

# 目錄

	<b>Page</b>
目錄	1
Abstract	4
中文摘要	6
前言	7
材料與方法	
◆ 組織晶片(Tissue microarray)	14
◆ 免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry)	14
◆ HT29 細胞株(HT29 cells)	15
◆ MOB2 RNA 干擾(MOB2 RNA interference)	16
◆ 感染 HT29 細胞(Infection of HT29 cells)	16
◆ 轉染 HT29 細胞(Transfection of HT29 cells)	17
◆ 西方墨點法(Western blotting)	17
◆ 免疫螢光染色(Immunofluorescence)	18
◆ 細胞增生分析(Cell proliferation assay) 細胞增生分析(Cell proliferation assay)	19
◆ 細胞移行分析(Transwell migration assay)	19
結果	
◆ hMOB2 在腫瘤組織的表現	21
◆ HT29 細胞的 hMOB2 表現	22
◆ hMOB2-shRNAi HT29 細胞	23

◆ hMOB2 表現與細胞增生	23
◆ 細胞移行(transwell assay)分析	24
<b>討論</b>	
◆ hMOB2 蛋白是普遍分布於人體各個組織，且在癌組織中有高度表現	26
◆ hMOB2 蛋白可調控細胞移行	27
◆ hMOB2 蛋白可影響細胞增生	28
<b>參考文獻</b>	30
<b>圖與表</b>	
◆ 圖 1：HT29 細胞培養圖	33
◆ 圖 2：免疫組織化學染色法 hMOB2 蛋白表現強度	34
◆ 表 1-1：不同器官惡性腫瘤與正常/良性組織的 hMOB2 表現強度-1	35
◆ 表 1-2：不同器官惡性腫瘤與正常/良性組織的 hMOB2 表現強度-2	36
◆ 圖 3：不同組織的 hMOB2 平均表現強度	37
◆ 圖 4：肺癌組織的 hMOB2 表現	38
◆ 圖 5：食道癌組織的 hMOB2 表現	40
◆ 圖 6：大腸組織染色配對(一)	42
◆ 圖 7：大腸組織染色配對(二)	43
◆ 圖 8：hMOB2 蛋白於 HT29 細胞的表現	44

◆ 圖 9：hMOB2-shRNAi HT29 細胞的 hMOB2 表現	46
◆ 圖 10：細胞增生實驗	47
◆ 圖 11：細胞移行實驗顯微鏡照片圖	49
◆ 圖 12：細胞移行實驗結果量化圖	50
◆ 圖 13：MOR 的訊號傳遞	51
個人資料	52

# **The Function of MOB2 Protein in Cancer Metastasis**

## **Abstract**

Cell migration is an important biologic function. It participates in several biologic processes, such as embryo development, organization, wound healing, immune reaction and metastasis. Metastasis is the main cause of cancer mortality. Thus, understanding the molecular regulation of cell migration may help to provide a clue to prevent cancer metastasis. It has been known that MOB2 proteins regulate cell polarity and cell morphology in yeasts, the morphology of the wing and photoreceptor cell in *Drosophila*, centrosome duplication and cell death signaling in mammals. In the previous study, we found MOB2 protein can induce the neurite formation in mouse N2A cell line and affect the migration of human hepatocarcinoma cell line (Mahluva cell). In this study, we used LS-SCA5 tissue microassay to evaluate the expression of hMOB2. Using immunohistochemistry stain, hMOB2 was generally expressed in various type of tissues with different extent. Besides, we found the expression of hMOB2 is significantly increased in malignant tissues than normal tissues. This indicates hMOB2 may have a role in cancer development and

progression. We further evaluated the function of hMOB2 by an in vitro assay using the colonal cancer cells (HT29 cell). We found that hMOB2 expressed in the cytoplasm of HT29 cells. When the expression of hMOB2 in HT29 cells was knocked down by shRNAi, cell proliferation and cell migration were both decreased significantly. Thus, hMOB2 protein had a role in cell proliferation and cell migration. All together, hMOB2 is a potential candidate for future study in cancer development and progression.

# MOB2 蛋白在癌症轉移的功能

## 摘要

細胞移行是一個很重要的生物功能，其與胚胎發育、器官形成、傷口癒合、免疫反應與癌症轉移都有關係。癌症轉移是造成癌症死亡的主要原因，因此，瞭解細胞移行的分子機制可以提供我們尋找預防癌症轉移的線索。MOB2 蛋白已知可以去調控酵母菌的細胞極性與細胞型態；在果蠅中 MOB2 則可以影響翅膀型態與感光細胞型態；在哺乳類 MOB2 與中心粒的分裂和細胞死亡訊息有關連。在先前的研究中，我們發現 MOB2 蛋白可誘發老鼠 N2A 細胞的神經纖維形成；也能影響人類肝癌細胞株 Mahlavu 細胞的細胞移行。此次的實驗裡，我們利用 LS-SCA5 組織晶片，來評估 hMOB2 在人體組織的表現。透過免疫組織化學染色，我們發現 hMOB2 在人體各個組織都有不同程度的表現，而在癌症組織中 hMOB2 的表現比正常組織來更高，代表著 hMOB2 與癌症的形成與惡化可能有關係。為了評估 hMOB2 的細胞功能為何？我們利用大腸癌細胞株 HT29 細胞來進行體外實驗。我們發現 hMOB2 主要分布於 HT29 細胞的細胞質。當 HT29 細胞的 hMOB2 表現被 RNA 干擾抑制時，HT29 細胞的增生能力與移行能力都有顯著的受到抑制。這說明著 hMOB2 蛋白與細胞增生與移行有關。

綜合以上發現，我們認為 hMOB2 蛋白與癌症的發生與惡化具有重要的角色，值得未來進一步的研究。

# The Function of MOB2 Protein in Cancer Metastasis

## 前言:

細胞移行(Cell migration)是一個相當複雜的過程: 胞外化學物質、胞外環境都會引起一系列的胞內訊號傳遞與化學反應, 進而使細胞產生移動。在正常的細胞中, 細胞移行與胚胎發育、器官形成、傷口癒合、免疫反應等等有關(Raftopoulou and Hall, 2003)。所以當細胞移行出現異常時將會對生物體產生很大的影響, 甚至可能造成生物死亡。

目前癌症的發生是全世界一個相當重要的健康議題, 儘管治療方法, 如: 手術、化學治療、放射治療、標靶治療, 不斷的進步, 癌症所造成的死亡仍是居高不下。癌症轉移是癌症治療失敗的一個重要主因, 然而癌症轉移的機轉與原因相當複雜, 至今仍無法得到一個完整的全貌。細胞移行與腫瘤轉移之間息息相關, 因此有很多的研究在探討細胞移行的機轉。MOB2 蛋白在我們的研究中也是一個與細胞移行有關的調節因子。

Mps-one binder(MOB)蛋白最早是在 1998 年由 Luca and Winey 發現。他們利用 yeast-2-hybrid screening 發現 Mps1p kinase 與 Mob1p 之間會相互結合, 進而調控酵母菌的分裂與細胞週期的進展(Luca and



Winey, 1998)。在經過眾多學者的研究得知，MOB 蛋白是一個高度保留的蛋白，在酵母菌、果蠅與人類身上都有發現這類蛋白存在 (Salimova, et al., 2000; Colman-Lerner, et al., 2001; He, et al., 2005; Devroe, et al., 2004)。MOB 蛋白的分群可以區分為三種，MOB1、MOB2 與 MOB3。在不同的物種，其命名會有所差異，請見表 I。在這些不同的 MOB 蛋白中都有一段相似的胺基酸序列，稱之為 Mob1-like phocein domain，這段序列的功能目前仍不清楚。

	<b>MOB1 Subgroup</b>	<b>MOB2 Subgroup</b>	<b>MOB3 Subgroup</b>
<b>Yeast</b>	<b>Mob-1p</b>	<b>Mob-2p</b>	---
<b>Drosophila</b>	<b>dMOB1</b>	<b>dMOB2</b>	<b>dMOB3</b>
<b>Human</b>	<b>hMOB1A/B</b>	<b>hMOB2</b>	<b>hMOB3A/B/C</b>

**表 I:**

酵母菌有兩種 MOB 蛋白,分別為 Mob-1p 與 Mob-2p；果蠅有三種 MOB 蛋白，dMOB1、dMOB2、dMOB3；人類有六種 MOB 蛋白，hMOB1A、hMOB1B、hMOB2、hMOB3A、hMOB3B、hMOB3C。

MOB 蛋白可以與 nuclear Dbf2-related (NDR) kinase 交互作用，進而產生不同的功能 (Hergovich, et al., 2006)。在酵母菌中(圖 A)，Mob1p 可與 Dbf2p 作用，使得 Cdc14p 磷酸化,進而調節有絲分裂的結束(exit of mitosis)與細胞週期的進展 (Mohl, et al., 2009)；Mob2p 會與 Cbk1p 作用後使 Ace2p 磷酸化，去影響細胞極性(cell polarity)與型態(morphology) (Colman-Lerner, et al., 2001; Weiss, et al., 2002; Jansen, et al., 2006; Hou, et al., 2003)。

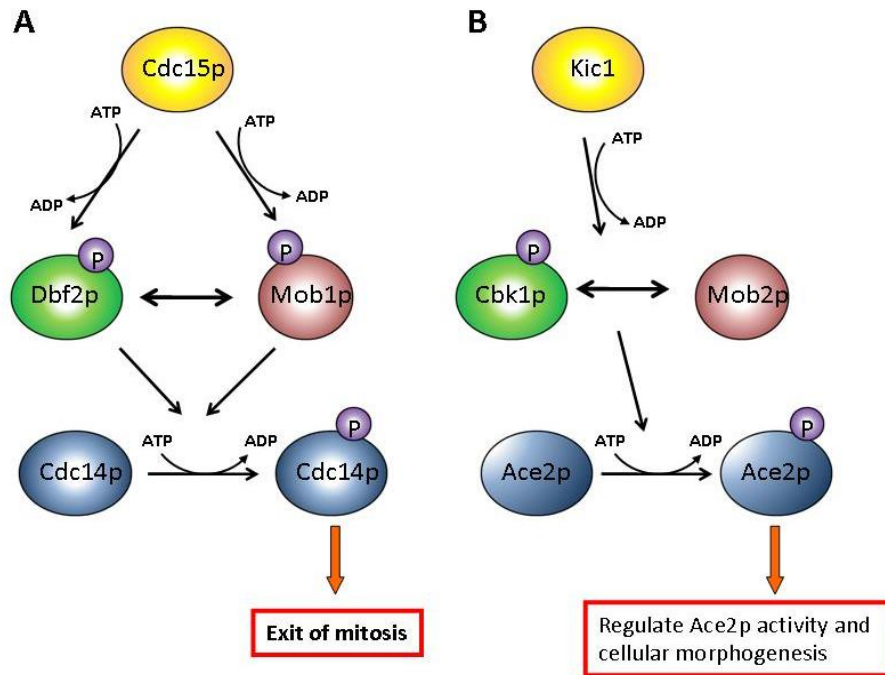


圖 A: MOB 蛋白在酵母菌中的訊號傳遞。(Modified figure from Hergovich, 2011)

在果蠅中(圖 B), dMOB1 與 Hippo pathway 有關, Hippo, dMOB1、Warts 會形成一複合體去活化 Yorkie (Yki), 進而去調節細胞的增生、成長與死亡 (Lai, et al., 2005; Wei, et al., 2007; Saucedo and Edgar, 2007); dMOB1 也能活化 Trc, 去影響樹突細胞的樹突型態(dendritic morphogenesis)(Emoto, et al., 2004). 樹突的維持(dendritic maintenance)也需要 Warts 的參與(He, et al., 2005)。dMOB2 目前發現與果蠅的翅膀型態與感光細胞型態有關係(He, et al., 2005; Liu, et al., 2009), 而 dMOB2 也發現可以跟 Trc 結合(He, et al., 2005), dMOB1 與 dMOB2 之間在 Trc 上是否會相互拮抗還需要進一步的研究才能釐清。dMOB3 的功用目前仍不清楚。

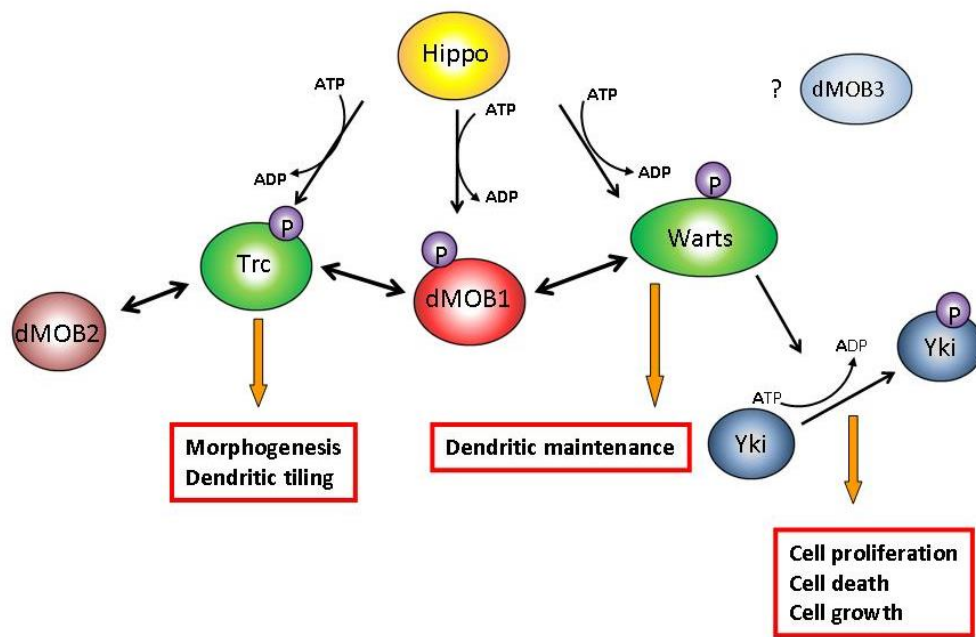


圖 B: MOB 蛋白在果蠅中的訊號傳遞。(Modified figure from Hergovich, 2011)

而在人類細胞中(圖 C)，hMOB1 可以活化 LATS1/2，進而使 YAP 磷酸化，可以抑制細胞增生，此路徑與果蠅中的 Hippo pathway 相當的類似 (Praskova, et al., 2008)。hMOB1 能與 NDR1/2 結合去調控中心體分裂與細胞死亡 (Hergovich, et al., 2005; Hergovich, et al., 2009; Wilmeth, et al., 2010)。由於 hMOB2 可以與 hMOB1 競爭與 NDR1/2 N 端的結合，因此 hMOB2 在功能上與細胞死亡、中心體分裂有關(Kohler, et al. 2010)。

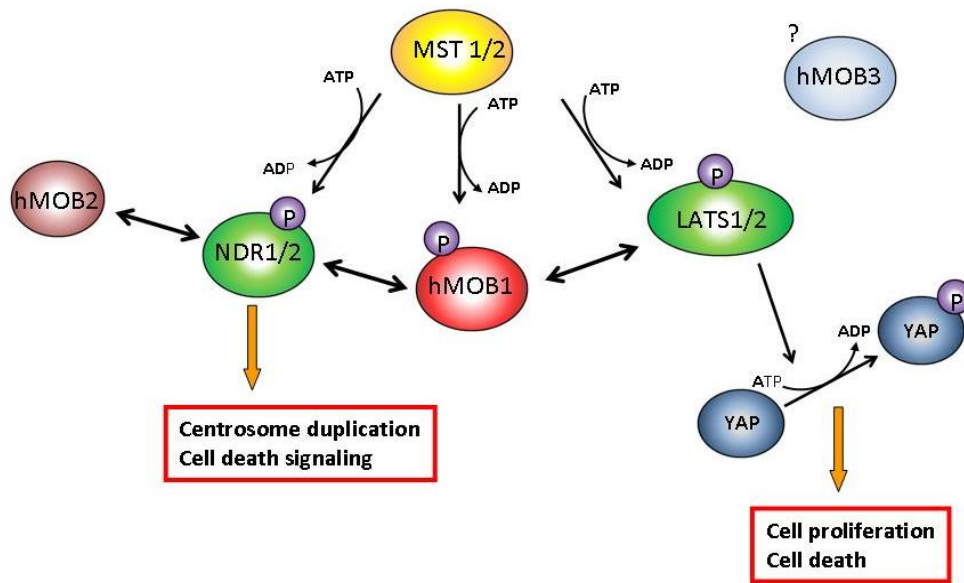


圖 C: MOB 蛋白在人類中的訊號傳遞。(Modified figure from Hergovich, 2011)

在我們實驗室過去的研究中發現，dMOB2 跟果蠅感光細胞的發育與型態有相關，在感光細胞發育的初期 dMOB2 會聚集在感光細胞的頂膜(apical membrane)。隨著感光細胞的發育，dMOB2 將會移動到感光細胞的底部。在 dMOB2 被抑制的時候，會使得細胞內 actin 排列產生異常，使得感光細胞的發育產生異樣(Liu, et al., 2009)。利用老鼠的神經母細胞瘤細胞株 N2A 細胞的研究中，發現 MOB2 與神經纖維的生成有關。MOB2 會聚集在神經纖維的基部、分支與末端。當 MOB2 被抑制時，神經纖維的生成會下降；相反的，MOB2 過度表現時，神經纖維的生成則會增加 (Lin, et al., 2011)。此外，利用人類肝癌細胞株 Mahlavu cell 在細胞移行的研究中發現 hMOB2 在細胞移行

的時候會集中在爬行細胞的前緣，並且與 AKT 磷酸化、ERK 磷酸化有關。在細胞移行分析(transwell assay)與傷口癒合分析(wound healing assay)皆觀察到 hMOB2 過度表現時細胞移行能力會上升，而 hMOB2 被抑制時細胞移行能力則會下降，顯示細胞移行的能力與 hMOB2 的表現有正相關。藉由以上這些發現，我們認為 hMOB2 蛋白與細胞移行有關，對於惡性腫瘤的惡化與轉移可能扮演著重要角色。因此我們希望進一步的研究 hMOB2 蛋白在各種癌組織中，是否有過度表現的現象?而我們也希望透過研究 hMOB2 蛋白在大腸癌細胞 HT-29 cell 的功能，來進一步確認 hMOB2 蛋白是否可以調控細胞移行?

## 材料與方法 (Materials and Methods)

### 1. 組織晶片 (tissue microarray)

由於組織晶片上有許多不同的組織檢體，因此很適合用來一次大量篩選有興趣的標的物。本實驗中，我們選用了 LifeSpan BioSciences 公司編號 LS-SCA5 的組織晶片來進行染色實驗。此晶片上有 21 種人類組織，包含腎上腺、脂肪組織、膀胱、腦部、乳房、結腸、12 指腸、食道、輸卵管、膽囊、腎臟、肝臟、肺臟、淋巴瘤、卵巢、胰臟、腮腺、攝護腺、直腸、皮膚、小腸；每種組織會有癌組織與良性組織的配對，每個組織是來自不同的病人，並有提供病理診斷與臨床資訊(性別、年紀、腫瘤分期)。

### 2. 免疫組織化學染色法(immunohistochemistry)

我們使用了 Histostain® -SP Kits(Invitrogen™)來對組織晶片進行免疫化學組織染色。為了使晶片脫蠟，將晶片放置於 62°C 的烤爐 10 分鐘後，將晶片置入 xylene 中 20 分鐘。接著依序置入 100% 酒精、95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精、50% 酒精各 5 分鐘，一倍 PBS 中 2 分鐘，再以去離子蒸餾水洗淨 PBS。接著將晶片放入 100°C citric acid buffer 作用 20 分鐘(抗原活化)，將晶片與此 buffer 溶液在室溫下靜置 30 分鐘降溫後，將晶片放入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 methanol 1:9 的混合液中 10 分鐘。用去離子蒸餾水清洗三次後，用血清阻斷溶液(SERUM BLOCKING

SOLUTION)反應 10 分鐘以進行阻斷(blocking)。將阻斷後的樣本與一級抗體(rabbit anti-Mob2,1:100;Lin et al., 2011)在室溫下進行一小時的反應，接著用去離子蒸餾水清洗三次後，置入二級抗體(BIOTINYLATED SECOND ANTIBODY)中，在室溫下作用 10 分鐘。以去離子蒸餾水清洗三次後，將樣本放入 ENZYME CONJUGATE buffer，在室溫下靜置 15 分鐘。利用去離子蒸餾水洗淨後再放入 DAB buffer，在室溫下靜置 10 分鐘後進行染色。在去離子蒸餾水清洗後，利用 hematoxylin buffer 在室溫下進行 7 分鐘的對比染色。經過去離子水清洗後，將晶片置入 PBS 中 3 分鐘，在依序放入 95%酒精、100%酒精、xylene 中各 5 分鐘。接著以 mounting medium 進行包埋，之後便可以利用正立顯微鏡(Axioskop 2 plus, Zeiss)進行觀察。

### **3. HT29 細胞株(HT29 cells)**

HT29 細胞是由 44 歲女性白人身上的大腸癌細胞(腺癌)所培養出來的細胞株，屬於分化良好的癌細胞。細胞本身是呈現類上皮細胞的型態，培養的細胞容易聚集在一起 (adherent pattern)，請見圖 1。HT29 細胞、過度表現 hMOB2 的 HT29 細胞、經 shRNA 處理過的 HT29 細胞都是以 RPMI(Roswell Park Memorial Institute medium)與胎牛血清在 37°C 與 5%二氧化碳下進行培養。

#### **4. MOB2 RNA 干擾(MOB2 RNA interference)**

為了抑制 HT29 細胞內生性 hMOB2 的表現，我們利用短髮夾 RNA 質體(pLKO.1-shRNA plasmid)，其上帶有 scrambled shRNA 序列 (clone ID:TRCN0000072179)或針對人類 MOB2 的 shRNA 序列 (hMOB2 shRNA1, Clone ID: TRCN0000166012,序列為 GCGAGATTGACCTTAACGAGT;hMOB2 shRNA2,Clone ID: TRCN0000165158,序列為 GATCACCGACTTCCAGTTCAA)來進行 RNA 干擾。此質體與使用 shRNA 序列等相關訊息，可於中央研究院國家型核糖核酸干擾設施平台(National RNAi Core Facility, Taiwan)購得。

#### **5. 感染 HT29 細胞(Infection of HT29 cells)**

為了製造抑制 hMOB2 表現的 HT29 細胞株，我們將 HT29 細胞感染了 lentivirus，以 lentivirus 作為 shRNA 載體。感染了帶有 hMOB2-shRNA1 或 hMOB2-shRNA2 載體的 HT29 細胞為實驗組，而感染帶有 scrambled shRNA 的 HT29 細胞作為對照組。將  $2.0 \times 10^5$  個 HT29 細胞培養在大小為 30 mm 的細胞培養皿中 24 小時後，第二天加入不等量的 lentivirus 與 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polybrene 到細胞培養皿中作用 24 小時。接著加入抗生素 puromycin(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )培養 14 天後，篩選出有被



感染 lentivirus 的 HT29 細胞。在選出被感染的 HT29 細胞後，我們會進行西方墨點法來確認 hMOB2 的表現有無被抑制。

## 6. 轉染 HT29 細胞(Transfection of HT29 cells)

為了製作過量表現 hMOB2 的 HT29 細胞株，取  $2.0 \times 10^5$  個細胞在 30 mm 細胞培養皿中培養 6 小時，加入先前實驗室製備好的 pcDNA-hMOB2 質體 2  $\mu$ g 後進行轉染。我們轉染是利用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen Life Tech)，根據其操作手冊來進行實驗。之後加入 600  $\mu$ g/ml G418 培養 14 天後，篩選出有被轉染的 HT29 細胞，之後再以西方墨點法確認 hMOB2 的表現。

## 7. 西方墨點法(western blotting)

我們利用 RIPA 緩衝液(25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS)與適量的蛋白酶抑制劑(0.1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml pepstatin A, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10  $\mu$ g/ml aprotinin)來取得細胞組織萃取液進行西方墨點法。將細胞萃取液在 4°C 與 12000g 的條件下離心 10 分鐘。蛋白質濃度利用光譜儀 spectrophotometer (Bio-Rad Smart Spec<sup>TM</sup> Plus)，以 Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad)來做定量。取出 30 mg 蛋白質後以 6X SDS gel loading dye 在 95°C 下作用 5 分鐘，使蛋白質變性。用 10% polyacrylamide gel 來進行電泳將蛋白質分離後，轉到 PVDF 膜(polyvinylidene fluoride

membrane; PerkinElmer), 在 20 伏特下作用 30 分鐘, 使蛋白質能固定到膜上。將 PVDF 膜上非特異鍵結的蛋白質以 5% 去脂牛奶在 0.2% Triton-X100/1x PBS (PBST) 室溫下作用一小時進行阻斷。將未連結的去脂牛奶以 PBST 洗淨(清洗三次, 每次 10 分鐘)。將洗淨後的膜與一級抗體在 4°C 下進行過夜反應。我們所使用的一級抗體包含了兔子抗體 rabbit anti-Mob2(1:500; ABGENT) 與老鼠抗體 mouse anti-tubulin (1:2000; Sigma-Aldrich)。第二天利用 PBST 將未結合的抗體洗淨, 洗淨三次, 每次 10 分鐘。將此膜與二級抗體 anti-rabbit-HRP(1:5000; Jackson ImmunoResearch Lab) 與 anti-mouse-HRP(1:5000; Jackson ImmunoResearch Lab) 在室溫下反應兩小時後, 用 PBST 洗淨。接著利用 LAS-1000 luminescent image analyzer detection system (Fujifilm) 來測量並量化反應結果。

## 8. 免疫螢光染色(immunofluorescence)

將玻片上的組織樣本浸泡在 0.1M PBS(pH 7.4) 的 3.7% 福馬林溶液中, 在室溫下作用 20 分鐘進行固定。接著以 PBS 洗淨三次後, 將細胞與一級兔子抗體 rabbit anti-Mob2 (1:100; ABGENT) 在 4°C 下進行過夜反應。在用 PBS 洗淨三次後, 將細胞與二級抗體在室溫避免光照下反應一小時。二級抗體包含 Donkey anti-Rabbit-Cy5 (1:200; Molecular Probes-Invitrogen), rhodamine-phalloidin

(1:200;sigma-Aldrich)來染 F-actin 與 SYTOX<sup>®</sup> Green(Invitrogen Life Tech)來染細胞核。以 PBS 洗淨後，將細胞以 mounting medium 進行封片後，再以共軛焦顯微鏡(LSM510, Zeiss)進行觀察。

## 9. 細胞增生分析(cell proliferation assay)

利用 24 格的細胞培養盤 (每格直徑 15mm)，以 10%FBS 培養  $1.0 \times 10^5$  個細胞。培養 24 小時後，以 1 倍的 PBS 清洗後，加入 100  $\mu$ l trypsin 使細胞懸浮，再加入 900  $\mu$ l 培養液。取出 10  $\mu$ l 的細胞懸浮液後加入 10  $\mu$ l 的 trypan blue 混合(用來標示死亡細胞)後，再取出 10  $\mu$ l 混合液，透過 Hemocytometer 進行細胞數的計算。再將計算所得的細胞數，換算成實際的細胞濃度與細胞總數。利用相同的方法，分別計算培養 24 小時、48 小時與 72 小時的細胞數量，總共重複三次的實驗。利用 T-test 來統計不同細胞株的增生能力有無差別。

## 10. 細胞移行分析(transwell migration assay)

細胞移行分析是一個普遍被用來探討細胞侵犯與細胞移行能力的實驗方法。我們以 scrambled-shRNA HT29 細胞作為對照組，來評估 hMOB2 shRNA1 或 shRNA2 HT29 細胞的移行能力。將細胞與不含血清的培養液置於頂盤，而底盤則放有含 10%血清的培養液。在 37<sup>°</sup>C 下培養 18 小時後，將未移行的細胞利用棉花棒刮除，剩餘的細胞以 3.7%福馬林固定後，以 PBS 洗淨，再以 0.1% Triton-X100 作用 1

分鐘以增加通透性。利用 PBS 洗淨後，再以 DAPI(1:1000;Sigma)進行細胞核染色 30 分鐘。PBS 洗淨後，利用倒置顯微鏡(Zeiss Axiovert 200M inverted microscope)觀察結果。重複三次的實驗後，收集資料並以 T-test 分析。

## 結果

### 1. hMOB2 在腫瘤組織的表現

為瞭解 hMOB2 基因與腫瘤之關係，本實驗利用人類組織晶片 (LifeSpan BioSciences, LS-SCA5) 來觀察 hMOB2 在腫瘤組織的表現情形。將組織晶片經過脫蠟處理，以免疫組織化學染色法染色的 LS-SCA5 晶片，利用正立顯微鏡 (Axioskop 2 plus; Zeiss) 觀察，並透過影像處理軟體 (AxioVision LE) 來取得組織的影像。為了比較不同病人、不同器官、良性與惡性組織間 hMOB2 表現的強度，我們依據不同的染色強度給予分數，最低 1 分，最高 4 分 (圖 2)。整體來看，共有 48 組配對，95 個樣本，我們將配對的良性與惡性組織的觀察結果呈列於表 1-1 與表 1-2。經過觀察後，可以發現有 37 組惡性腫瘤組織內 hMOB2 的表現比良性/正常組織來的高，特別是在上皮組織發生的腫瘤，如：口咽、食道、胃、小腸、大腸、直腸、膽囊、乳腺、肺部。有 9 組樣本癌症組織與正常組織的 hMOB2 的表現是相近的，這 9 個組織包含了腮腺、腦部、膀胱、子宮、輸卵管。另外有兩個樣本正常組織的 hMOB2 表現量比癌症組織來得高，包含了肝臟與腎上腺。將各個組織的 hMOB2 表現強度平均後，做出各組織良性與癌症強度比較的柱狀圖 (圖 3)。舉例來看，肺癌組織 (圖 4A 與 B) 的 hMOB2 表現相當強烈 (4 分)，不僅高於癌組織旁的結締組織，也高於一般良性的

肺泡組織(圖 4C)。食道癌組織(圖 5A 與 B)一樣有高度表現 hMOB2(3~4 分)，而食道的肌肉組織(圖 5C) hMOB2 的表現則僅有 1 分。由以上的觀察結果，我們可以發現大部分癌組織的 hMOB2 的表現量高於一般良性/正常組織，顯示出 hMOB2 在癌症的形成上有關。

## 2. HT29 細胞的 hMOB2 表現

在組織晶片的觀察實驗中，發現 hMOB2 在大腸癌組織的表現相當的高(圖 6 與圖 7)。晶片提供了兩位大腸癌患者的癌症組織切片與兩位正常大腸組織的切片；透過染色之後，可以見到癌組織的 hMOB2 表現相當強烈，分數為三分與四分；相反的，正常的大腸組織 hMOB2 的表現就明顯較低下。此外，大腸癌的發生率是目前國人癌症的第一名，因此我們選用了 HT29 大腸癌細胞株來進行研究，希望可以進一步了解大腸癌細胞，並且評估 hMOB2 在細胞移行的功能為何？為瞭解 hMOB2 基因是否與 HT29 細胞的移行有關，本實驗利用免疫螢光染色，來觀察 hMOB2 的表現與分布。我們利用兔子 anti-MOB2 (1:100;ABGENT)抗體來染 hMOB2(綠色)，rhodamine-phalloidin 來染 F-actin(紅色)與 SYTOX<sup>®</sup> Green 染細胞核(藍色)。透過顯微鏡下可以觀察到綠色螢光的 hMOB2 主要分布於 HT29 細胞的細胞核與細胞質(圖 8A)。進一步利用西方墨點法，去分析 HT29 細胞的萃取液後，確認了在 HT29 細胞中確實有 hMOB2 蛋白的表現(圖 8B)。

### 3. hMOB2-shRNAi HT29 細胞

為了去分析 hMOB2 在 HT29 細胞的功能，我們利用 RNA 干擾 (RNA interference) 的方式來抑制 hMOB2 在 HT29 細胞株的表現，然後觀察 HT29 細胞的移行模式。首先將帶有 hMOB2-shRNA1、hMOB2-shRNA2 或 scramble shRNA 的 lentivirus 來感染 HT29 細胞，經過 puromycin(2 $\mu$ g/ml)篩選 14 天後，正常未被感染的 HT29 細胞會死亡，如此可以篩出被 lentivirus 感染的 HT29 細胞。將受感染的 HT29 細胞穩定培養後，取得其細胞萃取液進行西方墨點法來測試 hMOB2 的表現。觀察染色的結果，可以見到 hMOB2-shRNAi HT29 細胞的 hMOB2 的表現量明顯變低(圖 9A)，此結果顯示 hMOB2-shRNA1 與 hMOB2-shRNA2 可以有效抑制 HT29 細胞 hMOB2 的表現。藉由 LAS-1000 luminescent image analyzer detection system (Fujifilm)此軟體將西方墨點法的結果量化後(圖 9B)，我們以 HT29 細胞的 hMOB2 表現量當作 100%，發現感染 hMOB2-shRNA1 HT29 細胞的 hMOB2 表現量僅有 25%，而感染 hMOB2-shRNA2 HT29 細胞的 hMOB2 表現量則是 26%，利用 student's t-test 做分析後，發現在 hMOB2 的表現量有明顯的下降 (分別為  $p=0.0007$  與  $p=0.009$ )。

### 4. hMOB2 表現與細胞增生

為瞭解 hMOB2 是否會影響到細胞增生，我們在細胞培養盤中，

每格放入  $1.0 \times 10^5$  個細胞，經過 24、48、72 小時的培養後，透過 Hemocytometer 計算細胞數後，以 Student's t-test 來比較正常 HT29 細胞與 hMOB2-shRNAi HT29 細胞細胞增生能力的差異。正常 HT29 細胞與 Scramble-shRNA HT29 細胞互相比較時(圖 10A)，就細胞數目上來看，正常 HT29 細胞的細胞數稍微少於 scramble-shRNA HT29 細胞。經過統計比較後，兩者之間並沒有差異( $p=0.397$ )，這代表用來進行感染的 lentivirus 載體不會去影響 HT29 細胞的增生。接著進行 hMOB2-shRNAi HT29 細胞與 scramble-shRNA HT29 細胞增生的比較(圖 10B):初期兩天的培養，兩者的細胞數目並沒有差異，到了第三天可以發現 scramble-shRNA HT29 細胞數目明顯多於 hMOB2-shRNA1 HT29 細胞 ( $p=0.0006$ )或 hMOB2-shRNA2 HT29 細胞( $p=0.0164$ )。兩組 hMOB2- shRNA HT29 細胞間的數目比較則是沒有差異( $p=0.074$ )。由此結果可以得知，當 hMOB2 的表現被抑制時，HT29 細胞的增生會受到抑制。

## 5. 細胞移行(transwell assay)分析

為瞭解 HT29 細胞的移行能力是否與 hMOB2 有關，我們以細胞移行分析法來分析細胞移行能力。我們以 scramble-shRNA HT29 細胞作為控制組，其移行能力當作 100%，而 hMOB2-shRNA1/hMOB2-shRNA2 HT29 細胞作為實驗組。在含有



10%血清的底盤培養液的誘導下，經過 18 小時後的培養，取得頂盤的膜，以 DAPI 去染膜上的 HT29 細胞，在顯微鏡下觀察(圖 11)。結果可以發現 scramble-shRNA HT29 細胞有移行的細胞數目明顯高於 hMOB2-shRNA1/hMOB2-shRNA2 HT29 細胞。量化後可以發現 hMOB2 shRNA1 HT29 細胞的移行能力下降了 83.6% ( $p=0.0006$ )，而 hMOB2 shRNA2 HT29 細胞則下降了 90.7% ( $p=0.009$ ) (圖 12)。由此可見 hMOB2 的表現被抑制時，會使 HT29 細胞的移行能力變差。綜合上述的實驗，我們發現 hMOB2 基因與細胞之移行有顯著之關係，本結果對於未來研究癌細胞轉移的分子機制提供了重要的線索。

## 討論

### 1. hMOB2 蛋白是普遍分布於人體各個組織，且在癌組織中有高度表現

MOB 蛋白已知是一個在酵母菌、果蠅、哺乳類生物間高度保留的一群蛋白質(Luca and Winey, 1998; Salimova, et al., 2000; Colman-Lerner, et al. 2001; He, et al., 2005; Devroe, et al., 2004)。根據先前實驗室的研究利用老鼠的組織以 RT-PCR 與西方墨點法分別去評估不同器官 MOB2 RNA 與 MOB2 蛋白的表現，結果發現：MOB2 廣泛的表現在老鼠各個器官內。而在本次的研究中，我們利用組織晶片 LS-SCA5 以 anti-MOB2 抗體進行免疫組織化學染色後，可以觀察到 hMOB2 蛋白在各個不同的人類器官的良性/正常組織中均有不同強度的表現，因此可以知道 hMOB2 蛋白是一個普遍存在於人體各個組織的蛋白。而在比較癌組織與正常/良性組織的 hMOB2 蛋白表現強度時，可以看到大部分的癌組織內 hMOB2 蛋白的表現都比較高，代表著 hMOB2 與癌症的發生與惡化可能有相關。hMOB2 蛋白在癌症發生上所扮演角色的研究並不多，先前在肝癌的研究中發現 hMOB2 mRNA 的高表現與肝癌產生包膜侵犯(capsule invasion)有顯著的相關性，顯示出 hMOB2 與腫瘤的惡化可能有相關(Wang, et al., 2001)。

## 2. hMOB2 蛋白可調控細胞移行

許多 MOB2 的研究可以發現 MOB2 蛋白在不同生物中各有不同的功能:在酵母菌中，Mob2p 與其細胞極性與細胞型態有關 (Colman-Lerner, et al., 2001; Weiss, et al., 2002; Jansen, et al., 2006; Hou, et al., 2003)；果蠅的研究上則發現 dMOB2 會影響其翅膀與感光細胞的型態(He, et al., 2005; Liu, et al., 2009)；利用老鼠的 neuroblastoma 細胞株的研究則發現 MOB2 會促進神經突觸的增生(Lin, et al., 2011)。儘管功能上不盡相同，然而這些功能都與細胞膜的改變與細胞骨架的調節有相關，因此 MOB2 對於細胞移動也可能會有影響。如同我們所預測的，利用肝癌 Mahlavu 細胞株的實驗中發現過度表現 hMOB2 時，Mahlavu 細胞的移行能力會增加；相反地，當 hMOB2 被抑制時，Mahlavu 細胞的移行能力則會下降。在本次的實驗中，HT29 細胞的移行能力透過細胞移行分析(transwell assay)在 10%血清的誘導下，在第 18 小時的觀察發現其會因為 hMOB2 受到抑制而下降。而且透過細胞增生實驗的觀察可知在 hMOB2-shRNA HT29 細胞的增生能力在培養初期與正常 HT29 細胞相比無明顯差異，所以本實驗中 hMOB2-shRNA HT29 細胞的移行能力下降與細胞增生無關。綜合以上分析，可得知 hMOB2 會影響細胞移行的能力，而且 hMOB2 與細胞的趨化作用(chemotaxis)可能有相關。

hMOB2 是透過怎樣的機制去調控細胞移行，目前仍不清楚。在

利用 Mahlavu 細胞進行傷口癒合的實驗中，觀察到 hMOB2 會聚集在細胞的爬行前緣(leading edge)。當細胞受到特定訊號的引導時，細胞會形成爬行前緣往特定方向進行移動。Actin 的聚合與重組，integrin 的運送與回收，Rac 的活化與 PI3K 聚集等等都與爬行前緣的形成有關係(Arjonen, et al., 2011)。而在真菌 (fungus)的 MOR (morphogenesis-related NDR kinase)訊號傳遞中(圖 13)， MOB2 與 NDR 結合後可以去磷酸化 Rab GTPases、Rho GTPases、transcription factors 與 mRNA binding proteins，進而調控 actin 細胞骨架的變化、vesicle 的運送與細胞壁的完整性，最後可以去影響細胞的極性與型態 (Maerz and Seiler, 2010)。另外也有研究指出 cAMP 可以增加 astrocyte hMOB2 mRNA 的表現，促進 astrocyte 的 stellation (Fang et al., 2012)。因此 hMOB2 蛋白這些相關的因子的關聯性是值得我們進一步去研究的。

### 3. hMOB2 蛋白可影響細胞增生

在我們 hMOB2-shRNAi HT29 細胞的細胞增生實驗中觀察到當 hMOB2 受到抑制時，在第三天的細胞數目達到顯著性的下降，說明著 hMOB2 可以促進細胞增生/抑制細胞死亡。hMOB2 蛋白是透過怎樣的分子機制去調節細胞增生，目前仍不清楚。有學者的研究指出 hMOB2 不會與 LATS1 或 LATS2 結合，而可以與 NDR1 或 NDR2 的

N 端胺基酸序列結合，此 N 端胺基酸序列處亦是 hMOB1A/B 與 NDR1/2 作用之處。hMOB1A/B 與 hMOB2 之間在 NDR1/2 的 N 端胺基酸的結合是呈現相互競爭的，而且 hMOB2 可以干擾 phosphatase 2A inhibitor OA 的作用，使得 NDR 的磷酸化下降，減少內生性 NDR 的活性(Kohler, et al. 2010)。因此 NDR 相關的功能，如細胞計畫性死亡與中心粒的複製，會受到 hMOB2 的負調控。而且在過度表現 hMOB2 的 Mahlavu 細胞上發現磷酸化的 ERK 與磷酸化的 AKT 都有增加的情形。所以 hMOB2 可能可以透過抑制 NDR 的活性，活化 ERK 訊號與活化 AKT 訊號去增強細胞增生與促進細胞存活(Luca, et al.,2012)。然而有研究利用肝癌細胞株 SMMC-7721 細胞進行 hMOB2 過量表現的實驗，發現 SMMC-7721 細胞的生長與增生會受到 hMOB2 的負調控(Leng, et al., 2012)。這樣的觀察結果與我們的觀察結果相反，因此 MOB2 在細胞增生的角色為何還需要更多的研究才能確知。

結論：在本次的研究裡，我們發現 hMOB2 在人體各個器官都有表現，且在癌症組織中可發現普遍 hMOB2 過度表現。利用大腸癌 HT29 細胞株進行 hMOB2 功能研究，在細胞增生實驗發現 hMOB2 的抑制可使細胞的增生能力下降；細胞移行實驗中也確認了 hMOB2 的抑制會使細胞的移行能力下降。綜合以上發現，我們認為 hMOB2 對於腫瘤的發生與惡化佔有重要的角色，值得進一步的研究。

## 參考文獻

- Arjonen, A., Kaukonen, R., and Ivaska, J. (2011). Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh Migr.* 5, 421-430
- Colman-Lerner, A., Chin, T.E. and Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107, 739–750.
- Devroe, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Silver, P.A. (2004). Human Mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. *J. Biol. Chem.* 279, 24444–24451.
- Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W.B., Adler, P.N., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (2004). Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell* 119, 245–256.
- Fang K.M., Liu Y.Y., Lin C.H., Fan S.S., Tsai C.H. and Tzeng S.F. (2012). Mps one binder 2 gene upregulation in the stellation of astrocytes induced by cAMP-dependent pathway. *J Cell Biochem* 113, 3019-3028
- He, Y., Emoto, K., Fang, X., Ren, N., Tian, X., Jan, Y.N. and Adler, P.N. (2005). *Drosophila* Mob family proteins interact with the related Tricornered (Trc) and Warts (Wts) kinases. *Mol. Biol. Cell* 16, 4139–4152.
- Hergovich, A., Bichsel, S.J. and Hemmings, B.A. (2005) Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8259–8272.
- Hergovich, A., Stegert, M.R., Schmitz, D. and Hemmings, B.A. (2006) NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 253–263.
- Hergovish, A., Kohler, R.S., Schmitz, D., Vichalkovski, A., Cornils, H., and Hemmings, B.A. (2009). The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Curr. Biol.* 19, 1692-1702
- Hergovish, A. (2011). MOB control: Reviewing a conserved family of kinase regulators. *Cell Signal* 23, 1433-1440.
- Hou, M.C., Wiley, D.J., Verde, F. and McCollum, D. (2003). Mob2p interacts with the protein kinase Orb6p to promote coordination of cell polarity with cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 116, 125–135.
- Jansen, J.M., Barry, M.F., Yoo, C.K., and Weiss, E.L. (2006). Phosphoregulation of Cbk1 is critical for RAM network control of transcription and morphogenesis. *J. Cell Biol.* 175, 755-766

- Kohler, R.S., Schmitz, D., Cornils, H., Hemmings, B.A., and Hergovich, A. (2010). Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role of human MOB2 in the regulation of human NKR kinases. *Mol. Cell Biol.* 30, 4507-4520
- Lai, Z.C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.L. and Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor. *Mol. Cell* 120, 675–685.
- Leng J.J., Tan H.M., Chen K., Shen W.G., Tan J.W. (2012). Growth-inhibitory effects of MOB2 on human hepatic carcinoma cell line SMMC-7721. *World J Gastroenterol.* 18, 7285-7289
- Lin, C.H., Hsieh, M.L., Fan, S.S. (2011). The promotion of neurite formation in Neuro2A cells by mouse Mob2 protein. *FEBS Letters* 585, 523-530
- Liu, L.Y., Lin, C.H. and Fan, S.S. (2009). Function of *Drosophila* mob2 in photoreceptor morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 338, 377–389.
- Luca, F.C. and Winey, M. (1998). MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Mol. Biol. Cell.* 9, 29–46.
- Luca A.D., Maiello M.R., D'Alessio A., Pergameno M., Normanno N. (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 16 Suppl 2: S17-27
- Maerz S. and Seiler S. (2010). Tales of RAM and MOR: NDR kinase signaling in fungal morphogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 13, 663-671
- Mohl, D.A., Huddleston, M.J., Collingwood, T.S., Annan, R.S., and Deshaies, R.J. (2009). Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitoses. *J. Cell Biol.* 184, 527-539
- Praskova, M., Xia, F., and Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr. Biol.* 18, 311-321
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2003). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 265, 23-32
- Salimova, E., Sohrmann, M., Fournier, N. and Simanis, V. (2000). The *S. pombe* orthologue of the *S. cerevisiae* mob1 gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation. *J. Cell Sci.* 113, 1695–1704.
- Saucedo, L.J., and Edgar, B.A. (2007). Filling out the Hippo pathway. *Nat. rev. Mol. Cell Biol.* 8, 613-621
- Wang Z.X., Wang H.Y., Wu M.C. (2001). Identification and characterization of a novel human hepatocellular carcinoma-associated gene. *Br J Cancer.* 85, 1162-1167

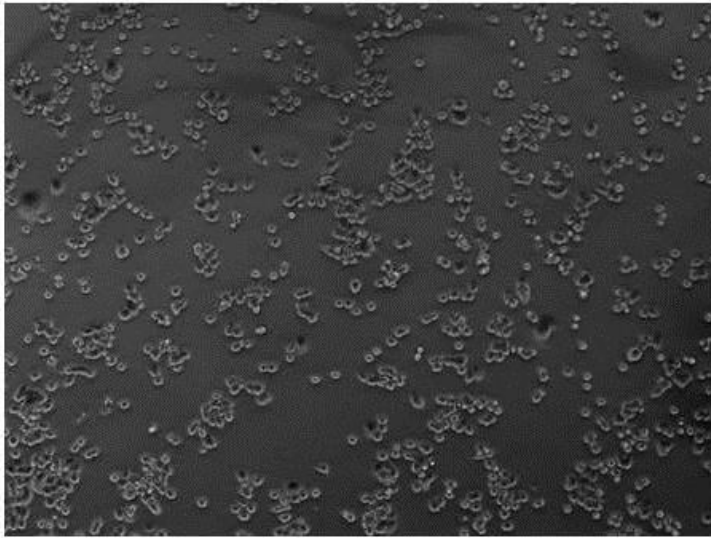
Wei, X., Shimizu, T. and Lai, Z.C. (2007). Mob as tumor suppressor is activated by hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J.* 26, 1772–1781.

Weiss, E.L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D.G. and Luca, F.C. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J. Cell Biol.* 158, 885–900.

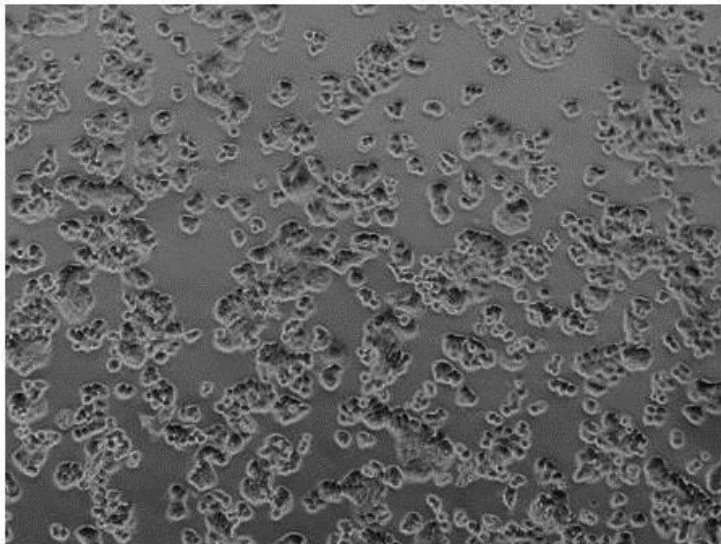
Wilmeth, L.J., Shrestha, S., Montano, G., Rashe, J., and Shuster, C.B. (2010). Mutual dependence of Mob1 and the chromosomal passenger complex for the localization during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 21, 380-392



## 圖與表



A



B

圖 1：HT29 細胞培養圖

圖 1A：HT29 細胞培養 24 小時後呈現一顆一顆的細胞，並開始有群聚的現象

圖 1B：HT29 細胞培養 48 小時後增生後的細胞明顯的成團聚集。

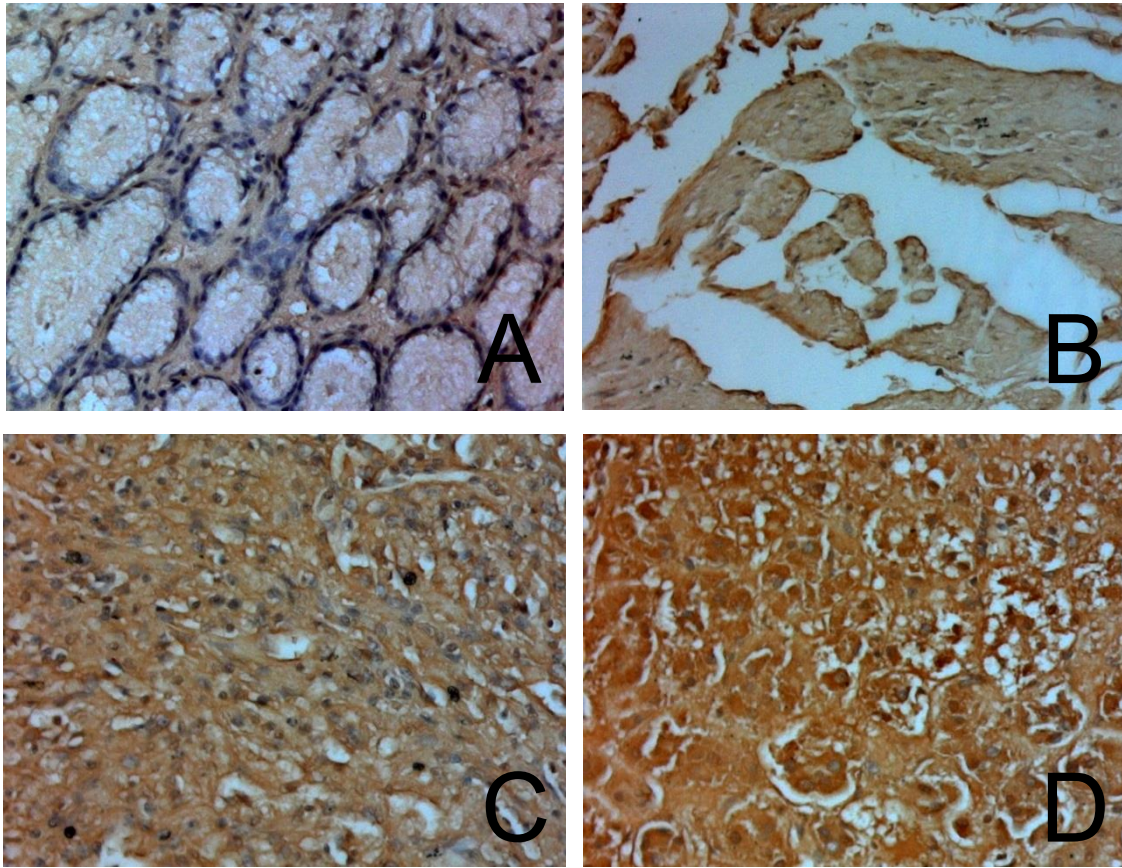


圖 2: 免疫組織化學染色法 hMOB2 蛋白表現強度

根據染色後的顏色的深淺，我們將 hMOB2 的表現強度區分為四級。

一級的強度下細胞內褐色顆粒表現極少(2A)，二級強度時細胞內有些

許的褐色顆粒(2B)，三級強度時細胞內普遍表現褐色顆粒(2C)，四級

強度時細胞內的褐色顆粒極多且濃染(2D)。

表 1-1: 不同器官惡性腫瘤與正常/良性組織的 hMOB2 表現強度-1。

(器官後面的數字代表了不同組別的不同組織)

Tissue	hMOB2 Expression	
	Cancer	Normal
Tonsil	2	1
Throat, Pharynx	2	1
Esophagus I	3	1
Esophagus II	3	1
Esophagus III	3	1
Stomach I	3	2
Stomach II	3	2
Stomach III	3	2
Small intestine, Duodenum I	3	1
Small intestine, Duodenum II	3	2
Colon I	4	1
Colon II	3	1
Rectum I	3	1
Rectum II	3	1
Parotid gland	3	3
Pancreas	3	2
Liver I	3	4
Liver II	4	2
Gallbladder	4	1
Adrenal gland	3	4
Kidney I	4	2
Kidney II	3	2
Thyroid I	2	1
Thyroid II	3	1

表 1-2: 不同器官惡性腫瘤與正常/良性組織的 hMOB2 表現強度-2。

(器官後面的數字代表了不同組別的不同組織)

Tissue	hMOB2 Expression	
	Cancer	Normal
Placenta	X	1
Brain	2	2
Breast I	3	2
Breast II	3	2
Lung I	4	2
Lung II	3	1
Lung III	4	2
Lung IV	3	3
Lung V	3	2
Lymph node I	3	2
Lymph node II	3	2
Bladder I	4	4
Bladder II	3	3
Testis	2	2
Prostate	3	2
Ovary I	3	1
Ovary II	3	1
Uterus I	1	1
Uterus II	2	2
Fallopian tube	3	3
Adipose	2	1
Muscle	2	1
Skin	2	1
Thymus	3	2

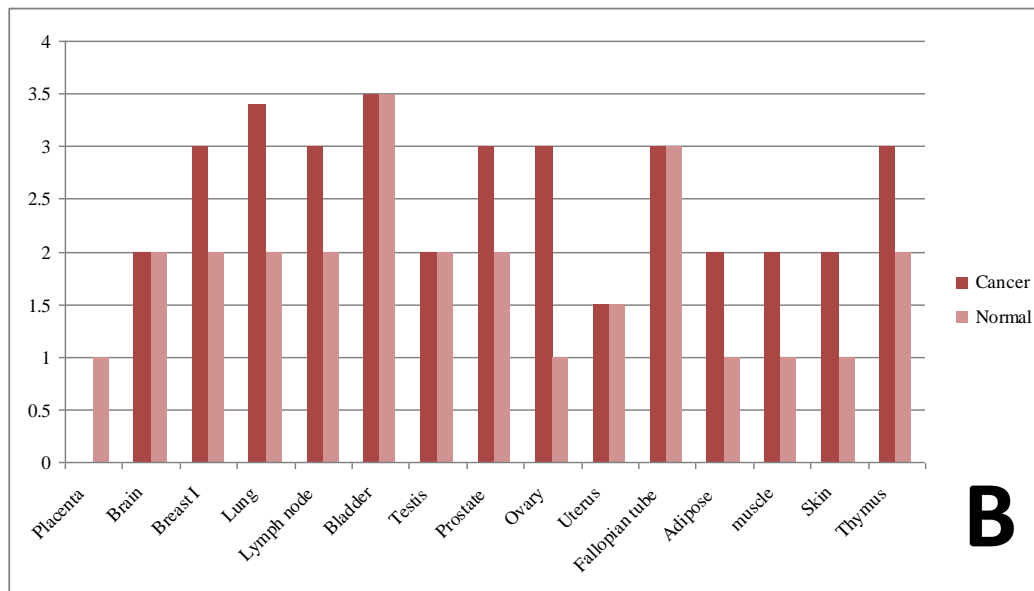
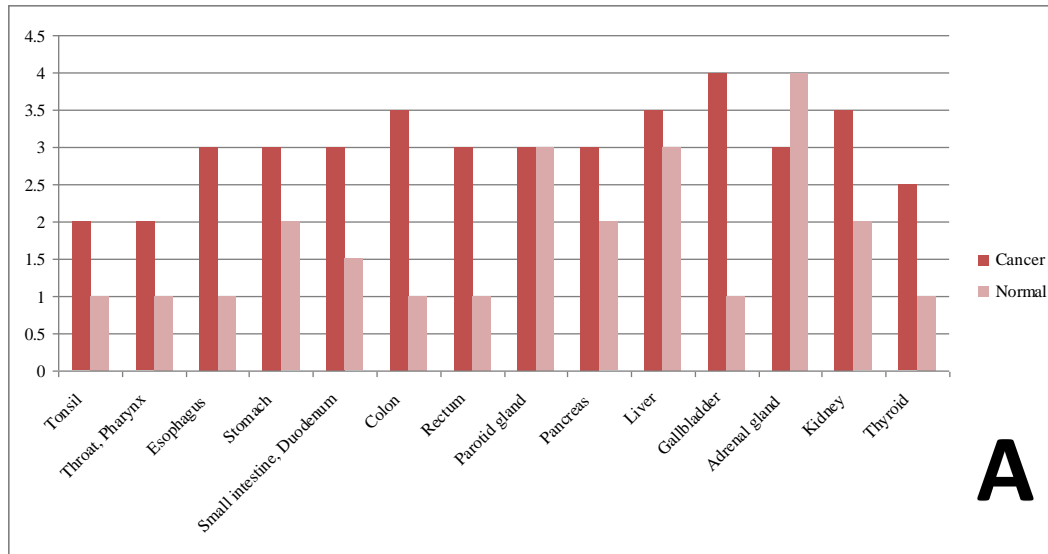


圖 3:不同組織的 hMOB2 平均表現強度

圖 3A:表 1-1 各個器官的 hMOB2 的表現強度平均後,所得的柱狀圖。

圖 3B:表 1-2 各個器官的 hMOB2 的表現強度平均後,所得的柱狀圖。

透過圖表的比較可以明顯看出大部分癌組織的 hMOB2 表現高於正常 / 良性組織。

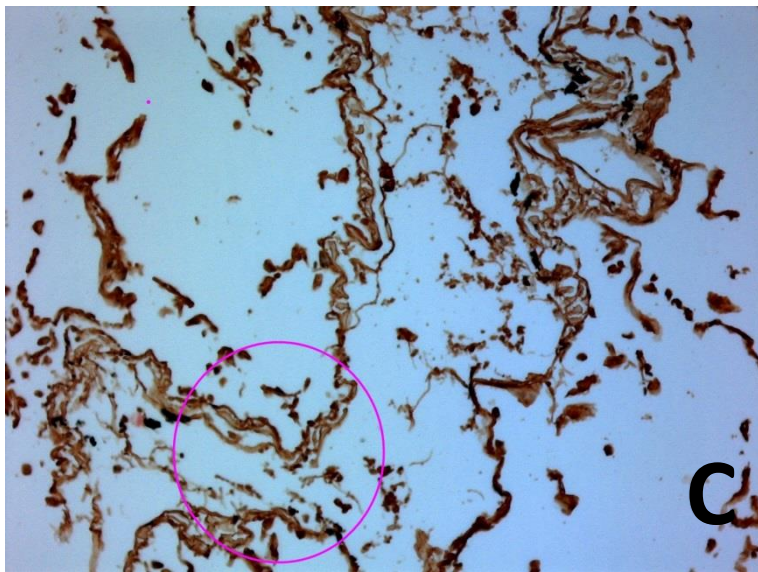
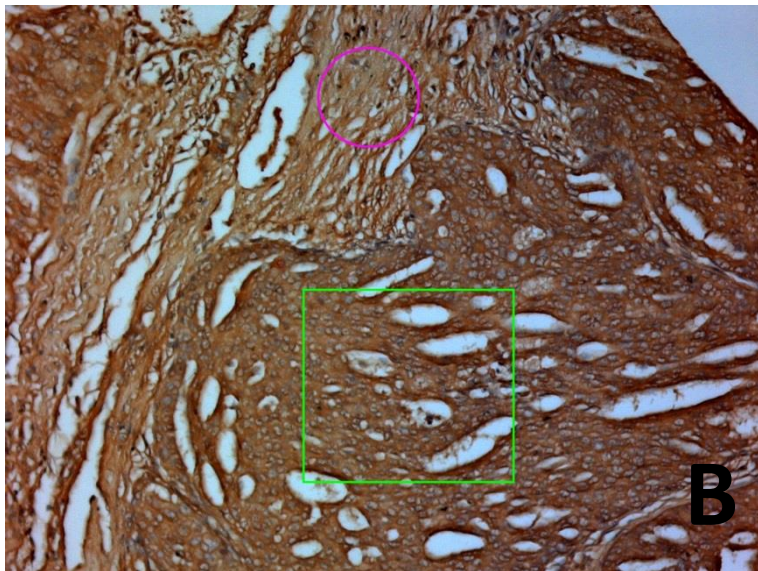
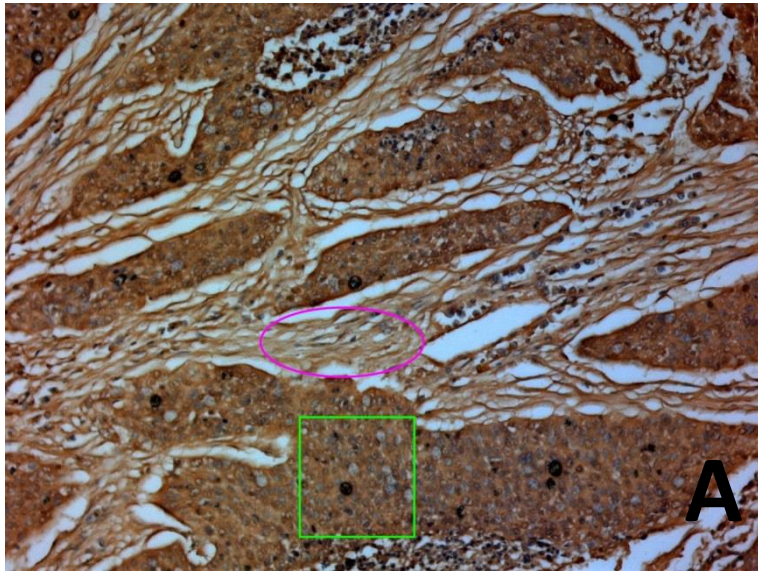


圖 4：肺癌組織的 hMOB2 表現

圖 4A：為 66 歲男性肺癌的組織切片，病理診斷為扁平上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma)。癌細胞(綠色方框)內的 hMOB2 表現相當強烈(4 分)；而周邊結締組織(紅色圓框)hMOB2 的表現僅有 1~2 分。

圖 4B：為 70 歲男性肺癌的組織切片，病理診斷為腺鱗癌 (adenosquamous cell carcinoma)。癌細胞內(綠色方框)的 hMOB2 表現強烈(3~4 分)；而周邊結締組織(紅色圓框)hMOB2 的表現則約為 1~2 分。

圖 4C：為 27 歲男性良性肺組織切片，肺泡組織(紅色圓框)雖有 hMOB2 的表現，但其表現強度約 1~2 分。

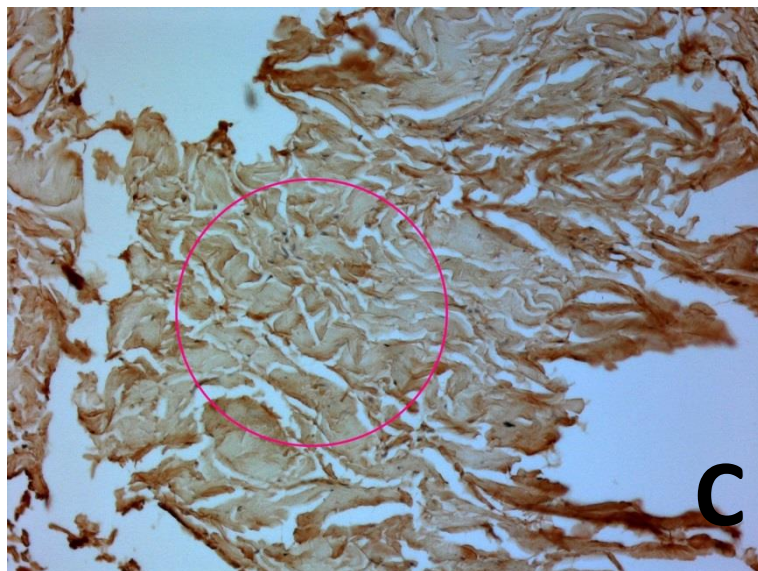
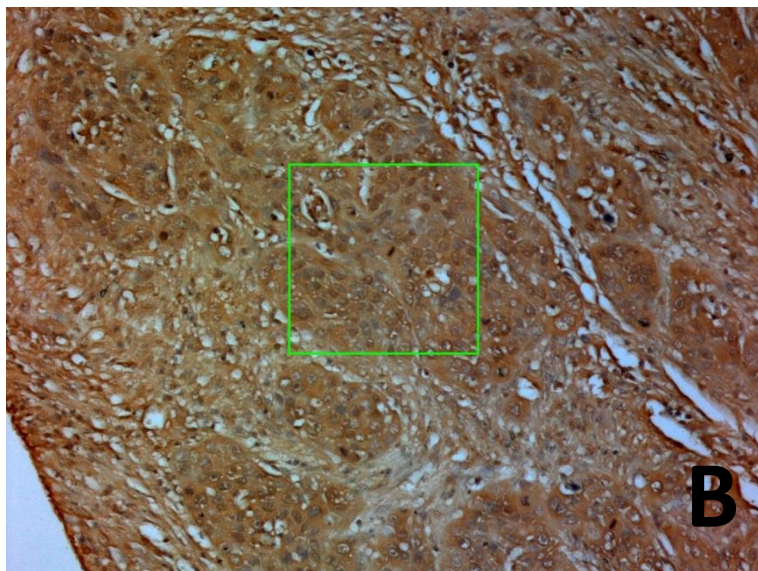
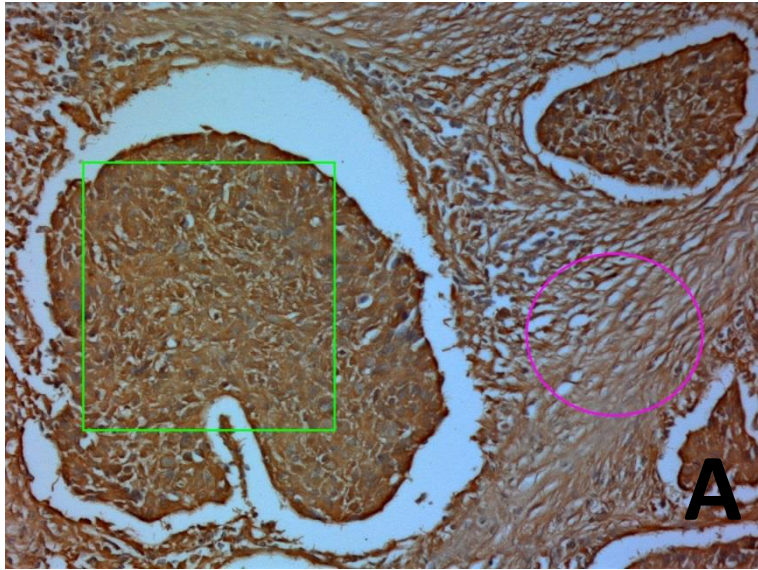




圖 5：食道癌組織的 hMOB2 表現

圖 5A：為 72 歲男性食道癌的組織切片，病理診斷為扁平上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma)。癌細胞(綠色方框)的 hMOB2 表現強烈，可達 4 分的強度；而周邊的結締組織(紅色圓框)的 hMOB 強度則僅有 1~2 分。

圖 5B：為 50 歲男性食道癌的組織切片，病理診斷為腺癌 (adenocarcinoma)，癌組織(綠色方框)的 hMOB2 表現可達 3 分。

圖 5C：為 20 歲男性良性食道組織切片，圖中主要可見的是平滑肌細胞(紅色圓框)，而其內 hMOB2 的表現只有 1 分的強度。

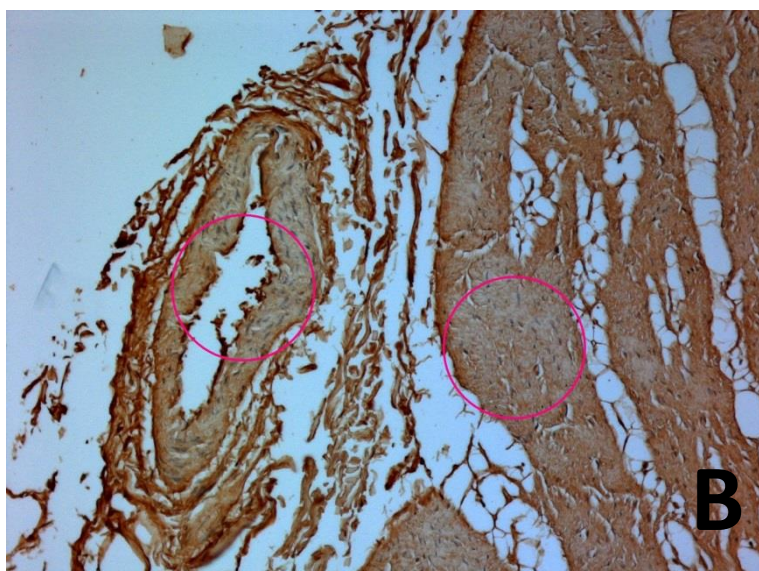
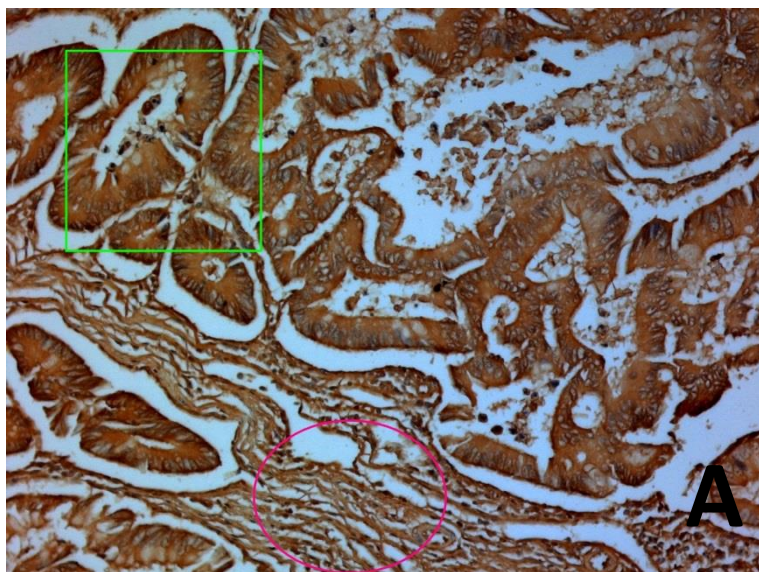


圖 6：大腸組織染色配對(一)

圖 6A：為 65 歲女性大腸癌的組織切片，病理診斷為腺癌 (adenocarcinoma)。癌細胞(綠色方框)有明顯的 hMOB2 表現(約 3-4 分)；而周邊組織(紅色圓框)約為 2 分。

圖 6B：為 28 歲男性正常大腸組織切片，圖中可見肌肉組織(紅色圓框)相較於圖 6A 癌組織 hMOB2 的表現(約 1-2 分)明顯比較低。

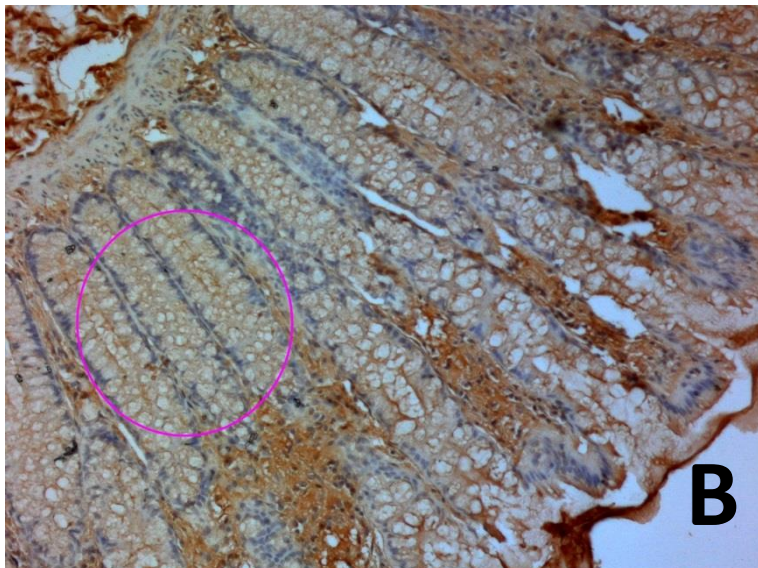
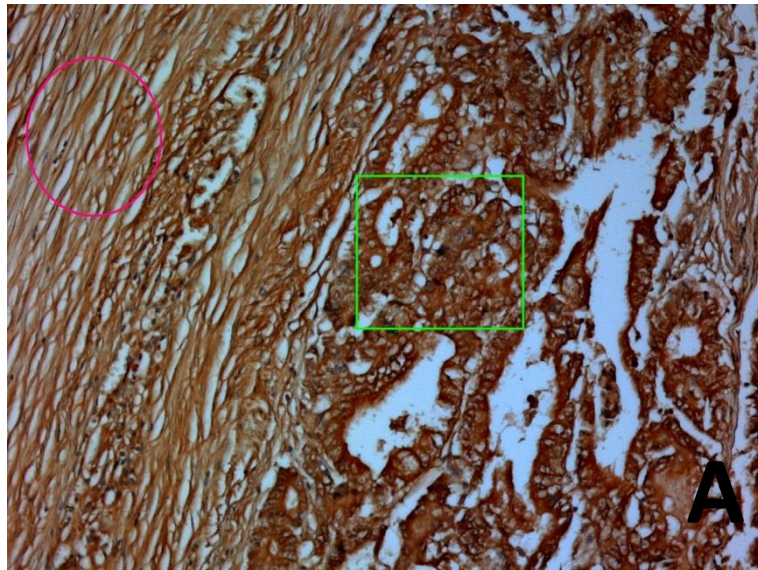
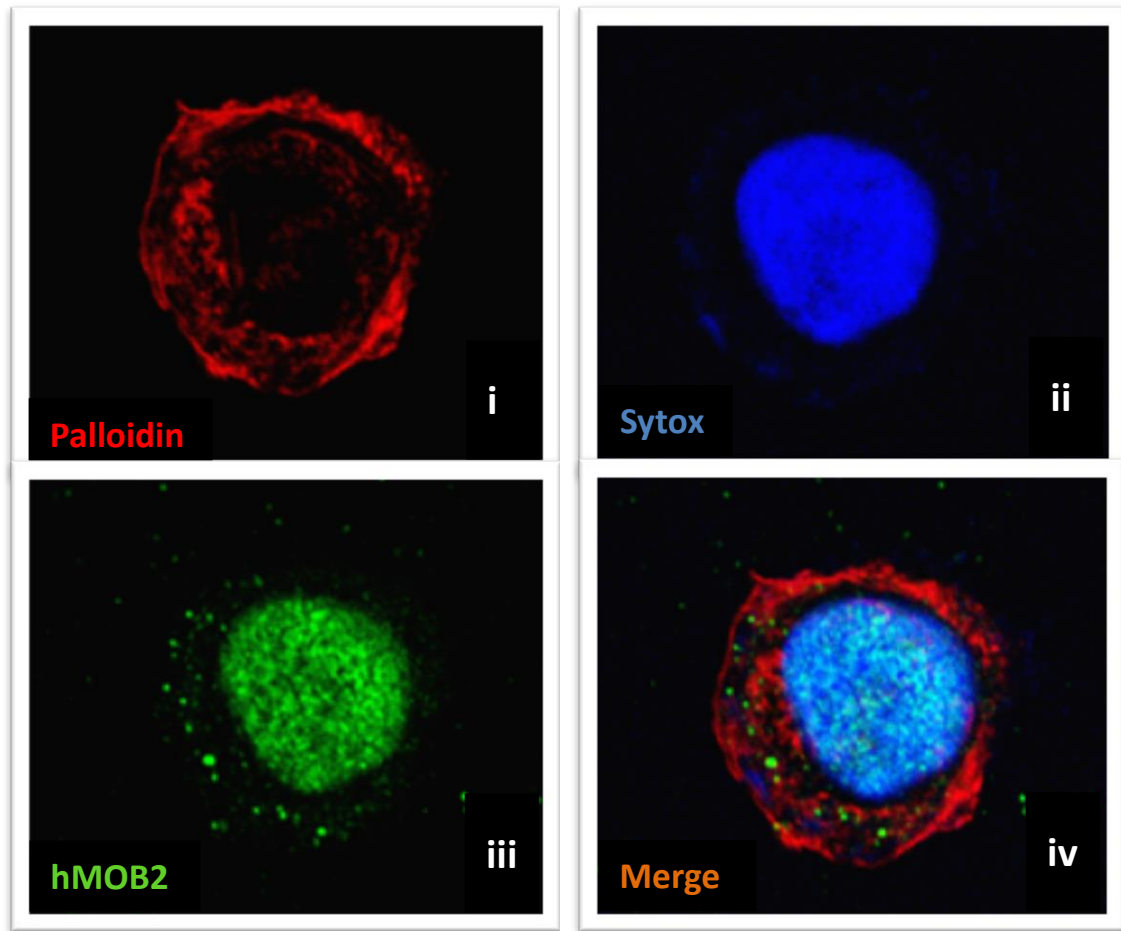


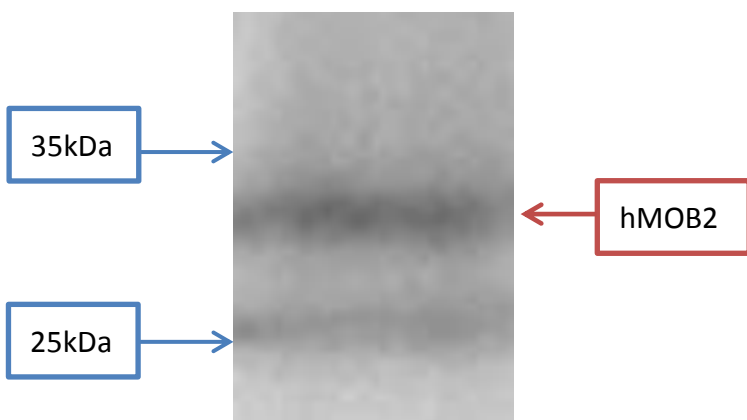
圖 7：大腸組織染色配對(二)

圖 7A：為 52 歲女性大腸癌的組織切片，病理診斷為腺癌 (adenocarcinoma)。癌細胞(綠色方框)有明顯的 hMOB2 表現(4 分)；而周邊組織(紅色圓框)約為 2 分。

圖 7B：為 64 歲男性正常大腸組織切片，大腸柱狀上皮(紅色圓框)可見 hMOB2 的表現(1 分)明顯低於圖 7A 的癌組織。



**A**



**B**

圖 8: hMOB2 蛋白於 HT29 細胞的表現

圖 8A: 免疫螢光染色法, 將 HT29 細胞利用 phalloidin (紅色) 染 F-actin (i 小圖), sytox (藍色) 染細胞核(ii 小圖) 與 anti-MOB2 抗體 (綠色) 染 hMOB2 (iii 小圖) 的結果。可見 hMOB2 主要分布於 HT29 細胞的細胞核與細胞質。

圖 8B: 將 HT29 細胞的萃取液進行西方墨點法的染色結果。可以看到 HT29 細胞確實有表現 hMOB2 蛋白, 位於約 30 kDa 的位置。

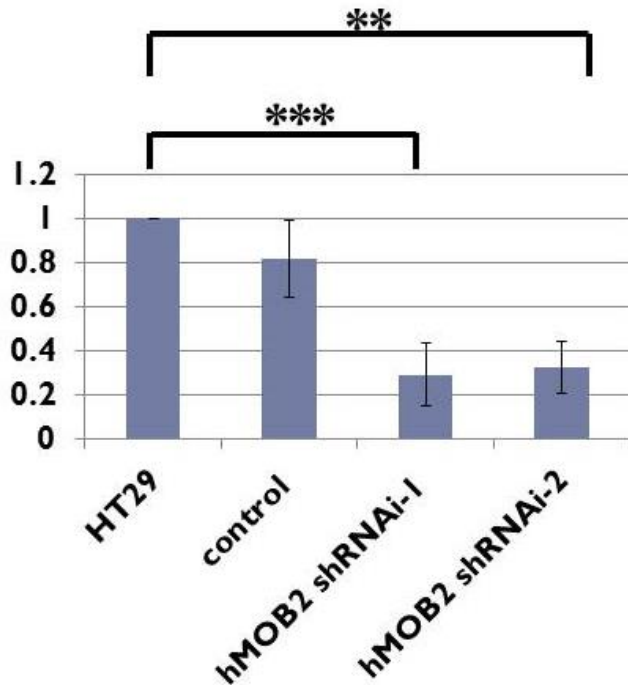
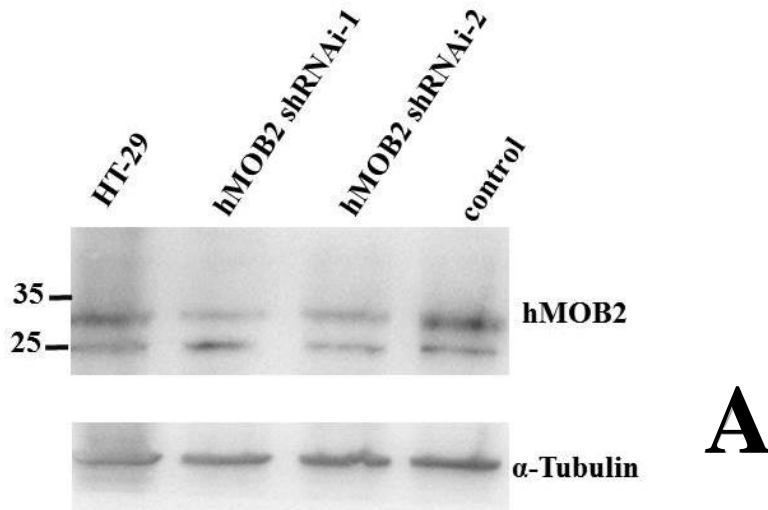


圖 9：hMOB2-shRNAi HT29 細胞的 hMOB2 表現

HT29 細胞利用 hMOB2-shRNAi 1/2 進行干擾後，可以在西方墨點法 (圖 9A)發現 hMOB2-shRNAi 1/2 HT29 細胞的 hMOB2 色帶顏色較 HT29 細胞或 control 組的色帶來得濃染。將西方墨點法的結果量化之後(圖 9B)，統計上可以發現 hMOB2-shRNAi 1/2 HT29 細胞的 hMOB2 表現量明顯低於 HT29 細胞(\*\*：  $p < 0.01$ ; \*\*\*：  $p < 0.001$ )。

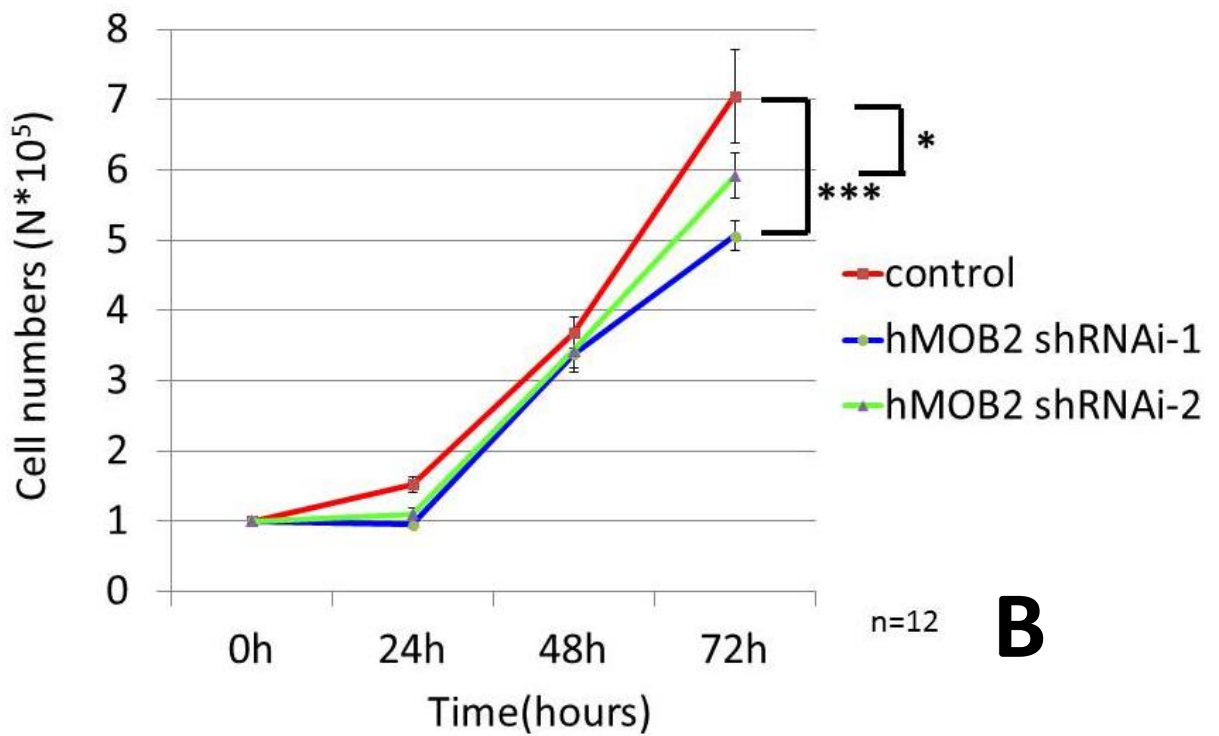
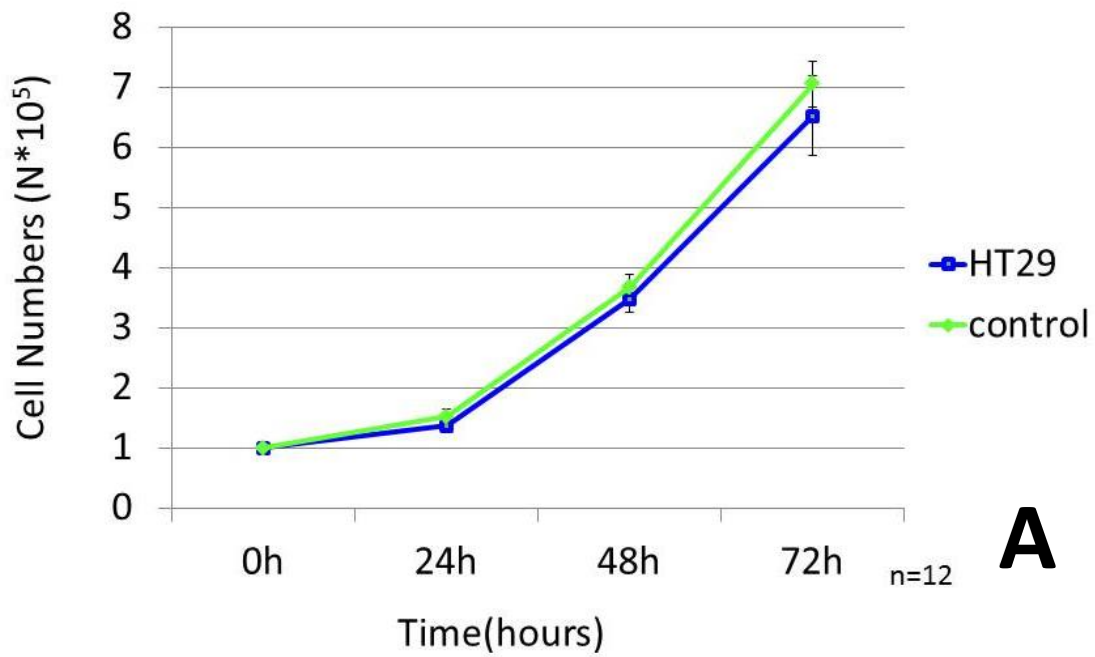


圖 10：細胞增生實驗

圖 10A: 藉由細胞培養的觀察中可以發現 HT29 細胞與 control

(scramble-shRNA) HT29 細胞在第 24、48、72 小時的細胞數目上並沒

有差異( $p=0.397$ )，顯示兩者的細胞增生能力是相似的。

圖 10B: 同樣的細胞培養實驗，可以發現 control 組的細胞數與 hMOB2 shRNAi 1/2 組的細胞數互相比較時，在第 24、48 小時可以發現 control 組的細胞數較多，但此時還沒有統計上的差異。直到第 72 小時，control 組的細胞數明顯高於 hMOB2 shRNA1 組或 hMOB2 shRNA2 組的細胞數。顯示當 hMOB2 被抑制時，HT29 細胞的增生能力會受到抑制。

(\* :  $p<0.05$ ;\*\*\* :  $p<0.001$ )





圖 11：細胞移行實驗顯微鏡照片圖

細胞移行實驗的顯微鏡觀察，可以看見 control 組的細胞數(白點)明顯多於 hMOB2 shRNAi HT29 細胞。

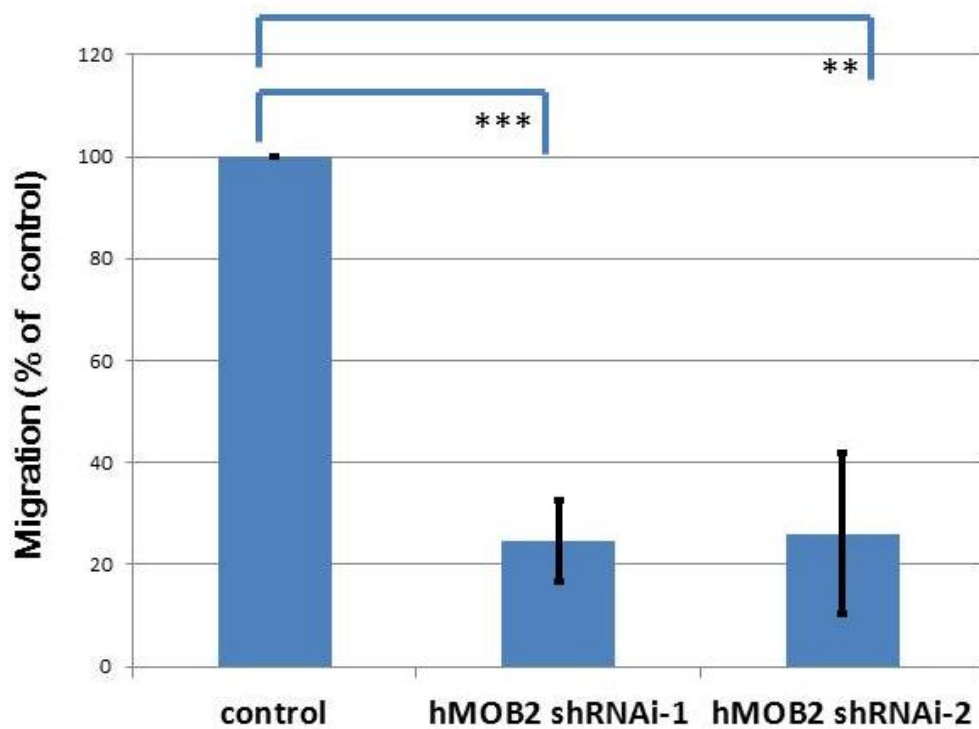


圖 12：細胞移行實驗結果量化圖

將 control 組的細胞移行能力定為 100%，經過比較後可以發現 hMOB2 shRNA1 HT29 細胞與 hMOB2 shRNA2 HT29 細胞的移行能力皆有明顯的下降。（\*\*： $p < 0.01$ ；\*\*\*： $p < 0.001$ ）

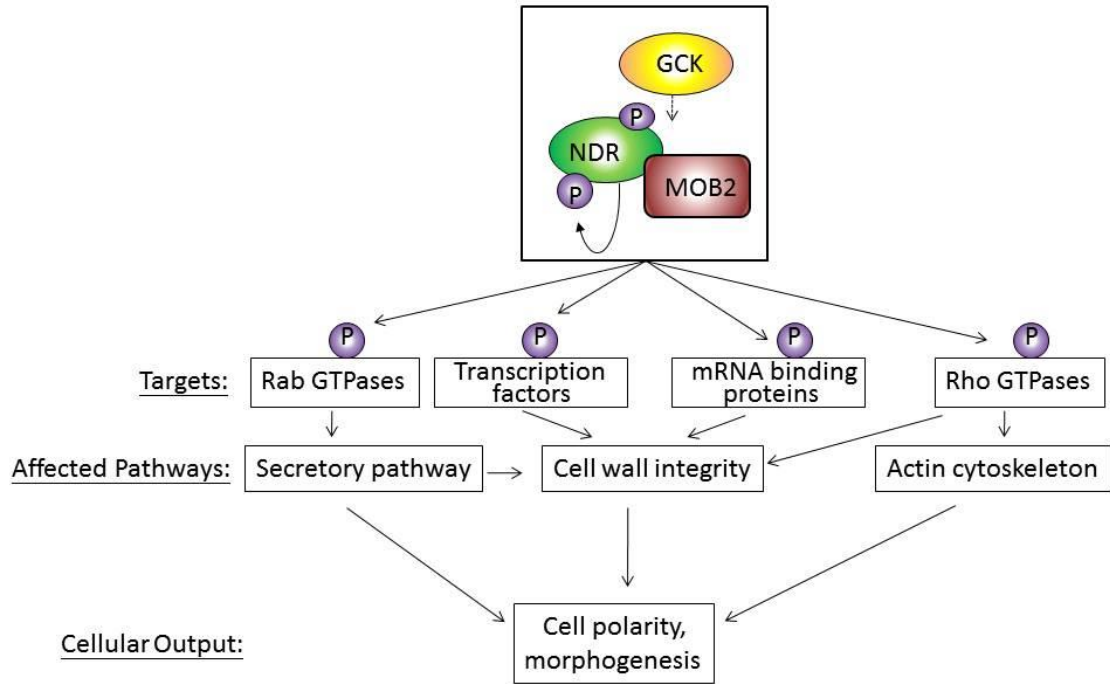


圖 13: MOR 的訊號傳遞

GC kinase 可使 NDR kinase 的 hydrophobic motif 上的 threonine 磷酸化，在 NDR 與 MOB2 結合的時候可使 NDR 完全活化後，進而去磷酸化下游的標的(Rab GTPases、Rho GTPases、transcription factor 與 mRNA binding proteins)，會去影響細胞分泌、細胞壁的完整、actin 細胞骨架等功能，最後會造成細胞極性與型態的變化。