

# 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 $\mu$ M glutamate、1 $\mu$ M sodium pyruvate、100 $\mu$ g/ml penicillin/streptomycin 之 DMEM/F12 培養液於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 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。

#### IC<sub>50</sub> 檢測

將 K1 細胞以 1 $\times$ 10<sup>4</sup>/well/100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 IC<sub>50</sub> 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

2x10<sup>4</sup>/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 1×10<sup>4</sup>/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 1x10<sup>5</sup> 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: GGAAGGGCATCTCGTAAG

### 西方墨點法(Western blot)

取每孔 1x10<sup>5</sup> 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 1x10<sup>5</sup> 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 $\mu$ l 與 50 $\mu$ l 的 Firefly luciferase substrate 和 50 $\mu$ 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  $\mu$ l 37% formaldehyde 室溫反應 10 分鐘固定細胞的 DNA-protein interaction，再來加入 103 $\mu$ l 10X glycine 終止反應。離心後吸掉上清液，接著每個 sample 加 500  $\mu$ 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°C Incubate overnight，隔天在 IP 組和 beads control 組加入 protein A magnetic beads 4°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 $\mu$ l 5 M NaCl 65°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

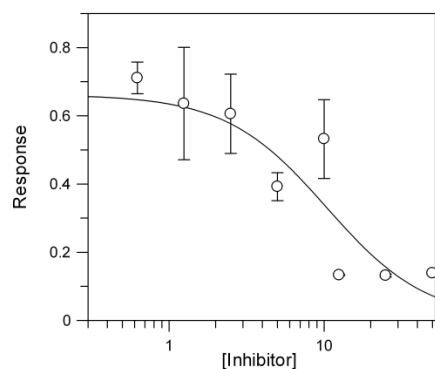
Bmi1-P-E2F1-R: CGGCCTGGGAATTAGTGTC

## **(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(IC<sub>50</sub>)。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 IC<sub>50</sub> 為 10.4  $\pm$  4.1  $\mu$ 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  $1 \times 10^4$ /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。

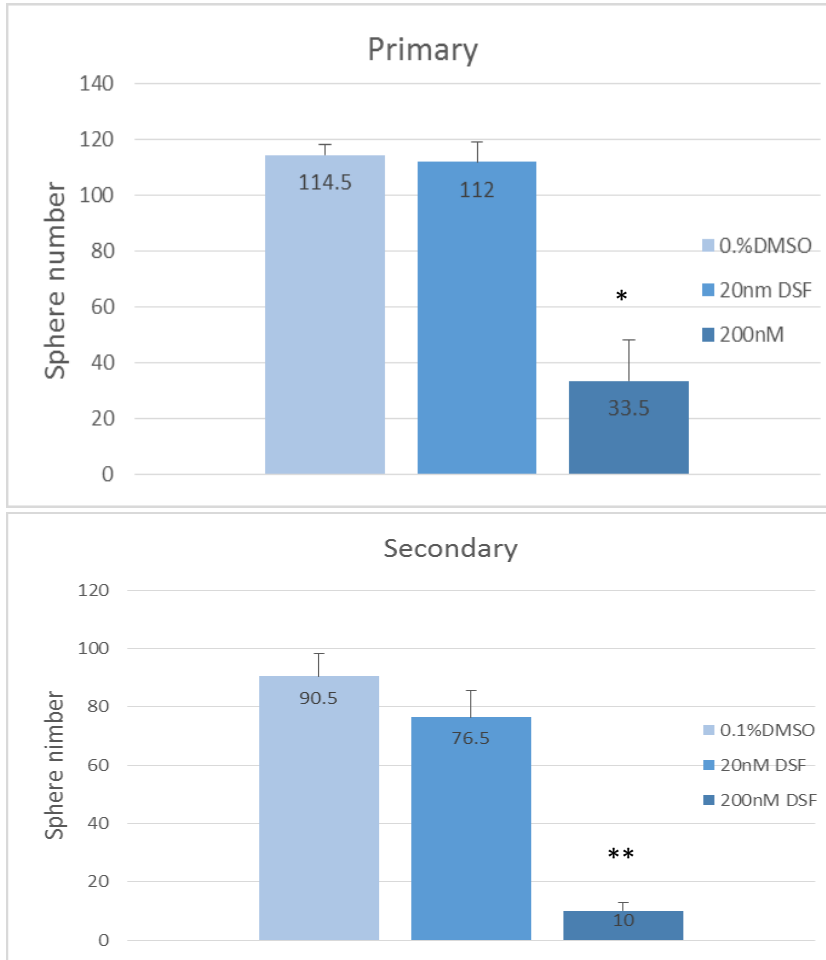
(2)DSF 對 K1 細胞形成癌症球體的影響

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.



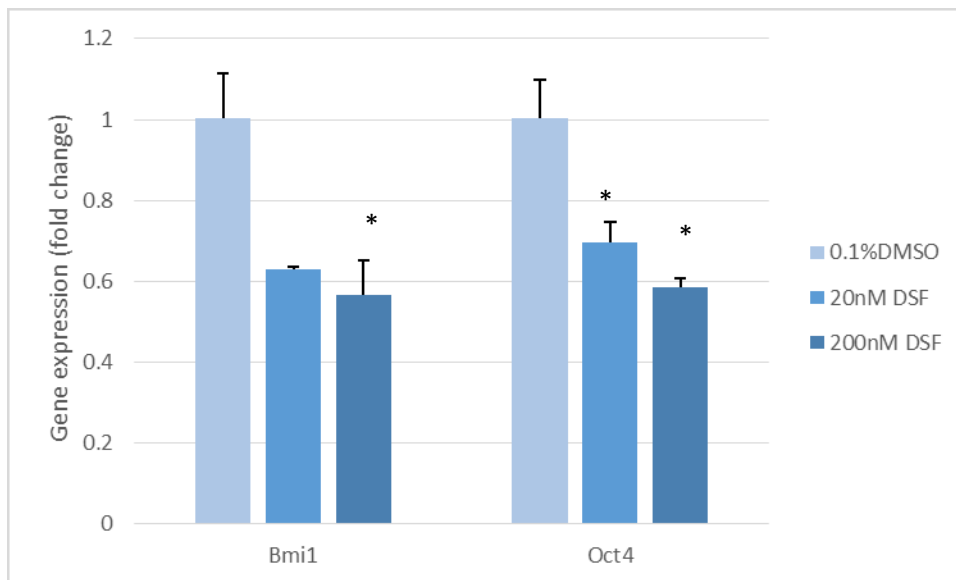
圖二.不同濃度的 DSF 對於甲狀腺癌 K1 細胞形成癌症球體的影響

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

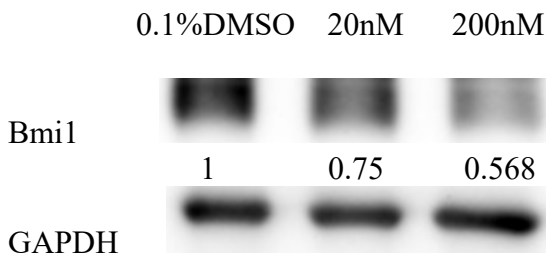
接著我們以定量 PCR 分析 DSF 對於自我更新相關基因的影響，結果如圖三，以濃度 20nM DSF 和 200nM DSF 處理 K1 甲狀腺癌球體細胞，可造成 Bmi1、Oct4 基因表現下降，推測 DSF 抑制 K1 甲狀腺癌細胞株內癌幹細胞的自我更新可能是透過抑制 Bmi1、Oct4 的表現。



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。

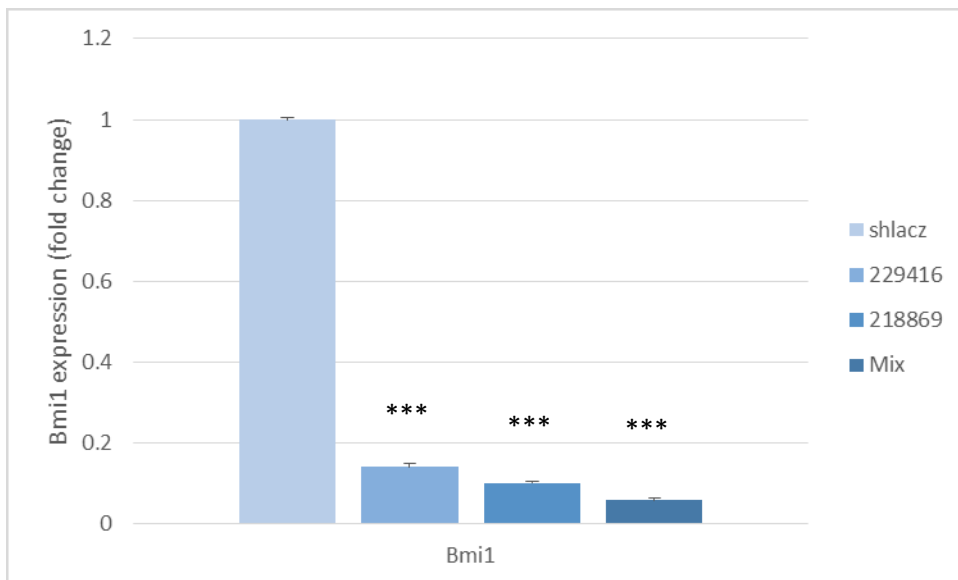


圖四. DSF 對於 K1 癌球體細胞內 Bmi1 表現的影響。將 K1 細胞培養成癌球體後，以不同濃度的 DSF 處理 72 小時，並以西方點墨法分析 Bmi1 蛋白表現的情況。

#### (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)。

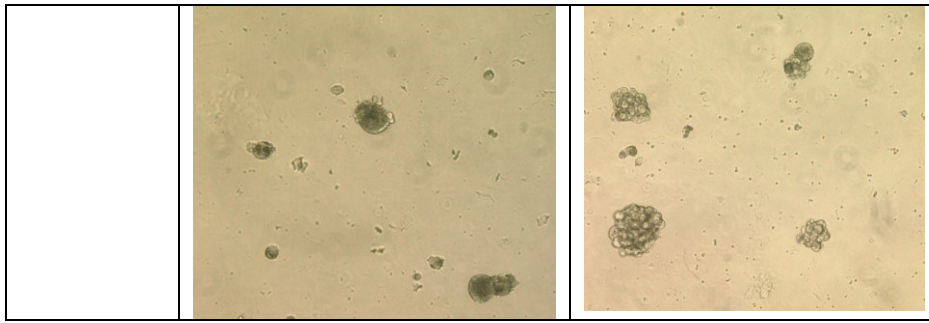




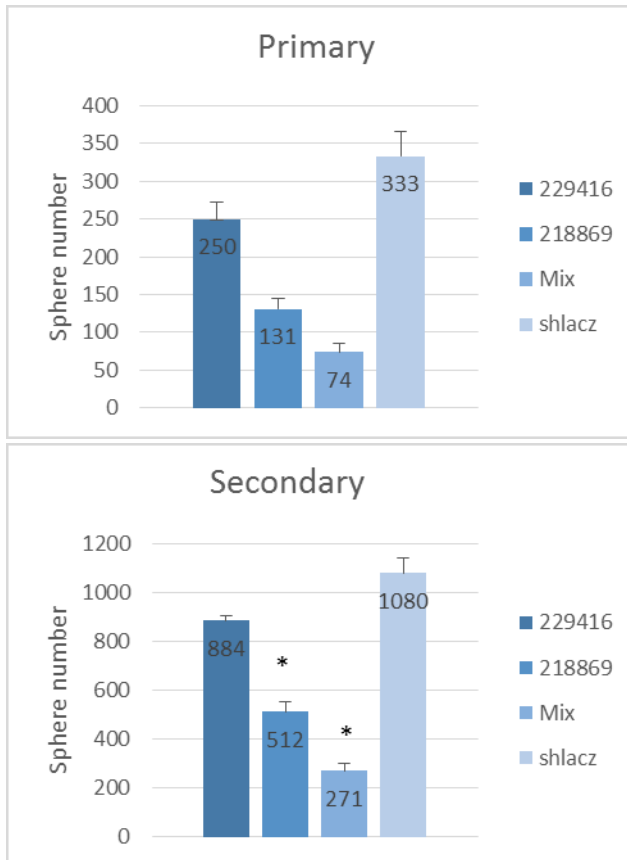
圖五.藉由定量 PCR 的方式來確認病毒是否有感染成功，以 GUSB 為對照組，Bmi1 確實明顯下降。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

A.

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



B.



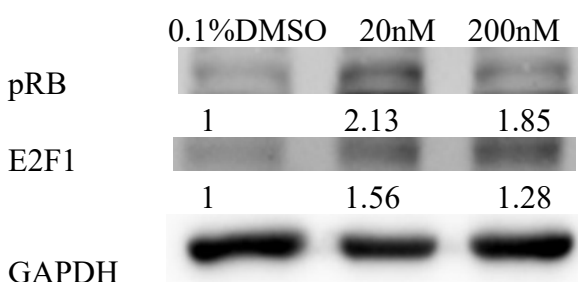
圖六.抑制 Bmi1 表現可降低甲狀腺癌幹細胞的自我更新。

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)。

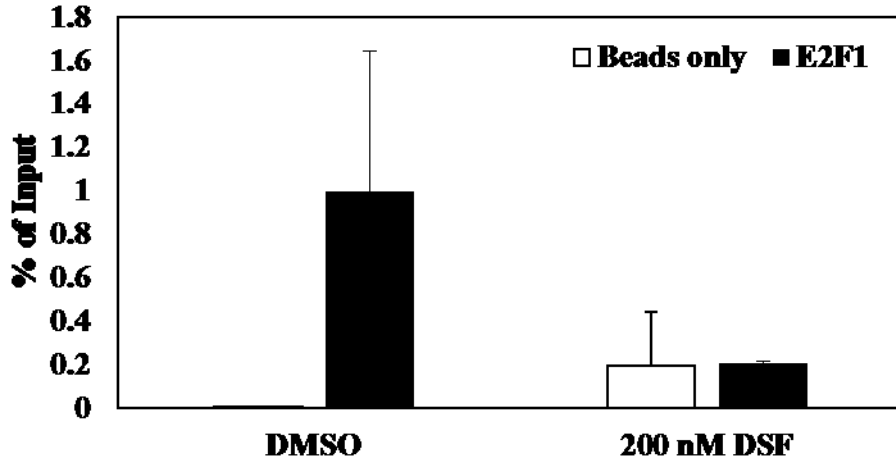


圖七. DSF 對於 K1 癌症球體細胞內 pRB 或 E2F1 表現的影響。將 K1 以不同濃度的

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

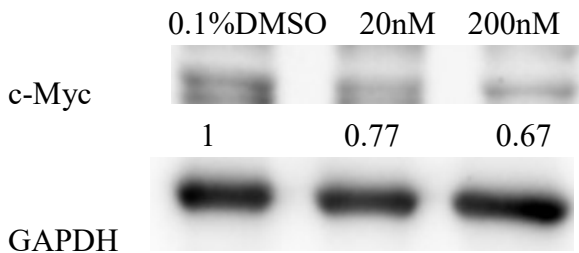
參考文獻提到，Bmi1 啟動子上有 E2F1 transcription factor 的結合位[14]，透過染色質沉澱法(Chromatin immunoprecipitation) 的實驗結果，我們發現 DSF 會使 E2F1 結合到 Bmi1 啟動子的狀況受到抑制(圖九)。



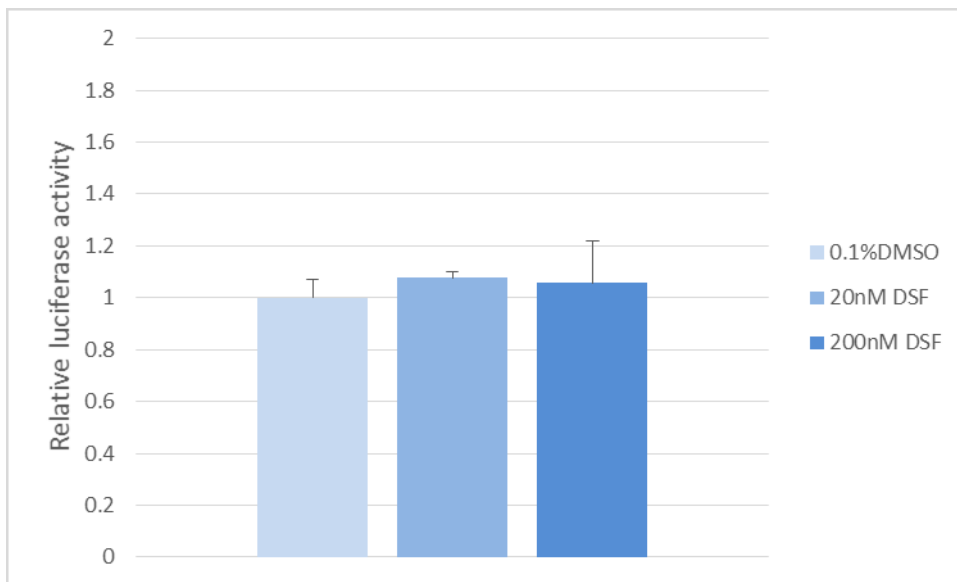
圖九. 將 K1 癌症球體以 200nM DSF 處理 72 小時，以 Chromatin immunoprecipitation 檢測 E2F1 結合至 Bmi1 啟動子的能力。

(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- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and stem-like features in breast cancer via ERK/NF- $\kappa$ 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 $\kappa$ 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