

以小鼠為模式建立抑制肺腺癌藥物之篩選平台

洪紹文^{1,2*} 陳嘉琪¹ 邱健昭¹ 林王威¹ 楊程堯¹

1. 財團法人農業科技研究院動物科技研究所動物資源組

2. 元培醫事科技大學護理學系

摘要

肺癌是全球癌症病人死亡的主要原因，本研究目的在於以 A549 人類肺癌細胞株誘導建立異位異種移植的 A549 肺癌小鼠模式，並搭配肺部組織病理學與細胞學判讀檢測技術，來建立一套抗肺癌藥物篩選平台，利用此平台來進行抗肺癌研發藥物標的篩選與治療策略設計。實驗方法利用人類肺癌 A549 細胞株接種於免疫缺陷老鼠 (NOD SCID mice) 皮下，並投予臨床抗癌藥物 (5-FU 或 Cisplatin)，後續針對腫瘤進行病變分析。由結果得知，已成功建立異位異種移植 (ectopic xenotransplantation) 人類肺癌 A549 於小鼠的癌症模式與 5-FU (17.5-20 mg/kg body weight, intravenous injection, thrice/week for 4 weeks) 或 Cisplatin (4 mg/kg body weight, intraperitoneal injection, 3 times) 於癌化小鼠的治療策略。此外，搭配肺部組織病理學與細胞學判讀檢測技術的病變分析 (器官轉移、細胞有絲分裂、PCNA、Pan CK 與 Factor-8)，已成功建立一套符合生技醫藥研發抗肺癌藥物篩選平台，期望此平台未來將可運用於抗肺癌藥物篩選與治療策略設計，協助生技醫藥業者篩選有效研發標的與測試其研發藥品功效，加速進入臨床試驗。

關鍵詞：異位、體內、肺癌、平台、異種移植

*通訊作者。E-mail: lymphoma2002@yahoo.com.tw

Establishment of Anti-Lung Adenocarcinoma Drug Screening Platform in Mice

Shao-Wen Hung^{1, 2*} Chia-Chi Chen¹ Chien-Chao Chiu¹ Jen-Wei Lin¹
Cheng-Yao Yang¹

¹ Division of Animal Resources, Animal Technology Laboratories,
Agricultural Technology Research Institute

² Nursing Department of Yuanpei University

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. The purpose of this study was to establish an ectopic xenotransplantation model of human lung cancer cell line A549 in mice, and to combine with the histopathology of lung and cytological detection for the establishment of an anti-lung cancer drug screening platform. Experimental methods included that human lung cancer A549 cell line was inoculated into the subcutaneous tissue of immunodeficient mice (NOD SCID mice) and administered with clinical anti-cancer drugs (5-FU or Cisplatin), followed by lesion analysis of the tumor. According to the results, we have successfully established an ectopic xenotransplantation of human lung cancer A549 in mice and the treatment strategies of 5-FU (17.5-20 mg/kg body weight, intravenous injection, thrice/week for 4 weeks) or Cisplatin (4 mg/kg body weight, intraperitoneal injection, 3 times) in tumor-bearing mice. In addition, the lesion analysis (organ metastasis, cell mitosis, PCNA, Pan CK, and Factor-8) was performed together with lung histopathological and cytometric detection techniques. In this study, a screening platform for biomedical research and development of anti-lung cancer drugs has been successfully established. We hope that the ectopic xenograft lung cancer model with therapeutic strategies with chemotherapeutic drugs will be applied to the new anti-cancer drug research and development in the future.

Keywords: ectopic, *In vivo*, lung cancer, platform, xenograft

*Corresponding author. E-mail: lymphoma2002@yahoo.com.tw

壹、前言

隨著世界人口不斷上升，全球對於糧食的需求將與日俱增，同時人類對畜產品的需求也會隨之而提升。根據聯合國於 2004 年的報告指出：世界人口將從 2000 年的 61 億成長至 2050 年的 89 億，而 2016 年全球已達到 73 億人口，屆時糧食的供應將面臨短缺的問題；除了人口因素外，全球氣候變遷同樣造成了糧食的減產 (Hanjra and Qureshi, 2010)，人類在未來將必須在有限的水土資源下生產出足夠的食物；而在糧食減產的同時，各地區的經濟情況以及消費習慣，也將連帶的影響到糧食的價格 (Schneider *et al.*, 2011)。畜牧業為提供人類動物性蛋白質營養來源之重要產業，同時也影響著國家經濟，其中飼料費用佔了畜牧經營約 60% 的成本；由於國內飼料多仰賴進口，常受國際原物料價格波動而影響畜牧產品價格，尤其是大豆在 2014 年時價格已飆升至每公斤 18 元新台幣 (財團法人中央畜產會，2015)。而隨著原物料的減產與漲價，控制飼料成本將會是未來畜牧界的重要課題。

癌症是全世界主要公共衛生問題，也是美國第 2 大死亡原因 (Siegel *et al.*, 2017)。Siegel 等 (2017) 指出，2017 在美國男性與女性新發生癌症病例，共計 836,150 與 852,630 案例。在美國男性十大癌症之首為前列腺癌 (19% 發生率)，其次分別為肺和支氣管癌 (14% 發生率)、大腸直腸癌 (9% 發生率)、膀胱癌 (7% 發生率)、皮膚黑色素癌 (6% 發生率)、腎與腎盂癌 (5% 發生率)、非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma) (5% 發生率)、血癌 (4% 發生率)、口腔和咽喉癌 (4% 發生率)、肝和肝內膽管癌 (3% 發生率)；美國女性十大癌症之首為乳癌 (30% 發生率)，其次分別為肺和支氣管癌 (12% 發生率)、大腸直腸癌 (8% 發生率)、膀胱癌 (7% 發生率)、甲狀腺癌 (5% 發生率)、皮膚黑色素癌 (4% 發生率)、非霍奇金淋巴瘤 (4% 發生率)、血癌 (3% 發生率)、胰臟癌 (3% 發生率)、腎與腎盂癌 (3% 發生率)。由此可知，肺和支氣管癌發生率為美國癌症新案發生率第 2 位。

肺癌已知是全球癌症相關死亡的主要原因，其中癌轉移是肺癌治療失敗和死亡的主要原因 (Fidler, 2003；Sun *et al.*, 2007)。Siegel 等 (2017) 指出，2017 在美國男性與女性癌症死亡病例，共計 318,420 與 282,500 案例。在美國男性十大癌症致死之首為肺和支氣管癌 (27% 死亡率)，其次分別為大腸直腸癌 (9% 死亡率)、前列腺癌 (8% 死亡率)、胰臟癌 (7% 死亡率)、肝和肝內膽管癌 (6% 死亡率)、血癌 (4% 死亡率)、食道癌 (4% 死亡率)、膀胱癌 (4% 死亡率)、非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma) (4% 死亡率)、

腦與其他神經系統癌症皮（3%死亡率）；在美國女性十大癌症致死之首為肺和支氣管癌（25%死亡率），其次分別為乳癌（14%死亡率）、大腸直腸癌（8%死亡率）、胰臟癌（7%死亡率）、卵巢癌（5%死亡率）、子宮癌（4%死亡率）、血癌（4%死亡率）、肝和肝內膽管癌（4%死亡率）、非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin lymphoma）（3%死亡率）、腦與其他神經系統癌症皮（3%死亡率）。由此可知，肺和支氣管癌發生率為美國癌症新案發生率第2位，亦為美國癌症死亡率第1位，因此需要加以重視。

在台灣依據衛福部公布 2016 年國人的十大死因，其排序分別為癌症、心臟疾病、肺炎、腦血管疾病、糖尿病、事故傷害、慢性下呼吸道疾病、高血壓性疾病、腎病變、慢性肝病和肝硬化。在台灣，癌症自 1982 年起，已連續 35 年位居國人十大死因榜首，2016 年除了總死亡人數創下新高外，死亡時鐘也比 2015 快了 9 秒，平均 3 分 3 秒，就有 1 人死亡。此外，十大癌症之首為肺癌，其次分別為肝和肝內膽管癌、結腸直腸和肛門癌、女性乳房癌、口腔癌、前列腺癌、胃癌、胰臟癌、食道癌、卵巢癌（民國 105 年死因統計年報）。

2016 年國人癌症死亡人數為 47,760 人，死亡率為每十萬人口 203.1 人，占總死亡人數之 27.7%，其中男性為 29,215 人，死亡率為每十萬人口 249.4 人；女性為 18,545 人，死亡率則為每十萬人口 157.2 人。依死亡率排序，2016 年十大癌症死因依序為氣管、肺和支氣管癌（死亡率：每十萬人口 39.9 人）、肝和肝內膽管癌、結腸、直腸和肛門癌、女性乳房癌、口腔癌、前列腺癌、胃癌、胰臟癌、食道癌、卵巢癌（民國 105 年死因統計年報）。由此可知，在台灣與美國，肺癌皆為主要癌症死因第 1 位。

人類非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）的異種移植模式，通常是將癌細胞注射到小鼠的皮下組織中，一般注射在腹脇部（flank）。腹脇部作為一個主要的異種移植位點，通常用於方便腫瘤測量，但即使是植入最侵略性的肺癌細胞株，也很少發生轉移現象（Doré *et al.*, 1987）。為了研究各種醫療和手術治療策略對臨床前肺癌發生轉移的影響，目前已成功開發了 NSCLC 自發轉移的小鼠模式，所使用為免疫系統缺損的小鼠 NOD.CB17-Prkdcscid / NcrCr1（NOD-SCID），能夠將人類來源癌細胞株異種移植並產生自發性轉移，此模式可用於與皮下接種癌細胞的小鼠模式進行比較（Harris *et al.*, 2011）。

肺癌是全球罹癌病患死亡的首要原因，治療失敗和死亡的主要原因常和癌症發生轉移有關（Siegel *et al.*, 2017）。雖然這些罹患肺癌病患可藉由外科手術和化學療法來切除與治療腫瘤，但不幸的是，即使在使用最好的化療藥物進行治療之後，罹患肺癌病患的

5 年生存率只在 1%-49% 之間。因此，急需建立合適的肺癌動物模式、尋找出治療策略與了解有助於癌侵襲和轉移的細胞介質、開發針對這些介質的新型治療劑，以協助生技醫藥業者開發更有效抑制癌增殖與癌轉移的治療方法。本研究希望建立一套抗肺癌藥物篩選系統，搭配異位異種移植小鼠模式、肺部組織病理學診斷與判讀及癌增生與轉移標記之免疫組織化學染色，此系統未來將可運用於抗肺癌藥物的篩選與治療策略設計，協助生技醫藥業者篩選有效研發標的與測試其研發藥品功效，加速進入臨床試驗。

貳、材料與方法

一、藥品與試劑

5-FU (Sigma-Aldrich, Cat. No. F6627)、Cisplatin (Sigma-Aldrich, Cat. No. C2210000)、PBS (Sigma-Aldrich, Cat. No. P5368)、Matrigel (Sigma-Aldrich, Cat. No. DLW356237)、TrypLE Express (Thermo Fisher, Cat. No. 12605036)、Penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Cat. No. P4333)、PCNA (PC10) Mouse mAb (Cell Signaling, Cat. No. 2586)、Pan Cytokeratin (AE1/AE3) Mouse mAb (Biocare medical, Cat. No. CM 011 A, B, C)、Anti-Von Willebrand Factor (Factor 8) Mouse mAb (F8/86) (abcam, Cat. No. ab778)、Saline (信東生技股份有限公司)、Zoletil 50 (Virbac)。

二、細胞培養

A549 細胞 (ATCC® CCL-185™) 購自 ATCC，細胞以 DMEM 培養液，內含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS, Gibco) 與 1% 抗生素 (100 U/mL penicillin 和 100 mg/mL streptomycin)，於 37°C 下進行培養，待細胞約 8 成滿盤時，再進行繼代培養。

三、細胞 trypan blue exclusion 染色與計數

將約 8 成滿盤之 A549 細胞，與 TrypLE Express 一同於 37°C 下作用 10 分鐘，之後將細胞懸浮液以 4°C、400 ×g 離心 15 分鐘，移除上清液後，以無血清之 DMEM 培養液回溶細胞團塊，之後取 10 μL 之細胞回溶液與 10 μL 0.4% trypan blue solution 混和成 2 倍稀釋液後，注入血球計數盤中，並於光學顯微鏡下計算活細胞數量。最後，將 A549 細胞以等體積 matrigel 進行稀釋成 $1 \times 10^7/100 \mu\text{L}$ ，以待後續動物接種使用。

四、實驗動物

6-8 週齡之雄性 NOD SCID 小鼠 (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCr1)，購自國家實驗動物中心 (台北，台灣)，飼養於獨立空調與 12 小時自動明暗控制之 GLP 動物試驗室 (動物科技研究所，財團法人農業科技研究院，苗栗，台灣)，並將動物房溫度控制於 24-27°C、濕度維持在 60-70%。小鼠飼養皆符合財團法人農業科技研究院實驗動物照護

及使用委員會(The Institutional Animal Care and Use Committee of Agricultural Technology Research Institute)之規範，動物實驗核准編號為實動字第 105118 號。

五、各試驗組別資訊

本研究共計執行 3 次肺癌試驗，首先建立異位異種移植小鼠 A549 肺癌模式，之後再進行分組與執行不同臨床抗癌用藥治療策略。3 次試驗的分組與治療策略資訊如下(表 1-3)：

表 1 試驗一：異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，靜脈內注射生理食鹽水或 5-FU (17.5 或 35 mg/kg body weight)

Table 1 Experiment 1: After the lung cancer cell line A549 was xenotransplanted, saline or 5-FU (17.5 or 35 mg / kg body weight) was injected intravenously

組別	測試物質	樣本數
對照組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，靜脈內注射生理食鹽水 (100 μ L)，1 週 3 次，共計 12 次	8
5-FU 低劑量組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，靜脈內注射 17.5 mg/kg body weight 5-FU (100 μ L)，1 週 3 次，共計 12 次	8
5-FU 高劑量組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，靜脈內注射 35 mg/kg body weight 5-FU (100 μ L)，1 週 3 次，共計 12 次	8

表 2 試驗二：異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射生理食鹽水或 cisplatin (4 mg/kg body weight) 或靜脈內注射 5-FU (20 mg/kg body weight)

Table 2 Experiment 2: After the lung cancer cell line A549 was xenotransplanted, normal saline or cisplatin (4 mg / kg body weight) were injected intraperitoneally or 5-FU (20 mg / kg body weight) was injected intravenously

組別	測試物質	樣本數
對照組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射生理食鹽水 (100 μ L)，1 週 3 次，共計 12 次	8
Cisplatin 組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射 4 mg/kg body weight cisplatin (100 μ L)，共計 3 次 [Cisplatin 投藥頻率為每 4 天投藥 1 次 (Q4d \times 3)，投藥時間點分別為第 1 天 (D0)、D4、D8]	8
5-FU 組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，靜脈內注射 20 mg/kg body weight 5-FU (100 μ L)，1 週 3 次，共計 12 次	8

表 3 試驗三：異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射生理食鹽水、cisplatin (4 mg/kg body weight) 或 5-FU (35 mg/kg body weight)

Table 3 Experiment 3: After the lung cancer cell line A549 was xenotransplanted, saline, cisplatin (4 mg / kg body weight) or 5-FU (35 mg / kg body weight) was injected intraperitoneally

組別	測試物質	樣本數
對照組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射生理食鹽水 (100 μ L)，1 週 3 次，共計 12 次	8
Cisplatin 組	異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射 4 mg/kg body weight cisplatin (100 μ L)，共計 1 次 [投藥時間點為第 1 天	8

5-FU 組	(D0)] 異位異種移植肺癌細胞株 A549 後，腹腔內注射 35 mg/kg body weight 5-FU (100 μL)，1 週 3 次，共計 12 次	8
--------	--	---

六、建立異位異種移植 A549 肺癌小鼠模式

本研究涉及之動物試驗於財團法人農業科技研究院執行，動物之使用、飼養及實驗內容皆依據財團法人農業科技研究院實驗動物照護及使用委員會批准之文件與試驗準則進行。本研究之試驗設計，包含異位異種移植 A549 肺癌小鼠動物模式建立與臨床用藥之治療策略，均參考相關文獻後施行 (McLemore et al., 1988; Yamori et al., 1997; Khan et al., 2007; Tan et al., 2010; Li et al., 2013; Zhao et al., 2014; Ling et al., 2015)。

試驗一：首先，24 隻 6-8 週齡 SPF 等級之 NOD SCID 小鼠 (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCr1) (體重 17-20 g)，隨機分成 3 組 (對照組；5-FU 低劑量組；5-FU 高劑量組)，每組 8 隻。異位異種移植 A549 肺癌小鼠建置如下：首先，小鼠保定後，以 1×10^7 A549 細胞數混合不含血清之細胞培養液 (50 μL) 與 50 μL matrigel 後，進行小鼠右腹脇部皮下接種，接種 15 天 (D0) 後待腫瘤體積達 100 mm³，即可進行藥物功效測試，來評估藥物之抗肺癌功效。本次試驗一之參考藥物為 5-FU，投藥濃度分別為 17.5 和 35 mg/kg body weight，投藥途徑為尾靜脈內投藥。投藥頻率為每週 3 次 (星期 1、星期 3、星期 5)，全程投藥共計 12 次。量測與採樣方面，試驗全程評估實驗動物之臨床行為表現；於腫瘤接種前 1 天 (D-16)，進行老鼠秤重與血樣收集；於投藥當天 (D0) 與投藥後 28 天 (D28)，進行老鼠秤重、腫瘤體積量測 (腫瘤體積 = $1/2 \times a \times b^2$ ，a：腫瘤最長長度；b：腫瘤最短長度) 與血樣收集；於投藥後 7 天 (D7)、投藥後 14 天 (D14) 與投藥後 21 天 (D21)，進行老鼠秤重與腫瘤體積量測 (圖 1A)。最後，於犧牲時進行各臟器 (肝臟、脾臟、肺臟等) 與腫瘤採樣、秤重，並以 10% 中性福馬林固定臟器與腫瘤，之後修片並進行 H&E 染色及病理觀察與判讀和免疫組織化學染色。

試驗二：首先，24 隻 6-8 週齡 SPF 等級之 NOD SCID 小鼠 (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCr1) (體重 17-20 g)，隨機分成 3 組 (對照組；Cisplatin 組；5-FU 組)，每組 8 隻，異位異種移植 A549 肺癌小鼠建置方式如試驗一。本次試驗二之參考藥物為 5-FU 與 Cisplatin，濃度分別為 20 和 4 mg/kg body weight，5-FU 投藥途徑為尾靜脈內投藥，Cisplatin 投藥途徑為腹腔內投藥。5-FU 投藥頻率為每週 3 次 (星期 1、星期 3、星期 5)，全程投藥共計 12 次；Cisplatin 投藥頻率為每 4 天投藥 1 次 (Q4d × 3)，開始投藥第 1 天 (D0)，全程投藥共計 3 次。量測與採樣方面，試驗全程評估實驗動物

之臨床行為表現；於腫瘤接種前 1 天 (D-16)，進行老鼠秤重與血樣收集；於投藥當天 (D0) 與投藥後 28 天 (D28)，進行老鼠秤重、腫瘤體積量測 (腫瘤體積 = $1/2 \times a \times b^2$ ，a：腫瘤最長長度；b：腫瘤最短長度) 與血樣收集；於投藥後 7 天 (D7)、投藥後 14 天 (D14) 與投藥後 21 天 (D21)，進行老鼠秤重與腫瘤體積量測 (圖 1B)。最後，於犧牲時進行各臟器 (肝臟、脾臟、肺臟等) 與腫瘤採樣、秤重，並以 10% 中性福馬林固定臟器與腫瘤，之後修片並進行 H&E 染色及病理觀察與判讀和免疫組織化學染色。

試驗三：首先，24 隻 6-8 週齡 SPF 等級之 NOD SCID 小鼠 (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl) (體重 17-20 g)，隨機分成 3 組 (對照組；5-FU 組；Cisplatin 組)，每組 8 隻，異位異種移植 A549 肺癌小鼠建置方式如試驗一。本次試驗三之參考藥物為 5-FU 與 Cisplatin，濃度分別為 35 和 4 mg/kg body weight，5-FU 與 Cisplatin 投藥途徑皆為腹腔內投藥。5-FU 投藥頻率為每週 3 次 (星期 1、星期 3、星期 5)，全程投藥共計 12 次；Cisplatin 僅 1 次投藥 (D0)。量測與採樣方面，試驗全程評估實驗動物之臨床行為表現；於腫瘤接種前 1 天 (D-16)，進行老鼠秤重與血樣收集；於投藥當天 (D0) 與投藥後 28 天 (D28)，進行老鼠秤重、腫瘤體積量測 (腫瘤體積 = $1/2 \times a \times b^2$ ，a：腫瘤最長長度；b：腫瘤最短長度) 與血樣收集；於投藥後 7 天 (D7)、投藥後 14 天 (D14) 與投藥後 21 天 (D21)，進行老鼠秤重與腫瘤體積量測 (圖 1C)。最後，於犧牲時進行各臟器 (肝臟、脾臟、肺臟等) 與腫瘤採樣、秤重，並以 10% 中性福馬林固定臟器與腫瘤，之後修片並進行 H&E 染色及病理觀察與判讀和免疫組織化學染色。

七、組織病理學檢查與病變評分

將進行異位異種移植肺癌細胞株 A549，並給予不同抗癌藥物處理的小鼠，採集腫瘤團塊、肺臟、肝臟與脾臟等組織，以中性 10% 福馬林液固定後進行組織切片檢查。切片製作主要為腫瘤團塊及不同組織，以橫切方式修片後放入包埋盒，經脫水、石臘浸潤及包埋等步驟，製成石臘組織塊，再以石臘組織切片機 (Leica RM 2145, Nussloch, Germany) 切成 4 μm 厚度之組織切片，再分別以 Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色與免疫組織化學染色，於光學顯微鏡下觀察不同處理組的組織病理學變化。組織學分析與評估的指標，包括腫瘤細胞轉移與腫瘤細胞有絲分裂相。由於 A549 細胞株是人類肺泡上皮細胞來源肺癌，由於其屬於高度惡性的腫瘤細胞，腫瘤細胞有絲分裂相旺盛且與疾病嚴重度呈高度正相關。因此，腫瘤細胞有絲分裂相評估方法是在 200 倍放大倍率下隨機觀察兩個視野，並記錄其腫瘤有絲分裂數目 (Duhig *et al.*, 2015)。

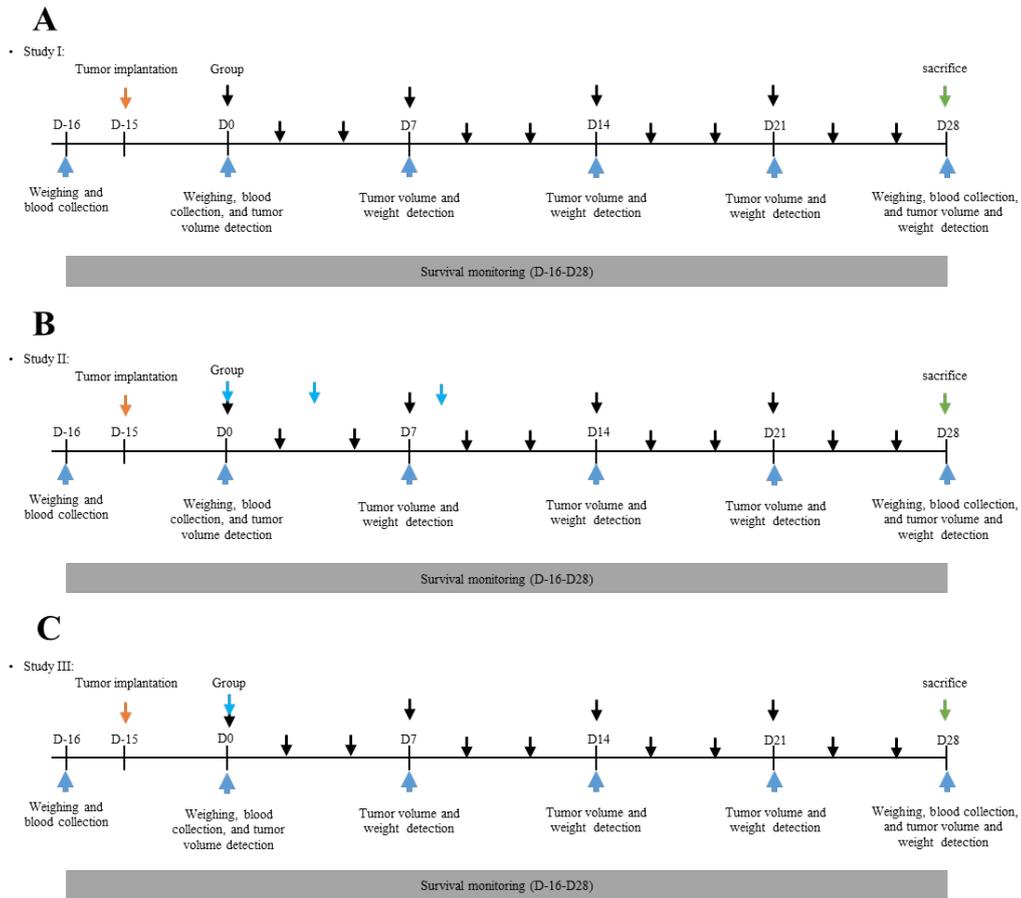


圖 1 A549 誘發異位肺癌小鼠的建立時間表、5-FU 或 Cisplatin 的治療策略與樣品（血樣、臟器、腫瘤團塊）的收集和分析。(A) 試驗一；(B) 試驗二；(C) 試驗三。↓：腫瘤接種；↓：5-FU 投予；↓：Cisplatin 投予；↑：監測與採樣；↓：犧牲

Fig. 1 Schedule of the establishment of A549-induced lung cancer mice, therapeutic strategies of 5-FU/Cisplatin and samples (blood samples, organs, and tumor mass) collection and analysis. (A) Study I; (B) Study II; (C) Study III. ↓: tumor implantation; ↓: 5-FU administration; ↓: Cisplatin administration; ↑: detection and sample collection; ↓: sacrifice.

八、免疫組織化學染色

將 4 μm 厚度之組織切片以二甲苯進行組織脫蠟 2 次（每次 5 min）。之後，利用漸降系酒精（100% 酒精、95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精）進行組織回水（每種濃度酒精作用 3 min），然後再進行水洗。使用抗原修復鍋做抗原修復（修復時間約 10 min）後，以 TBST 清洗 5 min。以 Hydrogen Peroxide 作用 10 min，然後以 TBST 進行清洗 2 次（每次 5 min）。以 Protein Blocking 作用 10 min 後，再以 TBST 清洗 2 次（每次 5 min）。分別加入 1:100 之 Primary antibody [PCNA(PC10) Mouse mAb、Pan Cytokeratin(AE1/AE3)]

Mouse mAb、Anti-Von Willebrand Factor (Factor 8) Mouse mAb (F8/86)]，放置於 4°C 作用至隔天，再行 TBST 清洗 2 次 (每次 5 min)。加入 HRP Polymer (Invitrogen) 作用 15 min 後，再行 TBST 清洗 2 次 (每次 5 min)。加入 DAB Chromogen 進行呈色 1-3 min 後，進行水洗 5 min。最後，進行蘇木紫染色並封片鏡檢。

免疫組織化學染色分析與評估的指標，包括增生細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、泛細胞角質蛋白 (Pan cytokeratin, Pan CK) 及第 8 因子 (Factor 8) 等三個分析指標。病灶區嚴重度的判定則是參考 (Wang et al., 1997; Shackelford et al., 2002; Yazdani et al., 2013)，評分標準如下：

a. 增生細胞核抗原 (PCNA)：PCNA 是一種與 DNA polymerase delta 有關的 non-histone nuclear protein，其存在於細胞增生的整個細胞週期。尤其在 S 時期量達最高，因此偵測細胞核中的抗原表現訊號也與腫瘤細胞之分裂與藥物是否具有抑制作用具有正相關性。等級 0 = 陰性 (無法偵測到 PCNA 抗原)；等級 1 = 1-10% 腫瘤細胞出現 PCNA 陽性訊號；等級 2 = 11-33% 腫瘤細胞出現 PCNA 陽性訊號；等級 3 = 34-66% 腫瘤細胞出現 PCNA 陽性訊號；等級 4 = 67-100% 腫瘤細胞出現 PCNA 陽性訊號。

b. 泛細胞角質蛋白 (Pan CK)：Pan CK 是細胞骨架的成分，複層鱗狀上皮及其腫瘤主要表達高相對分子量 CK，單層上皮及其腫瘤主要表達低相對分子量角質蛋白。將其高低分子量 CK 結合運用於偵測與追蹤上皮細胞來源的腫瘤。將 Pan CK 的抗原表現強度區分為 0 = 陰性 (無法偵測到 Pan CK 抗原)；1 = 弱陽性 (Pan CK 陽性訊號微弱)；2 = 強陽性 (Pan CK 陽性訊號清晰明顯)。

c. 第 8 因子 (Factor-8)：該抗原僅由內皮細胞合成，其存在於 Weibel-Palade 體內和巨核細胞。由於腫瘤組織中的新生血管與其氧氣及養份供應有密切相關，因此分析腫瘤組織內的新生血管多寡也與腫瘤組織的癒後有關，評估方式採用在 200 倍放大倍率隨機觀察兩個視野，並記錄新生血管數目。

九、統計分析

實驗中所得數據以 Student's *t*-test 進行分析，當 $p < 0.05$ 即代表有顯著性差異。病灶區嚴重度的判定則是參考 (Shackelford et al., 2002)，各組之間的組織學變化是否達到顯著性差異，使用 Mann Whitney U-test 的檢定方法進行，組間差異達到 $p < 0.05$ 則認定為具有顯著性統計差異， $p < 0.01$ 則為極顯著性差異。

參、結果

一、臨床行為表現與觀察

(一) 體重監測

於小鼠接種細胞後予以每日小鼠觀察、臨床行為、外觀、存活、飲食等，並依試驗規劃時程進行實驗動物體重監測。於試驗一中可見，對照組與 5-FU 低劑量組(17.5 mg/kg body weight)，組間體重無顯著性差異($p > 0.05$)。對照組與 5-FU 高劑量治療組(35 mg/kg body weight) 於第 14 天組間體重具統計學上差異 ($p < 0.05$) (圖 2A)；於試驗二可見，對照組與 Cisplatin 組組間體重無顯著性差異($p > 0.05$)。對照組與 5-FU 組(20 mg/kg body weight) 於第 14 天與第 21 天之組間體重具統計學上差異 ($p < 0.05$) (圖 3A)；於試驗三可見，對照組與 Cisplatin 組組間體重無顯著性差異 ($p > 0.05$)。對照組與 5-FU 組(35 mg/kg body weight) 於第 21 天組間體重具統計學上差異 ($p < 0.05$) (圖 4A)。

(二) 存活率監測

於試驗一可見，試驗進行直至犧牲前，對照組與 5-FU 低劑量組的存活率皆為 100% (8/8 ; 8/8)，5-FU 高劑量組的存活率為 0% (0/8) (圖 2B)；於試驗二可見，對照組、Cisplatin 組與 5-FU 組，3 組存活率均為 100% (8/8 ; 8/8 ; 8/8) (圖 3B)；於試驗三可見，對照組與 Cisplatin 組的存活率皆為 100% (8/8 ; 8/8)，5-FU 組存活率為 75% (6/8) (圖 4B)。

二、腫瘤生長評估

(一) 腫瘤體積監測

於試驗一可見，第 0 天腫瘤體積於 3 組組間無統計學上顯著差異 ($p > 0.05$)；第 7 天對照組與 5-FU 低劑量組或對照組與 5-FU 高劑量組之腫瘤體積具統計學上差異 ($p < 0.05$; $p < 0.01$)；第 14 天對照組與 5-FU 低劑量組或對照組與 5-FU 高劑量組之腫瘤體積具統計學上差異 (皆為 $p < 0.001$)；第 21 天對照組與 5-FU 低劑量組之腫瘤體積具統計學上差異 ($p < 0.01$) (圖 2C)。

於試驗二可見，第 0 天腫瘤體積於 3 組組間無統計學上顯著差異 ($p > 0.05$)；第 7 天、第 14 天與第 21 天對照組與 Cisplatin 組組間或對照組與 5-FU 組組間之腫瘤體積具統計學上差異 [對照組 vs Cisplatin 組： $p < 0.01$ (第 7 天)、 $p < 0.001$ (第 14 天)、 $p < 0.001$ (第 21 天)；對照組 vs 5-FU 組： $p < 0.01$ (第 7 天)、 $p < 0.001$ (第 14 天)、 $p < 0.001$ (第 21 天)] (圖 3C)。

於試驗三可見，第 0 天、第 7 天與第 14 天之腫瘤體積於 3 組組間無統計學上顯著差異($p > 0.05$);於第 21 天對照組與 5-FU 組組間之腫瘤體積具統計學上差異($p < 0.001$) (圖 4C)。

(二) 腫瘤重量比較

最後小鼠犧牲後，摘取腫瘤予以秤重。於試驗一可見，對照組與 5-FU 低劑量組組間腫瘤重量有顯著差異 ($p < 0.01$) (圖 2D);於試驗二可見，對照組與 Cisplatin 組組間腫瘤重量具統計學上差異 ($p < 0.05$)，對照組與 5-FU 組組間腫瘤重量有顯著差異 ($p < 0.01$) (圖 3D);於試驗三可見，對照組與 5-FU 組組間腫瘤重量具統計學上差異($p < 0.05$) (圖 4D)。

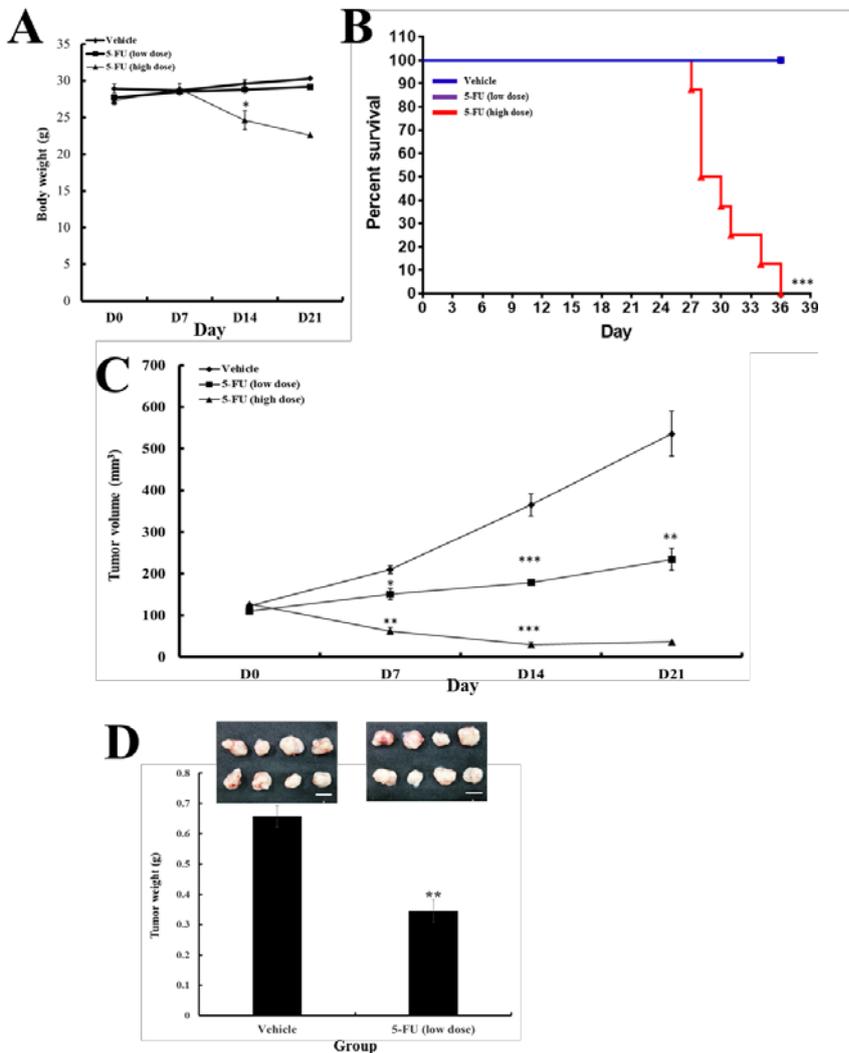


圖 2 老鼠臨床行為表現與觀察與腫瘤生長評估。(A)體重變化;(B)存活率;(C)腫瘤體積變化;(D)腫瘤重量。Vehicle：對照組；5-FU (low dose)：5-FU 低劑量組；5-FU (high dose)：5-FU 高劑量組。數據呈現：mean ± SEM。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$

Fig. 2 Clinical behavior and observation in mice and assessment of tumor growth. (A) body weight change; (B) survival rate; (C) tumor volume change; (D) tumor weight. Vehicle: control group; 5-FU (low dose): 5-FU low dose group; 5-FU (high dose): 5-FU high dose group. Data presented: mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

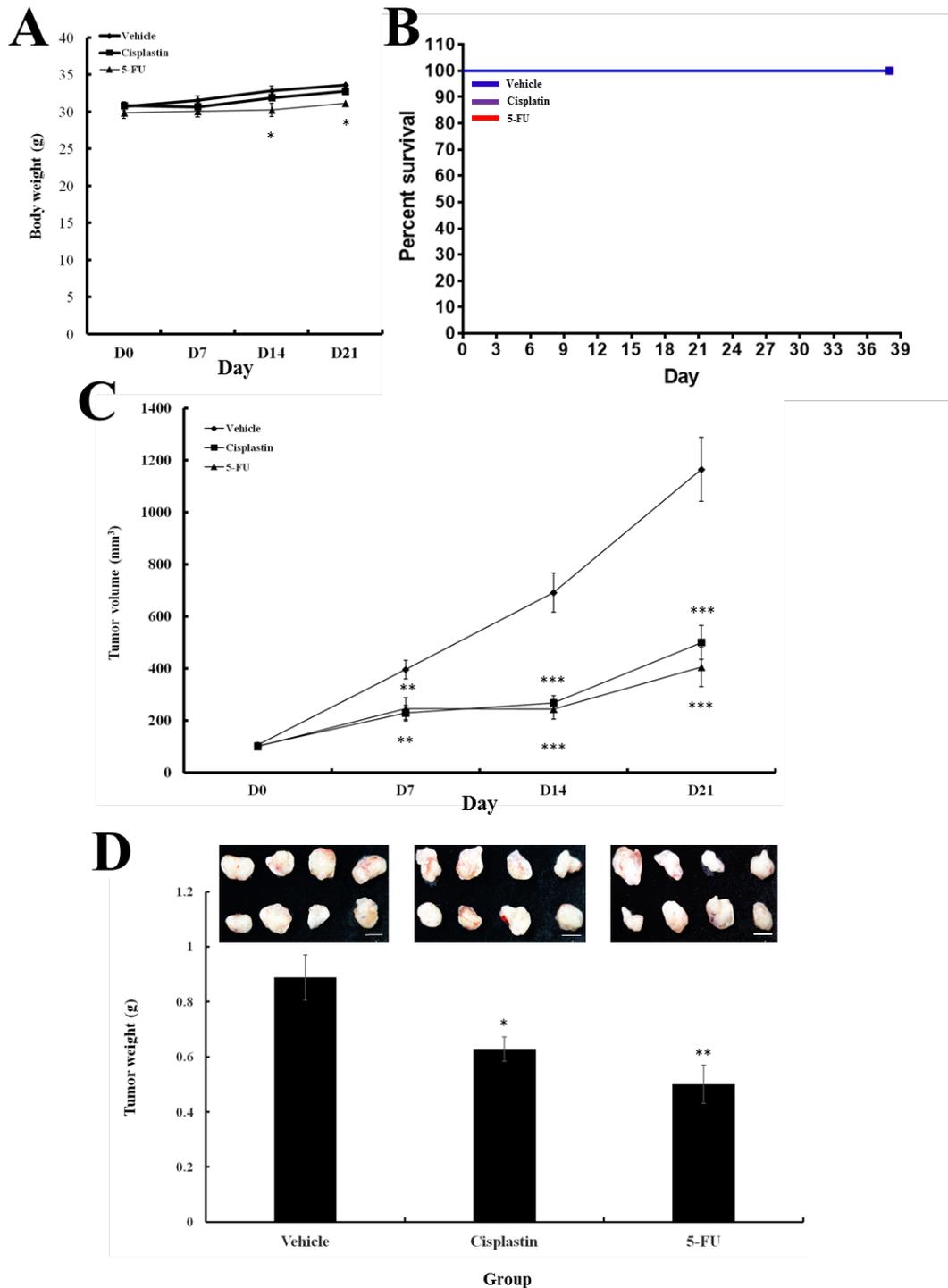


圖 3 老鼠臨床行為表現與觀察與腫瘤生長評估。(A) 體重變化；(B) 存活率；(C) 腫瘤體積變化；(D) 腫瘤重量。Vehicle：對照組；Cisplatin：Cisplatin 組；5-FU：5-FU 組。數據呈現：mean ± SEM。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$

Fig. 3 Clinical behavior and observation in mice and assessment of tumor growth. (A) body weight change; (B) survival rate; (C) tumor volume change; (D) tumor weight. Vehicle: control group; Cisplatin: Cisplatin group; 5-FU: 5-FU group. Data presented: mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

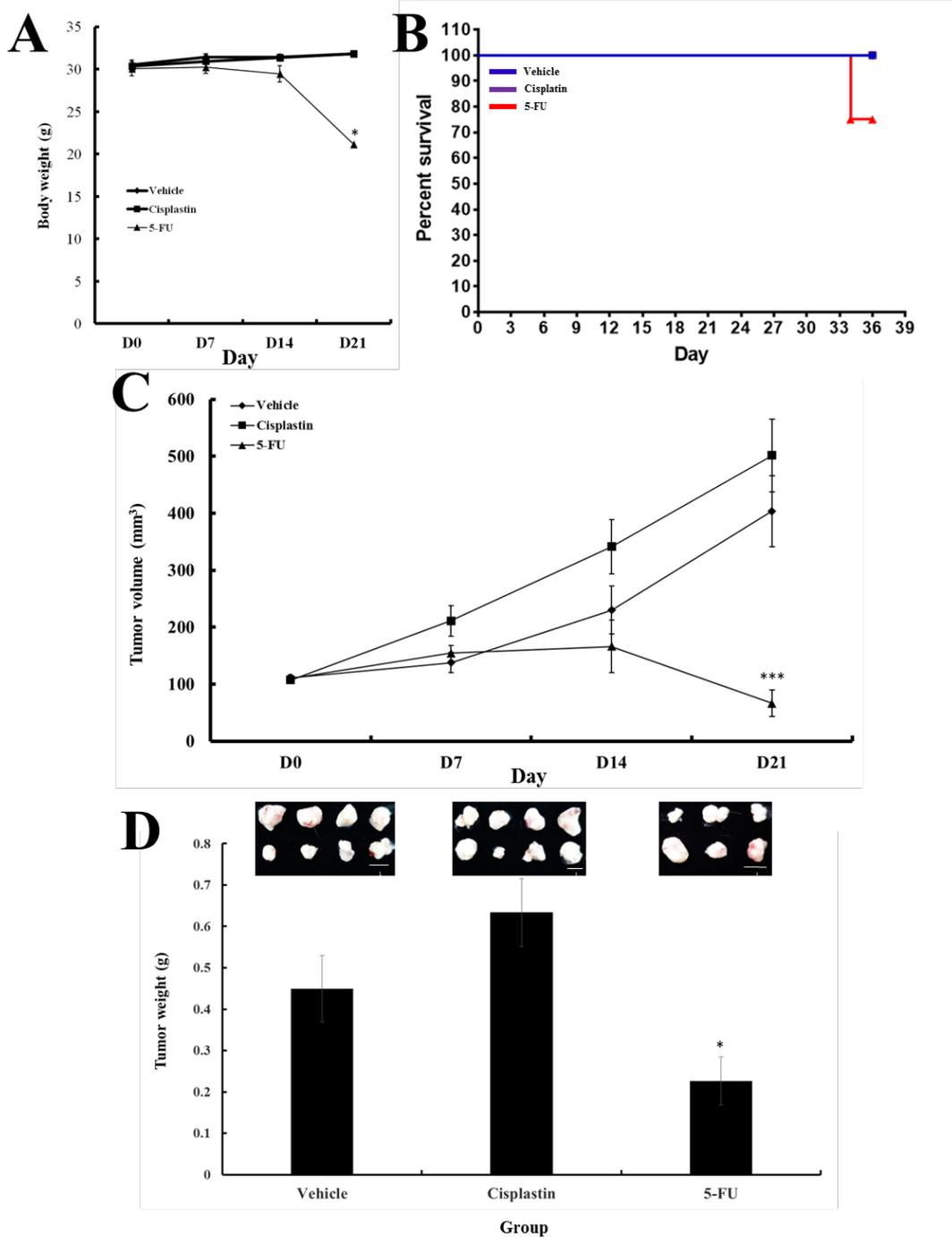


圖 4 老鼠臨床行為表現與觀察與腫瘤生長評估。(A) 體重變化；(B) 存活率；(C) 腫瘤體積變化；(D) 腫瘤重量。Vehicle：對照組；Cisplatin：Cisplatin 組；5-FU：5-FU 組。數據呈現：mean \pm SEM。* $p < 0.05$ ；*** $p < 0.001$

Fig. 4 Clinical behavior and observation in mice and assessment of tumor growth. (A) body weight change; (B) survival rate; (C) tumor volume change; (D) tumor weight. Vehicle: control group; Cisplatin: Cisplatin group; 5-FU: 5-FU group. Data presented: mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

三、病變分析

(一) 試驗一：

在觀察腫瘤有無發生器官轉移方面，可見到對照組有 2 隻動物肺臟出現腫瘤細胞，發生率為 25% (2/8)，5-FU 低劑量組則無發現腫瘤有轉移情形，發生率為 0% (0/8)，其餘組織如脾臟與肝臟則無發現腫瘤細胞。

在腫瘤細胞有絲分裂相計數上，對照組於 200 倍放大倍率下可見到有絲分裂數目平均為 9 ± 2.4 ，在 5-FU 低劑量組平均有絲分裂數目，則僅為 5 ± 2.8 ，且 2 組間在統計上具明顯差異 ($p < 0.05$) (圖 5，表 4)。

增生細胞核抗原 (PCNA) 分析顯示，對照組的腫瘤細胞核表現 PCNA 抗原的平均表現量為等級 4，然而在 5-FU 低劑量組的腫瘤細胞核之 PCNA 平均表現量為等級 2，2 組間具統計上明顯差異 ($p < 0.05$) (圖 5，表 4)。

細胞角質蛋白 (Pan CK) 的分析上，對照組的腫瘤細胞於 PanCK 抗原表現量平均為 2 ± 0 ，在 5-FU 低劑量組的腫瘤細胞，PanCK 抗原表現量平均也為 2 ± 0 ，2 組在 Pan CK 的表現量分析上並無明顯差異 (圖 5，表 4)。

在第 8 因子 (Factor-8) 的染色發現，對照組的新生血管被 Factor-8 抗原所標定的平均數量為 5 ± 1.4 ，另外在 5-FU 低劑量組的新生血管被 Factor-8 抗原標定的平均數量為 3 ± 2.3 ，2 組在新生血管的數量分析上有統計上差異 ($p < 0.05$) (圖 5，表 4)

(二) 試驗二：

在觀察腫瘤有無發生器官轉移方面，可見對照組有 1 隻動物肺臟出現腫瘤細胞，發生率為 12.5% (1/8)，Cisplatin 組無發現腫瘤有轉移情形，發生率為 0% (0/8)，5-FU 組也無發現腫瘤有轉移情形，發生率為 0% (0/8)，其餘組織如脾臟與肝臟也無發現腫瘤細胞。

在細胞有絲分裂相計數上，對照組於 200 倍放大倍率下可見到有絲分裂數目，平均為 8 ± 2.2 ，Cisplatin 組平均有絲分裂數目則為 9 ± 3.8 ，5-FU 組平均有絲分裂數目則下降為 4 ± 1.9 ，與對照組相比較，在統計上具極顯著差異 ($p < 0.01$) (圖 6，表 5)。

增生細胞核抗原 (PCNA) 分析顯示，對照組的腫瘤細胞核表現 PCNA 抗原的平均表現量為等級 4，Cisplatin 組的腫瘤細胞核之 PCNA 平均表現量也為等級 4，5-FU 組的腫瘤細胞核之 PCNA 平均表現量為等級 2，與對照組相比較 2 組之間具統計上明顯差異 ($p < 0.05$) (圖 6，表 5)。

細胞角質蛋白 (Pan CK) 的分析上，對照組的腫瘤細胞於 PanCK 抗原表現量平均為 2，cisplatin 組與 5-FU 組的腫瘤細胞 PanCK 抗原表現量平均也為 2，3 組在 PanCK 的表現量分析上並無明顯差異 (圖 6，表 5)。

在第 8 因子 (Factor-8) 的染色也發現，對照組的新生血管被 Factor-8 抗原所標定的平均數量為 6 ± 2.1 ，Cisplatin 組的新生血管被 Factor-8 抗原標定的平均數量為 7 ± 2.3 ，5-FU 組的新生血管被 Factor-8 抗原標定的平均數量為 3 ± 1.4 。在新生血管的評估上，5-FU 治療組的血管新生明顯較對照組低 ($p < 0.05$) (圖 6，表 5)。

(三) 試驗三：

在觀察腫瘤有無發生器官轉移方面，對照組有 2 隻動物肺臟出現腫瘤細胞，發生率為 25% (2/8)，cisplatin 組也發現腫瘤有轉移情形，發生率為 12.5% (1/8)，5-FU 組則無發現腫瘤有轉移情形，發生率為 0% (0/8)，其餘組織如脾臟與肝臟也無發現腫瘤細胞。

在細胞有絲分裂相計數上，對照組於 200 倍放大倍率下可見到有絲分裂數目平均為 10 ± 3.1 ，Cisplatin 組平均有絲分裂數目則為 12 ± 2.7 ，5-FU 組平均有絲分裂數目則下降為 3 ± 1.4 ，與對照組相比較在統計上具有極明顯差異 ($p < 0.01$) (圖 7，表 6)。

增生細胞核抗原 (PCNA) 分析顯示，對照組的腫瘤細胞核表現 PCNA 抗原的平均表現量為等級 4，Cisplatin 組的腫瘤細胞核之 PCNA 平均表現量也為等級 4，5-FU 組的腫瘤細胞核之 PCNA 平均表現量為等級 2，與對照組相比較，2 組之間具統計上之明顯差異 ($p < 0.05$) (圖 7，表 6)。

細胞角質蛋白 (Pan CK) 的分析上，對照組的腫瘤細胞於 PanCK 抗原表現量平均為 2，Cisplatin 組與 5-FU 組的腫瘤細胞 PanCK 抗原表現量平均也為 2，3 組在 PanCK 的表現量分析上，並無明顯差異 (圖 7，表 6)。

在第 8 因子 (Factor-8) 的染色也發現，對照組的新生血管被 Factor-8 抗原所標定的平均數量為 7 ± 1.9 ，Cisplatin 組的新生血管被 Factor-8 抗原標定的平均數量為 9 ± 2.5 ，5-FU 組的新生血管被 Factor-8 抗原標定的平均數量為 3 ± 1.1 。在新生血管的評估上，5-FU 組的血管新生現象明顯較對照組低，且有統計差異 ($p < 0.05$) (圖 7，表 6)。

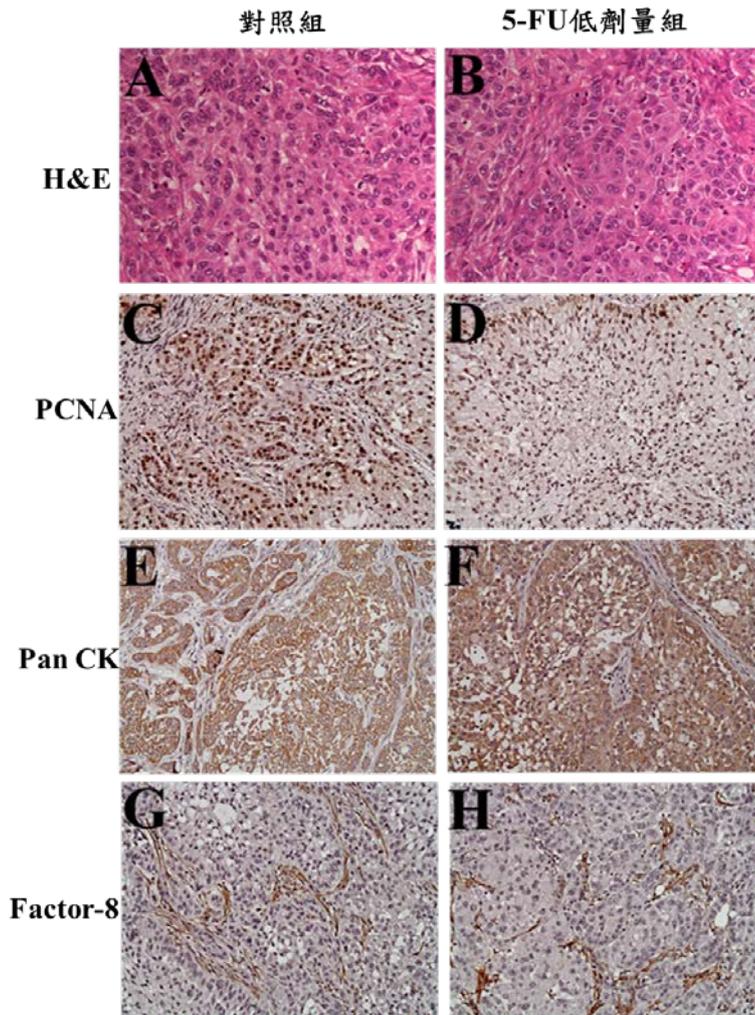


圖 5. 試驗一的腫瘤組織切片 (H&E 染色與免疫組織化學染色)。對照組：A、C、E、G；5-FU 低劑量組：B、D、F、H。A & B：H&E 染色、C & D：增生細胞核抗原 (PCNA)、E & F：細胞角質蛋白 (Pan CK)、G & H：第 8 因子 (Factor-8)

Fig. 5. Experiment 1: tumor tissue sections (H & E staining and immunohistochemical staining). Control group: A, C, E, G; 5-FU low dose group: B, D, F, H. A & B: H & E staining, C & D: PCNA, E & F: Pan CK, G & H: Factor-8.

表 4. 試驗一的器官轉移、細胞有絲分裂、PCNA、Pan CK 與 Factor-8 的結果
Table 4. Experiment 1: the results of organ metastasis, cell mitosis, PCNA expression, Pan CK expression, and Factor-8 expression

組別	對照組	5-FU 低劑量組
肺臟轉移	2/8	0/8
腫瘤細胞有絲分裂相	9 ± 2.4	5 ± 2.8*
增生細胞核抗原 (PCNA)	4	2*
細胞角質蛋白 (Pan CK)	2 ± 0	2 ± 0
第 8 因子 (Factor-8)	5 ± 1.4	3 ± 0.6*

備註:前面數字代表該組的評分分數之平均值,後面數字為標準誤差。在器官轉移前面數字為發生轉移動物數,後面數字為該組所有動物數。細胞有絲分裂相為 200 倍視野下觀察到的細胞分裂數目;PCNA 的數字則為嚴重等級;Pan CK 為抗原反應有無與強弱;Factor-8 為 200 倍視野下觀察到的新生血管數目。

* = 與腫瘤組有顯著性差異 ($p < 0.05$)

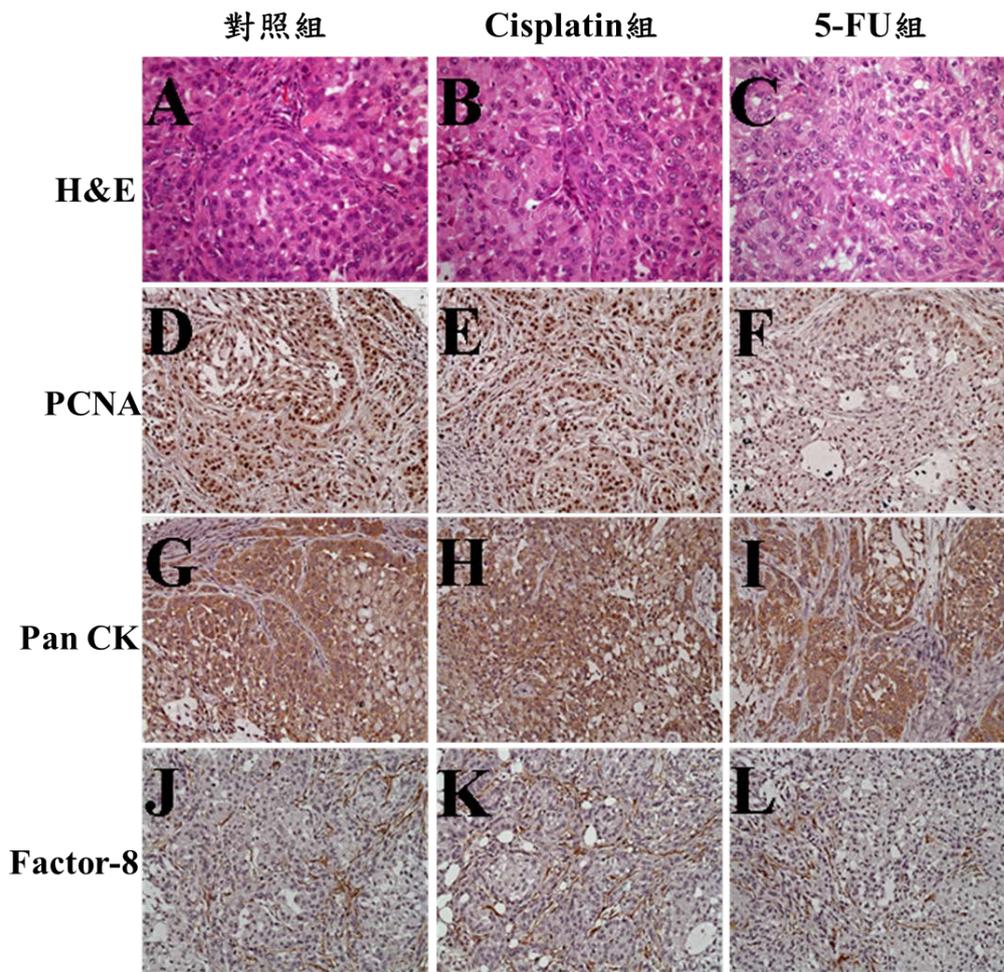


圖 6. 試驗二的腫瘤組織切片 (H&E 染色與免疫組織化學染色)。對照組：A、D、G、J；Cisplatin 組：B、E、H、K；5-FU 組：C、F、I、L。A-C：H&E 染色、D-F：增生細胞核抗原 (PCNA)、G-I：細胞角質蛋白 (Pan CK)、J-L：第 8 因子 (Factor-8)
 Fig. 6. Experiment 2: tumor tissue sections (H & E staining and immunohistochemical staining). Control group: A, D, G, J; Cisplatin group: B, E, H, K; 5-FU group: C, F, I, L. A-C: H & E staining, D-F: PCNA, G-I: Pan CK, J-L: Factor-8.

表 5. 試驗二的器官轉移、細胞有絲分裂、PCNA、Pan CK 與 Factor-8 的結果
 Table 5. Experiment 2: the results of organ metastasis, cell mitosis, PCNA expression, Pan CK expression, and Factor-8 expression

組別	對照組	Cisplatin 組	5-FU 組
肺臟轉移	1/8	0/8	0/8
腫瘤細胞有絲分裂相	8 ± 2.2	9 ± 3.8	4 ± 1.9**
增生細胞核抗原 (PCNA)	4	4	2*
細胞角質蛋白 (Pan CK)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
第 8 因子 (Factor-8)	6 ± 2.1	7 ± 2.3	3 ± 1.4*

備註:前面數字代表該組的評分數之平均值,後面數字為標準誤差。在器官轉移前面數字為發生轉移動物數,後面數字為該組所有動物數。細胞有絲分裂相為 200 倍視野下觀察到的細胞分裂數目;PCNA 的數字則為嚴重等級;Pan CK 為抗原反應有無與強弱;Factor-8 為 200 倍視野下觀察到的新生血管數目。

* = 與腫瘤組有顯著性差異 ($p < 0.05$); ** = 與腫瘤組有極顯著性差異 ($p < 0.01$)

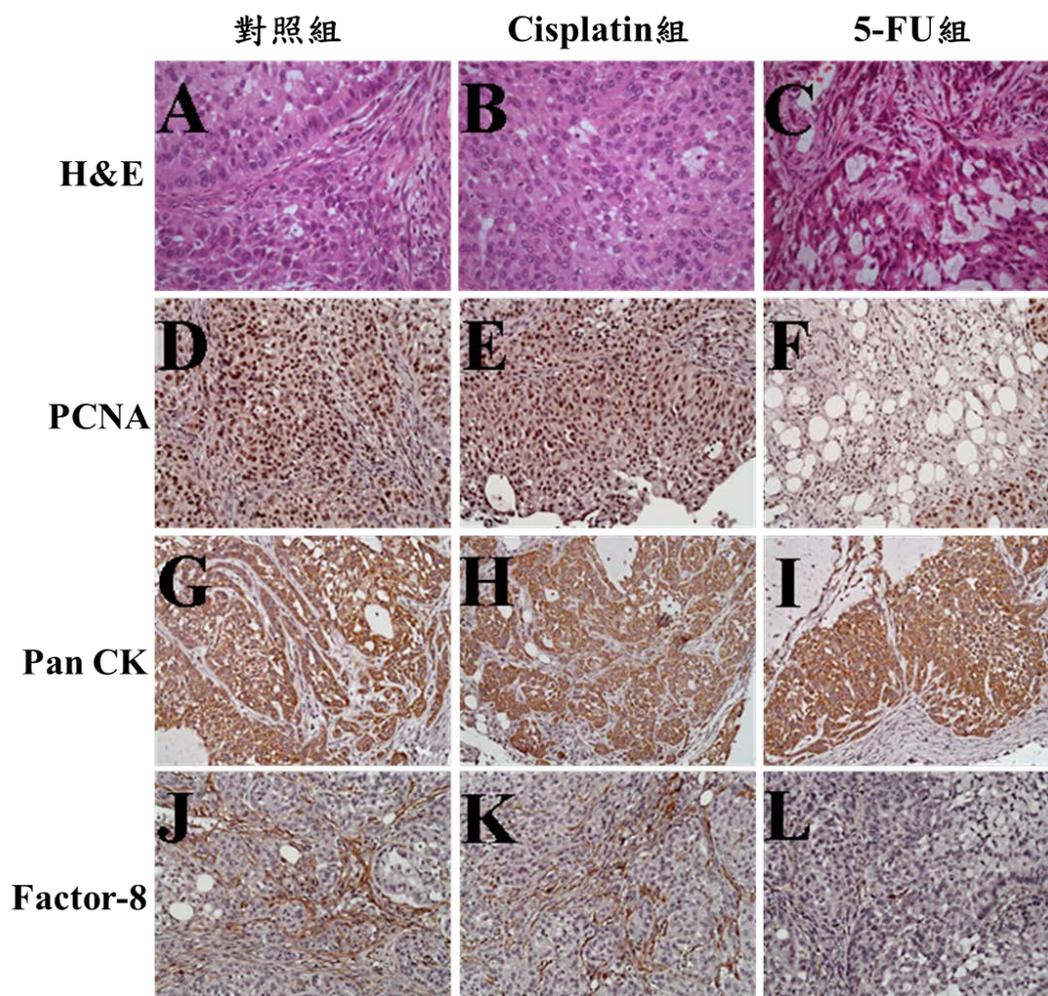


圖 7 試驗三的腫瘤組織切片 (H&E 染色與免疫組織化學染色)。對照組：A、D、G、J；Cisplatin 組：B、E、H、K；5-FU 組：C、F、I、L。A-C：H&E 染色、D-F：增生細胞核抗原 (PCNA)、G-I：細胞角質蛋白 (Pan CK)、J-L：第 8 因子 (Factor-8)
 Fig. 7 Experiment 3: tumor tissue sections (H & E staining and immunohistochemical staining). Control group: A, D, G, J; Cisplatin group: B, E, H, K; 5-FU group: C, F, I, L. A-C: H & E staining, D-F: PCNA, G-I: Pan CK, J-L: Factor-8.

表 6 試驗三的器官轉移、細胞有絲分裂、PCNA、Pan CK 與 Factor-8 的結果
 Table 6 Experiment 3: the results of organ metastasis, cell mitosis, PCNA expression, Pan CK expression, and Factor-8 expression

組別	對照組	Cisplatin 組	5-FU 組
肺臟轉移	2/8	1/8	0/6
腫瘤細胞有絲分裂相	10 ± 3.1	12 ± 2.7	3 ± 1.4**
增生細胞核抗原 (PCNA)	4	4	2*
細胞角質蛋白 (Pan CK)	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
第 8 因子 (Factor-8)	7 ± 1.9	9 ± 2.5	3 ± 1.1*

備註：前面數字代表該組的評分分數之平均值，後面數字為標準誤差。在器官轉移前面數字為發生轉移動物數，後面數字為該組所有動物數。細胞有絲分裂相為 200 倍視野下觀察到的細胞分裂數目；PCNA 的數字則為嚴重等級；Pan CK 為抗原反應有無與強弱；Factor-8 為 200 倍視野下觀察到的新生血管數目。

* = 與腫瘤組有顯著性差異 ($p < 0.05$)；** = 與腫瘤組有極顯著性差異 ($p < 0.01$)

肆、討論

根據衛福部統計，我國癌症的發病率和死亡率逐年走高，並且越來越年輕化。目前，我國惡性腫瘤發生率第 1 位是肺癌，死亡率第 1 位也是肺癌。肺癌病患常見的臨床症狀有咳嗽與咳血，有時會持續 2-3 週，即使用一些抗炎、消炎、清熱解毒的藥物，症狀也沒有明顯的改善。此外，亦可見到體重減輕、氣短和胸痛（胸痛大多在肺癌的中晚期才會出現）等情形發生（Fidler, 2003；Qiu *et al.*, 2010；Soon *et al.*, 2017）。根據臨床統計，第 I 期肺腺癌患者 5 年存活率高達 80%，但若進入 IIIB 或第 IV 期，平均存活時間僅 6 個月。存活情況有時因人而異，如接受化學治療或標靶治療的患者，可多活 1.5-2 年。肺腺癌相當可怕，常用於診斷肺癌的方法包括：電腦斷層掃描、胸部 X 光檢查、正子攝影、核磁共振攝影、組織病理學或細胞學診斷、胸水細胞學檢查、肋膜切片、超音波指引切片、電腦斷層指引切片、支氣管鏡切片與細胞學檢查、淋巴結做細針抽吸或切片檢查等。建議有肺腺癌家族史者或 40 歲以上的人，應每年接受 1 次電腦斷層掃描或做胸部 X 光檢查與痰液細胞檢查，吸菸量大的人宜每隔半年照 1 次，即早發現早期肺癌，即可早期治療。

依據病理檢驗，來確定癌細胞種類。依據各型肺癌分化程度以及形態特徵，可將肺癌分為小細胞肺癌（small cell lung cancer, SCLC）與非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）2 種，其中 3 種主要 NSCLC 為肺腺癌，鱗狀細胞癌和大細胞癌等。大約 40% 的肺癌屬於肺腺癌，鱗狀細胞癌大約占 30%，大細胞癌大約占 9%。原發性肺癌本身最常見的轉移部位是腦、骨、肝臟和腎上腺（Venur *et al.*, 2018），活檢組織進行免疫染色通常有助於確定癌症原發部位（Yan *et al.*, 2017）。癌症分期是影響肺癌預後和潛在治療措施的因素之一（Tandberg *et al.*, 2017）。對 NSCLC 的分期評估使用的是 TNM（Tumor-Node-Metastasis）分期法，是基於原發腫瘤的大小、是否轉移至淋巴結及有否遠處轉移（Chen, 2016）。使用 TNM 分期系統可將肺癌分為隱匿癌、0 期、I 期（A & B）、II 期（A & B）、III 期（A & B）和 IV 期。這一分期系統可輔助選擇治療措施和評估預後（Tazza *et al.*, 2017），可用於達到精準醫療。本研究使用 A549 是肺腺癌細胞株，因此屬於 NSCLC。肺腺癌是一種分化生長速度極快的癌症，早期幾乎沒有任何症狀，一旦出現不適，往往已進展到第 III 期甚至第 IV 期，預後相當不理想。此外，本研究建立的肺癌模式為異位癌模式（皮下接種），為模擬轉移性癌症。

肺癌的治療取決於癌細胞的類型、轉移程度和病人的身體狀況。通常的治療措施包括外科手術療法、化學療法、放射線療法、標靶療法及和緩醫療等（Chougule and Basak,

2017 ; Refai *et al.*, 2017 ; Soon *et al.*, 2017 ; Ujiie *et al.*, 2017)。對大多數早期的 NSCLC 患者，會選擇外科手術切除腫瘤，並在切除部位進行放射線治療，以降低可能復發的風險 (Ujiie *et al.*, 2017)。SCLC 通常使用化學療法和/或放射線療法或是早期 SCLC 以外科手術切除後，再進行放射線治療 (Ujiie *et al.*, 2017)。此外，預防性腦照射 (prophylactic cranial irradiation, PCI)，用於降低腫瘤轉移風險，對 SCLC 最有用 (Venur *et al.*, 2018)。另外，對晚期肺癌來說，靶靶療法變得越來越重要 (Chougule and Basak, 2017)。和緩醫療可以避免無用但昂貴的治療措施，適用癌症晚期的病人 (Siegel *et al.*, 2017)。

肺癌治療後之預後方面，在已開發國家如美國，16.8% 肺癌患者確診後，可存活至少 5 年；在英國，低於 10% 肺癌患者確診後，可存活至少 5 年。開發中國家，當確診時往往已是癌症晚期，30-40% 的 NSCLC 已是 IV 期，60% 的 SCLC 也已發展到 IV 期 (Siegel *et al.*, 2017)。確診時分期越晚肺癌患者存活時間越短，最早期確診的病人中，70% 存活至少可達 1 年，最晚期確診的病人則下降到 14% (Siegel *et al.*, 2017)。

當前肺癌治療的研究方向包括活化免疫系統來攻擊腫瘤細胞的免疫治療、透過單獨或合併遺傳學、化學療法和放射線療法等，這些新的治療肺癌的研究理論，主要是藉由干擾癌細胞逃避宿主免疫系統攻擊的能力 (阻斷 CTLA-4 或 PD-1 的訊息傳遞鏈) (Cho, 2017)。目前，肺癌病人進行化療的主要問題是癌細胞出現藥物耐藥性。因此，未來可建立耐藥細胞株，並與其親代細胞比較研究這些細胞株，以確定其分子、生物化學性質是否發生改變，將是重要的研究策略。確定這些藥物耐藥性的分子決定因素很重要，建立藥物耐藥性的細胞與動物模式，是在臨床試驗之前應該解決的重要問題之一。

本研究共執行 3 次異種異位 A549 肺癌小鼠模式建立與臨床癌症藥物治療，由結果可知 NOD SCID 小鼠 (NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/NcrCr1) 可適用於人類來源肺癌細胞的接種，並於接種後 15 日起，即可進行藥物治療功效評估。此外，A549 接種 1 隻 NOD SCID 小鼠的總細胞數為 1×10^7 ，經由 3 次試驗，共執行 72 隻 NOD SCID 小鼠，其腫瘤生長體積於藥物功效試驗前相當，3 次試驗無統計上差異。因此，在建立以 A549 細胞株的小鼠模式方面，建議每隻老鼠採用總細胞數 1×10^7 進行接種，並於接種 15 天後，腫瘤體積可達 100 mm^3 ，即可進行藥物功效測試。

在臨床癌症化療藥物的選擇方面，3 次試驗共執行 2 種臨床癌症化療藥物 5-FU 與 Cisplatin。在 5-FU 的治療策略方面，採取每週 3 次投藥，每次試驗共計 12 次投藥，藥物濃度分別為 17.5、20 與 35 mg/kg body weight，投藥方式採尾靜脈內投藥或腹腔內投藥，投藥體積皆為 $100 \mu\text{L}$ 。由 3 次試驗結果可見，若要執行每週 3 次投藥，每次試驗共

計 12 次投藥，35 mg/kg body weight 採尾靜脈內或腹腔內投藥會造成老鼠全數死亡或部分死亡，因此可能不適合用於此種治療頻率，但 17.5 與 20 mg/kg body weight 建議可適用於此種治療頻率，投藥方式則採尾靜脈內投藥。

Cisplatin 的治療策略方面，採取每次試驗 3 次投藥或僅 1 次投藥，藥物濃度為 4 mg/kg body weight，投藥方式採腹腔內投藥，投藥體積為 100 μ L。由 2 次試驗結果可見，在腫瘤體積與重量的結果，試驗二的 3 次投藥顯著優於 1 次投藥（試驗三），因此 Cisplatin 採 1 次腹腔內投藥，不適合用於當做正對照組，Cisplatin 採 3 次腹腔內投藥，較適合用於當做正對照組。根據文獻指出，臨床患者通常對於 Cisplatin 的化療具有良好的初始反應，但隨後因為癌細胞產生 Cisplatin 耐藥性（cisplatin resistance），顯著降低其臨床上抗癌的功效性（Galluzzi *et al.*, 2012；Wu *et al.*, 2015）。因此，設計 4 mg/kg body weight Cisplatin，1 次腹腔內投藥，來降低癌細胞產生 Cisplatin 耐藥性，並想了解是否亦具有抑癌功效。根據本研究結果得知，4 mg/kg body weight Cisplatin，1 次腹腔內投藥不具抑癌功效，但是否產生耐藥性，需要再進一步確認。

比較 5-FU 與 Cisplatin 的治療策略，來選出未來執行相關藥物功效試驗之正對照組。根據 3 次試驗結果，建議選擇 17.5 與 20 mg/kg body weight（每週 3 次尾靜脈內投藥，每次試驗共計 12 次投藥）來當作正對照組之參考藥物治療策略。

有關病變判讀與分析方面，於犧牲時進行各臟器（肝臟、脾臟、肺臟等）與腫瘤採樣，並以 10% 中性福馬林固定臟器與腫瘤，之後修片並進行 H&E 染色及病理觀察與判讀和免疫組織化學染色。在組織病理學檢查與病變評分方面，經 H&E 染色後之切片，置於光學顯微鏡下觀察。組織學分析與評估的指標，包括腫瘤細胞是否發生轉移與腫瘤細胞有絲分裂相的數目。由 3 次試驗結果得知，A549 屬於高度惡性的癌細胞，於對照組呈現腫瘤細胞發生轉移與有絲分裂相旺盛。此外，於試驗三的 Cisplatin 組亦可見腫瘤細胞發生轉移。因此，腫瘤細胞是否發生轉移與腫瘤細胞有絲分裂相的數目可用於評估後續藥物功效成功與否之指標。在免疫組織化學染色結果方面，切片分別以抗增生細胞核抗原（PCNA）、抗泛細胞角質蛋白（Pan CK）及抗第 8 因子（Factor 8）的單株抗體進行染色與後續呈色與評分等級。由 3 次試驗結果得知，對照組高度表現 PCNA、Pan CK 及 Factor 8；5-FU 組與 Cisplatin 組表現 PCNA、Pan CK 及 Factor 8 顯著低於對照組；5-FU 組與 Cisplatin 組於表現 PCNA、Pan CK 及 Factor 8 相較下，則呈現顯著性降低或相當。因此，免疫組織化學染色的 3 種指標（PCNA、Pan CK 及 Factor 8），亦可使用於評估後續藥物功效成功與否。

伍、結論

隨著醫療照護的進步，人類平均壽命大幅提高。然而，將近 70% 的 NSCLC 病人在診斷時已屬局部晚期或發生轉移，而無法接受手術治療。因此，發展新的抗癌藥與治療策略實屬必需，提升生技醫藥產品動物功效及安全驗證能量，發展一套肺癌小鼠動物模式，可用來檢測各研發單位所研發的抗癌藥的功效與探討藥物抗癌機制，將可參與搶食全球肺癌治療市場。此外，腫瘤細胞轉移、腫瘤細胞有絲分裂相、增生細胞核抗原 (PCNA)、泛細胞角質蛋白 (Pan CK) 與第 8 因子 (Factor 8) 做為肺癌治療分析指標。組織病理評分結果，將可做為藥物治療後之評估依據。

本研究目的在於以 A549 人類肺癌細胞株誘導建立異位異種移植的 A549 肺癌小鼠模式，並搭配肺部組織病理學與細胞學判讀檢測技術，來建立一套抗肺癌藥物篩選系統，利用此系統來進行抗肺癌研發藥物標的篩選與治療策略設計。由結果得知，目前已成功建立以 A549 人類肺癌細胞株進行右腹脇部皮下接種誘發異位異種移植肺癌小鼠模式；成功建立對特異性腫瘤標誌進行標定，並以免疫組織化學染色進行檢測與評估；成功建立肺部病變分析技術平台，完成一套抗肺癌藥物篩選系統。根據這些已完成建置之動物模式、檢測與判讀平台，未來將有效協助生技廠商篩選有效研發標的與測試其研發藥品功效，作為進入臨床試驗之功效評估依據，加速進入臨床試驗。

參考文獻

- 民國 105 年死因統計年報。2016。死因統計。衛生福利部。台北。台灣。
- Chen, K. N. 2016. Small cell lung cancer and TNM staging. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 19: 409-412.
- Cho, J. H. 2017. Immunotherapy for non-small-cell lung cancer: current status and future obstacles. *Immune Netw*. 17: 378-391.
- Chougule, A., and S. Basak. 2017. Epidermal growth factor receptor T790M testing in progressed lung cancer: A review of sensitive methods for analysis of tissue and liquid biopsy samples. *Indian J. Cancer* 54 (Supplement): S45-S54.
- Doré, J. F., M. Bailly, and S. Bertrand. 1987. Metastases of human tumors in experimental animals. *Anticancer Res*. 7: 997.
- Duhig, E. E., A. Dettrick, D. B. Godbolt, J. Pauli, A. van Zwieten, A. R. Hansen, I. A. Yang, K. M. Fong, B. E. Clarke, and R.V. Bowman. 2015. Mitosis trumps T stage and proposed international association for the study of lung cancer/american thoracic society/european

- respiratory society classification for prognostic value in resected stage 1 lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 10: 673-681.
- Fidler, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer* 3: 453-458.
- Galluzzi, L., L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, and G. Kroemer. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31: 1869-1883.
- Harris, J. E. Jr., J. Shin, B. Lee, K. Pelosky, C. M. Hooker, K. Harbom, A. Hulbert, C. Zahnow, S. C. Yang, S. Baylin, C. Brayton, and M. V. Brock. 2011. A murine xenograft model of spontaneous metastases of human lung adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 171: e75-79.
- Khan, N., N. Hadi, F. Afaq, D. N. Syed, M. H. Kweon, and H. Mukhtar. 2007. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis* 28: 163-173.
- Li, J. J., Q. H. Gu, M. Li, H. P. Yang, L. M. Cao, and C. P. Hu. 2013. Role of Ku70 and Bax in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of A549 cells in vivo. *Oncol. Lett.* 5: 101-106.
- Li, X., Z. Lian, S. Wang, L. Xing, and J. Yu. 2018. Interactions between EGFR and PD-1/PD-L1 pathway: Implications for treatment of NSCLC. *Cancer Lett.* 418: 1-9.
- Ling, X., D. Westover, F. Cao, S. Cao, X. He, H. R. Kim, Y. Zhang, D. C. F. Chan, and F. Li. 2015. Synergistic effect of allyl isothiocyanate (AITC) on cisplatin efficacy in vitro and in vivo. *Am. J. Cancer Res.* 5: 2516-2530.
- McLemore, T. L., J. C. Eggleston, R. H. Shoemaker, B. J. Abbott, M. E. Bohlman, M. C. Liu, D. L. Fine, J. G. Mayo, and M. R. Boyd. 1988. Comparison of intrapulmonary, percutaneous intrathoracic, and subcutaneous models for the propagation of human pulmonary and nonpulmonary cancer cell lines in athymic nude mice. *Cancer Res.* 48: 2880-2886.
- Qiu, Y., H. Yang, H. Chen, L. Ge, X. Xu, X. Xiong, and J. He. 2010. Detection of CEA mRNA, p53 and AE1/AE3 in haematoxylin-eosin-negative lymph nodes of early-stage non-small cell lung cancer may improve veracity of N staging and indicate prognosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 40: 146-152.
- Refai, M., M. Andolfi, and A. Sabbatini. 2017. Physiopathology aspects of anatomical video-assisted thoracic surgery resections: current status and prospects of development. *J. Vis. Surg.* 3: 161.

- Shackelford, C., G. Long, J. Wolf, C. Okerberg, and R. Herbert. 2002. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol. Pathol.* 30: 93-96.
- Siegel R. L., D. M. Kimberly, and J. Ahmedin. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* 67: 7-30.
- Soon, Y. Y., B. Vellayappan, J. C. S. Tey, C. N. Leong, W. Y. Koh, and I. W. K. Tham. 2017. Impact of epidermal growth factor receptor sensitizing mutations on outcomes of patients with non-small cell lung cancer treated with definitive thoracic radiation therapy: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8: 109712-109722.
- Sun, S., J. H. Schiller, M. Spinola, and J. D. Minna. 2007. New molecularly targeted therapies for lung cancer. *J. Clin. Invest.* 117: 2740-2750.
- Tan, Q. J. Li, H. W. Yin, L. H. Wang, W. C. Tang, F. Zhao, X. M. Liu, and H. H. Zeng. 2010. Augmented antitumor effects of combination therapy of cisplatin with ethaselen as a novel thioredoxin reductase inhibitor on human A549 cell *in vivo*. *Invest. New Drugs* 28: 205-215.
- Tandberg, D. J., B. C. Tong, B. G. Ackerson, and C. R. Kelsey. 2017. Surgery versus stereotactic body radiation therapy for stage I non-small cell lung cancer: A comprehensive review. *Cancer* doi: 10.1002/cncr.31196.
- Tazza, M., and G. Metro. 2017. Adjuvant treatment of non-small cell lung cancer: focus on targeted therapy. *J. Thorac. Dis.* 9: 4064-4069.
- Ujiie, H., A. Effat, and K. Yasufuku. 2017. Image-guided thoracic surgery in the hybrid operation room. *J. Vis. Surg.* 3: 148.
- Venur, V. A., V. Karivedu, and M. S. Ahluwalia. 2018. Systemic therapy for brain metastases. *Handb. Clin. Neurol.* 149: 137-153.
- Wang, D., J. Q. Shi, and F. X. Liu. 1997. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 3: 101-103.
- Wu, T., M. C. Wang, L. Jing, Z. Y. Liu, H. Guo, Y. Liu, Y. Y. Bai, Y. Z. Cheng, K. J. Nan, and X. Liang. 2015. Autophagy facilitates lung adenocarcinoma resistance to cisplatin treatment by activation of AMPK/mTOR signaling pathway. *Drug Des. Devel. Ther.* 9: 6421-6431.
- Yamori, T. S. Sato, H. Chikazawa, and T. Kadota. 1997. Anti-tumor efficacy of Paclitaxel against human lung cancer xenograft. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 1205-1210.
- Yan, L. Z, E. V. Dressler, and V. R. Adams. 2017. Association of hypertension and treatment outcomes in advanced stage non-small cell lung cancer patients treated with

bevacizumab or non-bevacizumab containing regimens. *J. Oncol. Pharm. Pract.* doi: 10.1177/1078155217690921.

Yazdani, S., Y. Miki, K. Tamaki, K. Ono, E. Iwabuchi, K. Abe, T. Suzuki, Y. Sato, T. Kondo, and H. Sasano. 2013 Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* 44: 1586-1596.

Zhao, L., W. J. Wang, J. N. Zhang, and X. Y. Zhang. 2014. 5-Fluorouracil and Interleukin-2 immunochemotherapy enhances immunogenicity of non-small cell lung cancer A549 cells through upregulation of NKG2D ligands. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15: 4039-4044.

107年 5月 8日 投稿

107年 7月 18日 接受