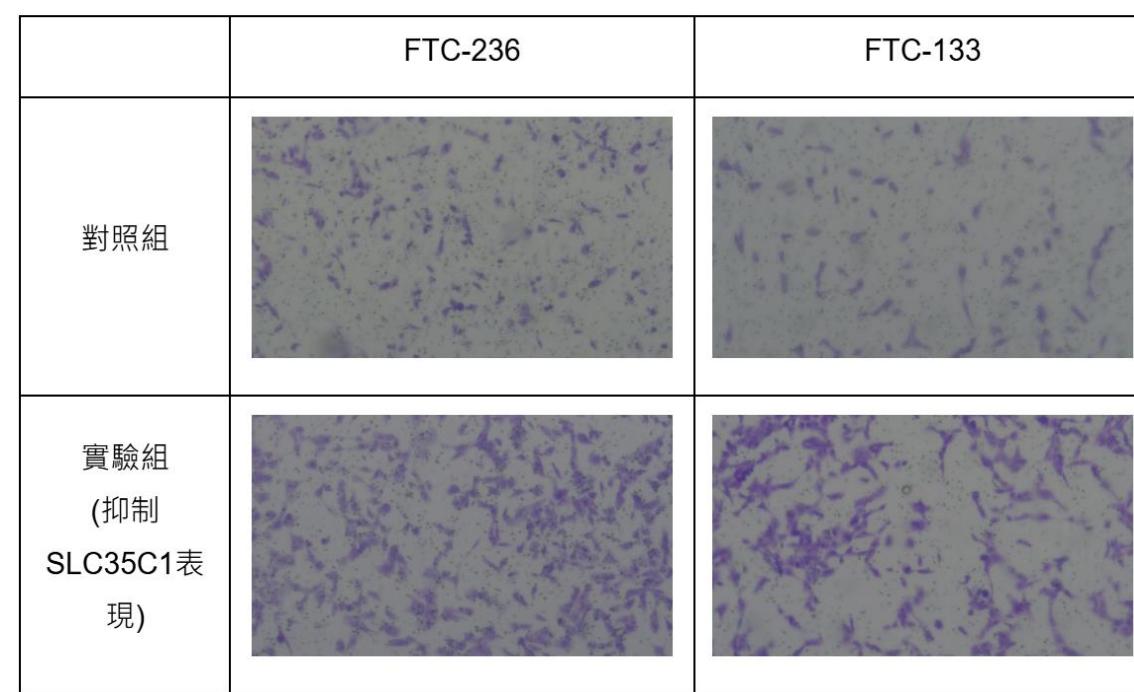
過度表現SLC35C1

→細胞遷移能力下降



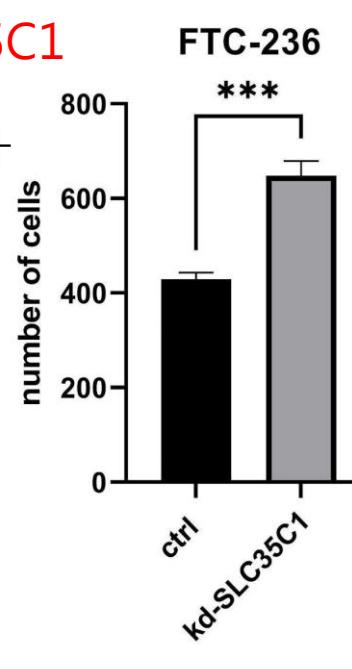
過度表現SLC35C1

的FTC-236與正常FTC-236的細胞遷移數目/每張照片
(平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)



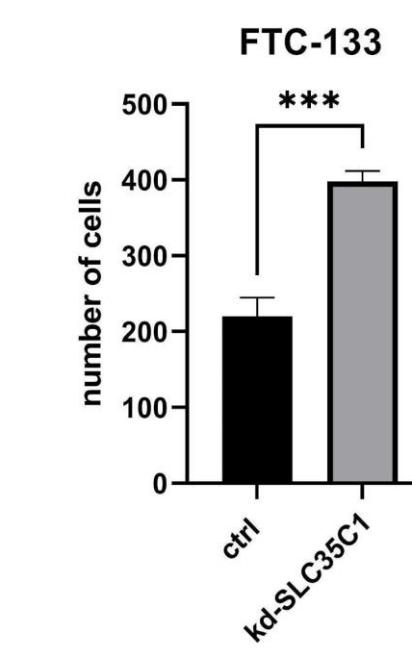
以si-RNA抑制SLC35C1

→細胞遷移能力上升



48hr

過度表現SLC35C1的FTC-236與正常FTC-236的細胞遷移數目/每張照片
(平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)



抑制SLC35C1表現的FTC-236、

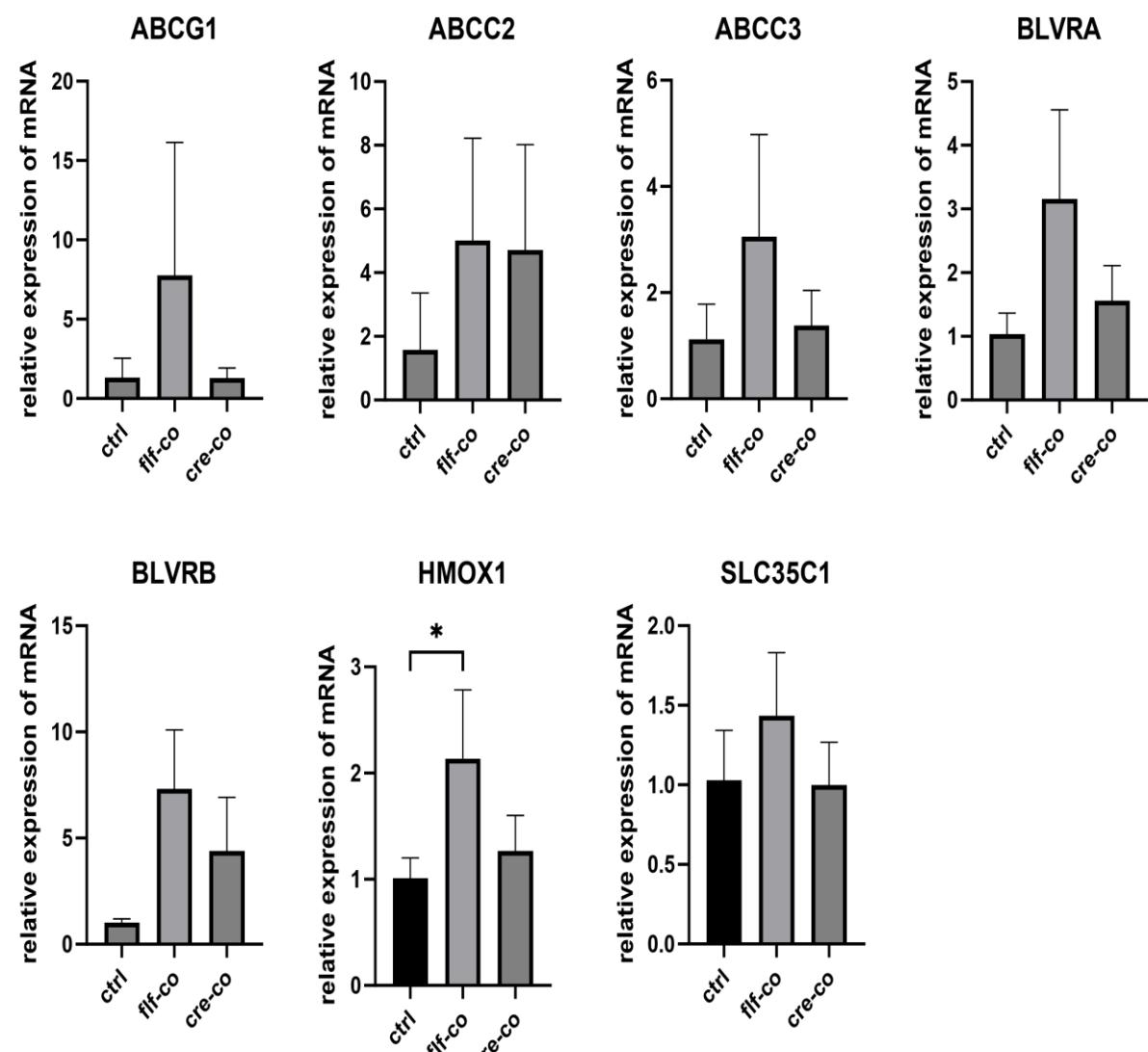
FTC-133與對照組的細胞遷移數目/每張照片

(平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test)

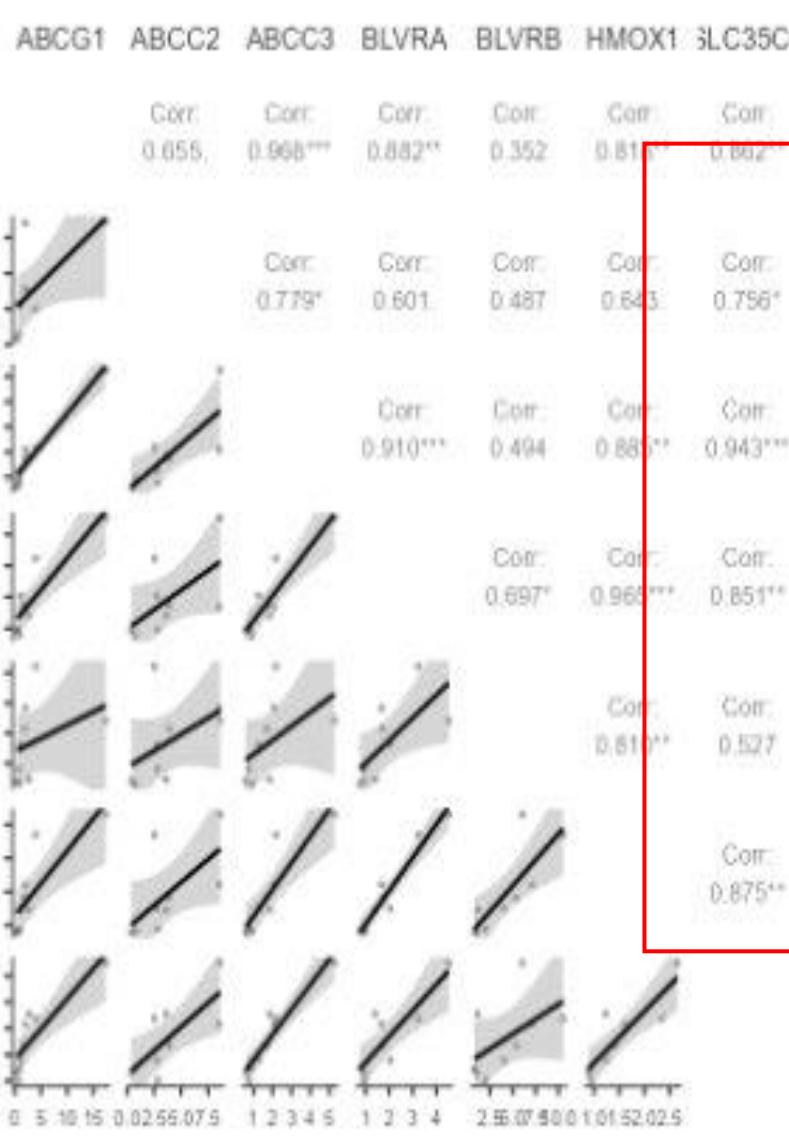
細胞遷移能力:抑制SLC35C1 > 對照組 > 過度表現SLC35C1

SLC35C1 \uparrow 遷移能力 \downarrow →細胞傾向留在原處

四、探討骨組織環境對甲狀腺癌基因表現的影響



FTC-236在小鼠骨髓共培養環境下的mRNA表現量
(平均 \pm 標準誤, $n = 3$, two-tailed t-test).



骨頭環境 →

SLC35C1 \uparrow ABCG1、ABCC2、ABCC3、

BLVRA、HMOX1 \uparrow 協助血紅素代謝成膽紅素

→噬骨細胞相關miRNA \uparrow

→抑制噬骨細胞的細胞凋亡

→促進噬骨作用

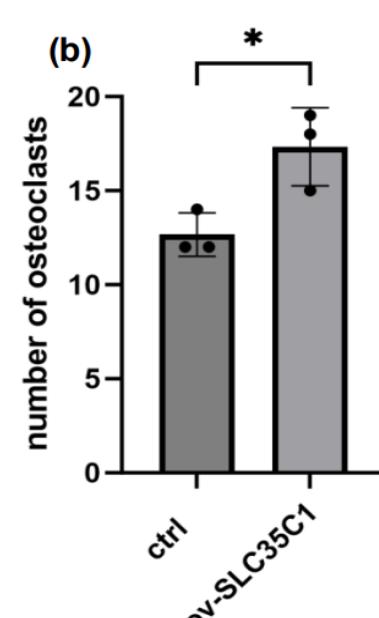
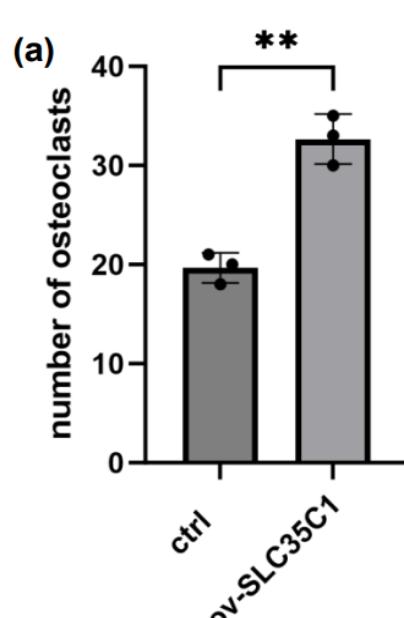
SLC35C1與其他基因mRNA表現量的線性回歸分析

(* : $p > 0.05$; ** : $p > 0.01$; *** : $p > 0.005$ · Pearson檢定)

五、探討不同SLC35C1表現量的甲狀腺癌細胞(FTC-236)對噬骨細胞分化的影響

flf骨髓	對照組	過度表現SLC35C1
條件培養基與 MEMα培養基 1:3混合培養		
條件培養基與 MEMα培養基 1:1混合培養		

正常小鼠骨髓(flf)

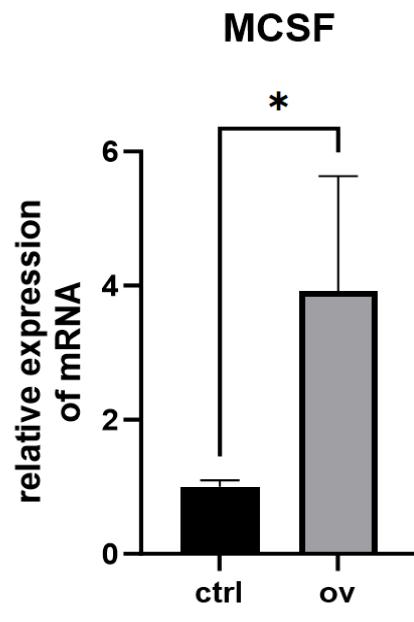
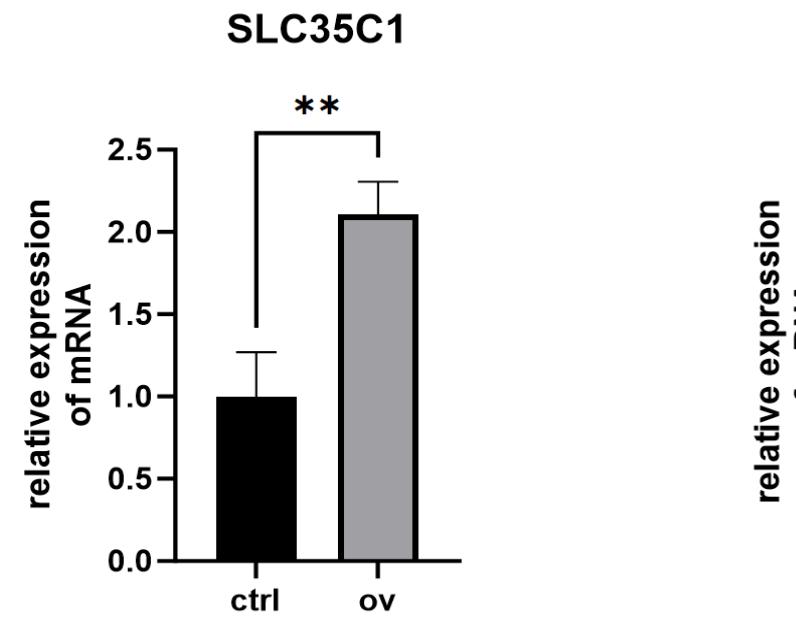


過度表現SLC35C1
的條件培養基
→促進噬骨細胞分化

過度表現SLC35C1
甲狀腺癌細胞
→改變周圍環境
→促進噬骨細胞分化
→促進噬骨作用

正常小鼠骨髓(flf)條件培養基與MEMα培養基(a)與1:1混合培養(b)1:3混合培養
(平均 ± 標準誤, n = 3, two-tailed t-test)。ov: 過度表現組。

六、探討不同SLC35C1表現量的甲狀腺癌細胞對噬骨細胞相關因子的影響



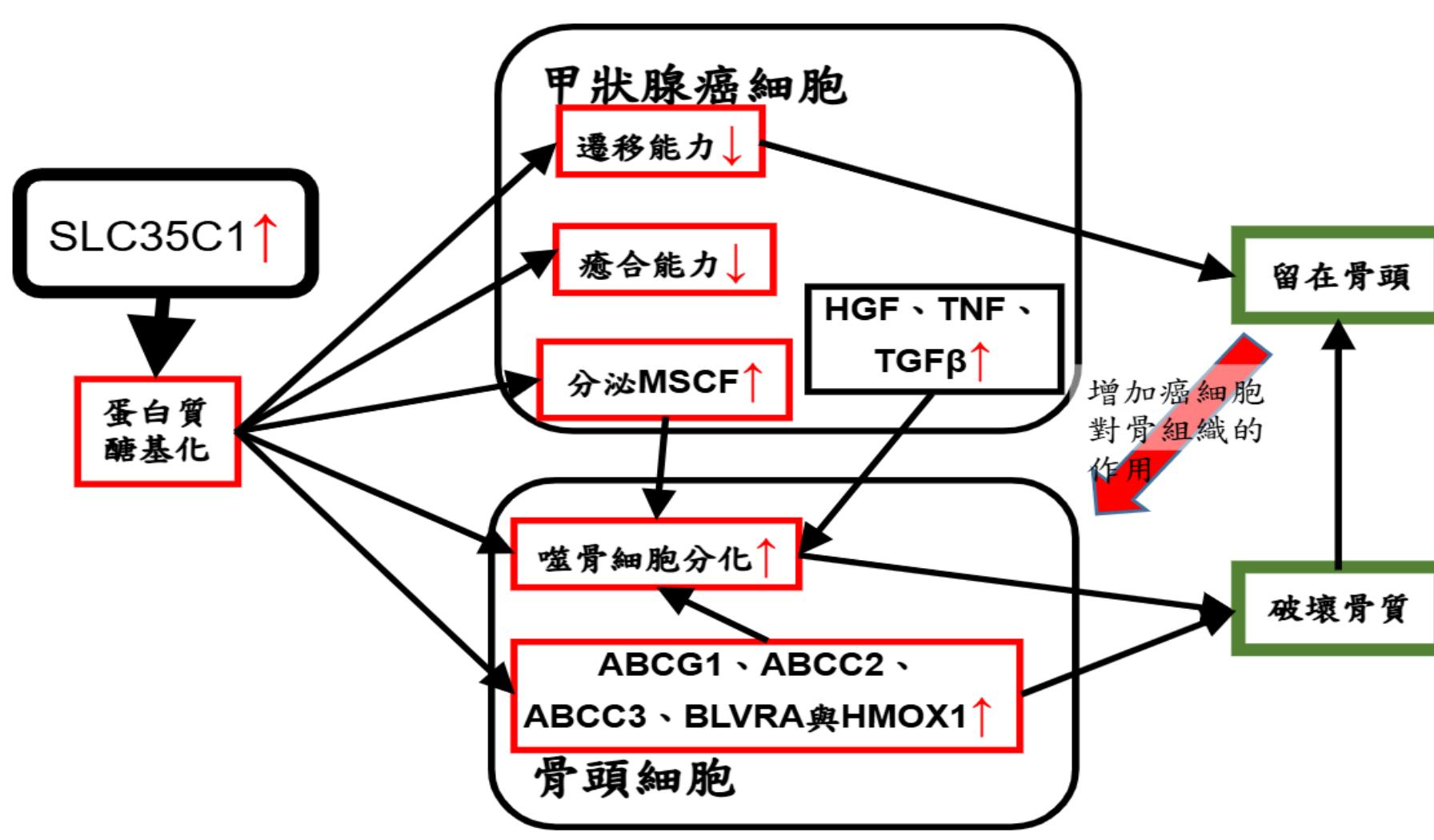
SLC35C1 ↑ MCSF ↑

SLC35C1上調 MCSF
→MCSF 與噬骨細胞上受體結合
→刺激噬骨細胞分化

過度表現SLC35C1的FTC-236細胞，SLC35C1與MCSF的mRNA表現量(平均 ± 標準誤, n = 3, two-tailed t-test)

伍、結論

- 過度表現SLC35C1→甲狀腺癌的遷移能力↓、癒合能力↓
- 甲狀腺癌細胞SLC35C1可能透過以下路徑促進噬骨細胞分化→加速侵蝕骨頭
 - 骨質釋放出更多促進腫瘤生長的因子
 - 形成惡性循環推動腫瘤的擴散與骨質的破壞
 - 上調MCSF
 - 提升ABCG1、ABCC2、ABCC3、BLVRA與HMOX1表現增加→增加膽紅素代謝→抑制噬骨細胞凋亡
- 骨微環境上調甲狀腺癌細胞SLC35C1→使未分化甲狀腺癌細胞遷移能力下降→傾向留在骨組織



陸、參考文獻

- Jurado, S., Parés, A., Peris, P., Combalia, A., Monegal, A., & Guañabens, N. (2022). Bilirubin increases viability and decreases osteoclast apoptosis contributing to osteoporosis in advanced liver diseases. *Bone*, 162, 116483.
- Song Z. (2013). Roles of the nucleotide sugar transporters (SLC35 family) in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 590–600. Chen, H. C. (2005). Boyden Chamber Assay. In: Guan, JL. (eds) *Cell Migration. Methods in Molecular Biology™*, vol 294. Humana Press.
- Glantschnig, H., Fisher, J. E., Wesolowski, G., Rodan, G. A., & Reszka, A. A. (2003). M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell death and differentiation*, 10(10), 1165–1177.