

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	080010
參展科別	生物化學
作品名稱	探討CTEN影響NF- κ B路徑與細胞遷移之關聯性

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	江慧玉
作者姓名	魏亦渲

關鍵詞	<u>CTEN、NF-κB路徑、細胞遷移</u>
-----	--

作者簡介



我是北一女中科學班的魏亦渲。我在高一時對生化領域的研究以及癌症的治療感興趣，因此加入廖憶純教授的實驗室學習生化實驗並進行專研。進行實驗的將近兩年半我很感謝廖憶純教授給我機會進入實驗室並給我很多幫助和指導，也感謝江慧玉老師的指導和建議，以及實驗室的學長姐們的照顧，讓我可以順利完成我的專題研究，參加這次的國際科展。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區 別：北區

科 別：生物化學科

作品名稱：探討 CTEN 影響 NF- κ B 路徑與細胞遷移之關聯性

關鍵詞：CTEN、NF- κ B 路徑、細胞遷移

編 號：

探討 CTEN 影響 NF- κ B 路徑與細胞遷移之關聯性

摘要

C-terminal tensin-like (CTEN) 是種可調控細胞遷移的蛋白質。在正常細胞中，CTEN 表現量低且多位於細胞質；然而癌細胞的 CTEN 則是過量表現於細胞核中，且目前研究指明 CTEN 可能影響 NF- κ B 路徑的活化，因此本研究探討癌細胞核中 CTEN 對 NF- κ B 訊息傳導路徑，以及細胞遷移癌化的機制。目前研究結果證實：表現量位於癌細胞核的實驗組對於 NF- κ B 轉錄活性有顯著的提升(其 p -value < 0.05)，且與空白對照組比較，其提升細胞遷移的能力約增加 11 倍。實驗挑選六種與細胞發炎、癌化相關的基因，以 qPCR 測定 CTEN 與其表現量的關係，歸納結果得知癌細胞核中 CTEN 與這些基因沒有明顯的正相關。本研究接續研究 CTEN 影響 NF- κ B 路徑及其與 EMT 的關係，瞭解 CTEN、基因在這些路徑的交叉作用，將可提供更為新穎的癌症治療干預靶點。

Abstract

C-terminal tensin-like (CTEN) is a protein that regulates cell migration. In normal cells, CTEN is expressed at low levels and primarily localized in the cytoplasm. However, in cancer cells, CTEN is overexpressed and found predominantly in the nucleus. Current studies suggest that CTEN may influence the activation of the NF- κ B signaling pathway. This research investigates how nuclear CTEN in cancer cells affects the NF- κ B pathway and the mechanisms of migration and cancer progression. Our results indicate that in experimental groups where CTEN is expressed in the cancer cell nucleus, there is a significant increase in NF- κ B transcriptional activity (p -value < 0.05). Compared to the control group, cell migration ability increased approximately 11-fold. Six genes associated with inflammation and carcinogenesis were selected for qPCR analysis to evaluate their expression in relation to CTEN levels. Findings show no significant positive correlation between nuclear CTEN and the expression of these genes. This study continues to explore the role of CTEN in influencing the NF- κ B

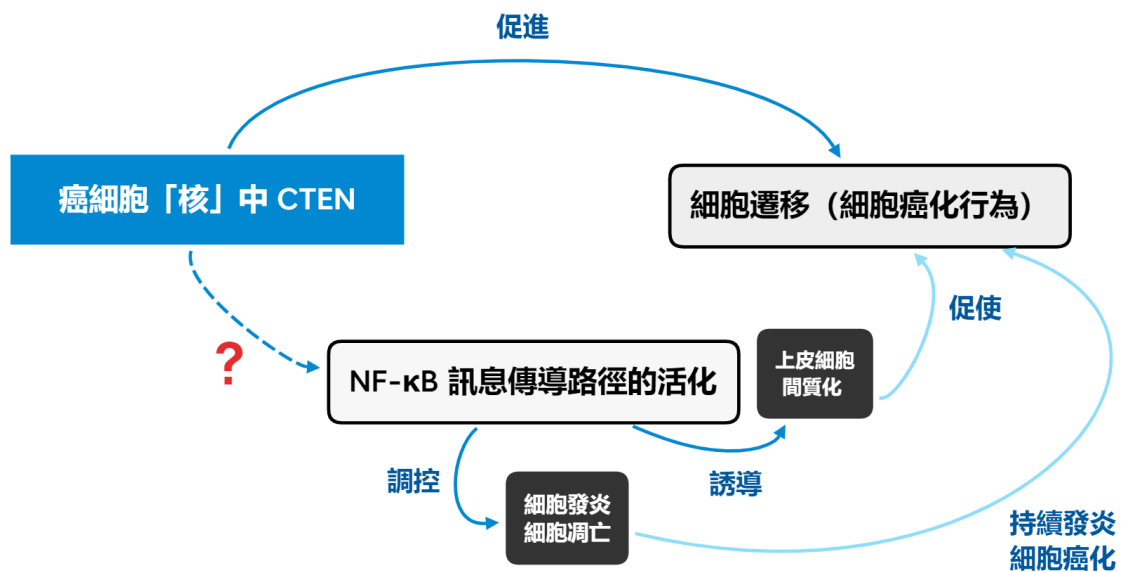
pathway and its relationship with epithelial-mesenchymal transition (EMT). Understanding CTEN's interaction with genes in these pathways may reveal novel targets for cancer therapeutic interventions.

壹、前言

一、研究動機

癌症一直是醫藥界想要突破、尋求療法的課題。當體內細胞的致癌基因被活化或是抑癌基因喪失功能時，即可能導致細胞癌化。Nuclear factor kappa B (簡稱 NF- κ B) 是與致癌相關的重要轉錄因子，抑制 NF- κ B 訊息傳導路徑有助於抑制細胞癌化，因此開發 NF- κ B 訊息傳導路徑的抑制物為現今研發癌症藥物的策略之一。然而，若直接使用抑制 NF- κ B 的藥劑，則可能會影響 NF- κ B 正常的生理功能，例如：破壞人體基本防禦能力、使免疫力下降。

從文獻研究探討，C-terminal tensin-like (簡稱 CTEN) 蛋白質在癌細胞中會異常富集在細胞核內。此外，CTEN 在細胞核中會與 NF- κ B 的次單元體 p65 蛋白作用，具有調控 NF- κ B 在癌細胞中活化的潛力，是一個新穎且值得開發的治療標的。然而，癌細胞核內的 CTEN 是否能調控 NF- κ B 訊息傳導路徑？CTEN 是否藉由調控 NF- κ B 而促進細胞遷移的癌化行為（圖一）？這是本研究欲探究、瞭解的機制，期望此研究結果能為設計治癌藥物提供更明確的想法與策略。

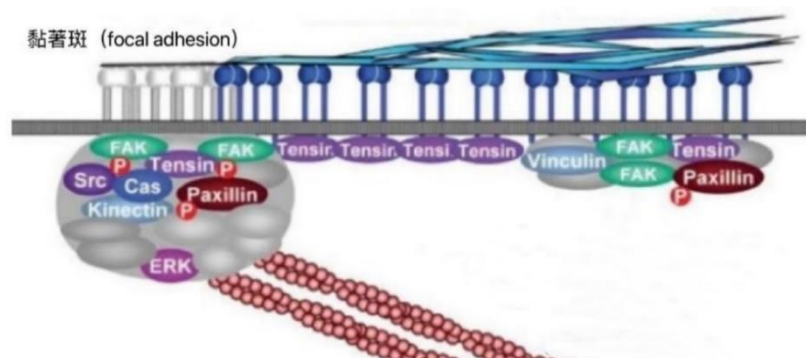


圖一、癌細胞核中 CTEN、NF- κ B 訊息傳導路徑與細胞癌化之關係示意圖（作者親繪）

二、研究原理

(一) C-terminal tensin-like (簡稱 CTEN) 蛋白質

CTEN 為黏著斑 (focal adhesion) 上 tensin 蛋白質家族的其中一員 (如圖二)。黏著斑是一種作為細胞與細胞間質的物理連結、會以新生、瓦解調控細胞移動的大型蛋白質複合體。Tensin family 是位在 focal adhesion 的蛋白質家族，由 Tensin 1、Tensin 2、Tensin 3 和 Tensin 4 (即 CTEN) 所組成。在多數的正常細胞內，CTEN 多分布於細胞質，且表現量極低或幾乎偵測不到；然而，在大腸癌細胞中，CTEN 卻呈現明顯較高的表現量，且主要富集在癌細胞的細胞核內 (Hong et al., 2019; Liao et al., 2009)。位於細胞核內的 CTEN 會提升癌細胞的遷移與侵襲能力 (Liao et al., 2009)，但目前尚未瞭解此過程的反應機理。



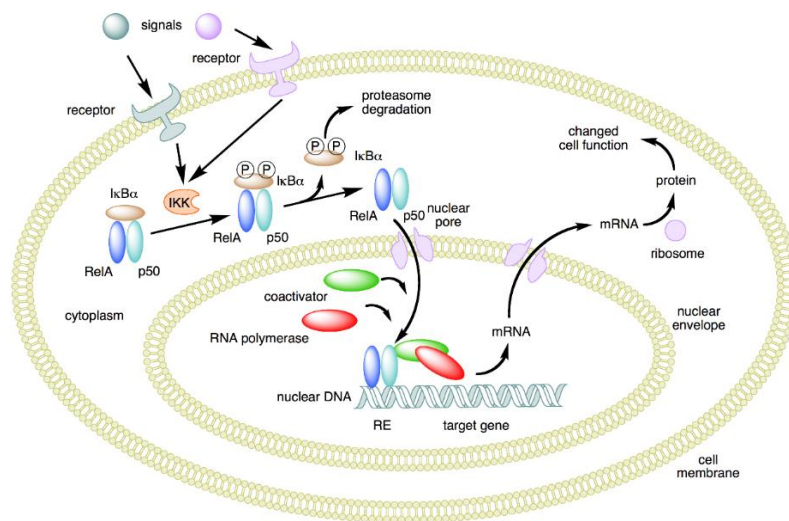
圖二、focal adhesion 及 tensin family 位置示意 (Pai et al., 2017)

(二) Nuclear factor kappa B (簡稱 NF- κ B)

NF- κ B 是由五個蛋白質所組成的轉錄因子家族，包含 p65 (RelA)、RelB、c-Rel、p105/p50 (NF- κ B1) 與 p100/p52 (NF- κ B2)，可調控發炎、免疫反應、細胞凋亡、增生及發育等。NF- κ B 參與的訊息傳導路徑有 canonical 和 alternative 兩途徑，其中主要為 canonical pathway，如圖三。此路徑會受到因發炎反應產生的細胞激素 (cytokine) 以及壓力刺激而被活化，使得由 I κ B α 、p65 及 RelA 組成的 I κ B complex 將 I κ B kinase 磷酸化，並運送至蛋白酶體 (proteasome) 降解。這過程使得原本位於細胞質，且與 I κ B complex 結合的非

活化 NF- κ B 被釋放出，呈現活化狀態進入細胞核中，進一步與 DNA 結合，並調控下游基因表現（Vallabhapurapu and Karin, 2009）。

過去研究指出，在許多癌細胞中皆觀察到 NF- κ B 呈現持續活化的狀態，例如大腸癌、乳癌、肝癌、骨髓癌等（Curran et al., 2002; Gao et al., 2007; Kim et al., 2003; Ni et al., 2007; Sun et al., 2007）。持續活化的 NF- κ B 與癌細胞的存活及增生有關，且誘導上皮細胞間質化（epithelial mesenchymal transition；EMT）而促使細胞遷移（Xia et al., 2014）。

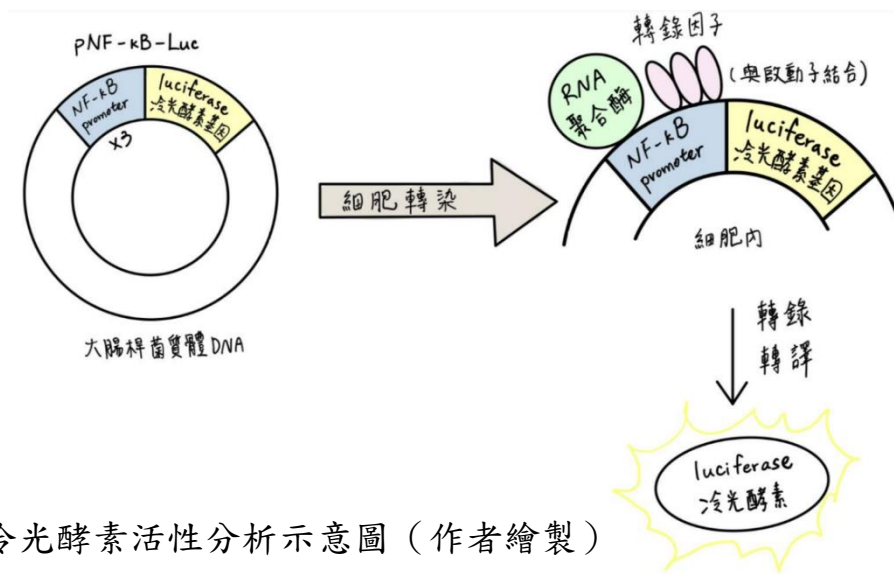


圖三、NF- κ B 訊息傳導路徑示意圖（來源：Wiki）

（三） CTEN 對大腸癌細胞之遷移與侵襲能力的影響

一般細胞中 CTEN 多位於黏著斑，然而過去研究指出大腸癌細胞中的 CTEN 會大量表現在細胞核內（Liao et al., 2009）。另一研究於細胞轉染時，利用 nuclear localization signal（NLS）標記 CTEN，結果發現 NLS-CTEN 對於細胞遷移與侵襲能力的影響明顯高於 wild-type CTEN（王，2017；涂，2019）。此外，目前已知提高大腸癌細胞的生長因子及細胞激素後，可提高 CTEN 之表現量（Hung et al., 2014），顯示癌症遷移與 CTEN、生長因子以及細胞激素應有密切關係。

(四) 實驗操作會採用西方墨點法 (Western blotting) 先分析目標蛋白質，即 CTEN 的表現量；再以雙螢光酵素活性檢測，亦稱為冷光酵素活性分析，進一步分析細胞中 NF- κ B 轉錄活性。將含有三段 NF- κ B 啟動子序列及螢光蟲冷光酵素基因的質體轉染至細胞中，一日後，測量其冷螢光強度即可得知 NF- κ B 之轉錄活性 (圖四)。



圖四、冷光酵素活性分析示意圖 (作者繪製)

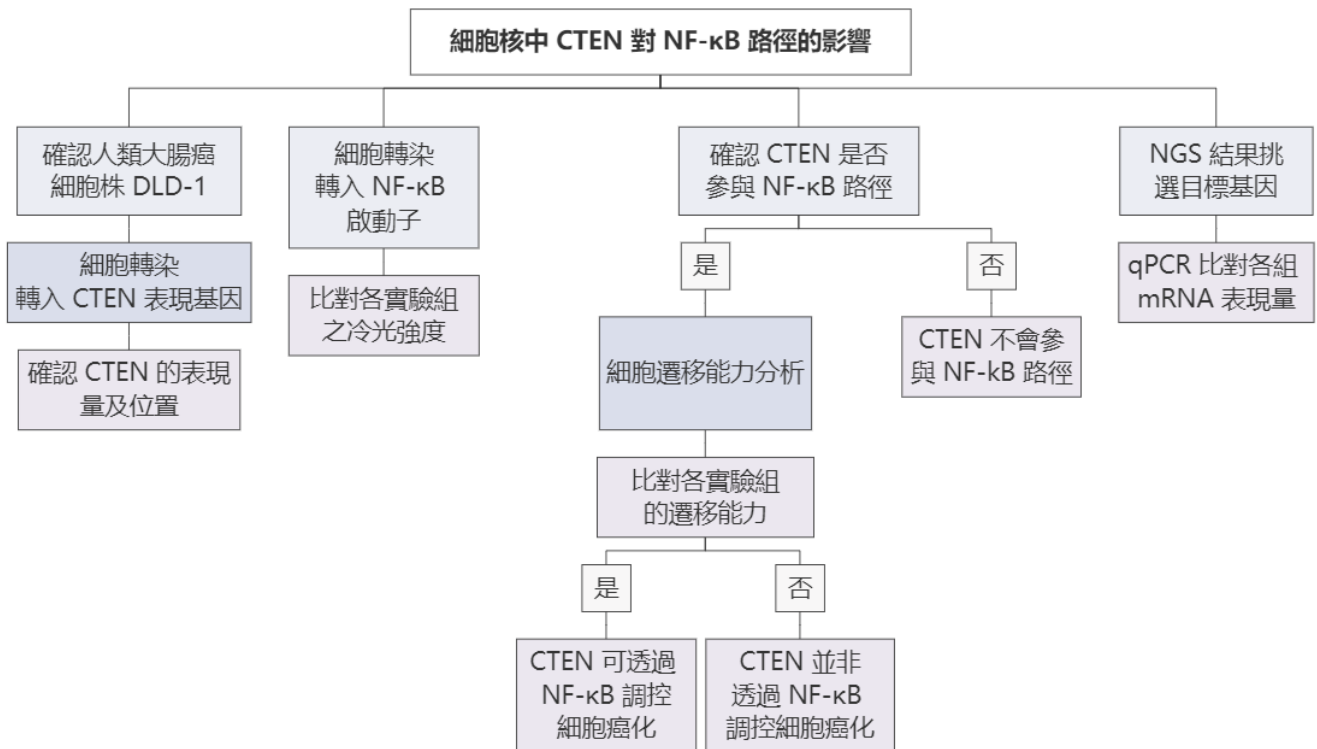
(五) 為了進一步瞭解細胞核中的 CTEN 對於目標基因表現的影響，後續實驗設計會採用次世代定序 (Next Generation Sequencing, 簡稱 NGS) 的方式，挑選較為符合本研究方向的目標基因。接著再以 qPCR 進一步分析此目標基因在(1)不帶有外源性 CTEN 之 EV 組、(2)外源性 CTEN 多分布於細胞質之 WT-CTEN 組以及(3)外源性 CTEN 累積於細胞核之 NLS-CTEN 組，此三個實驗組中的表現量。

三、研究目的

- (一) 探究 CTEN 表現量與 NF- κ B 路徑的關係
- (二) 探討 CTEN 在細胞中不同的分布位置對於 NF- κ B 路徑的影響
- (三) 探討細胞核中 CTEN 是否藉由 NF- κ B 路徑影響癌細胞的遷移能力
- (四) 探討細胞核中 CTEN 對目標基因的影響

貳、研究方法或過程

一、 研究架構



圖五、研究架構圖（作者繪製）

二、 研究器材與藥品

（一） 實驗材料：

1. DLD-1: 人類大腸癌細胞株
2. pNF-κB-Luc：帶有 3 段重複之 NF-κB 結合序列的啟動子，與螢光蟲冷光酵素基因 (firefly luciferase gene, Luc) 的質體 DNA
3. pcDNA3-myc：帶有 myc tag 的質體 DNA
4. pcDNA3-myc-CTEN：帶有 CTEN 基因的 pcDNA3-myc 質體 DNA
5. pcDNA3-myc-NLS-CTEN：帶有 nuclear localization sequence (NLS) 之 CTEN 基因的 pcDNA3-myc 質體 DNA
6. 大腸桿菌 DH5α

(二) 實驗藥品與試劑

Lipofectamine 2000 transfection reagent	胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)	結晶紫 (crystal violet)
High glucose DMEM (細胞培養基)	1X PBS (Phosphate buffered saline)	trypsin-EDTA
甲醇 (methanol)	Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1910)	
Serum-free 細胞培養液	working solution (serum-free 細胞培養液與 Matrigel 以 25 : 1 配成)	
乙醇	Sample buffer	
iScript cDNA Synthesis Kit	qPCR machine	
滅菌釜	RNA spin mini (GE Healthcare, 25-0500-71)	

(三) 實驗器材

培養皿	1.5mL eppendorf	吸量管	電動分注器
無菌吸管	細胞培養箱	恆溫水浴槽	離心機
顯微鏡	生物安全櫃	Transwell	電泳槽
濕式轉膜系統	UVP 影像系統	P1000/p200/p20/p2 pipetman	
分光光度計	超音波儀	nanodrop（超微量分光光度計）	
微盤式螢光冷光偵測儀 (Luminescent image analyzer, LS-304)			

(四) qPCR 引子

基因	引子序列	長度 (mer)
PTPN22	F: 5' -ACAACTGTGGCTGAGAAGCCCA -3'	22
	R: 5' - GTAGCTGGAATCCTCATCAGAGG -3'	23
TGM2	F: 5' - GCAGTGACTTTGACGTCTTTGCCC -3'	22
	R: 5' - GTAGCTGTTGATAACTGGCTCCACG -3'	
PLK2	F: 5' - CAACAATGGTGCTCACATGAGCC -3'	23
	R: 5' - GGAGCATCTGTTGCTGGGAAAAC -3'	

(五) Western blot 抗體

一次抗體	物種	反應條件
Anti-Myc antibody (Cell signaling, #2276)	Mouse	1:1000、4°C、 overnight
Anti- α -tubulin antibody (Sigma, T6074)	Mouse	1:5000、RT、1 hr
Anti-PARP antibody (Cell signaling, #9532)	Rabiiy	1:1000、4°C、 overnight
二次抗體	物種	反應條件
<i>Peroxidase</i> -labeled affinity purified antibody to mouse IgG (H+L) (KPL, 474-1806)	Goat	1:10000、RT、1 hr
<i>Peroxidase</i> -labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) (KPL, 474-1806)	Goat	1:10000、RT、1 hr

三、 實驗步驟

(一) 細胞相關實驗：

1. 細胞培養與繼代：將人類大腸癌細胞株 DLD-1 置入含有 10% 的 fetal bovine serum (FBS)、100 units/mL penicillin、100g/mL streptomycin 的 high glucose (4.5g/L) Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 中，再將其放入 37°C 含有 5% CO₂ 的細胞培養箱內。
2. 細胞轉染
 - (1) 於 DLD-1 細胞株滿度 70-90% 時進行轉染。
 - (2) 以 100 μ l serum-free EMEM 稀釋 1 μ g 質體 DNA (pNF- κ B-Luc 和 pRL-TK)。以 100 μ L serum-free EMEM 稀釋 5 μ L Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, 11668-019)。
 - (3) 將上述步驟 1、2 兩溶液以 1:1(v/v) 混合均勻，靜置 5 min。
 - (4) 在六孔盤中加入 20 μ L 上述混合溶液，放置於 37°C 細胞培養

(二) 蛋白質分析與定量

1. BSA 蛋白質標準曲線

- (1) 取 10 μg Bovine Serum Albumin (BSA) 與 1.0 mL 1X PBS 配製成濃度為 10 mg/mL 的 A 溶液。再以逐步稀釋的方式，配製出胎牛血清蛋白標準溶液，如下表一所示。

表一、BSA 蛋白質標準溶液

編號	精取濃溶液體積	1X PBS buffer	濃度
B	120 μL A 溶液	1080 μL	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
C	400 μL B 溶液	100 μL	800 $\mu\text{g}/\text{mL}$
D	300 μL B 溶液	200 μL	600 $\mu\text{g}/\text{mL}$
E	200 μL B 溶液	300 μL	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$
F	100 μL B 溶液	400 μL	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- (2) 在 96 孔透明盤中放入 B~F 溶液各 5 μL ，再加入 reagent A (鹼性酒石酸銅溶液) 及 reagent S (界面活性劑) 50:1 (v/v) 混合溶液成為 25 μL ，最後加入 200 μL reagent B (稀釋福林試劑) 並避光 15 min。
- (3) 使用微量盤分光光度計測量 OD 650 吸光值，並將各標準溶液之吸光值進行數據處理，繪製成 BSA 蛋白質檢量線。

2. 蛋白質萃取及定量

- (1) 以 1mL 1X PBS 潤洗細胞培養盤。100 μL 加入 Cell lysis buffer，以細胞刮棒收集細胞並以 pipette 將液體及細胞沉澱收入 1.5 mL eppendorf 後，放入冰箱中 30 min。
- (2) 在 4°C 下，以 10000g 離心 10 min，將蛋白質上清液移至新的 eppendorf。在 96 孔透明盤中放入上清液各 2 μL 及 18 μL 超純水，再加入 reagent A 及 reagent S 以 50:1 (v/v) 混合溶液共 25 μL ，最後加入 200 μL reagent B 並避光 15 min。
- (3) 使用微量盤分光光度計測量 OD650 吸光值，並以此數值計算蛋白質濃度以用於蛋白質膠體電泳之樣本定量。

3. 蛋白質膠體電泳

- (1) 以計算確認過的蛋白質樣本濃度來計算 30 μg 蛋白質所需之樣本體積，並將蛋白質樣本以 2 $\times$ sample buffer (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% - ME (mercaptoethanol), 0.2% 溴酚藍及超純水於 1.5 mL eppendorf 配製成總體積 19.8 μg 溶液，再放入 95 $^{\circ}\text{C}$ 加熱槽內 10 min。
- (2) 進行電泳 10% SDS-PAGE，依照標準流程來操作。將製好的膠片裝至電泳槽中，並倒入電泳緩衝液 (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Gly, 0.1% SDS)，取 18 μL 於配製好之蛋白質樣本加入樣品槽，同時於最左端之樣品槽加入 marker，然後以 135V 進行電泳 80 min。

(三) 西方墨點法 western blotting

1. 將 PVDF 膜浸泡於 100% CH_3OH ，並在轉印槽倒入適量緩衝液 (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Gly, 10% CH_3OH)。在轉印夾中由負極到正極，依序放置海綿、濾紙、膠片、PVDF 轉印膜、濾紙、海綿。將轉印夾蓋上後放入轉印槽，並以 0.4 mA 進行轉印 1 hr。
2. 取出轉印完成的 PVDF 膜，加入 Gelatin-NET (50 mM Tris, 0.25% gelatin, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% tween-20, pH8.0) 於室溫下反應 1 hr。加入以 Gelatin-NET 稀釋之一級抗體於 4 $^{\circ}\text{C}$ shake overnight 反應。
3. 以 PBST 潤洗 10 min 共三次後，加入以 Gelatin-NET 稀釋之二級抗體，於室溫反應 1 hr 後，同樣以適量 PBST 潤洗 10 min 共三次。將 PVDF 膜至於塑膠盒中，加入 ECL 呈色劑 (Millpore) 溶液，均勻淋在 PVDF 膜上，取出 PVDF 膜後以 UVP 影像系統拍攝結果。

(四) 雙螢光酵素活性分析

1. 質體抽取及純化：

- (1) 將大腸桿菌菌液 5 mL、培養液 100 mL 及抗生素 0.1 mL 加入錐形瓶中，以鋁箔紙封緊培養約 16 hr。在 HiPure Midi Column 中加入 10 mL Equilibration Buffer，靜置。
- (2) 將菌液以 4000g 離心 10 min 後加入 4 mL Lysis Buffer，倒立搖勻五次後再靜置 5 min。加入 4 mL Precipitate Buffer 後，立即倒立搖勻直到沉澱物均勻混合，於室溫下再以 12000g 離心 10 min。
- (3) 用 pipette 取上清液至上述 column 中，將 column 放置於離心管，並加入 5 mL Elution Buffer。此時離心管收集的液體即包含 DNA。再加入 3.5 mL C₃H₈O 搖勻後放入 -20 °C 冰箱約 30-60 分鐘。
- (4) 將液體分裝至離心管後離心 30 min，以 pipette 除去上清液。加入 300 µL、70 % 酒精搖勻後離心 5 min 再除去上清液。以 200 µL TE（緩衝液 10mM Tris-HCl 及 1mM EDTA, pH8.0）回溶沉澱物至同一離心管中，並保存於 -20 °C 冰箱中。

2. 冷光酵素活性分析 Dual luciferase assay

- (1) 以無菌 PBS 潤洗細胞，再加入取自 Dual Luciferase Reporter Assay System（Promega, E1910）之 1X Passive Lysis Buffer 200 µL，於室溫下搖晃致出現白色細胞沉澱。以 pipetman 收集細胞沉澱及液體並於 44000g 離心 10 min
- (2) 在 96 孔不透明盤中加入 20 µL 細胞樣本液體，再加入溶解於 Luciferase Assay Buffer II 之 Luciferase Assay Substrate 50 µL。立即以螢光冷光偵測儀進行檢測，螢光讀值即表示細胞中螢火蟲冷光酶（firefly luciferase）的活性。再加入 Stop & Glo medium (Stop & Glo, Stop & Glo buffer) 50 µL 並立即以螢光冷光偵測儀進行檢測，螢光讀值即表示細胞中水母冷光酶（renilla luciferase）的活性。
- (3) 重複此實驗三次，以 excel 作圖並進行數據分析。

(五) 遷移能力分析

1. 將細胞液以 Serum-free 培養液調整濃度為 5×10^4 顆細胞 / mL。
2. 在 24 孔盤中加入含有 10% FBS 之細胞培養液 800 μ L，再放入 8 μ m transwell。取 250 μ L 混合均勻的細胞液加入 upper chamber 中，並置於 5% CO₂、37°C 細胞培養箱中，培養 24 小時後取出。
3. 除去 upper chamber 及 24 孔盤中的細胞培養液，加入含有 20% methanol 之 0.5% 結晶紫 700 μ L 後，放入 transwell 於常溫下染色 30 min。
4. 以 PBS 清洗，並將 transwell 內側的細胞以棉花棒清除後自然風乾。以相機拍下六個視野以 ImageJ 輔助進行細胞計數。

(六) RNA 分析

1. RNA 萃取及定量

- (1) 去除細胞培養液，以 PBS 5mL 潤洗兩次後，加入 1.5mL PBS 以細胞刮棒收及細胞，並以 200g 離心 5 分鐘去除上清液。
- (2) 加入 350 μ L Ral + 3.5 μ L B-ME 並 vortex 混勻後將溶液移至 purple ring nucleospin 並以 11000g 離心 1 分鐘。
- (3) 丟棄 purple ring，加入 350 μ L 70% ethanol pipetting 五次，將溶液轉移至 blue ring column 並以 11000g 離心 30 秒。
- (4) 加入 350 μ L MDB，以 11000g 離心 1 分鐘，移至新 tube 後加入 95 μ L DNase reaction mixture (rDNase : reaction buffer for rDNase=1:9) 靜置 15 分鐘。
- (5) 加入 200 μ L RAW2 以 11000g 離心 30 秒，移至新 tube 再加入 600 μ L RA3 以 11000g 離心 30 秒，再移至新 tube 後加入 250 μ L RA3，以 11000g 離心 2 分鐘，最後將 column 移至 nuclease-free collection tube。
- (6) 於 column 中心加入 40 μ L RNase free H₂O，以 11000g 離心 1 分鐘，此時 tube 內液體即含純化過之 RNA。

(7) 將 RNA 樣本以超微量分光光度計測量濃度後稀釋至 250 ng/ μ L

2. RNA 電泳

(1) 將電泳槽、製膠台泡於 3% 雙氧水中 15 分鐘。

(2) 以稀釋過之 6 μ L RNA (1500 ng) 及 6X loading dye 2 μ L + DEPC 水 (Diethyl pyrocarbonate) 配置 RNA 樣本。

(3) 以 0.24g Agarose powder + 20mL 1X TAE + 2 μ L SYBR 配置電泳膠，加入緩衝液 (1X TAE) 並於每個 well 加入 12 μ L RNA 樣本進行電泳。

(4) 以 UVP 影像分析系統確認 RNA 品質。

3. cDNA 製備

(1) 以 20 μ L tube 加入 4.8 μ L RNA 樣本並加入 1 μ L transcriptase、4 μ L 5X reaction mix、10.2 μ L nuclease-free H₂O。

(2) 依 kit 設定 RT 條件跑 30 分鐘後，將樣本保存於 -20°C 冰箱。

4. 定量 PCR (qPCR)

(1) 於 96 孔微量多孔盤中加入 0.5 μ L cDNA 樣本、7.8 μ L nuclease-free H₂O、0.6 μ L gene、10 μ L SYBR。

(2) 以 CFX connect 機器進行定量 PCR。

5. DNA 電泳

(1) 自 96 孔微量多孔盤各取一種基因之樣本。

(2) 以 0.4g Agarose powder + 20mL 1X TAE + 2 μ L SYBR 配置電泳膠，加入緩衝液 (1X TAE) 並於每個 well 加入 20 μ L 基因樣本及 4 μ L 6X purple loading dye 進行電泳。

(3) 以 UVP 影像分析系統分析 DNA 品質。

參、研究結果與討論

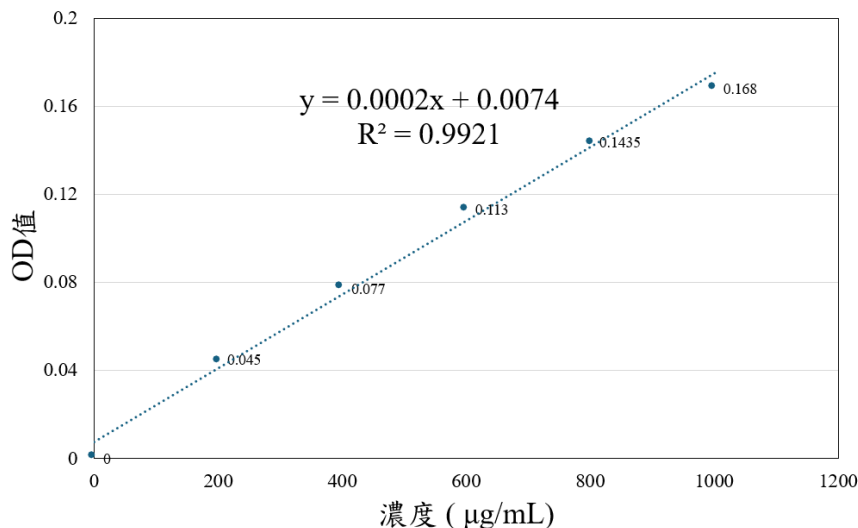
一、 確認外源性 CTEN 在 DLD-1 細胞中的表現

本研究設計三個實驗組，分別為 EV, WT, NLS：

- EV：表示轉入空質體，不帶有外源性 CTEN
- WT-CTEN；表示外源性 CTEN 多分布於細胞質
- NLS-CTEN：表示帶有 NLS 序列，外源性 CTEN 累積於細胞核

(一) 製作 BSA 蛋白質檢量曲線

在進行蛋白質電泳前，先製作胎牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin, BSA）之檢量曲線，如圖六。



圖六、BSA 蛋白質檢量線（作者親繪）

說明：蛋白質檢量線之 R^2 值為 0.9921，顯示線性極佳。後續利用實驗吸光值對應樣品之濃度計算蛋白質量，且於電泳時進行蛋白質定量。

(二) 蛋白質樣品用量評估

本實驗採集三個實驗組的全細胞蛋白質液及核質分離蛋白質液，進行 10X 稀釋後的 OD 650 吸光值測試，再運用檢量線可得知蛋白質的濃度，如下列表二、表三。以此濃度計算 60 μg 蛋白質需要的原液用量，再以 sample buffer 配製成電泳使用的蛋白質樣品。

表二、各實驗組的吸光值與原液濃度

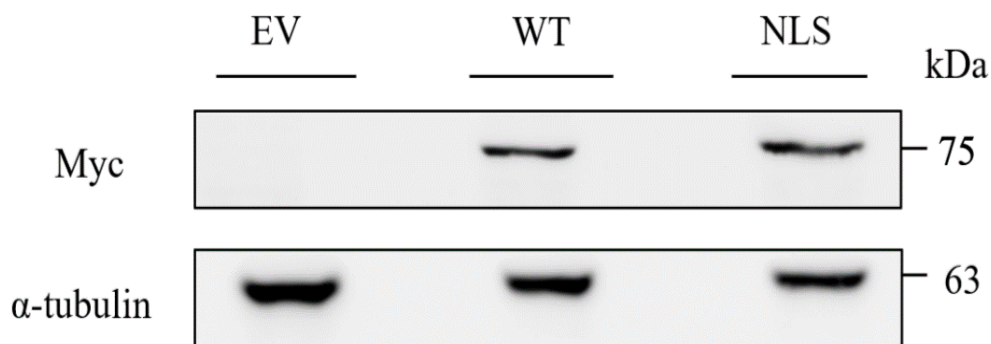
	EV	WT-CTEN	NLS-CTEN
吸光值	0.162	0.19	0.139
蛋白質原液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	19325	22825	16450

表三、各實驗組之細胞質 (cy) 及細胞核 (nu) 吸光數值與原液濃度

	EV (cy)	EV (nu)	WT-CTEN (cy)	WT-CTEN (nu)	NLS-CTEN (cy)	NLS-CTEN (nu)
吸光值	0.1470	0.1085	0.1520	0.1090	0.1070	0.0860
蛋白質原液 ($\mu\text{g/mL}$)	6980	5055	7230	5080	4955	3930

(三) 西方墨點法分析目標蛋白 CTEN

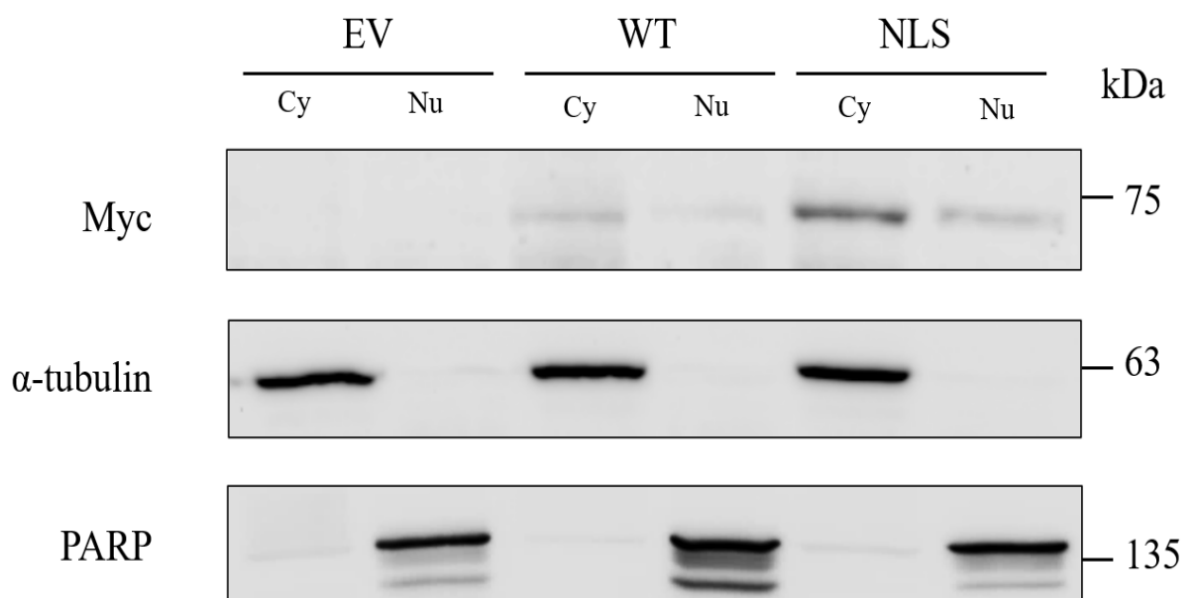
1. 取穩定表現的 empty vector (EV), WT-CTEN, NLS-CTEN 之 DLD-1 細胞株的全細胞蛋白質樣品各 18 μL ，進行蛋白質電泳及 Western blotting 分析，如下圖七。



圖七、DLD-1 細胞株中外源性 CTEN 之表現 (作者親自製作)

- (1) 圖七中：抗原 Myc 欄位呈現的訊號代表 CTEN 表現量；在抗原 α -tubulin 欄位呈現的訊號表示微管蛋白的表現量，此為細胞質的 marker，可作為實驗條件的背景基準；kDa 為標準分子量。
- (2) 在 Myc 列顯示：EV 組中未顯現外源性 CTEN 訊號，而 WT-CTEN 及 NLS-CTEN 之外源性 CTEN 皆有明顯表現，與實驗預期相符合。

2. 將各實驗組進行細胞質(cy)、細胞核(nu)分離的電泳及 Western blotting 分析，如圖八。圖中 α -tubulin 為細胞質 marker，PARP 為細胞核 marker，皆為實驗條件的背景基準。

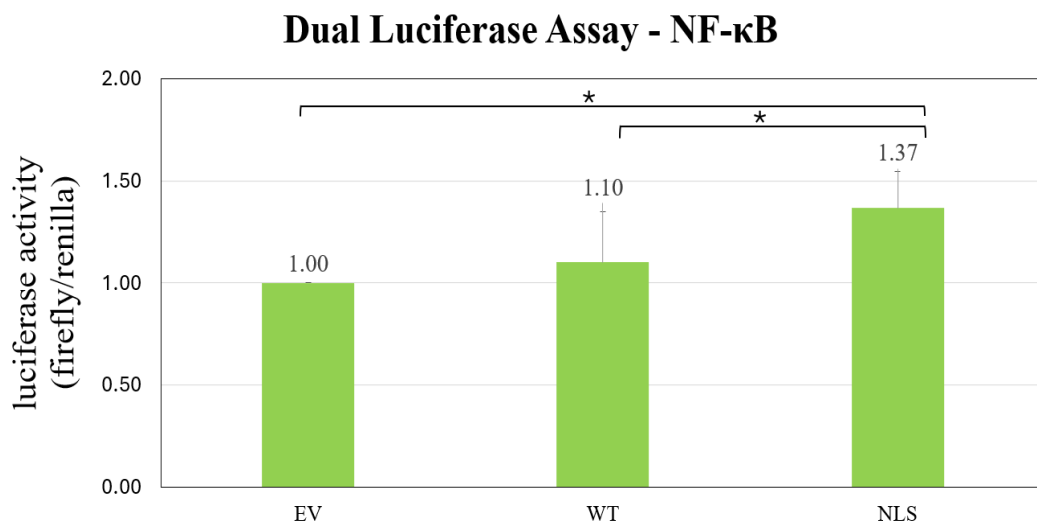


圖八、DLD-1 細胞株中外源性 CTEN 之表現（作者親自製作）

- (1) 在 α -tubulin 作為細胞質 marker 以及 PARP 作為細胞核 marker 的背景下，這兩列的實驗結果如預期； α -tubulin 訊號顯示在各組之細胞質(cy)，PARP 的訊號則顯現在細胞核(nu)。
- (2) 在圖八中，Myc 的結果明確顯示 NLS-CTEN 之細胞核的外源性 CTEN 表現量大於 WT-CTEN 之 CTEN 的表現量，且 EV 不表現外源性 CTEN，與實驗預期相符合。

二、冷光酵素活性分析 NF- κ B 轉錄活性

- (一) 將 NF- κ B 啟動子及 firefly 冷光酵素基因轉染至 EV, WT-CTEN 及 NLS-CTEN 三組細胞中，同時轉染 pRL-TK 質體及 renilla 冷光酵素基因，作為 internal control，用以標準化各組數據。
- (二) 實驗共重複四次，平均結果繪製成圖九。以 EV 實驗組的冷光作為基準，即設定為 1.00，圖中縱軸為標準化後的冷光強度比值。
- (三) 由實驗結果可看出：NLS-CTEN 的冷光強度比值較高，且經過計算
 - NLS-CTEN 與 WT-CTEN 之 p -value 為 0.026；
 - NLS-CTEN 與 EV 之 p -value 為 0.085；
 - WT-CTEN 與 EV 之 p -value 為 0.5；上述結果表示 NLS-CTEN 與另兩組皆有顯著差異，而 WT-CTEN 與 EV 兩組間沒有顯著差異。
- (四) 實驗結果顯示：在 NLS-CTEN 細胞中，NF- κ B 的轉錄活性高於其他兩組(WT-CTEN 與 EV)，即表示當 CTEN 富集於細胞核 (NLS-CTEN) 時，NF- κ B 轉錄活性顯著提升，顯示 CTEN 在細胞核中能夠加速 NF- κ B 路徑的活化並增強細胞遷移能力。



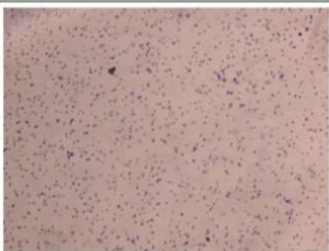
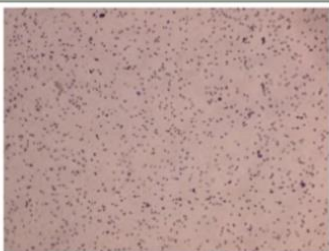
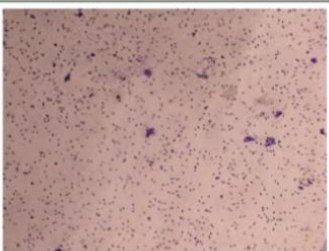
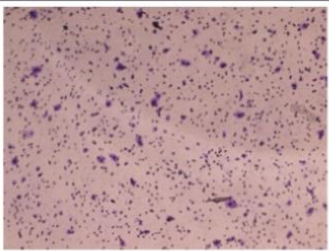
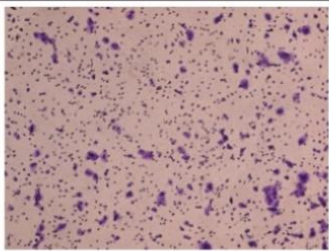
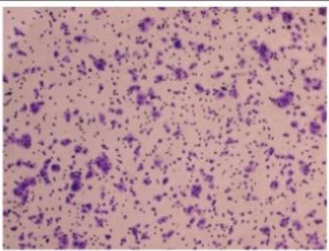
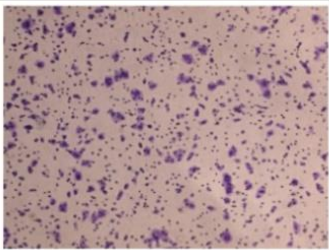
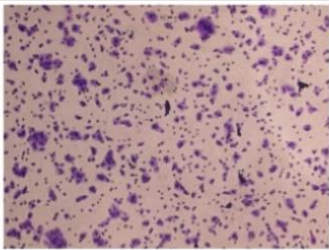
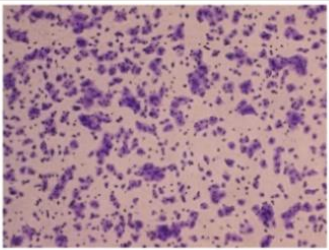
圖九、各實驗組的 luciferase 冷光螢光強度（作者親自製作）

三、細胞遷移能力之比較

此實驗為探討 DLD-1 細胞株中，細胞遷移能力與細胞核內的 CTEN 的關係。實驗操作將細胞置放於薄膜上進行培養，24 小時後，使薄膜另一側的細胞以結晶紫染色並拍攝顯微照片。

(一) 為尋找進行實驗的最佳細胞數條件，本實驗選擇 2.5×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 個細胞，三個不同的細胞數進行實驗比較，實驗結果如表四。

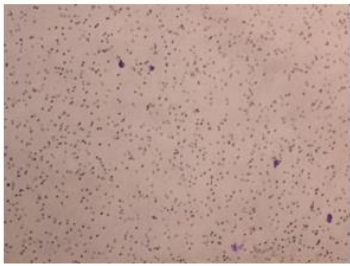
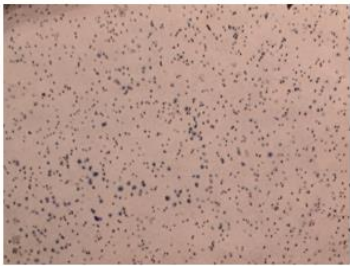
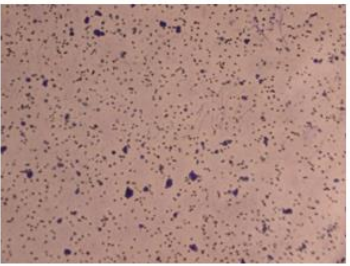
表四、不同細胞數遷移實驗結果圖（作者親攝）

Sample 細胞數	EV	WT-CTEN	NLS-CTEN
2.5×10^4			
5×10^4			
1×10^5			

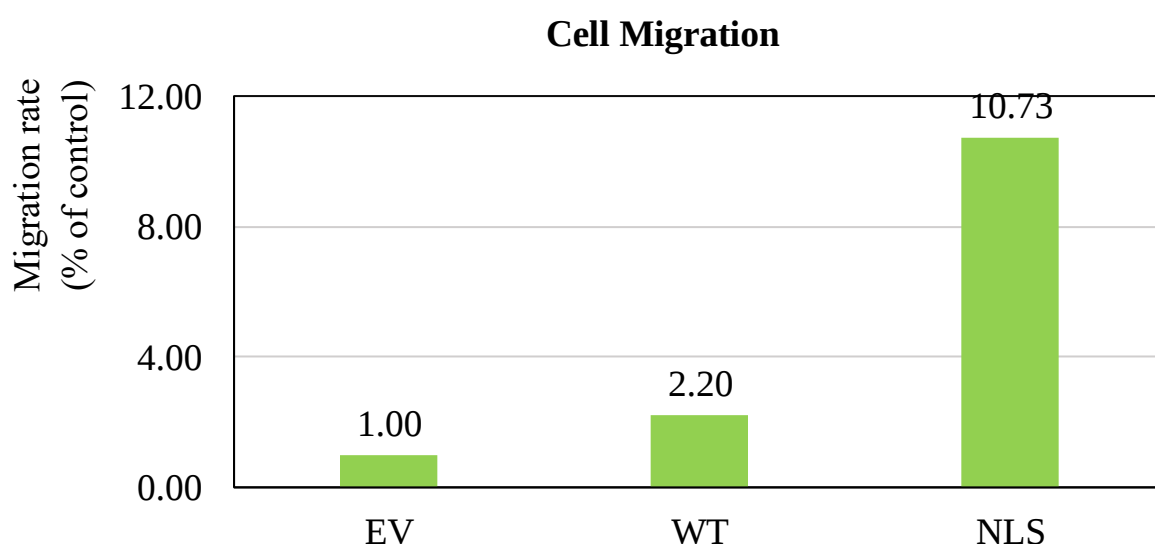
使用結晶紫將細胞染色，透過肉眼片可看出，實驗細胞數越多、遷移的細胞數也越多。然而，遷移的細胞若出現團聚，將造成計數上的困難，因此選擇以 5×10^4 個細胞重複實驗。

(二) 選擇以 5×10^4 個細胞重複實驗，實驗進行 24 小時後拍攝顯微照片，以 image J 輔助細胞計數。實驗進行二重複確認。

表五、實驗組 5×10^4 個細胞的遷移結果 (作者親攝)

Sample	EV	WT-CTEN	NLS-CTEN
Count	3.6	8.1	39.3
Photo			

以 EV 作為對照基準，換算 WT-CTEN 及 NLS-CTEN 此兩組的相對遷移數，可得到下列圖十。由實驗結果可知：WT-CTEN 及 NLS-CTEN 的遷移能力皆高於 EV 組，WT-CTEN 約為 2 倍，而 NLS-CTEN 則比 EV 組高達約 11 倍，NLS-CTEN 組遷移數量明顯較多。這個明顯的差異性，顯示當 CTEN 富集於細胞核時，使得細胞遷移的能力增強。



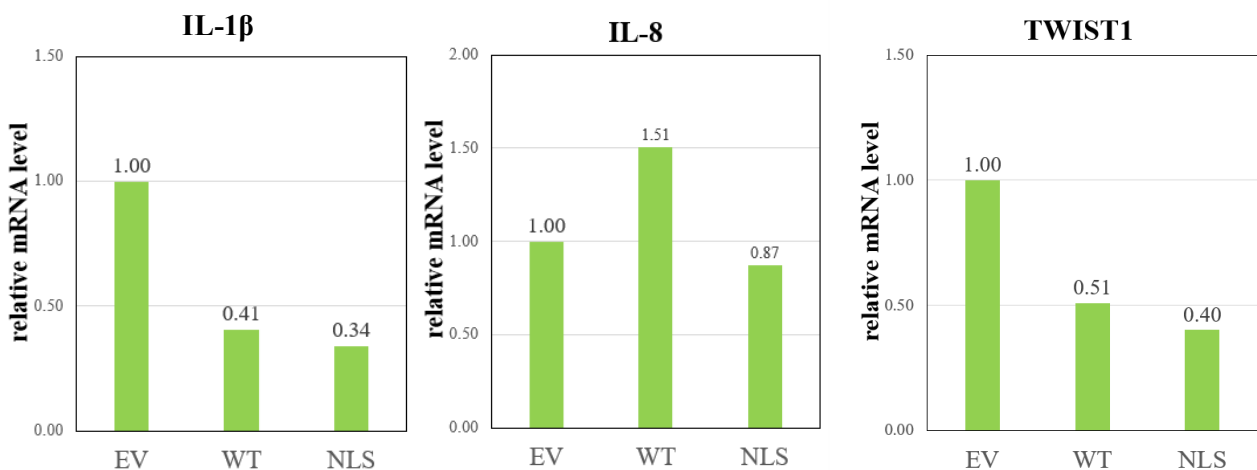
圖十、計算實驗遷移的細胞數 (EV 為控制組標準化) (作者親自製作)

四、以 qPCR 確認細胞核中 CTEN 對目標基因的影響

本實驗挑選了三種與細胞凋亡、侵襲相關的基因進行分析，分別是：

- IL-1 β (Interleukin 1 beta)：與細胞增殖、分化、凋亡相關
- IL-8 (Integrin beta 8)：促進細胞侵襲
- TWIST1 (Twist-related protein 1)：參與調控腫瘤轉移

進行 qPCR 以探討各基因在 CTEN 分布不同之細胞中的表現差異。



圖十一、各基因在 CTEN 位置差異下的表現量（作者親自製作）

- (一)由上述實驗結果初步判斷：觀察 NLS-CTEN 組的表現，IL-1 β 、IL-8 以及 TWIST1 皆與 CTEN 是否表現於細胞核似乎沒有明顯的正相關。
- (二)從文獻[十六]得知，Twist 和 CTEN 都與癌症轉移有關，但目前沒有證據表明兩者有直接的關係。然而，Twist 是通過誘導 EMT 來增加細胞的遷移，而 CTEN 在細胞核中富集後會活化 NF- κ B 路徑，從而提升大腸癌細胞的遷移能力。這顯示兩者都在促進細胞的運動方面都具影響力。
- (三)查閱文獻[十四]研究指出，NF- κ B 訊號可誘導 EMT；NF- κ B 在 EMT 中的作用包括穩定細胞間黏附蛋白的分解、增加細胞遷移能力。由於 CTEN 透過 NF- κ B 訊號促進癌細胞的遷移和侵襲，而 Twist 則透過 EMT 路徑的轉化提升轉移能力，兩者的相似處都是受 NF- κ B 路徑影響且可加強 EMT

和轉移能力。這意味著抑制 NF- κ B 訊號有望同時降低 CTEN 和 Twist 的活性，從而減少腫瘤的轉移潛力。

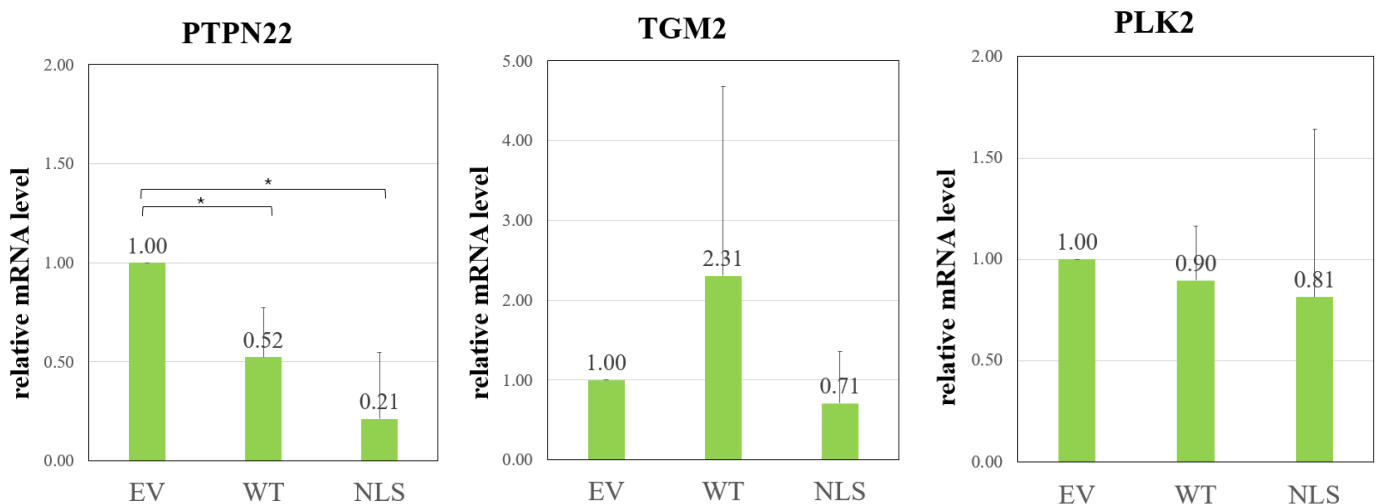
(四)實驗進一步再挑選另三組，同樣與細胞發炎、癌化相關，且在 NGS 結果中於 NLS-CTEN 組表現量高於 WT-CTEN 組的基因

■ PTPN22 (Protein tyrosine phosphate non-receptor type 22)：與細胞免疫與發炎反應相關。

■ TGM2 (Transglutaminase2)：與細胞分化、凋亡相關。

■ PLK2 (polo like kinase 2)：與細胞癌化及抗細胞凋亡相關。

重複進行 qPCR 實驗探討，其結果如下。



圖十二、另三組各基因在 CTEN 位置差異下的表現量（作者親自製作）

1. 本次實驗經過四重複，且統計實驗結果如圖十二，確認 CTEN 累積於細胞核對於 PTPN22/TGM2/PLK2 的基因表現量似乎沒有正相關。
2. 由文獻[四]，TGM2 在多種癌細胞中被發現過度表現，且在 EMT 中起到重要作用，可增強癌細胞的耐藥性和存活率。CTEN 在大腸癌中透過活化 NF- κ B 路徑增強癌細胞的遷移力，這與 TGM2 的部分功能相似。因此在某些高侵襲性的腫瘤中，CTEN 和 TGM2 可能會在相似的信號路徑中有交叉作用，例如在 NF- κ B 和 EMT 路徑中，從而共同促進腫瘤的侵襲和遷移。

3. PLK1、PLK2 都是 Polo-like kinase 家族，它們與細胞分裂、DNA 損傷修復、和細胞週期調控相關。參閱文獻[十二]，PLK1 對 RhoA 的活化可顯著提升癌細胞的運動能力。CTEN 和 PLK1-RhoGDI1 系統之間在癌細胞運動機制可能存在一些間接關聯，因為 NF- κ B 在 Rho GTPase 活性調節中也有參與，表示在某些癌症中，CTEN 和 PLK1-RhoGDI1 系統可能在共同的細胞骨架重組和遷移信號傳遞中發揮作用。

肆、結論與應用

依據目前研究成果，本研究選擇人類大腸癌細胞株 DLD-1，且使用蛋白質膠體電泳、西方墨點法來確認此細胞株的表現符合預期。實驗設計 EV、WT-CTEN 及 NLS-CTEN 三組分別具有不同表徵 CTEN 的實驗組，以分析其與 NF- κ B 轉錄活性、細胞遷移能力的關係；由實驗結果得知：沒有外源性 CTEN 的 EV 組與分布於細胞質的 WT-CTEN 組，兩者的 NF- κ B 轉錄活性相差不多，而表現量位於細胞核的 NLS-CTEN 組，則是對於 NF- κ B 轉錄活性有顯著的提升，且細胞遷移能力明顯較強。此外，由 qPCR 的結果得知：IL-1 β 、IL-8、TWIST1、PTPN22、TGM2 以及 PLK2，這六種基因表現在 NLS-CTEN 組皆沒有明顯上升，顯示這些與細胞發炎、侵襲、遷移等行為相關的因子，與 CTEN 富集於細胞核沒有太大的直接關係。

因此，根據本研究結果可整理出以下結論：CTEN 在細胞核內的累積與 NF- κ B 活化呈現顯著的正相關，而這種活化性為並不是通過本研究選取的六個目標基因，分別是 IL-1 β 、IL-8、TWIST1、PTPN22、TGM2 以及 PLK2 來進行。此外，實驗證明富集於細胞核內的 CTEN 明顯可提升細胞遷移的能力，與空白對照組相比，約提升 11 倍。未來研究可進一步選擇其他可能的致癌基因，探討 CTEN 與這些基因間是否具有較直接或間接的調控關係，尤其是在 NF- κ B 路徑中的作用機制，甚至可著重探討 CTEN 和這些基因是否在 EMT 或 NF- κ B 路徑中存在著協同作用或交叉作用。若能瞭解這些分子之間的交互作用，相信可以為癌症治療提供新的干預靶點與契機。

伍、參考資料

- 一、邱品慈 (2016) 探討細胞核中 CTEN 參與調控 NF- κ B 及 ER α 訊號反應路徑之功能，碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 二、王乙喧 (2017) CTEN 於細胞核中累積對腫瘤形成特性的影響，碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系，臺北市。
- 三、涂淑芬 (2019) 細胞核中 CTEN 影響腫瘤特性與調控 NF- κ B 訊息路徑之分子機制，碩士論文，國立臺灣大學生化科技學系。
- 四、Antonyak, M. A., Li, B., Regan, A. D., Feng, Q., Dusaban, S. S., & Cerione, R. A. (2009). Tissue transglutaminase is an essential participant in the epidermal growth factor-stimulated signaling pathway leading to cancer cell migration and invasion. *The Journal of biological chemistry*, 284(27), 17914 – 17925.
- 五、Curran, J. E., Weinstein, S. R., & Griffiths, L. R. (2002). Polymorphic variants of NFKB1 and its inhibitory protein NFKBIA, and their involvement in sporadic breast cancer. *Cancer Lett*, **188**(1-2), 103-107.
- 六、Gao, J., Pfeifer, D., He, L. J., Qiao, F., Zhang, Z., Arbman, G., Sun, X. F. (2007). Association of NFKBIA polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese populations. *Scand J Gastroenterol*, **42**(3), 345-350.
- 七、Hong, S.Y., Shih Y.P., Lo A., Lo, S.H. (2019). Identification of subcellular targeting sequences of Cten reveals its role in cell proliferation. *BBA - Molecular Cell Research*, 1866, 450–458.
- 八、Hung, S. Y., Shih, Y. P., Chen, M., & Lo, S. H. (2014). Up-regulated cten by FGF2 contributes to FGF2-mediated cell migration. *Mol Carcinog*, **53**(10), 787-792.
- 九、Kim, L. H., Lee, H. S., Kim, Y. J., Jung, J. H., Kim, J. Y., Park, B. L., & Shin, H. D (2003). Identification of novel SNPs in the interleukin 6 receptor gene (IL6R). *Hum Mutat*, **21**(4). 450-451.

- 十、 Liao, Y. C., N. T., Shih, Y. P., Dong, Y., & Lo, S. H. (2009). Up-regulation of C-terminal tensin-like molecule promotes the tumorigenicity of colon cancer through beta-catenin. *Cancer Res*, **69**(11), 4563-4566.
- 十一、 Liu, F., Bardhan, K., Yang, D., Thangaraju, M., Ganapathy, V., Waller, J. L., Liu, K. (2012). NF-kappaB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. *J Biol Chem*, **287**(30), 25530-25540.
- 十二、 Lim, J., Hwang, Y. S., Yoon, H. R., Yoo, J., Yoon, S. R., Jung, H., Cho, H. J., & Lee, H. G. (2024). PLK1 phosphorylates RhoGDI1 and promotes cancer cell migration and invasion. *Cancer cell international*, 24(1), 73.
- 十三、 Ni, W. F., Tsai, F. H., Yang, S. F., & Chang, Y. C. (2007). Elevated expression of NF-kappaB in oral submucous fibrosis—evidence for NF-kappaB induction by safrol in human buccal mucosal fibroblasts. *Oral Oncol*, **43**(6), 557-562.
- 十四、 Oh, A., Pardo, M., Rodriguez, A. *et al.* NF-κB signaling in neoplastic transition from epithelial to mesenchymal phenotype. *Cell Commun Signal* **21**, 291 (2023).
- 十五、 Sachin Gopalkrishna Pai, Benedito A. Carneiro, Jose Mauricio Mota, Ricardo Costa, Caio Abner Leite, Romualdo Barroso-Sousa, Jason Benjamin Kaplan, Young Kwang Chae & Francis Joseph Giles.(2017)Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response.Journal of Hematology & Oncology ,101.
- 十六、 Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117**(7), 927–939.

【評語】 080010

本研究探討癌細胞核中 CTEN 對 NF- κ B 訊息傳導路徑，以及細胞遷移癌化的機制。目前研究結果證實：表現量位於癌細胞核的實驗組對於 NF- κ B 轉錄活性有顯著的提升(其 p-value < 0.05)，且與空白對照組比較，其提升細胞遷移的能力約增加 11 倍。

優點：

1. C-terminal tensin-like(CTEN)是種可調控細胞遷移的蛋白質。
在正常細胞中，CTEN 表現量低且多位於細胞質；然而癌細胞的 CTEN 則是過量表現於細胞核中，顯示其為致癌重要基因。
2. 實驗組對於 NF- κ B 轉錄活性有顯著的提升，其提升細胞遷移的能力約增加 11 倍。
3. 接續研究 CTEN 影響 NF- κ B 路徑及其與 EMT 的關係，瞭解 CTEN 和基因在這些路徑的交叉作用，將提供新穎的癌症治療干預靶點。

建議：

1. 比去年作品多做了的實驗挑選三種與細胞發炎、癌化相關的基因，以 qPCR 測定 CTEN 與其表現量的關係，歸納結果得知癌細胞核中 CTEN 與這些基因沒有明顯的正相關。但應探討這六個基

因是否會受到 NF- κ B 轉錄活性有關？或者應該去找和 NF- κ B 轉錄活性有關且和細胞發炎、癌化相關的基因來探討，更能了解 CTEN 如何經由入核調控 NF- κ B 轉錄活性，進而促進細胞遷移癌化。

2. 本研究使用 NLS 強迫 CTEN 入核，在癌細胞中 CTEN 是如何入核的需討論？如果是經由磷酸化而入核，那發展使之磷酸化的激酶可視為抗癌靶標。
3. 實驗挑選六種與細胞發炎、癌化相關的基因，研究結果癌細胞核中 CTEN 與這些基因都沒有明顯的正相關。(1)此實驗結果之推論為何？(2)當初挑選這六種基因的原因？