

2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 090007
- 參展科別** 醫學與健康科學
- 作品名稱** *CHST11* 基因表現量對於肺癌細胞產生上皮間質轉化(EMT)之影響
The Expression of CHST11 Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in lung cancer cells
- 得獎獎項** 大會獎：一等獎
美國 ISEF 正選代表
英特爾傑出青年女性科學家獎
- 就讀學校** 臺北市立第一女子高級中學
- 指導教師** 蕭宏昇、賴廷倫
- 作者姓名** 邱蕙安
- 關鍵詞** *CHST11*、非小細胞肺癌、上皮間質轉化(EMT)

作者簡介



我是邱蕙安，目前就讀臺北市立第一女子高級中學三年級。

在投入研究的這兩年當中，我不僅僅體會到了做實驗的樂趣，許許多多實驗上遇到的困難與問題，也引導我去查閱資料、去思考，並增進了我解決問題的能力，亦從中體會到醫學研究的價值、困難與必要性。

一路走來，特別感謝教授和學長的不厭其煩的教導、專研老師的協助以及家人和同學們的鼓勵，很榮幸有這個機會可以與大家分享我的作品，也期許未來的自己可以繼續努力，抱持這份熱忱去探索更多未知的領域。

摘要

肺癌的轉移是治療失敗的主因之一，因此了解癌細胞轉移的機制對於治療肺癌極為重要。上皮間質轉化(EMT)是癌細胞轉移的起始，且代謝體異常更是影響肺癌細胞 EMT 的關鍵，然而相關機制仍不明確。本研究對肺腺癌細胞 EMT 前後的基因體學資料(GSE49644)，以及臨床上 246 位肺腺癌病人的 EMT 狀態(GSE31210)，分析其關聯性以及預後指標意義。根據分析結果，並進一步查閱相關文獻後發現 *CHST11* 在癌症中角色極不明確，因此，我們針對 *CHST11* 基因進行進一步的研究，探討 *CHST11* 表現量與肺癌細胞發生 EMT 的關係以及其可能機制。

根據實驗結果，本研究發現：一、葡萄糖胺聚糖合成路徑與非小細胞肺癌的 EMT 高度相關；二、*CHST11*-*SNAI2*路徑可調控肺癌細胞 EMT 過程；三、*CHST11* 可做為肺癌病人的不良預後指標。這些結果或許能幫助我們更了解在肺癌細胞的代謝體異常對於肺癌細胞 EMT 過程中的作用。

Abstract

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is one of the most lethal cancers, for it often develops metastasis after therapy. Previous studies have showed that cancer metastasis usually begins from epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and metabolic disorder is a key mediator of lung cancer EMT. However, the detail mechanism behind EMT process still remains unclear. In our research, both gene expression pattern of cell lines (GSE49644) and clinical database of 246 patients (GSE31210) are analyzed, and some genes in glycosaminoglycan biosynthesis pathways were found to be related with EMT. Based on our analysis results and previous studies, we further investigated the role of *CHST11* in cancer metastasis and its prognostic value in NSCLC patients. Q-PCR and western blotting results revealed that cells went through EMT showed higher expression of *CHST11* as well as some M-type markers, such as N-cadherin and Vimentin. Also, the inhibition of *CHST11* does decrease the expression of these M-type markers as well as the migration ability of cells in Boyden chamber assay. Furthermore, silencing of *CHST11* could also inhibited the expression of key EMT transcription factor, *SNAI2*, which indicated that *CHST11* might controls EMT by manipulating the expression of *SNAI2*. Finally, we used immunohistochemistry to examine the CHST11 protein level in clinical NSCLC patient tissue microarray and found that patients with higher *CHST11* expression had shorten overall survival and disease-free survival than those patients who have lower *CHST11* expression. In conclusion, our findings implicated that 1) The glycosaminoglycan biosynthesis pathways and genes are important in NSCLC EMT; 2) A novel *CHST11-SNAI2* pathway is involved in EMT cell model; 3) *CHST11* is a poor prognostic marker in NSCLC patients. These results might help us to understand the role of aberrant cancer metabolism in NSCLC EMT.

壹、前言

一、研究動機

根據台灣行政院衛生福利部公告 104 年國人死亡統計結果中，惡性腫瘤居十大死因首位，占所有死亡人數的 28.6%，而十大癌症死亡率中氣管、支氣管和肺癌又位居第一。由於初期的肺癌並不容易診斷，因此大多數的病人在被診斷出肺癌時，常發現已經轉移到別的器官。癌症相關死亡因素中，高達 90% 是因轉移所致(Keshamouni, Arenberg, & Kalemkerian, 2009)。當癌症細胞轉移開始時，會由上皮細胞轉型至間質細胞(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)。幫助增加細胞的移動性 跟侵襲性 (De Craene & Berx, 2013; Thiery, 2002; Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009; Yilmaz & Christofori, 2009)。此外，代表細胞在上皮細胞狀態(epithelial-type, E-type)的標記蛋白，E-cadherin，表現量會下降，而代表細胞為間質細胞狀態(mesenchymal-type, M-type)的標記蛋白，N-cadherin、vimentin 與 EMT 轉錄因子 SNAI 2、SNAI 或 TWIST 等，表現量則會上升。

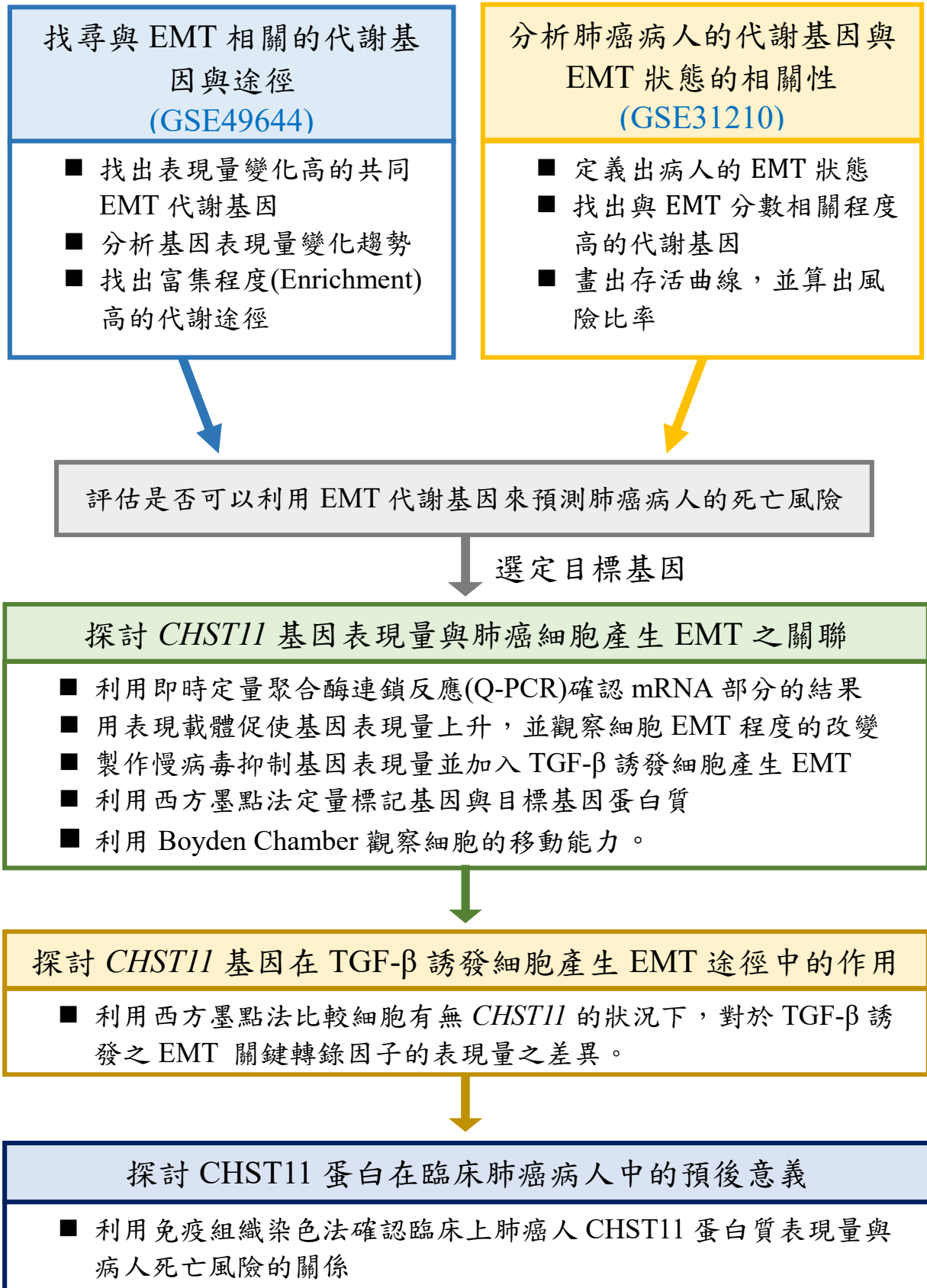
細胞代謝的變化亦是近代在癌症治療上一個重要的主題(Kee & Cheong, 2014; Masoudi-Nejad & Asgari, 2015)。代謝的改變很早就被發現為癌症細胞的特徵之一(Warburg, 1956)。瓦式效應(Warburg effect)指出，癌細胞偏向利用無氧發酵的糖解作用來增加葡萄糖的攝取以提供能量，即使在氧氣充足的環境之下。過去幾年中在癌症研究上許多重要的研究進展，幫助我們了解癌細胞的代謝轉變如何提供其快速生長所需的能量(Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009)。然而在癌細胞中，葡萄糖並不只提供癌細胞足夠能量生長，癌細胞中的葡萄糖被用於代謝途徑中，引導合成脂質、蛋白質、醣類與 DNA，並用在癌細胞生長所需(Hay, 2016; Martinez-Outschoorn, Peiris-Pages, Pestell, Sotgia, & Lisanti, 2017; Vander Heiden et al., 2009)。

然而，真正造成大部分癌症病人死亡的原因為癌細胞的轉移，而在近代的癌症研究，在轉移過程中的代謝變化仍未有完整的發現，因此我們希望利用 EMT 的細胞模型，來研究代謝與肺癌轉移間的關係。

二、 研究目的

1. 找尋與 EMT 相關的代謝基因與途徑
2. 分析肺癌病人的代謝基因與 EMT 狀態的相關性
3. 評估是否可以利用 EMT 代謝基因來預測肺癌病人的死亡風險
4. 探討 *CHST11* 基因表現量與肺癌細胞產生 EMT 之關聯
5. 探討 *CHST11* 基因在 TGF- β 誘發細胞產生 EMT 途徑中的作用
6. 探討 CHST11 蛋白在臨床肺癌病人中的預後意義

貳、研究方法與過程



一、數據分析

(一) 挑出表現量變化顯著的代謝基因

使用 Genespring 軟體，分析 GEO Datasets 中的 GSE49644 的基因資料。在三種不同的非小細胞肺癌細胞株 A549、HCC827 及 NCI-H358 加入 TGF- β 來誘導細胞發生轉型後，挑出其中基因表現量變化倍數絕對值大於等於 1.5 的共同基因，並從中篩選出與代謝相關之基因(酵素及運輸蛋白)。

開啟 Genespring 軟體，建立三個新的實驗(new experiment)，分別是三種不同的非小細胞肺癌細胞株 A549、HCC827 及 NCI-H358，主要分析的是基因表現量，因為原本 GSE49644 資料庫進行實驗所用的基因晶片是 Affymetrix，所以要選擇 Affymetrix Expression，接下來將從 GEO Datasets 下載 GSE49644 的原始數據匯入，使用軟體內分析工具中的 Fold Change，Entity List 選擇全部(All Entity)，Interpretation 選擇 EMT type，將全部數據針對中位數做標準化分析，再以 E-type 為標準做 fold change 分析，以 fold change ≥ 1.5 為界線，得到 M-type 基因表現量大於等於 E-type 的 1.5 倍的基因。再以 Moderated T-Test 中 Benjamini-Hochberg FDR 的分析方法算出 P-value，以 P-value ≤ 0.05 為界線，以確保錯誤率很低。接著使用 Venn Diagram 選出三種細胞株表現量變化顯著的共同基因，最後再利用基因中具有 EC 編號(EC number)以及基因名稱(Gene Symbol)為 SLC 開頭的基因，挑選出其中與代謝有關的基因(Metabolic Genes)，包含蛋白產物為酵素(enzyme)或運輸蛋白(transporter)的基因，選出的基因就是表現量變化顯著的代謝基因。

(二) 找出基因的表現量在產生 EMT 前後之變化趨勢(圖一)

使用 MetaboAnalyst 網站中的統計分析(statistical analysis)，分析前述所得的共同代謝基因(共 216 個探針，151 種基因)，並使用集群分析(cluster analysis)為原則分類。

先進入 MetaboAnalyst 網站，點選開始後，再點選頁面左上角的統計分析(statistical analysis)，將之前在 Genespring 分析的資料以其所規定之格式儲存為逗點分隔值檔案(csv)後上傳。為了要確保數據的完整性，需要將缺少的數據補滿，將缺少的數據設定為原始數據中的最小正值的一半；若是缺少的數據比例太高，將直接刪除該基因的所有數據。因為之前在 Genespring 已經做過標準化了，所以這裡不需要再做一次。做完標準化後，點選集群分析(Cluster Analysis)中的熱感圖(heatmap)，再選擇基因(samples)不要重新排列，即可得到所需之結果。

(三) 找出相關性高的代謝途徑及其對應基因

使用 DAVID 網站的 KEGG 途徑分析(KEGG pathway analysis)分析前述所得的共同代謝基因，找出富集程度最高的 19 種代謝途徑(以 $-\log(P\text{-value})$ 表示其相關程度)，並列出位於各個途徑中之代謝基因。

先進入 DAVID 網站，將 216 個代謝基因的探針號碼(probe ID)輸入網站，並且將識別碼(identifier)選擇為 AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID，列表類型(List type)選擇為基因列表(Gene List)。為了要使結果較容易讀，我們要將 probe ID 轉換成 Gene Symbol。點選畫面中的 Gene ID Conversion Tool，將基因列表轉換成 OFFICIAL_GENE_SYMBOL，並將轉換成 Gene Symbol 的列表存為一個新的基因列表。轉換完成後回到前一個頁面，選取新的基因列表，點選畫面中的 Functional Annotation Chart，再選取 Pathways 中的 KEGG_PATHWAY，按下 Chart 鍵，即可得到富集程度最高的數個代謝途徑以及其相關資訊和所對應的基因，再以 $-\log(P\text{-Value})$ 為橫軸，運用 excel 畫出圖形，以表示代謝途徑與代謝基因的相關性。

(四) 定義 EMT score

參考論文 Epithelial-to-Mesenchymal Transition Rewires the Molecular Path to PI3K-Dependent Proliferation. (Salt, Bandyopadhyay and McCormick, 2014)中定義細胞 EMT 狀態的方法，分析 GEO Datasets 中的 GSE31210 的基因資料，利用標記基因的表現量變化，作為細胞 EMT 程度的參考。

將已知的 M-type 標記基因表現量之總和($FNI + VIM + ZEB1 + ZEB2 + TWIST1 + TWIST2 + SNAI1 + SNAI2 + CDH2$)減掉已知的 E-type 標記基因表現量之總和($CLDN4 + CLDN7 + TJP3 + MUC1 + CDH1$)，定義出資料庫中 246 位病人的 EMT 分數(EMT score)，並利用此方式來呈現臨床病人檢體細胞的 EMT 狀態。分數越高，細胞的狀態越接近 M-type；分數越低，細胞的狀態則越接近 E-type。

(五) 畫出存活曲線圖及算出風險比率(Hazard Ratio ; HR)

以 GSE31210 為背景資料，利用 Kaplan-Meier Plotter 網站分析肺癌病人中代謝基因的存活曲線與風險比率(Hazard Ratio ; HR)。

因為我們主要研究肺癌細胞中代謝基因對於 EMT 之影響，所以點選 Start KM Plotter for lung cancer，接著輸入與 EMT score 相關係數大於等於 0.5 的 Gene Symbol，再將畫面右方的 Datasets 選為 GSE31210(n=246)，接著按下 Draw Kaplan-Meier Plot，即可得到存活曲線圖，以及該基因之風險比率(Hazard Ratio ; HR)。

二、實驗操作

(一) 培養 293T、NCI-H358 細胞

細胞培養於含 10% 胎牛血清(FBS)及 1% 抗生素(PHG)的特定培養液中，放置於恆溫培養箱(Incubator)。每 2-3 天置換一次新鮮細胞培養液，且於單層滿時進行細胞繼代培養(subculture)。

(二) 細胞繼代培養(以 1:4 分盤)

吸除培養液後，以 10c.c 的 PBS 清洗，然後將 PBS 以及雜質吸除，並加入 1c.c 的胰蛋白酶 (trypsin)，放入恆溫培養箱(Incubator)中約 10 分鐘。準備 4 個 10 公分盤，在 10 公分盤中加入 8c.c 的培養液，並標明細胞、培養液與日期。然後將放置於恆溫培養箱(Incubator)中的 10 公分盤取出，吸取 7c.c 的培養液來回沖洗細胞，然後將 10 公分盤中的混和液體吸出(共 8c.c)，在事先準備的 4 個 10 公分盤中各加入 2c.c 的液體，稍微搖晃使液體均勻後放入恆溫培養箱(Incubator)。

(三) 轉殖shRNA的大腸桿菌中萃取shRNA

在養菌管內加入5c.c.含有Ampicillin concentration的TB培養液(Terrific Broth)，利用tip從96孔盤中沾帶有目標shRNA的大腸桿菌後放入養菌管中，將養菌管放進暖房(warm room)中的搖菌機培養16個小時後，將細菌以3000rpm、4°C，離心15分鐘。除去上清液後在養菌管中加入250µl的P1，打散細胞團塊，並放入1.5c.c的eppendorf中。加入250µl的P2，搖晃使液體呈現黏稠狀，再加入350µl的N3，輕搖使管內產生白色沉澱。以13000rpm、4°C，離心10分鐘，吸取上清液至spin column中，再次以13000rpm、4°C，離心10分鐘，將管子下半部中的廢液倒掉。加入500µl的PB，以13000rpm、4°C，離心1分鐘，將管子下半部中的廢液倒掉。加入750µl的PE，以13000rpm、4°C，離心1分鐘，將管子下半部中的廢液倒掉。再一次以13000rpm、4°C，離心1分鐘，將管子下半部中的廢液倒掉。將離心後的spin column中含有DNA的上半部放到eppendorf中，加入50µl的DDW(二次去離子後的水)，放置1分鐘後，以13000rpm、4°C，離心1分鐘，離心後可得到所需之shRNA。

(四) 製作shRNA慢病毒

在實驗的前一天先將293T細胞以1:4分盤。將293T細胞換成沒有加入胎牛血清的培養液，拿兩個管子分別命名為A、B兩管，於A管中加入15 μ g的DNA(含有7 μ g shRNA、7 μ g Δ R8.91、0.7 μ g MDG)、100 μ lCaCl₂，並加入DDW使溶液總和為400 μ l，在B管中加入400 μ l的2X HBS，將配置好的A管中的液體一滴一滴加入配置好放在試管振盪器上的震動的B管中，將混合後的液體放置10分鐘後，均勻的慢慢加入養著293T細胞(約5成滿)的10公分盤中。利用磷酸鈣法將shRNA轉染至293T細胞中，把含有沉澱的混懸液加到培養的細胞上，通過細胞膜的胞吞作用攝入質體DNA，並在293T細胞內重組DNA並製造出無法再複製但具一次感染性的安全慢病毒(replication incompetent lentivirus)。24小時後，將培養液換回正常使用的培養液，病毒顆粒在細胞內組裝完成後會釋放出去，在將shRNA轉染細胞後的48小時與72小時收取上清液，液體中即含有所需感染A549細胞的病毒。並利用shRNA中所含之螢光片段，透過螢光顯微鏡觀察轉染之結果。

(五) 將模式細胞特定基因抑制並誘發成為間質細胞態(M-type)

因為本實驗中所選之模式細胞NCI-H358為原本偏向上皮細胞態(E-type)的細胞株，因此需要利用乙型轉錄因子(TGF- β)影響細胞中基因的轉錄，使其轉化成為間質細胞態(M-type)。將選出之代謝相關之基因慢病毒感染至模式細胞中以抑制目標基因表現量，加入5 ng / ml TGF- β 誘發細胞產生EMT，並在養了模式細胞的10公分盤中，以medium : TGF- β = 1:1000 的比例將其加入10公分盤中。以感染shluc慢病毒的模式細胞作為對照組，並觀察E-type及M-type標記基因其蛋白質表現，與細胞轉移能力的變化。

(六) 將模式細胞萃取出RNA轉為cDNA

cDNA 為互補 DNA，利用反轉錄酶，以 RNA 為模板做成的複製品。得知濃度後，經過計算，以每管 5000ng/20 μ L 進行反轉錄反應。使用 PCR機器進行反轉錄，軟體設定為 25 $^{\circ}$ C 10 分鐘，接著 37 $^{\circ}$ C 120 分鐘，最後 85 $^{\circ}$ C 5 分鐘，即可得到cDNA。

(七) 即時定量聚合酶鏈鎖反應

即時定量聚合酶鏈鎖反應 (qPCR) 作用的原理與 PCR 相同，但是 qPCR 在反應時就會即時得到結果。qPCR 是用化學螢光偵測 DNA 即時濃度，與 PCR 相比，污染機率較低，也較精確。若是基因的螢光較早被激發出來，表示其基因表現量較高。取 50ng cDNA 為起始模板，加入 1 μ l 的 10 μ M 特定基因引子，如 *CDH1*、*VIM* 與 *CHST11* 基因引子。與 2 μ l 的 5 倍 EVA-Green Q-PCR mastermix 補水至 10 μ l。混合後，利用 Applied Biosystem StepOne Plus 即時定量聚合酶連鎖反應器偵測基因表現量，並用 GAPDH 作為內校正基因。

(八) 將細胞製作成蛋白質樣本(sample)

利用合適的表面活性劑和還原劑，去除多糖，脂類等干擾分子，將收取的細胞中的蛋白質萃取出來。將已經誘發成為 M-type 的細胞中的 medium 倒除後，用 PBS 將雜質及廢物清洗掉，接者在細胞盤中加入 500 μ l 已經配好的 RIPA buffer (加蛋白酶與磷酸酶抑制劑 PMSF、 Na_3VO_4 、NaF、Lemp)，並利用 tip 的底部刮除盤上之細胞，將刮除後的細胞放入 eppendorf 中，並搖 20 至 30 分鐘後，將其以 15000rpm、4°C，離心 20 分鐘後，可吸取上清液，並進一步進行蛋白質的定量。過程應在低溫下進行以避免細胞破碎釋放出的各種酶類的修飾。

(九) 定量蛋白質濃度

因為蛋白質抽取後的濃度都不一致，為了能使西方墨點法後的結果分析更加精確，所以先測定蛋白質的濃度，將其濃度調至一樣，避免有誤判出現。根據標準品和樣品的數量，將 BCA Reagent A : BCA Reagent B 依照 50 : 1 的體積配製工作液，充分混合均勻。將 2000 μ g/ml 的蛋白標準液加二次水稀釋至 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 μ g/ml。將稀釋後的標準液及樣品各取 20 μ l 分別加到 96 孔盤中，各孔再加入 100 μ l BCA 工作液，混合均勻，放置於 37°C 約 30 分鐘。用分光光度計測定 562nm 吸光值，並繪製標準直線，以內插法計算出樣品濃度。

(十) 西方墨點法(Western Blot)

取已定量的蛋白質，加入 5 倍 protein loading dye，加熱至 95°C，放置5分鐘使蛋白質變性後。將夾有 12% SDS-PAGE (聚丙烯醯胺凝膠)的玻璃板固定於電泳槽內，並於槽內注滿 1X Running Buffer，以90伏特進行電泳兩小時直至蛋白質染劑至膠體底部，同時將PVDF轉印膜浸泡於100%甲醇中以活化。接下來以負極到正極的順序將海綿、兩張濾紙、膠體、轉印膜、兩張濾紙、海綿放置於轉漬槽中，並加入Transfer buffer，以90伏特電壓、200安培電流，轉印90分鐘。轉印完成後，將轉印膜以5%脫脂牛奶進行blocking，溶劑為PBST，室溫作用1小時。Blocking完成後，加入一級抗體，置於cold room過夜。隔天以PBST清洗三次，每次10分鐘，加入二級抗體，室溫下作用1小時，再以PBST清洗3次，每次10分鐘。轉印膜加入ECL substrate solution作用5分鐘後顯影於底片上。

(十一) 細胞移行實驗(Boyden Chamber)

EMT過程中會增加細胞移行遷徙能力，藉由血清梯度造成肺癌細胞對血清生長因子的趨化作用，同時利用孔隙(8 μ M)比肺癌細胞略小的疏水性聚偏氟乙烯(PVDF)膜為阻隔材質，可研究肺癌細胞在穿透膜上小孔過程中的型態改變狀況與細胞移行的能力。先以纖維連接蛋白(Fibronectin)塗層在PVDF膜的下層，增加遷徙後的細胞貼附能力。將PVDF膜組裝至Boyden Chamber中，同時於下層加入32 μ l的含血清培養液，提供細胞遷移的趨動力。Boyden Chamber上層則置入 15000顆經不同條件處理的肺癌細胞，使其懸浮於無血清培養液，產生血清梯度的趨向力。組裝完成後，將Boyden chamber靜置於37°C CO₂細胞培養箱中，靜置14小時，觀察細胞移行遷徙的能力。待時間到後，以甲醇固定細胞10分鐘，並利用Giemsa stain染劑染色一個小時後。抹除未穿透PVDF膜的細胞，利用40倍正立顯微鏡拍照並計算細胞數目。

(十二) CHST11免疫組織染色

利用組織測試片或台灣非小細胞肺癌肺癌病人臨床組織矩陣鑑定*CHST11*於肺癌病人中的表現量與預後相關性分析。臨床肺癌組織矩陣樣本蒐集自高雄醫學大學，樣本蒐集、製作組織晶片與分析基因表現的步驟與過程都經由高雄醫學大學研究倫理委員會(IRB)審核通過，同意號碼為KMUHIRB-E(I)-20160099。

組織矩陣藉由Roche Ventana自動免疫染色儀測定石蠟切片組織內*CHST11*的蛋白表現量。石蠟玻片於60度烘箱中烘片一小時，使組織略微脫蠟與固定後，將玻片放入Ventana自動免疫染色儀中，進行脫蠟、活化抗原(retrivial)、blocking等步驟。後加入500倍稀釋的*CHST11*抗體進行抗體抗原雜交反應與後續二抗增幅及DAB呈色步驟。反應完畢後，利用Hematoxylin做counter-stain後封片。在病理醫師的協助下，利用正立顯微鏡判讀結果。

參、研究結果與討論

一、找尋與 EMT 相關的代謝基因與途徑

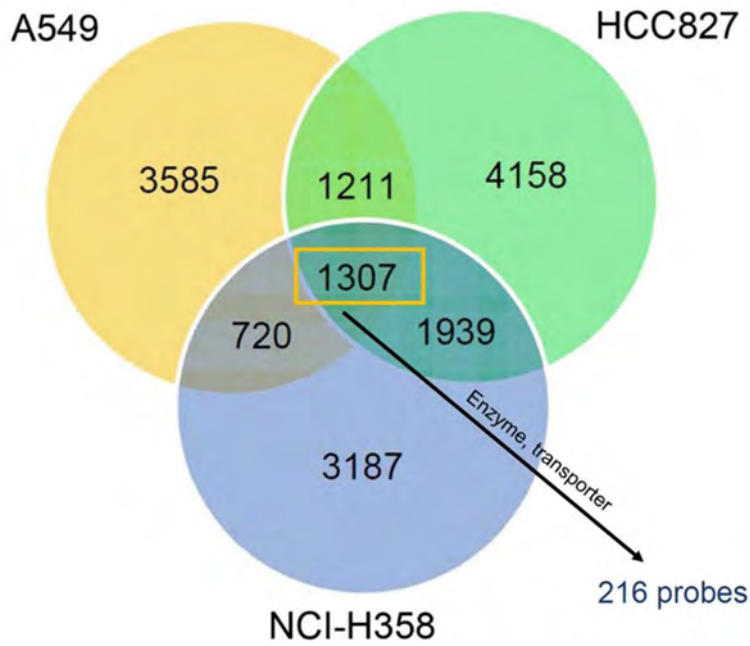
代謝變化已知為腫瘤細胞與正常細胞的顯著差異，而透過分析代謝基因在細胞 EMT 時表現量的變化，我們可以更清楚地找出代謝變化與腫瘤細胞轉移的關係。

為了找出在不同細胞株產生 EMT 過程中皆有明顯表現量的共同代謝基因。分析 GEO Datasets 中一個非小細胞肺癌基因表現量資料庫 GSE49644 中的基因資料，以 A549、HCC827 以及 NCI-H358 為模式細胞並以誘發其產生 EMT 的過程代表肺癌細胞的轉移，我們發現在經過 TGF- β 誘發成為間質細胞狀態(mesenchymal type; M-type) 的 A549、HCC827 以及 NCI-H358 細胞株中，表現量變化倍數皆大於等於 1.5 的共同探針(probes)，總共有 1307 個，共 256 個基因。為了縮小範圍且使目標基因更符合一開始的假設，我們挑出 1307 個基因中控制酵素以及運輸蛋白的代謝基因，共 216 個探針，151 個基因。(圖一)

將 151 個代謝基因匯入 MetaboAnalyst 網站，利用統計分析並以集群分析為原則分類，將其三個細胞株產生 EMT 前後的表現量以熱感圖方式呈現。我們可以更清楚的看出肺癌細胞在 E-type 和 M-type 的基因表現量有明顯的差距，且三種細胞株的基因變化的趨勢大致上相同。因此我們可以合理的推測代謝基因的表現量變化與肺癌細胞產生 EMT 有一定程度的關係。(圖二)

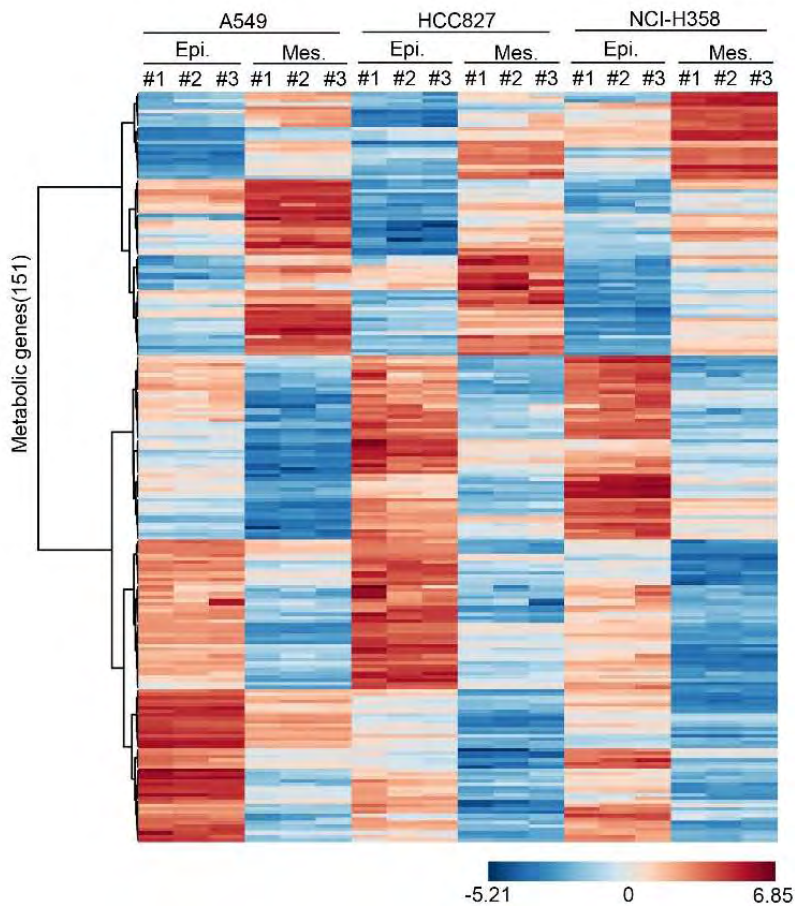
為了更加確立我們的假設，以及進一步找出可能造成此現象的原因。利用 DAVID 網站的 KEGG 途徑分析，根據 151 個代謝基因在途徑中的重要性以及數量等因素，分析出具有富集程度(Enrichment)的代謝途徑，而在其中富集程度最高的第一名與第四名皆為葡萄胺聚糖生合成代謝途徑(Glycosaminoglycan biosynthesis)，因此將葡萄胺聚糖生合成代謝途徑做為本研究的目標途徑。(圖三)

再將前述分析所得具高度相關性的代謝途徑中，所對應的表現量產生明顯變化的代謝基因，以圖表方式列出。可發現具有高度相關性的葡萄胺聚糖生合成代謝途徑中，代謝基因表現量變化皆為上升，因此我們推測在肺癌細胞產生 EMT 的過程中，此代謝途徑對於幫助肺癌細胞轉移具有重要的作用。(表一)



圖一. A549、HCC827、NCI-H358 細胞株在 EMT 時表現量變化明顯的共同基因

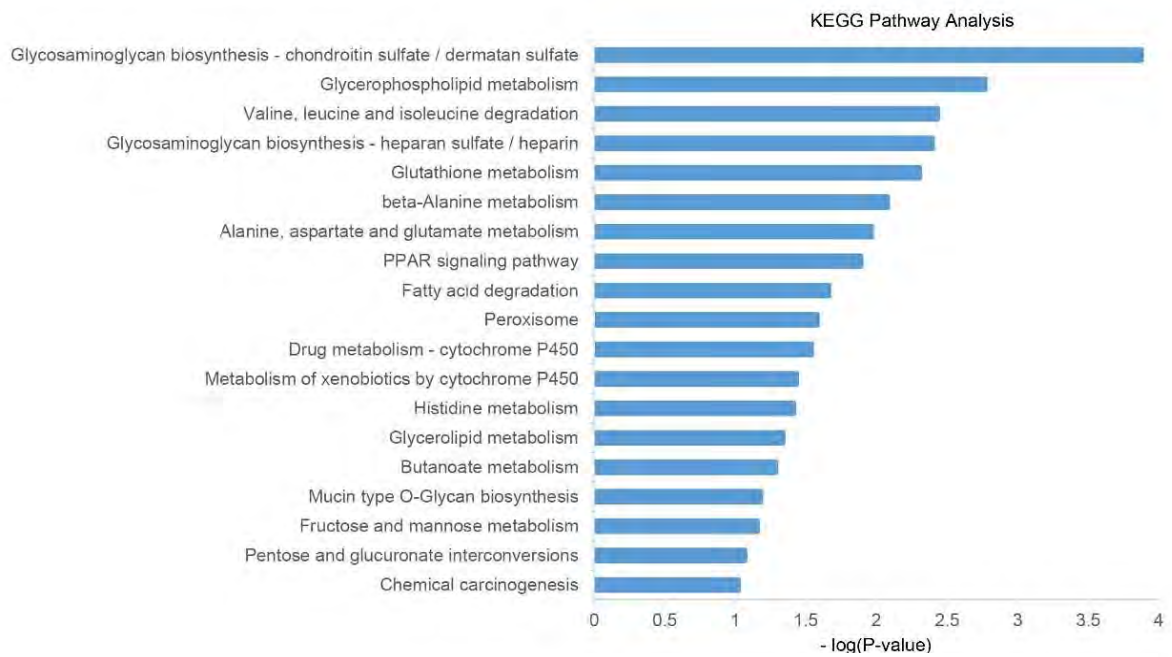
以三個圓表示 M-type 的 A549、HCC827 以及 NCI-H358 細胞株，重疊部分為表現量變化倍數大於等於 1.5 倍的共同探針個數，中間三圓重疊部分即為三個細胞株中所得的 1307 個共同探針。



圖二. A549、HCC827、NCI-H358 細胞株在 EMT 時的基因表現量變化趨勢

縱軸為 151 個代謝基因，橫軸為三個肺癌細胞株 A549、HCC827、NCI-H358 在 E-type(Epi.)和 M-type(Mes.)時的表現量，實驗重複三次(#1、#2、#3)。

紅色表示表現量較高，藍色表示表現量較低，並以色階來呈現表現量的差異



圖三. EMT 代謝基因之途徑富集分析(Pathway Enrichment Analysis)

以長條圖代表 EMT 代謝基因之途徑的富集(Enrichment)程度。 $-\log(P\text{-value})$ 的值越高，表示富集程度越高。

表一. 具高度相關性代謝途徑中的代謝基因

列出具高度相關性的代謝途徑，與途徑中相對應的代謝基因。

紅色為表現量上升的基因，藍色為表現量下降的基因。

Metabolic Pathway	Metabolic Enzymes
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	CSGALNACT2, CHST11, CHSY1, CHPF2, DSE
Glycerophospholipid metabolism	GPD2, PLA2G16, MBOAT1, LPCAT2, PLA2G4C, GPCPD1, GPAM
Valine, leucine and isoleucine degradation	BCAT1, ABAT, ALDH3A2, HIBADH, AUH
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	NDST1, HS3ST3A1, EXT1, HS3ST3B1
Glutathione metabolism	GPX2, GSR, GSTA4, G6PD, MGST1
beta-Alanine metabolism	ALDH1A3, ABAT, ALDH3A2, ALDH3B1
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	ALDH5A1, GFPT2, ABAT, ASNS
PPAR signaling pathway	ACOX2, CPT2, ACSL4, SLC27A2, MMP1
Fatty acid degradation	ECI1, CPT2, ACSL4, ALDH3A2
Peroxisome	ACOX2, NUDT12, NUDT7, ACSL4, SLC27A2
Drug metabolism - cytochrome P450	GSTA4, ALDH1A3, MGST1, ALDH3B1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	GSTA4, ALDH1A3, MGST1, ALDH3B1
Histidine metabolism	ALDH1A3, ALDH3A2, ALDH3B1
Glycerolipid metabolism	AKR1B10, MBOAT1, GPAM, ALDH3A2
Butanoate metabolism	ACSM3, ALDH5A1, ABAT
Mucin type O-Glycan biosynthesis	GALNT1, GCNT3, GALNT10
Fructose and mannose metabolism	SORD, GMDS, AKR1B10
Pentose and glucuronate interconversions	SORD, AKR1B10, ALDH3A2
Chemical carcinogenesis	GSTA4, ALDH1A3, MGST1, ALDH3B1

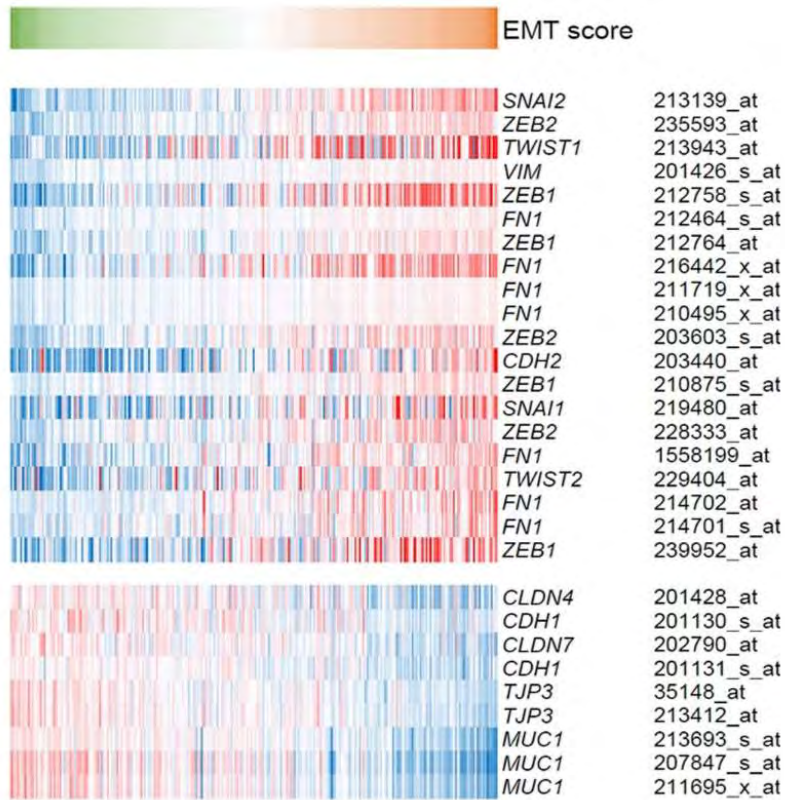
二、分析肺癌病人的代謝基因與 EMT 狀態的相關性

為了進一步找出代謝基因表現量變化與臨床的關係，因此分析了臨床病人肺腺癌細胞 EMT 程度與基因表現量的相關性。利用 GEO Datasets 中一個臨床上肺腺癌病人的基因表現量資料庫 GSE31210 中的基因資料，並且參考了基因體學中標定 EMT 狀態的方法，計算出細胞的 EMT score，EMT score 越高，則細胞的 EMT 越高，藉此定義出 246 位肺腺癌病人的 EMT 狀態。(圖四)

再將在病人肺腺癌細胞中各個基因表現量高低與病人的 EMT score 做相關性的分析，找出相關程度絕對值大於等於 0.5 的基因，由此，我們可找出在臨床上有影響的代謝基因 (圖五)。

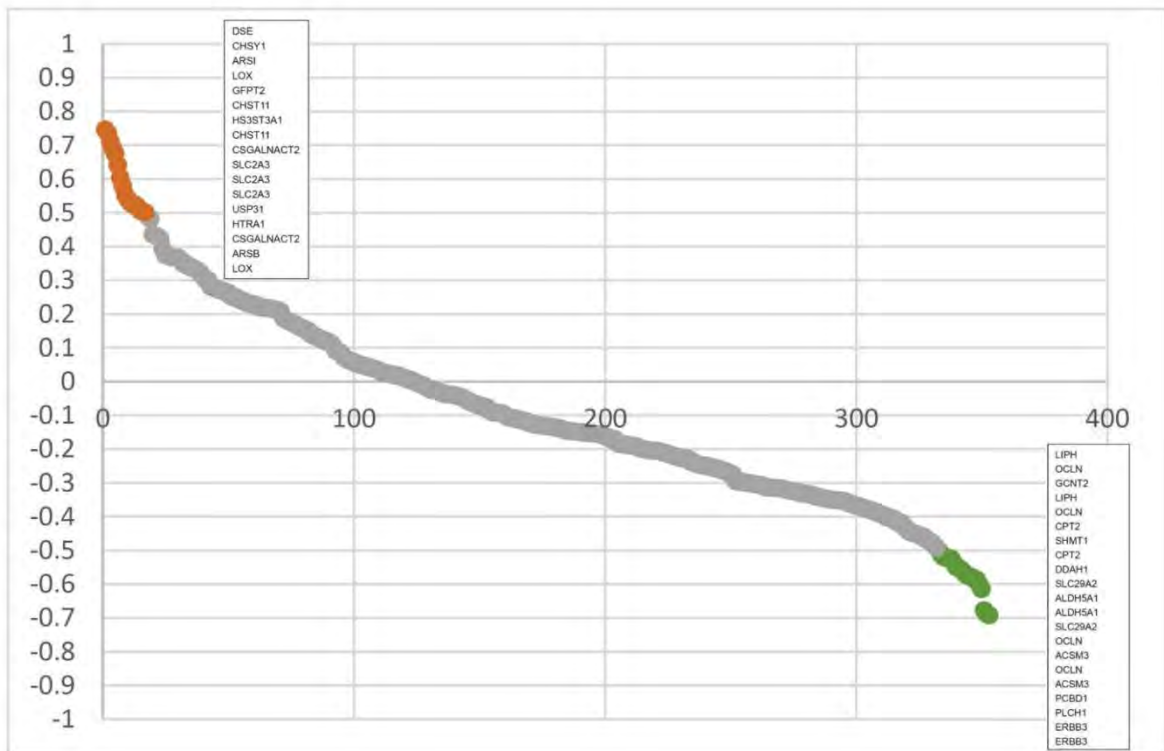
挑出兩者中具有明顯正負相關的代謝基因，相關程度絕對值大於等於 0.5 的基因，將其基因表現量高低程度與細胞的 EMT score 並列比較，可明顯看出基因表現量高低與 EMT score 有相同的趨勢。由此，可確認找到的代謝基因表現量在臨床上有一定影響。(圖六)

以 GSE31210 為背景資料，利用 Kaplan-Meier Plotter 軟體畫出存活曲線，並算出相關程度絕對值大於等於 0.5 的基因的風險比率(Hazard Ratio；HR)，將其值畫成散布圖，發現大部分基因的 HR 值皆大於 2 或小於 0.5，可看出在基因表現量高或低時，病人的死亡率也會有高低的差異，因此可推測目標基因的表現量變化確實在臨床上與病人的死亡率有關。(圖七)



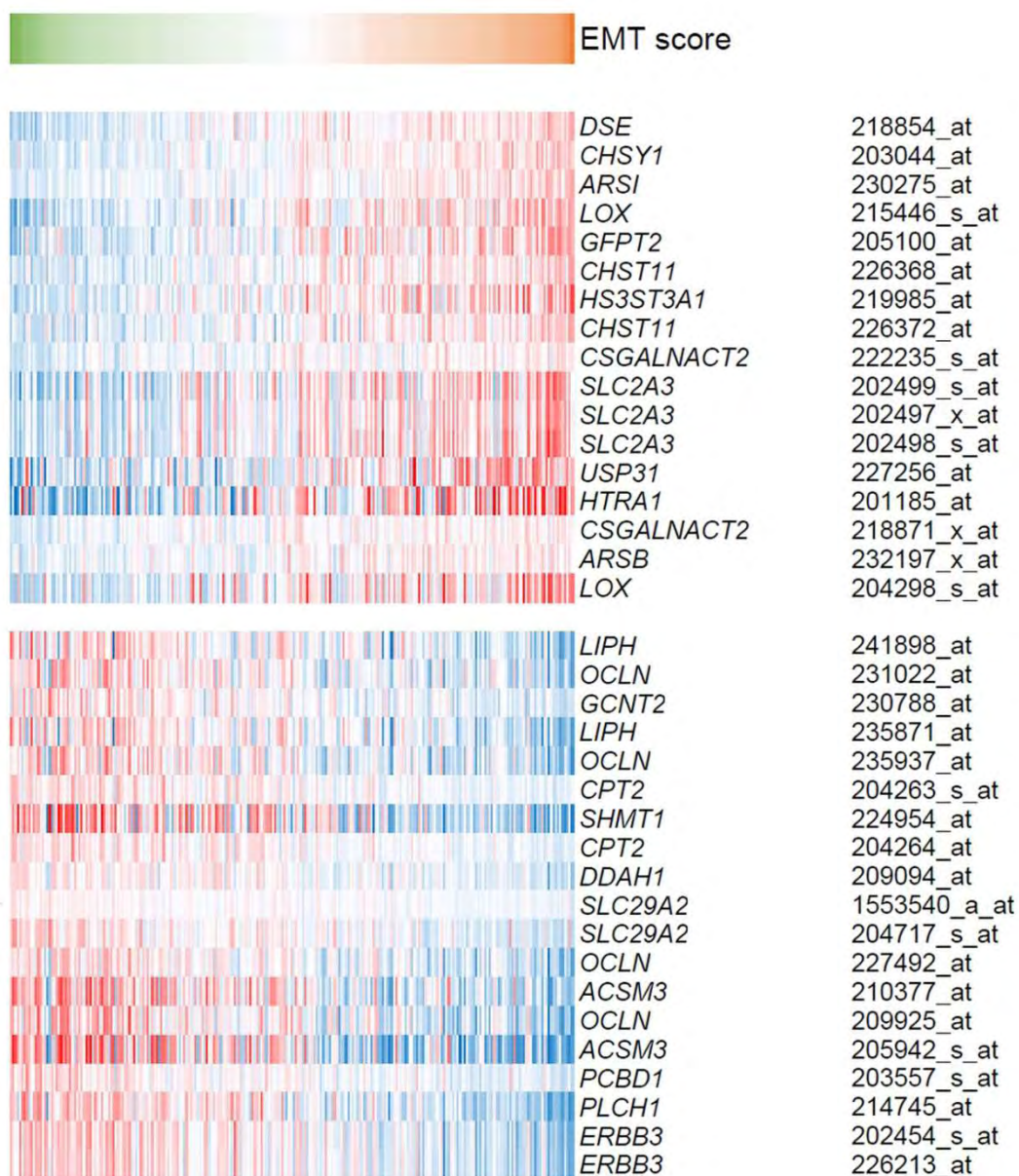
圖四 EMT 標記基因定義臨床病人肺癌細胞的 EMT score

縱軸為 EMT 的標記基因，最上方為 246 位病人的 EMT score，綠色表示分數較低，橘色表示分數較高。紅色為表現量高，藍色為表現量低，並以色階來呈現表現量的差異



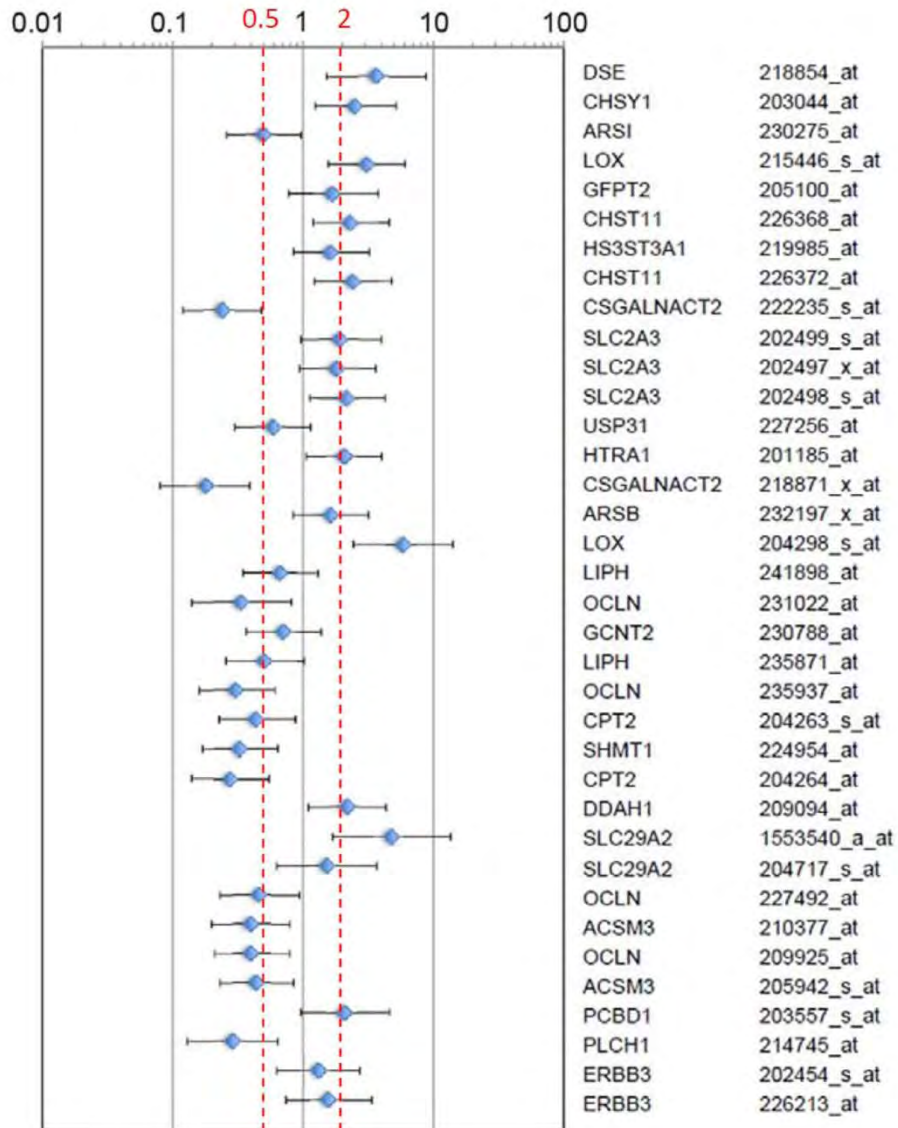
圖五. 細胞 EMT score 與基因表現量相關程度

依照相關程度由大到小排列，橘色表示相關程度大於等於 0.5 的基因，綠色表示相關程度小於等於 -0.5 的基因。



圖六. 與 EMT score 成顯著正負相關的代謝基因表現量

將表現量高低與 EMT score 的相關程度絕對值大於等於 0.5 的基因由大到小列出，並以熱感圖(heatmap)的方式呈現，紅色為表現量較高的基因，藍色為表現量較低的基因。

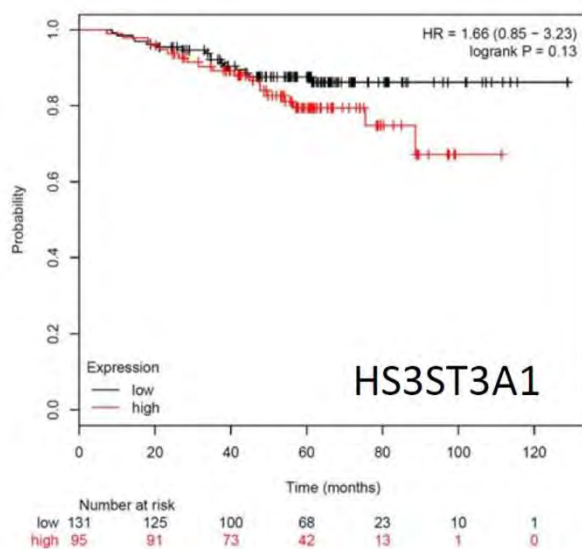
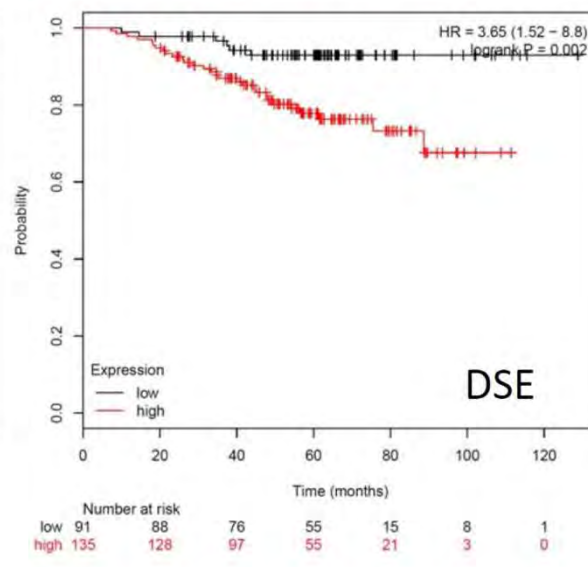
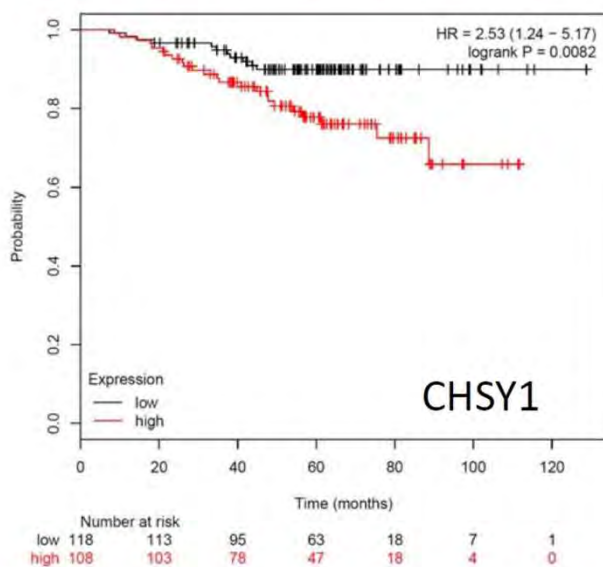
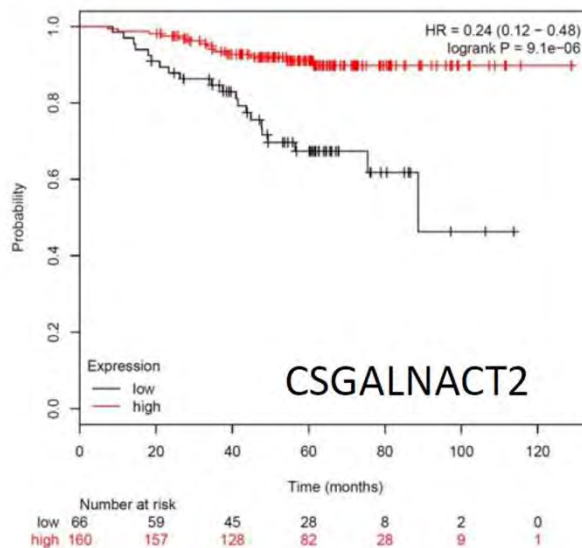
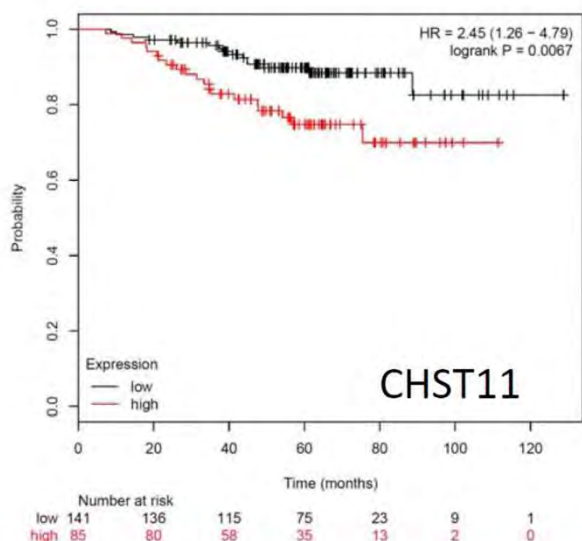


圖七. EMT 代謝基因的風險比值

根據各個基因所畫出的存活曲線算出的風險比率畫出散布圖，
 虛線為風險比率 2 與 0.5。

三、評估是否可以利用 EMT 代謝基因來預測肺癌病人的死亡風險

將第一部分分析找出葡萄糖胺聚糖生合成代謝途徑中表現量有明顯變化的代謝基因，及第二部分分析中與肺腺癌細胞的 EMT score 具有高度相關程度的基因，互相比對後，找出在兩次分析中皆出現的重要代謝基因 *CHST11*、*CSGALNACT2*、*CHSY1*、*DSE*、*HS3ST3A1* 做為目標基因並畫出其存活曲線圖後，發現 *CHST11*、*CHSY1*、*DSE* 的 HR 值皆大於 2 且 logrank P 皆小於 0.05，因此可做為顯著的不良預後因子。(圖八)



圖八. 葡萄糖聚糖合成代謝基因在肺癌病人的存活曲線分析

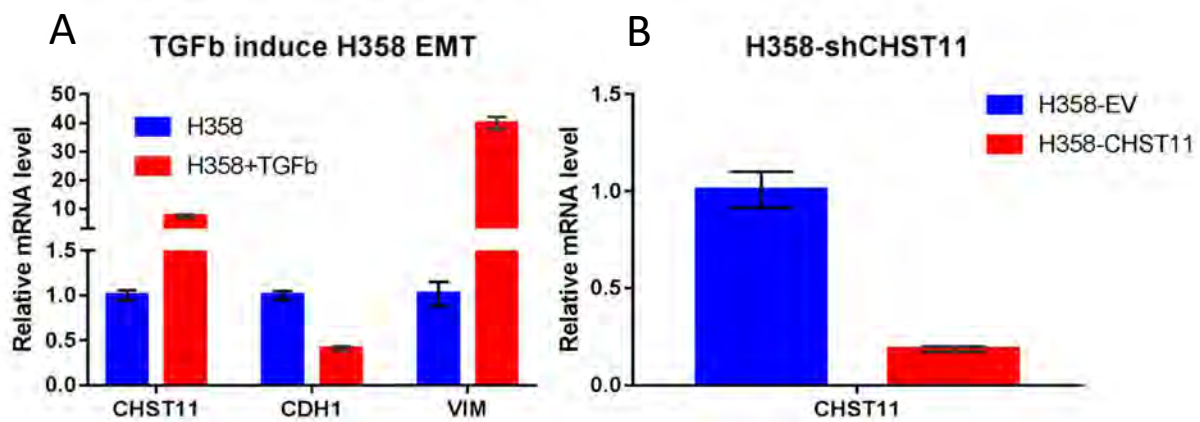
橫軸為經過的時間，縱軸為存活比例。黑色為該基因表現量較低時的情況，紅色為該基因表現量較高的情況。右上的 logrank P 表示顯著性，HR 為風險比率。

四、探討 *CHST11* 基因表現量與肺癌細胞產生 EMT 之關聯

參考前面的分析結果以及現有的文獻資料後，我們決定以 *CHST11* 作為目標基因，在 NCI-H358 細胞中加入 TGF- β 使其誘發成為 M-type，來模擬細胞發生 EMT 的過程，並以是否抑制 *CHST11* 基因表現量作為對照組。先利用 Q-PCR 確認 TGF- β 對細胞的影響以及 shRNA 對於細胞中 *CHST11* 的抑制效果，從圖中我們可發現在 TGF- β 作用下，*E-Cadherin* 表現量下降，*Vimentin* 表現量上升，代表細胞 EMT 程度上升，TGF- β 確實誘發細胞發生 EMT，且在 EMT 過程中 *CHST11* 表現量也上升；而加入 shRNA 慢病毒的細胞其 *CHST11* 基因表現量也確實被抑制。(圖九)

在加入 TGF- β 處理後，利用正常的 NCI-H358 細胞(加入空載體)作為對照組，觀察抑制 *CHST11* 基因表現量後，能否減緩細胞的 EMT 狀態。並利用西方墨點法觀察 Vimentin、N-Cadherin (M-type 標記蛋白)、 β -Actin (housekeeping protein)、以及 *CHST11* 的蛋白質的相對量值來判斷細胞的 EMT 狀態。從西方墨點法的結果中，可發現當抑制 *CHST11* 基因後，Vimentin 以及 N-Cadherin 蛋白的產量都有明顯下降，細胞的 EMT 狀態降低，代表在 TGF- β 作用下 *CHST11* 基因表現能幫助細胞發生 EMT。(圖十)

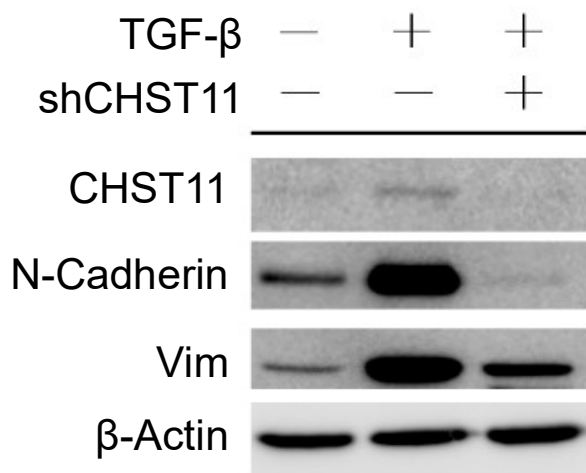
再利用 Boyden Chamber 觀察細胞的移行遷徙(migration)能力是否有變化。從 Boyden Chamber 的結果中，我們可以看出在 TGF- β 作用下抑制 *CHST11* 基因表現量後，穿過 PVDF 膜的 NCI-H358 細胞大幅減少，代表細胞的移行遷徙的能力有明顯的下降。(圖十一)



圖九. 利用 Q-PCR 確認 TGF- β 對細胞的影響以及 shRNA 對於細胞中 CHST11 的抑制效果

A.橫軸分別為 *CHST11*、*CDH1*(*E-Cadherin*)以及 *Vimentin* 的表現量。縱軸為三者基因表現量以 *GAPDH*作為內校正之後彼此間的相關程度。*E-cadherin* 為 E-type 標記基因、*Vimentin* 為 M-type 標記基因，*E-cadherin* 以及 *Vimentin* 的表現量可代表細胞的 EMT 程度。

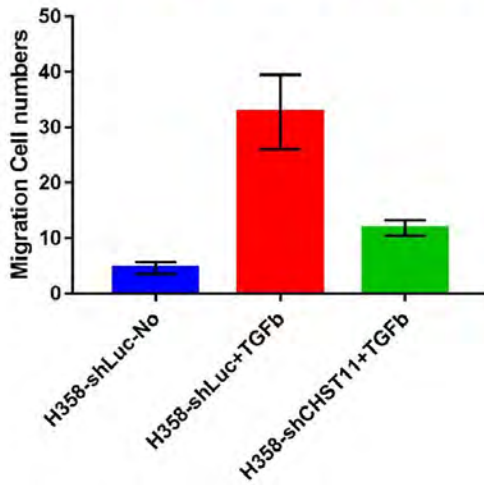
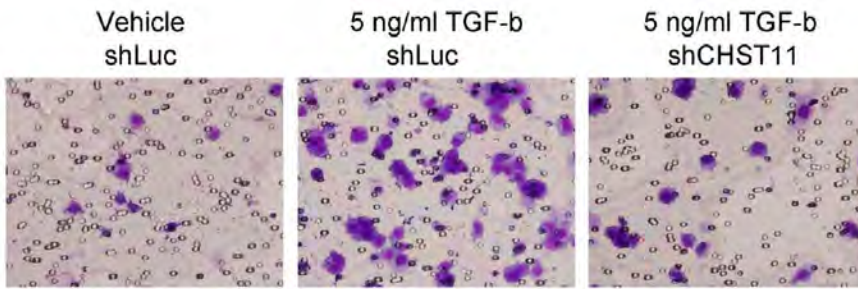
B.圖為 NCI-H358細胞利用 shRNA 慢病毒抑制 *CHST11*基因表現量的結果。縱軸為 *CHST11*基因表現量以 *GAPDH*作為內校正之後彼此間的相關程度。



圖十. 長期加入 TGF- β 處理的 NCI-358 細胞各種蛋白質表現量變化

圖中橫軸為細胞的處理方式。第一排為正常的 NCI-H358 細胞，第二排為只加了 TGF- β 的細胞，第三排為抑制 *CHST11* 基因且加了 TGF- β 的細胞。

N-cadherin、Vim(Vimentin)蛋白為 M-type 標記蛋白，N-cadherin 以及 Vimentin 蛋白的表現量可代表細胞的 EMT 程度。



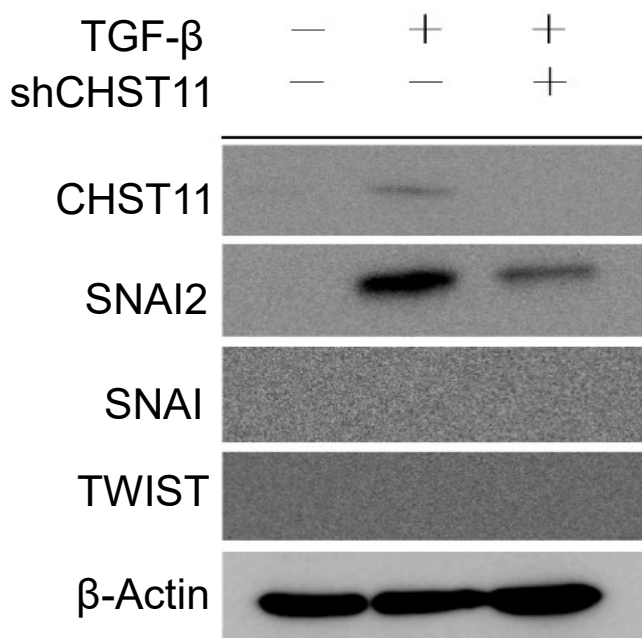
圖十一. 長期加入 TGF- β 處理的 NCI-358 細胞在 Boyden Chamber 的結果

圖上方為細胞穿過 PVDF 膜的情況，一個紫色的點即為一顆細胞。下方為將穿過膜的細胞量化後的結果，橫軸為經過不同處理後的細胞，縱軸為細胞數目。

五、探討 *CHST11* 基因在 TGF- β 誘發細胞產生 EMT 途徑中的作用

根據上述實驗結果，我們發現在 TGF- β 的作用下，*CHST11* 基因能幫助細胞產生 EMT。因此，我們希望能進一步探討 *CHST11* 基因在 TGF- β 作用的途徑中，有著什麼樣的作用。參考相關文獻之後，我們利用正常的 NCI-H358 細胞(加入空載體)作為對照組，觀察 TGF- β 的作用的途徑中幾個重要的轉錄因子，*SNAI*、*SNAI2* 以及 *TWIST* 基因，在抑制 *CHST11* 基因後其表現量的變化。根據西方墨點法結果可發現，*SNAI2* 的表現量在抑制 *CHST11* 基因表現量後有明顯的下降，因此可推測 *CHST11* 基因在 TGF- β 作用下會透過提高 *SNAI2* 蛋白質的表現量來促進細胞產生 EMT 的現象。(圖十二)

根據現有文獻，我們已知在 TGF- β 作用下會活化 SMAD 路徑，同時 SMAD3 的磷酸化後會結合至 *CHST11* 的 promoter 上，誘發 *CHST11* 表現。我們的結果發現，抑制 *CHST11* 能顯著的抑制 EMT 轉錄因子 *SNAI2* 的表現量與細胞移行遷徙能力，避免 EMT 發生。這是之前文獻未曾探討過的部分。

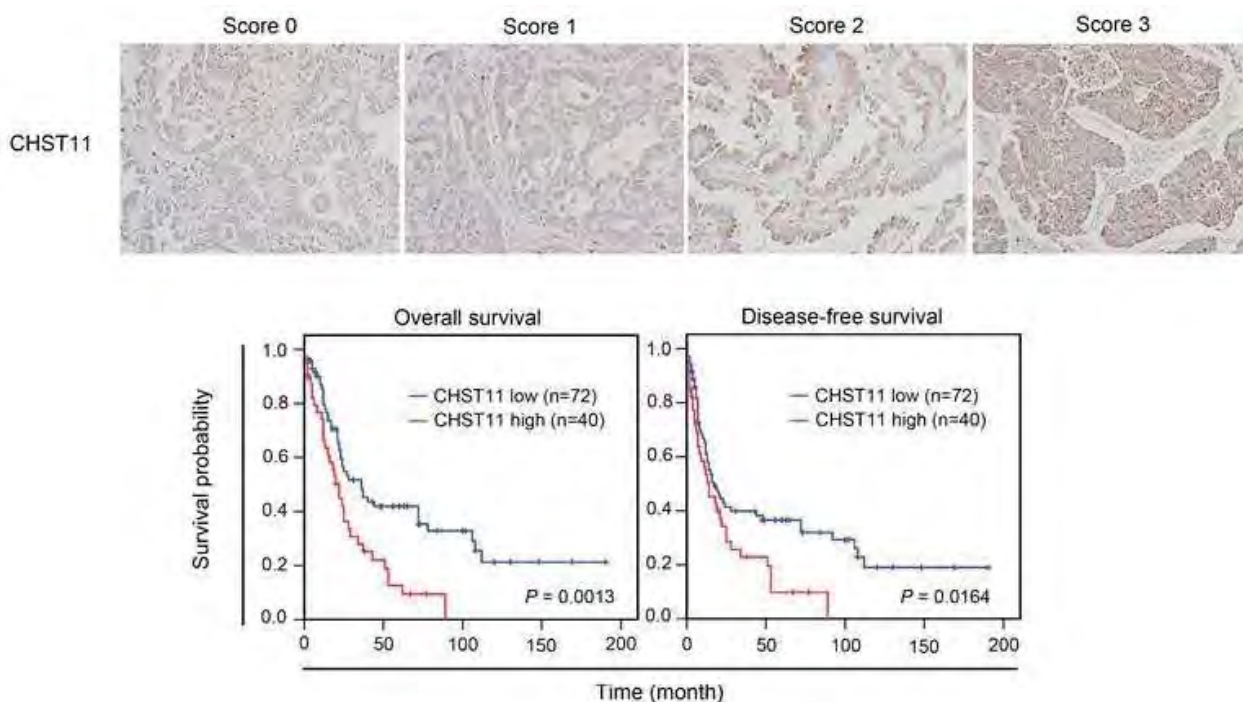


圖十二. 長期加入 TGF- β 處理的 NCI-358 細胞中 TGF- β 誘發細胞產生 EMT 途徑上重要轉錄因子的表現量變化

圖中橫軸為細胞的處理方式。第一排為正常的 NCI-H358 細胞，第二排為加了 TGF- β 的細胞，第三排抑制 *CHST11* 基因且加了 TGF- β 的細胞。*SNAI*、*SNAI2* 以及 *TWIST* 為 TGF- β 誘發細胞產生 EMT 途徑上重要轉錄因子。

六、探討 CHST11 蛋白在臨床肺癌病人中的預後意義

藉由前述實驗結果，我們可知 *CHST11* 的表現會與肺癌細胞的癌細胞移行能力有關，並且能調控 EMT 過程中的重要轉錄因子 *SNAI2* 蛋白的表現。然而 *CHST11* 在台灣臨床肺癌病人的表現並未有人探討。因此，我們利用蛋白做免疫組織染色，去研究其在臨床病人中的基因表現量。藉由測試試片調整抗體濃度後，我們可以在臨床肺癌病人的組織晶片上得到強弱不一的染色結果。將 *CHST11* 蛋白的表現量高低與病人的總體生存與無病生存期資料做 Kaplan-Meier 分析。我們發現，肺癌病人中擁有高 *CHST11* 蛋白表現的肺癌病人之總體生存(Overall survival, OS)與無病生存期(Disease-free survival, DFS)皆明顯短於 *CHST11* 表現低的病患。所以，在肺癌病人中，*CHST11* 蛋白的表現量可做為臨床不良預後之指標。(圖十三)



圖十三. 免疫組織染色鑑定 *CHST11* 做為肺癌臨床預後指標能力

上圖為在 *CHST11* 在肺癌組織矩證中的染色強度代表圖。Score 0 至 3 分別為在不同病人肺癌組織中的 *CHST11* 蛋白染色強度。Score 0 為 *CHST11* 表現最弱，Score 3 為最強。下圖為 *CHST11* 蛋白之 Kaplan-Meier 存活分析圖。下圖左為台灣肺癌病人總體生存期(Overall survival, OS)分析圖。下圖右為無病生存期(Disease-free survival, DFS)分析圖。

肆、結論與應用

一、結論

已知代謝與肺癌細胞轉移間存在關係，然而其相關機制上不明確。為了找出可能的相關機制，本研究先分析了非小細胞肺癌(NSCLC)細胞中的基因模式以及臨床上肺腺癌病人的基因資料，發現葡萄糖胺聚糖合成途徑 (glycosaminoglycan biosynthesis pathway) 在癌細胞轉移的過程中，扮演幫助細胞發生 EMT 的重要角色，且其中的 *CHST11*、*CHSY1*、*DSE* 基因可作為肺癌病人的不良預後因子。

查閱相關文獻後，我們選擇以 *CHST11* 基因做更進一步的研究。利用加入 TGF- β 誘發產生 EMT 的細胞作為研究模型，來研究 *CHST11* 基因表現量與肺癌細胞轉移間的關係，以及其可能扮演的角色。本研究發現，在 TGF- β 作用下，抑制 *CHST11* 的表現量，能夠減緩細胞 EMT 狀態上升的程度。且細胞的移行遷徙能力有明顯的下降。進一步檢測在 TGF- β 作用途徑下幾個重要的 EMT 轉錄因子，發現 *CHST11* 基因能透過提高 *SNAI2* 的表現量來促進細胞發生 EMT。

最後，本研究藉由免疫組織染色法檢測 *CHST11* 的蛋白表現量高低，並與病人的總體生存與無病生存期資料做 Kaplan-Meier 分析。我們發現，肺癌病人中擁有高 *CHST11* 表現的肺癌病人之總體生存(Overall survival, OS)與無病生存期(Disease-free survival, DFS)皆明顯短於 *CHST11* 表現低的病患。所以，在肺癌病人中，*CHST11* 的表現量可做為臨床不良預後之指標。

二、未來展望

我們的初步研究結果顯示：葡萄胺聚糖生合成代謝途徑關鍵酵素 *CHST11* 對於 TGF- β 所導致的肺癌細胞 EMT 過程扮演關鍵角色。根據 Cooney 博士報告在乳癌細胞模式中，*CHST11* 會調控細胞表面的 P-selectin 配體 chondroitin sulfate glycosaminoglycans (CS-GAGs) 的含量，藉由改變 CS-GAGs 的含量可以改變乳癌細胞的侵襲能力。在高度侵襲性的老鼠乳癌細胞 4T1 中，經酵素 Chondroitinase ABC 降解糖蛋白上的糖基配體，藉以模擬抑制葡萄胺聚糖生合成代謝途徑與抑制 *CHST11* 基因功能的狀況。此一狀況能有效的抑制 4T1 細胞在免疫缺陷鼠中的肺轉移能力(Cooney et al., 2011)。在肺癌中，葡萄胺聚糖生合成代謝途徑或 *CHST11* 基因可能亦透過同樣的機制，來調控癌細胞轉移造成的肺癌病人的不良預後。然而，詳細機制仍需進一步的證明。

此外，*CHST11* 調控 *SNAI2* 迄今未有相關文獻報導，且其詳細調控機制仍未明確。之後可藉由 cDNA microarray 分析在有無 TGF- β 與 *CHST11* 的狀態下的基因表現情況，幫助我們進一步了解細胞在此過程中的變化與相關可能機制，並進一步了解葡萄胺聚糖生合成代謝途徑在肺癌 EMT 過程中的角色。

當我們了解了這些因果關係，或許能對於肺癌 EMT 過程中的相關機制研究，找到對於肺癌 EMT 轉移過程中新的治療利基，並針對其開發新的療法。

伍、參考資料 (文獻) 及其他

1. Cooney, C. A., Jousheghany, F., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Gomes, T., Kieber-Emmons, A. M., . . . Monzavi-Karbassi, B. (2011). Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 13(3), R58. doi:10.1186/bcr2895
2. De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13(2), 97-110. doi:10.1038/nrc3447
3. Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, 16(10), 635-649. doi:10.1038/nrc.2016.77
4. Huimin Zhou, Yanping Li, Xiaobo Song, Yongfu Zhao, Lei Cheng, Lifan Zhao, Li Jia(2015) *CHST11/13* Regulate the Metastasis and Chemosensitivity of Human Hepatocellular Carcinoma Cells Via Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Dig Dis Sci*. 61(7), 1972-85. doi:10.1007/s10620-01604114-5
5. Kee, H. J., & Cheong, J. H. (2014). Tumor bioenergetics: an emerging avenue for cancer metabolism targeted therapy. *BMB Rep*, 47(3), 158-166.
6. Keshamouni, V., Arenberg, D., & Kalemkerian, G. (2009). *Lung cancer metastasis : novel biological mechanisms and impact on clinical practice*. New York: Springer.
7. Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pages, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1), 11-31. doi:10.1038/nrclinonc.2016.60
8. Masoudi-Nejad, A., & Asgari, Y. (2015). Metabolic cancer biology: structural-based analysis of cancer as a metabolic disease, new sights and opportunities for disease treatment. *Semin Cancer Biol*, 30, 21-29. doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.007
9. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. (2016). EMT:2016. *Cell*, 166(1), 21-45.
10. Salt MB, Bandyopadhyay S, McCormick F. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition rewires the molecular path to PI3K-dependent proliferation. *Cancer Discov*, 4(2), 186-99.
11. Sumit Bhattacharyya, Leo Feferman, Joanne K. Tobacman.(2015) Regulation of Chondroitin-4-Sulfotransferase (*CHST11*) Expression by Opposing Effects of Arylsulfatase B on BMP4 and Wnt9A. *Biochim Biophys Acta*. 1849(3), 342–352. doi:10.1016/j.bbagr.2014.12.009.

12. Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 442-454. doi:10.1038/nrc822
13. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
14. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
15. Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
16. Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 15-33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0

【評語】 090007

研究目的: 對肺腺癌細胞 EMT 前後的基因體學資料, 以及臨床上 246 位肺腺癌病人的 EMT 狀態, 分析其關聯性以及預後指標意義。發現 CHST11 在癌症中角色極不明確, 因此, 針對 CHST11 基因進行進一步的研究, 探討 CHST11 表現量與肺癌細胞發生 EMT 的關係以及其可能機制。

1. 需要探討 TGF- β 如何誘導 CHST11 表現? TGF- β 作用下會活化 SMAD 路徑, 同時 SMAD3 的磷酸化後會結合至 CHST11 的 promoter 上, 誘發 CHST11 表現, 需要有實驗證據來證明.
2. CHST11 表現在肺癌病人的臨床檢體, 必須利用西方墨點來證明!