

細胞培養

細胞培養 (cell culture) 係指在體外 (in vitro) 人工模擬出適當環境，以便對細胞或組織進行培養，且能保持特定種類細胞的型態、功能等特性，以便研究各種因素對細胞的結構、功能和各種生命活動規律的影響。細胞培養的優點包括有：第一，在人工培養的環境下容易穩定控制，可減少條件變因；第二，培養的過程相對簡單快速，因此可以大量地培養出具相同基因體、條件、性狀相似的細胞以作為實驗樣本，使實驗數據有較高的一致性。因此，在生命科學研究上，經常透過建立細胞株及細胞培養技術，有效率地去探討特定的蛋白質(或基因)在一些疾病 (e.g., 癌症、高血壓、糖尿病) 中扮演的角色。

然而，除了癌細胞 (cancer cell) 與幹細胞 (stem cell) 外，已分化的細胞是不能夠無限制地在體外不斷的分裂生長。因此需要以人工方式進行逐步改造，建立起單一類型的永生細胞株 (immortalized cell line)。這種細胞無生長限制且不易老化，可作為長久進行細胞培養的材料。此一改造過程包括將特定基因，如保護染色體末端的端粒酶等基因 (e.g., telomerase, keratins, SV40 large T antigen) 送入目標細胞中，這些特定基因的產物功能包括可以促進細胞的存活、DNA 的複製及推動細胞週期 (cell cycle)、抑制細胞凋亡等，甚至促使細胞轉型成為癌細胞。

1. 建立可以長期培養的永生細胞株，不需要送入下列哪種類型的基因？
(A) DNA 複製與修復 (B) 抑制細胞凋亡 (C) 促進細胞存活 (D) 引發細胞凋亡。
2. 下列何種原因使細胞培養成為良好的癌症研究平台？
(A) 培養的環境容易控制 (B) 實驗技術操作上方便快捷 (C) 獲得的數據有較高的一致性
(D) 以上皆是。

細胞癌化過程- Part 1. 致癌基因的活化

致癌基因 (oncogene) 通常是由參與細胞增殖 (proliferation) 與生存的基因經過突變後而形成。一旦這些促進增殖的基因發生突變，而導致異常地活化，就可能促使細胞不斷地生長。1970 年，科學家發現動物被某些病毒感染之後會長出腫瘤，因而推測這些病毒的基因體可能帶有致癌的基因。為了鑑定哪些病毒基因是致癌基因，科學家便從由病毒引起的腫瘤中萃取各種基因片段，並利用基因重組技術包裝進人造的病毒中再去感染動物細胞；若能夠使腫瘤形成，這個基因片段就是致癌基因 (Figure 1)。第一個致癌基因 v-src，是從雞的反轉錄病毒 (retroviruses) 中被鑑定出來。

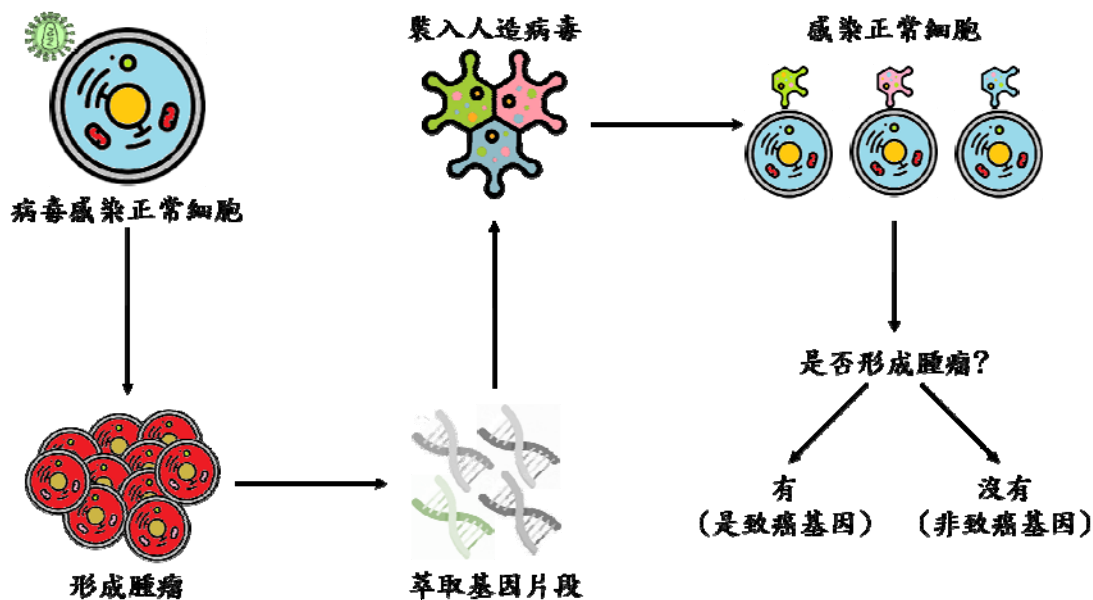


Figure 1. 致癌基因的發現。

1. 科學家是如何推論出有致癌基因的存在？
2. 藉由下表判斷哪種病毒帶有致癌基因：

(A)	病毒 a	基因 1	不會形成腫瘤
(B)	病毒 b	基因 2	不會形成腫瘤
(C)	病毒 c	基因 3	會形成腫瘤
(D)	病毒 d	基因 4	不會形成腫瘤

細胞癌化過程– Part 2. 抑癌基因失去功能

在正常的情況下，抑癌基因 (tumor suppressor gene) 可抑制細胞不正常的分裂、阻止致癌基因異常活化、協助 DNA 修復，甚至啟動細胞凋亡清除異常的細胞；反之，當抑癌基因失去功能時，將無法管控細胞分裂的過程；假如 DNA 修復等機制也未能發揮作用，就會使細胞內 DNA 的突變數量持續累積，最終導致細胞死亡或轉型成為癌細胞。科學家提出抑癌基因的假說源自 1969 年 Henry Harris 進行的體細胞雜合實驗，實驗結果顯示，將正常細胞與腫瘤細胞融合後的雜合細胞，大多數在動物體中不具有形成腫瘤的能力，因此科學家猜想是正常的細胞中有些分子機制抑制了腫瘤的發育。

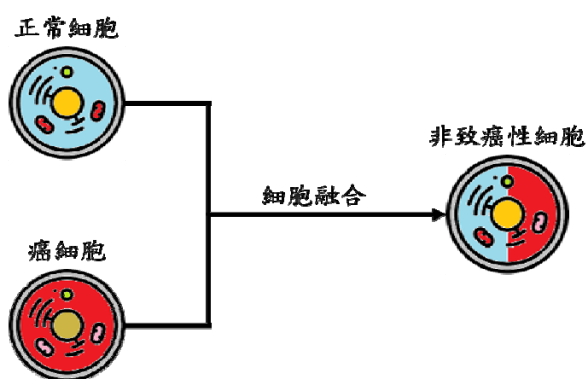


Figure 2. 細胞融合實驗

1971 年，遺傳學家 Knudson 發現視網膜母細胞瘤 (retinoblastomas) 的病患有類似單一顯性基因的遺傳機率。研究期間他將每位患者的性別、家族遺傳史、腫瘤程度進行統計並得到下表 (table 1)，發現有些有遺傳史但不患有癌症的人，他們的後代卻會產生腫瘤，這樣的發現顯示個人可以具有遺傳突變但不會產生腫瘤，此外他們也發現在沒有遺傳史的情況下患有嚴重型視網膜母細胞瘤的機率相當低。因此 Knudson 推測細胞必須要帶兩個突變基因才會成為癌細胞，並將這個基因命名為“Rb 腫瘤抑制基因 (RB1)”，另外也提出了雙重打擊假說 (Two-Hit Hypothesis；Figure 3) 解釋了為什麼具有家族遺傳史的患者通常是嚴重型，而不具有遺傳史的話通常是輕微型的視網膜母細胞瘤。

1986 年，RB1 才被鑑定分離出來，並在多年後人們了解到，正常的 RB1 在細胞中的功能是抑制細胞週期，以利細胞在複製的時候自我檢查，因而確定了 RB1 是抑癌基因的地位。

Table 1. 視網膜母細胞瘤遺傳統計

	嚴重	輕微	總量
有遺傳史	30%	15%	45%
無遺傳史	0%	55%	55%
總量	30%	70%	100%

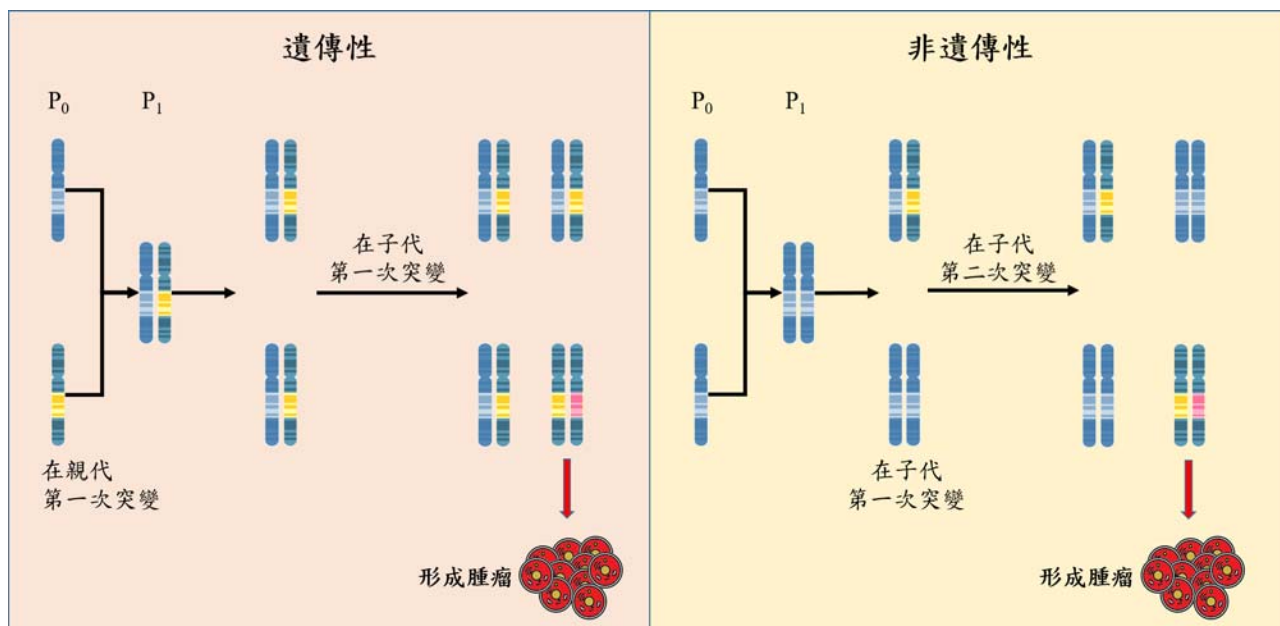


Figure 3. Two-Hit Hypothesis.

1. 正常的抑癌基因有什麼功能？

- (A) 啟動細胞凋亡 (B) 抑制細胞凋亡 (C) 使細胞癌化 (D) 促進細胞分裂。

2. 為何具有家族遺傳史的病患會比沒有遺傳史的病患容易罹患嚴重型視網膜母細胞瘤？

- (A) 因為沒有遺傳史的人身體都比較注意健康。
 (B) 因為有遺傳史的病患其等位基因只要突變一次，而沒有遺傳史的病患需要兩次突變。
 (C) 因為有遺傳史的病患運氣都很不好。
 (D) 因為沒有遺傳史的病患其等位基因只要突變一次，而有遺傳史的病患需要兩次突變。

細胞癌化過程– Part 3. 腫瘤促進子的活化

腫瘤促進子 (tumor promoter) 這類的基因在單獨存在的情況下不具有致癌的能力，但是在與致癌基因共同存在的條件下，會使得癌化的狀況加劇。以調控細胞週期相關基因表現的 Fork head box protein M1 (FoxM1) 轉錄因子 (transcription factor) 為例，當我們將 FoxM1 的表現量提高後，發現肺癌細胞的生長速度會上升，反之將 FoxM1 的表現量將低後，癌細胞的生長速度則會下降。因此我們可以推測，FoxM1 不會是抑癌基因，但是在肺癌細胞中對於細胞增殖是重要的 (Figure 1. A-C)。

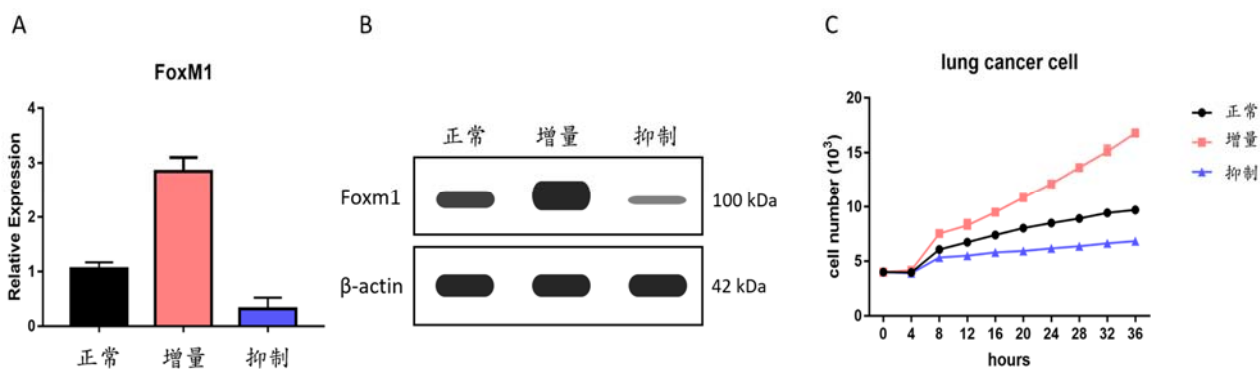


Figure 4. 對肺癌細胞進行 FoxM1 表現量增量或抑制後，用不同的實驗進行檢測。(A)用即時定量 PCR 檢測不同處理過後的肺癌細胞中 FoxM1 的 mRNA 表現量。(B)用西方墨點法檢測不同處理過後的肺癌細胞中 FoxM1 的蛋白質表現量，Beta-actin 為組間控制組。(C)計算不同處理過後肺癌細胞的生長速度。

TP53 是相當重要的抑癌基因，其功能有包括控制細胞週期、促進 DNA 修復以及使 DNA 過度受損的細胞進行凋亡；當 TP53 功能受損時，由於無法控制細胞週期，導致異常生長，並可能增加基因突變的累積。另外，於肺腺癌病人中常發現 Kras 基因發生特定的突變，Kras 突變後成為致癌基因，將刺激細胞分裂且不受控制，並造成細胞轉型。我們可藉由在正常的肺臟細胞中，分別或組合表現 Kras、TP53、FoxM1 這些基因 (Table 2)，來比較這些基因對細胞株的影響，進而推斷 FoxM1 是不是腫瘤促進子。

我們分析發現在不同的基因表現組合下 (table 2)，細胞會有不同的侵襲能力 (Figure 5)。在單獨表現一種基因的組別中 (F-H)，除了突變的 Kras 這組細胞的侵襲能力會提升外，單獨表現突變的 TP53 及 FoxM1 的細胞，其侵襲能力都沒有明顯的提高，因此我們可以推測

FoxM1 不是致癌基因。另外，在具表現突變 Kras 及 TP53 的情況下 (B-C)，表現 FoxM1 對細胞的侵襲能力則有明顯的提升；最後比較 FoxM1 分別與突變的 Kras 及 TP53 共同表現 (D-E)，則看到 FoxM1 與致癌基因 Kras 共同表現，可提升細胞的侵襲能力。

Table 2. 於正常肺細胞中表現(+) Kras, TP53, FoxM1 的排列組合。Δ：突變。

	control	Tumor promoter				oncogene		
group	A	B	C	D	E	F	G	H
Δ Kras	-	+	+	+	-	+	-	-
Δ TP53	-	+	+	-	+	-	+	-
FoxM1	-	+	-	+	+	-	-	+

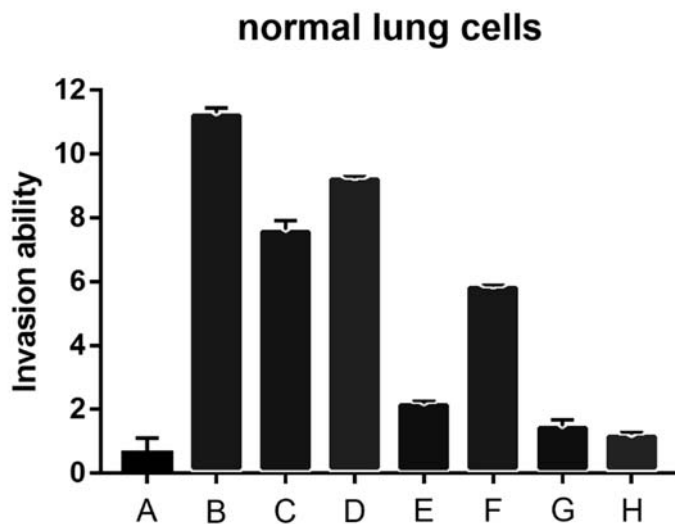


Figure 5. 在肺細胞株中表現不同的基因組合後，檢測細胞的侵襲能力。

綜合以上的結果，雖然 FoxM1 會促進細胞株與癌細胞週期提升細胞生長速度，但是不會促使細胞株癌化，而在正常細胞中如果與致癌基因共同存在時會使癌化與侵襲的情形加劇，因此我們可以推測 FoxM1 癌細胞中扮演的角色應該為腫瘤促進子。

1. 請說明為何 FoxM1 不屬於致癌基因，卻依然對癌症的發展相當重要？