

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 ： 探討MBNL3在卵巢癌及乳癌是否扮演促進癌化之角色 名 稱

執行計畫學生：高煒翎

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-092-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：潘惠錦

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 108年04月01日

前言

Muscleblind-like(MBNL)家族蛋白是一種 RNA-binding protein，MBNL 蛋白會結合到 pre-mRNA 調控選擇性剪接(alternative splicing)，其中 MBNL1 及 MBNL2 在各種成人組織包括腦，心臟和骨骼肌中表達，而 MBNL3 主要表現在胎盤中。有研究指出 MBNL3 與肝癌有關，MBNL3 會促進肝癌的發生。

先前實驗室已經發現卵巢癌細胞株(OVCAR3及HeyC2)及乳癌細胞株(MCF-7)中的內生性MBNL3表現量較正常卵巢細胞株(IOSE)及正常乳房表皮細胞株(MCF-10A)較高，發現弱化MBNL3的OVCAR3及MCF-7會有生長速率下降、增生能力下降、癒合能力下降以及遷徙能力下降等現象。

在本實驗中，初期我原將利用動物實驗進一步探討 MBNL3 對卵巢癌及乳癌細胞生長及促進癌細胞轉移之角色。因此我建構有表達 luciferase 之 OVCAR3-shLUC 細胞株、OVCAR3-shMBNL3 細胞株，並利用慢病毒感染此細胞，進行 knockdown MBNL3，並利用即時定量 PCR 偵測 MBNL3 表現量，但我們發現有表達 luciferase 之 OVCAR3 細胞株中 MBNL3 的內生性表現量有改變，經過多此討論及修改後我們決定捨棄動物實驗。先前已有文獻指出，在肝癌細胞中 MBNL3 之內生性表現量較正常肝臟細胞高，且發現在肝癌細胞中 knockdown MBNL3 後會造成 PXN 蛋白表現量下降，並且在正常肝臟細胞中 overexpression MBNL3 後會造成 PXN 蛋白表現量上升，以及在 lncRNA-PXN-AS1 中是否有 exon4 的表現量造成改變，因此我們決定將目標轉移到 PXN 蛋白上，並檢測 OVCAR3 是否有 PXN 表現以及 knockdown MBNL3 之後 lncRNA-PXN-AS1 中的 exon4 表現量否有改變。

研究目的

本實驗之目的在於利用慢病毒感染將卵巢癌細胞株之 MBNL3 弱化，並檢測弱化的卵巢癌細胞株及未弱化的軟巢癌細胞株的癌細胞特性是否有改變，並加以探討 MBNL3 改變癌化之路徑。

研究問題

1. 建構含有 luciferase 之卵巢癌細胞株，並進行 MBNL3 之弱化
2. 弱化 MBNL3 之卵巢癌細胞株與未弱化 MBNL3 之卵巢癌細胞株的 PXN 表現量是否有改變

文獻回顧

卵巢癌是全世界婦女最常見的惡性腫瘤之一，根據流行病學調查這種癌症的發病率在工業化國家比發展中國家高。台灣的卵巢癌發病率逐漸上升，從 1979 年的每 10 萬名女性 2.08 人到 2008 年的每 10 萬人中有 7.87 人。儘管早期卵巢癌的 5 年存活率約為 92%，但由於早期卵巢癌的症狀較難發現，因此容易忽略。被確診為晚期卵巢癌的 5 年內存活率僅為 30%。卵巢癌分為卵巢上皮細胞癌

(epithelial ovarian carcinoma)，性腺細胞特定間質細胞癌(sexcord stromal tumor)和惡性生殖細胞瘤(Germ cell tumor)，取決於它們在卵巢中的原始位置[1]。卵巢上皮細胞癌(epithelial ovarian carcinoma, EOC)佔所有卵巢癌約85%[2]。在EOC中最常見的是漿液性(serous)約佔50%至60%，依序為子宮內膜狀(endometrioid)約佔25%，最後則是黏液性(mucinous)以及透明細胞(clear cell)分別各佔約4%[3]。致癌的風險因子有BRCA1或BRCA2基因突變、初經過早、更年期過晚及不孕等[4, 5]。主要症狀有腰痛、無力、腹痛、腹脹、便秘、進食困難以及泌尿道症狀等[6]。

據台灣衛生署統計，過去二十年，台灣的乳癌發病率已大幅上升。自2003年以來，乳癌一直是最常見的女性癌症。此外，乳癌的發病率從2003年到2008年上升了14.69%[7]。乳癌總共分為四大種類(1)luminal A型，其特性是乳癌細胞的賀爾蒙接受體(指ER、PR)呈強陽性，同時HER-2是陰性(2)luminal B型，其特性是賀爾蒙接受體呈弱陽性，同時HER-2可能是陽性或是陰性(3)HER-2陽性型，其特性是賀爾蒙接受體為陰性，而HER-2為陽性(4)基底細胞型，其特性是賀爾蒙接受體與HER-2均為陰性，故此類型有另一別稱為三陰性型[8]。HER2是由HER2編碼的185-kDa跨膜癌蛋白基因。它位於染色體17q21上[9]。乳癌患者可分為Her-2/neu陽性或Her-2/neu陰性兩種，HER-2基因與乳癌的發生頻率有相對的關聯性，且會促進乳癌細胞的生長並影響癌症的復發率和致死率[10]。乳癌的症狀有乳房或腋下有腫塊、乳頭溢血、乳頭位置改變、乳房皮膚發紅、乳房或乳頭大小變化、乳房或乳頭形狀的變化、乳房或腋窩的疼痛以及乳房皮膚的凹陷[11]。

Muscleblind-like (MBNL)家族蛋白果蠅及人類的同源基因，在哺乳動物中有三個MBNL家族異構物，包括MBNL1、MBNL2及MBNL3，MBNL蛋白會直接結合pre-mRNA進行選擇性剪接(alternative splicing)[12, 13]。其中MBNL1及MBNL2在各種成人組織包括腦，心臟和骨骼肌中表達，而MBNL3主要表現在胎盤中。此外MBNL基因的剪接錯誤也牽涉到肌強直性營養不良1型(Myotonic dystrophy type 1, DM1)及肌強直性營養不良2型(Myotonic dystrophy type 2, DM2)[14]。有研究指出，MBNL3會影響CD44的剪接，進而促進骨髓性白血病(myeloid leukemia)的惡化[15]。值得注意的是，研究指出MBNL3與肝癌有關，MBNL3會促進肝癌的發生，在該研究中，作者在正常肝臟細胞株(QSG-7701)中過度表現MBNL3，發現過度表達MBNL3的QSG-7701細胞株中會引起腫瘤的表現[16]。

因此，我將探討MBNL3是否會促進卵巢癌及乳癌之生長和轉移，了解MBNL3在卵巢癌及乳癌是否可扮演促進癌化之角色。

研究方法與步驟

1. 慢病毒製備

Lentivirus packaging 所需基因分為三個獨立質體表現：pMD.G、pCMV- Δ R8.91與轉殖基因pLKO.1-shRNA，利用293T作為lentivirus packaging細胞。

pLKO.1-shRNA是從中研院RNAi core所購買。(Human MBNL3shRNA目標序列: TRCN0000164411、TRCN0000162715、TRCN0000159900)我們將針對MBNL3三個不同目標序列(target sequence)的shRNA質體細菌株養大量，之後抽出質體(lentiviral shRNA plasmid)。293T細胞種於10 cm 培養皿，待細胞長約七、八滿，以PBS清洗後換10 ml新鮮的培養基，將所需質體(8.1 μ g pCMV- Δ R8.9、0.9 μ g pMD.G、9 μ g lentiviral shRNA plasmid)於1.5 ml離心管中混合均勻補水至450 μ l，緩慢加入12.5 mM CaCl₂、2X HBS (Hepes-Buffered Saline; Promega, USA)並於室溫靜置10分鐘，將靜置後的溶液均勻加入已加過Chloroquine培養293T細胞10 cm dish中，並置於培養箱10至12小時後，經PBS清洗後置換10 ml新鮮的培養基，經48小時後，收集上清液。

2. 慢病毒感染

將 4×10^4 顆細胞種於6 cm dish，加入8 μ g/ml polybrene(增加感染效率)於3 ml培養基後，加入適量慢病毒液進行感染，隔天換成含有2 μ g/ml puromycin的培養基，進行篩選成stable-shRNA cell lines。

3. luciferase之卵巢癌細胞株製備

利用p3xFlag-CMV-14與pGL3做ligation，先將p3xFlag-CMV-14與pGL3用HindIII與Xba I進行酵素切兩小時，用1%agrose gel確認長度，再進行膠回收，測O.D.值確認濃度，將vector濃度/vector長度(kb) $\times 1 \lambda$:insert濃度/insert長度(kb) $\times n \lambda = 1:6$ 及ligase buffer(10x) 1 λ 、ligase enzyme 1 λ ，補d2H2O至10 λ ，放4°C overnight，取5 λ ligase產物與50 λ competent cell(DH5 α)，vortex 1秒，放冰上5分鐘，heat-shock 42°C 45秒，冰上5分鐘，塗盤，16至18小時後，liquid culture 16至18小時，抽質體，酵素切確認長度，transfect進OVACR3卵巢癌細胞株及MCF-7乳癌細胞株。

4. RNA之萃取

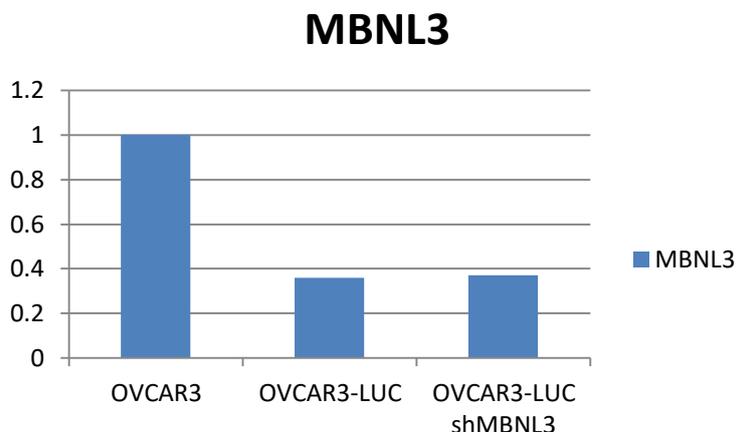
將細胞培養皿內的medium去除後，加入1ml的Tri-reagent並均質化後，再加入100 μ l BCP使其分層，以13500 g、15分鐘、4°C離心後，將RNA水層的部分分離出來，加入冷藏的isopropanol使RNA沉澱，並離心獲得RNA pellet。然後，將RNA pellet用以DEPC水配置的75%酒精清洗去鹽類和雜質。去除酒精後，置於空氣中乾燥。最後，用DEPC水回溶，並使用超微量分光光度計(NanoDrop)測量其波長260 nm及260/280之比值，用來估計其濃度及純度。

5. 反轉錄聚合酵素連鎖反應(Reverse transcription PCR)

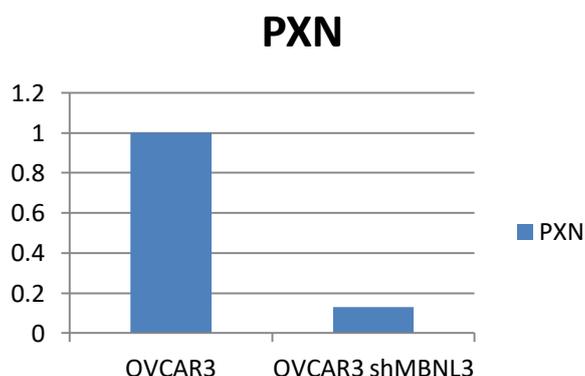
將萃取出來的RNA定量後，取total 1 μ g，再加入oligodT和dNTP、DEPC水，在65°C下反應5分鐘，然後置於冰上1分鐘，再加入5X RT buffer、0.1M DTT、SuperScriptIII RT，最後先在50°C下反應50分鐘，再70°C下反應15分鐘。反轉錄成cDNA後，保存於4°C。將cDNA稀釋10倍後，取2 μ l當模板，加入dNTP、PCR buffer、primer、Tag聚合酶，然後進行半PCR反應。最後以1.5% agarose gel進行電泳，以溴化亞錠(Ethidium bromide)染色後便在紫外燈下確認產物。

6. 即時定量PCR(real-time PCR)

【圖 3】利用 Q-PCR 檢測 Knockdown MBNL3 之效率，發現轉染完 luciferase 之 OVCAR3 的 MBNL3 內生性表現量有所改變，因此決定不繼續進行動物體內實驗。



【圖 4】檢測 OVCAR3 之內生性 PXN 蛋白表現量是否與 shMBNL3 之 OVCAR3 有差異，發現 Knockdown MBNL3 之 OVCAR3 之 PXN 內生性表現量有較低的現象。



綜合以上之結果，未來將繼續根據文獻繼續探討在 PXN 剪接事件中是否有 exon4 之表現量差異，並繼續檢測下游蛋白及其影響機制進行研究。

參考文獻

1. Pinto, C., et al., *Human DNA2 possesses a cryptic DNA unwinding activity that functionally integrates with BLM or WRN helicases*. *Elife*, 2016. **5**.
2. Gharwan, H., K.P. Bunch, and C.M. Annunziata, *The role of reproductive hormones in epithelial ovarian carcinogenesis*. *Endocr Relat Cancer*, 2015. **22**(6): p. R339-63.
3. Farley, J., L.L. Ozbun, and M.J. Birrer, *Genomic analysis of epithelial ovarian cancer*. *Cell Res*, 2008. **18**(5): p. 538-48.
4. Paul, A. and S. Paul, *The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014. **19**: p. 605-18.
5. Sueblinvong, T. and M.E. Carney, *Current understanding of risk factors for*

- ovarian cancer*. *Curr Treat Options Oncol*, 2009. **10**(1-2): p. 67-81.
6. Doubeni, C.A., A.R. Doubeni, and A.E. Myers, *Diagnosis and Management of Ovarian Cancer*. *Am Fam Physician*, 2016. **93**(11): p. 937-44.
 7. Ho, M.L., et al., *Mortality of breast cancer in Taiwan, 1971-2010: temporal changes and an age-period-cohort analysis*. *J Obstet Gynaecol*, 2015. **35**(1): p. 60-3.
 8. Wilson, T.R., et al., *Development of a robust RNA-based classifier to accurately determine ER, PR, and HER2 status in breast cancer clinical samples*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **148**(2): p. 315-25.
 9. Woodhouse, E.C., R.F. Chuaqui, and L.A. Liotta, *General mechanisms of metastasis*. *Cancer*, 1997. **80**(8 Suppl): p. 1529-37.
 10. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
 11. Sathian, B., et al., *Awareness of breast cancer warning signs and screening methods among female residents of Pokhara valley, Nepal*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(11): p. 4723-6.
 12. Lee, K.S., et al., *Monoclonal antibodies against Muscleblind-like 3, a protein with punctate nuclear localization*. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011. **30**(2): p. 181-8.
 13. Konieczny, P., E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak, *MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(17): p. 10873-87.
 14. Kino, Y., et al., *Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(3): p. 740-56.
 15. Holm, F., et al., *Reversion to an embryonic alternative splicing program enhances leukemia stem cell self-renewal*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(50): p. 15444-9.
 16. Yuan, J.H., et al., *The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1*. *Nat Cell Biol*, 2017. **19**(7): p. 820-832.