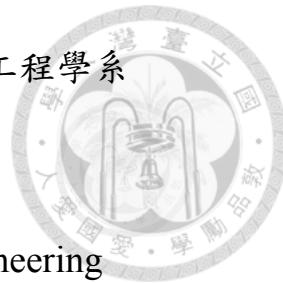


國立臺灣大學生物資源暨農學院生物產業機電工程學系

碩士論文



Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

應用陽離子型微脂體基因輸送系統進行誘餌寡核苷酸誘導

乳癌細胞 MCF-7 凋亡之研究

A Study of Decoy Oligonucleotide-induced Breast Cancer Cell MCF-7

Apoptosis Using a Cationic Liposome Gene Delivery System

陳俊昇

Chun-Shen Chen

指導教授：陳林祈 博士

Advisor: Lin-Chi Chen, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



## 致謝

進入 403 實驗室已經度過了兩年的時間，終於來到畢業的時候，許多點點滴滴的回憶湧上心頭，彷彿昨日才發生。非常感激在讀碩士班的這條路上承蒙許多老師與同儕的教導與幫助，讓我順利地完成學業。我非常感謝並珍惜進入陳林祈老師實驗室中學習，在碩士班的階段不論在課業學習、學術研究、更甚至待人處事方面，老師不厭其煩的諄諄教誨，讓我成長許多，使我開始有處理事情的邏輯性以及與以往不一樣的生活態度。在任何的方面，老師總是包容、信任以及給我機會嘗試新的挑戰，我想這不是幾句話能表達心中的感激。希望老師以及實驗室未來發展都能順順利利、勇往直前。

感謝劉嘉睿教授、吳嘉文副教授、侯詠德助理教授擔任我的論文指導口試委員並撥冗參加口試，對論文更給予了許多寶貴的建議以及指導，讓我的研究成果更加嚴謹完整。另外也感謝國科會計畫的支持，才能使本研究可以無後顧之憂地進行。謝謝在 403 實驗室一起打拼過的學長姐、同學、學弟妹，這個空間因為有你們而溫暖！

最後感謝我的家人，不管在任何方面總是包容我、關心我，有你們的支持和陪伴是我前進的動力，也讓我能順利的完成碩士論文並且拿到畢業證書。僅將這篇論文獻給一直支持我的人。



## 中文摘要

信息傳遞及轉錄激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 為細胞當中重要的一個轉錄因子，STAT3 的活化時促使許多的細胞激素及生長因子表現。STAT3 的磷酸化為其活化的原因，磷酸化後的 STAT3 會以二聚體之方式結合並藉由輸入蛋白 (importin) 送至細胞核中。進入細胞核之 STAT3 會與 DNA 結合進而造成下游基因的表現。STAT3 及其所調控的基因皆在細胞的生長及存活上扮演重要的角色，而 STAT3 在許多腫瘤當中有持續過度表現的現象，故此調控 STAT3 在癌細胞中的表現及具有研究的價值。在許多的調控方法中，誘導寡核苷酸 STAT3-decoy oligonucleotide (STAT3-decoy ODN) 為一段能與 STAT3 的 DNA 鍵結區域結合之短序列核苷酸，與 STAT3-decoy ODN 結合後的 STAT3 無法與輸入蛋白結合進入細胞核中，藉此抑制 STAT3 下游基因的表現。在本論文中，我們選擇利用帶正電微脂體 DOTAP/DOPE 作為輸送 STAT3-decoy ODN 的載體，微脂體與細胞膜皆為脂質所構成，故可藉由融合或是胞吞作用將藥物送至細胞當中，而帶正電之脂質有助於將帶負電的 STAT3-decoy ODN 吸附於表面，增加輸送的效率。我們以乳癌細胞株 MCF-7 為輸送目標，探討 STAT3-decoy ODN 以帶正電微脂體送入細胞後在基因表現、細胞凋亡及細胞存活率的影響。我們發現，當我們利用 4  $\mu\text{g}$  至 16  $\mu\text{g}$  的 STAT3-decoy ODN 與 32  $\mu\text{g}$  微脂體所形成的脂質複合物溶於 100  $\mu\text{l}$  的培養液中能夠降低 STAT3 下游基因 cyclin-D1 的基因表現量並且誘導細胞的死亡，並且在六小時內即有藥性的反應且此藥性更能維持長達三天之久。

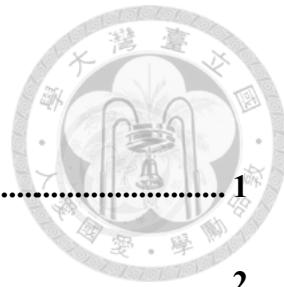
※關鍵字：微脂體、訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3、STAT3-decoy oligonucleotide、細胞死亡



## Abstract

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is an important transcription factor, many cytokine and growth factor will be induced when STAT3 is activated. Activation of STAT3 is through enzymatic phosphorylation. Phosphorylated STAT3 tends to form a dimer structure and be sent to nucleus by importin then binds to specific DNA motif to regulate expression of downstream gene, which play a key role in cell-proliferation, metastasis and apoptosis. To regulate STAT3, STAT3-decoy oligonucleotide (STAT3-decoy ODN) is a consensus sequence with STAT3 binding motif and could trap STAT3 to restrict it transported into nucleus and silence downstream gene expression. In this thesis, cationic liposome DOTAP/DOPE is used to transport STAT3-decoy ODN into cell. Liposome is composed by lipid, which also the formation of the cell membrane. Liposome can be uptaken by cell through fusion or endocytosis. With cationic lipid, liposome can attract anionic STAT3-decoy ODN to form a lipoplex increasing gene delivery efficiency. Using MCF-7 as the target cell to study the effect of the STAT3-decoy ODN transported by cationic liposome from cell viability and gene expression. Liposome formed by 4  $\mu$ g to 16  $\mu$ g STAT3-decoy ODN with 32  $\mu$ g liposome in 100  $\mu$ l medium could down-regulate gene expression of cyclin-D1, which is the downstream gene regulated by STAT3 and induce cell death during 6 hours after treatment, and the effect could last at least 3 days long.

**\* keywords:** liposome, Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3-decoy oligonucleotide, cell death

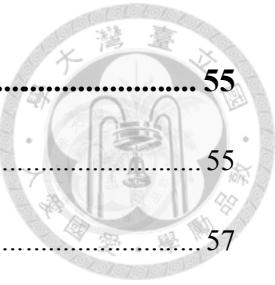


## 目錄

致謝 .....	1
中文摘要 .....	2
Abstract .....	3
目錄 .....	4
圖目錄 .....	7
表目錄 .....	9
<b>第一章 緒論 .....</b>	<b>10</b>
1.1. 背景 .....	10
1.2. 動機 .....	14
1.3. 目的 .....	15
1.4. 實驗架構 .....	16
<b>第二章 文獻回顧 .....</b>	<b>17</b>
2.1. 訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 與乳癌的關係 .....	17
2.2. 使用 decoy-ODN 調控訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 的表現量 .....	20
2.3. 以微脂體作為藥物輸送的載體 .....	23
2.4. 不同比例的微脂體與藥物所形成之脂質複合物的輸送效率探討 .....	25
<b>第三章 材料與方法 .....</b>	<b>28</b>
3.1. 使用儀器與藥劑 .....	28
3.1.1. 材料 .....	28
3.1.2. 儀器 .....	30



3.2.	STAT3-dODN 與核酸引子 .....	32
3.3.	微脂體製備 .....	33
3.4.	表面電位及粒徑大小 .....	34
3.5.	細胞培養 .....	34
3.6.	細胞繼代培養 .....	34
3.7.	細胞計數 .....	35
3.8.	MTT assay .....	35
3.9.	RNA 萃取 .....	35
3.10.	逆轉錄聚合酶鏈式反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR).....	36
3.11.	即時聚合酶鏈鎖反應 (quantitative real time polymerase chain reaction , RT-qPCR).....	37
3.12.	流式細胞術 (flow cytometry) .....	39
3.13.	共軛焦顯微鏡 (confocal microscope).....	39
	<b>第四章 實驗結果 .....</b>	<b>40</b>
4.1.	微脂體的物理性質 - 粒徑與 DNA 最大可攜帶量.....	40
4.1.1.	微脂體粒徑 .....	40
4.1.2.	脂質複合物的 DNA 最大攜帶量 .....	42
4.2.	不同比例之脂質複合物對於細胞存活率之影響.....	43
4.3.	時間對於脂質複合物毒殺細胞的影響.....	47
4.4.	以流式細胞儀鑑定脂質複合物毒殺細胞之特性.....	48
4.5.	由共軛焦顯微鏡觀察脂質複合物對於細胞的輸送效率.....	52
4.6.	以脂質複合物投藥與 MCF-7 後對於其基因表現的影響 .....	54



<b>第五章</b>	<b>結論與未來展望 .....</b>	<b>55</b>
5.1.	結論 .....	55
5.2.	展望 .....	57
<b>第六章</b>	<b>參考文獻 .....</b>	<b>58</b>



## 圖目錄

圖 1.1	STAT3 的於細胞內對於基因表現的作用示意圖 .....	13
圖 1.2	實驗計畫 .....	15
圖 1.3	實驗架構 .....	16
圖 2.1	訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 與癌症關係的重要發現 .....	19
圖 2.2	文獻中所提出的 STAT3-dODN 作用示意圖 .....	21
圖 2.3	不同微脂體與不同序列之 DNA 對脂質複合物表面電位 所造成的 影響 .....	26
圖 2.4	不同微脂體依不同比例與 NF-κB decoy ODN 形成脂質複合物後對 RAW 264.7 細胞的存活率的影響 .....	27
圖 3.1	篩選儀器示意圖 (Avanti Polar Lipids) .....	33
圖 3.2	微脂體羈押操作示意圖 (Avanti Polar Lipids) .....	33
圖 3.3	逆轉錄聚合酶鏈式反應流程圖 .....	36
圖 4.1	微脂體的粒徑分布 .....	41
圖 4.2	脂質複合物與不同比例 DNA 表面電位的變化 .....	42
圖 4.3	STAT3-dODN 原始劑量為 16 μg 對細胞的毒殺性 .....	44
圖 4.4	STAT3-dODN 原始劑量為 4 μg 對細胞的毒殺性 .....	45
圖 4.5	STAT3-dODN 原始劑量為 1 μg 對細胞的毒殺性 .....	46
圖 4.6	時間對於脂質複合物毒殺細胞的影響 .....	47
圖 4.7	MCF-7 以 STAT3-dODN 投藥後進行流式細胞儀分析的結果 .....	49
圖 4.8	有成功輸送 STAT3-dODN 的細胞由流式細胞儀所獲得的圖譜 .....	50
圖 4.9	以控制組對細胞進行投藥後所得之圖譜 .....	51



圖 4.10	由共軛焦顯原鏡拍攝經螢光標記後 STAT3-dODN 投藥與 MCF-7 的影像(1) .....	52
圖 4.11	由共軛焦顯原鏡拍攝經螢光標記後 STAT3-dODN 投藥與 MCF-7 的影像(2) .....	53
圖 4.12	特定基因在投與脂質複合物後的表現量差異 .....	54



## 表目錄

表 2.1	以 STAT3-dODN 做藥物輸送的文獻整理 .....	22
表 3.1	本實驗所使用之藥品 .....	28
表 3.2	本實驗所使用之藥品(續) .....	29
表 3.3	本實驗所使用到之儀器整理 .....	30
表 3.4	本實驗所使用到之儀器整理(續) .....	31
表 3.5	本實驗所使用到之寡核苷酸及引子整理 .....	32
表 3.6	即時聚合酶鏈鎖反應配方 .....	37
表 3.7	即時聚合酶鏈鎖反應流程 .....	38
表 4.1	微脂體粒徑分布之量化數據 .....	40



## 第一章 緒論

### 1.1. 背景

癌症目前高居於全球十大死因之首，危害著人們的健康。長久以來，科學家們持續不斷的研究治療癌症的可能性，亦有許多的診療方法因此而被開發出來，藥物制放系統（drug delivery system, DDS）即是一套具有專一性、長效性與複方性的藥物治療方法，此方法為極具潛力的癌症治療方式。

在全球，乳癌在癌症當中的發生率約占了 20%，並且有 10% 的女性罹癌患者因著罹患乳癌而去世。乳癌的發生通常是由賀爾蒙依賴非轉移性之腫瘤演變成賀爾蒙非依賴型且具有高度轉移的特性。由研究發現，乳癌細胞在生長的過程中其細胞凋亡（apoptosis）的機制會漸漸衰退，形成具有高度轉移性的乳癌腫瘤(Wu, 1996)，而其他研究結果也顯示，細胞凋亡的機制為細胞自我調控以抑制細胞易位及轉移的防護機制(Glinsky, Glinsky et al., 1997; Jäättelä, 1999)。

訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 為細胞當中重要的一個轉錄因子，STAT3 的活化時促使許多的細胞激素及生長因子表現並抑制細胞凋亡的發生，諸如介白素-6 (interleukin-6, IL-6)、表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 及干擾素 (interferon)。STAT3 的磷酸化為其活化的原因，磷酸化後的 STAT3 會以二聚體之方式結合並藉由輸入蛋白 (importin) 送至細胞核中。進入細胞核之 STAT3 會與 DNA 結合進而造成下游基因的表現，包括 B-細胞淋巴瘤基因 2 (b-cell lymphoma 2, Bcl-2)、B-細胞淋巴瘤基因 XL (b-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)、c-myc、周期蛋白 D1 (cyclin D1)、周期蛋白 D2 (cyclin D2) 及 survivin。STAT3 及其所調控的基因皆在細胞的生長及存活上扮演重要的角色，而 STAT3 在許多腫瘤當中有持續過度表現的現象，故



此調控 STAT3 在癌細胞中的表現及具有研究的價值。

經研究發現，在人類乳癌細胞的發展過程中，表皮生長因子受體（epidermal growth factor receptor, EGFR）會有活化的表現(Rajkumar and Gullick, 1994; Cance and Liu, 1995; Cohen, Siegall et al., 1998; Ma, Gauvillé et al., 1998; Kim and Muller, 1999)，並伴隨其配體（ligand）不正常的過度表現(Gullick and Srinivasan, 1998)，這樣的現象被認為是造成乳癌細胞惡性轉移及增生的重要原因之一(Muthuswamy and Muller, 1994; Sheffield, 1998; Biscardi, Tice et al., 1999)，而 STAT3 的表現也會促使表皮生長因子受體的活化。(Ruff-Jamison, Chen et al., 1993; Zhong, Wen et al., 1994; Yu, Meyer et al., 1995; Cao, Tay et al., 1996; David, Wongi et al., 1996; Leaman, Pisharody et al., 1996; Chaturvedi, Reddy et al., 1998; Reddy, Korapati et al., 2000)

在許多的調控方法中，STAT3-decoy oligonucleotide（STAT3-decoy ODN）為一段能與 STAT3 的 DNA 鍵結區域結合之短序列核苷酸，與 STAT3-decoy ODN（STAT3-dODN）結合後的 STAT3 皆無法與輸入蛋白結合進入細胞核中，藉此抑制 STAT3 下游基因的表現。

轉錄因子（transcription factors）為細胞核內的核蛋白，其作用與基因的表現息息相關，這些蛋白質會與其調控基因的啟動子（promoter）上特定的序列鍵結，這些特定的序列約有六到十個鹼基對長，並且能夠在啟動子上有多次的重複；雖然這樣的蛋白質與核苷酸間的交互作用具有序列的高度專一性，不過這樣的序列卻能夠在不同基因的啟動子上被發現，這樣的一致性便稱為 motif。通常會有一群的轉錄因子鍵結在轉錄起始點（transcription initiation site）的上游與下游，而各轉錄因子之間與核酸聚合酶（RNA polymerases）和輔助因子（cofactors）間的交互作用會決定整個轉錄反應的活性，並且取決於不同的狀況與不同的細胞會呈現不同的活性強度。



因為轉錄因子具有能夠調控基因表現的特性，科學家及發展出了以控制轉錄因子調控基因表現的具潛力治療方式。因為轉錄因子能夠在不具有基因體（genome）的環境下辨認其相對應的鍵結序列，故此我們能夠利用凝膠阻滯分析（electrophoretic mobility shift assay, EMSA）來鑑定轉錄因子鍵結序列的活性。而在近年的研究中，科學家利用轉錄因子對於序列的專一性研發出一套調控基因表現的方法，利用與鍵結序列相似的序列使轉錄因子鍵結在序列上使之無法與欲表現之基因結合，進而達到調控基因的效果。

在輸送藥物的載體選擇上，微脂體（liposome）在輸送核苷酸藥物上已有許多的應用(Felgner, Gadek et al., 1987; Miller, 1998; Barenholz, 2001)，透過帶正電微脂體（cationic liposome）與核苷酸的結合形成脂質複合物（lipoplexes），並藉由胞吞作用（endocytosis）進入細胞內部，進而達到治療的效果。目前有接近五分之一的臨床試驗是使用微脂體作為藥物的載體，帶正電的脂質能與大部分的核苷酸結合，諸如：質體（plasmid）、單股核苷酸（single-strand DNA, ssDNA）、雙股核苷酸（double-strand DNA, dsDNA）。

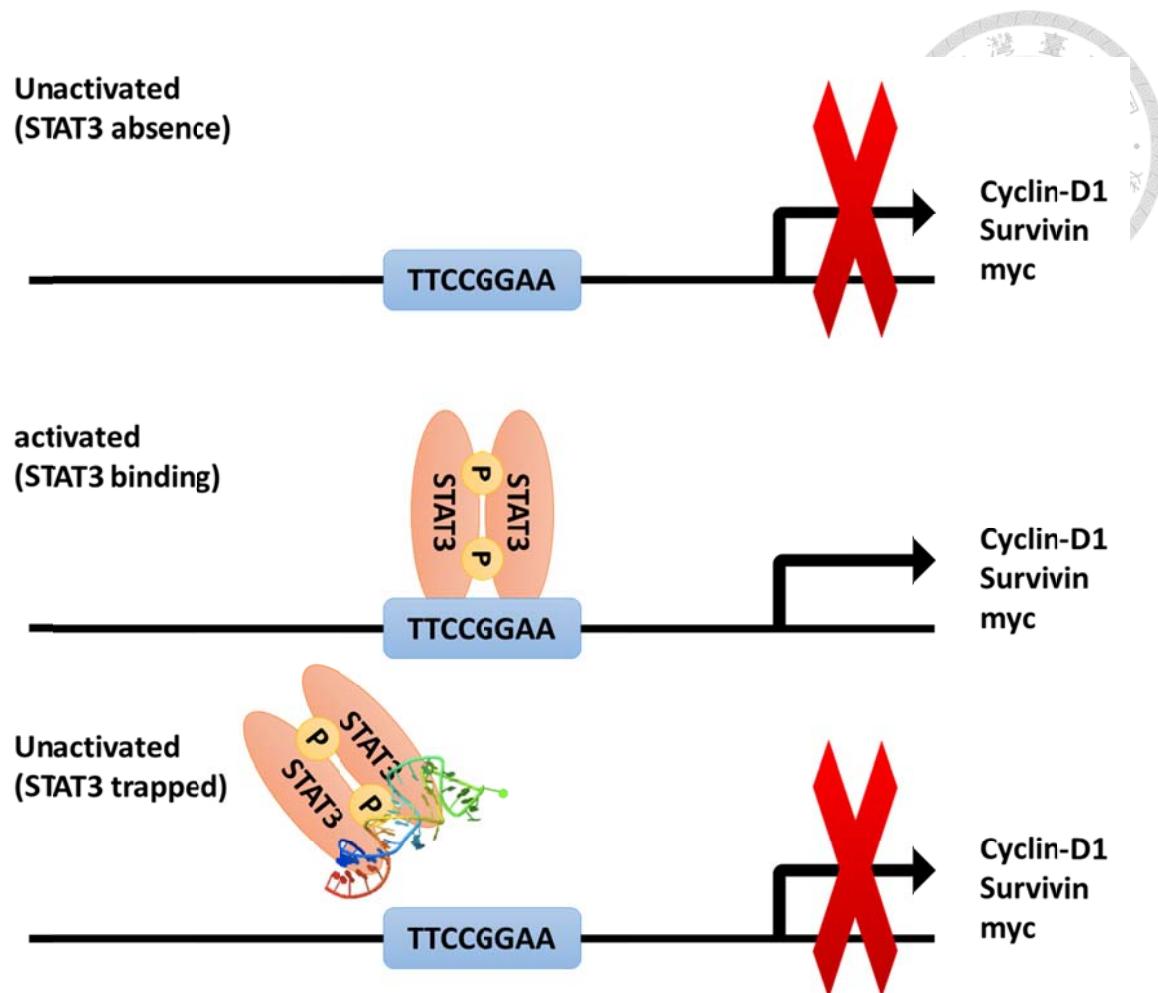


圖 1.1 STAT3 的於細胞內對於基因表現的作用示意圖

當 STAT3 不存在時，受 STAT3 調控的下游基因將不會被啟動；當 STAT3 被表現時，受 STAT3 調控的下游基因將會被啟動，細胞表現出癌化及抗凋亡的狀態；當癌化細胞的 STAT3 被抑制時，STAT3 下游的基因將被關閉，此時的細胞凋亡機制將再次地被啟動。



## 1.2. 動機

雖然利用 STAT3-dODN 來抑制 STAT3 在癌細胞當中的作用並使得癌細胞產生細胞凋亡已經有許多團隊正著手進行研究，但是在研讀論文的過程中發現過去文獻中對於人類乳癌細胞與 STAT3 關係的研究是相對少的，而利用 STAT3-dODN 調控乳癌細胞當中持續表現的 STAT3 更是沒有報導提出，因此本篇論文將以使用 STAT3-dODN 為調控乳癌細胞生長的角度切入，藉以探討 STAT3-dODN 對於乳癌細胞的影響，期望藉著本篇論文能夠釐清 STAT3-dODN 對於乳癌細胞抑制生長的效果，並從訊息傳遞的角度探討造成此現象的原因。另一方面本篇論文期望能夠以自製的載體來進 STAT3-dODN 的實驗，藉以發展屬於本實驗室的一套藥物輸送的平台。



### 1.3. 目的

自本實驗中，我們利用微脂體輸送 STAT3-decoy ODN 進入乳癌細胞株 MCF-7 當中，針對不同濃度及不同比例去探討此系統對於 MCF-7 的影響，我們會從藥物輸送效率、藥物作用時間關係、細胞的存活率、基因表現量、細胞型態改變與否及細胞凋亡的進程做完整的探討。我們亦會研究微脂體的物理性質，諸如：粒徑大小、表面電荷數與核苷酸攜帶量這幾個面向來做分析與比較。

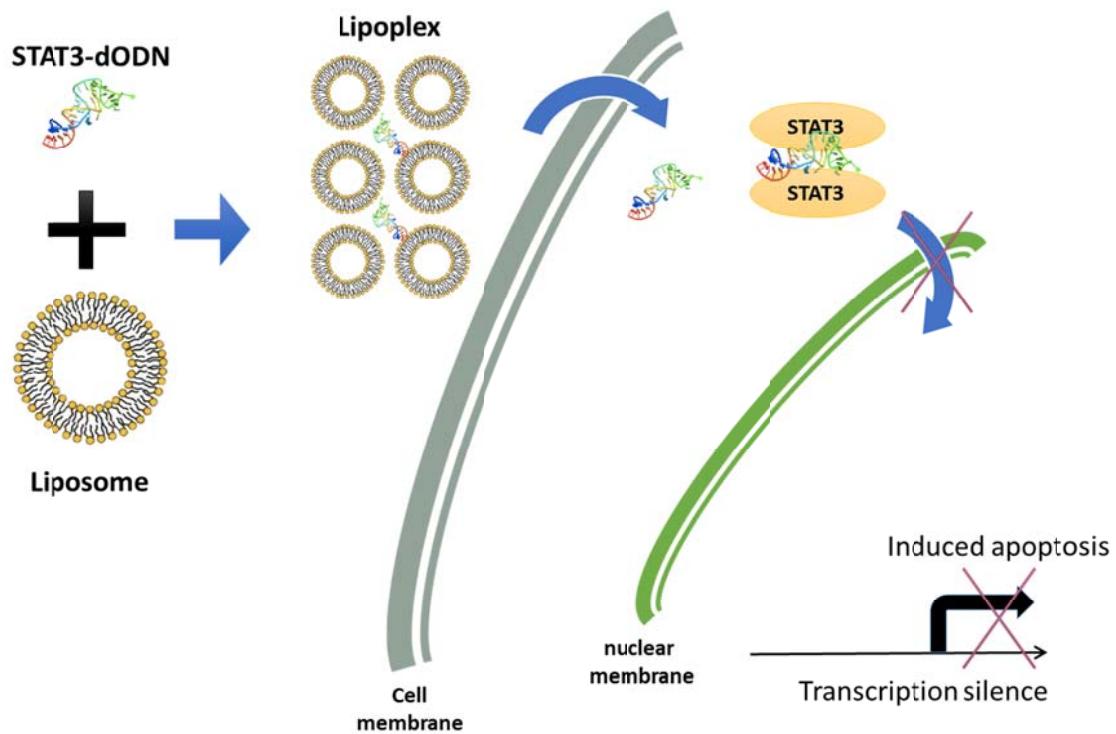


圖 1.2 實驗計畫

利用帶正電微脂體與 STAT3-dODN 結合後將之輸送至 MCF-7 細胞內使得 STAT3 的下游基因無法轉譯進而造成細胞的死亡



#### 1.4. 實驗架構

為利用均一粒徑的微脂體輸送 STAT3-dODN 進入乳癌細胞 MCF-7 當中，首先我們會製備粒徑均一的微脂體並分析其所能攜帶的藥物量和其物理性質間的關係，並挑選不同比例所形成的脂質複合物進行藥物輸送的實驗，探討對於細胞存活率及基因表現量的影響。本實驗的架構如流程圖 1.3 所示：

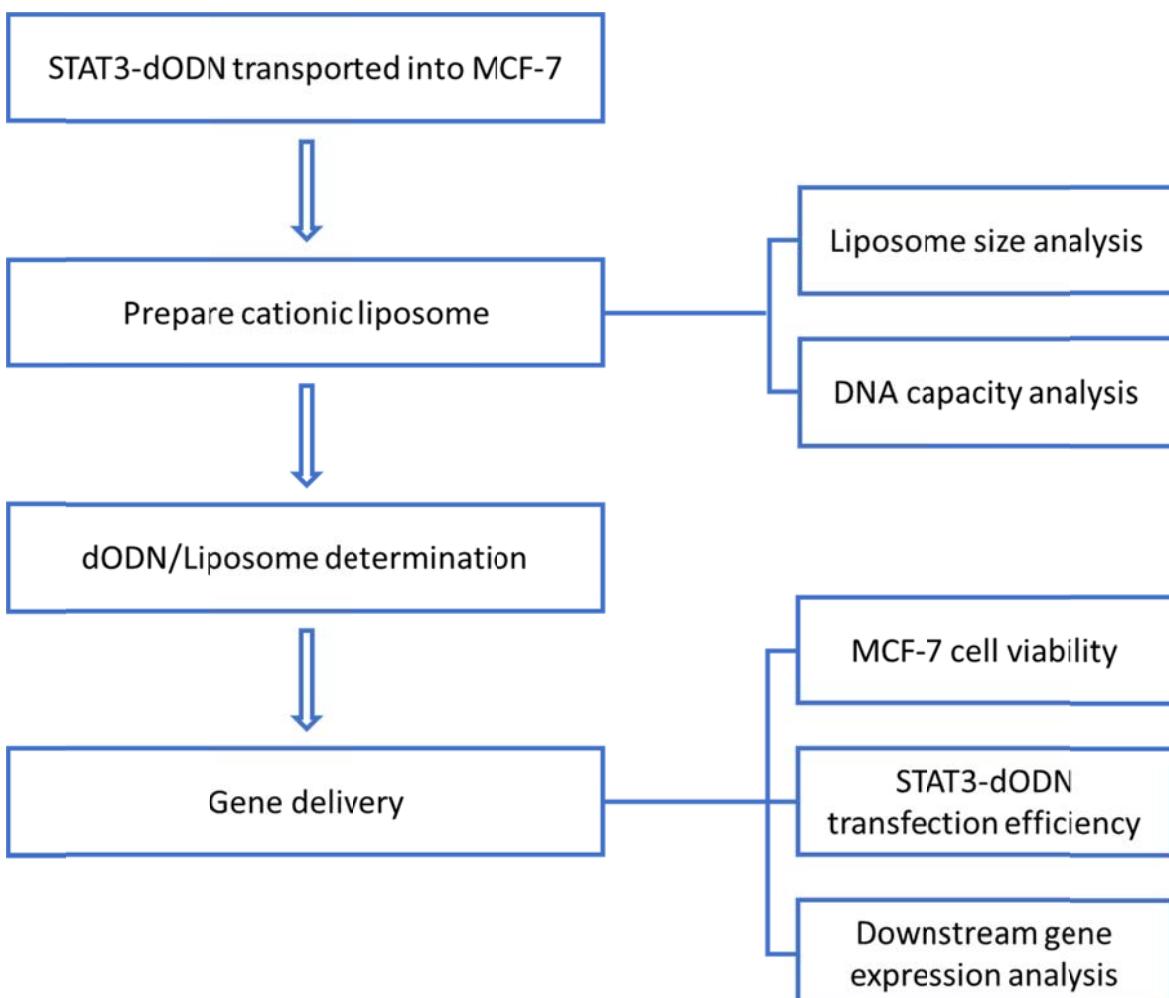


圖 1.3 實驗架構



## 第二章 文獻回顧

### 2.1. 訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 與乳癌的關係

暨心臟病及肺癌之後，乳癌細胞攀上了全球婦女致死率的第三名，在乳癌的治療上科學家們至今已經有十足的進展，諸如以病人賀爾蒙受體的狀態分辨乳房疾病特徵；釐清遺傳基因的異常機制以及評估病人發生轉移的風險(Evans, Skrzynia et al., 2005; Chen and Colditz, 2007)。其次，了解每個病人體內因子(molecular factors)的改變將能夠提供更有效率的治療方式。雖然乳癌的致死率已經逐年的下降，但是對於此癌症若能有更進一步的認識將能夠更進一步的提升每位患者的存活率，我們仍然對於許多會造乳癌腫瘤增生的因子還未有清楚的理解，像是訊息傳遞及轉錄激活蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)即為一個例子，訊息傳遞及轉錄激活蛋白在極多比例的乳癌患者及其他疾病上被發現(Yu and Jove, 2004; Haura, Turkson et al., 2005; O'Sullivan, Liougue et al., 2007)，為了能找到更有效率及更貼近乳癌患者需求的治療方法，故此我們有需要將此一蛋白在我們體類的機制做清楚的了解。

訊息傳遞及轉錄激活蛋白為轉錄因子家族的其中一員，分別調控著許多下游基因的活化，並且與細胞生長、分化及存活有密切的關係(Bowman, Garcia et al., 2000)，這些蛋白一般在細胞質中以非活化的單體存在，當其酪氨酸(tyrosine)被磷酸化時此蛋白及被活化，磷酸化後的訊息傳遞及轉錄激活蛋白會傾向於結合成同源的蛋白二聚體(homodimer) 或與其他的訊息傳遞及轉錄激活蛋白形成異源二具體(heterodimer) (Ihle, 2001)，形成二聚體的訊息傳遞及轉錄激活蛋白能夠通過核膜並且活化許多基因的轉錄反應(Ihle, Witthuhn et al., 1995; Darnell Jr, 1997)，如今在哺乳類中發現的訊息傳遞及轉錄激活蛋白總共有七個(Copeland, Gilbert et al.,



1995; Ihle, 2001)，而訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)為此家族中主要且與許多的癌症有密切關聯的一員(Bromberg, Wrzeszczynska et al., 1999; Bowman, Garcia et al., 2000)，訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 的活化會使得細胞週期不斷地進行、阻止細胞進入細胞凋亡(apoptosis)的過程、提升血管生成的效率、產生免疫逃避(immune evasion)的機制並造成腫瘤的侵入及轉移(Bowman, Garcia et al., 2000; Yu and Jove, 2004)，這些特徵皆與癌症的形成息息相關(Hanahan and Weinberg, 2000)，除此之外，訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 也會導致下游的細胞激素(cytokines)被活化，例如會造成腫瘤生成的血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)即為一例(Yeh, Lai et al., 2006)。

從過去的報導中發現，許多腫瘤的生成皆與訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 的持續活化有十分密切的關係(Bromberg, Wrzeszczynska et al., 1999; Buettner, Mora et al., 2002)；而且，在許多乳癌病人及乳癌細胞株中也有如此的特徵，但是在正常的乳房上皮細胞中訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 並不會被表現(Watson and Miller, 1995; Garcia, Yu et al., 1997; Bowman, Broome et al., 2001)，更甚者，訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 在乳癌當中被磷酸化的比例極高(Garcia, Yu et al., 1997)，而已受體活化(Receptor-mediated activation)的訊息傳遞及轉錄激活蛋白如訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 及 5 在體內實驗及體外實驗皆會發生乳癌細胞癌化的現象(Clevenger, 2004)，基於以上的論述，了解訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 活化所造成的現象後，研究此一蛋白的調控或許能夠幫助我們預防及治療乳癌腫瘤的發生。

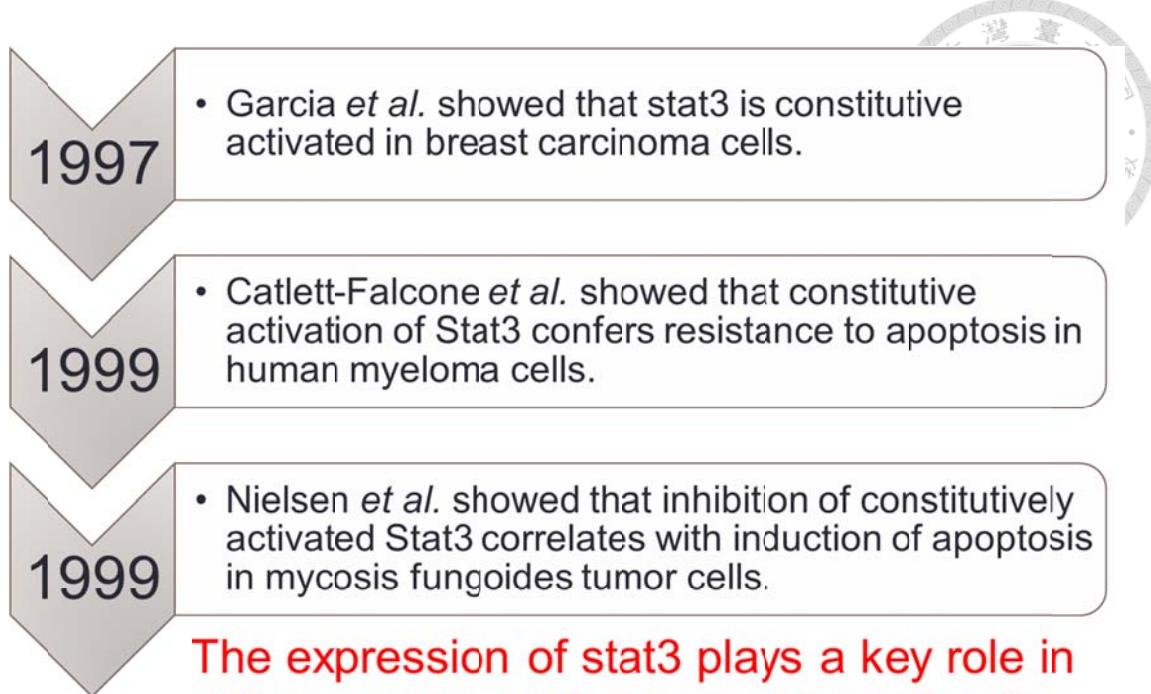


圖 2.1 訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 與癌症關係的重要發現



## 2.2. 使用 decoy-ODN 調控訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 的表現量

目前已有許多的策略能夠抑制訊息傳遞及轉錄激活蛋白的作用，包括以訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 的辨識序列的反股將其序列預先鍵結、以無法磷酸化或無法與 DNA 鍵結的訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 突變序列抑制二聚體的形成與 DNA 的鍵結(Nakajima, Yamanaka et al., 1996; Rubin Grandis, Drenning et al., 1998; Li and Shaw, 2002)、抑制上游的磷酸化酵素(Fry, Kraker et al., 1994; Turkson, Bowman et al., 1999; Kraker, Hartl et al., 2000)或是送入一段能磷酸化的氨基酸序列使訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 無法磷酸化(Turkson, Ryan et al., 2001)；當中還有另外一項策略令人感興趣，即是利用一段能與訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 結合的序列阻止其與轉錄為結合，這樣的序列我們稱為 decoy oligodeoxynucleotides (dODN)，這樣的一段序列是與訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 在轉錄結合位上的序列類似的一段，當這樣的序列在細胞中達一定濃度後，訊息傳遞及轉錄激活蛋白 3 與轉錄結合位的序列結合能力就會降低，如此即能達到調控基因表現的目的(Nabel, Plautz et al., 1990)，而這樣的策略已經應用在抑制訊息傳遞及轉錄激活蛋白 6 的活化上面(Wang, Yang et al., 2000)。

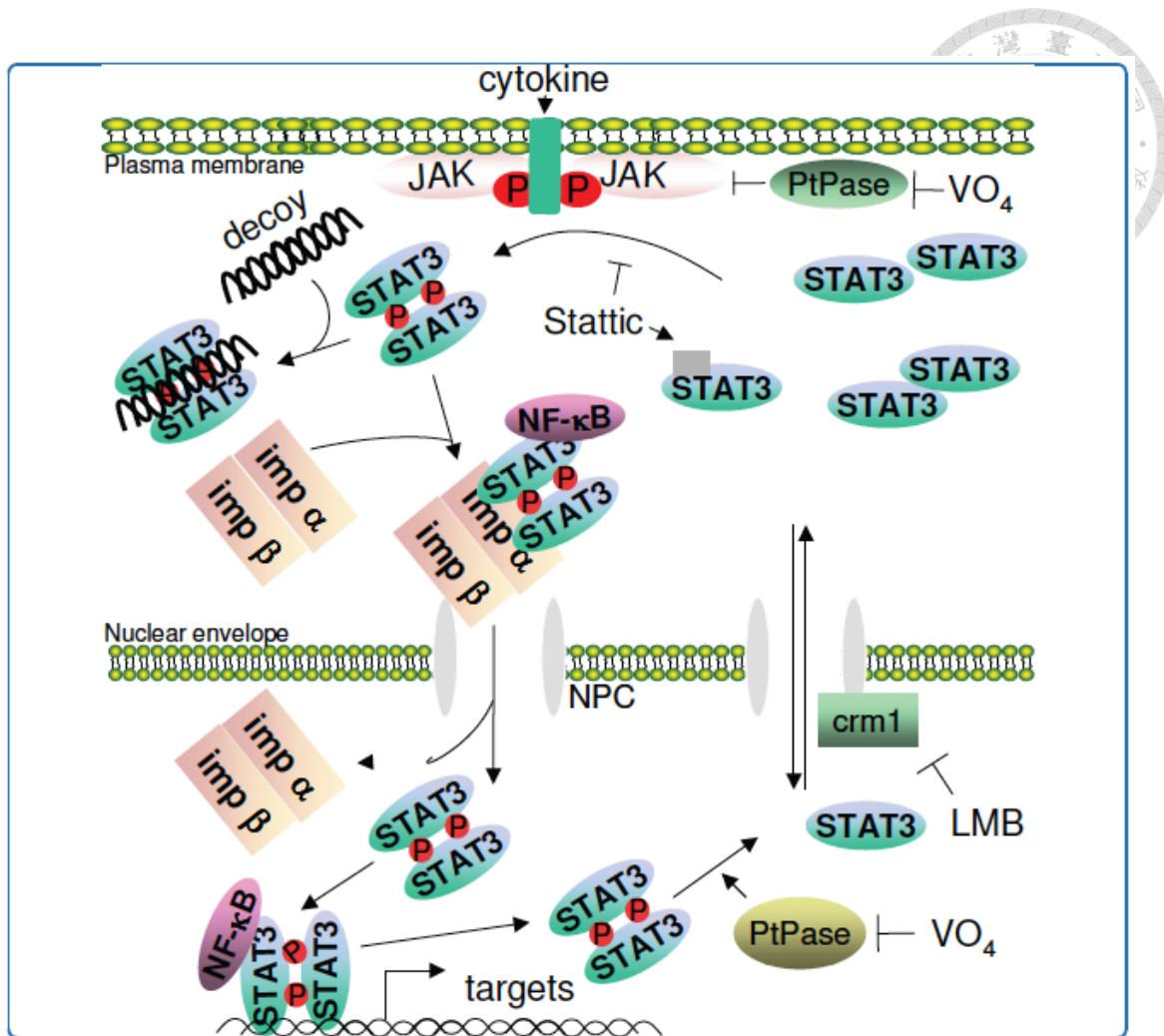
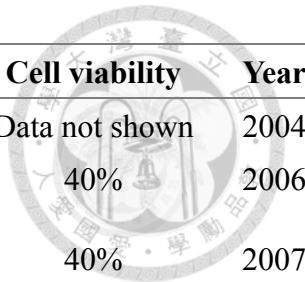


圖 2.2 文獻中所提出的 STAT3-dODN 作用示意圖

(Souissi, Najjar et al., 2011)

此圖顯示了細胞內部 STAT3 的作用機制，當細胞接受到特定細胞激素實未活化的 STAT3 將被磷酸化成活化態並且以二聚體的方式存在；STAT3 的二聚體將會經由 importin 輸送至細胞核中並與特定的序列結合使得下游基因被啟動。而當 STAT3-decoy ODN 存在時，活化的 STAT3 二聚體會與 dODN 結合而無法藉由 importin 進入至細胞核中，使得下游基因被關閉。



Author	Target	Transfection reagent	Cell viability	Year
Börner	SH SY5Y, human neuroblastoma cell line	Cycloheximide	Data not shown	2004
Sun	SHZ-88, rat breast carcinoma cell line	Lipofectamine	40%	2006
Lui	PCI-37A, 1483, PCI-15B, UM-22A, UM-22B, head and neck squamous cell carcinoma cell lines	Lipofectamine Optifect	40%	2007
Liu	B16, murine melanoma cell line	Lipofectamine	14%	2007
	MCA-38, murine colon adenocarcinoma cell line			
Gu	human glioma U251 and A172 cell lines	Lipofectamine	33%	2008
Shen	U251, human glioma cell lines	--	Data not shown	2009
Souissi	SW 480, human colon adenocarcinoma cell line	TEAPC-Chol/DOPE	40%	2011
Sen	T24 bladder cancer cell line, UM-SCC1 and UM-22B <b>Phase 0 clinical human trial in Head and Neck Tumors</b>	--	Data not shown	2012
Jung	Primary human macrophages	JetPei transfection reagent	Data not shown	2012
Geinguenaud	SW 480, human colon adenocarcinoma cell line	$\gamma$ Fe2O3 nanocrystals	Data not shown	2012
Busch-Dienstfertig	Male Wistar rats	Lipofectamine	Data not shown	2012
<b>This work</b>	<b>Human breast cancer cell line, MCF-7</b>	<b>DOTAP/DOPE</b>	<b>50%</b>	<b>2014</b>

表 2.1 以 STAT3-dODN 做藥物輸送的文獻整理



### 2.3. 以微脂體作為藥物輸送的載體

在選擇藥物輸送的載體時，微脂體是個總是會拿來作嘗試的其中之一，當這類的脂霜層結構在 1965 年被發現(Bangham, Standish et al., 1965)，並以微脂體為之命名，因為具有親水的腔室故其能夠在內部攜帶親水性的物質；故此藥物能夠被微脂體包覆而能夠提供一個媒介將之送入細胞中。因為微脂體具有和細胞膜相似的構造，因此以微脂體作為藥物的載體具有低毒性及以及低免疫反應的優點並且能夠攜帶如 DNA、RNA 和蛋白質這類帶負電的聚分子進入細胞(Bangham, Standish et al., 1965; Gregoriadis, 1988; Ledley, 1995)；在這之前要將此類聚分子送入細胞的效率都未盡理想，且各樣的個案都有著差異性存在，對於體內的運送或是體位的運送都存在著許多的困難點，而陽離子微脂體的發現在基因的輸送上具有很好的效果，不過在組織體中的輸送卻也是未盡理想(Bertling, Gareis et al., 1991; Legendre and Szoka Jr, 1992)，因為微脂體會被網狀內皮系統(Reticuloendothelial system, RES)清除(Alving, Steck et al., 1978; Fidler, Raz et al., 1980; Poste, Bucana et al., 1982)，因此要將微脂體輸送至特定的組織當中會有些許的困難，所以如何增進組織的輸送效率即是這一領域的主要課題。

一開始的微脂體是利用中性與帶負電的脂質所構成，但是此組成的微脂體在藥物的輸送效率上並不是那麼的理想(Schaeffer-Ridder, Wang et al., 1982; Nicolau, Le Pape et al., 1983)；直到在 1987 年，Felgner et al. 團隊發展出了一套以陽離子微脂體作為藥物輸送的平台(Felgner, Gadek et al., 1987)；利用陽離子脂質所帶的正電與帶負電的 DNA 以靜電力結合並和中性的輔助脂質做混和，如此能將 DNA 包覆於四個微脂體之間，若 DNA 為超螺旋結構則能包覆的更加緊密；以上述的脂質複合物做藥物輸送時能夠大大的提高藥物輸送的效率(Felgner, Gadek et al., 1987)；早期認為帶正電的微脂體能有較好的藥物輸送效率是因為其能夠與細胞膜



融合，不過後來發現是由於細胞的吞噬作用使得效率提升。

帶正電微脂體雖然能夠增進藥物輸送的效率，但其致命的缺點是其對於細胞居相當大的毒性，因此許多的陽離子脂質被合成出來以期能夠增進藥物輸送的效率並且降低其對於細胞的毒性，至此，基因輸送的效率因著帶正電微脂體的出現而大大的提升，不過利用帶正電微脂體還是無法解決在組織中較低的輸送效率，因為陽離子脂質會造成血清的帶負電的蛋白質沉澱，因此目前在組織的藥物輸送上仍有能夠進步的空間。



#### 2.4. 不同比例的微脂體與藥物所形成之脂質複合物的輸送效率探討

在 2004 年, Ciani *et al.* 發表了一篇論文主題為比較不同比例的微脂體與 DNA 其表面電位的關係，當中使用了兩種不同的微脂體(DOTAP/DOPE 與 DC-Chol/DOPE)以及兩種不同序列的 DNA(polyA 與 polyT)。這篇論文探討了不同微脂體與單雙股 DNA 以不同比例混和後其表面電位的改變，結果如圖 2.3 所示，當 DOTAP/DOPE 與 DC-Chol/DOPE 單獨存在時，其表面電位分別為  $+48 \pm 5$  與  $+39 \pm 4$  mV，其中以 DOTAP/DOPE 與 polyA 或 polyT 之單股結合時，其表面電位約在電荷比 0.5 的時候到達中性點；而 DC-Chol/DOPE 與 polyA 或 polyT 之單股結合時，其表面電位的中性點出現在電荷比 0.15 與 0.3 時；而當 DC-Chol/DOPE 與 polyA/polyT 之雙股股結合時，其表面電位約在 0.4 時到達中性點。此篇論文顯示出了脂質複合物的表面電位與微脂體和 DNA 之間的比例關係，當 DNA 對微脂體的比例越高時，其表面電位就會下降，約在 0.15~0.5 之間達到中性點，比例的差異隨使用的微脂體與 DNA 序列不同而變化。

而在 2008 年, Rosa *et al.* 發表了一篇以兩種不同的脂質與膽固醇(DE, DOPE, chol)製作出四種不同的微脂體(DE, DE/DOPE, DE/chol, DE/DOPE/chol)並且探討上述四種微脂體運送 NF- $\kappa$ B decoy ODN 的效率及脂質複合物的物理性質，他們發現比不同比例 DNA 與微脂體混和出的脂質複合物具有不同的藥物輸送效率，並且其效率並不一定與比例呈現正相關(圖 2.4)，顯示出不同微脂體攜帶不同藥物的最佳輸送比例並不一定相同，會隨著個案而變化。

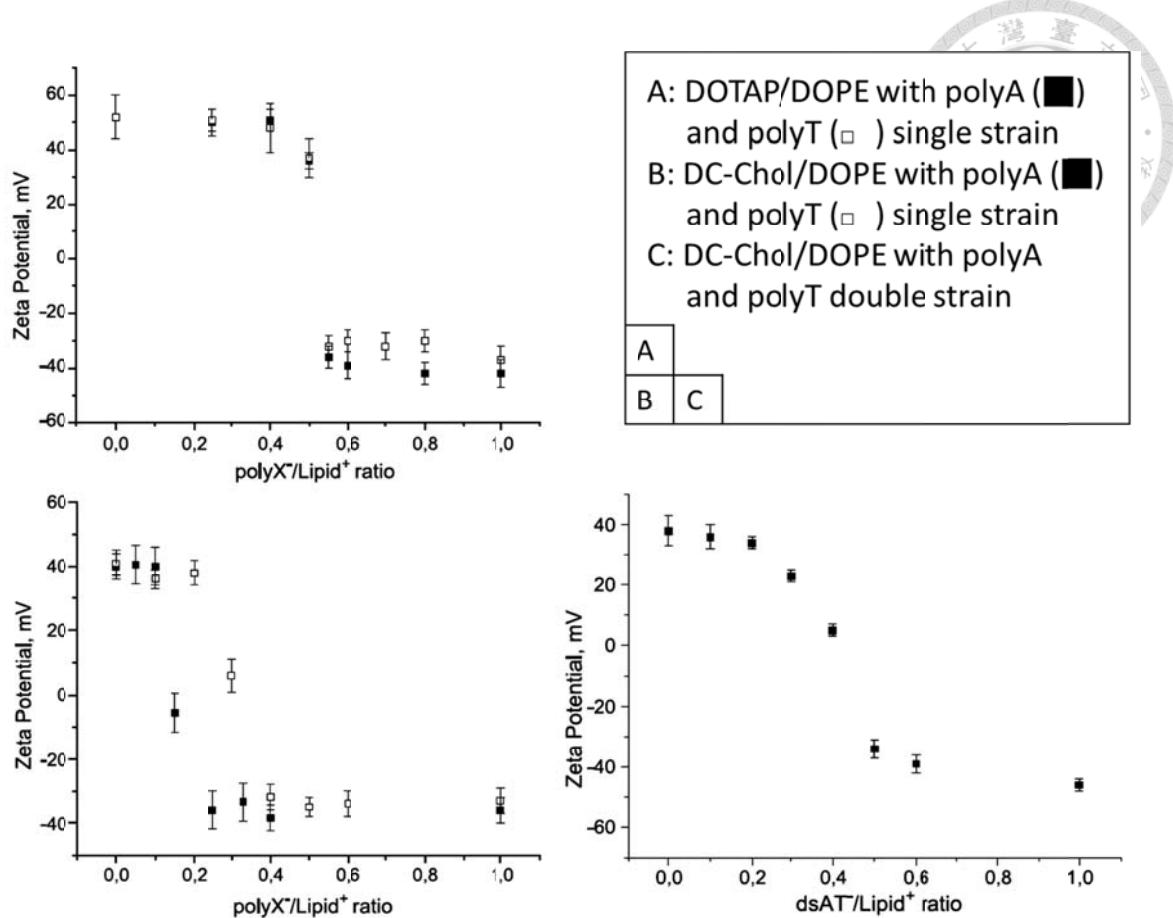


圖 2.3 不同微脂體與不同序列之 DNA 對脂質複合物表面電位

所造成的影响

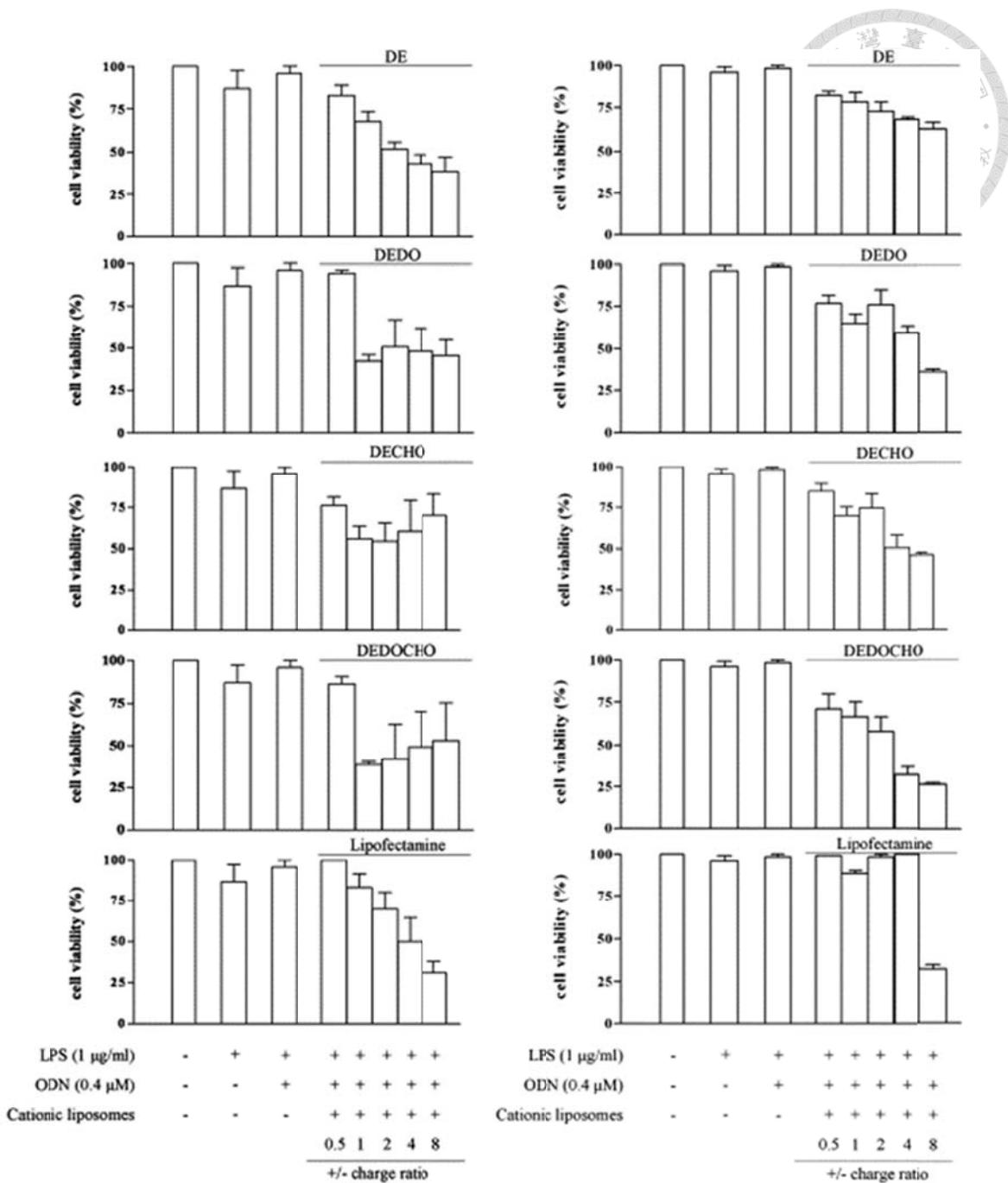


圖 2.4 不同微脂體依不同比例與 NF- $\kappa$ B decoy ODN 形成脂質複合物後對

RAW 264.7 細胞的存活率的影響

### 第三章 材料與方法



#### 3.1. 使用儀器與藥劑

##### 3.1.1. 材料

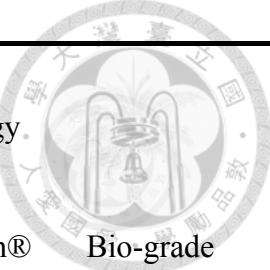
本實驗所使用到之所有藥劑與化學物皆列於表 3.1.1，使用之藥品皆符合 A.C.S.的藥品規範，細胞相關之實驗藥品皆為生物試劑等級，所有的水溶液皆以超純水配置。

表 3.1 本實驗所使用之藥品

Reagent	Manufacturer	Specification
DNA primer	iDT	OPC
Cell culture medium, MEM-α	Gibco	500 ml
Penicillin/streptomycin 100X	amresco	100 ml
Phosphate buffered saline, PBS	Life technology	500 ml
Trypsin	Life technology	
1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP (chloride salt)	Avanti Polar Lipids	Chloroform
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE	Avanti Polar Lipids	Chloroform
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES	Sigma-Aldrich®	
Polycarbonate Membrane	Avanti Polar Lipids	50nm & 100nm
Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit	Qiagen	
Human breast carcinoma cell line, MCF-7	BCRC	

表 3.2 本實驗所使用之藥品(續)

---

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT	Life technology.	
Dimethyl sulfoxide, DMSO	Sigma-Aldrich® Bio-grade	
4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI	Life technology	
Propidine iodide, PI	Life technology	
Annexin V, Alexa Fluor® 555 Conjugate	Life technology	
Annexin V binding buffer	Life technology	
Trypan blue	Life technology	
Fetal bovine serum, FBS	Life technology	
RNeasy Mini Kit	Qiagen	
SuperScript® III First-Strand Synthesis System	Life technology	

---

### 3.1.2. 儀器

本篇論文所使用到的儀器詳列如下：

表 3.3 本實驗所使用到之儀器整理



Instrument	Company	Model
Clean bench	HIGH TEN	4BH-24
Auto-clave	TOMIN	-
Auto-pipet	High Tech Lab	SWIFTPET
Pipement	RAININ	LTS series
PCR machine	Applied Biosystems	2720
Precision balancer	Mettler-Toledo	AB104
Microwave oven	RCA	700W
Power supply	Major Science	MP-300V
Gel image system	DigiGel	UV2020(306nm)/DGIS-8
Shaker	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Centrifuge	Beckman Coulter	Microfuge 18
Biological safety cabinet	Thermo	
CO <sub>2</sub> incubator	Thermo	Forma™ 310 Direct Heat CO <sub>2</sub> Incubators
Confocal Microscopes	Leica	Leica TCS SP5 II
Flow cytometer	Beckman	Coulter fc500
Zetasizer	Malvern Instruments	Zetasizer 2000
Extruder Set With Holder/Heating Block	Avanti Polar Lipids	

表 3.4 本實驗所使用到之儀器整理(續)

---

qPCR machine	Qiagen	Rotor-Gene Q
ELISA reader	Molecular Devices	Spectra Max
NanoDrop	Thermo	ND-1000
Counting Chamber	Marienfeld	
96 well culture plate	Corning	

---



### 3.2. STAT3-dODN 與核酸引子

本論文所使用的核酸引子皆為每得科技所代理之 Integrated DNA Technologies (iDT) 之產品，所使用到的核酸引子及 STAT3-dODN 詳列如下：

**表 3.5** 本實驗所使用到之寡核苷酸及引子整理

STAT3-dODN	CATTTCCCGTAAATCGAAGATTACGGGAAATG	33 mers
STAT3-SCR	ATATGTCTCTTAATTGTTAGTCCATGATCTCAGT TG	33 mers
Survivin-F	AGAACTGGCCCTTCTGGAGG	175 bps
Survivin-R	CTTTTATGTCCTCTATGGGGTC	
GAPDH-F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452 bps
GAPDH-R	TCCACCACCCCTGTTGCTGTA	
Bcl-2 F	CTTGAGTCGGTGGGTCA	162 bps
Bcl-2 R	GGGCCGTACAGTCCACAAA	
Bcl-xl F	CCTTGCCCTAACGGCGGATTG	173 bps
Bcl-xl R	CCCGGTTGCTCTGAGACATT	
Cyclin-D1 F	GTTGCAAAGTCCTGGAGCCT	200 bps
Cyclin-D1 R	CACAGGAGCTGGTGTCCAT	
Cyclin-D2 F	CTGACTGAGCTGCTGGCTAA	190 bps
Cyclin-D2 R	CTCACAGGTCGATATCCCGC	
Myc F	CATCAGCACAACTACGCAGC	120 bps
Myc R	GCTGGTGCATTTCGGTTGT	

### 3.3. 微脂體製備

將 DOTAP 和 DOPE 以 1:1 的比例混合並用氮氣乾燥 30 分鐘再利用抽氣幫浦抽真空 30 分鐘，之後加入 20mM HEPES 水溶液均勻搖晃一小時使微脂體回溶至 10mM 的濃度。利用注射針筒將回溶之微脂體擠壓通過特定孔洞的聚碳酸酯膜二十次後即可得到粒徑較均一的微脂體。

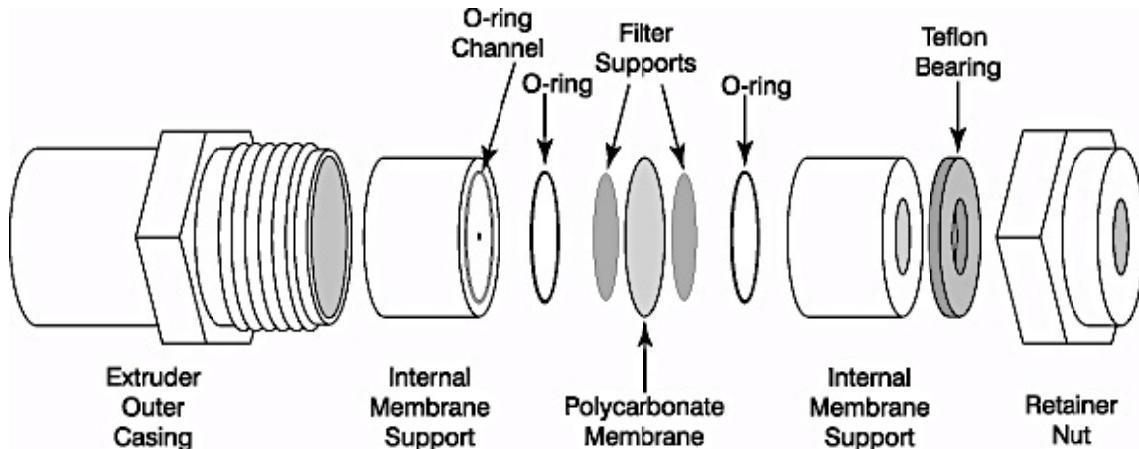


圖 3.1 篩選儀器示意圖 (Avanti Polar Lipids)



圖 3.2 微脂體擠壓操作示意圖 (Avanti Polar Lipids)



### 3.4. 表面電位及粒徑大小

將微脂體稀釋至 2 mM 測量粒徑大小，是利用雷射光對於粒子的散射程度來做判定。將不同比例的微脂體與 STAT3-dODN 混合後，配置成 0.2mM 測量其表面電位。表面電位的取得為測量其粒子在電場下的泳動率換算而得。

### 3.5. 細胞培養

將人類乳癌細胞株以 MEM- $\alpha$  ( Minimum Essential Medium  $\alpha$  ) 培養，培養細胞的 MEM- $\alpha$  中會加入 10 % ( v/v ) 胎牛血清 ( fetal bovine serum, FBS ) 及 100 IU/mL 的抗生素 ( penicillin/streptomycin )。細胞以十公分培養盤培養三到四天後更換培養液，約八成滿之後進行繼代培養。

### 3.6. 細胞繼代培養

將十倍胰蛋白酶 ( trypsin ) 以磷酸緩衝水溶液稀釋。細胞以 3 ml 磷酸鹽緩衝溶液清洗兩次，加入 1 ml 胰蛋白酶 ( trypsin ) 並於 37°C 培養箱培養 3-5 分鐘 ( 視細胞脫落狀況而定 )，再加入 1 ml 培養液終止反應，將細胞吸出以每分鐘 800 轉離心五分鐘使細胞沉降，在加入新的培養盤中繼續培養

### 3.7. 細胞計數

將從培養盤上脫離下來的細胞以每分鐘 800 轉離心五分鐘後加入 1 ml 培養液分散均勻；取 10  $\mu$ l 含有細胞的培養液與 100  $\mu$ l trypan blue 混和均勻後，以血球計數盤計量所含有之細胞。



### 3.8. MTT assay

以 5 ml 磷酸鹽緩衝水溶液回融 5 mg MTT；將  $3.2 \times 10^4$  的 MCF-7 種至 96 孔盤中培養一天後，將培養液移除並置換成不含胎牛血清的培養液再培養一天後，以適當濃度的 STAT3-dODN/微脂體複合物施予細胞，經過適當投藥時數後，以 PBS 清洗兩次並加入新的不含胎牛血清的培養液 50  $\mu$ l 並於當中加入 5  $\mu$ l MTT，反應 2 小時後吸除 25  $\mu$ l 的培養液並加入 50  $\mu$ l DMSO，37°C 反應十分鐘後利用 ELISA reader 測量其 540 的吸收值。

### 3.9. RNA 萃取

將  $4 \times 10^5$  的 MCF-7 培養於 12 孔盤一天後，將培養液移除並置換成不含胎牛血清的培養液再培養一天後，以適當濃度的 STAT3-dODN/微脂體複合物施予細胞，經過一天的投藥後，以 PBS 清洗兩次，用 RNeasy mini kit 萃取出細胞的 mRNA，並利用 nanodrop 進行定量。

### 3.10. 逆轉錄聚合酶鏈式反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

將萃取而得的 mRNA 以 SuperScript® III First-Strand Synthesis System 反轉錄成 cDNA。流程詳述如下：



<b>Denature</b>	RNA + primer + dNTP (10μl) 65°C for 5 min	<b>cDNA synthesis mix</b>
	↓	
	Chill on ice for 1 min	10X RT buffer 2
	↓	25 mM MgCl <sub>2</sub> 4
<b>Anneal</b>	Add 10μl cDNA synthesis mix	0.1 M DTT 2
	↓	RnaseOUT 1
<b>cDNA synthesis</b>	50°C for 50 min	SuperScript® III RT 1
	↓	
<b>Terminate reaction</b>	85°C for 5 min	<b>total</b> 10μl
	↓	
<b>Remove RNA</b>	Add 1μl of RNase H 37°C for 20 min	
	↓	
	cDNA template	

圖 3.3 逆轉錄聚合酶鏈式反應流程圖

### 3.11. 即時聚合酶鏈鎖反應 (quantitative real time polymerase chain reaction ,

#### RT-qPCR)

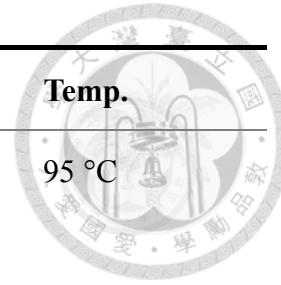
利用獲得的 cDNA 做特定基因的表現量檢測, PCR 片段之引子如表 3.2 所述，  
我們利用 Rotor-Gene Q 及 Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit 來偵測特定基因的表  
現量，配方及流程如下表所述：

表 3.6 即時聚合酶鏈鎖反應配方

Component	Volume
2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	3.8 μl
Forward primer (100μM)	0.06 μl
Reverse primer (100μM)	0.06 μl
Template DNA	1 μl
RNase-free water	6.08 μl
<b>Total</b>	<b>11 μl</b>

表 3.7 即時聚合酶鏈鎖反應流程

Step	Time	Temp.
PCR initial activation step	5 min	95 °C
Two-step cycling		
Denaturation	5 s	95 °C
Annealing & extension	10 s	60 °C
Number of cycles	40	





### 3.12. 流式細胞術 (flow cytometry)

將  $10^6$  的 MCF-7 培養於 6 孔盤一天後，將培養液移除並置換成不含胎牛血清的培養液再培養一天後，以適當濃度的 STAT3-dODN/微脂體複合物施予細胞(本實驗當中的 STAT3-dODN 為五端修飾 FAM 之序列)，經過一天的投藥後，以 PBS 清洗兩次，用胰蛋白酶將細胞從培養盤上脫除放入微量離心管並加入含胎牛血清之培養基後離心，倒去上清液後加入 annexin-V binding buffer 200  $\mu\text{l}$  並將細胞分散均勻；在各管中加入 10  $\mu\text{l}$  annexin V-555 與一滴 PI 的試劑，以震盪機震盪 30 分鐘後再加入 800  $\mu\text{l}$  annexin-V binding buffer 並用流式細胞儀測定細胞的型態以及各螢光的強度。

### 3.13. 共軛焦顯微鏡 (confocal microscope)

放入已滅菌之蓋玻片於孔盤中，將  $10^6$  的 MCF-7 培養於 6 孔盤一天後，將培養液移除並置換成不含胎牛血清的培養液再培養一天後，以適當濃度的 STAT3-dODN/微脂體複合物施予細胞(本實驗當中的 STAT3-dODN 為五端修飾 FAM 之序列)，經過一天的投藥後，以 PBS 清洗兩次，加入 1 ml 不含胎牛血清的培養基與一滴 DAPI 試劑並放入 37°C 培養箱中培養 15 分鐘後，將蓋玻片取出置於載玻片上，用火烤乾後以指甲油封片後，於共軛焦顯微鏡上拍攝螢光影像。

## 第四章 實驗結果



### 4.1. 微脂體的物理性質 - 粒徑與 DNA 最大可攜帶量

#### 4.1.1. 微脂體粒徑

我們利用 50 nm 及 100 nm 兩種不同孔徑的聚碳酸酯膜擠壓微脂體使之能夠呈現不同大小的粒徑分布，如圖 4.1 所示，量化數據則如表 4.1 所示。可以發現經過 100 nm 膜的微脂體的粒徑分布範圍較小，有較均一的粒徑大小平均粒徑約為 104.2 nm，而經由 50 nm 膜所得的微脂體粒徑分布較廣，粒徑差異性較大，平均粒徑為 75 nm，然其標準差帶寬寬度高達 109.6 nmol 高於 100 nm 膜的 74.8 nm；這兩種製備法所測得知表面電位差異不大；為了減少實驗的變因故此我們選擇以 100 nm 製備粒徑較均一的微脂體作為這次藥物輸送實驗的載體。

表 4.1 微脂體粒徑分布之量化數據

孔徑大小	avg. (nm)	peak (nm)	width (nm)	zeta (nm)
50 nm	75	95	109.6	42.3±2.6
100 nm	104.2	116.5	74.8	51.4±1.5

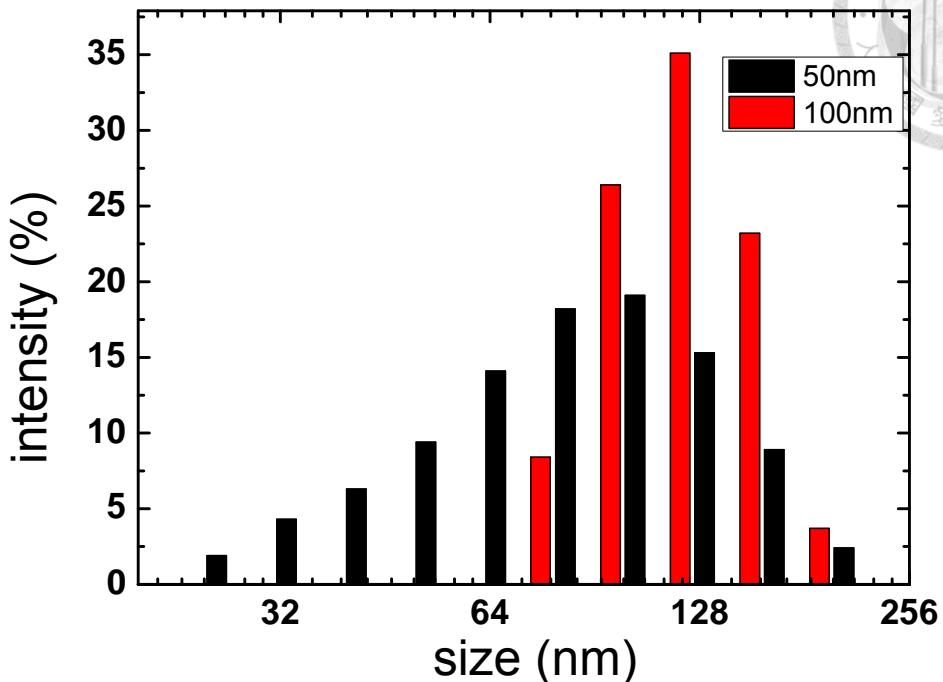
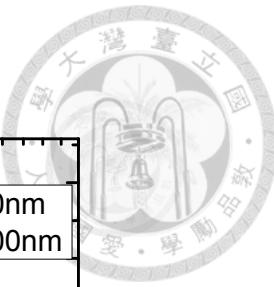


圖 4.1 微脂體的粒徑分布

紅色柱為擠壓通過 100nm 聚碳酸酯膜所得到的微脂體；黑色柱為擠壓通過 50nm 聚碳酸酯膜所得到的微脂體；可以發現由 100nm 孔洞所得的微脂體粒徑較集中而通過 50 nm 孔洞的微脂體粒徑較分散。

#### 4.1.2. 脂質複合物的 DNA 最大攜帶量

我們將不同比例的 STAT3-dODN 與微脂體形成脂質複合物，並測量其表面電位值(圖 4.2)，可以發現  $1\text{ }\mu\text{g}$  的微脂體約可攜帶  $0.6\text{ }\mu\text{g}$  至  $0.8\text{ }\mu\text{g}$  的 STAT3-dODN，此實驗結果與文獻相比較並無太大的差異，唯獨本實驗所測量到之數據在  $1\text{ }\mu\text{g}$  微脂體攜帶  $0.1\text{ }\mu\text{g}$  STAT3-dODN 後其表面電位即開始下降；文獻之數據至  $0.5\text{ }\mu\text{g}$  才有顯著的下降。

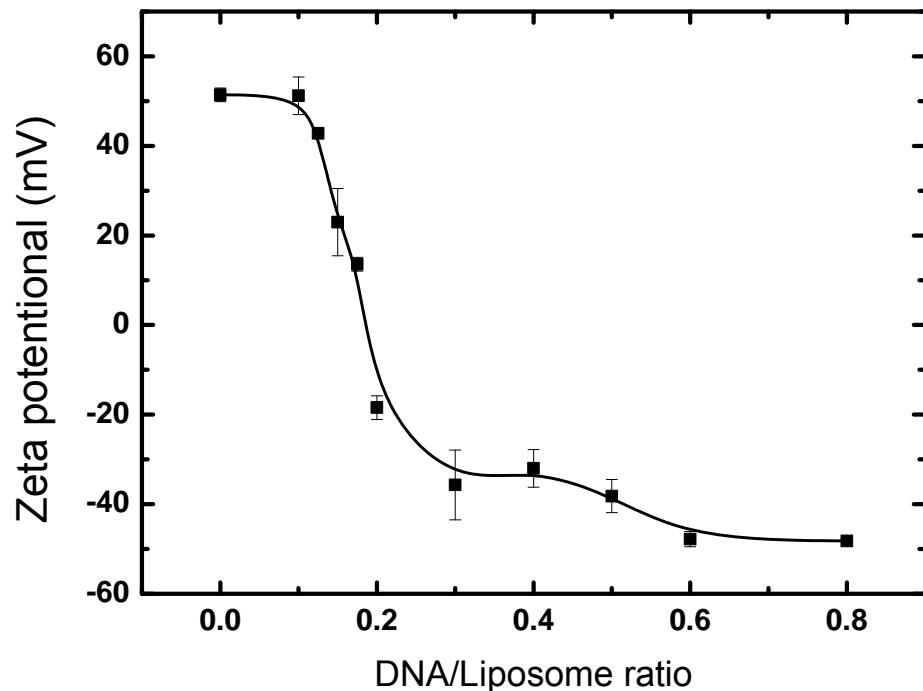


圖 4.2 脂質複合物與不同比例 DNA 表面電位的變化

DOTAP/DOPE 與 STAT3 形成的脂質複合物其表面電位的中性點約在 DNA 對微脂體比例為 0.2 時。



#### 4.2. 不同比例之脂質複合物對於細胞存活率之影響

我們分別以  $1\text{ }\mu\text{g}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g}$ 、 $16\text{ }\mu\text{g}$  的 STAT3-dODN 與  $32\text{ }\mu\text{g}$  的微脂體形成脂質複合物並將之作為藥物投藥與細胞三天，並以 MTT 觀察其細胞的存活率，由下面三張圖可以發現，當我們的微脂體攜帶將 STAT3-dODN 序列隨機排列所得之 STAT3-scr 序列時，細胞存活率十分的高，而單純只有微脂體的實驗組會有較高的死亡率，這表示微脂體所帶的正電荷會影響到細胞的存活率，而 DNA 所帶的負電荷能中和微脂體本身的毒性。

而由 STAT3-dODN 實驗組與對照組來看，由於對照組之序列片段送入細胞並不會影響其基因的表現量，因此其細胞的存活率並不受影響，而帶有 STAT3-dODN 的脂質複合物有可能影響了細胞的基因表現進而造成細胞的死亡；由圖 4.2.4、4.2.2、4.2.3 可以看出，當 STAT3-dODN 的初始劑量為  $16\text{ }\mu\text{g}$  及  $4\text{ }\mu\text{g}$  時都具有將細胞毒殺的效果，而原始劑量為  $1\text{ }\mu\text{g}$  時因為劑量太低的緣故所以可看出微脂體對細胞的毒殺性占較大的因素。

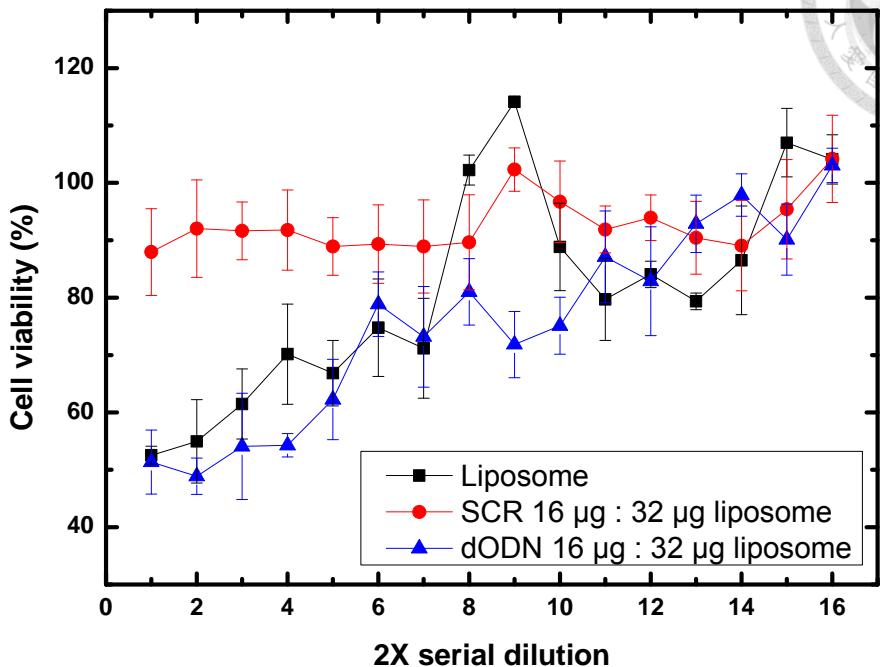
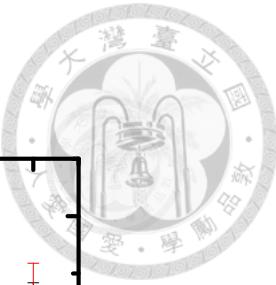


圖 4.3 STAT3-dODN 原始劑量為 16 μg 對細胞的毒殺性

將單純的微脂體投藥與細胞時會造成細胞的死亡，表示微脂體本身具有相當的毒性；將控制組的 DNA 與微脂體以比例 1:2 形成脂質複合物時，DNA 能中和微脂體帶有的毒性；因此將 STAT3-dODN 與微脂體形成脂質複合物後所造成的毒殺性為 STAT3-dODN 所造成。

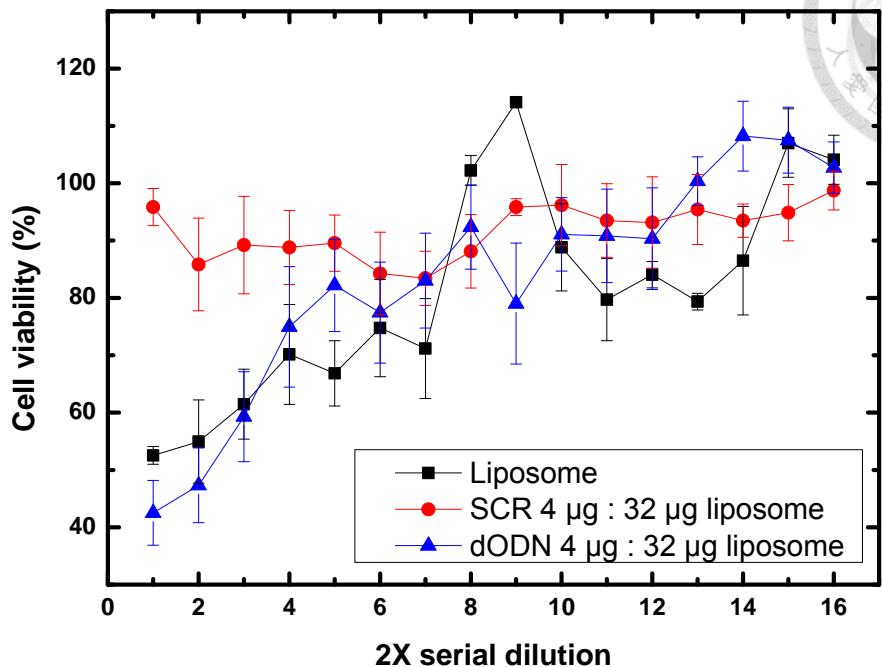
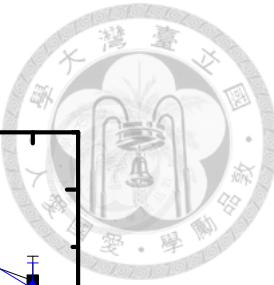


圖 4.4 STAT3-dODN 原始劑量為 4 μg 對細胞的毒殺性

將單純的微脂體投藥與細胞時會造成細胞的死亡，表示微脂體本身具有相當的毒性；將控制組的 DNA 與微脂體以比例 1:8 形成脂質複合物時，DNA 能中和微脂體帶有的毒性；因此將 STAT3-dODN 與微脂體形成脂質複合物後所造成的毒殺性為 STAT3-dODN 所造成。

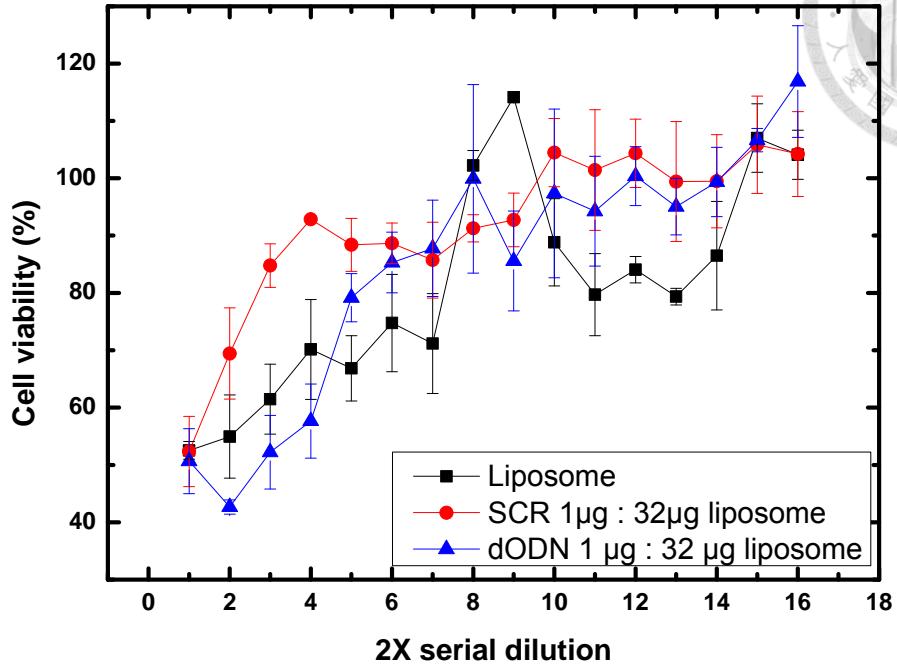
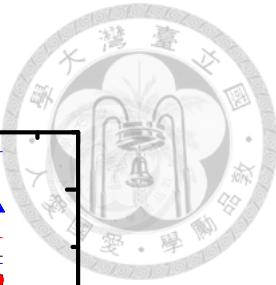


圖 4.5 STAT3-dODN 原始劑量為 1 μg 對細胞的毒殺性

將控制組 DNA 的比例降低至 1:32 後即會失去對微脂體毒性的保護作用，使得微脂體對細胞的毒殺性顯現出來



### 4.3. 時間對於脂質複合物毒殺細胞的影響

我們以 STAT3-dODN 原始劑量  $4\text{ }\mu\text{g}$  配置成脂質複合物，且以序列稀釋兩次及四次的濃度分別投藥與細胞，並在 6 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72 小時的時後分別測量細胞的存活性，結果如下圖所示。我們可以發現脂質複合物毒殺細胞與濃度和時間皆有正相關：濃度越大毒殺性越高，時間越長毒殺性也越高；由圖也可看出脂質複合物在 12 小時之內即發揮功效並且遲須作用至少三天，顯示其為一長效型的藥物。

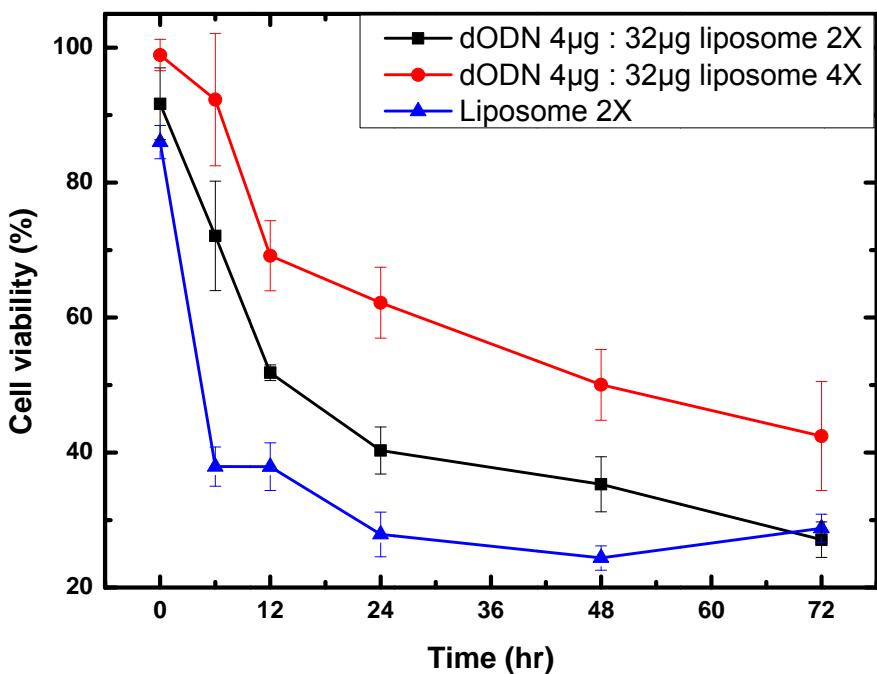


圖 4.6 時間對於脂質複合物毒殺細胞的影響

STAT3-dODN 的脂質複合物的誘導細胞凋亡能力與能度有關，稀釋兩倍的藥效比稀釋四倍的來的好。STAT3-dODN 的脂質複合物能在六小時內即發揮作用，並且藥效持續至少三天。



#### 4.4. 以流式細胞儀鑑定脂質複合物毒殺細胞之特性

由前述實驗我們可得知脂質複合物具有毒殺細胞的特性，故此更進一步的我們想要知道其機制是否為細胞凋亡(apoptosis)而非細胞壞死(necrosis)；我們將 STAT3-dODN 標記上 FAM 並且使用能標記細胞凋亡前期的專一性蛋白辨識染劑— annexin-V—還有能染到核膜的 PI 與經過脂質複合物處理過的細胞反應，並用流式細胞儀觀察細胞凋亡及細胞壞死的特徵，結果如下圖 4.7 所示。

綠色的點代表有成功送入 STAT3-dODN 的細胞，紅色的為未送入的細胞，四個象限的左下角為未發生凋亡或壞死的區間，左上角及右下角分別代表細胞壞死前期與細胞凋亡前期的區間，右上角代表細胞週期的末期。由圖 4.8 可發現成功送入 STAT3-dODN 的細胞壞死的情況較為嚴重，且到達末期的細胞也較多，顯示出 STAT3-dODN 對於細胞的影響十分的大，對照於圖 4.9 的對照組可發現對照組凋亡及壞死的細胞都相對少。

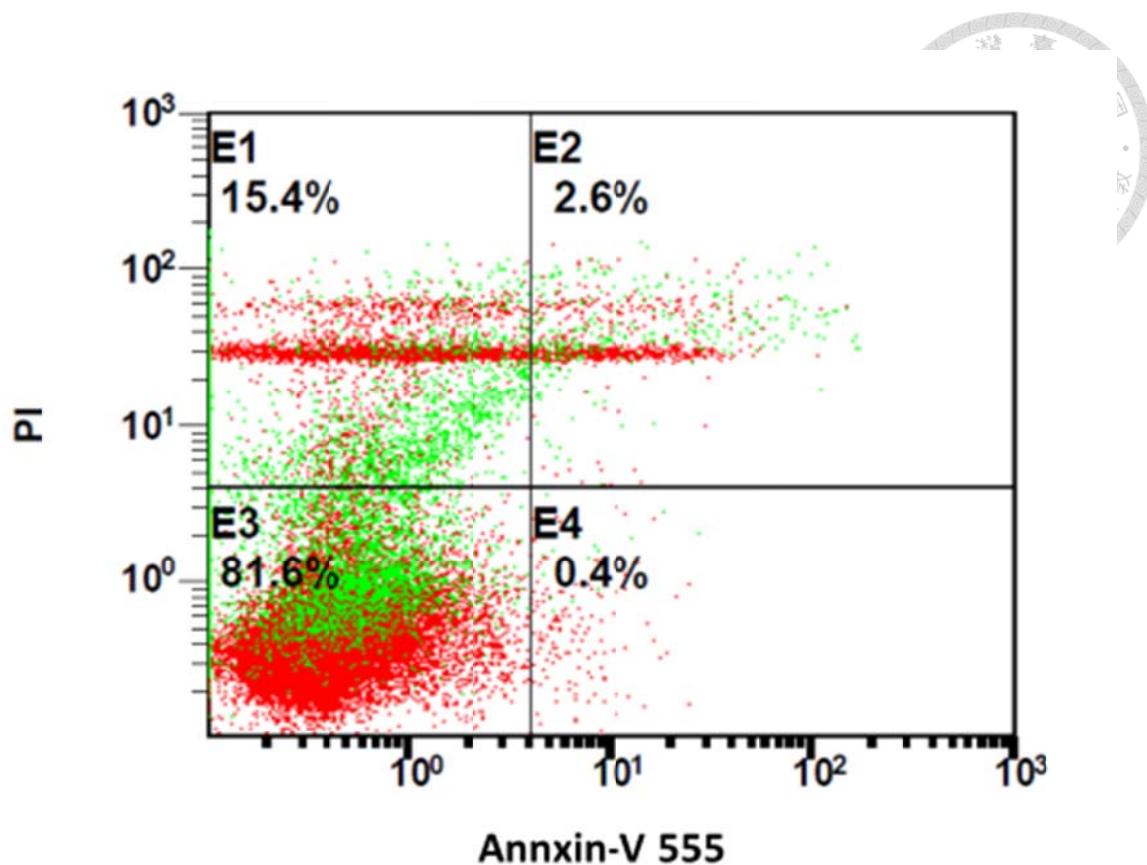


圖 4.7 MCF-7 以 STAT3-dODN 投藥後進行流式細胞儀分析的結果

綠色點為成功送入帶 FAM 螢光 STAT3-dODN 的 MCF-7 細胞，紅色點為為成功送  
入 STAT3-dODN 的細胞，Annxin-V 為染細胞凋亡前期的標記，PI 為染核膜的標記。

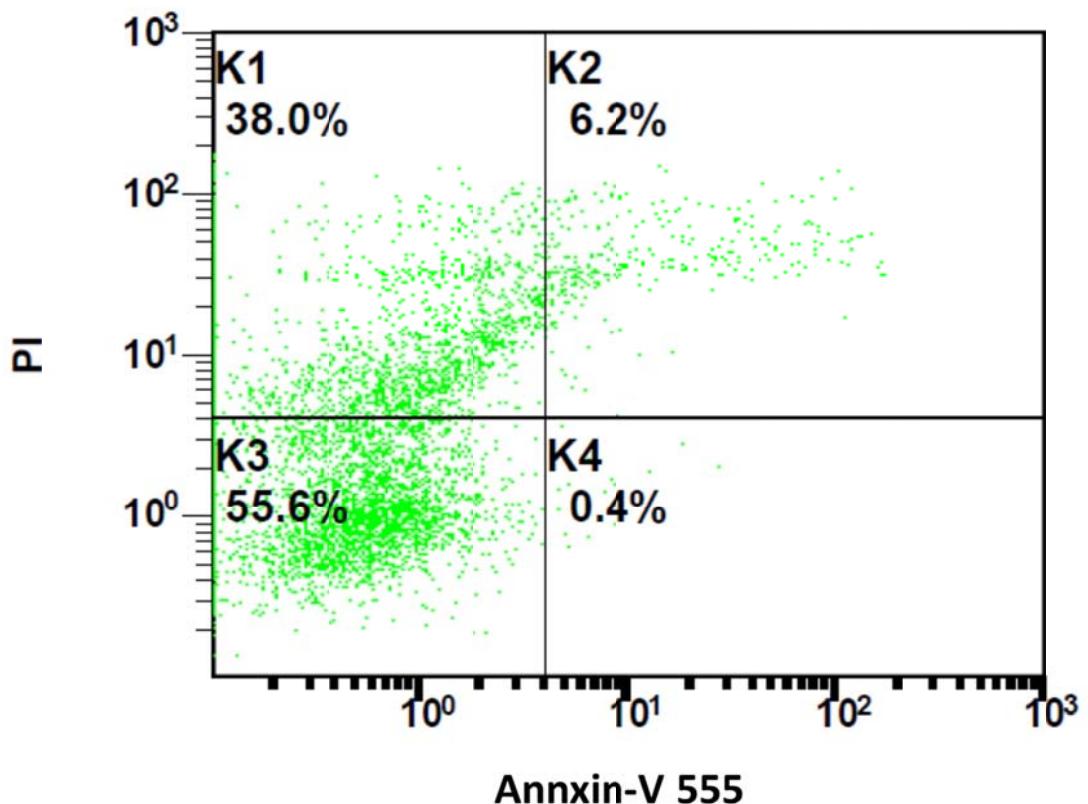
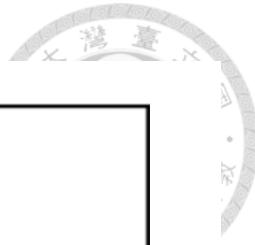


圖 4.8 有成功輸送 STAT3-dODN 的細胞由流式細胞儀所獲得的圖譜

單獨輸出有成功送入 STAT3-dODN 的 MCF-7 細胞，可發現可染到較多的核膜的訊號，表示成功送入 STAT3-dODN 的 MCF-7 細胞有較多細胞膜破裂的情況。

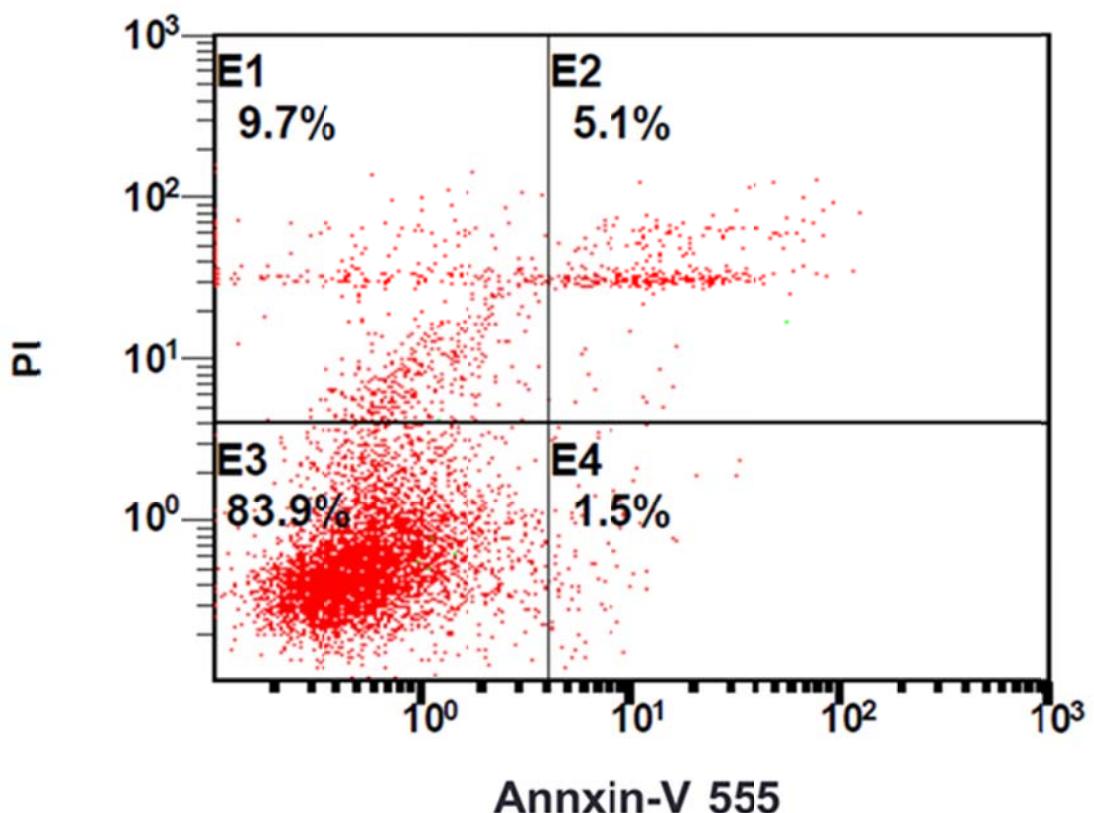
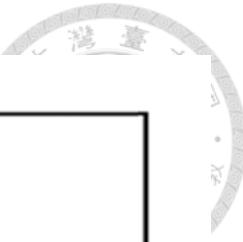


圖 4.9 以 STAT3-scr 對細胞進行投藥後所得之圖譜

將 STAT3-scr 脂質複合物送入 MCF-7 細胞，可以發現其細胞膜較無破裂的情況，表示其細胞相對較完整，並不受到投藥的影響。



#### 4.5. 由共軛顯微鏡觀察脂質複合物對於細胞的輸送效率

我們將 STAT3-dODN 標記上 FAM 螢光後，與微脂體形成脂質複合物並送入細胞中培養一天後，於螢光顯微鏡下觀察。於螢光顯微鏡下看到呈現藍色的即為 MCF-7 的細胞核，呈現綠色的即為帶有螢光標記的脂質複合物，由圖片可以看出有部分的脂質複合物能夠成功地進入到細胞內部，其餘的散落在外的脂質複合物有部分是未送入的也有部分是細胞死亡後再釋出的。

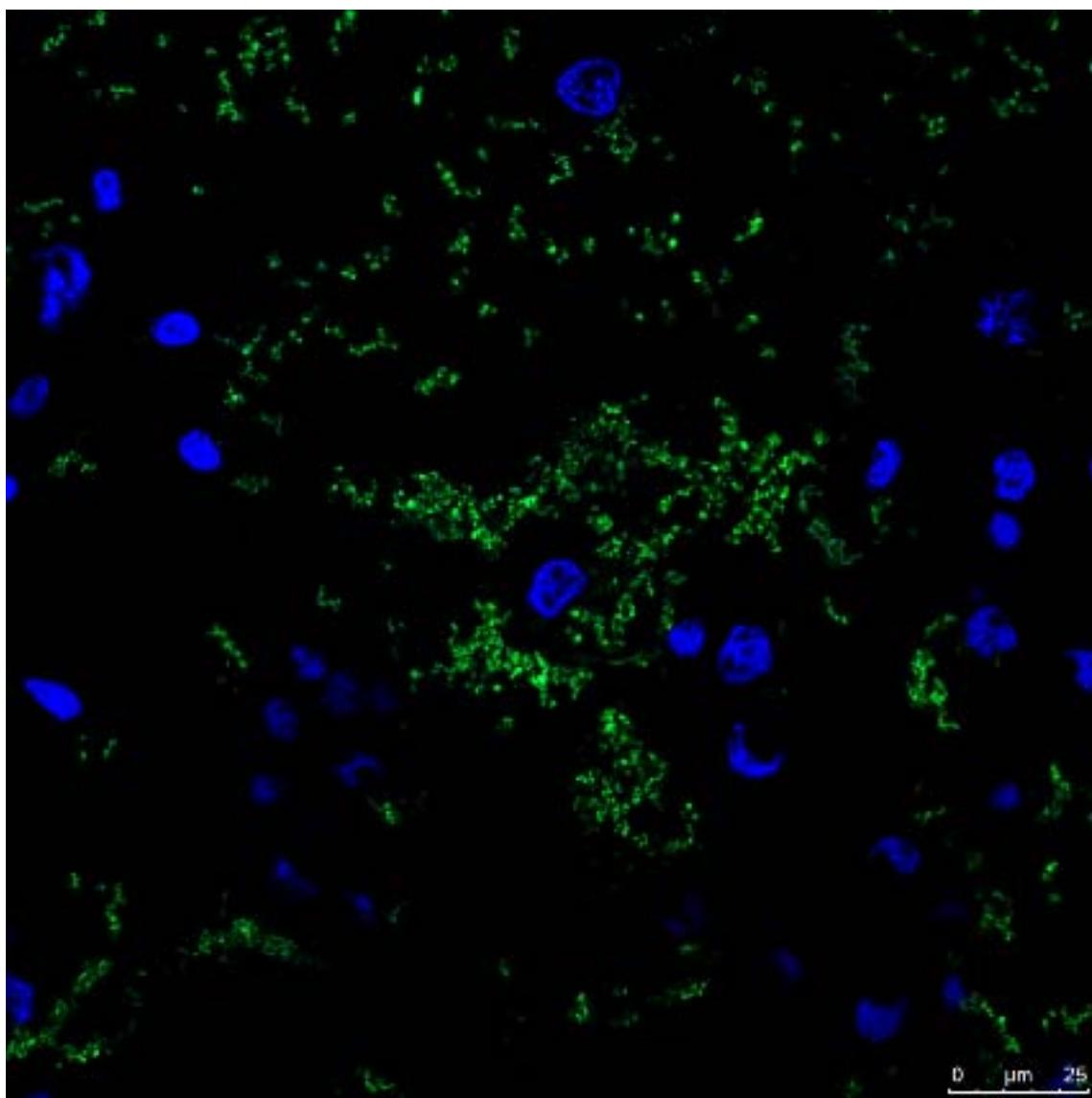


圖 4.10 由共軛顯微鏡拍攝經螢光標記後 STAT3-dODN 投藥與

MCF-7 的影像(1)

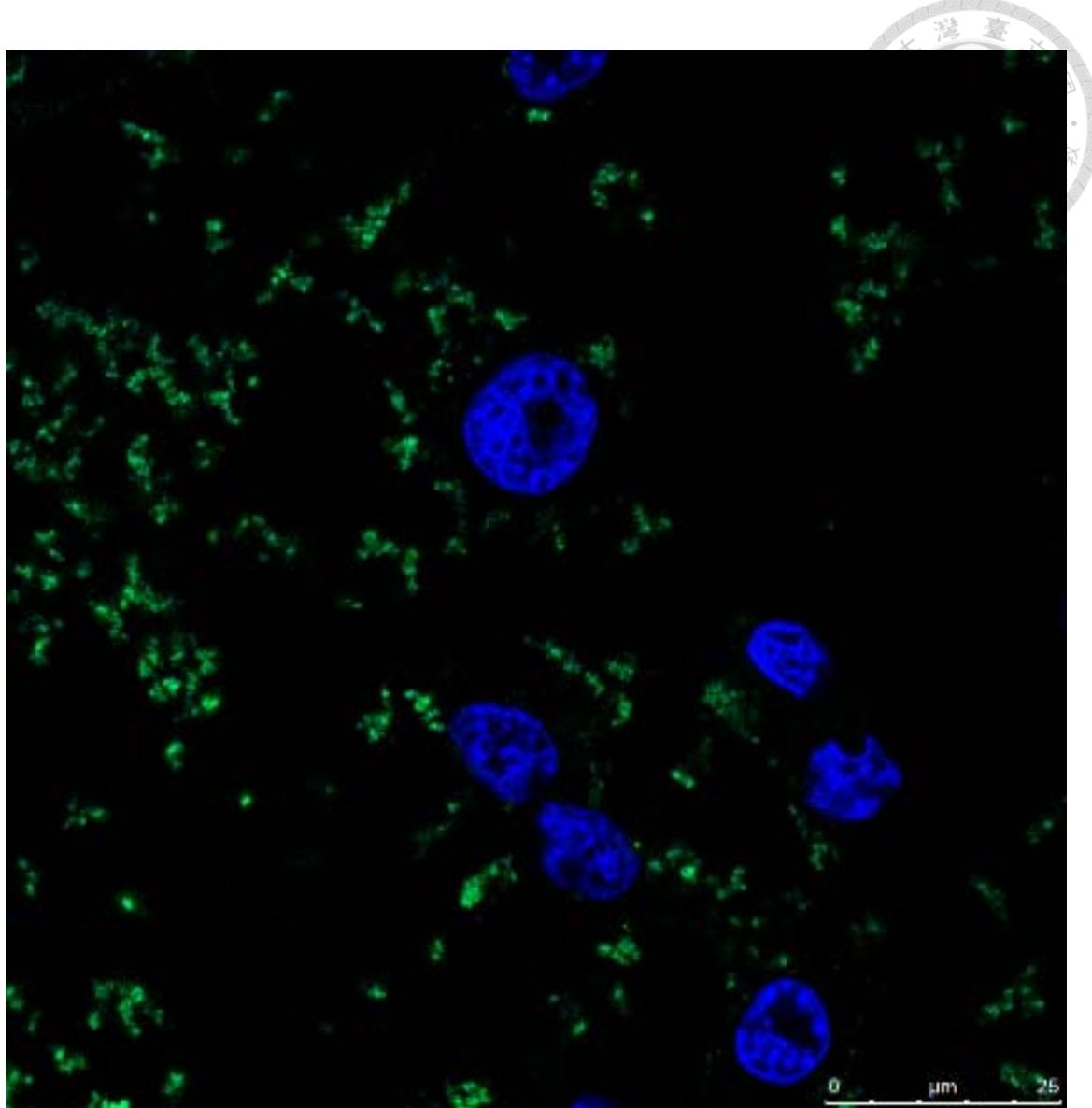


圖 4.11 由共軛顯原鏡拍攝經螢光標記後 STAT3-dODN 投藥與 MCF-7 的影像(2)

藍色螢光呈現的影像為細胞的細胞核，而綠色的影像為我們所投藥的成功 STAT3-dODN 脂質複合物，有些許的 STAT3-dODN 能夠到達細胞附近，而散落在外的 STAT3-dODN 應為未成功送入細胞或是細胞破裂後釋出的。



#### 4.6. 以脂質複合物投藥與 MCF-7 後對於其基因表現的影響

我們將不同比例的 STAT3-dODN 與微脂體結合形成不同的脂質混和物，並對 MCF-7 投藥三天後萃取出細胞的 mRNA 並轉錄成 cDNA 後以特定的引子做特定基因的定量，以下的實驗數據皆以 GAPDH 做為參考值來比較各基因在不同的脂質複合物投藥後所顯示出的改變。

我們可以發現當使用原劑量 1  $\mu\text{g}$ 、序列稀釋兩次投藥與細胞的時候，其 Cyclin-D1 的基因表現量有顯著的下降，表示以這樣的條件投藥與細胞的時候能夠影響其基因的表現量不過在其他的條件下基因表現量的調控就沒有明顯的差異。

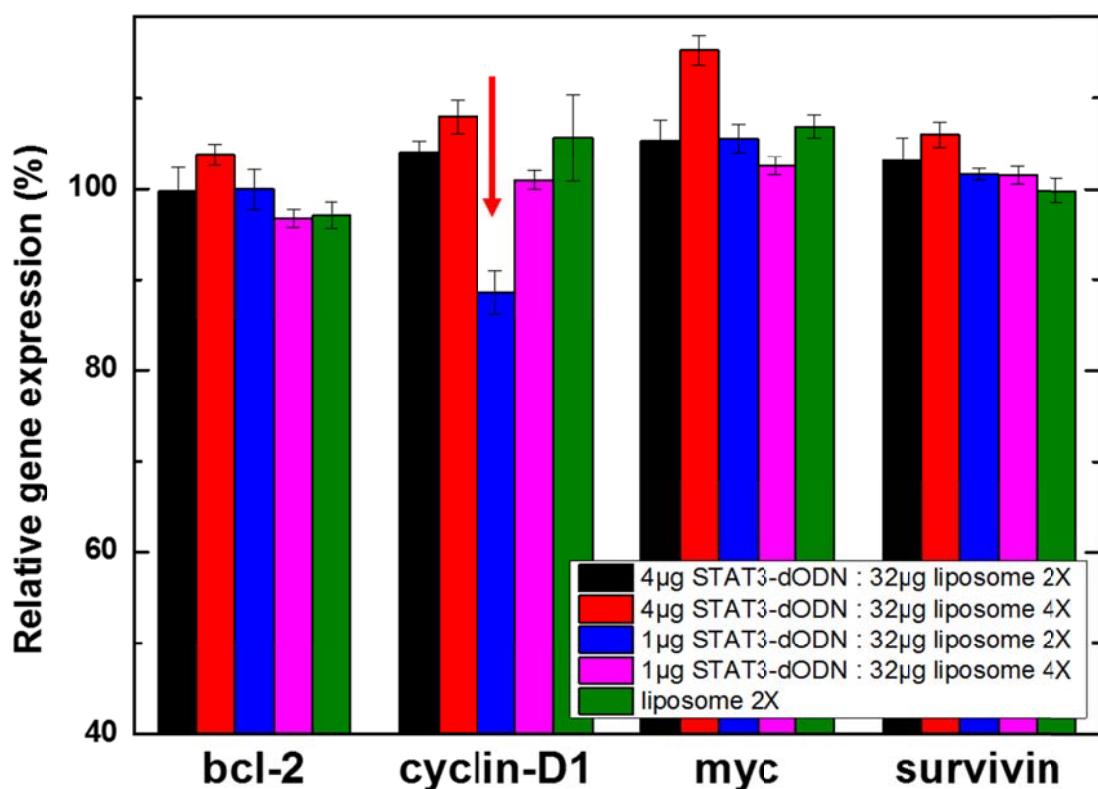


圖 4.12 特定基因在投與脂質複合物後的表現量差異

在 1:32 濃度為 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  時，cyclin-D1 的表現量有顯著的下降，代表送入的 STAT3-dODN 發揮其效果抑制了下游基因的表現。



## 第五章 結論與未來展望

### 5.1. 結論

由本篇論文的結果可以看出，透過不同孔徑的聚碳酸酯膜我們能夠製備特定大小的微脂體，並且能將之與不同比例的 DNA 接合形成不同的脂質複合物。而經由細胞存活率的實驗我們可發現，單純的微脂體因為帶有的正電荷對於細胞是有一定殺傷力的，將之與 DNA 節後後所形成的脂質複合物能夠降低微脂體本身帶有的毒性。

帶有 STAT3-dODN 的脂質複合物經由實驗可看出其具有能毒殺人類乳癌細胞株 MCF-7 的能力，由細胞存活率實驗可發現當我們以  $16\text{ }\mu\text{g}$  的 STAT3-dODN 與  $32\text{ }\mu\text{g}$  的微脂體結合並溶於  $200\text{ }\mu\text{l}$  的培養液中投藥與細胞的時候，我們能使原本對細胞已無毒性的脂質複合物再次對細胞產生毒殺的效果，顯示出帶有 STAT3-dODN 的脂質複合物是能夠將 STAT3-dODN 送入細胞並發揮其效用的，所產生的毒反應並非來自於微脂體正電荷的影響，這樣的結果在  $4\text{ }\mu\text{g}$  的 STAT3-dODN 與  $32\text{ }\mu\text{g}$  的微脂體結合並溶於  $200\text{ }\mu\text{l}$  的培養液中投藥與細胞的時候也有能看見同樣的效果，而當 STAT3-dODN 只有  $1\text{ }\mu\text{g}$  時，微脂體的毒殺作用就會顯現出來，表示脂質複合物中 DNA 藥物與微脂體的比例對於細胞的影響是十分巨大的。而我們也能夠發現含有 STAT3-dODN 的脂質複合物在投藥後的六小時內即有顯著的效果，而其效用一能夠延續至三天後，表示這樣的一個藥物致放系統具有長期的藥物釋放能力。

在流式細胞儀的實驗當中，我們亦可看出含有 STAT3-dODN 的脂質複合物對於細胞的影響，我們發現有成功送入 STAT3-dODN 的細胞在流式細胞儀的觀察下呈現較多的細胞死亡現象(由圖 4.7 及圖 4.8 可看出)，而對比於以控制組送入的細胞也可以看出 STAT3-dODN 對於細胞的影響。而由共軛焦顯微鏡所做的實驗發現，



雖然有些許的 STAT3-dODN 進入的細胞當中，但亦有許多的 STAT3-dODN 是位於細胞膜外的，表示我們的實驗條件或許有可以再進步的空間；我們認為這樣的結果有可能是因為投藥的時間過長到致送入 STAT3-dODN 的細胞已經死亡破裂而將 STAT3-dODN 再次地釋出；也有可能是輸送的效率並不像預期中的那麼高，或許可以再調整實驗的參數再坐進一步的探討。而由基因表現量的實驗可以看出，在特定比例下的 STAT3-dODN 脂質複合物確實能夠調控細胞的基因表現量，達到藥物致放的目的。

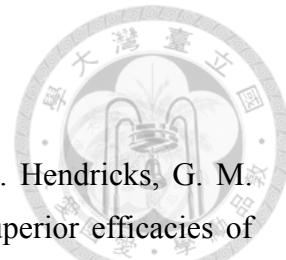
綜合以上的實驗我們能知道，STAT3-dODN 以微脂體送入人類乳癌細胞 MCF-7 後確實能夠造成細胞的死亡，並減少因微脂體本身正電荷所造成的毒性，唯在基因表現量與輸送效率上看來的效果並不盡理想，我認為在投藥的時間上、STAT3-dODN 與微脂體的比例上或許能夠再作些許的最佳化，另外因著載體本身所具有的毒性來看，我認對微脂體本身做修飾也是之後能夠嘗試的一個方向，或許能夠減少毒性並且增加輸送的效率。



## 5.2. 展望

由本次的實驗結果上，我們後續可繼續努力嘗試再做更深入的研究，條列如下：

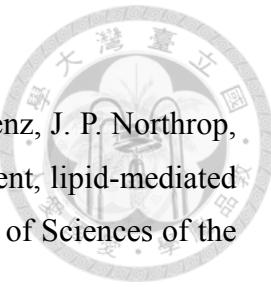
1. 基於本篇論文的基因輸送平台，我們能夠嘗試更多樣的藥物輸送系統。
2. 以微脂體作為基礎材料對其組成或者分子進行修飾，製作出實驗室專屬低毒性高效率的藥物載體。
3. 能夠將 STAT3 對於細胞的影響研究的更加透徹。
4. 配合實驗室已在進行之普魯士藍及氧化鐵的研究，研發出複方型的藥物輸送系統。



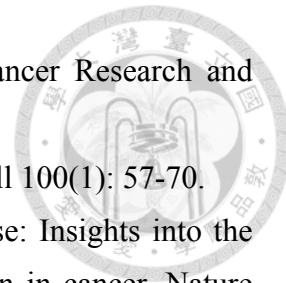
## 第六章 參考文獻

- Alving, C. R., E. A. Steck, W. L. Chapman Jr, V. B. Waits, L. D. Hendricks, G. M. Swartz Jr and W. L. Hanson. 1978. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome encapsulated drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(6): 2959-2963.
- Avanti Polar Lipids, I.
- Börner, C., J. Kraus, H. Schröder, H. Ammer and V. Höllt. 2004. Transcriptional regulation of the human  $\mu$ -opioid receptor gene by interleukin-6. *Molecular pharmacology* 66(6): 1719-1726.
- Bangham, A. D., M. M. Standish and J. C. Watkins. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13(1): 238-252.
- Barenholz, Y. 2001. Liposome application: Problems and prospects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 6(1): 66-77.
- Bertling, W. M., M. Gareis, V. Paspaleeva, A. Zimmer, J. Kreuter, E. Nürnberg and P. Harrer. 1991. Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. *Biotechnology and applied biochemistry* 13(3): 390-405.
- Biscardi, J. S., D. A. Tice and S. J. Parsons. 1999. c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Advances in Cancer Research* 76: 61-119.
- Bowman, T., M. A. Broome, D. Sinibaldi, W. Wharton, W. J. Pledger, J. M. Sedivy, R. Irby, T. Yeatman, S. A. Courtneidge and R. Jove. 2001. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13): 7319-7324.
- Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson and R. Jove. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19(21): 2474-2488.
- Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese and J. E. Darnell Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell* 98(3): 295-303.
- Buettner, R., L. B. Mora and R. Jove. 2002. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clinical Cancer Research* 8(4): 945-954.
- Busch-Dienstfertig, M., D. Labuz, T. Wolfram, N. N. Vogel and C. Stein. 2012. JAK-STAT1/3-induced expression of signal sequence-encoding proopiomelanocortin

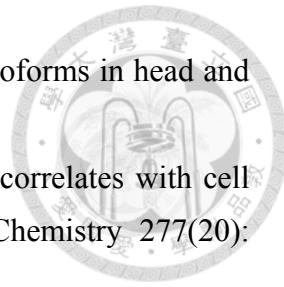
- mRNA in lymphocytes reduces inflammatory pain in rats. *Mol. Pain* 8(83).
- Cance, W. G. and E. T. Liu. 1995. Protein kinases in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 35(1): 105-114.
- Cao, X., A. Tay, G. R. Guy and Y. H. Tan. 1996. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Molecular and Cellular Biology* 16(4): 1595-1603.
- Chaturvedi, P., M. V. R. Reddy and E. P. Reddy. 1998. Src kinases and not JAKs activate STATs during IL-3 induced myeloid cell proliferation. *Oncogene* 16(13): 1749-1758.
- Chen, W. Y. and G. A. Colditz. 2007. Risk factors and hormone-receptor status: Epidemiology, risk-prediction models and treatment implications for breast cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 4(7): 415-423.
- Ciani, L., S. Ristori, L. Calamai and G. Martini. 2004. DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1664(1): 70-79.
- Clevenger, C. V. 2004. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *American Journal of Pathology* 165(5): 1449-1460.
- Cohen, B. D., C. B. Siegall, S. Bacus, L. Foy, J. M. Green, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom and H. P. Fell. 1998. Role of epidermal growth factor receptor family members in growth and differentiation of breast carcinoma. *Biochem. Soc. Symp.* 63: 199-210.
- Copeland, N. G., D. J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J. E. Darnell Jr, A. L. F. Mui, A. Miyajima, F. W. Quelle, J. N. Ihle and N. A. Jenkins. 1995. Distribution of the mammalian stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29(1): 225-228.
- Darnell Jr, J. E. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277(5332): 1630-1635.
- David, M., L. Wongi, R. Flavell, S. A. Thompson, A. Wells, A. C. Larner and G. R. Johnson. 1996. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin: Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *Journal of Biological Chemistry* 271(16): 9185-9188.
- De Rosa, G., D. D. Stefano, V. Laguardia, S. Arpicco, V. Simeon, R. Carnuccio and E. Fattal. 2008. Novel cationic liposome formulation for the delivery of an oligonucleotide decoy to NF- $\kappa$ B into activated macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70(1): 7-18.
- Evans, J. P., C. Skrzynia, L. Susswein and M. Harlan. 2005. Genetics and the young



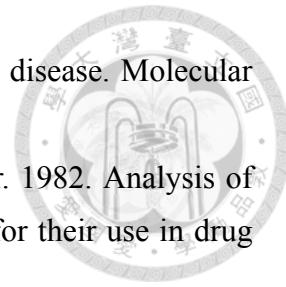
- woman with breast cancer. *Breast Disease* 23: 17-29.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(21): 7413-7417.
- Fidler, I. J., A. Raz, W. E. Fogler, R. Kirsh, P. Bugelski and G. Poste. 1980. Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Research* 40(12): 4460-4466.
- Fry, D. W., A. J. Kraker, A. McMichael, L. A. Ambroso, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors and A. J. Bridges. 1994. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* 265(5175): 1093-1095.
- Garcia, R., T. L. Bowman, G. Niu, H. Yu, S. Minton, C. A. Muro-Cacho, C. E. Cox, R. Falcone, R. Fairclough, S. Parsons, A. Laudano, A. Gazit, A. Levitzki, A. Kraker and R. Jove. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20(20): 2499-2513.
- Garcia, R., C. L. Yu, A. Hudnall, R. Catlett, K. L. Nelson, T. Smithgall, D. J. Fujita, S. P. Ethier and R. Jove. 1997. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth and Differentiation* 8(12): 1267-1276.
- Geinguenaud, F., I. Souissi, R. Fagard, L. Motte and Y. Lalatonne. 2012. Electrostatic assembly of a DNA superparamagnetic nano-tool for simultaneous intracellular delivery and in situ monitoring. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8(7): 1106-1115.
- Glinsky, G. V., V. V. Glinsky, A. B. Ivanova and C. J. Hueser. 1997. Apoptosis and metastasis: Increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Letters* 115(2): 185-193.
- Gregoriadis, G. 1988. Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 78(8): 693.
- Gu, J., G. Li, T. Sun, Y. Su, X. Zhang, J. Shen, Z. Tian and J. Zhang. 2008. Blockage of the STAT3 signaling pathway with a decoy oligonucleotide suppresses growth of human malignant glioma cells. *Journal of neuro-oncology* 89(1): 9-17.
- Gullick, W. J. and R. Srinivasan. 1998. The type 1 growth factor receptor family: New



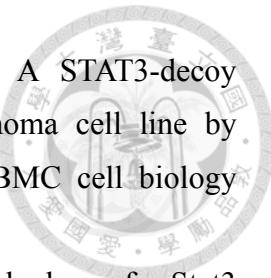
- ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 52(1-3): 43-53.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Haura, E. B., J. Turkson and R. Jove. 2005. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2(6): 315-324.
- Ihle, J. N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 13(2): 211-217.
- Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto and O. Silvennoinen. 1995. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annual Review of Immunology* 13: 369-398.
- Jäättelä, M. 1999. Escaping cell death: Survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research* 248(1): 30-43.
- Jung, M., A. Weigert, M. Tausendschön, J. Mora, B. Ören, A. Sola, G. Hotter, T. Muta and B. Brüne. 2012. Interleukin-10-induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin production in macrophages with consequences for tumor growth. *Molecular and cellular biology* 32(19): 3938-3948.
- Kaneda, Y. 2000. Virosomes: Evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43(2-3): 197-205.
- Kim, H. and W. J. Muller. 1999. The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research* 253(1): 78-87.
- Kraker, A. J., B. G. Hartl, A. M. Amar, M. R. Barvian, H. D. H. Showalter and C. W. Moore. 2000. Biochemical and cellular effects of c-Src kinase-selective pyrido[2,3-d]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 60(7): 885-898.
- Leaman, D. W., S. Pisharody, T. W. Flickinger, M. A. Commane, J. Schlessinger, I. M. Kerr, D. E. Levy and G. R. Stark. 1996. Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 16(1): 369-375.
- Ledley, F. D. 1995. Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. *Human Gene Therapy* 6(9): 1129-1144.
- Legendre, J. Y. and F. C. Szoka Jr. 1992. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: Comparison with cationic liposomes. *Pharmaceutical Research* 9(10): 1235-1242.
- Leong, P. L., S. Xi, S. D. Drenning, K. F. Dyer, A. L. Wentzel, E. C. Lerner, T. E.



- Smithgall and J. R. Grandis. 2002. Differential function of Stat5 isoforms in head and neck cancer growth control. *Oncogene* 21(18): 2846-2853.
- Li and P. E. Shaw. 2002. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *Journal of Biological Chemistry* 277(20): 17397-17405.
- Lieblein, J. C., S. Ball, B. Hutzén, A. K. Sasser, H. J. Lin, T. H. M. Huang, B. M. Hall and J. Lin. 2008. STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer* 8.
- Liu, X., J. Li and J. Zhang. 2007. STAT3-decoy ODN inhibits cytokine autocrine of murine tumor cells. *Cellular & molecular immunology* 4(4): 309-313.
- Lui, V. W. Y., A. L. Boehm, P. Koppikar, R. J. Leeman, D. Johnson, M. Ogagan, E. Childs, M. Freilino and J. R. Grandis. 2007. Antiproliferative mechanisms of a transcription factor decoy targeting signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: the role of STAT1. *Molecular pharmacology* 71(5): 1435-1443.
- Ma, L., C. Gauvillé, Y. Berthois, A. Degeorges, G. Millot, P. M. Martin and F. Calvo. 1998. Role of epidermal-growth-factor receptor in tumor progression in transformed human mammary epithelial cells. *International Journal of Cancer* 78(1): 112-119.
- Mann, M. J. and V. J. Dzau. 2000. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *Journal of Clinical Investigation* 106(9): 1071-1075.
- Miller, A. D. 1998. Cationic liposomes for gene therapy. *Angewandte Chemie - International Edition* 37(13-14): 1769-1785.
- Muthuswamy, S. K. and W. J. Muller. 1994. Activation of the SRC family of tyrosine kinases in mammary tumorigenesis. *Advances in Cancer Research* 64: 111-123.
- Nabel, E. G., G. Plautz and G. J. Nabel. 1990. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 249(4974): 1285-1288.
- Nakajima, K., Y. Yamanaka, K. Nakae, H. Kojima, M. Ichiba, N. Kiuchi, T. Kitaoka, T. Fukada, M. Hibi and T. Hirano. 1996. A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO Journal* 15(14): 3651-3658.
- Nicolau, C., A. Le Pape, P. Soriano, F. Fargette and M. F. Juhel. 1983. In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(4 I): 1068-1072.
- O'Sullivan, L. A., C. Liongue, R. S. Lewis, S. E. M. Stephenson and A. C. Ward. 2007.



- Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Molecular Immunology* 44(10): 2497-2506.
- Poste, G., C. Bucana, A. Raz, P. Bugelski, R. Kirsh and I. J. Fidler. 1982. Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Research* 42(4): 1412-1422.
- Rajkumar, T. and W. J. Gullick. 1994. The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 29(1): 3-9.
- Real, P. J., A. Sierra, A. De Juan, J. C. Segovia, J. M. Lopez-Vega and J. L. Fernandez-Luna. 2002. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21(50): 7611-7618.
- Reddy, E. P., A. Korapati, P. Chaturvedi and S. Rane. 2000. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: A covert liaison unveiled. *Oncogene* 19(21): 2532-2547.
- Rubin Grandis, J., S. D. Drenning, A. Chakraborty, M. Y. Zhou, Q. Zeng, A. S. Pitt and D. J. Tweardy. 1998. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 102(7): 1385-1392.
- Ruff-Jamison, S., K. Chen and S. Cohen. 1993. Induction by EGF and interferon- $\gamma$  of tyrosine phosphorylated DNA binding proteins in mouse liver nuclei. *Science* 261(5129): 1733-1736.
- Schaeffer-Ridder, M., Y. Wang and P. H. Hofschneider. 1982. Liposomes as gene carriers; Efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase. *Science* 215: 215-217.
- Sen, M., S. M. Thomas, S. Kim, J. I. Yeh, R. L. Ferris, J. T. Johnson, U. Duvvuri, J. Lee, N. Sahu and S. Joyce. 2012. First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer discovery* 2(8): 694-705.
- Sheffield, L. G. 1998. C-src activation by ErbB2 leads to attachment-independent growth of human breast epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250(1): 27-31.
- Shen, J., R. Li and G. Li. 2009. Inhibitory effects of decoy-ODN targeting activated STAT3 on human glioma growth in vivo. *In vivo* 23(2): 237-243.
- Souissi, I., I. Najjar, L. Ah-Koon, P. O. Schischmanoff, D. Lesage, S. Le Coquil, C.



- Roger, I. Dusander-Fourt, N. Varin-Blank and A. Cao. 2011. A STAT3-decoy oligonucleotide induces cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF- $\kappa$ B. BMC cell biology 12(1): 14.
- Sun, Z., Z. Yao, S. Liu, H. Tang and X. Yan. 2006. An oligonucleotide decoy for Stat3 activates the immune response of macrophages to breast cancer. Immunobiology 211(3): 199-209.
- Turkson, J., T. Bowman, J. Adnane, Y. Zhang, J. Y. Djeu, M. Sekharam, D. A. Frank, L. B. Holzman, J. Wu, S. Sefti and R. Jove. 1999. Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncprotein. Molecular and Cellular Biology 19(11): 7519-7528.
- Turkson, J., D. Ryan, J. S. Kim, Y. Zhang, Z. Chen, E. Haura, A. Laudano, S. Sefti, A. D. Hamilton and R. Jove. 2001. Phosphotyrosyl Peptides Block Stat3-mediated DNA Binding Activity, Gene Regulation, and Cell Transformation. Journal of Biological Chemistry 276(48): 45443-45455.
- Wang, L. H., X. Y. Yang, R. A. Kirken, J. H. Resau and W. L. Farrar. 2000. Targeted disruption of Stat6 DNA binding activity by an oligonucleotide decoy blocks IL-4-driven T(H)2 cell response. Blood 95(4): 1249-1257.
- Watson, C. J. and W. R. Miller. 1995. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. British Journal of Cancer 71(4): 840-844.
- Wu, J. 1996. Apoptosis and angiogenesis: Two promising tumor markers in breast cancer. Anticancer Research 16(4 B): 2233-2239.
- Yeh, H. H., W. W. Lai, H. H. W. Chen, H. S. Liu and W. C. Su. 2006. Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion. Oncogene 25(31): 4300-4309.
- Yu, C. L., D. J. Meyer, G. S. Campbell, A. C. Larner, C. Carter-Su, J. Schwartz and R. Jove. 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncprotein. Science 269(5220): 81-83.
- Yu, H. and R. Jove. 2004. The stats of cancer - New molecular targets come of age. Nature Reviews Cancer 4(2): 97-105.
- Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell Jr. 1994. Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science 264(5155): 95-98.

