

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

OKL38蛋白、脂筏(lipid raft)及特定microRNA表現在n-3和n-6多元不飽和脂肪酸調控乳癌細胞轉移扮演之角色

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 103-2313-B-040-001-  
執行期間：103年08月01日至104年07月31日  
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：李健群

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林辰宇  
博士班研究生-兼任助理人員：蔡佳翰

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 11 月 02 日

中文摘要：乳癌為全球女性最常見的惡性腫瘤，癌細胞轉移是導致乳癌患者死亡主要原因，在諸多乳癌分型中，又屬缺乏雌激素(estrogen)、黃體素(progesterone)及人類第二型表皮生長因子(HER2/neu)受體的三陰性乳癌治療最棘手。已知改變細胞膜lipid raft中integrin及EGFR表現與分布與調控乳癌細胞發展有關。然而，DHA或其它PUFAs是否透過影響integrin及ErbB於lipid raft的表現與分布，進而阻斷其下游Src、PKC、PI3K等訊號路徑而調控癌細胞轉移、凋亡和自噬作用仍不清楚。OKL38為一抑癌蛋白。臨床研究證實在各種惡性腫瘤細胞中OKL38表現較低或不表現，尤其是乳癌細胞。預備實驗得知在六種PUFAs中，僅DHA顯著誘發MCF-7細胞OKL38表現，然而DHA如何誘發OKL38的表現，及其是否在DHA抑制乳癌細胞轉移、促進癌細胞自噬作用、凋亡扮演重要角色，值得深入研究。本研究第一部份結果顯示DHA顯著抑制細胞移行、侵襲能力以及向下調節integrin  $\beta 4$ 表現，且呈現濃度依賴關係，而且DHA藉由瓦解細胞膜lipid raft降低其中integrin  $\beta 4$ 的分佈和Src表現及磷酸化，DHA處理PI3K可負向調控Src及Akt (Ser473)磷酸化及其下游MMP-9、uPA、S100A4蛋白質表現；siRNA knockdown integrin  $\beta 4$ 亦可抑制MMP-9、uPA、S100A4蛋白質表現。綜合上述結果得知，DHA降低MMP-9，uPA及S100A4表現進而抑制Hs578T乳癌細胞移行、侵襲，部分因素可能與DHA負向調控integrin  $\beta 4$ 表現、減少integrin  $\beta 4$ 分佈於lipid raft及抑制integrin  $\beta 4$ 下游Src及Akt訊號路徑的活化。第二部分研究結果發現，DHA可顯著誘發OKL38蛋白質及mRNA表現，此誘發效果呈劑量關係。給予PI3K inhibitor-LY294002可顯著抑制DHA誘發OKL38表現及Nrf2核內累積及Nrf2-ARE結合力，因此DHA主要透過活化PI3K-Akt訊號路徑促使Nrf2進入細胞核內而啟動OKL38轉錄作用。此外誘發OKL38可能與DHA抑制癌細胞發展有關。

中文關鍵詞：OKL38、表皮生長因子、插入素、微RNA、多元不飽和脂肪酸、乳癌、轉移、自噬作用

英文摘要：Breast cancer is the commonly diagnosed cancer among women all over the world. Metastasis is leading cause of death from breast cancer. There are many subtypes of breast cancer, especially triple-negative breast cancer (TNBC), is most difficult to be cured. It has been shown that the cooperation between integrin and epidermal growth factor receptor (EGFR) in lipid raft regulates certain signaling functions that are important for breast cancer progression. However, whether docosahexaenoic acid (DHA) and other PUFAs alter integrin- and EGFR-related signaling by disrupting its lipid raft association, results in regulating metastasis, apoptosis and autophagy is not fully understood. OKL38 may be identified as a tumor suppressor protein that inhibits tumor cell growth. Clinical study showed OKL38 level was down-regulated or lost in various malignant tumors and cancer cell lines, especially breast cancer cells. Among n-3 and n-6 PUFAs, only DHA

significantly up-regulated OKL38 expression. However, the effect of OKL38 on DHA inhibition of breast cell migration and induction of apoptosis and autophagy is not fully clarified. (一) The results from the project indicates that DHA significantly inhibited cell migration, invasion and dramatically down-regulated integrin  $\beta 4$  expression in a dose-dependent manner. These results suggest that DHA inhibits  $\beta 4$ -mediated MMP-9, uPA and S100A4 expression as well as cell migration and invasion at least in part via down-regulating integrin  $\beta 4$  expression and decreasing the distribution of integrin  $\beta 4$  in lipid raft as well as the activation of integrin  $\beta 4$ -mediated Src and Akt signaling pathways. (二) The results from the project indicates that DHA induces OKL38 expression at least partially through activation of PI3K-Akt signaling pathway and subsequent Nrf2 transactivation in MCF-7 cells. Moreover, induction of OKL38 may be involved in DHAs anti-cancer activity.

英文關鍵詞：OKL38、EGF、Integrin、microRNA、PUFA、breast cancer、metastasis、Autophagy

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

OKL38 蛋白、脂筏(lipid raft)及特定 microRNA 表現在  
n-3 和 n-6 多元不飽和脂肪酸調控乳癌細胞轉移扮演之角色

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST-103-2313-B-040-001

執行期間：2014 年 8 月 1 日至 2015 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學營養系

計畫主持人：李健群

共同主持人：

計畫參與人員：蔡佳翰、林辰宇

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，\_\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 104 年 10 月 31 日

# 目錄

中文摘要 .....	I
英文摘要.....	I
報告內容.....	1
前言.....	
研究目的.....	1
文獻探討.....	1
研究方法.....	2
結果與討論.....	4
參考文獻.....	7
科技部補助專題研究計畫成果報告自評表.....	8

## 中文摘要

乳癌為全球女性最常見的惡性腫瘤，癌細胞轉移是導致乳癌患者死亡主要原因，在諸多乳癌分型中，又屬缺乏雌激素(estrogen)、黃體素(progesterone)及人類第二型表皮生長因子(HER2/neu)受體的三陰性乳癌治療最棘手。已知改變細胞膜 lipid raft 中 integrin 及 EGFR 表現與分布與調控乳癌細胞發展有關。然而，DHA 或其它 PUFAs 是否透過影響 integrin 及 ErbB 於 lipid raft 的表現與分布，進而阻斷其下游 Src、PKC、PI3K 等訊號路徑而調控癌細胞轉移、凋亡和自噬作用仍不清楚。OKL38 為一抑癌蛋白。臨床研究證實在各種惡性腫瘤細胞中 OKL38 表現較低或不表現，尤其是乳癌細胞。預備實驗得知在六種 PUFAs 中，僅 DHA 顯著誘發 MCF-7 細胞 OKL38 表現，然而 DHA 如何誘發 OKL38 的表現，及其是否在 DHA 抑制乳癌細胞轉移、促進癌細胞自噬作用、凋亡扮演重要角色，值得深入研究。本研究第一部份結果顯示 DHA 顯著抑制細胞移行、侵襲能力以及向下調節 integrin  $\alpha 6\beta 4$  表現，且呈現濃度依賴關係，而且 DHA 藉由瓦解細胞膜 lipid raft 降低其中 integrin  $\beta 4$  的分佈和 Src 表現及磷酸化，DHA 處理 PI3K 可負向調控 Src 及 Akt (Ser473) 磷酸化及其下游 MMP-9、uPA、S100A4 蛋白質表現；siRNA knockdown integrin  $\beta 4$  亦可抑制 MMP-9、uPA、S100A4 蛋白質表現。綜合上述結果得知，DHA 降低 MMP-9, uPA 及 S100A4 表現進而抑制 Hs578T 乳癌細胞移行、侵襲，部分因素可能與 DHA 負向調控 integrin  $\alpha 6\beta 4$  表現、減少 integrin  $\beta 4$  分佈於 lipid raft 及抑制 integrin  $\alpha 6\beta 4$  下游 Src 及 Akt 訊號路徑的活化。第二部分研究結果發現，DHA 可顯著誘發 OKL38 蛋白質及 mRNA 表現，此誘發效果呈劑量關係。給予 PI3K inhibitor-LY294002 可顯著抑制 DHA 誘發 OKL38 表現及 Nrf2 核內累積及 Nrf2-ARE 結合力，因此 DHA 主要透過活化 PI3K-Akt 訊號路徑促使 Nrf2 進入細胞核內而啟動 OKL38 轉錄作用。此外誘發 OKL38 可能與 DHA 抑制癌細胞發展有關。

關鍵詞: OKL38、表皮生長因子、插入素、微 RNA、多元不飽和脂肪酸、乳癌、轉移、自噬作用

## Abstract

Breast cancer is the commonly diagnosed cancer among women all over the world. Metastasis is leading cause of death from breast cancer. There are many subtypes of breast cancer, especially triple-negative breast cancer (TNBC), is most difficult to be cured. It has been shown that the cooperation between integrin and epidermal growth factor receptor (EGFR) in lipid raft regulates certain signaling functions that are important for breast cancer progression. However, whether docosahexaenoic acid (DHA) and other PUFAs alter integrin- and EGFR-related signaling by disrupting its lipid raft association, results in regulating metastasis, apoptosis and autophagy is not fully understood. OKL38 may be identified as a tumor suppressor protein that inhibits tumor cell growth. Clinical study showed OKL38 level was down-regulated or lost in various malignant tumors and cancer cell lines, especially breast cancer cells. Among n-3 and n-6 PUFAs, only DHA significantly up-regulated OKL38 expression. However, the effect of OKL38 on DHA inhibition of breast cell migration and induction of apoptosis and autophagy is not fully clarified. (一) The results from the project indicates that DHA significantly inhibited cell migration, invasion and dramatically down-regulated integrin  $\alpha 6\beta 4$  expression in a dose-dependent manner. These results suggest that DHA inhibits  $\alpha 6\beta 4$ -mediated MMP-9, uPA and S100A4 expression as well as cell migration and invasion at least in part via down-regulating integrin  $\alpha 6\beta 4$  expression and decreasing the distribution of integrin  $\beta 4$  in lipid raft as well as the activation of integrin  $\alpha 6\beta 4$ -mediated Src and Akt signaling pathways. (二) The results from the project indicates that DHA induces OKL38 expression at least partially through activation of PI3K-Akt signaling pathway and subsequent Nrf2 transactivation in MCF-7 cells. Moreover, induction of OKL38 may be involved in DHAs anti-cancer activity.

Keywords: OKL38、EGF、Integrin、microRNA、PUFA、breast cancer、metastasis、Autophagy

## 前言

乳癌好發於女性，也是美國女性癌症死亡的第二大原因，2008年流行病學研究調查即指出，在所有因癌症死亡的美國女性中，高達15%是死於乳癌(Marian and Roberts, 2009)。乳癌的高致死率主要來自於乳癌細胞的高度轉移能力，使癌細胞易擴散並侵犯鄰近組織、器官所致。一般而言，女性乳癌好發年齡在四十五至六十五歲間，但隨著飲食及生活習慣的改變，近年來，台灣女性乳癌好發年齡已有逐年下降的趨勢。與90年代相較下，口腔癌、女性乳房癌、前列腺癌、胰臟癌與食道癌之癌症死因標準化死亡率皆顯著增加，其中又以女性乳房癌和口腔癌增加幅度較大。因此，在施以手術或化療、放射療等治療方式後，如何進一步有效抑制癌細胞復發及轉移，即成為防患乳癌死亡率增加的重要手段。縱使過去數十年來科學家不斷致力於研究乳癌細胞轉移之分子作用機轉，期望能找出降低癌細胞因發生轉移所導致高死亡率的治療方式。

## 研究目的

由於不少研究指出乳癌之發生與飲食油脂有密切關係，因此，本實驗室致力於探討n-3多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)-linolenic acid (LNA)、Eicosapentaenoic acid (EPA)、Docosahexaenoic acid (DHA)對降低乳癌死亡率相關癌細胞轉移之作用，深入瞭解其可能分子作用機制。

## 文獻探討

近期研究發現，oxidative stress induced growth inhibitor 1 (OSGIN1)又稱OKL38，其蛋白產物在抑制癌細胞生長扮演重要角色(Hu et al., 2012)，也被視為一個新的乳癌治療標的基因。然而，與OKL38蛋白相關之研究不多，其基因調控與功能性更值得深入探討。早期研究所發現的OKL38為由人類骨髓漿細胞(Bone marrowstromal cell; BMSC)分離出的蛋白，具有抑制細胞生長的功能，因此又被稱為BMSC-derived growth inhibitor (BDGI)。根據Multiple Tissue Expression array及Multiple Tissue Northern blot分析結果，OKL38普遍表現於人體各組織中，其中又以肝臟、腎臟及睪丸表現量最高。然而，Cancer profiling array (CPA)分析結果發現，乳癌、腎癌、肝癌組織OKL38 mRNA及蛋白表現量顯著低於鄰近癌細胞之正常乳腺上皮細胞、腎細胞和肝臟實質細胞(Ong et al., 2004)。一旦給予可過度表達OKL38蛋白的基因載體，可抑制腎癌細胞生長並促使其細胞凋亡(Ong et al., 2004)。另外研究顯示，懷孕及哺乳期的母鼠，其乳腺組織亦可大量表現OKL38蛋白，但對於各種不同乳癌細胞株而言，其OKL38基因轉錄體(transcripts)表現量卻顯著偏低。給予過度表達OKL38蛋白的基因載體，則可抑制乳癌細胞生長分化，並促使其細胞凋亡(Huynh et al., 2001)。由上述研究結果得知，OKL38的表現在調控癌細胞死亡及降低乳癌細胞生長過程應扮演重要角色。

Lipid raft為細胞漿膜(plasma membrane)上富含膽固醇及鞘磷脂(sphingolipid)的微構造(microdomain)區域，此一構造區域常被認為是細胞膜蛋白受體(receptor)與細胞內二級訊號分子結合位置，也是蛋白受體接受細胞外一級訊號分子刺激後啟動細胞內各種不同訊號傳遞路徑的分水嶺。因此，不同的刺激訊號可能引發不同的蛋白受體及其它物質如脂質或醣類分子聚集於lipid raft，lipid raft再藉由提供特殊的環境及其組成成分的差異而調控細胞生理、生化反應的進行。DHA抑制A549人類肺癌細胞、結腸癌細胞及MDA-MB-231乳癌細胞增生與生長，與DHA降低其EGFR在癌細胞lipid raft的累積近而負向調控EGFR下游Ras/Sos1/Erk訊號路徑有關(Rogers et al., 2010)。Ewaschuk (2012)等研究發現，DHA的抑癌效應可能與DHA誘發CD95受體移轉至lipid raft進而引發CD95 (APO-1/Fas)依賴型細胞凋亡(apoptosis)相關。然而針對乳癌細胞，MMP的表現則多與integrin  $\beta$ 1或 $\beta$ 4所形成的heterodimer有關，例如EGF可透過磷酸化活化EGFR後啟動 $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin mediated-ERK訊號傳遞路徑，進一步誘發NF- $\kappa$ B和AP-1-dependent MMP-9基因表現，進而增加MDA-MB 231乳癌細胞侵襲能力(Sen and Chatterjee, 2011)。人類乳癌細胞MDA-MB-231可同時表現EGFR和 $\alpha$ 6 $\beta$ 4-integrin，EGF透過磷酸化活化EGFR後進一步將integrin  $\beta$ 4次單位磷酸化(Mainiero et al., 1996)，並啟動 $\alpha$ 6 $\beta$ 4-integrin-mediated訊號傳遞路徑，進而誘發乳癌細胞的移行(Perou et al., 2000)。雖有研究顯示，DHA可降低乳癌細胞EGFR在細胞膜lipid raft的聚集(Rogers et al., 2010)，但鮮少研究聚焦於DHA對lipid raft中integrin表現的影響，此外，其它脂肪酸是否也可透過改變lipid raft組成而影響各種訊號路徑，進一步調控乳癌細胞的生長與轉移，值得深入探討。

## 研究方法

### 乳癌細胞培養

將MCF-7、Hs578T人類乳癌細胞株培養於Dulbecco's modified Eagle's medium 加入10% Fetal bovine serum (FBS)、3.7g/L sodium bicarbonate 和1% penicillin/streptomycin，細胞置於含有37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養，隨後依不同實驗設計進行實驗。本實驗預計以0~100 μM 之DHA處理癌細胞24小時後，再依細胞種類給予或不給予抑制劑0.5~24 小時，觀察DHA對癌細胞轉移及其作用機制影響。

### 脂肪酸製備

實驗所使用之多元不飽和脂肪酸製備方法如下：脂肪酸預先溶於乙醇中，隨後依不同實驗設計將脂肪酸濃度調整成0~100 μM。脂肪酸使用前，加入牛血清白蛋白，混合均勻以調製FA-BSA complex。

### 細胞存活率(Cell viability)分析

將乳癌細胞培養在12 孔盤中，依不同實驗加入不等濃度n-6、n-3 PUFAs預培養24小時。在藥理模式下，依不同抑制劑加入不等濃度抑制劑預培養1小時，隨後吸除培養液，以冰PBS清洗二次，加入含0.5 mg/ml (MTT之培養液於4°C下暗反應3 小時，隨後加入isopropanol，反應10 分鐘，吸取並置入ependrof 微量離心管中，離心5分鐘，取上層液於波長570 nm下讀取吸光值。所得之吸光質與對照組比較，即可求得相對細胞存活率。

### 蛋白質濃度定量(Coomassie-Bradford Protein Assay)

利用Coomassie Plus protein assay reagent kit 測定各細胞質液樣本蛋白質濃度，利用ELISA 讀取儀測定吸光值，對照蛋白質標準濃度曲線即可計算樣本中蛋白質濃度。

### 西方墨點法 (Western blotting)

乳癌細胞處理同前段，當樣本測定蛋白質濃度後，取10~20 μg蛋白質於7.5%或10%SDS-PAGE中進行電泳分離，再轉印到PVDF membrane 上。轉印完成後，取出PVDF 膜並利用Ponceau S solution確定轉印成功後，以buffer A 清洗三次，每次5分鐘，再以buffer B製備含5 %脫脂奶粉溶液於室溫下進行blocking反應60分鐘，反應完成後以buffer A 清洗二次，依據觀察不同標的基因分別加入等polyclonal antibody，於4 °C下反應12小時，反應完成後以buffer A 清洗二次，再與HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG 反應1 小時，以buffer A 清洗二次後，即可使之呈色。

### RNA 萃取

細胞以PBS 清洗後，加入TRIzolTM reagent，靜置5分鐘將RNA萃出，接著將細胞刮下移入ependorf 微量離心管中，加入100 μl chloroform 溫和搖晃15秒，於室溫靜置5分鐘，於4°C下離心10分鐘，取出上層液後加入isopropanol，混合均勻，於4°C離心10分鐘，倒除上層液，加入45 μl 無菌水溶解後進行RNA 定量，經定量後的RNA樣本可接續利用RT-PCR 或quantitative real-time PCR 技術分析mRNA表現。

### 細胞核蛋白質萃取

細胞依照不同實驗處理後，移除細胞培養液並以冰冷的PBS 清洗兩次，加入700 μl PBS 將細胞括下，於4°C下以1,500×g 離心5 分鐘，去除上清液，下層細胞再加入250 μl hypotonic buffer使細胞懸浮，冰浴15 分鐘後於4°C下以6,000×g 離心15 分鐘，沉澱物(pellet)即為細胞核。Nuclear pellet以等張溶液(含10 mM HEPES、10 mM KCl、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1.0 mM EDTA、4 μg/ml leupeptin、20 μg/ml aprotinin)懸浮清洗，再離心15 分鐘，吸除上清液後，加入45 μl hypertonic buffer 於室溫下震盪30 分鐘，隨後以10,000×g 離心15 分鐘，所得的上清液即為細胞核蛋白質萃取液。

### 細胞膜lipid raf 樣本製備與分離



細胞至少七分滿，吸除medium 利用ice PBS wash 三次(第三次完全吸除)，加入1 ml membrane buffer至1.5 cm dish 後將細胞刮下。收集2 dish 樣本(共2 ml)後，利用Douncehomogenizer 研磨20 次後離心5 分鐘，並收集上層懸浮液，將懸浮液滴入Percoll表面並進行超高速離心64,000 g，30 分鐘。收集靠近Percoll 上層的不透明band即為plasma membrane fraction，取出plasma membrane fraction 於tube，再以ultrasonic cell disruptor 破碎細胞膜，即為homogenized plasma membrane fraction樣本。接續進行Sucrose-Density Centrifugation:取1 ml 樣本(避免取到樣本泡沫)加入sucrose/MBS buffer 一同移至超高速離心管最下層，再緩慢加入35% sucrose/MBS/ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer 於超高速離心管最中層，謹慎添加切勿晃動或mix，再緩慢加入5% sucrose/MBS/ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer 於超高速離心管最中層(交界處肉眼可見分層)，接著以超高速離心46,000 rpm，16-20小時(in 4°C)。離心完成後，lipid raft/caveolar 將形成微弱的band 懸浮於35% sucrose~5% sucrose 層中。每一fraction 吸取0.5 ml(由最上層開始吸取)並編號紀錄，共可取10個fraction。

#### 反轉錄聚合酶鏈式反應分析(Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

利用RT-PCR 觀察 $\beta$ 1-integrin、 $\beta$ 4-integrin、 $\alpha$ 6-integrin、OKL38在不同種類乳癌細胞中之表現。以下基因所設計的引子可利用SYBR Green system 進行Quantitative real-time PCR。進行RT-PCR 步驟如下:將500 ng RNA 加入含有2.5 mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP，20 U RNAsin、100 pM random hexamers 和20 U MMLV reverse transcriptase 之反應液(總體積為20  $\mu$ l)，以37°C、60 分鐘和94°C、5 分鐘進行反轉錄，之後以4°C 終止反應。取5  $\mu$ l RT 混合液加入含有10 $\times$ PCR buffer，2.5 mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP，10 pM forward and reverse primers 及1 U Tag DNA polymerase 之反應液(總體積為25  $\mu$ l)，放入PCR 儀器中進行DNA 複製。DNA 電泳進行時，將每一管PCR DNA產物加入5  $\mu$ l 10 $\times$ loading dye 均勻混合，注入含Ethidium bromide 之1.5% agarose之膠片中，以100 伏特進行電泳，最後利用紫外燈照射拍攝電泳圖，並定量mRNA之表現。

#### 細胞移行分析

計數細胞懸浮於含10% FBS DMEM (200  $\mu$ l)中並先製備含不同劑量DHA細胞培養液，取DHA細胞培養液與細胞懸浮一同置入transwell 的inserts 內，而24-multiwell plates加入600  $\mu$ l 不含血清的DMEM 培養12 小時。吸除insert 及24-multiwell 的培養液，insert置換成40 ng/ml EGF 於不含血清的DMEM 中，24-multiwell plates 置換成含5%血清的DMEM中，透過血清的濃度梯度刺激細胞移動並於37°C 培養箱中培養24小時。將insert 拿起並將其內的細胞培養液吸掉，以100% methanol 固定細胞5 分鐘，以stain A及B各染色5 分鐘，用清水將insert 外圍的染劑洗掉。在顯微鏡下觀察薄膜下層細胞及計數細胞。

#### 細胞侵襲分析

利用Standard Transwell Inserts 在transwell 的polycarbonate 膜上面加入無菌過濾的1% matrigel 100  $\mu$ l/well，待乾備用。計數cells 懸浮於serum free 的細胞培養液中，再種到transwell chamber 內，而下面的24 well 細胞培養盤內則加入含有10% FBS 的細胞培養液，若細胞會分泌MMP-2 (gelatinase A) 或MMP-9(gelatinase B)，細胞才可穿過gelatin層，移動至膜的另一端。在37°C 培養箱中培養後，將insert 拿起並將其內的細胞培養液吸掉，用PBS 來回清洗insert，拿棉花棒將內層的細胞完全擦去。以stain A 及B 各染色5 分鐘，用清水將insert 外圍的染劑洗掉。在顯微鏡下以100 倍視野觀察薄膜下層細胞及計數細胞。

#### 傷口癒合分析(Wound Healing Assay)

調整含有10% FBS 之細胞懸浮液中的細胞數106/ ml，取50  $\mu$ l 細胞懸浮液加入24 well 細胞培養盤，置入培養箱中培養24 小時，先將培養液吸除並將原本設置於培養盤中的wound field 移除，利用無菌之PBS 清洗二次，再加入新鮮的培養液，此時即可加入n-3 和n-6 PUFAs，觀察其對癌細胞移行的影響。

#### 短暫轉染(Transient transfection)

依照Qiagen siRNA 操作建議步驟，先將須用品移至室溫回溫，全程無菌且避免核糖核酸酶(RNase

A) 污染之環境下操作，取20  $\mu\text{M}$  si-OKL38、si- $\beta 4$ -integrin 9.6  $\mu\text{l}$  於1.5 ml 離心管，並補EC-R buffer 至總體積100  $\mu\text{l}$ ，同樣取9.6  $\mu\text{l}$  於1.5 ml離心管，並補EC-R buffer 至總體積100  $\mu\text{l}$ 。混合均勻後加入 RNAiFect reagent 28.8  $\mu\text{l}$  並且以piptmen 吸放混合，重複5 次均勻後，室溫靜置10-15 分鐘。趁此空檔將細胞培養液更換培養液。待反應時間到，將每孔siRNA混合液緩慢滴入培養液中，於培養箱中24 小時，換培養液後依不同實驗設計處理細胞。

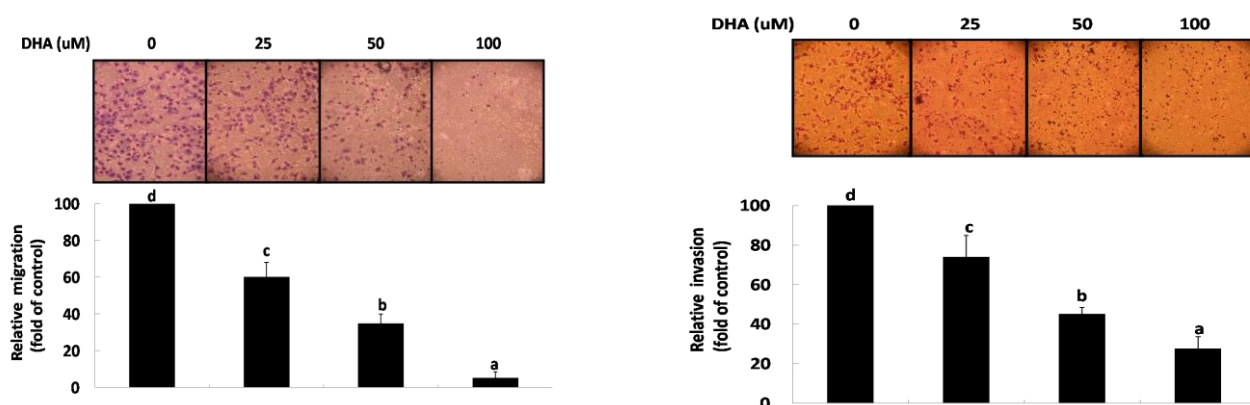
### 統計分析

本實驗所得之數據將先以一元變方分析(one-way analysis of variance)行統計分析，隨後再以Student's t-test 或Turkey's multiple comparison test 進行處理組間差異性檢定，當 $p < 0.05$  則視為具顯著差異。

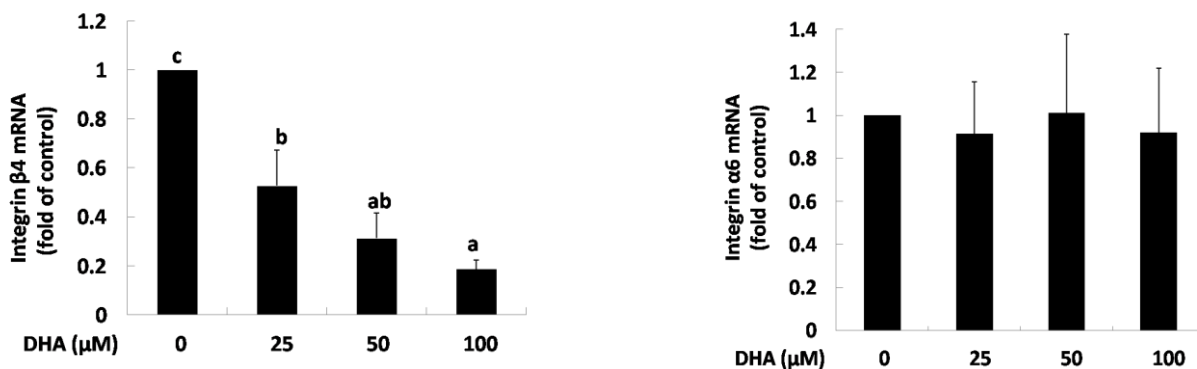
## 結果與討論

### 第一部分

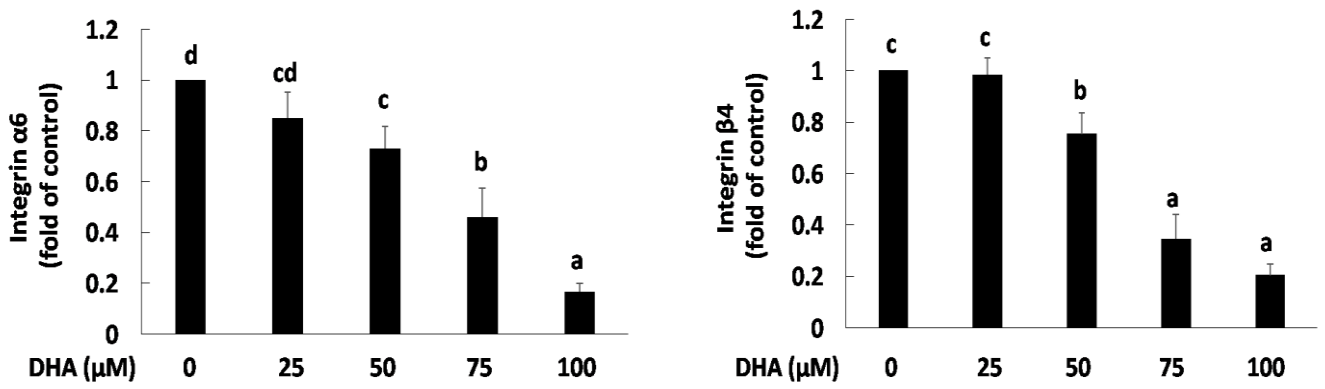
圖一、不同劑量DHA對Hs578T乳癌細胞移行、侵襲之影響



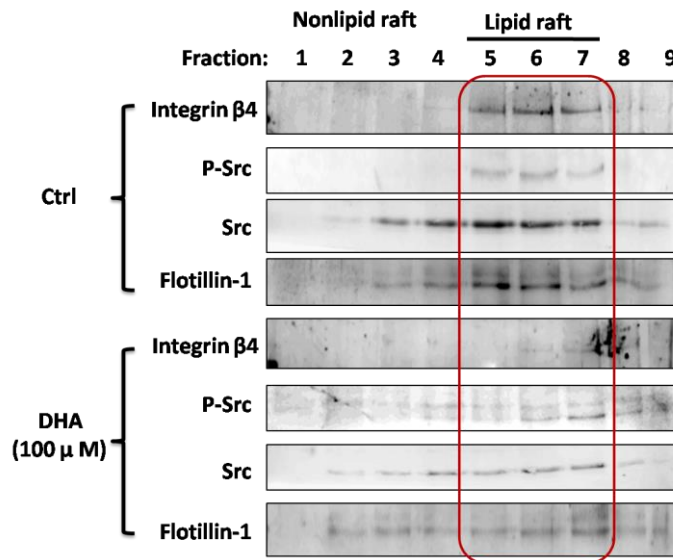
圖二、不同劑量 DHA 對 Hs578T 乳癌細胞 Integrin  $\alpha 6\beta 4$  mRNA 表現之影響



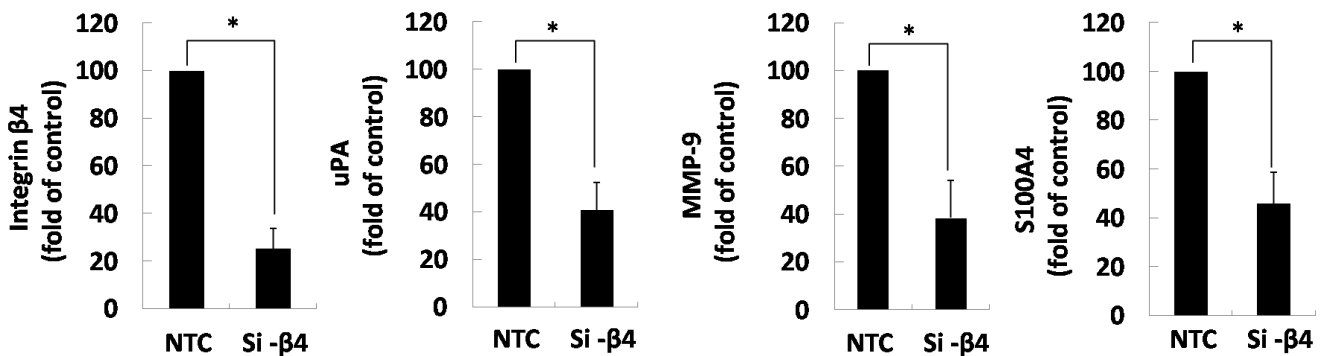
圖三、不同劑量 DHA 對 Hs578T 乳癌細胞 Integrin  $\alpha 6\beta 4$  蛋白質表現之影響



圖四、不同劑量 DHA 對 Hs578T 乳癌細胞之 integrin  $\beta 4$ 、p-Src、Src 分佈於 lipid raft 表現之影響

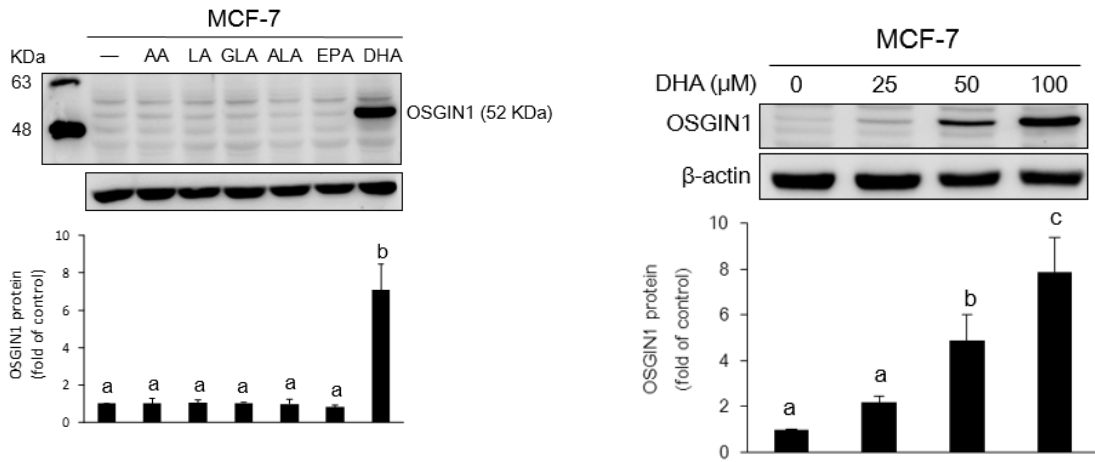


圖九、si-integrin  $\beta 4$  對 Hs578T 乳癌細胞之 S100A4、uPA、MMP9 等轉移相關標的蛋白質表現之影響

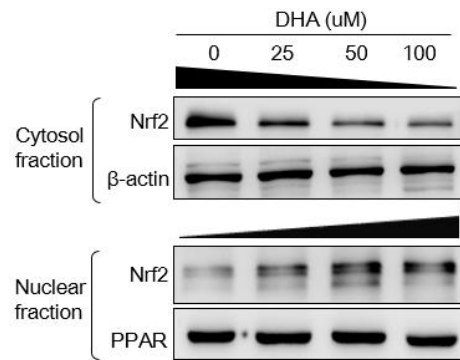


## 第二部分

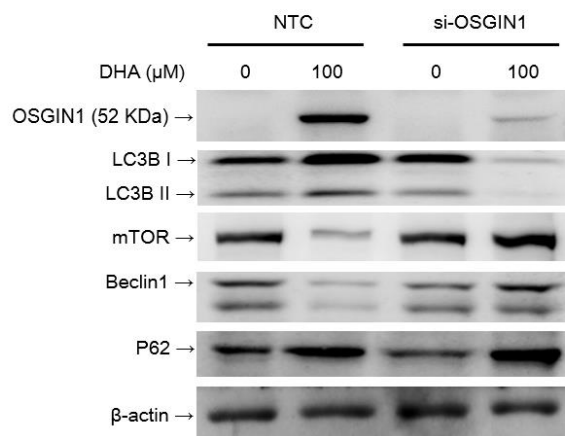
圖一、n-6、n-3 PUFAs 對 OSGIN1 (OKL38) 表現之影響



圖二、DHA 對 Nrf2 細胞質、核 translocation 之影響



圖三、siOSGIN1 (siOKL38) 對 DHA 誘發 autophagy 之影響



## 參考文獻

- Hu J, Yao H, Gan F, Tokarski A, Wang Y. Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function. *PLoS One*. 2012;7:e43362.
- Ong CK, Ng CY, Leong C, Ng CP, Foo KT, Tan PH, Huynh H. Genomic structure of human OKL38 gene and its differential expression in kidney carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2004;279:743-54.
- Huynh H, Ng CY, Ong CK, Lim KB, Chan TW. Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland. *Endocrinology*. 2001;142:3607-15.
- Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, Hernandez K, McKinnon KM, Ahwah SM, Pardini RS. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis*. 2010;31:1523-30.
- Ewaschuk J, Newell M, Field CJ. Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER(-) breast cancer cells. *Lipids*. 2012;47:1019-30.
- Sen T, Chatterjee A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates EGF-induced MMP-9 in breast cancer cells: involvement of integrin receptor  $\alpha 5\beta 1$  in the process. *Eur J Nutr*. 2011;50:465-78.
- Mainiero F, Pepe A, Yeon M, Ren Y, Giancotti FG. The intracellular functions of  $\alpha 6\beta 4$  integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol*. 1996;134:241-53.

## 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

本研究結果發現多元不飽和脂肪酸中的 DHA 可抑制乳癌細胞轉移及生長可能透過二種不同機制：(一) DHA 顯著抑制 Hs578T 乳癌細胞移行以及侵襲能力，可能與其降低 integrin  $\beta$ 4 mRNA 和蛋白質表現，進而減少 integrin  $\beta$ 4 於 lipid raft 聚集，進而負向調控 Src 磷酸化及其下游 Akt (S473) 訊號路徑的活化，降低 uPA、MMP-9、S100A4 之蛋白質表現，最終抑制乳癌細胞轉移。(二) DHA 可顯著誘發 OKL38 (OSGIN1) 基因表現，進而促進乳癌細胞產生自噬作用結果可能與引發 autophagy-dependent apoptosis 有關。此結果證實魚油中富含的 DHA 可應用於臨床癌症治療的輔助方法，對改善癌症的預後有正面的意義。

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/11/02

科技部補助計畫	計畫名稱: OKL38蛋白、脂筏(lipid raft)及特定microRNA表現在n-3和n-6多元不飽和脂肪酸調控乳癌細胞轉移扮演之角色
	計畫主持人: 李健群
	計畫編號: 103-2313-B-040-001- 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李健群		計畫編號：103-2313-B-040-001-						
計畫名稱：OKL38蛋白、脂筏(lipid raft)及特定microRNA表現在n-3和n-6多元不飽和脂肪酸調控乳癌細胞轉移扮演之角色								
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）		
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比				
國內	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇		
		研究報告/技術報告	0	0	0%			
		研討會論文	0	0	0%			
		專書	0	0	0%	章/本		
	專利	申請中件數	0	0	0%	件		
		已獲得件數	0	0	0%			
	技術移轉	件數	0	0	0%	件		
		權利金	0	0	0%	千元		
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次		
		博士生	1	1	100%			
		博士後研究員	0	0	0%			
		專任助理	0	0	0%			
國外	論文著作	期刊論文	0	2	0%	篇	研究成果已彙整成兩篇論文並已撰寫完畢，準備投稿SCI期刊	
		研究報告/技術報告	2	2	100%			
		研討會論文	2	2	100%			
		專書	0	0	0%	章/本		
	專利	申請中件數	0	0	0%	件		
		已獲得件數	0	0	0%			
	技術移轉	件數	0	0	0%	件		
		權利金	0	0	0%	千元		
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	0%	人次		
		博士生	0	0	0%			
		博士後研究員	0	0	0%			
		專任助理	0	0	0%			
其他成果 （無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國		無						



際影響力及其他協助 產業技術發展之具體 效益事項等，請以文 字敘述填列。)			
	<b>成果項目</b>	<b>量化</b>	<b>名稱或內容性質簡述</b>
<b>科 教 處 計 畫 加 填 項 目</b>	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

## 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以100字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

依實驗結果可知魚油中富含的DHA具有抗癌效果，其可能透過誘發OKL38抑癌蛋白的表現而促進癌細胞發生程式性凋亡。而對於三陰性乳癌，DHA可透過破壞癌細胞膜lipid raft結構，進而破壞與誘發癌細胞增生及轉移之訊號路徑，進而抑制癌細胞發展。本研究結果建議DHA對於預防或降低乳癌患者術後再復發有益。