

# 2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090017  
參展科別 醫學與健康科學  
作品名稱 探討 rVP1 在肺癌細胞上 Integrin 路徑及  
Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的作用機制  
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 陳怡旻、楊淑美  
作者姓名 黃郁晴

關鍵字 rVP1、Integrin 路徑、Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑

## 作者簡介



大家好，我是黃郁晴，目前就讀於臺北第一女子高級中學。很高興能進到國際科展複審，一路上，遇到非常多的挫折，但都幸運得挺過來了。過程中，不僅能學到非常多新的知識，對我來說，思索專研時更能大大提升我的邏輯思考，獲益良多。

感謝總是回答我所有問題的實驗室學長，緊要關頭總把我罵醒的老師，還有撥空與我長談的教授，因為有大家的幫忙，我才能有這個機會！

## 摘要

經基因重組技術純化的口蹄疫病毒鞘蛋白 rVP1 被證實在癌細胞內會經由 Integrin 路徑對癌細胞的轉移及凋亡產生影響。本研究所探討的是 rVP1 對肺癌幹細胞 H1299 及肺癌細胞 A549 中 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的作用機制，目的除了要了解兩路徑在肺癌細胞中的影響，也希望能找出兩路徑的交互作用機制。

本研究發現肺癌幹細胞 H1299 中  $\beta$ -catenin 會因加入 rVP1 而表現量下降，與肺癌細胞 A549 中 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑上游的膜上受體 Frizzled-8 因 rVP1 作用而表現量下降；而不論在肺癌幹細胞 H1299 及肺癌細胞 A549 中 Grb2 都不會因 rVP1 作用而表現量有所改變；Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游產物 MIG-7 則會因加入 Wnt3a ligand 而表現量下降。

由實驗結果推測癌症幹細胞本身與癌細胞特性不同，可能使得 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑產生的效果不同；Grb2 的變化量則需要更多實驗求證。Integrin 路徑會影響到 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的上游生成，兩者確實有相互影響。

## Abstract

Recombinant capsid protein VP1 (rVP1) of foot-and-mouth disease virus binds to integrins to modulate Akt/GSK3- $\beta$  signaling and suppress migration/invasion and metastasis of cancer cells. In this study, we investigated the mechanism of rVP1 interacting with Integrin pathway and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in lung cancer stem cell H1299 and lung cancer cell A549, hoping to understand the effects on lung cancer cells made by these two pathways and discover the interacting mechanism of these two pathways.

In this study, we found that  $\beta$ -catenin in lung cancer stem cell H1299 decreased when rVP1 was added, and that the membrane receptor of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, Frizzled-8 (FZD8), also decreased due to the interaction of rVP1 and Integrin pathway. However, Grb2 in lung cancer stem cell H1299 and lung cancer cell A549 wouldn't decrease although rVP1 was added. In addition, the product of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, MIG-7, decreased when Wnt3a ligand was added.

From the results of our experiment, we speculated that the different characteristics between lung cancer cell A549 and lung cancer stem cell H1299 might lead to different effects made by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. More experiments need to be conducted to determine the changes of Grb2 amount. Integrin pathway will influence the production of membrane receptor of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.

# 一、前言

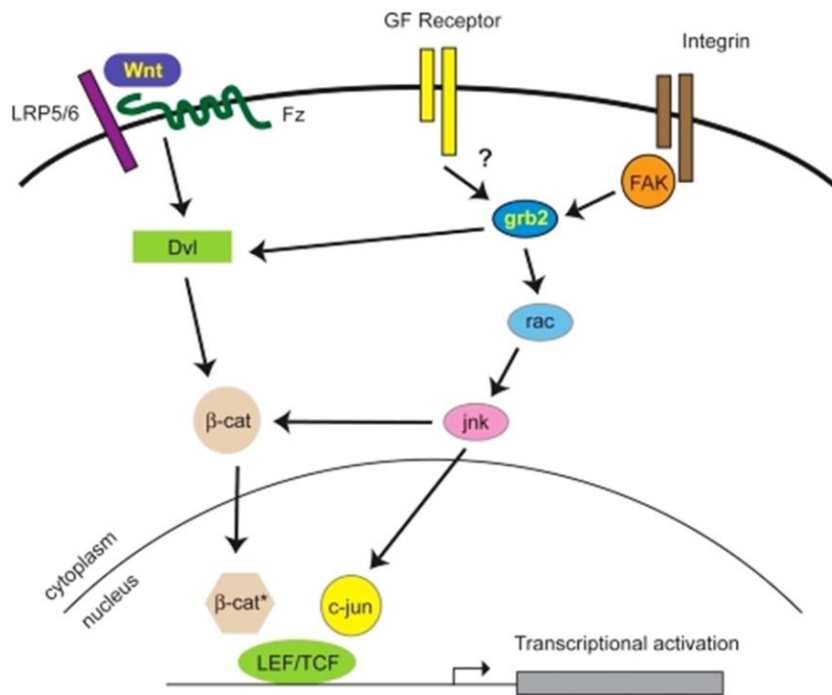
## (一)研究動機

肺癌在台灣的「發生率」排名第三、癌症「死亡率」排名第一。隨著生活習慣的轉變，罹患肺癌的人數逐年上升，年齡層也漸漸年輕化，罹癌原因更加多元了，不只是傳統認定的二手菸、廚房油煙，空氣中「PM2.5」的汙染物也成了一大原因。

癌症致死的原因大多是轉移至其他器官，最終導致器官衰竭。如果提早發現，則可以採切除腫瘤的方式，為甚麼肺癌的致死率那麼高?因為前期都不會有任何徵兆，到了較後期，才會有一些症狀如:咳嗽長久不癒等，這時候到醫院檢查大多是第三期了，早已喪失了最佳的治療時間。

過去發現口蹄疫病毒鞘蛋白 rVP1 能通過 Integrin 路徑減緩肺癌幹細胞的轉移，這些效果已在癌症研究中被證實。(Ho, 2012)

在已知這些結果的情況下，我得知了原來在肺癌細胞上的 Integrin 路徑經過 Grb2 與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑共同調控  $\beta$ -catenin，而 rVP1 尚未被證實會經 Grb2 到 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游 (圖一)。



圖一、肺癌細胞上的 Integrin 路徑經過 Grb2 與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑共同調控  $\beta$ -catenin 的表現量。肺癌細胞中 FAK 與 growth factor receptors 激活 rac 和 jnk; 而 Grb2 也直接與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游 Dvl2 作用，激活轉錄因子 LEF/TCF。(Crampton et al, 2009)

在原論文(Crampton, 2009)中,直接指出 Grb2 與 FAK 結合會使 Wnt signaling 中的 DVL 產生變化、其下游轉錄因子的表現量也有改變,證明 Grb2 會連接 Integrin 路徑和 Wnt signaling。

根據此圖,假設若 rVP1 在肺癌幹細胞內通過 Grb2,則代表 rVP1 對於 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑皆有影響,且因為同時對兩者作用, $\beta$ -catenin 的表現量也會有顯著差異。

在 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑方面,我希望找到在肺癌幹細胞中會使  $\beta$ -catenin 表現量上升的 wnt ligand,因為如果上圖成立,則 rVP1 在肺癌幹細胞中便能有效抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游  $\beta$ -catenin 的入核現象。在探討論文時,我得知在癌細胞中會使  $\beta$ -catenin 表現量上升的 wnt ligand 有 wnt1、wnt2、wnt3a、wnt5a (Stewart DJ1, 2014),但是 wnt5a 並不是影響典型的 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑,而是 Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway (Amanda J Mikels, Roel Nusse, 2006),因此只選用 wnt1、wnt3a 來進行之後的實驗。

若能更有效的調控  $\beta$ -catenin 是否可以達到抑制癌症的目的?在肺癌細胞 A549 中,我想了解在 rVP1 作用下 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的相互機制。若能更清楚 rVP1 在抑制癌症時的路徑,不但可更深入探討,更可以應用在類似藥物上。

## (二)研究背景

### 癌幹細胞 H1299 與肺癌細胞 A549

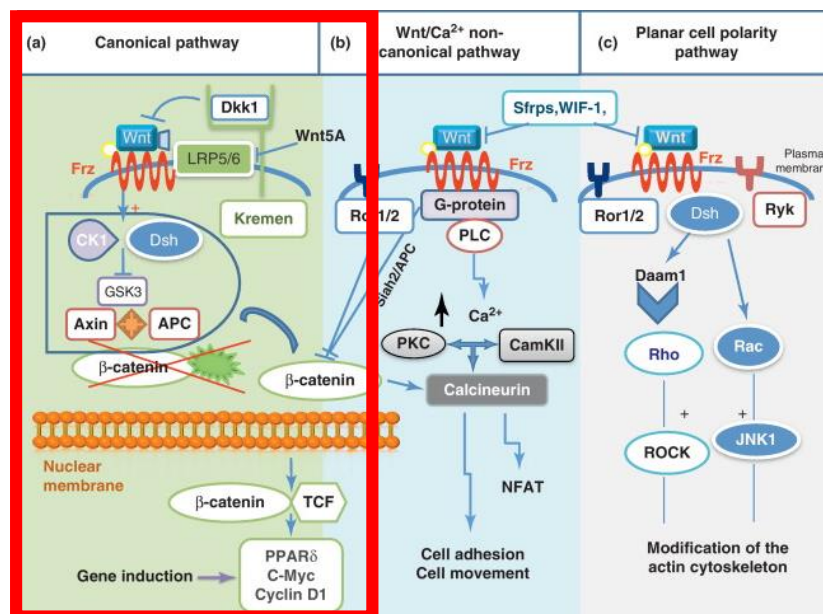
癌症幹細胞 (Cancer Stem Cell, CSC),又稱癌幹細胞、腫瘤幹細胞,是指具有幹細胞性質的癌細胞,也就是有「自我複製」以及「具有多細胞分化」等能力的癌細胞。癌症幹細胞通常分化較慢,數量較少,且具有抗藥性蛋白,如 ABCG2 能抵抗化療藥物。若在治療中未殺死癌症幹細胞,容易發現在治療之後腫瘤仍會復發及轉移,因此癌症幹細胞被稱為「癌症的種子」。目前也有部分癌症治療與癌幹細胞有關。他們使用特定的生物標記來尋找癌症幹細胞,如在肺癌中,CD133+、ABCG2 為其特殊的蛋白標記 (楊, 2012)。

本研究中所使用的細胞為肺癌幹細胞 H1299 與肺癌細胞 A549。H1299 是轉移癌細胞,被發現時已轉移至淋巴結,屬於非小細胞肺癌。而 A549 則是原位癌細胞,也屬於非小細胞肺癌。在培養細胞時,肺癌幹細胞 H1299 會懸浮在培養液中,為球狀結構,且細胞體積較大、生長較快,因此,選擇肺癌幹細胞 H1299 是為了取得更多蛋白質。而肺癌細胞 A549 生長時會平貼培養皿,且其細胞黏性較強。

### Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑

Wnt signaling 是一種細胞傳導路徑，與細胞癌化、胚胎發育、細胞遷移、細胞分裂、細胞分化及幹細胞全能性等皆有關。此路徑可分為典型傳遞路徑 (Canonical Wnt pathway) 及非典型傳遞路徑 (Non-canonical Wnt pathway) 兩種。非典型傳遞路徑又可再被細分為細胞平面極性路徑 (Cell-planer polarity pathway) 以及鈣離子路徑 ( $Ca^{2+}$  pathway) (岳，2014)。

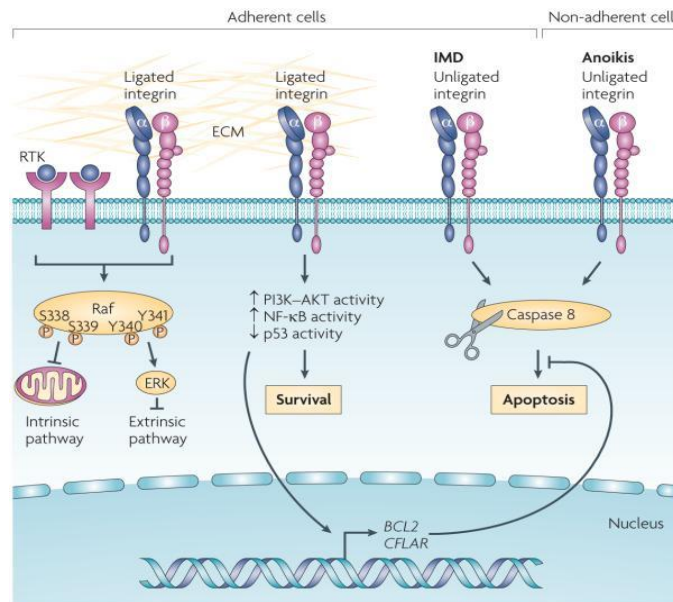
本研究所要探討的是典型傳遞路徑，也就是 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑。當 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑未被開啟時，GSK-3 $\beta$  會對  $\beta$ -catenin 進行磷酸化，使  $\beta$ -catenin 被蛋白質酶分解，因此整個細胞中只有維持基礎量的  $\beta$ -catenin。當 Wnt ligand 接上 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的受體 FZD(Frizzled)後，便會活化 DVL (Dishevelled)，啟動下游基因活化。DVL 會抑制 GSK-3 $\beta$ (Glycogen synthase kinase-3 beta)的作用使  $\beta$ -catenin 能在細胞質累積，一旦  $\beta$ -catenin 累積足夠濃度便會進入細胞核和 TCF/LEF (T 細胞因子/淋巴增強因子) 作用，開啟下游的基因。(圖二紅框) 其中有些基因跟致癌有密切關係，因此在很多癌症的研究中，經常跟 wnt signaling pathway 有關(岳，2014)。



圖二、Wnt signaling 示意圖 (Marinou, 2012)

### Integrin 路徑

會受到 rVP1 影響的 integrin 是一種跨膜受體，能使細胞和其外環境之間連接。它是由  $\alpha$  及  $\beta$  兩群大小不同的次單位所構成 (圖三)，而  $\alpha$  及  $\beta$  兩群次單位會進行配對，這些組合都是特定的，如  $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$  等。在 Integrin 路徑中，integrin 會將細胞外的信號傳入細胞內，這些信號影響細胞週期、增殖、分化等 (Giancotti, 1999)。

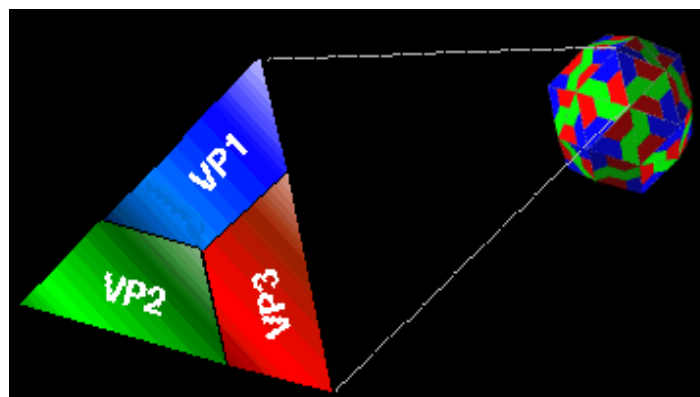


圖三、Integrin pathway 示意圖 (Desgrosellier, 2010)

### rVP1(Recombinant VP1 viral casid protein1)

研究中所使用的藥物 rVP1 是來自於偶蹄類動物的嚴重傳染病——口蹄疫，口蹄疫病毒含有四種外鞘蛋白，即 VP1、VP2、VP3 及 VP4，其中 VP4 位於外鞘的內部，其餘 VP1、VP2 及 VP3 位於外鞘的外部 (圖四)，因此較可能與宿主的免疫系統反應。(曾，2005)

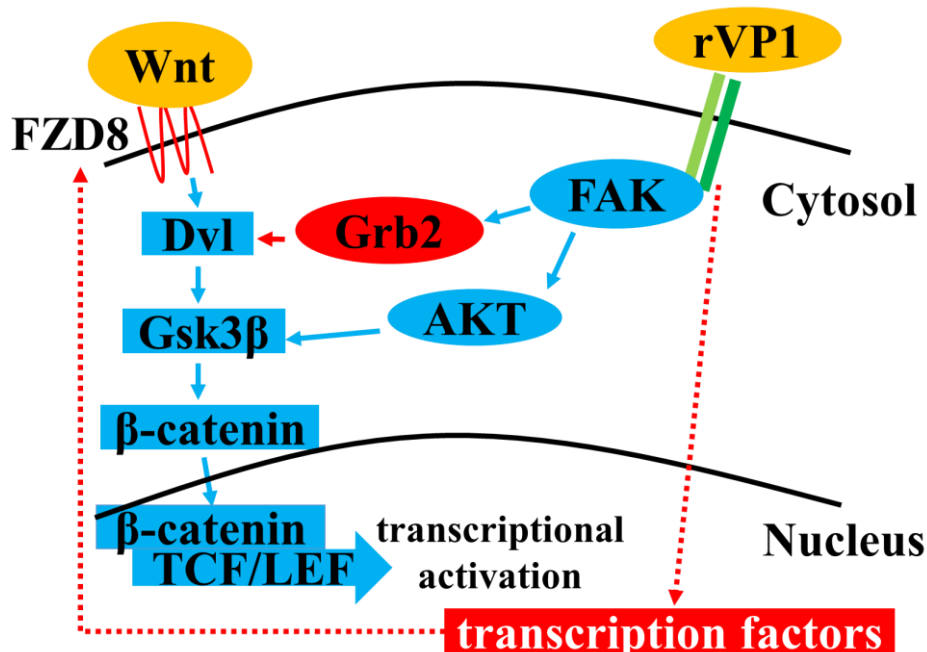
目前已知 VP1 具有很強抗原性，可使宿主體內產生中和抗體。此外 VP1 可與宿主細胞表面的 integrin 產生結合作用，促使口蹄疫病毒進入宿主細胞。因此 VP1 與宿主細胞之間的作用對病毒是否可成功感染細胞極具關鍵性。除此之外，經基因重組技術純化的 VP1 蛋白 (rVP1) 可結合 integrin 降低 Akt 激酶之活性、GSK-3 $\beta$  的去磷酸化以及提高凋零相關蛋白之活性，造成細胞凋零(apoptosis) (蘇，2007)。



圖四、口蹄疫病毒 (圖中二十面體) 及其鞘蛋白之結構組成圖示 (註：圖中未標示出 VP4) (曾，2005)

### (三)研究目的

1. 探討 rVP1 在肺癌細胞與肺癌幹細胞中連結 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的作用途徑
2. 利用 rVP1 對肺癌細胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑膜上受體 FZD8 的影響探討 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的交互作用



圖五、藥物 rVP1 在肺癌(幹)細胞中的作用路徑

此圖為我將圖一加上 rVP1 原本已知作用的路徑，紅色部分為我假設 rVP1 會通過的部分，而 FAK-AKT 此條路徑為 rVP1 原本在肺癌細胞與肺癌幹細胞中影響的部分，如果在 rVP1 作用下 Grb2 表現量並無變化，則 rVP1 可能就只通過 FAK-AKT 這條路徑來影響 Integrin 路徑及 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑兩者下游。

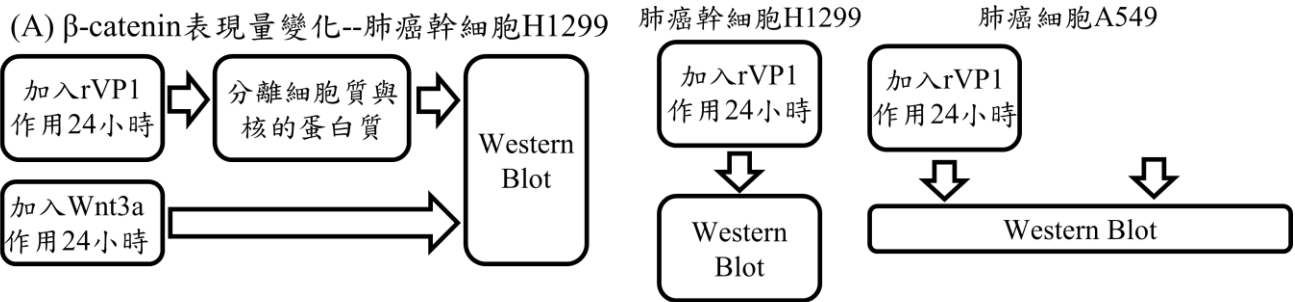
而 FZD8 為 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的膜上受體，若加入 rVP1 後其表現量下降，說明 Integrin 路徑對 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的膜上受體生成有影響。也就表示 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑之間有相互影響的關係，只是若要從基因方面探討 Integrin 路徑所影響的 FZD8，需要更多資料與時間，而目前尚未有相關研究。

## 二、研究方法或過程

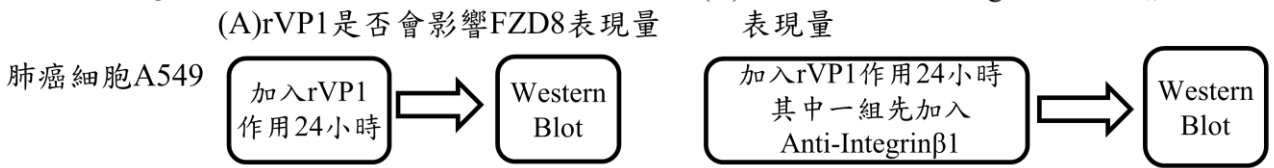
### (一)研究過程



**1. 探討 rVP1 在肺癌細胞與肺癌幹細胞中連結 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的作用途徑**



**2. 利用 rVP1 對肺癌細胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑膜上受體 FZD8 的影響探討 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的交互作用**



因為要探討 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑在肺癌幹細胞內所扮演的角色以及 Grb2 在 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑調控  $\beta$ -catenin 時是否參與，所以先在肺癌幹細胞內加入 rVP1 觀察  $\beta$ -catenin 的變化量，確認 rVP1 在肺癌幹細胞內的作用。

然後因為本研究假設當 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑受到刺激使  $\beta$ -catenin 表現量表現量上升，可利用 rVP1 經 Integrin 路徑而抑制，所以加入 Wnt3a，而 Wnt3a 會連接到 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的膜上受體，影響  $\beta$ -catenin 的表現量。

再來，為了探討 Grb2 在 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑調控  $\beta$ -catenin 時是否參與，我加入 rVP1 觀察 Grb2 的變化量，並每隔六小時測一次其變化，觀察 rVP1 作用期間 Grb2 的變化情形。

在肺癌細胞 A549 的部分，我做了 Grb2 肺癌幹細胞組的對照組，以及 Wnt3a 肺癌幹細胞組的對照。另外，為了探討肺癌細胞中 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的相互機制，我加入 rVP1，觀察 FZD8 等 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的膜上受體在 rVP1 的作用下會有何種變化，且有一組中加入 Anti-integrin $\beta$ 1 確認其變化是因為 rVP1 而引起的。

**(三) 研究方法**

**細胞蛋白質萃取**

本研究所探討的細胞訊息傳遞路徑皆由細胞中的蛋白質所組成，因此需要將蛋白質與其餘細胞的物質分離，避免在測量中有任何雜質。將細胞培養盤中的細胞隨著培養液吸至管中，離心 3 分鐘（轉速 12000rpm），吸取上清液（培養液）丟掉，留下底部的細胞胚，將此步驟重複兩次，以確保細胞培養液能完全抽取。之後加入裂解液（lysis buffer）25 $\mu$ l，與細胞胚混均勻，放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱冰 30 分鐘，然後再離心 20 分鐘（轉速 12000rpm），最後將上清液取出，其餘底部的胚即為細胞中的蛋白質。

### 蛋白質濃度測定

因為蛋白質抽取後的濃度都不一致，所以為了在做完西方墨點法後的結果分析能更精確，所以先測定蛋白質的濃度，將其濃度接調至一樣，避免有誤判出現。

利用酸性溶液 CBG（Coomassie brilliant blue G-250）染劑（1 倍）和不同濃度的蛋白質反應，產生差異性的顏色變化。蛋白質的濃度越高，染劑和蛋白質結合而產生顏色變化的量也相對成正比。首先，製備蛋白質標準液，以 2 倍序列稀釋的 BSA（Bovine serum albumin, Sigma）當作標準液，然後取 2 $\mu$ l 標準液與 98 $\mu$ l CBG 染劑混合作用。第三步，以分光光譜儀（Spectrophotometer DU800, Beckman Coulter）在 OD595nm 測定樣品吸光值。第四步，畫出標準曲線，以內插法計算出樣品濃度（ $Y=A+BX$ ；Y：OD595nm 讀值；X：待測樣品濃度）。

### SDS 電泳膠體製作（SDS Page, SDS - polyacrylamide gel electrophoresis）

此為進行西方墨點法時所需的膠體配置，SDS 為介面活性劑會破壞蛋白質的二級結構使其變性，並包覆變性蛋白質，使其帶有一致的負電荷和一致的形狀。如果沒有 SDS 使其負電荷一致，可能會使有相近分子量的蛋白質，分布於不同的位置。

膠體溶液配置：上膠 resolving gel 4%

藥品名稱	體積
ddH <sub>2</sub> O	3.05 ml
30% 丙烯膽鹼	0.675 ml
0.5M Tris-Cl pH6.8	1.25 ml
10% SDS (sodium dodecyl sulfate)	50 $\mu$ l
20% APS (Ammonium persulfate)	25 $\mu$ l
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	7.5 $\mu$ l

膠體溶液配置：下膠 stacking gel 4%

藥品名稱	體積	
ddH <sub>2</sub> O	3.4	ml
30% 丙烯腈	4	ml
0.5M Tris-Cl pH6.8	2.5	ml
10%SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	0	μl
20%APS (Ammonium Persulfate)	50	μl
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	5	μl

### 西方墨點法

用此方法能將蛋白質的量清楚表示，再利用比較每一個不同濃度的藥劑中所顯示的蛋白質質量，將結果呈現。

將做好的膠架好，拔開尺梳，將蛋白質以微量吸管注入凹槽中，然後使用電泳電源供應器，電壓使用 90 伏特。然後開始轉印，將濾紙、轉印膜、膠片、濾紙使用三明治法依序排好，放入轉印槽，再加入 transfer buffer(以 1400ml ddH<sub>2</sub>O、200ml 10x TGS、400ml 甲醇混合而成)，使用電流 300 毫安培進行 120 分鐘。最後將轉印膜取出，加入脫脂牛奶 (5%) 搖晃一小時，再加入一抗並封袋一晚。

隔天拿出轉印膜，利用 TBST (TBS 1x 1000ml+Tween20 1ml) 清洗三次，每次 10 分鐘，然後加入二抗並搖晃 1 小時，再利用 TBST 清洗三次，最後加些螢光染劑浸潤，放入冷光螢光影像擷取系統攝像。

### 細胞核蛋白質與細胞膜蛋白質抽取與分離

因為要測 β-catenin 在細胞質和細胞核內的量，觀察 β-catenin 的入核現象，所以要將細胞核蛋白質與細胞膜蛋白質分離。

抽取細胞蛋白質，加入 CEB-A 200μl、DTT 1μl，然後混合均勻並放冰上 10 分鐘後，加入 CEB-B 11μl 並混合均勻，再放冰上 1 分鐘。然後混合 15 秒，離心 16000g (4°C) 5 分鐘，抽取的上清液為細胞質。

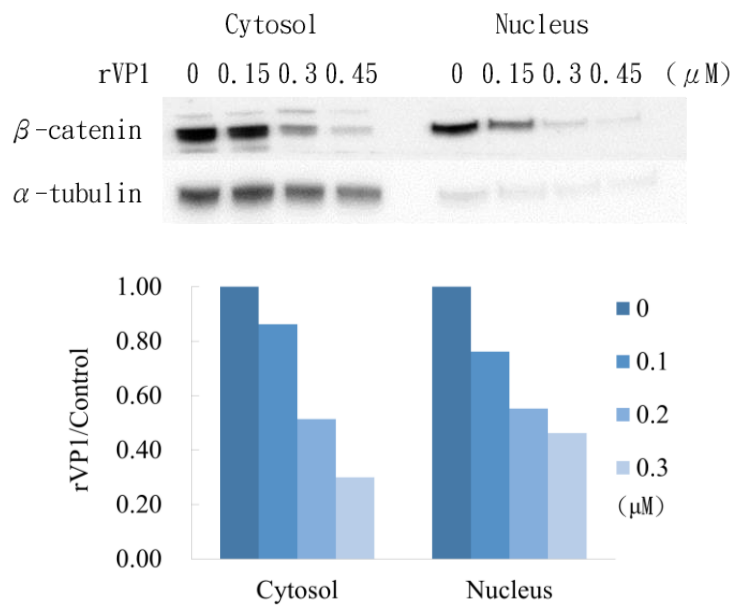
用剩下的 CEB-A 將樣本洗淨 (去除剩餘的細胞質蛋白質)，加入 NEB 200μl 並放冰上 60 分鐘，然後離心 16000g (4°C) 20 分鐘，抽取的上清液為細胞核蛋白質。

### 三、研究結果與討論

#### (一)研究結果

##### 1.確認 rVP1 能有效減少肺癌幹細胞核中的 $\beta$ -catenin

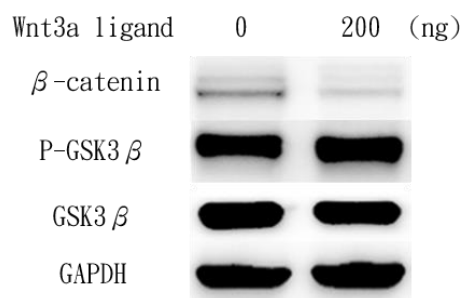
發現在未加入 rVP1 之前，在細胞質和細胞核中均有  $\beta$ -catenin 蛋白表現量；但加入不同濃度的 rVP1 後，在細胞核及細胞質中  $\beta$ -catenin 蛋白表現量會隨 rVP1 濃度上升而有顯著的下降。(圖六)

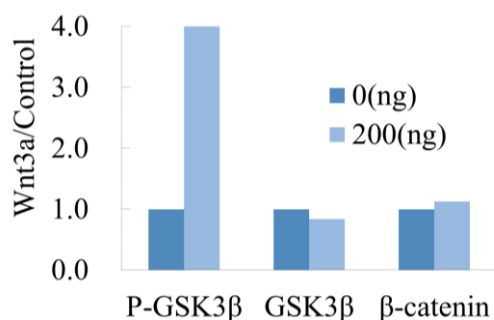


圖六、以西方墨點法探討在加入不同劑量(0.15 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M、0.45 $\mu$ M)的 rVP1 後  $\beta$ -catenin 表現量及細胞分布位置。(  $\alpha$ -tubulin 為細胞質內的定量控制。 )

##### 2.在肺癌幹細胞中加入 Wnt3a，探討其對 $\beta$ -catenin 表現量之影響

加入 Wnt3a 強迫細胞進行 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑，發現在加入不同劑量的 Wnt3a 後，細胞中的  $\beta$ -catenin 蛋白質表現量會隨濃度上升而下降。(圖七)

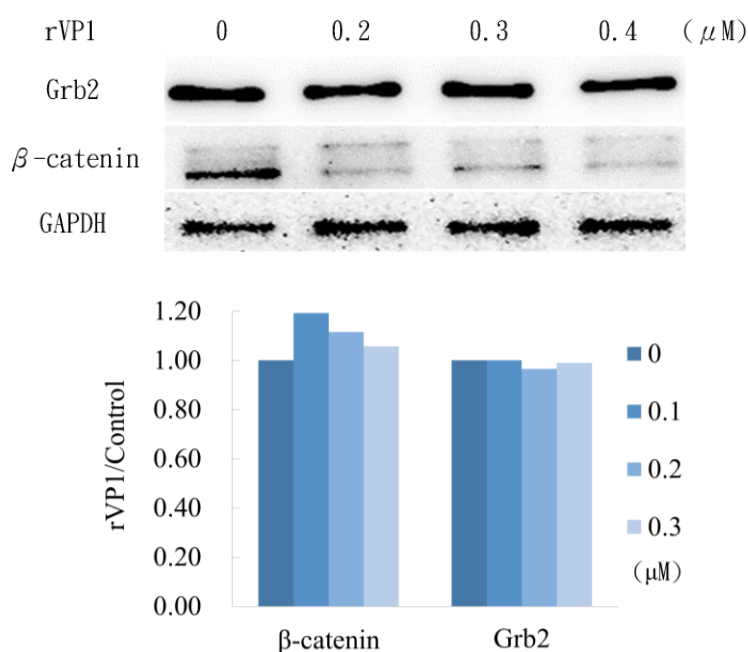




圖七、以西方墨點法探討在加入 Wnt3a (200ng)後 β-catenin 的表現量。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

### 3.加入 rVP1 在肺癌幹細胞 H1299 中，探討 rVP1 抑制 β-catenin 的路徑是否經過 Grb2

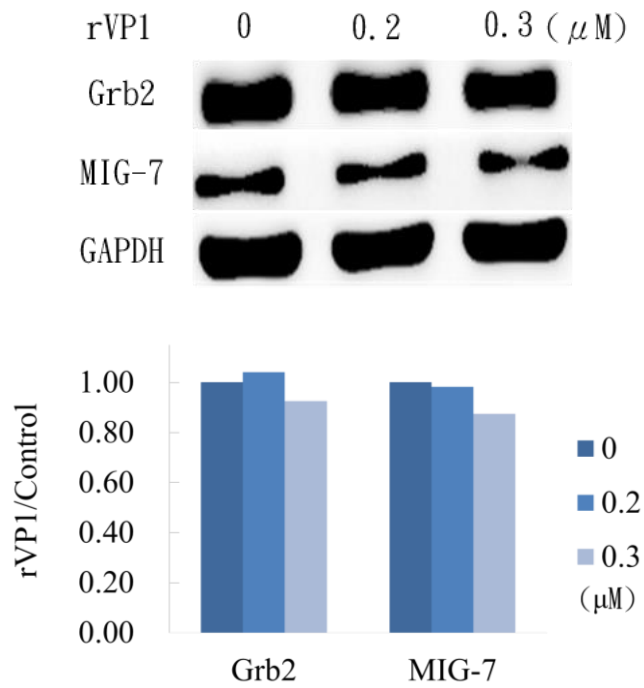
β-catenin 因 rVP1 的作用而表現量下降，證明 rVP1 對細胞是有影響的，也表示 rVP1 有經由 Integrin 路徑作用。發現加入不同濃度的 rVP1，細胞中的 Grb2 的表現量皆沒有變化。(圖九)



圖九、以西方墨點法探討在加入不同劑量(0.2μM、0.3μM、0.4μM)的 rVP1 後 β-catenin 和 Grb2 表現量。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

### 4.探討肺癌細胞 A549 加入 rVP1 後 Grb2 的變化

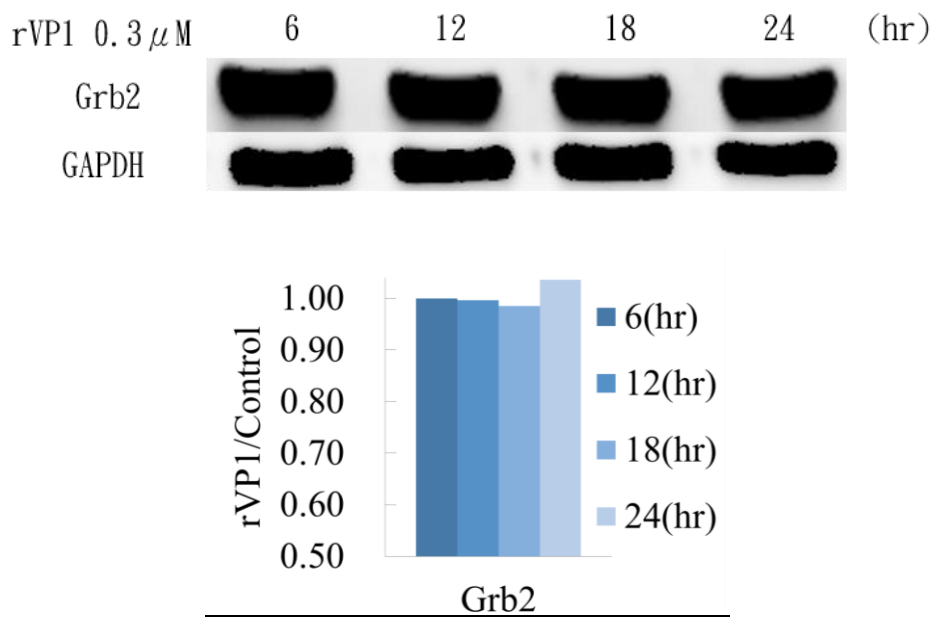
加入 rVP1 後，隨著 rVP1 濃度升高，可以發現 Grb2 表現量維持不變，與在肺癌幹細胞內的結果相同。而 MIG-7 則是 Wnt/β-catenin 路徑的下游，在 rVP1 作用下，其表現量下降，也就表示 rVP1 對於 β-catenin 產生抑制的作用，證實此次實驗中 rVP1 的效用正常。(圖十)



圖十、以西方墨點法探討在加入不同劑量的 rVP1(0.2 $\mu\text{M}$ 、0.3 $\mu\text{M}$ )後肺癌細胞 A549 中 Grb2 的表現量。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

#### 5.加入 rVP1 至肺癌細胞 A549 中，測量每隔六小時 Grb2 的表現量

為了瞭解 rVP1 作用過程中 Grb2 的變化，在肺癌細胞 A549 加入 rVP1 0.3 $\mu\text{M}$  後，每隔 6 小時觀察一次 Grb2 的變化，可以發現 Grb2 在 rVP1 的作用過程中並沒有表現量的差異，維持穩定的量。(圖十一)

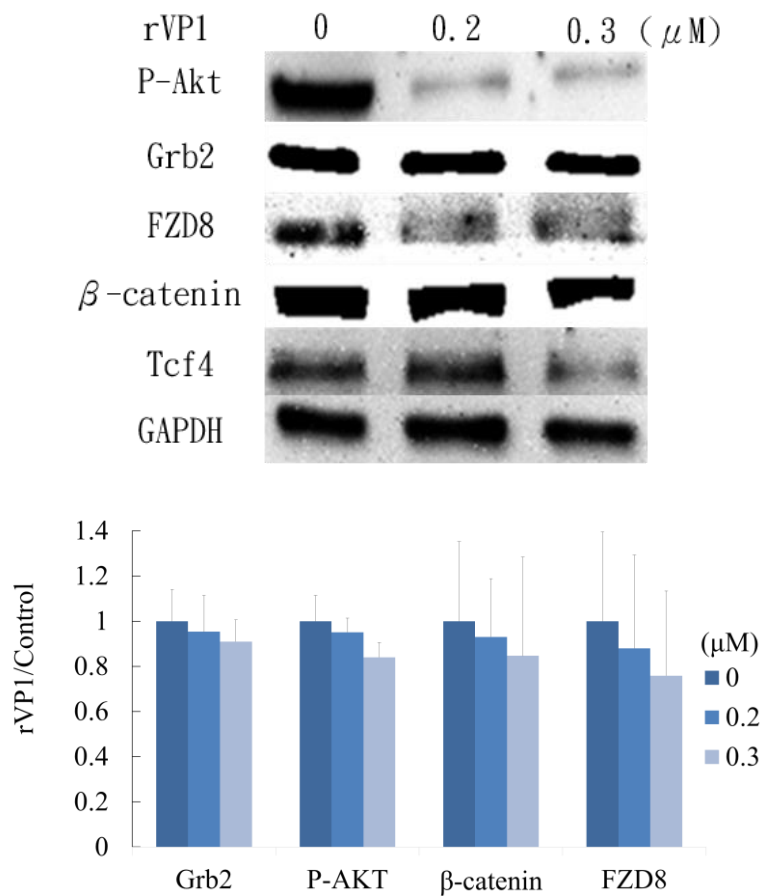


圖十一、以西方墨點法探討在加入 rVP1(0.3 $\mu\text{M}$ )後每隔 6 小時肺癌細胞 A549 中 Grb2 的表現

量。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

## 6. 觀察肺癌細胞 A549 加入 rVP1 後 FZD8 是否下降

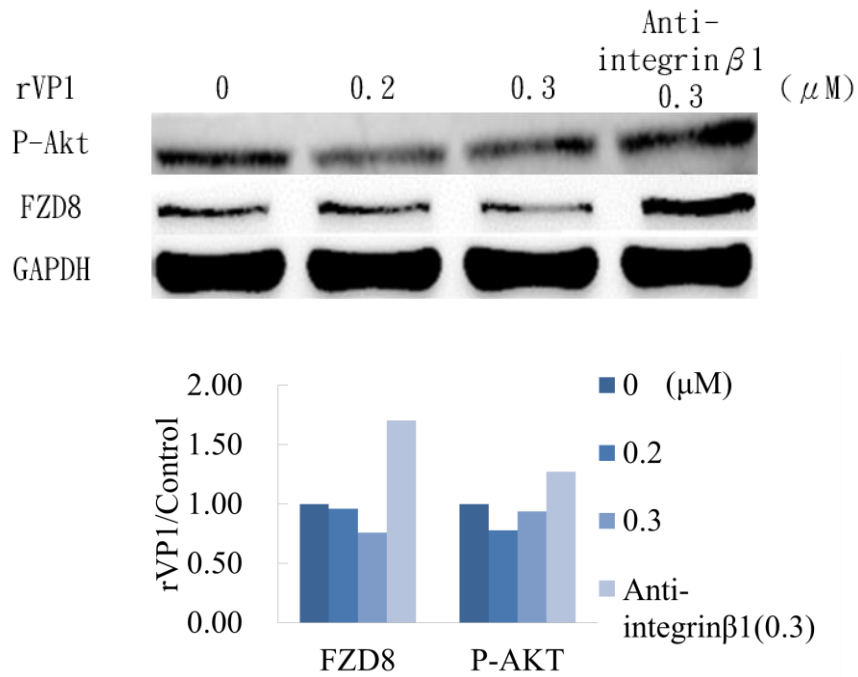
在加入 rVP1 後 P-Akt 與  $\beta$ -catenin 的表現量皆下降，也就表示 rVP1 在此次實驗中的確有作用，而 Tcf4 則為 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游的轉錄因子，也隨著 rVP1 濃度升高而下降。而在 FZD8 方面，也可以看到 rVP1 濃度升高後，其表現量確實下降了，可以觀察到 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的每個階段的變化(圖十二)。



圖十二、以西方墨點法探討肺癌細胞 A549 在加入不同劑量(0.2 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M)的 rVP1 後 FZD8 的表現量。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

## 7. 探討肺癌細胞中 FZD8 是否因為 rVP1 作用而下降

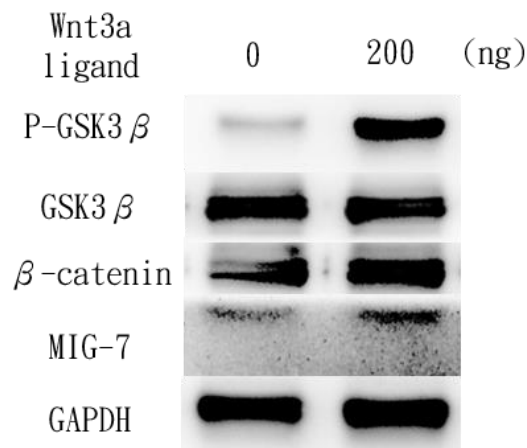
為了確定 FZD8 的表現量下降是 rVP1 所導致的，因此加入 Anti-integrin $\beta$ 1 阻斷 Integrin 路徑。發現隨著 rVP1 濃度升高，FZD8 的表現量下降，但是在 Anti-integrin $\beta$ 1 組裡的 FZD8 卻上升了，。(圖十三)



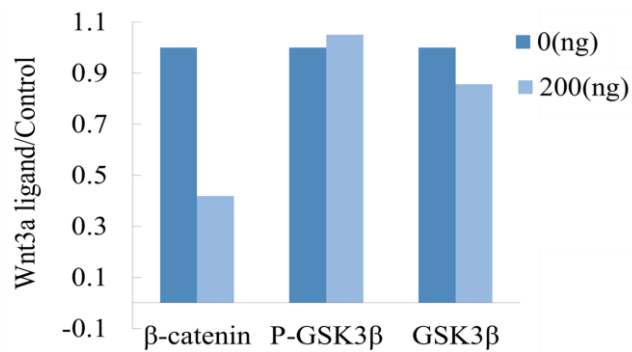
圖十三、以西方墨點法探討 FZD8 的表現量是否是受到 rVP1 的作用。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

### 8. 加入 Wnt3a ligand 至肺癌細胞 A549 中探討 MIG-7 變化

此實驗可作為 Wnt1 ligand 和 Wnt3a ligand 在肺癌幹細胞組的對照，在加入 Wnt3a ligand 後，可以發現 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游產物 MIG-7 的表現量上升，而且  $\beta$ -catenin 的表現量也上升，與在肺癌幹細胞 H1299 中加入 Wnt3a ligand 的結果(圖八)相反。(圖十四)







圖十四、以西方墨點法探討在加入 rVP1(200ng)後 β-catenin 和 Grb2 表現量。(GAPDH 為此實驗的定量控制。)

## (二)討論

在加入 rVP1 至肺癌幹細胞 H1299 中，在細胞核中及細胞質中 β-catenin 皆有下降，與之前在普通肺癌細胞中的實驗結果相符合，說明 rVP1 對於普通癌細胞及癌症幹細胞皆有效用。

而加入 wnt1 ligand 及 wnt3a ligand 刺激癌幹細胞中 Wnt/β-catenin 路徑作用後，原本預期結果會像普通癌症細胞一樣：β-catenin 表現量會上升，但在肺癌幹細胞中 β-catenin 表現量竟下降，這個結果與假設：「當 Wnt/β-catenin 路徑受到刺激使 β-catenin 表現量表現量上升，可利用 rVP1 經 Integrin 路徑而抑制。」並不相同。

關於此處與假設矛盾之處，會先觀察肺癌幹細胞在經過 rVP1 抑制後入核的表現量，以及比較 β-catenin 在肺癌細胞與肺癌幹細胞中本身的含量差異，探討其在兩者的重要性。但仍可推測 Wnt/β-catenin 路徑在肺癌細胞與肺癌幹細胞中所扮演的角色不完全相同，可能是因為癌症幹細胞本身與癌細胞特性不同，雖然同樣是 Wnt/β-catenin 路徑，但所產生的效果可能不同。之後會從 Wnt/β-catenin 路徑的下游產物進行確認，而因為肺癌細胞有很多種，每種之間存在差異，之後會針對同類的細胞進行實驗，並增加別種在肺癌細胞中所佔比例較大的進行，以避免不同種細胞之間的變因。

而在 Grb2 實驗結果中我發現在加入不同濃度的 rVP1 後，Grb2 的量並沒有下降，維持一穩定的量。因為在實驗中所測得 Grb2 表現量為總量，因此不會有變化。但經由資料 (Cheng, 2013) 得知，在 Grb2 與 FAK 結合時，FAK 會有磷酸化蛋白質的表現，因此之後會針對這些蛋白質進行測量，觀察其變化，已顯示真正 Grb2 的變化情形。

在肺癌細胞方面，觀察到了 FZD8 在 rVP1 作用下的變化情形，因為加入 Integrinβ1 antibody 後，阻斷了 Integrinβ1 與 rVP1 作用的接合位，發現在 rVP1 無作用的情況下，FZD8 上升了，

也就表示 FZD8 的下降的確是 rVP1 所造成的。而 rVP1 是透過 Integrin 路徑進行抑制，所以結果顯示 Integrin 路徑會影響到 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的膜上受體生成，但其影響基因仍未知，只能推斷 Integrin 路徑與 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑確實有相互影響。

Wnt3a 的膜上受體為 FZD8，加入 Wnt3a 後 MIG-7 的表現量上升，表示 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑對 MIG-7 的作用機制，之後與加入 rVP1 後 Integrin 路徑的結果相互比較，探查 Integrin 路徑對 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑下游的影響。

#### 四、結論與應用

1. rVP1 經由 Integrin 路徑使 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑的膜上受體 FZD8 表現量下降，表示 Integrin 路徑有控制 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑在細胞中影響力的能力。但 Integrin 路徑下游調控 FZD8 表現量的轉錄因子尚未得知。
2. 目前已知 FAK 與 Grb2 結合時會有磷酸化蛋白質表現，因此雖然現階段認為 Integrin 路徑中 Grb2 只具有訊息傳遞功能，但仍須從其磷酸化表現量變化，才能知道 rVP1 是否經由 Grb2 作用。
3. 對於 rVP1 是否能抑制加入 Wnt3a 後  $\beta$ -catenin 的表現量，可以先了解在 Wnt3a 刺激後  $\beta$ -catenin 的入核現象，再加入 rVP1 才可知道。

#### 五、參考文獻

科技部高瞻自然科學教學資源平台。岳威廷(2014)Wnt 訊息傳遞路徑 (Wnt signaling pathway)

楊淵傑、吳登強 (2012) 癌組織的種子—癌幹細胞。科學發展 2012 年 8 月，476 期。

蘇勤方(2007)口蹄疫病毒鞘蛋白 rVP1 誘發 Prohibitin 之遷移

曾思宜 (2005) 口蹄疫病毒鞘蛋白 VP1 在細胞造成之訊息傳遞及其影響

Ming-Yi Ho, Shao-Wen Hung, Chi-Ming Liang, Shu-Mei Liang. (2014) Recombinant viral capsid protein VP1 suppresses lung cancer metastasis by inhibiting COX-2/PGE2 and MIG-7 Metastasis.

Suzanne Y. S. Cheng, Guobin Sun, David D. Schlaepfer, Catherine J. Pallena. (2013) Grb2 Promotes Integrin-Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Autophosphorylation and Directs the Phosphorylation of Protein Tyrosine Phosphatase by the Src-FAK Kinase Complex.

Ming-Yi Ho, Shu-Mei Liang, Shao-Wen Hung, and Chi-Ming Liang. (2012) MIG-7 Controls

COX-2/PGE2-Mediated Lung Cancer.

Hans Clevers, and Roel Nusse. (2012) Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. Howard Hughes Medical Institute and Department of Developmental Biology

K. Marinou, C. Christodoulides, C. Antoniadis and M. Koutsilieris. (2012) Wnt signaling in cardiovascular physiology. Department of Physiology

Chen TA, Wang JL, Hung SW, Chu CL, Cheng YC, Liang SM.(2011) Recombinant VP1, an Akt inhibitor, suppresses progression of hepatocellular carcinoma by inducing apoptosis and modulation of CCL2 production.

Jay S. Desgrosellier and David A. Cheresh (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jan; 10(1): 9–22.

Steve P. Crampton, Waterman, Beibei Wu, Christopher C. W. Hughes, Edward J. Park (2009) Integration of the  $\beta$ -Catenin-Dependent Wnt Pathway with Integrin Signaling through the Adaptor Molecule Grb2.

Amanda J Mikels, Roel Nusse.(2006) Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits  $\beta$ -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context

Filippo G. Giancotti, Erkki Ruoslahti (1999) Integrin Signaling. *Science* 3 Aug 1999: Vol. 285, pp. 1028-1033

## 【評語】 090017

利用口蹄疫病情蛋白 rVP1，結合在 Integrin 上之後，細胞之凋亡及轉移受影響，但路徑並未知，他們發現 Wnt/ $\beta$ -catenin 包含在其中。

1. Wnt/ $\beta$ -catenin 之路徑須更多的 data 來確認。
2. Western blot 之品質需再提升。
3.  $\beta$ -catenin 之下游基因需再確認。