

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 利用斑馬魚為模式生物探討乳癌之分子機轉 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 莊詠筌
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-049-B
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月
指導教授： 楊建洲

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 106年04月01日

前言

在先前的研究中發現 Hsp27 和乳癌細胞的癌化有相當大的關係，且 Hsp27 表現量與癌細胞癌化程度呈現高度正相關，在細胞實驗中甚至能誘導某些乳癌細胞株產生類似血管新生的作用[1]，特此我們開發了斑馬魚乳癌異種移植模式來觀察 Hsp27 對乳癌細胞於斑馬魚體內的發展動態，以研究受 Hsp27 所誘導之乳癌細胞在活體內所呈現之病理現象。我們利用具有血管綠色螢光的轉殖斑馬魚 Tg(*fli-1:EGFP*)之 3 天大胚胎作為實驗對象，除了體積小、斑馬魚易於繁殖之外，其體色透明的特性能使植入的乳癌細胞易於觀察，且不必剔除免疫系統便能讓癌組織在斑馬魚體內生長，比起使用 nude mice 更能模擬癌細胞在人體內面對免疫系統時生長的實際狀況。而 Hsp27 蛋白之磷酸化會影響其伴護蛋白(chaperone)的活性，已有文獻指出 Hsp27 磷酸化後將無法與伴護蛋白聚集成具有活性的複合體，其功能將轉變成調控細胞內訊息傳遞的角色。因此本實驗除了使用野生型(wild type)的 Hsp27 進行研究之外，同時也利用點突變的方式將 Hsp27 鄰酸化位點(serine 15、78、82)進行點突變，分別突變為 Hsp27A (將 serine 置換為 alanine 之磷酸化死亡突變型)以及 Hsp27D (將 serine 置換成 aspartic acid 之模擬磷酸化突變型)[2]，此兩種突變的 Hsp27 蛋白質未來將與野生型 Hsp27 進行比較分析，探討 Hsp27 蛋白質在乳癌細胞發展的病程中所扮演的角色。

在本實驗中，初期我們選用 BT-474 乳癌細胞株來進行研究及分析，但因為 BT-474 為較溫和的乳癌品系，在呈現病理現象時常因強度不足而只能針對現象進行觀察，難以進行量化的工作，因此又挑選較惡性的三陰性乳癌(TNBC)細胞株 MDA-MB-231 進行後續的螢光定量實驗。透過多次修正實驗細節及廣泛的資料收集和討論，對於數據精度有不錯的提升，然而進行精細的定量工作需大量的時間，選用 MDA-MB-231 細胞株的實驗並未進行到比較 Hsp27 相關質體的階段，但針對 MDA-MB-231 tRFP 進行異種移植後 1 到 5 天的螢光強度變化分析已經完成，未來可以考慮挑選不易產生過大誤差之時期執行後續的研究。

研究目的

本實驗之目的在於利用斑馬魚作為動物模式，並使用有穩定表現 Hsp27 相關質體的乳癌細胞作為樣本對 3 天大斑馬魚胚胎進行異種移植。透過此種技術提供足夠可定量之病理數據來分析 Hsp27 基因在乳癌細胞動態上的影響，甚至嘗試進一步運用到抗癌藥物篩檢上。

研究問題

1. 利用顯微注射技術對 3 天大斑馬魚胚胎進行乳癌細胞之異種移植，並分析 wtHsp27、Hsp27A 及 Hsp27D 對 BT-474 乳癌細胞於斑馬魚胚胎體內的影響。
2. 利用顯微注射技術對 3 天大斑馬魚胚胎進行乳癌細胞之異種移植，並分析 MDA-MB-231 乳癌細胞在 3 天大斑馬魚體內的螢光變化，以此做為往後實驗之基礎。

文獻回顧

異種移植是癌症研究裡重要的一環，會使用此種方法往往是為了獲得能與分子機轉相互呼應之證據，而實驗室在進行異種移植時最常用的模式生物不外乎就是實驗用老鼠，為了使癌細胞順利生長，會使用具免疫缺陷的老鼠 nude mice 及 SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mice。其中因 nude mice 的胸腺發育不全，主要缺乏細胞免疫機制及產生抗體的效率極差，經常被用於癌症異種移植研究。但一連串的實驗下來常常都要犧牲大量的樣本，除了每個時期都必須殺樣本來觀察癌症細胞在老鼠體

內的動態之外，為了獲得具有顯著意義的數據，則每時期就必須殺死一定數量的老鼠，相當消耗資源。而且飼養老鼠的成本相當高，需要有適當生存空間但環境維持卻又相當耗費人力，難以建立大量實驗樣本，很多實驗室為了省空間省成本而顧此失彼，陷實驗鼠於不利的環境中，進而導致實驗誤差增加甚至樣本死亡，代價甚高。而相對於使用斑馬魚，這些問題似乎都能得到良好的改善。

斑馬魚(Zebrafish, *Danio rerio*)是目前相當重要的脊椎動物模式，其飼養優點包含：體型小、飼養容易、不佔太多空間、具有光週期誘發產卵、每次產卵數量眾多(約100~200 顆)、胚胎發育期短、幼魚體色透明，以及幼魚的免疫系統在發育初期尚未建立完全，幾乎不必考慮。近幾年來，斑馬魚的基因序列被陸續解出，往後的研究也指出有很多哺乳動物的重要調控基因在斑馬魚都能找到功能類似，甚至有著高度同源性質的基因。各種特殊的基因轉殖魚模式也逐漸被開發出來，透過研究其基因特性來探討某些疾病或發育層面的問題[3、4]。斑馬魚模式已被應用於研究一些器官組織如耳朵、眼睛、心臟、肌肉、血液、肝臟、胰臟及腎等等，有相當多的研究結果顯示，一些在人類發現的器官病變之病理現象在斑馬魚身上也可以觀察到類似變化[5]。因此，斑馬魚被相當廣泛的應用在研究心血管疾病、癌症、發育學、再生現象及細胞凋亡等研究上。

斑馬魚應用於學術研究行之有年且成果甚豐。其中斑馬魚被使用在異種移植的例子，除了最熟悉的癌症研究以外，甚至白血病[6]及免疫系統的發育[7]也都可以使用斑馬魚。因此決定採用斑馬魚作為模式生物進行癌細胞的異種移植實驗，利用幼魚體色透明的特性，我們可以觀察到轉染螢光基因的癌細胞在魚體裡的變化，又因為體積小，飼養空間不大，較容易獲得大量的初步病理數據，且不必宰殺活體。至於免疫系統部分，斑馬魚胚胎的免疫系統雖不是完全沒有作用，但在發育初期，其胚胎只保有部分先天性免疫功能，事實上，斑馬魚的免疫系統發育是由卵黃細胞及巨噬細胞互相影響所形成，而至於後期的適應性免疫則須 4 到 6 周才能建立完全[8]，因此基本上不需要做免疫系統的剔除便可做到初步的定性、定量。

Hsp (Heat Shock Protein)家族是第一種被發現的 chaperone 蛋白，此種蛋白的表現

和細胞承受外界壓力的耐受性有密切關聯且廣泛存在於很多物種體內。Hsp 可以透過強化其他蛋白的摺疊效率來穩定其客戶蛋白(client proteins)的穩定性[9]，甚至有研究顯示 Hsp 家族在癌細胞內的過度表現和患者的存活率及治療效率呈現高度相關[10]。其中 Hsp90 因為參與很多賀爾蒙接收器蛋白、生長調控蛋白及缺氧時所誘導之蛋白的穩定折疊有關係而被率先研究，而會與 Hsp90 產生作用的蛋白後來也被證實和致癌機轉有關[11]。針對抑制 Hsp90 所開發出的抗癌藥已經投入乳癌療程[12]，透過多種藥物與 Hsp90 抑制劑的協同治療可以有效壓制癌細胞增生。不過問題在於就算使用此種療法在病理上可以觀察到腫瘤縮小，但真正誘發乳癌產生的是乳癌癌症幹細胞 BCSC (breast cancer stem cell)，然而這種協同治療對於影響 BCSC 動態的分子機制卻尚未明瞭。有研究發現 BCSC 對於藥物協同治療會使的 BCSC 對 Hsp90 抑制劑的抗性增加，同時也會觀察到 Hsp90 的表現量有上升的現象，而這樣的結果似乎與 Hsp27 有著一定關聯。後續也有研究指出若以 siRNA 將 Hsp27 的表現抑制將可以提升 Hsp90 抑制劑的功效[13]。而 Hsp27 的重要性除了會與 Hsp90 產生交互作用之外，甚至也會參與 MEK/ERK 訊息傳遞路徑以及影響 P53 的轉錄而間接控制細胞週期[2]。綜合以上敘述，說明 Hsp27 在細胞癌化機制裡扮演相當重要的角色，若是能對此開發出應對策略並應用於臨床治療，無疑是另一個對付癌症的手段。

(四)研究方法及步驟

1. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

利用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)，進行目標基因序列之放大，各基因序列所對應之引子(primer)請參閱表 1。反應總體積為 50 μ l，含有 4 μ l DNA(濃度為 2.8ng/ μ l)、1 μ l dNTP(濃度為 10mM)、10 μ l 5x buffer、2.5 μ l forward primer、2.5 μ l reverse primer、0.5 μ l DNA polymerase 以及 29.5 μ l d₂H₂O。將溶液樣本置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行，反應條件為 denature 98 $^{\circ}$ C 30 秒，98 $^{\circ}$ C 10 秒、annealing 62 $^{\circ}$ C 30 秒、elongation 72 $^{\circ}$ C 30 秒(30 個循環數)，72 $^{\circ}$ C 10 分鐘，最後溫度維持在 25 $^{\circ}$ C。

2. DNA 純化(DNA Clean-up)

本步驟使用 DNA Clean/Extraction Kit(GeneMark)進行 DNA 純化，目的在純化出 PCR 反應後的 DNA 片段。首先，加入 3 倍 PCR 產物體積的 Binding Solution 於 PCR 產物中並混合均勻，再移置到組合的 Spin Column 與 Collection Tube，以 12000rpm 轉速離心 1 分鐘。接著，倒去離心廢液後，加入 700 μ l 的 Wash Solution 並以 12000rpm 轉速離心 1 分鐘，再重覆本步驟一次。為了移除殘餘的酒精，倒去離心廢液後，直接以 12000rpm 轉速離心 3 至 5 分鐘，然後將 Spin Column 移置一個新的 eppendorf 中。加入預熱過的 d₂H₂O 35 μ l 於管內壁上，靜置 5 分鐘，待充分溶出 DNA 後，以 12000rpm 轉速離心 3 分鐘收集純化產物。

3. 限制酶作用(Restriction Enzyme Digestion)

以特定的酵素針對對應的酵素作用序列，將載體(vector)與插入子(insert)切割出相同的連接端點，本實驗我們使用了兩組載體，一組載體為 pPICZ B(圖 1)，將去除終止密碼(stop codon)的 *Hsp27* 基因片段(*wtHsp27*、*Hsp27A* 和 *Hsp27D*)利用 PCR 技術放大並接入至 pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C 載體中(圖 2)，並以此表現質體進行細胞轉染。pPICZ B 載體部份，反應總體積為 48.5 μ l，含有 DNA 3 μ l(3000ng)、10x No.3 Buffer 5 μ l、100x BSA 0.5 μ l、限制酶 *XhoI* 1.5 μ l 以及 d₂H₂O 38.5 μ l；插入子部分，反應總體積為 48.5 μ l，含有 DNA 10 μ l(3000ng)、10x No.3 Buffer 5 μ l、100x BSA 0.5 μ l、限制酶 *XhoI* 1.5 μ l 以及 d₂H₂O 31.5 μ l。兩種反應溶各自配置完成後，置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 1.5 個小時，再各別加入限制酶 *NotI* 1.5 μ l 並接續於於 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時。pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C 載體，反應總體積為 48.5 μ l，含有 DNA 3 μ l(3000ng)、10x No.4 Buffer 5 μ l、限制酶 *AfeI* 1.5 μ l 以及 d₂H₂O 39 μ l；插入子部分，反應總體積為 48.5 μ l，含有 DNA 10 μ l(3000ng)、10x No.4 Buffer 5 μ l、限制酶 *AfeI* 1.5 μ l 以及 d₂H₂O 32 μ l。兩種反應溶液各自配置完成後，置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 1.5 個小時，再各別加入限制酶 *EcoRI* 1.5 μ l 並接續於 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時。

4. 黏合作用(Ligation)

目的為使載體與插入子於相同限制點處結合，總反應體積為 10 μ l，取載體 DNA

2 μ l(依濃度調整)、插入子 DNA 5 μ l(依濃度調整)、10x T4 DNA Ligase Buffer 1 μ l、T4 DNA Ligase 1 μ l、d₂H₂O 1 μ l，配置完成後，置於 16°C 下反應 12 個小時以上。

5. 基因轉型(Transformation)

先將 competent cell 從 -80°C 冰箱取出，置於冰上溶解。隨後將 4-5 μ l 的 ligation 產物加入 competent cell 中，輕輕敲打 eppendorf 使其混勻再放置冰上 10 分鐘。之後將 eppendorf 放在 42°C 的水浴槽 1 分鐘進行 heat-shock，再迅速置於冰水裡搖晃 10 秒鐘，隨即將 eppendorf 插入冰上靜置 10 分鐘，接續加入 1 ml 的 LB broth 並放置於 37°C 培養箱中旋轉 45~60 分鐘。最後將 eppendorf 以轉速 3000rpm 離心 5 分鐘，去除 800 μ l 的上清液並將底部菌塊拍散，取 100 μ l 菌液均勻塗抹在含有 zeocin (pPICZ B) 或 ampicillin (pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C) 抗生素的 LB agar plate 上，最後放入 37°C 培養箱裡隔夜培養 16 小時，利用 agar plate 所含的抗生素來進行菌株篩選。

6、細胞培養(cell culture)

本實驗主要以 10 公分 dish 作為培養 BT-474 細胞的容器，細胞所使用的細胞培養液為 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 加上 10% 的胎牛血清 Fetal Bovine Serum (FBS) 和 1% 的 Pencillin/Steptomycin(PS)。進行 subculture 時首先將舊培養液吸出，用 4 ml 的 PBS 潤洗以免殘留的培養液干擾胰蛋白酶(trypsin)的作用。隨後加入 1ml 的 1x 胰蛋白酶作用使細胞飄起，再利用 4ml 的細胞培養液中和後拿去以每分鐘 1000 轉離心。離心結束後去除上清液再以適量的新細胞培養液打散細胞並回種約 1x 10⁶ 個細胞於培養皿中並至於 37°C/5% CO₂ 培養箱培養。

7. 基因轉染(Transfection)

我們使用 Lipofectamine 2000 Reagent 進行細胞轉染。先取出兩管 eppendorf 分別加入 150 μ l 及 700 μ l 的 DMEM medium，裝有 medium 150 μ l 的 eppendorf 加入 12 μ l 的 Lipofectamine 2000 Reagent；裝有 medium 700 μ l 的 eppendorf 則加入 14 μ g 的 DNA，之後將兩管溶液取 1:1 的體積混和並置於室溫 5 分鐘，之後取出 250 μ l 的溶液加入培養有細胞約 9 成滿的 3.5 公分培養盤中，置於 37°C 中培養 1 到 3 天後放到倒立螢光顯微鏡下觀察。

8. 篩選穩定表現紅螢光之 BT-474、MDA-MB-231 細胞群(Stable Cell Selection)

利用質體攜帶了抗 bsd 抗生素的基因，我們使用濃度為 20 μ l/ml 的 bsd 抗生素做穩定細胞群的篩選，每 1 ml 的 DMEM 細胞培養液加入 1 μ l 的抗生素，持續篩選培養細胞成細胞菌落，再將細胞菌落以流式細胞儀進行篩選，將表現紅色螢光蛋白(tRFP) 的 BT-474 細胞挑選出來並持續以抗生素維持培養細胞。

9. 斑馬魚(*Danio rerio*)飼養

本實驗使用野生株 AB strain 和血管螢光(+/+)斑馬魚 Tg(*fli-1:EGFP*)，兩種品系的斑馬魚皆飼養於 28 $^{\circ}$ C 培養箱中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食。

10. 顯微注射(Microinjection)

利用顯微注射技術進行斑馬魚之異種移植手術。先以拉針器製作注射所需的毛細管針，條件為 heat:330、pull:150、vel:150、time:150。用鑷子將拉好的毛細管針前端以 45 度斜口切斷，口徑大小儘量控制在略大於心臟，再以針筒灌入礦物油以平衡注射時的壓力。裝載注射液時，將細胞濃度大約控制在每 nl 的 PBS 含有 87 顆細胞並注射於卵黃囊內。注射前先將 0.04% 的麻醉劑 tricaine，並讓斑馬魚浸泡至溶液內至停止游動時始可進行異種移植手術。

11. 異種移植手術(xenograft)後斑馬魚樣本飼養

使用 3 天大的血管螢光轉植魚胚胎(+/-或+/+)作為移植樣本，移植手術完成後將胚胎放入培養箱並在 2 天內將培養溫度從 28 $^{\circ}$ C 緩慢升溫至 37(或 34) $^{\circ}$ C 且持續飼養。飼養期間以適量的草履蟲餵食且必須每日換水。

12. 倒立螢光顯微鏡觀察

將斑馬魚樣本以 0.02% tricaine 稀釋麻醉，必要時可使用 0.5% low-melting agarose 膠體溶液或甲基纖維素擺位至側面向上、雙眼對齊並固定之。我們將倒立螢光顯微鏡調整至 Rhodamine 濾鏡以觀察表現 wtHsp27-c-myc 及紅螢光蛋白的 BT-474 細胞於胚胎內的表現位置，同時可再將顯微鏡調整為 FITC 濾鏡以觀察到 EGFP 綠色

螢光蛋白表現於轉殖魚的血管內皮細胞，兩者皆可攝像記錄之。

結果與討論

此研究之重點在於透過 wtHsp27-c-myc、Hsp27A-c-myc、Hsp27D-c-myc 三組基因及單純表現 tRFP(control)之乳癌細胞對 3 天大的血管螢光斑馬魚 Tg(fli-1:EGFP) 進行異種移植手術並透過螢光表現分析各斑馬魚樣本內癌細胞之動態，進而探討 Hsp27 對乳癌細胞於活體內之侵襲性、轉移性及承受環境壓力之能力的影響，相關質體及引子(primer)之資料請參照表 1、表 2、圖 1、圖 2。

1. BT-474 之相關研究

本實驗利用帶有紅螢光基因(tRFP)的 BT-474 乳癌細胞株分別表現 wtHsp27-c-myc、Hsp27D-c-myc 及 Hsp27A-c-myc 基因，並利用顯微注射技術將具有穩定質體表現的細胞植入 3 天大血管螢光斑馬魚 Tg(fli-1:EGFP)之卵黃內(圖 3)。然而因 BT-474 乳癌細胞株侵襲效率不高，產生的病理現象較輕微，所以並沒有進行螢光強度之定量，僅挑選現象差異較明顯的 5dpi 進行觀察。透過倒立式螢光顯微鏡將現象紀錄並比較後發現，相較於其他樣本，可穩定表現 Hsp27D-c-myc 基因的 BT-474 細胞株具有較強的侵襲性，並足以形成腫瘤甚至轉移至卵黃組織之外(圖 4)。

2. MDA-MB-231 之相關研究

經過多次實驗及觀察，因 BT-474 乳癌細胞株癌化性質較不顯著，因此僅能區別 Hsp27D-c-myc 和 wtHsp27-c-myc、Hsp27A-c-myc、control 之差異，且較難表現出可定量之病理現象。經過蒐集多方資料及縝密的討論後，決定以國際上較普遍使用在斑馬魚異種移植實驗的高侵襲性三陰性乳癌細胞株 MDA-MB-231(15)作為新的勝任細胞株來進行後續研究，另外為降低高溫培養對斑馬魚胚胎產生的影響，也將最後培養溫度 37°C 修正為 34°C。而對於顯微注射及活體內(in vivo)螢光定量的部分，我們將植入部位由卵黃組織改為國際常用的 DoC(Dock of Cuvier)並針對轉移至 CHT(caudal haematopoietic tissue)(圖 5)(14)區域之螢光反應以 ImageJ 軟體進行分析及定量。

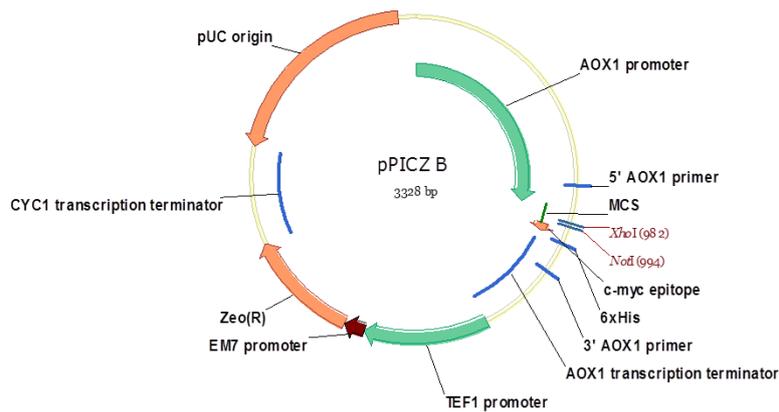
我們先使用 MDA-MB-231 tRFP 進行實驗並成功獲得可進行螢光定量的病理現象，在圖中我們可以發現明顯的癌細胞轉移於尾部(圖 6)。我們隨後利用修正後的方法來尋找適合觀察的時期，發現雖然 1dpi(day post-injection)螢光強度較強，但誤差較大，不適合觀察，而至於 2dpi 到 5dpi 雖然螢光強度可能只有 1dpi 的一半甚至更低，不過誤差容易控制(圖 7)，因此往後實驗可以考慮使用 2 至 5dpi 的資料進行分析及比較。

【表 1】各基因序列所對應之引子(primer)的詳細描述。

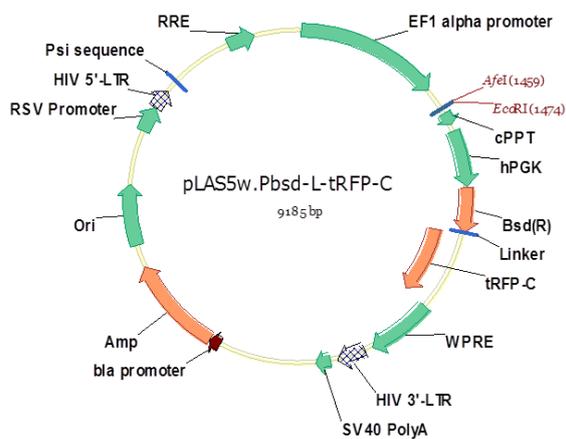
Primer ID	Primer sequence	RE site	Description
XhoI-Hsp27-F	5'-TATCTCgAgATgACCGAgCgCCgCgTCCCCT-3'	<i>XhoI</i>	Subclone Hsp27 fragments into pPICZ B vector
Hsp27ns-NotI-R	5'-TATgCggCCgCCTTggCggCAgTCTCATCggAT-3'	<i>NotI</i>	
AfeI-Hsp27-F	5'-AATAgCgCTATgACCGAgCgCCgCgTCCCC-3'	<i>AfeI</i>	Subclone Hsp27-c-myc fragments into pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C vector
c-myc-stop-EcoRI-R	5'-gCggAATTCCTTACAgATCCTCTTCTgAgATgAg-3'	<i>EcoRI</i>	

【表 2】本實驗所使用之載體與構築完成之質體。其中 Hsp27D 及 Hsp27A 為對 Hsp27 的磷酸化位點做的兩種突變，為的是往後觀察磷酸化機制對 Hsp27 影響乳癌細胞 BT-474 於斑馬魚體內的動態。

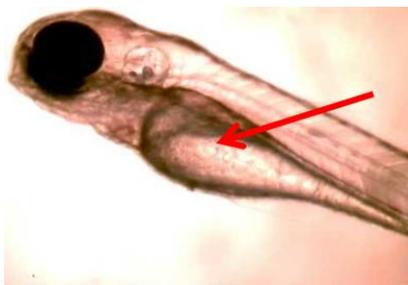
vector	plasmid
pPICZ B	pPICZ B::wtHsp27
	pPICZ B::Hsp27D
	pPICZ B::Hsp27A
pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C	pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C::wtHsp27-c-myc
	pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C::Hsp27D-c-myc
	pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C::Hsp27A-c-myc



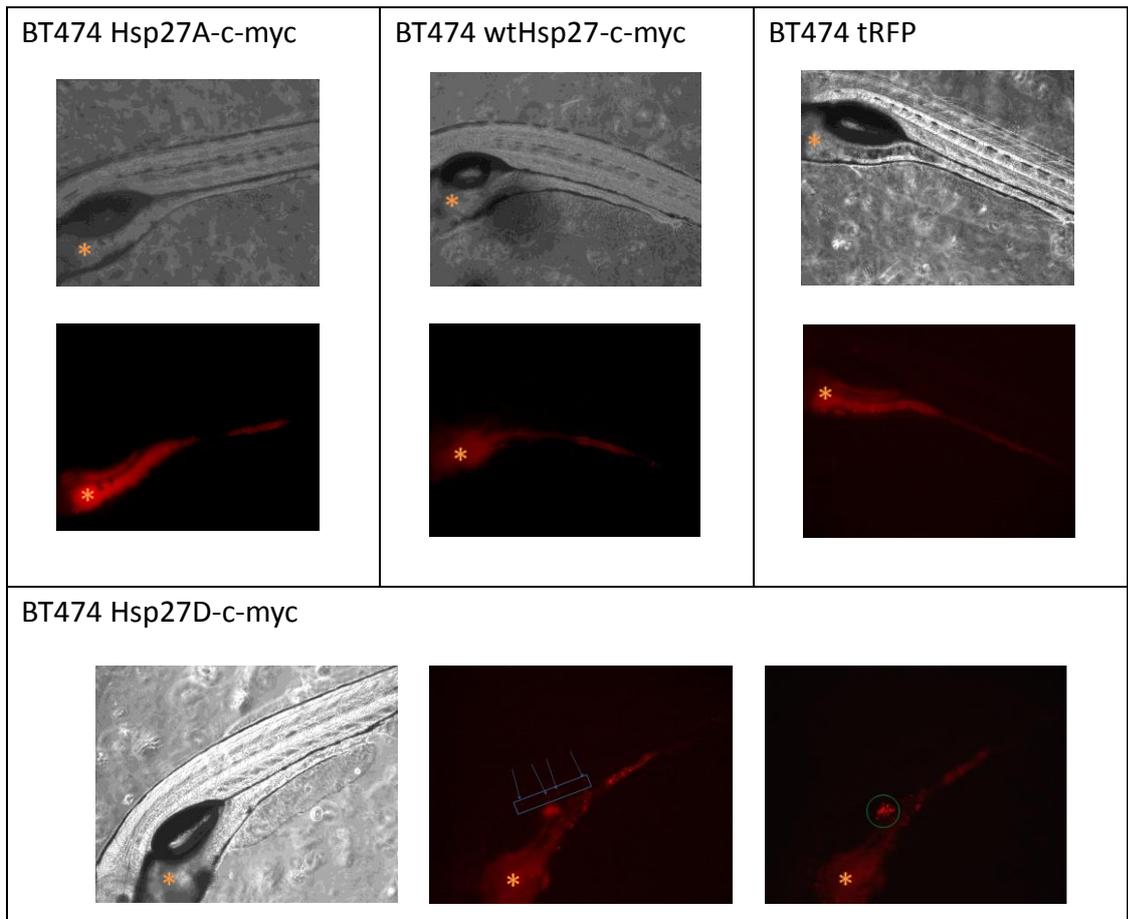
【圖 1】pPICZ B 載體。 *wtHsp27* 插入在 *XhoI* 及 *NodI* 切點間，利用此載體將 *wtHsp27* 接上 c-myc epitope，再利用引子對 *AfeI*-*Hsp27*-F 及 c-myc-stop-*EcoRI*-R 進行 PCR 放大 *wtHsp27*-c-myc 融合基因片段。



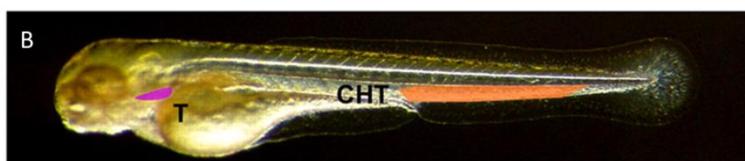
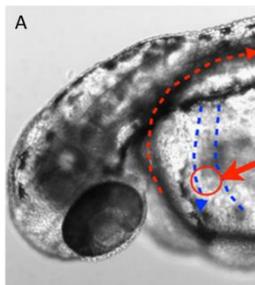
【圖 2】pLAS5w.Pbsd-L-tRFP-C 載體。 將 *wtHsp27*-c-myc 接到 *AfeI* 及 *EcoRI* 切點間並以此質體進行基因轉染，送入 BT-474 乳癌細胞株。質體上有抗 bsd 基因，可利用 bsd 抗生素進行細胞群的 stable cell selection。另外也寫入了 tRFP 基因，使成功轉染之細胞可以產生紅螢光蛋白，讓癌組織能以紅螢光在斑馬魚體內呈現。



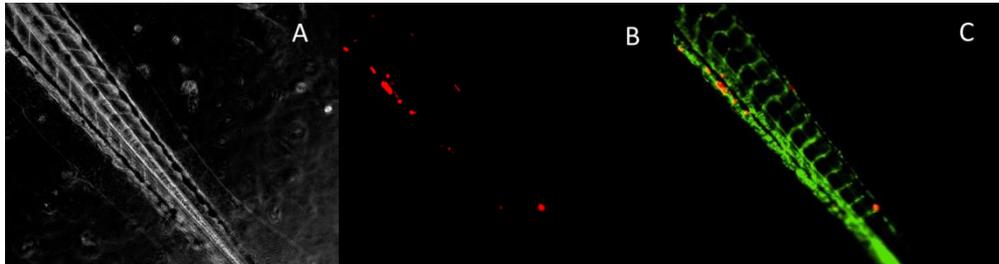
【圖 3】BT-474 乳癌細胞於斑馬魚胚胎之植入位置。 紅色箭頭執行顯微注射時之針位置。



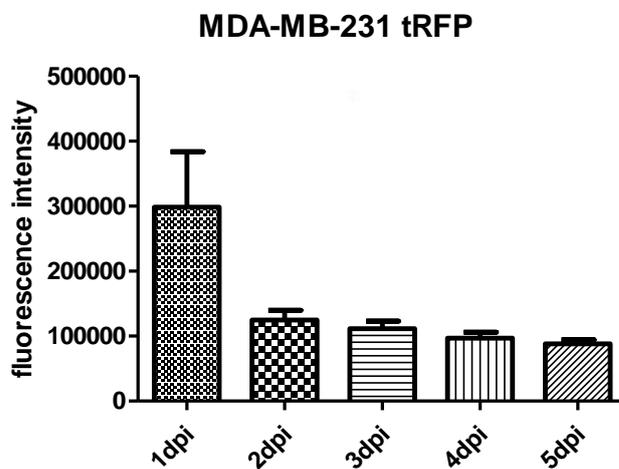
【圖 4】 BT-474 細胞植入斑馬魚卵黃組織後的第五天影像。在圖中可以看見表現 Hsp27D-c-myc 的 BT-474 乳癌細胞(紅色)有明顯的轉移(藍色箭頭)及腫瘤生成(綠色圓圈)，而分別表現 wtHsp27-c-myc、Hsp27A-c-myc 及單純表現 tRFP 的 BT-474 乳癌細胞(紅色)的現象較為相近且較輕微，並無明顯的轉移及腫瘤生成。(* 字為乳癌細胞注射位置)



【圖 5】 DoC(duct of cuvier)及 CHT(caudal hematopoietic tissue)之示意圖。(A)藍色箭頭為血管 DoC(duct of cuvier)之所在位置，紅色實心箭頭為乳癌細胞注射位置。斑馬魚血液由藍色虛線流入心臟並沿著紅色虛線之方向流出。(B)為 CHT(caudal hematopoietic tissue)之所在位置，而圖中 T 的位置為胸腺。



【圖 6】 為 MDA-MB-231 tRFP 尾部轉移示意圖。(A)為斑馬魚之可見光圖，頭部方向為左上。(B)為相同角度之斑馬魚紅螢光影像。紅色部分為 MDA-MB-231 tRFP 細胞之座落位置。(C)為斑馬魚的紅、綠螢光影像之疊圖，紅色為 MDA-MB-231 tRFP 細胞，綠色部分為血管內皮細胞，在圖中可以清楚看見 MDA-MB-231 乳癌細胞位於血管內。



【圖 7】 MDA-MB-231 之 1dpi 至 5dpi 螢光定量圖。各組資料之樣本數皆為 30 隻，可以發現 1dpi 的螢光強度較強但誤差大，2、3、4、5dpi 的螢光強度雖然較弱，但誤差小，較適合拿來進行後續的比較及分析。推測是因為癌細胞有一定之異質性，從培養血環境轉至斑馬魚體內時癌細胞承受了較大程度的環境變化，因此會有一部份癌細胞因無法適應而死亡。

參考文獻

1. Che-Hsin Lee., et al., Epidermal growth factor/heat shock protein 27 pathway regulates vasculogenic mimicry activity of breast cancer stem/progenitor cells . Elsevier, 2014. 104: p. 117-126.
2. Maria Katsogiannou., et al.,Heat shock protein27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Frontiers In Genetics*, 2014. 5: 346.
3. Kimmel, C.B., et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 1995. 203(3): p. 253-310.
4. Postlethwait, J.H., et al., A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 1994. 264(5159): p. 699-703.
5. Jeng-Wei Lu, et al., A genetic linkage map for the zebrafish. *World Journal of Gastroenterol*, 2015. 21(42): p. 12042-12058.
6. WeiXu Ma, et al., An overview of chronic myeloid leukemia and its animal models, 2015. 58(12): p. 1202-1208.
7. Jorge Galindo-Villegas, et al., Recent findings on vertebrate developmental immunity using the zebrafish model., 2016. 69: p. 106-112.
8. Lam SH, et al., Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. Elsevier, 2004. 28(1): p. 9-28.
9. C. Georgopoulos, et al., Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones, *Annu. Rev. CellBiol*, 1993. 9: p. 601-634.
10. E.T. Soo, et al., Heat shock proteins as novel therapeutic targets in cancer. *In Vivo* (Athens, Greece), 2008. 22: p.311-315.
11. M.A. Brown,et al., Hsp90efrom signal transductionto cell transformation. *Biochem*,

Biophysical Research Communications, 2007. 363: p.241-246.

12. R.K. Ramanathan, et al., Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat-shock protein 90, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol*, 2010. 28: p.1520-1526.
13. Che-Hsin Lee, et al., Inhibition of heat shock protein (Hsp) 27 potentiates the suppressive effect of Hsp90 inhibitors in targeting breast cancer stem-like cells. *Biochimie*, 2012. 94(6): p.1382-1389.
14. Miriam de Boeck et al., Smad6 determines BMP-regulated invasive behaviour of breast cancer cells in a zebrafish xenograft model. *Scientific Report*, 2016. Apr 26;6:24968.
15. Yuping Liu et al., Antimetastatic Therapies of the Polysulfide Diallyl Trisulfide against Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) via Suppressing MMP2/9 by Blocking NF- κ B and ERK/MAPK Signaling Pathways. *PLoS One*, 2015. Apr 30 ; 10(4): e0123781.