

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

第一名

052002

上皮細胞黏附分子（EpCAM）與 Dabrafenib
對未分化性甲狀腺癌（ATC）進程機制之探討

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 林柏辰 高二 劉人瑄	指導老師： 謝慧齡
---------------------------------	------------------

關鍵詞： 未分化性甲狀腺癌、上皮細胞黏附分子、
Dabrafenib

得獎感言

科展：充滿困頓與驚奇的學習之旅

在參加第64屆全國中小學科學展覽會的過程中，我們深刻體會到科學不僅僅是一個理論與實驗的結合，更是一場持久的探索與追尋。在這段旅程中，我們經歷了數次的實驗失敗，也重複了數次的修正與探索，終於逐漸找到了屬於我們的答案。每一次的突破，都是我們堅持不懈的結果，也是整個研究過程中最大的樂趣來源。

這次科展也讓我們更深刻地認識到科學研究的重要性，尤其是在癌症相關研究的領域。透過與專家們的交流，我們學到了如何在基礎研究與臨床應用間找到平衡，這讓我們感受到學習的力量與價值。也讓我們更加確立了自己未來要在生命科學領域深耕的目標，希望能夠通過科學研究，解答自身對於問科學世界無盡的好奇心，更期望為社會貢獻自己的一份力量。

對於未來想要參加科展的同學們，我們想說的是，科學之路上充滿挑戰，但每一個挑戰都是成長的機會。不要害怕犯錯，因為每一次失敗都是為了下一次成功鋪路。相信自己，保持對科學的好奇心，勇敢探索未知的領域。

感謝這次科展的機會，讓我們不僅收穫了知識，還認識了許多志同道合的朋友，這將會是人生中一段難忘的回憶。



這是我們操作流式細胞儀的照片，這些東西可以花上半個小時

摘要

上皮細胞黏附分子(EpCAM)與上皮細胞間黏附、信息傳導、增殖與分化等功能有密切關係，已被證實會在多種上皮癌細胞中大量表達，被視為一種可行的臨床標記。透過細胞群落、細胞存活率、細胞轉移與侵入試驗，觀察到 EpCAM 能增強未分化性甲狀腺癌 (ATC)的細胞增殖、生長、轉移與侵入能力。

此外實驗發現 dabrafenib 小分子抗癌藥物處理的 ATC，其細胞增殖、生長、轉移與侵入能力均有下降的趨勢。藉由西方墨點法發現，磷酸化 ERK 蛋白的表現量隨 dabrafenib 濃度的上升而逐步下降，顯示 dabrafenib 具有抑制 ATC 細胞訊息傳遞路徑中 ERK 蛋白磷酸化的效果，進而影響 ATC 的生長。因此若能進一步了解 EpCAM 和 dabrafenib 在癌細胞中的作用機轉，EpCAM 相關藥物與 dabrafenib 未來在臨床應用上，或許能為 ATC 患者提供另一種治療方式。

壹、前言

一、研究動機

惡性甲狀腺瘤 ATC (Anaplastic thyroid cancer) 約佔所有甲狀腺瘤的 1%~2%，極為罕見但死亡率高，其中位存活期 (median overall survival) 僅 3~7 個月，具有侵襲能力強、預後較差且轉移、發展快速等特點，臨床表現為快速增大的頸部腫塊，會局部擴散、壓迫鄰近結構，並有擴散至區域淋巴結和遠處部位的趨勢 (Ralhan et al., 2010)，不僅如此，截至目前都沒有能夠有效延長患者生存時間的治療方式。

上皮細胞黏附分子 (Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 常見於上皮組織和自上皮衍生的惡性腫瘤中，其與細胞黏附、增殖、分化、轉移有關 (Liang et al., 2018)，因此臨床持續在開發一些針對上皮細胞癌的小分子藥物，其中也包括了 BRAF 的小分子抑制劑 dabrafenib。

我們從文獻中可以發現 EpCAM 與上皮細胞的增殖與生長能力有密切關係。此外，細胞對小分子藥物的抗藥性也可能與 EpCAM 存在一定關聯，因此藉由細胞及分子角度剖析 EpCAM、dabrafenib 與 ATC 的交互作用以增加對其分子機制的了解，有望對臨床醫學治療的開發帶來幫助。

二、研究背景與文獻回顧

(一)、未分化性甲狀腺瘤 (Anaplastic thyroid cancer, ATC)

甲狀腺癌 (Thyroid cancer, TC) 是最常見的內分泌惡性腫瘤之一，佔所有癌症的 3-4%，全球每年約會新增 122,800 的確診案例 (Ralhan et al., 2010)。甲狀腺癌的亞型包括乳突性甲狀腺癌 (Papillary Thyroid Cancer, PTC)、濾泡性甲狀腺癌

(Follicular Thyroid Cancer, FTC)，和未分化性甲狀腺癌 (Anaplastic thyroid cancer, ATC)。PTC 和 FTC 被歸類為分化性甲狀腺癌，都起源於參與碘代謝的濾泡上皮甲狀腺細胞。ATC 約佔所有甲狀腺瘤的 1%~2%，極為罕見但死亡率高，其中位存活期 (median overall survival) 僅 3~7 個月。在以 EpEX，EpICD 和 β -catenin 蛋白針對不同類型甲狀腺癌的免疫組織化學分析後可發現，在 ATC 細胞中，EpCAM 信息傳遞高量發生，造成 EpEX 被裁切後在細胞膜表現量較低，且 EpICD、 β -catenin 都有

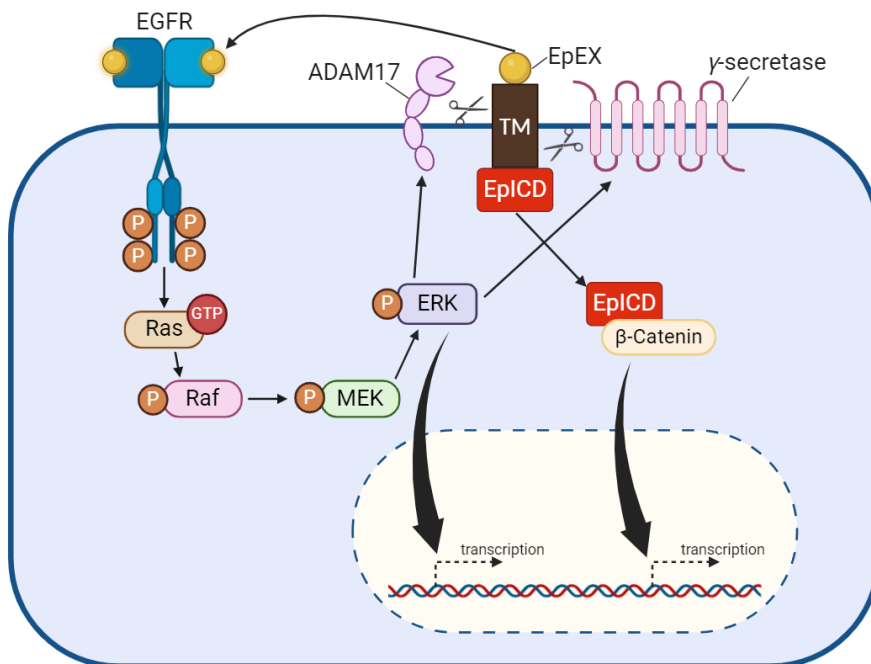
較高比例的人核現象，這也解釋了為何 ATC 相較其他類型的甲狀腺癌具有較差的預後 (Ralhan et al., 2010)。

(二)、上皮細胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule , EpCAM)

上皮細胞黏附分子(EpCAM)是一種穿膜醣蛋白，常見於上皮組織和自上皮衍生的惡性腫瘤中，受 A disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17)和 γ -secretase 切割後能夠分為 extracellular region (EpEX)、transmembrane domain(TM)與 intracellular domain (EpICD) 三個結構域，與細胞黏附、增殖、分化、轉移有關(Liang et al., 2018)。EpCAM 也被視為一種腫瘤標記，藉由免疫染色，能夠判定 EpEX、EpICD 等相關蛋白在特定位置的表達量，以比較不同癌症間侵襲能力的強弱差異(Liang et al., 2018)。

(三)、EpCAM extracellular domain (EpEX)

上皮細胞黏附分子的胞外結構域 (EpEX) 能夠和細胞膜上表皮生長因子受體 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 結合，活化下游 Mitogen-activated protein kinase (ERK)等蛋白質的信號傳導。而 ERK 又能促進 γ -secretase 的切割作用，從而促進癌細胞的發展(圖一)(Liang et al., 2018)。



圖一、EpCAM 相關的信號傳遞路徑

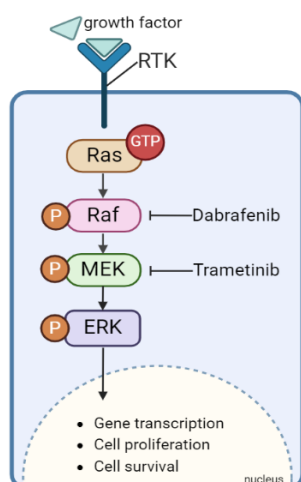
(參考自:Liang K. H., 2018 ; Chen et al., 2020)(自行繪製)

(四)、V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)

BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)是大鼠肉瘤基因 (rat sarcoma gene, *RAS*)的關鍵分子，可活化多種途徑，例如誘導細胞生長和細胞增殖的 ERK(extracellular signal-regulated kinases, 又稱 MAPK, Mitogen-activated protein kinases) 及 MEK(Mitogen-activated protein kinase kinase)兩種蛋白，進而傳遞影響細胞生長的訊息(Banzi et al., 2016)。從過去的文獻可以知道，非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)、大腸癌(colon cancer)、黑色素瘤(Melanoma)等多種上皮癌症具有較高比例的 BRAF V600E 的突變，此外，20%到 50%的 ATC 也含有突變，且被認為與 ATC 的低分化性及較差的預後有關(Subbiah et al., 2018)。

(五)、Dabrafenib

Dabrafenib 是小分子的 BRAF 抑制劑，作用在生長因子與受體酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTK)所引發的細胞訊息傳遞路徑中，最終會造成磷酸化的 ERK 被抑制，藉此阻斷下游的基因轉錄，從而阻止細胞增生，有助於癌症的治療。目前已被證實 dabrafenib 的單獨使用對於 BRAF V600E 突變的黑色素瘤及非小細胞肺癌病患具有治療效果(Subbiah et al., 2018)。不僅如此，非小細胞肺癌的治療中也可使用 dabrafenib 與 trametinib(一種 MEK 的抑制劑)同步進行藥物治療(Khunger et al., 2018)，是一種極具臨床潛力的癌症藥物(圖二)，因此我們希望能了解 dabrafenib 和 EpCAM 對於未分化性甲狀腺癌(ATC)的影響。



圖二、Dabrafenib 和 trametinib 在非小細胞肺癌中的作用機制

BRAF 和 MEK 抑制劑結合在 MAPK 路徑中產生兩個不同的抑制點，阻斷癌細胞癌游訊號傳導並抑制其生長(參考自: Khunger, 2018)(自行繪製)。

三、研究目的

- (一) 探討 EpCAM 對 ATC 甲狀腺癌細胞增殖與生長能力的影響
- (二) 探討 EpCAM 對 ATC 甲狀腺癌細胞轉移與侵入能力的影響
- (三) 探討小分子藥物 dabrafenib 對 ATC 甲狀腺癌細胞的影響

貳、研究設備及器材

一、甲狀腺瘤細胞株

T178 細胞株(Ct、OE)、T245 細胞株(Ct、OE)、T264 細胞株(WT、KO)

備註說明:Ct：Control (未做基因處理不表現 EpCAM 的細胞株)

OE：EpCAM overexpression (EpCAM 過量表達)

WT：Wildtype (野生型,未做基因處理少量表達 EpCAM 的細胞株)

KO：EpCAM knockout (EpCAM 剔除)

二、試劑及設備

(一) 西方墨點法 (Western-blotting)

1. ddH₂O
2. 30% acrylamide
3. 1.5M Tris(pH8.8)
4. 10% SDS
5. 10% APS(ammonium persulfate)
6. TEMED
7. 1.0M Tris(pH6.8)
8. Running buffer
 - (1) ddH₂O
 - (2) 0.025 M Tris
 - (3) 0.192 M Glycine
 - (4) 0.1% SDS

9. Transfer buffer
 - (1) ddH₂O
 - (2) 0.025 M Tris
 - (3) 0.192 M Glycine
 - (4) 10% MeOH
10. Blocking buffer
 - (1) PBST
 - (2) 3%BSA
11. PBST
 - (1) 0.025 M Tris,
 - (2) 0.137 M Sodium chloride
 - (3) 0.0027 M Potassium chloride
 - (4) 0.1% Tween- 20
12. First antibody
 - (1) Rabbit anti-EpCAM
 - (2) Rabbit anti- β tubulin
13. Second antibody
 - (1) Horseradish Peroxidase (HRP)
14. ECL reagent
 - (1) 魯米諾(Luminol)
 - (2) 過氧化氫(H₂O₂)
15. PVDF membrane
16. 電泳(SDS-PAGE)槽
17. 轉漬(gel transfer)槽
18. 冷光呈相分析系統

(二) 細胞存活率試驗(Cell viability assay)

1. Growth medium
 - (1) Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
 - (2) 1% Penicillin
 - (3) 1X MEM Non-Essential Amino Acids(MEM NEAA)
 - (4) 1X Sodium Pyruvate
 - (5) 10% Fetal Bovine Serum(FBS)
2. WST-1 solution(WST-1 : medium=1 : 10)
3. 96 well plate
4. 多功能微量盤分析儀

(三) 細胞群落試驗(Colony formation assay)

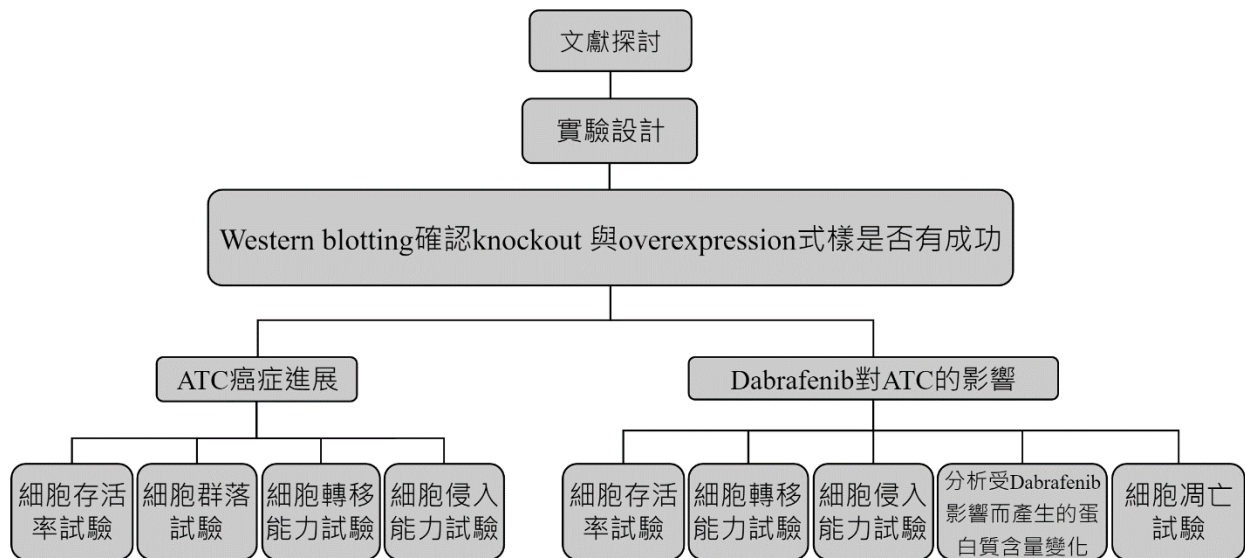
1. Growth medium
2. 6 well plate
3. Crystal Violet 染劑

(四) 細胞轉移與侵入能力試驗(Cell migration and invasion assay)

1. 10%FBS medium(Growth medium)
2. no FBS(0%) medium
 - (1) Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
 - (2) 1% Penicillin
 - (3) 1X MEM Non-Essential Amino Acids(MEM NEAA)
 - (4) 1X Sodium Pyruvate
3. Crystal Violet 染劑
4. 24 well
5. Transwell
6. IC capture

參、研究過程或方法

一、研究流程圖



二、實驗方法

(一) 細胞培養

1. 細胞株：未分化性甲狀腺癌細胞 T178、T245 與 T264。
2. 培養基：PMBI，內含 10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1% penicillin、MEM Non-Essential Amino Acids (MEM NEAA)、Sodium Pyruvate。
3. 培養條件:37°C, 5%CO₂。

(二) 細胞計數與繼代

1. 當細胞覆蓋 8 成的培養皿(10cm well)時，先抽出 well 內舊的 medium。
2. 加入 5mL 的 PBS 以清洗細胞表面。
3. 抽除 PBS，加入 1mL 的 trypsin，並放入培養箱 3~5 分鐘待其反應。
4. 加入 1mL 的 medium 終止 trypsin 的反應。
5. 後續即可進行分盤，或以 trypan blue 染色並利用自動計數器計數。

(三) 蛋白質萃取

1. 將細胞移出培養箱後以加入 lysis buffer。
2. 將細胞刮下裝入 eppendorf 中。

3. 將離心機預冷至 4°C。
4. 以 13000g 離心 20 分鐘。
5. 上清液即為蛋白質溶液，儲存於 -20°C 中保存。

(四) 西方墨點法(Western blotting)

1. 配製 10% Resolving Gels (每片 5mL)
 - (1) ddH₂O
 - (2) 1.5M Tris(pH8.8)
 - (3) 30% acrylamide
 - (4) 10% SDS
 - (5) 10% APS
 - (6) TEMED
2. 配製 4% Stacking Gels (每片 3mL)
 - (1) ddH₂O
 - (2) 1M Tris(pH6.8)
 - (3) 30 % acrylamide
 - (4) 10 % SDS
 - (5) 10 % APS
 - (6) TEMED
3. 拔除齒梳並置入電泳槽，倒入 running buffer。
4. 將待測定之 sample 注入樣品槽內，以 100V 電泳 90 分鐘。
5. 以負極到正極的順序將海綿、兩張圖畫紙、Resolving Gels、PVDF membrane、兩張圖畫紙、海綿放置於轉漬槽中。
6. 加入 Transfer buffer，將轉漬槽放至 4°C 冰箱，以 90V 轉漬 90 分鐘。
7. 將 PVDF 以 blocking buffer 進行 blocking，放在室溫下震盪作用 1 小時。
8. 加入一級抗體，放於 4°C 震盪作用隔夜。
9. 以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。

10. 加入二級抗體，在室溫震盪 1 小時。
11. 以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。
12. PVDF 均勻淋上 ECL substrate solution，用冷光呈相分析系統拍攝照片。

(五) 細胞存活率試驗(Cell viability assay)

1. 取兩個 96 孔盤。
2. 每個 well 加入 1×10^4 顆細胞，分別培養 24、48 小時。
3. 培養時間到後吸除 96 well 內上清液。
4. 加入 100 μ L 的 WST-1，於培養箱靜置 1 小時。
5. 以 OD 450 nm 測量其吸光度。

(六) 細胞群落試驗(Colony formation assay)

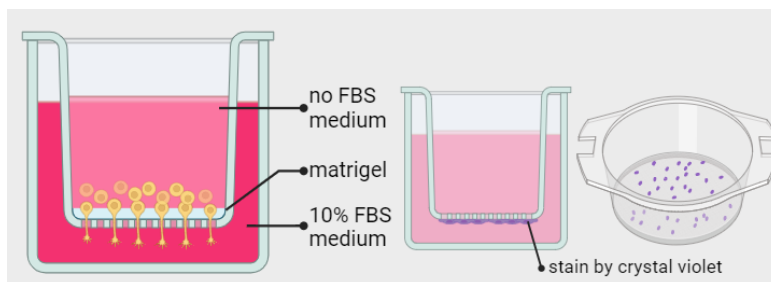
1. 於六孔盤中加入 5×10^3 顆細胞。
2. 於培養箱中靜置一周。
3. 時間到後吸除 6 well 內上清液。
4. 每個 well 內加入 1 mL 的 Crystal Violet 染劑，反應約 15~20 分鐘。
5. 吸除染劑後以 ddH₂O 清洗，晾乾後即可拍照記錄結果。

(七) 細胞轉移與侵入能力試驗(Cell migration and invasion assay)

如圖三，轉移侵入測試中我們會使用到兩種培養盤，位於內部且裝有無血清培養基(no FBS medium)的稱為 transwell，其底部具有半透膜因此能使細胞穿越到達另外一側。癌細胞具有轉移至富含營養處的特性，因此當我們將細胞培養在 transwell 內時，細胞便會通過半透膜到達外側，再針對外側細胞進行染色，我們便能比較不同細胞的轉移能力。

1. 將 Matrigel 自 -20°C 冰箱取出，放置於 4°C 解凍。
2. 將 10 μ L Matrigel 與 90 μ L no FBS medium 混合。
3. 加入 transwell 中，放入 24 孔盤於 37°C 培養箱靜置 30 分鐘。
(migration assay 不必進行上述步驟)
4. 於 24 孔盤內加入 750 μ L 10% FBS medium。

- transwell 內加入 450 μ L no FBS medium 與 2×10^5 顆細胞。
- 確認無氣泡後放如培養箱隔夜。
- 吸除 medium1 再以棉花棒沾取 PBS 擦拭 transwell 內部。
- 於 tranwell 內加入 500 μ L Crystal Violet 染劑，置於室溫反應 20 分鐘。
- 於 ddH₂O 中清洗 transwell，室溫晾乾後以 IC capture 拍照。

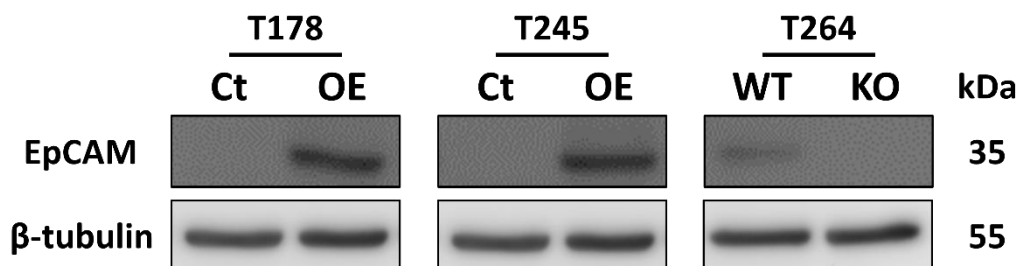


圖三、細胞轉移與侵入能力試驗之裝置(自行繪製)

肆、研究結果

一、以西方墨點法確認針對甲狀腺癌細胞(ATC)的特殊處理是否成功

在進入後續實驗前，需要確認 EpCAM overexpression 與 knockout 的甲狀腺癌細胞株是否有確實過量表達與剔除 EpCAM，因此我們先以西方墨點法測定 EpCAM 的表現狀態。首先，從圖四 β -tubulin 表現量相近的狀態，顯示每個分析樣本中的蛋白質含量大致上是相等的。其次，在 T178、T245 甲狀腺癌細胞株中 EpCAM 過量表現(OE)的樣本中，其 EpCAM 的含量明顯多於未做基因處理且不表現 EpCAM 的對照組(Ct)，如此即可確認該細胞有成功過量表達 EpCAM。最後，在 T264 甲狀腺癌細胞株中，未做基因處理且少量表達 EpCAM 的野生型(WT)癌細胞顯示出少量的 EpCAM 表達，而 EpCAM 剔除(KO)的樣本不具有 EpCAM 的表現，即可確認 EpCAM 的剔除處理也是成功的。



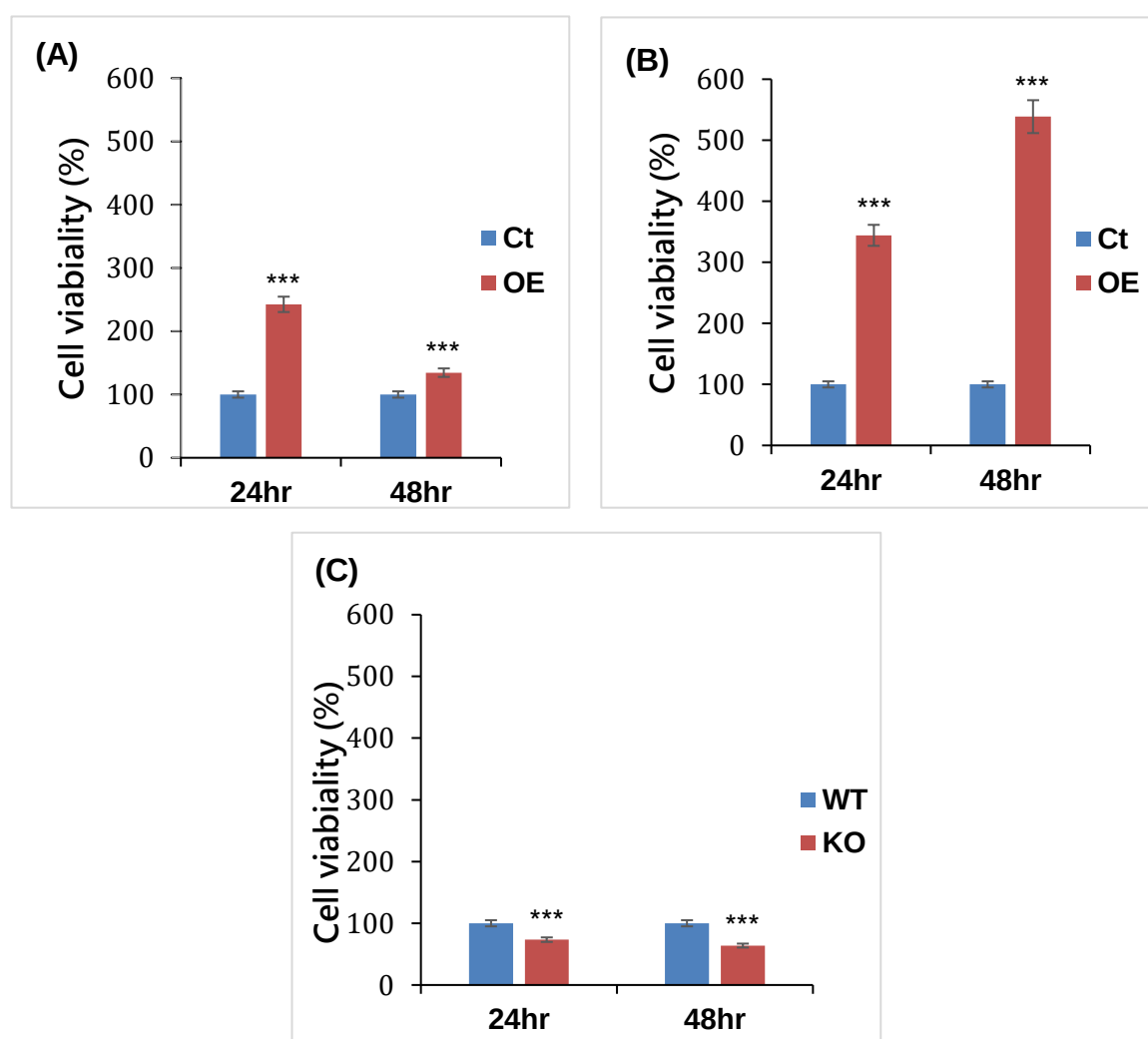
圖四、以西方墨點法確認針對甲狀腺癌細胞(ATC)的特殊處理結果

Ct 為對照組，OE 為 EpCAM 過量表現組，WT 為野生癌細胞組，KO 為 EpCAM 剔除組(照片為作者自行拍攝)

二、觀察 EpCAM 對 ATC 癌症進程的影響

(一) EpCAM 對甲狀腺癌細胞(ATC)存活率的影響

確認 EpCAM 的過量表達或剔除在以上三個細胞株皆成功後，以細胞存活率試驗來了解 EpCAM 的有無是否會對甲狀腺癌細胞的生長能力造成影響。圖五(A)(B)顯示，無論是在 T178 或 T245 細胞株，進行過量表達 EpCAM 處理的 ATC 細胞有較高的吸光值，顯示具有過量表現 EpCAM 的 ATC 細胞的存活率明顯高於對照組。然而，在圖五(C) EpCAM 剔除的 ATC 細胞中，其細胞存活率明顯低於野生型癌細胞。由此可知，EpCAM 過量表現能提升 ATC 細胞的存活率。



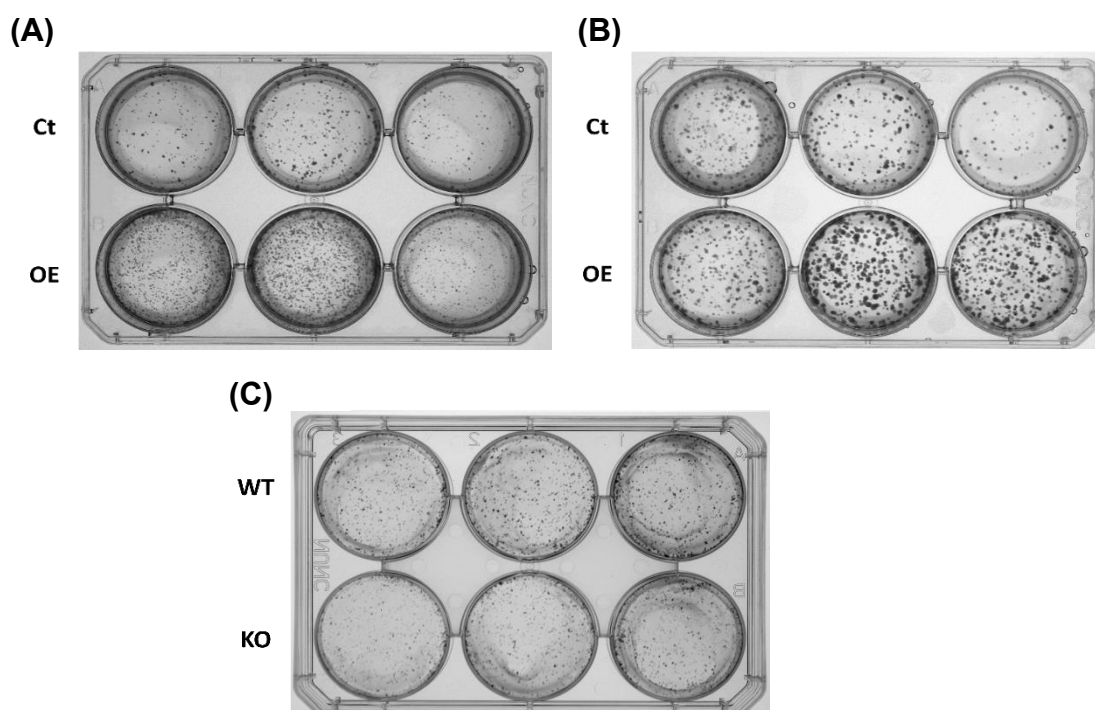
圖五、EpCAM 的有無對三種甲狀腺癌細胞株存活率(cell viability)的影響結果

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct：對照組，OE：EpCAM 過量表現組，WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM 剔除組。(A)(B)圖中以 Ct 組、(C)圖中以 WT 組數值為 100%，並使用 T-test 分析。*** $p < 0.001$ 。(n=8)

(二) 細胞群落試驗(Colony formation assay)

環境中細胞數較少時，該環境對細胞屬於艱困環境，此時細胞會傾向以形成群落的方式生長。圖六為培養盤在白光下的照片，可顯示無論是 T178 或 T245 ATC 細胞株(圖六(A)(B))，過量表達 EpCAM 的細胞皆有較密集的群落生長情形，圖六(C)則顯示了 EpCAM 剔除的 T264 ATC 細胞株形成細胞群落的狀態較差。因此可以推斷，EpCAM 的存在會增強 ATC 細胞群落生長的能力。



圖六、白光下 EpCAM 過量表現與 EpCAM 剔除之 ATC 細胞群落生長狀況

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組

WT:野生型癌細胞組，KO:EpCAM 剔除組

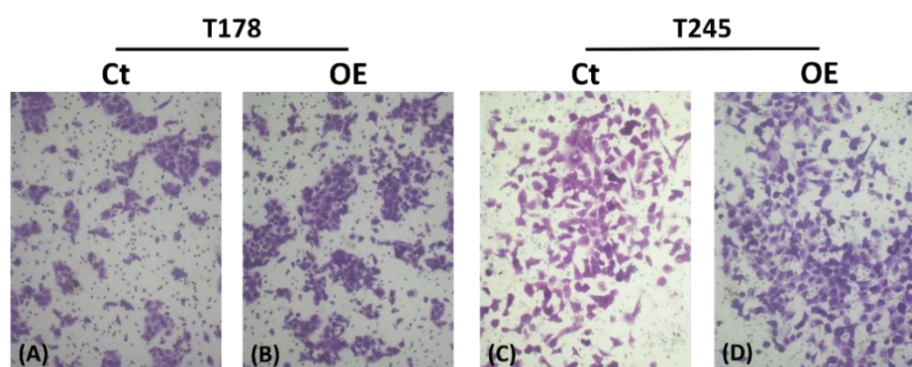
(照片為作者自行拍攝)

(三) EpCAM 對甲狀腺癌細胞(ATC)轉移與侵入能力的影響

癌細胞的轉移與侵入一直是癌症治療中十分棘手的問題之一，其分子機制也受到高度關注。將 ATC 培養於如圖三的裝置中，經顯微照相，並以 0.5%SDS 回溶於結晶紫後測量其吸光值。若吸光值越高，代表癌細胞轉移與侵入能力越強。

1. 轉移能力測試(Cell migration assay)

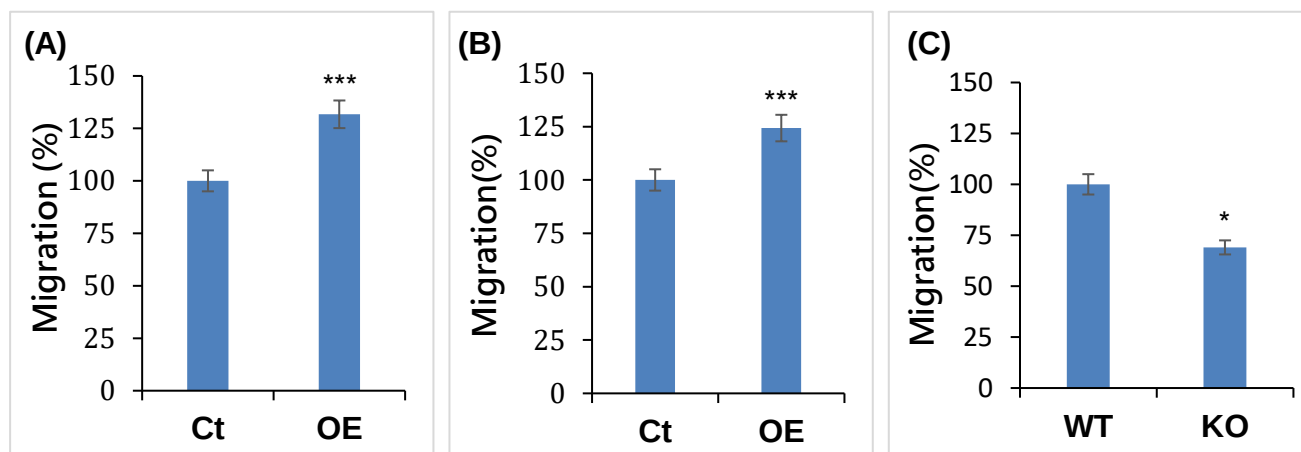
圖七的顯微照片中顯示出，T178 與 T245 ATC 細胞中，EpCAM 過量表現(OE)的組別，穿過半透膜的細胞數量較對照組(Ct)多。且經由吸光值量測定後，發現無論是 T178 或 T245 細胞株，過量表達 EpCAM 的細胞在轉移試驗的吸光值較高(圖八(A)(B))，反觀 EpCAM 剔除組(KO)其吸光值較野生型癌細胞(WT)低(圖八(C))，代表 EpCAM 能提升 ATC 細胞的轉移能力。



圖七、ATC 細胞經細胞轉移能力試驗後的顯微照相圖

(A)(B) T178 ATC 細胞株、(C)(D) T245 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組(照片為作者自行拍攝)



圖八、ATC 細胞轉移能力試驗(Migration assay)

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組。

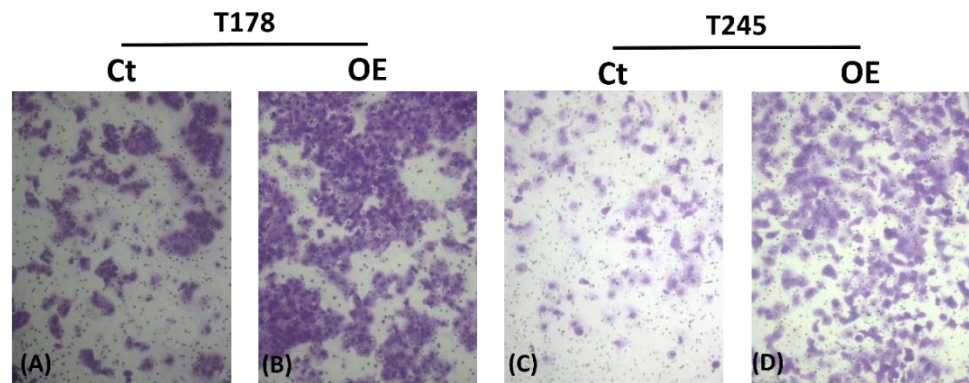
WT:野生型癌細胞組，KO:EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以 Ct 或 WT 組數值為 100%，並使用 T-test 分析。

*** $p < 0.001$ ，* $p < 0.05$ 。(n=3)

2. 侵入能力測試(Cell invasion assay)

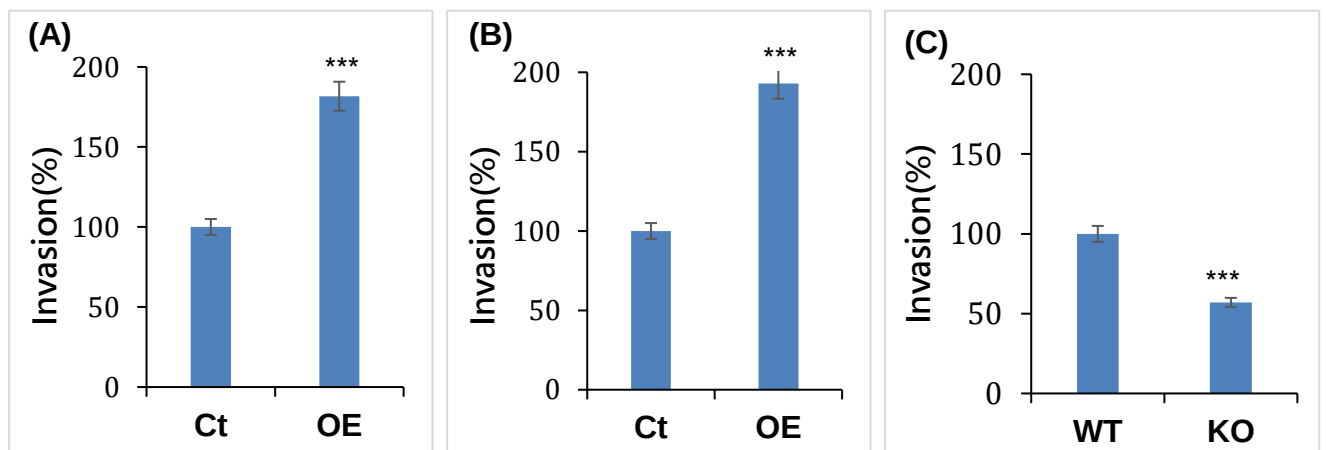
圖九的顯微照片中顯示出，T178 與 T245 ATC 細胞中，EpCAM 過量表現(OE)的 ATC 穿過 matrigel 的細胞數量明顯較對照組(Ct)多，且經由吸光值量測定後，無論是 T178 或 T245 細胞株，EpCAM 過量表現的 ATC 細胞在侵入能力試驗的吸光值較高(圖十(A)(B))，而 EpCAM 剔除組(KO)其吸光值較野生型癌細胞(WT)低(圖十(C))，代表 EpCAM 能夠提升 ATC 細胞的侵入能力。



圖九、ATC 細胞經細胞侵入能力試驗後的顯微照相圖

(A)(B) T178 ATC 細胞株、(C)(D) T245 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組(照片為作者自行拍攝)



圖十、ATC 細胞侵入能力試驗(Invasion assay)

(A) T178 ATC 細胞株、(B) T245 ATC 細胞株、(C) T264 ATC 細胞株

Ct:對照組，OE: EpCAM 過量表現組。

WT:野生型癌細胞組，KO:EpCAM 剔除組。

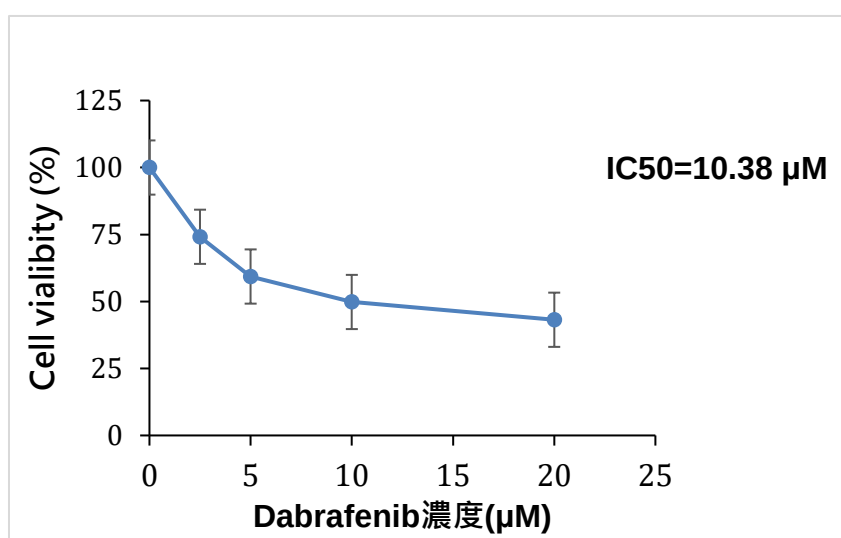
圖中統計數據以 Ct 或 WT 組數值為 100%，並使用 T-test 分析。

*** $p < 0.001$ 。(n=3)

三、觀察 Dabrafenib 對 ATC 的影響

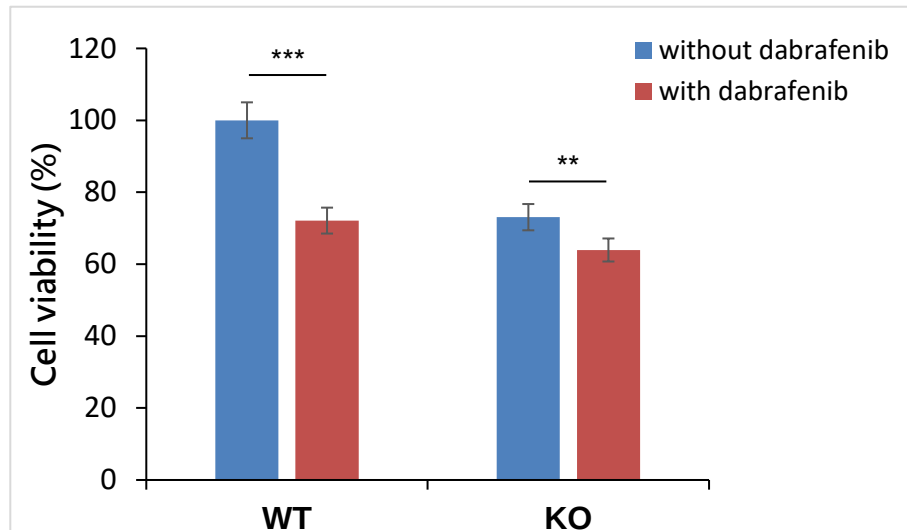
(一) Dabrafenib 對甲狀腺癌細胞(ATC)存活率的影響

在進入後續的藥物試驗前，我們以野生型(WT)細胞株作為實驗對象，分別以 0、2.5、5、10、20 μM 的 dabrafenib 處理三天，再透過細胞存活率試驗計算 dabrafenib 對 ATC 的 IC₅₀(半抑制濃度)，並以此濃度作為後續藥物測試實驗的濃度考量。結果如圖十一所示，dabrafenib 對 ATC 細胞的 IC₅₀ 約為 10.38 μM 。根據此實驗結果，後續藥物試驗會以 10 μM 作為測試濃度。



圖十一、不同濃度 Dabrafenib 對野生型 ATC 細胞(T264)處理 72 小時後之 IC₅₀ 測定 (n=5)

為瞭解對癌細胞可能具有療效的小分子藥物，dabrafenib，對 ATC 生長能力的影響情形，我們分別在培養液中加入 10 μM 的 dabrafenib 並培養 24 小時後，再進行細胞存活率試驗。結果如圖十二顯示，無論是野生癌細胞(WT)或 EpCAM 剔除組(KO)癌細胞，加入 dabrafenib 後皆有較低的吸光值，由此可知 dabrafenib 的確能夠有效降低 ATC 細胞的生長能力。



圖十二、Dabrafenib 對 ATC 細胞存活率之試驗結果

WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM 剔除組

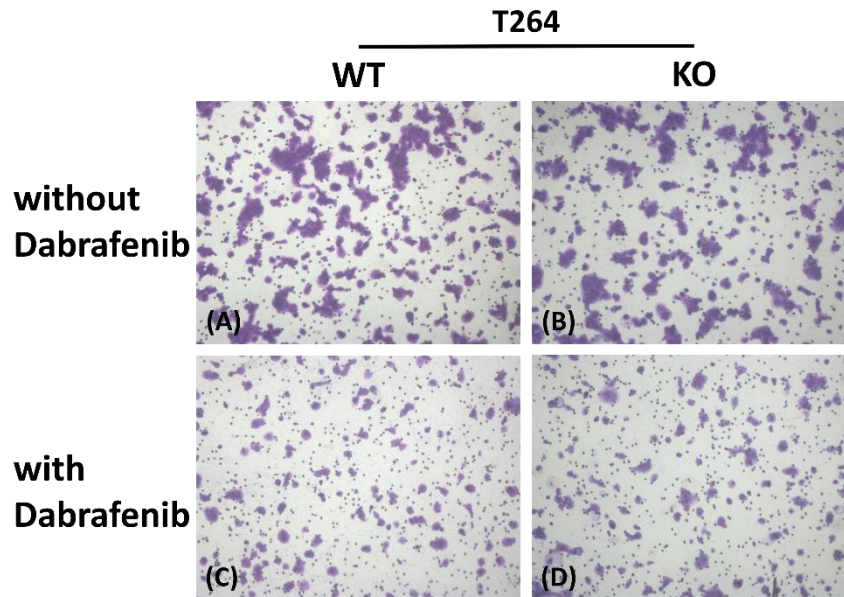
圖中統計數據以不含 dabrafenib 的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為 100%，並使用 T-test 分析。*** $p < 0.001$ ，** $p < 0.01$ 。(n=8)

(二) Dabrafenib 對細胞轉移與侵入能力的影響

Dabrafenib 是 BRAF 小分子抑制劑，會造成磷酸化的 ERK 被抑制，我們以 T264 為實驗細胞株，於培養液內加入了 $10\mu\text{M}$ 的 dabrafenib 並培養 24 小時後，分析 dabrafenib 對 ATC 細胞轉移與侵入能力的影響。

1. 轉移能力測試(Cell migration assay)

在轉移能力測試中，將染色細胞的結晶紫回溶於 SDS 並經吸光值定量測定後發現，無論是 WT 或 KO 細胞株，加入 dabrafenib 後的細胞轉移數量(圖十三(C)(D))或吸光值(圖十四)皆較未加藥物時低，由此可知 dabrafenib 能夠有效降低 T264 細胞的轉移能力。



圖十三、Dabrafenib 的有無經細胞轉移能力試驗後的 ATC 顯微照相圖

(A)無 Dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

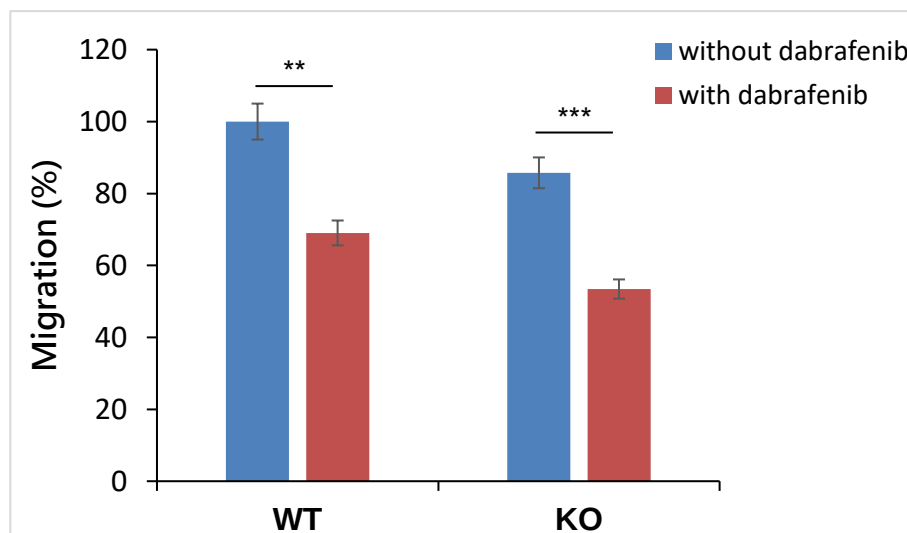
(B)無 Dabrafenib 處理的 T264 ATC EpCAM 剔除組

(C)10 μ M Dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

(D)10 μ M Dabrafenib 處理的 T245 ATC EpCAM 剔除組

WT:野生型癌細胞，KO: EpCAM 剔除組

(照片為作者自行拍攝)



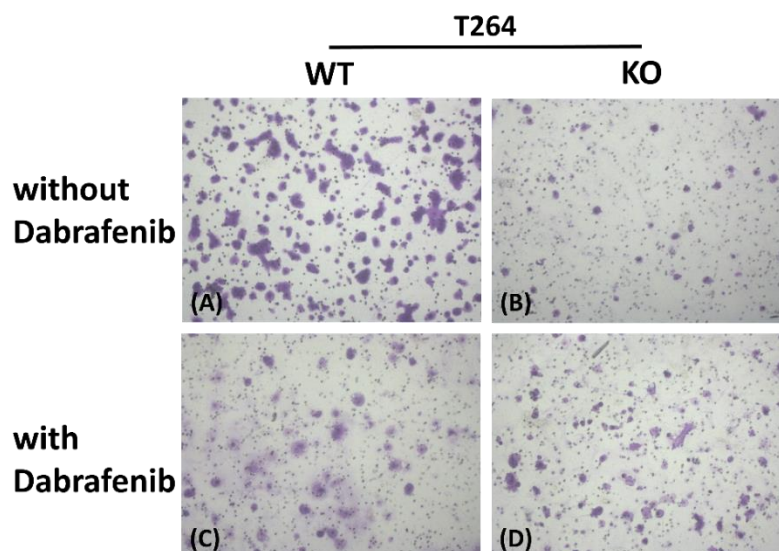
圖十四、Dabrafenib 對 ATC 細胞轉移能力試驗結果

WT:野生型癌細胞，KO: EpCAM 剔除組

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為 100%，並使用 T-test 分析。*** $p < 0.001$ ，** $p < 0.01$ 。(n=3)

2. 侵入能力測試(Cell invasion assay)

在癌細胞侵入能力測試中發現，無論是 WT 或 KO 細胞株，加入 dabrafenib 後的細胞侵入數量(圖十五(C)(D))或吸光值(圖十六)皆較未加藥物時低，由此可知 dabrafenib 能夠有效降低 T264 癌細胞的侵入能力。



圖十五、Dabrafenib 的有無經細胞侵入能力試驗後的 ATC 顯微照相圖

(A)無 Dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

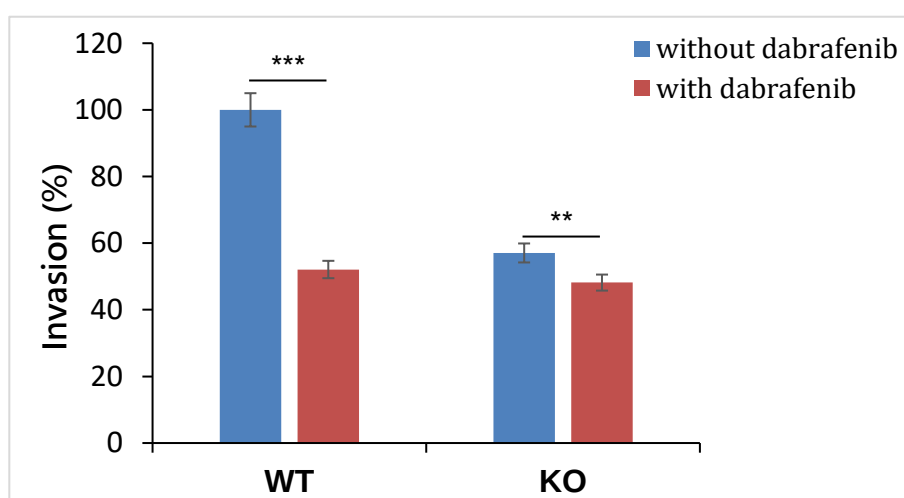
(B)無 Dabrafenib 處理的 T264 ATC EpCAM 剔除組

(C)10 μ M Dabrafenib 處理的 T264 ATC WT 組

(D)10 μ M Dabrafenib 處理的 T245 ATC EpCAM 剔除組

WT:野生型癌細胞，KO: EpCAM 剔除組

(照片為作者自行拍攝)



圖十六、Dabrafenib 對 ATC 細胞侵入能力試驗結果

WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

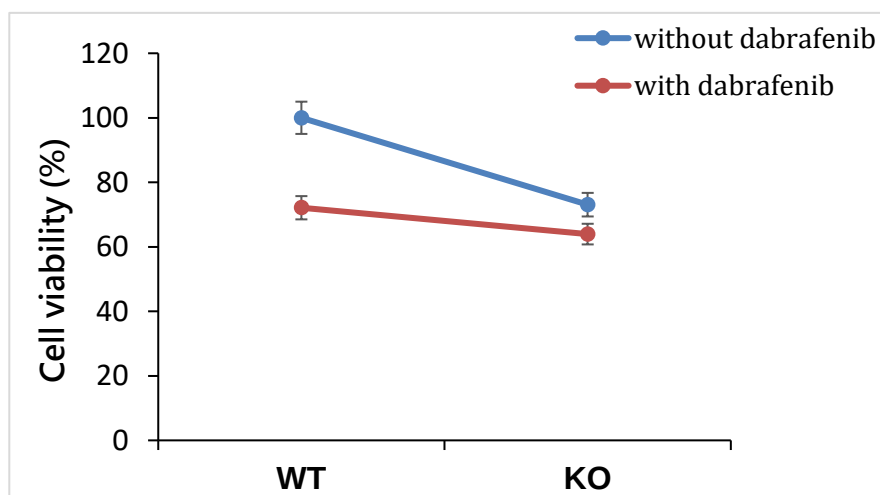
圖中統計數據以不含 dabrafenib 的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為 100%，並使用 T-test 分析。*** $p < 0.001$ ，** $p < 0.01$ ($n=3$)

(三) 分析 EpCAM 與 Dabrafenib 在細胞存活率、轉移與侵入能力中是否有交互關係

在了解 EpCAM 與 dabrafenib 對 ATC 的影響過後，我們希望能夠探討這兩項因素間是否具有交互關係。我們將各項實驗結果重新整理，在統計時皆以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值作為 100%，並利用雙因子變異數分析，以了解 EpCAM 與 dabrafenib 之間是否存在交互作用的關係。

1. 細胞存活率試驗(Cell viability assay)

藉由前述細胞存活率試驗的結果我們瞭解到 EpCAM 能夠增加 ATC 細胞的生長能力，dabrafenib 則會造成相反的影響。而從圖十七的統計結果當中我們發現，這兩項因素的 p 值為 0.000353664，代表兩者之間具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對 ATC 細胞生長能力的影響具有交互作用關係



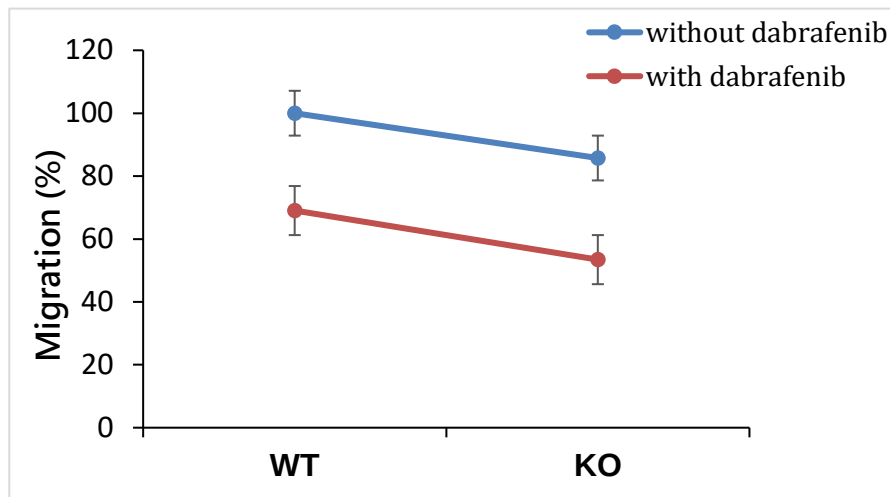
圖十七、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞存活率之交互作用關係圖

WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值為 100%，並使用雙因子變異數分析(Two way ANOVA) P 值=0.000353664。(n=8)

2. 轉移能力測試(Cell migration assay)

在轉移能力試驗中，從圖十八的統計結果我們發現，EpCAM 與 dabrafenib 兩項因素的 p 值為 0.65553698 代表兩者之間不具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對細胞轉移能力的影響不具有交互作用。



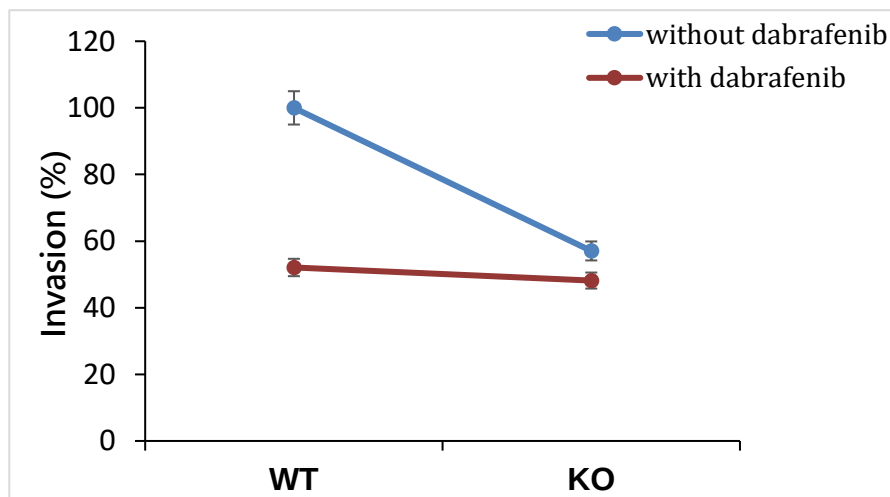
圖十八、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞轉移能力之交互作用關係圖

WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值為 100%，並使用雙因子變異數分析(Two way ANOVA) P 值=0.65553698。(n=3)

3. 侵入能力測試(Cell invasion assay)

在侵入能力試驗中，從圖十九的統計結果我們發現，EpCAM 與 dabrafenib 兩項因素的 p 值為 9.86755E-09 代表兩者之間具有顯著差異，顯示 EpCAM 與 dabrafenib 對細胞侵入能力的影響具有交互作用。



圖十九、Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 細胞侵入能力之交互作用關係圖

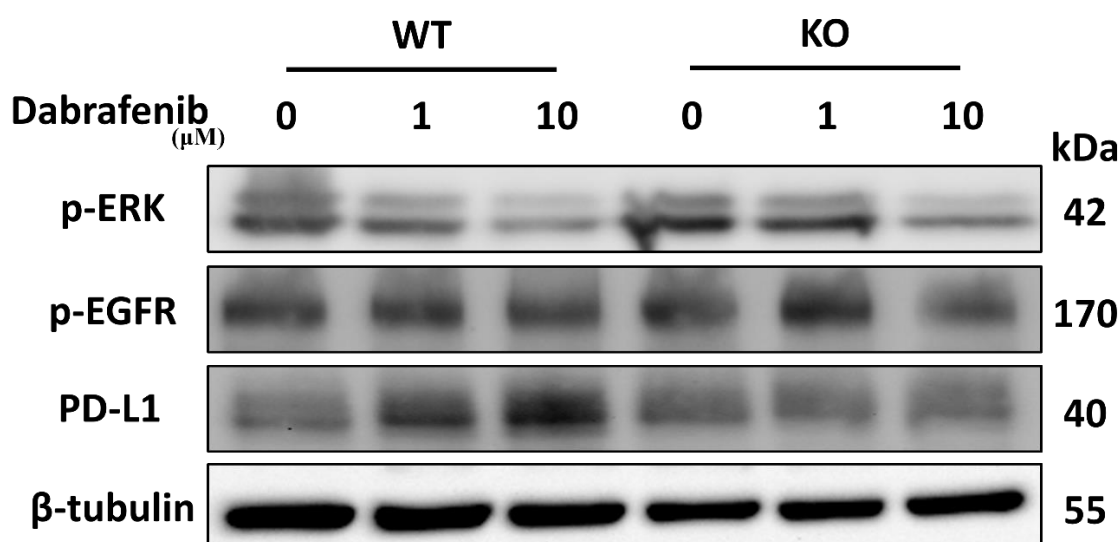
WT:野生型癌細胞 KO: EpCAM 剔除組。

圖中統計數據以不含 dabrafenib 的 WT 細胞株之吸光值數值為 100%，並使用雙因子變異數分析(Two way ANOVA) P 值=9.86755E-09。(n=3)

(四) 分析受 Dabrafenib 影響而產生的蛋白質表現量變化

在確認了 dabrafenib 能有效降低 ATC 的生長能力、細胞轉移與入侵能力後，將 ATC 細胞 T264 置於含有 0、1、10 μ M dabrafenib 的培養液中培養 6 小時，並透過西方墨點法確認具有影響癌細胞增生的 p-ERK、p-EGFR、PD-L1 蛋白的表現量變化，以了解甲狀腺癌細胞的各種癌化表徵是如何受到這些蛋白質含量變化的影響。

結果如圖二十所示，首先 β -tubulin 的狀態顯示，每個分析樣本中的蛋白質含量大致上是相等的。其次，在野生型(WT)與 EpCAM 剔除組(KO)癌細胞皆可發現，加入 dabrafenib 後，磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白的表現量隨藥物濃度的上升而逐步下降，推測 dabrafenib 在實驗中確實具有抑制癌細胞訊息傳遞路徑中 ERK 蛋白磷酸化的效果，且其抑制效果與藥物濃度呈現正相關，故透過 p-ERK 受 dabrafenib 抑制的作用而影響 ATC 癌細胞的生長。此外，在加入不同濃度 dabrafenib 後，野生型(WT)與 EpCAM 剔除組(KO)癌細胞的 EGFR 表現量並沒有明顯差異，證實 dabrafenib 對磷酸化 ERK(p-ERK)的抑制，並非透過 EGFR 所主導的機轉路徑所造成。最後，在野生型(WT)細胞中能夠發現，PD-L1 的表現量隨藥物濃度的上升而有不同程度的增加，而 EpCAM 剔除(KO)的癌細胞，在經由藥物處理過後，PD-L1 的表現量並無顯著變動。



圖二十、以西方墨點法確認不同濃度 Dabrafenib 對 T264 甲狀腺癌細胞(ATC)蛋白質表現量的影響(照片為作者自行拍攝)

WT 為野生型癌細胞組，KO 為 EpCAM 剔除組。

伍、討論

一、 EpCAM 對 ATC 甲狀腺癌細胞進程的影響

從過去的研究中我們了解到，EpCAM 能夠促進大腸直腸癌細胞的生長、增殖、轉移等能力，且此增強結果與 EpEX 所誘導的 EGFR 信息傳導路徑有主要關係，不僅如此 EpEX 可透過自泌(autocrine)與旁泌(paracrine)的方式而影響臨近細胞 (Liang et al., 2018; Chen et al., 2020)。對比我們的實驗，EpCAM 不只影響直腸癌細胞，對未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)同樣具有相似的影響效果。

從上述的結果我們確認了 EpCAM 能夠提升 ATC 細胞的轉移與侵入能力。然而在侵入試驗方法中，會在 transwell 內加入一層能模擬體內胞外基質環境的 matrigel 材料。若同時比較圖八與圖十可發現，侵入試驗中的 OE 與 Ct 組的差距值明顯大於轉移試驗，此一結果顯示，EpCAM 能更有效的提升細胞的侵入能力。因此我們相信，當處於相同的臨床生理環境下，EpCAM 表達量較高的癌細胞，藉由其高侵入的特性，可能會為病人帶來更高的威脅性。

綜合以上，在細胞實驗中，EpCAM 的高表現量能夠影響 ATC 細胞進程，推測在動物實驗中也會出現相似結果，因此我們相信 EpCAM 在臨床中能夠作為偵測 ATC 的篩檢分子之一。

二、 Dabrafenib 藥物試驗中細胞存活率對轉移與侵入試驗結果的影響

為了確認 ATC 細胞在轉移與侵入能力試驗當中，受 dabrafenib 處理後轉移及侵入能力的下降並非皆是由於細胞存活率下降所導致，我們期望轉移與侵入率皆低於相同藥物濃度下的細胞存活率，也就是在藥物的半抑制濃度處理下，兩者的比例低於 50%。但將圖十一、圖十四及圖十六進行比較後可以發現，在 10 μ M dabrafenib 處理下無論是轉移與侵入率皆高於 50%，比較圖十一及圖十二也能發現，無論是 WT 或是 KO 的細胞株，其細胞存活率皆未達到半抑制的成效。

我們認為這可能與藥物作用時間有關。在利用細胞存活率試驗計算半抑制濃度時，我們將 ATC 細胞在不同濃度 dabrafenib 中處理 72 小時，但後續的藥物試驗僅反應 24 小時，因此我們推測，較長的作用時間可能會提升 dabrafenib 對 ATC 細胞存活率的抑制效

果。而接著比較圖十二、圖十四及圖十六後可以發現，在同樣進行藥物處理 24 小時的條件下，ATC 細胞的轉移與侵入率低於細胞存活率，由此可知 dabrafenib 確實具有抑制細胞存活率、轉移與侵入能力的效果。

三、 EpCAM 與 Dabrafenib 在各項能力中是否有交互關係

近年內年小分子藥物在癌症治療的研究及臨床上的應用都取得了相當大的進展，然而在過去的研究中卻發現，相同的藥物在不同患者間不一定能夠帶來相似的治療效果。隨著癌症基因組定序的技術與資料庫發展成熟，學者發現同類型的癌細胞間依然具有數百至數千個基因表現的差異，這些差異也對臨床藥物的選擇帶來挑戰性(Hoelder et al.,2012)。面臨上述困難，為了能夠對病患帶來最佳的治療效果，利用設計藥物組合來達成精準醫療的目標也逐漸受到重視，在這樣的願景下，了解單一分子與藥物間的交互關係便相當重要 (Hoelder et al.,2012)。從圖十七到圖十九的結果我們發現，當 EpCAM 存在時，dabrafenib 對 ATC 細胞生長與侵入能力具有較好的抑制效果，可是這兩項因子在轉移能力卻沒有表現出明顯的交互關係，雖然我們仍不清楚造成這項差異的機制，但我們認為，若未分化性甲狀腺癌病患的癌細胞在臨床上具有較強的生長與侵入能力，dabrafenib 或許能夠帶來相當的治療效果。可是如果同時希望降低 ATC 的轉移風險，可能便須考量結合其他小分子藥物，藉以達成上述的目標，為病患帶來最佳的治療成效。

四、 小分子藥物 Dabrafenib 對 ATC 甲狀腺癌細胞的影響

(一) 加入 dabrafenib 後 ATC 細胞內蛋白質表現量的差異

1. 有關 p-EGFR 蛋白與 p-ERK 蛋白的探討

從圖二十中可知，加入 dabrafenib 後，野生型(WT)與 EpCAM 剔除組(KO)癌細胞的磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白表現量皆較未加藥時更低，推測 dabrafenib 在實驗中確實具有抑制癌細胞訊息傳遞路徑中 ERK 蛋白的效果而影響癌細胞的生長。在過去研究中利用 dabrafenib 對非小細胞肺癌進行治療時也能看到相同的趨勢。此外，加入 dabrafenib 後，變化量不大的 EGFR 蛋白，也證實了 dabrafenib 對磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白的抑制，並非透過 EGFR 所主導的機轉路徑所造成。

從過去針對甲狀腺癌的研究我們可以知道，ERK 的磷酸化主要可以透過 EGFR 與 BRAF 路徑來誘導，並對下游蛋白或基因造成相同且具有加成性的影響 (Notarangelo et al.,2017) 。此外，具有較高 BRAF 蛋白突變率的癌細胞與不具有此突變細胞相比，對於 BRAF 抑制劑的敏感性較高，臨床上能獲得較佳的治療效果 (Notarangelo et al.,2017) 。又未分化性甲狀腺癌(ATC)具有相當高比例的 BRAF V600E 突變(Subbiah et al., 2018)，因此我們相信，dabrafenib 等 BRAF 抑制劑對於此種癌症會有值得期待的治療成效。

2. 有關 PD-L1 蛋白的探討

Programmed cell death 1(PD-1) 是一種位於巨噬細胞和 T 細胞表面的糖蛋白。當 PD-1 與其配體 PD-1 ligand(PD-L1)結合時，可以抑制胞毒型 T 細胞的免疫反應，從而導致表達 PD-L1 的細胞具有一定程度的免疫耐受性 (Ahn et al.,2017) 。 PD-L1 存在於各類腫瘤細胞中，且其表現量與腫瘤微環境(Tumor microenvironment)中的多種致癌信號或干擾素- γ (Interferon- γ , IFN γ)的表達量有關。PD-L1 表達被發現與黑色素瘤、非小細胞肺癌及甲狀腺癌患者的復發風險增加和生存時間縮短有關(Ahn et al.,2017)。此外，在非小細胞肺癌、甲狀腺癌等多種上皮腫瘤中皆發現 PD-L1 的表達量與磷酸化 ERK 的存在呈現正相關性，且臨床治療上已有透過抑制磷酸化 ERK 的藥物治療非小細胞肺癌的案例(Brauner et al.,2016)，顯示該蛋白在癌症進程中的重要性。

從圖二十的結果可以發現，在野生型(WT)癌細胞中，經由 dabrafenib 處理後具有較高的 PD-L1 表現量，且隨 dabrafenib 的濃度上升而增加，而 EpCAM 剔除組(KO)的癌細胞在藥物處理後 PD-L1 的表現量卻沒有顯著變化。我們推測在逐步增加 dabrafenib 的處理下，ATC 細胞內可能有其他基因參與 PD-L1 的調控，使 PD-L1 的表現量維持恆定。同時微量表現 EpCAM 的野生型(WT)ATC 細胞 PD-L1 表現量有上升趨勢，顯示 EpCAM 有可能是增加 PD-L1 表現量的因素之一，甚至進而使 ATC 細胞對 dabrafenib 產生抗藥性。

3. 如何使西方墨點法結果更能聚焦在 Dabrafenib 的影響

在抽取蛋白質前我們會以含有 dabrafenib 的培養液培養細胞，在先前的實驗中，我們皆是使用含有 10%FBS 的培養液，但 FBS 當中具有多種不同生長因子，雖然從實驗中無法看出直接證據，但這些生長因子可能會影響蛋白質表現量與磷酸化，因此希望未來能選用不含 FBS 的培養液(no FBS medium)進行培養，以減少外部因子的干擾。

(二) Dabrafenib 與其他藥物的聯合使用

從文獻中我們發現，以 BRAF 抑制劑治療他種甲狀腺瘤時，可能會同步使用其他小分子藥物，這些藥物多半能夠抑制細胞傳訊路徑中 BRAF 外的其他蛋白質，並且已被證實比起單獨使用，使用聯合藥物治療的成效更佳，還能延緩病患出現抗藥性的時間，並降低藥物相關不良反應的發生率 (Notarangelo et al.,2017)。希望未來我們能設計系統化的測試方法，進行藥物種類與濃度對於聯合治療的可行性分析。

陸、結論

- 一、 EpCAM 能提升未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)的增殖、生長、轉移與侵入能力。
- 二、 Dabrafenib 能夠降低未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)的增殖、生長、轉移與侵入能力。
- 三、 Dabrafenib 與 EpCAM 對 ATC 癌細胞生長與侵入能力的影響具有交互關係。
- 四、 Dabrafenib 能抑制 ATC 癌細胞中的 p-ERK 蛋白的產生，以減緩癌細胞的生長。

未來對於此一研究的方向，可使用不含 FBS 的培養液培養細胞等方式，進行 ATC 細胞內蛋白質分析，以期能更好的聚焦於 dabrafenib 對 ATC 細胞的影響。此外，也可結合其他類型的小分子藥物進行聯合試驗，再與單獨使用的成效進行比較，並釐清兩種藥物的作用機轉，以做為藥物聯合使用可行性的判斷依據。

柒、參考文獻資料

- 一、Ahn S., Kim T.H., Kim S.W., Ki C.S., Jang H.W., Kim J.S., Kim J.H., Choe J.H., Shin J.H., Hahn S. Y., Oh Y.L., & Chung J. H. (2017). Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 24(2):97 – 106. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0421>
- 二、Banzi M., De Blasio, S., Lallas A., Longo C., Moscarella E., Alfano R., & Argenziano G. (2016). Dabrafenib: a new opportunity for the treatment of BRAF V600-positive melanoma. *OncoTargets and Therapy*. 9:2725-2733.
- 三、Brauner E., Gunda V., Borre V.P., Zurakowski D., Kim Y.S., Dennett K.V., Amin S., Freeman G.J., Parangi S. (2016). Combining BRAF inhibitor and anti PD-L1 antibody dramatically improves tumor regression and anti tumor immunity in an immunocompetent murine model of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget*. 7(13):17194-17211. doi: 10.18632/oncotarget.7839.
- 四、Chen, H. N., Liang, K. H., Lai, J. K., Lan, C. H., Liao, M. Y., Hung, S. H., Chuang, Y. T., Chen, K. C., Tsuei, W. W., & Wu, H. C. (2020). EpCAM Signaling Promotes Tumor Progression and Protein Stability of PD-L1 through the EGFR Pathway. *Cancer research*, 80(22), 5035 – 5050. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1264>
- 五、Hoelder S., Clarke, P. A., & Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Molecular oncology*, 6(2), 155-176.
- 六、Khunger A., Khunger M., & Velcheti V. (2018). Dabrafenib in combination with trametinib in the treatment of patients with BRAF V600-positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer: clinical evidence and experience. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 12: 1753466618767611. doi: 10.1177/1753466618767611.
- 七、Liang K.H., Tso H.C., Hung S. H., Kuan I.I., Lai J.K., Ke F.Y., et.al. (2018). Extracellular domain of EpCAM enhances tumor progression through EGFR signaling in colon cancer cells. *Cancer Letters*. 433:165-175. doi:10.1016/j.canlet.2018.06.040.

- 八、Notarangelo T., Sisinni L., Condelli V., & Landriscina M. (2017). Dual EGFR and BRAF blockade overcomes resistance to vemurafenib in BRAF mutated thyroid carcinoma cells. *Cancer Cell International*. 17(86):1-9. doi:10.1186/s12935-017-0457-z.
- 九、Rahhan R., Cao J., Lim T., MacMillan C., Freeman J.L., & Walfish P.G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer*. 10(1):1-11. doi:10.1186/1471-2407-10-331.
- 十、Subbiah V., Kreitman R.J., Wainberg Z.A., Cho J.Y., Schellens J.H., Soria J.C., et.al. (2018). Dabrafenib and trametinib treatment in patients with locally advanced or metastatic BRAF V600 – mutant anaplastic thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 36(1): 7-13. doi:10.1200/JCO.2017.73.6785.

【評語】 052002

本作品研究上皮細胞黏附分子(EpCAM)與Dabrafenib(小分子的 BRAF 抑制劑)對未分化性甲狀腺癌(ATC)進程機制之探討，Dabrafenib 作用在生長因子與受體酪胺酸激.(receptor tyrosine kinases, RTK)所引發的細胞訊息傳遞路徑中，最終會造成磷酸化的 ERK 被抑制，藉此阻斷下游的基因轉錄，從而阻止細胞增生，有助於癌症的治療。

研究目的

- (一) 探討 EpCAM 對 ATC 甲狀腺癌細胞增殖與生長能力的影響。
- (二) 探討 EpCAM 對 ATC 甲狀腺癌細胞轉移與侵入能力的影響。
- (三) 探討小分子藥物 dabrafenib 對 ATC 甲狀腺癌細胞的影響。

整體實驗設計合理，數據分析也明確，但對於實驗動機及背景交代並不夠清楚需加強說明，如：

1. 選用 dabrafenib 的原因？Dabrafenib 藥物已通過美國食品藥品監督管理局(FDA)驗證，做這些研究的目的為何？

2. 選擇 ATC 做為題目的原因？為何使用三種未分化性甲狀腺癌細胞 T178、T245 與 T264，他們的特色與差異性為何？dabrafenib 對於不同的基因型是否都有效呢？
3. 可以分析 EpCAM 在病人的檢體上的表現程度。
4. 當 EpCAM 存在時，dabrafenib 對 ATC 細胞生長與侵入能力具有較好的抑制效果，這個實驗很重要可能需要再重複幾次，或者用多一點細胞株來證實。

作品簡報

上皮細胞黏附分子(EpCAM)與Dabrafenib 對未分化性甲狀腺癌(ATC)進程機制之探討

摘要

上皮細胞黏附分子(EpCAM)與上皮細胞間黏附、信息傳導、增殖與分化等功能有密切關係，已被證實會在多種上皮癌細胞中大量表達，被視為一種可行的臨床標記。透過細胞群落、細胞存活率、細胞轉移與侵入試驗，觀察到EpCAM能增強未分化性甲狀腺癌(ATC)的細胞增殖、生長、轉移與侵入能力。此外實驗發現 Dabrafenib小分子抗癌藥物處理的ATC，其細胞增殖、生長、轉移與侵入能力均有下降的趨勢。藉由西方墨點法發現，磷酸化ERK蛋白的表現量隨Dabrafenib濃度的上升而逐步下降，顯示Dabrafenib具有抑制ATC細胞訊息傳遞路徑中ERK蛋白磷酸化的效果，進而影響ATC的生長。因此若能進一步了解EpCAM和Dabrafenib在癌細胞中的作用機轉，EpCAM相關藥物與Dabrafenib未來在臨床應用，有望為ATC患者提供另一種治療方式。

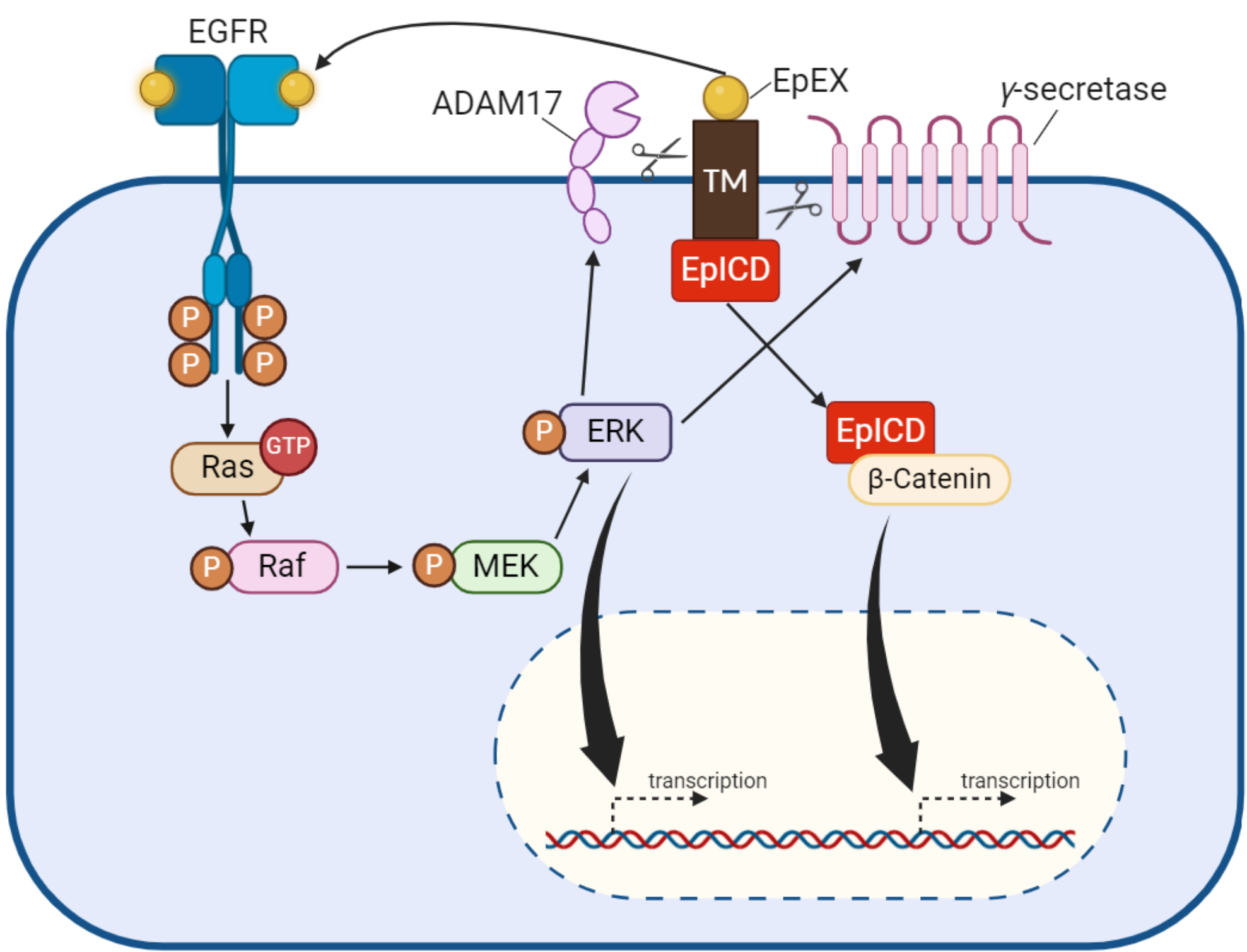
研究目的與過程

一、背景介紹

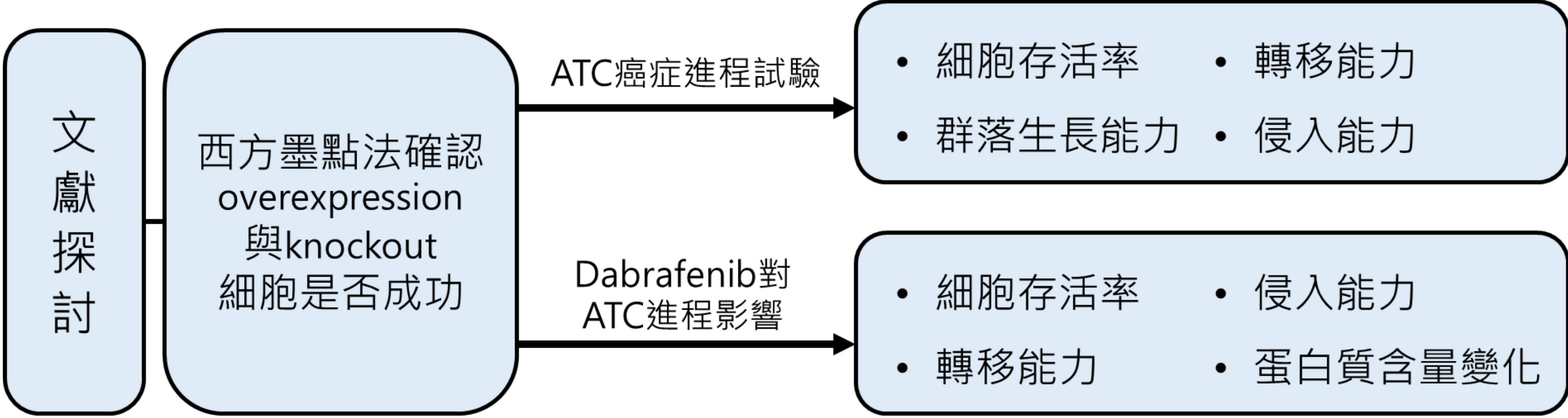
- (一) 未分化性甲狀腺癌(Anaplastic thyroid cancer , ATC)
- (二) 上皮細胞黏附因子
(Epithelial cell adhesion molecule , EpCAM)
 - 上皮腫瘤中有較高表現量
 - 促進癌細胞的進程
- (三) Dabrafenib
 - 阻斷癌細胞生長的小分子藥物
 - 造成磷酸化的ERK被抑制
 - 已用於黑色素瘤及非小細胞肺癌的治療

二、研究目的

- (一) 探討EpCAM對ATC增殖、生長、轉移與侵入能力的影響
- (二) 探討Dabrafenib對ATC存活率、轉移與侵入能力的影響
- (三) 分析受Dabrafenib影響後ATC所產生的蛋白質含量變化



圖一、EpCAM相關的信號傳遞路徑
EpCAM由EpEX、TM、EplCD組成
(參考自:Liang K. H., 2018 ; Chen et al., 2020)
(圖片為作者自行繪製)

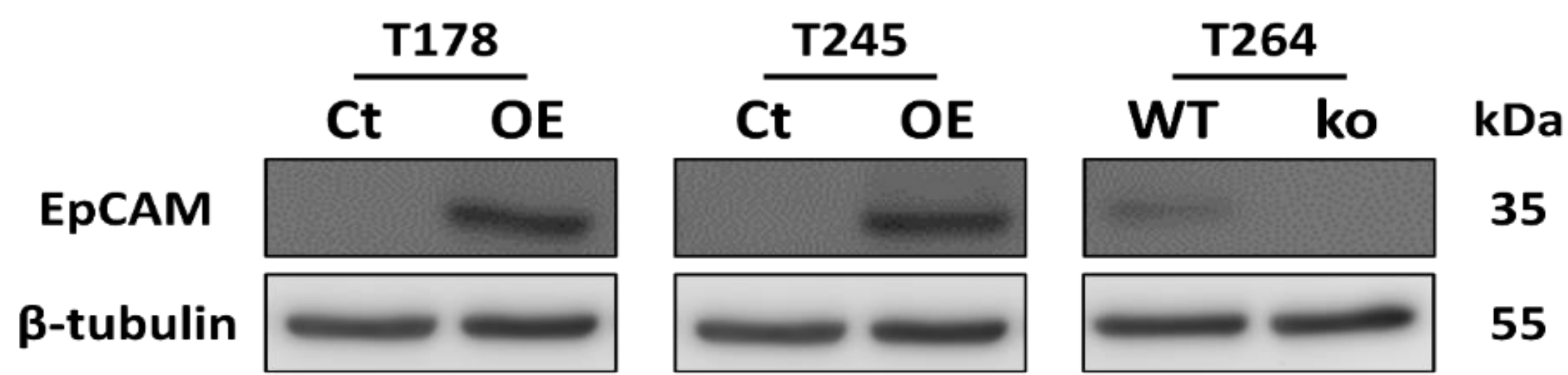


圖二、研究架構與流程

(圖片為作者自行繪製)

研究結果

一、以西方墨點法確認針對甲狀腺癌細胞(ATC)的特殊處理是否成功



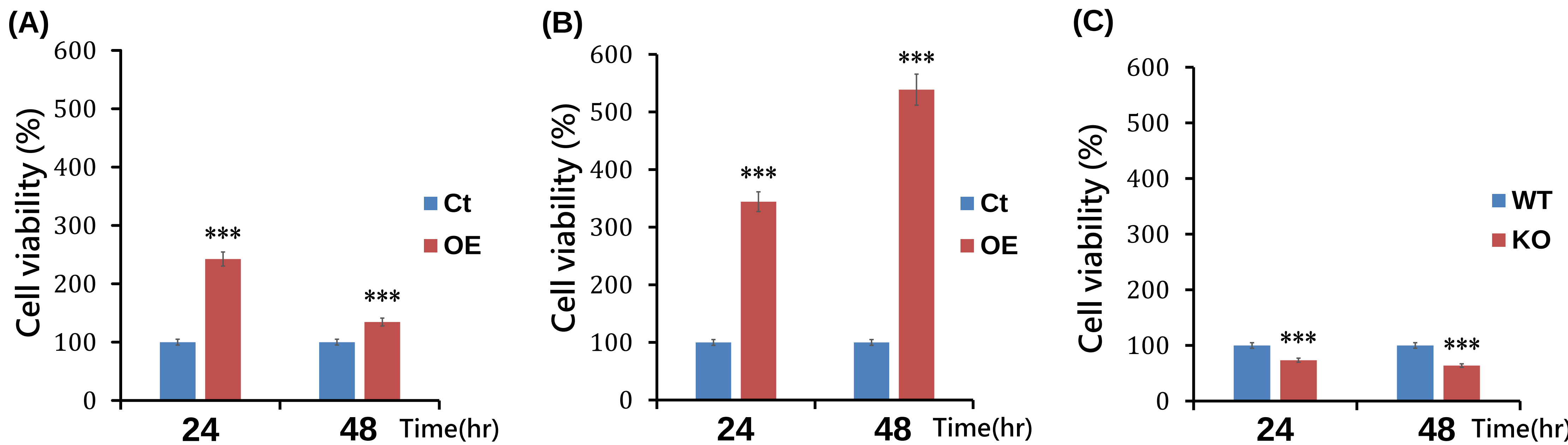
圖三、確認針對甲狀腺癌細胞(ATC)的特殊處理結果
(圖片為作者自行拍攝)

首先，我們需要確認EpCAM overexpression (OE)與 knockout (KO)的甲狀腺癌細胞株是否確實過量表達與剔除EpCAM。圖三顯示T178 與 T245 ATC細胞株確實具有過量表達EpCAM的效果，且T264 ATC細胞株的EpCAM剔除處理，也是成功的。

二、觀察EpCAM對ATC癌症進程的影響

(一) EpCAM對甲狀腺癌細胞(ATC)存活率的影響

圖四為EpCAM過度表達的T178、T245細胞株與EpCAM剔除的T264細胞株，以WST-1處理後所測得之相對吸光值表示其存活率。由結果可知，EpCAM的存在能提升ATC細胞的存活率。



圖四、EpCAM的有無對三種甲狀腺癌細胞株存活率的影響結果

(A) T178 ATC細胞株、(B) T245 ATC細胞株、(C) T264 ATC細胞株

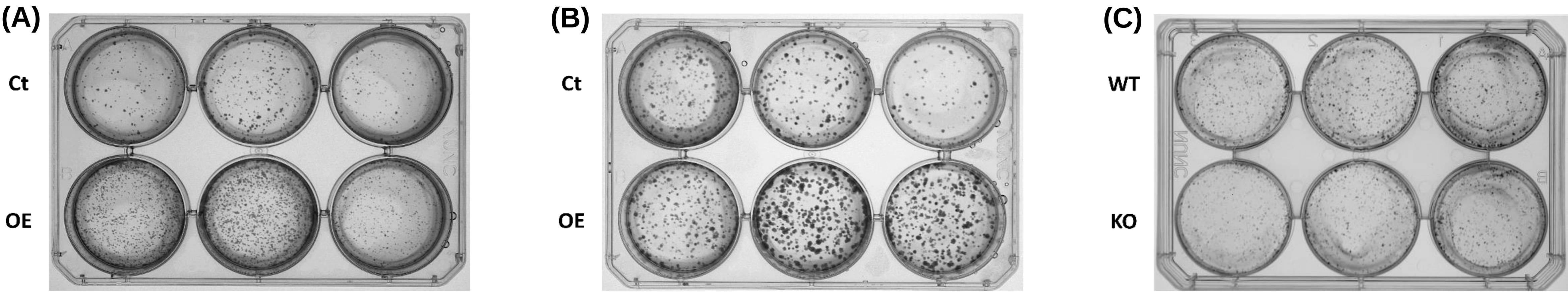
Ct：對照組，OE：EpCAM過量表現組，WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM剔除組

(A)(B)圖中以Ct組、(C)圖中以WT組數值為100%，並使用T-test 分析。***p<0.001。(n=8)

(以上圖片為作者整理數據後繪製)

(二) 細胞群落試驗(Colony formation assay)

環境中細胞數較少時，該環境對細胞屬於艱困環境，此時細胞會傾向以形成群落的方式生長。由圖五可以推斷，EpCAM的過度表現會增強ATC細胞群落生長的能力。

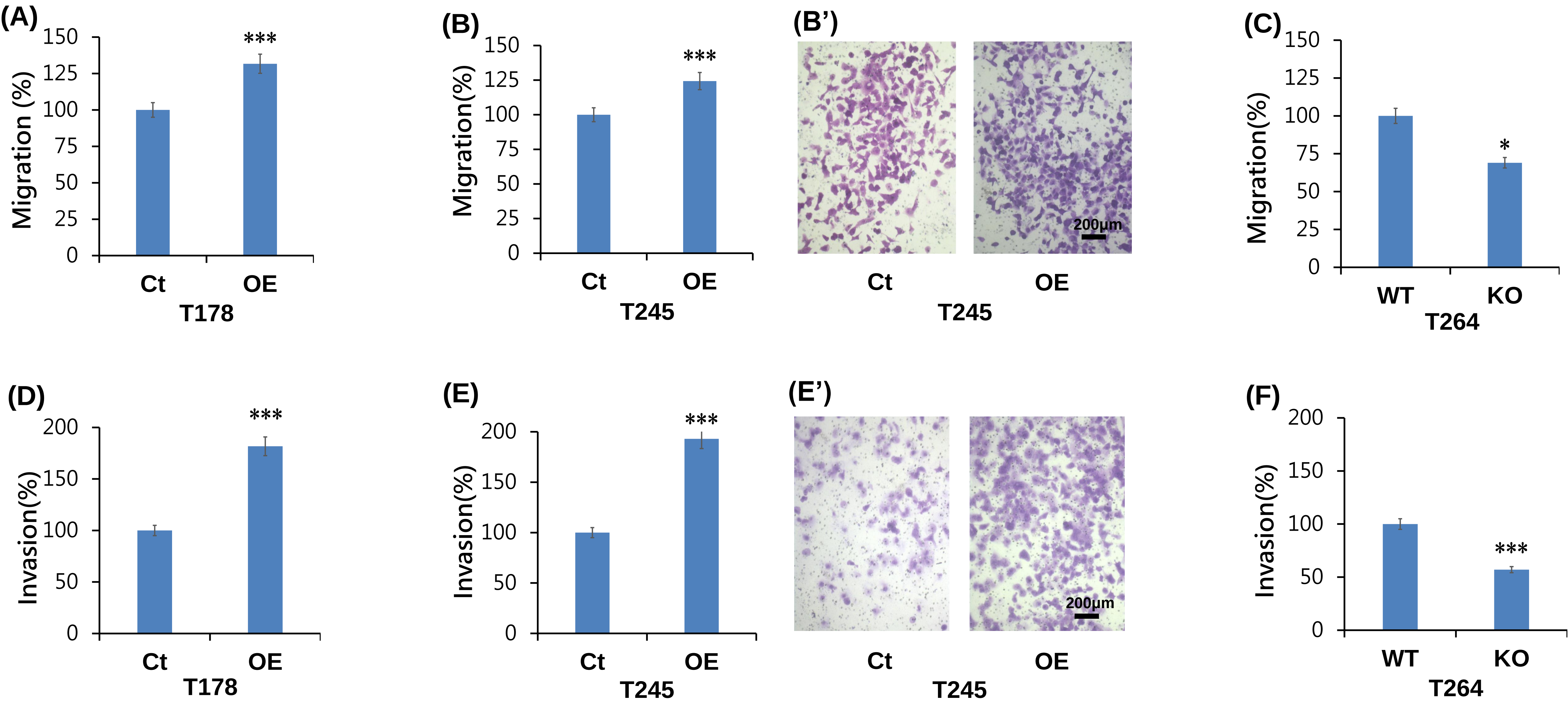


圖五、不同ATC細胞株群落生長狀況 (A) T178 ATC細胞株、(B) T245 ATC細胞株、(C) T264 ATC細胞株
Ct：對照組、OE：EpCAM過量表現組、WT：野生型癌細胞組、KO：EpCAM剔除組

(以上圖片皆為作者拍攝)

(三) EpCAM對甲狀腺癌細胞(ATC)轉移與侵入能力的影響

圖六顯示，OE組細胞轉移與侵入力均顯著大於Ct對照組。顯示EpCAM具有增強ATC細胞轉移與侵入的能力。



圖六、ATC細胞轉移與侵入能力試驗 (除(B')、(E')為作者拍攝外，其餘圖片皆為作者整理數據後繪製)

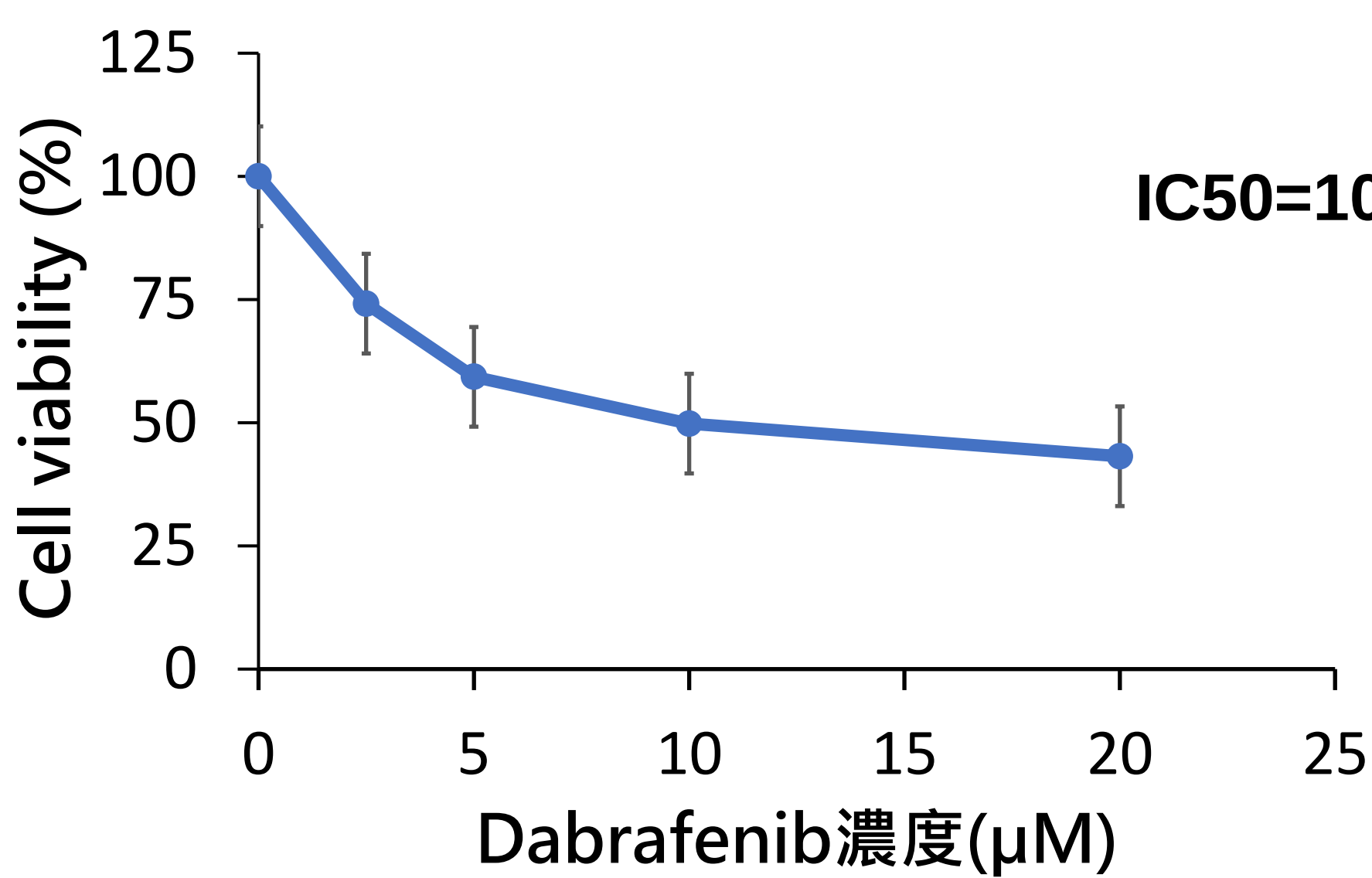
(A)~(C):細胞轉移試驗，(B')為T245細胞株顯微照相圖。(D)~(F):細胞侵入試驗，(E')為T245細胞株顯微照相圖。Ct：對照組，OE：EpCAM過量表現組
WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM剔除組。圖中統計數據以Ct或WT組數值為100%，並使用T-test 分析。***p<0.001，*p<0.05。(n=3)

三、觀察Dabrafenib對ATC的影響

(一) Dabrafenib對甲狀腺癌細胞(ATC)存活率的影響

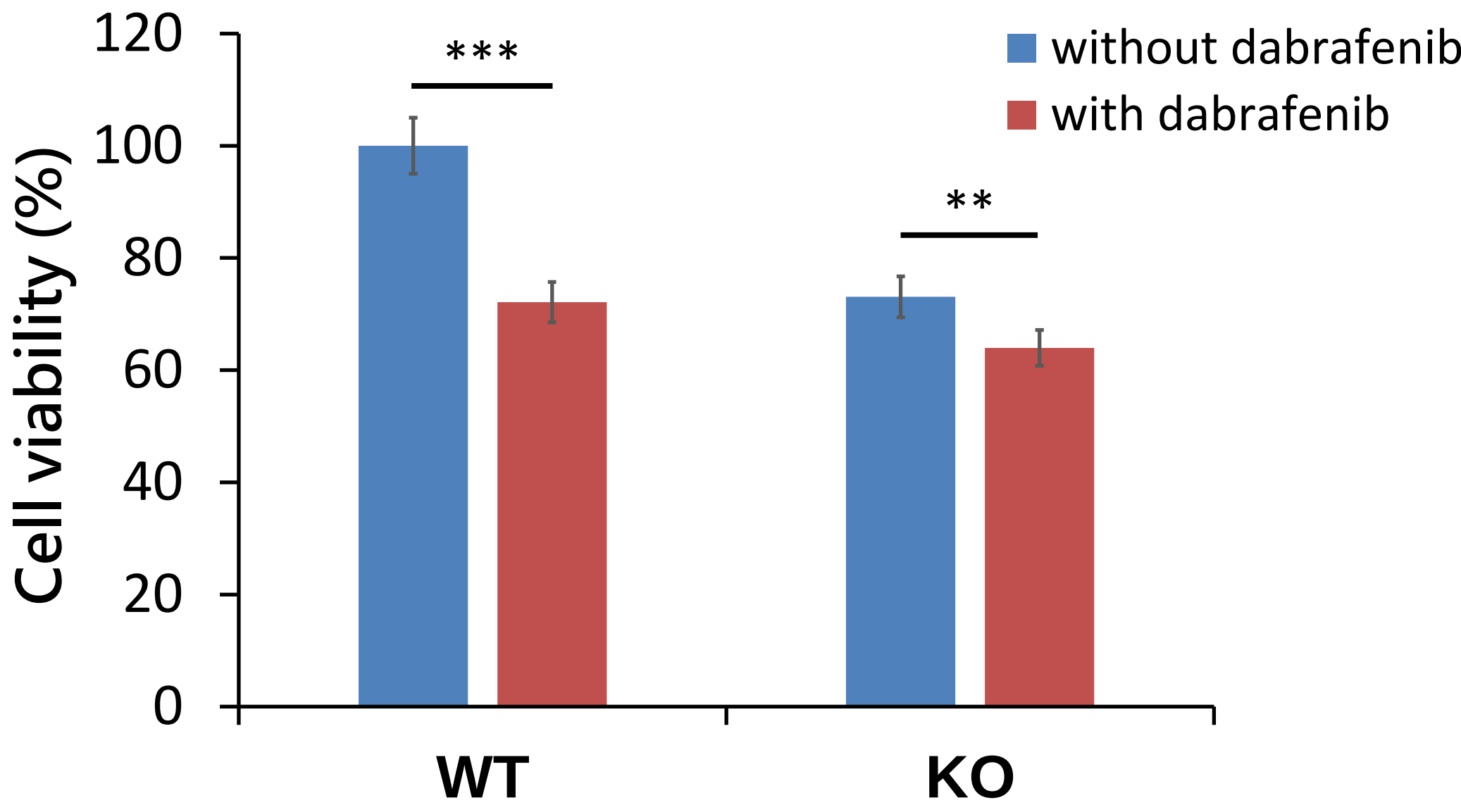
經由圖七細胞存活率試驗確認Dabrafenib對野生型(WT) T264細胞的半抑制濃度(IC50)約為10.38µM。

由圖八的結果可以推知，Dabrafenib能有效降低WT與EpCAM剔除組(KO)癌細胞的生長能力。



圖七、Dabrafenib對野生型(WT) T264癌細胞IC50測定
由曲線計算可得 IC50 = 10.38µM

(圖片為作者整理數據後繪製)



圖八、Dabrafenib對ATC存活率的影響結果

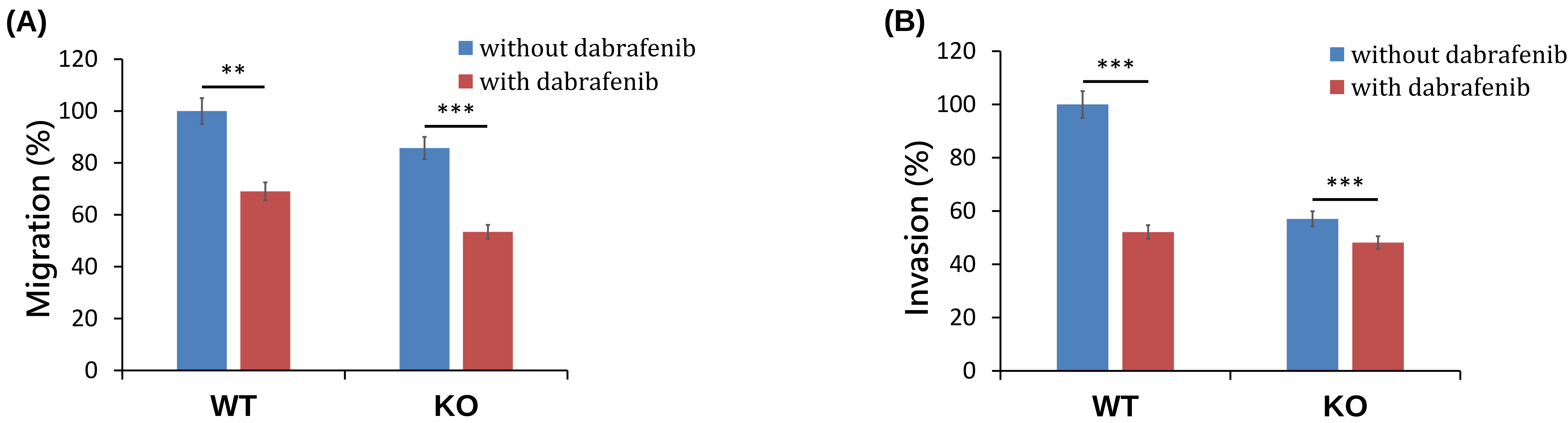
WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM剔除組

圖中統計數據以不含Dabrafenib的野生型(WT)細胞株之吸光值數值為100%，並使用T-test 分析。***p<0.001，**p<0.01。(n=8)

(圖片為作者整理數據後繪製)

(二) Dabrafenib對甲狀腺癌細胞(ATC)轉移與侵入能力的影響

加入10 µM Dabrafenib後，野生型癌細胞(WT)與EpCAMp剔除(KO)癌細胞轉移與侵入能力，均顯著低於未加Dabrafenib處理的ATC細胞。推測Dabrafenib能有效降低ATC的轉移與侵入能力。



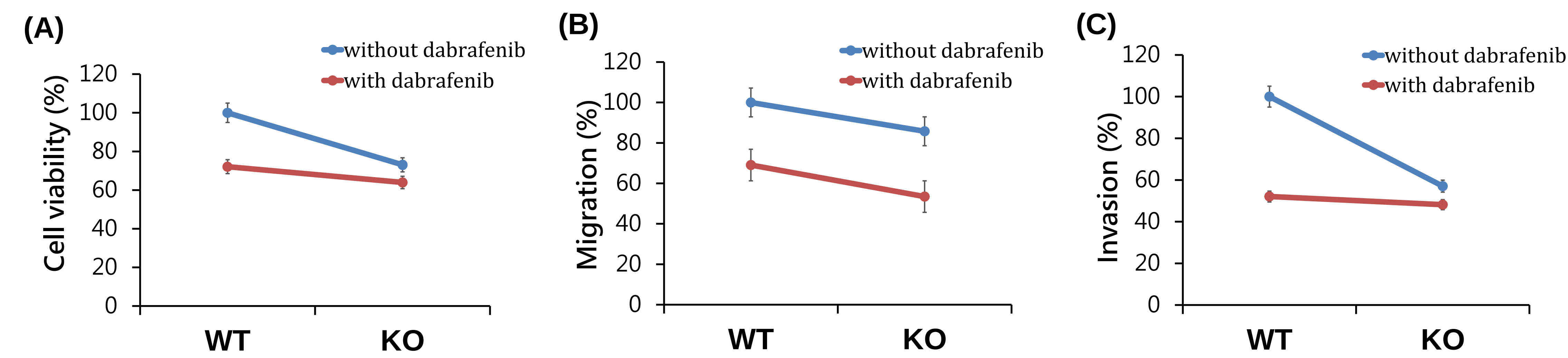
圖九、Dabrafenib對ATC細胞轉移與侵入能力試驗結果 (A) Cell migration assay (B) Cell invasion assay

(以上圖片皆為作者整理數據後繪製)

WT：野生型癌細胞，KO：EpCAM剔除組。圖中統計數據以WT組數值為100%，並使用T-test 分析。***p<0.001,**p<0.01。(n=8)

(三) 分析EpCAM與Dabrafenib在細胞存活率、轉移與侵入能力中是否有交互關係

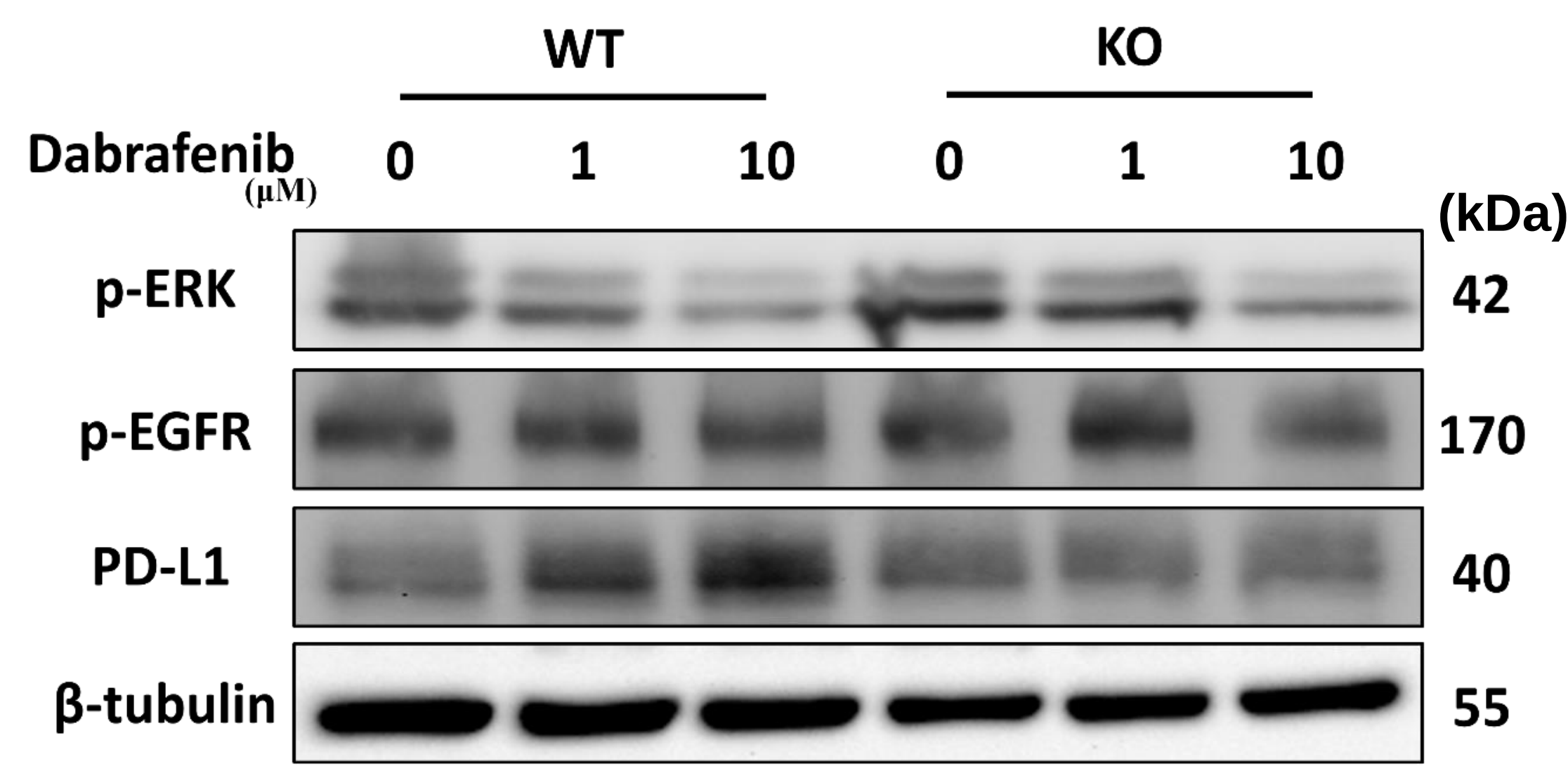
以雙因子變異數分析EpCAM與Dabrafenib 存在時對ATC之影響。可以發現EpCAM與Dabrafenib在細胞存活率、侵入能力當中具有交互作用，但這兩項因子在細胞轉移能力測試中不具有交互關係。



圖十、Dabrafenib與EpCAM對ATC細胞存活率、轉移能力、侵入能力之交互作用關係圖

(A) Cell viability assay (B) Cell migration assay (C) Cell invasion assay 。WT：野生型癌細胞，KO：EpCAM剔除組。
圖中統計數據以不含Dabrafenib的WT細胞株之吸光值為100%，並以Two way ANOVA分析。(A)p<0.001 (B)p>0.05 (C)p<0.001。
(以上圖片為作者整理數據後繪製)

(四) 分析受Dabrafenib影響而產生的蛋白質表現量變化



圖十一、以西方墨點法確認Dabrafenib對ATC細胞(T264)蛋白質表現量的影響

WT：野生型癌細胞組，KO：EpCAM 剔除組 (圖片為作者自行拍攝)

加入Dabrafenib後：

- WT及KO組癌細胞中，p-ERK蛋白的表現量皆隨藥物濃度的上升而有逐步下降的趨勢。
- p-EGFR表現量在不同藥物濃度間沒有顯著差異。
- WT組癌細胞中，PD-L1的表現量隨藥物濃度的上升有不同程度的增加。而KO組癌細胞，PD-L1表現量無顯著變動。

討論

一、EpCAM與Dabrafenib在癌細胞生長、轉移與侵入能力中的交互關係

- EpCAM與Dabrafenib對ATC生長與侵入能力具有交互關係，但對轉移能力不具有交互關係。
- 相較於轉移能力，ATC細胞在侵入周圍組織時，牽涉到基底膜與胞外基質(ECM)的水解與破壞，猜測若EpCAM與Dabrafenib皆對此步驟造成影響，便能促成此兩因子在侵入試驗出現交互作用。

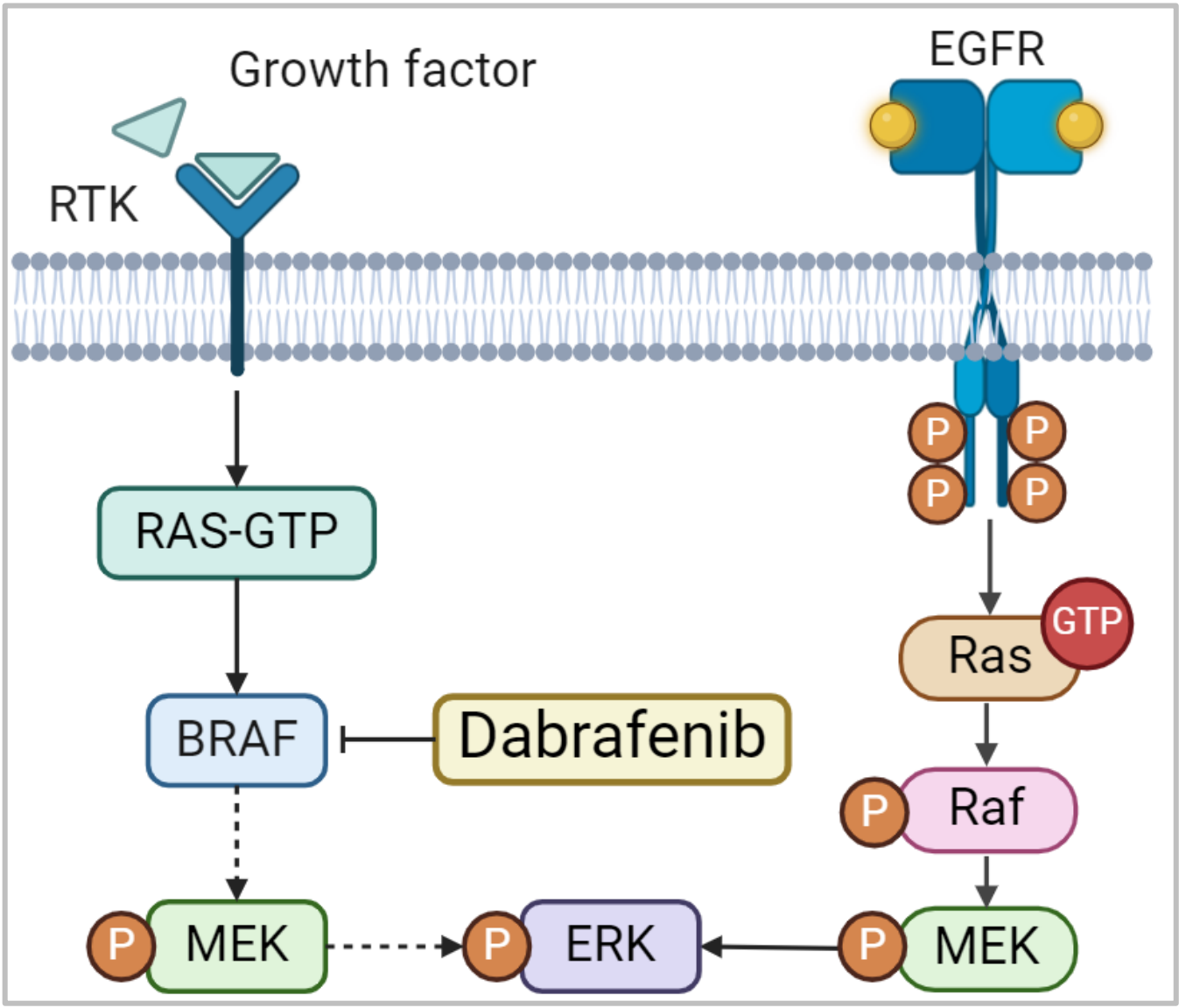
二、小分子藥物Dabrafenib對ATC 甲狀腺癌細胞的影響

(一) 有關EGFR蛋白與p-ERK蛋白的探討

- p-ERK可藉EGFR與BRAF兩種機轉路徑誘導形成
- 突變的BRAF對其抑制劑的敏感度較高，故對於具有高比例BRAF V600E突變的ATC而言，BRAF抑制劑(Dabrafenib)對ATC的療效是可期的。

(二) 有關PD-L1蛋白的探討

- 表現於ATC細胞膜表面，可以抑制胞毒型T細胞的免疫反應。
- 表達量與p-ERK的存在呈現正相關性。
- 野生型(WT)癌細胞中，Dabrafenib處理後具有較高的PD-L1表現量，而EpCAM剔除組(KO)的癌細胞在藥物處理後PD-L1的表現量則沒有顯著變化。由此推測有其他基因參與PD-L1的調控，且EpCAM可能是增加PD-L1表現量的因素之一，甚至進而使ATC細胞對Dabrafenib產生抗藥性。



圖十二、p-ERK的形成路徑

(圖片為作者自行繪製)

結論與未來展望

- EpCAM能提升未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)的增殖、生長、轉移與侵入能力。
- Dabrafenib能夠有效降低未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)的增殖、生長、轉移與侵入能力。
- Dabrafenib能抑制未分化性甲狀腺癌細胞(ATC)中的p-ERK蛋白的產生，以減緩癌細胞的生長。
- 期許未來能夠結合其他類型的小分子藥物進行聯合試驗，再與各藥物單獨使用的成效進行比較，並釐清不同藥物的作用機轉，以做為藥物合併治療可行性的判斷依據。

主要參考文獻

• Notarangelo T., Sisinni L., Condelli V., & Landriscina M. (2017). Dual EGFR and BRAF blockade overcomes resistance to vemurafenib in BRAF mutated thyroid carcinoma cells. Cancer Cell International. 17(86):1-9. doi:10.1186/s12935-017-0457-z.

• Ralhan R., Cao J., Lim T., MacMillan C., Freeman J.L., & Walfish P.G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. BMC Cancer. 10(1):1-11. doi:10.1186/1471-2407-10-331.