

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：謝明麗 博士

Mingli Hsieh, Ph.D.

研究碳酸酐酶八號對於大腸癌的影響

A study of the effects of CA8 in colon cancer

研究生：吳政諺

Cheng-Yen Wu

民國 107 年 2 月

東海大學生命科學系碩士論文

研究碳酸酐酶八號對於大腸癌的影響

A study of the effects of CA8 in colon cancer

The seal of Tungshai University is a circular emblem with a scalloped outer edge. It features a central design with three interlocking rings and a cross-like symbol. The text 'TUNGSHAI UNIVERSITY' is written in a circular path around the center, and '1955' is at the bottom. The Chinese characters '東海大學' are also visible at the top.

研究生：吳政諺

Cheng-Yen Wu

指導教授：謝明麗 博士

Mingli Hsieh, Ph.D.

民國一〇七年二月

致謝

在這實驗室時間過的時間過得飛快，兩年半一下就過去了，在實驗室期間過得很充實，我最要感謝是我的指導老師謝明麗老師，她在我碩班期間，除了對我學業和實驗上的指導外，她也像是我在台中的家人一樣，總是在我困難時，快要放棄時給我最大的鼓勵。哲民學長在台中時給了我許多幫助，另外先前離開的助理詩涵，先前在我受傷時，幫忙我許多生活上的事。接著學弟冠宇感謝他在我受傷期間，幫忙我處理學校的事物。最後實驗室這個大家庭的成員郁馨、立心、翊珊、天恆、慧蘋，除了在實驗上給我的幫忙，我們也一起努力在同一個題目上，就像是戰友一樣。而最近剛加入的俞安和冠驊，感謝他們在我的論文上給了我不少的建議。千言萬語的感謝，就讓要離開的我有滿滿的不捨，先前曾有人說天下沒有不散的宴席，我接下來將要帶著我的所學進入職場，在老師的教誨與回憶將會變成我最大的能量讓我迎向未來的挑戰，謝謝在台中的家人。

目錄

英文摘要	5-6
中文摘要	7-8
介紹	9-16
材料與方法	17-23
結論	24-32
討論	33-41
參考文獻	42-46
附圖	47-70
圖表	71-72
個人資料	73

Abstract :

Cancer is a leading cause of death worldwide. Of all types of cancer, colon cancer causes the fourth-most deaths. It is known that aerobic glycolysis is the primary energy generating process in cancer development, during which little ATP is produced per unit of glucose absorbed. Carbonic anhydrase VIII (CA8) is a novel protein which may play an important role in the energy metabolism of cancer cells. Our previous results suggest that there is a significant effect of CA8 on the FAK/Akt pathway. In human osteosarcoma (HOS) cells, we showed that the knockdown of endogenous CA8 experienced higher cell survival rates in glucose-free environments, compared with parental HOS cells. Our previous data also indicated a relationship between CA8 expression and energy metabolism. In this study, I investigated whether CA8 is involved in regulating glucose metabolism. I suppressed CA8 expression through shRNA knockdown in two human colon cancer cell lines, SW480 and SW620. These cell lines were used to study, under different concentrations of glucose, whether CA8 affects

AMPK/beclin-1/LC-3B and AMPK/PARP pathways. According to my results, I found that first, downregulation of CA8 can decrease cell growth and cell migration in SW620, but that can not be affected in SW480. Second, CA8 knockdown in SW480 increased p53 and Beclin-1/LC-3B expression, indicating that expression of CA8 may influence autophagy on primary tumor cells. However, CA8 knockdown in SW620 increased beclin-1 and p53 expression, but has no effect on the level of LC-3B expression. These results suggest that metastatic colon cancer cells respond differently to CA8 knockdown, compared with primary colon cancer cells, which may be relevant to the cell survival rate under cancer drug treatment. In summary, CA8 may affect glucose metabolism- and cell survival-related molecules in colon cancer. Therefore, CA8 can potentially be an effective target in cancer therapy.

中文摘要：

全世界死亡原因之一是癌症所導致，其中以結腸癌致死的例子，位居癌症死亡的第三名。目前可以得知癌症會在能量產生會有異常的狀況，主要是透過有氧糖解作用，吸收大量的葡萄糖，但只產生少量的 ATP，碳酸酐酶第八型(CA8)是一個新穎的蛋白，可能在能量代謝中扮演重要的角色，我們先前的研究結果顯示 CA8 和 FAK/ Akt 的路徑關係，在人類 HOS 骨肉瘤細胞，當降低內生性 CA8 表達，在葡萄糖缺乏情況下比起親代的 HOS 細胞，使細胞存活提高，顯示 CA8 表達和能量代謝的關係。在我的研究中，我想調查 CA8 是否參與在調節葡萄糖代謝機制，我利用了人類 SW480 和 SW620 結腸癌細胞，以 shRNA 降低 CA8 表達，來進行研究 AMPK/Beclin-1/ LC-3B 和 AMPK/PARP 路徑。根據目前我的數據顯示，第一，CA8 的表達在 SW620 細胞下降會降低細胞生長及爬行，但卻不會影響 SW480 細胞。第二，在 SW480 中卻只會增加 p53 及 Beclin-1/LC-3B 的表達，這可以顯示 CA8 的表達對原位癌細胞會影響自噬作用。然而，在 SW620 中降低 CA8 會增加 p53 及 Beclin-1 的表達，但卻不會對 LC-3B 的表達有影響。這一些結果支持轉移型大腸癌細胞比起原

位大腸癌細胞，在降低 CA8 的反應有所不同，這可能跟在癌症藥物治療下的癌症相關。總結，CA8 在大腸癌細胞中可能影響在葡萄糖代謝和細胞存活和相關分子。因此，CA8 可能在未來可做為一個藥物處理的目標分子。

關鍵字：大腸癌、碳酸酐酶第八型、細胞自噬作用、細胞凋亡

一. 介紹

1.1 大腸癌

大腸癌於近五年世界衛生組織統計，是好發率佔全球前三的癌症，除了遺傳性的大腸癌以外，主要已開發國家中的罹癌人口比例遠高於未開發或開發中國家，罹癌主因是現代人飲食不正常所導致，且現代人常沒保持良好的運動習慣，又煙又酒增加罹患大腸癌機率。在醫學研究中，大腸癌發展可以分為五期，第一期 (Tis) 原位腫瘤會貼附在腸道粘膜上，第二期 (T1) 會持續往黏膜下層侵略，第三期 (T2) 期侵略至肌肉層中，第四期時會開始穿過腸壁，且暴露腸壁外的腫瘤會開始產生粘膜以及脂肪層，此時的腫瘤是具有轉移的可能性，可以藉由淋巴系統做轉移，其中在淋巴系統的轉移可以分成四期 (N0) 代表無淋巴轉移的現象產生，(N1) 有一至三個局部淋巴結受到侵入，(N2) 有四個以上局部淋巴結受到侵入，(N3) 已侵犯到遠端的淋巴結。在第五期 (T4) 的時候，腫瘤的組織穿越腸壁，且透過血管及淋巴管來擴散至全身，其中又可以分為沒有器官轉移，和 (M1) 有遠端器官的轉移 (Swider et al., 2014)。大腸癌在越晚期發現，癌症致死率越高。

1.2 碳酸酐酶八號 Carbonic anhydrase VIII (CA8)

碳酸酐酶第八型，是一種新穎的蛋白，目前對於此蛋白的功能只能知道會與 IP3 (Inositol trisphosphate) 來競爭 IP3R1 (Inositol trisphosphate receptor) 的位置，進而控制鈣離子的釋放(Foskett, 2010)。

此蛋白屬於 α -carbonic anhydrase 家族，此家族蛋白僅存在於哺乳類動物中，而其主要功能會催化二氧化碳的水合反應，但因為在 CA8 中缺乏一個鋅離子的結合位，進而導致 CA8 喪失了催化二氧化碳水合反應的功能。先前在小鼠的研究中，發現 CA8 會去和鈣離子的受器 IP3R1 結合，藉由這樣的現象來抑制鈣離子的釋放，同樣的報導中，也發現在老鼠的小腦組織會有 CA8 大量表達(Hirota et al., 2003)。所以先前的研究大部分針對神經退化性疾病，進行 CA8 的功能研究，先前的研究中發現有一種走路癱跛老鼠的稱作 *waddle mice*，在 *waddle mice* 的小腦內發現 CA8 的基因上有 19 鹼基對缺失，以至於致喪失了 CA8 的功能，同時也失去平衡的功能(Jiao et al., 2005)。而人類的研究中，在伊拉克有一個四足症的家族，研究中發現在病人小腦有明顯的萎縮，家族中的成員同時也有智能不足的現象產生，而最終發現他們的小腦內的 CA8 蛋白序列具有 S100P 的突變。另外一篇

報導中，也發現另一個家族內成員都患有小腦萎縮症，研究中也找出他們在 CA8 蛋白序列產生了點突變 G162R(Kaya et al., 2011; Turkmen et al., 2009)。這些報告顯示，CA8 在不管在老鼠還是人類的小腦中都有一定的功能存在。另外一方面，發現在老鼠體內除了小腦有大量表達 CA8 之外，相較於身體其他部位，CA8 在身體各處皆有的表達(Hirota et al., 2003)。因為在部分的惡性癌症中發現有 CA9 和 CA12，所以就有學者利用病人的檢體來找出影響的相關 CA 家族的分子，研究中發現 CA8 在部分人類病人的大腸癌組織中表達(Miyaji et al., 2003)。在癌症的研究中發現在人類 LOVO 大腸癌細胞，過量表達 CA8 會導致癌細胞的侵略性增強(Nishikata et al., 2007)。除此之外，在肺癌研究中也發現到肺癌的組織中有大量表達 CA8 的情形(Ishihara et al., 2006)。

1.3 癌症與代謝異常

先前本實驗室也在人類骨肉瘤細胞中報導，如果降低 CA8 表達在缺乏葡萄糖的情況下，仍會持續生長，這也顯示缺乏 CA8 可降低細胞對於葡萄糖的依賴，CA8 可能在醣類代謝中扮演一個重要的角色(Wang et al., 2016)。已知在較為惡性的癌症細胞，有幾項有別於正常

細胞的特徵，包括躲避免疫機制，能量代謝產生異常，基因的不穩定及突變，以及發炎促發的腫瘤生長(Hanahan and Weinberg, 2011)。這四種癌症特徵中，我主要是針對代謝異常的特徵進行研究。罹患大腸癌重要的原因，大部分出自精緻飲食所導致，所以我想探討癌細胞的代謝相關分子調控，是否別於正常細胞的分子調控。正常細胞的代謝主要透過克氏循環 (TCA cycle) 的途徑來獲得大量的 ATP，但是癌化的細胞代謝改變，主要會提高葡萄糖進入糖解路徑的速率，最後生成大量乳糖，但產出較少的 ATP 持續提供癌細胞能量，也稱作為瓦氏效應 (Warburg effect) (Liberti and Locasale, 2016)。癌細胞處在不正常的代謝狀態下，影響下游分子，為了就是使癌細胞有辦法持續存活，跟細胞存活相關的蛋白 (Protein kinase B; Akt) 會持續促使癌細胞的生長，除此之外，Akt 另外的功能也大量活化糖解代謝的上游酵素分子，如 glucose transport 1 (Glut1), hexokinase 2 (HK2) 和 Phosphofructokinase (PFK)，可幫助持續促使葡萄糖大量吸收 (Mulukutla et al., 2015)(圖 S1)。而糖解下游路徑分子 AMP-activated protein kinase (AMPK) 在能量缺乏下，AMP 就會啟動平衡癌細胞中的能量代謝的 AMPK，促使 Glut1 和 glucose transport 4 (Glut4) 提

高癌細胞的葡萄糖的吸收，持續提供癌細胞所需要的能量。因先前研究中也發現，癌細胞在代謝狀態改變時，在能量提供較為匱乏的情況下，可以加速糖解代謝的路徑活性，藉由路徑活化提供癌細胞持續生長。於是在本次研究中延續探討有氧糖解下游路徑分子，是否在大腸癌細胞中具表達變異。

1.4 CA8 和自噬作用之間的關係

細胞的自噬作用在正常細胞中是作為一個保護的機制，當細胞發現不利於生長時，就會啟動此路徑來清除廢物，達到能量來源的供給。在自噬作用啟動的過程中，可以分為三個階段，第一階段開始從細胞內部形成自噬體 (autophagosome)，此時Beclin-1以及Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC-3B) 將會參與在自噬體形成的過程中，而另外Sequestosome-1 (p62) 會標的細胞中較老的胞器，第二階段當自噬體形成後，會接著與溶酶體 (lysosome) 進行結合，最後在形成自噬溶酶體 (autophagolysosome) 將會啟動自噬作用的機制，此時參與在其中所有被標的p62的胞器，將被裂解(Mizushima and Yoshimori, 2007)。另外在目前研究中也發現，鈣離子的釋放會活

化自噬作用相關分子如 extracellular regulated protein kinases (Erk)，導致自噬作用的啟動 (Kondratskyi et al., 2013)。在癌細胞中，當細胞過多時形成為團塊，在團塊內部的細胞就會缺乏葡萄糖的來源。此時，團塊內部的細胞會開始分解，分解後外圍生存的細胞會吸收這一些養分，給予細胞ATP的供給(Mowers et al., 2017)。先前報導也說明自噬作用可能使腫瘤持續產生血管新生的現象，最後腫瘤就會透過血管傳送以及擴散至全身(Mathew et al., 2007)。但在癌細胞跟自噬作用之間還有另外的作用，自噬作用活化也可能會去抑制著細胞生長，從治療的方面也可以看出，因癌細胞生長原本不受控制，可以經由自噬作用的機制啟動，就可以去加速癌細胞產生細胞凋亡(Kulkarni et al., 2016)。

先前研究藉由已知的CA8功能，在本實驗室曾經研究CA8和自噬作用之間的關係(Wang et al., 2014)，主要是利用肌陣攣癇癇發作伴破碎紅纖維病變 (Myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers; MERRF) 的疾病模式，MERRF突變是在粒線體DNA中有著A8344G的點突變，在此文獻中發現，帶著突變點的細胞其CA8表達量呈現下降的趨勢，自噬作用則會活化引發細胞凋亡。反之，若過量表達CA8，則可以降低不正常的自噬作用活化，細胞的存活會有顯著上升的現象，

這說明了在MERRF 的疾病模式中，CA8和自噬作用相關，且扮演了一個具有保護功能的新穎的蛋白(Wang et al., 2014)，因此在本篇論文中，我們也會探討CA8在大腸癌細胞中是否影響細胞自噬作用。

1.5 CA8和細胞凋亡之間的關係

細胞凋亡機制存在於不同的細胞當中，而在癌細胞中是一個保護性的機制，可以藉由活化細胞凋亡路徑，有效促使癌細胞死亡。先前研究指出癌細胞可以經由不同的路徑促使細胞凋亡死亡(Qiu et al., 2015)。有文獻就說明細胞凋亡路徑，可以區分為透過 caspase 的路徑，及透過 caspase-independent 的路徑，這兩條路徑都會活化細胞凋亡(van der Flier et al., 2003)。這兩條路分別會透過 caspase-3 或是 apoptosis inducing factor (AIF) 的分子影響到細胞凋亡的路徑(Joza et al., 2002)。本實驗室先前在人類骨肉瘤癌細胞中研究 CA8 表達對細胞凋亡的影響，發現降低 CA8 會增加 caspase-3 cleaved 的表達(Wang et al., 2016)，另外我們實驗也在 MARRF 疾病的突變細胞中發現 CA8 表達量較低，當過量表達 CA8 於此突變細胞中，會導致 apoptotic 細胞顯著下降(Wang et al., 2014)。所以本篇論文主要也想

探討在大腸癌細胞中的 CA8 是如何影響細胞凋亡的路徑。

二. 材料方法

2.1 細胞培養

本次實驗所使用的細胞株，皆為人類大腸癌細胞，有人類 SW480 結腸癌細胞 (ATCC-CCL-228)，人類 SW620 結腸癌細胞 (ATCC-CCL-227)，人類 COLO320 結腸癌細胞 (ATCC-CCL-220.1)，人類 HT29 結腸癌細胞 (ATCC-HTB-38)，繼代過程皆使用的培養基 RPMI-1640 內部含有 (10% fetal bovine serum, 1x penicillin-streptomycin)。細胞在實驗中皆培養在 37°C 和 5% 的 CO₂ 中，過程中以二到三天繼代一次，每次利用 1ml 的 0.25x trypsin-EDTA 靜置於 37°C 培養箱，反應 2 分鐘，接著利用 1ml 的 RPMI-1640 培養液衝起細胞，收進離心管後，以 1000rpm 5min 把細胞離心下來。離心完後去除上清液，回溶 1ml 的 RPMI-1640，參考 ATCC 中的細胞量，將細胞重新種回新 10cm dish 中，加入新的培養液混合均勻，最後放置培養箱中培養。如果實驗要進行分析時，將會計數出一定的細胞 4×10^5 ，培養在 3cm dish 48 小時後處理並且進行實驗，或是依實驗所需分出不同的細胞數至需要的孔盤內部。

2.2 細胞蛋白萃取及定量

將培養 3cm dish 細胞從培養箱取出，並且以 1xPBS 清洗三次把殘餘的培養液清洗乾淨，再將殘餘的 1xPBS 吸乾，最後每個 3cm dish 加入 50 μ l 現配的細胞萃取液包含 (15% glycerol, 1mM DTT, 0.5% triton-X100, 1xprotease, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1x PBS) 加入細胞中後 10min 後始用刮刀刮下，但如果要觀察膜蛋白可以利用 RIPA buffer (50Mm HEPE-KOH(PH7.5), 150Mm LiCl, 1Mm EDTA, 1% NP40, 0.7% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 15% glycerol) 加入後均勻覆蓋在細胞上，置於冰上 1hr，使用刮勺刮下細胞，將樣品蛋白液收進微量離心管中。利用超音波震盪器，全程維持在攝氏 4 度，把細胞震碎，最後，放入冷凍離心機中，以低溫離心 13000rpm 30 min，再取出蛋白上清液。

細胞蛋白濃度測定主要是利用 Bradford 的方法進行測定，首先會製作不同濃度的 BSA 分別有 0, 5, 10, 15, 20 μ g/ml 的外標準品，再分別在每 1ml 的二次水中加入 2 μ l 的樣品，最後加入 Bio-rad Protein assay 的試劑，以分光光度計的可見光 595 nm 的波長測定不

同樣品的蛋白濃度，而最高濃度則不可以超過標準曲線的範圍內，而稀釋樣品的斜率達到 0.99，此次蛋白定量才可以相信。

2.3 西方墨點法

將蛋白濃度測量後，取 30 μ g 的蛋白來分析。以 12%SDS-page 和 10%SDS-page 來分離不同大小的蛋白，樣品再加入膠體中前，要和 sample buffer 均勻混合，在置於熱板加熱 5min，加速蛋白質變性，加熱過後再置於冰上 5 min 使蛋白不會回復成折疊狀，再將樣品加入到膠體上每一個 well 中，在上膠體利用 70V 的電壓，使樣品可完整交集，當樣品跑至下膠體後，轉至 100V 使不同大小蛋白可以分離在膠體內。

當樣品蛋白依不同大小分佈於膠體內，將在膠體上的蛋白轉漬到 PVDF 膜上，轉漬過程下先用 99.5% 甲醇先活化 PVDF 膜。再將膠體在膜上，順序是以負極轉至正極，轉印轉印過程不可以有泡沫出現在膠體與膜之間。轉漬過程中，利用電壓 100V 轉漬，電流不可以超過 300mA，轉漬 85 到 90 分鐘，當轉漬完畢後，以 5% 的牛奶溶解於 1xTTBS blocking，阻斷非專一性蛋白與抗體的結合，在室溫下

震盪 2 小時。震盪結束後利用 1xTTBS 清洗乾淨，再以不同的一級抗體抓取特異性蛋白，震盪 16 小時，最後利用帶有冷光激發物質的二級抗體辨識一級抗體，於室溫下震盪 2 小時結合，並且於冷光呈色。

2.4 建立穩定細胞株

1.SW480-CA8myc 和 SW480-EGFP:

利用 SW480 細胞株培養在 3cm dish，每一盤中 4×10^5 細胞，等一個晚上細胞貼附後，加入 0.8 μ l 10%polybame 和 medium 均勻混合加入細胞中，並加入 AS3W.puro-CA8-myc 的慢性病毒進行感染細胞。病毒在作用 24 小時後，換成新鮮的培養基培養 24 小時。最後，加入含有 1 μ g/ml 的 puromycin 培養基篩選細胞，直到控制組的細胞完全死亡。

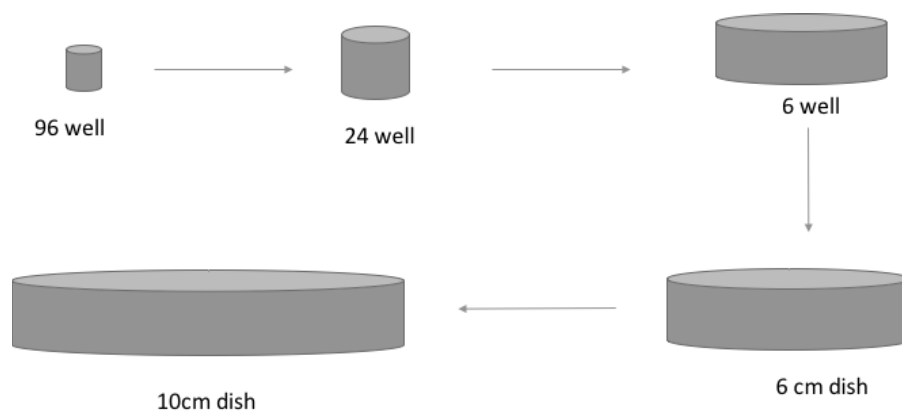
2.SW620-shLuc 和 SW620-shCA8:

利用 SW620 細胞株培養在 3cm dish，每一盤中 4×10^5 細胞，等一個晚上細胞貼附後，加入 0.8 μ l 10%polybame 和 medium 均勻混合加入細胞中，並且加入 shRNA 慢性病毒進行感染細胞。病毒在作用 24

小時後，換成新鮮的培養基培養 24 小時。最後，加入含有 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 puromycin 培養基篩選細胞，直到控制組的細胞完全死亡。

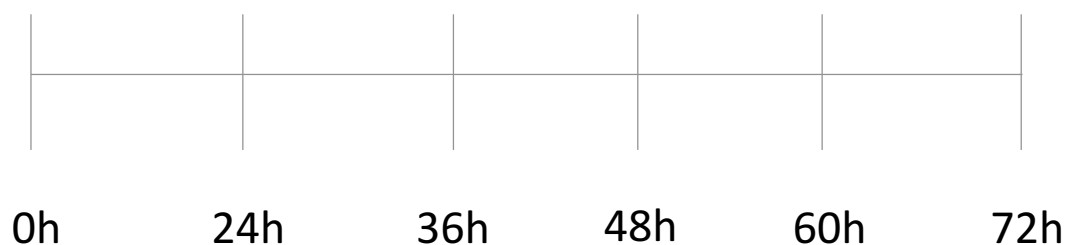
3. 篩選單株細胞

先將細胞從 6cm dish 中沖下，經過離心後回溶 1ml 的培養基，利用血球計數器算出細胞總量，單位為 cells/ml，再利用序列稀釋的方式把細胞稀釋到 20 cells/ml，再分別分在 96well 中的每一孔當中。隔天經過 24 小時貼附，觀察每一個 well 中只能有一顆細胞，並且標記起來，等到細胞長出小群體後開始利用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 puromycin 篩選，隔兩天觀察一次，並且換新的含藥物的培養基。若要移置到大的 dish 中，要讓細胞至少在原來孔盤長到 7 分滿才可以移到大培養皿中。



2.5 生長曲線測定

首先於 24 孔盤中種下 5×10^4 的細胞後，貼附 24 小時後，確認細胞生長狀態良好進行測定 24, 36, 48, 60, 72 小時，方法利用 MTT 的方法，將 MTT 加入到培養液中稀釋成 0.5mg/ml，再加入至含細胞的 24 孔盤中，培養兩個小時，確定細胞內粒線體中產生紫色結晶，再把孔盤內不含 MTT 培養液吸乾，利用 95%DMSO 打破細胞溶出結晶紫，再以 ELSA reader 測定 595nm 的可見光測定，其測定出的數值落在 1.0- 0.2 的區間。



2.6 於 SW620 中加入 STS 的藥物處理

Staurosporine (STS) 藥物是會促使細胞產生細胞凋亡，於先前本實驗室也使用此項藥物進行細胞凋亡的研究。先在 3cm dish 種下

4×10^5 的細胞，貼附 24 小時。接著利用 1xPBS 清洗殘餘的培養液一次，在把本次實驗中主要是利用 $10 \mu\text{M}$ 的 STS 處理人類 SW620 大腸癌細胞株 8 小時，之後利用 1xPBS 洗掉細胞上殘餘的培養液，最後破細胞萃取出蛋白，利用西方墨點法檢測確認藥物有作用於細胞中。

三. 結果

3.1 不同大腸癌細胞中 CA8 的表達

我們先選擇不同大腸癌細胞株包含 HT29, SW480, SW620 及 COLO320，利用西方墨點法分析內生性 CA8 表達。從圖一中明顯地發現，在人類 SW620 大腸癌細胞株中 CA8 表達量是最高的。在 COLO320 細胞及 SW480 中，也發現適中的 CA8 表達，在 HT29 細胞內 CA8 的表達量則為最低。因為先前只觀察 HT29 及 SW480 細胞中 CA8 的表達，所以先前實驗室人員就在 HT29 細胞送入過量表達的 CA8myc 和控制組的載體，建立穩定表達的細胞株後，分別命名為 HT29-vector 和 HT29-CA8myc ;在 SW480 細胞中，利用了 shRNA 降低內生性 CA8 和用當控制組的 Luc，經過 puromycin 篩選出穩定的細胞株，分別命名為 SW480-shLuc 和 SW480-shCA8，並用西方墨點法確認細胞株內 CA8 的表達 (圖二 B)。

3.2 不同 CA8 表達的穩定大腸癌細胞株建立

在我的研究中另外加入 SW620 的細胞株，進行內生性 CA8 表達的比較。如圖一所示，發現 SW620 內生性 CA8 表達量較 HT29 高。我選擇在 CA8 表達量較高的 SW620 中，利用 shRNA 降低內生性 CA8 和 shLuc 控制組的載體，經由藥物的篩選出穩定的細胞株，再利用西方墨點法分析細胞內 CA8 的表達，如圖二 A 所示，分別命名為 SW620-shLuc 和 SW620-shCA8。同時我們在 CA8 表達適中的 SW480 細胞中，也過量表達 CA8 或控制組的載體，經由藥物的篩選出穩定的細胞株，在利用西方墨點法分析確認細胞內 CA8 的表達，如圖二 B 所示，分別命名為 SW480-EGFP 和 SW480-CA8myc。

3.3 過量表達 CA8 於人類 HT29 大腸癌細胞在不同的葡萄糖濃度處理下對於細胞內分子機制的影響

藉由先前的研究結果知道 CA8 的表達會影響骨肉瘤細胞葡萄糖的攝取，接著我改變細胞培養液的中葡萄糖濃度，利用過量表達 CA8 在 HT29 細胞，去研究過量 CA8 是否會影響葡萄糖代謝下游的分子

機制。我們的實驗設定低葡萄糖在 0.5mM 的濃度，而一般培養液中的葡萄糖濃度 11mM。在 HT29-CA8myc 細胞在降低葡萄糖濃度培養 48 小時後，比起控制組並沒發現過量表達 CA8 對細胞中的分子會有顯著，例如 AMPK 和 Akt 葡萄糖代謝相關分子的影響。但卻可以發現，在降低葡萄糖濃度時，和正常葡萄糖培養下的細胞比較 p-AMPK 和 p-FAK 顯著下降（圖三 A），而如圖三 B 可發現 p-Akt, LC-3 I 和 LC-3 II 則是上升，這結果表明了過量表達 CA8 在 HT29 細胞沒有顯著的影響 AMPK 和 Akt 等分子，但是細胞培養液中降低葡萄糖則會去影響細胞內參與能量代謝等分子的表達。

3.4 降低 CA8 表達的 SW620 細胞在不同葡萄糖濃度下對 p-Akt 的影響

我們在 HT29-CA8myc 細胞中沒辦法看到 CA8 過量的影響，只能發現葡萄糖濃度下降對細胞的影響。所以我接著研究不同葡萄糖濃度，分別以 11mM 及 0.5mM 的葡萄糖濃度處理表達不同 CA8 蛋白的細胞 48 小時，再藉由西方墨點法分析，實驗結果發現在 0.5mM 濃度的葡萄糖濃度下 SW480-shCA8 比起 SW480-shLuc 細胞， p-Akt 表達沒有改變（圖四）。進一步我們也利用 SW620-shCA8 及 SW620-shLuc 來分析

CA8 在 SW620 的功能，從圖五可見 SW620-shCA8 比起 SW620-shLuc 細胞，在低葡萄糖下 p-Akt 也會有下降的現象，但這現象卻在 11mM 葡萄糖濃度培養下沒有相同的影響。

3.5 增加葡萄糖濃度並不會影響 CA8 的變化

在初期研究的過程中曾觀察到 CA8 在低葡萄糖濃度培養下，似乎有減少表達的現象，為了確認 CA8 的表達是否受葡萄糖濃度調控，所以參考先前的文獻找出四種不同的濃度(Zhuang et al., 2014)，分別為 0, 5.5, 11, 25mM 的葡萄糖和一個控制組 25mM mannitol，觀察 CA8 表達是否受到不同葡萄糖濃度的影響，同時也測量 Glut3 在不同的葡萄糖濃度下的表達。在圖六中所示，我們利用了 SW480-shLuc 細胞，從結果中發現 CA8 的表達雖然在極度缺乏葡萄糖時會呈現下降，但是不會受到隨著葡萄糖濃度漸次提高而逐漸增加 CA8 的表達；但在缺乏葡萄糖狀況下，可見到 Glut3 會大量表達。我們進一步也在 SW620 細胞中改變不同葡萄糖濃度來探討對 CA8 的影響，一樣發現 CA8 不會隨著葡萄糖濃度而增加（圖七 B），但跟 SW480 細胞相同的是在缺乏葡萄糖時 Glut3 會有增加表達的現象（圖七 A）。

從這些結果中發現，CA8 並不會隨著葡萄糖濃度循序漸進提升，而有增加表達的現象，而 Glut-3 則是在缺乏葡萄糖的情況下則可明顯增加表達。

3.6 降低人類大腸癌細胞 SW480 及 SW620 細胞中 CA8 的表達對於葡萄糖攝取的影響

先前已經有的文獻提出，癌細胞中的代謝與正常的細胞有所不同，細胞會改變代謝方式，大量的活化糖解代謝，但最後不進入克氏循環中產生 ATP，而是提升葡萄糖進入後，最後產生乳酸產生少量 ATP，持續存活下去(Marie and Shinjo, 2011)。在本實驗室先前的研究中也發現 CA8 對於葡萄糖的依賴非常重要(Wang et al., 2016)。因此本次實驗，也針對 CA8 對大腸癌細胞葡萄糖攝取能力的影響來探討，分別利用了 SW480-shLuc, SW480-shCA8 及 SW620-shLuc, SW620-shCA8 細胞，利用細胞吸收 2-NBDG，此藥物因結構類似葡萄糖會被細胞吸收後會產生螢光，測定細胞內發出的螢光，來監測葡萄糖的攝取，如圖 S2A 所見在 SW480-shCA8 和 SW480-shLuc 細胞相比較，葡萄糖的攝

取會明顯的下降。我們實驗室進一步也利用 SW620-shCA8 細胞比起控制組 SW620-shLuc 細胞進行實驗，結果顯示當降低 CA8 會導致葡萄糖攝取能力顯著的下降（圖 S2B），這些結果說明，CA8 會參與葡萄糖吸收相關機制。

3.7 降低 CA8 會降低 SW620 大腸癌細胞生長及爬行

先前的文獻證明當在人類 LOVO 大腸癌細胞中過量表達 CA8，會促使癌細胞侵略能力加強(Nishikata et al., 2007)。在本論文中，我們就使用 SW480-shLuc, SW480-shCA8, SW480-eGFP 和 SW480-CA8myc，利用 MTT 的方法探討細胞生長的現象，分別處理了 24, 36, 48, 60, 72 小時，從圖八結果中可以發現，在經由 72 小時培養下，不管是降低 CA8 表達或是過量表達 CA8 對於 SW480 細胞生長沒有很大的影響。實驗室的學妹也使用 SW620-shCA8 細胞和 SW620-shLuc 細胞相比較，在 72 小時前可以發現降低 CA8 表達在 SW620 中會顯著的抑制細胞生長（圖 S3）。另外，實驗室其他的研究也利用 wound healing 的方法，分析細胞移行的速度，主要利用 SW480-shLuc,

SW480-shCA8, SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 細胞，來探討 CA8 表達對細胞移行影響。從圖 S4 發現 SW480-shCA8 細胞比起 SW480-shLuc 細胞，對細胞移行無顯著的影響，但是在圖 S5 結果中可見，SW620-shCA8 細胞比起 SW620-shLuc 細胞，在第 48 小時顯著抑制細胞移行。總結上述可以發現，CA8 在 SW620 細胞中扮演影響細胞生長的角色且影響細胞的移行，但在 SW480 中沒有發現相同的狀況。

3.8 在 SW480 細胞降低 CA8 表達會增加自噬作用路徑活化

在先前 MERRF 細胞中發現，細胞內部 CA8 的表達會影響 LC-3 II 表達，顯示 CA8 的表達在 MERRF 細胞中會影響自噬作用(Wang et al., 2014)。因此我想知道，在大腸癌細胞中 CA8 是否也會影響自噬作用，於是利用 SW480-shLuc, SW480-shCA8, SW480-eGFP 和 SW480-CA8myc 細胞株來進行實驗，藉由這些表達不同 CA8 的細胞，使用西方墨點法來分析 Beclin-1 和 LC-3 II 的蛋白表達是否受影響。先前已有研究提出 Beclin-1 是 LC-3 II 的上游分子，在 SW480-shCA8 細胞比起 SW480-

shLuc 細胞會增加 Beclin-1 表達，也可以發現 SW480-CA8myc 細胞比起 SW480-eGFP 細胞會降低 Beclin-1 表達（圖 S6）。同時我們也比較 LC-3 II 的表達，經由統計可以知道 SW480-shCA8 細胞比起 SW480-shLuc 細胞會顯著增加 LC-3 II 的表達（圖九 B），但是 SW480-CA8myc 的細胞比起 SW480-eGFP 細胞卻不會顯著影響 LC-3 II 的表達（圖九 D）。進一步也使用 SW620 細胞進行研究，在 SW620-shCA8 細胞比起 SW620-shLuc 細胞會顯著增加 Beclin-1 的表達（圖十 B），但卻不會顯著影響 LC-3 II 的表達（圖十 D）。從上面結果可以說明，CA8 在 SW480 細胞株中可能有參與影響自噬作用相關路徑，而在 SW620 細胞株中，參與自噬作用路徑的影響可能較為複雜。

3.9 在 SW620 細胞中降低 CA8 表達會影響細胞凋亡相關分子表達

在先前 MERRF 細胞中發現，細胞內部 CA8 的表達會降低細胞的凋亡（apoptosis）（Wang et al., 2014）。另外其他文獻中也指出 AMPK 的活化，在大腸癌細胞中會導致細胞產生細胞凋亡的現象（Kim and He, 2013）。於是我利用 SW620 細胞探討 CA8 對 p-AMPK 影響，藉由西方墨點法分析後，利用 SW620-shCA8 細胞比起 SW620-shLuc 細胞經由

定量統計後，會顯著的降低 p-AMPK (圖十一 B)。進一步利用西方墨點法分析細胞凋亡相關的 p53 分子，也發現 SW620-shCA8 比起 SW620-shLuc 細胞，可顯著增加 p53 的表達 (圖十二 B)。接著分析細胞凋亡的特徵目標的蛋白 (Poly (ADP-ribose) polymerase) PARP，結果顯示 SW620-shCA8 細胞比起 SW620-shLuc 細胞，不會影響 PARP-cleaved 的表達，顯示 CA8 的表達在 SW620 細胞中不會影響細胞凋亡 (圖十三 C)。為了更確定在 SW620 中 CA8 的角色，所以我們就利用 STS 活化細胞凋亡，探討 CA8 在 SW620 對於細胞凋亡路徑的影響，在沒處理 STS 組別，不管 SW620-shLuc 或是 SW620-shCA8 都不會產生 PARP-cleaved (圖十四)。但當我們處理 10 μ M 的 STS 八個小時後，會促使 PARP-cleaved 和 caspase-3-cleaved 被活化，但卻看不到 SW620-shCA8 和 SW620-shLuc 的差異。

(四) 討論

CA8 是一個新穎的蛋白質，先前的研究顯示在人類小腦中有這一種蛋白的大量表達(Aspatwar et al., 2013)，而在癌症研究中也有多篇的文獻指出 CA8 的過量表達在肺癌細胞中，會降低細胞凋亡的產生。另外在大腸癌細胞中表達 CA8 會促使細胞的生長及移行(Akisawa et al., 2003; Ishihara et al., 2006; Nishikata et al., 2007)。目前對於此蛋白的功能只知道它會藉由和 IP3R1 結合，去降低鈣離子的釋放，但對於此蛋白較詳盡的分子作用機制並沒有明確的了解。實驗室先前發現 CA8 在骨肉瘤細胞內表達會促使細胞對於葡萄糖具有依賴性(Wang et al., 2016)，由於葡萄糖的代謝在癌症中會變得異常(Hanahan and Weinberg, 2011)，本篇論文我們利用大腸癌作為癌症研究的模型，研究 CA8 是否在癌細胞中影響糖解下游的分子。

首先我們在不同大腸癌細胞中研究，發現 CA8 表達在 SW620 細胞中比起 SW480 表達量較高（圖一），這可以說明第三期轉移的 SW620 癌細胞中 CA8 的表達，比起在二期原位腫瘤上的 SW480 細胞的 CA8 表達量更高。所以我們將這兩株大腸癌細胞分別調降 CA8 表

達，同時也在表達 CA8 量較少的 SW480 細胞中過量表達 CA8，用來研究 CA8 在大腸癌細胞中的功能。在圖 S3 所示，SW620-shCA8 細胞比和控制組細胞相比較，細胞的生長會明顯的降低。同時細胞爬行的能力也會降低，但這些現象卻無法在 SW480-shCA8 細胞中發現。從以上的結果推測在內生性 CA8 表達較高的細胞中，探討降低 CA8 表達在細胞中扮演的角色，可能會比較容易偵測到細胞內 CA8 的角色。從先前文獻中已知，過量表達 CA8 在人類 LOVO 大腸癌細胞中，會增加細胞的侵襲性(Nishikata et al., 2007)，另外我們先前的研究中也發現，降低 CA8 的表達在人類 HOS 骨肉瘤細胞，會使細胞移行的相關蛋白 FAK 表達下降(Wang et al., 2016)。我們利用傷口癒合測定 (wound healing assay) 的研究結果也表明，在降低 CA8 的 SW620 細胞中會降低細胞移行能力，從這裡可以知道 CA8 在 SW620 大腸癌細胞中，也會參與細胞移行的路徑及影響細胞生長 (圖 S5)。

我們之前在人類骨肉瘤細胞中降低 CA8 的表達，在缺乏葡萄糖情況下，細胞的存活率提升，表示調降 CA8 可能使細胞對於葡萄糖較不具有依賴性。進一步測定 CA8 如何影響葡萄糖代謝相關分子，

也發現降低 CA8 會導致葡萄糖攝取能力明顯下降，且會降低 glycolysis 路徑的活性(Wang et al., 2016)。本次研究中探討 CA8 在大腸癌細胞中對葡萄糖代謝的影響，結果顯示在 SW480 和 SW620 細胞中降低 CA8 會導致葡萄糖攝取能力明顯降低（圖 S2）。這與先前在骨肉瘤細胞研究結果相同，可以顯示 CA8 不管是在哪一種癌細胞中，與葡萄糖的依賴性偏高。所以我接著進行改變培養基中葡萄糖濃度的研究，使用 HT29-CA8myc 和 HT29-vector 細胞進行的實驗顯示（圖三），過量表達 CA8 的 HT29 細胞，對於細胞中醣類代謝相關分子，並不會有太大的影響，但卻可以發現當缺乏葡萄糖時會促使 Akt 的活化，LC-3 II 的活化，這和先前文獻的報導相同，也就是細胞培養在缺乏能量的情況下會活化自噬作用相關路徑的分子 (Chen et al., 2012)，同時也促使存活路徑的 Akt 大量活化(Nelson et al., 2002)。先前的文獻也指出，在能量缺乏時細胞內部會啟動平衡機制，主要的關鍵分子是 AMPK，此分子由三個次單元 (α, β, γ) 所形成的一種激酶。有文獻表示:人類 HepG2 肝癌細胞在缺乏葡萄糖培養一至六小時，會導致磷酸化 AMPK 活化(Zang et al., 2006)。另外也有文獻提到在大鼠的胰島素瘤細胞中觀察，在缺乏葡萄糖培

養 90 分鐘之後，會活化 AMPK，主要原因是透過超氧化物的生成所導致的，而不會僅是在缺乏 ATP 下所導致，所以 AMPK 的活化有可能透過其他的路徑(Sarre et al., 2012)。可是我的研究結果中在缺乏葡萄糖 48 小時沒有觀察到 AMPK 活化，雖然與大部分文獻的發現並不相同，但是這可能是不同文獻使用的實驗方法有所不同所導致，未來需要更多的實驗來解釋為何在大腸癌細胞中缺乏葡萄糖會導致 AMPK 活性下降。此外，在 SW620-shCA8 細胞中降低葡萄糖濃度後比起控制組細胞，會降低 Akt 的活化（圖五）。這可說明在大腸癌細胞中降低 CA8 可能導致醣類代謝相關機制活性下降，這和先前實驗室在 HOS 細胞中的發現類似(Wang et al., 2016)，但是因 SW620 帶有不同於 HOS 細胞的 p53 突變，可能改變細胞對於環境或藥物的耐受性，所以我們在正常葡萄糖培養情況下去降低 CA8 才無法發現 Akt 活性的差異(Ahmed et al., 2013; Wang et al., 2016)。

另外一方面，我們在降低葡萄糖濃度的初步實驗時，發現 CA8 的表達在 SW480-shLuc 細胞以及 SW620-shLuc 細胞中似乎會減少，然而使用許多不同濃度的葡萄糖進一步測試後發現，CA8 的表達並不會隨著濃度提高而表達增加，這說明不同濃度的葡萄糖濃度不會

影響 CA8 表達(圖六, 圖七 B)。雖然 CA8 可能參與醣類相關的代謝, 但並不受葡萄糖濃度的調控。我也觀察到不管在 SW480 或是 SW620 細胞中, 在缺乏葡萄糖培養下 Glut3 會大量表達 (圖六, 圖七 A), 這點和先前文獻報導相符合, 細胞在缺乏葡萄糖情況下會活化葡萄糖轉運酶(Tumova et al., 2016)

由於本實驗室先前在 MERRF 相關的研究發現, CA8 的表達會去抑制細胞的自噬作用 (autophagy) (Wang et al., 2014)。所以我們在 SW480 及 SW620 的大腸癌細胞中也來探討 CA8 是否會調控自噬作用。我的結果顯示, 在 SW480 細胞中, 降低 CA8 會去增加 Beclin-1 和 LC-3 II, 這可顯示在原位癌的細胞株中, CA8 能藉由調控自噬作用相關路徑來影響細胞的存亡 (圖九, 圖 S6)。但在 SW620 細胞中, 降低 CA8 表達時, 雖然會增加細胞內 Beclin-1 的表達, 但卻對 LC-3 II 沒有顯著的影響 (圖十), 從這結果可以得知, 降低 CA8 在此轉移型的大腸癌細胞中, 無法藉由活化自噬作用影響細胞存活。這也顯示 CA8 在不同時期的癌細胞內, 可能有不同的角色。已知癌症的晚期轉移, 可能因為環境改變, 在外觀特徵及分子表達上都可能產生改變。本篇論文所使用的大腸癌原位腫瘤細胞衍生的

SW480 細胞具有上皮樣形態，而同一個病患腫瘤轉移淋巴結中衍生的 SW620 細胞則具有成膠質細胞樣外觀；另外，SW620 比起 SW480 更容易產生細胞增殖及轉移的現象產生，且在 SW620 透過 TNF- α 和 anti-FAS 誘導的細胞凋亡敏感度較低(Hewitt et al., 2000)。所以這兩株細胞不僅在外型上有改變，且在細胞中分子機制上也不盡相同。

先前在 MERRF 的細胞模型中，或是在人類 HOS 骨肉瘤細胞中，都發現 CA8 可以抑制細胞凋亡 (apoptosis) 的相關路徑分子，所以我們也使用了 SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 來探討 CA8 對於細胞凋亡的影響，我們利用西方墨點法檢測凋亡目標分子 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，主要因為 PARP 會去參與修復 DNA，但如果此蛋白產生裂解的現象，代表細胞凋亡啟動(Swindall et al., 2013)。在我們的研究中，發現降低 CA8 對於 PARP-cleaved 不會有太大的影響 (圖十三 C)。為了進一步了解 CA8 是否活化細胞凋亡分子，我們決定加入活化細胞凋亡的藥物 staurosporine (STS)，但是結果並沒有發現 PARP-cleaved 在細胞缺乏 CA8 時產生顯著的差異。由於先前研究得知與細胞凋亡相關路徑分子有 AMPK、p53 及 caspase-3 (Kim and He, 2013; Nieminen et al., 2013)，

我們發現在 SW620 中降低 CA8 會降低 p-AMPK (圖十一)，但卻會增加 p53 的表達 (圖十二)，這雖然和先前多數參考文獻不大相同，但是也有文獻提出，AMPK 不是只有透過 p53 來影響細胞凋亡，可能還會藉由 MAPK 或是 Akt 相關路徑影響細胞走向細胞凋亡(Dai et al., 2015)。所以未來可研究 CA8 是否透過 MAPK 相關路徑影響細胞凋亡。另一方面，我們發現降低 CA8 在 SW480 及 SW620 細胞中，不會影響 caspase-3 cleaved 的表達，這可能與先前研究報導相類似，或許 CA8 影響 apoptosis 主要並不透過 caspase 相關的路徑，可能是透過 apoptosis inducing factor (AIF) 或其他相關的凋亡訊息分子(Qiu et al., 2015)。

綜合以上的研究結果，可以推測在大腸癌的不同時期，CA8 可能會在扮演不同的角色，我們觀察到 CA8 在原位大腸癌細胞中可能有抑制自噬作用的功能。已知過度活化的自噬作用可能會增加氧化壓力，促使細胞產生細胞死亡，所以 CA8 如果抑制過度自噬作用產生，可提高細胞的存活，促使腫瘤的生長。可是在轉移的大腸癌細胞中，我們卻發現 CA8 並沒有顯著的影響自噬作用，主要是可能因為在轉移出去的癌症細胞中，因為環境改變為了存活，CA8 的表達

增加同時也改變 CA8 的下游影響分子。我們在轉移出去的 SW620 癌細胞中，探討 CA8 是否會調控細胞凋亡相關的分子路徑，但是目前我們尚沒有確切的證據來證明細胞凋亡和 CA8 直接的相關。目前我們的結果顯示:CA8 調控細胞凋亡可能透過 AMPK，而細胞凋亡的路徑是可能透過 caspase-independent 相關分子來影響細胞凋亡的路徑。至於 CA8 如何影響大腸癌，我們仍需更多證據。

另外有趣的是我們在 SW480 或是 SW620 兩株細胞中都發現，降低 CA8 表達會增加 p53 的表達，所以未來我們會想要探討 p53 在這兩株細胞中所扮演的角色。先前的文獻有報導這兩株細胞的 p53 有 R273S 的突變點，會導致細胞對於內質網壓力的耐受性增加(Ahmed et al., 2013)。所以可以針對 p53 相關的路徑持續探討，同時也可以研究 CA8 是否改變大腸癌細胞藥物耐受性。

近年來有許多文獻針對癌症的治療用藥研究，除化療用藥外，化療藥常合併使用糖尿病一線用藥 Metformin，此藥物主要針對糖尿病患者，在服用此藥物後可以有效降低血糖，先前研究中就證明 Metformin 對於乳癌具有治療的效果(Kasznicki et al., 2014)。未來我

們也會探討使用 Metformin 是否對於大腸癌具有治療的效果，同時探討 CA8 與 Metformin 治療效能之間的關聯，釐清在大腸癌細胞中的 CA8 是否在未來可當作一個用藥的指標，這一方面的研究需要透過更多的實驗來得到較清楚的了解。

參考文獻

Uncategorized References

Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Eknaes, M., Hektoen, M., Lind, G.E., and Lothe, R.A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2, e71.

Akisawa, Y., Nishimori, I., Taniuchi, K., Okamoto, N., Takeuchi, T., Sonobe, H., Ohtsuki, Y., and Onishi, S. (2003). Expression of carbonic anhydrase-related protein CA-RP VIII in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch* 442, 66-70.

Aspatwar, A., Tolvanen, M.E., Jokitalo, E., Parikka, M., Ortutay, C., Harjula, S.K., Ramet, M., Vihinen, M., and Parkkila, S. (2013). Abnormal cerebellar development and ataxia in CARP VIII morphant zebrafish. *Hum Mol Genet* 22, 417-432.

Chen, Y., Liersch, R., and Detmar, M. (2012). The miR-290-295 cluster suppresses autophagic cell death of melanoma cells. *Sci Rep* 2, 808.

Dai, Y.L., Huang, S.L., and Leng, Y. (2015). AICAR and Metformin Exert AMPK-dependent Effects on INS-1E Pancreatic beta-cell Apoptosis via Differential Downstream Mechanisms. *Int J Biol Sci* 11, 1272-1280.

Foskett, J.K. (2010). Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels in neurological diseases. *Pflugers Arch* 460, 481-494.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hewitt, R.E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G.W., and Stetler-Stevenson, W.G. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol* 192, 446-454.

Hirota, J., Ando, H., Hamada, K., and Mikoshiba, K. (2003). Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *Biochem J* 372, 435-441.

Ishihara, T., Takeuchi, T., Nishimori, I., Adachi, Y., Minakuchi, T., Fujita, J., Sonobe, H., Ohtsuki, Y., and Onishi, S. (2006). Carbonic anhydrase-related protein VIII increases invasiveness of non-small cell lung adenocarcinoma. *Virchows Arch* 448, 830-837.

Jiao, Y., Yan, J., Zhao, Y., Donahue, L.R., Beamer, W.G., Li, X., Roe, B.A., Ledoux, M.S., and Gu, W. (2005). Carbonic anhydrase-related protein VIII deficiency is associated with a distinctive lifelong gait disorder in waddles mice. *Genetics* 171, 1239-1246.

Joza, N., Kroemer, G., and Penninger, J.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* 18, 142-149.

Kasznicki, J., Sliwinska, A., and Drzewoski, J. (2014). Metformin in cancer prevention and therapy. *Ann Transl Med* 2, 57.

Kaya, N., Aldhalaan, H., Al-Younes, B., Colak, D., Shuaib, T., Al-Mohaileb, F., Al-Sugair, A., Nester, M., Al-Yamani, S., Al-Bakheet, A., *et al.* (2011). Phenotypical spectrum of cerebellar ataxia associated with a novel mutation in the CA8 gene, encoding carbonic anhydrase (CA) VIII. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156B, 826-834.

Kim, I., and He, Y.Y. (2013). Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. *Front Oncol* 3, 175.

Kondratskyi, A., Yassine, M., Kondratska, K., Skryma, R., Slomianny, C., and Prevarskaya, N. (2013). Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front Physiol* 4, 272.

Kulkarni, Y.M., Kaushik, V., Azad, N., Wright, C., Rojanasakul, Y., O'Doherty, G., and Iyer, A.K. (2016). Autophagy-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cells by a Novel Digitoxin Analog. *J Cell Physiol* 231, 817-828.

Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41, 211-218.

Marie, S.K., and Shinjo, S.M. (2011). Metabolism and brain cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 66 Suppl 1, 33-43.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 961-967.

Miyaji, E., Nishimori, I., Taniuchi, K., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., and Onishi, S. (2003). Overexpression of carbonic anhydrase-related protein VIII in human colorectal cancer. *J Pathol* 201, 37-45.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.

Mowers, E.E., Sharifi, M.N., and Macleod, K.F. (2017). Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* 36, 1619-1630.

Mulukutla, B.C., Yongky, A., Grimm, S., Daoutidis, P., and Hu, W.S. (2015). Multiplicity of steady states in glycolysis and shift of metabolic state in cultured mammalian cells. *Plos One* 10, e0121561.

Nelson, B.A., Robinson, K.A., and Buse, M.G. (2002). Defective Akt activation is associated with glucose- but not glucosamine-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E497-506.

Nieminen, A.I., Eskelinen, V.M., Haikala, H.M., Tervonen, T.A., Yan, Y., Partanen, J.I., and Klefstrom, J. (2013). Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1839-1848.

Nishikata, M., Nishimori, I., Taniuchi, K., Takeuchi, T., Minakuchi, T., Kohsaki, T., Adachi, Y., Ohtsuki, Y., and Onishi, S. (2007). Carbonic anhydrase-related protein VIII promotes colon cancer cell growth. *Mol Carcinog* 46, 208-214.

Qiu, M., Chen, L., Tan, G., Ke, L., Zhang, S., Chen, H., and Liu, J. (2015). A reactive oxygen species activation mechanism contributes to JS-K-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Sci Rep* 5, 15104.

Sarre, A., Gabrielli, J., Vial, G., Leverve, X.M., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (2012). Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. *Free Radic Biol Med* 52, 142-150.

Swider, A., Siegel, R., Eskdale, J., and Gallagher, G. (2014). Regulation of interferon lambda-1 (IFNL1/IFN-lambda1/IL-29) expression in human colon epithelial cells. *Cytokine* 65, 17-23.

Swindall, A.F., Stanley, J.A., and Yang, E.S. (2013). PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers (Basel)* 5, 943-958.

Tumova, S., Kerimi, A., Porter, K.E., and Williamson, G. (2016). Transendothelial glucose transport is not restricted by extracellular hyperglycaemia. *Vascul Pharmacol* 87, 219-229.

Turkmen, S., Guo, G., Garshasbi, M., Hoffmann, K., Alshalah, A.J., Mischung, C., Kuss, A., Humphrey, N., Mundlos, S., and Robinson, P.N. (2009). CA8 mutations cause a novel syndrome characterized by ataxia and mild mental retardation with predisposition to quadrupedal gait. *PLoS Genet* 5, e1000487.

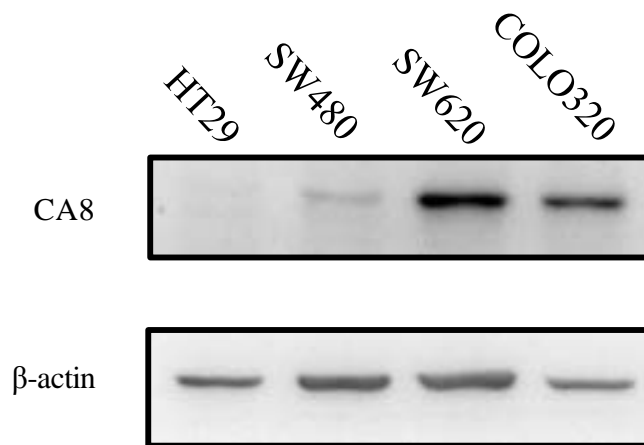
van der Flier, M., Geelen, S.P., Kimpen, J.L., Hoepelman, I.M., and Tuomanen, E.I. (2003). Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome? *Clin Microbiol Rev* 16, 415-429.

Wang, T.K., Cheng, C.K., Chi, T.H., Ma, Y.S., Wu, S.B., Wei, Y.H., and Hsieh, M. (2014). Effects of carbonic anhydrase-related protein VIII on human cells harbouring an A8344G mitochondrial DNA mutation. *Biochem J* 459, 149-160.

Wang, T.K., Lin, Y.M., Lo, C.M., Tang, C.H., Teng, C.L., Chao, W.T., Wu, M.H., Liu, C.S., and Hsieh, M. (2016). Oncogenic roles of carbonic anhydrase 8 in human osteosarcoma cells. *Tumour Biol* 37, 7989-8005.

Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., and Cohen, R.A. (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55, 2180-2191.

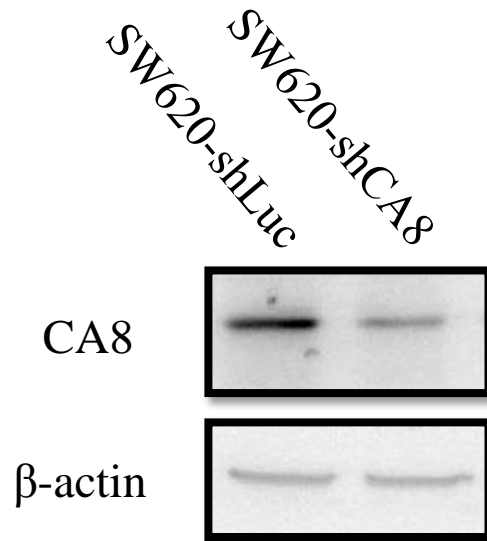
Zhuang, Y.X., Chan, D.K., Haugrud, A.B., and Miskimins, W.K. (2014). Mechanisms by Which Low Glucose Enhances the Cytotoxicity of Metformin to Cancer Cells Both In Vitro and In Vivo. *Plos One* 9.



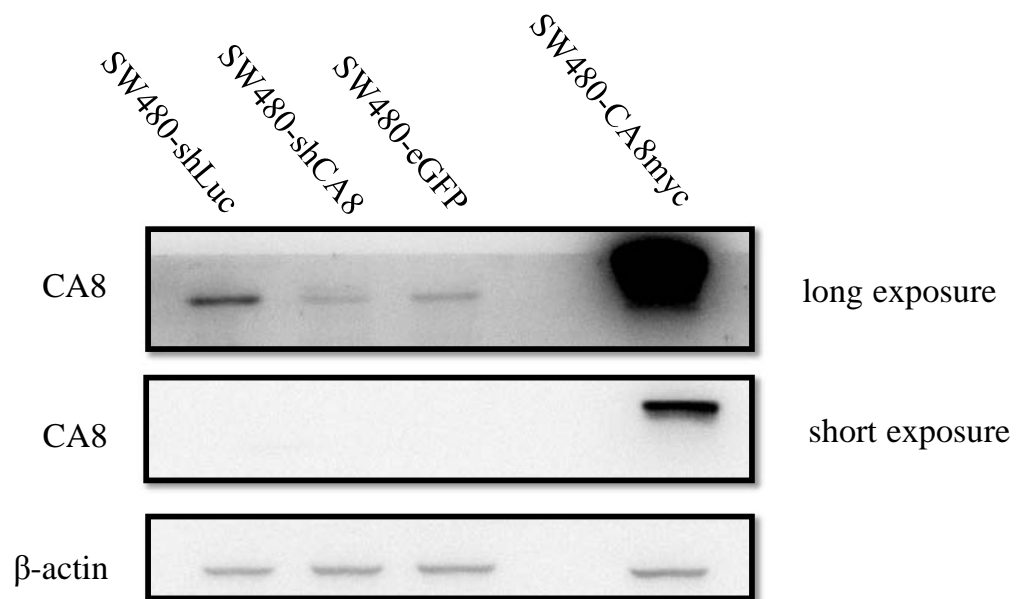
圖一. 不同結腸癌細胞內生性 CA8 的比較

HT29, SW480, SW620 及 COLO320 的大腸癌細胞株，將細胞利用細胞萃取緩衝液萃出蛋白，利用西方墨點法分析 CA8 的表達。

A



B

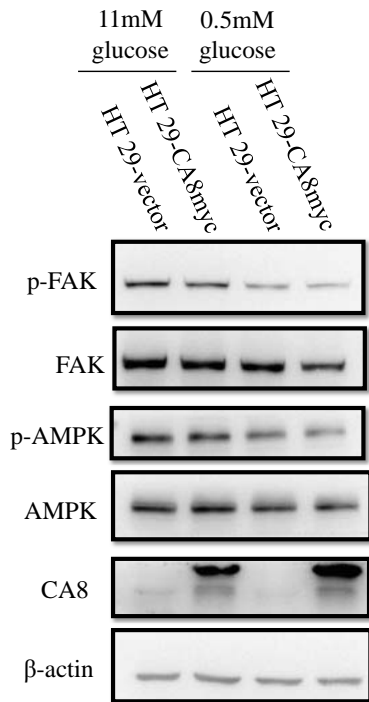


圖二. 不同 CA8 表達在 SW620 及 SW480 穩定細胞株中

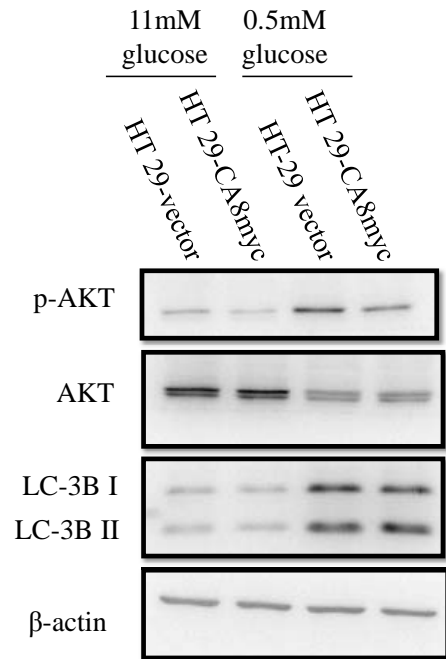
(A) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 細胞株。將細胞利用細胞萃取緩衝液抽出蛋白，最後利用西方墨點法偵測 CA8 的表達。(B)

SW480-shLuc, SW480-shCA8, SW480-eGFP 和 SW480-CA8myc 細胞株。將細胞利用細胞萃取緩衝液抽出蛋白，利用西方墨點法偵測 CA8 的表達。

A

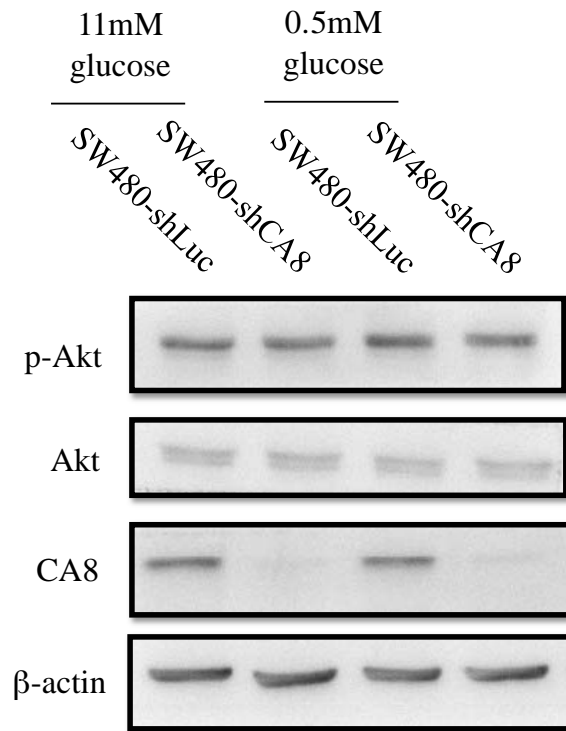


B



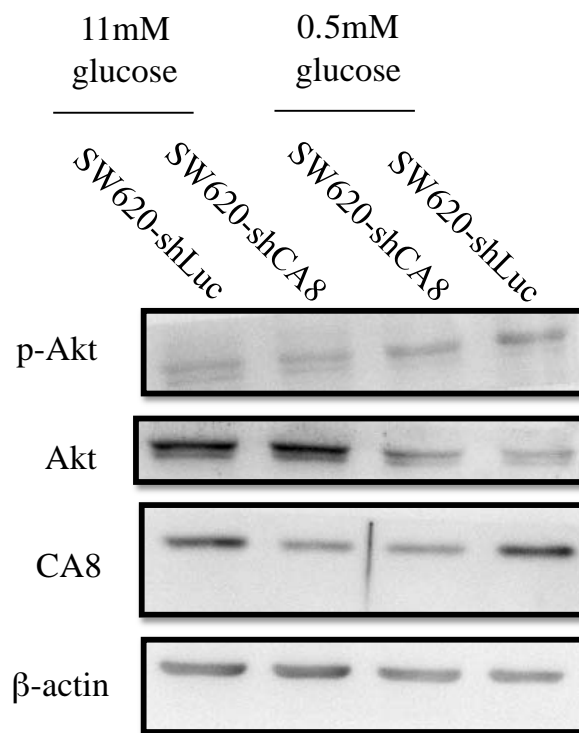
圖三. 在 HT29 細胞中低葡萄糖培養會改變分子的表達

(A) HT29-vector 和 HT29-CA8myc 培 48 小時於 11mM 和 0.5mM 的葡萄糖培養，利用西方墨點法分析 p-AMPK, p-FAK, AMPK, FAK 及 CA8 的表達。(B) HT29-vector 和 HT29-CA8myc 培養 48 小時於 11mM 和 0.5mM 的葡萄糖培養，利用西方墨點法測定 p-Akt, Akt 及 LC-3B。



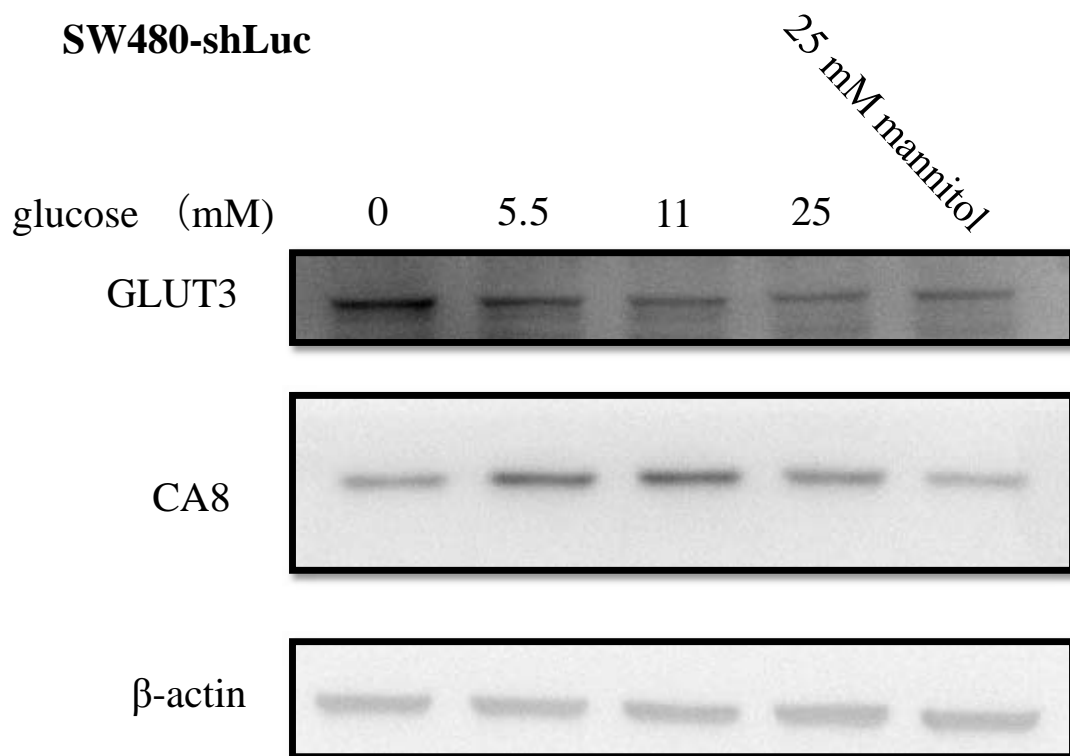
圖四. 在 0.5mM 的葡萄糖培養下在 SW480-shCA8 不會影響 p-Akt 的表達

利用 SW480-shLuc 和 SW480-shCA8，經繼代培養 48 小時於 11mM 和 0.5mM 的葡萄糖，最後破細胞收下蛋白，利用西方墨點法測定 p-Akt, Akt 及 CA8。



圖五. 在 0.5mM 的葡萄糖培養下在 SW620-shCA8 會降低 p-Akt 的表達

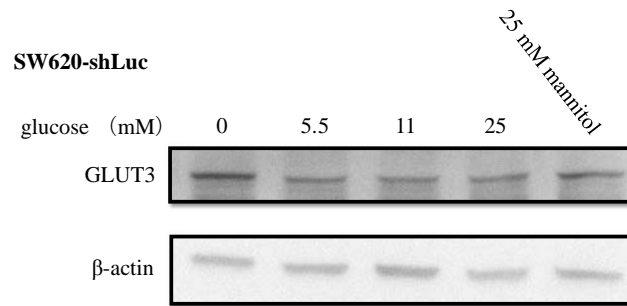
利用 SW620-shLuc 和 SW620-shCA8，經繼代培養 48 小時於 11mM 和 0.5mM 的葡萄糖，利用西方墨點法測定 p-Akt, Akt 及 CA8。



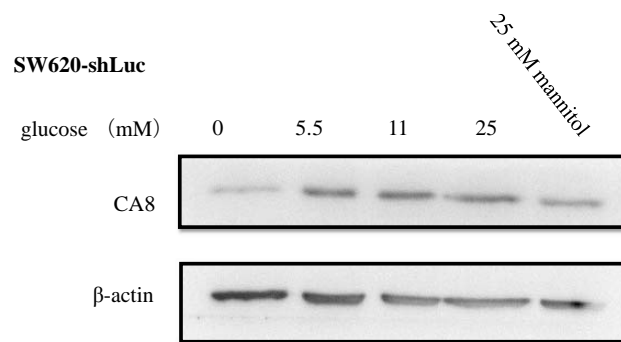
圖六. 增加葡萄糖濃度在 SW480-shLuc 細胞對 CA8 表達不會影響

在 SW480-shLuc 細胞分別以 0, 5.5, 11, 25 mM 的葡萄糖濃度，把 25 mM mannitol 當作控制組，確定蛋白表達不受滲透壓影響，培養 48 小時後，利用西方墨點法分析 CA8 和 Glut3 的表達。

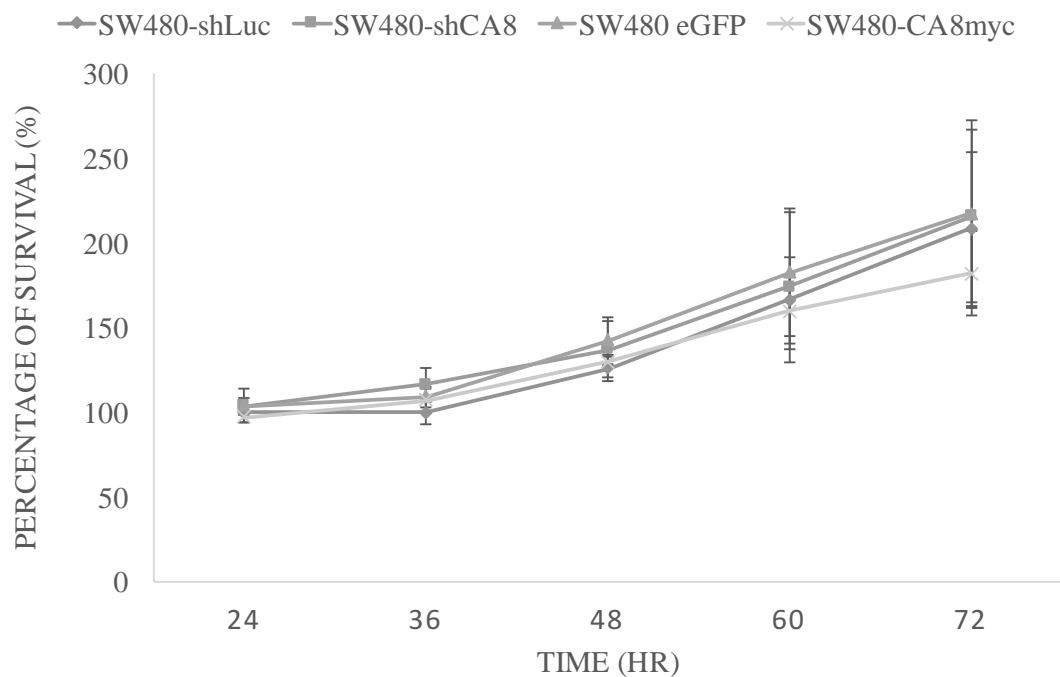
A



B



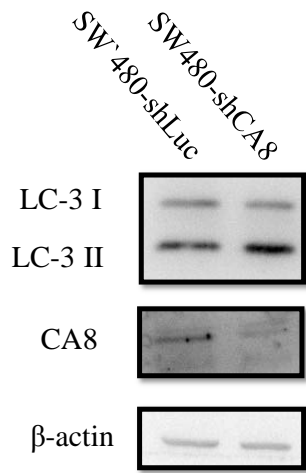
圖七. 增加葡萄糖濃度在 SW480-shLuc 細胞對 CA8 表達不會影響
在 SW620-shLuc 細胞分別以 0, 5.5, 11, 25 mM 的葡萄糖濃度，把 25 mM mannitol 當作控制組，確定蛋白表達不受滲透壓影響，培養 48 小時後，(A) 利用西方墨點法分析 CA8 表達。(B) 利用西方墨點法分析 Glut3 表達。



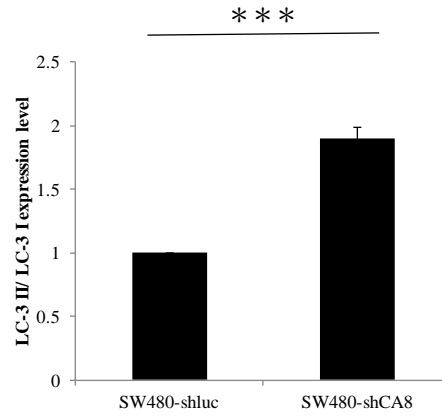
圖八. 過量表達 CA8 或降低 CA8 對 SW480 生長的影響

SW480-shLuc, SW480-shCA8, SW480-EGFP 和 SW480-CA8myc，分別培養到 24, 36, 48, 60, 72 小時後，利用 MTT 的方法，以 DMSO 破細胞，溶出細胞中的紫色結晶，以 595nm 測定。以 SW480-shLuc 當作基準 (100%)，與 SW480-shCA8, SW480-EGFP 和 SW480-CA8myc 相比較，三次獨立實驗。

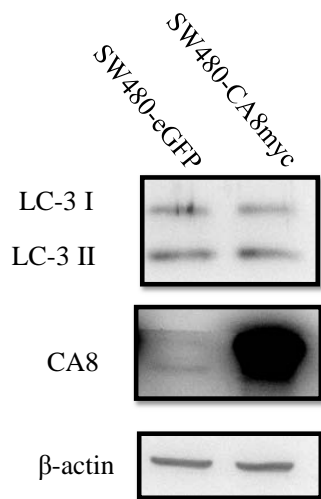
A



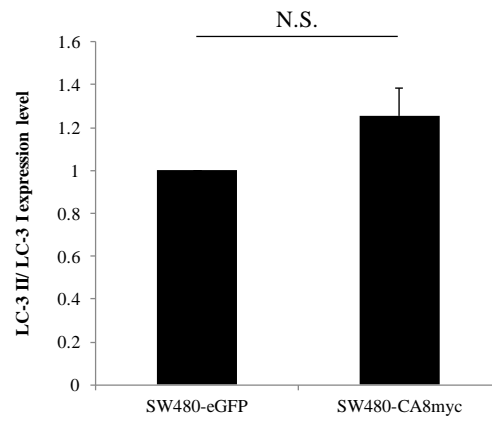
B



C



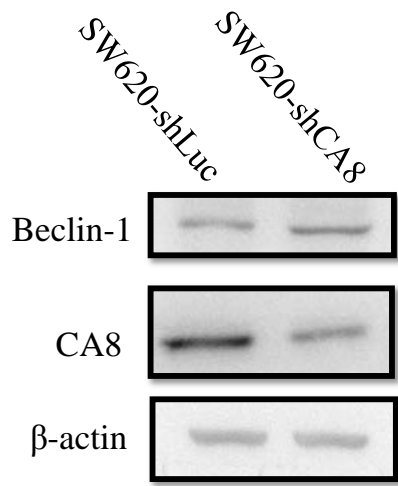
D



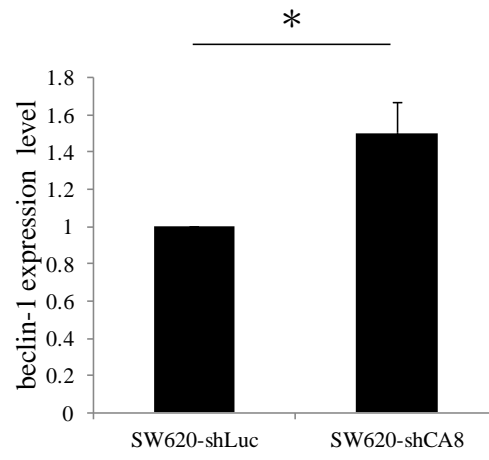
圖九. 在 SW480 細胞下調 CA8 後會增加 LC-3B 的表達

(A) SW480-shLuc 和 SW480-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，LC-3B 的表達。(B) 三次獨立實驗定量統計，數據平均值±SEM，***P < 0.001. (C) SW480-EGFP 和 SW480-CA8myc 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，LC-3B 的表達。(D) 三次獨立實驗定量統計，數據平均值±SEM，n.s.= non-significant。

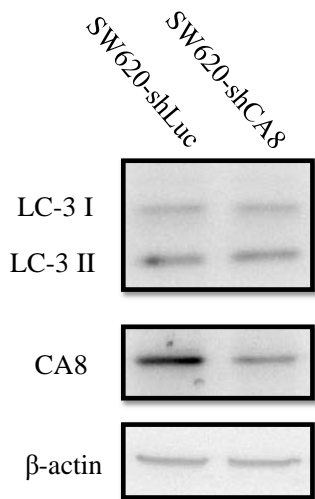
A



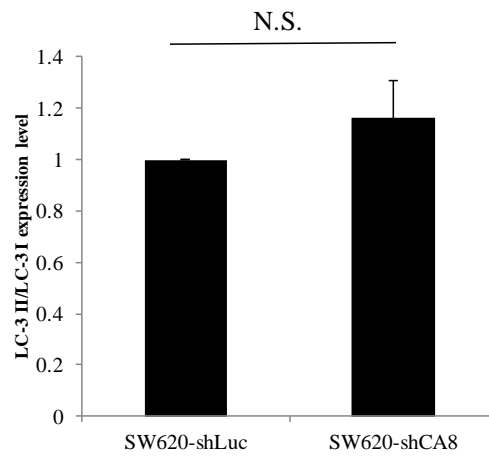
B



C



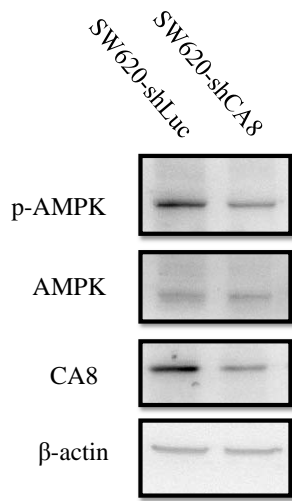
D



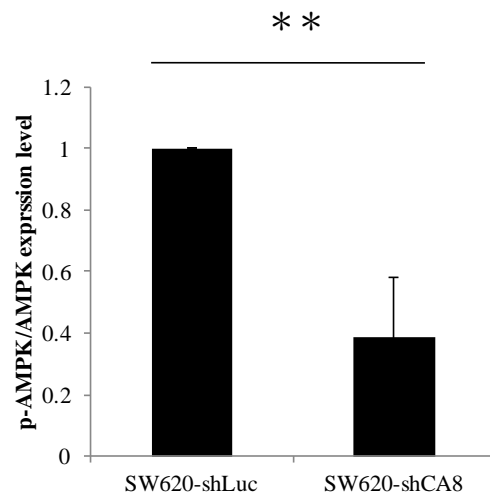
圖十. 在 SW620 下調 CA8 後增加 beclin-1 的表達但卻不影響 LC-3B 的表達

(A) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，LC-3B 的表達。(B) 三次獨立實驗定量統計，數據平均值±SEM，* P <0.05.，n.s.= non-significant (C) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，Beclin-1 的表達。(D) 三次獨立實驗定量統計，數據平均值±SEM，* P <0.05.。

A



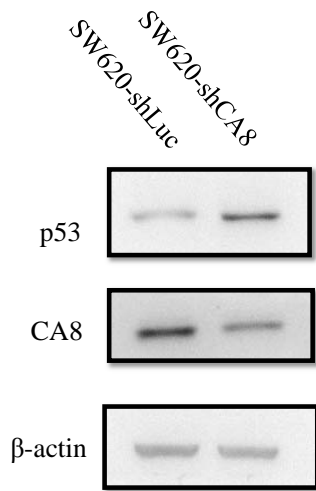
B



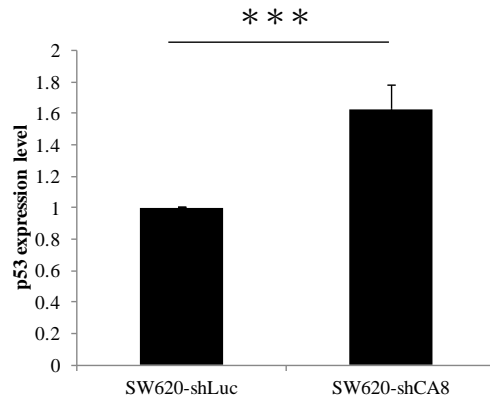
圖十一. 下調 CA8 在 SW620 細胞中會降低 p-AMPK 表達

(A) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測 p-AMPK 和 AMPK 的表達。(B) 三次獨立實驗定量統計 p-AMPK/AMPK，數據平均值±SEM，**P < 0.01。

A



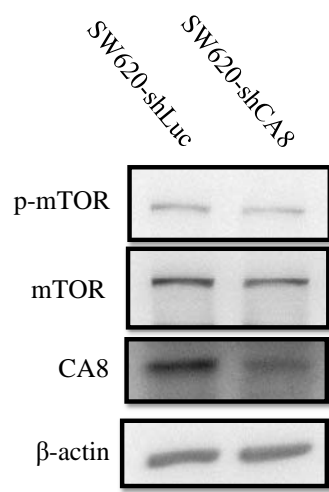
B



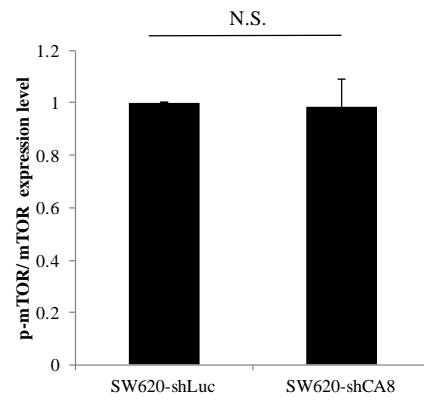
圖十二. 下調 CA8 在 SW620 細胞中會增加 p53 表達

(A) 由 SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，p53 的表達。(B) 三次獨立實驗定量定量，數據平均值 \pm SEM，***P < 0.001。

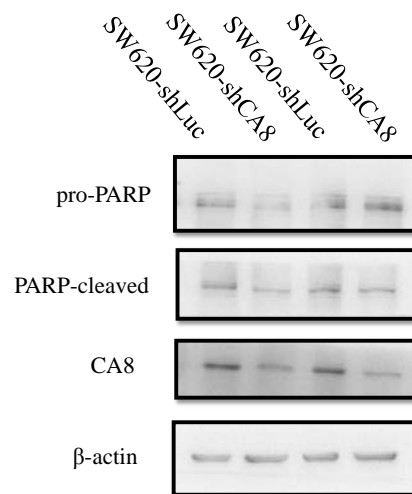
A



B



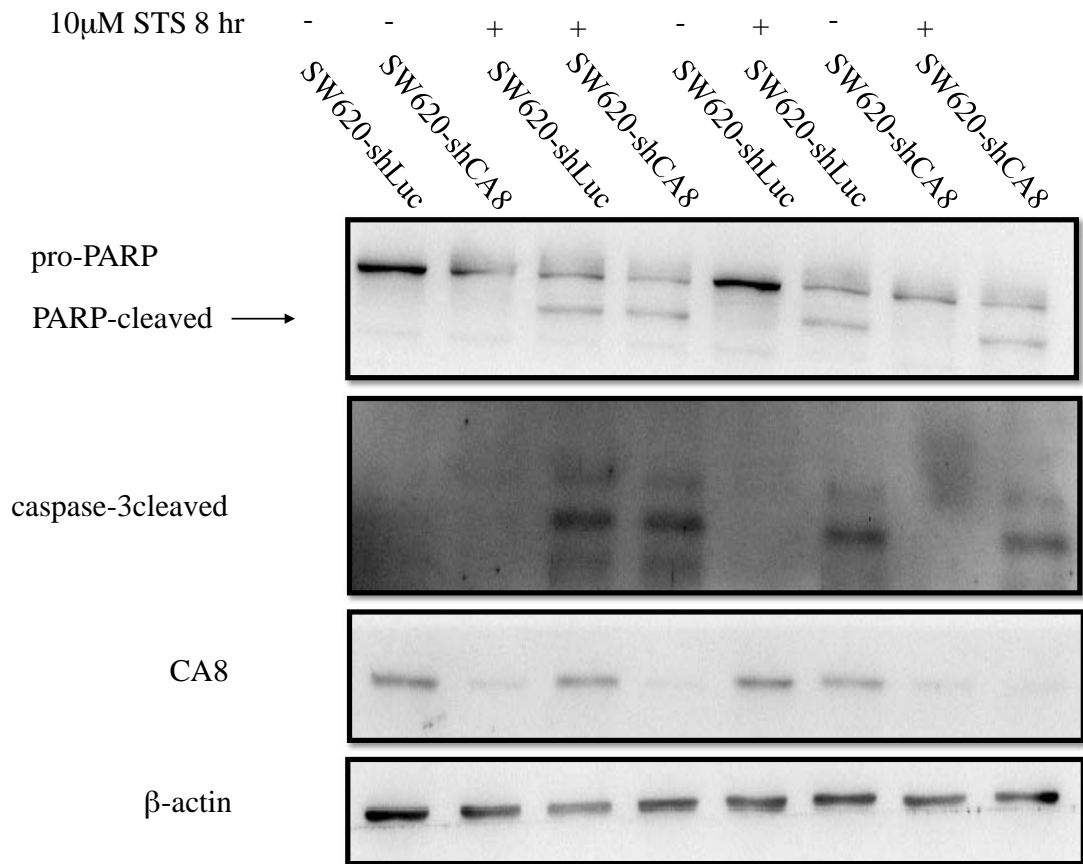
C



圖十三. 在 SW620 下調 CA8 不影響 p-mTOR 和 PARP-cleave 的表達

(A) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，p-mTOR 及 mTOR 的表達。(B) 三次獨立實驗定量統計 p-mTOR / mTOR，數據平均值 \pm SEM，n.s.= non-significant。

(C) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 經繼代培養 48 小時後，利用西方墨點法檢測，PARP cleaved 的表達。



圖十四. 處理 STS 在 SW620-shLuc 與 SW620-shCA8 不會有明顯的差異

利用 SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 細胞，分別加入 10 μ M 的 STS 處理 8 個小時，利用西方墨點法來偵測 PARP cleaved 和 Caspase-3 cleaved 的表達。紅色箭頭是 PARP-cleaved。

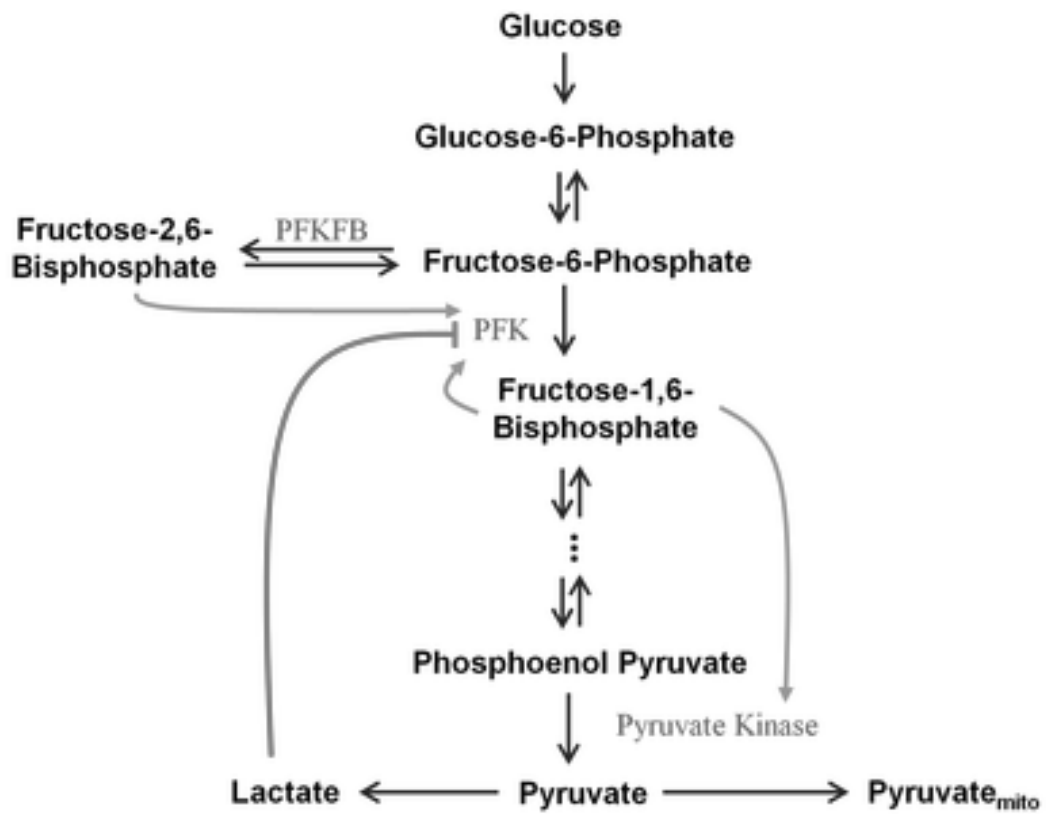
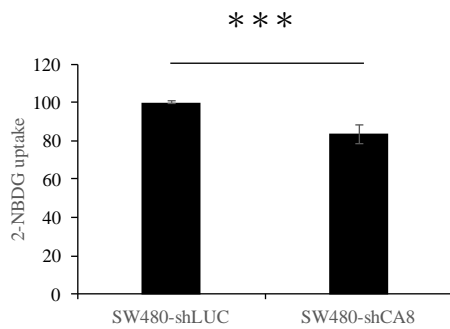


圖 S1. 糖解作用受到異構酶的調控而改變構型(摘錄自 Mulukutla et al., 2015)

A



B

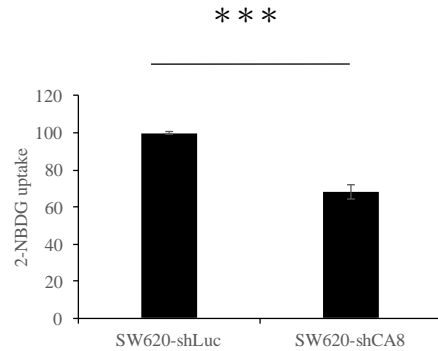


圖 S2. 下調 CA8 在 SW480 細胞和 SW620 細胞會降低葡萄糖攝取

(A) SW480-shLuc 和 SW480-shCA8，培養 24 小時後，最後 2-NBDG 處理 1 小時，再測定 480nm，這是經由三次獨立實驗統計，並且把 SW480-shLuc 當成基準 (100%) 平均值±SEM，* P < 0.05. **P < 0.01.數據 (B) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8，培養 24 小時後，最後 2-NBDG 處理 1 小時，最後以再測定 480nm。這是經由三次獨立實驗數據統計，並且把 SW620-shLuc 當成基準 (100%) 平均值±SEM，* P < 0.05. **P < 0.01.數據。來自張慧蘋製作

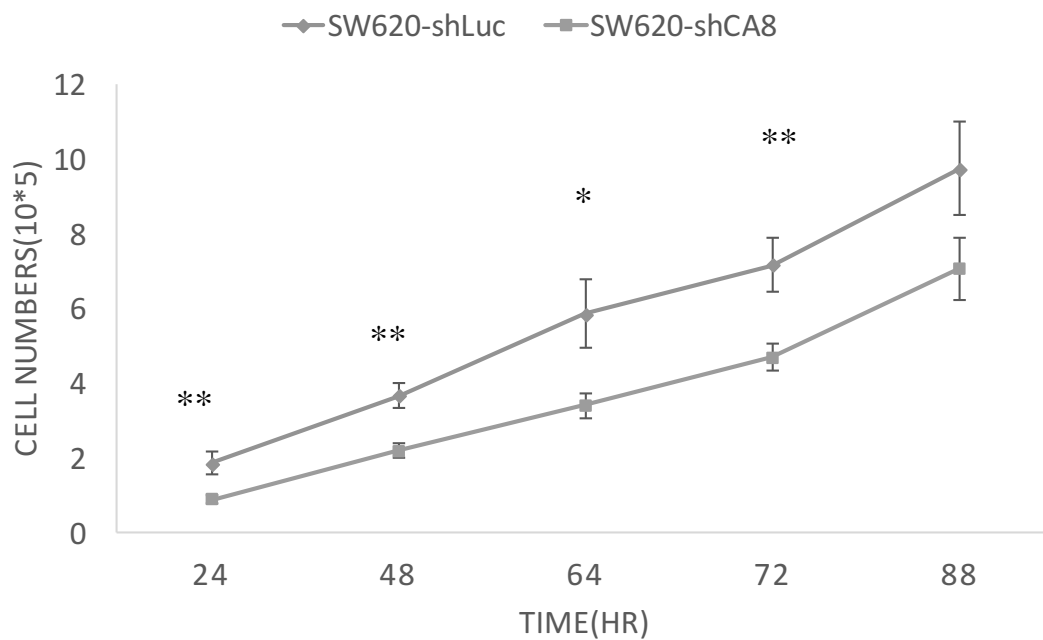
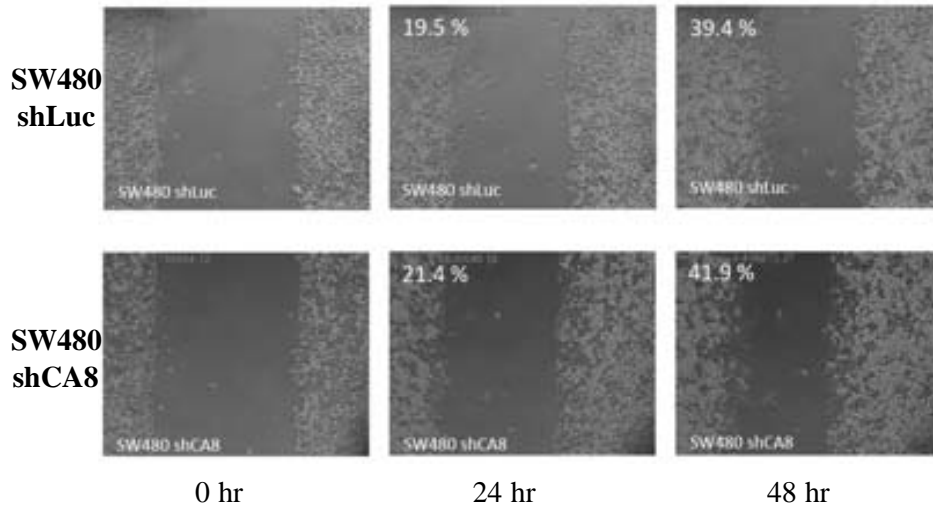


圖 S3. 下調 CA8 在 SW620 細胞當中會降低細胞生長

SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 細胞分別培養 24, 48, 64, 72, 88 小時，利用血球計數器計數細胞總量，這經由三次獨立實驗，數據平均值 \pm SEM，* P < 0.05. **P < 0.01.，n.s.= non-significant 數據來自張慧蘋製作。

A



B

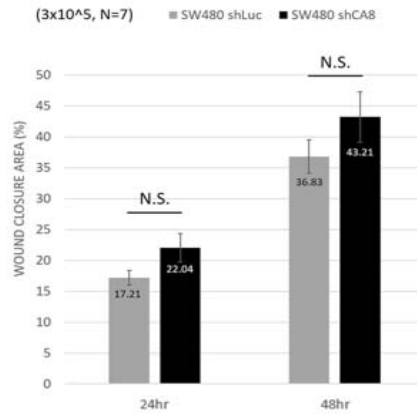
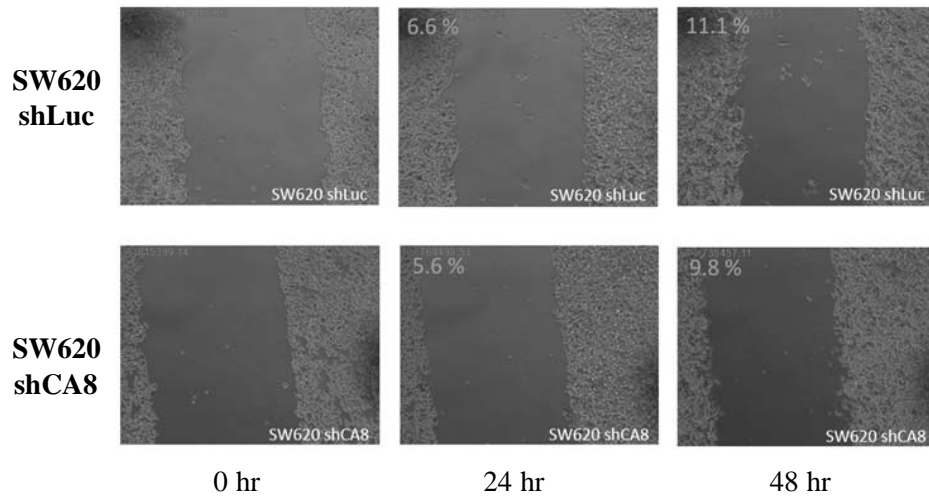


圖 S4. 下調 CA8 在 SW480 細胞當中並不影響細胞爬行的能力

(A) 5×10^5 的 SW480-shLuc 和 SW480-shCA8 中培養 24 小時後，在每一個孔盤中劃一道傷口，再分別培養 24 小時及 48 小時後測定傷口面積，再以拍照測定面積量 (B) 七次獨立實驗測定面積統計，平均值 \pm SEM，n.s.= non-significant。來自陳翊珊製作。

A



B

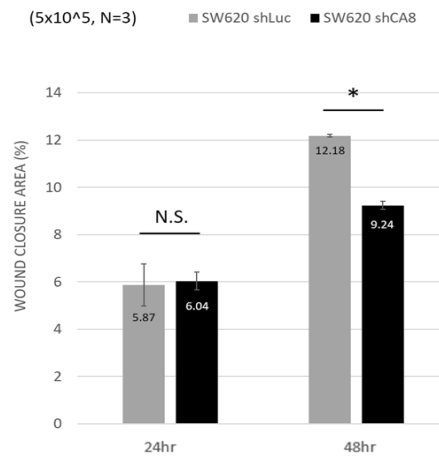


圖 S5. 下調 CA8 在 SW620 細胞當中會降低細胞爬行的能力

(A) SW620-shLuc 和 SW620-shCA8 中培養 24 小時後，在每一個孔盤中劃一道傷口，再分別培養 24 小時及 48 小時後測定傷口面積，再以拍照測定傷口面積量 (B) 三次獨立實驗測定後，把傷口面積換算成百分比再以平均值 \pm SEM，* P < 0.05.，n.s.= non-significant。來自陳翊珊製作。

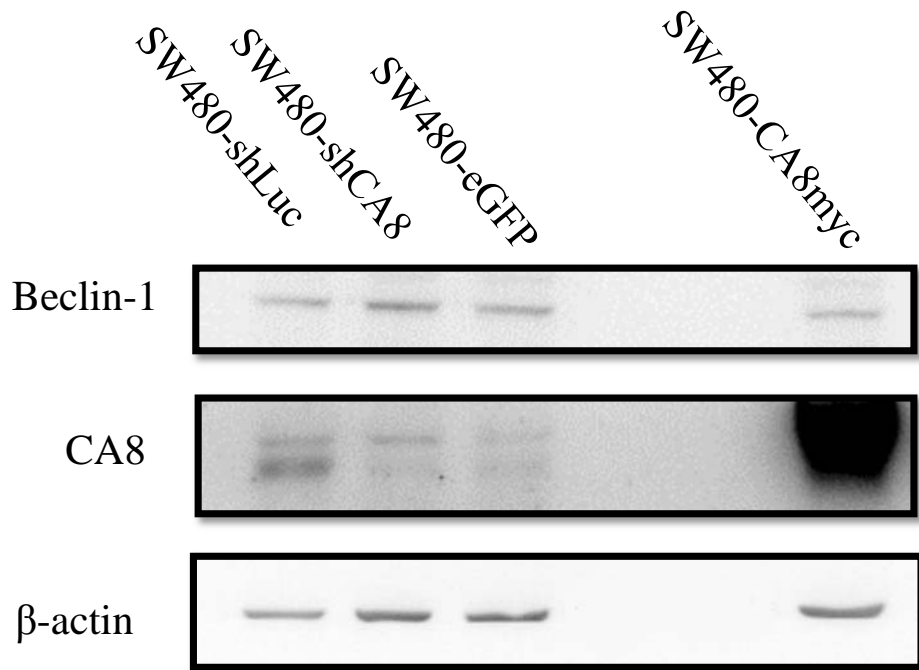


圖 S6. CA8 在 SW480 細胞當中對於 Beclin-1 的表達影響

SW480-shLuc, SW480-shCA8, SW480-eGFP 和 SW480-CA8myc 細胞，

經由培養繼代 48 小時後，利用西方墨點法檢測分析 Beclin-1 的表

達。來自張俞安製作。

圖表 1. 抗體稀釋比例

抗體名	廠商	稀釋比例	二抗濃度	備註
CA8	Santa Cruz	1:2000	1:5000	全程 2.5% 牛奶
p-Akt(ser473)	Cell signal	1:2000	1:5000	
Akt total	Cell signal	1:2000	1:5000	
p-AMPK(Thr172)	Cell signal	1:2000	1:5000	
AMPK	Santa Cruz	1:2000	1:5000	
p-mTOR	Cell signal	1:2000	1:5000	
mTOR	Cell signal	1:2000	1:5000	
Beclin-1	Gene tex	1:5000	1:5000	
p53	HDSB	1:3000	1:5000	
LC-3B	Cell signal	1:2000	1:5000	
PARP	Gene tex	1:5000	1:5000	
Caspase-3	Cell signal	1:2000	1:5000	
Glut-3	abcame	1:3000	1:5000	全程 2.5% BSA
Beta-actin	novus	1:10000	1:10000	
p-Bad	Cell signal	1:1000	1:5000	

Bad	BD	1:1000	1:5000	
p-FAK	BD	1:2000	1:5000	全程 2.5% 牛奶
FAK	Santa Cruz	1:2000	1:5000	全程 2.5% 牛奶
PFK	Gene tex	1:5000	1:10000	
HK-I	Gene tex	1:5000	1:5000	