

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090005
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	上皮細胞黏附分子（EpCAM）與Dabrafenib對未分化性甲狀腺癌（ATC）進程機制之探討

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 謝慧齡
作者姓名	林柏辰 劉人瑄

關鍵詞	<u>EpCAM、Dabrafenib、未分化性甲狀腺癌</u>
-----	----------------------------------

作者簡介



大家好，我們是林柏辰和劉人瑄，目前就讀於師大附中數理資優班三年級。高一時有幸進入吳漢忠老師的實驗室，學習實驗技術與進行專題研究。非常感謝專題指導老師、指導教授、與實驗室學長姐一路以來給予我們的幫助，期望能在未來繼續在科學領域探索與學習。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區 別：

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：上皮細胞黏附分子（EpCAM）與 Dabrafenib 對
未分化性甲狀腺癌（ATC）進程機制之探討

關鍵詞：EpCAM、Dabrafenib、未分化性甲狀腺癌

編號：

摘要

上皮細胞黏附分子(EpCAM)與上皮細胞間黏附、信息傳導、增殖與分化等功能有密切關係，已被證實會在多種上皮癌細胞中大量表達，被視為一種可行的臨床標記。透過細胞存活率、細胞群落、轉移與侵入試驗，觀察到 EpCAM 能增強未分化性甲狀腺癌 (ATC) 的細胞增殖、生長、轉移與侵入能力。

此外實驗發現 dabrafenib 小分子抗癌藥物處理的 ATC，其細胞增殖、生長、轉移與侵入能力均有下降的趨勢，而細胞凋亡程度則有顯著的上升。此次研究藉由西方墨點法發現，磷酸化 ERK 蛋白的表現量隨 dabrafenib 濃度的上升而逐步下降，顯示 dabrafenib 能夠抑制 ATC 細胞訊息傳遞路徑中 ERK 蛋白的磷酸化，進而影響 ATC 的生長。若能深入了解 EpCAM 和 dabrafenib 在癌細胞中的作用機轉，EpCAM 相關藥物與 dabrafenib 未來在臨床應用上，或許能為 ATC 患者提供另一種新的治療方式。

Abstract

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is related to cell adhesion, signal transduction, proliferation, and differentiation in epithelial cells, and it has been shown to be highly expressed in various epithelial cancers, making it a potential clinical target. Through experiments such as cell viability, colony formation, migration, and invasion assays, EpCAM was found to enhance the proliferation, growth, migration, and invasion of anaplastic thyroid carcinoma (ATC) cells.

Additionally, treatment of ATC cells with the small-molecule drug dabrafenib led to a decrease in cell proliferation, growth, migration, and invasion, while significantly increasing apoptosis rates. Western blot results revealed that the expression level of phosphorylated ERK protein decreased with increasing dabrafenib concentration, indicating that dabrafenib inhibits the phosphorylation of ERK in the signaling pathway of ATC cells, thereby affecting cancer progression. A deeper understanding of the mechanisms of action of EpCAM and dabrafenib in cancer cells could provide another potential treatment option for ATC patients through the clinical application of EpCAM-targeted drugs and dabrafenib in the future.

壹、前言

一、研究動機

惡性甲狀腺瘤 ATC (Anaplastic thyroid cancer) 約佔所有甲狀腺瘤的 1%~2%，極為罕見但死亡率高，具有侵襲能力強、預後較差且轉移、發展快速等特點，臨床表現為快速增大的頸部腫塊，會局部擴散、壓迫鄰近結構，並有擴散至區域淋巴結和遠處部位的趨勢 (Ralhan et al., 2010)，不僅如此，截至目前都沒有能夠有效延長患者生存時間的治療方式。

上皮細胞黏附分子 (Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 常見於上皮組織和自上皮衍生的惡性腫瘤中，其與細胞黏附、增殖、分化、轉移有關 (Liang et al., 2018)。由於 EpCAM 在上皮癌症中的重要性，因此臨床上持續針對與 EpCAM 相關的訊號傳遞蛋白質開發各式類型小分子藥物，例如 EGFR 的抑制劑 Gefitinib、Erlotinib (Hoelder et al., 2012)，也包括了已用於非小細胞肺癌、黑色素瘤 (Subbiah et al., 2018) 與乳突狀甲狀腺癌 (Notarangelo et al., 2017) 治療及研究的 BRAF 小分子抑制劑 dabrafenib。

雖然近年對於小分子藥物的開發相較於過去已成熟許多，但在藥物開發與臨床使用上還是面臨許多問題，例如，部分在癌症進程中相當重要的蛋白，如突變的 RAS 蛋白、c-MYC 或 HIFs 等，由於技術上的限制，被認為無法作為小分子藥物的標靶位點 (Hoelder et al., 2012)。此外，已成功進入臨床試驗並展現出治療效果的藥物，經常在治療後期或治療不同病患時出現抗藥性的問題，這些抗藥性的產生機制常與上游或平行路徑的活化有密切的關係 (Hoelder et al., 2012)。雖然面臨如此困境，但近年來在精準醫療的訴求下，小分子藥物療法的開發依然受到重視，耐藥性的分子機制與小分子藥物的聯合使用可行性探討等課題也隨之受到一定的關注 (Hoelder et al., 2012)。

過去 dabrafenib 在非小細胞肺癌病患治療中出現相當不錯的成效，不但有效改善病患的臨床表現，在長期使用下也能維持良好的癌症病情控制與治療成效，因此被認為是具有相當潛力的小分子藥物 (Subbiah et al., 2018)。不過，這樣的結果在其他癌症種類中卻面臨不同的挑戰，以 dabrafenib 在過去針對乳突狀甲狀腺癌的研究為例，利用 dabrafenib 進行處理後，雖然出現一定的治療成效，但卻出現了 EGFR 表現量上升的現象，

並且導致一定的抗藥性 (Notarangelo et al., 2017)。不過，當 dabrafenib 與 EGFR 抑制劑共同作用後，便達到非常好的癌症進程抑制成效 (Notarangelo et al., 2017)。以上的資料都顯示若我們能夠探討 dabrafenib 對 ATC 的治療可行性，並深入探究其對細胞分子路徑的影響，或許就能夠針對在使用 dabrafenib 治療癌症時可能出現抗藥性的問題提出可行的解決方案。

綜上所述，我們從文獻中可以發現 EpCAM 與上皮細胞的增殖與生長能力有密切關係。此外，細胞對小分子藥物的抗藥性也可能與 EpCAM 存在一定關聯，但對於未分化性甲狀腺癌癌症進程的確切影響仍未受到確認，因此藉由細胞及分子角度剖析 EpCAM、dabrafenib 與 ATC 的交互作用以增加對其分子機制的了解，有望對臨床醫學治療的開發帶來幫助。

二、研究背景與文獻回顧

(一)、未分化性甲狀腺癌 (Anaplastic thyroid cancer, ATC)

根據世界衛生組織-國際癌症研究機構(IARC)對 2022 年全球癌症統計數據，甲狀腺癌 (Thyroid cancer, TC) 佔所有內分泌惡性腫瘤的 90%，且佔所有癌症的 4.1%，2022 年即新增了 821,173 的確診案例，佔所有癌症的第七位。而在男女比例上，女性的發病率約是男性的 3 倍 (Bray et al., 2024)。確診率以東亞地區最高，約占總確診人數的 23% (Bray et al., 2024)。甲狀腺癌的亞型包括乳突性甲狀腺癌 (Papillary Thyroid Cancer, PTC)、濾泡性甲狀腺癌 (Follicular Thyroid Cancer, FTC)，和未分化性甲狀腺癌 (Anaplastic thyroid cancer, ATC)。PTC 和 FTC 被歸類為分化性甲狀腺癌，都起源於參與碘代謝的濾泡上皮甲狀腺細胞。ATC 約佔所有甲狀腺癌的 1%~2%，其中位存活期 (median overall survival) 僅 3~7 個月，五年存活率僅有約 5%，十年存活率更可能僅有 1%，可見 ATC 雖極為罕見但死亡率高。在以 EpEX，EpICD 和 β -catenin 蛋白針對不同類型甲狀腺癌的免疫組織化學分析後可發現，在 ATC 細胞中，EpCAM 信息傳遞高量發生，造成 EpEX 被裁切後在細胞膜表現量較低，且 EpICD、 β -catenin 都有較高比例的人核現象 (Rahnan et al., 2010)。

(二)、上皮細胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule , EpCAM)

上皮細胞黏附分子(EpCAM)是一種穿膜醣蛋白，常見於上皮組織和自上皮衍生的惡性腫瘤中，受 A disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) 和 γ -secretase 切割後能夠分為 extracellular region (EpEX) 與 intracellular domain (EpICD) 結構域，與細胞黏附、增殖、分化、轉移有關(Liang et al., 2018)。其中 EpCAM 的胞外結構域 (EpEX) 能夠和細胞膜上表皮生長因子受體 (Epidermal growth factor receptor , EGFR) 結合，活化下游 Mitogen-activated protein kinase (ERK)、Protein kinase B (AKT)等蛋白質的信號傳導。磷酸化的 ERK 蛋白能進入細胞核引起與細胞生長、增殖、分化等能力有關的基因轉錄 (Liang et al., 2018)。而 EpCAM 的胞內結構域 (EpICD) 則能夠和 β -catenin 等蛋白結合為複合體並入核觸發致癌相關的基因轉錄與癌症進程訊號傳導 (Liang et al., 2018)。因此，這些蛋白質的活化效應皆能促進癌細胞的發展 (圖一)。此外，EpCAM 也被視為一種腫瘤標記，藉由免疫染色，能夠判定 EpEX、EpICD 等相關蛋白在特定位置的表達量，以比較不同癌症間侵襲能力的強弱差異 (Liang et al., 2018)。

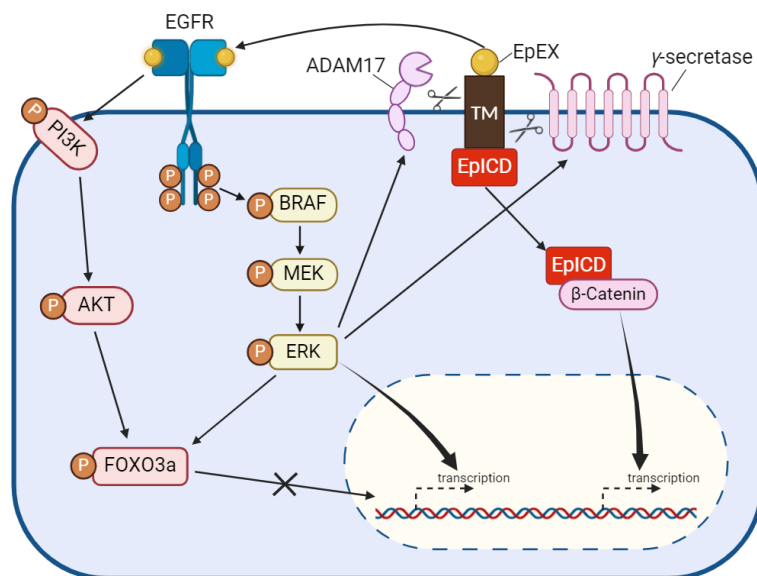
(三)、V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)

BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)是大鼠肉瘤基因 (rat sarcoma gene , *RAS*)的關鍵分子，可活化多種途徑，例如誘導細胞生長和細胞增殖的 ERK(extracellular signal-regulated kinases, 又稱 MAPK, Mitogen-activated protein kinases) 及 MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) 兩種蛋白，進而傳遞影響細胞生長的訊息 (Banzi et al., 2016)。從過去的文獻可以知道，非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer)、大腸癌(colon cancer)、黑色素瘤(Melanoma)等多種上皮癌症具有較高比例的 BRAF V600E 的突變，此外，20%到 50%的 ATC 也含有突變，且被認為與 ATC 的低分化性及較差的預後有關 (Subbiah et al., 2018)。

(四)、Forkhead box O3a (FOXO3a)

FOXO3a 是 Forkhead 轉錄因子家族的成員。未受到磷酸化的 FOXO3a 會在細胞核中積聚，增強參與細胞凋亡和細胞週期控制的各種基因的轉錄，例如 *BIM*、*FasL* 和 *p21* 等 (Chen et al., 2020)。EGFR 下游所活化的 ERK 與 AKT 皆被證實能夠透過不

同路徑促進 FOXO3a 的磷酸化，並阻止細胞凋亡的發生，藉此增強癌細胞的生長(圖一)(Chen et al., 2020)。



圖一、EpCAM 相關的信號傳遞路徑 (參考自:Liang K. H., 2018 ; Chen et al., 2020)
(圖片為作者自行繪製)

(五)、Dabrafenib

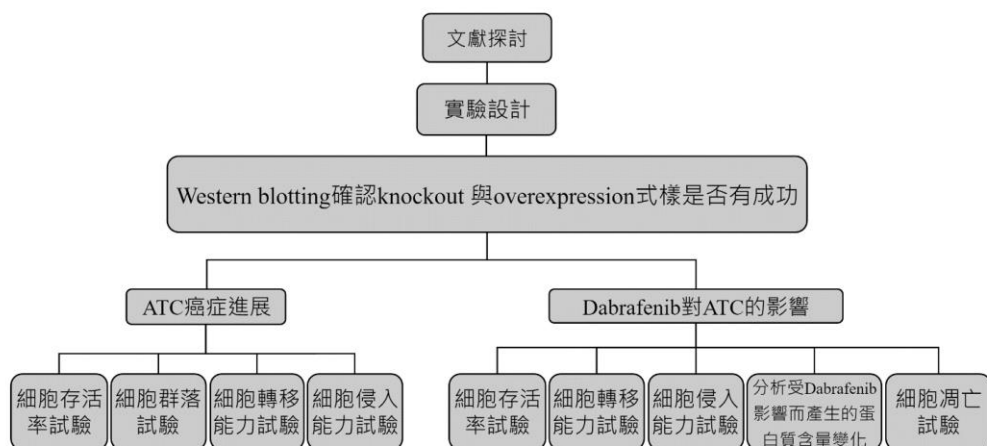
Dabrafenib 是小分子的 BRAF 抑制劑，作用在生長因子與受體酪胺酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTK) 所引發的細胞訊息傳遞路徑中，最終會造成磷酸化的 ERK 被抑制，藉此阻斷下游的基因轉錄，從而阻止細胞增生，有助於癌症的治療。目前 dabrafenib 已被用於治療 BRAF V600E 突變的黑色素瘤及非小細胞肺癌病患 (Subbiah et al., 2018)，也已經投入在乳突狀甲狀腺癌進行研究 (Notarangelo et al., 2017)。雖然 dabrafenib 是一種極具臨床潛力的癌症藥物，不過在乳突狀甲狀腺癌與黑色素瘤的長期治療紀錄與研究當中，都出現了由其他蛋白質路徑活化而導致的抗藥性問題 (Brauner et al., 2016), (Notarangelo et al., 2017)，因此我們除了希望能了解 dabrafenib 和 EpCAM 對於未分化性甲狀腺癌(ATC)的癌症進程的影響外，也希望能夠深入探討 ATC 細胞在 dabrafenib 處理下分子層面的調控。

三、研究目的

- (一)探討 EpCAM 對未分化性甲狀腺癌細胞增殖、生長、轉移與侵入能力的影響。
- (二)探討 dabrafenib 對未分化性甲狀腺癌細胞增殖、生長、轉移、侵入與細胞凋亡的影響。
- (三)分析未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)經 dabrafenib 處理後而產生的蛋白質表現量變化。

貳、研究方法或過程

一、研究流程圖(圖片為作者自行繪製)



二、研究設備與器材

(一) 甲狀腺瘤細胞株

T178 細胞株 (Ct、OE)、T245 細胞株 (Ct、OE)、T264 細胞株 (WT、KO)

備註說明：Ct：Control (未做基因處理不表現 EpCAM 的細胞株)

OE：EpCAM overexpression (EpCAM 過量表達)

WT：Wildtype (野生型,未做基因處理少量表達 EpCAM 的細胞株)

KO：EpCAM knockout (EpCAM 剔除)

(二) 試劑及設備

1、西方墨點法 (Western-blotting) (表格為作者自行繪製)

ddH ₂ O	1.5M Tris(pH8.8)	30% acrylamide
10% SDS	TEMED	10% APS(ammonium persulfate)
1.0M Tris(pH6.8)	電泳(SDS-PAGE)槽	PVDF membrane
Running buffer	Transfer buffer	PBST
(1) ddH ₂ O	(1) ddH ₂ O	(1) 0.025 M Tris,
(2) 0.025 M Tris	(2) 0.025 M Tris	(2) 0.137 M Sodium chloride
(3) 0.192 M Glycine	(3) 0.192 M Glycine	(3) 0.0027 M Potassium chloride
(4) 0.1% SDS	(4) 10% MeOH	(4) 0.1% Tween- 20
Blocking buffer	ECL reagent	Second antibody：
(1) PBST	(1) 魯米諾(Luminol)	Horseradish Peroxidase (HRP)
(2) 3%BSA	(2) 過氧化氫(H ₂ O ₂)	
First antibody	轉漬(gel transfer)槽	冷光呈相分析系統

2、細胞存活率試驗(Cell viability assay) (表格為作者自行繪製)

96 well plate	多功能微量盤分析儀	WST-1 solution (WST-1 : medium=1 : 10)
Growth medium (1) Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (2) 1% Penicillin (3) 1X MEM Non-Essential Amino Acids(MEM NEAA) (4) 1X Sodium Pyruvate (5) 10% Fetal Bovine Serum(FBS)		

3、細胞群落試驗(Colony formation assay) (表格為作者自行繪製)

Growth medium	6 well plate	Crystal Violet 染劑
---------------	--------------	-------------------

4、細胞轉移與侵入能力試驗(Cell migration and invasion assay) (表格為作者自行繪製)

24 well plate	Transwell	Crystal Violet 染劑
10%FBS medium (Growth medium)	IC capture	no FBS(0%) medium (1) 1% Penicillin (2) 1X Sodium Pyruvate (3) 1X MEM Non-Essential Amino Acids(MEM NEAA) (4) Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

5、細胞凋亡試驗 (表格為作者自行繪製)

24 well plate	binding buffer	10%FBS medium(Growth medium)
ddH ₂ O	PI 染劑	Annexin V 染劑
流式細胞儀		

三、實驗方法

(一) 細胞培養

1. 細胞株：未分化性甲狀腺癌細胞 T178、T245 與 T264。
2. 培養基：PMBI，內含 10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1% penicillin、MEM Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA)、Sodium Pyruvate。
3. 培養條件:37°C, 5%CO₂。

(二) 細胞計數與繼代

1. 當細胞覆蓋 8 成的培養皿(10cm well)時，先抽出 well 內舊的 medium。
2. 加入 5mL 的 PBS 以清洗細胞表面。
3. 抽除 PBS，加入 1mL 的 trypsin，並放入培養箱 3~5 分鐘待其反應。
4. 加入 1mL 的 medium 終止 trypsin 的反應。
5. 後續即可進行分盤，或以 trypan blue 染色並利用自動計數器計數。

(三) 蛋白質萃取

1. 將細胞移出培養箱後以加入 lysis buffer。
2. 將細胞刮下裝入 eppendorf 中。
3. 將離心機預冷至 4°C。
4. 以 13000g 離心 20 分鐘。
5. 上清液即為蛋白質溶液，儲存於 -20°C 中保存。

(四) 西方墨點法(Western blotting)

1. 配製 10% Resolving Gels (每片 5mL) (表格為作者自行繪製)

ddH ₂ O	1.5M Tris(pH8.8)	30% acrylamide
10% SDS	10% APS	TEMED

2. 配製 4% Stacking Gels (每片 3mL) (表格為作者自行繪製)

ddH ₂ O	1M Tris(pH6.8)	30 % acrylamide
10 % SDS	10 % APS	TEMED

3. 拔除齒梳並置入電泳槽，倒入 running buffer。
4. 將待測定之 sample 注入樣品槽內，以 100V 電泳 90 分鐘。
5. 以負極到正極的順序將海綿、兩張圖畫紙、Resolving Gels、PVDF membrane、兩張圖畫紙、海綿放置於轉漬槽中。
6. 加入 Transfer buffer，將轉漬槽放至 4°C 冰箱，以 90V 轉漬 90 分鐘。

7. 將 PVDF 以 blocking buffer 進行 blocking，放在室溫下震盪作用 1 小時。
8. 加入一級抗體，放於 4°C 震盪作用隔夜。
9. 以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。
10. 加入二級抗體，在室溫震盪 1 小時。
11. 以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。
12. PVDF 均勻淋上 ECL substrate solution，用冷光呈相分析系統拍攝照片。

(五) 細胞存活率試驗 (Cell viability assay)

1. 取兩個 96 孔盤。
2. 每個 well 加入 1×10^4 顆細胞，分別培養 24、48 小時。
3. 培養時間到後吸除 96 well 內上清液。
4. 加入 100 μ L 的 WST-1，於培養箱靜置 1 小時。
5. 以 OD 450 nm 測量其吸光度。

(六) 細胞群落試驗 (Colony formation assay)

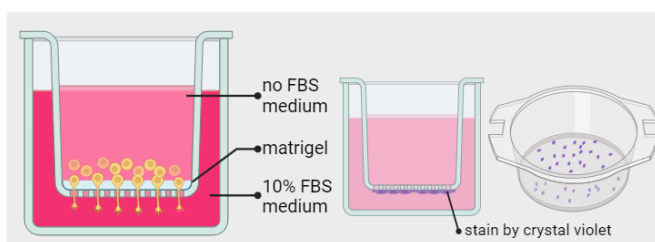
1. 於六孔盤中加入 5×10^3 顆細胞。
2. 於培養箱中靜置一周。
3. 時間到後吸除 6 well 內上清液。
4. 每個 well 內加入 1 mL 的 Crystal Violet 染劑，反應約 15~20 分鐘。
5. 吸除染劑後以 ddH₂O 清洗，晾乾後即可拍照記錄結果。

(七) 細胞轉移與侵入能力試驗 (Cell migration and invasion assay)

如圖二，轉移侵入測試中我們會使用到兩種培養盤，位於內部且裝有無血清培養基 (no FBS medium) 的稱為 transwell，其底部具有半透膜因此能使細胞穿越到達另外一側。癌細胞具有轉移至富含營養處的特性，因此當我們將細胞培養在 transwell 內時，細胞便會通過半透膜到達外側，再針對外側細胞進行染色，我們便能比較不同細胞的轉移能力。

1. 將 Matrigel 自 -20°C 冰箱取出，放置於 4°C 解凍。
2. 將 10 μ L Matrigel 與 90 μ L no FBS medium 混合。

3. 加入 transwell 中，放入 24 孔盤於 37°C 培養箱靜置 30 分鐘。
(migration assay 不必進行上述步驟)
4. 於 24 孔盤內加入 750 μ L 10% FBS medium。
5. transwell 內加入 450 μ L no FBS medium 與 2×10^5 顆細胞。
6. 確認無氣泡後放如培養箱隔夜。
7. 吸除 medium1 再以棉花棒沾取 PBS 擦拭 transwell 內部。
8. 於 tranwell 內加入 500 μ L Crystal Violet 染劑，置於室溫反應 20 分鐘。
9. 於 ddH₂O 中清洗 transwell，室溫晾乾後以 IC capture 拍照。



圖二、細胞轉移與侵入能力試驗之裝置(圖片為作者自行繪製)

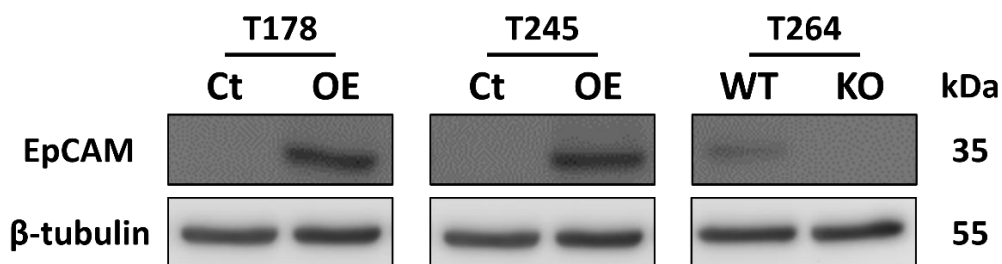
(八) 細胞凋亡試驗(Cell apoptosis assay)

1. 於24孔盤中加入 1×10^5 顆細胞，過夜培養。
2. 置換為含有不同濃度dabrafenib的medium，培養24小時。
3. 配置染劑：將PI染劑和Annexin V染劑與1X的binding buffer以1：1：50混合，放置於冰上避光保存。
4. 將24well內上清液吸除，加入500 μ L PBS。
5. 吸除PBS後加入300 μ L trypsin，放入37°C培養箱反應。
6. 加入500 μ L含血清的medium，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。
7. 置入離心機，1000 RPM離心5分鐘。
8. 將離心管內的上清液倒掉，加入100 μ L的PBS，1000RPM再離心5分鐘。
9. 將離心管內的PBS倒掉，加入100 μ L配製好的染劑，避光處反應15分鐘
10. 上機紀錄結果。

參、研究結果

一、以西方墨點法確認針對甲狀腺癌細胞 (ATC) 的特殊處理是否成功

在進入後續實驗前，需要確認 EpCAM overexpression 與 knockout 的甲狀腺癌細胞株是否有確實過量表達與剔除 EpCAM，因此我們先以西方墨點法測定 EpCAM 的表現狀態。首先，從圖三 β -tubulin 表現量相近的狀態，顯示每個分析樣本中的蛋白質含量大致上是相等的。其次，在 T178、T245 甲狀腺癌細胞株中 EpCAM 過量表現 (OE) 的樣本中，其 EpCAM 的含量明顯多於未做基因處理且不表現 EpCAM 的對照組 (Ct)，如此即可確認該細胞有成功過量表達 EpCAM。最後，在 T264 甲狀腺癌細胞株中，未做基因處理且少量表達 EpCAM 的野生型 (WT) 癌細胞顯示出少量的 EpCAM 表達，而 EpCAM 剔除 (KO) 的樣本不具有 EpCAM 的表現，即可確認 EpCAM 的剔除處理也是成功的。



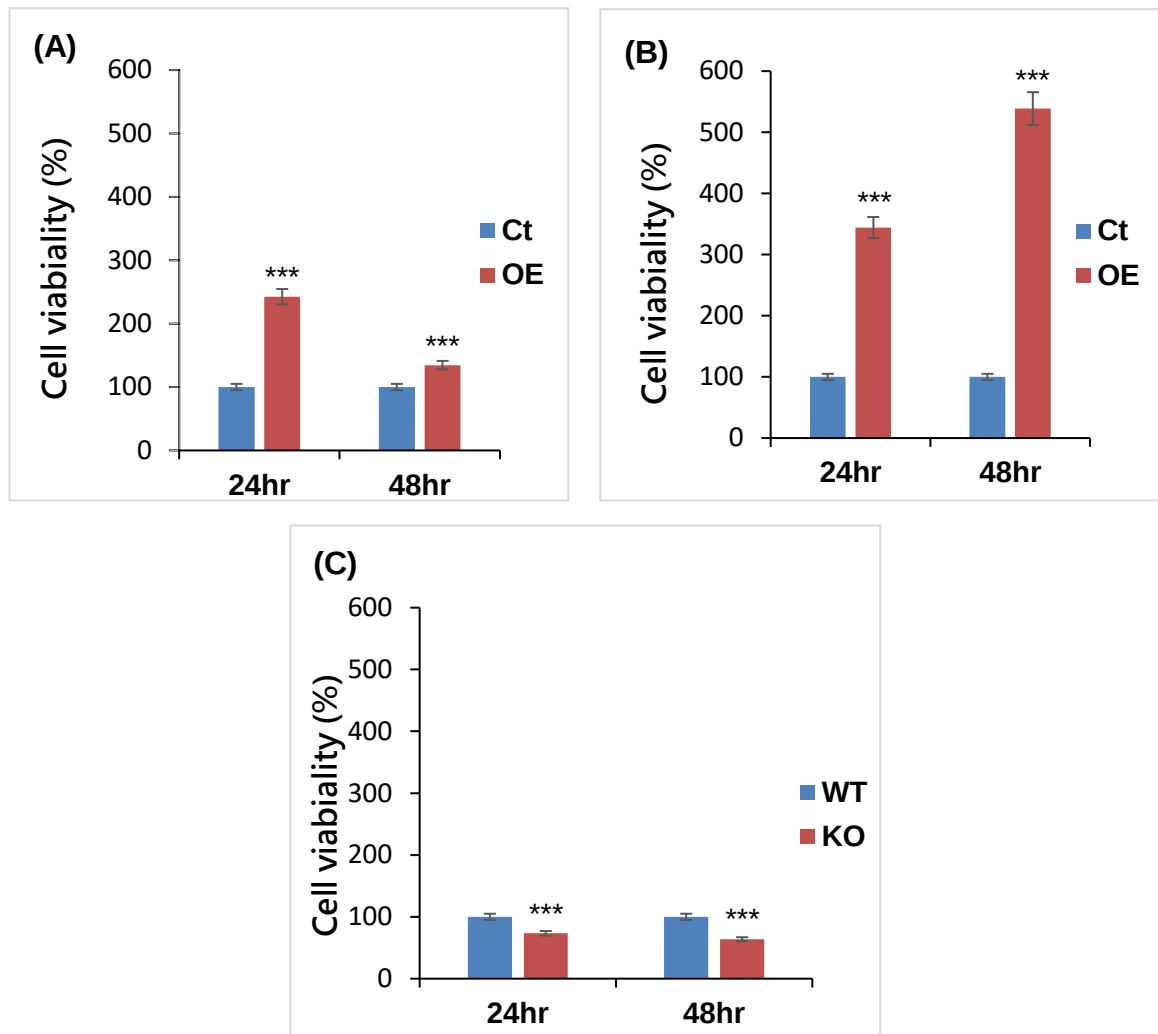
圖三、以西方墨點法確認針對甲狀腺癌細胞(ATC)的特殊處理結果

Ct 為對照組，OE 為 EpCAM 過量表現組，WT 為野生癌細胞組，KO 為 EpCAM 剔除組(圖片為作者拍攝)

二、觀察 EpCAM 對 ATC 癌症進程的影響

(一) EpCAM 對甲狀腺癌細胞(ATC)存活率的影響

確認 EpCAM 的過量表達或剔除在以上三個細胞株皆成功後，以細胞存活率試驗來了解 EpCAM 的有無是否會對甲狀腺癌細胞的生長能力造成影響。圖四 (A)(B) 顯示，無論是在 T178 或 T245 細胞株，進行過量表達 EpCAM 處理的 ATC 細胞有較高的吸光值，顯示具有過量表現 EpCAM 的 ATC 細胞的存活率明顯高於對照組。然而，在圖四(C) EpCAM 剔除的 ATC 細胞中，其細胞存活率明顯低於野生型癌細胞。由此可知，EpCAM 過量表現能提升 ATC 細胞的存活率。



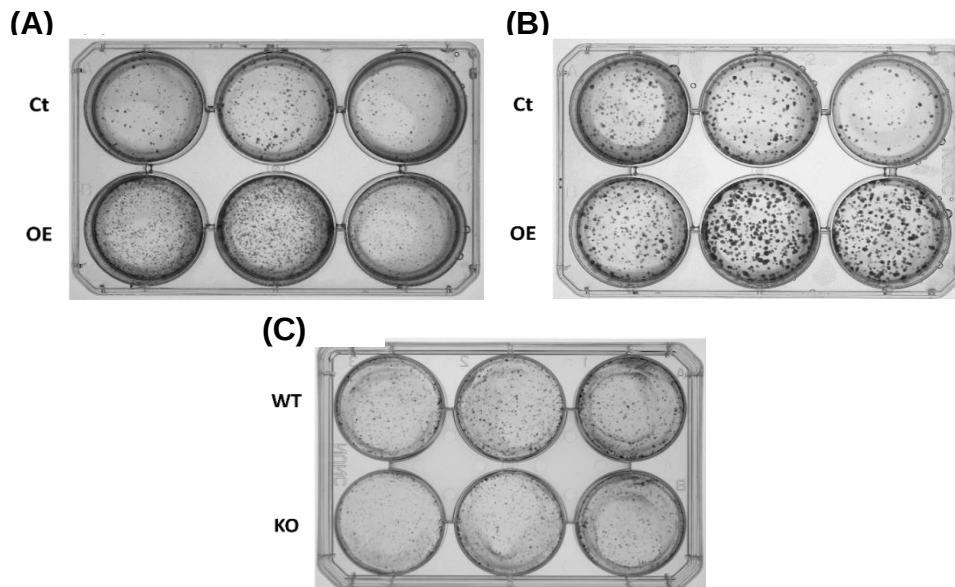
圖四、EpCAM 的有無對三種甲狀腺癌細胞株存活率(cell viability)的影響結果

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct：對照組，OE：EpCAM 過量表現組，WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM 剔除組。(A)(B)圖中以 Ct 組、(C)圖中以 WT 組數值為 100%，並使用 T-test 分析。
*** $p < 0.001$ 。(n = 8) (圖片為作者統計後繪製)

(二) 細胞群落試驗 (Colony formation assay)

環境中細胞數較少時，該環境對細胞屬於艱困環境，此時細胞會傾向以形成群落的方式生長。圖五為培養盤在白光下的照片，可顯示無論是 T178 或 T245 ATC 細胞株(圖五(A)(B))，過量表達 EpCAM 的細胞皆有較密集的群落生長情形，圖五(C)則顯示了 EpCAM 剔除的 T264 ATC 細胞株形成細胞群落的狀態較差。因此可以推斷，EpCAM 的存在會增強 ATC 細胞群落生長的能力。



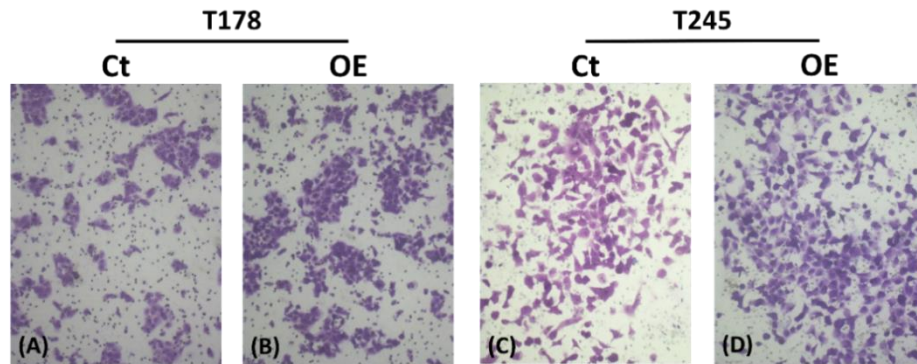
圖五、白光下 EpCAM 過量表現與 EpCAM 剔除之 ATC 細胞群落生長狀況
 (A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株
 Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組
 WT:野生型癌細胞組，KO:EpCAM 剔除組
 (圖片為作者拍攝)

(三) EpCAM 對甲狀腺癌細胞 (ATC) 轉移與侵入能力的影響

癌細胞的轉移與侵入一直是癌症治療中十分棘手的問題之一，其分子機制也受到高度關注。將 ATC 培養於如圖二的裝置中，經顯微照相，並以 0.5%SDS 回溶於結晶紫後測量其吸光值。若吸光值越高，代表癌細胞轉移與侵入能力越強。

1. 轉移能力測試(Cell migration assay)

圖六的顯微照片中顯示出，T178 與 T245 ATC 細胞中，EpCAM 過量表現 (OE) 的組別，穿過半透膜的細胞數量較對照組 (Ct) 多。且經由吸光值量測定後，發現無論是 T178 或 T245 細胞株，過量表達 EpCAM 的細胞在轉移試驗的吸光值較高 (圖七(A)(B))，反觀 EpCAM 剔除組 (KO) 其吸光值較野生型癌細胞 (WT) 低(圖七(C))，代表 EpCAM 能提升 ATC 細胞的轉移能力。

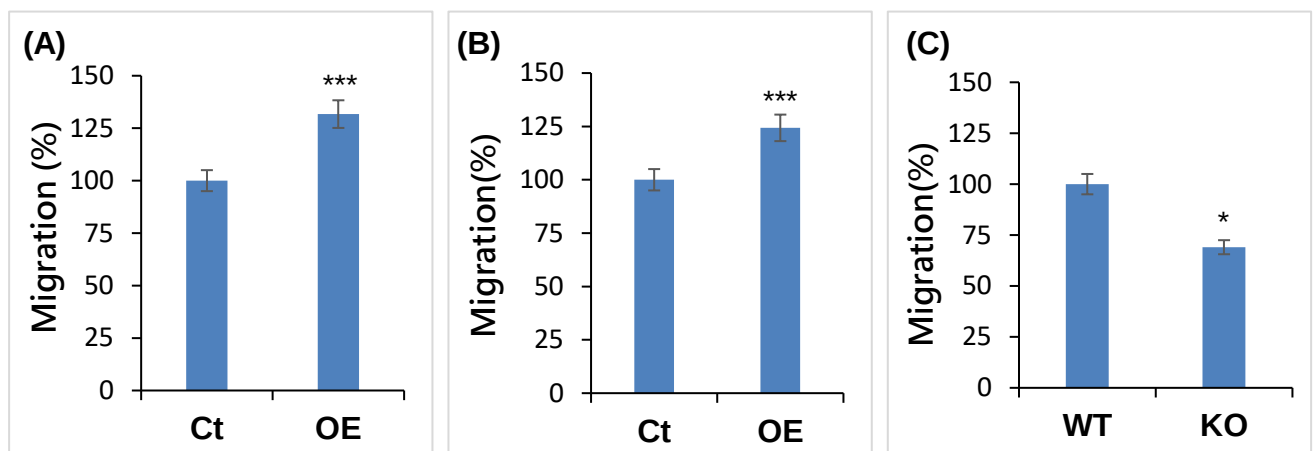


圖六、ATC 細胞經細胞轉移能力試驗後的顯微照相圖

(A)(B) T178 ATC 細胞株、(C)(D) T245 ATC 細胞株

Ct: 對照組，OE: EpCAM 過量表現組

(圖片為作者拍攝)



圖七、ATC 細胞轉移能力試驗(Migration assay)

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組。

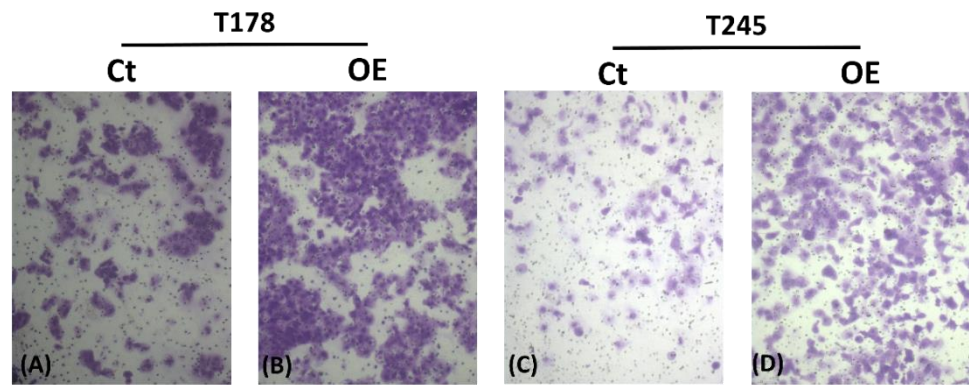
WT:野生型癌細胞組，KO:EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以 Ct 或 WT 組數值為 100%，並使用 T-test 分析。

*** $p < 0.001$ ，* $p < 0.05$ 。(n = 3) (圖片為作者統計後繪製)

2. 侵入能力測試(Cell invasion assay)

圖八的顯微照片中顯示出，T178 與 T245 ATC 細胞中，EpCAM 過量表現 (OE) 的 ATC 穿過 matrigel 的細胞數量明顯較對照組 (Ct) 多，且經由吸光值量測定後，無論是 T178 或 T245 細胞株，EpCAM 過量表現的 ATC 細胞在侵入能力試驗的吸光值較高(圖九(A)(B))，而 EpCAM 剔除組 (KO) 其吸光值較野生型癌細胞 (WT) 低(圖九 (C))，代表 EpCAM 能夠提升 ATC 細胞的侵入能力。

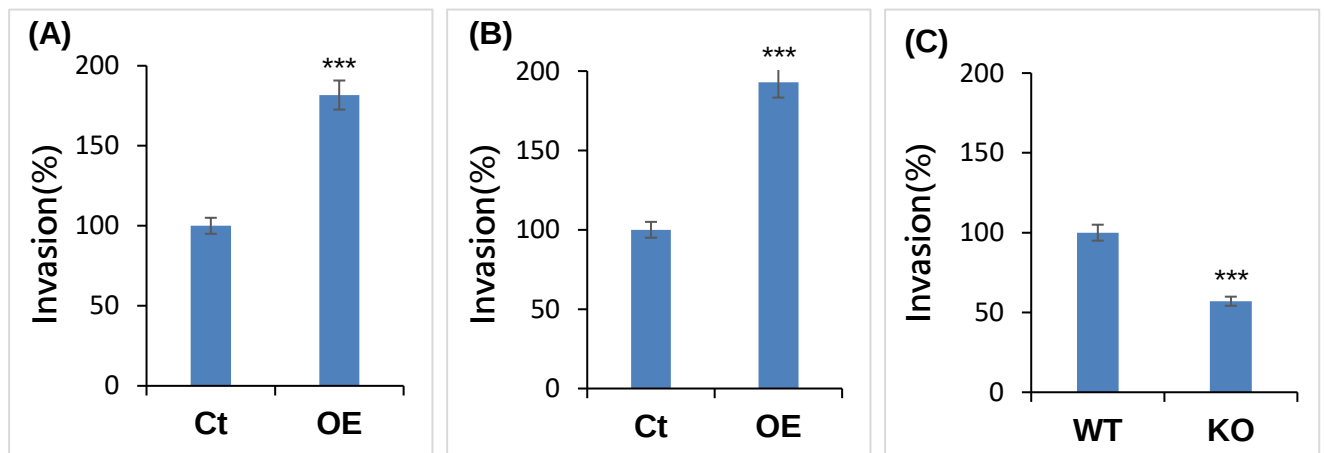


圖八、ATC 細胞經細胞侵入能力試驗後的顯微照相圖

(A)(B) T178 ATC 細胞株、(C)(D) T245 ATC 細胞株

Ct: 對照組，OE: EpCAM 過量表現組

(圖片為作者拍攝)



圖九、ATC 細胞侵入能力試驗(Invasion assay)

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組。

WT:野生型癌細胞組，KO: EpCAM 剔除組。

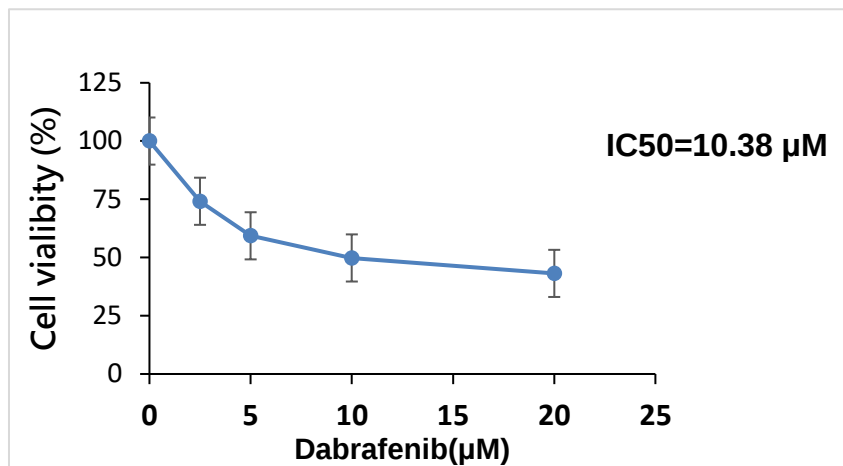
圖中統計數據以 Ct 或 WT 組數值為 100%，並使用 T-test 分析。

***p<0.001。(n = 3) (圖片為作者統計後繪製)

三、觀察 Dabrafenib 對 ATC 的影響

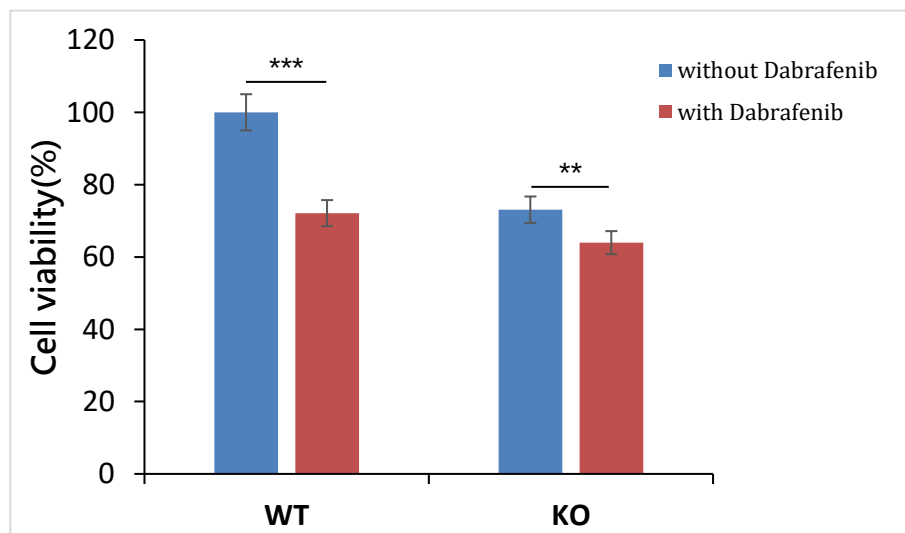
(一) Dabrafenib 對甲狀腺癌細胞(ATC)存活率的影響

在進入後續的藥物試驗前，我們以野生型 (WT) 細胞株作為實驗對象，分別以 0、2.5、5、10、20 μ M 的 dabrafenib 處理三天，再透過細胞存活率試驗計算 dabrafenib 對 ATC 的 IC₅₀(半抑制濃度)，並以此濃度作為後續藥物測試實驗的濃度考量。結果如圖十所示，dabrafenib 對 ATC 細胞的 IC₅₀ 約為 10.38 μ M。根據此實驗結果，後續藥物試驗會以 10 μ M 作為測試濃度。



圖十、不同濃度 Dabrafenib 對野生型 ATC 細胞(T264)處理 72 小時後之 IC₅₀ 測定 (n=5) (圖片為作者統計後繪製)

為瞭解對癌細胞可能具有療效的小分子藥物，dabrafenib，對 ATC 生長能力的影響情形，我們分別在培養液中加入 10 μ M 的 dabrafenib 並培養 24 小時後，再進行細胞存活率試驗。結果如圖十一顯示，無論是野生癌細胞 (WT) 或 EpCAM 剔除組 (KO) 癌細胞，加入 dabrafenib 後皆有較低的吸光值，由此可知 dabrafenib 的確能夠有效降低 ATC 細胞的生長能力。



圖十一、Dabrafenib 對 ATC 細胞存活率之試驗結果

WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM 剔除組

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為 100%，並使用 T-test 分析。***p<0.001，**p<0.01。(n = 8)

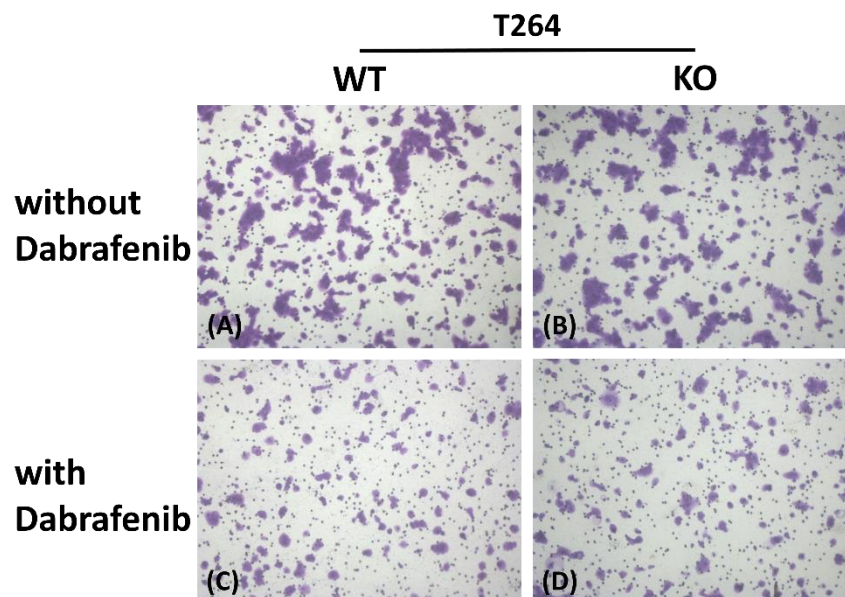
(圖片為作者統計後繪製)

(二) Dabrafenib 對細胞轉移與侵入能力的影響

Dabrafenib 是 BRAF 小分子抑制劑，會造成磷酸化的 ERK 被抑制，我們以 T264 為實驗細胞株，於培養液內加入了 $10\ \mu\text{M}$ 的 dabrafenib 並培養 24 小時後，分析 dabrafenib 對 ATC 細胞轉移與侵入能力的影響。

1. 轉移能力測試(Cell migration assay)

在轉移能力測試中，將染色細胞的結晶紫回溶於 SDS 並經吸光值定量測定後發現，無論是 WT 或 KO 細胞株，加入 dabrafenib 後的細胞轉移數量(圖十二(C)(D))或吸光值(圖十三)皆較未加藥物時低，由此可知 dabrafenib 能夠有效降低 T264 細胞的轉移能力。



圖十二、Dabrafenib 的有無經細胞轉移能力試驗後的 ATC 顯微照相圖

(A)無 dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

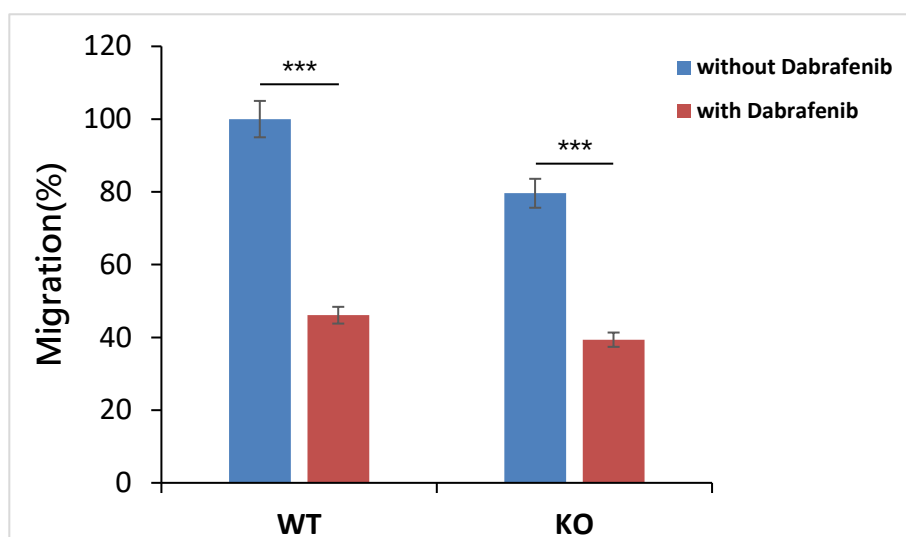
(B)無 dabrafenib 處理的 T264 ATC EpCAM 剔除組

(C) $10\ \mu\text{M}$ dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

(D) $10\ \mu\text{M}$ dabrafenib 處理的 T245 ATC EpCAM 剔除組

WT:野生型癌細胞，KO: EpCAM 剔除組

(圖片為作者拍攝)



圖十三、Dabrafenib 對 ATC 細胞轉移能力試驗結果

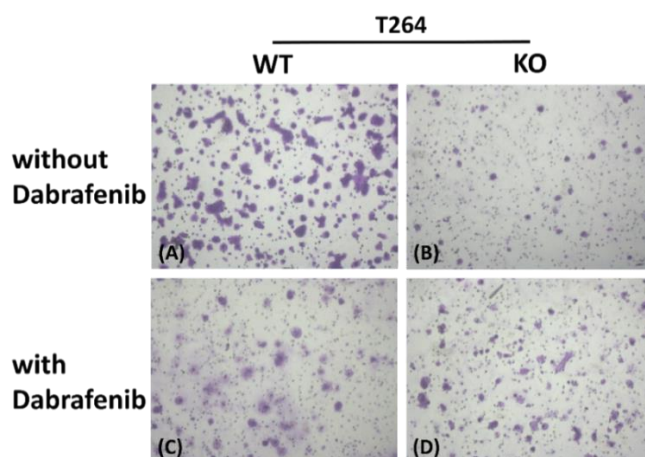
WT:野生型癌細胞，KO: EpCAM 剔除組

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為 100%，並使用 T-test 分析。*** $p < 0.001$ 。(n = 4)

(圖片為作者統計後繪製)

2. 侵入能力測試 (Cell invasion assay)

在癌細胞侵入能力測試中發現，無論是 WT 或 KO 細胞株，加入 dabrafenib 後的細胞侵入數量(圖十四(C)(D))或吸光值(圖十五)皆較未加藥物時低，由此可知 dabrafenib 能夠有效降低 T264 癌細胞的侵入能力。



圖十四、Dabrafenib 的有無經細胞侵入能力試驗後的 ATC 顯微照相圖

(A)無 dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

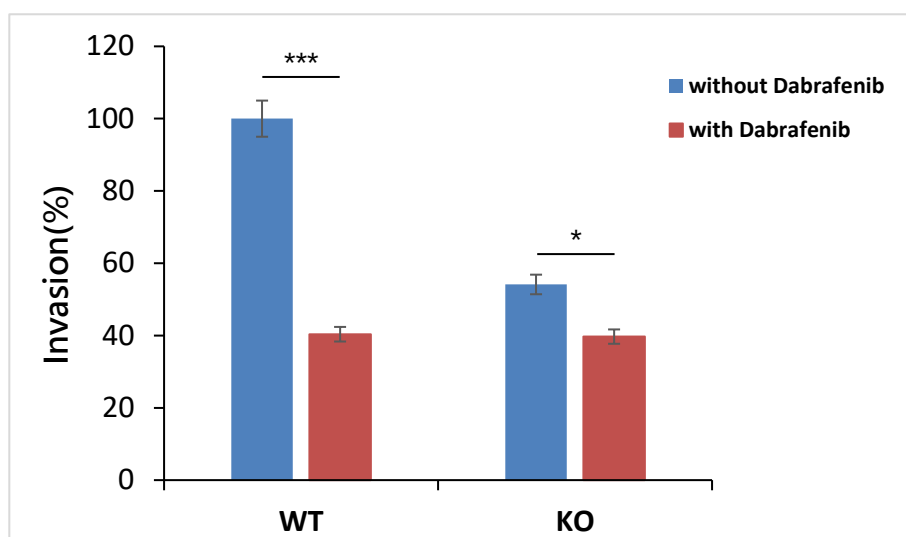
(B)無 dabrafenib 處理的 T264 ATC EpCAM 剔除組

(C)10 μ M dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

(D)10 μ M dabrafenib 處理的 T245 ATC EpCAM 剔除組

WT:野生型癌細胞，KO: EpCAM 剔除組

(圖片為作者拍攝)



圖十五、Dabrafenib 對 ATC 細胞侵入能力試驗結果

WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

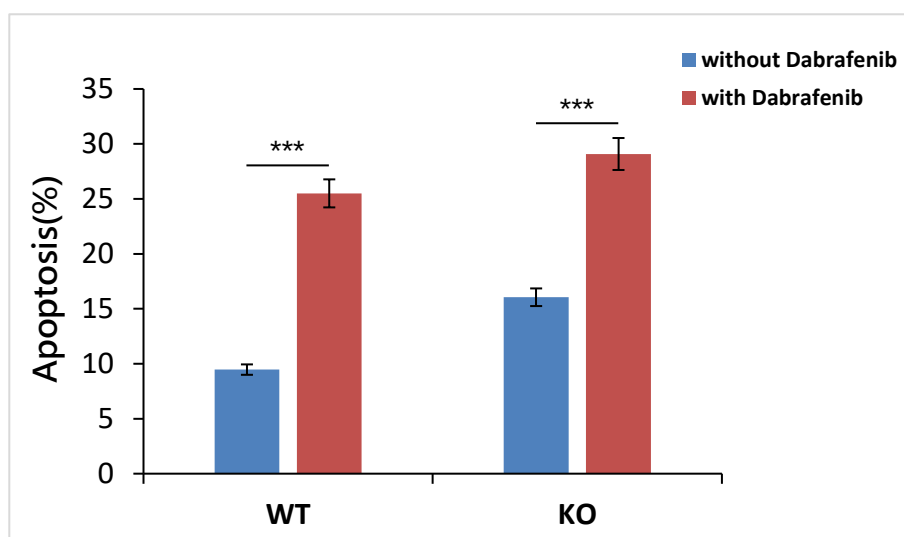
圖中統計數據以不含 dabrafenib 的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為 100%，並使用 T-test 分析。*** $p < 0.001$ ，* $p < 0.05$ (n = 4)

(圖片為作者統計後繪製)

(三) Dabrafenib 對細胞凋亡率的影響

我們以 T264 為實驗細胞株，於培養液內加入 $10 \mu\text{M}$ 的 dabrafenib 並培養 24 小時後，利用 PI 與 Annexin-V 兩種染劑對細胞做染色，再用流式細胞儀進行分析。PI 染劑能插入鹼基之間與 DNA 結合，且對活細胞不具滲透性，故能檢測凋亡晚期的細胞；早期凋亡細胞其磷脂醯絲氨酸 phosphatidylserine (PS) 會暴露在細胞膜外，故使用與 PS 高親和力的 Annexin-V 染劑，即可檢測凋亡早期的細胞。若細胞能與 PI 與 Annexin-V 雙染劑結合，代表細胞已經壞死，若細胞無受到 PI 與 Annexin-V 的染色，即代表其為未進入細胞凋亡的活細胞。藉由這兩種染劑的交互作用，即可用於活細胞，壞死細胞，凋亡早期與凋亡晚期細胞的區分。

由圖十六可知，不論是野生型癌細胞 (WT)，或是 EpCAM 剔除組的癌細胞 (KO)，加入 dabrafenib 後，其細胞凋亡的情形皆顯著高於對照組。由此推測 Dabrafenib 可能具有促進癌細胞細胞凋亡的現象。



圖十六、Dabrafenib 對 ATC 細胞凋亡率的影響結果

WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以 T-test 分析。*** $p < 0.001$ ($n = 6$)

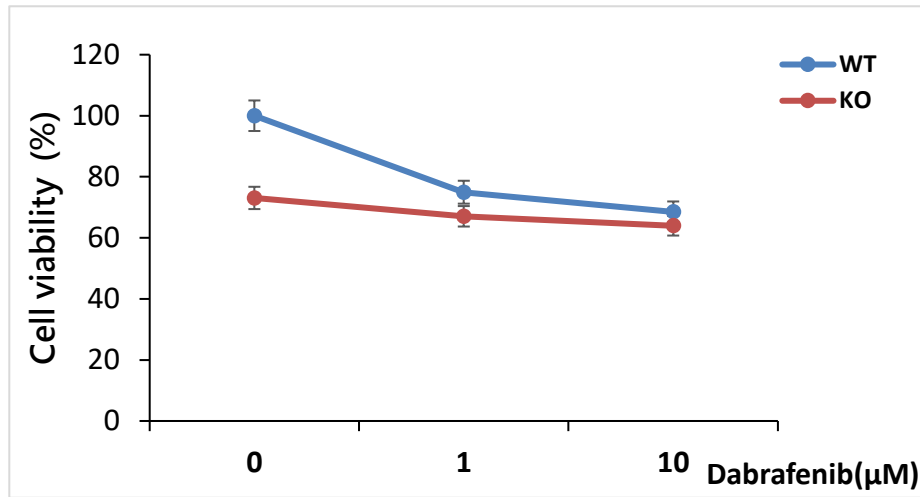
(圖片為作者統計後繪製)

(四) 分析 EpCAM 與 Dabrafenib 在細胞存活率、轉移與侵入能力及細胞凋亡試驗中是否有交互關係

在了解 EpCAM 與 dabrafenib 對 ATC 的影響過後，我們希望能夠探討這兩項因素間是否具有交互關係。我們將各項實驗結果重新整理，在對細胞存活率、轉移與侵入能力試驗的結果進行統計分析時皆以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值作為 100%，並利用雙因子變異數分析，以了解 EpCAM 與 dabrafenib 之間是否存在交互作用的關係。

1. 細胞存活率試驗(Cell viability assay)

藉由前述細胞存活率試驗的結果我們瞭解到 EpCAM 能夠增加 ATC 細胞的生長能力，dabrafenib 則會造成相反的影響。而從圖十七的統計結果當中我們發現，這兩項因素的 p 值為 0.000031025，代表兩者之間具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對 ATC 細胞生長能力的影響具有交互作用關係。



圖十七、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞存活率之交互作用關係圖

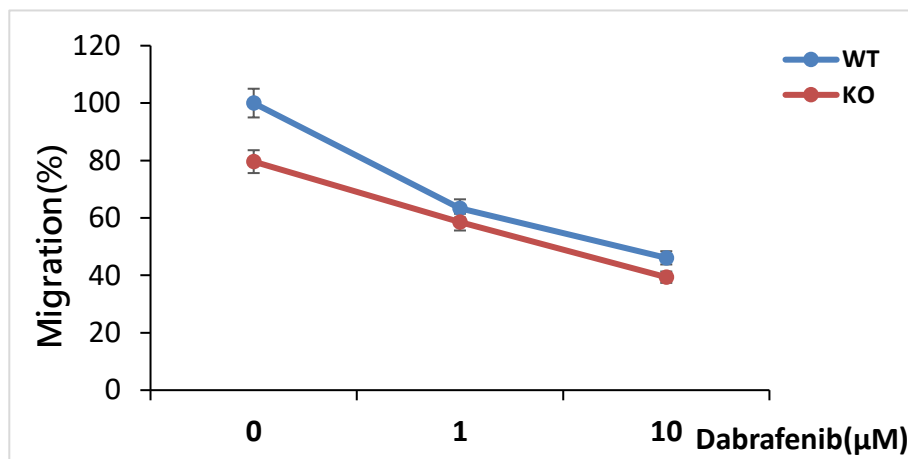
WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值為 100%，並使用雙因子變異數分析 (Two way ANOVA) P 值<0.001。(n = 8)

(圖片為作者統計後繪製)

2. 轉移能力測試 (Cell migration assay)

在轉移能力試驗中，從圖十八的統計結果我們發現，EpCAM 與 dabrafenib 兩項因素的 p 值為 0.15499837 代表兩者之間不具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對細胞轉移能力的影響不具有交互作用。



圖十八、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞轉移能力之交互作用關係圖

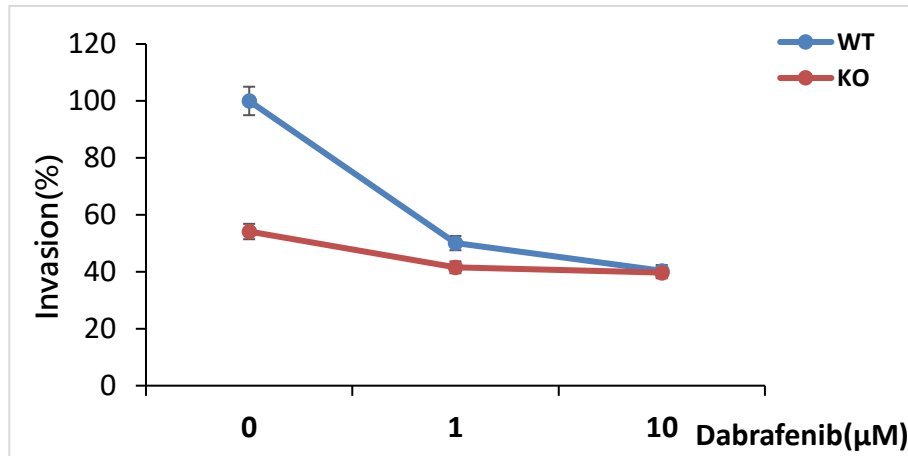
WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值為 100%，並使用雙因子變異數分析(Two way ANOVA) P 值 > 0.1。(n = 4)

(圖片為作者統計後繪製)

3. 侵入能力測試 (Cell invasion assay)

在侵入能力試驗中，從圖十九的統計結果我們發現，EpCAM 與 dabrafenib 兩項因素的 p 值為 0.00000112 代表兩者之間具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對細胞侵入能力的影響具有交互作用。



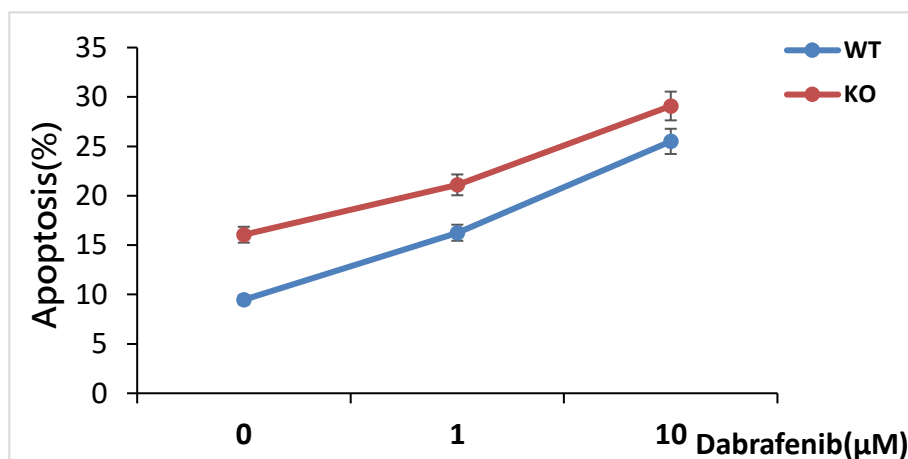
圖十九、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞侵入能力之交互作用關係圖

WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值為 100%，並使用雙因子變異數分析 (Two way ANOVA) P 值 < 0.001。(n = 4)
(圖片為作者統計後繪製)

4. 細胞凋亡試驗 (Cell apoptosis assay)

在細胞凋亡試驗中，從圖二十的統計結果我們發現，EpCAM 與 dabrafenib 兩項因素的 p 值為 0.76692 代表兩者之間不具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對細胞侵入能力的影響不具有交互作用。



圖二十、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞凋亡之交互作用關係圖

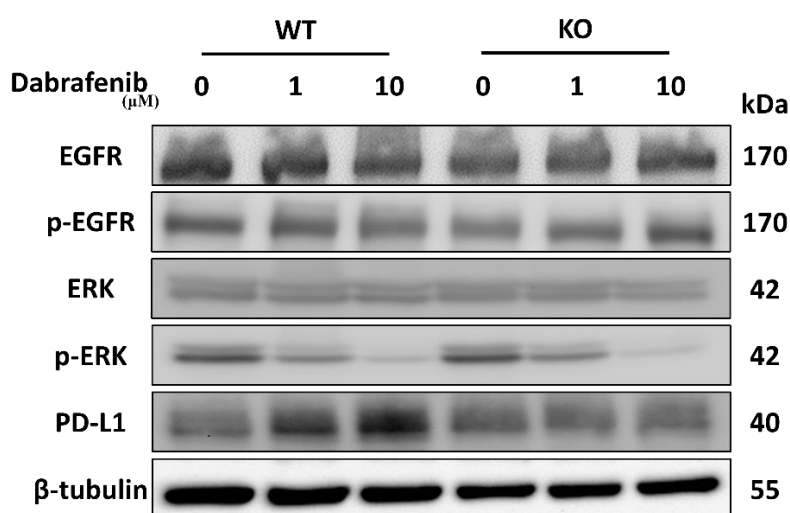
WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組

圖中統計數據使用雙因子變異數分析 (Two way ANOVA) P 值 > 0.1 (n = 6)
(圖片為作者統計後繪製)

(五) 分析受 Dabrafenib 影響而產生的蛋白質表現量變化

在確認了 dabrafenib 能有效降低 ATC 的生長能力、細胞轉移與入侵能力後，將 ATC 細胞 T264 置於含有 0、1、10 μ M dabrafenib 的培養液中培養 6 小時，並透過西方墨點法確認具有影響癌細胞增生的磷酸化 ERK (p-ERK)、磷酸化 EGFR (p-EGFR) 與 PD-L1 蛋白的表現量變化，以了解甲狀腺癌細胞的各種癌化表徵是如何受到這些蛋白質含量變化的影響。

結果如圖二十一所示，首先 β -tubulin 的狀態顯示，每個分析樣本中的蛋白質含量大致上是相等的。其次，在野生型(WT)與 EpCAM 剔除組(KO)癌細胞皆可發現，加入 dabrafenib 後，ERK 蛋白的表現量在各組皆相近，然而 p-ERK 蛋白的表現量隨藥物濃度的上升而逐步下降，推測 dabrafenib 在實驗中確實具有抑制癌細胞訊息傳遞路徑中 ERK 蛋白磷酸化的效果，且其抑制效果與藥物濃度呈現正相關，故透過 p-ERK 受 dabrafenib 抑制的作用而影響 ATC 癌細胞的生長。此外，在加入不同濃度 dabrafenib 後，在野生型 (WT) 與 EpCAM 剔除組 (KO) 癌細胞中，無論是 EGFR 亦或 p-EGFR，其蛋白質表現量皆沒有明顯差異，證實 dabrafenib 對 p-ERK 的抑制，並不會回饋性的影響 EGFR 的表現量與磷酸化。最後，在野生型 (WT) 細胞中能夠發現，PD-L1 的表現量隨藥物濃度的上升而有不同程度的增加，而 EpCAM 剔除 (KO) 的癌細胞，在經由藥物處理過後，PD-L1 的表現量並無顯著變動。



圖二十一、以西方墨點法確認不同濃度 Dabrafenib 對 T264 甲狀腺癌細胞(ATC)蛋白質表現量 (表格為作者拍攝)

WT 為野生型癌細胞組，KO 為 EpCAM 剔除組。

肆、討論

一、 EpCAM 對 ATC 甲狀腺癌細胞進程的影響

從過去的研究中我們了解到，EpCAM 能夠促進大腸直腸癌細胞的生長、增殖、轉移等能力，且此增強結果與 EpEX 所誘導的 EGFR 信息傳導路徑有主要關係，不僅如此 EpEX 可透過自泌 (autocrine) 與旁泌 (paracrine) 的方式而影響臨近細胞 (Liang et al., 2018; Chen et al., 2020)。對比我們的實驗，EpCAM 不只影響直腸癌細胞，對未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)同樣具有相似的影響效果。

從上述的結果我們確認了 EpCAM 能夠提升 ATC 細胞的轉移與侵入能力。然而在侵入試驗方法中，會在 transwell 內加入一層能模擬體內胞外基質環境的 matrigel 材料。若同時比較圖七與圖九可發現，侵入試驗中的 OE 與 Ct 組的差距值明顯大於轉移試驗，此一結果顯示，EpCAM 能更有效的提升細胞的侵入能力。因此我們相信，當處於相同的臨床生理環境下，EpCAM 表達量較高的癌細胞，藉由其高侵入的特性，可能會為病人帶來更高的威脅性。

綜合以上，在細胞實驗中，EpCAM 的高表現量能夠影響 ATC 細胞進程，推測在動物實驗中也會出現相似結果，因此我們相信 EpCAM 在臨床中能夠作為偵測 ATC 的篩檢分子之一。

二、 Dabrafenib 藥物如何促使細胞凋亡

從圖十六的結果我們能發現，在 10 μ M dabrafenib 處理下，未分化性甲狀腺癌細胞的細胞凋亡率有顯著的上升，由此能夠推論 dabrafenib 能夠促使細胞凋亡的發生。

EGFR 活化的下游蛋白路徑中，有一個稱為 FOXO3a 的蛋白質，未受到磷酸化的 FOXO3a 會在細胞核中積聚，增強參與細胞凋亡的各種基因的轉錄 (Chen et al., 2020)，從而促使細胞凋亡的發生。不過，磷酸化的 FOXO3a 蛋白 (p-FOXO3a) 會被控制在細胞質中無法進入細胞核，此外與 EGFR 相關的 ERK 與 AKT 等蛋白質皆被證實能夠透過不同路徑促進 FOXO3a 的磷酸化，而癌細胞便能夠透過此機制阻止細胞凋亡的發生 (圖一)(Chen et al., 2020)。由此推測，dabrafenib 對 ERK 蛋白磷酸化的抑制作用，使其下游的 FOXO3a 蛋白磷酸化效果受到抑制，從而增加了 ATC 的細胞凋亡率。

三、 EpCAM 與 Dabrafenib 在各項能力中是否有交互關係

近年內年小分子藥物在癌症治療的研究及臨床上的應用都取得了相當大的進展，然而在過去的研究中卻發現，相同的藥物在不同患者間不一定能夠帶來相似的治療效果。隨著癌症基因組定序的技術與資料庫發展成熟，學者發現同類型的癌細胞間依然具有數百至數千個基因表現的差異，這些差異也對臨床藥物的選擇帶來挑戰性 (Hoelder et al.,2012)。面臨上述困難，為了能夠對病患帶來最佳的治療效果，利用設計藥物組合來達成精準醫療的目標也逐漸受到重視，在這樣的願景下，了解單一分子與藥物間的交互關係便相當重要 (Hoelder et al.,2012)。從圖十七與圖十九的結果我們發現，EpCAM 與 dabrafenib 在存活率與侵入能力試驗中具有交互關係，並且當 EpCAM 存在時，dabrafenib 對 ATC 細胞生長與侵入能力具有較好的抑制效果，由此推測，由 EpCAM 所誘導的 ERK-BRAF 路徑對於細胞這兩項能力應該相當重要，也因此若是在臨床希望透過小分子藥物抑制癌細胞存活與侵入時，dabrafenib 能作為一個相當不錯的藥物選擇。

不過，這兩項因子在轉移能力卻沒有表現出明顯的交互關係，首先，比較轉移與侵入兩項能力的差異後可以發現，癌細胞侵入周圍組織時，更多的牽涉到基底膜的破壞與胞外基質的水解，若 EpCAM 與 dabrafenib 皆對此步驟造成影響，便有可能促使這兩項因子在侵入能力中具有交互關係，而在轉移能力中則不具有。

此外，細胞凋亡試驗中這兩項因素也不具交互關係，從圖一的信號傳遞路徑圖中能發現，EpCAM 和 EGFR 結合後所活化的 ERK 和 AKT 這兩個下游蛋白都與細胞凋亡有關，由於我們推測 dabrafenib 應該是透過 ERK 蛋白的路徑促使細胞凋亡的發生，因此我們進一步推斷，在 ATC 細胞中，EpCAM 應該更仰賴於活化 AKT 蛋白的路徑來抑制細胞凋亡，主要作用路徑不同的原因便導致 EpCAM 與 dabrafenib 這兩項因素在細胞凋亡試驗中不具交互關係。

四、 小分子藥物 Dabrafenib 對 ATC 甲狀腺癌細胞的影響

(一) 加入 Dabrafenib 後 ATC 細胞內蛋白質表現量的差異

1. 有關 p-EGFR 蛋白與 p-ERK 蛋白的探討

從圖二十一中可知，加入 dabrafenib 後，野生型 (WT) 與 EpCAM 剔除組 (KO) 癌細胞的磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白表現量皆較未加藥時更低，推測 dabrafenib 在實驗中確實具有抑制癌細胞訊息傳遞路徑中 ERK 蛋白的效果而影響癌細胞的生長。在過去研究中利用 dabrafenib 對非小細胞肺癌進行治療時也能看到相同的趨勢。此外，加入 dabrafenib 後，EGFR 蛋白的表現量沒有出現明顯的變化，除了可以知道藥物對於 BRAF 蛋白的抑制並非透過 EGFR 這個位點所開始作用，也進一步確認了 dabrafenib 對 BRAF 蛋白的抑制，並不會回饋性的影響 EGFR 的表現量。

從過去針對甲狀腺癌的研究我們可以知道，ERK 的磷酸化主要可以透過 EGFR 與 BRAF 路徑來誘導，並對下游蛋白或基因造成相同且具有加成性的影響 (Notarangelo et al.,2017)。此外，具有較高 BRAF 蛋白突變率的癌細胞與不具有此突變細胞相比，對於 BRAF 抑制劑的敏感性較高，臨床上能獲得較佳的治療效果 (Notarangelo et al.,2017)。又未分化性甲狀腺癌(ATC)具有相當高比例的 BRAF V600E 突變 (Subbiah et al., 2018)，因此我們相信，dabrafenib 等 BRAF 抑制劑對於此種癌症會有值得期待的治療成效。

2. 有關 PD-L1 蛋白的探討

Programmed cell death 1 (PD-1) 是一種位於巨噬細胞和 T 細胞表面的醣蛋白。當 PD-1 與其配體 PD-1 ligand (PD-L1)結合時，可以抑制胞毒型 T 細胞的免疫反應，從而導致表達 PD-L1 的細胞具有一定程度的免疫耐受性 (Ahn et al.,2017)。PD-L1 存在於各類腫瘤細胞中，且其表現量與腫瘤微環境 (Tumor microenvironment) 中的多種致癌信號或干擾素- γ (Interferon- γ , IFN γ) 的表達量有關。PD-L1 表達被發現與黑色素瘤、非小細胞肺癌及甲狀腺癌患者的復發風險增加和生存時間縮短有關 (Ahn et al.,2017)。此外，在非小細胞肺癌、甲狀腺癌等多種上皮腫瘤中皆發現 PD-L1 的表達量與磷酸化 ERK 的存在呈現正相關性，且臨床治療上已有透過

抑制磷酸化 ERK 的藥物治療非小細胞肺癌的紀錄 (Brauner et al., 2016)，顯示該蛋白在癌症進程中的重要性。

從圖二十一的結果可以發現，在野生型 (WT) 癌細胞中，經由 dabrafenib 處理後具有較高的 PD-L1 表現量，且隨 dabrafenib 的濃度上升而增加，而 EpCAM 剔除組 (KO) 的癌細胞在藥物處理後 PD-L1 的表現量卻沒有顯著變化。我們推測在逐步增加 dabrafenib 的處理下，ATC 細胞內可能有其他基因或機制參與 PD-L1 的調控，使 PD-L1 的表現量維持恆定。同時微量表現 EpCAM 的野生型 (WT) ATC 細胞 PD-L1 表現量有上升趨勢，顯示 EpCAM 有可能是增加 PD-L1 表現量的因素之一，甚至進而使 ATC 細胞對 dabrafenib 產生抗藥性。

3. 如何使西方墨點法結果更能聚焦在 Dabrafenib 的影響

在抽取蛋白質前我們會以含有 dabrafenib 的培養液培養細胞，在先前的實驗中，我們皆是使用含有 10%FBS 的培養液，但 FBS 當中具有多種不同生長因子，雖然從實驗中無法看出直接證據，但這些生長因子可能會影響蛋白質表現量與磷酸化，因此希望未來能選用不含 FBS 的培養液 (no FBS medium) 進行培養，以減少外部因子的干擾。

(二) Dabrafenib 與其他藥物的聯合使用

從文獻中我們發現，以 BRAF 抑制劑治療他種甲狀腺瘤時，可能會同步使用其他小分子藥物，這些藥物多半能夠抑制細胞傳訊路徑中 BRAF 外的其他蛋白質，並且已被證實比起單獨使用，使用聯合藥物治療的成效更佳，還能延緩病患出現抗藥性的時間，並降低藥物相關不良反應的發生率 (Notarangelo et al., 2017)。希望未來我們能設計系統化的測試方法，進行藥物種類與濃度對於聯合治療的可行性分析。

伍、結論與應用

- 一、 EpCAM 能提升未分化性甲狀腺癌細胞 (ATC) 的增殖、生長、轉移與侵入能力。
- 二、 Dabrafenib 能夠降低未分化性甲狀腺癌細胞 (ATC) 的增殖、生長、轉移與侵入能力。
- 三、 Dabrafenib 能夠增加未分化性甲狀腺癌細胞 (ATC) 的細胞凋亡率。
- 四、 Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 癌細胞生長與侵入能力的影響具有交互關係。

五、 Dabrafenib 能抑制 ATC 癌細胞中的 p-ERK 蛋白的產生，以減緩癌細胞的生長。

未來對於此一研究的方向，可使用不含 FBS 的培養液培養細胞等方式，進行 ATC 細胞內蛋白質分析，以期能更好的聚焦於 dabrafenib 對 ATC 細胞的影響。此外，也可結合其他類型的小分子藥物進行聯合試驗，再與單獨使用的成效進行比較，並釐清兩種藥物的作用機轉，以做為藥物聯合使用可行性的判斷依據。

陸、參考文獻資料

- 一、Ahn S., Kim T.H., Kim S.W., Ki C.S., Jang H.W., Kim J.S., Kim J.H., Choe J.H., Shin J.H., Hahn S. Y., Oh Y.L., & Chung J. H. (2017). Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 24(2):97 – 106. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0421>
- 二、Banzi M., De Blasio, S., Lallas A., Longo C., Moscarella E., Alfano R., & Argenziano G. (2016). Dabrafenib: a new opportunity for the treatment of BRAF V600-positive melanoma. *OncoTargets and Therapy*. 9:2725-2733.
- 三、Brauner E., Gunda V., Borre V.P., Zurakowski D., Kim Y.S., Dennett K.V., Amin S., Freeman G.J., Parangi S. (2016). Combining BRAF inhibitor and anti PD-L1 antibody dramatically improves tumor regression and anti tumor immunity in an immunocompetent murine model of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget*. 7(13):17194-17211. doi: 10.18632/oncotarget.7839.
- 四、Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
- 五、Chen, H. N., Liang, K. H., Lai, J. K., Lan, C. H., Liao, M. Y., Hung, S. H., Chuang, Y. T., Chen, K. C., Tsuei, W. W., & Wu, H. C. (2020). EpCAM Signaling Promotes Tumor Progression and Protein Stability of PD-L1 through the EGFR Pathway. *Cancer research*, 80(22), 5035 – 5050. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1264>
- 六、Hoelder S., Clarke, P. A., & Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Molecular oncology*, 6(2), 155-176.

- 七、Liang K.H., Tso H.C., Hung S. H., Kuan I.I., Lai J.K., Ke F.Y., et.al. (2018). Extracellular domain of EpCAM enhances tumor progression through EGFR signaling in colon cancer cells. *Cancer Letters*. 433:165-175. doi:10.1016/j.canlet.2018.06.040.
- 八、Notarangelo T., Sisinni L., Condelli V., & Landriscina M. (2017). Dual EGFR and BRAF blockade overcomes resistance to vemurafenib in BRAF mutated thyroid carcinoma cells. *Cancer Cell International*. 17(86):1-9. doi:10.1186/s12935-017-0457-z.
- 九、Ralhan R., Cao J., Lim T., MacMillan C., Freeman J.L., & Walfish P.G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer*. 10(1):1-11. doi:10.1186/1471-2407-10-331.
- 十、Subbiah V., Kreitman R.J., Wainberg Z.A., Cho J.Y., Schellens J.H., Soria J.C., et.al. (2018). Dabrafenib and trametinib treatment in patients with locally advanced or metastatic BRAF V600 – mutant anaplastic thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 36(1): 7-13. doi:10.1200/JCO.2017.73.6785.

【評語】 090005

1. 創新性與重要性：

本研究探討了上皮細胞黏附分子(EpCAM)和小分子抗癌藥物 dabrafenib 在未分化型甲狀腺癌(ATC)中的作用，具有重要的創新性和臨床意義。ATC 是一種極具侵襲性的罕見癌症，目前缺乏有效的治療方法。研究發現 EpCAM 能增強 ATC 的惡性行為，而 dabrafenib 則能抑制 ATC 細胞的生長和轉移，這為開發新的 ATC 治療策略提供了重要線索。特別是，研究揭示了 dabrafenib 可能通過抑制 ERK 蛋白的磷酸化來發揮作用，這一發現為深入理解藥物作用機制奠定了基礎。

2. 優點：

該研究採用了多種實驗方法來分析 EpCAM 和 dabrafenib 對 ATC 細胞的影響，包括細胞存活率、細胞群落形成、轉移和侵入試驗等。這種多角度的分析方法增強了研究結果的可靠性和說服力。此外，研究通過西方墨點法深入探討了 dabrafenib 的分子作用機制，發現其可能通過抑制 ERK 蛋白的磷酸化來影響 ATC 細胞的生長，這一發現為未來開發更有針對性的治療策略提供了方向。研

究結果不僅具有理論意義，還具有潛在的臨床應用價值，為 ATC 患者提供了新的治療希望。

3. 待改進的部分：

本研究仍有一些方面需要進一步改進和深入研究。首先，研究主要分別討論了 EpCAM 和 dabrafenib 的作用，缺乏對二者聯合作用的實驗分析。建議進行 EpCAM 抑制劑與 dabrafenib 的聯合用藥實驗，探討是否存在協同效應，以及是否能克服單一用藥的耐藥性問題。其次，雖然實驗顯示 EpCAM 能促進細胞增殖和轉移，但其具體的分子機制仍不清晰。建議深入分析 EpCAM 是否通過影響特定下游分子（如 Wnt/ β -catenin 或 EMT 相關基因）來促進腫瘤惡性行為。此外，研究方法上也存在一些需要完善的地方，如在細胞株中過量表達與剔除 EpCAM 的實驗方法應在作品說明書中詳細呈現，部分實驗（如圖二十一）需要進行三重複以增加結果的可靠性。最後，還需要進一步澄清 dabrafenib 對 ATC 細胞轉移和侵入能力的抑制作用是否僅僅源於其對細胞存活的影响，以更全面地理解藥物的作用機制。