

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 熱休克蛋白在乳癌幹細胞的生物性功能角色探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 98-2314-B-040-023-  
執行期間：98年11月01日至99年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：張文璋

計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

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

中華民國 99年10月28日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

熱休克蛋白在乳癌幹細胞的生物性功能角色探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2341-B-040-023-

執行期間：2009 年 11 月 01 日至 2010 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學生物醫學科學系

計畫主持人：張文璋

共同主持人：

計畫參與人員：王修洹、馮香菩、張毓尹

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 99 年 10 月 28 日

## 一、英文摘要

Breast cancer stem cells (BCSCs) have been identified as a subpopulation of breast cancer cells with markers of CD24-CD44+ or aldehyde dehydrogenase activity high (ALDH+), are associated with radiation resistance and metastasis and are considered as potential therapeutic targets for future breast cancer therapy. Heat shock proteins (Hsps) are a group of proteins which are induced expression after stress to serve as a chaperone for maintenance of corrected protein folding and are also overexpressed in many cancers with the function of apoptosis inhibitor to maintain survival of cancer cells. Here we investigated the biological functions of Hsp27, Hsp70 and Hsp90 in BCSCs. The expressions of Hsp27, Hsp70 and Hsp90 were greater in ALDH+ BCSCs than ALDH- non-BCSCs. p38 MAPK, the upstream kinase of Hsp27, was also increased in BCSCs. Treatment with quercetin, a plant polyphenolic compound which has been used as Hsps inhibitor, decreased the expression of Hsp27 in breast cancer cells and the population of ALDH+ BCSCs. Knockdown of Hsp27 by siRNA also suppressed ALDH+ BCSCs as similar as quercetin treatment. Quercetin also inhibited cell migration of ALDH+ BCSCs, which is the important feature of cancer stem cells. We also found that Hsp90 inhibitors treatment was not efficiently suppressed the population of ALDH+ BCSCs. It may be due to the induction of Hsp27 or Hsp70 under the treatment of Hsp90 inhibitors. Overall, our results demonstrate that at least Hsp27 plays an important role in the maintenance of ALDH+ BCSCs and Hsp27 may serve as an interesting target in breast cancer therapy.

## 二、中文摘要

乳癌幹細胞為乳癌細胞中具有 CD24-CD44+ 表面分子標記或細胞內 aldehyde dehydrogenase 活性高度表現(ALDH+)的特殊細胞，目前認為這群細胞對於乳癌的生成、抗藥性以及轉移有顯著的貢獻，也因此針對乳癌幹細胞的療法將是未來乳癌治療發展的趨勢。熱休克蛋白為細胞內 chaperone 蛋白，其重要性為當細胞遭受環境壓力時能夠維持胞內蛋白結構穩定性，此外，在癌症細胞中常會發現熱休克蛋白的過度表現，熱休克蛋白能夠幫助癌細胞抵抗自體凋亡以維持細胞存活。本研究計畫中，我們探討了 Hsp27 與 Hsp90 在乳癌幹細胞的維持以及細胞移動能力的影響。藉由 Aldefluor assay 分離 ALDH+ 乳癌幹細胞並進行西方墨點法，發現 Hsp27 與 Hsp90 的表現皆較 ALDH- 細胞為高，並且 ALDH+ 乳癌幹細胞也具有較高的磷酸化態 Hsp27 以及活化態的上游磷酸酶 p38 MAPK。利用 Hsp27 的抑制劑，槲黃素(quercetin)，能夠抑制乳癌細胞內的 ALDH+ 乳癌幹細胞群，此抑制情況與使用 RNA 干擾抑制 Hsp27 表現得到的結果類似。此外，Hsp27 特異性 RNA 干擾片段也有減緩乳癌細胞生長的效果，而槲黃素並能抑制 ALDH+ 乳癌幹細胞的細胞移動能力。另一方面，Hsp90 抑制劑並不能有效抑制 ALDH+ 乳癌幹細胞群，這可能與 Hsp90 抑制劑處理乳癌細胞時反而增加 Hsp27 表現有關。總結本研究結果，我們發現至少 Hsp27 對於乳癌幹細胞的維持以及細胞移動能力有重要影響，而 Hsp27 將可能是未來針對乳癌幹細胞療法發展中的一個具有潛力的目標。

### 三、前言

癌症幹細胞 (cancer stem cells) 近年來在癌症研究上是新興的熱門研究對象，原因在於癌症幹細胞具有起始腫瘤生成、高度致癌性、抗藥性以及癌症轉移等重要特性，因此針對癌症幹細胞的標靶療法被認為具有癌症治療的潛力。乳癌幹細胞能夠藉由表面分子標記 CD24-CD44+ 或細胞內 aldehyde dehydrogenase 活性作為特異性標記，透過分析具有這些特殊標記的細胞可以做為評估特定細胞內訊息傳遞分子或特殊藥物是否能夠影響乳癌幹細胞族群。在眾多參與細胞癌化的分子中，熱休克蛋白(heat shock proteins, Hsps)在許多癌症組織中都被發現具有高度表達的現象，其中 Hsp27, Hsp70 以及 Hsp90 在乳癌組織中特別是高度表現，並且這些熱休克蛋白已被證實參與在癌細胞對抗自體凋亡(apoptosis)、抵禦藥物治療以及癌細胞移動侵襲能力中。不過到目前為止，熱休克蛋白在乳癌幹細胞中扮演的角色並沒有相關文獻報告，以及抑制細胞內熱休克蛋白的表現是否能成為降低乳癌幹細胞族群的有效方式也不得而知。

### 四、研究目的

本研究計畫的目的為了解乳癌相關熱休克蛋白 Hsp27 與 Hsp90 是否參與在乳癌幹細胞的維持與致癌性中，研究特定目標有：

1. 利用建立自乳癌病人的異體移植(xenograft)癌細胞，分析 Hsp27 與 Hsp90 在 ALDH+ 乳癌幹細胞與 ALDH- 一般乳癌細胞表現是否有差異。
2. 利用槲黃素處理或 RNA 干擾技術抑制細胞內 Hsp27 的表現，觀察 ALDH+ 乳癌幹細胞族群的比例、細胞移動能力的變化與 Hsp27 表現的相關性。
3. 利用抑制劑抑制細胞內 Hsp90 活性，觀察 ALDH+ 乳癌幹細胞族群的比例變化與細胞內 Hsp27 或 Hsp70 表現的相關性。

### 五、研究方法

1. 以 Aldefluor assay 與流式細胞分選儀分離 ALDH+ 乳癌幹細胞與 ALDH- 一般乳癌細胞後，以西方墨點法偵測細胞內 Hsp27 與 Hsp90 的表現。同時利用 antibody array 方式比較兩群細胞的 p38 MAPK 磷酸化情況。
2. 利用槲黃素處理乳癌細胞後，以 Aldefluor assay 分析不同濃度槲黃素處理下，ALDH+ 乳癌幹細胞族群比例變化，同時觀察 Hsp27 在不同槲黃素濃度處理下的變化。利用改良式傷口癒合(wound healing)能力測試，觀察不同槲黃素濃度處理下，ALDH+ 乳癌幹細胞的細胞移動能力的變化。
3. 以 Hsp27 特異性 siRNA 轉染乳癌細胞後，利用 Aldefluor assay 分析 ALDH+ 乳癌幹細胞族群

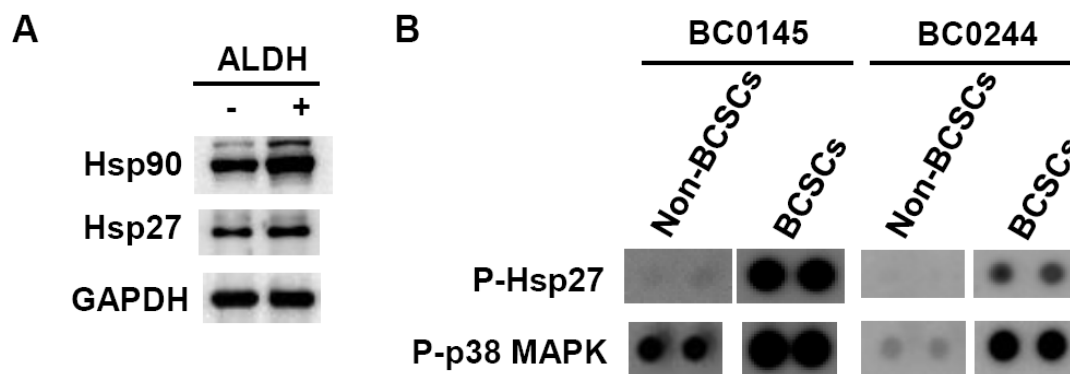
比例變化，並以西方墨點法確認 siRNA 效用，同時觀察轉染後乳癌細胞的生長曲線是否受到改變。

4. 以 Hsp90 抑制劑 Geldanamycin(GA)或 17-AAG 處理乳癌細胞，以 Aldefluor assay 分析 ALDH+ 乳癌幹細胞族群變化，同時以西方墨點法偵測經 GA 或 17-AAG 處理下，細胞內 Hsp27 或 Hsp70 蛋白的表現變化。

## 六、研究成果

### 1. ALDH+ 乳癌幹細胞內 Hsp27 與 Hsp90 的表現皆高於 ALDH- 一般乳癌細胞

我們首先以 Aldefluor assay 與流式細胞分選儀將 ALDH+ 與 ALDH- 兩群細胞自 AS-B244 乳癌細胞株中分離，以西方墨點法偵測細胞內 Hsp27 與 Hsp90 的表現。由 Fig.1A 可以發現兩種熱休克蛋白在乳癌幹細胞中的表現量都要比一般乳癌細胞來得多。過去文獻報告指出，Hsp27 的磷酸化與其調控細胞存活或細胞移動能力有關，並且 Hsp27 的磷酸化主要受到 p38 MAPK 的調控，因此我們利用 antibody array 方式偵測 BC0145 與 BC0244 異體移植乳癌組織中 ALDH+ 與 ALDH- 兩群細胞內 Hsp27 與 p38 MAPK 的磷酸化情形，由 Fig.1B 可以發現無論是 p-Hsp27 或 p-p38 MAPK 皆在 ALDH+ 乳癌幹細胞中有明顯增加的情況。

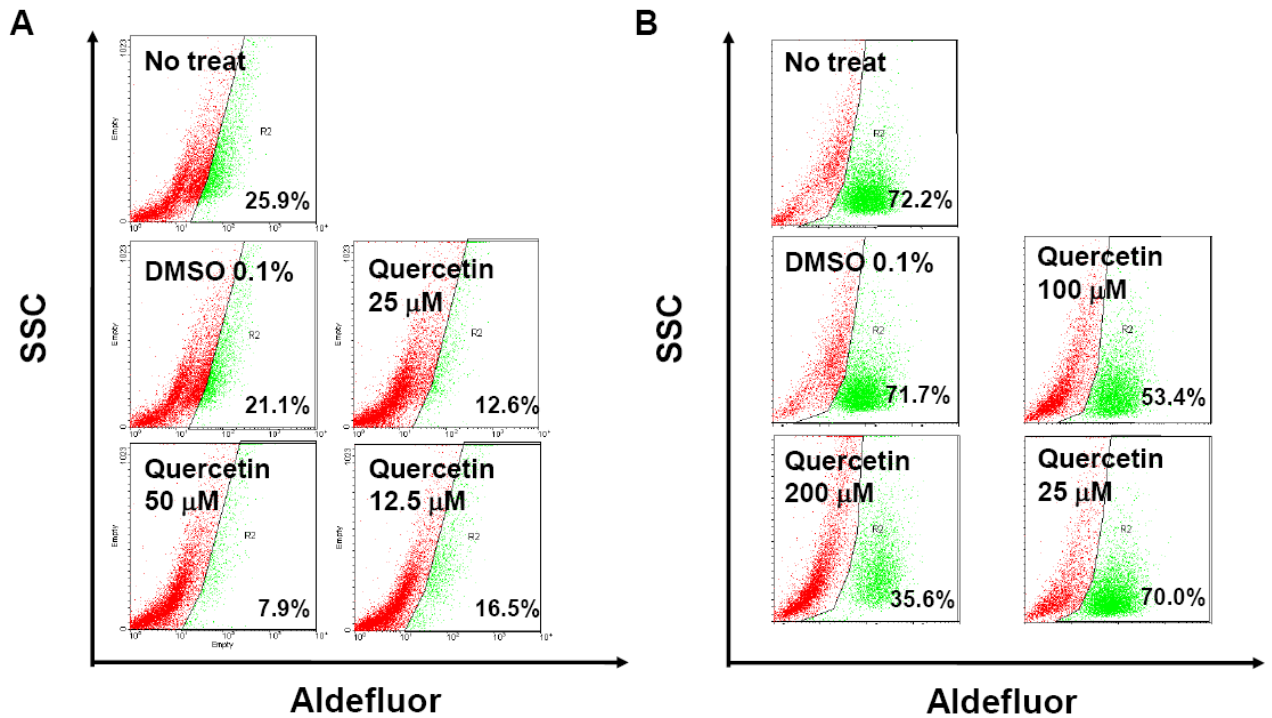


**Fig. 1. Heat shock proteins expression in breast cancer stem cells.** A. ALDH+ (BCSCs) or ALDH- (non-BCSCs) cells were isolated from AS-B244 cells and immunoblot with anti-Hsp90, anti-Hsp27 or GAPDH antibody. B. ALDH+ (BCSCs) or ALDH- (non-BCSCs) cells were isolated from BC0145 or BC0244 xenograft tumors and detected the expression of phosphorylated Hsp27 or p38 MAPK by antibody array.

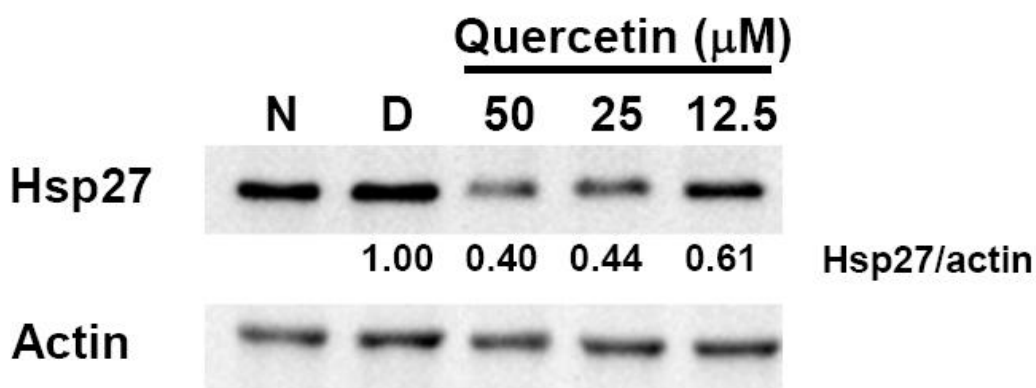
### 2. 抑制細胞內 Hsp27 表現造成乳癌幹細胞族群下降以及降低乳癌幹細胞的細胞移動能力

槲黃素為植物多酚類化合物，過去文獻報導槲黃素可以降低細胞內 Hsp27 的表現，因此我們將 AS-B145 以及 AS-B244 細胞處理不同濃度的槲黃素 48 小時後，以 Aldefluor assay 分析兩種乳癌細胞中 ALDH+ 細胞族群的變化。由 Fig.2 結果得知，槲黃素能夠以濃度依靠的方式抑制 ALDH+ 細胞族群比例 (Fig. 2A, AS-B145; Fig. 2B, AS-B244)；同時以西方墨點法分析不同濃度槲黃素處理下，兩種細胞內 Hsp27 蛋白表現量也呈現濃度依靠性的抑制 (Fig.3)。由此結果我們猜想，槲黃素應該是透過抑制細胞內 Hsp27 蛋白的表現來抑制乳癌幹細胞族群，於是我們接下來利用 RNA 干擾方式直接抑制細胞內 Hsp27 蛋白表現，並以 Aldefluor assay 分析經 RNA 轉染

後，AS-B145 細胞中 ALDH<sup>+</sup> 乳癌幹細胞族群的比例變化。由 Fig.4A 結果發現，當以 RNA 干擾方式抑制 Hsp27 表現後，ALDH<sup>+</sup> AS-B145 細胞比例也跟下降，其下降情況與槲黃素處理相當。我們同時也檢測 AS-B145 細胞在 Hsp27 siRNA 轉染下，細胞生長曲線的變化，由 Fig. 4B 發現當細胞內 Hsp27 表現備抑制時，細胞生長有趨緩的情況。此外，細胞移動能力是癌症幹細胞很重要的一項特徵，我們進一步測試槲黃素是否能抑制 ALDH<sup>+</sup> AS-B244 乳癌幹細胞的細胞移動能力。藉由傷口癒合行為測試，槲黃素的確能以濃度依靠的方式抑制乳癌幹細胞的細胞移動能力(Fig.4C)。



**Fig. 2. Quercetin inhibited ALDH<sup>+</sup> population of breast cancer cells.** AS-B145 (A) or AS-B244 (B) cells were treated with indicated concentration of quercetin or DMSO for 48h and ALDH<sup>+</sup> cells were determined by Aldefluor assay and quantified by WinMDI software.



**Fig. 3. Quercetin suppressed Hsp27 expression in breast cancer cells.** AS-B145 cells were treated with indicated concentration of quercetin or DMSO for 48h and Hsp27 protein level was determined with western blot.

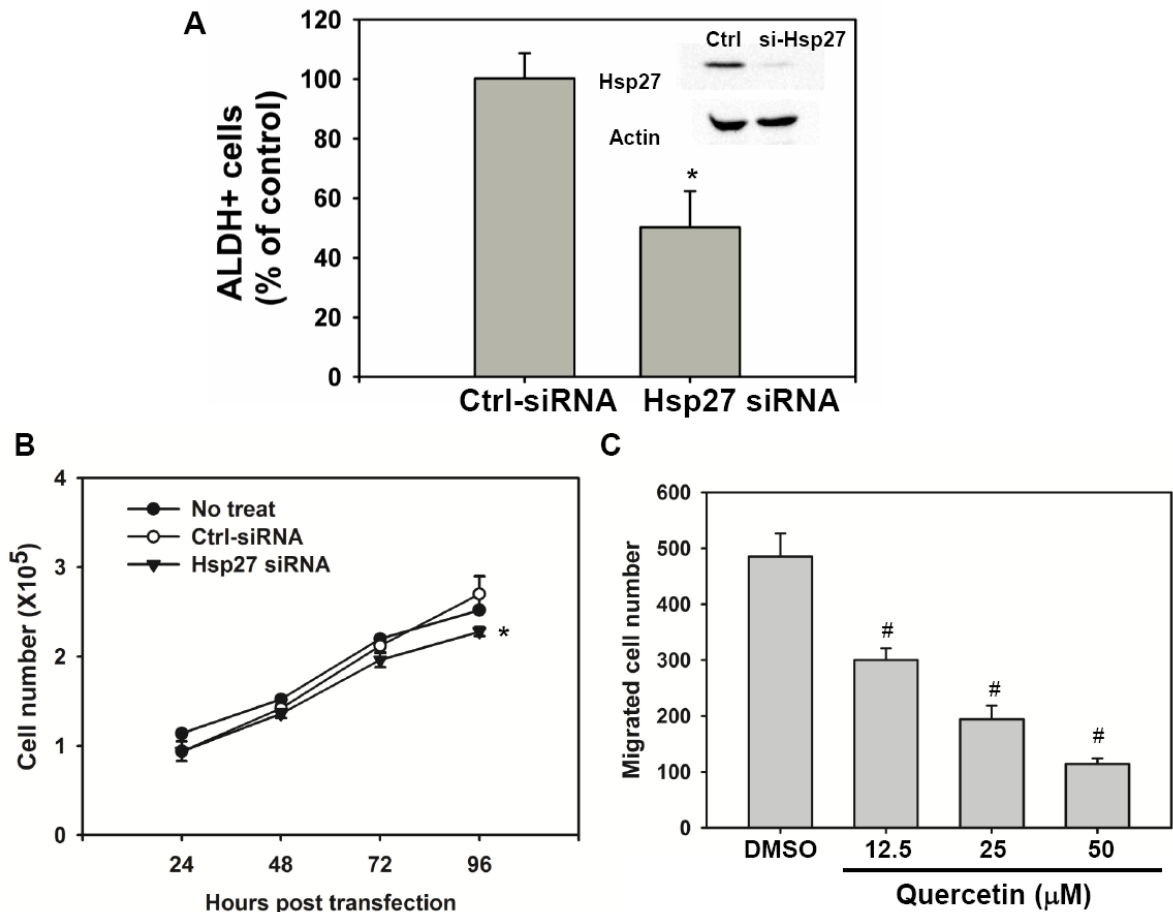
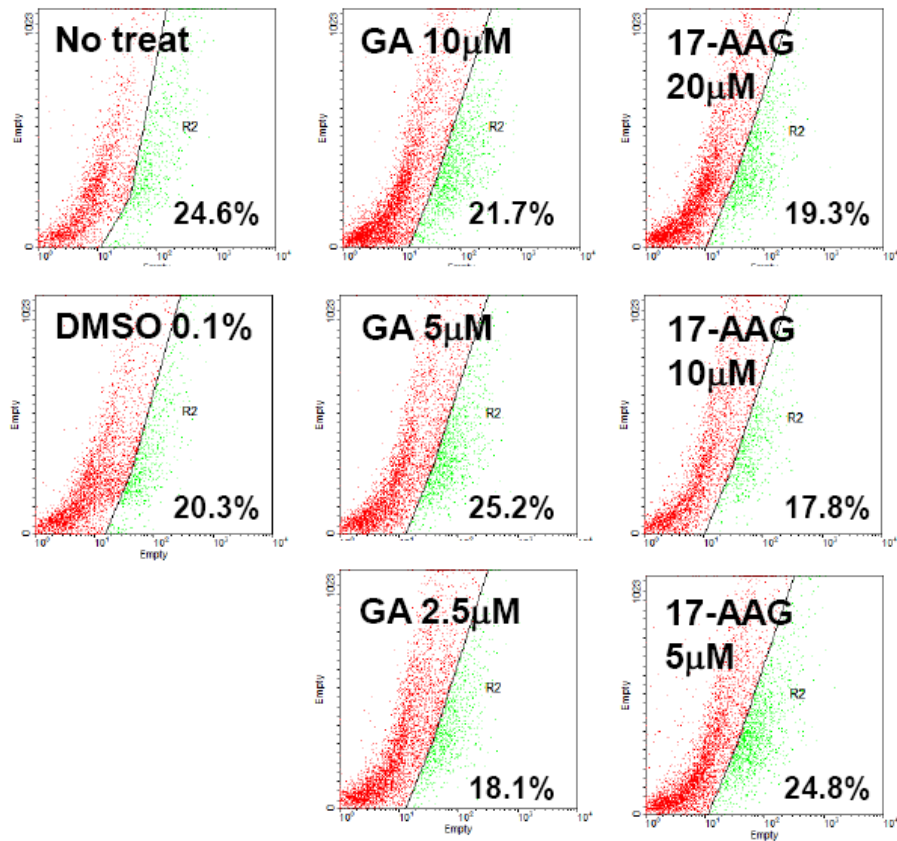


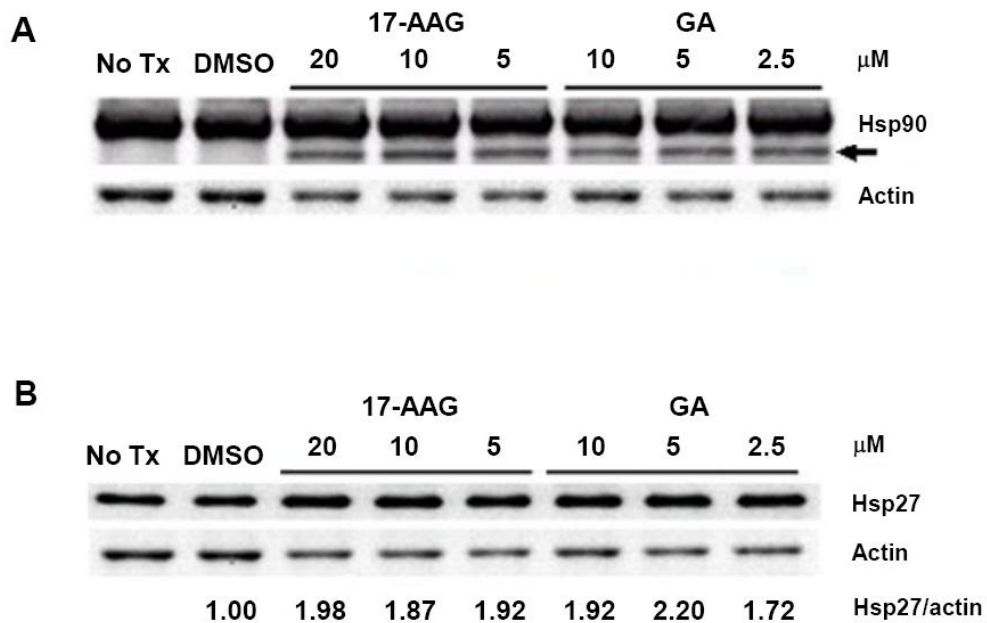
Fig. 4. Knockdown of Hsp27 decreased ALDH+ population and cell growth and quercetin inhibited cell migration of breast cancer cells. (A, B) AS-B145 cells were transfection with Hsp27 siRNA or control siRNA (ctrl-siRNA). ALDH+ population of cells was determined by Aldefluor assay at 48h post transfection. Knockdown of Hsp27 was confirmed by western blot(A). Cell growth curve was determined by trypan-blue stain (B). (C) ALDH+ cells were isolated from AS-B244 cells and cell migration was determined by wound-healing assay.

### 3. Hsp90 抑制劑對 ALDH+乳癌幹細胞群的影響

由結果一已知 Hsp90 在 ALDH+乳癌幹細胞表現有上升的情形，因此我們利用 GA 與 17-AAG 兩種 Hsp90 抑制劑處理 AS-B145 細胞，觀察對於 ALDH+乳癌幹細胞族群的比例變化。由 Fig. 5 發現，無論是 GA 或 17-AAG，在選用的濃度下對於 ALDH+乳癌幹細胞族群影響不如槲黃素，並且沒有呈現濃度依靠現象。過去已有文獻指出，Hsp90 抑制劑處理情況下，熱休克蛋白主要轉錄因子 heat shock factor 1(HSF1)反而會進入細胞核，並造成其他熱休克蛋白的表現增加，因此我們猜想 GA 或 17-AAG 效用不佳的原因或許與此現象有關。藉由西方墨點法檢測 GA 或 17-AAG 處理下，AS-B145 細胞內 Hsp27 蛋白表現，發現 Hsp27 在 GA 或 17-AAG 處理下確實有明顯增加的情況(Fig. 6)，而 Hsp90 本身蛋白量並無明顯變化，但出現了斷裂型式(Fig. 5B)，與文獻記載相符。



**Fig. 5. Hsp90 inhibitors did not efficiently suppress ALDH+ population of breast cancer cells.** AS-B145 cells were treated with indicated concentration of GA, 17-AAG or DMSO for 48h and ALDH+ population was determined by Aldefluor assay.



**Fig. 6. Hsp90 inhibitors increased Hsp27 expression in breast cancer cells.** AS-B145 cells were treated with indicated concentration of GA, 17-AAG or DMSO for 48h and Hsp90 or Hsp27 expression was determined by western blot.



## 七、研究成果自評

原計畫為三年期計畫，最終只獲 8 個月補助，雖然如此我們仍有顯著成果，證實 Hsp27 對於乳癌幹細胞維持以及細胞移動能力有重要影響，但時間限制，對於深入的分子機制以及活體腫瘤形成能力未能詳加探討，未來將另外申請研究經費繼續研究。

無衍生研發成果推廣資料

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：張文瑋		計畫編號：98-2314-B-040-023-					
計畫名稱：熱休克蛋白在乳癌幹細胞的生物性功能角色探討							
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	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>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。)</p>	<p>無</p>
--	----------

科 教 處 計 畫 加 填 項 目	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
	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	



# 國科會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：

原計畫擬申請三年期，但最終只獲 8 個月補助，在建立 Hsp27 表現細胞株、抑制其他熱休克蛋白表現、動物實驗以及相關分子機轉尚無法執行，未來將另題研究計畫進行。

## 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）

過去對於熱休克蛋白與癌症的研究，雖有臨床證據顯示癌症細胞常有過度表達熱休克蛋白的情形，但是對於這些熱休克蛋白在癌症幹細胞的功能尚缺少實驗的直接相關證據，經由此計畫證實熱休克蛋白 Hsp27、Hsp70 及 Hsp90 在乳癌幹細胞中都有過度表現，並且抑制 Hsp27 能有效減少 ALDH+ 染癌幹細胞族群，並且減緩乳癌細胞增生，顯示針對 Hsp27 的抑制將可能成為乳癌治療的新穎標靶。此外，雖然目前 Hsp90 抑制劑再癌症治療尚已進入臨床試驗，但本計畫初步成果顯示 Hsp90 抑制劑的處理會增加癌細胞內其他熱休克蛋白的表現，因此癌細胞可能透過此方式對於 Hsp90 抑制劑達到抗藥性，未來針對以 Hsp90 抑制劑為癌症藥物的治療方式將必須考慮搭配其他熱休克蛋白抑制劑合併使用，以降低癌細胞的抗藥性產生。