

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : Disulfiram 抑制甲狀腺癌細胞自我更新的機制探討 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 謝仰致
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-016-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： 關宇翔

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： 中山醫學大學醫學系藥理學科

中華民國 106年05月18日

題目: Disulfiram 抑制甲狀腺癌細胞自我更新的機制探討

(一) 摘要

甲狀腺癌為最常見的內分泌性腫瘤，在國內甲狀腺癌發生率有逐年上升的傾向，其中女性的發生率是男性的 3.25 倍，甲狀腺癌名列女性第五大癌症。而治療方式多為手術，放射治療或化療，但病人的存活率顯示其效用不見彰顯，近年來研究指出，癌細胞中有一群具有幹細胞特性的癌症幹細胞(Cancer Stem Cell)，擁有自我更新(Self-renewal)及細胞分化(Differentiation)的能力，被認為有形成腫瘤、發展成癌症的潛力，也是造成癌症再度復發、較差預後的原因之一，也被認為與癌症轉移、抗藥性密不可分。因此，標靶癌症幹細胞目前被視為成功治療癌症的關鍵。Disulfiram (DSF) 的通用名為雙硫崙，又稱雙硫醛，原作為治療酒精成癮的藥物，近年來有研究發現 DSF 具有抑制癌幹細胞的功用，也與其他抗癌藥物有協同的作用增加抗癌藥物對細胞的毒性。Bmi1 與癌細胞增生、癌細胞轉移、腫瘤球體形成有關，在我們的研究發現，經 DSF 處理的甲狀腺癌細胞，Bmi1 的表現量有明顯下降，且同時發現 RB 蛋白表現量的上升；同時，透過染色質免疫沉澱法，我們發現 DSF 能抑制 E2F1 與 Bmi1 啟動子的結合情況。所以我們推測 DSF 抑制甲狀腺癌幹細胞活性的分子機制為，DSF 造成 RB 表現量增加，使 E2F1 結合到 Bmi1 啟動子的狀況被抑制，造成 Bmi1 表現下降，進而導致甲狀腺癌幹細胞自我更新的抑制。

(二) 文獻回顧與探討

甲狀腺癌可分為四種，乳突癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、濾泡癌(Follicular thyroid carcinoma, FTC)、髓質癌(Medullary thyroid carcinoma, MTC)以及分化不良癌(Anaplastic thyroid carcinoma, ATC)，其中 PTC 比例約佔 80%、FTC 佔 15%、MTC 佔 3%、ATC 佔 2%，並以 ATC 最為惡性。許多證據顯示甲狀腺癌是由一群腫瘤起始細胞(tumor-initiating cells, TICs)所衍生，TICs 也就是我們常說的癌症幹細胞(Cancer Stem Cells) [3]，癌症幹細胞是具有幹細胞特性的癌細胞，擁有自我更新(Self-renewal)及細胞分化(Differentiation)的能力，被認為有形成腫瘤、發展成癌症的潛力，也是造成癌症再度復發、較差預後的原因之一，也被認為與癌症轉移、抗藥性密不可分[4]。而治療甲狀腺癌方式多為手術，放射治療或化療，但病人的存活率依舊不見提升，所以甲狀腺癌幹細胞被視為治療甲狀腺癌重要的關鍵[3]。

Disulfiram (DSF)的通用名為雙硫崙，又稱雙硫醛，原作為治療酒精成癮的藥物已收入美國、日本等國藥典[5]。近年來有研究發現 DSF 具有抑制癌幹細胞的功用[6] [7]，而 DSF 的抗癌特性需要有銅離子的存在，文獻指出 DSF/Cu 對 ROS(reactive oxygen species)是一個很強的誘導者；DSF/Cu 也是 NFκB 路徑的抑制劑，DSF 也與其他抗癌藥物有協同作用增加抗癌藥物對細胞的毒性，如在大腸癌與乳癌中，增強 5-fluorouracil、paclitaxel、gemcitabine 所誘導的細胞自噬作用[8] [9]，這些研究顯示，DSF 可以成為抗癌藥物的一大潛力，在本研究計畫中則希望更進一步了解，DSF 影響甲狀腺癌幹細胞自我更新的分子機制。

Bmi1(B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1)是一種多梳基因(Polycomb gene)，有文獻指出，如果抑制 Bmi1 基因表現，會抑制，並增加對抗癌藥物的敏感性，也會使細胞停留在 G0/G1 時期，因此 Bmi1 對於維持癌幹細胞的幹性(stemness)與致瘤性(tumorigenicity)扮演著關鍵角色[10]。

RB (Retinoblastoma) protein 是一種腫瘤生成的抑制者，且許多癌症的生成都與

RB 基因突變有關。RB 可以抑制一些 pluripotency factor 來達到抑制癌症的產生，而 RB 蛋白可以經由蛋白間交互作用來調控 E2F(E2 factor)家族，E2F 家族為轉錄因子，與 DNA 的合成有關[13]，而 E2F1 的下游基因包含 Bmi1，文獻中指出 Bmi1 啟動子上有 E2F1 transcription factor 的結合位點[14]。所以由以上資料可以推測，RB 或可藉由抑制 E2F 轉錄活性進而下調 Bmi1 表現量，達到抑制腫瘤生長。

(三) 研究動機與研究問題

本實驗研究動機始於在研究 DSF 對於 K1 甲狀腺癌細胞的生物活性中，發現 DSF 對 K1 細胞株有細胞毒性，且能抑制 K1 細胞株內癌幹細胞活性，在處理過 DSF 的 K1 細胞株中，發現到 Bmi1、Oct4 等自我更新相關基因 mRNA 的表現下降，Bmi1 的蛋白表現亦下降，後續使用帶有 sh-Bmi1 之不同各慢病毒株(編號 229416 或 218869)或混合病毒感染 K1 細胞，再以癌症球體培養方式分析癌幹細胞自我更新活性，發現抑制 Bmi1 表現可降低 K1 甲狀腺癌細胞內癌幹細胞的自我更新。有研究指出 Bmi1 啟動子上有 E2F1 轉錄因子的結合位[14]，且經 DSF 加藥處理的甲狀腺癌細胞，發現 RB 蛋白表現量的上升。因此，所以我們推測 DSF 抑制甲狀腺癌幹細胞活性的分子機制為，DSF 造成 RB 表現量增加，使 E2F1 結合到 Bmi1 啟動子的狀況被抑制，造成 Bmi1 表現下降，進而抑制甲狀腺癌幹細胞的自我更新。

本研究的目標為:

- (1).探討在甲狀腺癌中 Bmi1 的轉錄是否會受到 E2F1 的調控。
- (2).探討 DSF 在 K1 甲狀腺癌細胞中能否使 RB 的活性增加，進而影響 E2F1 結合到 Bmi1 啟動子的轉錄作用。

(四)材料與方法

細胞培養

K1 甲狀腺癌細胞株屬於，購自 European Collection of Cell Cultures (ECACC)，以含 10% 胎牛血清、1 μ M glutamate、1 μ M sodium pyruvate、100 μ g/ml penicillin/streptomycin 之 DMEM/F12 培養液於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱培養之。

DSF 配置

Disulfiram 以 DMSO 配置成 50mM 溶液保存於 -20°C，再以 DMSO 進一步稀釋成其他工作濃度。

IC₅₀ 檢測

將 K1 細胞以 1 \times 10⁴/well/100 μ l 的量種植入 96 孔微盤，處理以不同濃度的 DSF 進行培養 72 小時，隨後加入 WST-1(10 μ l/well)於 37°C 進行呈色反應，在 0.5 小時、1.5 小時、2.5 小時的時間點以盤式分光光度計量測波長 440nm 及 650nm 的讀值，利用 440nm-650nm 之數值以 GraFit 軟體計算出 IC₅₀ 濃度。

癌症球體培養

癌症球體(tumorsphere)培養為檢驗與分離癌症幹細胞的一種活性分析法，其方法為將

2x10⁴/ml 的 K1 細胞濃度以含生長因子(1X B27 supplement,10ng/ml EGF,10ng/ml bFGF,5µg/ml Insulin,1µg/ml Hydrocortisone,4µg/ml Heparin)之 DMEM/F12 培養基(含 1% methylcellulose), 於超低貼附培養盤中進行初代培養(Primary Sphere), 並處理 DSF(20nM、200nM)或 0.1%DMSO, 於第三天和第六天補充 500µl 含藥物及生長因子的培養液, 並於第七天數細胞並拍照紀錄之。

而二級球體(Secondary sphere)培養, 則是以 HyQTase 將初代球體分解成單細胞懸浮液後, 取 1×10⁴/ml 的初代球體細胞種回低貼附培養盤中, 依據初代球體培養方式進行培養, 並於第七天數細胞並拍照紀錄之。

定量 PCR

取每孔 1x10⁵ 的 K1 細胞種植至低附著性的 6 孔盤中, 以藥物濃度為 20nM、200nM 及控制組(0.1%DMSO)處理 48 小時後收下細胞備用, 之後以 Quick-RNATM MiniPrep Kit 進行 RNA 純化, 將取得的 RNA 測其濃度後, 以 RNAREvertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas) 進行反轉錄成 cDNA, 最後取濃度為 10ng/ul 的 cDNA, 以 KAPA SYBR FAST qPCR Kit 進行 qPCR。本研究將使用的引子序列如下:

BMI1

BMI1-F: AATCCCCACCTGATGTGTGT

BMI1-R: GCTGGTCTCCAGGTAACGAA

Oct4

Oct4-Q-F: GGTCCGAGTGTGGTTCTGTA

Oct4-Q-R: CGAGGAGTACAGTGCAGTGA

GUSB

GUSB-F: GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT

GUSB-R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA

MRPL19

MRPL19-F: GGGATTTGCATTCAGAGATCAG

MRPL19-R: GGAAGGGCATCTCGTAAAG

西方墨點法(Western blot)

取每孔 1x10⁵ 的 K1 細胞種植至低附著性的 6 孔盤中, 以藥物濃度為 20nM、200nM 及控制組(0.1%DMSO)處理 72 小時後收下細胞備用, 加入 25µl 細胞裂解液, 並以超音波細胞震碎器破碎細胞, 將得到的細胞蛋白液, 再定出蛋白的濃度, 每個樣品取 30µg 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 小時, 再以特異性一級抗體於 4°C反應過夜, 隔日以含過氧化酶之特異性二級抗體於室溫反應 1 小時, 經過適當清洗後, 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。

慢病毒感染

使用 12 孔盤做培養, 每 well 取 1x10⁵ 的細胞, 種植細胞即加入帶有 sh-Bmi1 或 Bmi1 基因的病毒液和 polybrene (8g/ml)進行培養, 感染 48 小時後, 移除含病毒液之培養基更換為一般的培養液, 再培養 24 小時後加入 puromycin (2g/ml)或 blastcidin S (10µg/ml) 進行篩選, 繼續增生之細胞即為成功感染的細胞, 建立剔除 Bmi1 基因或過度表現 Bmi1 之 K1 細胞株。

轉染

使用 Lipofectamine 3000 Reagent 轉染試劑, 取欲轉染質體 0.5µg 和適量轉染試劑於無

血清之培養液(如 Opti-MEM medium)混和，加入預先準備已培養於 6 孔盤中的 K1 細胞，加入前須更換為低血清以及無抗生素之培養液，反應 6 小時後更換為正常培養液，若欲轉染質提體有抗生素的基因，之後則可以使用適量抗生素篩選。

Luciferase Reporter Assay:

將細胞轉染 pMyc-Luc 以及 pR-Luc 反應 6 小時，後更換成一般培養液，並以藥物濃度為 20nM、200nM 及控制組(0.1%DMSO)處理 48 小時，之後吸掉培養盤的培養液後，以 50ul 1 X PLA(25nM Tris PH8.0、10% Triton x-100、15% glycerol)，刮取細胞後備用。每個樣品各取 10 μ l 與 50 μ l 的 Firefly luciferase substrate 和 50 μ l 的 Renilla luciferase substrate 均勻混合，之後測其吸光讀值，經過數值的比較可得知 C-myc 的轉錄活性是否有因藥物的處理而增減。

染色質免疫沉澱(Chromatin Immunoprecipitation)

以藥物濃度 200nM 及控制組(0.1% DMSO)於低貼覆性的方式培養，藥物處理 72 小時後收下細胞備用，將細胞回溶於 1ml PBS，接著加入 27 μ l 37% formaldehyde 室溫反應 10 分鐘固定細胞的 DNA-protein interaction，再來加入 103 μ l 10X glycine 終止反應。離心後吸掉上清液，接著每個 sample 加 500 μ l SDS Lysis buffer 其中包含 1X protease inhibitor，反應 10 分鐘後將 chromatin sonication 至適當片段大小，離心將細胞碎片去除後，將 sample 各別分成免疫沉澱(IP)與 beads control 與 input control，並以 ChIP Dilution buffer 補至 1 ml。IP 組加入欲看之 DNA-protein interaction 的抗體 4 $^{\circ}$ C Incubate overnight，隔天在 IP 組和 beads control 組加入 protein A magnetic beads 4 $^{\circ}$ C 處理 2 個小時，接著用不同的 wash buffer wash 每個 sample，最後以 elution buffer 解開抗體與 magnetic beads 的結合，後加入 8 μ l 5 M NaCl 65 $^{\circ}$ C overnight 解開 protein/DAN complexes。接著先後加入 RNase A 與 Proteinase K，得到最後 IP 到的產物，在以 PCR cleanup kit 來 purify DNA，最後以 KAPA SYBR FAST qPCR Kit 進行定量 PCR，來檢測預期 protein 會 binding 的 DNA 序列。本研究將使用的引子序列如下：

Bmi1-P-E2F1

Bmi1-P-E2F1-F: CCGGGGAGAAAGAAAGAACG

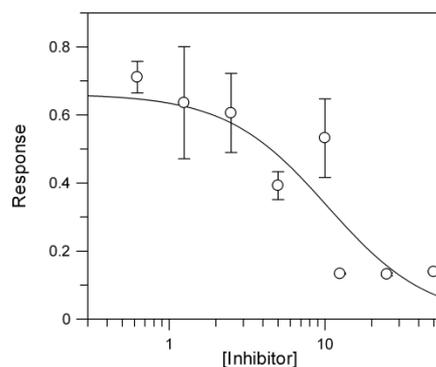
Bmi1-P-E2F1-R: CGGCCTGGGAATTAGTGTC

(五)結果

(1) DSF 對 K1 甲狀腺癌細胞增生的影響

最近發現 DSF 具有抑制乳癌幹細胞的功用，也與其他抗癌藥物有協同的作用，增加抗癌藥物對細胞的毒性，所以首先本實驗先檢測 DSF 對 K1 甲狀腺癌細胞增生作用的影響，找出抑制 50%細胞增生所需的最小濃度(IC₅₀)。透過 WST-1 細胞增生試劑檢測，我們發現 DSF 具有抑制 K1 甲狀腺癌細胞增生的效果，其 IC₅₀ 為 10.4 \pm 4.1 μ M (圖一)。

IC50 Data



| Parameter | Value | Std. Error |
|--------------|---------|------------|
| Y Range | 0.6624 | 0.0883 |
| IC 50 | 10.3843 | 4.0698 |
| Slope factor | 1.3374 | 0.5815 |

圖一. DSF 對 K1 甲狀腺癌細胞增生的影響。K1 細胞以 1×10^4 /格的細胞量種植於 96 孔盤中，並處理不同濃度的 DSF，於培養 72 小時後，利用 WST-1 細胞增生試劑量測細胞增生情況，並以 GraFit 軟體計算 IC50 數值。

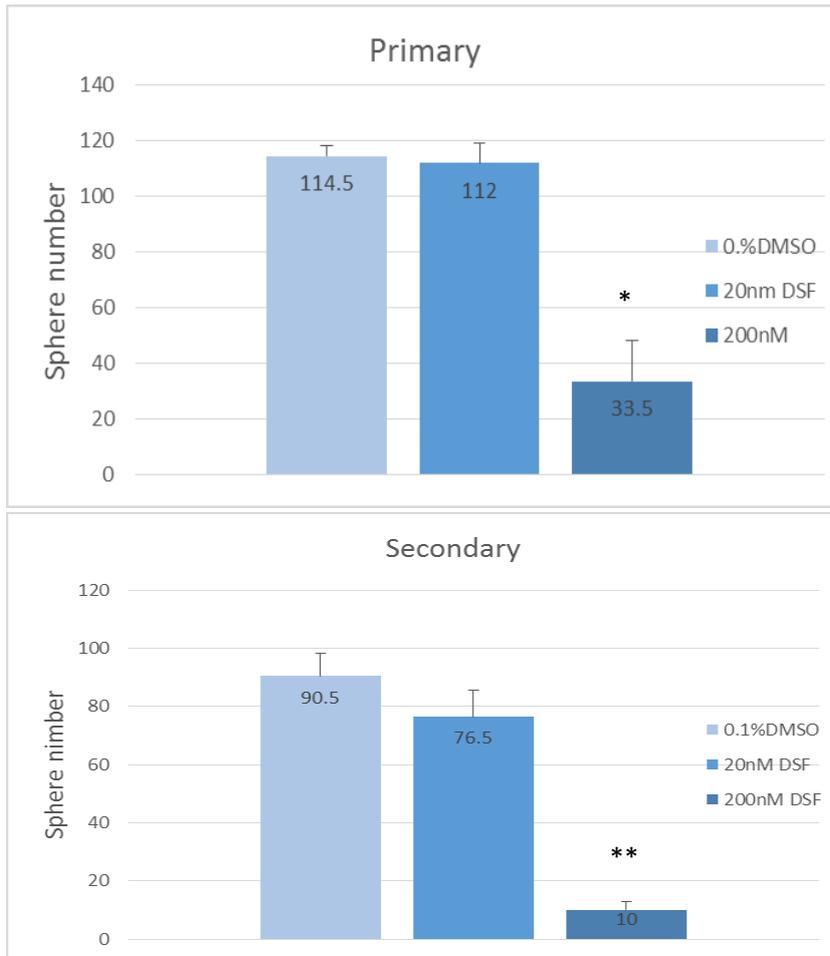
(2)DSF 對 K1 細胞形成癌症球體的影響

癌症球體細胞培養(Tumorsphere)是檢驗與分離癌症幹細胞的一種活性分析法 [11]，我們接著透過此方式分析 DSF 是否具抑制甲狀腺癌幹細胞自我更新的活性。由圖二的結果顯示，20 nM 的 DSF 略為抑制 K1 細胞形成甲狀腺癌症球體，而 200nM 的 DSF 則明顯的抑制甲狀腺癌幹細胞的球體形成能力，顯示 DSF 有抑制甲狀腺癌幹細胞自我更新的活性，而且有效作用濃度遠低於抑制細胞增生的 IC50 濃度。

A.

| | 0.1% DMSO | 20nM DSF | 200nM DSF |
|-----------|-----------|----------|-----------|
| Primary | | | |
| Secondary | | | |

B.



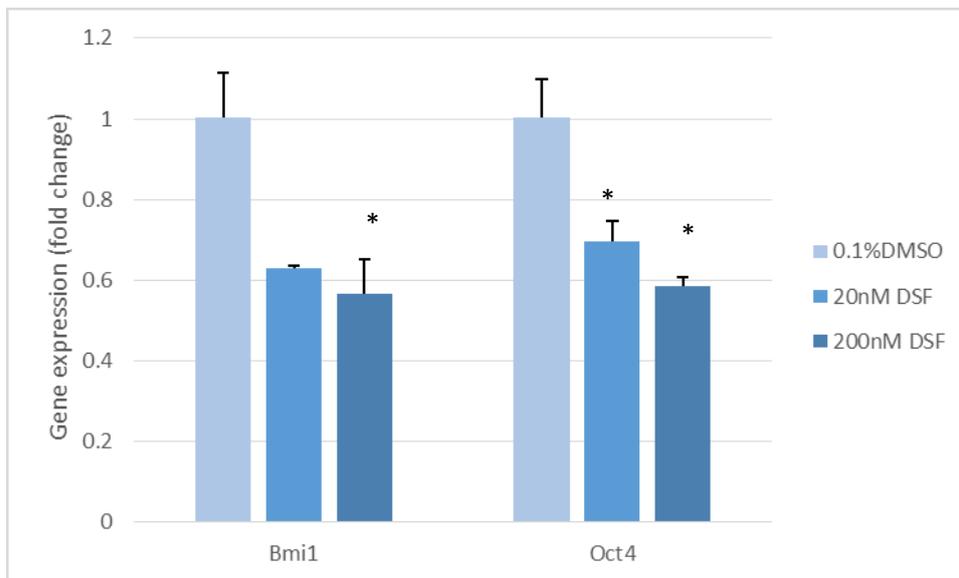
圖二.不同濃度的 DSF 對於甲狀腺癌 K1 細胞形成癌症球體的影響

A.以含 0.1% DMSO、20 nM、或 200 nM DSF 的培養基對 K1 細胞進行癌症球體培養，培養 7 天後以倒立式顯微鏡觀察、拍照並計算球體數目。

B. K1 甲狀腺癌球體數目的量化表，顯示 200 nM 之 DSF 可以有效抑制 K1 細胞形成癌症球體的能力。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

(3). DSF 能抑制癌症球體內 Bmi1、Oct4 等自我更新相關基因 mRNA 的表現

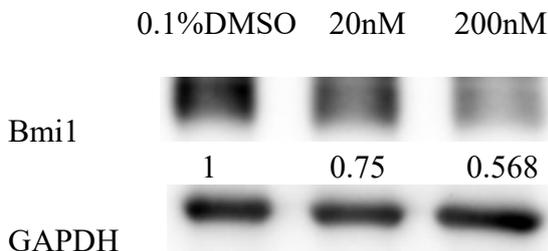
接著我們以定量 PCR 分析 DSF 對於自我更新相關基因的影響，結果如圖三，以濃度 20nM DSF 和 200nM DSF 處理 K1 甲狀腺癌球體細胞，可造成 Bmi1、Oct4 基因表現下降，推測 DSF 抑制 K1 甲狀腺癌細胞株內癌幹細胞的自我更新可能是透過抑制 Bmi1、Oct4 的表現。



圖三. DSF 對 K1 甲狀腺癌球體內 Bmi1 或 Oct4 基因表現的影響。癌球體細胞培養方式培養 K1 細胞，以不同濃度 DSF 進行處理 48 小時，並抽取總 RNA，以即時定量 PCR 進行 Bmi1 或 Oct4 基因之表現的檢測。*, $p < 0.05$ 。

(4).DSF 能抑制 K1 癌球體內 Bmi1 的蛋白表現

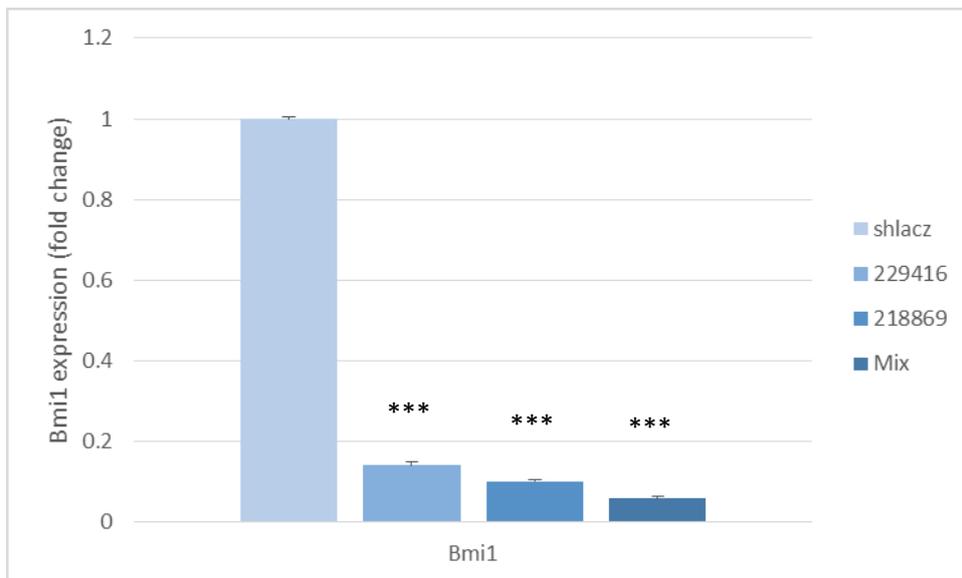
我們利用西方點墨法偵測 DSF 對 Bmi1 蛋白表現的影響，從圖四顯示 K1 球體細胞內的 Bmi1 蛋白量，在 DSF 處理之下有下降的情形，並呈現濃度依靠性。



圖四. DSF 對於 K1 癌球體細胞內 Bmi1 表現的影響。將 K1 細胞培養成癌球體後，以不同濃度的 DSF 處理 72 小時，並以西方點墨法分析 Bmi1 蛋白表現的情況。

(5).抑制 Bmi1 表現可降低甲狀腺癌幹細胞的自我更新

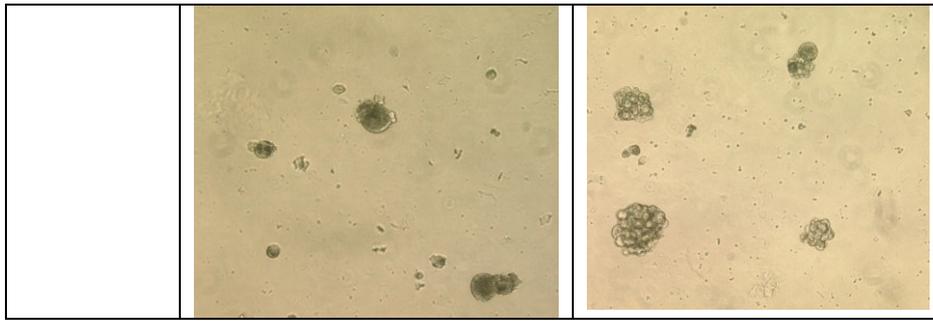
我們利用帶有 sh-Bmi1 之不同各慢病毒株(編號 229416 或 218869)或混合病毒(229416+218869)感染 K1 細胞，確實可以抑制之 Bmi1 表現 (圖五)。接著我們以癌球體培養分析 Bmi1 被抑制的 K1 細胞其癌幹細胞活性是否受到影響，結果發現，抑制 Bmi1 表現可明顯降低甲狀腺癌幹細胞的自我更新 (圖六)。



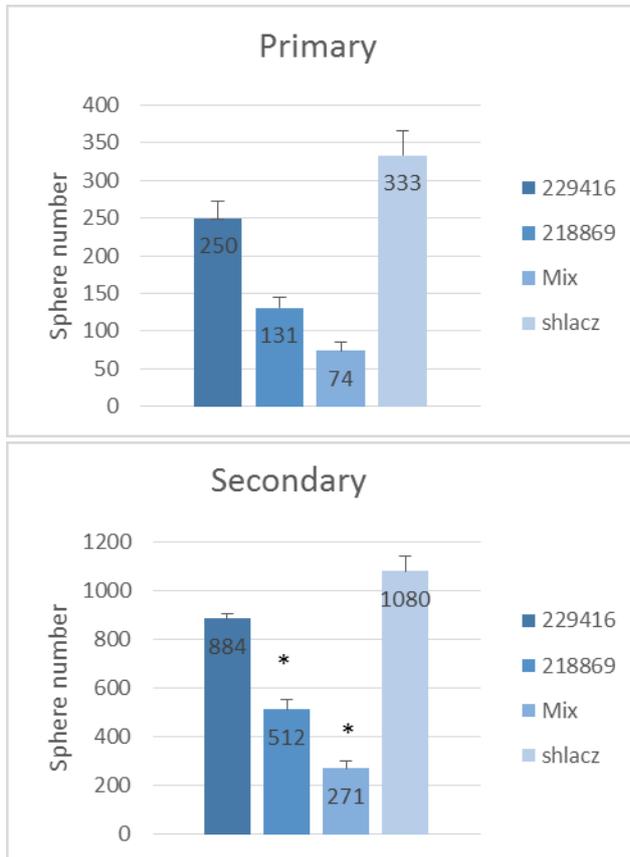
圖五.藉由定量 PCR 的方式來確認病毒是否有感染成功，以 GUSB 為對照組，Bmi1 確實明顯下降。*, p<0.05; **, p<0.01;***,p<0.001

A.

| | | |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | <u>229416</u> | <u>218869</u> |
| <u>Primary</u> | | |
| | <u>229416+218869</u> | <u>sh Lacz</u> |
| | | |
| <u>Secondary</u> | <u>229416</u> | <u>218869</u> |
| | | |
| | <u>229416+218869</u> | <u>sh Lacz</u> |
| | | |



B.



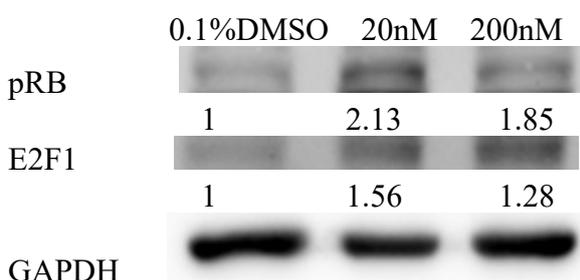
圖六.抑制 Bmi1 表現可降低甲狀腺癌幹細胞的自我更新。

A. 使用兩株帶有 sh-Bmi1 之病毒(229416 或 218869)或混合病毒(416+869)感染 K1 細胞後，以 puromycin 進行篩選成功感染的細胞，再以癌症球體培養方式分析癌幹細胞自我更新活性，培養 7 天後以顯微鏡觀察並計算球體數目。

B. 癌症球體數目的量化表，可以發現抑制 Bmi1 的表現會使球體的形成減少

(6) DSF 能提升 K1 癌症球體內 RB 的蛋白表現

有文獻指出，RB 可以抑制一些 pluripotency factor 來抑制腫瘤幹細胞[12]，且 RB 可以藉由抑制 E2F1 進入細胞核來影響 E2F1 的轉錄活性[13]。結果發現，經 DSF 處理的 K1 癌症球體，RB 蛋白的表現量有提升(圖七)。

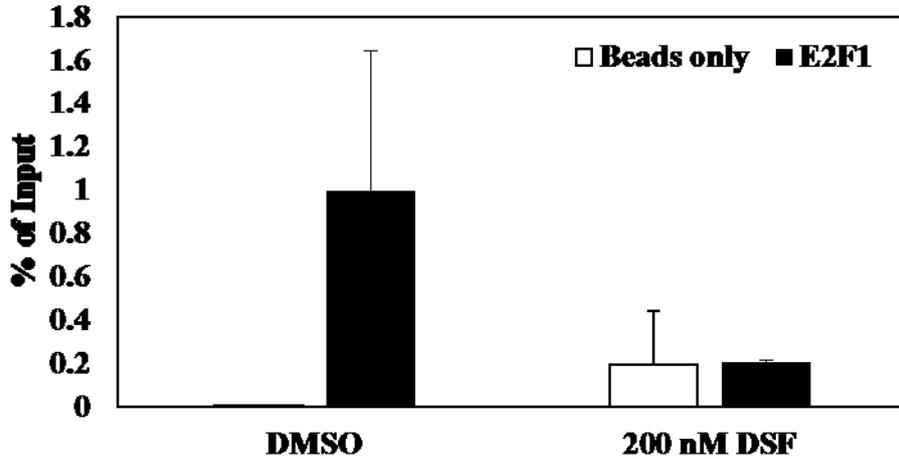


圖七. DSF 對於 K1 癌症球體細胞內 pRB 或 E2F1 表現的影響。將 K1 以不同濃度的

DSF 處理 72 小時，並以西方點墨法分析 pRB 或 E2F1 蛋白的表現。

(7) DSF 能抑制 K1 癌症球體內 E2F1 結合到 Bmi1 啟動子

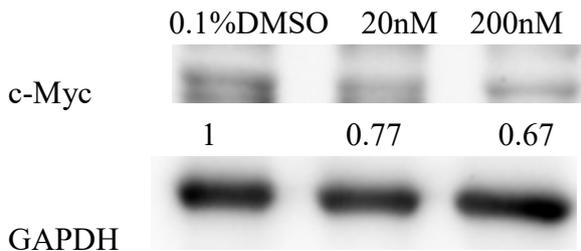
參考文獻提到，Bmi1 啟動子上有 E2F1 transcription factor 的結合位[14]，透過染色質沉澱法(Chromatin immunoprecipitation) 的實驗結果，我們發現 DSF 會使 E2F1 結合到 Bmi1 啟動子的狀況受到抑制(圖九)。



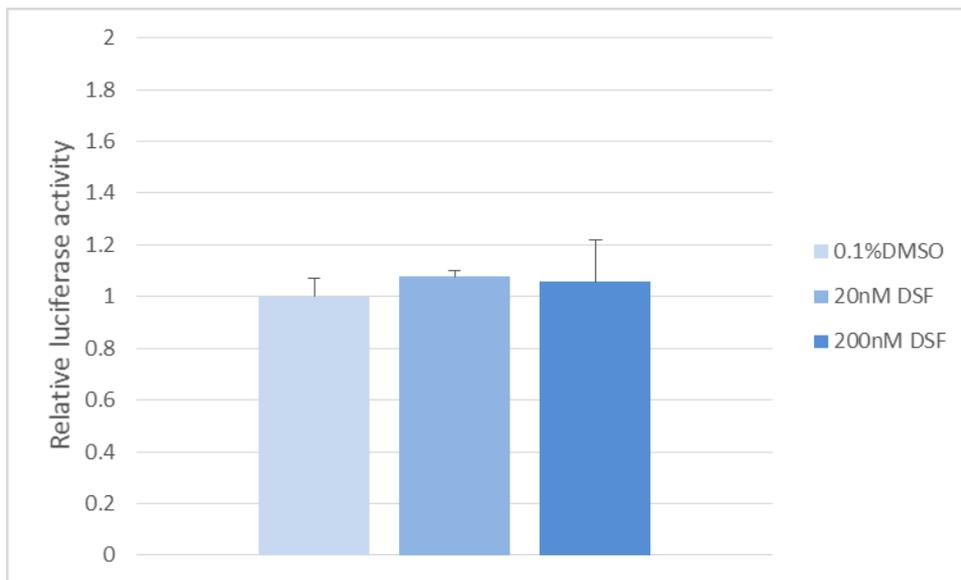
圖九. 將 K1 癌症球體以 200nM DSF 處理 72 小時，以 Chromatin immunoprecipitation 檢測 E2F1 結合至 Bmi1 啟動子的能力。

(8.) DSF 抑制 Bmi1 的表現量與 c-Myc 的調控無關

有研究指出 Bmi1 的轉錄會受到 c-Myc 的調控[1]，我們發現 DSF 可以抑制 c-myc 蛋白表現量(圖十)，但在 c-myc luciferase reporter assay 的實驗中，經 DSF 處理的 K1 細胞無法看到 c-myc 轉錄活性受抑制的現象(圖十一)。



圖十. DSF 對於 K1 癌症球體細胞內 c-Myc 表現的影響。將 K1 癌症球體細胞以不同濃度的 DSF 處理 72 小時，並以西方點墨法分析 c-Myc 蛋白表現的情況。



圖十一. DSF 對於甲狀腺癌細胞內 c-myc 轉錄活性並無影響。K1 細胞以 c-myc reporter 質體轉染 24 小時，再經 DSF 處理 72 小時，收集細胞裂解液，以 Firefly luciferase substrate 檢測 c-myc 轉錄活性。

(六) 討論

甲狀腺癌是國內常見的內分泌性腫瘤，其中女性的發生率是男性的 3.25 倍，名列女性第五大癌症。腫瘤的發生始於癌幹細胞，癌幹細胞具有幹細胞特性，擁有自我更新、細胞分化的能力；若能有效地針對癌幹細胞做治療，肯定能帶來一大福祉。

在本實驗，首先發現 DSF 不僅能夠抑制甲狀腺癌 K1 細胞的生長；利用癌症球體的培養方式，也能觀察到 DSF 抑制甲狀腺癌幹細胞自我更新的能力。接著，以 DSF 處理過的甲狀腺癌幹細胞，Bmi1 的 mRNA 或是蛋白表現量皆有下降。為了更進一步探討 Bmi1 在甲狀腺癌所扮演的角色，我們以帶有 sh-Bmi1 的慢病毒 knockdown K1 細胞，再用癌症球體的培養方式檢測癌幹細胞自我更新的能力，結果顯示抑制 Bmi1 表現可以明顯降低甲狀腺癌幹細胞的自我更新。

接著我們要找出 DSF 抑制 Bmi1 表現量的分子機制，參考文獻提到 Bmi1 的啟動子上有 E2F1 transcription factor 的結合位[14]，在 Chromatin immunoprecipitation 實驗中，經 DSF 處理的甲狀腺癌癌症球體細胞內，E2F1 結合到 Bmi1 啟動子的狀況被抑制；更者我們發現 DSF 能夠使 K1 癌症球體的 RB 蛋白表現量上升，所以 DSF 使 Bmi1 表現量下降的原因，可能是因為 RB 蛋白的增加，抑制 E2F1 進入細胞核內，導致 E2F1 減少與 Bmi1 啟動子的結合，使得 Bmi1 的表現量下降，進而抑制甲狀腺癌球體的形成(抑制自我更新)。

有研究指出 Bmi1 的轉錄會受到 c-myc 的調控[1]，雖然我們發現 DSF 會抑制 c-myc 蛋白表現，但在 luciferase reporter assay 實驗中，卻沒有觀察到轉錄活性受到影響，可能表示 DSF 只影響細胞質中的 c-myc 含量，並沒有抑制 c-myc 進入細胞核內，或是抑制 c-myc 的程度不足以影響其轉錄活性，所以 DSF 抑制甲狀腺癌 Bmi1 表現的原因並非透過 c-myc 調控。

在造血幹細胞中[15]，Bmi1 的表現能夠抑制 p16，由於 p16 被抑制使得 cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)/CDK6 complex 不受抑制，(CDK4)/CDK6 complex 的活化讓 RB 蛋白被磷酸化進而降解，E2F1 被釋放使細胞進入 S phase，使造血幹細

胞能進行自我更新的增生。在我們的實驗中發現 DSF 會去抑制甲狀腺癌幹細胞內 Bmi1 的表現，我們猜測 DSF 在抑制 Bmi1 後，或能造成 p16 表現增加，導致 RB 蛋白抑制 E2F1 進入細胞核，再持續抑制 Bmi1 的表現，形成一個抑制的正向回饋(positive feedback)路徑達到抑制甲狀腺癌幹細胞自我更新的效果。

(七)參考文獻

1. Wang HB, Liu GH, Zhang H, Xing S, Hu LJ, Zhao WF, Xie B, Li MZ, Zeng BH, Li Y, Zeng MS. **Sp1 and c-Myc regulate transcription of BMI1 in nasopharyngeal carcinoma.** FEBS J. 2013. 280(12):2929-44.
2. Regan PL, Jacobs J, Wang G, Torres J, Edo R, Friedmann J, Tang XX. **Hsp90 inhibition increases p53 expression and destabilizes MYCN and MYC in neuroblastoma.** Int J Oncol. 2011. 38(1):105-12.
3. Gao YJ, Li B, Wu XY, Cui J, Han JK. **Thyroid tumor-initiating cells: increasing evidence and opportunities for anticancer therapy (review).** Oncol Rep. 2014. 31(3):1035-42.
4. Borah A, Raveendran S, Rochani A, Maekawa T, Kumar DS. **Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy.** Oncogenesis. 2015. 4:e177.
5. Rosato V, Abenavoli L, Federico A, Masarone M, Persico M. **Pharmacotherapy of alcoholic liver disease in clinical practice.** Int J Clin Pract. 2016. 70(2):119-31.
6. Triscott J, Rose Pambid M, Dunn SE. Concise review: bullseye: **targeting cancer stem cells to improve the treatment of gliomas by repurposing disulfiram.** Stem Cells. 2015. 33(4):1042-6.
7. Han D, Wu G, Chang C, Zhu F, Xiao Y, Li Q, Zhang T, Zhang L. **Disulfiram inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and stem-like features in breast cancer via ERK/NF- κ B/Snail pathway.** Oncotarget. 2015. 6(38):40907-19.
8. Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, Jiang W, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. **Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells.** Br J Cancer. 2013. 109(7):1876-85
9. Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S, Kannappan V, Armesilla AL, Xu B, Cassidy J, Darling JL, Wang W. **Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties.** Br J Cancer. 2011. 104(10):1564-74.
10. Zhu D, Wan X, Huang H, Chen X, Liang W, Zhao F, Lin T, Han J, Xie W. **Knockdown of Bmi1 inhibits the stemness properties and tumorigenicity of human bladder cancer stem cell-like side population cells.** Oncol Rep. 2014. 31(2):727-36.
11. Lee CH, Yu CC, Wang BY, Chang WW. **Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs.** Oncotarget. 2015. doi: 10.18632/oncotarget.6261.
12. Michael S. Kareta, Laura L. Gorges, Sana Hafeez, Be' re' nice A. Benayoun, Samuele Marro, Anne-Flore Zmoos, Matthew J. Cecchini, Damek Spacek, Luis F.Z. Batista, Megan O'Brien, Yi-Han Ng, Cheen Euong Ang, Dedeepya Vaka, Steven E. Artandi, Frederick A. Dick, Anne Brunet, Julien Sage, and Marius Wernig. **Inhibition of Pluripotency Networks by the Rb Tumor Suppressor Restricts Reprogramming and Tumorigenesis.** Cell stem cell. 2015 Jan 8;16:39-50
13. Joseph R. Nevins. **The RB/E2F pathway and cancer.** Human Molecular Genetics. 2001 Jan 22. Vol. 10 NO.7 699-703
14. Katrin Nowak, Kornelius Kerl, Daniel Fehr, Christoph Kramps, Christine Gessner, Katrin Killmer, Birgit Samans, Bernd Berwanger, Holger Christiansen I and Werner Lutz. **BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas.**

Nucleic Acids Research .2006 Mar 31. Vol. 34, No. 6 1745–1754 doi:10.1093/nar/gk
15. Brian P. Sorrentino. **Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells.**
Nature Reviews Immunology 4, 878-888 (November 2004) | doi:10.1038/nri1487