

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：趙偉廷

Chao, Wei Ting

鈉離子通道阻斷劑 *Phenytoin* 與化療藥物 *Paclitaxel*

共同使用對於三陰性乳癌具有治療潛力

Phenytoin, the sodium channel inhibitor, combined with

Paclitaxel is the potential treatment for triple negative

breast cancer cell.

研究生：黎楊炫

Li, Yang Shen

中華民國 107 年 07 月 13 日

東海大學生命科學系碩士論文

鈉離子通道阻斷劑 *Phenytoin* 與化療藥物 *Paclitaxel*

共同使用對於三陰性乳癌具有治療潛力

Phenytoin, the sodium channel inhibitor, combined with
Paclitaxel is the potential treatment for triple negative
breast cancer cell.

研究生：黎楊炫

Li, Yang Shen

指導教授：趙偉廷

Chao, Wei Ting

中華民國 107 年 07 月 13 日

誌謝

轉瞬即逝的研究所生活順利地結束了。在其中最感謝的人是指導教授，趙偉廷老師。在實驗上老師給我們學生非常大的自由度還有課程的配合，得以讓我做許多各式樣的實驗，而不只是單單侷限在實驗範圍內，因此也學習到了許多此篇論文所用之外的實驗技巧，諸如 RNA 的萃取；活體的保定、注射；電子顯微鏡的樣本製作與上機…等。也感謝老師同意讓我去學習使用全細胞篩制技術，這項技術麻煩了指導老師幫忙拜託陳仁祥老師指導我學習。遙想一開始自大狂妄的以為學習全細胞篩制技術應該是沒有什麼困難的，結果卻是一路跌跌撞撞。真的是感謝陳老師願意不厭其煩的細心教導，在百忙之中還時常被我打擾請教問題。也很感謝兩家實驗室中的學弟妹，交接給我先前的文獻以及實驗操作上的經驗。諸多事情何以言表，真的是可以體會到當年小時候所讀的課文中所提到的謝天，該感謝的太多了就謝天吧。再次感謝趙偉廷老師、陳仁祥老師、恩馨學姊、瀛丰學姐、楊仁龍學弟、邱相齡學妹、張育維學妹、施景皓學弟以及其他在實驗上幫助我的卻沒有提到的實驗室學弟妹們。謝謝。

目錄

Abstract.....	1
摘要	3
一、 前言	5
三陰性乳癌（Triple-negative breast cancer；TNBC）	5
乳癌的化療藥物-紫杉醇（ <i>Paclitaxel</i> ）	6
離子通道與癌細胞的研究.....	7
鈉離子通道抑制劑本妥英（ <i>Phenytoin</i> ）與癌細胞的研究	8
研究目的.....	9
研究策略.....	10
二、 材料與方法	11
細胞株培養.....	11
藥物處理.....	11
細胞存活率.....	11
傷口癒合（Wound healing）實驗.....	12
西方點墨法.....	12
全細胞膜片箝制技術（whole-cell patch-clamp）	13

三、 結果	16
<i>Phenytoin</i> 對於乳癌細胞並無明顯的毒性	16
<i>Paclitaxel</i> 對於乳癌細胞的毒殺作用	16
<i>Phenytoin</i> 的處理並不會增強 <i>Paclitaxel</i> 對細胞的毒殺效果	17
<i>Phenytoin</i> 可抑制細胞爬行能力	18
<i>Phenytoin</i> 結合使用 <i>Paclitaxel</i> 可有效抑制細胞爬行能力	18
<i>Phenytoin</i> 對於如 pFAK、pAKT 細胞爬行相關之訊息傳遞蛋白之影響	19
處理藥物 <i>Paclitaxel</i> 後，MDA-MB-231 細胞株的鈉離子電流.....	20
四、 討論	21
五、 參考文獻	25
六、 圖表	32

表目及圖目

圖 一、藥物的化學結構.....	32
圖 二、 <i>Phenytoin</i> 和 <i>Paclitaxel</i> 兩者間的交互作用	33
圖 三、藥物 <i>Phenytoin</i> 與 <i>Paclitaxel</i> 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上的毒殺效果.....	34
圖 四、不同處理情況的藥物 <i>Phenytoin</i> 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上的毒殺效果.....	35
圖 五、不同藥物濃度的 <i>Phenytoin</i> 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上抑制細胞爬行效果	36
圖 六、不同藥物濃度的 <i>Phenytoin</i> 結合使用 <i>Paclitaxel</i> 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上抑制細胞爬行效果	37
圖 七、藥物處理後利用西方點墨法分析訊息傳遞路徑蛋白的表現	38
圖 八、藥物處理後以全細胞膜片箝制實驗所得的 IV 曲線圖	39
圖 九、 <i>Paclitaxel</i> 會降低 VGSC 的表達進而降低細胞爬行能力.....	40

Abstract

There are many different kinds of breast cancer treatments, such as radiation therapy, hormonal therapy, and targeted drug therapy. Triple-negative breast cancer cells have no estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 receptor on the surface of cell membranes. Therefore, targeted drugs or hormone therapy are not applicable, and only traditional chemotherapy drugs can be applied. The first line of chemotherapy drug for treating breast cancer is *paclitaxel*. The mechanism of *paclitaxel* is to inhibit cell division through tubulin disruption, and the cancer cell will be inhibited to grow. However, the side effect will affect the normal cell too. Ion channel receptor such as sodium channel has been shown to be expressed on the triple-negative breast cancer cells; and is associated with cell motility. Other studies show the result about inhibiting the sodium channel and the ability of triple negative cancer cell migration will reduce. Therefore, this study is to investigate whether low dose *paclitaxel* combined with *phenytoin*, a sodium channel inhibitor, can be a potential treatment for triple-negative breast cancer. Cell viability and migration were monitored for the drug efficacy; signal protein expressions and patch clamp experiment were used to investigate the

mechanism of *paclitaxel* and *phenytoin*. The results demonstrated that *phenytoin* has no effect on cell growth in triple negative breast cancer cells; however, and that low dose *paclitaxel* combined with *phenytoin* can inhibit cell migration. The signal transduction of pFAK, pAKT, and pMAPK do not show the relevance of *phenytoin* treatment. This study demonstrated that *paclitaxel* combined with *phenytoin* can suppress cell migration in triple negative breast cancer cells, however, whether the efficacy of *phenytoin* is through others signaling pathway requires further study.

摘要

現今有許多不同的癌症治療方法，像是放射線治療、賀爾蒙治療，或是標靶藥物治療。由於三陰性乳癌的細胞膜表面上沒有動情激素受體、黃體素受體和 HER-2 受體，所以無法使用賀爾蒙治療和標靶藥物治療，仍只能以化學治療作為主要的治療方式。目前第一線常用的化療藥物為 *Paclitaxel*，其機制為抑制細胞分裂使細胞自我凋亡，缺點是身體中其他活躍地分裂的細胞也會被影響。離子通道蛋白像是鈉離子通道蛋白會表現在三陰性乳癌的細胞膜表面上，且與細胞的爬行能力相關。前人的研究發現，將鈉離子通道抑制住時可降低三陰性乳癌的爬行能力，因此本研究是想探討使用低濃度的 *Paclitaxel* 結合 *Phenytoin* 用於治療三陰性乳癌是否具有治療的潛力。實驗主要從細胞的存活度和爬行能力來觀測藥物的藥效，同時也為了判斷藥物的作用機制，從細胞的訊息傳遞路徑以及全細胞膜片箝制技術的結果中觀察，探討藥物的使用為何有效。實驗結果顯示 *Phenytoin* 對於三陰性乳癌細胞不具毒性，而搭配上低濃度的 *Paclitaxel* 能更進一步的抑制細胞爬行。而其中的分子機制在目前實驗結果，加入 *Phenytoin* 和 *Paclitaxel* 後細胞中的 pMAPK、pFAK 和 pAKT 與細胞爬行能力之間沒有顯著的關聯。本研究結果顯示 *Paclitaxel* 與 *Phenytoin* 結合可有效抑制三陰性乳癌細

胞爬行，而沒有預期外的毒性，至於 *Phenytoin* 是否影響其他細胞爬行能力的訊息傳遞路徑，則需進一步實驗證明。

一、 前言

三陰性乳癌（Triple-negative breast cancer；TNBC）

癌細胞的生長需要細胞外的刺激來促進細胞分裂，像是賀爾蒙或是生長因子，然而並非所有的癌細胞生長都依靠一樣的刺激來源，像是三陰性乳癌其腫瘤細胞特性是荷爾蒙受體（ER：estrogen receptor 動情激素接受體／PR：progesterone receptor 黃體激素接受體）及人類表皮因子接受體（HER2）皆為陰性，不表達在細胞膜上。其細胞生長的活化是由於 BRCA1（腫瘤抑制基因）突變（Y Miki, J, 1994），而導致異常增生。三陰性乳癌在乳癌中約佔 10%－25%（Seung Taek Lim, 2018），也就是說有這麼多的乳癌病患是無法受惠於現今的標靶藥物治療和賀爾蒙藥物治療的。因此在找尋新的治療目標上是很重要的。

癌症的標靶治療都是針對特定的生物標記，尤其是細胞膜上與生長有關的接受器通常都成為藥物抑制的目標。在乳癌上，若腫瘤細胞的 ER 或 PR 陽性，稱其為荷爾蒙受體陽性，這類病患能以荷爾蒙療法治療；若是 HER2 有明顯表現，則為 HER2 陽性。大眾常見的 anti-HER2 標靶藥物，如賀癌平（Trastuzumab）、泰嘉錠（Lapatinib），只對這類病患有幫助；而 ER、PR、及 HER2 皆呈現陰性者，就稱為三陰性乳癌。根據美國臨床腫瘤學會的指南定義為 ER<1%，PR<1%，HER2/0 或 HER2/1+（Brian D. Lehmann, 2011）。三陰性乳癌約佔所有乳

癌的 10-25%左右，相對於前兩者，三陰性乳癌的治療選擇相當有限，幾乎僅能以化療為主。

三陰性乳癌較為容易發生於年輕（小於 40 歲）的病患。常呈現高惡性度也易有淋巴結轉移，且轉移程度常與原發腫瘤的大小無關（原發腫瘤可能還很小，卻已轉移至腋下淋巴結）。與其他乳癌種類相比，復發的機會較高，腦部轉移的比例也高。一旦轉移或復發，由於可用的藥物治療選擇比其他類型乳癌少，因此預後狀況差。

乳癌的化療藥物-紫杉醇 (*Paclitaxel*)

紫杉醇 *Paclitaxel* 是從太平洋紫杉 (*Taxus brevifolia*) 樹皮所提煉而得到的萃取物 (圖一、A)，其具有獨特的作用機轉，可影響細胞內的微管系統，是細胞有絲分裂抑制劑。當細胞分裂時會形成大量的微管，也就是有絲分裂時星狀體的紡錘絲。一般而言在染色體分佈至兩子細胞後這微管系統便會進行分解，完成細胞分裂。當 *Paclitaxel* 存在時可抑止微管的分解過程，使細胞停止在細胞週期的 G2 與 M 期，進而導致死亡 (Weimin Fan, 1999)。 *Paclitaxel* 目前在癌症治療的臨床上，多應用於乳癌以及卵巢癌的治療上，在過去已有許多研究。舉些例子：以標靶藥物的概念合成新的抗 HER2 蛋白，rhuMAb HER2，其與 *Paclitaxel* 結合使用可以增加 *Paclitaxel* 在乳癌上的毒殺效果 (Jose

Baselga, 1998)。Trastuzumab 與 *Paclitaxel* 共同使用，在有 HER2 表達的乳癌病患上具有降低癌細胞轉移的效果（Andrew D. Seidman, 2001）。大部分化療藥物會活化 NF- κ B 路徑，導致細胞具有抗藥性，而 Curcumin 可以抑制這一路徑。因此將 *Paclitaxel* 與 Curcumin 共同使用，可降低由 *Paclitaxel* 所引發的 NF- κ B 路徑（Bharat B. Aggarwa, 2005）。上述都是 *Paclitaxel* 用於癌症的研究，觀察結合其他藥物是否可以抑制由 *Paclitaxel* 所引發的抗藥性；或是合併藥物看其對於乳癌的治療效果是否有更優秀的結果。

離子通道與癌細胞的研究

細胞膜上除了已知的與生長相關的接受器外，其實還有非常多的穿膜蛋白分佈在細胞膜上，像是離子通道蛋白。在近年來的研究中也發現到離子通道與癌細胞的行為有密切關係，像是鉀離子通道的研究對於癌細胞的爬行能力有所影響（Xi Huang, 2014）、鈣離子通道的研究對於癌細胞的增殖、爬行、生長週期有關（Gregory R. Monteith, 2012）、鈉離子通道的研究與癌腫瘤的生長和爬行也是有所相關的（Ming Yang, 2012）。在早期，由於離子通道蛋白的化學特性與細胞內生長因子調控的訊息傳遞蛋白兩者間有很大的不同，過去的研究通常都是分

開討論的。但是近期的研究結果中發現，離子通道不再只是單單調節滲透壓與神經脈衝而已，也與細胞的生存有相關聯。與癌細胞的轉移能力、增殖能力、細胞生長週期有不可忽視的關聯性。但由於這一部分的研究尚在新興階段，大部分的離子通道與細胞內訊息傳遞路徑之間的關聯性尚不明確，所以這一部分也是很值得去研究的領域。

鈉離子通道抑制劑本妥英（*Phenytoin*）與癌細胞的研究

Phenytoin（圖一、B），常用於治療癲癇。當腦部產生不受控制的電流訊號，導致腦部功能短暫的改變，產生肢體抽搐、思考受損等症狀，當以上的症狀反覆發生稱為癲癇。由於 *Phenytoin* 可阻斷鈉離子通道，當神經不正常放電，而體內 *Phenytoin* 藥物維持在一定濃度時，可以抑制鈉離子通道，因此神經不容易產生動作電位而失控。

Phenytoin 常見的攝取方式是藉由口服或靜脈注射。

近期有許多的研究證實，當有表現出鈉離子通道的癌細胞其鈉離子通道被阻斷時，細胞的爬行能力會因此下降。在癌細胞研究中常可以看到使用河豚毒素 Tetrodotoxin (TTX) 作為強效的鈉離子通道阻斷劑進行實驗。而其實驗結果在乳癌細胞中使用 TTX 之後，與使用 *Phenytoin* 作為實驗用藥所呈現的結果大致上是相同的 (Ming Yang, 2012)。具體來說，在癌細胞 MDA-MB-231 細胞株（三陰性乳癌）中

有表達鈉離子通道，處理上述兩者藥物後，細胞的爬行能力皆下降了。而對照組 MCF-7 細胞株（ER 陽性）細胞膜表面上沒有表達鈉離子通道，而在處理上述兩種藥物後，對於其爬行能力並沒有影響。但由於 TTX 是個強力毒藥，而 *Phenytoin* 在臨床治療上使用得更久以及對於副作用的掌握更明確，因此在藥物的選擇上會偏向選擇以 *Phenytoin* 作為治療癌症的實驗用藥。

研究目的

由於三陰性乳癌的細胞膜表面上並沒有表達常見的 ER、PR 和 HER2 蛋白，在標靶治療上極為困難，因此尋找其他在細胞膜表面上且有潛力用於治療癌症的蛋白做為治療的目標極為重要。離子通道蛋白在各種細胞膜的表面上，有多種功用，如神經傳遞（鈉離子通道、鉀離子通道）、肌肉收縮（鈣離子通道）、調節滲透壓等，因此是一個可以做為開發新標靶藥物的目標蛋白。搜尋文獻發現，鈉離子通道和癌細胞轉移能力有相關性（Ming Yang,2012），具有抑制細胞爬行的能力，但並沒有和 *Paclitaxel* 合併使用的研究（Fabiola ,M, 2015）。由於臨床上在進行三陰性乳癌治療時都會合併使用 *Paclitaxel*，因此本研究的目的在於探討當兩者藥物同時作用時，是否具有合併使用的效果；或是不影響化療的前提下有提升治療的效果。另外離子通道蛋白的結

構與化學特性與其他細胞內生長因子調控的訊息傳遞蛋白大相逕庭，過去的研究通常都是分開討論的。*Phenytoin* 這個藥物的機轉為抑制鈉離子通道，而且發現也可以降低細胞爬行的能力，但大多沒有討論有關於訊息傳遞路徑的部分。因此本研究的另一個目的是探討鈉離子蛋白與細胞訊息傳遞路徑的關聯性（圖二）。

研究策略

檢測同時使用兩者藥之後是否會影響藥物的毒性、細胞的爬行能力、藥物間的機轉、以及 *Paclitaxel* 是否會影響鈉離子通道。由於 *Phenytoin* 的機轉為抑制鈉離子通道，且其有抑制細胞爬行的效果，而 *Paclitaxel* 也有抑制細胞爬行的效果，所以我們會檢測是否 *Paclitaxel* 也和鈉離子通道相關。我們使用了四種研究方法。首先在藥物毒性方面，先使 MDA-MB-231 細胞株處理藥物 24 小時，組別為 *Phenytoin* 與 *Paclitaxel* 和兩者結合，過後使用細胞計數器進行計算。細胞爬行能力，同樣處理藥物三個組別各 24 小時後，再使用傷口癒合(Wound healing) 實驗觀察細胞爬行的表現與速率。其機轉會使用西方點墨法檢查細胞的訊息傳遞路徑中與細胞爬行相關的蛋白質是否被抑制或是活化。另外 *Paclitaxel* 也有能力抑制細胞爬行，所以會嘗試檢測在處理過 *Paclitaxel* 的細胞其細胞膜電流上的表現是否也會和 *Phenytoin* 相同。

二、 材料與方法

細胞株培養

MDA-MB-231 屬於高轉移性惡性乳腺癌細胞，常用於癌症腫瘤轉移實驗。MDA-MB-231 細胞株培養在含有 5% 小牛血清 FBS 與抗生素的 DMEM 培養液（Dulbecco's modified eagle medium, Gibco）中，培養箱內維持 5% 的二氧化碳及 37 °C 的環境。

藥物處理

Paclitaxel 以 PBS 配製成 1 μ g/ml 存放在室溫下，使用時再利用培養液稀釋至所需的濃度；*Phenytoin* 粉末溶於 0.1M 的 NaOH 溶液中，配製成濃度 180mM 保存於 -20 °C 冰箱中，使用時再利用培養液稀釋至所需的濃度。由於 *Phenytoin* 不易溶於水中，因此在配製時須注意是否已經結晶。

細胞存活率

以 0.05×10^6 個細胞種在 24 孔盤培養皿中，待一天至細胞貼上培養皿後再以 *Phenytoin* 處理 24 小時，組別依序是控制組、10 μ M、50 μ M、150 μ M；*Paclitaxel* 處理 24 小時，組別依序是控制組、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml；兩者藥物合併使用處理 24 小時，組別分別是固定 *Paclitaxel*

濃度在 20ng/ml 和 1ng/ml 依序測試 *Phenytoin* 藥物濃度 0 μ M、10 μ M、50 μ M、150 μ M。藥物處理 24 小時後以 trypsin 將細胞從培養皿上取下來，以細胞記數器記數。每個組別數三次平均為一個樣本，樣本數皆為三。

傷口癒合 (Wound healing) 實驗

將 0.6×10^6 個細胞種至 35mm 培養皿中，24 小時後處理藥物 *Phenytoin* 24 小時，組別依序是控制組、10 μ M、50 μ M、150 μ M。兩者藥物合併使用處理 24 小時，組別為固定 *Paclitaxel* 濃度 1ng/ml 依序測試 *Phenytoin* 藥物濃度 0 μ M、10 μ M、50 μ M、150 μ M。藥物處理 24 小時後將細胞劃一道縫隙並以倒立顯微鏡 (ZEISS Axiovert 200MAT, AxioVision LE) 拍攝照片，24 小時後再拍一次。將 24 小時後的時間點之中央沒有細胞的面積除以初始拍之面積為剩下的面積，再以 1 減之則為爬行的距離。

西方點墨法

使用 RAPI lysis buffer (25mM Tris-base, 150mM NaCl, 1%NP-40, 5%Glycerol, 1mM EDTA, 100 μ M sodium orthovanadate, 200 μ M PMSF, protease inhibitor cocktail) 萃取細胞的蛋白，並注入含有 30 μ g 蛋白的

RIPA lysis buffer 使用 SDS-PAGE 電泳進行跑膠。跑膠結束後利用濕式轉漬方法將蛋白轉漬至 PVDF 膜上，使用含有 5% 的脫脂牛奶配製於一倍的 PBST 中室溫 blocking 一個小時，清洗完後加入一級抗體 pFAK, pMAPK, pAKT, (1:1000, Cell signaling) 和 GAPDH (1:1000, SANTA CRUZ)，作用在 4 °C overnight。再使用與 HRP 結合的二級抗體 anti-rabbit (1:10000, Jackson) 室溫作用一個小時。利用 ECL 系統 (enhanced chemiluminescence, Millipore) 化學冷光反應進行顯色，再利用 MultiGel-21 (Topbio) 偵測冷光訊號，再以 GAPDH 定量其表現。

全細胞膜片箝制技術 (whole-cell patch-clamp)

Nav1.5 鈉通道電流以全細胞膜片箝制技術記錄 (Hamill et al, 1981, Brackenbury et al., 2010)。玻璃 (Borosilicate) 電極用水平式拉針器 Model P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) 製作並以 Narishige MF830 鍛燒器將電極前端火琢圓潤以利貼附於細胞膜表面上。

細胞外液之成分為：97.75 mM NaCl, 5mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, and 10 mM glucose (pH 7.3)。

細胞內液之成分為：94.25 mM CsCl, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM EGTA, 10 mM Heps, 10 mM sucrose (pH 7.3)。

紀錄時，細胞內液填充於玻璃電極內將電極前端下降至細胞外液，確

認電阻為 2 - 3 M Ω 。此實驗是以 DIGIDATA 1322A (Molecular Devices) 和 Axopatch 200A 放大器 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) 與電腦做紀錄，紀錄時 8-pole Bessel 濾波器設定於 2 kHz，取樣頻率為 20 kHz 且沒有另外補償電容。電腦紀錄軟體 (Clampex9.2, Molecular Devices) 顯示電流下降至約三分之二時 (電極已碰到細胞膜)，迅速給予負壓使細胞膜緊貼電極，電阻大於 10⁹ohm 時，代表細胞膜與電極已穩定的貼合。此時給予瞬間稍大的吸力將電極前端的細胞膜吸破，形成一個與電極相通但與外界隔絕的孔洞。用軟體測定電極電阻與細胞電容後，進行補償 (R-C compensation)，此時給予電壓刺激使細胞膜鈉離子通道開啟，並記錄細胞電流。將膜電壓維持在 -100mV (holding potential)，給予一系列由 -100mV 至 +50mV 的膜電壓 (間隔為 10mV)。而後分析資料由 Clampfit 10.6 軟體 (Molecular Devices) 以手動的方式在軟體中做資料的處理。

數據分析

利用全細胞膜片箝制技術 (whole-cell patch-clamp) 記錄之細胞電流透過 Clampfit 10.6 軟體分析 (Molecular Devices)。擷取不同膜電壓所得之通道電流並除於該細胞所測得之電容值，製作鈉離子通道電流密度與電壓關係圖 (IV curve)。對於 -20mV 之電流密度，以 two sample t-test 比較控制組的鈉離子通道表達和處理藥物 *Paclitaxel* 組別的鈉離子通道表達兩者間是否有差異。電流密度大小除特別標示外以平均值 \pm 標準差表示。

三、結果

Phenytoin 對於乳癌細胞並無明顯的毒性

實驗首先試驗以不同濃度的藥物對細胞的存活度測試，單一藥物濃度設定，*Phenytoin* 的藥物濃度組別為 0 μ M、10 μ M、50 μ M、150 μ M（圖三、A），此藥物濃度設定是因為病患使用這項藥物時，藥物在血中濃度須達 10 μ M–20 μ M，而在攝取時的原劑量濃度約為 50 μ M，以及此藥不易溶於水中（在到達濃度 150 μ M 以上時藥物在室溫中會結晶）。結果可以觀察到，細胞存活率不會因為 *Phenytoin* 的藥物濃度而有所影響。隨著藥物濃度的上升，細胞的存活率在各組間沒有差異。這在先前的參考文獻中也是得到一樣的結果。

Paclitaxel 對於乳癌細胞的毒殺作用

Paclitaxel 藥物濃度的測試組別為 0 ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml（圖三、B），其結果隨著藥物濃度越高，細胞的存活率就越低，且在濃度約為 10ng/ml 時細胞存活度便低於 50%。由於 *Paclitaxel* 藥物本身會導致細胞分裂異常而使細胞自我凋亡，因此得到的結果符合預期。

Phenytoin 的處理並不會增強 *Paclitaxel* 對細胞的毒殺效果

在藥物合併處理的實驗中，先以 1ng/ml 的 *Paclitaxel* 濃度進行實驗，因為 MDA-MB-231 細胞株在單一藥物進行細胞存活度實驗時，當藥物濃度在 10ng/ml 就已經高於 IC₅₀ 的劑量，另外 *Paclitaxel* 藥物本身亦具有抑制細胞爬行的能力，因此在結合兩者藥物進行細胞爬行實驗時為求可顯著地觀察 *Phenytoin* 抑制爬行的效果，實驗以較低劑量的 *Paclitaxel* 濃度處理細胞。在固定 *Paclitaxel* 濃度為 1ng/ml 的狀況下與 *Phenytoin* 共同使用進行試驗。可以看到在合併處理 24 小時藥物後，細胞存活率不會因為 *Phenytoin* 的濃度變化而有所影響（圖四、A），其中控制組也有加入 *Paclitaxel*。另外以濃度 20ng/ml 的 *Paclitaxel* 結合 *Phenytoin* 進行試驗，細胞存活率依舊不會因為 *Phenytoin* 的藥物濃度而有所影響（圖四、B），而其中控制組也有加入 *Paclitaxel*。此結果顯示細胞的存活度變化不是因為 *Phenytoin* 所造成，因此 *Phenytoin* 對於細胞並沒有毒殺效果，且也沒有因為濃度變化而增強 *Paclitaxel* 的毒殺效果。

Phenytoin 可抑制細胞爬行能力

依據 *Phenytoin* 在細胞存活度實驗所使用之藥物濃度，進行細胞爬行實驗。先以單一藥物 *Phenytoin* 進行實驗（圖五、A），可觀察到隨著藥物濃度的提升抑制爬行的能力越好，並且在濃度 $150\mu\text{M}$ 的條件下可觀察到顯著的差異。從倒立顯微鏡所拍攝的照片中可以清楚發現，濃度 $150\mu\text{M}$ 這一組別除了傷口癒合的面積變小之外（圖五、B），前沿細胞爬向傷口中間的數量也變得比其他組別少。

Phenytoin 結合使用 *Paclitaxel* 可有效抑制細胞爬行能力

結合使用 *Phenytoin* 與 *Paclitaxel* 藥物結合使用進行實驗（圖六、A）。使用 *Paclitaxel* 藥物濃度為 1ng/ml 的主要因素在於，*Paclitaxel* 藥物本身有抑制細胞爬行的能力且會毒殺細胞，當使用較高濃度 *Paclitaxel* 進行實驗時，所有組別的細胞株都不會移動。為了凸顯實驗中 *Phenytoin* 的藥效，而將 *Paclitaxel* 的用量降低。當兩者藥物同時使用的結果做數據分析可以看到，細胞爬行能力被更有效的抑制（圖六、B）。控制組本身也有加入 *Paclitaxel* 藥物 1ng/ml ，其中細胞的爬行能力已經有被抑制，而加入 *Phenytoin* 藥物後細胞的爬行能力能被抑制的更好。在 *Phenytoin* 在 $10\mu\text{M}$ 的濃度條件下與控制組相比就已有顯著

的差異。另外也可以在倒立顯微鏡所拍攝的照片中觀察到，往中間爬行的前沿細胞數目與控制組相比數量較少。

***Phenytoin* 對於如 pFAK、pAKT 細胞爬行相關之訊息傳遞蛋白之影響**

當我們看到 *Phenytoin* 可抑制細胞爬行能力時，希望更進一步的瞭解其機轉與原因。是否 *Phenytoin* 這藥物與分子訊息傳遞路徑有相關性？我們以西方點墨法直接觀察常見的細胞爬行蛋白 pFAK、pAKT 的表達(圖七)。此兩種訊息傳遞路徑皆是常見的細胞爬行相關蛋白，且在先前文獻也有提到鈉離子通道可能會通過第二訊息傳遞分子與 Src 蛋白有關 (Sébastien Roger, 2015)。圖中結果可以觀察到，藥物處理之後的細胞其與細胞爬行相關訊息傳遞蛋白 pFAK、pAKT 並沒有顯著的差異，推測可能與更下游的訊息傳遞蛋白有關聯。目前鈉離子通道與訊息傳遞蛋白間的相關實驗文獻較少，未來可以繼續實驗其他的訊息傳遞蛋白，如 Src 蛋白也與細胞爬行相關。

處理藥物 *Paclitaxel* 後，MDA-MB-231 細胞株的鈉離子電流

參考文獻中有提到藥物鈉離子通道與細胞爬行的關聯性 (Ming Yang, 2012)。 *Phenytoin* 可阻斷鈉離子通道進而抑制細胞爬行，在藥物 *Paclitaxel* 中也有觀察到抑制細胞爬行的效果，因此想觀察 *Paclitaxel* 對於鈉離子電流是否也有影響。於是我們使用全細胞膜片箝制技術來進行實驗 (圖八)。以電流變化最大處做觀察 (圖八、A)，在-20mV 時。處理 *Paclitaxel* 後細胞膜鈉離子電流的密度與控制組相比有減少的趨勢，平均值由電流 4.5057pA/pF 降至 1.0876pA/pF，統計結果上雖無顯著差異 (圖八、B)，但由於樣本數少 (樣本數為四)，因此標準差較大。若是增大樣本數，標準差將會減小，結果可能會更明顯。

四、討論

本研究的主要目的是希望能夠藉由離子通道做為癌症藥物的目標以彌補特定病人細胞生長相關接受器表達的不足，無法進行標靶藥物治療的困境。由於先前有許多的研究是測試 *Phenytoin* 與癌細胞爬行的相關性，但是其中未有與 *Paclitaxel* 合併使用的結果(Fabiola Martin, 2015)，而臨床上在三陰性乳癌的臨床治療上通常都需投予第一線化療藥物 *Paclitaxel*，因此本研究則欲驗證兩種藥物結合使用的影響。

在細胞爬行實驗中雖有減少 *Paclitaxel* 的濃度，其主要是為了凸顯出 *Phenytoin* 的抑制爬行效果，因為高濃度的 *Paclitaxel* 所造成的細胞毒性會影響細胞爬行結果，於此本研究並非透過實驗結果建議減少臨床使用 *Paclitaxel* 的藥濃度。而有關討論 *Paclitaxel* 的藥量部分，由於化療副作用極大，最終目的仍然是在找尋更好的方法治療三陰性乳癌，或許在將來的動物實驗中可以測試結合使用化療藥物 *Paclitaxel* 與 *Phenytoin* 以觀察是否能減少化療藥物的用量。*Phenytoin* 雖然在離體實驗中沒有抑制細胞生長的效果，但在動物實驗中卻是能減少癌腫瘤的大小 (Michaela Nelson, 2015)。另外未來也可以用臨床數據來找尋是否能佐證結合兩種藥物有更好的治療效果。如與臨床醫師合作，取得以 *Phenytoin* 為用藥的癲癇病患，並且同時罹患三陰性乳癌的病例做為比較的資料。而 *Phenytoin* 藥物在治療乳癌時也有用來作為神

經性止痛劑的例子，也可以當作臨床的案例。

而在分子機制的部分並沒有看到投藥後有所差別，猜想的結果除了可能有抗藥性的問題使得分子蛋白被補償之外，我們所使用的藥物濃度較低也會導致訊息傳遞分子的反應變得較不明顯。另外也有可能是被其他路徑所影響。在其他參考文獻有提到 (Michaela Nelson, 2015) 鈉離子或許會經由 Src 蛋白去調控細胞骨架的形成而影響爬行的效果，所以在未來的實驗中，可以使用西方點墨法做實驗觀察投以 *Phenytoin* 後 Src 蛋白在細胞中的表現 (圖九)。

而在最後全細胞膜片箝制技術中有觀察到在處理藥物 *Paclitaxel* 之後與控制組的細胞相比鈉離子電流有下降，對此有一個推測。由於 *Paclitaxel* 對於微管有所影響，而其中 γ tubulin 微管蛋白與細胞的極化有所關聯，極化可以使細胞有方向性從而運動。而細胞的運動與離子通道有關 (Xi Huang, 2014)，細胞會利用離子通道調控滲透壓，而使細胞型態的大小可以變大縮小。而 *Paclitaxel* 或許因其抑制微管蛋白的關係，間接的影響離子通道蛋白的表達。未來可進一步的利用抑制微管蛋白的藥物來做是否可以取得相同抑制鈉離子電流的結果，例如使用秋水仙素，其機轉為使微管蛋白無法聚合，觀察在投以藥物後，是否鈉離子電流的表達也會減少。還可使用免疫螢光染色的方法直接看細胞膜表面上的鈉離子通道蛋白是否減少了，以及鈉離子通道蛋白

在細胞中的分布。

另外有一推測，由於 *Phenytoin* 對於訊息傳遞分子沒有顯著的影響，且 *Paclitaxel* 會藉由某種方式使得細胞膜上表達的鈉離子通道減少，因此猜測降低細胞爬行能力的主要原因是鈉離子通道本身與細胞爬行運動有直接的關聯。由於 *Phenytoin* 對於鈉離子通道的作用是阻斷鈉離子的開啟，但是在培養細胞時與離子通道開關並無關連，而細胞的爬行能力還是降低了。前人研究，鈣離子與細胞爬行的蛋白之一 Vinculin 有關係，抑制鈣離子進入會影響到 Vinculin 的表達而使得細胞無法爬行 (Yuh-Cherng Guo, 2013)。而其中鈉離子通道的機制又是如何值得深入實驗。

結論

在先前已有許多實驗證實，當阻斷鈉離子通道時可以降低三陰性乳癌細胞的爬行能力。而 *Phenytoin* 這一鈉離子通道阻斷劑，不只是可以用來治療癲癇病患，更是發現可以應用在癌症治療上。在本實驗中也進行與化療藥物結合使用時，*Phenytoin* 不會因此產生毒性，也不會增強 *Paclitaxel* 的毒殺效果。再加上此藥已使用多年對於副作用的掌握亦瞭如指掌，具有應用在臨床上的潛力。而本實驗中也首度發現 *Paclitaxel* 會降低鈉離子通道表達，也是一個很好的方向證實細胞

爬行能力與離子通道之間的相關性。即使 *Paclitaxel* 對離子通道的影響不一定是控制通道的開合，可能通過其他機制來影響細胞爬行，這樣的結果不受離子通道狀態影響，更能應用在癌症治療。以離子通道蛋白做為新的標靶藥物的目標很有可能是藥物發展新的方向。

五、 参考文献

Andrew D. Seidman, Monica N. Fornier, Francisco J. Esteva, Lee Tan, Stamatina Kaptain, Ariadne Bach, Katherine S. Panageas, Crispinita Arroyo, Vicente Valero, Violante Currie, Teresa Gilewski, Maria Theodoulou, Mary Ellen Moynahan, Mark Moasser, Nancy Sklarin, Maura Dickler, Gabriella D' Andrea, Massimo Cristofanilli, Edgardo Rivera, Gabriel N. Hortobagyi, Larry Norton, and Clifford A. Hudis. (2001) Weekly Trastuzumab and *Paclitaxel* Therapy for Metastatic Breast Cancer with Analysis of Efficacy by HER2 Immunophenotype and Gene Amplification. *Journal of Clinical Oncology*.
10.1200/JCO.2001.19.10.2587

Anutosh Ganguly, Hailing Yang, and Fernando Cabral (2010)
Paclitaxel-dependent cell lines reveal a novel drug activity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 10.1158/1535-7163.MCT-10-0552

Bharat B. Aggarwal, Shishir Shishodia, Yasunari Takada, Sanjeev Banerjee, Robert A. Newman, Carlos E. Bueso-Ramos, and Janet E. Price. (2005)
Curcumin Suppresses the *Paclitaxel*-Induced Nuclear Factor- κ B Pathway in Breast Cancer Cells and Inhibits Lung Metastasis of Human

Breast Cancer in Nude Mice. *Clinical Cancer Research*.

10.1158/1078-0432.CCR-05-1192

Brian D. Lehmann, Joshua A. Bauer, Xi Chen, Melinda E. Sanders, A. Bapsi Chakravarthy, Yu Shyr, and Jennifer A. Pietenpol. (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*.
10.1172/JCI45014

CM Armstrong and F Bezanilla. (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *Journal of General Physiology*.
10.1085/jgp.70.5.567

Daniela A. Brito, Zhenye Yang, and Conly L. Rieder. (2008). Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *The Journal of Cell Biology*. 10.1083/jcb.200805072

Fabiola Martin, Chiedu Ufodiama, Ian Watt, Martin Bland, and William J. Brackenbury. (2015) Therapeutic value of voltage-gated sodium channel inhibitors in breast, colorectal, and prostate cancer: a systematic review. *Frontiers in Pharmacology*. 10.3389/fphar.2015.00273

Fawzi Aoudjit and Kristiina Vuori. (2001) Integrin signaling inhibits

Paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*.

10.1038/sj.onc.1204554

Gregory R. Monteith, Felicity M. Davis, and Sarah J. Roberts-Thomson (2012)

Calcium Channels, and Pumps in Cancer: Changes and Consequences.

Journal of Biological Chemistry. 10.1074/jbc.R112.343061

Jose Baselga, Larry Norton, Joan Albanell, Young-Mee Kim, and John

Mendelsohn. (1998) Recombinant Humanized Anti-HER2 Antibody

(Herceptin™) Enhances the Antitumor Activity of *Paclitaxel* and

Doxorubicin against HER2/neu Overexpressing Human Breast Cancer

Xenografts. *Cancer research*. Published July 1998

Lucie Brisson, Virginie Driffort, Lauriane Benoist, Mallorie Poet, Laurent

Counillon, Ester Antelmi, Rosa Rubino, Pierre Besson, Fabien Labbal,

Stéphan Chevalier, Stephan J. Reshkin, Jacques Gore, and Sébastien

Roger. (2013) Nav1.5 sodium channels allosterically regulate the NHE-1

exchanger and promote breast cancer cell invadopodial activity. *Journal*

of Cell Science. 10.1242/jcs.123901

Michaela Nelson, Ming Yang, Adam A Dowle, Jerry R Thomas, and William J Brackenbury. (2015) The sodium channel-blocking antiepileptic drug *Phenytoin* inhibits breast tumour growth and metastasis. *Molecular Cancer*. 10.1186/s12943-014-0277-x

Michaela Nelson, Ming Yang, Rebecca Millican-Slater, and William J. Brackenbury. (2015) Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget*. 10.18632/oncotarget.5441

Ming Yang, David J. Kozminski, Lindsey A. Wold, Rohan Modak, Jeffrey D. Calhoun, Lori L. Isom, and William J. Brackenbury. (2012) Therapeutic potential for *Phenytoin*: targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 10.1007/s10549-012-2102-9

Rui Gao, Jing Wang, Yi Shen, Ming Lei, and Zehua Wang. (2009) Functional Expression of Voltage-Gated Sodium Channels Nav1.5 in Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 10.1007/s11596-009-0113-5

Scott P. Fraser, James K.J. Diss, Athina-Myrto Chioni, Maria E. Mycielska,

Huiyan Pan, Rezan F. Yamaci, Filippo Pani, Zuzanna Siwy, Monika Krasowska, Zbigniew Grzywna, William J. Brackenbury, Dimis Theodorou, Meral Koyutürk, Handan Kaya, Esra Battaloglu, Manuela Tamburo De Bella, Martin J. Slade, Robert Tolhurst, Carlo Palmieri, Jie Jiang, David S. Latchman, R. Charles Coombes, and Mustafa B.A. Djamgoz. (2005) Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation of Human Breast Cancer Metastasis. *Clinic Cancer Research*. 10.1158/1078-0432.CCR-05-0327

Sébastien Roger, Ludovic Gillet, Jean-Yves Le Guennec, and Pierre Besson. (2015) Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role? *Frontiers in Pharmacology*. 10.3389/fphar.2015.00152

Seung Taek Lim, Chan Heun Park, Sung Yong Kim, Seok Jin Nam, Eun Young Kang, Byung-In Moon, Hyouk Jin Lee, Ye Won Jeon, Hongki Gwak, Young Jin Suh. (2018) The effect of adjuvant chemotherapy on survival in Korean patients with node negative T1c, triple negative breast cancer. *Plos one*. 10.1371/journal.pone.0197523

Valentino J. Stella, Suwaldi Martodihardjo, Katsuhide Terada, and Venkatramana M. Rao. (2000) Some relationships between the physical

properties of various 3-acyloxymethyl prodrugs of phenytoin to structure:
Potential in vivo performance implications. Journal of Pharmaceutical
Sciences. 10.1021/js980008v

Weimin Fan. (1999) Possible Mechanisms of *Paclitaxel*-Induced Apoptosis.
Biochemical Pharmacology. 10.1016/S0006-2952(99)00006-4

William J. Brackenbury, Jeffrey D. Calhoun, Chunling Chen, Haruko
Miyazaki, Nobuyuki Nukina, Fumitaka Oyama, Barbara Ranscht, and
Lori L. Isom. (2010) Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6
and β 1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite
outgrowth. Proc Natl Acad Sci USA. 10.1073/pnas.0909434107

Xi Huang and Lily Yeh Jan. (2014) Targeting potassium channels in cancer.
Journal of Cell Biology. 10.1083/jcb.201404136

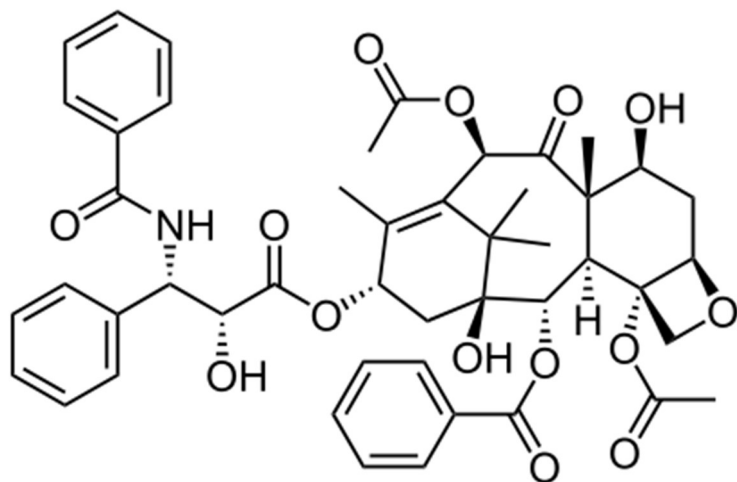
Xin D. Guo, Jeremy P.K. Tan, Sung H. Kim, Li J. Zhang, Ying Zhang, James
L. Hedrick, Yi Y. Yang, and Yu Qian. (2009) Computational studies on
self-assembled paclitaxel structures: Templates for hierarchical block
copolymer assemblies and sustained drug. Biomaterials.
10.1016/j.biomaterials.2009.08.022

Yoshio Miki, Jeff Swensen, Donna Shattuck-Eidens, P. Andrew Futreal,
Keith Harshman, Sean Tavtigian, Qingyun Liu, Charles Cochran, L.
Michelle Bennett, Wei Ding, Russell Bell, Judith Rosenthal, Charles
Hussey, Thanh Tran, Melody McClure, Cheryl Frye, Tom Hattier,
Robert Phelps, Astrid Haugen-Strano, Harold Katcher, Kazuko Yakumo,
Zahra Gholami, Daniel Shaffer, Steven Stone, Steven Bayer, Christian
Wray, Robert Bogden, Priya Dayananth, John Ward, Patricia Tonin,
Steven Narod, Pam K. Bristow, Frank H. Norris, Leah Helvering, Paul
Morrison, Paul Rosteck, Mei Lai, J. Carl Barrett, Cathryn Lewis, Susan
Neuhausen, Lisa Cannon-Albright, David Goldgar, Roger Wiseman,
Alexander Kamb, and Mark H. Skolnick. (1994) A strong candidate for
the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*.
10.1126/science.7545954

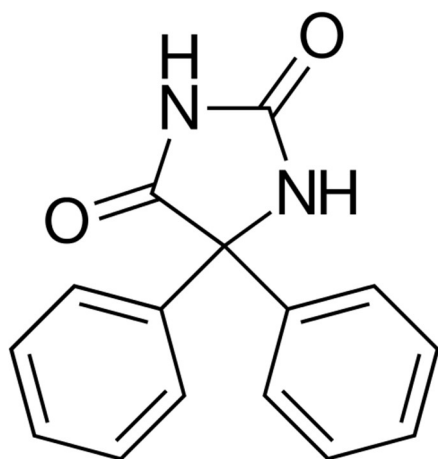
Yuh Cherng Guo, Che Mai Chang, Wen Li Hsu, Siou Jin Chiu, Yao Ting Tsai,
Yii Her Chou, Ming Feng Hou, Jaw Yan Wang, Mei Hsien Lee, Ke Li
Tsai, and Wei Chiao Chang. (2013) Indomethacin Inhibits Cancer Cell
Migration via Attenuation of Cellular Calcium Mobilization. *Molecules*.
10.3390/molecules18066584

六、圖表

(A)

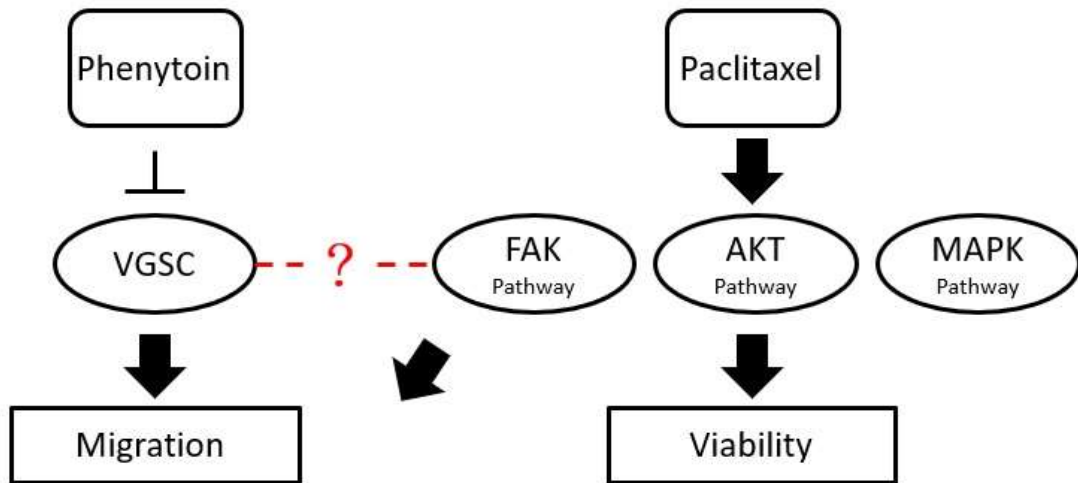


(B)



圖一、紫杉醇 (*Paclitaxel*) 與本妥英 (*Phenytoin*) 的化學結構

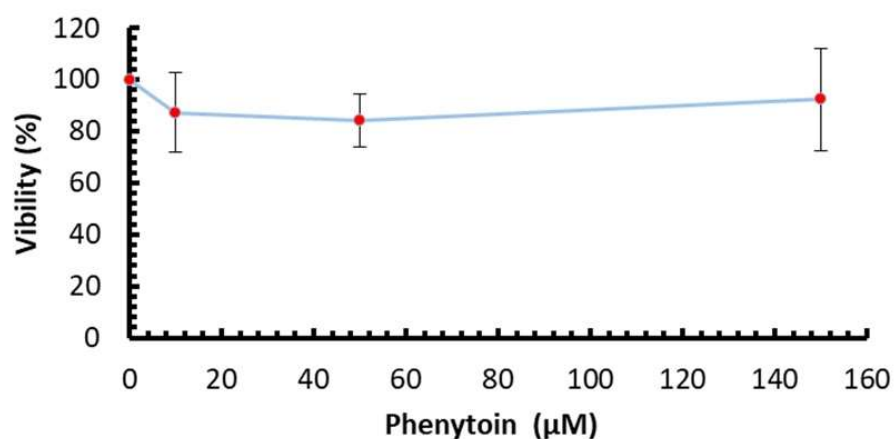
(A) 紫杉醇 (*Paclitaxel*) 分子結構 (Xin D. Guo, 2009)，有 11 個立體中心和一個 17 碳的四環骨架結構。易溶於丙酮、氯仿、乙醚等有機溶劑。(B) 本妥英 (*Phenytoin*) 分子結構 (Valentino J. Stella, 2000)，5,5-二苯基咪唑烷-2,4-二酮。藥物偏酸性，需以鹼性水溶液溶解。



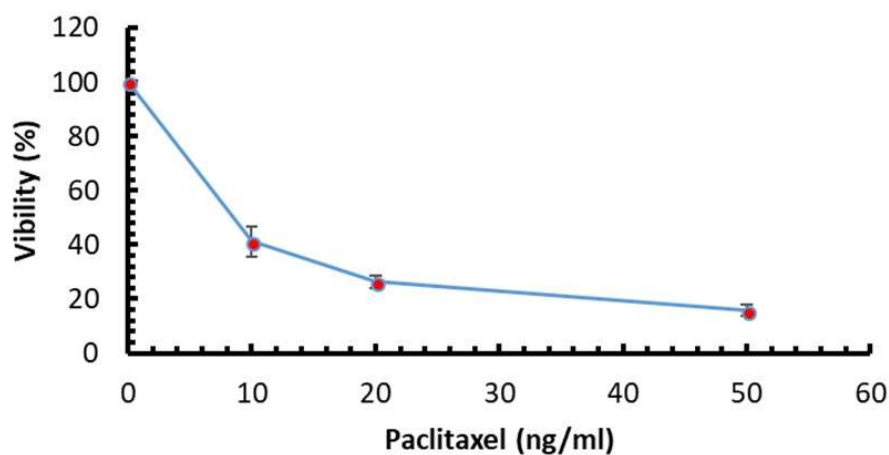
圖二、*Phenytoin* 和 *Paclitaxel* 兩者間的交互作用

Voltage-gated sodium channel (VGSC) 與訊息傳遞路徑兩者間的交互作用方式尚不明確。是因為 VGSC 調控訊息傳遞分子，進而導致細胞爬行的表現被影響？還是因為訊息傳遞分子調控 VGSC 的表達，使得細胞爬行受到影響？

(A)



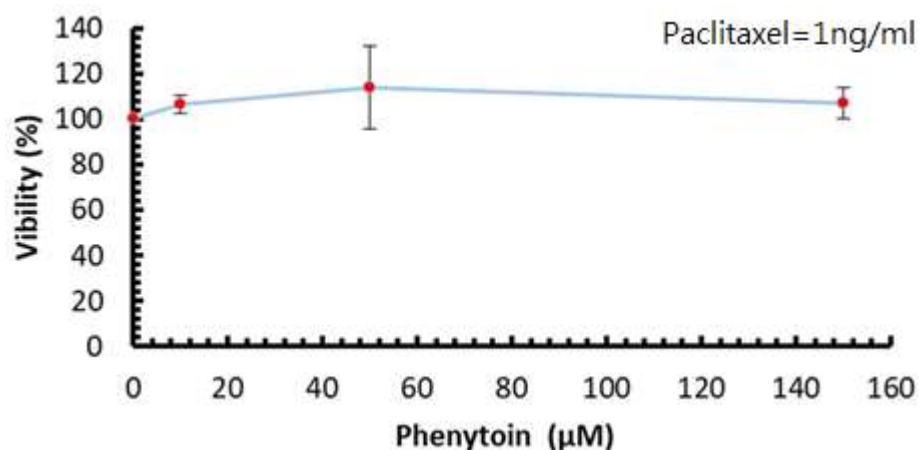
(B)



圖三、藥物 *Phenytoin* 與 *Paclitaxel* 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上的毒殺效果

(A) MDA-MB-231 細胞株處理 24 小時藥物 *Phenytoin* 組別為 $0 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 。(B) MDA-MB-231 細胞株處理 24 小時藥物 *Paclitaxel* 組別為 0ng/ml 、 10ng/ml 、 20ng/ml 、 50ng/ml 。以上樣本數皆為三。

(A)



(B)

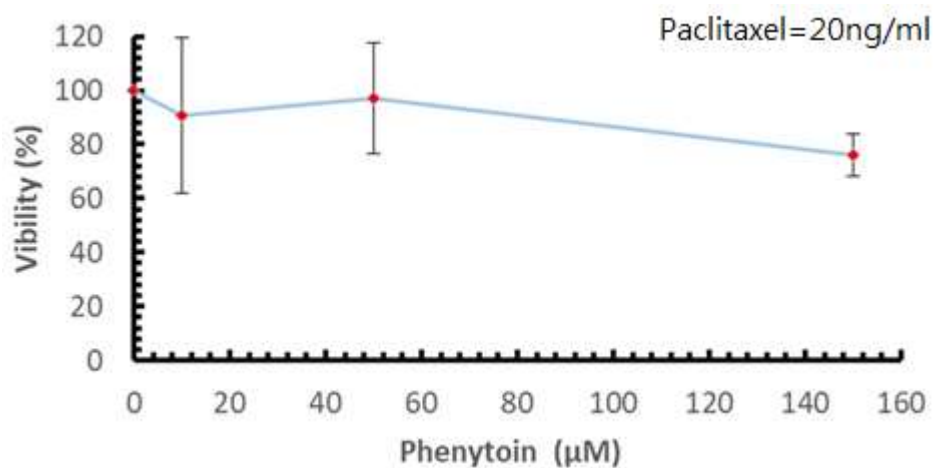


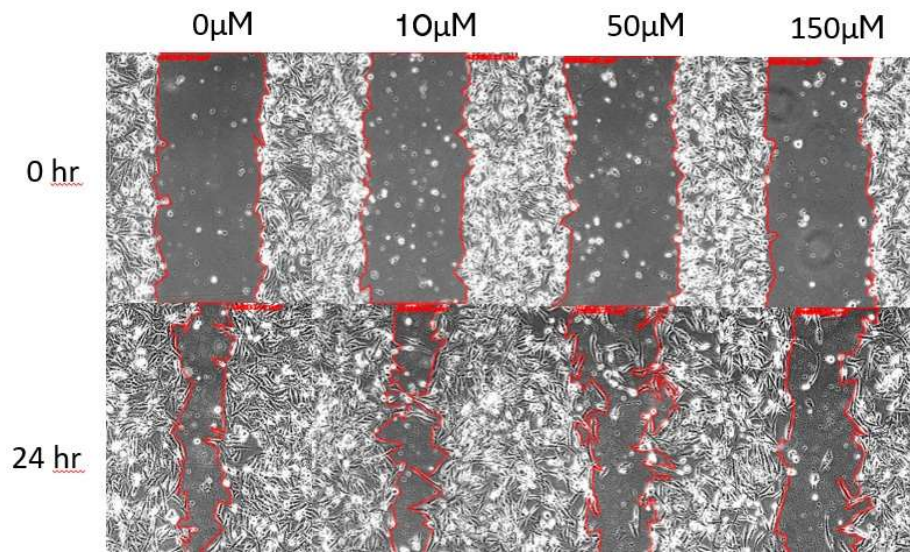
圖 四、不同處理情況的藥物 *Phenytoin* 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上的毒殺效果

(A) MDA-MB-231 細胞株處理 24 小時藥物，每一組別皆加入 1ng/ml 的 *Paclitaxel*，*Phenytoin* 濃度依序為 $0\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、 $150\ \mu\text{M}$ 。

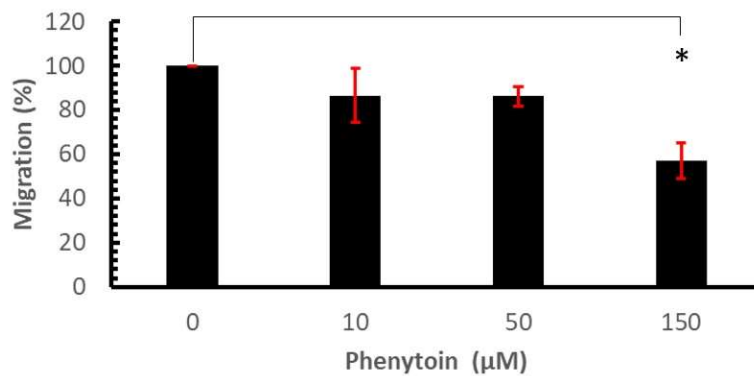
(B) MDA-MB-231 細胞株處理 24 小時藥物，每一組別皆加入 20ng/ml 的 *Paclitaxel*，*Phenytoin* 的濃度依序為 $0\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、 $150\ \mu\text{M}$ 。

以上樣本數皆為三。

(A)



(B)

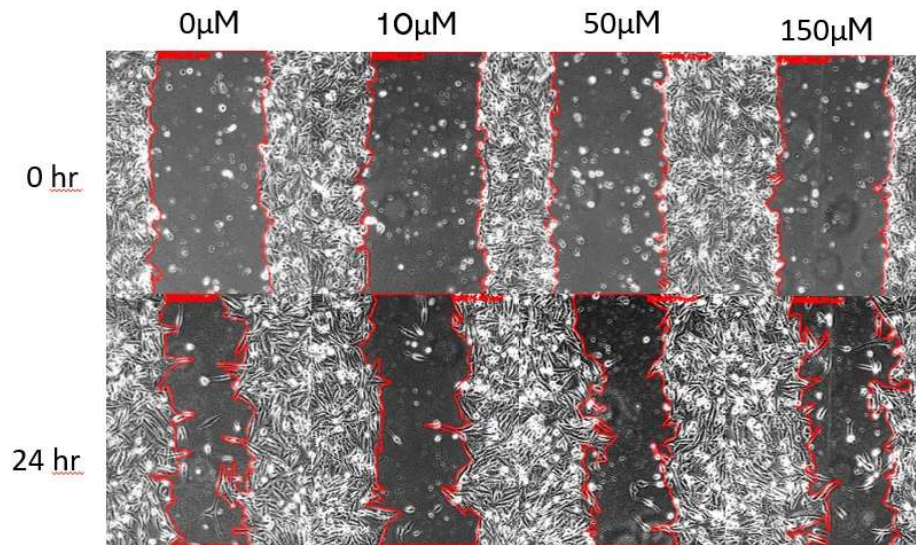


圖五、不同藥物濃度的 *Phenytoin* 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上抑制細胞爬行效果

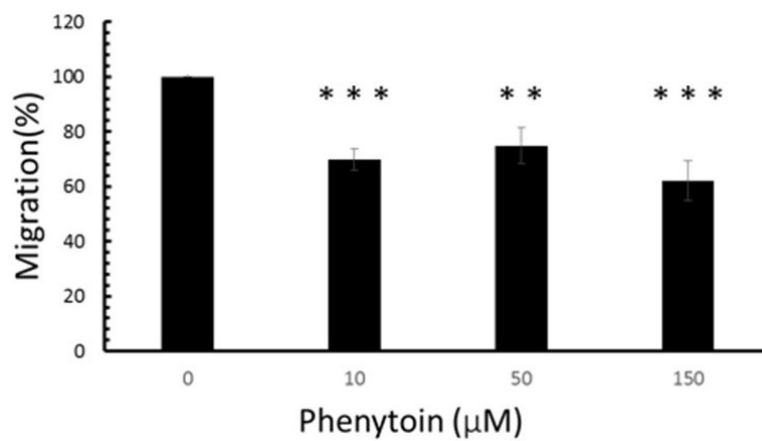
(A) MDA-MB-231 細胞株處理藥物 *Phenytoin* 後，於倒立顯微鏡下傷口癒合實驗的結果。(B) 將A圖做數據分析得到的數值化結果。

n=3。

(A)



(B)



圖六、不同藥物濃度的 *Phenytoin* 結合使用 *Paclitaxel* 在 MDA-MB-231 人類乳癌細胞上抑制細胞爬行效果

(A) MDA-MB-231 細胞株同時處理藥物 *Phenytoin* 與 *Paclitaxel*，濃度 1ng/ml。(B) 將A圖做數據分析得到的數值化結果。n=3

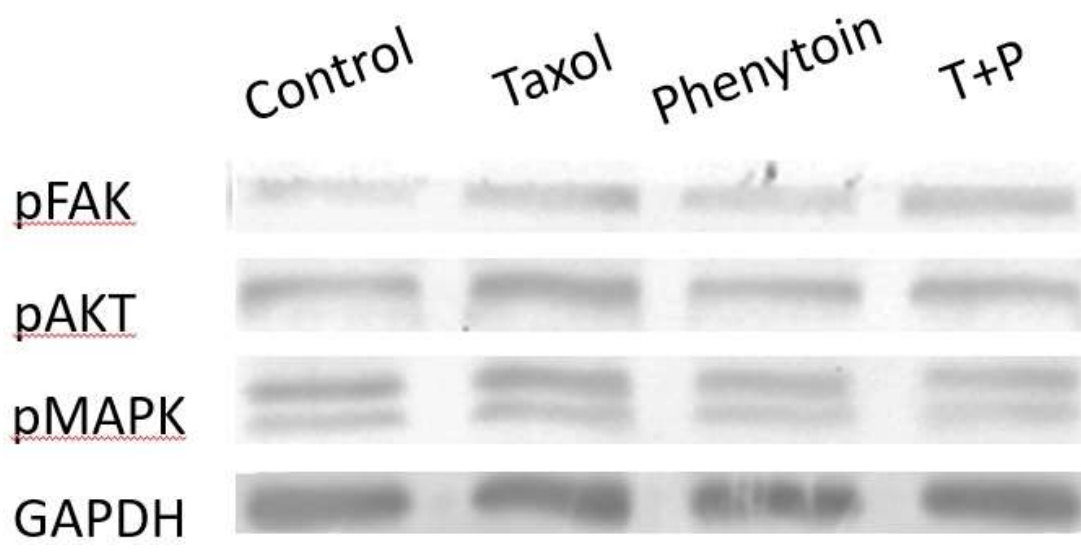
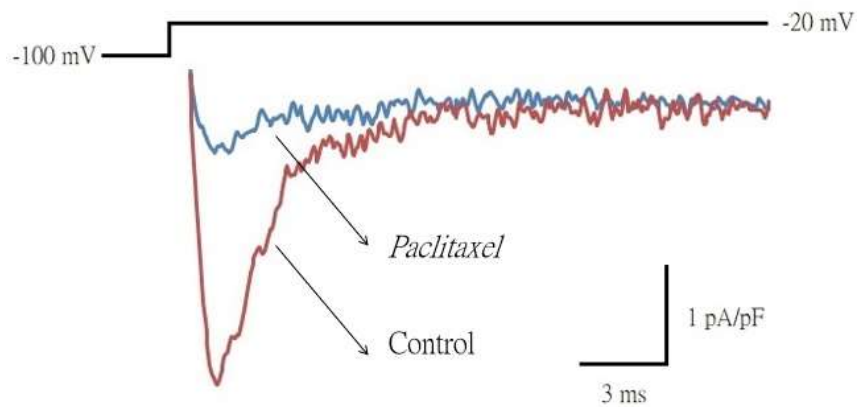


圖 七、藥物處理後利用西方點墨法分析訊息傳遞路徑蛋白的表現

圖為西方點墨法實驗的呈色結果以 HRP-anti rabbit 為二抗。經由結果觀察得出，兩藥物抑制細胞爬行的能力與 pAKT、pFAK 並沒有直接的相關性。

(A)



(B)

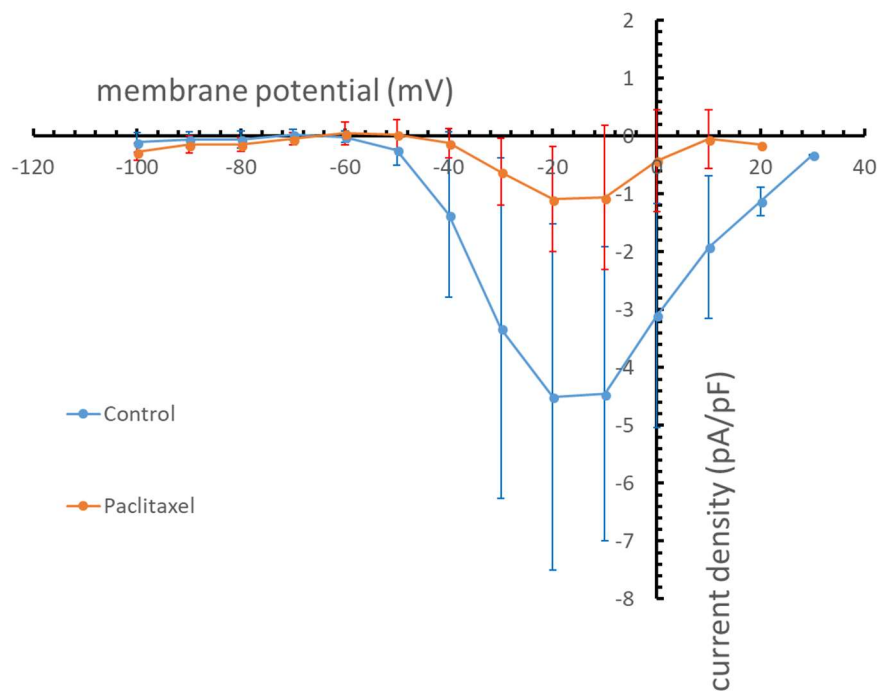
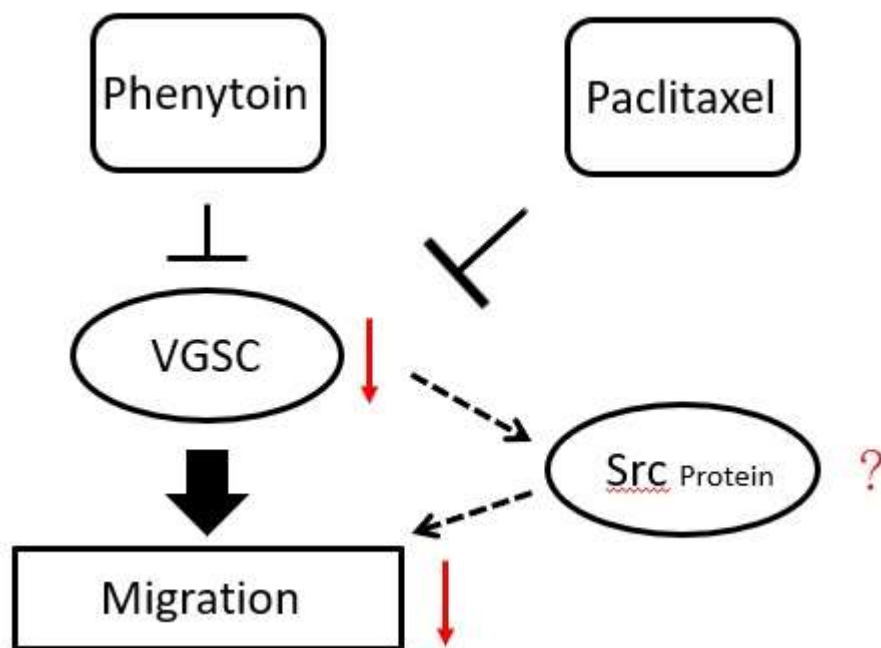


圖 八、藥物處理後以全細胞膜片箝制實驗所得的 IV 曲線圖

(A) 原始之電流紀錄。(B) IV 曲線圖，X 軸為刺激細胞膜的電壓，Y 軸為鈉離子通道打開的電流變化。樣本數為四。可以看出在處理 *Paclitaxel* 藥物後有降低鈉離子電流的趨勢，以此可推論鈉離子通道的表現減少了。



圖九、*Paclitaxel* 會降低 VGSC 的表達進而降低細胞爬行能力

在全細胞膜片箝制技術的實驗中發現，*Paclitaxel* 會降低鈉離子通道的表達，而在西方點墨法中沒有觀察到 *Phenytoin* 對於訊息傳遞分子有所影響。在此結果上推測，*Paclitaxel* 抑制細胞爬行的效果，其中一部分的原因應該是由於抑制鈉離子通道的表達。而鈉離子通道表達減少不確定是否會進一步的影響訊息傳遞路徑。