

臺北醫學大學醫學科學研究所醫學檢驗暨生物技術組碩士論文

Taipei Medical University
Graduate Institute of Medical Science for School of Medical
Laboratory Science and Biotechnology
Master Thesis

骨橋蛋白在子宮內膜異位中所扮演的角色

The role of osteopontin in endometriosis

研究生：李怡蓉(Yi-Rong Lee)

指導教授：高淑慧 博士(Shu - Hwei Kao, Ph.D.)

中華民國九十七年六月

June, 2008

致謝

時間真的過得好快，一轉眼我已經升上碩二接著也完成了論文，一切很像在作夢。當然，在這兩年的研究生活中，有苦有樂，我很感謝這一路上給予我生活及研究方面教導的高淑慧老師，謝謝老師給予我實驗方面的指導，才能讓我的碩士論文能順利誕生，另外還要感謝曾啟瑞院長、趙湘台主任、王鵬惠醫師及陳政潔老師能抽空給予論文的指正。

這兩年中要謝謝高家的學姐們、小朱學長及文瀚學長，還有我最喜歡的學妹們怡娟、安安、顛珊、明芳及學弟項詒，感謝你們在實驗中的幫助及提供了生活上不少的樂趣，使我在實驗中可以繼續勇往直衝。當然，少不了要謝謝我在高家的好伙伴宜珮，感謝她給予我實驗及生活上寶貴的意見，另外還感謝醫技組的所有同學們及學長姐們，淑娟學姐、梅真學姐、小花學姐、阿達、乃琦、家慧、百鴻，你們都是給予我生活及實驗上。

最後，要感謝我的爸媽、姐姐及男友，感謝你們的支持讓我這兩年無後顧之憂的讓我可以專心的完成論文，另外要特別感謝我的表哥表嫂，感謝他們讓我在台北能安心的生活及專心的完成學業。完成這本論文實在不容易，但是最後我還是做到了，這兩年我學習到獨立思考及解決問題，我也常告訴自己「做個認真的研究生就是每天要 100% 的努力，即使只得到 50% 的實驗結果也不能氣餒，繼續找出問題，讓自己更進步」與大家共勉之。

目錄

中文摘要	1
Abstract	3
研究動機與目標	5
第一章 文獻回顧	6
文獻回顧	7
子宮內膜異位 (endometriosis)	7
一、子宮內膜異位 (endometriosis)	7
二、子宮內膜異位形成的機轉	8
三、治療方式	9
四、子宮內膜異位與荷爾蒙關係	10
五、目前與子宮內膜異位相關研究	11
骨橋蛋白 (Osteopontin)	12
一、骨橋蛋白 (Osteopontin)	12
三、骨橋蛋白的功能	14
四、骨橋蛋白訊息的調控 (Mediator of OPN signaling)	15
五、骨橋蛋白在腫瘤細胞中所扮演的角色	16
六、骨橋蛋白在生殖醫學中所扮演的角色	17
六、骨橋蛋白分泌作用機轉	19
基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloprotenase, MMP)	19
第二章實驗材料與方法	21
藥品試劑	22
實驗方法	25
一、檢體收集 (Tissue collection)	25
二、HEC-1A 細胞培養	25
三、藥物的配製	26
四、MTS assay	26
五、Scratch wound assay	27
六、Matrigel [®] invasion assay	27
七、組織蛋白質製備 (Preparation of tissue lysate)	28
八、細胞蛋白質製備 (Preparation of cell lysate)	28
九、培養液蛋白質製備 (Preparation of conditional medium)	29

十、蛋白質定量	29
十一、西方墨點法	30
十二、分析細胞內相關基因的表現	32
十三、Gelatin zymography	33
十四、Small interference RNA	35
十五、雷射共軛焦顯微鏡	35
十六、放射免疫測定法(Radioimmunoassay)	36
十七、統計分析	37
第三章 實驗結果與分析	38
一、子宮內膜組織中 OPN 含量	39
二、在子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡液、巧克力囊腫體液及精漿中 OPN 含量。	39
三、OPN 對子宮內膜細胞移行能力 (migration) 的影響	40
四、OPN 對子宮內膜細入侵能力 (invasion) 的影響	40
五、OPN 對 cell proliferation 的影響	41
六、雌激素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。	41
六、黃體素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。	42
七、雌激素及黃體素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。	42
八、雌激素及黃體素對子宮內膜細胞移行能力的影響。	43
九、在子宮內膜異位患者濾泡液中 E ₂ 和 P ₄ 濃度。	43
十、OPN siRNA 對細胞移行的影響。	44
十一、Secreted OPN 的測定。	44
十二、共軛焦顯微鏡觀察細胞內 actin 分佈的情形。	45
十三、OPN 經由 PI-3k 訊息路徑調控細胞移行能力。	45
十四、OPN 不經由 NF-κB 訊息路徑調控細胞移行能力。	46
十五、OPN 會促進子宮內膜細胞產生 MMP-2 和 MMP-9 活性增加。	46
第四章 討論	48
第五章 參考文獻	58
第六章 圖表	67

表目錄

Table 1. 本研究中所使用的引子 DNA oligonucleotides 序列。.....	68
Table 2. 本研究所使用 siRNA OPN single stranded RNA oligonucleotide。.....	69



圖目錄

Figure 1. SIBLING family 基因的染色體位置與人類骨橋蛋白的基因結構。	70
Figure 2. 骨橋蛋白 functional domain。	71
Figure 3. 骨橋蛋白於細胞中有不同的訊息傳遞路徑。	72
Figure 4. 子宮內膜組織中 OPN 的含量。	73
Figure 5. 在子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡液及巧克力囊腫濾泡液中 OPN 定量。	74
Figure 6. OPN 對子宮內膜細胞移行能力 (migration) 的影響。	75
Figure 7. OPN 對子宮內膜細胞入侵能力 (invasion) 的影響。	76
Figure 8. OPN 對 cell proliferation 的影響。	77
Figure 9. 雌激素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。	78
Figure 10. 黃體素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。	79
Figure 11. 雌激素及黃體素對內膜細胞 OPN 表達的影響。	80
Figure 12. 雌激素與黃體素對子宮內膜細胞移行能力的影響。	81
Figure 13. 不同濃度的雌激素與黃體素對子宮內膜細胞移行能力的影響。	82
Figure 14. 在子宮內膜異位患者與正常人濾泡液中 E ₂ 和 P ₄ 含量比例。	83
Figure 15. OPN siRNA 對細胞移行的影響。	84
Figure 16. conditioned medium 中 Secreted OPN。	85
Figure 17. OPN 對 HEC-1A 細胞中 actin 分佈的影響。	86
Figure 18. Wortmannin (PI-3k inhibitor) 對由 OPN 引發子宮內膜細胞移行能力 (migration) 的影響。	87
Figure 19. Wortmannin (PI-3k inhibitor) 對由 OPN 引發子宮內膜細胞於 NF-κB 訊息傳遞路徑的影響。	88
Figure 20. OPN 會促進子宮內膜細胞產生 MMP-2 和 MMP-9 活性增加。	89
Figure 21. OPN 於子宮內膜異位中所扮演的角色。	90

Abbreviations

APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	1,4-Dithiothreitol
E2	Estradiol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EtBr	Ethidium bromide
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	Horse radish peroxidase
LE	luminal epithelium
mRNA	messenger RNA
MMP	Matrix metalloproteinase
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB
NIK	nuclear factor inducing kinase
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene difluoride membrane
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
P4	Progesterone
siRNA	Small interference RNA
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylenediamine
uPA	urokinase plasminogen activator

中文摘要

子宮內膜異位是一種婦產科常見的疾病，而造成此疾病的發病過程及機轉並不清楚。近年來有研究指出在大鼠的子宮內膜異位的模式中，發現骨橋蛋白(osteopontin, OPN)在子宮組織內會大量表現。本論文主旨在探討 OPN 在子宮內膜異位的形成中所扮演的角色。首先，我們利用西方墨點法發現子宮內膜異位病患的子宮內膜組織、腹膜液、濾泡液和巧克力囊腫體液中 OPN 會大量表現。此外，我們並以子宮內膜 HEC-1A 細胞為細胞模式，觀察 OPN 對子宮內膜細胞的移行、入侵和增生能力的影響。接著我們以不同劑量的 OPN 去處理細胞，細胞產生移行及入侵，但不具有增生能力。由 OPN 引發的細胞移行及入侵可被 $\alpha_v\beta_3$ integrin inhibitor 所減緩。另一方面，我們發現 β -estradiol 和 progesterone 會增加細胞內 OPN 表現及分泌型的 OPN 釋出，也會誘導細胞產生移行，但當 β -estradiol 和 progesterone 共同作用時，OPN 表現及細胞移行現象則降低。接著，我們將細胞中內生性的 OPN knockdown 後，可減緩 β -estradiol 所誘導細胞移行的現象及 OPN 的分泌。接下來我們更進一步探討 OPN 於細胞內的訊息傳遞路徑，當細胞經由 $1\mu\text{M}$ Wortmanin (PI-3k inhibitor) 前處理後，OPN 仍可引發細胞移行且 NF- κ B 蛋白質表現增加，但是在 $10\mu\text{M}$ Wortmanin (PI-3k inhibitor) 前處理下，移行現象則被抑制。最後我們

從 zymography assay 中發現 OPN 會促進細胞表現 MMP-2、MMP-9。

由上述的結果，我們推測 OPN 可被 β -estradiol 刺激而表現及分泌釋出，可再經由 autocrine 或 paracrine 的機制，與細胞上 $\alpha\beta 3$ integrin 結合而促使細胞移行及侵入，其中訊息傳遞路徑可能是經由 PI-3K 路徑活化 MMP2/9 及產生 actin 重組 (remodeling)。

關鍵字：子宮內膜異位、骨橋蛋白、雌激素。

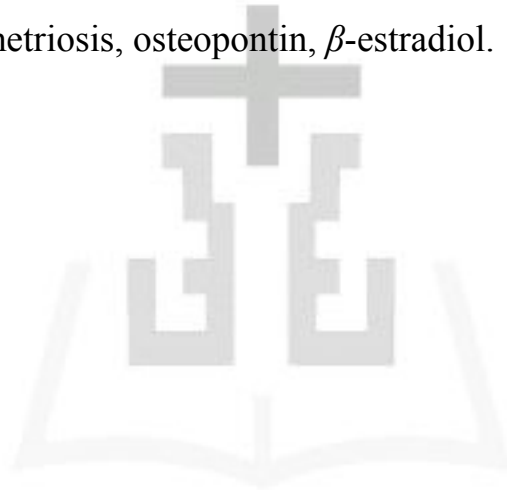


Abstract

Endometriosis is a common gynecological disease. The pathology and etiology of endometriosis is still unclear. Recently, enhanced osteopontin (OPN) expression was found in the endometriotic tissue of rat model. We propose that OPN could promote the endometriotic cell migration and invasion. The differential proportion of OPN was detected in the endometrium from the patients with endometrial hyperplasia, myoma, endometriosis or adenomyosis. A significant increase of OPN was found in the eutopic endometrium in the women with adenomyosis. In this study, HEC-1A cell was used as the *in vitro* endometriotic cell model to illustrate the effects of OPN on cell migration, invasion and proliferation. A dose-response and time-dependent increase of cell migration and cell invasion was demonstrated. But there was no difference in cell proliferation followed the OPN treatment. Nevertheless, the OPN induced cell migration and invasion was attenuated or inhibited by $\alpha_v\beta_3$ integrin inhibitor (anti- $\alpha_v\beta_3$ antibody). On the other hand, we also found β -estradiol or progesterone was found to augment OPN expression and secretion, and induced cell migration. β -estradiol-induced cell migration was attenuated followed the silence the OPN expression by OPN

siRNA. In immunofluorescent staining, we observed actin remodeling in the-OPN treated cells. We also found a dose response activation of MMP-2 and MMP-9 followed OPN treatment. Finally, we found cell migration was attenuated by Wortmannin (PI-3k inhibitor). We suggested OPN-induced cell migration and invasion was mediated by the OPN- $\alpha_v\beta_3$ interaction. The molecular signal pathway of OPN/ $\alpha_v\beta_3$ -mediated MMP activation and actin remodeling through PI-3K.

Keywords : endometriosis, osteopontin, β -estradiol.



研究動機與目標

在婦產科疾病中，子宮內膜異位症為生殖年齡婦女常見的疾病，然而造成子宮內膜異位的原因機轉並不清楚，目前文獻指出子宮內膜細胞和碎片會經由逆流的經血，而移行到子宮以外的地方生長(Zhang *et al.*, 2006)。目前子宮內膜異位的治療方式有兩種，分別是給予荷爾蒙藥物治療及手術治療，但仍有復發的情況發生(Farquhar, 2002)，因此研究內膜異位形成的致病因子顯得格外重要。在2002年已經有研究指出子宮內膜異位是一種雌激素依賴型的疾病（estrogen-dependent disease）(Kitawaki *et al.*, 2002)。近年來研究以大鼠子宮內膜異位模式，將子宮內膜異位組織移植到大鼠體內，經由免疫染色發現OPN會大量表現於子宮內膜組織(Odagiri *et al.*, 2007)。目前，也有文獻指出OPN在不同腫瘤細胞及著床和胎盤生成中，有不同的角色與功能(Johnson *et al.*, 2003a)。所以OPN在子宮內膜異位中，可能扮演一個很重要的角色。

本研究主要以子宮內膜HEC-1A細胞為細胞模式來探討OPN在子宮內膜異位中所扮演的角色與功能及是否會經由雌激素、黃體素的刺激，而增加OPN的表現，進而促進子宮內膜細胞的移行、入侵和增生的現象。我們更進一步的探討OPN於子宮內膜細胞中的訊息傳遞路徑所引發一系列相關功能。



第一章 文獻回顧

文獻回顧

子宮內膜異位 (endometriosis)

一、子宮內膜異位 (endometriosis)

子宮內膜異位 (endometriosis) 是常見的婦產科疾病，故名思義，也就是子宮內膜組織、子宮內膜腺上皮細胞 (glandular epithelial cells)、及基質細胞 (stroma cells) 跑到子宮肌肉層 (myometrium) 子宮以外的位置，例如：卵巢 (俗稱巧克力囊腫)、腹膜腔、骨盆腔等部位 (Farquhar, 2002; Matarese *et al.*, 2003)。在病理組織學上，子宮內膜異位具有類似腫瘤 (tumor-like) 的特性，可生長、滲入和貼附到子宮周圍附近的組織 (Kitawaki *et al.*, 2002)。另外，子宮內膜異位被認定是一種慢性發炎疾病，主要的症狀有下列幾種：經痛 (dysmenorrhoea)、性交疼痛 (painful intercourse)、慢性骨盆腔疼痛 (chronic pelvic pain) 及不孕症 (infertility) (Farquhar, 2002; Matarese *et al.*, 2003; Poliness *et al.*, 2004)。目前已有文獻指出有30-50%的不孕症患者中患有子宮內膜異位，被推測可能是因為其所造成的骨盆腔內輸卵管的沾粘所影響 (Bhatt *et al.*, 2006; Carter, 1994; Hughes *et al.*, 2007)。

在子宮內膜異位中，除了子宮內膜組織 (glandular epithelial、stroma cells) 跑到子宮以外的體腔，異位細胞生長在在子宮肌層內

則稱為子宮肌腺症 (Adenomyosis) (Dueholm and Lundorf, 2007)，大部份的子宮肌腺症病患也常伴隨著子宮內膜異位，受孕也比較不容易。此外，另一種由子宮平滑肌細胞增生而成的良性腫瘤，稱為子宮肌瘤 (Myoma)。肌瘤可發生於身體中任何含平滑肌的地方，但在骨盆腔卻最常發生於子宮(Yoon *et al.*, 2007)。子宮肌瘤在婦產科中為最常見的腫瘤，也是最常見的良性腫瘤。依照目前美國生殖醫學會(American Society for Reproductive Medicine, ASRM)，將子宮內膜異位分為輕微、輕度、中度、重度(Panda *et al.*, 1997)。

二、子宮內膜異位形成的機轉

造成子宮內膜異位的原因機轉並不清楚，目前有兩種假說，第一種假說主要是子宮內膜組織細胞不正常的移行至子宮腔以外的地方生長，包括卵巢、輸卵管及腹腔。此假說以1927年Sampson學說為主，他認為子宮內膜細胞和碎片會經由逆流的經血，進而於子宮以外的地方生長，例如：腹膜腔 (peritoneal cavity)，異位的子宮內膜細胞會貼附在腹腔壁，增生後形成子宮內膜異位(Koninckx *et al.*, 1999; Matarese *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006)。並且子宮內膜細胞和碎片經由逆流的經血進而貼附 (adhesion) 及入侵 (invasion) 於異位組織中，

是透過活化細胞外間質的蛋白溶解 (extracellular proteolysis)，所以 MMPs 在子宮內膜中也扮演一個重要的角色 (Braundmeier *et al.*, 2006; Nothnick, 2001; Shaco-Levy *et al.*, 2008)。第二種假說是與化生 (metaplasia) 有關，有子宮內膜異位的患者，因為對性荷爾蒙有依賴性，而導致腹膜細胞轉變成 Müllerian-type epithelium (Koninckx *et al.*, 1999)，在 2001 及 2003 年也有學者提出子宮內膜異位和自體免疫或是自然的免疫失能有關，可能是子宮內膜細胞跑到腹膜腔後，產生發炎反應，經由樹突細胞 (dendritic cells, DCs) 呈現自體抗原進而誘發自體抗體 (autoantibodies) 的產生，而自然殺手細胞 (nature killer cells, NK cells) 也會降低毒殺異位的子宮內膜細胞的能力 (Matarese *et al.*, 2003)，最後形成了自體免疫 (Matarese *et al.*, 2003; Nothnick, 2001)。

三、治療方式

近年已經有研究指出子宮內膜異位是一種雌激素依賴型的疾病 (Kitawaki *et al.*, 2002; Olive *et al.*, 2004)，因為子宮內膜有雌激素接受器 (estrogen receptor) 和黃體素接受器 (progesterone receptor)，所以這兩種荷爾蒙可以直接作用在子宮內膜及子宮內膜組織 (Fujishita *et al.*, 1997)。另外，子宮內膜異位的治療方式還有給予非類固醇抗發炎藥物、口服避孕藥黃體素拮抗劑 Mifepristone、Danazol、GnRH

agonist (gonadotropin-releasing hormone agonist) 及手術治療，但還是會有復發的情況發生(Farquhar, 2002; Ferrero *et al.*, 2005; Jackson and Telner, 2006; Olive *et al.*, 2004)。當停經後的婦女服用雌激素替代性治療時，易使子宮內膜異位復發(Goh and Hall, 1992)。

四、子宮內膜異位與荷爾蒙關係

在女性的月經週期中，主要由雌激素 (estrogen) 和黃體素 (progesterone) 來調控子宮內膜的成長。在生理週期中有兩個時期，首先為增生期 (proliferative phase)，雌激素會大量增加來刺激濾泡 (follicle) 生長，接著分泌期 (secretory phase) 會促進黃體素大量增加，進行排卵 (ovulation) (Groothuis *et al.*, 2007; Horne and Blithe, 2007)。早期已經有文獻指出子宮內膜有雌激素接受器 (estrogen receptor) 和黃體素接受器 (progesterone receptor)，所以這兩種荷爾蒙可以直接作用在子宮內膜及子宮內膜組織(Fujishita *et al.*, 1997)。有學者利用免疫組織化學法發現，在子宮內膜異位病人的子宮內膜發現雌激素接受器 (estrogen receptor) 會表現增加(Jones *et al.*, 1995)，而另外黃體素接受器 (progesterone receptor) 會表現降低(Attia *et al.*, 2000)。近年已經有研究指出子宮內膜異位是一種雌激素依賴型的疾病(Kitawaki *et al.*, 2002; Olive *et al.*, 2004)，在2006年有文獻提出利用

*in vitro*細胞實驗中，子宮內膜異位具有黃體素抵抗性（progesterone resistant）的現象，是因為黃體素接受器表現減少，黃體素無法作用，導致雌激素也無法正常代謝(Bulun *et al.*, 2006)。

五、目前與子宮內膜異位相關研究

於1986年時，已經有學者利用蛋白質體學的技術，針對子宮內膜異位病人的血清及腹膜液來做比較，但無明顯的差異(Joshi *et al.*, 1986)。近年來已有研究從子宮內膜異位病人的組織、腹膜液，利用二維電泳、ProteinChip array技術去尋找一些有特異性的蛋白質(Kyama *et al.*, 2006; Poliness *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006)。在2004年已有文獻指出，在子宮內膜異位病患的血清中，發現了一些有意義目標分子（target molecules），例如：生長因子（growth factor）、細胞激素（cytokines）、荷爾蒙（hormone）、蛋白溶解性酵素（proteolytic enzyme）、自體抗體等，但目前並無確定的特異性蛋白可做為子宮內膜異位指標(Yang *et al.*, 2004)。在2007年，已經有學者以大鼠子宮內膜異位模式，將子宮內膜異位老鼠與正常老鼠的子宮組織，使用cDNA microarray的方式，發現Osteopontin、Lyn、Vav1、Runx1和L-selectin在子宮內膜異位的病理過程中扮演一個重要的角色(Konno *et al.*, 2007)。另外，2007年Ryo Konno等人以大鼠子宮內膜異位模式，使用

轉錄體學 (Transcriptomics) 技術，找出74個上游基因表現，其中他們找到兩個分子為osteopontin(OPN)和L-selectin (SELL) 與細胞貼附及發炎有關，推測和子宮內膜異位有關，他們經由動物實驗，將人類子宮內膜組織移植到大鼠內，經由免疫染色發現osteopontin會大量表現於子宮內膜異位組織(Odagiri *et al.*, 2007)。

骨橋蛋白 (Osteopontin)

一、骨橋蛋白 (Osteopontin)

骨橋蛋白 (Osteopontin, 簡稱OPN) 在1979年Senger發現OPN是一種會經由惡性轉移的上皮細胞所分泌的磷酸蛋白(Senger *et al.*, 1979)。早期曾經被命名為secreted phosphoprotein 1 (SPP1)，或是early T-lymphocyte activation gene 1 (Eta-1)。在1987年OPN被發現在骨頭中是一個重要的黏液蛋白 (sialoprotein)，OPN在骨細胞 (osteoclasts) 中會有連結到細胞外基質 (cell extracellular matrix) 的功能，所以OPN的命名方式，是以osteo為骨頭 (bone) 的意思，pontin為橋樑 (bridge) 的意思(Oldberg *et al.*, 1986; Sodek *et al.*, 2000; Weber, 2001)。目前OPN被發現存在於腎臟、腦、巨噬細胞、血管平滑肌肉細胞、許多上皮內細胞、也存在於血液、乳汁、尿液和精液(Prince *et al.*, 1987; Rangaswami *et al.*, 2006; Weber, 2001)。在一些癌症病患及自體性免疫疾病的病患血清中，OPN濃度會具有指標性的增加，所以

OPN也會表現於病理生理的反應中(Singhal *et al.*, 1997)。

二、基因結構

OPN 屬於 SIBLING (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) 基因家族，成員包括bone sialoprotein (BSP)、dentin sialoprotein (DSPP) 和 matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) (Fedarko *et al.*, 2004)。OPN基因位於人類的第四號染色體的q21-q25的位置，包含7個 exons，全長11.1kb，其中6個 exons encoded，全長為954 bp (Sodek *et al.*, 2000) (Figure 1)，另外，其他物種如老鼠、兔子、牛和豬的OPN基因序列也已經被證明了(El-Tanani *et al.*, 2006)。OPN是一個單體(monomer)從氨基酸264到301的長度，通常會經由轉譯後的修飾，包括磷酸化、醣化及酵素的切割 (Figure 2A)，分子量大約在25到75 kDa之間(Johnson *et al.*, 2003a)。OPN是一種含有 arginine-glycine-aspartate (GRGDS 或 RGD)的磷酸化醣蛋白，也是一種細胞外基質(extracellular matrix, ECM)，經由thrombin切割後，可釋放出兩個與integrin結合的部位，分別為RGD序列及RSK序列，RGD序列主要和integrin($\alpha\beta 3$)結合，而靠近C端序列可與CD44 glycoprotein結合(Rangaswami *et al.*, 2006; Sodek *et al.*, 2000; Wai and Kuo, 2008) (Figure 2B)。而調控OPN表現的區域稱為啟動區(promoter)，此區域有三個重要的位置，TATA box (核苷酸-27到

-19)、inverted CCAAT box (核苷酸-52到-46) 及GC box (核苷酸-100到-93) (Wai and Kuo, 2004)。目前已發現有許多因子可以來調控OPN的表現，例如：荷爾蒙 (vitamin D3、estrogen、progesterone)、細胞激素 (interlukin 1 α 和 β 、tumor necrosis factor α)、生長因子 (tumor growth factor β -1、fibroblast growth factor) 和一些化學物質(Johnson *et al.*, 2003a; Rodrigues *et al.*, 2007; Sodek *et al.*, 2000; Wai and Kuo, 2008)，可以啟動OPN promoter，使OPN基因大量表現。

三、骨橋蛋白的功能

在生理及病理中，骨橋蛋白的功能主要有癌症形成 (oncogenesis)、腫瘤復發 (cancer progression) (Teramoto *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2000)、骨頭重建 (bone remodeling) (Shapses *et al.*, 2003)、血管新生 (angiogenesis) (Wu *et al.*, 2000)、抑制細胞凋亡(Xie *et al.*, 2003; Zohar *et al.*, 2004)。目前已有文獻指出OPN在不同腫瘤細胞中，扮演不同的角色，主要有四種功能：

- (1) 細胞貼附 (cell attachment) (Sodek *et al.*, 2000)
- (2) 細胞轉移 (cell migration) (Al-Shami *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2007; Tuck *et al.*, 2003)
- (3) 細胞增生 (cell proliferation) (Angelucci *et al.*, 2004)
- (4) 細胞侵入 (cell invasion) (Chakraborty *et al.*, 2008; Panda *et al.*,

1997; Takafuji *et al.*, 2007; Wai and Kuo, 2004)。

四、骨橋蛋白訊息的調控 (Mediator of OPN signaling)

在許多細胞類型中，如平滑肌細胞、人類前列腺癌細胞、乳癌細胞，OPN會引起細胞貼附 (attachment)、移行 (migration)、增生 (proliferation) 及細胞外基質侵入 (invasion) 的作用，主要是經由與 $\alpha\beta 3$ 結合或與CD44結合(Philip *et al.*, 2001; Rangaswami *et al.*, 2006; Sodek *et al.*, 2000)。在乳癌細胞中，OPN可透過 $\alpha\beta 3$ integrin的結合促進轉移、移行，另外，也會調控上皮細胞移行，造成血管新生 (angiogenesis) (Bayless *et al.*, 2000)。在許多腫瘤細胞中主要是以CD44與OPN結合，進而調控侵入性生長和惡性轉移(Figure 3)(Celetti *et al.*, 2005)。之前已有文獻報導，當細胞的extracellular matrix remodeling 與 degradation 時，會促進細胞 invasion 及 tumor progression，而這過程主要是有ECM degrading enzyme的參與，包括：基質金屬蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)、ADAM-related membrane protease、tissue serine protease 等，近年來已有文獻指出，在不同細胞中，OPN會誘導MMP活性，進而促進細胞移行及入侵(Fedarko *et al.*, 2004; Philip *et al.*, 2001; Wai *et al.*, 2005)。當OPN與這兩種integrin結合後主要可調控細胞與基質間的連結及細胞的訊息傳

遞(Wai and Kuo, 2004)。

五、骨橋蛋白在腫瘤細胞中所扮演的角色

OPN也會過度表現在許多人類腫瘤中，例如：腸、乳房、肝臟、前列腺、胃、卵巢和肺癌(Celetti *et al.*, 2005; Wai and Kuo, 2004)。而在子宮內膜癌病患中，子宮內膜組織也會大量表現出OPN (Briese *et al.*, 2006)。在2008年，已有文獻証實癌症病患例如：乳癌、胃癌、肝癌、胰臟癌等患者的血漿中，OPN會大量的表現(Wai and Kuo, 2008)。在不同腫瘤細胞中，OPN可能經由 $\alpha\beta3$ integrin或CD44結合後調控不同的訊息傳遞路徑，產生不同的影響 (Figure 3)。在乳癌細胞，OPN會與細胞上的 $\alpha\beta3$ integrin結合，進而經由PI-3-kinase dependant Akt phosphorylation活化MMP路徑，促進細胞移行及轉移(Das *et al.*, 2003; Philip *et al.*, 2001)。此外，OPN也可以藉由nuclear factor inducing kinase (NIK) dependent NF- κ B 調控MMP及urokinase plasminogen activator (uPA) 的活性(Chakraborty *et al.*, 2008; Rangaswami *et al.*, 2004)。另外，在人類前列腺癌細胞，OPN與 $\alpha\beta3$ integrin結合後經由Rho GTPase 訊息傳遞，使細胞內的細胞骨架產生actin remodeling，活化MMP-9後促進細胞移行(Desai *et al.*, 2007)。但目前OPN在子宮內膜細胞中相關的訊息傳遞路徑尚未被研究釐清。

目前已經有許多文獻，使用RNA interference方法(Mocellin *et al.*, 2006)，製作一段雙股OPN RNA，使OPN 訊息RNA (messenger RNA, mRNA) 無法表現，即為OPN knockdown，在不同的腫瘤細胞（例如：乳癌細胞、老鼠的結腸腺癌細胞和人類頭頸癌細胞）中，OPN knockdown 被證實可減少腫瘤細胞的侵入、增生及抑制腫瘤形成 (Celetti *et al.*, 2005; Shevde *et al.*, 2006; Wai *et al.*, 2005)。

六、骨橋蛋白在生殖醫學中所扮演的角色

研究指出，在人類子宮內膜中會大量表現 $\alpha\beta 3$ integrin，另外在滋養層 (trophoblast) 和著床前胚胎的上皮表面都會表現OPN及 $\alpha\beta 3$ integrin，所以與胚胎貼附至子宮內膜的上皮細胞的過程中扮演很重要的角色(Apparao *et al.*, 2001)。近年來，有許多文獻推測在懷孕的過程中，OPN是一個很重要的蛋白質，因為OPN會明顯增加於豬、羊、兔、老鼠及人類的子宮(Apparao *et al.*, 2003; Garlow *et al.*, 2002; Girotti and Zingg, 2003)。OPN可被子宮內膜腺體(endometrium glands)分泌，分泌出來的OPN會經由酵素切割產生具生物活性的45 kD片段 (Johnson *et al.*, 2003b)，可與胎盤的滋養外胚層(trophectoderm)結合，所以在著床及胎盤生成中扮演一個重要的角色。他們認為OPN對子宮周圍環境有影響，因為(1) OPN是胎兒組織營養物 (histroph) 化合

物之一，在子宮與胎盤的周圍扮演貼附及訊息傳遞的角色，(2) OPN 的基因表現可藉由子宮基質（uterine stroma）當蛻膜化時對胎兒侵入的反應，(3) 胎盤及子宮有特定的免疫細胞，會調控OPN作用及細胞激素的分泌。所以他們認為OPN在子宮和胎盤中是具有功能可被調控，也許可以維持及完成整個懷孕過程(Johnson *et al.*, 2003a)。

在2006年有文獻指出，OPN會影響胎盤與母親子宮內交接處會有組織重建（tissue remodeling），主要藉由細胞與細胞外基質的交流（cell-ECM communication），增加細胞增生、移行、生存和細胞激素的調控。在胚胎著床（implantation）的過程中，OPN 訊息RNA（messenger RNA, mRNA）不只由管狀上皮細胞（luminal epithelium, LE）也會由腺狀上皮細胞（glandular epithelium, GE）分泌(Apparao *et al.*, 2003; Apparao *et al.*, 2001; von Wolff *et al.*, 2001)。OPN不只會表現於人類的子宮與胎盤間，也會表現於兔子、羊，所以推測OPN在著床及胎盤生成中扮演一個重要的角色(White *et al.*, 2006)。

另外，已有文獻已指出子宮的管腔表面（luminal surface）有 $\alpha v \beta 3$ integrin表現，進而與OPN結合，可在子宮內膜或促進胚胎（embryo）貼附及訊息傳遞中扮演一個重要的角色(Lessey, 2002a)。除了人類，還有文獻指出OPN也會表現在豬的子宮內膜可與胎盤的integrin結合，可以啟動胎盤發育和訊息傳遞，所以OPN在豬（porcine）的胎盤

生成 (placenta) 中扮演一個重要的角色(Garlow *et al.*, 2002)。

近期，有文獻報告指出，胚胎著床時，荷爾蒙雌激素 (estrogen) 會去調控OPN表現於子宮的管狀上皮細胞 (luminal epithelium, LE)，可以在胎盤的滋養外胚層 (conceptus trophoblast) 間當作橋樑 (White *et al.*, 2006)。所以由以上的研究，可發現OPN在子宮內膜的表現，不只與integrin表現有關，與荷爾蒙的刺激也有相關。

六、骨橋蛋白分泌作用機轉

在一些細胞中 (例如：黑細胞、上皮細胞、轉移的甲狀腺細胞)，已經有研究指出OPN會經由autocrine的機制來刺激下游，導致細胞侵入(Castellone *et al.*, 2004; Geisinger *et al.*, 2002; Medico *et al.*, 2001)。目前已經文獻指出在乳癌細胞中，OPN會透過autocrine或paracrine的機轉，來調控下游的訊息傳遞，造成血管新生 (angiogenesis) 和乳癌細胞、上皮細胞移行 (migration) (Chakraborty *et al.*, 2008)。所以OPN已被發現可經由autocrine或是paracrine的機制來促進細胞的移行、侵入等功能。

基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase, MMP)

基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase, MMP) 是一種需要鋅離子的蛋白水解酶，當MMP可以被分泌到細胞外周圍 (extracellular

milieu)，主要是被許多因子所調控，包括荷爾蒙、細胞激素和生長因子。MMPs家族有二十多個相關蛋白水解酶組成，廣泛的分為四大類：Collagenase、gelatinase、stromelysins 和 membrane-type enzymes (table1)(Curry and Osteen, 2001; Wenzl and Heinzl, 1998)。MMP目前被發現與胚胎發育、血管新生、骨頭生長與傷口癒合等有關，在正常情況下，人體內MMP的表現很少，但是當在病理狀態下，MMP會去 degradation ECM，例如：關節炎和癌症。目前已經有許多研究指出MMP的表現與腫瘤得侵入、移行有關，主要是ECM degradation所導致。

MMP在人類的子宮內膜的脫落重建中也扮演重要的角色，在月經前，當雌激素與黃體素的表現量減少，子宮內膜會大量表現MMP，會調控子宮內膜細胞的脫落及重建 (remodeling) (Braundmeier *et al.*, 2006; Irwin *et al.*, 1996)。MMP與月經週期也有相關，在嚙齒動物中，當雌激素週期 (estrous cycle) 改變時，MMP mRNA 表現會增加，主要是MMP-2、MMP-7和MMP-11會大量表現。而黃體素則會抑制子宮內膜中MMP mRNA 表現，但是目前機制還不清楚(Curry and Osteen, 2001)。近期已有研究指出MMP和子宮內膜異位也有相關，在子宮內膜異位病患的組織中發現MMP-2、MMP-9表現會大量增加 (Shaco-Levy *et al.*, 2008)。

第二章 實驗材料與方法



藥品試劑

廠商	藥品
Affinity BioReagent(Golden, CO)	anti- α v β 3 antibody
Amersco(solon,OH)	Agarose I
Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)	Ammonium persulfate (APS) Enhanced chemiluminescence (ECL) N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF)
Ambion (Lakewood, NJ)	RNaseZAP Mouse anti-GAPDH antibody Silencer® Pre-designed siRNA
BD Biosciences(Bedford, MA)	BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber Mouse anti-NF- κ B antibody
Bio-Rad (London, UK)	Ammonium persulfate(APS) N,N,N-tetramethylethylenediamide(TEMED) Protein assay dye reagent
CIS Bio International (France) Diagnost Products Corporation(USA) Fluka (Buchs, CH)	RIA P4 analysis Kit RIA E2 analysis Kit 40% Acrylamide/bis solution (N',N'-methylene-bis-acrylamide solution)
Gibco (Grand island, NY)	Antibiotic-antimycotic Penicillin-streptomycin Trypan bule Trypsin-EDTA
Invitrogen (Carisbad, CA)	SeeBlue® Plus2 prestained protein standard
J.T.-Baker (Phillipsburg, NJ)	1,4-dithiothreitol (DTT) Acetic acid, CH ₃ COOH Chloroform Citric acid, HOC(COOH)(CHCOOH) ₂ •H ₂ O Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, Na ₂ HPO ₄ EDTA

	<p>Glycerol 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES Hydrogen chloride, HCl Isopropanol Magnesium Chloride, MgCl₂ Methanol, CH₃OH Phosphoric acid, H₃PO₄</p>
	<p>Potassium chloride, KCl Sodium acetate, (NH₄)₂SO₄ Sodium bicarbonate, NaHCO₃ Sodium carbonate, Na₂CO₃ Sodium chloride, NaCl Sodium hydroxide, NaOH Sodium tartrate Sucrose Tris-HCl</p>
Jackson ImmunoResearch (West Grove,PA)	Anti- mouse IgG conjugated horse radish peroxidase(HRP)
Life technologies (Gaithersburg, MD)	Fetal bovine serum (FBS)
Molecular Probes(Leiden,NL)	Phalloidin(A12373)
Promega	Cell proliferation assay
Qiagen (Hilden,Germany)	QIAGEN RNeasy Mini Kit
Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	<p>Anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase Mouse monoclonal anti- actin antibody Mouse monoclonal anti- OPN antibody</p>
Sigma (St. Louis, MO)	<p>4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI) Bovine serum albumin(BSA) Dimethylsulfide oxide (DMSO) Ethidium bromide (EtBr) Glutamic acid β-estradiol</p>

Glycine
Glyoxylic acid
High glucose DMEM medium (D5648)
DMEM/Nutrient mixture F12 Ham(D2906)
Nutrient mixture F12 Ham (N3520)
Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)
Potassium phosphate monobasic, KH_2PO_4
Recombinant human osteopontin
Sodium dodecyl sulfate (SDS)
Triton X-100

Vector laboratories(Burlingame,CA) VECTASHIELD[®] Mounting Medium



實驗方法

一、檢體收集 (Tissue collection)

檢體收集依照台北醫學大學人體試驗委員會規定(案號為 P950046)。本研究從台北醫學大學附設醫院收集帶有子宮肌瘤 (myoma) (n=14)、子宮肌腺症 (adenomyosis) (n=9) 及子宮內膜增生 (endometrium hyperplasia) (n=3) 的患者正位及異位子宮內膜組織，子宮組織檢體先用 PBS 清洗，將組織上的紅血球清洗去除，冰凍於-20°C 冰箱保存。體液收集分別從患有子宮內膜異位病患的腹膜液 (peritoneal fluid) (n=5)、濾泡液 (follicle fluid) (n=3)、巧克力囊腫液 (chocolate cyst fluid) (n=1) 及精漿 (seminal plasma) (n=3) 冰凍於-20°C 冰箱保存。我們也收集經超排卵後，子宮內膜異位患者 (n=4) 及正常女性的濾泡液 (n=4)，冰凍於-20°C 冰箱保存。

二、HEC-1A 細胞培養

本研究所用的細胞是 HEC-1A 細胞株選購自 ATCC HTB-112™。HEC-1A 細胞株是一種中度分化的子宮內膜細胞，需培養於 10% 胚胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、100 unit/ml penicillin G 及 100 mg/ml streptomycin 之 DMEM/F12 培養液，置於 5% CO₂、37°C 的培養箱。

三、藥物的配製

1. osteopontin (OPN) 的配製與使用濃度：

Recombinant human osteopontin 取 50 μg 的蛋白質溶於經 0.2 μm filter 過濾的 phosphate buffer saline(PBS) 包含 2.5 mg 的 bovine serum albumin (BSA)。實驗中所使用 OPN 濃度 1.25 μM (4.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、2.5 μM (8.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、5 μM (16.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及 10 μM (32.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

2. 雌激素 (β -estradiol, E_2) 的配製：溶於滅菌完去離子水，本實驗使用 5nM E_2 、10nM E_2 及 50nM E_2 。

3. 黃體素 (Progesterone, P_4) 的配製：溶於滅菌完 1x PBS，本實驗皆使用 50 nM P_4 、100 nM P_4 及 200 nM P_4 。

四、MTS assay

此實驗原理是使用 MTS [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 試劑，是一種新合成的 tetrazolium 化合物，MTS 會被活細胞中的 dehydrogenase enzymes 還原，反應生成紫色的 formazan，藉由測量粒腺體 NADPH 去氫酶 (NADPH dehydrogenase) 之活性，以比色的方式偵測活細胞的數量，用來觀察細胞增生 (Cell proliferation)。將 1.5×10^4 個細胞培養於 96 孔盤 (96 well) 中，細胞貼附於 well 中約七、八分滿時，在分別依不同特定 OPN 濃度處理細胞

24 小時，去除 DMEM/F12 medium，再加入已配置好的 solution (MTS solution 20 μ l + 200 μ l DMEM/F12 medium) 於每一個 96 well 中，反應 4 小時後，於 490 nm 讀取 formazan 的吸光數值。本實驗皆重複三次。

五、 Scratch wound assay

觀察細胞接受 OPN 的刺激後是否會移行。將 1×10^6 細胞培養於 6 well culture dish 24 小時後，細胞貼附於培養皿上約七、八分滿時，吸掉上清液，使用滅菌後的 pipette tip 於 well 中間劃一條線，再用 PBS 清洗 well 兩次，接著加入不含 10% FBS 和 no phenol red 的 DMEM/F12 medium 3 ml，加入待測物 (chemoattractant) 如 OPN、anti- $\alpha\beta 3$ integrin antibody、 E_2 刺激，經培養不同的時間點，再到顯微鏡下觀察細胞是否會經由待測物的刺激而產生移行。

六、 Matrigel[®] invasion assay

此實驗使用 BD BioCoat[™] Matrigel[™] Invasion Chamber (BD Biosciences, Bedford, MA) 來觀察 OPN 是否能使 HEC-1A 細胞有侵入的能力 (Figure 7)。將 5×10^4 細胞培養於 BD Falcon Cell Culture Insert (為上層的 chamber)，加入不同濃度的 OPN 於不含 10% FBS 和 phenol red free DMEM，此實驗待測藥物為 OPN 和 anti- $\alpha\beta 3$ integrin，另外在

下層BD Falcon TC Companion plate 中，加入不同濃度的藥物後，置於5% CO₂、37°C 的培養箱，22小時。將上層的Cell Culture Insert取出，置於新的BD Falcon TC Companion plate，再顯微鏡下計數於Matrigel中間和上面的細胞，皆各數三個視野下的細胞，另外再計數舊的BD Falcon TC Companion plate（有invasion能力的細胞皆掉落於此plate內）細胞數，各數三個視野下的細胞。本實驗皆重複三次。

七、組織蛋白質製備（Preparation of tissue lysate）

將組織使用研砵磨碎，收集於1.5 ml 微量離心管(ependorf tube)加入100 µl protein lysis buffer（pH 7.4 20 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 25 mM β-glycerophosphate, 100 µM PMSF, 1% Triton, 1µg/ml apotinin, 50mM NaF, 1mM sodium orthovanadate ），置於冰上作用30分鐘，使組織內的細胞膜可被打破，再用sonication 均質打破細胞，蛋白質可以完全釋出，以8500×g 4°C，離心30分鐘。收集之上清液為蛋白質萃取液，以西方墨點法來觀察子宮組織OPN蛋白質的表現。

八、細胞蛋白質製備（Preparation of cell lysate）

將1x10⁶細胞培養於10 cm培養皿24小時，細胞貼附於培養皿上約六分滿時，吸掉上清液，以1x PBS清洗一次，加入no phenol red、FBS

DMEM/F12 medium 約24小時，依不同的時間點加入10 nM E₂或100 nM P₄後收集細胞。分別收集不同時間點刺激下收集的細胞，收取cell pellet，均勻加入100 µl protein lysis buffer，置於冰上作用30分鐘，再用sonication 均質打破細胞，蛋白質可以完全釋出，以8500×g 4°C，離心30分鐘，收集之上清液為蛋白質萃取液，以西方墨點法來觀察細胞內OPN蛋白質的表現。

九、培養液蛋白質製備 (Preparation of conditional medium)

將1x10⁶細胞培養於10 cm培養皿24小時，細胞以1x PBS清洗一次，加入no phenol red、FBS DMEM/F12 medium 約24小時，依不同的時間點加入10 nM E₂或100 nM P₄後收集細胞。將10 nM E₂或100 nM P₄經過不同時間點刺激下，收集細胞培養液，600×g 4°C，離心10分鐘，將細胞碎片及死細胞去除，取出上清液，利用低溫真空抽乾法濃縮培養液中細胞所分泌的蛋白質。

十、蛋白質定量

定量原理是利用Bradford Method經由Coomassie Brilliant Blue G-250 reagent 和蛋白質結合的特性。G-250與蛋白質結合後，顏色會從紅色變為藍色，以光源595nm波長進行偵測，蛋白質濃度越高，其吸光值會越高。Bio-Rad protein assay dye先以去離子水依1：4之比例

稀釋五倍後，用Whatman No.1濾紙過濾後，於每一試管加入1 ml過濾液。以0.2 mg/ml、0.4 mg/ml及0.8 mg/ml之BSA作為標準液，測量各點吸光值後來製定吸光值與蛋白質濃度的標準曲線。在裝有過濾液之試管加入1-3 μ l的待測蛋白液，以595 nm波長測定吸光值，比對標準液曲線計算待測物之蛋白質濃度。

十一、西方墨點法

1. SDS-PAGE gel preparation

Gel 分為兩層，上層為stacking gel，配置方法為3.2 ml ddH₂O中，分別加入515 μ l的40% acrylamide/bis、412.5 μ l的1.5M Tris-HCl (pH6.7)、41.25 μ l的10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、41.25 μ l的10% ammonium persulfate (APS) 及 8.25 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) 後，待膠體凝固。下層膠為10% separation gel，配方為在4.577ml dd H₂O中，分別加入937.5 μ l的3 M Tris-HCl(pH8.9)、1.875 ml的40% acrylamide/bis、75 μ l的10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、37.5 μ l的10% ammonium persulfate (APS) 及 7.5 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) 後，待膠體凝固。

2. 電泳 (electrophoresis)

將電泳膠片置於電泳槽中並填滿電泳緩衝液 (running buffer)，取定量50 μ g的待測物蛋白質萃取液與0.35 M protein loading dye混合

後，於95°C下加熱5分鐘作用結束後立刻置於冰上冷卻，將處理好的蛋白質萃取液注入每一個well中，以10 % SDS-PAGE gel調整電壓至90 voltage進行電泳分析。約三小時後即可停止電泳並進行蛋白質的轉印。

3.轉印 (Transfer)

剪裁適當大小之PVDF membrane，以100% methanol潤濕後，以去離子水洗淨浸泡備用。電泳結束後將SDS-PAGE gel由玻片上取下放在3M paper上，再將PVDF membrane覆蓋於SDS-PAGE gel上，以油性筆在PVDF membrane上將marker的位置標示清楚，再覆蓋一層3M paper，於4 °C低溫環境以400 mA之電流轉印100分鐘即完成。

4.免疫轉漬 (immunoblot)

轉印完成後，將PVDF membrane以含5%脫脂奶粉的tris buffered saline with Tween-20 (TBST) blocking buffer作用1小時後，倒掉blocking buffer，以1x TBST清洗三次，各十分鐘。清洗完畢後加入primary antibody (anti-OPN antibody、anti-GAPDH antibody、anti-actin antibody) 抗體作用兩小時後，再以1x TBST清洗三次，各十分鐘，接著加入secondary antibody (anti-mouse IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)) 特異性抗體作用40分鐘後，以1x TBST清洗四次，各十分鐘，最後以enhanced chemiluminescence (ECL) 做呈色。利用

ECL呈色的方式，在PVDF membrane上覆蓋ECL buffer作用一分鐘至五分鐘顯影。

十二、分析細胞內相關基因的表現

(1) RNA的抽取與純化

所有使用的器具均以RNaseZAP處理，以除去RNase，再使用QIAGEN RNeasy Mini Kit，首先將Buffer RLT與 β -mercaptoethanol以100:1混合，加入350或600 μ l 混合液於已處理好之細胞培養皿中，混合均勻後，加入同體積的70%酒精，再次均勻混合，吸取到RNeasy mini column中，離心8000 \times g 15秒後倒掉濾液。加入700 μ l Buffer RW1到mini column中，離心8000 \times g 15秒後倒掉濾液。加入500 μ l Buffer RPE到mini column，離心8000 \times g 2分鐘後倒掉濾液，更換新的離心管，再離心8500 \times g 1分鐘，確保未殘留試劑於column。最後換新的離心管，在column中加入30-50 μ l RNase-free water，靜置一分鐘後，離心10000 rpm 1分鐘，所得濾液即為RNA萃取液。

(2) 轉錄聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

以1 μ g RNA在50 μ l反應混合液，反應混合液包括四種dNTP各200 μ M、1 \times Reaction Buffer (25 mM Tris-HCl, 0.1 mM MgCl₂, 0.75 M KCl, pH 8.3)、100 mM Oligo dT、dithiothreitol (DTT) 與5U MMLV Reverse

transcriptase，反應的溫度設定為37°C作用60分鐘。

(3) 聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

本實驗以1 µg cDNA在50 µl反應混合液，最終反應混合液包括四種 dNTP mixture 200 µM、引子各0.8 µM、1.0 U Super-therm DNA polymerase與1倍PCR reaction buffer(0.01% gelatin, 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM Tris-HCl, pH 9.0)。反應的溫度及時間設定為95°C變性 (denaturation) 5分鐘，95°C變性40秒、56°C引子接合 (annealing) 40秒、72°C引子延伸 (primer extension)，以 Mini cycleTMPCR machine (MJ Research Watertown City, MA) 進行25或35個循環反應，而後以72 °C引子延伸5分鐘。所用cDNA引子列於 Table 1。

(4) 電泳 (electrophoresis)

取6 µl PCR產物，以1.2% agarose gel、100伏特電壓下，在Mupid-2J 迷你水平電泳槽 (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)，使用0.5倍TBE緩衝液 (0.1M Tris, 0.1M boric acid, 2 mM EDTA-Na₂, pH8.0) 進行瓊膠電泳。再以ethidium bromide (50 µg/ml) 進行5~10分鐘的染色，於紫外光線透視燈 (Viber Lourmat photo-print 008-SD, Cedex, France) 下檢視DNA的長度。

十三、 Gelatin zymography

1. Gelatin gel preparation :

Zymography gel分為兩層，上層為stacking gel，泡製方法與西方墨點法相同。下層為10% separation gel，泡製方法為在10.2 ml ddH₂O中，分別加入5 ml的40% acrylamide/bis、2.5 ml的3M Tris-HCl (pH8.9)、2 ml的10 mg/ml gelatin、200 μ l的10% SDS、100 μ l的10% ammonium persulfate (APS) 及20 μ l N,N,N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) 後，待膠凝固即完成。

2. 實驗方法

製備1% gelatin SDS-PAGE電泳膠片，將電泳膠片置於電泳槽中並填滿電泳緩衝液 (running buffer)。將10 μ l sample(medium)，加入10 μ l 2x sample buffer(2.5ml 0.5M Tris-HCl, pH 6.8、4 ml 10% SDS、2 ml glycerol、0.5 ml 0.1% Bromophenol blue)，靜置10分鐘。將sample混合液loading到電泳片中，以125伏特進行電泳。約2小時後，將電泳片拆下，加入50 ml的25% Triton X-100 denature buffer，在室溫下輕搖30分中。倒掉denature buffer之後，加入約30 ml的developing buffer (50 mM Tris-HCl、5mM CaCl₂、0.2M NaCl、0.02% Brij 35)，於37°C恆溫下反應20個小時。將反應完後的膠片，以staining solution (0.25% commasie blue、10% acetic acid、50% methanol)染色30分鐘，之後再以destain solution (50 ml methanol、10 ml acetic acid、40 ml ddH₂O)

來進行退染並觀察結果。

十四、 Small interference RNA

首先於 6 well中種 2×10^5 細胞，約5或6成滿後可進transfection。將pre-design siRNA (Ambion) 送入細胞，其siRNA序列於Table 2。將DMEM/F12 medium吸掉後，加入1 ml OPTI-MEM，另外準備1.5 ml vial，將約2.5~6 μ l Lipofectamine 2000 於500 μ l OPTI-MEM 室溫下反應5分鐘，再將100 pmol siRNA加入，室溫下反應25分鐘後,再加入6 well中，經過4.5小時後進行recovery，加入1.5ml的DMEM/F12含有FBS medium overnight。隔日早上換置新鮮的DMEM/F12 medium 2ml於已經transfection的 6 well中，依加藥後的24或48小時收細胞。

十五、雷射共軛焦顯微鏡

1. 雷射共軛焦顯微鏡

本實驗使用共軛焦顯微鏡 (TCS SPS AODS, Leica, Germany) 來觀察經由不同濃度OPN處理後，細胞內actin的改變及分布情形。

2. 螢光染劑

Phalloidin，可與細胞內的actin結合，主要是從死亡的*Amanita phalloides* 蕈菇分離出來，一個稱為Phallotoxin的bicyclic peptide，再接上綠色螢光，其激發波長 (excitation) 488nm與放射波長 (emission) 為518nm，以藍色光源照射後發散青綠色螢光。本實驗主要是將HEC-1

細胞經由不同濃度OPN刺激下，利用phalloidin來觀察細胞內actin的變化。另外我們也利用DAPI染料來來標定細胞核的位置。DAPI是針對細胞核之DNA染色，在激發波長為350nm與最大放射波長為450nm，在紫外光濾鏡下呈現藍色。

3. 細胞處理

將 1×10^6 細胞培養於 0.17mm 蓋玻片上，置於6 well培養盤附著生長，約七、八分滿後，加入不同濃度的OPN，吸掉DMEM/F12 medium，1X PBS清洗兩次，加入 Fix solution（4% Formaldehyde及 0.03M sucrose）室溫1小時，1小時後吸掉Fix solution，加入Extract（Fix solution+ 0.1% Triton x-100）室溫15分鐘，接著加入Blocking solution（5mg/ml BSA）1至2小時於室溫，1X PBS清洗兩次，加入75 μ l 5U的phalloidin 20分鐘，此時為螢光染劑，所以要開始避光，20分鐘後，1X PBS清洗兩次，加入1 μ M DAPI約三分鐘後，1X PBS清洗三次，即可將玻片加入少許的抗退劑 VECTASHIELD[®] Mounting Medium延緩螢光時間減退（photobleaching）的速度，維持螢光至少在50%以上。在細胞處理好後，將抗退劑加在載玻片上，覆蓋蓋玻片後，以雷射共軛焦顯微鏡觀察。

十六、放射免疫測定法(Radioimmunoassay)

我們收集4位正常女性與5位子宮內膜異位患者經超排卵後的濾

泡液，利用放射免疫測定法，分別使用RIA E₂ analysis Kit 和RIA P₄ analysis Kit ，來偵測濾泡液中E₂和P₄的濃度。

十七、統計分析

以Student's paired test作分析， $p < 0.05$ 表示具有統計意義。實驗結果以mean \pm standard deviation (S.D) 表示。





第三章 實驗結果與分析

實驗結果與分析

一、子宮內膜組織中 OPN 含量

為探討 OPN 在子宮內膜異位中所扮演的角色，首先我們收集患有子宮內膜增生 (endometrium hyperplasia)、肌瘤 (myoma)、腺肌瘤 (adenomyosis) 病患的正位子宮內膜組織 (eutopic endometrium)，萃取組織中的蛋白質，利用西方墨點法來測定組織中 OPN，測得主要有 50、32、25 kD 的 OPN，實驗結果如 Figure 4A。我們以 50 kD OPN 作定量分析，並且以子宮內膜增生為實驗對照組，結果發現在子宮肌腺 (adenomyosis) 患者的子宮內膜組織中 OPN 表現量增加至對照組的 23.6% (n=5, $p < 0.05$)。另外，子宮肌瘤 (myoma) 病患的子宮內膜組織中 OPN 表現量增加至子宮內膜增生病患的 6% (n=6) 並沒有明顯差異 (Figure 4B)。

二、在子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡液、巧克力囊腫體液及精漿中 OPN 含量。

我們將子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡液及巧克力囊腫濾泡液，萃取蛋白質，利用西方墨點法來測的體液內 OPN 的含量。我們進一步使用軟體分析，由 recombinant OPN 1.5 μ M 為標準樣本來定量各種體液中 OPN 含量，結果顯示子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡

液、巧克力囊腫液及精漿中，OPN 濃度約為 $15.3\mu\text{M}$ 、 $14.8\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 及 $0.9\mu\text{M}$ (Figure 5)。我們發現在子宮內膜異位患者體液中與對照組和其他體液如精漿作比較，OPN 會大量表現。

三、OPN 對子宮內膜細胞移行能力 (migration) 的影響

接下來我們想更進一步的去探討 OPN 對於子宮內膜細胞移行、侵入、增生等能力的影響，在移行方面，利用 Scratch wound assay 方法來觀察子宮內膜 HEC-1A 細胞移行。我們發現當 HEC-1A 細胞分別 $1.25\mu\text{M}$ 、 $2.5\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 及 $10\mu\text{M}$ OPN 刺激，處理不同時間點 0 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時，於 37°C 、5% CO_2 環境下，觀察移行的能力，結果顯示隨著處理的濃度及作用時間增加而增加移行的能力。另外，我們以 $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin 的抑制劑，500 ng/ml (anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ antibody) 進行分析，處理不同時間點 0 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時，發現 anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ antibody 會減緩或抑制由 OPN 引發的細胞移行能力 (Figure 6)。

四、OPN 對子宮內膜細入侵能力 (invasion) 的影響

我們使用 BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences, Bedford, MA) 來定量 OPN 入侵的能力。我們將細胞培養於 BD Falcon Cell Culture Insert (為上層的 chamber) 及在下層 BD

Falcon TC Companion plate 中分別加 1.25 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M 的 OPN，置於 5% CO₂、37°C 的培養箱，22 小時。我們發現當細胞於 1.25 μ M OPN 處理後細胞入侵能力較對照組增加 68.8% \pm 4.5% (n=3, p<0.05)。於 2.5 μ M OPN、5 μ M OPN 及 10 μ M OPN 的處理發現各組細胞入侵能力較對照組增加 71.6% \pm 7.4% (n=3, p<0.05)、75.8% \pm 7.9% (n=3, p<0.05) 及 72.5% \pm 2.1% (n=3, p<0.05)。另外，當我們以 1 μ g/ml α v β 3 integrin 的抑制劑 (anti- α v β 3 antibody) 進行處理 24 小時，發現 α v β 3 integrin 的抑制劑的添加其入侵能力會減緩，其入侵能力較對照組增加 40.3% \pm 2.1% (n=3, p<0.01) (Figure 7)。

五、 OPN對cell proliferation的影響

利用 MTS assay 來觀察 OPN 對細胞增生 (proliferation)。當細胞分別以 1.25 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M OPN 處理 24 小時下，隨著 OPN 濃度增加時，490nm 的吸光數值並無明顯增加，所以我們發現 HEC-1A 細胞並不會隨著 OPN 濃度增加而有明顯增生的現象 (Figure 8)。

六、 雌激素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。

接下來我們更進一步探討 OPN 是否會經由雌激素和黃體素所調控。首先我們 RT-PCR 方法來觀察，1 \times 10⁶ 細胞經由 10 nM E₂ 作

用於 1 小時~24 小時後，OPN mRNA 表現增加，於 9 小時表現最大量 (Figure 9A)。接下來我們利用 Western blot 來觀察 HEC-1A 細胞經由 10nM E₂ 處理後，我們發現 OPN 蛋白質的表達會隨著刺激的時間增加而表現增加，以 6 小時和 9 小時最為明顯 (Figure 9 B)。進一步定量 OPN 的含量發現於 6 小時和 9 小時處理的 OPN 增加了 54.1% ± 21.3% (n=3, p<0.05) 及 65.9% ± 20.4% (n=3, p<0.05) (Figure 9C)。

七、黃體素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。

1×10⁶ 細胞經由經由 100 nM P₄ 處理後發現 OPN mRNA 隨著作作用時間的增加而增加，於 6 小時作用其表現最大量 (Figure 10A)。接下來於 Western blot 來觀察細胞 OPN 表達的情形。我們發現 OPN 蛋白質的表達亦會隨著刺激的時間增加而表現增加，以 24 小時最為明顯 (Figure 10 B)。經定量分析後發現 24 小時的處理其 OPN 增加了 100.6% ± 31% (n=3, p<0.05) (Fig 10 C)。若與 10 nM E₂ 的作用比較發現，100 nM P₄ 的作用較 10 nM E₂ 作用影響 OPN 表現量大。

八、雌激素及黃體素對子宮內膜細胞 OPN 表達的影響。

我們進一步觀察 E₂ 及 P₄ 共同處理後對 OPN 的影響。HEC-1A 細胞經由 10nM E₂ 與 100 nM P₄ 共同作用於 1 小時、3 小時、6 小時、

9 小時、12 小時、24 小時後，OPN mRNA 表現會隨著時間增加而表現增加 (Figure 11A)。接下來我們利用 Western blot 和定量分析來觀察細胞內 OPN 的表達，我們發現 OPN 蛋白質的表達不會隨著刺激的時間增加而增加蛋白表現 (Figure 11B 和 11C)。

九、 雌激素及黃體素對子宮內膜細胞移行能力的影響。

前面的實驗結果顯示雌激素和黃體素可促進 OPN 表現，接著繼續探討是否也會造成細胞移行。我們利用 Scratch wound assay 方法來觀察 HEC-1A 細胞移行。當 HEC-1A 細胞單獨處理於 50nM E₂ 或 100 nM P₄ 時，發現細胞於 24 小時及 48 小時具有明顯移行的能力。我們使用 $\alpha\beta 3$ integrin 的抑制劑 (Anti- $\alpha\beta 3$ antibody) 處理則會減緩或抑制移行能力。但是當 HEC-1A 細胞於 10nM E₂ 或 100 nM P₄ 共同處理時，發現細胞不具有明顯移行的能力 (Figure 12)。所以我們推測 HEC-1A 細胞於 50nM E₂ 刺激下，可以增加 OPN 表現量經由 $\alpha\beta 3$ integrin 促使細胞移行。此外，當我們使用不同濃度配比的 E₂ 和 P₄ 共同處理，除了 10nM E₂ 或 100 nM P₄ 配比外，其餘濃度細胞皆具有移行能力 (Figure 13)。

九、 在子宮內膜異位患者濾泡液中 E₂ 和 P₄ 濃度。

我們利用 radioimmunoassay (RIA) kit 來偵測子宮內膜異位患者

與對照組經超排卵所取出濾泡液中E₂和P₄濃度，我們將進一步將E₂和P₄濃度比例分析，經由以上的結果，發現對照組E₂和P₄含量比例約為1:10 (0.805μM : 9.35μM)，而子宮內膜異位病患體內的E₂和P₄含量比例約為1:40 (0.724μM : 31.263μM)，所以我們推測E₂和P₄含量比例不同會促進細胞移行，造成子宮內膜異位的形成 (Figure 13)。

十、OPN siRNA對細胞移行的影響。

為進一步確認OPN在促使細胞產生移行及入侵上的角色，所以我們進行Small interferen RNA實驗。來確認細胞內OPN的表現konckdown後，對細胞特性的影響。將100 pmol OPN siRNA進行，transfection至HEC-1A細胞內，利用RT-PCR(figure 15A)及Western blot(figure 15B)來進行確認其效率。我們發現當細胞以OPN siRNA transfection後，細胞內可以knockdown OPN mRNA與蛋白質的表現。再以Scratch wound assay方法來觀察HEC-1A細胞內的OPN knockdown後細胞是否移行。如Figure 15 C 我們發現將HEC-1A細胞的OPN knockdown後，可減緩細胞移行，但當外加入OPN 10μM後，會增加細胞移行現象。另外，將HEC-1A細胞的OPN knockdown後，再加入10 nM E₂，我們發現細胞移行現象有減緩的趨勢(Figure 15)。

十一、Secreted OPN的測定。

我們接下來要繼續探討 E_2 和 P_4 是否會促進HEC-1A細胞產生 Secreted OPN表現。我們收集各組不同加物作用24小時後，各組別的 conditioned medium，利用西方墨點法來觀察。當細胞在以10nM E_2 、100nM P_4 刺激24小時後，有 Secreted OPN表現。經由10nM E_2 和100nM P_4 共同作用或是將細胞內的OPN knockdown後添加10nM E_2 ，皆會減緩 Secreted OPN表現 (Figure 16)。

十二、共軛焦顯微鏡觀察細胞內 actin 分佈的情形。

我們接下來要更進一步來探討細胞的移行能力是否與細胞骨架 actin 位置改變有關，我們利用帶有螢光的可以辨識細胞內 actin 蛋白的 phalloidin 作用於已處理不同 OPN 濃度的細胞，並以 DAPI 來標定細胞中細胞核的位置，使用雷射共軛焦顯微鏡來觀察細胞內 actin 分佈情形。結果如 Figure 17，我們發現當以 OPN 處理的細胞會有移行的現象，且與 actin remodeling 有關。結果顯示隨著濃度增加，細胞內的 actin 會明顯表現且會出現偽足使細胞可以移行。另外當我們加入 $\alpha v\beta 3$ integrin 的抑制劑 (500 ng/ml)，發現細胞內的 actin 的表現及偽足的產生皆減少。

十三、OPN 經由 PI-3k 訊息路徑調控細胞移行能力。

為了進一步確認 PI-3K 訊息傳遞路徑是否參與在由 OPN 所引發

的細胞移行的分子調控機制中，我們使用了 PI-3K inhibitor (Wortmannin)來進行分析其分子機轉。首先，我們利用 Scratch wound assay 方法來觀察子宮內膜 HEC-1A 細胞移行。由於 OPN 可以引發細胞移行現象，但在 1 μ M Wortmannin 處理 2 小時後，仍具移行的能力。但經由 5 μ M 或 10 μ M Wortmannin 處理 2 小時後，則發現可減緩或抑制由 OPN 引發的細胞移行能力 (Figure 18)。所以，我們推測 OPN 在與 $\alpha\beta$ 3 integrin 結合後，可經由 PI-3K signal pathway 調控細胞移行。

十四、OPN 不經由 NF- κ B 訊息路徑調控細胞移行能力。

接下來我們要確認 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 訊息傳遞路徑是否參與此分子調控中。利用西方墨點法來觀察細胞內 NF- κ B 的表現。將 HEC-1A 細胞前處理 1 μ M、5 μ M 和 10 μ M 的 Wortmannin 2 小時後，再添加 10 μ M OPN，我們發現細胞會隨著 Wortmannin 濃度增加 NF- κ B 會隨著濃度而表現增加，另外，單獨添加 Wortmannin 時，NF- κ B 也表現增加。當單獨加入 10 μ M OPN 時，NF- κ B 表現減少。(Figure 19)。我們由以上實驗結果發現 NF- κ B signal pathway 並不參與於細胞移行。

十五、OPN 會促進子宮內膜細胞產生 MMP-2 和 MMP-9 活性增加。

在 HEC-1A 細胞使用 1.25 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M OPN 處理

24 小時後，將 conditioned medium 收集後，利用 Gelatin zymography 方法，將 10% SDS-PAGE 中加入 Gelatin substrate，當細胞分泌出 MMP-2 (Gelatinase A) 和 MMP-9 (Gelatinase B) 時，可以消化 Gelatin substrate，經由 coomassie blue 染色後可產生透明的 band。我們發現 HEC-1A 細胞經由 1.25 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M OPN 處理 24 小時後，皆於 conditioned medium 中具有活性的 MMP-2 (68 kD) 和 MMP-9 (86kD) (Figure 20A)。此外，我們也利用西方墨點法來觀察細胞內 MMP-9 的表現。我們使用 1.25 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M OPN 處理 24 小時後，發現經由 2.5 μ M、5 μ M OPN 刺激後，MMP-9 會大量表現 (Figure 20B)。



第四章 討論

討論

近期已有研究證實在人類子宮內膜中，會特別表現 $\alpha\beta3$ integrin(Lessey, 2002a)，另外在滋養層 (trophoblast) 和著床前胚胎的上皮表面都會表現 OPN 及 $\alpha\beta3$ integrin，所以 OPN 胚胎貼附至子宮內膜的上皮細胞中扮演很重要的角色(Apparao *et al.*, 2001)。近年來，有許多研究推測在懷孕的過程中，OPN 是一個很重要的蛋白質，因為 OPN 會明顯增加於豬、羊、兔、老鼠及人類的子宮(Apparao *et al.*, 2003; Garlow *et al.*, 2002; Girotti and Zingg, 2003)。2007 年 Ryo Konno 等人經由動物實驗 (rat model)，將人類子宮內膜組織移植到大鼠內，經由免疫組織染色發現 OPN 會大量表現於子宮內膜異位組織(Odagiri *et al.*, 2007)，此外，他們在建置的子宮內膜異位的老鼠模式中，發現 OPN mRNA 會大量表現於正位子宮內膜(Konno *et al.*, 2007)。但是在 2002 年也有文獻提出一個論點，他們認為子宮內膜異位患者的子宮內膜其 OPN 表現並無改變，同時 $\alpha\beta3$ integrin 表現亦有降低的現象，進而導致子宮內膜異位患者的子宮內膜失去功能及生殖能力(Lessey, 2002b)。

在本研究中我們首先探討在子宮內膜異位病患的子宮內膜，OPN 的表現是否有影響，我們在患有子宮內膜增生 (hyperplasia)、肌瘤 (myoma)、腺肌症 (adenomyosis) 病患的正位子宮內膜組織 (eutopic

endometrium)，發現在腺肌症病患的子宮內膜，OPN 會增加 23.6% ($p < 0.05$)，遠較子宮內膜增生、肌瘤增加 (figure 4)。另外，我們也在子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡液及巧克力囊腫液中，發現 OPN 含量約為 50 $\mu\text{g/ml}$ (15 μM)，所以在實驗設計時我們選用 OPN 的濃度 (1.25~10 μM) 於子宮內膜異位患者體液中濃度的範圍內。另外，我們在其他液體如精漿 (seminal plasma) 中 OPN 含量約為 3 $\mu\text{g/ml}$ (0.9 μM)，所以我們發現在子宮內膜異位患者體液內 OPN 會大量表現 (figure 5)。目前已有文獻指出在一些癌症病患的血清中 OPN 也會大量表現含量約 0.5~2 $\mu\text{g/ml}$ (Wai and Kuo, 2008)，所以我們發現在子宮內膜異位病患的子宮內膜中 OPN 大量表現，可能是引起此疾病的重要因子之一。

在許多癌細胞中 (例如：乳癌、前列腺癌、胃、卵巢、肺癌和子宮內膜癌) OPN 會大量表現，造成腫瘤的移行、侵入、增生、貼附 (Chakraborty *et al.*, 2006; El-Tanani *et al.*, 2006; Rangaswami *et al.*, 2006; Wai and Kuo, 2004)。在前列腺癌細胞中，OPN 會促進細胞移行、侵入及增生，但分別透過不同的機制 (Angelucci *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2007)；在乳癌細胞的研究中，OPN 會促進細胞移行、侵入及腫瘤增生，也都經由不同的下游訊息傳遞 (Chakraborty *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2007)。近年來有文獻指出在人類的絨毛膜癌細胞、

老鼠的黑色素瘤細胞及大腸腺癌細胞中都被證實 OPN 的大量表現會導致細胞移行、入侵及腫瘤增生(Wai *et al.*, 2005)。

目前還沒有研究指出 OPN 在子宮內膜異位中的功能為何。我們推測在子宮內膜異位病患，子宮內膜中大量表現 OPN，可能會促進子宮內膜細胞的移行、侵入、增生。在我們的 HEC-1A 細胞模式的實驗結果中，發現 OPN 在子宮內膜細胞大量表現時，會促進細胞移行、侵入但不會有增生的現象 (Figure 6, 7, 8)，目前也尚未有 OPN 會促進子宮內膜增生相關的文獻。因此我們推測子宮內膜異位的病患子宮內膜因為 OPN 過度表現所以會促進細胞跑到子宮以外的地方，造成異位但不會有增生的現象。

近期已有許多文獻推測在懷孕的過程中，OPN 是一個很重要的蛋白質，可能會被荷爾蒙所調控，因為 OPN 會明顯增加於豬、羊、兔、老鼠及人類的子宮(Apparao *et al.*, 2003; Garlow *et al.*, 2002; Girotti and Zingg, 2003)。1997 年的文獻指出在人類的絨毛膜上皮細胞的滋養葉外層 (syncytiotrophoblast layer) 會分泌黃體素，促進滋養葉內層 (cytotrophoblast layer) 表現 OPN，經由 paracrine 機制，可促進這兩種細胞的貼附及訊息傳達(Omigbodun *et al.*, 1997)。另有研究指出在羊的子宮內黃體素也會調控 OPN，會大量表現在子宮腺狀上皮細胞 (glandular epithelium, GE) (Johnson *et al.*, 2000)。在雌激素與 OPN

研究方面，有研究指出在經由卵巢切除（ovariectomized, OVX）後老鼠的管狀上皮細胞（luminal epithelium, LE）發現雌激素會誘導 OPN mRNA 表現增加而當雌激素與黃體素共同作用時則相反(White *et al.*, 2006)。我們的實驗結果中證實 HEC-1A 細胞經由 10nM 雌激素或 100nM 黃體素刺激後可以促進 OPN mRNA 與蛋白質表現增加(Figure 9 和 Figure 10)，但當 10nM 雌激素與 100nM 黃體素共同作用時則相反 (Figure 11)。在 Ishikawa 細胞(為一株常見的子宮內膜細胞)中，也發現黃體素會使 OPN 表現增加，而 $\beta 3$ integrin 經由表皮生長因子來調控，但在此文獻中作者發現當 Ishikawa 細胞經由 100nM 雌激素與 10nM 黃體素共同刺激下 OPN 蛋白表現會增加(Apparao *et al.*, 2001)；另外我們也發現 HEC-1A 細胞經由 50nM 雌激素刺激後可以經由 $\alpha\beta 3$ integrin 促進細胞移行 (Figure 12)；HEC-1A 細胞經由 100nM 黃體素刺激後可以促進細胞移行；但當 10nM 雌激素與 100nM 黃體素共同作用時則減緩 (Figure 12)。從以上的實驗結果，我們推測 HEC-1A 細胞會經由雌激素刺激而大量表現 OPN，與細胞上的 $\alpha\beta 3$ integrin 結合，而產生細胞移行。但是 HEC-1A 細胞也會經由黃體素刺激而大量表現 OPN，是否會透過 $\alpha\beta 3$ integrin，機轉還未清楚。當 10nM 雌激素與 100nM 黃體素共同作用時，OPN 並無明顯表現的結果與 2001 年 Apparao *et al* 在 Ishikawa 細胞使用 100nM 雌激素與

10nM 黃體素刺激下結果相反，可能是使用濃度不一樣或是不同的細胞株所導致結果有差異。另外，在 2001 年有文獻指出雌激素可增加 OPN 表現，在 estrogen-response element (5'-GGTCANNNTGACC-3') 上有七個 steroid factor-response element (SFRE) 相似的序列在 OPN promoter 上，使得雌激素接受器 α (estrogen receptor α) 可結合至 promoter 而增加 OPN 表現(Apparao *et al.*, 2001)，但目前還未有 progesterone receptor 會與 OPN promoter 結合相關的報導，所以當雌激素與黃體素共同作用時是否會產生競爭 OPN promoter 上 binding site 機制尚未清楚。近年已經有研究指出子宮內膜異位是一種雌激素依賴型的疾病，體內雌激素濃度較高(Kitawaki *et al.*, 2002; Olive *et al.*, 2004)，在 2006 年有文獻提出利用 *in vitro* 細胞實驗中，子宮內膜異位的子宮內膜中黃體素接受器表現降低，使黃體素無法正常作用，也導致雌激素代謝不正常(Bulun *et al.*, 2006)。當我們分別使用不同濃度的雌激素與黃體素共同作用 24 小時和 48 小時後，發現細胞會產生移行，但當 10nM 雌激素與 100nM 黃體素共同作用時則減緩 (Figure 13)。正常女性濾泡液中 E_2 和 P_4 含量比例約 1:10 (18nM:155nM)，因此我們使用 10nM 雌激素與 100nM 黃體素比例近似正常女性體內的荷爾蒙濃度，所以不會導致 OPN 過度表現進而促使細胞移行，在我們的研究中也發現經過超排卵後，子宮內膜異位患者濾泡液中 E_2

和 P₄ 含量比例約 1:40，與對照組為正常女性的濾泡液中 E₂ 和 P₄ 含量比例約 1:10 (0.805 μ M : 9.35 μ M)，比例明顯有差異 (Figure 13)，我們推測當 10nM 雌激素與 100nM 黃體素濃度配比改變後，比例不平衡就會促進細胞移行而誘導子宮內膜異位的疾病產生。

接下來，我們想要更進一步的確認 OPN 在子宮內膜異位中，是否扮演很重要的角色，我們使用了 small interfering RNA(siRNA)的技術，在 *in vivo* 實驗中，將打入老鼠體內的乳癌細胞、大腸癌細胞內 OPN knockdown 後，發現老鼠體內的腫瘤增生、移行、入侵的現象減緩(Chakraborty *et al.*, 2008; Philip *et al.*, 2001; Wai *et al.*, 2005)。在我們的實驗結果中發現將 HEC-1A 細胞內的 OPN knockdown，發現細胞的移行現象減緩，另外，HEC-1A 細胞內的 OPN knockdown 後加入 OPN，細胞產生移行現象，但是當加入雌激素後，移行現象減緩 (Figure 15)。從以上的文獻與我們的研究結果顯示在 HEC-1A 細胞中，雌激素刺激了 OPN 大量表現後會促進細胞移行，所以我們推測造成子宮內膜異位的因素，OPN 可能是一個很重要的因子。

近期已經文獻指出在乳癌細胞中，OPN 會透過 autocrine 和 paracrine 的機制，來調控下游的訊息傳遞，造成血管新生 (angiogenesis) 和乳癌細胞、上皮細胞移行 (migration) (Chakraborty *et al.*, 2008)。在老鼠的大腸癌細胞中，OPN 會透過 autocrine 和 paracrin

的機制，來抑制一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)，促使腫瘤增生(Wai *et al.*, 2006)。從我們的實驗發現，我們發現當細胞於10nM E₂或100nM P₄刺激24小時後，conditional medium內含有分泌型OPN(secreted OPN)。另外，當HEC-1A細胞內的OPN knockdown後再給予10nM E₂，分泌型OPN的含量減緩，此現象於10nM E₂和100nM P₄共同刺激後，分泌型OPN的表現也減緩 (Figure 16)。同時在scratch wound assay實驗中也發現細胞於10nM E₂或100nM P₄刺激24小時後，皆有移行現象(Figure 13)，但當HEC-1A細胞內的OPN knockdown後再給予10nM E₂，移行現象減緩 (Figure 15)。所以經由實驗的結果我們推測OPN經由雌激素或黃體素刺激後，大量表現出分泌型OPN後，經由autocrine或paracrine的方式來調控細胞移行。

有關於OPN的訊息傳遞方面的文獻報告中，在前列腺癌細胞中，OPN透過 $\alpha\beta3$ integrin進行Rho GTPase訊息傳遞，導致actin remodeling，促使細胞移行，另外細胞入侵能力與MMP-9活性有關(Desai *et al.*, 2007)。在乳癌細胞，OPN會經由PI-3-kinase dependant Akt phosphorylation活化MMP路徑，促進細胞移行、轉移(Das *et al.*, 2003; Philip *et al.*, 2001)。在2008年有文獻指出OPN可以透過nuclear factor- κ B (NF- κ B) / activating transcription factor-4 (ATF-4)路徑，藉由autocrine和paracrine機制，來引發腫瘤血管新生和入侵及移行

(Chakraborty *et al.*, 2008)。在我們的實驗結果中，當細胞經由不同濃度的OPN處理於24小時後，細胞可以增加移行能力之外也會產生Actin remodeling (polymerization)，但是當我們加入 $\alpha v\beta 3$ integrin的抑制劑 (500ng/ml) 會減緩或抑制移行能力和actin remodeling (Figure 17)。另一方面，將HEC-1A細胞在不同濃度的Wortmannin (PI-3K inhibitor) 處理下，可減緩移行的能力 (Figure 18)。但在Figure 19的結果顯示，細胞會隨著Wortmannin (PI-3k inhibitor) 濃度的增加，NF- κ B蛋白質表現增加，但在Wortmannin抑制PI-3K的作用後，我們發現細胞內並不移行。所以我們推測OPN會透過PI-3K訊息傳遞路徑來調控細胞移行，但是是否能透過PI-3K/NF- κ B路徑調控細胞移行，我們必須使用NF- κ B inhibitor或是PI-3K inhibitor與NF- κ B inhibitor共同作用，才能更進一步的確認OPN是否也可經由PI-3K/NF- κ B來調控細胞移行。目前已有文獻指出NF- κ B路徑與細胞存活 (cell survival)，抑制細胞凋亡 (apoptosis) 有關(Denhardt *et al.*, 2001; Wai and Kuo, 2004)，但在子宮內膜細胞中機制尚未清楚。

近年來已有文獻指出，在不同細胞中，OPN會誘導MMP活性，進而促進細胞移行、侵入(Fedarko *et al.*, 2004; Philip *et al.*, 2001; Wai *et al.*, 2005)。也有研究指出MMP和子宮內膜異位也有相關，在子宮內膜異位病患的組織中發現MMP-2、MMP-9表現會大量增加

(Shaco-Levy *et al.*, 2008)。在我們的研究結果顯示，HEC-1A細胞經由不同濃度的OPN處理後，會產生具有MMP-2、MMP-9的表現 (figure 20)。從以上的實驗結果，我們推測HEC-1A細胞可能經由PI-3K路徑，來促進細胞內actin remodeling及活化MMP-2、MMP-9，可使細胞產生移行能力，但是細胞入侵的能力是否是經由PI-3K路徑，機制還不清楚。

經由本次的論文研究主題中，我們發現 OPN 在子宮內膜異位中扮演很重要的角色，可能是造成子宮內膜細胞的移行、入侵，一個很重要的因子。另外，雌激素與黃體素的研究方面，雌激素與黃體素皆會促進 OPN 表現，而子宮內膜病患體內的雌激素與黃體素濃度比例不平衡，可能會誘導子宮內膜細胞 OPN 大量表現，經由 autocrine 或是 paracrine 機制，進行下游 PI-3K 路徑而促進細胞移行 (figure 21)。未來，希望能利用動物模式來模擬子宮膜異位，更加以確定 OPN 於子宮內膜異位中為一個標靶基因，對於子宮內膜異位的治療與篩檢能有更大的幫助。



第五章 參考文獻

(1997) Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and sterility* **67**: 817-821

Al-Shami, R., Sorensen, E.S., Ek-Rylander, B., Andersson, G., Carson, D.D., and Farach-Carson, M.C. (2005). Phosphorylated osteopontin promotes migration of human choriocarcinoma cells via a p70 S6 kinase-dependent pathway. *Journal of cellular biochemistry* **94**, 1218-1233.

Angelucci, A., Festuccia, C., Gravina, G.L., Muzi, P., Bonghi, L., Vicentini, C., and Bologna, M. (2004). Osteopontin enhances the cell proliferation induced by the epidermal growth factor in human prostate cancer cells. *The Prostate* **59**, 157-166.

Apparao, K.B., Illera, M.J., Beyler, S.A., Olson, G.E., Osteen, K.G., Corjay, M.H., Boggess, K., and Lessey, B.A. (2003). Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus. *Biology of reproduction* **68**, 1484-1490.

Apparao, K.B., Murray, M.J., Fritz, M.A., Meyer, W.R., Chambers, A.F., Truong, P.R., and Lessey, B.A. (2001). Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 4991-5000.

Attia, G.R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B.R., and Bulun, S.E. (2000). Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**, 2897-2902.

Bayless, K.J., Salazar, R., and Davis, G.E. (2000). RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *The American journal of pathology* **156**, 1673-1683.

Bhatt, S., Kocakoc, E., and Dogra, V.S. (2006). Endometriosis: sonographic spectrum. *Ultrasound quarterly* **22**, 273-280.

Braundmeier, A.G., Fazleabas, A.T., Lessey, B.A., Guo, H., Toole, B.P., and Nowak, R.A. (2006). Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates metalloproteinases in human uterine endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**, 2358-2365.

Briese, J., Schulte, H.M., Bamberger, C.M., Loning, T., and Bamberger, A.M. (2006). Expression pattern of osteopontin in endometrial carcinoma: correlation with expression of the adhesion molecule CEACAM1. *Int J*

Gynecol Pathol 25, 161-169.

Bulun, S.E., Cheng, Y.H., Yin, P., Imir, G., Utsunomiya, H., Attar, E., Innes, J., and Julie Kim, J. (2006). Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Molecular and cellular endocrinology* 248, 94-103.

Carter, J.E. (1994). Combined hysteroscopic and laparoscopic findings in patients with chronic pelvic pain. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* 2, 43-47.

Castellone, M.D., Celetti, A., Guarino, V., Cirafici, A.M., Basolo, F., Giannini, R., Medico, E., Kruhoffer, M., Orntoft, T.F., Curcio, F., *et al.* (2004). Autocrine stimulation by osteopontin plays a pivotal role in the expression of the mitogenic and invasive phenotype of RET/PTC-transformed thyroid cells. *Oncogene* 23, 2188-2196.

Celetti, A., Testa, D., Staibano, S., Merolla, F., Guarino, V., Castellone, M.D., Iovine, R., Mansueto, G., Somma, P., De Rosa, G., *et al.* (2005). Overexpression of the cytokine osteopontin identifies aggressive laryngeal squamous cell carcinomas and enhances carcinoma cell proliferation and invasiveness. *Clin Cancer Res* 11, 8019-8027.

Chakraborty, G., Jain, S., Behera, R., Ahmed, M., Sharma, P., Kumar, V., and Kundu, G.C. (2006). The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Current molecular medicine* 6, 819-830.

Chakraborty, G., Jain, S., and Kundu, G.C. (2008). Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer research* 68, 152-161.

Curry, T.E., Jr., and Osteen, K.G. (2001). Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biology of reproduction* 64, 1285-1296.

Das, R., Mahabeleshwar, G.H., and Kundu, G.C. (2003). Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 28593-28606.

Denhardt, D.T., Giachelli, C.M., and Rittling, S.R. (2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, 723-749.

Desai, B., Rogers, M.J., and Chellaiah, M.A. (2007). Mechanisms of

osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Molecular cancer* 6, 18.

Dueholm, M., and Lundorf, E. (2007). Transvaginal ultrasound or MRI for diagnosis of adenomyosis. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 19, 505-512.

El-Tanani, M.K., Campbell, F.C., Kurisetty, V., Jin, D., McCann, M., and Rudland, P.S. (2006). The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 17, 463-474.

Farquhar, C. (2002). Endometriosis. *Clinical evidence*, 1654-1662.

Fedarko, N.S., Jain, A., Karadag, A., and Fisher, L.W. (2004). Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *Faseb J* 18, 734-736.

Ferrero, S., Abbamonte, L.H., Anserini, P., Remorgida, V., and Ragni, N. (2005). Future perspectives in the medical treatment of endometriosis. *Obstetrical & gynecological survey* 60, 817-826.

Fujishita, A., Nakane, P.K., Koji, T., Masuzaki, H., Chavez, R.O., Yamabe, T., and Ishimaru, T. (1997). Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertility and sterility* 67, 856-864.

Garlow, J.E., Ka, H., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Jaeger, L.A., and Bazer, F.W. (2002). Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biology of reproduction* 66, 718-725.

Geissinger, E., Weisser, C., Fischer, P., Scharl, M., and Wellbrock, C. (2002). Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer research* 62, 4820-4828.

Girotti, M., and Zingg, H.H. (2003). Gene expression profiling of rat uterus at different stages of parturition. *Endocrinology* 144, 2254-2265.

Goh, J.T., and Hall, B.A. (1992). Postmenopausal endometrioma and hormonal replacement therapy. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 32, 384-385.

Groothuis, P.G., Dassen, H.H., Romano, A., and Punyadeera, C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human reproduction update* 13, 405-417.

Horne, F.M., and Blithe, D.L. (2007). Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Human reproduction*

update 13, 567-580.

Hughes, E., Brown, J., Collins, J.J., Farquhar, C., Fedorkow, D.M., and Vandekerckhove, P. (2007). Ovulation suppression for endometriosis. Cochrane database of systematic reviews (Online), CD000155.

Irwin, J.C., Kirk, D., Gwatkin, R.B., Navre, M., Cannon, P., and Giudice, L.C. (1996). Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. *The Journal of clinical investigation* 97, 438-447.

Jackson, B., and Telner, D.E. (2006). Managing the misplaced: approach to endometriosis. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 52, 1420-1424.

Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bazer, F.W., and Spencer, T.E. (2003a). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biology of reproduction* 69, 1458-1471.

Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Joyce, M.M., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Gray, C.A., and Pfarrer, C. (2003b). Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biology of reproduction* 69, 92-98.

Johnson, G.A., Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Taylor, K.M., Gray, C.A., and Bazer, F.W. (2000). Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biology of reproduction* 62, 1315-1321.

Jones, R.K., Bulmer, J.N., and Searle, R.F. (1995). Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Human reproduction (Oxford, England)* 10, 3272-3279.

Joshi, S.G., Zamah, N.M., Raikar, R.S., Buttram, V.C., Jr., Henriques, E.S., and Gordon, M. (1986). Serum and peritoneal fluid proteins in women with and without endometriosis. *Fertility and sterility* 46, 1077-1082.

Kitawaki, J., Kado, N., Ishihara, H., Koshiba, H., Kitaoka, Y., and Honjo, H. (2002). Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 83, 149-155.

Koninckx, P.R., Barlow, D., and Kennedy, S. (1999). Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecologic and obstetric investigation* 47 Suppl 1, 3-9; discussion 9-10.

- Konno, R., Fujiwara, H., Netsu, S., Odagiri, K., Shimane, M., Nomura, H., and Suzuki, M. (2007). Gene expression profiling of the rat endometriosis model. *Am J Reprod Immunol* 58, 330-343.
- Kyama, C.M., T'Jampens, D., Mihalyi, A., Simsa, P., Debrock, S., Waelkens, E., Landuyt, B., Meuleman, C., Fulop, V., Mwenda, J.M., *et al.* (2006). ProteinChip technology is a useful method in the pathogenesis and diagnosis of endometriosis: a preliminary study. *Fertility and sterility* 86, 203-209.
- Lessey, B.A. (2002a). Adhesion molecules and implantation. *Journal of reproductive immunology* 55, 101-112.
- Lessey, B.A. (2002b). Implantation defects in infertile women with endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 955, 265-280; discussion 293-265, 396-406.
- Matarese, G., De Placido, G., Nikas, Y., and Alviggi, C. (2003). Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends in molecular medicine* 9, 223-228.
- Medico, E., Gentile, A., Lo Celso, C., Williams, T.A., Gambarotta, G., Trusolino, L., and Comoglio, P.M. (2001). Osteopontin is an autocrine mediator of hepatocyte growth factor-induced invasive growth. *Cancer research* 61, 5861-5868.
- Mocellin, S., Costa, R., and Nitti, D. (2006). RNA interference: ready to silence cancer? *J Mol Med* 84, 4-15.
- Nothnick, W.B. (2001). Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertility and sterility* 76, 223-231.
- Odagiri, K., Konno, R., Fujiwara, H., Netsu, S., Ohwada, M., Shibahara, H., and Suzuki, M. (2007). Immunohistochemical study of osteopontin and l-selectin in a rat endometriosis model and in human endometriosis. *Fertility and sterility* 88,(Suppl 2):1207–11.
- Oldberg, A., Franzen, A., and Heinegard, D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 8819-8823.
- Olive, D.L., Lindheim, S.R., and Pritts, E.A. (2004). New medical treatments for endometriosis. *Best practice & research* 18, 319-328.
- Omigbodun, A., Ziolkiewicz, P., Tessler, C., Hoyer, J.R., and Coutifaris, C. (1997). Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology* 138, 4308-4315.

- Panda, D., Kundu, G.C., Lee, B.I., Peri, A., Fohl, D., Chackalaparampil, I., Mukherjee, B.B., Li, X.D., Mukherjee, D.C., Seides, S., *et al.* (1997). Potential roles of osteopontin and alphaVbeta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 9308-9313.
- Philip, S., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2001). Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* *276*, 44926-44935.
- Poliness, A.E., Healey, M.G., Brennecke, S.P., and Moses, E.K. (2004). Proteomic approaches in endometriosis research. *Proteomics* *4*, 1897-1902.
- Prince, C.W., Oosawa, T., Butler, W.T., Tomana, M., Bhowan, A.S., Bhowan, M., and Schrohenloher, R.E. (1987). Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *The Journal of biological chemistry* *262*, 2900-2907.
- Rangaswami, H., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2004). Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *The Journal of biological chemistry* *279*, 38921-38935.
- Rangaswami, H., Bulbule, A., and Kundu, G.C. (2006). Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends in cell biology* *16*, 79-87.
- Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Schmitt, F.L., Paulsson, M., and Lindmark-Mansson, H. (2007). The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *16*, 1087-1097.
- Senger, D.R., Wirth, D.F., and Hynes, R.O. (1979). Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* *16*, 885-893.
- Shaco-Levy, R., Sharabi, S., Benharroch, D., Piura, B., and Sion-Vardy, N. (2008). Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and beta-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*.
- Shapses, S.A., Cifuentes, M., Spevak, L., Chowdhury, H., Brittingham, J.,

Boskey, A.L., and Denhardt, D.T. (2003). Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcified tissue international* 73, 86-92.

Shevde, L.A., Samant, R.S., Paik, J.C., Metge, B.J., Chambers, A.F., Casey, G., Frost, A.R., and Welch, D.R. (2006). Osteopontin knockdown suppresses tumorigenicity of human metastatic breast carcinoma, MDA-MB-435. *Clin Exp Metastasis* 23, 123-133.

Singhal, H., Bautista, D.S., Tonkin, K.S., O'Malley, F.P., Tuck, A.B., Chambers, A.F., and Harris, J.F. (1997). Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 3, 605-611.

Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 279-303.

Takafuji, V., Forgues, M., Unsworth, E., Goldsmith, P., and Wang, X.W. (2007). An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 26, 6361-6371.

Teramoto, H., Castellone, M.D., Malek, R.L., Letwin, N., Frank, B., Gutkind, J.S., and Lee, N.H. (2005). Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. *Oncogene* 24, 489-501.

Tuck, A.B., Hota, C., Wilson, S.M., and Chambers, A.F. (2003). Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene* 22, 1198-1205.

von Wolff, M., Strowitzki, T., Becker, V., Zepf, C., Tabibzadeh, S., and Thaler, C.J. (2001). Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertility and sterility* 76, 775-781.

Wai, P.Y., Guo, L., Gao, C., Mi, Z., Guo, H., and Kuo, P.C. (2006). Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery* 140, 132-140.

Wai, P.Y., and Kuo, P.C. (2004). The role of Osteopontin in tumor metastasis. *The Journal of surgical research* 121, 228-241.

Wai, P.Y., and Kuo, P.C. (2008). Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 27, 103-118.

Wai, P.Y., Mi, Z., Guo, H., Sarraf-Yazdi, S., Gao, C., Wei, J., Marroquin, C.E., Clary, B., and Kuo, P.C. (2005). Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon

adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis* 26, 741-751.

Weber, G.F. (2001). The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* 1552, 61-85.

Wenzl, R.J., and Heinzl, H. (1998). Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecologic and obstetric investigation* 45, 253-257.

White, F.J., Burghardt, R.C., Hu, J., Joyce, M.M., Spencer, T.E., and Johnson, G.A. (2006). Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction (Cambridge, England)* 132, 919-929.

Wu, Y., Denhardt, D.T., and Rittling, S.R. (2000). Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *British journal of cancer* 83, 156-163.

Xie, Z., Singh, M., Siwik, D.A., Joyner, W.L., and Singh, K. (2003). Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *The Journal of biological chemistry* 278, 48546-48552.

Yang, W.C., Chen, H.W., Au, H.K., Chang, C.W., Huang, C.T., Yen, Y.H., and Tzeng, C.R. (2004). Serum and endometrial markers. *Best practice & research* 18, 305-318.

Yoon, H.J., Kyung, M.S., Jung, U.S., and Choi, J.S. (2007). Laparoscopic myomectomy for large myomas. *Journal of Korean medical science* 22, 706-712.

Zhang, H., Niu, Y., Feng, J., Guo, H., Ye, X., and Cui, H. (2006). Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertility and sterility* 86, 274-282.

Zohar, R., Zhu, B., Liu, P., Sodek, J., and McCulloch, C.A. (2004). Increased cell death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *American journal of physiology* 287, H1730-1739.



第六章 圖表

Table 1. 本研究中所使用的引子 DNA oligonucleotides 序列。

primer	Sequence(5' → 3')
<i>β</i> -actin forward	5'-CGGATGTCCACGTCACACTT-3'
reverse	5'-GTTGCTATCCAGGCTGTGCT-3'
GAPDH forward	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT- 3'
reverse	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC- 3'
OPN forward	5'-GGATCCCTCACTACCATGAG- 3'
reverse	5'-AAGCTTGACCTCAGAAGATGCACT- 3'



Table 2. 本研究所使用 siRNA OPN single stranded RNA oligonucleotide。

siRNA primer	Sequence(5' → 3')
siRNA 1	5'-GGUCAAAAUCUAAGAAAGUUt-3' 5'-AACUUCUUAGAUUUUGACc-3'
siRNA 2	5'-GGAGUUGAAUGGUGCAUAct-3' 5'-GUAUGCACCAUUCAACUCc-3'



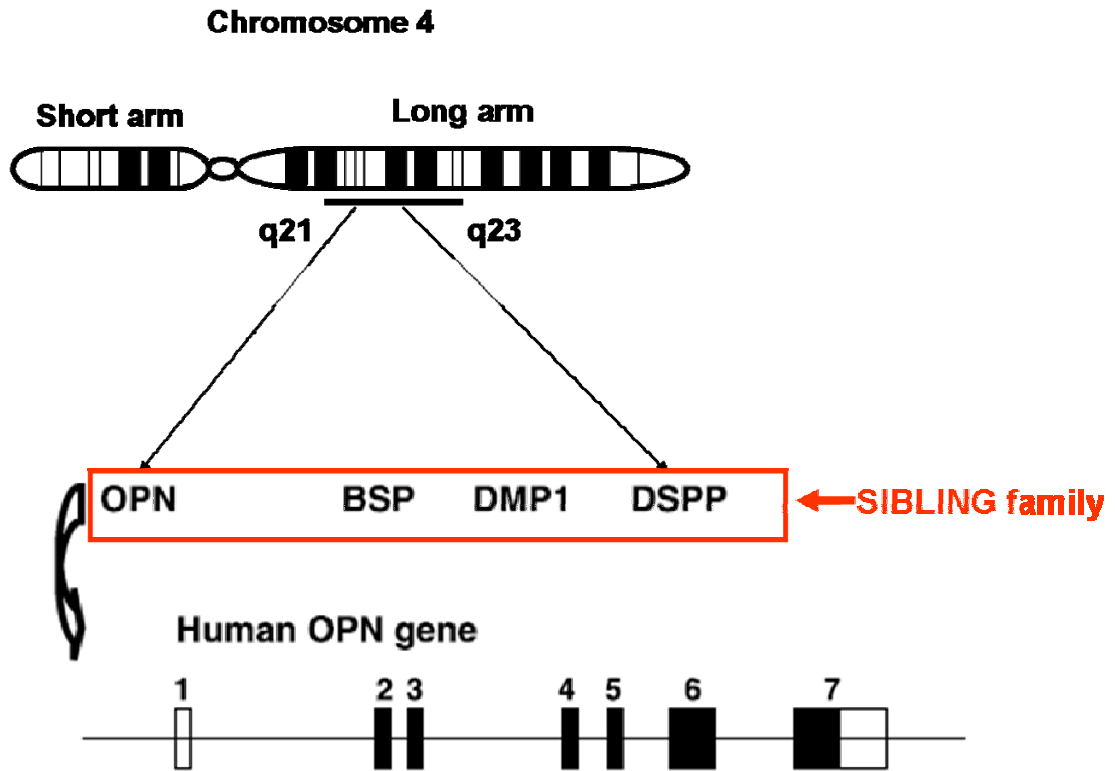
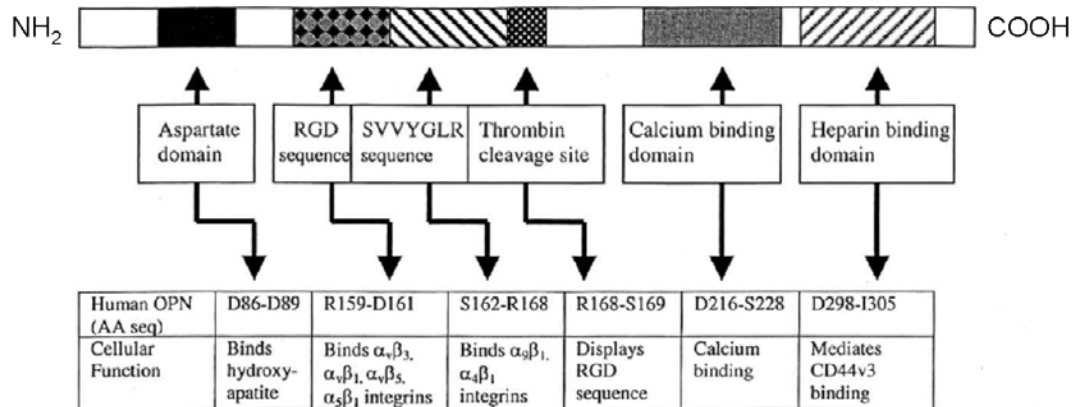


Figure 1. SIBLING family 基因的染色體位置與人類骨橋蛋白的基因結構(Rodrigues et al., 2007)。人類 OPN 基因位於染色體 4 長臂 q21-q23，屬於 SIBLING family，其基因共含 7 個 exon。

A



B

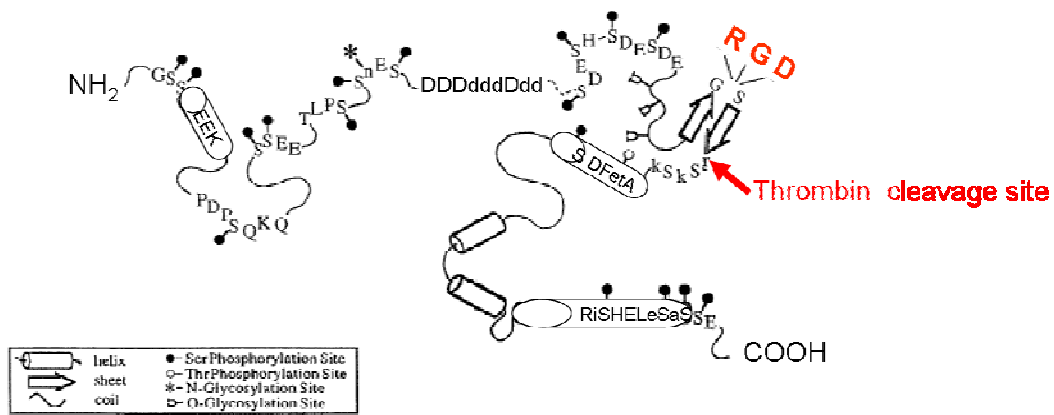


Figure 2. 骨橋蛋白 functional domain. A圖為R159~D161可與 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_5$ 等結合，D298~S305為CD44結合區域(Wai and Kuo, 2004)。B圖為骨橋蛋白基本組成，包含integrin結合位置，thrombin蛋白酶切割的位置，RGD分別為arginine-glycine-aspartate (Johnson et al., 2003a)。

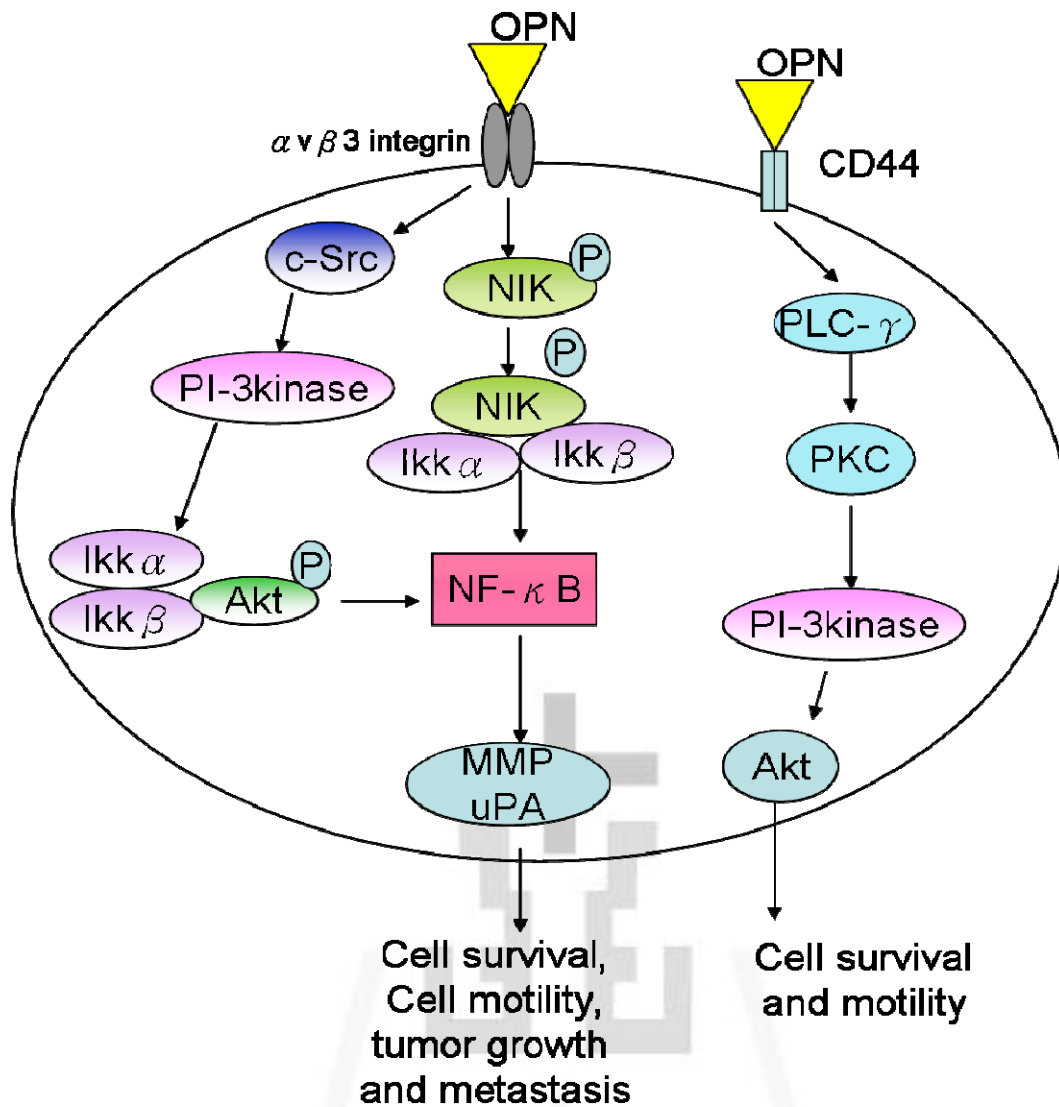


Figure 3. 骨橋蛋白於細胞中有不同的訊息傳遞路徑。可經由與細胞膜上的 $\alpha v \beta 3$ integrin或 CD44結合活化不同的訊息傳遞，來促進細胞移行、腫瘤生長及轉移(Rangaswami et al., 2006) 。NIK : nuclear factor inducing kinase , PI-3k : phosphatidylinositol 3- kinase , NF- κ B : nuclear-factor kappa-B , MMP : matrix metalloproteinase , uPA : urokinase plasminogen activator 。

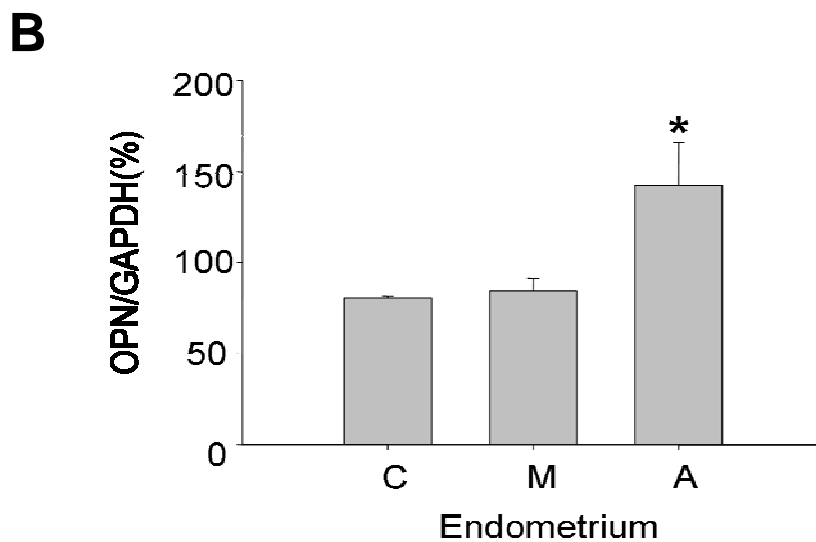
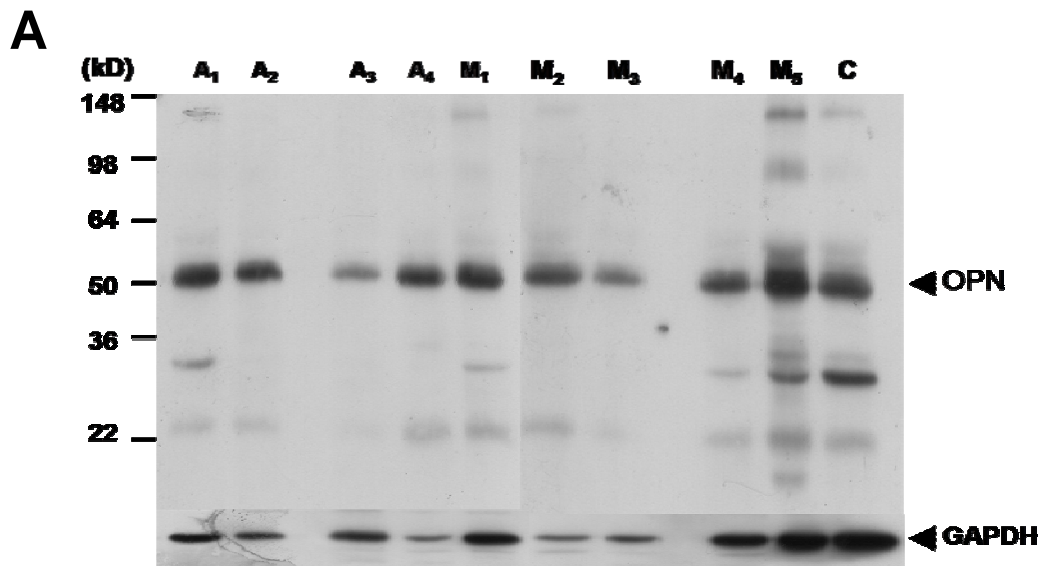


Figure 4. 子宮內膜組織中 OPN 的含量。由我們收集 25 位患有子宮內膜、肌瘤、腺肌症的正位子宮內膜組織 (eutopic endometrium)，利用西方墨點法來測定組織中 OPN 的含量，OPN 有主要的三種分子量分別為 50、32、25 kD 的 OPN (圖 A)。以 50 kD OPN 進行定量分析，發現在異位組織中的 OPN 有較高的表現量，C: Control (endometrium hyperplasia)，M: myoma，A: adenomyosis。以 *t*-Test 統計運算 $*p < 0.05$ 。

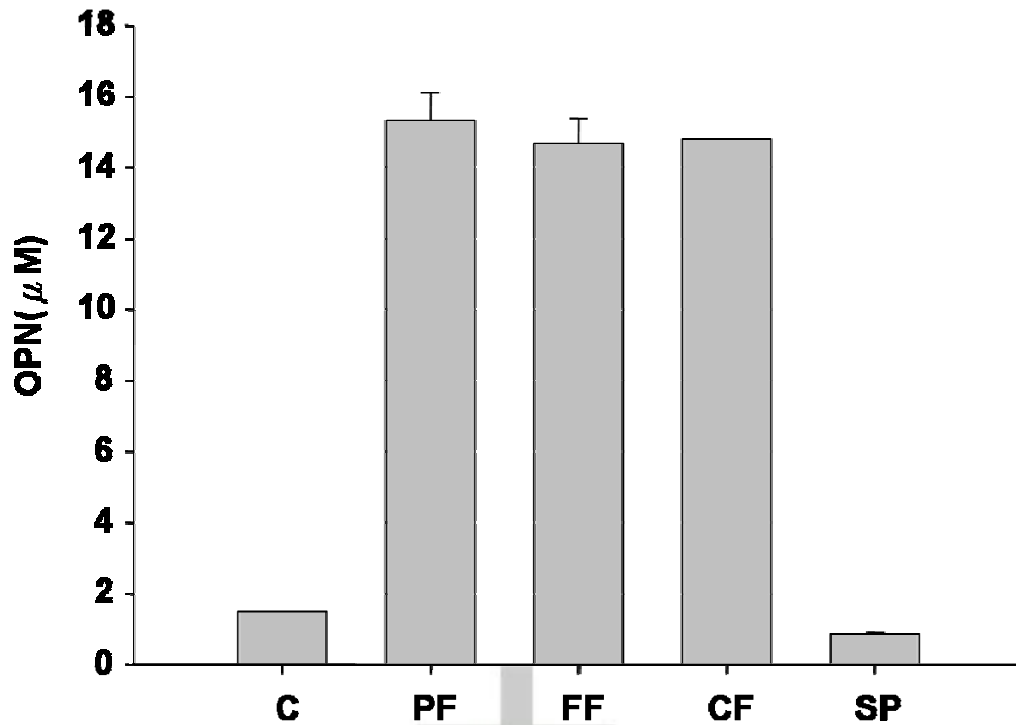


Figure 5.在子宮內膜異位病患的腹膜液、濾泡液及巧克力囊腫液中 OPN 定量。我們利用西方墨點法作成量化圖，使用 0.5 μ g/ml recombinant OPN 為 Control，與病患體內的腹膜液(n=5)、濾泡液(n=3)及巧克力囊腫濾泡液中 OPN 含量作比較。此外，我們同時測定精漿 OPN 含量，用以比對。我們發現病患體內的腹膜液、濾泡液及巧克力囊腫體液明顯有大量 OPN 表現。PF 為 peritoneal fluid, FF 為 follicle fluid, CF 為 chocolate cyst fluid, SP 為 seminal plasma。

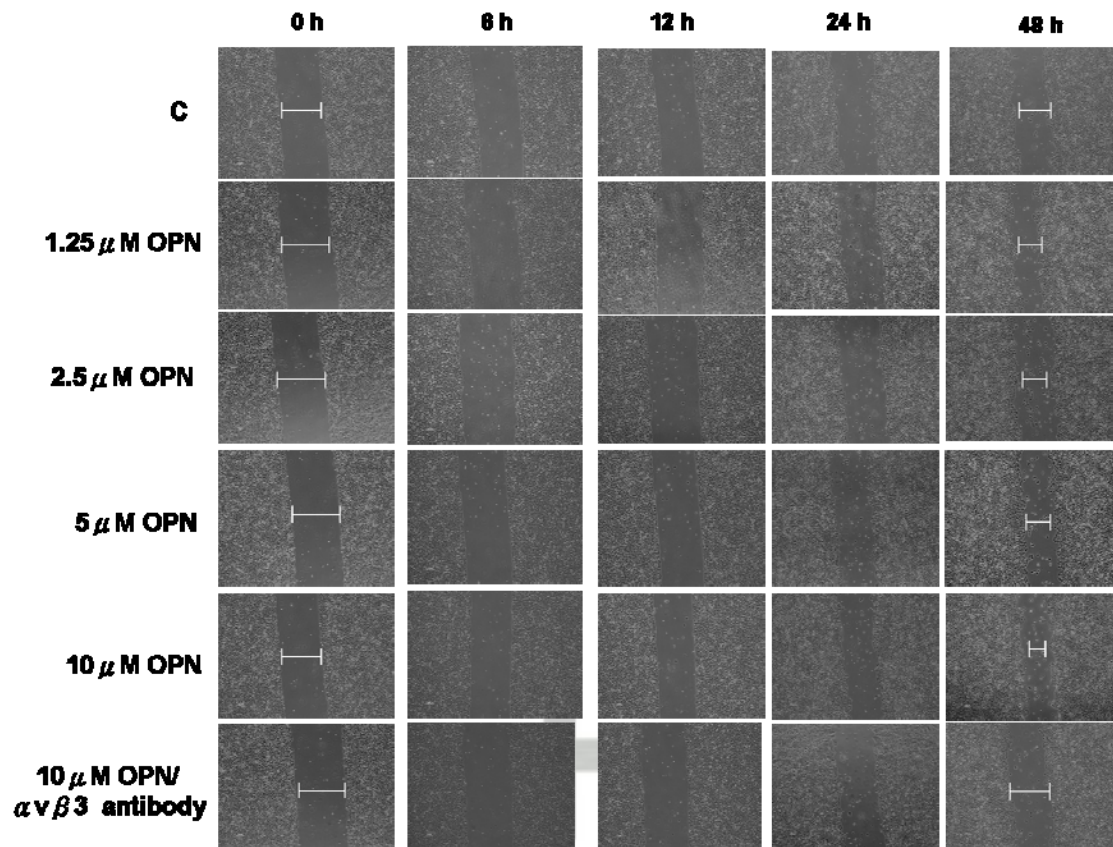


Figure 6. OPN 對子宮內膜細胞移行能力 (migration) 的影響。 利用 Scratch wound assay 方法來觀察子宮內膜 HEC-1A 細胞移行。我們發現 HEC-1A 細胞的移行能力會隨著不同濃度的 OPN 刺激或處理時間而增加。另外，我們以 500 ng/ml α v β 3 integrin 的抑制劑進行分析，發現 anti- α v β 3 antibody 會減緩或抑制由 OPN 引發的細胞移行能力。

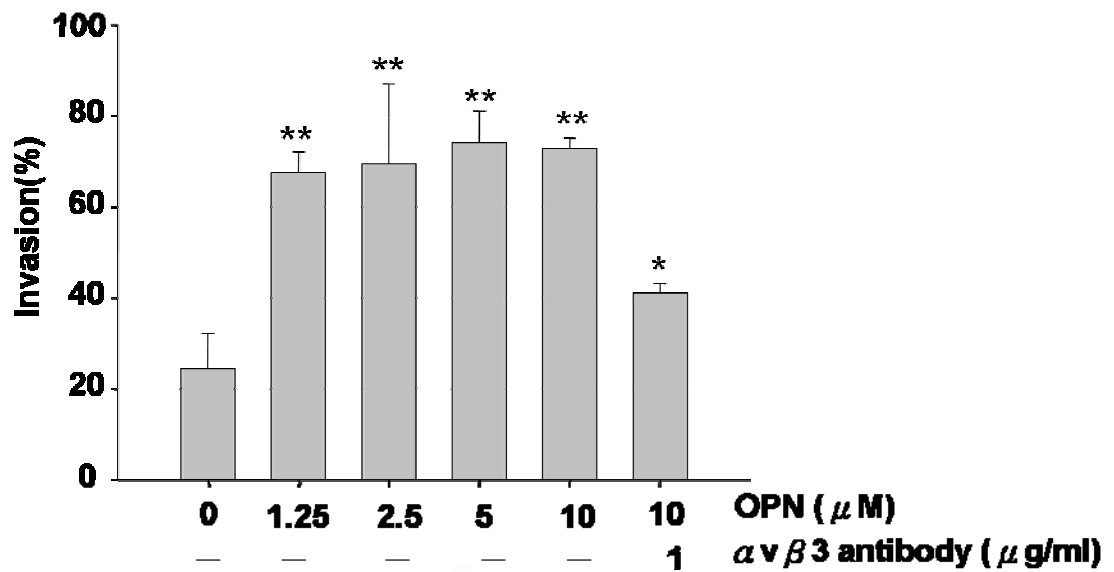


Figure 7. OPN 對子宮內膜細胞入侵能力 (invasion) 的影響。我們使用 BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber 來定量 OPN 入侵的能力。我們發現當 HEC-1A 細胞於不同濃度的 OPN 刺激下，皆增加其入侵的能力。另外，我們當以 1 μ g/ml α v β 3 integrin 的抑制劑 (Anti- α v β 3 antibody) 進行處理，發現 α v β 3 integrin 的抑制劑會減緩或抑制入侵能力。數值以 mean \pm SD (standard deviation), n=3。* p <0.05，** p <0.01。

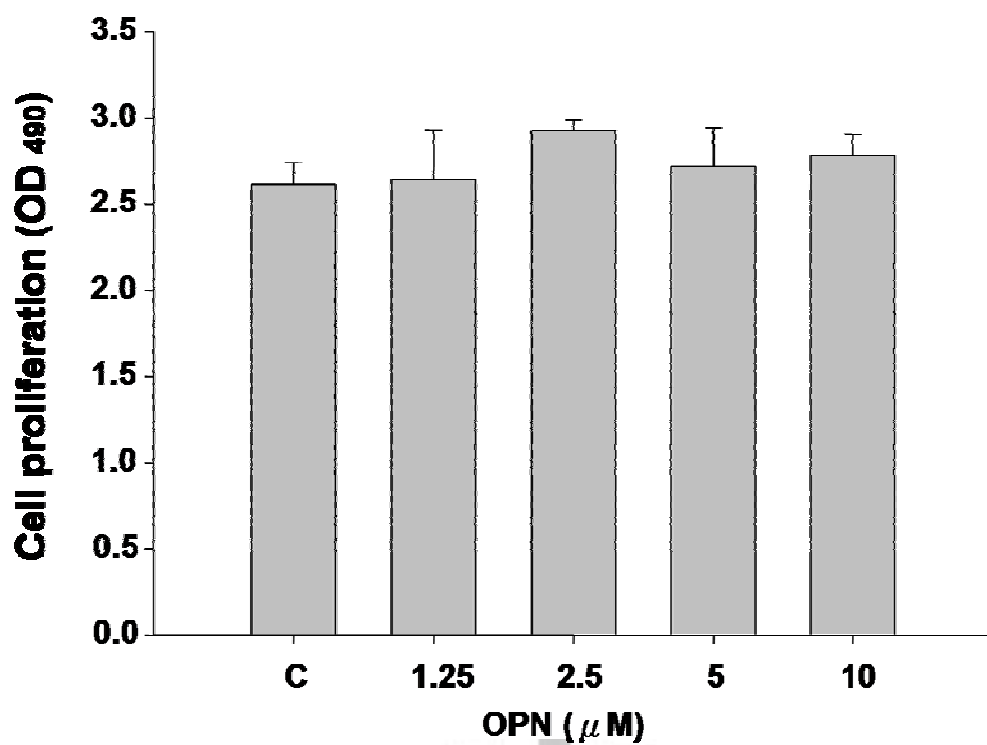


Figure 8. OPN對cell proliferation的影響。利用MTS assay來測定OPN對cell proliferation的影響。我們發現當HEC-1A細胞於不同濃度的OPN刺激下，隨著OPN濃度增加時細胞並無明顯增生現象。數值以mean \pm SD (standard deviation), n=3, C為control。

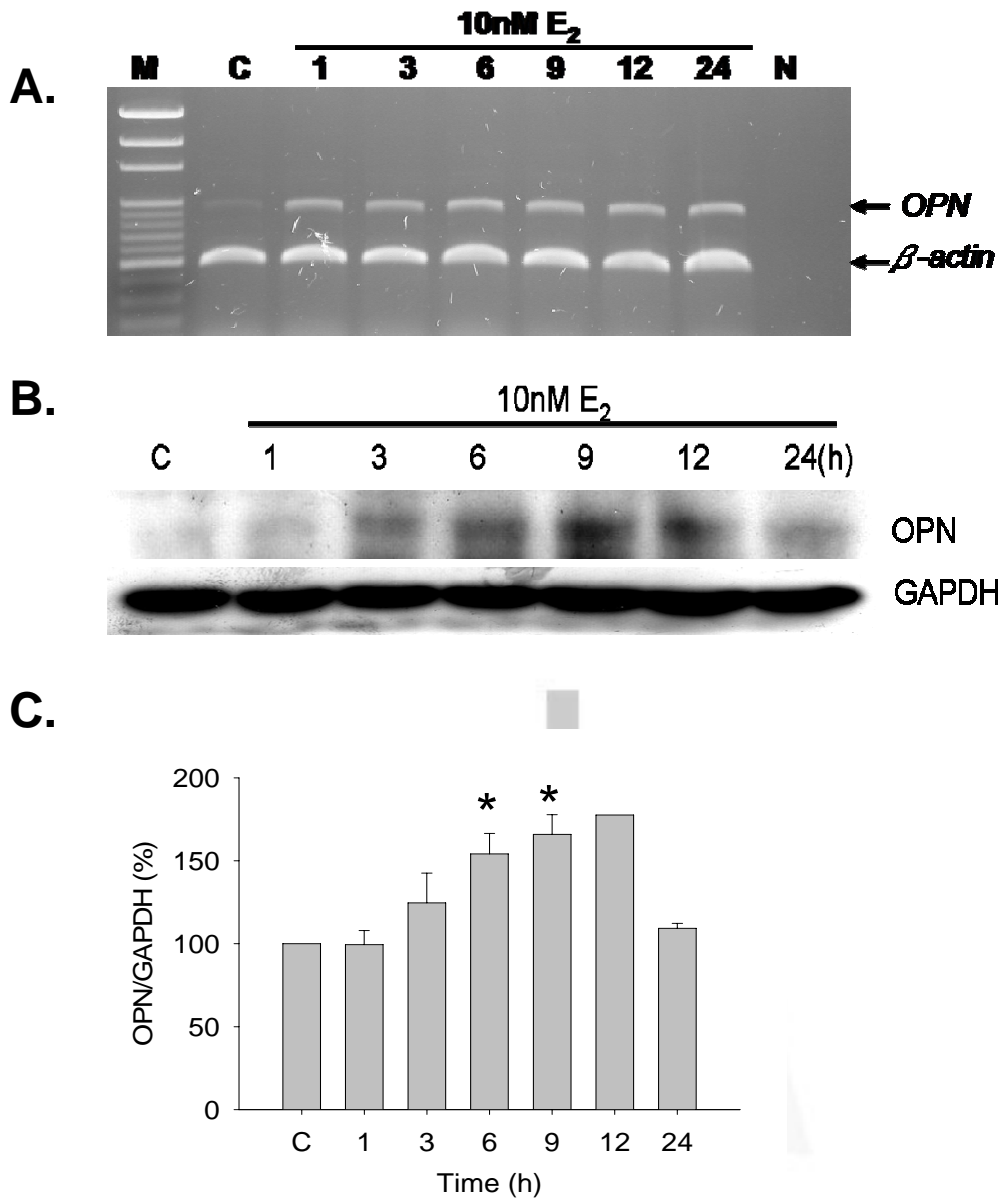


Figure 9. 雌激素對子宮內膜細胞OPN表達的影響。A圖利用RT-PCR來分析HEC-1A細胞經由10nM E_2 於不同作用時間處理，我們發現OPN mRNA的表達會隨著刺激的時間增加而表現增加，OPN RT-PCR的產物為908bp， β -actin的產物為450bp。B圖以西方墨點法來觀察HEC-1A細胞經由10nM E_2 不同時間作用後，OPN蛋白質的表達以6小時有顯著性的增加，OPN為50kD，GAPDH為37 kD。C圖為圖B的量化圖(n=3) * $p < 0.05$ 。

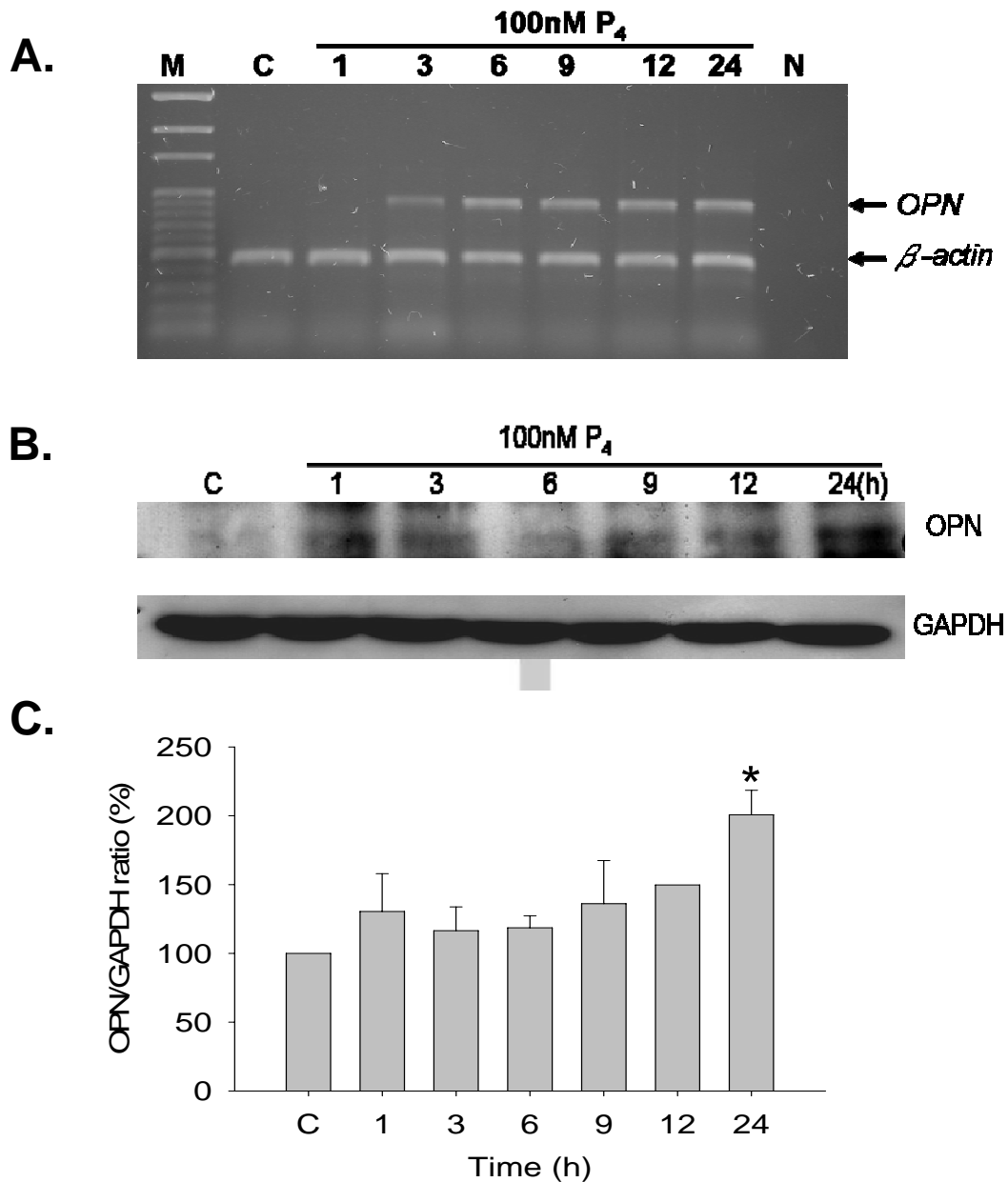


Figure 10. 黃體素對子宮內膜細胞OPN表達的影響。A圖利用RT-PCR來觀察HEC-1A細胞經由100 nM P_4 於不同作用時間處理，我們發現OPN mRNA的表達會隨著作用時間的增加而增加表現。B圖以西方墨點法來定量細胞經由100 nM P_4 處理後OPN表達的變化，結果發現於24小時作用後OPN有顯著性的增加。C圖為圖B的量化圖(n=3)
* $p < 0.05$ 。

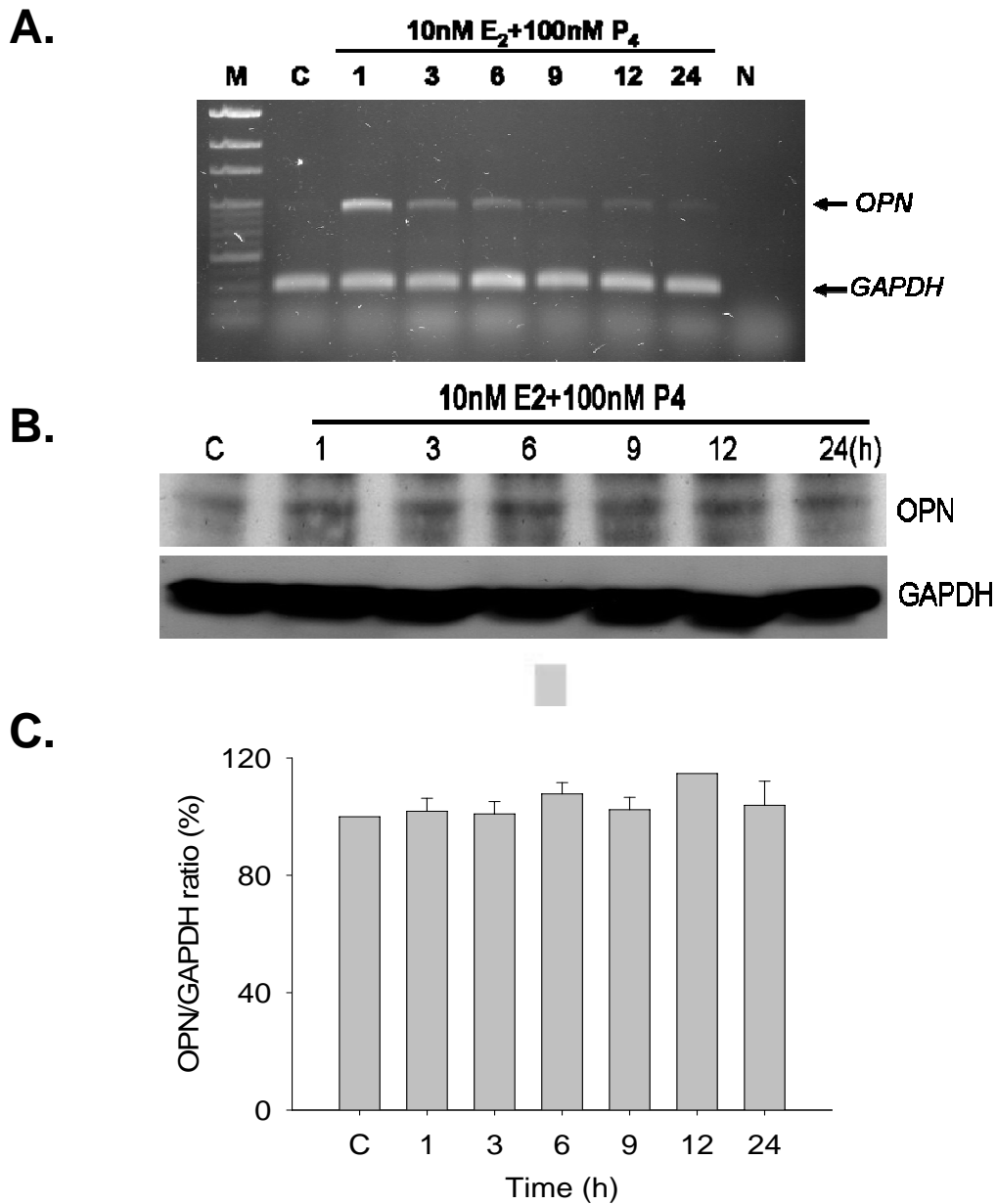


Figure 11. 雌激素及黃體素對內膜細胞OPN表達的影響。A圖利用RT-PCR來測定OPN mRNA 的含量。我們取用 1×10^6 HEC-1A細胞經由10nM E₂與100 nM P₄共同添加並作用於不同時間後，我們發現OPN mRNA的表達會隨著刺激的時間增加而表現增加。B圖以西方墨點法來OPN含量，結果顯示OPN蛋白質表達未隨著作用時間的增加而增加。C圖為圖B的量化圖。

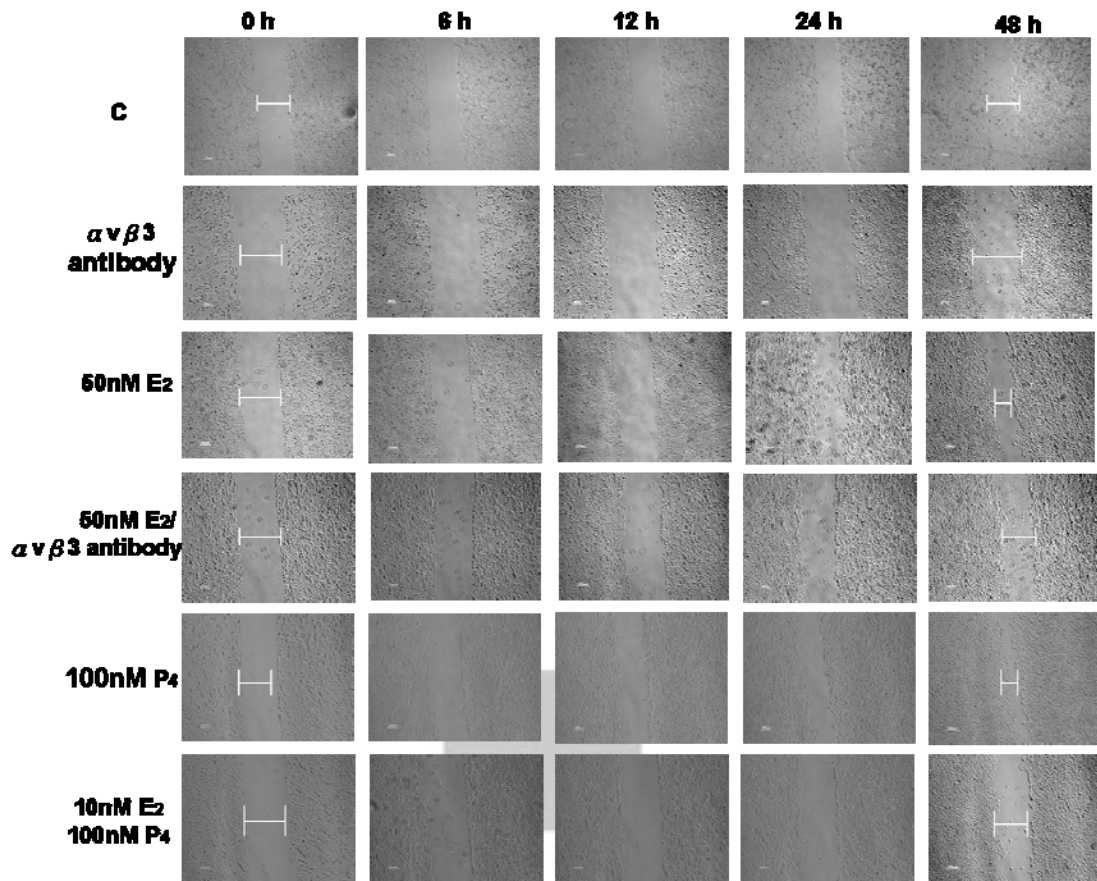


Figure 12. 雌激素與黃體素對子宮內膜細胞移行能力的影響。利用 Scratch wound assay 方法來觀察 HEC-1A 細胞移行能力。當細胞於 50 nM E₂ 作用下，具有移行的能力。另外，我們用 500ng/ml αvβ3 integrin 的抑制劑會減緩或抑制移行能力。當細胞於 100nM P₄ 刺激下，細胞的移行能力增加。另外，經由 10nM E₂ 與 100nM P₄ 共同作用下，細胞的移行現象減緩。

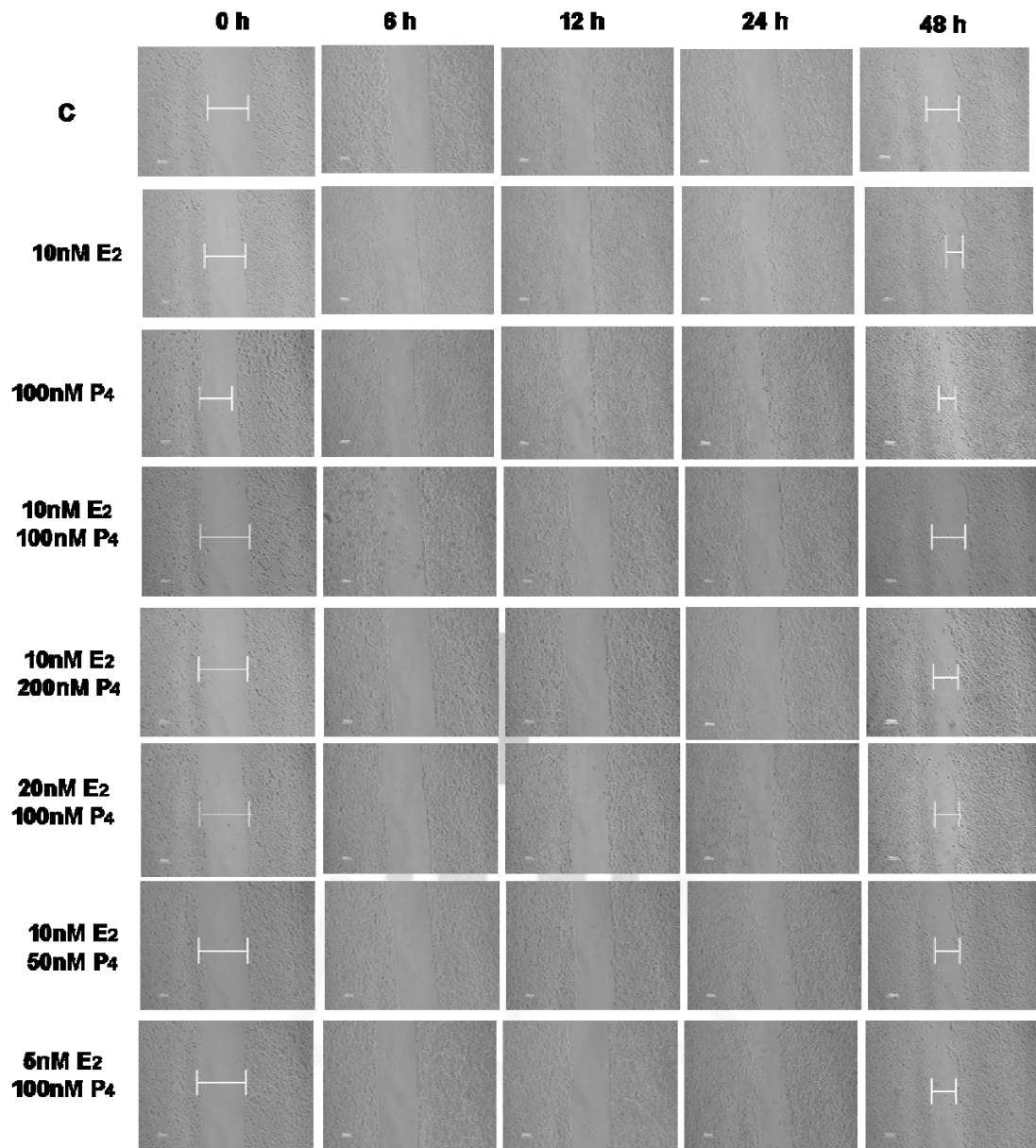


Figure 13.不同濃度的雌激素與黃體素對子宮內膜細胞移行能力的影響。利用Scratch wound assay方法來觀察HEC-1A細胞移行。我們使用不同配比的E₂和P₄分別培養細胞至48小時。結果顯示除10nM E₂和100nM P₄共同作用後，細胞無明顯移行現象，其餘各組不同E₂/P₄配比的作用，皆使細胞產生移行。

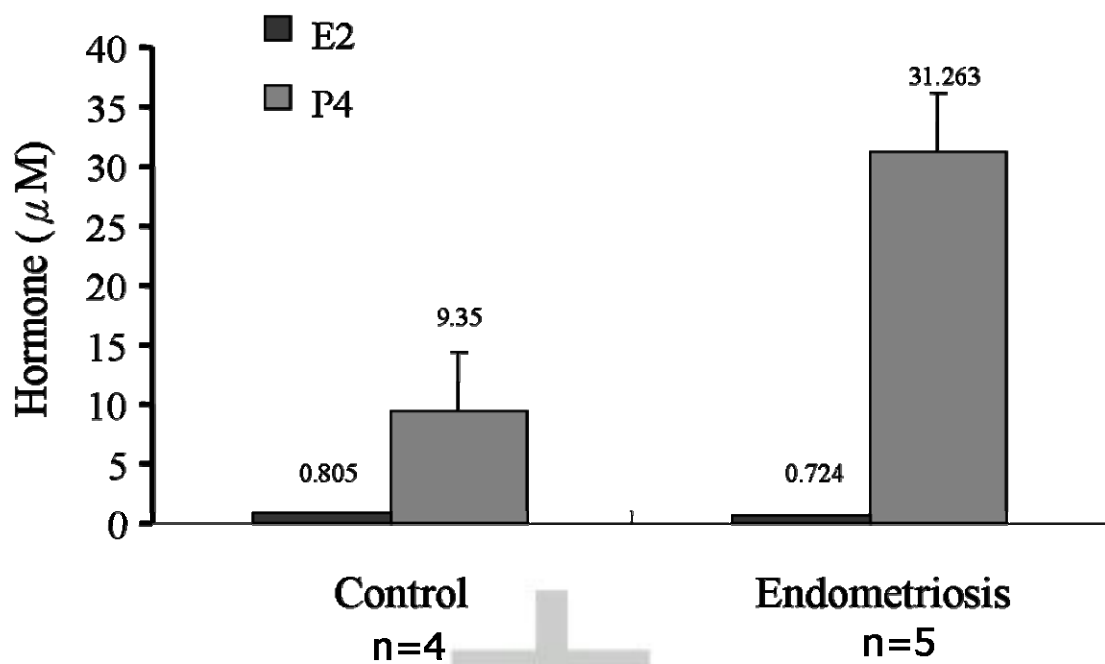


Figure 14. 在子宮內膜異位患者與正常人濾泡液中E₂和P₄含量比例。我們收集不同患有子宮內膜異位患者經超排卵後的濾泡液，並以RIA來測定E₂和P₄的濃度。control為對照組(正常女性)，endometriosis為子宮內膜異位。

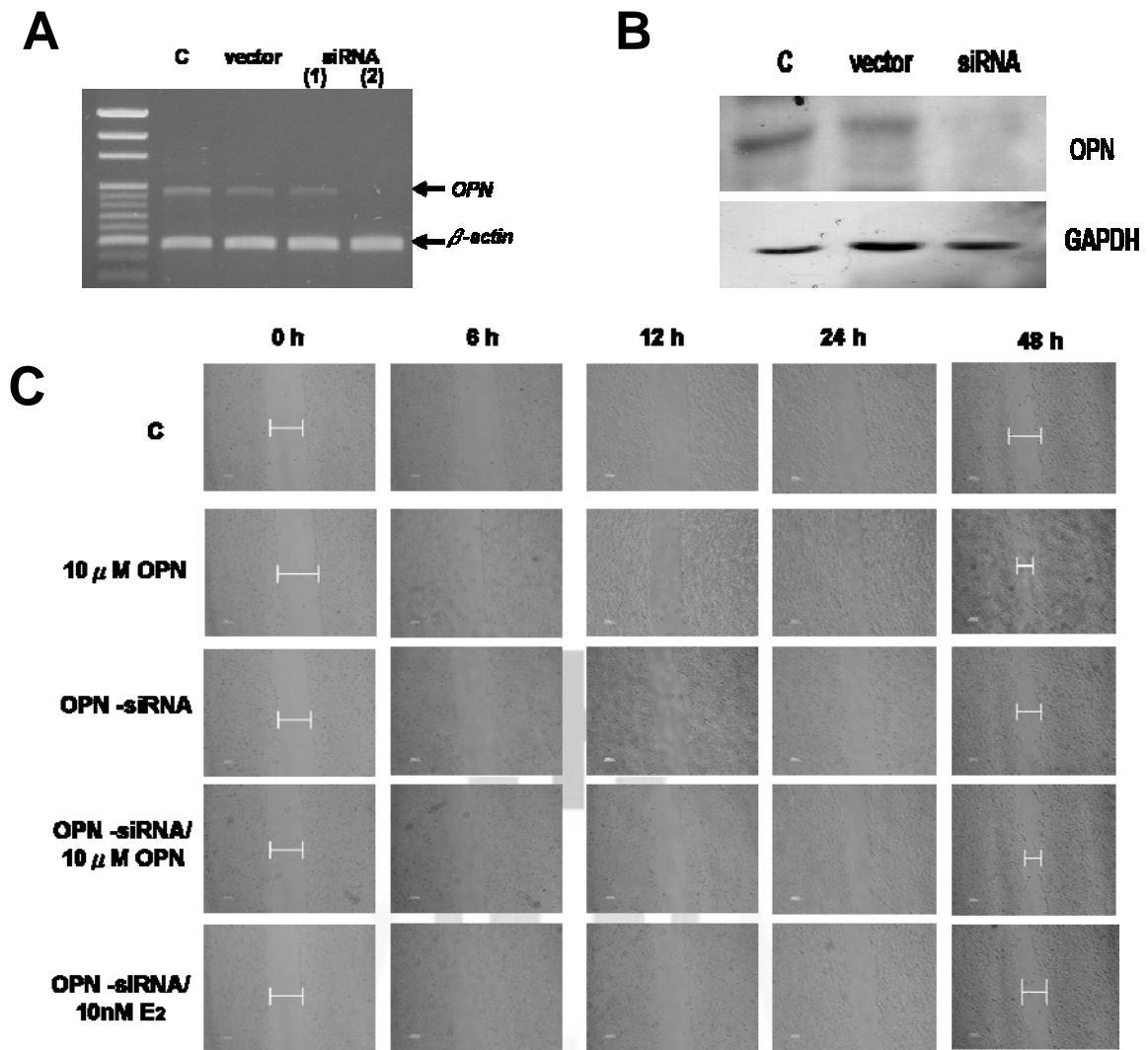


Figure 15. OPN siRNA對細胞移行的影響。 HEC-1A細胞進行OPN knockdown 試驗，利用RT-PCR(A圖)及Western blot(B圖)來確認細胞內OPN表現konckdown的可信度，*OPN* RT-PCR的產物為908bp， *β -actin* RT-PCR的產物為450bp。C圖則利用Scratch wound assay方法來觀察HEC-1A其細胞移行能力的影響。我們觀察於OPN knockdown細胞或是OPN konckdown細胞繼續添加10 μ M OPN或10nM E₂。A圖siRNA(1)、siRNA (2) RNA序列於Table 2。

C	E ₂	P ₄	E ₂ +P ₄	OPN-siRNA/E ₂
[Blurred content]				

Figure 16. Conditioned medium 中 Secreted OPN 的含量。 我們收集各組不同添加物作用24小時後，各組別的conditioned medium，利用西方墨點法來觀察是否含有分泌型OPN。當細胞在以10nM E₂、100nM P₄刺激24小時後，有secreted OPN表現。經由10nM E₂、100nM P₄共同作用或是細胞內的OPN knockdown後加入10nM E₂，會secreted OPN表現亦有減少的現象。

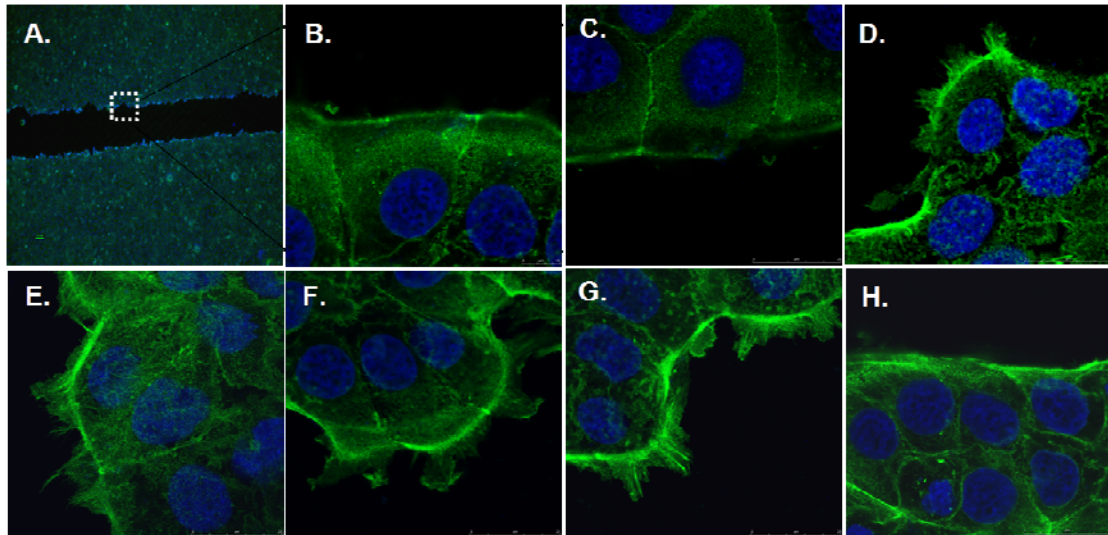


Figure 17. OPN 對 HEC-1A 細胞中 actin 分佈的影響。我們將細胞以不同濃度的 OPN 作用 24 小時後，利用 Scratch wound assay 和免疫螢光染色的方法和共軛焦顯微鏡來觀察細胞中 actin 的分佈情形。我們使用 Phalloidin (A12373) 與細胞內的 actin 結合(綠色螢光)，另外使用 DAPI (藍色螢光) 來標定細胞核的位置。A 為 40 倍率下觀察，B~H 為 1000 倍率下觀察。A 及 B 為 Control 組，C 為添加 500ng/ml anti- α v β 3 antibody，D-G 分別為 1.25 μ M、2.5 μ M OPN、5 μ M OPN 和 10 μ M OPN，H 為 10 μ M OPN+ 500ng/ml anti- α v β 3 antibody。當細胞經由不同濃度的 OPN 處理 24 小時後，細胞具有移行能力之外也會產生 actin remodeling (polymerization)，但當加入 α v β 3 integrin antibody 會減緩或抑制此現象。

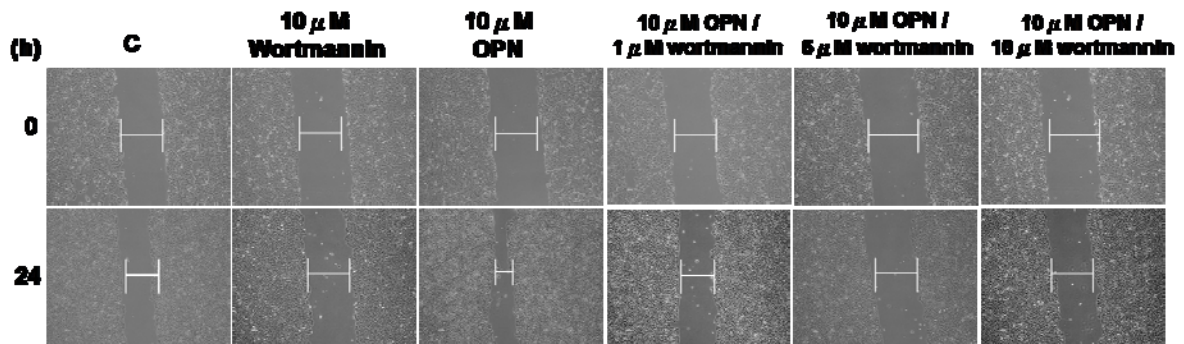


Figure 18. Wortmannin (PI-3k inhibitor) 對由 OPN 引發子宮內膜細胞移行能力 (migration) 的影響。利用 Scratch wound assay 方法來觀察子宮內膜 HEC-1A 細胞的移行能力。在 1 μ M Wortmannin 處理 2 小時後，細胞仍具移行的能力。但經由 5 μ M 或 10 μ M Wortmannin 處理 2 小時後，則減緩或抑制由 OPN 引發的細胞移行能力。

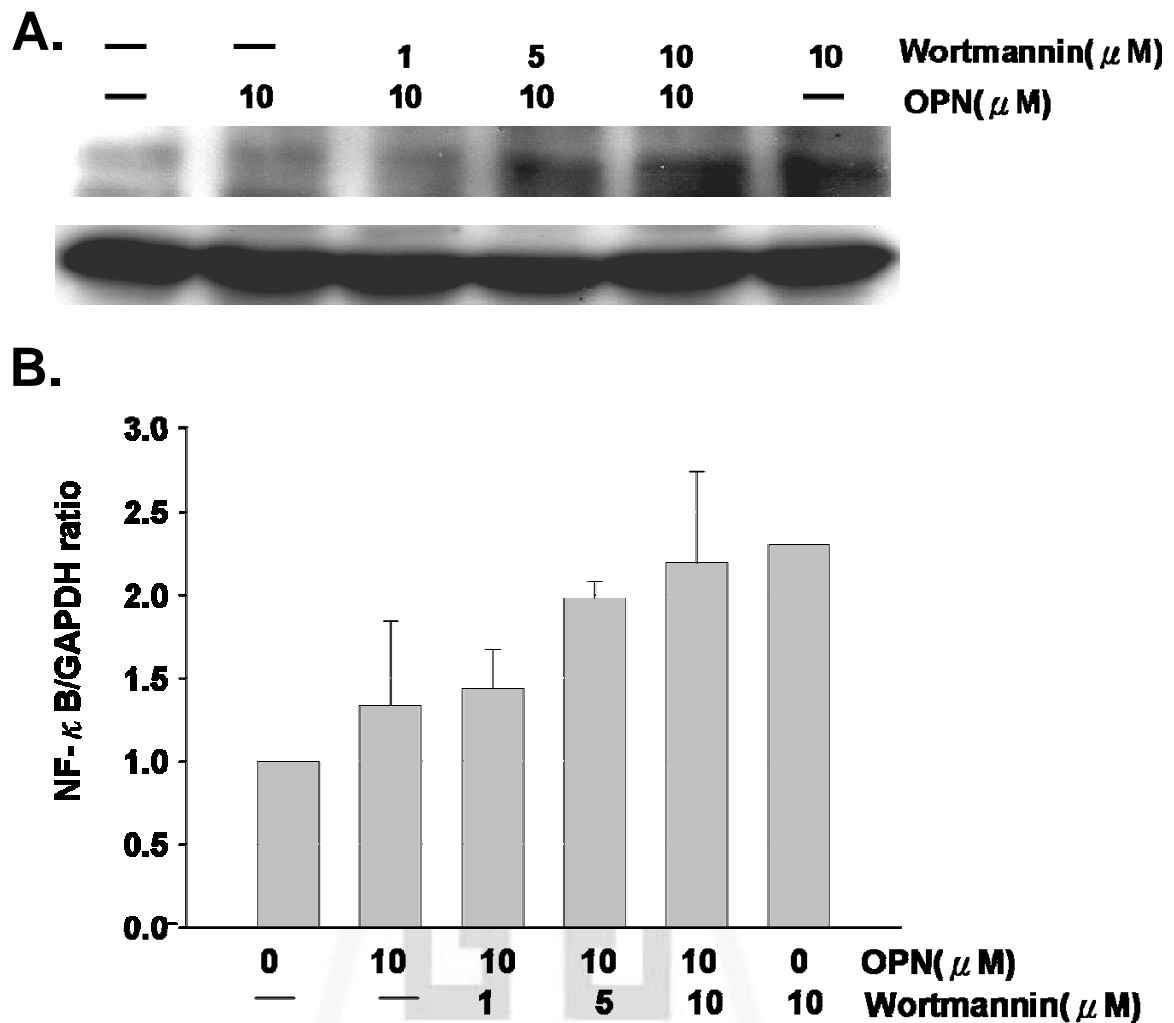


Figure 19. Wortmannin (PI-3k inhibitor) 對由 OPN 引發子宮內膜細胞於 NF- κ B 訊息傳遞路徑的影響。A 圖將細胞以不同濃度的 Wortmannin (PI-3k inhibitor) 作用 2 小時後，再加入 10 μ M OPN，利用西方墨點法來觀察細胞內 NF- κ B 的表現。B 圖為圖 A 的量化圖 (n=2)。HEC-1A 細胞前處理 5 μ M 和 10 μ M 的 Wortmannin 2 小時，再加入 10 μ M OPN 24 小時後，細胞內的 NF- κ B 蛋白質表現增加。

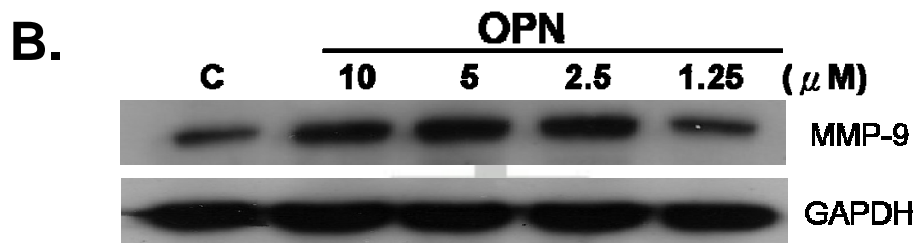
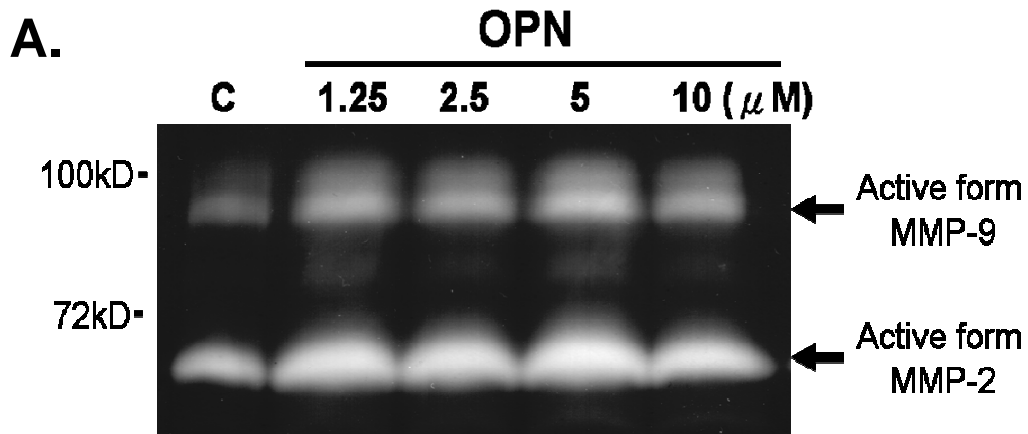


Figure 20. OPN 會促進子宮內膜細胞產生 MMP-2 和 MMP-9 活性增加。A 圖在 5×10^5 HEC-1A 細胞使用不同濃度 OPN 處理 24 小時後，將 conditioned medium 收下後，利用 Gelatin zymography 方法測定細胞內 MMP-2 及 MMP-9，發現 HEC-1A 細胞經由不同濃度 OPN 處理 24 小時後，conditioned medium 中具有 active form MMP-2 (68 kD) 和 MMP-9 (86 kD)。B 圖利用西方墨點法來觀察使用不同濃度 OPN 處理 24 小時後，cell lysate 內 MMP-9 (92kD) 的表現。

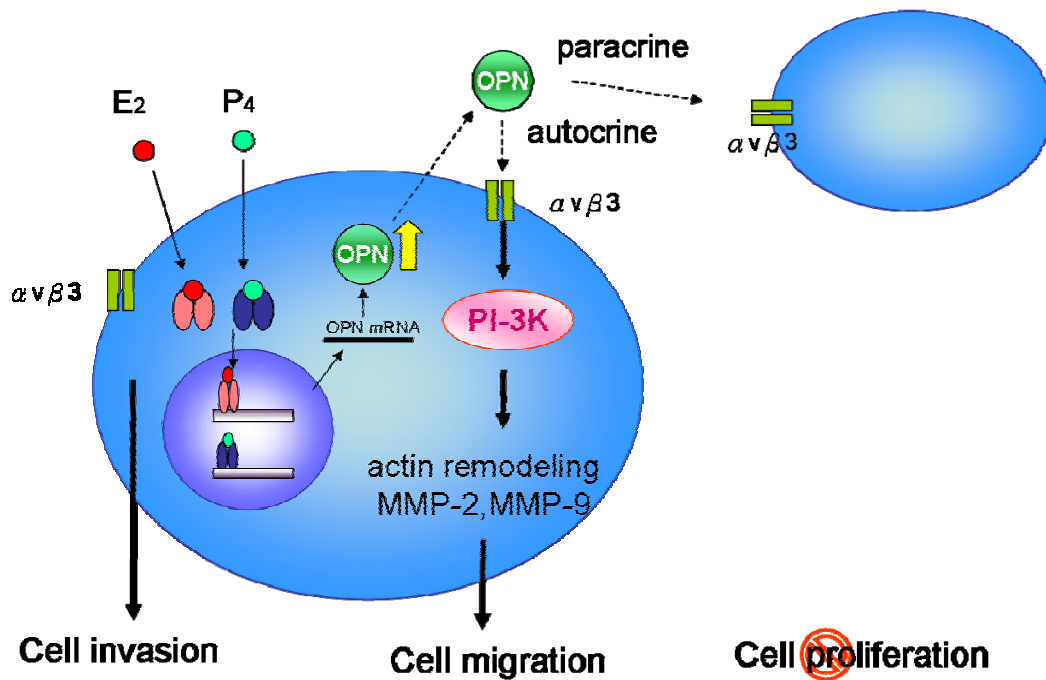


Figure 21. OPN 於子宮內膜異位中所扮演的角色。我們推測患有子宮內膜異位患者體內 E₂ 或 P₄ 會刺激子宮內膜細胞大量表現 OPN，誘導 secreted OPN 表現，可能經由 autocrine 或 paracrine 方式使 OPN 與 $\alpha v \beta 3$ integrin 結合，經由 PI-3K 路徑可以活化 MMP-2 和 MMP-9 及 actin remodeling，進而調控細胞移行能力。另外，OPN 也會促進細胞入侵但無增生的能力。