

# 東海大學生命科學系碩士論文

BK通道對癌細胞生長與轉移之可能影響

Possible role of BK channel in cancer cell viability  
and migration

研究生：李欣璇

LEE SHIN SHYUAN

指導教授：陳仁祥

Ren-Shiang Chen, Ph.D.

中華民國 104 年 07 月 25 日

東海大學生命科學系  
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 李欣璇 君所撰寫之論文

(中文)

BK 通道對癌細胞生長與轉移之可能影響

(英文)

Possible role of BK channel in cancer cell viability and migration

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

趙世廷

(簽名)

委員

蔡克勵

陳仁祥

中華民國 104 年 7 月 9 日

## 誌謝

我要感謝陳仁祥老師收我作為東海生科電生理學實驗室的第一位研究生，我於大學期間未加入過實驗室，沒有修過專題。碩一剛進實驗室，感覺懵懵懂懂很多事情都不了解，隨著新實驗室逐漸建立到可以開始運作實驗，才在陳老師的指導下漸漸學習到實驗中的各種細節，以及培養個人的思考能力。接著要感謝謝明麗老師與分子醫學實驗室的同學們，提供並教導我許多分生實驗技術。然後感謝趙偉廷老師與細胞生物學實驗室的助理姊姊和同學們，也借了很多細胞實驗物品和技術給我。還要感謝系上熱心的老師們借我使用實驗室內的儀器，也要感謝各個實驗室的助理與學生帶我使用這些儀器。還有感謝系上的助教們提供各種行政上的、論文系統上的、日常生活上的建議與諮詢，最後要謝謝我的爸爸、媽媽以及弟弟的陪伴與支持，以及電生理學實驗室還有林玉雯老師轉譯醫學實驗室的同學與學弟妹之照顧與意見。

## 目錄

中文摘要	-----	2
Abstract	-----	3
前言	-----	4
材料與方法	-----	8
結果	-----	19
討論	-----	25
參考文獻	-----	35
圖目與表目	-----	38
附圖	-----	39
個人資料	-----	47

## 中文摘要

BK 鉀離子通道 (Large-conductance voltage- and calcium-gated potassium channels)之結構為四聚體，參與了許多生理機制。當 BK 通道活化時，會對特定生理刺激提供回饋調節，包括細胞質內鈣離子濃度的變化。Focal adhesion kinase (FAK)參與細胞粘連、細胞爬行、細胞週期等重要生理過程。過去研究指出許多癌細胞的 FAK 表達有增多的現象。PF573228 是一種抗癌化合物，研究已知其是個強效而有選擇性的 FAK 抑制劑，並且可以不經抑制 FAK 磷酸化途徑對 BK 通道直接作用。以上發現揭示了癌細胞的 BK 鉀離子電流與細胞爬行可能會有關聯。為了驗證這個假說在大腸癌細胞株 (SW480)是否成立，我們首先以逆轉錄聚合酶鏈式反應 (RT-PCR)確定了 BK 通道的表達。接著，我們測量 SW480 細胞在有 BK 通道活化劑 (PF573228, BMS-19011)、BK 通道抑制劑 (Paxilline)或者促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK)抑制劑 (U0126)等不同藥物存在的影響下，其細胞存活度的變化。我們也利用 Transwell Migration Assay 觀察上述之藥物對癌細胞的爬行能力的影響。實驗數據指出活化BK通道可以抑制細胞爬行，但活化或抑制 BK 通道對生長或爬行無顯著影響。此外，PF-573228 對 SW480 大腸癌細胞之抑制作用主要透過抑制 FAK 進行，而活化 BK 鉀電流則扮演次要的角色。

## Abstract

BK (Large-conductance voltage- and calcium-gated potassium) channels are tetrameric proteins that are important regulators of numerous physiological functions. When activated, BK channels may provide feedback regulation on certain physiological stimuli, including the fluctuation of cytoplasmic calcium. Focal adhesion kinase (FAK) regulates many cell functions including focal adhesion, cell migration and cell cycle progression. FAK has been previously reported to be increased in many cancer cells, and oscillating activity of BK channels appears to be important for the migration of some metastatic cells. PF573228, an effective anticancer compound that potently and selectively inhibits FAK, was reported to exert an additional effect on BK channels via a pathway unlinked to the inhibition of FAK phosphorylation. The above findings suggest a possible correlation between BK potassium currents and tumor suppression in cancer cells. To test this hypothesis in an adenocarcinoma cell line (SW480), we first confirmed the expression of BK channels by RT-PCR. We then measured the viability of SW480 cells in the presence of BK channel agonists (PF573228, BMS-191011), antagonist (Paxilline), as well as a mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor (U0126) by MTT Assay. We also investigated how the above chemicals affect cancer cell metastasis by performing Transwell Migration Assay. Current data indicated that activation of BK channels does inhibit cancer cell migration. On the other hand, PF573228 indeed reduces cancer cell migration mainly by inhibiting FAK and partly by activating BK currents.

## 前言

細胞轉化成癌細胞的途徑非常多，例如：表皮生長因子受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 失調，導致細胞過度生長 (Cunningham et al., 2004)，或者胞外基質與 integrin 傳來的刺激與 focal adhesion kinase (FAK) 的反應失常，讓細胞不易凋亡、過度增殖與爬行活躍 (So et al., 2011; Zhao and Guan, 2009)。然而比起原位癌，最讓人們聞風色變的還是隨著血液循環系統移動，可能在人體的任一組織器官形成新病灶的轉移癌。

癌細胞的轉移需要透過細胞爬行 (cell migration) 這個過程來進行。細胞要移動的時候細胞前端突出，與基質表面接觸固著，形成一個特殊構造 focal adhesion (FA)，接著細胞後緣的 FA 瓦解，因為細胞骨架產生的收縮性而使細胞往前移動 (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007)。FA 是很多蛋白質組成的蛋白複合體，包含  $\alpha$ -actin、FAK、Src、Talin 與 Cas-Crk 等蛋白 (Pellinen and Ivaska, 2006)。由胞外基質傳來的外界刺激可透過 integrin 與 FA 複合體的蛋白質互動，進而影響細胞的爬行方向或能動性 (motility) (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007)。過去研究指出許多癌細胞之 FA 有增多 focal adhesion kinase (FAK) 表達的現象 (So et al., 2011)。

PF573228 是一種抗癌化合物，研究已知是強效而有選擇性的

FAK 抑制劑 (Jones et al., 2009)。PF573228 會與 FAK 的 ATP 結合位作用，抑制 FAK 的酵素活性使 FA 更替減少，導致細胞爬行能力下降。2011 年 So 與其研究團隊發現 PF573228 具有不經抑制 FAK 磷酸化途徑對 BK 通道直接作用的能力 (So et al., 2011)。他們使用腦垂體癌細胞株 GH3 的實驗顯示，PF573228 增加 BK 通道的活性，使 BK 通道的鉀電流增大以及增加通道開啟的機率。此結果揭示了癌細胞的 BK 鉀離子電流與細胞移行可能會有關聯。

BK 通道是由  $\alpha$  次單元形成的四聚體蛋白， $\alpha$  次單元有七個穿膜區，包含電壓感應區與參與孔道形成的區域。 $\alpha$  次單元位在細胞膜內側的 C 端有兩個 RCK (regulating conductance of  $K^+$ ) 區，能與二價之鈣或鎂金屬離子結合。因此 BK 通道的開啟與活化可受電壓改變與二價金屬離子的濃度調節 (Contreras et al., 2013; Zhang and Yan, 2014)。

BK 通道參與許多生理過程，例如在肌肉細胞，當細胞接受外界刺激使膜電位上升至 -40 mV，細胞膜上的鈣離子通道因為膜電位改變而開啟，讓細胞外的鈣離子流入細胞，膜電位變得更正電性，流入的鈣離子也會讓肌漿網 (sarcoplasmic reticulum) 上的鈣離子通道開啟，令儲存在鈣離子通道內的鈣離子釋放到細胞質內。累積的鈣離子濃度與更上升的膜電位，促使細胞對刺激做出反應，例如收縮。但是鈣離子也會活化細胞膜上的 BK 通道開啟，讓鉀離子流出細胞外，流失正電



荷而降低膜電位。細胞過極化使得細胞膜上的鈣離子通道關閉，細胞停止收縮 (Standen, 2000)。因此 BK 通道能中止細胞對外來刺激產生的反應，扮演類似汽車剎車器的角色。

大腸直腸癌在許多已開發國家為男性第二癌症死因(僅次於肺癌)，女性的三癌症死因 (Su et al., 2012)。近年來台灣人民醫療科技進步與飲食生活習慣之改變，導致老年人口比例增加，以及過重與肥胖的人數上升，大腸直腸癌在台灣不論男女性皆為排名第三之造成死亡的癌症 (Su et al., 2012)。因此如何有效控制並醫治大腸直腸癌的病情，是台灣急切需要探討的醫療議題。本實驗以大腸直腸癌之細胞株進行實驗，研究 BK 通道之活化與抑制在大腸癌細胞生理扮演何種角色，期望能找出並發展新的醫療方向。

本實驗探討之細胞株 SW480 為來自五十歲男性大腸直腸癌的細胞株，研究已知其對抗表皮生長因子受體的 (anti-EGFR)標靶藥物 Cetuximab (商品名 Erbitux)具有抗藥性，由於 SW480 細胞之 KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)基因的第十二個密碼子 (codon)之突變 (G12V)，使得抗體無法辨識，而無法有效抑制 SW480 細胞的 RAS/RAF/MAPK 訊息傳遞途徑持續活化 (Kumar et al., 2014; Napolitano et al., 2015)。針對此種 KRAS 突變之大腸癌細胞類型，尋找新的大腸直腸癌治療方法對具有此突變的病人極為重要。

本實驗根據 2011 年 So 研究的結果 (So et al., 2011)，假設增強 BK 鉀通道電流的活化會有抑制癌細胞活性的效果，反之若抑制了 BK 鉀通道電流的產生則會讓癌細胞更加活躍 (圖一)。為了驗證這個假說，我們使用具有抗標靶藥物能力的 SW480 細胞株，檢驗其對 BK 通道活化劑、抑制劑的反應，期望透過離子通道的調節，能找出新的癌症治療方針，來達到抑制大腸癌症的效果。

## 材料與方法

### 細胞培養

SW480 細胞株 (東海生科系細胞生物學實驗室) 培養於含有 10 % 胎牛血清 (Gibco) 與 1 % Penicillin-streptomycin (Biowest) 的 RPMI-1640 (Gibco) 細胞培養液中，細胞種在 60 mm 無菌細胞培養皿 (Biofil) 培養於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱，細胞長滿底盤時進行繼代，使用 0.5 ml trypsin (Corning) 將細胞切下，以 2.5 ml 細胞培養液懸浮細胞後，分六分之一的細胞至含 3.5 ml 培養液的新 60 mm 培養皿中，每隔三到四天進行下一輪繼代。

### 萃取 total RNA

種於 60 mm 細胞培養皿的 SW480 細胞長滿，使用 trypsin 將細胞切下，其中六分之一用於繼代，另取六分之一種於含 2 ml 培養液之 35 mm 無菌細胞培養皿 (Falcon)，於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 細胞培養箱放置 24 小時。配置 PBS 溶液，10 倍濃度配方如下：1.37 M NaCl、0.03 M KCl、0.08 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 與 0.015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，以 5 M NaOH 溶液調至 pH 7.2。滅菌後，用滅菌二次水稀釋為一倍的作用濃度。24 小時後拿出培養皿置冰上 2 分鐘，吸除培養液，用冰 PBS 洗三次，加 1 ml TRIzol (Invitrogen) 到培養皿中，搖勻置冰上 5 分鐘。刮下細胞裝入微量離心管，於室溫下等 5 分鐘加 0.2 ml chloroform 搖勻，室溫下靜置三分鐘

後，在 4 °C 離心機以 12100 rpm 離心 15 分鐘後，吸上清液到新的微量離心管，加入等體積的 Isopropanol 搖勻，於 -20 °C 放置 20 分鐘，再於室溫靜置 10 分鐘。在 4 °C 離心機以 12100 rpm 離心 10 分鐘，吸除上清液，留下含 total RNA 之沉澱物，再加入 0.5 ml 75 % 乙醇將沉澱物搖起，接著用 4 °C 離心機以 10500rpm 離心 5 分鐘，吸乾乙醇，將 total RNA 沉澱物風乾後加入 20 µl 滅菌二次水。

### RT-PCR

將 total RNA 作為模板以 2X RT smart mix (SolGent) 進行反轉錄作出 cDNA，取 1 µg total RNA 加入 0.5 µl 100 µM oligo dT primer、10 µl 2X RT smart 以及滅菌二次水混合至總體積 20 µl，在室溫下等 5 分鐘後，加熱至 53 °C 維持 1 小時，於 95 °C 放置 5 分鐘做出 cDNA。

### Gradient PCR 與 PCR

利用 2X SuperRed PCR Master Mix (BioTools) 進行 PCR 反應。Positive control 取 1 µl cDNA 加 12.5 µl 2X PCR Master Mix、1 µl GAPDH forward primer、1 µl GAPDH reverse primer 與滅菌二次水。BK1 組取 1 µl cDNA 加 12.5 µl 2X PCR Master Mix、1 µl BK1 forward primer、1 µl BK1 reverse primer 與滅菌二次水。BK2 組取 1 µl cDNA 加 12.5 µl 2X PCR Master Mix、1 µl BK2 forward primer、1 µl BK2 reverse primer (Chen et al., 2010) 與滅菌二次水。Negative control 只加

12.5  $\mu$ l 2X PCR Master Mix、1  $\mu$ l BK2 forward primer、1  $\mu$ l BK2 reverse primer 與滅菌二次水。每組 primer 濃度為 10  $\mu$ M，每組反應總體積皆為 25  $\mu$ l，進行以下 gradient PCR 反應: 95°C 反應 5 分鐘後，95°C 反應 20 秒，50.7 至 56.8°C 分六組溫度各反應 1 分鐘，72°C 反應 1 分鐘，進行 35 個循環，最後再 72°C 反應 5 分鐘，由 gradient PCR 得到最佳反應溫度，再進行以下 PCR 反應：95°C 反應 5 分鐘後，95°C 反應 20 秒，53.5°C 反應 1 分鐘，72°C 反應 1 分鐘，進行 35 個循環，最後再以 72°C 反應 5 分鐘。PCR 產物與 marker (Gen100 DNA Ladder; GeneMark)以加入 DNA View (Biotools)的 2 % agarose gel (Lonza)電泳分離後拍照分析。

表一、Gradient PCR 與 PCR 實驗中，Positive control 與偵測 BK 通道 mRNA 表達所使用的引子序列。

引子	序列 (5'→3')
GAPDH forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GAPDH reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC
BK1 forward	TGCTAGCTATGGCAAATGGTG
BK1 reverse	TTAATCTTCTGGGCCTCCTTC
BK2 forward	TTGCCAACCTCTTCTCC
BK2 reverse	TGTGCTTGAGCTCATGG

## 電生理

SW480 細胞長滿 60 mm 細胞培養皿，使用 trypsin 將細胞切下，取出繼代的細胞液後，其餘細胞液取出 10  $\mu$ l 與等體積之 Trypan Blue (Corning) 溶液混勻，於細胞計數盤 (hemocytometer; Hausser) 計算細胞數量，算出 10 萬顆細胞需要多少細胞液，取出算出的細胞液體積，加入有 2 ml 細胞培養液的 35 mm 無菌細胞培養皿，置於 37 °C，5 % CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱培養 24 小時，接著吸除培養液，沿著培養皿邊緣加入 1.5 ml bath solution (配方如下：140 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 與 10 mM glucose，pH 值以 5 M NaOH 調至 7.4，滲透壓以蔗糖調至 300 mmol/Kg)。接著將培養皿放於倒立顯微鏡 (Olympus)，選定要觀測的細胞，在顯微鏡視野下將玻璃微電極靠近細胞。玻璃微電極由毛細玻璃管以 flaming/brown micropipette puller model-97 (Sutter) 拉動製成，再以 Microforge MF-830 (Narishige) 鍛燒，使微電極之電阻介於 2-5 M $\Omega$ 。玻璃微電極內填入 pipette solution (配方如下：110 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES 與 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) (Deschenes and Tomaselli, 2002)，pH 值以 45 % KOH 調至 7.2，滲透壓以蔗糖調至 300 mmol/Kg)。將玻璃

微電極貼附到單顆細胞表面後，給予些微吸力使電極與細胞緊密貼合，電阻達  $G\Omega$  時，迅速吸破細胞，測量 whole-cell 模式下的電流訊號。

### 電生理數據分析

細胞反應的電流變化由 Axon Multiclamp 700B (Molecular Device) 放大，並藉由 Axon Digidata 1440A (Molecular Device) 將生物電流的類比訊號轉換為數位訊號，再由小型桌上型電腦接收及儲存，並以軟體 pClamp 10.4 進行 voltage-clamp 記錄與後續的數據分析。

本實驗將記錄之電流峰值依下列公式 (公式一、二、三)，轉變為電導值 (conductance)，以分析測得之鉀電流可能有幾種鉀通道電流加總成，進而推斷 BK 通道是否參與其中。以公式一算出室溫為  $25^\circ\text{C}$  時，鉀離子之平衡電位理論值為  $-79.3\text{ mV}$  (圖三)。

$$E_K = \frac{RT}{zF} * \ln \frac{K_{out}}{K_{in}} \quad (\text{公式一})$$

$E_K$ :  $K^+$  ions equilibrium potential (theoretical value); R: gas constant

( $\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ); T: absolute temperature ( $^\circ\text{K}$ ); z: valence (=1 for  $K^+$  ions);

F: Faraday's constant (96,485 coulombs/Mole univalent ion);  $K_{out}$ :

extracellular  $K^+$  ions concentration;  $K_{in}$ : intracellular  $K^+$  ions

concentration.

$$I = npi = np\gamma (V-E_K) \quad (\text{公式二})$$

I: total  $K^+$  current; n: channel number; i: single  $K^+$  channel current;  $p$ :  $K^+$  channel open probability;  $\gamma$ : single  $K^+$  channel conductance; V: testing potential.

$$G = \frac{I}{V-E_K} = np\gamma \quad (\text{公式三})$$

G: conductance (nS); V: testing potential.

### MTT Assay 與細胞計數

將 50 mg 的 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 粉末 (Bio Basic) 加入 10 ml 滅菌之二次水，充分混勻後，通過 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑的無菌針筒過濾器，配成 5 mg/ml 的 MTT 溶液保存於 4°C。60 mm 細胞培養皿的 SW480 細胞長滿繼代後，剩餘的細胞液取出 10  $\mu\text{l}$  與等體積之 Trypan Blue 溶液混勻，於細胞計數盤 (Hausser) 計算細胞數量。以細胞培養液稀釋細胞濃度至 5000 cells/200  $\mu\text{l}$ 、10000 cells/200  $\mu\text{l}$  與 20000 cells/200  $\mu\text{l}$ ，並種入 96 孔無菌細胞培養盤 (Falcon)，每個濃度都種三個孔，每個孔 200  $\mu\text{l}$ ，同樣的方法種 10 盤，置於 37°C，5 %  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱培養，從 24 小時開始到 72 小時，每過 12 小時就取出 2 盤，其中一盤吸除培養液，沿著孔壁加入 100  $\mu\text{l}$  培養液後，避光下每孔加 10  $\mu\text{l}$  MTT 溶液，避光放回細胞培養箱培養作用 4 小時，接著吸除 75  $\mu\text{l}$  的廢液，再加入 25  $\mu\text{l}$



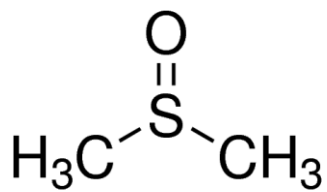
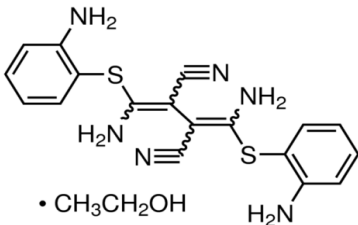
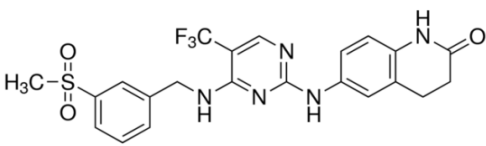
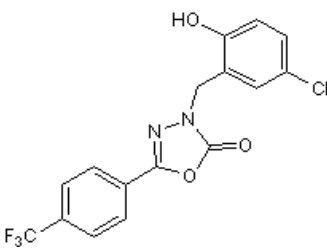
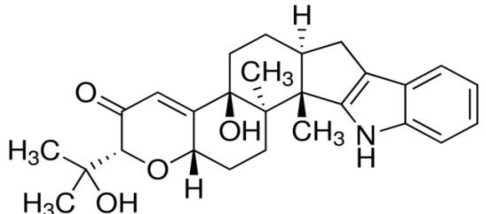
DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma) 放回細胞培養箱培養 10 分鐘溶出結晶，放入 Elisa reader(Sunrise)，並以軟體 Floop4(TECAN)設定波長 570 nm 記錄吸光值。另一盤吸除培養液後，每孔加入 50  $\mu$ l trypsin 將細胞切下，再加 50  $\mu$ l 培養液懸浮細胞，然後每孔取 10  $\mu$ l 與等體積之 Trypan Blue 溶液混勻，於細胞計數盤 (Hausser)計算細胞數量。將兩盤細胞得到的吸光值與細胞數量作線性迴歸分析。

給予 SW480 細胞 MEK 抑制劑、FAK 抑制劑、BK 通道活化劑或抑制劑的 MTT Assay

表二、本實驗八組處理組之藥品作用濃度。

處理組	作用濃度
Control	培養 SW480 細胞之培養液。
DMSO	11 $\mu$ M DMSO。
U0126	10 $\mu$ M U0126。
PF-573228	3 $\mu$ M PF-573228。
PF+Pax	3 $\mu$ M PF-573228 + 1 $\mu$ M Paxilline。
BMS-191011	10 $\mu$ M BMS-191011。
BMS+Pax	10 $\mu$ M BMS-191011 + 1 $\mu$ M Paxilline。
Paxilline	1 $\mu$ M Paxilline。

表三、本研究使用之 MEK 抑制劑、FAK 抑制劑、BK 通道活化劑以與抑制劑，以及各項藥品之分子結構。

藥品	分子結構	作用
DMSO		將下列藥品製成 10 mM stock 之溶劑。
U0126		MAPK kinase (MEK 1 and 2) 之抑制劑。
PF-573228		FAK 抑制劑，也是 BK 通道活化劑。
BMS-191011		專一性高之 BK 通道活化劑。
Paxilline		強效而專一性高之 BK 通道抑制劑

MTT 溶液如上述配成 5 mg/ml 的濃度。配置 8 組含不同藥劑的細胞培養液，第一組只有細胞培養液作控制組，第二組為含 11  $\mu$ M DMSO 的培養液，第三組為加入 MEK 抑制劑 10  $\mu$ M U0126 (Sigma)

的培養液，第四組為含FAK抑制劑3  $\mu$ M PF573228 (Sigma)的培養液，第五組是加3  $\mu$ M PF573228 與 BK 通道抑制劑1  $\mu$ M Paxilline (Sigma)的培養液，第六組為加入BK 通道活化劑10  $\mu$ M BMS-191011 (Sigma)的培養液，第七組為含10  $\mu$ M BMS-191011 與1  $\mu$ M Paxilline 的培養液，最後第八組則是加1  $\mu$ M Paxilline 的培養液 (表二、表三)。

60 mm 細胞培養皿的 SW480 細胞長滿繼代後，剩餘的細胞液取出 10  $\mu$ l 與等體積之 Trypan Blue 溶液混勻，於細胞計數盤計算細胞數量，用細胞培養液稀釋至 5000 cells/200  $\mu$ l 與 10000 cells/200  $\mu$ l 兩種濃度，取 5 個 96 孔無菌細胞培養盤，每盤兩種濃度分別種 24 個孔。於 37  $^{\circ}$ C，5 % CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中，經過 12 小時讓細胞貼附底層後，吸掉舊的培養液。將兩種濃度的 24 個孔每 3 個分 1 組。每組三個孔分別加入 200  $\mu$ l 事先配好的培養液或加藥的培養液，再過 12 小時後開始每 12 小時取出 1 盤，進行 MTT assay，以 Elisa reader 記錄吸光值。

### Transwell Migration Assay

配置 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 螢光染劑，將 DAPI 粉末 (Sigma) 完全融入滅菌二次水，配成 0.1 mg/ml 的 stock 於 -20  $^{\circ}$ C 保存。實驗前，再將 DAPI stock 以 PBS 稀釋為最終 0.1  $\mu$ g/ml 的作用濃度，冰於 4  $^{\circ}$ C。然後以 PBS 稀釋 37 % Formaldehyde (Sigma) 為 3.7 %

Formaldehyde，並同樣以 PBS 稀釋 Triton-X (OmniPur)至 0.1 % 的作用濃度。

同上述加藥之 MTT Assay 配 8 組含不同藥劑的細胞培養液，每組取 0.7 ml 加入 24 孔無菌細胞培養盤 (Biofil)的一孔。另外再配 8 組含藥的培養液，但使用不含 FBS 的 RPMI-1640 溶液。

SW480 細胞長滿 60 mm 底盤，使用 trypsin 將細胞切下，以 RPMI-1640 溶液懸浮細胞後，分六分之一的細胞用於繼代，剩餘細胞取出 10  $\mu$ l 與等體積之 Trypan Blue 溶液混勻，於細胞計數盤計算細胞數量，用配好的含藥 RPMI-1640 稀釋至 100000 cells/300  $\mu$ l。將八組稀釋好的 300  $\mu$ l 細胞液，分別吸起加入八個 8  $\mu$ m PET 膜之懸掛式細胞培養小杯 (Hanging cell culture inserts; Millipore)，再放入對應藥劑的 24 孔無菌細胞培養盤的孔內，靜置於 37  $^{\circ}$ C，5 % CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱培養 24 小時，讓細胞被孔盤內的含 FBS 培養液吸引，由培養小杯的內側通過濾膜爬至外側。接著吸乾 24 well 孔盤內的舊培養液，拿出培養小杯吸除 RPMI-1640 溶液，用棉花棒清理培養小杯內側之濾膜，用 PBS 洗 24 well 孔盤一次，再加入 0.4 ml 的 3.7 % Formaldehyde，將培養小杯放回 24 孔盤的對應孔。20 分鐘後，吸掉 Formaldehyde，用 PBS 洗 24 孔盤 3 次，最後吸乾培養小杯。再加 0.4 ml 0.1 % Triton-X 到孔盤中等 1 分鐘，接著吸除 Triton-X，用 PBS 洗 24 孔盤 3 次，再

吸乾培養小杯。於避光下加 0.4 ml 0.1 µg/ml DAPI 染劑。同樣避光等 30 分鐘，用 PBS 洗 24 孔盤 3 次，最後吸乾培養小杯。利用共軛焦顯微鏡 (Zeiss) 以螢光為光源 (X-Cite) 拍照，並以軟體 ImageJ 分析照片圖檔。

### 統計分析

加藥的 MTT Assay 與 Transwell Migration Assay 得到之各組吸光值數據，皆以統計軟體 SAS 9.4 進行 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 分析。若結果達顯著差異，再接著做 Tukey's HSD Test、Duncan's Multiple Range 與 Bonferroni Multiple Range Test 之後續分組分析。

## 結果

### SW480 細胞株表達 BK 通道的 mRNA

本實驗使用兩組偵測引子檢測 SW480 細胞株中的 BK 通道轉錄產物之表達。第一組 BK1 引子設計偵測的片段為 BK 通道 mRNA 的 exon 1 與 exon 2 之間的 403 個 base pair (bp)，此片段為 BK 通道  $\alpha$  次單元之第一個穿膜區。但是 BK1 引子在前置之 gradient PCR 實驗，一直無法產生預期的 403 bp 之產物。因此參考先前的研究 (Chen et al., 2010) 設計第二組 BK2 引子，偵測的片段為 exon 15 至 exon 25 之間的 741 bp，位置在 BK 通道  $\alpha$  次單元之細胞膜內側部分，RCK 1 與 RCK 2 domain 之間的 linker 上。

PCR 產物電泳分離後的結果如圖二所示，GAPDH 的引子有偵測到 226 bp 的片段，代表已從 SW480 細胞中萃取出 total RNA，並成功轉變為 cDNA。BK1 引子不論於 gradient PCR 或 PCR 產物中皆未能偵測到 403 bp 大小的產物。BK2 引子在黏合溫度為 52.7 至 54°C 之間皆有偵測到如之前研究的 741 bp 大小的片段，在 53.5°C 的黏合溫度下得到最清晰且專一性佳的 PCR 產物。因此推斷 SW480 細胞株中表達了 BK 通道的 mRNA。

## SW480 細胞在電位高時可激發出向外的鉀電流

在倒立顯微鏡視野下，將玻離微電極於 bath solution 中貼近細胞表面，形成緊密貼合後，迅速吸破細胞，讓電極溶液與細胞質液直接接觸。在 whole-cell 模式下，將細胞維持在 -100 mV 使細胞上的離子通道為關閉狀態，再於 -20 mV 刺激離子通道開啟 (圖三 A)，配合適用於記錄鉀離子電流的 bath solution 與 pipette solution (Deschenes and Tomaselli, 2002)，隨著電壓以 10 mV 的變化量增加，於 +100 mV 可激發出平均 427 picoampere (pA) 大的正電流 (圖三 B, C)，代表有正電離子流出細胞外。由於 pipette solution 中主要含有鉀離子，因此測得的向外正電離子流主要來自鉀電流。將電壓與電流作圖得到圖三 C 之 I-V plot，圖三 D 將電流峰值除以 driving force ( $=V-E_K$ ) 轉換為 conductance (G) (公式二、三)，再繪製電導對電壓的 G-V plot，可看出大部分之鉀通道於 +70 mV 以上才被活化。

## MTT Assay 測得的吸光值與細胞數量有線性關係

SW480 細胞種入 96 孔無菌細胞培養盤，自 24 小時起開始取出兩盤，一盤換培養液加 MTT 溶液放 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 培養四小時的期間，將另一盤作 trypsin 處理懸浮，計算懸浮的細胞數量。每 12 小時作一輪，將 24 到 72 小時共 5 個數據點，得到的 O.D (吸光值) 對計數的細胞數量作圖並進行線性迴歸得到圖四。兩次平均的結果 (N=2)，

96 孔培養盤一孔起始種 5000 顆細胞的回歸線方程式為  $y=133220x-12179$ ， $R^2=0.9934$ 。起始種 10000 顆細胞的回歸線方程式為  $y = 154396x-25094$ ， $R^2=0.9687$ 。起始為 20000 顆細胞的回歸線方程式是  $y=146013x-14065$ ， $R^2=0.7550$ 。 $R^2$  值可為資料點分布與回歸線相符與否的參考值，起始為 5000 與 10000 顆細胞的五個數據點分布皆與回歸線相近幾乎重疊， $R^2$  值近於 1，因此兩者的回歸線方程用於轉換 O.D 值與細胞數目可行性比較高。起始細胞數為 20000 顆細胞，到 60 小時似乎已長滿底盤，達 72 小時以 Trypan Blue 染色可明顯看出部分細胞內有染劑進入，表示其細胞膜已不完整。因此之後八組給藥的實驗，皆以 96 孔細胞培養盤起始種 5000 與 10000 顆細胞的濃度進行。

#### 抑制 MAPK 訊號途徑、抑制 FAK 活性或活化 BK 通道對 SW480 細胞的生長影響沒有顯著差異

於 96 孔無菌細胞培養盤種入 SW480 細胞，12 小時之後換成新的細胞培養液或有加藥的培養液後，靜置於 37°C，5 % CO<sub>2</sub> 培養。自加藥後 12 小時開始，每 12 小時取出一盤 96 孔無菌細胞培養盤進行 MTT assay。結果於圖五、圖六顯示，自加藥後的 12 到 60 小時共 5 個數據點，分別進行 One-way ANOVA 分析，雖然皆未達顯著差異，但是從平均值來看，加入 MEK 抑制劑之 U0126 組 (N=4) 與加入 BK



通道活化劑的 BMS191011 組 (N=2)似乎有一些抑制生長的趨勢。

FAK 抑制劑之 PF-573228 組在起始 5000 顆細胞的實驗中，給藥達 48 至 60 小時，似乎有抑制生長的傾向。給 BK 通道抑制劑的 Paxilline 組，實驗結果看起來與 DMSO 組幾乎一樣，與原來假設抑制 BK 通道鉀活性會使癌細胞生長增加的假說不符。BMS-191011 與 BMS-191011+Paxilline 組幾乎重疊。而 PF-573228+Paxilline 組生長狀況比 PF-573228 組差一點。

綜合以上之結果得知，抑制 MAPK 途徑與 FAK 活性或活化 BK 鉀通道電流不能有效抑制 SW480 癌細胞的生長，而抑制 BK 鉀通道電流並未使細胞生長增加。因此得知在 SW480 細胞中調控 BK 鉀電流並無法有效控制 SW480 的細胞生長。

#### 弱化 SW480 細胞的爬行能力可能透過抑制 MAPK 訊號途徑、降低 FAK 活性或強化 BK 鉀通道電流

雖然於 MTT Assay 的細胞生長實驗結果，均未達顯著差異，代表 MEK 與 FAK 之抑制劑以及 BK 通道之活化劑與抑制劑，對影響 SW480 細胞之生長沒有效果，但這可能暗示本實驗使用之藥品效用是針對細胞爬行而非細胞生長或增生。因此進行了 Transwell Migration Assay，檢測在上述藥物之作用影響下，SW480 細胞之爬行能力是否有顯著之改變。

以 control 組為 100 % 的細胞爬過細胞培養小杯之 8  $\mu$ m PET 膜的參考值，將另外七組的細胞數量標準化以百分比呈現，如圖七所示，七組數據進行 One-way ANOVA 分析後，有達顯著差異 ( $p=0.0042$ )。比較保守的 Tukey's HSD Test 之結果，只有 PF-573228 組與 DMSO 組有差異。使用敏感性比較高的 Duncan's Multiple Range Test 以及 Bonferroni Multiple Range Test，結果將七個不同處理組分為 A、B 與 C 三組，不同組表示有顯著差異。

由 Tukey's HSD Test 得到 SW480 細胞的爬行能力在給予 FAK 抑制劑 PF-573228 (So et al., 2011) 後有明顯的被抑制。Duncan's and Bonferroni Multiple Range Test 結果皆得到 MAPK 抑制劑 U0126 與 BK 通道活化劑 BMS-191011 也有有效的抑制 SW480 細胞爬行。而 PF-573228+Paxilline 組的爬行能力有回復的趨勢，表示 BK 鉀通道電流的活性有參與 PF-573228 抑制細胞爬行的作用，但可能不是主要的機制。而 BMS-191011+Paxilline 組將 BMS-191011 增加 BK 鉀電流的效果逆轉，未能使細胞爬行能力回復到 DMSO 組的狀態，但是 BMS-191011+Paxilline 組與 PF-573228 組達顯著差異，表示 BMS-191011 抑制 SW480 細胞爬行，不只透過活化 BK 鉀通道電流，與 PF-573228 的作用相似，可能有不是針對 BK 通道的非專一性效果。

另外抑制 BK 鉀電流的 Paxilline 組與 DMSO 組沒有顯著差異，代表只抑制 BK 通道，不能影響細胞爬行。

統整以上結果得知，抑制 MAPK 訊息途徑或 FAK 蛋白活性，以及活化 BK 鉀通道電流皆能有效抑制 SW480 大腸癌細胞爬行，並且 PF-573228 抑制細胞爬行，以抑制 FAK 為主，BK 通道的活化為輔助。另外，BMS-191011 抑制 SW480 爬行，除了藉由增加 BK 通道的活化，可能還有非專一性的作用輔助。最後，只抑制 BK 通道電流對 SW480 之細胞爬行沒有明顯效果。

## 討論

哺乳動物組織的細胞膜上普遍存在 BK 通道之表達。BK 通道參與許多生理與病理過程，連結源自細胞膜電位與細胞內鈣離子濃度變化產生的訊號，對神經與非神經細胞之生理現象都扮演了關鍵的角色 (Contreras et al., 2013)。BK 通道也被發現在許多細胞株中為最常見的離子通道之一，如前列腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、乳癌、神經膠質瘤、腦膜瘤與其他腦腫瘤 (Contreras et al., 2013)。

### SW480 細胞中的鉀電流

先前研究發現在正常之大腸細胞中，BK 通道 mRNA 的表達約佔 total RNA 之 5 % (Chen et al., 2010)，在未購入 BK 通道之抗體下，本實驗採用 gradient PCR 與 PCR 來偵測大腸直腸癌細胞株 SW480 是否也有 BK 通道 mRNA 之表達。實驗結果發現 BK 通道也表達在大腸癌上皮細胞株 SW480 (圖二)，而 BK1 引子未能偵測到預期之片段，很可能是因為 BK 通道在不同的組織中有專一的 isoform 存在，表示 BK 通道之 mRNA 有 alternative splicing 發生 (Ge et al., 2014)，使得 BK1 引子偵測之片段改變或缺失。

另外，根據電生理記錄之結果，於高電位下可記錄到向外的鉀電流 (圖三 B, C)。圖三 D 中，我們可觀察到 SW480 鉀電流之導電度在 +60 或 +70 mV 以上才顯著增加，這項結果與文獻紀錄細胞內低鈣

濃度狀況下，BK 通道之活性必須到接近+100 mV 才會顯著增加是一致的 (Horrigan and Aldrich, 2002; Magleby, 2003)。雖然圖三 D 顯示在一般生理狀況下 ( $V_m < 0$  mV)，BK 通道活性甚低，但是由於 BK 通道之導電度甚大 (200 至 300 pS)，是常見鉀離子通道的 10 到 20 倍。因此，一旦膜電位去極化或是細胞內鈣離子濃度提升，便可以大量活化 BK 通道 (Horrigan and Aldrich, 2002; Magleby, 2003)，顯著增加向外之鉀電流，降低細胞內鉀離子濃度，進而影響細胞之生長 (Ge et al., 2014)。依 PCR 結果與電生理實驗，判斷 BK 通道應有參與在 SW480 之鉀電流中。在未來的實驗中，應當可以配合 BK 通道活化劑或抑制劑，以電生理實驗觀察 BK 電流對 whole-cell 模式的整體鉀電流影響，來判斷 BK 電流佔全細胞鉀電流之比例。

### BK 通道對 SW480 細胞生長之影響

之前研究已知，BK 通道在非可興奮性細胞 (non-excitabile cells) 中對細胞增生、爬行能力與細胞體積的調節有重要的功能 (Contreras et al., 2013)。有文獻指出將 BK 通道開啟延長，使更多鉀離子流出細胞，進而降低細胞內的鉀離子濃度，會促使細胞進入凋亡程序，因此認為活化 BK 通道可能導致細胞凋亡 (Ge et al., 2014)。FAK 抑制劑 PF-573228 在腦垂體癌細胞株上被發現也是 BK 通道的活化劑 (So et al., 2011)，本實驗之目的即在於檢測 PF-573228 對 SW480 大腸癌細

胞生長與爬行能力之影響。在 MTT Assay 中，PF-573228 並未明顯抑制 SW480 細胞之生長曲線，給予混合 PF-573228 與 BK 通道抑制劑 Paxilline，細胞的生長曲線有低一點的趨勢 (圖五、圖六)。顯示 Paxilline 與 PF-573228 混合使用效果在細胞生長增生這方面作用不明。

加入 BK 通道活化劑的 BMS-191011 組，細胞生長曲線比 PF-573228 組再低一些，但與 DMSO 組也未達顯著差異。BMS-191011 加 Paxilline 的處理結果，其生長曲線與僅加 BMS-191011 的線幾乎重疊，顯示 SW480 細胞在 BMS-191011 存在下，細胞生長狀況不如 DMSO，但使用 Paxilline 抑制 BK 通道開啟，並未讓生長曲線變得比較靠近 DMSO 組 (圖五、圖六)。

Paxilline 為強效而專一性性強的 BK 通道抑制劑，半數抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) 為 17 nM (Ahluwalia et al., 2004)，本實驗參考文獻使用 1 μM 的作用濃度 (So et al., 2011)。倘若增加 BK 通道活化能夠抑制 SW480 細胞之生長，以 Paxilline 逆轉 BK 通道活化劑的效果，預期會回復癌細胞的生長曲線，但圖五與圖六的結果顯示 PF-573228+Paxilline 與 BMS-191011+Paxilline 組的生長曲線並未與 DMSO 組重疊。依此推測活化 BK 鉀通道電流可能無法有效影響細胞生長。

MAPK 抑制劑 U0126 於本實驗作為抑癌效果的 positive control，其抑制 MAPK kinase 1 (MEK 1) 的 IC50 為 0.07  $\mu$ M，抑制 MAPK kinase 2 (MEK 2) 的 IC50 則為 0.06  $\mu$ M (Duncia et al., 1998)，另有文獻指出 U0126 限制 SW480 細胞增生的 IC50 為低於 10  $\mu$ M (Flanigan et al., 2013)，本實驗使用 10  $\mu$ M 的濃度，預期會有抑制癌細胞生長增殖的作用。實驗結果顯示 U0126 組之生長曲線只出現略低於 DMSO 組的傾向，未達顯著抑制 SW480 細胞生長的效果。先前研究指出 U0126 會阻斷生長因子受器的訊息傳遞，導致細胞生長增生受抑制 (Duncia et al., 1998)，因此推斷 SW480 細胞株使用 10  $\mu$ M U0126 可能有些抑制生長增生的效果出來，但是要有效降下 SW480 細胞的生長曲線，可能還須更高的劑量。

另一導致 U0126 及上述其他藥物皆對細胞生長曲線沒有影響的可能原因，是實驗方法中，自 12 小時加藥後，一直到 60 或 72 小時之間，皆未更換細胞培養液並補充藥物，因此這些藥物的有效濃度可能隨著細胞之代謝而逐漸降低。針對這個可能性，未來的實驗應當每 24 至 48 小時更換細胞培養液以維持各化合物有效濃度。

### BK 通道對 SW480 細胞爬行之影響

在 MTT Assay 中，PF-573228 並未明顯抑制 SW480 細胞之生長曲線，但 Transwell Migration Assay 結果顯示 PF-573228 顯著減少了

爬過培養小杯濾膜之細胞百分比例。PF-573228+Paxilline 在細胞爬行的實驗則有回復癌細胞爬行能力的效果 (圖七), 顯示 PF-573228 除了直接作用在 FAK 蛋白上, 可能也有部分依靠 BK 通道鉀電流的活化來抑制細胞爬行。

當使用 Tukey's HSD Test 進行檢定時, PF-573228 具有抑制 SW480 細胞爬行的能力, 然而 PF-573228+Paxilline 卻無法逆轉 PF-573228 之效果。當使用另一個較為靈敏型的 Bonferroni Multiple Range Test 時, 呈現與 Duncan's Multiple Range Test 一致的結果 (圖七), 亦即 PF-573228 可抑制 SW480 爬行, 而 PF-573228+Paxilline 可減少抑制爬行的效果。

以 One-way ANOVA 的 Duncan's Multiple Range Test 後續分析細胞爬行的實驗數據, BMS-191011 組爬過培養小杯的細胞數顯著少於 DMSO 組, 但以 Paxilline 反轉 BMS-191011 令 BK 通道活化的作用, 通過細胞培養小杯之濾膜的細胞數並未提升至接近 DMSO 組。這項統計檢定的結果顯示 BMS-191011 除了活化 BK 通道開啟以外, 對 SW480 細胞可能還有其他非專一性的作用, 因而使爬行速率低於 DMSO 組, 以及細胞爬行能力沒有因為 BK 通道被 Paxilline 阻斷而提升。



本實驗之抑癌的 positive control U0126 組，使用接近抑制 SW480 增生之 IC50 的濃度 10  $\mu$ M。細胞爬行之 One-way ANOVA 的 Duncan's Multiple Range Test 分析結果呈現 U0126 組有顯著低於 DMSO 組。推斷 SW480 細胞株使用 10  $\mu$ M U0126，雖然不足以抑制細胞生長曲線，但可能有抑制增生的效果，進而減少了爬過培養小杯的細胞數量。顯示 U0126 於此濃度不夠使細胞死亡，但足夠減少增生與爬行之細胞數量。若應用於醫療，將會是能夠有效抑制大腸癌細胞爬行與增生，而不會毒殺周圍正常細胞之最佳作用濃度。

#### 比較 BK 通道活性在不同癌細胞之作用

BK 鉀通道電流的抑制或增強對癌細胞存活率以及爬行能力的影響，在不同癌細胞得到的結果大相逕庭。於腦垂體癌細胞株 GH3 中發現 PF-573228 能夠抑制癌細胞之轉移，並同時增強 BK 通道之活化 (So et al., 2011)。於乳癌細胞株 MCF-7 與 MDA-MB-231 偵測到比較多的 BK 通道的表達與電流，並可能加劇如癌細胞的侵略性 (Khaitan et al., 2009; Mound et al., 2013; Schickling et al., 2015)。而於前列腺癌 LNCaP 細胞之實驗顯示，BK 通道與 T-type Cav3.2 鈣離子通道能一同調節 LNCaP 細胞之生長，抑制 BK 鉀通道的表達或電流皆能減少 LNCaP 細胞生長 (Gackiere et al., 2013)。另外，在神經膠質瘤過度表達 BK 通道，結果也是癌細胞的惡化更嚴重 (Contreras et al., 2013)。

本實驗結果顯示在大腸上皮癌細胞株 SW480，PF-573228 可以抑制細胞爬行，單獨使用 Paxilline 抑制 BK 通道對生長或爬行無顯著影響。然而 PF-573228+Paxilline 之實驗，說明 PF-573228 除了直接抑制 FAK，確實也會對 BK 通道有作用。

應用較為靈敏的統計檢定 (Duncan's Multiple Range Test)，雖然增加了偽陽性 (False Positive) 的風險，卻也顯示了 BK 通道抑制劑 Paxilline 可以逆轉部分 PF-573228 對 SW480 細胞爬行之抑制效果(圖七)。而且使用比較能限制偽陽性風險發生之 Bonferroni Multiple Comparison Test 也得到相同的結果。這一結果暗示以 BK 通道為標靶之藥物，或許在特定之癌細胞中可以扮演治療癌細胞轉移的輔助角色。

### 未來實驗發展方向

除了於電生理記錄實驗中加入 BK 通道之活化劑或抑制劑，觀察整體鉀電流的變化與測試藥物效用，以及調整加藥 MTT Assay 之實驗步驟以外。由於本實驗 PCR 與電生理結果已顯示，SW480 大腸直腸細胞可能有內生性 BK 通道表達，因此可以進行 small-interferent RNA (siRNA) 減少表達或基因 knock-out 實驗，直接觀測降低或缺少內生性 BK 通道，對 SW480 細胞之生長與爬行造成之變化。另外也考慮進行 gene over-expression 實驗，避開 BK 通道活化劑在本實驗中

發現之非專一性作用，觀察增加 BK 通道表達對 SW480 細胞是否有抑制生長與爬行的效果。

此外，先前之離子通道研究發現，potassium chloride cotransporter (KCC) 不只扮演離子通道一種角色，此通道之成員 KCC4，受到 Insulin-like growth factor I (IGF-I) 與 epidermal growth factor (EGF) 訊息刺激而至細胞膜上表達。KCC4 併入細胞膜之 lipid rafts 之後，與細胞骨架連接蛋白 ezrin 一同促進細胞骨架重組之調節，對癌細胞的侵略性細胞爬行影響重大，這揭示了離子通道也可以作為穩定細胞膜結構之鷹架蛋白 (scaffold protein) (Chen et al., 2009)。以前研究已知 FAK 抑制劑 PF-573228 可以活化 BK 通道 (So et al., 2011)，本實驗發現 BK 通道活化劑 BMS-191011 具有部分抑制細胞爬行之能力。由 KCC4 的研究我們猜測 BK 通道在細胞膜上可能與 FAK 很靠近，或著可能有連結，將來可以進行免疫沉澱或螢光共振能量轉移等蛋白質-蛋白質相互作用檢測，來確認 BK 通道與 FAK 或其他 Focal adhesion 相關蛋白是否有 colocalization 的狀況。並且以 Wound-Healing Assay 檢測細胞爬行與胞外基質 (extracellular matrix) 重組之速率，驗證本實驗中 Transwell Migration Assay 結果，以及檢驗 BK 通道是否作為細胞膜結構性蛋白，還有是否參與胞外基質重建與擴展。

另外，前言提到 SW480 細胞株由於 KRAS 之突變 (G12V)，對 anti-EGFR 之單株抗體標靶藥物 Cetuximab (又名 Erbitux) 具有抗藥性 (Kumar et al., 2014; Napolitano et al., 2015)。我們也應該觀察同時給予 Erbitux 以及 BK 通道活化劑或抑制劑的條件下，SW480 細胞之生長存活狀況與細胞爬行速度，檢測 BK 鉀通道電流是否也參與調控 KRAS 誘發之 RAS/RAF/MAPK 細胞生長訊息傳遞途徑，或與 EGFR 有無 colocalization 的關聯。

除此之外，本實驗電生理結果，是在低鈣離子濃度之 pipette solution 下記錄的，原因是原來使用含 1 mM  $\text{CaCl}_2$  之 pipette solution 時，細胞狀況很差，玻璃微電極不易與細胞維持緊密貼合，一進入 whole-cell 模式細胞便瓦解，無法記錄電流數據。推測是 pipette solution 中之鈣離子持續進入細胞作為第二傳訊分子，過度刺激 SW480 細胞訊息傳遞途徑，造成鈣離子中毒而使細胞瓦解。未來可考慮使用 2,5-di-tert-butylhydroquinone (DBHQ) 或 thapsigargin (TG) 兩種  $\text{Ca}^{2+}$  pump 抑制劑 (Ghosh et al., 1991; Kaneko and Tsukamoto, 1994; Short et al., 1993)，將 SW480 細胞內質網儲存的鈣離子排空，再進行 whole-cell 模式電生理實驗，解決鈣離子對細胞生理狀況的影響，完全以電壓變化來調控細胞膜上離子通道之開啟。

## 結論

本實驗之 PCR 結果顯示大腸直腸癌細胞株 SW480 表達了 BK 通道。電生理結果發現高電位下 SW480 有向細胞外流動之鉀電流，是由多種鉀離子通道包含 BK 通道的鉀電流加總而成。MTT Viability Assay 結果得到 MEK 抑制劑 (U0126)、FAK 抑制劑 (PF-573228)、BK 通道活化劑 (PF-573228 與 BMS-191011) 與 BK 通道抑制劑 (Paxilline) 對 SW480 細胞的生長沒有顯著影響。Transwell Migration Assay 結果則發現 FAK 抑制劑與 BK 通道活化劑有明顯抑制 SW480 細胞爬行的效果。而且過去研究認為專一性高的 BK 活化劑 BMS-191011，於本實驗發現可能對 SW480 細胞有非針對 BK 通道的作用一同抑制細胞爬行 (圖七 A, B, C)。綜合以上結果提出 BK 鉀通道電流極可能於大腸直腸癌細胞中，扮演輔助調節細胞爬行的角色，未來若應用於醫療可協助限制大腸癌於人體的惡化擴散。

## 參考文獻

- Ahluwalia, J., Tinker, A., Clapp, L.H., Duchon, M.R., Abramov, A.Y., Pope, S., Nobles, M., and Segal, A.W. (2004). The large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is essential for innate immunity. *Nature* 427, 853-858.
- Ananthakrishnan, R., and Ehrlicher, A. (2007). The forces behind cell movement. *International journal of biological sciences* 3, 303-317.
- Chen, L., Jeffries, O., Rowe, I.C., Liang, Z., Knaus, H.G., Ruth, P., and Shipston, M.J. (2010). Membrane trafficking of large conductance calcium-activated potassium channels is regulated by alternative splicing of a transplantable, acidic trafficking motif in the RCK1-RCK2 linker. *J Biol Chem* 285, 23265-23275.
- Chen, Y.F., Chou, C.Y., Wilkins, R.J., Ellory, J.C., Mount, D.B., and Shen, M.R. (2009). Motor protein-dependent membrane trafficking of KCl cotransporter-4 is important for cancer cell invasion. *Cancer Res* 69, 8585-8593.
- Contreras, G.F., Castillo, K., Enrique, N., Carrasquel-Ursulaez, W., Castillo, J.P., Milesi, V., Neely, A., Alvarez, O., Ferreira, G., Gonzalez, C., *et al.* (2013). A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. *Channels* 7, 442-458.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., *et al.* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 351, 337-345.
- Deschenes, I., and Tomaselli, G.F. (2002). Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 528, 183-188.
- Duncia, J.V., Santella, J.B., 3rd, Higley, C.A., Pitts, W.J., Wityak, J., Fietze, W.E., Rankin, F.W., Sun, J.H., Earl, R.A., Tabaka, A.C., *et al.* (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2839-2844.
- Flanigan, S.A., Pitts, T.M., Newton, T.P., Kulikowski, G.N., Tan, A.C., McManus, M.C., Spreafico, A., Kachaeva, M.I., Selby, H.M., Tentler, J.J., *et al.* (2013). Overcoming IGF1R/IR resistance through inhibition of MEK signaling in colorectal cancer models. *Clin Cancer Res* 19, 6219-6229.

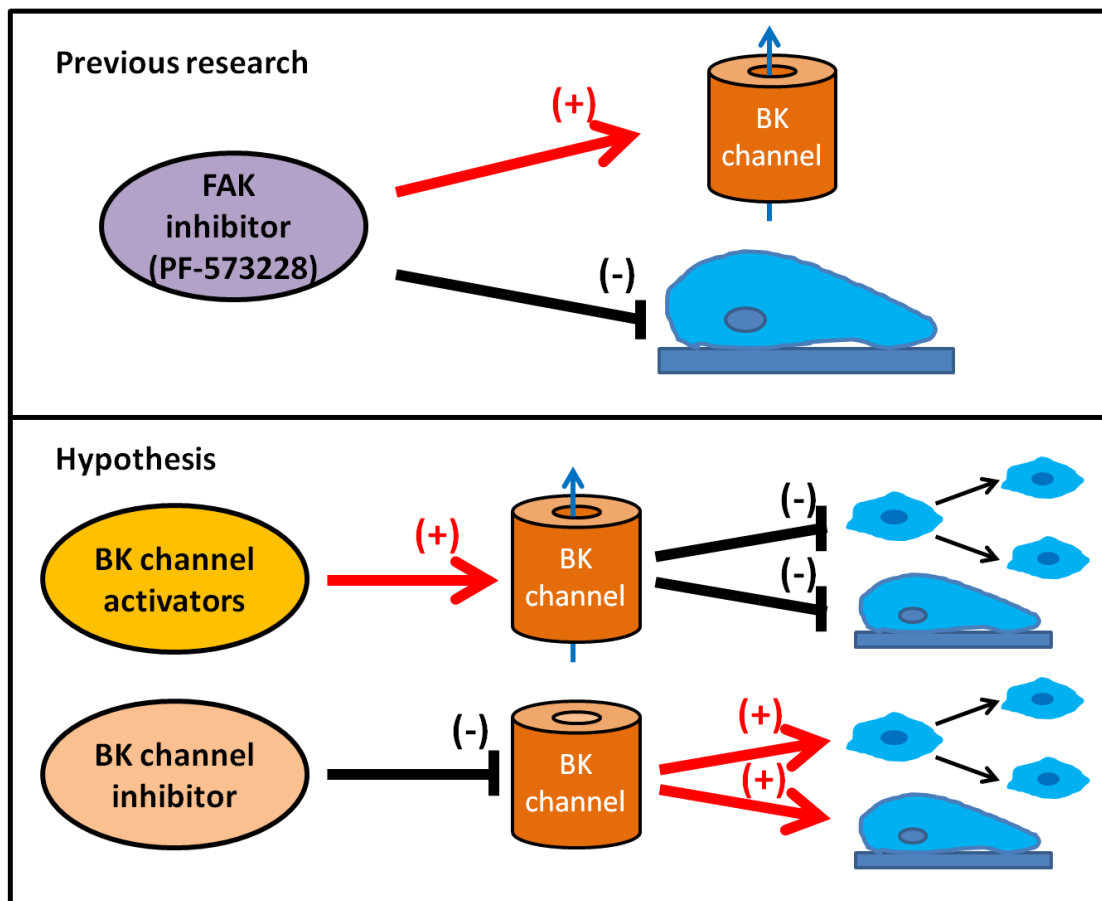
- Gackiere, F., Warnier, M., Katsogiannou, M., Derouiche, S., Delcourt, P., Dewailly, E., Slomianny, C., Humez, S., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M., *et al.* (2013). Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology open* 2, 941-951.
- Ge, L., Hoa, N.T., Wilson, Z., Arismendi-Morillo, G., Kong, X.T., Tajhya, R.B., Beeton, C., and Jadus, M.R. (2014). Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 22, 427-443.
- Ghosh, T.K., Bian, J.H., Short, A.D., Rybak, S.L., and Gill, D.L. (1991). Persistent intracellular calcium pool depletion by thapsigargin and its influence on cell growth. *J Biol Chem* 266, 24690-24697.
- Horrigan, F.T., and Aldrich, R.W. (2002). Coupling between voltage sensor activation, Ca<sup>2+</sup> binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol* 120, 267-305.
- Jones, M.L., Shawe-Taylor, A.J., Williams, C.M., and Poole, A.W. (2009). Characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 198-203.
- Kaneko, Y., and Tsukamoto, A. (1994). Thapsigargin-induced persistent intracellular calcium pool depletion and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 79, 147-155.
- Khaitan, D., Sankpal, U.T., Weksler, B., Meister, E.A., Romero, I.A., Couraud, P.O., and Ningaraj, N.S. (2009). Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. *BMC Cancer* 9, 258.
- Kumar, S.S., Price, T.J., Mohyeldin, O., Borg, M., Townsend, A., and Hardingham, J.E. (2014). KRAS G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. *Gastrointestinal cancer research : GCR* 7, 23-26.
- Magleby, K.L. (2003). Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol* 121, 81-96.
- Mound, A., Rodat-Despoix, L., Bougarn, S., Ouadid-Ahidouch, H., and Matifat, F. (2013). Molecular interaction and functional coupling between type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and BKCa channel stimulate breast cancer cell proliferation. *Eur J Cancer* 49, 3738-3751.
- Napolitano, S., Martini, G., Rinaldi, B., Martinelli, E., Donniacuo, M.,

- Berrino, L., Vitagliano, D., Morgillo, F., Barra, G., De Palma, R., *et al.* (2015). Primary and Acquired Resistance of Colorectal Cancer to Anti-EGFR Monoclonal Antibody Can Be Overcome by Combined Treatment of Regorafenib with Cetuximab. *Clin Cancer Res* 21, 2975-2983.
- Pellinen, T., and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci* 119, 3723-3731.
- Schickling, B.M., England, S.K., Aykin-Burns, N., Norian, L.A., Leslie, K.K., and Frieden-Korovkina, V.P. (2015). BKCa channel inhibitor modulates the tumorigenic ability of hormone-independent breast cancer cells via the Wnt pathway. *Oncol Rep* 33, 533-538.
- Short, A.D., Bian, J., Ghosh, T.K., Waldron, R.T., Rybak, S.L., and Gill, D.L. (1993). Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content is linked to control of cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4986-4990.
- So, E.C., Wu, K.C., Liang, C.H., Chen, J.Y., and Wu, S.N. (2011). Evidence for activation of BK Ca channels by a known inhibitor of focal adhesion kinase, PF573228. *Life Sci* 89, 691-701.
- Standen, N. (2000). Tuning channels for blood pressure. *Nature* 407, 845, 847-848.
- Su, S.Y., Huang, J.Y., Jian, Z.H., Ho, C.C., Lung, C.C., and Liaw, Y.P. (2012). Mortality of colorectal cancer in Taiwan, 1971-2010: temporal changes and age-period-cohort analysis. *International journal of colorectal disease* 27, 1665-1672.
- Zhang, J., and Yan, J. (2014). Regulation of BK channels by auxiliary gamma subunits. *Frontiers in physiology* 5, 401.
- Zhao, J., and Guan, J.L. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer metastasis reviews* 28, 35-49.



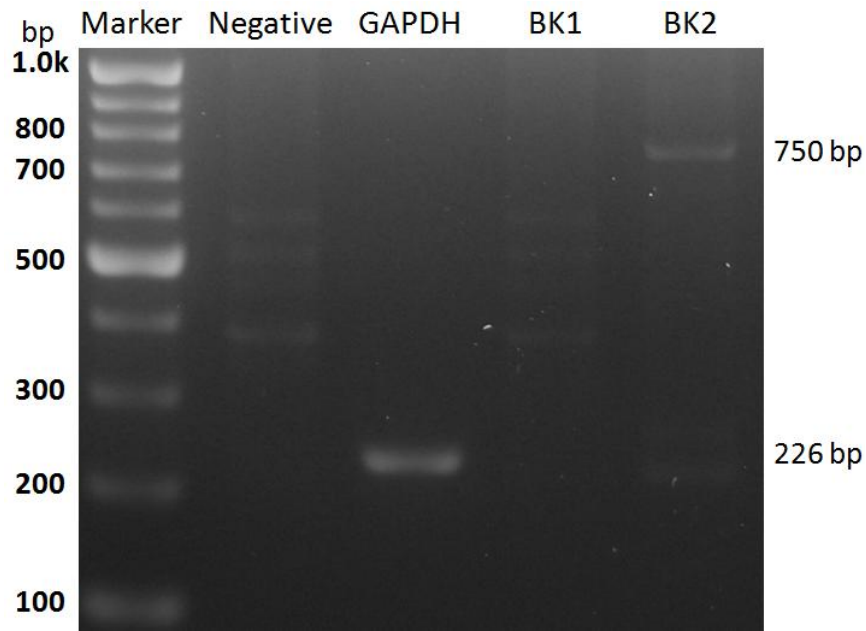
## 表目與圖目

表一、Gradient PCR 與 PCR 實驗中，Positive control 與偵測 BK 通道 mRNA 表達所使用的引子序列。-----	10
表二、本實驗八組處理組之藥品作用濃度。-----	14
表三、本實驗使用之 MEK 抑制劑、FAK 抑制劑、BK 通道活化劑以與抑制劑，以及各項藥品之分子結構。-----	15
圖一、本實驗所預測試之假說。-----	39
圖二 SW480 中 BK 通道之表達。-----	40
圖三、SW480 細胞在 whole-cell 模式下測量到的鉀離子電流。----	41
圖四、MTT Assay 測得的吸光值與細胞數量作線性迴歸的結果。 42	
圖五、起始濃度為 5000 顆細胞的 MTT Assay 結果。-----	43
圖六、起始濃度為 10000 顆細胞的 MTT Assay 結果。-----	44
圖七、Transwell Migration Assay 的結果圖。-----	45
圖八、本實驗之總結論圖解。-----	46



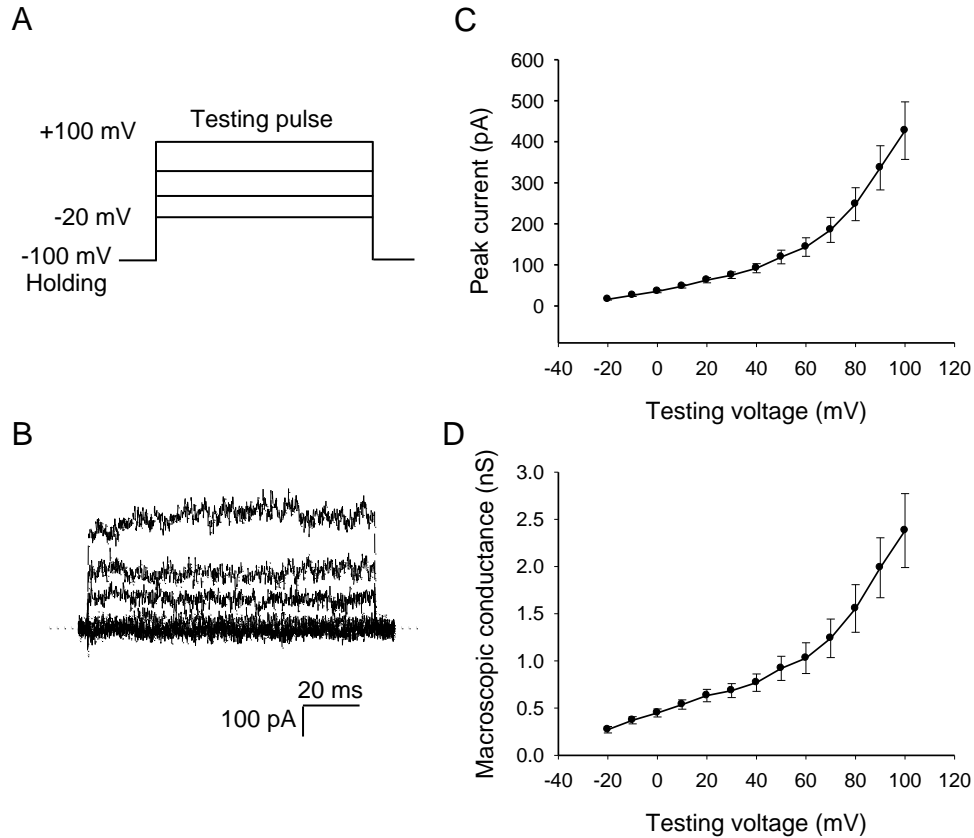
圖一、本實驗所欲測試之假說。

根據先前研究得知，強效而有選擇性的 FAK 抑制劑 PF573228 也能增加 BK 通道的活性 (So et al., 2011)，顯示癌細胞的 BK 通道可能與細胞爬行有關聯。因此，假設給予癌細胞 BK 通道的活化劑可能會有抑制癌細胞的效果，反之若給予 BK 通道抑制劑則會讓癌細胞更加活躍。本實驗將從細胞生長增殖與細胞爬行能力兩項指標，來判定大腸直腸癌 SW480 細胞株是否受到 BK 通道之活化或抑制影響，而改變癌細胞之增生與爬行速率。



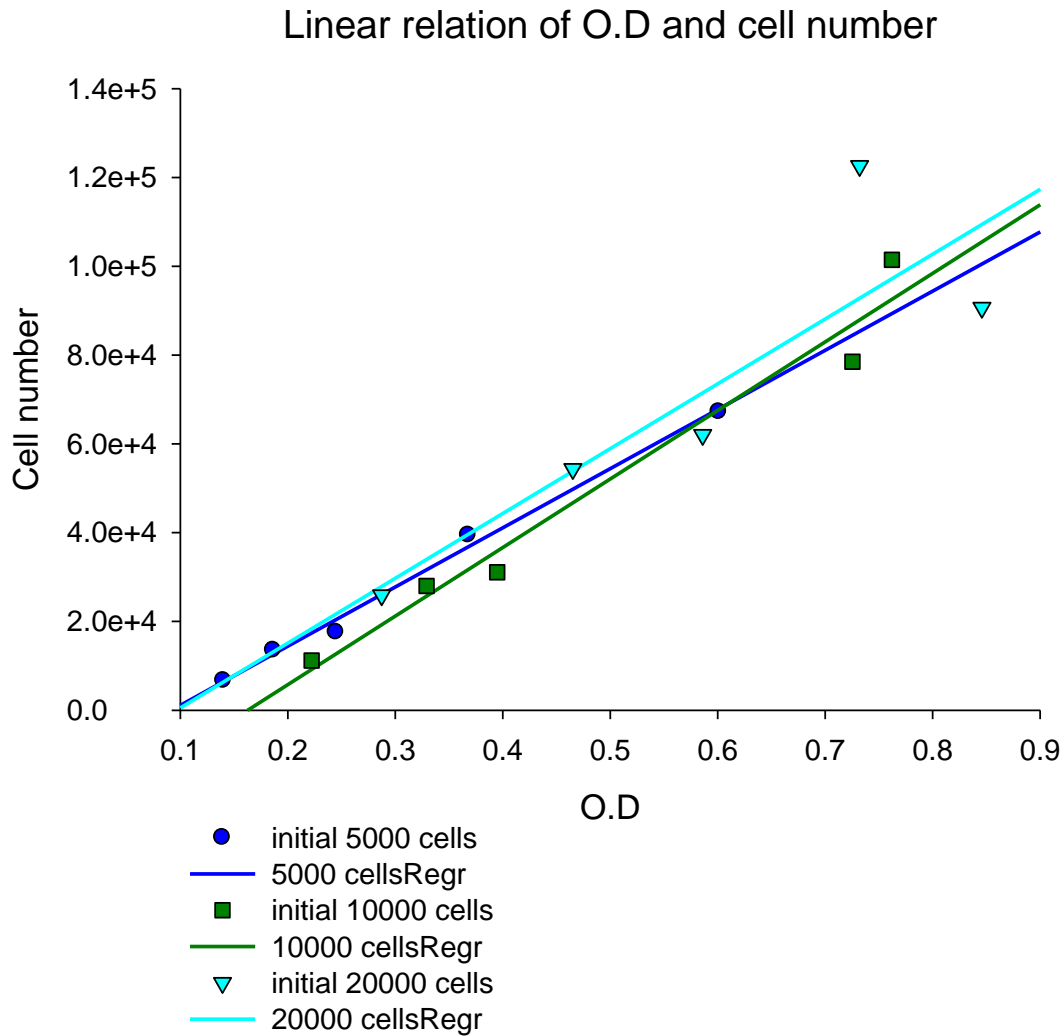
圖二、SW480 中 BK 通道之表達。

此為 gradient PCR 找出最佳引子黏合溫度後，以 53.5 °C 作為黏合溫度的 PCR 結果圖，positive control 的 GAPDH 產物大小為 226 bp，第一組偵測 BK 通道表達的 BK1 引子產物預測為 403 bp，但跑膠結果並未偵測到。第二組引子 BK2 產物預測為 750 bp，在圖中可見在 700 與 800 bp 之間有 band 出現。雖然 BK1 引子未偵測到 BK 通道轉錄產物，但參考過去文獻 (Chen et al., 2010) 的 BK2 引子有偵測到，因此判斷 SW480 細胞確實有表達 BK 通道之 mRNA。



圖三、SW480 細胞在 whole-cell 模式下測量到的鉀離子電流。

(A)將細胞膜電壓維持在-100 mV，測試電位由-20 mV 開始，每次增加 10 mV，一直到+100 mV，共記錄 100 ms，每 2 s 重複一次。(B)在 whole-cell 模式下，一顆代表性 SW480 細胞以 voltage-clamp 於-20 mV 至+100 mV 所記錄之鉀電流。(C)將激發出向外之正電流峰值 (N=23)對電壓作圖所得之 I-V plot。(D)將(C)之電流峰值除以 driving force ( $V-E_K$ )，可換算為電導 (conductance)，再繪製電導對電壓的 G-V plot。由此圖可推測 SW480 細胞中 BK 通道之電流在+70 mV 以上才開始顯著活化。 $E_K = -79.3$  mV (理論值)。



圖四、MTT Assay 測得的吸光值與細胞數量作線性迴歸的結果。

起始濃度為 5000 顆細胞的回歸線方程式為  $y=133220x- 12179$ ， $R^2$

$=0.9934$ 。起始濃度為 10000 顆細胞的回歸線方程式為  $y =$

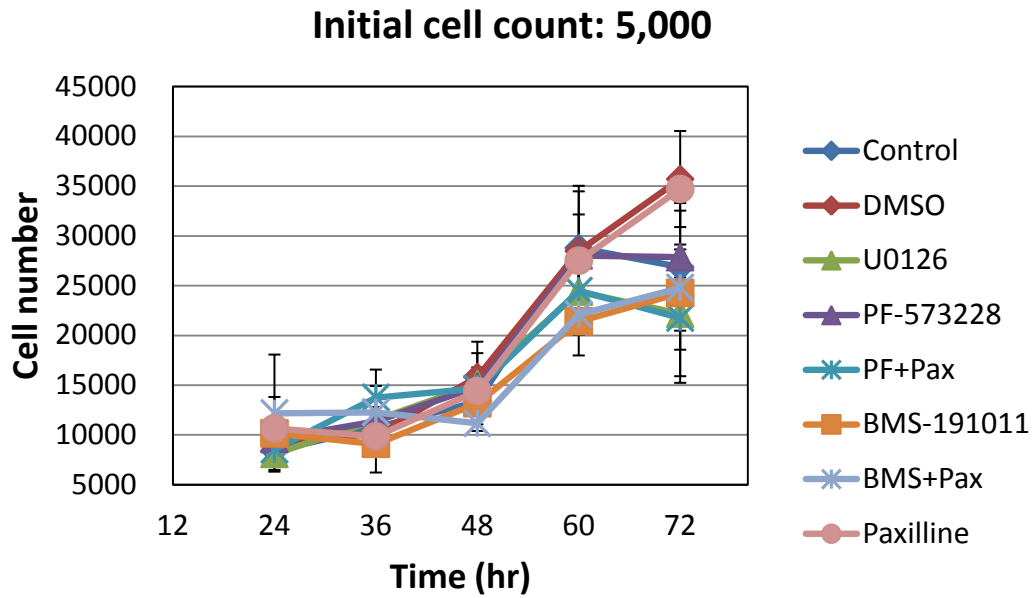
$154396x-25094$ ， $R^2=0.9687$ 。起始濃度為 20000 顆細胞的回歸線方程

式為  $y=146013x-14065$ ， $R^2=0.7550$ 。 $R^2$  值在起始 20000 顆細胞的狀況

下偏低，表示資料點分布偏離回歸線。為了能比較準確轉換吸光值與

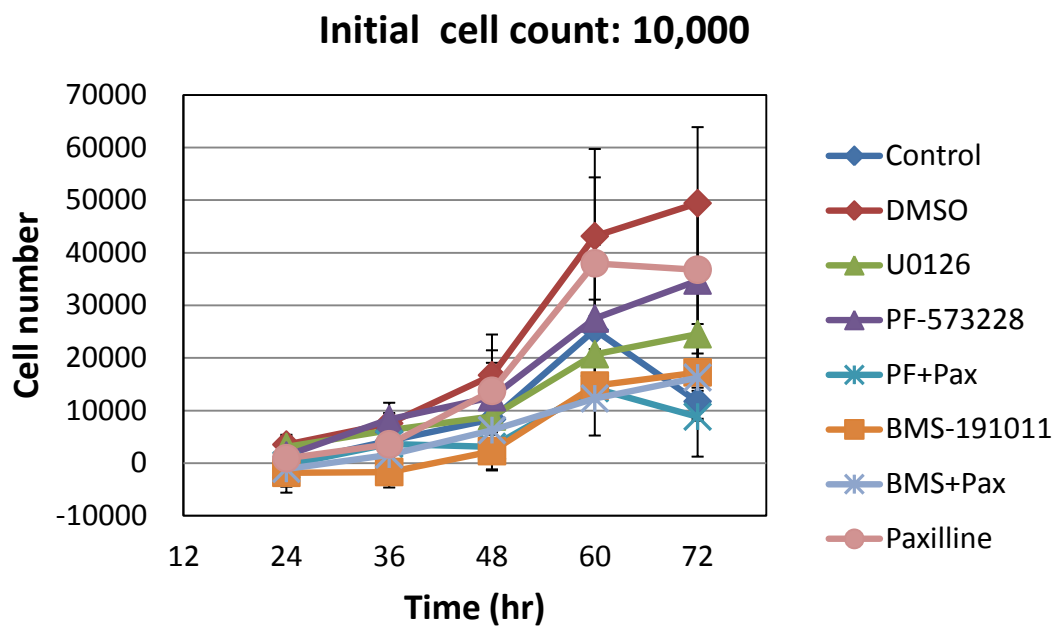
細胞數量，之後於 96 孔無菌細胞培養盤操作的實驗，皆以起始 5000

與 10000 顆細胞的濃度進行。



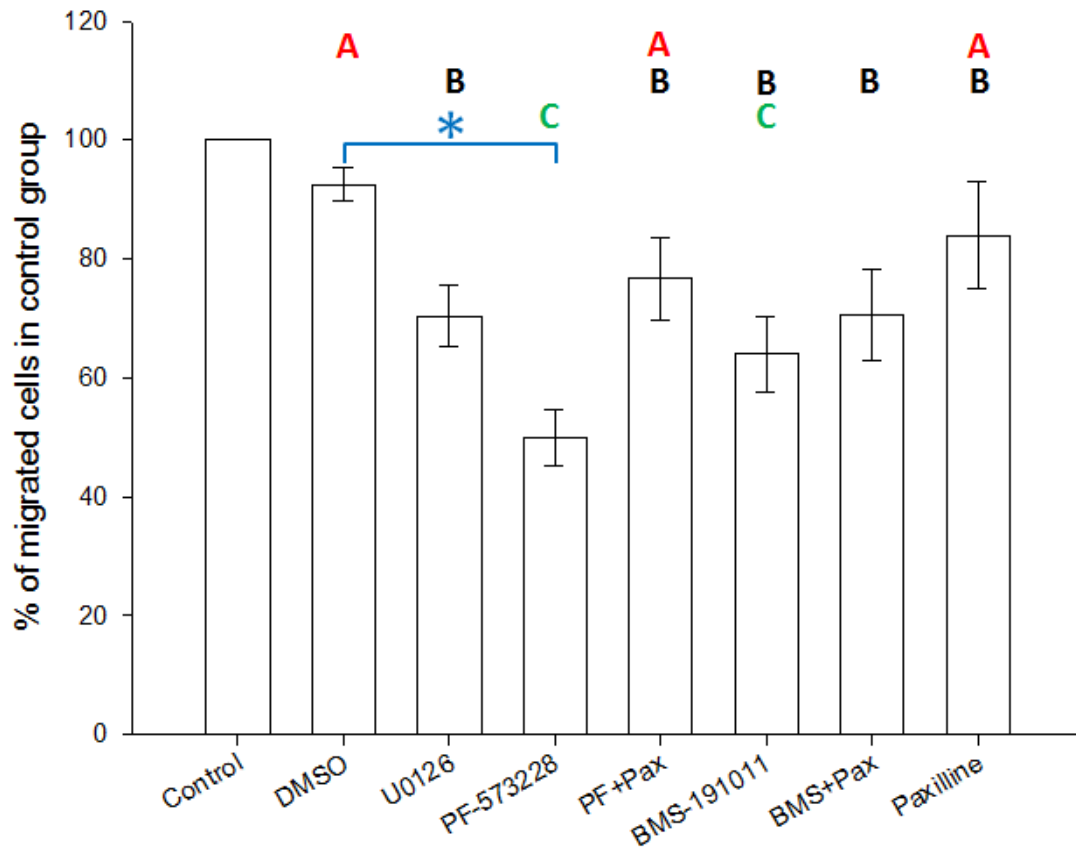
圖五、起始濃度為 5000 顆細胞的 MTT Assay 結果。

將時間對 O.D 值依回歸線方程式轉換為細胞數量作圖。Control、PF+Pax、BMS-191911 與 BMS+Pax 為 2 次實驗平均 (N=2)，餘下實驗組皆為 4 次實驗平均 (N=4)。時間軸以種細胞的時間來算，因此圖上 24 小時為給藥後 12 小時，36 小時為給藥後 24 小時，依此類推。八組不同處理的五個數據點，以 One-way ANOVA 分析未達顯著差異。



圖六、起始濃度為 10000 顆細胞的 MTT Assay 結果。

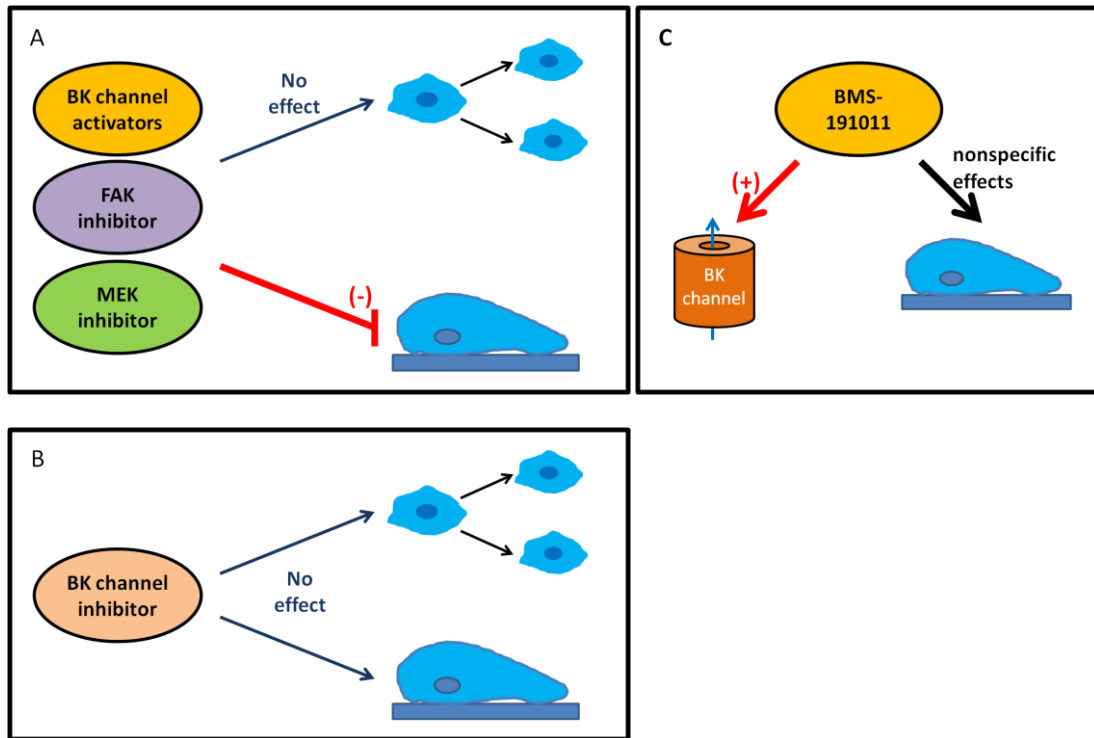
將時間對 O.D 值依回歸線方程式轉換為細胞數量作圖。Control、PF+Pax、BMS-191011 與 BMS+Pax 為 2 次實驗平均(N=2)，其餘組處理則為 4 次實驗平均(N=4)。時間軸同樣以種細胞的時間來算，時間軸實際為給藥後的 12 至 60 小時。八組不同處理的五個數據點，以 One-way ANOVA 分析未達顯著差異。



圖七、Transwell Migration Assay 的結果圖。

此為四次實驗的結果平均 (N=4)，以沒有加任何藥劑的 control 組平均細胞數作為參考值 (Mean±SE = 163±16)，將其餘七組數據除以 control 組將之標準化後，進行 One-way ANOVA 分析，有達顯著差異 ( $p=0.0042$ )。藍色星號為 Tukey's HSD Test 的結果，只有 PF-573228 組與 DMSO 組有差異。使用 Duncan's Multiple Range Test 的後續分析，結果分為 **A**、**B** 與 **C** 三組，不同組表示有顯著差異，由 **A** 組得 DMSO 組與 U0126、PF-573228、BMS-191011 或 BMS+Pax 組有差異，**B** 組再得到 PF-573228 組與 PF+Pax 組有差異，**C** 組再得知 PF-573228 組與 BMS+Pax 組有差異。





圖八、本實驗之總結論圖解。

(A) MEK 抑制劑 (U0126)、FAK 抑制劑 (PF-573228)、BK 通道活化劑 (PF-573228 與 BMS-191011)對 SW480 細胞生長增殖沒有顯著效果，但皆有效抑制細胞爬行。(B) BK 通道抑制劑 (Paxilline)對 SW480 細胞的生長與爬行皆無顯著影響。(C) BMS-191011 已知是專一之 BK 通道活化劑，但於本實驗發現有非針對 BK 通道的作用而抑制 SW480 細胞爬行。

## 個人資料

姓名：李欣璇 (LEE SHIN SHYUAN)

籍貫：馬來西亞

出生日期：民國 78 年 08 月 14 日

戶籍地址：台中市北區武漢街 43 號

學歷：2005-2008 國立台中第二高級中學

2008-2012 私立東海大學生命科學系 生物醫學組

2012-2015 私立東海大學生命科學系 碩士班 電生理學實驗室

經歷：普通生物學實驗助教

植物分類學實驗助教