

中山醫學大學
免疫學研究所
碩士論文

肝細胞生長因子和第一型類胰島素生長因子對
肺癌細胞株轉移之影響

The Effect of Hepatocyte Growth Factor and Insulin-like
Growth Factor-I on Tumor Metastasis in Lung Cancer
Cell Lines

研究生：林禮薇 (Li-Wei Lin)

指導教授：李宜儒博士 (Yi-Ju Lee)

中華民國 九十二年一月

本論文為中山醫學大學授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院免疫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

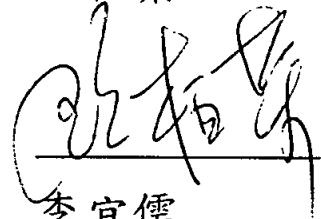
口試委員

中山醫學大學毒理學研究所助理教授 吳文俊

吳文俊

東海畜產系副教授

歐柏榮



中山醫學大學免疫學研究所助理教授

李宜儒

(論文指導教授)

李宜儒

學生林禮薇論文題目為「肝細胞生長因子和類胰島素生長因子-I 對人類肺癌細胞的影響」，其論文已經中山醫學大學醫學院免疫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 李宜儒

簽名：李宜儒

中華民國九十二年一月

致謝

感謝我的指導教授李宜儒博士在這兩年多的日子裡一直給予我指導與協助使我獲益良多。另外有幸邀請到吳文俊老師、歐柏榮老師擔任此次的口試委員在論文上細心審核並及時修正。以及我的學妹卓欣怡、學弟吳東逸在實驗上的幫助。最後對於全體免疫所的所有師生表達感謝之意，讓我在中山醫學大學免疫所這兩年來成長許多，未來我必將我所學回饋社會以不辱校名。特此致謝。

免疫所學生林禮薇

2003. 02

目錄

	頁數
中文摘要	1
英文摘要	3
縮寫檢索表	5
第一章緒論	6
第二章實驗材料及方法	19
第三章結果	27
第四章討論	37
圖表	43
參考文獻	62

中文摘要

肺癌是造成國人死亡的主因之一，其高死亡率與腫瘤轉移造成治療不易有關。腫瘤轉移與細胞外基質的分解、細胞與基質及周圍細胞的黏連瓦解及細胞移動有關。肝細胞生長因子（HGF）與第一型類胰島素生長因子（IGF-I）皆可刺激細胞增殖、移動、侵入及血管生成，因而促進腫瘤轉移。儘管文獻中顯示在肺癌及其他癌症病患裡，這些生長因子及其受體的表現量愈高病患的預後愈差，但其機轉仍不是十分清楚，且關於 HGF 與肺癌的研究也不多。因此，我們將進一步探討 HGF 與 IGF-I 及其受體對肺癌轉移的影響。本篇論文中的實驗主要是使用肺癌細胞株 CL1-0 及其亞株 CL1-1 和 CL1-5，因為這些亞株具有不同程度的侵入性；CL1-5 具高度侵入性，而 CL1-1 卻非常低。我們檢測肝細胞生長因子受體 Met 和第一型類胰島素生長因子受體（IGF-IR）在細胞株的表現，和 HGF 與 IGF-I 刺激所誘發的訊息傳遞及其對細胞增生、matrix metalloproteinase（MMP）活性、抗凋亡能力、細胞移動及侵入性的影響。實驗結果顯示高侵入性的 CL1-5 表現較多的 Met；而低侵入性的 CL1-1 則是表現較高的 IGF-IR。HGF 刺激所誘發的訊息傳遞在 CL1-5 中較強，然而細胞並無受體自發性的活化，表示 Met 應無活化型突變（activating mutation），且此細胞株也無 autocrine loop 的情形。IGF-I 的訊息傳遞則十分有趣，CL1-1 表

現較高的 IGF-IR 及其下游訊息傳遞分子 IRS-2，而 CL1-5 則是表現較高的 IRS-1。因此，IGF-I 在這些細胞株皆可誘發訊息傳遞，但傳遞路徑可能有所差異。我們也發現 CL1-1 的生長速率較快，而 CL1-5 抗拒因細胞和細胞之間以及細胞和細胞外基質脫離所誘發的細胞凋亡能力較強。此外，HGF 和 IGF-I 刺激皆可促進細胞的移動，然而二者對 MMP 活化都沒有太大的作用。不論在蛋白分子的表現或生長因子刺激對細胞的影響，CL1-0 都與 CL1-1 十分相似。我們希望藉此研究能更進一步了解腫瘤轉移的機轉，並對未來治療方面能有所幫助。

Abstract

Lung cancer is one of the leading causes of death in Taiwan. The high mortality of lung cancer is due to tumor metastasis that makes the treatment difficult. Tumor metastasis is a complex process involving coordination of matrix disintegration, cell detachment, cell-cell junction disassembly, cell migration, and the changes in the expression of integrins and other cell adhesion molecules. Hepatocyte growth factor (HGF) and insulin-like growth factor I (IGF-I) play a critical role in tumor metastasis, probably through their stimulatory effect on cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. Although it has been known that elevated expression of these growth factors and their receptors are associated with poor prognosis, the underlying mechanisms are not fully understood. Besides, there have not been many reports studying the correlation between the deregulation of HGF and its receptor with lung cancer. Thus, we investigated into the role of HGF and IGF-I in lung tumor metastasis. A lung cancer cell line CL1-0 and its sublines CL1-1 and CL1-5 were used in this study since they exhibit different extents of invasiveness. CL1-5 is prone to invade, while CL1-1 shows very low extent of invasiveness. We examined the expression of the HGF receptor Met and

IGF-I receptor (IGF-IR), the signaling pathways triggered by HGF and IGF-I, as well as the effect of these growth factors on cell proliferation, matrix metalloproteinase (MMP) activity, survival, cell migration and invasion. Higher level of Met expression was observed in CL1-5, whereas greater extent of IGF-IR expression was detected in CL1-1. Exposure to HGF strongly induced the tyrosine phosphorylation of Met in CL1-5, but there was no ligand-independent activation, suggesting that Met did not harbor activation mutations, and autocrine-loop did not exist in CL1-5. IGF-I-stimulated signaling was distinct in these cell lines. Tyrosine phosphorylation of IGF-IR and IRS-2 was mainly restricted to CL1-1, but phosphorylation of IRS-1 was more pronounced in CL1-5. This was due to the differences in the expression levels of these proteins. Moreover, we found that CL1-1 was highly proliferative, whereas CL1-5 was more refractory to apoptosis induced by disruption of both cell-matrix and cell-cell interactions. Both HGF and IGF-I were potent to promote cell migration, but were ineffective in augmentation of MMP activity. We hope our studies will help for deciphering the mechanisms for tumor metastasis and furthermore, for designing strategies to treat lung cancer.

縮寫檢索表

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECM	extracellular matrix
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycoltertraacetate
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
HGF	hepatocyte growth factor
IGF-I	insulin-like growth factor 1
IRS	insulin receptor substrate
MMP	matrix metalloproteinase
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl) 1,3-propanediol

第一章 緒論

一、癌症轉移

癌症威脅人類生命的主因是癌細胞會“轉移(metastasis)”。在癌症的初期，癌細胞僅侵犯並毀壞病源周圍的組織。惡性細胞像幅射狀地向四週擴散，並很快壓迫和毀滅相鄰的正常細胞。當癌症僅侷限於發病部位時，稱為局部性或原位癌。如能在這階段診斷治療，治癒率最高。當癌細胞轉移到人體其他部位並持續生長成續發性的惡性腫瘤，就稱為轉移性癌(1)。轉移首先從“浸潤(invasion)”開始。癌細胞破壞基底膜(basal membrane)侵入周圍的組織，隨後進入血液或是淋巴到達更遠的組織和其他內臟器官，在此位置生長形成新的癌(1)。

若癌症起始於周圍空間較大的組織，例如一些腔道的表皮細胞，像是胃壁細胞、腸壁細胞、膀胱壁細胞等，癌細胞生長比較容易，因為有足夠的空間發展。然而，若癌細胞起始於具實質組織的內臟器官，癌細胞的生長就比較困難。在這些組織裡，癌細胞必須先生長，向四周擴充其生長空間。但在癌細胞數目增加後，會擠壓附近正常的細胞，而使其死亡。此外，也可能使血管壁或神經受到破壞，造成出血或疼痛等症狀。因此，當原發性或續發性癌組織壓迫、侵犯或毀壞維持生命重要器官的細胞時，會造成壓迫、潰爛、感染、出血、疼痛

或器官功能喪失等症狀，最終導致個體死亡（1）。

二、癌細胞轉移的原因

癌症轉移是一複雜的過程，當細胞轉變成癌細胞時，需要特殊的訊息使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發癌細胞組織周圍血管增生以供應足夠的養份，另外提升癌細胞對周圍組織的侵潤和轉移（3）。然而，並不是所有細胞轉移都是不好的，胚胎在發育時期細胞移動對於個體發育是必要的。如骨髓中的幹細胞要發育成其他的細胞形態就必須由骨髓中轉移，穿過血管壁後到達正確地方發育成正常的細胞形態（3）。另外在胚胎發育時神經細胞的移動對於個體的神經管分佈也有相關性（3）。

癌細胞轉移的機轉並不是很清楚，可能的原因如下。一是基因突變而造成功能失調，例如 Myc、Ras 及 p53。Myc 基因突變曾被發現在多種癌症，例如乳癌、大腸癌、小細胞肺癌、骨癌。當 Myc 表現失調時會造成癌細胞不斷的分裂（4）。此外，當 Myc 基因突變時細胞會產生抗凋亡的能力，這主要是因為 Myc 誘發 Bcl-x_L 蛋白質的表現（5）。而 Ras 基因突變最常發現在胰腺癌，其次為結腸癌、甲狀腺腫瘤、肺癌，而胃癌則較少見（8）。Ras 在很多的研究中已被証實與癌細胞轉移有關，其可能原因為 Ras-MAPK 訊息一直被活化而

誘發 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 的大量表現，促使癌細胞分解基底膜造成轉移(6-8)。p53 為轉錄因子，它具有調節細胞週期、幫助 DNA 的修復以及引發不正常細胞的凋亡進而防止細胞癌化(5)。造成癌細胞轉移的另一種機轉是生長因子及其受體過度表現或活化，常見的有 FGF、EGF、IGF、HGF、PDGF 等(9)。在此情況下，生長因子的訊息傳遞路徑會被持續性地激活，因而提高細胞生長速率、轉移及抗凋亡能力等。Chemokine 受體表現異常與癌細胞轉移到特定的組織有關(10)。研究發現乳癌細胞膜上有 chemokine 受體 CXCR4 和 CCR7 的大量表現，而其配子 CXCL12 和 CCL21 卻是表現在淋巴球、肺臟、肝臟和骨髓(11)。

三、癌症的治療

大部份原發性癌的病灶可以由外科手術及其他治療方法將其移除，但是轉移性癌因已擴散至身體各處，造成治療上的困難。再者，在惡性腫瘤演變過程中，雖然通常是由單一細胞為癌症起源，但當其轉移時癌細胞已累積許多基因突變，而形成許多不穩定且多樣性的癌細胞群落，這也造成治療的困難。而且化學藥物治療常無法完全根除所有的癌細胞，反而在“物競天擇”的定律下，使得一些具有抗藥性或更惡性化的癌細胞子株有機會擴展，最後造成治療失敗。由於癌轉

移的複雜性，使其在治療上有極大困難。事實上，癌症轉移所造成的死亡率約為 90% (2)。

四、肺癌

根據世界衛生組織報告，近二十年來人類癌病的死亡率增加 19%，其中以肺癌增加最多；男性增加了 76%而女性則是增加 85%。依三十五個先進國家的統計，其男性肺癌死亡率居所有癌病死亡率的第一位，而女性則為第六位。美國每年有十五萬人以上死於肺癌；在日本及亞洲其他區域，近年來肺癌也已成爲一個重大的問題。而在中國，預計到 2030 年死於肺癌的人數將可達到每年三百萬人 (11)。

1995 年在衛生署登記的癌症病人資料中，男性罹患肝癌的人數最多，發生率為十萬分之三十二；其次為肺癌，發生率為十萬分之二十七。女性則以子宮頸癌為最多，發生率為十萬分之三十二；肺癌為第四，發生率為十萬分之十二。到了 2002 年肺癌死亡人數達六千二百六十一人，比肝癌還多出二百六十人，成爲國人十大癌症之首。因此肺癌為國內十大癌症死因之一，且有逐年增加的趨勢。以年齡層而言，病患多在 40 歲以上，但近年來年齡層有往下降的現象 (13)。

五、肺癌的分類

肺癌在臨床上分成二大類，即小細胞癌 (small cell lung carcinoma ; SCLC) 和非小細胞癌 (non-small cell lung carcinoma ; NSCLC)。小細胞癌約佔所有肺癌的 25%，生長快速且轉移性高。非小細胞癌佔所有肺癌的 75%，又可細分為三型：鱗狀細胞癌 (squamous carcinoma)、腺癌 (adenocarcinoma)、大細胞癌 (large cell carcinoma)。鱗狀細胞癌又稱類表皮癌，常見於男性吸煙者，早期僅有局部的生長，晚期則經血液轉移。腺癌為目前肺癌數量最多的一種類型，常常是在轉移之後才出現臨床症狀，多由血液轉移，無吸煙者所罹患的肺癌常為此類。大細胞癌生長速度較緩慢，可經由血液及淋巴轉移。綜合而言，腺癌的發生率最多，其次為鱗狀細胞癌及小細胞癌，而大細胞癌則甚少見。若由性別來看，女性以腺癌居首，鱗狀細胞癌次之；男性則以鱗狀細胞癌最多，腺癌次之 (2, 12, 13)。

肺癌的生長和發展是多樣化的。腫瘤從肺臟黏膜起源或向支氣管腔內生長，或沿支氣管黏膜向下蔓延，或向鄰近肺組織浸潤，形成腫塊。它可以直接侵犯縱隔、胸壁、膈肌、心包膜等，或經由淋巴管散播到肺門、縱隔、鎖骨上和腋下淋巴結，甚至直接侵犯血管，發生癌栓，造成遠處轉移。肺癌常轉移至多個器官，常見的依序為腦、腎上腺、肝、骨骼及腎 (13)。

六、造成肺癌的原因

肺癌的形成應該是多重因素造成，如抽菸、二手菸、遺傳和環境中其他的致癌物質等等。抽菸是導致肺癌最主要的原因，在男性病患中，90%的人是因吸菸而引起的；在女性病患中因吸菸而引起肺癌佔了80%。不吸菸卻長期吸入“二手菸”的人也同樣會遭受傷害。根據統計因長期吸入“二手菸”而死於肺癌的人，男性占24%而女性占22% (14)。外界環境導致肺癌的因素有空氣污染，如吸入石綿、鎘、砷、放射性氬氣等，而中國人食物喜歡油炸、燒、煎所產生的空氣污染，可能也與肺癌發生有關 (15)。最近的文獻指出，台灣不抽菸女性肺癌病人中，大多有人類乳突瘤病毒 HPV16/18 的感染 (16)。然而，是否為病毒感染導致肺癌的產生還有待進一步釐清。

七、肝細胞生長因子

肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 也稱為分離因子 (scatter factor)，因最初被證實促進肝細胞的生長而得名 (17-19)。HGF 主要是由纖維母細胞所分泌，是一種多功能的生長因子 (20)。它能降低細胞和細胞之間的黏合，使細胞分散，例如在 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 的細胞 HGF 會造成 E-cadherin 的降解而使細胞失去極性 (polarity) (21)。此外，HGF 還能刺激細胞增殖、抑制

細胞的凋亡、增加 DNA 的修復能力，加強細胞的移動和侵入，以及促進血管生成（18，20，22，23，38）。這些功能不但與正常細胞的生長、發育、修復有關，也在腫瘤的形成、增生及轉移過程扮演重要的角色。

HGF 在齧齒類和人類肺臟的表現量很低，但是當臟器受到傷害時，如肝切除、急性肝臟或肺臟損害，肺臟中的 HGF 會上升（18，23）。此時，分泌 HGF 的細胞主要是間質組織中（stroma）的纖維母細胞。然而，HGF 也有可能在上皮細胞中表現，這主要是發現在癌症病人的檢體及細胞株（37，39）。當 HGF 與其受體表現在同一細胞時，會形成 autocrine loop，更加提高細胞侵入性的生長。

HGF 在細胞膜上的受體為 Met，它是一種 proto-oncogene，在許多上皮細胞皆有表現。Met 的分子量為 190 KDa，由二個 subunits 所組成的；其中一個為 α subunit（50 KDa），另外一個為 β subunit（145 KDa）（20）。 β subunit 具酪胺酸激酶的活性，當 HGF 和 Met 結合時會促使 Met 磷酸化並與多種訊息分子結合，如 phosphatidylinositol 3-kinase（PI3K）、growth factor receptor bound-2（Grb2）、signal transducers and activators of transcription 3（Stat3）及 Grb2 associated binder-1（Gab）（22，24-30）。PI3K 的活化可以提高細胞的存活，這主要是經由 Akt 的作用以提高抗細胞凋亡的蛋白質如 Bcl-X_L 的表

現量，以及抑制 Bad 和 caspase-9 的作用 (22, 29)。另一方面此訊息傳遞可以促進細胞骨架的重新組合，降低細胞黏附分子 (integrins) 的表現，以及提高細胞的移動能力 (31)。Grb2/SOS 與受體的結合可活化 Ras-Raf-MEK-Erk 的訊息路徑，增加細胞生長及抗凋亡的能力 (32)。Gab1 結合到受體會使其產生酪胺基酸磷酸化，因而與 Grb2、PI3K、PLC- γ 及 SRC homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-2) 結合，提高訊息傳遞的強度及複雜性 (21, 24, 25, 28, 29, 33)。Stat3 的活化則與 branching morphogenesis 有關 (25)。

此外，HGF 的刺激亦可激發一些與細胞黏附有關的訊息分子，例如 focal adhesion kinase (FAK) 和 paxillin (26, 34, 35)。p125^{FAK} 受 HGF 刺激而產生酪胺基酸磷酸化，因而與 Src、PI3K 以及 Grb2/SOS 結合，刺激細胞移動和侵入的能力 (26, 29, 30, 35)。在人類的攝護腺癌中，HGF 可有效地增加 paxillin 的磷酸化以及其他細胞黏附分子的反應 (34)。

癌細胞常有 Met 過度表現的情形，已知的例子包括膀胱癌、肺癌、胰臟癌、甲狀腺癌、大腸癌以及胃癌 (21)。而 Met 過度表現是因為 gene amplification 或轉錄失調所造成的。Met 基因的突變也被檢測到。目前已知的突變點共 21 處，其中多數是位在激酶區域 (kinase domain)。這些突變會使得 Met 產生自發性的活化；也就是說即使沒

有 HGF 的刺激，受體也有激酶活性及酪胺酸磷酸化的情形 (21)。除此之外，癌細胞常被發現會同時表現 HGF 及 Met，形成 autocrine loop。HGF 和 Met 的異常表現影響癌症病人的預後程度 (9)。針對肺癌而言，曾有報導發現 NSCLC 細胞株 (H226Br) 具有 HGF autocrine loop 的情形，造成 Akt 持續性的活化因而可抗拒細胞在不貼附時所誘發的凋亡 (37)。然而 Salgia et al. 發現在 SNCLC 的病人中，多數病人會有 Met 的高度表現，卻僅有少數病人具有 HGF 表現的情形 (40)。另有文獻指出，多數的 SCLC 細胞株會有 Met 大量表現且 HGF 表現也相對的增加，因此 paracrin 以及 autocrine loop 對 SCLC 癌細胞扮演一個重要的角色 (36)。

八、第一型類胰島素生長因子

第一型類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 亦具有多重功能，包括了促進細胞生長、分化、存活、移動及侵入 (42, 43)。IGF-I 的受體 (IGF-I receptor, IGF-IR) 是由異質四構體 (hetero-tetramer) 所組成，包含了兩個 130-135 KDa 的 α subunit 和兩個 90-95 KDa 的 β subunit。 β subunit 為一個穿過細胞膜的蛋白質，含有酪胺酸激酶的活性 (42-44)。當 IGF-I 與受體的 α subunit 結合後，會造成其在構形上的改變，繼而刺激 β subunit 內在的酪胺酸激酶活

性，導致 β subunit 在多個位置的自我磷酸化 (autophosphorylation) (42)。

目前已知的 IGF-IR 激酶的受質有：胰島素受體受質 insulin receptor substrate, IRS)、Shc、Grb2、Gab1 和 p62^{dok} 等 (42-44)。IRS 分子會與 PI3K、SHP-2 及小的承接分子 (adaptor molecule)，如 Nck、Grb2 連結 (45, 46)。PI3K 將細胞膜上的肌甘酸 (inositides) 磷酸化之後，會導致 phosphoinositide-dependent kinase (PDK) 的活化，而 PDKs 又會去刺激多種的絲胺酸/蘇胺酸激酶 (serine-threonine kinases)，包括了 p70^{S6k}、Akt (或 protein kinase B (PKB)) 及兩個 protein kinase-C (PKC) isoform, PKC ϵ 和 PKC λ 。此外，PI3K 也會與 p21^{ras}、Rac 和 Rab4 等 GTP-binding proteins 結合並刺激他們的活性。p21^{ras}、Rac 和 Rab4 與細胞生長、調控肌動蛋白 (actin) 的結構及細胞內泡囊的運送有關 (47-49)。

Shc 有三種，其分子量各為 46 KDa、52 KDa 及 66 KDa。他們皆有 NH₂ 端的 PTB domain，中段與膠原蛋白 (collagen) 的 α 1 chain 相似且富含甘胺酸 (glycine) / 脯胺酸 (proline) 的區域，以及 COOH 端的 SH2 domain 所組成。被酪胺酸磷酸化的 Shc 分子會與 Grb2 結合，而 Grb2 又和 SOS 作持續性 (constitutively) 的連接 (50)。當 Grb2/SOS 複合體結合到 Shc 時，會誘發 Ras 分子中 GDP、GTP 的交

換。被激活的 GTP-Ras 再刺激 Raf 分子並與其結合，之後再將 MEK 磷酸化，最後刺激 Erk 的活性。Erk 的活化與細胞的增殖、移動與存活等生理現象有關，且可促進基因的表現 (51-53)。

IGF-I 是一種能高度促進細胞增殖的生長因子，IGF-IR 的過度表現當被發現在肺癌、乳癌、甲狀腺癌、攝護腺癌、神經膠質母細胞瘤、神經胚細胞瘤、以及橫紋肌肉瘤等 (54)。大多數的 SCLC 細胞株具有同時表現 IGF 和 IGF-IR 現象，因而產生 autocrine loop，更加提高細胞生理反應。而在 NSCLC 的細胞株中，IGF-IR 的表現雖然很多，但 IGF-I 表現卻是很低。當加入 IGF-I 之後，細胞生長可以增加 1.4~7 倍之多。這表示在 NSCLC 的細胞，IGF-I 主要是由 stroma 產生 (42, 55-57)。

在肺癌細胞株 M-27 中 IGF-I 和 IGF-IR 的表現量皆低。以含 IGF-IR 的載體殖入此細胞並將其打入老鼠體內，M-27 的細胞可以轉移到老鼠肝臟並且在肝臟大量的增生 (58)。而在 A549 細胞株中放入一個含有 dominant-negative IGF-I 的載體時，癌細胞的 anchorage-independent 生長以及腫瘤的形成則被抑制 (59)。IGF-I 的作用受到 insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) 調控，某些 IGFBP 會抑制 IGF-I 與受體的結合 (33)。研究顯示在 NSCLC 細胞株中 (A549、226B、H596 以及 H226Br) IGFBP-6 的表現量很

低，當以含有 IGFBP-6 載體轉入癌細胞中表現時，細胞凋亡情形明顯上升 (44)。同樣地，IGFBP-3 對肺癌細胞株的生長及腫瘤形成也有重大影響 (60)。

IGF-I 對其他癌症也十分重要。如在乳癌細胞中，常發現有 IGF-IR 過度表現的情形 (43)。相同的乳癌細胞也會表現一些 IGFBP 來調控 IGF-I 的作用，曾有報告顯示 IGFBP-4 表現越低對乳癌病人的預後就越差 (61)。在前列腺腫瘤初期會大量的表現 IGF-IR，在癌症晚期卻不易測得 IGF-IR mRNA 的表現。雖然認為 IGF-IR 和癌細胞的轉移和侵入有相當大的關係，作者認為前列腺癌晚期其 IGF-IR 的訊息傳遞可能不是很重要，這可能和此階段的癌細胞分化(如細胞增殖、分化、細胞凋亡)情形降低有關 (62)。

九、實驗目的和動機

肺癌是造成國人死亡的主因之一，其高死亡率與腫瘤轉移造成治療不易有關。腫瘤轉移與細胞外基質的分解、細胞與基質及周圍細胞的黏連瓦解及細胞移動有關。而細胞表面黏附分子和趨化因子受體的表現則會影響腫瘤轉移的位置。HGF 與 IGF-I 皆可刺激細胞增殖、移動、侵入及血管生成，因而促進腫瘤轉移。儘管文獻中顯示在肺癌及其他癌症病患裡，這些生長因子及其受體的表現量愈高病患的預後愈

差，但其機轉仍不是十分清楚，且關於 HGF 與肺癌的研究也不多。因此，我們將進一步探討 HGF 與 IGF-I 及其受體對肺癌轉移的影響。本篇論文中的實驗主要是使用肺癌細胞株 CL1-0 及其亞株 CL1-1 和 CL1-5，因為這些亞株具有不同程度的侵入性。CL1-5 具高度侵入性，而 CL1-1 卻無。我們首先檢測 Met 和 IGF-IR 在細胞株的表現，及 HGF 和 IGF-I 刺激所誘發的訊息傳遞，以尋求其與肺癌轉移的相關性。此外這些生長因子對細胞增生、MMP 活性、抗凋亡能力、移動及侵入的影響也一一被檢驗。

第二章 實驗材料和方法

一、 實驗試劑

IGF-I 購自於 Pepro Tech 公司，HGF 購自於 R&D 公司。EGF、HEPES (sodium salt)、Brilliant blue R-250 及 actin 抗體購自於 sigma 公司。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 和 trypsin 購自於 Gibco 公司。PD98059 購自於 Alexis 公司，而 wortmannin 購自於 Calbiochem 公司。protein A-sepharose beads 購自於 Zymed 公司。IGF-IR、IR、Met、FAK、caspase-3 抗體購自於 Santa Cruz 公司。IRS-1、IRS-2、Src 及 anti-phosphotyrosine 抗體購自於 Upstate Biotechnology 公司。Matrigel、PI3K、p130^{Cas}、paxillin、Grb2、integrin β_1 、integrin β_3 、E-cadherin、N-cadherin、EGFR 與 caveolin 抗體購自於 Becton Dickinson 公司。

二、 細胞培養

細胞來源

人類肺癌細胞株 CL1-0 及其亞株 CL1-1，CL1-5 是由台大楊洋池教授所贈與。CL1-0 取自于一位患有非小細胞肺癌病人的組織，而 CL1-0 亞株 CL1-1，1-2，1-3，1-4，1-5 乃是經由 invasion assay 所分

離出來。其中 CL1-5 的侵入性最強，而 CL1-1 最弱。本篇論文是以 CL1-0，及其亞株 CL1-1，CL1-5 為實驗材料。CL1-0，1-1，1-5 以含有 10% fetal bovine serum (FBS)，1 mM sodium pyruvate solution，0.1 mM non-essential amino acid solution，2 mM L-glutamin，100 U/ml penicillin 和 100 μ g/ml streptomycin 的 DMEM 培養，每二至三天更換一次新的培養液。

細胞繼代培養

當細胞長到幾近全滿時，將培養液吸掉，以 1X PBS (含 137 mM NaCl，2.7 mM KCl，10 mM Na_2HPO_4 ，1.8 mM KH_2PO_4) 沖洗二次，再加入 1X trypsin (含 0.25% trypsin，1 mM EDTA) 進行消化作用。待細胞和培養盤完全分離後，加入含有血清的培養液終止 trypsin 的反應，將細胞打散，再以一比六的稀釋倍數將細胞分到新的培養盤繼續培養。

冷凍細胞

當細胞長到幾近全滿時，將培養盤中的培養液吸掉，以 1X PBS 沖洗二次，加入 trypsin 作用。消化後的細胞，以轉速 1200 r.p.m. 離心 8 分鐘後，吸掉上清液，加入少量 freezing medium (含 30% FBS，

10% DMSO) 進行細胞計數。而後將 1.5×10^7 /vial 的數目加入冷凍小管，放入 -70°C 的冰箱中 24 小時，再轉置于液態氮桶內儲存。

解凍細胞

將細胞由液態氮中取出後，放在 37°C 的水浴中回溫，而後與含 10% FBS 的培養液混合，加入 10 公分的培養盤中，放入 37°C 的細胞培養箱中進行細胞培養。6~8 小時後觀察細胞貼附的情形以及存活的狀況，若大多數細胞已貼附，則更換新的細胞培養液。

三、計算細胞生長曲線

將細胞以 1×10^3 /well 種於 24 孔細胞培養盤，並加入 10% FBS，20 ng/ml HGF，100 nM IGF-I，10 ng/ml EGF 或不加入任何刺激。刺激後 24、48、72 小時收集細胞，利用細胞計數器計算細胞數目並做成曲線。

四、製備細胞溶胞液 (cell lysates)

刺激後將培養盤中的培養液吸取，以 1X PBS 沖洗兩次，加入 lysis buffer (50 mM Tris，150 mM NaCl，2 mM EDTA，1 mM Na_3VO_4 ，10 mM NaF，10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin，1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton X-100)。將細胞與 lysis buffer 的混合液置於 1.5 ml 的離心管，在 4°C 下混合作用 1~2 小時，接著以 14000 r.p.m. 的速度離心 15 分鐘，所得上清液即為細胞溶胞液。

蛋白質濃度測定是採用 Bradford 的方法 (BioRad protein assay)。將 dye reagent 和稀釋過的樣品以 1:4 的比例混合均勻，靜置室溫 5~10 分鐘。以分光光度儀測量波長 595 nm 的吸光值，再與標準曲線比對，計算出樣品的蛋白質濃度。取出部份的細胞溶胞產物與 SDS sample buffer (含 15 mM Tris, pH6.8, 10% glycerol, 0.5% SDS, 180 mM β -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue) 混合，於 100 °C 乾浴器中加熱 5~10 分鐘；其餘的細胞溶胞產物則貯藏在 -80°C 冰箱。

五、SDS-聚丙烯醯氨板膠電泳 (SDS-PAGE) 及 Commassie Blue

染色法

依實驗所需配製 6~12% 的下膠 (含 6~12% acrylamide : bisacrylamide (29 : 1), 375 mM Tris, pH 8.8, 0.1% SDS)。將上述試劑與 10% ammonium persulfate、TEMED 混合均勻後，加入直立式膠台座中，靜置 30~60 分鐘。待下膠凝固後，再加入 5% 上膠 (含 5% acrylamide : bisacrylamide, 125 mM Tris, pH 6.8, 0.1% SDS) 並將梳狀塑膠薄片 (comb) 置入，待其凝固後取出，所形成的凹槽可供樣

本注入之用。下膠凝固之後便可將樣本注入凹槽。電泳時採固定電流，每片膠約須 15~20 mA。

取出電泳完畢的膠片後，浸漬於染色溶液（含 0.2% Brilliant blue R-250，50% methanol 及 10% acetic acid glacial），並輕微搖晃 40~60 分鐘，再將膠片轉置於脫色溶液（含 10% methanol 及 10% acetic acid glacial）中，更換脫色溶液數次直到 band 出現。

六、西方墨點法（Western Blot）

依實驗所需配製 6~12% SDS-聚丙烯醯氨板膠，以固定電流進行電泳，待 dye front 跑至膠底部即可停止。在電泳停止前，先裁剪尺寸大小與膠片相仿的 PVDF membrane，將其以 methanol 浸漬 1~2 分鐘，而後用二次水浸洗 5 分鐘，重覆浸洗兩次後再將 PVDF membrane 浸漬於轉漬緩衝液（含 25 mM Tris-HCl，192 mM Glycine 及 20% methanol）中備用。將電泳完畢的膠片，緊貼於 PVDF membrane，置於轉漬器中，並使用固定電壓 100 伏特轉漬 2 小時。轉漬完畢的 PVDF membrane 以含 5% 脫脂奶粉的 TBST（含 50 mM Tris-Hcl，pH 7.4，150 mM NaCl，0.1% 的 Tween-20）浸泡，在室溫下震盪作用 1 小時，再與初級抗體作用。在室溫下作用時間為 2 小時，在 4°C 則須隔夜（overnight）。作用完後以 TBST 浸洗三次，每次 10 分鐘。浸洗後把

membrane 和二級抗體置於室溫作用 1 小時，同樣再以 TBST 浸洗 30 分鐘。最後用 ECL 組裝試劑使蛋白質呈像在 X 光片上。

七、免疫沉澱法

細胞以 3×10^6 細胞數種在 10 公分培養盤，依實驗所需做適當的刺激並收取細胞溶胞液。將等量的細胞溶胞液加入 1~2 μg 的抗體及 50 μl protein A-sepharose beads，在 4°C 下作用 6~8 小時，而後快速離心 15 秒，將 sepharose beads 沉澱下來，抽掉上清液，加入 lysis buffer 清洗 beads 3~4 次。最後一次清洗後，加入 2X sample buffer，在 100°C 乾浴器中加熱 10 分鐘，取其上清液此即為免疫沉澱的樣品。

八、Gelatin Zymography

細胞株以 $5 \times 10^5/\text{well}$ 的細胞數種在 24 孔的培養盤上，6~8 小時後用 1X PBS 沖洗二次，更換成不含血清的培養液並加入所需刺激的生長因子。在 37°C 培養 24 小時後，收取細胞培養液，以轉速 1200 r.p.m 離心 3~5 分鐘，取上清液。將此上清液與不含 β -mercaptoethanol 的 SDS-sample buffer 混合，在 37°C 作用 30 分鐘，再注入含 0.1% gelatin 的 8% SDS-聚丙烯醯氨板膠。電泳完畢後，將膠片置于 Renaturation Buffer (含 2.7% Triton X-100)，於室溫下作用 1 小時，再更換成

Developing Buffer (含 50 mM Tris, pH 7.5, 200mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.2% Brij35 solution), 並在 37°C 作用 16 小時。作用完後, 將膠片以二次水清洗數次, 再以 Commassie blue 進行染色。

九、Scratch wound motility assay

細胞株以 3×10^5 /well 的細胞數種在 24 孔的培養盤中。待細胞生長到幾近全滿時, 先用培養液沖洗二次, 再以吸管尖 (yellow tip) 在每一孔中間劃一直線, 最後用培養液沖洗使得中間的細胞溝呈現無細胞的狀態。接著給予適當刺激, 並在每 12 小時照像, 以觀察細胞移動的情形。

十、In vitro Matrigel invasion assay

本實驗是使用直徑 6.5 mm, 孔徑為 8.0 μ 的 transwell (Costar)。首先在 transwell 濾膜的下方覆蓋一薄層 Matrigel, 待其風乾後, 再在濾膜的上方覆蓋另一層 Matrigel (20 μ g/well)。而後將 5×10^4 /200 μ l 細胞加入 upper chamber, 而 lower chamber 則加入 600 μ l 培養液及所需刺激。三天之後, 取出 transwell, 先用 10% 福馬林固定, 再以 hematoxylin 和 eosin 染色。

十一、Apoptosis assay

本實驗利用二種方式來誘發細胞凋亡。第一種方式是移除培養液中的血清。將 5×10^4 /well 的細胞數培養在放有 12 mm 蓋玻片的 6 公分培養盤中，待細胞貼附後，用 1X PBS 沖洗二次，加入不含血清的培養液。培養 24、48、72 小時後將玻片取出，以 2% 福馬林固定作用 20 分鐘，再用含 0.1 M glycine 的 PBS 沖洗三次，加入 0.5% Triton X-100 作用 10 分鐘後，再用 1X PBS 沖洗數次，最後加入 4 μ g/ml Hoescht 33258 染色 1 分鐘。核片斷化的情形以螢光顯微鏡觀察。

第二個方式是使細胞無法貼壁。首先在 6 公分培養盤上覆蓋 poly-HEMA (poly (2-hydroxyethyl methacrylate)) (5 mg/cm^2)，在通風櫥中風乾後，用 1X PBS 沖洗二次，加入 5×10^4 /well 的細胞數培養 24、48、72 小時後，收集細胞，利用 cytospin (1500 r.p.m, 10 分鐘) 將 $1 \times 10^3 \sim 10^4$ 的細胞數離心到玻片上，再以 Hoescht 33258 染色，觀察細胞核片斷化的情形。若是此方式無法誘發細胞凋亡時，則在培養液中加入 EGTA (2.5、5、10 mM) 阻斷細胞與細胞之間的黏附作用。除此之外，另收集細胞溶胞液以西方墨點法觀察 caspase-3 活化的情形。

第三章 結果

一、CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 的細胞型態

肺癌細胞株 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 培養在一般的塑膠培養盤、第一型膠原蛋白 (collagen I)、或一種類似基底膜的基質上 (Matrigel) 時，細胞的形態大為不同。在一般的塑膠培養盤上，CL1-0 和 CL1-1 為不規則的鱗狀 (cobblestone-like) 且細胞與細胞緊密接觸；CL1-5 則為紡錘狀和鱗狀，而細胞呈散狀分布 (圖一，a、d、g)。當培養在 collagen I 上時，CL1-0 和 CL1-1 貼附的程度減少且細胞無法完全展開 (spread-out)，因而呈現圓形的形態。除此之外，細胞之間的接觸降低。CL1-5 培養在 collagen I 上的形態則與在一般塑膠培養盤上相同 (圖一，b、e、h)。而培養在 Matrigel 會造成細胞聚集，進而形成細胞團 (cell cluster) 的構造，其中以 CL1-5 最為明顯 (圖一，c、f、i)。

二、蛋白分子在 CL1-0 及其亞株 CL1-1 和 CL1-5 的表現

我們以免疫沉澱法及西方墨點法檢測各種蛋白分子在 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 的表現，其中包括了 (1) 生長因子受體：Met、IGF-IR、EGFR；(2) 參與細胞與細胞及細胞與細胞外基質作用的分子：integrin β 1、integrin β 3、E-cadherin、N-cadherin；(3) 細胞貼附

所誘發的訊息分子：FAK、Src、paxillin、P130^{cas}；及（4）其他分子：transglutaminase II、caveolin-1。我們發現 CL1-5 表現高量 Met、EGFR、integrin β 1、integrin β 3、paxillin、p130^{cas}、transglutaminase II 和 caveolin-1。而 CL1-1 則是表現較高的 IGF-IR 和 E-cadherin。其他分子如 N-cadherin、Src、FAK 和 Grb2 則無顯著差異（圖二、三）。其中比較特別的是 IGF-IR 的表現，因為 IGF-I 曾被證實與腫瘤的生長和轉移有關，而我們卻發現侵入性較高的細胞其 IGF-IR 的表現低於侵入性較低的細胞。不過相同的情形也曾在前列腺癌細胞被偵測到（62）。由於 Met 和 IGF-IR 在 CL1-1 和 CL1-5 中的表現歧異，我們進而研究 HGF 和 IGF-I 在這些細胞株的訊號傳遞及其對細胞存活、移動及 MMP 表現的影響。

三、HGF 刺激對 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 所誘發的訊息傳遞

為了檢測（1）受體的高度表現是否會造成受體自發性的活化（ligand-independent activation），（2）受體在這些細胞株中是否因突變而轉為持續性的活化態（constitutive active），及（3）腫瘤細胞是否會分泌 HGF 而造成 autocrine loop，我們比較細胞在未受及接受刺激下受體酪胺酸磷酸化的情形以及其下游的訊號傳遞。三株細胞以 20 ng/ml HGF 刺激 20 分鐘，收集的細胞溶胞液再以免疫沉澱法及西

方墨點法檢測蛋白質的表現量及磷酸化的程度。在未受刺激時，Met 並無磷酸化的情形產生。HGF 的刺激誘發 Met 酪胺酸磷酸化，但主要是發生在 CL1-5，這應該是因為 Met 在 CL1-5 的表現量遠高過於另兩株細胞的緣故（圖四，A）。Erk 和 Akt 與細胞增殖、移動、存活有關，且許多生長因子的刺激都會造成 Erk 和 Akt 的活化，所以我們接著再以西方墨點法檢測這兩個分子在細胞株的活化情形。CL1-5 在未受刺激時，Erk 和 Akt 已是在活化態，HGF 的刺激並不能加以提高其活化情形。反之，在 CL1-0 和 CL1-1 中 Erk 和 Akt 並無自發性的活化，而 HGF 可刺激 Erk 和 Akt 的活化（圖四，B）。對於 HGF 刺激造成 Met 和 Erk、Akt 活化程度的差異，我們推測可能的原因是在 CL1-0 及 CL1-1 中，儘管 Met 的表現量較低，但已足夠引發 Erk 和 Akt 活化。至於在 CL1-0、CL1-1 中 Met 的酪胺酸磷酸化無法被檢測到可能是因為抗體的敏感性較低造成的。另一種可能是，HGF 是經由 EGFR 誘發 Erk 和 Akt 的活化（40）。基於以上的結果，我們推斷 CL1-5 並無 autocrine loop 的情形，且 Met 的高度表現並未造成受體自發性的活化。除此之外，Erk 和 Akt 在 CL1-5 細胞中自發性的活化應與 Met 的高度表現無關。

四、IGF-I 刺激對 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 所誘發的訊息傳遞

我們檢測 IGF-I 刺激對 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 所誘發的訊號傳遞。三株細胞以 100 nM IGF-I 刺激 15 分鐘，收集的細胞溶胞液再以免疫沉澱法及西方墨點法檢測蛋白質的表現量及磷酸化的程度。細胞在未受刺激時，IGF-IR 並無磷酸化的情形產生。IGF-I 刺激誘發兩個蛋白分子的酪胺酸磷酸化，其分子量約為 105 及 95 KDa (圖五，A)。因為這和 IGF-IR 及胰島素受體 (insulin receptor, IR) 的分子量十分相近，所以我們將 membrane 洗淨並與 IGF-IR 和 IR 的抗體作用，進而確認 105 KDa 的蛋白為 IGF-IR 而 95 KDa 為 IR。不同於 HGF/Met 的結果，高量的受體磷酸化是發生在 CL1-0 及 CL1-1，這應該是因為 IGF-IR 在 CL1-0 和 CL1-1 的表現量遠高過於 CL1-5 的緣故 (圖五，A)。IR 與 IGF-IR 共同沉澱的結果並不意外，因為已有文獻證實 IR 和 IGF-IR 可以形成雜合受體 (hybrid receptor)，且 IGF-I 或胰島素皆可結合上並誘發訊號傳遞 (63)。我們接著檢測 IGF-I 刺激對 IR 酪胺酸磷酸化的影響。細胞溶胞液加入 IR 的抗體進行免疫沉澱，再以西方墨點法檢測 IR 的表現量及磷酸化的程度。然而，不論刺激與否皆無法造成 IR 的酪胺酸磷酸化，且其表現量在三株細胞中並無差異 (圖五，B)。

IGF-IR 具酪胺酸激酶的活性，活化的 IGF-IR 可促成多個分子結合到受體上並被磷酸化，IRS-1 和 IRS-2 正是其中的兩個受質。磷酸

化的 IRS 可作為眾多下游訊息分子的結合聚點 (docking site)，如 PI3K、Grb2、SHP-2、Nck 等，進而活化多重的訊息路徑。其中 PI3K 會催化細胞膜上磷脂質的磷酸化，造成 Akt 活化；而 Grb2/SOS 則可促進 Ras 活化，最終造成 Erk 活化。我們發現 IGF-I 刺激所誘發 IRS-1 磷酸化主要發生在 CL1-5 而 IRS-2 卻是在 CL1-0 和 CL1-1，這個差異是歸因於分子表現量的高低 (圖六、七，A)。PI3K 及 Grb2 結合到 IRS 的量度大致與 IRS 酪胺酸磷酸化的程度成正比 (圖六、七，B)，除了 Grb2 與 IRS-1 結合之外。儘管 IRS-1 酪胺酸磷酸化在 CL1-5 最高，Grb2 結合到 IRS-1 的程度卻無相同的情形 (圖六，B)。而 Erk 和 Akt 的結果則與 HGF 的實驗相似。CL1-5 在未受刺激時，Erk 和 Akt 已是在活化態，IGF-I 的刺激並不能加以提高其活化情形。反之，在 CL1-0 和 CL1-1 中 Erk 和 Akt 並無自發性的活化，而 IGF-I 可刺激 Erk 和 Akt 的活化 (圖八)。綜合而言，IGF-I 在三株細胞皆可誘發訊號傳遞，但由於 IGF-IR、IRS-1 及 IRS-2 表現量不同，因而有可能造成訊號傳遞的強度與路徑有所差異；這是否與細胞侵入性或其他 phenotype 有關將是我們未來研究的方向。除此之外，Erk 和 Akt 在 CL1-5 細胞中自發性的活化應與 IGF-I 的訊號傳遞無關。

五、CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 的生長曲線

在釐清 Met 和 IGF-IR 在細胞株的表現量及 HGF 和 IGF-I 所誘發的訊號傳遞之後，我們接下來檢測這些生長因子對細胞增生的影響。細胞以 10%胎牛血清、20 ng/ml HGF、100 nM IGF-I、10 nM EGF 刺激 0-3 天，每 24 小時收取細胞進行計數，最後作成生長曲線。實驗結果顯示不論是以胎牛血清或生長因子刺激，CL1-0 和 CL1-1 的生長速率遠高過於 CL1-5 (圖九)。而在這些刺激當中，10%胎牛血清的效果又強過於生長因子。CL1-5 的生長速度緩慢並非意料之外，因為這與我們做繼代培養時的觀察相符合；且曾有文獻指出當腫瘤細胞轉移能力增強時，其增生的程度反而減弱 (64)。比較意外的是雖然 Met 在 CL1-0 和 CL1-1 的表現量不高，HGF 仍能有效地刺激細胞生長(圖九，A、B)。我們推測可能的原因是低量的 Met 已足夠傳遞訊息，促進細胞增殖；由前述實驗結果—HGF 誘發 CL1-0 和 CL1-1 細胞中 Erk 和 Akt 的活化—可為佐證 (圖四，B)。

六、MMP 在 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 的表現及所受的調節

癌細胞轉移需要與其周圍環境脫離，而細胞外基質的分解是促成轉移的一項要因。MMP 是一種蛋白水解酶，它的主要受質即是細胞外基質。目前已知的 MMP 共 28 種，各作用在不同的受質。本實驗以 gelatin zymography 檢測 MMP-2 和 MMP-9 的活性，因為這兩種

MMP 可以分解基底膜中的成分。我們將細胞培養在不含血清的培養液中並給予適當刺激，24 小時後收取培養液，以快速離心移除其中的細胞，所得上清液再以 gelatin zymography 分析。每個實驗樣品所用的體積相當於等數目的細胞。如同文獻所載，MMP-9 在 CL1-5 的活性高過於 CL1-0 和 CL1-1 (65)。雖然 MMP-2 的活性也可以被偵測到，但它的量低於 MMP-9。HGF 和 IGF-I 的刺激並未提高 MMP-9 的活性，不論是在 CL1-0、CL1-1 或 CL1-5 (圖十，A)。然而，當細胞培養在 Matrigel 上，MMP-9 的活性都大幅提高，但仍以 CL1-5 最強 (圖十，B)。因此，MMP-9 的活性不受 HGF 和 IGF-I 調節，反而因細胞與細胞外基質的接觸而上升。

七、CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 細胞株對促細胞凋亡刺激的敏感性

癌細胞的特性除了有不正常的增殖外，還會對促進細胞凋亡 (pro-apoptotic) 的刺激產生抗性，進而提高癌細胞數及腫瘤大小。為了了解細胞侵入性與此抗性的相關性，我們檢測 CL1-0 及其亞株 CL1-1、CL1-5 對各種促細胞凋亡刺激的敏感性。檢測方法是以測量核片段化 (DNA fragmentation) 及 caspase-3 的活化為主。促細胞死亡的刺激有許多種，如移除培養基中的血清、以藥物或 death receptor

ligand (Fas、TRAIL、TNF 等) 刺激細胞、或使細胞無法貼壁。上皮細胞在正常狀態下是與基底膜接觸，此種接觸可促進細胞存活。細胞無法貼壁時會死亡，此現象稱之為 anoikis。

我們發現移除培養基中的血清並不會造成 CL1-0、CL1-1、CL1-5 細胞死亡，即使處理高達三天的時間。當我們將培養皿以 poly-HEMA 處理而使細胞無法貼壁時，細胞雖懸浮但卻黏附在一起呈現細胞團的形態，且無細胞死亡的情形。使用 EGTA 螯合鈣離子以打斷 cell-cell junction 時，細胞團的尺寸變小但並未達到細胞完全分離的狀態。在加入 2.5 mM EGTA 作用 24 小時之後，三株細胞核的形態為完整且呈橢圓狀，但 CL1-5 的細胞核比另外二株小 (圖十一~十三)。作用 48 小時之後，部份 CL1-0 和 CL1-1 的細胞核呈現核片斷化的情形 (圖十一、十二); CL1-5 則不受影響 (圖十三)。在提高 EGTA 至 5 mM、10 mM，作用 48 小時之後，CL1-0 和 CL1-1 則有 20-30% 及 40-50% 的細胞核產生核片斷化的情形 (圖十一、十二)。CL1-5 即使在 10 mM EGTA 下作用 48 小時，細胞核仍保持完整 (圖十三)。檢測 caspase-3 的活化亦得到相同的結果 (圖十四)。所以，侵入性強的 CL1-5 較能抗拒細胞和細胞之間以及細胞和細胞外基質脫離所誘發的細胞凋亡。這個結果是合理的，因為轉移中的腫瘤細胞是不貼附在細胞外基質上，也沒有大量細胞死亡的情形產生。

八、HGF 及 IGF-I 刺激對 CL1-5 細胞移動的影響

為了探討 HGF 及 IGF-I 刺激對細胞移動的影響，我們使用 wound healing assay 來檢測細胞移動的程度。將細胞養到全滿，以吸管尖 (yellow tip) 刮出一條均勻的間隙，加入 10%胎牛血清、20 ng/ml HGF、100 nM IGF-I、10 nM EGF 刺激 0-36 小時，觀察細胞向間隙移動的情形。CL1-0 和 CL1-1 細胞移動的型態相似，間隙兩旁的細胞會逐漸向中央靠近，使得間隙的寬度愈來愈窄。然而，我們不確定這是因為 CL1-0 和 CL1-1 生長的速度較快還是細胞移動所造成的 (圖十五)。CL1-5 的細胞多以”單一細胞 (single cell)”的形態向間隙中央移動。HGF 及 IGF-I 皆可刺激細胞移動，但 10%胎牛血清效果更好 (圖十六)。由前述實驗結果得知，Erk 和 Akt 在 CL1-5 中為持續性的活化態。為了釐清這兩個訊號是否與細胞移動有關，我們在細胞培養液中加入 MEK 的抑制劑 PD98059 和 PI3K 的抑制劑 wortmannin，並觀察它們對細胞移動的影響。結果顯示這兩種抑制劑皆能降低細胞移動，但不能完全阻斷 (圖十七)。

九、HGF 及 IGF-I 刺激對 CL1-1 和 CL1-5 細胞侵入性的影響

為了探討 HGF 及 IGF-I 刺激對細胞侵入性的影響，我們以

Matrigel invasion assay 來檢測。將細胞培養在 Matrigel-coated 的 transwell 上，加入 10%胎牛血清、20 ng/ml HGF、100 nM IGF-I、10 nM EGF 刺激三天，觀察細胞穿透過 transwell 的程度。如同文獻所載，CL1-1 的侵入性非常低；除了胎牛血清可刺激少數細胞穿透過 transwell 之外，其他的刺激皆無作用（圖十八）。CL1-5 在未受刺激時已有明顯地細胞穿透情形，經過刺激之後效果更加顯著。其中以胎牛血清的作用最強，其次為 IGF-I 和 EGF，HGF 最弱（圖十九）。

第四章 討論

癌症的發生起始於一個細胞產生癌化，而此細胞經過持續地增生形成具有相同基因 (homogeneous) 的細胞群。但是再經過不斷生長分裂以及外來的刺激下，各個細胞間的差異也就愈來愈大，形成相異基因 (heterogeneous) 的細胞群。當癌細胞轉移時，它必須與鄰近的細胞及細胞外基質分離，移動到其他組織，並且在新的組織中生存下來 (66, 67)。而能夠成功地完成這個過程必須仰賴細胞本身的改變以及鄰近基質 (stroma) 的支持。基質中含有許多生長因子，例如 EGF、IGF-I、FGF、HGF 等，他們可以刺激細胞的增生、移動，細胞外基質的降解以及防止細胞凋亡，進而促進癌細胞的轉移 (68)。癌細胞本身則會有多重的基因表現改變，像 cell-cell junction 蛋白分子的表現量降低 (如 E-cadherin)。在此過程會伴隨有細胞形態的改變；細胞由鱗狀上皮細胞轉變為類似間葉組織中紡錘形的細胞，此種轉變稱為 epithelial-mesenchymal transition (EMT)。EMT 最早被證實和胚胎的發育有關，但是近年來發現與癌細胞的轉移也是密不可分 (69)。當細胞轉變為 mesenchyme 的形態時，E-cadherin 的表現降低、vimentin 升高，且細胞移動的能力大幅提高 (70-73)。若此時以轉染的方式高度表現 E-cadherin，則可以加強細胞和細胞之間的穩定性以及形成 cell-cell junctions (71-74)。EMT 的發生也可受生長因子影響。TGF- β 、

HGF、FGF-1、EGF 都曾被報導可以刺激 EMT，而其作用的機轉可能是經由活化 MAPK 或是 Rac 的路徑產生 Snail 和 Slung，進而降低 E-cadherin 的表現和 cell-cell junction 的穩定性以及影響細胞骨架的分佈 (63, 64, 75, 76)。

CL1-1 和 CL1-5 在形態上相差甚大，前者為鱗狀而後者為紡錘狀 (圖一)。除此之外，二者在蛋白分子的表現上也極為不同。E-cadherin 在 CL1-5 的表現降低，而 integrin $\beta 1$ 、integrin $\beta 3$ 、paxillin、p130^{cas} 卻是上升 (圖三)。Integrin 是細胞膜上的醣蛋白，由 α 和 β subunit 所組成。目前已知有 18 個 α subunit 和 8 個 β subunit，不同的組合可以結合到特殊的配子，但主要的配子是細胞外基質。配子和 integrin 的結合會引發細胞骨架的重整及訊息傳遞，FAK、Src、paxillin、p130^{cas} 皆參與此類訊息傳遞 (77, 78)。Integrin 的功能除了可提供物理性的黏附作用之外，還可促進細胞的增殖、分化、存活及移動。但是當 integrin 及其他相關的分子表現失當時，則與腫瘤的生長與轉移有關；例如轉移性高的癌細胞常被發現有 $\alpha_v\beta 3$ 或 $\alpha 6\beta 4$ integrin 的過高表現 (79, 80)。因此，CL1-5 不論在細胞形態或基因表現上都符合它的高侵入性。

當細胞轉變為 mesenchyme 的形態時，常伴隨有生長減緩的情形，這也是 adenocarcinoma 所有的特徵之一。因為 EMT 的發生需要

Smad2 的活化，而高度的 Smad2 活化會造成 cell cycle 的停止，因此細胞的增生能力降低 (64)。這或許可以解釋為什麼 CL1-5 的生長速度比 CL1-1 緩慢 (圖九)。

癌細胞轉移需要與其周圍環境脫離，而細胞外基質的分解是促成轉移的一項要因。MMP 是一種蛋白水解酶，它的主要受質是細胞外基質。然而，MMP 也能作用在 E-cadherin，如 MMP-3 和 MMP-7，因而促使 cell-cell junction 的瓦解 (81)。除此之外，也有報導指出 MMP 具有調節細胞生長的功能，例如在缺乏 *Mmp9* 的老鼠中，癌細胞的生長受到抑制 (82, 83)。這可能是藉由 MMP 的作用釋放出位於細胞膜上的生長因子如 TGF- α ，或分解 IGF-BP 使得 IGF 被釋放出來，進而促進細胞的生長 (84-87)。另外，MMP 也可以調節細胞凋亡。在乳腺上皮細胞中，MMP-3 可以經由分解 laminin 而引發細胞的凋亡 (88, 89)。而 MMP-7 會切割癌細胞膜上的 FasL，使其由細胞膜上游離出來而無法與鄰近細胞的 Fas 作用，因此減少細胞的死亡 (90)。MMP-9 和 MMP-11 也具有類似的功能 (91, 92)。這是癌細胞增加其存活及抗拒化療藥物的一種機轉。

轉移與侵入性高的癌細胞，通常 MMP 的表現量與活性也高 (81)。如同文獻所載，MMP-9 在 CL1-5 的活性高過於 CL1-0 和 CL1-1，然而 HGF 和 IGF-I 的刺激並未提高 MMP-9 的活性，反而因

細胞與細胞外基質的接觸而上升。目前為止，我們並不了解此種現象所代表的生理意義。但是在肺癌組織中，轉移的前端（leading edge of metastasis）常被檢測出有 laminin 5 的高量表現，這可能與引導癌細胞的移動有關。不過或許也能因此而提高 MMP 的活性以利癌細胞的轉移。

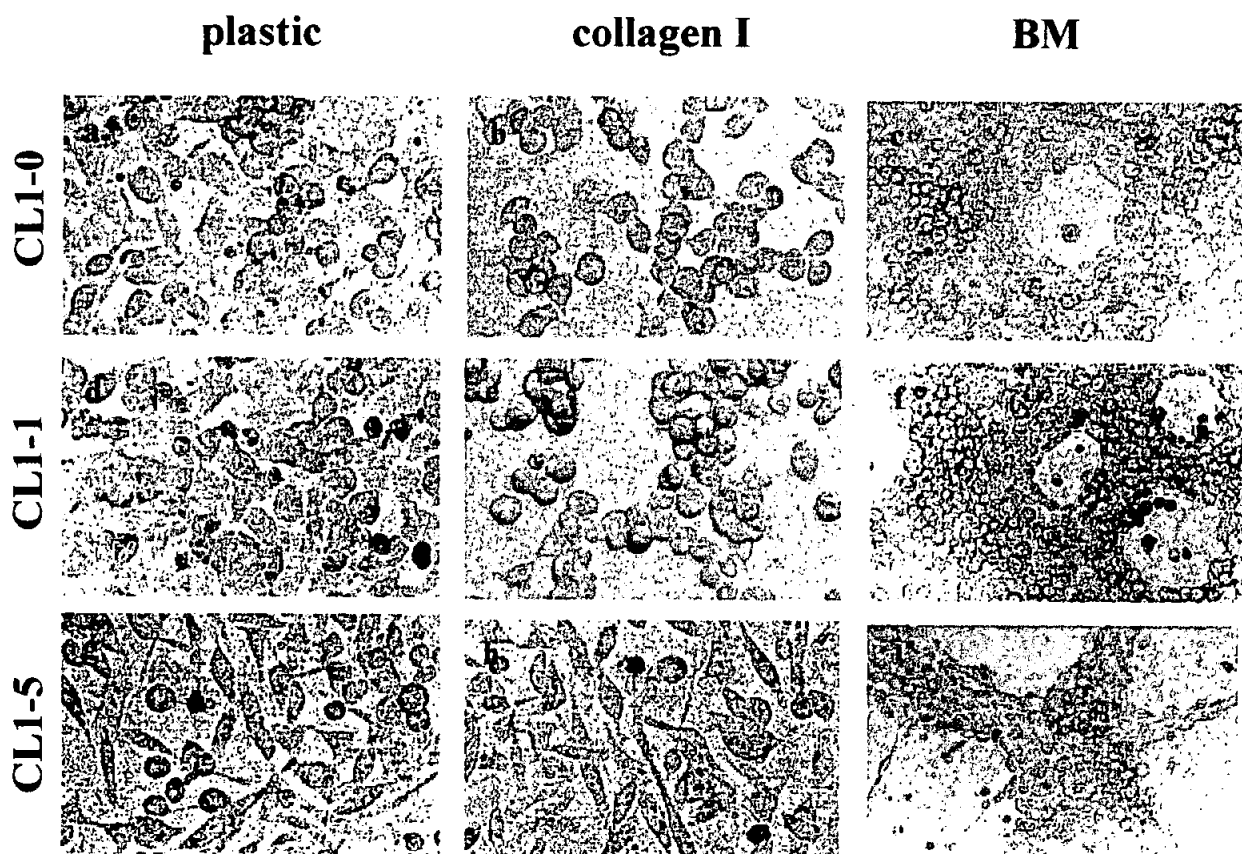
Anoikis 是指因細胞脫離附著層所誘發的死亡，這在正常細胞發育的過程中扮演了極為重要的角色，它可以阻止與基質脫離的細胞在不適當的環境繼續生長。其致死的機轉可能是經由活化 P38 kinase 而提高 FasL 的表現 (93, 94)。然而，在癌細胞形成和轉移的過程中，最大的特徵就是對於 anoikis 的敏感性降低。這種抗性是必要的，因為當癌細胞在血液或淋巴液中移動時是不與基質接觸的。據文獻所載，此抗性的產生可能與細胞產生大量的抗凋亡蛋白質 Bcl-X 有關。許多生長因子都可以減低細胞因不貼附而產生的死亡。在頭頸部的鱗狀上皮細胞癌，HGF 的刺激可以抑制 anoikis，這是經由活化 ERK 而提高 cyclooxygenase-2 (Cox-2) 的表現。Cox-2 是一個抗凋亡的蛋白質，當它大量表現時可以減低 anoikis 的產生 (95, 96)。此外，活化 FAK、Src 和 p130^{Cas} 也可以抑制 anoikis (97-99)。這些訊息分子都參與細胞貼附時 (through integrin) 所產生的訊息傳遞，所以當細胞不與細胞外基質接觸時，可藉由活化 integrin 下游的路徑以達到防止

anoikis 的目的。

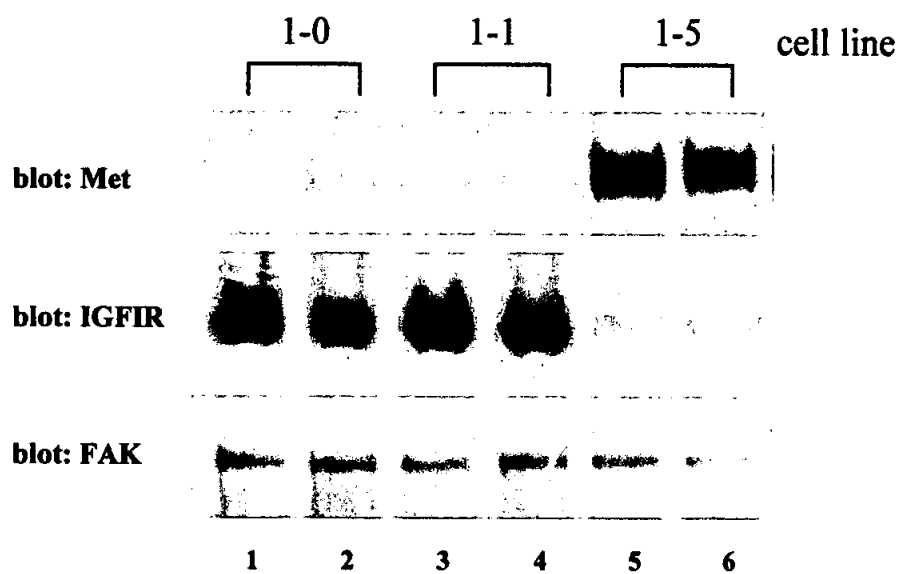
我們實驗的結果顯示，以懸浮方式培養肺癌細胞株並不會造成細胞死亡。但是當我們加入 EGTA 打斷 cell-cell junction 時，低侵入性的 CL1-0 和 CL1-1 會死亡，而高侵入性的 CL1-5 卻不會。這個結果並不意外，因為癌細胞轉移時，細胞間的黏附已大幅降低甚至不存在。所以對細胞型態為已轉變成紡錘形的 CL1-5 而言，此種處理應該不會有太大的影響。此外，CL1-5 表現高量的 p130^{Cas}、paxillin，或許與其抗性有關。

綜合而言，CL1-5 表現高量的 Met，HGF 的刺激可以提高細胞移動、侵入，但其產生的影響並未達到我們所預期的程度。我們推測可能的原因是 Met 的高量表現在增加細胞的生存能力及抑制細胞的凋亡。最近的研究發現細胞膜上的 Met 可以和 Fas 結合以防止 Fas 的多體化 (oligomerization)，進而阻斷 FasL 所引發的細胞凋亡 (100)。此功能不需要 HGF 的刺激。另外，HGF 在癌症細胞中的作用需要有 integrin β 4 的存在。Integrin β 4 如同 Met 的 signal amplifier；在 HGF 的刺激下，Met 會誘發 integrin β 4 的酪胺酸磷酸化，進而促使各種訊息分子的結合及活化，最後提高 HGF 訊息傳遞的強度 (101)。目前為止我們無法在細胞株中偵測到 integrin β 4 的表現，或許這可以解釋為什麼 HGF 對 CL1-5 所產生的作用不是很強。IGF-I 在三株細胞皆有

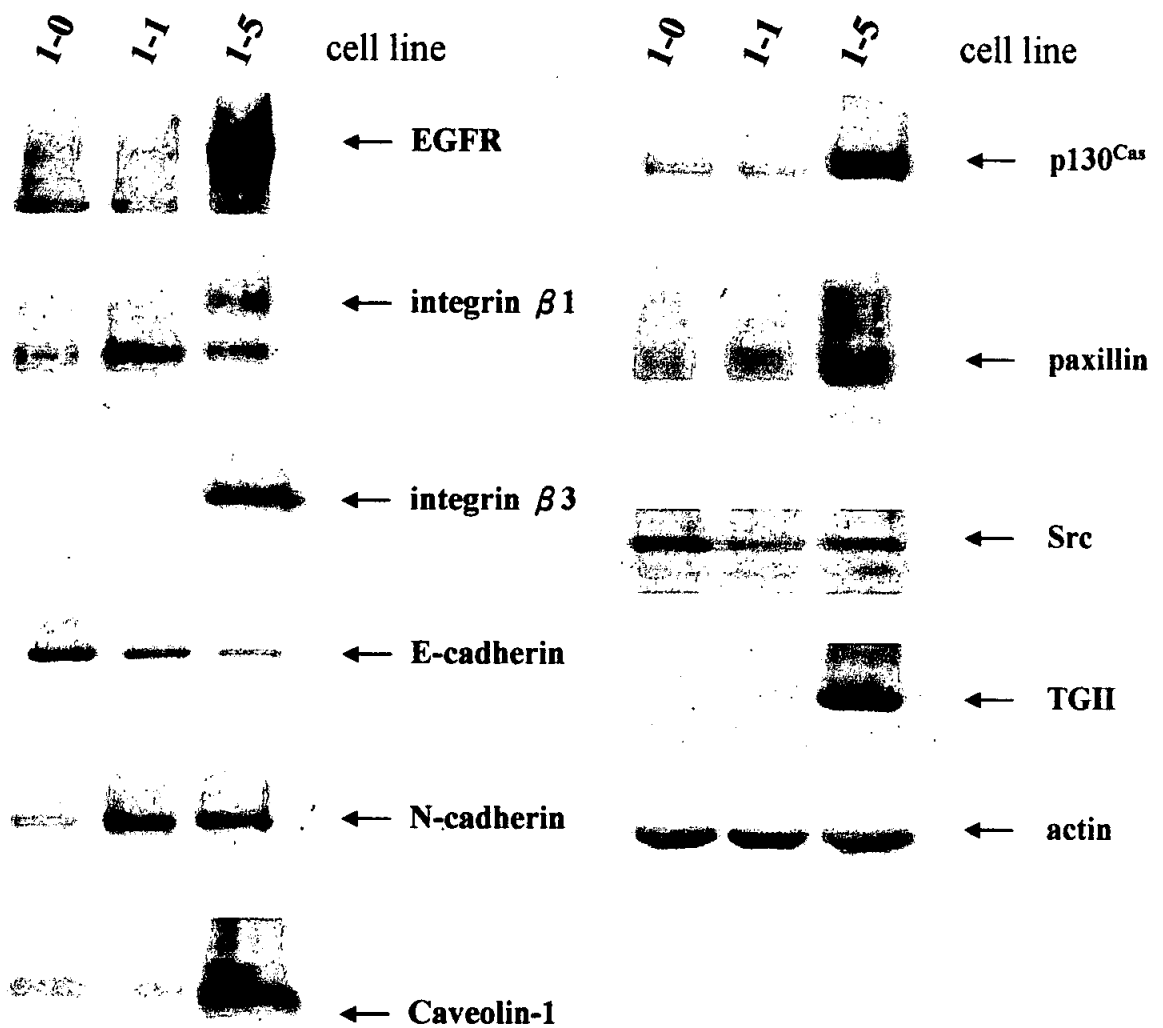
作用，因為 IGF-IR 和 IRS-2 在 CL1-0 及 CL1-1 表現較高，而 IRS-1 卻是在 CL1-5 較高。至於經由 IRS-1 或 IRS-2 所產生的訊息路徑的差不多，還需進一步釐清。



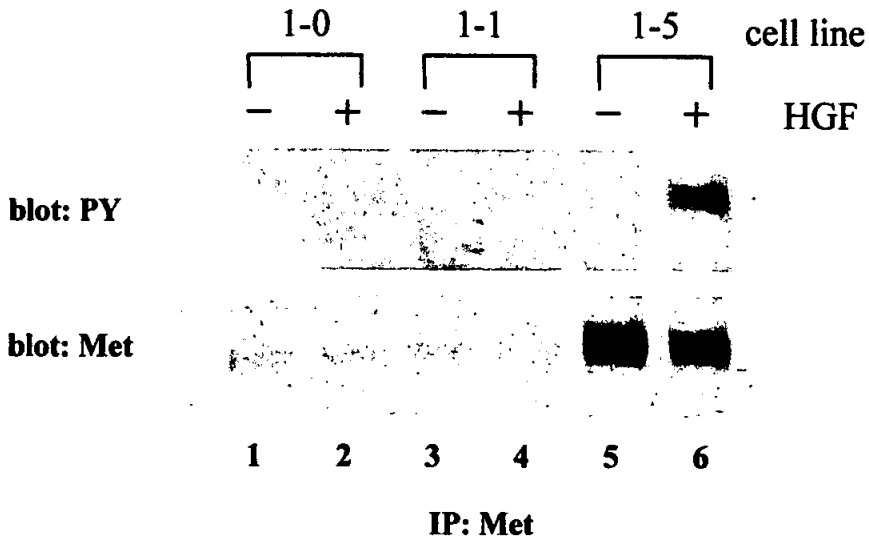
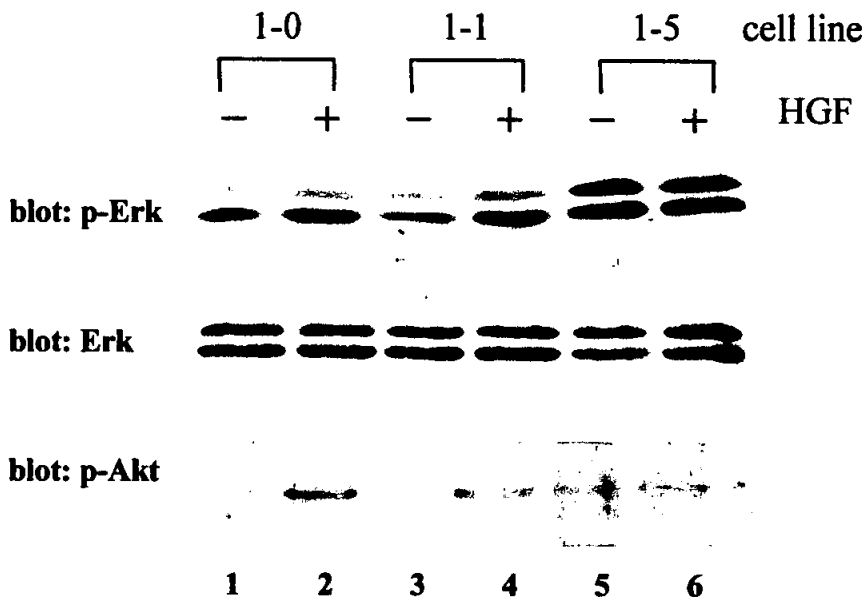
圖一、肺癌細胞株CL1-0及其亞株CL1-1、CL1-5的細胞形態。將細胞分別培養在塑膠盤 (plastic)、collagen I或基底膜 (BM) 上，並以光學顯微鏡照像。



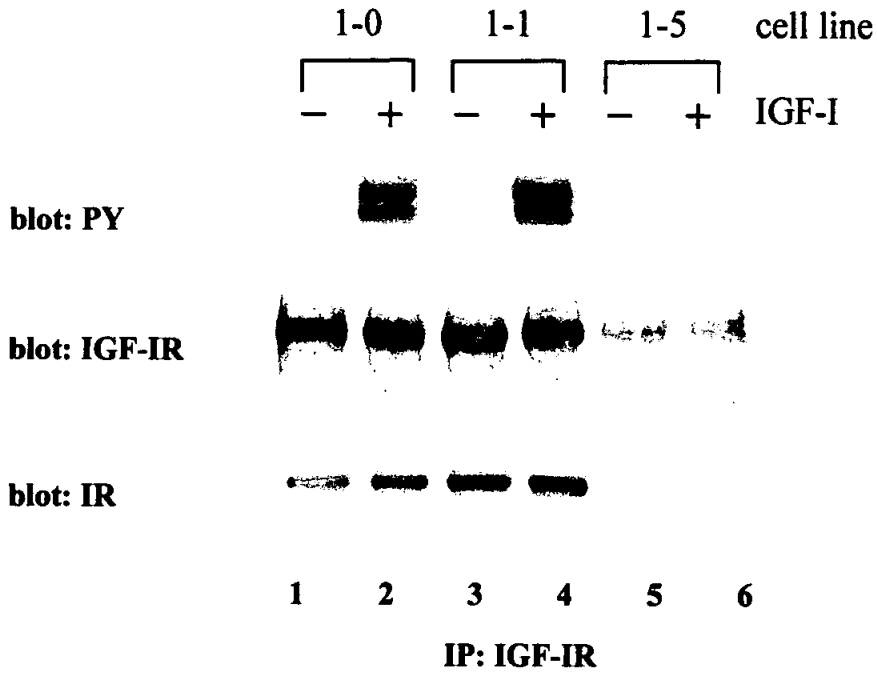
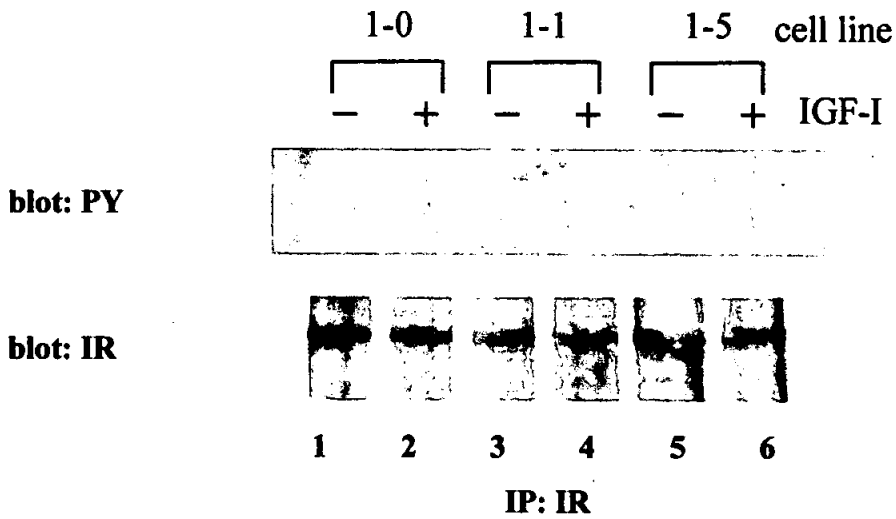
圖二、Met、IGF-IR及FAK在CL1-0及其亞株CL1-1、CL1-5的表現。收取三株細胞的細胞溶胞液，再以西方墨點法檢測Met、IGF-IR及FAK蛋白質分子的表現量。



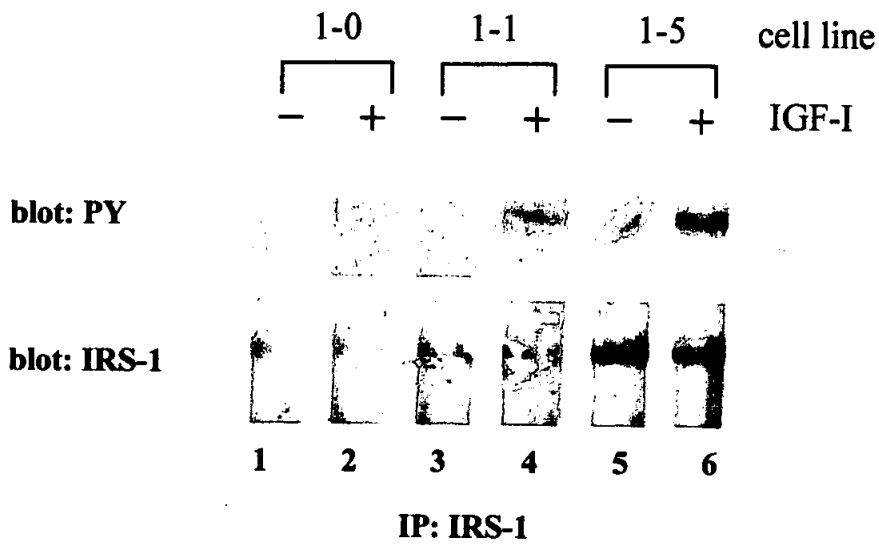
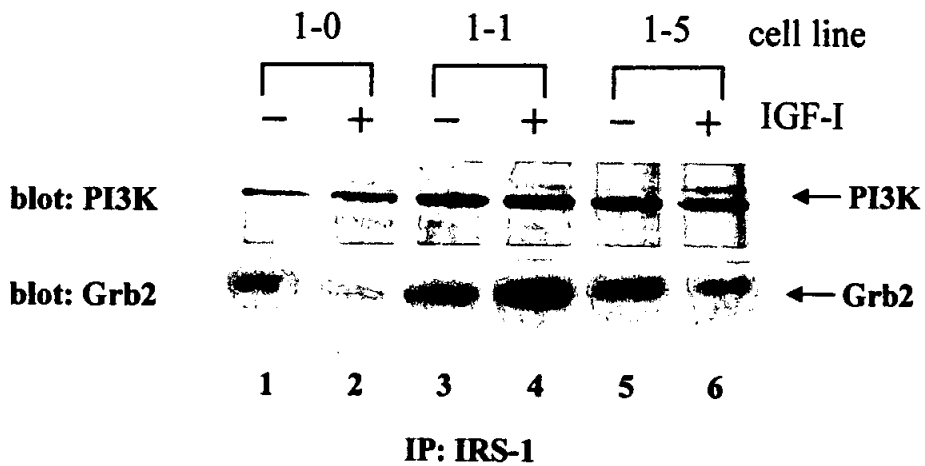
圖三、蛋白質分子在CL1-0及其亞株CL1-1、CL1-5的表現。收取三株細胞的細胞溶胞液，再以西方墨點法檢測各種蛋白質分子的表現量。

A**B**

圖四、HGF刺激對CL1-0、CL1-1和CL1-5所誘發的訊息傳遞。三株細胞以20 ng/ml HGF刺激20分鐘並收集細胞溶胞液。(A)細胞溶胞液以Met抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測Met表現量及酪胺酸磷酸化的情形。濾膜先與 α -phosphotyrosine抗體作用，呈像之後洗去，再與Met抗體作用。(B)利用西方墨點法分析細胞內p-Erk，Erk及p-Akt的表現量。

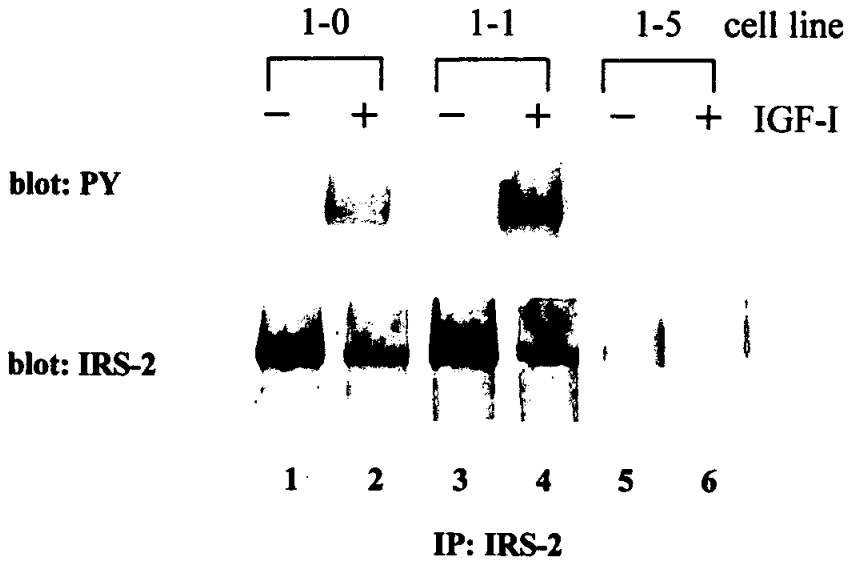
A**B**

圖五、IGF-I 刺激所誘發受體磷酸化的情形。三株細胞以100 nM IGF-I 刺激15分鐘並收集細胞溶胞液。(A)細胞溶胞液以IGF-IR抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測IGF-IR表現量及酪胺酸磷酸化的情形。(B)細胞溶胞液以IR抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測IR表現量及酪胺酸磷酸化的情形。

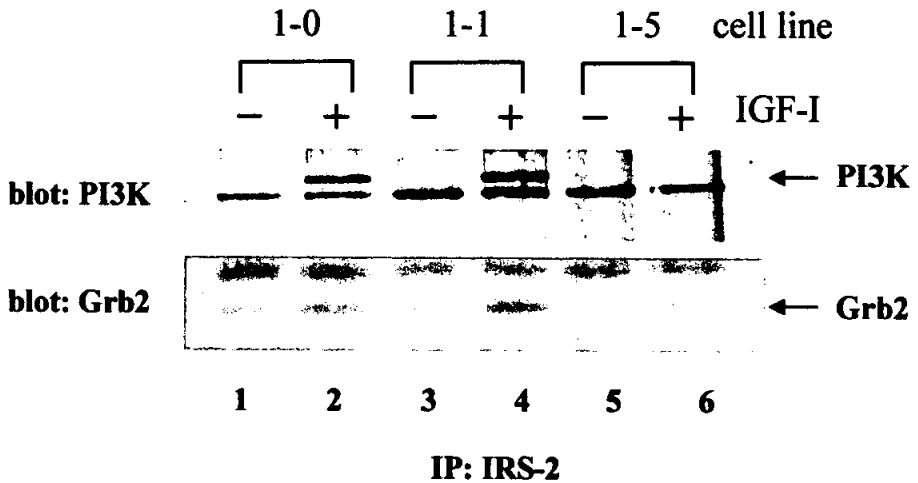
A**B**

圖六、IGF-I刺激所誘發IRS-1磷酸化及其下游的訊息傳遞。三株細胞以100 nM IGF-I刺激15分鐘並收集細胞溶胞液。(A)細胞溶胞液以IRS-1抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測IRS-1表現量及酪胺酸磷酸化的情形。(B)細胞溶胞液以IRS-1抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測PI3K和Grb2與IRS-1結合的情形。

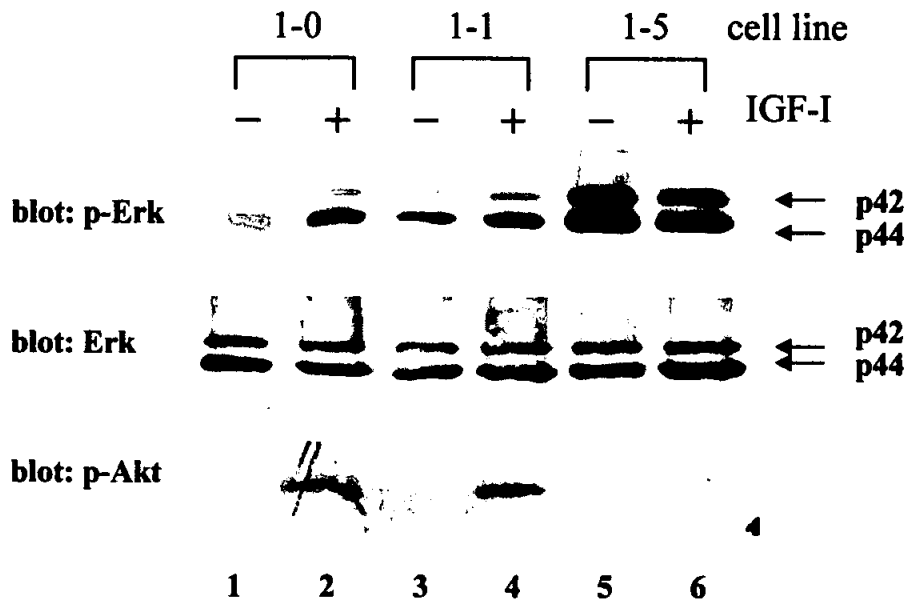
A



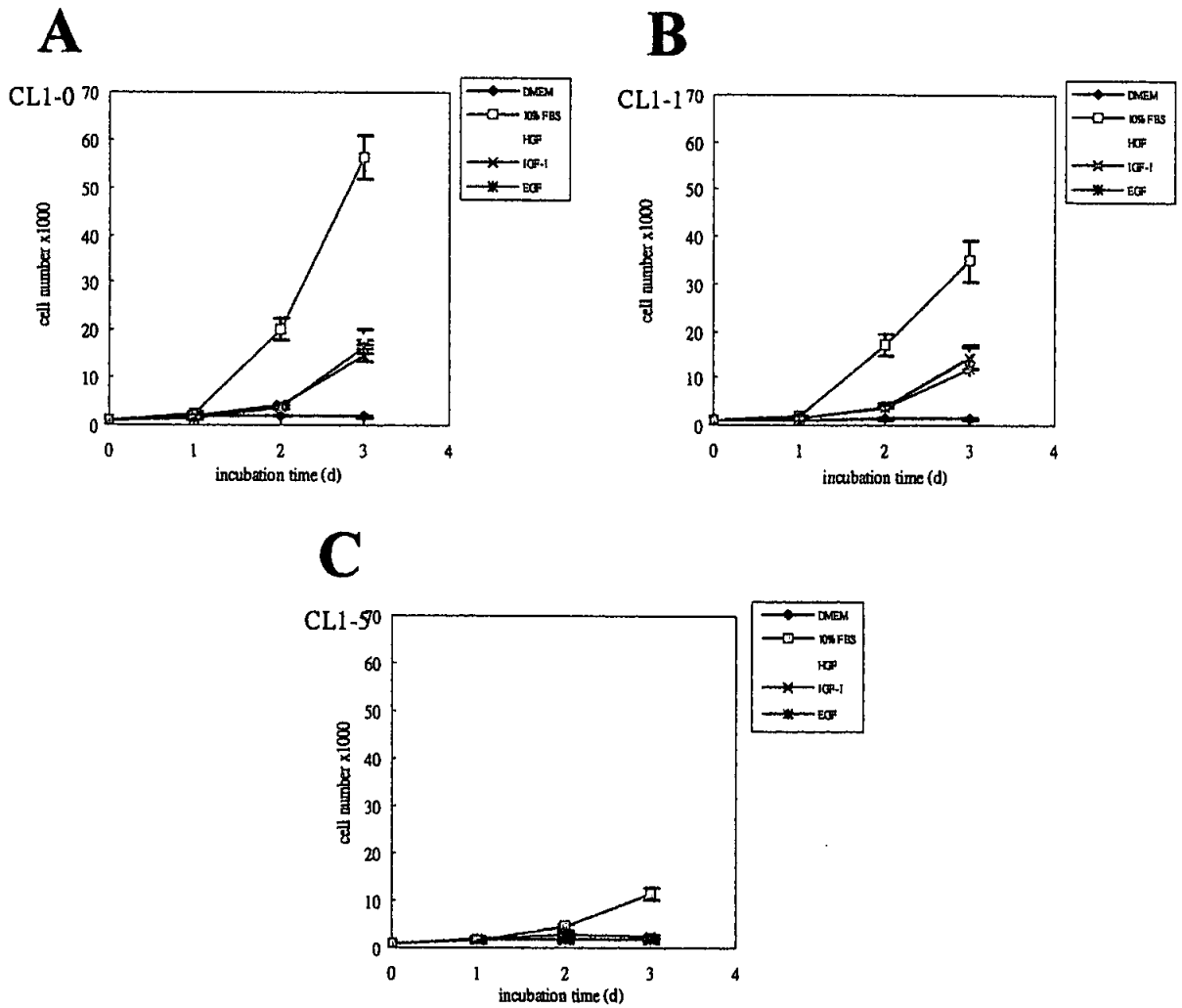
B



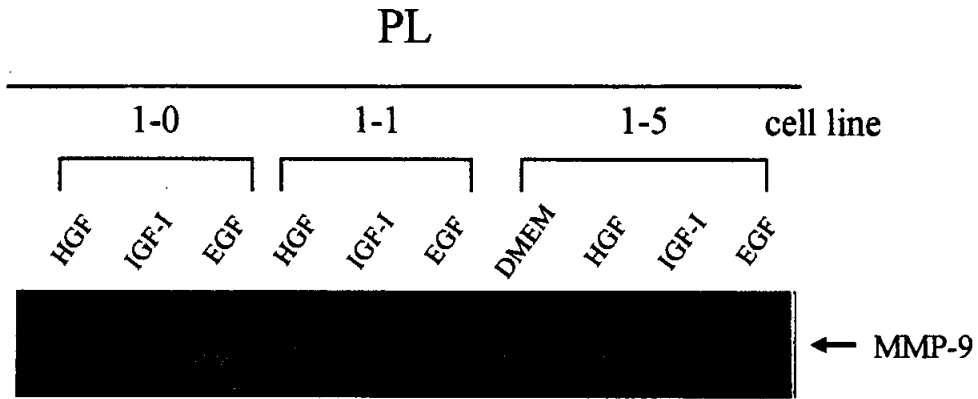
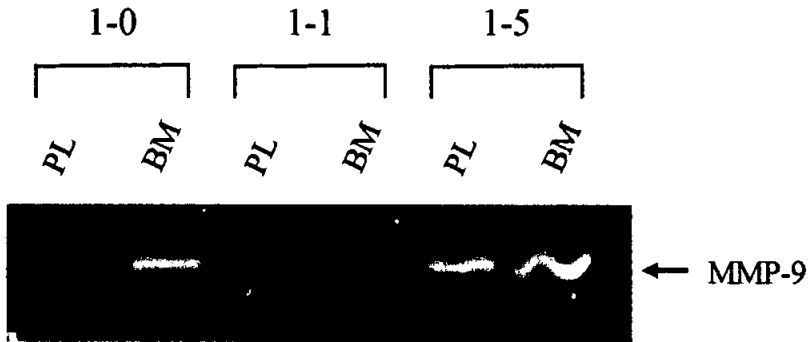
圖七、IGF-I刺激所誘發IRS-2磷酸化及其下游的訊息傳遞。三株細胞以100 nM IGF-I刺激15分鐘並收集細胞溶胞液。(A)細胞溶胞液以IRS-2抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測IRS-2表現量及酪胺酸磷酸化的情形。(B)細胞溶胞液以IRS-2抗體進行免疫沉澱，再用西方墨點法檢測PI3K和Grb2與IRS-2結合的情形。



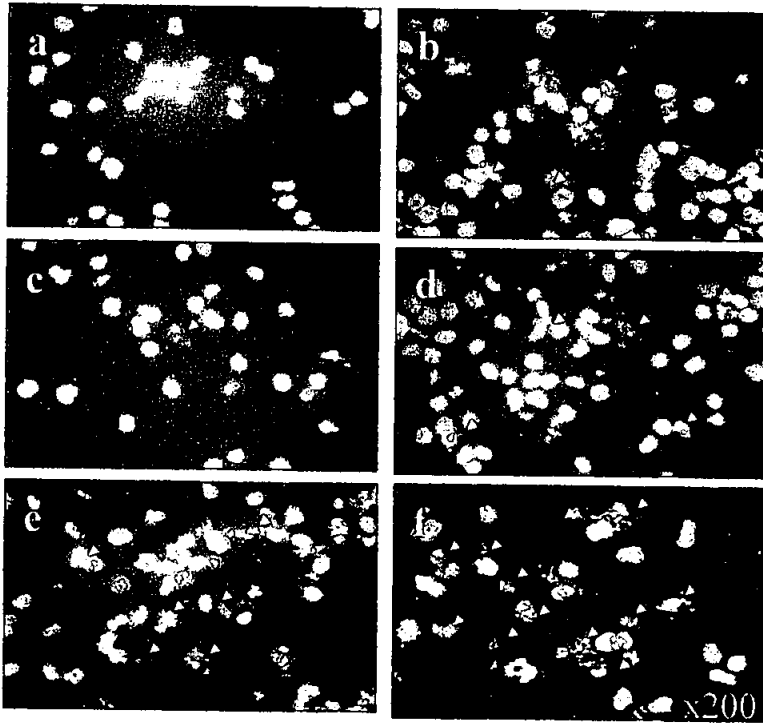
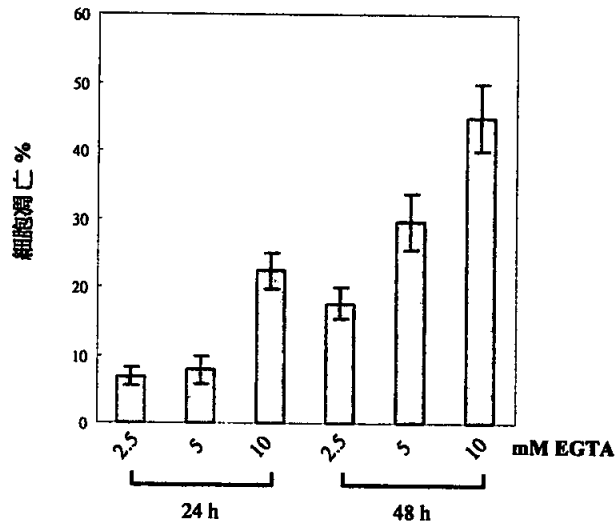
圖八、IGF-I刺激所誘發Erk及Akt活化之情形。三株細胞以100 nM IGF-I刺激15分鐘並收集細胞溶胞液。利用西方墨點法分析細胞內p-Erk、Erk及p-Akt的表現量。



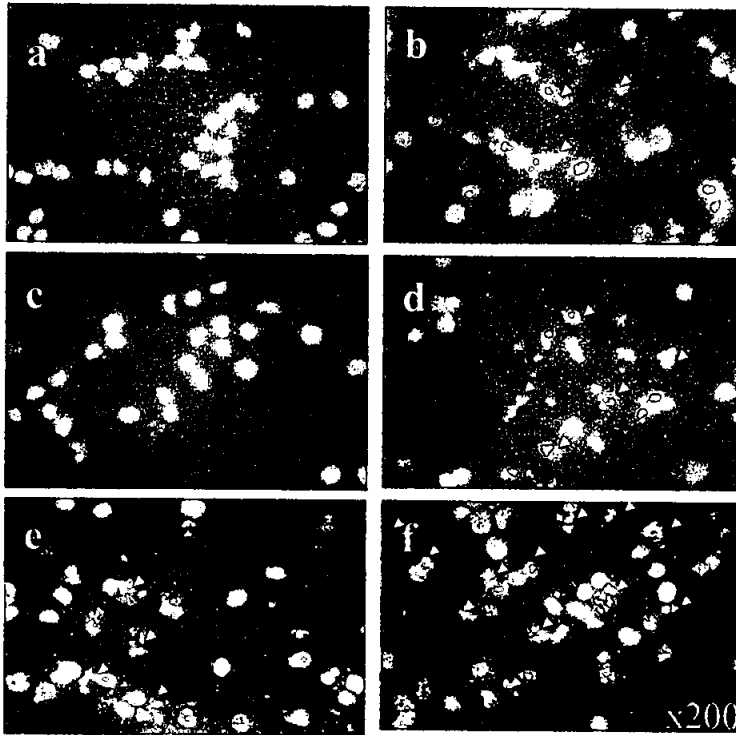
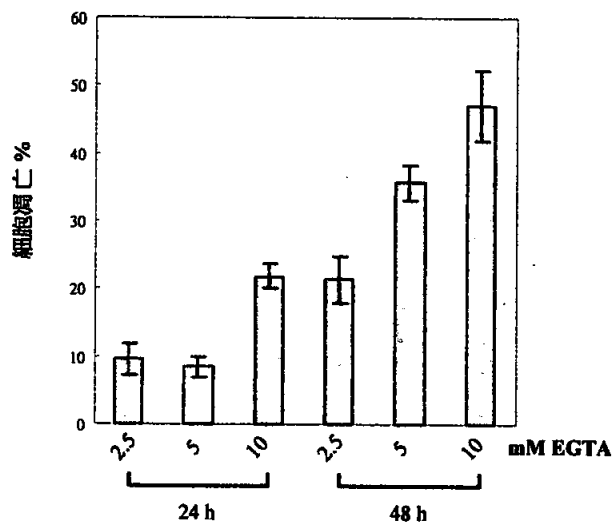
圖九、CL1-0及其亞株CL1-1、CL1-5的生長曲線。細胞以10%胎牛血清、20 ng/ml HGF、100 nM IGF-I、10 nM EGF刺激0-3天，每24小時收取細胞進行計數，最後作成生長曲線。此為三次實驗的算數平均數±標準偏差(S.D)。

A**B**

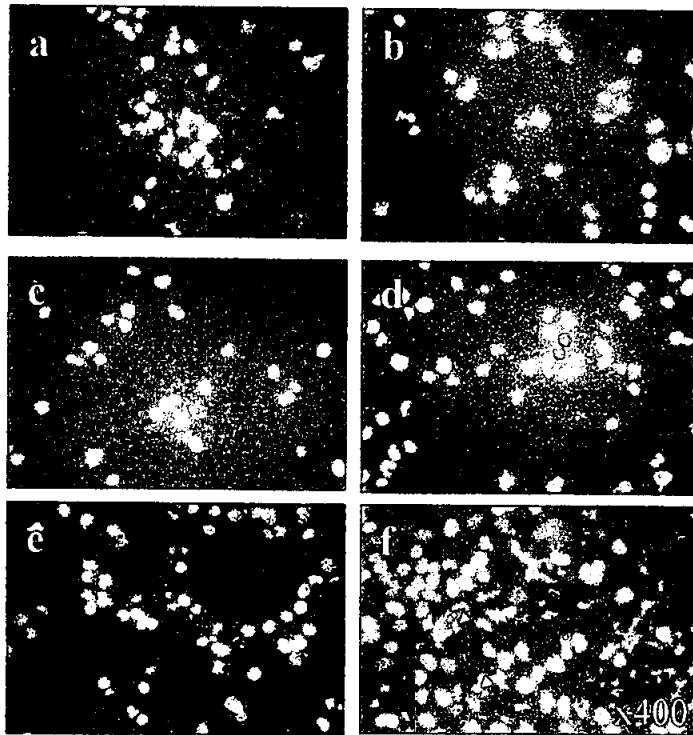
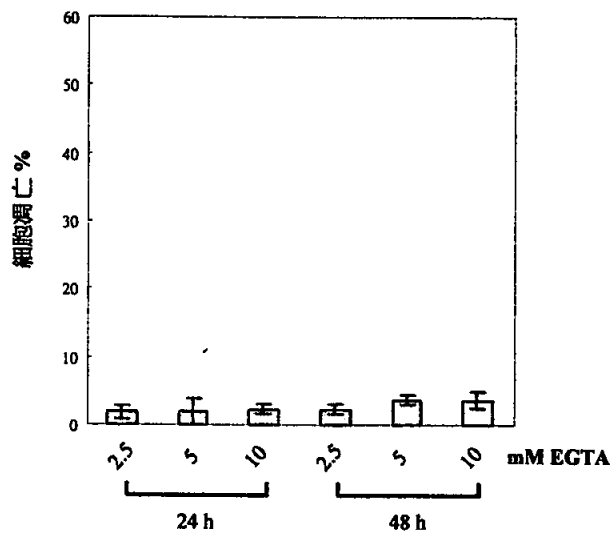
圖十、生長因子及細胞外基質對MMP活化的影響。(A)將細胞培養在塑膠盤 (PL) 上並加入20 ng/ml HGF、100 nM IGF-I、10 nM EGF，24小時後收取培養液，再以 gelatin zymography 檢測MMP-9的活性。(B)將細胞培養在塑膠盤或基底膜 (BM) 上，24小時後收取培養液，再以 gelatin zymography 檢測MMP-9的活性。

A**CL 1-0****B**

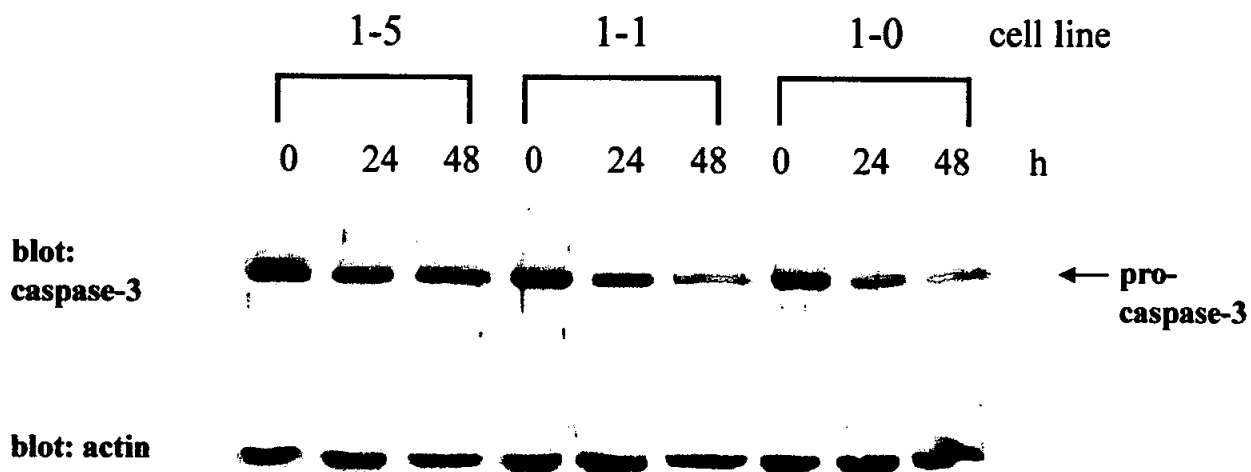
圖十一、CL1-0對促細胞死亡刺激的敏感性。(A)將CL1-0培養在poly-HEMA-coated的培養盤上，並加入 2.5 mM (a, b)、5 mM (c, d)、10 mM (e, f) EGTA。作用24小時 (a, c, e)、48小時 (b, d, f)之後，利用Hoescht 33258染色，並顯微鏡下觀察核片斷化的情形 (箭頭所指的位置)。(B)細胞凋亡百分比，此為三次實驗的計數平均數±標準偏差(S.D)。

A**CL 1-1****B**

圖十二、CL1-1對促細胞死亡刺激的敏感性。(A)將CL1-1培養在poly-HEMA-coated的培養盤上，並加入 2.5 mM (a, b)、5 mM (c, d)、10 mM (e, f) EGTA。作用24小時 (a, c, e)、48小時 (b, d, f)之後，利用Hoescht 33258染色，並顯微鏡下觀察核片斷化的情形 (箭頭所指的位置)。(B)細胞凋亡百分比，此為三次實驗的計數平均數±標準偏差(S.D)。

A**CL 1-5****B**

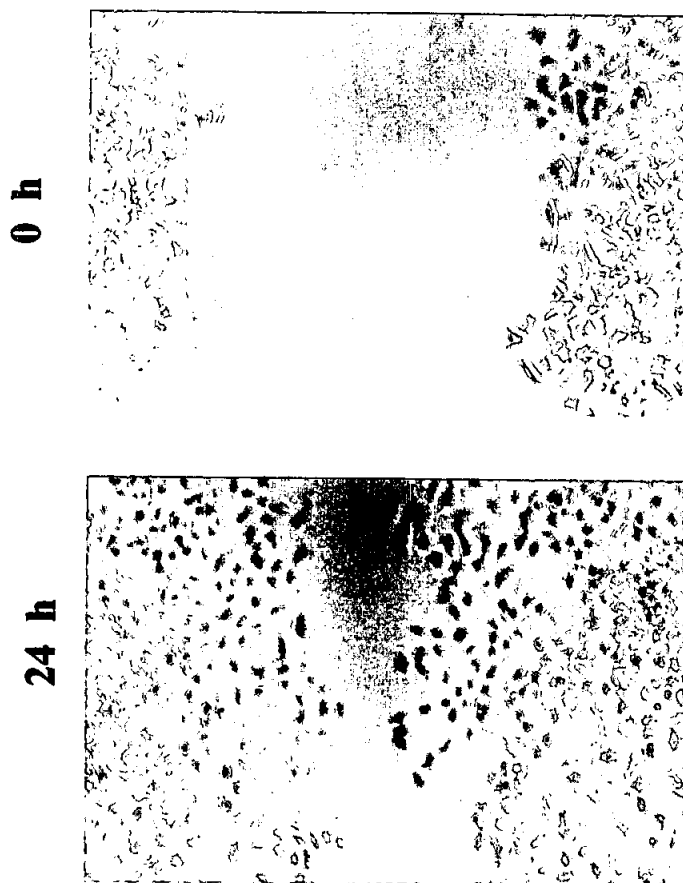
圖十三、CL1-5對促細胞死亡刺激的敏感性。(A)將CL1-5培養在poly-HEMA-coated的培養盤上，並加入 2.5 mM (a, b)、5 mM (c, d)、10 mM (e, f) EGTA。作用24小時 (a, c, e)、48小時 (b, d, f)之後，利用Hoescht 33258染色，並顯微鏡下觀察核片斷化的情形 (箭頭所指的位置)。(B)細胞凋亡百分比，此為三次實驗的計數平均數±標準偏差(S.D)。



圖十四、CL1-0及其亞株CL1-1、CL1-5對促細胞死亡刺激的敏感性。三株細胞培養在 ploy-HEMA-coated 的培養盤上並加入上 10 mM EGTA。作用 0、24、48小時收集細胞溶胞液，並利用西方墨點法，分析細胞內pro-caspase-3 的表現量。

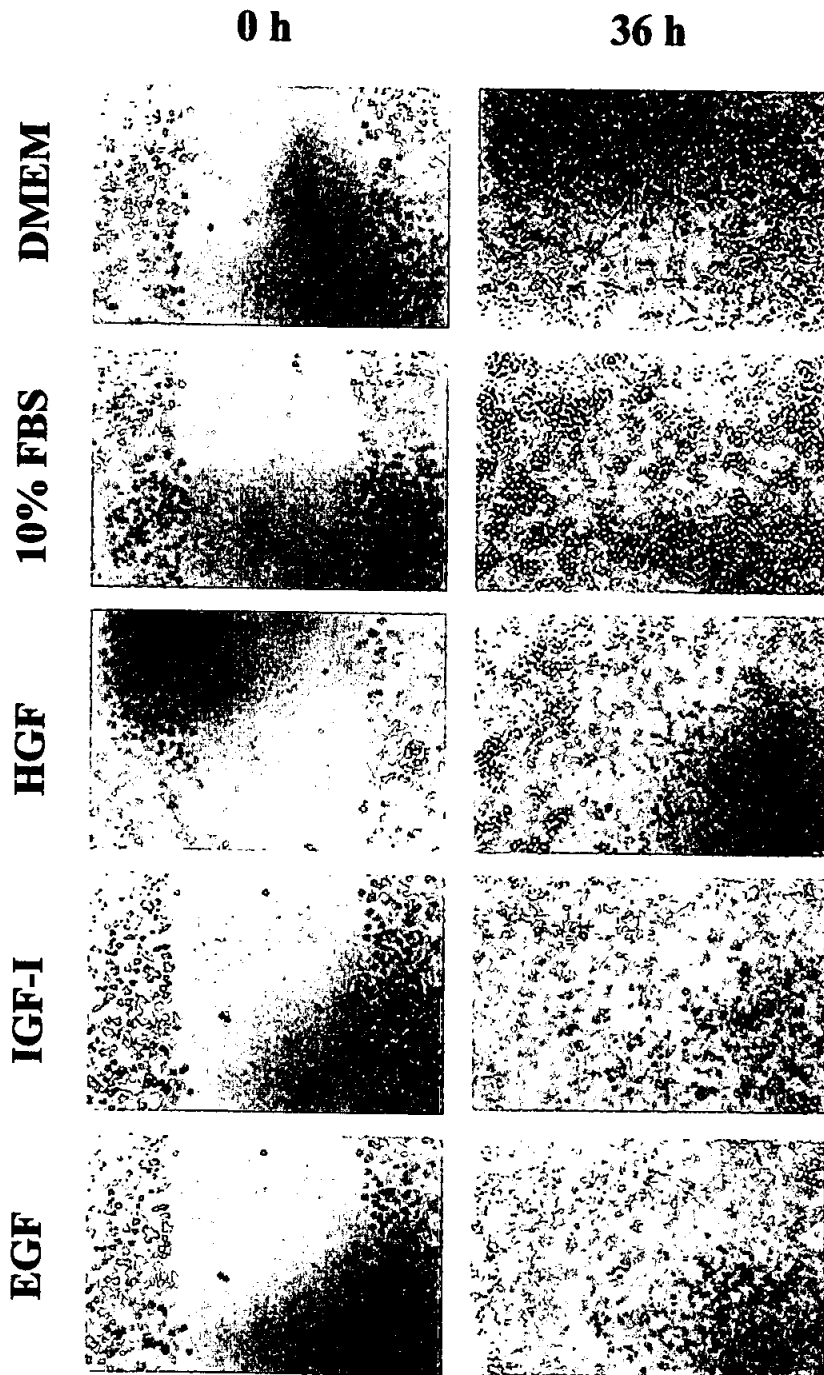
CL1-1

10% FBS



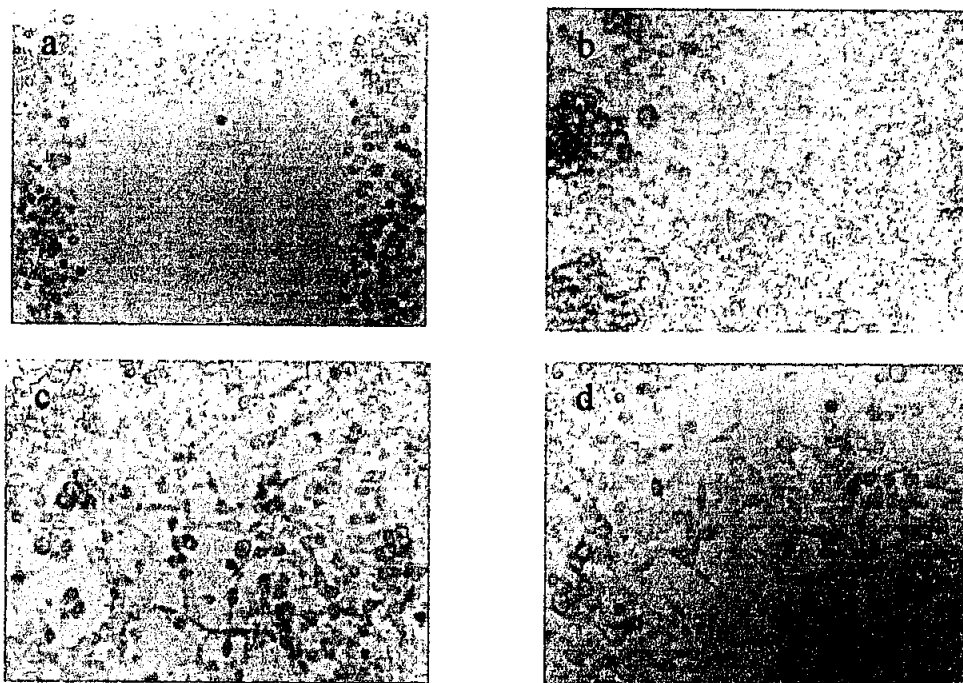
圖十五、CL1-1細胞移動的情形。將10%胎牛血清加入細胞作用0~24小時，再以光學顯微鏡觀察細胞移動的情形。

CL1-5



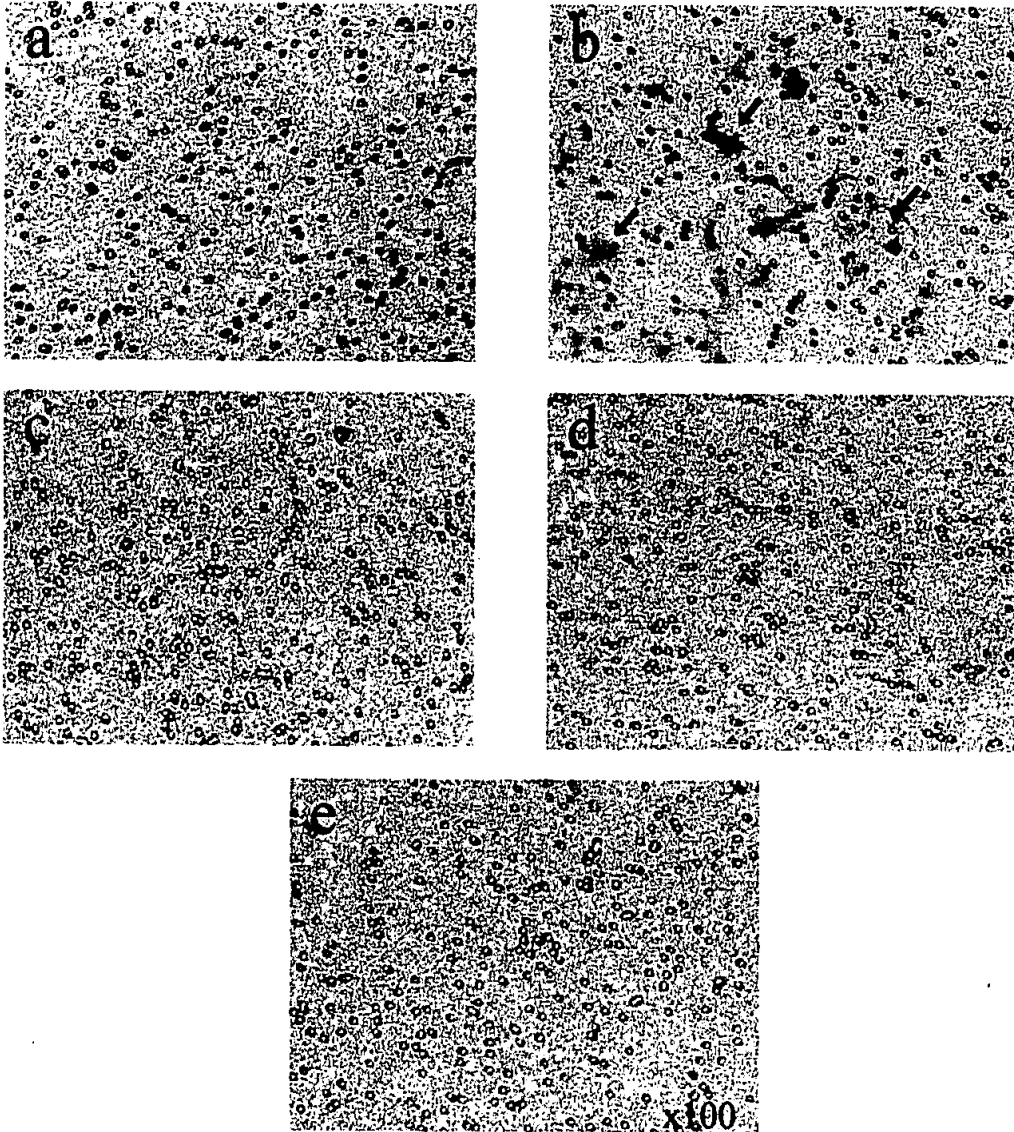
圖十六、生長因子刺激對CL1-5細胞移動的影響。將10%胎牛血清、20 ng/ml HGF、100 nM IGF-I、10 nM EGF加入細胞作用0~36小時，再以光學顯微鏡觀察細胞移動的情形。

CL1-5



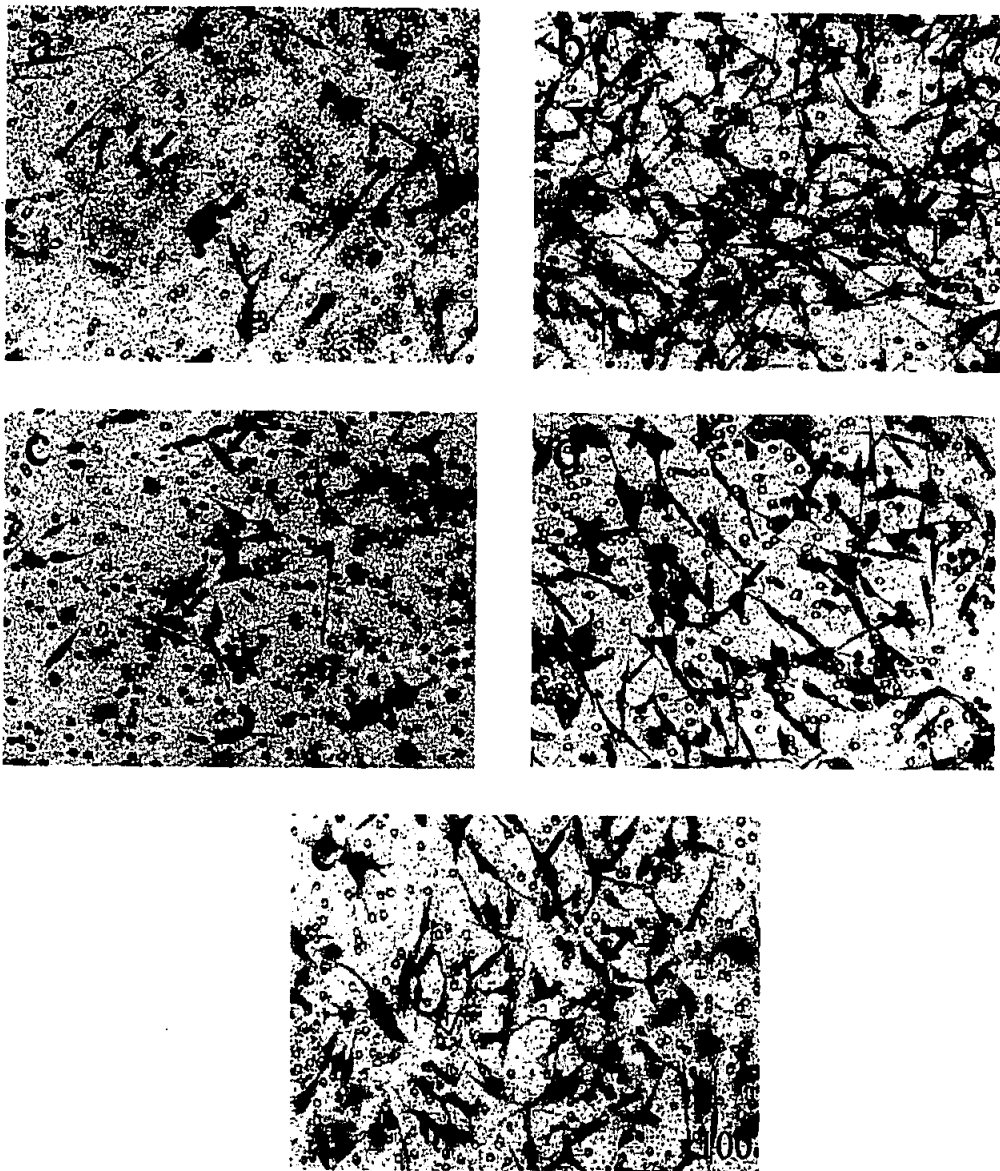
圖十七、抑制劑對於CL1-5細胞移動的影響。細胞以含10%胎牛血清的DMEM培養 (a-d)，並分別加入25 μ M PD98059 (c)、10 μ M wortmannin (d) 或不加入抑制劑作用 (a、b)，再以光學顯微鏡觀察細胞移動的情形。a為作用0小時，b-d為36小時。

CL1-1



圖十八、生長因子刺激對CL1-1細胞侵入的影響。將細胞培養在transwell上，加入DMEM (a)、10%胎牛血清 (b)、20 ng/ml HGF (c)、100 nM IGF-I (d)、10 nM EGF (e)培養三天。穿透過的細胞再以hematoxylin和eosin染色。(箭頭所指)

CL1-5



圖十九、生長因子刺激對CL1-5細胞侵入的影響。將細胞培養在transwell上，加入DMEM (a)、10%胎牛血清 (b)、20 ng/ml HGF (c)、100 nM IGF-I (d)、10 nM EGF (e)培養三天。穿透過的細胞再以hematoxylin和eosin染色。(箭頭所指)

參考文獻

1. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2:563
2. 姜伯穎·謝文斌 2000. 外科與非外科治療的肺癌存活情形 *當代醫雜誌* 335: 717
3. Overall CM, Lopez-Otin C. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: invasion for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2: 657
4. Dang, C.V. 1999. c-Myc target gene involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell. Biol.* 19:1
5. Elizabeth A.C., Tadahisa T., Peter J.W., Andras K., Susan G. and Sonrri S.T. 1999. HGF-mediated apoptosis via P₅₃/bax-indepent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis* 20:583
6. Zhang Y, Thant AA, Machida K, Ichigotani Y, Naito Y, Hiraiwa Y, Senga T, Sohara Y, Matsuda S, Hamaguchi M. 2002. Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metaollproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma line QG90. *Cancer Res.* 62:3962
7. Webb CP, Taylor GA, Jeffers M, Fiscella M, Oskarsson M, Resau JH, Vande Woude GF. 1998. Evidence for a role of HGF/SF during Ras-mediated turmorigenesis/metastasis. *Oncogene* 17: 2019
8. Bos, J.L. 1998. Ras oncogenes in human cnacer: a review. *Cancer Res.* 49:4682
9. Giatromanolaki A. 2001. Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 21:4373
10. Campbell, J.J. & Butcher, E.C. 2000. Chemokines in tissue-specific and microcenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* 12:336
11. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. 2001. Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50
12. 曾若琦·謝文斌 2001 肺癌篩選試驗的更多追蹤報導 *當代醫學* 338:1005

13. 郭壽雄 1998 肺癌 當代醫學 13: 8.
14. Hildegard M. Schuller. 2002. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat. Rev.* 2:455
15. 莊素玉 1996. 成功的殺手—癌症 天下雜誌 9:112
16. Niyaz H, Zhao C, Li Y. 2000. Detection and significance of HPV16, 18 infection, P53 overexpression and telomerase activity in patients with lung cancer *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 23:679
17. Nagaike M, Hirao S, Tajima H, Noji S, Taniguchi S, Matsumoto K, Nakamura T. 1991. Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. *J. Biol. Chem.* 34: 22781
18. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N. 1993. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the cDNA for a Human Serine Protease Responsible for Activation of Hepatocyte Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 268:10024
19. Jiang Y, Xu W, Lu J, He F, Yang X. 2001. Invasiveness of Hepatocellular Carcinoma Cell Lines: Contribution of Hepatocyte Growth Factor, c-met, and Transcription Factor Ets-1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 286:1123
20. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM. 1992. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 11:4825
21. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM, Di Renzo MF. 1996. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factoring in human non-small-cell lung carcinomas. *Brit. J. Cancer* 74:1862
22. Yuan R, Fan S, Achary M, Stewart DM, Goldberg ID, Rosen EM. 2001. Altered gene expression pattern in cultured human breast cancer cell treated with hepatocyte growth factor/scatter factor in the setting of DNA damage. *Cancer Res.* 61:8022

23. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM, Di Renzo MF. 1996. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factoring in human non-small-cell lung carcinomas. *Brit. J. Cancer* 74:1862
24. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. 1992. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell. Biol.* 119:629
25. Zhu H, Naujokas MA, Fixman ED, Torossian K, Park M. 1994. Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 269:29943
26. Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH. 1994. Hepatocyte growth factor/Scatter factor growth induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125^{FAK}) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 269:31807
27. Arakaki N, Kajihara T, Arakaki R, Ohnishi T, Kazi JA, Nakashima H, Daikuhara Y. 1999. Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J. Biol. Chem.* 274: 13541
28. Sakkab D, Lewitzky M, Posern G, Schaeper U, Sachs M, Birchmeier W, Feller SM. 2002. Signaling of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF) to the Small GTPase Rap1 via the Large Docking Protein Gab1 and the Adapter Protein CRKL. *J. Biol. Chem.* 275:10772
29. Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. 2001. Hepatocyte growth factor/Scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to proangiogenic cytokines and interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 61:5911
30. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. 1994. A multifunctional docking site mediates

- signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77:261
31. Shinohara M, Kodama A, Matozaki T, Fukuhara A, Tachibana K, Nakanishi H, Takai Y. 2001. Roles of cell-cell adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Gab-1. *J. Cell. Biol.* 276:18941
 32. Ueoka Y, Kato K, Kuriaki Y, Horiuchi S, Terao Y, Nishida J, Ueno H, Wake N. 2000. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinoma via Ras-mediated pathway. *Brit. J. Cancer* 82:891
 33. Fan S, Ma YX, Gao M, Yuan RQ, Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM. 2001. The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for cell survival and DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* 21:4968
 34. Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG. 2002. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol. Chem.* 277:10452
 35. Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL. 1998. Identification of p130^{Cas} as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J. Cell. Biol.* 140:211
 36. Tsao MS, Yang Y, Marcus A, Liu N, Mou L. 2001. Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small-cell lung cancer. *Hum. Pathol.* 32:57
 37. Qiao H, Hung W, Tremblay E, Wojcik J, Gui J, Ho J, Klassen J, Campling B, Elliott B. 2002. Constitutive activation of met kinase in non-small-cell lung carcinomas correlates with anchorage-independent cell survival. *J. Cell Biochem.* 86:665
 38. Robert C, Bolon I, Gazzeri S, Veyrenc S, Brambilla C, Brambilla E. 1999. Expression of plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in lung cancer and their role in tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 5:2094
 39. Rygaard K, Nakamura T, Spang-Thomsen M. 1993. Expression of the

- proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Brit. J. Cancer* 67:37
40. Scheving LA, Stevenson MC, Taylormoore JM, Traxler P, Russell WE. 2002. Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:203
 41. Yi S, Chen JR, Viallet J, Schwall RH, Nakamura T, Tsao MS. 1998. Paracrine effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on non-small-cell lung carcinoma cell lines. *Brit. J. Cancer* 77:2162
 42. Brodt P, Fallavollita L, Khatib AM, Samani AA, Zhang D. 2001. Cooperative regulation of the invasive and metastatic phenotypes by different domains of the type I insulin-like growth factor receptor β subunit. *J. Cell. Biol.* 276:33608
 43. Bostedt KT, Schmid C, Ghirlanda-Keller C, Olie R, Winterhalter KH, Zapf J. 2001. Insulin-like growth factor (IGF)I down-regulates type I IGF receptor (IGF 1R) and reduces the IGF I response in A549 non-small-cell lung cancer and Saos-2/B-10 osteoblastic osteosarcoma cells. *Exp. Cell Res.* 271:368
 44. Sueoka N, Lee HY, Wiehle S, Cristiano RJ, Fang B, Ji L, Roth JA, Hong WK, Cohen P, Kurie JM. 2000. Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 19:4432
 45. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell Biol.* 14:4902
 46. Jhun BH, Rose DW, Seely BL, Rameh L, Cantley L, Saltiel AR, Olefsky JM. 1994. Microinjection of the SH2 domain of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression. *Mol. Cell Biol.* 14:7466
 47. Cheatham B, Kahn CR. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16:117

48. Cormont M, Van Obberghen E, Zerial M, Le Marchand-Brustel Y. 1996. Insulin induces a change in Rab5 subcellular localization in adipocytes independently of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Endocrinology* 137:3408
49. Toliás KF, Cantley LC, Carpenter CL. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* 270:17656
50. Baltensperger K, Kozma LM, Cherniack AD, Klarlund JK, Chawla A, Banerjee U, Czech MP. 1993. Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. *Science* 260:1950
51. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nat.* 358:417
52. Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS. 2001. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol. Cell Biol.* 21:2981
53. Treisman R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:205
54. Quin KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos M, Grimley C, Battey J, James L, Mulshine, and Cuttitta F. 1996. Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. *J. Cell Biol.* 271:11477
55. Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, Li P, Wang Y, Schmitz W, Dietz R, von Harsdorf R. 2001. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptosis signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* 104:2088
56. Nair PN, De Armond DT, Adamo ML, Strodel WE, Freeman JW. 2001. Aberrant expression and activation of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) are mediated by an induction of IGF-IR promoter activity and stabilization of IGF-IR mRNA and contributes to growth factor independence and increased

- survival of the pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Oncogene* 20:8203
57. Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P, Baserga R. 1995. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in Vivo. *Cancer Res.* 55:2463
 58. Brodt P, Samani A, Navab R. 2000. Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy. *Biochem. Pharmacol.* 60:1101
 59. Jiang Y, Rom WN, Yie TA, Chi CX, Tchou-Wong KM. 1999. Induction of tumor suppression and glandular differentiation of A549 lung carcinoma cells by dominant-negative IGF-I receptor. *Oncogene* 18:6071
 60. Lee HY, Chun KH, Liu B, Wiehle SA, Cristiano RJ, Hong WK, Cohen P, Kurie JM. 2002. Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 62:3530
 61. Maxwell P, van den Berg HW. 1999. Changes in the secretion of insulin-like growth factor binding proteins -2 and -4 associated with the development of tamoxifen resistance and estrogen independence in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* 139:121
 62. Yu H, Nicar MR, Shi R, Berkel HJ, Nam R, Trachtenberg J, Diamandis EP. 2001. Levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 2 and 3 in serial postoperative serum samples and risk of prostate cancer recurrence. *Urology* 57:471
 63. Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K. 1990. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem. J.* 270:383
 64. Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. 2002. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat. Cell Biol.* 4:487
 65. Chu YW, Yang PC, Yang SC, Shyu YC, Hendrix MJ, Wu R, Wu CW. 1997. Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17:353

66. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57
67. John D. Hood and David A. Cheresh. 2002. Role of integrin in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2:91
68. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342:440
69. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113:173
70. Weidner KM, Hartmann G, Naldini L, Comoglio PM, Sachs M, Fonatsch C, Rieder H, Birchmeier W. 1993. Molecular characteristics of HGF/SF and its role in cell motility and invasion. *Exs.* 65:311
71. Birchmeier, W. and Behrens, J. 1994. Cadherin expression in carcinoma: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta.* 1198:11
72. Hirohasi, S. 1998. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.* 153:333
73. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. 1995. E-cadherin is a tumor/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancer. *EMBO J.* 14:6107
74. Adams, C.L. and Nelson W. J. 1998. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:572
75. Kowalczyk, A.P., Bounslaeger, E.A., Norvell, S.M., Palka, H.L. and Green, K.J. 1999. Desmosomes: intercellular adhesive junction specialized for attachment of intermediate filaments. *Int. Rev. Cytol.* 185:237
76. Garrod, D., Chidgey, M. and North, A. 1996. Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:670
77. Sastry, S. K. & Burridge, K. 2000. Focal adhesion: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* 261:25

78. Brooks, P. C., Clark, R. A. & Chersch, D.A. 1994. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264:569
79. Serini G, Trusolino L, Saggiorato E, Cremona O, De Rossi M, Angeli A, Orlandi F, Marchisio PC. 1996. Changes in integrin and E-cadherin expression in noeplastic versus normal thyroid tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:442
80. Mignatti, P. & Rifkin, D.B. 1993. Biology and biochemistry of proteinase in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73:161
81. Sympson CJ, Talhouk RS, Alexander CM, Chin JR, Clift SM, Bissell MJ, Werb Z. 1994. Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J. Cell Biol.* 125:681
82. Scotlandi K, Avnet S, Benini S, Manara MC, Sera M, Cersano V, Perdichizzi S, Lollini PL, De Giovanni C, Landuzzi L, Picci P. 2002. Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. *Int. J. Cancer* 101:11
83. Coussens, L.M. Tinkle, C.L. Hanahan, D. & Werb, Z. 2002. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103:481
84. Ahonen, M., Baker, A.H. & Kahari, V.M. 1998. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cell. *Cancer Res.* 58:2310
85. Belien, A. T., Paganetti, P. A. & Schwab, M.E. 1999. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J. Cell Biol.* 144:373
86. Deryugina, E. I., Luo, G.X., Reisfeld, R.A. Bourdon, M.A. & Srongin, A. 1997. Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Res.* 17:3201
87. Ala-Aho, R., Johansson, N., Baker, A.H & Kahari, V.M. 2002. Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080

- cell. *Int. J. Cancer* 97:283
88. Ahonen, M., Baker, A.H. & Kahari.V.M. 1998. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cell. *Cancer Res.* 58:2310
 89. Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP, Sautes-Fridman C, Basset P, Rio MC. 2001. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 61:2189
 90. Mitsiades, N., Yu,W.-H., Poulaki, V., Tsokos, M.& Stamekovic,I. 2001. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* 61:577
 91. Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez-A C. 1997. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 274:6935
 92. Hua, J. & Muschel, R.J. 1996. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res.* 56:5279
 93. Rosen K, Shi W, Calabretta B, Filmus J. 2002. Related Articles, Books, LinkOut Cell detachment triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent overexpression of Fas ligand. A novel mechanism of Anoikis of intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277:46123
 94. Vachon PH, Harnois C, Grenier A, Dufour G, Bouchard V, Han J, Landry J, Beaulieu JF, Vezina A, Dydensborg AB, Gauthier R, Cote A, Drolet JF, Lareau F. 2002. Related Articles, Books, LinkOut Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology.* 123:1980
 95. Zeng Q, McCauley LK, Wang CY. 2002. Related Articles, Books, LinkOut Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein

- 1-dependent cyclooxygenase-2. Implication in head and neck squamous cell carcinoma progression. *J. Biol. Chem.* 277:50137
96. Rul W, Zugasti O, Roux P, Peyssonnaud C, Eychene A, Franke TF, Lenormand P, Fort P, Hibner U. 2002. Related Articles, Books, LinkOut Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Ann N Y Acad Sci.* 973:145
97. Fukazawa H, Noguchi K, Murakami Y, Uehara Y. 2002. Related Articles, Books, LinkOut Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated kinase (ERK) pathway. *Mol. Cancer Ther.* 1:303
98. Schmidt M, Hovelmann S, Beckers TL. 2002. Related Articles, Books, LinkOut A novel form of constitutively active farnesylated Akt1 prevents mammary epithelial cells from anoikis and suppresses chemotherapy-induced apoptosis. *Brit. J. Cancer* 87:924
99. Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q. 2002. Related Articles, Books, LinkOut Anchorage-independent phosphorylation of p130^(Cas) protects lung adenocarcinoma cells from anoikis. *J. Cell Biochem.* 87:439
100. Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. 2002. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell.* 9:411
101. Kein R. 2002. Novel effector function for an old receptor. *Nat. Cell Biol.* 4:E11

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本 92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院) 免疫學 系所

組 P1 學年度第 1 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：肝細胞生長因子和才型類胰島素生長因子抑制劑

同意 不同意 (政府機關重製上網) 除轉移複製

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：李宜儒

研究生簽名：林禮淑
(親筆正楷)

學號：8913002
(務必填寫)

日期：民國 92 年 07 月 24 日

1. 本授權書 (得自 <http://sticnet.stic.gov.tw/sticweb/html/theses/authorize.html> 下載或至 <http://www.stic.gov.tw> 首頁右下方下載) 請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請確認學校是否代收，若無者，請個別再寄論文一本至台北市(106-36)和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 黃善平小姐。(本授權書諮詢電話：02-27377606 傳真：02-27377689)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿，89.11.21 部份修正。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。