

# 出國報告(出國類別：進修)

## 三陰性乳癌抗藥性研究

服務機關：國防醫學院

姓名職稱：許桓銘、助理教授

派赴國家：美國

報告日期：102年9月10日

出國時間：101年7月16日至102年6月30日

## 摘 要

三陰性乳癌是乳癌種類中最有侵犯性的乳癌，罹患三陰性乳癌的病患通常比其他型乳癌患者有高復發率及高死亡率。因為賀爾蒙接受器陽性及人類表皮第二生長因子陽性患者，可以使用抗賀爾蒙藥物及標靶藥物治療，但三陰性乳癌缺乏對抗的標靶目標。化學藥物治療是三陰性乳癌患者重要的治療方式，但抗藥性卻是化學藥物治療失敗的主要原因。因此探討三陰性乳癌抗藥性機轉，是非常重要的課題。

本研究利用四株不同三陰性乳癌細胞株，包括MDA436, MDA231, HCC1806, 及MDA468 細胞株。美國加州大學洛杉磯分校乳癌中心實驗室已經建立不同三陰性乳癌細胞株對於常用乳癌化學藥物 Doxorubicin, Docetaxel, Gemcitabine, 及 Cisplatin 的抑制 50%細胞生長藥物濃度(IC50)，其中MDA468 和HCC1806 是屬於藥物敏感細胞株，而MDA231 和MDA436 是屬於抗藥性細胞株。分別萃取四株細胞株的蛋白質，分解成胜肽(Peptide)，並且純化磷酸化胜肽，利用質譜儀鑑定。

使用蛋白質體學應用軟體 Masscot 及 Scaffold 分析藥物敏感細胞株與抗藥性細胞株之間磷酸化蛋白質，以表現量大於 1.5 倍為基準，找到 55 個磷酸化蛋白質，於抗藥性細胞株內表現量大於藥物敏感細胞株。進一步分析結果，這些活化蛋白質主要參與 Integrin 訊息傳導途徑及 Heterotrimeric G-Protein 訊息傳導途徑。說明抗藥性機轉可能與這兩大訊息傳導途徑有密切關聯，對於治療三陰性乳癌藥物的選擇可以提供參考。

# 目 次

摘 要.....	2
目 次.....	3
本 文.....	4
一、目的.....	4
(一) 背景介紹：.....	4
(二) 蛋白質體學(Proteomics)：.....	4
二、過程.....	6
(一) 材料與方法：.....	6
(二) 結果：.....	7
三、心得及建議.....	11

# 本 文

## 一、目的

### (一) 背景介紹：

乳癌是全球女性好發癌症第一位，近 20 年來，乳癌已經是成為台灣地區婦女癌症第一位，每年約新增 7000 名病例。手術治療是乳癌首要治療，但手術後輔助治療更是提高乳癌存活率的重要關鍵，臨床治療乳癌病患係根據乳癌組織標本型態給予不同治療方針。70%乳癌病患通常有表現賀爾蒙接受器(Estrogen Receptor or Progesterone Receptor)，此類病患可以使用抗賀爾蒙藥物治療，治療效果良好且存活率高；另一類乳癌病患高度表現人類表皮第二生長因子，治療上可以使用標靶藥物(Herceptin)治療，治療成效良好；約 10-15%病患沒有表現賀爾蒙接受器(Estrogen Receptor and Progesterone Receptor)以及沒有表現人類表皮第二生長因子，稱之為三陰性乳癌，此類病患因為缺乏治療標的，無法使用特定標靶藥物及抗賀爾蒙藥物治療，所以只能依賴化學藥物治療。臨床上三陰性乳癌患者對於化學藥物有高比例的抗藥性，產生高復發率及低存活率。

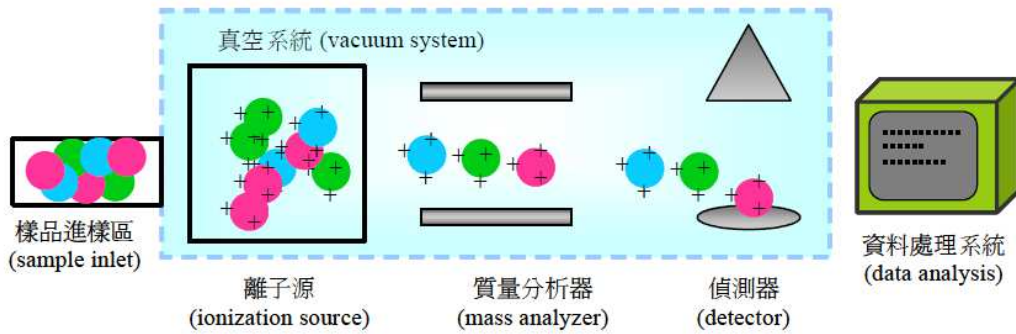
對於三陰性乳癌治療，使用合適的化學藥物是提高存活率降低復發率的重要策略。但是目前臨床上並沒有適當的生物指標，因此研究三陰性乳癌抗藥性以及找尋對抗的生物指標是重要的研究課題。

### (二) 蛋白質體學(Proteomics)：

近年來重要的生物基因體定序計畫陸續完成，蛋白質體學成為後基因時代生命科學領域最重要的課題之一。根據生物中心法則(Central Dogma of Biology)，由基因體的DNA轉錄成mRNA，再由mRNA轉譯成蛋白質，相較於基因，蛋白質往往才是功能的執行者。蛋白質體學的概念自從1995 年被提出，蛋白質體學是針對整體蛋白質作定性、定量及功能的分析。但由於蛋白體在數量及結構上的複雜性遠超過基因體，人類30,000 個基因所能表現的蛋白質即可能超過 100,000 個，再加上轉譯後修飾作用 (post-translational modification, PTM)，這些蛋白質體的複雜程度和其中許多蛋白質的低含量 (low abundance) 驅使了高靈敏度分析儀器的需求。

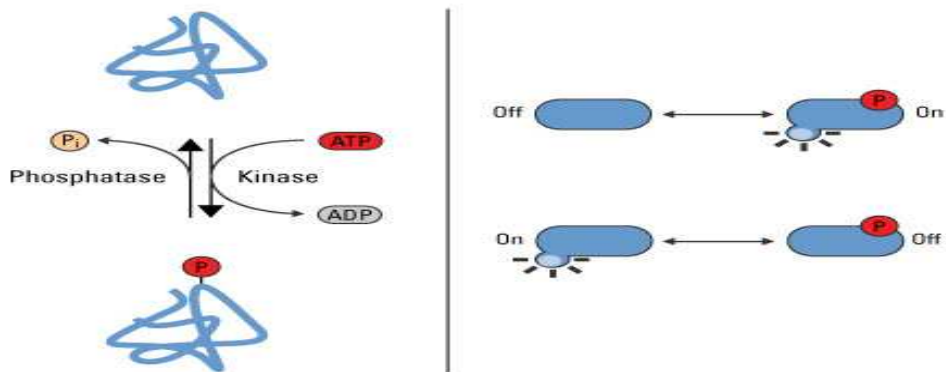
以質譜法分析蛋白質體是一新興的分析技術，質譜法是一個測帶電離 (ion) 的方法，當分析樣品進入質譜儀後，首先在離子源使分析物進行游離化 (ionization) 以轉換為氣相的帶電離子，進入質量分析器後，在電場、磁場等物理力量的作用下，偵測器可測得不同離子的質荷比 (mass-to-charge ratio，

$m/z$ )，便可從電荷推算出分析物的質量，並配合電腦資料庫搜尋演算進行蛋白質身份的鑑定。如下圖：



### 磷酸化蛋白質(Protein phosphorylation)：

蛋白質磷酸化是蛋白質轉譯後修飾中影響蛋白質活性化重要步驟，藉由激酶 (Kinase)的作用將磷酸根與絲胺酸 (Serine)、蘇胺酸 (Threonine) 及酪胺酸 (Tyrosine) 形成共價鍵。細胞內藉由調控蛋白質磷酸化或去磷酸化，使得蛋白質活性化，進行訊息傳導發揮功能。如圖：



### 研究目的：

此研究的目的是運用蛋白質體學技術，針對三陰性乳癌不同抗藥性細胞株，萃取其中蛋白質，分析比較磷酸化蛋白表現量，並且使用生物資訊軟體尋找重要訊息傳導途徑，進一步得到與抗藥性關聯的訊息傳導途徑，提供有用生物標記及對抗抗藥性治療指標。

## 二、過程

### (一) 材料與方法：

#### 培養細胞：

取用三陰性乳癌細胞株，包括MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436, 及 HCC1806。細胞培養方式依據美國菌種保藏中心(ATCC: American Type Culture Collection)的指引，按照正常模式培養細胞。

#### 萃取蛋白質：

細胞培養在6孔洞細胞培養盤內，待細胞生長至90%滿時，先將細胞培養盤內培養液移除，使用冰PBS液清洗細胞後，加入250ul細胞分解液(Lysis Buffer: 8 M urea, 4% CHAPS, 40mM Tris-base, 65mM DTT, 1% SDS)，萃取細胞內蛋白質，並使用Pierce BCA protein assay進行蛋白質定量。

#### 蛋白質沉澱：

取用1mg蛋白質加入20ul的1M DTT，置於56°C溫箱一小時。再加入80ul的1M IAA，置於黑暗環境室溫下40分鐘。加入0.11體積的100% TCA置於冰上10分鐘，然後加入500ul的10% TCA置於冰上20分鐘，離心取得沉澱物。使用500ul的Acetone清洗沉澱物，離心取得沉澱物並乾燥。

#### 蛋白質分解成胜肽(Peptide)：

蛋白質沉澱物加入500ul的100mM ammonium bicarbonate及Trypsin 20ug，置於37°C溫箱2小時；然後再加入Trypsin 20ug置於37°C溫箱20小時。轉入過濾瓶，收集過濾液離心真空乾燥。

#### 收集磷酸化胜肽：

乾燥胜肽加入400ul的loading buffer(80% acetonitrile, 2% TFA)，然後加入4mg的TiO<sub>2</sub> beads作用1小時，離心收集TiO<sub>2</sub> beads。加入wash buffer I (30% acetonitrile, 2% TFA) 1ml，作用20分鐘；離心收集TiO<sub>2</sub> beads，加入wash buffer II(80% acetonitrile, 0.1% TFA) 1ml，作用20分鐘。離心收集TiO<sub>2</sub> beads，加入elution buffer I(400mM NH<sub>4</sub>OH, 50% ACN, pH 11) 400ul，作用20分鐘，離心收集上清液；TiO<sub>2</sub> beads加入400ul elution buffer II(500mM NH<sub>4</sub>OH, 60% ACN, pH 11) 作用20分鐘，離心收集上清液。合併收集上清液真空乾燥。

#### 質譜儀鑑定磷酸化胜肽：

利用Thermo Fisher LTQ Orbitrap mass spectrometry質譜儀進行磷酸化胜肽定序，將原始資料運用Mascot蛋白質資料庫搜尋，分析蛋白質種類；並運用 Scaffold Proteomics軟體進行定量分析。

## (二) 結果：

實驗室針對不同三陰性細胞株分別使用目前臨床常用化學藥物 Doxorubicin, Docetaxel, Gemcitabine, 及Cisplatin測試抑制50%細胞生長藥物濃度(IC50)。我們可以將細胞株分類為藥物敏感及抗藥性細胞株，其中MDA231和MDA436屬於抗藥性細胞株；MDA468和HCC1806屬於藥物敏感細胞株，如圖：

### Chemoagents

<u>Cell Lines</u>	<u>Doxorubicin</u>	<u>Docetaxel</u>	<u>Gemcitabine</u>	<u>Cisplatin</u>
HCC1937	841.7	253392	NO RESPONSE	333854
MDA436	840.1	NO RESPONSE	NO RESPONSE	NO RESPONSE
MDA231	644.6	215645	NO RESPONSE	NO RESPONSE
HCC1187	413.9	NO RESPONSE	NO RESPONSE	NO RESPONSE
HCC1806	233.2	1.102	4.163	208994
MDA468	158.9	2.378	146	59710

IC50 (nm): The **half maximal inhibitory concentration**

將MDA231、MDA436與MDA468、HCC1806分別比較不同細胞株之間蛋白質表現量，運用Excel計算設定蛋白質表現量差距1.5倍以上的蛋白質。我們找到了在抗藥性細胞株有32個高表現量蛋白質及22個低表現量蛋白質。

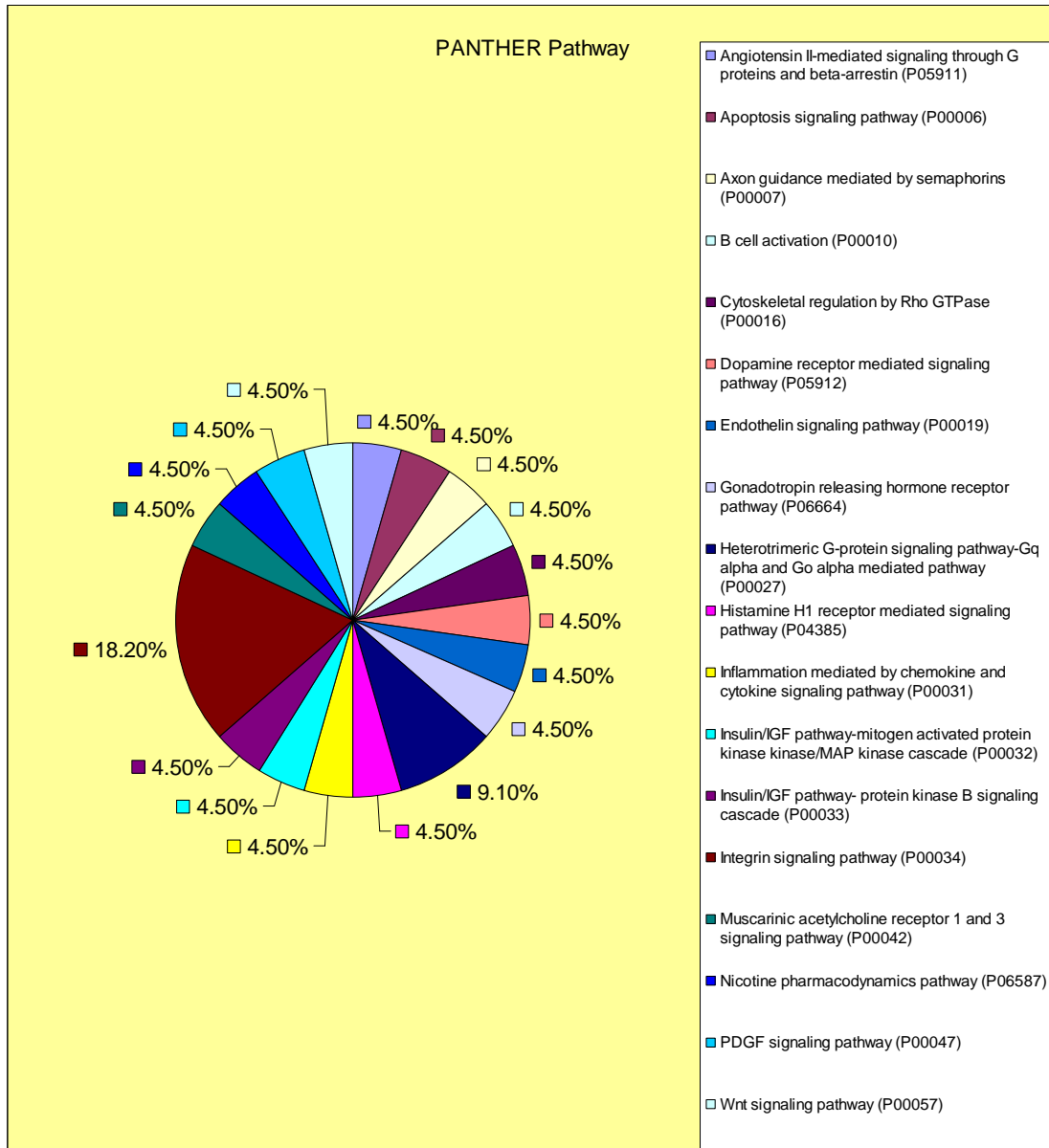
MDA231,MDA436 V.S. MDA468, HCC1806

高表現量蛋白質	T-Test (P-Value)	Accession Number	MW	Average Fold Change
Vimentin	95% (0.0064)	62414289	54 kDa	26.46
Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 15-Like 1 Isoform 2	95% (0.0026)	10864047	94 kDa	15.50
Microtubule-Associated Protein 1B	95% (0.012)	153945728	271 kDa	11.80
Filamin-C Isoform A	95% (0.00015)	116805322	291 kDa	11.77
Beta-2-Syntrophin	95% (0.00016)	5803177	58 kDa	9.25
Niban-Like Protein 1 Isoform 1	95% (0.038)	51093863	84 kDa	8.81
Filamin-B Isoform 2	95% (0.041)	105990514	278 kDa	8.23
Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 2 Isoform 3	95% (0.040)	15011974	108 kDa	7.27
Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 12A Isoform A	95% (0.0013)	219842212	115 kDa	5.63
Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type 12 Isoform 1	95% (0.037)	196114951	88 kDa	5.60
Cap-Gly Domain-Containing Linker Protein 2 Isoform 1	95% (0.019)	116008447	116 kDa	5.34
Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase 1	95% (0.040)	13540569	49 kDa	5.30
Abelson Tyrosine-Protein Kinase 2 Isoform D	95% (0.0033)	209862772	116 kDa	5.09
Acetyl-Coa Carboxylase 1 Isoform 1	95% (0.023)	38679960	270 kDa	4.77
Centrosomal Protein Of 170 Kda Isoform Alpha	95% (0.00074)	109255228	175 kDa	4.51
Nucleolar Rna Helicase 2 Isoform 1	95% (0.035)	50659095	87 kDa	4.49
A-Kinase Anchor Protein 2 Isoform 2	95% (0.014)	211971074	95 kDa	4.43
Tropomyosin Alpha-4 Chain Isoform 2	95% (0.00023)	4507651	29 kDa	4.32
Galectin-1	95% (0.0044)	4504981	15 kDa	4.29
Protein Ahnak2	95% (0.0049)	156766050	617 kDa	4.22
Calumenin Isoform C Precursor	95% (0.016)	314122177	38 kDa	4.08
Filamin-A Isoform 1	95% (0.0029)	116063573	280 kDa	3.28
Sequestosome-1 Isoform 1	95% (0.0058)	4505571	48 kDa	3.20
Monocarboxylate Transporter 4	95% (0.0050)	109288010	49 kDa	3.07
Spectrin Alpha Chain, Non-Erythrocytic 1 Isoform 2	95% (0.022)	154759259	285 kDa	2.82
Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3	95% (0.00061)	153945846	304 kDa	2.81
Annexin A2 Isoform 2	95% (0.0017)	209862831	39 kDa	2.79
Cyclin-Dependent Kinase 17 Isoform 2	95% (0.049)	281427168	60 kDa	2.75
Zyxin	95% (0.037)	4508047	61 kDa	2.53
Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor Precursor	95% (0.043)	119964726	274 kDa	2.05
Apoptotic Chromatin Condensation Inducer In The Nucleus Isoform 3	95% (0.031)	259906020	147 kDa	1.96
Ras And Rab Interactor 1	95% (0.014)	68989256	84 kDa	1.87



低表現量蛋白質	T-Test (P-Value)	Accession Number	MW	Average Fold Change
<b>Keratin, Type I Cytoskeletal 18</b>	95% (0.0069)	40354195	48 kDa	-1.90
<b>Calreticulin Precursor</b>	95% (0.039)	4757900	48 kDa	-2.26
<b>Desmoplakin Isoform I</b>	95% (0.00042)	58530840	332 kDa	-3.45
<b>60S Ribosomal Protein L22 Proprotein</b>	95% (0.034)	4506613	15 kDa	-3.59
<b>Ribonucleoprotein Ptb-Binding 1</b>	95% (0.034)	123173757	80 kDa	-3.88
<b>Na(+)/H(+) Exchange Regulatory Cofactor Nhe-Rf1</b>	95% (0.0027)	4759140	39 kDa	-4.04
<b>Transcription Intermediary Factor 1-Beta</b>	95% (0.000048)	5032179	89 kDa	-4.94
<b>Rela-Associated Inhibitor</b>	95% (0.020)	215820635	89 kDa	-5.65
<b>Ezrin</b>	95% (0.0035)	161702986	69 kDa	-6.04
<b>14-3-3 Protein Sigma</b>	95% (0.0030)	5454052	28 kDa	-6.72
<b>Plakophilin-3</b>	95% (0.00028)	6005830	87 kDa	-6.93
<b>Etoposide-Induced Protein 2.4 Homolog Isoform 1</b>	95% (0.00066)	55956766	39 kDa	-7.99
<b>Ladinin-1</b>	95% (0.00026)	20070205	57 kDa	-8.86
<b>Band 4.1-Like Protein 1 Isoform A</b>	95% (0.000000047)	30061489	99 kDa	-11.18
<b>Protein Fam83H</b>	95% (0.010)	157311635	127 kDa	-12.70
<b>Keratin, Type I Cytoskeletal 19</b>	95% (0.00000023)	24234699	44 kDa	-13.02
<b>Epidermal Growth Factor Receptor Isoform A Precursor</b>	95% (0.048)	29725609	134 kDa	-15.64
<b>Keratin, Type I Cytoskeletal 17</b>	95% (0.00000030)	4557701	48 kDa	-26.37
<b>Keratin, Type I Cytoskeletal 14</b>	95% (0.016)	15431310	52 kDa	-44.77
<b>Keratin, Type Ii Cytoskeletal 6A</b>	95% (0.0058)	5031839	60 kDa	-45.69
<b>Keratin, Type Ii Cytoskeletal 6C</b>	95% (0.0022)	155969697	60 kDa	-59.40
<b>Keratin, Type Ii Cytoskeletal 5</b>	95% (0.0014)	119395754	62 kDa	-95.74

利用Bioinformatics軟體PANTHER，將高表現量蛋白質輸入運算，搜尋蛋白質訊息傳導途徑，瞭解與抗藥性關聯的重要途徑。



與抗藥性關聯的途徑中，以Integrin Signaling Pathway佔有最大比例，表示Integrin Signaling Pathway在抗藥性機轉中扮演重要角色，Integrin Signaling Pathway原本是維持細胞與細胞間聯繫穩定作用，因此若失衡則癌細胞容易轉移及產生抗藥性。

### 三、心得及建議

此行至美國加州大學洛杉磯分校(UCLA)乳癌中心進修，跟隨Helena Chang教授學習。門診教學中學習與病患溝通技巧，如何讓病患充分瞭解病情，取得病患信任，與病患討論手術治療流程及手術風險；手術教學中學習手術技巧及如何處理手術相關併發症，收穫豐富。Helena Chang教授對每位病患表現同理心及耐心，看診時間至少30分鐘，詳細問診與身體檢查，並且充分衛教，使病患有視病猶親感受。充分手術前解釋，病患對於手術風險有認知，減少醫療糾紛。

Helena Chang教授同時負責乳癌研究實驗室，專注於三陰性乳癌抗藥性研究。在Helena Chang教授指導下，學習運用蛋白質體學探討與三陰性乳癌抗藥性關聯的重要訊息傳導途徑。從細胞培養、萃取蛋白質及利用質譜儀鑑定蛋白質，以及利用生物資訊工具分析，可以了解蛋白質體學對於找尋生物標記及對抗抗藥性標靶目標是有效工具。

醫療工作涵括範圍廣泛，包括病患健康保險、診斷、治療及追蹤，無法由醫師獨力完成。在UCLA看診過程中，首先會由協調師安排病患檢查與手術排程，護理師對病患完成衛教工作，醫師專責與病患討論病情與治療，所有醫療相關人員通力合作。合理分配工作量，讓所有人員專司其職，營造良好工作環境，提供病患優質醫療。

醫療日新月異，不斷有新概念、新方法、新技術，所以醫療工作人員要有吸收新知的動力。實際觀摩瞭解國外先進技術發展及醫療環境的轉變，可以幫助提升國內醫療發展，維持與世界同步的醫療水準。

由於國人對於醫療品質的要求愈來愈高，臨床醫師工作負荷量也不斷增加。因此有效分工不僅可以合理分配醫師工作，維持高品質醫療。所以建議增加醫師助理人力，分擔非專業性行政工作，醫師負責醫療專業工作，如此臨床醫師可以更有充裕時間關懷病患，不僅病患滿意度提升，醫療品質也能精進。

學習可以使自己更專業，此行UCLA進修讓個人開闊視野，也見識美國醫療對於病患醫療品質的要求。因此建議繼續人員培訓，掌握國際醫療趨勢。