

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	研究PCBP1訊息路徑是否扮演Porphyromonas gingivalis促進胰臟癌Epithelial-mesenchymal- transition之主要角色
------------	---

執行計畫學生：賴俊霖

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-101-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：詹明修

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：中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 108年04月01日

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

*計畫 PCBP1 訊息路徑是否扮演 *Porphyromonas* *
* : *gingivalis* 促 Epithelial-mesenchymal-transition 之主 *
*名稱 要角色促進胰臟癌 *

執行計畫學生：賴俊霖

學生計畫編號：107-2813-C-040-101-B

研究期間：107年7月1日至108年2月底止，計8個月

指導教授：詹明修

處理方式(請勾選)：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

執行單位：中山醫學大學 微生物免疫學科

中華民國 108 年 3 月 31 日

(一)摘要

胰臟癌是一種難以察覺性及高死亡率的癌症，且新病例數逐年增加中。根據 American Cancer Society 2018 年統計報告，有 52% 病患為轉移階段的胰臟癌，五年存活率僅 3%。而近年來的研究指出，牙周病及其致病菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 可能與胰臟癌相關。在指導教授先前的研究中，發現 *P. gingivalis* 會促進胰臟中表現 *Kras*^{G12D} 致癌蛋白的基因轉殖小鼠 (*LSL-Kras*^{G12D}; *Pdx-1-Cre*) 之胰臟癌惡化，且從免疫組織化學法 (immunohistochemistry; IHC) 分析，發現發炎蛋白表現及 TGF- β /Smads 訊息路徑被活化。此外，在人類胰臟癌 BxPC-3 細胞株體外培養的實驗中也發現 *P. gingivalis* 菌液增加發炎相關蛋白的表現，以及 TGF- β /Smads 訊息路徑的活化。將 *P. gingivalis* 菌的代謝產物之一醋酸與 BxPC-3 細胞共同培養，也可見發炎相關蛋白隨醋酸濃度增加而增加。最新的研究指出在癌細胞中，某些受體(如 EGFR)活化 Akt、MAPKs 和 CDK 會活化 PCBP1 (RNA-binding protein poly(RC) binding protein 1) 使之與活化之 Smad3 結合，並促進 EMT (Epithelial-mesenchymal-transition) 現象。在我們給予 *P. gingivalis* 菌液處理後，磷酸化 PCBP1 和 SMAD3 皆有增加，且 N-cadherin 和 SNAIL 蛋白也有增加。然而，在另外加入 AKT and MEK inhibitor 後，卻只有磷酸化 PCBP1 表現下降，EMT 蛋白還是上升，這代表 *P. gingivalis* 菌代謝物誘導 EMT 之路徑並非主要走 PCBP1-SMAD3-EMT 訊息路徑。*P. gingivalis* 菌代謝物誘導 EMT 之主要路徑還有待研究。

(二)研究動機與研究問題

在指導教授先前的研究中，發現牙周病菌(*P. gingivalis*) 會促進胰臟中表現 *Kras*^{G12D} 致癌蛋白的基因轉殖小鼠 (*LSL-Kras*^{G12D}; *Pdx-1-Cre*)之胰臟癌惡化。

在給予 *P. gingivalis* 塗抹 *LSL-Kras*^{G12D}; *Pdx-1-Cre* 基因轉殖小鼠處理後四週之胰臟組織經免疫組織化學法 (immunohistochemistry; IHC) 染色，相對於對照組品系小鼠，胰臟細胞上皮間質轉移 (Epithelial-mesenchymal-transition, EMT) 相關蛋白質表現都有明顯增加 (Figure 1)，此外，也發現 TGF- β 訊息路徑下游活化態 Smad-2 和 Smad-3 表現量也明顯增加 (Figure 2)。

從人類胰臟癌細胞 BxPC-3 的體外培養實驗中也證實，給予不同濃度之 *P. gingivalis* 菌液培養，觀察到磷酸化活化的 Smad-2 和 Smad-3 蛋白質表現量隨著給予菌液濃度增加而增加，另外，加入菌液上清液或是細菌體培養之細胞，均會表現 Cox-2 蛋白質，且自酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 的分析發現，*P. gingivalis* 及細菌上清液均會促進 BxPC-3 細胞製造 IL-1 β 。

不管是在動物實驗還是細胞實驗，都有促進 TGF- β /Smads 訊息路徑，因此，細菌之產物很可能：

- (1) 促發細胞產生 TGF- β
- (2) 為 TGF- β 類似物
- (3) 促進其他的傳遞路徑加強 TGF- β /Smads 訊息路徑之傳遞
- (4) 促進某種傳遞路徑造成 EMT

文獻指出在癌細胞中，Smad3 的 T179 位置會被 MAPKs 和 CDKs 重度的磷酸化，而 EGFR、Ras activation 和 PTEN mutation 會磷酸化 PCBP1 (RNA-binding protein poly(RC) binding protein 1)，這兩種磷酸化活化的蛋白會進入細胞核結合在 CD44 pre-mRNA 上影響 alternative splicing，導致 EMT 增加。[Veenu Tripathi et al., *Mol Cell* 2016 Nov.]

而在初步研究中，我們發現放入其中一種細菌代謝物--醋酸至細胞培養液中，發現發炎蛋白表現量隨加入醋酸濃度增加有增加的趨勢。(Figure 7)

因此我有興趣想了解 *P. gingivalis* 菌的產物是否也透過活化 PCBP1 來增加 EMT 的發生？

我的研究目標為：

1. 探討 *P. gingivalis* 菌液是否刺激胰臟癌細胞中 Oncogene protein-PCBP1-EMT 之途徑

(1) *P. gingivalis* 菌液是否刺激胰臟癌細胞中 PCBP1 磷酸化及也會造成細胞 EMT 的表現。

(2) 以抑制劑對 AKT、CDK 及 MAPK 的阻斷是否影響 *P. gingivalis* 菌液對於 PCBP1 的活化。

2. 探究 *P. gingivalis* 菌的產物對這條訊息路徑的影響機制

(1) 加入 *P. gingivalis* 代謝產物之短鏈脂肪酸 (如醋酸)，探究 PCBP1 是否活化？

(2) 加入 *P. gingivalis* 之細胞壁脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)，探究 PCBP1 是否活化？

(3) 加入 *P. gingivalis* 分泌蛋白 Gingipain 之抑制劑，探究磷酸化 PCBP1 表現量是否有影響？

(三)文獻回顧與探討

根據 American Cancer Society 2018 年統計報告，胰臟癌五年存活率僅 8%，其中，只有 10% 病患診斷為原位癌，五年存活率只有 32%；而有 52% 病患就診時，已經為轉移階段的胰臟癌，五年存活率僅 3%。胰臟癌的難以察覺性及高死亡率，確實是個困擾的疾病，即便有多種治療策略正在開發，但新病例數還是持續上升之中。

近幾年來被譽為第十二個人體器官之腸道菌相受到廣泛研究，越來越多的證據顯示腸道菌相與健康及許多慢性疾病息息相關，其中當然也包括癌症 [Schroeder and Bäckhed, *Nat Med*. 2016]

研究指出，牙周病及其致病菌 (*P. gingivalis*) 被認為可能與胰臟癌相關 [Chang et al, *Pancreas* 2016; Fan et al., *Gut* 2018]。牙周病為普遍的口腔疾病，大多數人都曾發生過牙周相關疾病，而此菌也廣泛存在於每個人的口腔之中。

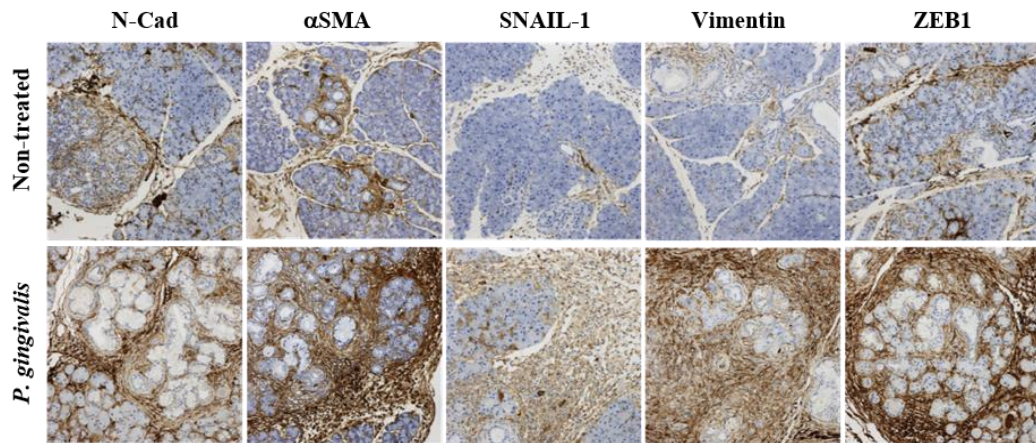


Figure 1. *P. gingivalis*-inoculation accelerates, but probiotics-treatment reduces, epithelial-mesenchymal-transition in pancreas of *LSL-Kras^{G12D};Pdx-1-Cre* transgenic mice. Immunohistochemical analysis for E-cadherin (E-Cad), N-cadherin (N-Cad), smooth muscle actin (SMA), Snail-1, Vimentin, and ZEB1 expressions was practiced on pancreatic specimens from non-treated, *P. gingivalis*-treated *LSL-Kras^{G12D};Pdx-1-Cre* transgenic mice.

我們先前的研究顯示將 *P. gingivalis* 口腔塗抹於 *LSL-Kras^{G12D}; Pdx-1-Cre* 基因轉殖小鼠，四週後胰臟顯著增大、PanIns 病變級數增加、細胞增生 (PCNA 表現) 增加，但是對於其他對照組品系小鼠則沒有。由 Figure 1. 結果顯示，*P. gingivalis* 口腔塗抹更顯著增加胰臟細胞 EMT 相關蛋白質包括 N-Cad、 α SMA、SNAIL-1、Vimentin、ZEB1 等的表現。

胰臟癌的進展過程中，Kras 基因突變多半最先發生，之後再累積更多的基因，包括 p53 等數個抑癌基因及 *smad4*、*tgf β 1*、*tgf β 2* 基因等突變 [Kamisawa et al., *Lancet* 2016]。Smad4 為 TGF- β 訊息路徑中的 co-Smad，與活化 (磷酸化) 之 R-Smads 如 Smad2、Smad3 結合，轉錄多種系統的基因群，包括細胞增生、轉移、分化或凋亡，同時可促進細胞間質 remodeling，並影響免疫與發炎反應 [Syed, *J Cell Biochem.* 2016]。

Figure 2 顯示 *LSL-Kras^{G12D}; Pdx-1-Cre* 基因轉殖小鼠口腔塗抹 *P. gingivalis* 後四週，胰臟細胞內 TGF- β 訊息路徑之活化的程度。經 *P. gingivalis* 處理後，TGF- β 表現陽性區域增加，且多位於癌變區域。Smad2 及 Smad3 的蛋白質的表現與活化入細胞核的程度均增加，Smad4 的蛋白質的表現也較無塗抹 *P. gingivalis* 的 *LSL-Kras^{G12D}; Pdx-1-Cre* 基因轉殖小鼠胰臟細胞內的 Smad4 增加，而 Smad7 則顯著減少。

已知纖維化是胰臟癌抗化療的重要因素，而組織纖維化也與 TGF- β 訊息路徑活化息息相關，故學長也測試了胰臟組織中纖維化的程度。經使用 Trichrome 染色胰臟組織中膠原蛋白的表現，如 Figure 3. 所示給予 *P. gingivalis* 會增加 *LSL-Kras^{G12D}; Pdx-1-Cre* 基因轉殖小鼠胰臟中膠原蛋白的表現 (藍色區域)。

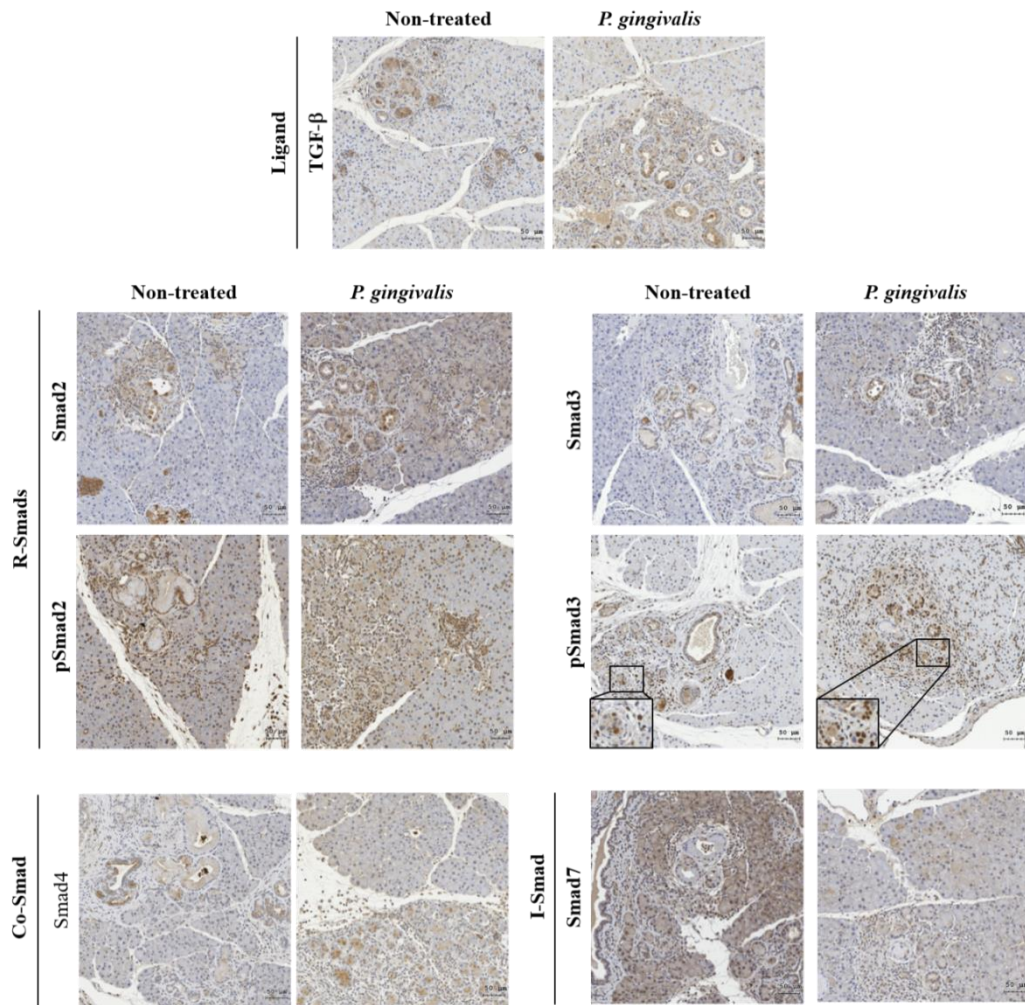


Figure 2. The expression levels of TGF- β signal pathway-related proteins in pancreatic tissues of *LSL-Kras^{G12D}; Pdx-1-Cre* mice either with or without *P. gingivalis*-treatment.

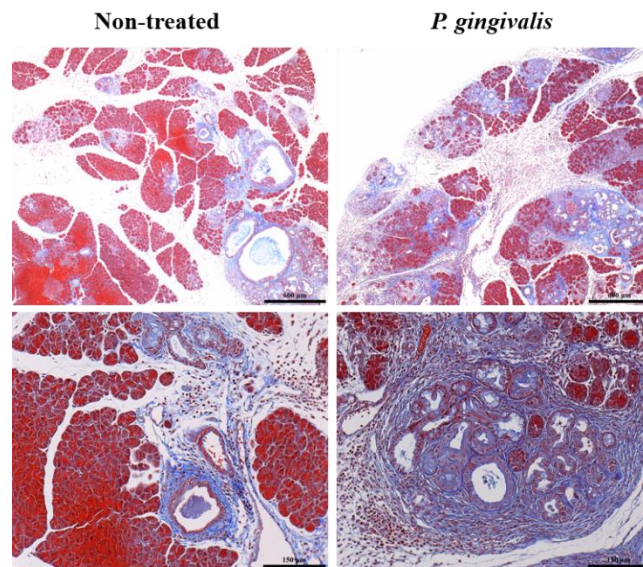


Figure 3. *P. gingivalis*-inoculation accelerates but probiotics suppress fibrosis in pancreas of *LSL-Kras^{G12D};Pdx-1-Cre* transgenic mice. Trichrome staining of the pancreas from non-treated, *P. gingivalis*-treated *LSL-Kras^{G12D}; Pdx-1-Cre* transgenic mice. Large-scale collagen deposition in the pancreas were demonstrated in the mice receiving *P. gingivalis*-treatment.

為測試活體外培養情況之下，*P. gingivalis* 對胰臟癌細胞株的 TGF- β 訊息路徑之活化的程度是否同樣發揮作用，實驗將不同濃度之無菌之 *P. gingivalis* 培養液及新鮮培養液給予人類胰臟癌 BxPC-3 細胞株培養 24 小時，分析上述各訊息路徑相關蛋白質的表現。由 Figure 4. 的結果我們可以發現活化態 Smad2 及 Smad4 隨 *P. gingivalis* 培養液濃度增加而增加，活化態 Smad3 之表現尤為明顯。另一方面，加入最高濃度之 *P. gingivalis* 培養液的組別，BxPC-3 細胞內的 Smad7 幾乎沒有表現。

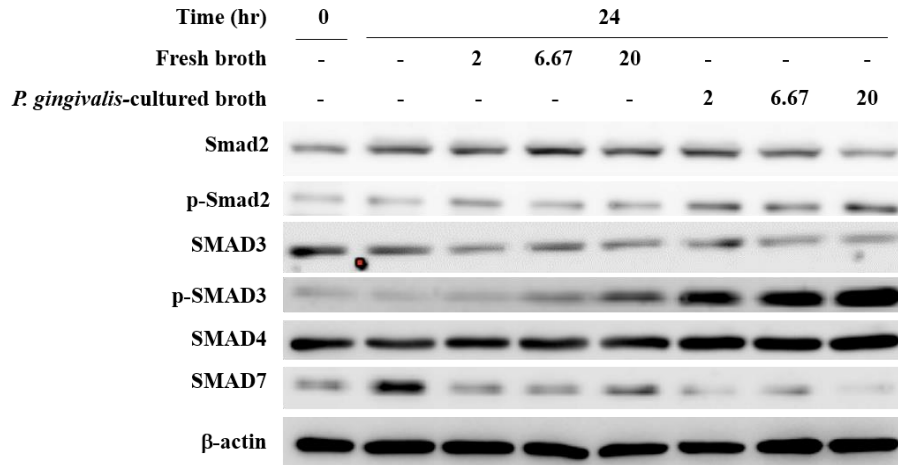


Figure 4. *P. gingivalis* culture broth promoted TGF- β signal pathway activation *in vitro*. The expression levels of TGF- β signal pathway-related proteins in human pancreatic cancer BxPC-3 cells either treated with fresh broth or *P. gingivalis*-cultured broth for 24 hours, and the protein levels were determined by protein gel electrophoresis and Western blots.

P. gingivalis 本即為牙周病致病菌，會引起牙周發炎。實驗室學長姊也測試對 BxPC-3 細胞株是否也同樣引起發炎相關蛋白質的表現。Figure 5. 顯示 BxPC-3 細胞受菌液上清液或是細菌體的作用，均會表現 Cox-2 蛋白質 (Fig. 5A)，另外，自 ELISA 的分析，*P. gingivalis* 及細菌上清液均會促進 BxPC-3 細胞製造 IL-1 β (Fig. 5B)。

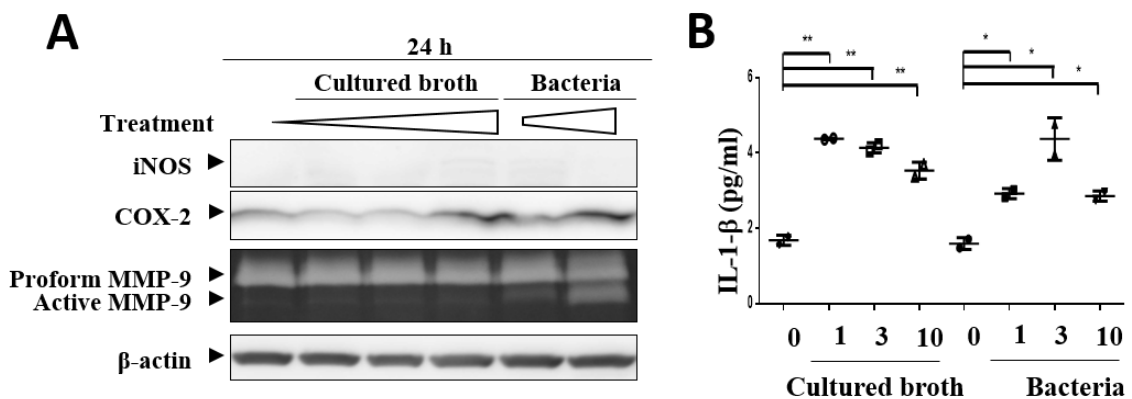


Figure 5. Dose dependently induction of inflammatory machineries in *P. gingivalis*- and cultured broth-treated pancreatic cancer cells. BxPC-3 pancreatic cancer cells were treated with either *P. gingivalis* or cultured broth for 24 hours. **A.** The levels of iNOS and Cox-2 proteins were determined by Western blots and the MMP-9 levels were determined by zymography analysis. **B.** The levels of IL-1- β in culture supernatant were determined by ELISA analysis.

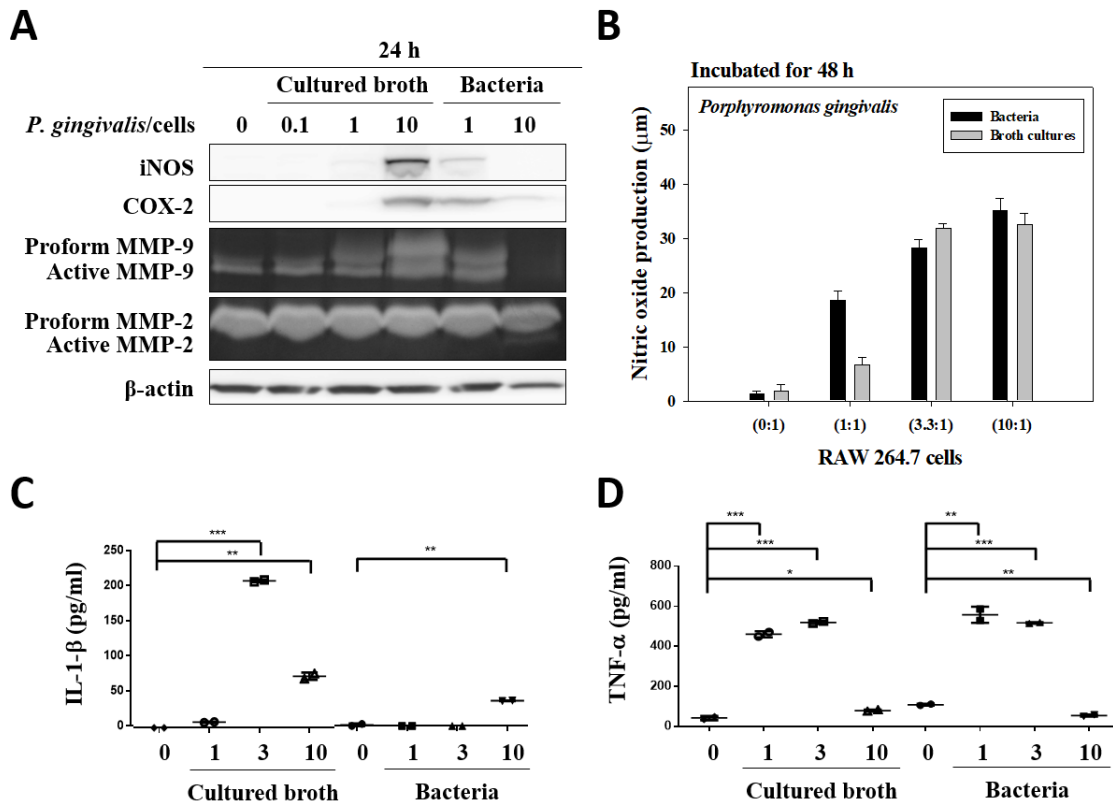


Figure 6. *P. gingivalis* stimulated inflammatory responses in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were cultured with the various doses of *P. gingivalis* or its culture broth for 24 hours. **A.** The levels of iNOS, Cox-2 proteins were determined by Western blots, and the MMP-2 and MMP-9 levels were determined by zymography analysis. **B.** The nitric oxide production was assayed by Griess method. The levels of IL-1-β (**C**) and TNF-α (**D**) in culture supernatant were determined by ELISA analysis.

由於癌組織中常有浸潤之巨噬細胞，細胞培養的實驗中，評估了 *P. gingivalis* 對巨噬細胞株 RAW264.7 的作用。於細胞株培養過程中加入不同濃度之 *P. gingivalis* 培養液及菌體，24 小時後收集培養液及細胞，分析發炎相關分子的表現。如 Figure 6，細菌培養液可刺激 RAW264.7 細胞株表現 iNOS 及 Cox-2，且促進基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases; MMP)-9 的活化，細胞培養液中一氧化氮含量也顯著隨 *P. gingivalis* 培養液或菌體濃度增加而增加 (Fig. 6A and 6B)。在促發炎性細胞激素的表現上，IL-β 及 TNF-α 均隨細菌培養液或菌體的給予而有顯著增加 (Fig. 6C and 6D)。

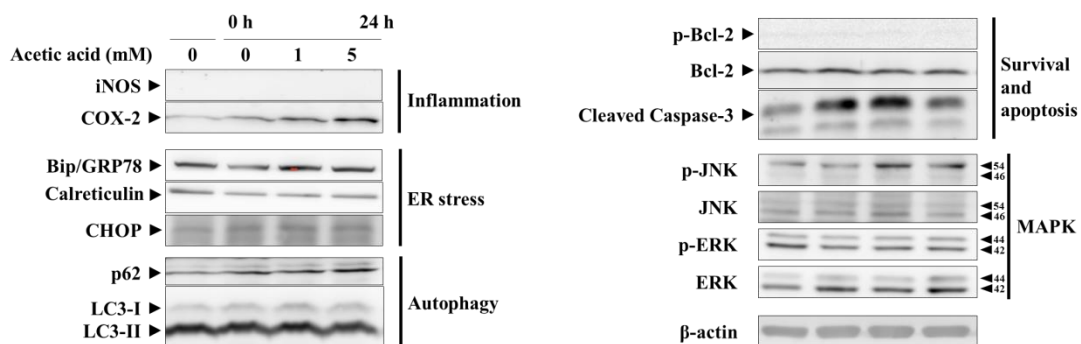


Figure 7. Protein expression profiles in acetic acid-treated BxPC3 cells.

而在初步研究中，我們發現放入其中一種細菌代謝物--醋酸至細胞培養液中，發現發炎蛋白表現量隨加入醋酸濃度增加有增加的趨勢。(Figure 7)

因此可以推論 *P. gingivalis* 會加速胰臟癌的發展。

(四)研究方法及步驟

前面實驗已針對 TGF- β 訊息路徑之活化做了測試，不管是活體實驗還是細胞實驗，給予 *P. gingivalis* 皆有活化此路徑效果。但除了此路徑本身外，研究指出還有 PCBP1 的路徑能協同 TGF- β 訊息路徑造成 EMT 的發生。因此，我探討 *P. gingivalis* 菌液是否刺激胰臟癌細胞中 Oncogene protein-PCBP1-EMT 之途徑。

我使用 *P. gingivalis* 菌株刺激人類胰臟癌 BxPC-3 細胞株進行實驗。

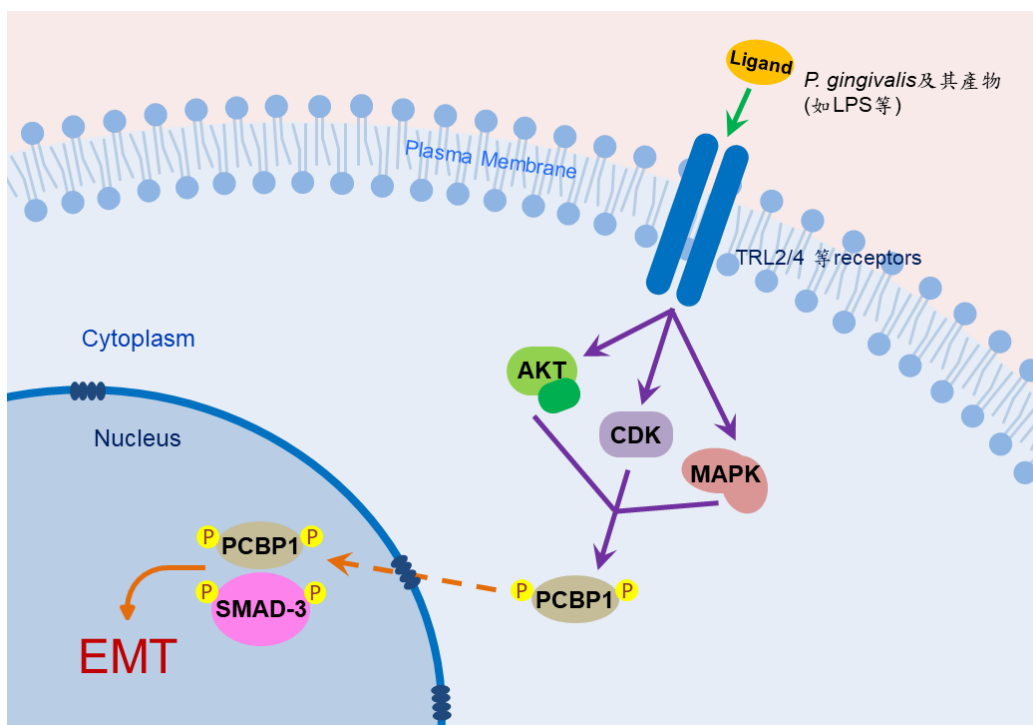


Figure 8. The another pathway to promote EMT expression.

※探討 *P. gingivalis* 菌液是否刺激胰臟癌細胞中 Oncogene protein-PCBP1-EMT 之途徑。(Figure 8 橘色箭頭)

(1) 將 *P. gingivalis* 菌液加入細胞培養液中，觀察其 PCBP1 活化程度(磷酸化)以及 EMT 相關蛋白的表現量。

方法：加入不同濃度 *P. gingivalis* 菌液至細胞培養液中，培養 24 小時，使用蛋白質電泳和西方點墨法觀察 BxPC-3 細胞株內 PCBP1 活化程度及 EMT 相關蛋白的表現量。

(2) 以抑制劑對 AKT、CDK 及 MAPK 進行阻斷是否影響 *P. gingivalis* 菌液對於 PCBP1 的活化。(Figure 8 紫色箭頭)

方法：在細胞培養液中加入 *P. gingivalis* 菌液，並個別加入訊息路徑之抑制

劑(AKT 抑制劑：AKT inhibitor；MAPK 抑制劑：U0126)培養 24 小時，使用蛋白質電泳和西方點墨法觀察其 PCBP1 蛋白的活化程度。

(五)實驗結果

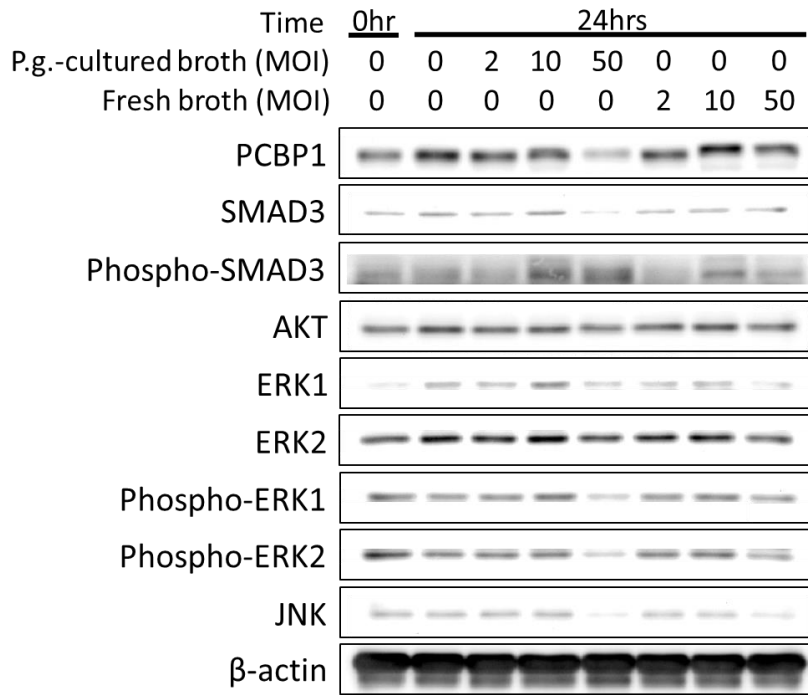


Figure 9. The expression of proteins in BxPC-3 cells treated by *P. gingivalis*-cultured broth and fresh broth.

在 Figure 9.中，發現 PCBP1 蛋白表現量隨 *P. gingivalis* 菌液量增加而降低，而磷酸化 SMAD3 蛋白表現量隨 *P. gingivalis* 菌液量增加而增加。而在加 fresh broth 處理的部分，蛋白質量沒有太大差異，且經 mRNA 分析表現量也沒有顯著差異，因此接下來實驗都只以 *P. gingivalis* 菌液處理。

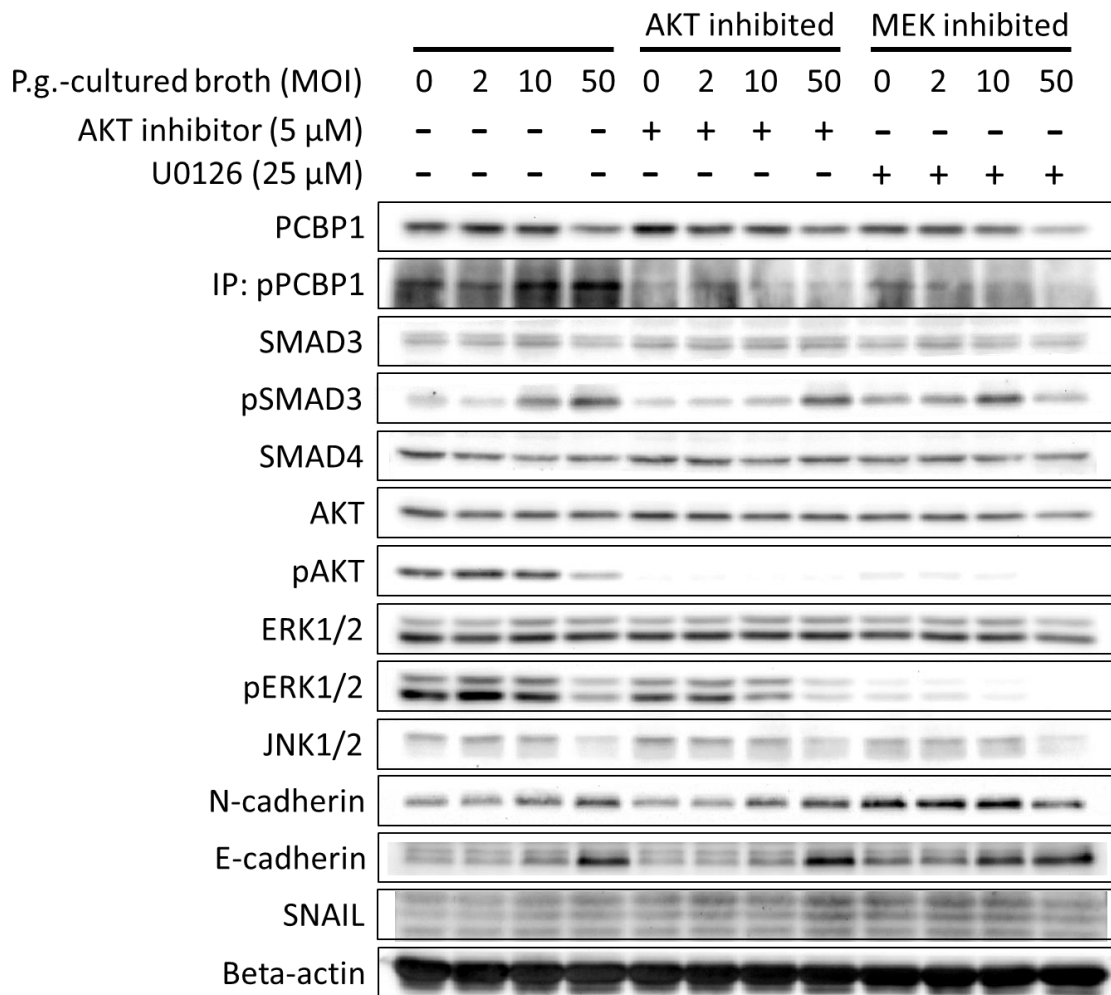


Figure 10. The expression of proteins in BxPC-3 cells treated by *P. gingivalis*-cultured broth, AKT inhibitor, and MEK inhibitor for 24 hours.

由 Figure 10. 中可知，磷酸化 PCBP1 蛋白表現量也隨 *P. gingivalis* 菌液量增加而增加，與磷酸化 SMAD3 一樣，這代表 *P. gingivalis* 菌液很可能促使 PCBP1 蛋白磷酸化與磷酸化 SMAD3 結合入核進行 alternative splicing。此外，EMT 相關蛋白 N-cadherin 和 SNAIL 蛋白表現量也跟著 *P. gingivalis* 菌液量增加而增加，可知 *P. gingivalis* 菌液能促進 EMT 表現。

為了更進一步了解 *P. gingivalis* 菌液是否促進 PCBP1-SMAD3-EMT 的路徑，因此給予 AKT inhibitor 以及 MEK inhibitor 處理，發現磷酸化 PCBP1 蛋白表現量隨 *P. gingivalis* 菌液量增加而下降，而磷酸化 SMAD3 不太受 inhibitors 的處理，還是增加趨勢。除此之外，N-cadherin 和 SNAIL 表現量趨勢並未因磷酸化 PCBP1 表現量下降而減少，這代表 *P. gingivalis* 菌液促進 N-cadherin 和 SNAIL 表現並不是主要走這條路徑。

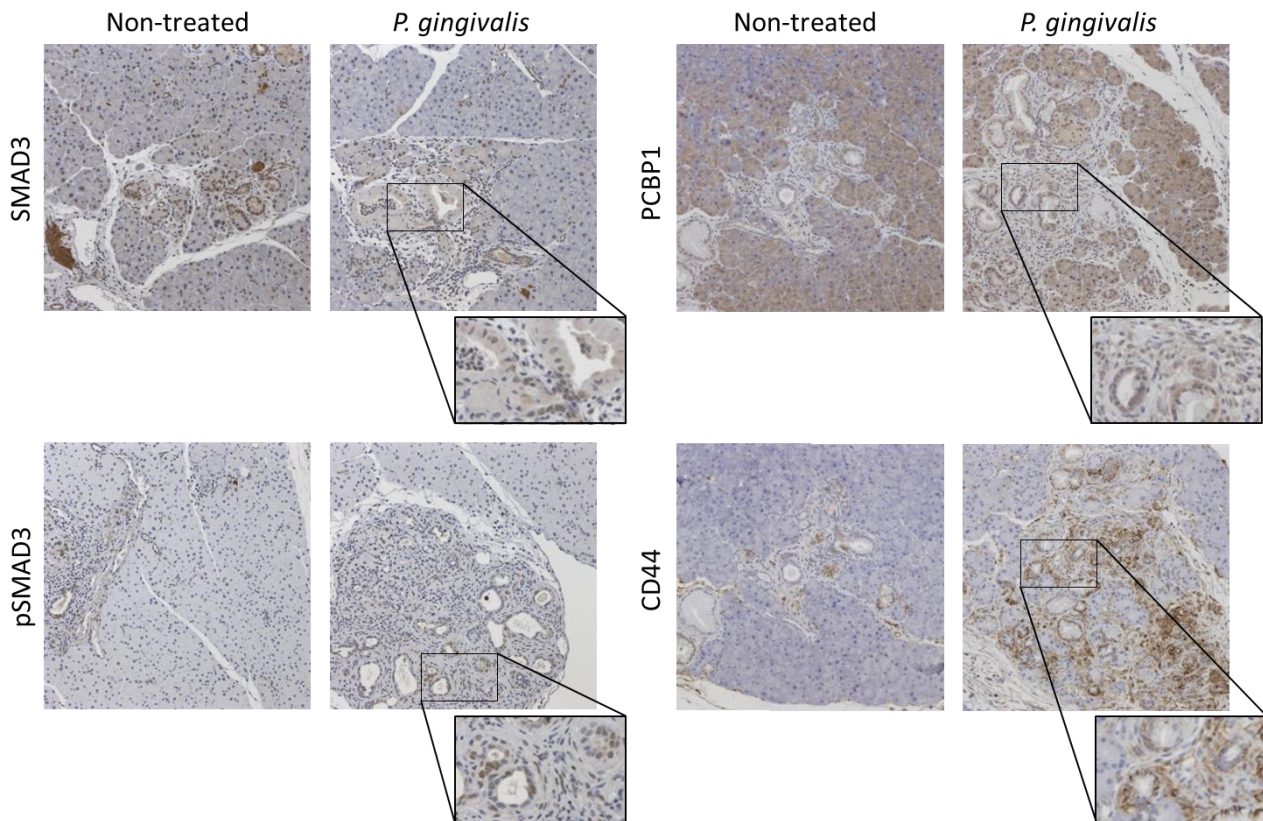


Figure 11. The expression of TGF- β signal pathway-related proteins and PCBP1, CD44 protein in pancreatic tissue of the *LSL-Kras^{G12D};Pdx-1-Cre* transgenic mice by non-treated and *P. gingivalis*-oral-smear treatment. Immunohistochemistry stain of TGF- β , SMAD3, phospho-SMAD3, PCBP1 and CD44 proteins.

而我們也對實驗室先前口腔塗抹 *P. gingivalis* 菌處理之 *LSL-Kras^{G12D};Pdx-1-Cre* 基因轉殖鼠胰臟組織蠟塊做 IHC 染色 (Figure 11)，觀察到 PCBP1 及磷酸化 SMAD3 在細胞核中表現出現在惡化組織部位中，且文獻提及 PCBP1-SMAD3 複合體所影響 CD44 蛋白，其表現量也在組織惡化區域增加。

(六)討論

我們發現磷酸化 PCBP1 與 SMAD3 導致 EMT，並不是主要影響 N-cadherin 和 SNAIL 之 EMT 蛋白表現。而在文獻中提及磷酸化 PCBP1 與 SMAD3，會結合入核對 CD44 mRNA 進行 alternative splicing，在我們的組織切片惡化部位中也發現有 CD44 蛋白的增加，因此未來可以往這個方向研究。

(七)參考文獻

- Chang JS, Tsai CR, Chen LT, Shan YS. - Investigating the Association Between periodontal disease and risk of pancreatic cancer. *Pancreas*. 2016 Jan;45(1):134-141.
- Fan X, Alekseyenko AV, Wu J, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, Purdue MP, Abnet CC, Stolzenberg-Solomon R, Miller G, Ravel J, Hayes RB, Ahn J. - Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut*. 2018

Jan;67(1):120-127.

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. - Pancreatic cancer. *Lancet*. 2016 Jul 2;388(10039):73-85.

Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr;17(4):219-232.

Schroeder BO, Bäckhed F. - Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016 Oct 6;22(10):1079-1089.

Syed V. - TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem*. 2016 Jun;117(6):1279-1287.

Veenu Tripathi, Katherine M Sixt, Shaojian Gao, Xuan Xu, Jing Huang, Roberto Weigert, Ming Zhou, and Ying E. Zhang - Direct regulation of alternative splicing by SMAD3 through PCBP1 is essential to the tumor-promoting role of TGF- β . *Mol Cell* . 2016 November 3; 64(3):549–564.