

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : miR-494 在乳癌幹細胞的角色 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 李蓉蓉
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-049-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 張文瑋

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 103年03月31日

一、摘要

癌症幹細胞(Cancer Stem Cell)為一群具有幹細胞特性的癌細胞，具有自我複製(Self-renewal)及細胞分化(Differentiation)的能力，並且與癌症細胞的抗藥性以及轉移有關，特別是隨著癌症轉移出去後，而成為產生新型癌症的來源¹。Hinokitiol 為自檜木萃取之醇類化合物，具有抑制癌症細胞增生的活性，但對於癌症幹細胞的影響仍未有研究。我們的研究發現 Hinokitiol 在 10 μ M 即具有抑制乳癌幹細胞的自我更新能力，並且伴隨 Bmi1 的蛋白表現量下降，但 Bmi1 的 mRNA 表現量並沒有變化，透過 microRNA 目標基因預測網頁發現 miR-494 與 Bmi1 的序列有互補情形，我們也發現在 Hinokitiol 處理下，乳癌幹細胞內的 miR-494 表現上升。利用轉染 miR-494 mimic 使乳癌細胞過度表達 miR-494，乳癌幹細胞的自我更新能力被抑制了，且 Bmi1 的蛋白表現量下降，由此結果我們推測 miR-494 可能藉由調節 Bmi1 來調節乳癌幹細胞的特性。此外利用轉染 miR-494 inhibitor 抑制乳癌細胞內 miR-494 的表現，發現 Hinokitiol 抑制乳癌幹細胞自我更新的作用消失，且無法抑制 Bmi1 的蛋白表現，因此我們推測 Hinokitiol 抑制乳癌幹細胞自我更新的機制，可能是藉由增加 miR-494 的表現，進而抑制 Bmi1。

二、前言

癌症幹細胞(Cancer Stem Cell)為一群具有幹細胞特性的癌細胞，具有自我複製(Self-renewal)及細胞分化(Differentiation)的能力，並且與癌症細胞的抗藥性以及轉移有關，特別是隨著癌症轉移出去後，而成為產生新型癌症的來源¹。癌症幹細胞也是導致癌症難以根治、會再度復發、擁有較差預後之原因，目前癌症幹細胞是現在癌症研究的一大重點，且被視為能夠成功治療癌症的重要關鍵。乳癌中也存在乳癌幹細胞，研究指出，乳癌幹細胞具有抵抗放射線治療的能力²。Hinokitiol 又名檜木醇，在化妝品中是常使用的內容物；現今發現 hinokitiol 可以有效破壞在前列腺癌細胞中的雄激素接受器³；近年來也被發現具有抑制癌細胞增生的功能；但是關於在乳癌幹細胞中的影響卻沒有相關的文獻，因此引發我們的興趣，讓我們想要朝這方面研究。micro RNAs(miRNAs)被發現與癌症幹細胞(Cancer Stem Cells, CSCs)的自我更新與致癌性有關。成熟的 miRNA 是一約 19~25 核苷酸長度的 RNA 分子，目前認為單一微小 RNA 分子可調節約 200 個基因；依據其不同的 RNA 序列細分不同的 miRNA，像是 miR-15、miR-103、miR-200、miR-494 等⁴。其中，發現 miR-145、miR-125b、miR-21 在人類乳癌細胞中，有過量表現情形⁵。在肺癌細胞 A549 中，miR-494 擁有抑制細胞增生和促進細胞衰老的能力⁶。但 miR-494 在乳癌幹細胞的作用和影響目前卻還不明瞭。Bmi1 是 polycomb repressive complex 1(PRC1)的一個核心元件，有研究指出 Bmi1 在胰腺癌細胞中，具有致瘤性且會增加癌幹細胞的生成⁷。另有研究顯示出在已分化的乳腺細胞其形成的懸浮球體中，Bmi1 的表現量比一般乳腺細胞來的高；因此如果降低 Bmi1 的表現量，則形成球體的數目和大小都會下降，藉此來降低乳癌的

形成⁸。

三、研究目的

本研究動機起自於在乳癌幹細胞的研究中，發現 hinokitiol 能抑制其體外自我更新的活性，並且觀察到 hinokitiol 能抑制 Bmi1 的蛋白表現，卻不影響 Bmi1 之 mRNA 表現或蛋白質穩定性。再者，在 Bmi1 下降的同時，發現 miR-494 表現上升，經序列比對則發現 Bmi1 之 3'-UTR 區域與 miR-494 之種子區域有虛列的互補性。因此，我們提出一個假設: hinokitiol 能透過增加 miR-494 的表現，抑制 Bmi1 蛋白量，進而導致乳癌幹細胞自我更新活性下降。

四、材料與方法

1.細胞培養

由乳癌細胞建立的乳癌幹細胞株(AS-B145)，以 MEM 培養基(含 10%胎牛血清、10 μ g/ml insulin、1X penicillin/streptomycin、1mM glutamine、1mM sodium pyruvate)，DMEM/F12 培養基(含 10%胎牛血清、1X penicillin/streptomycin、1mM glutamine、1mM sodium pyruvate)培養於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱。

2.懸浮球體培養

先將不同濃度之 Hinokitiol 與球體細胞培養用的生長因子(1X B27 supplement, 10ng/ml EGF, 10ng/ml bFGF, 5 μ g/ml Insulin, 1 μ g/ml Hydrocortisone, 4 μ g/ml Heparin)均勻混合，然後將 AS-B145 細胞、藥物與生長因子及球體細胞培養液混合均勻，再將混合好的培養液以每孔體積 2000 μ l 加入超低附著依賴性的 6 孔盤中，於 48 小時後再加入 500 μ l 的 Medium，於第五天加入含藥物的 Medium，最後於一星期後以倒立式顯微鏡觀察並計數球體數目，並將細胞收 Lysate。

3.細胞轉染

先將乳癌幹細胞(AS-B145)種在貼附性的 6 孔盤中，隔天再將 RNA 利用 Turbofect reagent 幫忙轉載進細胞中，24 小時後，將其細胞培養成非貼附性球體細胞，而轉載 48 小時後，收下細胞進行 Western Blot。

4.西方點墨法

依據非貼附性球體細胞培養結果決定濃度後，取 1x10⁴ 細胞種植至超低附著依賴性的 6 孔盤中，加入所決定的濃度藥劑及控制組(0.1% EtOH、10 μ M、1 μ M)，於 7 天後以 1X PBS 將細胞轉移至 50ml 離心管後以 500G、5 分鐘、4°C 離心收集細胞，再加入 30 μ l 細胞裂解溶液將細胞裂解(lysis)後，定出蛋白的濃度，每個樣品取 20 μ g 總蛋白量，進行 Western Blot，以找出 AS-B145 抑制乳癌幹細胞自我更新的路徑。

5.純化 RNA

依據非貼附性球體細胞培養結果決定濃度後，取 1x10⁴ 細胞種植至超低

附著依賴性的6孔盤中，加入所決定的濃度藥劑及控制組(0.1%EtOH、10 μ M、1 μ M)，於7天後以1X PBS將細胞轉移至50ml離心管後以500G、5分鐘、4 $^{\circ}$ C離心收集細胞，再用Quick-RNATM Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) 抽取總RNA。

6. Real-time PCR

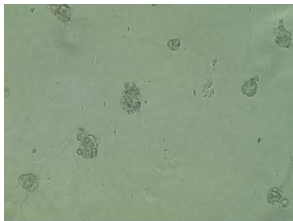
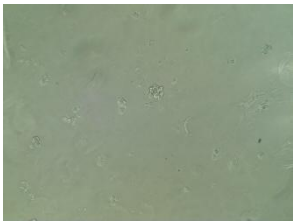
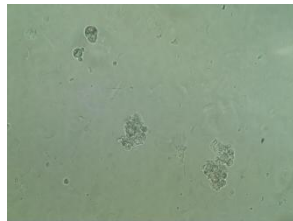
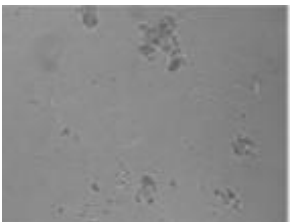
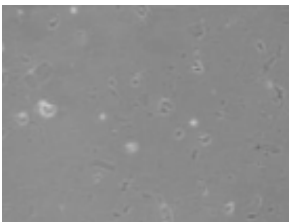
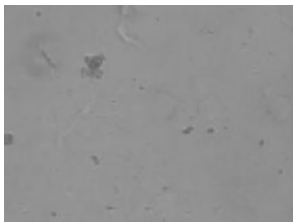
對於一般基因之mRNA的定量，取1 μ g之總RNA，以RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)，利用Oligo dT與Reverse transcriptase將mRNA反轉錄成cDNA。針對Bmi1或GUSB基因的定量，將10ng cDNA、SYBR Green試劑(KAPA)以及下列引子對混和後，利用StepOneTM Real-Time PCR System (Invitrogen)，以下列步驟進行偵測(95 $^{\circ}$ C，20sec) 1cycle(95 $^{\circ}$ C，10sec；60 $^{\circ}$ C，20sec；70 $^{\circ}$ C，1-10sec)40 cycle。針對miRNA的表現，取2 μ g總RNA，利用Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer Set (RIBOBIO, Guangzhou, China)內之各miRNA專一性RT primer，以及RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit內之Reverse Transcriptase合成cDNA，再利用Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer Set內之miRNA專一性引子對與SYBR Green試劑混和後，利用StepOneTM Real-Time PCR System進行偵測。

五、結果

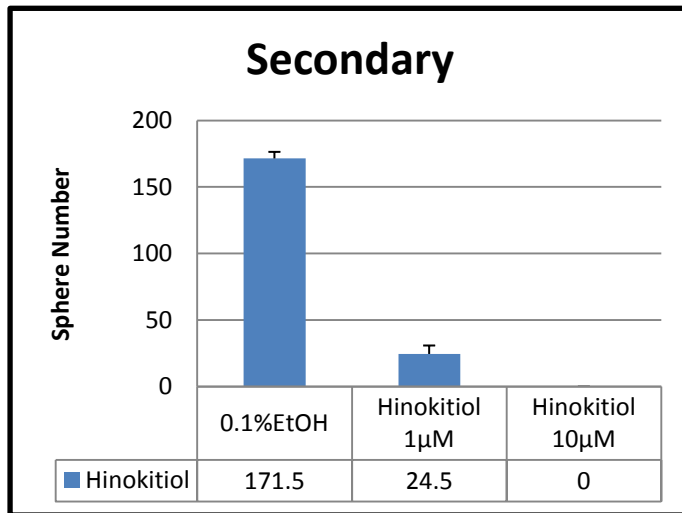
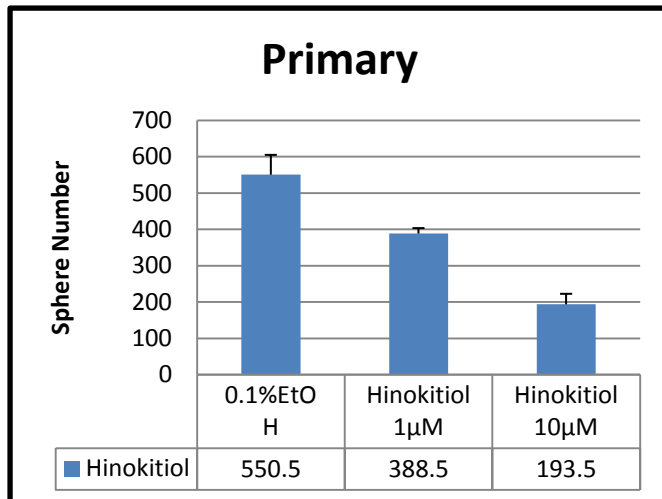
1.Hinokitiol具有抑制乳癌幹細胞自我更新的能力

球體懸浮培養方式 (sphere cultivation)為一種常用來評估癌症幹細胞自我更新活性的方法，我們首先利用此方式了解hinoiktiol是否影響癌症幹細胞的自我更新。由圖一的結果顯示，Hinokitiol在10 μ M可以抑制球體形成能力，而1 μ M則沒有明顯降低球體形成能力。此結果顯示，Hinokitiol有抑制乳癌幹細胞的自我更新能力。

A

	0.1%EtOH	10 μ M	1 μ M
Primary			
Secondary			

B



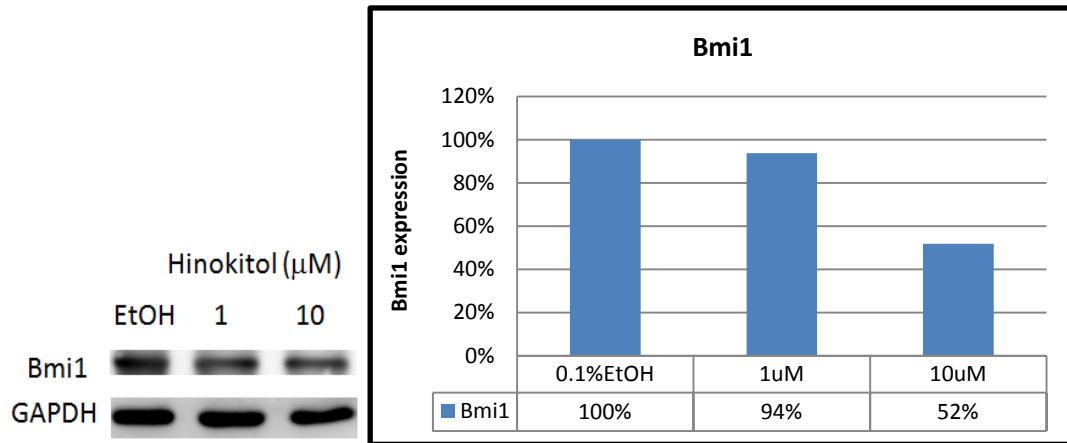
圖一、Hinokitiol對於乳癌細胞株AS-B145球體形成能力的影響。

A，以含0.1%EtOH、10µM、1µM hinokitiol培養基對AS-B145進行球體形成培養，培養7天後以倒立式顯微鏡觀察並進行球體計數。

B，球體數目量化後的結果，顯示10µM hinokitiol可以有效抑制AS-B145形成球體的能力。

2. Hinokitiol 能抑制乳腺小球(mammosphere)內 Bmi1 的表現

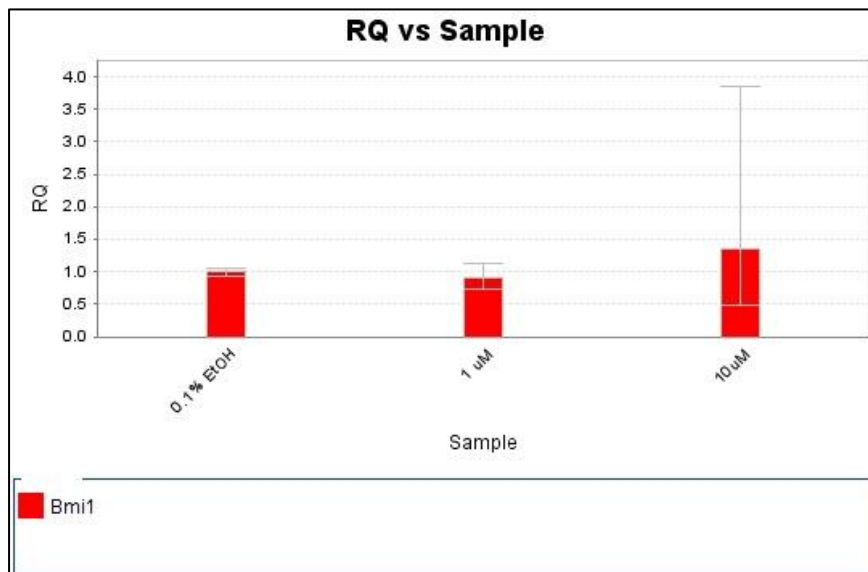
有研究指出 Bmi1 在乳腺小球細胞中，有過量的表現。我們利用西方點墨法偵測 hinokitiol 對於 Bmi1 的影響，由圖二發現 AS-B145 乳腺小球細胞中的 Bmi1 總蛋白在 Hinokitiol 處理下有下降的情形。



圖二、Hinokitiol對乳腺小球細胞內Bmi1蛋白的影響。利用西方點墨法偵測hinokitiol存在下，乳腺小球細胞內Bmi1的表現，右方柱狀圖為定量結果。

3. Hinokitiol不影響Bmi1之mRNA表現

為了瞭解Hinokitiol如何使AS-B145 乳腺小球內Bmi1蛋白表現下降，我們首先猜測hinokitiol可能影響Bmi1的轉錄作用。利用定量RT-PCR(圖三)，我們則發現hinokitiol並不會明顯影響Bmi1 mRNA的表現，因此Hinokitiol抑制Bmi1的作用可能與影響轉錄無關。



圖三、Hinokitiol對於乳腺小球細胞內Bmi1 mRNA的影響。將AS-B145細胞培養成乳腺小球後，再處理hinokitiol 24小時，隨後抽取乳腺小球細胞之總RNA，再以定量RT-PCR偵測Bmi1 mRNA的表現。

4. Hinokitiol可以增加乳腺小球內miR-494的表現並且過度表現miR-494可抑制乳癌幹細胞的自我更新

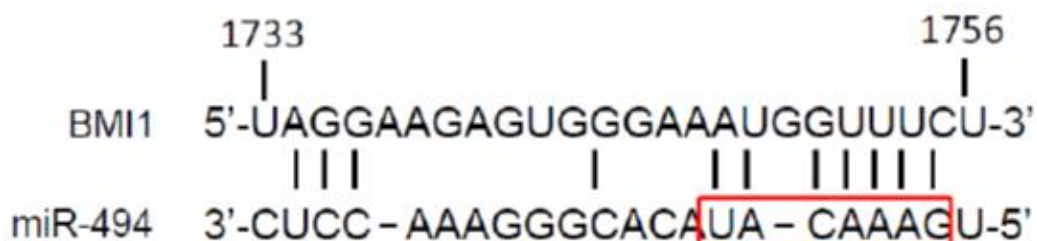
由於hinokitiol不影響Bmi1之mRNA表現，我們便猜想或許hinokitiol是透過miRNA途徑來影響Bmi1蛋白的表現。經由序列比對，發現Bmi1與miR-494其種

子序列(Seed Region)是有部分互補的情況，且除了種子序列外，也有幾個核苷酸彼此互補，這能增強兩者序列的連接性(圖四A)。利用定量PCR，我們則發現Hinokitiol的處理能提高AS-B145 乳腺小球內miR-494的表現(圖四B)，因此Hinokitiol的抑制作用可能也與調節miR 494的活性或表現量有關。

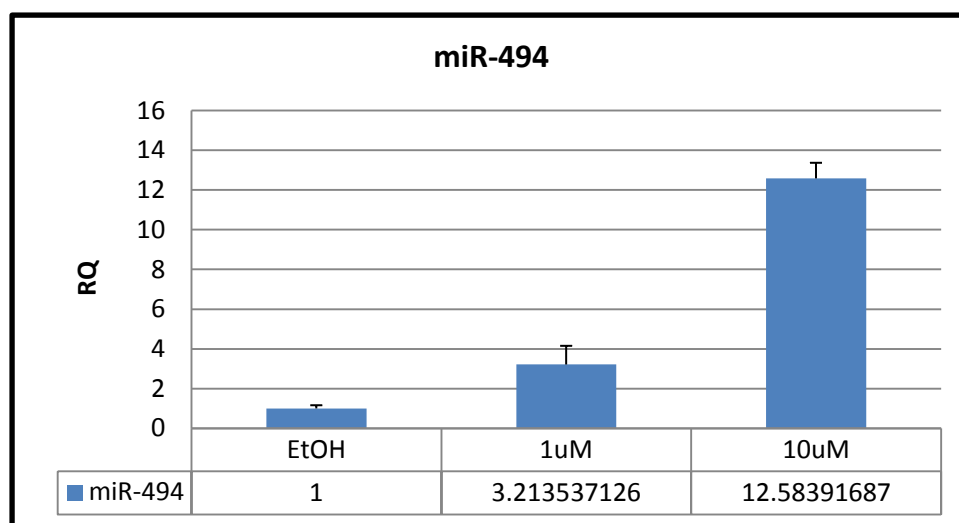
藉由轉染miR-494 mimic來觀察miR-494對於AS-B145乳腺小球的影響。利用定量PCR，我們可發現是否有成功轉染miR-494 mimic(圖四C)，緊接著將轉染的細胞培養成懸浮球體(圖四C)，以此觀察細胞的自我更新能力(圖四D)，將懸浮球體量化後(圖四E)，我們發現在over-expression miR-494的AS-B145細胞，其細胞的自我更新能力明顯下降。

總括來說，miR-494的表現可以抑制乳腺細胞(AS-B145)的自我更新能力。

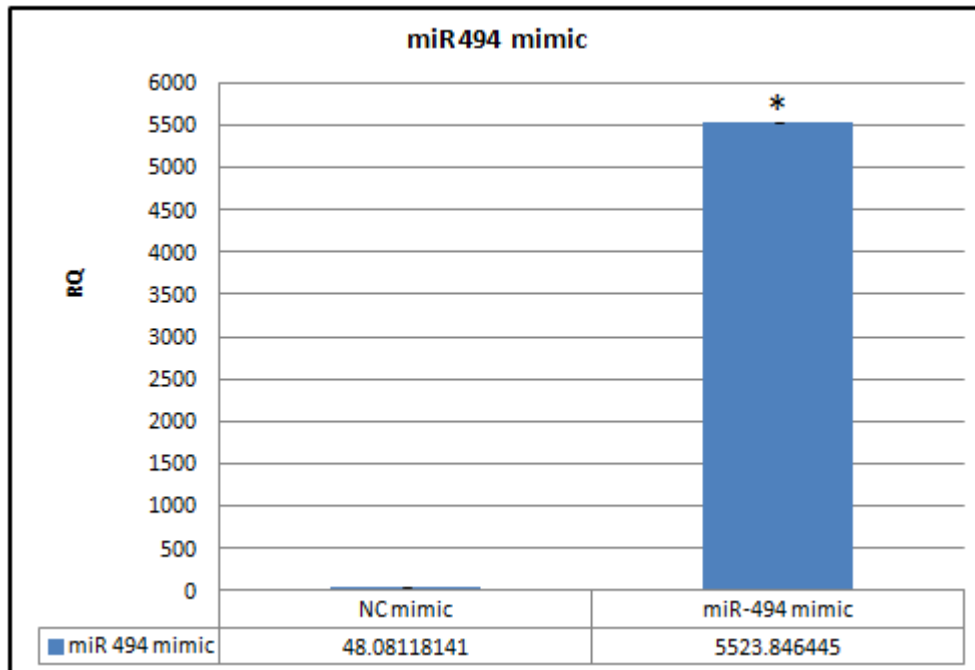
A



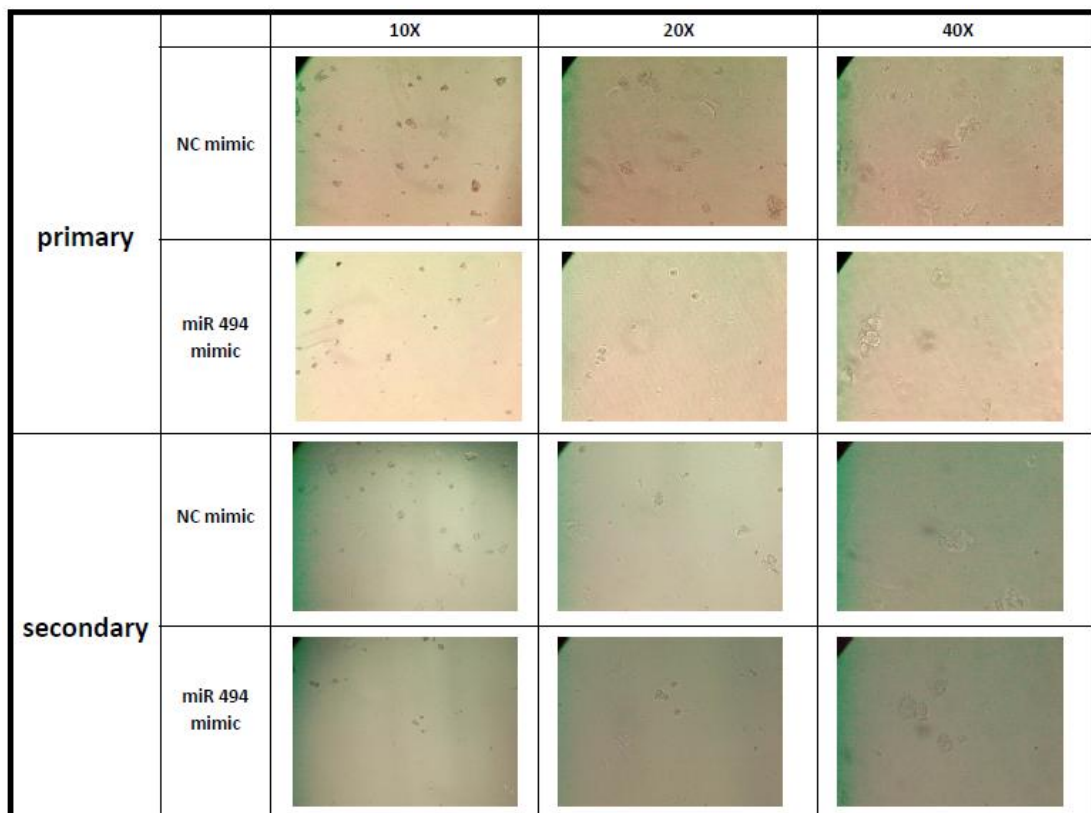
B



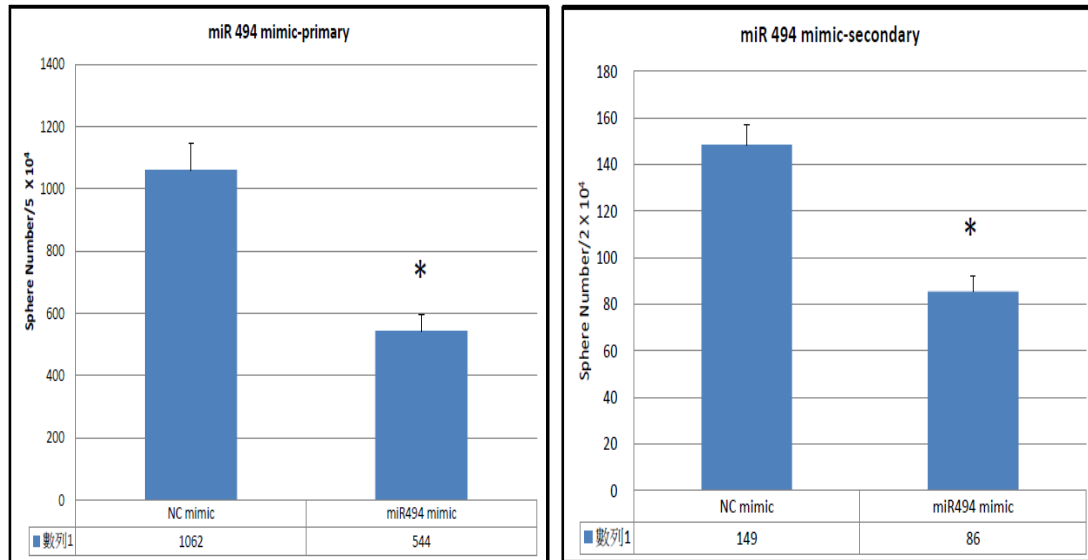
C



D



E



圖四、Hinokitiol能增加乳腺小球內miR-494的表現。

A, Bmi1之3'-UTR與miR-494之序列比對

B, 將AS-B145細胞培養成乳腺小球後, 再處理hinokitiol 24小時, 隨後抽取乳腺小球細胞之總RNA, 再以定量PCR偵測miR-494的表現。

C, 轉染miR-494 mimic 24小時後, 抽取乳腺小球細胞之總RNA, 再以定量PCR偵測miR-494的表現。*, p<0.05.

D, 轉染miR-494 mimic 24小時後, 將其培養成懸浮球體, 並用顯微鏡在不同物鏡下觀察。

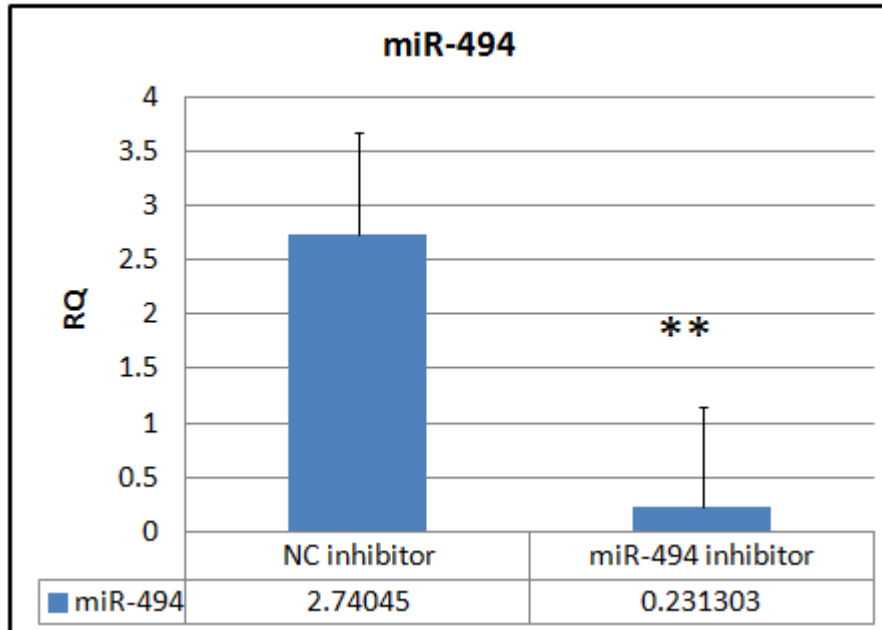
E, 懸浮球體數目量化圖。*, p<0.05.

5. 抑制乳癌細胞內miR-494的表現可抑制乳癌幹細胞的自我更新

由於前面實驗結果顯示hinokitiol可能是藉由miR-494來調控乳癌幹細胞。因此藉由轉染miR-494 inhibitor(圖五A), 來觀察此現象的可信度。由懸浮球體的量化圖可發現雖然有hinokitiol的處理, 但因為miR-494被knock-down了, 所以AS-B145的自我更新能力就不受藥物的影響(圖五B, C)。

總括來說, 我們可以推測hinokitiol可能是藉由miR-494來調控如乳癌幹細胞的自我更新能力。

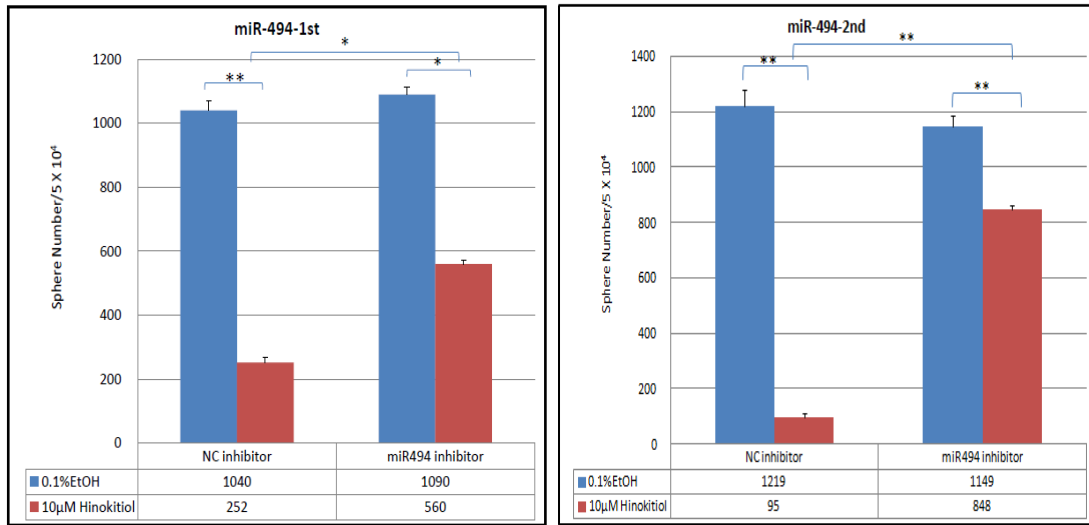
A



B

		0.1% EtOH		10 μ M Hinokitiol	
		10X	20X	10X	20X
primary	NC inhibitor				
	miR 494 inhibitor				
secondary	NC inhibitor				
	miR 494 inhibitor				

C



圖五、Hinokitiol對於knock-down miR-494乳癌細胞株AS-B145球體形成能力的影響。

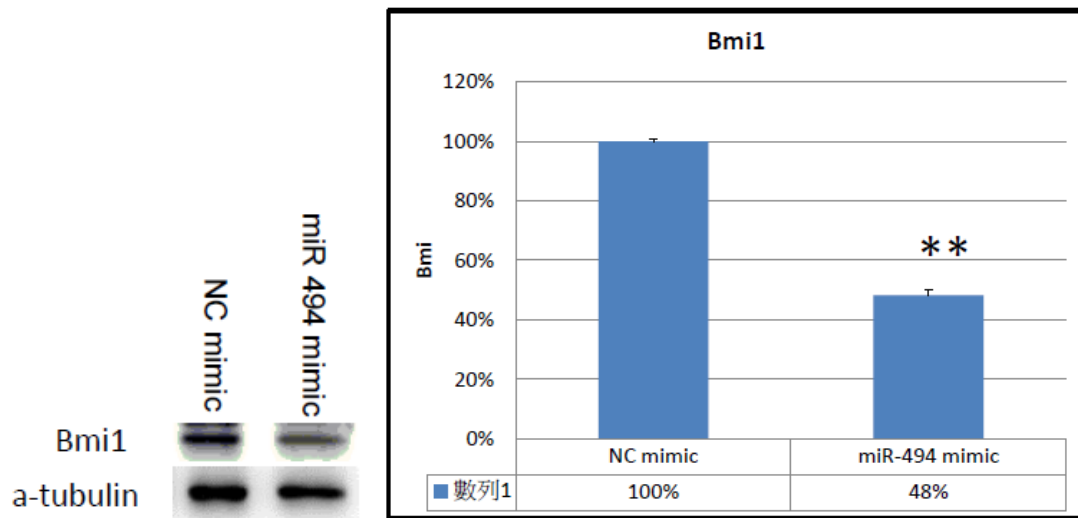
A，轉染miR-494 inhibitor 24小時後，抽取乳腺小球細胞之總RNA，再以定量PCR偵測miR-494的表現。**, p<0.01.

B，以含0.1%EtOH、10µM hinokitiol培養基對AS-B145且knock-down miR-494後進行球體形成培養，培養7天後以倒立式顯微鏡觀察並進行球體計數。

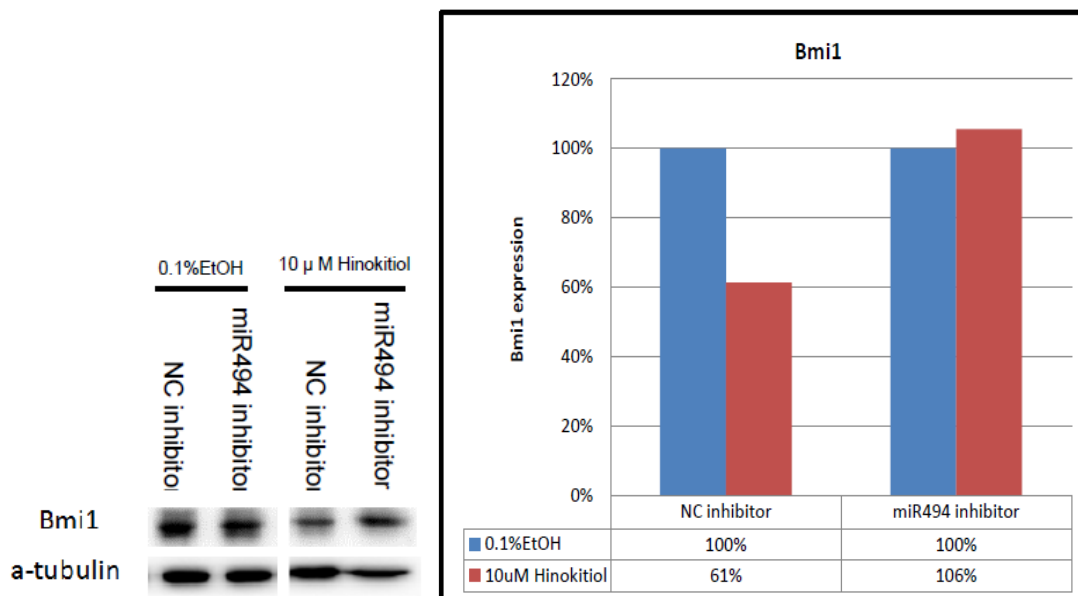
C，球體數目量化後的結果，顯示knock-down miR-494後，即使有Hinokitiol的處理也沒有影響AS-B145形成球體的能力。*, p<0.05; **, p<0.01.

6. 調控miR-494的表現可影響Bmi1的表現

有研究指出Bmi1在乳腺小球細胞中，有過量的表現。我們利用西方點墨法偵測miR-494對於Bmi1的影響，由圖六發現過度表現miR-494後，其AS-B145乳腺小球細胞中的Bmi1總蛋白有下降的情形。由圖七發現當抑制miR-494後，AS-B145雖然有hinokitiol的處理，但細胞中的Bmi1總蛋白卻沒有變化。總括來說，hinokitiol可能是藉由miR-494調節Bmi1來影響AS-B145。



圖六、over-expression miR-494對乳腺小球細胞(AS-B145)內Bmi1蛋白的影響。利用西方點墨法偵測在over-expression miR-494下，乳腺小球細胞內Bmi1的表現，右方柱狀圖為定量結果。



圖七、knock-down miR-494對乳腺小球細胞內 Bmi1 蛋白的影響。利用西方點墨法偵測在 knock-down miR-494 下，乳腺小球細胞內 Bmi1 的表現，右方柱狀圖為定量結果。

七、討論

由於 hinokitiol 不影響 Bmi1 之 mRNA 表現，我們便猜想或許 hinokitiol 是透過 miRNA 途徑來影響 Bmi1 蛋白的表現。經由序列比對，發現 Bmi1 與 miR-494 其種子序列(Seed Region)是有部分互補的情況，且除了種子序列外，也有幾個核苷酸彼此互補，這能增強兩者序列的連接性。

因此我們利用轉染 mimic，藉此觀察 miR-494 與 Bmi1 的關連性。經由懸浮

球體實驗，我們發現了過度表達 miR-494，其自我更新能力有明顯的下降；緊接著進行西方點墨法的實驗，來加強確認 miR-494 與 Bmi1 的關係，如同圖上顯示，在過度表達 miR-494 後，其 Bmi1 的蛋白表現量有明顯下降。因此我們可以推測 miR-494 可能是藉由調控 Bmi1 來抑制乳癌幹細胞的自我更新能力。

接著我們利用轉染 inhibitor，藉此觀察 hinokitiol 與 miR-494 之間的關係。經由懸浮球體實驗，我們發現雖然有 hinokitiol 的處理，但因為抑制了 miR-494 的表現，因此在藥物處理下，自我更新能力並沒有改變；緊接著西方點墨法的實驗，觀察到在 hinokitiol 處理下，miR-494 被抑制後，其 Bmi1 的表現量沒有變化。

因此我們可以推測 hinokitiol 可能是藉由調控 miR-494 來調控 Bmi1 表現，藉此再影響癌幹細胞的特性。

八、參考文獻

1. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(12):895-902.
2. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1777-1785.
3. Shicheng Liu , Hitoshi Yamauchi. Hinokitiol, a metal chelator derived from natural plants, suppresses cell growth and disrupts androgen receptor signaling in prostate carcinoma cell lines. Research Department, Saitama Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 8-1, Minamisakae-cho, Kasukabe, Saitama 344-0057, Japan
4. Christos Polytharchou, b, Dimitrios Iliopoulos, a, b, c, and Kevin Struhl, 1. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. Contributed by Kevin Struhl, July 25, 2012 (sent for review March 14, 2012)
5. Marilena V. Iorio, Manuela Ferracin, Chang-Gong Liu, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-7070.
6. H. Ohdaira, M. Sekiguchi, K. Miyata and K. Yoshida. MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. *Cell Prolif.*, 2012, 45, 32–38.
7. Proctor E, Waghray M, Lee CJ, Heidt DG, Yalamanchili M, et al. (2013) Bmi1 enhances tumorigenicity and cancer stem cell function in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS ONE* 8(2): e55820. doi:10.1371/journal.pone.0055820
8. Suling Liu, Gabriela Dontu, Iliia D. Mantle, et al. Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells. *Cancer Res* 2006;66:6063-6071. Published online June 15, 2006.