

國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology,

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

幽門螺旋桿菌感染誘導之胃上皮細胞抗細胞凋亡分子

分析與機制探討

Analysis of anti-apoptotic factors induced by

Helicobacter pylori infection of gastric epithelial cells

研究生：劉宛欣 撰

Graduate Student: Wan-Hsin Liu

指導教授：周綠蘋 博士

Advisor: Lu-Ping Chow, Ph.D.

中華民國九十九年七月

July, 2010



致謝

兩年的光陰匆匆過去，我從一個只會看著書本和 paper 想像經過的幻想狂和辯論家，逐漸蛻變成一個習慣動手做實驗和懂得如何去實現自己夢想藍圖的務實者，這本論文的完成要感謝很多人，其中最要感謝的是我的指導教授周綠蘋博士，謝謝老師給了我機會讓我進來 941 實驗室，讓我可以這裡自由的學習，放膽去實行那些我想像中的實驗，儘管老師總是有很多事務要處理，但還是不厭其煩的與我討論實驗的細節。感謝老師總是從旁提醒我，要我不要常常操之過急，慢慢的去把每件事確實的做好，並且一再的給我機會，這本論文才有完成的一天。

除此之外，還要謝謝 941 實驗室的學長姐：莉莉學姐、筑陵學姐、景光學長、成州學長、玉茹學姐、文麒學長、文雅學姐、瑞傑學長、李豪學長、家錚學姐、培芬學姐、昭圻學長、至達學長、舒涵學姐以及郁玲學姐，感謝學長姐們在技術上總是給予我許多指導，並且在我需要的時候提供我抗體以及不時的跟我討論，使我在實驗的過程中少了許多迷網，以及增添了很多的快樂。還要感謝一起打拼的碩二夥伴聖燁和含君，從碩一開始就一路相伴，一起度過了碩一許多的考試、碩二煉獄的一周一次進度報告到所上的大進度報告，還有最後一起挺過論文和口試。最後還要謝謝小幫手書宇還有碩一的兩個學妹盈竹和韻如。以及林老師家的助理尚昀學長、宜璇還有晴語，給了我許多歡笑與討論。

另外要感謝的，還有我的口試委員楊雅倩教授、趙瑞益教授、繆希椿教授。謝謝你們不辭辛苦得來參加我的口試，並且在口試的過程中提供我非常非常寶貴的建議，讓我可以再好好的思考那些尚未完成的部分，感謝教授們都細心閱讀我的論文，使這本論文能夠更臻完善，你們的幫助，點點滴滴都在心頭。

最後要感謝一路走來支持我的家人們：我的父母，雙胞胎姐姐、哥哥以及另一半奕軒熱情溫暖的家人，時常提供給我許多溫暖以及支持，讓我可以無後顧之憂安心的做實驗；還有最最摯愛的另一半奕軒，總是在我徬徨無措的時候給我寶貴的建議，在這兩年默默的支持我，風雨無阻的接送，在進度報告前夕壓力最大的時候，一起承受我的壓力還有無怨無悔的犧牲了自己的周末和夜晚，只為了陪著容易緊張的我一起跑電泳、壓片，以在我受到打擊的時候給予我全部的鼓勵還有溫暖，沒有你們溫暖的親情和堅定的愛情，就沒有今日的我。是你們成就了我，僅將這本論獻給你們。

2010/07/20 劉宛欣



摘要

關鍵字：幽門螺旋桿菌、胃癌、COX-2、存活素、抗細胞凋亡

胃癌是世界上最常見的癌症之一。目前最受科學家注意的是幽門螺旋桿菌感染而造成的胃癌。儘管近年來有許多研究著重於幽門螺旋桿菌其致病機轉的探討，幽門螺旋桿菌導致胃癌發生的詳細機制卻仍還不是完全清楚。由先前的研究指出，幽門螺旋桿菌的寄生將會導致宿主胃部黏膜的發炎，由目前的研究顯示其主要原因之一是二號環氧化酶 (COX-2) 被幽門螺旋桿菌誘導表現所致。二號環氧化酶為一製造前列腺素 PGE₂ 之酵素，除了參與發炎反應外，尚有研究指出，COX-2 以及 PGE₂ 可能參與抗細胞凋亡反應，然而 COX-2 及 PGE₂ 是如何參與或調控抗細胞凋亡反應目前尚不清楚。本論文利用幽門螺旋桿菌感染胃上皮細胞 AGS 確立幽門螺旋桿菌的感染可以促進抗細胞凋亡分子「存活素」的大量表現，並發現 COX-2 及 PGE₂ 均參與減少存活素泛素化之調控，為更進一步研究 COX-2 對存活素之調控，本論文以 shRNA 或者選擇性抑制 COX-2 之藥物 Celecoxib 處理幽門螺旋桿菌感染之 AGS，均有促使 AGS 中存活素下降之趨勢，證明，幽門螺旋桿菌確可以透過 COX-2 的表達以及其下游分子 PGE₂ 之產生來抑制存活素的泛素化，並減少其降解，因此 COX-2 可能是透過其和其下游分子 PGE₂ 之作用來穩定存活素，進而行使抗細胞凋亡之功能。除此之外，為了探討存活素是否確實在細胞質中行抗細胞凋亡反應，本論文更使用螢光顯微鏡觀察存活素在細胞中之位置，可觀察到處理幽門螺旋桿菌後，存活素確有自細胞核移至細胞質之現象，因此存活素可能在幽門螺旋桿菌感染後行使抗細胞凋亡之功能。本論文首度證明了幽門螺旋桿菌確有透過 COX-2 以及 PGE₂ 來穩定存活素之現象，並證明了幽門螺旋桿菌可以透過引起存活素在細胞中位置之改變，因此可以產生抗細胞凋亡反應，進而導致胃癌產生。



Abstract

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastric cancer, COX-2, survivin, anti-apoptosis

Gastric cancer is one of the most common cancers and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection has been widely accepted as a major factor of gastric cancer. Although many efforts have been made to study *H. pylori*, the exact mechanisms of gastric carcinogenesis induced by *H. pylori* remain unclear. Past studies have reported that *H. pylori* infection results in the over-expression of cyclooxygenase-2 (COX-2). It has been reported that both COX-2 and its downstream factor PGE₂ may be involved in the regulation of anti-apoptosis, but the exact mechanisms is unclear. This thesis shows that *H. pylori* infection not only induces the over-expression of COX-2 but also results in the over-expression of anti-apoptotic factor, survivin, in gastric epithelial cells, AGS. In addition, both COX-2 and PGE₂ stabilize survivin by decreasing the ubiquitination of survivin. Moreover, a significant decrease of the amount of survivin is observed when either the shRNA of COX-2 or the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, is used to inhibit the COX-2 induced by *H. pylori* infection. These results show that *H. pylori* infection can induce a great amount of survivin by over-expressing COX-2 and PGE₂, which stabilize survivin. In addition, by using immunofluorescent microscopy to examine the location of survivin, it is observed that survivin translocates from nucleus to cytoplasm after *H. pylori* infection. This result implies that *H. pylori* can change the location of survivin so that survivin could execute anti-apoptosis. To my best knowledge, this is the first work that shows the infection of *H. pylori* induces a great amount of survivin, which is stabilized by COX-2 and PGE₂, and induces the translocation of survivin.



縮寫

ACN	Acetonitrile
APS	Ammonium persulfate
BabA	Blood group antigen-binding adhesion
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
CagA	Cytotoxin-associated gene A
cag PAI	cag Pathogenicity island
CBB	Coomassie brilliant blue
COX-2	Cyclooxygenase 2
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamineteraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	Horseradish peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
INCENP	Inner centromere protein
IP	Immunoprecipitation
IPA	Ingenuity pathways analysis
kDa	Kilo Dalton(s)
LPS	Lipopolysaccharides
M.O.I	Multiplicity of infection
OipA	Outer inflammatory protein A
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PKB	Protein kinase B
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SabA	Sialic acid-binding adhesin

SDS	Sodium dodecylsulphate
SHP-2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2
shRNA	Short hairpin RNA
TEMED	N,N,N',N''-tetramethylene diamine
TN	Tris and NaCl buffer
TNT	Tris, NaCl and Tween buffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
VacA	Vacuolating cytotoxin gene A
XAF1	XIAP-associated factor 1
XIAP	X-linked IAP(XIAP)



目錄

摘要	iv
Abstract.....	vi
縮寫	viii
第一章 導論	3
第一節 胃癌簡介	3
第二節 幽門螺旋桿菌 (<i>Helicobacter pylori</i>).....	9
第三節 幽門螺旋桿菌所造成之宿主反應 (host response).....	12
第四節 第二型環氧化酶與其下游分子和胃癌的發生	17
第五節 存活素與胃癌	20
第六節 本篇論文的研究目的	24
第二章 實驗材料	26
第三章 實驗方法	30
第一節 幽門螺旋桿菌與胃腺癌細胞的培養	30
第二節 幽門螺旋桿菌感染胃腺癌細胞	32
第三節 質體抽取	34
第四節 蛋白質分析法	36
第五節 螢光顯微鏡觀察	42
第四章 實驗結果	44
第一節 幽門螺旋桿菌感染 AGS 細胞促使存活素上升	44
第二節 COX-2 表現與存活素上升之關係	45
第三節 PGE ₂ 表現與存活素上升之關係	48
第四節 幽門螺旋桿菌感染引起存活素位置之改變	49
第五節 幽門螺旋桿菌感染引起存活素上升的其它訊息路徑	50
第五章 討論	52
第一節 實驗方法討論	52
第二節 <i>H. pylori</i> 所引起磷酸化訊息傳遞之改變	55
第三節 總結與未來展望	56
第六章 參考文獻	58
第七章 圖表與說明	68
附錄	80



第一章 導論

第一節 胃癌簡介

一、 病理學上的分類與特性

胃癌，是一種發生在胃部任何位置的惡性腫瘤，而因為發生在胃部，所以有可能轉移到周邊的器官，如食道、肝臟等器官。除此之外，就致死率而言，根據現有的流行病學統計資料顯示，在美國，胃癌 (gastric cancer) 在致死率中居於第二名[1, 2]；在台灣，胃癌的發生率是所有癌症中的第四名，致死率則僅低於第一名的肝癌及第二名的肺癌而為第三位，在所有死亡原因中，胃癌則居於第十五名。而就目前所知的胃癌種類來區分，胃癌約可分為腺癌 (adenocarcinoma)、非何杰金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma) 及肉瘤 (sarcoma) 等幾類，其中有 95 % 的胃癌屬於腺癌；然而若依病理組織學上的分類法(又稱為 Lauren 分類法)，則胃癌主要可分為腸型 (intestinal type) 及瀰漫型 (diffuse type) 兩種[3]。

較常見的胃癌為腸型胃腺癌。腸型胃腺癌的癌細胞較為分化，癌細胞會形成類似腺體 (gland) 的構造，主要發生在胃的底部 (distal stomach)，常以潰瘍的形式呈現。腸型胃腺癌的發生是一連串階段性的過程，從正常的黏膜細胞 (normal mucosa)，轉變至慢性胃炎 (chronic gastritis)、萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)、胃萎縮 (atrophy)，直到腸上皮化生 (intestinal metaplasia)。在胃萎縮及腸上皮化生發生之後，接著會演變成不良化生 (dysplasia)、腫瘤 (carcinoma) 直到最後產生惡性轉移 (metastatic dissemination)。然而，使「惡性前病變」 (pre-malignant lesions) 轉變到「惡性」 (malignant) 腫瘤的因素至今仍尚未完全了解；除此之外，就發病的族群和男女比例而言，腸型胃腺癌主要發生於高齡族群，發生於男性的比例為女性的兩倍。

而瀰漫型的胃腺癌的癌細胞則較未分化，沒有聚合 (cohesion) 的現象，也不具有任何正常機能。在瀰漫型胃腺癌中，癌細胞各自向胃壁浸潤，使胃壁變厚但不形成腫塊，可發生於整個胃部包括賁門及胃底區，其發生的原因似乎與胃萎縮及腸上皮化生無關。瀰漫型胃腺癌還具有較強的能力來進行內部或貫穿的轉移，所以預後情形較差。目前除了慢性發炎之外，仍未有較清楚的階段性轉化過程被研究出來。而流行病學的研究顯示，與腸型胃腺癌不同，瀰漫型胃腺癌主要發生於年輕族群，且男女比例大致相等，並且似乎與病患本身的基因缺陷有關，例如胃上皮細胞的表面結合因子 (E-cadherin) 基因表達量不足等。然而，事實上大部分的胃腺癌並沒有辦法明確地區分為屬於那一類，多以混合的型態並存。[4, 5]

1992 年，Correa 等人根據病理上的變化，並配合流行病學上的統計意義，第一次提出胃癌發生是個多步驟、多因素的過程。發生的情形大致如下：

Chronic gastritis→atrophic gastritis→intestinal metaplasia→dysplasia→gastric cancer

這個模型提供現今研究胃癌的基礎，稱為“Correa’s cascade”。

二、 胃癌的流行病學及發生率

1. 時間的差異性

就 1930 年代而言，當時的美國及歐洲，胃癌是癌症中造成死亡的首要原因，之後七十年在所有已開發國家，由於生活環境改善、及早有效篩檢及治療上的進步，胃癌致死率都有顯著下降[4, 6]。然而近三十年來，在已開發國家，胃癌發生區域逐漸由胃竇部/胃體部 (antral / corpus) 轉變成接近胃賁門 (cardia / proximal) 的胃癌，且胃賁門胃腺癌 (gastric cardia adenocarcinoma) 發生率較三十年前上升五至六倍[7-13]；造成這種趨勢的原因可能有二個，且主要是與飲食有關：一是胃酸逆流，另一個原因則可能是肥胖[14, 15]；除此之外，還有一篇來自於瑞典的研究

報告指出，胃賁門胃腺癌的發生率與膳食纖維的攝取多寡有高度負相關 (P trend < .0001) 的關係，主要原因可能是來自於膳食纖維可以中和唾液中的致癌物質亞硝酸鹽[16]。

2. 地理上的差異性

而就胃癌發生率的地理性探討，胃癌發生率的地理差異性甚大。約三分之二的胃癌病例發生於開發中國家(圖一)，其中，又以日本、韓國及南美等國的胃癌發生率最高[17]。常發生非賁門胃腺癌 (noncardia gastric adenocarcinoma) (流行於較落後的國家) 的地區包括東亞、東歐、中南美洲；而南亞、北非、東非、北美、澳洲及紐西蘭則較低[17]。胃癌高發生率地區 (如日本) 的人口若移民至低發生率地區 (美國)，則新移民發生胃癌的機率會明顯降低 [18]，且其第二代發生胃癌的機率與當地居民相同[17]，證明其罹患胃癌的原因，確實與地理性相關。



(圖一：摘自 World J Gastroenterol.12(3):354-362 (2006))

3. 年齡、性別、種族、及社經地位的差異性

另外，胃癌發生的可能性也會隨著年齡、性別、種族及其社經地位有所不同，在年齡方面，胃癌罹患的機率會隨年齡的增加而增加，罹患胃癌的患者主要以五十至七十歲的人居多，而在三十歲以前罹患胃癌的人數非常少；而在性別上，男性罹患非贛門胃腺癌的機率則較女性較高出兩倍，且男性罹患胃贛門胃腺癌的機率更較女性高六倍[17]。在種族方面，黑人罹患胃癌的機會較白種人高，且即使居住於同一地區的不同種族，發生胃癌的機率也有顯著差異，顯示不同人種的基因背景可能具有或缺乏抵抗胃癌發生的因子；而就社經地位方面，整體來說處於低社經地位的人口患胃癌的機率高。[5]

三、導致胃癌的危險因子

除了時間、地理、人口方面的差異外，以下還有一些可能導致胃癌的因素：

1. 胃部手術

根據 1922 年以來的研究，因罹患消化性潰瘍、慢性胃炎、息肉、外傷等因素而切除部份胃的患者，在經過十五至二十年後，可能因為長時間的胃酸分泌降低而容易罹患胃癌[19]。

2. 飲食因子

隨著時間、不同國家之間、不同社經地位族群之間、以及移民及其後代之間，胃癌的發生率及致死率有顯著的差異，因此研究學者推測，飲食對於胃癌的發生應扮演重要角色[4, 17, 20]，但目前尚未定論。目前推測的飲食因子大致為下列三項：

a、新鮮的蔬果

因為新鮮蔬果中含有豐富的維生素 C (vitamin C, ascorbate)、維生素 E

(vitamin E, α -tocopherol)、類胡蘿蔔素 (carotenoids, β -carotene) 及硒元素 (selenium) 等具有抗氧化等功效的營養素，因此可能是避免罹患胃癌的重要因素之一，而其中又以維生素 C 的效果最為顯著[21]。

b、高鹽飲食的攝取

在 1965 年的研究文獻指出，若是攝取過量的鹽類可能與胃癌發生有關。主要是因為在動物實驗中，若給予飲食中過高的鹽分，可能會導致其胃部產生早期萎縮性胃炎的症狀，因此研究學者推測若在飲食中不斷攝取高鹽食物，可能會提高罹患胃癌的風險。[20]

c、亞硝酸鹽及硝酸鹽

另外，有許多帶有 N-亞硝基的化合物 (N-nitroso compounds) 在動物實驗中，也已被證明是致癌物質，這些 N-亞硝基化合物的主要來源是肉類中的防腐劑 (例如香腸)；因為防腐劑中含的亞硝酸鹽及硝酸鹽可在胃中經化學反應而形成 N-亞硝基化合物，進而致癌[21]。

值得注意的是，上述各種飲食危險因子，均並非單一因素即可造成胃癌，而是取決於彼此之間交互作用的最終結果。

3. 惡性貧血 (pernicious anemia)

惡性貧血的發生主要是由於維生素 B12 (cyanocobalamin) 缺乏所導致，然而根據流行病學的統計，罹患惡性貧血的人發生胃癌的機率也為正常人的三倍 [22]，因此推測胃癌的罹患可能也與惡性貧血有關。

4. 鼻咽癌病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)

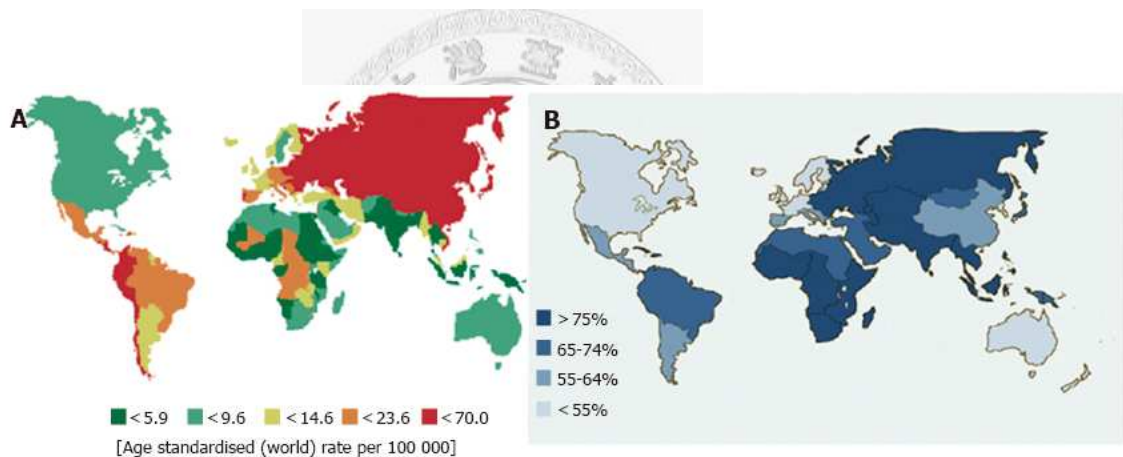
另外在過去研究中也顯示，有 6~16 % 的胃癌可能與鼻咽癌病毒的感染有關，然而這些病例主要發生在非西方地區，其發生機制也與非鼻咽癌感染的胃癌有所不同[23]。

5. 血型與遺傳

而在流行病學的統計數據中顯示，血型為 A 型的人發生胃癌的機率較其他血型為高[24]；而家族中若有胃癌病史，其後代罹患胃癌的機率也較高[25]。

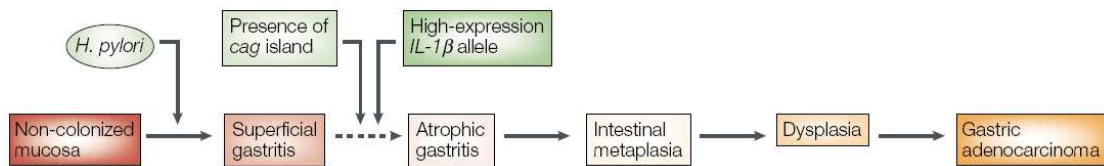
6. 幽門螺旋桿菌

在流行病學的研究也發現，通常胃癌發生率越高的地區(圖二 A)，幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*) 的盛行率也越高(圖二 B)；相較之下，在幽門螺旋桿菌盛行率較低的已開發地區，其罹患胃癌的人口數也較低[26, 27]；另外，血液對幽門螺旋桿菌呈陽性反應 (seropositive) 的人，其罹患胃癌的機率較血液對幽門螺旋桿菌呈陰性反應的人高出約 2.1~16.7 倍[28-34]。



(圖二：摘自 World J Gastroenterol.12(3):354-362 (2006))

目前已有研究報告指出，幽門螺旋桿菌的慢性感染可能與胃癌的產生有很大的關聯性，並且國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 在 1994 年將幽門螺旋桿菌列為人類的第一型致癌因子[35]。由 Correa's cascade 的說明，幽門螺旋桿菌的感染將會導致階段性的胃部組織傷害及惡化，有可能從慢性胃炎、萎縮性胃炎、腸上皮化生、不良化生，最終走向胃腺癌[36]。(圖三)



(圖三：摘自 Nature Reviews Cancer 2: 28-37 (2002))

第二節 幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)

一、幽門螺旋桿菌的型態與特徵

幽門螺旋桿菌是造成人類慢性感染的常見細菌之一，在 1982 年由兩位澳洲學者 Barry J. Marshall 和 Robin J. Warren 由胃部的檢體中發現[37]，並在體外環境中培養成功，也並且因為闡明幽門螺旋桿菌的感染與罹患十二指腸潰瘍的關係，拿到 2005 年的諾貝爾生理醫學獎；幽門螺旋桿菌是一種格蘭氏陰性、微好氧的螺旋狀桿菌，體長約 2.5-5 μm ，寬則介於 0.5-1.0 μm 間。在菌體的一端著生有 4-6 根鞭毛 (flagella)，常寄生在哺乳類胃黏膜的黏液層 (mucus gel layer) 及胃黏膜的上表皮細胞 (superficial epithelium) 之間。

一般幽門螺旋桿菌的感染通常發生於幼童時期，大多是經由口攝入，而終身存在於人體中。盛行率通常與社經地位有關，比如低收入戶及低教育、或是兒童時期的居住環境公共衛生不佳、人口過於擁擠等，都會增加幽門螺旋桿菌感染的機會[28-34]。一般認為，幽門螺旋桿菌的感染將可能導致慢性胃炎 (chronic gastritis)、胃潰瘍 (peptic ulceration)、胃萎縮 (gastric atrophy)、非何杰金氏胃部惡性淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma of the stomach)，以及胃腺癌 (gastric adeno- carcinoma) 等疾病。

二、 幽門螺旋桿菌的致病因子 (virulence factor)

然而並非所有的幽門螺旋桿菌均會導致胃癌，根據先前的研究顯示，會導致胃癌的幽門螺旋桿菌主要可能是因為具備有以下的蛋白質(又被稱為致病因子 (virulence factor))：Urease、flagella、lipopolysaccharides (LPS)、VacA、adhesin，以及 CagA 等。

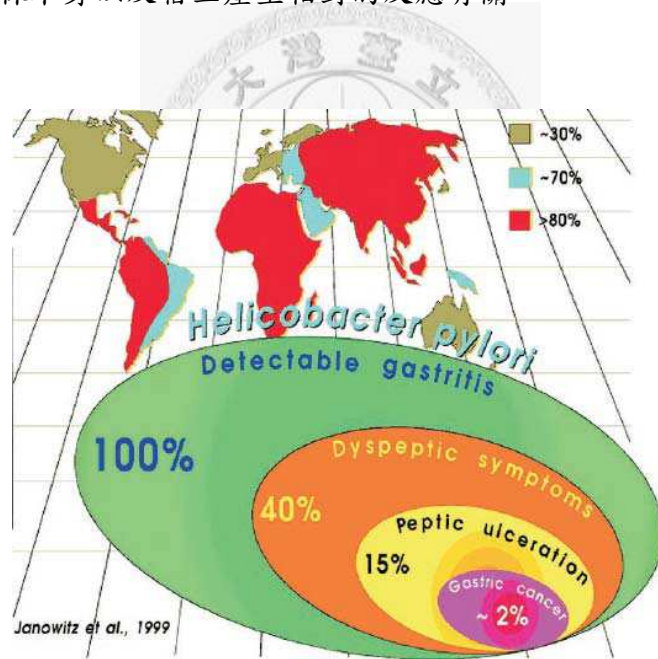
Urease 主要是存在幽門螺旋桿菌的細胞膜中，可將尿素分解生成氨 (ammonia)，以中和菌體周圍的酸性環境，使幽門螺旋桿菌生存在 pH 條件為 6.9~8 的環境下，是目前認為幽門桿菌可克服胃中強酸環境而存活的主要原因 [38]。而幽門螺旋桿菌的鞭毛 (flagella) 則可幫助幽門螺旋桿菌快速的由強酸性胃內腔穿透至胃上皮細胞，到達細胞表面的中性環境，形成群落 [39-43]。而 LPS 醣蛋白則可模擬宿主細胞的醣蛋白，使得幽門螺旋桿菌可躲避宿主之免疫系統的清除。此外，幽門螺旋桿菌的細胞膜還含有多種蛋白質及醣類，其中一種醣蛋白分子複合物稱為 adhesin，可與胃上皮細胞的表面受體形成專一性之結合 [37]，adhesin 主要是由 BabA、SabA、OipA 三種醣蛋白構成；除此之外，幽門桿菌亦具分解脂質的酵素 (lipase)，如 phospholipase A 與 phospholipase C，可分解胃黏膜的脂質，改變胃黏膜的成分。而當幽門螺旋桿菌結合上宿主細胞後，則可透過第四型分泌系統將其餘的致病性蛋白，例如 cagPAI 家族 (Cag A、CagE...)、VacA 等送入宿主中，並對宿主細胞產生傷害 [44-46]。

三、 幽門螺旋桿菌的流行病學

幽門螺旋桿菌存在於世界上半數人口以上的胃部，而開發中地區의 感染率 (如亞洲、中東地區、南美洲以及非洲) 則是遠高於已開發地區 [47, 48]。多數的感染皆從幼兒時期便已發生，特別是在開發中國家，五歲孩童已有 50 % 以上的感染率，到了成人更是高達 90 % [49]。以性別上而言，男女感染率無論在開發中或已開發地區的比例皆無明顯差異 [50, 51]。

就發病率而言，開發中國家較已開發國家高出約 1~3 %，且發病時間經常在

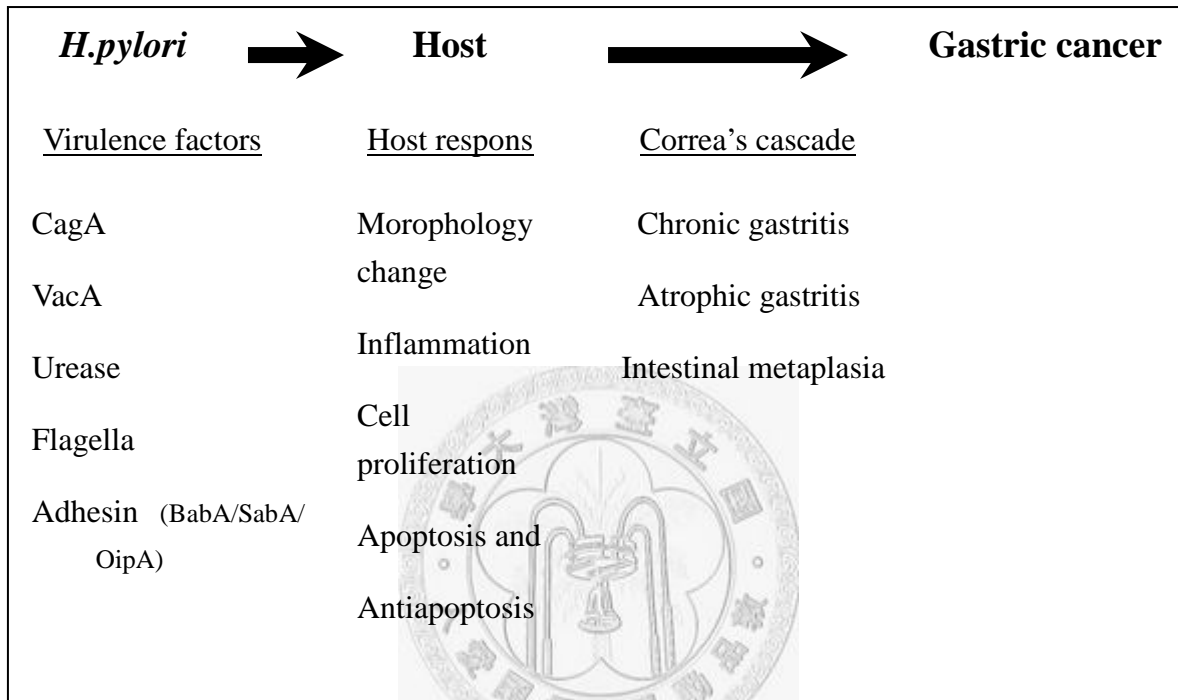
初期感染的幾年，意即對幽門螺旋桿菌的急性細菌感染免疫反應多半發生在兒童時期[49, 51]。而由血液檢測中發現，這種感染是可回覆的 (sero-reversible)。舉秘魯的一項調查為例，在同一群六個月大的嬰兒的血液檢測中，發現其中有 71% 受到感染，然而在十八個月大時，感染率卻降低為 48 % [52]，表示幽門螺旋桿菌是可以被人體免疫系統清除的。然而，一旦發生了幽門螺旋桿菌的反覆性感染，則有可能會轉變為幽門螺旋桿菌的慢性感染，到了成年，病患通常會有慢性胃發炎的現象[53]。並且逐漸產生消化不良等現象，甚者會逐漸轉變為消化性潰瘍[54]；而在這當中，可能會有 2~3 % 的人口最終惡化為胃癌（圖四）。然而，由於並非所有感染幽門螺旋桿菌的患者均會演化成胃癌。這也暗示著，幽門螺旋桿菌的致癌與否可能跟菌株本身以及宿主產生相對的反應有關。



(圖四：摘自 Med Sci Monit 9(7): SR65-78 (2003))

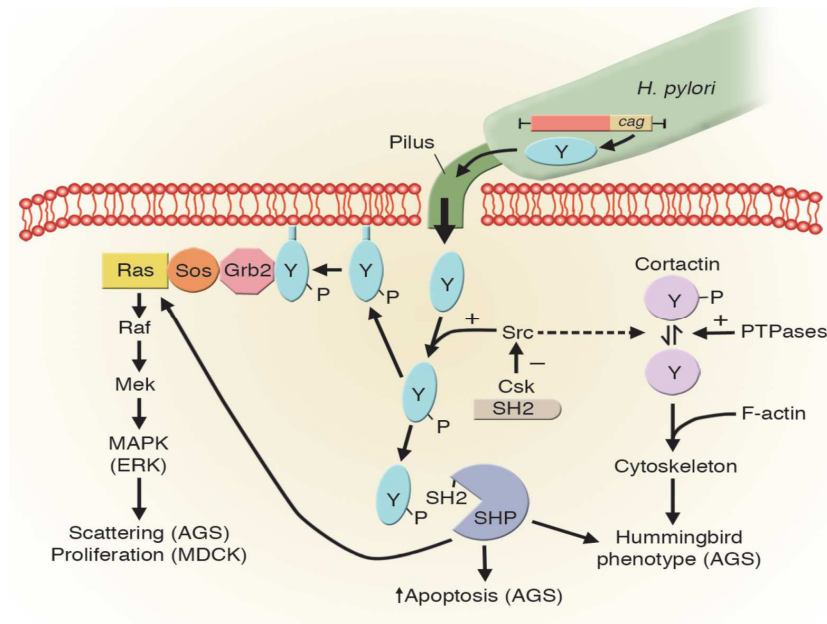
第三節 幽門螺旋桿菌所造成之宿主反應 (host response)

就目前研究所知，幽門螺旋桿菌感染宿主細胞後，可能會產生的反應如下頁表的整理，以下將分別就各項反應做介紹：



一、細胞型態改變 (Morphology change)

胃細胞被幽門螺旋桿菌感染後，最明顯的的特徵就是細胞型態的改變，主要是細胞的型態會有拉長的型式，又稱為蜂鳥狀 (hummingbird phenotype)。根據目前的研究顯示，幽門螺旋桿菌主要是透過 CagA 蛋白來影響細胞的型態。其機制以圖五說明之：



(圖五：摘自 The Journal of Clinical Investigation **113**:321-333 (2004))

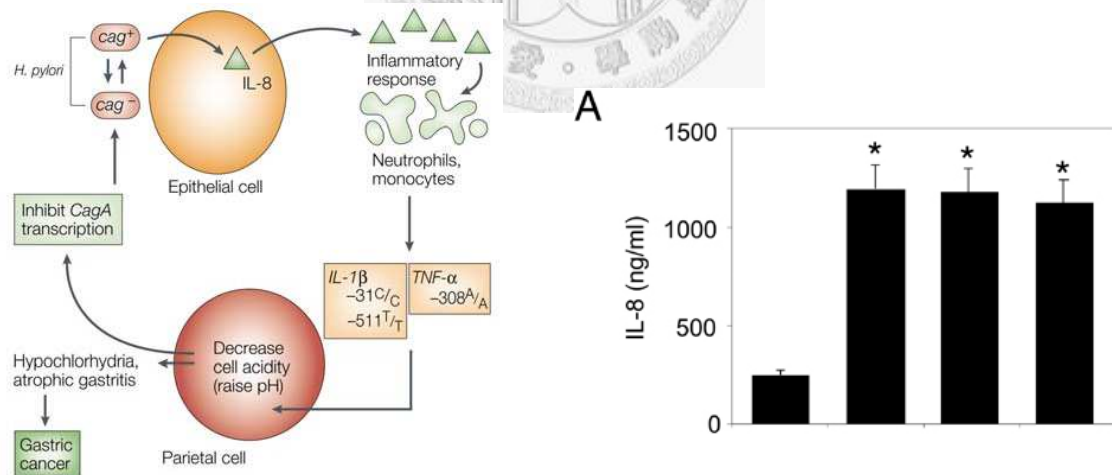
CagA 蛋白是幽門螺旋桿菌所產生的諸多致病因子 (virulence factor) 之一，也是至今幽門螺旋桿菌的致病因子中，被研究最為透徹的。在幽門螺旋桿菌中，並非所有幽門螺旋桿菌菌株都會表現 CagA，只有帶有 cagPAI (cag Pathogenicity Island (PAI)) 這個特殊的基因群 (gene cluster) 的幽門螺旋桿菌能夠表現第四型分泌系統 (type IV secretion system, TFSS) 所需之蛋白質以及 CagA [44]。當幽門螺旋桿菌黏附到胃上皮細胞時，會透過第四型分泌系統將 CagA 送入宿主細胞內。此時 CagA 會被 Src kinase 磷酸化，進而影響到許多下游分子，並且會影響宿主細胞的生理。而 CagA 是目前已知的原核生物蛋白質中，少數幾個能夠進入真核細胞並且受到磷酸化修飾的例子[55]。

因此，當 CagA 蛋白質轉送至宿主細胞中，並被宿主細胞的 Src kinase 磷酸化後，磷酸化的 CagA 一方面會與 SHP-2 蛋白質磷解酶結合並不正常增加其活性，使得 focal adhesion kinase 的活性被抑制，造成細胞型態有拉長的現象，並增加細胞的移動能力 [48]。此外，CagA 會與 Grb2 作用，並進一步活化

Ras/Raf/Mek/MAPK 的路徑，產生細胞分散 (scattering) 的現象。另外，CagA 還會與 Csk 作用而迴饋抑制 Src 的活性，使得 cortactin 的磷酸化的情形減少，此時，無磷酸化的 cortactin 可與 F-actin 結合，因而使細胞產生蜂鳥狀的型態 (hummingbird phenotype) [49]。

二、發炎 (Inflammation)

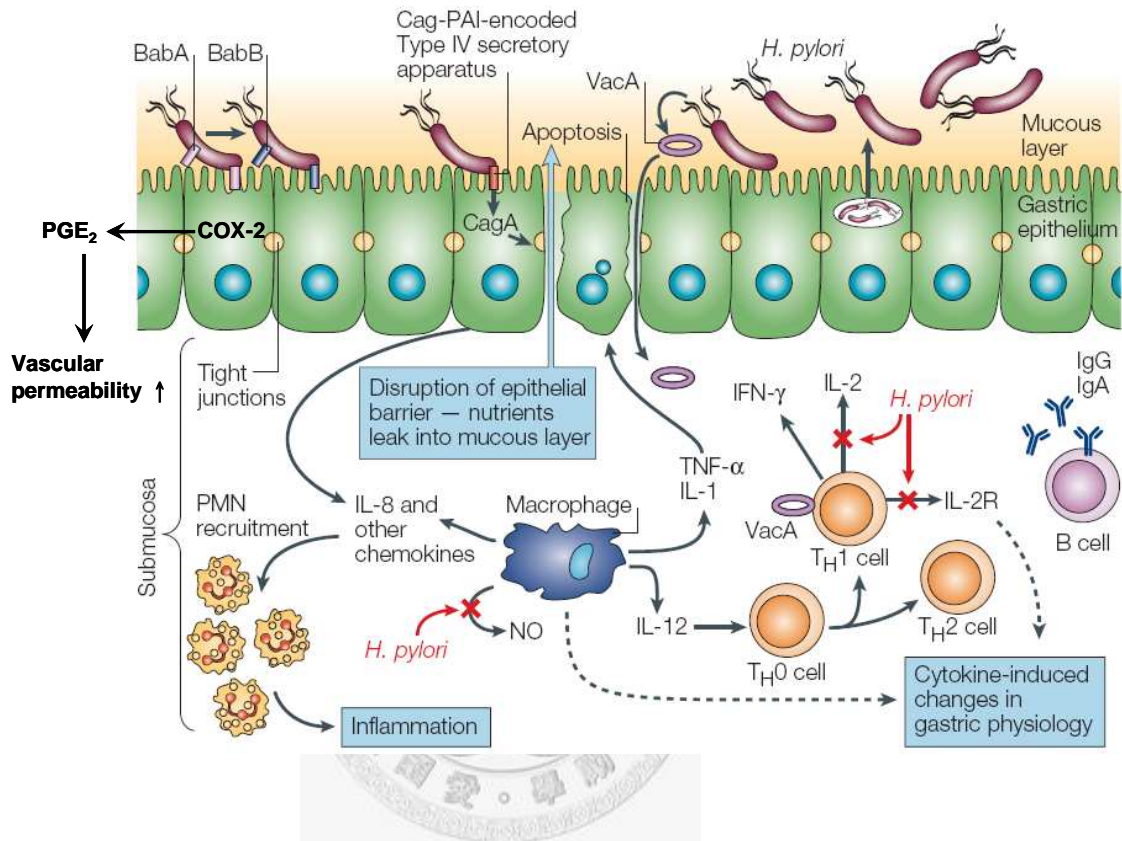
幽門螺旋桿菌的 CagA 蛋白除了會造成細胞型態改變，還會誘使受感染細胞許多種 cytokines 表現量增加，特別是 interleukin (IL)-8。IL-8 表現量高的細胞容易產生發炎反應 (inflammation)，並且當 IL-8 增加表現時會吸引 (recruit) 中性細胞 (neutrophils) 和單核球 (monocytes) 到受感染細胞附近，這些免疫相關細胞會釋放一些 pro-inflammatory cytokines，像是 IL-1 β 或 tumour necrosis factor (TNF)- α 等物質，這些物質產生會使胃部 pH 值上升促使受感染細胞產生慢性發炎(圖六)。



(圖六：摘自 Nature Review Cancer, 2:28-37 (2002))

另外也有文獻指出幽門螺旋桿菌可能可藉由 NF- κ B、AP-1 或者 C/EBPs 等轉錄因子的活化，促進 COX-2 (cyclooxygenase-2) 的表現，COX-2 的表現可以製

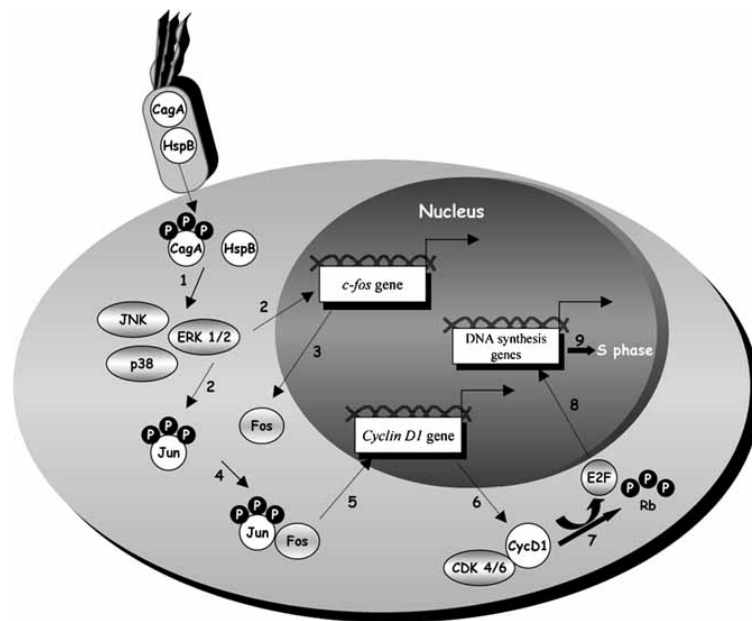
造下游的前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) [56] (圖七)。促使血管通透性增高，使得免疫細胞更容易進入發炎的区域。



(圖七：摘自 Nat Rev Microbiol. 2(9):747-765(2004))

三、細胞增殖 (cell proliferation)

幽門螺旋桿菌感染後，也會造成細胞的不正常增生 (proliferation)。首先磷酸化的 CagA 會活化 MAP kinases，針對 ERK1/2 以及 Jun 蛋白進行磷酸化並促進 c-fos 基因轉錄，接下來 Jun 會和 FOS 蛋白形成 heterodimer 一起進入細胞核中作用。Jun/FOS heterodimer 可能會進一步影響 Cyclin D1 基因轉錄和蛋白質表現，被轉譯出來的 Cyclin D1 可進一步和 Cyclin-dependent kinase 形成複合體：Cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK 4/6)(圖八)。



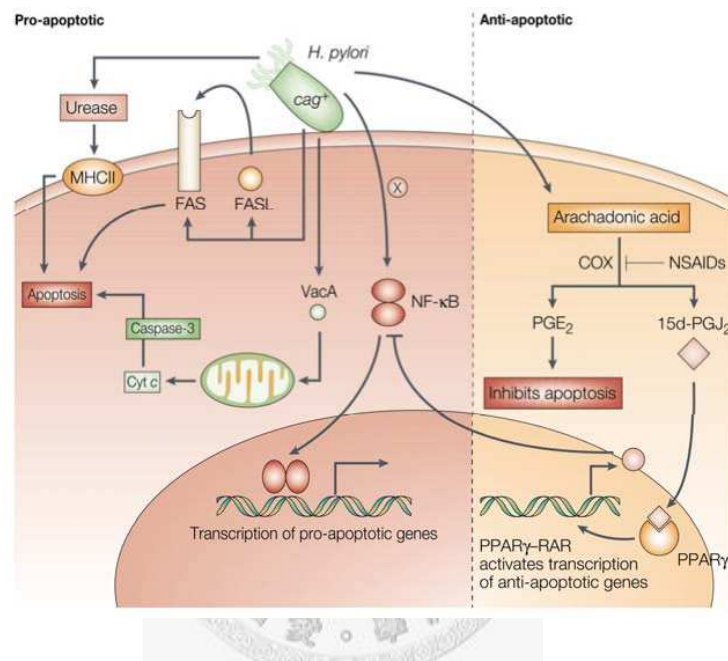
(圖八：摘自 Journal of Cellular Physiology, 200:334-342 (2004))

當 Cyclin D1 大量表現時會針對 Rb 蛋白進行磷酸化進而釋出轉錄因子 E2F，E2F 對於 DNA 合成為相當重要一環，大量表現 E2F 可以縮短細胞處在 G1 phase 的時間，並且造成細胞增生 (proliferation)。

四、細胞凋亡與抗細胞凋亡 (apoptosis and anti-apoptosis)

關於幽門螺旋桿菌是否會造成細胞凋亡反應有兩派說法：一派認為幽門螺旋桿菌感染細胞後可能會藉由下列三種方式造成寄主細胞產生細胞凋亡：(1) 幽門螺旋桿菌感染後會促進 FAS 表現，並藉由和 FAS ligand (FASL) 的結合促進細胞凋亡發生。或者 (2) 幽門螺旋桿菌會藉由和 class II major histocompatibility complex (MHC) 物質的結合促進細胞凋亡；另外，除了前述兩項機制，第三種可能是：幽門螺旋桿菌的 VacA 基因可以透過活化 cytochrome C 進一步活化 caspase 3，促使胃部細胞進行細胞凋亡 (apoptosis)。

而另一派則認為，幽門螺旋桿菌可能會藉由 NF- κ B 活化，促進 COX-2 (cyclooxygenase-2)、iNOS (inducible nitric oxide synthase)、Bcl-2 等抗細胞凋亡因子的表現。而又因為 Bcl-2 家族的蛋白質可抑制細胞凋亡因子 p53、Bax 的表現 [56] (圖九)。因此幽門螺旋桿菌可能也具有使細胞產生抗細胞凋亡反應的效果。而雖然有文獻指出，COX-2 可能也具有抗細胞凋亡的功能[56]，但是 COX-2 究竟是如何達到抗細胞凋亡的機制，至今還沒有較全面清楚的結論。



(圖九：摘自 Nature Review Cancer, 2:28-37 (2002))

儘管對於幽門螺旋桿菌的致癌機制尚未完全了解，但目前科學家仍接受，幽門螺旋桿菌是迄今唯一已知與癌症發生有高度相關的病原菌。在過去利用動物實驗的研究結果 (Mongolian gerbils, 蒙古沙鼠) 已經證實，幽門螺旋桿菌的感染會導致胃癌的發生[57]，而且其過程符合 Correa's cascade。

然而如以上所述，實際上幽門螺旋桿菌的感染，對宿主細胞所造成的反應以及訊息傳遞路徑的調控是非常複雜而多面向的。在過去已有學者使用 microarray

和 proteomics 的技術作整體性的研究，不過在 *H. pylori* 所引起各種型態變異或其他宿主反應的參與，仍有許多有待釐清之處。

第四節 第二型環氧化酶與其下游分子和胃癌的發生

一、 第二型環氧化酶 (Cyclooxygenase-2, COX-2)

COX 全名為環氧化酶 (Cyclooxygenase, COX)，目前所知總共有三種亞型 (isoform)：分別為 COX-1、COX-2 及 COX-3。而目前對 COX-1 及 COX-2 的瞭解較為清楚，某些文獻認為 COX-3 為 COX-1 的 split form，並主要表現在人的腦部及心臟。COX-1 及 COX-2 分子量均為 71 kDa，由 600 多個胺基酸所組成，兩者序列有 63 % 之相似性；一般而言，COX-1 會恆定表現於大部分正常組織中，包括腎臟、肺臟、胃、十二指腸、結腸與直腸等，負責調控基本生理功能，例如腎臟血流、胃黏膜的完整性及血小板之正常功能，並合成生理需求下所需之前列腺素[58, 59]。而 COX-2 則為誘發表現型基因。除了腦部、胰島細胞、卵巢、子宮與腎臟之外，大部分正常組織並不表現 COX-2；而根據先前的研究顯示，COX-2 會受 TNF- α 、LPS、IL1 之刺激而大量表現在發炎的組織或器官[60-65] 以及活化的巨噬細胞中。COX-2 主要的功能為合成前列腺素 (Prostaglandin)：COX-2 可將花生四烯酸 (arachidonic acid) 轉化為 PGG₂，再經由 peroxidase 代謝成 PGE₂、PGF₂、PGI₂ 和 TXA₂ 等…[66, 67] 這些產物與發炎反應、免疫功能、血小板凝集、血管新生、排卵及受孕等作用相關(圖十)。根據先前的研究顯示，在動物實驗中，惡化(malignancies)的組織或器官中，均有 COX-2 的大量表現。在 *in vitro* 的實驗也得到類似的結果[68-73]。

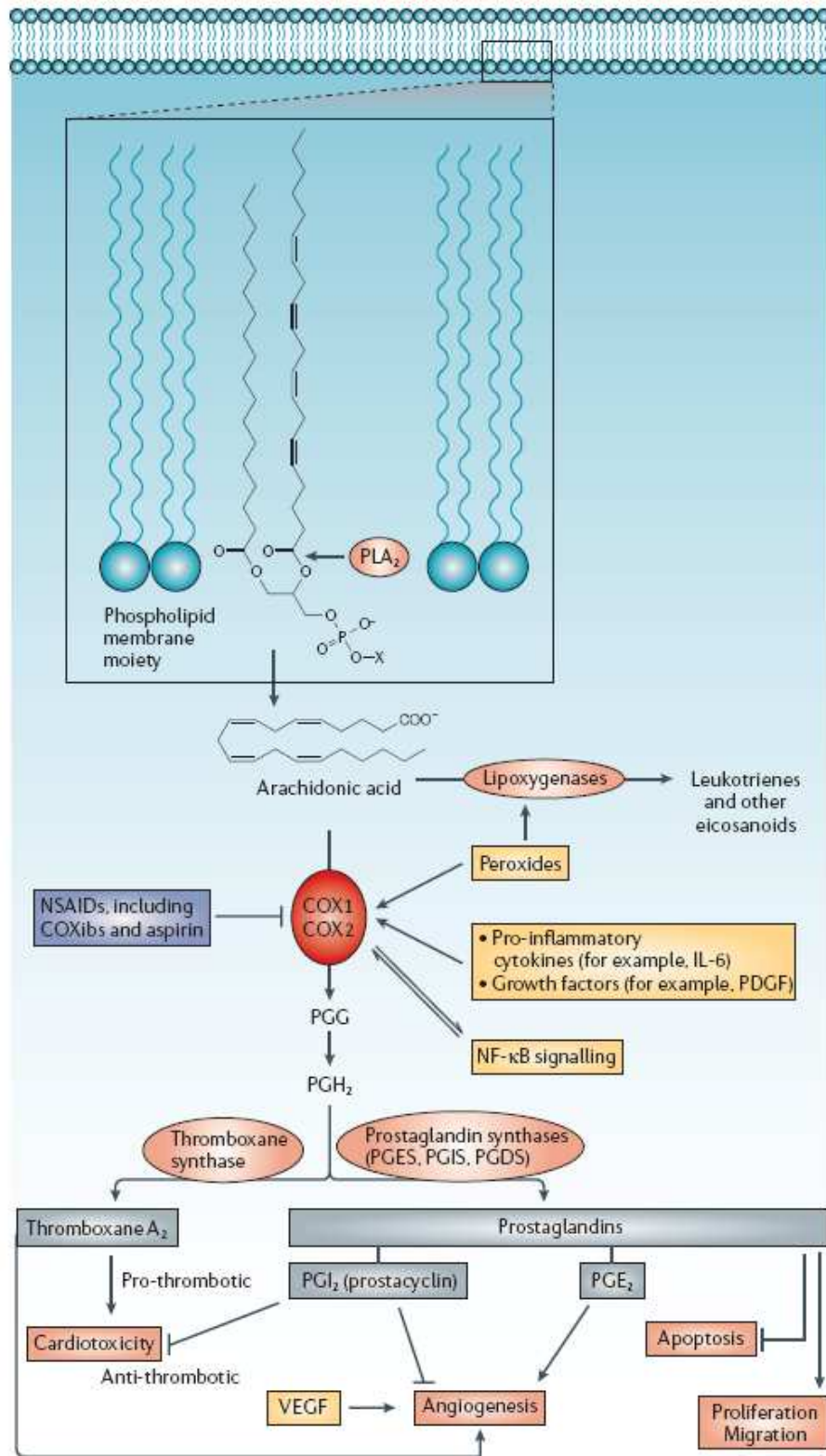
二、 COX-2 與胃癌

先前的文獻指出，在胃癌上皮細胞株感染幽門螺旋桿菌後，會有大量表現 COX-2 的情形[72, 74]，而前列腺素的受體表現量亦有顯著的增加，代表 COX-PG 系統可能參與胃癌發生的過程。此外，在動物實驗中顯示，抑制 COX-2 可以使

得裸鼠無法成功的移植胃癌腫瘤，而若對老鼠使用 COX 的抑制劑(如阿斯匹靈)(註)則可降低罹患胃癌的可能性[75]；在流行病學的研究中也顯示，阿斯匹靈或者非類固醇消炎藥物的 (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) (如 Celecoxib 與 Rofecoxib) 的服用可以減低消化系統方面的惡性腫瘤的發生；而在臨床上，若是對於罹患萎縮性胃炎的病患使用 COX-2 的選擇性抑制劑，則有助於減緩發炎，以及降低腸胃道罹患與幽門螺旋桿菌相關之胃癌的風險(圖十)。因此目前認為，COX-2 的表現可能是帶有 Cag-A 的幽門螺旋桿菌致癌的一個重要原因之一[76]。

(註·阿斯匹靈對 COX 無選擇性，可對 COX-1 以及 COX-2 均產生抑制效果。)





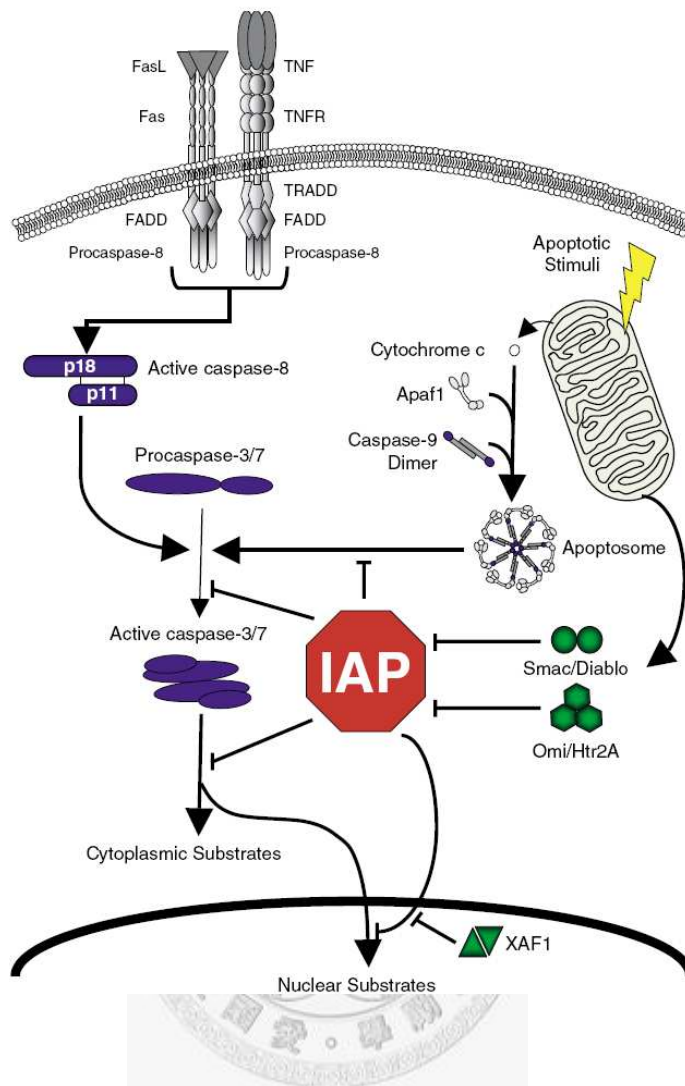
(圖十：摘自 Nature Review Cancer, 6(2):130-140 (2006))

在 2003 年，由 Krysan K 等人的研究指出，COX-2 以及其下游的分子 PGE₂ 可能有助存活素 (survivin) 減低其的泛素化 (Ubiquitination) 的功能，進而可使得存活素在細胞中大量存在，而存活素則是一與抗細胞凋亡相關的蛋白，因此為 COX-2 是如何調控細胞中的抗凋亡反應，提供了一個可能的途徑[77]。

第五節 存活素與胃癌

一、存活素 (Survivin)

存活素 (survivin) 是細胞凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis, IAP) 的一種。目前所知的細胞凋亡抑制蛋白包括: X-linked IAP(XIAP), cIAP1, cIAP2, livin, NAIP, apollon 以及 survivin。根據先前的研究顯示，細胞凋亡抑制蛋白 (IAP) 主要是透過抑制 caspase 的活性，來達到抑制細胞凋亡的功能。而存活素則是細胞凋亡抑制蛋白中最小的分子，只有大約 142 個胺基酸，約 16.5 kDa，一般討論到存活素的功能，主要認為存活素可以透過和 XIAP 的合作，抑制 caspase3/7 酵素的成熟，以及抑制 caspase3/7 的活性，或者干擾 Smac/DIABLO 的形成，藉以達到抑制細胞凋亡的功能(圖十一)。



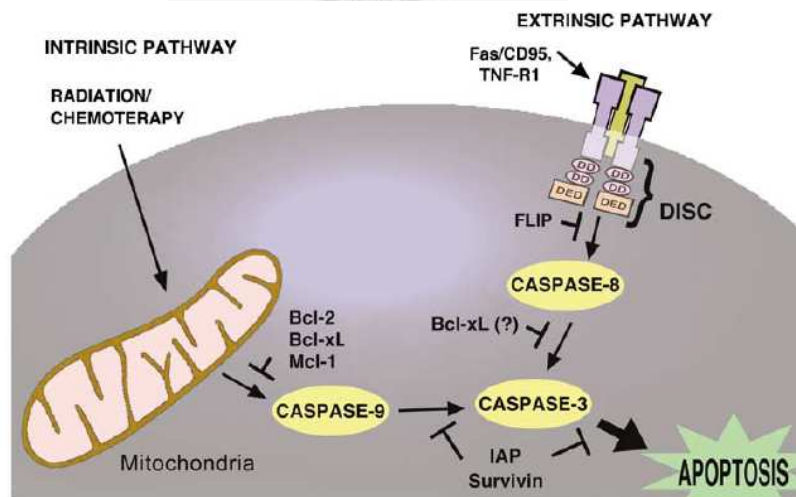
(圖十一：摘自 *Oncogene*, 22(53):8568-8580 (2003))

除了在惡性腫瘤或產生癌症的組織和細胞中有存活素的大量表現[78]，一般在正常的情況下，存活素卻主要是表現在胚胎組織或細胞中；而在正常的成人組織或細胞中，則幾乎偵測不到存活素的表現；因此，進一步的研究確認，在正常的情況下，存活素主要是在細胞的分裂中扮演重要的調控角色，而由於其半衰期很短(約 30 分鐘)，因此當在細胞結束分裂時，存活素就不會存在在正常的細胞中。而在細胞分裂時，存活素可以透過和 Aurora B, Borealin/Dasra 以及 INCENP (Inner centromere protein) 的結合，形成染色體傳遞複合體 (chromosome passenger complex)，調控細胞分裂時染色體的分配[79]，因此在 G₂/M phase 時，

可被大量觀測到。因此科學家亦視存活素為一個癌症生成的重要因子，不但可以使癌細胞大量分裂，亦可達到抑制癌細胞凋亡的功效。

根據先前的研究顯示，存活素會大量表現在惡性腫瘤的組織或癌細胞中，這些惡性的腫瘤及癌細胞包括：食道癌、胃癌、大腸癌、胰臟癌、乳癌、卵巢癌、肺癌以及血液方面的癌症。而在胃癌當中，存活素的表現大約為 34.5 % ~ 68 % 左右；目前在胃癌的研究當中，存活素的表達可以視為一種第三期胃腺癌的臨床診斷因子，在 157 個胃癌組織當中，大約有 63 個呈現陽性反應(約 40.1 %)，而在臨床的病理學診斷當中，存活素的表現被視為和腫瘤的大小成正相關。因此在胃癌的研究當中，存活素的大量表達可以視為一種胃癌情形的診斷因子，存活素的表達越大量，代表預後情形越不佳[80]。

而在目前的基因治療上，也有文獻指出，若是以 siRNA 的方式 knock down 存活素的表現，將會使得裸鼠的胃癌腫瘤縮小[81]，亦有文獻指出，若是在胃癌細胞株(如 SGC-7901) 中以 siRNA 的方式抑制存活素的表現，將可誘導細胞凋亡。因此可以推測，存活素可能有做為基因治療的標靶的潛力(圖十二)[82, 83]。



(圖十二：摘自 Gene Ther, 13(6):464-477 (2006))

目前的研究顯示，存活素的上游調控因子包括 β -catenin/TCF、SP1、HIF α 、STAT3...等，這些因子可以幫助存活素在細胞中大量表現，而當存活素大量表現後，Cdc 2 則可磷酸化存活素的 Thr 34 使得存活素被穩定下來[78]。

二、 存活素與環氧化酶

先前的研究結果顯示，雖然知道 COX-2 會在許多惡性的腫瘤或惡化的組織和癌細胞中大量表現，但對於其如何參與癌化的過程並不十分清楚。近年來有許多報導指出，在許多惡性的腫瘤和組織切片，以及癌細胞當中，都有 COX-2 和存活素共同表達的現象。[84-89]。

而根據 Yu 等人在 2002 年發表在 British Journal of Cancer 的論文指出 [90]，由免疫染色切片的圖可知，相較於正常人的胃上皮組織切片，胃癌病人的腫瘤組織切片上，有較多 COX-2 以及存活素的大量表達；除此之外，若是以病人的腫瘤組織切片和正常人的胃上皮組織切片做 RT-PCR 的分析，可發現 COX-2 的表現以及存活素的表現在統計上有一級的相關性。而在胃癌的癌細胞株中，也可觀察到類似的現象，他們分析了包括正常的胃上皮細胞、病人的正常上皮細胞、腫瘤上的細胞以及 MKN45、AGS，和 KATOIII 這些胃癌細胞株，發現在腫瘤細胞以及胃癌細胞株都可以看見 COX-2 和存活素共同大量表現的現象。因此可以推測，在胃癌細胞或者惡化的胃癌腫瘤當中，COX-2 可能透過和存活素共同作用的方式，參與胃癌的發生。

而就幽門螺旋桿菌的感染與存活素的關係而言，Yu 等人同樣分析了經由幽門螺旋桿菌感染所造成胃癌的腫瘤組織切片，亦發現有存活素的大量表達 (26.7%)；因此可以推知，幽門螺旋桿菌的感染、COX-2 以及存活素的表達，可能都參與胃癌生成的過程。幽門螺旋桿菌極有可能是透過 COX-2 的因子，使得存活素在細胞中維持大量，因而使得癌細胞或者惡化的腫瘤組織中帶有大量的存活素。

第六節 本篇論文的研究目的

儘管過去數十年來對 *H. pylori* 的感染機制、造成的宿主反應以及與疾病的相關性已有非常多的研究。然而由於其透過宿主細胞內訊息傳遞的調控以及參與的分子相當複雜，至今仍有許多不明之處有待釐清。

本篇論文的研究的目的主要是希望可以了解幽門螺旋桿菌是如何誘使細胞啟動抗細胞凋亡反應。由先前研究指出，幽門螺旋桿菌可能誘發 COX-2 的大量表現。因此本篇論文想知道是否幽門螺旋桿菌的感染可以促使存活素在癌細胞中的表現量更為上升？除此之外，幽門螺旋桿菌是否藉由大量表現 COX-2 使得存活素可以穩定的存在細胞中，進而行使抗細胞凋亡反應使得胃癌產生？另外，參與存活素在細胞中穩定的因子又有哪些？是否包含 COX-2 下游分子 PGE₂？本篇論文使用胃癌上皮細胞 AGS，因其具有野生型之 p53 基因，因此在許多研究中被選為正常細胞的模擬。並希望藉由對 AGS 處理幽門螺旋桿菌，來進一步探究幽門螺旋桿菌誘導細胞產生抗細胞凋亡反應的機制。



第二章 實驗材料

一、幽門螺旋桿菌菌株

選用分離自臨床胃癌病人之幽門螺旋桿菌菌株（編號 HC3），由台大醫院內科提供。

二、胃腺癌細胞株

AGS cell line 胃腺癌上皮細胞（Human Epithelial Gastric Cells），由台大醫學院陳青周教授實驗室提供

1. **ATCC® (American Type Culture Collections)** : CRL-1739™
2. 此細胞株之 p53 基因為野生型，是一株最接近正常的胃癌細胞株胃腺癌上皮細胞。

三、細胞培養液及試劑：

1. **細胞培養液**：
 - a. DMEM 粉末培養基、Fetal Bovine Serum 購自 Hyclone, Utah, United States of America。
 - b. Penicillin-streptomycin (10X)、Trypsin-EDTA (10X)購自 Invitrogen, California, United States of America。
2. **轉染 (Transfection) 試劑**：

PolyJet™ DNA 購自 SignaGen Laboratories 公司。
3. **藥物**：
 - a. Celecoxib 購自輝瑞藥廠。

- b. dmPGE₂ 購自又鑫生物科技。
- c. MG-132 購自默克(Merck) 公司。

四、大腸桿菌及表現載體 (expression vector)

1. COX-2 表現 clone:購自探索科技。
2. COX-2 shRNA 表現 clone:購自中央研究院 RNAi Core Lab。
3. pEGFP 取自台大醫學院卓越研究中心 基因體研究組教學資源中心(購自 BD Clontech)。

五、質體抽取 kit

1. High-speed plasmid mini kit 購買自 Geneaid corporation
2. High-speed plasmid midi kit 購買自 Geneaid corporation

六、儀器及裝置

1. Amersham Bioscience Ultrospec 3000 Spectrophotometer
2. Amersham pharmacia biotech electrophoresis power supply 301/1001
3. Beckman Coulter Microfuge R centrifuge
4. Beckman NVT 90 ultraspeed rotor, for Beckman Centrifuge
5. Beckman Ultracentrifuge
6. Bertec Micro-centrifuge
7. *CHERNG HUEI* oil bath incubator
8. *Cocono* Hybridization incubator
9. ELMI intelli mixer RM-2M
10. Firstec Scientific hybridization oven
11. Hitachi himac CF15R centrifuge
12. Jenco 6173 pH meter

13. Kubota 1020 centrifuge
14. Scientific Industries Vortex-2 Genie
15. Sonics and Materials Inc. Vibra Cell™
16. Olympus IX70 Epi-fluorescence microscope
17. PLA-16,250 rotor for Beckman Ultracentrifuge
18. TKS Orbital shaker
19. Tomin TM-325 autoclave

七、藥品與試劑組

1. Acrylamide、N,N'-Methylene-bis-acrylamide、Tris、SDS、Urea、DTT、Triton X-100 等化學藥品購自 Amersham Bioscience, Buckinghamshire, United Kingdom。
2. BCA Protein Assay Reagent 購自 Pierce, Illinois, United States of America。
3. Protease inhibitor 購自 Merck, New Jersey, United States of America。
4. Phosphatase inhibitor 購自 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany。
5. Ammonium sulfate、Bromophenol blue、Ethanol、EDTA、Glycerol、Imidazole、Potassium chloride、Sodium hydroxide、Phosphatase inhibitor cocktail 1 & 2、Protease inhibitor cocktail 等化學藥品購自 Sigma, Missouri, United States of America。
6. Acetic acid、Acetonitrile、 β -Mercaptoethanol、Methanol、TEMED 購自 Merck, New Jersey, United States of America。
7. Prestained Protein Ladder Prep1025 購自 BioMan Scientific Co; Ltd, Taiwan。
8. 初級抗體 (primary antibodies):
 - a. anti-COX-2 購自 Santa-Cruz Biotechnology 公司。

- b. anti-survivin 購自 Cell Signaling Technology, Massachusetts, United States of America。
9. 次級抗體 (secondary antibodies) :
- a. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody 購自 Pharminge, California, United States of America。
 - b. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody 購自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pennsylvania, United States of America
 - c. HRP-conjugated donkey anti-goat IgG antibody 購自 Santa-Cruz Biotechnology 公司
 - d. Anti-rabbit IgG, molecular probe Alexa Fluor 546 goat ; anti-mouse IgG 購自 Invitrogen Corporation。
10. DAPI, Hoechst 33342 : 購自 Invitrogen Corporation。



第三章 實驗方法

第一節 幽門螺旋桿菌與胃腺癌細胞的培養

一、 幽門螺旋桿菌之菌株及培養條件

菌株分離自胃癌病人的腸胃道內，經初級培養 (primary culture) 後於 -80°C 冷凍保存。取出適量菌液均勻塗布於血液平板培養基 (CDC Anaerobic Blood Agar, BD BBL™stecker™ plate；含有 5 % defibrinated sheep's blood、0.04 % L-cystine、0.0005 % hemin、0.001 % vitamin K、0.5 % agar、0.5 % yeast extract、0.5 % NaCl、0.5 % papaic digest of soybean meal、1.5 % pancreatic digest of casein) ，置於 37°C 之微好氧環境 (5 % O_2 、10 % CO_2 、85 % N_2) 培養箱作繼代培養 (sub-culture) 約二至三天，加入 2mL PBS，以三角玻棒使菌落懸浮並收集菌液。為避免細菌的變異、或因次級培養代數過多造成細菌感染能力變差，菌株的培養以五代內為限(約兩星期)。

二、 胃腺癌細胞的培養

1. 培養基 (medium) 的配製

DMEM 粉末狀培養基以二次蒸餾水完全溶解，加入 3.7 克碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 並使其完全溶解，接著以 pH 儀將培養基調成 pH 7.3~7.4 後，以二次蒸餾水將體積補至 1000 mL，然後通過 $0.22\ \mu\text{m}$ 細胞培養專用無菌過濾膜，分裝備用。使用前加入胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 及青黴素與鏈黴素 (Penicillin/ Streptomycin)，使其最終濃度為含 10 % FBS 及 1 % 抗生素 (分別是 10 units/mL 的青黴素及 10 units/mL 的鏈黴素)，作為培養細胞用。

2. 細胞的培養 (cell culture)

AGS 細胞以底面積為 75 cm^2 的培養瓶 (T-75 flask, Corning[®]) 培養，置於 37°C ， $5\% \text{ CO}_2$ 的恆溫培養箱中。待細胞在培養瓶中長至八、九成滿，以 PBS 溶液沖洗細胞二次，再加入含有 $0.2\% \text{ EDTA}$ 及 $0.5\% \text{ 胰蛋白酶}$ 的緩衝溶液 (Trypsin-EDTA) 1 mL 將細胞剝落 (trypsinization) 下來，在 37°C 下處理三至五分鐘，最後加入 3 mL 培養基停止胰蛋白酶對細胞的作用。將細胞均勻打散後，重新分配適量細胞至培養瓶中繼代培養 (sub-culture)，或至細胞培養皿 (cell culture dish, Corning[®]) 以進行實驗。

3. 細胞計數 (counting)

取等體積的細胞懸浮液與 trypan blue 混和均勻，然後用細胞計數盤 (hemocytometer) 在顯微鏡下計算細胞數目。

4. 細胞轉染 (transfection)

a. 細胞種植 (cell seeding)

AGS 細胞經 trypsinized 且均勻打散後，分配至 6 公分 培養盤 (p60 culture dish)，使每盤細胞數為 $3 \times 10^5 / \text{well}$ 。待 16 小時 後，細胞長至八成滿即可進行轉染實驗。

b. 轉染前的準備

轉染時使用 PolyJet DNA reagent 和不含抗生素及血清的 DMEM 於 37°C 。

c. 轉染步驟:

- i. 取 $250 \mu\text{L}$ DMEM 混合 $10 \mu\text{g}$ plasmid。
- ii. 取 $250 \mu\text{L}$ DMEM 混合 $10 \mu\text{L}$ PolyJet DNA reagent。
- iii. 待步驟 ii 混合 5 分鐘 ，將步驟 i 加入步驟 ii 中，靜待二十分鐘。
- iv. 以 PBS 2 mL 清洗兩次，並將細胞的培養溶液置換為不含血清及抗生素之 DMEM 5 mL 。
- v. 待二十分鐘後，將步驟 iii 加入細胞中，均勻混合，並於 37°C $5\% \text{ CO}_2$

的恆溫培養箱培養六小時。

- vi. 六小時候，將含 plasmid 以及 PolyJet DNA reagent 的細胞培養溶液置換為完全培養溶液（含有 1 % 的抗生素及 10 % 胎牛血清之 DMEM），同樣於 37°C 5 % CO₂ 的恆溫培養箱培養 16 至 18 小時。
- vii. 16 至 18 小時後，再換一次完全培養溶液，若是有轉染帶有綠色螢光蛋白 (EGFP) 之細胞，可於此時在螢光顯微鏡下觀察其螢光的情形，並了解轉染的效率。
- viii. 於第三天可以處理幽門螺旋桿菌，或者收取細胞。

附註： 不同培養條件需要加入不同的轉染溶液，以六公分培養盤為例，其總溶液體積為 5 mL，取 250 μ L DMEM 混合 10 μ g 質體 加入 250 μ L DMEM 混和等質體質量之體積之 PolyJet DNA reagent。

Culture dish	Plasmid(μ g)	PolyJet DNA reagent(μ L)	DMEM(μ L)
6 cm dish	10	10	250
10 cm dish	28	28	500

第二節 幽門螺旋桿菌感染胃腺癌細胞

一、細胞的準備 (plating)

AGS 細胞經 trypsinization 並均勻打散後，等量分配至 60 mm 細胞培養皿或六孔培養盤中，待兩天後細胞長至八、九成滿，在預備幽門螺旋桿菌感染前，以 PBS 沖洗細胞兩次，換成不含有抗生素的培養液 (antibiotics-free medium) 至少三小時以上。

二、幽門螺旋桿菌的收取

幽門螺旋桿菌解凍後，再繼代培養一代即可使用。每一盤血液平板培養基上的幽門螺旋桿菌以 3 mL PBS 刮取下來，將全部收下來的菌液混合均勻，以 7,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液，再以適量體積的 PBS 均勻打散細菌沈澱；取 100 μ L 菌液和 900 μ L PBS 混合均勻 (10 倍稀釋)，以 PBS 為空白液，測量 600 nm 的可見光吸光值；得到的吸光值 χ 乘上 10^9 ，即表示細菌數為 $\chi \times 10^9 / \text{mL}$ 。收下來的細菌須盡快加到細胞中，因為微好氧幽門螺旋桿菌在室溫環境下只能存活 2 小時。

三、幽門螺旋桿菌感染胃腺癌細胞

將培養液換為不含抗生素的培養液三小時以上後，即可收取幽門螺旋桿菌對 AGS 細胞進行感染。在此之前須先計算細胞數目，才能決定在幽門螺旋桿菌感染比例 (multiplicity of infection, M.O.I) 值為 100 的情形下所需要的菌液體積。細菌加到細胞中要以平均分散為原則。在 37°C，5 % CO₂ 細胞培養箱進行感染。

四、胃腺癌細胞分離 (AGS cells fractionation)

感染實驗中，幽門螺旋桿菌會附著在細胞膜上，因此在電泳分析前，為避免細菌蛋白質影響細胞蛋白質定量結果，要先分離掉細胞膜。

AGS 細胞以 4 °C PBS 沖洗數次，去除未貼附在細胞上的懸浮細菌，再加 7 mL 的 4 °C PBS 到細胞培養皿中，用刮杓把細胞刮下來，重複兩次以完全收集細胞，收集在 15 mL 離心管，之後以 200 g 離心 5 分鐘，去除上清液；加入 8 mL 4°C homogenization buffer (含有 250 mM sucrose、3 mM imidazol, pH 7.4) 將沈澱的細胞混合均勻，以 1,500 g 離心 10 分鐘，去除上清液；用 700 μ L 含有 1 % 蛋白質磷解酶抑制劑 (使用 Roche 出產的 phosphatase inhibitor cocktail tablet, PhosSTOP) 及 1 % 蛋白質水解酶抑制劑 (使用 Merck 出產的 protease inhibitor cocktail) 的 4 °C homogenization buffer 將沈澱在底部的細胞混合均勻並轉換至

1.5 mL 微量離心管 (eppendorf) 中，然後用 1 mL 針筒來回推吸四次以上，利用針筒孔徑大小的推擠篩選力量達到破壞細胞的細胞膜而對細菌顆粒沒有影響的效果；之後以 1,500 g 離心 10 分鐘，得到的沈澱即為細菌顆粒及細胞膜未被破壞的完整細胞 (bacteria + unlysed cells)；將取得的上清液轉換至新的 1.5 mL 微量離心管，再以 20,000g 離心 1 小時以上，得到的沈澱為細胞膜、細胞核 (membrane + nuclear)，上清液為細胞質 (cytosol)，取上清液的部分繼續實驗。

第三節 質體抽取

一、 微量質體(mini plasmid)的抽取

前一天先以 10 mL 養菌管裝取 5 mL 培養液 (LB 或 TB) 加入抗生素，使抗生素的濃度為正確的濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 並加入 100 μL 左右菌液，培養 16 小時，第二天取 1 mL 菌液，以 14,500 rpm 離心 2 分鐘。並加入 200 μL PD1 buffer，上下搖晃 10 次，再加入 200 μL PD2 buffer，上下搖晃 10 次，再加入 300 μL PD3 buffer，上下搖晃 10 次。以 14,500 rpm 離心 5 分鐘，趁等待時，架好 kit 所附的管柱及微量試管，待五分鐘後，取出上清液，滴入 kit 所附的管柱中，以 14,500 rpm 離心 10 秒，倒掉廢液，以 400 μL W1 buffer，再以 14,500 rpm 離心 10 秒，再次倒掉廢液，加入 600 μL Wash buffer，再以 14,500 rpm 離心 10 秒，倒去廢液。以 14,500 rpm 離心 2 分鐘，將管柱上殘留廢液離乾。加入 40 μL 水或 TE buffer，靜待 2 分鐘，使管柱吸收水或 TE buffer。再以 14,500 rpm 離心 2 分鐘。即可取得微量質體，用於之後的轉染實驗或者可用於 DNA 定序。

二、 中量質體(midi plasmid)的抽取

前一天先以 500 mL 三角錐型瓶裝取 150 mL 培養液 (LB 或 TB) 加入抗生素，使抗生素的濃度為正確的濃度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 並加入 1 mL 左右菌液，培養 16 小時，第二天將全部菌液倒入 300 mL 離心管，以 6,500 g 離心 10 分鐘。在離心時，架好 kit 所附的管柱及 50 mL 離心管以盛裝廢液，並加入 5mL PEQ

buffer，待離心 10 分鐘結束後，倒去離心上清液，並加入 4 mL PM1 buffer，並以滴管 (dropper) 將離下來的菌均勻打散，再加入 4mL PM2 buffer，以滴管輕輕將打散的菌液攪拌均勻，使其呈現透明黏稠狀，再加入 4mL PM3 buffer，以滴管輕輕將黏稠的菌液攪拌均勻，使其呈現白色豆花狀。以 6,500 g 離心 10 分鐘，待 10 分鐘後，將上清液加入 Kit 所附的管柱中(吸取時，盡量小心不要吸到白色沉澱)，待其以重力自然滴乾，再加入 12 mL PW buffer，同樣以重力自然滴乾；準備 50 mL 離心管，內加入 6mL isopropanol，將管柱換裝到內含 isopropanol 之離心管，加入 8 mL PEG buffer 以將 DNA 溶洗出管柱，待 8 mL PEG 以重力滴乾後，放入 -20 °C 冰箱至少 30 分鐘。待 30 分鐘後，以 8,000 rpm 離心 15 分鐘，可看到白色的 DNA 沉澱，倒掉上清液，以 5 mL 75% 酒精 wash，再以 8,000 rpm 離心 15 分鐘，再次倒掉上清液，倒置 eppendorf 或以 Speed Vac 的方式，使 DNA 乾燥，再加入 500 μ L 的水或 TE buffer，緩緩震盪 16 小時，使 DNA 溶解。即可取得中量質體，用於之後的轉染實驗。

三、以 phenol/ chloroform 進行 DNA 沉澱

因為以 kit 所抽取的 DNA 可能含有蛋白質或鹽類等依些雜質，因此有時候會再利用 phenol/chloroform 來進行 DNA 沉澱。因此，將上述 (一) 或 (二) 所抽取之質體，加入等體積之 phenol，vortex 震盪混合，室溫下淨置 3 至 5 分鐘，再以 14,500 rpm 離心 5 分鐘，取上層部分，再加入 1/10 體積的 sodium acetate 於 DNA 溶液中，使其最終濃度為 0.3 M。加入 2.5 倍體積 100% Ethanol (EtOH) 混合後，置於 -20°C 中 30 至 60 分鐘，再以 14,500 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液(此步驟可再以 1 mL 75% 酒精 wash，再以 8,000 rpm 離心 15 分鐘，再倒掉上清液，或者直接倒掉上清液，進行接下來的步驟)，倒置 eppendorf 或以 Speed Vac 的方式，使 DNA 乾燥，再加入適當體積的水或 TE buffer，緩緩震盪 16 小時，使 DNA 溶解。即可取得沉澱過後的質體。

第四節 蛋白質分析法

一、 免疫沉澱法(Immunoprecipitation, IP)

以 1 倍的 RIPA 溶解細胞(內含有 protease inhibitor 以及 phosphatase inhibitor) ，於冰上 30 分鐘，在 4°C 的條件下，以 14,500 rpm 離心 15 分鐘，取上清液；再加入 protein A (約 3 μg 蛋白質加入 50 μL 的 protein A) 於 4°C 反應 3 小時，同樣在 4°C 的條件下，再以 10,000 rpm 離心 30 秒，取上清，加入 primary antibody ，於 4°C 反應 16 小時。再加入 protein A ，於 4°C 反應 3 小時，再以 10,000 rpm 離心 30 秒，取上清。最後以 1 mL RIPA 清洗 protein A 三次，回溶於 50 μL RIPA/in 1 倍 sample buffer 。

二、 蛋白質之濃度測定 (BCA Protein Assay)

一. 試劑成分

試劑 A : 0.2 N NaOH 鹼性溶液中含有 sodium carbonate、sodium bicarbonate、sodium tartrate 及 BCA 測試劑。

試劑 B : 4% 硫酸銅溶液。

2. 測定步驟

將試劑 A 與試劑 B 以體積 50:1 混合配成操作溶液 (working solution) ，取 10 μL 蛋白質溶液與 100 μL 操作溶液 (1:10) 混合均勻，在 37°C 下反應 30 分鐘後，以分光光度計測定 562 nm 可見光吸收值。此測定系統以已知濃度的 BSA (0.25 ~ 2 mg/mL) 當作標準蛋白質溶液而建立一「吸光值-濃度」之標準曲線圖。未知濃度的蛋白質樣品與操作溶液反應後，所得之吸光值即可藉由標準曲線圖換算得知其濃度。

三、 十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

1. 板膠的裝置

取兩塊平面玻璃 (mini gel: 10 × 10.5 cm ; normal gel: 15 × 15 cm)，洗淨後以去離子水潤溼，烘乾後，以凹形軟質膠片 (12 × 15 × 0.1 公分)作為 spacer，以鐵夾夾住玻璃的左右兩邊，再將此裝置直立放置。

2. 配製膠體(一片 mini-gel 的配方)

本實驗為了分析存活素，而使用 Tricine-SDS PAGE，先配製 49.5% solution (含有 acrylamide 單體)、gel buffer。詳細成分如下：

49.5% solution: 48 % acrylamide, 1.5 % N,N'-methylene-bis-acrylamide。

Gel buffer: 3 M Tris-HCl, pH 8.45 緩衝液及 0.3 % SDS 溶液。

再配製 separating gel： 配方如下

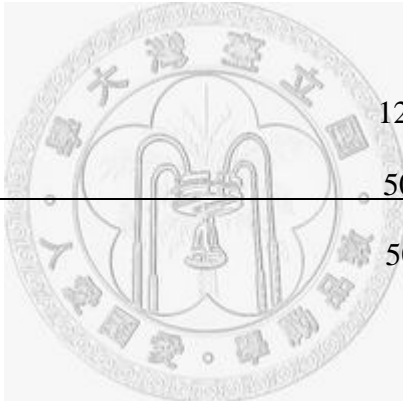
	Separating gel		Spacer gel	Stacking gel
Gel %(mL)	16.5	10.0		
49.5% Sol.(mL)	2.0	1.2	0.6	0.25
Gel buffer(Ml)	2.0	2.0	1.0	0.75
50% glycerol(mL)	1.3	1.3	-	-
ddH₂O(Ml)	0.7	1.5	1.4	2.0
10%APS(μL)	40	40	12	24
TEMED(μL)	4	4	3	3

均勻混合後凝膠溶液後，將此凝膠溶液注入玻璃裝置中，拍打去除氣泡後於凝膠上方加入甲醇，靜置於室溫下待凝膠介面形成。

最後再配製 stacking gel：盡量倒除上方甲醇，並以二次水略為清洗，倒置滴乾二次水。將上述的 stacking gel 混合溶液均勻混合後，將凝膠溶液加入已凝固 separating gel 上，並放入梳狀模版 (comb)，使 stacking gel 凝成凹槽狀；待凝膠凝固後再將梳狀模版取下，供蛋白質樣品注入。

3. 電泳緩衝液 (Running buffer) 的製備 (10 倍配方)

a. 下層溶液(正極)： Tris/HCl 0.2 M, pH8.9



Tris	121.4 g
<u>ddH₂O</u>	<u>500 mL</u>
Total volume	500 mL, pH 滴定至 8.9

b. 上層溶液(負極)： Tris 0.1 M, Tricine 0.1M, SDS 0.1%, pH 8.25

Tris	60.57 g
Tricine	89.59 g
SDS	5.00 g
<u>ddH₂O</u>	<u>500 mL</u>
Total volume	500 mL, pH 滴定至 8.25

4. 蛋白質樣品處理 (Sample preparation)

將蛋白質樣品溶於至少等體積的 2 倍 protein sample buffer 中，於 95 °C 水浴加熱 5 分鐘。2 倍 protein sample buffer 的配方如下：

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.0 mL
10% SDS	4.0 mL
50% Glycerol	2.4 mL
β-Mercaptoethanol	0.2 mL
Coomassie Brilliant Blue	0.01%
ddH ₂ O	10 mL
Total volume	10 mL

5. 電泳之操作方法

將鑄好膠之玻璃片周圍橡膠條拿掉，玻璃片以鐵夾固定至電泳裝置上，使有凹槽的一面朝向電泳槽。將電泳緩衝液住滿上下電泳槽，將加熱處理好的蛋白質樣品溶液加入樣品槽中。電泳槽上層接負極，下層接正極，以固定 30 伏特 (V)，400 毫安培 (mA) 的電泳進行電泳一小時，再以固定 90 伏特 (V)，400 毫安培 (mA) 的電泳進行電泳，待指示劑移至膠片底部後，完成電泳並停止通電。

本實驗採用的標準蛋白質分子量 (Low-range Protein Molecular Weight Markers) 如下所示：

Phosphorylase B	97.4 kDa
Bovine serum albumin	66.2 kDa
Ovalbumin	45.6 kDa
Carbonic anhydrase	31.0 kDa
Soybean trypsin inhibitor	21.5 kDa
Lysozyme	14.4 kDa

四、 西方墨點法 (Western blot)

1. 蛋白質轉印分析 (Transfer)

剪裁與 separating gel 大小相同的 PVDF membrane，先讓 membrane 由原來的疏水性以 100 % 甲醇浸潤成具有親水性的特質，再將其浸泡於轉印緩衝液 (10 mM CAPS、10 % MeOH，pH 11.0)。由下而上依序自下層石墨板鋪蓋 (1) 三張浸泡過轉印緩衝液的濾紙、(2) PVDF membrane、(3) separating gel 以及 (4) 另外三張浸泡過轉印緩衝液的濾紙，鋪蓋過程中不要產生氣泡，也不要讓 membrane 乾掉；最後壓上已接上負極之上層石墨板，裝置下層石墨板小心接上正極。轉印使用的電流依據 separating gel 的面積，每平方公分約 1 mA，通電時間為四小時。轉印完後取下 PVDF membrane 先以 Fast green 染劑進行染色確定蛋白轉印的效率及位置，再進行抗體偵測。

3. 蛋白質染劑及西方墨點法緩衝液的配置 (Preparation of reagents and buffers)

a. Fast Green 的配方如下：

Fast green	0.1 g
Acetic acid	10.0 mL
Ethanol (95%)	26.3 mL
<u>ddH₂O</u>	<u>64 mL</u>
Total volume	100 mL

b. 配製清洗緩衝溶液 (Washing buffer)

TN	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl
TNT	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% Tween 20 (v/v)

3. 西方墨點法操作步驟

轉印好的 PVDF membrane 以 Fast green 蛋白質染劑染色數秒，再以二次蒸餾水漂洗褪色，待背景回復白色；風乾後，將 PVDF membrane 依染色結果裁切適當位置，並以鉛筆在角落標示標的蛋白質名稱，再以 100 % 甲醇浸潤 PVDF membrane 使其恢復親水性，以水潤洗一次後，泡在含有 4 % 脫脂奶粉的 TN 緩衝溶液，於室溫搖晃 1 小時進行填塞作用 (blocking)。倒掉反應液，即可進行初次抗體 (primary antibody) 結合反應。初級抗體以 TN 稀釋，各抗體的稀釋比例：anti-survivin (1:500)、anti-actin (1:10,000)、anti-COX-2 (1:200)、anti-Ubiquitin (1:1,000)。初級抗體結合反應於 4°C 反應 16 小時。倒去一次抗體溶液並以 TNT 緩衝液漂洗 3 次，每次 10 min。接著進行次級抗體 (secondary antibody) 結合反應，次級抗體以含有 4 % 脫脂奶粉的 TNT 稀釋，各抗體的稀釋比例如下：HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:2,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:2,000)、HRP-conjugated donkey anti-goat IgG antibody (1:1,000)。次體抗體結合反應於室溫搖晃 1 小時，最後以 TNT 緩衝液漂洗 3 次，每次 10 分鐘。

4. ECL 呈色

首先將 PVDF membrane 上多餘的緩衝溶液吸掉，均勻加入適量的反應物 (Western Lightning™ Western Blot Chemiluminescence Reagent, A 與 B 兩種溶液等體積混合)，反應 2 分鐘後，將多餘的受質溶液吸掉，把 membrane 置入暗盒 (cassette) 中，剪裁適當大小的 X 光底片 (Fujifilm) 進行壓片並計時，時間到之

後，將底片放入顯影液 (developer) 中直到可見陽性反應，以水漂洗後再將底片置入定影液 (fixer) 以去除未呈色的部分，直到整張 X 光底片都呈透明為止，用水將底片洗淨自然風乾或烘乾保存。

第五節 螢光顯微鏡觀察

一、標本處理

1. 樣本預備

做免疫染色至少細胞要先養 8hr，在 24 wells plate 內先放入 12 mm cover glass，再加入以 Trypsin 切下約 10^5 的胃上皮細胞，再以 0.5 mL DMEM，繼續養 16 小時，再加入幽門螺旋桿菌前，需 starvation 3 小時以上，再加入幽門螺旋桿菌。

2. 標本製作

將處理幽門螺旋桿菌後的細胞以 1 倍的 PBS (500 μ L) 清洗標本三次，加入 500 μ L 3.7% paraformaldehyde 固定細胞三十分鐘。再加入 500 μ L 0.1 % Triton X-100 於 4 % milk (milk 須以 PBS 配)，blocking 16 小時，加入 50 μ L 1st antibody 16 小時，4 $^{\circ}$ C。再以 PBS 清洗三次，每次十分鐘。加入 2nd antibody，室溫反應 1 小時。再以 PBS 清洗三次，每次十分鐘。在 slide 上滴 2 μ L mounting gel (or 5% glycerol)，將 cover glass 斜 45 度放到 glycerol 上，四周以 kimwipe 擦拭邊緣塗上一層指甲油，於暗處至乾，即可觀察。



第四章 實驗結果

第一節 幽門螺旋桿菌感染 AGS 細胞促使存活素上升

一、 幽門螺旋桿菌感染後細胞的形態改變

在研究幽門螺旋桿菌造成的現象以前，需要先確認幽門螺旋桿菌感染的有效性。根據先前的文獻指出，幽門螺旋桿菌的感染會造成胃腺癌細胞的細胞骨架重新組合 (cytoskeleton rearrangement)、細胞延長 (cell elongation)、細胞間接觸減少，而呈現明顯的「蜂鳥狀」 (hummingbird phenotype) 或「紡錘狀」 (scattering phenotype) 等型態[91, 92]。

於是在本實驗中，以倒立式螢光顯微鏡 (Olympus IX70) 來觀察感染胃腺癌細胞 (AGS) 及以幽門螺旋桿菌感染比例 (multiplicity of infection, M.O.I) 100 感染 1 小時後的細胞型態，發現細胞會被拉長而呈現紡錘狀或蜂鳥狀 (Fig. 1)，顯示我們所使用的幽門螺旋桿菌的確會對胃腺癌上皮細胞株進行有效的感染。

二、 幽門螺旋桿菌誘導存活素的上升與幽門螺旋桿菌誘導

COX-2 的上升

由於在先前的文獻中指出，COX-2 以及其下游產物 PGE₂ 可能會促使存活素的泛素化 (Ubiquitination) 降低，致使存活素的降解減少，因此存活素在細胞中的含量得以增加[77]；而又有文獻指出幽門螺旋桿菌可誘使 AGS 表達 COX-2 [74]，以及在幽門螺旋桿菌的感染下，胃癌病人的腫瘤細胞中之存活素有上升的現象 [90]，因此我們想進一步的了解，是否在幽門螺旋桿菌的感染下，的確有存活素上升的現象，並且是否存活素在幽門螺旋桿菌感染後的增加，主要是因為幽門螺旋桿菌誘使 COX-2 表達來穩定存活素，進而使存活素在細胞中的含量增加？因此在本實驗中，分別對 AGS 細胞處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌一小時、三

小時、五小時三個時間點，在 Fig. 2 的結果中，我們發現在幽門螺旋桿菌感染一小時時，細胞中存活素的上升較為明顯 (Fig. 2A,C)。接著我們想進一步的了解，是否 COX-2 的上升也符合存活素上升的趨勢，因此，在本實驗中，同樣對 AGS 細胞處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌一小時、三小時、五小時 (Fig. 2A, B)。而由 Fig. 2 可觀察到，在以 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌處理三小時左右，可看見 COX-2 的表現量達到最高。但因為存活素與 COX-2 表現量達到最高的時間點並不一致，因此由此我們並不能確定幽門螺旋桿菌所誘導大量表現的存活素主要是來自 COX-2，可能是來自於幽門螺旋桿菌所誘導的其他路徑調控而使得存活素的表現量上升。因此為了更進一步的找出 COX-2 對存活素的調控，我們想要先確立 COX-2 與存活素的關係。

第二節 COX-2 表現與存活素上升之關係

一. COX-2 對存活素的調控— COX-2 的上升與存活素的上升

為了進一步的確認 COX-2 對存活素的影響，並排除幽門螺旋桿菌誘使的其他路徑對於存活素調控造成的影響，於是我們希望藉由直接在 AGS 細胞中大量表現 COX-2 的方式來進一步的確定 COX-2 是否和存活素在細胞中含量的上升有關。

於是在本實驗中 (Fig. 3)，我們以綠色螢光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 做為轉染 (transfection) 實驗的控制組，代表質體的確有送入細胞中，並以 COX-2 的轉染為實驗組；在 Fig. 3 中，我們可以看見由於轉染 EGFP 的 AGS 細胞尚未感染幽門螺旋桿菌，因此 AGS 細胞並不表現 COX-2，符合前面的文獻的結果，COX-2 為誘導表現的酵素；而轉染 COX-2 的細胞，則有大量表現 COX-2 的情形。並且，在轉染 COX-2 而大量表現 COX-2 的 AGS 細胞中，的確可以看到存活素在細胞中的含量較轉染 EGFP 而無表現 COX-2 的 AGS 細胞有上升的現象。代表 COX-2 還是可能參與某些調控，使存活素在細胞中的含

量上升。

二. COX-2 對存活素的調控— COX-2 的上升促使存活素的泛素化 (Ubiquitination) 減少

由於先前文獻指出[77]，可能是由於 COX-2 可以減少存活素的泛素化的情形，使得存活素可以在細胞中的含量上升，因此在本實驗中，除了在 AGS 細胞中大量表現 COX-2 外，並在收取轉染 COX-2 之 AGS 細胞前二小時，添加 5 μ M 的 MG-132，使得 proteasome 的活性被抑制，泛素化的蛋白質較不會被降解，使我們可以較清楚的觀察存活素泛素化的情形。並將細胞溶解於 RIPA buffer，以存活素的抗體來做免疫沉澱的實驗，再以泛素 (ubiquitin) 之抗體做西方墨點染色實驗，藉以確認存活素泛素化的情形。

而在 Fig. 4A 中，我們可以看見，同樣的，在轉染 COX-2 的 AGS 細胞中，存活素的表現量有上升的現象，而在免疫沉澱的實驗當中，也的確可以看見 (Fig. 4B)，當存活素的含量上升後，泛素化的情形有下降的趨勢。

因此我們可以合理的推測，幽門螺旋桿菌所誘導產生的 COX-2 的確可能參與對於存活素含量的上升，而可能是透過使存活素的泛素化減低的方式，來使得存活素的含量上升。

三. COX-2 對存活素的調控— COX-2 的 knock down 促使存活素的減少

為了更進一步的確認在幽門螺旋桿菌感染中，被幽門螺旋桿菌誘導表現的 COX-2 的確具有穩定存活素功能，於是在下面的實驗當中，我們自中研院的 RNAi 核心實驗室購買了五株 COX-2 之 shRNA 的菌株 (supplementary table.1)，在定序的結果確認後，我們同樣的將 shRNA 以轉染的方式送入細胞中，並對細胞處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌三小時，想藉此了解是否若幽門螺旋桿菌誘導的 COX-2 的表現量下降，則存活素在細胞中的含量也會受到影響。

因此在本實驗中，同樣以 EGFP 做為轉染的控制組，代表有成功的將質體送入細胞中。而轉染 EGFP 的細胞同時會和轉染 COX-2 之 shRNA 的 AGS 細胞一起處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌三小時，因此轉染 EGFP 的細胞同樣代表在正常處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌三小時的情況下，COX-2 所被誘導表現的情形；而轉染 COX-2 之 shRNA 的 AGS 細胞中之 COX-2 的表現量則表示處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌三小時後，COX-2 在被不同的 COX-2 shRNA knock down 後，在細胞中被誘導表現的量 (Fig. 5)。在 Fig. 5 中，我們可以看出在轉染 COX-2 的 shRNA 後，某幾株細胞(如 A、C) 被幽門螺旋桿菌誘導表現之 COX-2 的確有下降的現象，而在這幾株細胞中，存活素的表現量也的確有下降的現象。

這個實驗結果可能暗示我們，幽門螺旋桿菌所誘導表現的 COX-2 在幽門螺旋桿菌所誘導之下，存活素表現量的增加中的確是不可或缺的。

四. COX-2 對存活素的調控— COX-2 的抑制促使存活素的減少

為了更進一步的確認 COX-2 在幽門螺旋桿菌的感染中對於存活素所扮演的調控角色，在下面的實驗中，我們使用了 COX-2 的選擇性抑制劑 Celecoxib (Celebrex[®])，觀察是否在幽門螺旋桿菌的感染中，藉由抑制 COX-2 的活性，存活素的量會因為無法被 COX-2 穩定而減少。

因此在本實驗中，我們以不處理幽門螺旋桿菌以及任何藥物的細胞，做為存活素在一般 AGS 細胞中的控制組，以只處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌的細胞做為在感染 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌不同時間時，存活素表現量的控制組；接著對 AGS 細胞分別處理 50 μ M 以及 25 μ M 的 Celecoxib，再分別對只處理幽門螺旋桿菌組，和處理 50 μ M 以及 25 μ M 的 Celecoxib 的 AGS 細胞處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌一小時及兩小時，來觀察存活素的量是否有減少的現象；在結果 (Fig. 6) 中，我們可觀測到，相對於一般處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌的細胞株，處理 Celecoxib 的 AGS 細胞被幽門螺旋桿菌所誘導的存活素的量，的確有減少的趨勢，尤其在兩小時時，最為明顯。

然而，之前的文獻以及前面的結果指出，COX-2 可能可以透過減少存活素泛素化的方式，來使得存活素的降解的情形減少，進而使得存活素含量增加；因此我們想知道，若是同時對處理 Celecoxib 的 AGS 細胞處理 MG-132 來抑制 proteasome 的活性，是否可以減少存活素的減少？因此我們再對另外一組細胞同時處理了 50 μ M 以及 25 μ M 的 Celecoxib 和 5 μ M 的 MG-132 後，再對這組細胞處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌，觀測存活素的含量是否有減少減少的趨勢。

在 Fig. 6 中，我們發現，在對於處理 50 μ M 以及 25 μ M 的 Celecoxib，及同時處理 M.O.I 100 幽門螺旋桿菌的 AGS 細胞中，處理 5 μ M 的 MG-132 後，的確使得存活素的減少有減緩的現象。證明 COX-2 可能在減少存活素的降解上，扮演了一定的調控角色。

第三節 PGE₂ (prostaglandin E₂) 表現與存活素上升之關係

為了更進一步的了解 COX-2 對存活素作用的方式，我們想要繼續探討 COX-2 的下游分子 PGE₂。我們想要知道 COX-2 是否是利用 PGE₂ 來造成存活素的泛素化減少？因此在下面的實驗中，我們想要先了解 PGE₂ 與存活素的關係。

一. PGE₂ 對存活素的調控— PGE₂ 促使存活素的上升

同樣的，我們必須先了解 PGE₂ 與存活素的關係，才能進一步的了解 COX-2 是否是透過 PGE₂ 來調控存活素的泛素化。因此在下面的實驗中我們分別對細胞處理不同濃度的 PGE₂ 48 小時，我們想要藉此知道，是否 AGS 細胞中的存活素含量會因此受到改變。另外值得注意的是，因為 PGE₂ 的半衰期並不長，其效果可能無法持續兩天，因此在本實驗中，我們使用較為穩定的 16,16-dimethyl prostaglandin E₂ (dmPGE₂) 來進行實驗，dmPGE₂ 為 PGE₂ 的 analog，在先前許多文獻中已經被使用在 *in vivo* 或者 *in vitro* 中[77, 93, 94]。在實驗結果 (Fig. 7)

中，我們可以發現，當處理 dmPGE₂ 的濃度為分別為 1 μM, 2 μM 以及 5 μM 時，都可以看見存活素上升的現象。因此 PGE₂ 可能也參與了 COX-2 穩定存活素的過程。

二. PGE₂ 對存活素的調控— PGE₂ 促使存活素的泛素化減少

為了更進一步的了解 PGE₂ 對存活素的量的調控，是否是利用參與減少存活素泛素化而使其在細胞中的含量增加？因此，我們同樣對 AGS 細胞處理 dmPGE₂ 5 μM 48 小時，同樣可看見存活素的含量有上升的現象 (Fig.8A)，並且在收取細胞前兩小時，加入 5 μM 的 MG-132，減少 proteasome 的活性，使我們可以較清楚的觀測到蛋白質泛素化的現象；並以 RIPA buffer 溶解細胞，再以存活素的抗體做免疫沉澱實驗，接著，以泛素之抗體做西方墨點染色法實驗，藉以確認存活素泛素化的情形。在 Fig. 8B 中，我們可以看見存活素的泛素化的確有減少的情形。

因此我們可能可以合理的推測，COX-2 會藉由其下游的分子 PGE₂，使得存活素的泛素化減少，並進而使得細胞中存活素的量上升；而幽門螺旋桿菌可能是藉由誘導 COX-2 的上升，而使得存活素在細胞中的量增加，進而達到抑制癌細胞凋亡的機制。

第四節 幽門螺旋桿菌感染引起存活素位置之改變

一、 存活素位置改變的重要性

在先前的研究中指出，存活素不只具有抗細胞凋亡的功能，也在細胞分裂中扮演相當重要的角色。因此我們想要更進一步的了解，存活素在幽門螺旋桿菌中所扮演的角色，是否是如同我們所假設的，是扮演抗細胞凋亡的角色。而在先前的許多研究中，更指出存活素在細胞中不同的位置，則可能扮演著完全不同的功能[95]：當存活素位於細胞核時，可能主要是負責細胞大量的分裂，而較不具有保護細胞的功能；而當存活素位於細胞質時，才是主要扮演抗細胞凋亡的角色；並

且在某些文獻中更指出，存活素在細胞核中的穩定性可能較低[96]；而在臨床上，存活素存在的位置更具有相當指標性的意義，若是存活素出現在細胞核中，可代表較好的預後，然而存活素若是出現在細胞質中，則代表較差的預後[97]。而在某些文獻中則指出[95]，若是突變存活素的 nuclear export sequence (NES) 片段，使得存活素無法離開細胞核，則會使得癌細胞較容易凋亡，因而可降低化療藥物的使用量。因此，若是可以知道幽門螺旋桿菌的感染對存活素細胞位置中的調控，對於了解幽門螺旋桿菌在導致胃癌的發生上，也有非常重要的意義。

二、 幽門螺旋桿菌的感染導致存活素離開細胞核

為了進一步的了解幽門螺旋桿菌感染對存活素在細胞中位置的調控，我們使用螢光顯微鏡來觀察存活素的位置，由實驗結果 (Fig. 9) 中可以發現，一般在 AGS 細胞當中，存活素是存在細胞核中的，這個結果似乎符合前面文獻所提的，存活素在尚未受到使細胞凋亡的刺激時，主要是負責細胞分裂的功能；因此我們更進一步的對 AGS 細胞處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌，想觀測存活素是否會為了抵抗幽門螺旋桿菌對 AGS 細胞產生的凋亡刺激，而離開細胞核執行抗細胞凋亡的功能？由 Fig. 9 可以發現，我們在處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌三小時後，則可發現存活素的確有自細胞核中移出到細胞質的情形。而若是處理 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌六小時後，則可看見更大部分的存活素自細胞核移至細胞質的情形。由此我們可以知道幽門螺旋桿菌的確會影響存活素在細胞中的位置，而這樣的調控很可能符合我們推測的，是為了執行抗細胞凋亡的功能。

第五節 幽門螺旋桿菌感染引起存活素上升的其它訊息路徑

由於在先前的實驗中，雖然我們証實了 COX-2 以及其下游的分子 PGE₂ 在幽門螺旋桿菌的感染這一刺激中，對於 AGS 細胞中的存活素具有減少其泛素化，導致其穩定的性質，然而我們更想進一步的找出在幽門螺旋桿菌的感染下，促使存活素表現量上升的其他調控因子還有哪些？為了較快速的找出可能的上游

調控因子，我們使用 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) 這一資料庫去分析幽門螺旋桿菌可能經由哪些路徑來調控存活素的上升。

而經由此資料庫的分析 (Fig.10)，推測幽門螺旋桿菌在感染胃上皮細胞後，可能會經由活化 Akt 的方式，促使 glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) 產生在 Ser 9 的位置產生磷酸化，而使得 GSK3 β 失去活性，進而使得 β -catenin 得以在細胞核中大量累積，並從而轉錄 Cyclin D1 及存活素。



第五章 討論

第一節 實驗方法討論

一. 細胞株與菌株的選用

本實驗所選用的 AGS cell line，主要是因為其細胞的 p53 基因表現量最接近正常的胃細胞，因此被多位學者拿來做為研究幽門螺旋桿菌的癌細胞株，並依此來建立幽門螺旋桿菌感染產生反應的模型；然而，AGS 之性質與正常的細胞比較仍有許多差異，尤其是在本實驗中，AGS 內生性的存活素比例相當高，但在正常胃上皮細胞中，卻幾乎不會看到存活素的表現，因此若欲使實驗結果印證較真實的生理情形，則必須選擇更接近正常的胃部細胞株或是初代細胞，有些中國的文獻[98]則使用 GES1 細胞株，此細胞株是正常的胃上皮細胞，但是使其永生化 (immortalized) 以減低實驗中的存活素的背景值。

而在幽門螺旋桿菌的部分，本實驗用以感染的菌株是由台大醫院胃癌病人檢體中分離培養所得的 GC3，將來若選用普遍被應用在學術研究中的標準菌株(註)如 26695 或 J99 等[91]，所得實驗結果可能更具代表性。

註. 標準菌株是指有經過定序，具有完整基因圖譜的菌株。

二. 細胞轉染實驗與 shRNA knock down

在本論文當中，使用 PolyJet DNA reagent 作為轉染用的試劑，主要是因為其對細胞產生的毒性較 Lipofectamine 低、轉染的效率並無較低並且價格較為合理，因此拿來使用。而在 COX-2 的大量表現上，未來可以選取具有同樣的啟動子的載體來做為控制組，會更具代表性。

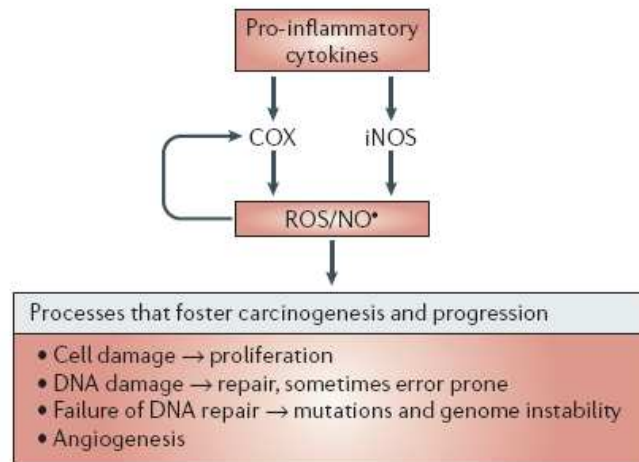
而在 shRNA knockdown 的實驗中，雖然我們可以看見 COX-2 在西方墨點的偵測上蛋白質表現量有下降的現象，但並非所有的 shRNA 都有達到理想的 knock down 效果，可能是因為 shRNA 在不同的細胞株中仍有其表達的差異性存在，因

此在抑制上的效果並不完全符合先前回報的結果 (Supplementary Table.1)。在先前的回報結果 (A549 細胞株) 中，抑制 COX-2 結果最佳的序列菌株分別為 C > E > D > A > B，然而在本實驗中，抑制效果反而是 A > C > B > E > D 菌株。而為了有較佳的驗證，除了西方墨點法對於蛋白質的驗證，之後也應以 Q-PCR 的方式確實偵測 COX-2 mRNA 的表現量是否確實降低。

另外，在本實驗中，是以 EGFP 作為轉染實驗的調控，主要是考量 COX-2 為一誘導表現之酵素，也就是在正常情況下，若無幽門螺旋桿菌的感染，AGS 細胞並不表現，因此我們想要了解在正常感染 M.O.I 100 的幽門螺旋桿菌的情況下，COX-2 誘導表現的狀況與以 shRNA knock down 的情況下，COX-2 被誘導表現的差異。但未來應再以其他 shRNA 做為該時段感染幽門螺旋桿菌 M.O.I 100 後的控制組，以證明 COX-2 的 shRNA 具專一性抑制效果，其可信度會更佳。

三. Celecoxib 與非類固醇抗發炎藥物 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) 的選用

在本篇論文當中，為了探討抑制 COX-2 活性對存活素產生的影響，而使用了 COX-2 的選擇性抑制劑 Celecoxib，本藥物是非類固醇抗發炎藥物 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) 的一種，在臨床上被廣泛的使用在止痛、解熱以及抗發炎上，主要是因為這種藥物可以做用在環氧化酶 COX 上，藉以抑制 PG (prostaglandin) 的產生。先前則有許多文獻指出，藉由抑制發炎的效果，可以減緩發炎區域聚集白血球，使得該區域自由基減少，減少因自由基產生造成細胞增生的刺激，或者 DNA 的傷害，因而可降低罹癌的可能性[67]。



(圖十三：摘自 Nature Review Cancer, 6(2):130-140 (2006))

雖然有文獻指出，NSAID 藥物的使用(例如阿斯匹靈)可以減緩消化道方面惡性腫瘤的產生，但是長期的使用卻發現某幾種 NSAID (如: indomethacin, piroxicam, sulindac and ibuprofen) 可能會導致胃出血、胃潰瘍或腎毒性…等副作用，而在經過許多研究之後，科學家發現 NSAID 所造成的副作用主要是與抑制 COX-1 有關。因此科學家開始開發 COX-2 的選擇性抑制劑，這些抑制劑對於先前所提的胃出血、胃潰瘍等副作用可以有較好的容忍力，如 Celecoxib (Celebrex[®])、Rofecoxib (Vioxx[®])、Valdecoxib (Bextra[®])。然而，有些文獻卻指出，這類的藥物因為會導致血小板不易凝結，仍有可能導致心血管的疾病。而在台灣方面目前獲得衛生署許可上市的為 Celecoxib (Celebrex[®]) 及 Rofecoxib (Vioxx[®])，目前 celecoxib (Celebrex[®]) 在臨床藥理學上發現其並不會抑制血小板凝集，也不會延長出血時間，因此算是較為安全的藥物。

先前有文獻指出，在老鼠的胃上皮細胞中若處理 NSAID 類藥物，則有助於增加存活素的降解以及癌細胞的凋亡[99]，因此我們希望同樣以上市並且較為安全

的 Celecoxib (Celebrex[®]) 做為抑制 COX-2 的藥物，並且可以去除抑制 COX-1 的副作用。然而為了更確定抑制 COX-2 對於存活素的影響，在日後可能需要再以其他 COX-2 的選擇性抑制劑(如 NS-398) 再加以確認。另外由於這些 NSAID 類的藥物均屬於有機類化合物，須溶於 DMSO 中，在實驗時需要更加注意 DMSO 的濃度，需要盡量不使 DMSO 的添加影響細胞的生理活性，因此在本論文的實驗設計中，DMSO 所添加的體積均小於等於所有溶液體積之 0.1%。

第二節 幽門螺旋桿菌與抗細胞凋亡反應分子

幽門螺旋桿菌一直以來都被認為是導致胃癌的一個主要原因，然而其究竟為何導致胃癌的機制，目前仍是尚在研究當中，在本篇論文中提出，幽門螺旋桿菌極有可能是透過誘導 COX-2 的表現，引發下游 PGE₂ 分子的產生，進而使得存活素得以減少其泛素化的情形，並在細胞中穩定存在，進而抵抗細胞的凋亡，使癌細胞 (AGS) 可以有衍生成胃癌的潛力。然而在本論文中，COX-2 被誘導表現的時間卻不完全與存活素表現的時間一致，最主要的原因是存活素可能還同時受到許多其他路徑的調控，我們經過文獻的搜尋以及配合 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) 軟體的分析，推測可能是經由上游的 GSK3 β 被磷酸化，導致其活性被抑制後，使得 β -catenin 可以在細胞中大量累積，而進入細胞核中大量表現存活素所致，未來希望可以進一步的分析 β -catenin 在細胞中大量累積的現象，以及磷酸化的情形，必要時可以使用 β -catenin 的 shRNA knock down，可能可以更進一步的證實此一現象，或者可使用 GSK3 β 的突變株 (S9A) 使其 Ser 9 的位置無法被幽門螺旋桿菌誘導磷酸化，而得以永久活化，再進一步觀察在 β -catenin 減少的情況下，存活素降低的情形。希望可以更進一步的了解，幽門螺旋桿菌透過存活素分子來調控抑制細胞凋亡的情形。除此之外，幽門螺旋桿菌的感染除了會透過表現 COX-2 和 PGE₂ 來減少存活素在細胞中的泛素化，COX-2 和 PGE₂ 更有可能影響存活素在細胞中的修飾，先前有文獻指出[100]磷酸化或者泛素化等轉譯後修飾具有互相調節的現象，而除了泛素化外，與泛素類似的蛋白質 SUMO 也被指

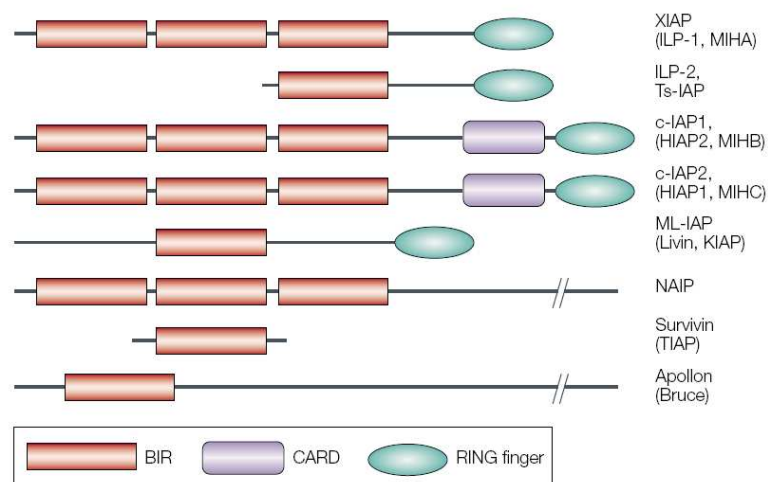
可能和泛素修飾在相同位置。因此在未來，也可以由本實驗室的質譜的技術更進一步檢視存活素在幽門螺旋桿菌感染後之修飾情形。

另外，本實驗雖然證明了 PGE₂ 可以影響存活素之泛素化，但並未證明是直接或是間接，因此在未來也可以再詳加探討。

第三節 總結與未來展望

關於存活素是否可導致癌症，在目前的研究中，仍是一個爭議性頗大的問題，有些文獻認為存活素主要是配合 X-linked IAP (XIAP) 來抵抗細胞凋亡或者主要是幫助細胞分裂，然而在許多文獻中，則可以明顯發現，不管是以藥物的方式抑制存活素的表現，或者以 RNA 干擾的方式 (shRNA 或者 si RNA) 都可以同樣的看見細胞凋亡的現象明顯增加，因此我們仍然認為癌細胞中大量表現存活素，對於癌細胞的生存是一個保護的作用，在平時未受到刺激時可以幫助癌細胞分裂，而在受到刺激時(例如幽門螺旋桿菌的感染)，可以幫助癌細胞抵抗細胞凋亡反應，進而使得癌細胞得以繼續生存。因此，存活素的穩定存在可以做為癌症發生的一個潛在因子。

目前已經有許多研究在探究存活素可以穩定存在於癌細胞中的原因，以及存活素究竟是透過何種機制被降解？在 2007 年有文獻[101]指出，存活素在細胞中的降解，主要是透過和 XIAP 以及 XAF1((XIAP)-associated factor 1) 的結合，因為 XIAP 的結構中帶有 RING domain (圖十四)，這個結構經過研究，被認為是一個 E3 ligase；而 XAF1 蛋白則可以透過和 XIAP 的 RING domain 作用，而降解和 XIAP 結合的存活素，然而實際上 XIAP 以及 XAF1 究竟是如何作用，而導致存活素被降解？至今還是一個尚未探討的謎題。而在目前的研究當中，XIAP 以及 XAF1 均被認為在細胞凋亡以及抵抗細胞凋亡的機制中，扮演相當重要的角色 [102-109]。而在幽門螺旋桿菌導致胃癌的研究領域中，也正在如火如荼的研究幽門螺旋桿菌對 XIAP 以及 XAF1 兩分子的調控，



(圖十四：摘自 Nature Review Cancer, 3(1):46-54 (2003))

我們對 XIAP 和 XAF1 是如何導致存活素的降解非常感興趣，但我們更感興趣的是，若是存活素、XAF1 和 XIAP 的結合得以降解存活素，那又是透過何種機制來決定存活素可以透過和 XIAP 的結合來抵抗細胞的凋亡呢？在得以大量表現 COX-2 的癌細胞中，是否是透過下游 PGE₂ 分子的干擾來調控，使得 XIAP、XAF1 和存活素無法順利結合，致使最後只有 XIAP 和存活素的得以順利結合，使得存活素和 XIAP 可以共同執行抗細胞凋亡的功能呢？

在未來的研究當中，除了需要更進一步的了解幽門螺旋桿菌對於胃上皮細胞中其他訊息路徑的調控以導致存活素的增加，我們更希望可以往存活素在癌細胞中究竟是被如何決定穩定存在的機制去探究，探討是否除了以 RNA 干擾存活素表現的方式外，還有其他方式可以決定存活素的減少，也可以在未來的基因治療上提供新的目標。

第六章 參考文獻

1. (2008). Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? WHO Online Q&A. WHO.
2. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
3. Lauren, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64, 31-49.
4. Kelley, J.R., and Duggan, J.M. (2003). Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 56, 1-9.
5. Crew, K.D., and Neugut, A.I. (2006). Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12, 354-362.
6. Powell, J., and McConkey, C.C. (1992). The rising trend in oesophageal adenocarcinoma and gastric cardia. *Eur J Cancer Prev* 1, 265-269.
7. Armstrong, R.W., and Borman, B. (1996). Trends in incidence rates of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in New Zealand, 1978-1992. *Int J Epidemiol* 25, 941-947.
8. Hansen, S., Wiig, J.N., Giercksky, K.E., and Tretli, S. (1997). Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. *Int J Cancer* 71, 340-344.
9. Harrison, S.L., Goldacre, M.J., and Seagroatt, V. (1992). Trends in registered incidence of oesophageal and stomach cancer in the Oxford region, 1974-88. *Eur J Cancer Prev* 1, 271-274.
10. Levi, F., La Vecchia, C., and Te, V.C. (1990). Descriptive epidemiology of adenocarcinomas of the cardia and distal stomach in the Swiss Canton of Vaud. *Tumori* 76, 167-171.
11. Moller, H., and Jensen, O.M. (1987). [Trends in the occurrence of esophageal, cardial and stomach cancer in Denmark 1943-1982. Neoplasm statistics No. 19]. *Ugeskr Laeger* 149, 1904-1909.
12. Pera, M., Cameron, A.J., Trastek, V.F., Carpenter, H.A., and Zinsmeister, A.R. (1993). Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 104, 510-513.
13. Thomas, R.J., Lade, S., Giles, G.G., and Thursfield, V. (1996). Incidence trends in oesophageal and proximal gastric carcinoma in Victoria. *Aust N Z J Surg* 66, 271-275.

14. Lagergren, J., Bergstrom, R., and Nyren, O. (1999). Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 130, 883-890.
15. Hohenberger, P., and Gretschel, S. (2003). Gastric cancer. *Lancet* 362, 305-315.
16. Terry, P., Lagergren, J., Ye, W., Wolk, A., and Nyren, O. (2001). Inverse association between intake of cereal fiber and risk of gastric cardia cancer. *Gastroenterology* 120, 387-391.
17. (1997). Cancer incidence in five continents. Volume VII. IARC Sci Publ, i-xxxiv, 1-1240.
18. McMichael, A.J., McCall, M.G., Hartshorne, J.M., and Woodings, T.L. (1980). Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* 25, 431-437.
19. Stalnikowicz, R., and Benbassat, J. (1990). Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. *Arch Intern Med* 150, 2022-2026.
20. Joossens, J.V., Hill, M.J., Elliott, P., Stamler, R., Lesaffre, E., Dyer, A., Nichols, R., and Kesteloot, H. (1996). Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol* 25, 494-504.
21. Kono, S., and Hirohata, T. (1996). Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes Control* 7, 41-55.
22. Hsing, A.W., Hansson, L.E., McLaughlin, J.K., Nyren, O., Blot, W.J., Ekblom, A., and Fraumeni, J.F., Jr. (1993). Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer* 71, 745-750.
23. Oh, S.T., Cha, J.H., Shin, D.J., Yoon, S.K., and Lee, S.K. (2007). Establishment and characterization of an in vivo model for Epstein-Barr virus positive gastric carcinoma. *J Med Virol* 79, 1343-1348.
24. Sharara, A.I., Abdul-Baki, H., ElHajj, I., Kreidieh, N., and Kfoury Baz, E.M. (2006). Association of gastroduodenal disease phenotype with ABO blood group and *Helicobacter pylori* virulence-specific serotypes. *Dig Liver Dis* 38, 829-833.
25. Palli, D., Galli, M., Caporaso, N.E., Cipriani, F., Decarli, A., Saieva, C., Fraumeni, J.F., Jr., and Buiatti, E. (1994). Family history and risk of stomach cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 15-18.
26. Howson, C.P., Hiyama, T., and Wynder, E.L. (1986). The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 8, 1-27.
27. Parsonnet, J. (1995). The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2, 45-51.
28. Barreto-Zuniga, R., Maruyama, M., Kato, Y., Aizu, K., Ohta, H., Takekoshi, T., and Bernal, S.F. (1997). Significance of *Helicobacter pylori* infection as a risk factor in gastric cancer: serological and histological studies. *J Gastroenterol* 32,

- 289-294.
29. Hansson, L.E., Engstrand, L., Nyren, O., Evans, D.J., Jr., Lindgren, A., Bergstrom, R., Andersson, B., Athlin, L., Bendtsen, O., and Tracz, P. (1993). *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology* *105*, 1098-1103.
 30. Hu, P.J., Mitchell, H.M., Li, Y.Y., Zhou, M.H., and Hazell, S.L. (1994). Association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and observations on the detection of this bacterium in gastric cancer cases. *Am J Gastroenterol* *89*, 1806-1810.
 31. Kokkola, A., Valle, J., Haapiainen, R., Sipponen, P., Kivilaakso, E., and Puolakkainen, P. (1996). *Helicobacter pylori* infection in young patients with gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol* *31*, 643-647.
 32. Miehleke, S., Hackelsberger, A., Meining, A., von Arnim, U., Muller, P., Ochsenkuhn, T., Lehn, N., Malfertheiner, P., Stolte, M., and Bayerdorffer, E. (1997). Histological diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis is predictive of a high risk of gastric carcinoma. *Int J Cancer* *73*, 837-839.
 33. Shogo Kikuchi, O.W.T.N.T.N.O.K.T.K.Y.I.R.G.o.P.o.G.C.a.Y.A. (1995). Serum anti-*Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults. *Cancer* *75*, 2789-2793.
 34. Sipponen, P., Kosunen, T.U., Valle, J., Riihela, M., and Seppala, K. (1992). *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* *45*, 319-323.
 35. (1994). IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. Lyon, 15-22 February 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* *60*, 1-560.
 36. Correa, P., and Houghton, J. (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* *133*, 659-672.
 37. Marshall, B.J., and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* *1*, 1311-1315.
 38. Amieva, M.R., and El-Omar, E.M. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* *134*, 306-323.
 39. Blaser, M.J. (1993). *Helicobacter pylori*: microbiology of a 'slow' bacterial infection. *Trends Microbiol* *1*, 255-260.
 40. Haas, R., Meyer, T.F., and van Putten, J.P. (1993). Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol* *8*, 753-760.
 41. Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L., and Hennessy, W. (1986). *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric

- epithelium. *J Infect Dis* 153, 658-663.
42. Lying, H., Suerbaum, S., Geis, G., and Haas, R. (1992). Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol* 6, 2863-2874.
 43. Tompkins, L.S., and Falkow, S. (1995). The new path to preventing ulcers. *Science* 267, 1621-1622.
 44. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14648-14653.
 45. Montecucco, C., and Rappuoli, R. (2001). Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 457-466.
 46. Peek, R.M., Jr., Vaezi, M.F., Falk, G.W., Goldblum, J.R., Perez-Perez, G.I., Richter, J.E., and Blaser, M.J. (1999). Role of *Helicobacter pylori* *cagA*(+) strains and specific host immune responses on the development of premalignant and malignant lesions in the gastric cardia. *Int J Cancer* 82, 520-524.
 47. Ernst, P.B., and Gold, B.D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 54, 615-640.
 48. Everhart, J.E. (2000). Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 29, 559-578.
 49. Miyaji, H., Azuma, T., Ito, S., Abe, Y., Gejyo, F., Hashimoto, N., Sugimoto, H., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., et al. (2000). *Helicobacter pylori* infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 257-262.
 50. Lauren, P. (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64, 31-49.
 51. Frenck, R.W., Jr., and Clemens, J. (2003). *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect* 5, 705-713.
 52. Klein, P.D., Gilman, R.H., Leon-Barua, R., Diaz, F., Smith, E.O., and Graham, D.Y. (1994). The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol* 89, 2196-2200.
 53. Peek, R.M., Jr. (2001). IV. *Helicobacter pylori* strain-specific activation of signal transduction cascades related to gastric inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G525-530.
 54. Konturek, P.C., Konturek, S.J., Pierzchalski, P., Bielanski, W., Duda, A., Marlicz, K., Starzynska, T., and Hahn, E.G. (2001). Cancerogenesis in *Helicobacter pylori*

- infected stomach--role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit* 7, 1092-1107.
55. Backert, S., and Selbach, M. (2005). Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends in Microbiology* 13, 476-484.
 56. Peek, R.M., Jr., and Blaser, M.J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2, 28-37.
 57. Morita, D., Ichikura, T., and Mochizuki, H. (2001). [The expression of PPAR gamma in gastric cancer]. *Nippon Rinsho* 59 Suppl 4, 595-597.
 58. Karim, S., Habib, A., Levy-Toledano, S., and Maclouf, J. (1996). Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J Biol Chem* 271, 12042-12048.
 59. Pairet, M., and Engelhardt, G. (1996). Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* 10, 1-17.
 60. Chen, C.C., Sun, Y.T., Chen, J.J., and Chiu, K.T. (2000). TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. *J Immunol* 165, 2719-2728.
 61. Coyne, D.W., Nickols, M., Bertrand, W., and Morrison, A.R. (1992). Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. *Am J Physiol* 263, F97-102.
 62. Fosslie, E. (2000). Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37, 431-502.
 63. Fu, J.Y., Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A., and Needleman, P. (1990). The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265, 16737-16740.
 64. Geng, Y., Blanco, F.J., Cornelisson, M., and Lotz, M. (1995). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* 155, 796-801.
 65. Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D., and Hwang, D. (1992). Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267, 25934-25938.
 66. Vane, J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 97-120.
 67. Ulrich, C.M., Bigler, J., and Potter, J.D. (2006). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev*

- Cancer 6, 130-140.
68. Konturek, P.C., Konturek, S.J., and Brzozowski, T. (2006). Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 3, 51-65.
 69. Konturek, P.C., Kania, J., Kukharsky, V., Ocker, S., Hahn, E.G., and Konturek, S.J. (2003). Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol* 54, 17-32.
 70. Ito, M., Tanaka, S., Maeda, M., Takamura, A., Tatsugami, M., Wada, Y., Matsumoto, Y., Yoshihara, M., Haruma, K., and Chayama, K. (2008). Role of the gastrin-gastrin receptor system in the expansive growth of human gastric neoplasms. *Digestion* 78, 163-170.
 71. Guo, X.L., Wang, L.E., Du, S.Y., Fan, C.L., Li, L., Wang, P., and Yuan, Y. (2003). Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 9, 246-249.
 72. Iwamoto, J., Mizokami, Y., Takahashi, K., Matsuoka, T., and Matsuzaki, Y. (2008). The effects of cyclooxygenase2-prostaglandinE2 pathway on *Helicobacter pylori*-induced urokinase-type plasminogen activator system in the gastric cancer cells. *Helicobacter* 13, 174-182.
 73. Yamac, D., Ayyildiz, T., Coskun, U., Akyurek, N., Dursun, A., Seckin, S., and Koybasioglu, F. (2008). Cyclooxygenase-2 expression and its association with angiogenesis, *Helicobacter pylori*, and clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 204, 527-536.
 74. Chang, Y.J., Wu, M.S., Lin, J.T., and Chen, C.C. (2005). *Helicobacter pylori*-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol* 175, 8242-8252.
 75. Shen, H., Sun, W.H., Xue, Q.P., Wu, J., Cheng, Y.L., Ding, G.X., Fu, H.Y., Tsuji, S., and Kawano, S. (2006). Influences of *Helicobacter pylori* on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandinE2 synthesis in rat gastric epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 21, 754-758.
 76. Kabir, S. (2009). Effect of *Helicobacter pylori* eradication on incidence of gastric cancer in human and animal models: underlying biochemical and molecular events. *Helicobacter* 14, 159-171.
 77. Krysan, K., Merchant, F.H., Zhu, L., Dohadwala, M., Luo, J., Lin, Y., Heuze-Vourc'h, N., Pold, M., Seligson, D., Chia, D., et al. (2004). COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. *FASEB J* 18, 206-208.
 78. Yamamoto, H., Ngan, C.Y., and Monden, M. (2008). Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* 99, 1709-1714.

79. Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., and Giles, F.J. (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 14, 5000-5005.
80. Song, K.Y., Jung, C.K., Park, W.S., and Park, C.H. (2009). Expression of the antiapoptosis gene Survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 39, 290-296.
81. Chen, T., and Deng, C. (2008). Inhibitory effect of siRNA targeting survivin in gastric cancer MGC-803 cells. *Int Immunopharmacol* 8, 1006-1011.
82. Miao, G.Y., Lu, Q.M., and Zhang, X.L. (2007). Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 13, 1170-1174.
83. Pai, S.I., Lin, Y.Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 13, 464-477.
84. Erkanli, S., Bolat, F., Kayaselcuk, F., Demirhan, B., and Kuscü, E. (2007). COX-2 and survivin are overexpressed and positively correlated in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 104, 320-325.
85. Lambropoulou, M., Papadopoulos, N., Tripsianis, G., Alexiadis, G., Pagonopoulou, O., Kiziridou, A., Liberis, V., Kakolyris, S., and Chatzaki, E. Co-expression of survivin, c-erbB2, and cyclooxygenase-2 (COX-2): prognostic value and survival of endometrial cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 136, 427-435.
86. Younis, T., Hache, K.D., Rayson, D., Dewar, R., Gray, S., and Barnes, P.J. (2009). Survivin and COX-2 expression in male breast carcinoma. *Breast* 18, 228-232.
87. Song, I.H., Kim, D.W., Shin, K.C., Shin, H.D., Yun, S.Y., Kim, S.B., Shin, J.E., Kim, H.J., and Kim, E.Y. (2008). [Down-regulation of survivin in growth inhibition of hepatoma cells induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor]. *Korean J Hepatol* 14, 351-359.
88. Luo, S.M., Liu, R.D., Li, W.R., and Hou, J.H. (2009). [Survivin and COX-2 expressions in giant cell tumor of bone and their relation to the prognosis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 29, 156-159.
89. Athanassiadou, P., Grapsa, D., Athanassiades, P., Gonidi, M., Athanassiadou, A.M., Tsipis, A., and Patsouris, E. (2008). The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. *Pathol Res Pract* 204, 241-249.
90. Yu, J., Leung, W.K., Ebert, M.P., Ng, E.K., Go, M.Y., Wang, H.B., Chung, S.C., Malfertheiner, P., and Sung, J.J. (2002). Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 87, 91-97.
91. Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., et al.

- (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539-547.
92. Su, B., Ceponis, P.J., and Sherman, P.M. (2003). Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 52, 861-867.
 93. Herrler, T., Leicht, S.F., Huber, S., Hermann, P.C., Schwarz, T.M., Kopp, R., and Heeschen, C. (2009). Prostaglandin E positively modulates endothelial progenitor cell homeostasis: an advanced treatment modality for autologous cell therapy. *J Vasc Res* 46, 333-346.
 94. North, T.E., Goessling, W., Walkley, C.R., Lengerke, C., Kopani, K.R., Lord, A.M., Weber, G.J., Bowman, T.V., Jang, I.H., Grosser, T., et al. (2007). Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447, 1007-1011.
 95. Angell, H. (2008). A study into the potential role of Survivin localization in resistance to drug-induced apoptosis. *Bioscience Horizons* 1, 85-91.
 96. Connell, C.M., Colnaghi, R., and Wheatley, S.P. (2008). Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. *J Biol Chem* 283, 3289-3296.
 97. Qi, G., Tuncel, H., Aoki, E., Tanaka, S., Oka, S., Kaneko, I., Okamoto, M., Tatsuka, M., Nakai, S., and Shimamoto, F. (2009). Intracellular localization of survivin determines biological behavior in colorectal cancer. *Oncol Rep* 22, 557-562.
 98. Li, X.D.-h.W.J.-d.J.B.Z.Y.-y.Z.F.-z.C. (2006). Cloning of survivin promoter and its specific transcriptional activities in gastric cancer cell line AGS. *China Journal of Modern Medicine* 16.
 99. Chiou, S.K., and Mandayam, S. (2007). NSAIDs enhance proteasomic degradation of survivin, a mechanism of gastric epithelial cell injury and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 74, 1485-1495.
 100. Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 28, 730-738.
 101. Arora, V., Cheung, H.H., Plenchette, S., Micali, O.C., Liston, P., and Korneluk, R.G. (2007). Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* 282, 26202-26209.
 102. Tu, S.P., Liston, P., Cui, J.T., Lin, M.C., Jiang, X.H., Yang, Y., Gu, Q., Jiang, S.H., Lum, C.T., Kung, H.F., et al. (2009). Restoration of XAF1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer. *Int J Cancer* 125, 688-697.
 103. Tu, S.P., Sun, Y.W., Cui, J.T., Zou, B., Lin, M.C., Gu, Q., Jiang, S.H., Kung, H.F., Korneluk, R.G., and Wong, B.C. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

- to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer* *116*, 1252-1263.
104. Chung, S.K., Lee, M.G., Ryu, B.K., Lee, J.H., Han, J., Byun, D.S., Chae, K.S., Lee, K.Y., Jang, J.Y., Kim, H.J., et al. (2007). Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses. *Gastroenterology* *132*, 2459-2477.
 105. Byun, D.S., Cho, K., Ryu, B.K., Lee, M.G., Kang, M.J., Kim, H.R., and Chi, S.G. (2003). Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* *63*, 7068-7075.
 106. Liew, J.C., Tan, W.S., Alitheen, N.B., Chan, E.S., and Tey, B.T. Over-expression of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) delays serum deprivation-induced apoptosis in CHO-K1 cells. *J Biosci Bioeng*.
 107. Hiscutt, E.L., Hill, D.S., Martin, S., Kerr, R., Harbottle, A., Birch-Machin, M., Redfern, C.P., Fulda, S., Armstrong, J.L., and Lovat, P.E. Targeting X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein to Increase the Efficacy of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis for Melanoma Therapy. *J Invest Dermatol*.
 108. Seeger, J.M., Brinkmann, K., Yazdanpanah, B., Haubert, D., Pongratz, C., Coutelle, O., Kronke, M., and Kashkar, H. Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance. *Br J Cancer* *102*, 1717-1723.
 109. Kim, S.H., and Singh, S.V. p53-Independent apoptosis by benzyl isothiocyanate in human breast cancer cells is mediated by suppression of XIAP expression. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* *3*, 718-726.



第七章 圖表與說明

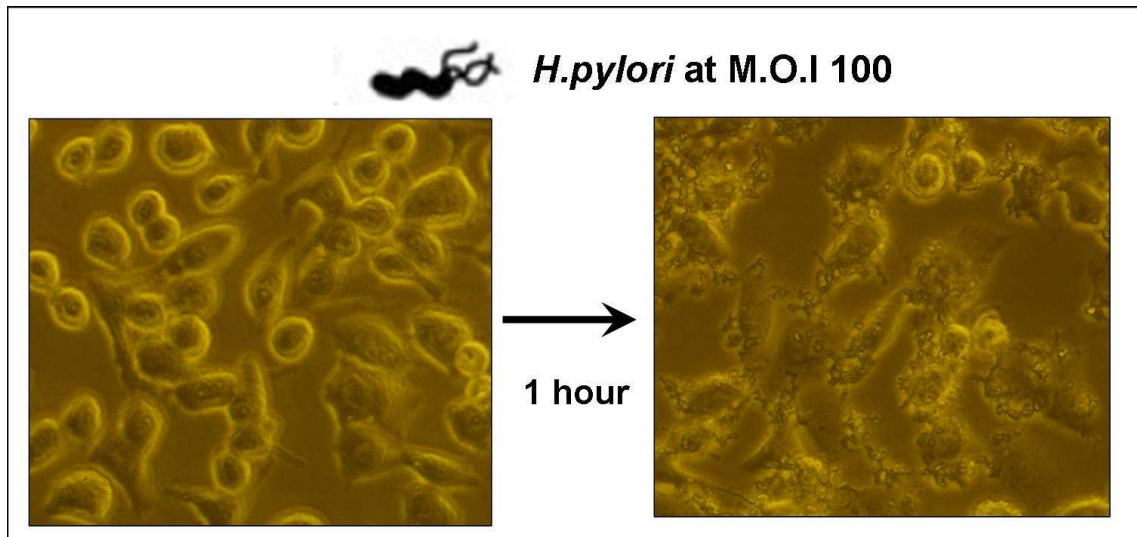
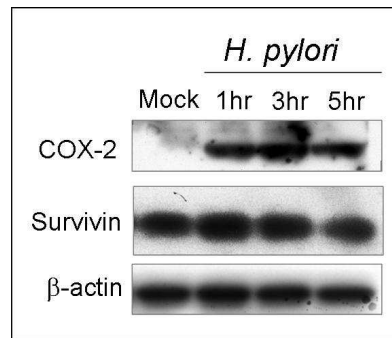
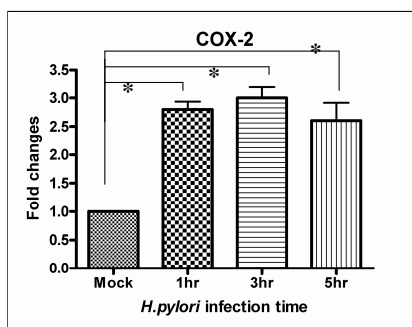


Figure 1. The effectiveness of *H. pylori* infection of AGS cells using an M.O.I. of 100. Phase-contrast micrographs of non-infected AGS cells (left) or AGS cells infected with *H. pylori* for 1 hour (right). After *H. pylori* were added to the cultured cells at an M.O.I. of 100, AGS cells were induced to the hummingbird phenotypes. The optical images were obtained by Olympus IX70 Epi-fluorescence microscope.

A



B



C

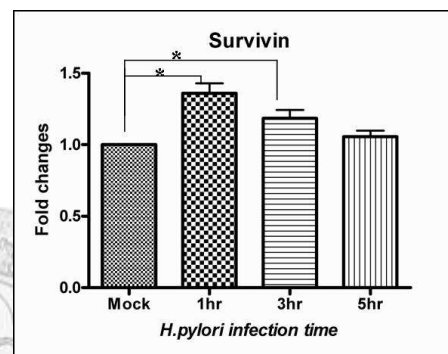
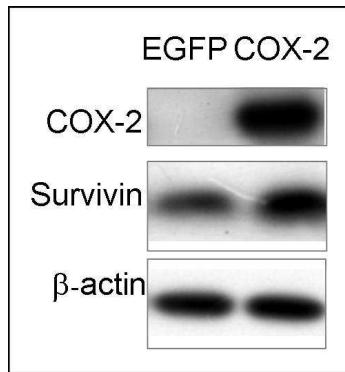


Figure 2. The effect of *H. pylori* infection on COX-2 and survivin expression. (A) AGS cells were incubated with *H. pylori* at an M.O.I. of 100 at 37 °C for the indicated times. After incubation, cell lysates were analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using an anti-survivin antibody and anti-COX-2 antibody. The loading control is β -Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells. Results are representative of three independent experiments. (B)(C) Quantification of COX-2 and survivin was performed by densitometry. Data are means \pm S.E. of values from three experiments, with an n = 3 per experiment. Statistical significance: *, p < 0.05.

A



B

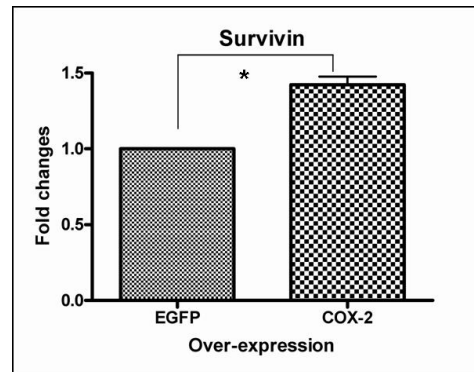
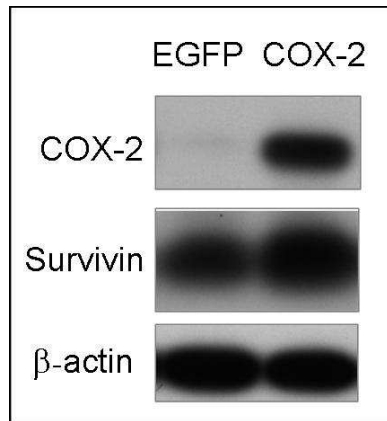


Figure 3. Over-expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) promotes survivin levels increase. (A) AGS cells were transfected with EGFP or COX-2 10 μ g. After transfecting with cyclooxygenase-2 (COX-2) 10 μ g, AGS cells overexpressed survivin. The transfection control is AGS cells transfected with EGFP (enhanced green fluorescent protein) 10 μ g. Cell lysates were analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using anti-COX-2, and anti-survivin antibodies. The loading control is β -Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells. Results are representative of three independent experiments. (B) Quantification of survivin was performed by densitometry. Data are means \pm S.E. of values from three experiments, with an n = 3 per experiment. Statistical significance: *, p < 0.05.

A



B

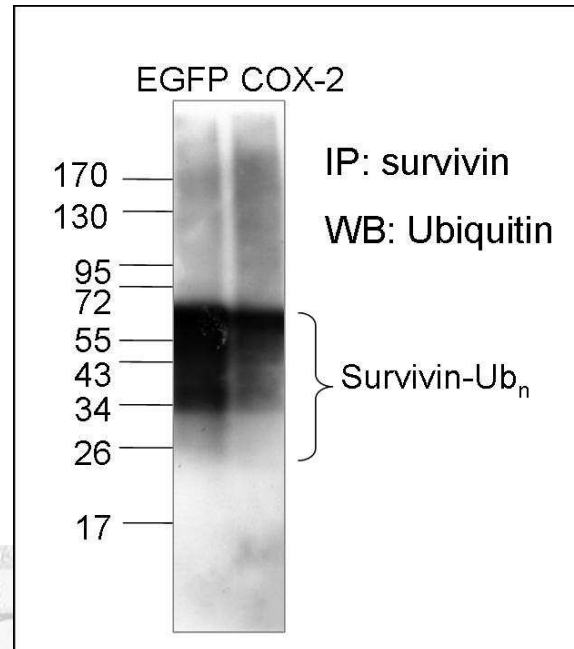


Figure 4. Over-expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) decreases the ubiquitination of survivin. (A) AGS cells were transfected with EGFP or COX-2 10 μ g. After transfecting with cyclooxygenase-2 (COX-2) 10 μ g, AGS cells overexpressed survivin. The transfection control is AGS cells transfected with EGFP (enhanced fluorescent protein) 10 μ g. The loading control is β -Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells. (B) Survivin was immunoprecipitated from AGS cells, which transfected with EGFP or COX-2 10 μ g, using anti-survivin antibodies. Cell lysates were analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using an anti-ubiquitin antibody. Ubiquitination of survivin is significantly decreased in AGS cells, which were transfected COX-2., Results are representatives of three independent experiments.

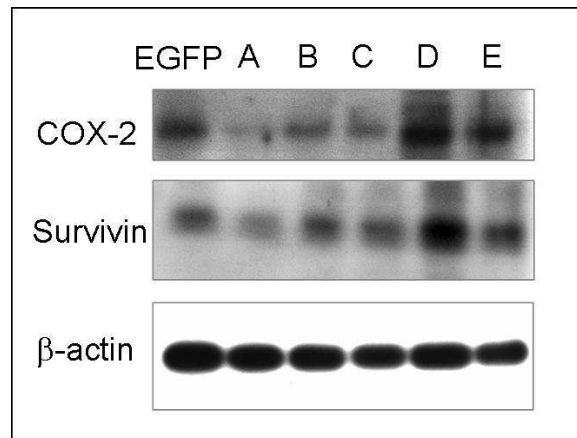


Figure 5. Survivin levels are decreased after COX-2 depression by shRNA knock down. AGS cells were transfected with COX-2 shRNA (short hairpin RNA) or EGFP. AGS cells were then incubated with *H. pylori* at an M.O.I. of 100 at 37 °C for 3 hours. Cell lysates were analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using anti-COX-2 and anti-survivin antibodies. Expression of survivin decreased in some AGS cells “A”, “C”, which were transfected with COX-2 shRNA. The labels “A”—“E” represents 5 different sequences of shRNA of COX-2. The transfection control and the the *H.pylori* infection control is AGS cells transfected with EGFP (enhanced fluorescent protein) 10 µg.AGS cells. The loading control is β-Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells.

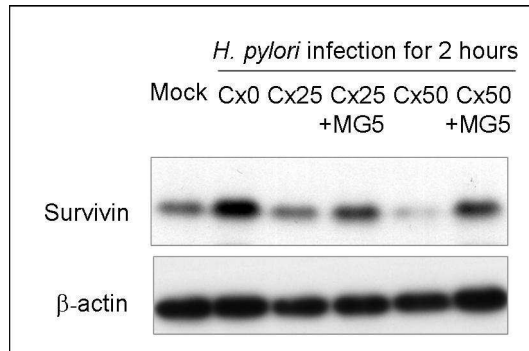
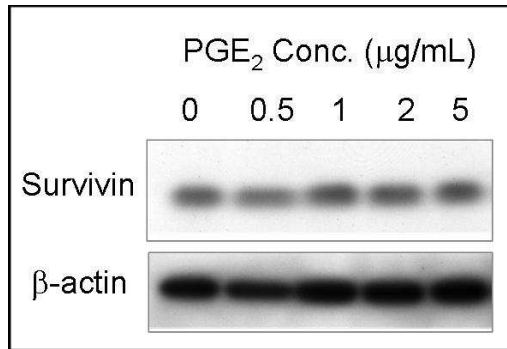


Figure 6. Survivin levels are decreased after COX-2 inhibition by Celecoxib. COX-2-mediated regulation of survivin is mediated by decreasing proteasomal degradation. The immunoblots of survivin levels after *H. pylori* infection for 2 hours, respectively. The results showed that the expression of survivin after *H. pylori* infection has decreased because of the addition of Celecoxib, a selective inhibitor of COX-2. The addition of 5 μ M proteasome inhibitor, MG-132, prevents such decrease of survivin. AGS cells were incubated with *H. pylori* at an M.O.I. of 100 at 37 °C for the indicated time. Cell lysates were analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using an anti-survivin antibody. Results are representative of three independent experiments. The loading control is β -Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells. Cx0/25/50, celecoxib 0/25/50 μ M; MG5, MG132 5 μ M.

A



B

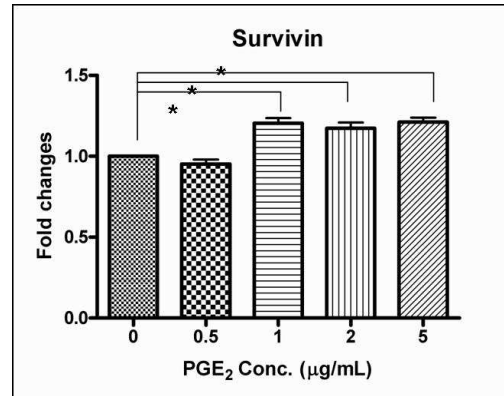
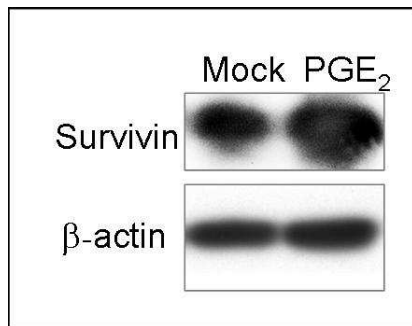


Figure 7. PGE₂ promotes increase of survivin levels in AGS cells. (A) AGS cells were incubated with dmPGE₂ 0.5,1,2, and 5 µg/mL for 48 hours. Cell lysates were then analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using anti-survivin antibody. The loading control is β-Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells. Results are representative of three independent experiments. (B) Quantification of survivin was performed by densitometry. Data are means ± S.E. of values from triplicate experiments, with an n = 3 per experiment. Statistical significance: *, p < 0.05.

A



B

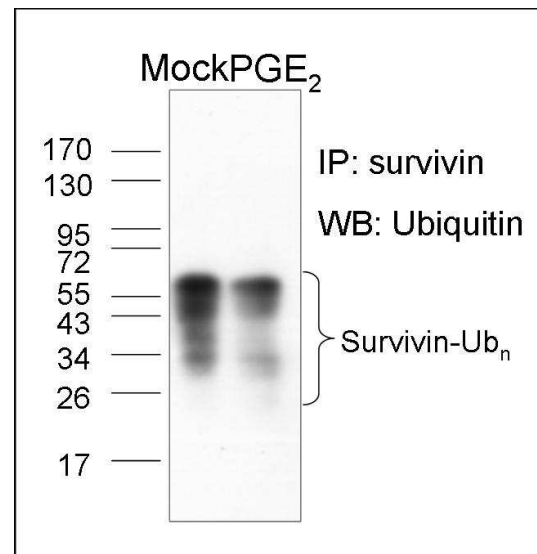


Figure 8. PGE₂ promotes survivin levels by decreasing the ubiquitination of survivin. (A) AGS cells were incubated with dmPGE₂ 5 μg/mL for 48 hours. Cell lysates were then analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using anti-survivin antibody. The loading control is β-Actin, which is a 42-kDa protein expressed in AGS cells. Results are representative of three independent experiments. (B) Survivin was immunoprecipitated from AGS cells, using anti-survivin antibodies. Cell lysates were then analyzed by Tricine SDS-PAGE (16.5 % gels), followed by Western blot analyses using anti-ubiquitin antibodies. Ubiquitination of survivin is significantly decreased in AGS cells, which were incubated with dmPGE₂ 5 μg/mL for 48 hours. Results are representative of three independent experiments.

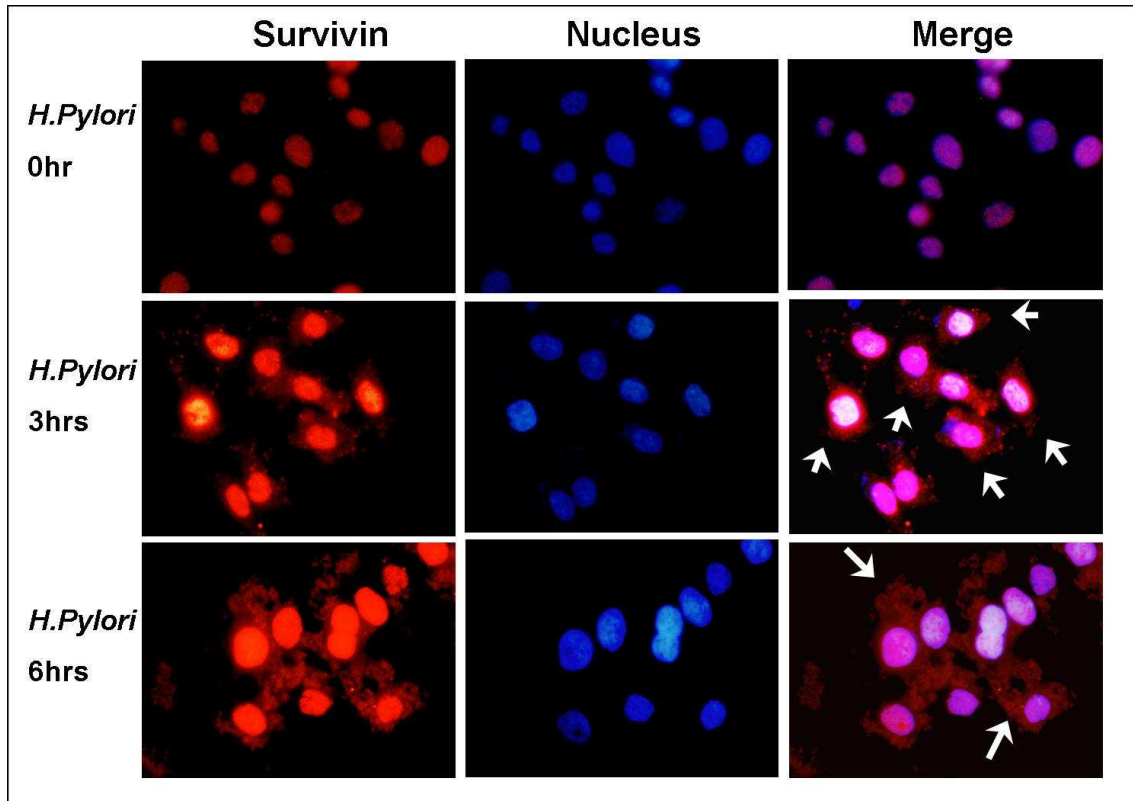


Figure 9. *H. pylori* induced survivin translocation from nucleus to cytoplasm.

Cellular distribution of survivin (red) in AGS cells was detected by fluorescence microscope. Cells were incubated with *H. pylori* at M.O.I. of 100 at 37 °C for the indicated time. Survivin located in nucleus in the control group (upper). However, survivin translocated from nucleus to cytoplasm (middle and bottom) after incubation with *H. pylori* for 3 hours. After incubation, the cells were fixed with 3.7 % paraformaldehyde at room temperature, treated with 0.1% Triton X-100, and blocked with 4 % milk. The fixed cells were subjected to immunostaining using anti-survivin monoclonal antibodies as primary antibodies. After treatment with the primary antibodies, cells were incubated with the secondary anti-rabbit antibodies conjugated with Alexa Fluor 546 and DAPI for 1 hour, and. Data are representative of three experiments.

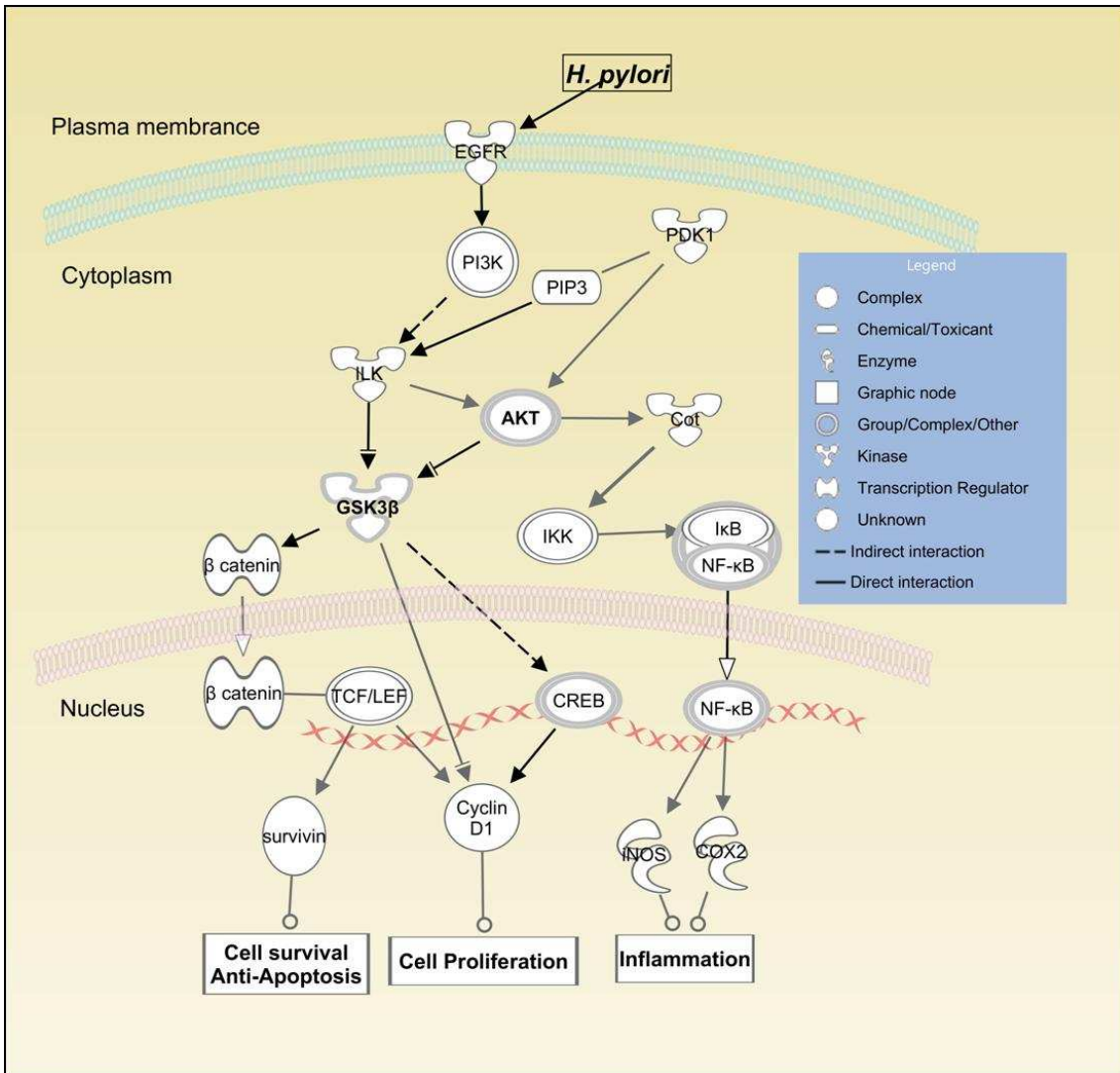


Figure 10. Signal transduction networks produced by Ingenuity Pathway Analysis.

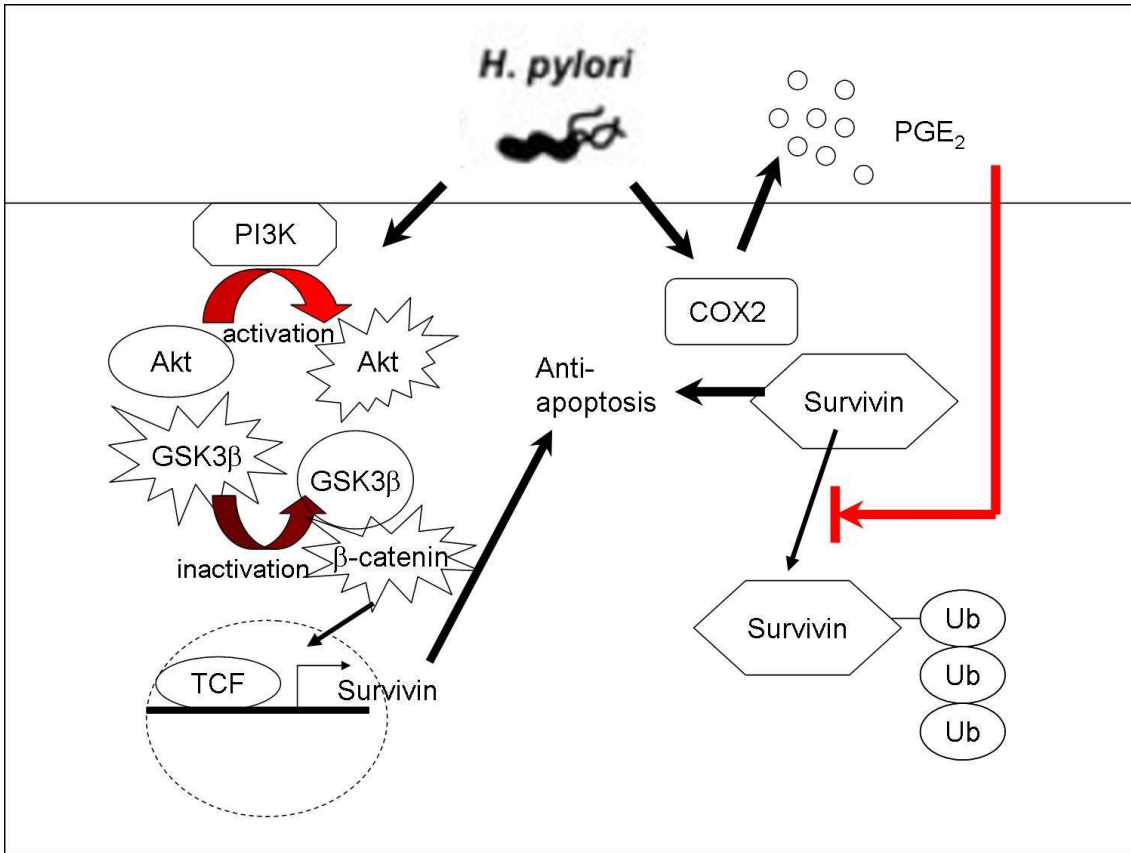


Figure 11. Hypothetical model of survivin over-expression through β -catenin accumulation and COX-2 over-expression in *H. pylori* infection.



附錄

Supplement Table 1.

Cloneld	TRC Knock Down Efficiency	Symbol	Oligo Sequence	Sequence Alignment
TRCN00 0004553 5	38%	PTGS2	CCGGCCAGGGCTCAAACATGATGTTCTCGA GAACATCATGTTTGAGCCCTGGTTTTTG	Forward(F): 100%
				Reverse(R): 100%
TRCN00 0004553 6	-18%	PTGS2	CCGGCGTTGTGAATAACATTCCCTTCTCGA GAAGGGAATGTTATTCACAACGTTTTTG	Forward(F): 100%
				Reverse(R): 100%
TRCN00 0004553 3	83%	PTGS2	CCGGGCTGAATTTAACACCCTCTATCTCGA GATAGAGGGTGTTAAATTCAGCTTTTTG	Forward(F): 100%
				Reverse(R): 100%
TRCN00 0004553 4	53%	PTGS2	CCGGGCAGATGAAATACCAGTCTTTCTCGA GAAAGACTGGTATTTTCATCTGCTTTTTG	Forward(F): 100%
				Reverse(R): 100%
TRCN00 0004553 7	72%	PTGS2	CCGGCCATTCTCCTTGAAAGGACTTCTCGA GAAGTCCTTTCAAGGAGAATGGTTTTTG	Forward(F): 100%
				Reverse(R): 100%

Sequence of COX-2 shRNA purchased from National RNAi Core Facility, Academia Sinica.