

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 090010
- 參展科別** 醫學與健康科學
- 作品名稱** 上皮細胞黏著分子(EpCAM)促進大腸癌細胞中對於艾瑞莎(Gefitinib)之抗藥性研究
EpCAM enhances Gefitinib-induced drug resistance in colon cancer cells
- 得獎獎項** 大會獎：三等獎
出國正選代表
- 就讀學校** 臺北市立第一女子高級中學
- 指導教師** 吳漢忠、孫譽真
- 作者姓名** 陳韻淇
- 關鍵詞** 上皮細胞黏著分子(EpCAM)、艾瑞莎(Gefitinib)、抗藥性

作者簡介



我是陳韻淇，來自台北市立第一女子高級中學，特別喜歡黑冠麻鷺和小企鵝，一直在學習熱忱待物、真誠待人。科展真的是一場華麗的冒險，能來到國際科展非常榮幸，無論結果如何都要繼續保持對知識與思考的熱忱。

最後謝謝教授、學長姊、生物老師不厭其煩的教導，謝謝巧一尤們的歡樂和聖光，謝謝每個看著我成長的你們。

摘要

上皮生長因子受體 (EGFR) 已被確認在人類上皮惡性腫瘤扮演重要角色，因此臨床上開發出許多針對 EGFR 之大腸癌、肺癌等的小分子標靶藥物，但治療期間所產生的抗藥性仍是一大瓶頸。

過去上皮細胞黏著分子(EpCAM)只被認為是胞間連接分子，現今則在癌幹細胞 (cancer stem cells, CSCs)等領域被研究。然而從文獻與先前實驗室的試驗，可以看見 EpCAM 促進癌症抗藥性的可能。

本研究發現在大腸癌中，艾瑞莎 (Gefitinib) 會透過轉錄因子 FOXO3a 促進細胞凋亡，而 EpEX 會經由抑制 FOXO3a 所促進的凋亡路徑，導致癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性，且此抗藥性，也與 EpICD 下游之誘導性多能幹細胞相關基因 (iPS-related genes) 的表現有關，但其分子機制尚不清楚。

本研究以大腸癌與 Gefitinib 做為癌症與 EGFR 小分子藥物的模型，找出 EpCAM 可能造成的抗藥路徑，未來可應用在各類癌症之聯合治療 (Combination therapy)，以克服癌症治療所產生的 EGFR 小分子藥物抗藥性。

Abstract

Epithelial growth factor receptor (EGFR) plays an important role in human epithelial malignancies, as a therapeutic target in colon and lung cancers. As it is common in cancer therapy, challenges with respect to treatment resistance emerge over time.

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) was considered as an adhesion molecule in previous reports. Current research about EpCAM is focused on the molecular mechanisms regulating cancer stem cells (CSCs) and epithelial-mesenchymal transition (*EMT*). To the author's best knowledge, there are very few publications that discuss the issue of the contribution of EpCAM in drug resistance. However, from the literature and previous laboratory tests, EpCAM can be seen to play a potential role in promoting drug resistance in cancer cells.

This study found that in colon cancer, Gefitinib, a small molecule EGFR inhibitor, promotes apoptosis through the transcription factor FOXO3a. Moreover, EpEX enhances Gefitinib-induced drug resistance by inhibiting the FOXO3a-induced apoptotic pathway, and it is also related to the expression of induced pluripotent stem (iPS)-related genes, which are the downstream of EpICD, but the molecular mechanism is still unclear.

In this study, we used colon cancer and Gefitinib as models of cancer and *small molecule EGFR* inhibitors respectively, to find out the possible drug resistance pathways of EpCAM. In the future, it can be applied to cancer combination therapy to overcome the *EGFR* inhibitors-induced drug resistance .

壹、前言

一、研究動機

癌症長期居國人十大死因之首，其中大腸癌(結、直腸癌)和肛門癌的死亡率更是十大癌症第三位。近年來小分子藥物的蓬勃發展，使大腸癌患者之有機會增加存活期限，但治療期間所產生的抗藥性仍是一大瓶頸。

上皮生長因子受體 (EGFR) 已被確認在人類上皮惡性腫瘤的細胞生理扮演重要角色，因此臨床上開發出許多針對 EGFR 之大腸癌、頭頸癌、肺癌和胰腺癌等的小分子標靶藥物，其中也包括艾瑞莎 (Gefitinib)。而同時我們也從文獻中發現上皮細胞黏著分子 (EpCAM)，可能在 EGFR 小分子藥物的抗藥性扮演重要角色。

除了大腸癌細胞外，許多癌細胞也有過量表現之 EGFR，使得 EGFR 小分子藥物有更多臨床治療的研究與應用價值，而 EpCAM 更在許多癌細胞生理上扮演重要角色。若我們能以大腸癌與 Gefitinib 做為癌症與 EGFR 小分子藥物的模型，找出 EpCAM 可能造成的抗藥路徑，未來可應用在癌症之聯合治療 (Combination therapy)，以克服癌症治療中的 EGFR 小分子藥物抗藥性，也為小分子藥物的抗藥性研究提供一個新方向。

二、研究背景

(一) 上皮生長因子受體(Epidermal growth factor receptor, EGFR)

上皮生長因子受體(EGFR)是一種酪胺酸激酶受體(receptor of tyrosine kinase, RTK)。EGFR 與特定配體(ligand)結合之後會影響細胞增殖(cell proliferation)、細胞凋亡(apoptosis)、遷移(migration)、存活、血管發生和腫瘤發生等的細胞傳訊下游級聯反應(downstream cell signaling cascades)。EGFR 與人類上皮惡性腫瘤的細胞生理有關，包括大腸癌、頭頸癌、肺癌和胰腺癌等，因此 EGFR 成為許多癌症小分子藥物的作用標的。

(二) 艾瑞莎(Gefitinib, Iressa, ZD1839)

艾瑞莎(Gefitinib)是小分子的 EGFR 抑制劑。Gefitinib 競爭 EGFR 的 ATP 結合位，使 EGFR 的 tyrosine kinase 無法磷酸化，而阻斷 EGFR 的訊號傳導，進而阻止癌細胞增殖、存活等的下游等級連反應。Gefitinib 是目前同類藥品中少數可以口服的藥品，可省去病患需定期至醫院施打化學治療藥品的麻煩，且 Gefitinib 副作用通常較輕微，如腹瀉或皮疹等。另外，也由於 EGFR 存在於多種癌細胞中，現在各地正著手研究 Gefitinib 應用在各類癌症治療的可能。

(三) 上皮細胞黏著分子(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)

上皮細胞黏著分子(EpCAM)屬於第一型糖蛋白，表現在人類上皮細胞、幹細胞、前驅細胞與癌細胞的細胞膜上。EpCAM 包含 extracellular region (EpEX)、transmembrane domain(TM)與 intracellular domain (EpICD)三個部分。過去 EpCAM 單純只被認為是胞間連接分子，現今則被認為與細胞訊息傳遞、轉移、存活及分化等有關。

(四) EpEX

EpEX 是 EpCAM 的 extracellular region，可被位於細胞膜上的 ADAM17 (TACE)酶裁切而釋出。先前的研究表示在幹細胞內 EpEX 會磷酸化 EGFR、PDGFR、HER2 及 Axl 等受體 (Kuan et al., 2017)。

(五) EpICD

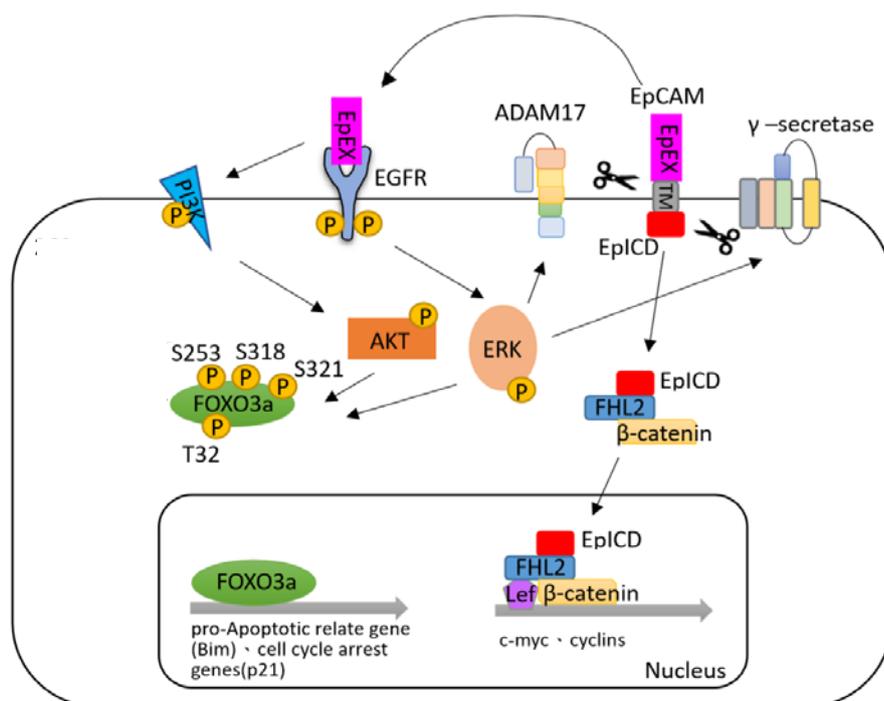
EpICD 是 EpCAM 的 intracellular domain，可被細胞膜上的 γ -secretase 裁切釋出。EpICD 會和 FHL2、Lef 與 β -catenin 形成複合體，進入細胞核中調控 *c-Myc*、*cyclins* 等基因，EpICD 也會調控誘導性多能幹細胞相關基因 (iPS-related genes) *Nanog*、*Oct3/4*、*Klf4* 和 *Sox2* 等 (Munz et al., 2009)。

(六) FOXO3a

FOXO3a 是與細胞凋亡有關的轉錄因子，下游基因為細胞凋亡相關基因(*Bim*)以及細胞週期相關基因(*p21*)。磷酸化的 FOXO3a 活性會減低而無法促進細胞凋亡。

(七) EGFR、EpCAM、FOXO3a 的關係

如圖一，此處說明了 EGFR、EpCAM、FOXO3a 三者之間的關係: EGFR 與 FOXO3a 之間有 AKT、ERK 兩條途徑，未磷酸化的 FOXO3a 進入細胞核調控細胞凋亡相關基因(*Bim*)以及細胞週期相關基因(*p21*)。EGFR 可受多種配體活化，此圖顯示的為 EpCAM 裁切出 EpEX 後磷酸化 EGFR，接著 AKT、ERK 的磷酸化，使得 FOXO3a 磷酸化而活性減低，進而無法促進細胞凋亡。此圖也顯示 EpCAM 裁切出的 EpICD 與 FHL2、Lef、 β -catenin 形成複合體，進入細胞核調控 *c-myc*、*cyclins* 等基因，另外 EpICD 也有進入核中調控幹細胞相關之轉錄因子 *Nanog*、*Oct3 / 4*、*Klf4* 和 *Sox2* 基因的形式(此圖未顯示)。ERK 的磷酸化也會促進 ADAM17、 γ -secretase 作用，產生更多 EpEX 及 EpICD，進而正回饋上述 EpEX 及 EpICD 的作用。



圖一、EGFR、EpCAM、FOXO3a 關係示意圖

三、文獻探討與假說

根據先前研究得知 EpEX 會活化 EGFR (Kuan et al., 2017)，我們推測 EpEX 會降低 Gefitinib 抑制 EGFR 的效果，而影響下游途徑，使細胞對於 Gefitinib 產生抗藥性而存活。先前研究顯示，在同樣過量表現 EGFR 的非小細胞肺癌(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)中，發現 FOXO3a 是 Gefitinib 抗藥路徑的一個重要轉錄因子 (Chiu et al., 2016)。加上先前我們實驗室在大腸癌細胞中，用 EpCAM 抗體 (EpAb2-6) 抑制 EpEX 的裁切時，發現 FOXO3a 較有活性而能促進細胞凋亡。因為上述原因，我們推測大腸癌細胞對於 Gefitinib 的抗藥性可能一樣與 FOXO3a 有關，更重要的是：EpEX 可能會透過 FOXO3a 傳訊路徑而使大腸癌細胞對於 Gefitinib 產生抗藥性。

另外，EpEX 會正回饋 γ -secretase 而裁切出更多 EpICD，我們也好奇 Gefitinib 抗藥性是否也與 EpICD 及其下游基因有關，於是我們先就目前已知的 EpICD 下游的誘導性多能幹細胞相關基因 (iPS-related genes) 進行初步探討。

四、研究目的

- (一)在大腸癌細胞中，EpCAM/EpEX 是否導致癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性。
- (二)在大腸癌細胞中 Gefitinib 是否透過 FOXO3a 降低癌細胞的存活。
- (三) EpCAM/EpEX 是否透過抑制 FOXO3a 途徑，導致大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性。
- (四) EpEX 促進大腸癌細胞的 Gefitinib 抗藥性是否與 EpICD 下游之誘導性多能幹細胞相關基因 (iPS-related genes) 的表現有關。

貳、研究方法或過程

一、研究設備與器材

(一) 細胞株

SW620 細胞株、COLO205 細胞株、HCT116 細胞株、293T 細胞株

(二) 藥品及試劑

PBS、DMEM Medium、RPMI Medium、FBS (Fetal bovine serum, 胎牛血清)、P/S (Penicillin & Streptomycin)、trypsin-EDTA、Gefitinib、Trypan Blue 染劑、RIPA buffer、蛋白酶抑制劑、磷酸酶抑制劑、Bradford、BSA、protein loading dye、ddH₂O、1.5M Tris(pH 8.8)、0.5M Tris(pH 6.8)、30% Acrylamide/Bis、10% SDS、100% TEMED、10% APS、95% EtOH、1X Running Buffer、Transfer buffer、一級抗體、二級抗體、ECL substrate solution、MTT (3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide)、DMSO、TBST、TransIT-LT1、OPTI-MEM、pCMV- Δ R8.91、pMD.G、shLUC-RLKO.1、shEpCAM-RLKO.1、PAS2 EpCAM、polybrene、Puromycin、TRIzol solution、異丙醇、70% EtOH、RNase free 水、氯仿、5X Reaction Buffer、dNTP Mix, 10 mM each、RT Random Primers、RevertAid H Minus Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、SYBR Green、EpICD 下游誘導性多能幹細胞相關基因 primer、EpEX

(三) 器材

Nano Drop ND-1000、BioSpectrum 600 Imaging System Motorized Platform (高感度微量數位影像分析系統)、Roche Lightcycler 480 (即時定量聚合酶反應器)、Biometra T3000 Thermocycler (多槽型核酸增值儀)、BIO-RAD Model 680 microplate reader (酵素免疫分析儀)、PerkinElmer EnSpire Multimode Plate reader (多功能微分子即時分注偵測儀)、LUNA-II Automated Cell Counter (自動細胞計數器)、LUNA Reusable Slide (重

複使用式細胞計數片)、培養箱、巴士德無菌吸管、電動吸管 (pipette aid)、微量吸管分注器 (Pipette)、真空吸取器、無菌操作台、恆溫水浴槽、10 公分培養皿、冰塊、離心機、15mL 離心管、50mL 離心管、96 孔盤、孔式加熱板、鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)、間隔條、玻璃板、樣本梳、垂直電泳槽、電源供應器、海綿、3M 圖畫紙、NC 轉印膜、轉漬槽、4°C 冰箱、震盪器、六公分培養盤、eppendorf、-80°C 冰箱、拭鏡紙、電腦、384 孔盤

二、實驗方法

(一) 細胞培養

將人類大腸癌細胞 SW620、HCT116 分別培養在含有 10% 胎牛血清的 DMEM Medium 培養基(DMEM-10%FBS)的 10 公分培養皿中，COLO205 則培養在含有 10% 胎牛血清的 RPMI Medium 培養基(RPMI-10%FBS)的 10 公分培養皿中，設定培養箱條件為 37°C、5% 二氧化碳，視細胞生長速度，約 2-3 天更換培養液。當細胞生長九分滿時，得以分盤進行實驗，或繼續細胞繼代。

(二) 細胞繼代

當細胞生長九分滿時，由培養箱移入無菌操作台內，先以巴士德無菌吸管移除舊的 DMEM Medium 培養基或 RPMI Medium 培養基，再加入 PBS 潤洗後吸乾。接著加入 1mL 已回溫的 trypsin-EDTA，均勻搖晃使溶液充滿底面，放入培養箱 2-5 分鐘後取出，用手輕拍培養皿底部使細胞浮起。接著再加入 3mL DMEM-10%FBS 或 RPMI-10%FBS 於培養皿之中，以抑制 trypsin 的繼續作用，接著 pipetting 均勻，此時可進行細胞計數、將細胞移入別的培養皿進行實驗或繼代到新培養皿中。

(三) 種細胞

承細胞繼代，pipetting 均勻後取 10 μ L 細胞液，與 10 μ L Trypan Blue 染劑混勻，放

入重複使用式細胞計數片裡，再用自動細胞計數機進行細胞計數。再計算實驗所需細胞數，將適當細胞液移入新培養皿，再加入適合該培養基大小的 DMEM Medium 培養基或 RPMI Medium 培養基。約 20 小時後細胞會貼附底部，再來才能依實驗所需加藥處理。

(四) 蛋白質萃取和定量

將做好不同處理的細胞移出培養箱，移除培養液並用冰的 PBS 沖洗兩次，吸乾之後加入 RIPA buffer，再將細胞刮下放置冰上 20 分鐘，接著用 12000 rpm 4°C 離心 20 分鐘，上清液即為蛋白質溶液。

將 Bradford 稀釋 5 倍，每管加入 1mL。再將 BSA 稀釋 10 倍，在剛才已有 Bradford 的管子裡加入 0、2、4、6、8、10 μ L 稀釋後的 BSA 以及 2 μ L 的待測蛋白質溶液。將每管混和均勻之後，每管取 200 μ L 到 96 孔盤，放入多功能微分子及時分注偵測儀用 595nm 測吸光值，用已知濃度的 BSA 算出標準直線，再將待測蛋白質溶液的吸光值代入，即可測得濃度。

(五) 西方點墨法(Western blotting)

取已定量的蛋白質，加入 5 倍 protein loading dye，用 95°C 加熱 8 分鐘使蛋白質變性後，將管壁水氣離心下來。將夾有 12% SDS-PAGE 的玻璃板固定於電泳槽中，並將槽內加滿 1X Running Buffer，以 100 伏特進行電泳約一個半小時直到蛋白質染劑至膠體底部。接下來以負極到正極的順序將海綿、兩張 3M 圖畫紙、膠體、NC 轉印膜、兩張 3M 圖畫紙、海綿放置於轉漬槽中，並加滿 Transfer buffer，將轉漬槽與電源供應器放至 4°C 冰箱，以 90 伏特電壓轉漬 90 分鐘。接下來將轉印膜以 1% BSA/TBST 進行 blocking，放在室溫下的震盪器作用 1 小時。Blocking 完成後，加入一級抗體，放於 4°C 冰箱的震盪器作用隔夜，隔天以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入二級抗體，在震盪器作用 1 小時，再以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。最後將轉印膜均勻淋上 ECL substrate solution，用高感度微量數位影像分析系統拍下冷光顯影。

(六) 細胞存活率分析(MTT assay)

MTT assay 是測定細胞存活率的方法。MTT (3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶於水為黃色溶液，活細胞內粒線體中的琥珀酸去氫酵素 (succinate dehydrogenase) 和細胞色素 C (cytochrome C) 會作用，使 MTT 還原成紫色的 formazan 結晶，其生成量與活細胞數目成正相關。加入 MTT 試劑後測量細胞吸光值，可得知琥珀酸去氫酵素還原 MTT 的能力 (formazan 生成量)，也就代表粒線體的活性。由於粒線體是細胞中對環境因素最敏感的胞器，因此足以代表細胞的生理狀況。故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。

將 MTT solution 以無胚牛血清的 DMEM 50 倍稀釋備用。將欲檢測的 96 孔盤之舊培養液甩乾，再加入 20 μ L/孔的 MTT 稀釋溶液，放入 37°C、5%二氧化碳的培養箱裡培養 3 小時。之後取出 96 孔盤並小心吸乾黃色 MTT 溶液，盡量不要吸到結晶與細胞。加入 100 μ L/孔的 DMSO 並以震盪器搖動 10 分鐘，待結晶完全溶解於 DMSO 中呈紫色。最後以多功能微分子及時分注偵測儀，以 570 nm 波長測其吸光值即可計算細胞存活率。

(七) 製造慢病毒(Lentiviral production)

第一天用無胚牛血清的 DMEM 種 293T 細胞株在六公分培養盤裡。

第二天細胞密度應該介在七到九分滿，如表一在管內稀釋 transfection reagent，輕彈使之均勻放置室溫下 5 分鐘。再加入表二質體，與上述之 transfection reagent 輕彈均勻，放置室溫下 20-30 分鐘。再將以上 transfection complex 滴進 293T 細胞的培養盤裡，在 37°C、5%二氧化碳的培養箱裡培養 18 小時。

Reagent	Per 6cm plate
TransIT-LT1	15 μ L
OPTI-MEM to total volume	250 μ L

表一、transfection reagent 的種類與應加之體積

處理組別	Plasmid	Per 6cm plate
shLUC (控制組)	pLKO.1-shLUC	1.25 μ g
shEpCAM	pLKO.1-shEpCAM	
EpCAM overexpression	pAS2-EpCAM	
以上三組均需	pCMV- Δ R8.9	1.125 μ g
	pMD.G	0.125 μ g

表二、質體的種類與應加之體積

第三天更換培養液以移除 transfection reagent，加入 5mL 含 BSA 的 DMEM 培養基，放入 37°C、5%二氧化碳的培養箱裡培養 24 小時。

第四天及第五天吸取培養液，即可收集培養液裡的慢病毒。

(八) 感染慢病毒(Lentiviral infection)

第一天種 HCT116 於 6 公分培養盤裡。

第二天加入先前製造的含慢病毒培養液，並在其中加入 8 μ g/mL 的 polybrene 促進感染效率，放入 37°C、5%二氧化碳的培養箱裡培養隔夜。

第三天換新的 10%FBS-DMEM Medium 培養基，感染病毒後至少 48 小時後用 2 μ g/mL Puromycin 篩選出有被感染到的細胞。Puromycin 篩選後至少要 72 小時才可進行西方點墨法和細胞存活率分析。

(九) 反轉錄反應 PCR(RT-PCR)

使用 TRIzol solution 萃取出細胞中的 RNA，將經過異丙醇沉澱所得之 RNA 用 70% EtOH 清洗後放在烘箱烘乾，再加少量 RNase free 水使 RNA 溶解。

在含有 TRIzol 和 RNA 的 eppendorf 加入氯仿。再將 eppendorf 離心，使 RNA 以外的物質沉澱。再加入異丙醇，使 RNA 與異丙醇作用產生沉澱。接著離心使 RNA 在 eppendorf 底部形成 pellet，將上清液吸掉。再用 70% EtOH 清洗 pellet 後將 eppendorf 放置 60°C 的烘箱烘乾。最後將 pellet 溶於 RNase free 水中，接著繼續反轉錄反應

PCR(RT-PCR)，或是冰入-80°C 冰箱備用。

接著用 Nano Drop ND-1000 測 RNA 濃度，先以拭鏡紙輕拭探測器，在主畫面點選 Nucleic Acid，依軟體跳出的對話框動作，在探測器上點 1 μ L 二次水，放下上臂後再按 OK) 完成電腦與儀器連線。擦拭探測器後，再點上 1 μ L RNA 即可測得 RNA 濃度。

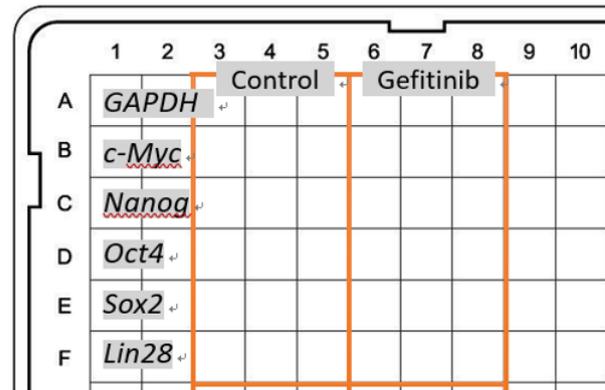
測得濃度後，經過計算，以每管 1000 ng/20 μ L 進行反轉錄反應，並添加 9.5 μ L 如表三的 PCR buffer mix，再加水至 20 μ L。使用多槽型核酸增值儀進行反轉錄，軟體設定為 25°C 10 分鐘，然後 42°C 60 分鐘，最後 70°C 10 分鐘，得到互補 DNA(cDNA)，cDNA 是利用反轉錄酶，以 RNA 為模板做成的複製品。

成分	體積 (μ L)
5X Reaction Buffer	4.0
dNTP Mix, 10 mM each	2.0
RT Random Primers	2.0
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	0.5
總體積	9.5

表三、RT-PCR 的成分與體積

(十) 即時聚合酶鏈鎖反應 (Q-PCR)

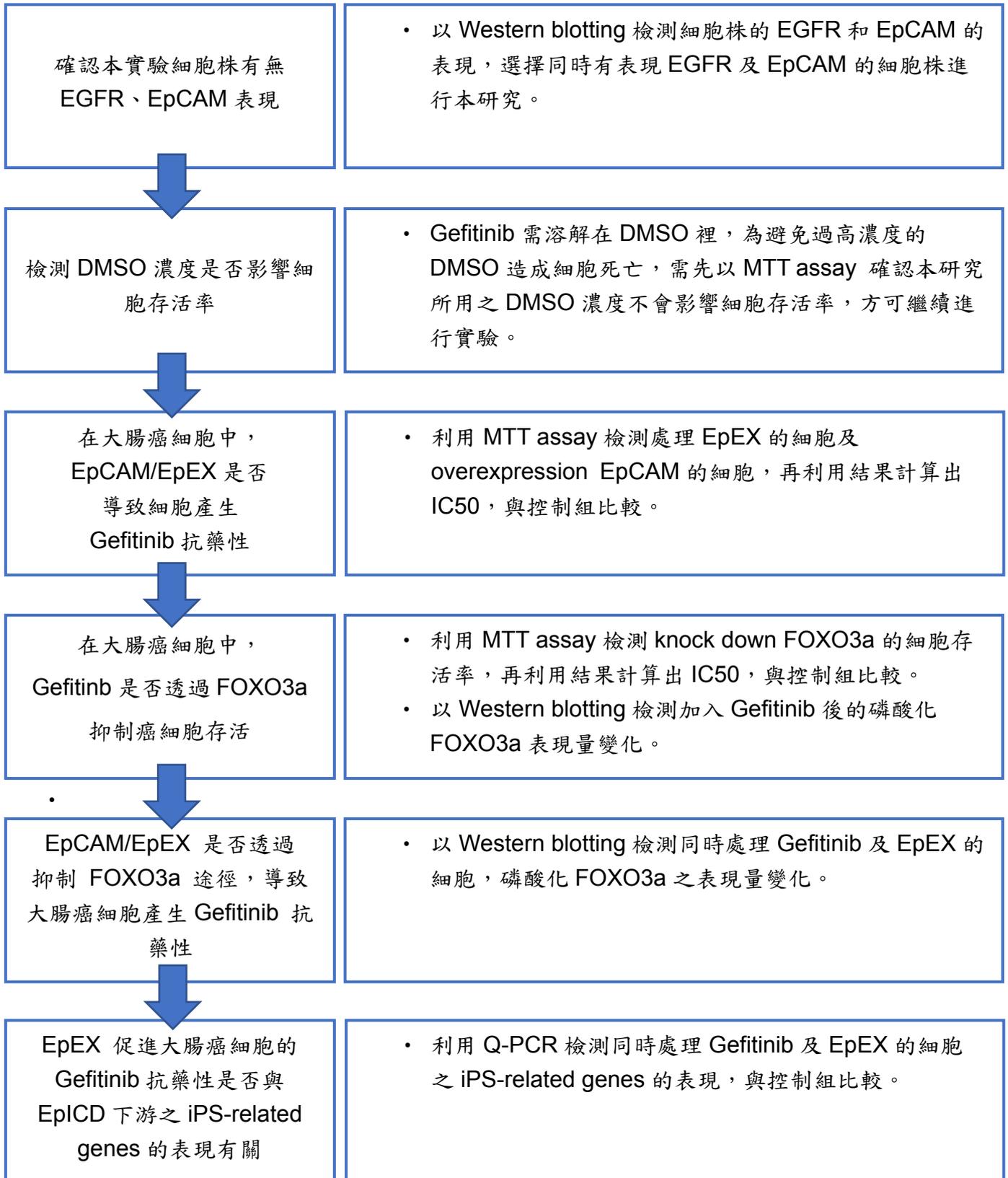
Q-PCR 技術利用專一的 Primer probe(引子探針)會在 PCR 過程中產生螢光(在此我們使用 SYBR Green 釋放綠螢光，SYBR Green 僅會與雙股 DNA 進行結合，然後釋放螢光，進而被螢光系統偵測。)，再利用螢光偵測系統來偵測每個循環(cycle)所釋放出的螢光量，進而推算出每個循環所產生的產物含量，達到即時定量的目的。若是基因的螢光較早被激發出來，表示其基因表現量較高。



圖二、使用 384 孔盤做 Q-PCR 之示意圖

先將待測基因 (*GAPDH*、*c-Myc*、*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Lin28*) 的 primer 稀釋成 $1 \mu\text{M}$ 。如圖二所示，控制組與用 1%FBS-DMEM 加 $10 \mu\text{M}$ Gefitinib 處理 3 天的細胞，兩者每種基因都重複做 3 次以提升實驗準確度。*c-Myc*、*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Lin28* 都是誘導性多能幹細胞相關基因 (iPS-related genes)，也都位於 EpiCD 下游。再將 cDNA 稀釋 20 倍，每個孔加入 $4 \mu\text{L}$ ，與 $1 \mu\text{L}$ 的 primer 與 $5 \mu\text{L}$ 的 SYBR Green。最後使用 Roche Lightcycler 480 機器與 Lightcycler 480 軟體測反應訊號。

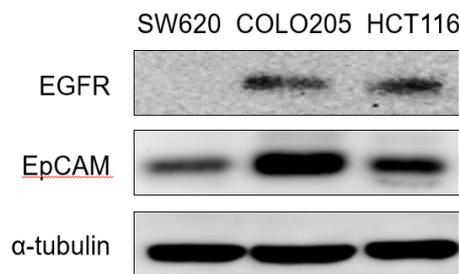
三、實驗流程



參、研究結果

一、確認本實驗細胞株有無 EGFR、EpCAM 表現

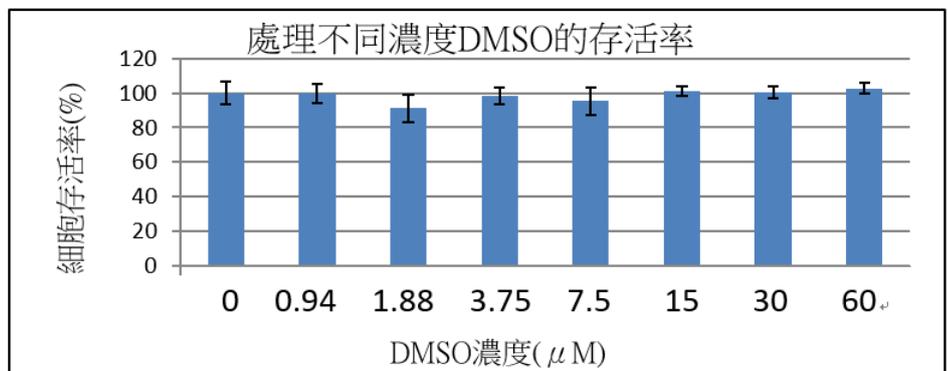
我們從常做為藥物作用研究的大腸癌細胞中挑選 SW620、COLO205、HCT116 三種細胞，利用西方點墨法 (Western Blot) 檢測 EGFR、EpCAM 的蛋白質表現量，以確認該細胞株適不適合拿來研究 EpCAM、EGFR 與 Gefitinib 抗藥性的關聯。結果如圖三，只有 SW620 未表現 EGFR，而三種細胞皆有表現 EpCAM 蛋白。



圖三、以西方點墨法檢測 SW620、COLO205、HCT116 三種細胞 EGFR 和 EpCAM 的蛋白質表現量

二、測試 DMSO 濃度是否影響細胞存活率

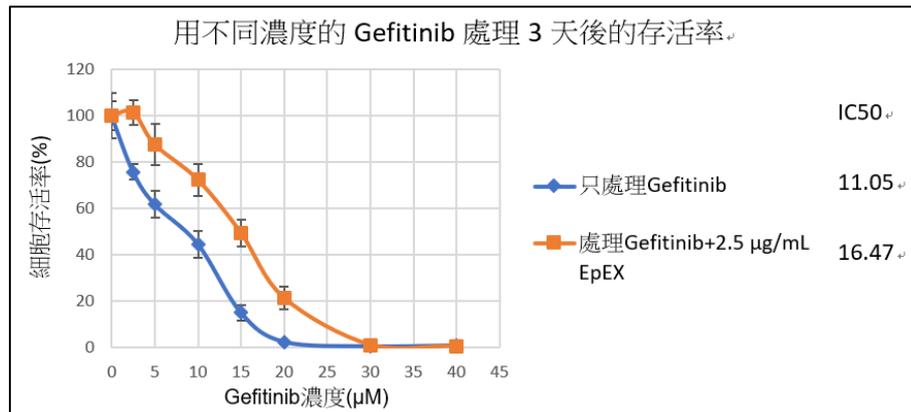
Gefitinib 需溶解在 DMSO 裡，但濃度過高的 DMSO 會產生細胞毒性。為了確保對細胞作處理時，DMSO 不會影響到細胞存活率，我們以無胎牛血清的 DMEM 培養基，加入 60 μ M DMSO 並序列稀釋到 0.94 μ M 培養 3 天後，進行細胞存活率測試，結果如圖四，當 DMSO 濃度高至 60 μ M 仍不會對細胞死亡有顯著影響。



圖四、以 MTT assay 測試不同濃度之 DMSO 對於細胞存活率的影響

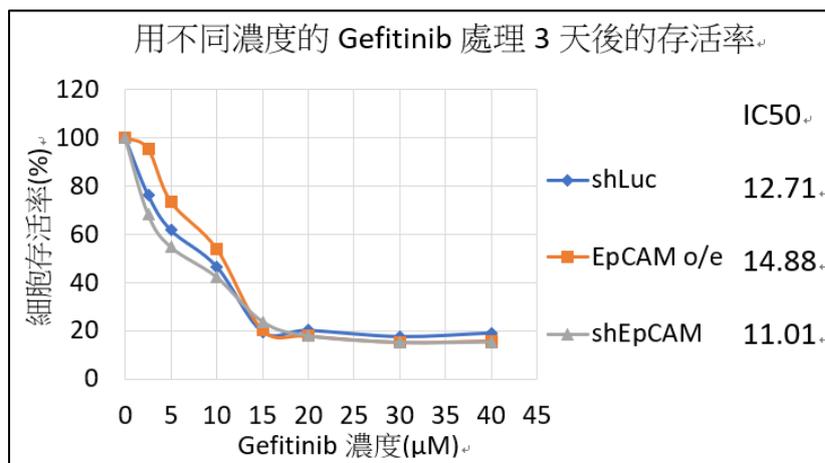
三、在大腸癌細胞中，EpCAM/EpEX 是否導致癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性

(一) 控制組為 HCT116 細胞只加入 Gefitinib，實驗組則以相同濃度 Gefitinib，與 2.5 μ g/mL EpEX 共同處理。兩者皆以 0、5、10、15、20、30、40 μ M 的 Gefitinib 處理 3 天，再以細胞存活率分析測試 EpEX 對於細胞的 Gefitinib 耐受性是否有影響。結果如圖五，有 2.5 μ g/mL EpEX 處理的細胞，半抑制濃度 (IC50) 比較高。



圖五、在不同濃度的 Gefitinib 處理 EpEX 與否，利用細胞存活率分析計算出 IC50 以測試 EpEX 對於 Gefitinib 抑制細胞存活的影响

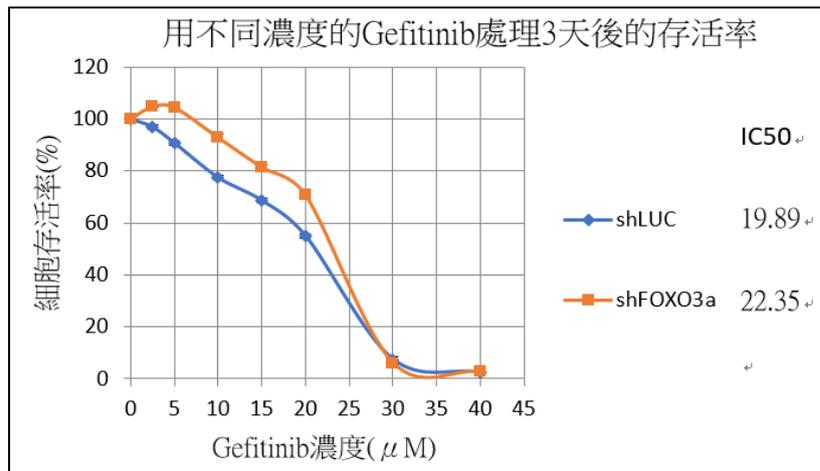
(二) 利用慢病毒感染 HCT116 細胞，將 EpCAM 基因 knock down (shEpCAM)、overexpression (EpCAM o/e)，與 shLuc (控制組) 細胞同樣以 0、5、10、15、20、30、40 μ M 的 Gefitinib 處理 3 天，再以細胞存活率分析算出半抑制濃度 (IC50)。結果如圖六，IC50 的數值為 EpCAM o/e > shLUC > shEpCAM。



圖六、用不同濃度的 Gefitinib 處理 EpCAM o/e、shLuc、shEpCAM 細胞，利用細胞存活率計算出 IC50，以探討 EpCAM 是否造成大腸癌細胞對 Gefitinib 的抗藥性

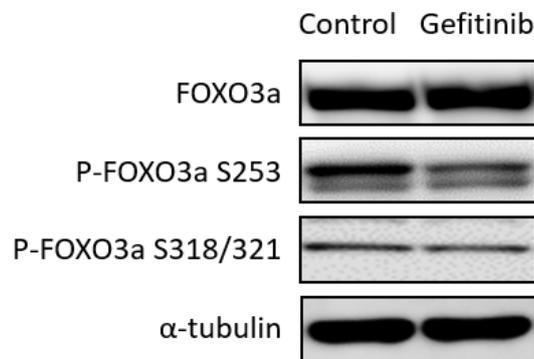
四、在大腸癌細胞中 Gefitinib 是否透過 FOXO3a 降低癌細胞的存活

(一) 利用慢病毒感染 HCT116 細胞，將 FOXO3a 基因 knock down (shFOXO3a) 與 shLuc (控制組) 細胞同樣以 0、5、10、15、20、30、40 μ M 的 Gefitinib 處理 3 天，再以細胞存活率算出半抑制濃度 (IC50)。結果如圖七，細胞在不同濃度的 Gefitinib 處理 3 天後，shFOXO3a 細胞的 IC50 較控制組高。



圖七、用不同濃度的 Gefitinib 處理 shLuc、shFOXO3a 細胞，利用細胞存活率計算出 IC50，以探討 FOXO3a 是否為 Gefitinib 抑制大腸癌細胞存活之重要因子

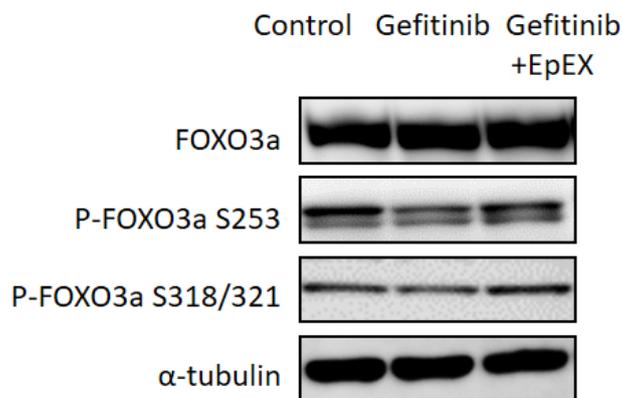
(二) 以 10 μ M Gefitinib 處理 HCT116 細胞一天，再用西方點墨法檢測 FOXO3a 磷酸化 S253 和 S318/321 兩個位點的蛋白質表現量，以探討 FOXO3a 是否為 Gefitinib 作用之重要因子。結果如圖八，經由 Gefitinib 處理的 HCT116 細胞，FOXO3a 的 S253 位點磷酸化表現量明顯降低。



圖八、以 10 μ M Gefitinib 處理 HCT116 一天，用西方點墨法檢測 FOXO3a 是否為 Gefitinib 作用之重要因子

五、EpCAM/EpEX 是否透過抑制 FOXO3a 途徑，導致大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性

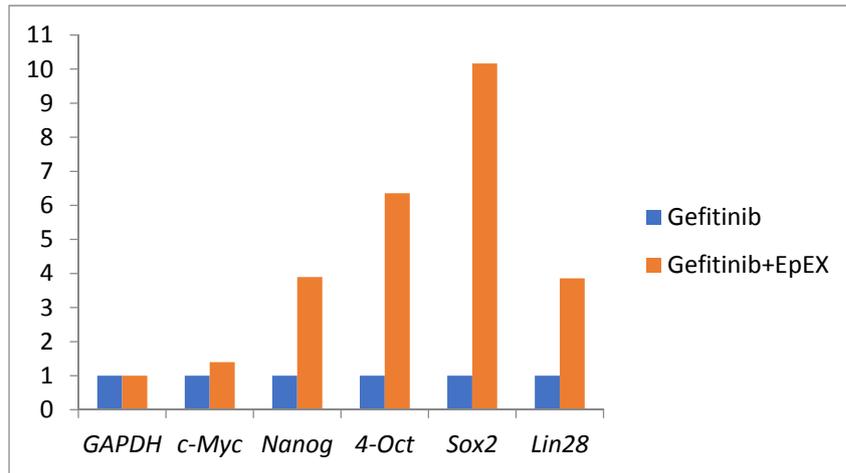
經過 10 μ M Gefitinib 處理 1 天的 HCT116 細胞，再以 2.5 μ g/mL EpEX 處理 2 小時，之後利用西方點墨法分析 FOXO3a 磷酸化 S253 和 S318/321 兩個位點的蛋白質表現量，檢測 EpEX 導致大腸癌細胞對 Gefitinib 產生抗藥性是否透過 FOXO3a 途徑。結果如圖九，經由 Gefitinib 處理後 FOXO3a 的 S253 位點磷酸化表現量明顯降低。相較於單獨處理 Gefitinib 的細胞，Gefitinib 和 2.5 μ g/mL EpEX 共同處理 2 小時的細胞 FOXO3a 的 S253 和 S318/321 位點磷酸化表現量明顯提高。



圖九、有 Gefitinib 的情況下加入 EpEX，以西方點墨法分析 EpEX 是否透過抑制 FOXO3a 途徑造成大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性

六、EpEX 促進大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性是否與 EpICD 下游之誘導性多能幹細胞相關基因 (iPS-related genes) 的表現有關

在 10 μ M Gefitinib 的情況下加入 2.5 μ g/mL EpEX 處理 2 小時，利用 Q-PCR 檢測 EpICD 下游的誘導性多能幹細胞相關基因 (*c-Myc*、*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Lin28*) 的變化，以探討 EpICD 與細胞產生 Gefitinib 抗藥性之關聯。如圖十，在有 Gefitinib 的情況下加入 EpEX，會造成 EpICD 下游的誘導性多能幹細胞相關基因 (*c-Myc*、*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Lin28*) 表現量提升。



圖十、利用 Q-PCR 檢測在有 Gefitinib 的情況下，加入 EpEX 後誘導性多能幹細胞相關基因的表現

肆、討論

一、確認本實驗細胞株有無 EGFR、EpCAM 表現

因為 SW620 並未表現 EGFR，所以不適合拿來研究 EpCAM、EGFR 與 Gefitinib 抗藥性的關聯。另外因時間因素，本實驗只先選用 HCT116 細胞株，希望未來可以用別種大腸癌細胞完整進行實驗，增加實驗可信度。

二、測試 DMSO 濃度是否影響到細胞之存活率

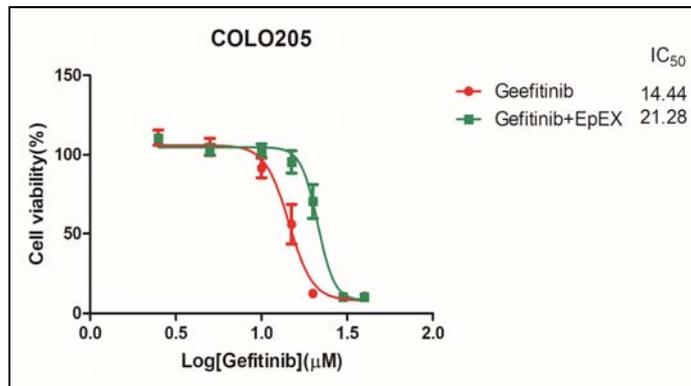
DMSO 是一種能使細胞吸收油脂的介面活性劑，Gefitinib 需溶解在 DMSO 裡，但是過多 DMSO 會有細胞毒性。為了確保對細胞作處理時，該 DMSO 的濃度不會造成細胞死亡，我們須測試不同濃度 DMSO 對於細胞死亡的影響。

當 DMSO 濃度高至 60 μ M 仍不會對細胞死亡有顯著影響，所以在該濃度以下的細胞死亡並非由 DMSO 造成，而是我們處理的 Gefitinib。

三、在大腸癌細胞中，EpCAM/EpEX 是否導致癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性

(一) 相較於單獨以 Gefitinib 處理的細胞，有加入 2.5 μ g/mL EpEX 的細胞 IC50 比較高，代表 EpEX 確實增強大腸癌細胞對於 Gefitinib 的耐受性，故在大腸癌細胞中，EpEX 的確會導致細胞產生 Gefitinib 抗藥性。此外，本項實驗以 COLO205 細胞株

進行實驗可獲得相同結果(圖十一)，再次驗證 EpEX 的確會導致細胞產生 Gefitinib 抗藥性。



圖十一、在不同濃度的 Gefitinib 處理 EpEX 與否，利用細胞存活率分析計算出 IC₅₀ 以測試 EpEX 對於 Gefitinib 抑制細胞存活的影响

(二) IC₅₀ 的大小為 EpCAM o/e > shLuc > shEpCAM，代表對於 Gefitinib 耐受性強弱為 EpCAM o/e > shLuc > shEpCAM，這說明了 EpCAM 可以提升大腸癌細胞對於 Gefitinib 的耐受性，EpCAM 表現較少則可使 Gefitinib 殺死癌細胞的作用更好。因此 EpCAM 確實造成大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性。

四、在大腸癌細胞中 Gefitinib 是否透過 FOXO3a 降低癌細胞的存活

(一) shFOXO3a 細胞的 IC₅₀ 比較高，代表 shFOXO3a 細胞對於 Gefitinib 的耐受性比較高，也就代表 FOXO3a 基因的 knock down 可使得 Gefitinib 殺死癌細胞的作用降低，所以代表 Gefitinib 殺死癌細胞需要有 FOXO3a 參與才能正常作用，故大腸癌細胞中 Gefitinib 透過 FOXO3a 降低癌細胞的存活。

(二) 細胞加入 Gefitinib 後，FOXO3a 的 S253 位點磷酸化表現量明顯降低，代表 FOXO3a 磷酸化會減少，而可以協助細胞凋亡，達成 Gefitinib 殺死癌細胞的效果，故大腸癌細胞中 Gefitinib 透過 FOXO3a 降低癌細胞的存活。

五、EpCAM/EpEX 是否透過抑制 FOXO3a 途徑，導致大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性。

Gefitinib 處理後 FOXO3a 的 S253 位點磷酸化表現量明顯降低，代表此時 FOXO3a

可以正常在細胞核內協助細胞凋亡。而再用 2.5 $\mu\text{g/mL}$ EpEX 處理 2 小時的細胞，可以看到 FOXO3a 位點 S253 和 S318/321 磷酸化表現量又明顯提高，此時 FOXO3a 會被送至細胞質被蛋白酶體分解，而不能在細胞核協助細胞凋亡，大腸癌細胞就容易在有 Gefitinib 的情況下存活。因此 EpEX 會導致大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性，並且是透過抑制 FOXO3a 途徑。

六、EpEX 促進大腸癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性是否與 EpICD 下游之誘導性多能幹細胞相關基因的表現有關

因為加入 EpEX 會正回饋 γ -secretase 而裁切出更多 EpICD。我們好奇是否 Gefitinib 抗藥性也受到 EpICD 影響，因此決定初步探究 EpICD 下游基因的變化。依照 Q-PCR 結果，在有 Gefitinib 的情況下加入 EpEX，會造成 EpICD 下游的誘導性多能幹細胞相關基因(*c-Myc*、*Nanog*、*Oct4*、*Sox2* 及 *Lin28*) 表現量全部都提升，因此我們認為 Gefitinib 抗藥性除了與 FOXO3a 有關，也與 EpICD 下游的誘導性多能幹細胞相關基因有關，但其機制尚不清楚。

我們也有進行上皮細胞間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 基因 (*Slug*、*Snail* 及 *Vimentin*) 的實驗，其與癌細胞的轉移有關，但 *Slug*、*Snai* 及 *Vimentin* 並沒有一致的變化，所以先初步排除 EMT 基因與 EpCAM 造成的 Gefitinib 抗藥性的關聯性。

伍、結論與應用

本研究發現大腸癌細胞中，Gefitinib 的確透過 FOXO3a 而使癌細胞死亡，而 EpCAM/EpEX 會增加 FOXO3a 磷酸化使之無法促進細胞凋亡，進而導致細胞產生 Gefitinib 抗藥性。另外，EpCAM/EpEX 促進 Gefitinib 抗藥性的產生與 EpICD 下游之誘導性多能幹細胞相關基因的表現有關，但分子機制尚不清楚。除了大腸癌細胞外，許多癌細胞也有過量表現之 EGFR，EpCAM 更常表現在癌細胞上，可見 EGFR 在癌症小分

子標靶藥物的研發上有重要地位，EpCAM 也在多種癌細胞生理扮演重要角色。本研究以大腸癌與 Gefitinib 做為癌症與 EGFR 抑制劑的模型，找出 EpCAM 造成大腸癌細胞的抗藥路徑，未來可應用在癌症之聯合治療 (Combination therapy)，以克服癌症治療所產生的 EGFR 小分子藥物抗藥性，也為癌症抗藥性的研究提出一個新的方向。

陸、參考文獻

- 一、105 年國人死因統計結果 (民 106 年 6 月 19 日)。衛生福利部。民 107 年 5 月 19 日，取自：<https://www.mohw.gov.tw/cp-16-33598-1.html>
- 二、Guanzhong Zhang, Xiaodong Xie, Tianyi Liu, Jihua Yang, and Shunchang Jiao. "Effects of pemetrexed, gefitinib, and their combination on human colorectal cancer cells." *Cancer Chemother Pharmacol*(2013)72:767–775. Web.
- 三、Yin-Hsun Feng, Chao-Jung Tsao, Chao-Liang Wu, Jan-Gowth Chang, Pei-Jung Lu, Kun-Tu Yeh, Gia-Shing Shieh, Ai-Li Shiau, and Jeng-Chang Lee. "Sprouty2 protein enhances the response to gefitinib through epidermal growth factor receptor in colon cancer cells." *Cancer Sci.* 2010 Sep;101(9):2033-8. Web.
- 四、Qiong Li, Daoxiang Zhang, Xiaoying Chen¹, Lei He, Tianming Li, Xiaoping Xu, and Min Li. "Nuclear PKM2 contributes to gefitinib resistance via upregulation of STAT3." *Sci Rep.* 2015; 5:16082. Web.
- 五、Jer-Yen Yang, Chun-Ju Chang, Weiya Xia¹, Yan Wang, Kwok-Kin Wong, Jeffrey A. Engelman, Yi Du¹, Michael Andreeff, Gabriel N. Hortobagyi, and Mien-Chie Hung. "Activation of FOXO3a is sufficient to reverse MEK ERK kinase inhibitor chemoresistance in human cancer." *Cancer Res*; 70(11); 4709–18. Web.
- 六、I.-I. Kuan, Kang-Hao Liang, Yi-Ping Wang, Ting-Wen Kuo, Yaa-Jyuhn James Meir, Sareina Chiung-Yuan Wu, Shang-Chih Yang, Jean Lu, and Han-Chung Wu. "EpEX EpCAM and Oct4 or Klf4 iPSCs." *Sci Rep.* 2017; 7: 41852. Web.

- 七、Ching-Feng Chiua, Yi-Wen Changa, Kuang-Tai Kuob, Yu-Shiuan Shend, Chien-Ying Liue, Yang-Hao Yug, Ching-Chia Cheng, Kang-Yun Lee, Feng-Chi Chen, Min-Kung Hsu, Tsang-Chih Kuo, Jui-Ti Ma, and Jen-Liang Su. "NF- κ B-driven suppression of FOXO3a contributes to EGFR mutation-independent gefitinib resistance." *PNAS*.2016; E2526–E2535. Web.
- 八、Dorothea Maetzel, Sabine Denzel, Brigitte Mack, Martin Canis, Philip Went, Michael Benk, Cuong Kieu, Peer Papior, Patrick A. Baeuerle, Markus Munz, and Olivier Gires. "Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM." *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):162-71. Web.
- 九、Markus Munz, Patrick A. Baeuerle , and Olivier Gireshe. "The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling." *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5627-9. Web.
- 十、Kang-Hao Liang, Hsien-Cheng Tso, Shao-Hsi Hung, I.-I. Kuan, Jun-Kai Lai, Feng-Yi Ke, Yi-Ting Chuang, I-Ju Liu, Yi-Ping Wang, Ruey-Hwa Chen, Han-Chung Wu. "Extracellular domain of EpCAM enhances tumor progression through EGFR signaling in colon cancer cells." *Cancer Lett*. 2018; 433:165-175.

【評語】 090010

上皮細胞黏著分子(EpCAM)只被認為是胞間連接分子，然而從文獻與先前實驗室的試驗，可以看見 EpCAM 促進癌症抗藥性的可能。他們研究發現在大腸癌中，艾瑞莎(Gefitinib) 會透過轉錄因子 FOXO3a 促進細胞凋亡，而 EpEX 會經由抑制 FOXO3a 所促進的凋亡路徑，導致癌細胞產生 Gefitinib 抗藥性，但其分子機制尚不清楚。

1. 研究方向清楚，明白。
2. 宜證明 EpEX 在癌症抗藥性的細胞中高度表現。
3. 宜再證明 Gefitinib 處理後 p-FOXO3a 表現變化不明顯。