

國立台灣師範大學

人類發展與家庭學系 營養科學與教育組

碩士論文

Department of Human Development and Family Studies

National Taiwan Normal University

小 GTPase Rab37 對 Formosanin C 誘導之細胞自噬

在肺癌細胞中的角色

The role of small GTPase Rab37 in Formosanin C-induced
autophagy in lung cancer cells

研究生：張舒翕 Shu-Yu Chang

指導教授：蘇純立博士

Advisor：Chun-Li Su, Ph.D.

中華民國一零八年八月

August, 2019

摘要

肺癌已經是台灣多年來死亡率第一名的癌症。轉移是治療肺癌最重要挑戰。中草藥重樓皂苷萃取物 Formosanin C (FC) 被發現可以藉由誘導降解型細胞自噬以及透過抑制組織金屬蛋白酶 (MMPs) 來降低肺癌轉移。降解型細胞自噬為細胞分解胞內物質以維持細胞能量平衡的方式。在肺癌細胞，人類小型 GTPase Rab37 增加金屬蛋白酶組織抑制劑 (TIMP1) 透過「分泌型細胞自噬」，降低 MMP9 的分泌以抑制肺癌轉移。本研究發現 FC 能夠 (1) 毒殺肺癌細胞 CL1-5, (2) 提高肺癌細胞的細胞自噬作用，其路徑與提高 ATG7 和 Ras/MEK/ERK 路徑的表現有關，(3) 增加 p62 來抑制肺癌細胞的爬行。然而，在肺癌治療上，FC 是否輔助化療藥物以發揮肺癌細胞致死的效果還有待更多證據釐清。

關鍵字：肺癌、Formosanin C、細胞自噬、Rab37、ATG7、Ras/MEK/ERK、p62

Abstract

Lung cancer has been the leading cause of cancer death in Taiwan for many years. Metastasis is a tricky challenge for lung cancer treatment. Formosanin C (FC), extracted from Chinese herbal saponin *Rhizoma Paridis* saponin (RPS), was found to have anti-tumor ability through inducing degradative autophagy and inhibiting pulmonary metastasis via repressing of matrix metalloproteinases (MMPs). Degradative autophagy degrades intracellular substances to maintain cell energy homeostasis. Human small GTPase Rab37 increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and reduces pulmonary metastasis through “secretory autophagy” in lung cancer cells. In the present studies, FC (1) inhibited CL1-5 lung cancer cell viability, (2) stimulated autophagy via upregulating ATG7 and Ras/MEK/ERK pathway, and (3) inhibited the cell migration through upregulating p62. However, whether FC can assist chemotherapy for lung cancer or not need much more research.

Key words: lung cancer, Formosanin C, autophagy, Rab37, ATG7, Ras/MEK/ERK, p62

目錄

第一章 緒論 p. 1

第一節 肺癌 p. 1

一、肺癌的流行與發生 p. 1

二、肺癌治療 p. 2

第二節 細胞自噬 p. 3

一、降解型細胞自噬 (Degradative autophagy) p. 3

二、分泌型細胞自噬 (Secretory autophagy) p. 4

三、肺癌轉移與細胞自噬 p. 5

第三節 台灣蚤休 (Formosanin C, FC) p. 5

第二章 研究目的 p. 8

第三章 材料與方法 p. 10

第一節 實驗藥品與試劑 p. 10

第二節 儀器與實驗耗材 p. 12

第三節 實驗方法 p. 16

一、細胞培養、繼代、冷凍保存、解凍、計數 p. 16

二、藥物配製 p. 19

三、細胞存活率分析 (Cell viability analysis) p. 19

四、細胞自噬比例分析 p. 21

五、西方墨點法 p. 22

六、考馬斯亮藍染色法 p. 29

七、傷口癒合法 (Wound healing assay) p. 30

八、統計分析 p. 30

第四章 結果 p. 31

第一節 FC 的細胞毒殺能力 p. 31

第二節 FC 引起 CL1-5 細胞自噬 p. 32

第三節 FC 抑制 CL1-5 細胞爬行 p. 36

第五章 討論 p. 39

第六章 結論 p. 44

第七章 參考資料 p. 45

第八章 附錄 p. 52



圖次

Appendix Fig. 1 Lung cancer patients with low hRAB37 protein expression coinciding with low TIMP1 expression in their tumours show high lymph node metastasis and poor survival. p.52

Fig. 1 Percentage of viability of human lung carcinoma cell CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells in response to FC. p.53

Fig. 2 (a) (b) Expression of LC3 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.54-55

Fig. 3 Effect of FC on autophagy of human lung carcinoma CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells. p.56

Fig. 4 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) Expression of Rab37 and ATG5-12 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.57-60

Fig. 5 (a) (b) Expression of ATG7 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.61-62

Fig. 6 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) Expression of Class III PI3K and Beclin-1 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.63-66

Fig. 7 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) (C-a) (C-b) Expression of p-class I PI3K, p-Akt and p-mTOR in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.67-72

Fig. 8 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) (C-a) (C-b) Expression of Ras, p-MEK and p-ERK in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.73-78

Fig. 9 (A) Representative images captured by ISCapture microscope

of CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells in response to FC between 0 and 24 h from produced wounds. (B-a) (B-b) Expression of wound healing in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.79-81

Fig. 10 (a) (b) Expression of TIMP1 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively. p.82-83

Fig. 11 Expression of p62 in response to FC. p.84



表次

Table 1 Summary of protein expression. p.85



第一章 緒論

第一節 肺癌

一、肺癌的流行與發生

根據世界衛生組織 GLOBCAN 2018 統計，肺癌為全球癌症中發生率與死亡率最高的癌症（International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2018）。台灣行政院衛生福利部國民健康署 105 年癌症登記報告顯示，肺癌為所有癌症發生率第三，死亡率第一的癌症（台灣行政院衛生福利部國民健康署，2018）。吸菸是肺癌的主要原因，在高收入國家如美國、歐洲等地隨著政府的的宣導，肺癌發生率有下降的趨勢，開發中國家如中國、印尼及部分非洲國家的肺癌發生率達到巔峰或持續上升，值得注意的是，低抽菸比例的華人女性卻有高肺癌發生率，被認為與吸入過多因烹飪時產生的油煙及燃燒木炭的廢氣有關（Bray, F. et al., 2018）。

肺癌分為兩大種：非小細胞肺癌（Non-small-cell lung carcinoma, NSCLC）以及小細胞肺癌，比例分別佔 85%與 15%，其中，非小細胞肺癌又可區分為三種：鱗狀細胞癌、腺癌以及大細胞癌，比例分別為 15-30%、40%以及 5-10%。腺癌是所有肺癌中最常見的種類，分泌黏液的呼吸道表皮第二型肺泡細胞變異造成（Zappa, C. et al., 2016）。

二、肺癌治療

肺癌根據癌症分級系統 TNM (Tumor-Node-Metastasis) 可分為四期，治療方法也根據 TNM 期而異。在 NSCLC 病人，手術治療適用於 I、II 與 IIIA 期，化療輔助手術治療適用於 IIA、IIB 及 IIIA 期。由於將近 40% 的肺癌病人發現時已經為 IV 期，此期治療目標為延長存活及降低相關併發症，因此毒殺化療為第一線治療方式

(Zappa, C. et al., 2016)。給予化療之前，醫生會根據美國東岸癌症臨床研究合作組織 (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) 出版的生活品質評估表 (Performance status, PS) 來評估病人日常體能狀態，以決定給予的化療藥物， $PS \leq 2$ 才會給予化療，病人 PS 介於 0 至 1 者，會給予結合含鉑類藥物 (platinum, ex: cisplatin 或 carboplatin) 的化療第一線藥物，像是 paclitaxel、gemcitabine、docetaxel、vinorelbine、irinotecan 或 pemetrexed。以上合併使用之藥物平均延長病人八至十個月的壽命。肺腺癌病人可能以 pemetrexed 合併含鉑類藥物的治療效果為佳。含鉑類藥物因為有較多的副作用，因此 $PS=2$ 的患者通常被建議給予單一非含鉑類的化療藥物。若患者接受化療後癌症未被削弱甚至惡化，就必須停止化療療程。

三、肺癌細胞 CL1-5

為了瞭解肺癌細胞的侵入與轉移，科學家從罹患分化不良腺癌

的 64 歲長者身上取出 CL1 細胞，藉由體外細胞 transwell invasion chamber 與動物篩選出 CL1-1 到 CL1-5，CL1-5 為此一系列轉移程度最高者 (Chu et al., 1997)。

第二節 細胞自噬

一、降解型細胞自噬 (Degradative autophagy)

細胞自噬為細胞在飢餓、生長、死亡和腫瘤抑制過程中，細胞內部透過降解與清除錯誤蛋白和被破壞胞器的生理現象 (Yun et al., 2018)。主要分成四個階段：起始期 (initiation)、形成期 (formation)、展延期 (membrane expansion) 與成熟期 (maturation) (Yu et al., 2018)。其中最重要的過程就是藉由雙層膜胞器自噬體 (autophagosome) 降解物質。在壓力狀況下，自噬體將欲清除的物質運送給溶酶體 (lysosome)，被降解與再利用。這種過程對於保護細胞免於受傷的蛋白及外來毒素、維持細胞新陳代謝與能量平衡與促進細胞存活具有重要意義。

細胞自噬過程受到一系列蛋白質的調節。mTOR 包含兩個複合體：mTORC1 和 mTORC2，其中 mTORC1 扮演 autophagy-related protein (ATG) 磷酸化並抑制 autophagy 的關鍵角色。當 mTORC1 在壓力狀況下被抑制，Unc-51-like autophagy-activating kinase (ULK) 複合體去磷酸化而被活化，活化後會趨向 phagophore 並活

化 class III PI3K，同時 Beclin-1 在 autophagosome 成熟與延展期間召聚 ATG，ATG 就在延展階段調控 autophagosome 的形成。ATG5-ATG12/ATG16L 複合體會聚集 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) 並與 phagophore 的延展有關。LC3 接著促使 phagophore 延長，透過 ATG4B，pro-LC3 被轉變為活化的細胞型態 LC3-I，並再與 phosphatidylethanolamine (PE)、ATG3 和 ATG7 互相作用後轉變為 LC3-II。LC3-II 會附著於 autophagosome 的內膜與外膜處，與待降解物質結合。成熟的 autophagosome 可以和 lysosome 結合後，形成 autolysosome，移除細胞內被淘汰的蛋白與胞器。

二、分泌型細胞自噬 (Secretory autophagy)

有別於降解型細胞自噬把細胞內物質降解以維持細胞內的生理平衡，分泌型細胞自噬幫助未經由細胞內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 與高基氏體 (Golgi apparatus) 協助分泌出細胞外的蛋白 (Ponpuak, M. et al., 2015)。以分泌型細胞自噬送出細胞外的物質包含有胞外功能的蛋白、要被細胞移除的聚集型蛋白質、細胞內胞器物質以及細胞內的微生物。在哺乳動物中具有重要生理功能的發炎細胞激素 IL-1 β 就是透過此方式運輸到細胞外。IL-1 β 在細胞中透過發炎體被活化後，被送到細胞外與其他細胞上的 IL-1 受器結合後才能引起促發炎路徑。

三、肺癌轉移與細胞自噬

過去研究發現，人類細胞中的 Rab 小型 GTPases，除了可以調控胞內物質運輸外，此運輸路徑也和致腫瘤的形成有關 (Tsai et al., 2014)。Rab37 在人體中調控分泌金屬蛋白酶組織抑制劑 1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1) 到細胞外，TIMP1 可以抑制組織金屬蛋白酶 9 (MMP9)，進而使癌細胞不易轉移，一旦 Rab37 或是 TIMP1 功能異常，則會引起癌細胞轉移。過去有團隊初步發現 Rab37 所調節之 TIMP1 分泌現象與細胞自噬有關，進一步提出了 Rab37 可能同時藉由細胞的分泌作用與分泌型細胞自噬，使 TIMP1 被分泌到細胞外執行功能 (Appendix Fig. 1)。

第三節 台灣蚤休 (Formosanin C, FC)

台灣蚤休 (Formosanin C, FC)，百合科植物，為古代清熱解毒的草藥。相傳古代有七個兒子與一個女兒為民除蟒蛇，結果不幸喪命，但蟒蛇因吞了女兒的繡花針也喪命，蟒蛇葬身之處就長出此植物，被人發現能治毒蛇咬傷，植物的樣子為七片葉子與頂尖上開著一朵小黃花，故命其名為「七葉一枝花」。以根莖入藥，根部成扁圓柱形，略彎曲，密生層狀突起的粗環紋，像睡眠中的跳蚤，又似疊疊樓層，故《神農本草經》等書稱為「蚤休」、「重樓」等。性微寒，味苦；歸肝經。能清熱解毒，消腫止痛，涼肝定驚。用於疔瘡

癱腫，咽喉腫痛，毒蛇咬傷，跌撲傷痛，驚風抽搐等症。虛寒證陰性瘡瘍及孕婦禁服（財團法人台灣必安研究所，2013）。

過去研究發現，腹腔注射 FC 在肝腫瘤轉殖小鼠身上，能透過調節免疫系統達到抑制腫瘤的功效（Wu et al., 1990）。在小鼠肺腺癌細胞 LA795 中，FC 可以抑制 MMP-2、MMP-9 酵素活性，並且降低 MMP-1、-2、-3、-9 和 MMP-14 的蛋白表現。在 T739 老鼠身上，FC 抑制腫瘤生長與肺癌轉移能力勝過使用化療藥物 cisplatin（Man et al., 2011）。FC 在人類大腸直腸癌細胞 HT-29 透過活化 caspase-2 與破壞粒線體功能使細胞凋亡（Lee et al., 2009）。於人類 NSCLC A549 細胞中，FC 可以抑制 MMP-2、MMP-9 酵素活性來降低肺癌細胞的黏著、轉移與侵入效應（He et al., 2014）。

FC 的類似物 Polyphyllin VII（PP7）在肝癌細胞 HepG2 中可以透過抑制 PI3K/Akt/mTOR 路徑、活化 JNK，引起 Bcl-2 磷酸化，並從 Beclin-1/Bcl-2 複合體中解離 Beclin-1，引起細胞自噬讓細胞死亡（Zhang et al., 2016）。PP7 在肝癌 HepG2 細胞也會透過上調 Bax/Bcl-2、cytochrome c、caspases-3、-8、-9 的片段型態和多聚合酶引起內在與外在細胞凋亡，此外 PP7 也引起細胞內活性氧類（Reactive oxygen species，ROS）增生和去極化粒線體膜電位，進一步研究發現，PP7 可以增強 JNK、ERK 和 p38 等 MAPK 絲裂原活

化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinase，MAPK）路徑的主要物質和腫瘤抑制蛋白 p53 及 PTEN。PP7 經由生物轉化新合成的物質 ZH-2 在體內與體外具有藥物活性，透過抑制上皮細胞間質轉化（EMT）路徑，有效致死化療抗性高的乳癌細胞，改善乳癌化療的預後狀況（He et al., 2015）。PP7 在鼻咽癌細胞 HONE-1 和 NPC-039 中，藉由活化 caspase-8、caspase-9 以及改變 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bax 蛋白表現引發細胞凋亡，實驗中也發現到 LC3-II 和 Beclin-1 被引發代表著細胞自噬也有發生，進一步探討發現與 Akt、p38 MAPK 和 JNK 的活化有關（Chen et al., 2016）。Polyphyllin VI（PVI）和 polyphyllin VII（PVII）引發細胞週期停滯在 G2/M 期，藉由上調腫瘤抑制蛋白 p53 與下調 cyclin B1，與增加死亡受器 5（Death receptor 5，DR5）、DR3、Fas、片段 PARP 以及片段 caspase-3，導致細胞凋亡（Lin et al., 2015）。在人類口腔鱗狀癌細胞 SAS 和 OECM-1 中，PP7 透過活化 ERK、Akt、p38 MAPK 和 JNK 引起細胞凋亡，而透過 ERK 和 JNK 路徑引起細胞自噬（Hsieh et al., 2016）。

第二章 研究目的

我們團隊過去發現低劑量台灣蚤休（FC）可以引發多種癌症細胞之細胞毒殺、細胞自噬、鐵依賴型細胞自噬等功能（Lin et al., 2018），過去研究亦指出人類 GTPase Rab37 透過分泌型細胞自噬可調節 TIMP1，進而抑制肺癌細胞的轉移（Tsai et al., 2014）。本篇研究探討 FC 對 CL1-5 Parental 的細胞毒殺能力、細胞自噬能力、細胞自噬途徑和爬行抑制能力，並且和 Rab37 持續被活化的細胞株 CL1-5 RAB37^{Q89L} 比較細胞自噬能力、細胞自噬途徑和爬行抑制能力，期望能改善肺癌轉移。實驗設計如下：

- 一、檢測 FC 是否對於 CL1-5 細胞有否有細胞毒殺能力。利用 SRB assay 檢測不同濃度的 FC 對 CL1-5 細胞的生長抑制能力。
- 二、檢測 FC 是否引起 CL1-5 細胞自噬。利用流式細胞儀分析 Acridine orange（AO）染劑所染到的酸性囊泡（Acidic vascular organelles，AVOs）比例，並以西方墨點法觀察細胞自噬相關蛋白質 LC3-II 的表現量，再進一步檢測細胞自噬相關訊息傳遞路徑。
- 三、檢測 FC 是否抑制 CL1-5 細胞爬行。利用傷口癒合法（Wound healing assay），觀察細胞在含 FC 的細胞基質中爬行，以照相系統紀錄之，並以西方墨點法觀察抑制細胞爬行相關蛋白的表

現量。



第三章 材料與方法

第一節 實驗藥品與試劑

Coomassie brilliant blue R250 粉末由台大生化科技學系何佳安教授提供。

藥劑名稱	產品	廠商
細胞培養、繼代、冷凍保存、解凍、計數		
BM cyclin	10799050001	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	D5879	
Dimethyl sulfoxide (DMSO) Hybri-Max	M2650	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	11995-040	GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA
Fetal bovine serum	10437-028	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicillin	P3032	
Puromycin	SI-P8833	
Streptomycin	S9137	
Trypan blue	T8154	
Trypsin-EDTA	25200-072	GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA
藥物配製		
Polyphyllin B	CAS#50773-42-7	ALB Technology Limited, Kowloon, HongKong
細胞存活率分析		
Acetic acid, Glacial	9508-01	J.T. Baker, Center Valley, PA, USA
Sulforhodamine B	230162	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trichloroacetic acid (TCA)	T8657	

細胞自噬比例分析		
Acridine orange	A6014	Sigma, St. Louis, MO, USA
Nonyl acridine orange (Acridine orange 10-nonyl bromide)	A1372	Invitrogen TM, Carlsbad, CA, USA
西方墨點法		
2-Mercaptoethanol	28625	Pierce, Rockford, IL, USA
30% Acrylamide	161-0156	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ammonium persulfate (APS)	161-0700	
Bovine serum albumin (BSA)	B9001S	New England Biolabs Inc., Ipswich, Australia
Chemiluminescent HRP substrate	WBKLS0100	Millipore Corp., Billerica, MA, USA
Dodecyl sulfate sodium salt	1.1376	Merk, Darmstadt, Germany
Glycerol	G5516	Sigma, St. Louis, MO, USA
Glycine	161-0724	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
M-PER mammalian protein extraction reagent	78501	Pierce, Rockford, IL, USA
Na ₂ HPO ₄	199-0282	Wako, Osaka, Japan
NaHCO ₃	191-0130	
NaOH	191-02125	
N,N,N,N-tetra-methylethylenediamine (TEMED)	161-0800	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Paraformaldehyde	1.04003.1000	Merk, Darmstadt, Germany
Phosphatase inhibitor cocktail	P2850	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protease inhibitor cocktail	P9599	
Protein assay dye reagent	500-0006	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Skim milk powder	70166	Sigma, St. Louis, MO, USA
Sodium chloride	S5886	
Tris ultrapure	A1086	Applichem, Boca Raton, FL, USA
Tween 20	2055-3250	Showa Chemical, Tokyo, Japan
考馬斯亮藍染色法		
Coomassie blue R250	161-0400	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
傷口癒合法		
25 Culture-Inserts 2 Well for self-insertion	80209	ibidi, Gräfelfing, Germany

第二節 儀器與實驗耗材

儀器與耗材名稱	產品編號	廠商
細胞培養、繼代、冷凍保存、解凍、計數		
1.5 ml microtubes	1260-00	SSI, Lodi, CA, USA
1.5 ml microtubes (棕色)	20170-036	VWR, Radnor, PA, USA
10 cm 細胞培養盤	150466	Nunc, Roskilde, Denmark
15 ml 離心管	339650	
10 µl tip	104-Q	QSP, San Diego, CA, USA
200 µl tip	TW110-N-Q	
1000 µl tip	4846	Corning, Corning, NY, USA
50 ml 離心管	339652	Nunc, Roskilde, Denmark
Cover glass 蓋玻片	101050	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-königshofen, Germany
Parafilm	NEENAH, WI	Bemis Flexible Packaging,

	54956	Oshkosh, WI, USA
冰箱(4°C, -20°C)	8ED2FHKXVT	Whirlpool, Benton Harbor, Michigan, USA
玻璃吸管	NC-0710	Sibata, Tokyo, Japan
低溫冷凍櫃(-20°C)	FFU2124DW	Frigidaire, Fort Wayne, Indiana, USA
電子微量天平	TB-215D	Denver, Bohemia, NY, USA
倒立顯微鏡	ECLIPSE TS 100	Nikon instrument Inc., Melville, NY, USA
高速離心機	Universal 320R	Hettich, Beverly, Massachusetts, USA
恆溫水浴槽	B205-T2	Firstek Scientific, Taipei, Taiwan
烘箱	UNB 400	Memmert, Germany
吸管輔助器 Pipette-aid	18-068	Drummond, Broomall, PA, USA
細胞培養瓶 (25T)	156340	Nunc, Roskilde, Denmark
細胞冷凍管	363401	
細胞計數盤	719805	BRAND, Wertheim, Germany
超低溫冷凍櫃(-80°C)	Revco ULT 1386-3-V12	Revco, Southampton, NY, USA
超純水數位整合系統 Milli-Q Direct 8	ZR0Q00800	Millipore Corp., Billerica, MA, USA
垂直循環負壓式操	4BH-24	HI TEN, Taipei, Taiwan

作台 Laminar flow		
拭鏡紙	34155	Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA, USA
酸鹼測量器 pH meter	pH211	Hanna Instruments, Taipei, Taiwan
微量過濾器 0.22 μm	SCGPT05RE	Millipore Corp., Billerica, MA, USA
二氧化碳細胞培養箱 CO ₂ incubator	SCA-165DS	Astec Co., Ltd, Fukuoka, Japan
藥物配製		
2 ml microtubes	1310-00	SSI, Lodi, CA, USA
細胞存活率分析		
96 well 細胞培養盤	167008	Nunc, Roskilde, Denmark
Dancing roller the belly dancer (Shaker)	4.702.610	Stovall Life Science, Inc., Greensboro, NC, USA
ELISA reader 分光光度判讀儀	Synergy HT	BioTek, Highland Park, Winooski, USA
滅菌試劑槽 (配藥槽)	CB-R50-S	Gunster, New Taipei City, Taiwan
細胞自噬比例分析		
6 cm 細胞培養盤	150462	Nunc, Roskilde, Denmark

Falcon 5 ml polystyrene round-bottom tube (Flow 小管)	352052	Corning, Corning, NY, USA
流式細胞儀 Flow cytometry (儀器位置：衛生福利部雙和醫院)	LSRFortessa	Becton Dickinson, Lexington, KY, USA
高速離心機	Z326K	HERMLE Laborotechnik, Wehingen, Germany
西方墨點法		
PVDF membrane	NEF 1002	Perkin Elmer, Santa Clara, CA, USA
Shorter plates 短玻璃	1653308	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Spacer Plates 1.5 mm 長玻璃	1653312	
電源供應器	164-5050	
調速震盪器 Vortex	GENIE® VORTEX-2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
迴轉式震盪器 (Orbital shaker)	OS-071	DEAGLE, New Taipei City, Taiwan
加熱攪拌器 Stirrer	Q259-1085	Corning, Corning, NY, USA
膠片夾 Casting	1658052	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

frame		
細胞刮勺 Cell lifter	3008	Costar Corp., Cambridge, MA, USA
小型蛋白質垂直電泳槽	BP165-8007	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
鑄膠台 Casting stands	1658052	
鑄膠灰色墊片 Casting stand gasket	1658052	
轉漬用濾紙 Filter paper	1620161	
拆膠板 Gel releaser	1658052	
微量迷你離心機	aqbd	
傷口癒合法		
6 well 細胞培養盤	140675	Nunc, Roskilde, Denmark
ISCapture Imaging Application		Tucsen, Fujian, China

第三節 實驗方法

一、細胞培養、繼代、冷凍保存、解凍、計數

細胞株：CL1-5 Parental、CL1-5 RAB37^{Q89L} (Human lung adenocarcinoma cells)，由成大微免所劉校生教授提供。

溶液名稱	藥品	劑量
細胞培養液	DMEM	1000 ml
	FBS	100 ml

DMEM + 10% FBS	Antibiotics	1 ml
	保存於 4°C 冰箱	
Antibiotics	Penicillin	0.118 g
	Streptomycin	0.1 g
	M. Q. water	1 ml
	保存於-20°C 冰箱	
Phosphate buffer saline (PBS) 1X	NaCl	8 g
	Na ₂ HPO ₄	1.15 g
	KH ₂ PO ₄	0.2 g
	KCl	0.2 g
	加入少許 M.Q. water 調整 pH 7.4，再加入 M.Q. water 將體積補至 1L，經 0.22 μm 過濾膜過濾去雜質，拿去高溫滅菌釜滅菌	
Trypsin	0.25% Trypsin 和 1X PBS 以 1:3 比例稀釋	
BM cyclin	BM cyclin 1	4 μl/ml
	在培養液中加入，維持 3 天	
	BM cyclin 2	4 μl/ml
	在培養液中加入，維持 4 天	

(一) 細胞培養、繼代 (Cell culture)

CL1-5 細胞以含有 FBS、Antibiotics 的 DMEM 進行培養，養在 10 cm dish 中，CL1-5 RAB37^{Q89L} 的細胞株每 1 ml DMEM 需添加 1 μg puromycin，並存放於 5% CO₂ 氣體、溫度 37°C 的細胞培養箱中。當細胞長到大約八分滿時，需要繼代，繼代時將舊的 DMEM 抽掉，沿 dish 壁加入 2 ml PBS，搖晃均勻以洗淨 dish 內的舊 DMEM，抽

掉 PBS 後，加入 2 ml 稀釋後的 Trypsin，使細胞被切離 dish 底盤，靜置 2-3 分鐘，輕敲 dish 底部，加入 2 ml DMEM，將 dish 底部的細胞打下來，收集至 15 ml 離心管，以 1000 rpm，25°C，離心 5 分鐘，將 DMEM 倒除，加入適量 DMEM，將細胞依照適當比例放置回 10 cm dish 中，存放於 5% CO₂ 氣體、溫度 37°C 的細胞培養箱中。

(二) 細胞冷凍保存

細胞長到 10 cm dish 八分滿時，使用 Trypsin 將細胞懸浮液以 1000 rpm，25°C，離心 5 分鐘，等待離心同時，於凍管上先標示細胞名稱、培養液種類、冷凍日期、操作者姓名，並在當中先加入 100 μ l 的 DMSO 與 100 μ l 的 DMEM，進行放熱約 5 分鐘，離心後的細胞倒除上清液後，加入 800 μ l 的 DMEM，並以 1000 μ l tip 均勻打散細胞後，加入凍管中。先將凍管冰至 4°C，10 分鐘，再冰至 20°C，20 分鐘，最後放置入 -80°C，隔天再放入液態氮桶。

(三) 解凍細胞

取 1 ml DMEM 於 15 ml 離心管中，從液態氮桶中取出欲解凍的凍管，以 37°C 水浴槽回溫凍管，將凍管中的細胞液移至離心管中，並以 1000 rpm，25°C，離心 5 分鐘，等待離心同時先在 10 cm dish 中加入適量 DMEM，完成離心後倒除上清液，加入 1 ml

DMEM，以 1000 μl tip 打散細胞，將細胞液加回 10 cm dish 中，存放於 5% CO₂ 氣體、溫度 37°C 的細胞培養箱中。

(四) 細胞計數 (Cell counting)

依照細胞繼代時的步驟，等待離心過程中，在 2 ml microtube 中加入 900 μl DMEM，離心過後倒除上清液，加入適當比例之 DMEM，以 1000 μl tip 打散細胞，取出其中之 100 μl 細胞液，與 900 μl DMEM 混合均勻，取其中的 50 μl 細胞液，放置到另一個已加入 50 μl 的 trypan blue 的 2 ml microtube 中，混合均勻，在已蓋上蓋玻片的細胞計數盤上，上下兩側分別加入 17 μl 的細胞混合液。死細胞的細胞膜被破壞，Trypan blue 即可以進入到死細胞中，活細胞則無法染進 Trypan blue，在顯微鏡鏡頭下呈現白色顆粒狀，分別計算上下兩測五格細胞的數量，相加除以二取平均值，並且乘以稀釋倍數 (20 倍)，並乘以 10^3 ，數值為每毫升細胞液的細胞數。

二、藥物配製

FC 配製

FC 分子量為 1015.1848 g/mol，以微量天平取 1.015 g FC 粉末，溶於 1 ml 之 DMSO 中，配製成 10 mM 庫存液。

三、細胞存活率分析 (Cell viability analysis)

溶液名稱	藥品	劑量
------	----	----

SRB (0.1%)	SRB powder	0.5 g
	1 % 醋酸	50 ml
	放置於室溫，染劑可回收使用。	
TCA (10%)	TCA powder	50 g
	M.Q. Water	500 ml
	保存於 4°C 冰箱。	
Tris-base (20 mM)	Tris	1.2114 g
	M.Q. Water	500 ml
	保存於 4°C 冰箱。	

Sulforhodamine B (SRB) 為深紅色染劑，可染細胞內的蛋白，於酸性可以與細胞內的鹼性胺基酸結合，當胺基酸越多，表示細胞存活總量越高，細胞被染成越深的顏色，以 ELISA reader (波長 540 nm)，測量其吸光值，顏色越深則吸光值越高，可以視為細胞存活的指標。

將 CL1-5 細胞以 1×10^4 cells / 100 μ l / well 以 10% FBS 的 DMEM 種在 96 well 孔盤中，隔夜貼附後，以 10% FBS 的 DMEM 配置不同濃度的藥品，培養至目標時間，抽取上清液，以 PBS 沿著 96 well 孔盤壁加入清洗內部的上清液，抽取 PBS，每格加入 100 μ l TCA (10% w/v)，放入 4°C 冰箱一小時以上，將上清液抽掉，以清水小心清洗孔盤 3-5 次，並放置室溫晾乾，晾乾後每格加入 100 μ l SRB (0.1% w/v 1% 醋酸) 溶液，室溫下靜置 1 小時，之後抽去 SRB 溶液，可回收

使用，使用1%醋酸溶液沖洗3-5次，於室溫下晾乾，晾乾後每格加入100 μ l 20 mM Tris-base (pH10.0) 溶液，室溫下搖晃3-5分鐘，使用ELISA reader測量波長540 nm的吸光值 (Esteban et al., 2016)。數值分析後計算出細胞生長抑制情形。

四、細胞自噬比例分析

溶液名稱	藥品	劑量
AO 染劑	Acridine orange	1.5 μ g
	依實驗所需要量配置 (1.5 μ l/10 ml)	

細胞自噬時會產生酸性的雙層膜 autolysosome，Acridine orange (AO) 染劑可以染細胞當中酸性囊泡，染到的比例越高代表活細胞中有進行細胞自噬的比例越多。

將 CL1-5 細胞以 5×10^5 cells / 2 ml 以 10 % FBS 的 DMEM 種在 6 cm dish 中，細胞隔夜貼附後，每個 dish 加入總體積 4 ml 的藥品溶液，直到目標時間，以 trypsin 將活細胞收取至 15 ml 離心管，以 1000 rpm，25°C，離心 5 分鐘，倒除上清液，加入 1 ml PBS，以 1000 μ l tip 將細胞均勻打散，取至 2 ml microtube 中，再以 3000 rpm，4°C，離心 5 分鐘，倒除上清液，加入 100 μ l 無色的 DMEM，前往雙和醫院，在上機前加入 600 μ l 含有 AO 染劑的無色 DMEM，靜置 15 分鐘，以 1000 μ l tip 去細胞液至 5 ml polystyrene round-

bottom tube Flow 小管，並均勻打散細胞，上機後讀取酸性囊泡比例。

五、西方墨點法

(一) 細胞蛋白製備 (Whole cell lysates)

溶液名稱	藥品	劑量
Lysis buffer	M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	250 μ l
	Phosphatase inhibitor cocktail	2.5 μ l
	Protease inhibitor cocktail	10 μ l

將 CL1-5 細胞以 2×10^6 cells / 2 ml 以 10 % FBS 的 DMEM 種在 6 cm dish 中，細胞隔夜貼附後，每個 dish 加入總體積 4 ml 的藥品溶液，直到目標時間，以 trypsin 將活細胞收取至 15 ml 離心管，以 1000 rpm，25°C，離心 5 分鐘，倒除上清液，加入 1 ml PBS，以 1000 μ l tip 將細胞均勻打散，取至 2 ml microtube 中，再以 3000 rpm，4°C，離心 5 分鐘，倒除上清液，加入 50 μ l Lysis buffer，至於冰上，每五分鐘 vortex 10 秒，總共 30 分鐘，使細胞蛋白與 Lysis buffer 均勻作用，之後以 15000 rpm，4°C，離心 30 分鐘，離心後將上清液收集至新的 2 ml microtube 中，此上清液即為 whole cell lysate，寫上待測蛋白 sample 名稱、日期後，冰至 -80°C。

(二) 蛋白質濃度定量

BSA 最終濃度	20 mg/ml BSA 取量	M.Q. Water 取量
----------	-----------------	---------------

(mg/ml)	(μ l)	(μ l)
0	0	100
0.25	1.25	98.75
0.5	2.5	97.5
0.75	3.75	96.25
1	5	95
1.25	6.25	93.75

5X Protein assay dye 稀釋

溶液名稱	藥品	劑量
稀釋 protein assay dye	5X protein assay dye	100 ml
	M.Q. Water	400 ml
	避光保存於 4°C 冰箱	

使用牛血清蛋白 (BSA) 作為定量標準品，取六個點的濃度：0、0.25、0.5、0.75、1 與 1.25 mg/ml，取出待測蛋白 whole cell lysate 至於冰上，取 2 ml microtube，每一管加入 490 μ l 的稀釋 protein assay dye、9 μ l 的 M.Q. Water、1 μ l 的 whole cell lysate，vortex 10 秒，靜置 15 分鐘，取 96 well 孔盤，每孔加入 100 μ l 的標準品以及待測蛋白溶液，以 ELISA reader 讀取波長 590 nm 吸光值，以 BSA 測出的吸光值為標準曲線，算出趨勢方程式與 r^2 值， $r^2 > 0.95$ ，以趨勢方程式算出待測蛋白的的蛋白質濃度。

(三) 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE electrophoresis)

溶液名稱	藥品	劑量
1.5 M Tris (pH 8.8)	Tris	18.171 g

	加入少許 M.Q. Water 調整 pH 至 8.8， 再加入 M.Q. Water 至體積為 100 ml	
1.0 M Tris (pH 6.8)	Tris	12.114 g
	加入少許 M.Q. Water 調整 pH 至 6.8， 再加入 M.Q. Water 至體積為 100 ml	
10% SDS	SDS	1 g
	M.Q. Water	10 ml
10% APS	APS	0.1g
	M.Q. Water	1 ml
Separating Gel (10% 10 ml)	M.Q. Water	4.6 ml
	Tris (1.5M pH8.8)	2.5 ml
	30% acrylamide	2.7 ml
	10% SDS	0.1 ml
	10% APS	0.1 ml
	TEMED	0.006 ml
Stacking Gel (5% 5 ml)	M.Q. Water	3.4 ml
	Tris (1.5M pH8.8)	0.63 ml
	30% acrylamide	0.83 ml
	10% SDS	0.05 ml
	10% APS	0.05 ml
	TEMED	0.005 ml
5X SDS-page running buffer	Tris	15.2 g
	Glycine	72 g
	SDS	5 g
	加入少許 M.Q. Water 調整 pH 至 8.3，再 加入 M.Q. Water 至體積為 1 l，使用時稀 釋至 1X	
1X Transfer buffer	Tris	12 g
	Glycine	57.6 g

	M.Q. Water	3200 ml
	Methanol	800 ml
6X SDS loading dye	1M Tris	3.5 ml
	Bromophenol blue	6 mg
	SDS	1.2 g
	100% Glycerol	3 ml
	M.Q. Water	7 ml
	2-mercaptoethanol	50 μ l
	前 5 項混合後以每管 950 μ l 分裝保存於室溫，要使用時加入 2-mercaptoethanol 50 μ l 避光保存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱	
1X SDS loading buffer	1M Tris	2.5 ml
	10% SDS	10 ml
	10% Glycerol	5 ml
	M.Q. Water	32.5 ml
Blocking buffer	Skim milk powder	0.5g
	TBST buffer	10 ml
5X TBST buffer	Tris	12.114 g
	NaCl	43.875 g
	Tween 20	5 ml
	加入少許 M.Q. Water 調整 pH 至 7.4，再加入 M.Q. Water 至體積為 1 l，使用時加入 4 l M.Q. Water 稀釋至 1X	

將電泳長 (1.5 mm)、短玻璃片架於鑄膠台，以 M.Q. Water 加入到玻璃片間，靜置 15 分鐘觀察是否漏水，倒除 M.Q. Water，加入已配置好的 Separating Gel 到 4/5 的高度，並以 methanol 壓平，等待 Separating Gel 凝固後，回收 methanol，加入已配置好的 Stacking

Gel，並放入分離梳，待 Stacking Gel 凝固後，將兩層玻璃片由鑄膠台取下，小心放置於裝有 M.Q. water 的盒子中，並且把分離梳小心取出，取出同時須將分離梳上方的氣泡消除，即可使用，若非當日使用，可放置在此水盆中，冰於 4°C 冰箱。

蛋白樣品經定量後，與 6X loading dye 及 1X SDS loading buffer 混合，vortex 均勻，於 100°C 沸水中加熱 15 分鐘，以迷你離心機離心，將膠片架於電泳槽中，於內槽加入新鮮現配 1X running buffer，同時於外槽加入回收使用的 1X running buffer，從膠片最左側的格子依序加入 8 μ l protein marker、蛋白質樣品以及最右側加入 2 μ l protein marker，若有未加入樣品的樣品槽，需加入與蛋白質樣品等體積的 loading buffer，裝設好電源供應器，將外槽放置在覆蓋滿冰塊的大槽中，電源供應器以 50 volt 使樣品跑至 stacking gel 底部，再以 150 volt 跑至 separating gel 底部，電泳時間約 2-2.5 小時。

(四) 蛋白質樣品轉漬 (Transfer)

電泳快結束前，將 4 片 Filter pape 浸泡至 1X Transfer buffer 中，裁減與 gel 大小相當的 PVDF 膜浸泡至 Methanol。電泳結束時，轉印夾由下至上放入順序為：黑色夾層、海綿、2 片 Filter paper、膠片、PVDF 膜、2 片 Filter paper、海綿、白色夾層，取出玻璃片，以拆膠板小心取出膠片，並依照順序放置好，浸泡於 1X

Transfer buffer 中，使用滾輪，在海綿層上方由內向外將氣泡擠壓出去，將黑白夾層鎖緊放入轉漬槽中，放入冰袋後，倒滿 1X Transfer buffer，以濕式轉漬器轉印，固定電流為 400 mA，轉印時間依據 Separating Gel 而異，以 10% Separating Gel 舉例，轉印時間為 1 小時 15 分鐘，蛋白質會由膠片（負極）轉印至 PVDF 膜（正極）上。

（六）抗體雜交與顯影

溶液名稱	藥品	劑量
Chemiluminescent HRP substrate (感光劑)	HRP Substrate Peroxide Solution	1 ml
	HRP Substrate Luminol Reagent	1 ml

配置 TBST buffer 為溶劑 5% Skim milk，取出轉印好的 PVDF 膜，室溫下 blocking 2 小時（重複進行 blocking 時只需要 1 小時）。Blocking 結束後，TBST buffer 清洗 PVDF 膜一次 10 分鐘、共三次，加入一級抗體稀釋溶液，放至於 4°C 作用至少 16 小時，回收使用抗體稀釋液，以 TBST buffer 清洗一次 10 分鐘、三次，以 1：10000 的比例加入二級抗體，作用 1 小時，TBST buffer 清洗一次 10 分鐘、共三次，顯影前，感光劑 Peroxide Solution 與 Luminol Reagent 以 1：1 比例混合加在 PVDF 膜上，使樣品發出螢光，利用冷光螢光影像處理分析儀進行感光。影像利用 Image J 軟體（USA

National Institutes of Health, NIH) 進行定量分析。

一級抗體

抗體名稱	產品編號	廠商
Rabbit monoclonal anti-APG5L/ATG5	ab108327	Abcam, Cambridge Science Park, UK
Rabbit monoclonal anti-ATG7	ab133528	
Rabbit monoclonal anti-Beclin-1	3495	Cell Signaling Technology, Inc., Dancers, MA, USA
Rabbit polyclonal anti-GAPDH	GTX100118	GeneTex, Irvine, CA, USA
Rabbit polyclonal anti-LC3B	ab48394	Abcam, Cambridge Science Park, UK
Rabbit monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473)	4058	Cell Signaling Technology, Inc., Dancers, MA, USA
Rabbit monoclonal anti-phospho-MEK1/2 (Ser221)	2338	
Rabbit monoclonal anti-phospho-mTOR (Ser2448)	2971	
Rabbit polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204)	9101	
Rabbit polyclonal anti-phospho-PI3 Kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199)	4228	
Rabbit monoclonal anti-PI3 Kinase Class III	3358	
Rabbit polyclonal anti-RAB37	13051-1-AP	
Rabbit monoclonal anti-Ras	8955	Cell Signaling Technology, Inc., Dancers, MA, USA
Rabbit polyclonal anti-TIMP1	ab109125	Abcam, Cambridge Science Park, UK

二級抗體

抗體名稱	產品編號	廠商
Goat anti-rabbit (H+L) HRP conjugate	AP307P	Millipore Corp., Billerica, MA, USA
分裝至避光 microtube，保存於 4°C 冰箱		

六、考馬斯亮藍染色法

溶液名稱	藥品	劑量
Coomassie blue R250 solution	Coomassie blue R250 粉末	0.15 g
	methanol	50 ml
	M.Q. water	50 ml
	acetic acid	10 ml
	混勻後避光放置在室溫環境，可回收使 用	
destainer	M.Q. water	10 ml
	methanol	8 ml
	acetic acid	2 ml
	新鮮配置	

欲偵測細胞基質中的待測定蛋白含量，使用考馬斯亮藍（Coomassie blue R250）作為染劑染膠片，在膠片上會出現被染到的蛋白痕跡，作為實驗樣品等量 loading 的依據。

跑完膠後，取出膠片，不進行轉漬，直接浸泡在 Coomassie blue R250 solution 中 5 分鐘，回收溶液，加入 destainer，於室溫搖晃，當 destainer 也變為藍色時應該要換置新的 destainer，直到膠片未染

到蛋白的部分呈現透明，即可停止。

七、傷口癒合法 (Wound healing assay)

欲偵測細胞被藥物抑制爬行的效果，使用 Culture-Inserts 2 Well for self-insertion 來進行細胞爬行的實驗。

取 6 well 孔盤，將 insert 放入到孔盤中，每一孔放置一個，細胞以 3.5×10^4 cells / 70 μ l 以 10 % FBS 的 DMEM 種在 1 格 well 中，隔夜貼附後，抽掉上清液，把 insert 用消毒過的鑷子移除，每孔沿壁加入 1 ml PBS，清洗殘留細胞間的藥品，抽掉 PBS，加入 1 ml 以無色 DMEM 配置好的藥品溶液，放回細胞培養箱，每到目標時間，取出 6 well 孔盤並照相紀錄。以 Parental cell 沒有加藥物的組別為控制組，並且用照相系統量測距離，與控制組比較距離的倍數為量測數值。

八、統計分析

以 SPSS Statistical package for the Social Science 23.0 軟體進行變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA)，計算數據之平均值 (mean) 及標準誤 (Standard error of the mean, SEM)，並使用 Duncan's new multiple range test 作為事後檢定方法，比較各組別之間統計差異 ($p < 0.05$)。

第四章 結果

第一節 FC 的細胞毒殺能力

先前我們研究團隊發現 FC 對許多癌細胞株具有毒殺能力，因此先檢測 FC 是否對 CL1-5 Parental 細胞具有毒殺能力。CL1-5 Parental 細胞處理 0~10 μM 的 FC，作用 24 小時，利用 SRB assay 檢測細胞存活率。經計算存活率得知，細胞的存活率會隨著 FC 的濃度增加而下降，在劑量 3 μM FC 與 5 μM FC 下都有高毒殺能力，但是兩者並無顯著差異 (Fig. 1)。



第二節 FC 引起 CL1-5 細胞自噬

先前我們研究團隊發現 FC 可以引發肝癌細胞株的細胞自噬，又因為 3 μ M FC 和 5 μ M FC 毒殺效果沒有明顯差異 (Fig. 1)，所以觀察兩個劑量對 CL1-5 Parental 細胞自噬影響。在細胞自噬初期，LC3-I 會與 phosphatidylethanolamine 結合形成 LC3-II，並貼附在 autophagosome 膜上，因此 LC3-II 的出現代表有引起細胞自噬。首先使用西方墨點法偵測細胞中 LC3-II 的表現量，如 Fig. 2 (a) 和 Fig. 2 (b) 所示，在單一一次以及三重複實驗下，CL1-5 Parental 細胞的 LC3-II 蛋白會隨著 FC 劑量而增加，而 CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞在沒有給予任何藥物時，本身 LC3-II 表現有較高的趨勢。當細胞自噬進行到 autophagosome 與 lysosome 結合，並形成 autolysosome，使囊泡中的物質被降解，同時，位於 autolysosome 內的 LC3-II 也會被降解，因此細胞自噬的整個過程是否有完成，必須進一步確認。

細胞自噬過程的中間產物 autolysosome 屬於酸性囊泡，過去研究發現透過流式細胞儀分析 AO 染劑所染到的酸性囊泡 (Acidic vesicular organelles, AVOs) 比例，可以知道有多少比例的活細胞正在進行細胞自噬作用 (Esteban et al., 2016)。結果如 Fig. 3 所示，CL1-5 Parental 細胞的酸性囊泡比例會隨劑量提高而增加，表示細胞加入 FC 後皆能夠在 24 小時完成細胞自噬。

細胞自噬與多種蛋白質有關，其中 Rab37 經活化後被發現能夠增加 ATG5-12 與 ATG16L 的結合，有助於 LC3-II 形成，並進而增加 autophagosome，提高細胞自噬與降低細胞增生 (Sheng et al., 2018)。透過西方墨點法來觀察，單一次的實驗結果如 Fig. 4 (A-a) 和 Fig. 4 (B-a) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞在沒有加入 FC 時，比 CL1-5 Parental 細胞 Rab37 和 Atg5-12 有上升的趨勢，加入 FC 以後，CL1-5 Parental 細胞的 Rab37 和 ATG5-12 在 3 μ M 和 5 μ M FC 劑量出現類似的先下降後稍微上升的趨勢；經過三重覆試驗結果如 Fig. 4 (A-b) 和 Fig. 4 (B-b) 所示，可發現 Rab37、ATG5-12 對 CL1-5 Parental 細胞的細胞自噬在 FC 劑量 3 μ M 之下為抑制 Rab37 和 Atg5-12 的作用，在劑量 5 μ M 之下為保持 Rab37 和 Atg5-12 的作用。

ATG7 和 ATG5 近年來被認為是形成降解型細胞自噬的重要蛋白 (Shigeomi et al., 2018; Zheng et al., 2019)，皆與 LC3-II 的形成有密切相關。以西方墨點法來觀察，單一次的試驗結果如 Fig. 5 (a) 所示，在 CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞中 ATG7 有下降的趨勢，CL1-5 Parental 細胞的 ATG7 會隨著 FC 劑量表現量上升；經過三重覆試驗結果如 Fig. 5 (b) 所示，雖未有統計差異，卻有相似的趨勢，因此推斷 ATG7 和 CL1-5 Rab37 持續被活化所引起的細胞自噬無關，但

是和 FC 引起的 CL1-5 Parental 細胞自噬有相關。

Class III PI3K 在細胞自噬和蛋白分揀路徑中扮演多重角色，在人類 Class III PI3K 中包含有三個主要元素：PI3KC3/hVps34、p150 和 Beclin-1 (Sun et al., 2009)。在缺乏營養狀態下，Class III PI3K 為人類引起細胞自噬的重要因子 (Backer, J. M. 2008)。以西方墨點法觀察，單一次的結果如 Fig. 6 (A-a) 所示，與 CL1-5 Parental 細胞相比，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞自身的 Class III PI3K 表現量有上升的趨勢，加入 FC 後 CL1-5 Parental 的 Class III PI3K 表現量沒有升降；經過三重覆試驗後的結果如 Fig. 6 (A-b) 所示，雖未有統計差異，卻有相似的趨勢，代表 Class III PI3K 和 Rab37 持續活化表現的細胞株本身有較明顯的細胞自噬作用有關，但是 Class III PI3K 和 FC 對 CL1-5 Parental 所引起的細胞自噬無關。

Beclin-1，為存在於人類細胞中相當於酵母菌中 ATG6 的蛋白，為 Class III PI3K 的複合體要素之一，扮演細胞自噬關鍵性的角色之一，迄今，一些癌症治療藥物會透過調節 Beclin-1 來影響細胞自噬的作用 (Akio et al., 2001 ; Fu et al., 2013)。以西方墨點法來觀察，單一次實驗結果如 Fig. 6 (B-a) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞本身的 Beclin-1 表現量有高於 CL1-5 Parental 細胞的趨勢，加入 FC 的 CL1-5 Parental 細胞 Beclin-1 表現量沒有升降；經過三重覆試驗後的

結果如 Fig. 6 (B-b) 所示，不僅 CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞的 Beclin-1 表現量高於 CL1-5 Parental 細胞，而且加入 FC 後，CL1-5 Parental 細胞的 Beclin-1 表現量有隨之上升的趨勢，代表 Beclin-1 與 Rab37 持續活化表現的細胞株有較高的細胞自噬作用有關，至於在 CL1-5 Parental 細胞 FC 是否引起 Beclin-1 相關的細胞自噬，還有待更多實驗確認。

癌細胞往往因為細胞突變而引起 PI3K 路徑異常的表現。其中兩條路徑：PI3K/Akt/mTOR 與 Ras/Raf/MEK/ERK，被發現過度的表現會促進癌細胞的生長，兩條路徑的抑制劑在癌症治療扮演重要角色 (Asati, V. et al., 2016)。有研究認為，抑制 PI3K/Akt/mTOR 與上調 Ras/Raf/MEK/ERK，能夠引起細胞自噬，進而使癌細胞死亡 (Roy, B. et al., 2014)。以西方墨點法來觀察，單一次實驗結果如 Fig. 7 (A-a)、7 (B-a) 和 7 (C-a) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞本身的 PI3K/Akt/mTOR 表現量除了 p-mTOR 有增加的趨勢外，p-Class I PI3K 和 p-Akt 並沒有增減，在加入 FC 後 CL1-5 Parental 中除了 p-Class I PI3K 在 FC 3 μ M 有稍微增加趨勢，p-Akt 和 p-mTOR 並沒有增減；經過三重覆試驗後的結果如 Fig. 7 (A-b)、7 (B-b) 和 7 (C-b) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞本身的 PI3K/Akt/mTOR 表現量除了 p-Class I PI3K 有增加的趨勢外，p-Akt 和 p-mTOR 並沒有增減，在

加入 FC 後 CL1-5 Parental 的 p-Class I PI3K 和 p-mTOR 有增加的趨勢，綜合上述所言，Rab37 與 FC 均不影響 PI3K/Akt/mTOR 路徑，Rab37 與 FC 和此路徑所引發的細胞自噬無關。以西方墨點法來觀察 Ras/p-MEK/p-ERK 在 CL1-5 細胞的表現，單一次實驗結果如 Fig. 8 (A-a)、8 (B-a) 和 8 (C-a) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞本身的 Ras 和 p-ERK 的表現量比 CL1-5 Parental 細胞少，加入 FC 後 CL1-5 Parental 的 Ras 和 p-ERK 都下降，但是增加 p-MEK 的表現；經過三重覆試驗後的結果如 Fig. 8 (A-b)、8 (B-b) 和 8 (C-b) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞本身的 p-MEK 和 p-ERK 的表現量比 CL1-5 Parental 細胞有較多的趨勢，加入 FC 後 CL1-5 Parental 的 Ras、p-MEK 和 p-ERK 也呈現增加的趨勢，代表 Rab37 和 FC 提高 Ras/p-MEK/p-ERK 路徑並引起細胞自噬。

第三節 FC 抑制 CL1-5 細胞爬行

過去研究發現，FC 可以抑制腫瘤生長與肺癌轉移 (Man et al., 2011; He et al., 2014)。如 Fig. 9 (A) 所示，以傷口癒合法來觀察 CL1-5 Parental 的爬行狀況，單一次實驗結果如 Fig. 9 (B-a) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞的爬行能力低於 CL1-5 Parental 細胞，而在加入 FC 後，Parental 細胞的爬行能力有降低趨勢；經過三重覆試驗後的結果如 Fig. 9 (B-b) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞的爬行能力

與 CL1-5 Parental 細胞相似，而在加入 FC 後，Parental 細胞的爬行能力有降低趨勢，代表 FC 可以降低 CL1-5 細胞的爬行能力，Rab37 降低細胞爬行則需要有更多實驗確認。

過去研究發現，Rab37 在人體中調控分泌 TIMP1，並可以抑制組織組織金屬酶 9 (MMP9)，進而使癌細胞不易轉移，此分泌方式與細胞自噬有關，又稱之為分泌型細胞自噬 (Liu et al., 2018)。以西方墨點法來觀察 Rab37 和 TIMP1 表現，單一次實驗結果如 Fig. 4 (A-a)、10 (a) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞的 Rab37 和 TIMP1 表現量皆有增加趨勢，加入 FC 之後，CL1-5 Parental 的 Rab37 會減少，TIMP1 也逐漸減少；經過三重覆試驗後的結果如 Fig.4 (A-b)、10 (b) 所示，CL1-5 RAB37^{Q89L} 細胞的 Rab37 和 TIMP1 表現量皆有增加趨勢，加入 FC 之後，Rab37 和 TIMP1 都出現 FC 在劑量 3 μ M 先下降、5 μ M 回升的趨勢，推斷 Rab37 可以透過提高 TIMP1 分泌來影響細胞爬行能力，但是 FC 可否透過 Rab37 和 TIMP1 來影響 CL1-5 Parental 細胞的爬行則有待確認。

過去研究發現，在高轉移程度與高復發率的卵巢癌，以及具多重藥物阻抗的卵巢癌細胞株中，發現 p62 表現量都較低，因此推論 p62 可能可以抑制癌細胞的爬行 (Wang et al., 2018)。以西方墨點法來觀察 p62，單一次的實驗結果如 Fig. 11 所示，加入 FC 之後

CL1-5 Parental 的 p62 表現量隨劑量有增加趨勢，可見 FC 透過提高 p62 使細胞的爬行能力下降，且未來需要更多實驗支持。



第五章 討論

本篇研究探討 FC 對 CL1-5 Parental 的細胞毒殺能力、細胞自噬能力、細胞自噬途徑和爬行抑制能力，並且和 Rab37 持續被活化的細胞株 CL1-5 RAB37^{Q89L} 比較細胞自噬能力、細胞自噬途徑和爬行抑制能力，期望能改善肺癌轉移。本研究發現 FC 可以 (1) 毒殺 CL1-5 Parental 肺癌細胞，(2) 透過提高 ATG7 和 Ras/p-MEK/p-ERK 路徑引起 CL1-5 Parental 細胞自噬，(3) 透過 p62 增加抑制 CL1-5 Parental 細胞的爬行。

FC 過去被發現具有腫瘤抑制與抗轉移的功效。研究者利用酒精萃取 *Paris polyphylla* steroidal saponins，發現可以透過調節 MMP-2 和 MMP-9 來抑制肺癌的黏附、轉移和侵入 (He et al., 2014)；另外也有文獻使用甲醇萃取 FC，發現對於大腸直腸癌細胞可以引起 capase-2 活化與破壞粒線體來引發細胞凋亡 (Lee et al., 2009)；在小鼠中發現可以藉由抑制 MMP 蛋白降低肺癌細胞轉移 (Man et al., 2011)。FC 相似物 Polyphyllin VII 可以引發口腔癌的細胞自噬作用 (Hsieh et al., 2016)；在肝癌 HepG2 細胞中，則是透過活化 JNK 路徑和抑制 PI3K/Akt/m-TOR 路徑來引起細胞自噬 (Zhang et al., 2016)，並能破壞粒線體和介入 MAPK 路徑來引發細胞凋亡 (Zhang et al., 2016)；在鼻腔癌中，可以調節 Akt 與 AMPK 路徑，引起細胞

自噬與細胞凋亡現象 (Chen et al., 2016)。Polyphyllin VII 在經過生物體的轉換後形成的代謝物 ZH-2，可以抑制乳癌細胞的化療阻抗性 (He et al., 2015)；Polyphyllin VII 與 Polyphyllin VI 併用可以使肺癌細胞產生細胞週期停滯與引起細胞凋亡現象。本篇研究發現，FC 可以促進肺癌細胞死亡，然而，是否可以合併使用現行臨床的化療藥物促進細胞死亡，以提高臨床的應用，值得探究。

ATG7 在細胞自噬扮演重要角色，對於不同的癌症細胞有不同的作用機轉。在三陰性乳癌中，ATG7 被發現能抑制癌細胞的增生和轉移，促進細胞凋亡 (Li et al., 2019)。在大腸直腸癌中，ATG7 的過度表現在體內與體外試驗皆已發現可以引起癌細胞死亡 (Hao et al., 2017)。然而，在膀胱癌細胞中發現，細胞自噬會導致癌細胞增生，抑制泌尿上皮癌 (urothelial carcinoma-associated 1, UCA1) - miR-582-5p-ATG7 系統可以使 ATG7 表現下降，進而抑制膀胱癌細胞生長、侵入和轉移 (Wu et al., 2019)。另一篇文獻亦指出，抑制 ATG7 透過提高 ARE/poly (U)-binding/degradation factor 1 (AUF1)、降低 Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (TET1)、降低 ubiquitin specific peptidase 28 (USP28) 並降低 CD44，抑制膀胱癌的轉移 (Zhu et al., 2019)。在人類肝癌 SMMC-7721 細胞，以萘結構化合物 Plumbagin (PL) 可抑制 ATG7 與其他

細胞自噬及細胞凋亡的蛋白來抑制癌細胞生長，而且，在加入藥物之前先使用細胞自噬抑制劑 3-methyladenine，被發現可以抑制 PL 引起的細胞凋亡現象，顯示化合物 PL 的細胞自噬與細胞凋亡有密切關聯 (Lin et al., 2019)。在肺癌細胞 CL1-5 Parental 細胞中，發現給予細胞植化素 FC，可以使 ATG7 提升增加細胞自噬，然而是否與細胞凋亡有關，需要進一步探討。

過去研究指出，細胞自噬相關蛋白 Class III PI3K/Beclin-1 複合體與癌症治療的應用有密切相關。在酵母菌與人類細胞中，當處於營養缺乏狀態時，Class III PI3K 為引起細胞自噬的重要因子 (Backer, J. M., 2008)。乳癌藥物 Tamoxifen 藉由提高 Beclin-1 的合成以提高細胞自噬作用達到治癌功效 (Wienecke, R. et al., 2006)。ABT-737，一種 BH3 類似物，降低促細胞凋亡的 Bcl-2/Bcl-XL/Beclin-1 複合體的生成，刺激 Beclin-1 依賴性的 PI3KCIII 活化 (Malik, S. A. et al., 2011)。EB1089，一種化學治療性維生素 D 的類似物，在乳癌細胞 MCF-7 細胞中可以引發 Beclin-1 依賴型細胞自噬 (Høyer-Hansen, M. et al., 2005)。Spautin-1，在癌症中可以抑制兩種對 Vps34 的亞單位 Beclin-1 有泛素特異性的勝肽酶 USP10 與 USP13，促進 PI3KCIII/Vps34 複合體的降解 (Liu et al., 2011)。Xestosponging B 為 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) 的結

抗劑，可透過 Bcl-2 阻斷由 IP3R 和 Beclin-1 所形成的分子複合體引發細胞自噬 (Vicencio, J. M. et al., 2009)。RAD001 (Everolimus) 為一 mTORC1 抑制劑，應用於白血病，透過增加 Beclin-1 表現以引發細胞自噬現象 (Craazzolara, R. et al., 2009)。然而，在癌症中並非所有藥物都能透過直接上調 Beclin-1 來達到治療效果。

另外，蛋白質激酶透過磷酸化調節癌細胞中的轉錄、轉譯、增殖、生長和生存。PI3K 信息路徑在癌症中往往因為 PI3K 的基因放大、基因突變而受損，PI3K/Akt/mTOR 與 Ras/Raf/MEK/ERK 路徑的被認為是治療癌症的重要標的，在癌症許多臨床藥物中，多藉由抑制這兩個途徑來發揮治療癌症的效果 (Asati, V. et al., 2016)。然而，近年來發現，Ras/RAF/MEK/ERK 信號路徑能夠正向調節細胞自噬，並且活化 ERK 所引起破壞性細胞自噬，被認為是細胞生存變成細胞死亡的主要因子 (Sooro, M. A., et al., 2018)。像是甘露糖或葡萄糖特異性豆類凝集素，Concanavalin A (Con A)，被認為能透過與細胞膜受器結合導致特定代謝反應，抑制 PI3K/Akt/mTOR 並上調 MEK/ERK 路徑來引起細胞自噬，對部分癌細胞毒殺的功效 (Roy, B. et al., 2014)。

p62/SQSTM1 蛋白是細胞自噬過程中，即將被水解蛋白的受器，過去文獻對於它在癌細胞內扮演的角色十分多元。有學者認為

在細胞中 p62 的高度表現與癌症的預後不佳，反之也有學者認為 p62 與細胞致死機制有關 (Yan et al., 2019)。在高轉移程度與高復發率的卵巢癌，以及具多重藥物阻抗的卵巢癌細胞株中，發現 p62 表現量都較低 (Wang et al., 2018)。在多形性膠質母細胞瘤 U87MG 中，給予蛋白酶體抑制劑 MG132，可以短暫引起細胞自噬，當抑制細胞自噬時會加劇 MG132 所引發的細胞死亡，並接著提高 p62 與活化態 caspase-8，進一步觀察到 U87MG 的細胞死亡仰賴 p62，且衰減 MG132 所引發的細胞死亡需要有 p62 的 UBA 區域 (Zeng et al., 2014)。不過在一些文獻中指出，p62 在轉移的乳癌細胞中表現會增加，而且其過度表現與不良的預後有關連。在體外試驗中，p62 促進乳癌細胞的侵入能力，在體內試驗中發現若抑制 p62 能延緩乳癌細胞的轉移以及較低的致腫瘤特性 (Li et al., 2017)。體外試驗中發現，抑制 p62 蛋白可以降低骨肉瘤細胞的生長、轉移與侵入能力 (Lu et al., 2018)。細胞自噬的缺陷透過 p62 依賴型的腫瘤轉錄因子 Twist 的恆定，促進癌細胞的生長與轉移 (Qiang et al., 2014)。本篇研究發現，FC 可以增加肺癌細胞 CL1-5 Parental 細胞 p62 表現，降低肺癌細胞的轉移能力，然而轉肺癌細胞的轉移是否與其它的蛋白有關，值得探討。

第六章 結論

肺癌的死亡率居世界第一，而肺癌往往因為轉移而導致治療上的困難，在轉移的角色上，人類細胞中調節物質運輸的 GTPase Rab37 扮演重要角色，研究者發現此種細胞調節物質分泌的蛋白在肺癌病人身上有被抑制表現的現象 (Tsai et al., 2014)。Rab37 因為能夠調控 TIMP1 的分泌，進而抑制細胞轉移，此現象被認為與細胞自噬有高度相關，稱之為分泌型細胞自噬 (Liu et al., 2018)。細胞自噬作為調節細胞生理功能的重要步驟，已經在癌細胞的治療上成為重要的標的 (Levy, J. M. M. et al., 2017)。而植化素介入癌症治療也成為化療的輔助療法，可有效改善癌症病人的預後情形 (Hosseini, A. et al., 2015)。因此本研究探討 FC 可否 (1) 毒殺肺癌細胞，(2) 引起肺癌細胞的細胞自噬，以及 (3) 抑制肺癌細胞的爬行。結果發現，FC 確實能夠毒殺肺癌細胞，其凋亡機制可能和細胞自噬有關。FC 可以引起肺癌細胞的細胞自噬，其路徑與 ATG7 和 Ras/MEK/ERK 路徑有關。FC 可抑制肺癌細胞的爬行，其路徑與 p62 增加有關。然而，FC 的細胞自噬路徑需要經過更多有利的證據加以釐清，並如何與現行癌症化療藥物併用，需要加以研究，FC 方能成為未來肺癌治療的介入因子。

第七章 參考資料

財團法人台灣必安研究所。民國 108 年 6 月 18 日，取自

<http://www.brion.org.tw/>。

台灣行政院衛生福利部國民健康署 105 年癌症登記報告。民國 108 年 6 月 18 日，取自

<https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=269&pid=10227>。

Akio, K., Yukiko K., Yoshinori, O., Tamotsu, Y. (2001). Beclin–phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2(4), 330–5.

Amin, M. B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D. R., Brookland, R. K., Washington, M. K., et al. (2017). American Joint Committee on Cancer. Lung. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer, 431–456.

Asati, V., Mahapatra D. K., Bharti, S. K. (2016). PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur. J. Med.* 109, 314–41.

Backer, J. M. (2018). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J.* 410(1):1-17.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394–424.

Chen, J. C., Hsieh, M. J., Chen, C. J., Lin, J. T., Lo Y. S., Chuang Y. C., et

- al. (2016). Polyphyllin G induce apoptosis and autophagy in human nasopharyngeal cancer cells by modulation of Akt and mitogen-activated protein kinase pathways in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 7(43), 70276–89.
- Chu, Y. -W., Yang, P.-C. Yang, S.-C. Shyu, Y.-C. Hendrix, M. J. C. Wu, R. and Wu, C.-W. (1997). Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17:353–360.
- Crazzolaro, R., Cisterne, A., Thien, M., Hewson, J., Baraz, R., Bradstock, K. F., et al. (2009). Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 113(14):3297–306.
- Esteban, A. O., Andrea, L. K. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc.* 6(21), e1984.
- Fu, L. L., Cheng, Y., Liu, B. (2013). Beclin-1: Autophagic regulator and therapeutic target in cancer. *Int. J. Biochem. Cell B.* 45, 921–4.
- Hao, H., Xia, G., Wang, C., Zhong, F., Liu, L., Zhang, D. (2017). miR-106a suppresses tumor cells death in colorectal cancer through targeting ATG7. *Med Mol Morphol.* 50(2):76–85.
- He, D. X., Li, G. H., Gu, X. T., Zhang, L., Mao, A. Q. Wei, J. et al. (2015). A new agent developed by biotransformation of polyphyllin VII inhibits chemoresistance in breast cancer. *Oncotarget*. 7(22), 31814–24.
- He, H., Zheng, L., Sun, Y. P., Zhang, G. W., Yue, Z. G. (2014). Steroidal Saponins from *Paris polyphylla* Suppress Adhesion, Migration and

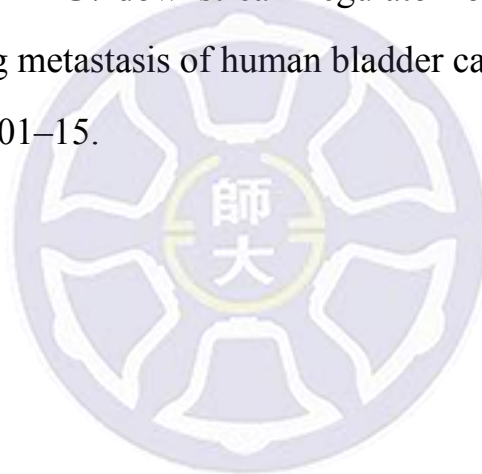
- Invasion of Human Lung Cancer A549 Cells Via Down-Regulating MMP-2 and MMP-9. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15(24), 10911–16.
- Hosseini, A., Ghorbani, A. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna. J Phytomed.* 5 (2): 84–97.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, IS, Elling, F., Jaä'ttela, M. (2005). Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 12, 1297–1309.
- Hsieh, M. J., Chien, S. Y., Lin, J. T., Yang, S. F., Chen, M. K. (2016). Polyphyllin G induces apoptosis and autophagy cell death in human oral cancer cells. *Phytomedicine.* 23, 1545–54.
- Isei, T., Takashi, U., Eiki, K. LC3 and Autophagy. (2008). *Autophagosome and Phagosome.* 445, 77–88.
- Jonathan, M. B. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* 410, 1–17.
- Lee, J. C., Su, C. L., Chen, L. L., Won, S. J. (2009). Formosanin C-induced apoptosis requires activation of caspase-2 and change of mitochondrial membrane potential. *Cancer Sci.* 100(3), 503–13.
- Levy, J. M. M., Towers, C. G., Thorburn, A. (2017). Targeting Autophagy in Cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 17(9), 528–42.
- Li, M., Liu, J., Li, S., Feng, Y., Yi, F., Wang, L., et al. (2019). Autophagy-related 7 modulates tumor progression in triple-negative breast cancer. *Lab Invest.*
- Li, S. S., Xu, L. Z., Zhou, W., Yao, S., Wang, C. L., Xia, J. L., et al. (2017). p62/SQSTM1 interacts with vimentin to enhance breast cancer

- metastasis. *Carcinogenesis*. 38(11), 1092–103.
- Lin, Y., Chen, Y., Wang, S., Ma, J., Peng, Y., Yuan, X., et al. (2019). Plumbagin induces autophagy and apoptosis of SMMC-7721 cells in vitro and in vivo. *J Cell Biochem*. 120(6):9820–830.
- Lin, Z., Liu, Y. T., Li, F. Y., Wu, J. J., Zhang, G. Y., Wang, Y., et al. (2015). Anti-lung Cancer Effects of Polyphyllin VI and VII Potentially Correlate with Apoptosis In Vitro and In Vivo. *Phytother. Res*. 29, 1568–76.
- Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., et al. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*. 147(1):223–34.
- Malik, S. A., Orhon, I., Morselli, E., Criollo, A., Shen, S., Mariño, G., et al. (2011). BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene*. 30, 3918–29.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Liu, Z., Yan, L., Huang, L., et al. (2011). Formosanin C-inhibited pulmonary metastasis through repression of matrix metalloproteinases on mouse lung adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.*, 11(6), 592–98.
- Miller, A. B., Hoogstraten, B., Staquet, M., Winkler, A. (1981). Reporting Results of Cancer Treatment. *Cancer*. 1(47), 207–14.
- Ponpuak, M., Mandell, M. A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 35:106–16.
- Roy, B., Pattanaik, A. K., Das, J., Bhutia, S. K., Behera, B., Singha, P., et al. (2014). Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in

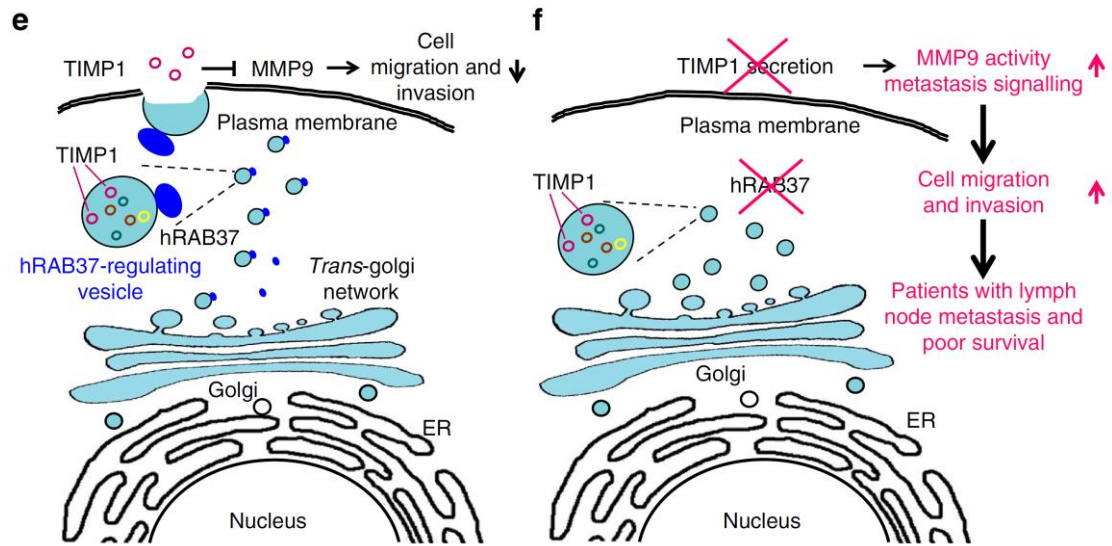
- Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. *Chem-Bio Interact.*
- Shi, X. P., Zh, M., Kang, Y., Yang T. F., Chen, X., Zhang, Y. M. (2018).
Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in regulating the
migration by an effective natural compound brucine in LoVo cells.
Phytomedicine. 46, 85–92.
- Shigeomi, S. (2018). Biological Roles of Alternative Autophagy. *Mol.
Cells.* 41(1), 50–54.
- Sooro, M. A., Zhang, N., Zhang, P., (2018). Targeting EGFR-mediated
autophagy as a potential strategy for cancer therapy. *Int. J. Cancer.*
143(9), 2116–25.
- Sun, Q., Fan, W. L., Zhong, Q. (2009). Regulation of Beclin 1 in
autophagy. *Autophagy.* 5(5), 713–16.
- Tsai, C. H., Cheng, H. C., Wang, Y. S., Lin, P., Jen, J. Kuo, I. Y., et al.
(2014). *Nat. Commun.* Small GTPase Rab37 targets tissue inhibitor of
metalloproteinase 1 for exocytosis and thus suppresses tumour
metastasis. 5:4804.
- Vicencio, J. M., Ortiz, C., Criollo, A., Jones, A. W., Kepp, O., Galluzzi,
L., et al. (2009). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates
autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ.*
16(7):1006–17.
- Wang, J. L., Cassandra, G., Ma, H. Z., Gao, P., Francis, J. H., Kan, Q. C.,
et al. (2018). Expression and role of autophagy-associated p62
(SQSTM1) in multidrugresistant ovarian cancer. *Gynecologic
Oncology.* 150(1), 143–50.
- Wienecke, R., Fackler, I., Linsenmaier, U., Mayer, K., Licht, T., Kretzler,

- M. (2006). Antitumoral activity of rapamycin in renal angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex. *Am J Kidney Dis.* 48: e27–9.
- Wu, J., Li, W., Ning, J., Yu, W., Rao, T., Cheng, F. (2019). Long noncoding RNA UCA1 targets miR-582-5p and contributes to the progression and drug resistance of bladder cancer cells through ATG7-mediated autophagy inhibition. *Onco Targets Ther.* 12:495–508.
- Wu, R. T., Chiang, H. C., Fu W. C., Chien, K. Y., Chung, Y. M., Horng, L. Y. (1990). Formosanin-C, an immunomodulator with antitumor activity. *Int. J. Inorg.* (12)7, 777–86.
- Yan, X. Y., Zhong, X. R., Yu, S. H., Zhang, L. C., Liu, Y. N. Zhang, Y. et al. (2019). p62 aggregates mediated Caspase 8 activation is responsible for progression of ovarian cancer. *J. Cell Mol. Med.* 23(6), 4030–42.
- Yang, C. M., Ji, S., Li, Y., Fu, L. Y., Jiang, T., Meng, F. D. (2017). β -Catenin promotes cell proliferation, migration, and invasion but induces apoptosis in renal cell carcinoma. *Oncotargets Ther.* 10, 711–24.
- Yu, L., Chen, Y., Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* 14(2), 207–15.
- Yun, C. W., Lee, S. H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3466.
- Zappa, C., Mousa S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 5(3): 288–300.
- Zeng, R. X., Zhang, Y. B., Fan, Y., Wu, G. L. (2014). p62/SQSTM1 is involved in caspase-8 associated cell death induced by proteasome

- inhibitor MG132 in U87MG cells. *Cell Biol. Int.* 38(10), 1221–6.
- Zhang, C., Jia, X., Wang, K., Bao, J. Li, P., Chen, M. et al. (2016).
Polyphyllin VII Induces an Autophagic Cell Death by Activation of the
JNK Pathway and Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway in HepG2
Cells. *PLoS One.* 11(1), e0147405.
- Zheng, W., Xie, W. W., Yin, D. Y., Luo, R., Liu M., Guo, F. J. (2019).
ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK
signaling. *J. Cell Commun. Signal.* 17, 42.
- Zhu, J. L., Huang, G., Hua, X. H., Li, Y., Yan, H. Y, Che, X., et al. (2019).
CD44s is a crucial ATG7 downstream regulator for stem-like property,
invasion, and lung metastasis of human bladder cancer (BC) cells.
Oncogene. 38, 3301–15.



第八章 附錄



Appendix Fig. 1 Lung cancer patients with low hRAB37 protein expression coinciding with low TIMP1 expression in their tumours show high lymph node metastasis and poor survival.

(Tsai et al., 2014)

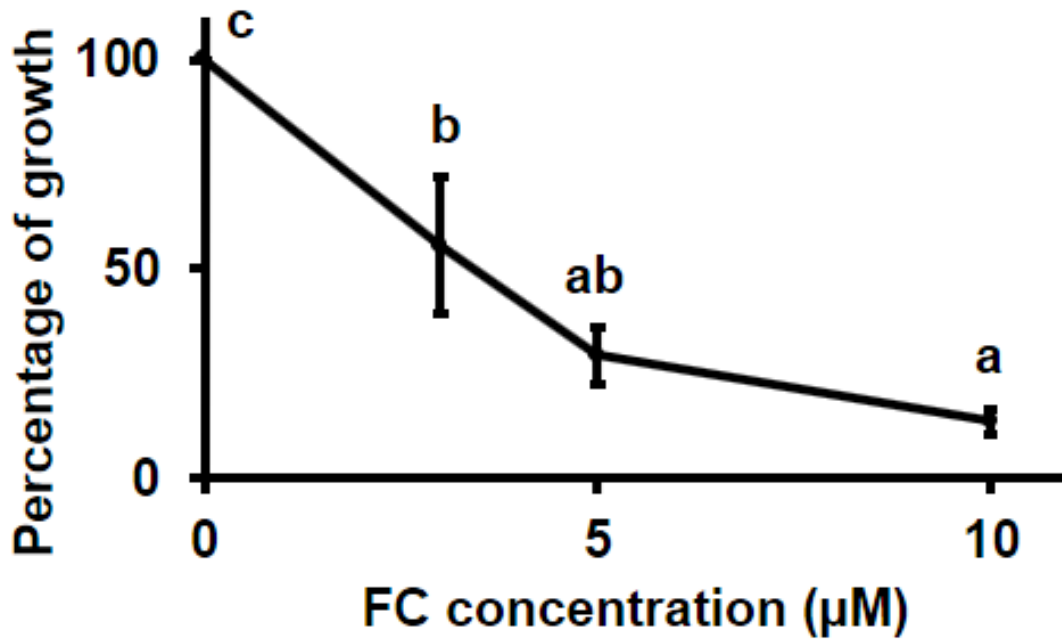
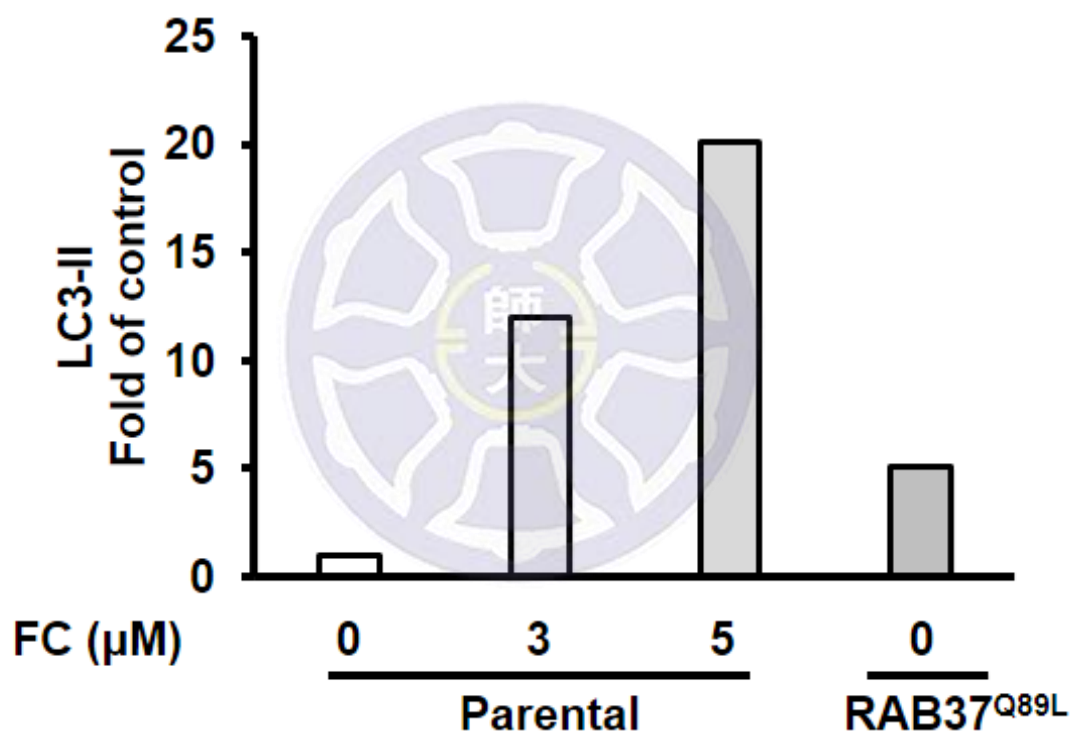
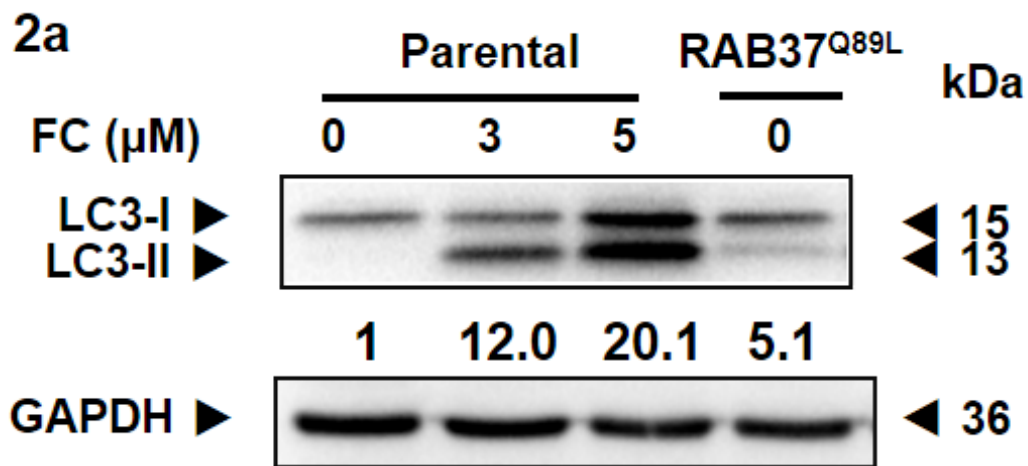


Fig. 1 Percentage of viability of human lung carcinoma cell CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells in response to FC.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (1×10^4) were treated with 0 to 10 µM of FC. After 24 h of incubation, growth of CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells were evaluated by SRB assay. (N=3)



2b

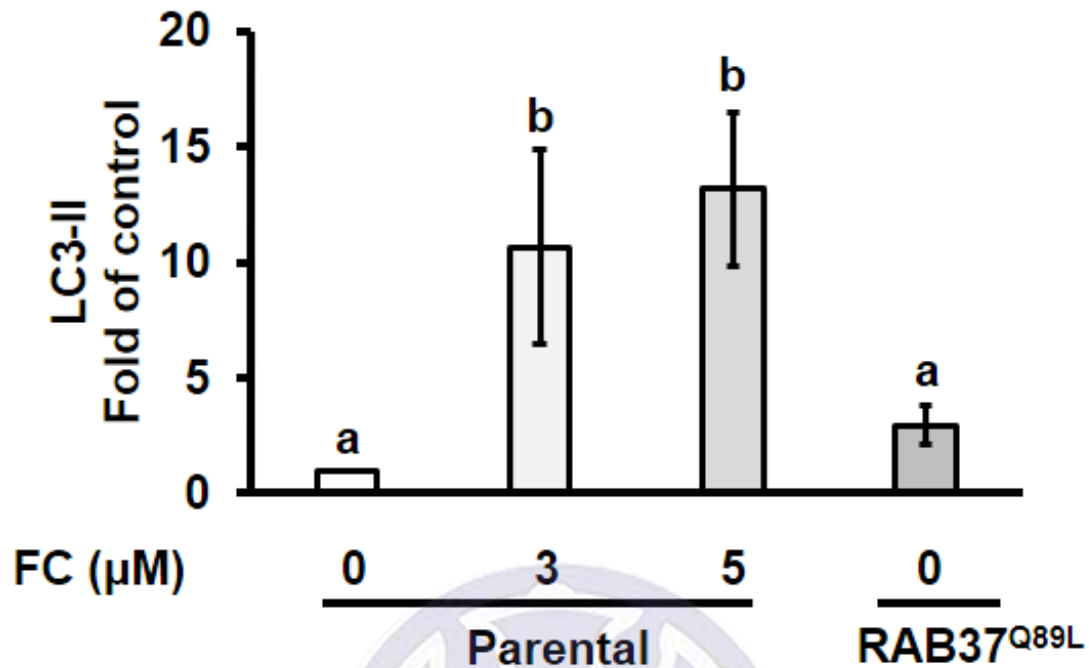


Fig. 2 (a) (b) Expression of LC3 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate were prepared and subjected to Western blot analysis using anti-LC3 antibody. GAPDH was used as an internal control.

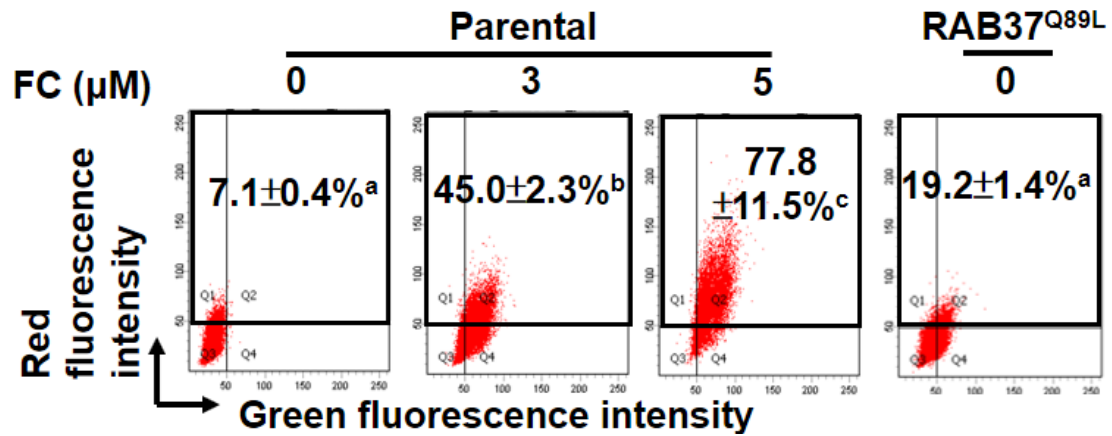
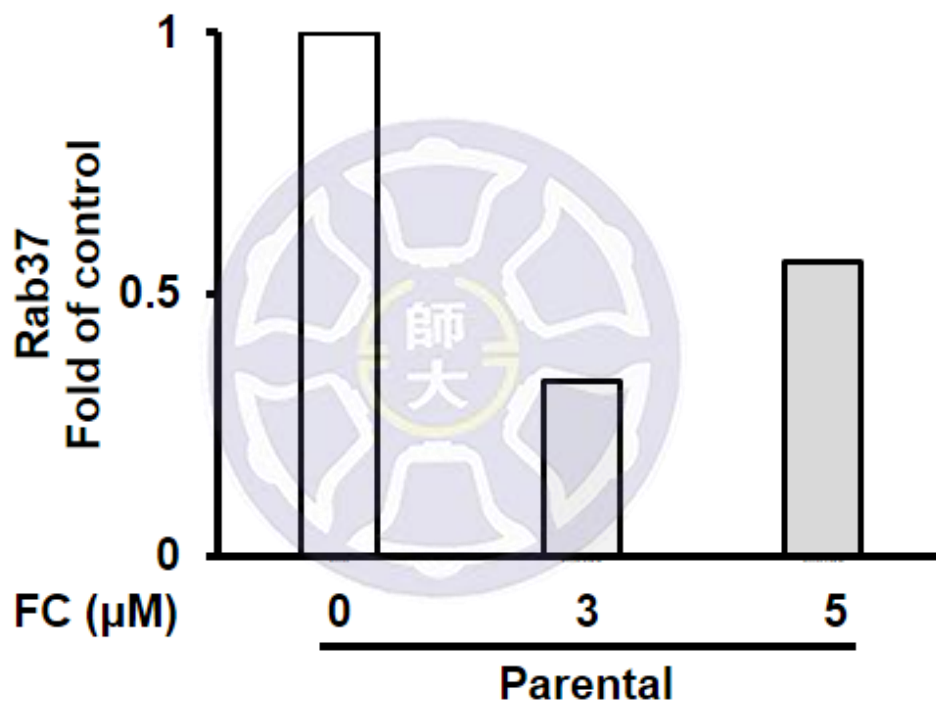
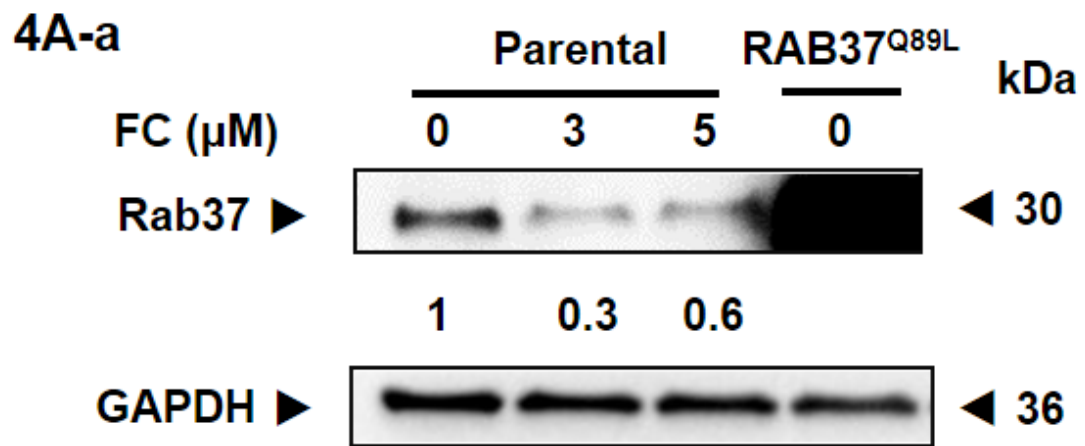


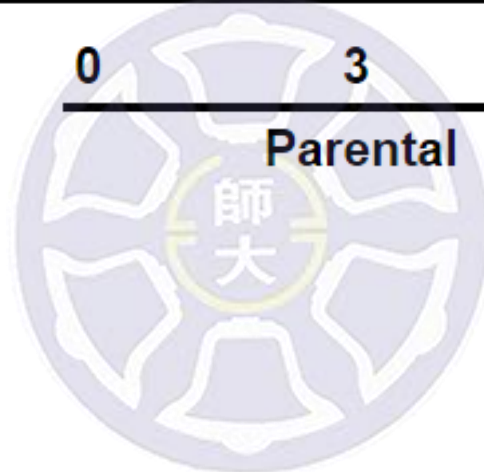
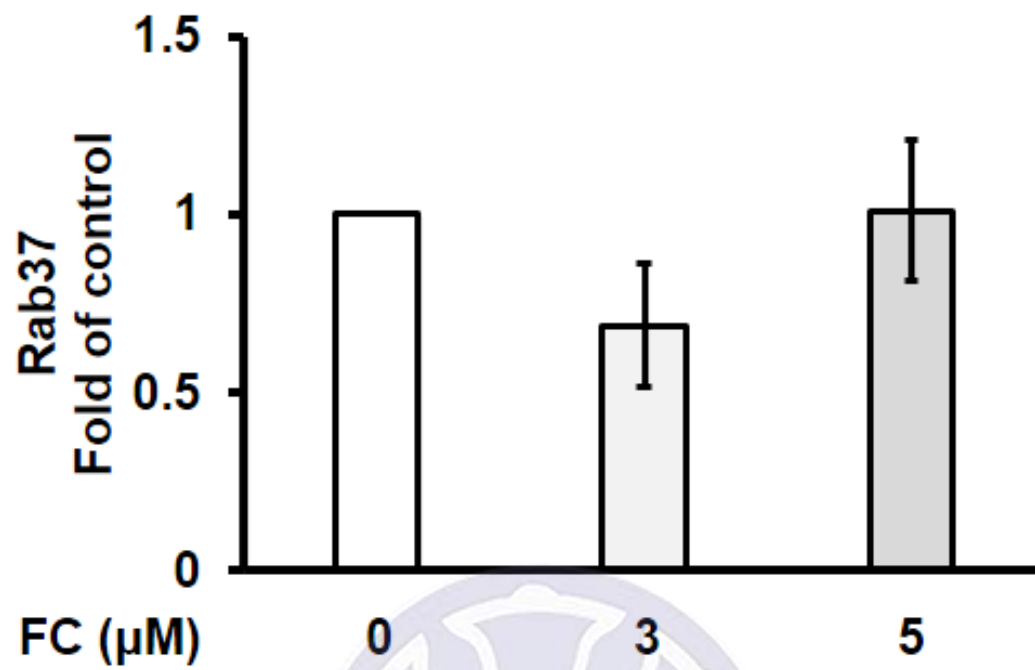
Fig. 3 Effect of FC on autophagy of human lung carcinoma CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (5×10^5) were treated with FC.

After treatment for 24 h, cells were stained with AO (1.5 μg/ml) for 15 min before set on flow cytometry. The percentage in the figure indicated the proportion of cells with AVOs staining (upper two quadrants).

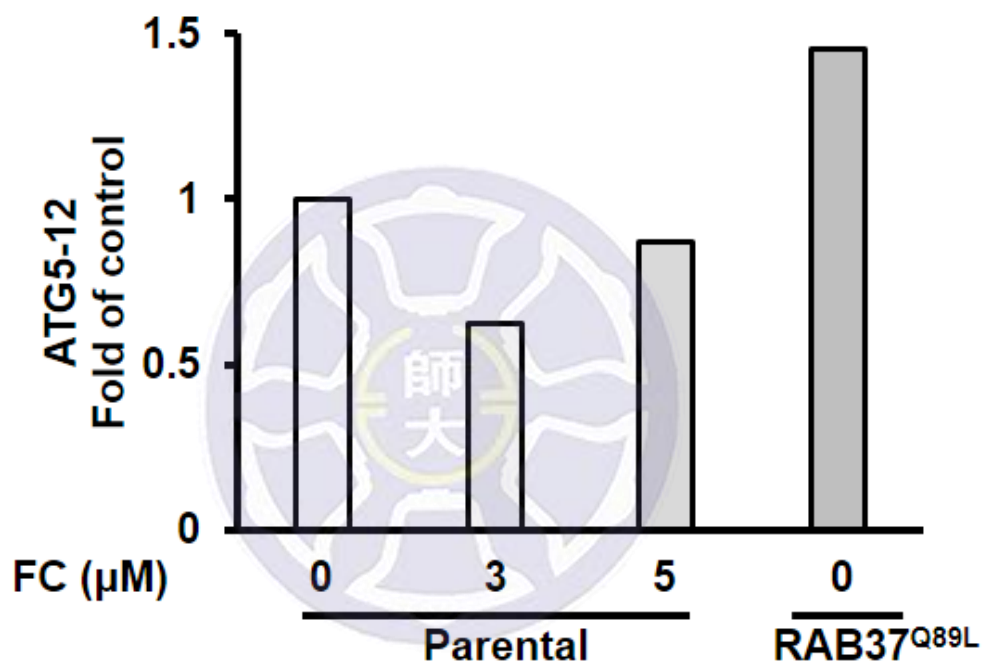
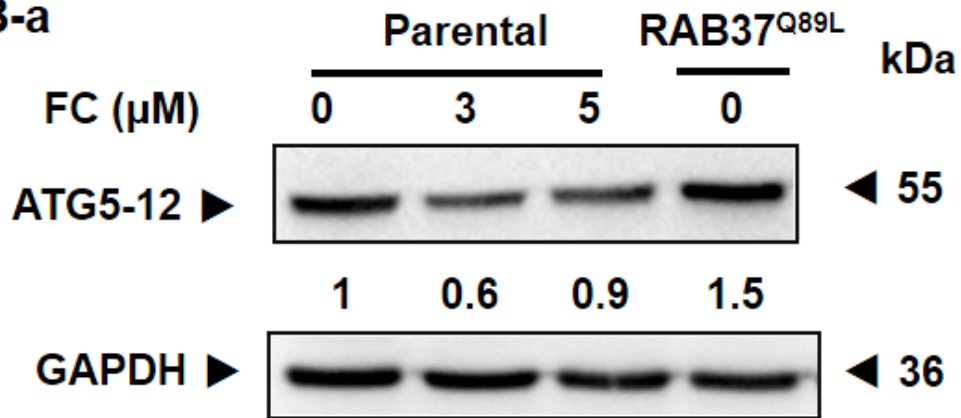


4A-b



Parental

4B-a



4B-b

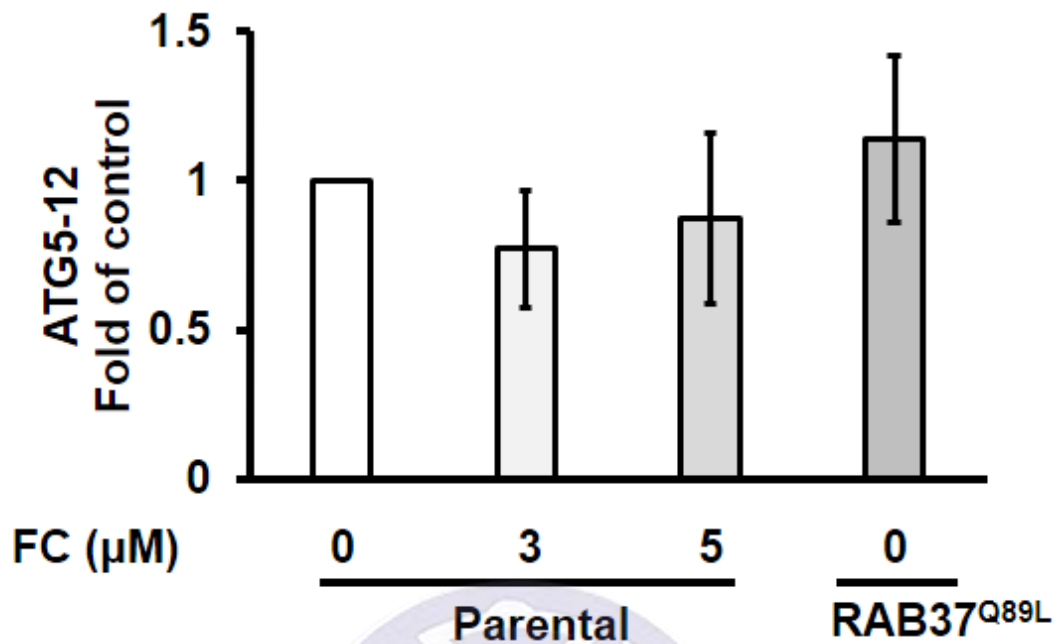
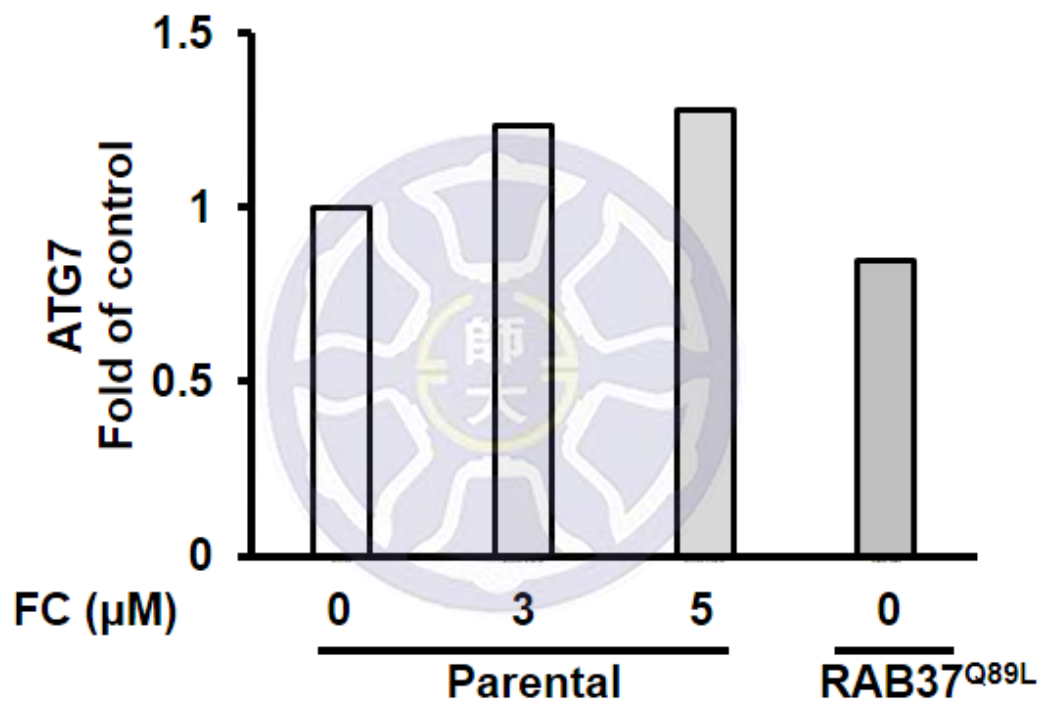
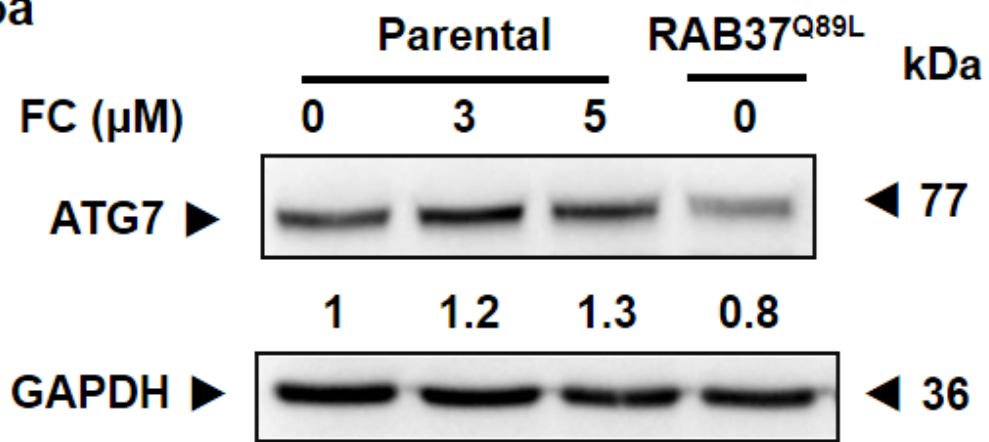


Fig. 4 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) Expression of Rab37 and ATG5-12 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blot analysis using anti-Rab37 (A) and anti-ATG5-12 (B) antibodies. GAPDH was used as an internal control. There were no significant difference between three and four groups in fig. 4 (A-b) and 4 (B-b).

5a



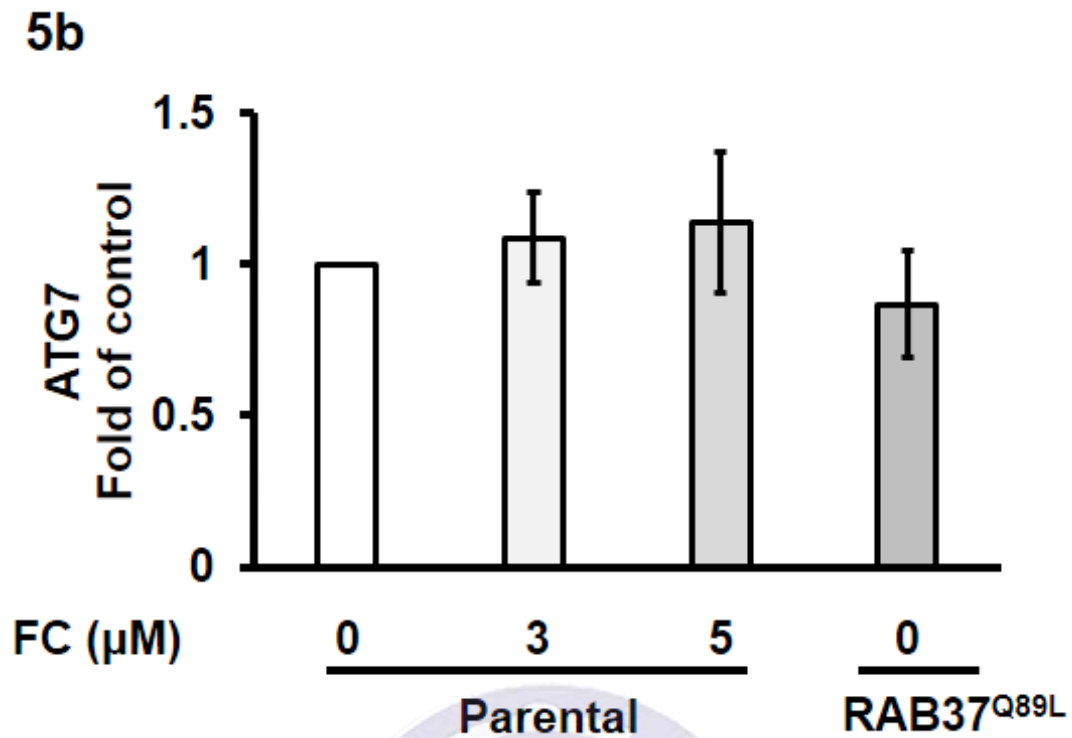
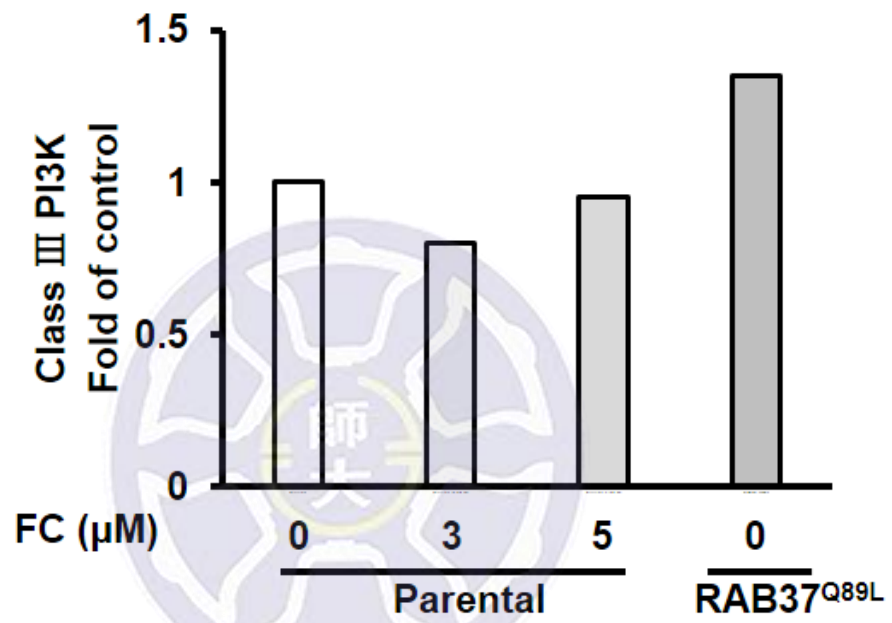
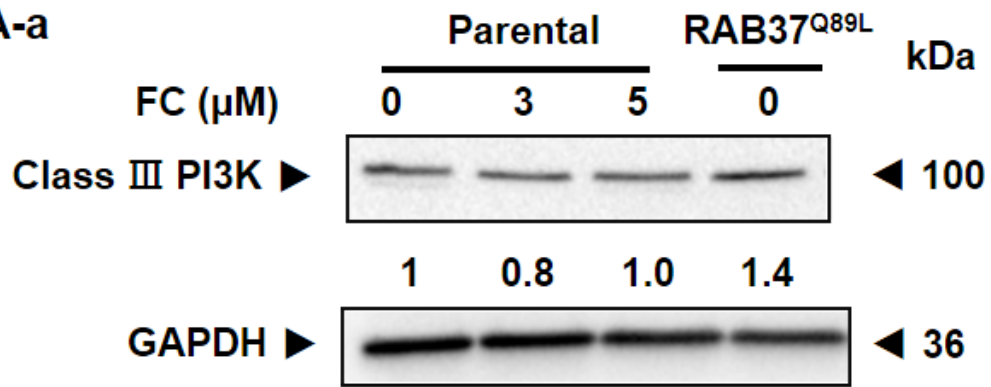
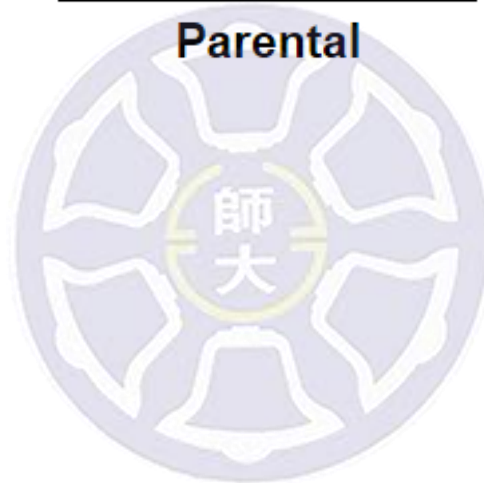
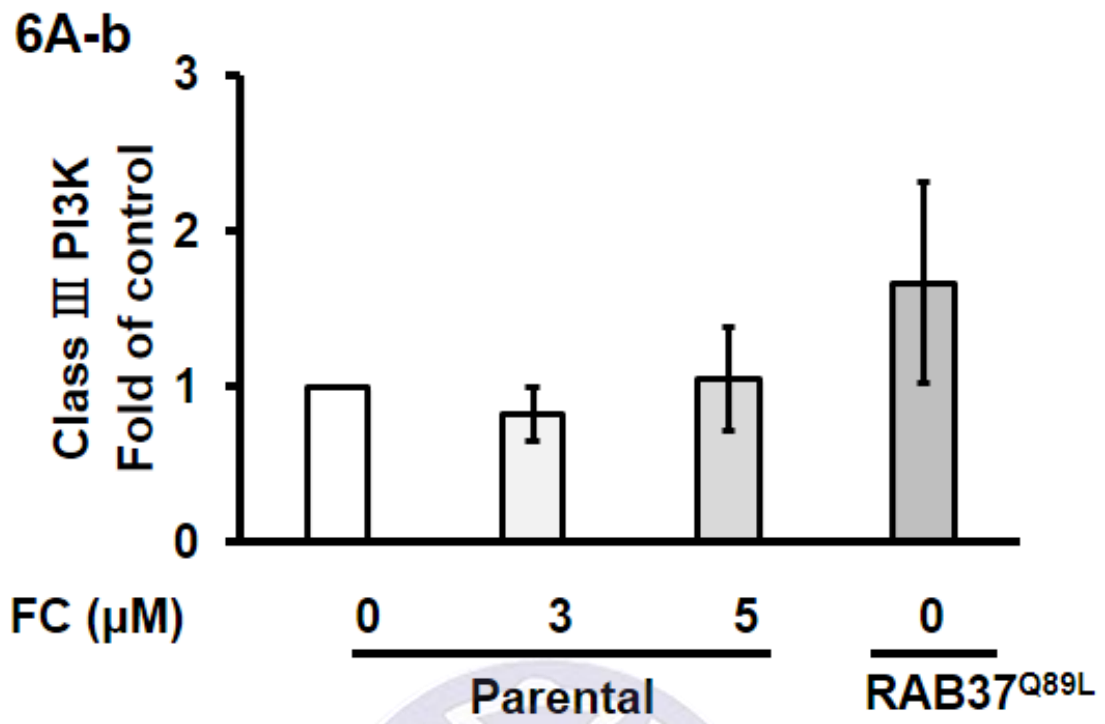


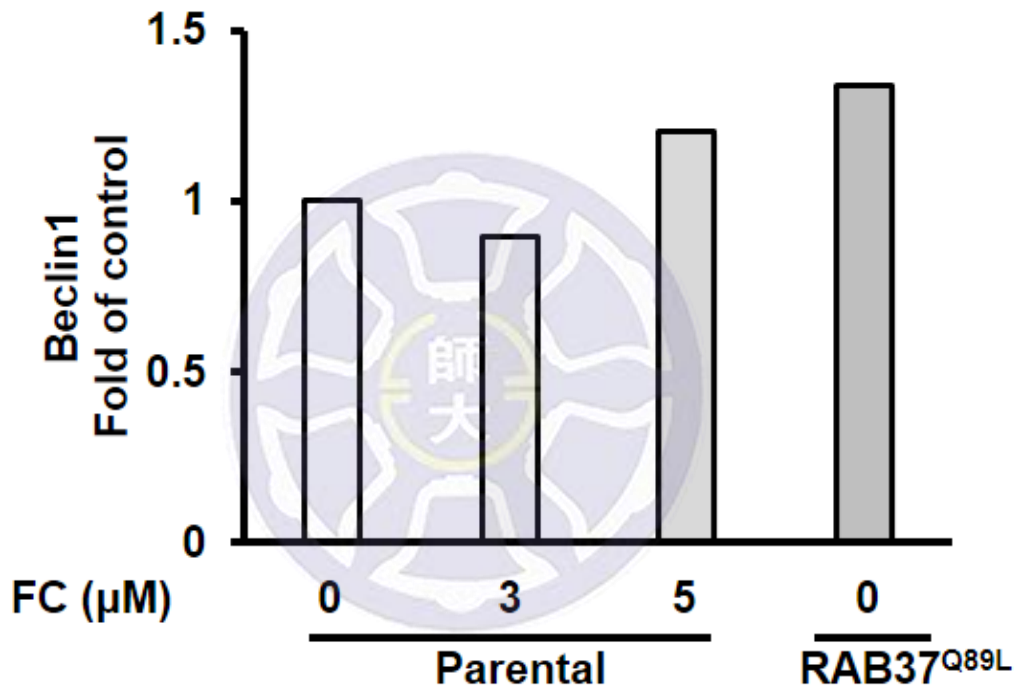
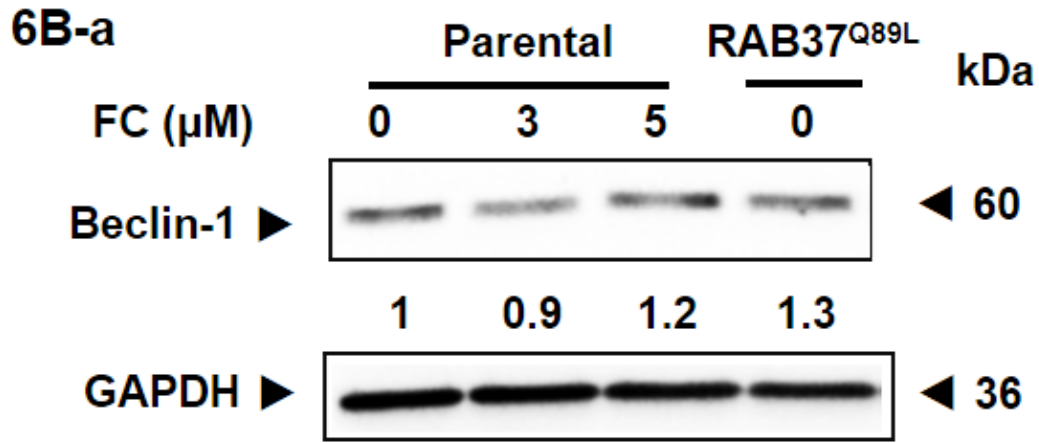
Fig. 5 (a) (b) Expression of ATG7 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blot analysis using anti-ATG7 antibody. GAPDH was used as an internal control. There was no significant difference between four groups in fig. 5 (b).

6A-a







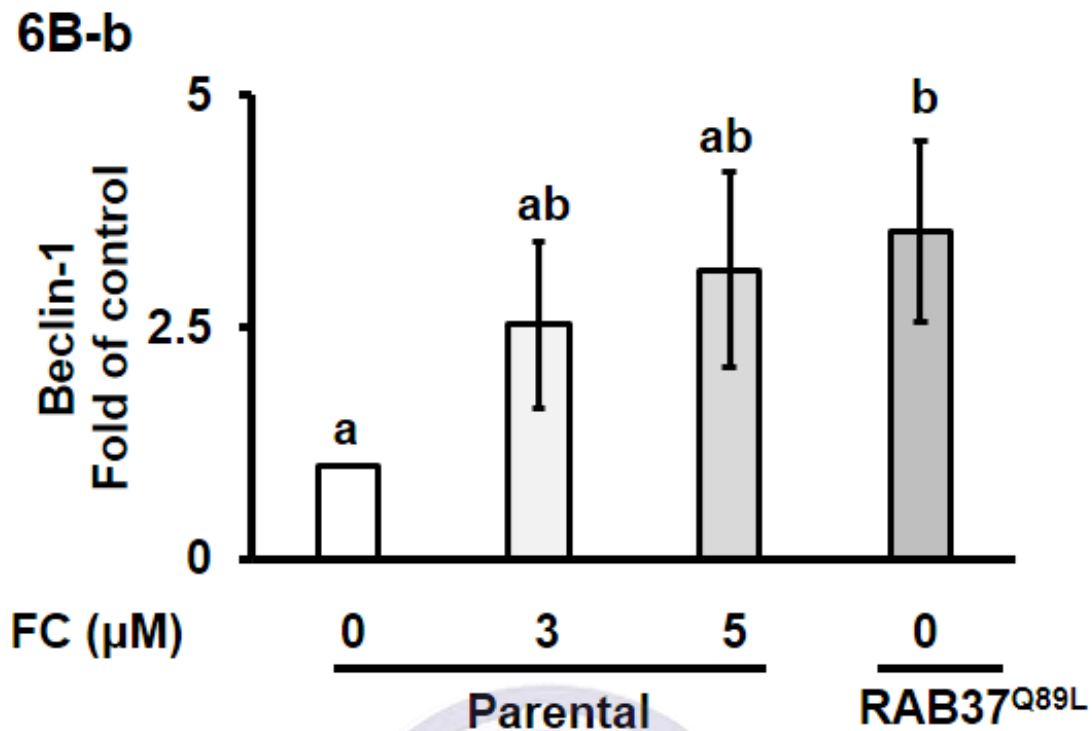
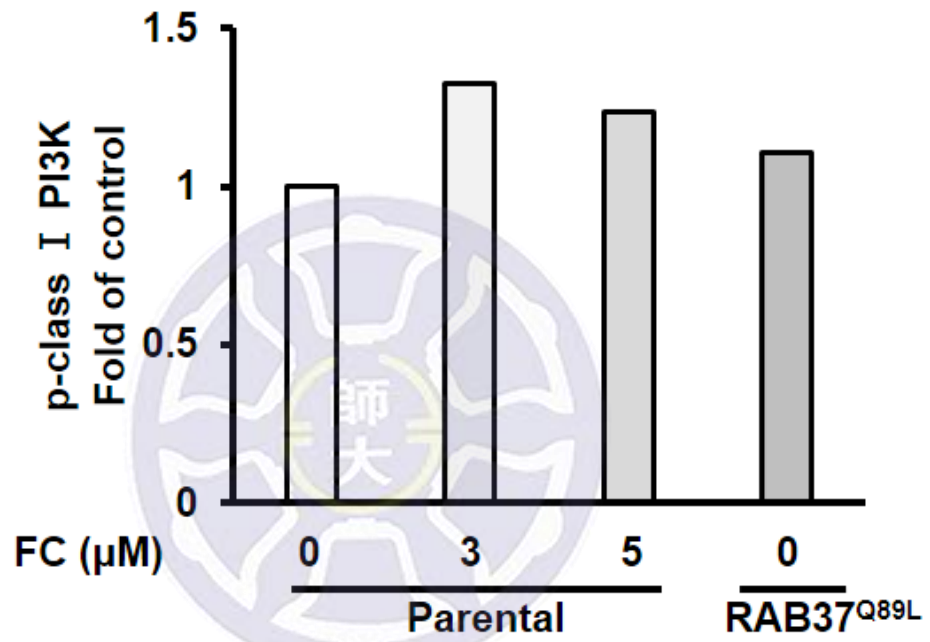
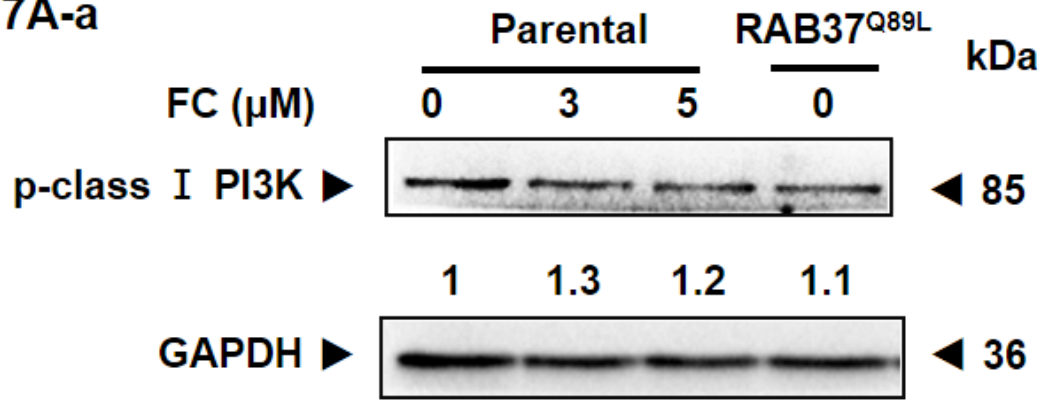


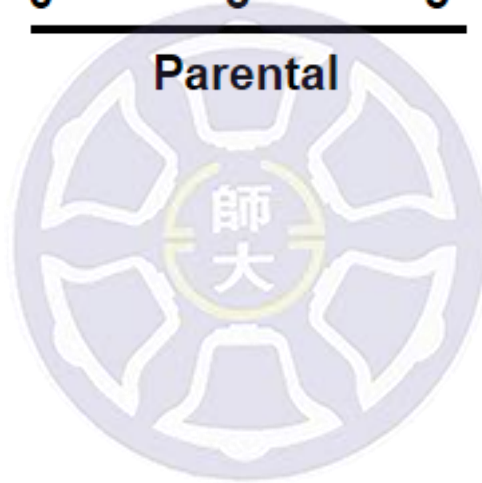
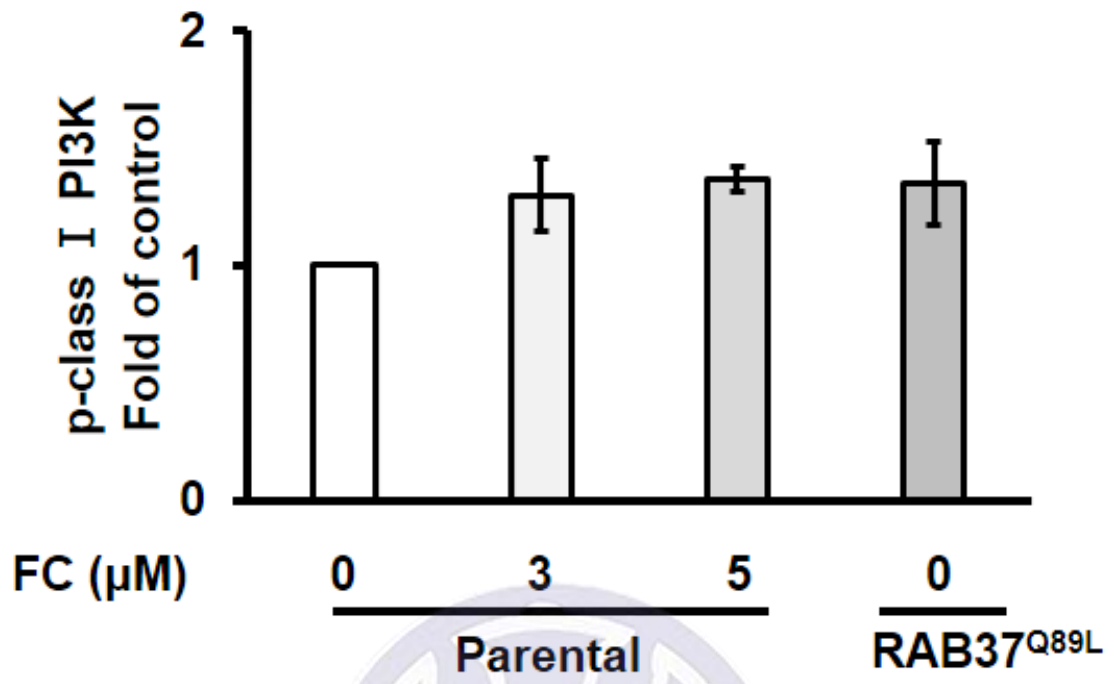
Fig. 6 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) Expression of Class III PI3K and Beclin-1 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blot analysis using anti-Class III PI3K (A) and Beclin-1 (B) antibodies. GAPDH was used as an internal control. There was no significant difference between four groups in fig. 6 (A-b).

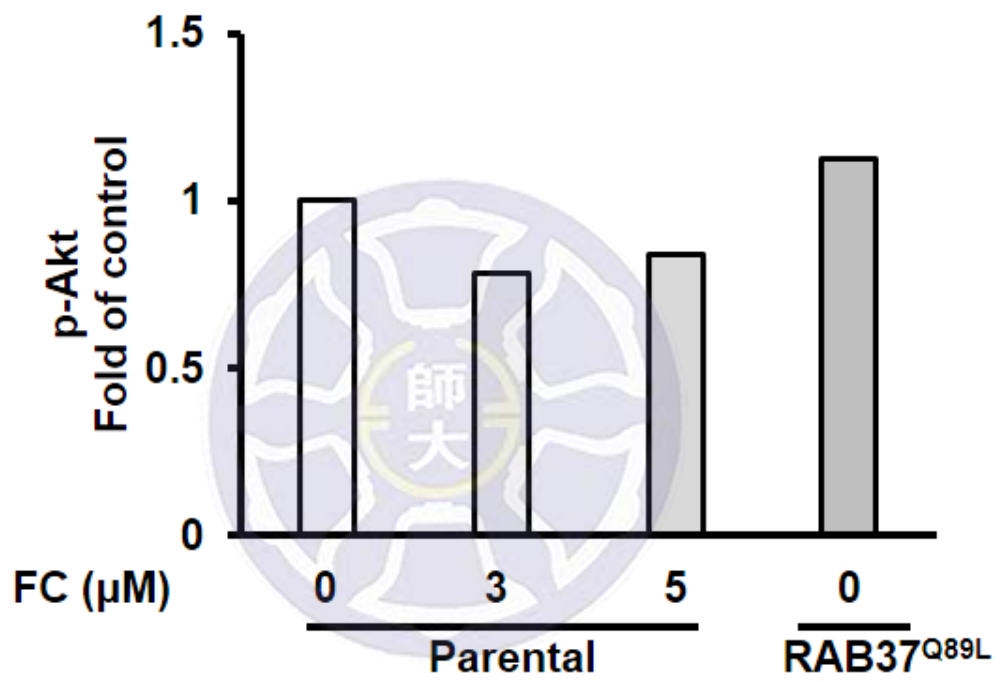
7A-a

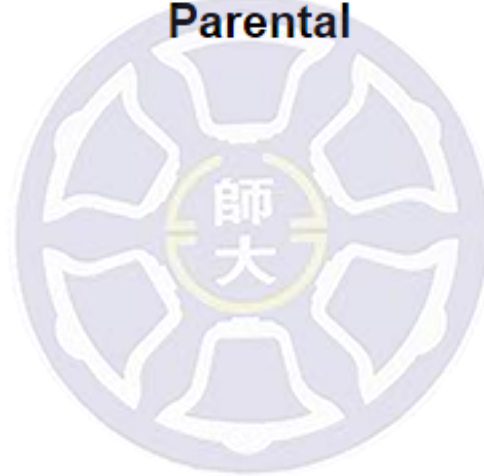
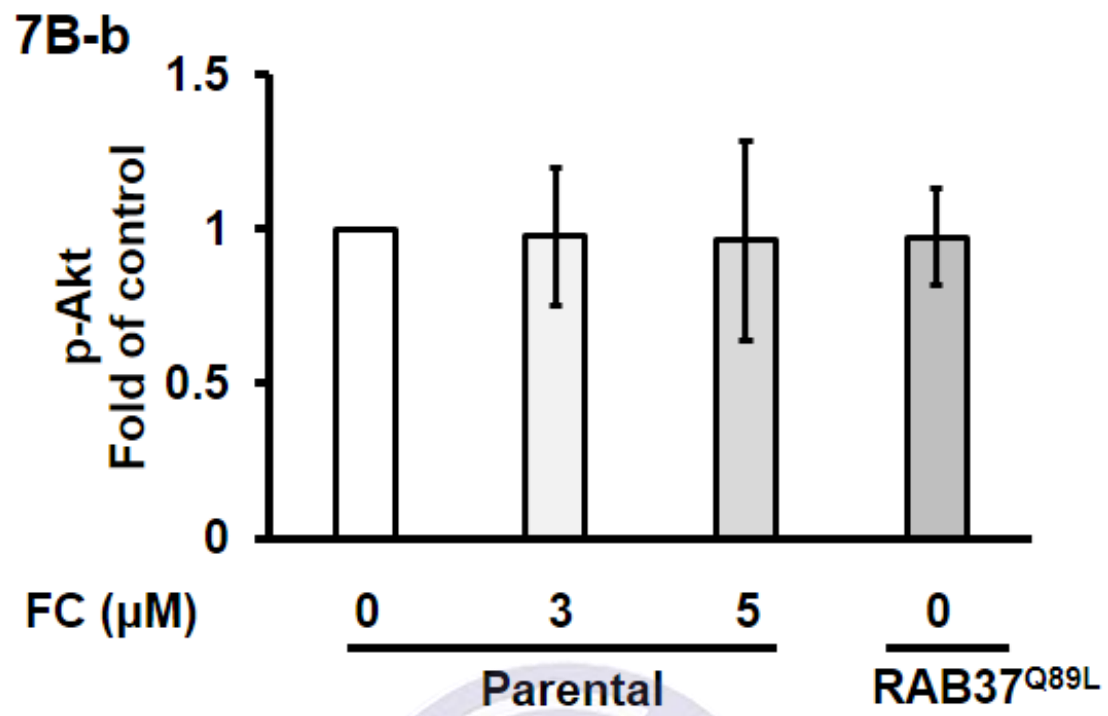


7A-b

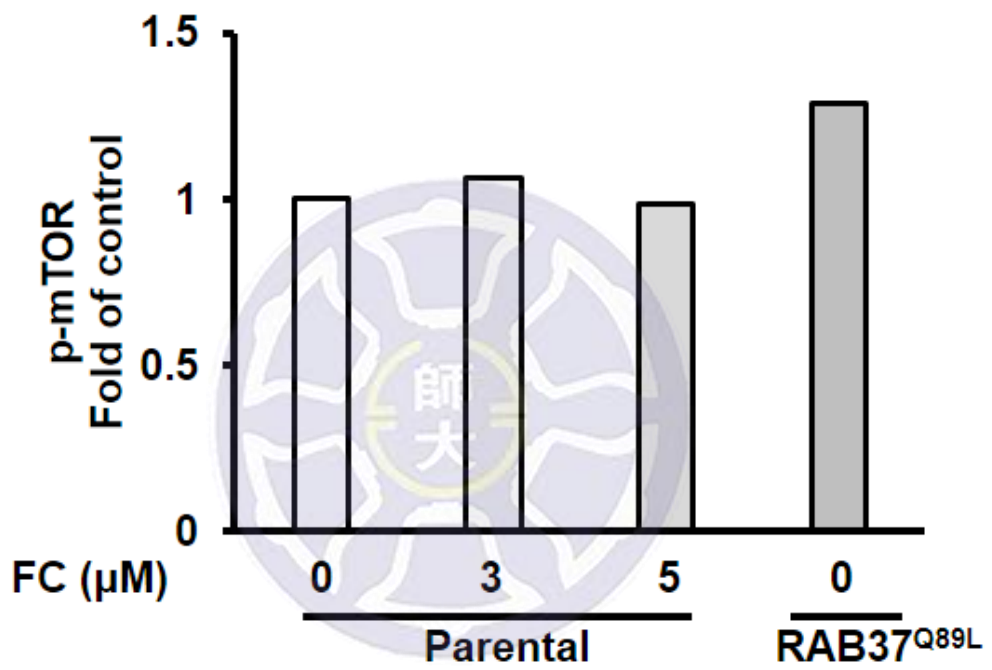
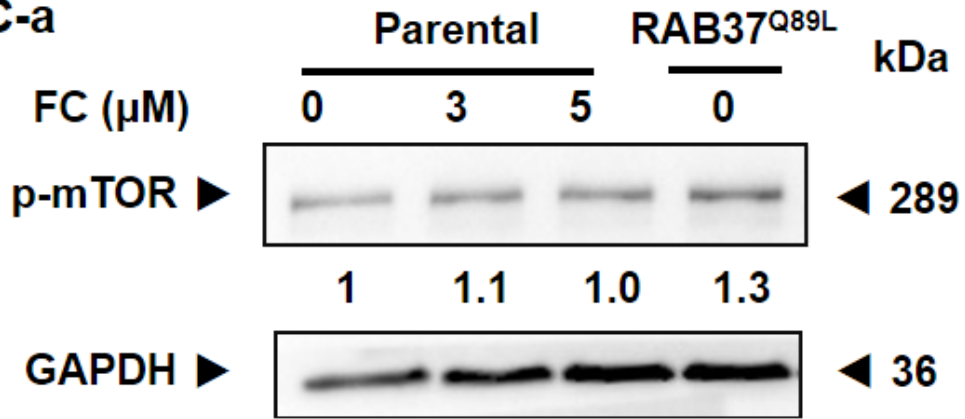


7B-a





7C-a



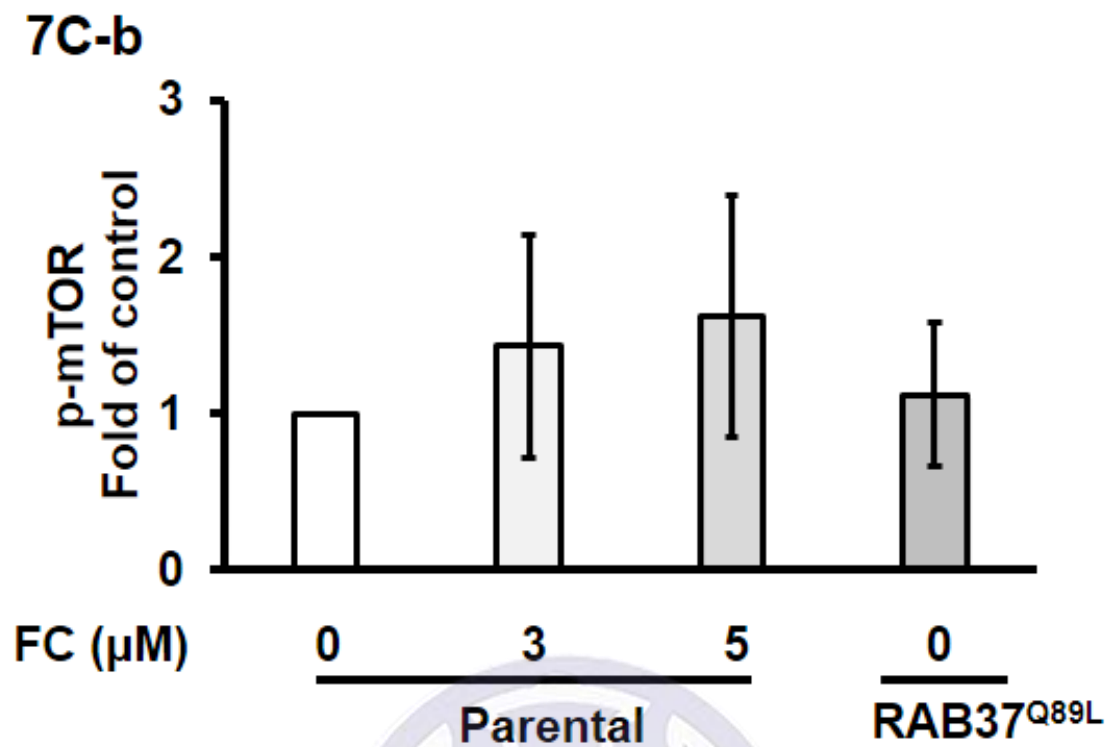
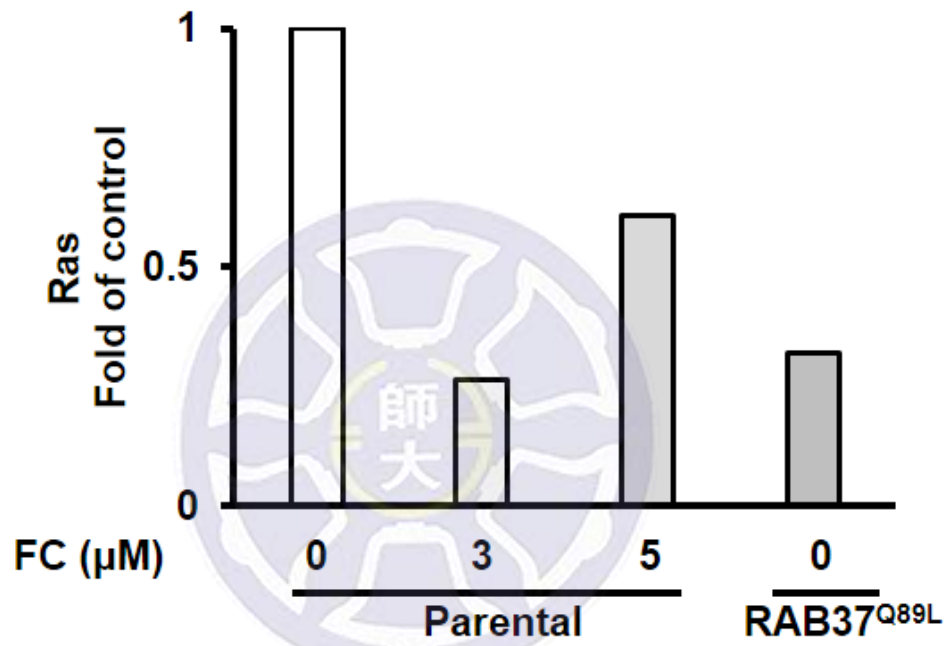
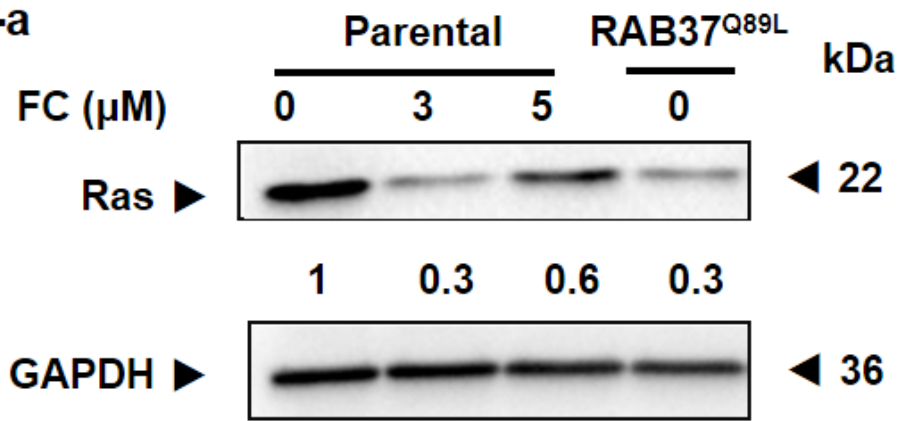


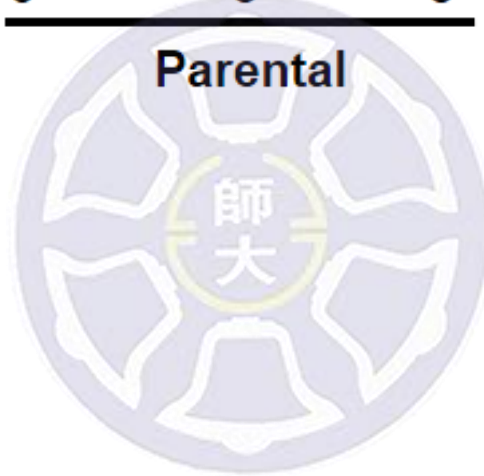
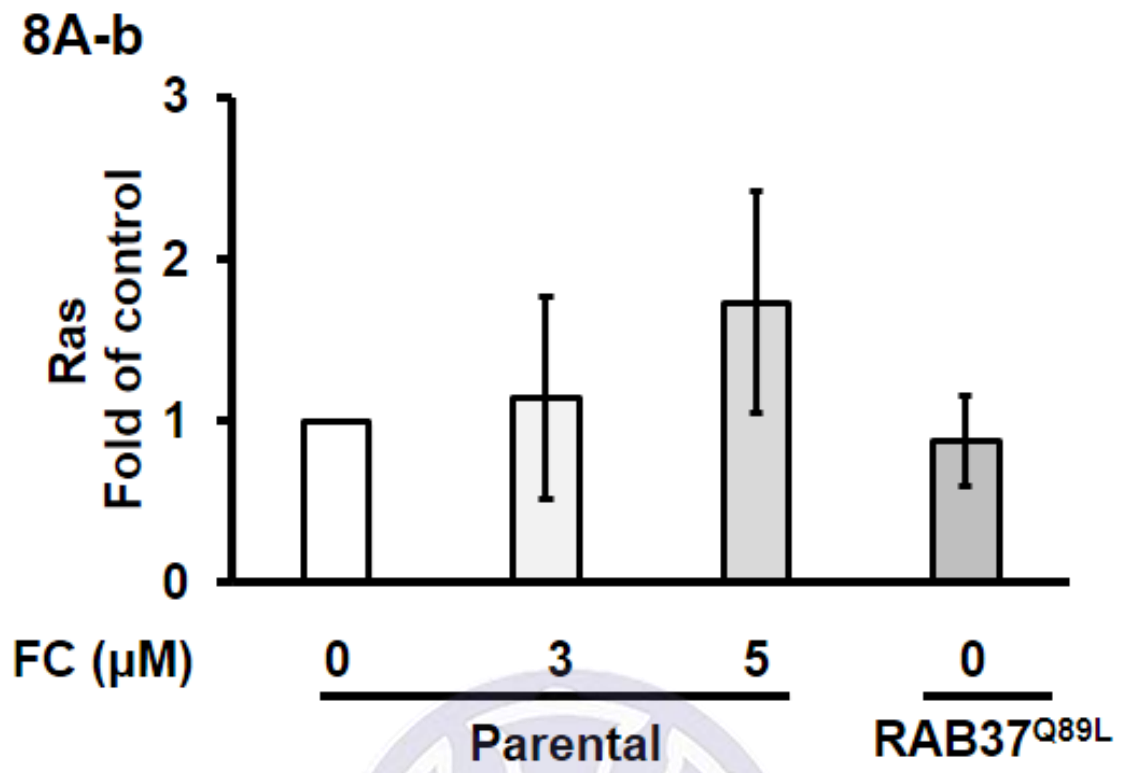
Fig. 7 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) (C-a) (C-b) Expression of p-class I PI3K, p-Akt and p-mTOR in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blot analysis using anti-p-class I PI3K (A), anti-p-Akt (B) and anti-p-mTOR (C) antibodies.

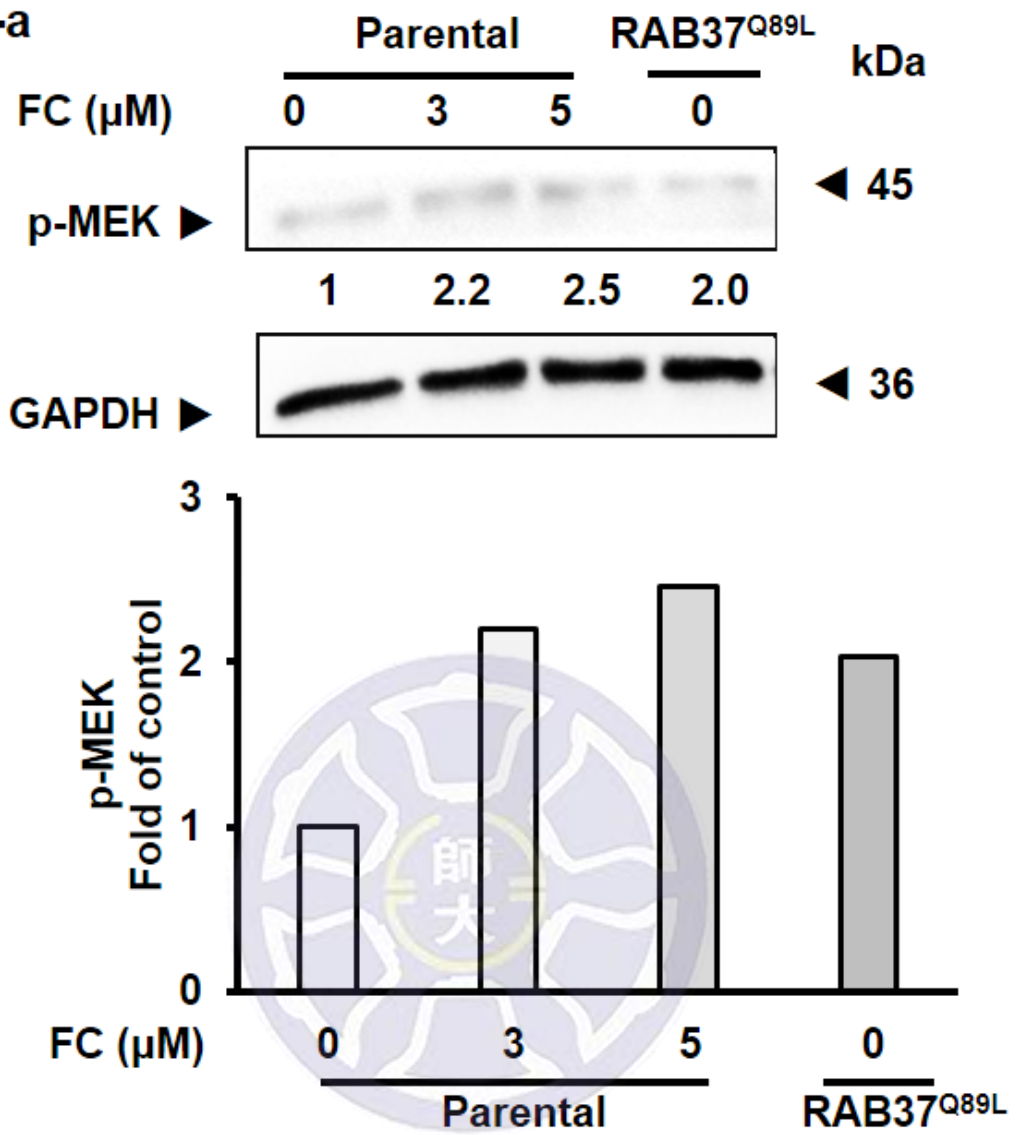
GAPDH was used as an internal control. There were no significant difference between four groups in fig. 7 (A-b), 7 (B-b) and 7 (C-b).

8A-a

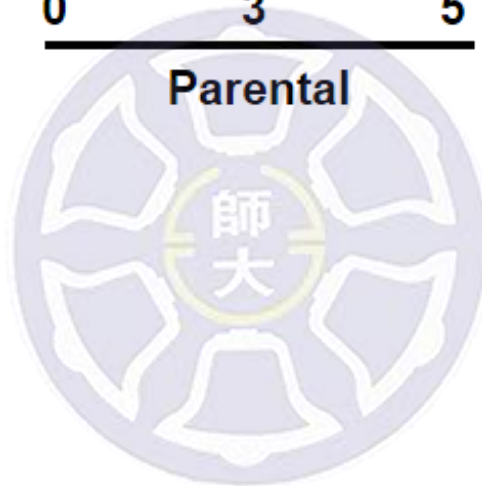
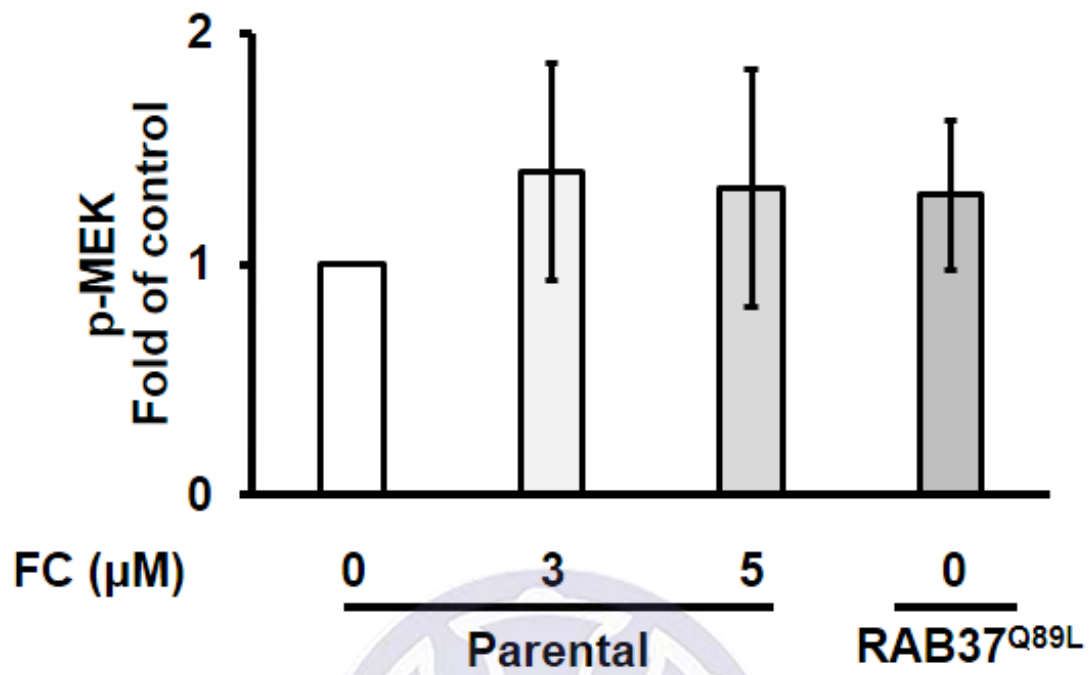




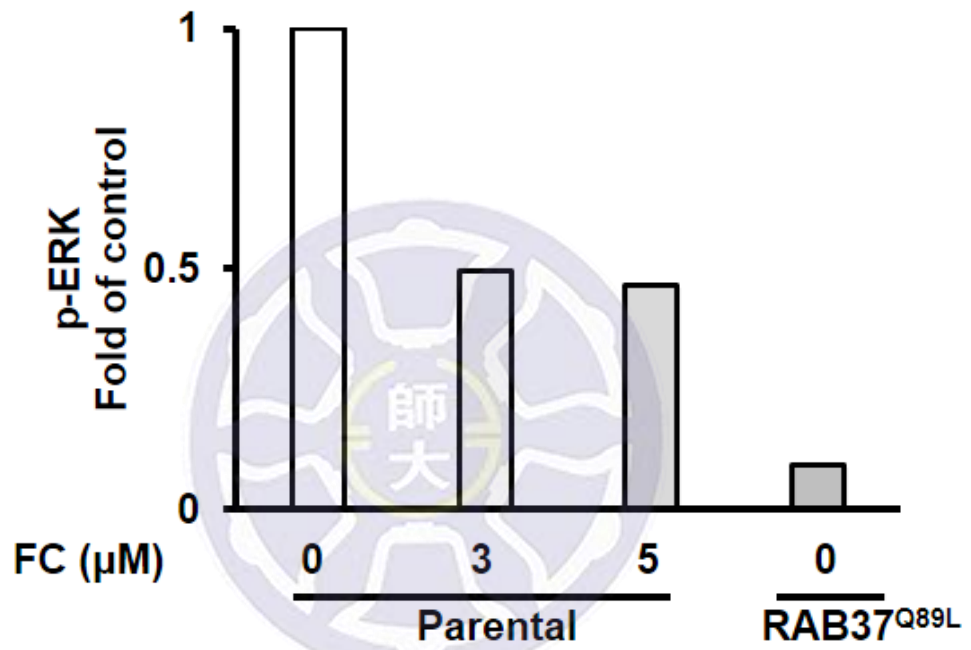
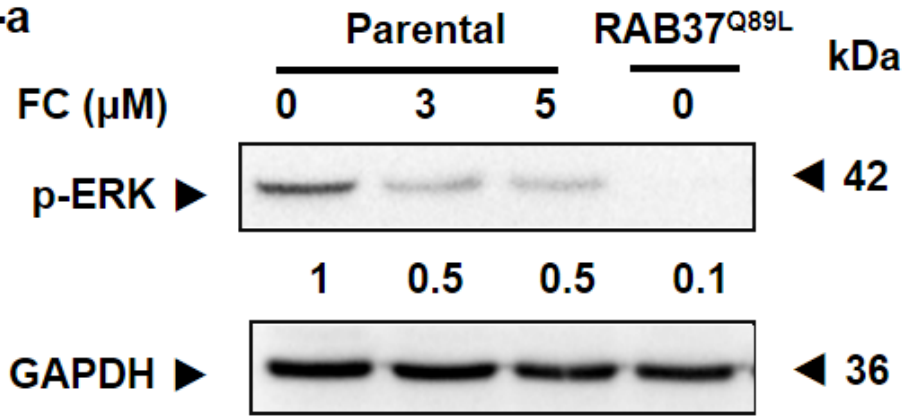
8B-a



8B-b



8C-a



8C-b

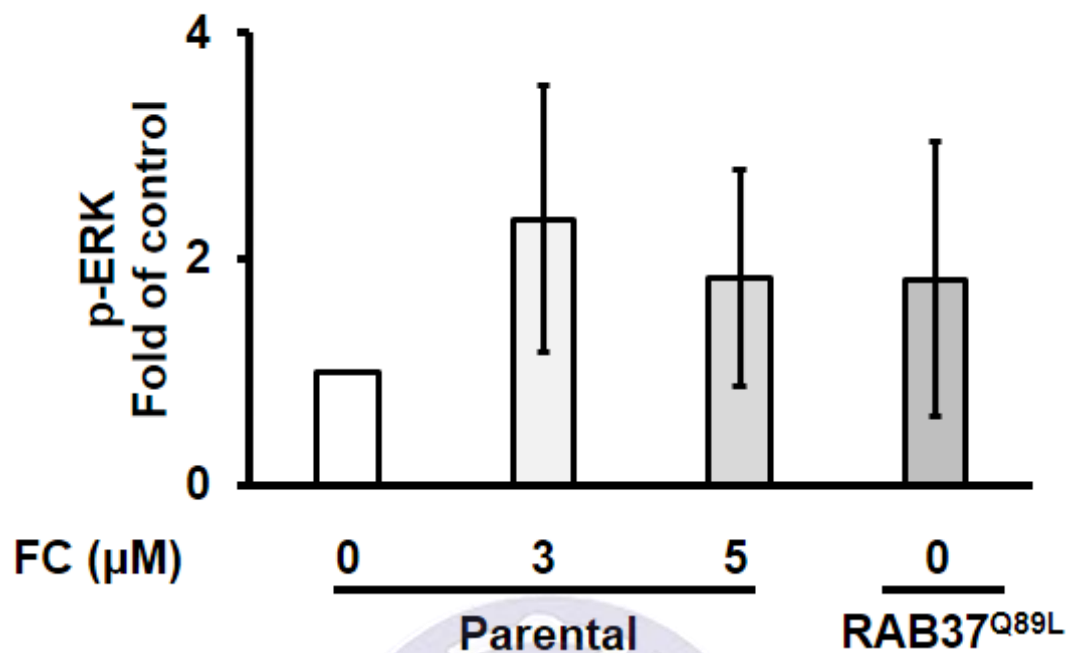
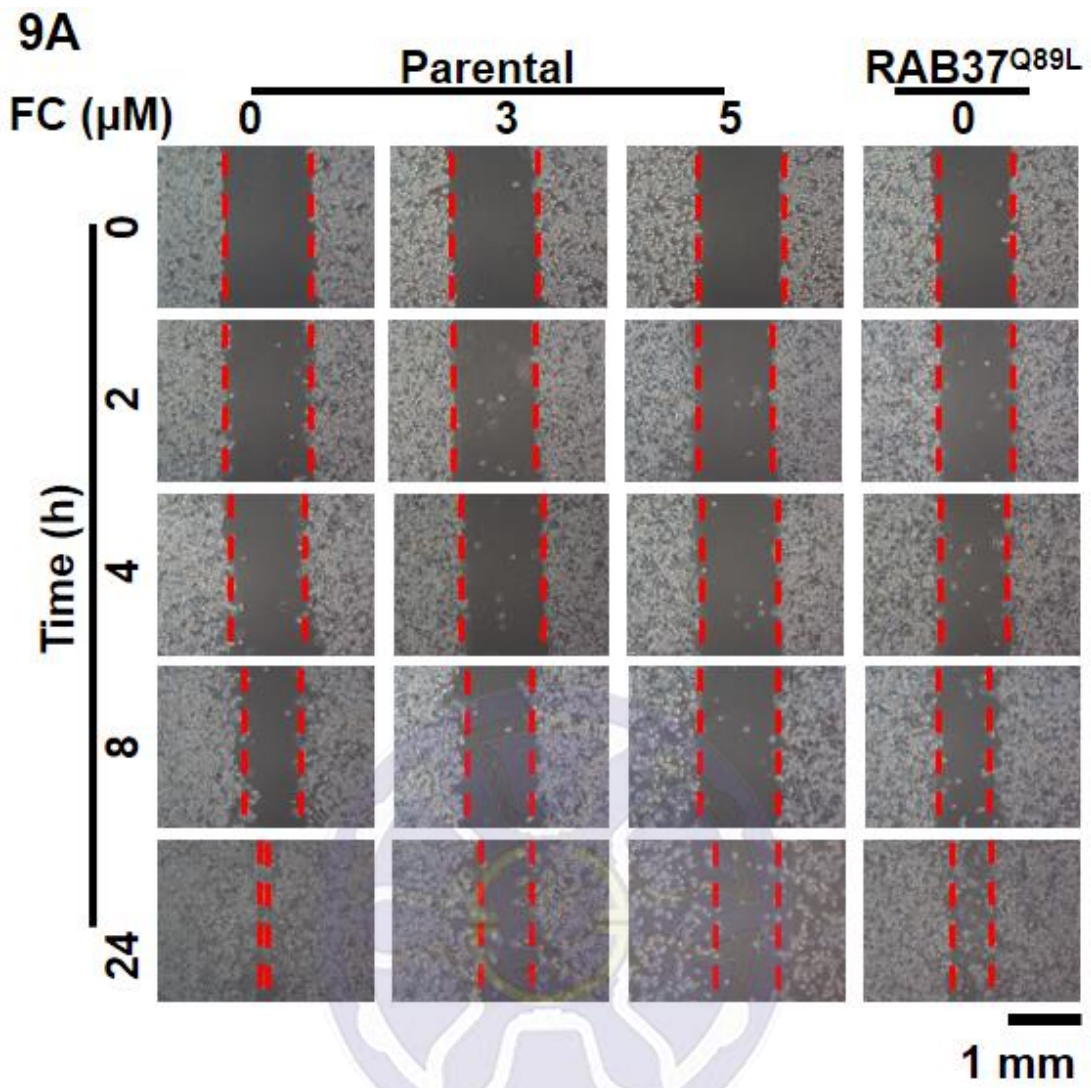
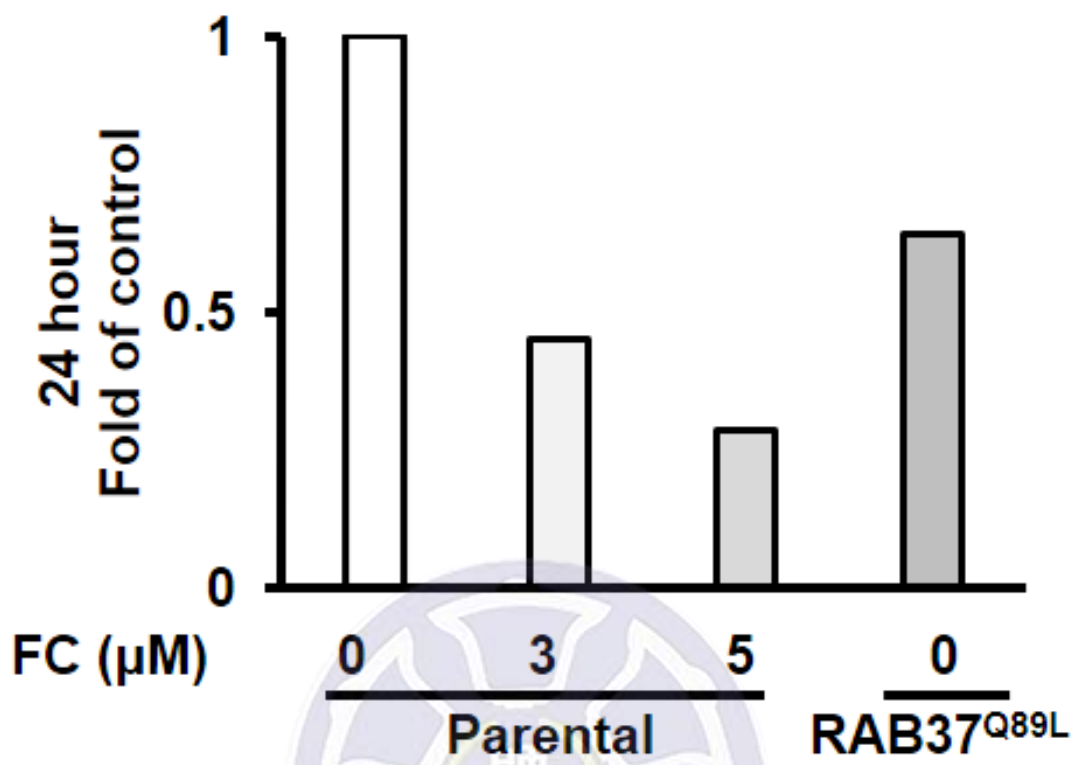


Fig. 8 (A-a) (A-b) (B-a) (B-b) (C-a) (C-b) Expression of Ras, p-MEK and p-ERK in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blot analysis using anti-Ras (A), anti-p-MEK (B) and anti-p-ERK (C) antibodies. GAPDH was used as an internal control. There were no significant difference between four groups in fig. 8 (A-b), 8 (B-b) and 8 (C-b).



9B-a



9B-b

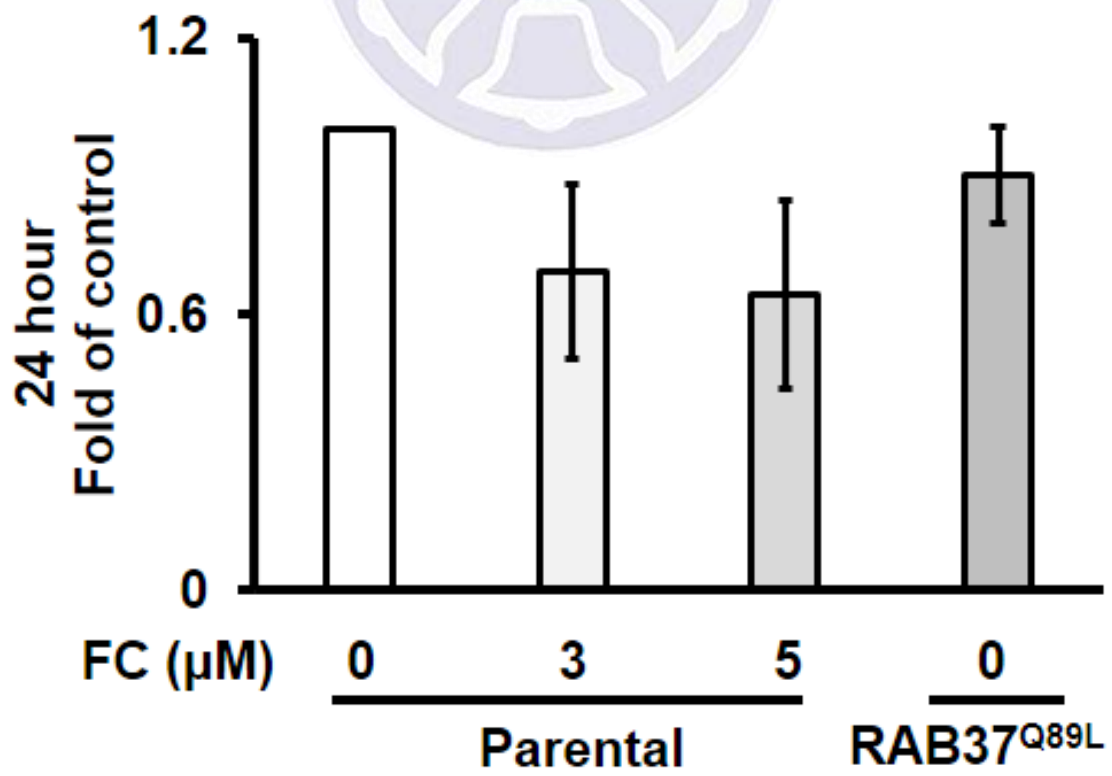
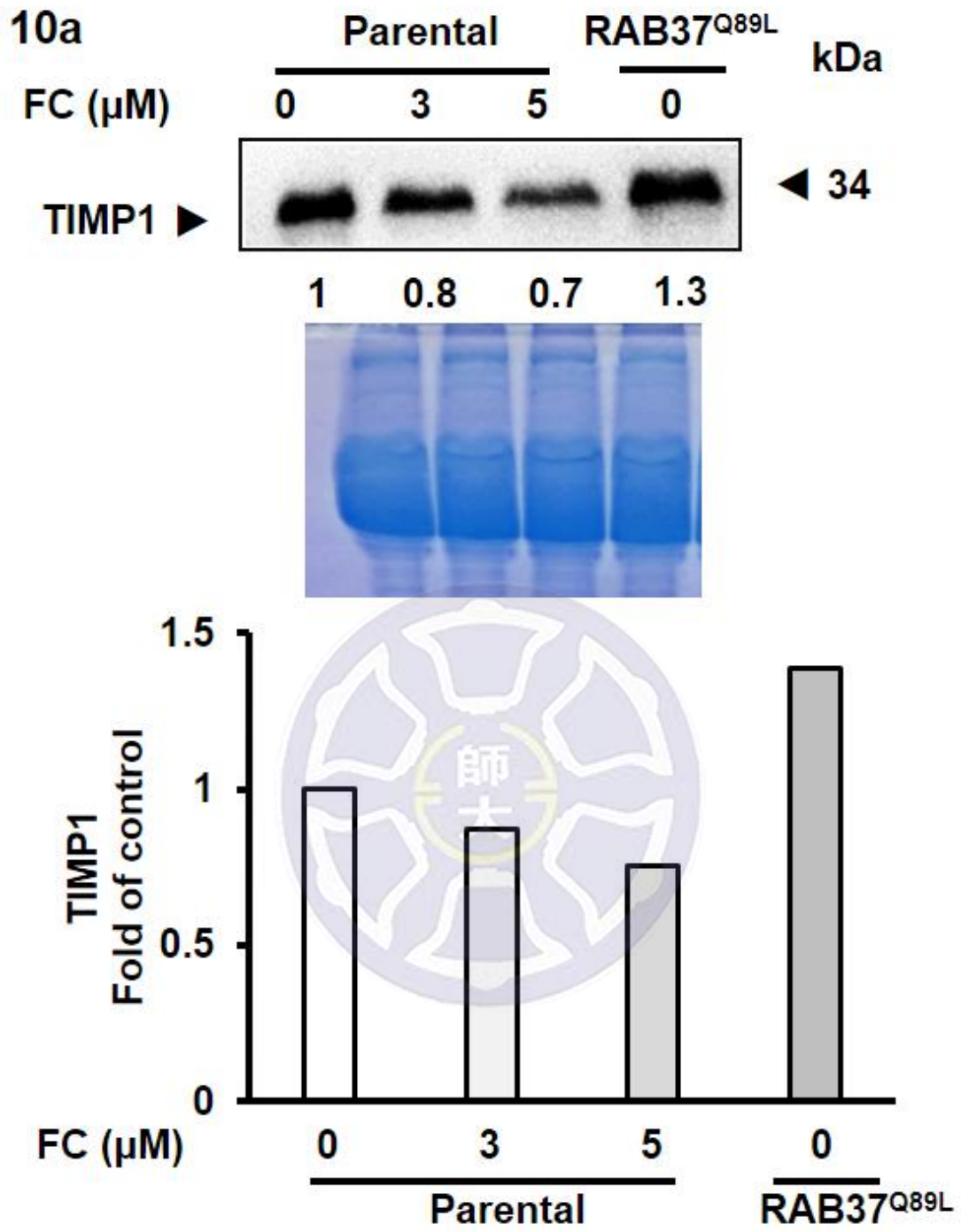


Fig. 9 (A) Representative images captured by ISCapture microscope of CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells in response to FC between 0 and 24 h from produced wounds. (B-a) (B-b) Expression of wound healing in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (3.5×10^4 cells / 70 μ l) were treated with FC for 2, 4, 8, and 24 h. There was no significant difference between four groups in fig. 9 (B-b).





10b

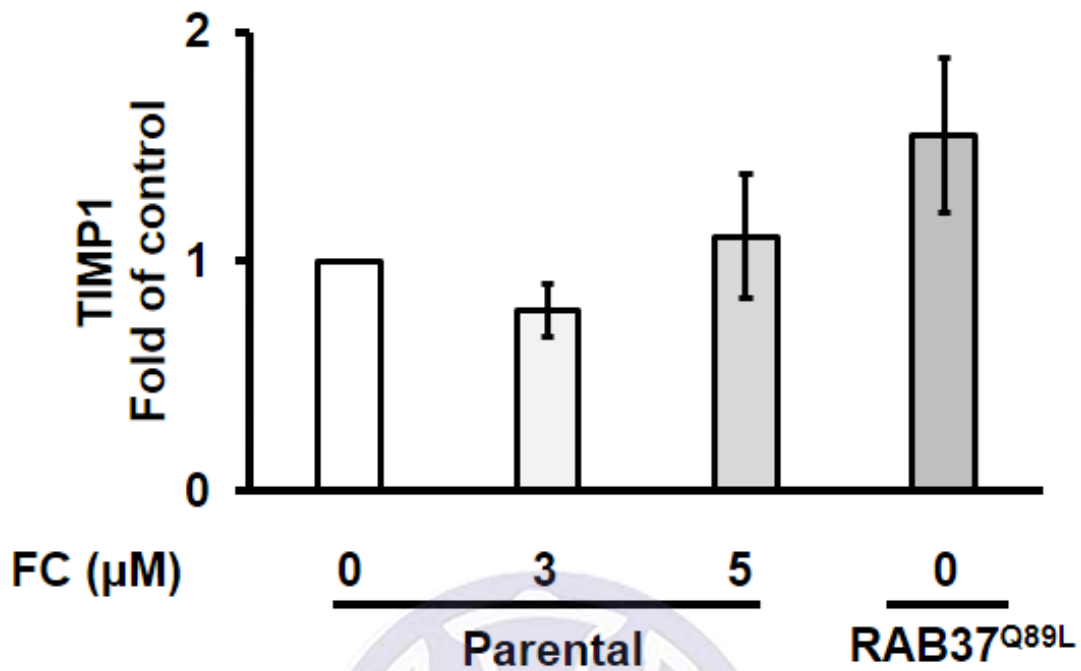


Fig. 10 (a) (b) Expression of TIMP1 in response to FC at 1 time and at triple repetition respectively.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell medium was harvested and subjected to Western blot analysis using anti-TIMP1 antibody. Gel dyed with Coomassie blue was used as an internal control. There was no significant difference between four groups in fig.

10 (b).

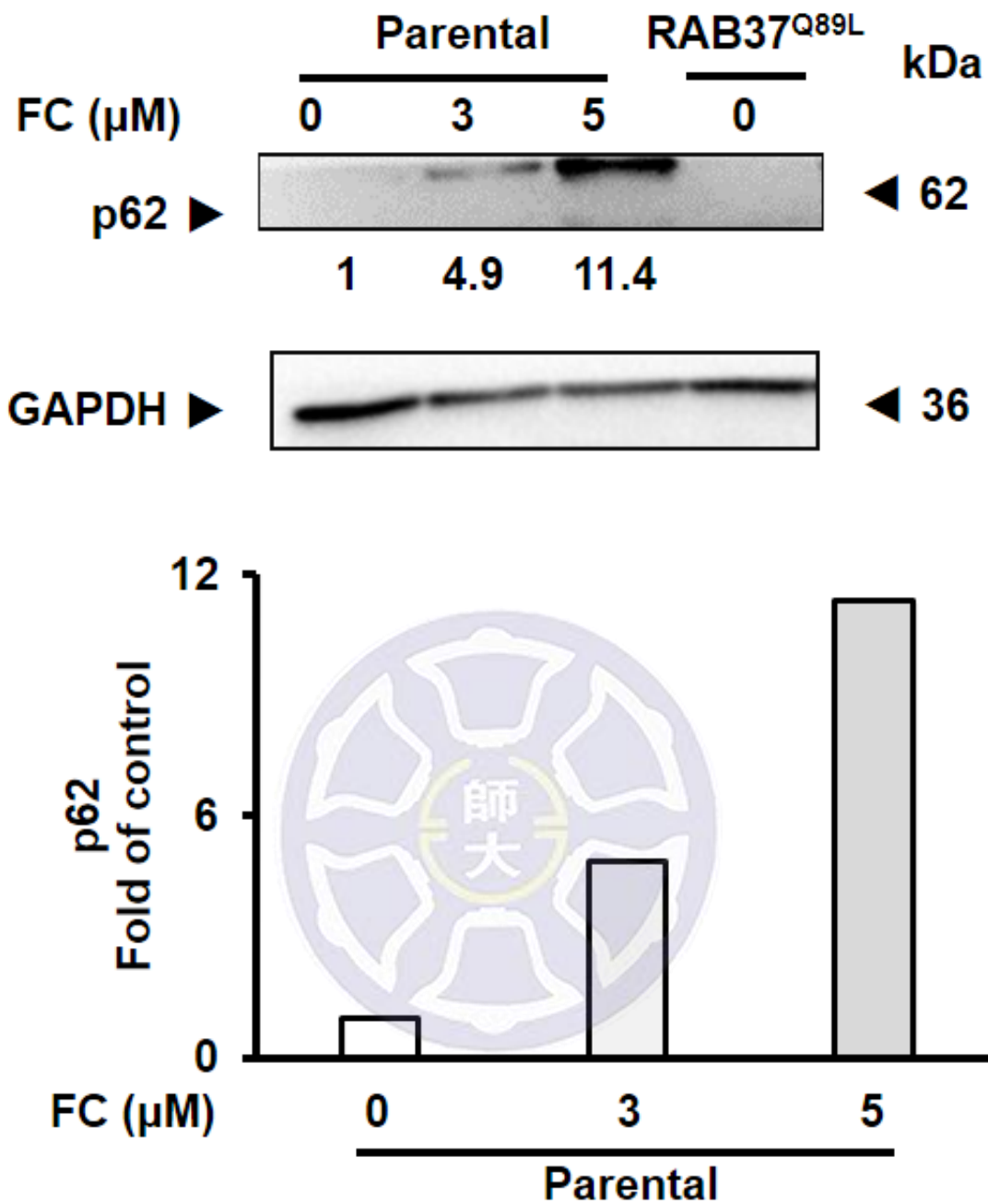


Fig. 11 Expression of p62 in response to FC.

CL1-5 Parental and RAB37^{Q89L} cells (2×10^6) were treated with FC for 24 h. CL1-5 Parental cell without treatment was control group. Total cell lysate was prepared and subjected to Western blot analysis using anti-p62 antibodies. GAPDH was used as an internal control. (N=1)

	N=1	N=1	N=3	N=3
	CL1-5 Parental cell treated with FC	CL1-5 RAB37 ^{Q89L} cell	CL1-5 Parental cell treated with FC	CL1-5 RAB37 ^{Q89L} cell
LC3-II	↑	↑	↑, p<0.05	○↑
Rab37	↓	↑	#↓, \$↑	§
ATG5-12	↓	↑	*↓	○↑
ATG7	↑	↓	*↑	○↓
Class III PI3K	-	↑	#↓	○↑
Beclin-1	↑	↑	*↑	↑, p<0.05
p-class I PI3K	↑	-	*↑	○↑
p-Akt	↓	-	*↓	○↓
p-mTOR	-	↑	*↑	○↑
Ras	↓	↓	*↑	○↓
p-MEK	↑	↑	*↑	○↑
p-ERK	↓	↓	*↑	○↑
Wound healing	↓	↓	*↓	○↓
TIMP1	↓	↑	#↓	○↑
p62	↑	-	§	§

#	0~3μM 有機會有統計差異
*	0~5μM 有機會有統計差異
\$	3~5μM 有機會有統計差異
○	有機會達統計差異
↑	表現量上升
↓	表現量下降
-	沒變
§	無法比較

Table 1 Summary of protein expression.