

計畫編號：NHRI-EX93-9304SC

國家衛生研究院整合性醫藥衛生科技研究計畫

基底膜調節類胰島素生長因子訊息傳遞所扮演的角色

計畫名稱

九十三年度成果報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：李宜儒

本年度執行期間：93 年 1 月 1 日 至 93 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考用，不代表本院意見

計畫名稱：基底膜調節類胰島素生長因子訊息傳遞所扮演的角色

計畫編號：NHRI-EX93-9304SC

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：李宜儒

研究人員：李金鳳、吳東逸、陳俊宏

關鍵字：基底膜、類胰島素生長因子、訊息傳遞

壹、九十三年度計畫研究成果摘要

中文摘要

對乳腺上皮細胞而言，細胞分化需要細胞與基底膜(basement membrane)的接觸並給予適當的激素(泌乳激素、胰島素、氫皮質酮)刺激。我們認為乳腺上皮細胞之所以同時需要基底膜和激素以達成其功能是因為當細胞黏附於基底膜上時，這些激素的訊息傳遞才能順利地進行。確實，泌乳激素和胰島素的訊息傳遞就需要細胞與基底膜接觸。另一個與乳腺上皮細胞分化及存活有關的生長因子，第一型類胰島素生長因子(IGF-I)的訊息傳遞亦是如此。細胞外基質(extracellular matrix)調控第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞主要是發生在 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)的酪胺酸磷酸化，而其受體的酪胺酸磷酸化並不受影響。在此，我們將更進一步探討基底膜調節第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的機制。

蛋白質酪胺酸磷酸化的程度受酪胺酸激酶及去磷酸酶所影響。就 IRS-1 而言，其酪胺酸磷酸化的程度與其移轉到受體上量的多寡有關。當一些抑制分子結合到 IRS-1 或是第一型類胰島素生長因子受體(IGF-I receptor)上時，會妨礙 IRS-1 移轉到受體上，進而阻斷第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞。先前的結果顯示當乳腺上皮細胞培養在塑膠盤上時，IRS-1 結合到受體的量則大幅減少，表示在此狀況下可能有抑制分子介入。許多蛋白質分子曾被證實具此作用。nucleolin、PKC ζ 和 ROK α 結合到 IRS-1，而 SOCS、

RACK 和 Grb14 結合到第一型類胰島素生長因子受體上。14-3-3 則可結合到二者。在此，我們利用免疫沉澱的方法檢測 PKC ζ 、SOCS-3、RACK、Grb14 與 IRS-1 以及第一型類胰島素生長因子受體結合的情形。在乳腺細胞中，PKC ζ 和 SOCS-3 並無上述結合的情形。而 RACK 和 Grb14 雖然結合到第一型類胰島素生長因子受體上，但其結合的程度並不因細胞貼附的基質不同而異。惟一不同的是 ROK α 。當細胞培養在塑膠盤上時，有較多的 ROK α 與 IRS-1 結合。因此，我們推測在這些細胞第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的缺陷可能與 ROK α 有關。

ROK α 是位於 Rho GTPase 下游一絲胺酸/蘇胺酸激酶 (serine/threonine kinase)。一般認為它之所以能抑制胰島素訊息傳遞在於其促使 IRS-1 的絲胺酸磷酸化。由文獻得知，增加 IRS-1 絲胺酸磷酸化反而會抑制其酪胺酸磷酸化。所以，ROK α 的作用應不利於第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞。為了證實此一說法，我們使用 ROK α 激酶的抑制劑 Y27632，並檢測其對於第一型類胰島素生長因子所誘發的 IRS-1 酪胺酸磷酸化的影響。當細胞培養在塑膠盤上時，Y27632 的作用可以提高 IRS-1 酪胺酸磷酸化；然而，若細胞培養在基底膜上，則毫無影響。這些結果更加證實 ROK α 對調控第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的重要性。

除了 ROK α ，還有許多絲胺酸/蘇胺酸激酶被證實可以磷酸化 IRS-1，如 PKC ζ 、PI3K、Erk、JNK 和 IKK β 等。先前的結果顯示抑制 Erk 和 IKK β 的活性並不能提高第一型類胰島素生長因子所誘發的 IRS-1 酪胺酸磷酸化；而 PI3K 的抑制劑 wortmannin 卻可以增加，但其作用並不侷限於培養在塑膠盤的細胞。在此，PI3K 的角色僅為負回饋抑制作用抑或是參與細胞外基質調控第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞仍需進一步釐清。我們也檢測了 PKC ζ 抑制劑對第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的影響。然而，此抑制劑並不能提高 IRS-1 酪胺酸磷酸化。所以，培養在塑膠盤的細胞之所以不足於第一型類胰島素生長因子訊息傳遞應與 PKC ζ 無關。

因為基底膜的存在與否決定第一型類胰島素生長因子訊息傳遞是否可

以進行，我們認為細胞外基質所誘發的特殊訊息路徑是調控第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的主要因子。因此，找出基質所誘發的特殊訊息並評估其對生長因子訊息傳遞的影響是本計劃的一個重點。在此，我們檢測 Rho GTPase 的活性，因為乳腺上皮細胞培養在塑膠盤或基底膜上時呈現出完全不同的型態 (morphology)。藉由 pull-down assay 得知，培養在塑膠盤上的細胞具較高的 Rho GTPase 活性，且 p190RhoGAP 酪胺酸磷酸化也較低。綜合以上的結果所得的結論是培養在塑膠盤的乳腺細胞之所以不能順利進行第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞，可能是因為這些細胞具較高的 Rho GTPase 活性，進而活化下游的 ROK α ，導致 IRS-1 的絲胺酸磷酸化增加，最終抑制了 IRS-1 的酪胺酸磷酸化及其後之訊息傳遞。

除了 Rho GTPase 的活性，其他與細胞黏附相關的訊息傳遞路徑也一一被檢視。先前的結果顯示當細胞培養在塑膠盤上時， β 1 integrin、paxillin、p130cas 和 c-Src 的表現量較高，且 FAK、paxillin 和 p130cas 酪胺酸磷酸化的程度也較強。在此，我們更進一步證實細胞因接觸不同的基質而導致 paxillin、p130cas 和 c-Src 的表現量不同的情形是在細胞貼附後不久後即發生，且是經由調控其蛋白質降解所造成。Calpain 是最可能參與此反應之蛋白水解酶，它曾被證實與細胞的展開與移動有關。相反地， β 1 integrin 的表現量則是調控在基因轉錄的階段。因此，細胞採用不同的機制以調節其與週遭環境的互動。是否這些差異與細胞外基質調控第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞有關則仍需釐清。

檢測乙型轉形生長因子 (TGF- β 1) 對第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞的影響乃本計劃另一個方針，因為文獻指出當細胞培養在塑膠盤上會產生乙型轉形生長因子，且此生長因子抑制乳蛋白 β -casein 的表現。所以，我們推測這些細胞有可能藉由製造乙型轉形生長因子以壓制第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞。然而，不論是蒐集所得此種細胞的 conditioned medium 或是外加乙型轉形生長因子皆無法抑制第一型類胰島素生長因子所誘發的 IRS-1 酪胺酸磷酸化。所以，乙型轉形生長因子應與細胞外基質調控第一型

類胰島素生長因子訊息傳遞無關。

綜合而言，我們找到了細胞外基質調控第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的一種機制。這主要是藉由 Rho GTPase、及其下游的 ROK α 以影響 IRS-1 絲胺酸磷酸化所致。

英文摘要

In mammary epithelia, a differentiated phenotype can be recapitulated *in vitro* by culturing cells on basement membrane (BM) in conjunction with the stimulation of lactogenic hormones (prolactin, insulin and hydrocortisone). One explanation for the dual requirement of hormone and BM for mammary function is that cell adhesion to BM renders these cells full responsiveness to hormones. Indeed, a preference for cell adhesion to BM is observed for prolactin and insulin signaling in mammary cells. Likewise, optimal signal transduction of insulin-like growth factor I (IGF-I), another important growth factor for mammary cell differentiation and survival, also relies on cell adhesion on BM. Regulation of IGF-I signaling by the extracellular matrix (ECM) takes place at the level of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1), similar to the control for insulin signaling, left the receptor tyrosine phosphorylation unaffected. Here we further investigated into the mechanism for BM-dependent modulation of IGF-I signaling.

The homeostasis of protein tyrosine phosphorylation is controlled by tyrosine phosphatases and tyrosine kinases. Regarding IRS-1, its recruitment to IGF-IR in response to IGF-I determines its accessibility to the receptor tyrosine kinase. Interference of this process might be due to the association of protein molecules with either IRS-1 or IGFIR, thereby creating steric obstruction for IRS-1/IGF-IR interactions. Incorrect localization of IRS-1 is another cause to terminate IGF-I signaling prematurely. We have found that IGF-I-induced recruitment of IRS-1 to IGF-IR is substantially reduced in mammary cells cultured on plastic, indicating that inhibitory molecule(s) is involved in ECM-mediated regulation of IGF-I signaling. A number of molecules have been

demonstrated to bind IRS-1 or IGF-IR. Nucleolin, PKC ζ and ROK α target to IRS-1, whereas SOCS, RACK and Grb14 (possibly Grb7 and Grb10 as well) interact with the receptor. 14-3-3 protein interacts with both IGF-IR and IRS-1. Thus, we examined the association of PKC ζ , SOCS-3, RACK and Grb14 with either IRS-1 or IGF-IR in mammary cells cultured on plastic and BM by immunoprecipitation. PKC ζ and SOCS-3 were not detected in IRS-1 and IGF-IR immunoprecipitates, respectively. While RACK and Grb14 were found to bind to IGF-IR, there was no significant variation in the extent of association under different culture conditions. Interestingly, higher amount of ROK α were bound to IRS-1 in cells cultured on plastic, suggesting that ROK α might be responsible for the defectiveness of IGF-I signaling in these cells.

ROK α , a downstream effector of Rho GTPase, is a serine/threonine kinase. It has been shown to bind to IRS-1 but its inhibitory effect on IGF-I signaling is probably attributed to its serine/threonine kinase activity that promotes IRS-1 serine phosphorylation. This type of phosphorylation, in turn, exerts detrimental effect on insulin/IGF-I signaling. To further investigate into the involvement of ROK α in the inhibition of IGF-I signaling, we examined the effect of Y27632, an inhibitor of ROK α , on restoring IRS-1 tyrosine phosphorylation. Pretreatment with Y27632 for 1h prior to IGF-I stimulation enhanced the level of IRS-1 tyrosine phosphorylation in cells cultured on plastic, whereas no obvious effect was observed in cells cultured on BM. Thus, ECM-mediated modulation of IGF-I is mediated, at least in part, by ROK α activity.

A number of serine/threonine kinases have also been shown to phosphorylate IRS-1, including PKC ζ , PI3K, Erk, JNK and IKK β . The effect of the inhibitors of PI3K, Erk and IKK β on insulin/IGF-I signaling was previously tested, and except for the PI3K inhibitor, others did not affect IGF-I-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1. Treatment of the PI3K inhibitor wortmannin augmented IRS-1 tyrosine phosphorylation irrespective the substrata that cells were cultured on. Whether PI3K is involved in the ECM-mediated regulation of IGF-I signaling or simply just exerts a feedback inhibition requires further

studies. In parallel with the binding assay, the role of PKC ζ in IGF-I signaling was examined by a cell-permeable myristoylated PKC ζ pseudosubstrate inhibitor (Myr-SIYRRGARRWKRL). This inhibitor was not able to restore IRS-1 tyrosine phosphorylation; it inhibited the phosphorylation instead. Based on these results, we believe that PKC ζ does not play a part in the impairment of IGF-I signaling in cells cultured on plastic.

ECM influences cellular physiology through the signaling pathways triggered by its binding to cell surface receptor. This should apply for the differential regulation of IGF-I signaling observed in mammary cells cultured on different substrata. Thus, seeking out the differences in signaling pathways triggered by cell adhesion to plastic or BM may help to spot the player involved in the crosstalk with the IGF-I-stimulated pathways. Here we examined the Rho GTPase activity by pull-down assay since mammary cells cultured on plastic and BM adopt distinct types of morphology. Greater extent of Rho GTPase activity was detected in cells cultured on plastic. This was in consistent with the result whereby tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP was lower in these cells. Taken together, a potential conclusion was drawn for the failure of IGF-I signaling in cells cultured on plastic. The exhibited higher Rho GTPase activity in these cells causes the activation of ROK α , which then raises the extent of IRS-1 serine phosphorylation. Accordingly, tyrosine phosphorylation of IRS-1 and the subsequent signaling relay is, at some degrees, hindered.

Other signaling events triggered by cell adhesion to substrata were also examined. We have found that cells cultured on plastic led to elevated expression of β 1 integrin, paxillin and p130cas and c-Src, as well as elevated levels of tyrosine phosphorylation of FAK, paxillin, p130cas. Here we further demonstrated that this differential expression of paxillin, p130cas and c-Src in response to different substrata occurs shortly after their adhesion and is regulated by a mechanism involving protein turnover. The likely protease responsible for their degradation was calpain which has been shown to affect the cell spreading and migration. By contrast, expression of β 1 integrin was

controlled at the transcriptional level. Thus, cells adopt different mechanisms to control their interaction with the surrounding ECM. Expression of certain cell surface receptor is modulated at the transcriptional level, whereas levels of the downstream signal/cytoskeletal molecules are regulated at the posttranscriptional level. Whether these differences affect IGF-I signaling will be investigated in the near future.

Examination of the role TGF- β 1 in the regulation of IGF-I signaling is another focus of this study since it has been shown to be upregulated in mammary cells cultured on plastic, and to confer inhibitory effect on β -casein gene expression. However, conditioned medium collected from cells cultured on plastic did not inhibit IGF-I-induced tyrosine phosphorylation of IRS-1 in cells cultured on BM; neither did exogenous addition of TGF- β 1. Thus, the possibility that TGF- β 1 is a potential mediator to deliver the “inhibitory signals” elicited by cell adhesion on plastic to block IGF-I signaling is excluded.

In summary, we identified a potential mechanism for ECM-mediated regulation of IGF-I signaling. ROK α activity, controlled by cell adhesion-induced activation of Rho GTPase, promotes serine phosphorylation of IRS-1, thereby inhibiting tyrosine phosphorylation of IRS-1.

貳、九十三年度計畫著作一覽表

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料

若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

1. 列出貴計畫於本年度中之所有計畫產出於下表，包含已發表或已被接受發表之文獻、已取得或被接受之專利、擬投稿之手稿 (manuscript) 以及專著等
2. 「計畫產出名稱」欄位：請依「臺灣醫誌」參考文獻方式撰寫
3. 「產出型式」欄位：填寫該產出為國內期刊、國外期刊、專利、手稿或專著等
4. 「SCI/SSCI」欄位：Social/Science Citation Index，若發表之期刊為 SCI/SSCI 所包含者，請在欄位上填寫該期刊當年度之 impact factor
5. 「致謝與否」欄位：請註明該成果產出之致謝單位。若該成果產出有註明衛生署資助字樣者，請以 DOH 註明；若該成果產出有註明國家衛生研究院委託資助字樣者，請以 NHRI 註明；若該成果產出有註明衛生署及國家衛生研究院資助字樣者，請合併以 DOH&NHRI 註明；若該成果產出有註明非上述機構資助字樣者，請以機構全銜註明，舉例如下：

序號	計 畫 產 出 名 稱	產 出 型 式	SCI/SSCI	致 謝 與 否
例	Kao CF, Chen SY, Lee YHW. Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. J. Biomed. Sci. 2004 Jan-Feb;11(1):72-94.	國外期刊	2.322	NHRI
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				

*本表如不敷使用，請自行影印。

參、九十三年度計畫重要研究成果產出統計表

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

(係指執行九十三年度計畫之所有研究產出成果)

科 技 論 文 篇 數		技 術 移 轉			
國 內	國 外	類 型	經 費	項 數	
期 刊 論 文	篇	篇	技 術 輸 入	千 元	項
研 討 會 論 文	篇	篇	技 術 輸 出	千 元	項
專 著	篇	篇	技 術 擴 散	千 元	項
技 術 報 告	技 術 創 新		著 作 權	專 利 權	
篇	項	(核 准)	項	(核 准)	項
		(申 請 中)	項	(申 請 中)	項

[註]：

期刊論文：指在學術性期刊上刊登之文章，其本文部份一般包含引言、方法、結果、及討論，並且一定有參考文獻部分，未在學術性期刊上刊登之文章(研究報告等)與博士或碩士論文，則不包括在內

研討會論文：指參加學術性會議所發表之論文，且尚未在學術性期刊上發表者

專 著：為對某項學術進行專門性探討之純學術性作品

技術報告：指從事某項技術之創新、設計及製程等研究發展活動所獲致的技術性報告且未公開發表者

技術移轉：指技術由某個單位被另一個單位所擁有的過程。我國目前之技術轉移包括下列三項：一、技術輸入。二、技術輸出。三、技術擴散

技術輸入：藉僑外投資、與外國技術合作、投資國外高科技事業等方式取得先進之技術引進國內者

技術輸出：指直接供應國外買主具生產能力之應用技術、設計、顧問服務及專利等。我國技術輸出方包括整廠輸出、對外投資、對外技術合作及顧問服務等四種

技術擴散：指政府引導式的技術移轉方式，即由財團法人、國營事業或政府研究機構將其開發之技術擴散至民間企業之一種單向移轉(政府移轉民間)

技術創新：指研究執行中產生的技術，且有詳實技術資料文件者

肆、九十三年度計畫重要研究成果

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

※請依下列項目簡述計畫重要之研究成果※

一、計畫之新發現、新發明或對學術界、產業界具衝擊性 (impact) 之研究成果。計畫之研究成果，請勾選下列項目並敘述其執行情形。

- 1.研發或改良國人重要疾病及癌症的早期診斷方式及治療技術
- 2.發展新的臨床治療方式
- 3.發展新生物製劑、篩檢試劑及新藥品
- 4.瞭解常見疾病及癌症之分子遺傳機轉
- 5.瞭解抗癌藥劑對癌細胞之作用機制
- 6.提供有效的疾病預防策略
- 7.利用生物統計與生物資訊研究，推動台灣生技醫藥研究，促進生物技術與基因體醫學之發展
- 8.醫療保健政策相關研究
- 9.瞭解環境毒理機制及重金屬對人體健康的影響
- 10.研發適合臨床使用的人造器官及生醫材料
- 11.縮短復健流程並增加復健效果的醫療輔助方式或器材之研究應用
- 12.改進現有醫療器材的功能或增加檢驗影像的解析能力
- 13.其他重要疾病或醫藥衛生問題研究_____

近年來國人罹患乳癌的人數逐年攀升，而癌症的發生與生長因子的異常息息相關。類胰島素生長因子及其受體的過度表現或活化就曾被證實與乳癌的發生及轉移有關。本計劃首先著重在釐清細胞外基質調節類胰島素生長因子在正常乳腺細胞中的訊息傳遞，爾後再將此所得的結果運用在乳癌的研究上。我們希望藉此不但能了解細胞外基質對正常乳腺細胞的發育所扮演的角色，並進一步找到治療癌症(乳癌)的方法。

二、計畫對民眾具教育宣導之研究成果(此部份將為規劃對一般民眾教育或宣導研究成果之依據，請以淺顯易懂之文字簡述研究成果，內容以不超過 300 字為原則)

細胞的生理反應是經由整合週遭環境中種種訊息所達成，而這些訊息來自生長因子、相鄰的細胞以及細胞外基質。細胞與其環境相互影響

並作持續調整以維持細胞特有的表型。類胰島素生長因子為一俱多功能性質的生長因子，它結合到細胞表面的受體以傳送生化訊號到細胞內部，以達成促進細胞的生長、存活、移動、分化及控制細胞大小的作用。然而，它的訊息傳遞並非在任何情況下皆可完成的。以正常的乳腺上皮細胞而言，類胰島素生長因子的訊息傳遞必須在細胞與一種特定的細胞外基質，稱為基底膜，接觸時才能達成。我們發現這是因為當細胞在沒有接觸到基底膜時，會產生一種抑制訊號，它會截斷類胰島素生長因子的訊息傳遞。由此可知，細胞外基質對調控細胞的功能扮演了舉足輕重的角色。

三、簡述全程計畫成果之討論與結論，如有技術移轉、技術推廣或業界合作，請概述情形及成效

本年度計畫執行所得的結果：找到細胞外基質調控第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的一種機制。這主要是藉由 Rho GTPase、及其下游的 ROK α 以影響 IRS-1 絲胺酸磷酸化所致。我們將會把本年所得的結果整理成兩篇論文。

四、成效評估（技術面、經濟面、社會面、整合綜效）

本年度的工作著重在釐清細胞外基質調節類胰島素生長因子在正常乳腺細胞中的訊息傳遞，也得到不錯的結果。我們希望這些成果將來可應用在乳癌的研究。

五、下年度工作構想及重點之妥適性

本年度的結果找到了細胞外基質調控第一型類胰島素生長因子訊息傳遞的一種機制，但是我們認為仍有其他的可能性存在。所以，下年度的工作將著重在探討細胞外基質是否調控酪胺酸去磷酸酶的表現或活性，進而影響第一型類胰島素生長因子的訊息傳遞。另外，因為基質的不同造成細胞的型態有異；這種差異是否影響生長因子的訊息傳遞也是一個重點。再者，我們將進一步檢測細胞外基質是否控制 IRS-1 在細胞內的分布，以至於影響其與激酶或去磷酸酶的接觸。

六、 檢討與展望

本年度的工作著重在釐清細胞外基質調節類胰島素生長因子在正常乳腺細胞中的訊息傳遞，也得到不錯的結果。我們計劃將本年度所得的結果整理成兩篇論文。

伍、九十三年度計畫所培訓之研究人員

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
 若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

種 類			人 數	備 註
專任人員	1.	博士後 研究人員	訓練中	
			已結訓	
	2.	碩士級 研究人員	訓練中	
			已結訓	
	3.	學士級 研究人員	訓練中	
			已結訓	
	4.	其他	訓練中	
			已結訓	
兼任人員	1.	博士班 研究生	訓練中	
			已結訓	
	2.	碩士班 研究生	訓練中	2 李金鳳、陳俊宏
			已結訓	1 吳東逸
醫 師		訓練中		
		已結訓		
特殊訓練課程				

註：1.特殊訓練課程請於備註欄說明所訓練課程名稱

2.本表如不敷使用，請自行影印

陸、參與九十三年度計畫所有人力之職級分析

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

職級	所含職級類別	參與人次
第一級	研究員、教授、主治醫師	人
第二級	副研究員、副教授、總醫師、助教授	1人
第三級	助理研究員、講師、住院醫師	人
第四級	研究助理、助教、實習醫師	人
第五級	技術人員	3人
第六級	支援人員	人
合計		人

[註]

第一級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正，若非以上職稱則相當於博士滿三年、碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者

第二級：副研究員、副教授、助研究員、助教授、總醫師、薦任技正，若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經驗者

第三級：助理研究員、講師、住院醫師、技士，若非以上職稱則相當於碩士、或學士滿三年以上之研究經驗者

第四級：研究助理、助教、實習醫師，若非以上職稱則相當於學士、或專科滿三年以上之研究經驗者

第五級：指目前在研究人員之監督下從事與研究發展有關之技術性工作，且具備下列資格之一者屬之：具初(國)中、高中(職)、大專以上畢業者，或專科畢業目前從事研究發展，經驗未滿三年者

第六級：指在研究發展執行部門參與研究發展有關之事務性及雜項工作者，如人事、會計、秘書、事務人員及維修、機電人員等

柒、參與九十三年度計畫所有人力之學歷分析

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

類別	學歷別	參與人次
1	博士	1人
2	碩士	人
3	學士	人
4	專科	人
5	博士班研究生	人
6	碩士班研究生	3人
7	其他	人
合計		人

捌、參與九十三年度計畫之所有協同合作之研究室

群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫 總計畫(請自行整合)

機構	研究室名稱	研究室負責人

玖、九十三年度之著作抽印本或手稿

依「貳、九十三年度計畫著作一覽表」所列順序附上文獻抽印本或手稿

拾、九十三年度計畫執行情形

註：群體計畫(PPG)者，不論是否提出各子計畫資料，都必須提出總計畫整合之資料
若為群體計畫，請勾選本表屬於：子計畫； 或 總計畫(請自行整合)

一、請簡述原計畫書中，九十三年預計達成之研究內容

本計畫主要是研究細胞外基質調控 IGF-I 訊息傳遞的機制。九十三年預計達成之研究內容共分成三部份：

1. 探討抑制分子及絲胺酸/蘇胺酸激酶是否參與細胞外基質調控 IGF-I 的訊息傳遞。
2. 檢定細胞黏附所誘發的訊息路徑並評估其對 IGF-I 訊息傳遞的影響。
3. 釐清 TGF- β 1 是否參與細胞外基質調控 IGF-I 的訊息傳遞。

二、請詳述九十三年度計畫執行情形，並評估是否已達到原預期目標（請註明達成率）

本年度計畫現已執行達原預期目標之 90%。詳細執行情形如下：

1. 探討抑制分子及絲胺酸/蘇胺酸激酶是否參與細胞外基質調控 IGF-I 的訊息傳遞。
 - (1) 檢測培養在塑膠盤或 Matrigel 上的乳腺細胞其 PKC ζ 、SOCS-3、RACK、Grb14 和 caveolin 的表現量，以及這些分子與 IRS-1、IGF-I 受體結合的情形。
 - (2) 檢測絲胺酸/蘇胺酸激酶 PKC ζ 和 ROK α 對 IRS-1 酪胺酸磷酸化的影響。
2. 檢定細胞黏附所誘發的訊息路徑並評估其對 IGF-I 訊息傳遞的影響。
 - (1) 檢測乳腺細胞培養在塑膠盤或 Matrigel 上其黏附分子表現之情形。
 - (2) 檢測乳腺細胞培養在塑膠盤或 Matrigel 上所誘發的訊息路徑。
 - (3) 釐清調控細胞黏附分子及其下游訊息分子表現量之機制。
3. 釐清 TGF- β 1 是否參與細胞外基質調控 IGF-I 的訊息傳遞。
 - (1) 蒐集培養在塑膠盤上的細胞的 conditioned medium，並檢測其對 IGF-I 訊息傳遞的影響。
 - (2) 檢測外加 TGF- β 1 對 IGF-I 訊息傳遞的影響。