

科技部補助專題研究計畫報告

氣硝柳胺抑制骨癌細胞株轉移及血管新生之機制探討(第3年)

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 106-2314-B-040-007-MY3
執行期間：108年08月01日至109年07月31日
執行單位：中山醫學大學附設醫院

計畫主持人：楊嘉欣
共同主持人：呂克修、楊順發

計畫參與人員：碩士級-專任助理：蔡孟盈

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 109 年 10 月 30 日

中文摘要：骨肉瘤是最常見的骨癌且易於轉移，而癌細胞轉移是癌症導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因。氯硝柳胺屬於水楊酰胺衍生物，是FDA批准的口服驅蟲藥，用於治療大部分的條蟲感染。而世界衛生組織也將氯硝柳胺列為基本藥物，對人類具有極佳的安全性和耐受性。近年來，有許多研究顯示氯硝柳胺具有抗癌的活性。在骨肉瘤轉移的相關研究目前雖有文獻探討卻不詳盡，因此，本研究在探討氯硝柳胺其抑制骨肉瘤細胞的轉移及詳細的分子機制。我們的研究發現U2OS和HOS骨肉瘤細胞株處理氯硝柳胺並不會毒殺細胞，但可以明顯抑制骨肉瘤細胞株移行、轉移及侵襲的能力與減少U2OS細胞其transforming growth factor beta-induced (TGFBI) 的表現。此外，當降低U2OS骨肉瘤細胞株其TGFBI的表現可以明顯抑制細胞的移動及侵襲能力。再者，氯硝柳胺也顯著地減少U2OS細胞其extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2的磷酸化表現，而不影響focal adhesion kinase (FAK)、steroid receptor coactivator (Src)、p-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2、p38及Akt訊息傳遞蛋白。在處理過U0126的U2OS細胞中氯硝柳胺更加降低了細胞移動及侵襲的能力與TGFBI的表現。總結以上結果，氯硝柳胺可透過抑制磷酸化ERK1/2訊息傳遞路徑來抑制TGFBI的表現，進而抑制骨肉瘤細胞的移動及侵襲。因此，氯硝柳胺或許可以應用在預防骨肉瘤的轉移或輔助骨肉瘤的治療。

中文關鍵詞：氯硝柳胺、骨癌、轉移

英文摘要：Osteosarcoma is one of the most common malignant bone tumors and harbors highly metastatic properties. Metastasis of cancer cells, a primary cause of cancer death and a multiple and intricate processes, may complicate the clinical management and lead to a poor prognosis for cancer patients. Niclosamide, salicylamide derivatives, is a Food and Drug Administration-approved oral antihelminthic drug and has anticancer activities. However, the effect of niclosamide on cancer invasion and metastasis of different osteosarcoma cell lines and the underlying mechanisms of such effect is not exhaustive. Here, we tested the hypothesis that niclosamide suppresses migration and invasion, features that are associated with metastatic process in human osteosarcoma cells and also investigate its underlying pathway. In our preliminary study, U2OS and HOS osteosarcoma cell lines have been treated with niclosamide and then subjected to assays for cell migration ability. The results showed that niclosamide, up to 200 nM, without cytotoxicity, inhibited the invasion and migration capabilities of human osteosarcoma U2OS and HOS cells and repressed transforming growth factor beta-induced (TGFBI) expression of U2OS cells. After the knockdown of TGFBI, U2OS cells' biological behaviors of cellular invasion and migration were significantly reduced. While niclosamide significantly decreased the phosphorylation of

extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2 in U2OS cells, no obvious influences on focal adhesion kinase (FAK), steroid receptor coactivator (Src), p-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2, p38, and Akt, including their phosphorylation, were observed. In U0126 treating U2OS cells, niclosamide further enhanced the decrease of their migration/invasion and TGFBI expression. We conclude that TGFBI derived from osteosarcoma cells via the ERK pathway contribute to cellular invasion and migration and niclosamide could inhibit the phenomenons. These findings indicate that niclosamide may be a powerful candidate for a preventive agent against osteosarcoma development and metastasis.

英文關鍵詞：Niclosamide, osteosarcoma, metastasis

中文摘要

骨肉瘤是最常見的骨癌且易於轉移，而癌細胞轉移是癌症導致死亡以及治療複雜度提昇的主要原因。氯硝柳胺屬於水楊酰胺衍生物，是 FDA 批准的口服驅蟲藥，用於治療大部分的條蟲感染。而世界衛生組織也將氯硝柳胺列為基本藥物，對人類具有極佳的安全性和耐受性。近年來，有許多研究顯示氯硝柳胺具有抗癌的活性。在骨肉瘤轉移的相關研究目前雖有文獻探討卻不詳盡，因此，本研究在探討氯硝柳胺其抑制骨肉瘤細胞的轉移及詳細的分子機制。我們的研究發現 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株處理氯硝柳胺並不會毒殺細胞，但可以明顯抑制骨肉瘤細胞株移行、轉移及侵襲的能力與減少 U2OS 細胞其 transforming growth factor beta-induced (TGFBI) 的表現。此外，當降低 U2OS 骨肉瘤細胞株其 TGFBI 的表現可以明顯抑制細胞的移動及侵襲能力。再者，氯硝柳胺也顯著地減少 U2OS 細胞其 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2 的磷酸化表現，而不影響 focal adhesion kinase (FAK)、steroid receptor coactivator (Src)、p-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2、p38 及 Akt 訊息傳遞蛋白。在處理過 U0126 的 U2OS 細胞中氯硝柳胺更加降低了細胞移動及侵襲的能力與 TGFBI 的表現。總結以上結果，氯硝柳胺可透過抑制磷酸化 ERK1/2 訊息傳遞路徑來抑制 TGFBI 的表現，進而抑制骨肉瘤細胞的移動及侵襲。因此，氯硝柳胺或許可以應用在預防骨肉瘤的轉移或輔助骨肉瘤的治療。

關鍵詞：氯硝柳胺、骨癌、轉移

英文摘要

Osteosarcoma is one of the most common malignant bone tumors and harbors highly metastatic properties. Metastasis of cancer cells, a primary cause of cancer death and a multiple and intricate processes, may complicate the clinical management and lead to a poor prognosis for cancer patients. Niclosamide, salicylamide derivatives, is a Food and Drug Administration-approved oral antihelminthic drug and has anticancer activities. However, the effect of niclosamide on cancer invasion and metastasis of different osteosarcoma cell lines and the underlying mechanisms of such effect is not exhaustive. Here, we tested the hypothesis that niclosamide suppresses migration and invasion, features that are associated with metastatic process in human osteosarcoma cells and also investigate its underlying pathway. In our preliminary study, U2OS and HOS osteosarcoma cell lines have been treated with niclosamide and then subjected to assays for cell migration ability. The results showed that niclosamide, up to 200 nM, without cytotoxicity, inhibited the invasion and migration capabilities of human osteosarcoma U2OS and HOS cells and repressed transforming growth factor beta-induced (TGFBI) expression of U2OS cells. After the knockdown of TGFBI, U2OS cells' biological behaviors of cellular invasion and migration were significantly reduced. While niclosamide significantly decreased the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2 in U2OS cells, no obvious influences on focal adhesion kinase (FAK), steroid receptor coactivator (Src), p-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2, p38, and Akt, including their phosphorylation, were observed. In U0126 treating U2OS cells, niclosamide further enhanced the decrease of their migration/invasion and TGFBI expression. We conclude that TGFBI derived from osteosarcoma cells via the ERK pathway contribute to cellular invasion and migration and niclosamide could inhibit the phenomenons. These findings indicate that niclosamide may be a powerful candidate for a preventive agent against osteosarcoma development and metastasis.

Key word: Niclosamide, osteosarcoma, metastasis

一、緒論

骨肉瘤 (osteosarcoma; OS) 是常見的骨惡性腫瘤，好發於青少年，通常發生在長骨的生長板周圍，大多數的骨肉瘤常伴隨肺部轉移，而肺部轉移是導致骨肉瘤高死亡率的主因，儘管現今醫療在臨床上已有所改善，但具有轉移和復發的骨肉瘤患者預後仍不良 [1]。因此，了解癌症的成因與轉移的機制並設法降低骨肉瘤死亡率是當前重要的研究課題。

在生物體內當正常細胞轉變成惡性腫瘤細胞時，需要特殊的訊息傳導使其不斷的增生、逃脫細胞凋亡、誘發惡性腫瘤細胞組織周圍血管增生，以供應足夠的養分，另外也提升惡性腫瘤細胞對周圍組織的侵襲和轉移能力 [2]。惡性腫瘤轉移係指惡性腫瘤細胞破壞基底膜後穿過細胞外基質侵入到周圍組織及循環系統中的血管或淋巴管，隨著循環的體液而移動至遠處的器官組織，接著貼附在內皮細胞上，穿破血管或淋巴管到達新的組織器官，並藉由血管新生長成新的腫瘤 [3]。惡性腫瘤會奪取正常組織器官的養分，使惡性腫瘤細胞大量增生，造成正常組織器官功能的耗弱，最後造成癌症病人的死亡。在臨床的治療中，癌細胞的轉移與侵襲是降低腫瘤治癒率、造成癌症復發與增加死亡率之主要原因。因此，找尋能夠抑制癌細胞轉移的藥物可幫助治癒癌症與減少死亡率。

氯硝柳胺 (Niclosamide) 其學名為 (5-chloro-N-(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamide，商品名為 Niclocide，屬於水楊酰胺衍生物，是 FDA 批准的口服驅蟲藥，用於治療大部分的條蟲感染約有 50 年之久 [4, 5]。氯硝柳胺也可作為一種殺軟體動物的藥劑，用於處理血吸蟲病防治計劃 [4]。氯硝柳胺對抗寄生蟲的活性被認為是透過抑制粒線體氧化磷酸化和厭氧 ATP 的產生所調節的 [6]。世界衛生組織 (WHO) 也將氯硝柳胺列為基本藥物，對人類具有極好的安全性 [4, 7] 和耐受性 [8]。氯硝柳胺具有許多生物活性，例如抗菌活性 [9]，包括抗結核活性 [10] 和抗藥性的金黃色葡萄球菌的活性 [11]、抗病毒活性 [12, 13] 和抗錐蟲活性 [14]。近年來，氯硝柳胺也被舊藥新用於探討癌症方面的治

療，有研究顯示氯硝柳胺展現有效的抗癌活性和抑制結腸直腸癌 [15-17]、肺癌 [18, 19]、乳癌 [20-23]、卵巢癌 [24-26]、前列腺癌 [20, 27]、膠質母細胞瘤 [28]、頭頸癌 [29]、白血病 [30, 31] 和子宮肌瘤 [32] 的生長，藉由透過抑制各種細胞內訊息傳遞路徑，包括 Wnt [15, 16, 32]、Wnt/beta-catenin [20, 25, 26]、S100A4 [17]、STAT3 [18, 19, 29]、NOTCH [30] 和 NF- κ B [31]。在骨癌方面的研究中：Li 等人指出氯硝柳胺藉由誘導細胞凋亡 (apoptosis) 及細胞週期停滯 (cell cycle arrest) 來抑制骨肉瘤細胞的增生 [33]；Liao 等人也指出氯硝柳胺可抑制骨肉瘤細胞的增生和存活以及爬行能力，氯硝柳胺也誘導細胞凋亡及 G1 arrest 且抑制 cell cycle progression，而氯硝柳胺可有效抑制 E2F1、AP1 及 c-Myc 的 transcription activity 及 RNA 表現與接種骨肉瘤細胞的老鼠其腫瘤生長 [34]，但對於抑制其轉移能力和機轉目前仍不詳盡，想將氯硝柳胺作為抗癌藥物使用並運用到臨床上還需要更多的研究來佐證。因此，本研究在探討氯硝柳胺其抑制骨肉瘤細胞的轉移及詳細的分子機制。

二、研究方法

1. 細胞培養及處理

骨肉瘤細胞株 U2OS 利用 DMEM 培養基加入適量 antibiotics 及 10% FBS 培養；HOS 利用 MEM 培養基加入適量 antibiotics 及 10% FBS 培養；以不同濃度之氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱中培育，視實驗需求處理氯硝柳胺 0-48 小時後，收取細胞進行後續實驗。

2. MTT (microculture tetrazolium) 分析

本實驗室用 MTT 來測試細胞是否有活性以及是否存活。將 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株以 8×10^4 的細胞數分至 24 孔盤中，37°C 培養 16 小時，加入氯硝柳胺處理 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，再加入 0.8 mL 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/mL)，待此作用 4 小時之後移除試劑，再以異丙醇將藍紫色結晶溶出，於 O.D. 563 nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

3. Wound healing 分析

將骨肉瘤細胞株以適當的細胞數分盤到 6 公分的培養皿，培養 16 小時後以 tip 劃出傷口並處理不同濃度的氯硝柳胺 (0-200 nM)，於 12、24 及 48 小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的情況。

4. Cell migration 分析

利用 48 well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 10% FBS 的細胞培養液，將細胞以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下後用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^4 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 24 小時後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾後以 Giemsa (1:10) 染色 3 小

時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 100 倍顯微鏡底下觀察移動的細胞數。

5. Cell invasion 分析

將 cellulose nitrate filters 預先 coating 上 Matrigel，在 laminar flow 風乾 3-5 小時，再將細胞以 0.05% 的 trypsin-EDTA 打下後用 trypan blue 計算細胞數，然後注入固定量的細胞 (10^4 cell/well) 於 upper chamber，待細胞移動 24 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾後以 Giemsa (1:10) 染色 3 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 100 倍顯微鏡底下觀察侵襲的細胞數。

6. RNA 萃取及反轉錄反應

將實驗細胞的細胞培養液去除，以 4°C PBS 清洗細胞後除去 PBS，重複清洗兩次。使用 total RNA mini kit (cultured cells) (Geneaid Biotech Ltd., Taoyuan, Taiwan) 萃取 total RNA，接著使用 high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 將 RNA 反轉錄成互補 DNA (complementary DNA; cDNA)。

7. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction; Real-time PCR) 分析

取 cDNA 加入 primer (Table 1) 和 SYBR Green 的試劑，混合均勻後放入 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 進行測量，完成後以電腦程式分析 mRNA 的表現量。

8. 蛋白質 (protein lysate) 製備

將實驗細胞的培養液去除，使用 4°C PBS 清洗細胞兩次後，加入 PRO-PREP™ 蛋白質萃取溶液 [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1

mM EDTA、1 μ M pepstatin A、1 μ M leupeptin、0.1 μ M aprotinin] (iNtRON Biotechnology Co., Seoul, Korea)，刮取細胞，收集至 1.5 mL eppendorf 中，利用超音波細胞破碎機 Misonic Sonicator 4000 (Qsonica, LLC, Newtown, Connecticut, USA) 震破細胞，待細胞溶液由濁白變為澄清即可，再以 13200 rpm 的轉速於 4 $^{\circ}$ C 離心 30 分鐘，吸取上清液到新的 1.5 mL eppendorf，儲存於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

9. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量採用 "Bradford's protein assay" 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白質含量越高。測定方法：首先以一系列已知濃度 BSA，加入五分之一體積的 Bradford protein dye 以波長 595 nm 之吸光度作一標準曲線，再以同樣的測定方法測得樣品之 O.D. 值，即可對照標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

10. Western blotting 分析

首先製備 10-12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液，取 16 μ L sample (蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ L 之 5 倍 loading buffer，將 sample denature (100 $^{\circ}$ C，10 min) 之後再 loading 到電泳片中，以 140V 進行電泳分離。大約 4 小時之後，將膠拆下進行蛋白轉漬，將 NC paper 置入冰冷之 transfer buffer 蓋上膠體後裝入 transfer holder，於 4 $^{\circ}$ C 下，以 400 mA 進行轉漬 2 小時，取出 NC paper 加入 blocking buffer，在室溫下搖動 1 小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4 $^{\circ}$ C 下反應 overnight，之後以 washing buffer (TBS + 0.05% Tween 20) 清洗四次，每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用 2 小時後以 washing buffer 清洗四次，每次 10 分鐘。最後加入 ECL 進行呈色反應，並以冷光系統紀錄結果。

11. siRNA 轉染

將實驗細胞以 8×10^5 的細胞數分植於 6 公分細胞培養皿中，培養 24 小時，細胞長約九成的滿度備用。使用 Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 進行轉染的實驗。首先取 150 pmol siRNA 和 250 μ L Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Invitrogen) 混合均勻，另外取 15 μ L lipofectamine 和 250 μ L Opti-MEM 混合均勻，各自室溫作用 5 分鐘，接著將兩管加在一起，混合均勻後室溫作用 20 分鐘。將 6 公分培養皿的細胞以 PBS 清洗兩次，以避免血清影響轉染的效力，加入 2 mL Opti-MEM，接著將 lipofectamine 與 siRNA 的混合液加入，輕輕搖晃培養皿混合均勻，在 37°C 細胞培養箱反應 72 小時後，進行細胞分析。

12. 統計分析

各組實驗數據以平均值加減標準差 (mean \pm standard deviation) 表示，並以 student's *t*-test 比較組間之差異，統計則以 SPSS 軟體進行分析，各組之間在 *p* 值 < 0.05 時才具統計上的顯著差異。

三、結果

1. 氯硝柳胺對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 和 HOS 細胞存活率的影響

將 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞以 8×10^4 的細胞數培養在 24 孔培養皿內，培養 16 小時後，給予不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，將藥物移除，利用 MTT assay 偵測細胞的存活率。由結果發現 U2OS 和 HOS 細胞在氯硝柳胺此濃度的處理之下並不會影響細胞的存活率 (Figure 1)。

2. 氯硝柳胺對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 和 HOS 細胞移行能力的影響

將 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 16 小時後利用傷口癒合模式 (wound healing assay) 以 tip 劃出傷口並以此劑量的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理，於 12、24 及 48 小時後，在顯微鏡下觀察傷口癒合的情況。結果發現氯硝柳胺可以明顯抑制 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株的移行能力 (Figure 2)。

3. 氯硝柳胺對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 和 HOS 細胞移動與侵襲能力的影響

將 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 16 小時後，給予不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時，以 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞 (10^4 cell/well) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中，於 37°C 培養箱反應 24 小時，再分別利用 cell migration 及 cell invasion 的分析方法，分別分析其移動和侵襲的能力，其結果與未處理氯硝柳胺之對照組做比較。結果顯示 U2OS 和 HOS 其移動與侵襲能力會隨著氯硝柳胺濃度增加而降低，代表氯硝柳胺可以明顯抑制 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株的移動及侵襲能力 (Figure 3)。

4. 氯硝柳胺對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 其 RNA 表現的影響

將 U2OS 骨肉瘤細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 24 小時後，以 0 和 200 nM 的氯硝柳胺處理 24 小時，萃取其 total RNA，送至圖爾思生物科技股份有限公司進行 RNA 定序。定序結果以 Heatmap 呈現 (Figure 4)，取 $p < 0.05$ 及 \log_2 fold change ± 1.8 分析，有 16 個基因表現量上升 (RENBP、ZNF114、GPNMB、TNFRSF14、PKD1L2、GREB1、SH2B2、RAB3IL1、CASKIN1、UAP1L1、NOV、PLEKHF1、TRIB3、VGF、UNC5B 和 HSD17B14)，有 4 個基因表現量下降 (TGFB1、CCL24、HIST1H2BK 和 CXCL14)。

進一步以定量的 real-time PCR 方法確定基因表現。將 U2OS 以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA。將 cDNA 混合 primer 及 SYBR Green 試劑後上機分析 RENBP、ZNF114、GPNMB、TNFRSF14、PKD1L2、TGFB1、CCL24 和 CXCL14 的 mRNA 表現，結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其 RENBP、ZNF114、GPNMB、TNFRSF14 和 PKD1L2 的 mRNA 表現量增加 (Figure 5)，TGFB1、CCL24 和 CXCL14 的 mRNA 表現量減少 (Figure 6)。

5. 氯硝柳胺對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 其 TGFB1 蛋白表現的影響

將 U2OS 骨肉瘤細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 24 小時後，處理不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 24 小時，萃取其蛋白質，以 anti-TGFB1 的抗體進行 Western blotting 分析，並以 β -actin 的表現量作為 internal control。結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其 TGFB1 的蛋白表現量減少 (Figure 7)。

6. TGFB1 對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 細胞移動與侵襲能力的影響

將 U2OS 骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 24 小時後，分別轉染 Non-targeting Control siRNA (NTsi) 及 TGFB1 siRNA (TGFB1si) 72

小時，以 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞 (10^4 cell/well) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中，於 37°C 培養箱反應 24 小時，再分別利用 cell migration 及 cell invasion 的分析方法，分別分析其移動和侵襲的能力。剩下的細胞萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA，將 cDNA 混合 TGFBI primer 及 SYBR Green 試劑後上機分析其 mRNA 表現。其結果與 NTsi 之對照組做比較。結果顯示 U2OS 轉染 TGFBI siRNA 後可抑制 TGFBI 的 mRNA 表現 (Figure 8A)，也明顯抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株的移動及侵襲能力 (Figure 8B)。

7. 氯硝柳胺對人類骨肉瘤細胞株 U2OS 其訊息傳遞路徑蛋白表現的影響

將 U2OS 骨肉瘤細胞以 5.5×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 24 小時後，處理不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 24 小時，萃取其蛋白質，以 anti-FAK、anti-Src、anti-ERK、anti-JNK、anti-p38、anti-Akt total 及 phosphorylated 的抗體進行 Western blotting 分析，並以 β -actin 的表現量作為 internal control。結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其磷酸化 ERK1/2 的蛋白表現量減少 (Figure 9)。

8. 利用 MEK1/2 抑制劑 U0126 與氯硝柳胺同時處理 U2OS 骨肉瘤細胞株其轉移能力與 TGFBI 表現量之影響

由 Figure 9 的實驗結果得知氯硝柳胺會抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株其 ERK1/2 磷酸化蛋白的表現量，因此本研究進一步探討氯硝柳胺是否透過磷酸化 ERK1/2 蛋白來影響 TGFBI 的表現進而影響細胞移動及侵襲的能力。將 U2OS 骨肉瘤細胞以 8×10^5 的細胞數培養在 6 公分培養皿內，培養 24 小時後同時處理 200 nM 的氯硝柳胺與 $10 \mu\text{M}$ 的 U0126 再培養 24 小時，以 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 重新計算細胞數，然後以固定量的細胞 (10^4 cell/well) 直接 load 在 Boyden chamber 的 well 中，於 37°C 培養箱反應 24 小時，再分別利用 cell migration

及 cell invasion 的分析方法，分別分析其移動和侵襲的能力。結果顯示氯硝柳胺結合 U0126 可以更加抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株的移動及侵襲能力 (**Figure 10**)。將剩下的細胞萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA，將 cDNA 混合 TGFBI primer 及 SYBR Green 試劑後上機分析其 mRNA 表現。結果顯示氯硝柳胺同時處理 U0126 也可更加抑制 TGFBI 的 mRNA 表現 (**Figure 11**)。

四、討論與結論

綜合以上結果，我們的研究發現氯硝柳胺抑制骨肉瘤細胞株移行、轉移及侵襲可能透過減少 TGFBI 的表現量與抑制磷酸化 ERK1/2 訊息傳遞蛋白。TGFBI (Transforming growth factor beta-induced) 最初稱為 β ig-H3 和 keratoepithelin，是由 transforming growth factor- β (TGF- β) 誘導產生的一種細胞外分泌基質蛋白 [35]，存在於正常細胞和腫瘤細胞中。TGFBI 最早在處理 TGF- β 的人類肺腺癌細胞株 A549 中被鑑定出來，該基因由高度保留的 683 個胺基酸蛋白 (68 kDa) 所編碼而成，包含一個 N-terminal secretory signal peptide、四個 internal homologous repeats (FAS1 domain) 和一個 C-terminal Arg-Gly-Asp (RGD) motif 充當 integrin 的配體識別位點 [36]。除了 TGF- β 外，interleukin-1、retinoic acid 和 tumor necrosis factor- α 也可誘導 TGFBI 的表現 [35, 37]。TGFBI 是一種連接蛋白，可調節 integrin 結合到 collagen、laminin 和 fibronectin 等細胞外基質蛋白，並參與活化形態發生 (morphogenesis)、細胞增生、黏附、遷移、分化和發炎反應 [35, 36, 38-46]，也與腎病變 [47]、類風溼性關節炎 [48]、動脈粥狀硬化 [49] 和癌症 [41, 45, 46] 等疾病相關。先前有研究指出增加 TGFBI 的表現會促進神經膠質瘤 [50]、胃癌 [51]、胰臟癌 [46]、肝癌 [52, 53]、乳癌 [54]、泌尿上皮癌 [55]、前列腺癌 [56]、卵巢癌 [57]、大腸癌 [41] 和骨肉瘤 [58] 細胞的轉移。以上這些觀察結果與我們的實驗一致，當 TGFBI 的表現被抑制時細胞的轉移也會隨之減少 (**Figure 8**)，因此，TGFBI 在癌症轉移中扮演非常重要的角色，抑制 TGFBI 的表現可能可以抑制癌症的轉移而增加存活率。本研究證實氯硝柳胺可透過抑制磷酸化 ERK1/2 訊息傳遞路徑來抑制 TGFBI 的表現，進而抑制骨肉瘤細胞的轉移。因此，氯硝柳胺可以應用在預防骨肉瘤的轉移或輔助骨肉瘤的治療。

參考文獻

1. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC and He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clinical orthopaedics and related research*. 2008; 466(9):2114-2130.
2. Kurschat P and Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clinical and experimental dermatology*. 2000; 25(6):482-489.
3. Nabeshima K, Inoue T, Shima Y and Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathology international*. 2002; 52(4):255-264.
4. Andrews P, Thyssen J and Lorke D. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacology & therapeutics*. 1982; 19(2):245-295.
5. Al-Hadiya BM. Niclosamide: comprehensive profile. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*. 2005; 32:67-96.
6. Weinbach EC and Garbus J. Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature*. 1969; 221(5185):1016-1018.
7. Tao H, Zhang Y, Zeng X, Shulman GI and Jin S. Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice. *Nature medicine*. 2014; 20(11):1263-1269.
8. Li Y, Li PK, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS and Buchsbaum DJ. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer letters*. 2014; 349(1):8-14.
9. Imperi F, Massai F, Ramachandran Pillai C, Longo F, Zennaro E, Rampioni G, Visca P and Leoni L. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(2):996-1005.
10. Piccaro G, Giannoni F, Filippini P, Mustazzolu A and Fattorini L. Activities of drug combinations against *Mycobacterium tuberculosis* grown in aerobic and hypoxic acidic conditions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013; 57(3):1428-1433.
11. Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL, Kim W, Jayamani E, Kwon B, Ausubel FM and Mylonakis E. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0124595.
12. Jurgeit A, McDowell R, Moese S, Meldrum E, Schwendener R and Greber UF. Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects. *PLoS pathogens*. 2012; 8(10):e1002976.
13. Chang Y-W, Yeh T-K, Lin K-T, Chen W-C and Yao H-T. Pharmacokinetics of anti-SARS-CoV agent niclosamide and its analogs in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2006; 14(4).

14. Merschjohann K and Steverding D. In vitro trypanocidal activity of the anti-helminthic drug niclosamide. *Experimental parasitology*. 2008; 118(4):637-640.
15. Chen W, Chen M and Barak LS. Development of small molecules targeting the Wnt pathway for the treatment of colon cancer: a high-throughput screening approach. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2010; 299(2):G293-300.
16. Osada T, Chen M, Yang XY, Spasojevic I, Vandeusen JB, Hsu D, Clary BM, Clay TM, Chen W, Morse MA and Lysterly HK. Antihelminth compound niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations. *Cancer research*. 2011; 71(12):4172-4182.
17. Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Kobelt D, Lemm M, Fichtner I, Schlag PM, Shoemaker RH and Stein U. Novel effect of antihelminthic Niclosamide on S100A4-mediated metastatic progression in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011; 103(13):1018-1036.
18. Li R, Hu Z, Sun SY, Chen ZG, Owonikoko TK, Sica GL, Ramalingam SS, Curran WJ, Khuri FR and Deng X. Niclosamide overcomes acquired resistance to erlotinib through suppression of STAT3 in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2013; 12(10):2200-2212.
19. You S, Li R, Park D, Xie M, Sica GL, Cao Y, Xiao ZQ and Deng X. Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2014; 13(3):606-616.
20. Lu W, Lin C, Roberts MJ, Waud WR, Piazza GA and Li Y. Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS One*. 2011; 6(12):e29290.
21. Wang YC, Chao TK, Chang CC, Yo YT, Yu MH and Lai HC. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells. *PLoS One*. 2013; 8(9):e74538.
22. Ye T, Xiong Y, Yan Y, Xia Y, Song X, Liu L, Li D, Wang N, Zhang L, Zhu Y, Zeng J, Wei Y and Yu L. The anthelmintic drug niclosamide induces apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer model. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85887.
23. Londono-Joshi AI, Arend RC, Aristizabal L, Lu W, Samant RS, Metge BJ, Hidalgo B, Grizzle WE, Conner M, Forero-Torres A, Lobuglio AF, Li Y and Buchsbaum DJ. Effect of niclosamide on basal-like breast cancers. *Molecular cancer therapeutics*. 2014; 13(4):800-811.
24. Yo YT, Lin YW, Wang YC, Balch C, Huang RL, Chan MW, Sytwu HK, Chen CK, Chang CC, Nephew KP, Huang T, Yu MH and Lai HC. Growth inhibition of ovarian tumor-initiating cells by niclosamide. *Molecular cancer therapeutics*. 2012;

11(8):1703-1712.

25. King ML, Lindberg ME, Stodden GR, Okuda H, Ebers SD, Johnson A, Montag A, Lengyel E, MacLean IJ and Hayashi K. WNT7A/beta-catenin signaling induces FGF1 and influences sensitivity to niclosamide in ovarian cancer. *Oncogene*. 2015; 34(26):3452-3462.
26. Arend RC, Londono-Joshi AI, Samant RS, Li Y, Conner M, Hidalgo B, Alvarez RD, Landen CN, Straughn JM and Buchsbaum DJ. Inhibition of Wnt/beta-catenin pathway by niclosamide: a therapeutic target for ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2014; 134(1):112-120.
27. Liu C, Lou W, Zhu Y, Nadiminty N, Schwartz CT, Evans CP and Gao AC. Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014; 20(12):3198-3210.
28. Wieland A, Trageser D, Gogolok S, Reinartz R, Hofer H, Keller M, Leinhaas A, Schelle R, Normann S, Klaas L, Waha A, Koch P, Fimmers R, Pietsch T, Yachnis AT, Pincus DW, et al. Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013; 19(15):4124-4136.
29. Li R, You S, Hu Z, Chen ZG, Sica GL, Khuri FR, Curran WJ, Shin DM and Deng X. Inhibition of STAT3 by niclosamide synergizes with erlotinib against head and neck cancer. *PLoS One*. 2013; 8(9):e74670.
30. Wang AM, Ku HH, Liang YC, Chen YC, Hwu YM and Yeh TS. The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2009; 106(4):682-692.
31. Jin Y, Lu Z, Ding K, Li J, Du X, Chen C, Sun X, Wu Y, Zhou J and Pan J. Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer research*. 2010; 70(6):2516-2527.
32. Ono M, Yin P, Navarro A, Moravek MB, Coon VJ, Druschitz SA, Gottardi CJ and Bulun SE. Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth. *Fertility and sterility*. 2014; 101(5):1441-1449.
33. Li Z, Yu Y, Sun S, Qi B, Wang W and Yu A. Niclosamide inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell lines by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Oncology reports*. 2015; 33(4):1763-1768.
34. Liao Z, Nan G, Yan Z, Zeng L, Deng Y, Ye J, Zhang Z, Qiao M, Li R, Denduluri S, Wang J, Wei Q, Geng N, Zhao L, Lu S, Wang X, et al. The Anthelmintic Drug Niclosamide Inhibits the Proliferative Activity of Human Osteosarcoma Cells by

Targeting Multiple Signal Pathways. *Current cancer drug targets*. 2015; 15(8):726-738.

35. Thapa N, Lee BH and Kim IS. TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39(12):2183-2194.

36. Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD and Purchio AF. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA and cell biology*. 1992; 11(7):511-522.

37. Ween MP, Oehler MK and Ricciardelli C. Transforming growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFBI)/(β ig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012; 13(8):10461-10477.

38. Bae JS, Lee SH, Kim JE, Choi JY, Park RW, Yong Park J, Park HS, Sohn YS, Lee DS, Bae Lee E and Kim IS. Betaig-h3 supports keratinocyte adhesion, migration, and proliferation through α 3 β 1 integrin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002; 294(5):940-948.

39. Kim JE, Jeong HW, Nam JO, Lee BH, Choi JY, Park RW, Park JY and Kim IS. Identification of motifs in the fasciclin domains of the transforming growth factor-beta-induced matrix protein betaig-h3 that interact with the α 5 β 1 integrin. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(48):46159-46165.

40. Thapa N, Kang KB and Kim IS. Beta ig-h3 mediates osteoblast adhesion and inhibits differentiation. *Bone*. 2005; 36(2):232-242.

41. Ma C, Rong Y, Radloff DR, Datto MB, Centeno B, Bao S, Cheng AW, Lin F, Jiang S, Yeatman TJ and Wang XF. Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes & development*. 2008; 22(3):308-321.

42. Kim YH, Kwon HJ and Kim DS. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)-dependent processing of β ig-h3 protein regulates cell migration, invasion, and adhesion. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(46):38957-38969.

43. Holmberg C, Quante M, Steele I, Kumar JD, Balabanova S, Duval C, Czepan M, Rakonczay Z, Jr., Tiszlavicz L, Nemeth I, Lazar G, Simonka Z, Jenkins R, Hegyi P, Wang TC, Dockray GJ, et al. Release of TGF β ig-h3 by gastric myofibroblasts slows tumor growth and is decreased with cancer progression. *Carcinogenesis*. 2012; 33(8):1553-1562.

44. Zhang Y, Wen G, Shao G, Wang C, Lin C, Fang H, Balajee AS, Bhagat G, Hei TK and Zhao Y. TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development. *Cancer research*. 2009; 69(1):37-44.

45. Lauden L, Siewiera J, Boukouaci W, Ramgolam K, Mourah S, Lebbe C, Charron D, Aoudjit F, Jabrane-Ferrat N and Al-Daccak R. TGF- β -induced (TGFBI) protein in melanoma: a signature of high metastatic potential. *The Journal of investigative dermatology*. 2014; 134(6):1675-1685.
46. Costanza B, Rademaker G, Tiamiou A, De Tullio P, Leenders J, Blomme A, Bellier J, Bianchi E, Turtoi A, Delvenne P, Bellahcène A, Peulen O and Castronovo V. Transforming growth factor beta-induced, an extracellular matrix interacting protein, enhances glycolysis and promotes pancreatic cancer cell migration. *International journal of cancer*. 2019; 145(6):1570-1584.
47. Li C, Lim SW, Choi BS, Lee SH, Cha JH, Kim IS, Kim J and Yang CW. Inhibitory effect of pravastatin on transforming growth factor beta1-inducible gene h3 expression in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *American journal of nephrology*. 2005; 25(6):611-620.
48. Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K and Goerdts S. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scandinavian journal of immunology*. 2001; 53(4):386-392.
49. O'Brien ER, Bennett KL, Garvin MR, Zderic TW, Hinohara T, Simpson JB, Kimura T, Nobuyoshi M, Mizgala H, Purchio A and Schwartz SM. Beta ig-h3, a transforming growth factor-beta-inducible gene, is overexpressed in atherosclerotic and restenotic human vascular lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996; 16(4):576-584.
50. Guo SK, Shen MF, Yao HW and Liu YS. Enhanced Expression of TGFBI Promotes the Proliferation and Migration of Glioma Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018; 49(3):1097-1109.
51. Li Z, Miao Z, Jin G, Li X, Li H, Lv Z and Xu HM. β ig-h3 supports gastric cancer cell adhesion, migration and proliferation in peritoneal carcinomatosis. *Molecular medicine reports*. 2012; 6(3):558-564.
52. Tang J, Zhou HW, Jiang JL, Yang XM, Li Y, Zhang HX, Chen ZN and Guo WP. BetaIg-h3 is involved in the HAb18G/CD147-mediated metastasis process in human hepatoma cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2007; 232(3):344-352.
53. Tang J, Wu YM, Zhao P, Jiang JL and Chen ZN. Betaig-h3 interacts with alpha3beta1 integrin to promote adhesion and migration of human hepatoma cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2009; 234(1):35-39.
54. Zhang J and Li Z. β -inducible gene-h3 promotes human breast carcinoma cell metastasis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling

- pathway. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018; 15(3):2910-2916.
55. Lang K, Kahveci S, Bonberg N, Wichert K, Behrens T, Hovanec J, Roghmann F, Noldus J, Tam YC, Tannapfel A, Kafferlein HU and Bruning T. TGFBI Protein Is Increased in the Urine of Patients with High-Grade Urothelial Carcinomas, and Promotes Cell Proliferation and Migration. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(18).
56. Chen WY, Tsai YC, Yeh HL, Suau F, Jiang KC, Shao AN, Huang J and Liu YN. Loss of SPDEF and gain of TGFBI activity after androgen deprivation therapy promote EMT and bone metastasis of prostate cancer. *Science signaling*. 2017; 10(492).
57. Ween MP, Lokman NA, Hoffmann P, Rodgers RJ, Ricciardelli C and Oehler MK. Transforming growth factor-beta-induced protein secreted by peritoneal cells increases the metastatic potential of ovarian cancer cells. *International journal of cancer*. 2011; 128(7):1570-1584.
58. Guo YS, Zhao R, Ma J, Cui W, Sun Z, Gao B, He S, Han YH, Fan J, Yang L, Tang J and Luo ZJ. β ig-h3 promotes human osteosarcoma cells metastasis by interacting with integrin α 2 β 1 and activating PI3K signaling pathway. *PLoS One*. 2014; 9(3):e90220.

圖表與圖表說明

Table 1

Primer	Sequence 5'→3'
RENBP	Forward: GGAGGCAGGTATGGATGTATTGTC
	Reverse: TCCCGAGTCAGCACAAAGG
ZNF114	Forward: TAGGGCACACAACACTCATGGT
	Reverse: GCAGAGGTTGCCCCAGTTT
GPNMB	Forward: TGGGACGATGTTTCAGTGAGAGT
	Reverse: GAATCTGATCTGTTACCACGTACACA
TNFRSF14	Forward: CAGCTGGCTGGTGACGAA
	Reverse: ACTACATCACCCCTTGGCTTTC
PKD1L2	Forward: CTGCCGTGTCAGAGAAAATCC
	Reverse: TCTGACCTTCTGTCTGACGTCTATG
TGFBI	Forward: CGTAATAGCCTCTGCATTGAGAAC
	Reverse: CAGCATGCTAAAGCGATTGTCT
CCL24	Forward: CCATAGTAACCAGCCTTC
	Reverse: CAGGTTCTTCATGTACCTC
CXCL14	Forward: GGACCCAAGATCCGCTACAG
	Reverse: CGTTCCAGGCGTTGTACCA
GAPDH	Forward: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	Reverse: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

Figure 1

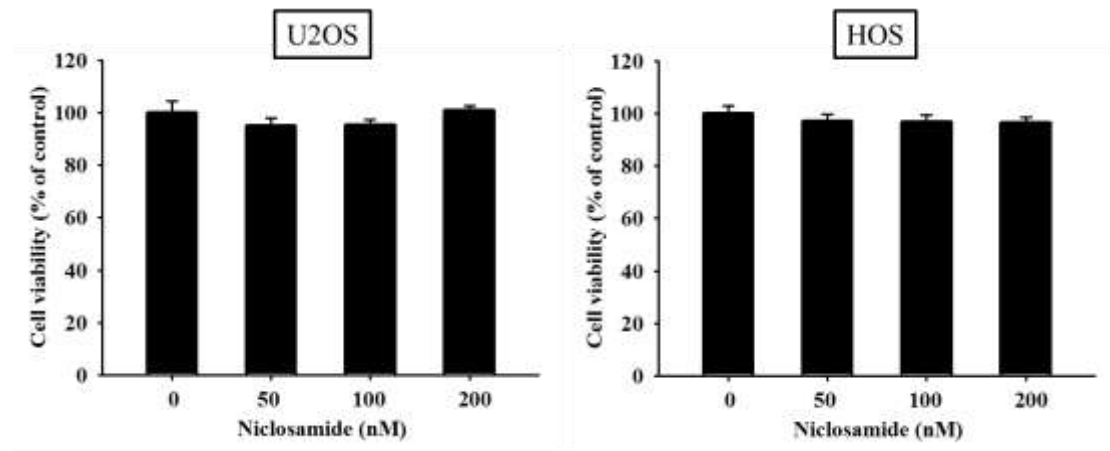


Figure 1. 使用 0-200 nM 濃度的氯硝柳胺，處理 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株，利用 MTT assay 分析其細胞存活率 (cell viability)，發現氯硝柳胺在此濃度並不會毒殺細胞。

Figure 2

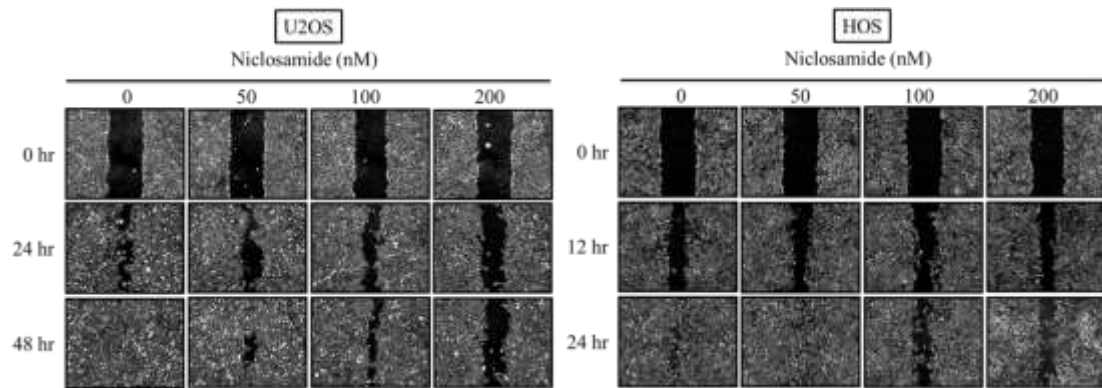


Figure 2. 將 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理後，利用傷口癒合模式 (wound healing assay) 的分析方法，分析其細胞移行的能力。結果發現氯硝柳胺可以明顯抑制 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株的移行能力。

Figure 3

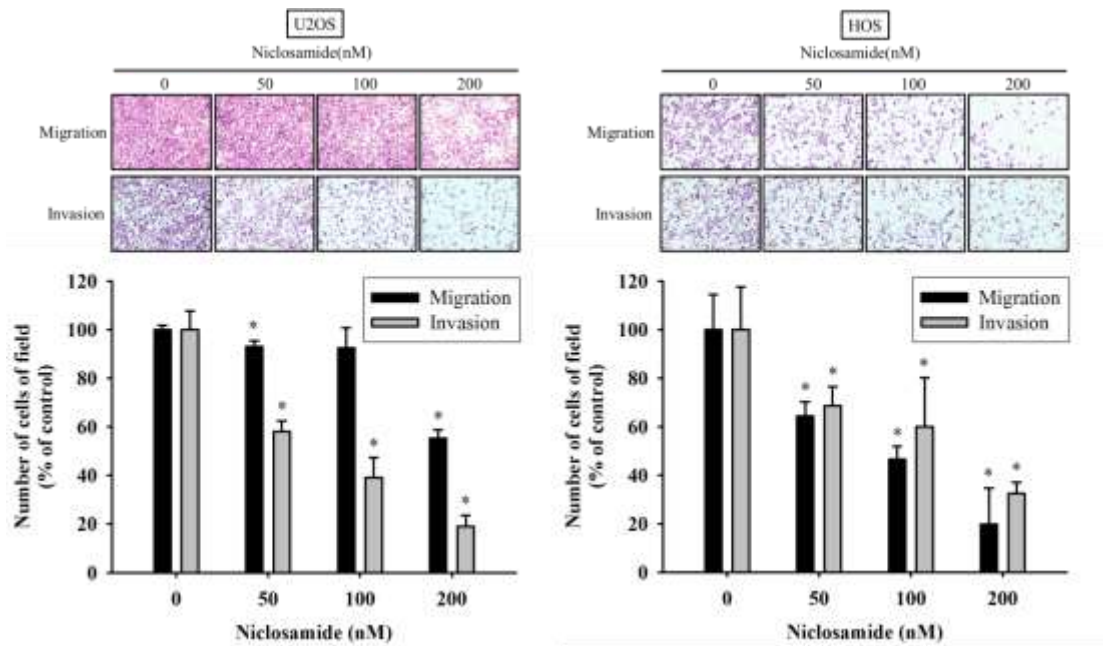


Figure 3. 將 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，利用 Boyden chamber 的分析方法，分析其移動及侵襲的能力。結果發現氯硝柳胺可以明顯抑制 U2OS 和 HOS 骨肉瘤細胞株的移動及侵襲能力。* $p < 0.05$ ，與 Niclosamide 0 nM 相比。

Figure 4

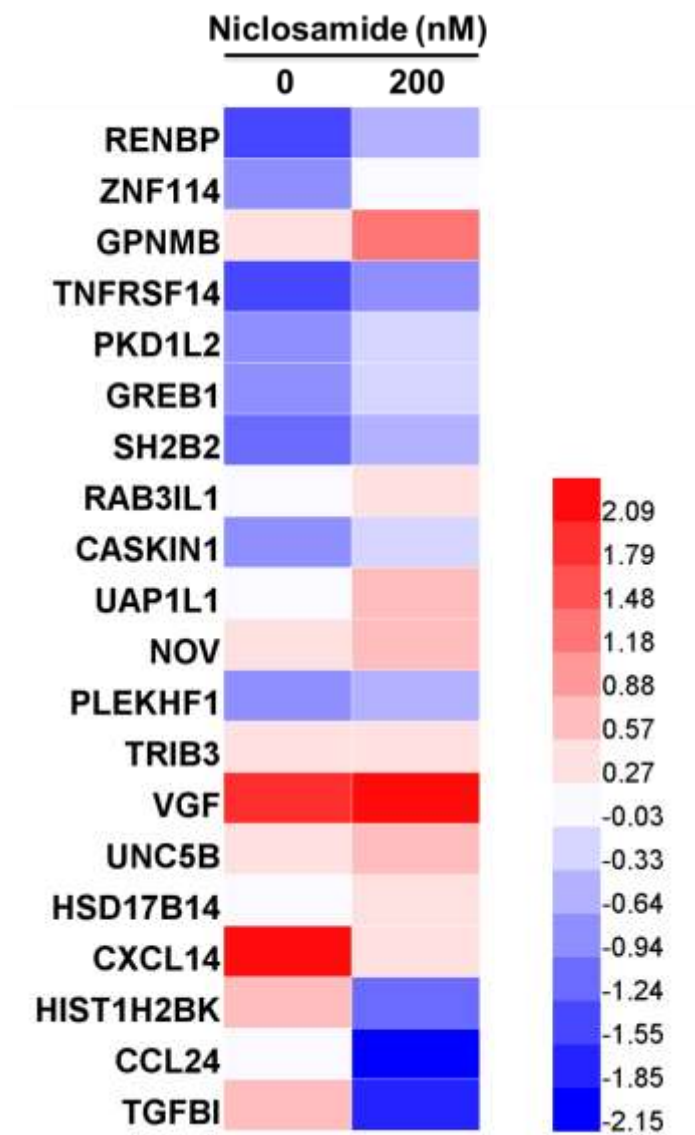


Figure 4. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以 0 和 200 nM 的氯硝柳胺處理 24 小時，萃取其 total RNA，送至圖爾思生物科技股份有限公司進行 RNA 定序。Heatmap 以 $p < 0.05$ 及 \log_2 fold change ± 1.8 分析繪製而成。

Figure 5

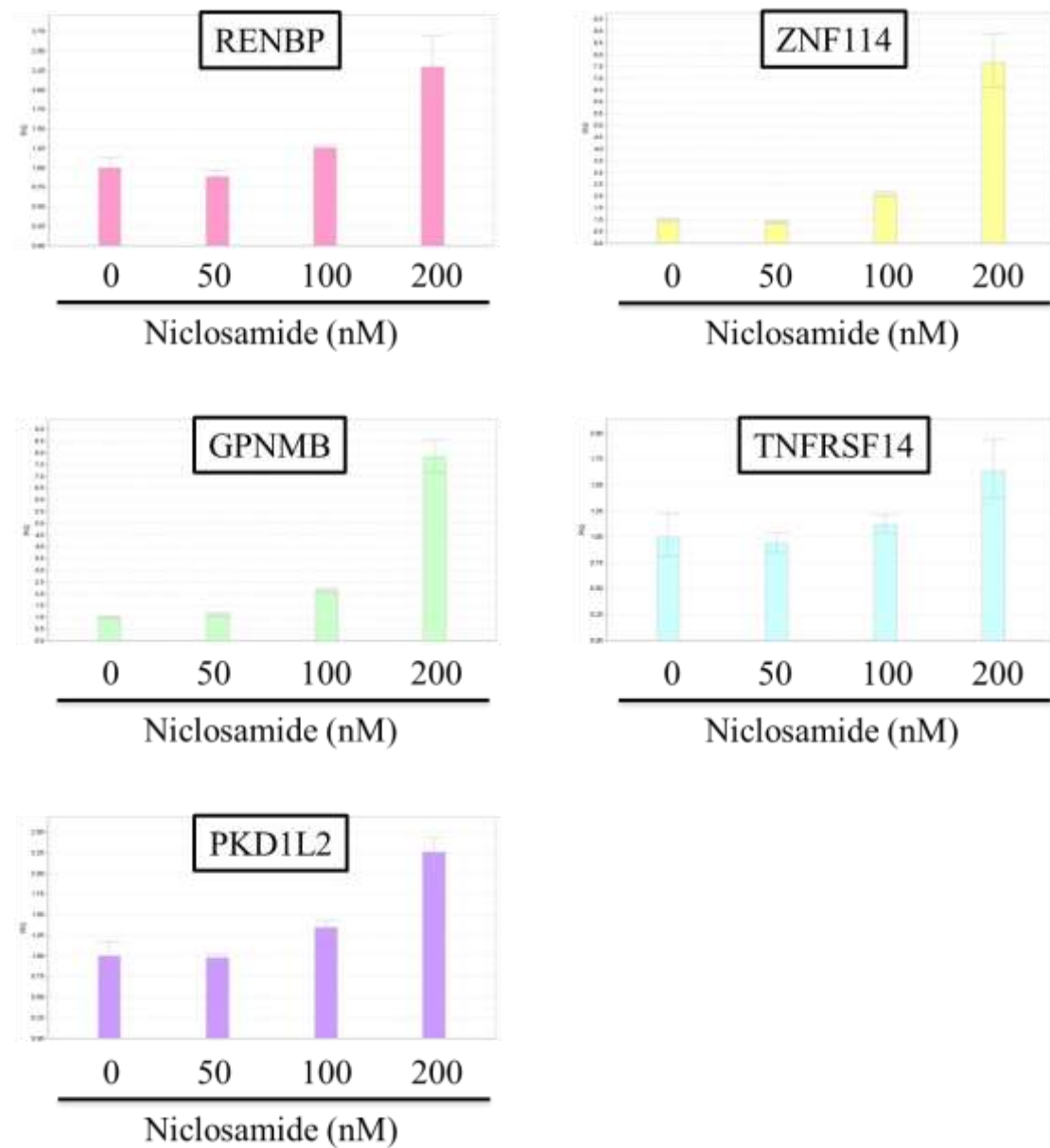


Figure 5. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA。利用定量的 real-time PCR 方法分析 RENBP、ZNF114、GPNMB、TNFRSF14 和 PKD1L2 的 mRNA 表現，結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其 RENBP、ZNF114、GPNMB、TNFRSF14 和 PKD1L2 的 mRNA 表現量增加。

Figure 6

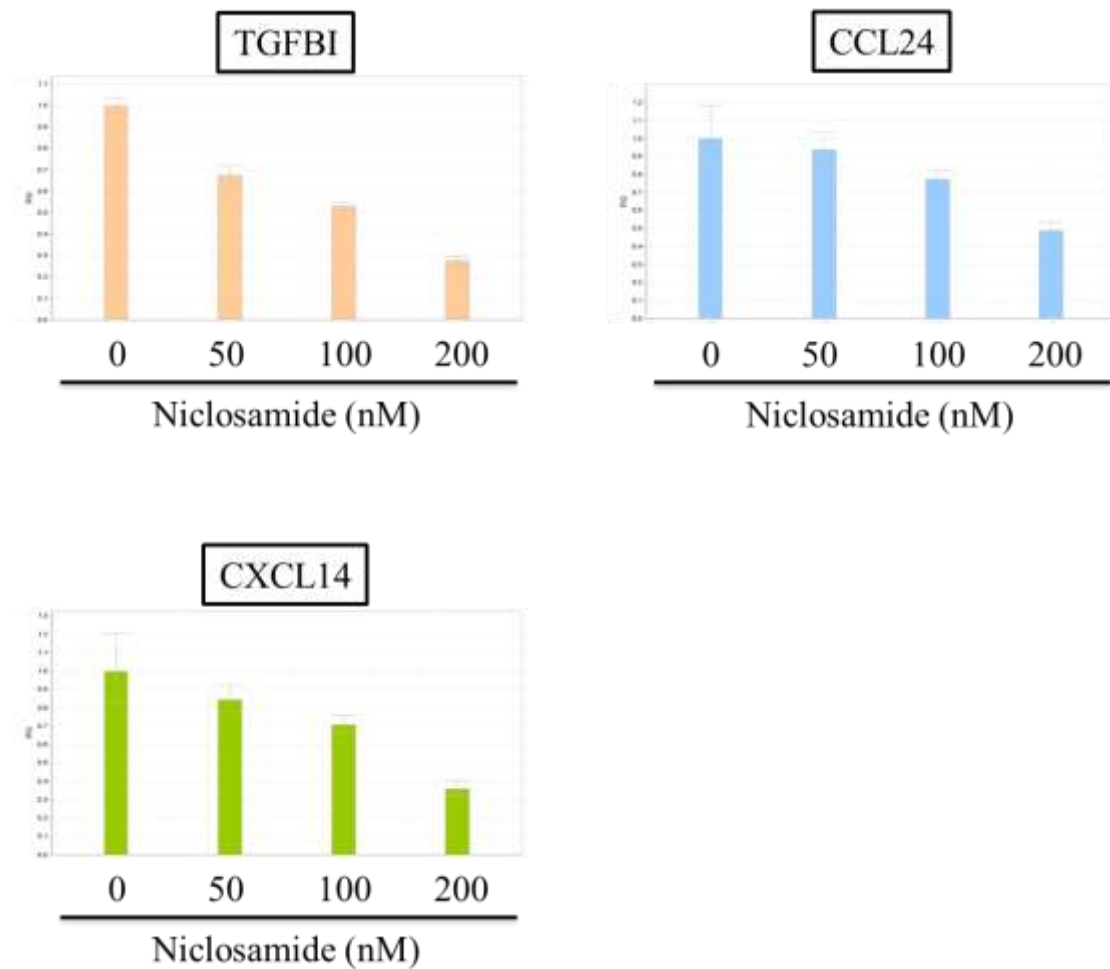


Figure 6. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA。利用定量的 real-time PCR 方法分析 TGFBI、CCL24 和 CXCL14 的 mRNA 表現，結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其 TGFBI、CCL24 和 CXCL14 的 mRNA 表現量減少。

Figure 7.

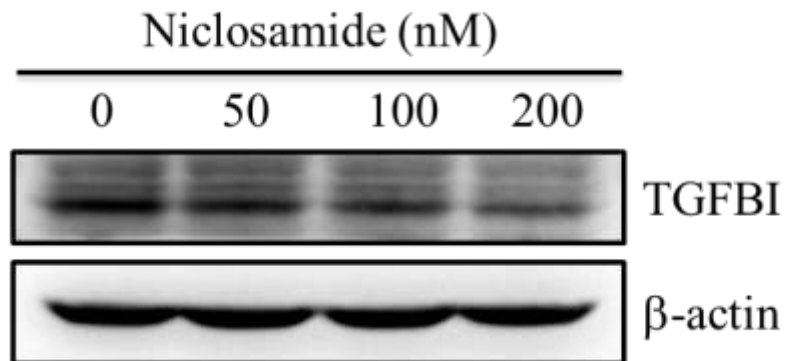
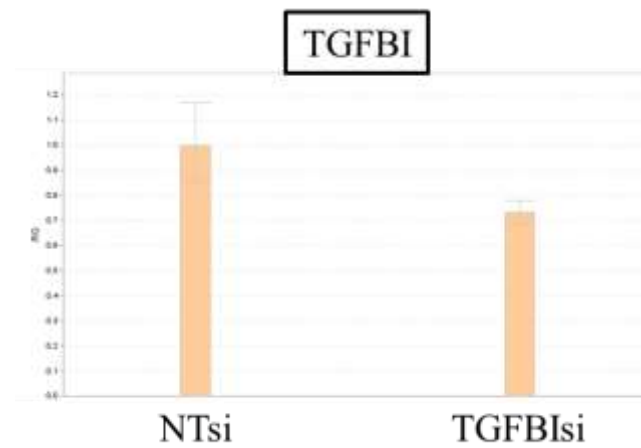


Figure 7. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，萃取其蛋白質。利用 Western blotting 來分析 TGFBI 的蛋白表現，結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其 TGFBI 的蛋白表現量減少。

Figure 8

(A)



(B)

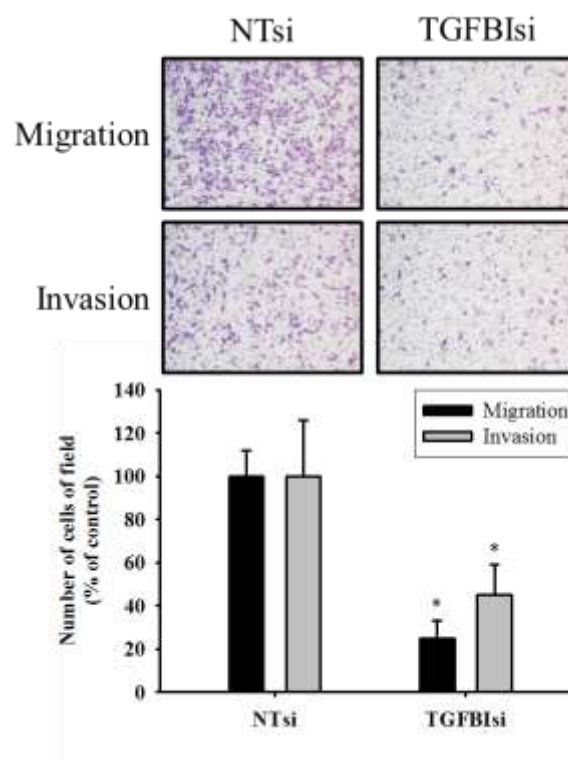


Figure 8. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以 TGFBI siRNA 處理 72 小時後，(A) 萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA。利用定量的 real-time PCR 方法分析 TGFBI 的 mRNA 表現；(B) 利用 Boyden chamber 的分析方法，分析其移動及侵襲的能力。結果發現抑制 TGFBI 的表現可以明顯抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株的移動及侵襲能力。* $p < 0.05$ ，NTsi 與 TGFBI si 相比。

Figure 9

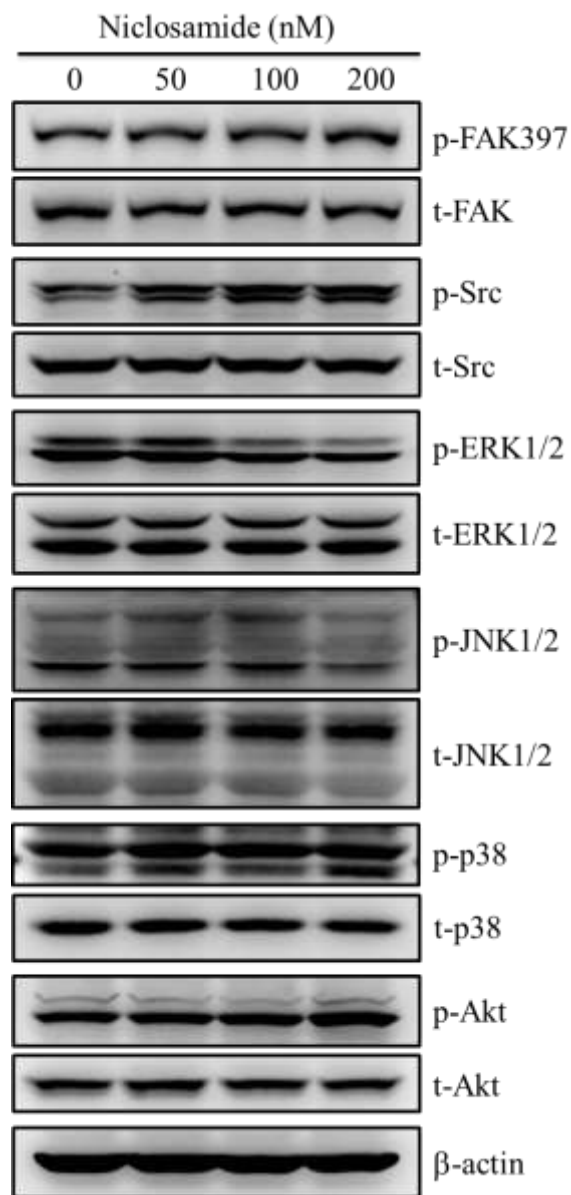


Figure 9. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以不同濃度的氯硝柳胺 (0, 50, 100, 200 nM) 處理 24 小時後，利用 Western blotting 來分析 FAK、Src、ERK1/2、JNK1/2、p38、Akt total 及 phosphorylated 的蛋白表現，結果顯示氯硝柳胺使 U2OS 骨肉瘤細胞株其磷酸化 ERK1/2 的蛋白表現量減少。

Figure 10

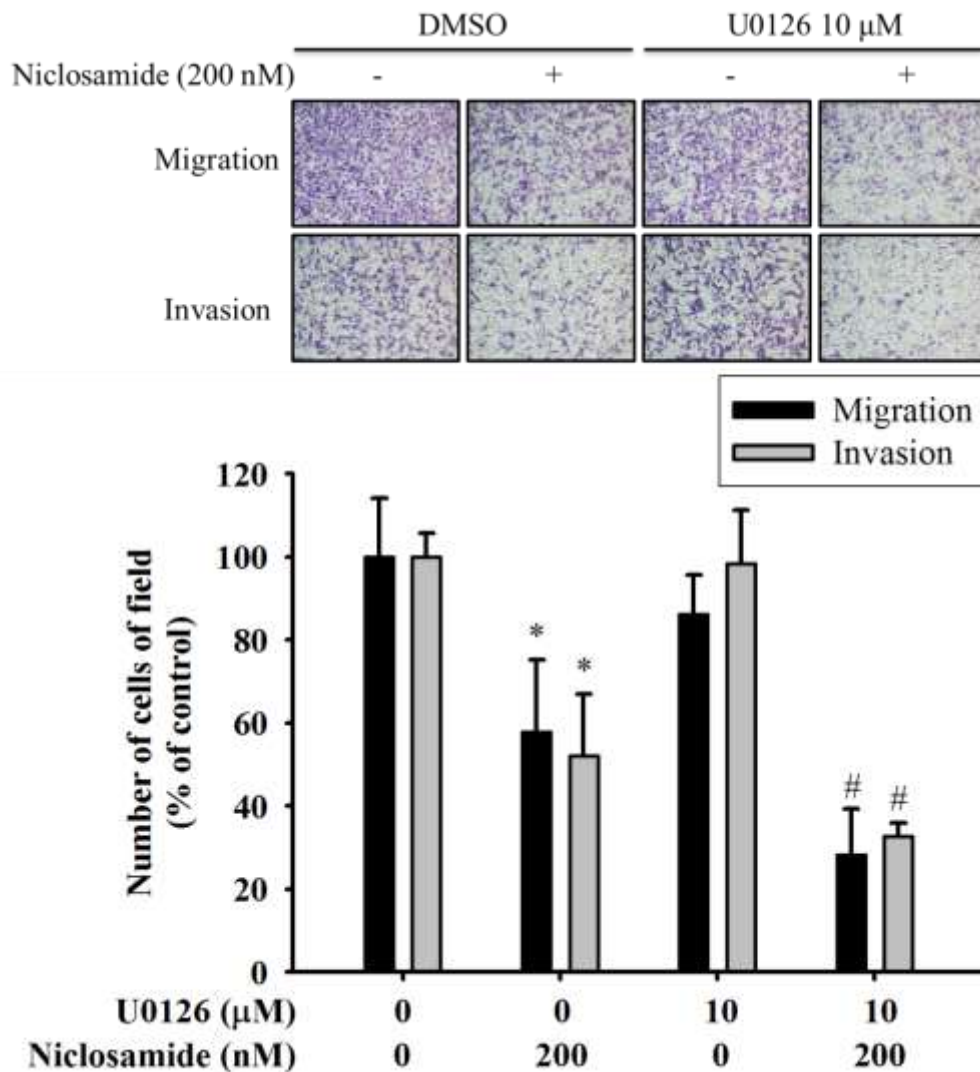


Figure 10. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以 200 nM 的氯硝柳胺與 10 μM 的 U0126 處理 24 小時後，利用 Boyden chamber 的分析方法，分析其移動及侵襲的能力。結果發現氯硝柳胺可以明顯抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株的移動及侵襲能力，而同時處理 U0126 可以更加抑制其移動及侵襲能力。* $p < 0.05$ ，Niclosamide 0 nM 與 200 nM 相比；# $p < 0.05$ ，Niclosamide 200 nM 與 Niclosamide 200 nM-10 μM U0126 相比。

Figure 11

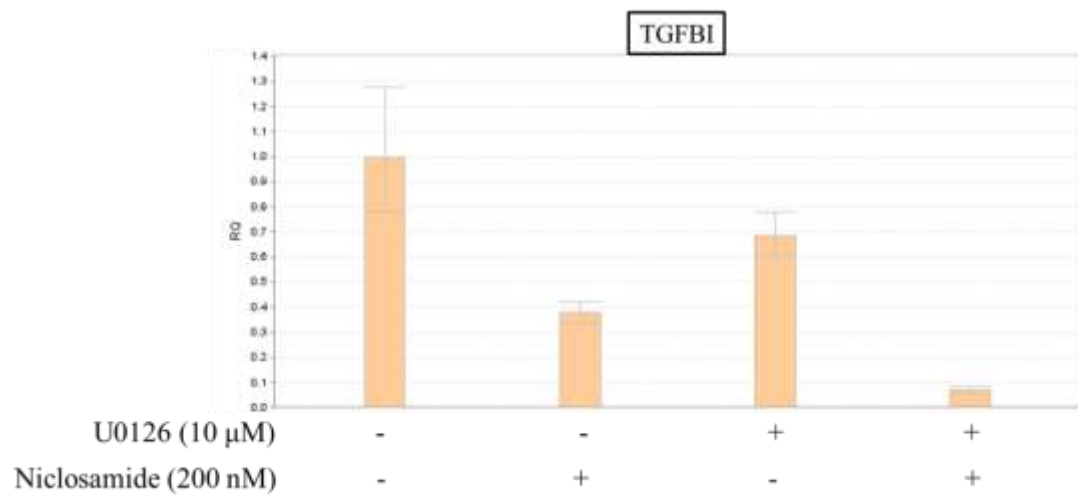


Figure 11. 將 U2OS 骨肉瘤細胞株以 200 nM 的氯硝柳胺與 10 μM 的 U0126 處理 24 小時後，萃取其 total RNA 並反轉錄成 cDNA。利用定量的 real-time PCR 方法分析 TGFBI 的 mRNA 表現。結果發現氯硝柳胺可以明顯抑制 U2OS 骨肉瘤細胞株 TGFBI 的 mRNA 表現，而同時處理 U0126 可以更加抑制其 TGFBI 的 mRNA 表現。

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：楊嘉欣		計畫編號：106-2314-B-040-007-MY3		
計畫名稱：氣硝柳胺抑制骨癌細胞株轉移及血管新生之機制探討				
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇
		研討會論文	0	
		專書	0	本
		專書論文	0	章
		技術報告	0	篇
		其他	0	篇
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇
		研討會論文	0	
		專書	0	本
		專書論文	0	章
		技術報告	0	篇
		其他	0	篇
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次
		碩士生	0	
		博士生	0	
		博士級研究人員	0	
		專任人員	1	
	非本國籍	大專生	0	
		碩士生	0	
		博士生	0	
		博士級研究人員	0	
		專任人員	0	
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。)				