



國立台灣大學醫學院藥理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Pharmacology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討 HDAC 抑制劑 MPT0E028

抑制腫瘤血管新生之體外及體內的作用機轉

A novel action mechanism for MPT0E028, a HDAC
inhibitor, inhibits tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.

林子涵

Tzu-Han Lin

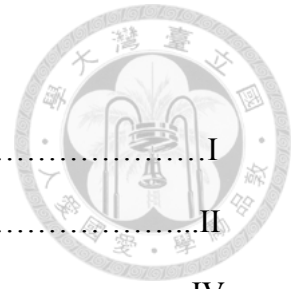
指導教授：鄧哲明 博士，潘秀玲 博士

Advisor : Che-Ming, Teng, Ph.D., Shioh-Lin Pan, Ph.D.

中華民國 104 年 6 月

June 2015

目錄



口試委員審定書.....	I
致謝.....	II
縮寫表.....	IV
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 研究動機與目的.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
第三章 實驗材料與方法	
第一節 實驗材料.....	48
第二節 實驗方法.....	51
第四章 實驗結果.....	62
第五章 討論.....	69
第六章 結論與展望.....	78
參考文獻.....	98

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

探討 HDAC 抑制劑 MPT0E028

抑制腫瘤血管新生之體外及體內的作用機轉

A novel action mechanism for MPT0E028, a HDAC inhibitor, inhibits tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.

本論文係林子涵君 (R02443019) 在國立臺灣大學藥理學研究所完成之碩士學位論文，於民國 104 年 6 月 17 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

鄧哲明

(指導教授)

陳育玲

(指導教授)

顏茂雄

楊春茂

黃德富

所長：

林琬琏

致謝

還記得當初大三一開始接觸藥理的時候，就被這個廣大深奧的科目深深吸引，於是大學畢業後下定決心一定要考進台大藥理所，感覺時間還停留在放榜那個瞬間的感動，沒想到一眨眼碩班兩年的研究生活就結束了。還記得當初剛進入鄧老師實驗室時的興奮與雀躍，從碩一一開始的笨手笨腳，凡事都要學長姐以及老師的教導，到碩二後慢慢進入狀況，能夠獨當一面的做實驗並且完成自己的研究，回首這兩年的求學過程，受到許多師長、學長姊、家人、同學以及朋友的幫助與鼓勵，除了感激還是感激，實在無法用簡單的隻字片語來表達心中的感謝，只好以此充滿感恩的致謝向各位幫助過我的恩人們致上最誠摯的感謝。首先，要感謝我的恩師，鄧哲明老師，感謝老師成為我生命中的一盞明燈，當初老師讓我進入鄧老師大家族時，已經覺得相當不可思議了，感謝老師讓我能在充滿溫馨以及挑戰的實驗室學習並且努力成長，老師的謙虛和藹以及誠信圓融的處世態度，還有孜孜不倦的學習態度以及浩瀚無邊的智慧，已成為我一生中需要不斷學習的榜樣，永恆的典範！感謝師母對於實驗室的照顧，還有對於我們學生的用心，每次收到師母送的禮物都覺得很感動，今年撥穗典禮難得師母也一起參與了，一起為鄧老師實驗室大家族畫下一個完美的句點。活潑親切的阿潘學姊，感謝您學術上的專業總是給我許多實驗上的啟發，每當研究遇到瓶頸時，學姊總是能像快刀斬亂麻般直接找出問題的根本，覺得學姊真的是名符其實的女強人，能夠完美地兼顧家庭與事業，實在是新時代女性的典範，也是我要努力學習的目標。感謝雅玲學姊這兩年的照顧，學姊總是很用心地處理實驗室所有耗材以及試劑的訂購，還有所上所有繁雜的行政事項，使我們能夠很順利且安心地完成實驗，老師退休將至，也常看到學姊繁忙的背影，希望把一切做得盡善盡美，真是辛苦您了！另外，也要特別感謝口試委員黃德富老師、顏茂雄老師以及楊春茂老師，感謝您們願意擔任我的口試委員，並且給予我許多寶貴的建議以及教導，使我的論文更加完整。我也要特別感謝之雅學姊的照顧與教導，在碩班這兩年一路一直有您在旁邊，無論是從頭教學指導我實驗的操作、討論實驗的方向、任何疑難雜症、還有大大小小的 seminar 一直到最後的口試，都是有您的幫忙與鼓勵，我才能如此順利地完成學業，不好意思在這兩年不斷的騷擾您，真的非常感謝！希望學姊未來的工作順利，然後和學長永遠甜甜蜜蜜喔！也要感謝所辦梁姐姐和沈姐姐在行政事務上的叮嚀與提醒，使我們總是能如期完成學校規定的事項。

感謝聰明美麗的敏吾學姐在實驗上的幫助與生活上的經驗分享，和學姊聊天真的很輕鬆，希望學姊之後的婚禮能夠非常完美，和學長永浴愛河白頭偕老！謝



謝溫柔婉約的瀚立學姐，總是覺得學姊好客氣，什麼事情都事必躬親，常常會把我的值日生一起做完了，真是不好意思，希望學姊之後去北醫也能很順利，然後準備當個幸福的新娘喔。感謝美麗的小白學姐，看著學姊每周台北台中彰化三邊跑，實在是覺得學姊很努力，母愛真的很偉大，希望未來學姐有更多時間可以陪伴柔柔還有親愛的家人們。感謝率真的耙子學姐在實驗上的幫忙，學姊是個完全的行動派，牡羊座個性完全表露無遺。感謝厲害的美全學姐，在碩一剛進來的時候有許多不懂的地方，學姊都很有耐心的教導我們。感謝犀利的琪琪，碩一生活有妳在旁邊真的每天充滿歡樂，總是會跟我說很多很新奇的知識還有許多人生的大道理，成為幸福人妻後要更享受生活喔！感謝貼心的怡琳在碩班兩年的陪伴，應該是年齡相仿個性又滿像的，所以生活中有大大小小的事情都會與妳分享，雖然當初知道妳要去北醫時非常捨不得，但天下無不散的筵席，我會記住並珍惜與妳相處的時光，也謝謝妳和家銘在我口試倒數的日子努力地完成動物實驗，辛苦你們了！感謝充滿活力的旺旺在我碩一的時候，總是在實驗以及生活中給予許多貼心的幫助，也要感謝和穎，雖然我從碩一進來就一路被你欺負到碩二，到了北醫之後還會三不五時回學校噏我和怡琳，但能遇到這麼親民，又對我和俊瑋在實驗上全心教導的學長，仔細想想實在是很幸運！感謝好朋友若瑜，兩年的碩班生活能遇到知己真的很難，謝謝妳總是在我無助與徬徨時給予我許多建議，並且實驗上有任何問題時我們也都能互相交流討論，每個禮拜的瑜珈課也是讓我們能在緊繃的生活能夠小小的喘息，希望未來我們工作都很順利並且友誼能一直長存。我也要感謝兩年的夥伴俊瑋，雖然我們個性好像水火不容哈哈，但兩年下來也產生的一些革命情感，一起發牢騷、一起買午餐、一起留下來準備 seminar、一起在晚上做實驗趕論文，如今我們終於順利完成學業了！感謝你對我的包容與照顧，還有生活上的心事分享讓我覺得研究生活並不孤單，希望你未來在當兵以及事業發展上都能順順利利喔！

感謝我的父母以及家人，有您們的支持與鼓勵，使我能夠安心地完成碩班兩年的學業，雖然回家的時間很少，但愛女心切，媽媽總是會幫我準備一個禮拜份的水果還有星期一的便當，爸爸也是不辭辛勞地每次接送我回家，妹妹總是可以安撫我煩躁的情緒，對於您們的感激真是無法表述，希望未來在社會上我能夠成為一個有用的人才，回饋社會並報答您們的恩情。感謝孟昇，謝謝你的耐心與鼓勵，陪伴我度過許多實驗室的夜晚與假日，並且安撫我許多不安的情緒與煩惱，對於你的感激也是說不盡的，希望未來我們也能繼續攜手度過更多難關。

最後謝謝幫助過我的所有師長、家人、學長姐以及朋友同學們。謹以此論文，獻給我摯愛的師長、家人與朋友，謝謝你們無私的愛與包容，才能成就今天的我。

縮寫表



AKT	Protein kinase B
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
CDK	Cyclin-dependent kinase
EBM-2	Endothelial cell basal medium-2
ECGs	Endothelial cell growth supplements
EGF	Epidermal growth factor
EGM-2	Endothelial cell growth factor-2
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
GI ₅₀	Median growth inhibition
HDAC	Histone deacetylase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IC ₅₀	Median inhibition concentration
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NRP1	Neuropilin 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PIGF	Placental growth factor
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SRC	V-SRC avian sarcoma viral oncogene
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

中文摘要

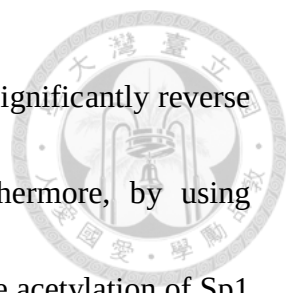
血管新生 (angiogenesis) 是從已存在體內的血管分化再形成新血管網絡的一個生理過程，無論是在生物的生長發育、組織的分化、傷口修復以及腫瘤的增生與轉移等皆佔有重要調控的角色。組蛋白去乙酰酶抑制劑 (HDAC inhibitor) 為近年來新穎的抗癌小分子化合物，藉由調控 histone 以及 non-histone 蛋白的去乙酰化程度，影響致癌基因 (oncogene) 以及抑癌基因 (tumor suppressor gene) 的表現，最終以達抑制癌症的療效。本篇論文的主題在探討 MPT0E028 對於血管新生促進因子 (endothelial growth factors; EGM-2) 引起血管新生的抑制作用與分子機轉。MPT0E028 為一個異羥肟酸 (N-hydroxamic acid) 的衍生物，同時也是一個 HDAC 抑制劑，已有許多研究證實此化合物能抑制癌細胞的生長並減緩疾病進程，目前已進入臨床試驗第一期。首先，在本篇論文的功能性實驗中發現 MPT0E028 能夠抑制人類臍靜脈內皮細胞的增生、細胞的移行以及類血管管腔的形成。同時利用西方墨點法，顯示 MPT0E028 也會影響第二型血管內皮生長因子受器 (VEGFR2) 的下游訊號傳遞，包括抑制 Erk1/2、Akt、p38 MAPK、Src 以及 FAK 的磷酸化。因此為了確認此化合物抑制血管新生的明確機制，利用 Human OneArray 晶片來分析經 MPT0E028 處理過之人類臍靜脈內皮細胞，其血管新生相關基因的表現。結果顯示神經纖毛蛋白質-1 (NRP1)，同時也是 VEGFR2 之共同受器，其 mRNA 以及蛋白表現量明顯下降。接著將細胞過度表現 NRP1，結果發現能有效地反轉 MPT0E028 抑制細胞增生。接續探討 MPT0E028 抑制 NRP1 的機制，利用免疫沉澱分析法發現 MPT0E028 會藉由增加其轉錄因子 Sp1 之乙酰化，進而造成 Sp1 與 DNA 親和力下降，推測可能與 NRP1 表現量下降有關。在 *in vivo* matrigel plug assay 以及腫瘤異體移植中，也證實 MPT0E028 在體內具有明顯抑制血管生成以及減緩腫瘤生長的作用。因此總結以上實驗結果，MPT0E028 在未來臨床發展上，值得進一步研發成可同時抗癌以及抗血管新生之 HDAC 抑制劑，且可能機制為藉由抑制 NRP1 表現量，達到抑制血管新生的作用。

英文摘要



Angiogenesis is the physiological process through which new blood vessels form from pre-existing vessels and is also a normal and vital process in growth and development, wound healing, formation of granulation tissue as well as tumor proliferation and metastasis. It has been reported that histone deacetylase inhibitors (HDAC inhibitors) are a novel class of small molecular anticancer agents through modulating the acetylation/deacetylation of histones and/or non-histone proteins and therefore altering the expression of oncogenes or tumor suppressors.

MPT0E028, a novel derivative of N-hydroxamic acid, as well as a small molecular HDAC inhibitor, has been shown to reduce advanced solid tumor growth and has entered phase I clinical trial. In this study, under the induction of EGM-2, MPT0E028 showed an effect of inhibiting angiogenesis including cell proliferation, cell migration and tube formation. MPT0E028 also inhibited the VEGFR2 downstream signaling, including reducing Erk1/2, Akt, p38 MAPK, Src and FAK phosphorylation. To further study the mechanism of MPT0E028 inhibiting angiogenesis, we subjected the drug-treated HUVECs to the Human OneArray to analyze the angiogenesis-related genes. The result came out that Neuropilin 1 (NRP1) mRNA, transcribed to be a VEGFR2 co-receptor protein, has significantly decreased compared to the control group.



We subsequently found out that the overexpression of NRP1 could significantly reverse the inhibition of cell proliferation caused by MPT0E028. Furthermore, by using immunoprecipitation, we revealed that MPT0E028 could increase the acetylation of Sp1, which is an important transcription factor of NRP1, therefore reduced the binding affinity between Sp1 and DNA. And by matrigel plug assay, MPT0E028 also showed an *in vivo* inhibitory effect in blood vessel formation. Taken together these studies, we can make a brief summary that MPT0E028 plays an inhibitory role in angiogenesis and may be through inhibiting NRP1 mRNA and protein expression. After further investigation of MPT0E028, the new HDACi may be a potential candidate of possessing both anti-cancer and anti-angiogenesis properties to inhibit tumor progression in the future.

第一章 研究動機與目的

世界衛生組織 (WHO) 在《全球癌症報告 2014》研究中提出，2012 年全球癌症患者和死亡病例都在急遽地增加，新增癌症病例有近一半出現在亞洲；另外，根據行政院衛生署公布台灣地區 2013 年最新的 10 大死因中，以慢性疾病為主，其中惡性腫瘤自 71 年起已連續 32 年高居國人死因首位，遠高於排名第 2 之心臟疾病，平均每一百個國人死亡，便有 29 人死因為癌症。因此，在醫藥市場以及臨床應用上研發抗腫瘤藥物實為當務之急。

血管新生是癌細胞生長以及轉移很重要的因素，也是造成癌症致死率提高很大的關鍵，其中血管內皮細胞扮演的角色也極為重要，因此在抗腫瘤藥物中若針對抗血管新生的治療著手，相對於傳統藥物直接毒殺癌細胞，也許對細胞的毒性以及人體的副作用而言應為較小。調控血管新生的因子眾多，包括新生過程中的各種變因、生長因子的不同表現量、細胞生長的缺氧環境，或是血管內皮細胞表面受器的突變都會所影響。在本論文中將以血管內皮細胞作為研究對象，探討 HDAC 抑制劑 MPT0E028 作為抗血管新生藥物，對於 EGM-2 內皮生長因子引發血管新生之影響，並進一步探討其抑制血管新生之機轉，以為日後治療癌症減少癌細胞轉移的候選藥物。

第二章 文獻回顧



一、 血管新生 (vasculogenesis & angiogenesis)

1.1 Vasculogenesis & angiogenesis

血管新生是一個生理上新的微血管發展成一個血液循環系統的過程。可分為兩種方式，vasculogenesis 以及 angiogenesis，vasculogenesis 通常指自發性的血管形成，當在胚胎形成過程中，內皮前驅細胞 endothelial progenitor cells (angioblasts) 會依著生長因子或是細胞外基質而移動，並自行分化形成原始的血管網路。而 angiogenesis 則是以一個以存在的原有血管系統作為基礎，再以出芽的方式 (sprouting) 發展出新的側枝血管，之後與毛細血管 (capillary) 和平滑肌細胞 (pericytes) 環繞形成新生血管 (Weis *et al.*, 2011)。原始 vasculogenesis 生成的血管網擴張，經 angiogenesis 後，將動脈與靜脈系統連結起來，而形成一個完整的血液供應系統 (附圖 1)。

1.2 類型

芽生性血管新生 (sprouting angiogenesis)：首先，血管內皮細胞上的促進血管新生的生長因子受體被活化；其次，活化的內皮細胞開始釋放蛋白酶以分解基底膜；內皮細胞遷移後增生以形成周圍基質及萌芽狀血管，芽狀血管擴大形成環形，最後形成完整的血管腔。

套疊性血管新生 (intussusceptive angiogenesis)：藉由通過間質柱狀結構插入已有的血管內腔，導致原有血管腔的分割和新生血管的形成 (Hillen *et al.*, 2007)。

1.3 生理角色

血管新生除了在建立胚胎中的心血管系統不可或缺之外，在生長或是發育上也扮演重要的角色，例如在傷口癒合、生殖系統的成熟和維持卵巢正常週期等等

(Folkman, 2006)。另外，血管新生也是腫瘤惡化過程中的重要步驟。而在腫瘤生長上，血管新生則會是腫瘤從休眠期轉變成惡性、生長迅速、可能侵襲其他組織的關鍵。而相較於癌症的研究，血管新生也在斷肢接合、心肌梗塞、腦中風、老人退化性黃斑、關節炎等病症上佔有很重要的地位 (Carmeliet, 2003)，另外也牽涉到許多失調症，例如子宮內膜異常增生、原發性肺動脈高壓症、發炎性腸道疾病、肥胖、氣喘及感染性疾病等等 (附表 1)。

二、 腫瘤與血管新生

2.1 研究發展歷史

西元 1787 年，由 John Hunter 最初提出並描述血管的生成；1800 年時一些德國病理學家觀察到部分人類腫瘤高度血管化，從而提出新生血管可能在腫瘤進展中具有重要的致病作用；1939 年，Ide 等人發現腫瘤生長會伴隨新生成的血管網絡，藉由兔子耳朵的腫瘤異體移植實驗，推測腫瘤可能會分泌促進血管生長物質 (Ide AG, 1939)；1945 年時，Algire 等人在腫瘤異體移植從動力學做了更深入的研究，他們推測，腫瘤細胞比正常的細胞擁有生長優勢，可能不是因腫瘤細胞擁有與生俱來自主生長的能力，而是它能夠不斷地誘導血管生成，也就是形成新的血管。這個精闢的結論，使腫瘤在缺乏血液供應的情況下將不會有效地生長，因此，抑制腫瘤血管的發展可能被利用作為一種治療策略 (Algire *et al.*, 1950)。1968 年，Melvin Greenblatt 和 Philippe Shubik 表示，甚至當一個微孔性過濾材質的物理性屏障被放在腫瘤和宿主基質間，移植的腫瘤會刺激血管增生。他們認為，IDE 和同事所提出的刺激血管生長物質是真實存在且可以擴散性的一種物質 (Greenblatt *et al.*, 1968)。

直到 1971 年，血管新生之父 Folkman 醫生從腫瘤中分離出腫瘤血管生成因子 TAF (tumor angiogenesis factor)，並提出相關的假說，認為如果單純以擴散作用，細胞不能離開血管 100-200 μm 距離以上。在沒有血管的情形下，腫瘤很難超過



1-2 mm，但當腫瘤直徑達到 1-2 mm 時便會釋放出 TAF 促進血管增生，接著腫瘤便依賴新生成的血管供給氧氣、養分以及幫助廢棄物的排泄與代謝 (Folkman, 1971)。接著在 Folkman 1996 年接著提出腫瘤二間室理論 (two compartment theory) 以解釋腫瘤細胞及內皮細胞的相互關係。腫瘤形成過程中，生物體必須引發新血管的產生，才能維持腫瘤繼續生長。在腫瘤形成的生態系中 (ecosystem)，可分成內皮細胞及腫瘤細胞兩個間室，這兩種細胞會互相影響。腫瘤細胞可以產生血管新生促進分子來促進內皮細胞的增生；相對的，內皮細胞也可以經由產生其他類的血管新生因子來促進腫瘤細胞的增生，這種雙向性影響是靠著旁體素效應 (paracrine effect) 來相互作用 (Folkman, 1996b)。這種腫瘤細胞與內皮細胞的相互作用的原理，可以解釋臨床的觀察與血管新生機轉的關聯性，得知腫瘤的成長及轉移一定必須伴隨新血管增生現象，腫瘤的成長及轉移與血管新生有密切的關聯。

在 1983 年時，由 Harold Dvorak 和他的同事最先確定，而 Pamela Keck 和同事也同時複製出一種血管內皮生長因子的異構體，證明是相同的血管通透性因子。此後不久，兩個團隊獨立地發現，在腫瘤裡最靠近低氧 (缺氧) 區域，因此最需要血管的細胞，具有最高的 VEGF 表現量，而缺氧可直接誘導培養的細胞表現血管內皮生長因子。之後，Gregg Semenza 和他的同事，後來查明缺氧誘導因子(HIF1) 在缺氧條件下，負責作為血管內皮生長因子表現的轉錄因子。在這期間，Ferrara 和他的同事，在小鼠實驗利用血管內皮生長因子的阻礙抗體抑制它的功能，提供明確的證據表明，血管內皮生長因子可刺激血管生成和腫瘤生長 (Ribatti, 2007)。這個發現為擬人化抗體 bevacizumab (Avastin) 的發展和臨床應用鋪路。基於早期在癌症患者配合化療使用和令人鼓舞的成功，美國食品和藥物管理局在 2004 年批准 bevacizumab (Avastin) 可用於治療轉移性結直腸癌，驗證了 Folkman 早在 30 多年前的假說，針對腫瘤血管治療癌症是可行的策略。

2.2 腫瘤血管新生的過程

腫瘤細胞的血管新生為一個多重步驟的過程，以下可大致分為 5 個步驟：

1. 首先，腫瘤細胞會分泌一些血管新生因子，主要包括血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF)、血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor ; PDGF)、鹼性纖維母細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor) (Folkman, 2006)。
2. 接著腫瘤新生因子會結合至內皮細胞的接受器 (vascular endothelial growth factor receptor 2 ; VEGFR2)，接受器自體磷酸化後活化內皮細胞，並誘導細胞內訊息傳遞，例如 PI3K-Akt-mTOR pathway 或是 MAPK pathway。
3. 內皮細胞開始分化，同時癌細胞和內皮細胞皆會釋放基質金屬蛋白酵素 (Matrix metalloproteinase ; MMP) 以及 angiopoietin-2，這兩者會去水解血管基底膜 (basement membrane)，對細胞外基質 (extracellular matrix ; ECM) 以及新生血管周邊組織進行重新塑形 (remodeling)，使得在血管新生時周邊的組織的結構與排列便於內皮細胞的移動。
4. 分化的內皮細胞開始增生 (proliferation)，從基底膜上的小洞開始移行 (migration) 以及侵入 (invasion)，並生成芽生型 (sprouting) 血管。另外，前端的內皮細胞會分化為頂端細胞 (tip cell)，並藉著黏附在新生成血管上的 integrin，例如 $\alpha_v\beta_3$ 以及 $\alpha_v\beta_5$ 引導血管芽向著腫瘤的方向由生長因子濃度低往濃度高的位置移行；後端的內皮細胞則會特化成 stalk cell，進行細胞增生的工作，延長血管芽後枝並形成管腔 (tube formation)。

轉移出的內皮細胞開始自行圈起 (roll up) 形成管狀 (vessel tube)，不同條的細枝血管 (vessel) 又會互相連結形成一個讓血液能夠循環的血管腔 (loop)，最後則會有特殊的肌肉細胞，如平滑肌細胞 (smooth muscle cells) 和外被細胞 (pericytes) 來穩定這些新生成的血管，血管網絡形成後便可開始血液循環，並提供腫瘤細胞充足的氧氣、養分以及代謝廢棄物 (Folkman, 2006; Hillen *et al.*, 2007; Potente *et al.*,

2011)(附圖 2)。



2.3 癌症血管新生抑制劑

藉由研究腫瘤的分子生物學基礎，可以用來了解抗血管新生藥物如何經由抑制腫瘤的血管新生，間接延緩腫瘤發生、達到治療原發性腫瘤及轉移性腫瘤的目的，目前抗血管新生療法的臨床藥物所用的策略包括以下 (附表 2)：

1. 抑制促進血管新生因子的結合基 (ligand) 及其受體 (receptor)：

以此作用原理進入臨床試驗的藥物目前為最多種類如：干擾素 α (interferon- α) 作用是抑制由腫瘤所產生的血管新生促進因子 VEGF 以及 FGF；早期的藥物包括 Neovastat 具有多重機轉包括抑制血管內皮細胞，抑制 VEGF；Rapamycin 則是經由減少 VEGF 的產生及抑制 VEGF 對血管內皮細胞的刺激，達到抑制血管新生的目的 (Guba *et al.*, 2002)；SU 6668 則是抑制 VEGFR、FGFR 及 PDGFR 的訊息傳遞 (Muehlbauer, 2003)。Bevacizumab (Avastin) 則是一對抗 ligand VEGF-A 的單株抗體，目前作為第一線藥物或第二線藥物，針對大腸直腸癌、乳癌以及卵巢癌的病人治療 (Wang *et al.*, 2014)；Aflibercept 則是一種融合性蛋白 (fusion protein)，作用為與 VEGF 共同競爭 VEGFR1 以及 VEGFR2 的結合，減少 VEGF 的結合進而抑制 VEGFR 下游的訊息傳遞，目前是治療大腸直腸癌的第二線藥物 (De Souza *et al.*, 2015)。Sunitinib (Sutent)、Sorafenib (Nexavar) 以及 Axitinib (Inlyta) 則是小分子的 tyrosine kinase receptor inhibitor 結合到 VEGFR2 的 cytoplasmic domain，抑制其自體磷酸化減少下游的訊息傳遞，用於治療肝癌、甲狀腺癌以及腎癌 (Beltran *et al.*, 2014; Locati *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2015)。

2. 直接作用在腫瘤血管內皮細胞：

以腫瘤血管內皮細胞上特異的標記為治療標的。以此作用原理進入臨床試驗的藥物如：TNP-470 是一種合成黴菌蛋白 (fungal protein) 的類似物，選擇性地抑制內皮細胞的移動性 (migration)，及抑制內皮細胞生長的作用 (Nelson, 1998)。

pentosan polysulfate 可以抑制內皮細胞的成長因子 (Folkman, 1996a)。其他直接作用在腫瘤的血管方式，利用腫瘤血管內皮細胞特異的標記製造出來的藥物，例如：非類固醇抗發炎藥物 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) 作用在 integrin $\alpha_v\beta_3$ 及其下的訊息傳遞 (signal transduction)，影響內皮細胞的移動，進而達到抑制血管新生的目的 (Dormond *et al.*, 2001)。也有以 PECAM-1/CD31 這種特異的內皮細胞標記為作用標的。Tumstatin 是第四型膠原蛋白的片段有抑制內皮細胞及促進細胞凋亡的作用 (Maeshima *et al.*, 2002)。

3. 增加內生性或合成性血管新生抑制因子：

以此作用原理進入臨床試驗的藥物如：早期如介白素 12 (interleukin-12) 經由增加可誘發蛋白 10 (inducible protein 10, IP10) 這種血管新生抑制因子的產生，及影響腫瘤內管狀結構形成來達到抑制血管新生的目的。其他藥物如 angiostatin、endostatin 等。比較新的藥物如 trebananib (AMG386) 以及 MEDI3617 則是 anti-angiopoietin，減少 angiopoietin-1 以及-2 和其受器 Tie-1 的結合，目前治療大腸直腸癌以及卵巢癌 (Leow *et al.*, 2012; Marchetti *et al.*, 2015)。Everolimus (Afinitor) 以及 Temsirolimus (Torisel) 屬於 mTOR inhibitor，可直接抑制 VEGF 的合成製造，減少血管新生因子的量，Everolimus 作為腎臟癌以及胰臟癌之第二線藥物，目前已進入臨床試驗第二期，而 Temsirolimus 作為治療轉移性乳癌之第一線或第二線藥物，目前已進行臨床試驗第二期及第三期 (Sendur *et al.*, 2014; Kordes *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2015)。

4. 使用基質金屬蛋白酶抑制劑 (matrix metalloproteinases inhibitors, MMPi)：

在腫瘤形成的過程中腫瘤細胞藉由基質金屬蛋白酶(MMP)的產生與附近的微環境 (microenvironment) 的相互作用，對於腫瘤的進行有相當重要的角色。MMP 是一種蛋白質分解酶 (proteolytic enzyme)，會同腫瘤細胞一起分解侵入基底層 (basement membrane) 及間質 (stroma)，對於血管的穿透及腫瘤細胞的轉移扮演重要角色，與原發性及轉移性腫瘤的生長及血管新生都有密切的關係，近年來已有

不少研究證實，抑制基質金屬蛋白酶即可抑制腫瘤血管新生 (Nelson *et al.*, 2000)。以此作用原理的藥物如：Marimastat (British Biotech) 是一種合成性的基質金屬蛋白酶抑制劑 (synthetic MMP inhibitor, MMPI)，可抑制由細胞要轉移時所需要的蛋白酶 (Folkman, 1996a)，目前用作治療乳癌以及非小細胞肺癌 (Shepherd, 2001; Goffin *et al.*, 2005)。另外 Neovastat 也有基質金屬蛋白酶的抑制作用 (Nelson *et al.*, 2000)，用於治療非小細胞肺癌以及多發性骨髓瘤等。其他已完成臨床試驗的藥物如：COL-3 以及 BMS-275291 皆屬於合成性的基質金屬蛋白酶抑制劑 (Lara *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2014)。

5. 作用機轉不明：

已進入臨床用途的藥物但其分子作用機轉仍然不清楚，如：thalidomide 以及 thalidomide 的類似物 CC-5013 (Ley *et al.*, 2015)；鈣離子流動抑制劑 CAI (carboxyamido-triazole) 和 COX-2 抑制劑 Celecoxib (Muehlbauer, 2003; Jeon *et al.*, 2015)。

三、內皮細胞的訊息傳遞

3.1 血管內皮細胞生長因子及其受器之特性與分類

血管新生過程中所需要的調控因子眾多，無論是誘導或抑制者皆參與其中，在正常生理狀態下，內皮細胞不會過度活化分化，血管的新生做為維持正常生理功能。血管新生因子作用在內皮細胞受器或是作用在細胞內誘導訊息傳遞，最重要的 VEGF 稱為血管通透因子，又分為 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 以及 VEGF-F，另外還有 ligand PlGF (placental growth factor)；receptor 的部分則有 VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase；Flt-1)、VEGFR-2 (fetal liver kinase-1/kinase insert domain containing receptor；Flk-1/KDR) 以及 VEGFR-3 (Flt-4)，皆屬於 tyrosine kinase receptors (RTKs)。這些受器在內皮細胞膜上的組合分為各自 homodimer、VEGFR-1 & -2 heterodimer 以及 VEGFR-2 & -3 heterodimer，不同的 ligand 對於不

同的 receptor 有其專一性。

內皮細胞的訊息傳遞除了必要的 receptor 以及 ligand 之外，還牽涉到一些不同的 coreceptor 幫忙，VEGFs 和 VEGFRs 同時都要和 co-receptor 例如硫化肝素蛋白多醣 (heparan sulphate proteoglycans; HSPGs) 以及神經纖毛蛋白質 (neuropilins) 做結合，如此結合產生的交互作用會影響 VEGFR 的相關反應，例如改變 receptor complex 的半衰期。

另外，血流也會藉由非 ligand 結合的方式活化 VEGFRs，這種方式是藉由形成一種 mechanosensory complex，其中 complex 組成包括細胞附著因子 (platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1; PECAM1)、血管內皮細胞鈣黏附因子 (vascular endothelial (VE) – cadherin)、凝集素 (integrins) 以及 VEGFRs，並利用流體力學應力的方式活化內皮細胞 (Olsson *et al.*, 2006) (附圖 3)。

3.2 VEGFR 下游訊息傳遞

VEGFR的活化首先需要ligand和receptor之間的結合，而在缺氧環境之下 (hypoxia) 會導致ligand VEGFA的大量表現，因缺氧環境會穩定hypoxia-inducible factors (HIFs) 的結構，並且和VEGFA基因的啟動子 (promoter) 做結合，增加其轉錄轉譯。同樣地原理，VEGFR-1、-2以及-3在缺氧環境之下表現量皆會增加。Ligand VEGF在轉譯成蛋白質時會經過mRNA的選擇性剪接 (alternative splicing)，形成不同VEGF異構物 (isoforms)，各自有不同的生物活性，在人體中主要為VEGFA₁₂₁、VEGFA₁₄₅、VEGFA₁₆₅、VEGFA₁₈₉以及VEGFA₂₀₆。一旦這些ligands結合到各自的VEGFR2之後，會使得receptor開始在胺基酸tyrosine的位置自體磷酸化 (autophosphorylation)，活化後的receptor會吸引相關反應的蛋白聚集，並且接著活化訊息傳遞的第二信使者 (second messenger)，開始一連串的下流反應。以VEGFR2而言，不同位置的tyrosine phosphorylation影響不同下游的訊息傳遞，Tyrosine 951會活化下游的src增加血管通透性、促進細胞移行能力 (cell migration)；Tyrosine

1214可以活化兩條下游，磷酸化FAK和p38 MAPK也會增加血管通透性，增加cell migration的能力。Tyrosine 1175則是可同時活化PI3K-Akt pathway增加細胞存活 (cell survival)，也可活化Erk1/2促進細胞增生 (cell proliferation)。這些VEGFR2下游訊息傳遞最終都是會促進血管的新生 (Olsson *et al.*, 2006; Verbridge *et al.*, 2013) (附圖 4)。

3.3 MAPK路徑與血管新生

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 屬於一群具有 serine-threonine kinase 的蛋白，負責調控細胞內部許多訊息傳遞進而影響許多生理功能，包括胚胎發育、細胞增生、分化、存活、凋亡以及變形等等。MAPK 家族中可分為多條下游路徑，其中最常見的為下列三條路徑：(1) Extracellular-signal regulated kinase (ERK) pathway, (2) p38 (MAPK14) pathway, (3) c-JNK N-terminal (MAPK8) pathway，此三條路徑分別在訊息傳遞上具有不同的調控腳色 (Liu *et al.*, 2007)。MAPK 訊號的傳遞需要至少三個 kinase，依序活化以傳遞自細胞膜上受器接收的訊息 (附圖 5)。

1. ERK pathway 與血管新生：

目前已有研究顯示抑制 Erk1/2 的活化能夠影響血管新生，包括內皮細胞的增生以及細胞移行的能力，在體外以及體內實驗皆已證明，包括類血管管腔形成減少以及 matrigel plug 中的血管形成減少。以細胞增生而言，目前 microarray 已分析出 Erk1/2 會去調控細胞週期相關蛋白的轉錄，包括 cyclin A、cyclin B、cyclin D1、cyclin E、CDK1、CDK4 以及 c-Myc 等等，因此若移除 p-Erk1/2 的活化則會造成內皮細胞週期無法至 G0/G1 期進入 S 期，造成 G0/G1 期停滯。在細胞移行的部分，paxillin 以及 focal adhesion kinase (FAK) 已被公認為調控肌動蛋白絲 (actin filament) 的聚集、細胞擴展以及細胞移行中兩個重要的蛋白，Erk1/2 的活化也會

增加兩者的表現促進細胞的爬行能力，因此若抑制 Erk1/2 的活化，則會造成 paxillin、FAK 本身蛋白以及 p-FAK (tyrosine 397) 之蛋白表現量皆下降，但研究已顯示並不影響兩者的 mRNA 表現量，因而推測是藉由影響轉譯後的修飾而導致蛋白表現量下降，進而降低細胞移行的能力 (Mavria *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2009)。

2. p38 MAPK pathway 與血管新生：

研究已顯示 p38 對於 VEGFR2 下游的訊息傳遞路徑扮演重要腳色，且有研究證實若缺少 p38 α 會造成胚胎發育異常的血管新生 (Mudgett *et al.*, 2000)，目前已知 p38 MAPK 對於內皮細胞血管新生最主要為調控細胞移行的能力，當 VEGFR2 活化後開啟 p38 MAPK 路徑，活化後的 p38 會繼續磷酸化 Hsp27、LIMK1 以及 cofilin，而造成機動蛋白的聚合與張力絲 (stress fiber) 的形成以促進細胞移行，另外亦有研究顯示在缺氧環境之下，p38 MAPK 的活化也會間接地造成 VEGF 表現量減少，進而影響血管新生的訊息傳遞 (Issbrucker *et al.*, 2003)。

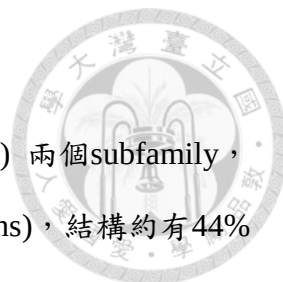
3.4 Akt/mTOR路徑與血管新生

PI3K/AKT/mTOR 路徑經由許多跨膜的生長因子受器經與生長因子結合後所活化，包括 ErbB family receptors, fibroblast growth factor receptors (FGFR), insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) 等等，除此之外 GPCR 也會經由活化 RAS 進而刺激 PI3K 具有活性的單元而造成 PI3K 之活化。活化後的 PI3K 會移動至細胞膜上，進一步使得 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 磷酸化成為 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃)，在此步驟有一負調控的角色即為 PTEN，會將 PIP₃ 去磷酸化轉變回 PIP₂ (Carracedo *et al.*, 2008; Polivka Jr *et al.*, 2014)。PIP₃ 會接續磷酸化 serine/threonine kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) 以及 AKT threonine 308 的位置 (Manning *et al.*, 2003)，活化後的 AKT 也會磷酸化 TSC2 進而抑制 TSC1/TSC2 複合物，而使得 RHEB 能夠去活化 mTOR 訊息得以傳

遞下去。活化後的 mTORC1 會藉由活化其下游的蛋白包括 eukaryotic translation initiation factor eIF4E-binding protein 1 (4EBP1) and p70S6 kinase (S6K) 以增加蛋白質的合成。PI3K/Akt/mTOR 路徑亦有負回饋的機制存在，包括藉由下游的 S6 kinase 抑制 PI3K 的活化 (Burris, 2013)。另外，磷酸化以及抑制 insulin receptor substrate 1 (IRS-1) 此適應蛋白亦會對於 insulin 或是 insulin-like growth factor 1 (IGF1) 所引發的 PI3K 路徑活化扮演負調控的角色。除此之外，活化後的 AKT 也會增加細胞存活，例如藉由抑制 proapoptotic Bcl-2 家族包括 BAD 以及 BAX 的表現而導致細胞凋亡 (Engelman *et al.*, 2006) (附圖 6)。

目前已有許多研究顯示 PI3K/Akt/mTOR 路徑可經由 RAS 的突變、PTEN 基因的表現減少或是生長因子受器例如 EGFR 表現的增加等等而導致活化。PI3K/Akt/mTOR 對於發育過程中正常的血管生成也扮演重要的角色，一旦 VEGF 與 VEGFR 結合後便開啟下游的反應，例如 PI3K 的 p110 α 會藉由正向調控 Rho 的活性而促進內皮細胞的移行以及血管新生 (Graupera *et al.*, 2008)、Akt 會增加內皮細胞的增生以及存活 (Primo *et al.*, 2007)、下游的 eNOS 表現也會增加血管的穿透度。在腫瘤細胞中，過度活化 PI3K/Akt/mTOR 路徑會藉由 HIF-1 α 相關性或是無相關性地增加 VEGF 生長因子的分泌，同時 PI3K/Akt 也會藉由調控其他血管新生相關因子例如 nitric oxide (NO) 以及 angiopoietin 的表現進而增加腫瘤中的血管新生 (Karar *et al.*, 2011)。EGFR/PI3K/Akt/mTOR 路徑會藉由正向調控 HIF-1 α ，增加 HIF-1 α 蛋白質表現量而不影響其 mRNA 量，進而增加 VEGF 的表現 (Pore *et al.*, 2006)，另外 EGFR 的活化亦會藉由調控 HIF-1 α 非相關性路徑，而是透過 PI3K 路徑調控 VEGF 啟動子的轉錄活性而達到增加 VEGF 表現量的增加 (Maity *et al.*, 2000)，因此在不同腫瘤中，已有許多研究藉由藥理機制抑制 EGFR 以降低 VEGF 分泌進而減少腫瘤的血管生成 (Huang *et al.*, 2002)。

四、神經纖毛蛋白質 (Neuropilin)



4.1 Neuropilin 結構與生理功能

Neuropilin分為Neuropilin-1 (NRP1) 以及Neuropilin-2 (NRP2) 兩個subfamily，兩者皆為單一穿膜醣蛋白 (single pass transmembrane glycoproteins)，結構約有44%相似，皆由三個domain所組成，膜外domain約由840個胺基酸組成，一個小的穿膜domain，以及約40個胺基酸所組成的膜內domain (附圖 7)。本身缺乏生物的催化活性 (catalytic activity) (Schwarz *et al.*, 2010)，但其膜內domain會和一個適應蛋白 (adaptor protein) synectin或稱為GIPC1互相作用，以促進細胞內嚥作用的物質運輸 (endocytic trafficking) (Salikhova *et al.*, 2008)。NRP1的ligand有兩個，第一個為分泌性醣蛋白semaphorin 3 (SEMA3A)，調控神經軸突 (axon) 生長方向；另一個則為VEGF₁₆₅，是NRP1作為VEGFR2 co-receptor共同調控血管新生重要關鍵。

4.2 NRP1與血管新生

在胚胎發育時期以及新生兒，NRP1對於發展新生血管扮演重要的角色，特別是在後腦以及視網膜 (Fantin *et al.*, 2011)。早期研究發現在基因轉殖並放大 (transgenic overexpression) NRP1的小鼠中，微血管的分支會增加，但也同時會造成出血的現象 (Kitsukawa *et al.*, 1995)；並且另一方面若無NRP1表現，則會造成小鼠大腦以及脊髓之芽生性血管生成減少 (Fantin *et al.*, 2013)；同樣的現象也出現在knockdown印度斑馬魚的NRP1a以及NRP1b之後，會造成降低血管的生成以及動脈和靜脈的形成 (Wang *et al.*, 2006)。在小鼠血管新生的實驗中，NRP1不僅僅只表現在內皮細胞上，在神經元幹細胞 (neural progenitors) 以及在芽生性血管旁的巨噬細胞上皆有表現 (Fantin *et al.*, 2010)。除此之外，NRP1也被證實會增加VEGF以及細胞外間質 (extracellular matrix; ECM) 所刺激的內皮細胞移行 (Raimondi *et al.*, 2014)。綜合以上可知NRP1除了影響動物發育期的血管新生之外，對於腫瘤的血管新生而言也具有不可或缺的特性 (Fantin *et al.*, 2013) (附圖 8)。



五、 組蛋白去乙醯化酶 (Histone deacetylases ; HDACs)

5.1 附基因調控(Epigenetic regulation)

表徵遺傳學 (epigenetic) 首先是由 C. H. Waddington 於 1942 年作為後生論和遺傳學的合詞而提出 (Waddington, 2012)。接著，Robin Holliday 將表徵遺傳學定義為「在複雜有機體的發育過程中，對基因活性在時間和空間中調控機制的研究」。因此，後生論也可用於描述任何影響有機體發育的因素，而不僅僅是 DNA 序列。Adrian Bird 將表徵遺傳學定義為，染色體的構造適應，以便啟始、發出信號或保持變構的活性狀態 (Bird, 2007)，這個定義既包括 DNA 修復或細胞周期的改變，也包括多代細胞的穩態改變，另外，「表徵遺傳學」也被用於描述還未證實的組蛋白修飾的遺傳過程。

Epigenetic regulation 是指不改變核苷酸序列，而改變生物體表現型(phenotype)或基因表現的基因調控方式。換言之，非遺傳因子 (non-genetic factors) 引起的基因表現差異，就是附基因調控。多細胞生物具有細胞分化的現象，即每一個體細胞所含的遺傳物質是相同的，但是其基因表現卻不同，有些基因被活化而表現，有些卻被抑制而靜默，這便是附基因調控的結果。附基因調控機制包括 DNA 的甲基化 (DNA methylation)、組蛋白的乙醯化及去乙醯化、和甲基化 (Histon acetylation/deacetylation & methylation)、以及微小 RNA 的表現 (microRNA expression) (Hajji *et al.*, 2010) 等等。

5.2 染色質結構與轉錄後修飾

染色質是遺傳物質 DNA 和富含鹼性基正電荷蛋白質的組蛋白 (histone) 在細胞間期 (G0/G1 phase) 緊密纏繞的形態表現，其基本結構為串珠狀的染色質絲。染色質的結構單體為核小體 (nucleosome)，核小體為直徑約 10 nm 的扁圓球形，大約由 200 個 (160-240) 左右鹼基對 (base pair) 的 DNA 和五種組蛋白結合而成，

DNA 纏繞核心 1.75 周，含 140 個鹽基對。其中四種組蛋白 (H2A、H2B、H3、H4) 各 2 分子組成八聚體的小圓盤，是核小體的核心結構 (附圖 9)。目前已知染色質有兩種類型，分別是真染色質 (euchromatin) 與異染色質 (heterochromatin)，兩者差異最早是以受到染色之後的顏色深度來分辨，前者較淡，而後者則較深。真染色質結構較鬆散可被轉錄，相對來說，異染色質一般分布於細胞核的邊緣地帶，其結構較為緊密，組蛋白包覆率及雙螺旋化的程度較高，沒有轉錄的功能 (Hansen, 2012)。

目前已知的轉錄後修飾包括以下：乙醯化反應 (acetylation)、甲基化 (methylation)、磷酸化 (phosphorylation) 以及泛素化 (ubiquitination)，這些轉錄後修飾會影響組蛋白與 DNA 的緊密程度，而導致之後基因的轉錄以及轉譯。以乙醯化的酵素 HAT (histone acetyltransferase) 來說，其受質最常見的即是組蛋白、轉錄因子、細胞核運輸因子以及細胞骨幹之重要組成微管蛋白。做為表觀基因調控的重要機制，轉錄因子可藉由特殊的 bromodomain 結構來辨識被乙醯化的組蛋白，進而影響染色質的結構和相關基因的表現，histone acetylation 最常去中和 histone4 lysine 支鏈上的正電荷，使之與帶有負電荷的 DNA 纏繞放鬆，進而促進轉錄因子進入基因之啟動子區域來活化轉錄過程的進行。乙醯化也會減少受質蛋白被泛素化的程度而保護受質蛋白不被蛋白酶降解，進而提升蛋白穩定度 (Zentner *et al.*, 2013) (附圖 10)。

5.3 HDACs 與 HDAC 抑制劑

組蛋白去乙醯化酶 (Histone deacetylases ; HDACs) 和 HAT 皆為參與 epigenetics 調控的重要酵素，共同調節染色質組蛋白的乙醯化修飾。HAT 可使抑癌基因 (tumor suppressor) 轉錄，使癌細胞受到控制，而 HDAC 的作用則是相反。兩者在正常細胞中可達到平衡，但近年來的研究發現癌症的發生和進展和表觀基因調控的失常有關，且發現多和 HDAC 在癌細胞中過度表達相關 (附圖 11)。目前已

知 HDAC 共有 18 種酶，依照與酵母菌 catalytic domain 的同源性分成四大類 (附圖 12)：

1. Class I：HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8 (多表現於細胞核)
2. Class IIa：HDAC4、HDAC5、HDAC7、HDAC9 (表現於細胞核及細胞質)
Class IIb：HDAC6、HDAC10 (多表現於細胞質)
3. Class III：Sirtuins 1-7 (表現於細胞核、細胞質以及粒線體)
4. Class IV：HDAC11 (表現於細胞核)

除了分類 Class III Sirtuins 1-7 其 cofactor 為 NAD^+ 以外，其他 HDAC isoform cofactor 皆為 Zn^{2+} (Alenghat *et al.*, 2014)。

不同的 HDAC 所調控的生理功能皆有不同之處 (附表 3)，影響之層面相當廣，包括了相關的 transcription factor、histones、chaperones 以及 DNA methylation 等等，近年來也有越來越多研究發現 HDACs 的異常活化與特定的癌症具有關性 (附表 4)，其中又以胃癌、肺癌、乳癌、以及前列腺癌為最密切相關。因此 HDAC 抑制劑目前研究已知除了會造成細胞 apoptosis 以及 autophagy，也會藉由增加 p21、減少 cyclin 而影響細胞週期；在血管新生的部分則是會降低 HIF-1alpha 以及 VEGF 的表現；同時也會減少細胞 DNA 損傷後的修復功能，增加 ROS 造成的細胞死亡；在 HDAC6 相關 protein 中，因 HDAC6 是熱休克蛋白 (Heat shock protein) 90 的 client protein，因此 Hsp90 的表現量亦會減少，使癌細胞相關的訊息傳遞也因此被影響 (Khan *et al.*, 2012) (附圖 13)。

目前 HDAC 抑制劑依照化學結構可分為六大類 (附表 5)：

1. Short-chain fatty acid：butyrate、valproic acid (VPA)、AN-9 (prodrug)，主要針對 Class I 以及 Class IIa 的 HDAC。
2. Hydroxamate：trichostatin A (TSA)、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, vorinostat)、PXD101、LAQ824、LBH589，目標為 Class I 以及 Class II。
3. Benzamide：MS-275、CI-994 (tacedinaline)，前者抑制 HDAC1、2、3、8。

- 
4. Cyclic tetrapeptide : depsipeptide、trapoxin A、apicidin 主要抑制 Class I 以及 II。
 5. Electrophilic ketone : trifluoromethylketone，並無抑制特定的 HDAC 專一性。
 6. Miscellaneous : depudecin、MGCD-0103，主要對抑制 Class I HDAC 有效。

目前 HDAC 抑制劑用於治療癌症的臨床試驗越來越多，且試驗結果也有越來越樂觀的趨勢 (附表 6)，所以如果能夠更加了解並控制細胞中 epigenetic regulation 的機轉，以及考慮其失常的可逆性，則在癌症治療中，利用 epigenetic therapy HDAC inhibitors 的未來臨床發展應是充滿希望的 (West *et al.*, 2014)。

5.4 HDAC 抑制劑與血管新生

目前已有許多研究證明，HDAC 與血管新生具有密不可分的關係，且有大量臨床研究證明 HDAC 可以促進新生血管的形成，其主要機制如下 (Shankar *et al.*, 2008)：

1. 增加缺氧誘導因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的表現：HIF-1 是一個 heterodimer 的轉錄因子，由 HIF-1 α 以及 HIF-1 β 所構成。在細胞缺氧的狀態環境下，HDAC1-3 的表現量會增加，進而抑制 p53 以及 VHL 不去水解 HIF-1 α ，使得 HIF-1 α 以及 VEGF 的表現量增加，促進血管新生。另外，Class II 的 HDAC 包括 HDAC 4、6、7 也會直接或是間接的影響 HIF-1 α ，增加其基因轉譯活性 (附表 7)。
2. 調控內皮細胞一氧化氮合酶 (eNOS) 的表現，以及調節內皮細胞的功能
3. 抑制 VEGF 拮抗體 (antagonist) 的生成，例如 semaphorin III。
4. 增加 bFGF mRNA 的表現量，使得 bFGF 進而提高 VEGF 及 VEGFR 在內皮細胞中的表現量。
5. 調控 angiostatin、platelet thrombospondin (TSP) 之活性。
6. 抑制內皮細胞的增生，移行和毛細血管 (capillary) 的形成。

而同時許多研究也發現 HDAC 抑制劑作用在癌細胞和內皮細胞中，會去影響

許多和血管新生相關的基因，進而促進或是抑制血管的生成，因此 HDAC 抑制劑作為對抗腫瘤血管新生，以及減少癌症轉移可視為未來治療癌症臨床發展的重要方向 (Ellis *et al.*, 2009) (附表 8)。



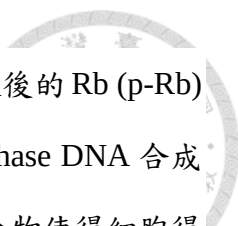
六、細胞週期 (cell cycle)

6.1 細胞週期分期

細胞週期是指細胞生長與細胞分裂交替進行，可以大致分為兩個時期：間期 (interphase) 以及細胞分裂期 (M phase)。在間期中，又分為三個時期 G₀/G₁ (GAP 1)、S (synthesis)、G₂ (GAP2)，主要工作是進行細胞的生長以及 DNA 的複製工作，而在 M phase (mitosis)，染色質絲逐漸聚集濃縮成棒狀的染色體，細胞核和其餘的細胞質進行分裂成為兩個細胞。值得一提的是 G₁ phase 是一個變動性相當大的時期，在細胞分裂較快速的細胞，例如癌細胞，G₁ phase 非常短暫甚至是沒有 G₁ 期，而在細胞分裂較慢的細胞中，例如人類臍靜脈內皮細胞，G₁ 可以長達數小時甚至數天。

6.2 細胞週期的調控

細胞並非永遠都在進行 cell cycle，在細胞週期中有幾個特殊的點可以控制細胞是否進行細胞週期，稱為限制點 (restriction point)。這些 restriction points 分別在 G₀/G₁ phase 的晚期，以及 G₂ phase 要進入 M phase 時，並且是由不同的週期素 Cyclin、cyclin-dependent kinases (CDKs)，以及 cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) 所調，依細胞所處的環境優劣，以決定細胞週期是否可進入下一個 phase。CDK 需要與 cyclin 結合形成複合物才會活化，在細胞週期進行的過程中，cyclins 會在特定的時間點合成與分解，以調控 CDK 活性。在 G₁ phase 時，若細胞有受到生長因子的刺激，會促進 cyclin D 的轉錄以及轉譯，並且與 CDK4/CDK6 形成複合



物後去磷酸化與轉錄因子 E2F 結合的 retinoblastoma (Rb) 蛋白，磷酸後的 Rb (p-Rb) 會與 E2F 分離，使 E2F 進行相關基因的轉錄與活化，包括掌管 S phase DNA 合成的 cyclin A、cyclin E 以及 CDK2。接著，cyclin E 與 CDK2 形成複合物使得細胞得以從 G1 phase 進入 S phase，而 cyclin A 與 CDK2 複合物則促進細胞週期進入 G2 phase (Musgrove *et al.*, 2011) (附圖 14)。進入 G2 phase 後，接著由 cyclin B 以及 CDK1 複合物來調控細胞週期進入 M phase 進行細胞的有絲分裂。M phase 又分為前期 (prophase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase) 以及末期 (telophase)。細胞分裂的過首先 CDK activated kinase 會磷酸化 CDK1 Threonine 161 的位置，同時 Cdc25C 此去磷酸化酵素則會將 CDK1 上 Threonine 14 以及 Tyrosine 15 位置的磷酸根去除，兩者酵素的作用可使 CDK1 形成活化態，並且與 cyclin B 結合形成複合物使細胞進入 M phase 並完成有絲分裂 (Narasimha *et al.*, 2014)。

另外 CDKIs 的作用即為抑制 cyclin 的表現量，進而調控細胞週期的進程，p15、p16、p18、p19 會抑制 cyclin D 以及 CDK4/6 形成複合物，使得下游 E2F 以及 Rb 無法被活化；p21 的過度表現則會抑制 cyclin E 使得細胞無法進入 S phase 造成 G0/G1 arrest；p27 則會抑制 cyclin A 影響 S phase DNA 的複製；p57 則會抑制 cyclin B 使細胞無法從 S phase 進入 G2/M phase。在癌細胞中，這些 CDKIs 可視為抑癌基因 (tumor suppressor gene) 其表現量會減少，失去原有細胞週期的平衡後，細胞開始不正常的增生以及減少細胞凋亡，因此在抗癌藥物的選擇上多為增加 CDKI 如 p21、p27 的表現，進而抑制不同 cyclin，導致癌細胞產生 G0/G1 phase arrest 或是 G2/M phase arrest，而找回原本細胞週期的平衡，減少細胞的不正常增生 (Warfel *et al.*, 2013) (附圖 15)。

附表 1. Disease characterized or caused by abnormal or excessive angiogenesis.

Organ	Diseases in mice or humans
Numerous organs	Cancer (activation of oncogenes; loss of tumor suppressors); infectious diseases (pathogens express angiogenic genes ¹¹² , induce angiogenic programs ¹¹³ or transform ECs ¹¹⁴); autoimmune disorders (activation of mast cells and other leukocytes)
Blood vessels	Vascular malformations (Tie-2 mutation ⁶⁸); DiGeorge syndrome (low VEGF and neuropilin-1 expression ³³); HHT (mutations of endoglin or ALK-1 (ref. 69)); cavernous hemangioma (loss of Cx37 and Cx40 (ref. 44)); atherosclerosis; transplant arteriopathy
Adipose tissue	Obesity (angiogenesis induced by fatty diet; weight loss by angiogenesis inhibitors ¹¹⁵)
Skin	Psoriasis, warts, allergic dermatitis, scar keloids, pyogenic granulomas, blistering disease, Kaposi sarcoma in AIDS patients ¹¹⁴
Eye	Persistent hyperplastic vitreous syndrome (loss of Ang-2 (refs. 65,116) or VEGF164 (ref. 18)); diabetic retinopathy; retinopathy of prematurity; choroidal neovascularization (TIMP-3 mutation ⁵¹)
Lung	Primary pulmonary hypertension (germline BMPR-2 mutation; somatic EC mutations ^{73,75,76}); asthma; nasal polyps
Intestines	Inflammatory bowel and periodontal disease, ascites, peritoneal adhesions
Reproductive system	Endometriosis, uterine bleeding, ovarian cysts, ovarian hyperstimulation ²⁵
Bone, joints	Arthritis, synovitis, osteomyelitis, osteophyte formation ¹²

Carmeliet P (2003) Nat Med. Jun;9(6):653-60.

附表 2. Angiogenesis inhibitors : current indications.

Drug	Mechanism of Action	Disease Area	Clinical Trials	FDA Approval Status
Bevacizumab (Avastin)	Anti-ligand: antibody to VEGF-A	Colorectal	Phase III 1st & 2nd lines	Stage IV/metastatic, with fluoropyrimidines
		Ovarian	Phase III 1st line	Pending; combined & in maintenance
		Breast		Approval rescinded due to safety/efficacy concerns
Aflibercept	Anti-ligand: fusion protein mimicking VEGFR-1 & -2 binding → ↓ VEGFs	Colorectal	Phase III 2nd line	Stage IV/metastatic, with FOLFIRI
AMG 386 and MEDI 3617	Anti-angiopoietin (antibody that inhibits the binding of angiopoietin 1 & 2 with their receptor Tie-1)	Colorectal ovarian	Phase I/II	Awaiting phase III studies
Sunitinib (Sutent), sorafenib (Nexavar), axitinib (Inlyta) (receptor tyrosine kinase inhibitors)	Inhibition of VEGFR-2 (among other actions)	Renal cell	Phase III	Clear-cell metastatic (sunitinib, sorafenib)
		HCC	Phase III	Childs A cirrhotic background (sorafenib)
		Thyroid cancer	Phase II	Metastatic papillary (axitinib, sorafenib)
Everolimus (Afinitor), temsirolimus (Torisel) (mTOR inhibitors)	Inhibition of ↑ VEGF synthesis (among other actions)	Renal cell	Phase III	Recurrent, high-risk
		Breast	Phase III	Aromatase inhibitor (AI) failure, with an AI

FOLFIRI = folinic acid, fluorouracil, and irinotecan; HCC = hepatocellular cancer; mTOR = mammalian target of rapamycin; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGFR = VEGF receptor.

Joseph SO, Wu J, *et al.* (2012) *Oncology*. Nov;26(11):1021-30, 1035.

附表 3. HDACs: molecular function and role in normal development.

	HDAC family member		Substrates	Binding Partners	Tissue Expression	mouse knock out phenotype
class I	HDAC1	N	p53, MyoD, E2F-1, Stat3, androgen	Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST	ubiquitous	embryonic lethal day 9.5, p21 and p27 up-regulation, reduced overall HDAC activity
	HDAC2	N	Bcl-6, Stat3, glucocorticoid receptor, YY-1	Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST	ubiquitous	viable until perinatal period, fatal multiple cardiac defects, excessive hyperplasia of heart muscle, arrhythmia
	HDAC3	N	GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP	N-CoR/SMRT	ubiquitous	embryonic lethal before day 9.5, defective cell cycle, DNA repair and apoptosis in embryonic fibroblasts. Conditional liver knock out results in hepatocyte hypertrophy and induction of metabolic genes
	HDAC8	N/C	nd	EST1B	ubiquitous	nd
class II A	HDAC4	N/C	GCMa, GATA-1, HP-1	ANKRA, RFXANK	heart, smooth muscle, brain	viable, premature and ectopic ossification, chondrocyte hypertrophy
	HDAC5	N/C	Smad7, HP-1, GCMa	REA, estrogen receptor	heart, smooth muscle, brain	myocardial hypertrophy, abnormal cardiac stress response
	HDAC7	N/C	FLAG1 and 2	HIF1a, Bcl-6,	heart, placenta, pancreas, smooth muscle	embryonic lethal, lack of endothelial cell-cell adhesion
	HDAC9	N/C	nd	FOX3P	smooth muscle, brain	viable at birth, spontaneous myocardial hypertrophy
class II B	HDAC6	C	a-Tubulin, HSP90, SHP, Smad7	nd	kidney, liver, heart, pancreas	viable, no significant defects, increase in global tubulin acetylation. MEFs fail to recover from oxidative stress
	HDAC10	C	HSP90?	nd	spleen, kidney, liver	nd
class IV	HDAC11	N/C	nd	HDAC6?	heart, smooth muscle, kidney, brain	nd

Abbreviations: MEFs, mouse embryonic fibroblasts; N, nuclear; C, cytoplasmic; N/C, nuclear and cytoplasmic; nd, no data

Witt O et al. (2009) Cancer Lett. May 8;277(1):8-21.

附表 4. Aberrant regulation of HDACs in cancer.

HDAC	Normal and oncogenic protein associations	Expression in cancer	Genetic evidence	Reference
Class I (homologous to RDP3 yeast protein, nuclear location, ubiquitous tissue expression)				
HDAC1	HDAC2, CoREST, NuRD, Sin3, AML1-ETO, PML, PLZF, BCL6, p53, AR, ER, Rb/E2F1	Elevated in gastric ^A , breast ^B , colorectal, HL, lung ^A , liver ^A	KD induced growth arrest, decreased viability, and increased apoptosis in colon, breast, and osteosarcoma cancer cells and increased survival of mice with overt PML-RAR α -mediated APL; HDAC1 KO/HDAC2 KD induced growth arrest in fibroblasts; KO induced genomic instability and arrest and reduced survival of transformed cells in vivo	7–9, 11, 12, 95–106
HDAC2	HDAC1, CoREST, NuRD, Sin3, AML1-ETO, PML, PLZF, Bcl6	Elevated in gastric ^A , prostate ^A , colorectal ^A , HL, CTCL	KD induced growth arrest, decreased viability, and increased apoptosis in colon and breast cancer cells and induced apoptosis and decreased lung cancer in vivo; HDAC1 KO/HDAC2 KD induced growth arrest in fibroblasts; KO induced genomic instability and arrest and reduced survival of transformed cells in vivo; KD induced apoptosis and decreased lung cancer in vivo	6, 7, 12, 96–101, 103, 106–109
HDAC3	HDAC4, HDAC5, HDAC7, NCoR/SMRT, AML1-ETO, PML, PLZF, PML-RAR α , PLZF-RAR α , Bcl6, STAT1, STAT3, GATA1, GATA2, NF- κ B	Elevated in gastric ^A , breast ^{A,B} , ALL, colorectal, HL; decreased in liver	KD in colon cancer cells decreased survival, increased apoptosis, and relieved transcriptional repression mediated by PML-RAR α in APL cells	7, 8, 12, 25, 78, 96, 97, 99, 100, 105, 110–113
HDAC8		Elevated in neuroblastoma	KD reduced proliferation of lung, colon, and cervical cancer cells	50, 71
Class IIa (homologous to Hda1 yeast protein, shuttle between nucleus and cytoplasm, tissue-restricted expression)				
HDAC4	HDAC3-NCoR, GATA1		KD in chondrosarcoma cells increased VEGF expression and reduced growth and induced apoptosis of colon and glioblastoma tumors in vivo	76–78, 105, 114
HDAC5	HDAC3-NCoR, GATA1, GATA2	Elevated in medulloblastoma; decreased in lung	KD decreased medulloblastoma cell growth and viability	9, 78, 105, 115
HDAC7	HDAC3-NCoR, ER α	Elevated in ALL; decreased in lung	KD induced growth arrest in colon and breast cancer cells	10, 78, 110, 116
HDAC9		Elevated in ALL, medulloblastoma	KD of HDAC9/10 inhibited homologous recombination and increased sensitivity to DNA damage and decreased medulloblastoma cell growth and viability	110, 115, 117
Class IIb (homologous to yeast protein Hda1, mostly cytoplasmic location, tissue-restricted expression)				
HDAC6	α -Tubulin, HSP90, HDAC11	Elevated in breast ^B , CTCL; decreased in lung	KD decreased VEGF expression and decreased cell viability due to accumulation of misfolded proteins	10, 16, 83, 105, 118, 119
HDAC10			KD of HDAC9/10 inhibited homologous recombination and increased sensitivity to DNA damage and decreased VEGF expression	117, 119
Class IV (unknown yeast protein homology, cytoplasmic location, tissue-restricted expression)				
Class 11	HDAC6	Elevated in breast, renal, liver	KD induced apoptosis in colon, prostate, breast, and ovarian cancer lines	94, 120, 121

^AIndependent prognosis indicator. ^BAssociated with enhanced prognosis. KD, knockdown; HL, Hodgkin lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

West AC, Johnstone RW. (2014) J Clin Invest. Jan;124(1):30-9.

附表 5. Molecular characteristics and clinical trial status of HDAC inhibitors.

Class	Compound	[range]	HDAC specificity	Clinical trials
Short-chain fatty acid	Butyrate	mM	Class I, IIa ¹²¹	Phase I, II
	Valproic acid (VPA)	mM	Class I, IIa ¹²¹	Phase I, II
	AN-9 (prodrug)	μM	N/A	Phase I, II
Hydroxamate	Trichostatin A (TSA)	nM	Class I, II ¹²¹	N/A
	Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat)	μM	Class I, II ¹²¹	Phase I, II, III (pre-registration)
	PXD101	μM	Class I, II ¹²¹	Phase I
	Oxamflatin	μM	N/A	N/A
	LAQ824	nM	Class I, II ¹²¹	Phase I
	LBH589	nM	Class I, II ¹²¹	Phase I
	<i>m</i> -carboxycinnamic acid bis-hydroxamide (CBHA)	μM	N/A	N/A
	Scriptaid	μM	N/A	N/A
	Pyroxamide	μM	Class I, unknown effect on class II ¹²⁶	Phase I
	Suberic bishydroxamic acid (SBHA)	μM	N/A	N/A
	Azelaic bishydroxamic acid (ABHA)	μM	N/A	N/A
	SK-7041	nM	HDACs 1 and 2 ¹²⁷	N/A
	SK-7068	nM	HDACs 1 and 2 ¹²⁷	N/A
	CG-1521	μM	N/A	N/A
	Tubacin	μM	Class IIb ³⁹	N/A
Benzamide	MS-275	μM	HDACs 1, 2, 3, 8 (marginally) ³⁴	Phase I, II
	CI-994 (tacedinaline)	μM	N/A	Phase I, II, III
Cyclic tetrapeptide	Depsipeptide	nM	Class I ³⁶	Phase I, II
	Trapoxin A	nM	Class I, IIa ¹²¹	N/A
	Apicidin	nM	HDACs 1 and 3, not HDAC8 ¹²⁰	N/A
	CHAPs	nM	Class I ¹²⁸	N/A
Electrophilic ketone	Trifluoromethylketone	μM	N/A	N/A
Miscellaneous	Depudecin	μM	Class I, unknown effect on class II ¹²⁹	N/A
	MGCD-0103		Class 1 ²⁰⁵	Phase I

Jessica E. Bolden et al. (2006) Nat Rev Drug Discov. Sep;5(9):769-84.

附表 6. HDAC inhibitors in current clinical trials.

HDACi	Highest phase trial	Cancer type	Best clinical outcome	Reference
Panobinostat (LBH-589)	III	CTCL	Ongoing; promising in phase II against CTCL (74% tumor reduction), HL (74% tumor reduction and 27% OR), and WM (MR or better in 47% of patients, 50% SD)	122–124
Belinostat (PXD101)	II	Thymoma	Significantly enhanced survival	125
Entinostat (MS275)	II	Melanoma	Some clinical activity, promising PK and PD values	126–128
Mocetinostat (MGCD01030)	II	B cell malignancies	Disease control (35% rate) in HL	129
Givinostat (ITF2357)	II	JAK2 ^{V617F} -expressing myeloproliferative neoplasms	Pruritus relief (~100%), splenomegaly reduction (75% of PV/ET and 38% of MF patients)	130
Practinostat (SB939)	II	Prostate cancer	Limited clinical efficacy to date but promising PK values	131, 132
Chidamide (CS055/HBI-8000)	II	Solid tumors and lymphomas	Ongoing; PR was observed in 5/31 patients during phase I	61
Quisinostat (JNJ-26481585)	II	CTCL	Ongoing; 31.6% reduction in mSWAT score of tumor burden, 1/19 CR, 4/19 PR	63
Abexinostat (PCI- 24781)	II	FL	Tumor reduction in 86%, ORR of 64%	64
CHR-3996	I	Various (mostly solid tumors)	Favorable PK and PD values	60
AR-42	I	Hematological malignancies	Ongoing, minor clinical responses in myeloma and T cell lymphoma	62

CR, complete response; ET, essential thrombocythemia; FL, follicular lymphoma; MF, myelofibrosis; MR, minimal response; OR, overall response; ORR, overall response rate; PD, pharmacodynamic; PK, pharmacokinetic; PR, partial response; PV, polycythaemia vera; SD, stable disease; WM, Waldenström macroglobulinemia.

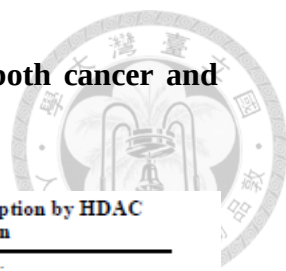
West AC, Johnstone RW. (2014) J Clin Invest. Jan;124(1):30-9.

附表 7. Direct and indirect influence of HDACs on HIF-1 α activity.

Target Protein	HDAC	Direct/ Indirect interaction with HIF-1 α	Mechanism	Effect of HDAC inhibition
pVHL and p53	HDAC1	Indirect	Overexpression of HDAC1 reduced pVHL and p53 expression resulting in increased HIF-1 α transcription	HDAC1 inhibition results in re-expression of pVHL and p 53 inducing HIF-1 a degradation
p300	HDAC?	Indirect	Proposed HDAC deacetylation regulates binding of p300 to HIF-1 α to induce HIF 1 α transactivation	HDAC inhibition induces acetylation of p300 causing its disassociation and degradation of HIF-1 α
Hsp90/Hsp70 axis	HDAC6	Indirect	HDAC6 regulates Hsp90 function and its interaction with HIF-1 α	HDAC6 inhibition results in hyperacetylation of Hsp90, accumulation of immature HIF-1 α /Hsp70 complex and degradation of HIF-1 α
HIF-1 α	HDAC1	Direct	HDAC1 binds the ODDD of HIF-1 α to positive regulate HIF-1 α stability and transactivation	HDAC1 inhibition results in the degradation and loss of HIF-1 α transcriptional activity
HIF-1 α	HDAC3	Direct	HDAC3 binds the ODDD of HIF-1 α to positive regulate HIF-1 α stability and transactivation	HDAC3 inhibition results in the degradation and loss of HIF-1 α transcriptional activity
HIF-1 α	HDAC7	Direct	HDAC7 co-translocates to the nucleus to increase HIF-1 α transcriptional activity via the formation of a HIF-1 α /HDAC7/p300 complex	No HDAC inhibition studies were performed
HIF-1 α	HDAC4	Direct	HDAC4 associates with HIF-1 α to increase its stability and transcriptional activity	Pharmalogical inhibition and shRNA against HDAC4 resulted in decreased HIF-1 α expression, transcriptional activity and proteosomal degradation independent of pVHL
HIF-1 α	HDAC6	Direct	HDAC6 associates with HIF-1 α to increase its stability and transcriptional activity	Pharmalogical inhibition and shRNA against HDAC6 resulted in decreased HIF-1 α expression, transcriptional activity and proteosomal degradation independent of pVHL

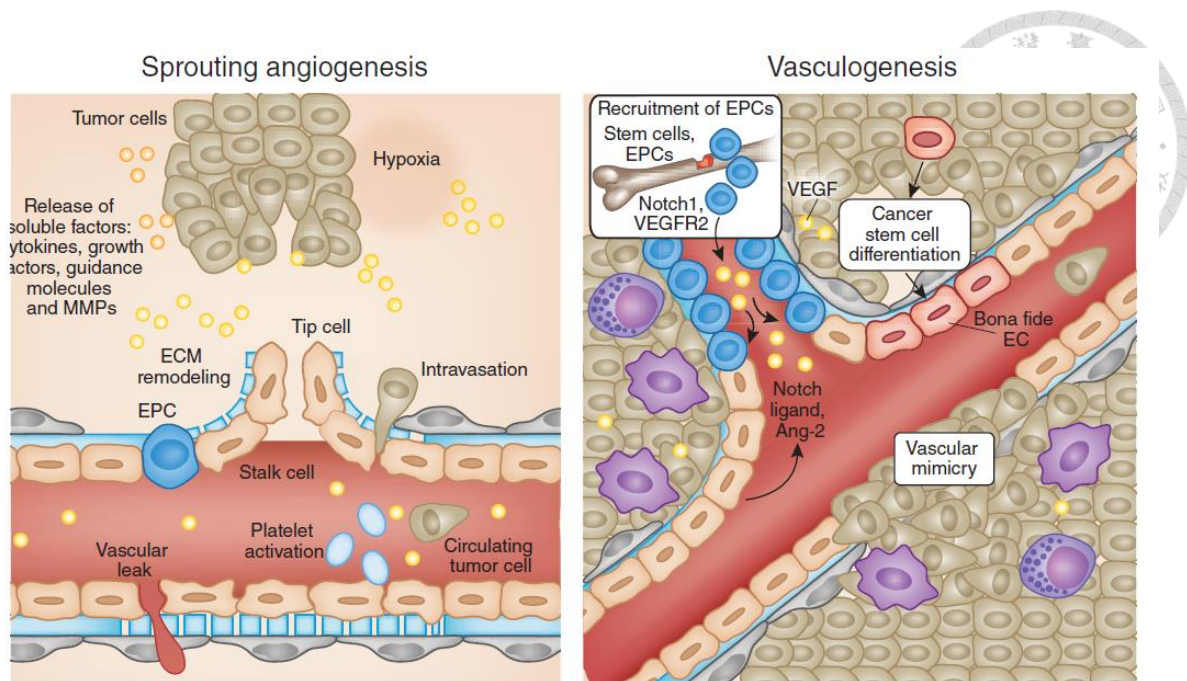
Ellis L, Hammers H, Pili R. (2009) Cancer Lett. Aug 8;280(2):145-53.

附表 8. Pro- and anti-angiogenic genes altered by HDACi in both cancer and endothelial cells.



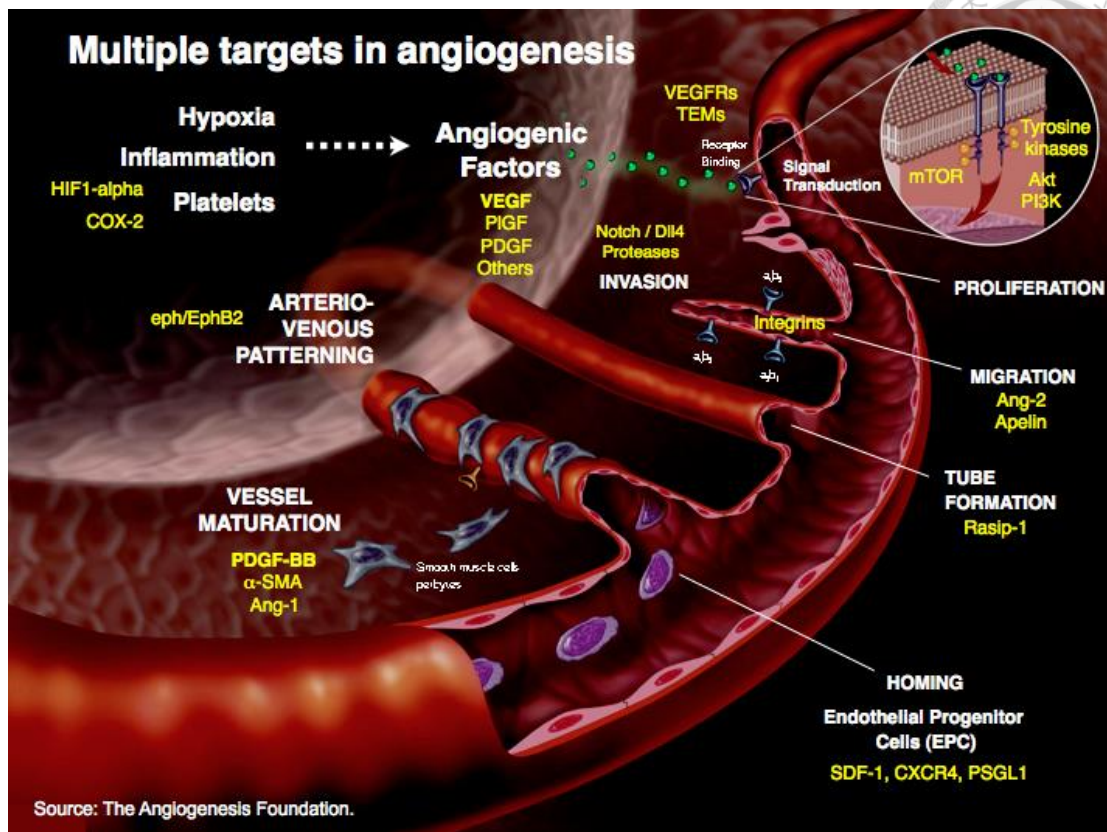
Gene	Target Cell	Activity on angiogenesis	Effect on gene transcription by HDAC inhibition
p53	Cancer	inhibits	Up-regulation
pVHL	Cancer	induces	Up-regulation
HIF-1 α	Cancer	induces	Down-regulation
VEGF	Cancer	induces	Down-regulation
Activin A	Cancer	inhibits	Up-regulation
bFGF	Cancer	induces	Down-regulation
Thrombospondin 1	Cancer	inhibits	Up-regulation
MMP-2	Cancer	induces	Up-regulation
MMP-9	Cancer	induces	Up-regulation
RECK	Cancer	inhibits	Up-regulation
FLT1	Cancer	induces	Down-regulation
FLK1	Cancer	induces	Down-regulation
Neurofibromin2	Cancer	inhibits	Up-regulation
Ang1	Cancer	induces	Down-regulation
VEGF receptor 1	Endothelial	induces	Down-regulation
VEGF receptor 2	Endothelial	induces	Down-regulation
Neuropilin-1	Endothelial	induces	Down-regulation
Semaphoring III	Endothelial	inhibits	Up-regulation
Tie2	Endothelial	induces	Down-regulation
Ang2	Endothelial	induces	Down-regulation
eNOS	Endothelial	induces	Down-regulation
VEGFD	Endothelial	induces	Down-regulation
Clusterin	Endothelial	inhibits	Up-regulation
Fibrillin1	Endothelial	inhibits	Up-regulation
Quiescin Q6	Endothelial	inhibits	Up-regulation

Ellis L, Hammers H, Pili R. (2009) Cancer Lett. Aug 8;280(2):145-53.



附圖 1. Multiple origins of tumor-induced neovascularization.

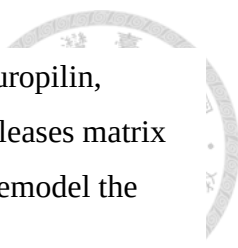
The combination of stimulatory signals within the tumor microenvironment prompts changes in multiple cell types. Perivascular cells detach from the mature blood vessels, compromising their integrity, permitting their remodeling and promoting an activated phenotype. Once the vascular barrier is disrupted, multiple cell types are exposed to angiogenic and inflammatory stimuli to escalate the response. Platelets are recruited to sites of exposed basement membrane, where they become activated and release their stores of stimulatory factors into the tumor microenvironment. Endothelial progenitor cells (EPCs) and myeloid cells from the bone marrow move to the perceived wound, where they release even more soluble factors locally. Cancer stem cells can differentiate to become bona fide endothelial cells, or tumor cells can physically participate in the formation of new vessels through vascular mimicry. However, the escalation of this response does not lead to the production of mature and proper blood vessels that improve the initial hypoxic situation because the tumor microenvironment is characterized by pockets of hypoxia amid the leaky and tortuous blood vessels. This environment also makes the tumor cells more invasive, allowing them to intravasate into the vasculature or lymphatics for metastasis to distant tissues. Effective strategies for cancer therapy must consider targets on multiple cell types and address issues of poor drug delivery in the leaky and poorly perfused tumor microenvironment.



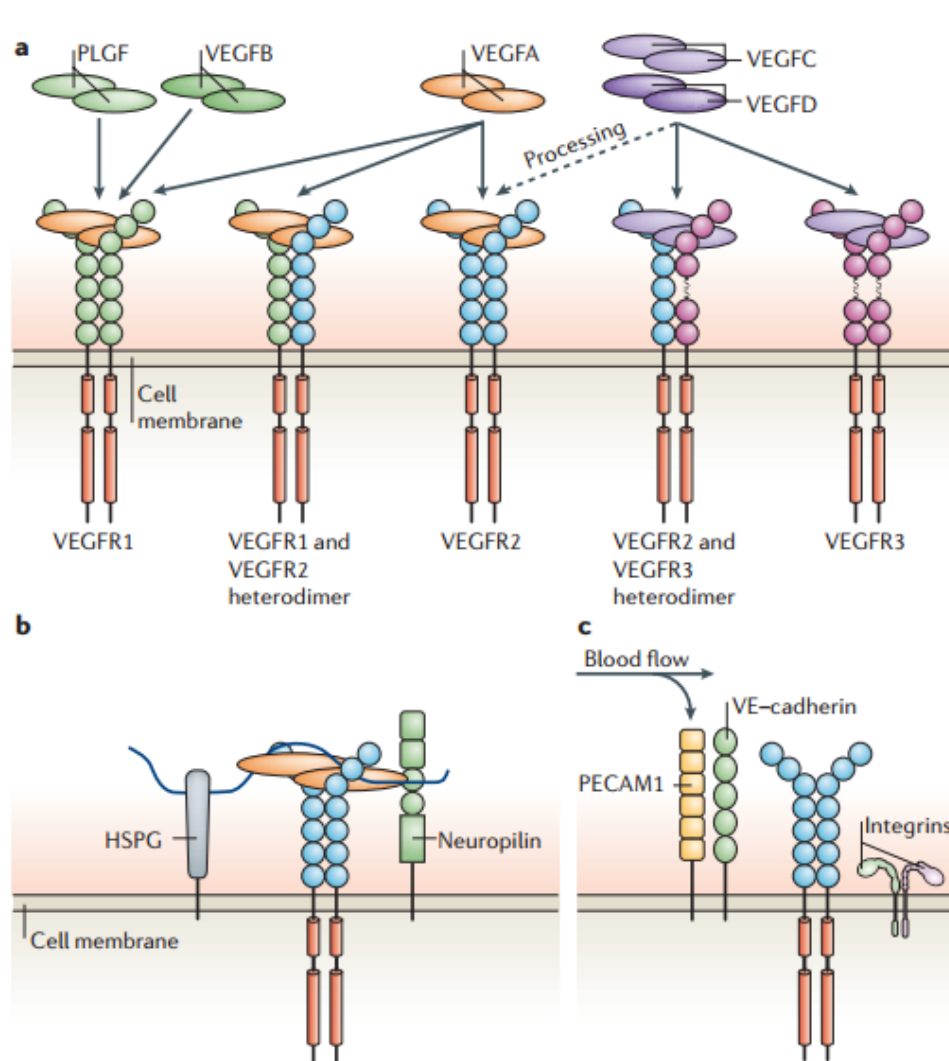
附圖 2. The angiogenesis process: how do new blood vessels grow?

The process of angiogenesis in a healthy adult occurs as an orderly series of events:

1. Blood vessels provide nutrients and oxygen throughout the body and are comprised of an inner lining of closely assembled endothelial cells ensheathed by pericytes, (the basement membrane) embedded in the stromal compartment (various stromal cells and extracellular matrix).
2. In healthy adults, a balance of growth factor signaling maintains endothelial cells in a quiescent, or resting state.
3. To monitor and supply sufficient amounts of oxygen to surrounding tissues, blood vessels have oxygen and hypoxia-induced sensors, or receptors, which allow vessel remodeling to adjust the blood flow accordingly.
4. Hypoxia or other endogenous signals activate cells and induce the release signaling factors (such as VEGF, Ang-2, FGF and chemokines) to promote the growth of new blood capillaries from pre-existing vessels – a process called angiogenesis.
5. Pericytes detach from the vessel (Ang-2 signaling), and endothelial cells are activated and lose their close contact as the vessel dilates (VE-cadherin signaling).

- 
6. In sprout formation, a tip cell is selected (selection influenced by Neuropilin, VEGF/VEGFR and NOTCH / DLL4 and JAGGED1 signaling) which releases matrix metalloproteases (MT1-MMP) to degrade the basement membrane and remodel the extracellular matrix.
 7. Tip cells are polarized and extend numerous filopodia to guide sprout migration (via semaphorins, ephrins, and integrins guidance signals) toward angiogenic stimuli (VEGF gradient). Tip cells are primarily migratory and do not proliferate.
 8. Stalk cells follow the tip cell and proliferate, extending the sprout. Proliferating stalk cells establish junctions with neighboring endothelial cells and release molecules such as EGFL7 (an endothelial cell chemoattractant expressed by proliferating endothelial cells) that bind to extracellular membrane components and regulates vascular lumen formation.
 9. Fusion of neighboring branches occurs when 2 tip cells encounter each other, establish EC-EC junctions (VE-cadherin, Ang-1) and form a continuous lumen. Extracellular matrix is deposited to establish a new basement membrane (TIMPs), endothelial cell proliferation ceases, and pericytes are recruited to stabilize the new vessel (PDGFR/PDGF-B, Ang-1)
 10. Once blood flow is established, the perfusion of oxygen and nutrient reduces angiogenic stimuli (VEGF expression) and inactivates endothelial cell oxygen sensors, re-establishing the quiescent state of the blood vessel.

Source : The Angiogenesis Foundation.



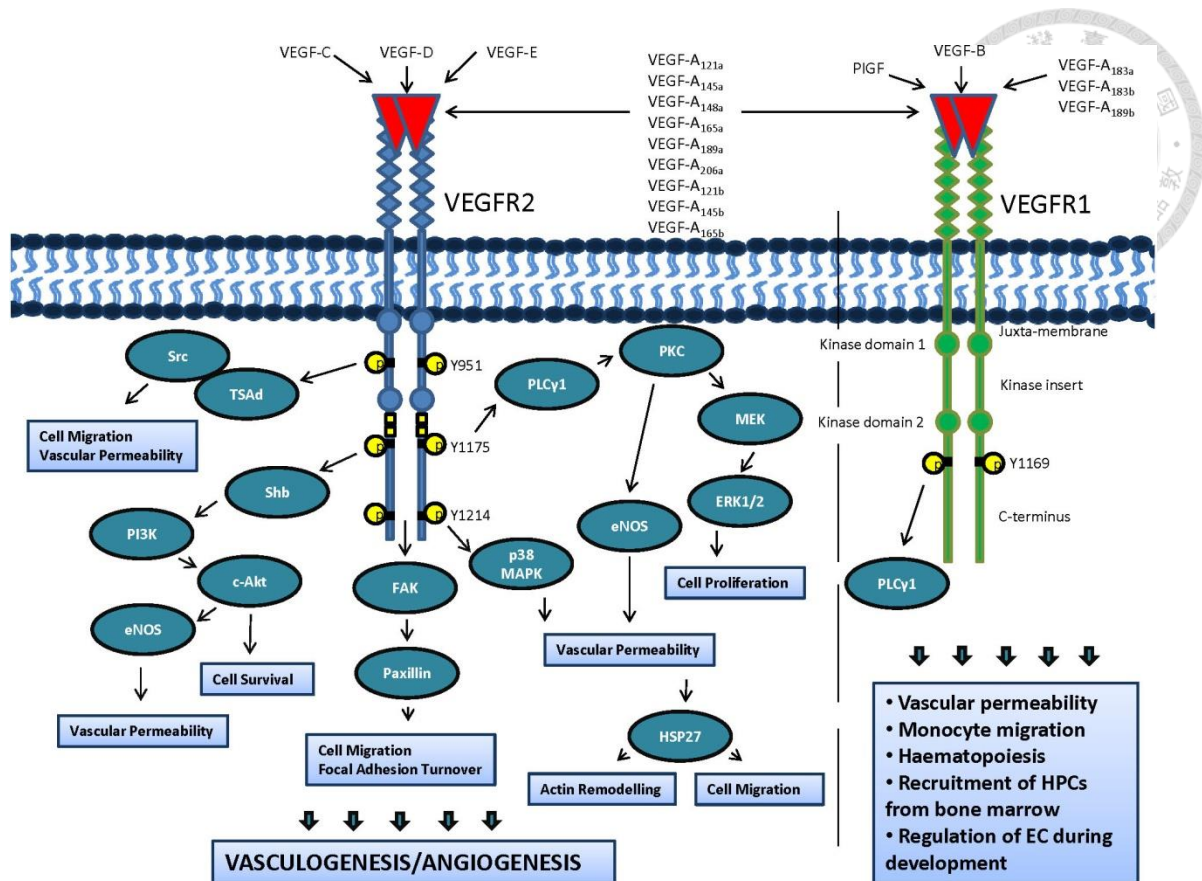
附圖 3. VEGF receptor-binding properties and signalling complexes.

a | Mammalian vascular endothelial growth factors (VEGFs) bind to the three VEGF receptor (VEGFR) tyrosine kinases, leading to the formation of VEGFR homodimers and heterodimers. Proteolytic processing of VEGFC and D allows for binding to VEGFR2.

b | VEGFR signalling is modulated by different co-receptors. VEGFs as well as VEGFRs bind to co-receptors such as heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) and neuropilins. These interactions can influence VEGFR-mediated responses, for example, affecting the half-life of the receptor complex.

c | Mechanosensory complex formation. Blood flow might activate VEGFRs in a ligand-independent manner, by the formation of mechanosensory complexes that consist of platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1 (PECAM1), vascular endothelial (VE)-cadherin, VEGFRs and integrins. PLGF, placenta growth factor

Olsson AK et al. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol. May;7(5):359-71.

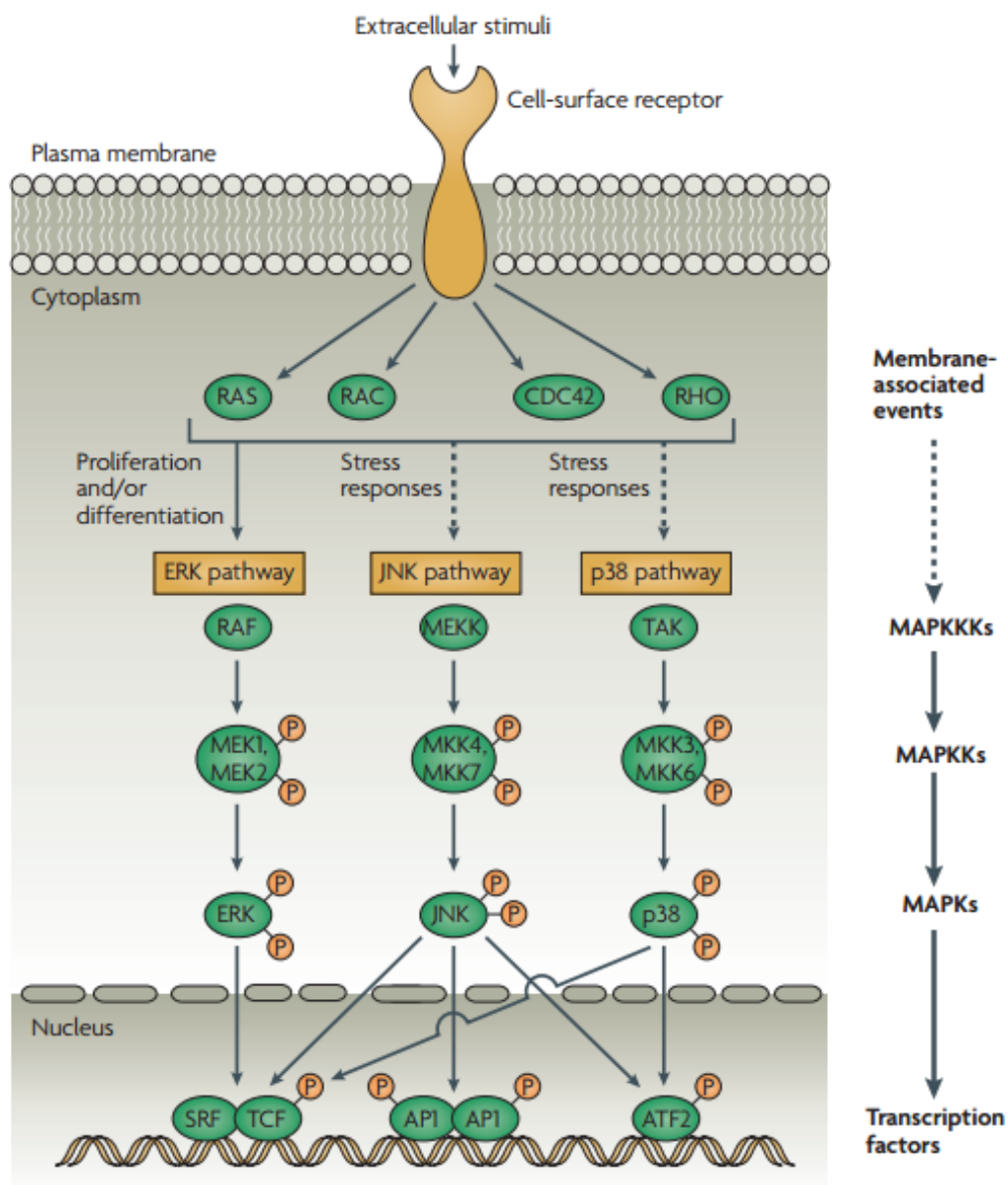


附圖 4. VEGFR1 and VEGFR2 and their associated ligands.

Black boxes on the receptors indicate important tyrosine residues. Yellow boxes show tyrosine residues 1054 and 1059 which are important for kinase activity.

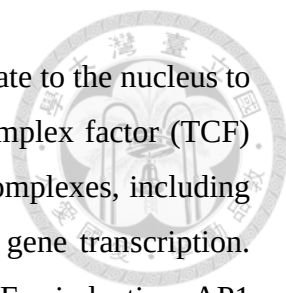
c-Akt, protein kinase B ; EC, endothelial cell ; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2 ; FAK, focal adhesion kinase ; HPC, hematopoietic progenitor cells ; HSP27, heat shock protein-27 ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; MEK, MAPK and ERK kinase ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; PKC, protein kinase C ; PLCγ1, phospholipase Cγ1 ; PlGF, placental growth factor ; Shb, SH2 domain-containing adaptor protein b ; TSAd, T-cell-specific adaptor, VEGF, vascular endothelial growth factor ; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase.

Fearnley GW et al. (2013) OA Biochemistry. Feb 01;1(1):5.



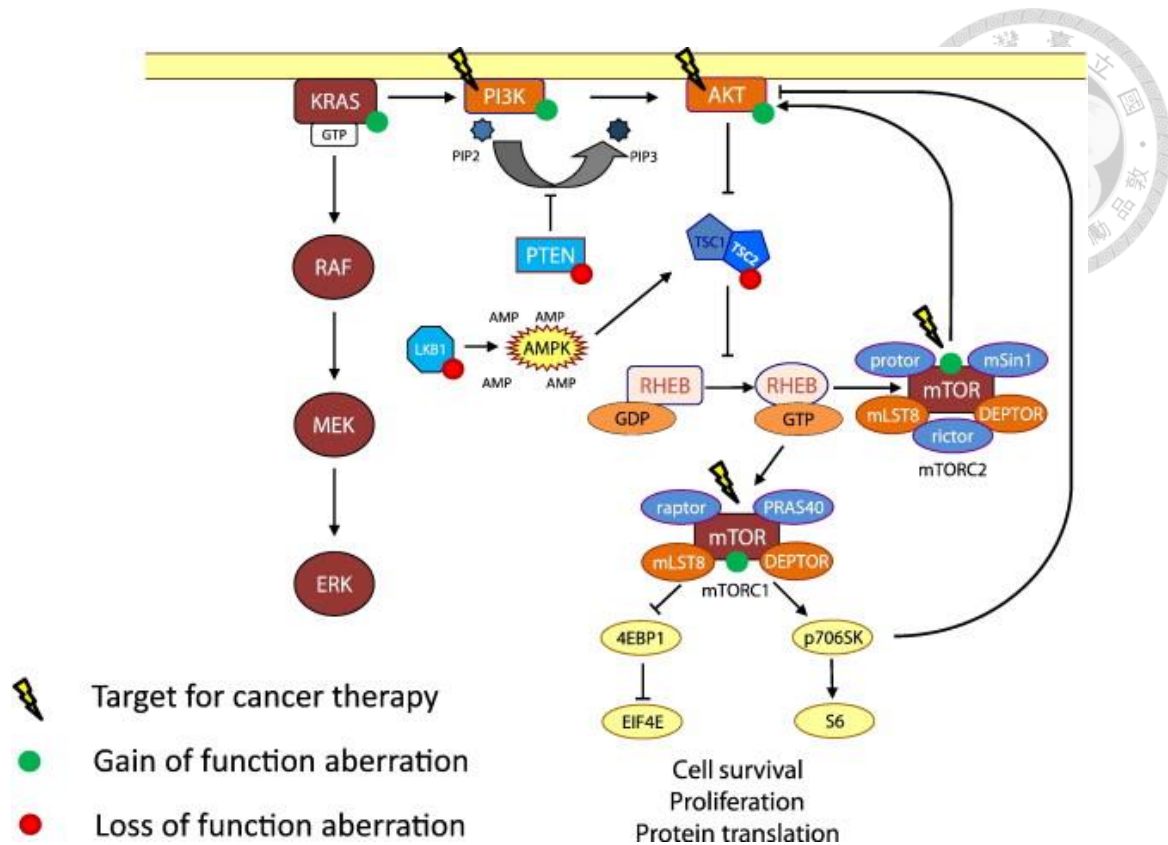
附圖 5. Schematic diagram of the three mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways.

Extracellular stimuli activate the MAPK pathways through mechanisms mediated by GTPases, including RAS, RAC, CDC42 (cell-division cycle 42) and RHO (RAS homologue). Once MAPKKKs (MAPK kinase kinases), such as RAF, MEKK (MAPK/ERK kinase kinase) and TAK (TGF β -activated kinase), are activated, they phosphorylate MAPKKs (MAPK kinases) on two serine residues. MAPKKs in turn phosphorylate the MAPKs ERK (extracellular-signal-regulated kinase), JNK (JUN N-terminal kinase) and p38 on both threonine and tyrosine residues, which results in the



catalytic activation of these MAPKs. Activated MAPKs can translocate to the nucleus to phosphorylate a number of transcription factors, such as ternary complex factor (TCF) family members and components in the activator protein 1 (AP1) complexes, including JUN and activating transcription factor 2 (ATF2), thereby altering gene transcription. TCF forms a complex with serum response factor (SRF) to regulate Fos induction. AP1 is involved in the transcription of a wide variety of genes. Growth factors preferentially activate the ERK pathway, whereas stress and inflammatory cytokines preferentially activate the JNK and p38 pathways.

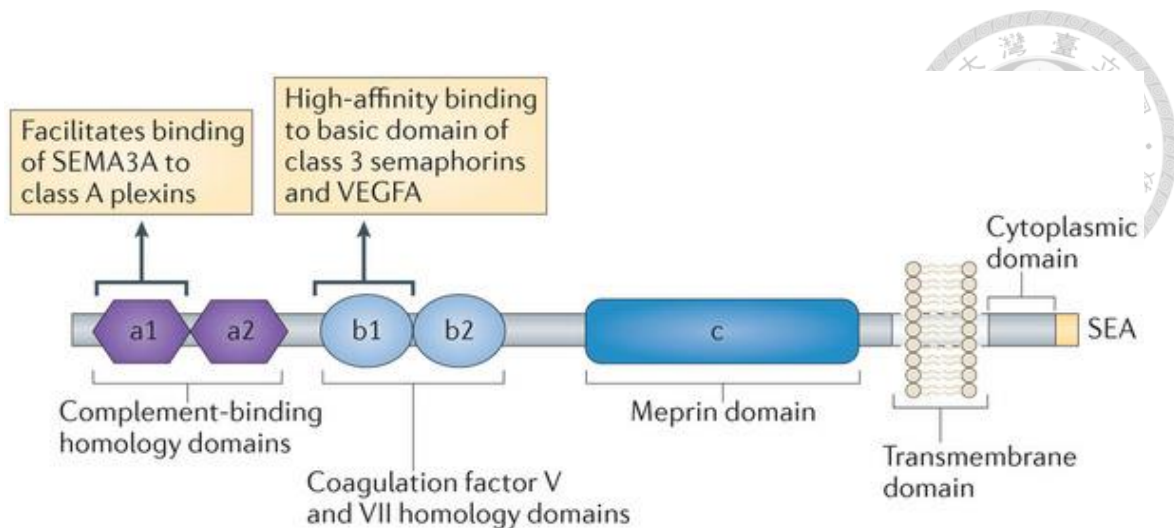
Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. (2007) *Nat Rev Immunol.* Mar;7(3):202-12.



附圖 6. The PI3K/AKT/mTOR pathway

Molecular targets for anticancer therapy and most common locations for gain-of-function aberrations or loss-of function aberrations.

Polivka J Jr, Janku F. (2014) Pharmacol Ther. May;142(2):164-75.

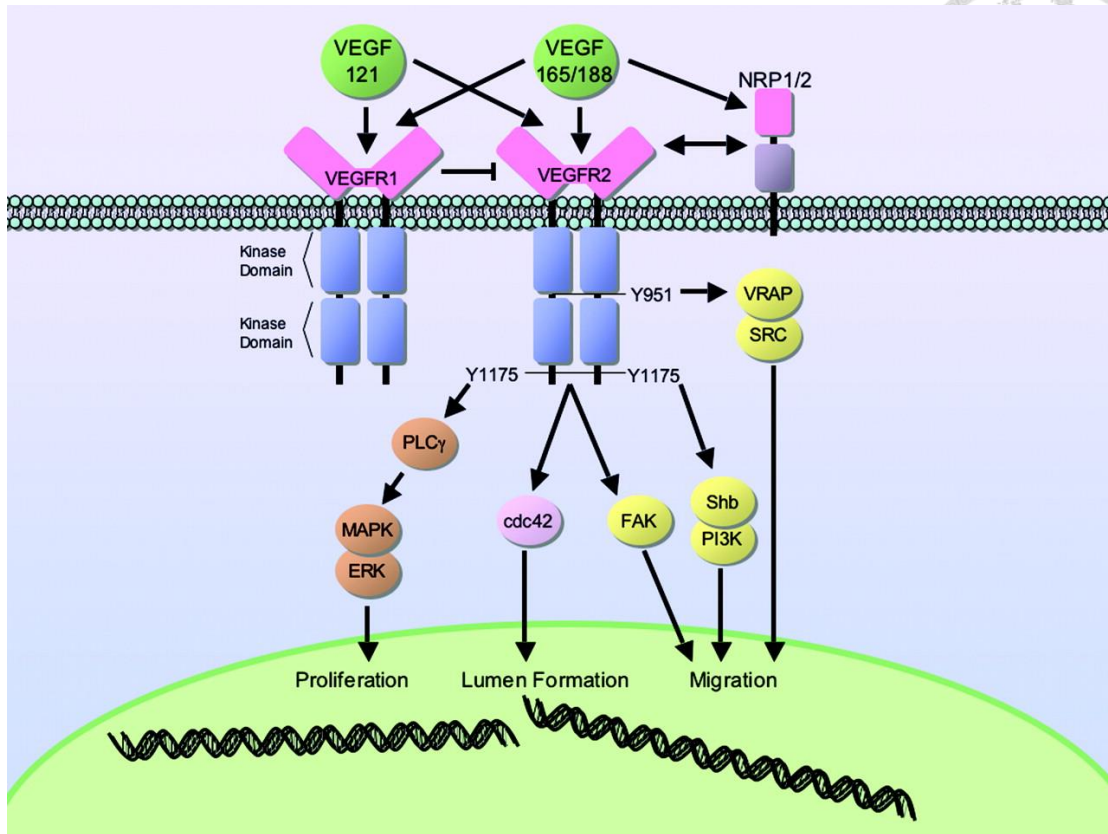


Nature Reviews | Immunology

附圖 7. The structure and binding sites of neuropilins.

Neuropilins (NRPs) have two complement-binding homology domains (a1 and a2), two coagulation factor V and VII homology domains (b1 and b2) and a meprin domain (c) in their extracellular regions. Cumulative findings indicate that a and b domains are crucial for ligand binding, including binding to semaphorin 3A (SEMA3A) and vascular endothelial growth factor splice variant VEGF165. Of note, several studies have shown that the b1 domain mediates the high-affinity binding of NRPs to the basic domain of class 3 semaphorins and to VEGFA108–111, such that VEGFA and class 3 semaphorins can compete for their binding to the b1 domain of NRPs111–114. In addition, it has been suggested that the b1 domain of NRP1 binds with high affinity to the basic domain of SEMA3A, whereas the a1 domain of NRP1 helps the Sema domain of SEMA3A to coordinate with the Sema domain of class A plexins and probably to activate the signalling of class A plexins114–116. SEA represent the last amino acid residues (Ser, Glu and Ala) of the cytoplasmic domain, which provide binding to the PDZ (PSD95, DLGA and ZO1 homology) domain-containing protein GIPC1 (also known as synectin).

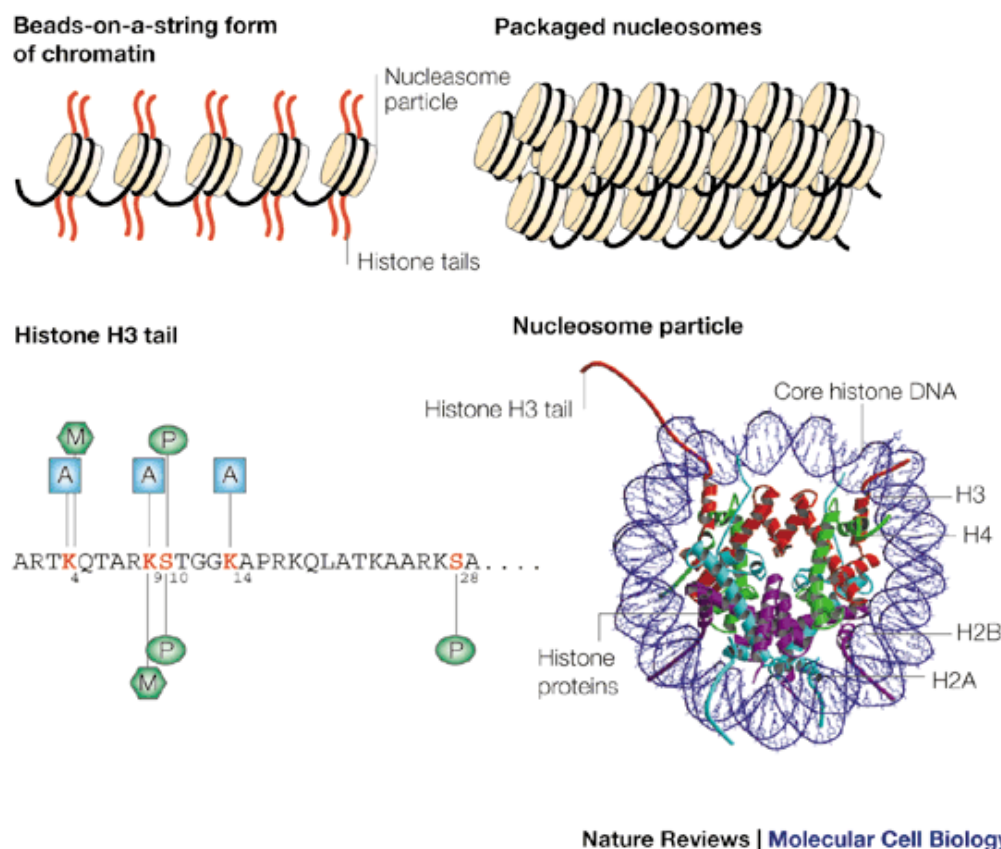
Atsushi Kumanogoh et al. (2013) Nature Reviews Immunology. Nov;13(11):802-14.



附圖 8. VEGF signaling in angiogenic ECs. VEGFR1 (Flt1) and VEGFR2 (Flk1/KDR) represent the 2 major VEGFRs on angiogenic ECs.

VEGF121 binds to VEGFR1 and VEGFR2, whereas VEGF165 and VEGF188 also bind to the coreceptor neuropilin-1. Signaling downstream of VEGFR2 is complex, and only selected pathways are shown. VEGF drives EC migration, proliferation, and morphogenesis and gene expression. See the text for details.

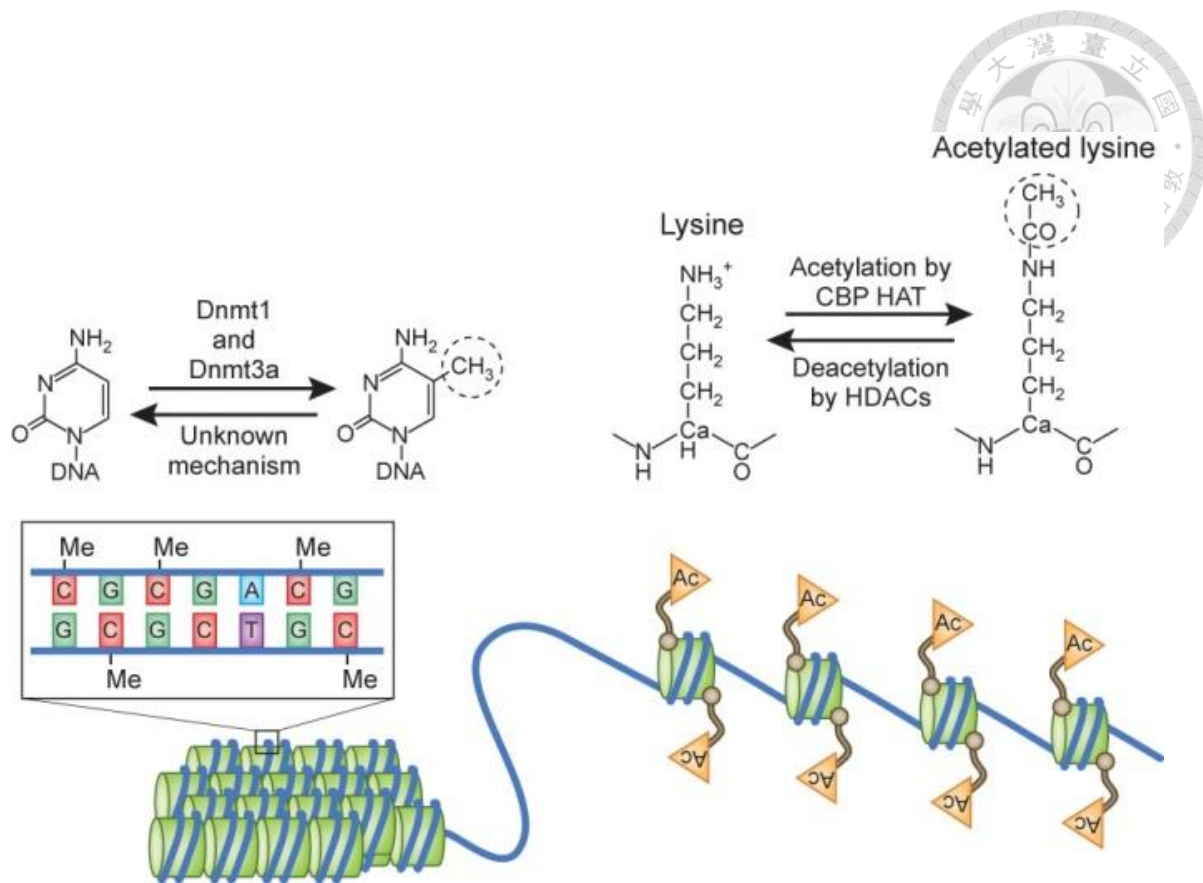
Holderfield MT, Hughes CC (2008) Circ Res. Mar 28;102(6):637-52.



附圖 9. Chromatin organization and the histone H3 amino-terminal tail.

The nucleosome particles that make up chromatin are depicted as yellow cylinders. The DNA is depicted as black strands and the amino-terminal histone tails are shown as red squiggles. Higher-order chromatin characteristic of condensed chromatin or heterochromatin is to the right of the chromatin schematic. Below and to the right is the high-resolution structure of the nucleosome core particle¹¹⁷ in which the DNA double helix is in blue and the histone H3 dimer is in red, H4 is in green, H2A is in aqua and H2B is in purple. Shown below and to the left is the histone H3 tail region from yeast with the modifications that are known to regulate gene activity. Acetylation is represented by (A), phosphorylation is represented by (P) and methylation is represented by (M). Modifications that promote transcriptional activation are shown above the sequence and modifications that induce transcriptional silencing or chromosome condensation are shown below the sequence.

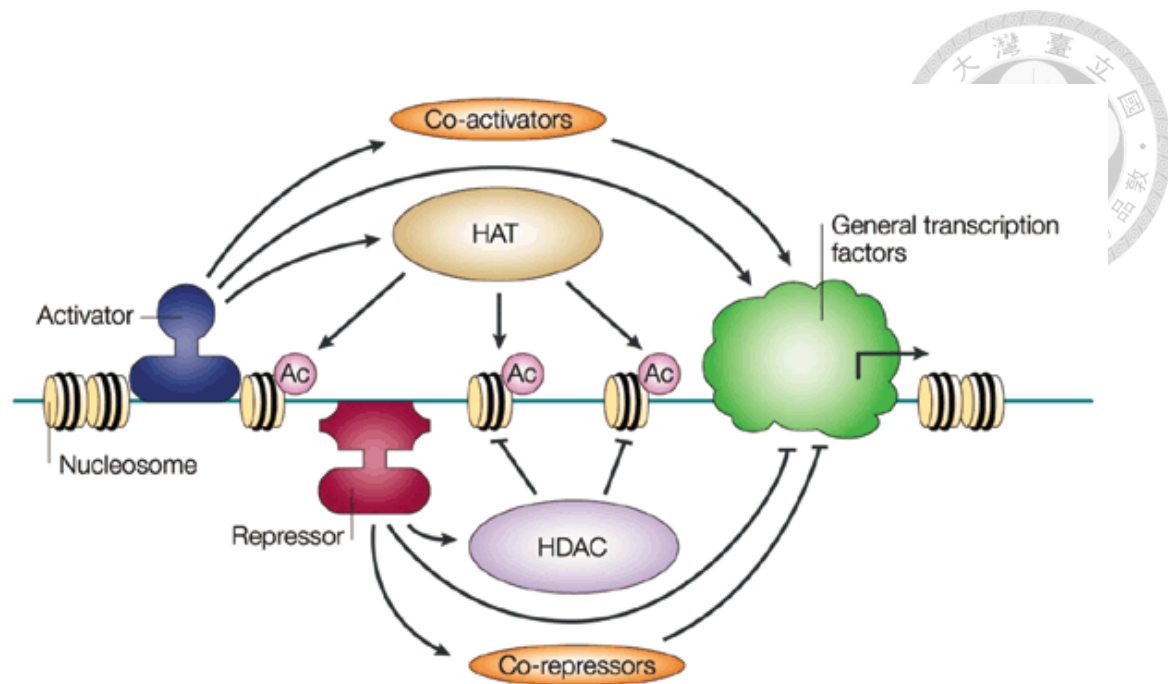
Ronen Marmorstein (2001) Nature Reviews Molecular Cell Biology. Jun;2(6):422-32.



附圖 10. DNA methylation and histone acetylation are two critical epigenetic mechanisms controlling chromatin structure and function in postmitotic mammalian neurons.

Hypermethylated DNA recruits silencing transcription chromatin remodeling complexes with histone deacetylases (HDACs) and promotes chromatin condensation. Hypomethylated DNA unfolds into a 'beads-on-a-string' structure in which histones are accessible for chromatin remodeling factors such as CREB-binding protein histone acetyltransferase (CBP HAT), the transcriptional coactivator implicated in epigenetic mechanisms controlling memory consolidation. Ac, acetyl group; Me, methyl group.

Edward Korzus (2010) Nature Neuroscience. Apr;13(4):405-6.

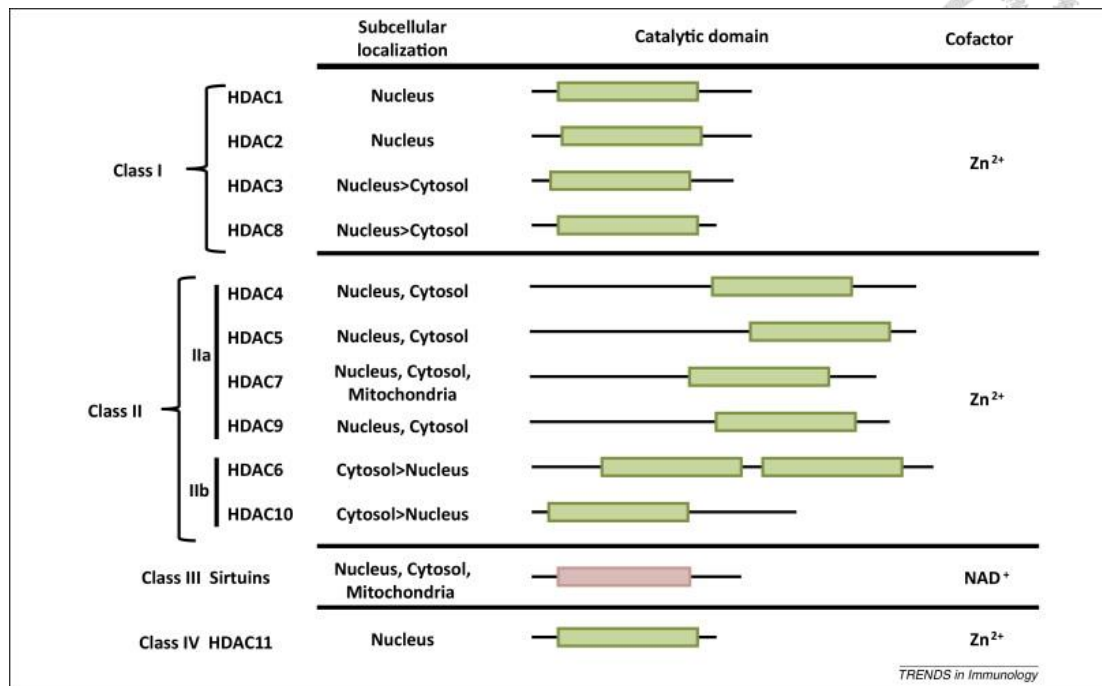


附圖 11. The role of histone deacetylase (HDAC) in repressing transcription.

Histone acetyl transferases (HAT) act to help activate transcription.

HDAC inhibitors target gene expression without modifying DNA sequence. They reverse histone deacetylation, which binds DNA tightly to histones and prevents the transcription and expression of tumor suppressor genes (among others). But freeing ‘anticancer’ DNA “is clearly not the whole picture,” says MacLeod. Generation of reactive oxygen molecules, proteins involved in programmed cell death and cell cycle inhibitors may also contribute to the anticancer effect. HDACs also deacetylate other proteins besides histones, including p53, which is involved with suppressing tumor growth.

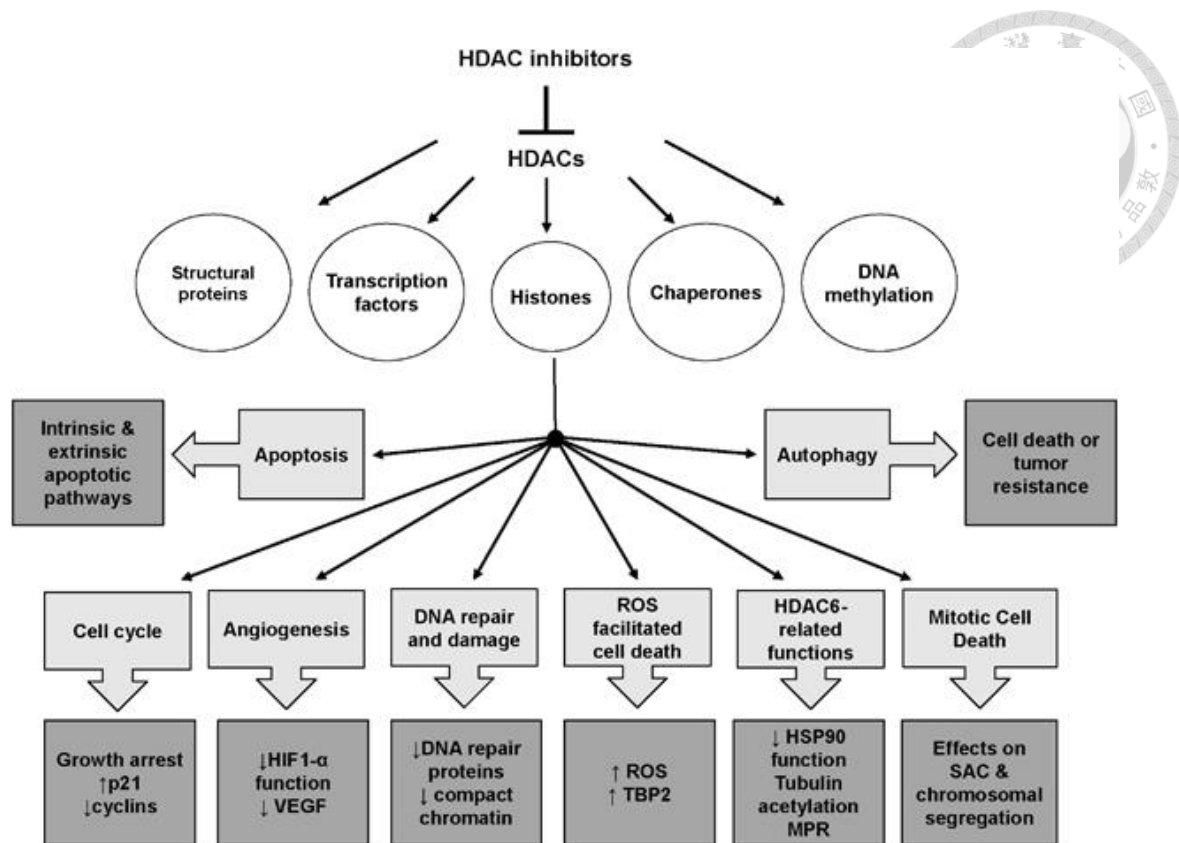
Muratani M, Tansey WP. (2003) Nat Rev Mol Cell Biol. Mar;4(3):192-201.



附圖 12. Histone deacetylase (HDAC) classification.

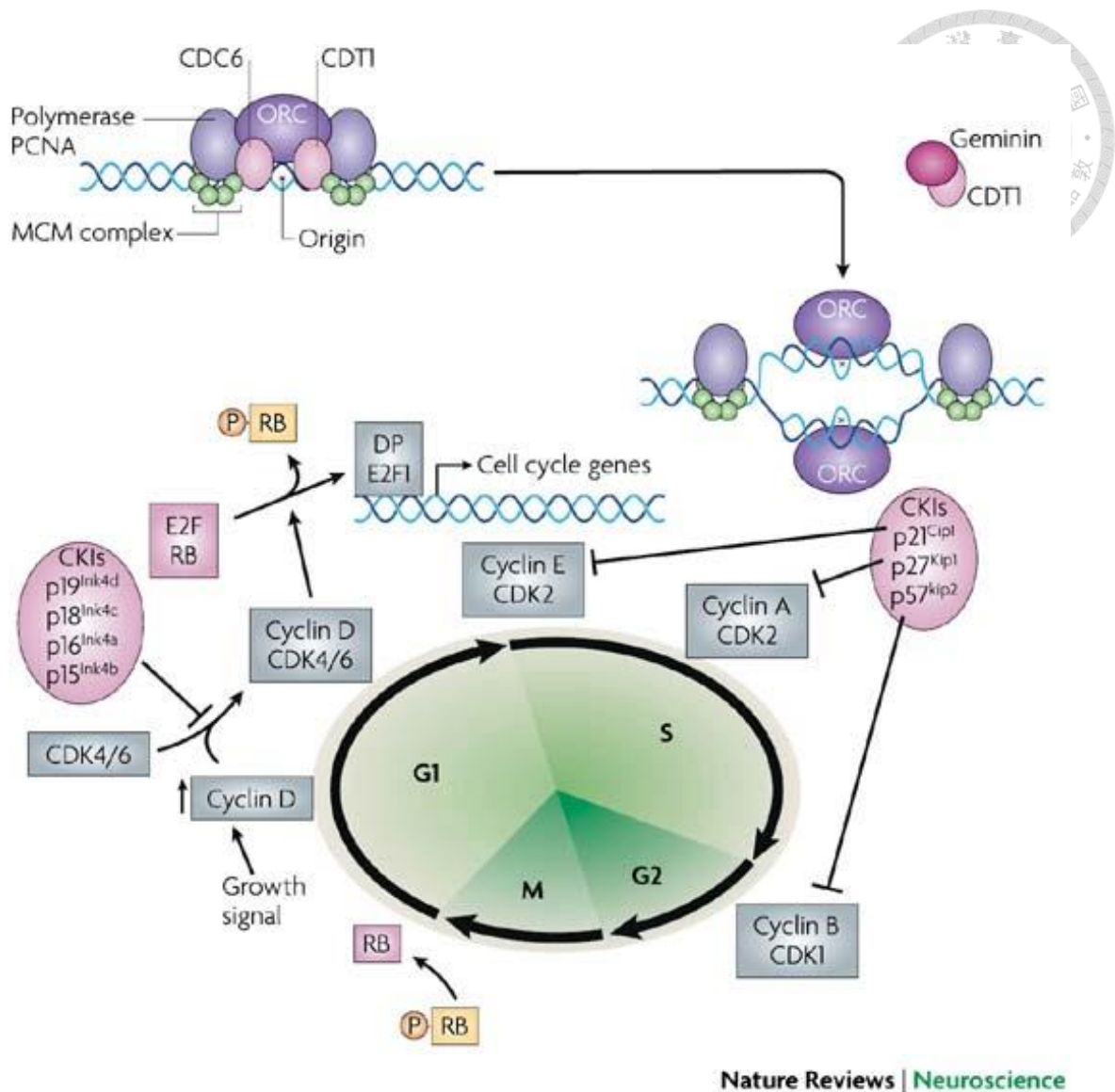
Isoforms of HDACs are divided into four classes based on the sequence similarity of their catalytic domain to yeast homologs. The distribution of the conserved catalytic domain and dominant region of subcellular localization are indicated.

Alenghat T, Artis D. (2014) Trends Immunol. Nov;35(11):518-25.



附圖 13. Different pathways affected by histone deacetylase (HDAC) inhibitors.

Khan O, La Thangue NB. (2012) Immunol Cell Biol. Jan;90(1):85-94.



附圖 15. Basics of the cell cycle.

Cell-cycle progression is controlled by cyclins and their CDKs. In G1, cyclin D initiates Rb complex phosphorylation, which derepresses E2F to induce *cyclin E* transcription. Components of this complex as well as p21 and p27 oppose these effects and can result in cell-cycle exit to G₀. After DNA replication in S phase, different quality controls ensure the integrity of the DNA, while a cyclin B/CDK1 complex orchestrates progression into mitosis. Chromosome abnormalities and DNA damage are reported to this complex via different pathways to delay or stop cell division. Canonical Wnt signalling can regulate the cell cycle at the indicated levels, further described in the text.

Karl Herrup & Yan Yang (2007) Nature Reviews Neuroscience. May;8(5):368-78.

第三章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料



一、藥物

MPT0E028 為一個 N-hydroxamic acid 結構之衍生物，此化合物由台北醫學大學劉景平教授所合成提供。於本論文實驗中，將 MPT0E028 之粉末溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO) 並置於-20℃冷凍保存。SAHA (Vorinostat) 作為本實驗之對照組也是由台北醫學大學劉景平教授所提供，SAHA 粉末溶於 DMSO，並於-20℃冷凍保存。

二、細胞株與細胞培養液

人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) 購自財團法人食品工業發展研究所 (BCRC) 之生物資源保存及研究中心。培養細胞所用之 fetal bovine serum (FBS)、trypsin-EDTA、M199 培養液、glutamine (100X)、pyruvate (100X) 購自 GIBCO-BRL life Technologies (Grand Island, NY, USA)。Penicillin-streptomycin-amphotericin B solution (內含 10,000 units/mL penicillin、10 mg/mL streptomycin、25 mg/mL amphotericin B) 購自 Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel)。HEPES 購自 Calbiochem (San Diego, CA)。Endothelial cell growth supplements (ECGs) 購自 Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA)。NaHCO₃ 購自和光純藥工業株式會社。

三、實驗試劑

Endothelial cell basal medium (EBM) 以及 endothelial growth factors (EGM-2) 購自 Clonetics (BioWhittaker, Walkersville, MD)。FITC-conjugated anti-mouse IgG、



propidium iodide (PI)、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、FITC-conjugated anti-rabbit IgG、與 Drabkin's reagent kit 購自 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)。Matrigel TM basement membrane matrix 購自 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)。BrdU labeling and detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 購自 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA)。Fluorometric HDAC activity assay kit 購自 BioVision (Mountain View, CA, USA)。TRIzol 試劑購自 Invitrogen (Carlsbad, CA)。random primer 以及 M-MLV RT 購自 Promega (Madison, WI)。pEGFP-N1-hNRP1m 購自 台大醫學院第一共研生醫資源中心。NRP1 以及 GAPDH primers 購自 Purigo Biotech Inc (Taipei, Taiwan)。Protein A/G Plus agarose 購自 (Santa Cruz, CA, USA)。

於西方墨點法使用之一級抗體：Rb 購自 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)。Cyclin D 購自 Calbiochem (San Diego, CA)。Phospho-FAK (Tyr397)、 β -actin、HDAC8 購自 Millipore (Bedford, MA, USA)。CDK2、CDK4、cyclin A、p21、p27、cyclin B1、cdc25A、HDAC6、sp1 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。acetyl-histone 3 (Lys 9)、acetyl- α -tubulin (Lys40)、acetyl-lysine、phospho-Rb (Ser807/811)、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC7、FAK、Akt、phospho-Akt (Ser473)、phospho-mTOR (Ser2448)、mTOR (Ser2448)、phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204)、p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr 204)、phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182)、p38 MAP kinase、phospho-Src (Tyr416)、Src、phospho-VEGFR2 (Tyr1175)、VEGFR2 購自 Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA)。NRP1 購自 Novus Biologics (Littleton, CO, USA)。

於西方墨點法使用之二級抗體：goat anti-mouse IgG-HRP、goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。

四、實驗動物

血管新生動物實驗以及動物腫瘤移植評估皆使用八週歲雌性 BALB/c 裸鼠購自國家實驗動物中心，並飼養於國立台灣大學醫學院實驗動物中心 (Laboratory Animal Center, College of Medicine, National Taiwan University)。



第二節 實驗方法



一、細胞培養與計數

本篇論文所選用的是人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)，自 BCRC 生物資源保存及研究中心購入。將細胞培養在預先使用 collagen coating 的 75 cm² 的培養瓶中，加入含有 20 % FBS、ECGs、10 mL glutamine、10 mL pyruvate、1 mL heparin 以及 10 mL 抗生素 (100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、0.25 µg/mL amphotericin) 的 M199 培養液，存放於 37°C、5 % CO₂/95 % air 的培養箱中。當細胞密度生長至約九分滿時，利用 0.05 % trypsin/0.02 % EDTA 將細胞切下，以 1：3 至 1：4 的比例稀釋進而繼代培養，或計算細胞數目後再均分於培養盤中 (6 cm-dish、6 well 或 96 well) 進行後續的實驗。在癌症的進程中，腫瘤生長時會同時釋放生長因子 (growth factor)，包括 VEGF、bFGF、rhEGF、以及 IGF-1 等等，對於血管新生扮演重要的腳色，刺激內皮細胞的有絲分裂以及促進血管生成的相關步驟。因此在血管新生相關實驗時，使用 EBM-2 與 EGM-2 medium mixture (7.5 mL EBM-2 + 225 µL EGM-2)，以模擬腫瘤生長時內皮細胞血管新生的環境。

二、結晶紫染劑細胞增生實驗 (crystal violet assay)

將每個 well 種細胞 5,000 顆在 96-well 細胞培養盤中，放入細胞培養箱中，待細胞完全貼附後。24hr 後吸掉上清液，加入 DMSO 或待測藥物的 EGM-2 培養液，持續培養。待細胞處理刺激劑或藥物 72 小時後，移除培養液，每個 well 加入 50 µL 結晶紫染劑，室溫下靜置 10 分鐘，將細胞固定染色，接著利用清水移除多餘結晶紫染劑，待風乾後，加入 100 µL 0.1M sodium citrate solution 溶解結晶紫，以分光光度計 (spectrophotometer) 在 OD₅₅₀ 讀取溶液之吸光值。



三、DNA 合成的測定

利用 BrdU incorporation assay 來測定 DNA 合成。5-溴，2-脫氧尿嘧啶核苷 (5-bromo 2 deoxyuridine, BrdU)，為胸腺嘧啶 (thymidine) 類似物，當 DNA 合成時，BrdU 可當是原料被接合到 DNA 中，再利用特異性抗體 (anti-BrdU antibody) 辨識以評估細胞增生的情形。將 HUVECs 以 5×10^3 cells/well 的細胞密度種在 96 well 的細胞培養盤中，放入細胞培養箱。待 24 後細胞完全貼附，移除上清液，換上 EBM-2 培養液處理 24 小時。之後，對照組單獨給予 EGM-2 培養液，實驗組則同時加入待測藥物刺激 48 小時，收集細胞前 18 小時加入 BrdU ($10 \mu\text{M}$)，最後利用 BrdU labeling and detection kit 測定 DNA 合成量，評估細胞增生的密度。

四、細胞毒性定量 (MTT) 的測定

細胞毒性定量的測定是利用 MTT 在活細胞中會被粒線體的酵素 dehydrogenase 作用，而產生紫色的 formazan 產物的特性來測定細胞存活率，是參照 Mosmann 發表的 MTT 偵測法 (Mosmann, 1983)。細胞在培養瓶中長至九分滿時，以 0.05% trypsin/0.02% EDTA 收集細胞並離心，將收集的細胞以密度 1×10^4 cells/well 將細胞種在 96-well 的細胞培養盤中，放入細胞培養恆溫中，待細胞完全貼附後，加入待測藥物處理 24 小時後，改換為 100 mL 含有 10% MTT solution (0.5 mg/mL) 的 culture medium，於 37°C 的細胞培養恆溫箱中作用 4 小時，等待 MTT 被存活細胞中的粒腺體酵素作用。吸掉上清液後，以 DMSO 將細胞打破溶解紫色的 formazan 結晶，於室溫下作用 10 分鐘，接著使用 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA reader) 讀取 OD_{550} 吸光值的變化，最後計算出加藥組相對於控制組的細胞存活百分比，同時，抑制 50% 細胞存活所需的藥物濃度即為 IC_{50} 。

五、Fluorometric HDAC activity assay kit



利用 fluorometric HDAC activity assay kit 來評估待測藥物抑制人類臍靜脈內皮細胞中 HDAC activity 的能力。首先將人類臍靜脈內皮細胞種在 6 cm-dish (6×10^5 cells/dish)，經待測藥物處理 24 hr 後，進行蛋白質萃取及定量，接下來實驗需全程避光，依照組別將不同物質加入 96 孔黑盤中。(Blank 組：加入 85 μ L ddH₂O；加藥組：加入 50 μ g 全細胞蛋白萃取液並加入 85 μ L ddH₂O，使得總體積達到 85 μ L)。接著，所有待測 well，包括 Blank 以及加藥組，均加入 10 μ L HDAC assay buffer (10x)，以及 5 μ L HDAC fluorometric substrate，接著將 96 孔黑盤放置於 37°C 恆溫烘箱震搖反應 30 分鐘。接著取出 96 孔黑盤，再每個 well 分別加入 10 mL lysine developer，並再置於 37°C 恆溫烘箱震搖反應 30 分鐘。最後取出以 fluorimeter (Ex/Em=350-380/440-460 nm) 進行樣本分析，得到抑制 50% HDAC 所需的藥物濃度及為 IC₅₀。

六、細胞移行試驗 (Boyden chamber migration assay)

第一天先將 8- μ m 孔徑大小的之濾膜使用 0.5 % gelatin coating 兩面 24 小時，第二天在 chamber 下層加入 110 μ L EGM-2，再放上濾膜，不能有氣泡。Boyden chamber 組合好後，將 HUVEC 培養在 EBM-2 或外加不同待測藥物濃度之 EBM-2 培養液中 (細胞濃度： 10^6 cells/ mL)，每個 chamber 上層加入 100 μ L 的待測細胞液，放入細胞培養箱。經過持續處理 6 小時後，移除上下層培養液，將濾膜取出後放入 4 % 甲醛液 (formaldehyde) 中固定 20 分鐘，並以棉花棒沾水移除濾膜上層的細胞，再將 membrane 放入結晶紫 (crystal violet) 中將下層細胞染色 10 分鐘，最後利用 PBS 清除多餘的結晶紫染劑。待濾膜完全風乾之後，在顯微鏡下拍照，並以 0.1 M sodium citrate solution 溶解結晶紫，最後以分光光度計 (spectrophotometer) 在 OD₅₅₀ 讀取溶液之吸光值以量化細胞移行能力。



七、類血管管柱形成試驗 (Tube formation assay)

實驗前一天，須將 matrigel 從-20℃ 冰箱移至 4℃ 冰箱冷藏，以利實驗進行。因 matrigel 物理性質是在-20℃ 時為固體狀，0-4℃ 時為液體狀，> 4℃ 時則會凝結成膠體狀。實驗第一天，先將 matrigel 加入 96-well 之細胞培養盤 (50 μ L/well)，其過程須注意不能有氣泡產生且要平均平鋪在 well 中，之後放入細胞培養箱中，在 37℃ 環境下 30 分鐘至 1 小時待其凝膠。接著將 HUVECs 混合於 EGM-2 或外加不同待測藥物濃度之 EGM-2 培養液中，之後將細胞 (5×10^4 cells/well)，加入已經 coated matrigel 之 96 孔盤中，至於 37℃ 細胞培養箱中培養 6-24 小時，並在顯微鏡下觀察其 matrigel 內管柱生成的情況，最後以 Image-pro plus 軟體測量 5 個不同視野下 (上、下、左、右以及中) 管柱的長度總和來量化管柱形成的程度。

八、流式細胞儀測定細胞週期 (Flow cytometric analysis)

將細胞種在 6 cm-dish (6×10^6 cells/dish)，經藥物待測濃度與不同時間處理後，將細胞用 trypsin 收集下來，並加入 70% v/v ethanol 使細胞懸浮後再放置於-20℃，至少 30 分鐘以上。接著，取出細胞並離心，吸掉酒精上清液，在室溫下加入 0.1 mL DNA 萃取液 (0.2 M Na_2HPO_4 - 0.1 M citric acid buffer, pH 7.8)，並打散 pellet。30 分鐘後，再加入 1 mL DNA 染色液- propidium iodide staining buffer (0.1% Triton X-100、100 μ g/mL RNase A、80 μ g/mL propidium iodide (PI) in PBS)，於避光下染色至少 30 分鐘。接著將細胞過濾後跑流式細胞儀，以 CellQuest program (Becton Dickinson) 以及 FACSscan 分析細胞週期。

九、西方墨點法 (Western blot)

本實驗方法可以分為四步驟：蛋白質萃取、蛋白質定量、蛋白質電泳、蛋白質轉印及偵測蛋白。



A. 蛋白質萃取

收集經藥物處理過的細胞至 eppendorf tube 內，製備 lysis buffer mix：混合 950 mL lysis buffer (內含 20 mM Tris-HCl buffer、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、2.5 mM sodium pyrophosphate) 以及以下 protease inhibitor 10 µg/mL leupeptin、10 µL 5 mM NaF、10 µL 1mM Na₃VO₄、10 µg/mL aprotinin、1mM PMSF。在 eppendorf 內加入適當 lysis buffer mix，依照收集蛋白質量 (多加入：6 well-30 µL，6 cm-dish-60 µL)，將樣品置於冰上 30 分鐘，或是可存放於-80°C 冰箱約一個月。接著將 eppendorf tube 於 4°C 轉速 13,000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液進行蛋白質定量步驟。

B. 蛋白質定量

利用 BCATM protein assay kit (solution A:solution B = 50:1)，進行蛋白質定量，在 96 well 中每個 well 加入 200 µL 的 solution A+B mixtrue，利用 2 mg/mL BSA 做出標準線，待測全細胞蛋白萃取液則每個 well 加入 2 µL，於 37°C 恆溫箱反應 30 分鐘後，再以波長 550 nm 測定吸光值，利用 BSA 做出的標準線，算出全細胞蛋白萃取液濃度。再加 lysis buffer 至樣品內，使得同一批樣品濃度均為 2.5 µg/µL，並加入 1/4 總體積的 5 倍 sample buffer (0.156 M Tris、1% SDS、25% glycerol、12.5% β-mercaptoethanol、0.2% bromophenol blue)，以 105°C 加熱破壞蛋白質雙硫鍵 10 分鐘，得到最終蛋白質濃度為 2.0 mg/mL，樣品放置於-20°C 保存。

C. 蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

原理為利用電壓為驅動力，將蛋白質依照不同分子量之移動速度不同而分離。需先配置上下膠，架完膠台後，先以水測試玻璃夾層有無縫隙漏水後，接著配置 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)，首先下膠的部分 (running gel)，根據分析的蛋白質分子量配置 7-13% running gel，%數越低的下膠可觀察較

大分子量的蛋白質，而%數越高則反之可以觀察分子量較小的分子量。將配置好的下膠加入玻璃夾層後，以 isopropanol 壓平下膠表面並去除氣泡。待下膠凝固時，配置上膠 (stacking gel)，上膠的濃度為固定。約 15 分鐘後，待下膠凝固後，移除 isopropanol，加入上膠，再放入齒型模板 (comb) 做出樣品槽，等待約 15 分鐘至上膠凝固。膠凝後放置電泳槽，於電泳槽內外分別加入跑膠緩衝液(running buffer (1x)：3 g Tris-Base、1 g SDS、14.4 g glycine、1 L ddH₂O)，內外 running buffer 不可混用。接著，將樣品及蛋白質分子量指示劑 (protein molecular weight marker)，從左至右依序加入樣品槽。接著開始跑膠，先以低電壓 90 伏特 (V) 跑約十五分鐘，等待樣品從 stacking gel 跑至 running gel，樣品維持同一水平，再以高電壓 140 伏特 (V) 等待樣品跑至下膠底部及完成跑膠。下表為製作四片膠，不同濃度 stacking gel 以及 running gel 所需之配方。

Running gel (4 pieces)	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13%
ddH ₂ O (mL)	15	14	13	12	11	10	9
30% acrylamide (mL)	7	8	9	10	11	12	13
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (mL)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
10% SDS (μL)	300	300	300	300	300	300	300
10% AP (μL)	300	300	300	300	300	300	300
TEMED (μL)	30	30	30	30	30	30	30

Stacking gel (4 pieces)	5%
ddH ₂ O (mL)	8
30% acrylamide (mL)	2
1.5 M Tris-HCl pH 6.8 (mL)	2
10% SDS (μL)	120

10% AP (μL)	120
TEMED (μL)	20



D. 蛋白質轉印與偵測蛋白

首先將 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 浸漬甲醇中來活化 membrane，接著在 transfer buffer 內，放入轉印夾後再依序放入海綿、3M paper、PVDF membrane、電泳膠片、3M paper、海綿，並將空氣排出後扣上轉印夾後放入轉印槽，以固定 400 mA 在 4°C 之下進行蛋白質轉印 120-150 分鐘 (視欲觀察的蛋白質分子量而定)。待轉印完成後，將 PVDF 取出浸泡於 5% 脫脂牛奶中 (5 g 脫脂牛奶溶於 100 mL PBS)，於室溫下搖晃 30 分鐘至 1 小時，減少蛋白質與抗體的非專一性結合。接著用 TBST (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM sodium orthovanadate 以及 0.05% Tween 20) 清洗 PVDF 二至三次，每次 10 分鐘，清洗 PVDF 上殘留的牛奶。接著，剪裁 PVDF membrane 上欲分析的蛋白質分子量對應位置，並浸至於 4% BSA 溶液適當稀釋的一級抗體中，於 4°C 冷房環境下搖晃 overnight 至隔日。隔天將一級抗體取出回收，同樣使用 TBST 清洗一級抗體三至四次，每次 10 分鐘。接著再加入適當的二級抗體 (anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (IgG) -HRP)，作用一小時後，取出二級抗體回收，再以 TBST 溶液清洗三至四次，每次 10 分鐘。最後加入 ECLTM (enhanced chemiluminescence) 試劑中，以 X 片偵測特定蛋白質。

十、RNA extraction

將細胞以藥物處理後，將上清液移除，並以 TRIZOL 將細胞刮下，每 1 mL 的 TRIZOL 加入 0.2 mL chloroform 混合均勻後靜置冰上 10 分鐘，並以 4°C 離心轉速 13,000 rpm 15 分鐘。取出最上層透明的上清液，再加入 0.5 mL isopropanol 與上清液混合均勻後置於冰上 15 分鐘，再以 4°C 離心轉速 13,000 rpm，15 分鐘，去除上清液，底部 pellet 即為 RNA 以及鹽類，待 isopropanol 揮發後，加入 0.5 mL 75% 酒

精洗掉鹽類，再以 4°C 離心轉速 13,000 rpm，5 分鐘。吸除酒精上清液，待酒精完全揮發後以 DEPC-H₂O 溶解，並加以定量。



十一、Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR)

首先先取 5 µg total RNA 加入 DEPC-H₂O 使總體積達 15.4 µL，接著加入 0.6 µL random primer (500 ng/µL) 在 65°C 下加熱 5 分鐘，破壞 RNA 二級結構，並將 random primer 結合至 mRNA 上。接著放置室溫 20 分鐘，再加入 5 µL 5x First strand buffer、1 µL RNase inhibitor (40 U/µL)、2 µL 10mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) 以及 1 µL M-MLV Reverse Transcriptase (200U/µL)，在 37°C 下反應 1 小時，接著在 90°C 加熱 5 分鐘後，即合成完 first strand complementary DNA (cDNA)。接著，取 2 µg cDNA 加入 10X SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems)，以及待測之 5'-3'-primer 1.5 mM 各 4µL，使得最終體積為 20 µL，並使用 mastermix (Taqman One Step RT-PCR；ABI) 進行 quantitative PCR reaction (設定 cycle 數為 40；選定 comparative CT($\Delta\Delta CT$))。使用 NRP1 的 primer 序列為：5'-AAATGCGAATGGCTGATTCAG-3'(forward) 以及 5'-CTCCATCGAAGACTTCCACGTAGT-3' (reverse)。GAPDH 為內生性控制組。

十二、細胞轉染 (Transient overexpression)

細胞轉染是利用 lipofectamine 2000 進行，操作方式依照原廠說明書的建議執行。根據實驗設計首先將 60 萬顆 HUVECs 種入 6 cm-dish 中，靜置培養箱一天待細胞貼附，隔日依實驗稍作調整比例，將 plasmid cDNA (10 µg) 和 LipofectamineTM 2000 (12 µL)，各自溶於 OPTI-MEM (Invitrogen) (100 µL)，靜置於室溫 15 分鐘，再將兩溶液混合 vortex 後靜置於室溫 40 分鐘。將 6 cm-dish 細胞培養液吸除，並

用 PBS 清洗殘留的細胞培養液，再個別加入 OPTI-MEM (850 μ L) 以及 plasmid cDNA 與 Lipofectamine™ 2000 之混合液 (200 μ L)，進行轉殖反應。於培養箱靜置 6 小時後再 re-serum，將轉殖試劑移除，並加入原來的細胞培養液中 止反應。轉殖後的細胞於培養箱靜置過夜，再依實驗設計的時間進行後續的動作。pEGFP-N1-hNRP1m 購自台大醫學院第一共研生醫資源中心。

十三、免疫沉澱分析法 (Immunoprecipitation)

免疫沉澱分析法為將欲偵測的蛋白質視為抗原，並利用抗體與之進行特異性結合的特性來進行研究。首先將沒有經藥物處理的 control 組別以及經藥物 MPT0E028 1 μ M 處理 24 小時的組別，使用 Trypsin 收集細胞以及 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) 外加 phosphatase 與 protease inhibitor 萃取蛋白質，於冰上放置 30 分鐘並接著 sonication (10 秒/次，共三次)，於 4°C 轉速 13,000 rpm 下離心 10 分鐘，吸取上清液以收集蛋白質。利用 BCA 試劑定量蛋白質濃度後，加入 10 μ L 的 protein A/G agarose beads 於 4°C 搖晃反應 1 小時。接著於 4°C 轉速 4,000 rpm 下離心 30 秒，吸取上清液並丟棄 beads。於上清液中取出 1,000-2,000 μ g 的蛋白質量，並以等體積的 ddH₂O 稀釋以減少離子濃度對於蛋白質的影響，再加入適當的抗體量 (IgG : 2 μ L、Sp1 : 10-20 μ L) 於 4°C 搖晃反應至隔日。隔日加入 20 μ L 的 protein A/G agarose beads 以抓取 immunocomplex，並於 4°C 搖晃反應 2 小時。接著利用轉速 4,000 rpm 離心 30 秒，吸除上清液再加入 1 mL IP wash buffer 上下輕微搖晃 10 次，做為清洗 protein A/G agarose beads 的步驟，並且重複以上清洗步驟三次。最後吸除上清液留下 beads 並且加入 60 μ L 的 2 倍的 sample buffer，於 105°C 下反應 10 分鐘，將 beads 與欲抓取的蛋白質分離，最後利用轉速 10,000 rpm 離心 10 秒，吸取上清液至新的 eppendorf 中，並接續利用蛋白質電泳以及西方墨點法分析欲觀察的蛋白表現量。



十四、血管新生動物實驗

以皮下注射方式打入混合 heparin (10 U/mL)、VEGF、bFGF、IGF-1、EGF、DMSO 或藥物的 0.5 mL Matrigel™ basement membrane matrix 至 BALB/c-nude mice 下腹部。實驗進行一個禮拜，分為口服給藥 (oral) 及藥物溶於 Matrigel plug 內 (co-pug) 兩組給藥方式。一個禮拜後將老鼠麻醉、犧牲，將 Matrigel plug 取下，並即時拍攝，接著取一部分的 Matrigel plug 進行組織切片染色 (H&E staining、Masson's Trichrome staining)，另一部分 plug 則小心將移除老鼠的毛髮與組織，放入 100 μ L PBS 中，利用超音波震盪器 (sonicator) 將 plug 均質化，再以 4,000 rpm，4°C 離心 10 分鐘，取得上清液，利用 Drabkin's reagent kit (Sigma) 測量其血紅素含量，量化血管新生的作用。

十五、動物腫瘤移植評估 (Tumor xenograft model)

首先培養大量之癌細胞，將 1×10^7 MDA-MB-231 腫瘤細胞以皮下注射方式植入 8 週歲之 BALB/c nude mice 背部。待腫瘤生長至 150 mm³ 時開始給予藥物，藥物以口服方式給予，並且每周測量腫瘤大小兩次。實驗組共分成 4 組，每組接 5 隻小鼠，第一組為 control 組別，植入腫瘤細胞後僅給予溶劑 (1% carboxymethyl cellulose + 0.5% Tween 80，0.2 mL/mouse)。第 2、3、4 組則分別為一組正對照組 (paclitaxel) 以及兩組加藥組 (MPT0E028)，當腫瘤體積達到 1,500 mm³ 時結束實驗，將小鼠犧牲並取出腫瘤組織保存於 10% 中性福馬林，或置於冷凍小管 -80°C 液態氮保存，萃取其中的蛋白質，進行西方墨點法分析。

十六、統計分析

所有實驗結果以平均值 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ SD)，或平均值 $\pm$ 平均值標準誤差 (mean $\pm$ SEM) 表示，並使用 one-way ANOVA 和 *t* test；當 $P < 0.05$ 時即為其

具有統計意義。



第四章 實驗結果



一、MPT0E028 抑制 HUVECs 之生長與存活

在血管新生的過程中，內皮細胞的增生，細胞的移行以及管腔的形成都是相當重要的，因此利用功能性實驗 (functional assay) 以探討藥物在體外抑制血管新生的能力。在第一個結果中，使用同為 pan-HDAC 抑制劑以及 N-hydroxamic acid 的衍生物，MPT0E028 以及 SAHA (Figure 1A)，比較兩者對於抑制細胞增生以及細胞毒性的能力。首先，使用結晶紫染劑細胞增生實驗，比較兩者抑制內皮細胞生長的能力，在 Figure 1B 中，MPT0E028 以濃度相關性 (concentration-dependent) 抑制內皮細胞的增生 ($GI_{50} = 0.26 \pm 0.03 \mu M$)，且抑制效果較 SAHA 顯著 ($GI_{50} = 0.58 \pm 0.01 \mu M$)。接續檢測藥物對於細胞生長時 DNA 合成的影響，使用 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay；在 Figure 1C 中顯示 MPT0E028 亦隨濃度相關性地抑制 DNA 的合成 ($GI_{50} = 1.42 \pm 0.44 \mu M$)，且相較 SAHA ($GI_{50} = 2.70 \pm 0.78 \mu M$) 有更好的抑制效果。藥物對於細胞毒殺效果則使用 MTT assay 測定，實驗結果顯示 MPT0E028 為 $IC_{50} = 3.89 \pm 0.14 \mu M$ 、SAHA 則為 $IC_{50} = 12.16 \pm 0.36 \mu M$ 。由實驗結果證實，MPT0E028 和 SAHA 均是抑制細胞增生作用，對產生細胞毒性作用相對小 (Figure 1D)。因此，比較兩者藥物對於抑制血管內皮細胞增生，MPT0E028 皆優於 SAHA。

二、MPT0E028 對於 HUVECs 移行之影響

因血管新生過程中，芽生性血管新生 (sprouting angiogenesis) 的多寡取決於內皮細胞移行的能力，因此本研究利用 Boyden chamber assay 以觀察 MPT0E028 對於 HUVECs 移行的影響，並與 SAHA 做效果比較。在 Figure 2A 及 2B 中顯示，MPT0E028 能以濃度相關性抑制 EGM-2 所誘導的細胞移行，在濃度 0.1, 0.3, 1, 3 μM 時，抑制程度依序為 57% ($P < 0.001$)、48% ($P < 0.01$)、45% ($P < 0.01$) 以及 32%

($P < 0.001$)，而 SAHA 在濃度 10 μM 時，抑制程度為 39% ($P < 0.001$)，因此可得知 MPT0E028 對於抑制內皮細胞移行的能力較優於 SAHA。



三、MPT0E028 對於 HUVECs 類血管管柱形成之影響

類血管管柱的形成對於在血管新生時，完成血管網絡系統為必需的步驟，因此本研究利用 Matrigel tube formation assay 以評估 MPT0E028 對於抑制內皮細胞類血管管腔網路形成的效果。實驗結果顯示在控制組中，EGM-2 能夠明顯誘導 HUVECs 的分化，形成許多分支狀的類血管管腔結構；相反地，MPT0E028 的組別，則依濃度相關性地明顯抑制管腔的形成 (Figure 3A)。最後利用 Image-Pro® Plus 影像分析軟體計算量化 96 well 中五個樣本區域 (上、中、下、左、右) 的管腔長度並取其平均值。Figure 3B 顯示 MPT0E028 在濃度 1 以及 3 μM 時抑制程度分別為 52% ($P < 0.01$)、31% ($P < 0.001$)，而 SAHA 則是在濃度 3 以及 10 μM 時抑制程度才分別達 50% ($P < 0.05$) 以及 26% ($P < 0.001$)，表示 MPT0E028 抑制 HUVECs 形成類血管管腔的能力亦優於 SAHA。

四、MPT0E028 對內皮細胞中 HDACs 活性及蛋白質表現量之影響

MPT0E028 以及 SAHA 同為 pan-HDAC 抑制劑，因此首先利用 Fluorometric HDAC activity assay kit 以評估兩者對於抑制 HUVECs 中 HDACs 活性的能力。在 Figure 4A 中，MPT0E028 抑制 HDACs 活性的 IC_{50} 為 $1.59 \pm 0.15 \mu\text{M}$ ，SAHA 的 IC_{50} 為 $4.68 \pm 0.13 \mu\text{M}$ ，約為前者的 3 倍，可知 MPT0E028 抑制 HUVECs 中核內 HDACs 活性的能力較 SAHA 強。進一步使用西方墨點法，檢測 MPT0E028 以及 SAHA 對於細胞中 HDACs 蛋白質表現量，以及 HDACs 抑制劑的指標蛋白是否有受影響，結果顯示在 Figure 4B 至 4E 中，MPT0E028 與 SAHA 皆能造成 α -tubulin 以及 histone 3 蛋白質乙醯化的增加，且兩者對於 HDAC2、6 的影響，分別在加藥 18 小時以及

6 小時後，皆依時間以及濃度相關性抑制其蛋白質表現，而對於 HDAC1、3、4 的蛋白質表現量，MPT0E028 以及 SAHA 皆無顯著影響。



五、MPT0E028 誘導 HUVECs 細胞週期停滯於 G0/G1 期

欲探討 MPT0E028 是否會調控 HUVECs 的細胞週期，本篇研究使用流式細胞儀加以檢測，在 Figure 5A 以及 5B 中顯示，MPT0E028 會依時間相關性地增加 HUVECs 在 G0/G1 期的細胞百分比，並減少 S/G2/M 期的細胞百分比，且在 18 小時 G0/G1 期細胞比例增加最明顯。接著，以不同濃度的 MPT0E028 處理 HUVECs 18 小時，在 Figure 5C 以及 5D 中，結果亦顯示藥物明顯依濃度相關性地增加 G0/G1 期，以及減少 S/G2/M 期的細胞百分比。

六、MPT0E028 對於 HUVECs 細胞週期 G0/G1 相關蛋白表現之影響

我們接續使用西方墨點法，探討 MPT0E028 對於調控 G0/G1 期相關蛋白質之影響，如 Figure 6A 以及 6B 所示，MPT0E028 能以濃度以及時間相關性地增加 p21^{Waf1/Cip1} 以及 p27 之蛋白表現，兩者約在 6 小時後表現增加。Rb 以及 p-Rb 則分別在加藥 6 以及 12 小時後依時間以及濃度相關性地減少；在 CDK 家族中 MPT0E028 會造成 p-CDK2 表現量下降，對於 CDK4 則沒有影響；另外，幫助細胞自 G0/G1 進入 S 期的 cyclin A、cyclin D1 與 cdc25a，以及幫助細胞進入 G2/M 期的 cyclin B1，MPT0E028 皆能依時間與濃度相關性抑制其蛋白質的表現。因此，可得知 MPT0E028 會藉由調控 G0/G1 相關蛋白表現，進而造成細胞週期停滯於 G0/G1。

七、MPT0E028 對於 VEGFR2 下游訊息傳遞之影響

本研究進一步探討，MPT0E028 對於血管新生最重要的 VEGFR2 訊息傳遞路

徑是否有影響。首先，利用西方墨點法檢測給予不同時間點的 MPT0E028，對於 HUVECs 中 VEGFR2 下游訊息傳遞蛋白質表現量的影響，結果如 Figure 7A 與 7C 所示，自上游 VEGFR2 的磷酸化，以及與細胞增生的下游相關蛋白，如 Erk、Akt、mTOR 的磷酸化以及 mTOR 本身，MPT0E028 皆能依時間以及濃度相關性地減少其蛋白質表現量，而 VEGFR2、Erk、Akt 總蛋白表現量則不受藥物所影響。此外，同時檢測了細胞移行的下游相關蛋白表現，在 Figure 7B 與 7D 中，p38 MAPK、Src、FAK 三者的磷酸化以及 FAK 總蛋白皆有依時間以及濃度相關性地減少，p38 MAPK 以及 Src 本身蛋白質表現量則不受 MPT0E028 影響。因此，由以上蛋白表現的實驗結果可得知 MPT0E028 會影響 VEGFR2 下游訊息傳遞路徑，包括細胞增生以及細胞移行之相關蛋白。

八、 MPT0E028 會減少 NRP1 mRNA 以及蛋白質表現

為了瞭解 MPT0E028 是如何在體內以及體外調控血管新生作用的機轉，本研究首先利用 microarray analysis 以評估 HUVECs 經 MPT0E028 處理後，是否會影響其血管新生相關基因的表現。首先，將 HUVECs 分別以 1 μ M MPT0E028 以及不加藥控制組處理 24 小時，抽取兩組的 mRNA 並利用 human onearray 做基因晶片檢測，得到基因表現的聚類分析 (clustering analysis)，如 Table 1 所示 MPT0E028 會減少促進血管新生相關的基因表現，例如：PLAUR、NRP1 以及 ANGPT2，並且也會增加抗血管新生的基因表現，例如：IGFBP3。而相較於其他促進血管新生的基因，NRP1 mRNA 明顯減少 ($\log_2$ ratio = -2.48003) (P value = 4.15624×10^{-21})，且 NRP1 作為 VEGFR2 的共同受器，亦有許多文獻指出 NRP1 對於調控血管新生之重要性，因此本篇研究便選定 NRP1 作為藥物影響血管新生的檢測目標。為了更加確認 microarray 的結果，本研究利用 quantitative RT-PCR assay 以及西方墨點法以檢測 NRP1 mRNA 以及蛋白質表現，結果如 Figure 8A 所示，MPT0E028 能依時間以及濃度相關性顯著地減少 NRP1 mRNA 量，同時在 Figure 8B 中，NRP1 也會依

時間以及濃度相關性地減少其蛋白質表現量。因此，藉由 microarray 分析、QRT-PCR 以及西方墨點法，推測 MPT0E028 可能會藉由影響 NRP1 基因的轉錄或 mRNA 降解，進而減少 mRNA 以及蛋白質的表現量。



九、MPT0E028 抑制 NRP1 的表現造成 HUVECs 細胞增生的減少

為了確認 NRP1 是否在 MPT0E028 抑制血管新生的機轉中扮演重要的角色，本研究利用質體 hEGFP-NRP1 在 HUVECs 執行細胞轉染的實驗，並且利用 QRT-PCR 比較轉染 vector 組別其兩者 mRNA 的表現，以確認 NRP1 確實有被過度表現 (Figure 9A)。接著，將已經過細胞轉染的 HUVECs 以 MPT0E028 處理 12 小時後，利用西方墨點法檢測 NRP1 的蛋白質表現量以及 VEGFR2 血管新生相關的下游蛋白表現，是否可因過度表現 NRP1 而反轉 MPT0E028 原本抑制的蛋白質表現。在 Figure 9B 中，與 vector 組別比較，過度表現 NRP1 的內皮細胞中，確實可以反轉 MPT0E028 所抑制的 VEGFR2 下游細胞增生相關蛋白，包括 Erk 以及 Akt 的磷酸化。為了確認過度表現 NRP1，能夠減少 MPT0E028 所抑制的細胞增生，本篇研究接續使用結晶紫染色細胞增生實驗予以檢測，結果如 Figure 9C 所示，過度放大 NRP1 的內皮細胞與細胞轉染 vector 的組別相比較，其細胞增生的能力在藥物濃度 0.3 μ M 以及 1 μ M 的條件下確實有被反轉回來，且具有統計上之意義。因此由這個實驗結果，可以說明 NRP1 對於 MPT0E028 所抑制的內皮細胞增生機轉中扮演重要的角色。

十、MPT0E028 會增加轉錄因子 Sp1 的乙醯化

我們接著進一步探討 MPT0E028 抑制 NRP1 mRNA 以及蛋白質表現之機轉，首先已有研究顯示，許多轉錄因子會與 NRP1 DNA 的 promoter 結合而促進基因轉錄，包括 AP-1、C/EBP β 、Sp1 等等，其中 Sp1 對於 NRP1 promoter 轉錄活性的影

響最大 (Rossignol *et al.*, 2003)；另外亦有研究顯示 pan-HDAC 抑制劑會藉由增加 Sp1 的乙醯化，進而降低其與 DNA 結合的親和力，減少相關基因的轉錄 (Waby *et al.*, 2010)。因此本研究進一步使用免疫沉澱法分析，MPT0E028 是否能增加 Sp1 之乙醯化。結果如 Figure 10 所示，在 input 的組別，MPT0E028 對於 Sp1 的蛋白質表現量並不影響，而在 IP 的組別，MPT0E028 則會顯著增加 Sp1 蛋白質的乙醯化，因而推測 MPT0E028 可能藉由抑制 HDAC 的活性使 Sp1 乙醯化增加，進而影響其與 NRP1 DNA promoter 之結合，導致 NRP1 表現量下降。

十一、 MPT0E028 會減少體內血管新生的形成

本研究為了探討 MPT0E028 在體內抑制血管新生的作用，利用 matrigel plug assays 以觀察藥物對血管新生生長因子的影響，首先，將 nu/nu 小鼠分為兩組不同給藥的方式，且兩組各有兩種劑量，第一組為 co-plug，將 MPT0E028 (1 μ M 及 10 μ M) 或溶劑 (DMSO)、生長因子以及 Matrigel 混合，再一起植入老鼠皮下；第二組則是在將 Matrigel 以及生長因子之混合物植入小鼠皮下之後，口服給予小鼠溶劑 (DMSO) 或 MPT0E028 (10 以及 20 mg/kg/day)。實驗進行一個禮拜後，犧牲小鼠取出 Matrigel plug 切片進行 Masson's Trichrome 以及 hematoxylin and eosin (H&E) 染色。在 Figure 11A 中，可以看到 Matrigel plug 本身相較於 basal 組，控制組中的生長因子能夠明顯地誘導血管的形成，而在切片染色玻片中亦可以看到控制組有明顯的血管生長，而在給藥組無論是 co-plug MPT0E028 或是口服給予 MPT0E028 的組別其血管的結構都明顯地減少，並且抑制程度依給藥的劑量增加而增加。同時，在取下 Matrigel plug 後，利用超音波震盪並測量 Matrigel plug 中血紅素的含量以評估 MPT0E028 抑制血管新生的程度；結果如 Figure 11B 所示，在 co-plug MPT0E028 以及口服給予 MPT0E028 的組別其 Matrigel plug 內血紅素含量皆依給藥劑量的上升而有減少的情形，MPT0E028 在濃度 1 μ M 以及 10 μ M 條件下抑制血管新生的程度分別為 52% 以及 77%，並且口服給予 MPT0E028 10 以及 20

mg/kg/day 也能達到明顯抑制血管的生成，程度分別可達 61% 以及 85%。因此，此實驗結果可說明 MPT0E028 具有依劑量相關性抑制體內血管生成的能力。



十二、MPT0E028 在小鼠異體移植的模式中延遲腫瘤生長

已有不少研究顯示腫瘤的生長必須依靠血管新生，因此抑制血管新生能夠減少腫瘤的生長，在本篇研究中，利用乳癌細胞 MDA-MB-231 進行腫瘤異體移植實驗，以評估 MPT0E028 是否能直接影響腫瘤的生長。首先，將人類乳癌細胞 MDA-MB-231 皮下注射於 8 週歲雌性裸鼠，並以每日口服給予不同劑量之 MPT0E028，於腫瘤體積達到 $1,200 \text{ mm}^3$ 結束實驗。實驗結果發現，如 Figure 12A 所示，在實驗 14 天時，給予 10 以及 25 mg/kg/day MPT0E028 之小鼠腫瘤皆小於 $1,000 \text{ mm}^3$ ，未給予藥物的控制組 MDA-MB-231 腫瘤體積則超過 $1,500 \text{ mm}^3$ ，可知給藥組別較 control 的組別明顯延緩小鼠腫瘤的生長。另外於此實驗中，口服給予 MPT0E028 的小鼠並未產生任何毒性症狀，包括體重減輕 (Figure 12B)，表示小鼠可以忍受藥物的處理。接續將腫瘤組織磨碎，並以 lysis buffer 溶解、定量後、進行西方墨點法分析 ac-histone 3、ac- α -tubulin 以及 NRP1 的蛋白質表現量，在 Figure 12C 可以看到，於腫瘤組織中，與 control 組比較，MPT0E028 能明顯增加 ac-histone 3、ac- α -tubulin 之蛋白表現，並且也會明顯減少 NRP1 的蛋白表現。

第五章 討論

HDACs 是一群會透過轉譯後修飾的方式調控組蛋白以及非組蛋白，包括轉錄因子、chaperones 或是一些結構性蛋白，進而改變蛋白結構的穩定性以及蛋白與蛋白之間的交互作用 (Glozak *et al.*, 2005)。而 HDAC 抑制劑亦可藉由增加 p53 以及 pVHL 的表現量，抑制 HIF-1 α 以及 VEGF 的 mRNA 以及蛋白質表現量，進而影響血管生成的步驟 (Ellis *et al.*, 2009)。內皮細胞中 VEGFR 下游訊息傳遞對於血管新生扮演的腳色甚為重要，因此，在抗血管新生的治療標靶中，anti-VEGF 為近年來成為主要研究與發展新藥的趨勢。1971 年 Folkman 即提出血管新生會影響腫瘤的存活、進程以及轉移，但直到三十三年後才有第一個 FDA 通過的抗血管新生藥物且為 anti-VEGF 的單株抗體 bevacizumab 上市；而近年來，sorafenib 以及 sunitinib 兩個小分子的 receptor tyrosine kinase 抑制劑先後上市，抑制 VEGFR 以及 PDGFR 的下游訊息傳遞，且分別用於治療肝癌以及腎臟癌；臨床研究已證實會減緩腫瘤的進程以及增加病人的存活率，因此抑制血管新生的藥物在抗癌治療中顯得日益重要。本篇論文研究一新合成的 HDAC 抑制劑 MPT0E028，於人類臍靜脈內皮細胞抑制血管新生作用機轉之探討，我們利用 microarray 分析並證明 HDAC 抑制劑 MPT0E028 會藉由抑制 NRP1 的 mRNA 以及蛋白質表現量而抑制血管新生。NRP1 作為 VEGFR2 的共同受器，VEGF 需要與其以及 VEGFR2 共同結合才得以開始下游的訊息傳遞 (Gelfand *et al.*, 2014)。首先，在 *in vitro* 功能性實驗，確認 MPT0E028 確實會影響內皮細胞的增生、移行以及形成類管腔的能力；而在 *in vivo* 實驗中 matrigel plug assay 以及腫瘤異體移植評估，也同樣證明 MPT0E028 可有效減少體內的血管生成以及減緩腫瘤生長。同時，利用西方墨點法以及流式細胞儀也發現 MPT0E028 會藉由抑制 MAPK pathway、Akt/mTOR pathway 以及影響細胞週期等方式而減少內皮細胞的增生，另外也會抑制細胞移行相關的蛋白，例如：Src、FAK 以及 p38 MAPK 影響血管通透性，而減少細胞的移行。以下根據研究結果作更進一步的討論。



一、探討 MPT0E028 與 SAHA 結構和藥效比較

Vorinostat 又名 suberanilohydroxamic acid，簡稱 SAHA，化學結構為 N-hydroxamin acid 的衍生物，為第一個通過美國 FDA 的 HDAC 抑制劑，屬於廣泛性 HDAC 抑制劑，使組織蛋白和轉錄因子蛋白質中之 lysine 去乙酰化 (Richon, 2006)，在 2006 年被許可治療皮膚 T 細胞淋巴瘤 (cutaneous T cell lymphoma ; CTCL) (Marks *et al.*, 2007)，目前對於非小細胞肺癌 (合併 paclitaxel 與 carboplatin)、惡性間皮瘤、多發性骨髓瘤、血癌、骨髓增生不良症候群、淋巴瘤、胃癌、肝癌、頭頸癌進行臨床研究。而 MPT0E028 亦屬於小分子化合物 HDAC inhibitor 且同為 N-hydroxamic acid 衍生物，目前已有許多研究證實其對於許多不同癌症，無論是在體外的細胞實驗以及體內動物實驗皆會影響癌細胞的增生或是造成癌細胞凋亡，且與 SAHA 比較皆具有更強的 HDAC 抑制劑的藥效 (Huang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014)。因此本篇實驗在探討 MPT0E028 對於抑制血管新生的作用與機轉時，同時也選用了 SAHA 作為對照組，並比較兩者於體外血管新生相關功能性實驗的藥效。

二、探討 MPT0E028 減少 HDAC family 蛋白質表現量

HDAC family 目前已有許多研究指出對於血管新生具有一定調控的角色，HDAC1、3 會結合至 HIF-1 α 上的 oxygen-dependent degradation domain (ODDD) 進而正向調控 HIF-1 α 的穩定性以及 transactivation (Kim *et al.*, 2007)；HDAC4 以及 HDAC6 也會和 HIF-1 α 結合並藉由減少 proteosomal degradation 而增加 HIF-1 α 穩定性以及轉錄活性 (Qian *et al.*, 2006)。本研究使用之藥物 MPT0E028 已被研究證實為一 pan-HDAC 抑制劑，且在先前的研究發現 MPT0E028 會顯著抑制 HDAC1、2、6 的活性 (Huang *et al.*, 2012)，因此在本研究中利用西方墨點法來探討 MPT0E028 對於內皮細胞中與血管新生相關的 HDAC 蛋白質表現量影響為何，實驗結果發現



HDAC2、6 的蛋白質表現量有明顯隨依時間以及濃度相關性地減少，但是對於 HDAC1、3、4 蛋白質則無明顯影響。而在 SAHA 藥物處理的組別，可以看到 SAHA 對於 HDAC2、6 也有依時間以及濃度相關性抑制，至於對於 MPT0E028 抑制血管新生的作用是否與抑制 HDAC family 的蛋白有所相關，日後需要更專一的實驗以及更深入的探討。

三、探討 MPT0E028 對於細胞週期的影響

細胞週期規律的運作，不但受到細胞內外的蛋白訊息傳遞所調節，也受到嚴密的調控分子所監視，可分為三個時期：G0/G1 期、S 期以及 G2/M 期。在每個時期皆有相關調控的蛋白，cyclin family、CDK family、Rb 以及 CDK 抑制劑如 p21 以及 p27 等皆參與其中的調控 (Herrup *et al.*, 2007)。細胞週期的第一個 checkpoint 即為 G1/S，細胞在 G1 期要進入 S 期時會藉由活化一系列相關蛋白以利細胞正確進入 S 期並且開始 DNA 的複製，其中包括 Rb、cyclin A、cyclin D1、CDK2、CDK4、p21 以及 p27 等，過去已有研究指出 HDAC 抑制劑使得內皮細胞中 p21^{WAF1/CIP1} 表現增加，造成細胞週期停滯在 G0/G1 期，同時也會減少 survivin 的表現量 (Qian *et al.*, 2004)；另外，在 2009 年研究中發現一 Raf-1 抑制劑 Sorafenib 可以藉由阻斷 Raf/MEK/Erk pathway 進而造成 G0/G1 arrest (Hayne *et al.*, 2000)。本篇研究在西方墨點法中也確認 MPT0E028 具有抑制 Erk1/2 磷酸化的能力，暗示其應具有調控細胞調節的能力。Rb 在 G1 期是扮演負調控角色，會與 E2F 結合而抑制 E2F 活化 (Lundberg *et al.*, 1998)，而細胞在受到生長因子刺激時，cyclin D 會與 CDK4/CDK6 形成複合物接著磷酸化 Rb，磷酸化後的 Rb 會與 E2F 分離，E2F 便可進行相關基因的轉錄與活化，包括掌管 S 期 DNA 合成的 cyclin A、cyclin E 以及 CDK2，cyclin E 會與 CDK2 形成複合物從 G1 期進入 S 期，而 cyclin A 與 CDK2 複合物則是促進細胞週期進入 G2 期。在進入 G2 期後，便由 cyclin B 以及 CDK1 形成複合物調控細胞週期進入 M 期以進行細胞的有絲分裂。因此在本篇研究中，首先利用流式細胞



儀發現 MPT0E028 確實表現 HDAC 抑制劑的特性，使內皮細胞週期停滯在 G0/G1 期，減少 S/G2/M 期的細胞百分比，接著再使用西方墨點法觀察一些調控 G0/G1 期的相關蛋白，可以看到 p21^{WAF1/CIP1} 以及 p27 蛋白表現量皆隨時間以及濃度相關性地增加，並且會影響 G1 期的 cyclin D1、S 期的 cyclin A 以及 G2 期的 cyclin B1 表現量皆下降，同時 Rb 以及 p-Rb 蛋白表現量皆有依時間以及濃度相關性下降，另外先前研究指出在人類內皮細胞中的 cdc25A 表現減少會去抑制 cyclin E 與 CDK2 的複合物表現，進而造成細胞週期停滯在 G0/G1 期 (Sandhu *et al.*, 2000)，因此在西方墨點法中也可發現 cdc25A 其表現量依時間以及濃度相關性減少，p-CDK2 其表現量也隨之下降。綜合以上結果，證明 MPT0E028 具有 HDAC 抑制劑的特性，能藉由調控細胞週期 G1/S checkpoint 的相關蛋白，進而使其停滯在 G0/G1 期，影響細胞正常的生長情形。

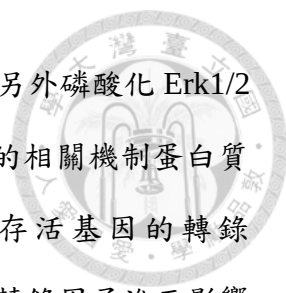
四、探討 MPT0E028 減少 Akt/mTOR 路徑之機轉

PI3K/Akt/mTOR 路徑目前已知在多數腫瘤細胞中被過度活化，與癌細胞的增生活有密切相關，不僅止於癌細胞此條訊息傳遞路徑，對於正常細胞的生理功能也扮演一定重要的腳色，例如細胞的增生、黏附、移行、入侵、代謝以及存活等等 (Bader *et al.*, 2005)。Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃)為 PI3K 所產生的第二信息傳遞分子，會去活化下游 Serine/Threonine kinase 即 PDK1 以及 Akt，Akt 會進而磷酸化下游的 mTOR 來調控蛋白質合成以及細胞的生長，而 Phosphatase and tensin homolog (PTEN)則普遍被認為具有負向調控 PI3K/Akt/mTOR 路徑的腫瘤抑制基因 (Toker *et al.*, 1997)。對於血管新生目前也有許多研究指出會經由此路徑上下游的訊息調控來促進血管的生成，常見的機制如下：(1) 在內皮細胞給予 VEGF 生長因子的刺激時，會增加 PI3K/Akt/mTOR 路徑的訊息傳遞而增加細胞移行的能力；(2) 內皮細胞持續性的活化 Akt 會導致畸形結構的血管生成進而增加腫瘤的血管生成 (Morales-Ruiz *et al.*, 2000)；(3) PI3K 之活性次單元 p110 α 對於細胞移

行以及血管新生具有重要調控功能，在胚胎發育時期若將 p110 α 移除，血管無法正常生長 (Graupera *et al.*, 2008); (4) EGFR/PI3K/Akt/mTOR 的路徑也會藉由正向調控 HIF-1 α 或是直接作用在 VEGF promoter 上進而增加 VEGF mRNA 以及蛋白質 (Maity *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001)。因此在本篇論文中探討 MPT0E028 對於 Akt/mTOR 路徑的影響，實驗結果證實 MPT0E028 會依時間以及濃度相關性抑制 p-Akt (ser473)、mTOR 以及 p-mTOR (ser2448) 的蛋白質表現，並且也會依時間以及濃度相關性地增加 PTEN 蛋白質表現量。另外因為活化 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 路徑在血管新生也扮演重要的角色，已有研究指出若使用 EGFR 抑制劑 C225 不但會減少 VEGF 的表現量，也會影響其他血管新生因子，如 interleukin-8 以及 bFGF；最近研究也指出在鱗狀上皮細胞癌中，EGFR 促進 VEGF-A 的表現量是需要 PI3K 以及 MAPK 此兩條路徑的共同活化 (Bancroft *et al.*, 2002)。因此在本篇研究中，於 supplemental figure 顯示 MPT0E028 對於 EGFR 會依時間相關性抑制其表現，而 MPT0E028 同時也會抑制 p-Erk1/2 的蛋白質表現量，因此推測 MPT0E028 同時藉由抑制 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 路徑以及 MAPK 路徑共同抑制 VEGF 的表現進而抑制細胞增生與存活，而這部分未來仍需要再多作 EGFR 下游訊息傳遞的分子探討以確認相關機制。

五、探討 MPT0E028 抑制細胞增生的機轉

近年來發現 Raf/MEK/ERK 路徑可藉由調控 G1/S checkpoint 蛋白而影響細胞週期的進行，首先細胞分裂素 (Mitogen) 會使得 Erk1/2 產生兩波的活化，第一波的活化是快速且強烈地約 10 分鐘結束，且活化的 Erk1/2 會轉移至細胞核內，緊接著第二波的活化則是較慢且穩定，並會持續整個 G1 期約 6 小時，直到細胞週期進入 S 期後，Erk1/2 的活化才會結束並且離開核內。調控細胞週期相關蛋白的部分，活化的 Erk1/2 會藉由增加 cyclin D 的表現，促使 cyclin D 以及 CDK4/6 的複合體形成並接著磷酸化 Rb，使得 Rb 與 E2F 分離，E2F 得以促進細胞週期進入 S 期開



始 DNA 的複製 (Coleman *et al.*, 2004; Chambard *et al.*, 2007)，另外磷酸化 Erk1/2 也會促進細胞存活，並且會藉由兩種方式，一種為將細胞死亡的相關機制蛋白質作轉譯後的修飾或是抑制其活化，第二種則是增加細胞存活基因的轉錄 (Srinivasan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2015)。ERK1/2 會影響 FOXO 轉錄因子進而影響抑癌基因 Bim、FasL，或是細胞週期 p27^{kip1} 以及 cyclinD 的表現。因此目前的 Erk1/2 抑制劑研究出的機制為藉由穩定 FOXO3 而抑制細胞的增生、減少細胞的轉型、減緩腫瘤的進程以及減少血管新生等等 (Mebratu *et al.*, 2009)。因此在此篇研究中，MPT0E028 確實會造成細胞週期停滯在 G0/G1 期，因而探討對於 Erk1/2 表現量的影響，實驗結果發現 MPT0E028 會依時間以及濃度相關性抑制 p-Erk1/2 的蛋白質表現量，但不影響 Erk1/2 其本身的蛋白質。

六、探討 MPT0E028 抑制細胞移行的機轉

內皮細胞的移行對於血管新生步驟是相當重要的，過程需要活化許多訊息傳遞來完成細胞骨架的重組，包括內皮細胞的黏附、延伸、收縮、前進等等，因此本篇研究以內皮細胞中 VEGFR2 下游訊息傳遞作相關細胞移行蛋白的探討，首先當 VEGF 結合至 VEGFR2 時會在 tyrosine 1214 的位置自體磷酸化，依序活化下游的 Nck、Fyn 以及 Cdc42，接著磷酸化 p38 MAPK，活化的 p38 MAPK 會接續磷酸化下游的 LIM kinase 以及 Hsp27，在內皮細胞中會增加 actin 的聚集表現量以及 stress fiber 的形成使得內皮細胞得以收縮進行細胞移行；另外 VEGF 與 VEGFR2 的結合也會造成 Hsp90 的聚集至 VEGFR2 進而活化 RhoA-ROCK，接著 RhoA-ROCK 會在 FAK serine 732 的位置上磷酸化，改變 FAK 構型使得其能夠被另一個 kinase Pyk 在 tyrosine 407 的位置磷酸化，造成 focal adhesion 的消長 (turnover) 而改變細胞的貼附能力 (Lamallice *et al.*, 2007)，且目前已有研究顯示 NRP1 與 VEGF 的結合對於 VEGFR2、NRP1 和 VEGF 受器與配體複合物的形成為不可或缺，並且會幫助 VEGF 刺激 VEGFR2 的下游 FAK tyrosine 407 位置的磷酸



化而增加細胞移行的能力 (Herzog *et al.*, 2011)。Pyk2 的磷酸化，以及 VEGFR2 tyrosine 951 的磷酸化皆會活化 Src，進而影響血管穿透度，增加內皮細胞移行的能力。因此在本篇研究中探討 MPT0E028 對於細胞移行相關的蛋白質表現，實驗結果可以看到 MPT0E028 能夠依時間以及濃度相關性地抑制 p-p38 MAPK、p-FAK 以及 p-Src 蛋白質表現量，至於 FAK 的整體蛋白質表現量亦隨時間以及濃度相關性地減少。之前已有研究顯示兩個 VPA 的衍生物 ACS2 以及 ACS33 同為 pan-HDAC inhibitor，對於膀胱癌中 FAK 以及 p-FAK 的蛋白質表現量皆會抑制 (Wedel *et al.*, 2008)，且已有研究證實減少 Erk1/2 的活化也會經由影響轉譯後的修飾而造成 FAK 以及 p-FAK 之蛋白表現量降低 (Srinivasan *et al.*, 2009)。因此推測 MPT0E028 應具有抑制 FAK 蛋白質合成的能力，而 p-FAK 表現量下降的原因推測有二，一為 FAK 本身蛋白質表現量下降所致，二為因減少 NRP1 的表現進而影響 VEGFR2 下游 FAK 的磷酸化。

七、探討 MPT0E028 抑制 NRP1 表現以及下游訊息傳遞機轉

本研究中首先使用 microarray 分析 MPT0E028 會影響許多不同的血管新生的基因表現，結果顯示 NRP1 mRNA 表現量約下降至 20%，為血管新生相關基因改變量最多者，且 NRP1 作為 VEGFR2 的共同受器，已有許多研究顯示對於調控 VEGFR2 下游訊息傳遞扮演重要的功能，因此以 NRP1 作為標靶蛋白檢測 MPT0E028 是否影響其表現量，結果發現 MPT0E028 會依時間以及濃度相關性抑制 NRP1 之 mRNA 以及蛋白質表現量。另外 PI3K/Akt 以及 Ras/Raf/Erk 訊息傳遞路徑，對於正常細胞增生、細胞週期 G1/S 的轉換以及內皮細胞的移行，皆為重要的調控路徑 (Wu *et al.*, 2010; Polivka *et al.*, 2014)。目前已有許多研究顯示抑制 PI3K/Akt 以及 Erk 訊息路徑能夠成為有效的血管新生抑制劑，因而抑制腫瘤的生長 (Wang *et al.*, 2012)，因此在本研究接著使用 hEGFP-NRP1 將 NRP1 過度表現，結果顯示確實能夠明顯地反轉 MPT0E028 抑制 Akt 以及 Erk1/2 的磷酸化作用，並

且在功能性實驗中，結晶紫染劑細胞增生實驗呈現同樣結果，過度表現 NRP1 能夠反轉 MPT0E028 所抑制的細胞增生現象，因此顯示 NRP1 是 MPT0E028 抑制血管新生重要之標靶蛋白。



八、探討 HDAC 抑制劑調控 sp1 活性進而抑制 NRP1 表現

已知 MPT0E028 為一個 pan-HDAC 的抑制劑，尤其對於 Class I 的 HDAC1、2 以及 Class IIb HDAC6 抑制活性最強 (Huang *et al.*, 2012)，目前亦有許多研究證實 HDAC 家族會藉由 epigenetic 方式修飾並調控 Sp1 轉錄因子的活性以及其下游基因啟動子的表現，例如 HDAC1 會藉由和 Sp1 黏附而影響 Sp1 與 E2F1 啟動子的結合，影響 E2F1 的基因轉錄進而影響細胞週期的變化 (Doetzlhofer *et al.*, 1999)；HDAC6 本身即會抑制 Sp1 的轉錄活性，而另有研究指出 p300 會藉由乙醯化 HDAC6 使其失去活性，而間接增加 Sp1 的表現 (Han *et al.*, 2009)；過度表現 HDAC1/2 也會抑制 Sp1 與 p300 結合表現而顯著減少 *Npr1* 此基因啟動子的活性 (Kumar *et al.*, 2014)。因此有許多研究已證實多種 HDAC 的抑制劑皆會影響 Sp1 與 DNA 結合的親和力，增加或抑制其轉錄活性，例如 trichostatin 會使原本在 DNA 上 HDAC1 和 Sp3 的複合物與 Sp1 分離，Sp1 得以結合至 IGFBP3 的啟動子上，增加 IGFBP3 mRNA 以及蛋白質表現，影響下游訊息傳遞，包括 IGF 所調控的細胞生長、分化以及細胞凋亡等等 (Choi *et al.*, 2002)。

相關研究已證實 Sp1 是與 NRP1 DNA 啟動子上結合最重要的轉錄因子 (Rossignol *et al.*, 2003)，比起其他轉錄因子如 AP-1 或是 C/EBP β 最能影響 NRP1 基因的表現，因此已有研究顯示 butyrate 此一 HDAC 抑制劑在大腸直腸癌細胞中，會抑制 Sp1 結合至 NRP1 DNA 啟動子上的序列，因而顯著減少 NRP1 mRNA 以及蛋白質表現量 (Yu *et al.*, 2010)，延伸研究也證實眾多 HDAC 抑制劑皆會增加 Sp1 在 lysine 703 位置的乙醯化，包括 butyrate、VPA、oxamflatin、scriptaid、CHAHA、APHA 等等，進而降低 Sp1 與 DNA 親和力，並抑制 Sp1 在基因序列上啟動子的轉

錄表現 (Waby *et al.*, 2010)。因此在本篇論文中探討 Sp1 與 NRP1 之間的關係，使用免疫沉澱染色分析法，證實在經 MPT0E028 處理後的組別，HUVECs 的轉錄因子 Sp1 乙醯化確實有增加的趨勢，進而推測為抑制 HDAC 所造成的影響，因此未來的研究方向，需要進一步利用 EMSA 實驗方法，以確認 MPT0E208 抑制 Sp1 與 NRP1 promoter 親和力之機轉，以及探討 MPT0E028 是抑制何種 HDAC isoform，所導致 Sp1 增加乙醯化之影響最大。

第六章 結論與展望



隨著時代以及醫藥技術的進步，許多疾病對於人類而言已不構成威脅，不但能掌控病情發展甚至有些病原體已銷聲匿跡，但是，癌症至今三十三年以來始終蟬聯世界第一名的各類疾病死因。在台灣，癌症的時鐘再度快轉，衛生福利部在今年公布民國 101 年新發生癌症人數及排名，當年度癌症患者新增 9 萬 6694 人，代表平均每 5 分鐘 26 秒就有一人罹癌，比民國 100 年快了 14 秒，而大腸癌連續七年高居國人十大癌症首位，並且罹癌者年齡層亦有逐年下降的趨勢，如此統計數據顯示對於癌症，醫療界還是急需有效且快速的治療與藥物。早期的癌症化學療法多是利用藥物毒殺細胞的特性，造成癌細胞死亡減緩腫瘤生長，但這樣治療方式的缺點即在於藥物的毒性過高、副作用大以及病人在藥物用久之後可能有抗藥性的產生，不但侷限了藥物治療的效果，也會降低病人在罹癌時的生活品質。因此近年來開隨著分子醫學、藥理學以及臨床醫學的進步，小分子藥物標靶治療 (molecular targeted therapy) 開始成為各大藥廠藥物研發以及醫院臨床治療癌症的主流。標靶療法的原理即在於會鎖定癌細胞和正常細胞不同的特定基因表現做標的，有些致癌基因會過度活化，或是抑癌基因表現下降，造成癌細胞下游相關路徑開始異常，其優點為藥物的選擇性高、藥物毒性下降、副作用也較傳統化學療法較低。本篇研究的小分子化合物具有抗血管新生即為一種標靶治療。

血管新生自從1971年由血管新生之父Folkman提出癌細胞的轉移和成長與其密不可分之後，便開啟了對於血管新生過程與因子以及血管新生抑制劑的藥理相關研究。內皮細胞對於血管新生而言扮演最重要的腳色，其中內皮細胞的增生、移行以及形成管腔的能力，都是影響血管新生的關鍵。因此本篇研究利用一個小分子合成的HDAC抑制劑MPT0E028，來探討其對於抑制血管新生的作用效果，並且探討其抑制的機轉。首先在一些功能性體外實驗中，證明MPT0E028確實會影響細胞的增生、減少細胞移行的能力，並且也會抑制內皮細胞的管腔形成；另外在體內的動物實驗中，也同樣證明MPT0E028具有抑制血管形成的能力。進一步探討



其抑制血管新生機轉應為抑制NRP1此VEGFR2共同受器的mRNA以及蛋白質表現量，進而影響其下游包括Erk以及Akt訊息傳遞，而達抗血管新生的作用並且抑制腫瘤的生長。目前，MPT0E028已有許多研究證實對於不同的癌症在體內以及體外都有抑制癌細胞增生以及造成癌細胞凋亡的作用，目前也已進入臨床試驗第一期，未來此藥物發展的方向，即在於確認其抗血管新生的作用對於臨床治療腫瘤時是否為加成效果，並且考慮合併其他標靶抗癌藥物做使用以提高藥物的作用，若有需要也可以對於MPT0E028的化學結構或是劑型再做改良，以增加藥效以及選擇性，並且同時減少藥物的毒性，或許可在將來發展成理想兼顧抗癌以及血管新生抑制劑藥物。

Table.1 Angiogenesis-related genes down-regulated and up-regulated by MPT0E028 in endothelial cells.

Accession no.	Gene name	Symbol	Log ₂ ratio	P value
NM_001005377.2 ^a	plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	-2.562548	1.3397E-19
NM_001024629.2 ^b	Neuropilin-1	NRP1	-2.480083	4.15624E-21
NM_006988.3	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	-2.239281	2.09775E-05
NM_001118888.1 ^c	angiopoietin 2	ANGPT2	-2.213176	2.06914E-11
NM_003868.2	fibroblast growth factor 16	FGF16	-1.838778	8.49436E-06
NM_024660.2	IGF-like family receptor 1	IGFR1	-1.55951	3.15388E-09
NM_001145031.1 ^d	plasminogen activator, urokinase	PLAU	-1.063044	0.00269689
NM_000138.4	Fibrillin 1	FBN1	1.006386	7.18684E-05
NR_038335.1 ^e	clusterin	CLU	1.159802	0.008331904
NM_000598.4 ^f	insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	2.469168	1.84644E-09

HUVECs were treated with 1 μ M MPT0E028 for 24 hr, then the total RNA was extracted for microarray analysis. Each unique splice variants of the gene was also tested. Different accession numbers are given.

^a PLAUR: NM_002659.3

^b NRP1: NM_001024628.2

^c ANGPT2: NM_001118887.1, NM_001147.2

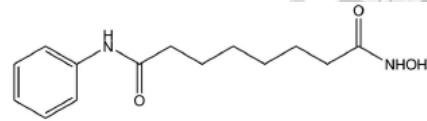
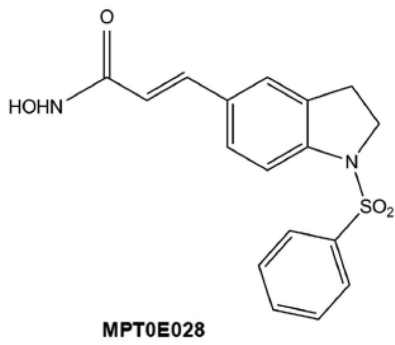
^d PLAU: NM_002658.3

^e CLU: NR_045494.1, NM_001831.3

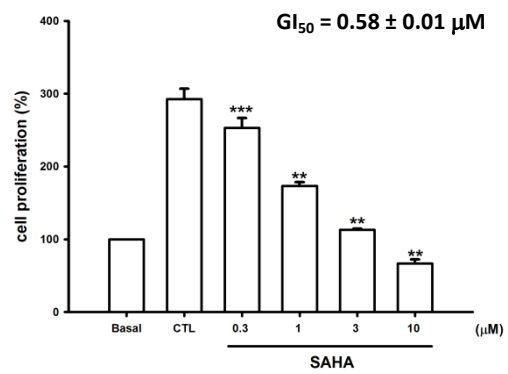
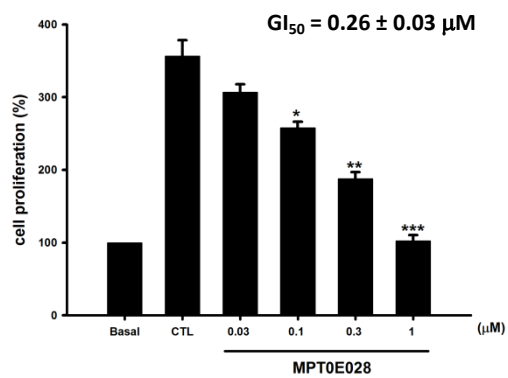
^f IGFBP3: NM_001013398.1



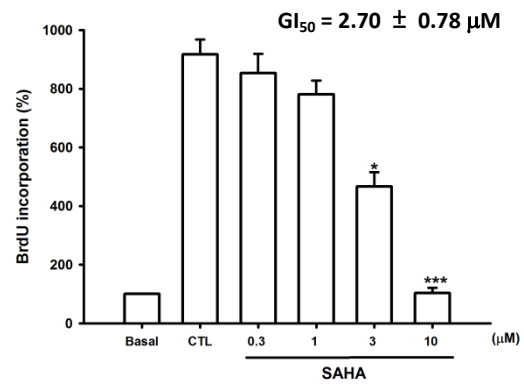
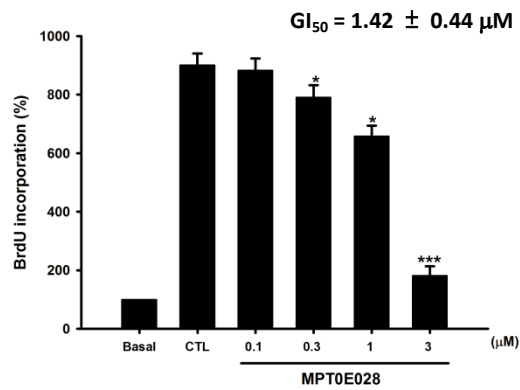
A.



B.



C.



D.

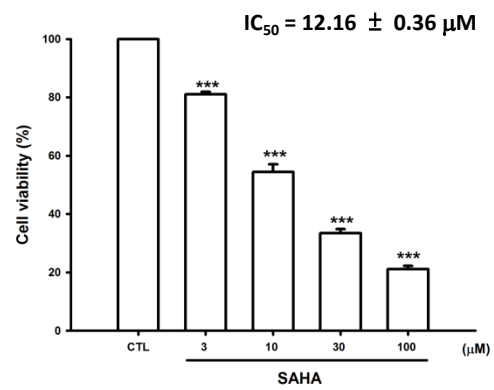
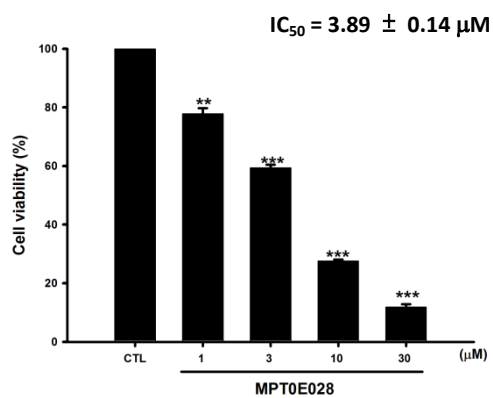
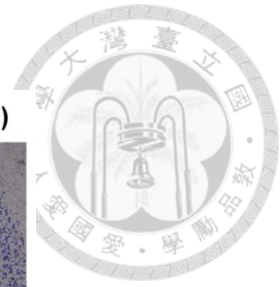
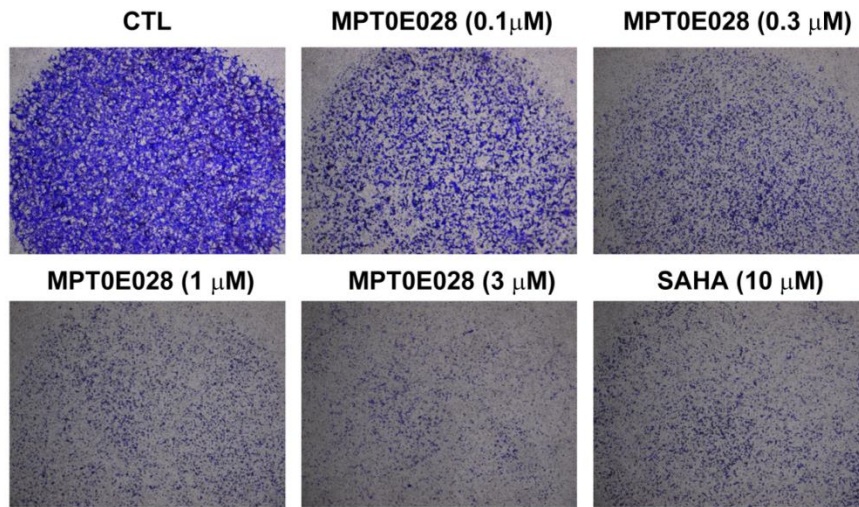


Figure 1. MPT0E028 inhibited cell proliferation and cell viability in HUVECs.

(A) Chemical structure of MPT0E028 and SAHA. **(B and C)** HUVECs were treated without (control, CTL) or with MPT0E028 at the indicated concentrations in EGM-2 medium. (100% = OD) **(B)** After treatment for 72 hr, the inhibition of cell proliferation was measured by crystal violet assay. **(C)** After treatment for 48 hr, DNA synthesis was determined by BrdU incorporation assay. **(D)** After treatment for 48 hr, cell viability was measured by MTT assay. Data represent the mean $\pm$ SEM from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group.

A.



B.

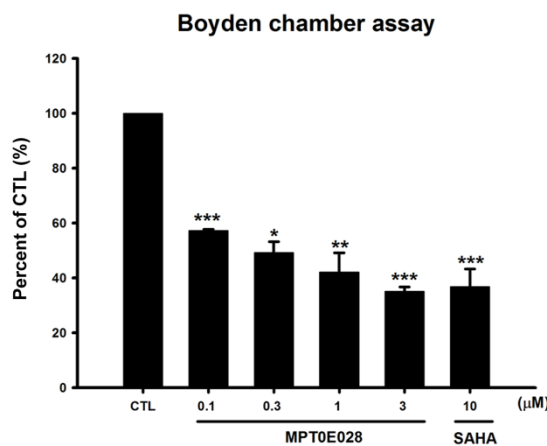
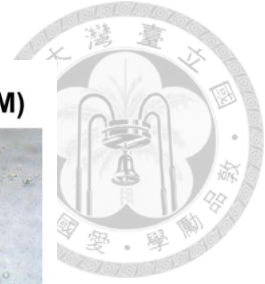
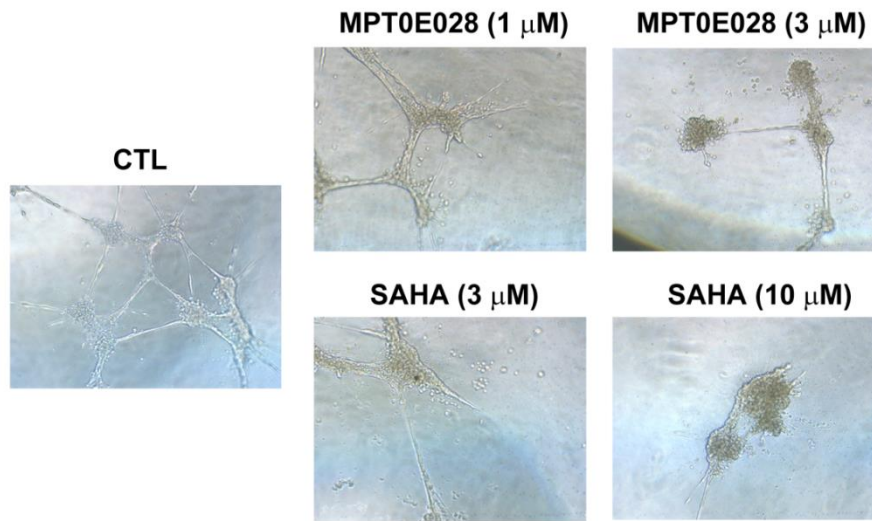


Figure 2. MPT0E028 inhibited cell migration in HUVECs

(A) Representative photographs of cell migration of HUVECs treated without or with MPT0E028 (0.1, 0.3, 1, 3 μM) and SAHA (10 μM) for 18 hr by using a boyden chamber assay (magnification is 4X). **(B)** Quantitative analysis of the migrated cell number. 100% = number of migrating cells. Data represent the mean $\pm$ SEM from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group.

A.



B.

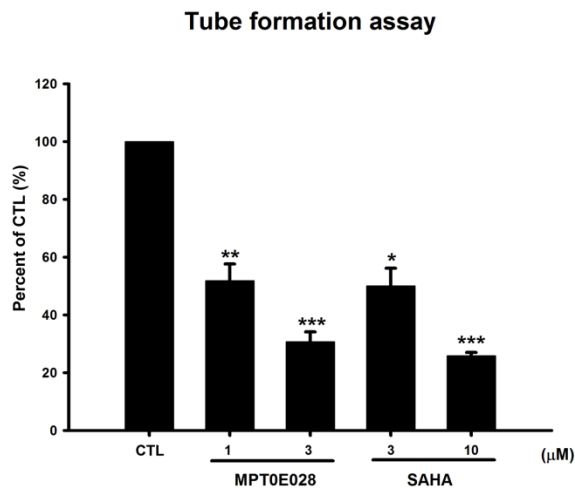
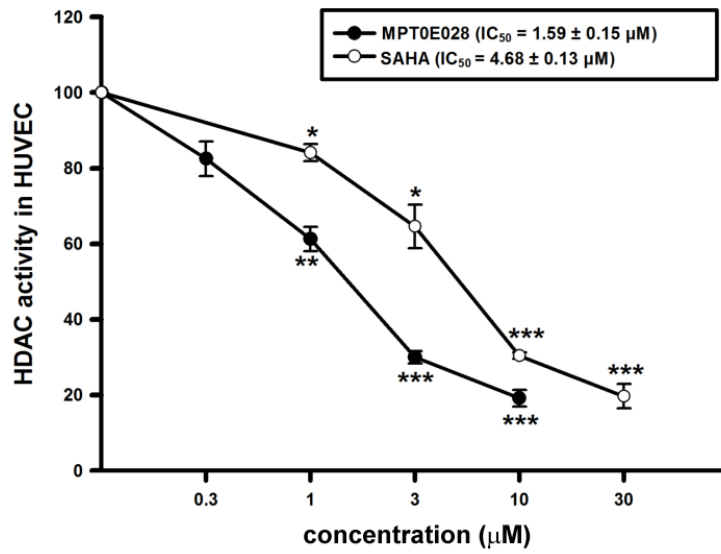


Figure 3. MPT0E028 inhibited tube formation in HUVECs.

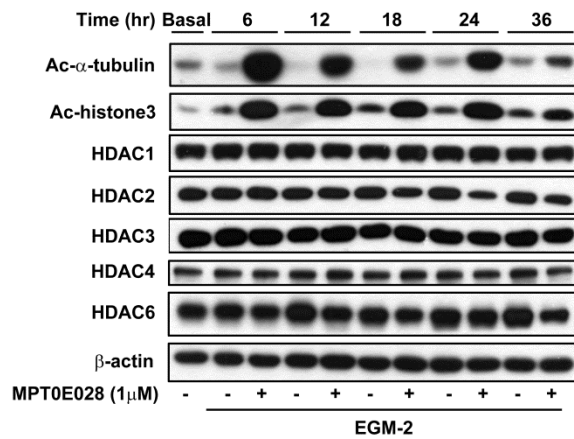
(A) Representative photographs of tube formation of HUVECs treated without or with MPT0E028 (1, 3 μM) and SAHA (3, 10 μM) on matrigel under microscope (magnification is 100X). (B) Quantitative analysis of the total tube length by image analysis software (Image-Pro® Plus). 100% = total tube length (mm). Data represent the mean ± SEM from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group.



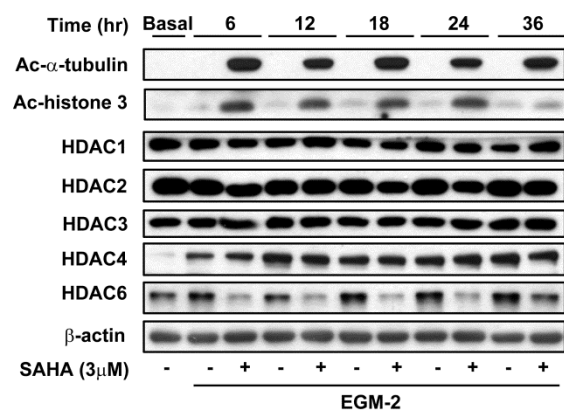
A.



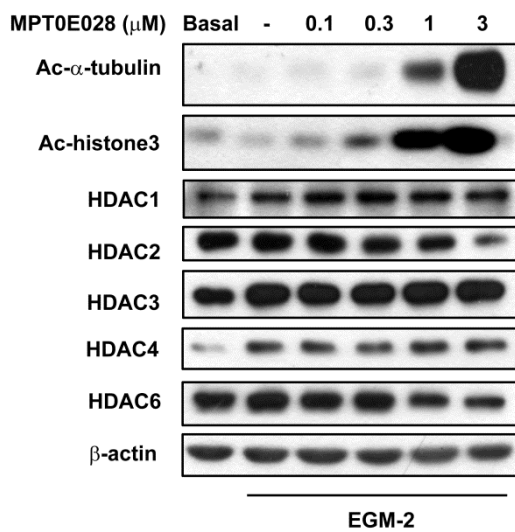
B.



C.



D.



E.

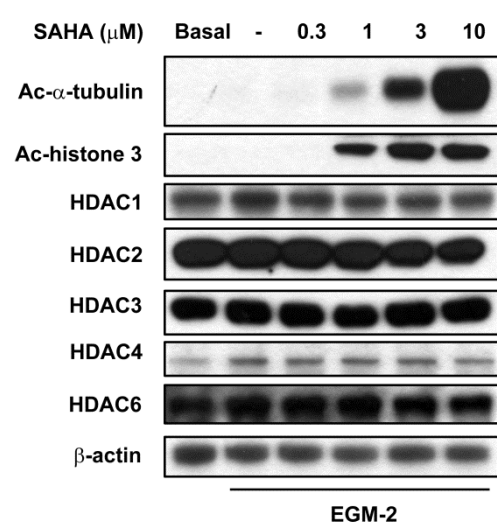
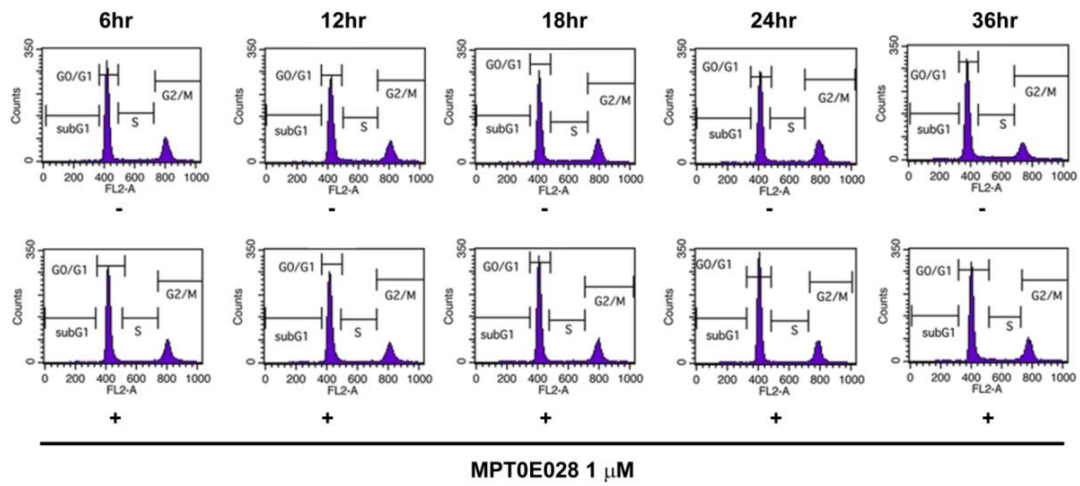


Figure 4. Effects of MPT0E028 and SAHA on HDACs activities and protein expressions.

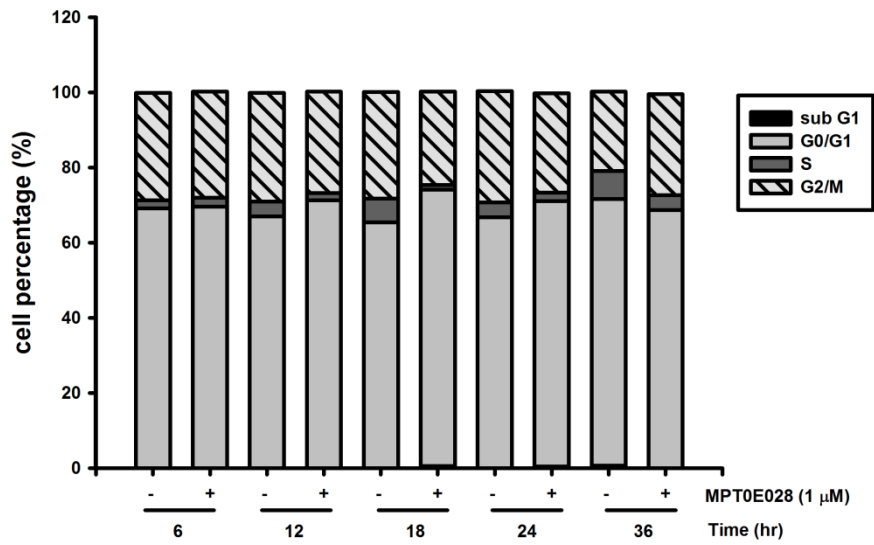


(A) Inhibition of pan-HDAC enzyme activity by MPT0E028 and SAHA. After treated with the indicated concentrations of MPT0E028 or SAHA for 24 hr, the whole-cell lysates from HUVECs were extracted to analyze the effect of MPT0E028 by Fluorometric HDAC activity assay kit. Data represent the mean $\pm$ SEM from three independent experiments. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ compared with the control group. **(B and C)** Western blots were performed after treatment with indicated concentrations and time interval of MPT0E028 and SAHA on HUVECs. Effects of 1 μ M MPT0E028 and 3 μ M SAHA on the HDAC6 inhibition markers (acetyl-histone 3, acetyl- α -tubulin), and various HDACs family in HUVECs were observed in a time-dependent manner. **(D and E)** Treatment with different concentrations of MPT0E028 and SAHA on HUVECs for 24 hr were observed in a concentration-dependent manner.

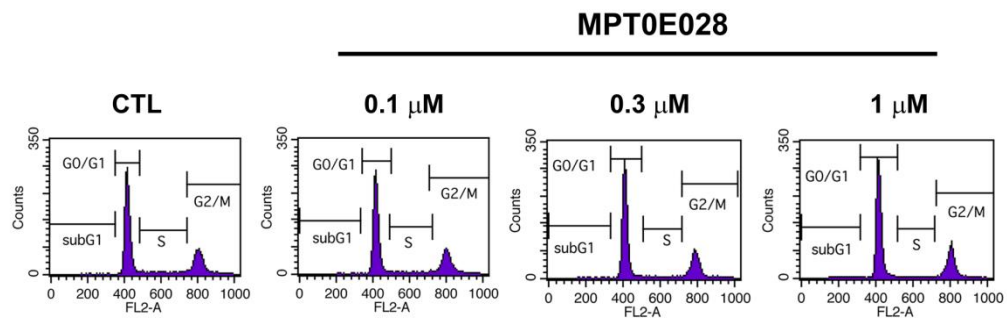
A.



B.



C.



D.

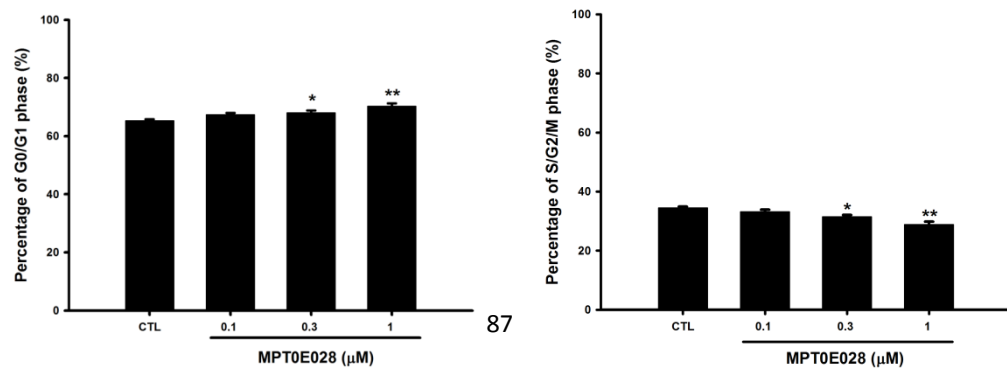
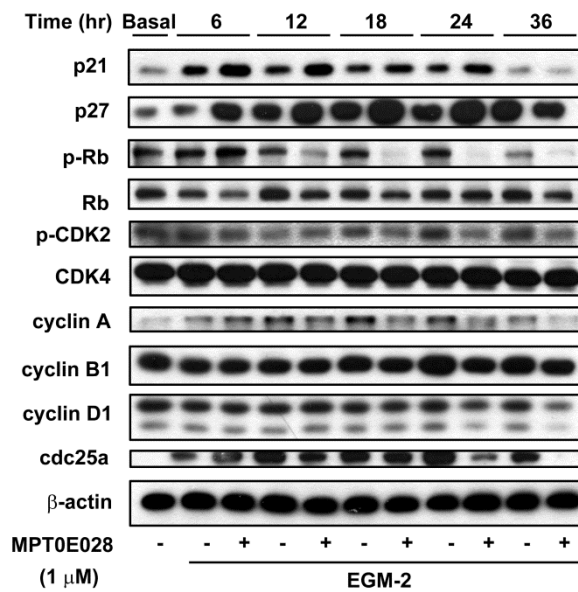


Figure 5. MPT0E028 induced HUVEC cell cycle arrest in G0/G1 phase.

(A and B) After starvation for 18 hr, HUVECs were then treated without or with MPT0E028 (1 μ M) for the indicated time interval. (A) Time-course dependent effects of MPT0E028 on cell cycle progression were analyzed by flow cytometry for cell cycle distribution. (B) Quantification of cell population in different phase. (C and D) After starvation for 18 hr, HUVECs were then treated without (control, CTL) or with the indicated concentrations of MPT0E028 for 18 hr. (C) Dose-dependent effects of MPT0E028 on cell cycle progression were analyzed by flow cytometry for cell cycle distribution. (D) Quantification of cell population in different phase. Data represent the mean $\pm$ SEM from three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with the control group.

A.



B.

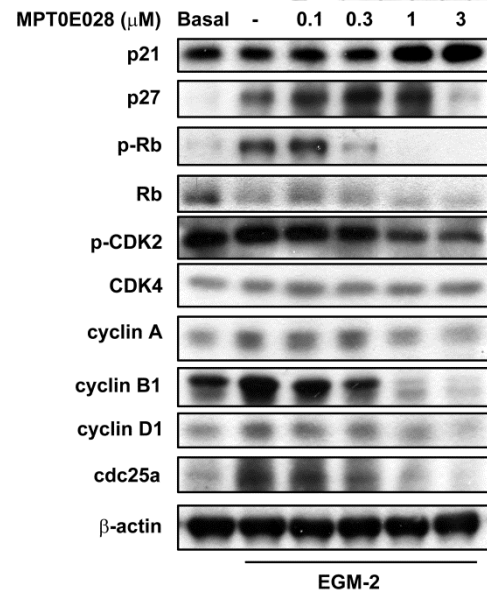
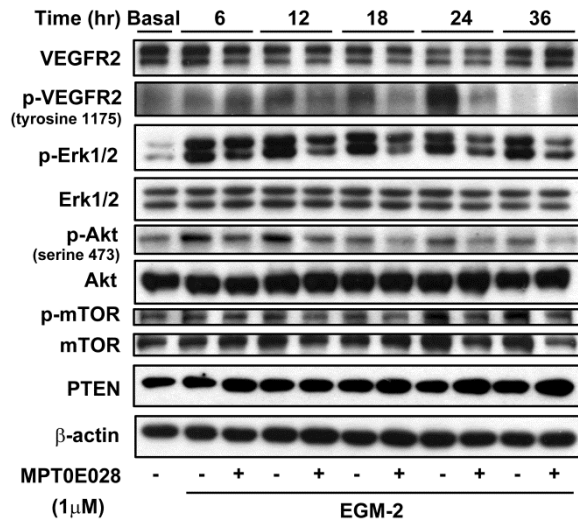


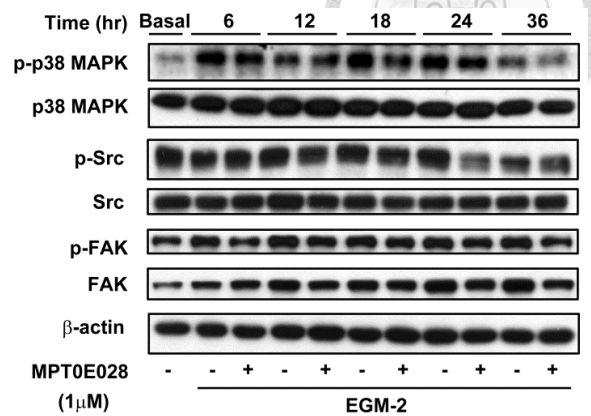
Figure 6. MPT0E028 altered the expression of G0/G1 phase related proteins.

(A) HUVECs incubated in EGM-2 medium were treated without or with MPT0E028 (1 μM) at indicated time interval. Cells were harvested and analyzed cell cycle-related protein expression by Western blot. **(B)** Treatment with indicated concentrations of MPT0E028 on HUVEC for 18 hr were observed in a concentration-dependent manner.

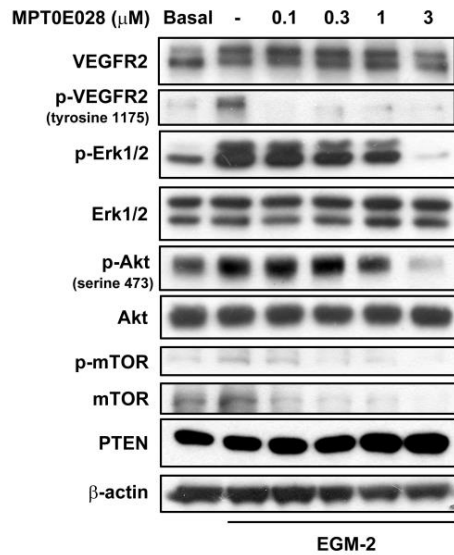
A.



B.



C.



D.

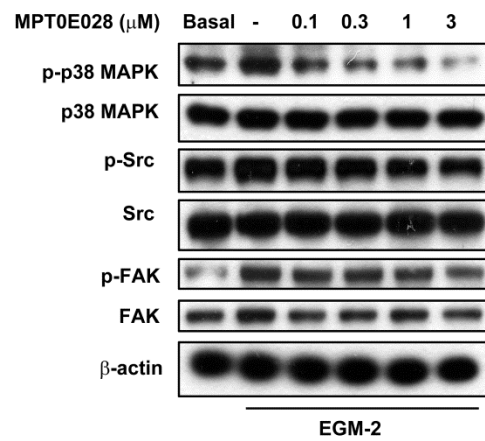
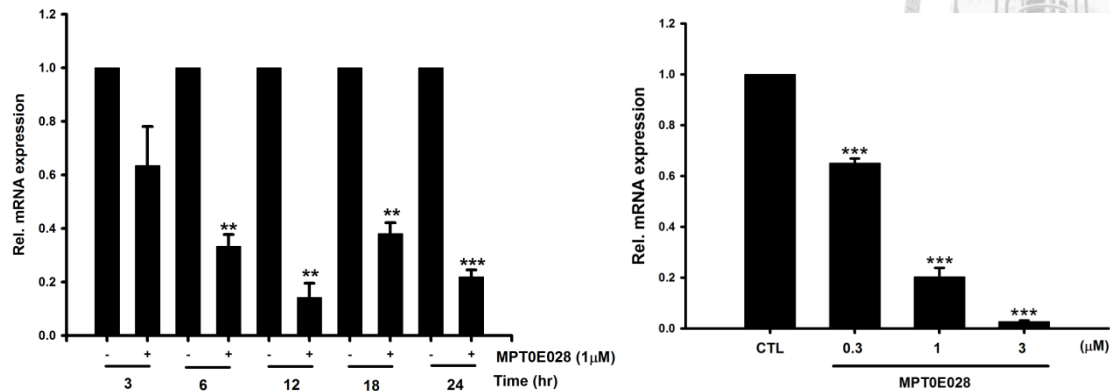


Figure 7. Effects of MPT0E028 on VEGFR2 downstream signaling pathway.

(A and B) HUVECs incubated in EGM-2 medium were treated without or with MPT0E028 (1 μ M) at indicated times. Cells were harvested and analyzed VEGFR2 and VEGFR2 downstream protein expression related to cell proliferation and cell migration.

(C and D) Treatment with indicated concentrations of MPT0E028 on HUVEC for 24 hr were observed for cell proliferation and migration-related proteins in a concentration-dependent manner.

A.



B.

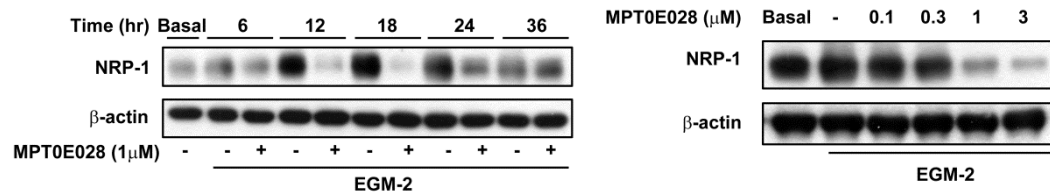


Figure 8. MPT0E028 reduced NRP1 mRNA and protein expression.

(A) *Left panel*, quantitative RT-PCR analysis of NRP1 mRNA expression in endothelial cells treated without (control, CTL) or with MPT0E028 (1 μM) for the indicated time interval. *Right panel*, HUVECs treated with MPT0E028 at indicated concentrations for 12 hr and inhibited the NRP1 mRNA expression in a concentration-dependent manner. (B) *Left panel*, Western blot showed inhibition of NRP1 protein expression by MPT0E028 at indicated time interval. *Right panel*, The concentration-dependent inhibition of NRP1 in HUVECs treated without or with MPT0E028 at indicated concentrations for 12 hr. Data represent the mean ± SEM from three independent experiments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group.

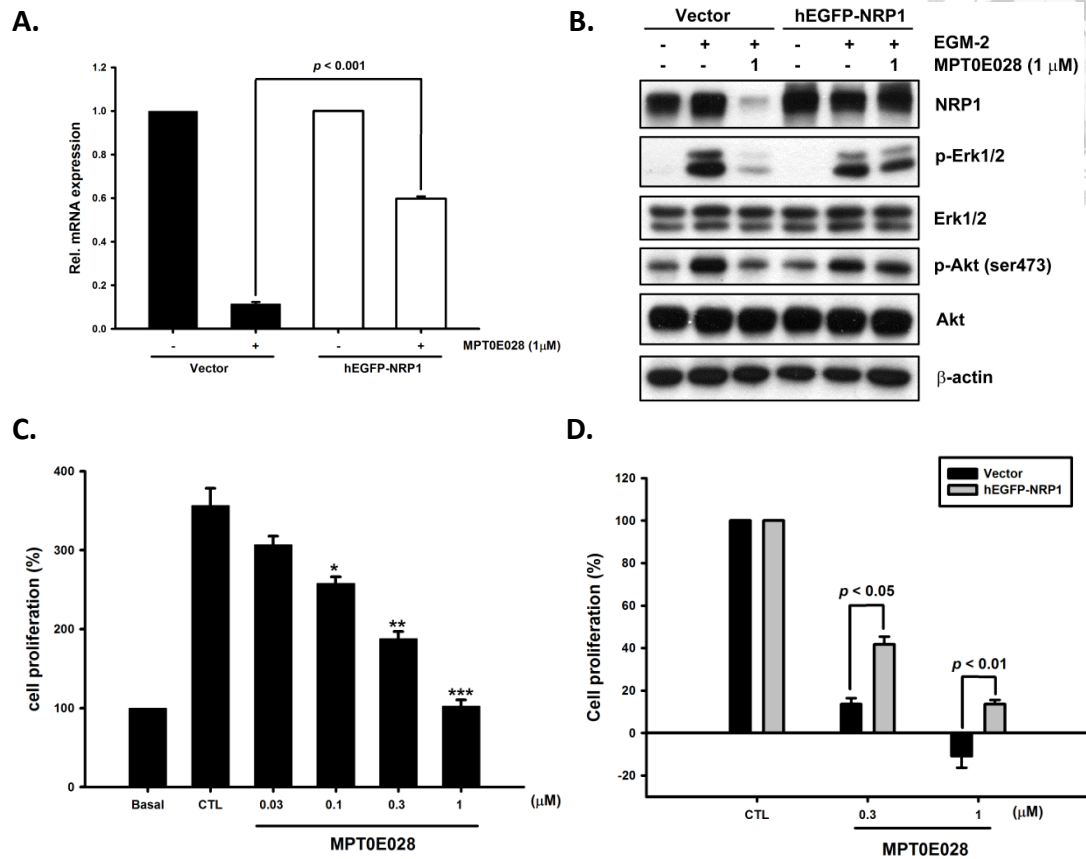


Figure 9. Inhibition of NRP1 expression by MPT0E028 reduced cell proliferation.

(A) NRP1 mRNA expression in endothelial cells was measured by qRT-PCR after transfected with vector or hEGFP-NRP1 for 6 hr and then treated with or without MPT0E028 for 12 hr. (B) Western blot showing that overexpressing NRP1 reversed the inhibition of phosphorylated Erk1/2 and Akt induced by MPT0E028. (C) Crystal violet assay. *Left panel*, MPT0E028 concentration dependently inhibited cell proliferation after 72 hr incubation. *Right panel*, HUVECs transfected with hEGFP-N1-hNRP1m increased cell proliferation after treatment with MPT0E028 for 72 hr. Data represent the mean $\pm$ SEM from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group.

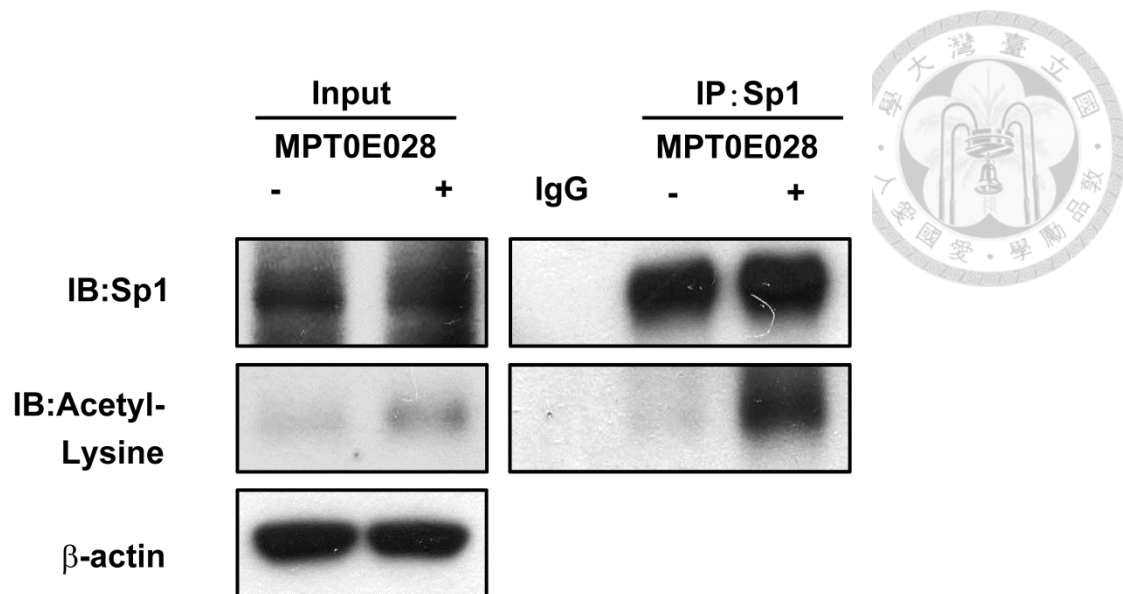
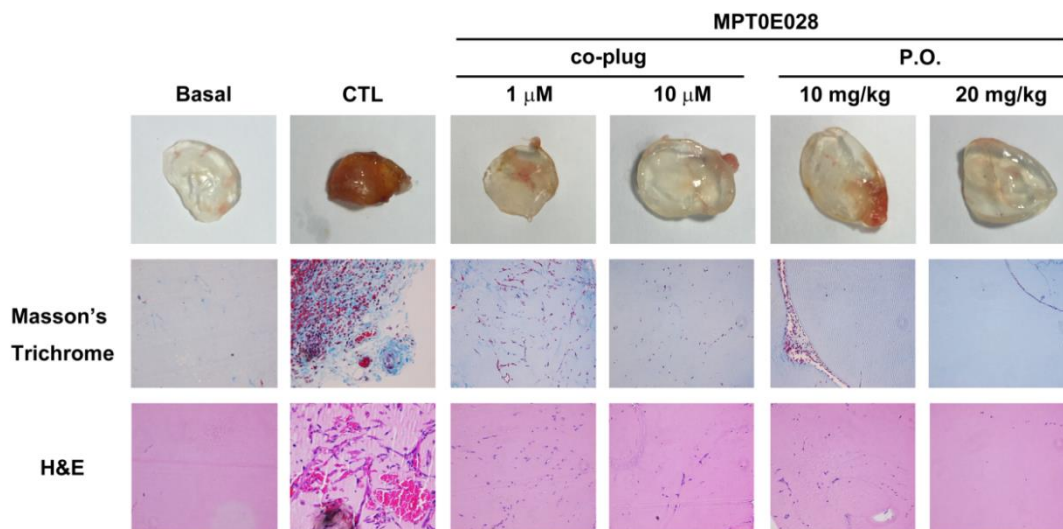


Figure 10. MPT0E028 induced the acetylation of Sp1.

HUVECs were treated without or with 1 μ M MPT0E028 for 24 hr. Cells were harvested and whole-cells extracts were immunoprecipitated (IP) with antibodies against Sp1. *Left panel*, whole-cell extracts were probed using antibodies against Sp1 and pan-acetyl-lysine. *Right panel*, immunoprecipitated proteins were also probed by using antibodies against Sp1 and pan-acetyl-lysine. IgG serves as a negative control.

A.



B.

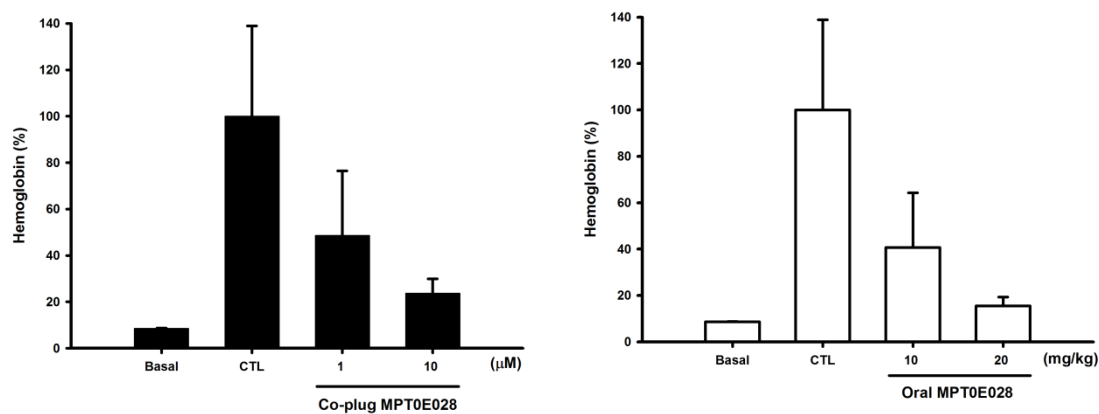


Figure 11. MPT0E028 reduced capillary formation in Matrigel plug assay.

(A) Nude mice were injected subcutaneously with matrigel mixed without (control, CTL) or with MPT0E028 (1 μ M and 10 μ M) or oral (p.o.) administration with MPT0E028 (10 and 20 mg/kg/d). Matrigel plugs were excised from the mice after a week and photographed. Sections of Trichrome and H&E stained matrigel plugs were examined by light microscopy. (B) Quantification of the hemoglobin contents of matrigel plugs by spectrophotometer were measured at 540 nm. 100% = OD. Data represent the mean $\pm$ SEM.

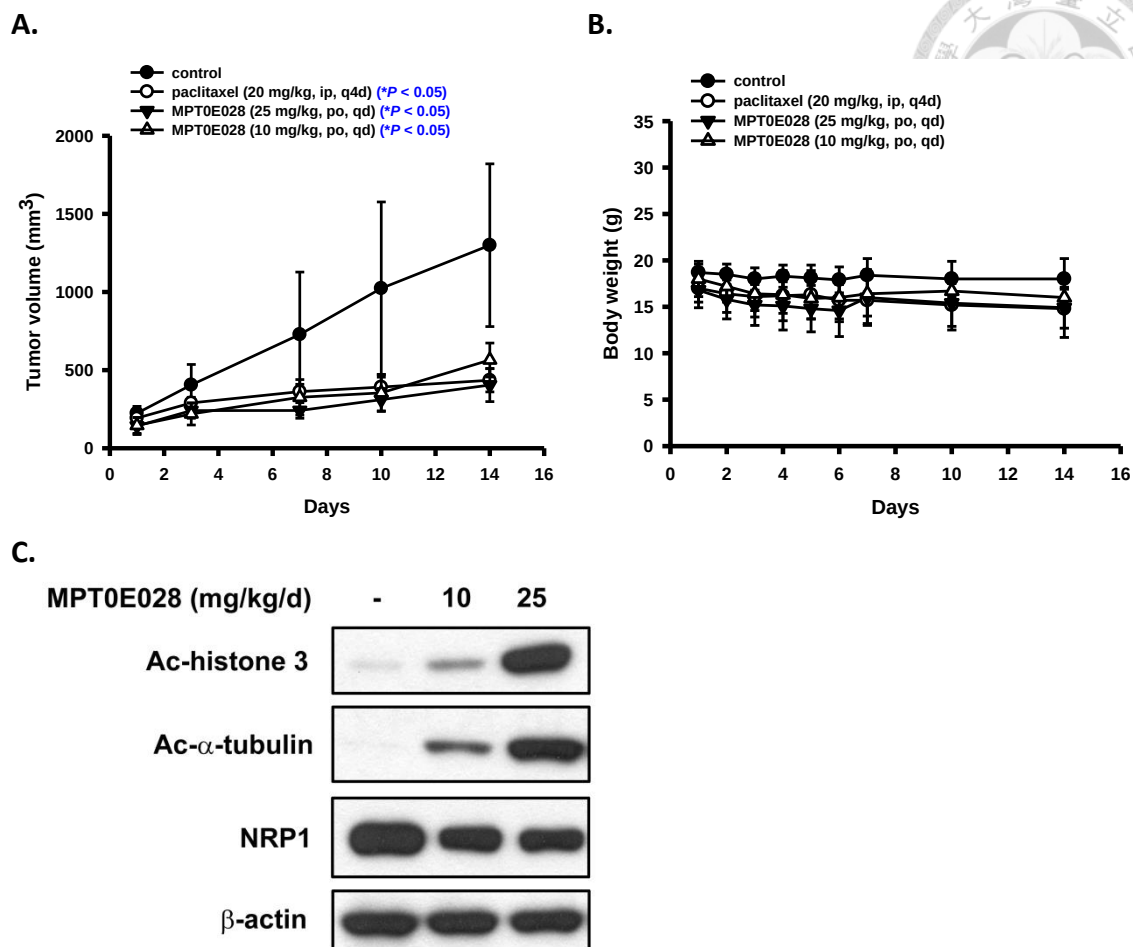


Figure 12. Anti-cancer activity of MPT0E028 in human triple negative breast cancer MDA-MB-231 xenograft model.

(A) Effect of MPT0E028 on the growth of MDA-MB-231 breast tumor xenograft in BALB/c nude mice. Tumor growth is presented as the mean tumor volume (mm³) $\pm$ S.E. Tumor volume was determined by caliper measurements and was calculated as the product of $1/2 \times \text{length} \times \text{width}^2$. **(B)** Body weight (g) of the mice. Each value represents the mean of at least five animals. **P* < 0.05. **(C)** Western blot analysis of ac-histone 3, ac- α -tubulin and NRP1 expression in tumor tissue.

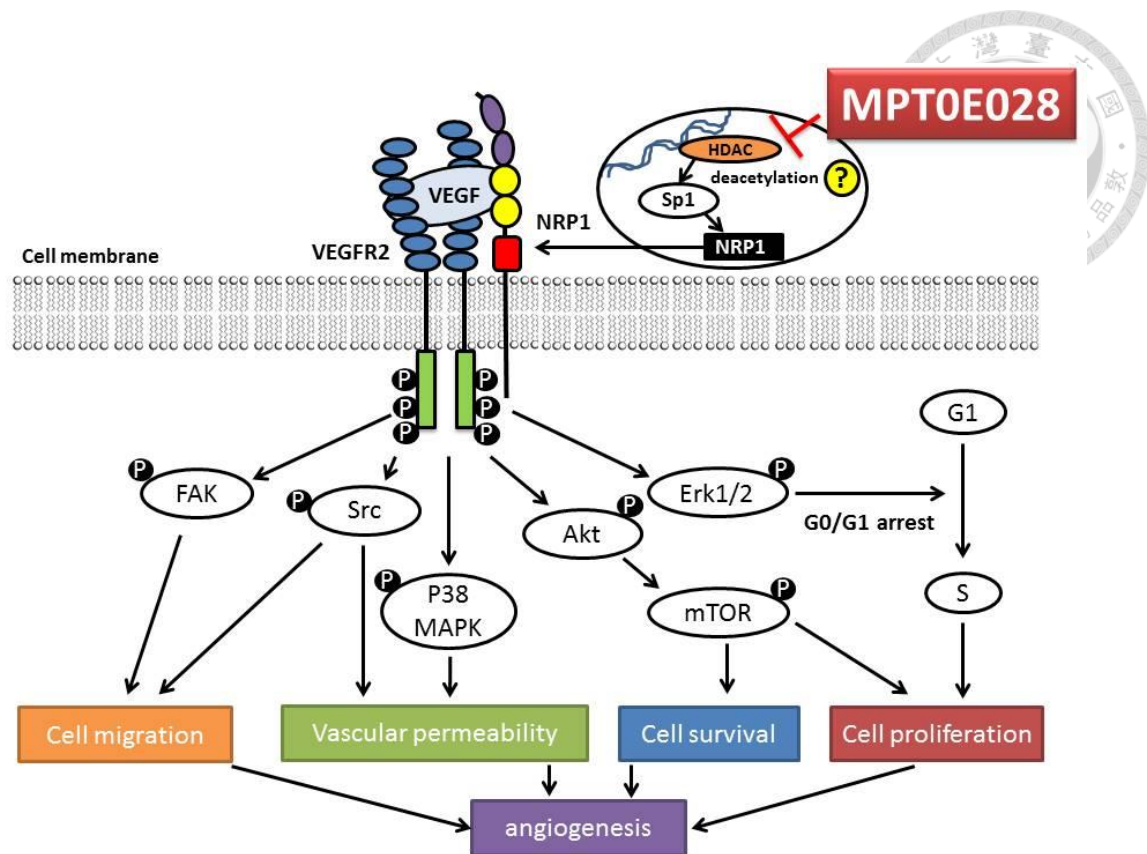
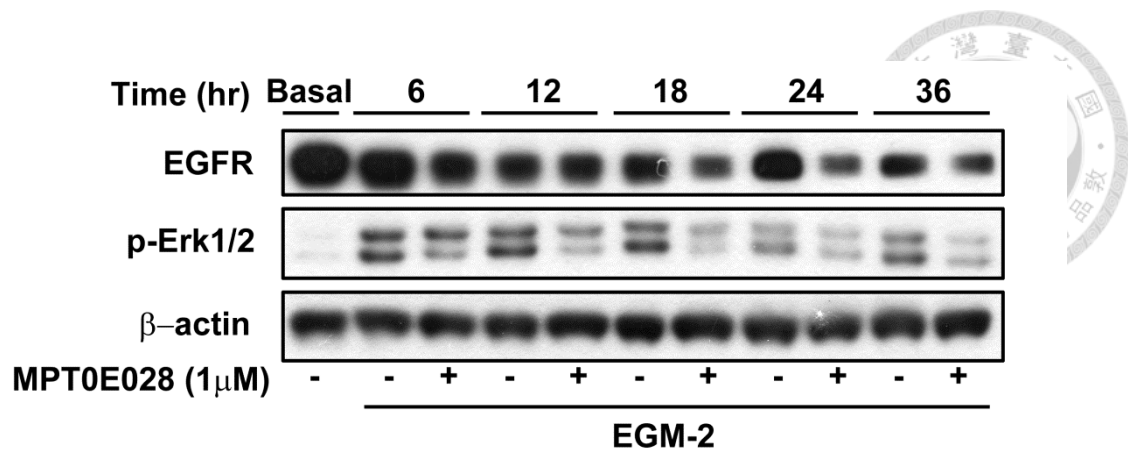


Figure 13. Schematic overview of MPT0E028 affected signaling pathways.



Supplementary Figure. Inhibition of EGFR expression by MPT0E028.

參考文獻



Alenghat T, Artis D (2014). Epigenomic regulation of host-microbiota interactions. *Trends in immunology* **35**(11): 518-525.

Algire GH, Chalkley HW, Earle WE, Legallais FY, Park HD, Shelton E, *et al.* (1950). Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. III. Vascular reactions' of mice to fibroblasts treated in vitro with methylcholanthrene. *Journal of the National Cancer Institute* **11**(3): 555-580.

Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews. Cancer* **5**(12): 921-929.

Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, Sunwoo JB, Yeh NT, Jackson S, *et al.* (2002). Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **99**(4): 538-548.

Beltran H, Kaur G, de Espana CG, Tagawa ST (2014). Exploring the role of anti-angiogenic therapies in prostate cancer: results from the phase 3 trial of sunitinib. *Asian journal of andrology* **16**(4): 568-569.

Bird A (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**(7143): 396-398.

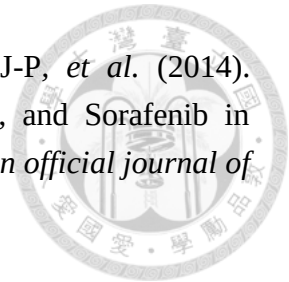
Burris HA, 3rd (2013). Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **71**(4): 829-842.

Carmeliet P (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**(6): 653-660.

Carracedo A, Pandolfi PP (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**(41): 5527-5541.

Chambard J-C, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**(8): 1299-1310.

Chen C-H, Chen M-C, Wang J-C, Tsai A-C, Chen C-S, Liou J-P, *et al.* (2014). Synergistic Interaction between the HDAC Inhibitor, MPT0E028, and Sorafenib in Liver Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**(5): 1274-1287.



Chen MC, Chen CH, Wang JC, Tsai AC, Liou JP, Pan SL, *et al.* (2013). The HDAC inhibitor, MPT0E028, enhances erlotinib-induced cell death in EGFR-TKI-resistant NSCLC cells. *Cell Death & Disease* **4**(9): e810.

Choi HS, Lee JH, Park JG, Lee YI (2002). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex. *Biochemical and biophysical research communications* **296**(4): 1005-1012.

Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**(5): 355-366.

De Souza A, Daly KP (2015). Safety and Efficacy of Combined Yttrium 90 Resin Radioembolization with Aflibercept and FOLFIRI in a Patient with Metastatic Colorectal Cancer. **2015**: 461823.

Doetzlhofer A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, *et al.* (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and cellular biology* **19**(8): 5504-5511.

Dormond O, Foletti A, Paroz C, Ruegg C (2001). NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* **7**(9): 1041-1047.

Ellis L, Hammers H, Pili R (2009). Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett* **280**(2): 145-153.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics* **7**(8): 606-619.

Fantin A, Schwarz Q, Davidson K, Normando EM, Denti L, Ruhrberg C (2011). The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the

spatial separation of retinal arteries and veins. *Development (Cambridge, England)* **138**(19): 4185-4191.

Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, *et al.* (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**(5): 829-840.

Fantin A, Vieira JM, Plein A, Denti L, Fruttiger M, Pollard JW, *et al.* (2013). NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood* **121**(12): 2352-2362.

Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* **285**(21): 1182-1186.

Folkman J (1996a). Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* **275**(3): 150-154.

Folkman J (1996b). New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **32a**(14): 2534-2539.

Folkman J (2006). Angiogenesis. *Annual review of medicine* **57**: 1-18.

Gelfand MV, Hagan N, Tata A, Oh WJ, Lacoste B, Kang KT, *et al.* (2014). Neuropilin-1 functions as a VEGFR2 co-receptor to guide developmental angiogenesis independent of ligand binding. *eLife* **3**: e03720.

Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**: 15-23.

Goffin JR, Anderson IC, Supko JG, Eder JP, Jr., Shapiro GI, Lynch TJ, *et al.* (2005). Phase I trial of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**(9): 3417-3424.

Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas LC, Phng LK, Cain RJ, Salpekar A, *et al.* (2008). Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* **453**(7195): 662-666.

Greenblatt M, Shubi P (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *Journal of the National Cancer Institute* **41**(1): 111-124.

Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, *et al.* (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* **8**(2): 128-135.

Hajji N, Joseph B (2010). Epigenetic regulation of cell life and death decisions and deregulation in cancer. *Essays in biochemistry* **48**(1): 121-146.

Han Y, Jeong HM, Jin YH, Kim YJ, Jeong HG, Yeo CY, *et al.* (2009). Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochemical and biophysical research communications* **383**(1): 88-92.

Hansen JC (2012). Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *The EMBO journal* **31**(7): 1621-1623.

Hayne C, Tzivion G, Luo Z (2000). Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *The Journal of biological chemistry* **275**(41): 31876-31882.

Herrup K, Yang Y (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* **8**(5): 368-378.

Herzog B, Pellet-Many C, Britton G, Hartzoulakis B, Zachary IC (2011). VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell* **22**(15): 2766-2776.

Hillen F, Griffioen A (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* **26**(3-4): 489-502.

Hoffmann K, Ganten T, Gotthardt D, Radeleff B, Settmacher U, Kollmar O, *et al.* (2015). Impact of neo-adjuvant Sorafenib treatment on liver transplantation in HCC patients - a prospective, randomized, double-blind, phase III trial. *BMC cancer* **15**(1): 392.

Huang H-L, Lee H-Y, Tsai A-C, Peng C-Y, Lai M-J, Wang J-C, *et al.* (2012). Anticancer Activity of MPT0E028, a Novel Potent Histone Deacetylase Inhibitor, in Human Colorectal Cancer HCT116 Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *PLoS ONE* **7**(8): e43645.

Huang HL, Peng CY, Lai MJ, Chen CH, Lee HY, Wang JC, *et al.* (2014). Novel oral histone deacetylase inhibitor, MPT0E028, displays potent growth-inhibitory activity against human B-cell lymphoma in vitro and in vivo. *Oncotarget*.

Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM (2002). Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer research* **62**(15): 4300-4306.

Ide AG B, N.H. & Warren, S.L. (1939). Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Roentgenol* **42**: 891-899.

Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, *et al.* (2003). p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**(2): 262-264.

Jeon YW, Ahn YE, Chung WS, Choi HJ, Suh YJ (2015). Synergistic effect between celecoxib and luteolin is dependent on estrogen receptor in human breast cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **12**(7): 363-369.

Karar J, Maity A (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* **4**: 51.

Khan O, La Thangue NB (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and cell biology* **90**(1): 85-94.

Kim SH, Jeong JW, Park JA, Lee JW, Seo JH, Jung BK, *et al.* (2007). Regulation of the HIF-1alpha stability by histone deacetylases. *Oncology reports* **17**(3): 647-651.

Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development (Cambridge, England)* **121**(12): 4309-4318.

Kordes S, Klumpen HJ, Weterman MJ, Schellens JH, Richel DJ, Wilmink JW (2015). Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*.

Kumar P, Tripathi S, Pandey KN (2014). Histone deacetylase inhibitors modulate the transcriptional regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-a gene: interactive roles of modified histones, histone acetyltransferase, p300, AND Sp1. *The Journal of biological chemistry* **289**(10): 6991-7002.

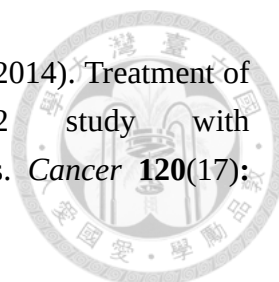
Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research* **100**(6): 782-794.

Lara PN, Jr., Stadler WM, Longmate J, Quinn DI, Wexler J, Van Loan M, *et al.* (2006). A randomized phase II trial of the matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in hormone-refractory prostate cancer patients with bone metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**(5): 1556-1563.

Leow CC, Coffman K, Inigo I, Breen S, Czapiga M, Soukharev S, *et al.* (2012). MEDI3617, a human anti-angiopoietin 2 monoclonal antibody, inhibits angiogenesis and tumor growth in human tumor xenograft models. *International journal of oncology* **40**(5): 1321-1330.

Ley AM, Chau CH, Figg WD (2015). Structural studies reveal thalidomide's mechanism of action and clinical effects: crystal clear or clearly complexed? *Cancer biology & therapy* **16**(1): 19-20.

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD (2007). MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nature reviews. Immunology* **7**(3): 202-212.



Locati LD, Licitra L, Agate L, Ou SH, Boucher A, Jarzab B, *et al.* (2014). Treatment of advanced thyroid cancer with axitinib: Phase 2 study with pharmacokinetic/pharmacodynamic and quality-of-life assessments. *Cancer* **120**(17): 2694-2703.

Lundberg AS, Weinberg RA (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Molecular and cellular biology* **18**(2): 753-761.

Ma J, Guo X, Zhang S, Liu H, Lu J, Dong Z, *et al.* (2015). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines. *Molecular medicine reports* **11**(6): 4525-4531.

Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, Kahn CR, *et al.* (2002). Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science (New York, N.Y.)* **295**(5552): 140-143.

Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D, O'Rourke DM (2000). Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer research* **60**(20): 5879-5886.

Manning BD, Cantley LC (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends in biochemical sciences* **28**(11): 573-576.

Marchetti C, Gasparri ML, Ruscito I, Palaia I, Perniola G, Carrone A, *et al.* (2015). Advances in anti-angiogenic agents for ovarian cancer treatment: The role of trebananib (AMG 386). *Critical reviews in oncology/hematology*.

Marks PA, Breslow R (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotech* **25**(1): 84-90.

Mavria G, Vercoulen Y, Yeo M, Paterson H, Karasarides M, Marais R, *et al.* (2006). ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell* **9**(1): 33-44.

Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **8**(8):

1168-1175.

Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, *et al.* (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circulation research* **86**(8): 892-896.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**(1-2): 55-63.

Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, *et al.* (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(19): 10454-10459.

Muehlbauer PM (2003). Anti-angiogenesis in cancer therapy. *Seminars in oncology nursing* **19**(3): 180-192.

Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**(8): 558-572.

Narasimha AM, Kaulich M, Shapiro GS, Choi YJ, Sicinski P, Dowdy SF (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife* **3**.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**(5): 1135-1149.

Nelson NJ (1998). Inhibitors of angiogenesis enter phase III testing. *Journal of the National Cancer Institute* **90**(13): 960-963.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**(5): 359-371.

Polivka J, Jr., Janku F (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & therapeutics* **142**(2): 164-175.

Pore N, Jiang Z, Gupta A, Cerniglia G, Kao GD, Maity A (2006). EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. *Cancer research* **66**(6): 3197-3204.

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**(6): 873-887.

Primo L, di Blasio L, Roca C, Droetto S, Piva R, Schaffhausen B, *et al.* (2007). Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *The Journal of cell biology* **176**(7): 1035-1047.

Qian DZ, Kachhap SK, Collis SJ, Verheul HM, Carducci MA, Atadja P, *et al.* (2006). Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer research* **66**(17): 8814-8821.

Qian DZ, Wang X, Kachhap SK, Kato Y, Wei Y, Zhang L, *et al.* (2004). The histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 inhibits angiogenesis and has a greater antitumor effect in combination with the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer research* **64**(18): 6626-6634.

Raimondi C, Fantin A, Lampropoulou A, Denti L, Chikh A, Ruhrberg C (2014). Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells. *The Journal of experimental medicine* **211**(6): 1167-1183.

Ribatti D (2007). The contribution of Harold F. Dvorak to the study of tumor angiogenesis and stroma generation mechanisms. *Endothelium : journal of endothelial cell research* **14**(3): 131-135.

Richon VM (2006). Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *British Journal of Cancer* **95**(Suppl 1): S2-S6.

Rossignol M, Pouyssegur J, Klagsbrun M (2003). Characterization of the neuropilin-1 promoter; gene expression is mediated by the transcription factor Sp1. *Journal of cellular biochemistry* **88**(4): 744-757.

Salikhova A, Wang L, Lanahan AA, Liu M, Simons M, Leenders WP, *et al.* (2008). Vascular endothelial growth factor and semaphorin induce neuropilin-1 endocytosis via separate pathways. *Circulation research* **103**(6): e71-79.

Sandhu C, Donovan J, Bhattacharya N, Stampfer M, Worland P, Slingerland J (2000). Reduction of Cdc25A contributes to cyclin E1-Cdk2 inhibition at senescence in human mammary epithelial cells. *Oncogene* **19**(47): 5314-5323.

Schwarz Q, Ruhrberg C (2010). Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell adhesion & migration* **4**(1): 61-66.

Sendur MA, Zengin N, Aksoy S, Altundag K (2014). Everolimus: a new hope for patients with breast cancer. *Current medical research and opinion* **30**(1): 75-87.

Shankar S, Srivastava RK (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology* **615**: 261-298.

Shepherd FA (2001). Angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **34 Suppl 3**: S81-89.

Song H, Fares M, Maguire KR, Siden A, Potacova Z (2014). Cytotoxic effects of tetracycline analogues (doxycycline, minocycline and COL-3) in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *PLoS One* **9**(12): e114457.

Srinivasan R, Zabuawala T, Huang H, Zhang J, Gulati P, Fernandez S, *et al.* (2009). Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS One* **4**(12): e8283.

Toker A, Cantley LC (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**(6634): 673-676.

Verbridge SS, Chakrabarti A, DelNero P, Kwee B, Varner JD, Stroock AD, *et al.* (2013). Physicochemical regulation of endothelial sprouting in a 3D microfluidic angiogenesis model. *Journal of biomedical materials research. Part A* **101**(10): 2948-2956.

Waby JS, Chirakkal H, Yu C, Griffiths GJ, Benson RS, Bingle CD, *et al.* (2010). Sp1 acetylation is associated with loss of DNA binding at promoters associated with cell cycle arrest and cell death in a colon cell line. *Molecular cancer* **9**: 275.

Waddington CH (2012). The epigenotype. 1942. *International journal of epidemiology* **41**(1): 10-13.

Wang CY, Tsai AC, Peng CY, Chang YL, Lee KH, Teng CM, *et al.* (2012). Dehydrocostuslactone suppresses angiogenesis in vitro and in vivo through inhibition of Akt/GSK-3 β and mTOR signaling pathways. *PLoS One* **7**(2): e31195.

Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X (2006). C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**(9): 1513-1515.

Wang TS, Lei W, Cui W, Wen P, Guo HF, Ding SG, *et al.* (2014). A meta-analysis of bevacizumab combined with chemotherapy in the treatment of ovarian cancer. *Indian journal of cancer* **51 Suppl 3**: e95-98.

Warfel NA, El-Deiry WS (2013). p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Current opinion in oncology* **25**(1): 52-58.

Wedel SA, Sparatore A, Soldato PD, Al-Batran SE, Atmaca A, Juengel E, *et al.* (2008). New histone deacetylase inhibitors as potential therapeutic tools for advanced prostate carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**(6a): 2457-2466.

Weis SM, Cheresch DA (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* **17**(11): 1359-1370.

West AC, Johnstone RW (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of clinical investigation* **124**(1): 30-39.

Wong MK, Jonasch E, Pal SK, Signorovitch JE, Lin PL, Wang X, *et al.* (2015). Prognostic factors for survival following initiation of second-line treatment with everolimus for metastatic renal cell carcinoma: evidence from a nationwide sample of clinical practice in the United States. *Expert opinion on pharmacotherapy* **16**(6): 805-819.

Wu P, Hu YZ (2010). PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress. *Current medicinal chemistry* **17**(35): 4326-4341.

Yu DC, Waby JS, Chirakkal H, Staton CA, Corfe BM (2010). Butyrate suppresses

expression of neuropilin I in colorectal cell lines through inhibition of Sp1 transactivation. *Molecular cancer* **9**: 276.

Zentner GE, Henikoff S (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* **20**(3): 259-266.

