

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090006
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	上皮細胞黏附因子(EpCAM)對腫瘤增生影響 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)、
癌症細胞訊息傳遞、EpCAM 中和性抗體

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三年級。在高一時幸運地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。另外抗 EpCAM 中和性抗體可以阻斷 EpCAM 訊息傳遞，進而引起癌細胞 PD-L1 的表現量降低並促進 T 細胞的毒殺活性。為了觀察 EpCAM 是否會對癌細胞的增生、轉移以及侵入能力造成影響，我們將細胞分為野生型 (wild type) 和 EpCAM 基因剔除細胞株 (EpCAM knockout) 進行實驗。首先，我們以 Western-blotting 和 qRT-PCR 確認 EpCAM 基因剔除組的 EpCAM 基因有確實被剔除，再進一步利用細胞存活率及細胞群落實驗證實 EpCAM 會促進癌細胞的增生能力，並分別藉由 EGFR 的抑制劑 Afatinib 與 HGFR 的抑制劑 Crizotinib 對於癌細胞存活率的實驗證實 EpCAM 對於 EGFR 與 HGFR 的訊息傳遞扮演重要角色。接著分析 EpCAM 對癌細胞轉移及侵入能力的影響， γ -secretase 和 ADAM17 皆為裁剪 EpCAM 進行訊息傳遞的重要酵素，實驗中的癌細胞分別以 γ -secretase 和 ADAM17 的抑制劑 DAPT 和 TAPI-1 處理，證實 EpCAM 的訊息傳遞與癌細胞轉移與侵入能力有關。接著我們以 EpCAM 中和性抗體處理癌細胞後，證實 EpCAM 中和性抗體確實會促使癌細胞凋亡。最後我們利用 Western blotting 分析 EpCAM 對於不同激酶磷酸化的蛋白質表現量之影響，找出 EpCAM 下游訊息傳遞的完整路徑，期望能找到治療癌症的關鍵。

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. Anti-EpCAM neutralizing antibody was shown to inhibit EpCAM-mediated signal transduction and reduce the protein level of PD-L1 in cancer cells 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 used to confirm that the EPCAM gene was indeed disrupted in the EpCAM knockout line. Then, we performed cell growth and colony formation assays to evaluate the effect of EpCAM on proliferation of cancer cells. We also confirmed EpCAM plays an important role in EGFR and HGFR signaling by using inhibitors Afatinib (EGFR inhibitor) and Crizotinib (HGFR inhibitor). Regulated intramembrane proteolysis (RIP) can trigger EpCAM-mediated signal transduction through the cleavage and shedding of EpEX and EpICD by ADAM17 and γ -secretase, respectively. Following we treated cancer cells with or without DAPT (γ -secretase inhibitor) and TAPI-1 (ADAM17 inhibitor), and confirmed that EpCAM signaling was involved migration and invasion of cancer cells. Next, the apoptosis assay revealed that the anti-EpCAM neutralization monoclonal antibody can promote apoptosis of cancer cells. At last, we analyzed the effects of EpCAM on different kinds of tyrosin kinase phosphorylation proteins by Western blotting, and clarified the complete EpCAM signaling pathway. We hope to further develop the therapeutic 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。大腸直腸癌及肺癌是全球最常見的惡性腫瘤之一，在臺灣的死亡率也相當的高，雖然近年來醫學進步，卻仍未找出最有效的療法治療癌症。

上皮細胞黏附因子 (EpCAM) 是一種穿膜糖蛋白，常見於上皮組織且大量表現於惡性腫瘤中，與癌細胞生長、增殖、轉移及侵入有關。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。EpCAM 分別會被 ADAM17 和 γ -secretase 兩種酵素裁切成 EpEX 和 EpICD，兩者皆會促進 EpCAM 的訊息傳遞，進而造成癌細胞增生與上皮間質轉化 (EMT) 等現象。

最近研究發現的 EpCAM 中和性抗體在先前的研究中顯示能與多種癌細胞的 EpCAM 結合並阻斷癌細胞的 EpCAM 訊息傳遞作用，進而誘導癌細胞凋亡並抑制腫瘤的生長，有效減少癌細胞增生惡化。

由先前的研究可以觀察到 EpCAM 是治療癌症的關鍵，我們藉由觀察 EpCAM 對癌細胞的影響並釐清 EpCAM 的訊息傳遞路徑，期望找出治療癌症最有效的療法，對癌症治療盡一份心力。

二、研究背景

(一) 上皮間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition, 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與基底膜的連接的上皮型態，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型態。

(二) EpCAM 訊息傳遞

在 EpCAM 的訊息傳遞作用中，EpCAM 分別被調節性模內水解 (regulated intramembrane proteolysis, RIP) 的兩種酵素 ADAM17 和 γ -secretase 裁切成 EpEX 和 EpICD。EpEX 會活化細胞膜上的表皮生長因子受體 (EGFR)，再將訊息傳遞到下游的酪氨酸激酶 (Tyrosine kinase) 進行活化。EpICD 則會進入細胞核，與目標基因的啟動子結合，促使細胞幹化與上皮間質轉化相關基因轉錄發生。因此 EpEX 與 EpICD 皆會促進 EpCAM 的訊息傳遞，造成癌細胞增生、抗凋亡和上皮間質轉化等現象。

(三) EpCAM 中和性抗體

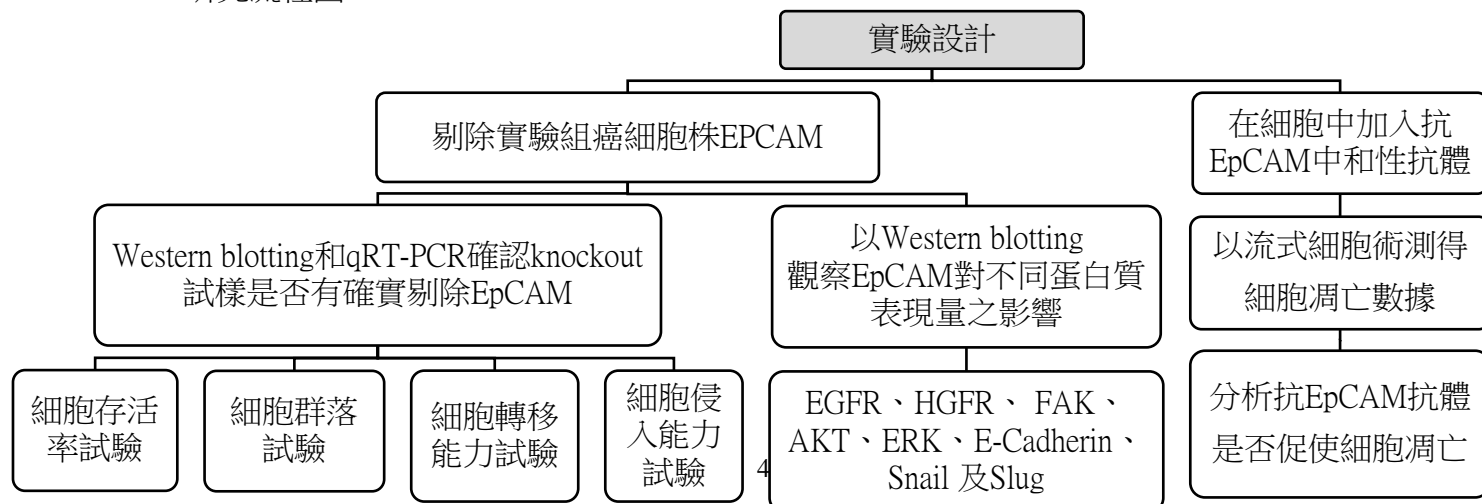
EpCAM 中和性抗體可以透過抑制 AKT-FOXO3a 訊息傳遞誘導癌細胞凋亡，此外也可以降低癌細胞 PD-L1 表現量，抑制腫瘤免疫逃脫，並增加 CD8⁺ T 細胞對癌細胞的毒殺效果。

三、研究目的

- (一) 探討 EpCAM 是否能調控癌細胞的增生能力
- (二) 探討 EpCAM 是否能調控癌細胞的上皮間質轉化與轉移能力
- (三) 探討 EpCAM 和 HGF 對於下游訊息傳遞之影響
- (四) 探討 EpCAM 中和性抗體是否能有效造成細胞凋亡

貳、研究方法與過程

一、研究流程圖



二、研究設備與材料

(一) 細胞培養 (cell culture)

1. 培養箱 (37°C, 5%CO₂)
2. 10 cm 培養皿
3. 1 mL 微量吸管
4. 100 μL 微量吸管
5. 電動微量吸管
6. 含血清培養基
 - (1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 - (2) RPMI 1640 Medium
 - (3) 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)
 - (4) 1% penicillin/streptomycin 抗生素 (PS)
7. PBS
8. 胰蛋白酶 (trypsin)

(二) 西方墨點法 (Western blotting)

1. 離心機
2. 電泳儀
3. 高感度微量數位影像分析系統
4. PBS (磷酸鹽緩衝生理食鹽水)
5. Eppendorf tube (微量離心管)
6. 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

7. 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

8. Tris-HCl 緩衝液

- (1) Tris-HCl pH 8.0

9. Laemmli 2× 緩衝液/上樣緩衝液

一、SDS

- (2) 2-巰基乙醇
- (3) 甘油
- (4) 溴酚藍
- (5) Tris-HCl

10. 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

11. 轉膜緩衝液 (濕轉)

- (1) 三羥甲基胺基甲烷
- (2) 甘胺酸
- (3) 甲醇

12. 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

13. 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

(三) 即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

1. 即時聚合酶鏈式反應儀
2. HCT116 和 HT29 的 cDNA 樣本
3. 10 mM dNTP (脫氧核糖核苷三磷酸)
4. Forward & Reverse primer (前置引子 & 反置引子)
5. SYBR Green Master Matrix
6. 96 孔盤&封膜
7. ddH₂O (雙蒸水)

(四) 細胞存活率試驗

1. Elisa reader
2. 培養箱 (37°C, 5%CO₂)
2. 96 孔盤
3. 15 mL 離心管
4. 1 mL 微量吸管
5. 100 μ L 微量吸管
6. 電動微量吸管

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. 10% WST-1

(五) 細胞群落實驗

1. 複式顯微鏡
2. 培養箱 (37°C, 5%CO₂)
3. 高感度微量數位影像分析系統
4. 6 孔盤
5. 15 mL 離心管
6. 1 mL 微量吸管
7. 100 μ L 微量吸管
8. 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)
9. 結晶紫染劑 (Crystal Violet)

(六) 細胞轉移與侵入能力分析

1. 複式顯微鏡
2. 培養箱 (37°C, 5%CO₂)
3. Transwell
4. 24 孔盤 (transwell 專用)
5. 15 mL 離心管
6. 1 mL 微量吸管
7. 100 μ L 微量吸管

8. 20 μ L 微量吸管
 9. 10% Matrigel
 10. PBS
 11. 0.5%Crystal violet+10%MeOH
 12. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (不含血清)
 13. 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)
 14. ddH₂O
 15. DAPT (GSI-IX, LY-374973)
 16. TAPI-1 (ADAM17/TACE 抑制劑)
- (七) 細胞凋亡試驗
1. 培養箱 (37°C, 5%CO₂)
 2. 離心機
 3. 流式細胞儀
 4. 24 孔盤
 5. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (不含血清)
 6. 10× 鏈接緩衝液 (binding buffer)
 7. ddH₂O
 8. PI 染劑
 9. Annexin V 染劑

三、細胞培養 (cell culture)

- (一) 細胞株:大腸直腸癌細胞 HCT116、HT29 細胞及肺癌細胞 H441 細胞
- (二) 培養基:Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 及 RPMI 1640 Medium，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) 培養細胞、加藥

1. 將 10³ 個細胞放入六孔盤並加入含血清的 DMEM 培養一天
2. 將培養基換成不含血清的 DMEM 再培養一天
1. 配置藥物：取三個 2 mL eppendorf tube, 各加入 2 mL 不含血清的 DMEM，再分別加入 3 μ L EpEX 及 2 μ L EFG 和 HGF
2. 吸除 6 孔盤中的培養基，將每個 well 加入配置好的藥物 1 mL
3. 放入培養箱中靜置 10 分鐘

(二) 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 \times 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

(三) 樣品製備

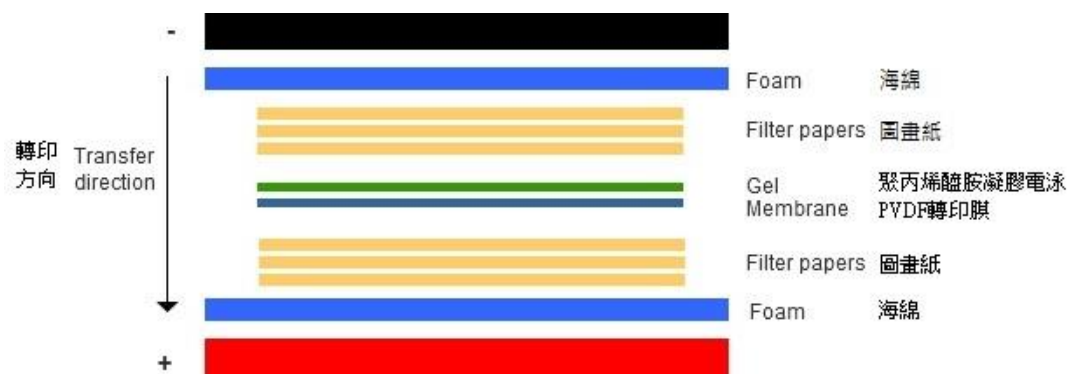
1. 取出小部分 (50 μ L) 裂解物，用於蛋白分析。確定每種細胞裂解物的蛋白濃度
2. 向剩餘體積的細胞裂解物中加入等體積的 2 \times Laemmli 樣品緩衝液
3. 變性：在 100 $^{\circ}$ C 下將樣品緩衝液中的每種細胞裂解物煮沸 5 分鐘，並進行分裝。在 -20 $^{\circ}$ C 下保存裂解物。
4. 在 37 $^{\circ}$ C 下解凍裝有細胞裂解物的離心管。在微型離心機中以 16,000 \times g 離心 5 分鐘

(四) 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

(五) 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. 如下圖製備轉移堆疊體：



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

(六) 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 50~60 RPM 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 50~60 RPM 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 3000 RPM 再離心 5 分鐘

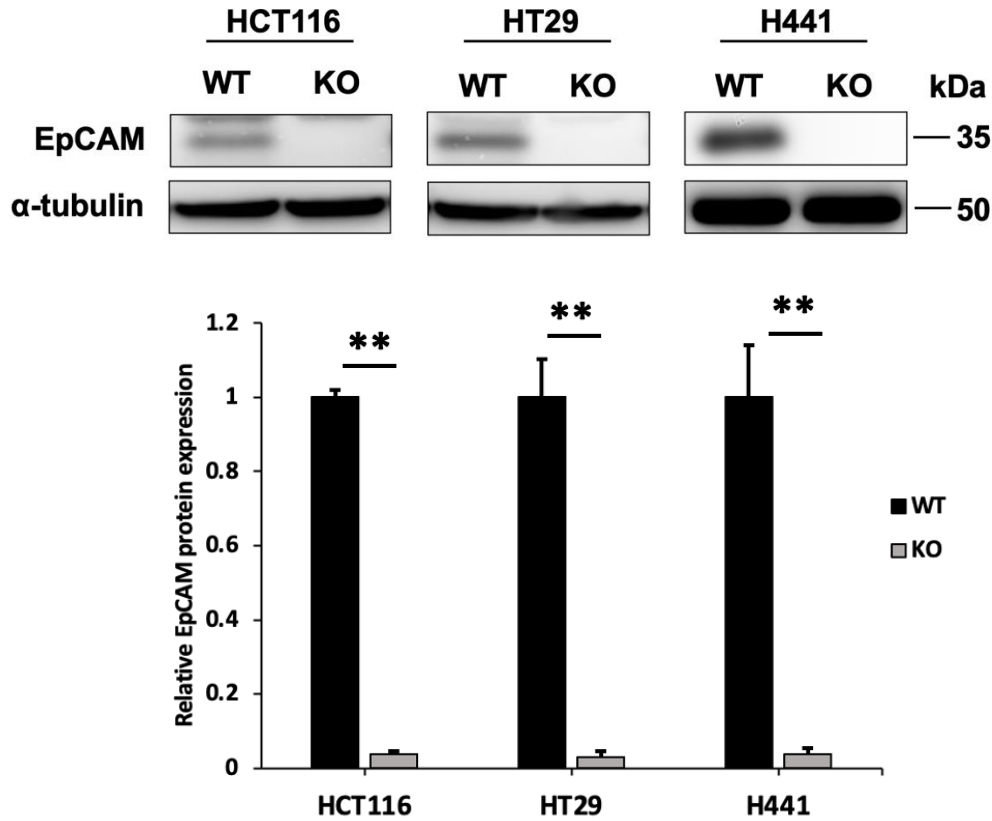
(五) 加入染劑

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

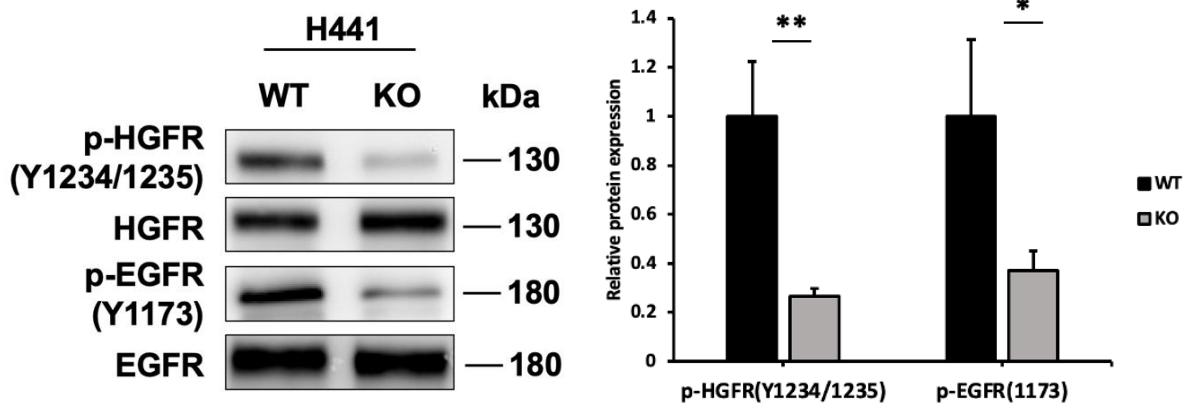
參、研究結果

一、西方墨點法 (Western blotting)

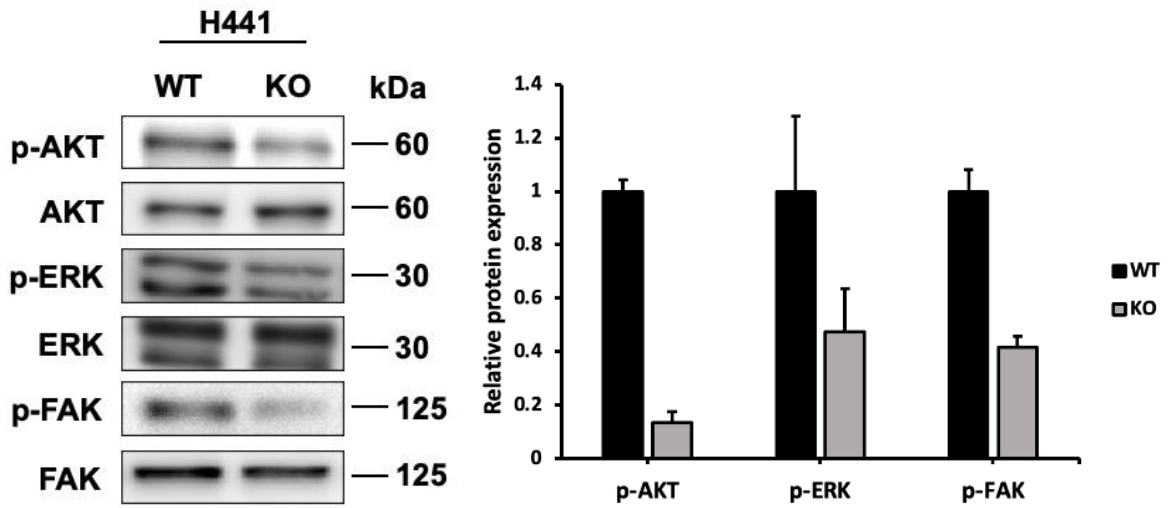
(一) 利用西方墨點法分析 wild type 與 EpCAM knockout 細胞中特定蛋白質表現



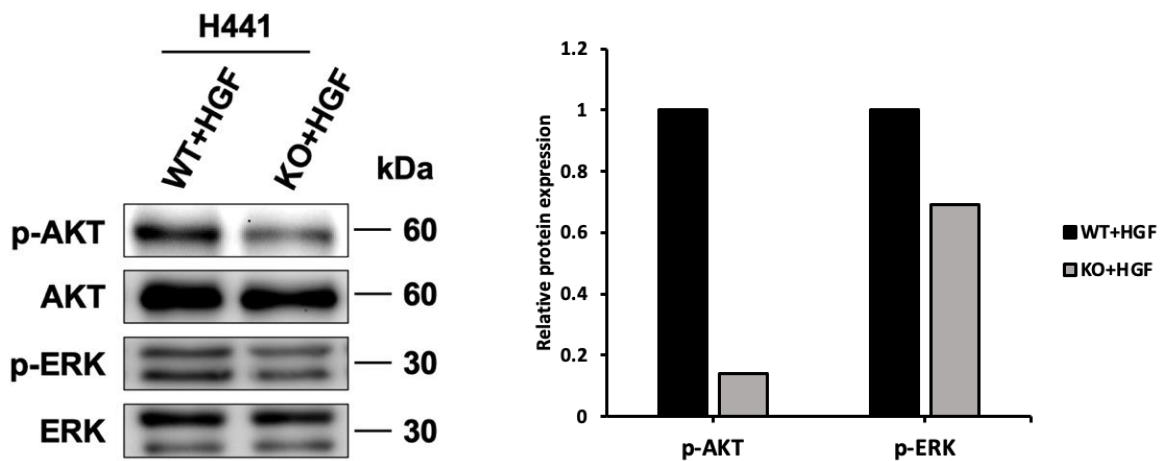
圖一、WT 及 KO 大腸直腸癌細胞 HCT116、HT29 及肺癌 H441 細胞之 α -tubulin 和 EpCAM 蛋白質表現量及相對定量之長條圖。N = 3, ** $p < 0.01$ 。(WT 為 wild type, KO 為 EpCAM knockout)



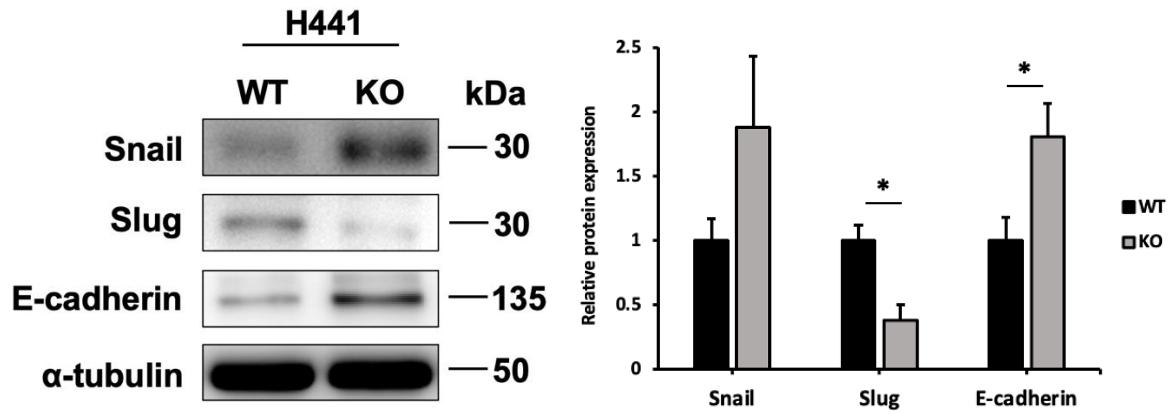
圖二、WT 及 KO H441 細胞之 p-HGFR、HGFR、p-EGFR、EGFR 蛋白質表現量及相對定量之長條圖。N = 3, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。(WT 為 wild type, KO 為 EpCAM knockout)



圖三、WT 及 KO H441 細胞之 p-AKT、AKT、p-ERK、ERK、p-FAK 及 FAK 蛋白質表現量及相對定量之長條圖。N = 2。(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)



圖四、WT 及 KO H441 細胞以 HGF 加藥處理之 p-AKT、AKT、p-ERK 及 ERK 蛋白質表現量及相對定量之長條圖。N = 1。(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)



圖五、WT 及 KO H441 細胞之 Snail、Slug、E-cadherin 及 α -tubulin 蛋白質表現量及相對定量之長條圖。N = 3，* $p < 0.05$ 。(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)

由圖一利用 α -tubulin 確認每種取樣的蛋白質取量是相同的後，可觀察到 wild type 的 EpCAM 表現量明顯較 knockout 高，確認 knock 組別的 EpCAM 有確實被剔除。再由圖二、三及五可觀察到 wild type 的表現量均明顯較 knockout 高，且圖四將細胞以 HGF 藥物處理後，可觀察到不論是 wild type 還是 knockout 皆較圖三高。

二、即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

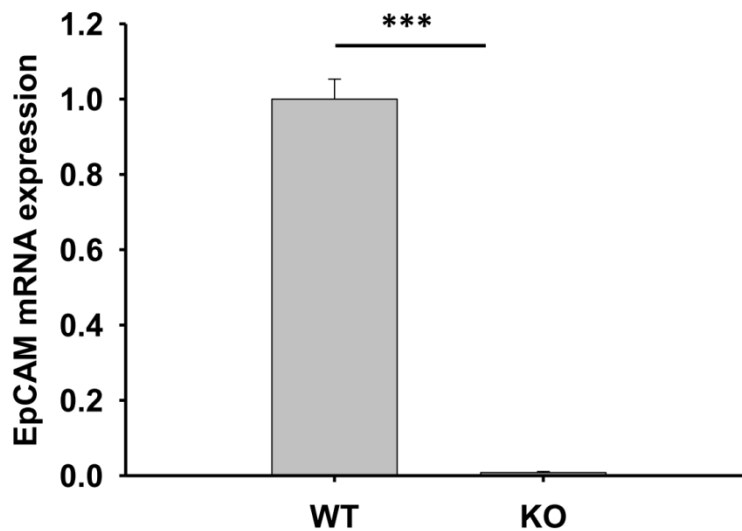
細胞株：HCT116

(一) 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。

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

(二) 繪製成長條圖比較



圖六、WT 及 KO HCT116 細胞之 EpCAM mRNA 表現量。N = 3，*** $p < 0.001$ 。

(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)

由圖六可以觀察到 EpCAM knockout 細胞相對於 wild type 幾乎沒有表現量。

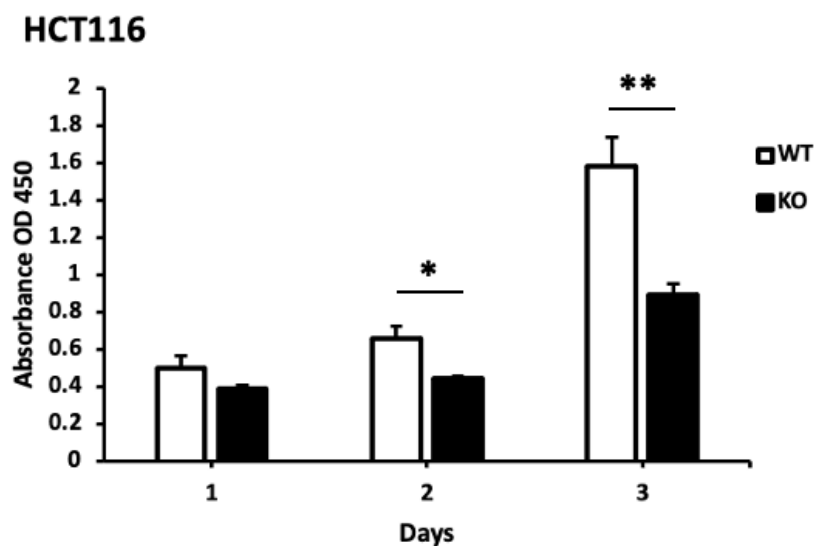
三、細胞存活率試驗

(一) 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。

(二) HCT116 的吸光值數據

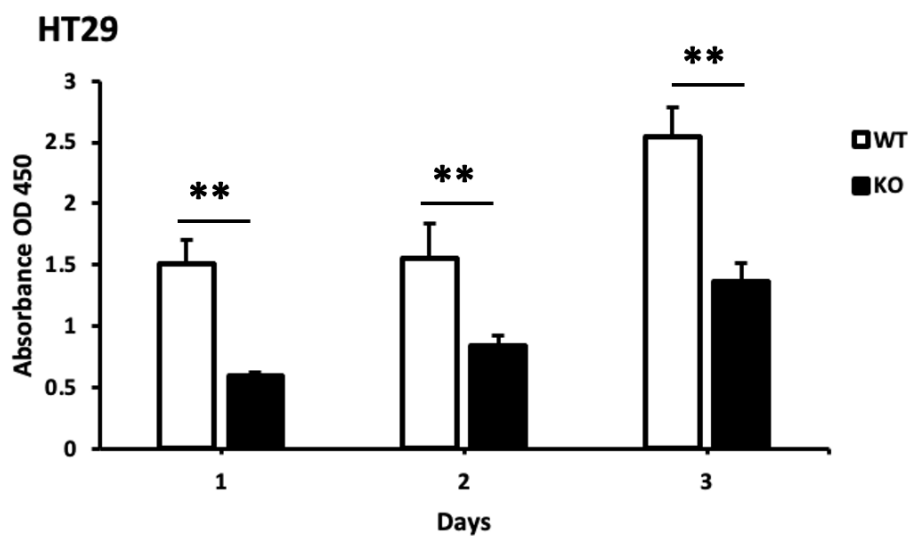


圖七、WT 及 KO HCT116 之 WST-1 吸光值數據。N = 3，** $p < 0.01$ ，* $p < 0.05$ 。

(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)

由圖七可以觀察到 wild type 的細胞生長率明顯大於 knockout。

(三) HT29 的吸光值數據

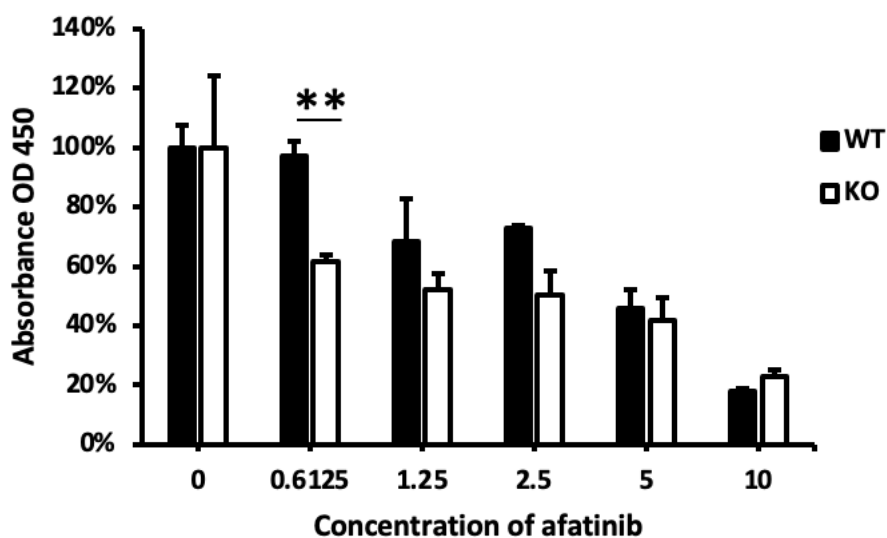


圖八、WT 及 KO HT29 之 WST-1 吸光值數據。N = 3，** $p < 0.01$ 。(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)

由圖八可以觀察到 wild type 的細胞生長率明顯大於 knockout。

(三) H441 細胞以 Afatinib 藥物處理

Afatinib 屬於細胞激素抑制劑，可以對 EGFR 抑制其自體磷酸化。



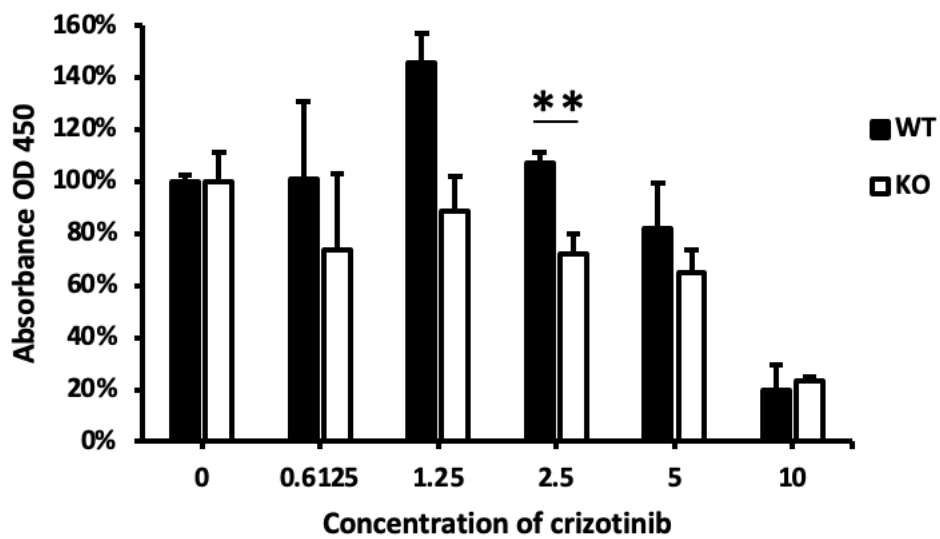
圖九、WT 及 KO H441 細胞以 Afatinib 藥物處理之 WST-1 吸光值數據。N = 3，** $p < 0.01$

(WT 為 wild type , KO 為 EpCAM knockout)

由圖九可觀察到 Afatinib 藥物可抑制癌細胞增生。

(四) H441 細胞以 Crizotinib 藥物處理

Crizotinib 是酪胺酸激酶受體的抑制劑，可抑制 HGFR 的磷酸化，改變癌細胞傳遞路徑。

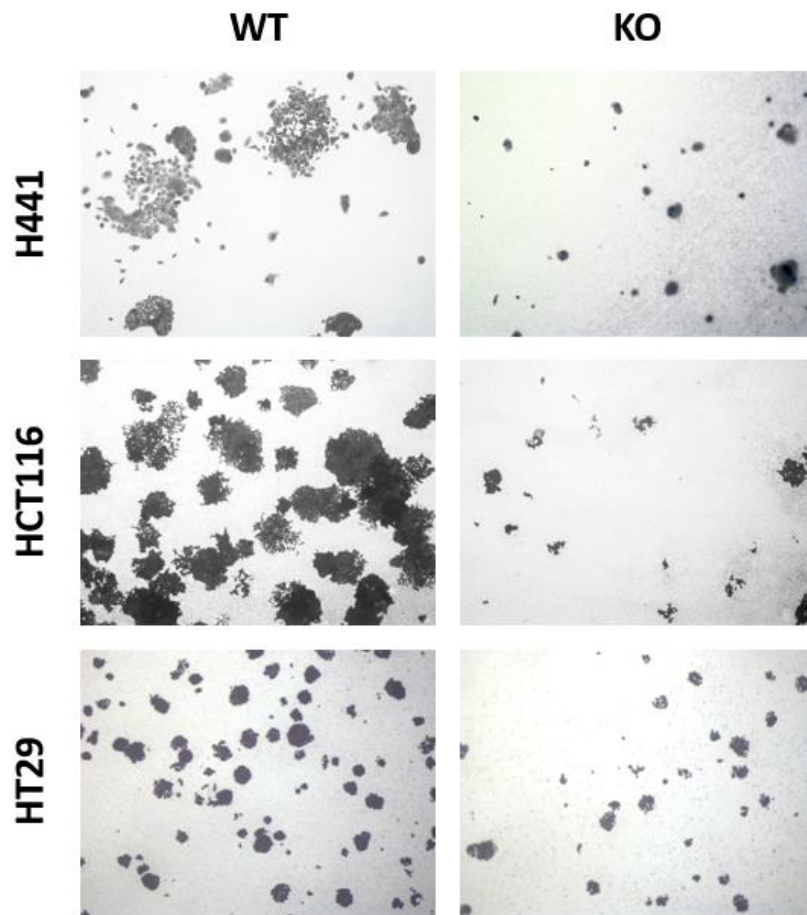


圖十、WT 及 KO H441 細胞以 Crizotinib 藥物處理之 WST-1 吸光值數據。N = 3 , ** $p < 0.01$ 。(WT 為 wild type , KO 為 EpCAM knockout)

由圖十可觀察到 Crizotinib 藥物可抑制癌細胞的增生。

四、細胞群落實驗

(一) 顯微鏡下拍照

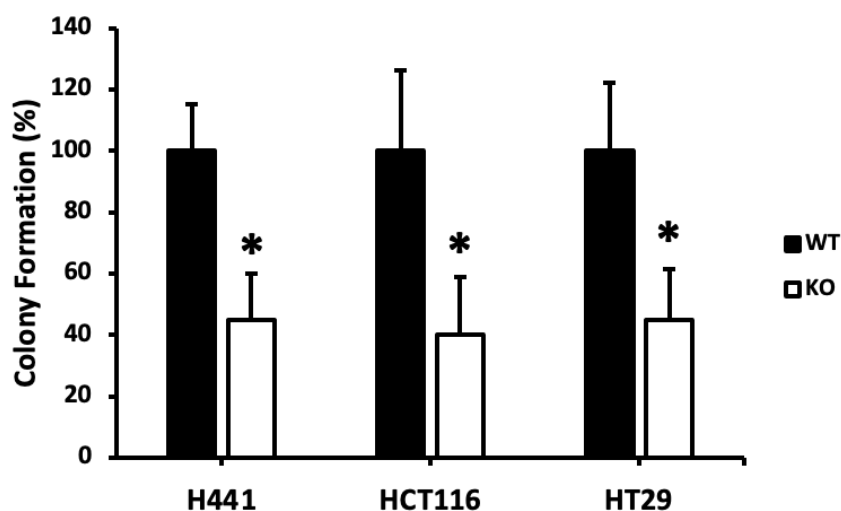


圖十一、H441、HCT116 和 HT29 的 wild type 和 EpCAM knockout 群落生長情況。

(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)

利用顯微鏡拍照觀察到無論是 H441、HCT116 還是 HT29 的群落生長情況 WT 都較 KO 多。

(二) 繪製成相對定量圖比較



圖十二、H441、HCT116 及 HT29 的群落數量統計表。N = 3，* $p < 0.05$ 。(WT 為 wild type，KO 為 EpCAM knockout)

由圖十二可觀察到無論是 H441、HCT116 或 HT29，WT 的群落數量都明顯較 KO 多。

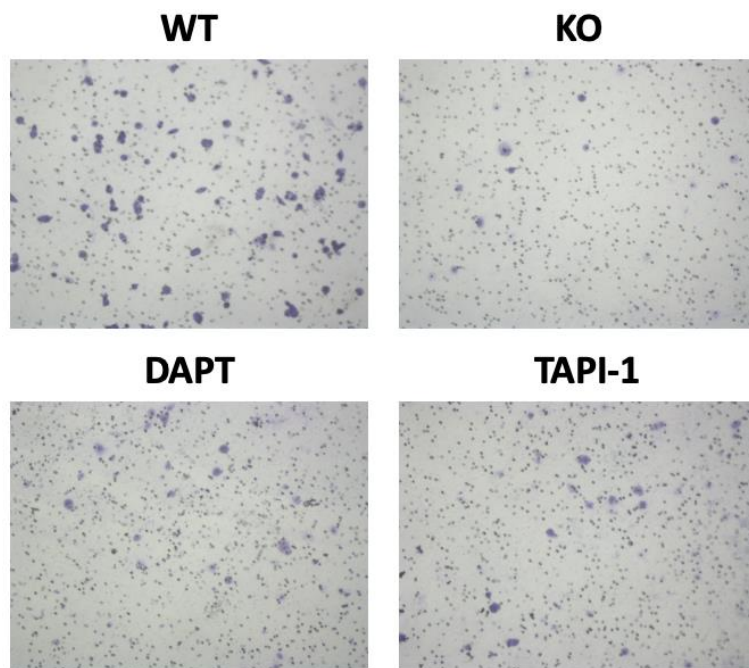
五、細胞轉移能力分析

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，可以將 EpCAM 之 EpICD 切下進而入核；而 ADAM17 (A disintegrin and metalloproteinase 17) 能促使膜結合蛋白脫落，將 EpCAM 之 EpEX 切下釋出。

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 無法被裁切釋放 EpEX 與 EpICD，觀察是否會對細胞的轉移與侵入能力造成影響。

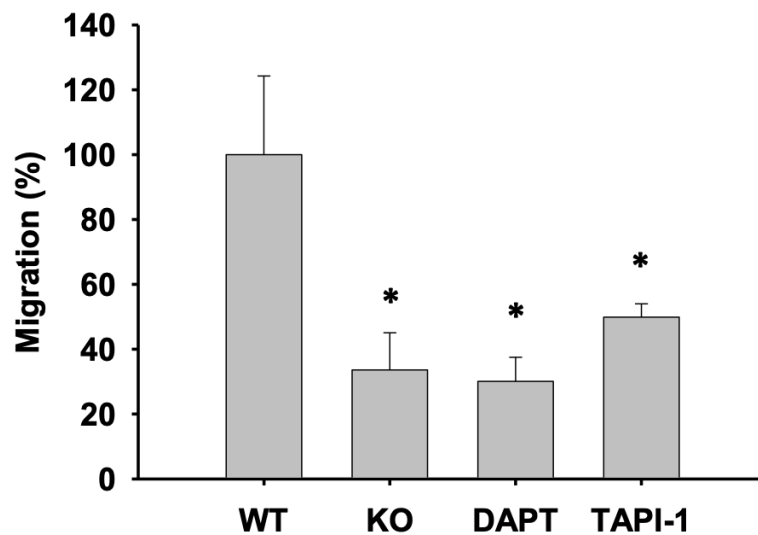
細胞株：HCT116

(一) 顯微鏡下拍照



圖十三、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞轉移情況。(WT 為 wild type, KO 為 EpCAM knockout)

(二) 將以上數據繪製成長條圖比較



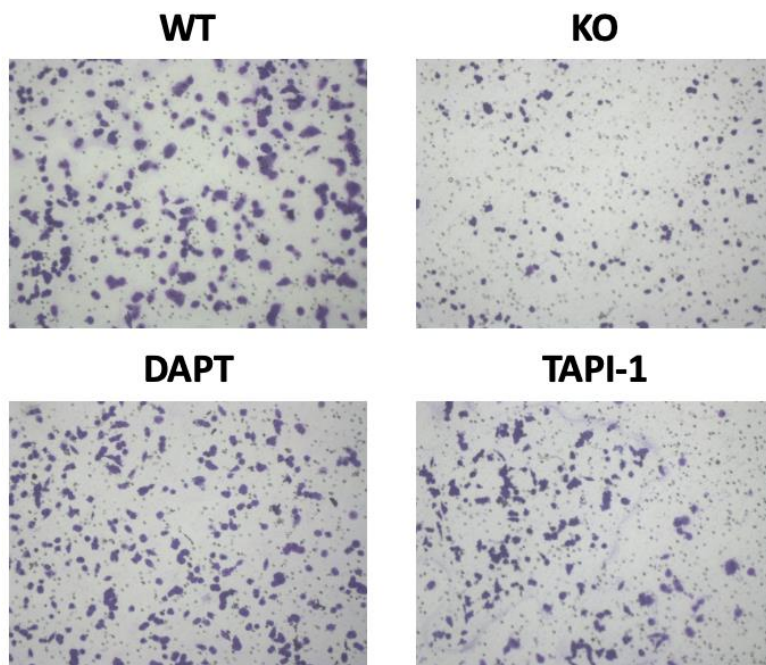
圖十四、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞轉移數量統計。N = 3, * $p < 0.05$

由圖十四可看出以 DAPT 及 TAPI-1 處理的癌細胞和 KO 轉移能力都較 WT 低。

六、細胞侵入能力分析

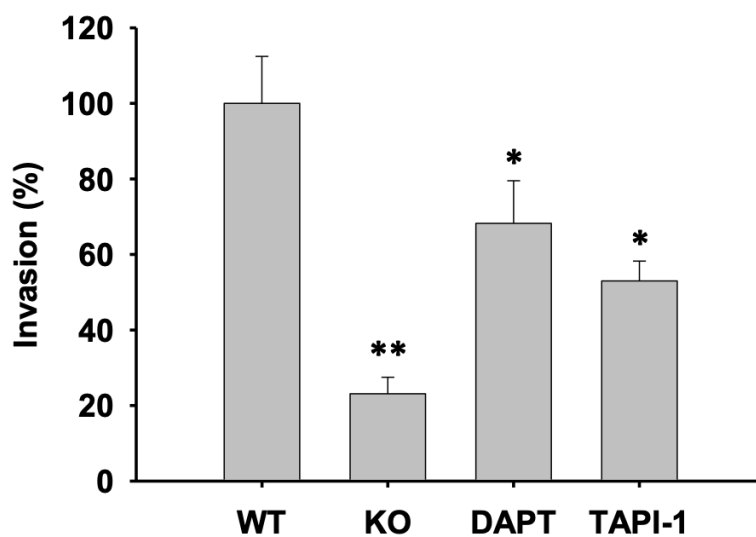
細胞株：HCT116

(一) 顯微鏡下拍照



圖十五、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞侵入情況

(二) 將以上數據繪製成長條圖比較



圖十六、HCT116 細胞以 DAPT 和 TAPI-1 處理和 KO 細胞侵入數量統計。N = 3，

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

由圖十六可看出以 DAPT 及 TAPI-1 處理的癌細胞和 KO 侵入能力都較 WT 低。

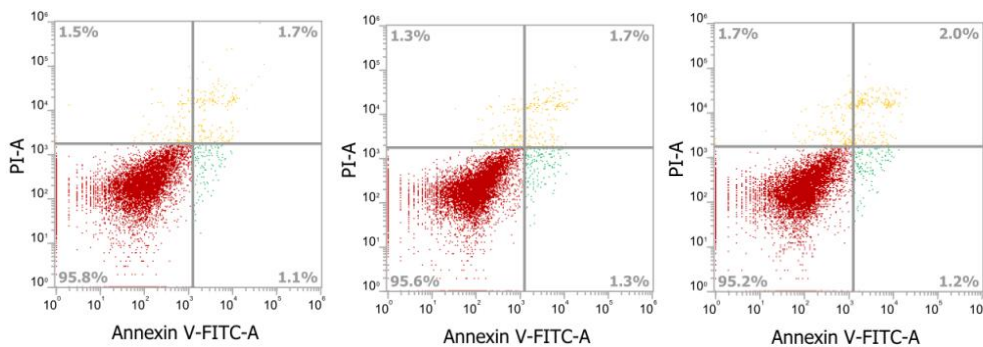
七、細胞凋亡試驗

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⁻)。

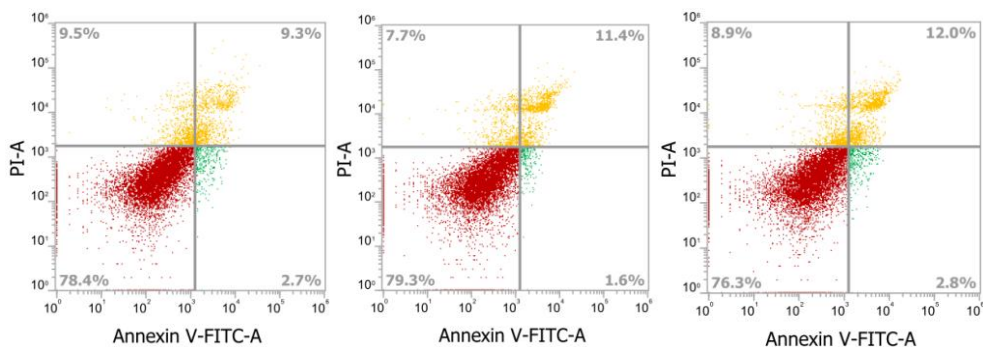
(一) 流式細胞儀紀錄結果 (圖中左下角%數為存活細胞比例)

1. HCT116 細胞以 normal IgG 抗體處理



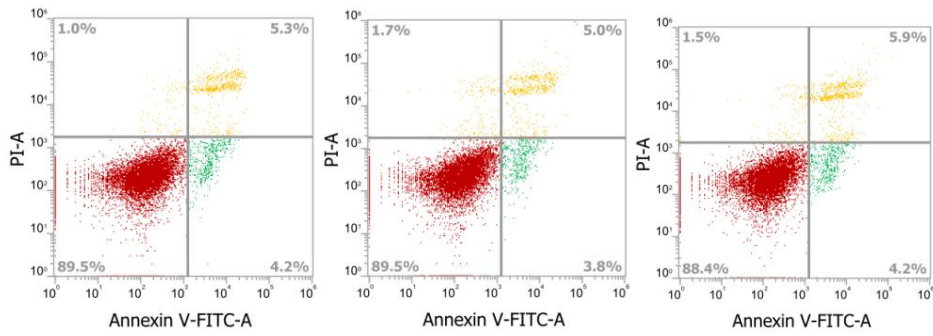
圖十七、HCT116 控制組

2. HCT116 細胞以 EpCAM 中和性抗體處理



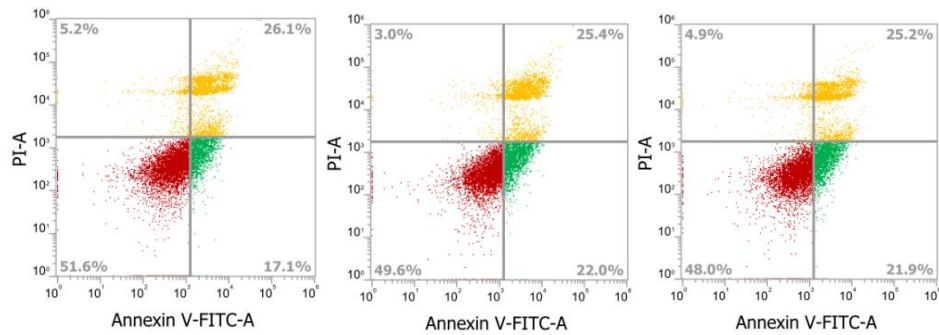
圖十八、HCT116 實驗組

3. HT29 細胞以 normal IgG 抗體處理



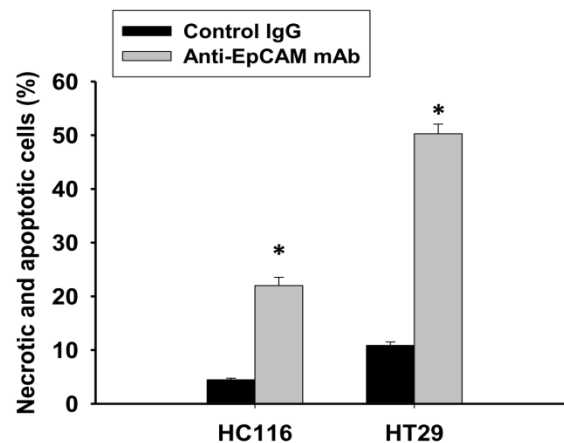
圖十九、HT29 控制組

4. HT29 細胞以 EpCAM 中和性抗體處理



圖二十、HT29 實驗組

(二) 繪製成長條圖比較



圖二十一、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。N = 3, * $p < 0.05$

由圖二十一可以觀察到不論是 HCT116 或 HT29 有加入 EpCAM 中和性抗體處理的癌細胞凋亡比例明顯上升。

肆、 討論

一、西方墨點法 (Western blotting)

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。由圖一可以觀察到 α -tubulin 的表現量相差不多，即可確定所取的蛋白質量是大約等量的。圖一中 HCT116、HT29 和 H441 細胞蛋白質在 Western blotting 的圖與定量結果發現 EpCAM knockout 組別幾乎偵測不到 EpCAM 的表現，即可確認實驗用的 EpCAM knockout 細胞有成功將 EpCAM 剔除。

接著由圖二、三及五，觀察 EpCAM 對不同訊息傳遞相關目標蛋白質的影響，能夠發現 wild type 的表現量明顯較 knockout 高，可知 EpCAM 可以促進蛋白質 HGFR、EGFR、FAK、AKT 和 ERK 磷酸化，並且調控 EMT 相關蛋白 Snail、Slug 及 E-cadherin 的表現，進而傳遞訊息造成癌細胞增生與轉移。圖四我們將細胞利用 HGF 藥物處理，對比圖四也可觀察到 HGFR 下游的 AKT 和 ERK 不論是 wild type 還是 knockout，有經過 HGF 藥物處理的磷酸化表現量均較高，得知 HGF 也是造成癌細胞訊息傳遞的因子之一。

二、即時聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

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。由圖六可看出雖然 knockout 細胞僅有非常些微表現量，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

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 WST-1 處理細胞後以 ELISA Reader 測量細胞的吸光值數據，在轉換成長條圖比較。根據圖七及圖八可以觀察到，不論是 HT29 還是 HCT116 細胞中 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。

接下來我們將 H441 肺癌細胞以 Afatinib 及 Crizotinib 藥物處理，由圖九及圖十可觀察到，Afatinib 及 Crizotinib 使癌細胞的吸光值數據降低，進而得知這兩種藥物皆可抑制癌細胞增生，且濃度越大，效果越明顯。

四、細胞群落試驗

利用顯微鏡拍照觀察到無論是 H441、HCT116 還是 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、細胞轉移能力分析

顯微鏡下的照片中被結晶紫染色的細胞即為有轉移現象的細胞，較難直接分辨細胞數的多寡。利用 ImageJ 計數軟體可以得到確切的細胞數目，再轉為長條圖後，由圖十四可以確認 EpCAM 會促進癌細胞的轉移，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。

六、細胞侵入能力分析

顯微鏡下的照片中被結晶紫染色的細胞即為有侵入現象的細胞，亦較難直接分辨細胞數的多寡。與細胞轉移能力分析相同，利用 ImageJ 計數軟體得到確切的細胞數目後轉為長條圖，由圖十六可以確認 EpCAM 會促進癌細胞的侵入，且 DAPT 和 TAPI-1 藥物也可以有效的抑制 EpCAM 的訊息傳遞，減少癌細胞的侵入。

七、細胞凋亡試驗

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。由圖二十一可以觀察到在 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。

伍、 結論

一、 結論

首先我們以 HCT116、HT29 兩種大腸癌細胞株與 H441 肺癌細胞株的 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表現量皆較高，而 knockout 表現量幾乎消失，確認細胞的 knockout 樣本中有確實剔除 EpCAM。再繼續分析 EpCAM 對其他與訊息傳遞相關蛋白質表現量可知 wild type 的磷酸化蛋白質表現量較高，進而得知 EpCAM 會透過將 HGFR、EGFR、FAK、AKT、ERK、Snail、Slug 及 E-cadherin 磷酸化以傳遞訊息。

接著，我們以兩種大腸癌細胞 HCT116 和 HT29，以及肺癌細胞 H441 的 wild type 以及 EpCAM knockout 樣本進行細胞存活率與細胞群落試驗，分析細胞的生長狀況，而不論是 H441、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。且 Afatinib (EGFR 抑制劑) 和 Crizotinib (HGFR 抑制劑) 皆抑制癌細胞的訊息傳遞，進而使增生能力降低，證實 EpCAM 對於 EGFR 及 HGFR 訊息傳遞也有一定的影響。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，及減少 EpICD 進入細胞核，而阻斷 EpCAM 訊息的傳遞，使得細胞轉移與侵入能力減弱。綜合以上實驗結果發現 EpCAM 的信息傳遞可以誘導 EGFR 和 HGFR 下游信息傳遞的活化，進而引起癌細胞的增生與轉移。

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

大腸直腸癌和肺癌是全球最常見的惡性腫瘤之一，雖然近年來醫學進步，但至今仍未找出最有效的癌症療法。我們藉由探討 EpCAM 在癌症中的作用，希望可以找到調控癌症增生及轉移的關鍵。另外，EpCAM 中和性抗體已成功被研發，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治療當中。

陸、 參考資料及其他

- 一、 Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, P., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P., Munz, M., Gires, O. (2009). Nuclear signaling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology*, *11*(2), 162-171. doi: 10.1038/ncb1824
- 二、 Chen, H., & Mao, J.P. (2012). The research progress on tumor immune escape built in relations of tumor and T lymphocytes. *China Biotechnology*, *32*(10), 86-92.
- 三、 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.F., Wu, H.C. (2020). EpCAM signaling promotes tumor progression and protein stability of PD-L1 through the EGFR pathway. *Cancer Research*, *80*, 5035-5050. doi: 10.1158/0008-5472
- 四、 Liang, K.H., Tso, H.C., Hung, S.H., Kuan, I.I., Lai, J.K., Ke, F.Y., Chuang, Y.T., Liu, I.J., Wang, I.P., Chen, R.H., Wu, H.C. (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
- 五、 Keller, L., Werner, S., & Pantel, K. (2019). Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*, *3*(6), 165-180. doi: 10.15698/cst2019.06.188
- 六、 Boesch, M., Spizzo, G., & Seeber, A. (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. doi: 10.1002/sctm.17-0289.
- 七、 Liao, M.Y., Lai, J.K., Kuo, Y.P., Lu, R.M., Lin, C.W., Cheng, P.C., Liang, K.H., Wu, H.C. (2015). An anti-EpCAM antibody EpAb2-6 for the treatment of colon cancer. *Oncotarget*, *6*(28), P2947-24968. doi: 10.18632/oncotarget.4453
- 八、 Baeuerle, P.A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer*, *96*(3), 417-423. doi: 10.1038/sj.bjc.6603494
- 九、 Schnell, U., Cirulli, V., & Giepmans., B.N.G. (2013). EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1828*(8), 1989-2001. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.04.018
- 十、 陳盈吟、陳崇裕。癌症免疫治療新進展。 **中西整合醫學雜誌**， **21**(1)， 1-7。

【評語】 090006

1. 此研究的主題明確、實驗設計及結果的論述也相當清楚，邏輯有條理。
2. 本研究分別針對 EpCAM 及癌細胞的訊息傳遞路徑進行討論，探討其對於癌症治療的可能性。
3. 實驗結果及討論還可以加強的地方：
 - (1) 部分實驗建議增加樣本數，確認結果的再現性(如圖三、圖四)。
 - (2) 為確認 HGF 加藥處理分別對於 WT/ KO 的影響，建議與圖三結果(未加藥)進行比較。
 - (3) 未標示藥物處理的濃度單位(圖九、圖十); 藥物處理的時間為何。
 - (4) 如何取得細胞轉移及侵入能力的分析? 僅以肉眼觀察或是以 kit 進行檢測(圖十四、圖十六)?