

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 探討 TRIB3/Notch 訊號對乳癌細胞抗放射線治療的分 *
* 名稱 : 子機制 *
* ***** ***** *

執行計畫學生：黃俞皓

學生計畫編號：MOST 105-2815-C-040-018-B

研究期間：105年07月01日至106年02月28日止，計8個月

指導教授：張文瑋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國

106年03月28日

題目:探討TRIB3/Notch訊號對乳癌細胞抗放射線治療的分子機制

(一)摘要:

放射線治療是一種對付惡性腫瘤常見的療法，臨床上常在手術切除大部分的腫瘤後搭配X-ray來消除剩下的癌細胞，但即便經過一系列的放射線治療後，部分癌細胞仍然存活，因此了解腫瘤抗放射線治療的機制，將有助於腫瘤放射增敏療法的開發。本研究利用三陰性乳癌(triple negative breast cancer, TNBC)細胞株AS-B244、MDA-MB231建立放射性抗性細胞 (radioresistant, RR)，定期以低劑量2Gy放射線照射，累積至約20Gy後確認RR細胞對放射線敏感性確實明顯降低，隨後以RNA microarray分析原細胞株及具放射抗性的RR細胞的基因表現差異，發現RR中tribbles homolog 3 (TRIB3)基因表現明顯上升，透過即時定量PCR與西方點墨法也發現具有抗放射線能力之TNBC細胞中，TRIB3的mRNA表現及蛋白表現均有明顯上升。我們進一步發現RR細胞相較於原始細胞株具有較高的癌幹細胞活性；RR細胞中的Notch路徑則有顯著活化的現象，利用shRNA抑制TRIB3的表現則會下調Notch-1的活化，同時增加RR細胞對放射線的敏感性；但是抑制TRIB3雖讓RR細胞的生長較為緩慢，卻反而增加RR細胞自我更新的活性。本研究發現TRIB3可能透過活化Notch1路徑使TNBC細胞對抗放射線治療產生抗性，但若要利用抑制TRIB3來作為TNBC的放射線增敏策略，則可能必須同時考慮合併抑制癌幹細胞活性的藥物，才能有效治療放射線抗性的腫瘤。

(二) 研究動機與研究問題:

本研究動機起自於在乳癌細胞的研究中，發現定期以低劑量放射線照射AS-B244細胞株，會促使其產生放射線敏感性下降的現象(圖一)，並發現經過放射線的照射後，TRIB3的mRNA及蛋白表現明顯上升(圖二、圖三)。另有研究指出knockdown TRIB3會下調Notch-1的表現[1]，且癌細胞可藉由活化Notch訊號來啟動下游的相關基因，進而達到抗放射線治療的結果[2]，而我們也發現Notch ligand: DLL1的mRNA表現在放射線不敏感之AS-B244-RR細胞內有明顯上升(圖四)，因此，我們推論TRIB3會藉由調控Notch ligand來活化Notch訊號途徑，進而使AS-B244-RR乳癌細胞產生抗放射線治療的現象。

本研究的目標為:

- (1)瞭解在放射線的照射下，是否活化放射不敏感之乳癌細胞內Notch訊號的活化。
- (2)抑制TRIB3的表現是否影響Notch訊號的活化，而增加乳癌細胞對放射線的敏感性。
- (3)探討TRIB3對於乳癌幹細胞自我更新的影響。
- (4)探討TRIB3對於放射抗性乳癌細胞內Notch訊息傳遞的影響。

(三)文獻回顧與探討

放射線治療是治療癌症非常重要的療法之一，但往往因為癌細胞內在或後天形成的放射線抗性而無法完全消滅癌細胞，最後又使癌症復發甚至轉移至其他器官，因此抗放射線治療是目前癌症治療主要的瓶頸[3]。腫瘤細胞抗放射線治療的原因，包括：DNA損傷及修復的基因產生突變、細胞週期的調控發生異常、細胞凋亡的機制失調、癌症幹細胞內的相關基因表現異常等，使得癌細胞對放射線的敏感性下降，進而產生抗性。有文獻指出，乳癌幹細胞可調節癌症轉移，對於化療、放射線治療具有抵抗性[4]，而癌症幹細胞(Cancer Stem Cell)是具有幹細胞特性的癌細胞，能夠自我更新(Self-renewal)及細胞分化(Differentiation)，被認為有形成腫瘤、發展成癌症的潛力，尤其是隨著癌症轉移出去後，而產生新型癌症的來源，癌症幹細胞也是造成癌症轉移、容易復發、較差預後的原因之一[5]。

Notch穿膜蛋白是細胞與細胞間接收訊號的受體(receptor)，主要是調控胚胎發育或成體組織中的自我更新、細胞增生及分化[6]，而 Notch訊號途徑是藉由其ligand 的活化來進行一連串的蛋白水解，再由 γ -secretase 切開其細胞內區域(Notch intracellular domain, NICD)，所釋放的NICD會進入細胞核內扮演調節轉錄的角色[7]；經過放射線照射，Notch訊號途徑會促進乳癌幹細胞的自我更新，造成存活的癌細胞可以對放射線治療產生耐受性[8]，而經過 γ -secretase 抑制劑的處理，可降低乳癌幹細胞的生成[9]。然而，乳癌細胞內的Notch訊號途徑還會調控細胞週期(p21, cyclin D1)、轉錄因子(c-Myc, NF-KB2)、血管生成路徑(VEGFR1,3)，因此，乳癌細胞產生抗放射線治療的原因是非常多面向的[10]。

Tribbles homolog 3 (TRIB3)是一個穩定的支架蛋白 (scaffold protein)，參與許多細胞生存及增生的途徑[11]。有研究發現TRIB3表現異常上升時，會促進癌細胞進行epithelial-mesenchymal transition (EMT)，導致腫瘤的轉移[12]。另有文獻指出，在肺腺癌細胞模式中knockdown TRIB3，會下調Notch-1的表現來誘導細胞凋亡 [1]。因此我們將深入探討乳癌細胞中TRIB3與Notch訊號間的分子機制，渴望對於臨床上抗放射線治療的標靶藥物開發有所助益。

(四)材料與方法

1. Cell culture

AS-B244細胞株是以含胎牛血清之MEM α medium(含10% FBS+ 1mM glutamine+ 1mM sodium pyruvate+ 1X penicillin/streptomycin+ 5 μ g/ml insulin)進行日常的細胞培養。MDA-MB231細胞株是以含胎牛血清之DMEM medium(含10%FBS+1mM glutamine+ 1mM sodium pyruvate+ 1X penicillin/streptomycin)進行日常的細胞培養。

2. Radiation sensitivity test

利用乳癌細胞株AS-B244、MDA-MB231定期以低劑量放射線2Gy進行照射，累積約20Gy 後，分別將未照射過的原細胞株及定期照射且存活的RR分別種在3.5cm dish，以0、2、4、8、16、32Gy的放射線照射後，培養96hr後，將其以血球計數器計算存活率。

3. Spheroid cell culture

將貼附在flask上的parental及RR細胞，以1X trypsin分解部分細胞骨架使其變為懸浮後，收集至15ml tube後以1300rpm、5分鐘離心收集細胞，各分裝至ependorf內，以4Gy進行照射後，將球體細胞培養用的growth factor (1X B27 supplement, 10ng/ml EGF, 10ng/ml bFGF, 5μg/ml Insulin, 1μg/ml Hydrocortisone, 4μg/ml Heparin)均勻混合，然後將AS-B244(NC、RR)細胞、growth factor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2000μl加入超低附著依賴性的6孔盤中，於第三天及第六天補入500μl的sphere medium，最後於一星期後以倒立式顯微鏡觀察並計數球體數目。

4. Lentivirus infection

將 2×10^5 /well的AS-B244、MDA-MB-231細胞種植至一般細胞培養用6孔盤中，待其貼附後，將培養液更換為含有polybrene (8 μg/ml)加入適當量的TRIB3慢病毒液，於37°C培養箱中進行感染，48小時後將含病毒之培養基移除，更換為正常培養基繼續培養24小時後，加入puromycin(2 μg/ml)進行篩選，將存活之細胞擴增，建立抑制表現TRIB3之AS-B244及MDA-MB 231細胞株。

5. quantitative PCR

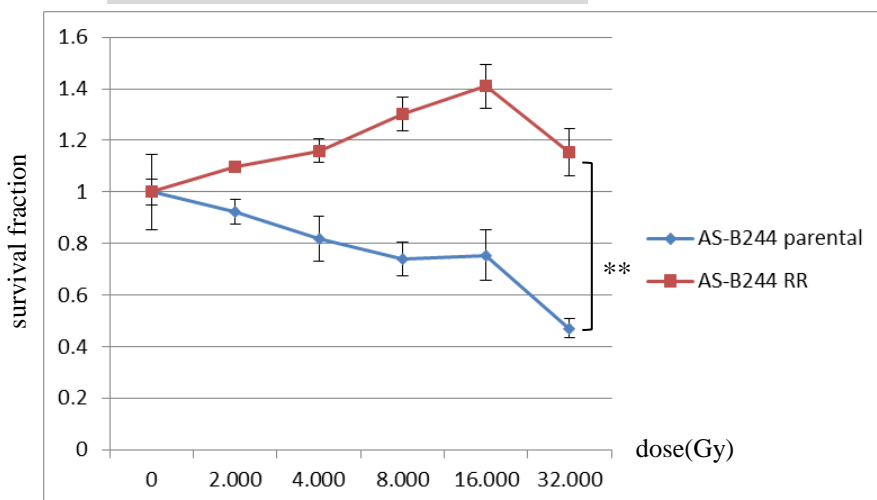
依據Radiation sensitivity test確認放射線抗性後，將貼附在flask上的parental及RR細胞，以1X trypsin分解部分細胞骨架使其變為懸浮後，收集至15ml tube後以1300rpm、5分鐘離心收集細胞，純化其RNA並轉為cDNA後，再將cDNA以特定的primer進行qPCR。

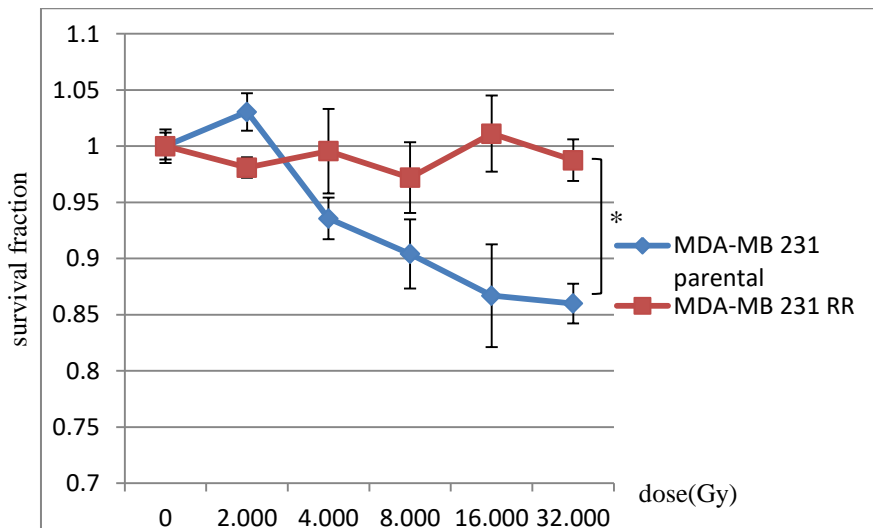
6. Western blot

分別收取parental及RR細胞，並加入細胞裂解液(RIPA buffer)破碎細胞，以得到蛋白液，再以BCA定量法測定蛋白濃度。每個樣品取30μg蛋白量，進行SDS-PAGE電泳分離，並轉漬於PVDF膜上，以5%脫脂牛奶進行blocking 1小時，再以特異性一級抗體於4°C培養過夜，隔日以含過氧化酶之特異性二級抗體於室溫培養1小時，經過適當清洗後，加入冷光顯影劑反應，以冷光照相儀擷取冷光訊號，再進行分析。

五)結果與討論:

1. 建立對放射線低敏感之乳癌細胞株

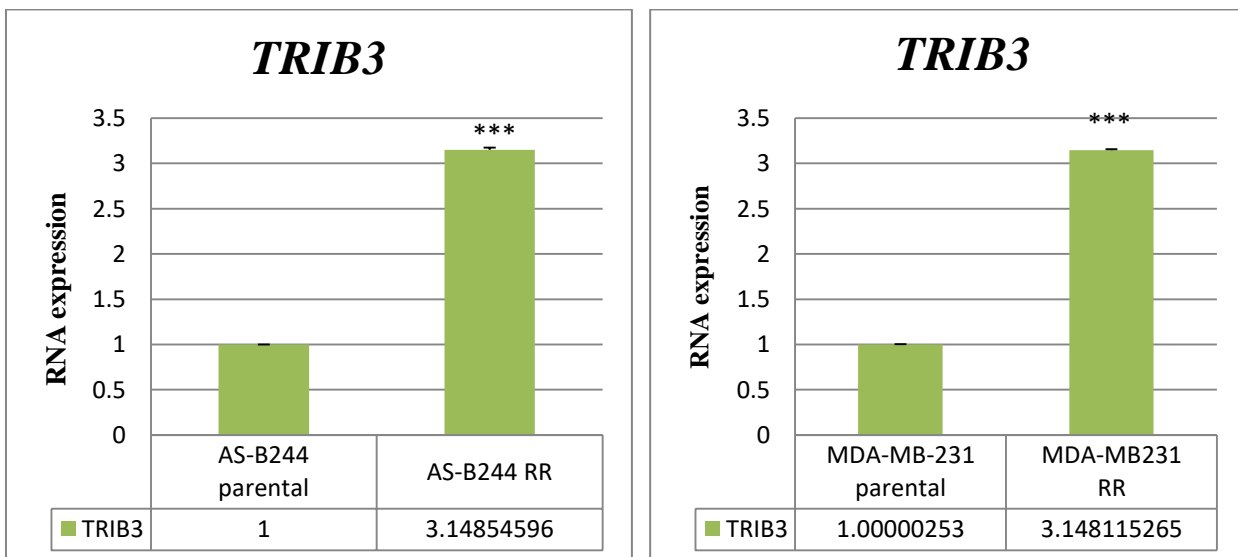




圖一、不同放射劑量對AS-B244、MDA-MB 231的parental及RR照射後之存活率

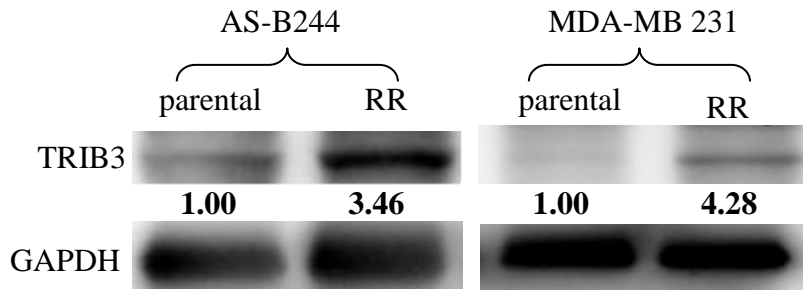
藉由Radiation sensitivity test，分別以不同劑量的放射線照射後，培養96小時，再計算其細胞存活狀況;發現RR在高劑量的照射後確實比原細胞株的生長情況還要良好。*** $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

2. 放射線能促進乳癌細胞內TRIB3的表現



圖二、放射抗性乳癌細胞(AS-B244、MDA-MB 231)內TRIB3 mRNA的表現

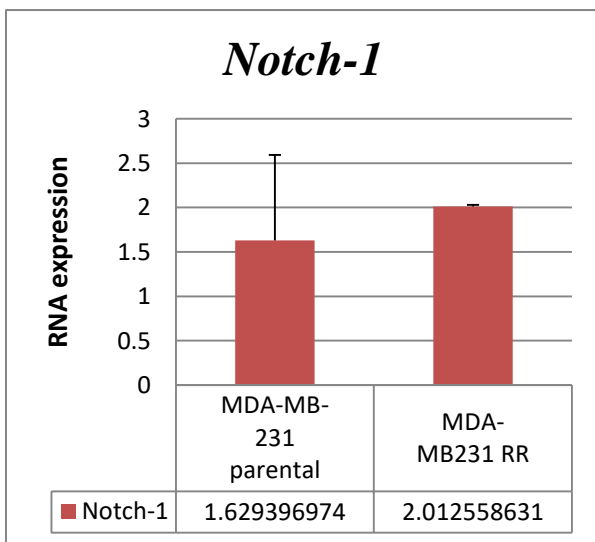
我們抽取AS-B244 parental與AS-B244-RR細胞之RNA，以全基因微點陣晶片分析兩者之基因表現差異，發現TRIB3基因訊號在AS-B244-RR細胞中明顯提升。我們接著以qPCR方式驗證TRIB3在原始AS-B244、MDA-MB 231細胞與放射抗性衍生細胞的表現，證實TRIB3在RR細胞中顯著增加。***, $p < 0.001$.



圖三、放射抗性乳癌細胞(AS-B244、MDA-MB 231)內TRIB3的蛋白表現

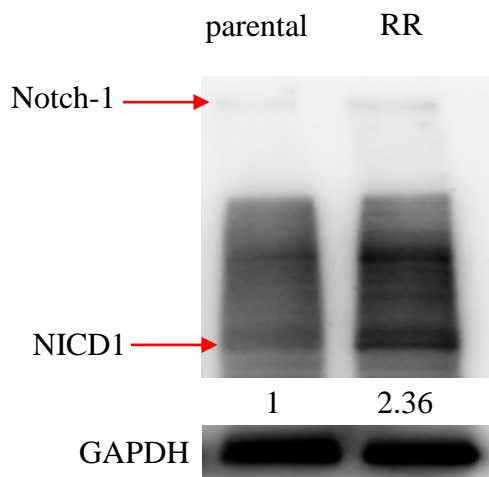
我們接著以西方墨點法分析AS-B244 parental與放射抗性AS-B244-RR細胞內TRIB3蛋白表現的差異，在AS-B244-RR細胞中同樣呈現明顯增加，與qPCR的結果相符。這些結果顯示，放射線可以造成TRIB3蛋白在乳癌細胞內保持穩定且較高的表現量。

3. 放射線能促進乳癌細胞內Notch pathway的活性



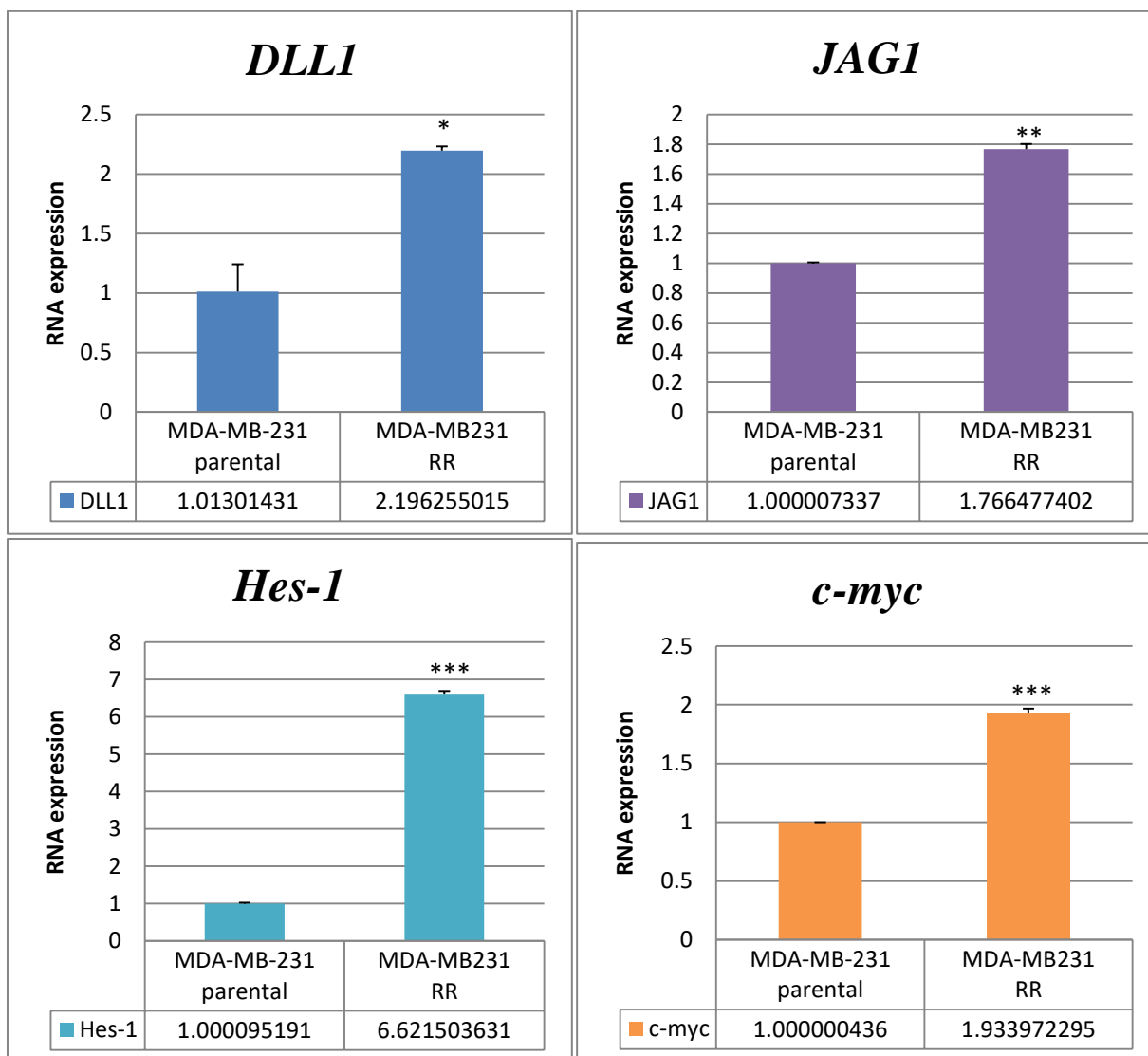
圖四、放射抗性乳癌細胞MDA-MB 231內Notch-1 mRNA的表現

我們抽取MDA-MB 231 原細胞株及RR細胞之總RNA，利用qPCR來觀察Notch-1 mRNA在RR細胞內表現是否較高，但我們發現其mRNA在原細胞株及RR細胞內並無明顯差異。



圖五、放射抗性乳癌細胞MDA-MB 231內Notch-1蛋白的表現

我們接著以西方墨點法分析MDA-MB231原細胞株(parental)與放射抗性MDA-MB231-RR細胞內完整的Notch-1及NICD1(Notch-1 intracellular domain)表現的差異，發現在RR細胞內NICD1有明顯的上升，因此我們推測放射線雖然不會促進*Notch-1* mRNA的轉錄，但卻會增加Notch-1 receptor的活性，進而使NICD1蛋白的表現增加。

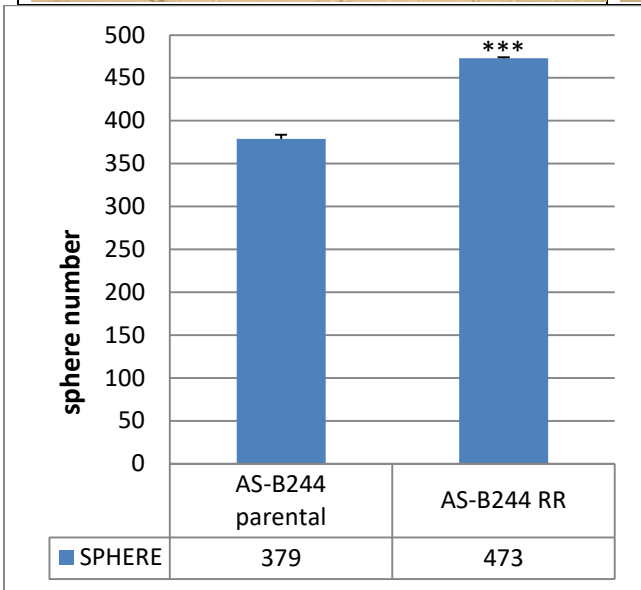
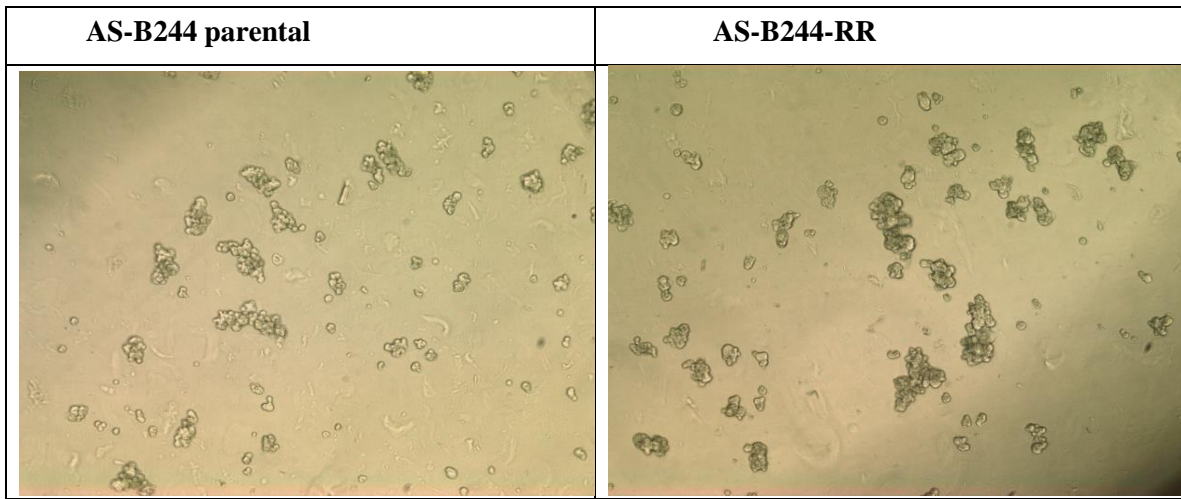


圖六、放射抗性乳癌細胞MDA-MB 231內Notch pathway相關基因的表現

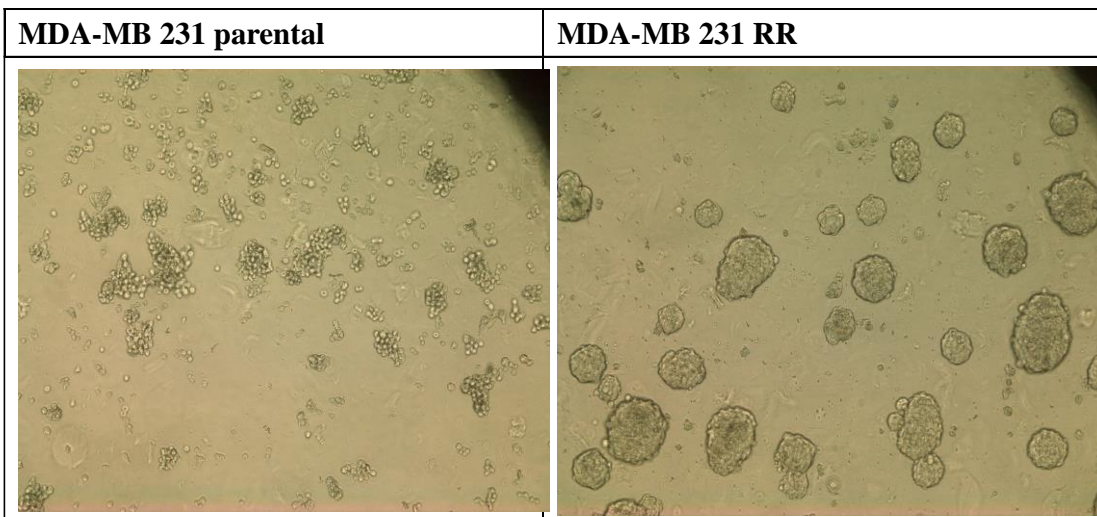
我們利用qPCR也發現Notch ligand:*Delta-like1*(*DLL1*)及*Jagged1*(*JAG1*)在RR細胞內具有較高的表現量，因此，推測放射線促進*TRIB3*的表現，進而上調Notch ligand來增加Notch-1 receptor的活性；我們也發現Notch pathway下游的標的基因:*Hes-1*及轉錄因子:*c-myc*在RR細胞內也有較高的表現量，因此可以確認放射抗性的乳癌細胞確實擁有較高的Notch訊號活性。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

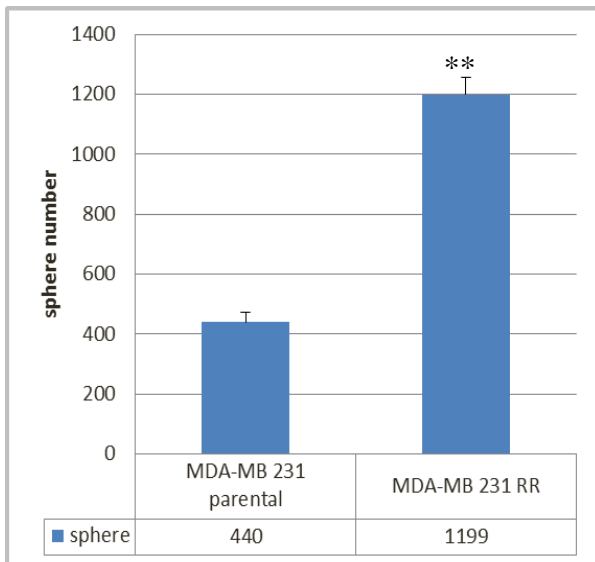
4. 放射抗性乳癌細胞內乳癌幹細胞的活性較為增加

有研究指出經過放射線照射，Notch訊號途徑會促進乳癌幹細胞的自我更新[8]，我們接著以癌症球體(tumor sphere)培養方式分析放射抗性乳癌細胞的癌幹細胞活性。如圖七-八所示，AS-B244-RR(圖七)和MDA-MB231-RR(圖八)形成球體的能力較原始細胞株要佳且球體體積也較大，顯示放射抗性乳癌細胞其癌幹細胞自我更新活性較原始細胞高。



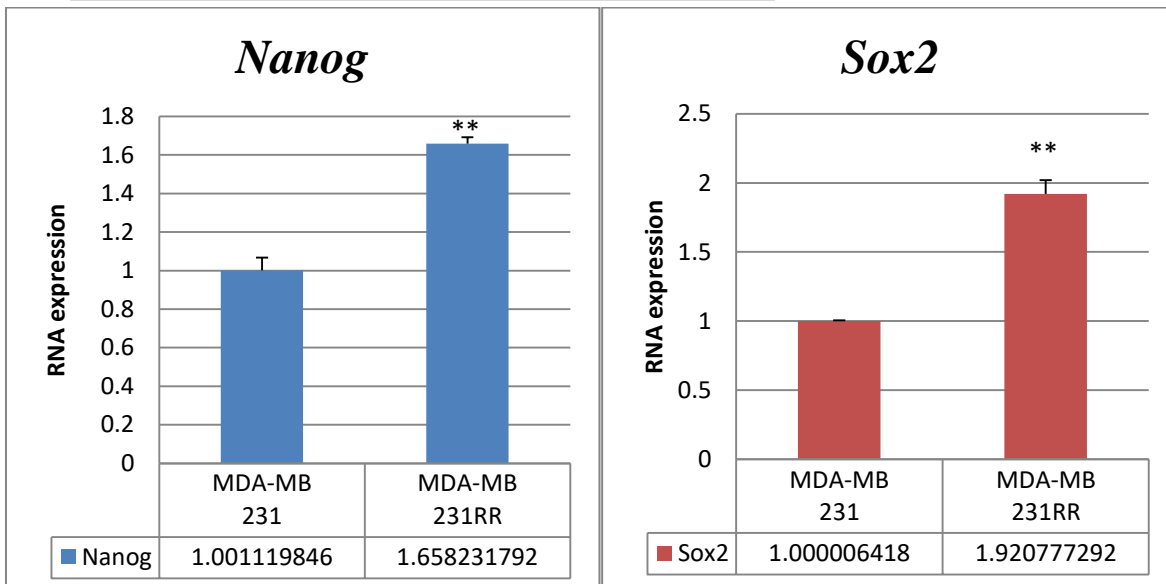
圖七、AS-B244-RR細胞具較高的癌幹細胞活性。





圖八、MDA-MB231-RR細胞其癌幹細胞活性明顯增加

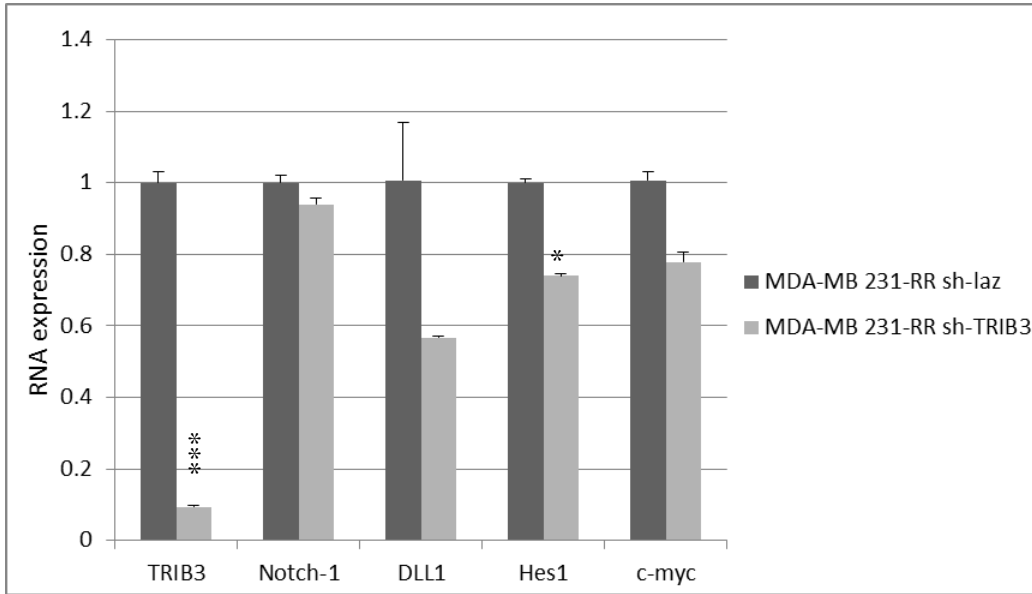
5. 具放射線抗細之乳癌細胞內幹性基因表現較為增加



圖九、放射抗性乳癌細胞MDA-MB 231內stemness gene(*Nanog*、*Sox2*)mRNA的表現

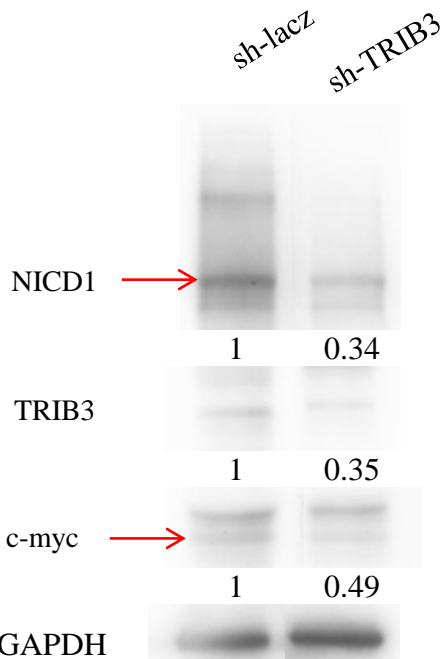
根據上方sphere形成之結果，我們接著以即時定量PCR方式分析乳癌細胞MDA-MB231(parental及RR)中，相關幹性基因的表現，發現在231-RR中*Nanog*及*Sox2* mRNA的表現有顯著上升。

6. 抑制TRIB3的表現會降低放射抗性之乳癌細胞內Notch訊息傳遞



圖八、抑制放射抗性之乳癌細胞MDA-MB 231-RR內TRIB3的表現能減弱Notch-1路徑的活化

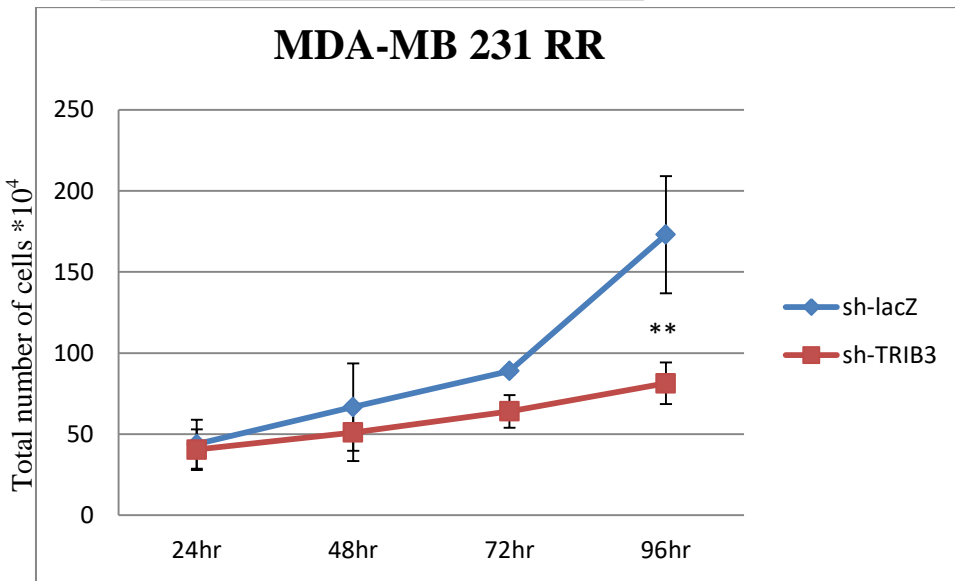
使用帶有sh-TRIB3片段之慢病毒感染MDA-MB231-RR乳癌細胞，建立穩定抑制TRIB3表達之MDA-MB231-RR乳癌細胞，接著利用qPCR分析TRIB3穩定抑制之MDA-MB231-RR細胞內，Notch下游相關基因的表現與sh-lacZ穩定表現之MDA-MB231-RR對照細胞的差異，發現雖然*Notch-1*仍然沒有明顯差異，但是Notch ligand (DLL1)、下游標的基因(Hes-1及轉錄因子:c-myc)確實有因為抑制TRIB3的表現後，而降低其mRNA的表現。



圖九、knockdown TRIB3在放射抗性之乳癌細胞MDA-MB 231-RR內NICD1及c-myc蛋白的表現

我們接著以西方墨點法分析放射抗性之乳癌細胞MDA-MB231-RR(sh-lacZ及sh-TRIB3)內，NICD1蛋白的表現確實因為TRIB3的抑制而明顯降低。

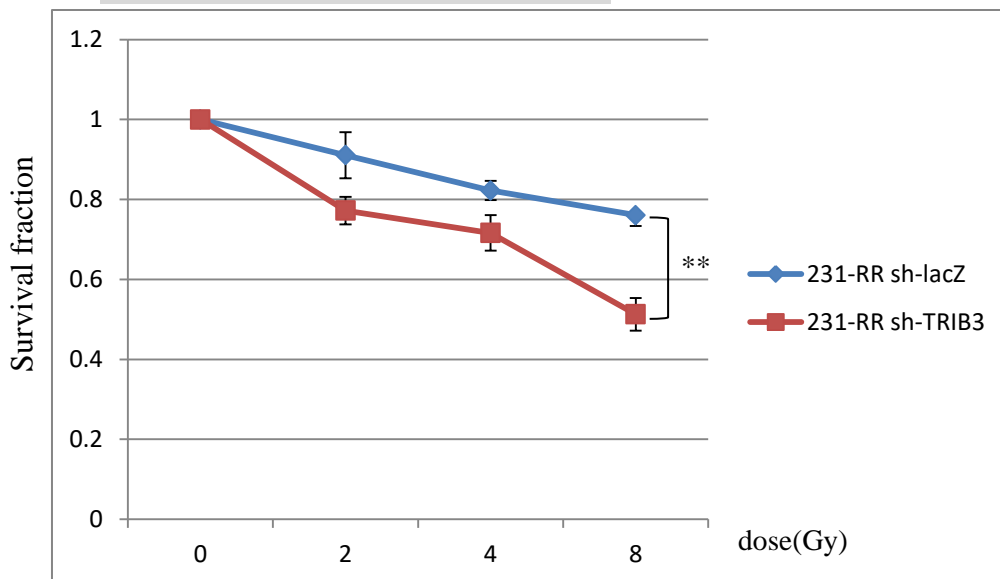
7. 抑制TRIB3表現會降低細胞增生之能力



圖十、knockdown TRIB3在放射抗性之乳癌細胞MDA-MB 231-RR內細胞增生狀況

我們以cell proliferation assay分析放射抗性之乳癌細胞MDA-MB231-RR(sh-lacZ及sh-TRIB3)，在24hr、48hr、72hr、96hr後，將細胞利用trypsin/EDTA收下來並以trypan blue進行細胞記數，發現抑制TRIB3表現後，雖然在24-72hr無明顯差異，但在96hr時細胞增生能力確實受到抑制。**, $p < 0.01$.

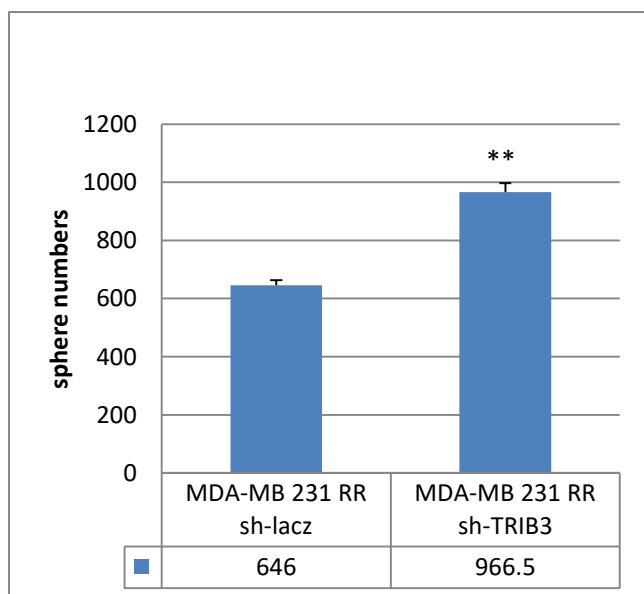
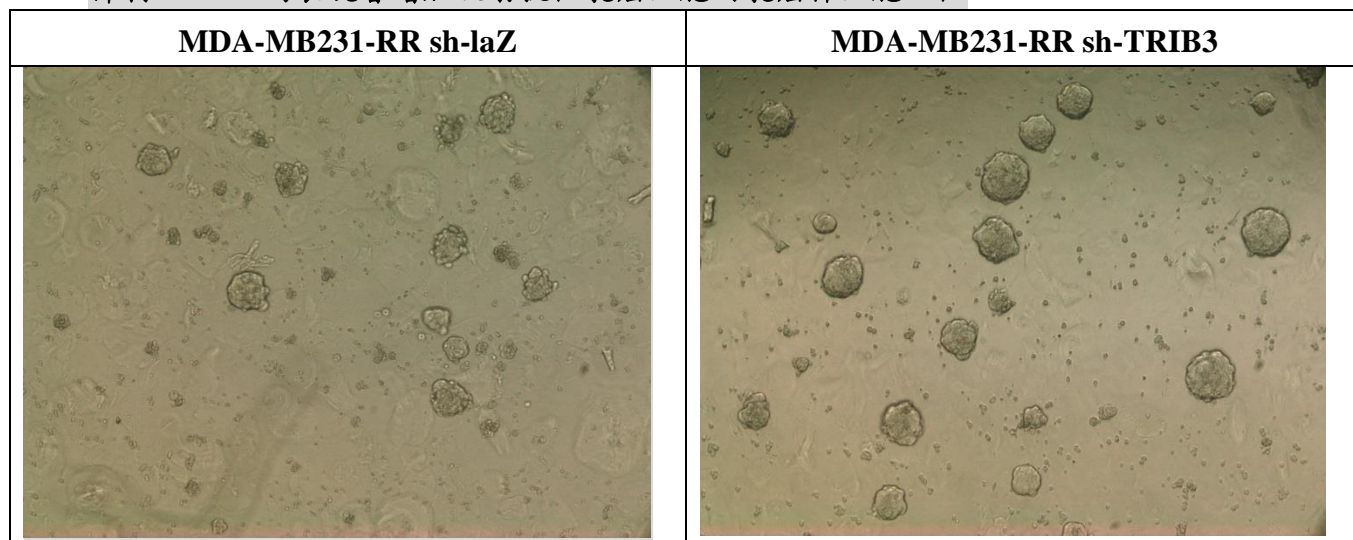
8. 抑制TRIB3表現會增加放射線敏感性



圖十一、抑制TRIB3表現能增加放射抗性之三陰性乳癌對放射線治療的敏感性

接著，我們藉由Radiation sensitivity test，分別以不同劑量的放射線照射後，培養96小時，再計算其細胞存活狀況；發現抑制TRIB3表現後，在高劑量的照射後確實增加其放射線敏感性。**, $p < 0.01$.

9. 抑制 TRIB3 的表現會增加放射抗性乳癌細胞內乳癌幹細胞活性



圖十二、放射抗性的 TNBC 細胞其癌幹細胞活性明顯上升

我們接著以癌症球體(tumorsphere)培養方式分析抑制TRIB3是否影響放射抗性TNBC乳癌細胞的癌幹細胞活性。如上圖所示，231RR 2當抑制TRIB3後形成球體的能力較好且球體體積也較大，顯示放射抗性乳癌細胞其癌幹細胞自我更新活性較sh-lacZ高。 $**$, $p < 0.01$ 。

綜合以上的結果，可以了解乳癌細胞的放射線抗性可能是藉由TRIB3表現的異常上升，來促進Notch receptor的活性增加，並上調下游的標的基因及轉錄因子，進而使乳癌細胞對放射線的敏感性下降；但根據圖十二，我們發現抑制TRIB3反而卻增加tumorsphere形成的能力，暗示TRIB3或許有調節癌幹細胞自我更新的能力。過去的文獻指出autophagy會促進癌幹細胞的自我更新[13]，另有研究指出，TRIB3會與p62交互作用而減少autophagy[14]。往後我們將去了解乳癌細胞的抗放射線治療能力是否TRIB3調節Autophagy的發生有關；同時也將更進一步探討抗放射線治療之TNBC乳癌細胞中TRIB3表現增加的分子路徑，以及TRIB3在抗放射線治療之TNBC細胞中的交互作用蛋白，以釐清TRIB3調節TNBC細胞抗放射線的分子機制。

(六)參考文獻:

1. Zhou H, Luo Y, Chen JH, Hu J, Luo YZ, Wang W, Zeng Y, Xiao L. **Knockdown of TRB3 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through regulation of Notch 1 expression.** *Mol Med Rep.* 2013 Jul;8(1):47-52. doi: 10.3892/mmr.2013.1453.
2. Shen Y, Chen H, Zhang J, Chen Y, Wang M, Ma J, Hong L, Liu N, Fan Q, Lu X, Tian Y, Wang A, Dong J, Lan Q, Huang Q. **Increased Notch Signaling Enhances Radioresistance of Malignant Stromal Cells Induced by Glioma Stem/ Progenitor Cells.** *PLoS One.* 2015 Nov 23;10(11):e0142594. doi: 10.1371/journal.pone.0142594.
3. Milas L, Hittelman WN. **Cancer stem cells and tumor response to therapy: current problems and future prospects.** *Semin Radiat Oncol.* 2009 Apr;19(2):96-105. doi: 10.1016/j.semradonc.2008.11.004. Review.
4. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. **The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation.** *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 20;98(24):1777-85.
5. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. **Applying the principles of stem-cell biology to cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2003 Dec;3(12):895-902. Review.
6. Muskavitch MA. **Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice.** *Dev Biol.* 1994 Dec;166(2):415-30. Review.
7. Kopan R. **Notch: a membrane-bound transcription factor.** *J Cell Sci.* 2002 Mar 15;115(Pt 6):1095-7.
8. Lagadec C, Vlashi E, Alhiyari Y, Phillips TM, Bochkur Dratver M, Pajonk F. **Radiation-induced Notch signaling in breast cancer stem cells.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013 Nov 1;87(3):609-18. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.06.2064.
9. Grudzien P, Lo S, Albain KS, Robinson P, Rajan P, Strack PR, Golde TE, Miele L, Foreman KE. **Inhibition of Notch signaling reduces the stem-like population of breast cancer cells and prevents mammosphere formation.** *Anticancer Res.* 2010 Oct;30(10):3853-67.
10. Al-Hussaini H, Subramanyam D, Reedijk M, Sridhar SS. **Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer.** *Mol Cancer Ther.* 2011 Jan;10(1):9-15. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0677. Review.
11. Wennemers M, Bussink J, van den Beucken T, Sweep FC, Span PN. **Regulation of TRIB3 mRNA and protein in breast cancer.** *PLoS One.* 2012;7(11):e49439. doi: 10.1371/journal.pone.0049439.
12. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Takatsuno Y, Kim H, Hirose H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. **Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis.** *Br J Cancer.* 2009 Nov 17;101(10):1664-70. doi: 10.1038/sj.bjc.6605361.
13. Vitale I, Manic G, Dandrea V, De Maria R. **Role of autophagy in the maintenance and function of cancer stem cells.** *Int J Dev Biol.* 2015;59(1-3):95-108. doi:10.1387/ijdb.150082iv. Review.
14. Hua F, Hu ZW. **TRIB3-P62 interaction, diabetes and autophagy.** *Oncotarget.* 2015 Oct 27;6(33):34061-2. doi: 10.18632/oncotarget.6108.