

2022 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** 缺氧誘導肺腺癌分泌含有 CD151 之 Exosome
於肝臟營造腫瘤轉移前微環境相關作用
- 得獎獎項** 二等獎
土耳其音樂科學工程博覽會正選代表
- 就讀學校** 高雄市立高雄女子高級中學
- 指導教師** 柯宏龍、黃冠陵
- 作者姓名** 沈子晏
- 關鍵詞** 肺癌、肝臟轉移微環境、Exosomes

作者簡介



我是目前就讀高雄女中二年級的沈子晏，因父親從事醫療工作，常常和我分享許多相關知識，使我從小就對疾病與人體有很大興趣。很感動有機會在課餘時間進入實驗室開拓不一樣的視野，待在高醫實驗室快兩年，心中感激不盡這一路上接受教授與學長姐們很大的幫助與支持，不只教我學術上的知識與培養科學邏輯思考，也建構我在實驗失敗中的挫折忍受力。

摘要

缺氧 (Hypoxia) 在癌症中，影響腫瘤微環境 (Tumor microenvironment, TME) 的重塑扮演重要的角色。原位癌細胞與欲轉移之遠端器官的微環境間，會透過細胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 進行細胞間相互作用，對於轉移前腫瘤微環境 (Pre-metastatic niche, PMN) 的形成和轉移過程至關重要。

本研究目的在闡明缺氧條件下，肺腺癌如何透過產生的外囊泡重塑肝臟轉移前微環境。結果顯示缺氧刺激肺癌產生的細胞外泌體 (Exosome) 增加了肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化和血管生成。由於缺氧肺癌所分泌的 EVs 含有 CD151 蛋白，促進 HSC 的活化和血管新生。缺氧肺癌所產生的 Exosome 增加了 HSC 和內皮細胞中 FAK (focal adhesion kinase)、Src (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) 和 AKT (AKT serine/threonine kinase) 通路的激活。

總結此實驗證實了缺氧腫瘤衍生的 Exosomes，探討其中富含的 CD151 機制，活化了 HSC 與特別的訊息傳遞於細胞中，調節肝臟 PMN 的形成。因此 CD151 可作為肺腺癌轉移至肝臟的新治療靶點。

Abstract

Hypoxia plays a critical role during the evolution of malignant cells and the tumor microenvironment (TME). Cell-cell interactions via extracellular vehicles (EVs) between primary cancer cells and the microenvironment of distant organs are crucial for pre-metastatic niche (PMN) formation and metastasis. This study aimed to clarify how a hypoxic condition remodel the liver PMN through Exosomes that are shed from lung adenocarcinoma. Hypoxic lung cancer produced Exosomes increased hepatic stellate cell (HSC) activation and angiogenesis. The results revealed that Exosomes secreted from hypoxic lung cancer contained CD151 protein, which contributed to HSC activation and angiogenesis. Hypoxic lung cancer produced Exosomes increased the activation of FAK, Src and AKT pathway in both HSC and endothelial cell. Overall, our study revealed tumor-derived CD151-enriched Exosomes, a unique intercellular communication, modulated the formation of liver PMN, and CD151 could be a novel treatment target for lung adenocarcinoma liver metastasis.

壹、研究背景與文獻回顧

一、 肺癌相關背景

肺癌 (Lung cancer) 的形成，是位在支氣管或肺臟的細胞具有異常生長能力，不僅侵襲力強，會破壞肺周圍健康組織，當癌細胞轉移時，會干擾身體其他器官的正常運作，是現今流行的癌症之一。根據美國癌症協會 (American Cancer Society) 統計資料，癌症死亡人口當中的四分之一來自肺癌患者，在美國的癌症死亡率排名第一 (Siegel, Miller et al. 2020)。在台灣，依據衛生福利部國民健康署的統計顯示，癌症死亡率中，肺、支氣管及氣管癌症死亡率位居第一，因此，肺癌是世界公共衛生重要問題。

肺癌依生長與擴散方式不同可分為兩大類：小細胞肺癌 (Small-cell lung carcinomas, SCLC) 與非小細胞肺癌 (Non-small cell lung carcinomas, NSCLC)。前者小細胞肺癌大約占肺癌 15%，從肺的縱膈開始生長，其分化程度高且侵襲力強、容易迅速擴散到淋巴系統中，起初治療方法多為化療或放射治療。後者非小細胞肺癌占肺癌大約 85% 較常見，可依生長位置分成三種類型，腺癌 (Adenocarcinomas)、鱗狀細胞癌 (Squamous cell lung cancers) 與大細胞癌 (Large cell anaplastic carcinomas)，其中又以腺癌占整體肺癌的 40%。另外非小細胞肺癌的癌症分期為 I 到 IV 期，早期 I 與 II 階段，腫瘤尚未進入淋巴循環系統中，治療方式多以手術切除腫瘤為主，且 II 期 NSCLC 患者手術後的 5 年生存率為 30% - 50%，在晚期 III 與 IV 階段，多以化學藥物治療或放射治療減緩症狀，但 40% 患者被診斷出肺癌時已是 IV 階段末期，此時肺癌細胞已擴散至淋巴系統中或具有轉移侵襲的能力 (Duma, Santana-Davila et al. 2019)。

除了化療與放療，臨床上也可透過已知的癌細胞生物標誌物 (biomarkers)，進行免疫療法或標靶治療。像是針對特定分子的抑制劑，如 Angiogenesis inhibitors、VEGF inhibitors、Pro-apoptotic agents 等。儘管治療方法眾多，現今治療方法對 60% 的肺癌晚期患者具有較差的預後結果，因此持續研究並找出更專一、穩定、有效且具預防性檢測功能的生物標誌物依舊是當務之急 (Lemjabbar-Alaoui, Hassan et al. 2015)。

二、 腫瘤內部缺氧環境 (Hypoxia) 與缺氧誘導因子 (Hypoxia-Inducible Factor, HIFs)

腫瘤細胞因為不斷生長，因此導致原本血液循環網絡不夠使用，無法供給高度增生腫瘤足夠的氧氣及養分，便產生缺氧的環境。低氧濃度誘發缺氧誘導因子 HIF-1 α 的表達，HIF-1 α 促進細胞糖解代謝從而促進細胞生長與增殖或形成其他生物過程，如促進血管生成、逃避生理免疫辨識和增加癌細胞抗氧化能力等機制(Paredes, Williams et al. 2021)。同時缺氧情況下，為了提供癌細胞氧分與轉移時便於侵入血液循環中，產生血管新生 (angiogenesis) (Hapach, Mosier et al. 2019)。然而在缺氧環境下更容易促成腫瘤分泌相關因子 (Tumor-derived secreted factors, TDSFs) 與細胞外囊泡 (EVs) 的分泌(Liu and Cao 2016)。因此缺氧對於腫瘤細胞重塑，有利於其生存的微環境，扮演著種要角色。

三、 轉移 (Metastasis)

癌症轉移是全球癌症死亡的主要原因之一，在腫瘤轉移過程中大致可分為五個步驟：(1) 原位癌細胞不斷增殖 (proliferation)，接著改變只有周遭環境產生利於其生長微環境 (Tumor microenvironment, TME)，其四周各種的基質細胞 (stromal cells) 及功能異常的免疫細胞會聚集於此 (2) 細胞透過上皮-間葉細胞轉換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 產生細胞骨架變形，使細胞具有移行和入侵能力而得以脫離原位母細胞群；(3) 適度重塑細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 讓癌細胞侵襲基底膜與細胞爬行，使癌細胞具有黏著性的 E-cadherin 分子減弱和 N-cadherin 表達增強，並滲入 (intravasation) 血管中，到達遠端器官前，需逃避免疫系統並存活 (4) 癌細胞從血管穿透進入 (extravasation) 下一個器官；(5) 到達標的器官後開始定殖，癌細胞為了適應周遭新環境，先進入休眠狀態後才增生並產生新的腫瘤微環境(Hapach, Mosier et al. 2019, Fares, Fares et al. 2020)。

四、 腫瘤轉移前的微環境（Pre-metastatic niche，PMN）與肝臟星狀細胞（Hepatic Stellate Cell，HSC）

為了增加腫瘤細胞自身轉移的成功率，原位腫瘤在轉移前會先釋放特定分子，如腫瘤分泌相關因子（Tumor-Derived Secreted Factors，TDSFs）和腫瘤分泌細胞外囊泡（Tumor-Derived Extracellular vesicles，EVs）等，對欲轉移的標的器官進行改造，形成轉移前微環境（Pre-metastatic niche，PMN），以利於將來腫瘤細胞在特定標的器官定殖與生長(Izraely and Witz 2021)，通常免疫抑制反應（immunosuppression）、發炎反應（inflammation）、血管新生（angiogenesis）、淋巴管生成（lymphangiogenesis）、器官趨性（organotropism）和細胞外基質重塑（extracellular matrix remodeling）(Liu and Cao 2016, Guo, Ji et al. 2019)。

在腫瘤轉移的土壤與種子（"Seed and Soil"）理論中，將具轉移能力的腫瘤細胞視為「seed」，轉移標的組織視為「soil」，而 Pre-metastatic niche 扮演的角色則是使土壤肥沃的環境「niche」。癌細胞因受多種因素的調控會轉移到遠處特定器官，稱為「器官趨性」(organotropism) (Chen, Hoffmann et al. 2018)。

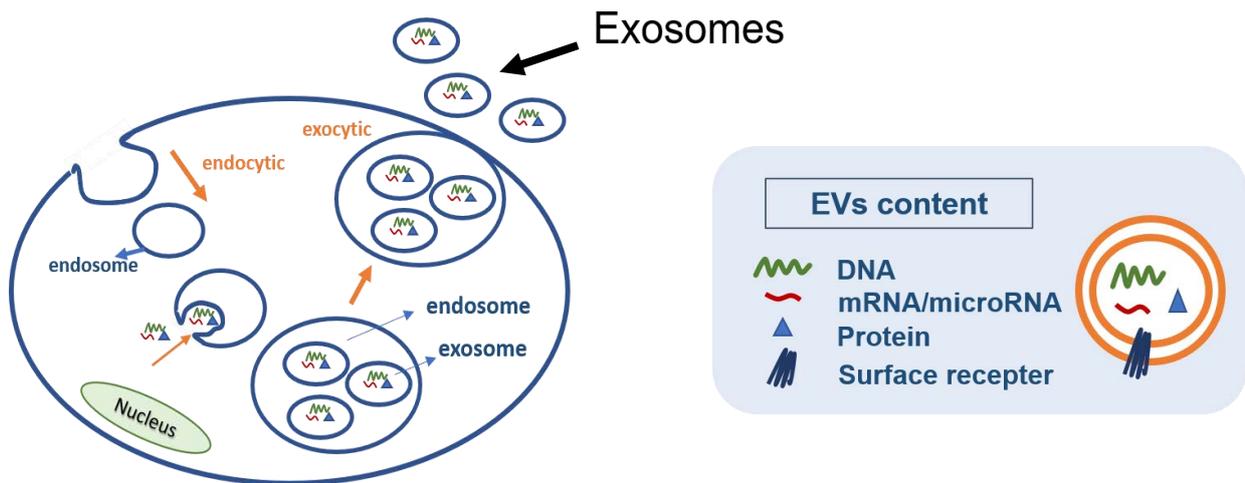
而肝臟星狀細胞（Hepatic Stellate Cell，HSC）在正常情況下，星狀細胞處於靜止休眠期，可以如脂肪細胞一樣儲存油脂或維生素。當肝臟發炎或受到其他傷害時，星狀細胞會因為一些生長因子或是發炎因子的影響開始增生與製造膠原蛋白，此時細胞進入活化狀態並釋放基質金屬蛋白酶調控細胞外基質（Extracellular matrix，ECM）。活化狀態中的星狀細胞，會釋放出原本儲存的維生素 A，並且開始製造一些因子影響周邊其他細胞，是變成肝纖維化的主要起因之一(Geerts 2001)。此外 HSC 誘導產生的血管新生也對 PMN 至關重要。HSC 藉由產生血管內皮生長因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）與血管生成素-1（angiopoietin-1）促進血管生成與肝纖維化(Seki and Brenner 2015)，如此有助於 PMN 中產生血管新生。

但是否所有肺原位腫瘤皆會產生有利於他的 PMN，還是僅限定於特定環境下（如發炎環境或缺氧環境等）才會形成，甚至相關的機制及參與分子仍然尚待研究(Liu and Cao 2016)。

五、 腫瘤外泌體 (Tumor-Derived Exosomes)

外泌體 (Exosome) 近幾年在細胞間的交互作用被證實扮演重要的角色，Exosome 屬於較小的細胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 的一種，EVs 依大小不同與表面蛋白質標記物的不同，可分為三類：外泌體 (Exosome)、微泡 (microvesicles) 和凋亡小體 (apoptotic bodies) (Mo, Cheong et al. 2021)。Exosome 攜帶各種生物材料，包含了 DNA、RNA、microRNA 與蛋白質等，參與了細胞間的訊息傳遞 (Jaiswal and Sedger 2019)。Exosome 是先由細胞進行內吞作用 (endocytic) 形成囊泡 (endosome)，細胞再將訊息因子與蛋白質傳入囊泡中形成許多 Exosomes，藉由胞吐作用 (exocytic) 分泌出直徑大小介於 50~150 奈米的 Exosomes (如圖一)。

現今 CD9, CD63, CD81 等，皆可視為 Exosome 的代表性表面分子 (Mo, Cheong et al. 2021)。此外也含有熱休克蛋白 (Heat shock protein, Hsp) 如 Hsp70 幫助 Exosome 內的蛋白質摺疊 (Rajagopal and Harikumar 2018)。



(圖一) Exosomes 形成與內容物

癌細胞會透過分泌 Exosomes 至 Pre-metastatic niche (PMN) 中，預先在遠端組織中形成更適合癌細胞生長的環境 (Liu and Cao 2016, Guo, Ji et al. 2019)。當 Exosomes 到達遠端組織時，會在 PMN 中促成幾種反應如免疫抑制 (immunosuppression) 發炎反應 (inflammation) 或影響器官趨性 (organotropism) 等。由於 Exosomes 會比癌細胞本身更早到達遠端標的器官，因此臨床上可以不用等到腫瘤轉移晚期，就能透過蒐集患者 Exosomes，了解其分子機制，提早預防癌症轉移或提供有效的治療措施 (Liu and Cao 2016)。

六、 Cluster of Differentiation 151 (CD151) 在癌症中扮演的角色

細胞獲得侵襲能力需要透過激活複雜信號路徑，產生上下游的分子介導程序。關於信號轉變的機制仍然不完全清楚，不過許多報告找出牽涉信號傳遞的相關分子，其中之一為 CD151。

CD151 屬於四跨膜蛋白的家族，分子量為 28 kDa 的蛋白質，在癌症中參與許多生物過程，如細胞增殖、血管新生、遷移與侵襲能力。另有研究提出四跨膜蛋白是血管生成過程中的關鍵參與者(Geerts 2001, Sadej, Grudowska et al. 2014)。

主要研究 CD151 是因為 CD151 和許多細胞表面蛋白產生相互作用，包括層粘連蛋白結合整合素 (laminin-binding integrins)、生長因子 (growth factor receptors) 和基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases) (Sadej, Grudowska et al. 2014)。此外 CD151 已在胰腺癌衍生的外泌體中，發現有助於腫瘤微環境的重塑，並參與基質調控。CD151 在不同類型癌症中，臨床分析結果證明其影響了腫瘤生長和侵襲能力，CD151 可作為具有價值的診斷和預期生物標誌物以及抗癌治療的潛在靶點(Sadej, Grudowska et al. 2014, Yue, Mu et al. 2015)。

七、 Integrin/FAK/Src/AKT signaling pathway

正常細胞上的整合膜蛋白 (Integrins) 可以透過與特定訊息因子結合或與 ECM (Extracellular matrix) 間交互作用下，活化細胞內一連串磷酸化的通路與改變細胞狀態。如粘著斑激酶 (Focal adhesion kinase, FAK)，參與整合膜蛋白導致的信號傳遞，控制多種生物反應過程，包括細胞擴散、遷移與存活 (Parsons, Martin et al. 2000)。透過激活 FAK 在 tyr397 (Y397) 的位置發生磷酸化 (phosphorylation)，此時 FAK 會與 Src 家族激酶結合，使 Src 家族激活 PI3K，進而活化下游蛋白 AKT (Schaller, Hildebrand et al. 1994, Chen, Appeddu et al. 1996)。AKT 蛋白也稱為 protein kinase B (PKB)，在細胞存活與細胞凋亡中有重要關鍵 (Burgering and Coffey 1995)，AKT 已被許多研究廣泛認為是影響細胞生長的關鍵因子，AKT 會透過磷酸化和抑制細胞凋亡相關的標靶分子，從而促進細胞存活，同時活化下游蛋白使 RNA 轉譯成其他蛋白質，提高細胞增生、代謝與轉移等能力等 (Parkin, Man et al. 2019)。

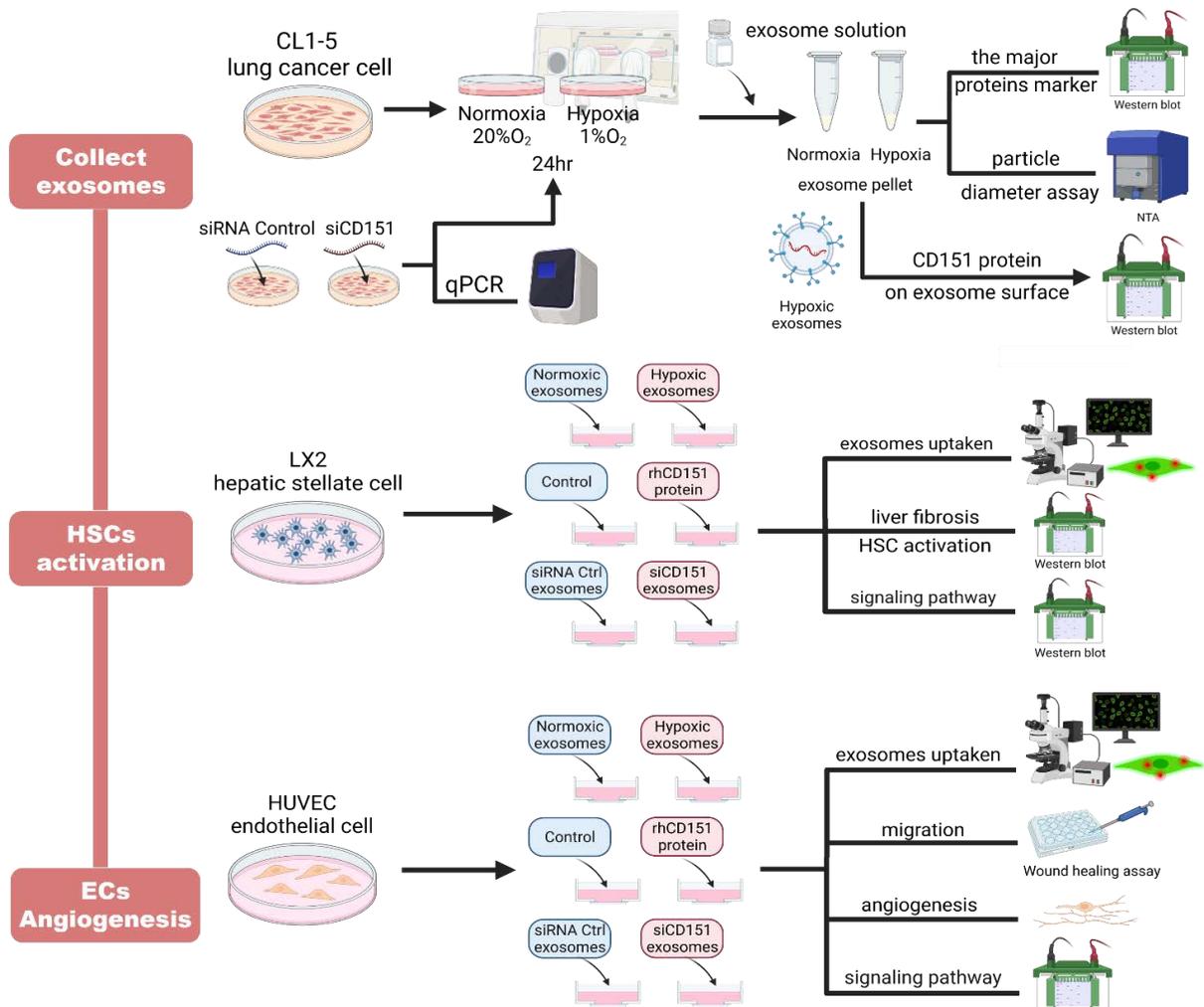
貳、研究動機及目的

一、研究動機與目標

癌症的轉移是造成病人死亡的最主要因素，了解癌細胞的轉移，特別是轉移前參與的病理機轉，將對於找出臨床上可以完全阻斷癌細胞轉移的標靶。經由了解肺腺癌細胞透過何種分子機制改變遠端器官肝臟的微環境。

- (一) 缺氧是否誘導肺癌細胞分泌 Exosomes
- (二) 缺氧肺癌所分泌之 Exosomes 是否影響肝星狀細胞活化及血管新生
- (三) 缺氧是否誘導肺癌細胞分泌含有 CD151 之 Exosomes
- (四) Exosomes 是否透過 CD151 蛋白影響 PMN 形成
- (五) 位於 Exosomes 上的 CD151 是透過何種訊息傳遞影響細胞狀態

二、研究策略流程圖



參、實驗材料和方法

一、試劑

(一) 細胞株

CL1-5 (Human lung adenocarcinoma cell , high invasive)	由國立臺灣大學醫學院 楊泮池 教授研究團隊提供
HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell)	購自新竹食品工業發展研究所
LX-2 (Human hepatic stellate cell)	購自 EMD Millipore (USA)

(二) 西方點墨法抗體

抗體	稀釋比例	貨號	廠牌
GAPDH	1 : 3000	5174	Cell Signaling Technology
Vinculin	1 : 1000	13901	Cell Signaling Technology
HIF-1 α	1 : 1000	610959	BD Biosciences
α -Smooth Muscle antibody	1 : 1000	A5228	Sigma-Aldrich
CD151	1 : 1000	17327	Cell Signaling Technology
P-FAK (Tyr397)	1 : 1000	3283	Cell Signaling Technology
P-Src Family (Tyr416)	1 : 1000	6943	Cell Signaling Technology
p-Akt (T308)	1 : 1000	13038	Cell Signaling Technology
FAK	1 : 1000	3285	Cell Signaling Technology
Src	1 : 1000	2108	Cell Signaling Technology
Akt	1 : 1000	9272	Cell Signaling Technology
CD9	1 : 1000	EXOAB-CD9A-1	System Biosciences
CD63	1 : 1000	EXOAB-CD63A-1	System Biosciences
CD81	1 : 1000	EXOAB-CD81A-1	System Biosciences
Hsp70	1 : 1000	EXOAB-Hsp70A-1	System Biosciences

Anti-rabbit IgG	1 : 3000	7074	Cell Signaling Technology
Anti-mouse IgG	1 : 3000	7076	Cell Signaling Technology
Goat Anti-Rabbit HRP Secondary Antibody	1 : 20000	EXOAB-KIT-1	System Biosciences

- (三) RPMI 1640、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、EGM-2、EBM-2、10x Trypsin、100x Glutamine 購自 Lonza
- (四) Accutase 購自 BD Bioscience
- (五) Fetal Bovine Serum, exosome-depleted 購自 Gibco
- (六) Exosome Precipitation Solution 購自 System Biosciences
- (七) PKH26 linker、Diluent C for General Membrane Labeling、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、propidium iodide (PI)、Trypan Blue Solution 0.4% 購自 Sigma
- (八) Calcein AM 購自 Tocris Bioscience
- (九) Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix(#356231) 購自 Corning
- (十) ON-TARGETplus Non-targeting Pool(20 nmol)、ON-TARGETplus Human CD151 siRNA-SMARTpool(5 nmol) 購自 Dharmacon

二、 儀器

無菌操作台



BIOBASE

細胞培養箱



Thermp Scientific 370

冷凍離心機



Eppendorf Centrifuge 5810 R

微量離心機



Eppendorf Centrifuge 5424 R

倒置顯微鏡



Leica DMIL LED

螢光顯微鏡



Nikon Eclipse TE2000-s

微需氧操作台



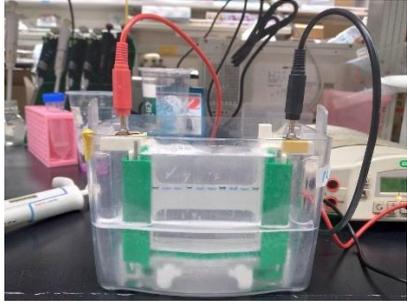
Baker Ruskinn InvivO2

恆溫循環水槽



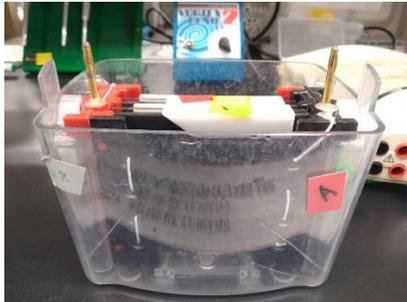
YIHDER BH-230D

迷你蛋白電泳槽



Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell

迷你蛋白轉印槽



Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell -

酵素免疫分析儀



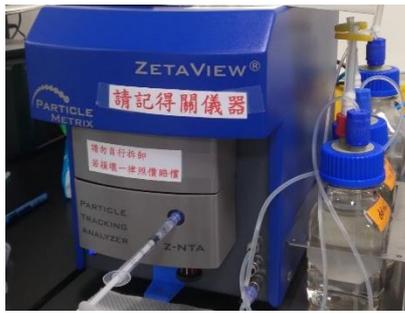
Bio-Tek PowerWave 340 Microplate Reader

冷光螢光照膠系統



Azure 600

奈米粒子追蹤分析儀



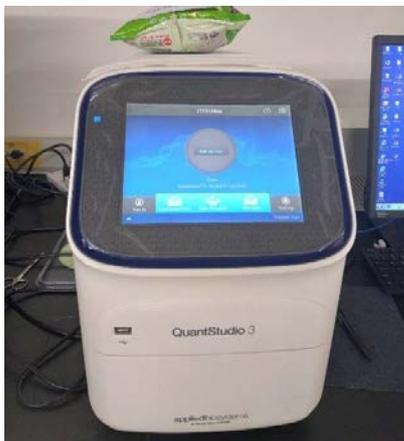
ZetaView Particle Metrix

聚合酶連鎖反應機器



GeneAmp PCR system 9700

定量即時聚合酶連鎖反應機器



StepOnePlus Real Time PCR system

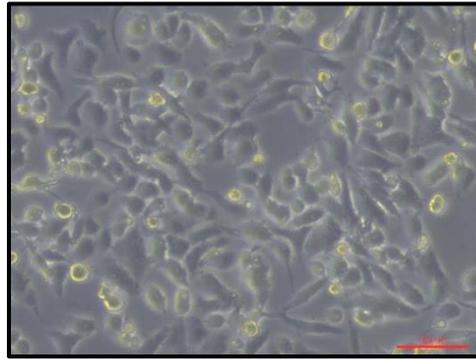
三、 細胞繼代培養 (Cell culture)

(一) 肺腺癌細胞 (CL1-5) 培養 (圖一)

培養在 10cm dish，使用培養基溶液為 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640，含有 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)，置於 37°C 含 5%CO₂ 培養箱中，等待細胞長到約八分滿時，以 1 : 4 擴盤繼代培養 (subculture)，每兩天換一次培養液。

繼代培養時，去除 dish 上的培養基溶液 (medium)，再以 Phosphate-buffered saline (PBS) 清洗殘留 medium，加入 0.05% 胰蛋白酶 (trypsin) 1c.c. 使細胞懸浮，靜置 5 分鐘左右，使細胞脫離培養皿基底，再加入培養液 (其中含有 FBS 能抑制 trypsin 作用)，以 4°C、1000rpm 離心

5 分鐘去除 trypsin，依實驗需求，透過細胞計數器計算細胞數量並完成繼代培養。

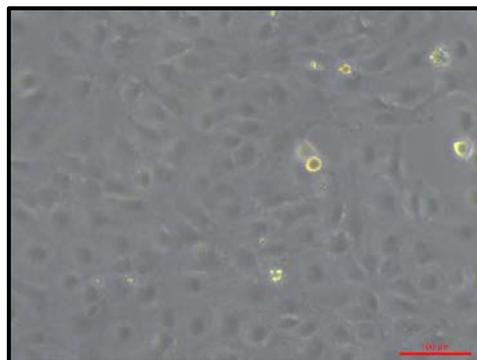


Human lung adenocarcinoma CL1-5 cells

(圖一)

(二) 肝臟星狀細胞 (LX2) 培養 (圖二)

使用培養基溶液為 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)，含有 2% 胎牛血清 (FBS) 與 1% 的麩醯胺酸 (Glutamine)，置於含有 5%CO₂ 的 37°C 培養箱中，等待細胞長到約八分滿時，以 1 : 3 擴盤繼代培養，每三天換一次培養液。

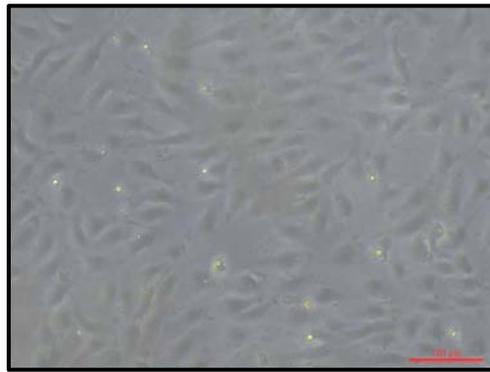


LX-2 Human hepatic stellate cell

(圖二)

(三) 人臍靜脈內皮細胞 (HUVEC) 培養 (圖三)

使用培養基溶液為 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2 (EBMTM-2)，內含有幫助血管內皮細胞生長的試劑 MV Microvascular Endothelial SingleQuotesTM Kit (EGMTM-2)，置於含有 5%CO₂ 的 37°C 培養箱中，等待細胞長到約九分滿時，以 1 : 2 擴盤繼代培養，每兩天換一次培養液。

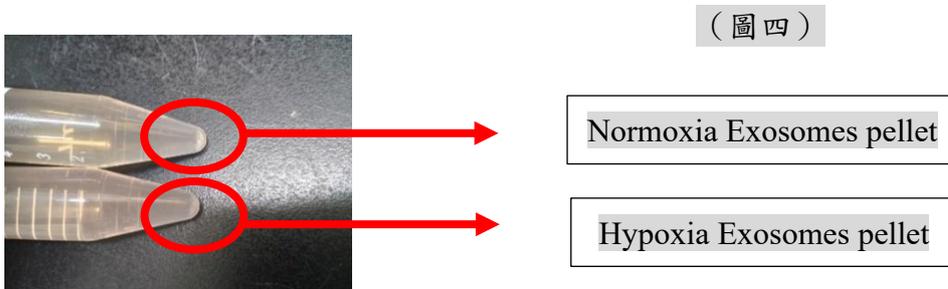


Human umbilical vein endothelial cell

(圖三)

四、 缺氧環境 (Hypoxia) 模擬與癌細胞外泌體 (Exosomes) 蒐集

肺腺癌細胞株 CL1-5 為具有轉移能力的癌細胞。培養於 10 cm dish，約八分滿時，將培養液換成已去除外泌體的 FBS (Fetal Bovine Serum, exosome-depleted) 與 RPMI 中，分別放入微需氧操作台與一般細胞培養箱，前者細胞培養於 1% O₂、5%CO₂ 的環境模擬細胞缺氧狀態 (Hypoxia)；後者培養於一般 20% O₂、5%CO₂ 的環境 (Normoxia)。24 小時後取細胞培養皿上培養液，以 4°C、2000g 離心 30 分鐘取上清液，加入可萃取外泌體的試劑 Exosome Precipitation Solution 混勻，置於 4°C 約兩天後取出，再以 4°C、1500g 離心 15 分鐘，去除上清液可得 Exosomes pellet。(如圖四)



五、 西方點墨法 (Western blot assay)

(一) 總蛋白質萃取

細胞種於 10 cm dish，待細胞長至九分滿時，以冰的 PBS 洗淨細胞，再加入 1 ml PBS 並以刮除方式取下細胞，以 4°C、3000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液留下 cell pellet，加入適量 cell lysis buffer (RIPA buffer：protease inhibitor=1000 μl：10 μl)，於冰上作用 30 分鐘後，劇烈震盪 20 秒，再以 4°C、12000rpm 離心 15 分鐘，取得上清液即為總蛋白質萃取液。

(二) 蛋白質定量與變性

利用 BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit 定量蛋白質濃度。事先配製 0.1 mg/ml 的 BSA (Bovine serum albumin)，在 96 well 中，分別加入 0、1.5、3、4.5、6 及 7.5 μ l 的 BSA 後，加入無菌水使每個 well 達 10 μ l，最後每個 well 加入 140 μ l BCA 試劑，作為定量之標準曲線；同時取 2 μ l 的蛋白質萃取液於 96 well 中，加入 148 μ l 的 BCA 試劑，至於 37°C 環境下避光 15 分鐘，此時細胞蛋白質在鹼性溶液中，將 Cu^{2+} 離子還原成 Cu^+ ，呈色隨之產生變化，再以酵素免疫分析儀定量分析顏色之吸光值，最後再以 cell lysis buffer 將每管蛋白質萃取液校正為相同濃度。

濃度一致後，依總體積比例加入適量 6X Protein Sample Dye (0.5M Tris-Base (pH=6.8)、Sodium dodecyl sulfate (SDS)、glycerol、Dithiotherito (DTT)、Bromphenol blue) 均勻混合，以 95°C 加熱 5 分鐘後立即降溫，使蛋白質完全變性。

(三) Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis 鑄膠 (SDS-PAGE)

依照欲觀察之蛋白質分子量大小配製不同濃度的膠體。事先備好配膠所需材料：無菌水、Acrylamide-Bis solution 30%、Gel buffer(1.5M Tris-Base (pH=8.8, 下膠(separating gel))、0.5M Tris-Base (pH=6.8, 上膠(stacking gel))、10%SDS、10% ammonium persulfate (APS)、tetramethylethylenediamine (TEMED)，以上混合均勻後，先將下膠(separating gel) 混合液倒入鑄膠器上的玻璃，再以異丙醇使其介面平整，待下膠凝固後加入上膠(stacking gel) 混合液並插入電泳齒梳，待凝固後即可移除齒梳完成上下層不連續的膠體。

(四) 電泳 (SDS-PAGE electrophoresis)

將膠體置入電泳槽中並鑄滿緩衝液 (Tank buffer)，於齒梳空格 (well) 中注入定量且變性完成之蛋白質萃取液與 Protein marker 進行電泳分析。以 100 伏特電壓進行 stacking，當蛋白質樣品跑到 stacking gel 與 separating gel 的介面時，在將電壓調至 120 伏特，使蛋白質分離。

(五) 蛋白質轉漬 (Transfer)

電泳完畢後取出膠體，將事先浸潤於甲醇的 PVDF 膜疊於 SDS-PAGE 膠體下，並在其上下方各疊兩張 3mm Filter paper，如三明治般夾層狀，在將夾層置於 Transfer buffer 中，

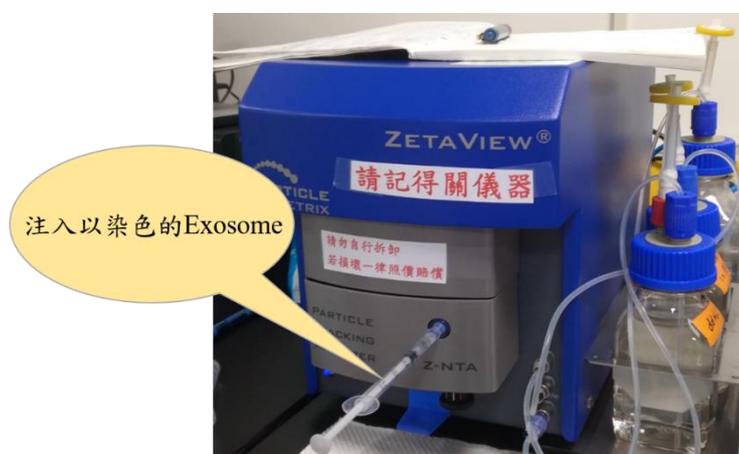
以 100 伏特電壓、1.5 小時完成轉漬，隨後出 PVDF 膜。

(六) 免疫點墨法 (Immunoblot)

將取出的 PVDF 膜加入 Blocking buffer (5% non-fat milk，溶於 TBST(20mM Tris-base、137mM Sodium chloride、1M Hydrochloric acid、0.01% Tween-20))，於 4°C 下 overnight 進行 Blocking。以 TBST 作為 Wash buffer 洗滌 PVDF 膜 3 次，每次 5 分鐘，再加入以 TBST 稀釋的一級抗體 (Primary antibody)，稀釋比例為 1000:1，於 4°C 下作用 overnight，再以 TBST 洗滌 PVDF 膜 3 次，每次 5 分鐘，將二級抗體 (Secondary antibody) 以 TBST 稀釋，比例多為 3000:1，均勻到在 PVDF 膜上反應 1 小時，再以 TBST 洗淨後浸潤於顯影劑 (chemiluminescent HRP substrate (luminol reagent : peroxide solution=1 : 1))，透過冷光螢光照膠系統上機拍照。

六、 以奈米粒子追蹤分析 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) 測量 Exosomes 粒徑大小

將蒐集完成的 Exosomes 用 BSA 定量，與蛋白質定量方式相同，濃度定為 $10 \mu\text{g}$ ，將 Exosomes 溶於 PBS 使其濃度相同，體積為 $20 \mu\text{l}$ ，利用 NTA 上樣分析蒐集到的 Exosomes 粒徑大小 (如圖五)。上樣時，需先使用 PBS 清洗機器，確保上樣時的粒子皆為 Exosomes，同時 Exosomes 溶液要再稀釋 1000 倍，取 $1 \mu\text{l}$ 的 $10 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 的 Exosome 加入 PBS 稀釋上機觀察粒子顆數，使其落在每 $1 \mu\text{l}$ 有 100 顆左右的粒子。確定濃度與顆數無誤後，進行 30 分鐘粒子染色。



(圖五) 將 Exosomes 染色後注入儀器分析粒徑大小

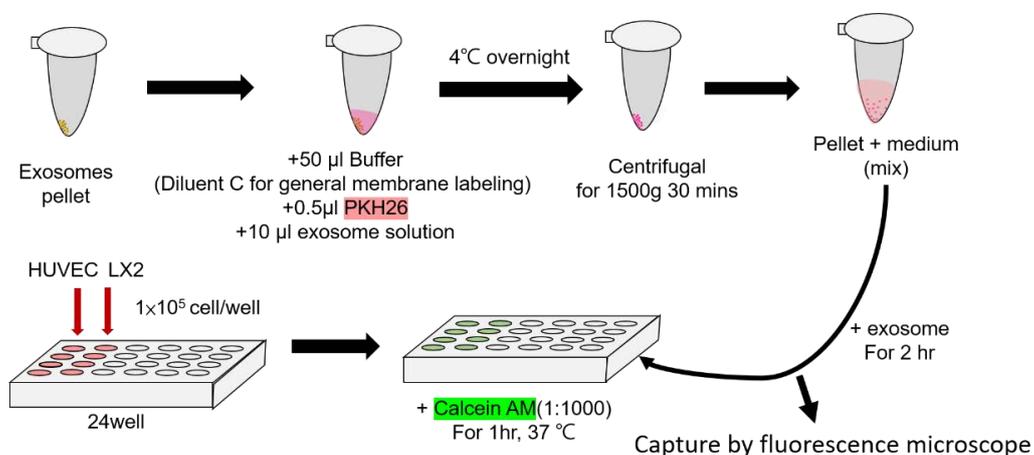
透過奈米粒子追蹤分析 (NTA)，這些粒子在溶液中會產生不規則的布朗運動，越小的粒子移動速率越快，使用軟體追蹤這些光點的運動軌跡，即可計算出每個粒子的尺寸大小。捕獲每個粒子的布朗運動影像，以雷射光照射與顯微鏡觀察之，奈米大小的 Exosomes 顆粒以特定抗體進行螢光標記，增加了粒子表面的特異性，帶有螢光分子因而產生光散射，在顯微鏡下呈現一顆顆的光點，根據周圍液體中大小顆粒的不同擴散運動，確定顆粒的流體動力學直徑。此外粒子表面的運動電荷狀態可以通過外加電場來測量。

七、細胞螢光染色 (Fluorescent) 與 PKH26 (PKH26-labeled) 標記 Exosomes，觀察細胞攝取 (uptake) Exosomes

分別收集 1×10^6 顆的 CL1-5 於 Hypoxia 與 Normoxia 下分泌的 Exosomes，以 PKH26 linker (PKH26 : Diluent C = 1 : 100) 染紅色螢光並加入 Exosome Isolation Reagent，置於 4°C 避光 24 小時進行細胞膜染色，再以 4°C 、10000rpm 離心 15 分鐘去上清液，留下已染螢光的 Exosomes pellet。

分別於 24 well plate 中，種入 1×10^5 顆 LX2 與 HUVEC 細胞，代細胞貼盤後，以 Calcein AM (Calcein AM : PBS = 1 : 1000) 染綠色螢光，置於 37°C 避光 1 小時，再以 PBS 將細胞清洗完成細胞質染色。

將已染色的 Hypoxia 與 Normoxia Exosomes 加入染色的 LX2 與 HUVEC (如圖六)，利用 LX2 模擬構成 PMN 環境，靜置於 37°C 避光 2 小時後，以 PBS 清洗細胞，並於螢光顯微鏡下觀察。以上實驗做三重複。

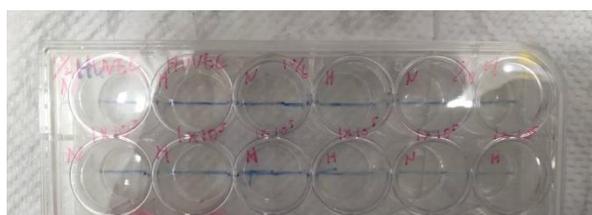


(圖六) Exosomes 染色加入 LX2 與 HUVEC

八、細胞爬行與血管新生能力分析

(一) 傷口癒合分析 (Wound healing assay)

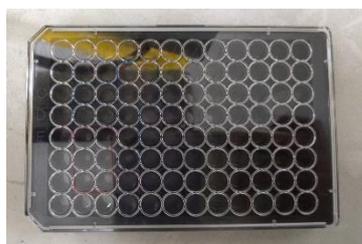
將 HUVEC 細胞以 1×10^5 顆細胞數/well，種在 24 well plate 中，等待細胞完全貼附於 well 上以 $200 \mu\text{l}$ tip 在 well 中間劃出一道傷口後，再利用 PBS 將多餘懸浮細胞去除，再將 1×10^6 顆的 CL1-5 於 Hypoxia 與 Normoxia 下分泌的 Exosomes pellet 回溶於新的培養基溶液加入 well 中 (如圖七)，以顯微鏡分別觀察 0 小時和 8 小時傷口癒合與細胞爬行情況做拍照記錄。



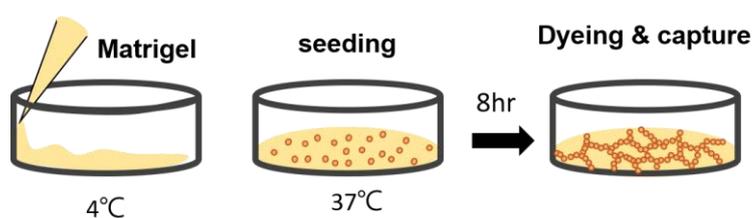
(圖七) 以 24 孔盤種入 HUVEC 並畫線觀察細胞移行

(二) 血管新生分析 (Angiogenesis assay)

使用 Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix 模擬細胞外基質，將 tip 與 PBS 提前放入 4°C 冰鎮，在冰上操作以 96 well 黑色孔盤 (如圖八) 加入稀釋過的 Matrigel (Matrigel: PBS = 2:1) $30 \mu\text{l}$ /well，放置 4°C 一晚後，使 Matrigel 鋪平於 well 上，再將其放入 37°C 培養箱中，等待 30 分鐘，待 Matrigel 凝固後，每個 well 種入 2×10^4 顆 HUVEC，再將 2×10^5 顆的 CL1-5 於 Hypoxia 與 Normoxia 下分泌的 Exosomes 回溶於新的培養基溶液，一同加入 well 中 (如圖九)，8 小時後，加入 Calcein AM (Calcein AM: PBS = 1:1000) 以螢光免疫染色 1 小時後，在螢光顯微鏡下觀察 HUVEC 血管織網狀態。



(圖八) 以 96 黑色孔盤先加入 Matrigel



(圖九)

九、以 siRNA 轉殖抑制特定基因表現

siRNA (Small interfering RNAs) 為外源性的 RNA，可阻斷特定 mRNA 表現。本研究以 siRNA 轉殖方式，阻斷 CD151 的基因。先將 siRNA 已無菌水稀釋，最終濃度定為 $20 \mu\text{M}$ ，將細胞培養至六、七分滿，siRNA 與 DharmaFECT®1 transfection reagent 混和添加比例後，加入不含 FBS 的培養溶液與細胞中，至於培養箱中 24 小時，萃取 RNA 或其他衍生物進行實驗，並以即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應確立基因阻斷效果。

	序列 (5' - 3')
Control siRNA	UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGGUUUACAUGUUUUCUGA UGGUUUACAUGUUUCCUA
CD151 siRNA	UCACAGGACUGGCGAGACA CCUCAAGAGUGACUACAUC GCAAGACGGUGGUGGCUCU GAUCAUCGCGGUAUCCUC

十、反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

(一) RNA 萃取

將 CD151 基因被阻斷後的 CL1-5 細胞，倒掉培養基溶液並以 PBS 清洗，加入 1mL TRIzol reagent 將細胞溶解 10 分鐘，吸取溶解液至微量離心管後，加入 $200 \mu\text{l}$ 的 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 混合均勻。再以 4°C 、12000rpm 離心 15 分鐘，下層為蛋白質，上層為 RNA，吸取上層 RNA 加入等比異丙醇 (Isopropyl alcohol) 混合均勻，以 4°C 、12000rpm 離心 15 分鐘，去除上清液並加入 75% 乙醇洗滌 RNA，再以 4°C 、7500rpm 離心 10 分鐘去除乙醇，再將殘留液體風乾，依 RNA 多寡加入適當體積之無酶無菌水 (RNase free H_2O)，以分光光度計測波長 260nm/280nm 之吸光值，用以定量 RNA 濃度及純度。

(二) RNA 反轉錄 (Reverse transcription) 成 complemenraty DNA (cDNA)

將萃取的 RNA 取出 500ng，加入 $2 \mu\text{l}$ 5X Primescript buffer、 $0.5 \mu\text{l}$ Primescript RT enzyme mix、 $0.5 \mu\text{l}$ Oligo dT Primer，再加入無菌水使其總體積為 $10 \mu\text{l}$ ，至於 PCR 機

器中，於 37°C 作用 15 分鐘，在於 85°C 作用 5 秒再降溫中止反應，此時得到由 mRNA 反轉錄出之 cDNA。

十一、 定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR)

取 2 μ l cDNA、5 μ l SYBR Green Master Mix (2 X)、2 μ l H₂O 與各式基因之 forward (10mM) and reverse primer (10 mM) 0.5 μ l 均勻混合。置於 StepOnePlus Real Time PCR system 進行 q-RT-PCR。設定反應條件為：Stage I：95°C、20 秒、1 cycle；Stage II：95°C、3 秒後降溫至 60°C、30 秒共 40 cycle；Stage III：95°C、3 秒後降溫至 60°C、1 分鐘，再升溫至 95°C、15 秒。上述溫度變化結束後，可分析 Cycle threshold (Ct)，結果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方式求得控制組及實驗組 mRNA 表現差異。

Gene name	Primer 序列 (5' - 3')
GAPDH_Left_Human	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
GAPDH_Rrght_Human	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
CD151_Human_Forward	GTGGCAGCAACAACCTCACAG
CD151_Human_Reverse	GGTGCTCCTGGATGAAGGTC

十二、 統計方法

每個三次獨立實驗結果的數據以平均值標準偏差來呈現。實驗數據分依採用 Tow sample students T-test，皆以控制組與實驗組做比較。當 P-value 值 < 0.05 則視為有意義。

肆、 研究結果

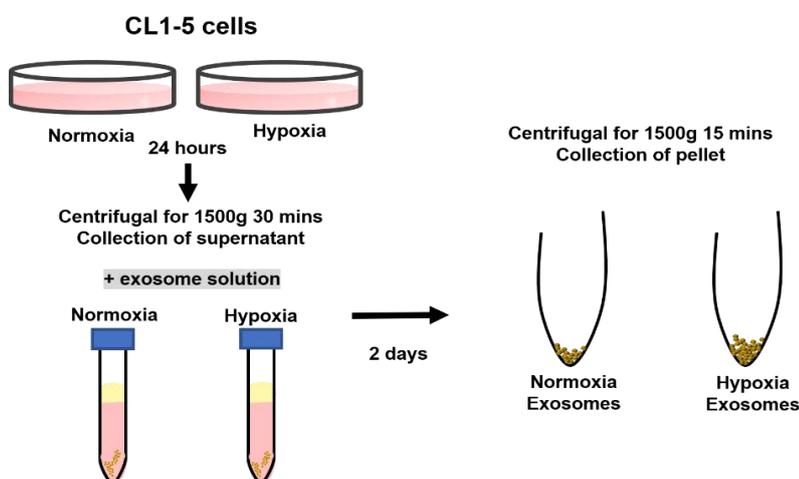
一、 缺氧環境刺激人類肺腺癌 CL1-5 細胞分泌 Exosomes

目前已證實腫瘤內部的癌細胞處於缺氧或發炎狀態下，會活躍的分泌腫瘤相關因子 (TDSFs) 或胞外囊泡 (EVs)。本實驗中的 Exosomes 便是 EVs 的一種。首先培養固定數量肺腺癌 CL1-5 細胞於正常環境 (Normoxia) 與缺氧環境 (Hypoxia)，置放 1 日後取其上清液含 Exosomes 於 medium 中，加入 Exosome precipitation solution 離心取得 Exosomes pellet，並利用細胞計數器回推總細胞數分泌的 Exosomes 量 (圖十 A)。上清液取出後，收集剩下細胞並萃取蛋白質進行西方點墨法分析，觀察缺氧誘導因子之中的 HIF-1 α 表現量，確定了 CL1-5 細胞處

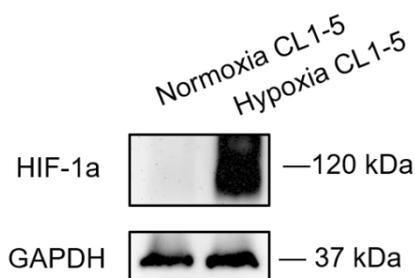
於缺氧情況下的 HIF-1 α 分子有高表現 (圖十 B)。此外已有研究指出 HIF-1 α 分子於乳腺癌中，會誘導產生可刺激細胞的相關酶，這些酶助於在肺形成乳腺癌轉移到肺前的腫瘤微環境 (Ko, Rugira et al. 2020)。

欲確認正常環境和缺氧環境下蒐集到的 pellet 沉澱為 Exosomes，而 Exosomes 現行已知的定義多為大小介於 30nm~150nm，常見表面蛋白為 CD9、CD63 和 CD81 (Geng, Pan et al. 2021)。為了確定 Exosomes 抽取的正確性，做了奈米粒子追蹤分析 (NTA) 及西方點墨法萃取 Exosomes 的蛋白質觀察 CD9、CD63、CD81、Hsp70 分子表現量。由兩者實驗結果可確定蒐集 pellet 為 Exosomes，但由西方點墨法結果發現，正常環境與缺氧環境下細胞分泌的 Exosomes 差別在於相同細胞數與相同蛋白質濃度下其蛋白質表現量有差異，缺氧情況收集的 Exosomes 蛋白有高表現，意味著缺氧環境會誘導肺癌細胞分泌 Exosomes。(圖十 C) 另外 NTA 分析結果也確定腫瘤分泌之 Exosomes 大小落在 300nm 以下，多數為 150nm (圖十 D)。

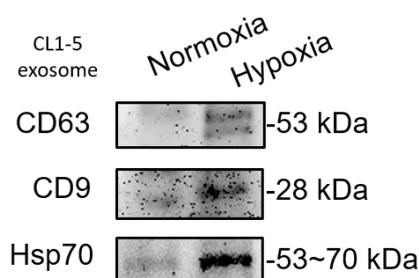
A



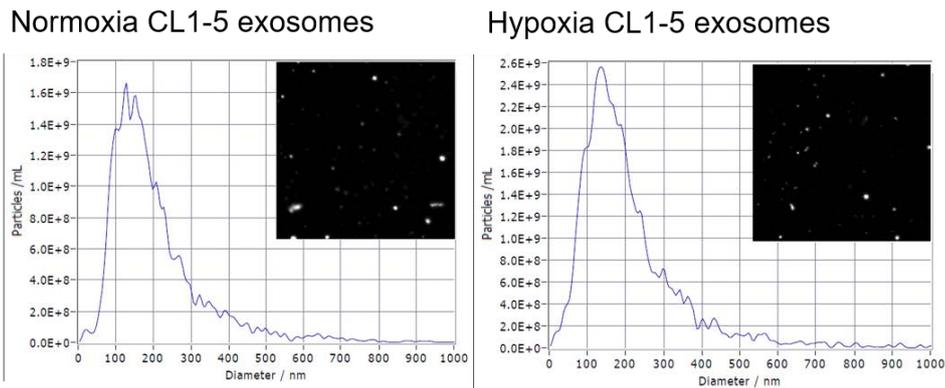
B



C



D

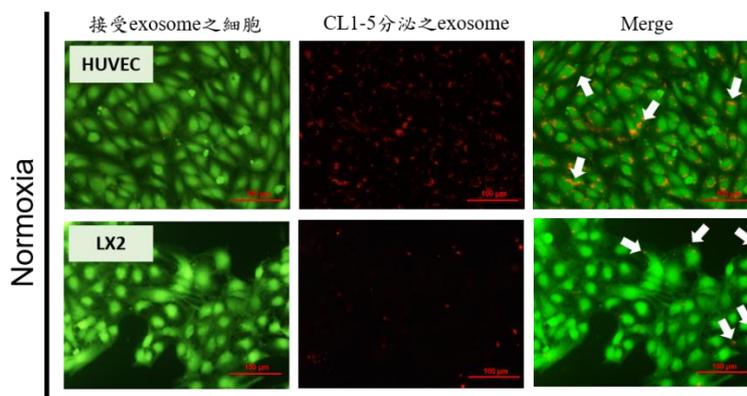


圖十、CL1-5 處於正常氧 (Normoxia) 與低氧 (Hypoxia) 誘導分泌 Exosomes 之影響。(A)將 CL1-5 細胞分別培養於正常氧 (Normoxia) 與低氧 (Hypoxia) 環境 24 小時，收其上清液取 Exosomes，細胞收集蛋白質做 Western blot。(B)缺氧刺激 CL1-5 表現 HIF-1 α 。(C)缺氧對 CL1-5 分泌 Exosomes 影響。(D)以 NTA 分析兩者環境蒐集到的 pellet 皆屬於 Exosomes 應有大小。每次實驗為獨立試驗三重複。

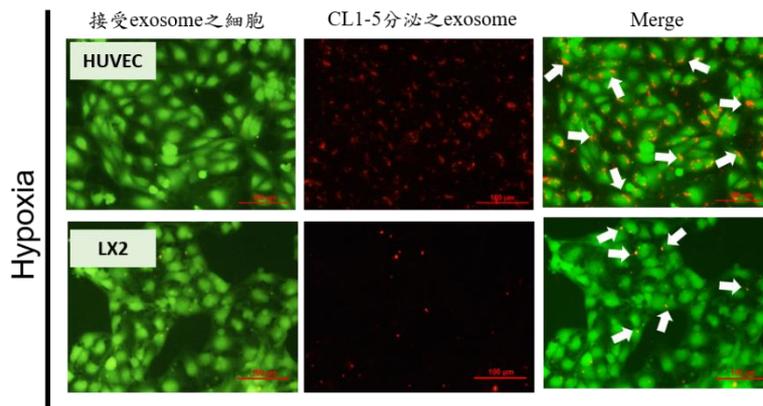
二、 肝臟星狀細胞 LX2 與血管內皮細胞 HUVEC 可攝取肺癌細胞分泌之 Exosomes

Exosomes 到達遠端特定器官後，與特定細胞之細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 旁的分子，如細胞膜上鑲嵌的整合膜蛋白 (integrin) 黏附後，參與細胞間的生物反應(Hoshino, Costa-Silva et al. 2015)。接著細胞以胞吞方式將 Exosomes 攝入細胞質內，利用螢光染色，將肝臟星狀細胞 LX2 與血管內皮細胞 HUVEC 染為綠色，加入已染紅色的 Exosomes，2 小時後以螢光觀察。(圖十一 A、B)進一步確定無論是正常環境或缺氧狀態肺腺癌細胞分泌之 Exosomes 皆被細胞攝取。

A



B

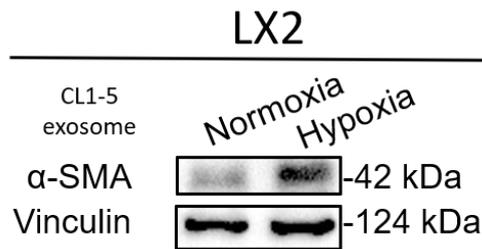


圖十一、HUVEC 與 LX2 細胞(綠螢光)攝取 Exosomes(紅螢光)。(A)HUVEC 與 LX2 攝取正常氧(Normoxia)下 CL1-5 分泌之 Exosomes。(B)HUVEC 與 LX2 攝取缺氧(Hypoxia)下 CL1-5 分泌之 Exosomes。(如箭頭所示)

三、 缺氧環境下，CL1-5 分泌的 Exosomes 活化肝臟星狀細胞 LX2

已知肝臟星狀細胞正常情況多處於休眠狀態，當肝臟星狀細胞活化時，由肌動蛋白如 α -SMA (Alpha Smooth Muscle Actin) 所構成的細胞骨架會增加並促進細胞收縮，啟動纖維化反應(Hinz, Celetta et al. 2001)。活化肝纖維化機制目前被認為是重塑 PMN 重要過程。被活化的肝臟星狀細胞除了使肝纖維化外，還可透過基質中的趨化因子使星狀細胞周圍血管新生(angiogenesis) (Zhu, Lin et al. 2015)。

但對於癌細胞處於正常氧與缺氧環境不同所分泌的 Exosomes 是否使肝臟星狀細胞活化仍屬未知。因此在本研究以西方點墨法分析肝臟星狀細胞 LX2 的活化，主要探討缺氧環境對比正常環境肺腺癌 CL1-5 細胞所分泌的 Exosomes 被肝星狀細胞攝入後造成的影響，分別將正常氧與缺氧 CL1-5 分泌的 Exosomes 加入 LX2 細胞中反應 24 小時後萃取蛋白質，結果發現缺氧 CL1-5 分泌的 Exosomes 會使 LX2 的 α -SMA 分子明顯增加許多(圖十二)。則證實腫瘤缺氧狀態下分泌的 Exosomes，參與肝臟星狀細胞活化，同時營造了在肝臟的腫瘤轉移前微環境(PMN)。

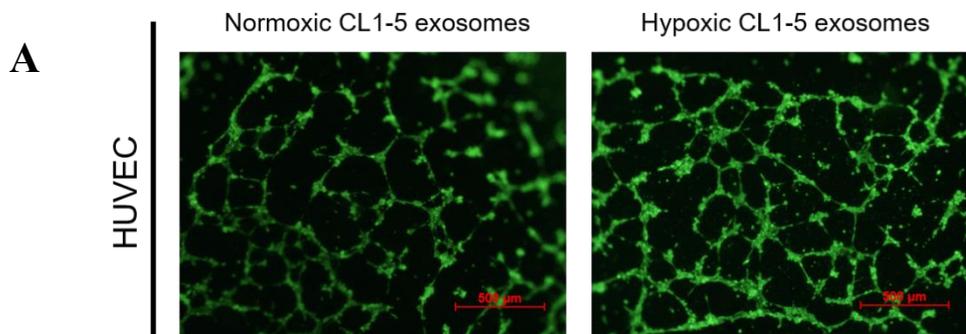


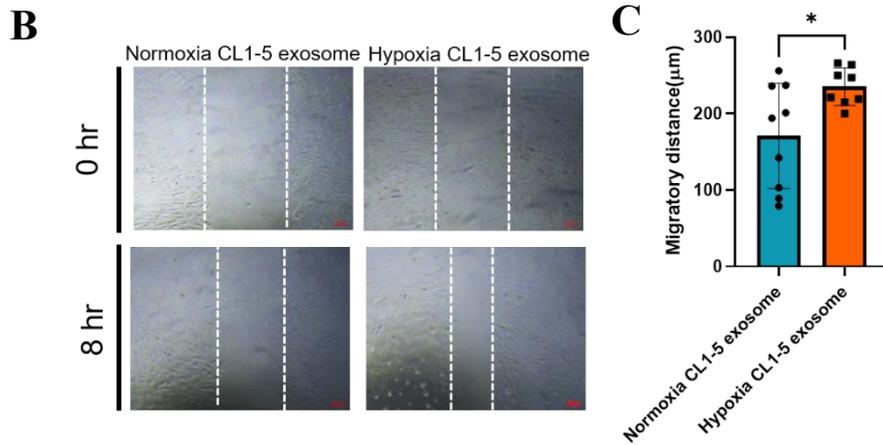
圖十二、缺氧(Hypoxia)CL1-5 分泌之 Exosomes 對肝星狀細胞 LX2 活化之影響。Hypoxia 環境分泌的 Exosomes 增加 LX2 中的 α -SMA。每次實驗為獨立試驗三重複。

四、 缺氧 CL1-5 產生的 Exosomes，促使血管內皮細胞血管新生 (Angiogenesis) 與增加細胞爬行 (Migration) 能力

腫瘤分泌的相關因子如 Exosomes，已被廣泛了解參與腫瘤轉移前微環境 (PMN) 形成，Exosomes 經由細胞外基質重塑 (ECM remodeling)，會伴隨血管新生 (angiogenesis) 的發生，也是形成 PMN 的重要條件之一(Liu and Cao 2016, Guo, Ji et al. 2019)。

然而在本實驗中，利用人臍靜脈內皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 模擬處於肝臟的血管內皮細胞觀察血管新生與細胞爬行，發現 HUVEC 細胞加入缺氧 CL1-5 分泌的 Exosomes，使得 HUVEC 血管新生狀態相較於加入正常氧分泌的 Exosomes 更佳且細胞纖維網節點較密 (圖十三 A)，細胞爬行速度也增加 (圖十三 B、C)。又可進一步確立缺氧誘導產生的 Exosomes 不僅活化肝臟星狀細胞還能促成血管新生與細胞移行。

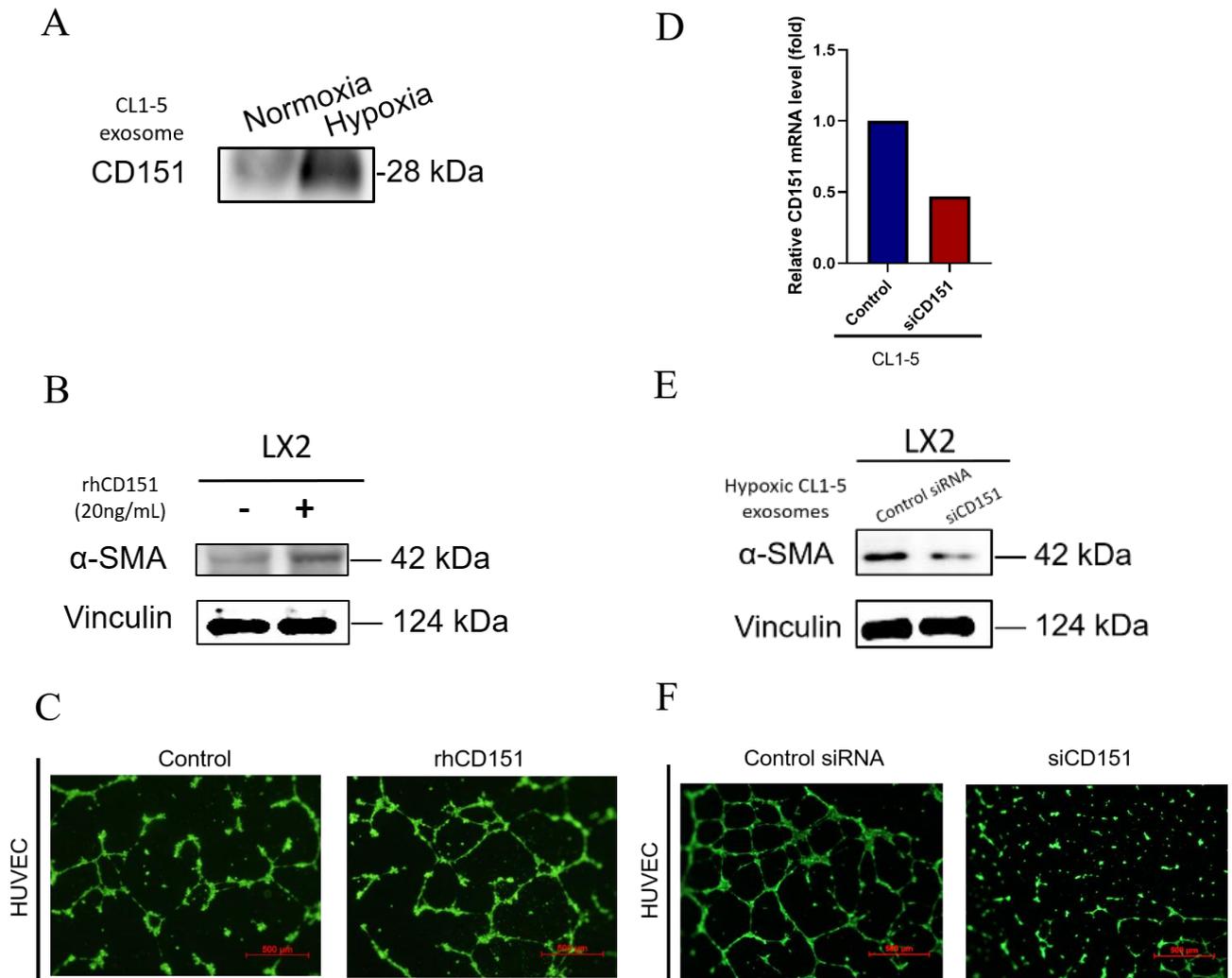




圖十三、缺氧 (Hypoxia) CL1-5 分泌之 Exosomes 對血管內皮細胞 HUVEC 之影響。(A)Hypoxia 環境 CL1-5 分泌的 Exosomes 加入 HUVEC 中，增加其血管新生能力。(B) 利用傷口癒合分析出 Hypoxia 環境 CL1-5 分泌的 Exosomes 加入 HUVEC 中，增加其細胞爬行能力。(C)至少三次以上的獨立實驗所分析出細胞爬行能力。結果表示為平均值±標準偏差; * 代表 $p < 0.05$ 。

五、 缺氧誘導 CL1-5 分泌含有 CD151 之 Exosomes 並參與 Pre-metastatic niche (PMN) 的形成

目前已有研究發現在老鼠胰腺癌分泌的 Exosomes 中含有 CD151 表面蛋白，並且 CD151 參與細胞外基質重塑(Yue, Mu et al. 2015)。但在本研究特別的是，以西方點墨法發現缺氧肺腺癌 CL1-5 分泌的 Exosomes 對比正常氧，其含有明顯高表現量的 CD151 (圖十四 A)，因此探討 CD151 對缺氧癌細胞分泌 Exosomes 機制，希望了解 CD151 對 PMN 形成的關鍵。分別在肝臟星狀細胞 LX2 與血管內皮細胞 HUVEC 加入基因重組產生的 rhCD151 蛋白質，利用正向驗證，以對照組與加入等量 rhCD151 蛋白質 20 ng/ml 的實驗組觀察 LX2 活化與 HUVEC 血管新生差異。(圖十四 B、C) 此外利用反向驗證使 CL1-5 不產生 CD151 蛋白質 (圖十四 D)，無法明顯活化 LX2 與幫助血管新生 (圖十四 E、F)，因此推論 CD151 在缺氧下所分泌的 Exosomes 有其存在必要性，參與了 α -SMA 增加使肝臟星狀細胞活化與促進血管新生，同樣在肝臟營造腫瘤轉移前微環境 PMN 形成。

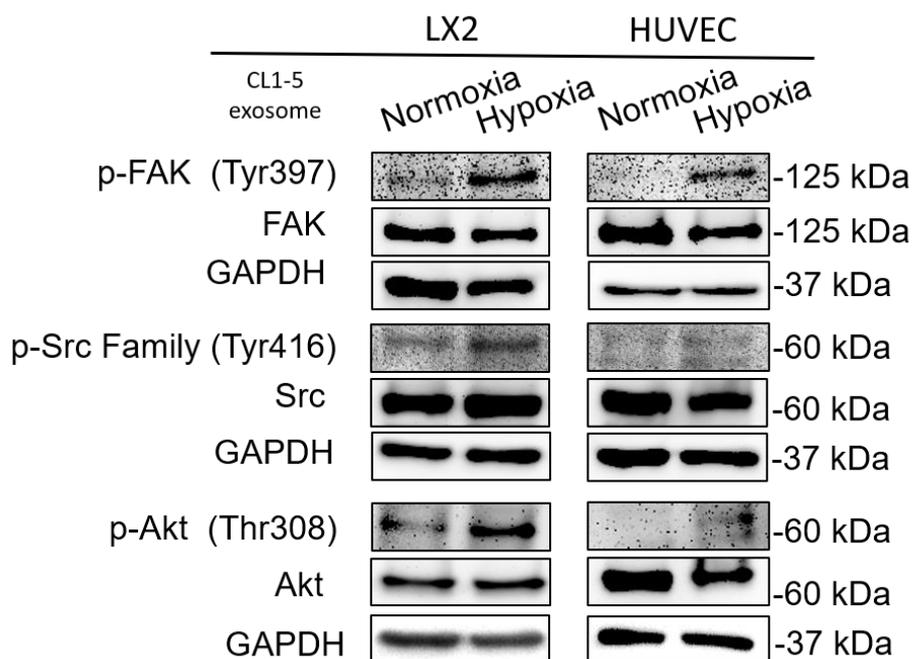


圖十四、缺氧 (Hypoxia) 誘導分泌含有 CD151 之 Exosomes 使肝星狀細胞 LX2 活化與增加血管內皮細胞 HUVEC 血管新生能力並營造 PMN 形成。(A) 缺氧誘導 CL1-5 分泌之 Exosomes 含有高表現的 CD151。(B) 加入 rhCD151 (20 ng/ml) 的蛋白質使 LX2 之 α -SMA 增加並活化細胞。(C) rhCD151 蛋白促成 HUVEC 血管新生。(D) qRT-PCR 確立人類肺癌細胞 CL1-5 之 CD151 基因經由 siCD151 而抑制 CD151 mRNA 基因表現。(E) 將 CL1-5 之 CD151 gene knockdown 後，收其 exosomes 加入 LX2 中。(F) 低表達的 CD151 使 HUVEC 較難產生血管新生。以上每次實驗為獨立試驗三重複。

六、 缺氧環境 CL1-5 分泌之 Exosomes 開啟 FAK/Src/AKT 訊息傳遞路徑

由於 CD151 屬於 Exosomes 上的表面蛋白之一。已知 Exosomes 透過其表面蛋白與細胞表面整合膜蛋白 (integrin) 結合後, FAK 會因 integrin 的結合開啟磷酸化, 而癌症轉移的過程中癌細胞需穿透基底膜並分解細胞外基質 (ECM), FAK/integrin 訊息傳遞路徑便參與其中, 使 FAK 在 Y397 的位置發生磷酸化, 同時與 Src 家族結合磷酸化並激活了下游蛋白 AKT。已知磷酸化的 AKT (T308) 能開啟多種下游蛋白反應, 造成細胞異常增生、增加血管新生或使細胞爬行能力增加等, 因此 FAK/Src/AKT 訊息傳遞路徑被認為與細胞移行能力或入侵能力調控相關(Schlaepfer and Mitra 2004, Parkin, Man et al. 2019)。可由前次血管新生與肝臟星狀細胞的活化實驗進一步推得這些 Exosomes 造成的生物反應為 FAK/Src/AKT 訊息傳遞路徑被開啟所導致形成的。

本實驗分別種 LX2 與 HUVEC 於 10 cm dish, 待細胞滿盤後加入正常氧與缺氧環境 CL1-5 分泌的 Exosomes 反應 1 小時, 以 50 μ g 蛋白質進行西方點墨法, 分析出缺氧的組別中, 其 FAK (Y397)、Src (Y416) 及 AKT (T308) 磷酸化程度高, 正常氧組別反之 (圖十五)。

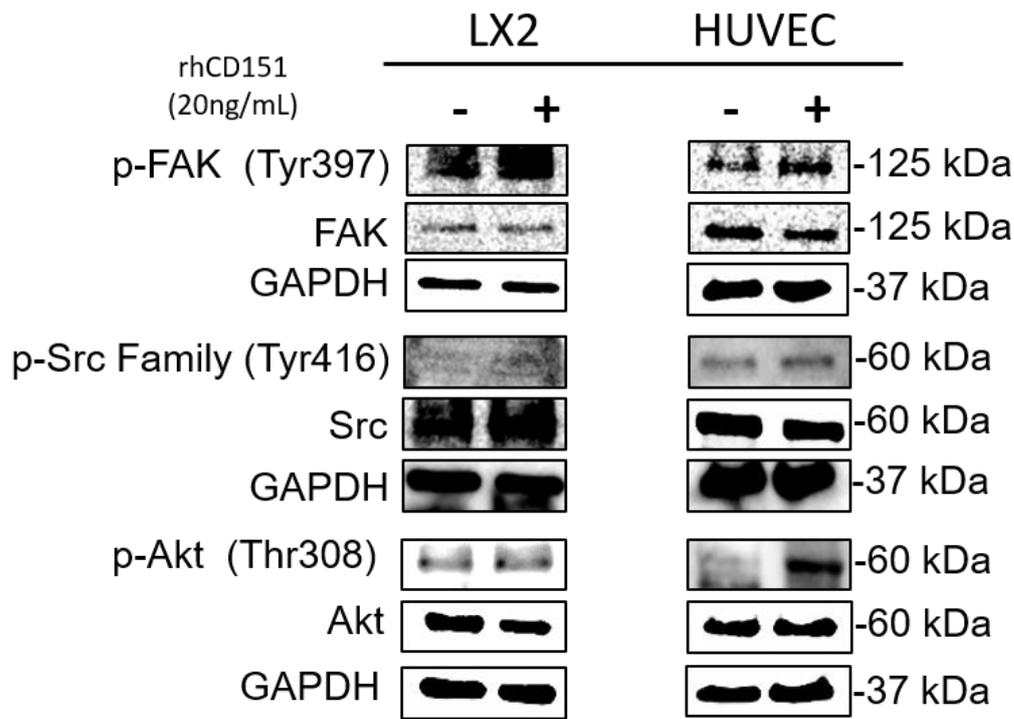


圖十五、缺氧使 CL1-5 之 Exosomes 磷酸化 FAK/Src/AKT 訊息傳遞路徑。 Hypoxia 誘導 CL1-5 分泌之 Exosomes 能增加 LX2 與 HUVEC 的 FAK、Src、AKT 磷酸化。每次實驗為獨立試驗三重複。

七、含有 CD151 之 Exosomes 誘導 FAK/Src/AKT 訊息傳遞路徑活化並助於 PMN 的形成

另外以正向驗證 rhCD151 (20 ng/ml) 有無加入細胞的差別，同樣進行西方點墨法分析磷酸化，其結果與加入 Exosomes 相同。此實驗驗證了 CD151 與 integrins 結合可活化了 Src、AKT。

(圖十六) 綜合前一實驗，進一步證實缺氧誘發肺癌細胞分泌含有 CD151 的 Exosomes 刺激 FAK/Src/AKT 的活化。



圖十六、CD151 蛋白質活化磷酸化 FAK/Src/AKT 訊息傳遞路徑，促進 Exosomes 在肝臟形成 PMN 機制。

rhCD151 蛋白質增加 LX2 與 HUVEC 細胞中 Src、AKT 磷酸化。每次實驗為獨立試驗三重複。

伍、討論

腫瘤轉移前微環境 (PMN) 的形成為癌症轉移的關鍵，同時決定了轉移的器官，由於癌症分泌相關因子或分泌了細胞外囊泡 (EVs) 等所導致的綜合效果 (Mo, Cheong et al. 2021)。肝臟 PMN 的形成涉及了細胞外基質重塑、肝星狀細胞 (HSC) 活化、血管內皮細胞纖網形成血管新生的發展，與骨髓細胞或免疫細胞的浸潤 (Liu and Cao 2016)。

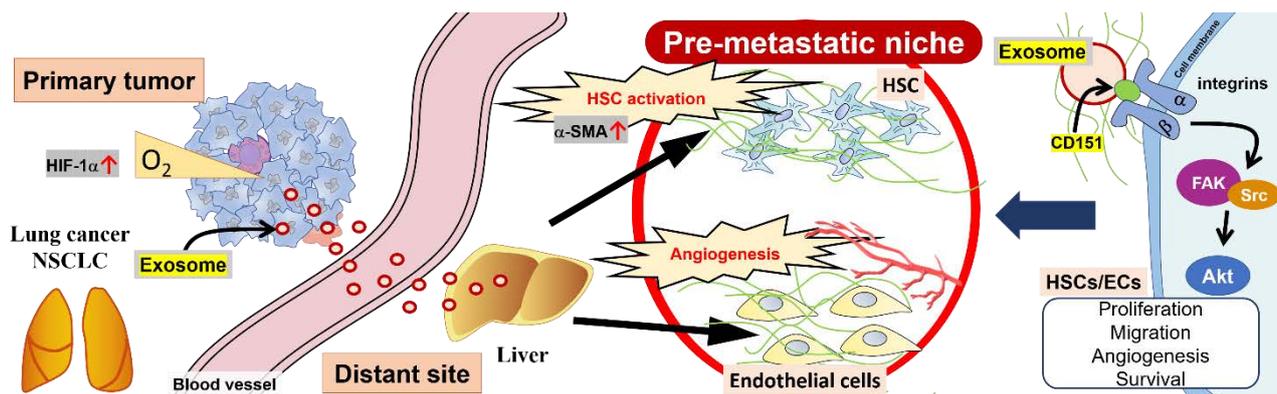
以研究 PMN 的形成為標靶，可以成為一種前景有望的治療措施，透過了解 PMN 可改善或提早預防癌症患者的臨床結果。對於原位腫瘤的所知仍然甚少，尤其是在肺癌中，肺癌引

發肝臟 PMN 形成的機制尚未完全被闡釋。本研究以實驗驗證支持了含 CD151 的 Exosomes 介導的肺癌肝轉移。肝臟的微環境 (microenvironment) 中富含 CD151 的 Exosomes 在癌細胞、肝星狀細胞 (hepatic stellate cells, HSC) 和血管內皮細胞 (Endothelial cell, ECs), 三者之間的串聯證實 CD151 可能是預防肺腺癌轉移至肝臟一項前景看好的治療標靶目標。

缺氧是腫瘤內部癌細胞常處的狀態，因為腫瘤外圍的脈管系統較難深入內部，使癌細胞無法維持快速增殖與滿足對氧氣與營養需求(Semenza 2012)。癌症衍生出的 Exosomes 通常幫助了腫瘤未來轉移，預先準備對其定殖有利的 PMN，並被認為是導致器官趨性的關鍵原因。低氧狀態觸發缺氧信號傳導，例如缺氧誘導因子 (HIFs)，間接促進癌細胞轉移並產生多種生物過程。包括上皮間質轉化 (EMT)、增加細胞移行能力、侵襲性和癌幹細胞的表型轉換。

已有研究指出，缺氧導致肺癌增加含有 microRNA 的 Exosomes 產生，從而改變血管通透性 (vascular permeability) 和巨噬細胞極化 (macrophage polarization) (Liu and Cao 2016)。根據目前的研究初次證明了缺氧會刺激肺癌分泌含有 CD151 的 Exosomes，從而促進肝臟 PMN 的形成。含有 CD151 的 Exosomes 會增加 肝星狀細胞(HSC) 活化和血管新生(angiogenesis)，藉此證明在轉移性癌症的定殖和生長中，產生關鍵作用。表示了 Exosomes 的表面蛋白 CD151 可能是肝臟 PMN 形成的相關關鍵循環因子之一，並且可以在肺癌缺氧的微環境中得到更多含有 CD151 的 Exosomes。

CD151 的表達已被證明影響了晚期胃癌的轉移與侵襲，CD151 與整合膜蛋白和生長因子受體 (如 EGFR 和 c-Met) 的結合有相關性(Kang, Lee et al. 2013)。整合膜蛋白 $\alpha 2 \beta 1$ 也已被發現在內皮細胞增殖中扮演關鍵角色，該過程對血管新生至關重要(Turner, Adams et al. 2020)。FAK (cytoplasmic tyrosine kinase) 經由整合膜蛋白 (integrins) 激活後，被廣泛視為導致細胞內信號傳導的關鍵介質，也是開啟了 Src/AKT 信號傳遞的上游調節劑，其在肝星狀細胞 LX2 和細胞增殖與血管內皮細胞 HUVEC 中激活了訊息傳通路。而在本研究中，實驗證明了缺氧肺癌衍生出富含 CD151 的 Exosomes 透過觸發 FAK、Src 和 AKT 訊息傳遞路徑，促進 HSC 活化和血管新生 (圖十七)。



圖十七、CD151 於 Exosomes 機制。肺腺癌中，腫瘤內部處於低氧狀態刺激了腫瘤細胞分泌 Exosomes，Exosomes 再透過血液循環提早到達肝臟，其中含 CD151 之 Exosomes 分別與肝臟的肝星狀細胞與血管內皮細胞結合，活化細胞內 FAK/Src/AKT 訊號路徑傳遞，使其產生血管新生並活化肝星狀細胞使肝纖維化。以上營造了有利於腫瘤轉移前的 Pre-metastatic niche。

陸、結論與應用

然而，CD151 存在 Exosomes 中的作用仍然模稜兩可，目前對原位肺腺癌引發肝臟 PMN 形成的機制也尚不清楚。此研究透過確定以肝臟微環境形成為標靶，並受具轉移能力的肺腺癌 CL1-5 細胞分泌的 CD151 在低氧狀態有高表現，進而介導產生相互作用，為肝臟轉移提供了新的見解。Exosomes 攜帶的生物活性物質具有診斷和預防價值，像是透過消除癌細胞分泌 Exosomes 或是阻斷 Exosomes 到達並影響遠端器官，以上針對轉移提供新治療策略(Mo, Cheong et al. 2021)。總結實驗結果，從 PMN 形成的角度來看，造就癌症轉移演變，可發展預防和治療肝臟轉移的綜合療法。

柒、參考文獻

1. Burgering, B. M. and P. J. Coffey (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." Nature **376**(6541): 599-602.
2. Chen, H. C., P. A. Appeddu, H. Isoda and J. L. Guan (1996). "Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **271**(42): 26329-26334.
3. Chen, W., A. D. Hoffmann, H. Liu and X. Liu (2018). "Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis." NPJ Precis Oncol **2**(1): 4.
4. Duma, N., R. Santana-Davila and J. R. Molina (2019). "Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment." Mayo Clin Proc **94**(8): 1623-1640.
5. Fares, J., M. Y. Fares, H. H. Khachfe, H. A. Salhab and Y. Fares (2020). "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited." Signal Transduct Target Ther **5**(1): 28.
6. Geerts, A. (2001). "History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells." Semin Liver Dis **21**(3): 311-335.
7. Geng, T., P. Pan, E. Leung, Q. Chen, L. Chamley and Z. Wu (2021). "Recent Advancement and Technical Challenges in Developing Small Extracellular Vesicles for Cancer Drug Delivery." Pharm Res **38**(2): 179-197.
8. Guo, Y., X. Ji, J. Liu, D. Fan, Q. Zhou, C. Chen, W. Wang, G. Wang, H. Wang, W. Yuan, Z. Ji and Z. Sun (2019). "Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors." Mol Cancer **18**(1): 39.
9. Hapach, L. A., J. A. Mosier, W. Wang and C. A. Reinhart-King (2019). "Engineered models to parse apart the metastatic cascade." NPJ Precis Oncol **3**: 20.
10. Hinz, B., G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani and C. Chaponnier (2001). "Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity." Mol Biol Cell **12**(9): 2730-2741.
11. Hoshino, A., B. Costa-Silva, T. L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, S. Singh, C. Williams, N. Soplop, K. Uryu, L. Pharmed, T. King, L. Bojmar, A. E. Davies, Y. Ararso, T. Zhang, H. Zhang, J. Hernandez, J. M. Weiss, V. D. Dumont-Cole, K. Kramer, L. H. Wexler, A. Narendran, G. K. Schwartz, J. H. Healey, P. Sandstrom,

- K. J. Labori, E. H. Kure, P. M. Grandgenett, M. A. Hollingsworth, M. de Sousa, S. Kaur, M. Jain, K. Mallya, S. K. Batra, W. R. Jarnagin, M. S. Brady, O. Fodstad, V. Muller, K. Pantel, A. J. Minn, M. J. Bissell, B. A. Garcia, Y. Kang, V. K. Rajasekhar, C. M. Ghajar, I. Matei, H. Peinado, J. Bromberg and D. Lyden (2015). "Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis." Nature **527**(7578): 329-335.
12. Izraely, S. and I. P. Witz (2021). "Site-specific metastasis: A cooperation between cancer cells and the metastatic microenvironment." Int J Cancer **148**(6): 1308-1322.
 13. Jaiswal, R. and L. M. Sedger (2019). "Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments." Front Oncol **9**: 125.
 14. Kang, B. W., D. Lee, H. Y. Chung, J. H. Han and Y. B. Kim (2013). "Tetraspanin CD151 expression associated with prognosis for patients with advanced gastric cancer." J Cancer Res Clin Oncol **139**(11): 1835-1843.
 15. Ko, Y. S., T. Rugira, H. Jin, Y. N. Joo and H. J. Kim (2020). "Radiotherapy-Resistant Breast Cancer Cells Enhance Tumor Progression by Enhancing Premetastatic Niche Formation through the HIF-1 α -LOX Axis." Int J Mol Sci **21**(21).
 16. Lemjabbar-Alaoui, H., O. U. Hassan, Y. W. Yang and P. Buchanan (2015). "Lung cancer: Biology and treatment options." Biochim Biophys Acta **1856**(2): 189-210.
 17. Liu, Y. and X. Cao (2016). "Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche." Cancer Cell **30**(5): 668-681.
 18. Mo, Z., J. Y. A. Cheong, L. Xiang, M. T. N. Le, A. Grimson and D. X. Zhang (2021). "Extracellular vesicle-associated organotropic metastasis." Cell Prolif **54**(1): e12948.
 19. Paredes, F., H. C. Williams and A. San Martin (2021). "Metabolic adaptation in hypoxia and cancer." Cancer Lett **502**: 133-142.
 20. Parkin, A., J. Man, P. Timpson and M. Pajic (2019). "Targeting the complexity of Src signalling in the tumour microenvironment of pancreatic cancer: from mechanism to therapy." Febs j **286**(18): 3510-3539.
 21. Parsons, J. T., K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor and S. A. Weed (2000). "Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement." Oncogene **19**(49): 5606-5613.

22. Rajagopal, C. and K. B. Harikumar (2018). "The Origin and Functions of Exosomes in Cancer." Front Oncol **8**: 66.
23. Sadej, R., A. Grudowska, L. Turczyk, R. Kordek and H. M. Romanska (2014). "CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario." Lab Invest **94**(1): 41-51.
24. Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines and J. T. Parsons (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." Mol Cell Biol **14**(3): 1680-1688.
25. Schlaepfer, D. D. and S. K. Mitra (2004). "Multiple connections link FAK to cell motility and invasion." Curr Opin Genet Dev **14**(1): 92-101.
26. Seki, E. and D. A. Brenner (2015). "Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis." J Hepatobiliary Pancreat Sci **22**(7): 512-518.
27. Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy." Trends Pharmacol Sci **33**(4): 207-214.
28. Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2020). "Cancer statistics, 2020." CA Cancer J Clin **70**(1): 7-30.
29. Turner, K. R., C. Adams, S. Staelens, H. Deckmyn and J. San Antonio (2020). "Crucial Role for Endothelial Cell $\alpha 2 \beta 1$ Integrin Receptor Clustering in Collagen-Induced Angiogenesis." Anat Rec (Hoboken) **303**(6): 1604-1618.
30. Yue, S., W. Mu, U. Erb and M. Zöller (2015). "The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding." Oncotarget **6**(4): 2366-2384.
31. Zhu, B., N. Lin, M. Zhang, Y. Zhu, H. Cheng, S. Chen, Y. Ling, W. Pan and R. Xu (2015). "Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis via interleukin-8 in hepatocellular carcinoma." J Transl Med **13**: 365.

【評語】 090007

此科展計畫從實驗設計到所有流程的細節論述都相當完整，作者的解釋也非常清楚，對於實驗背景也相當熟稔，讓人印象深刻。利用外泌體 (exosomes) 研究肝臟營造腫瘤轉移前微環境相關作用亦是相當新穎的課題。此科展計畫如果能多加入一些更精微的控制組實驗(如抑制 exosome 的進入或者是 integrin 其他途徑的抑制)將會讓實驗的完整性更高。