

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 探討去甲基班蝥素抑制上皮生長因子誘導視網膜色素上 皮細胞異常增生與爬行之機制
------------	---

執行計畫學生：林詩涵

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-043-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：謝逸憲

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

中華民國 109年03月26日

中文摘要

增生性玻璃體視網膜病變，英文簡稱 PVR，是視網膜剝離併發症之一。PVR 發生歸類於以下原因包括視網膜病變與眼科手術不當。其中，造成 PVR 最主要原因為視網膜色素上皮細胞之上皮-間質轉換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)，喪失上皮細胞特性且擁有間質細胞特性如不正常增生與爬行，進而導致 PVR 產生。目前對於 PVR 主要治療方式為手術治療，但手術失敗機率很高，藥物治療為目前學者急於突破的治療方式，但臨床結果均無意義。去甲基斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)為斑蝥素之衍生化合物，取自中藥斑蝥，以人工合成方式降低斑蝥素毒性但可增強其作用。目前在許多癌症中發現 NCTD 具有促癌細胞凋亡，抑癌細胞轉移以及減緩 EMT 作用。因此，本篇實驗將以上皮生長因子(Epidermal growth factor, EGF)誘導 ARPE-19 細胞，促使細胞不正常增生與爬行，藉此方法模擬 PVR 疾病，再使用 NCTD 處理細胞，探討 NCTD 抑制 EGF 誘導 ARPE-19 不正常增生與爬行之機制。

首先，MTT assay 顯示 NCTD 單獨處理細胞，隨著 NCTD 濃度提高而影響細胞生長，細胞爬行，接著以 NCTD 與 EGF 合併處理 ARPE-19，結果顯示 NCTD 可抑制由 EGF 誘導之 ARPE-19 細胞增生。為了得知 NCTD 與 EGF 是否透過改變細胞週期而影響細胞生長，故使用 Propidium iodine 染色，結果顯示，單獨處理 EGF 會誘導 ARPE-19 細胞 G2/M arrest，而結合 NCTD 處理後又能使細胞反向提高 G0/G1 arrest 比率，以西方墨點法偵測細胞週期相關蛋白也有相似結果。此外，細胞遷移試驗結果顯示，NCTD 處理可有效抑制由 EGF 誘導之細胞爬行能力。同時也發現 EGF 使 ARPE-19 細胞擁有間質細胞特性，此為 EMT。西方墨點法結果顯示 NCTD 藥物處理可抑制由 EGF 引起 Snail 蛋白大量表現，進而提高 E-cadherin 表現量。另外，分析 PI3K/AKT 相關訊息傳遞路徑，發現 NCTD 可抑制由 EGF 引起之 AKT 蛋白磷酸化。接著，利用 AKT 磷酸化抑制劑 LY294002 合併 NCTD 處理 ARPE-19 細胞，發現阻斷 AKT 訊息傳遞路徑亦能影響 Snail、E-cadherin 表現量，代表 Snail、E-cadherin 蛋白表現經由 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑調控。往後，我們會深入探討其分子機制，同時也將分析 MicroRNA 變化量以求找出 PVR 新 biomarker，增進 PVR 預防與治癒率。

Abstract

Background:

Proliferative vitreoretinopathy (PVR) is such a severe sight-threatening disease because of the abnormal migration of retinal pigment epithelium (RPE) cells. Norcantharidin(NCTD), a purified drug from blister beetles, has been showed the strong anti-migration efficacy in several cancer cell lines such as breast cancer, colon cancer, lung cancer and so on. In this paper, we aim to investigate whether norcantharidin suppress the EGF-induced migration in human RPE cell.

Methods:

The cell viability of ARPE-19 treated with NCTD alone or combination with EGF in 24 and 48 hrs was investigated by MTT assay and colony formation assay. The migration assay was investigated by using Boyden chamber. The cell cycle distribution was detected with PI stain by Flow Cytometry analysis. The expression of mRNA and protein after treatment of NCTD and EGF was investigated by qRT-PCR and western blot. The immunofluorescence assay was visualized by using the Zeiss LSM 510 metaconfocal microscope.

Results:

In order to test the effect of NCTD in the cell model, we did some experiments such as MTT assay, western blot assay and boyden migration to check the appropriate dose in our experiment. In the beginning, we imitated the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy through using EGF as an inducer to promote the ability of migration in ARPE-19 cell line. After treated with NCTD, the result showed that NCTD did not induce the cell toxicity but suppressed the EGF-induced cell proliferation. Boyden chamber assay displayed that NCTD also inhibit the EGF-enhanced migratory abilities. The cell cycle distribution and levels of protein associated cell cycle showed that NCTD reduce the EGF-induced G2/M arrest. Immunoblot results showed NCTD suppressed the EGF-induced the expression of Snail, which is the biomark of EMT. In addition, EGF-induced phosphorylation of AKT, co-treatment with AKT inhibitor, LY294002, further enhanced the inhibitory efficacy of NCTD on migratory abilities, expression of Snail and phospho-AKT after EGF induction.

Conclusions:

These results demonstrated that NCTD can effectively suppress the EGF-induced migration via the inhibition of AKT-regulated Snail. In conclusion, NCTD may have the potentiality for the therapy of proliferative vitreoretinopathy.

(一) 研究動機與研究問題

增生性玻璃體視網膜病變(PVR)發生與許多眼科疾病有關,視網膜相關手術後遺症也有可能導致PVR。同時,遺傳研究上也發現特定基因異常表現或眼科相關遺傳疾病也可能導致PVR。由先前臨床結果與文獻可知PVR難以預防,手術治療上也有一定難度。藥物治療研究顯示多種藥物在動物實驗上頗具療效,可當應用於臨床研究則無太大顯著效果。因此找出低毒性,低副作用之天然藥物且有效抵抗PVR為目前藥物治療研究中迫切需要突破之關鍵。去甲基斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)來自於中草藥斑蝥中的斑蝥素。為斑蝥素衍生化合物,實驗結果顯示去甲基斑蝥素比斑蝥素毒性更低,抗癌效果更好。目前已有許多研究顯示NCTD可透過調控癌細胞EMT進程因而抑制癌細胞增生與轉移,而PVR病變中最為重要的步驟為正常視網膜色素上皮細胞開始不正常增生與爬行,且具有間質細胞特性。因此,本實驗將以NCTD處理上皮生長因子(EGF)所誘導之不正常增生與爬行的ARPE-19細胞株,探討其中生物功能變化,訊息傳遞路徑調控與相關基因表現,更進一步深入探討其分子機制。

(二) 文獻回顧與探討

一、增生性玻璃體視網膜病變(proliferative vitreoretinopathy, PVR)

1. 簡介

增生性玻璃體視網膜病變,簡稱PVR,為視網膜剝離(Retinal Detachment, RD)手術併發症之一,也是視網膜手術失敗的原因之一。約有5%-10%RD患者易有PVR,PVR常發生於視網膜手術之後[1]。當患者罹患PVR時會觀察到視網膜與後側玻璃狀膜剝離,PVR發病機制分為下列步驟:(1)視網膜色素上皮細胞與神經膠質細胞(glial cell)不正常爬行(2)不正常爬行的細胞開始不正常增殖(3)細胞外側發展出一層不正常收縮膜(4)生成細胞外膠質並形成固定皺褶。其中,這些步驟中為細胞不正常增殖最為重要,影響PVR甚鉅[2]。多年來,諸多學者為了解決細胞不正常增生耗費許多精力研究,但仍不得其解。

2. 視網膜色素上皮細胞(Retinal pigment epithelium cell, RPE cell)

1990年代許多學者透過研究PVR,移除視網膜進而發現RPE cell在PVR疾病中扮演重要角色[3]。同時也在許多物種上發現當動物得到PVR時,24小時內RPE cell與glial cell的細胞型態會發生改變。細胞失去分化能力、極性,進一步擁有爬行能力。而當視網膜剝離時,容易在玻璃體腔(vitreous cavity)產生空洞,也更有助於RPE cell與glial cell產生爬行能力。後續研究發現視網膜剝離後,血液視網膜屏障(blood-retinal barriers)受損情況下,RPE cell會失去上皮細胞型態,擁有爬行能力,這過程稱之上皮-間質轉換(EMT)。RPE cell可擁有間質細胞的一些特性,像是爬行能力更強、具有侵襲能力、抵抗細胞凋亡及產生細胞外基質[4]。上皮-間質轉換過程中,細胞與細胞間連結相當重要,而細胞間連結中鈣粘蛋白(cadherin)扮演重要角色,有研究顯示正常RPE cell有少量N-cadherin表現或無表現,而當發生視網膜剝離後,RPE cell會分化成類纖維母細胞,其中N-cadherin表現大量增加,此現象又能在視網膜復位後回復[5]。故現今研究中多用人類視網膜色素上皮細胞株進行分生研究以求了解PVR疾病機轉,先以多種誘導因子如EGF、TNF- α 與TGF- β 誘導正常細胞不正常增生與爬行,接著使用各式藥物如天然中草藥萃取物處理細胞,使其回復上皮細胞特性。透過這些基礎研究尋求突破治療PVR瓶頸[6, 7]。

3. 危險因子

在裂孔性視網膜剝離患者中約有5~10%易罹患PVR,數據顯示近三個世紀以來PVR罹患率無顯著變動,非常穩定。PVR危險因子與眼睛疾病以及眼外科手術有關,如下敘述:

1. 術前危險因子:以下提到術前危險因子皆與視網膜有所關聯,如創傷型眼外傷、視網膜撕裂、大範圍或長期的視網膜剝離、脈絡膜剝離、玻璃體出血、葡萄膜炎與晶狀體缺乏。此外,與視網膜相關的一些疾病也容易提高 PVR 罹病率,像馬凡氏症候群、皮爾羅賓式症與家族滲出性玻璃體視網膜病變皆會提高 PVR 罹病率。
2. 術中危險因子:在某些手術中也會提高罹患 PVR 罹病率,像是非完全的玻璃體切除術、廣範圍的冷凍治療術、術中脈絡膜分離、術中玻璃體或視網膜下出血。更加精密的外科手術手法與預先防治皆能有效降低術中危險因子的影響,但有時 PVR 的發生也會與術後傷口癒合具有關聯性。
3. 術後危險因子:常見的術後危險因子有眼內發炎、玻璃體內出血、脈絡膜分離等等。
4. 遺傳因子與生物標誌物:找出上述影響 PVR 的高危險因子有助於防治 PVR,但想精準預測 PVR 何時發生仍有困難。近年來許多學者發現某些基因高度表現與 PVR 具有關聯性。研究顯示, TNF、SMAD7 與 p53 這些基因高度表現會提高 PVR 罹病率[8]。此外,學者們也想透過收集視網膜下流體尋找更多生物標誌物用以治療與預防 PVR,但這研究仍待更多臨床結果分析[9]。

4. 診斷與治療

1. 診斷方式:現今診斷中都是用生理顯微鏡(slit-lamp biomicroscopy)與非直接性眼睛檢查術。此外,也能用超音波生物顯微鏡更加仔細觀測臨床上無法觀測到的細節。螢光眼底血管攝影與光學同調斷層掃描並非常規診斷 PVR 的方法,但在臨床上發現這兩種方式在術後診斷方面能更有效率的發現黃斑改變以及 RPE cell 纖維化[10]。
2. 治療方式:PVR 治療方式可區分為下列幾個方式:
 - I. 外科手術治療:手術為最常見治療 PVR 方法,主要為切除或刮除後玻璃體底部患部處與纖維化組織。
 - II. 填塞治療:手術後將內填塞物質(矽油)注入患部,幫助細胞貼附完整。
 - III. 藥理治療:目前最常用的治療方式為手術治療,有許多學者想找尋出非侵入式,透過藥理治療方式達到治癒效果,目前研究中在動物實驗上有所成果,然而,在人體試驗上一直無所成就,這也是多數學者目前想突破的治療方法[11]。

二、上皮-間質轉換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)

1. 介紹

上皮-間質轉換(Epithelial-Mesenchymal Transition),簡稱 EMT,於 1980 年代自胚胎發育發現此現象。EMT 意指上皮細胞失去上皮細胞特性且上皮細胞相關蛋白表現量降低,接著逐漸由上皮細胞緊密型態轉換成細長型分散型態的過程,也就是間質細胞的細胞型態且間質細胞相關蛋白表現量上升,同時細胞具有爬行以及侵襲能力。在 EMT 的過程中,細胞可能擁有纖維母細胞特性,並釋放細胞外基質。一般情形下 EMT 為一正常生理現象,包括胚胎發育、神經管束形成與傷口癒合。近年來發現癌細胞也會利用 EMT 賦予自身有更強轉移能力,且越惡化之癌細胞 EMT 越明顯,多種癌症裡都有此相似現象。

2. 調控機制

調控 EMT 的確切分子機制目前仍未通透明瞭,現今已知許多因子皆能調控 EMT,如:生長因子、細胞激素、賀爾蒙等。其中 HGF、EGF、PDGF 與 TGF- β 皆能誘導細胞 EMT。這些因子能調控 Snail、Slug、ZEB1、Twist 等這些 EMT 相關轉錄因子表現[12, 13]。而 EMT 轉錄因子又能透過多種分子機制調控不同 EMT 蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 等)進程,

如 MAPK、PI3K/Akt、Smads、RhoB 與β-catenin 等不同訊息傳遞路徑。舉例而言，研究顯示 EGF 在乳癌中可透過 Smad/Snail 訊息傳遞路徑促使乳癌細胞 EMT[13]。另一研究顯示，EGF 可透過 MAPK/ERK 訊息調控路徑促使頭頸癌細胞 EMT[14]。有趣的是，EGF 亦能增強 TGF-β 所誘導的 EMT，代表 EMT 可被眾多因子調控且能相輔相成[15]。而為了深入探討 EMT，亦有學者使用 EGF 或 TGF-β 處理正常細胞或癌細胞進而促使 EMT 發生因而研究其分子機制 [16]。

三、Norcantharidin(NCTD)

1. 介紹

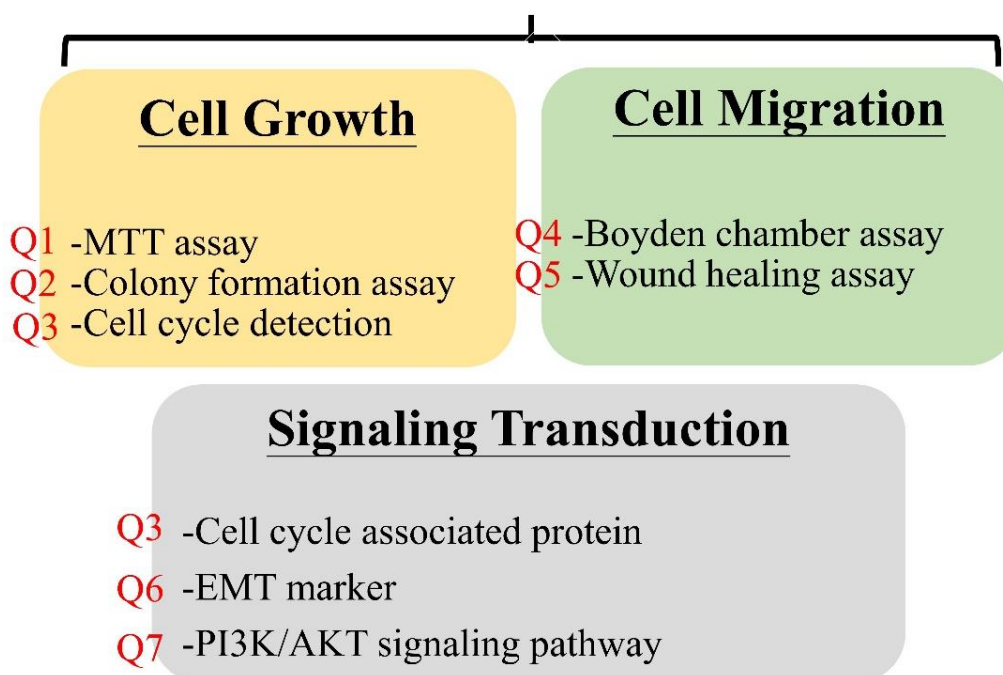
去甲基斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)為斑蝥的衍生化合物，取自於中藥材斑蝥蟲體。中藥斑蝥取自斑蝥蟲，主產於遼寧、河南一地。斑蝥蟲特徵為身上有三條黃色橫紋，胸腹部呈黑色，有特殊臭氣。用時需去頭、足、翅，炒至黃黑色並研磨使用。性味辛、寒，功效為破血逐瘀，攻毒飾瘡等療效。用時須注意斑蝥有毒，不可多用，孕婦與體弱者需禁忌。主要用於治療癰疽或瘰癧，外用適量，內服需散用。目前研究已知斑蝥素對於肝癌有效，可改善臨床症狀，並延長存活率，但斑蝥素毒性較高，對泌尿系統有嚴重副作用，故現已研發多種斑蝥素衍生物。去甲基斑蝥素為其中一個衍生物，可人工合成，且毒性較低及功效更好，

2. 調控機制

研究顯示，NCTD 可透過如促癌細胞凋亡，抑癌細胞轉移等影響多樣致癌機轉達到抑制癌症功效。如 NCTD 可透過活化細胞凋亡外在與內在路徑達到促前列腺癌凋亡現象[17]。結腸癌中，NCTD 可透過調控αvβ6-ERK-Ets1 路徑抑制EMT達到抑制癌細胞轉移效果[18]。更者，NCTD 能抑制 IL-6 引起的EMT進而達到抑制肝癌轉移效用[19]。此外，NCTD 亦能反轉藥物抗藥性並透過 YAP 蛋白調控非小細胞肺癌的EMT進程[20]。綜合以上，NCTD 具有多種抗癌功效，低毒性等優點。因此，本篇實驗將使用天然中草藥衍生物 NCTD 探討其抑制 EGF 誘導之細胞不正常增生與爬行機制。

(三) 實驗架構圖

To explore the preliminary effect of NCTD in EGF-induced ARPE-19 cells



(四) 研究方法與步驟

細胞解凍

從液態氮桶中取出含有細胞液的冷凍小管，放入37度水浴槽快速解凍後透過低速離心方式移除含有DMSO的上清液。使用新鮮培養液回溶細胞並加入新培養皿中，移至37°C、5% CO₂的培養箱進行培養，2~3天需更換一次細胞培養液，待細胞成長至8~9分滿時進行細胞繼代培養，解凍後過約兩個禮拜觀測細胞生理功能及型態是否正常，正常即可開始進行細胞實驗。

細胞培養

本實驗利用人類視網膜色素上皮細胞 human retinal pigmented epithelium cell, ARPE-19 細胞株進行實驗，在 DMEM/F12 培養液中加入 10% fetal bovine serum(HyClone)、100 units/mL penicillin 與 100 µg/mL streptomycin 混和均勻後用於細胞培養，細胞置於培養條件為 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養，每日透過顯微鏡觀察細胞，依據細胞生長狀況定期更換培養液與繼代培養。待細胞長至 8~9 分滿時，將舊培養基移除，使用磷酸緩衝液(Phosphate Balanced Solution, PBS)清洗培養皿，加入 1 mL 的 Trypsin-EDTA 至培養皿中並放回培養箱中作用約 5 分鐘，加入新鮮培養液中中止 Trypsin-EDTA 反應。利用離心方式使細胞沉澱，隨後移除上清液並以新鮮培養液均勻回溶細胞，依各實驗需求將細胞種至不同培養皿中以利實驗進行。

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

將 ARPE-19 細胞株培養於 24 well (CELLSTAR®) 中，每個 well 培養 3×10^4 個細胞。24 小時後待細胞貼盤，以不同濃度之 NCTD 加入不含血清之培養液預先處理細胞 2 小時，再加入 EGF 共同作用。待 24 和 48 小時後，移除舊培養液，更換含有 10% MTT 之培養液，將 24 well 放置培養箱中作用 3-4 小時。移除上清液，再加入 0.8 mL 異丙醇(isopropanol)，藉此溶解細胞中紫色結晶，利用 ELISA reader 以波長 570 nm 讀取吸光值，於此推算相對應細胞存活率。

細胞群落實驗(Colony formation assay)

將 ARPE-19 細胞株培養於 6 well (CELLSTAR®) 中，每個 well 培養 2×10^3 個細胞，待 24 小時後以不同濃度之 NCTD 與 EGF 共同處理細胞，待群落生成後(一週)以甲醇固定細胞 30 分鐘，以 5% Giemsa 染劑染色 8 小時，觀察並計數之。

細胞週期分析(Flow cytometry analysis)

將 5×10^5 個細胞培養於 6 cm dish(Gene DireX) 中，使用不同濃度 NCTD 於無血清培養液預先處理細胞二小時，再加入 EGF(20 ng/mL) 共同作用。作用 24 小時後，使用 Trypsin-EDTA 小心收取細胞，使用冰的 70% 酒精固定細胞，確實打散細胞，-20°C 冰箱固定 24 小時。離心細胞後使用 PBS 清洗細胞，接著加入配置好的 PI 溶液(0.02 mg/ml Propidium Iodide、0.02 mg/ml RNase 以及 0.1% Triton-100 的 PBS 溶液)打散細胞，避光染色 30 分鐘。最後將細胞打散且以孔徑 35 µm 篩網過濾後並以流式細胞儀上機分析。

細胞遷移試驗

將細胞計數後取 5×10^5 個細胞培養於 6 cm dish(Gene DireX) 中，等細胞貼盤後使用不同濃度 NCTD 在無血清培養液預先處理細胞二小時，再加入 EGF(20 ng/mL) 與 NCTD 共同作用。作用 24 小時後以 Trypsin-EDTA 收取細胞並計數，配置好 1 mL 含有 EGF 與 NCTD 無血清之 6×10^5 細胞液。接著，利用 48 孔 Boyden chamber 分析細胞遷移能力。將 chamber 下層注入 35 µL 含有血清之培養液，中間夾孔徑 8 µm 的半透膜，上層每個孔中注入 50 µL 已配好的細胞液，使每孔均有 3×10^4 個細胞。待 24 小時後取出半透膜，使用甲醇固定細胞 30 分鐘，再

以 5% Giemsa 染劑染色 8 小時，最後擦去上層未遷移至下層的細胞，利用光學顯微鏡拍照並計數細胞遷移數目，藉此分析細胞遷移能力。

蛋白萃取、定量與樣品配置

於 6 cm dish(Gene DireX)中培養 5×10^5 個細胞。藥物處理後去除上清液，利用 Trypsin-EDTA 使細胞脫盤，使用已加入蛋白酶抑制劑之 Lysis Buffer 回溶細胞並加入 1.5 mL 微量離心管，使用超音波震碎細胞，13000 rpm，4 °C 離心 30 分鐘後取上清液，此為蛋白萃取液。蛋白定量使用 Bradford 法，利用 Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 特性定量。分別將標準品與蛋白萃取液適當稀釋後加入 Protein Assay Dye 混和均勻後，利用分光光度計 OD 595 nm 波長測吸光值，利用標準品數值畫出標準曲線，再將樣品組吸光值代入曲線，可得樣品濃度。從每管樣品中取出 40 µg 蛋白，剩餘補 ddH₂O 至固定體積並加入 loading dye，混合均勻後置於 100 °C 加熱版 10 分鐘。加熱後將蛋白檢體置於冰上 10 分鐘即可。

西方墨點法

依據實驗需求配製成 6-12% 不等之膠體。下層膠時所需物質有 30% acrylamide、1.5 M tris pH8.8、10% SDS、10% APS 以及 TEMED，上層膠所需物質有 30% acrylamide、1M tris pH6.8、10% SDS、10% APS 以及 TEMED。膠體以電壓 80V 電泳 2 小時。將膠體自玻璃取出，放置於預先準備好的濾紙上，膠體上再放置 PVDF membrane，PVDF membrane 上再放濾紙，最後最外層須以海棉片包覆，利用轉漬夾板夾緊後，放入轉漬槽中並維持低溫環境，連接電源供應器使用固定電壓 100V 轉漬 2 小時。轉漬後取出 PVDF membrane，放入 5% blocking buffer 於室溫下作用 1 小時。以 TBS-tween20 溶液清洗三次 10 分鐘。加入稀釋 1000 倍之一級抗體於 4 °C 下作用 overnight。隔天以 TBS-tween20 溶液清洗三次 10 分鐘，接著加入相對應之稀釋 10000 倍二級抗體室溫下作用 1 小時，以 TBS-tween20 溶液清洗三次每次 10 分鐘。最後加入 ECL 呈色劑以冷光儀偵測並拍照定量。

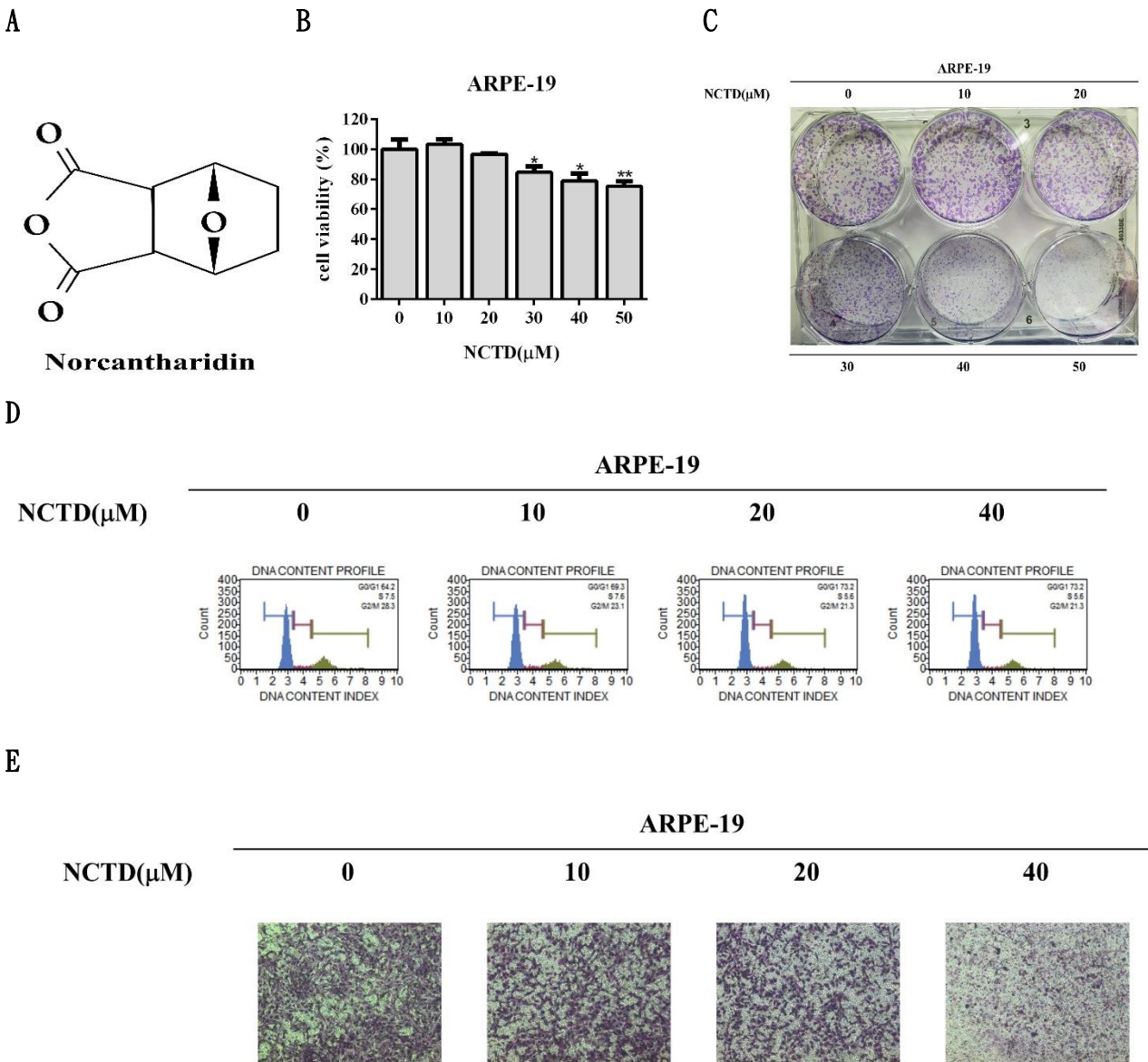
統計分析

所有實驗數據皆三重複後以 mean ± SEM 呈現之，統計數據使用 GraphPad Prism 6 軟體以 t test、One-way ANOVA 分析，當 P 值小於 0.05 與 0.01 時予以星號標記。

(五) 實驗結果

探討 NCTD 對於 ARPE-19 細胞正常生理功能之影響

首先，以不同濃度之 NCTD(圖一 A)(0-50 μ M)處理人類視網膜色素上皮細胞 ARPE-19，MTT assay 結果顯示，低劑量 NCTD 濃度不影響細胞生長，高劑量 NCTD 稍微抑制細胞生長，但從顯微鏡觀察得知高劑量 NCTD 不會造成細胞死亡(圖一 B)。細胞群落實驗顯示 NCTD 可抑制細胞群落形成與細胞長期增生圖一 C)。細胞週期實驗結果發現，NCTD 可使 ARPE-19 細胞停滯於 G0/G1 phase(圖一 D)，細胞遷徙實驗中顯示，NCTD 可抑制 ARPE-19 細胞爬行能力(圖一 E)。

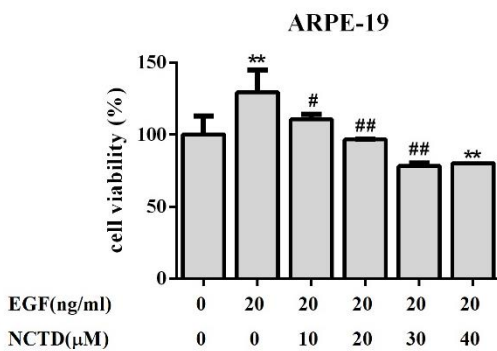


(圖一)

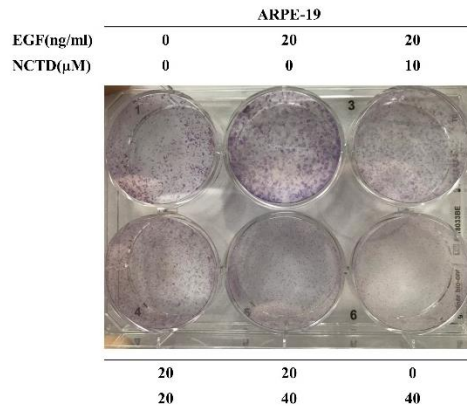
探討 NCTD 可否抑制由 EGF 誘導 ARPE-19 正常細胞不正常增生、爬行與其細胞週期改變

我們使用上皮生長因子 EGF (20 ng/ml) 誘導正常細胞快速生長，藉此模擬 PVR，從 MTT assay 結果得知，NCTD 劑量提升能抑制由 EGF 誘導的細胞增生(圖二 A)。在細胞群落實驗中也可發現，EGF 可增加細胞群落數與其生長速度，結合 NCTD 處理細胞又可抑制群落數與其生長速度(圖二 B)。接著，我們進一步分析 EGF 與 NCTD 共同處理人類視網膜色素上皮細胞 ARPE-19 時是否影響細胞週期。從流式細胞儀分析結果發現 EGF 單獨處理可誘導 ARPE-19 細胞 G2/M arrest，因而造成細胞快速生長。隨著 NCTD 濃度提高，又能促使細胞反而走向 G0/G1 arrest(圖二 C)，統計圖有相同實驗結果(圖二 D)。從 Western blot 結果能也反證此實驗結果，當 EGF 處理細胞時 Cyclin D1 蛋白表現量上升，P21、P27 蛋白表現量下降，隨著 NCTD 濃度提高，Cyclin D1 蛋白表現量下降，P21、P27 蛋白表現量回升(圖二 E)。

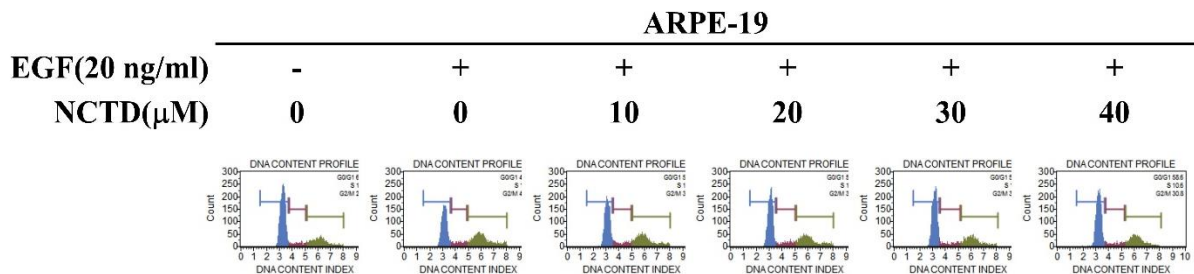
A



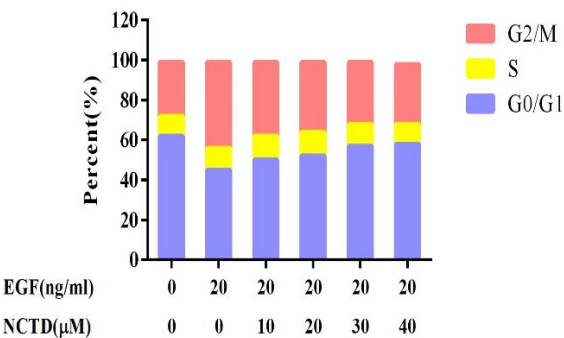
B



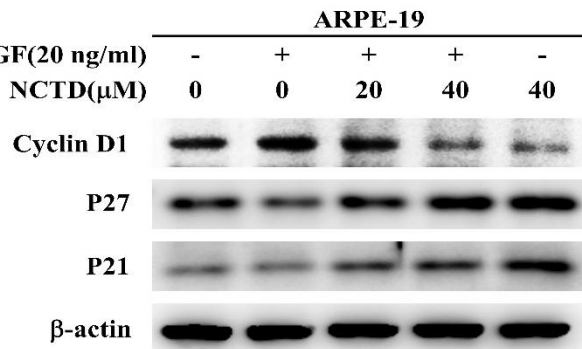
C



D



E

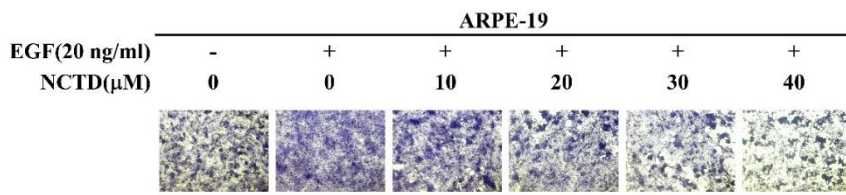


(圖二)

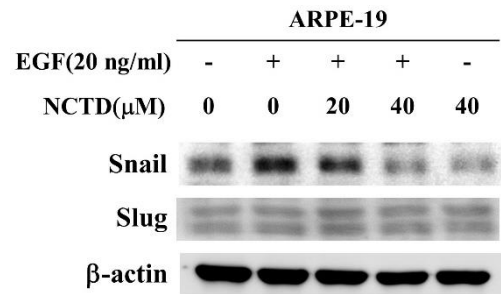
探討 EGF 結合 NCTD 對於 ARPE-19 爬行能力與 EMT 相關蛋白之影響

為了探討 EGF 與 NCTD 影響 ARPE-19 之爬行能力，使用 Boyden Chamber 分析，利用 EGF 與 NCTD 共同處理人類視網膜色素上皮細胞，細胞移動分析(圖三 A)結果顯示 EGF 可增加細胞移動能力，結合 NCTD 處理細胞又可抑制細胞爬行能力，而隨著 NCTD 濃度提高，抑制細胞移動能力現象愈明顯。細胞爬行能力可受許多機制調控，其中上皮-間質轉換(EMT)對於細胞爬行能力影響顯著，在本實驗加藥處理過程中發現細胞處理 EGF 後有明顯變長，與間質細胞特徵相似，而結合 NCTD 處理後細胞偽足又有回縮現象，與 EMT 相似，故本實驗將探討 EMT 是否調控 ARPE-19 爬行能力。西方墨點法結果顯示，Snail 蛋白表現量上升，Slug 沒有顯著變化(圖三 B)。

A



B

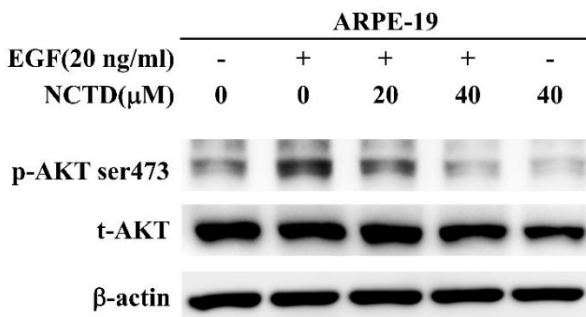


(圖三)

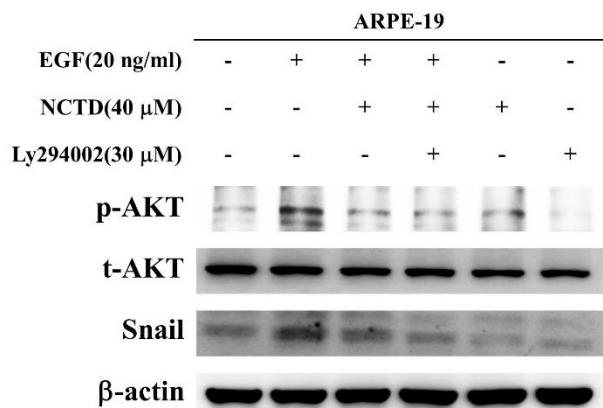
研究調控 Snail/E-cadherin 之訊息傳遞路徑

先前研究顯示，EGF 可活化 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑調控細胞生理功能，再者也有研究顯示 Snail/E-cadherin 可由 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑調控，因此，我們將探討在本篇實驗中 NCTD 與 EGF 是否可透過 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑活化 Snail/E-cadherin 蛋白表現，進而調控 ARPE-19 細胞爬行能力。首先，西方墨點法結果顯示，EGF 可活化磷酸化 AKT 蛋白，而 NCTD 又能抑制磷酸化 AKT 蛋白(圖四 A)，此外，為了進一步反證實驗結果，使用了 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑抑制劑 LY293002 結合 NCTD 處理由 EGF 誘導之 ARPE-19 細胞，西方墨點法結果顯示，LY293002 結合 NCTD 可更有效抑制磷酸化 AKT 蛋白，進而抑制 Snail 蛋白表現(圖四 B)。而在 Snail 蛋白表現被抑制的情況下，細胞爬行能力也被有效抑制(圖四 C)，代表 NCTD 確實可透過 Snail/E-cadherin 調控 ARPE-19 細胞爬行。

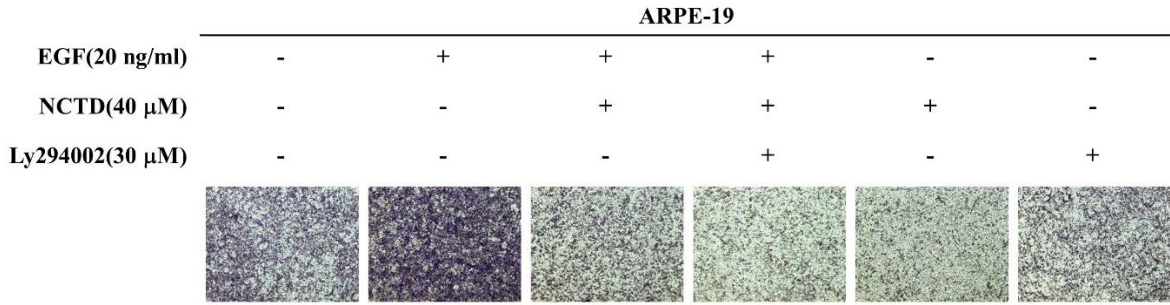
A



B



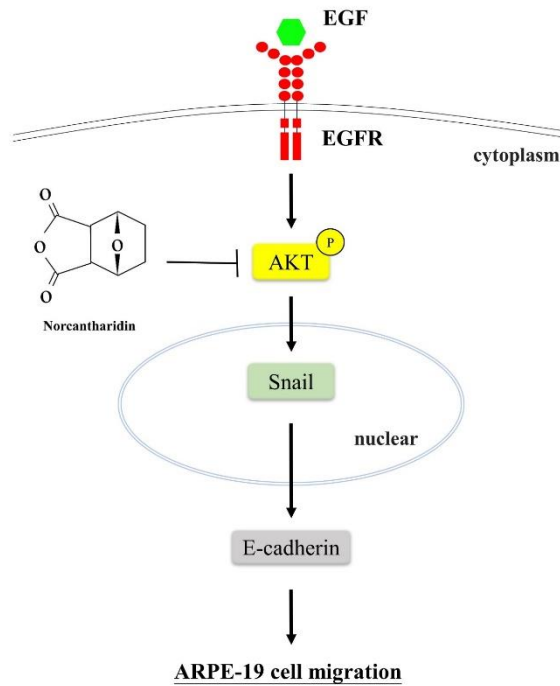
C



(圖四)

總結

綜合以上結果，得知 EGF 處理 ARPE-19 細胞時，可透過活化 PI3K/AKT 訊息傳遞路徑，促使 Snail 蛋白表現上升，造成 E-cadherin 蛋白表現下降，形成 EMT，增進 ARPE-19 細胞爬行能力。而共同處理 NCTD 藥物後，可藉由阻斷 AKT 磷酸化，進而抑制 Snail 表現，使 E-cadherin 表現回升，反轉 EMT 現象，抑制經由 EGF 誘導之細胞爬行。(圖六)



(圖六)

(六) 討論

本篇為第一篇將 NCTD 藥物作用於 ARPE-19 細胞之研究，ARPE-19 細胞在目前研究中主要用來探討黃斑部病變(Macular degeneration)。黃斑部病變之病因眾多，主要原因為視網膜不正常剝離(Retinal Detachment, RD)，其中，增生性玻璃體視網膜病變(PVR)為視網膜剝離手術併發症，也是視網膜手術失敗原因之一。約 5%-10% RD 患者易得 PVR，當患者罹患 PVR 時會觀察到視網膜與後側玻璃狀膜剝離，PVR 亦與黃斑部病變息息相關。視網膜剝離的原因很多，包括視網膜色素上皮細胞不正常增生與爬行，就目前研究而言，其致病機制仍未釐清，手術治療後再復發率亦高，因此，許多研究透過使用多種生長因子如 TGF-β或 EGF 刺激人類

正常視網膜色素上皮細胞，藉此模擬 PVR 疾病之關鍵細胞生理機制，再使用從植物萃取出之天然藥物進行實驗，天然藥物具有許多優點如毒性低，副作用少，也因為其對正常細胞毒性低，已在許多癌症研究中大放異彩。此外，也有研究指出天然藥物也可抗發炎作用，或輔以高毒性的藥物共同處理下，具有保護細胞功能，藉由副作用減低情況下給予病人更好的治療。其中，本篇實驗中使用之去甲基斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)為斑蝥素之衍生化合物，取自中藥斑蝥，以人工合成方式降低斑蝥素毒性但增強其作用，已在多篇期刊中證實 NCTD 抑制多種致癌機制，包括抑制癌細胞爬行、增生，或促使細胞凋亡、自噬，在抗發炎方面亦有研究。多篇關於 NCTD 調控頭頸疾病之研究亦顯示 NCTD 可通過血腦屏障。綜合以上，本篇研究使用了 NCTD 治療由 EGF 誘導之惡性 ARPE-19 細胞，成果包含：

1. NCTD 有效抑制由 EGF 誘導之細胞短期與長期增生。
2. 抑制短期與長期增生是透過調控細胞週期。
3. NCTD 有效抑制由 EGF 誘導之細胞爬行能力。
4. EGF 誘導之細胞具有 EMT 作用，而 NCTD 可反轉 EMT 之效果。
5. 發現在 EGF 誘導之細胞中 Snail 大量表現，而 Snail 為 ARPE-19 細胞爬行關鍵蛋白。
6. EGF 誘導之細胞中 AKT 訊息傳遞路徑活化，而 NCTD 可抑制之。
7. 利用 AKT 抑制劑證實第六點。

在未來，我們將透過更多實驗深入探討分子機制，並結合動物實驗，如下敘述：

- I. 在 EMT 相關蛋白部分，利用西方墨點法與 q-RT PCR 觀測其餘 EMT 相關標誌蛋白之變化，佐證我們的實驗結果。
- II. 利用核質分離實驗結合西方墨點法，證實 Snail 蛋白於細胞核中表現下降，藉此調控 E-cadherin 之基因轉錄作用。
- III. 利用 AKT 活化質體，大量活化訊息傳遞路徑下觀察 EMT 作用與細胞生理機制，反向證實本篇實驗結果。
- IV. 利用 microRNA database 交互查詢方式探討哪些 microRNA 在此機轉中扮演重要角色，並期望找出新的 biomarker 用以治療 PVR。
- V. 在動物實驗中，先透過藥劑作用令動物視網膜損傷或剝離，再透過施打或餵食不同濃度之 NCTD，觀察其視網膜細胞變化與其眼睛疾病改善程度。

(六) 參考文獻

1. Pennock, S., et al., *Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy?* Prog Retin Eye Res, 2014. **40**: p. 16-34.
2. *The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy.* Ophthalmology, 1983. **90**(2): p. 121-5.
3. Campochiaro, P.A., *Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy.* Arch

Ophthalmol, 1997. **115**(2): p. 237-41.

4. Chiba, C., *The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration*. Exp Eye Res, 2014. **123**: p. 107-14.
5. Chen, H.J. and Z.Z. Ma, *N-cadherin expression in a rat model of retinal detachment and reattachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(4): p. 1832-8.
6. Cheng, S.C., et al., *Anti-inflammatory property of quercetin through downregulation of ICAM-1 and MMP-9 in TNF-alpha-activated retinal pigment epithelial cells*. Cytokine, 2019. **116**: p. 48-60.
7. Lin, H.Y., et al., *Fisetin inhibits epidermal growth factor-induced migration of ARPE-19 cells by suppression of AKT activation and Sp1-dependent MMP-9 expression*. Mol Vis, 2017. **23**: p. 900-910.
8. Rojas, J., et al., *A strong genetic association between the tumor necrosis factor locus and proliferative vitreoretinopathy: the retina 4 project*. Ophthalmology, 2010. **117**(12): p. 2417-2423 e1-2.
9. Rojas, J., et al., *Predicting proliferative vitreoretinopathy: temporal and external validation of models based on genetic and clinical variables*. Br J Ophthalmol, 2015. **99**(1): p. 41-8.
10. Kiss, C.G., et al., *Anatomy and function of the macula after surgery for retinal detachment complicated by proliferative vitreoretinopathy*. Am J Ophthalmol, 2007. **144**(6): p. 872-877.
11. Nagasaki, H., K. Shinagawa, and M. Mochizuki, *Risk factors for proliferative vitreoretinopathy*. Prog Retin Eye Res, 1998. **17**(1): p. 77-98.
12. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
13. Kim, J., et al., *EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(51): p. 85021-85032.
14. Pan, M., et al., *EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers*. PLoS Biol, 2018. **16**(9): p. e2006624.

15. Buonato, J.M., I.S. Lan, and M.J. Lazzara, *EGF augments TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition by promoting SHP2 binding to GAB1*. J Cell Sci, 2015. **128**(21): p. 3898-909.
16. Li, L., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells*. Int J Mol Med, 2015. **36**(1): p. 113-22.
17. Yang, P.Y., et al., *Norcantharidin induces apoptosis in human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways*. Pharmacol Rep, 2016. **68**(5): p. 874-80.
18. Peng, C., et al., *Norcantharidin Suppresses Colon Cancer Cell Epithelial-Mesenchymal Transition by Inhibiting the alpha6beta6-ERK-Ets1 Signaling Pathway*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20500.
19. Gao, Y., et al., *Norcantharidin inhibits IL-6-induced epithelialmesenchymal transition via the JAK2/STAT3/TWIST signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells*. Oncol Rep, 2017. **38**(2): p. 1224-1232.
20. Jin, D., et al., *Norcantharidin reverses cisplatin resistance and inhibits the epithelial mesenchymal transition of human nonsmall lung cancer cells by regulating the YAP pathway*. Oncol Rep, 2018. **40**(2): p. 609-620.