

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	: 益生菌裂解液抑制肺癌細胞增生的機轉研究
------------	-----------------------

執行計畫學生：陳宥誠
學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-088-B
研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月
指導教授：詹明修

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 108年04月02日

壹、 中文摘要

肺癌為我國癌症死亡原因的第一位，但目前的治療方式尚無法有效的完全治癒肺癌病患，癌症復發的問題經常出現，因此需要更有效治療肺癌的方式。益生菌近年來的應用多為緩和過敏症狀，以及治療腸胃腹瀉等人體的腸胃疾病，但也有愈來愈多研究指出益生菌具有抑制癌細胞侵襲與轉移的能力。癌症幹細胞(Cancer Stem Cell)是具有幹細胞特性的癌細胞，被認為有形成腫瘤、發展成癌症的潛力，癌症幹細胞也是造成癌症轉移、容易復發、較差預後的原因之一，因此本研究要了解兩株益生菌之裂解液處理非小細胞肺癌 A549細胞與其 Pemetrexed 抗藥性 A400細胞，對於益生菌之裂解液對於 tumor sphere 的形成與 EMTs 能力的影響，首先我們發現經過裂解液處理後的肺癌細胞，其增生與形成 colony 的能力會降低，而我們也發現肺癌細胞 Pemetrexed 抗藥株 A400細胞對於益生菌裂解液更敏感，將益生菌裂解液與 Alimta 合併處理後，可觀察到 A400對於藥物敏感性增加，尤其是89裂解液，隨後我們也發現益生菌裂解液對能夠抑制肺癌細胞 IGF1R 表現，與其下游 ERK/Akt 的表現。ZEB1為癌細胞產生 EMTs 中的重要因子，我們也觀察到 ZEB1當細胞經過益生菌裂解液處理後，有下降趨勢。並且我們也透過 sphere-forming culture 發現益生菌裂解液減少肺癌細胞癌症球體數量，並且也減少 Bmi1/c-Myc 等調控癌幹細胞自我更新基因表現。綜合本研究成果，我們發現益生菌89之裂解液能透過抑制 IGF1R/ERK/ZEB1路徑，有效抑制 Alimta 抗藥性肺癌細胞的增生，並可使 Bmi1/c-Myc 表現下降抑制癌幹細胞的自我更新，具有發展成為肺癌治療過程中之輔助食品的潛力。

貳、 文獻回顧

Epithelial-to-mesenchymal transitions (EMTs)為腫瘤細胞產生轉移的一個重要基礎，而 Insulin-like growth factor-1 (IGF1R)在其中扮演重要的誘導者。IGF1R 為細胞膜上的一種穿膜蛋白，它具有調控細胞的凋亡、生長以及分化的能力，IGF1R 表現的失調也被指出為癌細胞增生、轉移與腫瘤治療抗性的產生有關[1] [2]，透過誘導 Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) 與 Snail，導致腫瘤細胞的侵襲與轉移[3]。ZEB1屬於 ZFH 蛋白家族的一員，具有抑制上皮細胞分化的能力，有研究指出 ZEB1的表現與 E-cadherin 的表現呈負相關[4] [5]，透過與 CDH1 基因 promoter 上的 E-box region 結合[6]，當 E-cadherin 的表現被抑制，細胞間的 cell-cell junction 與 apical-basal polarity 也會隨著消失，在乳癌中，癌細胞會藉由過度表現 RNA binding proteins (RBPs)，進而維持 ZEB1 mRNA 的穩定性，誘導癌細胞產生侵襲與轉移的能力，甚至是 stemness gene 的表現。[7]而當 IGF-1 pathway 的活化減少，也會使得 ZEB1 表現量降低[8]。在肺癌細胞中 ZEB1 的表現與腫瘤的大小和轉移有很大關聯，ZEB1 誘導的 EMT 在支氣管癌轉移的早期是相當重要原因之一，癌細胞會透過 IGF1 調控 ZEB1 的表現，進一步產生間質細胞的特徵，而導致細胞的侵襲與轉移[9]。EMT 也被認為是促進腫瘤細胞產生幹細胞的特徵，進一步導致癌症的復發、藥物抗性的產生，其中癌症幹細胞(Cancer Stem Cell)是具有幹細胞特性的癌細胞，能夠自我更新(Self-renewal)及細胞分化(Differentiation) [10]，被認為有形成腫瘤、發展成癌症的潛力，癌症幹細胞也是造成癌症轉移、容易復發、較差預後的原因之一，CSCs 為腫瘤組織中相對數量少的次族群，在癌症發生以及抗藥性的產生中扮演很重要的角色。

益生菌是指能夠被人類食用或應用，能夠改變體內微生物相，有益於原宿主的細菌，並且能夠正常繁殖，對人體不會產生致病性的菌株。近年來益生菌的應用多為減緩過敏症狀或緩和急性腸胃腹瀉等人體腸胃疾病，例如有研究提供 *Clostridium butyricum* 給

接受化療的肺癌病患，發現腹瀉現象有改善現象，且能提升病人的 lymphocyte count、platelet/lymphocyte ratio (PLR)與 Neutrophil/lymphocyte ratio (NLR)，顯示 *Clostridium butyricum* 能夠降低化療所引起的發炎反應[11]。有許多文獻指出益生菌對腫瘤細胞具有抑制增生與誘導細胞凋亡等功能，特別是益生菌內的活性物質降低腫瘤細胞 matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)，與增加 ZO-1蛋白的表現，而導致大腸癌細胞侵襲能力被抑制[12]。有研究利用自人體陰道分離的特殊 *Enterococcus faecalis* 菌株之代謝物 (metabolites)處理不同的人類癌細胞，包含 AGS(胃癌)、HeLa(子宮頸癌)、MCF7(乳癌)、HT-29(大腸癌)等，皆能導致癌細胞凋亡，並且當以 proteinase 將代謝物內的蛋白質去除後，則能明顯使抑制癌細胞的功效消失[13]。*Lactobacillus plantarum* 為人類口腔將常見的共生菌，被發現能使 KB 口腔癌細胞內 PTEN 表現增加以及抑制 MAPK 訊息傳遞路徑，誘導 KB 細胞走向細胞凋亡[14]。另有研究指出，一些乳酸桿菌菌株的菌體或培養液能增加癌細胞中 Bax/Bcl-2的比例或一氧化氮的釋放，進而抑制 HT-29大腸癌細胞的增生[15]。益生菌對於癌症的治療有其潛力，但對於其中機制還需要進一步研究探討。

參、 研究動機

根據我國衛福部統計資料，國人罹患癌症的比例中大腸直腸癌居於首位，而因癌症死亡的人口中，肺癌的死亡率卻遠高於大腸直腸癌，因此肺癌的治療有相當的迫切性。上皮間質轉換(EMTs)為原位癌產轉移的基礎，有研究指出前列腺癌細胞會因受到 IGF1 的刺激而導致 ZEB1 的表現而產生 EMTs，而在肺癌中 IGF1R 表現的失調也被指出為癌細胞增生、轉移與腫瘤治療抗性產生，因此肺癌細胞會透過 IGF1R 的活化，使下游的 MAPK/ERK pathway 導致 ZEB1 的表現，導致肺癌 EMTs 的產生[16] [17]，也是造成肺癌病患治療後容易復發以及預後不良的原因，本研究挑選兩株益生菌之裂解液處理非小細胞肺癌 A549 細胞與其 Pemetrexed 抗藥性 A400 細胞，欲探討益生菌裂解液對於 tumor sphere 的形成與 EMTs 的影響。

肆、 實驗材料與方法

細胞培養

肺癌細胞株 A549 以 DMEM medium(含10%FBS、1 μ M glutamine、1 μ M sodium pyruvate、100 μ g/ml penicillin/streptomycin/amphotericin B)培養於37°C含5% CO₂ 之培養箱，另外 A400則另外加入400nM Pemetrexed 以維持其抗性。

IC50

檢測藥物抑制癌幹細胞增生作用的程度，並定義抑制50%細胞增生的濃度。取 2.5*10³/well 的 A549與 A400細胞以不同濃度的生菌89/662裂解液處理，並合併1 M 的 Alimta 後種入96孔盤 培養96小時。之後加入10 μ l/well 之 MTT((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)在37°C 下進行反應2小時，隨後將液體吸乾，加入 100 μ l/well 之 DMSO 後靜置10分鐘，將經細胞反應 MTT 所產生的 formazan 以 DMSO 溶出，以盤式分光光度計量測570nm 波長測量其吸光值。

西方墨點法(Western blot)

分別收取 A549與 A400細胞，並加入細胞裂解液(NETN lysis buffer 與 RIPA lysis buffer)將細胞破碎，以得到蛋白液，再以 BCA 定量法測定蛋白濃度，先以 BSA 建立標準曲線，再加入100 μ l BCA solution 與蛋白質結合後變成深藍色，呈色後呈色以562 nm 波長偵測吸光值，推算樣品濃度。每個樣品取30 μ g 蛋白量，進行 SDS-PAGE 電泳分離，並轉漬於 PVDF 膜上，以5%脫脂牛奶進行 blocking 1個半小時，再以特異性一級抗體於4°C培養隔夜，隔日以含過氧化酶之特異性二級抗體於室溫培養1小時，經過 TBS-T 清洗後，加入冷光顯影劑反應，以冷光照相儀擷取冷光訊號，再進行分析。

定量 PCR(quantitative PCR)

將經過益生菌裂解液處理過的，以 Quick-RNATM MiniPrep Kit 進行 RNA 的萃取與純化，測出 RNA 的濃度後，每個樣品取1 μ g 與 RNA RevertAid First Strand cDNA

Synthesis Kit(Fermentas)進行反轉錄成 cDNA，接著取 10ng/μl 之 cDNA，以 KAPA SYBR FAST qPCR Kit 及基因特異性引子對進行 qPCR 分析。

癌症球體培養(Sphere-forming culture)

先將球體細胞培養用的生長因子(1X B27 supplement, 10ng/ml EGF, 10ng/ml bFGF, 5μg/ml Insulin, 1μg/ml Hydrocortisone, 4μg/ml Heparin)均勻混合，然後將生長因子及球體細胞培養基(DMEM/F12 containing 0.5% methylcellulose)加入35μg/ml 裂解液混合均勻，再將混合好的培養液以每孔2ml 加入超低貼附培養盤中，之後並分別將 2×10^3 /well 的細胞濃度種入培養盤中以進行初代球體培養(Primary Sphere)，期間每隔三天補充 500μl 的 medium (含生長因子)，數天後以倒立式顯微鏡觀察並計數球體數目，之後並收下細胞備用。

群落分析試驗(Colony assay)

種入少量的細胞(6well，500/well,12well，250/well)，探討益生菌裂解液對於細胞產生群落的影響，培養至細胞開始形成群落後，加入 formaldehyde 固定10分鐘，wash 至沒有 formaldehyde 殘留後，加入0.4% crystal violet 染色30分鐘，wash 直到沒有多餘的染劑殘留後並晾乾，以計數方式計算 colony 數量。

伍、 實驗結果

益生菌之裂解液對肺癌細胞具抑制增生能力

將 A549 細胞與其 Pemetrexed 抗藥性 A400 細胞(由中山醫學大學 醫學研究所 許國堂教授提供) 重入培養盤中並處理不同濃度之 89/662 裂解液(由景岳生物科技公司提供)。首先我們透過細胞計數，觀察到細胞經過裂解液處理後之肺癌細胞 A549 細胞株及 A400 的存活率，益生菌 89/662 之裂解液可以抑制 A549 與 A400 細胞的增生，其中可看出 A400 細胞對 89/662 裂解液相對於 A549 細胞更加敏感(圖一 A)，接著從群落分析的結果，也測定出細胞形成群落的能力降低(圖一 B)，這些結果顯示，益生菌89或662之裂解液對於肺癌細胞 A549或具 Pemetrexed 抗藥性之 A400肺癌細胞皆具有抑制生長的效果。

探討益生菌之裂解液對於肺癌細胞抗藥株增加其藥物敏感性

另外我們加入1 μ M 之 pemetrexed(商品名: Alimta)與益生菌裂解液對肺癌細胞做合併處理做合併處理，發現 A400細胞產生的抑制現象更明顯，因此推論89益生菌裂解液，能夠增加 A400細胞對於 Alimta 藥物的敏感性(圖二 C)，而662益生菌裂解液則沒有明顯增加 A400細胞對 alimta 敏感性的效果(圖二 D)，A400細胞對於1 μ M Alimta 相較於 A549細胞有明顯的抗藥性，但 A400細胞株對於89/662益生菌裂解液產生的抑制效果卻比 A549更明顯，另外89益生菌裂解液與1 μ M Alimta 合併後，對於 A400產生更明顯的抑制增生的效果。

探討益生菌之裂解液對於肺癌細胞抑制增生機制

由於 IGF1R 表現為肺癌的預後不良指標，並且 IGF1R 訊號調控癌細胞的增生與轉移，我們接著想了解益生菌裂解液對 IGF1R 訊號，因此選擇35 μ g/ml 濃度之益生菌裂解液進

行後續實驗，經過 RIPA 裂解取得蛋白，後再定量進行 Western blot 測試，觀察其 IGF1R 以及其下游基因表現的影響

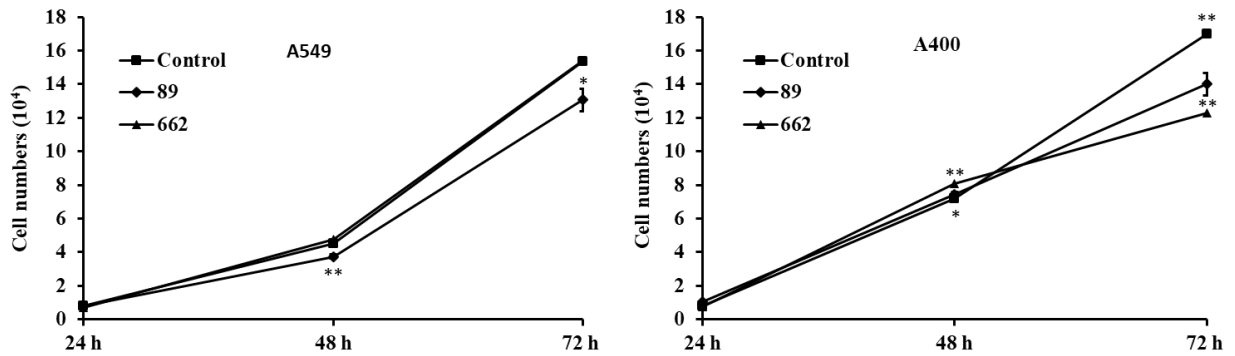
IGF1R 透過與其配體結合活化後，會進一步透過 PI3K/Akt 與 MAPK pathway 導致細胞的增生等作用[18]，而我們透過 WB 結果觀察到經過89/662益生菌裂解液處理後，肺癌細胞 A549/A400的 IGF1R 的表現量減少，並且抑制 IGF1R 之磷酸化(圖三 A)；隨後我們也探討益生菌裂解液對其下游訊號路徑的影響，由結果可得知益生菌89/662處理肺癌細胞後，MAPK pathway 中的 ERK 磷酸化降低(圖三 B)。另外先前有研究指出抑制 ERK 的表現後，ZEB1的表現量也隨之減少，進一步導致細胞 EMTs 被抑制[16]，透過 WB 的結果，我們也觀察到經過益生菌裂解液處理後，肺癌細胞內 ZEB1的表現量有下降的趨勢(圖三 C)。

探討益生菌之裂解液對於肺癌細胞 A400形成癌症球體與其幹性基因表現的影響

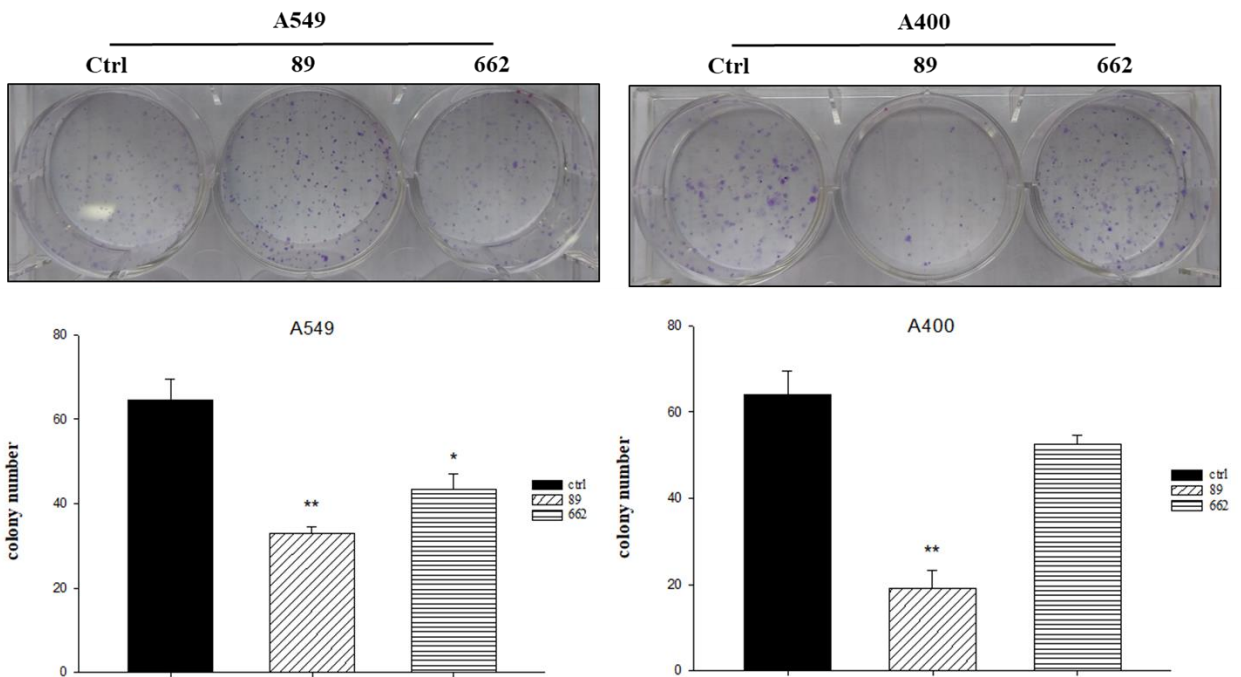
癌症幹細胞具有自我更新以及細胞分化，被認為有形成腫瘤、發展成癌症的潛力，癌症幹細胞也是造成癌症轉移、容易復發、較差預後的原因之一，我們利用癌症球體培養法，透過觀察其形成的癌症球體數量來分析肺癌幹細胞的自我更新活性。我們發現經過89益生菌裂解液處理後之 A400細胞，其形成癌症球體的能力被抑制(圖四 A)，因此我們進一步透過 qPCR 測定經過裂解液處理後之肺癌細胞癌症球體，與癌幹細胞自我更新相關之幹性基因(stemness genes)表現量的差異，發現 A400肺癌球體細胞經過89裂解液處理後，Bmi1/c-Myc/Sox2/Oct4/Nanog 等基因 mRNA 的表現量下降(圖四 B)。

陸、 實驗數據

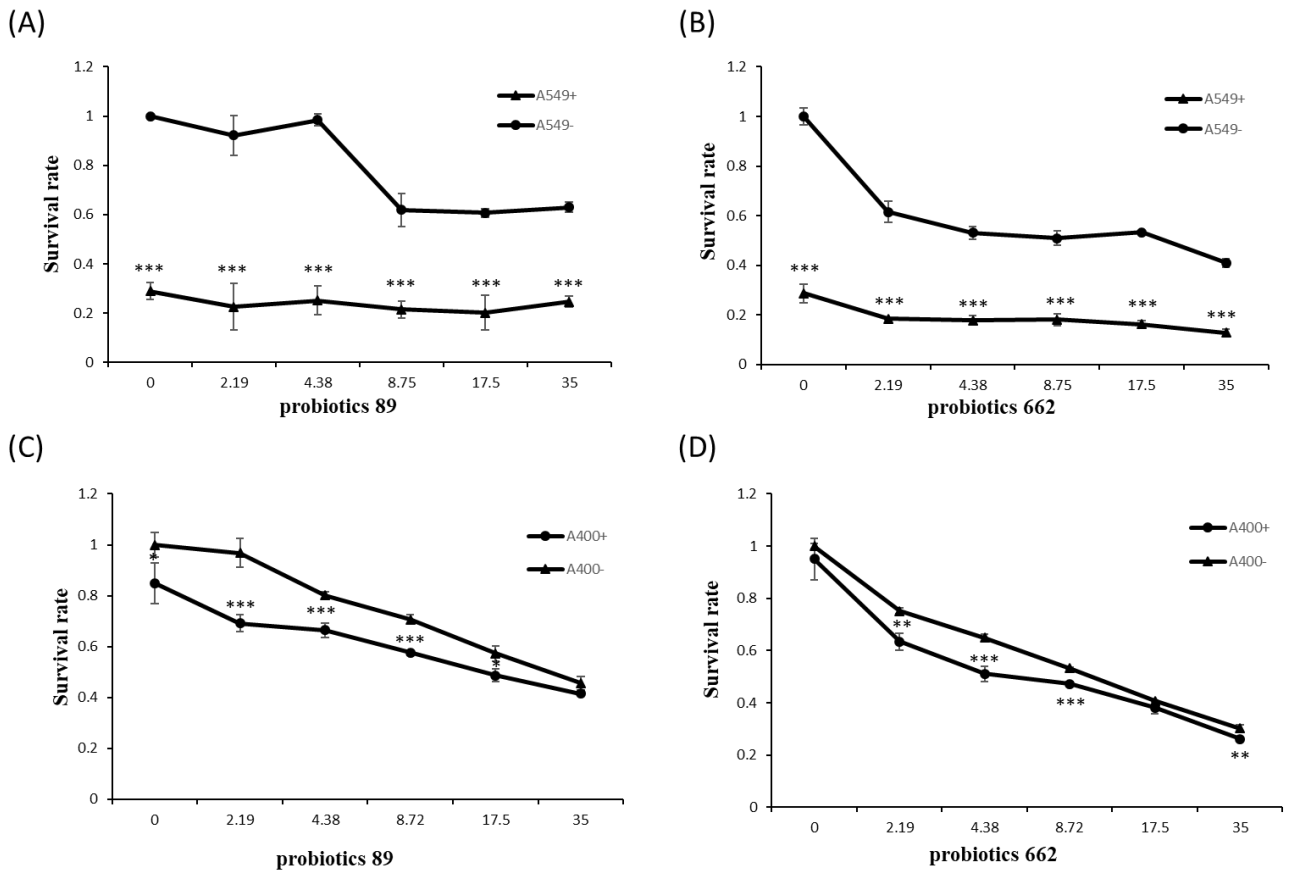
(A)



(B)



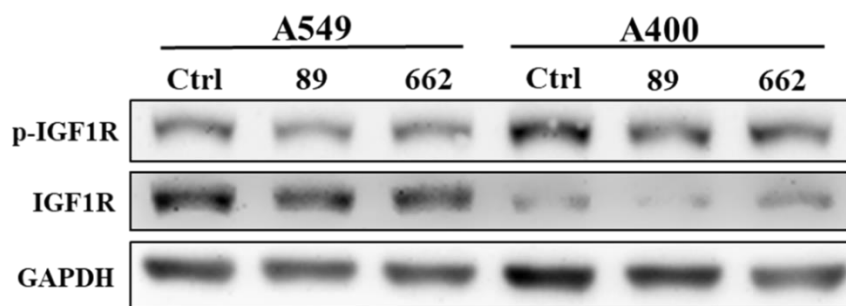
圖一、益生菌裂解液具有抑制肺癌細胞增生的功效。(A)透過 trypan blue exclusion assay 分析肺癌細胞生長曲線，以89/662益生菌裂解液以35 μ g/ml 濃度處理後，經過24h/48h/72h後，計數各時間點細胞總數 *， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$ 。(B)利用 Cologenic assay，以500個細胞/孔的細胞量種植入6孔細胞培養盤中，並加入89/662益生菌裂解液35 μ g/ml，於37 $^{\circ}$ C 培養箱培養14天後，以 formaldehyde 固定並以結晶紫染色，再計數群落數量。統計差異以 unpaired t-test 進行分析。*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$ 。



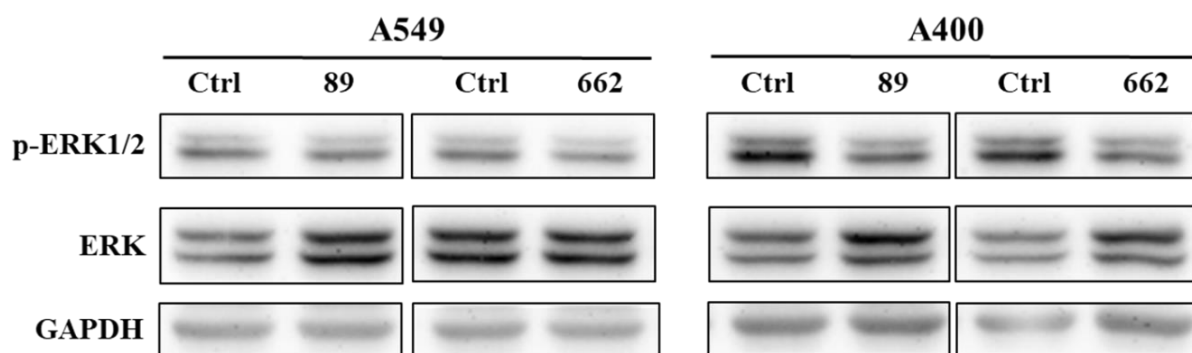
圖二、益生菌之裂解液可增加 Pemetrexed 抗藥性肺癌細胞株之 pemetrexed 敏感性。(A, B)

取35/17.5/8.72/4.38/2.19 $\mu\text{g/ml}$ 各濃度之89/662益生菌裂解液處理 A549 (A)或 A400 (B)細胞，以 MTT 分析細胞存活情況。(C, D)以 $1\mu\text{M}$ 之 Alimta 合併各益生菌(89, C; 662, D)裂解液濃度處理 A400細胞，於培養96hr後，以 MTT 進行細胞活性的測試。統計差異以 unpaired t test 進行分析。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

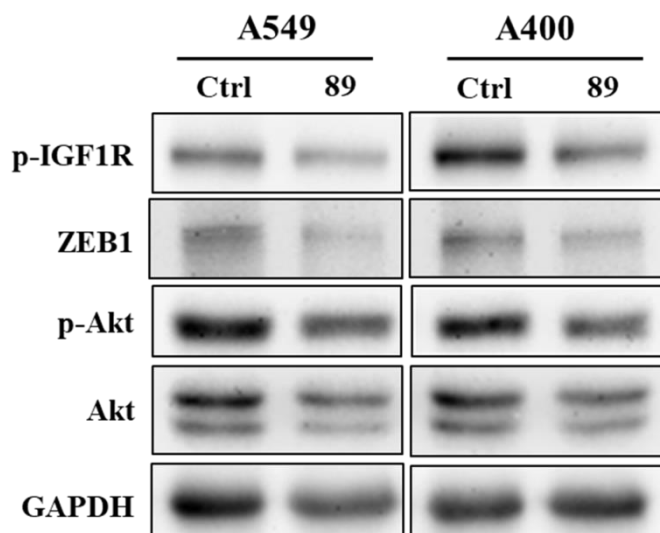
(A)



(B)

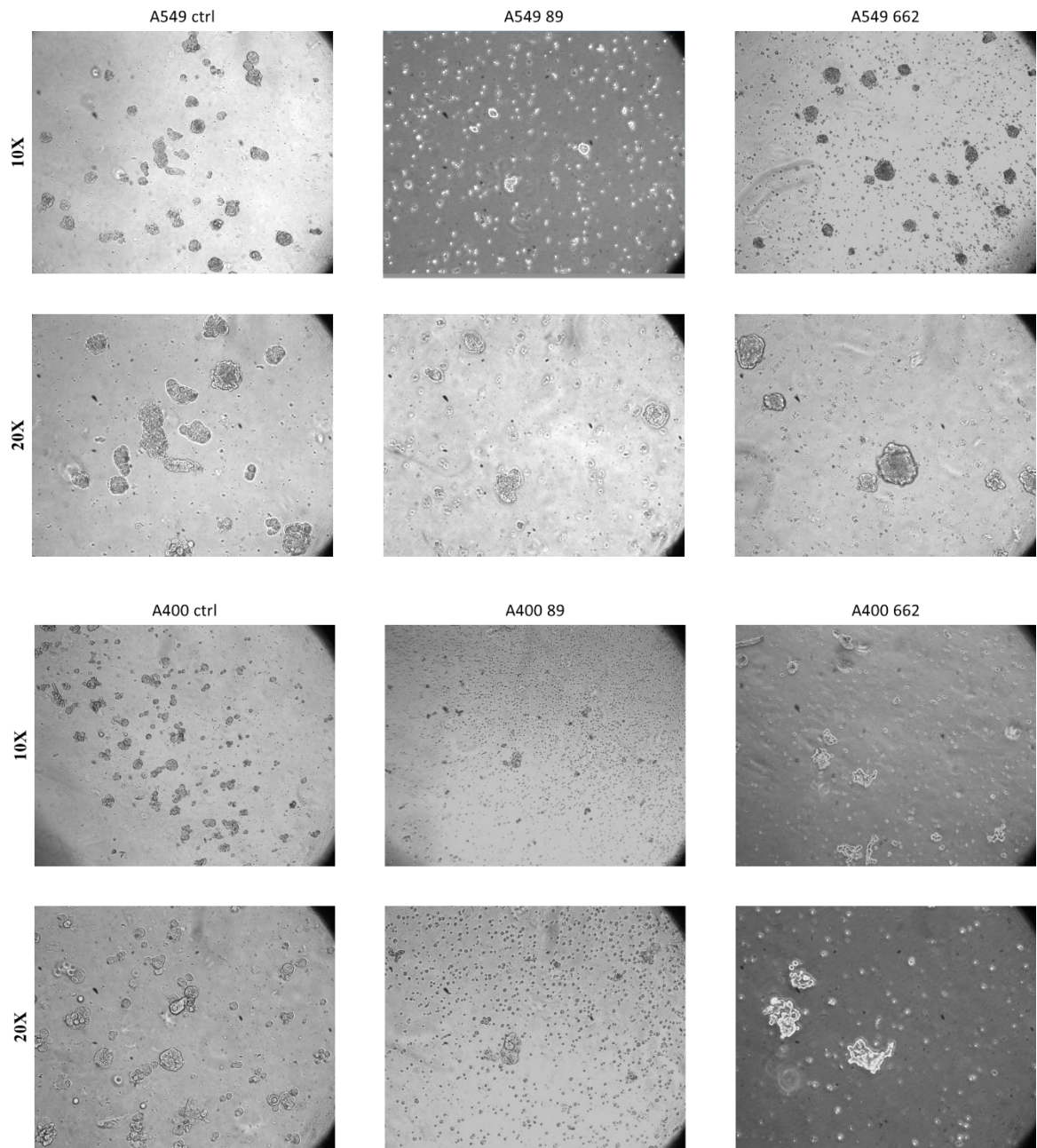
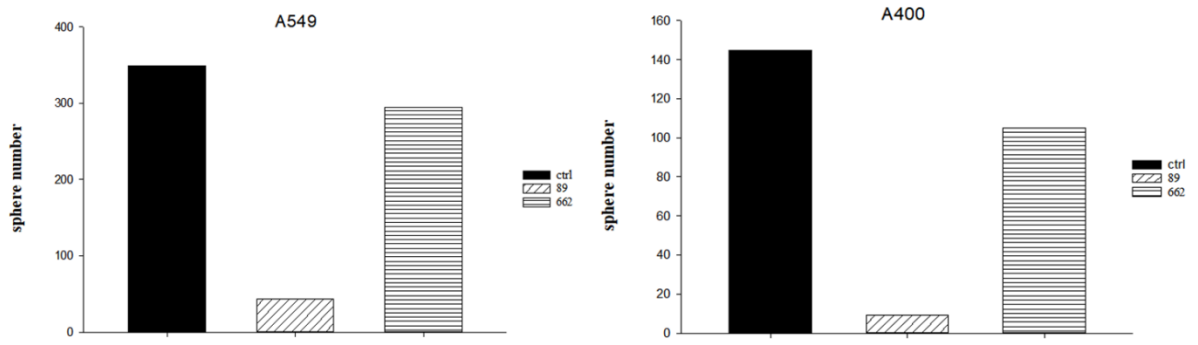


(C)

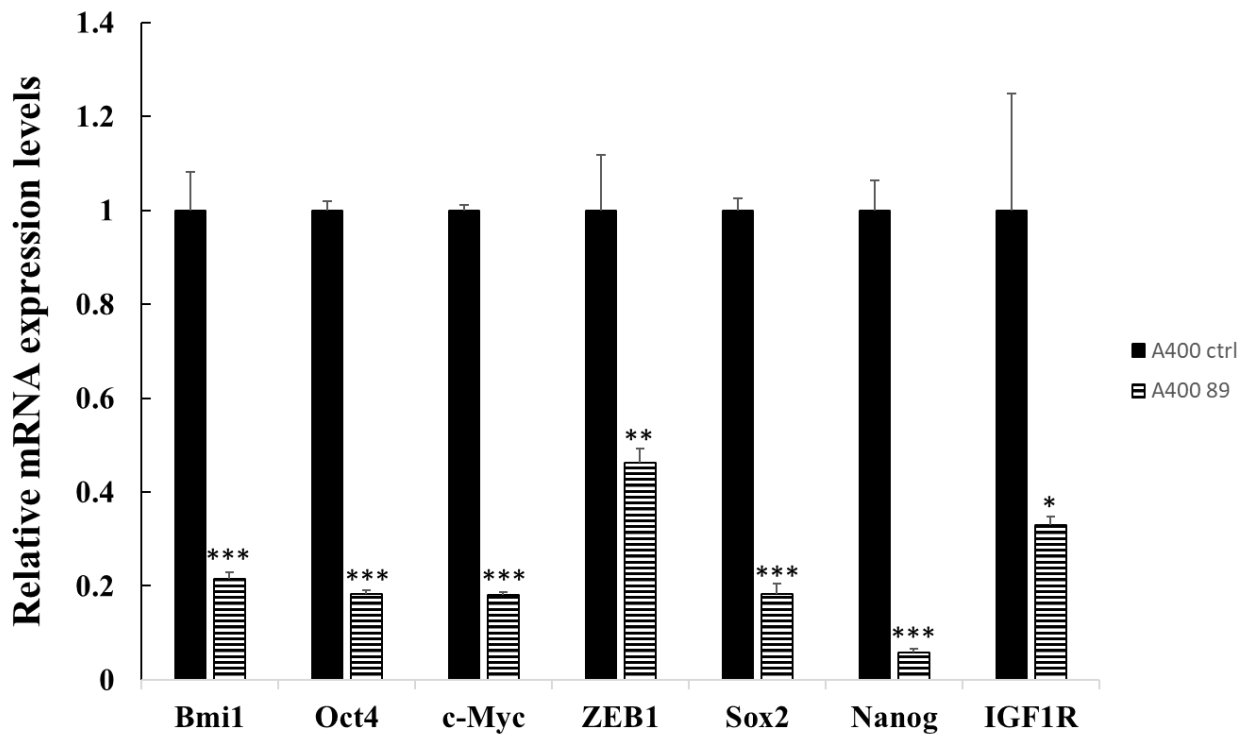


圖三、益生菌89之裂解液可抑制肺癌細胞中 IGF1R/ERK/ZEB1表現。A549肺癌細胞或其 Pemetrexed 抗藥性 A400細胞以益生菌89之裂解液(35 μ g/ml)處理，經72小時收取細胞總蛋白，以 Western blot 法分析 IGF1R/p-IGF1R(A), ERK/p-ERK(B), p-Akt/ZEB1(C)。

(A)



(B)



圖四、益生菌89之裂解液可抑制肺癌幹細胞之自我更新。(A)將益生菌89或662裂解液以35 μ g/ml 濃度加入癌症球體培養之培養基中，待14天後計數球體數目，並以倒立式顯微鏡拍照。(B)收取形成之 A400癌症球體並萃取其總 RNA，進行 qPCR 分析調控癌幹細胞自我更新相關基因的表現，包含 Bmi1, Oct4, c-Myc, ZEB1, Sox2, Nanog 與 IGF1R。*, $p < 0.05$ ； **, $p < 0.01$ ； ***, $p < 0.001$.

柒、 討論

兩株肺癌細胞經過662益生菌裂解液處理後，從 MTT 結果中看到有很明顯的抑制效果(圖二 B)，但透過 trypan blue exclusion 細胞計數的生長曲線(圖一 A)或群落分析(圖一 B)卻沒有明顯的差異，因此662益生菌的裂解液有可能會導致細胞粒線體功能的失常，導致 MTT 反應下降，但此作用或與細胞生長無關。文獻中指出肺癌細胞的抗藥株 A400在 p-ERK 的表現會比 A549高，導致 A400產生轉移與侵襲的能力也會比 A549來的強[14]，經過裂解液處理後的 A400細胞 p-ERK 的表現有明顯的下降(圖三 B)，因此我們推論益生菌裂解液可能會透過抑制 p-ERK 的表現，進一步抑制 EMT 的發生。癌症幹細胞具有自我更新、癌症發生和抗藥性產生等能力，A549與 A400兩株細胞形成之癌症球體的形態上有明顯的差異(圖四 A，A549細胞形成之癌症球體呈現較規則之腺體樣態，A400抗藥性細胞則呈現不規則形)，暗示兩株細胞在分化狀態上可能不同，並且 A400細胞可能屬於分化不良型，符合其較 A549細胞屬於較惡性之抗藥性本質。而兩株細胞經過裂解液處理後都有導致其癌症球體形成的能力被抑制，其中89益生菌裂解液有較明顯的效果，這或許與 A400細胞較 A549細胞其 IGF1R 或 ZEB1的表現較高(圖三 C)，導致 A400細胞內癌幹細胞對此兩個蛋白活性產生依賴性有關。經過西方點墨法結果中觀察到益生菌89裂解液可導致 ZEB1的表現量下降(圖三 C)，並且 A400細胞形成之癌症球體細胞經即時定量分析結果顯示，許多與癌幹細胞維持自我更新的基因在益生菌89裂解液處理下都呈現下降(圖四 B)，但眾多受影響的基因何者對益生菌89抑癌最重要，則有待未來進一步證明。綜合來說，本研究證實益生菌89裂解液具有抑制肺癌細胞生長與其癌幹細胞活性的活性，未來可進一步探討方向包含: (1) 益生菌89裂解液對於肺癌細胞轉移與侵襲能力的影響；(2) 使肺癌細胞過度表現 ZEB1是否能削弱益生菌89裂解液的抑制癌幹細胞自我更新活性；(3) 益生菌89裂解液是否能在肺癌異體腫瘤模式中展現其抗癌活性。

捌、 參考文獻

1. Hendrickson AW, Haluska P. **Resistance pathways relevant to insulin-like growth factor-1 receptor-targeted therapy.** *Curr Opin Investig Dugs.* 2009. 10(10):1032–1040.
2. Juan Zhou, Jinjing Wang, Yunyun Zeng, Xi Zhang, Qiaoting Hu, Jihua Zheng, Bei Chen, Bo Xie, and Wei-Min Zhang: **Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R-induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer** *Oncotarget.* 2015 Dec 29; 6(42): 44332–44345.
3. Cox OT, O’Shea S, Tresse E, Bustamante-Garrido M, Kiran-Deevi R, O’Connor R: **IGF1 receptor and adhesion signaling: an important axis in determining cancer cell phenotype and therapy resistance.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015. 6:106. 8
4. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. **DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells.** *Oncogene* 2005;24:2375–85
5. Gemmill RM, et al. **ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer.** *Cancer Lett.* 2011;300(1):66–78.
6. Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP, Dospoy PD, Augustyn A, Hight SK, Sato M, Girard L, Behrens C, Wistuba II, Gazdar AF, Hayward NK, Minna JD.: **ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer.** *J Clin Invest.* 2016;126(9):3219-3235
7. Pingfu Hou¹, Lin Li¹, Fang Chen¹, Yansu Chen³, Hui Liu⁴, Jingjing Li⁵, Jin Bai¹, and Junnian Zheng. **PTBP3-Mediated Regulation of ZEB1 mRNA Stability Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition in Breast Cancer.** *Cancer Res* 2018;78:387-398
8. Guadalupe Lorenzatti, Wei Huang, Anupama Pal, Ana M. Cabanillas, and Celina G. Kleer

- CCN6 (WISP3) decreases ZEB1-mediated EMT and invasion by attenuation of IGF-1 receptor signaling in breast cancer.** *J Cell Sci.* 2011 May 15; 124(10): 1752–1758.
9. Tisheeka R. Graham, Haiyen E. Zhau, Valerie A. Odero-Marah, Adeboye O. Osunkoya, K. Sean Kimbro, Mourad Tighiouart, Tongrui Liu, Jonathan W. Simons and Ruth M. O'Regan: **Insulin-like Growth Factor-I-Dependent Up-regulation of ZEB1 Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells.** *Cancer Res* 2008;68(7):2479–88
 10. Zhihong Cai, Yijing Cao, Yichen Luo, Haobin Hu, Hui Ling. **Signalling mechanism(s) of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance.** Volume 483, August 2018, Pages 156-163
 11. Yang Tian, Ming Li, Wei Song, Rui Jiang, and Yan Qing Li : **Effects of probiotics on chemotherapy in patients with lung cancer.** *Oncol Lett.* 2019 Mar; 17(3): 2836–2848.
 12. Escamilla J1, Lane MA, Maitin V: **Cell-free supernatants from probiotic Lactobacillus casei and Lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro.** *Nutr Cancer.* 2012. 64(6):871-8
 13. Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Yari Khosroushahi A: **A newly isolated probiotic Enterococcus faecalis strain from vagina microbiota enhances apoptosis of human cancer cells.** *J Appl Microbiol* 2014. 117(2):498-508.
 14. Asoudeh-Fard A, Barzegari A, Dehnad A, Bastani S, Golchin A, Omidi Y: **Lactobacillus plantarum induces apoptosis in oral cancer KB cells through upregulation of PTEN and downregulation of MAPK signaling pathways.** *Bioimpacts* 2017. 7(3):193-198.
 15. Chen ZY, Hsieh YM, Huang CC, Tsai CC: **Inhibitory Effects of Probiotic Lactobacillus on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29.** *Molecules* 2017. 22(1)

16. L-Y Chiu, I-L Hsin, T-Y Yang, W-W Sung, J-Y Chi, J T Chang, J-L Ko, and G-T Sheu: **The ERK–ZEB1 pathway mediates epithelial–mesenchymal transition in pemetrexed resistant lung cancer cells with suppression by vinca alkaloids.** *Oncogene*. 2017 Jan 12; 36(2): 242–253.
17. Heming Li, Izhar Singh Batth, Xiujuan Qu, Ling Xu, Na Song, Ruoyu Wang, corresponding and Yunpeng Liu: **IGF-1R signaling in epithelial to mesenchymal transition and targeting IGF-1R therapy: overview and new insights.** *Mol Cancer*. 2017; 16: 6.
18. Lian Tang¹, Jian Yang², Jieying Chen, Juejie Yu, Qingzhong Zhou, Xiaobo Lu¹, Yuanzheng Wang: **IGF-1R promotes the expression of cyclin D1 protein and accelerates the G1/S transition by activating Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway** *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(12):11652-11658