

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TWEAK對於人類非小型細胞肺癌的上皮細胞-間質細胞轉換及細胞骨架之影響
------------	--

執行計畫學生：葉綺真

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-047-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：廖智凱

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系解剖學科

中華民國 109年03月31日

目錄

中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
一、前言.....	1
二、研究動機與目的	1
三、文獻探討	2
四、研究方法	2
五、結果.....	4
六、結論與討論	8
七、文獻參考	9

中文摘要

腫瘤壞死因子相關細胞凋亡的微弱誘導蛋白簡稱為 TWEAK。TWEAK 誘發的訊息路徑可導致許多疾病，例如自體免疫性疾病，神經系統疾病，牙周疾病以及癌症。TWEAK 的受體為纖維母細胞生長因子可誘發受體 14 (Fn14)。越來越多的證據顯示，TWEAK 經由與其受體結合活化許多訊息傳導路徑，包括典型的 NF- κ B 路徑、非經典的 NF- κ B 路徑，以及 MAPK 相關的訊息調控路徑。TWEAK / Fn14 誘發的下游路徑已被證實會參與癌症的進展，例如細胞生長，增殖，分化，凋亡，血管新生，遷移和侵襲。上皮細胞-間質細胞轉換 (EMT) 在促進癌症遷移和侵襲中扮演著重要的角色。在這項研究中，我們探討 TWEAK 對於人類非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株 A549 中 EMT 相關蛋白和細胞遷移的影響。以 MTT 分析評估細胞毒殺性，實驗結果發現，TWEAK 處理 48 小時未能抑制細胞的活性。然而，A549 細胞以長時間暴露在 TWEAK 中 (72 小時以上) 會減緩細胞生長的速度。TWEAK 會以濃度依賴及時間依賴造成 E-cadherin 的表現減少，並且促使 N-cadherin 及 vimentin 的表現上升。此外，經由傷口癒合和 transwell 遷移的結果得知，TWEAK 可以顯著地增加 A549 細胞遷移的能力。TWEAK 處理 3 小時後，核轉錄因子 NF- κ B p50 的蛋白質表現量上升，這個現象能持續至 24 小時。而在 TWEAK 處理 12 小時後，E-cadherin 轉錄抑制蛋白 Snail 的表現量上升，並且在處理 36 小時後，也可以見到另一種 E-cadherin 轉錄抑制蛋白 Slug 的表現量有增加的情形。綜合以上結果，我們證實 TWEAK 藉由促進 Snail 和 Slug 的表現，造成人類非小細胞肺癌 A549 細胞進行 EMT 及細胞遷移。未來，仍需進一步的實驗以釐清 TWEAK 誘發的典型 NF- κ B 路徑是否有參與肺癌 EMT 和轉移。

關鍵字：腫瘤壞死因子相關細胞凋亡的微弱誘導蛋白、人類非小細胞肺癌、上皮細胞-間質細胞轉換、細胞遷移、訊息傳遞路徑

英文摘要

Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) inducing various signaling pathways has been implicated in the pathogenesis of many diseases such as autoimmune disorders, neurological disorders, periodontal disease as well as cancers. Growing evidence showed that TWEAK induces many signaling pathways including the canonical NF- κ B pathway, non-canonical NF- κ B pathways, and the MAPK via association with its receptor, fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14). TWEAK/Fn14 axis could participate in cancer progressions such as cell growth, proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis, migration, and invasion. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in promoting cancer migration and invasion. In this study, we investigated the effect of TWEAK on EMT-associated proteins and cell migration in a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549. TWEAK treatment for 48 h did not cause inhibition of cell viability, which was measured by MTT assay. However, long-term TWEAK treatment of A549 cells (above 72 h) slowed down cell growth. Following TWEAK treatment, dose- and time-dependent downregulation of E-cadherin expression and upregulation of N-cadherin and vimentin were seen. In addition, TWEAK significantly induced an increase in A549 cell migration, which was measured by wound healing and transwell migration assays. TWEAK induced a significant increase in nuclear transcription factor NF- κ B p50 levels at 3 h, which were sustained to 24 h. An increase in protein levels of E-cadherin transcriptional repressors Snail and Slug was also seen after TWEAK treatment for 12 h and 36 h, respectively. Our results suggest that TWEAK treatment of A549 cells leads to EMT and cell migration by the upregulation of Snail and Slug. Further study will need to provide evidence to link the TWEAK-induced canonical NF- κ B pathways to lung cancer EMT and metastasis.

Key words: Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis, Non-small cell lung cancer, Epithelial-mesenchymal transition, Cell migration, Signaling transduction pathway

一、前言

上皮性的原位癌細胞發生轉移時，會發生細胞型態的改變，從鵝卵狀的上皮細胞型態轉變為間質型態，稱為上皮細胞-間質細胞轉換[epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)]，此時上皮細胞相關的蛋白質如 E-cadherin 的表現量會明顯降低，而間質細胞相關的蛋白質，如黏附蛋白分子 N-cadherin 及中間絲蛋白 vimentin 的表現量會增加，導致相鄰細胞間的結合變為鬆散而傾向於遷移(migration)，EMT 也會促使細胞分泌基質金屬酶[Matrix metalloproteinase (MMP)]-2 及 MMP-9，造成細胞外基質的瓦解，使得癌細胞侵入血管內，藉由循環系統轉移至遠端的組織與器官(1)。

腫瘤壞死因子相關細胞凋亡的微弱誘導蛋白[tumor necrosis factor (TNF)-related weak inducer of apoptosis]簡稱 TWEAK，屬於 TNF 超級家族(superfamily)的成員之一，結構為 249 個胺基酸所組成的第二型跨膜蛋白(type II transmembrane protein)，其蛋白質 N 端(amino-terminal)位於細胞內，而蛋白質 C 端(carboxyl terminal)則裸露於細胞外，此細胞外區域具有 TNF 同源構造區域(TNF homology domain)。TWEAK 廣泛地存在於各種組織中如腦、肺、心臟及腎臟等，與許多疾病有關，例如自體免疫疾病、神經疾病、癌症等。TWEAK 的受器為 129 個胺基酸所組成的第一型跨膜蛋白，稱為纖維母細胞生長因子可誘發受體 14 [fibroblast growth factor-inducible 14]，簡稱為 Fn-14。Fn14 的細胞內區域為轉接蛋白 TNF 受體相關因子[TNF receptor associated factor (TRAF)]結合區，目前已證實 TRAF1、2、3 及 5 皆會結合於 Fn14 的細胞內區域，進而活化其下游的訊息傳遞路徑，主要分別為典型 NF- κ B 路徑、非典型 NF- κ B 路徑，以及 MAPK 路徑，TWEAK 藉由活化 Fn-14 相關的訊息路徑用以調控細胞的生長、增生、分化、細胞凋亡與血管新生等(2, 3)。

無論經由哪種路徑所產生的 NF- κ B 都會進入細胞核中執行轉錄因子的功能，促使腫瘤壞死因子 α (TNF α)的表現量上升，而 TNF α 的受體有兩種 TNFR1 及 TNFR2，前者會促使細胞凋亡，而後者則會維持細胞的存活並促使細胞增生。當 TWEAK 與 Fn14 結合後：(A)當缺乏 TRAF2 或 cIAP1 而無法形成複合體時，TNF α -TNFR1 的路徑會開始活化，促使 RIP1/ TADD (Fas Associated with Death Domain)/Caspase8 複合體的形成，而引起細胞凋亡(4, 5)；(B)TRAF2 與 cIAP1 形成複合體，抑制 TNF α -TNFR1 的路徑，並活化 TNF α -TNFR2 的路徑，促使 NF- κ B 的表現量上升，以及 p38 與 JNK 的磷酸化上升，進而促使細胞增生(6)，由此可知與 TWEAK-Fn14 引發的訊息傳遞會導致細胞走向細胞凋亡與增生兩種截然不同的結果，此決定於細胞含有 TRAF2 與 cIAP1 的程度。

二、研究動機與目的

根據衛生福利部 106 年的死因統計，十大死因之首為癌症，而肺癌長年位居十大癌症死因的首位(7)。肺癌可分類成小型細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)與非小型細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)，肺癌患者中有 85%為非小

型細胞肺癌所引起，並且確診為肺癌時常為第 III 及 IV 期，此時的癌細胞已經發生轉移，而導致化學療法及放射線治療的成效不佳(8)。雖然許多文獻證實上皮細胞-間質細胞轉換(EMT)在腫瘤轉移中扮演著重要的角色(2)，即便如此，TWEAK 影響人類非小型細胞肺癌的型態與轉移，以及相關的分子調控機轉仍需要進行實驗釐清。根據 Whitsett 等學者於 2012 年的研究中確認人類非小細胞肺癌 A549 細胞會表現大量的 Fn14(9)。許多研究在腫瘤的 EMT 形成及轉移過程也使用 A549 細胞，因此本計畫選用 A549 細胞作為細胞模式進行探討，深入了解 TWEAK-Fn14 訊息路徑在肺癌轉移的作用機轉。

三、文獻探討

先前文獻使用氣管上皮細胞 BEAS-2B 進行 TWEAK 研究指出，單獨處理 TWEAK 會明顯地抑制 E-cadherin 的 mRNA 與蛋白質的表現程度，對於 N-cadherin 的表現量只有些微地上升，另一方面，TWEAK 可以加強 TGF- β 1 誘發氣管上皮細胞發生 EMT 的情形，大幅增加的 E-cadherin 與減少的 N-cadherin 起因於 TWEAK 增加 TGF- β 1 下游的訊息路徑，包含增加 TGF- β 1 誘發 Smad2 磷酸化，以及活化 p38 及 NF- κ B 路徑(10)。在腎管上皮細胞中，單獨以 TWEAK 處理，僅會造成 E-cadherin 的表現量下降而不會影響 N-cadherin 的表現，此分子機轉為 TWEAK 會促使 E-cadherin 轉錄抑制因子 Snail 與 Slug 的表現量增加，並透過 ERK 及 NF- κ B 路徑而抑制 E-cadherin 的表現，進而導致腎小管細胞發生 EMT(11)。此外其他有關於細胞遷移與侵襲在肝臟星狀細胞的研究指出 TWEAK 可以促使表皮生長因子接受器[epidermal growth factor receptor (EGFR)]的磷酸化上升，或透過活化 AKT 相關的訊息路徑進而增強細胞的遷移能力(12)。Sequera 等學者在探討小鼠胚胎纖維母細胞(mouse embryonic fibroblasts)遷移與侵襲的機制時，結果發現 TWEAK 可以經由活化 ERK 訊息路徑及抑制 Fibulin-3 的表現，導致小鼠胚胎纖維母細胞的遷移與侵襲的能力上升(13)。

四、研究方法

1. 細胞株的培養

人類非小型細胞肺癌細胞株 A549 細胞以 1×10^4 cells/cm² 密度種貼於細胞培養盤內，細胞生長的培養液為 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) [額外加入 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 IU/mL 青黴素(penicillin)、100 μ g/mL 鏈黴素(Streptomycin)、2 mM 麩醯胺酸(glutamine)、3.7 g/L 碳酸氫鈉(NaHCO₃)]。細胞生長的環境在 37°C、5% CO₂ 的培養箱中，每 2 至 3 天更換新的培養液或進行實驗。

2. MTT assay

將細胞以密度約為 1×10^4 cells/well 種貼於 96 孔盤，隔天加入 TWEAK 處理，待藥物處理時間結束後，於每小格加入 1/10 體積的 MTT 試劑繼續作用 4 小時，

活細胞的粒腺體內膜具有琥珀酸去氫酶，能將 MTT 試劑還原生成深藍紫色的結晶物，接著移除液體，再於每小格加入 100 μ l DMSO 用以溶解深藍紫色結晶物，接著使用 ELISA reader 於波長 570 nm 讀取樣本的吸光值。

3. 傷口癒合分析(Wound healing assay)

將 ibidi Culture-Insert 放在 35 mm 培養皿中，種貼 4×10^4 cells/mL 的細胞密度於 insert 的兩側隔間，隔天將 culture insert 取出，此時兩側隔間的細胞群間距為 500 μ m。以藥物處理適當的時間後，使用倒立式相位差顯微鏡觀察間距是否變小，確認傷口癒合的情形。

4. 細胞移動分析(cell migration assay)

把人類肺癌 A549 細胞以 1% DMEM 調整成 2.5×10^5 cell/ml 的細胞密度，將細胞種貼在 transwell 上層，於 37°C、5% CO₂ 二氧化碳培養箱中培養 6 小時，再將細胞拿出培養箱，以 10% 福馬林於室溫固定 15 分鐘，再以 PBS 洗滌三次後，用棉花棒刮除 transwell 上層細胞，加入結晶紫於室溫下染色 30 分鐘，再以 PBS 洗滌三次，使用棉花棒將 transwell 上層細胞刮乾淨，保留遷移到 transwell 膜外的細胞，用倒立式顯微鏡下觀察並照五張相，用以進行細胞計數之統計。

5. 免疫螢光染色

以細胞密度 2.5×10^3 cells/cm² 將 A549 細胞培養於蓋玻片上，待長到適當密度加藥處理，24 小時後以 4% paraformaldehyde 於室溫固定 10 分鐘，再以 PBS 洗滌三次，接著加入 0.25% Triton X-100 進行通透後，以 blocking buffer (內含 0.1% Tween-20 及 1% BSA) 於是問下阻隔 1 小時，接著加入初級抗體於 4°C 作用至隔天，再以 PBS 洗滌後，再加入 Alexa594-conjugated 或 Alexa488-conjugated 的二級抗體於室溫下作用 1 小時，以 PBS 洗滌兩次後再以 0.9% NaCl 洗滌兩次後進行封埋，最後使用指甲油封片備存或是置於螢光顯微鏡下觀察。

6. 蛋白質萃取

人類非小型細胞肺癌細胞經由藥物處理之後，以 PBS 洗滌兩次，於 Lysis 緩衝液[RIPA 緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH7.4、1% NP-40、150 mM NaCl 與 1 mM EDTA)含有蛋白酶抑制劑(1 mM PMSF、1 mM protease cocktail)及磷酸水解酶抑制劑(1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM phosphate protease cocktail)]中刮下細胞，並且收集的細胞萃取液轉置於 1.5 ml 離心管中，於冰上作用 30 分鐘，過程中反覆以震盪器震盪，之後以 12000xg 離心後，取上清液至另一個乾淨的 1.5 ml 離心管，再從中取至少 5 μ L 細胞萃取液進行蛋白質濃度的測定(Bio-Rad DC protein assay)，在取上清液的離心管中加入上清液體積 1/3 的 4X sample buffer，經振盪器混勻後保存在 -20°C，或是進行蛋白質電泳分析。

7. 蛋白質電泳與西方轉漬法

蛋白質萃取液於 100°C 加熱 6 分鐘，在 10% SDS-PAGE 以電壓 100V 進行蛋白質電泳 20 分鐘後，再將電壓調整成 200V 續進行電泳約 30 分鐘，進入下膠後，蛋白質會依照其分子量大小進行分離，待蛋白質電泳結束後進行西方轉漬法，轉漬完成後將轉漬膜以 ponceau S (2% ponceau S、15% sulfosalicylic acid 和 15% trichloroacetic acid) 染色，切下欲觀察蛋白質的區域轉漬膜，先以 blocking solution (5% non-fat milk 或 2.5% BSA in PH7.4 washing buffer) 作用 1 小時後，加入初級抗體於 4°C 作用至隔夜，經 TBST (pH7.4) 洗滌三次，每次十分鐘後，加入二級抗體於室溫作用 1 小時，再以 TBST (pH7.4 或 8.2) 洗滌三次，每次十分鐘後，以 NBT/BCIP 或是 Enhanced chemiluminescence (ECL) 呈色。

8. 生長曲線分析

將 5×10^3 cells/cm² 培養於 24well 中，從隔天開始到第五天，每天都要使用血球計數盤計數未處理組及 TWEAK 的細胞數量，過程中加入 trypan-blue 用以排除死掉的細胞，最後將獲得細胞數目繪製成細胞生長曲線。

9. 生物統計分析

每種實驗數據至少取得三組以上進行數據統計分析，以 $P < 0.05$ 為顯著差異，統計結果則以平均值±標準差(mean ± SD) 的表示方式。使用 GrapPad Prism 5 軟體將數據輸入製作統計的量化圖。

五、結果與討論

1. TWEAK 對於人類非小細胞肺癌 A549 細胞活性與細胞生長的影響

使用不同濃度的 TWEAK 處理 48 小時後以 MTT 方式確認是否會造成毒殺性。如圖 1A 所示，低濃度甚至提高至 200 ng/ml 濃度的 TWEAK 皆不會影響 A549 細胞的存活度。使用血球計數盤評估 A549 每天的細胞數目並繪製出生長曲線，實驗結果發現，TWEAK 處理的前兩天與控制組相同，細胞數目都有些微的增加，而當 TWEAK 處理至第三天後，相較於控制組，細胞數目成長趨向緩慢，顯示長時間(約三天以後)會抑制 A549 細胞的生長(圖 1B)。

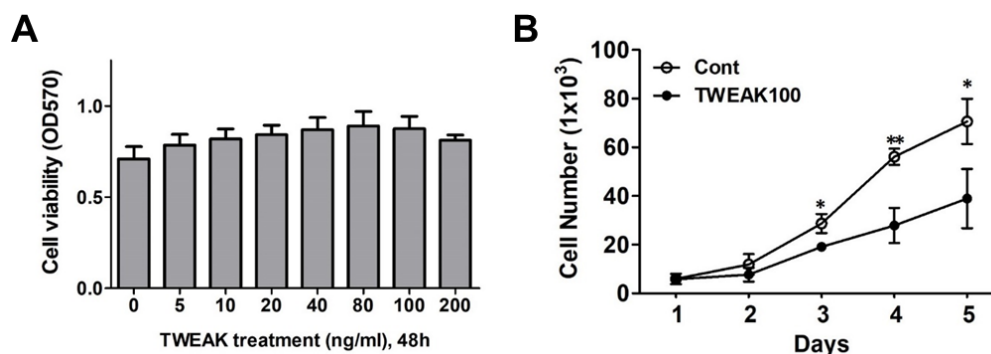


圖 1. TWEAK 處理之後，肺癌 A549 細胞的存活度(A)及生長曲線(B)。

2. TWEAK 對於人類非小細胞肺癌 A549 細胞型態的影響

於倒立式相位差顯微鏡下觀察 A549 細胞的型態變化，結果發現未加入 TWEAK 的 A549 細胞呈現鵝卵狀的上皮細胞型態，在藥物處理 24 小時後，使用 10 ng/ml TWEAK 的 A549 細胞略呈紡錘狀；在 40 ng/ml 的組別中，A549 細胞變得狹長，而且有明顯的偽足型態構造；以 100 ng/ml TWEAK 處理 24 小時後，大多數的細胞都變得細長也有明顯的偽足構造 (圖 2)。

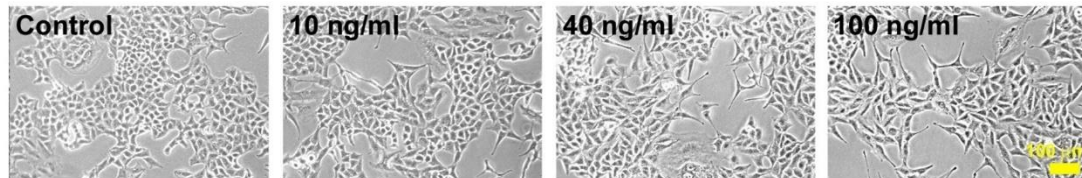


圖 2. TWEAK 影響肺癌 A549 細胞的細胞型態。(比例尺：100 μ m)

3. TWEAK 促使 A549 細胞進行上皮細胞-間質細胞轉換(EMT)

為了確認圖 2 細胞型態的變化是否牽涉 EMT 相關蛋白的變化，將 A549 細胞以 10、40、100 ng/ml TWEAK 處理 48 小時後，於西方轉漬法分析 EMT 相關蛋白的表現情況。隨著 TWEAK 處理的濃度增加至 100 ng/ml，E-cadherin 的表現量明顯地降低，而 N-cadherin 及 vimentin 明顯地增加(圖 3A)。根據圖 3A 的結果，選用 100 ng/ml TWEAK 進行接下來的實驗，首先 A549 細胞以 TWEAK 處理不同的時間點，實驗結果發現，隨著處理時間越長，至 48 小時 TWEAK 能明顯地抑制 E-cadherin 的表現，並且促使 N-cadherin 及 vimentin 的表現(圖 3B)。

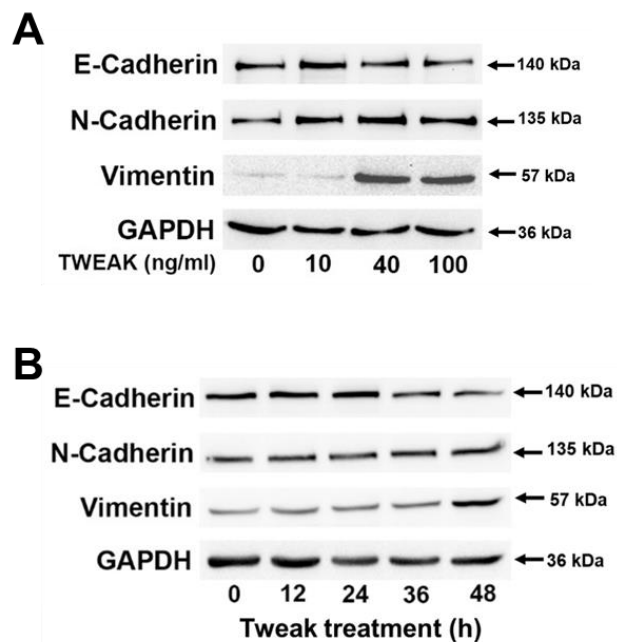


圖 3. TWEAK 影響 A549 表達 EMT 相關蛋白。(A) 不同濃度的 TWEAK 處理 48 小時。(B) 100ng/ml TWEAK 處理不同的時間點。

4. TWEAK 影響 EMT 相關蛋白在細胞內的表現及分布情形

未處理 TWEAK 的細胞(control)在細胞接合處表達大量的 E-cadherin 及少量的 N-cadherin，並且少量的 vimentin 可見於細胞核的周圍(圖 4，Control)。相較於 Control，A549 以 100 ng/ml TWEAK 處理 48 小時後，在細胞接合處的 E-cadherin 表現受到抑制，而 N-cadherin 在相鄰細胞間的表現量則增加，並且中間絲蛋白 vimentin 表現量也會增加並且於細胞質中展開。(圖 4，TWEAK)

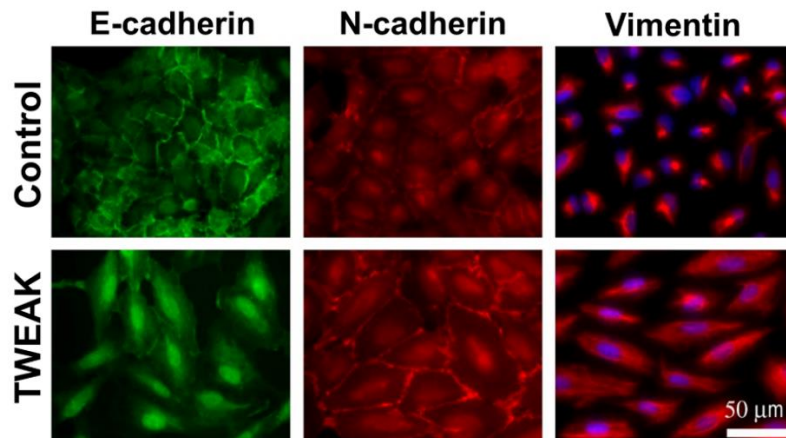


圖 4. TWEAK 處理 A549 細胞影響 EMT 蛋白的表現與分布。(比例尺：50 μm)

5. 確認加入 TWEAK 後是否可促進 A549 細胞的遷移

使用兩種方式檢測 TWEAK 處理後 A549 細胞的遷移能力：一、傷口癒合分析 (wound healing assay)，與控制組相比，100 ng/ml TWEAK 能夠加速傷口的癒合(圖 5A、B 及 C)；二、transwell migration assay，與控制組相比，100 ng/ml TWEAK 可以促進細胞 migration(圖 5D、E 及 F)。根據圖 1 的結果所示，TWEAK 並不會促進癌細胞的增生，因此確認 TWEAK 確實會促進 A549 細胞的遷移。

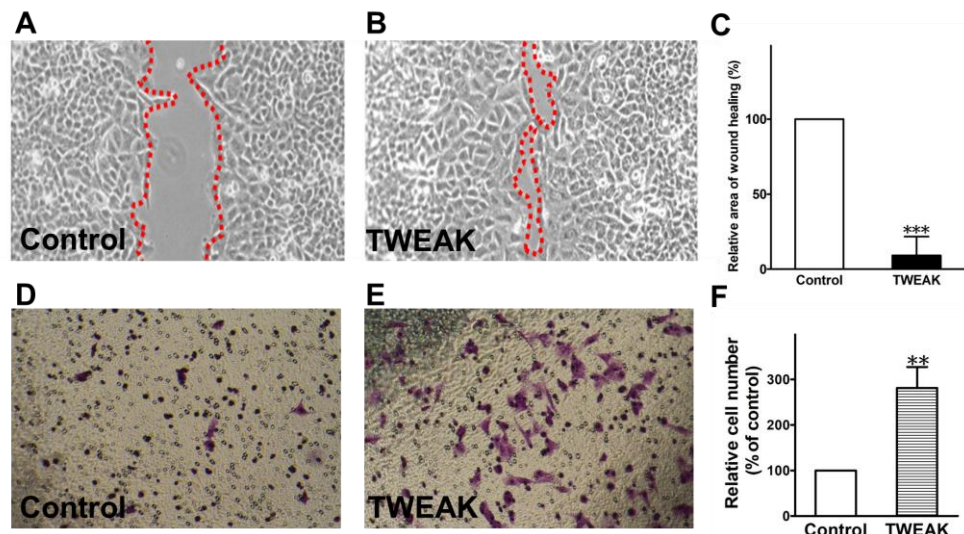


圖 5. TWEAK 對於 A549 細胞遷移能力的影響。(A-B) Wound healing assay。(C)

為 wound healing assay 的量化結果($***P < 0.001$, 與 Control 相比)。(D-E) Transwell migration assay。(C)為 transwell migration assay 的量化結果($**P < 0.01$, 與 Control 相比)。

6. TWEAK 促進 A549 細胞 NF- κ B 的表現量上升，並且使 NF- κ B 轉入細胞核內
為了確認 A549 細胞以 100 ng/ml TWEAK 處理後是否會活化典型的 NF- κ B 路徑，我們使用西方轉漬法與細胞免疫染色法進行分析。實驗結果顯示，TWEAK 處理 3 至 6 小時後，NF- κ B p50 的蛋白質表現量有上升的情況，隨著處理時間至 18 及 24 小時，NF- κ B p50 蛋白質表現量有明顯地增加(圖 6A)。NF- κ B 受到刺激時，會轉入至細胞核內執行轉錄因子的功能。利用細胞免疫螢光染色法，結果發現未處理 TWEAK 的細胞組(Control)，其細胞核內的染色訊號偏弱，少量的 NF- κ B p50 分散於細胞質中(圖 6B)，而以 TWEAK 處理後造成細胞核內螢光染色的訊號有明顯增加的情況(圖 6C)。顯示 A549 細胞以 100 ng/ml TWEAK 刺激後會活化非典型 NF- κ B 的相關訊息路徑。

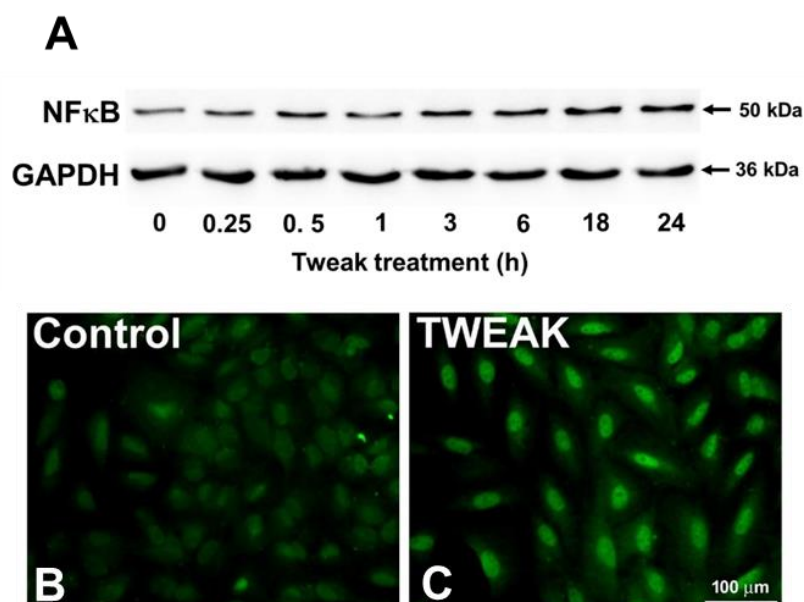


圖 6. TWEAK 活化非典型 NF- κ B 的路徑。(A)西方轉漬法，使用 NF- κ B p50 的抗體。(B 及 C)細胞免疫螢光染色法，綠色螢光表示 NF- κ B p50 在細胞內的分布情況。

7. TWEAK 促使 A549 細胞表現轉錄因子 Slug 及 Snail

將 A549 細胞以 100 ng/ml TWEAK 處理 12、24、36 及 48 小時後，於西方轉漬法分析轉錄因子 Slug 及 Snail 蛋白的表現情況。實驗結果發現，TWEAK 處理 12 小時後，Slug 的蛋白質表現量有顯著的增加(圖 7, Slug)，而 TWEAK 處理 12 及 24 小時對於 Snail 蛋白的表現並沒有顯著的影響，隨著處理時間越長至 24 及 48 小時，TWEAK 能明顯地增加 Snail 的蛋白質表現量 (圖 7, Snail)。

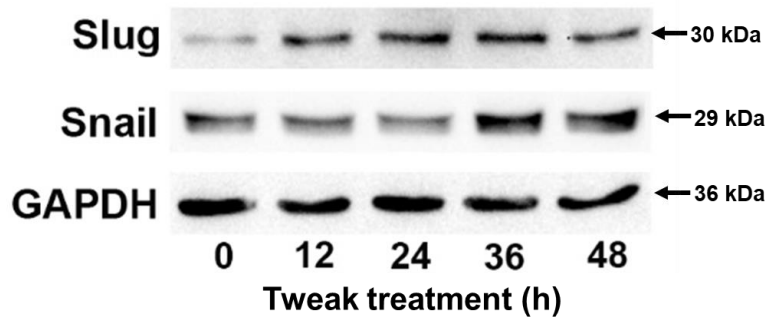


圖 7. TWEAK 影響 A549 表達轉錄因子 Slug 及 Snail。以 100ng/ml TWEAK 處理不同的時間點，收集細胞萃取液以西方轉漬方進行分析。

六、結論及討論

先前文獻證實氣管上皮細胞 BEAS-2B 以 TWEAK 處理 24 小時後，能夠造成 E-cadherin 的表現量明顯地下降，而對於 N-cadherin 的表現則影響較些微(10)。另一篇研究證實 TWEAK 可以促進人類膜間環細胞和 LX-2 細胞的遷移(14, 15)。如同於這篇文獻，我們的結果顯示，起初的 24 小時內 TWEAK 對於人類非小細胞肺癌 EMT 相關蛋白質並沒有顯著的且一致的變化，但在處理 48 小時後，TWEAK 可以明顯地造成 E-cadherin 的蛋白質表現量增加，且促使 N-cadherin 及 vimentin 的表現量明顯地上升，此外 TWEAK 也促使 vimentin 重新排列，使得細胞由鵝卵狀的上皮型態轉換成紡錘狀的間質細胞型態，進而促使 A549 細胞的遷移。

另一方面，我們的結果顯示 TWEAK 可以增加 NF- κ B 的表現，並促使 NF- κ B 轉入至細胞核內執行轉錄因子的功能。根據許多文獻指出，TWEAK 在正常的人類細胞中能夠經由 NF- κ B 路徑促使細胞進行上皮細胞-間質細胞轉換(EMT)(10, 11)。顯示 TWEAK 或許可以透過 NF- κ B 路徑促使肺癌 A549 細胞進行 EMT，然而許多文獻也指出 TWEAK 可以經由其他的訊息路徑如 p38、ERK 及 AKT 等誘發細胞進行 EMT(10-13)。是否藉由典型 NF- κ B 路徑，抑或是非典型 NF- κ B 路徑或其他訊息傳遞路徑促使肺癌 A549 細胞進行 EMT，仍需要更進一步的實驗用以證實。

根據圖 7 的結果，TWEAK 可以促使 Snail 及 Slug 的蛋白質表現量上升。這兩種轉錄因子已經知道屬於 E-cadherin 的抑制因子(repressor)，也被證實在正常細胞中可以被 TWEAK 誘發而大量表現(11)。綜合文獻與我們的研究成果，可以推論長時間處理 TWEAK(48 小時)，可以促使 A549 細胞發生 EMT 的型態變化，Snail 及 Slug 大量的表現使得 E-cadherin 的表現受到 TWEAK 所抑制，並且造成 N-cadherin 及 Vimentin 的表現上升，進而增加 A549 細胞的遷移，TWEAK 或許能夠經由活化非典型 NF- κ B 路徑導致上述的結果。

七、文献参考

1. Gloushankova, N. A., et al. (2017). "Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells." *Tissue Barriers* **5**(3): e1356900.
2. Bhattacharjee, M., et al. (2012). "A Bioinformatics Resource for TWEAK-Fn14 Signaling Pathway." *J Signal Transduct* 2012: 376470.
3. Winkles, J. A. (2008). "The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting." *Nat Rev Drug Discov* **7**(5): 411-425.
4. Enwere, E. K., et al. (2014). "Role of the TWEAK-Fn14-cIAP1-NF-kappaB Signaling Axis in the Regulation of Myogenesis and Muscle Homeostasis." *Front Immunol* **5**: 34.
5. Vince, J. E., et al. (2008). "TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha." *J Cell Biol* **182**(1): 171-184.
6. Ham, B., et al. (2016). "The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis." *Trends Cancer Res* **11**(1): 1-27
7. Bray, F., et al. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* **68**(6):394-424.
8. Abe, Y. & Tanaka, N. (2016). "The Hedgehog Signaling Networks in Lung Cancer: The Mechanisms and Roles in Tumor Progression and Implications for Cancer Therapy." *Biomed Res Int* **2016**:7969286.
9. Whitsett, T. G., et al. (2012). "Elevated expression of Fn14 in non-small cell lung cancer correlates with activated EGFR and promotes tumor cell migration and invasion." *Am J Pathol* **181**(1): 111-120.
10. Itoigawa, Y., et al. (2015). "TWEAK enhances TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells." *Respir Res* **16**: 48.
11. Berzal, S., et al. (2015). "TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) regulates junctional proteins in tubular epithelial cells via canonical NF-kappaB pathway and ERK activation." *J Cell Physiol* **230**(7): 1580-1593.
12. Zhang, F., et al. (2019). "TWEAK promotes hepatic stellate cell migration through activating EGFR/Src and PI3K/AKT pathways." *Cell Biol Int*.
13. Sequera, C., et al. (2018). "TWEAK promotes migration and invasion in MEFs through a mechanism dependent on ERKs activation and Fibulin 3 down-regulation." *J Cell Physiol* **233**(2): 968-978.
14. Xu, M., et al. (2016). "Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis Promotes Hepatic Stellate Cells Migration via Canonical NF-kappaB/MMP9 Pathway." *PLoS One* **11**(12): e0167658.
15. Sun, F., et al. (2018). "Involvement of TWEAK and the NF-kappaB signaling

pathway in lupus nephritis." *Exp Ther Med* **15**(3): 2611-2619.