

東海大學生命科學系  
碩士論文

指導教授：趙偉廷 博士，鄭瓊姬 博士

Wei-Ting Chao, Ph.D.; Chiung-Chi Cheng, Ph.D.

以異體移植老鼠動物模式探討 Plectin 對肝癌細胞移  
行及腫瘤侵犯的影響

In vivo xenograft mouse study on the effect of plectin  
deficiency in cell migration and tumor invasion of  
hepatoma cells

研究生：曾玉惠

Yu-Hui Tseng

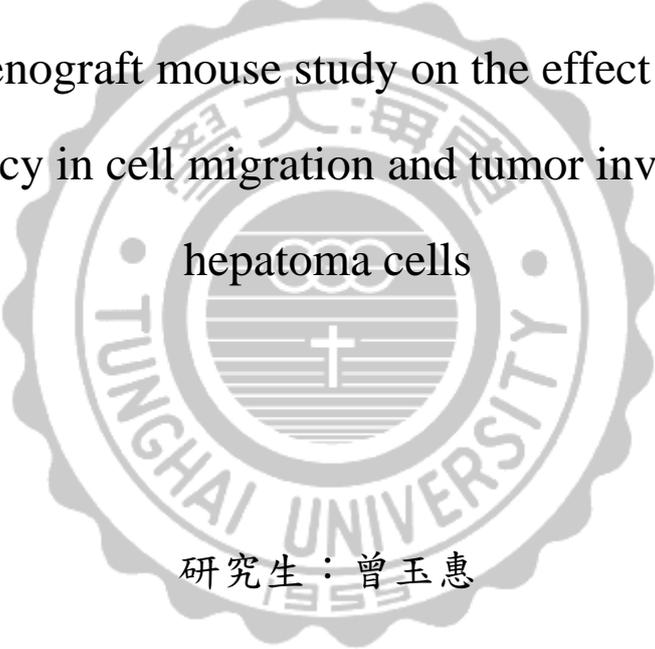
中華民國 105 年 7 月



# 東海大學生命科學系碩士論文

以異體移植老鼠動物模式探討 Plectin 對肝癌細胞移  
行及腫瘤侵犯的影響

In vivo xenograft mouse study on the effect of plectin  
deficiency in cell migration and tumor invasion of  
hepatoma cells

The seal of Tungshai University is a circular emblem with a scalloped border. It features a central cross, a banner with Chinese characters, and the university's name in English, 'TUNGSHAI UNIVERSITY', around the perimeter.

研究生：曾玉惠

Yu-Hui Tseng

指導教授：趙偉廷 博士，鄭瓊姬 博士

Wei-Ting Chao, Ph.D.; Chiung-Chi Cheng, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

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 曾玉惠 君所撰寫之論文

(中文)

以異體移植老鼠動物模式探討 Plectin 對肝癌細胞移行及腫瘤侵犯的影響

(英文)

In vivo xenograft mouse study on the effect of plectin deficiency in cell migration and tumor invasion of hepatoma cells

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

蔡云真

(簽名)

委員

趙偉廷

鄭瓊雅

中華民國 105年 7月 4日

## 致謝

首先要感謝我的指導老師趙偉廷老師、鄭瓊姬老師在研究上的教導和協助讓我受益良多，接著要感謝蔡玉真老師在學業上的指導與論文的建議讓我的論文可以更完整，我也要謝謝系上老師的教導和幫助讓我在大學以及研究所的過程中學到很多。另外，也要謝謝實驗室的學長姐魏婉貞、洪佳儂、高綾憶、張芷瑄、駱哲民、王資凱、李依庭以及曾經幫助過我的所有學長姐，還有我的同學黃冠瑋、洪恩馨，學弟妹黎喻暄、蕭偉雄、廖振群、蕭柔、林弘偉、邱相齡、許修瑞、林冠宇、侯欣雨以及實驗室學弟妹們的幫助與陪伴讓我的生活過得更充實，最後要謝謝我家人的支持讓我可以沒有後顧之憂的完成學業，因為有大家的幫助我才能順利的完成學業並且度過許多開心的時光，謝謝大家。

## 目錄

Abstract .....	1
摘要.....	3
一、前言 .....	5
肝癌轉移與細胞骨架 .....	5
Plectin.....	6
Rac1 與細胞移行 .....	7
集體細胞移行.....	8
Sorafenib 在肝癌的應用 .....	9
研究目的 .....	9
研究策略 .....	10
二、材料與方法 .....	12
細胞培養 .....	12
細胞轉染 .....	12
Rac1-GTP pull down assay .....	13
西方點墨法 .....	13
免疫螢光染色.....	14
Transwell assay .....	15
穩定細胞株備製.....	15
異體移植 .....	16

RT-PCR.....	17
Sorafenib 處理.....	18
MTT assay.....	19
三、結果.....	20
在 Chang cell 中 plectin 降解後促使 Rac1 活性增加.....	20
Plectin 降解後的細胞在小鼠體內的生長情形.....	20
Plectin 在 Chang、PLC、HepG2 三株細胞中的表達量.....	21
Chang、PLC、HepG2 三株細胞的移行能力.....	22
Chang、PLC、HepG2 三株細胞 collective cell migraton 的能力.....	22
Rac1 活性在 Chang、PLC、HepG2 三株細胞中的差異.....	23
Sorafenib 對 Chang、PLC、HepG2 三株細胞具有不同的敏感性 .....	24
Sorafenib 在小鼠中抑制腫瘤細胞增生的情況.....	25
四、討論.....	26
Plectin 的降解與肝細胞形態異常有關.....	26
Plectin 降解後透過 Rac1 的活化促進細胞移行.....	26
Plectin 降解後的細胞在小鼠體內的生長情形.....	27
plectin 的降解可能與集體細胞移行有關.....	28
Rac1 活性與集體細胞移行的結果相異.....	29
Plectin 缺失時細胞內的分子調控機制.....	29

Sorafenib 在小鼠中抑制腫瘤細胞增生的情況 .....	30
Sorafenib 以 plectin 作為生物標記的應用 .....	31
五、參考文獻 .....	33
六、圖表 .....	40
圖一、當 plectin 被降解後 Rac1 活性的變化 .....	40
圖二、plectin 降解的細胞在活體中腫瘤的變化 .....	41
圖三、Chang、PLC、HepG2 三株細胞中 plectin 的表達量 .....	43
圖四、Chang、PLC、HepG2 三株細胞的移行能力 .....	44
圖五、Chang、PLC、HepG2 三株細胞中集體細胞移行的情形 .....	45
圖六、Chang、PLC、HepG2 三株細胞中 Rac1 活性的差異 .....	46
圖七、sorafenib 處理 72 小時後 Chang、PLC、HepG2 三株細胞 之存活曲線 .....	47
圖八、在活體狀況下 sorafenib 的測試情形 .....	48
圖九、Plectin 缺失時分子調控機制示意圖 .....	49

## **Abstract**

The morphology of hepatoma cells is different from that of normal liver cells; it might be related to disorganization of the hepatic cytoskeletal network and resulting in liver cell transformation and migration. Intermediate filament, microtubule and microfilament are three major cytoskeletons in the cell. Plectin, a versatile cytoplasmic cross-linking protein, which connects intermediate filaments to microfilaments was shown to play important role in cell migration. Our previous studies have shown that the deficiency of plectin in Chang liver cell, affected CK18 expression and distribution, and induced pleomorphic changes of Chang liver cells. In our recent study also found plectin deficiency affected focal adhesion kinase (FAK) expression and distribution and further improved cell migration. To further investigate the role of plectin in vivo, this study established xenograft mouse model to investigate the effect of plectin deficiency in liver cell migration and the tumor invasion of hepatoma cells. Control and plectin knockdown human liver cell line, Chang cells were injected into immune deficient mice by portal vein injection. After 28 days, mice were sacrificed for tumor analysis. The expression and distribution of focal adhesion kinase and integrin will also be monitored.

In other side, we found that plectin deficiency increases FAK activity and cell migration. We found a clinical drug, sorafenib which is a tyrosine kinase inhibitor and can inhibit tumor proliferation, and angiogenesis. FAK is a tyrosine kinase, so we want to know whether the drug efficacy of sorafenib is related to plectin deficiency. The current results showed that

low expression of plectin is sensitive to sorafenib. Next, we will confirm the results by in vivo mouse model and hope that plectin can be a biomarker of sorafenib treatment in the future.

## 摘要

肝癌細胞的細胞形態與正常細胞之形態有所不同，過去的研究發現這可能與細胞骨架的組合和聯結的改變有關，也因為細胞的形態不穩定，所以造成細胞移行能力的增加。在細胞骨架中，中間絲(intermediate filament)、微小管(microtubule)跟微細絲(microfilament)是主要的三種細胞骨架，而 plectin，為一種多功能的細胞質聯結蛋白質為連接中間絲跟微細絲的蛋白質，因此 plectin 蛋白質的穩定對於細胞移行扮演重要的角色。在我們之前的研究當中，發現肝細胞株 Chang cell 的 plectin 被降解後會影響 CK18 的表現和結構改變，進而造成肝細胞形態改變並引起肝細胞多形性的轉化。而在我們最近的研究進一步發現 plectin 的缺失會影響細胞附著分子激酶(focal adhesion kinase, FAK)表現，而促進細胞移行。為了進一步在活體中證明 plectin 在肝癌所扮演的角色，我們以異體細胞移植老鼠模式探討肝細胞在 plectin 缺乏的狀態下的癌細胞生長以及擴散情形，並同時觀察 integrin 以及 FAK 的表現和分布。另外一方面，我們從第一部分的實驗結果中發現 plectin 的缺失會提高 FAK 的活化並促使細胞的移行能力增加。在肝癌的臨床用藥中有一種 tyrosine kinase inhibitor—sorafenib，目前研究指出 sorafenib 可以透過抑制 VEGFR、PDGFR、Raf 等分子的活

化去抑制腫瘤的增生以及血管新生，並促使細胞凋亡，而 FAK 也是一種 tyrosine kinase，因此我們想要知道 sorafenib 的藥性是否跟 plectin 的表達量有所關聯，所以我們利用細胞實驗以及皮下注射的方式測試 sorafenib 這個藥物對於 plectin 表達量不同的肝細胞株是否存在不同的敏感性。目前在細胞實驗中的結果顯示 sorafenib 在 plectin 表達量較低的肝細胞株中有較高的敏感性，而在活體實驗的部分我們將會利用 Chang、PLC、HepG2 這三株肝細胞在活體中確認細胞實驗的結果，希望將來可以透過 plectin 的表達量作為 sorafenib 使用的依據。

## 一、前言

### 肝癌轉移與細胞骨架

癌症為臺灣十大死因之首，近幾年肝癌佔男性死因第一位，在女性則為第二位，其中以肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)最為常見，而在肝細胞癌中又以轉移性的癌症占多數，在細胞的轉移過程中會以上皮細胞間質轉換 (epithelial–mesenchymal transition, EMT)(Kalluri and Weinberg, 2009)進入血液系統中透過血液循環轉移到其他部位，而在 EMT 的過程中細胞移行扮演著重要的角色(Friedl and Wolf, 2003; Yamaguchi et al., 2005)。先前的研究發現肝癌細胞與正常細胞的形態有所不同，我們認為這可能與細胞骨架的組合和連結相關，而在細胞移行的過程中也需要細胞骨架的參與以及調控。因此肝癌細胞可能因為細胞骨架的改變使得細胞形態不穩定進而造成細胞移行能力的增加(Yamaguchi and Condeelis, 2007)。細胞骨架包含 microtubules、microfilaments (actin filaments)以及 intermediate filaments (IF)，這些細胞骨架主要的功能為支撐細胞維持細胞形狀、幫助胞內分子的運輸，它們也參與在細胞移動以及許多訊息傳遞的過程中，在這三種細胞骨架中關於 microtubules 與 microfilaments 的作用機制研究較為詳細，而 intermediate filaments 的研究則較少。

## Plectin

而 Plectin 是一個 500kDa 大的蛋白質，幾乎可以在所有的哺乳類細胞中找到其作為連結細胞骨架保持細胞形態的功能(Andra et al., 1998)， plectin 可以利用兩端的結合位與 microtubules、actin filaments、intermediate filaments 連接形成網狀結構，使得細胞結構呈現較穩定且完整的細胞形態，其中 plectin 主要以 N 端的 actin binding domain (ABD)與 actin filament 連接、C 端的 plakin-repeat domain 與 intermediate filaments 連結 (Foisner et al., 1988; Wiche, 1998)，細胞角質 18(Cytokeratin 18, CK18)是一個主要在肝細胞中表達的 intermediate filaments，有研究顯示肝癌組織中 plectin 及 CK18 皆有表達下降的情形，且當 plectin 被降解後 CK18 在蛋白質表達量及分布上都會受到影響(Cheng et al., 2008; Liu et al., 1997; Su et al., 1994)，在角質細胞中也有發現當 plectin 缺乏時會造成 keratin 14 及 actin 的分布受到影響，並造成細胞核的形態產生改變(Almeida et al., 2015)。Plectin 也可以利用兩端的結合位與細胞膜上的 integrin 結合，integrin 是一個 transmembrane receptor，它可以在細胞膜下方與 Src、FAK 等分子結合形成 focal adhesion complex，透過 focal adhesion 的動態調節及下游的訊息傳遞促使細胞移動(Kostan et al., 2009; Nagano et al., 2012; Wozniak et al., 2004)。先前的研究中發現在病患的肝癌組織切片中，

腫瘤組織與正常的組織的 plectin 蛋白質相比蛋白質含量有顯著下降 (Cheng et al., 2008)，另外，在我們先前的實驗中也利用 plectin 缺失的細胞進行的 transwell assay 測試，結果顯示 plectin 的缺失會造成細胞移行能力的增加(Cheng et al., 2015)，所以我們認為 plectin 會透過調控細胞骨架的排列與表達也會透過訊息傳遞影響細胞的形態及移行能力，在肝癌細胞中的形成以及移動上扮演著重要的角色，但是詳細的機制則尚不清楚，因此我們會透過細胞實驗以及動物試驗來確認 plectin 在肝癌中的影響。

### **Rac1 與細胞移行**

Rac1 為 Rho GTPase family 中的一個小的傳訊 G protein 會調節多樣化的細胞活動，包括細胞週期、細胞之間的附著力(adhesion)與細胞的能動性(motility)(Keely et al., 1997; Vial et al., 2003)，它可以藉由調控細胞骨架在細胞前端形成 lamellipodia 促使細胞向前移動，Rac1 分為活化態(Rac1-GTP)與不活化態(Rac1-GDP)，Rac1-GTP 會特異性的與 PAK1(p21-activated kinases 1)上的 p21-binding domain (PBD)結合，並刺激 PAK1 使其活化進而使細胞形成 lamellipodia 並影響細胞骨架的排列(Hoppe and Swanson, 2004; Price et al., 1998)。因此，我們在探討細胞移行的過程中會利用與 Rac1-GTP 結合的 PAK 蛋白質將活化

態的 Rac1 分離出來，之後便可以藉由分析 Rac1 活化的含量來作為一個判斷細胞移行能力的依據，透過 Rac1 來探討 plectin 在細胞移行的過程中分子層面的影響。

## 集體細胞移行

在先前的文獻中大部份關於癌細胞轉移的假說皆認為細胞是透過 EMT 的方式單獨從細胞群中移動出來，進入血管進行遠端轉移，然而近期的研究中有提出另一種假說，他們認為在癌細胞轉移的過程中可能是透過 leader cell 利用 E-cadherin 的連結，帶著整群細胞移動進行轉移，而這樣的移動模式他們稱為集體細胞移行。這樣細胞群體移動的現象在胚胎發育、傷口癒合及癌症侵襲的過程中都有被觀察到，在這之中細胞與細胞間會相互連結並透過物理性及化學性的引導整合細胞內骨架的活性、產生集體極性促使整群細胞往相同的方向移動 (Choi et al., 2016; Friedl and Gilmour, 2009; Haeger et al., 2015; Ilina and Friedl, 2009; Scarpa and Mayor, 2016)。我們在後續細胞移行的實驗中也會觀察不同細胞株間集體細胞移行的情形與 plectin 表達之間的相關性。

## Sorafenib 在肝癌的應用

在我們先前的研究中發現當 plectin 被降解後會促使磷酸化 FAK(focal adhesion kinase)有上升情況(Cheng et al., 2015)，而 FAK 是 focal adhesion complex 中的一員，當 FAK 受到活化後會進一步活化下游分子進行訊息傳遞促使細胞進行移行及增生(Hauck et al., 2002; Mitra et al., 2005; Sieg et al., 1999)，因此 FAK 的活化對於癌細胞的生長是很重要的指標。目前在臨床上肝癌後期的一線用藥 sorafenib，它是一個 multikinase inhibitor 目前研究顯示它主要是透過阻斷 VEGFR、PDGFR 以及 Raf 等 kinase 的活化，藉由中斷訊息傳遞以此抑制細胞增生及腫瘤血管新生並促使細胞凋亡(Wilhelm et al., 2008)，已經被證實可以有意義的延長肝癌病人的壽命(Bruix et al., 2012; Kelley and Venook, 2008; Kostner et al., 2013)。而在我們的研究中發現 plectin 缺失時會上升的 FAK 也是一個與細胞增生相關很重要的 kinase，因此我們想測試是否 sorafenib 也可以透過抑制 FAK 的活化對於不同 plectin 表達量的細胞產生不同的敏感性。

## 研究目的

在我們先前結果顯示 Chang cell 中 plectin 蛋白質被降解後會造成細胞的移行能力增加，因此我們想要利用不同的細胞株以及不同的實

驗方法確認 plectin 在肝癌中的重要性，並透過建立異體移植的方法在小鼠身上進行動物實驗確認先前的研究結果在活體上也有相同的情況，我們也會測試 sorafenib 這個臨床用藥是否對於 plectin 表達多寡存在著不同的敏感性，並進一步研究 sorafenib 是否在不同 plectin 表達量的肝細胞中存在不同的敏感性，且這兩者間是否有相關性。

## 研究策略

首先，在離體實驗的部分我們利用 Chang cell 進行實驗透過 RNAi 的處理來模擬 plectin 缺失的肝細胞，藉此比較正常細胞與 plectin 缺失細胞兩者間 Rac1 的活性是否有差異。我們利用 Rac1-GTP pull down assay 的方式，將 Rac1-GTP 分離出來後進行西方點墨法分析其 Rac1 活性，確認 plectin 的缺失是否會造成 Rac1 活性的改變進而影響細胞移行的能力。另外一方面動物實驗的部分我們會將控制組以及 plectin 降解組別的穩定細胞株(stable cell line)經由肝門靜脈注射進入小鼠體內使細胞透過血液流至肝臟中，讓細胞回到肝臟的環境生長經過 28 天後將小鼠犧牲觀察腫瘤在肝臟中生長的情形，以此確認動物實驗結果與細胞實驗結果相符。

因為先前的實驗都是使用 Chang cell 進行實驗，為了確認在不同肝細胞株中 plectin 的表達量是否同樣會影響細胞移行的能力，第二部分我們將會使用 Chang、PLC、HepG2 這三株常見的肝細胞進行實

驗。一開始我們會先利用螢光染色、RT-PCR 及西方點墨法確認 plectin 在三株細胞中的表達量及分布，接著再用 transwell assay 及 Rac1-GTP pull down assay 測試三株細胞的移行能力及利用細胞連結蛋白質 E-cadherin 的螢光染色觀察細胞集體細胞移行的情況。

在另一方面，我們想要利用一種臨床藥物 sorafenib，一種 tyrosine kinase inhibitor 來測試 Chang、PLC、HepG2 這三株細胞株是否會因為 plectin 表達量的不同而存在不同的敏感性。我們在先前的研究中發現在病人組織中 plectin 表達下降而磷酸化 FAK 有活化的情況，且在 Chang cell 中經 plectin 降解後磷酸化 FAK 也有活化的情形發生，而 FAK 也是一種 tyrosine kinase，我們想以此測試 sorafenib 的藥性與 plectin 的缺失是否有所關連。我們會利用 MTT assay 測試三株細胞在不同濃度 sorafenib 處理下細胞的存活率並做出曲線圖觀察三株細胞是否存在不同的藥物敏感性。接著我們會在小鼠上進行動物實驗，首先會以皮下注射的方式將 Chang cell 打入小鼠背部的兩側，接著利用腹腔注射的方式給予藥物確認 sorafenib 對於腫瘤的抑制效果，之後我們會進一步將三株細胞打入小鼠體內施打藥物確認 sorafenib 在活體上是否也有與細胞實驗相同的結果。

## 二、材料與方法

### 細胞培養

利用 Chang、PLC、HepG2 三株肝細胞在含有 10% 小牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, gibco)與 50 unit/ml 抗生素的 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium, gibco)培養液於 37°C、5% 二氧化碳環境的培養箱中培養，培養兩至三天等細胞完全貼滿培養皿底部時，再使用胰蛋白酶(trypsin, gibco)使細胞附著蛋白質瓦解，將細胞使用培養液沖散後進行繼代培養。我們所使用到的三株肝細胞株分別為，Chang liver、PLC/PRF/5 以及 HepG2，Chang liver cell 源自 HeLa cell 呈現上皮細胞形態，我們將此細胞作為非肝癌細胞使用；PLC 源自於肝癌組織中形態為 Alexander cell 且為 HBV-positive 及 p53 突變的細胞株；HepG2 源自於肝細胞癌，呈現上皮細胞形態並帶有 N-ras 突變基因。

### 細胞轉染

一開始先將 Chang cell 種在 3 公分的培養皿中使細胞密度為 50%，接著讓細胞貼附約兩個小時後，準備兩個 1.5ml 的離心管一管加入 1 $\mu$ g 帶有 plectin shRNA 的質體(RNAi core)與 200 $\mu$ l 不含小牛血清的培養液，另一管加入 6 $\mu$ l 的 lipofectamine 2000(Invitrogen)與 200 $\mu$ l 不

含小牛血清的培養液混合均勻後靜置 5 分鐘，接著將兩管溶液混合靜置 20 分鐘後將混合的溶液加入細胞中，待 shRNA 作用約 48 小時後收取細胞懸浮液利用西方點墨法的方式確認 plectin 的降解效果。

### **Rac1-GTP pull down assay**

將控制組與 plectin 降解的兩組以 500 $\mu$ g 定量後，取 lysis buffer(25mM Tris-base, 150mM NaCl, 1%NP-40, 5% Glycerol, 1mM EDTA, 100 $\mu$ M sodium orthovanadate, 200 $\mu$ M PMSF, protease inhibitor cocktail)分別將其體積補至 700 $\mu$ l，加入 30 $\mu$ l 的 PAK 蛋白質後使其在 4 $^{\circ}$ C 的環境中混合 2 小時，以 4 $^{\circ}$ C、4500rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，用 wash buffer(25mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.2)沖散 pellet 再以 4 $^{\circ}$ C、4500rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，重複三次，最後使用二次水沖洗，去除上清液後加入 20 $\mu$ l 的 loading dye(sample buffer :  $\beta$ -ME = 9 : 1)利用 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘接著進行西方點墨法分析。

### **西方點墨法**

將準備好的細胞裂解液進行蛋白質定量後，加入 5 $\mu$ l 的 loading dye(BIO-RAD)使用 SDS-PAGE 電泳進行跑膠，上膠 90V，20 分鐘；下膠 120V，100 分鐘後，進行濕式轉漬到 PVDF membrane，100V，

一至二小時。利用一倍 PBST 配製 5% 的脫脂牛奶進行 blocking 一小時後，PBST 清洗 5 分鐘兩次，加入一抗(1:1000)一小時後，PBST 清洗 15 分鐘一次，5 分鐘兩次，加入二抗(1:10000)一小時後，PBST 洗 15 分鐘一次，5 分鐘四次後，即可進行呈色。

一級抗體：

Plectin (Rabbit, 1:2000, Origene)

GAPDH (Mouse, 1:1000, Santa Cruz)

Rac1 (Mouse, 1:2000, BD)

E-cadherin (Mouse, 1:1000, BD)

二級抗體：

Anti-Rabbit-HRP (1:10000, Jackson)

Anti-Mouse-HRP (1:10000, Jackson)

## 免疫螢光染色

將 Chang、PLC、HepG2 三株細胞分別計數  $0.05 \times 10^6$  個細胞種在 coverslip 上使細胞貼附一個晚上，隔天將細胞用 3.7% 的 formaldehyde (in PBS) 固定 20 分鐘後使用 0.1% 的 Triton X-100 (in PBS) 處理 1 分鐘使細胞穿孔，接著加入一級抗體染 1 小時，最後再加入 RNase(1:500)、PI(1:1000) 及二級抗體及染 1 小時即可封片，以上步驟置換前後皆要以 PBS 清洗三次，等玻片風乾後使用共軛焦顯微鏡(ZEISS LSM510)

進行觀察及拍攝。

一級抗體：

Plectin (Goat, 1:100, Santa Cruz)

二級抗體：

Fluor 488-Anti-Goat (1:200)

### **Transwell assay**

分別將 Chang、PLC、HepG2 三株細胞計數 $0.08 \times 10^6$ 個細胞混和均勻於不含血清的培養液中加入 transwell(MILLIPORE)的 insert 中，下方 24 well 中加入含有血清的培養液，放置培養箱中使其移行 4 小時後，將 insert 中沒有移行過去的細胞使用棉花棒去除，接著使用 3.7%的 formaldehyde (in PBS) 固定 20 分鐘、0.1%的 Triton X-100 (in PBS) 1 分鐘使細胞穿孔，利用 DAPI(1:1000, in PBS, molecular probes) 將細胞核染色，以上步驟置換前後皆要以 PBS 清洗三次，最後使用倒立螢光顯微鏡(ZEISS Axiovert200M)拍攝照片進行計數後進行統計量化。

### **穩定細胞株備製**

將帶有 plectin shRNA 和抗抗生素基因的質體與 lipofectamine 2000 同時轉染進入 Chang cell 中做為實驗組，另外做一組只有轉入

lipofectamine 2000 的控制組，經過 48 小時後，將培養液中加入抗生素(puromycin:培養液 = 2:1000)換入轉染後的兩組細胞中進行篩選，接著兩天換一次含有抗生素的培養液，直到控制組的細胞完全死亡後，再經過兩次篩選後再將存活下來的細胞換回正常培養液使其大量生長後，接著再利用西方點墨法的方式確認細胞中 plectin 含量確實有下降，即可確定得到帶有 plectin shRNA 質體的 stable cell line。接著再轉染帶有 GFP 的質體，利用上述相同的方法篩選(G418:培養液 = 14.2:1000)帶有綠螢光的穩定細胞株。

### 異體移植

肝門靜脈：將小鼠麻醉後，計數 $5 \times 10^6$ 個細胞與 100 $\mu$ l 的 PBS 混合均勻後使用胰島素針筒(BD)將細胞打入小鼠的肝門靜脈中，縫合後經過 28 天將小鼠犧牲觀察其體內腫瘤生長情形(Bouvet et al., 2006; Heijstek et al., 2005; Li, 2004)。

皮下注射：計數 $5 \times 10^6$ 個細胞與 100 $\mu$ l 的 PBS 及 100 $\mu$ l 的 Matrigel 混合均勻後使用胰島素針筒將細胞打入小鼠背部的兩側，每兩天測量一次腫瘤大小等到腫瘤長至 150mm<sup>2</sup> 後，即可開始施打藥物(Liu et al., 2006)。

## RT-PCR

將養在 3 公分培養皿中的細胞使用 PBS 清洗三次後去除，加入 1ml 的 TRIzol 靜置 5 分鐘，將細胞收入離心管中靜置 5 分鐘，接著加入 200 $\mu$ l 的 chloroform 混合後靜置 3 分鐘，接著以 4°C、12000rpm 離心 15 分鐘後將上清液取出並加入 500 $\mu$ l 的 Isopropanol 混合均勻，放置 -20°C 20 分鐘，室溫 10 分鐘後以 4°C、12000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後加入 500 $\mu$ l 的 75%酒精將 pellet 搖起後，以 4°C、9000rpm 離心 5 分鐘去除上清液，使 pellet 風乾後加入 20 $\mu$ l 的 DEPC 水沖散乾浴 56°C、5 分鐘，測定濃度後以 1 $\mu$ g 的濃度與 1 $\mu$ l 的 50 $\mu$ M oligo dT(Novagen)、10 $\mu$ l 2x RT smart mix 混合補水至 20 $\mu$ l 經室溫 5 分鐘 56°C 乾浴一小時，95°C 五分鐘將 mRNA 轉成 cDNA。接著再以 10 $\mu$ l 的 2x Taq PCR smart mix 與 forward、reverse primer 各 4 $\mu$ l、2 $\mu$ l 的 cDNA 進行 RT-PCR(95°C 5 分鐘再進行 31 cycle 95°C 20 秒、56°C 1 分鐘、72°C 30 秒接著 72°C 5 分鐘放大片段後進行跑膠(2% agarose gel，100V 50 分鐘)。

Plectin primer : 336 bp (Kazerounian et al., 2002)

forward 5-AAGACGTCCTCCAAGTCCTC-3 (12515-12534)

reverse 5-GGCGTTGCCCGAGAGCAT-3 (12833-12850)

GAPDH primer : 407 bp

forward 5-TCTGCTGATGCCCCCATGTTCGTC-3

reverse 5 TTCTTGATGTCATCATATTTGGCA-3

### **Sorafenib 處理**

在細胞實驗中，我們使用的溶劑為 DMSO(Dimethyl sulfoxide)將 sorafenib(Selleckchem)配成 10mM 的 stock 後以培養液進行稀釋，使所有組別 DMSO 最終濃度為 0.1%而 0 $\mu$ M 的 sorafenib 為控制組，將 Chang、PLC、HepG2 分別計數 $0.05 \times 10^6$ 個細胞種在 24well 中後，使用 0 $\mu$ M、2 $\mu$ M、4 $\mu$ M、6 $\mu$ M、8 $\mu$ M、10 $\mu$ M 六個濃度分別加入三株細胞中，在 37°C、5%二氧化碳的情況下培養 72 小時，接著再利用 MTT assay 測量三株細胞在 sorafenib 處理後的細胞存活率。

在動物實驗的部分，我們使用的溶劑為 Cremophor EL : 95%ethanol : dH<sub>2</sub>O = 12.5 : 12.5 : 75，每兩天以 50%Cremophor EL(Sigma)與 50%的 95%ethanol 溶劑配製 4 倍濃度的 sorafenib 溶液在室溫下避光儲存，藥物施打當天再使用 dH<sub>2</sub>O 稀釋(Fendrich et al., 2012; Wilhelm et al., 2004)。給予藥物方式為腹腔注射，經文獻參考後我們將濃度訂在 30mg/kg、每天施打一次(Liu et al., 2006)。

## MTT assay

將加藥處理 72 小時的細胞的培養液去除使用 PBS 清洗後每格 24well 中加入 300 $\mu$ l 含 10%MTT 溶液(MTT 溶液：5mg/ml in ddH<sub>2</sub>O, BIONOVAS)的培養液後放置 37°C、5%二氧化碳環境中培養 4 小時至反應完全後，將含 MTT 的培養液去除後加入 400 $\mu$ l 的 DMSO 使 MTT 產生的紫色結晶完全溶解後，接著取 200 $\mu$ l 進入 96 well 中利用 ELISA reader 設定 570nm 波長測定其 OD 值，以此測定處理不同藥物濃度組別中細胞的存活率並做成曲線圖。

### 三、結果

#### 在 Chang cell 中 plectin 降解後促使 Rac1 活性增加

在先前的研究中我們得知在 transwell assay 的測試中 plectin 被降解後的肝細胞其移行能力有顯著的增加(Cheng et al., 2015)，因此我們將進一步利用分子層面的方式探討 plectin 降解後對細胞產生的影響。首先，我們將 plectin siRNA 轉染到 Chang cell 中，透過 RNAi 的方式將細胞內的 plectin 降解，接著透過 Rac1-GTP pull down assay 利用會與 Rac1-GTP 連結的 PAK 蛋白質將 Rac1-GTP 分離出來，之後再進一步將其作西方點墨法的分析以此判斷不同處理組別的 Rac1 活性。從西方點墨法的結果(圖一，A)可以得知當 plectin 被降解後會促使 Rac1 活性增加經過量化統計(圖一，B)後顯示兩者間有顯著差異，因此我們認為這可能是造成細胞移行的能力增加的原因。

#### Plectin 降解後的細胞在小鼠體內的生長情形

在細胞實驗中我們得知將 plectin 降解後可能會透過增加 Rac1 活性的方式促使細胞移行的能力上升，接下來我們想進一步在活體上確認這個結果。一開始我們先建立帶有 plectin shRNA 質體的穩定細胞株，接著將控制組與 plectin 降解的細胞分別經由肝門靜脈打入小鼠

體內，細胞會透過血液循環進入肝臟中，經過 28 天後將小鼠犧牲取出肝臟觀察腫瘤生長的情形。實驗結果顯示在兩組小鼠肝臟中外觀(圖二，A)沒有太明顯的腫瘤形成，而在經過組織切片(圖二，B)後可以看到 plectin 降解的組別腫瘤有較嚴重的情況，但兩組之間從肝臟外觀中沒有太顯著的差異，因此在這個部份我們將會針對實驗方法改善並再次進行實驗。我們也將控制組及 plectin 降解組的穩定細胞株進行西方點墨法分析，結果顯示 plectin 的蛋白質表達被降解約 30%(圖二，C)。

### **Plectin 在 Chang、PLC、HepG2 三株細胞中的表達量**

為了確認 plectin 在其他肝細胞株中是否有相同的結果，所以我們增加 PLC 以及 HepG2 這兩株常見的肝癌細胞進行實驗。首先，利用免疫螢光染色(圖三，A)的方式在 Chang、PLC、HepG2 這三株肝細胞中使用抗體偵測其 plectin 的表達量，綠螢光的部分為 plectin，紅螢光的部分為細胞核，我們可以透過觀察綠螢光的表達量初步判斷三株細胞中 plectin 的差異，在結果中可以明顯的發現 Chang 的 plectin 表達量多於 PLC 與 HepG2。接下來我們進一步利用 RT-PCR 與西方點墨法確認三株細胞中總體 plectin 的 RNA 與蛋白質表達量，結果顯示 plectin 的 RNA(圖三，B)與蛋白質(圖三，C)表達量與免疫螢光染色的

結果相符，Chang 的表達量是多於 PLC 與 HepG2，經量化後可以得到相同的結果，Chang 的 plectin 表達是有顯著高於其他兩株細胞。

### **Chang、PLC、HepG2 三株細胞的移行能力**

接著我們利用 transwell 的方式測試三株細胞的移行能力，我們將細胞與不含血清的培養液混合後加入 transwell 上方的 insert 中，下方 24 well 中則加入含有 10% 血清的培養液，因此細胞會受到血清的驅使向下移動穿越 insert 下方具有小孔隙的薄膜，經過 4 個小時後我們將 insert 中尚未通過的細胞刮除，利用 DAPI 將細胞核染色並拍照計數通過的細胞數量，藉此判斷細胞移行的能力。實驗結果顯示三株細胞中通過薄膜的細胞數量(圖四，A)是 HepG2 最多，其次是 PLC 而 Chang 最少但這個結果在量化圖(圖四，B)中只能看到有這樣的趨勢而統計上沒有顯著差異，然而我們在細胞移行時觀察到 PLC 及 HepG2 這兩株細胞間有明顯聚集的情形發生，這與集體細胞移行的情況十分相似，因此我們想進一步觀察這三株細胞在集體細胞移行上是否有顯著的差異。

### **Chang、PLC、HepG2 三株細胞 collective cell migraton 的能力**

在細胞進行集體細胞移行的過程中會透過 E-cadherin 連結彼此而

其中會有 leader cell 在這群細胞的前端帶領整群的細胞移動，首先我們利用西方點墨法分析 Chang、PLC、HepG2 這三株細胞中 E-cadherin 的蛋白質含量(圖五，A)，結果顯示在 Chang 中 E-cadherin 幾乎沒有表達，明顯少於 PLC 以及 HepG2，在統計結果(圖五，B)中也可以看到有顯著差異。另一方面我們先用同樣的方式將細胞與不含血清的培養液混合放入上方 insert 中，下方加入含有 10% 血清的培養液使細胞透過 transwell 的方式移行 4 個小時，接著將未通過的細胞去除後將細胞核染色，並進一步使用 E-cadherin 的抗體進行螢光染色並拍攝照片，如果細胞是由三顆以上的細胞聚集並觀察到有透過 E-cadherin 的連結我們將這樣的情形定義為一個聚落，接著分別計數並加總三個細胞株聚集的面積進行量化，結果中可以明顯看到 HepG2 與 PLC 細胞間 E-cadherin 連結的情形(圖五，C)，而量化結果(圖五，D)也顯示三株細胞中集體細胞移行的情況 HepG2 最多，其次是 PLC，而 Chang 最少且這三株細胞間在統計中皆有顯著差異，而這樣的結果與 plectin 的表達量呈現負相關，這顯示 plectin 表達量較少時可能會增強細胞集體細胞移行的能力，而這也與我們前面 plectin 缺失會造成細胞移行能力增加的結果相符。

### **Rac1 活性在 Chang、PLC、HepG2 三株細胞中的差異**

我們收取 Chang、PLC、HepG2 三株細胞的細胞裂解液後，同樣

透過 Rac1-GTP pull down assay 藉由 PAK 蛋白質將 Rac1-GTP 分離出來，接著進行西方點墨法分析檢測 Chang、PLC、HepG2 中 Rac1 的活性，結果顯示三株細胞的 total Rac1 蛋白質表達量一致，而 Rac1-GTP 的表達則是 HepG2 明顯低於 Chang 以及 PLC(圖六)，這顯示在 Rac1 活性上 HepG2 明顯低於其他兩株細胞，然而這個結果與我們先前集體細胞移行的結果並不吻合。

### **Sorafenib 對 Chang、PLC、HepG2 三株細胞具有不同的敏感性**

另外一方面，為了測試臨床用藥 sorafenib 對於 plectin 表達量不同的細胞株是否存在不同的敏感性，我們將三株細胞分別種在 24 well 中使用 0 $\mu$ M、2 $\mu$ M、4 $\mu$ M、6 $\mu$ M、8 $\mu$ M、10 $\mu$ M 六個濃度的 sorafenib 處理 72 小時，利用 MTT assay 與 ELISA reader 測定細胞的存活率並將結果做成曲線圖，比較三株細胞對於 sorafenib 的敏感度。從實驗結果得知在 6 $\mu$ M 的濃度下 Chang 的存活率約為 80%、PLC 的存活率約為 60%，而 HepG2 的存活率僅剩約 30%(圖七)，這顯示 HepG2 在較低的濃度下就可以達到抑制細胞增生的效果，其次是 PLC 而 Chang 則需要更高濃度的藥物才可以達到抑制效果，因此這個結果顯示在細胞實驗的部分 sorafenib 對於三株細胞的敏感性確實是與 plectin 蛋白質表達呈現負相關。

## Sorafenib 在小鼠中抑制腫瘤細胞增生的情況

為了確認細胞實驗的結果，我們先利用 Chang cell 進行實驗以確認 sorafenib 的藥效，因為使用肝門靜脈注射的方式無法明確監控腫瘤的生長大小，所以我們透過皮下注射的方式將 Chang cell 打入小鼠兩側背部中，每隔兩天量一次腫瘤大小及小鼠重量，並以簡化的橢圓體公式  $\frac{l \times s^2}{2}$ ， $l$  為腫瘤的長邊， $s$  為腫瘤的短邊，透過這個公式估算腫瘤的體積(Yadav et al., 2011)，等到腫瘤體積達到  $150\text{mm}^3$  大小後即可進行 sorafenib 的藥物施打，藥物施打的方式為腹腔注射、頻率為每天一次、濃度為  $30\text{mg/kg}$ ，給藥 21 天後將小鼠犧牲後取下腫瘤比較控制組與 sorafenib 處理組的腫瘤大小，我們可以從結果中明顯地觀察到 sorafenib 處理組在第 16 天開始施打藥物後腫瘤大小與控制組相比其生長曲線有趨於平緩沒有繼續上升的現象(圖八，A)，接著我們將小鼠犧牲後取出腫瘤比較兩組腫瘤的大小，可以觀察到腫瘤大小有明顯的差異(圖八，B)，這個結果顯示藥物有明顯抑制的情況，因此我們可以確定 sorafenib 在小鼠異體移植的模式中具有抑制腫瘤增生的效果。

## 四、討論

### **Plectin 的降解與肝細胞形態異常有關**

在先前的研究中顯示在肝癌病人的組織中其細胞形態會產生改變而細胞骨架是主要影響細胞形態的原因，我們研究的蛋白質 plectin 則是連結多種細胞骨架的連接蛋白質，且先前的文獻中也發現當 plectin 被降解後會使 CK18 的蛋白質表達下降及細胞收縮、細胞骨架分布散亂的情形(Cheng et al., 2008)，因此我們認為 plectin 的降解可能會透過影響細胞骨架的排列及表達量進而使細胞形態產生改變及細胞能動性的增加造成肝癌的發生。

### **Plectin 降解後透過 Rac1 的活化促進細胞移行**

先前的實驗結果中我們得知 plectin 的降解會導致細胞移行能力的增加，為了進一步研究 plectin 在細胞移行中的角色我們在 Chang cell 中利用 RNAi 的方式將細胞中 plectin 的蛋白質降解，接著進行 Rac1 活性檢測，結果顯示 Rac1 活性有增強的情況(圖一)，Rac1 的活化與細胞骨架的調節及移動能力有很大的相關性，Rac1-GTP 會促使細胞在前端形成 lamellipodia 使細胞向前移動，而這部分則與我們先前進行 transwell assay 的實驗結果符合，當 plectin 降解後細胞移動的

能力有增加的情況。有文獻顯示鈣離子會透過 CaM 與 plectin 結合及 PKC $\alpha$  將 integrin 磷酸化的方式使 plectin 無法與 integrin 連接因而造成 actin filament 與 integrin 的作用 (Kostan et al., 2009; Song et al., 2015), 所以我們認為 plectin 缺失的情況下可能會導致相似的情形使得 integrin 與 actin filament 作用最終透過 Rac1 活化的增加促使細胞移行能力的上升, 而其中 plectin 是透過什麼管道調節 Rac1-GTP 的表達上升我們還無法確認。

### **Plectin 降解後的細胞在小鼠體內的生長情形**

為了確認先前細胞實驗的結果是否在活體上也有相同的情形, 因為脾臟目標較大操作較為容易, 所以我們一開始是利用脾臟注射的方式將細胞打入小鼠體內, 希望細胞會透過血液流動進入肝臟中, 結果顯示細胞容易滯留在脾臟中無法順利流到肝臟。因此, 我們重新建立異體移植的小鼠模式將細胞打入肝門靜脈中使其可以直接順著血流進入肝臟中生長, 經過一段時間後將小鼠犧牲觀察其肝臟中腫瘤的變化, 而我們的結果顯示細胞確實可以透過這樣的方式進入肝臟, 但在 plectin 降解後的細胞與控制組細胞兩者在小鼠肝臟中生長的情形在外觀上沒有太明顯的差異(圖二, A), 我們認為這可能與 plectin 降解效果不佳有所相關, 經西方點墨法的結果顯示在

打入小鼠中的細胞其 plectin 的表達量只有下降約 30%(圖二，C)，我們認為這可能是兩組小鼠實驗中無法顯現出明顯差異的原因之一。而另外一方面腫瘤在小鼠肝臟生長的情形也沒有達到預期效果，從外觀中無法看到明顯的腫瘤產生，我們認為這可能是因為實驗中所使用的小鼠品系為裸鼠(NU/NU)雖然具有免疫缺陷無法形成 T 細胞，但還是具有先天免疫的能力，而我們使用的細胞為人類肝細胞，小鼠體內的免疫系統可能還是對細胞造成影響，因此我們之後會針對這兩個部分進行實驗修改，我們會再重新找一個 plectin 降解效果較好的質體，並且將小鼠品系更換為重症聯合免疫缺陷小鼠(SCID)，希望之後可以透過改善實驗操作並得到與細胞實驗相符的結果。

### **plectin 的降解可能與集體細胞移行有關**

我們利用 Chang、PLC、HepG2 這三株肝細胞確認 plectin 與細胞移行的相關性，在實驗的過程中我們發現細胞在移行時有集體細胞移行的情況產生，而細胞在進行集體細胞移行時會由細胞連結蛋白質 E-cadherin 相互連結，所以我們經由西方點墨法與 transwell 的結果發現，在三株細胞中 plectin 的蛋白質表達與 E-cadherin 蛋白質表達及集體細胞移行的面積呈現負相關(圖三、圖五)，因此我們認為 plectin 的降

解可能會造成 E-cadherin 的表達量上升並促使集體細胞移行的產生，之後我們會進一步探討 plectin 與集體細胞移行之間作用的詳細機制。

### **Rac1 活性與集體細胞移行的結果相異**

我們檢測 Chang、PLC、HepG2 這三株細胞的 Rac1 活性後，結果顯示在集體細胞移行實驗中細胞移行能力最好的 HepG2，我們預期其 Rac1 活性應該是三株細胞中最高的，然而，結果與我們的預期相反 HepG2 的 Rac1 活性竟然明顯低於 Chang 以及 PLC(圖六)。有文獻顯示在進行集體細胞移行時，只有細胞前端的 leader cell 會有 Rac1 活性上升的情形，而其他 follow cell 則由 leader cell 帶領進行移動，而這些 follow cell 的 Rac1 活性則沒有明顯上升的情況(Yamaguchi et al., 2015)。我們認為這可能是 HepG2 中 Rac1 活性較低而其集體細胞移行能力卻很高的原因，因此我們之後可能需要透過細胞的免疫螢光染色，進一步確認 Rac1-GTP 在群體細胞中的表達位置以確認我們的推斷是否正確。

### **Plectin 缺失時細胞內的分子調控機制**

在我們先前實驗的結果中得知 plectin 降解後會促使磷酸化 FAK 上升、誘發 actin stress fiber 的產生及 Rac1 活性增加(Cheng et al., 2015)，

並且在不同肝細胞中發現 plectin 的表達量與 E-cadherin 的蛋白質表達及集體細胞移行也具有相關性。在先前的文獻中也得知 plectin 在沒有鈣離子的情況下會與細胞內的 intermediate filament 及細胞膜上的 integrin 連接，加入鈣離子時細胞中的 CaM 及 PKC $\alpha$  會使 plectin 與 integrin 的連結分開，促使 actin 與 integrin 結合，而加入鈣離子的狀況與 plectin 缺失的情形類似(Kostan et al., 2009)，所以我們利用這篇文獻作為基礎畫出 plectin 缺失時細胞內分子調控的機制圖(圖九)。我們認為在 plectin 正常表達的情況下，plectin 會與 integrin 及 intermediate filament 連結在一起以此穩定細胞內部的骨架及形態。然而，當 plectin 缺失時會促使細胞內 Rac1 活性的上升並促進 actin 單體聚合誘發細胞中 actin stress fiber 的產生，且促進磷酸化 FAK 表達增加並在 integrin 下方與其他分子聚集形成 focal adhesion complex，使細胞的能動性增加，在這個情況下如果細胞群體中 E-cadherin 又呈現高表達量時，這樣的情況下就會促使細胞的集體細胞移行能力上升。

### **Sorafenib 在小鼠中抑制腫瘤細胞增生的情況**

我們在先前的實驗結果中發現 plectin 的缺失會造成磷酸化 FAK 的表達上升，因此我們想利用作為 multikinase inhibitor 的肝癌臨床用藥 sorafenib 是否可以透過抑制 FAK 活化進而對 plectin 表達量不同的

細胞產生不同的敏感性。在細胞實驗中的結果顯示 HepG2 這株 plectin 表達量較少的細胞株對於 sorafenib 有較高的敏感性，在較低的濃度下就可以達到抑制細胞增生的情形(圖七)。目前，我們已經將 Chang cell 打入小鼠中並施打藥物，結果顯示 sorafenib 對於腫瘤確實有明顯抑制的效果(圖八)，而後我們也會進一步將三株細胞分別以皮下注射的方式打入小鼠體內，並施打 sorafenib 確認在活體中 plectin 表達量不同的細胞株經過藥物處理後腫瘤抑制的效果是否有差異。

### **Sorafenib 以 plectin 作為生物標記的應用**

目前針對癌症的治療逐漸從傳統的統一化學治療轉變成有專一性的個人化醫療，我們可以針對不同狀況的病人給予不同的治療，每種藥物都有不適合的狀況可能是本身藥物目標的表達較少或是目標基因突變進而導致治療無效產生抗藥性的情形，因此我們可以透過一些生物標記來判斷病人狀況並給予適合的治療方式，一來可以增加治療的效果，二來可以降低醫療成本。在我們的研究中發現 plectin 的缺失可能會透過 Rac1 的活化影響細胞的形態及移行的能力，也觀察到 plectin 的表達量與 sorafenib 藥物敏感性之間的存在相關性，因此我們希望將來可以利用研究的成果應用在臨床上將 plectin 作為生物標記用來作為肝癌診斷及 sorafenib 的用藥依據。



## 五、參考文獻

- Almeida, F.V., Walko, G., McMillan, J.R., McGrath, J.A., Wiche, G., Barber, A.H., and Connelly, J.T. (2015). The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes. *Journal of cell science* 128, 4475-4486.
- Andra, K., Nikolic, B., Stocher, M., Drenckhahn, D., and Wiche, G. (1998). Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. *Genes & development* 12, 3442-3451.
- Bouvet, M., Tsuji, K., Yang, M., Jiang, P., Moossa, A.R., and Hoffman, R.M. (2006). In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases. *Cancer research* 66, 11293-11297.
- Bruix, J., Raoul, J.L., Sherman, M., Mazzaferro, V., Bolondi, L., Craxi, A., Galle, P.R., Santoro, A., Beaugrand, M., Sangiovanni, A., *et al.* (2012). Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *Journal of hepatology* 57, 821-829.
- Cheng, C.C., Lai, Y.C., Lai, Y.S., Hsu, Y.H., Chao, W.T., Sia, K.C., Tseng, Y.H., and Liu, Y.H. (2015). Transient knockdown-mediated deficiency in plectin alters hepatocellular motility in association with activated FAK and Rac1-GTPase. *Cancer cell international* 15, 29.

Cheng, C.C., Liu, Y.H., Ho, C.C., Chao, W.T., Pei, R.J., Hsu, Y.H., Yeh, K.T., Ho, L.C., Tsai, M.C., and Lai, Y.S. (2008). The influence of plectin deficiency on stability of cytokeratin18 in hepatocellular carcinoma. *Journal of molecular histology* 39, 209-216.

Choi, P.W., Yang, J., Ng, S.K., Feltmate, C., Muto, M.G., Hasselblatt, K., Lafferty-Whyte, K., JeBailey, L., MacConaill, L., Welch, W.R., *et al.* (2016). Loss of E-cadherin disrupts ovarian epithelial inclusion cyst formation and collective cell movement in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7, 4110-4121.

Fendrich, V., Maschuw, K., Rehm, J., Buchholz, M., Holler, J.P., Slater, E.P., Bartsch, D.K., and Waldmann, J. (2012). Sorafenib inhibits tumor growth and improves survival in a transgenic mouse model of pancreatic islet cell tumors. *ScientificWorldJournal* 2012, 529151.

Foisner, R., Leichtfried, F.E., Herrmann, H., Small, J.V., Lawson, D., and Wiche, G. (1988). Cytoskeleton-associated plectin: in situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. *The Journal of cell biology* 106, 723-733.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 445-457.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews Cancer* 3, 362-374.

Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M.M., and Friedl, P. (2015). Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol* 25, 556-566.

Hauck, C.R., Hsia, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2002). The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB life* 53, 115-119.

Heijstek, M.W., Kranenburg, O., and Borel Rinkes, I.H. (2005). Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 22, 16-25.

Hoppe, A.D., and Swanson, J.A. (2004). Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Molecular biology of the cell* 15, 3509-3519.

Iilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *Journal of cell science* 122, 3203-3208.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428.

Kazerounian, S., Uitto, J., and Aho, S. (2002). Unique role for the periplakin tail in intermediate filament association: specific binding to keratin 8 and vimentin. *Experimental dermatology* 11, 428-438.

Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J., and Parise, L.V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390, 632-636.

Kelley, R.K., and Venook, A.P. (2008). Sorafenib in hepatocellular carcinoma: separating the hype from the hope. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 5845-5848.

Kostan, J., Gregor, M., Walko, G., and Wiche, G. (2009). Plectin isoform-dependent regulation of keratin-integrin alpha6beta4 anchorage via Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *J Biol Chem* 284, 18525-18536.

Kostner, A.H., Sorensen, M., Olesen, R.K., Gronbaek, H., Lassen, U., and Ladekarl, M. (2013). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: a nationwide retrospective study of efficacy and tolerability. *ScientificWorldJournal* 2013, 931972.

Li, Z. (2004). Xenograft Models for Liver Metastasis: Relationship between Tumor Morphology and Adenovirus Vector Transduction. *Molecular Therapy* 9, 650-657.

Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., and Carter, C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer research* 66, 11851-11858.

Liu, Y.H., Pei, R.J., Yeh, C.C., Lee, K.Y., Yeh, K.T., Hsu, Y.H., Ho, C.C., and Lai, Y.S. (1997). The alteration of cytokeratin 18 molecule and its mRNA expression during tumor transformation in hepatoma. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 96, 243-253.

Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 56-68.

Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., and Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int J Cell Biol* 2012, 310616.

Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A., and Bokoch, G.M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell* 9, 1863-1871.

Scarpa, E., and Mayor, R. (2016). Collective cell migration in development. *The Journal of cell biology* 212, 143-155.

Sieg, D.J., Hauck, C.R., and Schlaepfer, D.D. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of cell science* 112 ( Pt 16), 2677-2691.

Song, J.G., Kostan, J., Drepper, F., Knapp, B., de Almeida Ribeiro, E., Jr., Konarev, P.V., Grishkovskaya, I., Wiche, G., Gregor, M., Svergun, D.I., *et al.* (2015). Structural insights into Ca<sup>2+</sup>-calmodulin regulation of Plectin 1a-integrin beta4 interaction in hemidesmosomes. *Structure* 23, 558-570.

Su, B., Pei, R.J., Yeh, K.T., Hsu, Y.H., and Lai, Y.S. (1994). Could the cytokeratin molecule be modulated during tumor transformation in hepatocellular carcinoma? *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 62, 155-159.

Vial, E., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer cell* 4, 67-79.

Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *Journal of cell science* 111 ( Pt 17), 2477-2486.

Wilhelm, S.M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J.M., and Lynch, M. (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular cancer therapeutics* 7, 3129-3140.

Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., *et al.* (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* 64, 7099-7109.

Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et biophysica acta* 1692, 103-119.

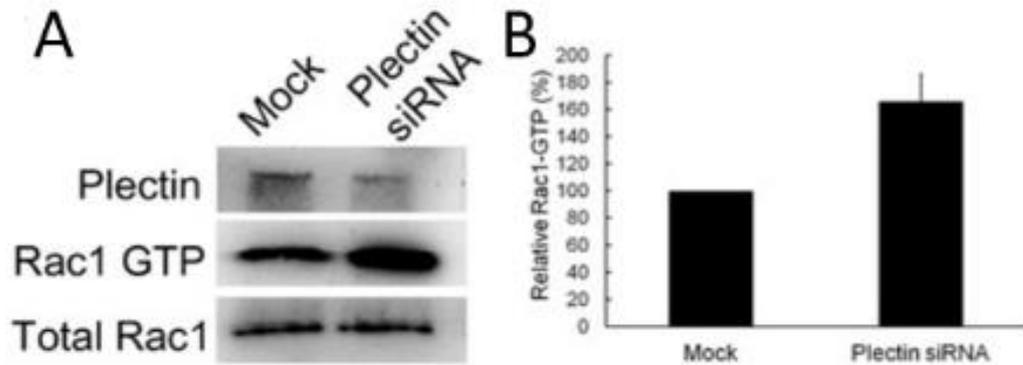
Yadav, A., Kumar, B., Teknos, T.N., and Kumar, P. (2011). Sorafenib enhances the antitumor effects of chemoradiation treatment by downregulating ERCC-1 and XRCC-1 DNA repair proteins. *Molecular cancer therapeutics* 10, 1241-1251.

Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta* *1773*, 642-652.

Yamaguchi, H., Wyckoff, J., and Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 559-564.

Yamaguchi, N., Mizutani, T., Kawabata, K., and Haga, H. (2015). Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin beta1 and PI3K. *Sci Rep* *5*, 7656.

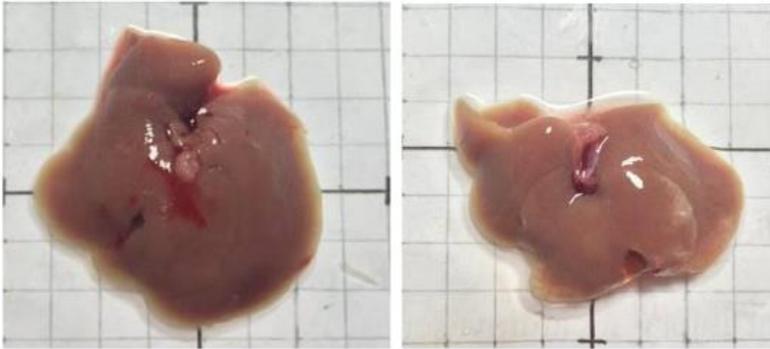
## 六、圖表



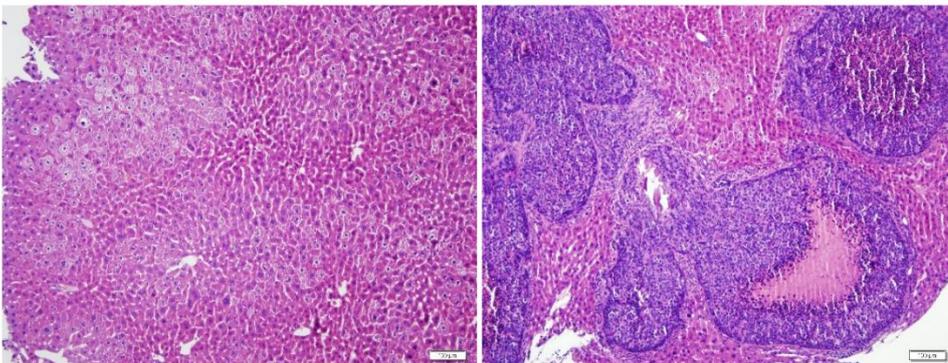
圖一、當 plectin 被降解後 Rac1 活性的變化

可以從(A)西方點墨法的圖中看到當 plectin 被降解後 Rac1-GTP 的蛋白質含量有明顯的增加，這顯示 Rac1 的活性因為 plectin 被降解而有受增強的情況。(B)而在量化圖中也可以看到相同的結果在利用 T-test 分析後顯示兩者有顯著差異(N=3,  $p < 0.05$ )。

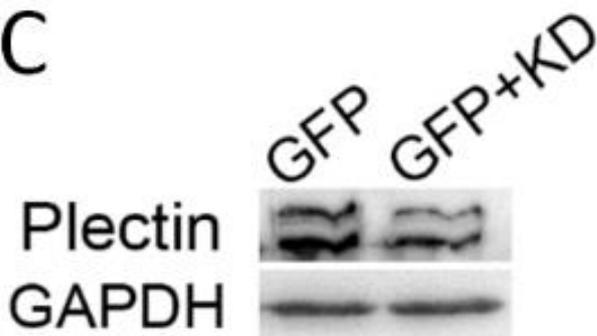
A



B



C

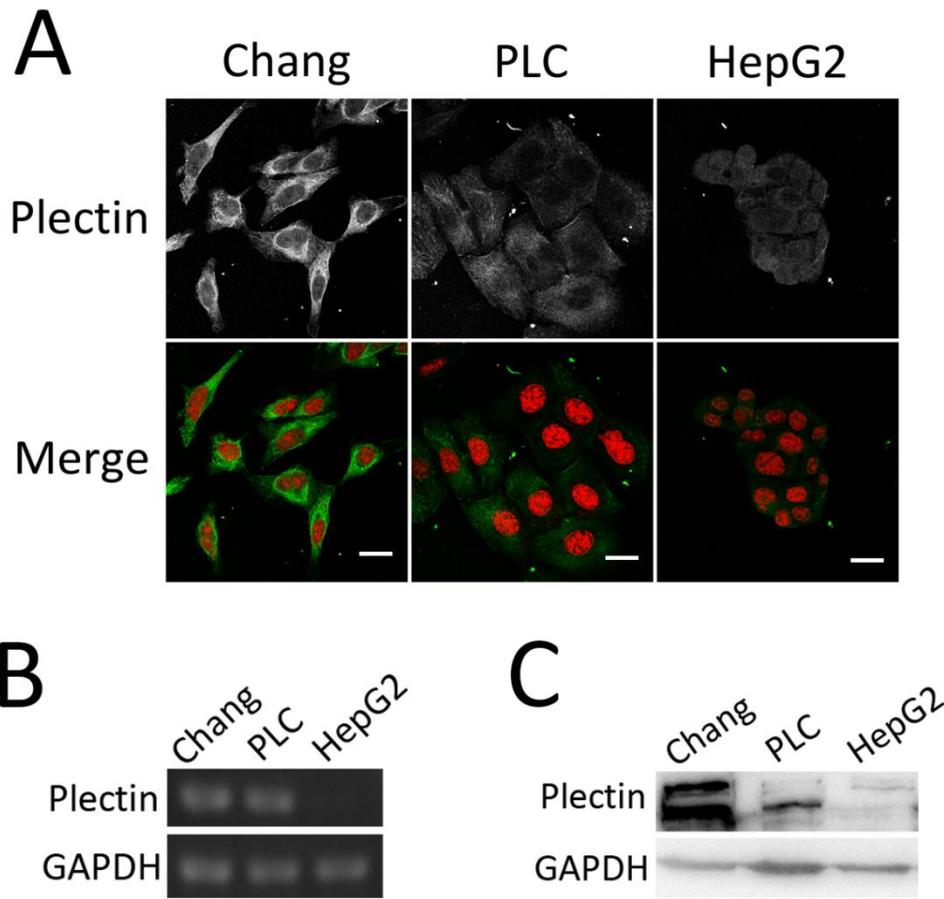


## 圖二、plectin 降解的細胞在活體中腫瘤的變化

將控制組及 plectin 降解的兩組 Chang cell 利用異體移植的方式經由肝門靜脈打入小鼠體內使細胞進入肝臟，經過 28 天後將小鼠犧牲取出其肝臟觀察腫瘤在肝臟的生長情形，圖中比例尺一小格為 $5 \times 5\text{mm}^2$ 。

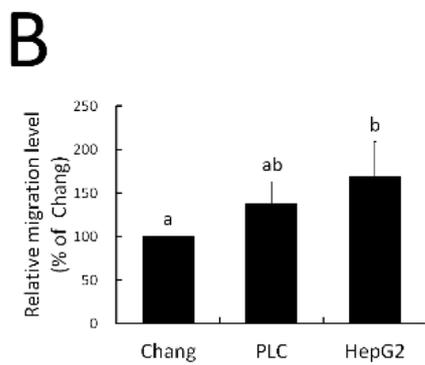
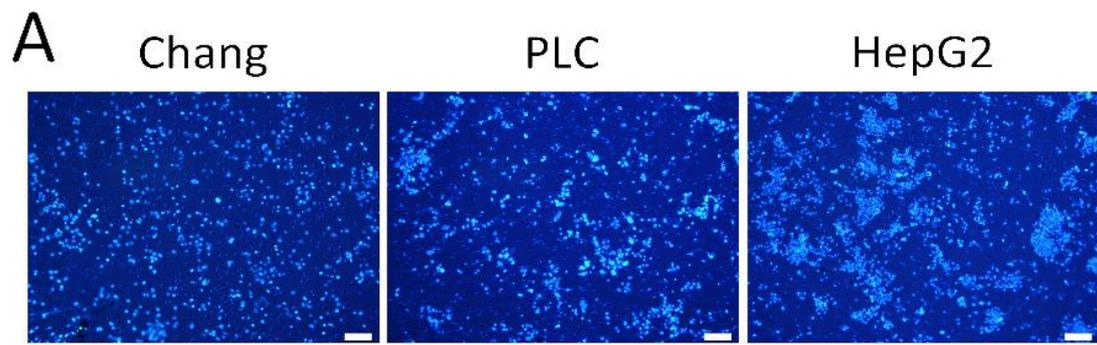
(A)在外觀上可以觀察到 plectin 降解組及控制組外觀皆無明顯腫瘤產

生(左圖為控制組，右圖為 plectin 降解組)。(B)我們將取出的小鼠肝臟進行組織染色，在 plectin 降解組中可以看到有明顯細胞增生的情形，控制組則無明顯細胞增生的情形(左圖為控制組，右圖為 plectin 降解組，右下角比例尺為 100 $\mu$ m)。(C)將控制組(只帶有 GFP 質體)及 plectin 降解組(同時帶有 plectin shRNA 及 GFP 質體)的穩定細胞株經由西方點墨法分析後可以發現 plectin 蛋白質被降解約 30%。



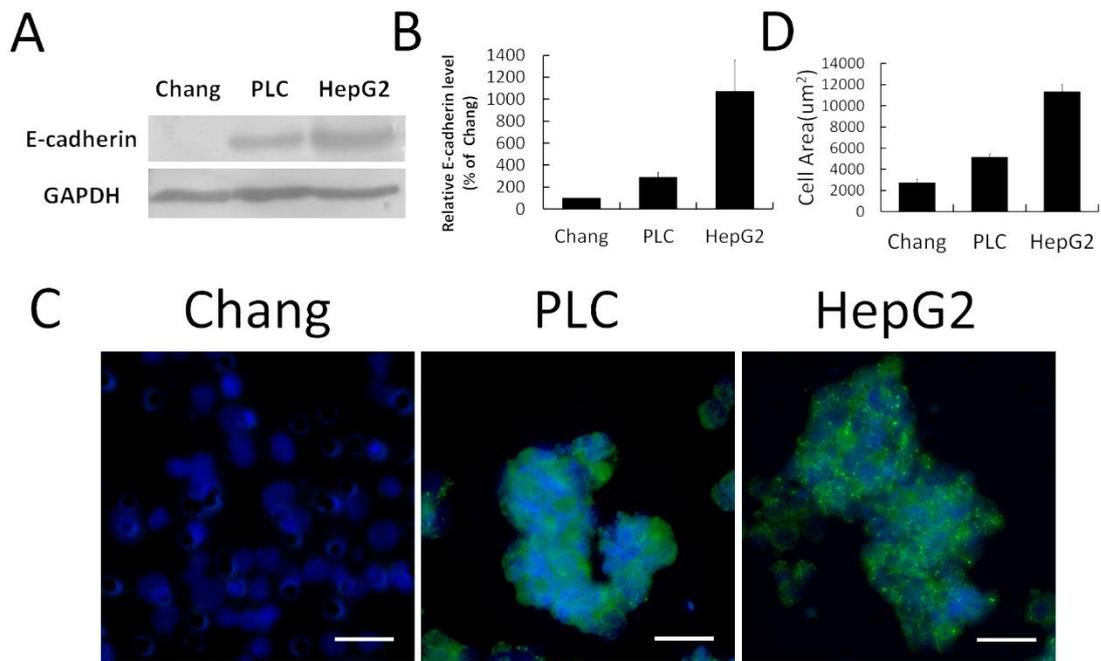
圖三、Chang、PLC、HepG2 三株細胞中 plectin 的表達量

(A)免疫螢光染色圖中 Chang、PLC、HepG2 分別染上綠色螢光的 plectin 以及紅色螢光的細胞核，我們可以明顯地觀察到在細胞中 plectin 的表達量是 Chang 多於 PLC 以及 HepG2 的，右下角比例尺為 20 $\mu$ m。(B、C)我們也可以從 RNA(N=2)及蛋白質(N=3)的表達中確認 plectin 在三株細胞中的表達量為 Chang 最多，其次是 PLC 而 HepG2 表達最少。



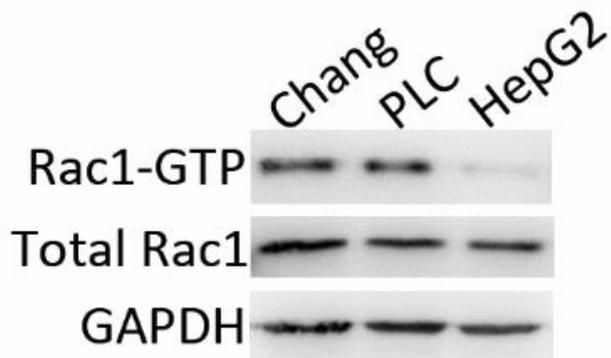
**圖四、Chang、PLC、HepG2 三株細胞的移行能力**

(A)經由 transwell 的染色及計數結果中我們得到細胞移行能力是 HepG2 最好，其次是 PLC 而 Chang 則最差，右下角比例尺為 100 $\mu$ m，(B)但在統計結果中沒有得到顯著差異(N=5)。



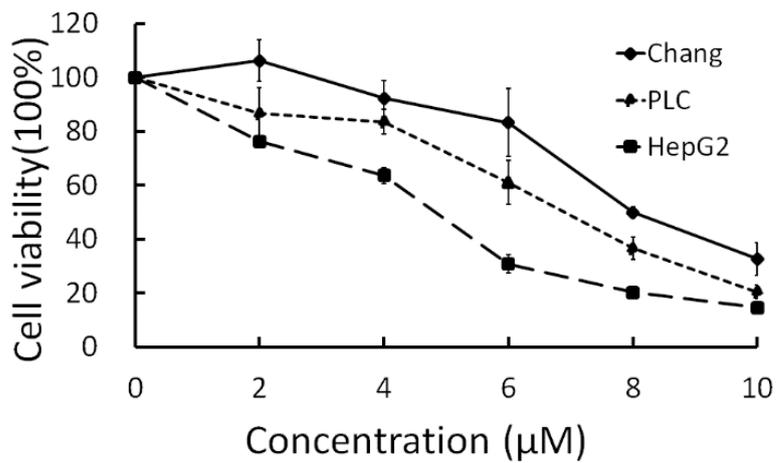
**圖五、Chang、PLC、HepG2 三株細胞中集體細胞移行的情形**

(A)將三株細胞透過西方點墨法分析後發現在 E-cadherin 的表達量上 Chang 表達最少，明顯低於 PLC 以及 HepG2，在(B)量化圖中也得到相同的結果而統計結果顯示有顯著差異(N=3， $p < 0.05$ )。(C)我們利用 transwell 使細胞移行 4 小時，接著將其細胞核(藍色)與 E-cadherin(綠色)進行染色並計算細胞聚集面積，右下角比例尺為 40μm。我們將有三顆以上並有 E-cadherin 連接的細胞定義為細胞聚落，經過加總統計後將數據量化，(D)量化結果顯示細胞聚集面積 Chang 最少，其次是 PLC，HepG2 最多，且三者間皆有顯著差異(N=2， $p < 0.05$ )。



**圖六、Chang、PLC、HepG2 三株細胞中 Rac1 活性的差異**

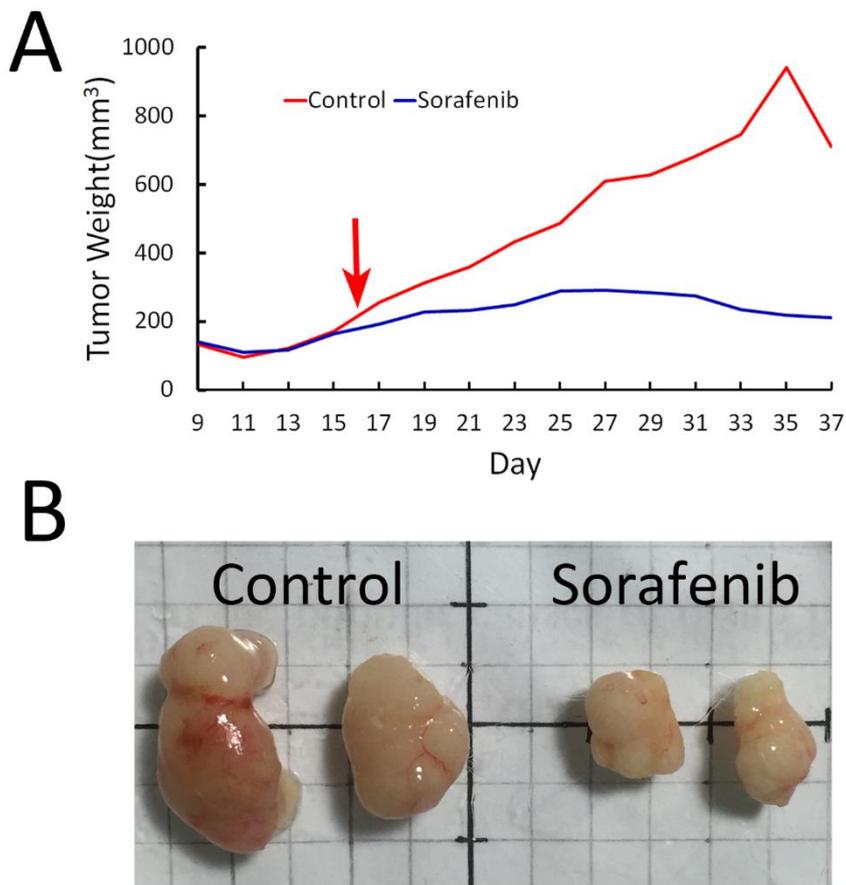
收取三株細胞的細胞裂解液定量後利用 PAK 蛋白質將 Rac1-GTP 分離出來後，進行西方點墨法分析，結果顯示三株細胞中 Total Rac1 的蛋白質表達量一致，而 Rac1-GTP 的表達則是 HepG2 明顯少於 Chang 以及 PLC(N=2)。



圖七、sorafenib 處理 72 小時後 Chang、PLC、HepG2 三株細胞之

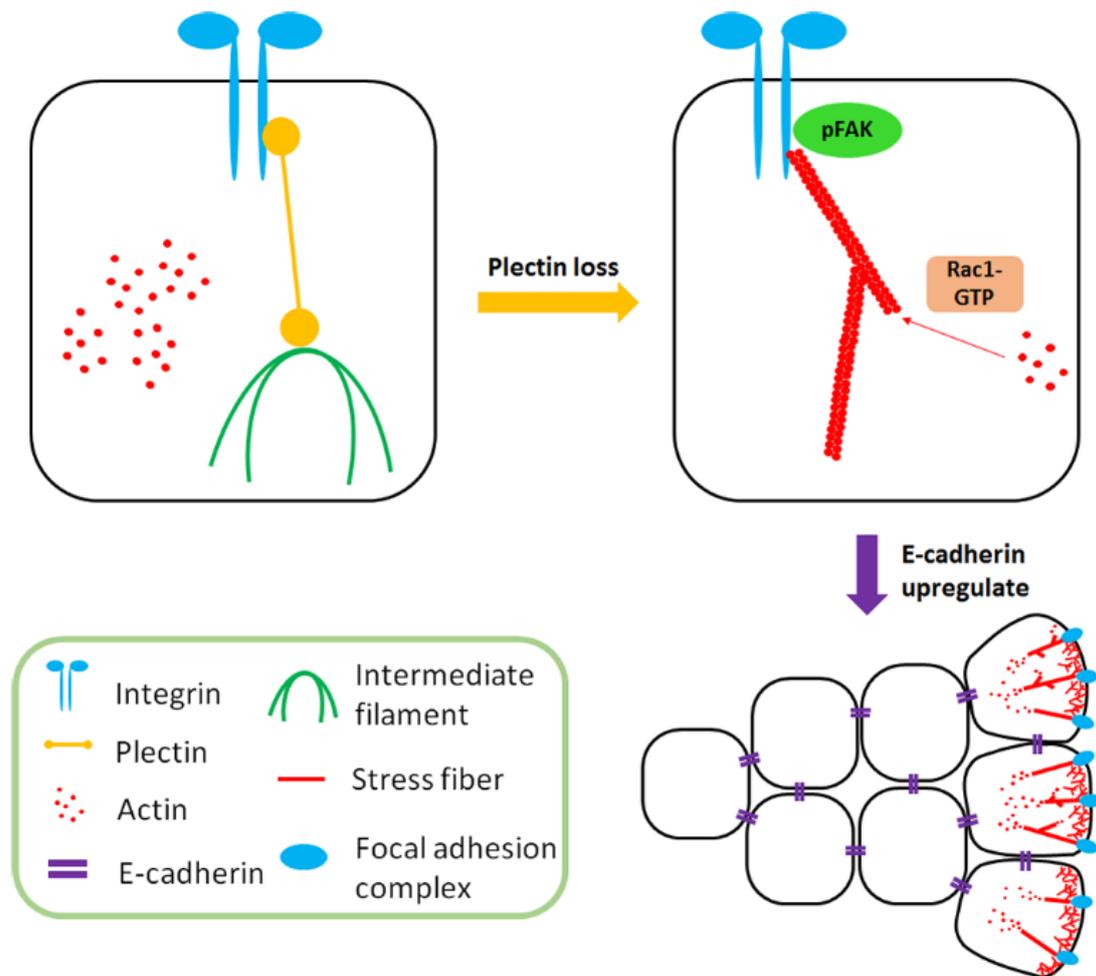
### 存活曲線

Chang、PLC、HepG2 三株細胞經 sorafenib 加藥處理 72 小時後利用 MTT assay 測定其細胞存活率，菱形曲線為 Chang、三角形曲線為 PLC、方形曲線為 HepG2，可以從折線圖中觀察到三株細胞對於 sorafenib 藥物的敏感性有 HepG2 大於 PLC 大於 Chang 的趨勢存在(N=4)。



圖八、在活體狀況下 sorafenib 的測試情形

將 Chang cell 利用皮下注射進入小鼠體內再分為控制組以及 sorafenib 藥物施打的組別，經藥物施打 21 天後將小鼠犧牲觀察期腫瘤生長情形。打入細胞後第 16 天(紅色箭頭處)腫瘤長至 150 mm<sup>3</sup> 時開始施打藥物連續 21 天，可以從腫瘤的生長曲線觀察到藥物有明顯抑制腫瘤的生長(圖八，A)。我們將腫瘤取出後比較兩組的腫瘤大小，左邊為控制組，右邊為 sorafenib 施打的組別(圖八，B)，可以明顯看到 sorafenib 可以有效地抑制腫瘤的增生，圖中比例尺一小格為 5 × 5mm<sup>2</sup>。



圖九、Plectin 缺失時分子調控機制示意圖

圖左為 plectin 正常表達的情況下，plectin 會抓住細胞膜上的 integrin 及細胞內的 intermediate filament，以維持細胞內部結構的穩固。圖右當 plectin 缺失時 Rac1 活性會增加，促使 actin filament 進行延長形成絲狀並與細胞膜上的 integrin 連接，而磷酸化 FAK 也會受到驅使移動到 integrin 下方形成 focal adhesion complex，使細胞的移動能力增加。此時，細胞間的 E-cadherin 如果呈現高表達的情況則會促進集體細胞移行的產生。