



國立臺灣大學醫學院生理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Physiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Liver receptor homolog-1 (LRH-1)

於乳癌細胞的轉錄調控

Transcriptional regulation of liver receptor homolog-1

(LRH-1) in breast cancer cells

張家心

Chia-Hsin Chang

指導教授：胡孟君 博士

Advisor: Meng-Chun Hu, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July 2019

誌謝



轉眼間兩年一下就過去了，這段時間發生了很多事，從最初的 serum starvation 到後來完全走到死路，砍掉重練開始做此題目，過程中數不清的失敗數不清的碰壁，以及好不容易累積起來的結果，各種酸甜苦辣交織在一起。在這絲毫稱不上順利的路途中，有幸接受了許多人的幫助。非常感謝兩年來指導我的胡孟君老師，讓我大四下學期即有機會來實驗室見習、熟悉所上的環境，每次討論都不厭其煩的點出我的盲點，指示下一步的方向；教導我如何邏輯性的思考，解決遇到的多樣困難。在我對實驗進度感到迷茫時，也不忘給我打強心針，撫平我的不安。同時也很感謝參加我的口試的口委老師們——徐立中老師、張淑芬老師以及盧主欽老師，從不同的視角出發，給我許多寶貴的意見並指出我的不足之處。

謝謝財春學長從我踏入實驗室開始就一直教我實驗室的大小事，作為實驗室裡可靠的靠山，一手接下雜七雜八的事務，畢業後也依舊很有耐性的回答我的問題。謝謝珮瑜學姊及怡萱學姊在我 7 月進實驗室，身邊還沒有其他同學的時候帶我去麵街買午餐，並示範實驗的操作流程。謝謝昕梅學姊和順喻學姊推薦我不少好(涼)課可以修，平常一起聊天說笑，分享實驗過程發生的奇事。謝謝我的同學稚鴻，實驗上不斷衝刺的身影始終激勵我要繼續努力。謝謝昱臻及智宇在實驗室營造的愉快氣氛，偶爾在我忙不過來的時候幫我買午餐，更重要的是幫我抽了多到數不清的 mini。也謝謝這一路上陪我談心的朋友們，俐融(超感謝你平時總聽我爆罵髒話、大發花癡)、敏心、佳鋆、歆芸、諳潔、伊純、蕙陵，以及各位同窗朋友們，時而嘴砲時而鼓勵組成的日常，無疑是我碩班生涯的珍寶。最後要特別感謝自始至終一直支持我的家人們，總是在我無助的時候給予我最大的關懷與支持，一次次協助我排解精神上的負擔，包容我在壓力之下的負面情緒，陪伴我渡過每一個困難。人生很長，兩年的時間轉瞬即逝，但在這裡積攢的種種經歷，相信會成為我邁向未來的重要基石。

目錄



誌謝	I
目錄	II
表次	IV
圖次	V
摘要	VI
Abstract.....	VII
第一章 序論	1
一、 乳癌簡介	1
1. 概況	1
2. 分類	1
二、 LRH-1 的生理功能.....	2
三、 LRH-1 的結構與調控.....	4
1. LRH-1 的結構.....	4
2. LRH-1 的異構物	5
3. 轉譯後修飾	6
4. 輔助調節因子	6
四、 LRH-1 於癌症的作用	8
五、 研究目的	10
第二章 材料與方法	11
一、 細胞培養	11
二、 藥品	12
三、 質體	12
四、 定點突變聚合酶連鎖反應 (site-directed mutagenesis).....	16

五、	蛋白質萃取.....	17
六、	西方墨點法 (Western blot).....	18
七、	RNA 萃取	20
八、	即時性反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR)	21
九、	冷光酵素活性分析 (Luciferase assay).....	23
十、	shRNA knockdown	24
十一、	統計分析 (statistical analysis)	26
第三章	結果	27
一、	LRH-1 於乳癌細胞的表現.....	27
二、	LRH-1 啟動子 II 於乳癌細胞表現轉錄活性	28
三、	Sp1 參與 LRH-1 之調控	29
四、	E2 及 PGE ₂ 於乳癌細胞對 LRH-1 表現的影響.....	30
五、	LRH-1 於乳癌細胞對麩醯胺酸代謝的影響.....	31
第四章	討論	32
一、	LRH-1 於乳癌細胞之表現.....	32
二、	LRH-1 的啟動子.....	33
三、	LRH-1 於乳癌細胞的調控.....	34
四、	LRH-1 對麩醯胺酸代謝的影響.....	35
參考文獻	38

表次



表一、藥品	12
表二、初級抗體	20
表三、次級抗體	20
表四、冷光反應試劑	20
表五、Real-time RT-PCR 使用之配對引子	22
表六、使用之 shRNA	25
表七、抑制 LRH-1 對麩醯胺酸代謝相關基因表現的影響	61

圖次



圖一、LRH-1 基因、mRNA 及蛋白質異構物示意圖	48
圖二、LRH-1 蛋白質於 HepG2、MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 的表現情況	49
圖三、LRH-1 於 HepG2、MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 的 mRNA 表現.....	50
圖四、於 MCF7 及 MDA-MB-231 使用 shRNA 可降低 LRH-1 的 mRNA 表現..	51
圖五、於 MCF7 及 MDA-MB-231 使用 shRNA 可降低 LRH-1 的蛋白質表現..	52
圖六、LRH-1 啟動子於 HepG2 及乳癌細胞株之活性	53
圖七、不同長度的 LRH-1 啟動子 II 於乳癌細胞株的啟動子活性	54
圖八、Sp1 結合序列突變減低 LRH-1 啟動子 II 的轉錄活性	55
圖九、Sp1 抑制劑可降低 LRH-1 啟動子 II 的轉錄活性	56
圖十、Sp1 抑制劑可降低 LRH-1 的 mRNA 表現	57
圖十一、於 MCF7 處理 E2 對 LRH-1 mRNA 表現及啟動子活性的影響	58
圖十二、於 MCF7 及 MDA-MB-231 處理 PGE ₂ 對 LRH-1 mRNA 表現的影響..	59
圖十三、於 MCF7 及 MDA-MB-231 抑制 LRH-1 對麩醯胺酸代謝的影響	60
附圖一、麩醯胺酸代謝路徑示意圖	62

摘要



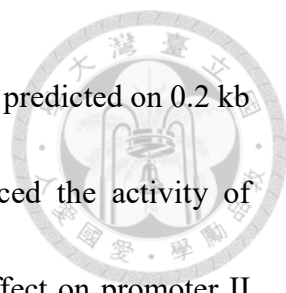
Liver receptor homolog-1 (LRH-1) 為細胞核受器之 5A 家族的成員，可參與類固醇生成及肝臟之膽酸恆定與醣類代謝等生理作用。LRH-1 亦表現於乳癌細胞，可促進細胞增生及疾病進程。過去的文獻指出 LRH-1 在肝臟可表現全長之 LRH-1 (LRH-1v1)，於乳癌細胞則主要表現長度較短的異構物 (LRH-1v4)，可能是由不同的啟動子調控，但其詳細的調控機制尚未釐清。本篇研究便深入探討 LRH-1 於乳癌細胞的轉錄調控。我們建構了 2.7k 之 LRH-1v1 啟動子 (啟動子 I) 及 LRH-1v4 潛在的啟動子 (啟動子 II)，分析在人類肝癌細胞株 HepG2 與乳癌細胞株 MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 的轉錄活性。結果顯示啟動子 I 於 HepG2 可表現很高的轉錄活性，然而於乳癌細胞則幾乎沒有活性。相反的，啟動子 II 於肝臟無活性表現，在乳癌細胞卻可表現轉錄活性。接著我們分析不同長度的啟動子 II 於乳癌細胞之活性，發現 0.2k 啟動子 II 即可於乳癌細胞表現很強的活性。在此區間內我們找到三個轉錄因子的關鍵結合序列，分別是細胞核受器常見的結合序列 AGGTCA(NR)、specificity protein 1 (Sp1) 及 specificity protein 3 (Sp3)。將三者之關鍵序列突變後，我們發現 Sp1 結合位的突變會降低啟動子 II 的轉錄活性，NR 與 Sp3 結合位的突變則無影響。給予 Sp1 抑制劑 mithramycin A 可顯著降低啟動子 II 的活性，也會抑制乳癌細胞 LRH-1v4 的 mRNA 表現量。已知麩醯胺酸 (glutamine) 對於癌細胞能量來源與細胞增生扮演重要的角色，以 shRNA 抑制 LRH-1 表現後，發現許多麩醯胺酸代謝相關的基因於 MCF7 及 MDA-MB-231 皆顯著降低表現。綜合以上結果，本篇論文發現 LRH-1 於乳癌細胞可藉由啟動子 II 調控，表現 LRH-1v4；且 Sp1 對啟動子 II 的活性很重要。此外，我們發現 LRH-1 可能影響乳癌細胞中麩醯胺酸的代謝。

關鍵字：LRH-1、乳癌細胞、Sp1、麩醯胺酸代謝

Abstract



Liver receptor homolog-1 (LRH-1), a member of nuclear receptor 5A subfamily (NR5A), regulates steroidogenesis, and involves in bile-acid homeostasis and glucose metabolism in liver. LRH-1 also expresses in breast cancer cells, promoting cell proliferation and progression of cancer cells. Previous studies showed that LRH-1 expresses a full-length isoform (LRH-1v1) in liver cells, whereas a shorter isoform (LRH-1v4) is predominantly present in breast cancer cells, which may be regulated by different promoters. The detail of regulating mechanism of LRH-1 expression in breast cancer cells is unclear. In this study, we aim to investigate the transcriptional regulation of LRH-1 in breast cancer cells. We constructed a 2.7 kb DNA fragment from LRH-1v1 promoter I and the potential promoter of LRH-1v4 isoform (promoter II) to analyze their transcriptional activities in human hepatocellular carcinoma (HepG2) and breast cancer cell lines (MCF7, T47D, and MDA-MB-231). Our data reveal that promoter I expresses high activity in HepG2; however, the activity of promoter I was not detected in breast cancer cells. In contrast, the transcriptional activity of promoter II was apparently detected in breast cancer cells but not observed in HepG2. The promoter II deletion analysis showed that the length of 0.2 kb sequence of promoter II had highest activity in breast cancer cells. Three potential binding sequences for nuclear receptor (AGGTCA ,



NR), specificity protein 1 (Sp1), and specificity protein 3 (Sp3) were predicted on 0.2 kb promoter II. Mutation of the Sp1 binding site significantly reduced the activity of promoter II, while mutation of NR and Sp3 binding sites had no effect on promoter II activity. In addition, treatment with Sp1 inhibitor mithramycin A significantly reduces activity of promoter II and also down-regulated levels of LRH-1v4 mRNA in breast cancer cells. Glutamine plays a critical role in energy generation and cancer cells proliferation. We found that knockdown of LRH-1 decreased mRNA levels of several genes involved in glutamine metabolism in breast cancer cells. Overall, our study demonstrated that LRH-1 is potentially regulated by promoter II to express LRH-1v4 in breast cancer cells. Sp1 positively regulates the activity of promoter II. Beside, LRH-1 may involve in process of glutamine metabolism in breast cancer cells.

Key words: LRH-1, breast cancer cells, Sp1, glutamine metabolism

第一章 序論



一、乳癌簡介

1. 概況

乳癌為最常出現於女性的癌症，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 指出 2018 年間有 627,000 位女性因乳癌逝世，約占女性中癌症致死人數的 15% [1]。根據台灣衛生福利部國民健康署的資料，乳癌為台灣女性發生率第一位之癌症，且近幾年的發生率有逐年上升的趨勢。民國 105 年的癌症登記報告顯示，乳癌於女性 10 大癌症死亡率的排名自民國 104 年的第四名上升至第三名 [2, 3]。

2. 分類

乳癌是一種複雜且表現多樣的癌症，可根據組織學、分級、淋巴結狀態及特定的指標來分類，常見的指標有雌性素受器 α (estrogen receptor α , ER α)、黃體固酮受器 (progesterone receptor, PR) 及人類表皮生長因子受器 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)。可將乳癌分成五大類，分化程度從已分化至未分化依序排列為：乳管 A 型 (luminal A)、乳管 B 型 (luminal B)、HER2 過度表現型 (HER2-positive, HER2⁺) 及三陰性乳癌 (triple-negative breast cancer, TNBC；可再細分成類基底細胞型 (basal-like) 及緊密連接蛋白低表現型 (claudin-low))。

Luminal A 相比其他分類的分化程度較高，會表現 ER α (ER-positive, ER⁺) 及 PR (PR-positive, PR⁺)，但不會過度表現表現 HER2 (HER2-negative, HER2⁻)，亦不表現作為細胞增生指標的 Ki-67，細胞間的聯繫緊密且不易轉移 [4-6]。

Luminal B 的表現情況和 luminal A 相似，但 PR 的表現量較低。許多 luminal B 的乳癌細胞會過度表現 HER2。會高度表現 Ki-67 及其他細胞增生相關的基因，因而有較強的細胞增生的能力且預後較 luminal A 差[4, 6-8]。

HER2⁺有過度表現 HER2 的特徵，細胞特性介於乳管細胞和基底細胞之間。會

高度表現 Ki-67 及其他和細胞增生相關的基因，且過度表現 HER2 和降低 ER 的表現量、阻斷細胞之間的連接有關，故和 luminal A、luminal B 相比有更強的轉移能力及較高的侵襲性 [4, 5, 8]。

TNBC 不表現 ER α 、PR 或 HER2 (ER-negative, ER⁻; PR-negative, PR⁻)。因缺乏可應用於治療的目標受器，且 TNBC 的分化程度較低，保有較多幹細胞的特性，侵襲能力高，故 TNBC 為最難治療的乳癌，預後也最差。可再依據 Ki-67 的表現多寡將 TNBC 分成 Ki-67 表現較多的 basal-like 及 Ki-67 表現較少的 claudin-low；其中 basal-like 的細胞特性和基底上皮細胞較相近，而 claudin-low 的緊密連接 (tight junction) 相關的蛋白質表現量較低，反而大量表現上皮細胞間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及腫瘤幹細胞特性相關的基因 [4, 5, 9]。

二、LRH-1 的生理功能

Liver receptor homolog-1 (LRH-1) 參與許多細胞內的生理機制，像是膽固醇運輸、膽酸恆定、類固醇生成等方面的調控。Scavenger receptor type BI (SR-BI) 為高密度脂蛋白 (high-density lipoproteins, HDLs) 的細胞膜受器，可選擇性地將 HDLs 攜帶的膽固醇回收至肝臟，於膽固醇逆向運輸 (reverse cholesterol transport, RCT) 扮演重要角色 [10]。根據 Schoonjans 等人的研究 [11]，LRH-1 會結合至 SR-BI 啟動子，提高 SR-BI 的轉錄活性，且此現象同時出現於人類與小鼠細胞，說明 SR-BI 為 LRH-1 的目標基因。Cholesteryl-ester-transfer protein (CETP) 表現於肝臟、小腸等組織，可將膽固醇酯 (cholesteryl ester) 自 HDLs 轉移至富含三酸甘油脂的脂蛋白，像是極低密度脂蛋白 (very low-density lipoproteins, VLDLs)、中低密度脂蛋白 (intermediate-density lipoproteins, IDLs) 或低密度脂蛋白 (low-density lipoproteins, LDLs)，進而被運送至肝臟乾清除，間接促進 RCT [12]。過去的研究指出 LRH-1 可藉由提升 liver X receptor/retinoid X receptor (LXR/RXR) 表現以促進 CETP 表現 [13]。隸屬於載脂蛋白家族之一的載脂蛋白 M (apolipoprotein M, ApoM) 主要表現

於肝臟及腎臟，為近期才區分出的載脂蛋白。ApoM 是 HDLs 的關鍵結構之一，以附著於 HDLs 為主、少量於 LDLs 或 VLDLs。帶有 ApoM 的 HDLs 可保護 LDLs 被氧化，且其調節膽固醇流出的效率較表面無 ApoM 之 HDLs 更佳 [14, 15]。依據 Venteclef 團隊的發現 [16]，LRH-1 可直接結合於 ApoM 之啟動子，從轉錄層面調控 ApoM 的表現。

將多餘的膽固醇進行膽酸生合成 (bile acid biosynthesis) 是身體移除膽固醇最主要的方式，可通過兩條途徑完成。Cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) 為其中一條途徑中第一個參與的酵素，同時也是該途徑的速率決定步驟，而 cytochrome P450 8B1 (CYP8B1) 則為其後續步驟的關鍵酵素。先前的研究指出兩者皆為 LRH-1 的目標基因 [17, 18]。當膽酸的產量過多時，會透過 farnesoid X receptor (FXR) 促進 small heterodimer partner-1 (SHP-1) 表現，進而抑制 LRH-1 的活性以達到降低 CYP7A1、CYP8B1 表現的目的 [19]。少量的膽酸透過糞便排出體外，其餘大部分的膽酸都會被再吸收，方式之一為通過主動運輸蛋白 apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) 進入迴腸上皮細胞，從底側經 multidrug-resistance protein 3 (MRP3) 進入循環系統，再透過腸肝循環 (enterohepatic circulation) 回歸肝臟維持膽酸的恆定。LRH-1 於此路徑中可調控 ASBT 和 MRP3 之表現 [20, 21]。

除了於肝臟、腸道等組織中調控膽固醇及膽酸代謝，LRH-1 亦表現於性腺、腎上腺等和類固醇生成相關的組織。可和 steroidogenic factor-1 (SF-1) 共同負責調控類固醇生成相關的酵素，參與類固醇荷爾蒙的生成。過去研究證明，若兩基因出現缺陷，皆會嚴重地影響類固醇生成 [22]。生成類固醇的起始步驟為將膽固醇通過粒腺體內膜，為類固醇生成的速率決定步驟，由 steroidogenic acute regulatory protein (StAR) 負責，可受到 LRH-1 的調控 [23]。待膽固醇進入粒腺體內膜後，會經由 cytochrome P450 11A1 (CYP11A1) 負責第一步的催化，Kim 的團隊證明 LRH-1 可調控 StAR 表現後 [24]，又證明 LRH-1 可直接調控 CYP11A1。3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (HSD3B2) 接續 CYP11A1 的作用，為生成黃體素之重要酵素。

Peng 等人的研究指出 [25]，排卵後黃體內 SF-1 的表現量會降低，而 LRH-1 於黃體內會高度表現，可頂替其功能，促進 HSD3B2 表現。芳香酶 (aromatase) 又稱 cytochrome P450 19A1 (CYP19A1)，是將雄性素轉換成雌性素的關鍵酵素。其啟動子具有組織特異性，由不同的轉錄因子控制，LRH-1 可於性腺活化其啟動子 II (promoter II) [26]。過去 Clyne 的團隊發現 LRH-1 會表現於正常乳房脂肪組織中的前脂肪細胞 (preadipocyte) [27, 28]，活化 aromatase 的啟動子 II 以調控 aromatase 表現，並隨著脂肪細胞的分化、成熟而減少，為 preadipocyte-specific 的轉錄因子。正常的成熟脂肪細胞以啟動子 I.4 (promoter I.4) 為主，啟動子活性不高；但在乳癌細胞及其周圍之脂肪細胞會表現 LRH-1，經前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 誘發而活化啟動子 II，強烈提高 aromatase 表現。

將 LRH-1 進行基因剔除，結果 *Lrh-1*^{-/-} 之小鼠於胚胎期的 6.5 至 7.5 天即因嚴重的發育缺陷而死亡，說明 LRH-1 於胚胎發育亦扮演重要角色，且其於發育過程中負責的功能無法由 SF-1 取代 [29]。

三、LRH-1 的結構與調控

1. LRH-1 的結構

LRH-1 由 *NR5A2* 基因所轉錄，此基因位於染色體 1 號的 q32.11。LRH-1 是一種轉錄因子，為孤兒受器，並和 SF-1 (來自 *NR5A1* 基因) 共同分屬於細胞核受器家族的 5A 分支 [17]。不同於許多細胞核受器會以同型二聚體或異型二聚體的形式和 DNA 結合，LRH-1 是以單體的形式結合於目標基因的啟動子，其保守序列為 5'-YCAAGGYCR-3' [30-32]。先前 Sablin 的研究指出 [33]，在沒有受器存在的情況下 LRH-1 仍可維持活化狀態的構型，有持續活化的轉錄活性；而 Krylova 的研究說明磷脂肌醇 (phosphatidyl inositols) 可做為配體調控 LRH-1 的轉錄活性 [34]。

LRH-1 為細胞核受器，有保守的蛋白結構 (圖一)，包括 A/B 結構域，此區域有最多變的大小及序列；高度保守的 DNA 結合域 (DNA-binding domain, DBD，

又稱 C 結構域)，由兩個鋅指 (zinc finger) 構成，是最為保守的區域，負責和 DNA 上的保守序列結合；配體結合域 (ligand-binding domain, LBD, 又稱 E 結構域)，此區由 12 個保守的 α 螺旋 (α -helix) 組成，包含依賴配體的 activation function-2 (AF-2)，可和輔活化物 (coactivator) 進行交互作用；以及 D 結構域，作為連接 C 結構域及 E 結構域的樞紐，結構靈活。此外，LRH-1 所屬的 NR5A 家族，在 C 結構域的 C 端另有作為此家族特徵的序列，Ftz-F1 box，從果蠅至人類高度相似，為高度保守的序列 [17]。

2. LRH-1 的異構物

至今已發現五種 LRH-1 蛋白異構物，如圖一。最長的異構物為 LRH-1v1；第二種為缺失 exon 2 的 hLRH-1，影響 A/B 結構域；第三種異構物 LRH-1v2 同時缺失 exon 2 及 exon 5，影響 A/B、D 及 E 結構域，無轉錄活性。三者是由選擇性剪接 (alternative splicing) 形成 [17]。Thiruchelvam 等人於乳癌細胞株 MCF7 又發現了另外兩種 LRH-1 蛋白異構物 [35]，命名為 LRH-1v4 及 LRH-1v5。作者發現兩者皆僅改變 A/B 結構域，且 LRH-1v4 的轉錄起始位置 (transcription start site, TSS) 位於 intron 1，LRH-1v5 的 TSS 則位於 intron 2。因兩者之 cDNA 皆包括 intron 序列，說明 LRH-1v4 及 LRH-1v5 可能是由不同於 LRH-1v1 的啟動子所調控，其中 LRH-1v4 為乳癌細胞主要表現的異構物。除此之外，Kawabe 的團隊證明 LRH-1v4 會表現於 KGN (人類卵巢顆粒細胞株) [36]。

Zhang 等人證明 LRH-1v1 的啟動子於肝臟有強烈的轉錄活性 [37]，包括許多肝臟特有的轉錄因子結合序列，如 hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1)、hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3，尤其是 HNF3 β)。Annicotte 等人則在 LRH-1v1 的啟動子序列上發現 ER α 的結合位 [38]，調控 LRH-1 表現。Kawabe 的團隊指出 LRH-1v4 啟動子上具有 SF-1 及 GC box 的結合位 [36]，且 LRH-1v4 的啟動子於 KGN 有高轉錄活性，但不表現於 HepG2 (人類肝癌細胞株)，說明 LRH-1 可利用不同的啟動子展現組織特異性。




3. 轉譯後修飾 (post-translational modifications)

至今有許多研究已證明 LRH-1 的活性可經由接上磷酸根、泛素 (ubiquitin)、small ubiquitin-like modifier (SUMO) 等轉譯後修飾而改變 [39]。將 LRH-1 之 D 結構域上的絲氨酸 238 及絲氨酸 243 磷酸化可提高 LRH-1 的轉錄效率 [40]。Ubiquitin-proteasome system (UPS) 可藉由蛋白酶體 (proteasome) 降解以特定形式之泛素長鏈標記的蛋白質 [41]；其中 cullin 4 (CUL4) 是 cullin 家族的一員，和 regulator of cullins 1 (ROC1)、DNA damage binding-protein 1 (DDB1) 及能辨認特定目標的 CUL4-DDB1 associated factors (DCAFs) 組成泛蛋白連接酶 (ubiquitin-protein ligase, E3)，標定目標蛋白 [42]。DNA damage-binding protein 2 (DDB2) 能作為 DCAF 辨認 LRH-1，導致 LRH-1 降解以調控其穩定性 [43]。當 LRH-1 和 SUMO 共價連結，會造成 LRH-1 累積於細胞核內的 promyelocytic leukemia protein nuclear bodies (PML-NBs)，阻斷 LRH-1 的轉錄活性 [44, 45]。另外，SUMO 化的 LRH-1 會影響聚集過來之輔助調節因子，改變 LRH-1 的調控模式 [46]。

4. 輔助調節因子 (co-regulators)

到目前為止已發現許多具有組織特異性的輔活化物 (coactivator) 及輔抑制物 (corepressor) 可調控 LRH-1 的轉錄活性 [39]。Safi 的團隊證明 peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) 可作為 LRH-1 的輔活化物 [47]，於前脂肪細胞和 LRH-1 的 AF-2 結合並促進 aromatase 表現，亦可於卵巢顯著增強 LRH-1 及 SF-1 的轉錄，參與調控類固醇生成相關的基因。此外，Yazawa 的團隊還發現 PGC-1 α 增加 LRH-1 及 SF-1 轉錄活性的現象會被 dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (Dax-1) 抑制 [48]。PGC-1 α 亦和 LRH-1 調控肝臟的膽酸恆定有關，促進 LRH-1 對 CYP7A1 的基因表現；此現象會受到 SHP 的負向控制，抑制 PGC-1 α 聚集於 CYP7A1 的啟動子序列上 [49]。


Dax-1 為非典型的細胞核受器，可和 LRH-1 的 E 結構域結合 [50]。主要表現



於性腺及胚胎幹細胞 (embryonic stem cell, ES cell) [39]。Dax-1 於人類的卵巢顆粒細胞 (ovarian granulosa cell) 會抑制 LRH-1 調控 HSD3B2 [25]。Ahn 等人證明給予小鼠的萊氏細胞 (Leydig cell) 胰島素 (insulin) 可刺激 Dax-1 表現 [51]，再透過 Dax-1 抑制 LRH-1 的作用，降低 LRH-1 所調控的類固醇生成。另外在乳癌細胞株 MCF7 中，受配體活化的雄性素受器 (androgen receptor, AR) 可直接促進 Dax-1 表現，進而抑制 LRH-1 對 aromatase 的調控以減少雌性素的生成，減緩癌細胞的增生 [52]。在胚胎發育的層面，Kelly 的團隊證實 Dax-1 會表現於小鼠的胚胎幹細胞 (mouse embryonic stem cell, mES cell) [53]。和 steroid receptor RNA activator (SRA) (為一種長鏈非編碼核糖核酸 (long noncoding RNA, lncRNA)，可作為細胞核受器的輔活化物) 共同促進 LRH-1 對 octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) 的轉錄調控，維持 mES cell 的多能性 (pluripotency) [54]。

SHP 和 Dax-1 一樣為非典型的細胞核受器，在肝臟及腸道中會大量表現，負責調控膽酸合成及膽固醇的恆定，可結合於 LRH-1 的 AF-2 [39]。膽酸合成的回饋抑制由 FXR (作為膽酸受器)、LRH-1 及 SHP 共同完成。受膽酸活化的 FXR 可佔據 SHP 啟動子序列上之 inverted repeat-1 (IR-1) 及 LRH-1 結合位 (不依賴 LRH-1)，促進 SHP 表現。SHP 除了抑制 LRH-1 對 CYP7A1 的調控，同時亦進行自身的回饋抑制 [55, 56]。小鼠及人類的 SHP 皆可和其他輔活化物競爭 LRH-1 的 AF-2 結合位，像是 p160 及 PGC-1 α ；且 SHP 的 C 端結構具有自主抑制的特性，可在不影響結合的情況下直接抑制 LRH-1 之轉錄活性 [57]。此外 Zhang 等人的研究發現 SHP 參與細胞增生相關的調控 [58]，*SHP*^{-/-}小鼠的肝細胞會強烈的增生，過度表現 SHP 可回復此現象。進一步他們證明其機制為 SHP 抑制 LRH-1 的轉錄活性來降低 cyclin D1 表現，說明 SHP 具有抑制腫瘤生長的功能。He 的研究顯示 SHP 於肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 會因啟動子被高度甲基化而大幅降低 [59]，應證 SHP 於癌症發展的抑制作用。

已知雄性素對卵巢功能的調控扮演重要角色 [60]。Wu 等人以大鼠的初代顆粒




細胞 (primary granulosa cell) 為研究對象 [61, 62]，發現睪固酮 (testosterone) 和 AR 結合後會促使 AR 直接連結至 LRH-1 啟動子，誘發 LRH-1 及下游 aromatase、CYP11A1 表現。睪固酮可經 5 α 還原酶 (5 α -reductase) 轉化成更強效的雄性素，二氫睪固酮 (dihydrotestosterone, DHT)；經 aromatase 轉化成雌性素，作者證明此現象並非由轉化成的 DHT 或雌性素導致。此外 DHT 不會促進 LRH-1 表現，反而會抑制睪固酮提高 LRH-1 表現的作用。因睪固酮可提高 aryl hydrocarbon receptor (AHR) 表現，誘導 AHR 和 AR 形成複合體以促進 LRH-1 的轉錄，說明此差異是由於聚集不同的輔助調節因子所致。

四、LRH-1 於癌症的作用

LRH-1 和癌症有密切的關係，像是增強癌細胞的增生及進程，於多種癌症扮演重要角色 [63]。LRH-1 高度表現於控制細胞增生及更新之腸隱窩 (intestinal crypts)，促進 cyclin E1 表現；此調控可被 β 鏈蛋白 (β -catenin) 加強，且 LRH-1 作為 β -catenin 的輔助活化物，會參與調控 cyclin D1，促使腸道上皮細胞增生 [64]。將 LRH-1 進行基因靜默 (gene silencing) 會由於細胞週期之 G₀/G₁ 階段的延長而減少細胞增生 [65]，故 LRH-1 被認為和結腸癌的形成有關 [66]。Benod 的團隊證明 LRH-1 在胰臟癌細胞中的表現量是正常細胞的 30 倍 [67]，阻斷 LRH-1 會降低和細胞生長、增生及分化相關的 LRH-1 目標基因表現，並顯著抑制癌細胞增生，說明 LRH-1 參與胰臟癌的進程。若於胰臟癌細胞中過度表現 LRH-1，則會大幅提高癌細胞轉移、侵入的情況，顯示 LRH-1 可增強癌細胞的侵略性 [68, 69]。另外，近期的研究發現 LRH-1 於去勢療法無效前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) 可提高類固醇生成相關酵素的轉錄活性，促進雄性素的合成以活化 AR 的訊息傳遞路徑 [70]。

約 75% 的乳癌細胞為 ER⁺ [71]，可執行雌性素相關反應，對乳癌細胞的生長非常重要 [72]。LRH-1 的目標基因 aromatase，因其將雄性素轉化為雌性素的特性，



於乳癌細胞中扮演重要角色。正常的脂肪組織使用 promoter I.4 低表現 aromatase；但在乳癌及周邊的脂肪組織中 LRH-1 大量表現並提高 promoter II 的轉錄活性，使 aromatase 的表現以乳癌細胞為中心向外側的脂肪組織遞減 [28]。過去研究顯示 LRH-1 為 ER α 的目標基因 [38]，而 LRH-1 亦可聚集於 ER α 的啟動子，調控 ER α 表現 [35]。此外，LRH-1 可佔據 ER α 的結合位，促進 ER α 的目標基因表現 [72]；Chand 的團隊亦證實 LRH-1 可和 ER α 共同結合於 ER α 結合位 [73]，促進 ER α 的目標基因表現，像是 growth regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB1)。作者證明 LRH-1 於 MCF7 可結合至 GREB1 啟動子上的三個 ER α 結合位，協助調控 GREB1 以促進乳癌細胞增生，證明 LRH-1 可於乳癌細胞和 ER α 合作，強化雌性素相關的反應。除了促進乳癌細胞的增生及疾病進程，LRH-1 還會參與上皮細胞間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)，誘發乳癌的移動及侵入，且同時出現於 MCF7 (屬於 ER $^{+}$)、MDA-MB-231 (屬於 ER $^{-}$) 及 MCF-10A (正常乳腺細胞)，說明此作用並非依賴於雌性素 [63]。

LRH-1 於肝臟除了參與膽固醇、膽酸的恆定外，亦可調控葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK)，於葡萄糖及脂肪代謝扮演重要角色 [74]。然而癌化之細胞不論於有氧或無氧的環境，皆減緩有氧代謝的運作，轉而進行糖解作用 (glycolysis)，此即著名之瓦氏效應 (Warburg effect) [75]。此時細胞可透過代謝麩醯胺酸 (glutamine) 產生 α 酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG)，再進入三羧酸循環 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 補足能量及細胞生合成的需求 [76, 77]。Xu 等人透過肝細胞專一性剔除 LRH-1 (*Lrh-1^{hep-/-}* mice) 之小鼠肝癌模式，發現 LRH-1 可促進 glutaminase 2 (GLS2) 表現 [78]，參與麩醯胺酸的代謝；且此調控和 GCK 的活化路徑無關。LRH-1–GLS2 路徑可進而活化 mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)，促進細胞的增生。證明 LRH-1 於肝癌細胞亦和能量代謝有關，並藉由調控麩醯胺酸代謝參與肝臟之腫瘤生成。

五、研究目的

LRH-1 於細胞代謝的層面扮演重要的角色 [74]，可於肝臟表現全長的異構物 (LRH-1v1) [43]。過去有文獻指出 LRH-1 會表現於乳癌細胞 [28, 79]，且於乳癌細胞主要表現的異構物 (LRH-1v4) 可能是由不同的啟動子所調控 [35]，但其詳細的調控機制尚未清楚。本篇研究想探討 LRH-1 於乳癌細胞的轉錄調控，及其在麩醯胺酸代謝可能扮演的角色。

研究目標如下：

1. 分析 LRH-1 於乳癌細胞的表現型式
2. 研究 LRH-1 於乳癌細胞表現的調控機制
3. 探討 LRH-1 於乳癌細胞是否參與麩醯胺酸代謝的調控

第二章 材料與方法



一、細胞培養

1. HepG2 細胞株

人類肝癌細胞株。細胞培養液為 MEM (Minimum Essential Media) (Thermo Fisher Scientific), 含有 10% fetal bovine serum (FBS) (Biological Industries)、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific)、1% sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific) 及 1% MEM non-essential amino acid (Thermo Fisher Scientific), 培養於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱。

2. MCF7 細胞株

人類乳腺癌細胞株。細胞培養液為 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Thermo Fisher Scientific), 含有 10% FBS、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 及 1% sodium pyruvate, 培養於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱。

進行給予 17β-estradiol (E2) 的實驗之前, 細胞培養 3 天於 phenol red-free DMEM (Thermo Fisher Scientific), 含有 5% charcoal-stripped FBS (由國立台灣大學醫學院生理學研究所蘇慧敏老師提供)、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 及 1% sodium pyruvate。給予前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 的實驗, 則事先將細胞培養於不含 10% FBS 的培養液中 24 小時。

3. T47D 細胞株

人類乳腺癌細胞株。細胞培養液為 DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific), 含有 10% FBS 及 100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin, 培養於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱。

4. MDA-MB-231 細胞株

人類乳腺癌細胞株。共使用兩種細胞培養液：第一種細胞培養液為 L-15

(Corning), 含有 10% FBS、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 及 1% sodium pyruvate, 培養於 37°C、0% CO₂ 細胞培養箱; 第二種細胞培養液為 DMEM, 含有 10% FBS、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 及 1% sodium pyruvate, 培養於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱。

給予前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 的實驗之前, 事先將細胞培養於不含 10% FBS 的培養液中 24 小時。

5. HEK293T 細胞株

人類胚胎腎臟細胞株。細胞培養液為 DMEM, 含有 10% FBS 及 100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin, 培養於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱。

二、藥品

表一、藥品

Name	Manufacturer	Solvent	Stock Conc.
17β-estradiol (E2) *	Steraloids Inc.	Ethanol	10 mM
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Cayman chemical	Ethanol	1 mM
Mithramycin A (Mith A)	Cayman chemical	DMSO	100 µM

*由國立台灣大學醫學院生理學研究所蘇慧敏老師提供。

三、質體

1. pcDNA3-FLAG

帶有 FLAG 標籤之載體。

2. pFLGA-hLRH-1

由巨細胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 啟動子驅動, 表現帶有 FLAG 標籤之人類 LRH-1 全長蛋白 [43]。



3. pFLAG-mLRH-1

由巨細胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 啟動子驅動，表現帶有 FLAG 標籤之小鼠 LRH-1 全長蛋白 [80]。

4. pGL3[Luc⁺]-Basic

帶有螢火蟲冷光酶 (*Photinus pyralis*) 標籤之載體。

5. pGL4.10[Luc2]-Basic

帶有螢火蟲冷光酶 (*Photinus pyralis*) 標籤之載體，由國立台灣大學醫學院第一共同研究室生醫資源中心提供。

6. phLRH-1pI 2.7k-Luc

取人類 *NR5A2* 基因前方約 2700 個鹼基序列作為啟動子，構築於 pGL3[Luc⁺]-Basic 上，由本實驗室楊豐名學長建構。

7. phLRH-1pII 2.7k-Luc

此質體委託國立台灣大學醫學院第一共同研究室生醫資源中心建構。擷取人類 *NR5A2* 基因之 intron 1 上約 2700 個鹼基序列，以 *NheI-HindIII* 嵌入 pGL4.10[Luc2]-Basic 中。

8. phLRH-1pII 1k-Luc

以 phLRH-1pII 2.7k-Luc 為模板，藉由聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 放大 *NR5A2* 基因之 intron 1 約 1000 個鹼基序列，將此 PCR 產物和 TA 載體 (RBC Bioscience) 連接。經過定序確認序列後，以 *NheI-HindIII* 切下並接合於 pGL4.10[Luc2]-Basic 之 *NheI-HindIII* 位置。

PCR 使用之配對引子：

Primer	Sequence
Forward	5'-TTCC <u>gctagc</u> TCTATGAGTGAG-3' *
Reverse	5'-GATTGCC <u>aagctt</u> ATCCGTG-3' #



*小寫字母為 *NheI* 的辨認序列。

#小寫字母為 *HindIII* 的辨認序列。

9. phLRH-1pII 0.5k-Luc

以 phLRH-1pII 2.7k-Luc 為模板，由 PCR 反應放大 *NR5A2* 基因之 intron 1 約 500 個鹼基序列，將此 PCR 產物和 TA 載體連接。經過定序確認序列後，以 *NheI*-*HindIII* 切下並接合於 pGL4.10[*Luc2*]-Basic 之 *NheI*-*HindIII* 位置。

PCR 使用之配對引子：

Primer	Sequence
Forward	5'- ATGG <u>gctagc</u> TTACCTCCTTCT-3' *
Reverse	5'-GATTGCC <u>aagctt</u> ATCCGTG-3' #

*小寫字母為 *NheI* 的辨認序列。

#小寫字母為 *HindIII* 的辨認序列。

10. phLRH-1pII 0.2k-Luc

以 phLRH-1pII 2.7k-Luc 為模板，由 PCR 反應放大 *NR5A2* 基因之 intron 1 約 200 個鹼基序列，將此 PCR 產物和 TA 載體連接。經過定序確認序列後，以 *NheI*-*HindIII* 切下並接合於 pGL4.10[*Luc2*]-Basic 之 *NheI*-*HindIII* 位置。

PCR 使用之配對引子：

Primer	Sequence
Forward	5'- TACTA <u>gctagc</u> GGCAATAGCAG-3' *
Reverse	5'-GATTGCC <u>aagctt</u> ATCCGTG-3' #

*小寫字母為 *NheI* 的辨認序列。

#小寫字母為 *HindIII* 的辨認序列。

11. phLRH-1pII mNR-Luc

以 phLRH-1pII 0.5k-Luc 為模板，將啟動子 II 上 nuclear receptor (NR) 結合序列



AGGTCA 進行突變。

PCR 使用之配對引子：

Primer	Sequence
Forward	5'-CCTCCTTTTTTAACCC <u>cGAaaTC</u> CCTCCTCGCAGCTTGG-3'
Reverse	5'-CCAAGCTGCGAGGAGG <u>AttTCg</u> GGGTAAAAAAGGAGG-3'

12. phLRH-1pII mSp1-Luc

以 phLRH-1pII 0.5k-Luc 為模板，將啟動子 II 上 specificity protein 1 (Sp1) 的關鍵序列進行突變。

PCR 使用之配對引子：

Primer	Sequence
Forward	5'-CTCCTCGCAGCTTGG <u>GaatGG</u> CTCCGGAGCTGCGAGAC-3'
Reverse	5'-GTCTCGCAGCTCCGGAG <u>CCatt</u> CCCAAGCTGCGAGGAG-3'

13. phLRH-1pII mSp3-Luc

以 phLRH-1pII 0.5k-Luc 為模板，將啟動子 II 上 specificity protein 3 (Sp3) 的關鍵序列進行突變。

PCR 使用之配對引子：

Primer	Sequence
Forward	5'-CAGAGGTCCTGCCCC <u>GCAattCC</u> GAGGAGGCGGAGGCAC-3'
Reverse	5'-GTGCCTCCGCCTCCTC <u>GgaatTG</u> CGGGCAGGACCTCTG-3'

14. phLRH-1pII mNR+Sp1-Luc

以 phLRH-1pII mSp1-Luc 為模板，將啟動子 II 上 NR 結合序列 AGGTCA 進行突變；使用之 PCR 配對引子同 phLRH-1pII mNR-Luc。

15. phLRH-1pII mNR+Sp3-Luc

以 phLRH-1pII mSp3-Luc 為模板，將啟動子 II 上 NR 結合序列 AGGTCA 進行



突變；使用之 PCR 配對引子同 phLRH-1pII mNR-Luc。

16. phLRH-1pII mSp1+Sp3-Luc

以 phLRH-1pII mSp3-Luc 為模板，將啟動子 II 上 Sp1 的關鍵序列進行突變；

使用之 PCR 配對引子同 phLRH-1pII mSp1-Luc。

17. phLRH-1pII mN+1+3-Luc

以 phLRH-1pII mSp1+Sp3-Luc 為模板，將啟動子 II 上 NR 結合序列 AGGTCA 進行突變；使用之 PCR 配對引子同 phLRH-1pII mNR-Luc。

18. pGL4.74[*hRLuc*/TK]

啟動子為皰疹病毒胸腺嘧啶激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)，表現水母冷光酶 (*Renilla reniformis*) (Promega)。

四、定點突變聚合酶連鎖反應 (Site-directed mutagenesis)

以質體 DNA 為模板，設計順式及逆式引子，以 *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent) 進行聚合酶連鎖反應 (PCR) [95°C 1 分鐘 → (95°C 30 秒 → 55°C 1 分鐘 → 68°C 6 分鐘)*19 循環 → 68°C 7 分鐘]。結束後將 1 μ L *DpnI* (10 U/ μ L) 加入 PCR 產物，放置 37°C 1 小時後再加 0.5 μ L *DpnI*，於 37°C 作用 30 分鐘。將此 DNA 依說明書上的步驟轉型至 JM109 勝任細胞 (RBC Bioscience)，挑選出含有目標突變之載體後經定序確認序列。

PCR 使用之反應試劑：

Reagent	50 μ L / reaction
DNA	50 ng
dNTP (10 mM)	1 μ L
Forward primer (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer (10 μ M)	1 μ L

10x <i>PfuUltra</i> II reaction buffer	5 µL
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS DNA polymerase	1 µL
ddH ₂ O	Add to 50 µL



五、蛋白質萃取

移除細胞培養液後直接將 50 µL RIPA buffer 加入 12 孔細胞培養盤，冰上靜置 15 分鐘。將細胞刮下並收集於 1.5 mL 微量離心管，以 15000 rcf 於 4°C 下離心 30 分鐘，取上清液至另一乾淨 1.5 mL 微量離心管，保存於 -20°C。

RIPA buffer：

Reagent	Final Concentration
Sodium chloride (NaCl)	150 mM
NP-40	1.0%
Sodium deoxycholate	0.5%
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.1%
Tris (pH 8.0)	50 mM
EDTA	5 mM
EGTA	1 mM
使用前加入	
DTT	5 mM
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	2 mM
Leupeptin	10 µg/mL



六、西方墨點法 (Western blot)

1. 蛋白樣本製備

使用 T-Pro Bradford protein assay kit (T-Pro Biotechnology) 檢測蛋白樣本的濃度，取 10 μ g 細胞萃取液和 4x 樣本緩衝液配成總體積為 10 μ L 的蛋白樣本，混和均勻後煮沸 10 分鐘，完成後即可上樣。

4x 樣本緩衝液：

Reagent	50 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	20 mL
Glycerol	20 mL
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	4 g
Bromophenol blue	0.05 g
β -mercaptoethanol (β -ME)	5 mL
ddH ₂ O	5 mL

2. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)

製作 9% 聚丙烯醯胺膠體，待膠體完全凝固後，組裝於電泳槽中，將 1x SDS 電泳緩衝液裝滿內槽，以 70 伏特的電壓進行預跑。之後再把準備好的蛋白樣本全部注入膠體上的孔槽，在室溫中全程於 70 伏特的電壓下分離蛋白樣本。

1x SDS 電泳緩衝液：

Reagent	Final concentration
Tris	25 mM
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.1%
Glycine	192 mM
EDTA	2 mM



3. 轉漬 (Transfer)

裁剪適當大小的聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (Bio-Rad)，完全浸泡於 100% methanol (Sigma-Aldrich) 1 分鐘以活化 PVDF 膜，再用 ddH₂O 清洗。接著將聚丙烯醯胺膠體、PVDF 膜、濾紙及海綿組裝於濕式轉漬槽 (Bio-Rad)，槽內注滿轉漬緩衝液，在低溫環境下以 250 毫安培固定電流轉漬 2 小時。

轉漬緩衝液：

Reagent	Final concentration
Tris	25 mM
Glycine	192 mM
Methanol	20%

4. 抗體反應

完成轉漬後，根據欲觀察的蛋白質位置，裁剪 PVDF 膜成適當大小浸泡於 Blocking One (nacalai tesque) 中，以 50 rpm 的速度室溫作用 1 小時，移除 Blocking One 溶液後用 TBST 緩衝液潤洗一次。以含有 5% Blocking One 的 TBST 溶液配製初級抗體，加入潤洗過後的 PVDF 膜，移入 4°C 冷房，搖速 50 rpm 作用一晚。

回收初級抗體後，室溫下以 100 rpm 的搖速用 TBST 緩衝液清洗 PVDF 膜 1 小時，過程中每 20 分鐘更換一次 TBST 緩衝液。以含有 5% Blocking One 的 TBST 溶液配製次級抗體，加入清洗過後的 PVDF 膜，搖速 50 rpm 室溫作用 1 小時。移除二級抗體後在室溫、100 rpm 的速度下，用 TBST 緩衝液清洗 PVDF 膜，每 5 分鐘更換一次 TBST 緩衝液，重複 2~3 次。

均勻地將冷光反應試劑淋於 PVDF 膜，透過冷光影像處理系統 (BioSpectrum 815, UVP) 偵測冷光訊號。

TBST 緩衝液：

Reagent	Final concentration
NaCl	125 mM

Tris-HCl (pH 7.5)	25 mM
Tween 20	0.1%



表二、初級抗體

Antibody	Host	Manufacturer	Catalog	Dilution
LRH-1	Rabbit	Proteintech	22460-1-AP	1:1000
NR5A2 (L-15)	Goat	Santa Cruz	sc-5995	1:1000
FLAG M2	Mouse	Sigma-Aldrich	F1804	1:1000
GAPDH	Mouse	Merck Millipore	MAB374	1:10000

表三、次級抗體

Antibody	Manufacturer	Dilution
HRP-Conjugated goat anti-rabbit IgG	Jackson	1:10000
HRP-Conjugated goat anti-mouse IgG	Jackson	1:10000
HRP-Conjugated donkey anti-goat IgG	Jackson	1:10000

表四、冷光反應試劑

Chemiluminescent HRP substrate	Manufacturer	Catalog
Trident femto Western HRP Substrate	GeneTex	GTX14698
Chemi-Lumi One Super	Nacalai	02230-30

七、RNA 萃取

移除 6 孔細胞培養盤內的細胞培養液後直接加入 1 mL RNA Isolation Reagent (LIGHT Biotech)，冰上靜置 2 分鐘，收集於 1.5 mL 微量離心管，再加入 200 μ L chloroform (Sigma-Aldrich)，劇烈的連續震盪 15 秒，隨即在 4°C 下以 15000 rcf 離

心 15 分鐘。離心後小心地吸取 400 μL 上清液至新的 1.5 mL 離心管，加入 500 μL isopropanol (Sigma-Aldrich) 並放入 -20°C 過一夜。

4°C 下以 15000 rcf 離心 15 分鐘沉澱 RNA，慢慢倒空上清液後加入 500 μL 以 DEPC 水稀釋之 70% ethanol 清洗 RNA，在 4°C 下以 15000 rcf 離心 5 分鐘，重複此清洗步驟一次。接著小心地移除上清液，於無菌操作台內抽風 15 分鐘使 RNA 之沉澱風乾，再以 20~40 μL DEPC 水回溶 RNA，即可保存於 -20°C 冰箱；透過微分子定量分析儀 (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific) 測量 RNA 濃度。

八、即時性反轉錄聚合酶連鎖反應 (Real-time RT-PCR)


以 Magic RT Mastermix cDNA synthesis kit (Biogenesis) 將 1 μg 萃取之 RNA 進行反轉錄，於 37°C 作用 1 小時合成 cDNA，再提高溫度至 85°C 作用 5 分鐘終止反應，將合成的 cDNA 產物保存於 -20°C 冰箱。

RT 使用之反應試劑：

Reagent	20 μL / reaction
RNA	1 μg
2x Magic RT Mastermix	10 μL
RT enzyme	0.5 μL
DEPC-ddH ₂ O	Add to 20 μL

取 1 μL cDNA 產物 (50 ng/ μL) 和配對引子、SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 配成總體積 20 μL 的 cDNA 樣本並混和均勻，每份樣本皆以二重複上機。透過 StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) 執行即時性聚合酶連鎖反應分析，其反應條件為： 95°C 10 分鐘 \rightarrow (95°C 15 秒 \rightarrow 60°C 1 分鐘)*40 次循環 \rightarrow 95°C 15 秒 \rightarrow 60°C 1 分鐘 \rightarrow 95°C 15 秒。

Real-time PCR 使用之反應試劑：



Reagent	20 μ L / reaction
SyBr green	10 μ L
cDNA (1:5 dilution)	5 μ L
Forward primer (5 μ M)	1 μ L
Reverse primer (5 μ M)	1 μ L
ddH ₂ O	3 μ L

表五、Real-time PCR 使用之配對引子

Primer	Sequence (for Human)	Final Conc.
GAPDH	F: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'	250 nM
	R: 5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3'	
LRH-1 e5	F: 5'-TGCCCTCTGACCTGACCATT-3'	250 nM
	R: 5'-CATGGTTCAGAGGTAGGCCTTT-3'	
LRH-1 v1	F: 5'-TGATGTGTCCTTCCCAAGGC-3'	250 nM
	R: 5'-CAATAGGTGTAAGTCCGTGCT-3'	
LRH-1 v4	F: 5'-TTCGCCGGAGTTGAATCTG-3'	250 nM
	R: 5'-ACTTTGGGCAGCATGACA-3'	
DHFR	F: 5'-TAAACTGCATCGTCGCTGTGT-3'	250 nM
	R: 5'-GGGCAGGTCCCCGTTCT-3'	
pS2	F: 5'-CATGGAGAACAAGGTGATCTG-3'	250 nM
	R: 5'-CAGAAGCGTGTCTGAGGTGTC-3'	
CYP19A1	F: 5'-ACCCTTCTGCGTCGTGTCA-3'	250 nM
	R: 5'-TCTGTGGAAATCCTGCGTCTT-3'	
SLC1A5	F: 5'-CCGCTTCTTCAACTCCTTCAA-3'	250 nM
	R: 5'-ACCCACATCCTCCATCTCCA-3'	

GLS	F: 5'-GCTGTGCTCCATTGAAGTGA-3'	250 nM
	R: 5'-GCAAAGTGCCTGAGAAGTC-3'	
GLS2	F: 5'-ATCAGAAAGTGGCATGCTGT-3'	250 nM
	R: 5'-GCCTTTAGTGCAGTGGTGAA-3'	
GLUD1	F: 5'-AGCTTTGGCTTCTCTGATGACAT-3'	250 nM
	R: 5'-ACCCCCAAACGGCACAT-3'	
GLUL	F: 5'-CCTGCTTGTATGCTGGAGTC-3'	250 nM
	R: 5'-GATCTCCCATGCTGATTCCT-3'	
ChREBP	F: 5'-GACTCGTCCGCTGTCTTTGG-3'	250 nM
	R: 5'-CCCCATCCCCATTTTGC-3'	



九、冷光酵素活性分析 (Luciferase assay)

於 24 孔細胞培養盤種 9.5×10^4 細胞，培養過夜後更換細胞培養液，每格加入 500 μ L 培養液。將 1 μ g 建構之質體及 5 ng 表現珊瑚冷光酶 (*Renilla luciferase*) 之質體，和 *TransIT-X2*[®] Transfection Reagent (Mirus) 混和，配成總體積 50 μ L 的混和液，室溫靜置 15 分鐘後將此混和液加入細胞培養液中。

轉染後培養一天，移除細胞培養液後加入 100 μ L lysis buffer，冰上靜置 10 分鐘。收集細胞裂解液於 1.5 mL 微量離心管，4000 rcf 離心 20 秒沉澱細胞碎片。取 25 μ L 上清液至白色的 96 孔細胞培養盤，做二重複；其中一重複在避光的情況下每格加 25 μ L Dual-Glo[®] Luciferase Assay Reagent (Promega)，另一重複同樣在避光情況下每格加 25 μ L Renilla-Glo[®] Luciferase Assay Reagent (Renilla-Glo[®] Luciferase Assay Substrate 與 Renilla-Glo[®] Luciferase Assay Buffer 以 1:100 之比例混和) (Promega)。以迴轉式震盪器震盪 30 rpm 10 分鐘，再移入冷光儀 (Orion II Microplate Luminometer, Berthold) 測量螢火蟲及水母冷光酶之活性。

質體 DNA 與轉染試劑：



DNA	Per 24-well plate
Plasmid	1 μ g
pGL4.74 [<i>hRLuc</i> /TK]	5 ng
Serum-free medium	Add to 25 μ L

Transfection reagent	Per 24-well plate
<i>TransIT</i> -X2 [®] Transfection Reagent	2 μ L
Serum-free medium	Add to 25 μ L

Lysis buffer :

Reagent	100 mL
1 M K ₂ HPO ₄	9.08 mL
1 M KH ₂ PO ₄	0.92 mL
10% Triton X-100	2 mL
ddH ₂ O	88 mL

十、 shRNA knockdown

將 1.75×10^5 HEK293T 種於 12 孔細胞培養盤，讓細胞生長過夜後更換細胞培養液，每格加入 1 mL 培養液。將 jetPRIME[®] *in vitro* DNA & siRNA transfection reagent (Polyplus-transfection) 及質體分別配置於其專屬之緩衝液中，各補體積至 50 μ L。將兩者混和後室溫靜置 15 分鐘，隨即將 100 μ L 混和液全部加入細胞培養液。轉染 6 小時後，更換 HEK293T 的細胞培養液為 1 mL 含有 1% Bovine Serum Albumins (BSA) (Sigma-Aldrich) 之細胞培養液，再繼續培養於 37°C、5% CO₂ 之細胞培養箱。同天種 1.3×10^5 MCF7 或 MDA-MB-231 於 12 孔細胞培養盤，同樣置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱過夜。

轉染 24 小時後，收集含有 lentivirus 之 1 mL HEK293T 細胞培養液於乾淨 1.5

mL 微量離心管，3000 rcf 離心 3 分鐘以沉澱細胞碎片。取上清液加入 1% Sodium pyruvate 及 0.8 μ L polybrene (10 μ g/mL) 混和均勻後，取代 MCF7 或 MDA-MB-231 原有的細胞培養液，培養於 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱感染 24 小時，而 HEK293T 則補入 1 mL 含有 1% BSA 之細胞培養液，繼續培養在 37°C、5% CO₂ 的細胞培養箱。初次感染 24 小時後，重複上述動作一次，進行第二次的 lentivirus 感染。

第二次感染同樣培養 24 小時，之後更換 MCF7 或 MDA-MB-231 的細胞培養液為含有 2.5 μ g/mL purimycin 之細胞培養液，篩選 24 至 48 小時。

質體 DNA 與轉染試劑：

DNA	Per 12-well plate
pCMV- Δ R8.91	0.9 μ g
pMD.G	0.1 μ g
Hairpin-pLKO.1	1 μ g
jetPRIME [®] buffer	Add to 50 μ L
Transfection reagent	Per 12-well plate
jetPRIME [®] reagent	4 μ L
jetPRIME [®] buffer	Add to 50 μ L

表六、使用之 shRNA

shRNA	Clone ID
shLacZ	TRCN0000072223
shLRH-1 (A)	TRCN0000019658
shLRH-1 (D)	TRCN0000019656
shLRH-1 (E)	TRCN0000019657

十一、統計分析 (Statistical analysis)

實驗數據由至少三次的獨立實驗所得，以 Mean \pm SEM 表示。使用統計軟體 IBM SPSS Statistics 21 進行 unpaired T-test 及單因子變異數分析 (one-way Anova) 的統計分析， $p < 0.05$ 即代表顯著差異。



第三章 結果



一、LRH-1 於乳癌細胞的表現

首先我分析 LRH-1 於乳癌細胞的表現，包括乳管 A 型 (luminal A) 的 MCF7 與 T47D，及三陰性 (claudin-low) 的 MDA-MB-231，以人類肝癌細胞株 HepG2 做比較。使用 Santa Cruz 販賣之 LRH-1 抗體 (L-15) 偵測的結果如圖二 A 所示，於 HepG2 可觀察到 62 kDa 的訊號，T47D 及 MCF7 則表現強烈的 53 kDa 訊號。由於 Santa Cruz 停售 L-15，測試許多其他廠牌的抗體後，以 proteintech 生產的 LRH-1 抗體進行實驗，在這些細胞株可於 62、53 及 40 kDa 偵測到訊號。62 kDa 的條帶於 HepG2 及 MCF7 較強，53 kDa 的條帶則以 MDA-MB-231 最為強烈，MCF7 次之。為了確認 proteintech 之 LRH-1 抗體的專一性，將帶有 FLAG 標記的人類及小鼠 LRH-1 全長蛋白質體分別轉染至 HEK293T 細胞，結果如圖二 B。proteintech 之 LRH-1 抗體可於 65 kDa 的位置偵測到條帶，且在相同位置上有強烈的 FLAG 訊號，說明此抗體確實可辨認 LRH-1。由於以 L-15 分析 HepG2 的結果和過去本實驗室以 L-15 偵測 HepG2 表現 LRH-1 的結果相似 [43]，因此 62 kDa 的條帶應該是 LRH-1v1；而考量分子量大小及誤差，我們推測 53 kDa 的條帶可能是 LRH-1v4。

為了分析 LRH-1 不同異構物的 mRNA 表現量，我設計三對引子進行 real-time RT-PCR，如圖三 A。擷取 LRH-1v1 之 5'非轉譯區 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 及 exon 1 的序列，用於偵測 LRH-1v1。擷取 LRH-1v4 之 5'-UTR 的序列 (相當於 LRH-1v1 的 intron 1) 搭配 exon 2 的序列，可專一性的辨認 LRH-1v4。另外，以 exon 5 為目標設計一對引子 (LRH-1e5) 以偵測 LRH-1 的總量。結果如圖三 B，以 HepG2 的表現量為基準，發現 MCF7 的 LRH-1v1 表現量很低，但 LRH-1v4 較高。T47D 之 LRH-1v1 的表現量同樣較 HepG2 低，LRH-1v4 則顯著高於 HepG2。而 MDA-MB-231 的 LRH-1v1 及 LRH-1v4 都顯著較 HepG2 低，甚至幾乎沒有表現

LRH-1v1。若改以 LRH-1v4 為準，比較各細胞中不同異構物的表現 (如圖三 C)，顯示 HepG2 的 LRH-1v1 表現量比 LRH-1v4 高，MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 的 LRH-1v1 表現則皆較 LRH-1v4 低，其中 MCF7 及 MDA-MB-231 的 LRH-1v1 表現量都顯著低於 LRH-1v4。

為確認上述結果，我選用三種 LRH-1 之 shRNA (其辨認位置如圖四 A) 抑制 LRH-1 表現。MCF7 的結果如圖四 B 顯示，經三種 shLRH-1 感染後 LRH-1v1 及 LRH-1v4 的 mRNA 表現皆顯著降低，以 LRH-1v4 的效果較明顯，mRNA 的表現皆降低 7 成。MDA-MB-231 的結果如圖四 C，shLRH-1(D) 及 shLRH-1(E) 皆顯著抑制 LRH-1v4 表現，但對 LRH-1v1 沒有影響，而 shLRH-1(A) 於 MDA-MB-231 並無抑制效果。此外，分析 MCF7 感染 shLRH-1 後的蛋白質表現，如圖五 A，62 kDa 及 53 kDa 的條帶訊號都明顯降低，以 shLRH-1(E) 的抑制作用較好。於 MDA-MB-231 的結果則如圖五 B 所示，62 kDa 的訊號無明顯改變，但 53 kDa 的量明顯減少，特別是 shLRH-1(E) 的抑制效果最突出。由於 mRNA 和蛋白質的結果相符，說明了 53 kDa 為 LRH-1v4 的可能性。

根據以上的結果，LRH-1 於 HepG2 及乳癌細胞不論是 mRNA 或是蛋白質層面，都有不同的表現型式。且蛋白質的表現量和 mRNA 的表現情況並不一定吻合，像是 MDA-MB-231 之 LRH-1 蛋白質表現強烈，mRNA 卻很低，此差異可能是因不同細胞株之 mRNA 及蛋白質穩定性的差異導致。

二、LRH-1 啟動子 II 於乳癌細胞表現轉錄活性

先前的研究證實 LRH-1v4 是由不同的啟動子調控 [36]。將調控 LRH-1v1 及 LRH-1v4 之啟動子各擷取 2.7k 鹼基序列，分別命名為啟動子 I 及啟動子 II (圖六 A)，比較兩者於 HepG2 及三株乳癌細胞的活性。如圖六 B 所示，啟動子 I 於 HepG2 表現很高強度的活性，但啟動子 II 幾乎沒有活性。相反的，啟動子 I 於三株乳癌細胞皆不表現活性，MCF7 及 T47D 甚至出現顯著降低的現象，反而是啟動子 II 都出


現顯著的活性，以 MCF7 及 MDA-MB-231 的活性較強 (圖六 C、D、E)。由上述實驗結果說明 HepG2 能以啟動子 I 調控 LRH-1v1，而乳癌細胞可能以啟動子 II 調控 LRH-1v4 表現。

接下來我想找出調控啟動子 II 的關鍵區域，便將 2.7k 鹼基序列裁短成 1k、0.5k 及 0.2k，檢測各長度啟動子表現的活性及差異。結果顯示最短的 0.2k 的啟動子 II 即可於三株乳癌細胞表現顯著的活性，以 MDA-MB-231 最強。如圖七所示，當長度自 1k 延長至 2.7k 後活性反而降低，說明 1k 至 2.7k 之間的區域可能具有抑制性調控的序列。以上結果顯示 0.2k 的啟動子 II 上具有可調控三株乳癌細胞表現 LRH-1v4 的重要序列。

三、Sp1 參與 LRH-1 之調控

下一步我想找出 0.2k 啟動子 II 上重要的調控序列，利用線上軟體 PROMO-ALGGEN 分析後發現三個轉錄因子的關鍵結合位，分別是位於 -59 至 -53 的細胞核受器常見之結合序列 AGGTCA，以 nuclear receptor (NR) 命名；位於 -37 至 -31 的 specificity protein 1 (Sp1)，以及位於 +12 至 +20 的 specificity protein 3 (Sp3)。將三者的關鍵序列進行單突變、雙重突變及三重突變的排列組合，突變設計如圖八 A，檢測各突變對 MCF7 及 MDA-MB-231 啟動子 II 活性之影響。MCF7 的結果如圖八 B 所示，所有突變組合中僅 Sp1 單突變、雙重突變之 NR+Sp1 及 Sp1+Sp3，以及三重突變才出現活性顯著降低的現象，降低的幅度皆大約 6 成左右，而 NR 或 Sp3 的突變皆不影響活性。MDA-MB-231 的結果和 MCF7 相似，僅含有 Sp1 突變的情況才顯著降低活性，且降低程度達 7 成 (圖八 C)，顯示 Sp1 的結合序列參與調控啟動子 II 的活性。

為釐清此序列是否由 Sp1 活化，我使用 Sp1 的抑制劑 mithramycin A (MithA) 處理 MCF7 及 MDA-MB-231 24 小時，分析對啟動子活性的影響。結果如圖九 A 顯示，MCF7 之啟動子 II 在處理 MithA 24 小時後活性降低；同樣的情況亦出現於



MDA-MB-231 (圖九 B)。此外我檢測 MithA 對 LRH-1 之 mRNA 表現的影響，根據先前的研究，MithA 可降低 MCF7 表現二氫葉酸還原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR)，故以此作為 MithA 的正控制 [81]。MCF7 的結果顯示 MithA 確實顯著降低 DHFR 的表現，與先前研究的結果類似。而 MithA 也顯著抑制了 LRH-1v1 及 LRH-1v4 之 mRNA 表現量，對 LRH-1v4 的抑制效果較明顯 (圖十 A)。MDA-MB-231 僅 LRH-1v4 受到 MithA 的影響而顯著降低其 mRNA 表現量，抑制程度不如 MCF7 強 (圖十 B)。上述結果說明 Sp1 可能有參與調控此結合序列，影響 LRH-1v4 的表現。

四、E2 及 PGE₂ 於乳癌細胞對 LRH-1 表現的影響

接著我想探究在乳癌細胞調控 LRH-1 基因表現可能的機制。過去文獻指出雌激素 (17 β -estradiol, E2) 於 MCF7 可活化 LRH-1 之啟動子 I，亦刺激 LRH-1v4 及 LRH-1v5 表現 [35, 38]。將 MCF7 處理 8 或 24 小時 10 nM E2，以 pS2 作為正控制 (已知 pS2 為 ER 的目標基因 [82]) 分析 LRH-1v1 及 LRH-1v4 的 mRNA 表現。實驗結果如圖十一 A，pS2 的 mRNA 表現於 8 或 24 小時的刺激皆顯著增加，證明 E2 的作用正常。而 LRH-1v1 及 LRH-1v4 之 mRNA 表現僅於 24 小時 E2 處理有上升的趨勢，但幅度不大且未達顯著差異。此外，偵測 24 小時 E2 處理下的啟動子活性 (圖十一 B)，發現 E2 對 2.7k 啟動子 I 無影響，反而會顯著降低 2.7k 啟動子 II 之活性。

此外，另有文獻指出 LRH-1 於乳癌細胞可受到 PGE₂ 誘發 [79, 83]。因 PGE₂ 可透過活化 cAMP、PKA、CREB，直接調控 aromatase (CYP19A1 基因) 表現 [84, 85]，故以其作為 PGE₂ 處理的正控制。MCF7 的結果如圖十二 A 所示，處理 1 或 10 μ M PGE₂ 24 小時後，對 CYP19A1 及 LRH-1v4 之 mRNA 表現無明顯影響，僅 LRH-1v1 的表現有些微降低。而 MDA-MB-231 接受 1 或 10 μ M PGE₂ 24 小時的刺激會使 CYP19A1 表現增加，但對 LRH-1v1 及 LRH-1v4 的表現則沒有明顯效果，

如圖十二 B。



五、LRH-1 於乳癌細胞對麩醯胺酸代謝的影響

過去於小鼠模式發現 LRH-1 於肝癌細胞可促進 GLS2 表現，參與麩醯胺酸代謝 [78]。因此我想檢測 LRH-1 是否亦參與乳癌細胞代謝麩醯胺酸。以 shRNA 抑制 LRH-1 的作用，分析 MCF7 及 MDA-MB-231 中和麩醯胺酸代謝相關的基因如 solute carrier family 1 member 5 (*SLC1A5*)、glutaminase (*GLS*)、glutamate dehydrogenase 1 (*GLUD1*) 及 glutamine synthetase (*GLUL*) 的表現；於麩醯胺酸代謝路徑之作用詳見於附圖一。同時亦檢測和葡萄糖、脂質代謝有關的轉錄因子 carbohydrate-response element-binding protein (*ChREBP*)，先前研究指出 ChREBP 可透過抑制 p53，促進糖解作用並調控癌細胞增生，且於將代謝方式改以糖解作用為主的 Warburg effect 扮演重要角色 [86]。結果指出，MCF7 表現之 *GLS*、*GLUD1* 及 *ChREBP* 皆受到 shLRH-1(D) 的影響而顯著降低，shLRH-1(E) 亦顯著抑制 *GLS* 表現，對其他基因則無明顯影響 (圖十三 A)。MDA-MB-231 的數據如圖十三 B，顯示 shLRH-1(D) 及 shLRh-1(E) 皆顯著降低這些基因的表現。以上結果統整於表七。此實驗結果說明，LRH-1 可能會影響乳癌細胞代謝麩醯胺酸的路徑，且對 MDA-MB-231 的作用較 MCF7 更為明顯。

第四章 討論



本篇研究發現 LRH-1 於乳癌細胞由啟動子 II 調控，表現可能是 LRH-1v4 的異構物。我們證明啟動子 II 序列上的 Sp1 結合序列對啟動子 II 的調控很重要，可影響乳癌細胞表現 LRH-1v4。此外，我們還發現 LRH-1 於乳癌細胞可能影響麩醯胺酸的代謝路徑。

一、LRH-1 於乳癌細胞之表現

先前的研究證明 LRH-1v1 表現於肝臟 [43]，LRH-1v4 則否 [36]，Camats 的團隊卻發現肝臟亦會表現 LRH-1v4 [87]。我們以 L-15 及 proteintech 偵測 LRH-1 於肝臟的表現，皆顯示肝臟會表現 LRH-1v1，使用 proteintech 可於 HepG2 偵測到我們推測為 LRH-1v4 的 53 kDa 條帶 (圖二 A)；mRNA 表現的結果則說明 LRH-1v1 於 HepG2 的表現明顯較 LRH-1v4 高 (圖三 C)。文獻指出 ER⁺及 ER⁻乳癌細胞株有相似的 LRH-1 蛋白質表現量 [88]，然而高表現的 mRNA 不一定對應著有高表現的蛋白質，研究結果顯示 ER⁻乳癌細胞株幾乎不表現其 mRNA [38, 88]。以 proteintech 偵測 ER⁺及 ER⁻乳癌細胞株，我們發現 53 kDa 的條帶於三株乳癌細胞都有訊號，在 MDA-MB-231 的表現很高 (圖二 A)，且 LRH-1 於 ER⁻乳癌細胞株之 mRNA 表現量明顯比 ER⁺乳癌細胞株少 (圖三 B)。另外，MCF7 及 MDA-MB-231 之 mRNA 結果皆指出 LRH-1v4 的表現量顯著較 LRH-1v1 多 (圖三 C)。

過去有研究於 ER⁺及 ER⁻乳癌細胞處理放射線素 D (actinomycin D) 及環己醯亞胺 (cyclohexamide)，分別抑制 mRNA 及蛋白質的合成。結果顯示 ER⁺乳癌細胞表現之 LRH-1 的 mRNA 及蛋白質穩定性皆較 ER⁻乳癌細胞低，且此現象是因 ER⁺乳癌細胞受到 E2 透過 ER α 的作用導致 [88]，說明兩種類型的乳癌細胞於 mRNA 及蛋白質表現量的差異。此外 Pang 等人發現 [89]，若乳癌細胞之 *NR5A2* 基因內的 CpG 位點 (CpG island) 發生甲基化 (methylation)，可提高 LRH-1v4 表現；而若

發生甲基化的 CpG 位點位於啟動子，則會降低 LRH-1v4 表現。該團隊亦證明高度的 LRH-1 免疫組織化學 (immunohistochemistry, IHC) 反應，和較高的腫瘤分級、ER 陰性、PR 陰性等特徵有顯著的關係，說明 LRH-1 的蛋白表現和腫瘤的表現型有關。

二、LRH-1 的啟動子

過去的文獻顯示 LRH-1 之啟動子 I 於肝癌細胞株 HepG2 及 Hep3B 有很強的活性，但在 NIH3T3 (小鼠胚胎之纖維母細胞) 及 HeLa (人類子宮頸癌細胞株) 則都不表現活性，指出啟動子 I 於肝臟的特異性 [37]。我的實驗於肝癌細胞 HepG2 也同樣觀察到高度的啟動子活性 (圖六 B)，在乳癌細胞中卻幾乎沒有偵測到活性 (圖六 C、D、E)。此外該篇研究在啟動子 I 上找到許多肝臟特有的調控序列，包括 hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1) 及 hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β)。

Gao 的團隊於小鼠胚胎幹細胞 (mouse embryonic stem cell, mESC) 發現一個由新的啟動子所調控的 LRH-1 異構物 (mLRH-1v2) [90]，於 mESC 表現量很高，並在胚胎發育期間可持續表現。調控 *mLrh-1v2* 的啟動子 (P2) 位於 *mLrh-1v1* 的 intron 1，在 mESC 有很強的活性。mLRH-1v2 的編碼區 (coding region, CDS) 起始於 exon 3，和 mLRH-1v1 相比缺少前面 61 個胺基酸，其餘序列皆相同。經序列對比後，我發現 mLRH-1v2 和人類 LRH-1v4 的蛋白質序列有高達 91% 的相似度。先前 Wagner 等人證明 β -catenin 於 mESC 可促進 P2 的轉錄活性 [91]，並透過 mLRH-1v2 調控和多能性 (pluripotency) 相關的基因表現。

根據 Kawabe 的研究 [36]，LRH-1 啟動子 II 於肝臟幾乎沒有活性，於 KGN 則可表現出活性。我們的實驗結果顯示 LRH-1 啟動子 II 在 HepG2 亦無活性表現 (圖六 B)，但於乳癌細胞具有活性 (圖六 C、D、E；圖七)。Kawabe 等人在 LRH-1 啟動子 II 的序列上找到 SF-1 及 GC box 的結合序列 [36]，透過單突變及雙重突變的實驗證明兩者皆影響啟動子 II 於 KGN 的活性，可分別由 SF-1 及 Sp 家族的成員

(如 Sp1、Sp3) 佔據。本篇實驗在 LRH-1 啟動子 II 上發現的三個轉錄因子的結合位，其中 nuclear receptor (NR) 即為該篇文獻所指之 SF-1 結合序列；另 Sp1 及 Sp3 的結合位都位於 GC box 的上游，是初次探討的對象。然而，我以關鍵序列突變的實驗證明 NR 於乳癌細胞並不影響啟動子 II 的活性，僅 Sp1 的結合序列參與調控啟動子 II (圖八)。

於肝細胞的研究顯示，LRH-1 近端及遠端的啟動子上有大量的 GC box 可由 Sp1 佔據 [92]，而 KGN 中 Sp1 亦可結合於 LRH-1 啟動子 II 的 GC box [36]。在我的研究中，於 LRH-1 啟動子 II 找到之不同於 GC box 的 Sp1 結合位，對 LRH-1v4 的轉錄調控扮演重要角色 (圖八)。處理 Sp1 抑制劑 mithramycin A (MithA)，證明失去 Sp1 的作用降低乳癌細胞之 LRH-1 啟動子 II 的轉錄活性 (圖九) 及 mRNA 表現 (圖十)，說明 Sp1 對調控 LRH-1 的重要性。

三、LRH-1 於乳癌細胞的調控

先前的研究指出 ER α 於 MCF7 可結合於 LRH-1 啟動子 I，在 E2 的刺激下可促進 LRH-1 表現 [38]。此外，E2 亦調控 LRH-1v4 及 LRH-1v5 表現於 ER⁺乳癌細胞，且此現象並不出現於 ER⁻乳癌細胞 [35]。然而我的實驗結果顯示於 MCF7 給予 8 小時 E2 對 LRH-1v1 及 LRH-1v4 的 mRNA 表現皆無明顯影響；24 小時處理下 LRH-1v1 及 LRH-1v4 僅少量增加，且未達顯著差異 (圖十一 A)。由於 Thiruchelvam 等人記載於文獻之 real-time RT-PCR 的配對引子有誤 [35]，LRH-1v4 的配對引子和 LRH-1v1/v2 完全相同，應無法區分出 LRH-1v4 之 mRNA 表現，但使用我所設計的配對引子卻無法重複其結果。另外，在啟動子活性測試的實驗中 (圖十一 B)，我發現給予 24 小時的 E2 不但未促進 LRH-1 啟動子 II 的活性，甚至顯著降低其活性表現。

另外，過去的研究指出 PGE₂ 會大量表現於乳房脂肪組織，結合於 PGE₂ receptor₂ (EP₂) 可活化 protein kinase A (PKA) 的路徑，促進 LRH-1 表現及誘發

aromatase [79, 84]。Sphingosine-1-phosphate (S1P) 於乳癌細胞可調控 PGE₂ 的生成 [93, 94]，刺激 PKA 下游分子及 LRH-1 共同促進 LRH-1 表現，證明 LRH-1 具有回饋調控的機制，維持 aromatase 表現以生成雌性素 [83]。然則我的實驗顯示 PGE₂ 對於 MCF7 及 MDA-MB-231 之 LRH-1v1 及 LRH-1v4 的 mRNA 表現皆無明顯的效果 (圖十二 B)。

四、LRH-1 對麩醯胺酸代謝的影響

細胞癌化後會經歷提高無氧之糖解作用 (glycolysis) 以及增加對麩醯胺酸 (glutamine) 依賴程度的代謝轉變 [95]。麩醯胺酸為血清中含量很高的胺基酸，經 SLC1A5 進入細胞，以粒線體內之 GLS 轉變成麩胺酸 (glutamate)；接著 GLUD 可將麩胺酸代謝成 α -KG 並進入 TCA cycle，維持細胞生合成及能量的恆定。此外，麩胺酸可藉由麩醯胺酸合成酶 (glutamine synthetase, GS；由 *GLUL* 基因轉錄) 逆向合成麩醯胺酸 (附圖一) [76]。

先前 Xu 的團隊將小鼠肝細胞專一性剔除 *Lrh-1* 基因並誘發肝癌形成 [78]，發現許多和麩醯胺酸代謝相關的基因表現降低，包括 *Gls2*。但 *Gls1* 並無受到影響，可能是因 GLS2 為較特定表現於肝臟、腦、胰臟等器官的型式，而 GLS 則較為廣泛 [76]；另 *Slc1A5* 及 *Glud1* 的表現亦無改變。而後作者證實 LRH-1 可直接調控 *Gls2*，其下游產生之 α -KG 可活化 mTORC1 以促進細胞增生。此外，於 HepG2 抑制 LRH-1 亦觀察到 *GLS2* 表現降低。此小鼠模式說明 LRH-1 可透過促進 GLS2 的表現，參與調控麩醯胺酸的代謝。

另外 Kung 等人以乳癌細胞為研究對象 [96]，發現不同類型的乳癌細胞對麩醯胺酸有不同的需求及調控方式。文獻中作者以探討乳管型 (luminal-type，如：MCF7、T47D) 及基底型 (basal-type，如：MDA-MB-231) 為主，發現 luminal-type 的乳癌細胞對麩醯胺酸缺乏的環境有較高的抗性，反而在缺乏葡萄糖的情況下受到較明顯的影響，為麩醯胺酸非依賴型 (glutamine-independent)。由於 luminal-type

的乳癌細胞可表現 GATA3 [97]，作者發現 GATA3 可促進 *GLUL* 轉錄以生成 GS，使 luminal-type 的乳癌細胞具有自行合成麩醯胺酸的能力，降低其對外界的依賴。此外作者發現 GATA3 會抑制 GLS 及 GLS2 表現，維持 glutamine-independent 的特性。我的實驗於 MCF7 抑制 LRH-1 表現 (圖十三 A；表七)，顯示 *GLS* 及 *GLUD1* 都因抑制 LRH-1 而減少，推測 LRH-1 影響 MCF7 代謝麩醯胺酸。而 *SLC1A5* 及 *GLUL* 皆無影響，可能是因為其 glutamine-independent 的特性，對外界之麩醯胺酸需求較低；而 GATA3 可促 *GLUL* 表現，或許緩解了 LRH-1 的抑制作用。

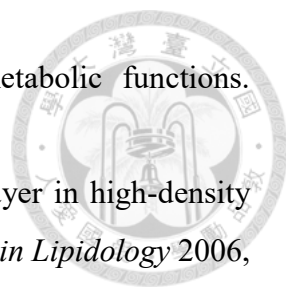
Basal-type 的乳癌細胞則對缺乏麩醯胺酸的環境變化敏感，並有顯著較高的麩醯胺酸攝取量，屬於麩醯胺酸依賴型 (glutamine-dependent)。偵測麩醯胺酸代謝相關的基因表現，發現 basal-type 表現之 GLS 顯著較 luminal-type 高，而 GLS2 表現較少。且 basal-type 不像 luminal-type 有 GATA3 可生成 GS [97]，更增加其對麩醯胺酸的需求。我們於 MDA-MB-231 抑制 LRH-1 的結果如圖十三 B 及表七，發現每個基因都顯著受到 LRH-1 抑制的影響，尤其是 *GLS* 及 *GLUD1* 的抑制程度都比 MCF7 多。而於 MCF7 無變化的 *SLC1A5* 在 MDA-MB-231 顯著降低表現，反映麩醯胺酸高攝取量的現象。整體來看，抑制 LRH-1 於 MDA-MB-231 有顯著影響，說明 LRH-1 於 MDA-MB-231 會影響麩醯胺酸代謝；且抑制效果較 MCF7 明顯，符合 MDA-MB-231 之 glutamine-dependent 的特性。


ChREBP 的目標基因包括糖解作用、糖質新生 (gluconeogenesis)、脂質合成 (lipogenesis) 等代謝路徑的相關基因，先前的研究指出 ChREBP 於癌細胞之代謝轉換扮演關鍵角色 [86]。我觀察 MCF7 及 MDA-MB-231 在抑制 LRH-1 後 *ChREBP* 的表現，發現兩細胞株之 *ChREBP* 皆受到抑制，說明 LRH-1 可能影響乳癌細胞對葡萄糖的代謝轉換 (圖十三；表七)。

自 NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 可獲得已發表之 LRH-1 的染色質免疫沉澱-定序 (chromatin immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq) 數據 (GSM1143122)。根據該數據資料分析 *SLC1A5*、*GLS*、

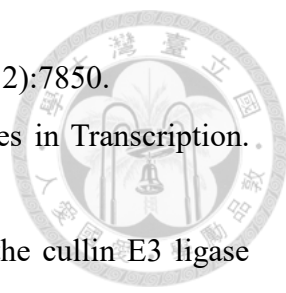
GLUD1、*GLUL* 及 *ChREBP* 基因前方 5k 的啟動子序列，皆沒有發現 LRH-1 的結合訊號；且透過線上軟體 PROMO-ALGEN 檢測每個基因 5k 的啟動子序列，亦無找到 LRH-1 的結合序列。此結果說明 LRH-1 對乳癌細胞之麩醯胺酸代謝的影響，可能是以間接調控的方式進行。

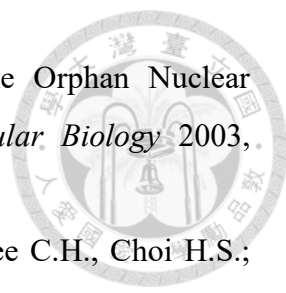
1. World Health Organization (WHO) ; Breast cancer; 2019.
[<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>]
2. 衛生福利部國民健康署；2016。105 年癌症登記報告。
3. 衛生福利部國民健康署；2016。104 年癌症登記年報。
4. Holliday D.L., Speirs V.; Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 2011, 13(4):215.
5. Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J.; Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer* 2017, 8(16):3131.
6. Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J., Watson M., Davies S., Bernard P.S., Parker J.S., Perou C.M., Ellis M.J., Nielsen T.O.; Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2009, 101(10):736.
7. Creighton C.J.; The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics* 2012, 6:289.
8. Lacroix M., Haibe-Kains B., Hennuy B., Laes J.F., Lallemand F., Gonze I., Cardoso F., Piccart M., Leclercq G., Sotiriou C.; Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes. *Oncology reports* 2004, 12(4):701.
9. Dai X., Xiang L., Li T., Bai Z.; Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer* 2016, 7(10):1281.
10. Krieger M.; Charting the Fate of the “Good Cholesterol”: Identification and Characterization of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI. *Annual Review of Biochemistry* 1999, 68(1):523.
11. Schoonjans K., Annicotte J.S., Huby T., Botrugno O.A., Fayard E., Ueda Y., Chapman J., Auwerx J.; Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO reports* 2002, 3(12):1181.
12. Tall A.; PLASMA LIPID TRANSFER PROTEINS. *Annual Review of Biochemistry* 1995, 64(1):235.
13. Luo Y., Liang C.P., Tall A.R.; The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 Potentiates the Sterol-mediated Induction of the Human CETP Gene by Liver X Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276(27):24767.
14. Huang L.Z., Gao J.L., Pu C., Zhang P.H., Wang L.Z., Feng G., Zhang Y;

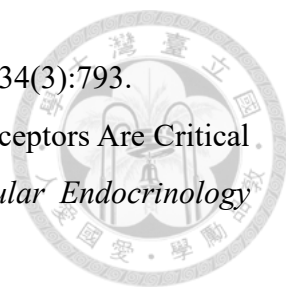
- 
- Apolipoprotein M: Research progress, regulation and metabolic functions. *Molecular medicine reports* 2015, 12(2):1617.
15. Dahlbäck B., Nielsen L.B.; Apolipoprotein M – a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2006, 17(3):291.
 16. Venteclef N., Haroniti A., Tousaint J.J., Talianidis I., Delerive P.; Regulation of Anti-atherogenic Apolipoprotein M Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor LRH-1. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(7):3694.
 17. Fayard E., Auwerx J., Schoonjans K.; LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends in Cell Biology* 2004, 14(5):250.
 18. Miki Y., Clyne C.D., Suzuki T., Moriya T., Shibuya R., Nakamura Y., Ishida T., Yabuki N., Kitada K., Hayashi S.-i., Sasano H.; Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: Possible regulator of insitu steroidogenesis. *Cancer Letters* 2006, 244(1):24.
 19. Goodwin B., Jones S.A., Price R.R., Watson M.A., McKee D.D., Moore L.B., Galardi C., Wilson J.G., Lewis M.C., Roth M.E., Maloney P.R., Willson T.M., Kliewer S.A.; A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. *Molecular Cell* 2000, 6(3):517.
 20. Francis G.A., Fayard E., Picard F., Auwerx J.; Nuclear Receptors and the Control of Metabolism. *Annual Review of Physiology* 2003, 65(1):261.
 21. Lazarus K.A., Wijayakumara D., Chand A.L., Simpson E.R., Clyne C.D.; Therapeutic potential of Liver Receptor Homolog-1 modulators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2012, 130(3):138.
 22. Yazawa T., Imamichi Y., Miyamoto K., Khan M.R.I., Uwada J., Umezawa A., Taniguchi T.; Regulation of steroidogenesis, development, and cell differentiation by steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Zoological science* 2015, 32(4):323.
 23. Kim J.W., Peng N., Rainey W.E., Carr B.R., Attia G.R.; Liver Receptor Homolog-1 Regulates the Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Human Granulosa Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004, 89(6):3042.

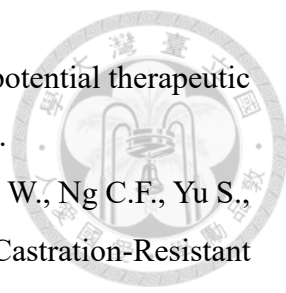
- 
24. Kim J.W., Havelock J.C., Carr B.R., Attia G.R.; The Orphan Nuclear Receptor, Liver Receptor Homolog-1, Regulates Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P450 Enzyme in Human Granulosa Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005, 90(3):1678.
 25. Peng N., Kim J.W., Rainey W.E., Carr B.R., Attia G.R.; The Role of the Orphan Nuclear Receptor, Liver Receptor Homologue-1, in the Regulation of Human Corpus Luteum 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type II. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003, 88(12):6020.
 26. Pezzi V., Sirianni R., Chimento A., Maggiolini M., Bourguiba S., Delalande C., Carreau S., Andò S., Simpson E.R., Clyne C.D.; Differential Expression of Steroidogenic Factor-1/Adrenal 4 Binding Protein and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)/Fetoprotein Transcription Factor in the Rat Testis: LRH-1 as a Potential Regulator of Testicular Aromatase Expression. *Endocrinology* 2004, 145(5):2186.
 27. Clyne C.D., Speed C.J., Zhou J., Simpson E.R.; Liver Receptor Homologue-1 (LRH-1) Regulates Expression of Aromatase in Preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(23):20591.
 28. Clyne C.D., Kovacic A., Speed C.J., Zhou J., Pezzi V., Simpson E.R.; Regulation of aromatase expression by the nuclear receptor LRH-1 in adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004, 215(1):39.
 29. Paré J.F., Malenfant D., Courtemanche C., Jacob-Wagner M., Roy S., Allard D., Bélanger L.; The Fetoprotein Transcription Factor (FTF) Gene Is Essential to Embryogenesis and Cholesterol Homeostasis and Is Regulated by a DR4 Element. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(20):21206.
 30. Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M.; The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995, 83(6):835.
 31. Nitta M., Ku S., Brown C., Okamoto A.Y., Shan B.; CPF: An orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96(12):6660.
 32. Solomon I.H., Hager J.M., Safi R., McDonnell D.P., Redinbo M.R., Ortlund E.A.;

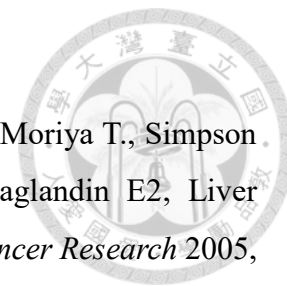
- Crystal Structure of the Human LRH-1 DBD–DNA Complex Reveals Ftz-F1 Domain Positioning is Required for Receptor Activity. *Journal of Molecular Biology* 2005, 354(5):1091.
33. Sablin E.P., Krylova I.N., Fletterick R.J., Ingraham H.A.; Structural Basis for Ligand-Independent Activation of the Orphan Nuclear Receptor LRH-1. *Molecular Cell* 2003, 11(6):1575.
34. Krylova I.N., Sablin E.P., Moore J., Xu R.X., Waitt G.M., MacKay J.A., Juzumiene D., Bynum J.M., Madauss K., Montana V., Lebedeva L., Suzawa M., Williams J.D., Williams S.P., Guy R.K., Thornton J.W., Fletterick R.J., Willson T.M., Ingraham H.A.; Structural Analyses Reveal Phosphatidyl Inositols as Ligands for the NR5 Orphan Receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 2005, 120(3):343.
35. Thiruchelvam P.T.R., Lai C.F., Hua H., Thomas R.S., Hurtado A., Hudson W., Bayly A.R., Kyle F.J., Periyasamy M., Photiou A., Spivey A.C., Ortlund E.A., Whitby R.J., Carroll J.S., Coombes R.C., Buluwela L., Ali S.; The liver receptor homolog-1 regulates estrogen receptor expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 2011, 127(2):385.
36. Kawabe S., Yazawa T., Kanno M., Usami Y., Mizutani T., Imamichi Y., Ju Y., Matsumura T., Orisaka M., Miyamoto K.; A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 2013, 154(4):1648.
37. Zhang C.K., Lin W., Cai Y.N., Xu P.L., Dong H., Li M., Kong Y.Y., Fu G., Xie Y.H., Huang G.M., Wang Y.; Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor NR5A2 (hB1F) gene. *Gene* 2001, 273(2):239.
38. Annicotte J.S., Chavey C., Servant N., Teyssier J., Bardin A., Licznar A., Badia E., Pujol P., Vignon F., Maudelonde T., Lazennec G., Cavailles V., Fajas L.; The nuclear receptor liver receptor homolog-1 is an estrogen receptor target gene. *Oncogene* 2005, 24:8167.
39. Stein S., Schoonjans K.; Molecular basis for the regulation of the nuclear receptor LRH-1. *Current Opinion in Cell Biology* 2015, 33:26.
40. Lee Y.K., Choi Y.H., Chua S., Park Y.J., Moore D.D.; Phosphorylation of the Hinge Domain of the Nuclear Hormone Receptor LRH-1 Stimulates

- 
- Transactivation. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(12):7850.
41. Geng F., Wenzel S., Tansey W.P.; Ubiquitin and Proteasomes in Transcription. *Annual Review of Biochemistry* 2012, 81(1):177.
 42. Hannah J., Zhou P.; Distinct and overlapping functions of the cullin E3 ligase scaffolding proteins CUL4A and CUL4B. *Gene* 2015, 573(1):33.
 43. Lai T.C., Hu M.C.; Regulation of liver receptor homologue-1 by DDB2 E3 ligase activity is critical for hepatic glucose metabolism. *Scientific Reports* 2019, 9(1):5304.
 44. Chalkiadaki A., Talianidis I.; SUMO-Dependent Compartmentalization in Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear Bodies Prevents the Access of LRH-1 to Chromatin. *Molecular and Cellular Biology* 2005, 25(12):5095.
 45. Lallemand-Breitenbach V., de Thé H.; PML nuclear bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010, 2(5):a000661.
 46. Venteclef N., Jakobsson T., Ehrlund A., Damdimopoulos A., Mikkonen L., Ellis E., Nilsson L.M., Parini P., Jänne O.A., Gustafsson J.A., Steffensen K.R., Treuter E.; GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes & Development* 2010, 24(4):381.
 47. Safi R., Kovacic A., Gaillard S., Murata Y., Simpson E.R., McDonnell D.P., Clyne C.D.; Coactivation of Liver Receptor Homologue-1 by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α on Aromatase Promoter II and Its Inhibition by Activated Retinoid X Receptor Suggest a Novel Target for Breast-Specific Antiestrogen Therapy. *Cancer Research* 2005, 65(24):11762.
 48. Yazawa T., Inaoka Y., Okada R., Mizutani T., Yamazaki Y., Usami Y., Kuribayashi M., Orisaka M., Umezawa A., Miyamoto K.; PPAR- γ Coactivator-1 α Regulates Progesterone Production in Ovarian Granulosa Cells with SF-1 and LRH-1. *Molecular Endocrinology* 2010, 24(3):485.
 49. Shin D.J., Osborne T.F.; Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator-1 α Activation of CYP7A1 during Food Restriction and Diabetes Is Still Inhibited by Small Heterodimer Partner. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(22):15089.
 50. Suzuki T., Kasahara M., Yoshioka H., Morohashi K.I., Umesono K.; LXXLL-


- 
- Related Motifs in Dax-1 Have Target Specificity for the Orphan Nuclear Receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Molecular and Cellular Biology* 2003, 23(1):238.
51. Ahn S.W., Gang G.T., Kim Y.D., Ahn R.S., Harris R.A., Lee C.H., Choi H.S.; Insulin Directly Regulates Steroidogenesis via Induction of the Orphan Nuclear Receptor DAX-1 in Testicular Leydig Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288(22):15937.
 52. Lanzino M., Maris P., Sirianni R., Barone I., Casaburi I., Chimento A., Giordano C., Morelli C., Sisci D., Rizza P., Bonofiglio D., Catalano S., Andò S.; DAX-1, as an androgen-target gene, inhibits aromatase expression: a novel mechanism blocking estrogen-dependent breast cancer cell proliferation. *Cell Death & Disease* 2013, 4:e724.
 53. Liu C., Wu H.T., Zhu N., Shi Y.N., Liu Z., Ao B.X., Liao D.F., Zheng X.L., Qin L.; Steroid receptor RNA activator: Biologic function and role in disease. *Clinica Chimica Acta* 2016, 459:137.
 54. Kelly V.R., Xu B., Kuick R., Koenig R.J., Hammer G.D.; Dax1 Up-Regulates Oct4 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells via LRH-1 and SRA. *Molecular Endocrinology* 2010, 24(12):2281.
 55. Lu T.T., Makishima M., Repa J.J., Schoonjans K., Kerr T.A., Auwerx J., Mangelsdorf D.J.; Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptors. *Molecular Cell* 2000, 6(3):507.
 56. Hoeke M.O., Heegsma J., Hoekstra M., Moshage H., Faber K.N.; Human FXR Regulates SHP Expression through Direct Binding to an LRH-1 Binding Site, Independent of an IR-1 and LRH-1. *PLOS ONE* 2014, 9(2):e88011.
 57. Lee Y.K., Moore D.D.; Dual Mechanisms for Repression of the Monomeric Orphan Receptor Liver Receptor Homologous Protein-1 by the Orphan Small Heterodimer Partner. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(4):2463.
 58. Zhang Y., Xu P., Park K., Choi Y., Moore D.D., Wang L.; Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation. *Hepatology* 2008, 48(1):289.
 59. He N., Park K., Zhang Y., Huang J., Lu S., Wang L.; Epigenetic Inhibition of Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner Is Associated With and Regulates

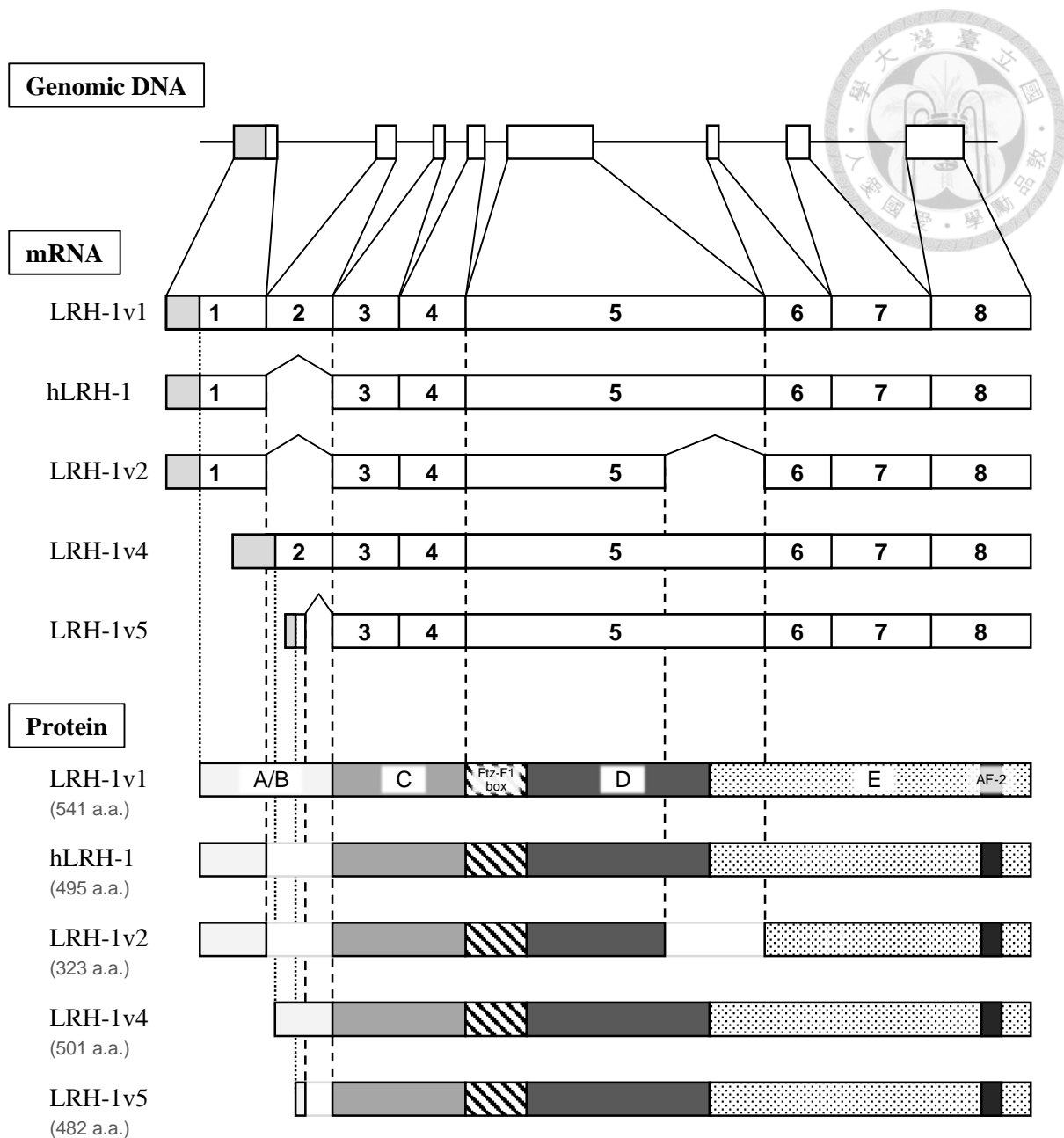
- 
- Hepatocellular Carcinoma Growth. *Gastroenterology* 2008, 134(3):793.
60. Sen A., Hammes S.R.; Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. *Molecular Endocrinology* 2010, 24(7):1393.
 61. Wu Y., Bennett J., Talla D., Stocco C.; Testosterone, not 5 α -Dihydrotestosterone, Stimulates LRH-1 Leading to FSH-Independent Expression of Cyp19 and P450scc in Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology* 2011, 25(4):656.
 62. Wu Y., Baumgarten S.C., Zhou P., Stocco C.; Testosterone-Dependent Interaction between Androgen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor Induces Liver Receptor Homolog 1 Expression in Rat Granulosa Cells. *Molecular and Cellular Biology* 2013, 33(15):2817.
 63. Chand A.L., Herridge K.A., Thompson E.W., Clyne C.D.; The orphan nuclear receptor LRH-1 promotes breast cancer motility and invasion. *Endocrine-Related Cancer* 2010, 17(4):965.
 64. Botrugno O.A., Fayard E., Annicotte J.-S., Haby C., Brennan T., Wendling O., Tanaka T., Kodama T., Thomas W., Auwerx J., Schoonjans K.; Synergy between LRH-1 and β -Catenin Induces G1 Cyclin-Mediated Cell Proliferation. *Molecular Cell* 2004, 15(4):499.
 65. Bayrer J.R., Mukkamala S., Sablin E.P., Webb P., Fletterick R.J.; Silencing LRH-1 in colon cancer cell lines impairs proliferation and alters gene expression programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015, 112(8):2467.
 66. Schoonjans K., Dubuquoy L., Mebis J., Fayard E., Wendling O., Haby C., Geboes K., Auwerx J.; Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(6):2058.
 67. Benod C., Vinogradova M.V., Jouravel N., Kim G.E., Fletterick R.J., Sablin E.P.; Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, 108(41):16927.
 68. Lin Q., Aihara A., Chung W., Li Y., Chen X., Huang Z., Weng S., Carlson R.I., Nadolny C., Wands J.R., Dong X.; LRH1 promotes pancreatic cancer metastasis. *Cancer Letters* 2014, 350(1):15.

- 
69. Nadolny C., Dong X.; Liver receptor homolog-1 (LRH-1): a potential therapeutic target for cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2015, 16(7):997.
 70. Xiao L., Wang Y., Xu K., Hu H., Xu Z., Wu D., Wang Z., You W., Ng C.F., Yu S., Chan F.L.; Nuclear Receptor LRH-1 Functions to Promote Castration-Resistant Growth of Prostate Cancer via Its Promotion of Intratumoral Androgen Biosynthesis. *Cancer Research* 2018, 78(9):2205.
 71. Anderson W.F., Chatterjee N., Ershler W.B., Brawley O.W.; Estrogen Receptor Breast Cancer Phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Breast Cancer Research and Treatment* 2002, 76(1):27.
 72. Lai C.F., Flach K.D., Alexi X., Fox S.P., Ottaviani S., Thiruchelvam P.T.R., Kyle F.J., Thomas R.S., Launchbury R., Hua H., Callaghan H.B., Carroll J.S., Charles Coombes R., Zwart W., Buluwela L., Ali S.; Co-regulated gene expression by oestrogen receptor α and liver receptor homolog-1 is a feature of the oestrogen response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research* 2013, 41(22):10228.
 73. Chand A.L., Wijayakumara D.D., Knower K.C., Herridge K.A., Howard T.L., Lazarus K.A., Clyne C.D.; The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 and ER α Activate GREB1 Expression to Induce Breast Cancer Cell Proliferation. *PLOS ONE* 2012, 7(2):e31593.
 74. Oosterveer M.H., Matakı C., Yamamoto H., Harach T., Moullan N., van Dijk T.H., Ayuso E., Bosch F., Postic C., Groen A.K., Auwerx J., Schoonjans K.; LRH-1–dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver. *The Journal of Clinical Investigation* 2012, 122(8):2817.
 75. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B.; Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324(5930):1029.
 76. Altman B.J., Stine Z.E., Dang C.V.; From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2016, 16:619.
 77. Erickson J.W., Cerione R.A.; Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism? *Oncotarget* 2010, 1(8):734.
 78. Xu P., Oosterveer M.H., Stein S., Demagny H., Ryu D., Moullan N., Wang X., Can E., Zamboni N., Comment A., Auwerx J., Schoonjans K.; LRH-1-dependent programming of mitochondrial glutamine processing drives liver cancer. *Genes &*



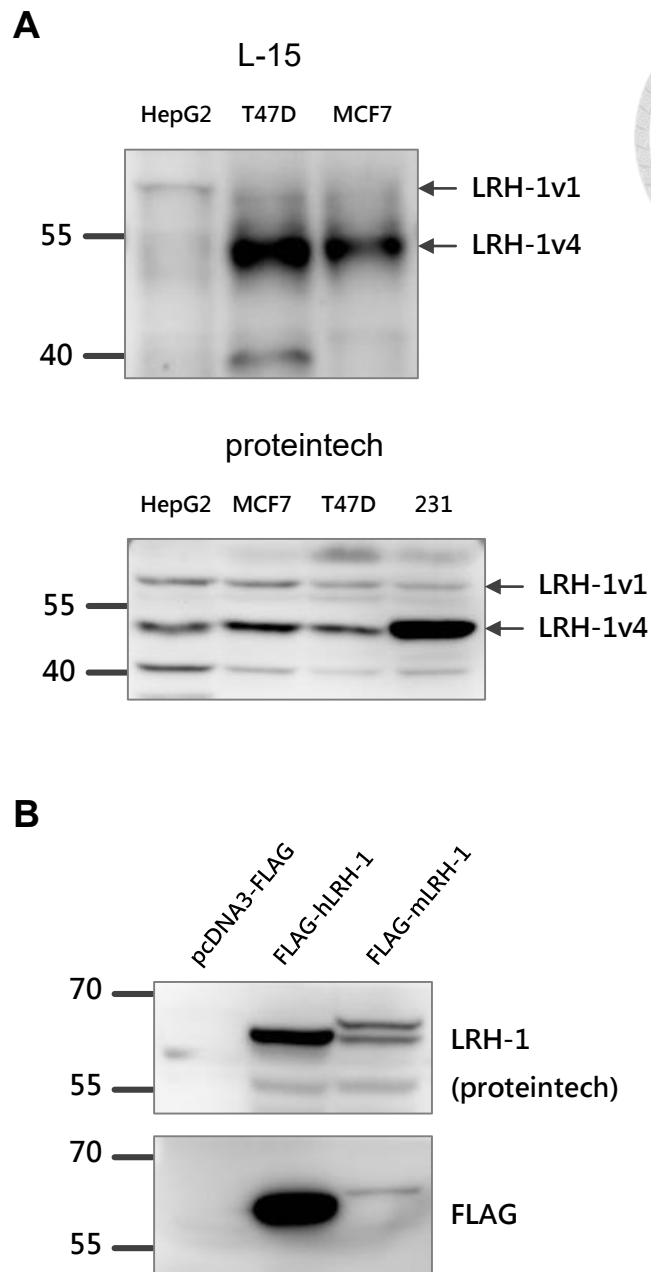
- Development* 2016, 30(11):1255.
79. Zhou J., Suzuki T., Kovacic A., Saito R., Miki Y., Ishida T., Moriya T., Simpson E.R., Sasano H., Clyne C.D.; Interactions between Prostaglandin E2, Liver Receptor Homologue-1, and Aromatase in Breast Cancer. *Cancer Research* 2005, 65(2):657.
 80. 潘建廷 (2005)。LRH-1 抗體製備及 LRH-1 調控 CYP11A1 之研究。國立台灣大學生理學研究所碩士論文。
 81. Uramoto H., Onitsuka T., Shimokawa H., Hanagiri T.; TS, DHFR and GARFT Expression in Non-squamous Cell Carcinoma of NSCLC and Malignant Pleural Mesothelioma Patients Treated with Pemetrexed. *Anticancer Research* 2010, 30(10):4309.
 82. Berry M., Nunez A.M., Chambon P.; Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, 86(4):1218.
 83. Hadizadeh S., King D.N., Shah S., Sewer M.B.; Sphingosine-1-phosphate regulates the expression of the liver receptor homologue-1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008, 283(1):104.
 84. Zhao Y., Agarwal V.R., Mendelson C.R., Simpson E.R.; Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 1996, 137(12):5739.
 85. Sofi M., Young M.J., Papamakarios T., Simpson E.R., Clyne C.D.; Role of CRE-Binding Protein (CREB) in Aromatase Expression in Breast Adipose. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003, 79(3):399.
 86. Iizuka K.; The transcription factor carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP): A possible link between metabolic disease and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2017, 1863(2):474.
 87. Camats N., Audí L., Fernández-Cancio M., Andaluz P., Mullis P.E., Carrascosa A., Flück C.E.; LRH-1 May Rescue SF-1 Deficiency for Steroidogenesis: An in vitro and in vivo Study. *Sexual Development* 2015, 9(3):144.
 88. Lazarus K.A., Zhao Z., Knowler K.C., To S.Q., Chand A.L., Clyne C.D.; Oestradiol reduces Liver Receptor Homolog-1 mRNA transcript stability in breast

- 
- cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, 438(3):533.
89. Pang J.M.B., Molania R., Chand A., Knowler K., Takano E.A., Byrne D.J., Mikeska T., Millar E.K.A., Lee C.S., O'Toole S.A., Clyne C., Gorringer K.L., Dobrovic A., Fox S.B.; LRH-1 expression patterns in breast cancer tissues are associated with tumour aggressiveness. *Oncotarget* 2017, 8(48):83626.
 90. Gao D.M., Wang L.F., Liu J., Kong Y.Y., Wang Y., Xie Y.H.; Expression of mouse liver receptor homologue 1 in embryonic stem cells is directed by a novel promoter. *FEBS Letters* 2006, 580(7):1702.
 91. Wagner R.T., Xu X., Yi F., Merrill B.J., Cooney A.J.; Canonical Wnt/ β -Catenin Regulation of Liver Receptor Homolog-1 Mediates Pluripotency Gene Expression. *Stem Cells* 2010, 28(10):1794.
 92. Chong H.K., Biesinger J., Seo Y.-K., Xie X., Osborne T.F.; Genome-wide analysis of hepatic LRH-1 reveals a promoter binding preference and suggests a role in regulating genes of lipid metabolism in concert with FXR. *BMC Genomics* 2012, 13(1):51.
 93. Pyne S., Pyne N.J.; Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem Journal* 2000, 349(Pt 2):385.
 94. Pettus B.J., Kitatani K., Chalfant C.E., Taha T.A., Kawamori T., Bielawski J., Obeid L.M., Hannun Y.A.; The Coordination of Prostaglandin E2 Production by Sphingosine-1-phosphate and Ceramide-1-phosphate. *Molecular Pharmacology* 2005, 68(2):330.
 95. Lu W., Pelicano H., Huang P.; Cancer Metabolism: Is Glutamine Sweeter than Glucose? *Cancer Cell* 2010, 18(3):199.
 96. Kung H.N., Marks J.R., Chi J.T.; Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *PLOS Genetics* 2011, 7(8):e1002229.
 97. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Monville F., Finetti P., Adélaïde J., Cervera N., Fekairi S., Xerri L., Jacquemier J., Birnbaum D., Bertucci F.; Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 2006, 25(15):2273.



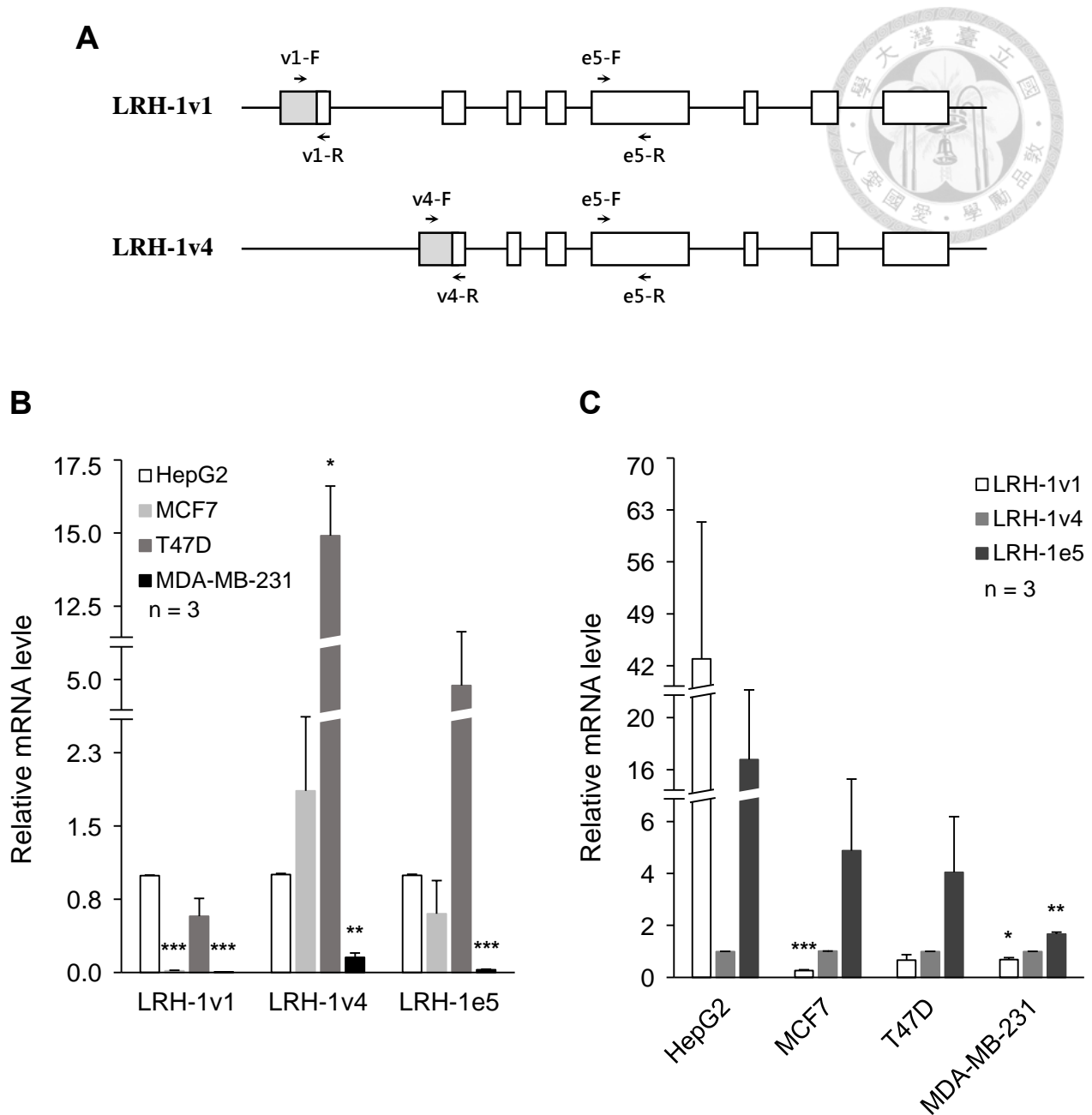
圖一、LRH-1 基因、mRNA 及蛋白質異構物示意圖

上層 DNA 的方框代表 exon，中間的間距為 intron；灰色區域為 5'非轉譯區 (5'-untranslated region, 5'-UTR)，白色區域為編碼區 (coding sequence, CDS)。中層 mRNA 的數字即為對應的 exon，最前方的灰色區域為 5'-UTR，其中 LRH-1v4 及 LRH-1v5 分別包含 intron 1 及 intron 2 的序列。下層的蛋白質含有 A/B、C (DNA 結合域)、D 及 E 結構域 (配體結合域)。



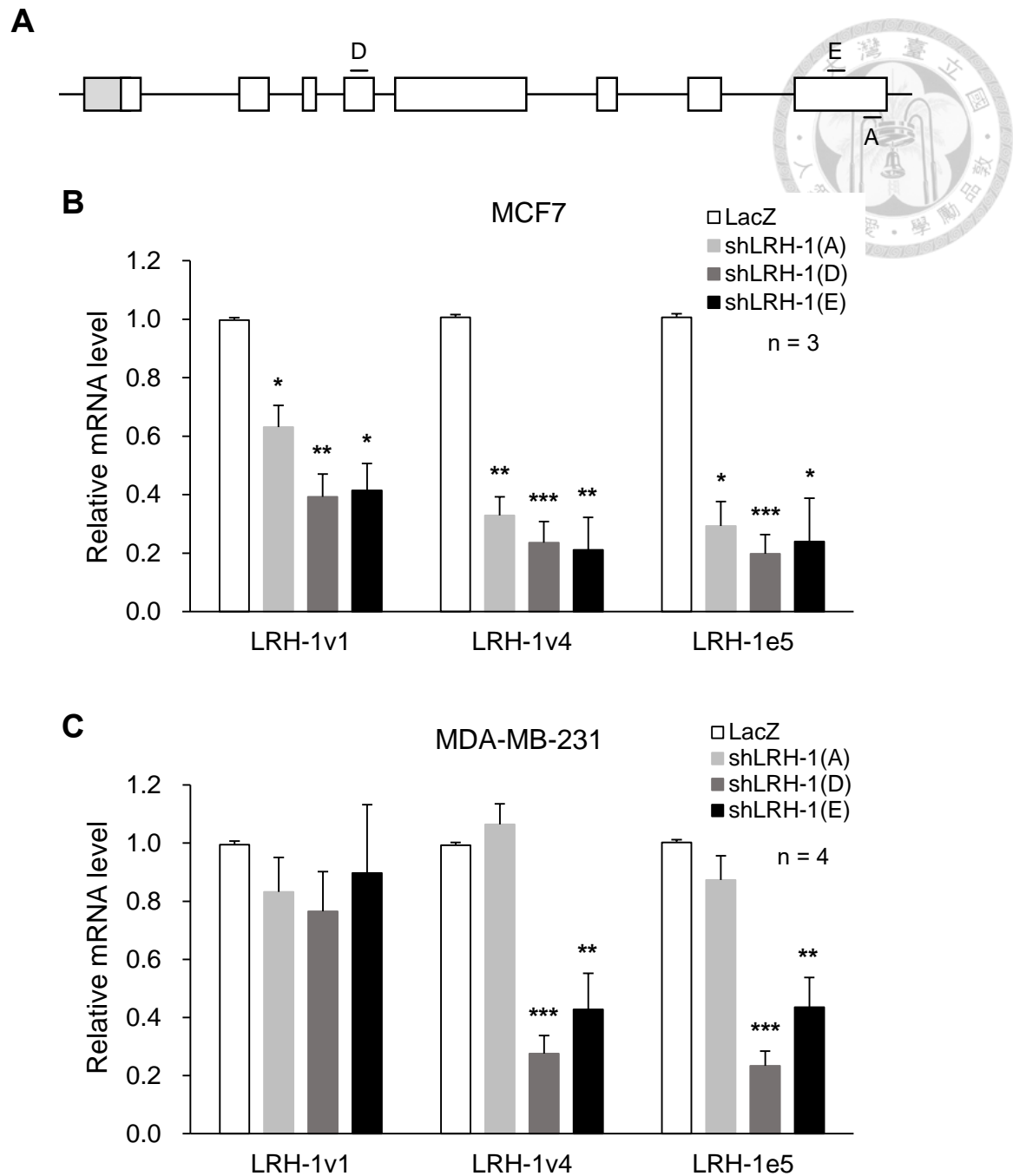
圖二、LRH-1 蛋白質於 HepG2、MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 的表現情況

(A) 收集 HepG2、MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 細胞裂解液以西方墨點法檢測，用於偵測 LRH-1 的抗體自 Santa Cruz (L-15) 及 proteintech 購買。(B) 轉染 1.5 μ g 帶有 FLAG 標籤之人類或小鼠的 LRH-1 全長蛋白至 HEK293T，以 proteintech 販售之 LRH-1 抗體分析。



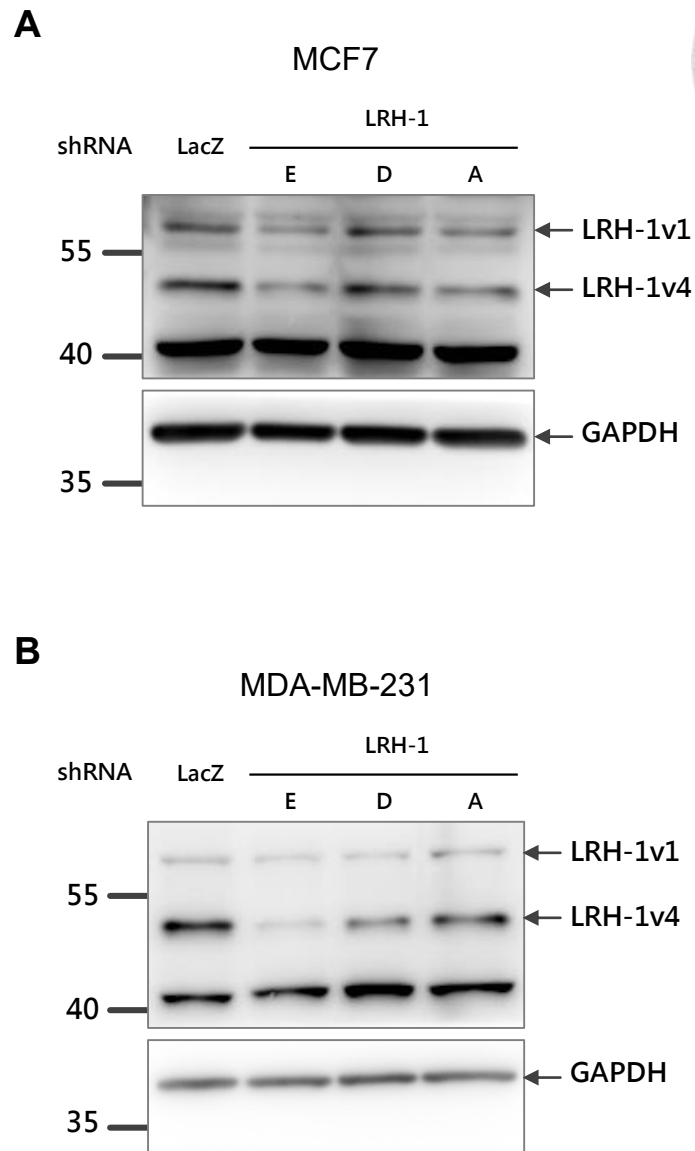
圖三、LRH-1 於 HepG2、MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 的 mRNA 表現

(A) Real-time RT-PCR 的配對引子示意圖。v1-F、v1-R 用於辨認 LRH-1v1，v4-F、v4-R 可專一性辨認 LRH-1v4。e5-F、e5-R 位於 exon 5。(B) 以 real-time RT-PCR 分析 HepG2、MCF7、T47D 及 MDA-MB-231 中，LRH-1v1、LRH-1v4 及 LRH-1 總量 (LRH-1e5) 的表現。圖中數據來自三次獨立實驗，以 Mean \pm SEM 表示；經 one-way Anova 分析，其中 (B) 的 * 表示和 HepG2 相比達顯著差異，(C) 的 * 表示和 LRH-1v4 相比達顯著，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

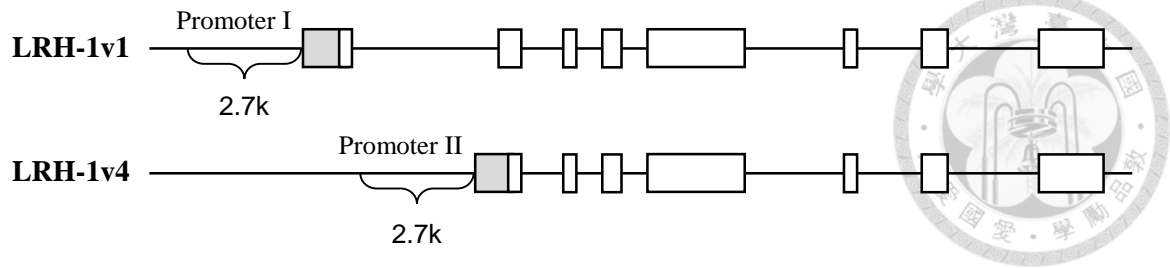
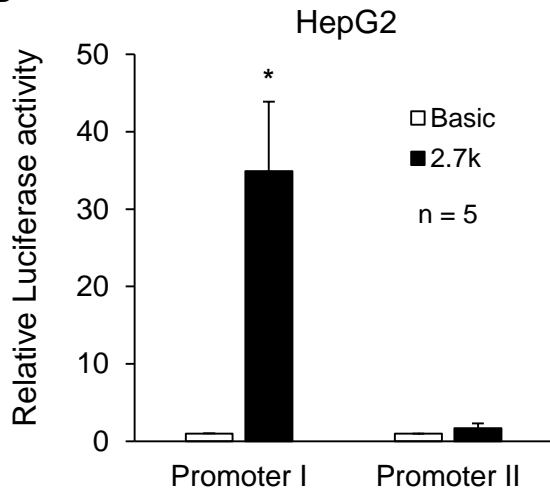
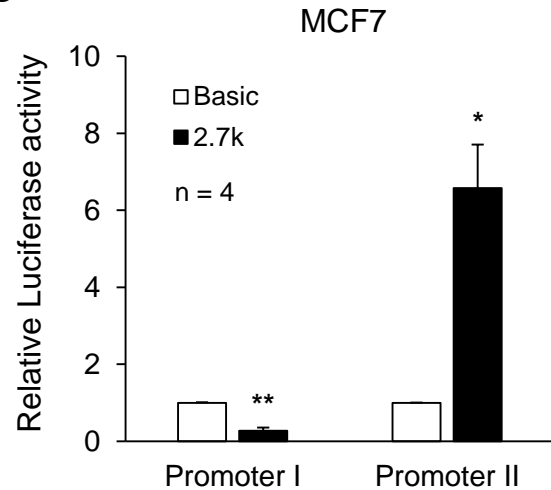
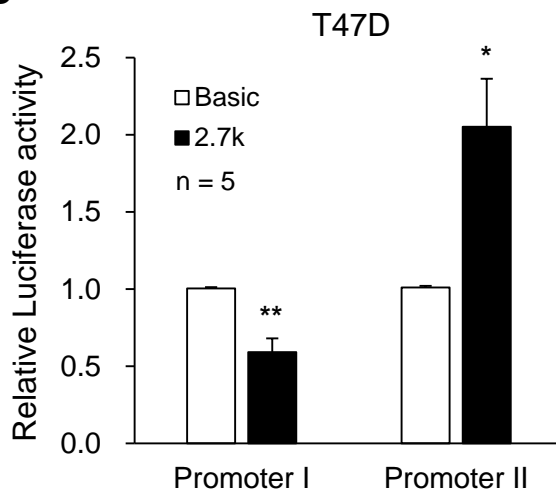
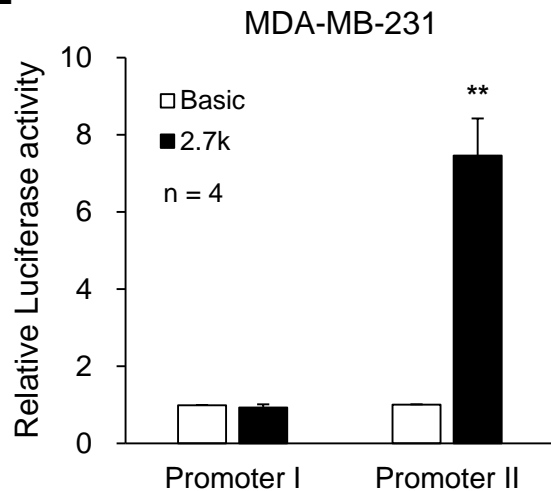


圖四、於 MCF7 及 MDA-MB-231 使用 shRNA 可降低 LRH-1 的 mRNA 表現

(A) 三種 shLRH-1 辨認位置的示意圖。將三種 shLRH-1 分別感染 MCF7 (B) 及 MDA-MB-231 (C) 後再用嘌呤黴素 (puromycin) 篩選一天，以 real-time RT-PCR 檢測 LRH-1v1、LRH-1v4 及 LRH-1 總量的 mRNA 表現。圖中數據由三次 (B) 或四次 (C) 獨立實驗所得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，* 表示和感染 LacZ 相比達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。

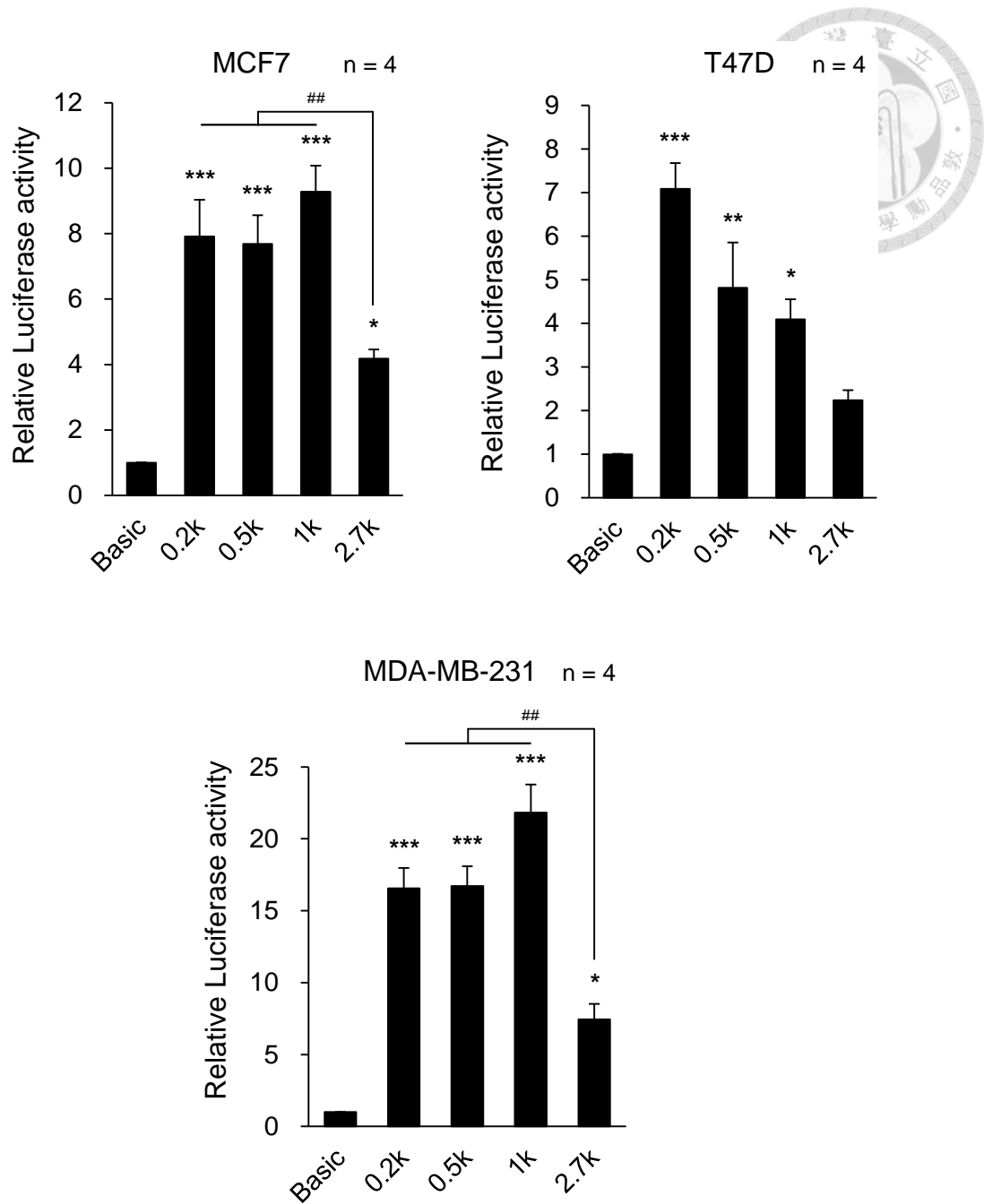


圖五、於 MCF7 及 MDA-MB-231 使用 shRNA 可降低 LRH-1 的蛋白表現
將三種 LRH-1 的 shRNA 分別感染 MCF7 (A) 及 MDA-MB-231 (B)，再用嘌呤黴素
篩選兩天，以西方墨點法分析 LRH-1 的蛋白情況。

A**B****C****D****E**

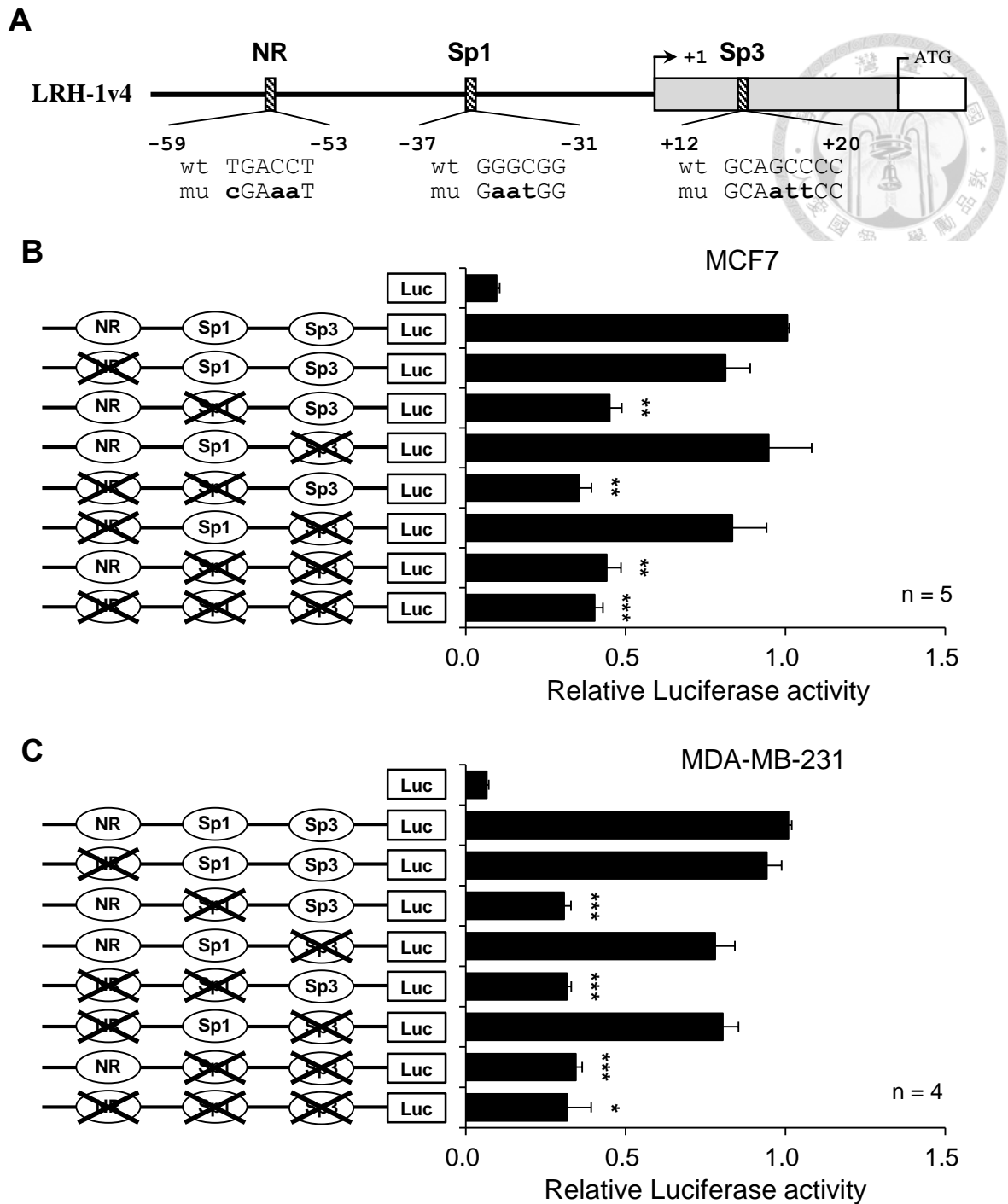
圖六、LRH-1 啟動子於 HepG2 及乳癌細胞株之活性

(A) LRH-1v1 的啟動子 (啟動子 I) 及 LRH-1v4 的啟動子 (啟動子 II) 的示意圖。各取 2.7k 啟動子 I 及啟動子 II 的序列，檢測兩者於 HepG2 (B)、MCF7 (C)、T47D (D) 及 MDA-MB-231 (E) 的活性。圖中數據由五次 (B, D) 或四次 (C, E) 獨立實驗而得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，* 表示和載體達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



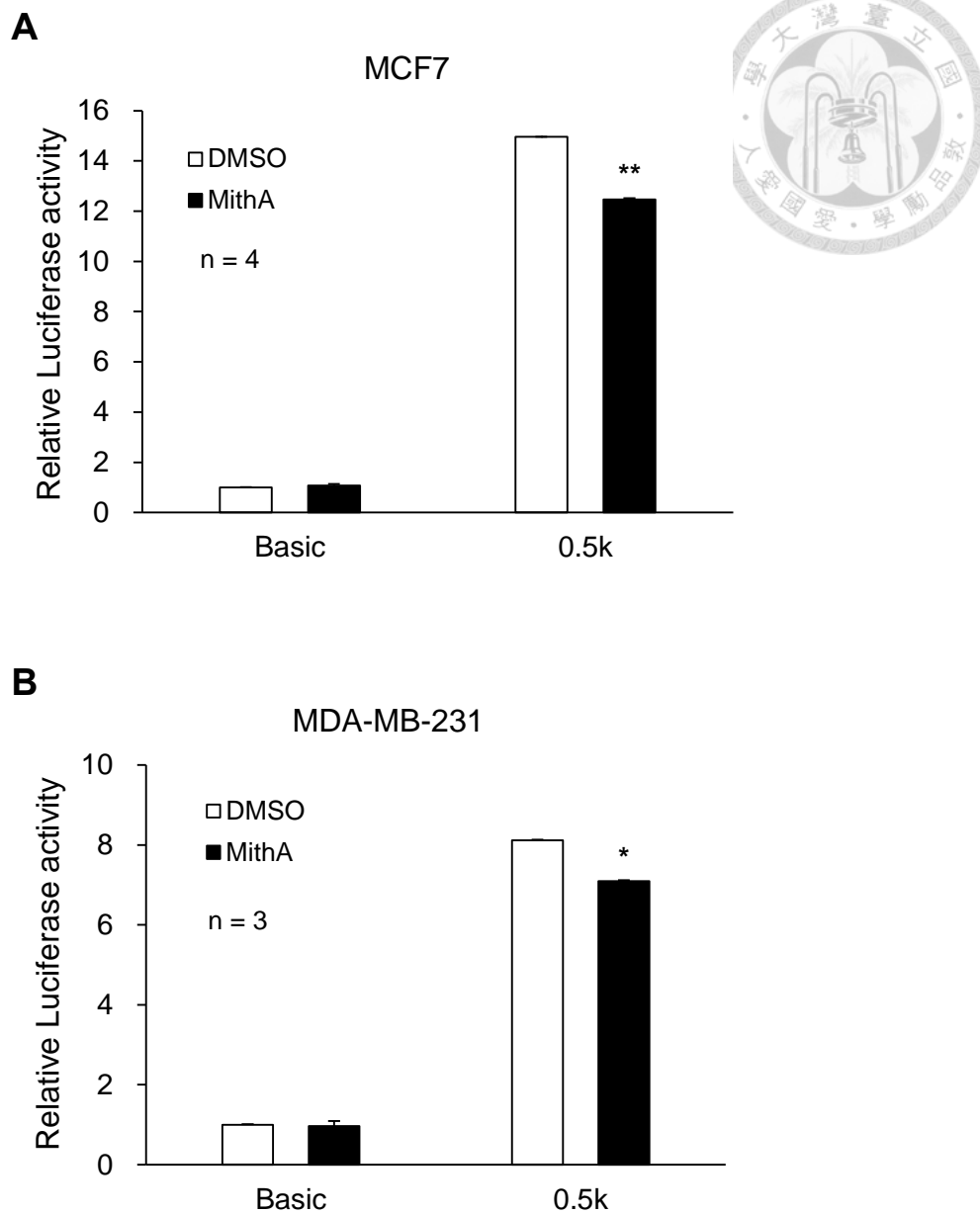
圖七、不同長度的 LRH-1 啟動子 II 於乳癌細胞株的啟動子活性

擷取 LRH-1 啟動子 II 之 0.2k、0.5k、1k 及 2.7k 片段，檢測各長度於 MCF7、T47D、MDA-MB-231 的活性。圖中數據皆由四次獨立實驗所得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 one-way Anova 分析，* 表示和載體相比達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ；# 表示和 2.7k 相比達顯著差異，## $p < 0.01$ 。



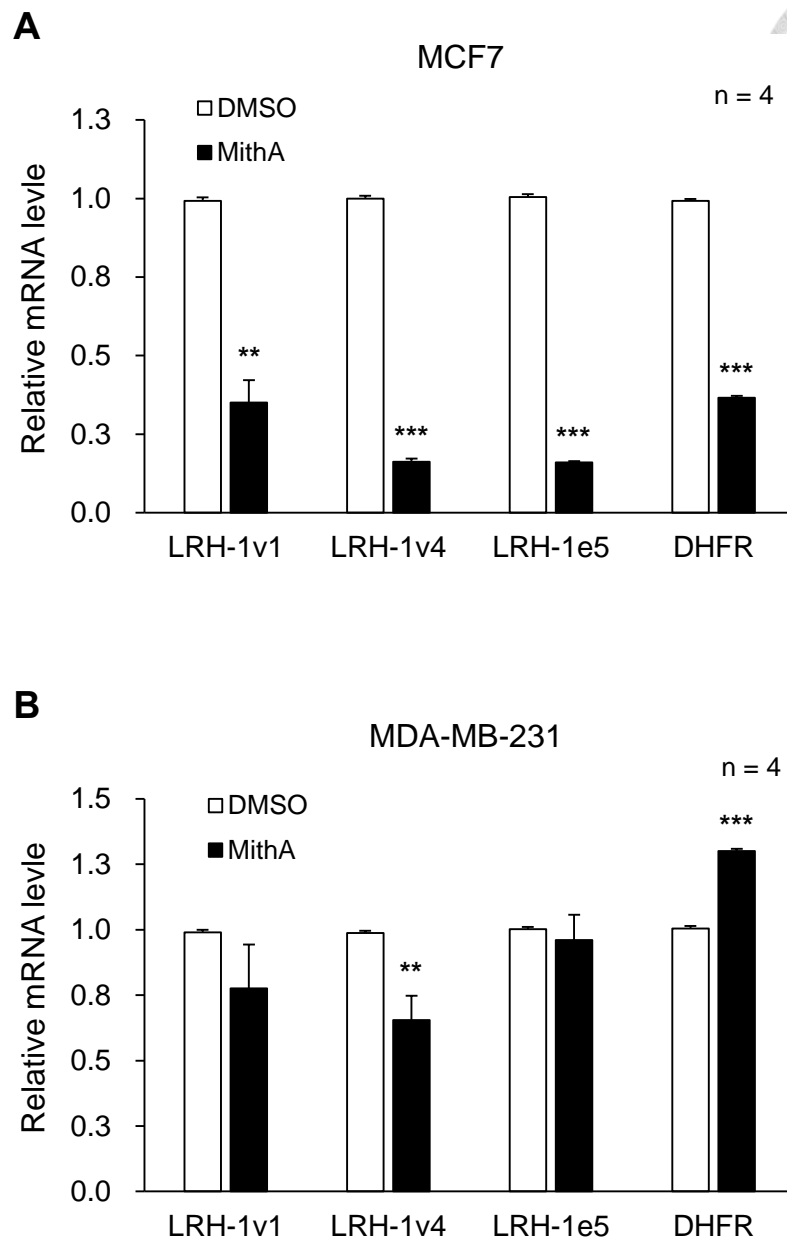
圖八、Sp1 結合序列突變減低 LRH-1 啟動子 II 的轉錄活性

(A) LRH-1v4 啟動子 (啟動子 II) 的示意圖。啟動子 II 有潛在的 nuclear receptor (NR)、Sp1 及 Sp3 結合位，小寫字母為突變的核苷酸。將 NR、Sp1 及 Sp3 的結合序列進行突變，分析各結合序列對 MCF7 (B) 及 MDA-MB-231 (C) 的影響。圖中數據由五次 (B) 或四次 (C) 獨立實驗而得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 one-way Anova 分析，* 表示和 0.5k 啟動子 II 相比達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



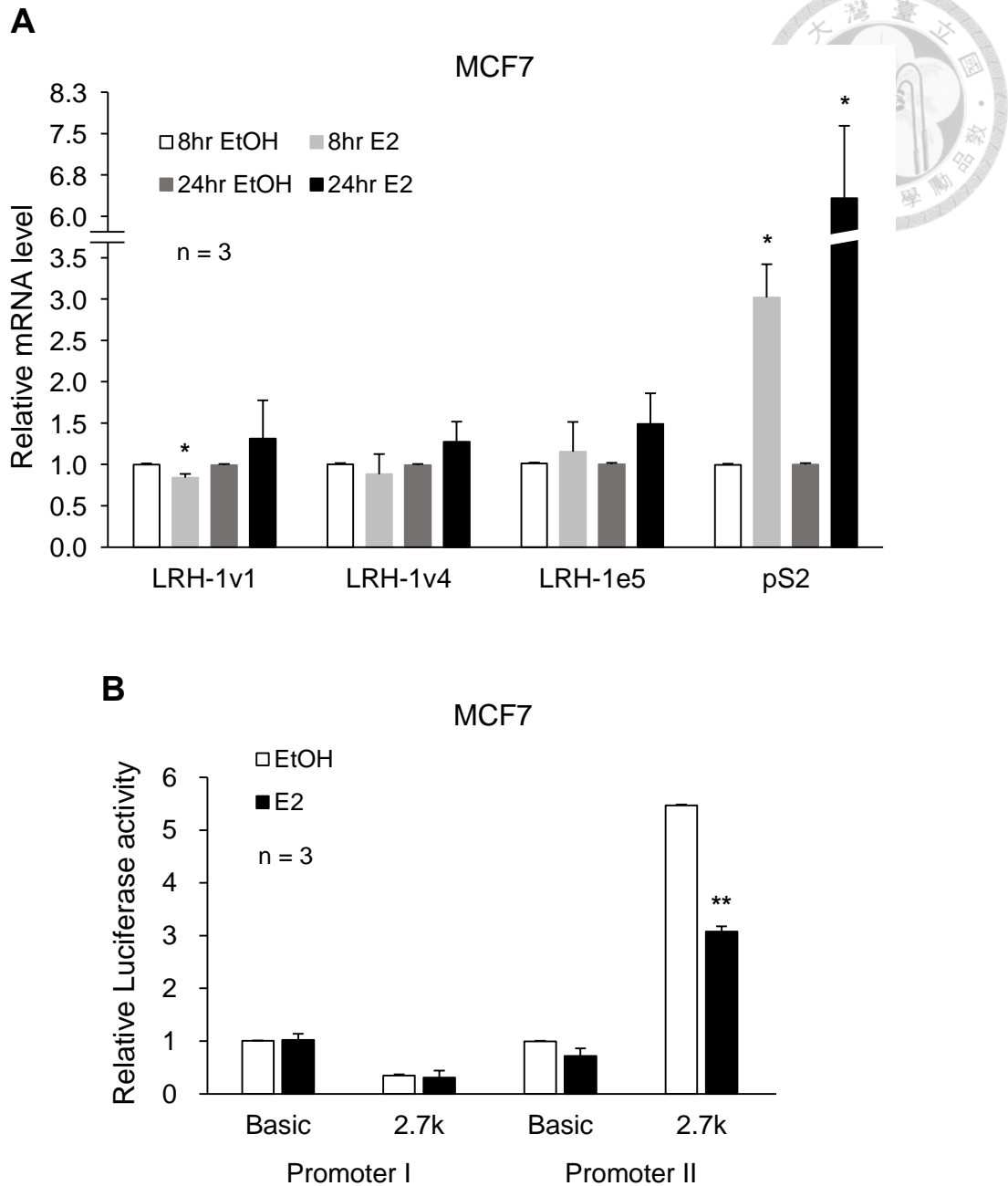
圖九、Sp1 抑制劑可降低 LRH-1 啟動子 II 的轉錄活性

MCF7 (A) 或 MDA-MB-231 (B) 轉染 0.5k 之 LRH-1 啟動子 II 的片段 24 小時後，給予 100 nM mithramycin A (MithA) 處理 24 小時，再檢測 LRH-1 之啟動子活性。圖中數據由四次 (A) 或三次 (B) 獨立實驗而得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，* 表示和載體相比達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。



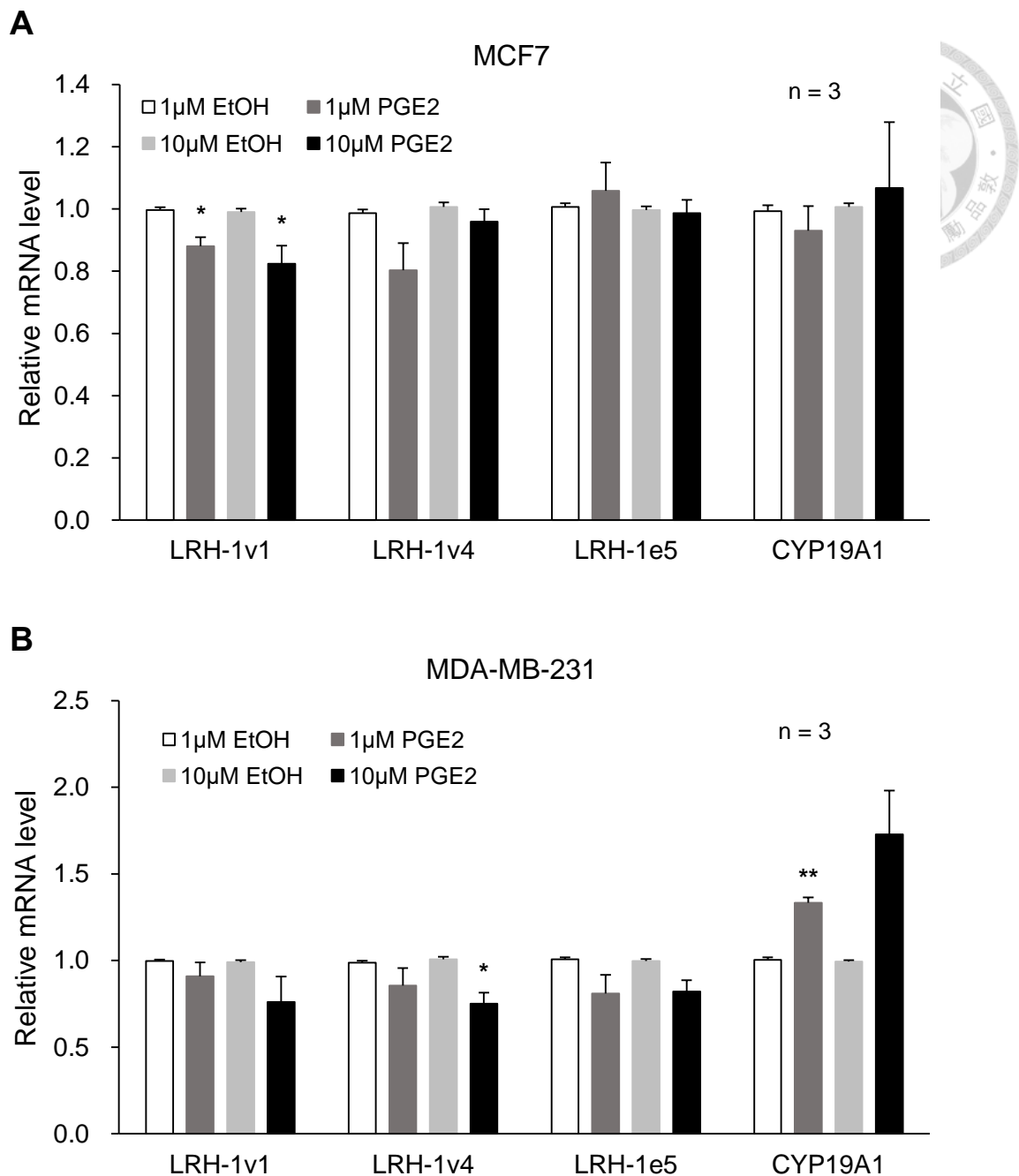
圖十、Sp1 抑制劑可降低 LRH-1 的 mRNA 表現

給予 Sp1 抑制劑 mithramycin A (MithA, 200 nM) 24 小時，以 real-time RT-PCR 分析 LRH-1v1、LRH-1v4 及 LRH-1 總量於 MCF7 (A) 或 MDA-MB-231 (B) 的 mRNA 表現，DHFR 為 MithA 的正控制。圖中數據皆由四次獨立實驗所得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，* 表示和 DMSO 處理相比達顯著差異，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



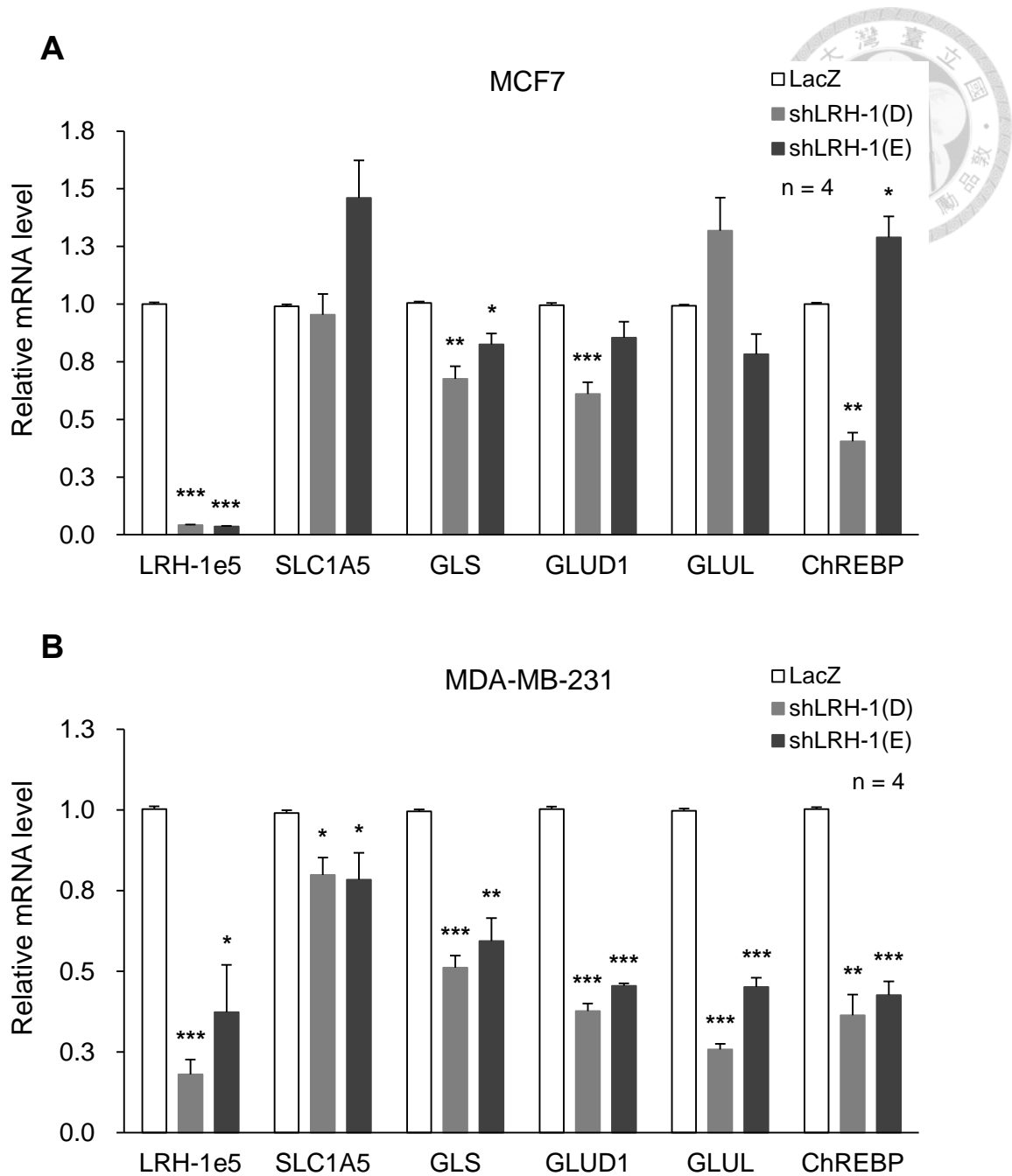
圖十一、於 MCF7 處理 E2 對 LRH-1 mRNA 表現及啟動子活性的影響

將 MCF7 培養於 phenol red-free DMEM 72 小時後，(A) 給予 10 nM 17 β -estradiol (E2) 作用 8 或 24 小時，以 real-time RT-PCR 分析 LRH-1v1、LRH-1v4 及 LRH-1 總量的表現。pS2 為 E2 的正控制；(B) 先轉染 2.7k 之 LRH-1 啟動子 I 或啟動子 II，再給予 10 nM E2 作用 24 小時，檢測啟動子活性。圖中數據皆由三次獨立實驗而得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，* 表示和 EtOH 處理相比達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。



圖十二、於 MCF7 及 MDA-MB-231 處理 PGE₂ 對 LRH-1 mRNA 表現的影響

將 MCF7 (A) 或 MDA-MB-231 (B) 培養於血清缺乏的 DMEM 24 小時，再給予 1 或 10 μM prostaglandin E₂ (PGE₂) 24 小時，分析 LRH-1v1、LRH-1v4 及 LRH-1 總量的 mRNA 表現。CYP19A1 作為 PGE₂ 的正控制。圖中數據皆由三次獨立實驗所得，以 Mean ± SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，* 表示和 EtOH 處理相比達顯著差異，* p < 0.05，** p < 0.01。



圖十三、於 MCF7 及 MDA-MB-231 抑制 LRH-1 對麩醯胺酸代謝的影響

以兩種 LRH-1 的 shRNA 感染 MCF7 (A) 或 MDA-MB-231 (B)，以嘌呤黴素篩選 72

小時，再進行 real-time RT-PCR 分析麩醯胺酸代謝、醣類與脂質代謝相關基因的表現。

圖中數據皆由四次獨立實驗而得，以 Mean \pm SEM 表示；經由 unpaired t-test 分析，

* 表示和感染 LacZ 相比達顯著差異，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



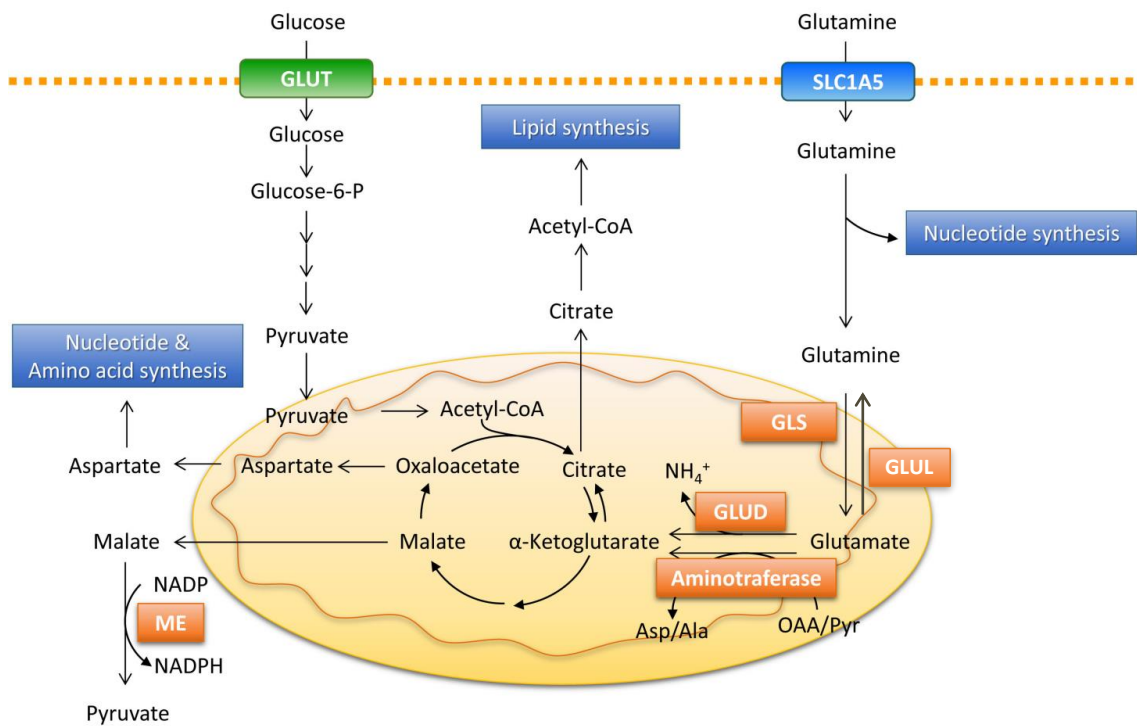
表七、抑制 LRH-1 對麩醯胺酸代謝相關基因表現的影響

以 shRNA 抑制 LRH-1 於 MCF7 及 MDA-MB-231 的表現。圖表中×代表無顯著影響，↓代表顯著下降，↑代表顯著上升。

Gene	MCF7		MDA-MB-231	
	shLRH-1(D)	shLRH-1(E)	shLRH-1(D)	shLRH-1(E)
SLC1A5	×	×	↓	↓
GLS	↓	↓	↓	↓
GLUD1	↓	×	↓	↓
GLUL	×	×	↓	↓
ChREBP	↓	↑	↓	↓



附圖一、麩醯胺酸代謝路徑示意圖



擷取自：Choi, Y.K., & Park, K.G.; Targeting glutamine metabolism for cancer treatment.

Biomolecules & therapeutics 2018, 26(1):19.

GLS, glutaminase; GLUD, glutamate dehydrogenase; GLUL, glutamine synthetase;

SLC1A5, solute carrier family 1 member 5.