

國立臺灣大學牙醫專業學院

口腔生物科學研究所甲組

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

糖蛋白 B7H3 在口腔癌細胞的表現與作用

Expression and Effects of Glycoprotein B7H3  
in Oral Cancer Cells



研究生：顧可立

Ko-Li Ku

指導教授：陳敏慧 教授

Advisor : Prof. Min-Huey Chen

中華民國 99 年 6 月

June, 2010

## 致謝

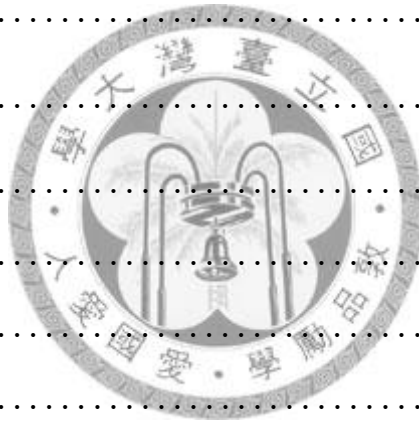
首先感謝陳敏慧老師給我很好的實驗環境，對於我想做的實驗給予支持，讓我可以無後顧之憂的做實驗，每每看到老師都是充滿活力朝氣，讓我在經歷挫折後能迅速地打起精神。

實驗室夥伴們大家都是超級超級的好人，感謝欣樺學姊在我剛進實驗室還懵懵懂懂的時候教導我實驗，讓我可以快速上手；也感謝依玆學姊讓我在他身邊觀摩實驗並讓我著手操作，增加我做實驗的實戰經驗；感謝俊利學長教我做轉染，以及明均學姊教我做 time lapse 並給我許多實驗上的建議，沒有你們，我的實驗也不可能順利完成，建勛學長與俊霆學姊在我實驗遇到困難的時候給我建議與指導，不論是在實驗上或精神上都給了我莫大的幫助，有你們在真好；容慈學姊，在努力做實驗、努力準備口試的時後有你的陪伴真好，一起打拼奮鬥的過程真的很難忘，我們終於熬過來了！芝茹是實驗室的開心果，有你在實驗室變的好熱鬧啊！口試的時候也感謝蓉書學姊幫忙指導我報告需要改進的地方；郁喬也一直再幫我打氣，謝謝你。

也謝謝口生所同學們，跟你們一起玩樂、一起用功、一起打拼的感覺真的很棒，更謝謝宇妙和致皓在實驗上給我莫大的幫助。佳盈、伯宇、佳芸，實驗室有你們的加入，也變得格外熱鬧呢！大家一起在未來的路上努力奮鬥，加油~

# 目錄

	頁次
• 目錄 .....	I
• 表次目錄 .....	III
• 圖次目錄 .....	IV
• Protocol 目錄 .....	VI
• 中文摘要 .....	VII
• 英文摘要 .....	VIII
第一章 引言 .....	1
1. 癌症的發生 .....	1
2. 頭頸部癌症 .....	1
3. 口腔癌 .....	1
4. 癌症的轉移 .....	6
5. 口腔鱗狀細胞癌 .....	7
6. 醣蛋白 .....	8
7. B7H3 .....	10
第二章 實驗目的 .....	14
第三章 材料與方法 .....	15
1. 細胞培養 .....	15
2. 醣蛋白的標定及偵測 .....	15
3. 小干擾 RNA 的轉染 .....	19
4. 西方墨點法 .....	20
5. 基因表現分析 .....	23



6. 細胞傷口癒合分析 .....	25
7. 細胞遷移能力分析 .....	25
8. 細胞侵襲能力分析 .....	25
9. 細胞貼附分析 .....	26
10. 細胞增生試驗 .....	26
11. 統計分析 .....	27
第四章 結果 .....	28
1. 醣蛋白於口腔癌細胞及正常細胞表現的差異 .....	28
2. 利用質譜儀分析找出在口腔癌細胞表現較強的醣蛋白 .....	28
3. B7H3 蛋白質表現 .....	28
4. B7H3 在不同口腔癌細胞的蛋白質表現情形 .....	29
5. siRNA 轉染 .....	29
6. 口腔癌細胞傷口癒合分析 .....	30
7. 口腔癌細胞遷移能力分析 .....	30
8. 口腔癌細胞侵襲能力分析 .....	31
9. 口腔癌細胞貼附分析 .....	31
10. 口腔癌細胞增生試驗 .....	32
第五章 討論 .....	33
1. 醣蛋白與癌症的關聯性 .....	33
2. B7H3 對癌細胞的影響 .....	33
3. 癌症與醣化有關 .....	35
第六章 結論 .....	38
第七章 未來研究方向 .....	40
參考資料 .....	41
附錄 (表、圖與 protocol) .....	49

## 表次目錄

附表 1、醣蛋白經過質譜儀分析的結果.....	49
附表 2、本篇實驗所用到的引子序列、黏合溫度與延伸循環次數.....	50



## 圖次目錄

圖 1、醣蛋白之醣基.....	51
圖 2、醣蛋白 B7H3 的家族.....	52
圖 3、ManNAc 與 ManNAcyne 的結構.....	53
圖 4、醣蛋白的標定與偵測之簡易實驗流程.....	54
圖 5、siRNA 的特徵與作用機制.....	55
圖 6、利用西方墨點法比較醣蛋白在口腔癌細胞株與正常細胞株的表現.....	56
圖 7、以西方墨點法確認細胞有表現 B7H3 蛋白，並比較口腔癌細胞株與正常細胞株的 B7H3 蛋白質表現量，再進行統計分析.....	57
圖 8、比較正常細胞株與多種癌細胞株之 B7H3 蛋白質表現量.....	58
圖 9、siRNA 經轉染進入細胞的情形之觀察.....	59
圖 10、siRNA 劑量對 B7H3 的抑制效果之觀察.....	60
圖 11、siRNA 抑制 B7H3 蛋白質及基因表現之觀察.....	61
圖 12、醣蛋白 B7H3 被抑制後，細胞平移能力改變之觀察.....	62
圖 13、口腔癌細胞在 0% FBS 及 2% FBS 中遷移能力之觀察，決定適合癌細胞進行遷移能力分析的時間.....	63
圖 14、觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞遷移能力之影響.....	64
圖 15、觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞侵襲能力之影響.....	65
圖 16、觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞株 Ca9-22 貼附能力之影響.....	66
圖 17、觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞株 SAS 貼附能力之影響.....	67

圖 18、觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞增生能力之影響 ..... 68



## Protocol 目錄

Protocol 1、siRNA 的轉染 .....	69
Protocol 2、總蛋白質定量 .....	70
Protocol 3、Western blot .....	72
Protocol 4、RNA 之萃取 .....	75
Protocol 5、染色 (adhesion、migration、invasion) .....	76
Protocol 6、MTT assay .....	77





## 中文摘要

口腔癌居全球癌症發病率及死亡率的第六名，且每年的死亡率不斷的攀升，而當口腔癌發生轉移時，能治癒的機會又是微乎其微，因此，研究口腔癌轉移的機制是非常重要的。近年來的研究發現在許多癌症中，醣蛋白 B7H3 會有過量的表現，且這些表現可能與癌症的癌化 (cancer progression)、轉移以及低存活率有關。B7H3 是一種位於細胞膜上的醣蛋白，除了會表現於免疫細胞，許多癌細胞也有 B7H3 蛋白的表現。本實驗主要探討口腔鱗狀細胞癌細胞株中 B7H3 的表現量，並以 siRNA 將 B7H3 抑制後，觀察癌細胞的移動、貼附以及增生能力是否改變。

首先，由西方墨點法發現口腔癌細胞株 Ca-9-22、SAS、CAL27 以及 HSC3 的醣蛋白表現普遍比正常細胞 S-G 多，之後藉由質譜儀分析以及西方墨點法找出並確定 B7H3 在口腔癌細胞株有大量的蛋白質表現。為了更進一步探討 B7H3 於癌細胞株的作用為何，本實驗利用 siRNA 轉染的方式抑制癌細胞 Ca9-22 和 SAS 表現 B7H3，並觀察此處理對癌細胞株移動、貼附以及增生能力的影響。本實驗首先以細胞傷口癒合分析 (wound healing assay) 觀察細胞的平移能力，發現轉染後細胞的平移能力有下降。接著利用細胞遷移能力分析 (migration assay) 以及侵襲能力 (invasion assay) 進行分析，結果顯示 B7H3 抑制後對癌細胞株 Ca9-22 以及 SAS 的遷移和侵襲能力是有抑制效果的。在細胞貼附能力方面，Ca9-22 和 SAS 癌細胞株對 fibronectin 與 laminin 的貼附能力有下降的趨勢，而在 collagen IV 方面的貼附能力雖然有降低，但於統計上並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。另外，細胞增生實驗 (MTT assay) 的結果顯示，B7H3 對細胞的增生能力並沒有影響。總結上述實驗結果可知，醣蛋白 B7H3 對口腔癌轉移可能扮演著重要的角色，極有潛力成為口腔癌轉移的標記而對其診斷治療有很大的幫助。

關鍵字：口腔癌、醣蛋白、B7H3、siRNA、細胞轉移、細胞侵襲、細胞貼附

## Abstract

The incidence and mortality of oral cancer is the sixth in the worldwide, and the mortality is continuing rising each year. Once metastasis is occurred in oral cancer, the opportunity for patient to be cured becomes indistinct. Therefore, investigating of the mechanism of oral cancer metastasis is very important. There are some studies report the over-expression of glycoprotein B7H3 in many cancers. It was also indicated that the over-expression of B7H3 might be related with the progression, metastasis, and low survival rate of cancer. B7H3 is a membrane glycoprotein, it can be expressed in immune cells and many cancer cells. In this study, the expression of B7H3 in oral squamous cell carcinoma cell lines was investigated. Small interfering RNA (siRNA) was applied for inhibiting the expression of B7H3 and the changes of mobility, adhesion, and proliferation of cancer cells were also investigated.

In this study, we found that the expression of glycoprotein in Ca-9-22, SAS, CAL27, HSC3 oral cancer cells is more than that in S-G normal cells with significant difference. Identification and confirmation of glycoprotein B7H3 was performed by mass analysis and western blot analysis. For further investigating the function of B7H3 in cancer cells, siRNA was transfected into cancer cells in Ca9-22 and SAS to knockdown B7H3, and the changes of the ability of mobility, adhesion, and proliferation of cancer cells were observed. The results of wound healing assay showed that the migration ability of transfected cells were lower than that of control cancer cells without siRNA transfection. Furthermore, migration and invasion assay also showed that B7H3 knockdown could reduce the migration and invasion potentials of Ca9-22 and SAS cancer cells. It was also found that cell adhesion in fibronectin and laminin is decreased. Whether B7H3 was knockdown in cancer cells, there is no significant effect

on adhesion to collagen IV ( $p > 0.05$ ). Besides, the MTT data showed that B7H3 has no effect on cell proliferation. In conclusion, glycoprotein B7H3 plays an important role in oral cancer cells especially in cell migration and invasion. We suggest that B7H3 is a potential marker and might be useful for oral cancer therapy.

Key words: oral cancer, glycoprotein, B7H3, siRNA, migration, invasion, adhesion



# 第一章 引言

## 1. 癌症的發生

惡性腫瘤，也就是癌症，在近年來國人死因排名一直是居高不下。癌症大多是外來、遺傳的，但也可能來自飲食，簡而言之，癌症就是由於正常細胞發生突變 (mutation)，使癌細胞的生長遠超過一般正常的細胞，因而會與正常細胞競爭養分，破壞身體內的新陳代謝系統、免疫系統和正常的組織，因此癌症不同於一般疾病，癌症常是難以控制與治療。最近的研究大多將罪魁禍首指向基因突變，一是致癌基因 (oncogene) 突變而呈現過度表現，另一則是抑癌基因 (suppressor gene) 的突變而無法抑制致癌基因。這兩種基因的不平衡表現，皆會使細胞不正常增生而導致癌症的發生。

## 2. 頭頸部癌症 (Head and neck cancer, HNC)

頭頸部癌症泛指頭顱部及頸部以上的惡性腫瘤，包括鼻腔、鼻竇、嘴唇、口腔、唾液腺、咽喉。頭頸部癌症已經成為全球第六大最常見的癌症，具有高復發率和高死亡率(Parkin, Bray et al. 2005)。頭頸部癌症好發於男性(Vokes, Weichselbaum et al. 1993)。在台灣，因罹患癌症而死亡的男性患者中，頭頸部癌症占第五大死因，平均每年約有 1500 人由於罹患頭頸部癌症而死亡(Hardisson 2003)。

## 3. 口腔癌 (oral cancer)

口腔癌乃頭頸部癌症的一種，泛指發生在口腔部位的癌症，包括唇、口底、舌、牙齦硬軟顎、頰等部位。口腔癌是由口腔內的組織細胞惡化所形成的腫瘤。口腔癌絕大部分是由黏膜細胞惡化所形成的，少部分由小唾液腺體惡化所形成的腺癌。在台灣，舌側、頰黏膜及牙齦是常見的口腔癌部位，其中舌側就佔了口腔

癌約三分之一，頰黏膜約佔四分之一、牙齦亦為四分之一(Chen 1987)。依據行政院衛生署的所發表的統計，97 年十大主要癌症中，口腔癌為第六名（男性十大癌症發生率的第四名）。根據最新癌症登記資料和死因統計，十年內，台灣每年罹患口腔癌的人數約從 1700 位增為約 4700 位，成長 160%，死亡人數則從約 1000 位增加為 2200 位，成長 110%，為台灣男性所罹患的主要癌症中，發生和死亡情形增加最快者。年紀越大，罹患口腔癌的風險也會增加，大約 95 % 口腔癌患者的年紀都超過 40 歲(Burket 1954)。

### 3-1 口腔癌的危險因子

流行病學的研究指出，導致口腔癌的危險因子包括菸、酒、檳榔及一些常見的致癌化學物質，另外，微生物如病毒、細菌、黴菌等的感染也可能是致病因子之一(Pindborg 1980; Rollo, Rozenbom et al. 1981; Eskinnazi 1987; Krogh, Hald et al. 1987)。除此之外，營養不良、紫外線的照射以及因不良補綴物而造成的慢性刺激，都會使正常的口腔黏膜產生惡性的變化，進而導致口腔癌的發生(Sliverberg and Lubera 1992)。

### 3-2 口腔癌的分期 (stage)

口腔癌的分期主要目的是要確立正確的治療方式，評估預後以及比較不同方式治療的結果。目前口腔癌的分期是依原位癌腫瘤的大小、頸部淋巴結轉移與否以及是否有遠端轉移的情形來決定。

- a. Stage 1：原位癌 (primary tumor) 小於 2 公分，沒有頸部淋巴結轉移。
- b. Stage 2：原位癌 (primary tumor) 介於 2~4 公分之間，沒有頸部淋巴結轉移。
- c. Stage 3：原位癌 (primary tumor) 大於 4 公分，或者不論腫瘤本身大小有同側頸部淋巴結的轉移。
- d. Stage 4：原位癌 (primary tumor) 侵犯鄰近組織，或頸部淋巴結出現兩側或對側的轉移，或有出現遠端轉移 (distant metastasis)，如肺、肝、骨等轉移。

### 3-3 口腔癌的分類

口腔癌的組織學分類可大致分為鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC)、疣狀癌 (verrucous carcinoma, VC)、肉瘤 (sarcoma)、惡性黑色素瘤 (melanoma) 等，其中以鱗狀細胞癌最常見，約佔百分之九十以上(Kumar V 1997)。

### 3-4 口腔癌的症狀

正常的口腔黏膜是粉紅色的柔軟組織，如果變厚且突起成不透明的白色斑塊，稱為白斑；如果是變薄或略為潰爛的紅色斑塊，則為紅斑，兩者皆為口腔癌的前期病變，會進一步惡化成口腔癌。口腔癌的臨床表徵是難以癒合的潰瘍或突出的潰爛硬塊，早期常不覺疼痛，偶爾出現帶血的唾液，晚期常伴有轉移的淋巴結腫塊，病變部位成長快速(Ranasinghe, Warnakulasuriya et al. 1993)。口腔癌由癌前 (pre-malignant) 轉變成惡性腫瘤 (malignant) 的機率介於 0.6~36 % (Oliver, MacDonald et al. 2000)。



### 3-5 口腔癌的診斷

篩檢方法：

- a. 漱口式染色劑檢查 (Toluidin Blue, Lugol solution 或 Methylene Blue)
- b. 細胞抹片檢查 (exfoliative cytology)
- c. 病理切片檢查 (excisional biopsy)
- d. 腫瘤標記 (Tumor marker)

當病理檢查確定為癌症後，會安排頭頸部電腦斷層或核磁共振造影、胸部 X 光及腹部超音波檢查、上消化道內視鏡檢查、全身骨頭掃描或全身正子檢查，以確定臨床狀況是否僅限於原發病灶，或原發病灶有否侵犯附近其他器官或構造，以及確定有無頸部淋巴結轉移或全身轉移。

### 3-6 口腔癌的治療

手術切除是治療口腔癌最重要的步驟，依期數不同而有不同程度的切除，有時還需加做頸部淋巴結切除。術後若有危險因素，如手術切口邊緣仍有殘存的腫瘤細胞、淋巴結轉移、淋巴結膜外侵犯、神經周圍或淋巴血管侵犯者，還需要接受手術後放射治療。由於新進化學治療藥物的進步，遠端轉移的病人可考慮化療或是參加化學治療的臨床試療。近來因著標靶治療的介入，口腔癌轉移或復發的患者若於一線治療時併用化療和標靶治療將可使疾病惡化時間延長百分之七十，為口腔癌治療的一大突破。

由於口腔易於直接診視，因此口腔癌是可以早期診斷治療的，只要初期 (stage 1、stage 2) 接受正規的治療，存活率高達 81.9%，但若是晚期 (stage 3、stage 4) 才開始接受治療，則治療後五年的存活率只有 23-25%。晚期口腔癌的復發大都發生在 3 年內，其中有 80% 出現在局部或頸部，有 20% 發生遠端轉移 (distant metastasis)。



#### 3-6-1 手術治療

針對原發病灶及頸部淋巴轉移兩部分可用外科手術的方式來治療。對於原發病灶，必須切除包含原發病灶的適當安全範圍。至於頸部淋巴方面，則須視狀況施行頸部淋巴廓清術。所謂「頸部淋巴廓清術」，就是將頸部內的淋巴組織移除的一種手術。依據清除的範圍大小，又可分為全頸部淋巴廓清術或選擇性淋巴廓清術。

在腫瘤切除之後，將視狀況施行口腔重建手術，以恢復口腔的功能及外觀。手術包括局部直接縫合、植皮、皮瓣及游離皮瓣重建術等等。而不可切除之病灶就以放射線治療或是化學藥物來治療。

### 3-6-2 放射線治療

放射線治療可單獨用於唇及口咽癌，對口腔腫瘤則是依臨床腫瘤大小、位置、淋巴結之轉移，及術後病理報告來決定是否執行術後放射線治療。當腫瘤越大，或是已侵犯到附近的肌肉或骨頭，或發生頸淋巴結有轉移，或者腫瘤已出現神經、血管侵犯等，則需輔助性放射線治療來提升局部控制率以減少復發的機率。

病患在接受照射治療之前要先接受牙齒評估，將預後不良之牙齒先行拔除，以免造成後續的放射線骨壞死。放射線治療之後的一個月內應避免拔牙或切片等手術，以免影響傷口的癒合。病患於照射後可能會產生如口腔潰瘍、口水分泌變少等併發症。為減低併發症所帶來的不適，可用漱口水漱口、塗抹藥膏及補充人工唾液；也可以每天睡前在牙齒上塗抹氟膠（每次 15-20 分鐘），以減少蛀牙的產生。



### 3-6-3 化學治療

#### a. 復發或遠端轉移病人

許多種類的化學治療藥物對口腔癌有部分的效果，單一藥物化學治療的反應率大約在 20%~40% 之間，然而，絕大部分都只有部分反應，合併數種藥物組合的化學治療可以提高反應率大約到 50%~70% 左右，但是合併多種藥物的副作用與毒性也相對較大，因此對於狀況較佳的病人可以考慮數種藥物組合化學治療，但對狀況較差的病人則考慮單一藥物化學治療。

#### b. 手術後化學放射治療

對於高復發或有轉移機率的高危險群病人，應該使用手術後同步化學放射治療，這樣不僅可降低腫瘤局部復發機率，同時也增加腫瘤控制的機會。



#### c. 對於無法手術切除之病人

許多臨床研究發現，同步化學治療加放射治療比單獨使用放射治療有更好的局部控制與存活率，但是治療的副作用也比較大。所以在選擇治療方式時應根據病人的身體狀況來評估，如果情況許可，應該優先考慮施行同步化學放射治療以得到較佳的療效。

#### d. 其他

當病人的身體狀況不許可施行手術，或是因手術以後可能造成器官功能嚴重缺損等等不適合手術的病人，可以依據病患的臨床狀況，考慮使用同步化學放射治療，化學治療，或是放射治療以控制腫瘤。

### 3-6-4 治療後的追蹤

目前公認口腔癌治療後的追蹤是必要且相當重要的。追蹤的目的是為了早期發現局部復發的腫瘤和次發性腫瘤。對於接受頸部放射線治療的病患應於第 1、2、5 年追蹤甲狀腺的功能。

復發的口腔癌常發生於治療後的一年內，因此治療後的第一年應每 1~2 個月追蹤檢查一次，第二年起間隔逐漸加長。此外在追蹤期間要注意遠端轉移及第二原發癌（常見於口腔、食道、肺臟等器官）發生的可能性。

## 4. 癌症的轉移

### 4-1 轉移的發生

癌症轉移是指原位癌中的腫瘤細胞脫落後經過一系列的步驟到達遠端進行增生而形成之新的腫瘤病灶的過程。然而要發生轉移，癌細胞首先必須由原位癌腫瘤脫落(Sugarbaker 1979)。目前已有研究證明，癌症細胞之所以能脫落是因為癌細胞的貼附性降低所造成(Fidler, Gersten et al. 1977)，脫落的細胞接著需要克服

重重阻礙才能進入血管或淋巴管。目前有許多研究顯示癌細胞能產生特定酵素來溶解基質與基底組織(Yogeeswaran, Gronberg et al. 1981; Ossowaki 1988)，當癌細胞進入血管或淋巴管，會透過某種方式逃過宿主的免疫防禦系統，這些免疫細胞主要為 T 細胞與 NK 細胞，最後癌細胞再貼附於遠端器官的血管或淋巴管，接著穿出並增生形成新的轉移瘤。癌症患者約有 90 % 是死於轉移而非腫瘤本身，若癌細胞轉移至重要器官，如肺、腦、肝，易引起個體死亡。因此癌症治療最重要的標的之一，是預防腫瘤轉移及有效控制轉移。

#### 4-2 口腔癌的轉移

腫瘤細胞轉移常是細胞失去調控所造成，其可藉由血液與淋巴系統來進行轉移，而口腔癌的轉移通常是經由淋巴系統。根據癌細胞轉移之病理發生學所做的臨床觀察顯示，從某些器官產生的原位癌，較容易轉移到特定的位置，如口腔癌，常會轉移到頸部淋巴結，但也可轉移到身體其它部分。當原位性的口腔癌轉移至其他器官或部位時，多數都無法以手術治療了。因此，除了考慮以放射線治療之外，多半也採用化學藥物來治療。至於其他的療法，如免疫療法、基因療法，或其他生物調適製劑療法因尚未成熟，目前仍在研究階段。

#### 5. 口腔鱗狀細胞癌 (Oral squamous cell carcinoma)

口腔鱗狀細胞癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是頭頸部癌症中最普遍的一種癌症(Lippman, Sudbo et al. 2005)，主要長在舌頭、上顎、口底、嘴唇，組織學上口腔鱗狀細胞癌的演變是由正常口腔黏膜，上皮增生，上皮變異，原位癌，最後才演變成侵犯性口腔癌，但部分的口腔黏膜亦可能直接跳過上述過程而直接轉變成口腔癌。口腔鱗狀細胞癌約佔所有口腔癌的 90 % (Scully and Felix 2006)，且在所有人類惡性腫瘤中佔 2~3 % (Parkin, Bray et al. 2005)，相對於所有癌症而言，口腔鱗狀細胞癌的預後是較差的(Scuibba 2001)。約有 30 % 的口腔鱗狀細胞癌患者

在診斷時便發現已經有頸部淋巴結轉移(Shah, Candela et al. 1990)。口腔鱗狀細胞癌的遠端轉移有 50 % 轉移到肺，其他在甲狀腺、橫膈膜、肝也常有遠端轉移的情況發生(Takei, Inoue et al. 1989)。

## 6. 醣蛋白 (Glycoprotein)

人體有 90 % 的蛋白質是醣蛋白，醣蛋白是一種複雜的蛋白質，其寡糖鏈 (oligosaccharide) 以共價鍵 (covalent bond) 連結到多肽骨架 (polypeptide backbone) 上，而寡糖鏈通常是經由共轉譯修飾 (co-translation) 或後轉譯修飾 (post-translation) 過程中的醣基化 (glycosylation) 作用而連結在蛋白質上(Hsu, Hanson et al. 2007)。

當細胞表面的單醣體 (monosaccharides) 進入細胞後，會經由一連串複雜的細胞生物合成 (biosynthesis) 代謝轉化過程，而後進入內質網 (endoplasmic reticulum) 及高基氏體 (Golgi apparatus)，再藉由醣轉移酶 (glycotransferase) 催化和醣共軛物聚集 (glycoconjugate assembly) 後，形成寡醣體 (oligosaccharide)，或與蛋白質或脂質鍵結形成醣蛋白 (glycoprotein)、醣脂質 (glycolipid) 而呈現於細胞表面(Varki A 1999; Drickamer K 2006)。

### 6-1 醣蛋白的分類

醣蛋白依其醣基 (glycan) 和蛋白的鍵結方式而分成兩類 (圖 1a)：

#### a. N-連結醣蛋白 (N-linked glycoprotein)

其醣基連結在蛋白質的 Asparagine (Asn) 上，N-linked glycosylation 需要多肽鏈上的一段保留序列 (consensus sequence)，也就是 Asn-X-Ser/Thr，醣基化通常會發生在這段序列上，此外，N-linked glycan 皆具有相同的核心五碳多醣 (core pentasaccharide)， $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (圖 1a)。N-linked glycan 又可細分成：

(1) high-mannose type：除核心部分外還有六個甘露糖 (mannose)，在卵白蛋白、甲

狀腺球蛋白、細胞膜上鍵結的醣蛋白均發現有此形式。(2) hybrid type：結構包含寡甘露糖 (oligomannose) 及 N-乙醯乳糖胺 (N-acetylactosamine) 形式的寡糖。(3) complex type：除了甘露糖外還有唾液酸 (sialic acid)、岩藻糖 (fucose)、半乳糖 (galactose) 及 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) (圖 1b)。大部分的 N-linked glycoprotein 在合成後會被運送到細胞膜上或是被分泌到細胞外。

b. O-連結醣蛋白 (O-linked glycoprotein) 的醣基則是透過蛋白質的 Serine (Ser) 或 threonine (Thr) 來做連結(Hanson, Hsu et al. 2007)。大多的 O-linked glycoprotein 會分泌到細胞外而形成細胞外間質 (extracellular matrix) 的一部分。

## 6-2 醣蛋白的功能

細胞表面的醣蛋白在胞飲 (pinocytosis)、分化、腫瘤生成 (tumorigenesis)、細胞與細胞間的識別作用 (intercellular recognition) 及貼附作用 (adhesion) 皆扮演重要的角色，也是許多荷爾蒙和病毒的受體 (receptor)，並且參與調控免疫特異性 (immunological specificity)(Manoharan, Padmanabhan et al. 2004)。

## 6-3 醣蛋白與癌症

有研究發現上皮腫瘤 (epithelial tumor) 會過量表現特定的醣蛋白 (Hollingsworth and Swanson 2004)。另外，在動物實驗中發現惡性腫瘤會造成醣蛋白的增加，然後再分泌進入循環系統中(Macbeth and Bekesi 1964)。在肝瘤腫 (hepatic neoplasm) 也發現醣蛋白的量有增高的趨勢(Agostini 1976)。也有文獻顯示，在癌症病患的血液中醣結合物 (glycoconjugate) 的量之所以較高是因為由細胞膜所釋放的醣結合物其週轉 (turnover) 的時間增加所致(Hickey, Clark et al. 1986)。而在口腔鱗狀細胞癌的患者中也發現血液所含的醣結合物有增加，而其增加的原因有可能是醣結合物由紅血球的細胞膜或腫瘤組織本身所釋放出來的(Manoharan,

Padmanabhan et al. 2004)。

#### 6-4 唾液酸

唾液酸 (sialic acid, N-acetylneuraminic acid, NANA) 是經常出現在醣蛋白和醣脂質 (glycolipid) 的醣基鏈 (glycan chain) 尾端之單醣單位 (monosaccharide unit) (圖 1c) (Narayanan 1994; Varki and Varki 2007)。唾液酸在細胞的功能很多，包括運輸帶正電的分子，以及細胞與細胞、細胞與間質 (matrix) 間的互動，也會影響膜上醣蛋白的結構(Narayanan 1994)。經由唾液酸化而來的醣蛋白及醣脂質，存在於細胞表面，對於癌細胞的轉移扮演著相當重要的角色(Chang, Yu et al. 2006)。也有文獻指出，經唾液酸化 (sialylation) 的醣蛋白與致癌基因轉變 (oncogenic transformation) 有關(Hakomori 1981)。

#### 7. B7H3

B7H3 是第一型跨膜蛋白 (type I transmembrane protein)，也是一種醣蛋白 (glycoprotein)，於 2001 年首次被發現，屬於 B7 家族 (family) 的成員，B7H3 與家族中其他成員有 20~27 % 的胺基酸是相同的(Chapoval, Ni et al. 2001)，和其他 B7 成員不同的是，B7H3 的 receptors 尚未被確定。B7H3 有兩種異構物 (isoform)：2Ig- 和 4Ig-B7H3 (圖 2)，分別表示具有 2 個及 4 個位於細胞外的 immunoglobulin-like domains，其分子量分別約為 45-kDa 以及 100-kDa(Chapoval, Ni et al. 2001; Sun, Richards et al. 2002; Ling, Wu et al. 2003)。2Ig-B7H3 於人類和老鼠細胞都有表現，而 4Ig-B7H3 則只會在特定的人類細胞表現(Sun, Richards et al. 2002; Ling, Wu et al. 2003)。4Ig-B7H3 又稱 CD276 isoform 1。

有文獻指出 B7H3 對 T 細胞的增生、毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 反應的誘導、T 細胞中 IFN- $\gamma$  的生成以及抗癌活性 (anti-tumor activity) 會有刺激、抑制的作用，或者沒有影響，並且與自體免疫疾病有關(Chapoval, Ni et al. 2001; Ling, Wu et al. 2003; Suh, Gajewska et al. 2003; Sun, Vale et al. 2003; Luo,

Chapoval et al. 2004; Steinberger, Majdic et al. 2004; Zhang, Chen et al. 2004; Flies and Chen 2007)，由這些特性看來，B7H3 是擁有共同抑制 (coinhibitory) 和共同刺激 (costimulatory) 的特質，而造成這種特質的原因極有可能取決於其受體 (receptor)(Hofmeyer, Ray et al. 2008)。

B7H3 在休眠的免疫細胞 (resting immune cell) 中並不表現，但可以被誘導而表現在活化的樹突細胞 (dendritic cell)、單核球 (monocyte)、T 細胞以及一些腫瘤細胞株(Chapoval, Ni et al. 2001; Sun, Richards et al. 2002; Steinberger, Majdic et al. 2004; Zhang, Zhou et al. 2005)。B7H3 蛋白除了在免疫細胞有表現外，許多癌細胞也有發現大量 B7H3 蛋白的存在，包括黑色素瘤 (melanoma)、子宮頸腺癌 (cervical adenocarcinoma)、神經母細胞瘤 (neuroblastoma)、急性紅血球性白血病 (erythroleukemia)、卵巢癌 (ovarian cancer)、乳癌 (breast carcinoma)、大腸癌 (colon carcinoma)、胃癌 (gastric carcinoma)、肺癌 (lung carcinoma)(Chapoval, Ni et al. 2001; Modak, Kramer et al. 2001; Castriconi, Dondero et al. 2004; Zhang, Zhou et al. 2005; Sun, Wang et al. 2006; Wu, Jiang et al. 2006)。B7H3 的轉錄階段 (transcription level) 普遍表現在心臟、肺、胎盤、前列腺、睪丸、子宮、胰臟、小腸、大腸、淋巴器官以及許多癌細胞株；在腦、骨骼肌、腎臟以及肺的表現較低(Chapoval, Ni et al. 2001)。

### 7-1 B7H3 與癌症

許多研究顯示，在多種癌症都發現有 B7H3 蛋白的大量表現，包括神經母細胞瘤、乳癌、胃癌，以及肺癌等都有觀察到此現象(Chapoval, Ni et al. 2001; Modak, Kramer et al. 2001; Castriconi, Dondero et al. 2004; Zhang, Zhou et al. 2005; Sun, Wang et al. 2006; Wu, Jiang et al. 2006)。有文獻指出，前列腺癌的患者其腫瘤 B7H3 的高度表現與會增加癌化 (cancer progression) 的風險，也會增加臨床上癌症的復發率，且癌症造成的死亡率也會增加(Roth, Sheinin et al. 2007; Zang, Thompson et al.

2007)。另外，腫瘤 B7H3 的表現也與腎細胞癌 (renal cell carcinoma) 和泌尿道上皮癌 (urothelial cell carcinoma) 患者的低存活率有關(Boorjian, Sheinin et al. 2008; Crispen, Sheinin et al. 2008)。B7H3 也會促進腫瘤的轉移，在非小細胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 中 B7H3 有過量表現，這些過量表現的 B7H3 可能會促使腫瘤產生淋巴結轉移 (lymph node metastasis) 的機率增加(Sun, Wang et al. 2006)。B7H3 在前列腺癌的骨轉移 (bone metastasis) 中也有很強的表現(Chavin, Sheinin et al. 2009)。另外也有文獻表示，B7H3 跟腫瘤細胞的轉移和侵襲以及腫瘤的癌化 (tumor progression) 有很大的關係(Chen, Tekle et al. 2008)。相反的，也有研究指出，B7H3 表現較高的胃癌患者，其存活率也相對較高(Wu, Jiang et al. 2006)。也有文獻指出，在小鼠的大腸癌模式中，B7H3 的表現會降低癌細胞的轉移(Lupu, Eisenbach et al. 2007)。



## 7-2 B7H3 與免疫反應及抗癌活性

有研究指出，B7H3 會與活化的 T 細胞上可能的受體 (putative receptor) 結合而促進 T 細胞增生和 IFN- $\gamma$  的表現(Chapoval, Ni et al. 2001)。也有文獻顯示，利用抗體來阻斷小鼠中 B7H3 的作用會導致 T 細胞活化量的提高並產生嚴重的實驗性自體免疫型腦炎 (experimental autoimmune encephalitis)(Suh, Gajewska et al. 2003; Prasad, Nguyen et al. 2004)。另外，B7H3 也會刺激 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 細胞來增加毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的活性(Ling, Wu et al. 2003)，也有動物實驗結果顯示老鼠所表現的 B7H3 可以加強其 CD8<sup>+</sup> T 細胞的活化(Hashiguchi, Kobori et al. 2008)。相反的，有研究顯示 B7H3 會透過抑制第一型輔助性 T 細胞 (T helper type 1, T<sub>H</sub>1) 作用來抑制免疫反應並抑制細胞激素 (cytokine) 的生成(Suh, Gajewska et al. 2003)，也有文獻則指出 B7H3 會抑制 T 細胞的增生與細胞激素 (cytokine) 的生成(Steinberger, Majdic et al. 2004)。現今關於 B7H3 在免疫方面的角色並沒有一致的結果，因為皆有文獻指出 B7H3 對於免疫反應有刺激 (stimulatory)

以及抑制 (inhibitory) 的作用，這些現象都顯示 B7H3 可能有一個以上的受體存在於活化的 T 細胞上。

另外，在老鼠腫瘤模式中，B7H3 的表現可以加強抗癌反應 (anticancer response)(Sun, Vale et al. 2003)。B7H3 也會與自然殺手 (natural killer,NK) 細胞表面可能的抑制受體 (putative inhibitory receptor) 交互作用而抑制自然殺手細胞所引起的神經母細胞瘤 (neuroblastoma) 的溶破 (lysis)(Castriconi, Dondero et al. 2004)。





## 第二章 實驗目的

癌症最可怕的地方就是會轉移，其主要透過淋巴及血液這兩條路徑轉移，經由淋巴常會轉移到頸部淋巴結，經血液則常轉移到胃、骨頭、肝臟，而鱗狀細胞癌大部分藉由淋巴轉移。當癌細胞發生轉移時，患者的存活率會明顯降低，說明癌細胞是否轉移為影響患者生存率的重要因素。當缺乏精確的臨床診斷標記時，癌轉移常造成診斷上的困難。因此本研究的目的就是要找出癌細胞中與轉移機制相關的分子，期待具有潛力成為口腔癌轉移在臨床診斷上的生物標記 (biomarker)，並且可以當做口腔癌治療的一個標的 (target)。目前尚未有文獻指出在口腔癌細胞中 B7H3 所扮演的角色為何，因此，本實驗主要為探討口腔癌細胞株所表現的醣蛋白 B7H3 是否與癌細胞的特性有關。

本實驗設計主要為探討 B7H3 於癌細胞株的表現，再以 siRNA 將 B7H3 抑制後觀察其對癌細胞之特性 (包括平移、遷移、侵襲、貼附，以及增生能力) 的影響。

### 第三章 材料與方法

#### 1. 細胞培養 (Cell Culture)

本實驗有使用到五種細胞株，其中 Ca9-22、SAS、CAL27、HSC3 皆屬於人類的口腔鱗狀細胞癌細胞株 (oral squamous cell carcinoma cell line)，而 S-G cells (Smulow-Glickman cells) 屬於正常的人類牙齦上皮細胞株 (human gingival epithelial cells)。此五種細胞株皆以一般的培養液培養即可。

Type	Name	Site	Studies
Normal	S-G	Gingiva	<b>Attachment</b> —Int J Periodont Restorative Dent. 1990 <b>Cytotoxicity</b> —In Vitro Mol Toxicol. 1999
OSCC	Ca9-22	Gingiva	<b>Chemosensitivity</b> —J Med Dent Sci. 2006 <b>Radiosensitivity</b> —Oral Oncol. 2005 <b>Migration &amp; invasion</b> — Oral Oncol. 2007 Biochem Biophys Res Commun. 2008 FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Neoplasia. 2008 Oral Oncol. 2009 Cancer Sci. 2010 <b>Drug delivery system</b> — Cancer Gene Ther. 2007 J Oral Pathol Med. 2009 <b>Adhesion</b> — Int J Mol Med. 2005 Microbiology. 2007 <b>Cell cycle arrest and proliferation</b> — Eur J Oral Sci. 2004 J Periodontal Res. 2008 Life Sci. 2009
	SAS	Tongue	<b>Migration &amp; invasion</b> — Neoplasia. 2008 Oral Oncol. 2008 Int J Oral Maxillofac Surg. 2008 Oral Oncol. 2009 Oncol Rep. 2009 Hum Exp Toxicol. 2010 <b>Toxicity and metabolism</b> —Toxicology. 2006 <b>Cell cycle arrest</b> —Int J Radiat Biol. 2008 <b>Inflammatory signalings</b> —Cancer Res. 2008 <b>Antitumor activity</b> —Oral Oncol. 2009 <b>Apoptosis</b> —Apoptosis. 2009 <b>Tumor angiogenesis</b> —Clin Cancer Res. 2009
	CAL27	Tongue	<b>Cell motility</b> —Oral Oncol. 2009
	HSC3	Tongue	<b>Migration &amp; invasion</b> — Oncol. 2008 Oral Oncol. 2009 <b>Apoptosis</b> —Apoptosis. 2009

培養方法為：將細胞分別培養在細胞培養皿，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱，每三天用 PBS (Phosphate Buffered Saline) 清洗 2 次並更換新的細胞培養液，待細胞滿盤之後，以 1 ml trypsin-EDTA solution 與細胞作用 5 分鐘，切除細胞貼附的鍵結，使細胞自培養皿脫落，接著分到新的培養皿中作繼代培養 (subculture)。細胞培養滿三個月後丟棄，以免因細胞的特性改變而影響實驗，然後再重新解凍細胞來培養。細胞的培養液使用含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 與 1 % 抗生素 (100 unit/ml Penicillin+100 µg/ml Streptomycin, PS) 之 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)。

#### 2. 醣蛋白 (glycoprotein) 的標定及偵測

為了觀察正常細胞與癌細胞之間的醣蛋白表現的差異，本實驗依照中研院翁

啟惠院長的實驗室所使用之方法來對醣蛋白進行標定及偵測(Hanson, Hsu et al. 2007)，也就是使用化學合成的醣 (ManNAcyne)，其為一種合成醣蛋白末端唾液酸 (sialic acid) 之 N-acetyl-D-mannosamine (ManNAc) 的類似物 (analog)，在細胞合成醣蛋白的過程中，可取代 ManNAc 而表現在醣蛋白上。這種醣的類似物具有炔基 (RC≡CR', alkynyl group) (圖 3)，可以和生物素 (biotin) 做鍵結，再用中性鏈親和素-瓊脂小珠 (NeutrAvidin-agarose beads) 與 biotin 結合，因而能將所要的醣蛋白抓下來，再進一步利用質譜儀 (Mass, LTQ-FT MS) 做分析 (圖 4)，以得知在癌細胞表現較多甚至只有在癌細胞才有表現的醣蛋白為何。

## 2-1 標定醣蛋白

在 6 孔培養盤 (6-well plate) 中每 well 種入約  $1.5 \times 10^5$  顆細胞，將溶於 DMSO 的 ManNAcyne 與 total medium 的量以 1:2000 的比例加入 well 中，再放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱裡培養三天後，細胞的醣蛋白就能被標定，再收細胞以進一步利用西方墨點法 (western blot) 來分析醣蛋白的表現，或做質譜儀分析。

## 2-2 細胞內蛋白質分離

將細胞用細胞刮刀或用 trypsin-EDTA solution 作用，使細胞脫離培養皿，並以 12000 r.p.m. 離心一分鐘，使細胞沉澱，吸掉上清液後加入 lysis buffer (RIPA) 及 protease inhibitor (1 mM PMSF, 10 μl/ml aprotinin, 10 μl/ml leupeptin) 使細胞溶破，並利用超音波震盪儀 (soniprep) 將細胞震碎，之後在 4°C 下以 12000 r.p.m. 離心 15 分鐘，並將上清液抽至新的離心小管中做蛋白質定量。

## 2-3 總蛋白質 (total protein) 定量

總蛋白質的定量採用 PIERCE BCA™ Protein assay kit，此定量法的原理是，在鹼性條件下，蛋白質會將 Cu<sup>2+</sup> 還原為 Cu<sup>+</sup>，Cu<sup>+</sup> 再與 bicinchoninic acid (BCA) 結合

成紫色物質，在波長 562 nm 時有很強的吸收值，並與標準曲線對比，即可計算待測蛋白的濃度。

在進行反應前，首先將 kit 中 reagent A 與 reagent B 以 50:1 的比例配成 working reagent，並將 working reagent 200  $\mu$ l 與 25  $\mu$ l 已萃取出蛋白質之 extraction buffer 溶液一起加入 96-well plate 中，以 parafilm 密封置入 incubator 於 37°C 反應 30 分鐘，parafilm 的密封是為了防止 CO<sub>2</sub> 干擾。最後再以 ELISA reader 波長 570 nm 測定讀值。各吸收值減去 blank (只有 working reagent) 之背景值，其值為最後之吸光值。用標準溶液讀值求出檢量線，求出樣品之 total protein 濃度 ( $\mu$ g/ml)。

在本實驗中以 bovine serum albumin (BSA) 配製標準溶液，選用的濃度分別為 2000、1500、1000、750、500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、0  $\mu$ g/ml，並與實驗中之樣品各取 25  $\mu$ l 加入 96-well plate 中，一起在 incubator 反應 30 分鐘，所得之標準線以二次曲線回歸。

#### 2-4 利用點擊化學 (click chemistry) 標定生物素 (biotin)

標定醣蛋白 (glycoprotein) 所需的總蛋白質量為 1.5 mg (1 mg/ml)，將足量的蛋白質樣本用微量離心管 (ependorf tube) 分成 3 管，每管 0.5 ml。加入生物素-疊氮化物 (biotin-azide)、三唑配體 (triazole ligand) (最後濃度 0.1 mM) 後震盪 (vortex)，再加入 CuSO<sub>4</sub> (最後濃度為 1 mM)，然後迅速加入抗壞血酸鈉 (sodium ascorbate) (最後濃度為 2 mM)，震盪混合均勻。30 分鐘後震盪一下再靜置 30 分鐘。加入冰冷 TCA:acetone 溶液 (最後體積為 20%) 後放冰上 30 分鐘，以沉澱蛋白質。以 6000 g 在 4 °C 離心 4 分鐘。接著洗蛋白質沉澱物，去上清液後加入 0.5 ml cold acetone 後超音波震盪 (sonicate) 5 秒，在室溫下以 6000 g 離心 4 分鐘，重複洗三次並將 3 管微量離心管收集成一管。將蛋白質沉澱物以 1 ml 1.2% SDS 的 PBS 溶液回溶 (resuspend)，超音波震盪 (sonicate) 5 秒後用 95 °C 加熱 5 分鐘以溶解沉澱物，此蛋白質樣本在 -20°C 可存放 1-3 天，直到進行親和力捕捉。

## 2-5 親和力捕捉 (Affinity capture)

用 PBS 清洗 NeutrAvidin-agarose beads 3 次，再將步驟 2-4 所得的蛋白質樣本稀釋到 0.2 % SDS (共 6 ml)，然後加入 beads 一起於室溫下旋轉 (rotation) 2 小時。以 0.2 % SDS 的 PBS 溶液清洗一次 (1400g 離心)，再以 PBS 清洗三次，最後以 ddH<sub>2</sub>O 洗三次。再將清洗後的 beads 移到低殘留螺旋蓋微量離心管 (low retention screw-cap microtube)，以桌上型微量高速離心機 (microfuge) 離心 1 分鐘後，靜置約 5 分鐘讓 beads 沉澱下來，吸除上清液。

## 2-6 小珠上的胰蛋白酶分解 (On-beads trypsin digestion)

將 beads 用 0.5 ml 6 M urea/PBS 回溶，加入 25  $\mu$ l 二硫代蘇糖醇 (Dithiothreitol, DTT) (最後濃度為 10 mM) 以打破雙硫鍵，震盪後於 37 °C 搖晃培養 30 分鐘。加入 25  $\mu$ l 碘乙醯胺 (Iodoacetamide, IAA)，使雙硫鍵無法回復，然後在 37 °C 搖晃避光培養 30 分鐘。加入 950  $\mu$ l PBS 稀釋，以桌上型微量高速離心機離心 1 分鐘，靜置約 5 分鐘讓 beads 沉澱下來，吸除上清液。以 1 ml 6 M urea/PBS 清洗 beads 兩次。加入預先配好的 trypsin 溶液 (200  $\mu$ l 2 M urea/PBS+2  $\mu$ l 100 mM CaCl<sub>2</sub>+4  $\mu$ l 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l trypsin)，以 37 °C 搖晃培養 overnight。將溶液轉移到 Bio-spin columns，以桌上型微量高速離心機稍做離心，將流出的 tryptic peptides 收集到 1.5 ml 低殘留微量離心管中。再以 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 清洗 beads 2 次，同樣將流出的樣本收集，加入 15  $\mu$ l 100 % 甲酸 (formic acid) 後 (最後為 5 %)，保存在 -20 °C 直到質譜分析 (MS analysis)。

## 2-7 小珠上的去醣基酶分解 (On-beads PNGase digestion)

將 beads 加入 0.6 ml PBS 清洗三次，再以 0.6 ml ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次後，將 beads 加入 ddH<sub>2</sub>O 後轉移到螺旋蓋微量離心管，離心後去除上清液，再將 beads 加入 200

µl 1X G7 buffer，離心後去除上清液，加入預先配好的 PNGase 溶液 (200 µl 1X G7 buffer+1 µl 2.5U/µl PNGase)，於 37 °C 搖晃培養 overnight。將溶液轉移到 Bio-spin columns 以桌上型微量高速離心機稍做離心，將流出的 PNGased peptides 收集到 1.5 ml 低殘留微量離心管中。再以 50 µl ddH<sub>2</sub>O 清洗 beads 2 次，同樣將流出的樣本收集，加入 15 µl 100 % 甲酸 (formic acid) 後 (最後為 5 %)，保存在 -20 °C 直到進行質譜分析 (MS analysis)。

### 3. 小干擾 RNA 的轉染 (Transfection of Small Interfering RNA)

小干擾 RNA (Small interfering RNA, siRNA)，也稱為短干擾 RNA (short interfering RNA) 或沉默 RNA (silencing RNA)，是一段長 19~25 核苷酸 (nucleotide) 的雙股 RNA，且在其兩股的 3'端有比另一股 5'端多 2 核苷酸的突出 (圖 5a)。目前已知 siRNA 主要參與 RNA 干擾 (RNA Interference, RNAi) 現象。

siRNA 可藉由脂質體 (liposome) 轉染到細胞內，本實驗利用 Lipofectamine™ 2000 reagent 將 siRNA 送入細胞中，當 siRNA 進入細胞後，會和一個核酶複合物結合，形成 RNA 誘導沉默複合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)，此複合物可以辨識並結合到特定序列之 mRNA 上，引發此 mRNA 序列的降解，使 mRNA 無法轉譯蛋白質，而造成該特定基因的沈默 (gene silencing)，失去功能 (圖 5b)。

本實驗所使用的 B7H3 small interfering RNA (siRNA) 是由 3 種具有特異性標靶 (specific-targeting) 的 siRNAs 所組成，可以抑制 B7-H3 的基因表現，其序列如下：

- 1) CAACCUUAGUUCUCUAAGU; ACUAGAGAACUAAGGUUG
- 2) GUGAUACACUAGUGAUCAU; AUGAUCACUAGUGUAUCAC
- 3) GAAGAUGUGAGGACUUCUA; UAGAAGUCCUC ACAUCUUC

而控制組 siRNA (control siRNA) 是一段含有 20~25 核苷酸 (nucleotide) 且不

具標靶功能的 siRNA，此 siRNA 有結合螢光素 (fluorecin)，可用來當作 siRNA 轉染的控制組以及藉由螢光顯微鏡觀察轉染的情形。

### 3-1 轉染的前置作業

在轉染的前一天，先將  $2 \times 10^5$  顆細胞加入含有 10 % 胎牛血清且無抗生素的培養液 (PS-free medium with 10 % FBS)，以避免抗生素降低轉染的效率並且造成細胞死亡，之後將細胞培養在 6 孔培養盤 (6-well plate)。等到隔天細胞長到約 7 分滿時，吸除培養液，加入 760  $\mu$ l DMEM，再放入 37°C 培養箱內等待轉染。

### 3-2 稀釋 siRNA 和 Lipofectamine™ 2000 reagent

先取一微量離心管 (eppendorf tube) 加入 5  $\mu$ l siRNA (50 pmol) 及 125  $\mu$ l DMEM，以微量吸管 (pipetman) 輕輕吸吐均勻，另外取一微量離心管加入 5  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 reagent 及 125  $\mu$ l DMEM，以微量吸管 (pipetman) 輕輕吸吐均勻，將兩管於室溫下靜置 5 分鐘。然後將兩管混合成一管，並用微量吸管 (pipetman) 輕輕吸吐均勻後，在室溫下靜置 20 分鐘，讓複合物 (complex) 形成。

### 3-3 轉染 (transfection)

把先前放入培養箱中的 6 孔培養盤拿出，將複合物均勻滴入 6 孔盤培養皿中，此時每個 well 的體積為 1 ml，將培養皿輕輕的前後左右搖晃之後，放入細胞培養箱中培養 6 小時，然後加入 1 ml 的 2x 正常培養液 (DMEM with 20% FBS, 2% PS)，再放入培養箱繼續培養，轉染完 72 小時收細胞，以進行後續的實驗。

## 4. 西方墨點法 (Western Blot)

在本實驗中，主要在比較不同細胞中 B7H3 的蛋白質表現量的多寡，以及觀察利用 siRNA 轉染處理過後的細胞，其 B7H3 的抑制效果如何。

分析醣蛋白表現的西方墨點法 (western blot) 其實驗步驟大致與分析 B7H3 蛋白質的步驟相同，差別在 4-3 的步驟時，在轉漬 (transfer) 完後，分析醣蛋白表現的西方墨點法是將生物素 (biotin) 接到 membrane 的醣蛋白上 (biotin 的連接方式請參考實驗方法 2-4) 並進行 blocking 之後，再以 streptavidin-HRP 去辨識皆有 biotin 的醣蛋白，以進行影像分析。

#### 4-1 細胞內蛋白質分離

將細胞用細胞刮刀或用 trypsin-EDTA solution 作用，使細胞脫離培養皿，並以 12000 r.p.m. 離心一分鐘，使細胞沉澱，吸掉上清液後加 lysis buffer (RIPA) 及 protease inhibitor (1 mM PMSF, 10 $\mu$ l/ml aprotinin, 10 $\mu$ l/ml leupeptin) 使細胞溶破，並利用超音波震盪儀 (soniprep) 將細胞震碎，之後在 4 $^{\circ}$ C 下以 12000 r.p.m. 離心 15 分鐘，並將上清液抽至新的離心小管中做蛋白質定量。

#### 4-2 總蛋白質 (total protein) 定量

總蛋白質的定量採用 PIERCE BCA<sup>TM</sup> Protein assay kit，此定量法的原理是，在鹼性條件下，蛋白質會將 Cu<sup>2+</sup> 還原為 Cu<sup>+</sup>，Cu<sup>+</sup> 再與 bicinchoninic acid (BCA) 結合成紫色物質，在波長 562 nm 時有很強的吸收值，並與標準曲線對比，即可計算待測蛋白的濃度。

在進行反應前，首先將 kit 中 reagent A 與 reagent B 以 50:1 的比例配成 working reagent，並將 working reagent 200  $\mu$ l 與 25  $\mu$ l 已萃取出蛋白質之 extraction buffer 溶液一起加入 96-well plate 中，以 parafilm 密封置入 incubator 於 37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，parafilm 的密封是為了防止 CO<sub>2</sub> 干擾。最後再以 ELISA reader 波長 570 nm 測定讀值。各吸收值減去 blank (只有 working reagent) 之背景值，其值為最後之吸光值。用標準溶液讀值求出檢量線，求出樣品之 total protein 濃度 ( $\mu$ g/ml)。在本實驗中以 bovine serum albumin (BSA) 配製標準溶液，選用的濃度分別為 2000、1500、1000、



750、500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、0  $\mu\text{g/ml}$ ，並與實驗中之樣品各取 25  $\mu\text{l}$  加入 96-well plate 中，一起在 incubator 反應 30 分鐘，所得之標準線以二次曲線回歸。

#### 4-3 西方墨點法 (Western Blot)

將已定量之 cell lysate sample 取適當的量加入 3x loading dye (350 mM Tris-base, 30% Glycerol, 350 mM SDS, 2% Bromophenol blue) 充分混合均勻並在 95°C 加熱 5 分鐘，以破壞蛋白質的 3、4 級結構，再用 10% polyacryamide gel 於 running buffer (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH=8.3) 下，每行分析 30  $\mu\text{g}$  之蛋白質，先以 90 V 跑電泳 30 分鐘，看蛋白質是否跑道上下交的分界處，之後再以 120 V 進行電泳分離約 1 小時。隨後將 gel 置於 transfer buffer (25 mM Tris-base, 20% methanol, 150 mM Glycine, pH=8.3) 中，再以 250 mA 之電流進行電泳轉漬 1 小時，使 gel 上的蛋白質轉至膜 (polyvinylidene fluoride microporous membrane) 表面，之後將 membrane 用 washing buffer (含 0.1% Tween-20 之 TBS 溶液，TBST) 洗三次，每次 5 分鐘，再把 membrane 浸潤在 blocking solution (含 0.5% Tween-20 及 5% milk 的 PBS 溶液) 在室溫下搖晃作用 1 小時，之後加入一級抗體 Monoclonal Anti-human B7H3 Antibody (1:500)，並於室溫下反應 1 小時或於 4°C 下反應 overnight，再用 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘，然後再加入標記有 horseradish peroxidase (HRP) 的二級抗體 (1:10000)，於室溫下反應 30 分鐘，再以 washing buffer 清洗三次，每次 5 分鐘。最後使用冷光反應劑 (Enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagent, ECL)，以用來偵測蛋白質的表現情形，並利用電泳影像分析軟體 Alphaimager 3300 (AlphaEase™ software) 進行影像分析。

## 5. 基因表現分析

### 5-1 RNA 之萃取

首先吸掉 6-well plate 中的培養液，再以 PBS 溶液清洗 1 次，之後於每個 well 中加入 1 ml 之 TRIzol reagent (Invitrogen)，輕輕搖晃 plate 約兩分鐘，讓 TRIzol reagent 能夠充分的與細胞反應而將細胞溶破。之後將細胞溶液移至 1.5 ml 微量離心管 (ependorf tube) 中，於每管中加入 200  $\mu$ l 氯仿 (chloroform)，劇烈震盪 15 秒使其混合均勻，然後室溫下靜置 2 分鐘。接著以 4 $^{\circ}$ C、12000 g 離心 15 分鐘。離心過後液體會有明顯分層，將上清液約 500  $\mu$ l 移至新的微量離心管中，加入等體積的異丙醇 (isopropanol, IPA) 後，上下搖晃約 5 次使其混合均勻並靜置於室溫 10 分鐘，再以 4 $^{\circ}$ C、12000 g 離心 30 分鐘，離心後底部會有白色片狀沉澱物，小心移除上清液，此時加入 75% DEPC 水泡於酒精溶液 (diethylpyrocarbonate treated ethanol) 清洗此沉澱物，震盪 (vortex) 使沉澱物飄起，接著以 4 $^{\circ}$ C、7500 g 離心 5 分鐘後，小心的抽乾酒精並將白色沉澱物風乾，最後將管內的沉澱物以 20  $\mu$ l 之 DEPC 水 (diethylpyrocarbonate treated water) 使 RNA 回溶。

取 1  $\mu$ l 之 RNA 溶液於光譜分析儀 (spectrophotometer, ND1000, Nano Drop<sup>®</sup>) 測量分析，測量樣品於波長 260 nm 與 280 nm 之吸收值可判定樣品的濃度與純度，一般而言，260 nm/280 nm 比值落在 1.8~2.2 者為佳，之後將 RNA 溶液保存於 -80 $^{\circ}$ C。

### 5-2 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

此步驟可分成反轉錄 (Reverse Transcription, RT-) 製備 DNA 及聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 兩大部分：

### 5-2-1 反轉錄 (Reverse Transcription) 製備 DNA

此過程採用 AB™ 的 High Capacity cDNA Reverse transcriptase kit。將上述所得之 total RNA 取 2 µg 於微量離心管中，再加入 2.5 µl 10x Reverse Transcription Buffer、1 µl 25x dNTP、2.5 µl 10x random primers、1.25 µl 50U/MI MutiScribe™ Reverse Transcriptase 及 5.25 µl 之 DEPC-treat ddH<sub>2</sub>O 中 (總體積為 25 µl)，並將之放入自動溫度循環機 (MJ® PCR Machine PTC-200; USA) 中進行反應，反應條件為：在 25°C 下作用 10 分鐘，並在 37°C 下作用 2 小時，之後再升溫至 85°C 作用 5 分鐘，最後降回 4°C 結束反應及完成 cDNA 的配置，再將其保存於 -20°C 以做聚合酶連鎖反應之用。

### 5-2-2 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

此步驟採用 Invitrogen Platinum® Taq DNA Polymerase kit。取 2 µl cDNA 作為模版 (template) 加入微量離心管中，加入 PCR 反應液 (1.5 µl 10 x PCR buffer、0.3 µl 10 mM dNTP mixture、0.9 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>、0.06 µl Taq DNA polymerase 及 9.64 µl ddH<sub>2</sub>O)，並加入 sense 與 antisense 的引子 (primer) 各 0.3 µl，使總反應體積達 15 µl。將微量離心管放入自動溫度循環機進行反應。所使用 primer 序列以及適當的黏合溫度請參照附表 2。待反應完畢後，取出適量反應產物進一步以 1% 瓊脂凝膠電泳分析。

### 5-3 瓊脂凝膠電泳 (Agarose Gel Electrophoresis)

取適當克數之瓊脂膠粉 (agarose)，溶於適當之 1× TAE buffer 中，配成 1% (1g/100ml) agarose gel，以微波爐加熱使粉末完全溶解，接著加入少許 Ethidium Bromide (EtBr) 做為內染。瓊膠溶液混合均勻後倒入水平模盤中，插入梳子 (comb)，靜置約 30 分鐘待瓊膠凝固後，將 comb 移除，置入裝有 TAE buffer 之水平電泳槽內，將 PCR 後的 9 µl DNA 與 1 µl loading dye 混合，載入 well 中，另取 2 µl 標示用

核酸 (100 bp DNA ladder LC) 作對照，同時以 100V 進行電泳。待 DNA 跑至適當距離後，把凝膠移至紫外光照光裝置 (ultraviolet transilluminator/ Alphaimager™ Image System；USA) 上觀察，並利用電泳影像分析軟體 Alphaimager 3300 (AlphaEase™ software) 進行影像分析。

## 6. 細胞傷口癒合分析 (Wound-Healing Assay)

將轉染 48 小時後的細胞取適量種到 24 孔培養盤中，隔天細胞滿盤時，以 200  $\mu$ l tip 在每個 well 中畫 3 道直線，以刮除細胞，再以 PBS 清洗兩次，加入 FBS-free medium，之後利用顯微鏡長時間影像記錄 (time lapse, 200 X) 來觀察癒合的情形，每 30 分鐘擷取一次影像，共記錄 24 小時，以觀察細胞的平移能力。

## 7. 細胞遷移能力分析 (Cell Migration Assay)

將轉染過的細胞加入 FBS-free medium，取 100  $\mu$ l ( $2 \times 10^5$  cell/ $\mu$ l) 到含有 8  $\mu$ m 孔洞膜的細胞培養杯 (cell culture insert) 中，再將位於培養杯下層的 24 孔培養盤加入 900  $\mu$ l 含 2 % FBS 的培養液，放入 37°C 培養箱培養一段時間後 (Ca9-22 細胞株培養 24 小時，SAS 細胞株則培養 16 小時)，吸除培養液並用 PBS 清洗 2 次後，於培養杯內外各加入 300 ml 甲醇 (methanol) 靜置 15 分鐘，將甲醇吸除，再於培養杯內外各加入 300 ml 含有 0.5 % 結晶紫染劑的乙醇 (crystal violet in 30 % ethanol) 靜置 10 分鐘後，用水沖洗，直至多餘的染劑都被洗掉為止，再將培養杯內未遷移的細胞以棉花棒擦除，有遷移到膜下層的細胞於顯微鏡 100 X 下隨意挑 5 個視野拍照，並以 MetaMorph® 軟體做定量分析。

## 8. 細胞侵襲能力分析 (Cell Invasion Assay)

將基底膜基質 (matrigel)、細胞培養杯、24 孔培養盤、微量吸管管嘴 (tip) 於 4 °C overnight。鋪 matrigel 需全程於冰上進行，以免 matrigel 太快凝固。取 20  $\mu$ l

matrigel (2 mg/ml) 平鋪在細胞培養杯內，有小泡產生的話需以針頭戳破，然後放入 37°C 培養箱 1 小時，使 matrigel 凝固。將轉染過的細胞加入 FBS-free medium，取 100  $\mu$ l ( $2 \times 10^5$  cell/ $\mu$ l) 到細胞培養杯 (cell culture insert) 中，再將位於培養杯下層的 24 孔培養盤加入 900  $\mu$ l 含 2 % FBS 的培養液，放入 37°C 培養箱培養一段時間後 (Ca9-22 細胞株培養 24 小時，SAS 細胞株則培養 16 小時)，吸除培養液並用 PBS 清洗 2 次後，於培養杯內外各加入 300 ml 甲醇 (methanol) 靜置 15 分鐘，將甲醇吸除，再於培養杯內外各加入 300 ml 含有 0.5 % 結晶紫染劑的乙醇 (crystal violet in 30 % ethanol) 靜置 10 分鐘後，用水沖洗，直至多餘的染劑都被洗掉為止，再將培養杯內未遷移的細胞和 matrigel 以棉花棒擦除，有遷移到膜下層的細胞於顯微鏡 100 X 下隨意挑 5 個視野拍照，並以 MetaMorph® 軟體做定量分析。

## 9. 細胞貼附分析 (Cell Adhesion Assay)

在 96 孔培養盤 (96-well plate) 中分別覆蓋 (coat) fibronectin, collagen IV, laminin, 然後放到無菌操作台 (laminar flow hood) 中風乾 overnight, 再以 PBS 清洗兩次，將轉染過後的細胞加入 FBS-free medium, 取 100  $\mu$ l (1000 cell/ $\mu$ l) 種到覆蓋好的 96 孔培養盤中，放入 37°C 培養箱培養，45 分鐘後以 PBS 清洗，將未貼附的細胞洗掉，然後再用甲醇固定 15 分鐘，接著用 0.5 % 結晶紫染劑的乙醇 (crystal violet in 30 % ethanol) 染 10 分鐘後，以清水洗去多餘染劑，再於顯微鏡 100 X 下隨意挑 3 個視野拍照，並以 MetaMorph® 軟體做定量分析。

## 10. 細胞增生試驗 (MTT assay)

MTT (3-[4,5-dimethylthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, 或稱 Tetrazolium assay, 是一種快速呈色法, 其主要依賴粒線體中, 琥珀酸去氫酶 (dehydrogenase) 之作用, 將黃色的 MTT 中 tetrazolium ring 轉為紫藍色之 formazan 晶體, 再利用二甲基楓 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 將晶體溶解, 形成紫色溶液。

此溶液可由波長約 570 nm 之黃光進行吸光測量並定量。由於活細胞才有粒線體酵素，故所測得的吸光值會與活細胞數量成正比，藉此，將細胞粒線體的活性量化進而反映出細胞的生長情形。

實驗方法：將轉染 72 小時後的細胞取 100  $\mu$ l (50 cell/ $\mu$ l) 培養於 96 孔培養盤 (96-well plate)，48 小時後吸除培養液，加入 100  $\mu$ l 的 2 mg/ml MTT solution，於室溫下避光反應 2 小時，之後吸掉 MTT solution，再加入 DMSO 100  $\mu$ l 避光反應 14 分鐘，此時液體會呈現紫色，最後每格 well 再取出 50  $\mu$ l 溶液移至新的 96 孔盤培養皿 (96-well plate) 中，再以酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 測定波長為 570 nm 時的吸光值。全程步驟皆需避光以免反應的產物因吸收其他光源造成衰退。

## 11. 統計分析

本實驗的數據均以平均值加減標準差 (Mean $\pm$ Standard Deviation) 來表示，而統計分析方法則是以 t-test 來比較有轉染及沒轉染之間的差異，當  $p < 0.05$  表示具有統計上的顯著差異，在圖中均以 “\*” 表示；而當  $p < 0.01$  時則用 “\*\*” 表示其具有極顯著差異。



## 第四章 結果

### 1. 醣蛋白於口腔癌細胞及正常細胞表現的差異

利用點擊化學 (click chemistry) 的方式，將細胞膜表面的醣蛋白做標定，並以西方墨點法 (western blot) 來比較口腔癌細胞 (Ca9-22 cells) 及正常細胞 (S-G cells) 之間，醣蛋白表現的差異。

由 western blot 的結果得知 (圖 6)，醣蛋白在口腔癌細胞中的表現比正常細胞要來的多，因此，我們推測醣蛋白在口腔癌細胞可能扮演某種重要的角色。

### 2. 利用質譜儀分析找出在口腔癌細胞表現較強的醣蛋白

我們假設醣蛋白與口腔癌細胞之間可能存在某種關聯，於是進一步分析這些具有特殊表現的醣蛋白。利用點擊化學分離出醣蛋白後，經由質譜儀分析 (MS analysis) 的結果，發現在進行三次的質譜儀分析中，都只在口腔癌細胞株表現而正常細胞不表現的醣蛋白有五種 (附表 1)。

綜合文獻的研究，發現醣蛋白 B7H3 (CD276 isoform 1) 與癌細胞的關係密切，且與多種癌症的癌化 (tumor progression) 有關，但醣蛋白 B7H3 與口腔癌之間的調控尚不清楚，加上上述的實驗結果，我們相信研究醣蛋白 B7H3 及口腔癌之間的關係是非常重要的。所以，我們決定針對 B7H3 與口腔癌細胞的特性，包括細胞的平移能力、遷移能力、侵襲能力、傷口癒合能力、貼附能力以及增生能力，做進一步的實驗研究。

### 3. B7H3 蛋白質表現

由質譜儀分析 (MS analysis) 的結果發現 B7H3 只在癌細胞 Ca9-22 有表現，為了進一步確認，本實驗以 western blot 分析 B7H3 的蛋白質表現，並利用電泳影像分析軟體 Alphaimager 3300 (AlphaEase™ software) 定量後，再以 actin 蛋白做標準

化 (normalization) ，進行資料分析與統計。由實驗結果顯示，B7H3 在口腔癌細胞 Ca9-22 中的確有過量的表現，且在統計上有明顯的差異 (圖 7)。

#### 4. B7H3 在不同口腔癌細胞的蛋白質表現情形

本實驗的目的主要是觀察 B7H3 在各種口腔癌細胞中是否普遍具有過量表現，除了先前使用的 Ca9-22 口腔癌細胞株，本實驗另外使用 SAS、CAL27、HSC3 三種口腔癌細胞株以 western blot 進行分析。

從實驗結果可知，這四種口腔癌細胞株的 B7H3 表現皆比正常細胞還要強 (圖 8)，更加證實了我們的假設，也就是 B7H3 在口腔癌細胞扮演著某種角色。後續的實驗我們以原先就有再進行實驗的 Ca9-22 以及 B7H3 表現較強的 SAS 這兩種口腔癌細胞株做進一步的實驗探討。



#### 5. siRNA 轉染

由上述實驗結果顯示，口腔癌細胞所表現的 B7H3 比正常細胞多，加上有文獻指出，B7H3 與癌症發展過程 (cancer progression) 息息相關，因此，本實驗利用轉染方式以 Lipofectamine™ 2000 reagent 將 siRNA 送入口腔癌細胞內，以達到抑制醣蛋白 B7H3 的表現，然後再觀察 B7H3 抑制後，對口腔癌細胞的特性之影響。

本實驗首先以螢光顯微鏡觀察轉染後 siRNA 進入細胞的情形 (圖 9)，siRNA 有結合螢光素 (fluorecin)，所以有進入癌細胞內的 siRNA 可以透過螢光顯微鏡觀察到綠色螢光，由結果得知，siRNA 的確有成功送入細胞內。

##### 5-1 以 siRNA 轉染抑制 B7H3 蛋白質表現的情形

為了找出適當的 siRNA 劑量來達到良好的抑制效果，本實驗利用不同劑量的 siRNA 轉染口腔癌細胞 72 小時後，再以 western blot 觀察轉染後細胞表現 B7H3 的情形。我們將 siRNA 分別以 0、50、100 pmol 三種不同的劑量進行轉染，從 western



blot 的結果可知，使用 50 pmol siRNA 轉染便可有效地抑制 B7H3 的蛋白質表現 (圖 10)，因此後續的實驗皆以 50 pmol siRNA 進行轉染。

接著以轉染 control siRNA 當做轉染控制組 (transfection control)，並與轉染 si-B7H3 的實驗組之 B7H3 蛋白質表現做比較，實驗結果顯示，si-B7H3 的確可以有效抑制 B7H3 蛋白質的表現 (圖 11a)。

## 5-2 以 siRNA 轉染抑制 B7H3 基因表現的情形

本實驗以 50 pmol siRNA 進行轉染 72 小時後，將 RNA 收集起來，利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 比較轉染後 B7H3 mRNA 的表現差異，並以 GAPDH 做為 loading control。從實驗結果可知，轉染後 B7H3 的基因表現與轉染控制組 (transfection control) 相比有明顯降低 (圖 11b)。

## 6. 口腔癌細胞傷口癒合分析

為了觀察醣蛋白 B7H3 對口腔癌細胞株的影響，本實驗初步以傷口癒合實驗觀察癌細胞平移能力的改變。待細胞長滿後以 200  $\mu$ l tip 刮出傷痕後，繼續培養並拍照觀察長達 24 小時，觀察細胞癒合的狀況。由實驗結果顯示，B7H3 被 siRNA 抑制後其平移能力有降低的現象 (圖 12)，表示 B7H3 會影響癌細胞的移動能力，可能與臨床上癌症的轉移息息相關。

## 7. 口腔癌細胞遷移能力分析

造成癌症病人惡化死亡最主要的因素之一就是腫瘤細胞具有轉移的能力，如果能抑制癌細胞的轉移，對癌症治療將有很大的益處。為了瞭解 B7H3 是否與癌細胞的轉移有關，首先必須找出適合細胞進行遷移 (migration) 的時間，以免因為培養的時間過長而使所有細胞都得以穿過孔洞膜到達培養杯下層，也就是避免隨機移動 (random migration) 的狀況發生。將細胞以 FBS-free medium 培養在含有 8  $\mu$ m

孔洞膜的細胞培養杯 (cell culture insert) 中，再將位於培養杯下層的 24 孔培養盤加入含 2 % FBS 的培養液，2 % FBS 的培養液可當作一種趨化因子 (chemotactic)，能誘導培養杯內的細胞產生趨化性移動 (chemotaxis) 而移動到孔洞膜下層，另外以下層加入 FBS-free medium (0 % FBS) 當做控制組。適宜細胞遷移的時間為 0 % FBS 控制組的細胞遷移數量越少越好，且 2 % FBS 實驗組的細胞仍然有足夠的時間產生遷移，實驗結果發現，適合 Ca9-22 癌細胞株遷移的時間為 24 小時，而 SAS 癌細胞株則為 16 小時 (圖 13)。

找出適合細胞進行遷移 (migration) 的時間後，再以轉染方式將 si-B7H3 送入細胞內 72 小時後收集細胞以進行細胞遷移能力分析 (cell migration assay)，實驗結果顯示，B7H3 抑制後，Ca9-22 與 SAS 口腔癌細胞株的遷移能力與轉染控制組 (transfection control) 相比，分別降低約 48 % 和 50 % (圖 14)。

## 8. 口腔癌細胞侵襲能力分析

口腔癌在臨床治療末期常會侵襲到頸部淋巴，造成治療上的困難，因此，如果能抑制口腔癌細胞的侵襲，對於口腔癌的病情控制將很有幫助。為了瞭解抑制 B7H3 之後是否會抑制口腔癌細胞的侵襲能力，我們採用基底膜基質 (matrigel) 模擬細胞間質來進行細胞侵襲能力分析 (cell invasion assay)。此實驗方法與遷移能力 (cell migration assay) 不同的是，孔洞膜的上方有覆蓋 matrigel。同樣讓 Ca9-22 實驗進行 24 小時而 SAS 癌細胞株進行 16 小時後，由實驗結果可知，B7H3 抑制後，癌細胞 Ca9-22 的細胞侵襲能力與轉染控制組 (transfection control) 相比，大大降低了將近 92 %，而 SAS 則降低約 60 % (圖 15)。

## 9. 口腔癌細胞貼附分析

細胞貼附能力的改變，與腫瘤生成 (tumorigenesis) 及轉移 (metastasis) 有很大的相關，因此我們利用貼附分析 (adhesion assay) 來觀察 B7H3 抑制後，細胞貼附

能力是否有改變。經過 si-B7H3 轉染 72 小時後，測試其對 fibronectin, collagen 4, laminin 的貼附能力。在 Ca9-22 口腔癌細胞株中，經 si-B7H3 轉染後的細胞對 fibronectin 與 laminin 的貼附能力和控制組相比分別降低 39% 與 79%，而在 collagen IV 方面雖然有降低，但於統計上並無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 16)。在 SAS 口腔癌細胞株中，細胞經轉染後對 fibronectin 與 laminin 的貼附能力分別降低 44% 與 21%，然而在 collagen IV 方面也有降低，但未達顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 17)。

#### 10. 口腔癌細胞增生試驗

本實驗以 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 對口腔癌細胞進行增生試驗。將經由 si-B7H3 轉染 72 小時的癌細胞，置於 96 孔培養盤培養 48 小時後做 MTT 試驗，實驗結果顯示，不論是 Ca9-22 或 SAS 癌細胞株，其細胞的增生能力與控制組相比並無顯著差異 (圖 18)，表示 B7H3 與口腔癌細胞的增生並無明顯關連。



## 第五章 討論

本研究首先觀察口腔癌細胞株與正常細胞所表現的醣蛋白是否有所不同，結果發現口腔癌細胞株所表現的醣蛋白普遍都高於正常細胞所表現的量。接著進一步探討哪些特定的醣蛋白會在口腔癌細胞株有過量表現，本實驗利用質譜分析口腔癌細胞株與正常癌細胞株的醣蛋白，並從分析的結果中挑選醣蛋白 B7H3 做後續的研究。我們利用 siRNA 來抑制 B7H3 的表現，發現口腔癌細胞的平移、遷移、侵襲、貼附能力都會受到影響，但不會影響癌細胞的增生能力。

### 1. 醣蛋白與癌症的關聯性

在本實驗發現，口腔癌細胞所表現的醣蛋白比正常細胞要來的多（圖 6），表示醣蛋白在口腔癌扮演某種重要的角色。由 Manoharan 等學者於 2004 年發表與口腔癌有關的研究中指出，口腔鱗狀細胞癌的患者，其血液及腫瘤組織中所含的醣結合物有增加(Manoharan, Padmanabhan et al. 2004)。在 Macbeth 等人的研究中也發現患有惡性腫瘤的老鼠，其血液中的醣蛋白有增加的趨勢(Macbeth and Bekesi 1964)。而 Hollingsworth 等學者發現特定的醣蛋白—黏蛋白 (mucin)，在上皮腫瘤中會有大量表現的情形(Hollingsworth and Swanson 2004)。在 Agostini 等人的研究中也指出，肝瘤腫 (hepatic neoplasm) 會過量表現醣蛋白(Agostini 1976)。這些研究皆與本實驗的結果相符合，証實醣蛋白的確與癌症有密不可分的關係。

### 2. B7H3 對癌細胞的影響

許多研究皆指出 B7H3 是許多腫瘤細胞的腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigen, TAA)，包括人類的黑色素瘤、胃癌、肺癌、神經膠質瘤 (glioma)、神經母細胞瘤、肉瘤(Seeger, Rosenblatt et al. 1981; Rosenberg, Ferrone et al. 1990; Chapoval, Ni et al. 2001; Castriconi, Dondero et al. 2004; Zhang, Zhou et al. 2005; Sun, Wang et

al. 2006; Wu, Jiang et al. 2006)。在 Roth 等學者和 Zang 等學者所做的研究都發現前列腺癌的患者其腫瘤 B7H3 會大量表現(Roth, Sheinin et al. 2007; Zang, Thompson et al. 2007)。而 Boorjian 等人和 Crispin 等學者在腎細胞癌及泌尿道上皮癌中也發現腫瘤的 B7H3 有增加的趨勢(Boorjian, Sheinin et al. 2008; Crispin, Sheinin et al. 2008)。本實驗以西方點墨法分析 B7H3 的蛋白質表現時也發現口腔癌細胞株會大量表現 B7H3 (圖 7、8)，此結果與上述的文獻相同，更加証實 B7H3 與癌症的關係密切。

在細胞傷口癒合分析發現，B7H3 被抑制後癌細胞的移動能力有下降的趨勢，而在後續的細胞遷移及侵襲實驗中也觀察到癌細胞經 siRNA 處理後，其遷移與侵襲能力都有降低，與傷口癒合分析的結果相似 (圖 12、14、15)。由實驗結果顯示，B7H3 的抑制可降低口腔癌細胞的平移、遷移、侵襲、貼附的能力，這些能力可能都與臨床上的癌症轉移有關，因此也表示 B7H3 與癌細胞的癌化特性有某種調控機制存在。Sun 等學者在非小細胞肺癌的研究中發現腫瘤過量的表現 B7H3 可能會促使腫瘤容易發生淋巴結轉移(Sun, Wang et al. 2006)。在 Chavin 等學者的研究指出，前列腺癌的骨轉移 (bone metastasis) 也有很強的 B7H3 表現(Chavin, Sheinin et al. 2009)。在 Chen 等學者的研究中，發現 siRNA 抑制 B7H3 的表現可以降低黑色素癌細胞的遷移、侵襲，以及貼附能力，但不會影響癌細胞的增生(Chen, Tekle et al. 2008)，皆與本實驗所觀察到的現象一致。

在本實驗中，利用 siRNA 抑制 Ca9-22 與 SAS 口腔癌細胞株之醣蛋白 B7H3 的表現後，其遷移能力分別降低約 48 % 和 50 % (圖 14)，兩株細胞降低的幅度是差不多的；然而，在侵襲能力方面，Ca9-22 大大降低了將近 92 %，SAS 卻只有降低 60 % (圖 15)；而貼附能力分析時發現 Ca9-22 口腔癌細胞株對 fibronectin 與 laminin 的貼附能力分別降低 39 % 與 79 % (圖 16)，SAS 口腔癌細胞株則對 fibronectin 與 laminin 的貼附能力分別降低 44 % 與 21 % (圖 17)，但下降的程度也沒有 Ca9-22 大，由以上實驗果顯示，Ca9-22 口腔癌細胞株經轉染抑制後，其侵襲、

貼附能力受到抑制的效果比 SAS 癌細胞株好，表示 B7H3 的存在對 Ca9-22 癌細胞株來說可能是比較重要的，因此當其 B7H3 表現被抑制時，所受到的影響會比較大；但也有可能是因為在進行轉染時，siRNA 對 SAS 癌細胞株的抑制效果不如 Ca9-22 好 (圖 11)，使 SAS 細胞株的 B7H3 仍能有些許的表現，因此 SAS 的遷移、侵襲、貼附能力降低的程度沒有 Ca9-22 來的大。

醣蛋白 B7H3 屬於典型的 Ig-like 分子，許多研究指出這些 Ig-like 分子能透過 cell-cell 以及 cell-matrix 的 interaction 來調控細胞的貼附和移動。間質金屬結合蛋白酶 (extracellular matrix metalloproteinase, MMP) 的誘導物 (inducer) 具有 2 個 Ig-like domains 且作用於細胞貼附，可誘導腫瘤組織中 MMP 的表現(Egawa, Koshikawa et al. 2006)。HepaCAM 被發現與 E-cadherin 共位 (co-localize) 以加強 cell-matrix 的 interaction 和細胞移動(Moh, Zhang et al. 2005)。N-cadherin 會與 FGF receptor 作用使 MMP-9 表現與促進腫瘤侵襲(Suyama, Shapiro et al. 2002)。而本實驗所研究的醣蛋白 B7H3 是透過何種機制來調控細胞移動與貼附的能力尚未有文獻發表，值得進一步的研究探討。

在臨床上被診斷出有口腔癌的病人，通常已有轉移的現象，因此若能同時抑制腫瘤的轉移和抑制原位瘤的生長，是最理想的治療方式。然而，本實驗結果發現，當 B7H3 被抑制時，對口腔癌細胞的增生能力並沒有影響，顯示 B7H3 並沒有調控腫瘤生長的能力，因此，若有機會將本實驗應用在臨床上，可能還需要配合能阻止原位瘤生長的治療方針，才能達到最佳的治療效果。

### 3. 癌症與醣化 (glycosylation) 有關

除了本實驗與相關文獻探討醣蛋白本身與癌症的關係，另外有文獻指出癌症也可能與醣蛋白的醣化 (glycosylation) 有關。有研究指出，在乳癌、卵巢癌、前列腺癌中發現，其腫瘤細胞上的特定醣蛋白在惡性轉變 (malignant transformation) 時其醣化會發生異常(Burchell, Mungul et al. 2001)，口腔上皮的惡性轉變也被發現

與細胞表面醣蛋白異常的醣化有關(Dennis, Granovsky et al. 1999)。異常的醣化會造成不正常過量的增生，這種情形在口腔潰創 (leukoplakias) 和口腔癌皆有被發現，可能是因為缺乏正常的醣基轉移酶 (glycosyl transferase) 或者有新的腫瘤相關酵素產生活化所致(Dabelsteen, Clausen et al. 1991; Gron, Andersson et al. 1999)。而在卵巢癌中也發現醣蛋白組成與大量的增生活性有密切的關係(Goldhirsch, Berger et al. 1998)。

有研究發現，口腔癌細胞表面通常會有較高的唾液酸 (sialic acid) 濃度，並且在血液中發現腫瘤細胞所分泌的唾液酸醣蛋白的量有增加的趨勢(Xing, Wang et al. 1994)。在口腔癌病患中也發現，其組織與血清中發現唾液酸化會發生改變，且這些改變與癌化有關(Shah, Telang et al. 2008)。早期有研究顯示，癌症和唾液酸 (sialic acid) 的增加有關，引起大眾對於唾液酸這種醣類的興趣，並認為唾液酸有可能成為癌症診斷治療的標記 (marker)(Narayanan 1994; Patel, Adhvaryu et al. 1994; Feijoo, Paez de la Cadena et al. 1997; Paszkowska, Berbec et al. 1998)。有文獻指出唾液酸的碳水化合物部分 (carbohydrate moiety) 會透過黏著 (cohesive)，貼附 (adhesion) 來影響細胞間的互動，而這些特性在細胞的惡性轉移時會發生改變(Nicolson 1984; Schutter, Visser et al. 1992)。在老鼠的自發性轉移中發現與腫瘤細胞表面的唾液酸化 (sialylation) 有關(Yogeeswaran and Salk 1981)。也有研究指出抑制細胞表面的唾液酸可以提供一個抗轉移 (anti-metastatic) 的治療標的(Hsu, Lin et al. 2005)，在黑色素瘤細胞也發現，當癌細胞表面的唾液酸化受到抑制時，其轉移的可能性也隨之降低(Chang, Yu et al. 2006)。Hakomori 等人的研究發現，唾液酸醣蛋白與致癌基因轉變 (oncogenic transformation) 的關係密切(Hakomori 1981)。

本實驗利用質譜儀將經由標定醣蛋白的醣基而取得之醣蛋白進行分析，其結果指出醣蛋白 B7H3 只在口腔癌細胞被發現而非正常細胞，導致這種結果的原因有二：第一，為 B7H3 蛋白質本身在口腔癌細胞及正常細胞表現之差異所致；第二，B7H3 蛋白的醣化程度在口腔癌細胞與正常細胞有所不同。本研究之後利用西方墨

點法發現在口腔癌細胞的 B7H3 蛋白質表現比正常細胞強，因此後續的實驗著重在 B7H3 的「蛋白質」方面，或許 B7H3 蛋白在口腔癌細胞與正常細胞的醣化程度也有所不同，因此在 B7H3 的「醣化」方面也很值得被進一步研究探討。





## 第六章 結論

口腔癌細胞的轉移一直以來都是治療口腔癌的困難所在，如果能找出口腔癌轉移的標記，對口腔癌的診斷及治療將有很大的助益。根據本實驗的結果，我們可以得到下列結論：

(1) 利用點擊化學 (click chemistry) 的方式標記醣蛋白並以西方墨點法 (western blot) 進行分析，發現口腔癌細胞株的醣蛋白表現量普遍比正常細胞株多，由此可推測醣蛋白在口腔癌細胞中可能扮演某種重要的角色。

(2) 為了找出在口腔癌細胞株表現較強的是何種醣蛋白，本實驗先以點擊化學標記醣蛋白後，再用親和力捕捉醣蛋白並以特定酵素進行分解，然後進行質譜分析。由分析結果中我們挑選出醣蛋白 B7H3 進行後續的實驗。

(3) 以西方墨點法分析口腔癌細胞株 (包含 Ca9-22、SAS、CAL27、HSC3) 與正常細胞株中 B7H3 的蛋白質表現，結果顯示口腔癌細胞株的 B7H3 表現量確實明顯比正常細胞多，可推論醣蛋白 B7H3 與口腔癌的確有密切的關係。

(4) 利用 siRNA 的轉染抑制 B7H3 的表現後，進行細胞遷移能力分析 (cell migration assay)，發現口腔癌細胞株 Ca9-22 以及 SAS 的遷移能力都有降低，分別為分別降低約 48 % 和 50 %，由此可推測癌細胞的遷移能力與 B7H3 有關。

(5) B7H3 表現被抑制後，以細胞侵襲能力分析 (cell migration assay) 觀察癌細胞，癌細胞株 Ca9-22 的侵襲能力大幅降低了將近 92 %，而 SAS 則降低約 60 %，由此可知，B7H3 具有調控癌細胞侵襲的能力。

(6) 以 siRNA 抑制 B7H3 的表現並細胞傷口癒合能力分析 (wound-healing assay) 發現，B7H3 表現被抑制後其平移能力有下降的趨勢，表示 B7H3 對口腔癌細胞的移動能力具有某種重要性在。

(7) 抑制 B7H3 表現後進行細胞貼附分析 (cell adhesion assay) 發現，在 Ca9-22 口腔癌細胞株中，細胞對 fibronectin 貼附能力降低 39 %，對 laminin 則是大大降低了 79 %。而 SAS 口腔癌細胞株在 fibronectin 與 laminin 的貼附能力也有明顯下降，分別為 44 % 與 21 %。這兩株口腔癌細胞株對 collagen IV 的貼附能力雖有降低，但未達顯著差異 ( $p > 0.05$ )，這些結果表示 B7H3 對細胞的貼附能力是有影響的，於不同的細胞基質 (cell matrix) 其影響也會有所不同。

(8) 口腔癌細胞經轉染後以細胞增生試驗 (MTT assay) 觀察細胞的增生能力是否會受影響。在 Ca9-22 與 SAS 這兩株細胞株的實驗結果，實驗組與控制組相比並無明顯差異，說明 B7H3 與細胞增生的機制無關。

綜合以上的結果，我們得知醣蛋白 B7H3 對口腔癌細胞的特性 (包括平移、遷移、侵襲、貼附的能力) 有影響，但其詳細的作用機制尚未了解，需待日後更進一步探討與研究。由結果顯示 B7H3 在口腔癌細胞有過量表現，說明 B7H3 有潛力成為診斷口腔癌的標記 (marker) 以及治療口腔癌的標的 (target)。由於多數的癌症病患最後並非死於原位癌，而是死於轉移後的癌症，因此近年來轉移性腫瘤越來越受重視，而科學家們也積極想找出更多能抑制癌細胞轉移的抗癌藥物，期許能一舉殲滅體內的癌細胞，而我們的實驗結果顯示，B7H3 能藉由某種路徑來調控癌細胞的轉移，對抑制口腔癌的轉移 (metastasis) 將有很大的幫助，也很值得進一步實驗研究。

## 第七章 未來研究方向

- (1) 本實驗於細胞培養發現口腔癌細胞會大量表現 B7H3 蛋白，可進一步將病患的口腔癌組織切片與正常組織切片做免疫組織染色 (immunohistochemical staining)，觀察是否在病患身上也可以觀察到 B7H3 在腫瘤具有大量表現，如此便可和本實驗的結果相互呼應。
- (2) 在進行三重複之質譜分析的結果中，發現 5 種醣蛋白會只表現於口腔癌細胞株 Ca9-22 而非正常細胞株，本實驗只挑選了 B7H3 進行實驗研究，或許另外 4 種醣蛋白也具有調控口腔癌細胞株的能力，也值得我們去更深入地探討。
- (3) 由結果已知 B7H3 會影響口腔癌細胞株的特性 (包括平移、遷移、侵襲，以及貼附能力)，可進一步探討與其相關的訊息傳遞路徑，以觀察 B7H3 是利用何種途徑來調控癌細胞的特性。
- (4) 本實驗是利用 siRNA 轉染癌細胞來抑制 B7H3 的表現，相反的，未來可將細胞的 B7H3 做大量表現，若能觀察到細胞的遷移、侵襲，以及貼附能力有增加的趨勢，就能更加支持我們的假設，也就是醣蛋白 B7H3 與口腔癌細胞有相當密切的關係。
- (5) 本實驗全為體外 (in vivo) 細胞培養實驗，之後可考慮進行活體 (in vivo) 實驗，觀察是否有一樣的結果。
- (6) 本實驗主要是針對醣蛋白 B7H3 的蛋白質部分進行探討，而質譜分析的結果，也有可能是口腔癌細胞與正常細胞的醣蛋白之醣化 (glycosylation) 有所差異導致，因此可進一步針對 B7H3 的醣化部分來觀察其醣化是否與口腔癌也具有關聯性。

## 參考資料

1. Agostini, C. (1976). "Hexosamine content found in serum and ascitic fluid of the rat during the development of yoshida ascites hepatoma cells." IRCS Med Sci,Libr Compend(4): 400-3.
2. Boorjian, S. A., Y. Sheinin, et al. (2008). "T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival." Clin Cancer Res **14**(15): 4800-8.
3. Burchell, J. M., A. Mungul, et al. (2001). "O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(3): 355-64.
4. Burket, L. W. (1954). "Oral medicine." Merck Rep **63**(2): 16-9.
5. Castriconi, R., A. Dondero, et al. (2004). "Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12640-5.
6. Chang, W. W., C. Y. Yu, et al. (2006). "Soyasaponin I decreases the expression of alpha2,3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells." Biochem Biophys Res Commun **341**(2): 614-9.
7. Chapoval, A. I., J. Ni, et al. (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." Nat Immunol **2**(3): 269-74.
8. Chavin, G., Y. Sheinin, et al. (2009). "Expression of immunosuppressive B7-H3 ligand by hormone-treated prostate cancer tumors and metastases." Clin Cancer Res **15**(6): 2174-80.
9. Chen, C. (1987). "An epidemiology study of oral squamous cell carcinoma in southern Taiwan." J Formosan Dent Assoc. **10**: 268-74.
10. Chen, Y. W., C. Tekle, et al. (2008). "The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion."

Curr Cancer Drug Targets **8**(5): 404-13.

11. Crispen, P. L., Y. Sheinin, et al. (2008). "Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **14**(16): 5150-7.
12. Dabelsteen, E., H. Clausen, et al. (1991). "Aberrant glycosylation in oral malignant and premalignant lesions." J Oral Pathol Med **20**(8): 361-8.
13. Dennis, J. W., M. Granovsky, et al. (1999). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 21-34.
14. Drickamer K, T. M. (2006). "Introduction to glycobiology, 2nd edn." Oxford University Press: Oxford, UK.
15. Egawa, N., N. Koshikawa, et al. (2006). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells." J Biol Chem **281**(49): 37576-85.
16. Eskinazi, D. (1987). "Oncogenic potential of sexually transmitted viruses with special references to oral cancer." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **64**: 35-40.
17. Feijoo, C., M. Paez de la Cadena, et al. (1997). "Sialic acid levels in serum and tissue from colorectal cancer patients." Cancer Lett **112**(2): 155-60.
18. Fidler, I. J., D. M. Gersten, et al. (1977). "Relationship of host immune status to tumor cell arrest, distribution, and survival in experimental metastasis." Cancer **40**(1): 46-55.
19. Flies, D. B. and L. Chen (2007). "The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity." J Immunother **30**(3): 251-60.
20. Goldhirsch, A., E. Berger, et al. (1998). "Ovarian cancer and tumor marker: sialic acid, galactosyl transferase and CA-125." Oncology **45**: 281-6.
21. Gron, B., A. Andersson, et al. (1999). "Blood-group-related carbohydrates are expressed in organotypic cultures of human skin and oral mucosa." APMIS

- 107(8): 779-90.**
22. Hakomori, S. (1981). "Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis." Annu Rev Biochem **50**: 733-64.
23. Hanson, S. R., T. L. Hsu, et al. (2007). "Tailored glycoproteomics and glycan site mapping using saccharide-selective bioorthogonal probes." J Am Chem Soc **129(23)**: 7266-7.
24. Hardisson, D. (2003). "Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma." Eur Arch Otorhinolaryngol **260(9)**: 502-8.
25. Hashiguchi, M., H. Kobori, et al. (2008). "Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **105(30)**: 10495-500.
26. Hickey, R., R. Clark, et al. (1986). "Year book of cancer." Chicago: Yearbook, Medical Publishers: 427.
27. Hofmeyer, K. A., A. Ray, et al. (2008). "The contrasting role of B7-H3." Proc Natl Acad Sci U S A **105(30)**: 10277-8.
28. Hollingsworth, M. A. and B. J. Swanson (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." Nat Rev Cancer **4(1)**: 45-60.
29. Hsu, C. C., T. W. Lin, et al. (2005). "Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids." Gynecol Oncol **96(2)**: 415-22.
30. Hsu, T. L., S. R. Hanson, et al. (2007). "Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104(8)**: 2614-9.
31. Krogh, P., B. Hald, et al. (1987). "Possible mycological etiology of oral cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine." Carcinogenesis **8**: 1543-8.
32. Kumar V, C. R., Robbins SL (1997). "Basic Pathology " 6<sup>th</sup> ed, WB Saunder Co., Philadelphia: 473-474.

33. Ling, V., P. W. Wu, et al. (2003). "Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss." Genomics **82**(3): 365-77.
34. Lippman, S. M., J. Sudbo, et al. (2005). "Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development." J Clin Oncol **23**(2): 346-56.
35. Luo, L., A. I. Chapoval, et al. (2004). "B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells." J Immunol **173**(9): 5445-50.
36. Lupu, C. M., C. Eisenbach, et al. (2007). "Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer." Oncol Rep **18**(3): 745-8.
37. Macbeth, R. A. and J. G. Bekesi (1964). "Plasma Glycoproteins in Malignant Disease." Arch Surg **88**: 633-7.
38. Manoharan, S., M. Padmanabhan, et al. (2004). "Analysis of glycoconjugates in patients with oral squamous cell carcinoma." Clin Chim Acta **339**(1-2): 91-6.
39. Modak, S., K. Kramer, et al. (2001). "Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors." Cancer Res **61**(10): 4048-54.
40. Moh, M. C., C. Zhang, et al. (2005). "Structural and functional analyses of a novel ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells." J Biol Chem **280**(29): 27366-74.
41. Narayanan, S. (1994). "Sialic acid as a tumor marker." Ann Clin Lab Sci **24**(4): 376-84.
42. Nicolson, G. L. (1984). "Cell surface molecules and tumor metastasis. Regulation of metastatic phenotypic diversity." Exp Cell Res **150**(1): 3-22.
43. Oliver, R. J., D. G. MacDonald, et al. (2000). "Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions." J Oral Pathol Med **29**(2): 49-55.

44. Ossowaki, L. (1988). "In vivo invasion of modified choroallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound Urokinase." J Cell Biolo **107**: 2437.
45. Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
46. Paszkowska, A., H. Berbec, et al. (1998). "Sialic acid concentration in serum and tissue of endometrial cancer patients." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **76**(2): 211-5.
47. Patel, P. S., S. G. Adhvaryu, et al. (1994). "Clinical application of serum levels of sialic acid, fucose and seromuroid fraction as tumour markers in human leukemias." Anticancer Res **14**(2B): 747-51.
48. Pindborg, J. J. (1980). "Oral cancer and precancer."
49. Prasad, D. V., T. Nguyen, et al. (2004). "Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells." J Immunol **173**(4): 2500-6.
50. Ranasinghe, A. W., K. A. Warnakulasuriya, et al. (1993). "Low prevalence of expression of p53 oncoprotein in oral carcinomas from Sri Lanka associated with betel and tobacco chewing." Eur J Cancer B Oral Oncol **29B**(2): 147-50.
51. Rich, J. R. and S. G. Withers (2009). "Emerging methods for the production of homogeneous human glycoproteins." Nat Chem Biol **5**(4): 206-15.
52. Rollo, J., C. V. Rozenbom, et al. (1981). "Squamous carcinoma of the base of the tongue: a clinicopathologic study of 81 cases." Cancer **47**(2): 333-42.
53. Rosenberg, C. D., S. Ferrone, et al. (1990). "Interspecific DNA-mediated transfer and amplification of a gene specifying a Mr 100,000 human melanoma-associated cell surface glycoprotein." Cancer Res **50**(5): 1559-65.
54. Roth, T. J., Y. Sheinin, et al. (2007). "B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy." Cancer Res **67**(16): 7893-900.
55. Schutter, E. M., J. J. Visser, et al. (1992). "The utility of lipid-associated sialic acid



- (LASA or LSA) as a serum marker for malignancy. A review of the literature." Tumour Biol **13**(3): 121-32.
56. Scuibba, J. (2001). "Oral Cancer." Am J Clin Dermatol **2**(4): 239-51.
57. Scully, C. and D. H. Felix (2006). "Oral medicine--update for the dental practitioner orofacial pain." Br Dent J **200**(2): 75-83.
58. Seeger, R. C., H. M. Rosenblatt, et al. (1981). "Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies." Cancer Res **41**(7): 2714-7.
59. Shah, J. P., F. C. Candela, et al. (1990). "The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity." Cancer **66**(1): 109-13.
60. Shah, M. H., S. D. Telang, et al. (2008). "Tissue and serum alpha 2-3- and alpha 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis." Glycoconj J **25**(3): 279-90.
61. Sliverberg, E. and J. Lubera (1992). "Cancer statistics." (CA 40): 5-22.
62. Steinberger, P., O. Majdic, et al. (2004). "Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains." J Immunol **172**(4): 2352-9.
63. Sugarbaker, E. V. (1979). "Current problems in cancer." Yearbook medical publishers. Chicago.: 3-59.
64. Suh, W. K., B. U. Gajewska, et al. (2003). "The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses." Nat Immunol **4**(9): 899-906.
65. Sun, M., S. Richards, et al. (2002). "Characterization of mouse and human B7-H3 genes." J Immunol **168**(12): 6294-7.
66. Sun, X., M. Vale, et al. (2003). "Mouse B7-H3 induces antitumor immunity." Gene Ther **10**(20): 1728-34.

67. Sun, Y., Y. Wang, et al. (2006). "B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer." Lung Cancer **53**(2): 143-51.
68. Suyama, K., I. Shapiro, et al. (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor." Cancer Cell **2**(4): 301-14.
69. Takei, K., T. Inoue, et al. (1989). "[A statistical study of autopsies performed on cases of oral cancer: with reference to distant metastasis in tongue cancer]." Shikwa Gakuho **89**(3): 627-38.
70. Varki A, C. R., Esko JD, et al (1999). "Essential of glycobiology." Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, NY.
71. Varki, N. M. and A. Varki (2007). "Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease." Lab Invest **87**(9): 851-7.
72. Vokes, E. E., R. R. Weichselbaum, et al. (1993). "Head and neck cancer." N Engl J Med **328**(3): 184-94.
73. Wu, C. P., J. T. Jiang, et al. (2006). "Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis." World J Gastroenterol **12**(3): 457-9.
74. Xing, R. D., Z. S. Wang, et al. (1994). "Total sialic acid as a tumor marker for oral cancer." Int J Biol Markers **9**(4): 239-42.
75. Yogeewaran, G., A. Gronberg, et al. (1981). "Correlation of glycosphingolipids and sialic acid in YAC-1 lymphoma variants with their sensitivity to natural killer-cell-mediated lysis." Int J Cancer **28**(4): 517-26.
76. Yogeewaran, G. and P. L. Salk (1981). "Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines." Science **212**(4502): 1514-6.
77. Zang, X., R. H. Thompson, et al. (2007). "B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19458-63.

78. Zhang, G. B., Y. J. Chen, et al. (2004). "Human recombinant B7-H3 expressed in *E. coli* enhances T lymphocyte proliferation and IL-10 secretion in vitro." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **36**(6): 430-6.
79. Zhang, G. B., H. Zhou, et al. (2005). "Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against 2IgB7-H3: expression analysis of 2IgB7-H3 on dendritic cells and tumor cells." Tissue Antigens **66**(2): 83-92.



		N1	N2	N3	NAME
3 TIMES	Ca ONLY	2	2	2	NPTN Isoform 1 of Neuroplastin
		2	2	2	PRNP Major prion protein
		2	2	2	DSG2 Desmoglein-2
		2	2	2	ITGB1 Isoform Beta-1C of Integrin beta-1
		2	2	2	<b>CD276 Isoform 1 of CD276 antigen</b>
	DYNAMIC	1	1	2	BSG Isoform 2 of Basigin
		1	1	3	TSPAN3 Tetraspanin-3
		1	1	2	SLC44A2 Isoform 2 of Choline transporter-like protein 2

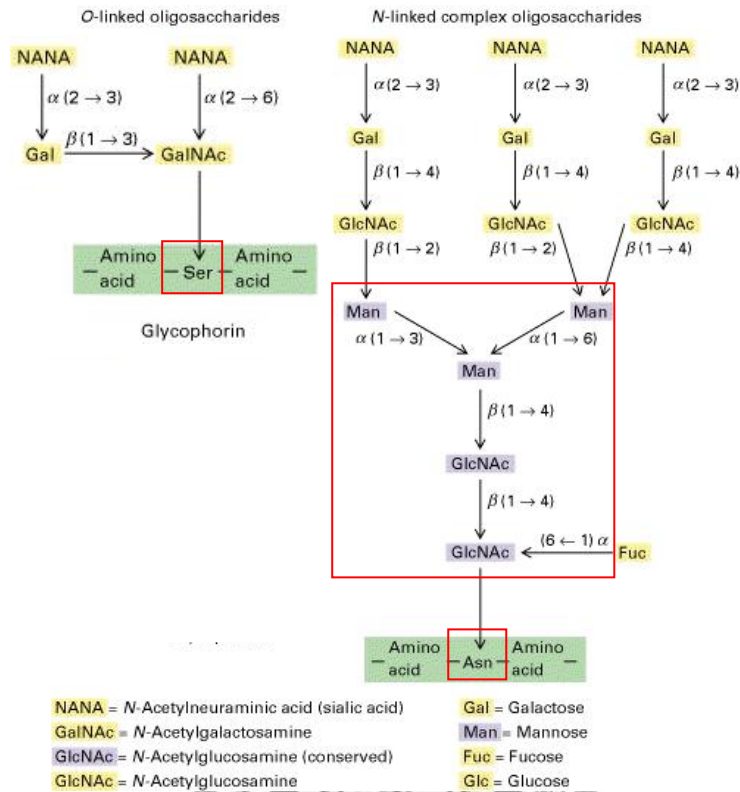
附表 1 醣蛋白經過質譜儀分析的結果

(Ca9-22&S-G→1 ; Ca9-22 ONLY→2 ; S-G ONLY→3 ; N→進行實驗的次數)

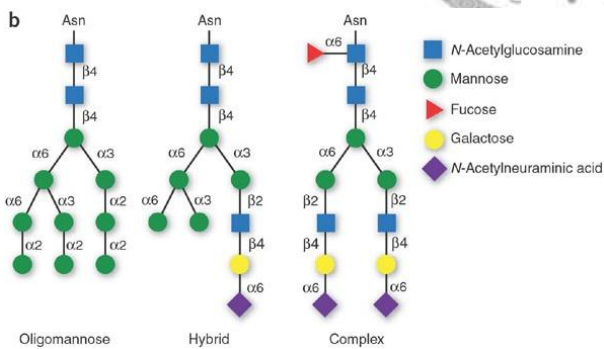
Gene product	PCR primer sequence	size	Annealing temperature	Cycles
<b>GAPDH</b>	F : 5'-GTCTTCACCCACCATGGAGAAGGCT-3' R : 5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT-3'	400 bp	58 °C	22
<b>B7-H3</b>	F : 5'-GCAGATCCTTCTTGAGCA-3' R : 5'-TTAGCATCAGGTAAGGGCTGA-3'	951 bp	55 °C	37

附表 2 本篇實驗所用到的引子序列、黏合溫度與延伸循環次數

(a)



(b)



(c)

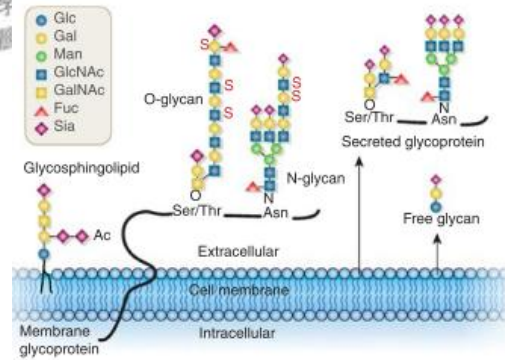


圖 1 醣蛋白之醣基 (a) 醣蛋白的分類: O-linked 與 N-linked (Molecular Cell Biology, 1999), (b) N-glycan 的分類 (Rich and Withers 2009), (c) 唾液酸 (sialic acid) 經常位於醣基的最末端。(Laboratory Investigation | Volume 87 September 2007)

(Ac, acetyl ester; Sia, sialic acid; S, sulfate ester)

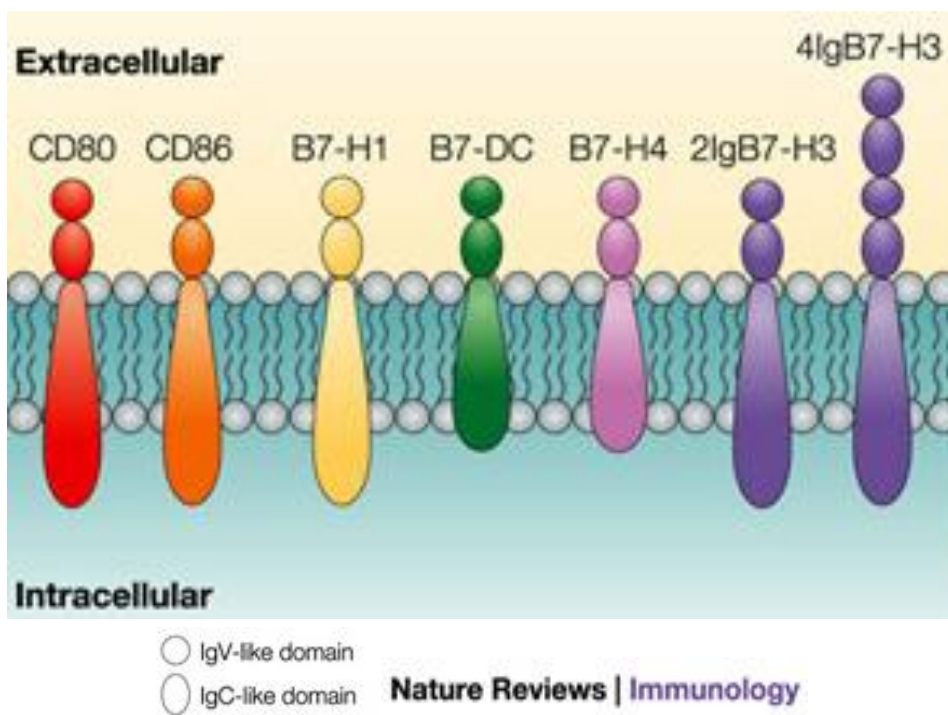
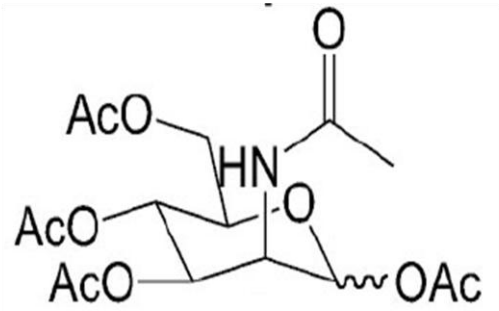
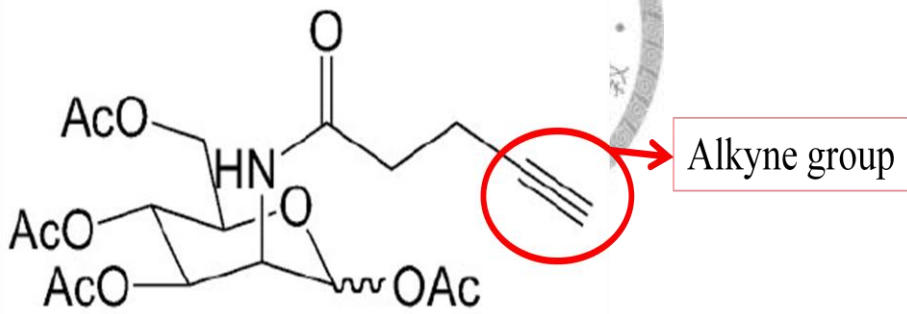


圖 2 醣蛋白 B7H3 的家族



N-acetylmannosamine  
(ManNAc)



ManNAcyne - Sugar analog

圖 3 ManNAc 與 ManNAcyne 的結構



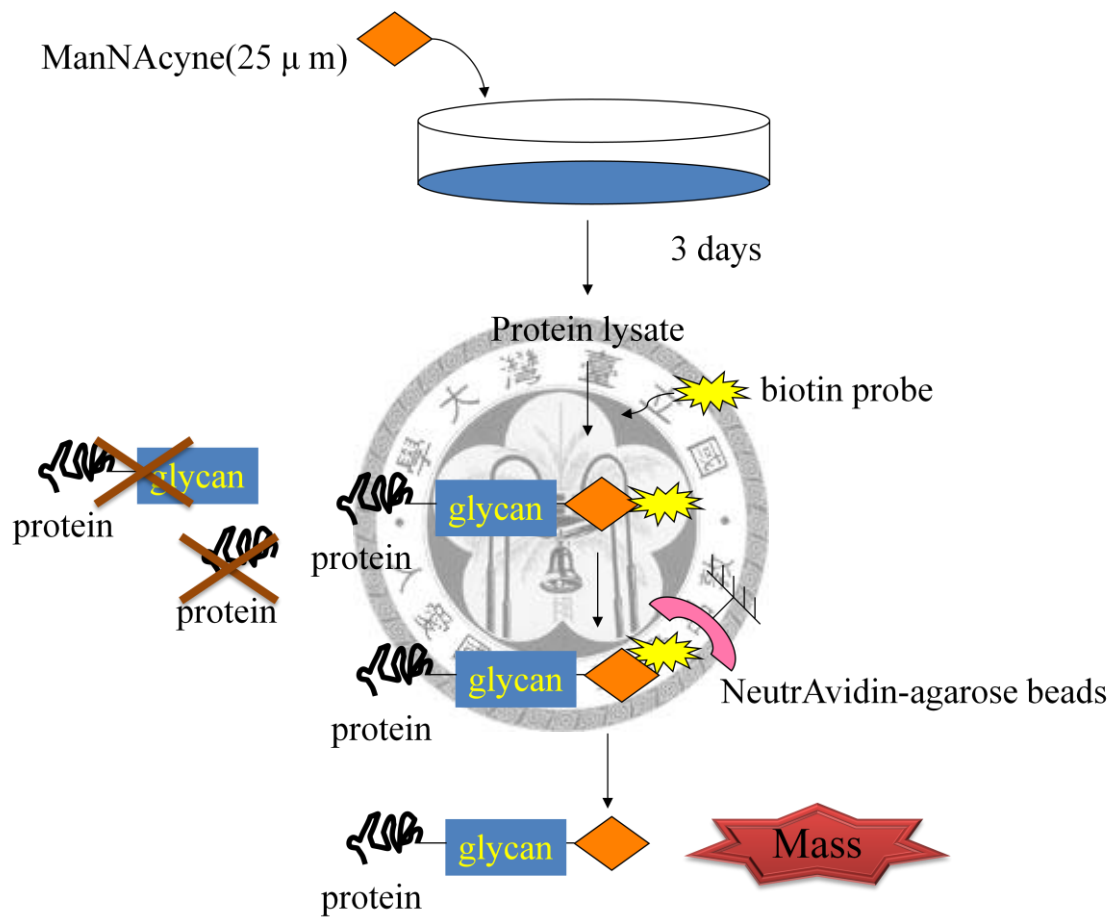
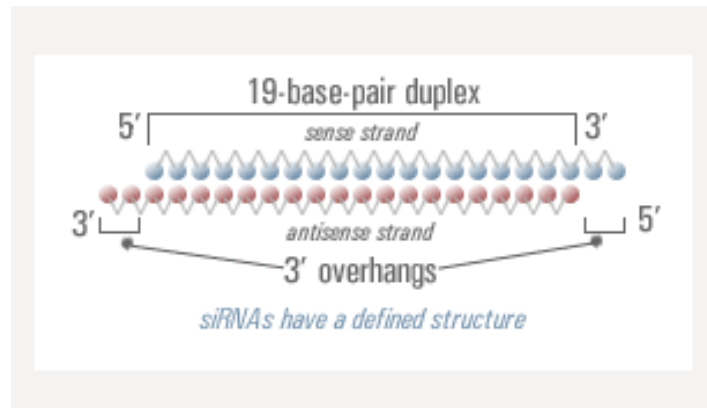


圖 4 醣蛋白的標定與偵測之簡易實驗流程

(a)



(b)

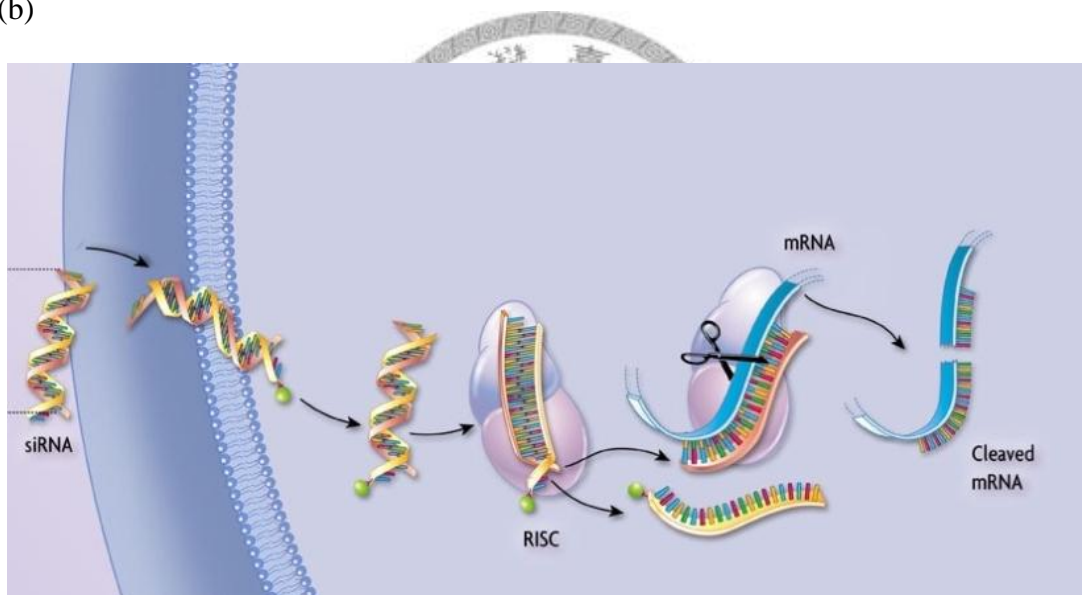


圖 5 siRNA 的特徵與作用機制：(a) siRNA 的核苷酸序列，(b) siRNA 進入細胞後將 mRNA 降解的過程。(© Alnylam Pharmaceuticals, Inc.)

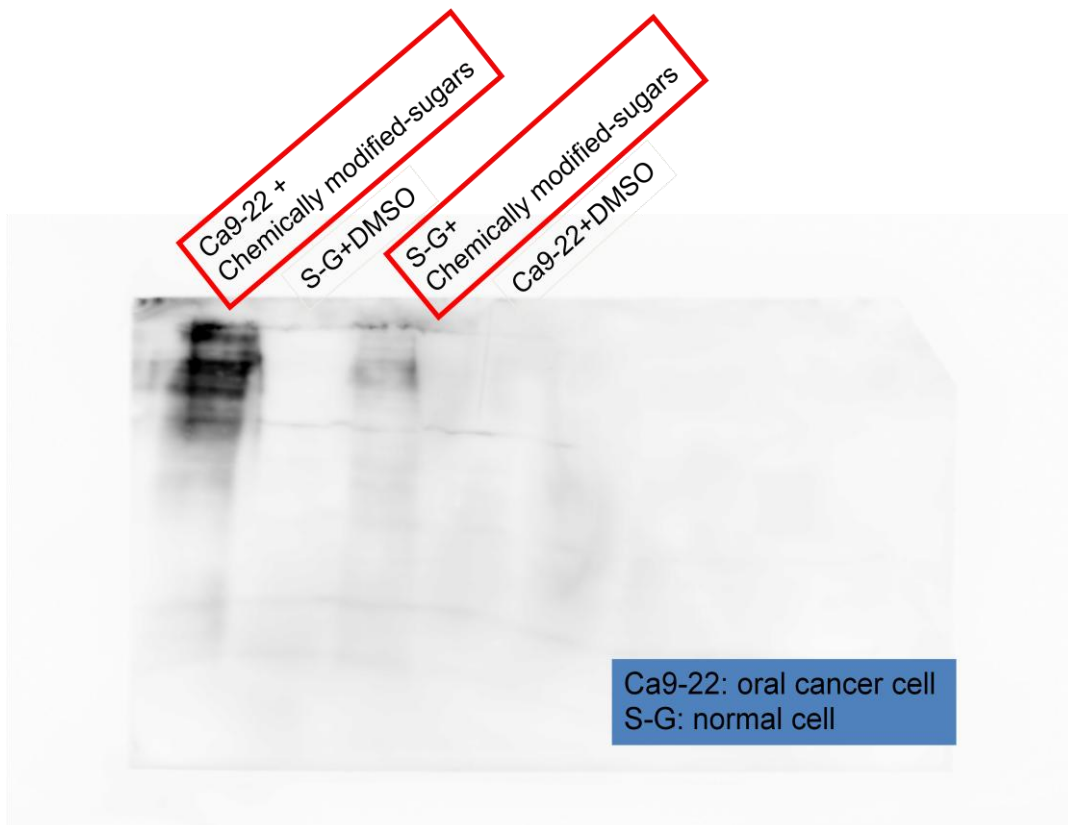


圖 6 利用西方墨點法比較醣蛋白在口腔癌細胞株與正常細胞株的表現。

(控制組為 S-G+DMSO 和 Ca9-22+DMSO；所用的 modified-sugar 為 ManNAcyne)

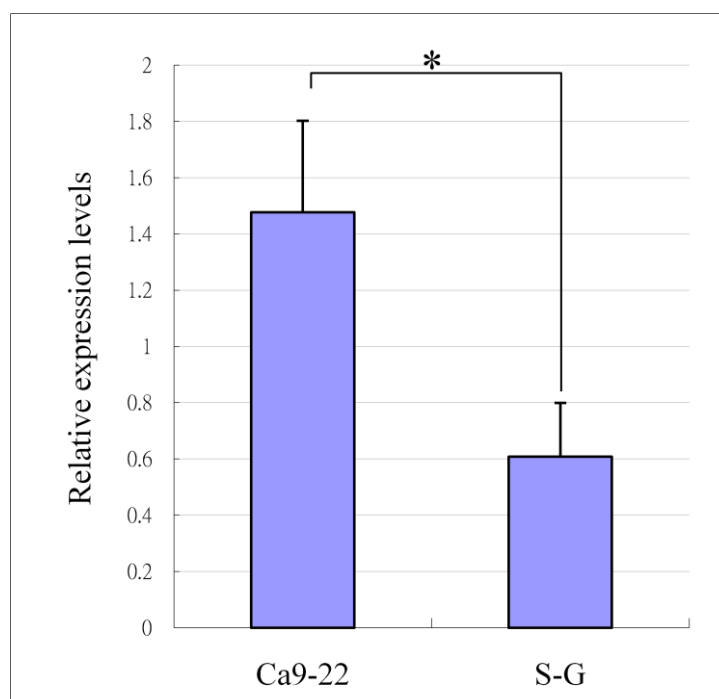
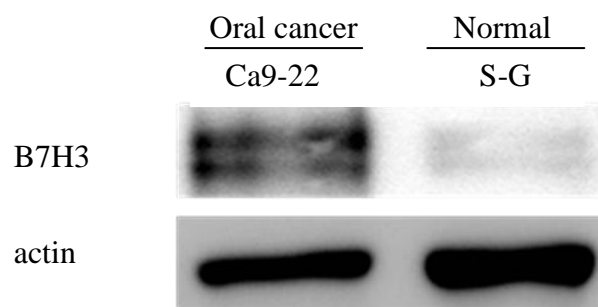


圖 7 以西方墨點法確認細胞有表現 B7H3 蛋白，並比較口腔癌細胞株與正常細胞株的 B7H3 蛋白質表現量，再進行統計分析。

(以 actin 當做 internal control；\*：p<0.05)

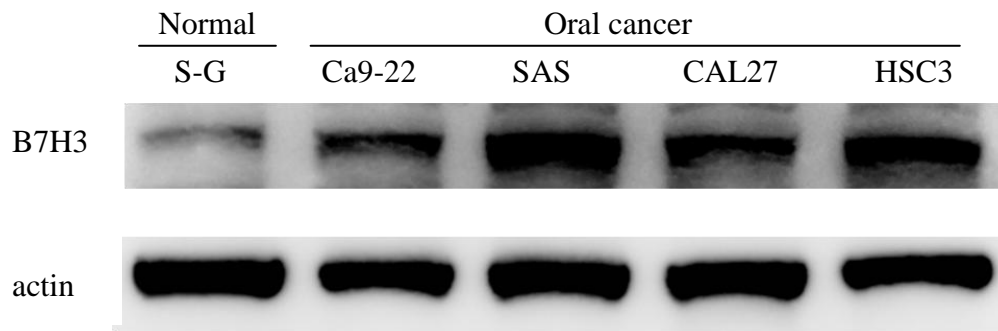


圖 8 比較正常細胞株與多種癌細胞株之 B7H3 蛋白質表現量。

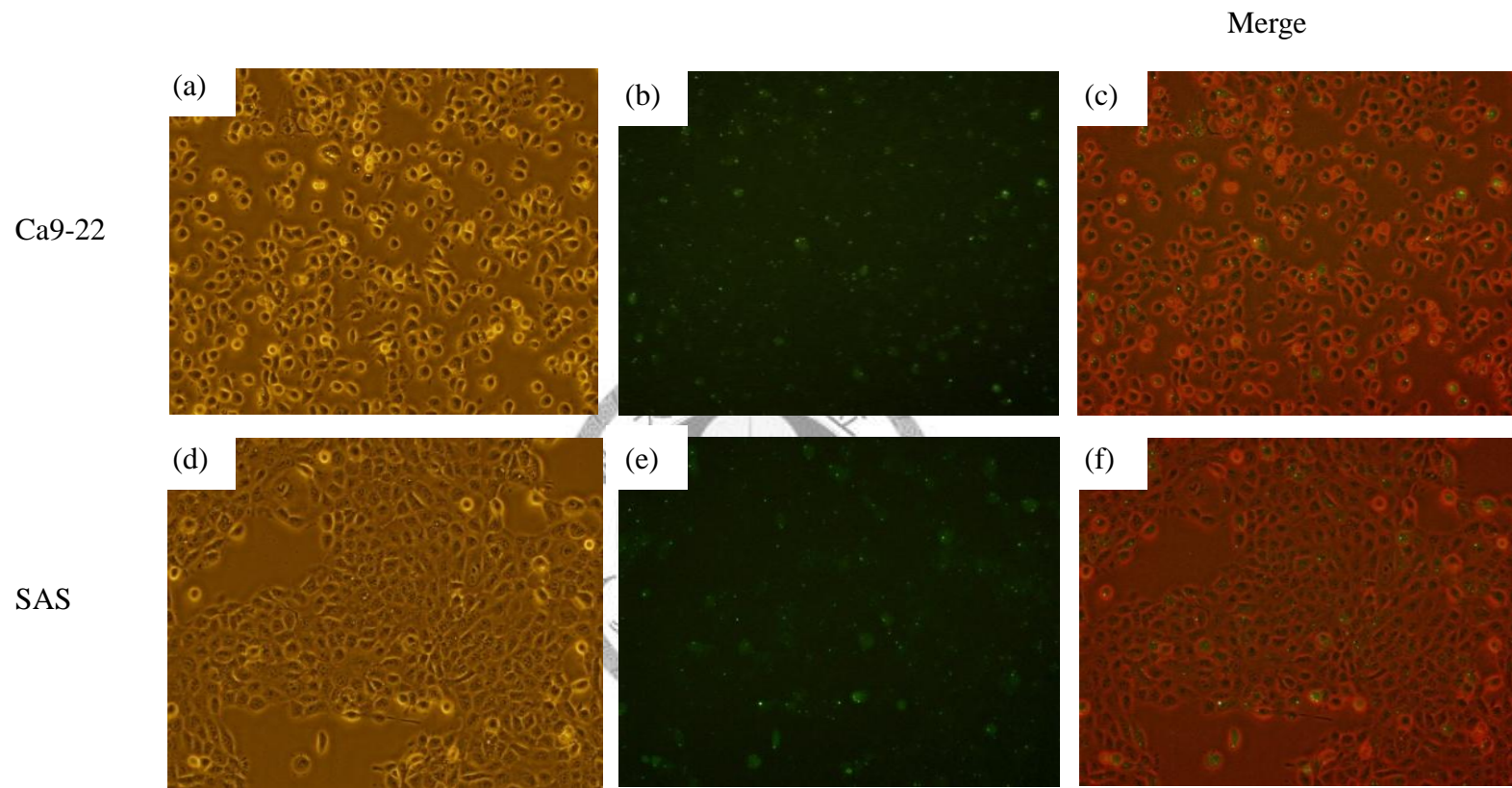


圖 9 siRNA 經轉染進入細胞的情形之觀察。(a)、(d) 轉染過後的細胞型態之觀察，(b)、(e) 帶綠色螢光的 siRNA 之觀察，(c)、(f) 分別將(a)、(b) 圖和 (d)、(e) 圖重疊以觀察 siRNA 是否有進入細胞。(a)、(b)、(c) 為 Ca9-22；(d)、(e)、(f) 為 SAS。(100x)

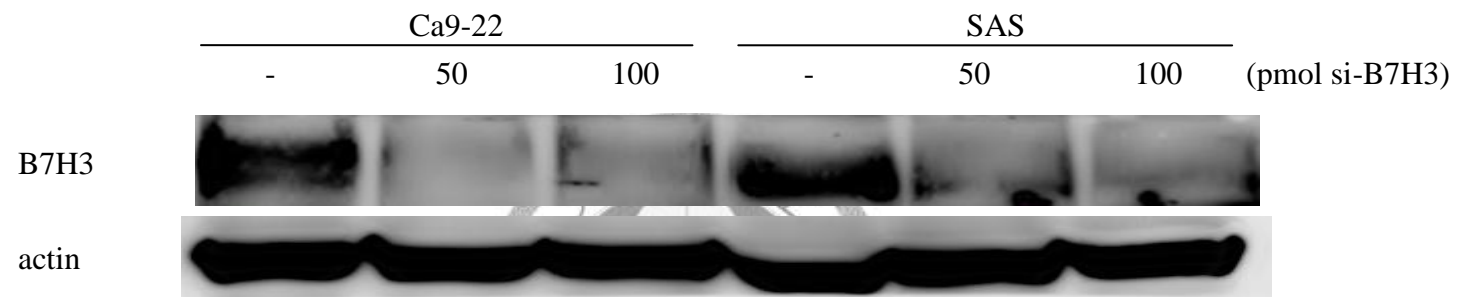
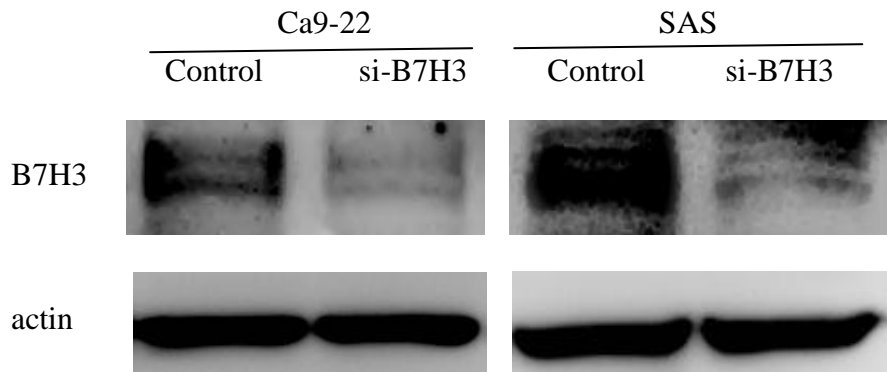


圖 10 siRNA 劑量對 B7H3 的抑制效果之觀察。(使用之 siRNA 劑量有 0、50、100 pmol)

(a)



(b)

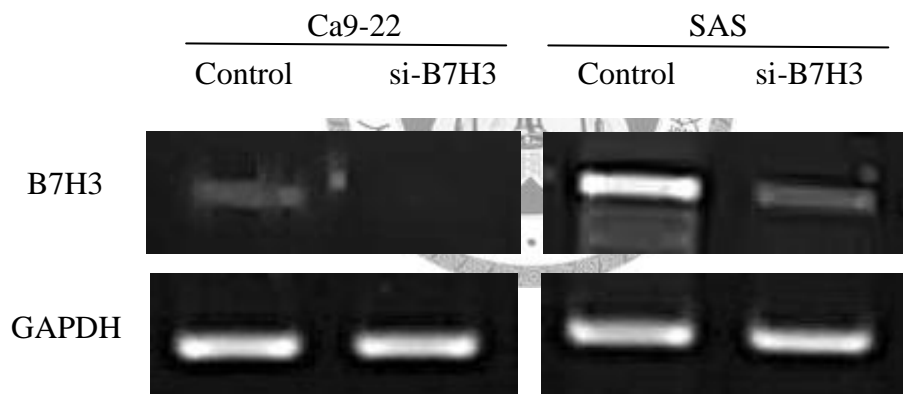


圖 11 siRNA 抑制 B7H3 蛋白質及基因表現之觀察。(a) 以西方墨點法觀察經轉染後 B7H3 蛋白質之表現，(b) 以 RT-PCR 觀察經轉染後 B7H3 基因之表現。(使用之 siRNA 劑量為 50 pmol，分別以 actin 及 GAPDH 做為 internal control)



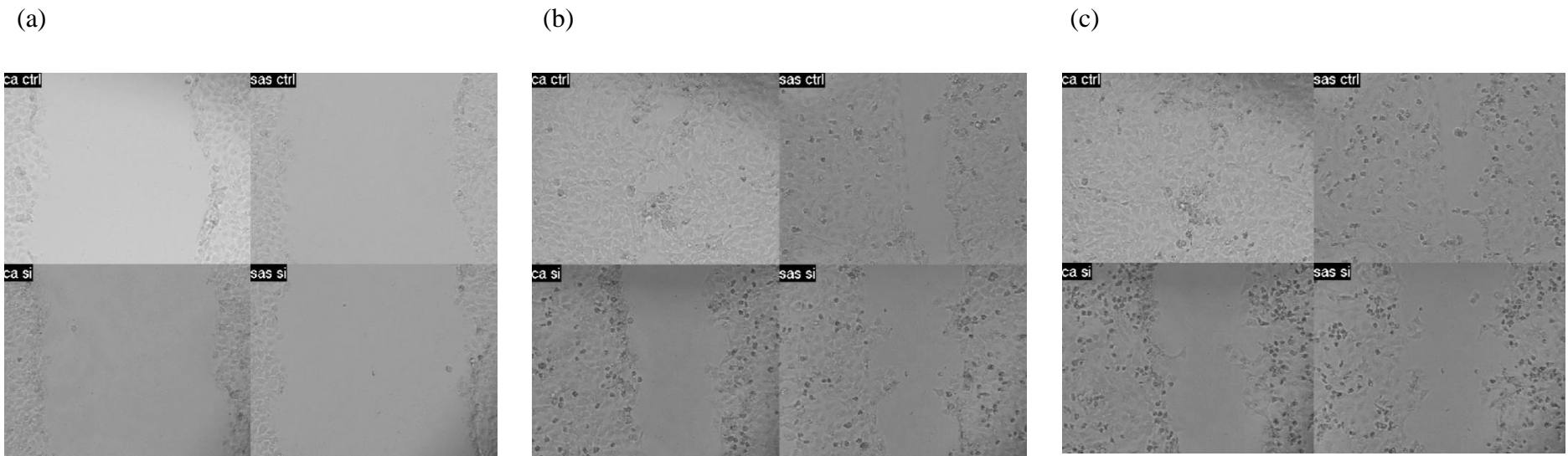


圖 12 醣蛋白 B7H3 被抑制後，細胞平移能力改變之觀察。(a) 細胞經 tip 刮除後 0hr，(b) 經刮除後 12hr，(c) 經刮除後 24hr。上方圖皆為 control 組，下方皆為經 siRNA 處理後之細胞；圖的左方為 Ca9-22，右方為 SAS。(100x)

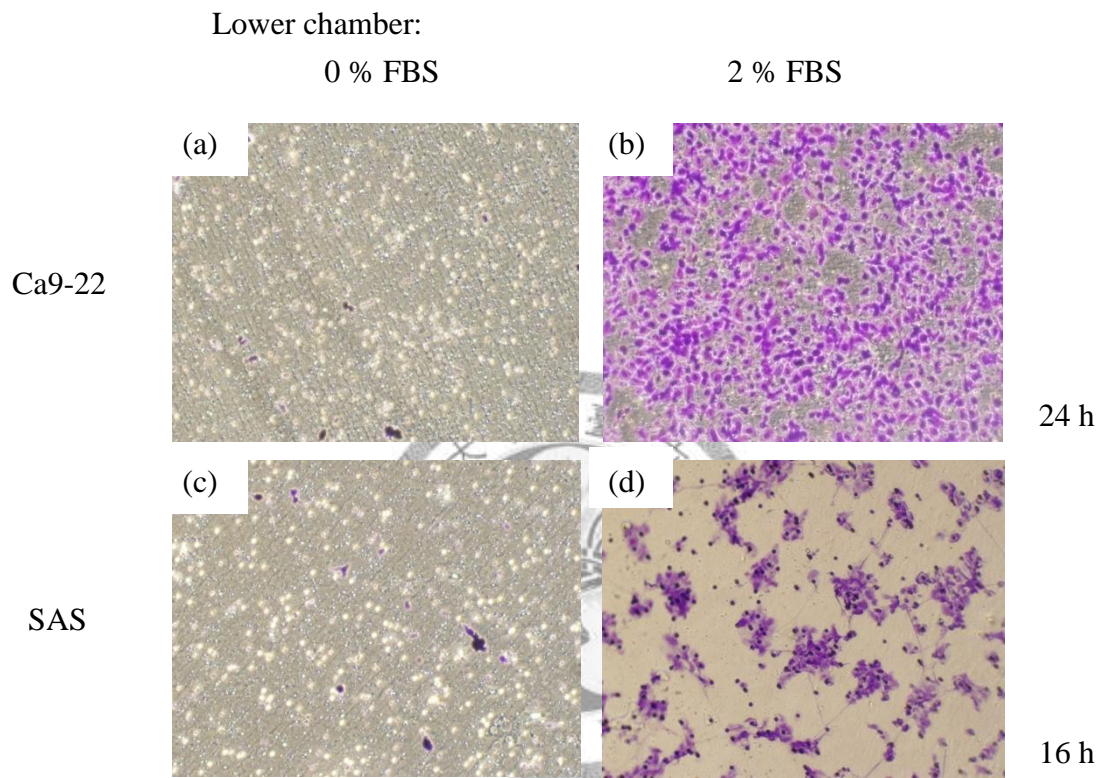


圖 13 口腔癌細胞在 0 % FBS 及 2% FBS 中遷移能力之觀察，決定適合癌細胞進行遷移能力分析的時間。(a)、(c) 於培養杯之上下層加入 0 % FBS medium；(b)、(d) 於上層加入 0 % FBS medium，下層加入 2 % FBS medium。適合 Ca9-22 遷移的時間為 24 h，SAS 則為 16 h。(100x)

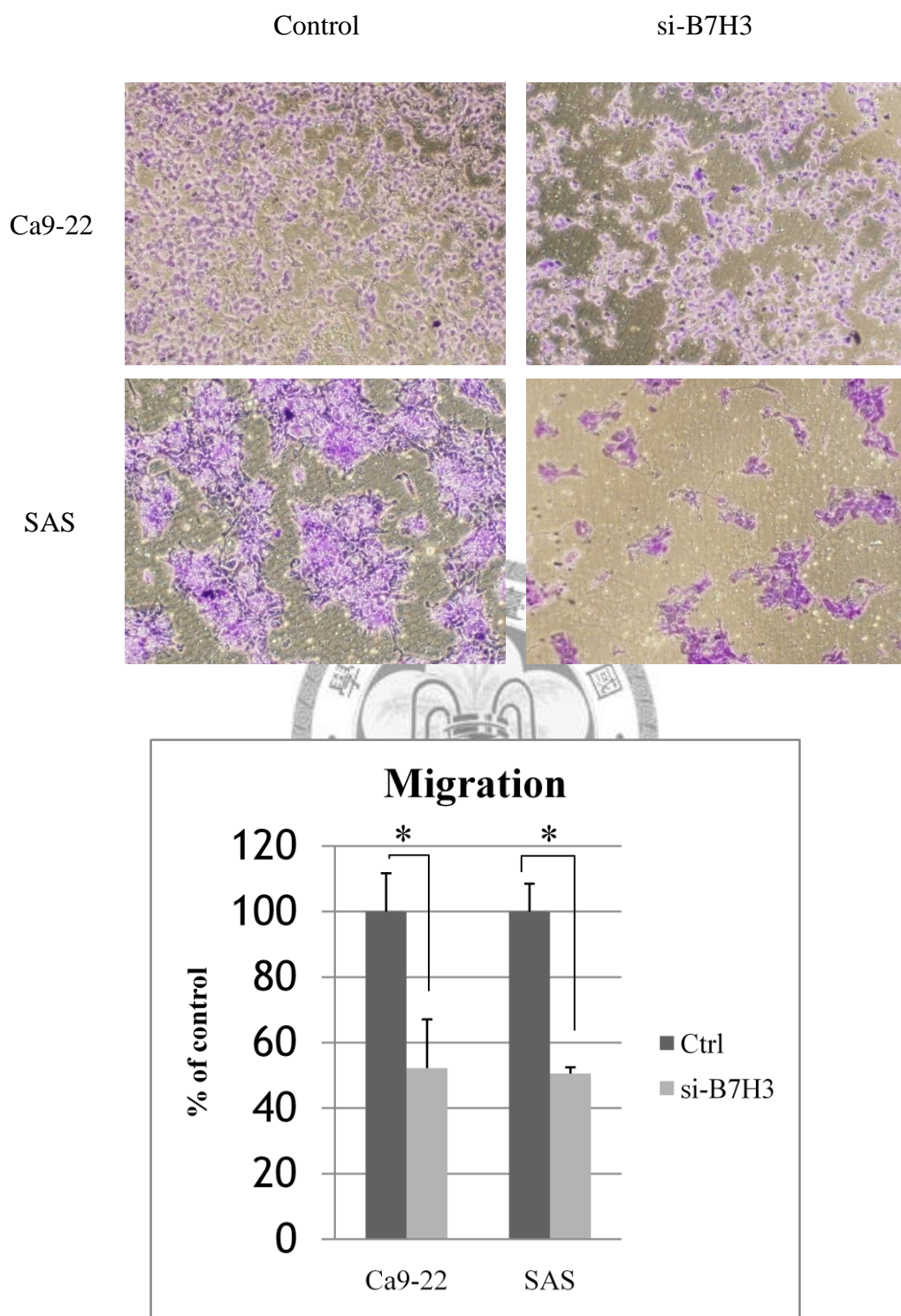


圖 14 觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞遷移能力之影響 (100x ; \* : p<0.05)

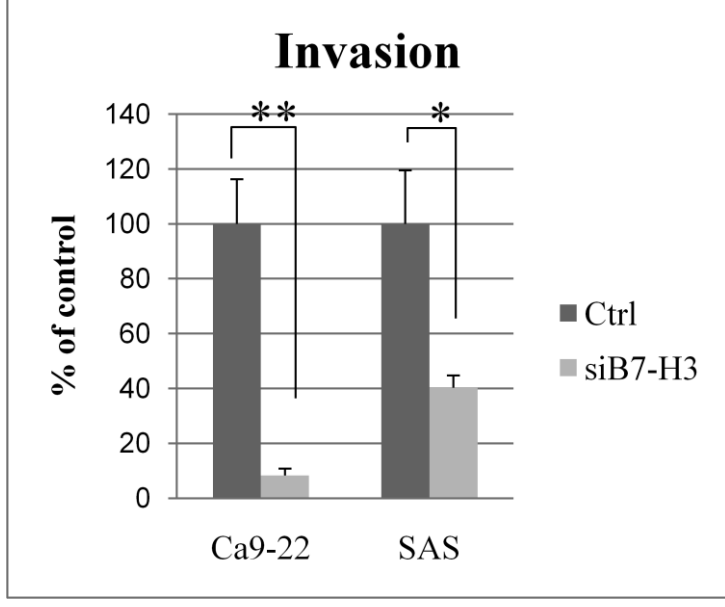
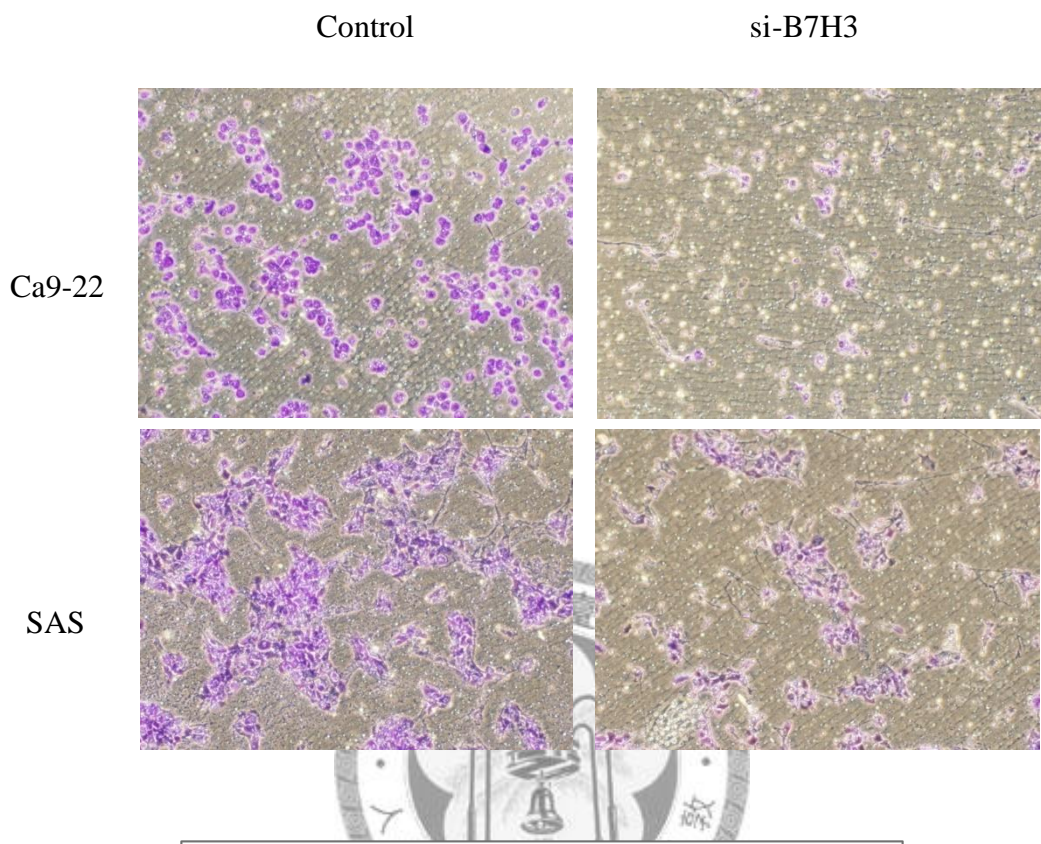


圖 15 觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞侵襲能力之影響

(100x ; \* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01)

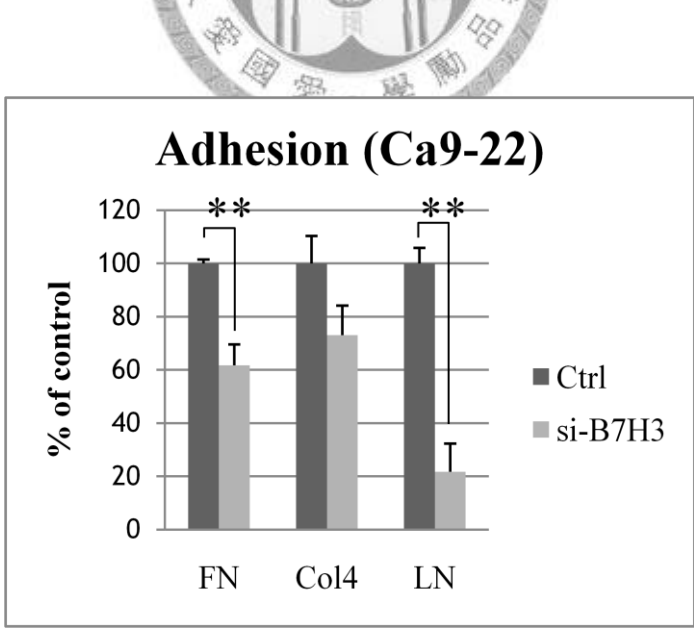
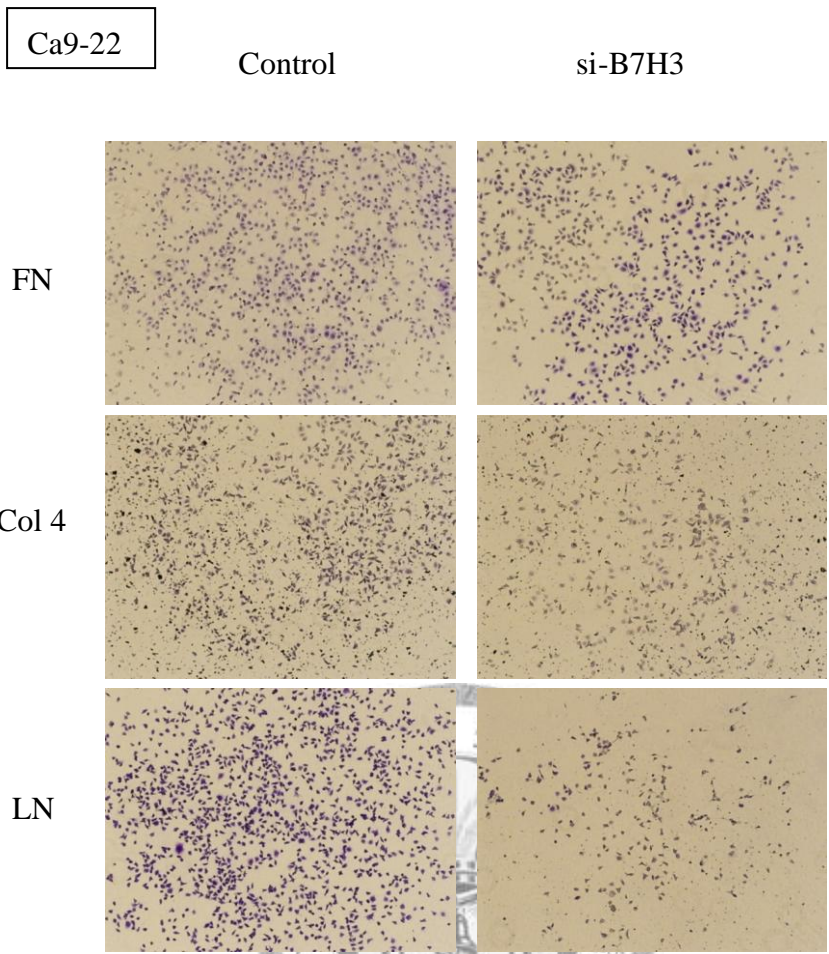


圖 16 觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞株 Ca9-22 貼附能力之影響  
(FN, fibronectin ; Col4, collagen 4 ; LN, laminin ; 40x ; \*\* : p<0.01)

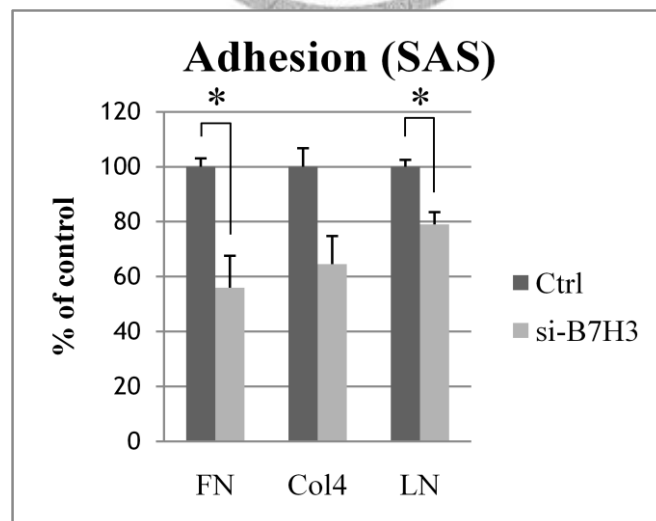
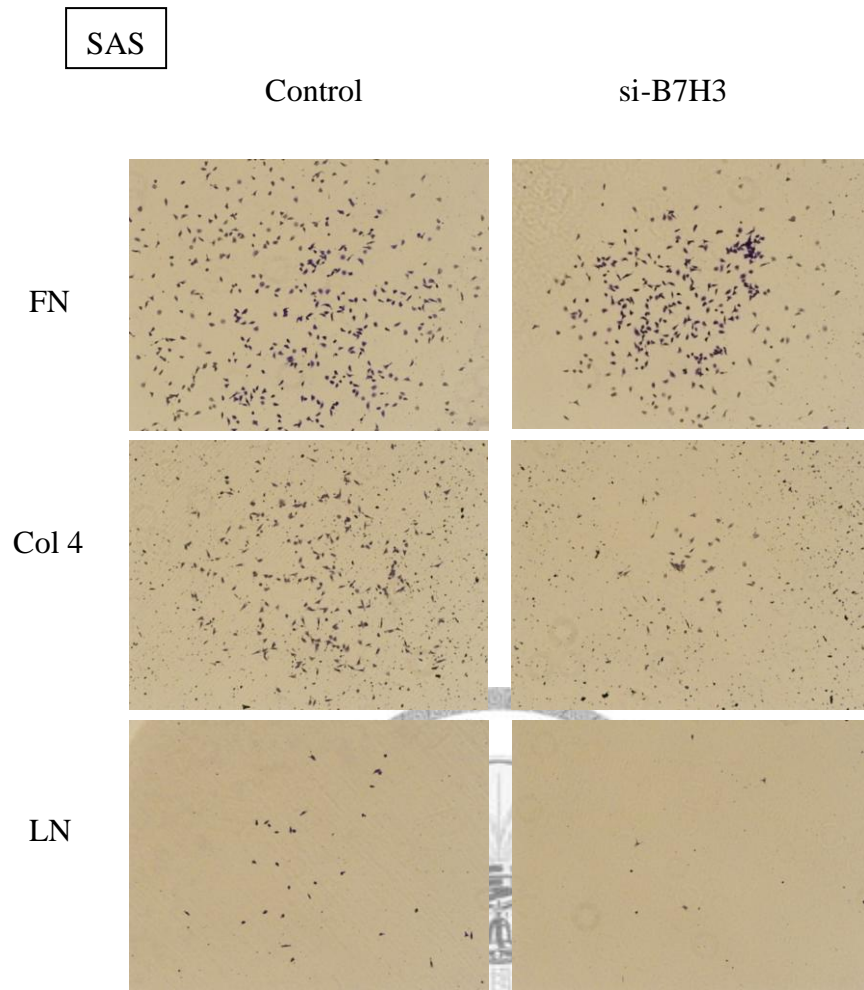


圖 17 觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞株 SAS 貼附能力之影響  
(FN, fibronectin ; Col4, collagen 4 ; LN, laminin ; 40x ; \* : p<0.05)

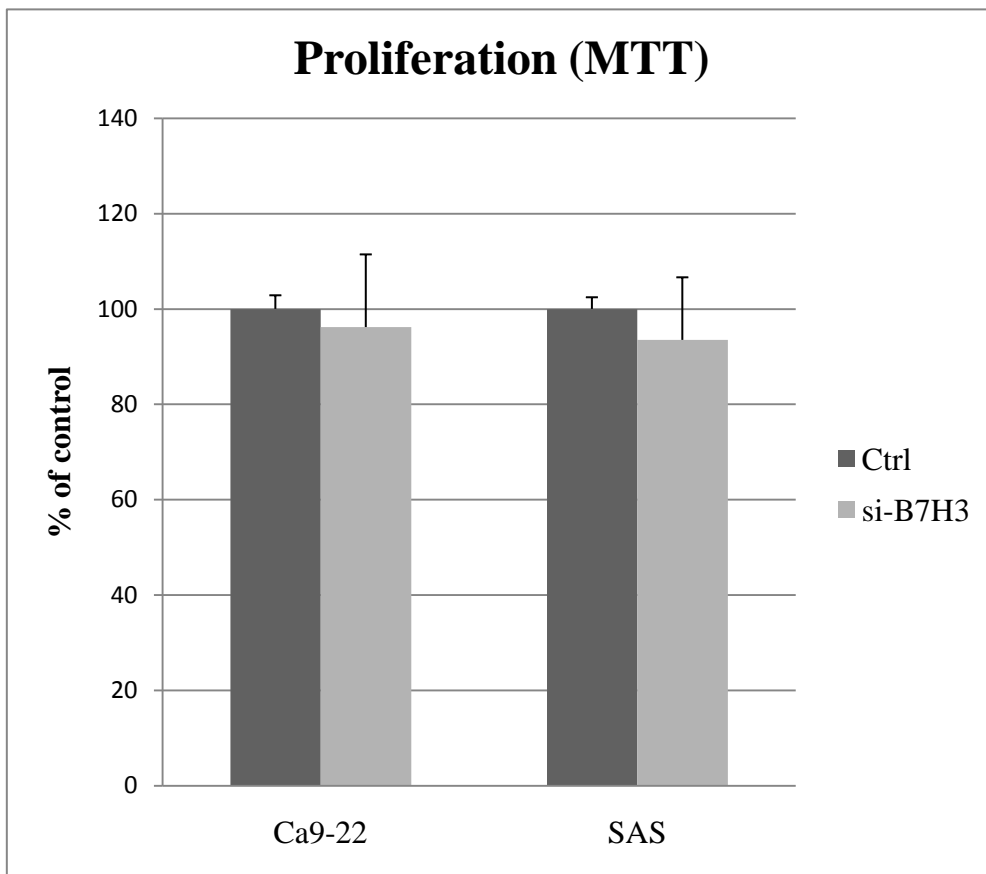


圖 18 觀察 B7H3 抑制後對口腔癌細胞增生能力之影響 (p 皆大於 0.05)

### Protocol 1、siRNA 的轉染

- (1) In 6-well plate, seeds  $2 \times 10^5$  cells per well in 2 ml antibiotic-free normal growth medium supplemented with FBS.
- (2) Incubate the cells at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator until the cells are 60-80% confluent. This usually takes 18-24 hours.
- (3) Wash the cells twice with PBS and add 740  $\mu\text{l}$  DMEM, then incubate the cells until transfection.
- (4) Prepare siRNA-Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 complexes as follows:
  - a. Dilute 5  $\mu\text{l}$  siRNA (50 pmol) in 125  $\mu\text{l}$  DMEM. Mix gently.
  - b. Mix Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 gently before use, then dilute 5  $\mu\text{l}$  in 125  $\mu\text{l}$  DMEM. Mix gently and incubate for 5 minutes at room temperature.
  - c. After 5 minutes incubation, combine the diluted siRNA with the diluted Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000. Mix gently and incubate for 20 minutes at room temperature.
- (5) Add the siRNA-Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 complexes to each well containing cell and DMEM (total 1 ml). Mix gently by rocking the plate back and forth.
- (6) Incubate the cells 6 hours at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator.
- (7) Add 1 ml of normal medium containing 2 times the normal serum and antibiotics concentration (2 x normal growth medium) without removing the transfection mixture.
- (8) After 72 hours incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the cells were collected and used for preparation of whole cell lysates or for other analysis.



## **Protocol 2、總蛋白質定量**

### **§ Preparation of cell lysates**

- (1) 以細胞刮勺將細胞收集並放入 eppendorf 中，12000 r.p.m. 離心 1 min。
- (2) 去上清液後加入 4  $\mu$ l protein inhibitor (PMSF:Aprotinin:Leupetin=10:1:1)，再加入 100  $\mu$ l RIPA (lysis buffer) 並 vortex 1 min，on ice 20 min。
- (3) 用 soniprep 將細胞震碎，震碎後會呈白色混濁。
- (4) 於 4°C 以 12000 r.p.m. 離心 10~30 min，將含有細胞蛋白質的上清液置入新的 eppendorf，接著取 5  $\mu$ l 進行定量，剩餘的蛋白質上清液則放入 -20°C 冰箱保存。

### **§ BCA Protein Assay (total protein)**

- (1) 取 25  $\mu$ l 的 BSA 標準溶液與細胞蛋白質溶液 (5  $\mu$ l 蛋白質上清液+20  $\mu$ l RIPA) 分別加入 96-well plate 中。
- (2) 各 well 加入 200  $\mu$ l 的 working reagent (WR)，震盪 30 s。
- (3) 用 parafilm 密封 plate，於 37°C 下反應 30 min。
- (4) 冷卻至室溫。
- (5) 用 ELISA reader 波長 570 nm 測吸光值。
- (6) 各吸光值減去 blank (only WR)，其值為最後之吸光值。
- (7) 用標準溶液讀值求出檢量線，以求出細胞的 total protein 濃度 ( $\mu$ g/ml)。

\* 配製 RIPA (100 ml)

150 mM Sodium chloride  
1 % Triton X-100 or NP-40  
0.5 % Sodium deoxycholate  
0.1 % SDS  
50 mM Tris (pH8)

\* 配製 BSA 標準溶液

以 bovine serum albumin (BSA) 配製標準溶液，並利用 RIPA 進行稀釋，選用的標準溶液濃度分別為 2000、1500、1000、750、500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、0  $\mu\text{g/ml}$ 。

\* 配製 working reagent

將 reagent A 與 B 以 50:1 的體積比混和成適量的 WR。



## **Protocol 3、Western blot**

### **§ 造膠**

- (1) 配製好 10 % polyacryamide gel 下層膠 (separate gel) 後，將其加入造膠器中，上面加 95 % 酒精以壓平下層膠並避免氣泡產生。
- (2) 凝固後加入 10 % polyacryamide gel 上層膠 (stacking gel) 並插上 comb。
- (3) Gel 凝固後在水中取下 comb。

### **§ 跑電泳**

- (1) 將做好的 10 % polyacryamide gel 架好並置於電泳槽中，倒入 1x running buffer。
- (2) 取 30  $\mu\text{g}$  的蛋白質 sample 與 3x loading dye 混和，95 $^{\circ}\text{C}$  加熱 5 min 後離心 20 s。
- (3) load 混和物到 gel 上，另外在 gel 上 load 3  $\mu\text{l}$  protein ladder。
- (4) 以 90 V 跑電泳 30 min，並觀察 protein 是否跑到上下膠分界處。
- (5) 以 120 V 跑電泳 1 hour。
- (6) 跑完的 gel 將玻璃片取下，切除上層膠。

### **§ Transfer**

- (7) 將 gel、濾紙、membrane 浸潤於 transfer buffer，不可有氣泡。
- (8) 放入 transfer box 中以 250 mA transfer 1 hour。
- (9) 取出 membrane 於右上角切一角做記號。
- (10) TBST 洗 3 次，各 5 min。

### **§ Blocking**

- (1) 將 membrane 浸入 blocking solution (0.5 % Tween-20 及 5 % milk in PBS)
- (2) 置於 shaker 上室溫搖晃作用 1hour。

### § 一級抗體

- (1) 將一級抗體以 1 % milk 做適當的稀釋後加到 membrane 。
- (2) 置於 shaker 上室溫搖晃作用 1hour 或於 4°C 下反應 overnight 。
- (3) TBST 洗 3 次，每次 5 min 。

### § 二級抗體

- (1) 將二級抗體以 1 % milk 做適當的稀釋加到 membrane 。
- (2) 置於 shaker 上室溫搖晃作用 30 min 。
- (3) TBST 洗 3 次，每次 5 min 。
- (4) 加入等量的兩種冷光反應劑 ECL 於 membrane 上，以觀察蛋白質的表現情形 。

\* 配製 10 % polyacrylamide gel

Separate gel (total 35 ml)

H <sub>2</sub> O	13.8 ml
30 % acrylamide mix	11.7 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	8.8 ml
10 % SDS	0.35 ml
10 % ammonium persulfate	0.35 ml
TEMED	0.014 ml

Stacking gel (total 10 ml)

H <sub>2</sub> O	5.55 ml
30 % acrylamide mix	1.7 ml
0.5 M Tris (pH6.8)	2.5 ml
10 % SDS	0.1 ml
10 % ammonium persulfate	0.1 ml
TEMED	0.01 ml



\* 配製 running buffer

25 mM Tris-base

190 mM Glycine

0.1 % SDS

\* 配製 3x loading dye

350 mM Tris

30 % Glycerol

350 mM SDS

2 % Bromophenol blue

\* 配製 transfer buffer

48 mM Tris

39 mM Glycine

0.04 % SDS

20 % methanol



\* 配製 TBST

10 x TBS

24.23 g Tris

80.06 g NaCl

→加水至 1 L

1 x TBST

(1) 將 10 x TBS 稀釋成 1 x。

(2) 加入 Tween-20 (final 0.1 % )。

#### **Protocol 4、RNA 之萃取**

- (1) 將含有足量細胞的 6-well plate 中之 medium 吸除。
- (2) 加入 500  $\mu$ l TRIzol，使均勻流過並斜放於室溫下 2 min。
- (3) 將液體吸起，放入 eppendorf 中。
- (4) 加入 200  $\mu$ l 氯仿。
- (5) 上下搖晃 15 s，室溫下靜置 2-3 min。
- (6) 於 4°C 下以 12000 g 離心 15 min。
- (7) 離心後會分成上下層，小心抽出上層（約 500  $\mu$ l）。
- (8) 放入新的 eppendorf 中並加入等體積的 isopropanol。
- (9) 上下搖晃 4-5 次，室溫下靜置 10 min。
- (10) 於 4°C 下以 12000 g 離心 10 min。
- (11) 倒除上清液，加入 500  $\mu$ l 75 % DEPC 水泡的酒精。
- (12) 震盪使 RNA 小片飄起即可。
- (13) 於 4°C 下以 7500 g 離心 5 min。
- (14) 吸除酒精，放入 hood 中風乾 (RNA 小片周圍變透明即可)。
- (15) 加入 20  $\mu$ l DEPC 水。
- (16) 取 1  $\mu$ l 測 O.D 值，其餘保存於 -80°C。

### **Protocol 5、染色 (adhesion、migration、invasion)**

- (1) 吸除 medium，以 PBS 洗 2 次。
- (2) 加入 methanol 以固定細胞，於室溫靜置 15 min。
- (3) 吸除 methanol。
- (4) 加入 0.5 % 結晶紫染劑 (in 30 % 乙醇)，靜置 15 min。
- (5) 直接以自來水沖洗，直至沒有染劑被洗出。
- (6) 乾燥後取數個視野拍照並保存。



## Protocol 6、MTT assay

- (1) seed 適量細胞並依實驗所需培養一段時間。
- (2) 吸除 medium。
- (3) 加入 MTT solution，放 2 hours (有紫色結晶產生)。
- (4) 吸除 MTT solution。
- (5) 加入 DMSO 以溶解結晶，靜置 14 min。
- (6) 取適量到 96-well plate 並以 ELISA reader 測 O.D 值。

### \* 配製 MTT solution

- (1) 取 0.1 g MTT 加入 50 ml PBS 中。
- (2) 搖晃使溶解。
- (3) 在 hood 中以針頭吸出 solution，並以 filter 過濾
- (4) 用錫箔紙包住並保存於 4°C。

