

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090021
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	上皮細胞黏附因子(EpCAM)對腫瘤微環境與 上皮間質轉化(EMT)影響之機制探討
得獎獎項	四等獎

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 吳漢忠、廖靜宜

作者姓名 余尹頌、蘇芷琳

關鍵詞 上皮細胞黏附因子(EpCAM)、
上皮間質轉化(EMT)、腫瘤微環境

作者簡介



大家好，我們是余尹頌和蘇芷琳，目前就讀師大附中數理資優班二年級。在高一時有幸進入吳漢忠老師的實驗室學習及進行專題研究，並在研究的過程中學習進步，很感謝教授、學長姐以及老師給予我們的幫助，讓我們順利完成此次的報告。在學習的過程中，發掘了更多生物的奧妙，也更有學習的熱忱了！我們期許能在國際科展中，認識更多和我們一樣熱愛科學的同伴，並與他們交流分享、切磋琢磨。

摘要

上皮細胞黏附因子 (EpCAM)參與了細胞的黏附、信息傳遞、增殖及分化等功能，並在惡性腫瘤組織中大量表達，被當作各種癌症的診斷標誌物，因此被認為是治療癌症的重要關鍵。另外近期研發的抗 EpCAM 中和性抗體被認為能抑制 EpCAM 的訊息傳遞，導致腫瘤細胞的死亡，也可以降低癌細胞中 PD-L1 蛋白的表現，進而導致腫瘤細胞死亡及活化 T 細胞殺死癌細胞的能力。

為了觀察 EpCAM 是否會對癌細胞造成影響，我們將癌細胞分成野生型 (wild type)以及 EpCAM 基因剔除細胞株，並以 Western blotting 及 qRT-PCR 確認實驗組的 EpCAM 基因有確實被成功剔除。進一步利用細胞存活率及細胞群落實驗證實 EpCAM 會促進大腸直腸癌細胞增生，並以抑制劑 DAPT 和 TAPI-1 處理證實 EpCAM 訊息傳遞會增加癌細胞轉移與侵入能力。接著為了驗證 EpCAM 中和性抗體的作用，我們用 EpCAM 中和性抗體處理癌細胞後，由細胞凋亡實驗確認 EpCAM 中和性抗體確實會促使癌細胞凋亡。我們的研究結果顯示 EpCAM 的訊息傳遞會促進腫瘤增生與轉移，而 EpCAM 中和性抗體於癌症治療中的高度前瞻性，期許將來能在癌症治療中提供一個可行有效的療法。

Abstract

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is involved in cell adhesion, signal transduction, proliferation and differentiation, and it is highly expressed in many types of malignant tumor tissues. Since EpCAM can be used as a diagnostic marker for various cancers, it may also be considered as a possible key treatment target for those cancers. In support of this idea, a recently developed anti-EpCAM neutralizing antibody was shown to inhibit EpCAM-mediated signal transduction and reduce the level of PD-L1 in cancer cells, thereby causing tumor cell death and facilitating T cell-dependent killing of cancer cells.

In order to evaluate the effects of EpCAM expression on cancer cells, we compared wild-type and EpCAM-knockout cell lines. Western blotting and qRT-PCR were first used to confirm that the EpCAM gene was indeed disrupted in the knockout line. Then, we performed cell survival and colony formation assays to evaluate the impact of EpCAM on proliferation of cancer cells. Cell migration and invasion assays were performed on wild-type and EpCAM-knockout cells with and without inhibitors DAPT and TAPI-1 treatment. Next, we tested the effects of our anti-EpCAM monoclonal antibody on cancer cells. An apoptosis assay revealed that the anti-EpCAM monoclonal antibody can indeed promote apoptosis of cancer cells. These findings support the idea that anti-EpCAM monoclonal antibodies are highly promising for cancer treatment, and we hope to further develop the antibodies into feasible and effective cancer therapies in the future.

壹、 前言

一、研究動機

癌症是威脅人類健康的重要疾病之一，找出對癌症最有效的療法也成為重要的研究課題。癌症治療中面臨的最大困難為癌細胞的轉移與免疫逃逸 (immune evasion)，惡性腫瘤細胞能穿透體內屏障侵入周遭環境，癌細胞通過血液或淋巴系統轉移到其他器官或部位，並進一步侵入組織，腫瘤便會在新部位增生形成新的腫瘤，使得癌症難以治癒。

上皮細胞黏附因子 (EpCAM) 是一種穿膜糖蛋白，常見於上皮組織和大量表達於惡性腫瘤中，與細胞黏附、遷移、增殖、分化及腫瘤發生有關。由於 EpCAM 在腫瘤上皮細胞中的高表現量，因此被認為是腫瘤標記，也是最早發現的腫瘤相關抗原之一，但它並未像其他用於治療癌症的標靶蛋白一樣受到同等程度的關注。最近研究發現的 EpCAM 中和性抗體，能阻斷癌細胞的 EpCAM 訊息傳遞作用，進而抑制腫瘤的生長。先前研究顯示 EpCAM 中和性抗體能與多種癌細胞的 EpCAM 結合，並誘導多種癌細胞凋亡，有效減少癌細胞增生惡化。

此外腫瘤會逃避免疫監視與宿主免疫不良使 T 細胞無反應性，腫瘤免疫逃逸也與相關抗原的缺失或調節有關，而目前已證實抑制免疫檢查點蛋白是治療腫瘤的關鍵，這項技術即稱為「癌症免疫療法」，成為近年來全新的治療方法。

由於腫瘤生物學和免疫學深入的研究，免疫治療已在臨床醫學上得到突破性的進步，成為多種癌症的標準療法。通過對腫瘤免疫應答 (immune response) 及腫瘤免疫逃避機制的認識，可以將這種相互作用利用於癌症免疫治療。藉由對腫瘤和免疫系統之間的分子相互作用的理解，可以產生了許多新穎的研究療法，對於癌症與醫療將是一大進步。

二、研究背景

(一) 上皮間質轉化 (EMT)

上皮細胞向間質細胞進行轉化的現象，與惡性腫瘤的轉移及侵入有密切的關係。通過 EMT，上皮細胞失去了細胞極性，失去與基底膜的連接等上皮表型，獲得了較高的遷移與侵襲、抗凋亡和降解細胞外基質的能力等間質表型。

(二) 癌症免疫療法 (Cancer immunotherapy)

利用身體本身的免疫細胞打擊癌症，也因此有機會避開傳統化療和標靶藥物受到的腫瘤微環境限制，能更有效地治療癌症。

因為免疫細胞 (T 細胞) 表面有 PD-1 蛋白質，而癌細胞有 PD-L1 蛋白質，當 PD-1 與 PD-L1 結合時會使免疫 T 細胞無法察覺癌細胞並殺死，因此當免疫檢查點抑制劑 (checkpoint inhibitors) 使用後，可降低腫瘤微環境的免疫抑制作用，使免疫 T 細胞正常運行，讓免疫系統攻擊癌細胞。

(三) 腫瘤微環境 (Tumor microenvironment)

腫瘤細胞不只有癌細胞，更包括周圍的血管、免疫細胞、纖維母細胞、骨髓源性炎症細胞、各種信號分子和細胞外基質 (ECM)，統稱為腫瘤微環境，其中的免疫細胞會影響癌細胞的增長。

腫瘤微環境主要會強力抑制免疫反應，讓存在其中的免疫細胞無法發現而攻擊癌細胞，促進癌症的生長。

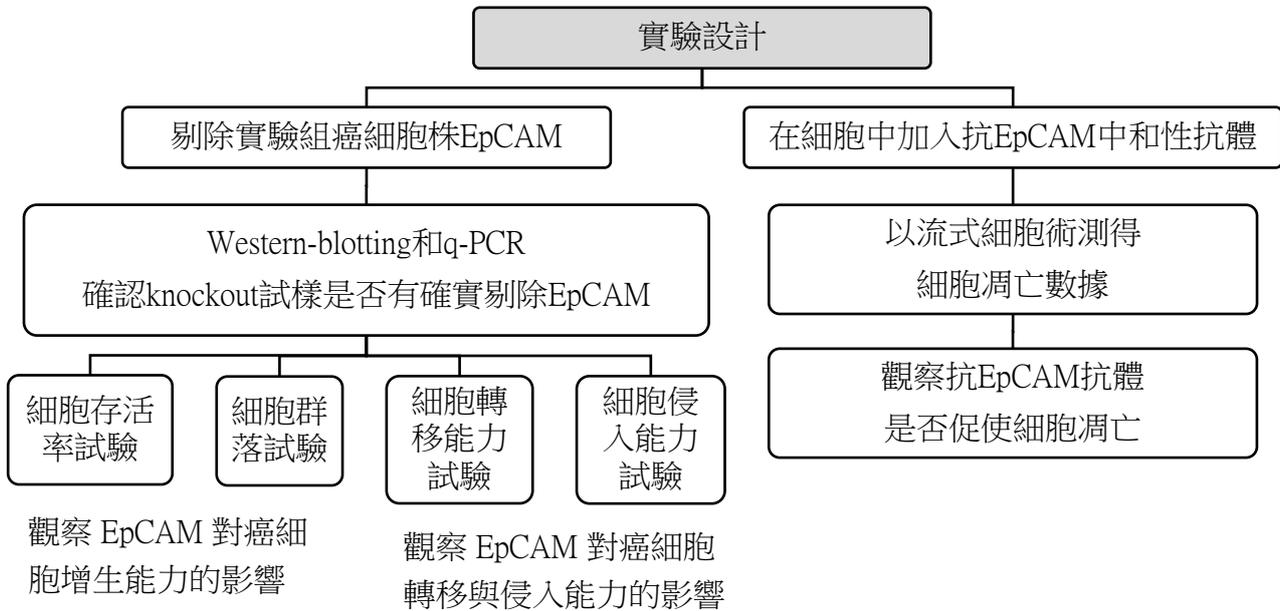
三、研究目的

(一) 探討 EpCAM 是否能調控大腸癌細胞的上皮間質轉化(EMT)與轉移能力

(二) 探討 EpCAM 是否能調控大腸癌中的腫瘤微環境

貳、 研究方法與過程

一、 研究流程圖



二、 材料與設備

(一) 西方墨點法 (Western-blotting)

1. PBS (磷酸鹽緩衝生理食鹽水)
2. Eppendorf tube (微量離心管)
3. Nonidet-P40 (乙基苯基聚乙二醇)緩衝液
 - (1) NaCl (氯化鈉)
 - (2) NP40 (乙基苯基聚乙二醇)
 - (3) 50 mM Tris-HCl (三羥甲基胺基甲烷) pH 8.0
 - (4) 蛋白酶抑制劑

4. RIPA 緩衝液 (放射免疫沈澱試驗緩衝液)
 - (1) NaCl (氯化鈉)
 - (2) NP-40 (乙基苯基聚乙二醇)
 - (3) 脫氧膽酸鈉
 - (4) SDS (十二烷基硫酸鈉)
 - (5) Tris-HCl pH 8.0
 - (6) 蛋白酶抑制劑
5. Tris-HCl 緩衝液
 - (1) Tris-HCl pH 8.0
6. Laemmli 2× 緩衝液/上樣緩衝液
 - (1) SDS
 - (2) 2-巰基乙醇
 - (3) 甘油
 - (4) 溴酚藍
 - (5) Tris-HCl
7. 電泳緩衝液 (Tris-甘胺酸/SDS)
 - (1) 三羥甲基胺基甲烷
 - (2) 甘胺酸
 - (3) SDS
8. 轉膜緩衝液 (濕轉)
 - (1) 三羥甲基胺基甲烷
 - (2) 甘胺酸
 - (3) 甲醇

9. 轉膜緩衝液 (半乾轉)
 - (1) 三羥甲基胺基甲烷
 - (2) 甘胺酸
 - (3) 甲醇
 - (4) SDS
 10. 封閉緩衝液
 - (1) 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)
 - (2) 加入 TBST 緩衝液中混勻並過濾
- (二) 即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)
1. HCT116 和 HT29 的 cDNA 樣本
 2. 10 mM dNTP (脫氧核糖核苷三磷酸)
 3. Forward & Reverse primer (前置引子 & 反置引子)
 4. SYBR Green Master Matrix
 5. 96 孔盤 & 封膜
 6. ddH₂O (雙蒸水)
- (三) 細胞存活率試驗
1. 24 孔盤
 2. 含血清培養基
 - (1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 - (2) 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)
 - (3) 1% penicillin/streptomycin 抗生素 (PS)
 3. 10% WST-1

(四) 細胞群落實驗

1. 6孔盤
2. 含血清培養基
 - (1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 - (2) 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)
 - (3) 1% penicillin/streptomycin 抗生素 (PS)
3. 結晶紫染劑 (Crystal Violet)

(五) 細胞轉移與侵入能力分析

1. Transwell
2. 24 well plate
3. 10% Matrigel
4. PBS
5. 0.5%Crystal violet+10%MeOH
6. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (不含血清)
7. 含血清培養基
 - (1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 - (2) 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)
 - (3) 1% penicillin/streptomycin 抗生素 (PS)
8. ddH₂O
9. DAPT (GSI-IX, LY-374973)
10. TAPI-1 (ADAM17/TACE 抑制劑)

(六) 細胞凋亡試驗

1. 24 孔盤
2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (不含血清)
3. 10× 鏈接緩衝液 (binding buffer)
4. ddH₂O
5. PI 染劑
6. Annexin V 染劑

三、細胞培養(cell culture)

- (一) 細胞株:大腸直腸癌細胞 HCT116 與 HT29 細胞
- (二) 培養基:Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ，內含 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 與 1% penicillin/streptomycin 抗生素
- (三) 培養條件:37°C, 5%CO₂

四、西方墨點法 (Western-blotting)

- (一) 製備細胞培養物裂解物 (cell lysate)
 1. 將細胞培養皿置於冰上，用冰冷的 PBS 洗滌細胞
 2. 將 PBS 吸出，然後加入冰冷的裂解緩衝液
 3. 用預冷的塑料細胞刮棒刮下貼壁細胞，然後輕輕地將細胞懸浮液轉移至預冷的微量離心管中
 4. 在 4 °C 下持續攪拌 30 分鐘
 5. 在 4 °C 預冷的離心機中以 16,000× g 的轉速離心 20 分鐘
 6. 輕輕地從離心機中取出離心管，置於冰上
 7. 將上清液轉移至放置在冰上的新離心管中，棄去沈澱

(二) 樣品製備

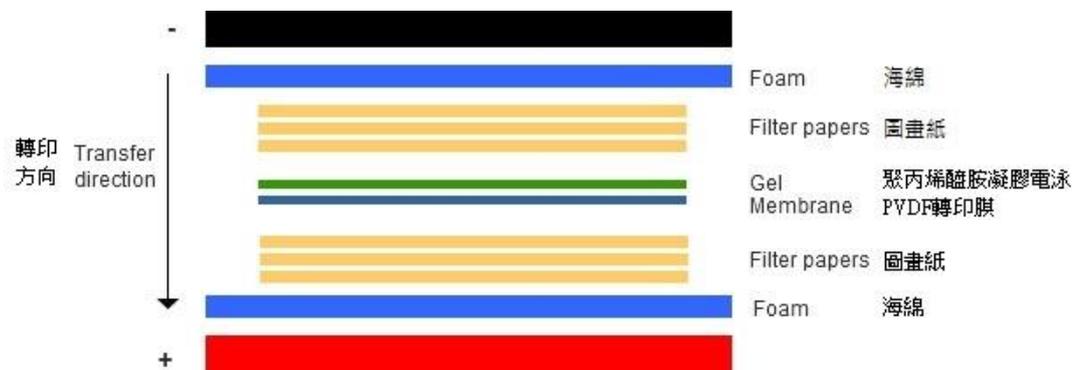
1. 取出小部分 (50 μ L) 裂解物，用於蛋白分析。確定每種細胞裂解物的蛋白濃度
2. 向剩餘體積的細胞裂解物中加入等體積的 2 \times Laemmli 樣品緩衝液
3. 變性：在 100 $^{\circ}$ C 下將樣品緩衝液中的每種細胞裂解物煮沸 5 分鐘，並進行分裝。在 -20 $^{\circ}$ C 下保存裂解物。
4. 在 37 $^{\circ}$ C 下解凍裝有細胞裂解物的離心管。在微型離心機中以 16,000 \times g 離心 5 分鐘

(三) 上樣和電泳 (SDS-PAGE)

1. 將等量的蛋白質和分子量標準上樣到 SDS-PAGE 凝膠孔中。來源於細胞裂解物或組織勻漿的總蛋白的上樣量為 20-30 μ g，純化蛋白的上樣量為 10-100 ng
2. 在 100 V 下進行電泳 1 至 2 小時

(四) 將蛋白質從聚丙烯醯胺凝膠電泳轉移到 PVDF (polyvinylidene difluoride) 轉印膜上

1. 如下圖製成轉移堆疊體：



圖片出處：<https://tw.sinobiological.com/category/wb-wet-transfer>

- (1) 用甲醇活化 PVDF (polyvinylidene difluoride) 1 分鐘，並在製備堆疊體之前用轉膜緩衝液沖洗 PVDF
- (2) 所得 PVDF 轉印膜可用於抗體染色

(五) 抗體染色

1. 用 5% 封閉緩衝液在室溫下封閉膜 1 小時，或在 4 °C 下封閉過夜
2. 用適當稀釋度的一級抗體在 5% 或 2% 封閉溶液中 4 °C 過夜孵育膜
3. 用 TBST 以 50~60RPM 洗滌 PVDF 轉印膜 3 次，每次 5 分鐘
4. 用推薦稀釋度的標記二級抗體在含 5% 封閉緩衝液的 TBST 中室溫孵育膜 1 小時
5. 用 TBST 以 50~60RPM 洗滌 3 次，每次 5 分鐘，再用 TBS 沖洗
6. 移除多餘的試劑，並用透明塑料膜覆蓋膜
7. 利用暗室顯影技術採集化學發光圖像

五、即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

(一) 配置樣本

1. 配製 cDNA 樣本：加入 ddH₂O 將 cDNA 樣本濃度稀釋為 10 ng/μL
2. 配製 5 μM forward primer (前置引子)：取 9 μL ddH₂O 至 eppendorf tube，再加入 1 μL 50 μM forward primer stock
3. 配製 5 μM reverse primer (反置引子)：取 9 μL ddH₂O 至 eppendorf tube，再加入 1 μL 50 μM reverse primer stock
4. 配製 1.2 mM dNTP：取 88 μL ddH₂O 至 eppendorf tube，再加入 12 μL 10 mM dNTP stock
5. 配製混合溶液：

試劑	濃度	體積
forward primer	5 μM	0.2 μL/well
reverse primer	5 μM	0.2 μL/well
dNTP	1.2 mM	0.2 μL/well
ddH ₂ O	-	4.6 μL/well

(此處混合溶液為一個 well 的量，視實際使用的 well 數做調整)

(二) 分裝

1. 取出 96 孔盤，每個 well 依序加入 5 μ L 混合溶液
2. 將 96 孔盤放至冰上，至-20°C 冰箱取出 SYBR Green Master Matrix，震盪後每個 well 依序加入 10 μ L SYBR Green Master Matrix
3. 取出封膜黏貼於 96 孔盤上，黏貼完全後即可放入即時聚合酶鏈式反應儀進行反應

(三) Real-Time PCR (即時聚合酶連鎖反應)循環溫度

1. 50°C 反應 2 分鐘
2. 95°C 反應 10 分鐘
3. 95°C 反應 15 秒
4. 60°C 反應 1 分鐘
5. 重複 40 次

六、細胞存活率試驗

(一) 接種細胞

1. 取三個 96 孔盤
2. 每個 well 加入 1×10^4 個細胞，將孔盤放入培養箱分別靜置 1~3 天

(二) 測量吸光值

1. 配製 WST-1 溶液：取 4.5 mL 含胎牛血清的培養基至 eppendorf tube，再加入 450 μ L WST-1
2. 吸除 96 孔盤中的上清液
3. 每個 well 加入 100 μ L 調配好的溶液後輕輕搖晃
4. 放入培養箱靜置 1 小時
5. 將孔盤取出
6. 使用儀器以 OD 450 nm 測吸光度

七、細胞群落實驗

(一) 接種細胞

1. 取一個 6 孔盤
2. 將每個 well 分別加入 5×10^3 個細胞，放入培養箱靜置約一個禮拜

(二) 細胞染色

1. 吸除 6 孔盤中的上清液
2. 每個 well 分別加入 1 mL 的 Crystal Violet 染劑，反應約 15~20 分鐘
3. 吸除染劑後用水清洗，晾乾後即可拍照記錄結果

八、細胞轉移與侵入能力分析

(一) 配製基質膠體 (Matrigel)

1. 將 Matrigel 自 -20°C 冰箱取出，放置於 4°C 解凍
2. 將 $10 \mu\text{L}$ 與 $90 \mu\text{L}$ 不含 FBS 的培養基混合
3. 加入 transwell 中，將 transwell 放入 24 well plate 置於 37°C 培養箱 30 分鐘

(二) 接種細胞

1. 將細胞以不含 FBS 的培養基回溶後計數
2. 加入含 FBS 的培養基至 transwell 外圍 ($750 \mu\text{L}/\text{well}$)
3. 每個 transwell 依序加入 2×10^5 個細胞 ($500 \mu\text{L}/\text{well}$)
4. 在其中二組樣本中分別加入 $2.5 \mu\text{L}$ DAPT 和 TAPI-1
5. 放入 37°C 培養箱靜置 24 小時

(三) 細胞染色

1. 將培養基吸除，以棉花棒沾取少量 PBS 擦拭 transwell 內部
2. 每個 tranwell 內加入 $500 \mu\text{L}$ 含 10% MeOH 的 Crystal Violet 染劑，室溫反應 30 分鐘
3. 以 ddH₂O 清洗 transwell，晾乾後即可拍照

九、細胞凋亡試驗

(一) 接種細胞

1. 取一個 24 孔盤
2. 每個 well 加入 2×10^5 個細胞，將孔盤放置培養箱過夜

(二) 加入抗體

1. 分別加入 Normal mouse IgG (NM IgG) 和 EpCAM 中和性抗體 (EpAb2-6)
2. 在不含 FBS 的 DMEM 培養基中，靜置 6 小時

(三) 配置染劑

1. 配製鏈接緩衝液：取 6.3 mL 的 ddH₂O 至離心管，再加入 700 μ L 10 \times 鏈接緩衝液
2. 取一個新的離心管，先加入 1.25 mL 配製好的鏈接緩衝液 (binding buffer)，再分別加入 25 μ L 的 PI 染劑和 Annexin V 染劑
3. 用 pipette 均勻混合後將配製好的染劑放到冰上並且避光

(四) 離心

1. 先將上清液吸除，加入 500 μ L PBS 洗滌細胞
2. 將 PBS 倒掉加入 300 μ L trypsin，放入 37°C 培養箱反應 3~5 分鐘
3. 加入 500 μ L 含血清的培養基，用微量吸管將培養基和細胞混合均勻後加入 1.5 mL 的離心管
4. 置入離心機，3000 RPM 離心 5 分鐘
5. 將離心管內的上清液倒掉，加入 1 mL 的 PBS 清洗
6. 同樣 3000RPM 再離心 5 分鐘

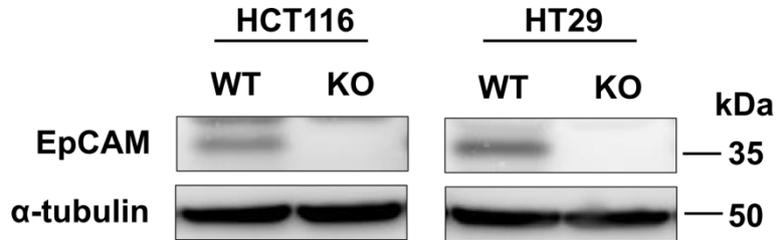
(五) 加入染劑

1. 將離心管內的 PBS 倒掉
2. 每個離心管內加入 100 μ L 配製好的染劑
3. 放置到避光處反應 15 分鐘，即可上機記錄結果

參、 研究結果與討論

一、 西方墨點法 (Western blotting)

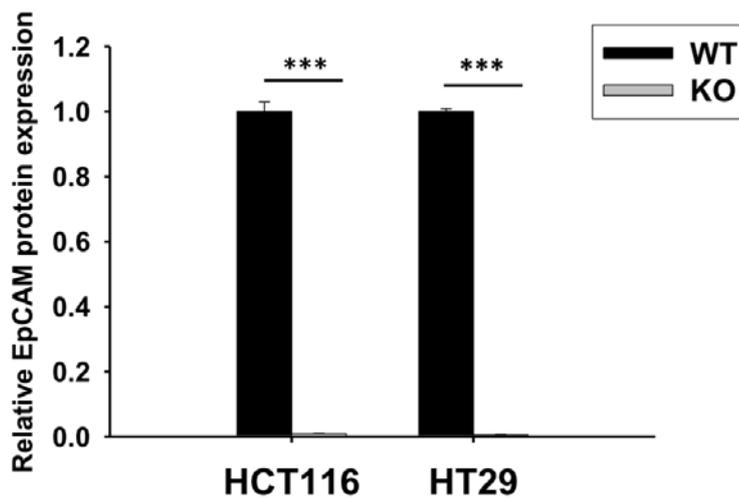
(一) 結果條帶



圖一、 WT 及 KO HCT116 和 HT29 細胞之 tubulin 和 EpCAM 蛋白質表現量

(WT 即為 wild type，KO 即為 EpCAM knockout)

(二) 定量分析



圖二、 WT 及 KO HCT116 和 HT29 細胞之 EpCAM/ α -tubulin 蛋白質表現量。

*** $p < 0.001$

(WT 即為 wild type，KO 即為 EpCAM knockout)

為了確認後續實驗的 EpCAM knockout 細胞有確實將 EpCAM 剔除，我們利用西方墨點法測量細胞內 tubulin 和 EpCAM 的表現量。由圖一和圖二可以觀察到 tubulin 的表現量相差不大，即可確定所取的蛋白質量是大約等量的。並且圖一中 knockout 試樣沒有 EpCAM 表現量，而 wild type 則有。將結果定量分析後，圖三也可以觀察到 wild type 的 EpCAM 表現量明顯比 knockout 高，即可確認實驗用的 EpCAM knockout 細胞有成功將 EpCAM 剔除。

二、即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

細胞株：HCT116

(一) Ct 值數據

蛋白質種類	試樣	1	2	3	平均
肌動蛋白 (Actin)	WT	17.01	17.13	17.08	17.07
	KO	16.92	16.89	16.92	16.9
EpCAM	WT	20.1	19.95	19.99	20.01
	KO	27.58	26.56	26.49	31.54

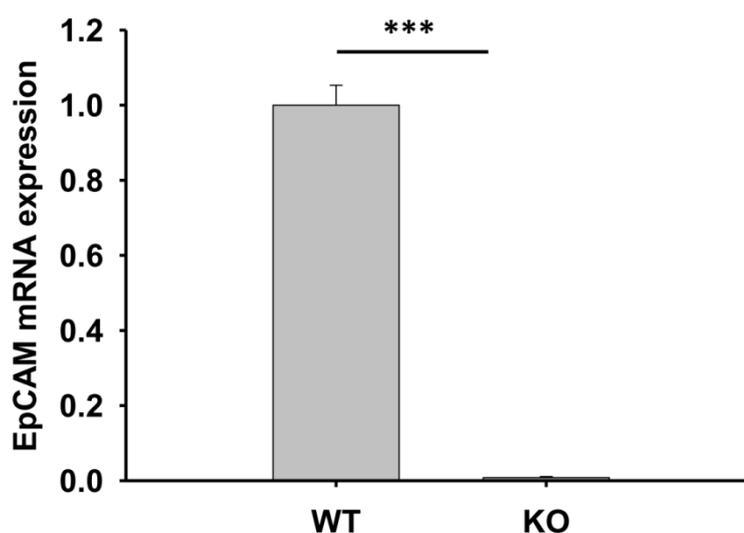
(二) 相對表現量計算

我們先分別測出肌動蛋白(Actin)與 EpCAM 的 Ct 值，利用同一種樣本的 Actin 定量，以 WT EpCAM 相對於 Actin 之放大倍率之倒數為標準，算出其他樣本 EpCAM 相對於 Actin 之放大倍率之倒數的相對比例。

$$\text{算法即為：} \frac{2^{(\text{目標樣本 Ct 值} - \text{Actin Ct 值平均})}}{2^{(\text{WT EpCAM Ct 值平均} - \text{Actin Ct 值平均})}}$$

試樣	1	2	3	平均
WT	0.940793	1.043876	1.015331	1
KO	0.004706	0.009543	0.010017	0.008089

(三) 將以上數據繪製成長條圖比較



圖四、WT 及 KO HCT116 細胞之 EpCAM mRNA 表現量。

*** $p < 0.001$

(WT 即為 wild type, KO 即為 EpCAM knockout)

為了確認後續實驗的 EpCAM knockout 細胞有確實將 EpCAM 剔除，我們利用即時聚合酶連鎖反應測量 wild type 和 EpCAM knockout 細胞 Actin 和 EpCAM 的 Ct 值，再換算成相對表現量。由圖四可看出雖然 knockout 細胞仍有些微表現量，但相對於 wild type 的基因表現量有十分顯著的差異，足以進行後續實驗。

三、細胞存活率試驗

(一) 1×10^4 個 HT29 細胞/well 在 10%FBS 培養及 5×10^3 個 HCT116 細胞/well 在 5%FBS 培養

1. 吸光值數據(以 WST-1 處理再以 OD450 測量)

若某一化學物質可吸收某一波長的光，則該化學物質在溶液中的濃度，會與溶液對該波長的吸光值(absorbance, 又稱為 optical density OD)成一正比關係，因此利用分光光度儀(spectrophotometer) 測定吸光值後，即可推知該化學物質在溶液中的濃度。

化學物質在波長 λ 的吸光值(A_λ ; absorbance)定義為 $A_\lambda = \log(I_0/I)$ ， I_0 (incident light density): 為分光光度儀所放出波長 λ 的光束強度， I (transmitted light intensity)為 I_0 經過溶液後，所穿透出的光束強度。

(1) 第一天

細胞種類	試様	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
10%FBS HT29	WT	1.246	1.592	1.385	1.827	2.014	1.817	1.460	1.528	1.049	0.857	1.4775
	KO	0.584	0.599	0.561	0.597	0.595	0.573	0.663	0.511	0.783	0.633	0.6099
5%FBS HCT116	WT	0.393	0.441	0.489	0.463	0.554	0.473	0.678	0.603	0.633	0.411	0.5138
	KO	0.373	0.351	0.350	0.417	0.413	0.414	0.400	0.373	0.466	0.389	0.3946

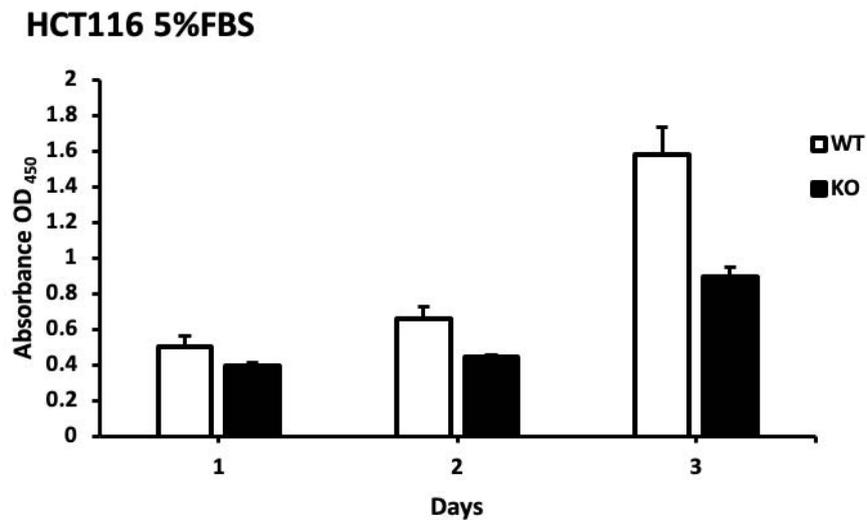
(2) 第二天

細胞種類	試様	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
10%FBS HT29	WT	1.331	1.194	1.018	1.518	1.109	2.123	1.965	1.750	2.070	1.579	1.5657
	KO	0.942	0.710	0.724	0.746	0.754	0.949	1.031	0.786	0.948	0.823	0.8412
5%FBS HCT116	WT	0.479	0.578	0.685	0.597	0.728	0.621	0.863	0.787	0.734	0.462	0.6534
	KO	0.470	0.424	0.466	0.438	0.515	0.430	0.503	0.435	0.345	0.423	0.4449

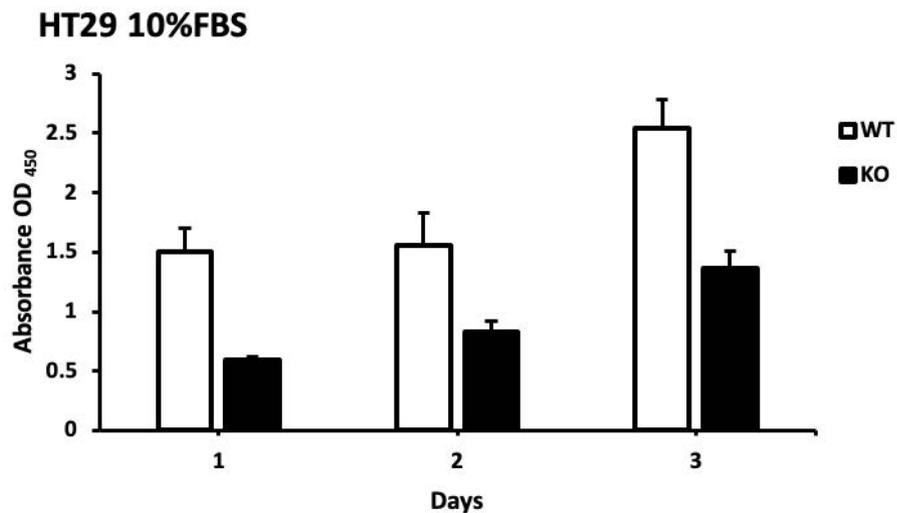
(3) 第三天

細胞種類	試様	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均
10%FBS HT29	WT	2.365	2.771	2.484	3.132	2.783	3.139	2.191	2.686	2.080	1.624	2.5255
	KO	1.196	2.456	1.910	1.838	1.527	1.240	1.495	0.772	1.245	1.108	1.3787
5%FBS HCT116	WT	1.234	1.599	1.635	1.846	1.815	1.619	1.963	1.397	1.431	1.039	1.5578
	KO	0.772	0.902	0.925	0.893	0.977	0.846	0.820	0.639	1.444	1.256	0.9474

2. 將以上數據繪製成長條圖比較



圖五、WT 及 KO HCT116 之 WST-1 吸光值數據
(WT 即為 wild type，KO 即為 EpCAM knockout)

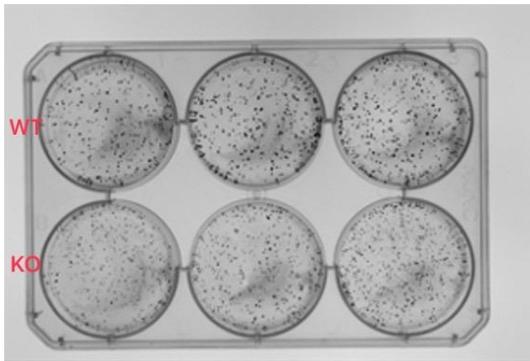


圖六、WT 及 KO HT29 之 WST-1 吸光值數據
(WT 即為 wild type，KO 即為 EpCAM knockout)

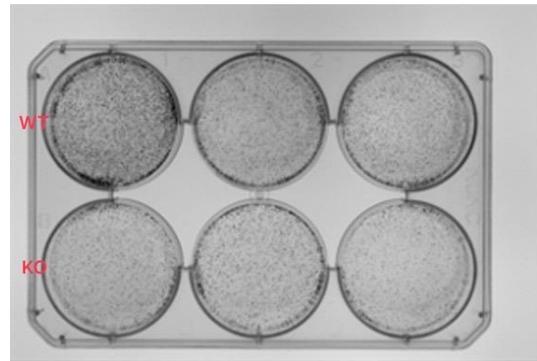
確認 EpCAM knockout 細胞有確實剔除 EpCAM 後，接下來我們利用細胞存活率試驗觀察 EpCAM 是否會對癌細胞的增生造成影響。先利用 ELISA Reader 測量細胞的吸光值數據，在轉換成長條圖比較。根據圖五及圖六可以觀察到，不論是 HT29 還是 HCT116 細胞中含有 wild type 細胞檢測出的吸光值數值都比 EpCAM knockout 高，可以證實 EpCAM 會促進大腸直腸癌細胞的增生。

四、細胞群落實驗

(一) 白光拍照

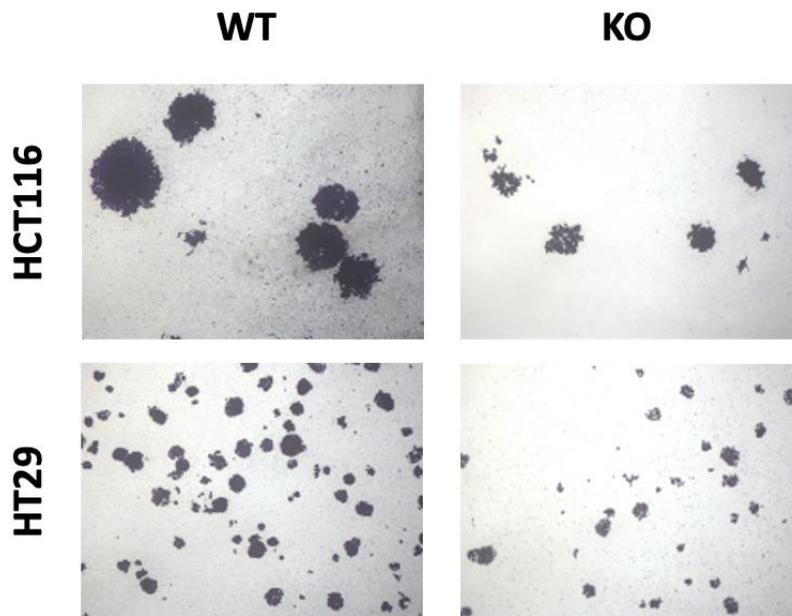


圖七、HCT116 cell



圖八、HT29 cell

(二) 顯微鏡下拍照



圖九、HCT116 和 HT29 的 wild type 和 knockout 群落生長情況

為了確認 EpCAM 是否會造成癌細胞的群落生長，我們利用細胞群落實驗來觀察。白光拍照之照片無法直接以肉眼分辨細胞群落之多寡。利用顯微鏡拍照觀察到無論是 HCT116 和 HT29 的群落生長情況 wild type 都較 EpCAM knockout 組別多，可以確認 EpCAM 會增進癌細胞群落生長。

五、轉移與侵入能力分析

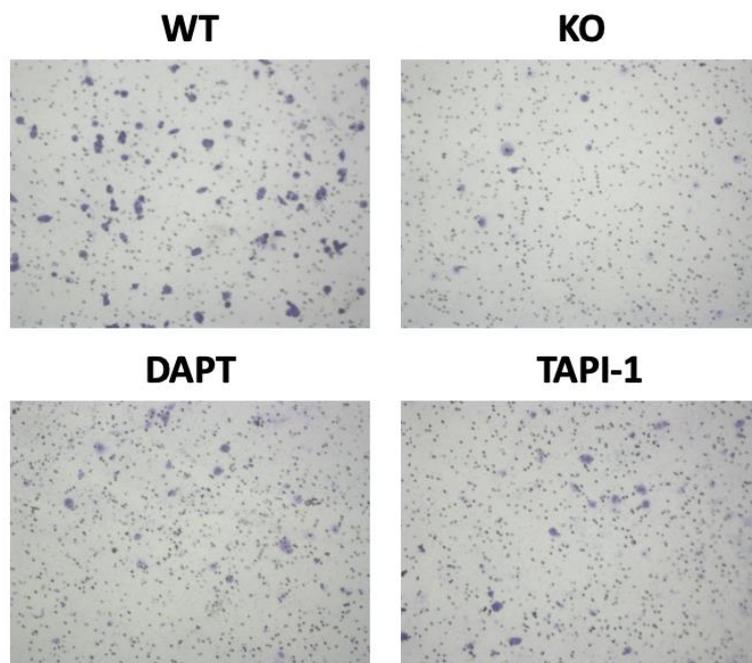
γ -secretase 是一種位於細胞膜內的複合蛋白酶，可在跨膜結構域內的殘基處切割單程跨膜蛋白，其中包含 EpCAM，將 EpCAM 之 EpICD 切下進入核；而 ADAM17 (A disintegrin and metalloproteinase 17) 能促使膜結合蛋白脫落，如 EpCAM 之 EpEX 切下造成釋出。

DAPT 和 TAPI-1 則分別為 γ -secretase 和 ADAM17 的抑制劑，我們在細胞中加入這兩種藥物以抑制 γ -secretase 和 ADAM17 的作用，使 EpCAM 無法分離為 EpEX 與 EpICD，觀察是否會對細胞的轉移與侵入能力造成影響。

細胞株：HCT116

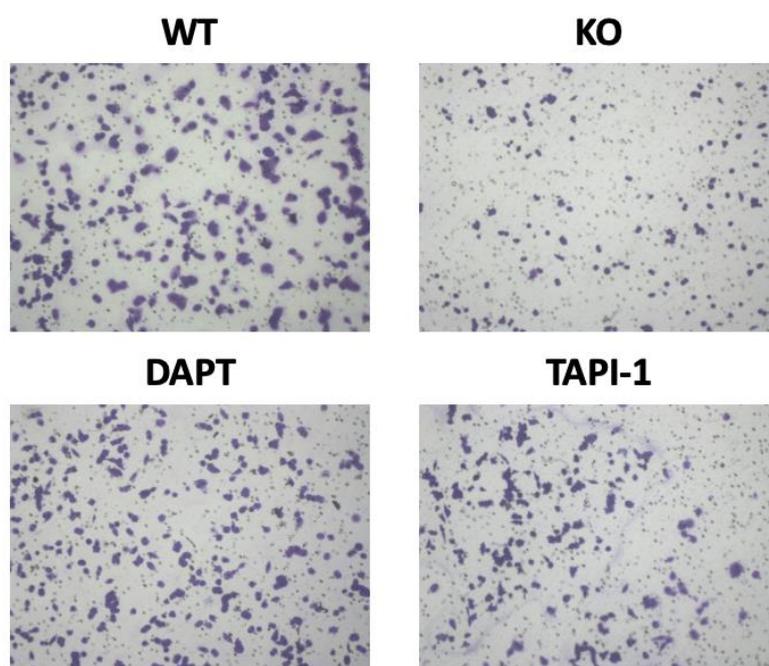
(一) 顯微鏡下拍照

1. 轉移能力分析



圖十、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞轉移情況

2. 侵入能力分析



圖十一、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞侵入情況

(二) 細胞數量

1. 轉移能力分析

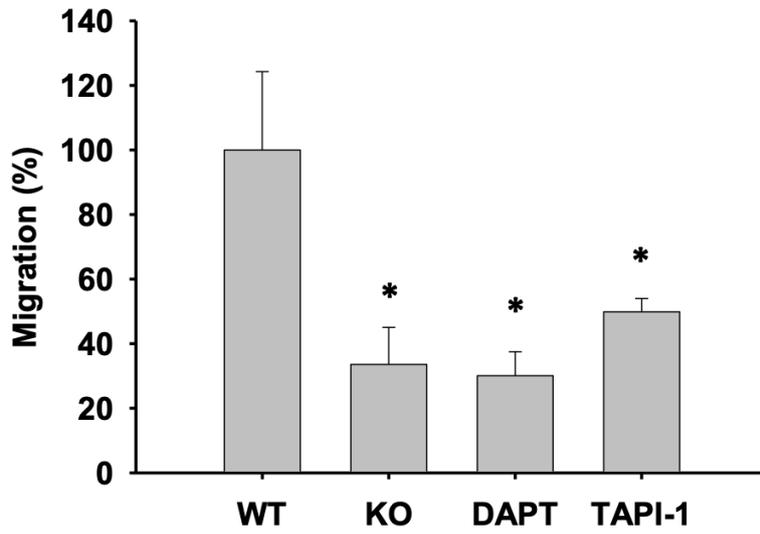
試樣	1	2	3	平均
WT	379	232	299	303
KO	110	64	132	102
DAPT	117	75	82	91
TAPI-1	151	164	139	151

2. 侵入能力分析

試樣	1	2	3	平均
WT	1651	1294	1422	1455
KO	396	269	344	336
DAPT	1019	817	1143	993
TAPI-1	804	684	826	771

(三) 將以上數據繪製成長條圖比較

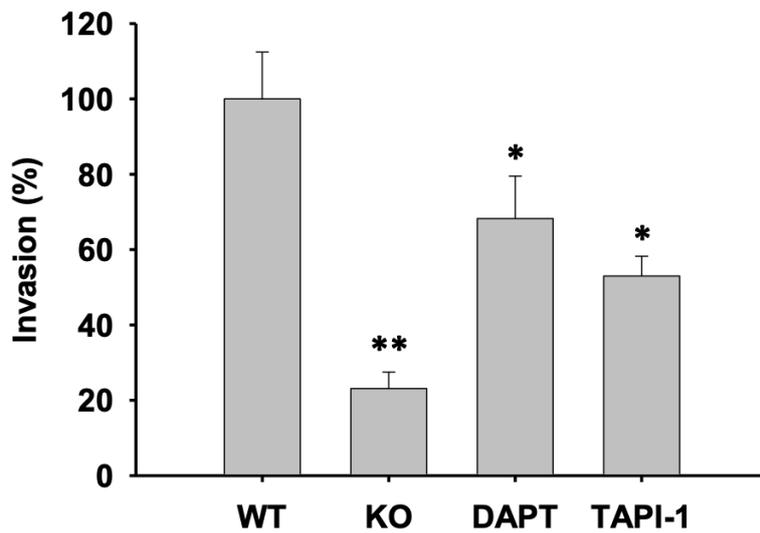
1. 轉移能力分析



圖十二、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞轉移數量統計

* $p < 0.05$

2. 侵入能力分析



圖十三、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞侵入數量統計

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

為了確認 EpCAM 是否會造成癌細胞的轉移及侵入，我們利用細胞轉移與侵入能力進行分析。顯微鏡下的照片中被染為紫色的細胞即為有轉移及侵入現象的細胞，較難直接分辨細胞數的多寡。利用 Image j 計數軟體可以得到確切的細胞數目，再轉為長條圖後，由圖十二及圖十三可以確認 EpCAM 會促進癌細胞的轉移及侵入，且 DAPT 和 TAPI-1 藥物也可以有效的抑制 EpCAM 的訊息傳遞，減少癌細胞的轉移及侵入。

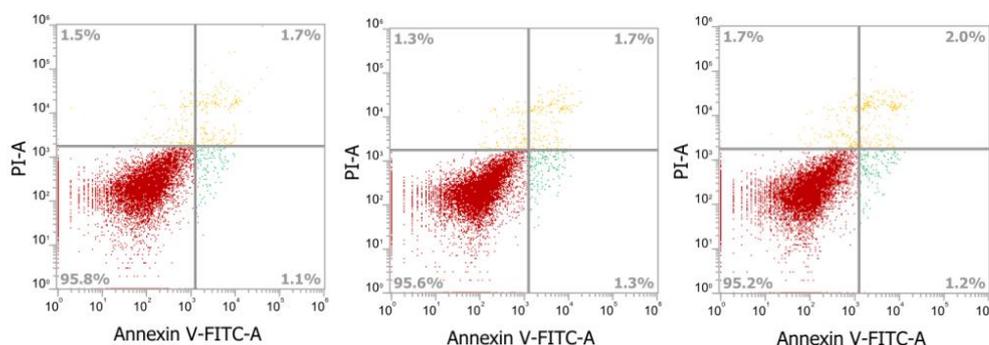
六、細胞凋亡試驗

免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 是一種抗體類型，IgG 約佔人體血清抗體的 75%，是血液循環中最常見的抗體類型。將 Normal mouse IgG 抗體和 EpCAM 中和性抗體分別加入癌細胞中作為對照組及實驗組，藉以觀察 EpCAM 中和性抗體是否可以促成細胞凋亡。

以流式細胞儀分析，橫軸為 Annexin-V 染色情況，縱軸為 PI 染色情況，能將得出的數據分為四個象限，雙染的第一象限及 PI 單染的第二象限為晚期凋亡或壞死細胞 (Annexin-V⁺, PI⁺) (Annexin-V⁻, PI⁺)，無染色的第三象限為活細胞 (Annexin-V⁻, PI⁻)，Annexin-V 單染的第四象限則為早期凋亡細胞 (Annexin-V⁺, PI⁻)。

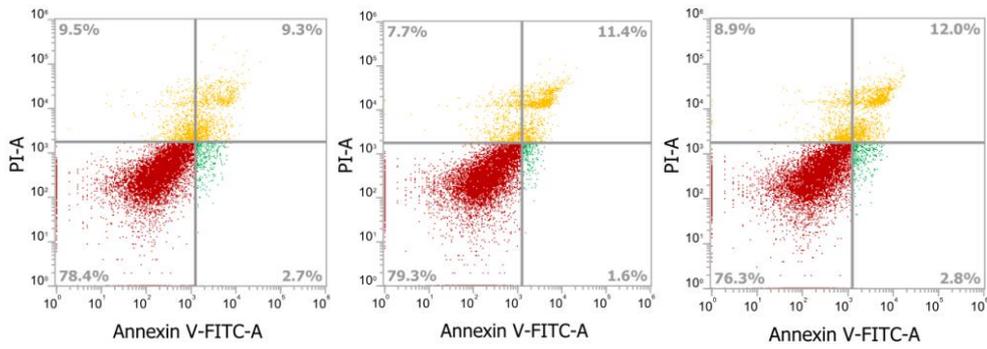
(一) 流式細胞儀紀錄結果 (圖中左下角%數為存活細胞比例)

1. HCT116 細胞以 normal IgG 抗體處理



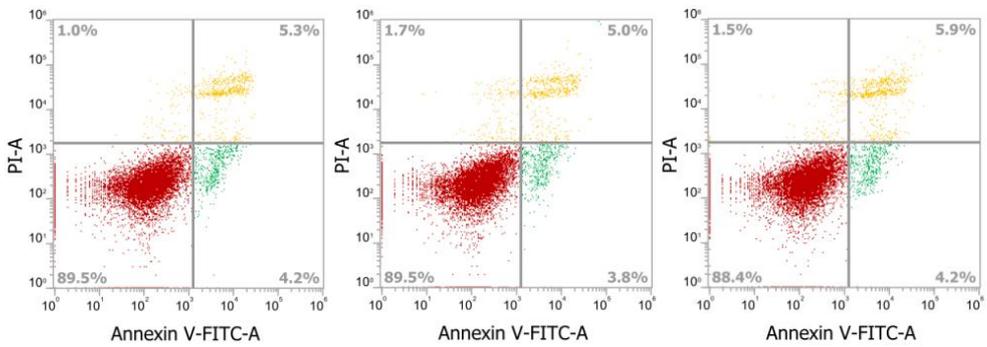
圖十、HCT116 對照組

2. HCT116 細胞以 EpCAM 中和性抗體處理



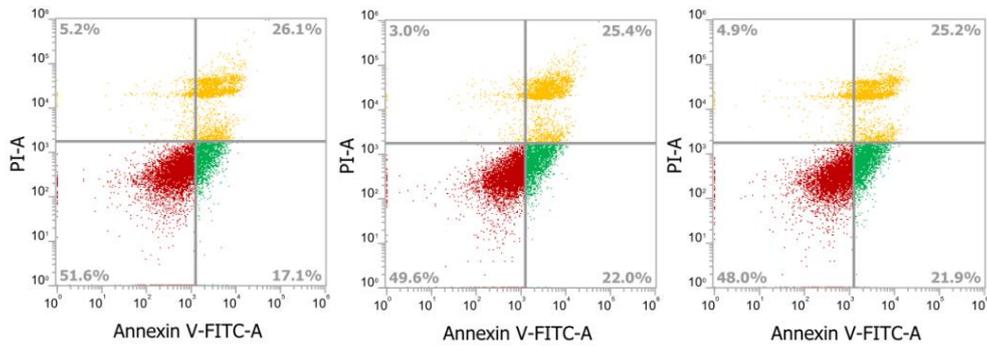
圖十一、HCT116 實驗組

3. HT29 細胞以 normal IgG 抗體處理



圖十二、HT29 對照組

4. HT29 細胞以 EpCAM 中和性抗體處理

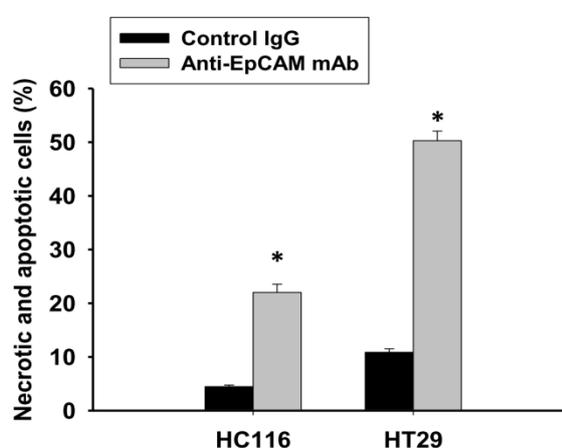


圖十三、HT29 實驗組

(二) 凋亡細胞比例 (100%-存活細胞比例)

細胞株	抗體	1	2	3	平均
HCT116	Normal IgG 抗體	4.2%	4.4%	4.8%	4.5%
	EpCAM 抗體	21.6%	20.7%	23.7%	22.0%
HT29	Normal IgG 抗體	10.5%	10.5%	11.6%	10.9%
	EpCAM 抗體	48.4%	50.4%	52.0%	50.2%

(三) 將以上數據繪製成長條圖比較



圖十四、Control IgG 和 EpCAM 中和性抗體處理 HCT116 和 HT29 細胞之細胞壞死與凋亡比例。* $p < 0.05$

為了確認 EpCAM 中和性抗體是否可以促使癌細胞凋亡，我們利用流式細胞儀測得細胞凋亡比例。由圖十四可以觀察到在 HCT116 和 HT29 細胞中加入 EpCAM 中和性抗體比加入控制組 normal IgG 抗體的細胞凋亡比例明顯上升，HT29 甚至上升近 40% 之多，確認 EpCAM 中和性抗體可以有效地促使細胞凋亡。

肆、 結論與未來展望

一、 結論

在研究初期，我們分別將 HCT116 與 HT29 兩種大腸癌細胞株的 EpCAM knockout 作為實驗組，先透過西方墨點法 (Western blotting) 與即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR) 兩種實驗分析細胞株 EpCAM 的蛋白質與基因表現量。比對 wild type 與 EpCAM knockout 細胞株的實驗結果可以發現，wild type 的 EpCAM 無論是蛋白質和基因皆表現量高而 knockout 表現量幾乎消失，確認細胞的 knockout 樣本中有確實剔除 EpCAM。

接著，我們以兩種大腸癌細胞的 wild type 以及 EpCAM knockout 樣本進行細胞生長率與細胞群落實驗，分析細胞的生長狀況，而不論是 HCT116 還是 HT29 細胞株，都能觀察到 wild type 的生長狀況較為顯著，進而推斷 EpCAM 能夠促進癌細胞的增生能力。再以同樣的 wild type 與 EpCAM knockout 樣本進行細胞轉移與侵入能力分析，而實驗結果也發現 wild type 有轉移與侵入現象的細胞較多，推斷出 EpCAM 亦能夠促進癌細胞的轉移與侵入。此外以 DAPT (γ -secretase 抑制劑) 與 TAPI-1 (ADAM17 抑制劑) 處理之細胞樣本其轉移與侵入現象的細胞數量也較少，推斷是因為抑制劑造成 EpCAM 無法進行裁切，藉以抑制 EpEX 作為配體的結合阻斷 EpCAM 訊息的傳遞，及減少 EpICD 進入細胞核，使得細胞轉移與侵入能力減弱。

研究的最後一個階段我們利用兩種大腸癌細胞 (HCT116、HT29)，實驗組以 EpCAM 中和性抗體處理，控制組以 normal IgG 抗體進行處理，之後利用流式細胞儀 (Flow cytometry) 以 Annexin-V/PI 雙染色法進行細胞凋亡分析，觀察到有加入 EpCAM 中和性抗體的癌細胞細胞壞死與凋亡比例相對於控制組明顯提升了許多，推斷出此中和性抗體能夠阻斷 EpCAM 訊息的傳遞並引起細胞凋亡。

二、未來展望

大腸直腸癌是全球最常見的惡性腫瘤之一，雖然近年來醫學進步，但至今仍未找出治療癌症最有效的療法。我們藉由探討 EpCAM 在癌症中的作用，希望可以找到調控癌症生長、增生及轉移的關鍵。另外，EpCAM 中和性抗體已經成功被研發出來，也在我們的研究中證實其確實可以有效地造成大腸直腸癌細胞凋亡，期許在未來能廣泛地應用在癌症的治療中。之後我們將再進一步分析 EpCAM 對 Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)、生長因子(growth factors)和細胞激素(cytokines)的表現之影響，以及受調節的膜內蛋白質裂解酵素是否受到影響。藉此可以觀察到 EpCAM 對腫瘤微環境的影響，更深入地探討 EpCAM，為找出治療癌症的有效療法盡一份心力。

伍、 參考資料

- 一、Dorothea Maetzel, Sabine Denzel, Brigitte Mack, Martin Canis, Philip Went, Michael Benk, Cuong Kieu, Peer Papior, Patrick A. Baeuerle, Markus Munz, Olivier Gires. (2009). Nuclear signaling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology*. 11(2), 162-171.
- 二、Hai Chen and Jian-ping Mao. (2012). The research progress on tumor immune escape built in relations of tumor and T lymphocytes. *China Biotechnology*, 32(10), 86-92.
- 三、Hao-Nien Chen, Kang-Hao Liang, Jun-Kai Lai, Chun-Hsin Lan, Mei-Ying Liao, Shao-Hsi Hung, Yi-Ting Chuang, Kai-Chi Chen, William Wei-Fu Tsuei, Han-Chung Wu. (2020). EpCAM signaling promotes tumor progression and protein stability of PD-L1 through the EGFR pathway. *Cancer Research*, 80, 5035-5050.
- 四、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. (2018). Extracellular domain of EpCAM enhances tumor progression through EGFR signaling in colon cancer cells. *Cancer Letters*. 433, 165-175.
- 五、Laura Keller, Stefan Werner, Klaus Pantel. (2019). Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 3(6), 165-180.

- 六、Maximilian Boesch, Gilbert Spizzo, Andreas Seeber. (2018). Concise Review: Aggressive Colorectal Cancer: Role of Epithelial Cell Adhesion Molecule in Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *STEM CELLS Translational Medicine*, 7(6), 495-501.
- 七、Mei-Ying Liao, Jun-Kai Lai, Mark Yen-Ping Kuo, Ruei-Min Lu, Cheng-Wei Lin, Ping-Chang Cheng, Kang-Hao Liang, Han-Chung Wu. (2015). An anti-EpCAM antibody EpAb2-6 for the treatment of colon cancer. *Oncotarget*, 6(28), P2947-24968.
- 八、Patrick Alexander Baeuerle and Olivier Gires. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer*. 96(3), 417-423.
- 九、Ulrike Schnell, Vincenzo Cirulli, Ben N G Giepmans. (2013). EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828(8), 1989-2001.
- 十、陳盈吟(Chen Ying-Yin)；陳崇裕(Chen Chung-Yu). 中西整合醫學雜誌；21 卷 1 期 (2019/6/30) ， P1-7.

【評語】 090021

整體實驗目標簡明，實驗結果雖在初期階段，缺少統計分析，但有潛力。

1. 數據繪製成長條圖之後，數據可以不用再放入
2. 數據應該有統計分析