

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 080001
- 參展科別** 生物化學
- 作品名稱** 以蛋白質體學方法鑑定人類肝癌細胞經蕾
莎瓦治療之預後的潛力生物標記
**Identification of Potential Prognostic
Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma
Cells Treated with Sorafenib**
- 得獎獎項** 大會獎：三等獎
- 就讀學校** 臺北市立第一女子高級中學
- 指導教師** 周綠蘋、陳怡旻
- 作者姓名** 闕嘉儀、顏均蓉
- 關鍵字** 肝癌、生物標記、蕾莎瓦

作者簡介



嗨！我們是闕嘉儀和顏均蓉，目前是北一女中三年級的學生。感謝學校給予我們這個機會到台大醫學院做專題研究，一探生物的奧妙。雖然專題研究的路程中難重重，沒日沒夜地做實驗，還有無數個熬夜的日子，但在看到結果出現的那一刻，就會覺得先前的辛苦不算什麼了。感謝周老師不辭辛苦的指導我們，也感謝實驗室學長姊不厭其煩地幫助我們。最後謝謝國際科展這個舞台讓我們有機會展現成果。

摘要

肝癌是死亡率極高的癌症。目前並無非侵入性方法判斷標靶藥物治療效果。蕾莎瓦 (Sorafenib) 是一種使用於肝癌晚期治療的標靶藥物，但有些病患在治療過程中會出現抗藥性，因此可預測蕾莎瓦治療效果的生物標記相當重要。

血液中的生物標記可及時追蹤疾病進展與預後之評估。本實驗利用質譜法鑑定分析在肝癌細胞(HuH7)中加入蕾莎瓦模擬治療後肝癌的分子機轉，並透過生物資訊軟體了解蛋白質在HuH7細胞中所扮演的角色。我們發現Galectin-3 和HMGB1可能參與腫瘤細胞的增生和遷移，以西方墨點法觀察其表現量，發現Galectin-3 和HMGB1在受到藥物處理後，表現量皆有下降的情形。

蕾莎瓦可抑制B-RAF激酶進而阻斷MAPK pathway。MAPK pathway又可分成ERKs、JNKs和p38/SAPKs三類。為確認Galectin-3之訊息傳遞路徑，將蕾莎瓦和ERK抑制劑處理細胞，發現Galectin-3的表現量隨著時間而下降，證實Galectin-3的表現會受到ERK路徑調控。Galectin-3與 HMGB1是極具潛力的生物標記可應用於蕾莎瓦的治療，希望這些生物標記可以應用在臨床上。

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal and prevalent cancers. In Taiwan, it ranks on top three deadly cancers for many years. In clinic, the Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification links the stage of the disease to a specific treatment strategy. However, there is still no efficient method for determining the progression and prognosis of the liver cancer. Sorafenib is one of the standard therapies for patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). Sorafenib is a small molecule that inhibits tumor-cell proliferation and tumor angiogenesis in a wide range of tumor models. Unfortunately, most patients eventually develop acquired resistance to sorafenib. Therefore, it is important to identify potential biomarkers that could predict the efficacy of sorafenib.

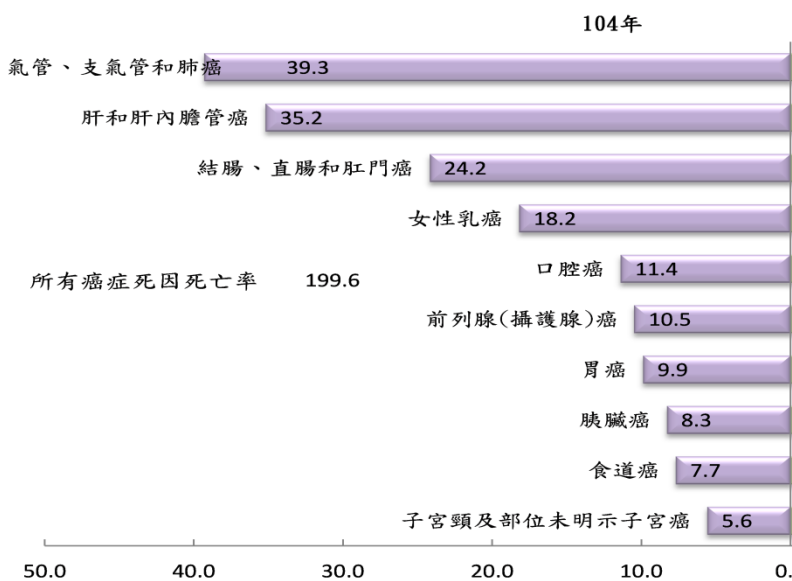
Serum biomarkers secreted by a tumor can be used to evaluate cancer progression and to reflect the early effects of cancer therapeutics. The proteome-based approaches have been widely applied in searching potential cancer biomarkers. We used the LC/MS approach to analyze the differences of protein expression levels between HuH7 and Sorafenib-treated HuH7 cells. The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was performed to analyze the different function of biomarker candidates in the HuH7 cells. According to the results, we found Galectin-3 and HMGB1 may correlate to cancer proliferation and migration. Furthermore, we used the Western blotting to validate the biomarker candidates and find the down-regulation expression of Galectin-3 and HMGB1 under the treatment of sorafenib.

It is known that sorafenib inhibits the activity of tyrosine protein kinases (B-RAF) and further blocks MAPK pathway. The MAPK pathway can be grouped into three main families, ERKs (extracellular-signal-regulated kinases), JNKs (Jun amino-terminal kinases), and p38/SAPKs (stress-activated protein kinases). The Galectin-3 expression in HuH7 cells, treated with U0126 (inhibitor of ERK pathway), declines following time course. In conclusion, we can confirm that expression of Galectin-3 is regulated by the ERK signaling pathway. According to the above results, we conclude that Galectin-3 and HMGB1 are potential biomarkers of disease progression and therapy efficacy. They are expected to become valuable in routine clinical care and help direct personalized therapy.

一、前言

(一)、肝癌

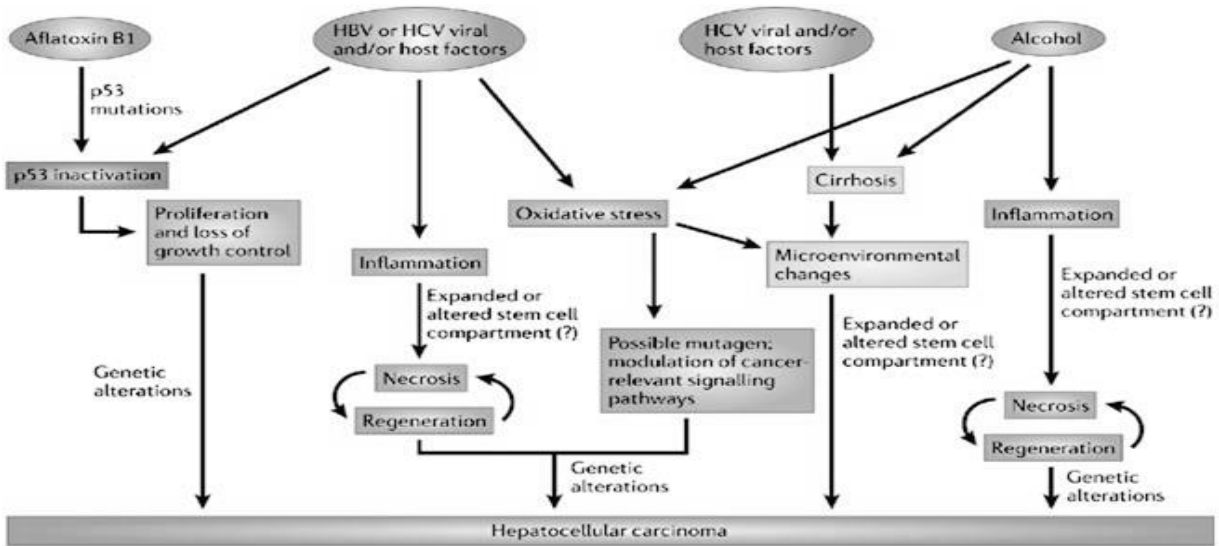
肝癌是全球第五大常見的癌症，每年全世界約有超過 140 萬人死於肝癌，肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是最為常見的原發性肝癌，約占 75%，其他如膽管細胞癌 (Intrahepatic cholangiocarcinoma)、肝母細胞瘤 (Hepatoblastoma) 則較為少見。肝癌主要的分布地區是在東亞以及撒哈拉沙漠以南的非洲，歐洲的盛行則最低。根據圖一衛生福利部於 2015 公布的資料指出(圖一)，肝癌高居國人癌症死因的第二名，也顯示出肝癌對國人健康的重大影響。



圖一、2015 台灣癌症十大死因(衛福部統計處 <http://www.mohw.gov.tw/cht/DOS/>)

肝癌的危險因子有 B 型肝炎病毒(HBV)、C 型肝炎病毒(HCV)的慢性感染，酒精與非酒精性肝炎，代謝症候群，以及黃麴毒素等。HBV 的慢性感染是肝癌的最主要病因，全球的肝癌中約有 55% 與 HBV 相關，台灣的肝癌更有高達 70~80% 與 HBV 相關，研究更發現，HBV 愈活躍，肝癌的發生率就越高。(廖,2010)

在不同的危險因子影響下，肝癌有著不同癌化過程 (Hepatocarcinogenesis)。如圖二，黃麴毒素可藉由造成 P53 基因突變使其失去活性，影響生命週期而引發癌化。HBV 可透過產生氧化壓力，使微環境改變或是影響訊息傳遞路徑，造成基因突變導致肝癌，也可與黃麴毒素一樣使 P53 基因失去活性，或是在慢性感染下使肝細胞不斷重複再生與壞死的週期，引起基因突變進而引發肝癌。HCV 則是透過肝硬化致癌。酒精可產生氧化壓力、肝硬化使微環境改變、訊息傳遞路徑受影響，或是使肝細胞不斷重複壞死與再生的過程，導致基因突變，引發肝癌。

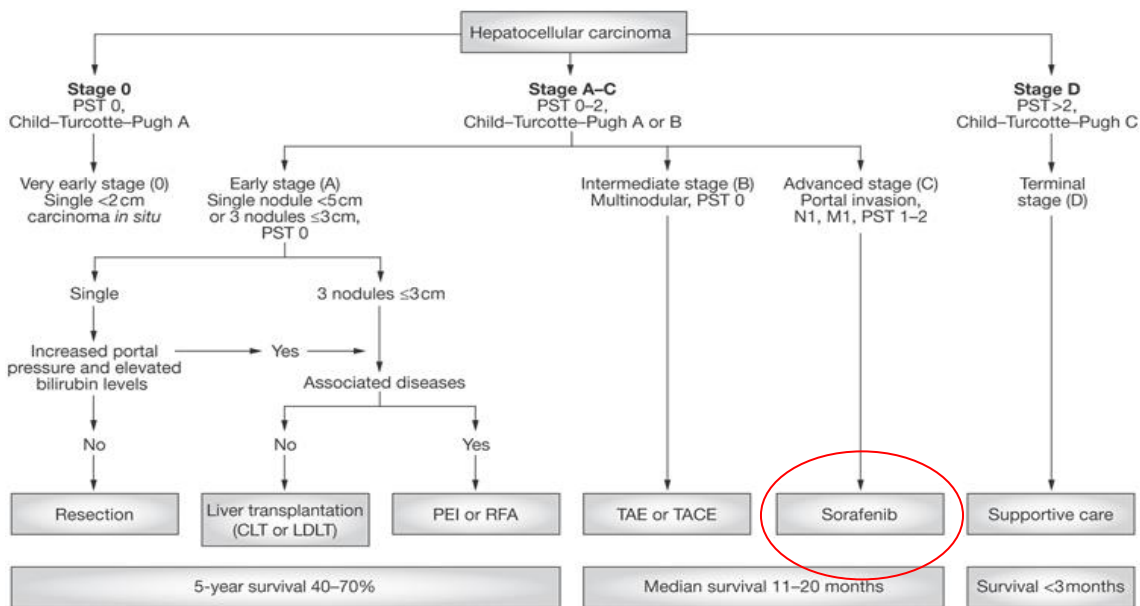


圖二、HCC 癌化過程(Paraskevi & Ronald, 2006)

目前對於肝癌的診斷，影像檢查方面可藉由超音波、電腦斷層攝影、核磁共振掃描，至於血清檢查則可透過檢測血中甲型胎兒蛋白(Alpha-fetoprotein, AFP)、脫羧基凝血酶原 (DCP) 或是 AFP-L3 濃度來進行檢測，也可進行肝臟穿刺做更進一步的檢查。

臨床上也會以 Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC)作為肝癌的分期方法(圖三)，BCLC 主要是以病人的體能狀況、腫瘤的大小及數目、肝外轉移的有無、肝硬化程度等進行評分，做為臨床肝癌治療方法的選擇依據與存活率的判斷指標。

肝癌的治療方法在早期可能是進行手術切除、肝臟移植，或是酒精注射(PEI)、射頻腫瘤滅除術(RFA)，在中期到晚期會以動脈栓塞術(TAE)或是給予口服標靶藥物蕾莎瓦(Sorafenib)來進行治療，在末期則以支持性療法為主(圖三)。

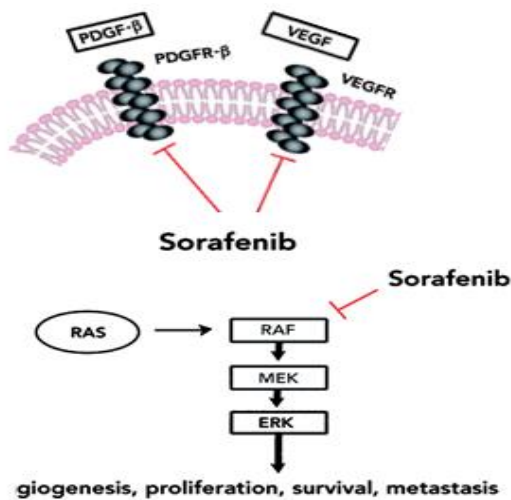


圖三、肝癌各分期(Janevska,2012)

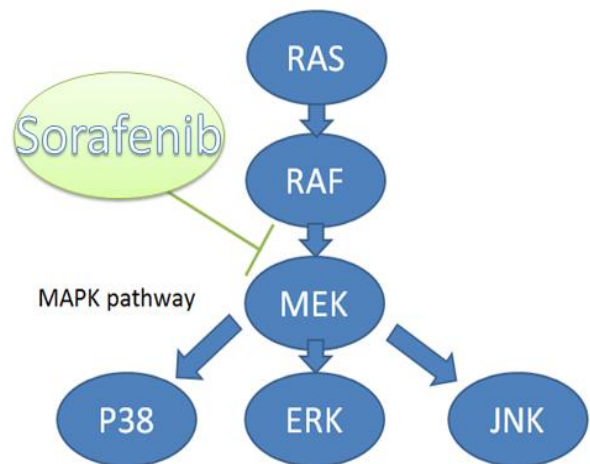
(二)、蕾莎瓦(Sorafenib)

透過分子生物技術抑制腫瘤血管新生，或是阻斷腫瘤細胞生長與修復能力的治療方法，稱之為標靶治療。肝癌是一種具有血管高度分化與細胞異常增生的癌症，若是可抑制 Ras-MAPK、血管內皮因子受體(Vascular endothelial growth factor, VEGFR)、纖維母細胞生長因子(Fibroblast growth factor, FGF)、血小板生長因子受體(Platelet-derived Growth Factor, PDGF)的藥物，便有利於肝癌的治療。

蕾莎瓦是第一個受美國食品藥物管理局(FDA)認可並作為肝癌標靶治療藥物上市的口服標靶藥物。蕾莎瓦屬於酪胺酸激酶抑制劑(tyrosine kinase inhibitor)，可抑制 RAF 激酶阻斷 MAPK pathway，也可抑制細胞膜上之 VEGFR、PDGFR 之活性(圖四)。MAPK pathway 又可分成 ERKs (extracellular-signal-regulated kinases)、JNKs (Jun amino-terminal kinases)和 p38/SAPKs (stress-activated protein kinases)三類(圖五)。當細胞因 MAPK 訊息傳遞路徑調控出現問題，引發細胞不正常的增殖，進而變成癌細胞，因此 Sorafenib 可藉由抑制 MAPK pathway，達到抑制腫瘤細胞生長與血管新生的效果。



圖四、Sorafenib 作用機轉(Lacouture et al. ,2008)



圖五、MAPK pathway

(三)、蛋白質體學

蛋白質體是指生命體某一器官、組織或細胞內表現的全體蛋白質，蛋白質體學即是針對蛋白質體進行研究的科學。傳統的蛋白質體學分析的主要內容是將生物的器官、組織、細胞內的蛋白質分離並分析其序列、結構、功能等，現今則多進行系統性的研究以探討蛋白質間的交互關係及定量分析，結合多維液相層析質譜儀及生物資訊，找尋少量而具重要功能的蛋白質。

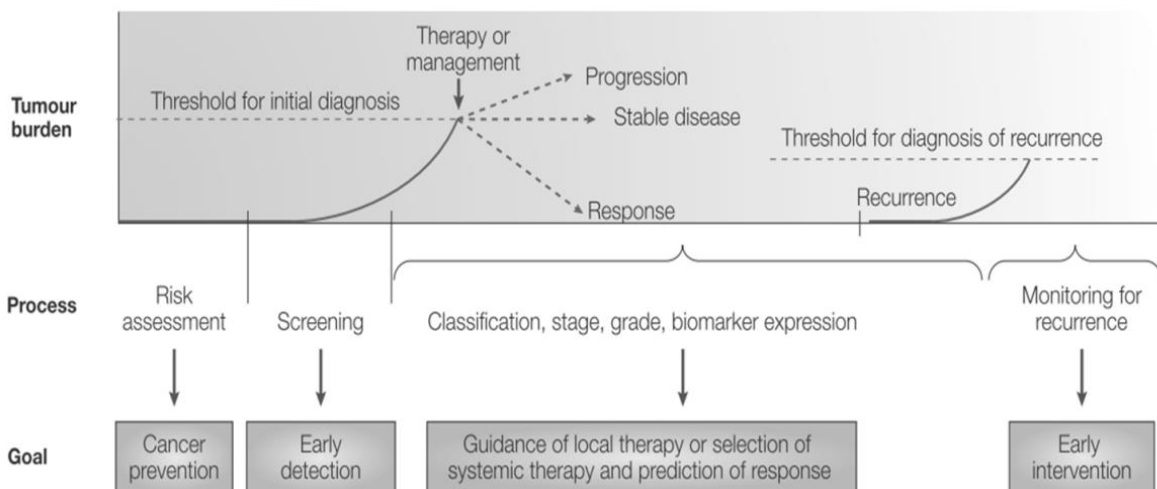
經由分析結果，可瞭解蛋白質在細胞內不同位置的表現、調節、活性、功能及交互作用。

比較各細胞不同發育期之間蛋白質表現的差異性，也可以探討生物的代謝途徑及致病機轉，進而找尋疾病適當的生物標記或開發標靶藥物。

(四)、肝癌生物標記

生物標記是用以客觀檢測或評估生理及疾病發展，或預測及監測藥物作用的指標，2007年美國FDA定義之生物標記，需符合：利用已確立性能與特性之量測系統驗證過，有確立之科學依據或實驗證據，可反應人體生理現象、藥物毒性、藥物生理反應及疾病發展過程等，同時可以提供做為臨床決定依據的生物特徵。隨著科學及醫學的進步，目前已被廣泛使用於疾病的診斷。在運用上亦須考慮到其敏感度及特異性。

腫瘤生物標記指與惡性腫瘤有關聯並依其功能性分為癌症預防生物標記 (cancer prevention biomarkers)、癌症偵測生物標記(cancer detection biomarkers)、疾病進展生物標記 (disease progression biomarkers)、療效生物標記 (efficacy biomarkers)、藥物目標生物標記 (biomarkers of drug targets)，圖六為生物標記在癌化過程中各階段的應用。



圖六、生物標記在癌化過程中各階段的應用 (Ludwig & Weinstein ,2005)

生物標記可應用於癌症的早期診斷，或是追蹤病人經藥物治療後的狀況，藉此評估預後，也可用於偵測癌症的復發。

1. 甲型胎兒蛋白(Alpha-fetoprotein，AFP)

Alpha-fetoprotein(AFP)長久以來一直作為HCC的生物標記，是第一個被用來檢測與追蹤HCC病人狀況的指標。AFP是一種在懷孕時，由胎兒的肝與卵黃囊所製造的醣蛋白，且被認為與肝癌、胃癌、肺癌，等等癌症有關。HCC病人血液中的AFP表現量通常是會提高的，一般而言，如果病人血液中AFP的量持續在500 ng/ml以上即為HCC。(Behne & Copur,2012)

2. Glypican-3(GPC3)

GPC3 是一種肝癌發生時會大量表現或釋出的細胞表面蛋白，也是 WNT 訊號傳遞路徑的受體。就特異性的表現而言，GPC3 只會在肝癌患者大量表現，罹患肝炎及肝硬化的病患表現並不明顯，且有小部分的 GPC3 可在血液中被檢測出來，是極有潛力成為診斷 HCC 的生物標記。(Nakatsura ,2009)

3. Des-Gamma-Carboxy (Abnormal) Prothrombin (DCP)

DCP 是一種異常的凝血酶原，在肝癌細胞中因缺乏依賴維生素 K 的羧化酶，DCP 這種異常的凝血酶原便被分泌出來，DCP 的表現量被認為與 HCC 腫瘤的大小與轉移相關，其敏感度為 72%，特異性為 90%，相較於 AFP，有較高的敏感度與特異性，與 AFP 同時用於診斷，更有 84% 的敏感度。(Behne & Copur ,2012)

(五)、研究動機

目前雖已有 AFP、GPC3、DCP 這些肝癌生物標記，但這些生物標記主要用於早期診斷，目前並沒有生物標記可用於追蹤標靶藥物—蕾莎瓦之治療成效，因此我們擬進行本研究以期找到適合的生物標記，幫助醫師評估病人預後。

(六)、研究目的

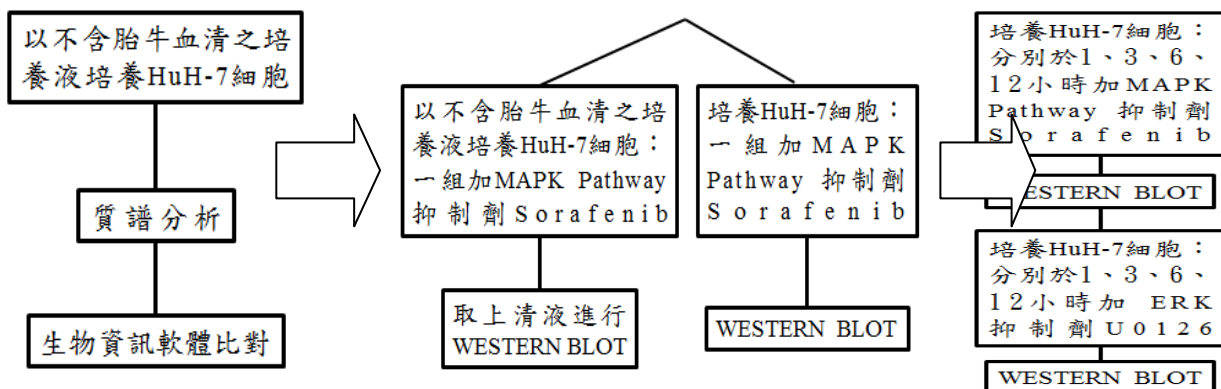
1. 進行資料分析鑑定有潛力成為生物標記的蛋白質
2. 驗證此蛋白確實會因 Sorafenib 刺激使表現量下降
3. 研究此蛋白質之訊息傳遞路徑

二、研究方法或過程

篩選出有潛力成為
生物標記的蛋白質

驗證此蛋白確實會因
Sorafenib 處理使表現量下

研究此蛋白質之
訊息傳遞路徑



(一)、細胞培養

培養人類肝癌細胞株 HuH7 細胞於底面積 28cm² 的培養皿，置於含 5% CO₂，37°C 的培養箱。待細胞八分滿時，以 PBS 沖洗兩次，再加入 1 mL 含有 0.5% 胰蛋白酶的 PBS，放入 37°C 培養箱中反應約 5 分鐘。將培養皿取出並拍打使附著於底部的細胞剝落，再加入 4 mL 培養液停止胰蛋白酶的作用。並且重複沖刷將細胞均勻打散後，在室溫以 1000 rpm 離心 3 分鐘，之後將上清液吸除，加入 1 mL 培養基將細胞均勻打散，並根據實驗的需要將適量細胞繼代培養。實驗中使用的藥物為肝癌唯一標靶藥物—Sorafenib 以及 ERK pathway 抑制劑 U0126。我們會將加入藥物的細胞與對照組，一同在培養箱培養 24 小時後再取出，並收取細胞中的蛋白質或是培養皿中的上清液。

(二)、十二烷基磺酸鈉-聚丙醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)

配製分離膠體 (Separating gel) 及堆疊膠體 (Stacking gel) 後，先於玻璃板中加入分離膠體 6mL，並加入甲醇。等分離膠體凝固後，將甲醇倒出以二次水沖洗，再加入堆積膠體 1.9mL，並插入洗淨的齒梳 (comb) 形成樣品槽，待膠體凝固後拔下齒梳，就可架上電泳槽準備跑膠。

在樣品配置方面，細胞內實驗中，會透過測定蛋白質濃度，將各管不同樣品間的蛋白質含量皆調成 20μg，並加水和 sample buffer 至 20μL；而在以上清液為樣品的細胞分泌實驗中，則會以體積定量的方式，每一管都加入樣品 15μL，再加入水和 sample buffer 至 20μL。樣品混合均勻後加上防爆夾，在 100 度下加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻後短暫離心，收取樣品後即可加入樣品槽。

將電泳槽下層加入電泳緩衝液後架上玻璃板，電泳槽上層也加入電泳緩衝液，再將配置好之樣品加入樣品槽。電泳槽通上電後，先以 90 伏特跑 30 分鐘，再以 150 伏特跑 90 分鐘，帶樣品移至膠體底部後停止通電。PVDF 膜浸潤於甲醇中，再浸泡至轉印緩衝液中，另取濾紙泡入轉印緩衝液中。於轉印槽中，由下而上依序放置，濾紙四張、PVDF 膜、膠體、濾紙四張。將轉印槽上蓋壓上，並清除氣泡。轉印使用的電流依據膠體的面積，每平方公分約 1 mA，通電時間為四小時，而電壓不超過 10 V。

轉印後取下膠體、PVDF 膜。膠體浸泡在 Coomassie brilliant blue (CBB) 染色液中，均勻搖晃至整張膠體背景呈深藍色。置入退色液均勻搖晃至背景呈現接近透明，以二次水清洗數次，浸泡保存於乾淨的二次水中備用。PVDF 膜則以 Fast Green 染色五分鐘，再以甲醇退染，晾乾後再進行裁切。

(三)、液相層析偶合串聯式質譜儀分析與生物資訊軟體

將電泳膠體於完成 CBB 染色及退染後，自膠片切取下目標蛋白質，並將之切碎成 1mm x1mm 並放入乾淨的微量離心管中，先以 500 μ L 二次水清洗 3 次，每次 10 分鐘，洗去鹽類及酸性物質，再加入 500 μ L 脫色液(40% ACN 及 25 mM NH_4HCO_3 , pH 7.8) 於 37 $^\circ\text{C}$ 烘箱內上下翻轉洗 2 次，每次 15 分鐘，以完全除去 CBB。移除脫色液後，加入 500 μ L 100% ACN 震盪數秒，重複兩次以去除膠內的水分，並利用 Speed Vac 將膠體抽乾。接著在每個蛋白質膠體加入 3 μ L 的胰蛋白酶 (0.1 μ g/ μ L)和 17 μ L 的 NH_4HCO_3 ，並置於冰上反應 30 分鐘使膠體吸進含有胰蛋白酶的酵素緩衝液。移除多餘的緩衝液，加入 20 μ L 的酵素緩衝液，於 37 $^\circ\text{C}$ 下反應 16 小時。

收集酵素緩衝液後，於原微量離心管中加入 30 μ L 1% trifluoroacetic acid (TFA)，在 37 $^\circ\text{C}$ 的超音波震盪水浴槽中，萃取膠內胜肽片段，30 分鐘後收集萃取液，重複兩次。再於離心管中加入 30 μ L 0.1% TFA 及 60% ACN 的萃取液，重複上述步驟兩次。將四次萃取液裝在同一管新的微量離心管中，利用 speed Vac 完全抽乾。

將乾燥後的胜肽片段，以 10 μ L 平衡溶液 (2% ACN, 0.1% FA) 回溶，再將前端含有 C18 的 tip (Supel-tip C18, Sigma) 裝在 10 μ L 的 pipettmen 上，重複十次吸取活化溶液 (90% ACN, 0.1 % FA) 使其浸濕活化後並排除。接著重複十次吸取平衡溶液 (2% ACN, 0.1% FA) 使其水合化後並排除。再重複十次吸取樣品，使胜肽片段與 C18 結合。接著重複十次吸取清洗溶液 (2% ACN, 0.1% FA) 將未結合鹽類去除。再吸取萃取溶液 (60% ACN, 0.1% FA)，將與 C18 結合的胜肽片段萃取出，收集在新的微量離心管中，再利用 Speed Vac 抽乾。

酵素水解後的胜肽片段經過去鹽及乾燥處理，以 2% ACN 及 0.1% FA 回溶。以逆向層析管柱分離胜肽片段後，利用電噴灑離子化(Electron spray ionization, ESI)將胜肽片段霧化。以質譜儀進行胜肽片段篩選、裂解及定序，再透過生物資訊軟體分析。

(四)、西方墨點法(Western Blot)

PVDF 膜浸潤於甲醇中，再浸泡至轉印緩衝液中。另取濾紙泡入轉印緩衝液中。於轉印槽，由下而上依序放置濾紙四張、PVDF 膜、膠體、濾紙四張。再將轉印槽上蓋壓上，並清除氣泡。轉印使用的電流依據膠體的面積，每平方公分約 1 mA，通電時間為四小時，而電壓不超過 10 V。

轉印後取下膠體、PVDF 膜。膠體浸泡在 Coomassie brilliant blue (CBB) 染色液中，均勻搖晃至整張膠體背景呈深藍色。置入退色液均勻搖晃至背景呈現接近透明，以二次水清洗數次，浸泡保存於乾淨的二次水中備用。PVDF 膜則以 Fast Green 染色五分鐘，再以甲醇退染，

晾乾後再進行裁切。

PVDF 膜經裁切後，浸入甲醇三分鐘，在浸入二次水中 3 分鐘。再放入含有 5% 脫脂奶粉的 TN 緩衝液，於室溫下進行填塞作用(blocking)一小時。再以 TNT 緩衝液洗三次，每次 10 分鐘，移除 TNT 緩衝液後再進行與抗體之間的結合。加入適當稀釋過後的一次抗體，於 4°C 反應 24 小時，使抗體與膜上目標蛋白結合。隔天移除一次抗體溶液，以 TNT 緩衝液漂洗 PVDF 膜三次，每次十分鐘。接著加入含有 5% 脫脂奶粉的 TNT 緩衝液做適當稀釋之二次抗體，在室溫下進行結合反應 1 小時。之後移除二次抗體溶液，並以 TNT 緩衝液漂洗 PVDF 膜三次，每次十分鐘。

取出 PVDF 膜置於乾淨的投影片紙上，將 Western Lighting™ Plus-ECL kit (PerkinElmer) 的 Enhanced Luminol Reagent Plus 與 Oxidizing Reagent Plus 兩種溶液 1:1 混合均勻後，與 PVDF 膜反應兩分鐘。將多餘的溶液吸掉，把 PVDF 膜置入暗盒中，在暗房中取 X 光膠片進行壓片並計時五分鐘，於顯影液 (developer, Kodak) 中呈色即可見陽性反應，以水洗後再置入定影液 (fixer, Kodak) 中將未呈色的部分除掉，直到整張 X 光膠片都呈透明為止，用水將 X 光膠片洗乾淨，自然風乾保存。

三、研究結果

(一)、生物資訊軟體分析蛋白質之功能

將細胞中的蛋白質經由電泳分離，再利用質譜儀及 Ingenuity 公司所發展的訊息傳遞資料庫 (IPA) 分析，得知與細胞死亡 (cell death)、癌細胞增生 (proliferation of tumor cell lines) 和癌細胞的遷移 (cell movement of tumor cell lines) 相關的蛋白質如表一。利用 TMHMM, SignalP 和 SecretomeP 分析出分泌型蛋白質，並與 IPA 結果交叉比對。

其中 Galectin-3 (Gal-3) 參與了腫瘤細胞的生長和移動，並與生物體死亡相關，而 HMGB1 亦和肝癌生長有關(表一)，又此二蛋白質皆為分泌型蛋白，可透過抽血進行檢測，因此我們選取 Galectin-3 和 HMGB1 做進一步的研究。

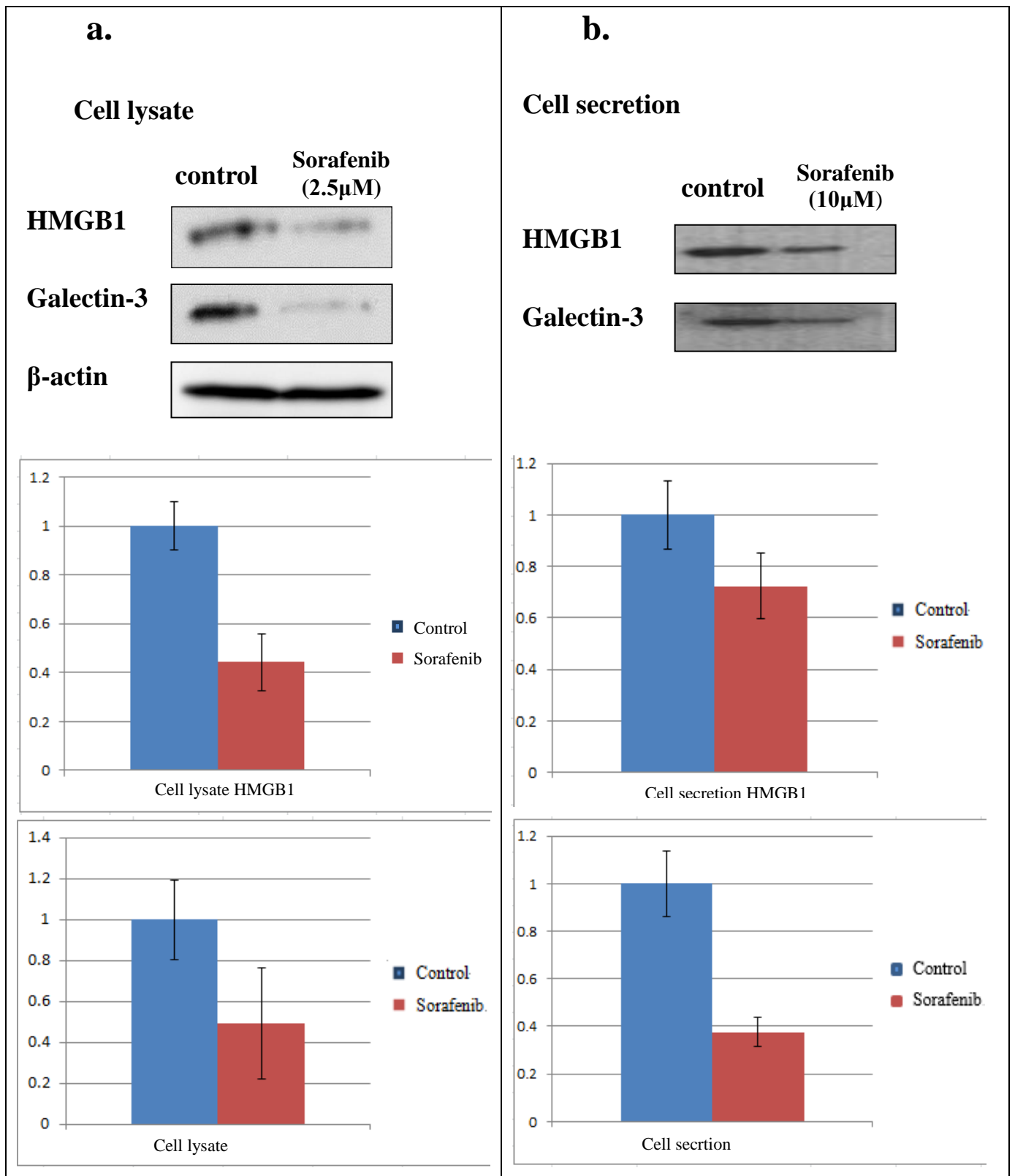
表一、生物資訊軟體分析結果，粗體字為本研究選取之蛋白質

Functions	Molecules
Cell death	A2M,AATF,AG2,APE,CACBP,CAT,DH1,CHTOP,CLU,CLYBL,CTNBIP1,DCK,DDX7,DX5,ETHE1,GLRX,GNAL,KPNA2,LDHA, Gal-3 , NDUFA13,NDUS4,NUDT1,NUA1,RPL10EC3B,SQSTM1,SPK1,SUDS3,TR2,TF,U10
Proliferation of tumor cell lines	A2,ATF,CAYBP,CDH,CLU,CLYBL,CW7,DX2,DX5,EF1,EF4A,EF,EP8,ERL1,FN1,GOLG2,GOPH3,GTP4, HM1 , KPN2, Gal-3 , NDFA13,NUDT1,NUMA1,RPS14,SUT2A1,TF,VN,YB1
Cell movement of tumor cell lines	A2M,AR2,CD1,CLU,FN1,GPC1,GOLGA2,KPA2, Gal-3 ,SQST1,VTN,YB1

(二)、HuH7 細胞加入 Sorafenib 蛋白質表現量差異

在細胞內實驗中，透過 Western blot 的結果(圖七)，可以得知 Galectin-3 和 HMGB1 的表現量再經過 2.5 μ M Sorafenib 刺激後，有顯著的下降，這顯示出了這兩種蛋白質確實會因藥物作用的有無，呈現不同的趨勢，使這兩個蛋白質有成為追蹤 Sorafenib 治療效果指標的潛力。但一個理想的生物標記，除了可幫助醫師更好評估病人預後之外，也應是可以藉由相較手術較為非侵入性的方式，如抽血等，檢測得到的蛋白，因此在細胞外的表現量也應要在藥物刺激下而下降。透過圖七可得知，Galectin-3 和 HMGB1 在細胞外實驗中，經過 10 μ M Sorafenib 刺激後，表現量也有下降的趨勢。

在實驗中，我們以 β -actin 為細胞內實驗的 internal control，但在細胞外實驗中，原本在細胞中能成為定量標準的蛋白質，經分泌之後，表現量必下降，且在加藥組中下降量較大，並不能以此作為比較標準，因此以體積定量做為基準。



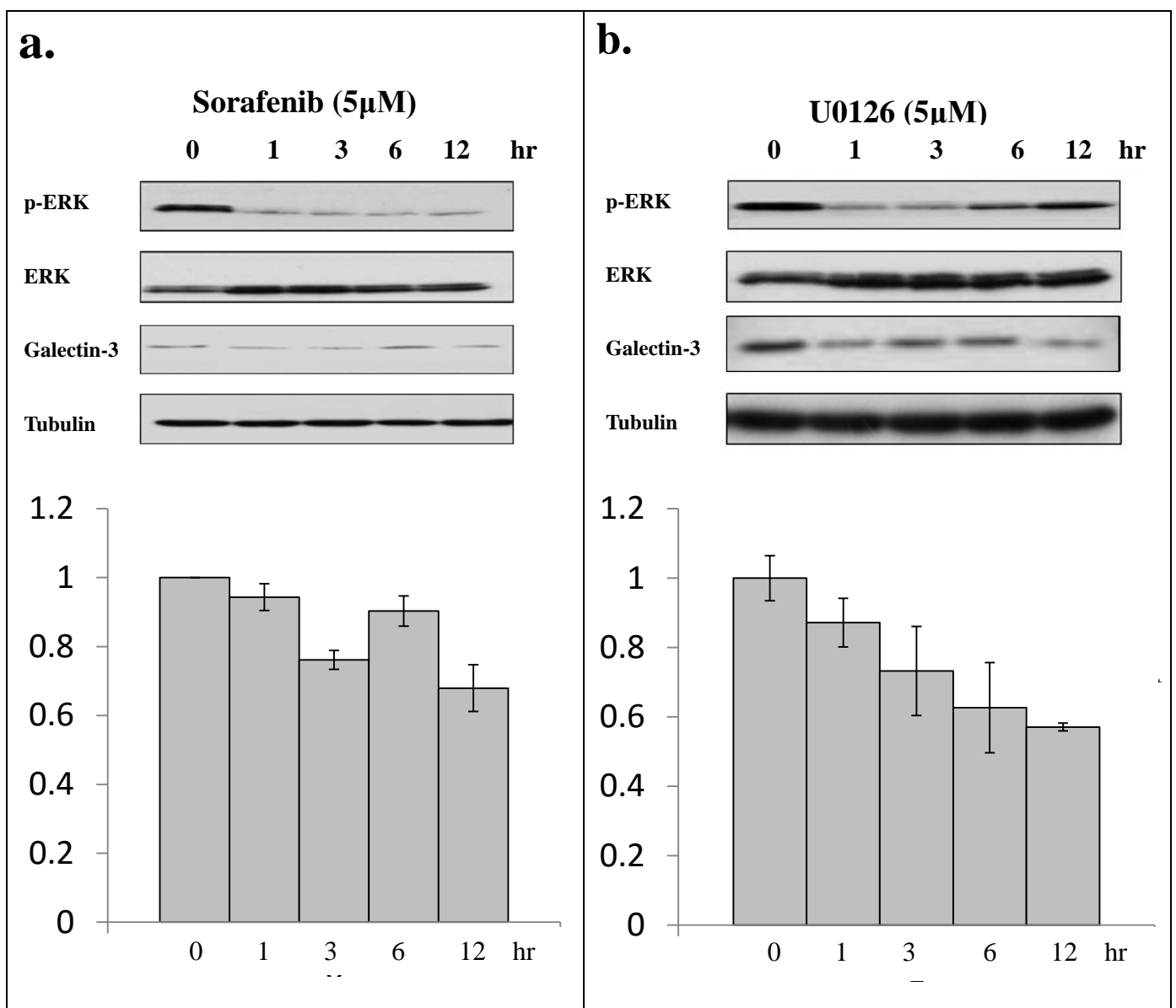
圖七、a. Sorafenib 在細胞內實驗對 Galectin-3 和 HMGB1 表現量影響與量化圖

b. Sorafenib 在細胞外實驗對 Galectin-3 和 HMGB1 表現量影響與量化圖

(三)、Galectin-3 之調控路徑

已知 Sorafenib 是一種酪胺酸激酶抑制劑，可阻斷細胞內 RAF/MEK 信息傳遞路徑。本實驗想瞭解 Galectin-3 的信息傳遞路徑，因此透過觀察細胞經 Sorafenib 作用 0、1、3、6、12 小時，發現 Galectin-3 在細胞內的表現量，有隨作用時間增加而下降的趨勢(圖八 a.)，證實 Galectin-3 為 RAF pathway 所調控之蛋白。

接下來以 ERK pathway 抑制劑 U0126，分別在細胞上作用 0、1、3、6、12 小時，可觀察到，p-ERK 與 Galectin-3 的表現量皆有隨作用時間增加而下降的趨勢，顯示出在 ERK 磷酸化被抑制的情況下，Galectin-3 的表現量也會隨之下降(圖八 b.)，確認 Galectin-3 會受 ERK pathway 調控。



圖八、a. Sorafenib 在 0~12 小時對 Galectin-3 表現量之影響及量化圖

b. U0126 在 0~12 小時對 Galectin-3 表現量之影響及量化圖

四、討論

目前對於肝癌，還沒有可有效反應病患經口服標靶藥物 Sorafenib 治療過後之狀況的生物標記，而本研究所找出的兩個生物標記 HMGB1、Galectin-3，可被癌細胞分泌至細胞外，經由生物資訊軟體分析得知，此兩種蛋白皆與腫瘤細胞的增殖(proliferation)有相關，且在 Sorafenib 刺激下，不論在細胞內或細胞外的表現量都有顯著的下降。由上述得知，這兩種蛋白皆可有效追蹤 Sorafenib 治療效果，也可能透過抽血等較為簡便的方式檢測，是十分有潛力的生物標記。

已知 Sorafenib 可抑制 MAPK pathway 中的 RAF/MEK 信息傳遞路徑，進而達到抑制整條路徑的效果，而 Galectin-3 再經 Sorafenib 刺激後表現量會有所下降，證實其為 RAF pathway 所調控之蛋白。RAF 下游為 MAPK pathway，MAPK pathway 由三種分子所組成：p38、JNK、ERK，單憑目前實驗結果無法判定 Galectin-3 會受哪一路徑調控。所以接下來使用 ERK pathway 抑制劑 U0126 刺激 HuH7 細胞，發現 Galectin-3 的表現量隨著藥物作用時間增加有下降的趨勢，證實 Galectin-3 會受到 ERK pathway 調控。

五、結論與應用

由於目前尚未有適當的生物標記作為醫生評估病人經預後的指標。Galectin-3 與 HMGB1 在肝癌的生長中扮演重要角色，在 Sorafenib 處理後表現量也會有所變動，是極具潛力的生物標記。同時，我們也了解到 Galectin-3 為 ERK pathway 所調控之蛋白。希望將來這些生物標記可以應用在臨床上，作為監控病人治療狀況的指標，進而達到個人化精準醫療的目標。

六、參考文獻

- 廖運範(2010)。挑戰 B 型肝炎～台灣經典。當代醫學，441 期，P766 – 776。
- Behne, T. and Copur, M.S. (2012) ‘Biomarkers for Hepatocellular carcinoma’, *International Journal of Hepatology*, 2012, pp. 1–7. doi: 10.1155/2012/859076.
- Farazi, P.A. and DePinho, R.A. (2006) ‘Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment’, *Nature Reviews Cancer*, 6(9), pp. 674–687. doi: 10.1038/nrc1934.
- Feng, M. and Ho, M. (2013) ‘Glypican-3 antibodies: A new therapeutic target for liver cancer’, *FEBS Letters*, 588(2), pp. 377–382. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.002.
- Janevska, D., Chaloska-Ivanova, V. and Janevski, V. (2015) ‘Hepatocellular carcinoma: Risk factors, diagnosis and treatment’, *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3(4), p. 732. doi: 10.3889/oamjms.2015.111.

- Lacouture, M.E., Wu, S., Robert, C., Atkins, M.B., Kong, H.H., Guitart, J., Garbe, C., Hauschild, A., Puzanov, I., Alexandrescu, D.T., Anderson, R.T., Wood, L. and Dutcher, J.P. (2008) 'Evolving strategies for the management of hand-foot skin reaction associated with the Multitargeted Kinase inhibitors Sorafenib and Sunitinib', *The Oncologist*, 13(9), pp. 1001–1011. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0131.
- Li, D., Mallory, T. and Satomura, S. (2001) 'AFP-L3: A new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma', *Clinica Chimica Acta*, 313(1-2), pp. 15–19. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00644-1.
- Ludwig, J.A. and Weinstein, J.N. (2005) 'Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection', *Nature Reviews Cancer*, 5(11), pp. 845–856. doi: 10.1038/nrc1739.
- Murugavel, K.G. and Mathews, S. (2008) 'Alpha-fetoprotein as a tumor marker in hepatocellular carcinoma: Investigations in south Indian subjects with hepatotropic virus and aflatoxin etiologies', *International Journal of Infectious Diseases*, 12(6), pp. e71–e76. doi: 10.1016/j.ijid.2008.04.010.
- Nakatsura (2009) 'Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer', *International Journal of Oncology*, 34(3). doi: 10.3892/ijo_00000190.

【評語】 080001

1. 本科展作品主旨在於分析肝癌細胞經蕾莎瓦治療的分子機轉，並探討具潛力的一些生物標記。
2. 本作品已有許多結果與發現，建議如果能以二維電泳分析取代單一膠體電泳，可能有其它的生物標記被發現。後續 JNK 與 p38 路徑的探討也將會使整個作品的研究更具完整性。