

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

抑制 RAS/ROCK 及 mTOR 對於馬兜鈴酸促進人體膀胱癌轉移  
及侵襲的治療角色

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 101-2314-B-040-003-  
執行期間：101年08月01日至102年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：張滋榮  
共同主持人：黃惠珮

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年10月30日

中文摘要：馬兜鈴酸(aristolochic acid, AA)不但具腎毒性，且會導致泌尿細胞癌(urothelial carcinoma)，2002年 Mutagenesis 雜誌報導 AA 之致癌機轉，可能與活化 H-ras 致癌基因及 p53 的加強表達有關。我們於 2006 年發表 AA 導致大鼠膀胱上皮增生及其細胞傳遞路徑論文。又於 2010 年發表膀胱癌組織之 Ras, PI3K, Akt, RhoA 表現增加且 Ras overexpression 會造成癌細胞 cytoskeleton F-actin 表現增加；若以 Ras/ROCK 抑制劑 Y27632 治療，則 cytoskeleton F-actin 表現可被抑制。我們又於 2011 年發表 AA 促進膀胱癌細胞 (TSGH) 轉移及侵襲的細胞及動物模式。此外，由於最近文獻認為，mTOR 抑制劑可以抑制原發性泌尿癌細胞生長。然而，膀胱癌其實是相當異質化且成因機轉很多，對於長期因 AA 所導致的膀胱癌而言，是否仍對 mTOR 抑制劑有療效，這點令人存疑？

本計畫擬探討人類膀胱癌細胞株分期和 RAS/ROCK 及 mTOR 表現的關係，及抑制劑的使用以確認不同人類膀胱癌細胞株分期和 Ras、mTOR 表現關係；結果可知，不同膀胱癌細胞，可分為走 mTOR 或 Ras 路徑，分別利用 RAS/ROCK 及 mTOR 抑制劑，可減少膀胱癌細胞增生移行的現象，若使用錯誤抑制劑，則無法達到抑制效果。本計畫結果證實，若正確抑制其作用途徑，應可有效治療疾病，並減少錯誤用藥及無效治療。

中文關鍵詞：膀胱癌、Ras/ROCK 抑制劑(Y27632)、mTOR 抑制劑、移行

英文摘要：Aristolochic acid (AA) is with nephrotoxicity and carcinogenicity predisposing to urothelial carcinoma. The postulated mechanisms of AA-associated urothelial carcinogenesis have been reported to be associated with H-ras oncogene activation and increased expression of p53. In 2006, we reported AA could induce urothelial proliferation in rats and the associated signal transduction. In 2010, we published the tissues of idiopathic bladder cancer were with increased expressions of Ras, PI3K, Akt, RhoA which led to increased expression of cytoskeleton F-actin. This increased expression of F-actin could be inhibited by ROCK inhibitor Y27632. In 2011, we published AA could induce invasion and migration of the bladder cancer TSGH cells in vitro and in vivo. Additionally, recent literature has reported that

mTOR inhibitor could inhibit the growth of idiopathic bladder cancer. However, the underlying mechanisms of bladder cancer are actually heterogeneous. Whether AA-associated bladder cancer is response to mTOR inhibitor treatment, it needs more studies to clarify.

In this project, we investigate the relationship between tumor stage and the expressions of RAS/ROCK and mTOR in five of various human urothelial cells. By using Y27632 or everolimus, we clarify the signal transduction of proliferative pathways and/or metastatic pathways of different cell lines. After treatment with mTOR inhibitor to T24 cell regulated by mTOR and the migration and proliferation of the cells were decreased, whereas Y27632 was no effect of inhibiting migration on T24 cells. On the other hand, Y27632 reduces the TSGH cells migration and proliferation via Ras related pathways, and everolimus did not inhibit the migration and proliferation of TSGH cells. In conclusion, if we clarify aforementioned pathways of the bladder cancer cell and use mTOR inhibitor and Ras/ROCK inhibitor to different patients, it will attenuate the cancer cells migration and inhibit the wrong medicine useage.

英文關鍵詞： Bladder cancer, Ras/ROCK inhibitor, mTOR inhibitor, migration

行政院國家科學委員會補助專題  
研究計畫

期中進度報  
告  
期末報告

(計畫名稱)

抑制 RAS/ROCK 及 mTOR 對於馬兜鈴酸促進人體膀胱癌轉移及侵襲的治療角色

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2314-B-040 -003

執行期間：101 年 08 月 01 日至 102 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：張滋榮

共同主持人：黃惠珮

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 \_0 份：

- 移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可

公開查詢

中 華 民 國 年 月 日

## 二、中英文摘要及關鍵詞 (keywords)

中文摘要：

馬兜鈴酸(aristolochic acid, AA)不但具腎毒性，且會導致泌尿細胞癌(urothelial carcinoma)，2002年 Mutagenesis 雜誌報導 AA 之致癌機轉，可能與活化 H-ras 致癌基因及 p53 的加強表達有關。我們於 2006 年發表 AA 導致大鼠膀胱上皮增生及其細胞傳遞路徑論文。又於 2010 年發表膀胱癌組織之 Ras, PI3K, Akt, RhoA 表現增加且 Ras overexpression 會造成癌細胞 cytoskeleton F-actin 表現增加；若以 Ras/ROCK 抑制劑 Y27632 治療，則 cytoskeleton F-actin 表現可被抑制。我們又於 2011 年發表 AA 促進膀胱癌細胞(TSGH)轉移及侵襲的細胞及動物模式。此外，由於最近文獻認為，mTOR 抑制劑可以抑制原發性泌尿癌細胞生長。然而，膀胱癌其實是相當異質化且成因機轉很多，對於長期因 AA 所導致的膀胱癌而言，是否仍對 mTOR 抑制劑有療效，這點令人存疑？

本計畫擬探討人類膀胱癌細胞株分期和 RAS/ROCK 及 mTOR 表現的關係，及抑制劑的使用以確認不同人類膀胱癌細胞株分期和 Ras、mTOR 表現關係；結果可知，不同膀胱癌細胞，可分為走 mTOR 或 Ras 路徑，分別利用 RAS/ROCK 及 mTOR 抑制劑，可減少膀胱癌細胞增生移行的現象，若使用錯誤抑制劑，則無法達到抑制效果。本計畫結果證實，若正確抑制其作用途徑，應可有效治療疾病，並減少錯誤用藥及無效治療。

關鍵字：膀胱癌、Ras/ROCK 抑制劑(Y27632)、mTOR 抑制劑、移行

Abstract:

Aristolochic acid (AA) is with nephrotoxicity and carcinogenicity predisposing to urothelial carcinoma. The postulated mechanisms of AA-associated urothelial carcinogenesis have been reported to be associated with H-ras oncogene activation and increased expression of p53. In 2006, we reported AA could induce urothelial proliferation in rats and the associated signal transduction. In 2010, we published the tissues of idiopathic bladder cancer were with increased expressions of Ras, PI3K, Akt, RhoA which led to increased expression of cytoskeleton F-actin. This increased expression of F-actin could be inhibited by ROCK inhibitor Y27632. In 2011, we published AA could induce invasion and migration of the bladder cancer TSGH cells in vitro and in vivo. Additionally, recent literature has reported that mTOR inhibitor could inhibit the growth of idiopathic bladder cancer. However, the underlying mechanisms of bladder cancer are actually heterogeneous. Whether AA-associated bladder cancer is response to mTOR inhibitor treatment, it needs more studies to clarify.

In this project, we investigate the relationship between tumor stage and the expressions of RAS/ROCK and mTOR in five of various human urothelial cells. By using Y27632 or everolimus, we clarify the signal transduction of proliferative pathways and/or metastatic pathways of different cell lines. After treatment with mTOR inhibitor to T24 cell regulated by mTOR and the migration and proliferation of the cells were decreased, whereas Y27632 was no effect of inhibiting migration on T24 cells. On the other hand, Y27632 reduces the TSGH cells migration and proliferation via Ras related pathways, and everolimus did not inhibit the migration and proliferation of TSGH cells. In conclusion, if we clarify aforementioned pathways of the bladder cancer cell and use mTOR inhibitor and Ras/ROCK inhibitor to different patients, it will attenuate the cancer cells migration and inhibit the wrong medicine useage.

Keywords: Bladder cancer, Ras/ROCK inhibitor, mTOR inhibitor, migration

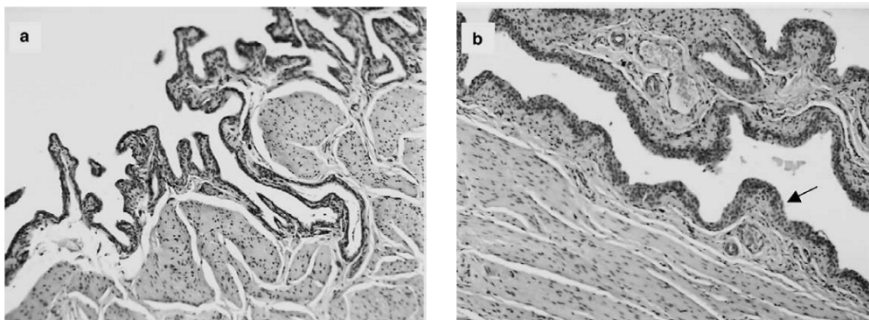
三、報告內容：包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）等。

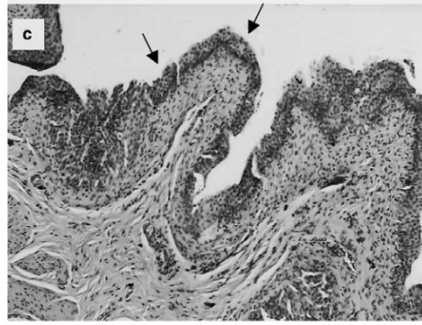
### (一)、前言

#### 【I】馬兜鈴酸與泌尿細胞癌的關聯

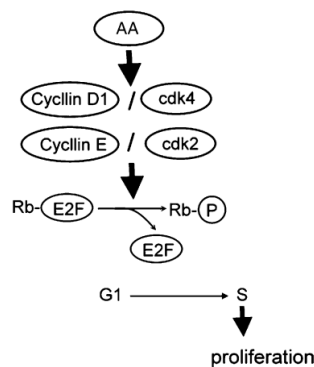
馬兜鈴酸一般指馬兜鈴酸-I (AA-I)，學名為 3, 4-亞甲二氧基-8-甲氧基-10-硝基-1-菲羧酸。分子式  $C_{16}H_9O_7N$ ，是從 *Aristolochia* 植物 (*Aristolochia species*) 所分離出來的 nitrophenanthrene 衍生物，傳統醫學上應用於鎮痛，消炎及利尿。若長期服用會引起腎衰竭[1]及膀胱癌[2]。早期的馬兜鈴酸毒理研究已證實馬兜鈴酸可誘發腎病變[3-4]。臨床上，中藥腎病變自西元 1993 年，比利時醫師 Vanherweghem 在 *Lancet* 雜誌上發表，敘述在一群服用含中藥 (Chinese herbs) 減肥藥的女性減重患者中發現造成快速進行性腎衰竭 (rapidly progressive renal fibrosis)，這種腎病變該作者稱之為中藥腎病變 (Chinese-herb nephropathy) [1, 5]。此後，很多國家包括西班牙，法國，英國和台灣都陸續發表了馬兜鈴酸腎病變的臨床病例報告[6-10]。馬兜鈴酸所引發的腎病變，主要是造成腎間質快速進行性纖維化，接近腎皮質部位更為明顯，但腎臟間質的細胞浸潤不明顯，而腎絲球則是相對較為完好。由於代謝緩慢，馬兜鈴酸容易於腎臟蓄積，造成腎絲球體及腎細胞間質纖維化，引起腎衰竭，患者需長期透析治療或是腎臟移植。

馬兜鈴酸被認為不但具有腎毒性 (nephrotoxicity)，而且具有致癌傾向 (carcinogenicity)，在致癌傾向方面主要是造成尿路系統的移行細胞癌 (urothelial carcinoma or transitional cell carcinoma) [2]。馬兜鈴酸已被證實有基因毒性 (genotoxic mutagen) [11-12]，不論是對於老鼠 (rats) [13-16] 或人類都是強力的致癌物質 (potent carcinogen) [2, 17]，而本研究團隊於 2006 年發表馬兜鈴酸導致 Wistar rats 膀胱上皮增生及其細胞傳遞路徑論文[18](圖一、圖二)。





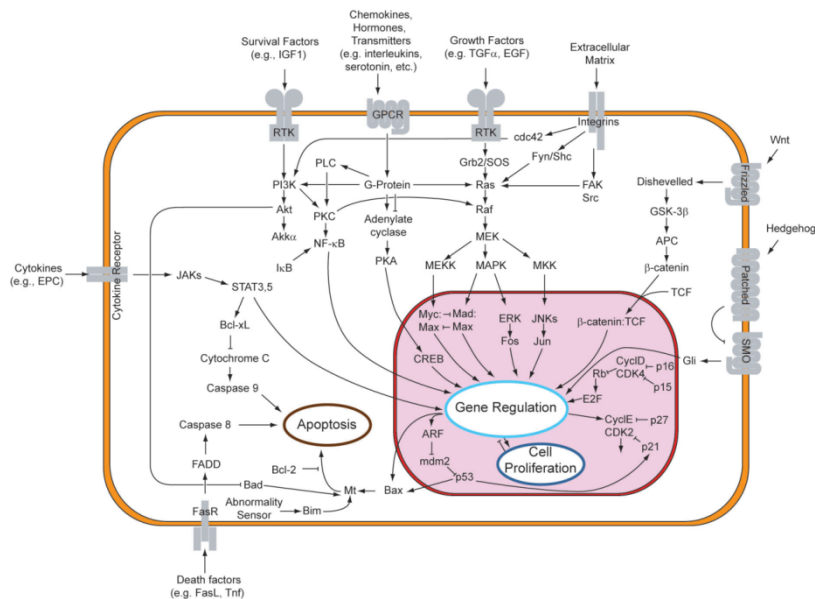
圖一. Section of bladder urothelium (panel A) and renal pelvis urothelium (panel B) from a normal rat (a) and those treated with aristolochic acid 5 mg/kg (b) or 10 mg/kg (c) for 12 weeks, showing urothelial dose-dependent proliferation (single arrow and double arrows) (Hematoxylin and eosin, X100). [Chang HR(張滋榮) et al. Food Chem Toxicol. 2006;44:28-35.]



圖二.上圖所示馬兜鈴酸造成膀胱上皮增生細胞訊息機轉 Proposed model for the induction of urothelial proliferation in rats caused by aristolochic acid through cell cycle progression via activation of cyclin D<sub>1</sub>/cdk4 and cyclin E/cdk2. [Chang HR (張滋榮) et al. Food Chem Toxicol. 2006;44:28-35.]

## 【II】 Ras and Rho family

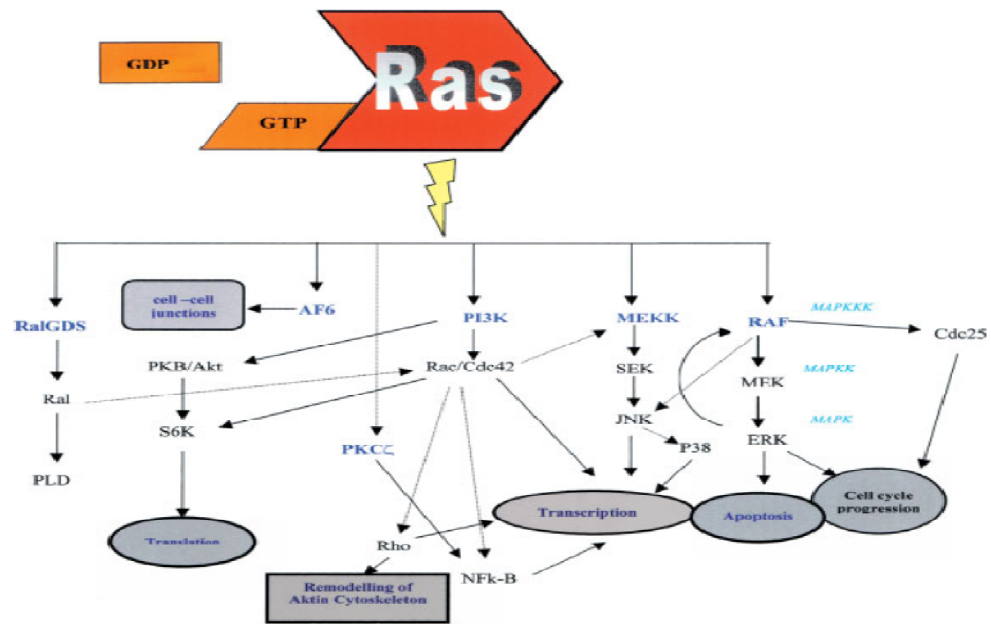
### 1. Ras and Rho family :



圖三： Ras 調控之細胞反應

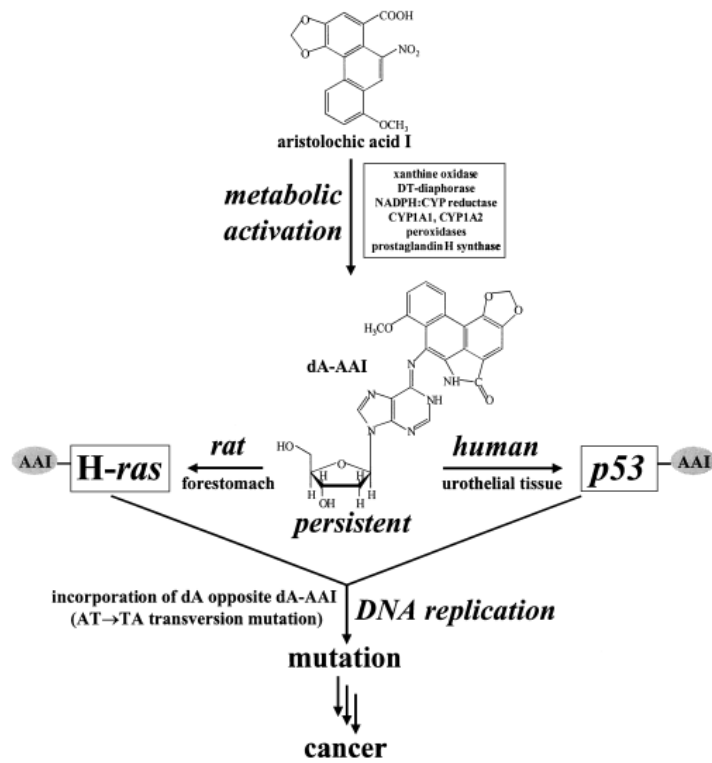


Ras 與 Rho 同屬 small GTPase family，可以藉由許多因子(如 growth factors, cytokines 或是 cellular adhesion molecular)調控細胞的反應(圖三) [19-21]。當 Ras 活化後，可藉由不同路徑來控制不同細胞的作用；主要的反應者(effector)有三個：RAF kinase、RAL-GEFs、PI3-K (bind the same region of Ras-GTP, the 32-40 domain) [22](圖四)。這些反應者在與 Ras 結合後，都可以引發 in vivo 的生物活性。PI-3K (phosphatidylinositol 3-kinase)是在訊息傳導路徑上扮演所謂 second messenger 的角色，當被活化後，它可以結合到所多 cytoskeleton kinase protein 進而調節這蛋白的活性[19]



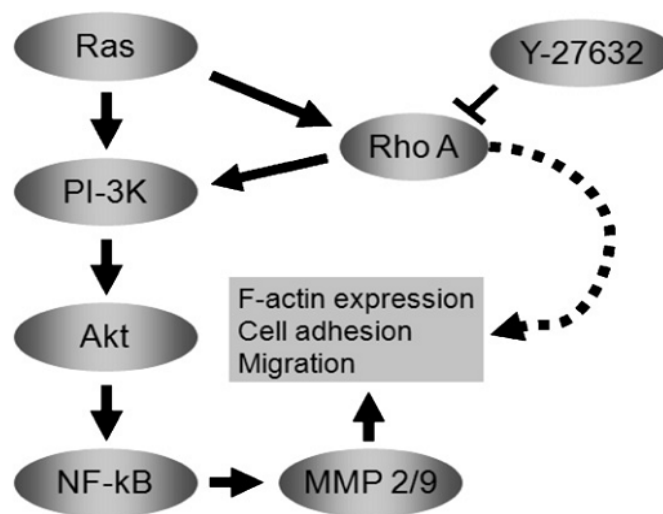
圖四：Ras 下游調節路徑

2002 年 Arlt 等學者於 Mutagenesis 雜誌發表如圖五所示馬兜鈴酸之可能致癌機轉[10]，這啟發我們對 Ras 有濃厚的興趣。最近的馬兜鈴酸突變及致癌的研究，大多是關於馬兜鈴酸脫氧核糖核酸加合物(DNA adduct)，活化 H-ras 致癌基因[23]。此外，馬兜鈴酸腎病變病患的泌尿道癌症以及泌尿道增生都與 p53 蛋白的過渡表現有關[24]。p53 抑癌基因是人類癌症腫瘤中最常見的突變基因。這些突變如同 H-ras 一樣可啟動人類腫瘤生成。



圖五：Postulated mechanism for the carcinogenicity of aristolochic acid in rodents and humans. [10]

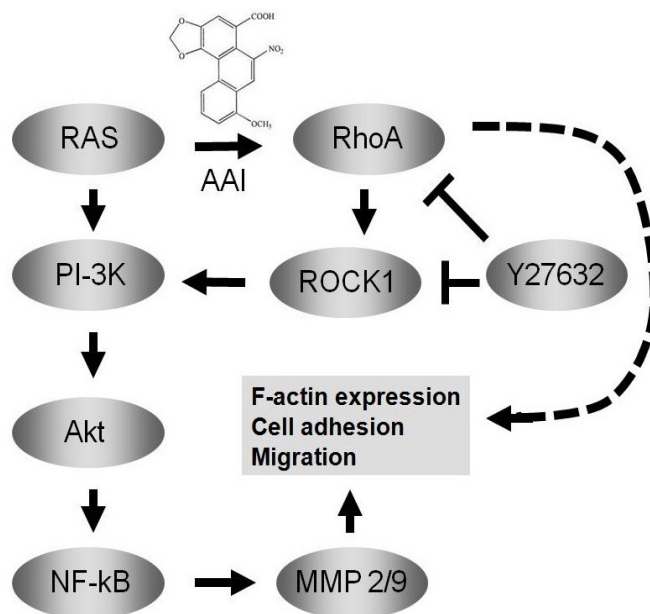
又本團隊於 2010 年 Chem Biol Interact 雜誌發表了 12 位病人的膀胱癌組織之 Ras, PI3K, Akt, RhoA 表現增加且 Ras overexpression 會造成癌細胞 cytoskeleton F-actin 表現增加，若 RhoA 抑制劑 Y27632 治療，則 cytoskeleton F-actin 表現可被抑制[25](圖六)。



圖六.膀胱癌細胞轉移及侵襲之訊息傳遞。A proposed model for the Ras and RhoA mediated invasion/migration of human bladder cancer cells. The dotted arrow represents the pathway which has been published in the literature and the

solid arrows represent the findings in this present study. Chang HR (張滋榮) et al. Chem Biol Interact. 2010;183:172-80.

Ras/Rho pathway 已被證實致癌模式有雙重關係[26]。本團隊甫於 2011 年 7 月 Nephrol Dial Transplant 雜誌發表中藥馬兜鈴酸促進膀胱癌細胞(TSGH) 轉移及侵襲的細胞及動物模式[26]，其訊息傳遞即與 Ras 有關，如附圖七。



圖七：上圖所示馬兜鈴酸所致之膀胱癌細胞轉移及侵襲之訊息傳遞 A proposed model for the effects of AAI on Ras and RhoA mediated invasion/migration of human bladder cancer cells. The dotted arrow represents the pathway which has been published in the literature and the solid arrows represent the findings in this present study. Huang HP (黃惠珮)...and Chang HR(張滋榮). Nephrol Dial Transplant. 2011 Jul 28. [Epub ahead of print]

### 【III】 Everolimus (RAD) 為新型 mTOR 抑制劑

Everolimus (RAD) 是一種抑制 mTOR 分子 (mammalian target of rapamycin)，mTOR 分子是一種控制腫瘤細胞分裂與血管增生的蛋白質，關係著癌細胞存活、生長、複製及代謝等重要訊息的傳遞路徑。mTOR 分子抑制劑的作用機制為抑制癌細胞分裂及血管新生，因此可減緩癌細胞的生長及擴散。此外，everolimus (RAD) 也是器官移植患者之免疫抑制劑。本團隊於最近向瑞士諾華原廠申請取得 everolimus (RAD) 之原型劑，申請目的為學術研究之使用，並已開始進行如下所述之腎癌細胞及泌尿癌細胞實驗。

本團隊甫於 2011 年 5 月 Molecular Carcinogenesis 發表的水飛薊素 (silibinin) 抑制腎癌細胞 (786-O) 轉移及侵襲的細胞及動物模式，且 silibinin 會增進 5-FU 及 paclitaxel 的化療效果[27]。高劑量 silibinin 具有抑制癌細胞生長能力、促

使癌細胞凋死亡及防止正常細胞癌化等作用，而且呈 dose-及 time-dependent 的關係。雖然 silibinin 可抑制癌細胞生長能力，甚至高劑量時可促使癌細胞凋亡的作用已經相當明確，該研究中我們亦運用 everolimus 檢測是否與 silibinin 有加成之抑制 RCC 細胞生長之現象，但結論無此好處，結果已於文中論述 [27]。

而後我們再用向瑞士諾華原廠申請取得之 everolimus，基於本實驗室既有的癌細胞轉移及侵襲之細胞及動物模式基礎來研究 everolimus 此一 mTOR 抑制劑對腎癌細胞的轉移及侵襲的影響，雖 mTOR 抑制劑臨床上已為 RCC 之標靶治療藥，但文獻搜尋 everolimus 是否可以抑制腎癌細胞的轉移及侵襲目前尚無報導，這方面的細胞及動物實驗工作已經完成(投稿中)。

## (二)、研究目的與架構

基於 2010 的 review 文獻認為，mTOR 抑制劑可以抑制原發性泌尿癌細胞生長且為重要的細胞訊息之一[28]。然而，事實上，泌尿細胞癌或膀胱癌都是相當異質化的癌症，其成因與機轉很多，對於國內眾多長期因中草藥、或止痛藥濫用而導致的膀胱癌病患而言，是否仍如文獻回顧所示仍然對於 mTOR 抑制劑有療效，這點令人存疑？基於馬兜鈴酸相關造成泌尿細胞癌的透析病患及移植病患不少，若能釐清這個問題可給國內大量膀胱癌病人帶來福音，又，由於 everolimus 亦是腎移植後的免疫抑制劑，若 mTOR 抑制劑被證實的確對馬兜鈴酸相關的移植病患膀胱癌有抑制作用，則能提供醫學實證，證實該藥物可為該類腎移植病患的主流用藥，並有抵抗移植腎排斥及抑制膀胱癌的雙效效果。

本實驗計畫擬進行【1】以不同的人類膀胱癌細胞株(T24、TSGH、HTB-5、HTB-9、J82)，利用 Western blotting 測定 RAS 與 mTOR 的蛋白量及與其相關的訊息傳遞蛋白如：檢測增生路徑-RAS, Akt, mTOR, p-GSK, b-caterin, apo-b；及轉移路徑-RAS, Akt, NFkB, MMPs。探討不同的人類膀胱癌細胞株 Ras 及 mTOR 之表現與轉移惡化之關聯，【2】以細胞增生實驗(cell proliferation), matrix metalloproteinase activity, 細胞移動性分析, 傷口癒合試驗(wound healing assay) 觀察不同的人類膀胱癌細胞株之轉移惡化程度。

## (三)、參考文獻

- [1] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341:387-391.
- [2] Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med* 2000; 342:1686-1692.

- [3] Jackson L, Kofman S, Weiss A, Brodovsky H. Aristolochic Acid (Nsc-50413): Phase I Clinical Study. *Cancer Chemother Rep* 1964; 42:35-37.
- [4] Peters G, Hedwall PR. Aristolochic Acid Intoxication: A New Type of Impairment of Urinary Concentrating Ability. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1963; 145:334-355.
- [5] Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994; 343:174.
- [6] Pena JM, Borrás M, Ramos J, Montoliu J. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis due to a chronic intake of a herb (*Aristolochia pistolochia*) infusion. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:1359-1360.
- [7] Stengel B, Jones E. [End-stage renal insufficiency associated with Chinese herbal consumption in France]. *Nephrologie* 1998; 19:15-20.
- [8] Lord GM, Tagore R, Cook T, Gower P, Pusey CD. Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK. *Lancet* 1999; 354:481-482.
- [9] Yang CS, Lin CH, Chang SH, Hsu HC. Rapidly progressive fibrosing interstitial nephritis associated with Chinese herbal drugs. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:313-318.
- [10] Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* 2002; 17:265-277.
- [11] Robisch G, Schimmer O, Goggelmann W. Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1982; 105:201-204.
- [12] Schmeiser HH, Pool BL, Wiessler M. Identification and mutagenicity of metabolites of aristolochic acid formed by rat liver. *Carcinogenesis* 1986; 7:59-63.
- [13] Mengs U. Tumour induction in mice following exposure to aristolochic acid. *Arch Toxicol* 1988; 61:504-505.
- [14] Schmeiser HH, Janssen JW, Lyons J, et al. Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues. *Cancer Res* 1990; 50:5464-5469.
- [15] Rossiello MR, Laconi E, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DS. Induction of hepatic nodules in the rat by aristolochic acid. *Cancer Lett* 1993; 71:83-87.
- [16] Cosyns JP, Goebbels RM, Liberton V, Schmeiser HH, Bieler CA, Bernard AM. Chinese herbs nephropathy-associated slimming regimen induces tumours in the forestomach but no interstitial nephropathy in rats. *Arch Toxicol* 1998; 72:738-743.
- [17] Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, Van Cangh PJ, van Ypersele de Strihou C. Urothelial malignancy in nephropathy due to Chinese herbs. *Lancet* 1994; 344:188.
- [18] Chang HR, Lian JD, Lo CW, Chang YC, Yang MY, Wang CJ. Induction of urothelial proliferation in rats by aristolochic acid through cell cycle progression via activation of cyclin D1/cdk4 and cyclin E/cdk2. *Food Chem Toxicol* 2006; 44:28-35.
- [19] Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:49-54.
- [20] Gille H, Downward J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 1999; 274:22033-22040.
- [21] Kresse H, Schonherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol* 2001; 189:266-274.
- [22] Tzivion G, Luo Z, Avruch J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 1998; 394:88-92.
- [23] Arlt VM, Wiessler M, Schmeiser HH. Using polymerase arrest to detect DNA binding specificity of aristolochic acid in the mouse H-ras gene. *Carcinogenesis* 2000; 21:235-242.
- [24] Arlt VM, Schmeiser HH, Pfeifer GP. Sequence-specific detection of aristolochic acid-DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase-dependent PCR. *Carcinogenesis* 2001; 22:133-140.
- [25] Chang HR, Huang HP, Kao YL, et al. The suppressive effect of Rho kinase inhibitor, Y-27632, on oncogenic Ras/RhoA induced invasion/migration of human bladder cancer TSGH cells. *Chem Biol Interact* 2010; 183:172-180.
- [26] Huang HP, Wang CJ, Tsai JP, et al. Y27632 attenuates the aristolochic acid-promoted invasion and migration of human urothelial cancer TSGH cells in vitro and inhibits the growth of xenografts In vitro. *Nephrol Dial Transplant* 2011.
- [27] Chang HR, Chen PN, Yang SF, et al. Silibinin inhibits the invasion and migration of renal carcinoma 786-O cells in vitro, inhibits the growth of xenografts in vivo and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil and paclitaxel. *Mol Carcinog* 2011.
- [28] Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the

(四)、研究方法

**【I】 探討不同的人類膀胱癌細胞株 Ras 及 mTOR 之表現與轉移惡化之關聯**

**(A) 不同的人類膀胱癌細胞株 Ras 及 mTOR 之表現**

1. **細胞培養**：不同的人類膀胱癌細胞株(T24、TSGH、HTB-5、HTB-9、J82)以不同培養基培養，加入 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin 及適量 L-glutamine，在 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 之培養箱環境中。在 urothelial cell carcinoma (UCC)分期: T24 和 J82 為 grade III; TSGH S 為 grade II stage A; HTB-9 為 grade II ; HTB-5 為 grade IV。細胞分別處理 everolimus (mTOR 抑制劑)與 Y27632 (Ras/ROCK 抑制劑)，以下述方法進行實驗。
2. **細胞存活率分析(Cell viability)**：利用 MTT(Microculture Tetrazolium) 分析測試細胞是否有活性以及是否存活。

**(B) 不同的人類膀胱癌細胞株之轉移惡化程度**

1. **Western blotting**：利用 Western blotting 測定 RAS 與 mTOR 的蛋白量及與其相關的訊息傳遞蛋白如：增生路徑-RAS, Akt, mTOR, p-GSK, b-caterin, apo-b；轉移路徑-RAS, Akt, NFkB, MMPs。
2. **基質金屬水解蛋白酶活性分析 (matrix metalloproteinase activity)**：利用 Gelatin Zymography assay 觀察 MMPs 之表現。
- 3 **細胞移動性分析**：利用 transwell 的分析方法，注入固定量的細胞 ( $10^4$ - $1.5 \times 10^4$ )於 Millicell，待細胞移動 24 小時以後，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞數之統計。

## (五)、結果與討論

### (A) 不同的人類膀胱癌細胞株 Ras 及 mTOR 之表現

我們使用 5 株不同膀胱癌細胞株(T24、TSGH、HTB-5、HTB-9、J82)，以 everolimus 或 Y27632 0-100  $\mu$ M 之劑量處理 1-3 天，觀察藥物對細胞之毒性。由 Figure 1A 可知，以 T24 細胞為例，經處理 everolimus 1 天，在最高濃度 100  $\mu$ M 仍有約 80%存活率，當藥物處理 2 天後，0.5  $\mu$ M everolimus 造成高達 50%細胞死亡；然而 T24 細胞對 Y27632 較不敏感，即使經 100  $\mu$ M Y27632 處理 3 天，細胞存活率仍達 80%以上 (data not shown)。另一方面，TSGH 細胞經 everolimus 處理 3 天後，於最高濃度下，細胞仍有 70%之存活率；但在加入 Y27632 2 天之後，在 0.5  $\mu$ M 的濃度，細胞約有 40%死亡 (Figure 1B)。以上結果可知，膀胱癌細胞株可分 2 群，分別對 mTOR 或 Ras/ROCK 抑制劑之處理，有抑制其生長之作用。之後實驗以 T24 (mTOR 路徑)與 TSGFH(Ras 路徑)為代表，觀察藥物對癌細胞移形惡化之抑制作用。

### (B) 不同的人類膀胱癌細胞株之轉移惡化程度

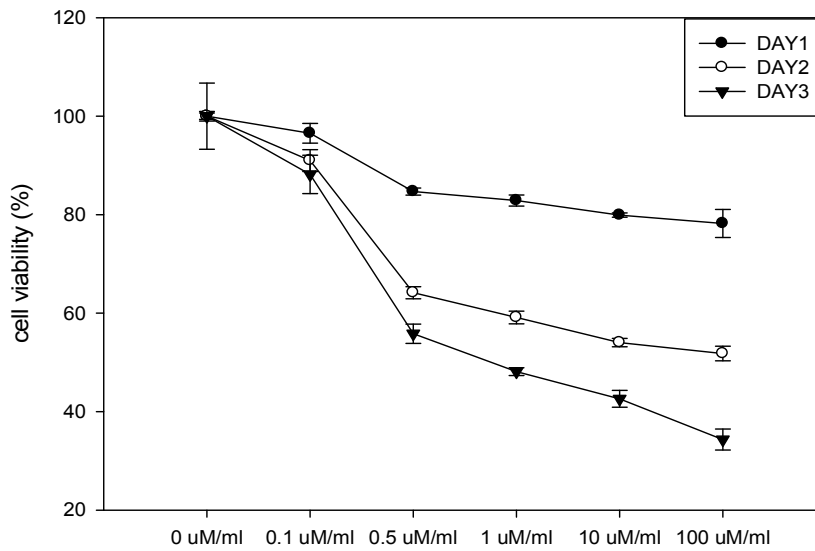
Figure 2A 之 Western 結果可知，T24 細胞經由 mTOR 抑制劑處理後，磷酸化 mTOR 在第 2 天有下降的趨勢，其下游相關蛋白表現亮也如預期減少，而 Ras 無論在第 1 天或第 2 天皆無任何表現之變化，同樣 Akt 下降亦不明顯，由此可知 T24 細胞確實走 mTOR 路徑。Figure 2B 則為 Y27632 處理 TSGH 細胞後其相關蛋白之表現，由結果可知 Y27632 可抑制 TSGH 細胞之 Ras 表現，其下游蛋白 Akt 同樣有被抑制之結果；雖然在最高劑量處理 1 天後 mTOR 表現量有減少，但第 2 天之蛋白表現量無改變，磷酸化 mTOR 亦無任何表現變化，推測可能為實驗誤差，綜合結果看來 TSGH 細胞應走 Ras 相關路徑。

接著進一步利用 Gelatin Zymography assay，觀察藥物對癌細胞基質金屬水解蛋白酵素活性的作用，藉以了解藥物對癌細胞惡化移行之影響。由 Figure 3A 發現 everolimus 可以抑制 T24 細胞 MMP9 之活性，Figure 3B 則顯示 Y27632 降低了 TSGH 細胞 MMP2/9 之表現，由此可知不同的藥物可以分別抑制不同膀胱癌細胞之基質水解作用。Figure 4A 結果為 everolimus 減少 T24 細胞移行之能力，而 Figure 4B 則為 Y27632 抑制 TSGH 細胞移行現象。

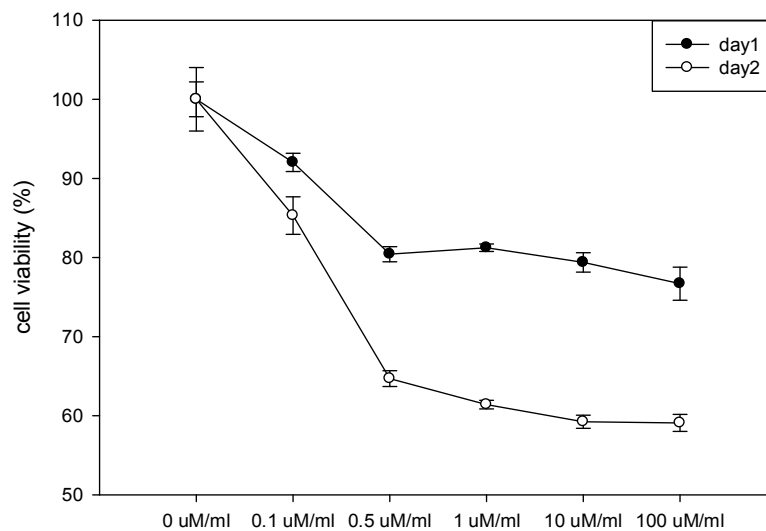
綜合本計畫之結果可知，不同膀胱癌細胞，可分為走 mTOR 或 Ras 路徑，若正確抑制其作用途徑，應可有效治療疾病，並減少錯誤用藥及無效治療。

**Figure 1.** Effects of different durations and concentrations of everolimus or Y27632 exposure on the viability of T24 or TSGH cells by MTT assay. T24 (A) or TSGH (B) cells were treated with the indicated concentrations of everolimus or Y27632, respectively, for 1 and 2 days. The viability of the cells was determined by MTT assay.

(A) T24

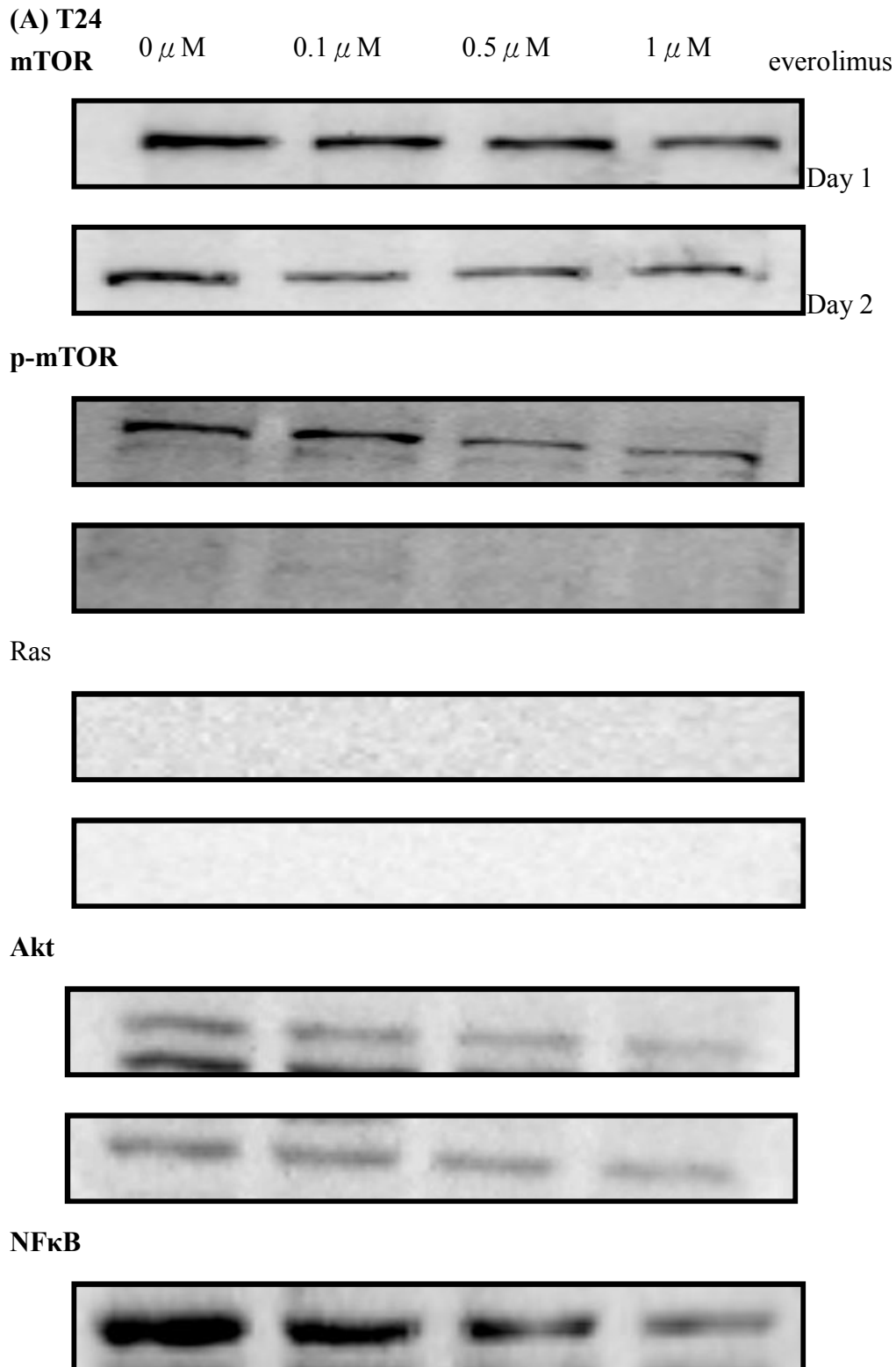


(B) TSGH



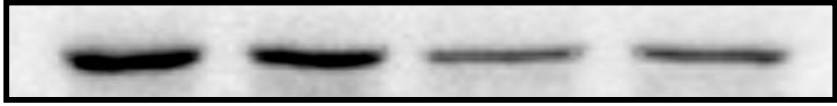


**Figure 2.** Effects of everolimus or Y27632 on the expression of migration-related proteins of T24 or TSGH cells. T24(A) or TSGH (B) cells were treated with the indicated concentrations of everolimus or Y27632, respectively, for 1 and 2 days. Total cell lysate was extracted and the expression of mTOR, p-mTOR, Ras, Akt, p-GSK $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B were assayed by western blotting. Tubulin was used as an internal control.





**p-GSK $\alpha$**



**Tublin**



**(B) TSGH**

Ras      0  $\mu$ M      0.1  $\mu$ M      0.5  $\mu$ M      1  $\mu$ M      Y27632



**mTOR**



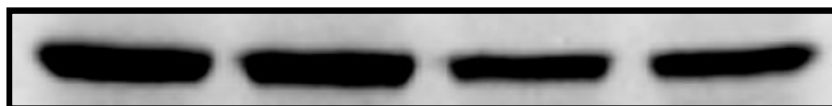
**p-mTOR**



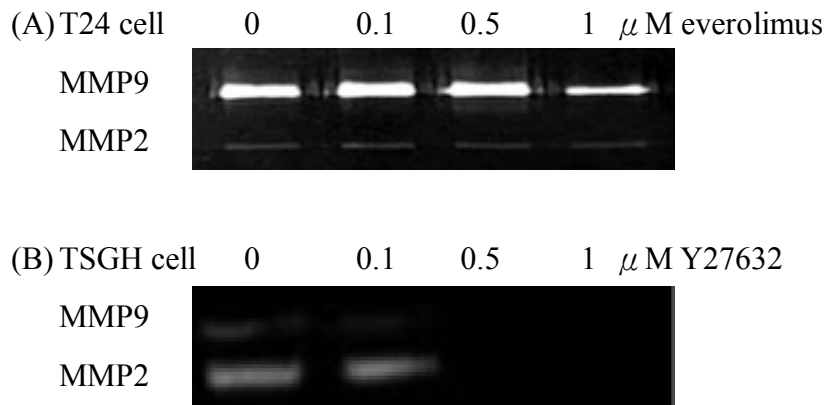
**Akt**



**Tublin**

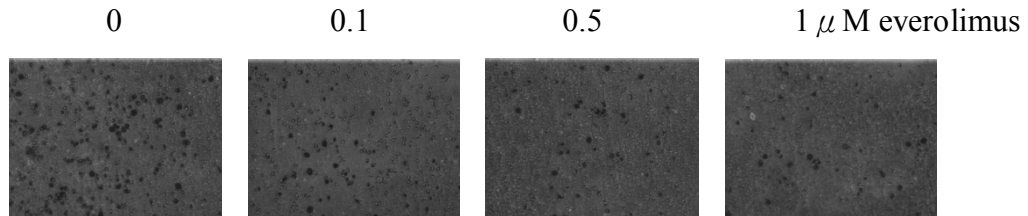


**Figure 3.** Gelatin zymography assay of the T24 and TSGH cells. T24 (A) or TSGH (B) cells were treated with the indicated concentrations of everolimus or Y27632, respectively for 2 days. The conditioned medium was prepared and collected. MMP2 and MMP9 activity was measured using gelatin zymography

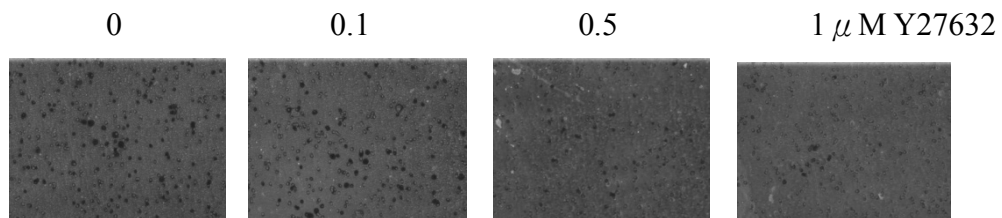


**Figure 4.** Effects of everolimus or Y27632 on the migratory ability of T24 or TSGH cells. T24 (A) or TSGH (B) cells were treated with the indicated concentrations of everolimus or Y27632, respectively for 2 days. The migrated cells were analyzed using a transwell assay. Motility was quantified by counting the number of cells that migrated to the undersides of the membrane under microscopy (100X).

(A) T24 cell



(B) TSGH cell



# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/27

國科會補助計畫	計畫名稱: 抑制RAS/ROCK及mTOR對於馬兜鈴酸促進人體膀胱癌轉移及侵襲的治療角色
	計畫主持人: 張滋榮
	計畫編號: 101-2314-B-040-003- 學門領域: 腎臟科新陳代謝及內分泌
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：張滋榮		計畫編號：101-2314-B-040-003-					
計畫名稱：抑制 RAS/ROCK 及 mTOR 對於馬兜鈴酸促進人體膀胱癌轉移及侵襲的治療角色							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	



# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本計畫擬探討人類膀胱癌細胞株分期和 RAS/ROCK 及 mTOR 表現的關係，及抑制劑的使用以確認不同人類膀胱癌細胞株分期和 Ras、mTOR 表現關係；結果可知，不同膀胱癌細胞，可分為走 mTOR 或 Ras 路徑，分別利用 RAS/ROCK 及 mTOR 抑制劑，可減少膀胱癌細胞增生移行的現象，若使用錯誤抑制劑，則無法達到抑制效果。本計畫結果證實，若正確抑制其作用途徑，應可有效治療疾病，並減少錯誤用藥及無效治療。