

2013 臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	090009
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	探討 CID384634 合併臨床賀爾蒙治療用藥 tamoxifen 對三陰性乳癌的作用機轉
得獎獎項	三等獎

就讀學校 國立臺中女子高級中學

指導教師 魏宗德、謝金山

作者姓名 呂羽雯、謝亦婷

關 鍵 字 三陰性乳癌、CID384634、Tamoxifen

作者簡介



我是呂羽雯，目前就讀台中女中二年級數理資優班。高一時參加科學研究社，特別喜歡可以做生物實驗的社課，因此決定要參加國際科展。一年多來常常必須在學校、社團和實驗室之間來回奔波，但在做實驗中得到了許多在學校學不到的知識和寶貴的經驗。因此，雖然忙碌我卻覺得十分值得。

摘要

乳癌是台灣女性死因第四名，其中的三陰性乳癌因具備高轉移力，又缺乏特定受體而不適用於標靶藥物治療或賀爾蒙治療法，所以其治療方法有其困難度。CID384634 為 2-phenynaphthyridone (2-PN) 的衍生物，此藥物可藉由干擾微管蛋白聚合抑制致瘤性高的細胞株生長，於是我們想探討 CID384634 對於高度轉移性的三陰性乳癌是否也有同樣的治療效果。本研究以 MTT assay 和西方墨點法探討其治療效果與作用途徑，並發現 CID384634 可藉由回復雌激素受體表現，並且在合併臨床賀爾蒙治療用藥 tamoxifen 有明顯抑制三陰性乳癌細胞存活率。實驗也證實 CID384634 具有抑制上皮細胞及間質細胞轉換的作用。我們希望在不久的將來 CID384634 可以用來治療三陰性乳癌。

Abstract

Breast cancer is the forth leading cause of cancer death among females in Taiwan. Among the variety of breast cancers, triple negative breast cancer is considered difficult to be treated because of its high metastatic potential and the lack of expression of specific receptors , leading it not apply to targeted drug therapy and hormone replacement therapy. CID384634 is a derivative of 2-phenynaphthyridone (2-PN), it was proved that this compound has the ability to inhibit the growth of the most tumorigenic cell lines by inhibiting tubulin polymerization. The objective of this study is to investigate whether CID384634 has antiproliferative effects on triple negative breast cancer cells. Our study investigated the molecular pathway and antiproliferative effects of CID384634 by MTT assay and western blotting. Our study showed that CID384634 induced the expression of estrogen receptor, and when combined clinical hormone therapeutic drug tamoxifen significantly inhibited triple negative breast cancer cells survival. Our experiments also confirmed that CID384634 inhibited the epithelial-mesenchymal transition. Therefore, we hope CID384634 can be applied in anticancer therapy and be used as a new therapeutic drug for triple negative breast cancer in the future.

壹、研究背景

一、乳癌 (Breast cancer)

乳癌是從乳腺的上細胞或小葉生長出來的一種惡性腫瘤，癌細胞不正常分裂，並侵入鄰近的組織及器官，或經由血液或淋巴系統轉移到其它地方。乳癌的成因包括遺傳基因、體質、外在環境及女性荷爾蒙等。根據行政院衛生署統計，乳癌是國內女性好發癌症第一名，而死亡率為第四名，民國 100 年女性乳癌死亡率為 4.4%。^{1,2}

乳癌分為四種亞型，包括

1. 管腔細胞 A 型(Luminal A)
2. 管腔細胞 B 型(Luminal B)
3. Her/2neu 過度表現型
4. 類基底細胞型(Basal-like)。

國家癌症研究所指出，女性癌症死因以乳腺癌位居第二，其次則是肺癌。在全球範圍內，超過 110 萬女性被診斷出患有乳腺癌，每年幾乎有 41 萬名女性死於乳腺癌。而在亞洲地區女性乳癌好發年齡在 40-50 歲之間，相較於歐美國家的好發年齡約提早十歲，但任何成年婦女皆有機會罹患此症。³

二、三陰性乳癌 (Triple-Negative Breast Cancer, TNBC)

三陰性乳癌為 ER(estrogen-receptor 動情激素受體)、PR (progesterone-receptor 黃體激素受體)、HER2(第二型人類上皮細胞生

長素受體)皆呈陰性的一種乳癌類型，此類型乳癌患者約佔所有乳癌者 15%，較容易發生於年輕（小於 40 歲）的病患、且其 BRCA1 基因缺陷比例高達 25%（一般乳癌病患僅 2%）。三陰性患者 ER、PR 呈陰性，對於抗賀爾蒙藥物的反應相當差，HER2 呈陰性反應，所以即時使用標靶療法，對病情也毫無助益。其復發的機會較其他類型的乳癌為高，腦部轉移的比例也高，進而導致死亡率也較高。^{5,11,13}

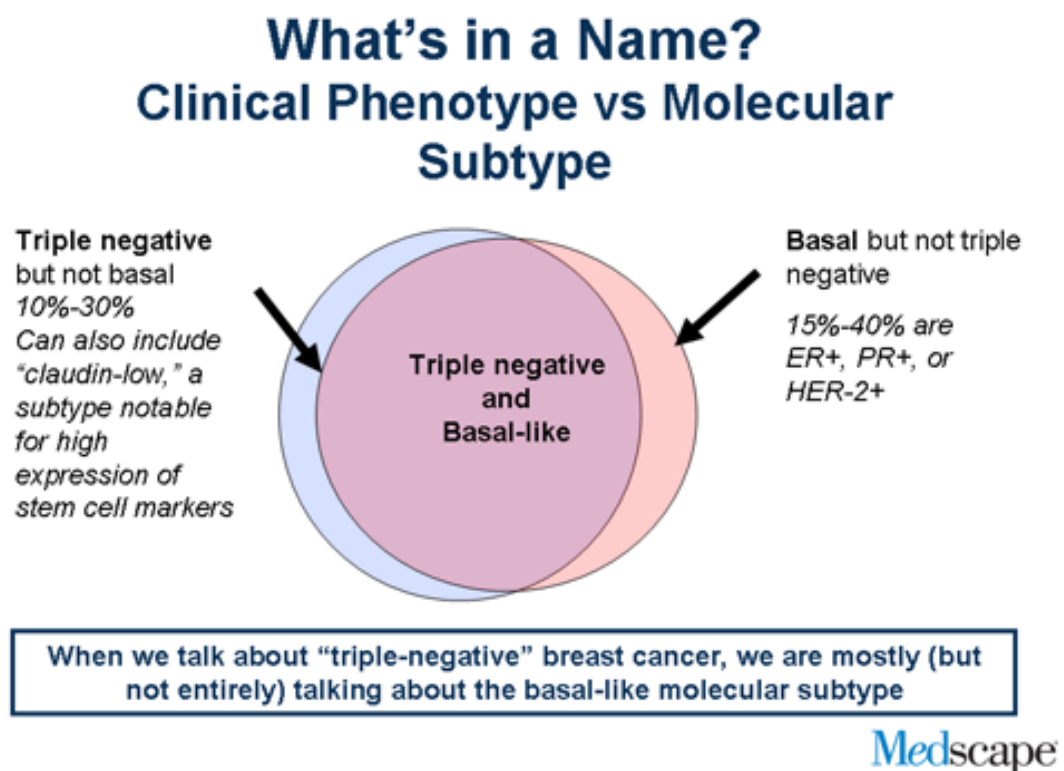


圖 1 三陰性乳癌（Triple-Negative Breast Cancer, TNBC）

三、上皮及間質細胞轉換（Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT）

癌症細胞發生轉移主要是藉由侵犯(invasion)、內滲(intravasation)、外滲(extravasation)及他處器官增殖(proliferation)等方式，由原位瘤發生位置生長器官透過血管或淋巴管並轉移至遠處的另一器官生長，造成癌細胞擴散，此一

過程辯稱之為 EMT。

研究指出，癌細胞轉移（metastasis）為癌症病患死亡的主要原因，而上皮及間質細胞轉換的過程（Epithelial-Mesenchymal Transition；EMT）則是讓癌細胞發生轉移的最起始步驟。EMT 是指上皮細胞形態（epithelial cell phenotype）與間質細胞形態（mesenchymal cell phenotype）之間的轉換過程，期最早是在胚胎發育（embryogenesis）過程中被觀察到，舉凡腔腸化（gastrulation）、神經脊形成（neural crest formation）、心瓣膜形成（heart valve formation）、腎臟生成（nephrogenesis）、肌肉生成（myogenesis）、周邊神經系統（peripheral nervous system）形成等胚胎發育與器官生成的過程都需要 EMT 的參與；此外，傷口癒合（wound healing）、分化完全之組織的再生與修復也需仰賴 EMT 的發生才得以進行。然而，有越來越多的研究指出，EMT 的發生會造成腫瘤細胞惡化為具轉移能力的癌細胞，於癌症惡化（cancer progression）中扮演極重要的角色。^{14,15}

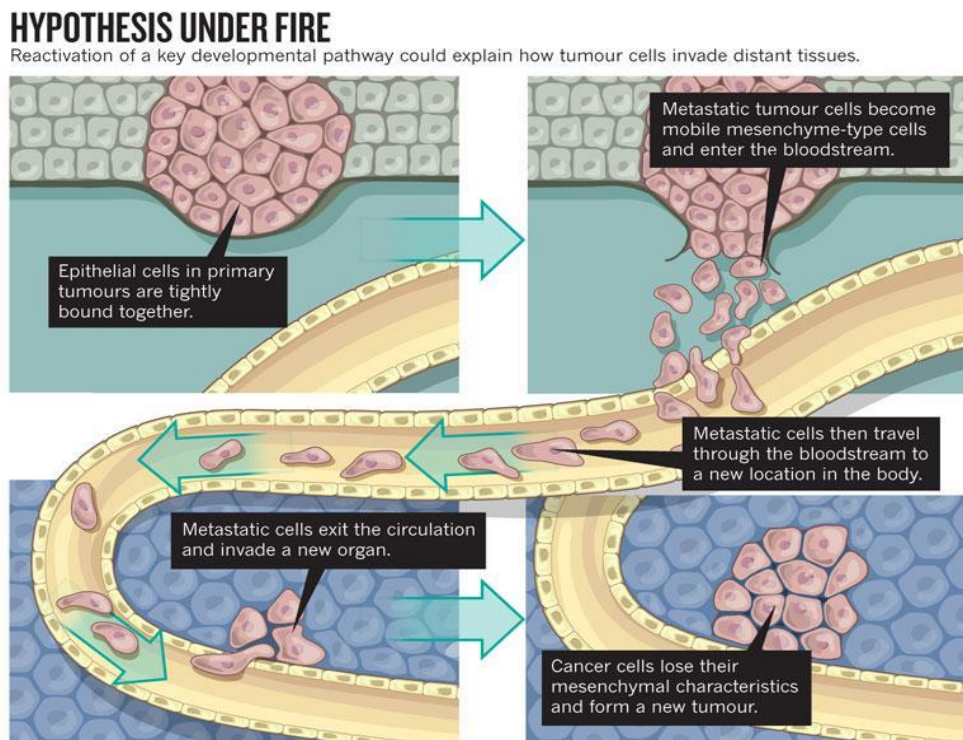


圖 2 EMT 示意圖

上皮細胞與間質細胞比較如下:

上皮細胞 Epithelial	間質(葉)細胞 mesenchymal
極性	非極性
細胞黏附性高，有 E-cadherin 緊密連結，形狀較橢圓	細胞黏附性低，E-cadherin 轉化 N-cadherin，成細長紡錘狀。
細胞與底層緊密連結	細胞與基底膜並無連結
低轉移能力	高轉移能力

四、細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡是一種細胞程序性死亡，是動物發育過程中的必經之路，細胞凋亡是細胞主動實施的，一般由生理或病理性因素引起，凋亡過程中細胞核中的 DNA 會被切成片段，最後形成凋亡小體並被巨噬細胞清除，是非常常見的細胞死亡方式，其特徵為喪失胞膜結構、胞質濃縮、染色體聚集，細胞凋亡又分為內在途徑與外在途徑，內在途徑始於腫瘤抑制基因，會受細胞內損傷所影響而激發作用於細胞凋亡前的物質，而外在途徑則是通過特定受體與配體能和受體結合而產生特異型的生物活性分子結合造成細胞凋亡。¹⁶

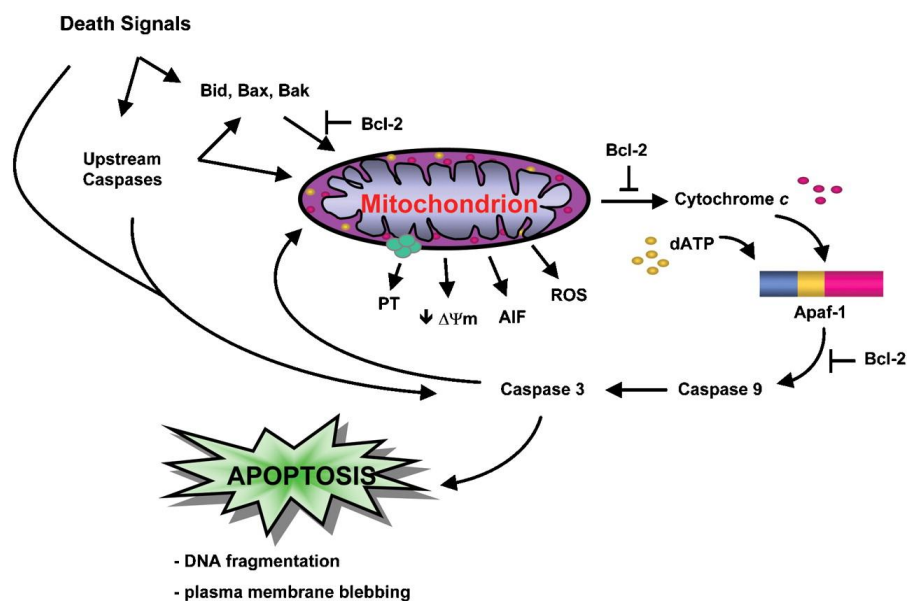


圖 3 細胞凋亡示意圖

五、CID384634 藥物介紹

Quinolone 的衍生物被作為抗菌的試劑，副作用很低³。中國醫藥大學藥物化學研究所郭盛助教授研究團隊以 reevesianine-A 為先導藥物（lead compound），設計合成一系列 substituted 2-phenyl-4-quinolone 類衍生物，並進行細胞毒性測試（cytotoxicity）、微管聚合作用的抑制（inhibition of tubulin polymerization）及秋水仙鹼結合的抑制（inhibition of colchicines binding）等試驗，中國醫藥大學藥物化學研究所郭盛助教授研究團隊近年來更合成一系列 2-phenynaphthyridone（2-PN）的衍生物，發現有些 2-phenynaphthyridone（2-PN）化合物具有明顯之抗腫瘤的活性。CID384634 這種藥物為（2-PN）的衍生物可藉由干擾微管蛋白聚合抑制致瘤性高的細胞株生長(Winston Hide, February 13, 2009)，於是我們想探討 CID384634 對於三陰性乳癌是否也有同樣的治療效果。

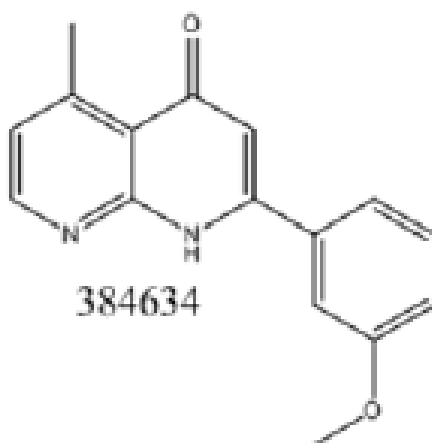


圖 4 CID384634 結構式

貳、研究動機與目的

本實驗主要探討分為兩部分：

探討 CID384634 對於三陰性乳癌的治療效果

分析 CID384634 其作用機轉

我們以 MTT assay 和西方墨點法分析 CID384634 抑制細胞生長和使細胞凋亡之效果，也藉由不同組合的比較，想探討其治療的途徑是否為活化動情激素受體，進而將三陰性乳癌轉化為動情激素受體陽性的乳癌。三陰性乳癌為乳癌類型中，預後最差的一種，若能將此種癌症轉化為預後較佳的其他類型乳癌，必能降低其治療的難度。

參、研究方法與過程

一、細胞培養

將乳癌細胞 MDA-MB-231 培養於含有 10% FBS(胎牛血清，含二價離子)、1% PS(盤尼西林 Penicillin-Streptomycin)的 DMEM/F12 培養基中，培養箱條件為 37 °C、5%二氧化碳，視細胞生長速度，約 2-3 天更換一次培養液。

二、細胞繼代

當細胞生長至約 80~90 % 分滿時，進行細胞繼代。先移除舊的 DMEM/F12 培養基，以 5 mL DPBS 清洗(DPBS 可洗去培養基中的二價離子以免影響後面 TE 作用)，移去 DPBS，加入 2 mL TE (trypsin-EDTA，包括 0.05 % trypsin 和 2.5 mM EDTA)，放進培養箱中反應約 3-5 分鐘使細胞懸浮，再加入 DMEM/F12 以終止 TE 作用。將培養基中的細胞液收入離心管中，以 1500 rpm 離心 5 分鐘。離心後，移除上清液，加入 DMEM/F12 培養基，均勻打散後分入 10 cm 培養皿中，再放入 37 °C、5 % CO₂ 培養箱中。

三、凍細胞

器具過火備用將 DMSO 加入 medium (比例 1 : 9)， DMSO 加 medium 會放熱，故靜置等待冷卻， DMSO 於此作為抗凍劑，使水分不會遇冷形成結晶破壞細胞，但濃度過高滲透壓差會使 cell 死亡從 incubator 中拿出 cell，抽離廢液以 PBS(5 mL)清洗細胞，再抽出 PBS 作用為洗去 medium 中的二價離子及細胞代謝物，加入 TE 等待作用約 5 分鐘 TE= Trypsin-EDTA，可使 cell 脫離 dish 浮起，加入 medium 中和 medium 其中的二價離子會和 EDTA 作用，使 TE 失效將細胞均勻打下，收集至 50 mL tube 離心(1500 rpm 5 min)，取出凍管，寫上姓名、日期、細胞名稱，將上清液抽出，加入配置好含有 DMSO 的 medium，Pipeting 使其均勻，各取 1 mL 加入凍管 cell 一盤約分 3 管，放到冰箱中 4 °C 20 min → -20 °C 20 min → -80 °C，太過急速冷凍會破壞細胞。

四、細胞存活率測試 (MTT assay)

MTT assay 是測定細胞存活率的常用方法，MTT 為一種黃色化合物，活細胞內粒線體中的琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 會作用使 tetrazolium 環裂開，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比。再利用測量 O.D.值，可得知細胞還原 MTT 的能力(formazan 形成量)，此 O.D.值代表了粒線體的活性，也代表活細胞數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。待培養 48 小時後，每孔加入 40 μL 的 MTT 試劑，放入 37 °C 培養箱中反應一小時，形成藍紫色晶體後移除培養基，每孔加入 200 μL DMSO 以溶解結晶，再測量 595 nm 吸光值即可計算細胞存活率。

五、西方墨點法 (Western blot)

西方墨點法可根據蛋白質分子量分離不同的物質，再利用抗體的專一性找到目標抗原蛋白，並將其染色，藉以表現我們所要找的蛋白質含量。西方墨點法可根據蛋白質分子量的大小，分離不同分子量的物質。

1. 萃取蛋白質

將MDA-MB-231細胞培養於以DMEM/F12配置的0 nM、100 nM、200 nM、400 nM之CID384634中，培養48小時。而後動作需在冰上操作以減緩細胞生理活性，先移除DMEM/F12培養基，以PBS清洗後移除，再加入TE等待3-5分鐘使細胞懸浮。再加入PBS，將細胞液收集至離心管，離心1500 rpm五分鐘。離心後移除上清液，加入PBS後轉移至1.5 mL eppendorf 中，離心2000 rpm 5分鐘，再加入GLB(Golden Lysis Buffer)打破細胞，在-20 °C下作用1天。置於冰上退溫後，離心12000 rpm 30分鐘，上清液即為總蛋白。

2. 蛋白質電泳

蛋白質定量後，以100 °C加熱5分鐘使蛋白質變性，並置於冰上。依比例配製含有AC (Acrylamide)、Tris (Tris aminomethane)、10 %SDS、APS (Ammonium persulfate)、TEMED的聚丙烯醯胺解析凝膠(resolving gel)並注入電泳玻璃架約至八分滿，並以酒精壓膠。凝膠後，配製集膠凝膠(stack gel)注入電泳玻璃架，再插上齒梳。鑄膠完成後組成三明治夾板，放入含有running buffer的電泳槽內，並將蛋白質樣品注入齒模中。以70伏特進行上膠電泳再以120伏特進行下膠電泳。當追蹤染劑(tracking dye)抵達膠體底部後將膠體取下以進行轉印(transfer)。

3. 轉漬及轉印

將3M濾紙及transfer membrane浸泡在transfer buffer中，以3M濾紙→膠體→transfer membrane→3M濾紙的順序擺放至轉漬器上，膠體朝向負極。以電流130 mA轉印。

轉印完成後，以TBST(450 mL DDW + 50 mL TBS + 1 mL Tween)清洗膜，查表找出該蛋白位置標記，剪下置於含有一抗的盒子中。隔日以TBST洗膜數次後，將膜置於含有二抗的盒子中震盪1小時，後

以 ECL(enhanced chemiluminescence)壓片。

肆、結果與討論

一、細胞存活率分析 (MTT assay)

利用 MTT assay 分析 CID384634 是否會影響 MDA-MB-231 之細胞存活率，將 MTT 試劑所造成的紫色結晶溶於有機試劑 DMSO 中，並藉由測定吸光值推算細胞存活率，結果發現，其抑制細胞存活的效果隨著藥物濃度的增加而上升。實驗過程為將 MDA-MB-231 細胞種於 24 孔盤中，培養 24 小時，待細胞貼附後移除舊培養基，並加入下列組合：

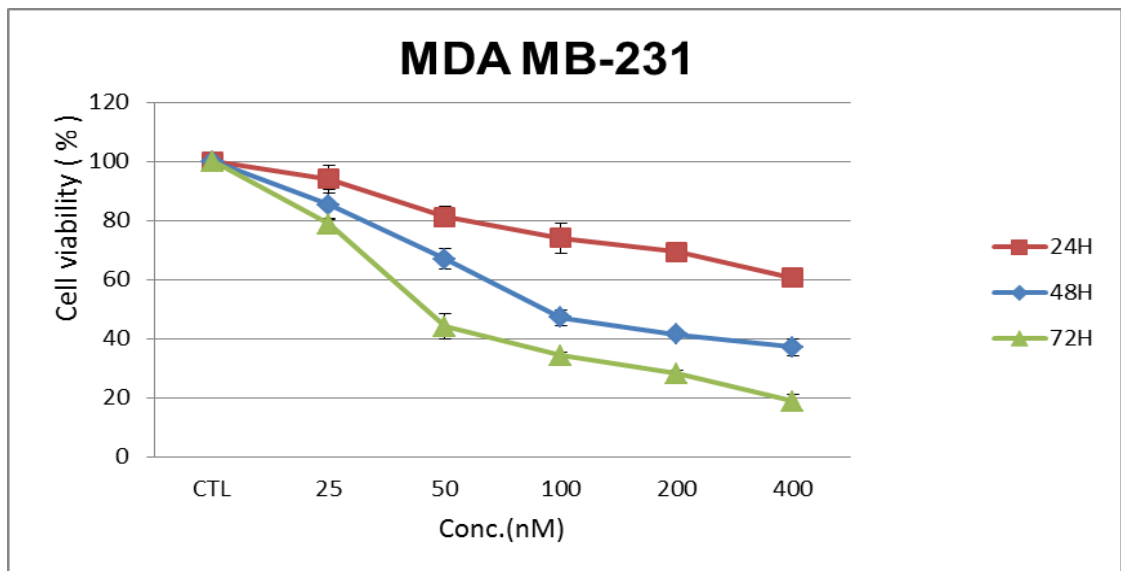


圖5

MDA-MB231 以 2×10^4 cell/well 種於 24 孔盤中，24 小時後，換成含有藥物之培養液，培養 24、48、72 小時，進行 MTT 細胞之存活率測定，結果發現 MDA-MB231 及 BT-20 治療 CID384634 藥物在 48 小時 100 nM 條件下即達到 IC_{50} 的效果。

二、西方墨點法 (Western blot)

利用西方墨點法觀察 CID384634 在蛋白質階段對於雌激素受體的表現量變化，將 MDA-MB231 以 7×10^5 cell/well 細胞種於 10 公分培養盤，待 24 小時培養後，以不同濃度的 CID384634 (濃度條件為 CTL、100 nM、200 nM、400 nM)，治療 48 小時後，收其細胞蛋白利用西方墨點法觀察雌激素受體蛋白表現的變化，MCF-7 細胞株是以發表具有雌激素受體的表現，因此做為正向控制組。由結果可以觀察到在 MCF-7 細胞株確實具有雌激素受體的表現，而在三陰性乳癌細胞株可以觀察到其雌激素受體蛋白質表達量會隨著 CID384634 濃度增加而有所恢復。

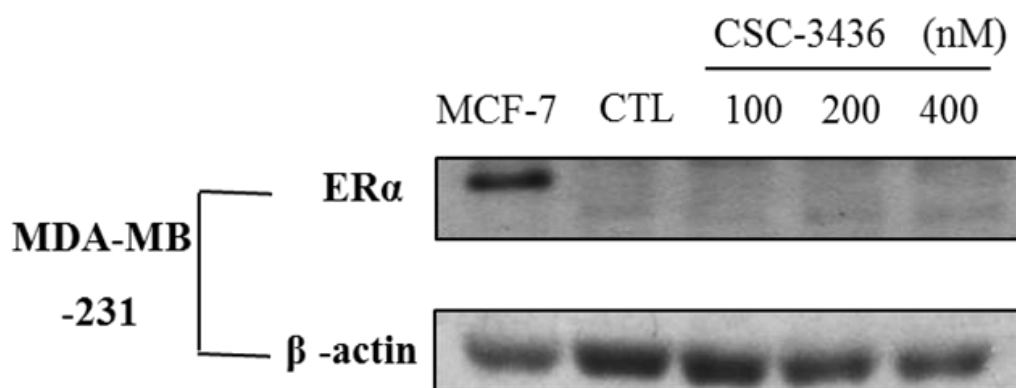


圖6

治療 48 小時後，收其細胞蛋白利用西方墨點法觀察雌激素受體蛋白表現的變化，MCF-7 做為正向控制組，雌激素受體蛋白質表達量會隨著 CID384634 濃度增加而有所恢復。

三、細胞存活率分析 (MTT assay)

本實驗利用 MTT 試驗觀察是否 CID384634 可誘導雌激素受體表達且具功能性。將 2×10^4 個 (MDA-MB-231) 細胞種於 24 孔盤中，待細胞貼附後，隔天加入含不同藥物條件下處理 (CTL, 17β-Estradiol, tamoxifen, CID384634,

17 β -Estradiol combine CID384634, tamoxifen combine CID384634)，培養 72 小時後，處理 MTT 試劑（每 500 μ L 培養液中加入 60 μ L MTT）反應二小時移除孔內培養液，每孔加入 400 μ L DMSO 將紫色結晶溶出，以 590 nm 之波長在 ELISA reader 下讀取吸光值，再以各實驗組平均值與對照組之比值作生長曲線圖，求出生長抑制百分比。過去研究指出，17 β -Estradiol 會造成 ER 表現型乳腺癌細胞的增生，而 tamoxifen 並不會有太大的治療效果。研究結果顯示，在單獨處理 17 β -Estradiol 的組別中並沒有明顯的細胞增生現象，而在 tamoxifen 單獨處理組別也不會有明顯影響細胞存活率，而在治療 CID384634 後本身也具有造成細胞存活率下降，在 CID384634 合併處理 17 β -Estradiol 組別中觀察到細胞存活率有明顯上升 MDA-MB 231 細胞株 13.98 %，而在 CID384634 合併處理 tamoxifen 也有明顯造成細胞存活率下降 MDA-MB 231 細胞株 39.75 %，實驗也觀察在具有 17 β -Estradiol 環境中 CID384634 合併處理 tamoxifen 也有與 CID384634 合併處理 tamoxifen 有類似的結果。

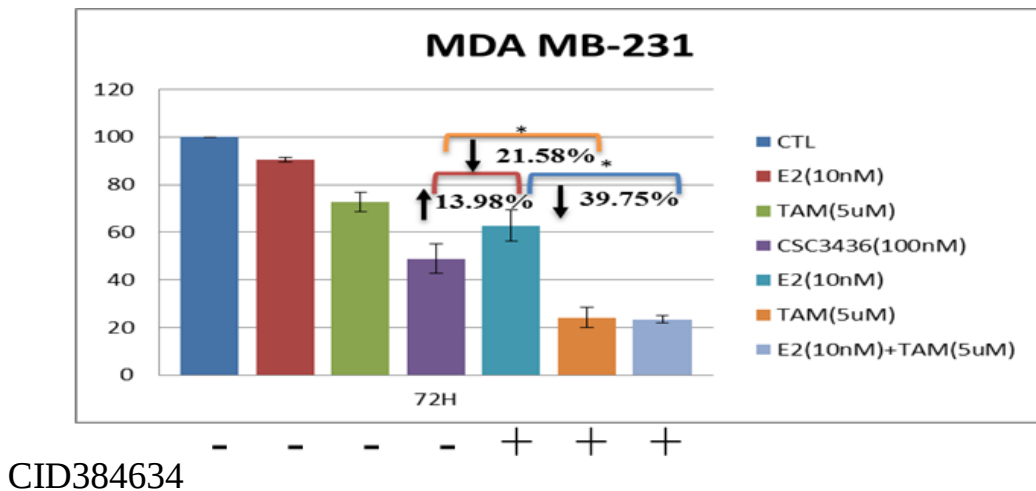


圖 7

MDA-MB-231 以 2×10^4 cell/well 種於 24 孔盤中，24 小時後，換成含有藥物之培養液，培養 72 小時，進行 MTT 細胞之存活率測定，結果發現 CID384634 不僅誘導雌激素受體恢復表達且恢復之雌激素受體接且具功能性。

四、西方墨點法 (Western blot)

觀察細胞在 CID384634 治療後對於細胞走向細胞凋亡之指標。將 MDA-MB-231 以 7×10^5 cell/well 細胞種於 10 公分培養盤，待 24 小時培養後，以 CID384634 100 nM 並同時處理 Tamoxifen 5 μ M 治療（治療條件為 CTL、Tamoxifen、CID384634、Tamoxifen combine CID384634），48 小時後，利用西方墨點法觀察細胞凋亡之指標 PARP 蛋白之表現。由圖三結果得知，CID384634 影響下 48 小時 MDA-MB-231 在 CID384634 治療下細胞皆有明顯的 Cleavage PARP 證實細胞確實走向細胞凋亡，且較在 Tamoxifen 單獨治療組別明顯增加。

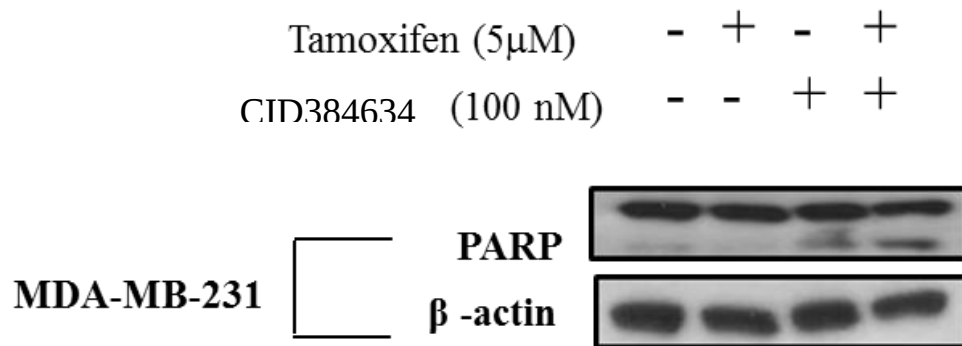


圖8

以 CID384634 100nM 同時處理 Tamoxifen 5 μ M 治療，48 小時後，可以觀察到處理 CID384634 組別中有明顯的 Cleavage PARP 證實細胞確實走向凋亡，且較在 CID384634 100nM 單獨治療組別中來的明顯。

五、細胞型態：

觀察加入不同濃度 CID384634 (100、200、400 nM) 及未加入藥物的細胞型態 (24、48、72 hr)，發現 CID384634 會將細長的 MDA-MB-231 細胞株轉化為較圓的細胞型態，藉此可初步判定 CID384634 可抑制細胞轉移能力，並改變其細胞形態。

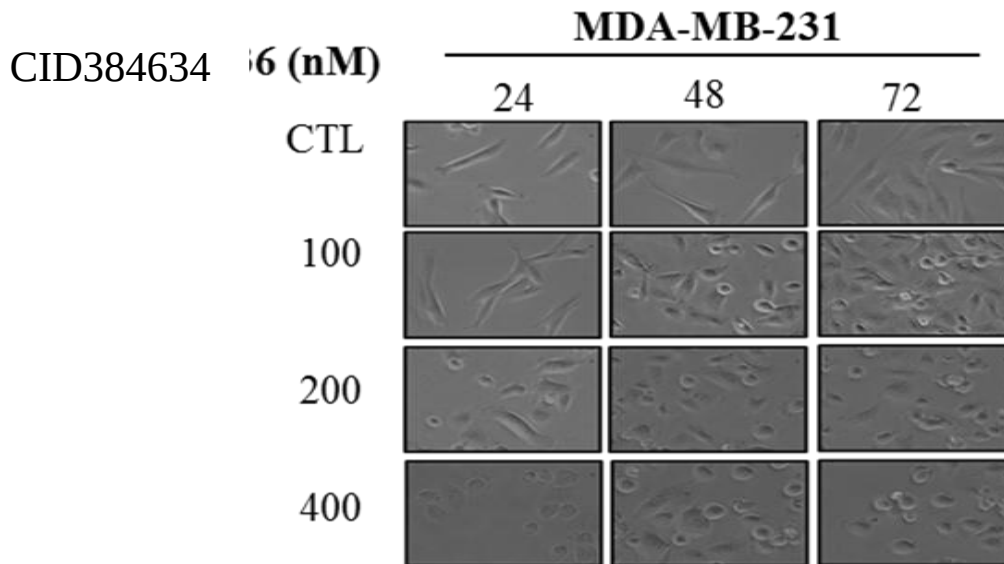


圖9

將 MDA-MB-231 以 5×10^4 cell/well 細胞種於 6 well 培養盤中，以不同濃度的 CID384634 及控制組（濃度條件為 CTL、100 nM、200 nM、400 nM），治療 24、48、72 小時後，以正立式光學顯微鏡觀察。由圖可觀察到 MDA-MB-231 細胞株可以觀察到隨著時間上升及藥量的增加，有明顯恢復上皮細胞型態。

伍、結論

本篇研究中證明了三陰性乳腺癌細胞合併處理 tamoxifen 及 CID384634 化合物後會明顯地使細胞由自噬走向細胞凋亡的現象，並且證實 CID384634 化合物可以明顯恢復三陰性乳腺癌雌激素受體的表現。最後，實驗也證實合併處理 tamoxifen 及 CID384634 化合物對於腫瘤生成之影響及作用機制，且能明顯的抑制癌細胞上皮及間質細胞轉換的過程（EMT）。本研究所提出的主要假設為探討在三陰性乳癌細胞中，CID384634 化合物可以成功的抑制乳腺癌細胞轉移。而長遠的目標則是希望藉由增加細胞自噬現象轉換成細胞凋亡現象，來提昇三陰性乳癌的治療效果。

陸、參考文獻

1. 台灣醫療網
2. 衛生署統計資料。2011。國人前十大死因。
3. 中華民國醫學大百科。2012。
4. 行政院衛生署疾病管制局九十八年度科技研究發展計畫。利用全基因體技術發展病原真菌及特殊病原先進檢驗及流病分型技術-IV (2009)。
5. Quyen D. Chu, M.D., Lori Panu, B.S., Neal T. Holm, M.D., Benjamin D. L. Li, M.D., Lester W. Johnson, M.D., and Songlin Zhang, M.D., Ph.D. High Chemokine Receptor CXCR4 Level in Triple Negative Breast Cancer Specimens Predicts Poor Clinical Outcome. *Journal of Surgical Research* 159, 689–695 (2010)
6. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873 (2007).
7. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42 (2008).
8. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn.* 233(3):706–20. (2005).
9. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology.* 50(6):2007–13. (2009).
10. Tucker RP. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(2):173–7. (2004).
11. S. L. Pal, J. Mortimerb, Triple-negative breast cancer: Novel therapies and new directions. *Maturitas.* 63, 269-274 (2009).
12. P. Conte, V. Guarneri, triple-negative breast cancer: current management and future options. *EJC Sup.* 7, 14-18 (2009)
13. W. J. I. Jr, L. A. Carey, What is triple-negative breast cancer *J Eur Cancer.*

44, 2799-2805 (2008)

14. P. Chaudhry, E. Asselin, Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *End Rel Cancer*. 16, 363-380 (2009)
15. J. Q. Chen, J. Russo, ER α -negative and triple negative breast cancer: Molecular features and potential therapeutic approaches. *Bio Bio Acta*. 1796, 162-175 (2009)
16. S. C. Weng, Y. Kashida, S. K. Kulp, D. Wang, R. W. Brueggemeier, C. L. Shapiro, and C. S. Chen. Sensitizing estrogen receptor–negative breast cancer cells to tamoxifen with OSU-03012, a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependentprotein kinase-1/Akt signaling inhibitor. *Mol. Cancer Ther*. 7, 800-808 (2010)
17. C. L. Smith, Z. Nawaz, B. W. Omalley, Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol*. 11, 657-666 (1997)

評語

探討 CID384634 對高度轉移的 triple negative breast cancer cell 是否和 tamoxifen 有加成之抑制效果。

1. CID384634 並不能增加 ER 的表現量，所以藉由 tamoxifen 毒殺 cancer cell 之假說並不成立。
2. 應再利用其他的 breast cancer cell repeat 實驗。