

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物科技研究所



碩士論文

Institute of Biotechnology
College of Bioresource and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

β -1, 3-半乳糖基轉移酶 5 及 Globo-系列醣神經鞘脂質

在 MCF-7 乳癌細胞遷移與貼附角色之探討

The roles of β -1, 3-galactosyltransferase 5 and globo
series glycosphingolipids in MCF-7 breast cancer cells
migration and adhesion

黃子瑋

Tz-Wei Huang

指導教授：宋麗英 博士

Advisor : Li-Ying Sung, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August 2022

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

β -1, 3-半乳糖基轉移酶 5 及 Globo-系列醣神經鞘脂質在
MCF-7 乳癌細胞遷移與貼附角色之探討
The roles of β -1, 3-galactosyltransferase 5 and globo series
glycosphingolipids in MCF-7 breast cancer cells migration
and adhesion

本論文係黃子瑋君 (R08642009) 在國立臺灣大學生物科技研究所完成之碩士學位論文，於民國 111 年 7 月 11 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

辛嘉英

(指導教授)

陳全木


楊尚訓

謝新海

所長：


蔡至勳

致謝



在生技所的日子匆匆過了三年，無數的實驗失敗構築了這篇論文。感謝宋麗英老師在這段時間內耐心的教導。一半做實驗，一半做人。我時時銘記於心。此外亦感謝口試委員陳全木老師、楊尚訓老師以及游舒涵老師，在這個充斥著疫情的時代不辭辛勞與風險的參與我的畢業口試，無數的建議彌補我諸多思考上的不足。感謝張為芳博士以及卓煥傑博士在實驗初期的種種教導，時光久遠，只記得那時懵懂無知。感謝立廣和彭敏在實驗操作上的教學以及論文撰寫的修正，時光飛逝，只記得那時手足無措。碩班的這段時間總是容易迷失方向，特別感謝家駿學長在歸國的短暫時間裡對實驗室生活、實驗設計以及未來規劃的那枝稻稈。此外實驗室生活中感謝徐淨、家寬和虹霆的幫助、Alex的英文支援以及漢中的午餐時間，這些可能就是老師常說的實驗室珍貴資源。最後感謝阡瑩這些年的默默陪伴與支持，以及六張犁健康屋的那些快樂時光。能在各自的十字路口與你們相遇，我想我是幸運的。

摘要



乳癌是嚴重的全球性疾病之一，在臺灣每年約有 10,000 名女性被診斷出癌症，此外每年更是有約 2,000 名臺灣婦女死於乳癌。根據統計，乳癌轉移到次級器官是乳癌病患存活率下降的主要原因，然而乳癌轉移 (metastasis) 機制仍充滿未知。目前研究指出 Globo-系列醣神經鞘脂質 (globo series glycosphingolipids) 中的 SSEA3、SSEA4 及 Globo H 專一表現於乳癌細胞表面。且前人文獻中發現若將乳癌細胞株 MBA-MB-231 (ER⁻, PR⁻ and HER2⁻) knockdown 合成 SSEA3 的酵素 β -1, 3-半乳糖基轉移酶 5 (B3GALT5)，則會導致細胞降低遷移 (migration) 及貼附 (adhesion) 的能力。因此本研究希望進一步釐清 globo series glycosphingolipids 在乳癌轉移過程中所扮演的角色。本試驗藉由乳癌細胞株 MCF-7 (ER⁺, PR⁺ 以及 GR⁺) 中過度表現 B3GALT5，發現 MCF-7 不僅展現上皮細胞的特色，並降低間葉細胞生物標的，同時也降低其細胞遷移與貼附的能力。此結果指示 globo series glycosphingolipids 在 MCF-7 及 MBA-MB-231 中可能具有不同的功能。此外，我們發現過度表現 B3GALT5 所導致的細胞轉移能力缺失，可藉由 knockdown 合成 Globo H 的酵素 FUT1 達成修復，然而 knockdown 合成 SSEA4 的酵素 ST3GAL2，卻無法修復此等功能。上述結果指示 Globo H 的表現可能會抑制 MCF-7 細胞轉移能力。總結來說，在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 會提升 Globo H 及 SSEA4 表現量而非 SSEA3，但僅有 Globo H 表現量提升會抑制細胞遷移及貼附的能力。本試驗結果指出在不同乳癌細胞型態中，Globo-系列醣神經鞘脂質可能具有不同的功能，更進一步了解 globo series glycosphingolipids 在乳癌細胞轉移機制中所扮演的角色，將有助於乳癌治療策略的研發。

關鍵字：乳癌、 β -1, 3-半乳糖基轉移酶 5、Globo-系列醣神經鞘脂質、細胞遷移、細胞貼附、MCF-7 乳癌細胞株

Abstract



Breast cancer is among the leading causes of death worldwide. In Taiwan, about 10,000 cases are diagnosed and approximately 2,000 women die from breast cancer per year.

Despite the fact that metastasis is the major cause of cancer deaths, the underlying mechanisms remain poorly understood. SSEA3, SSEA4 and Globo H are globo series glycosphingolipids (GSLs) specifically expressed on the surface of breast cancer cells.

Knockdown of β 1,3-Galactosyltransferase 5 (B3GALT5), the enzyme catalyzes the formation of SSEA3, in breast cancer cell line MBA-MB-231 (negative for ER, PR and HER2), has been shown to decrease cell migration and adhesion. Hence, in this study, we aim to understand the roles of globo series GSLs and signaling pathways involved in breast cancer metastasis. By overexpression of B3GALT5 in breast cancer cell line MCF-7 (positive for ER, PR and GR), we found that MCF-7 not only exhibits features of epithelial cells, but also decreased cell migration, adhesion and the expression of mesenchymal markers. These results indicate that globo series GSLs might have different functions between MCF-7 and MBA-MB-231. In addition, overexpression of B3GALT5 in MCF-7 impaired cell migration and adhesion, which could be recovered by knockdown of FUT1, the Globo H biosynthetic enzyme. In contrast, knockdown of ST3GAL2, the SSEA4 biosynthetic enzyme, would not affect cell migration and adhesion in B3GALT5-overexpression cells. These data suggest the expression of Globo H might inhibit the cell motility of MCF-7. Collectively, our findings indicated that overexpression of B3GALT5 in MCF-7 promotes the expression of Globo H and SSEA4 instead of SSEA3. Moreover, only the increasing of Globo H inhibits migration and adhesion of MCF-7 cells. The globo series GSLs might play different roles in different breast cancer cell types. Further understanding the mechanism of metastasis will help us to develop new therapeutic strategy for breast cancer.

Keywords : breast cancer, B3GALT5, globo series glycosphingolipids, migration, adhesion, MCF-7 breast cancer cell line

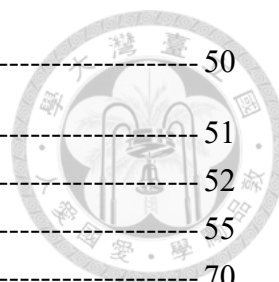


目次



致謝	i
摘要	ii
Abstract	iii
目次	v
圖次	vii
表次	ix
縮寫表	x
第一章 前言及文獻探討	1
1-1. 前言	2
1-2. 文獻探討	3
1-2-1. 乳癌	3
1-2-2. Epithelial mesenchymal transition (EMT) 及 mesenchymal epithelial transition (MET)	4
1-2-3. 乳癌轉移	5
1-2-4. Globo series 醣神經鞘脂質 (glycosphingolipids, GSLs)	7
第二章 誘導乳癌細胞進行 EMT 對 globo series GSLs 及 B3GLAT5 之影響	13
2-1. 背景	14
2-2. 材料與方法	15
2-3. 結果	17
2-4. 討論	25
第三章 B3GLAT5 對乳癌細胞轉移能力之影響	27
3-1. 背景	28
3-2. 材料與方法	29
3-3. 結果	33
3-4. 討論	48

第四章 乳癌細胞中 globo series GSLs 功能的探討	50
4-1. 前言	51
4-2. 材料與方法	52
4-3. 結果	55
4-4. 討論	70
綜合討論	72
總結與未來展望	74
參考文獻	75
附錄	83



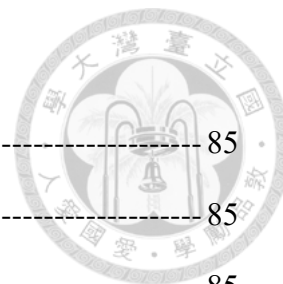
圖次



圖表 1. 細胞 EMT 和 MET 示意圖 -----	10
圖表 2. 乳癌細胞進程示意圖 -----	11
圖表 3. 乳癌細胞內 globo-series GSLs 合成圖 -----	12
圖表 4. 對 MCF-7 的 EMT 誘導進行優化 -----	19
圖表 5. TGF- β 誘導 MCF-7 進行 EMT 促使 B3GALT5 表現量降低 -----	21
圖表 6. TGF- β 誘導 MCF-7 進行 EMT 後，SSEA3、SSEA4 及 Globo H 的表現量 沒有顯著的改變 -----	23
圖表 7. 誘導 MCF-7 進行 EMT 後，B3GALT5 的表現量顯著下降，然而 SSEA3 以及 SSEA4 表現量沒有顯著的改變 -----	24
圖表 8. 建立 B3GALT5 表現質體 -----	36
圖表 9. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 -----	38
圖表 10. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後之細胞型態改變 -----	40
圖表 11. 在 MCF-7 中過度表現 B3GLAT5 後 epithelial markers 與 mesenchymal markers 都顯著的降低 -----	42
圖表 12. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後，MCF-7 的遷移能力降低 -----	44
圖表 13. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後，MCF-7 對 ECM 的貼附能力降低 -----	46
圖表 14. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 導致細胞遷移以及貼附能力下降 --	47
圖表 15. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後可使 SSEA4 表現量上升 -----	60
圖表 16. MCF-7 中不表現 FUT2 -----	61
圖表 17. 在過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中分別 knockdown ST3GAL2 以及 FUT1 導致 SSEA4 及 Globo H 表現量降低 -----	64
圖表 18. 過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中 knockdown FUT1 可使遷移能力回升 -----	66

圖表 19. 過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中，knockdown FUT1 可使細胞對 ECM 貼附能力回升-----	68
圖表 20. 在過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中 knockdown FUT1 促使細胞遷移並對 ECM 貼附能力回升 -----	69
附錄圖表 1. 圖表 4A 原始資料-----	83
附錄圖表 2. 圖表 4B 原始圖像資料-----	83
附錄圖表 3. 圖表 5B 原始資料-----	84
附錄圖表 4. 圖表 16A 原始資料 -----	84

表次



附錄表格 1. 圖表 5C-E 原始數據	85
附錄表格 2. 圖表 6B 原始數據	85
附錄表格 3. 圖表 9D 原始數據	85
附錄表格 4. 圖表 10B 原始數據	85
附錄表格 5. 圖表 10C 原始數據	85
附錄表格 6. 圖表 11A 原始數據	85
附錄表格 7. 圖表 11B 原始數據	85
附錄表格 8. 圖表 11E 原始數據	86
附錄表格 9. 圖表 12C 原始數據	86
附錄表格 10. 圖表 13C 原始數據	86
附錄表格 11. 圖表 15F-H 原始數據	86
附錄表格 12. 圖表 17A, B 原始數據	86
附錄表格 13. 圖表 17E 原始數據	86
附錄表格 14. 圖表 17F 原始數據	86
附錄表格 15. 圖表 18B 原始數據	87
附錄表格 16. 圖表 19B 原始數據	87
附錄表格 17. Cloning、PCR 以及 qPCR 所需引子	88

縮寫表



glycosphingolipids	GSLs
stage-specific embryonic antigens	SSEAs
stage specific embryonic antigen 3	SSEA3
stage specific embryonic antigen 4	SSEA4
globohexaosylceramide	Globo H
beta-1,3-galactosyltransferase 5	B3GALT5
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	ST3GAL2
fucosyltransferase 1	FUT1
fucosyltransferase 2	FUT2
epithelial-mesenchymal transition	EMT
mesenchymal- epithelial transition	MET
extracellular matrix	ECM
metalloproteinases	MMPs
ductal carcinoma in situ	DCIS
invasive ductal carcinoma	IDC
circulating tumor cells	CTC
bone marrow-derived cells	BMDC
vascular endothelial growth factor	VEGF
epidermal growth factor receptor	EGFR
short hairpin RNA	shRNA
induced pluripotent stem cell	iPSC
transforming growth factor beta	TGF- β
mitogen-activated protein kinase	MAPK
phosphoinositide 3-kinase	PI3K
focal adhesion kinase	FAK
green fluorescent protein	GFP
fluorescence activated cell sorting	FACS



第一章

前言及文獻探討

1-1. 前言

美國每年約有 500,000 人死於癌症，在眾多癌症之中，乳癌的確診率及死亡率都高居第二 (DeSantis *et al.*, 2019)，而乳癌確診率在臺灣婦女癌症中亦高居首位 (Taiwan Centers for Disease Control, 2022)。另一方面，醣神經鞘脂質 (glycosphingolipids, GSLs) 是表現在細胞膜表面的醣脂質，在正常細胞中 GSLs 的表現會改變細胞通訊、細胞貼附性及細胞分化的程度。此外，癌細胞的 GSLs 表現量異常通常被認為和癌細胞的癌化程度息息相關，因此成為觀測癌症的標的之一。近期研究發現 globo series GSLs 的末端產物 SSEA3、SSEA4 以及 Globo H，與其關鍵酵素 B3GALT5 會專一性表現於乳癌細胞中，並被認為是乳癌細胞的其中一種生物標記物 (biomarkers) (Cheung *et al.*, 2016)。此外，B3GALT5 與 globo series GSLs 的表現亦與乳癌細胞的遷移及貼附能力有關 (Chuang *et al.*, 2019)，然而，目前對於 globo series GSLs 影響乳癌細胞轉移的機制仍不清楚。因此，本篇研究將藉由過度表現 B3GALT5 於 MCF-7 乳癌細胞株，探討 globo series GSLs 與其關鍵酵素於乳癌轉移過程之中可能扮演的角色，以提供未來臨床發展治療乳癌的策略。



1-2. 文獻探討

1-2-1. 乳癌

早在西元前 1,500 年，古埃及人即對乳癌有所記載，3,500 年後的今天，它已成為現代女性最常被診斷出來的癌症之一，死亡率居高不下 (Nounou *et al.*, 2015)。全美國每年因乳癌死亡的人數約為 500,000 人 (Tse & Kalluri, 2007)，其中，女性被診斷患有乳癌的數量和致死率皆為所有癌症中的第二名 (DeSantis *et al.*, 2019)。而乳癌在臺灣女性的發生率也高居所有癌症之冠，每年約有 2,000 位婦女因乳癌過世。因此不論國內或者國外，乳癌的研究對於婦女來說是極為重要的 (Taiwan Centers for Disease Control, 2022)。

乳癌的形成原因分為遺傳性基因突變與後天環境造成，約只有 5~15% 的乳癌病患是由先天遺傳所導致，其中以 BRCA1 和 BRCA2 基因突變最為出名 (Colditz *et al.*, 2012)。後天形成的乳癌通常被認為是環境所造成之基因變異或表觀遺傳改變導致乳細胞的變異，其中包含：1) 細胞週期檢查點失調導致細胞不正常增生；2) 細胞凋亡能力的缺失，例如 p53 蛋白突變導致乳癌細胞的永生 (immortalization)；3) 訊號途徑的改變亦會導致細胞更加癌化，其中較著名的例子為異常的 Wnt signaling pathway 導致乳癌細胞生長能力以及轉移能力的增加 (Feng *et al.*, 2018)。目前乳癌的分類主要依照乳癌細胞是否表現 human epidermal receptor 2, estrogen receptor, progesterone receptor 及 ki67 蛋白表現，分為五種亞型，包括：Luminal A, Luminal B, Her2-enriched, triple negative 和 normal-like，其中以三陰性 (triple negative) 乳癌細胞生長快、轉移性較強且無賀爾蒙受器以進行賀爾蒙治療，因此最為惡性 (Allison *et al.* 2012)。

乳癌的期數分類是由 TNM 分期系統 (staging system) 來區分預後的好壞，T 代表腫瘤大小，N 代表擴散至淋巴結的程度，M 代表癌細胞轉移到其他器官的程度。根據此分類系統，乳癌可被分成零到四期，第零期代表乳癌為原位癌狀

態；第一期代表乳癌開始侵犯到周邊組織；第二期和三期則代表乳癌已經開始轉移到附近淋巴結；第四期代表乳癌已經成功轉移到遠端器官。

如果能在癌細胞還沒開始轉移的第零或第一期診斷出乳癌，可較容易找出適當的治療方法，並且提高病患的生存機率 (Duncan *et al.*, 1976)。因此，目前研究多針對早期乳癌的發現，以及如何提供乳癌即時且合適的治療為主。乳癌的檢測方法有觸診、使用低劑量的 x-ray 進行乳房攝影 (mammography)、磁振造影 (magnetic resonance imaging, MRI) 和對病人檢體進行生化分析 (Bhushan *et al.*, 2021)。早期的乳癌治療方法為手術移除腫瘤，並搭配放射性治療和化學療法殺死剩餘癌細胞，此外，亦藉由移除乳癌周圍淋巴結，進而防範癌細胞的擴散。然而這些療法容易影響病患的免疫系統，且無法確實殺死所有癌細胞，導致乳癌復發率居高不下。賀爾蒙療法為近期所研發之治療方法，雖然可藉由阻斷乳癌細胞賀爾蒙受器，達到專一性抑制大多數需要賀爾蒙的乳癌細胞，但對於缺少賀爾蒙受器的 triple negative 及 Her2⁺ 亞型之乳癌細胞並無法達到抑制作用。因此，研發對乳癌細胞高專一性的標靶治療即為現在乳癌治療的研究主流。伴隨精準醫療的推廣，找出乳癌細胞上專一的生物標記，不但可以幫助我們判斷乳癌細胞的惡性與否，並且有助於標靶治療的發展 (Nathanson *et al.*, 2021)。

1-2-2. Epithelial mesenchymal transition (EMT) 及 mesenchymal epithelial transition (MET)

上皮細胞間質轉化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 為許多細胞在進行移動前所需要的型態轉換，其最主要的功能為將細胞從上皮細胞 (epithelial) 型態轉變成間質細胞 (mesenchymal) 型態，從而促使細胞增加遷移以及對細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 的貼附能力。在傷口癒合、早期胚胎發育與癌細胞轉移，皆可觀察到 EMT 現象。癌細胞的 EMT 發生原因為周圍細胞所分泌的 TGF- β 促使細胞基因轉錄組發生改變，增進間質細胞相關基因的表現，包括

SNAI1/2、ZEB、TWIST1、GRHL2、OVOL1/2 以及 PRRX1 等 (Tam & Weinberg, 2013)。間質相關基因的變化促進細胞骨架結構產生改變，進而影響細胞的轉移能力。此外，細胞膜上負責細胞 adherens junction 的穿膜蛋白 E cadherin 表現量降低，除了導致細胞與細胞間物理上的連結度下降 (Chaffer *et al.*, 2016)，亦促使與 E cadherin 相連接的 β -catenin 進入細胞核，並且與 TCF4 相結合成為轉錄因子，進而促進細胞生長 (Schmalhofer *et al.*, 2009)。另一方面，EMT 還會導致 N cadherin 表現上升，進而增進細胞對於 ECM 的貼附能力。這些改變均會增進細胞的生長、遷移、對 ECM 的貼附以及侵入周邊組織的能力，使癌細胞更容易穿越周邊細胞組織幫助其成功轉移。有鑑於 E cadherin 與 N cadherin 在 EMT 中扮演重要功能，兩種蛋白質已普遍被認為是判斷 EMT 的生物標記之一 (Nieto *et al.*, 2016)。細胞型態間的轉換是可逆的，近期文獻中發現細胞型態不僅可從 epithelial 轉變成 mesenchymal，也能從 mesenchymal 轉變成 epithelial，此過程稱之為 mesenchymal epithelial transition (MET) (圖 1)。MET 現象的發生代表細胞失去轉移的自由度，並轉化其頂面-底側極性 (apico-basal polarity)，且再次表現維持細胞與細胞間接合相關的複合物，以增進細胞間的連結度。許多上皮細胞癌 (epithelial cancers) 透過進行 EMT 以幫助其轉移後進行 MET，進而協助癌細胞在特定器官形成聚落 (Thiery *et al.*, 2009)。

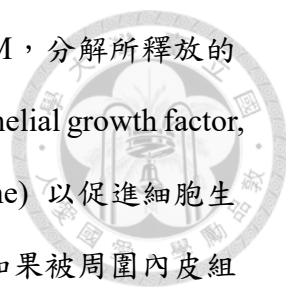
1-2-3. 乳癌轉移

大多數乳癌來自乳管中上皮細胞 (70%~80%)，或負責製造乳汁的乳小葉內的上皮細胞變異而造成 (Brennan *et al.*, 2009)。由全基因組定序 (whole genome sequencing, NGS) 分析技術發現 560 個原位癌細胞 (primary breast cancer cells) 中，每個癌細胞平均發生了 6,124 個 DNA 點突變，665 個基因序列的移除及插入 (Nik-Zainal *et al.*, 2016)，藉由累積許多基因突變，乳癌細胞獲得增生以及轉移能力 (圖 2)，這些轉變促使乳癌從非侵襲性的乳腺管原位癌 (ductal carcinoma

in situ, DCIS) 變成侵襲性乳腺管癌 (invasive ductal carcinoma, IDC) ，而 IDC 則具有更強的轉移能力，促使乳癌細胞轉移到遠端器官。當癌細胞轉移到其他器官時，病人的存活率即會顯著下降。據統計，約有 25%~50% 乳癌病患，儘管切除了初級腫瘤，仍然會因為乳癌細胞的轉移導致死亡 (Lorusso *et al.*, 2012) 。

乳癌轉移的第一步為侵入周邊組織，在此之前周圍的基質細胞 (stroma cells) 會分泌 TGF- β 促使乳癌細胞進行 EMT，此現象增進了癌細胞的轉移能力，為癌細胞轉移前重要的型態改變。接著細胞會分泌金屬蛋白酶 (metalloproteinases, MMPs) 分解周邊組織的基底膜 (basement membrane) 並進行入侵，乳癌細胞從 DCIS 轉變為 IDC，此為乳癌細胞正式轉移的指標 (Hanahan *et al.*, 2011) 。第二步驟為癌細胞入侵血液循環系統以及淋巴系統，此時這些細胞統稱為循環腫瘤細胞 (circulating tumor cells, CTC) 。CTC 會藉由分泌 L selectin 和 P selectin 與血小板以及白血球進行接合，此交互作用能幫助 CTC 在血液循環系統內的轉移 (Witz 2008) 。此外在血液循環系統中，CTC 會進行休眠以確保在轉移過程中癌細胞的存活 (Fabisiewicz & Grzybowska 2016) 。目前根據乳癌的休眠提出兩種假說：single cell dormancy 與 micrometastasis dormancy。前者癌細胞以單一細胞形式侵入血液循環系統，並維持在細胞週期之 G0~G1 期；後者認為癌細胞以細胞團塊為單位進行轉移，過程中癌細胞會持續進行生長，但由於外在環境的免疫反應，以及細胞團塊內新生血管之限制，使細胞團維持在特定大小 (Fehm *et al.*, 2008) 。最後一個步驟為乳癌細胞進入到其他器官進行 MET，細胞型態從 mesenchymal like 再次轉變回 epithelial like，幫助癌細胞停留在次級器官 (Sulaiman *et al.*, 2018) 。此外，乳癌細胞還會分泌一些細胞激素 (cytokines) ，促使該環境產生發炎現象並避免發生免疫反應，次級器官的基質細胞隨之改變其基因轉錄組以調整成適合癌細胞生長的微環境 (Mao *et al.*, 2013; Neophytou *et al.*, 2021) 。

乳癌次級腫瘤的生長需要一定養分供給，先前的研究中也發現骨髓源性細胞 (bone marrow-derived cells, BMDC) 會釋放 VLA-4 跟 fibronectin 產生相互作用，



此交互作用會使 BMDC 釋放 MMPs 分解次級腫瘤附近的 ECM，分解所釋放的 ECM 因子會促使癌細胞分泌血管內皮生成因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)，此種細胞激素會在乳癌細胞內形成胞內分泌 (intracrine) 以促進細胞生長以及增進存活能力。此外，此種激素也會被分泌到細胞外，如果被周圍內皮組織的上皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 所接收，則會進一步促使內皮細胞增生導致血管的新生，而新生的血管能提供乳癌次級腫瘤所需要的養分 (Kerbel, R. S. et al., 2008)。常見的乳癌轉移器官為大腦、肺臟、肝臟和骨頭。

在實驗中對乳癌細胞轉移的測量主要分為體外 (*in vitro*) 實驗以及體內 (*in vivo*) 實驗。*In vitro* 實驗主要對細胞的貼附能力、遷移能力及侵犯能力 (invasion) 進行測定 (Wang, L. et al., 2007)。*In vivo* 實驗中主要藉由將乳癌細胞注射入小鼠的尾靜脈或者乳腺脂肪中，藉此探討乳癌細胞在生物體內藉由循環系統轉移乳癌細胞的能力 (Khanna & Kent Hunter 2005; Fantozzi & Christofori 2006)。

1-2-4. Globo series 醣神經鞘脂質 (glycosphingolipids, GSLs)

GSLs 是一種表現在細胞膜表面的醣脂質，其組成是由親水端的醣類與疏水端的 ceramide 相互連結而生成。GSLs 坐落於細胞膜上的脂筏 (lipid raft)，並參與細胞與細胞間訊號的傳遞，促進免疫細胞釋放發炎因子，增進細胞貼附能力等相關反應，且在幹細胞分化上亦具有重要的功能。近期也發現細胞的癌化會影響不同種類 GSLs 的表現量與細胞膜上的分布比例 (Nitta *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2019)。

GSLs 可分為三大類：globo-series, ganglio-series 和 neolacto-series (Duncan *et al.*, 1976)。Globo series GSLs 專一表現於人類幹細胞以及癌細胞上，此特性使其在許多研究中受到重視 (Liang *et al.*, 2010)，Stage-specific embryonic antigens (SSEAs) 為 GSLs 的下游產物，被認為是幹細胞是否維持幹性 (stemness) 的標的

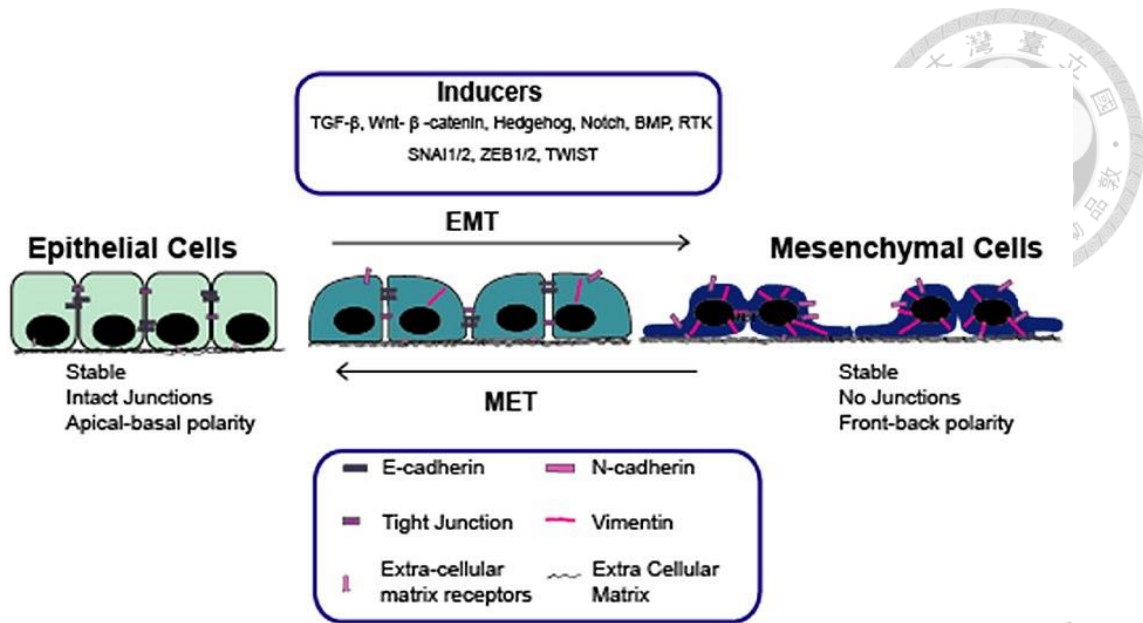
之一 (Ho *et al.*, 2016) 。Globo series GSLs 由半乳糖和葡萄糖所構成，包含 SSEA3, SSEA4 和 Globo H (圖 3) ，其皆由醣基轉移酶催化合成。此外，globo series GSLs 專一性表現於人類胚幹細胞 (human embryonic stem cell, hESC) 表面，因此被推測可能與全能性 (pluripotency) 有關連 (Henderson *et al.*, 2002) ；然而，亦有文獻指出 globo series GSLs 下游產物 SSEA3 與 SSEA4 的缺失，並不會影響小鼠誘導性多能幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPSC) 的全能性 (Hamamura *et al.*, 2020) 。除了可能與 stemness 相關外，近期有越來越多研究發現 globo series GSLs 與其相關酵素亦表現於多種癌細胞內，例如：乳癌、前列腺癌和胰臟癌 (Sivasubramaniyan *et al.*, 2015; Chuang *et al.*, 2019) 。因此，除了作為辨識癌細胞的標的之一，許多研究亦致力於探討 globo series GSLs 在癌細胞上的功能，尤其著重於專一性表現此醣脂質之癌細胞，以提供未來可能的治療方針 (Sigal *et al.*, 2021) 。

2016 年，中研院翁啟惠團隊發現乳癌細胞株專一性表現 SSEA3, SSEA4 和 Globo H 等 globo series GSLs ，且 SSEA3 的表現量與 colony 及 mammosphere 的形成能力呈現正相關。此外，將 MDA-MB-231 以及 MCF-7 乳癌細胞株打入小鼠體內，較高 SSEA3 表現量的乳癌細胞亦表現較高的致腫瘤性 (tumorigenicity) 。因此，SSEA3 被認為是乳癌細胞的生物標記之一 (Cheung *et al.*, 2016) 。接著於 2019 年，該團隊以免疫染色發現 SSEA3, SSEA4 和 Globo H 共同表現在乳癌細胞膜的 lipid raft 上，並且藉由調節 globo series GSLs 的關鍵酵素 B3GALT5，以 MDA-MB-231 的細胞模式證明了 B3GALT5 的降低會導致細胞活化 caspase 3，進而促使細胞凋亡，並且 B3GALT5 的降低也會導致乳癌細胞在遷移、貼附及侵犯的能力降低 (Cheung *et al.*, 2019) 。

有鑑於 globo series GSLs 在乳癌細胞上的專一性表現，以及於乳癌細胞轉移扮演重要角色，研發針對此類型醣脂質的抗體標定乳癌細胞，為具有潛力之標靶治療策略。因此，在 2021 年的一篇研究中進行了 globo series GSLs 最終產物

SSEA4 和 Globo H 對於抗體反應的實驗，受到 SSEA4 以及 Globo H 抗體標定之乳癌細胞株均會產生抗體依賴性細胞毒殺作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 的免疫反應 (Lee *et al.*, 2021) ，顯示了 SSEA4 以及 Globo H 在標靶治療中為具有潛能之候選目標。



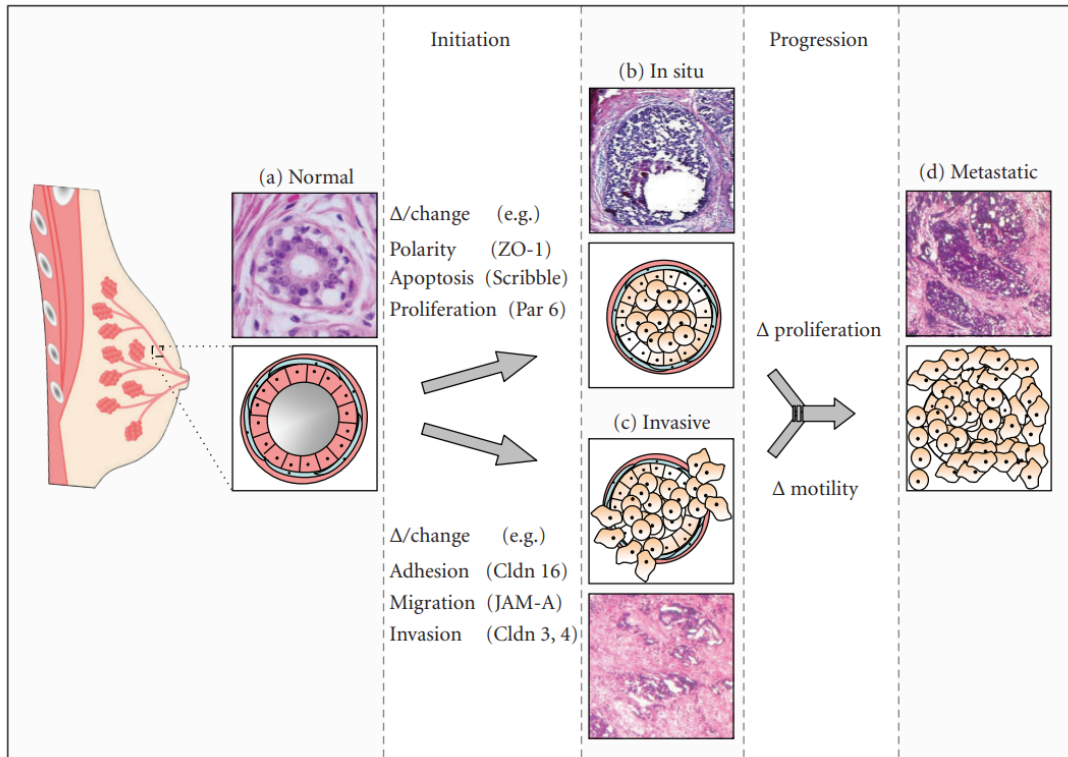


圖表 1. 細胞 EMT 和 MET 示意圖

細胞進行位移前會改變自身型態，從原本傾向於 epithelial 的細胞型態逐漸轉變成 mesenchymal 的細胞型態，稱為 EMT，此型態轉變幫助細胞增進遷移、貼附以及入侵周邊組織的能力。而此種型態上的轉變是可逆的，反轉 EMT 型態轉變的過程稱為 MET (Hill & Wang 2020)。

Figure 1. Illustration of EMT and MET

Cells alter morphology before migration. The phenomenon altering cell morphology from epithelial-like to mesenchymal-like is called EMT. It promotes cell migration, adhesion and invasion. Additionally, the process is reversible. it can change cell morphology contrarily, called MET.

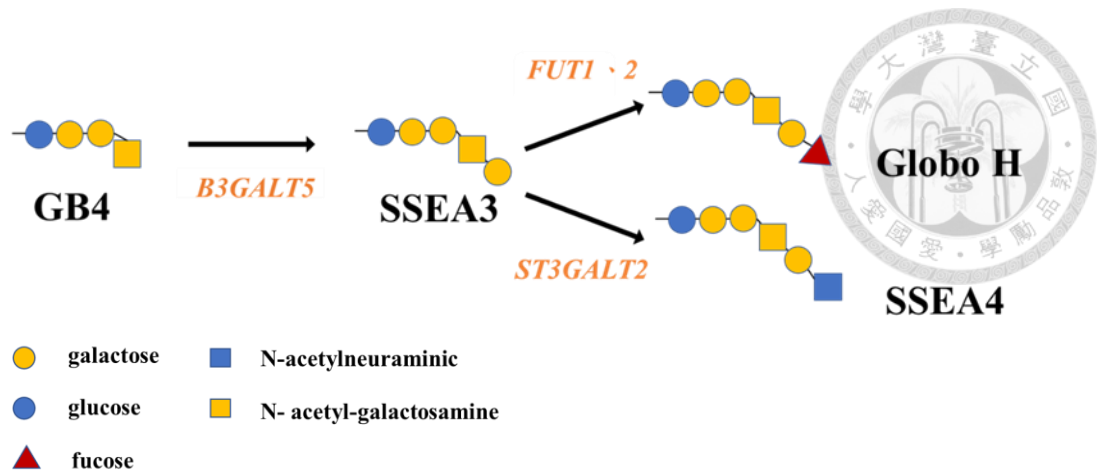


圖表 2. 乳癌細胞進程示意圖

大多數的乳癌細胞由乳管的上皮細胞所變異而來，隨者細胞變異的逐漸累積，乳癌細胞的增生能力以及轉移能力都會有大幅的提升，此能力的提升幫助乳癌細胞轉移到其他器官生成次級腫瘤 (Brennan *et al.*, 2010)。

Figure 2. Breast cancer cell progression

Most breast cancer cells originate from epithelial cells of breast duct. After the accumulation of gene mutation, breast cancer cell proliferation and metastatic ability increase, and the alteration promote breast cancer cells to migrate to secondary organs.



圖表 3. 乳癌細胞內 globo-series GSLs 合成圖

SSEA3 為 GB4 經由 B3GALT5 加上半乳糖胺 (galactosamine) 所製造而成，其下游的 globo H 為細胞經由 FUT1 或者 FUT2 在 SSEA3 的 galactosamine 後進行醴基化修飾加上岩藻糖 (fucose) 所形成，而 SSEA4 為 SSEA3 經由 ST3GAL2 進行醴基化修飾加上唾液酸 (sialic acid) 所製造而成。

Figure 3. The biosynthetic pathway of globo-series GSLs


By using B3GALT5, galactosamine was transfer to GB4 to create SSEA3. Then, SSEA3 was modified by FUT1 and FUT2 to produce Globo H. In other hand, SSEA3 can also modified by ST3GAL2 to produce SSEA4.



第二章

誘導乳癌細胞進行 EMT 對 globo series GSLs 及 B3GLAT5 之影響

2-1. 背景



基於 GSLs 在癌細胞上的高度表達，因此被認為是一種腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigens)。目前已知這些 GSLs 在癌細胞轉移時的貼附和遷移能力有重要的作用 (Hakomori *et al.*, 1991)。其中，以 SSEA3、SSEA4 與 Globo H 為主的 globo series GSLs，及其主要調控基因 B3GALT5，被發現專一的表現在乳癌細胞上，並且有助於乳癌細胞在轉移時的貼附與遷移能力 (Cheung *et al.*, 2016; Cheung *et al.*, 2019)。然而確切機制仍需更進一步瞭解。另一方面，EMT 在癌細胞轉移初始扮演重要的角色，EMT 能改變細胞骨架提升癌細胞的遷移能力。此外 EMT 也會改變細胞表面穿膜蛋白 E cadherin 和 N cadherin 的表現量，增進細胞對於 ECM 的貼附能力，並且降低細胞與細胞之間的物理連接 (Nieto *et al.*, 2016)。由於 globo series GSLs 的表現與 EMT 現象同樣都會影響乳癌細胞遷移及貼附的能力，且現在已知 globo series GSLs 的表現亦能促進與 EMT 有高度相關的 focal adhesion kinase (FAK) 訊號途徑 (Cheung *et al.*, 2019; Cicchini *et al.*, 2008)，暗示了乳癌細胞中 globo series GSLs 及細胞 EMT 之間可能的關聯。

乳癌初級腫瘤附近的基質細胞在癌細胞要進行轉移前會分泌 TGF- β ，並經由 MAPK 與 PI3K 等訊號途徑促使細胞進行 EMT (Akhurst *et al.*, 2012)。因此，透過 TGF- β 誘導 EMT 現象，被廣泛作為研究 EMT 的平台 (Tian *et al.*, 2017)。在本章節中，我們將基於此研究平台，於型態較為偏向 epithelial 之人類乳癌細胞株 MCF-7 中，探討乳癌轉移過程中 globo series GSLs 及其主要調控基因 B3GALT5 與 EMT 的關聯性。



2-2. 材料與方法

細胞培養

將 MCF-7 細胞貼附培養於 MEM 培養液 (11095-072, Gibco, United States) , 並且另外添加 Penicillin/Streptomycin (1%) (15140-122, Gibco, United States) 、sodium pyruvate (1%) (11360-070, Gibco, United States) 及 fetal bovine serum (FBS) (10%) (TMS-013-BKR, Germany)。細胞培養於含有 5% CO₂ 的潮濕 37 °C 細胞培養箱。

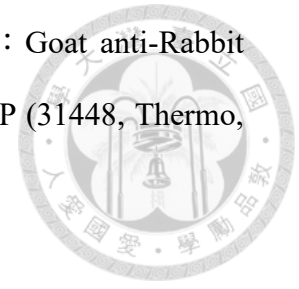
TGF- β 誘導細胞 EMT

將 6×10^5 細胞繼代到 12 孔盤 (353043, Corning, United States) 內等細胞貼附至孔盤底部，將孔盤內的培養液換成只含 1% FBS 的培養液進行 24 hr 前處理。進行 1% FBS 前處理後在培養液內加入 10 ng/ml TGF- β (100-21, PeproTECH, England) 進行 24 hr EMT 誘導後收取細胞。

西方墨點法

使用 RIPA (20-188, Merck Millipore, Germany) 從細胞中萃取出蛋白質，10 % polyacrylamide 膠進行電泳，並使用 PVDF membranes (GE Healthcare, United States) 進行濕式蛋白質轉印。將 PVDF membranes 浸泡在 5% milk in TBS 內室溫 30 min 進行 blocking 並加入抗體放置於 4 °C 並且放置過夜。當初級抗體成功結合在蛋白質上後使用 0.1% TBST 洗滌三次並加入二級抗體放置於室溫兩小時。使用 T Pro LumiFast Plus Chemiluminescent Substrate Kit (JT96-K002, T-Pro Biotechnology, Taiwan) 進行呈色並且使用 X-ray film 和 GeneGnome XRQ Chemiluminescence 影像處理系統擷取影像。使用的初級抗體：E cadherin (3195S, Cell Signaling, United States)、GAPDH (sc-47724, Santa Cruz, United States)、Tubulin (MAB1637, Merck Millipore, Germany)、Vimentin (V6630, Sigma-Aldrich, United States) 以及

B3GALT5 (MBS9419198, MyBioSource, Canada)。二級抗體：Goat anti-Rabbit IgG- HRP (A24531, Thermo, Taiwan)、Goat anti-Mouse IgG-HRP (31448, Thermo, Taiwan)。



流式細胞螢光分析與分選技術

使用胰蛋白酶 (trypsin) 將 10 cm 培養皿 (430167, Corning, United States) 的細胞從培養皿中解離，接著使用 5% FBS in DPBS 緩衝液將細胞回溶。加入初級抗體作用 30 min 並使用 5% FBS in DPBS 的緩衝液洗滌細胞，使用 0.45 篩孔 (mesh) 過濾互相沾黏的細胞，並使用流式細胞分選儀 (BD FACSAria III) 進行細胞分析以及分選。使用的初級抗體：SSEA3-PerCP5.5 (561564, BD Biosciences, Canada)、SSEA4-647 (560796, BD Biosciences) 以及 Globo H (14-9700-82, Invitrogen, United States)。二級抗體：Goat anti-Mouse IgG - Alexa Fluor™ 594 (A-11005, Thermo, Taiwan)。

統計分析

本篇論文使用 unpaired one way ANOVA 和 Tukey' s test ，全部的實驗皆至少進行獨立的三次重複試驗，所有的 error bar 皆由標準差呈現，統計的顯著性：
*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001；ns, not significant。



2-3. 結果

2-3-1. 使用 TGF- β 對 MCF-7 進行 EMT 誘導

E cadherin 是位於細胞膜上的穿膜蛋白，且在細胞與細胞連結中扮演了重要的角色 (Quanwen *et al.*, 2008)。E cadherin 的表現量下降促使細胞與細胞之間的物理連結變弱，進而提升細胞的運動能力。由於其大量表現於 epithelial cells 上，因此研究中多將 E cadherin 當成 epithelial cells 的 markers。E cadherin 蛋白表現量的下降，代表細胞逐漸喪失 epithelial 型態，為 EMT 現象的 biomarker 之一。本實驗中我們首先欲藉由觀測 E cadherin 的表現量，確認細胞是否被成功誘導 EMT。

根據 ATCC 建議，MCF-7 在含有胰島素的培養液中生長較為穩定，然而在 EMT 誘導實驗中，我們發現胰島素的添加會導致 EMT 誘導失效。胰島素是否會影響 TGF- β 對 MCF-7 的 EMT 誘導，我們對培養於有胰島素以及不含胰島素的 MCF-7 細胞分別以 TGF- β 進行 EMT 誘導。在實驗控制組 (vehicle ctrl) 中，胰島素的存在即會降低 E cadherin 的表現量；在經 TGF- β 處理組別中，胰島素的存在會提升 E cadherin 的表現量。此結果暗示了胰島素可能促進 EMT，並且會抑制 TGF- β 所誘導的 EMT 現象。雖然胰島素的添加有助於 MCF-7 的生長，然而此現象可能不利於觀測 EMT 相關的現象，因此在後續的實驗中皆使用不含胰島素的培養液。此外，MCF-7 培養液中添加 FBS 也可能對 EMT 誘導產生影響，因此在進行 EMT 誘導實驗的 TGF- β 處理前，會將 MCF-7 細胞進行 1% FBS 的 24 小時前處理(圖 4A)。

本試驗接續探討不同劑量 TGF- β 及其不同處理時間對 EMT 誘導效率的影響。結果顯示當 TGF- β 劑量為 10 ng/ml 時，E cadherin 表現量有較明顯的下降，因此後續將使用 10 ng/ml 的 TGF- β 濃度作為誘導條件。除此之外，相較於 48 hr 與 72 hr，當處理時間為 24 hr 時，E cadherin 的表現量下降最多，表示誘導 EMT

的效率較高 (圖 4B) 。綜合以上結果，本試驗將選擇以 10 ng/ml TGF- β 處理 24 hr，作為對 MCF-7 進行 EMT 誘導的條件。

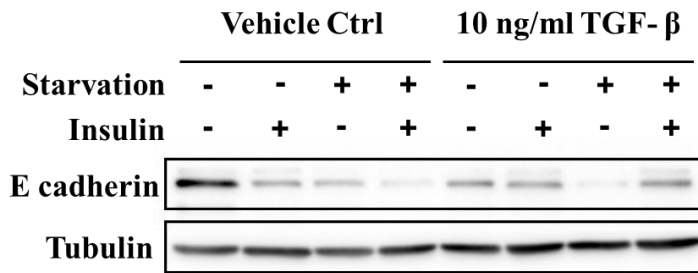
先前相關文獻指出細胞進行 EMT 誘導後型態會有明顯的改變，細胞會由原本球型的 epithelial-like 轉變成較為狹長的 mesenchymal-like 型態。故在對 MCF-7 進行 EMT 誘導後，實驗觀察到細胞從原本偏向球型的型態轉變成比較纖細的型態，且細胞的聚集度及堆疊度也明顯地下降 (圖 5A)，此型態上的改變符合細胞發生 EMT 後型態的改變。此外，epithelial markers 表現量的下降及 mesenchymal 表現量的上升也是細胞 EMT 的指標。為了更進一步確認是否有成功誘導 MCF-7 進行 EMT，本試驗針對 MCF-7 細胞的 epithelial 及 mesenchymal 相關標記進行觀測。試驗結果顯示，代表 epithelial 標記的 E cadherin 下降 46% 的表現量 (Fig. 5B, C)；而代表 mesenchymal 標記的 Vimentin 表現量上升 48% (Fig. 5B, D)，此實驗結果進一步證實了在 MCF-7 細胞培養中使用 TGF- β ，可成功誘導 EMT。

2-3-2. TGF- β 誘導 EMT 後 MCF-7 細胞內的 B3GALT5 表現量顯著降低

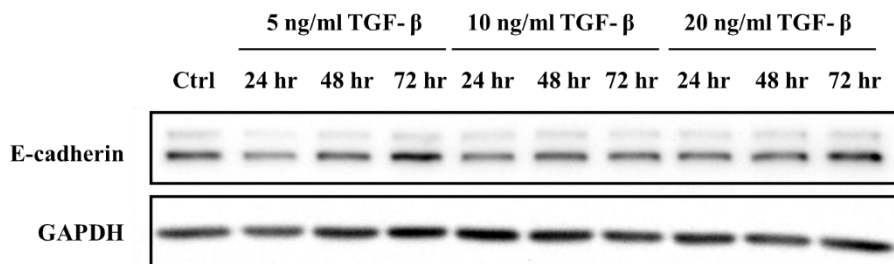
在成功誘導 MCF-7 細胞進行 EMT 後，本試驗接著對 globo series GSLs 的關鍵酵素 B3GALT5 在蛋白質層次的表現量進行觀測。結果顯示當細胞進行 EMT 誘導後，B3GALT5 表現量下降，說明 MCF-7 在進行 EMT 時會抑制 B3GALT5 的表現 (圖 5B, E)。接著，進一步探討在 EMT 過程中 MCF-7 細胞表面 globo series GSLs 表現量的改變。在誘導 MCF-7 進行 EMT 後，流式細胞螢光分析結果顯示 SSEA3、SSEA4 及 Globo H 表現量並沒有顯著的改變 (圖 6A, B)。此結果說明 globo series GSLs 可能與 MCF-7 進行 EMT 現象無關。在此次實驗中發現胰島素對 TGF- β 誘導 EMT 的影響，優化了使用 TGF- β 對 MCF-7 的誘導條件，並藉由使用 TGF- β 誘導 EMT 的平台，發現 B3GALT5 顯著的下降並且 globo series GSLs 沒有參與到 EMT 現象中 (圖 7A)。



A



B



圖表 4. 對 MCF-7 的 EMT 誘導進行優化

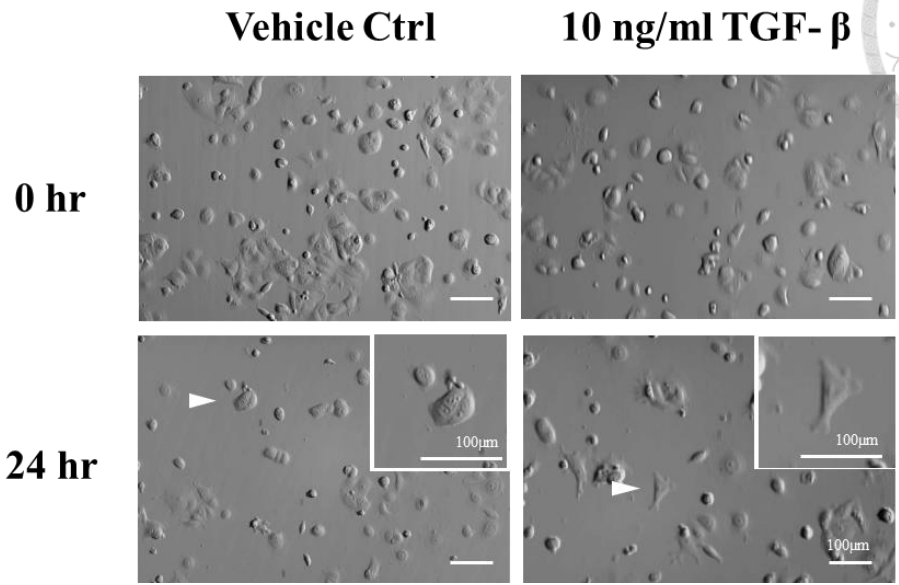
(A) MCF-7 培養液中的胰島素會影響 TGF- β 對於 EMT 的誘導。西方墨點法中發現胰島素的添加在 Vehicle ctrl 組別中會導致 E cadherin 表現量降低。此外胰島素的添加會抑制 TGF- β 組別 E cadherin 表現量的下降。(B) 使用不同劑量的 TGF- β 以及處理時間誘導 EMT，在西方墨點法中我們發現當使用 10 ng/ml TGF- β 進行 24 hr 的誘導後 E cadherin 的下降最多，也代表了該組別被誘導 EMT 的成度較大。

Figure 4. Optimization of EMT induction in MCF7

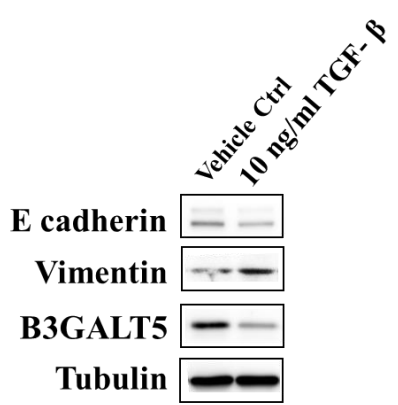
(A) Supplement of insulin in MCF7 medium influences the EMT inducing. Western blotting shows insulin significantly influences expression of E cadherin in protein level. (B) Inducing EMT with different TGF- β dosage and duration. Western blotting shows treating MCF7 with 10 ng/ml TGF- β for 24 hr is a better condition.



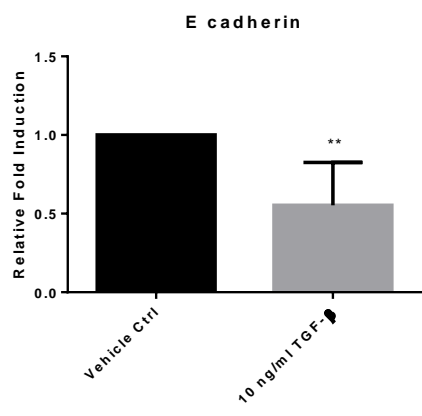
A



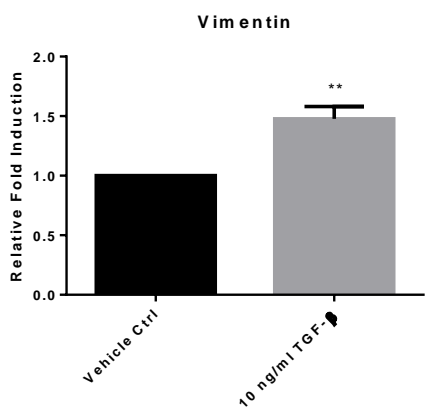
B



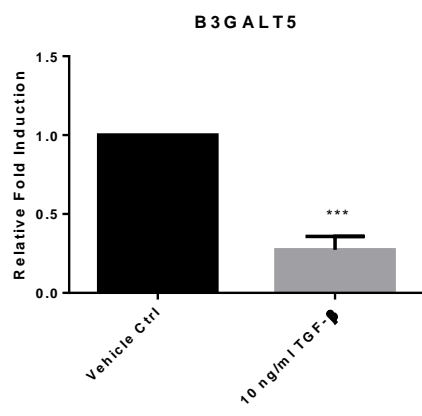
C



D



E



圖表 5. TGF- β 誘導 MCF-7 進行 EMT 促使 B3GALT5 表現量降低

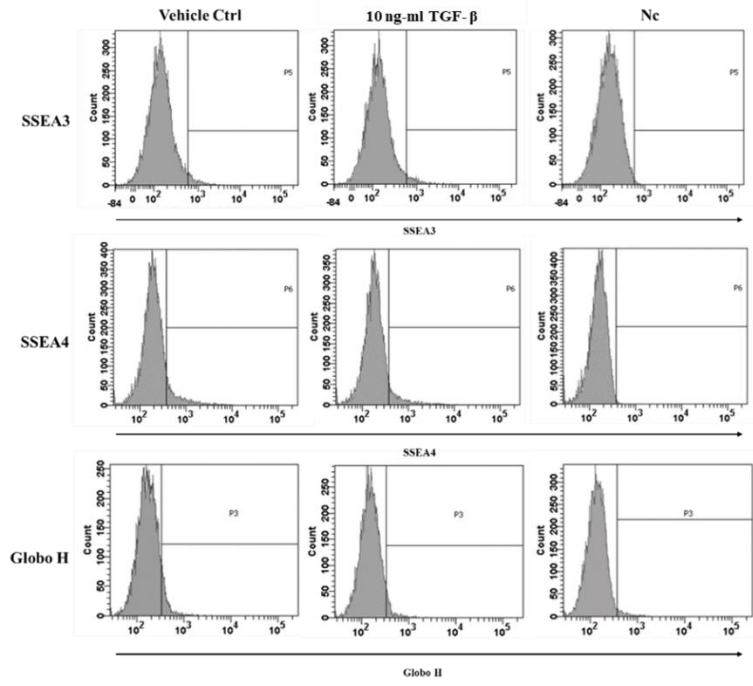
(A) 使用 10 ng/ml TGF- β 對 MCF-7 進行 24 hr 的 EMT 誘導後，MCF-7 變成類紡錘狀的細胞型態。 (B) 使用 10 ng/ml TGF- β 對 MCF-7 進行 24 hr 的 EMT 誘導後，使用西方墨點法探測 E cadherin、Vimentin 以及 B3GALT5 在蛋白層次的表現量。 (C-E) 對 E cadherin、Vimentin 以及 B3GALT5 進行相對定量，使用 Tubulin 進行標準化 (Student's T test; **P<0.01; ***P<0.001)。圖表以 means \pm SD 進行呈現。所有統計來自三次獨立實驗。

Figure 5. B3GALT5 expression decreases after EMT induction in MCF-7

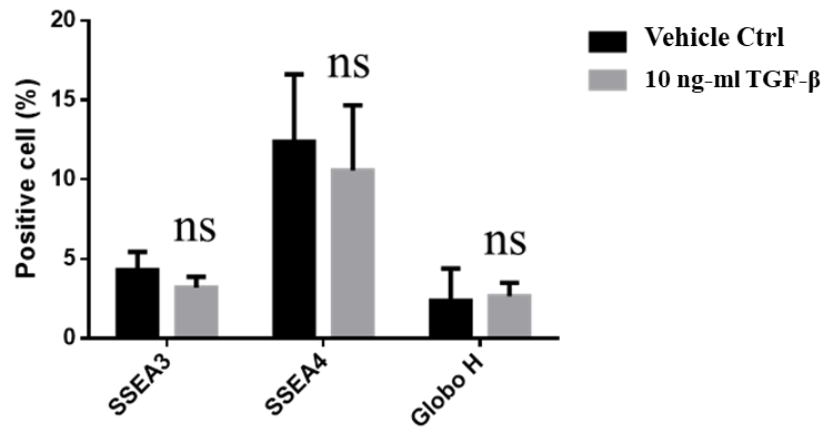
(A) The morphology of MCF-7 changes into mesenchymal-like phenotype after treating with 10 ng/ml TGF- β for 24 hr. (B) After treating MCF7 with 10 ng/ml TGF- β for 24 hr, E cadherin, Vimentin and B3GALT5 expression in MCF7 was determined by western blotting. (C~E) The relative quantification for E cadherin, Vimentin and B3GALT5 expression was normalized to Tubulin and presented as relative fold change (Student's T test, **P<0.01, ***P<0.001). Data are expressed as means \pm SD. All data are from three independent experiments.



A



B



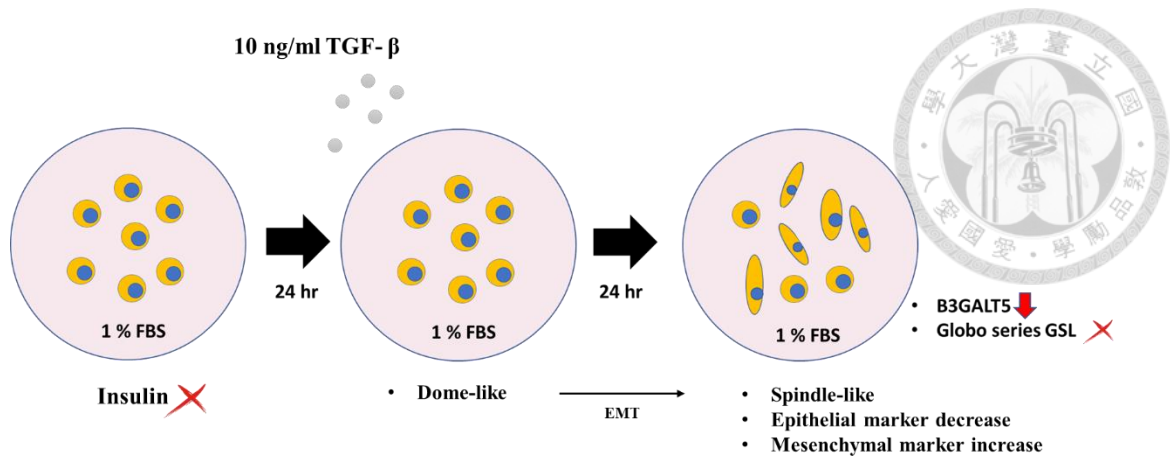
圖表 6. TGF-β 誘導 MCF-7 進行 EMT 後，SSEA3、SSEA4 及 Globo H 的表現量沒有顯著的改變

(A) 使用 10 ng/ml TGF-β 對 MCF-7 進行 24 hr 的 EMT 誘導後，使用流式細胞儀測量 MCF-7 表面的 SSEA3、SSEA4 及 Globo H 表現量。Nc：negative control。

(B) 長條圖代表有表現 SSEA3、SSEA4 以及 Globo H 的細胞比例。圖表以 means ± SD 進行呈現 (Student's t-test；ns, not significant)。所有統計來自三次獨立實驗。

Figure 6. SSEA3, SSEA4 and Globo H show not significant different after EMT induction in MCF7

(A) The expression of SSEA3, SSEA4 and Globo H on MCF-7 surface after treating with 10 ng/ml TGF-β for 24 hr was measured by FACS. (B) The positive cell proportion of SSEA3, SSEA4 and Globo H was presented. Data are expressed as means ± SD. (Student's t-test, ns, not significant). All data are from three independent experiments.



圖表 7. 誘導 MCF-7 進行 EMT 後，B3GALT5 的表現量顯著下降，然而 SSEA3 以及 SSEA4 表現量沒有顯著的改變

試驗結果顯示 MCF-7 培養液中的胰島素會影響 EMT 的誘導。使用此平台發現 B3GALT5 的表現量顯著的降低，然而 B3GALT5 的下游產物 SSEA3 以及 SSEA4 的表現量卻沒有顯著的改變。

Figure 7. Illustration of B3GALT5 decreasing after EMT induction in MCF-7

In the TGF- β inducing approach, we found the expression level of B3GALT5 is significant decreased. However, the downstream product of B3GALT5, SSEA3、SSEA4 and Globo H show not significant different. Additionally, we confirmed that the supplement of insulin in MCF-7 medium can influence the EMT inducing.

2-4. 討論



前人研究中指出 B3GALT5 以及 SSEA3 的表現可能會藉由 EMT 來增進乳癌細胞轉移的能力 (Cheung *et al.*, 2019)。因此，為了探討 B3GALT5 與 SSEA3 之間的關聯性，本研究首先建立了使用 TGF- β 誘導 MCF-7 進行 EMT 的平台。為了確認是否成功建立此平台，試驗首先觀測細胞型態的改變。根據前人研究，細胞進行 EMT 現象會失去細胞與細胞之間的連結度，且細胞會變得更加的像紡錘狀型態 (Smith & Bhowmick, 2016)，此現象與本試驗誘導 EMT 後的結果相符。此外，細胞是否成功進行 EMT 的另一個指標為 epithelial markers 表現量的降低以及 mesenchymal markers 表現量的提升 (Wang *et al.*, 2016)。E cadherin 被認為是重要的 epithelial markers (Theys *et al.*, 2011)，與之相等的 Vimentin 則被認為是重要的 mesenchymal markers (Zhang *et al.*, 2016)。在此次實驗中觀測到 E cadherin 表現量的下降及 Vimentin 表現量的上升，代表本研究的 EMT 誘導與前人定義的 EMT 相符。

在建立此平台的過程中，發現 MCF-7 培養液中的胰島素本身就會誘導細胞進行 EMT，並且會影響 TGF- β 對 EMT 誘導的影響力，此結果與前人研究中發現胰島素會誘導細胞進行 EMT 的結果相符 (Rodriguez-Monterrosas *et al.*, 2018)，因此本研究移除培養液內的胰島素以進行後續試驗。此外，本研究過程中，希望找出最適合誘導 EMT 的條件，因此使用不同濃度 TGF- β 以進行不同時間的處理。從實驗結果中發現使用 10 ng/ml TGF- β 進行 24 hr 的誘導效果最好。而在前人文獻中也同樣使用 10 ng/ml TGF- β 進行 24 hr 進行誘導 (Ricciardi *et al.*, 2015)，這與本實驗結果相符合。

在 EMT 平台建立後，本研究首先對 B3GALT5、SSEA3、SSEA4 以及 Globo H 表現量進行測定，結果顯示雖然 B3GALT5 的表現量下降，但其下游的 SSEA3、SSEA4 以及 Globo H 表現量皆沒有顯著的改變，可能代表 globo series GSLs 的表現與 EMT 之間沒有直接的關聯性。於 2021 年，Liao *et al.* 的文獻中研究發現過

度表現 B3GALT5 可能會誘導乳癌細胞株 MDA-MB-231 及從乳癌幹細胞所分離出來的 AS-B63 細胞株進行 EMT (Liao, 2021) ，而本次實驗的結果與前人研究不盡相符，推論可能與實驗所使用的細胞株不同有關，為了更進一步探討中間的差異性，本研究將於第三章節中，在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 以了解 B3GALT5 與乳癌細胞 EMT 之間的關聯性。



第三章

B3GLAT5 對乳癌細胞轉移能力之影響

3-1. 背景

先前文獻指出，globo series GSLs 的關鍵酵素 B3GALT5 於接近晚期之乳癌病患檢體中表現量較高，其表現量更與病患的存活率呈現負相關。此外，globo series GSLs 中的下游產物 SSEA3、SSEA4 及 Globo H，能藉由穩定 focal adhesion kinase (FAK) 訊號途徑以促進乳癌細胞生長、貼附以及侵犯周圍組織的能力 (Cheung *et al.*, 2019)。表現較高 SSEA4 的乳癌細胞對多數化學療法藥物具有一定的抗性，暗示了 SSEA4 的高表現量可能代表臨床上有較差的預後效果 (Aloia *et al.*, 2015)。雖然前一章節的實驗結果發現 B3GLAT5 及 globo series GSLs 不會參與到 MCF-7 中的 EMT 現象，然而多項研究均指出 globo series GSLs 與 B3GALT5 可能在乳癌轉移中扮演重要角色。因此，本研究接著欲探討 B3GALT5 的表現量是否會影響乳癌細胞的轉移。首先，利用 lentivirus 於乳癌細胞株 MCF-7 中過度表現 B3GALT5，並透過即時聚合酶連鎖反應技術觀測該細胞株內 epithelial markers 以及 mesenchymal markers 的表現量，希望藉由觀測相關 biomarkers 的改變來進一步分析 B3GALT5 以及 globo series GSLs 與 EMT 之間的關聯性。此外，本研究也藉由 wound healing assay 以及 adhesion assay 更進一步研究 B3GALT5 對乳癌細胞遷移與貼附能力之影響。

3-2. 材料與方法

細胞培養

將 MCF-7 細胞貼附培養於 MEM 培養液 (11095-072, Gibco, United States) , 並且另外添加 Penicillin/Streptomycin (1%) (15140-122, Gibco, United States) 、sodium pyruvate (1%) (11360-070, Gibco, United States) 及 fetal bovine serum (FBS) (10%) (TMS-013-BKR, Germany)。細胞培養於含有 5 % CO₂ 的潮濕 37 °C 細胞培養箱。

西方墨點法

使用 RIPA (20-188, Merck Millipore, Germany) 從細胞中萃取出蛋白質 , 10 % polyacrylamide 膠進行電泳 , 並使用 PVDF membranes (GE Healthcare, United States) 進行濕式蛋白質轉印。將 PVDF membranes 浸泡在 5% milk in TBS 內室溫 30 min 進行 blocking 並加入抗體放置於 4 °C 並且放置過夜。當初級抗體成功結合在蛋白質上後使用 0.1% TBST 洗滌三次並加入二級抗體放置於室溫兩小時。使用 T Pro LumiFast Plus Chemiluminescent Substrate Kit (JT96-K002, T-Pro Biotechnology, Taiwan) 進行呈色並且使用 X-ray film 和 GeneGnome XRQ Chemiluminescence 影像處理系統擷取影像。使用的初級抗體 : E cadherin (3195S, Cell Signaling, United States) 、 GAPDH (sc-47724, Santa Cruz, United States) 、 Tubulin (MAB1637, Merck Millipore, Germany) 、 Vimentin (V6630, Sigma-Aldrich, United States) 以及 B3GALT5 (MBS9419198, MyBioSource, Canada) 。二級抗體 : Goat anti-Rabbit IgG- HRP (A24531, Thermo, Taiwan) 、 Goat anti-Mouse IgG- HRP (31448, Thermo, Taiwan) 。





RNA 抽取以及 RNA 反轉錄

使用 Azol (Azol. 200, Arrow tech, United Stated) 抽取 RNA 並且用 RQ1 Nase-free DNase I (M198A, Promega, United Stated) 去除殘餘的 genomic DNA。成功抽取 RNA 後，使用 Goscript Reverse Transcription system (A276A, Promega, United Stated) 進行 RNA 反轉錄以獲取 cDNA。

Real-time PCR

在每反應中加入 20 ng 的 cDNA 並且將 cDNA 與 Heiff qPCR SYBR Green master mix (11203ES03, YEASEN, China) 並使用 quantitative polymerase chain reaction (the Roche Light Cycler, LC480, ROCHE Applied Science, Germany) 進行反應。Real-time PCR 的引子如附錄表格 17 所示。

顯微鏡

本實驗使用 laser-scanning confocal microscope (Leica TCS SP 5 confocal II microscope)。

免疫染色

使用 4% formaldehyde 進行 30 min 固定細胞，配置 blocking buffer [含有 2.5% bovine serum albumin (A9647, Sigma-Aldrich, United States) 、 Triton-X100 (X100, Sigma-Aldrich United States) 的 TBS 溶液]。將初級抗體在 blocking buffer 中稀釋並且在室溫進行至少 2 小時的染色。使用 TBST 進行潤洗後加入，使用同樣由 blocking buffer 稀釋的二級抗體進行染色室溫兩小時，使用 TBST 進行潤洗。使用的初級抗體有：E cadherin (3195S, Cell Signaling, United States)。二級抗體體：Donkey anti-Rabbit IgG - Alexa Fluor™ Plus 594 (A32754, Thermo, Taiwan)。



Adhesion Assay

在 12 孔盤 (353043, Corning, United States) 中渡上一層 Fibronectin (33016-015, Gibco, United States) 一小時後將 4×10^5 的細胞種植於孔盤中 (全程使用 FBS free MEM)，靜置一小時等細胞貼附。使用 PBS 沖洗孔盤四次，然後使用顯微鏡拍攝並且計算殘存細胞數量。

Wound Healing Assay

在 12 孔盤中 (353043, Corning, United States) 種植 7×10^5 並且使用 200 μ l 的 tip 進行畫線分別在 0、24、48、72 小時進行拍照並且用 image J 對中間的劃線面積進行定量，全程使用僅 1% FBS 的 MCF-7 進行實驗。面積計算公式： $(A_0 - A_1) / A_0 * 100\%$ ， A_0 ：起始中間畫線面積， A_1 ：最終中間畫線面積。

Construction

使用 polymerase chain reaction (PCR) 進行質體的製作，首先使用 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (M0530L, New England BioLabs, United States) 將 B3GALT5 以及 GFP cDNA 序列從實驗室既有之質體擴增，並於 B3GALT5 尾端接上 FLAG Tag，接著使用 Gibson Assembly Master Mix (E2611L, New England BioLabs, United States) 將 pSIN B3GLAT5 載體以及 GFP cDNA 進行接合，並且使用 JM109 菌株 (RH-718, Bioman, Taiwan) 將質體進行放大。製備好質體後使用 293T Ming 細胞株進行病毒包裝並且使用製備好的慢病毒對 MCF-7 進行感染。感染病毒兩天後使用流式細胞分選儀 (BD FACSAria III) 進行細胞分選。將含有 GFP 表現的細胞 (也就是成功感染病毒的 MCF-7) 進行分離。使用的引子如附錄表格 17 所示。

統計分析

本篇論文使用 unpaired one way ANOVA 和 Tukey's test ，全部的實驗皆至少進行獨立的三次重複試驗，所有的 error bar 皆由標準差呈現，統計的顯著性：

* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；ns, not significant。





3-3. 結果

3-3-1. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5

本研究欲建立以 EF-1 α promoter 驅動的 pSIN-B3GALT5 質體，為了方便對細胞內的蛋白表現進行觀察，在 B3GALT5 與 green fluorescent protein (GFP) 之間插入可進行自我截切的 T2A peptides。在轉譯後 T2A 蛋白被自我截切，因此載體會等量的表現 B3GALT5 以及 GFP 蛋白。藉此原理可由 GFP 的表現量來對 MCF-7 細胞內的外源 B3GALT5 表現量進行觀測 (圖 8A)。

首先，本試驗建立過度表現 B3GALT5 的病毒株 (圖 8B-8D)，並且使用製備好的病毒株對 MCF-7 進行感染。感染病毒兩天後再使用 FACS 技術將含有 GFP 表現的細胞 (即成功感染病毒的 MCF-7) 進行分離 (圖 9A)。從螢光顯微鏡中可看出這些藉由 FACS 分離出來的 MCF-7 細胞皆有 GFP 表現 (圖 9B)。此現象代表本試驗成功的將外源 B3GALT5 質體植入 MCF-7 中。為了更進一步探討是否有在 MCF-7 中成功過度表現 B3GALT5，進而對 B3GALT5 的蛋白質的表現量進行分析，從圖中可看到 B3GALT5 在蛋白質的表現量上升至 229 % (圖 9C, D)。綜合以上結果，可以判斷出本試驗已經在 MCF-7 中成功過度表現 B3GALT5。

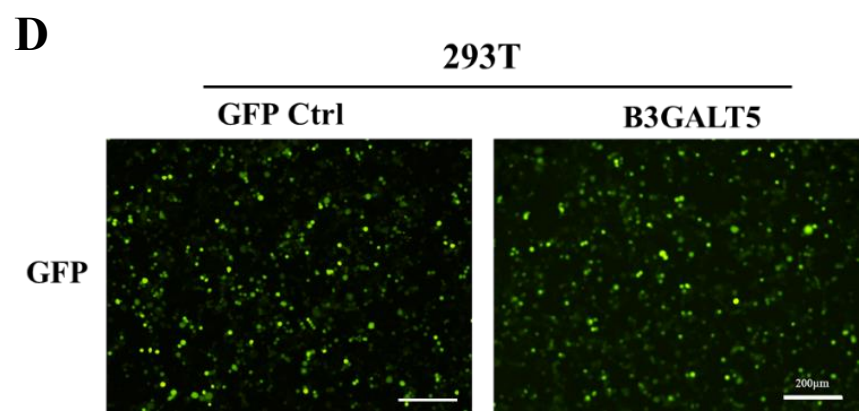
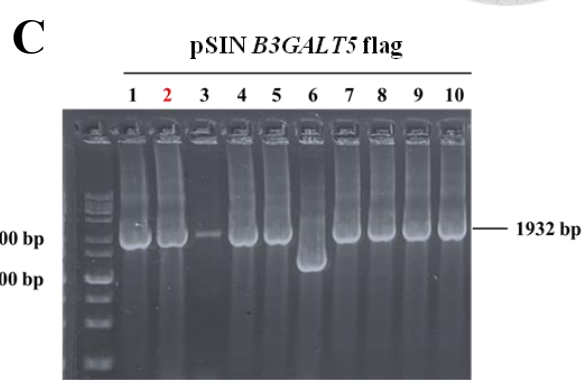
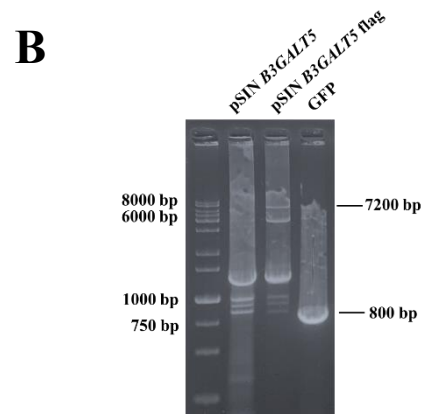
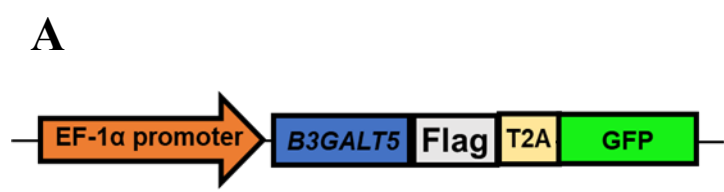
3-2. MCF-7 中 B3GALT5 表現量及 EMT 相關基因與蛋白表現之關係

過度表現 B3GALT5 後，本試驗接著對 MCF-7 的生長能力進行觀察，並且計算其 doubling time。結果顯示細胞的生長並無明顯受到 B3GALT5 表現量的影響 (圖 10A-C)。此外，在過度表現 B3GLAT5 後對細胞型態進行觀測，從圖中可發現 MCF-7 在過度表現 B3GALT5 後，細胞型態變得更加立體，且細胞與細胞之間也變得更加的聚集 (圖 10A)。為了更進一步了解 B3GALT5 以及 EMT 之間的關聯性，在過度表現 B3GALT5 後也測量 epithelial (CDH1、OVOL1、GRHL2、ESRPI) 和 mesenchymal (CDH2、Vimentin、SRSF1、SNAL1、PRRX1) markers 在

RNA 層級表現量的改變，從測量結果中，發現了不論是 epithelial markers 或者是 mesenchymal markers，在過度表現 B3GALT5 後都有顯著的下降 (圖 11A, B)。更進一步使用免疫染色法以及西方墨點法觀測 epithelial markers 中比較具有代表性的 E cadherin 時，也同樣發現 E cadherin 在蛋白質層次也有顯著的下降 (圖 11C-E)。

3-3. MCF-7 中 B3GALT5 表現量上升導致細胞遷移及貼附能力下降

根據前人研究，B3GALT5 的表現量可能與癌症的惡性程度及轉移能力有關 (Liao *et al.*, 2021)。因此，為了瞭解 B3GLAT5 對 MCF-7 遷移能力的影響，本試驗使用 wound healing assay 對過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 細胞株進行遷移能力的測試 (圖 12A)。結果顯示 B3GALT5 的過度表現導致 MCF-7 的遷移速度降低 (圖 12B)。經由量化與統計可以發現對過度表現 B3GALT5 的組別進行 wound healing assay 實驗後 48 hr 及 72 hr 細胞遷移的比例顯著高於對照組 (圖 12C)。後續使用 adhesion assay 對細胞貼附能力進行測試 (圖 13A)，也發現過度表現 B3GALT5 會降低細胞貼附能力 (圖 13B, C)。以上結果顯示在 MCF-7 中，B3GALT5 的表現量上升除了會抑制 epithelial markers 與 mesenchymal markers 的表現，也會減少細胞的行動與貼附能力 (圖 14)。

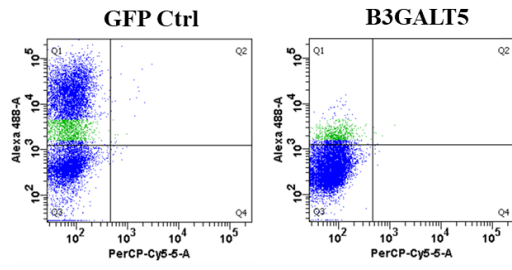
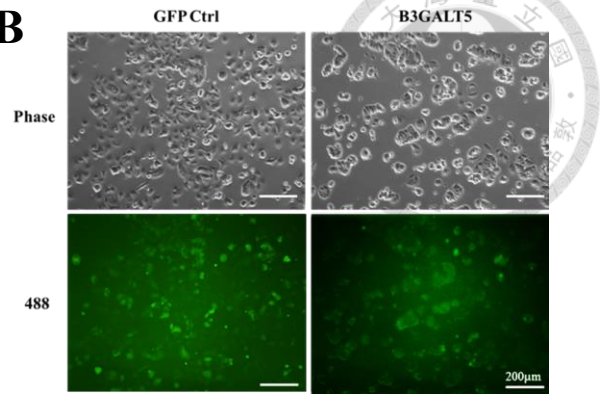
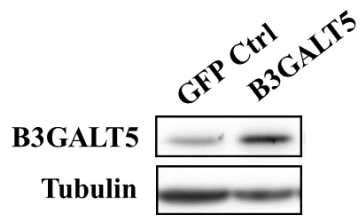
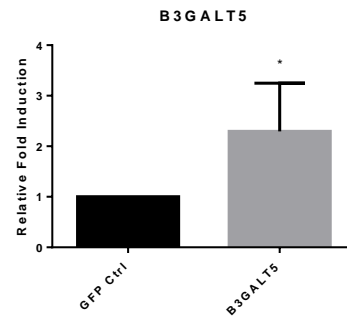


圖表 8. 建立 B3GALT5 表現質體

(A) B3GALT5 藉由 EF-1 α promoter 驅動。為了更方便探測 B3GALT5 質體，使用 T2A 將 GFP gene 連接在 B3GALT5 後面。(B) 使用 PCR 將 GFP 與 pSIN B3GALT5 載體的 DNA 片段擴增。800 bp : GFP, 7200 bp : pSIN B3GALT5 flag。(C) 使用 Colony PCR 技術確認 B3GALT5 質體的放大，並且挑選菌落 2 的質體進行後續實驗。(D) 使用 293T 細胞株將 B3GLAT5 質體進行病毒包裝，成功進行病毒包裝的病毒質體會感染 293T 進而表現 GFP。

Figure 8. B3GALT5 overexpression construction established by Gibson Assembly method

(A) B3GALT5 gene is driven by EF-1 α promoter. To detect the overexpression construction easier, GFP was linked after B3GALT5 by T2A. (B) Using Gibson Assembly method assemble B3GALT5 gene fragment and pSIN vector. 800 bp : GFP, 7200 bp : pSIN B3GALT5 flag. (C) Colony PCR technique is used to confirm the amplification of B3GALT5 construction. (D) Using 293T cell line packages lentivirus for B3GLAT5 overexpression.

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

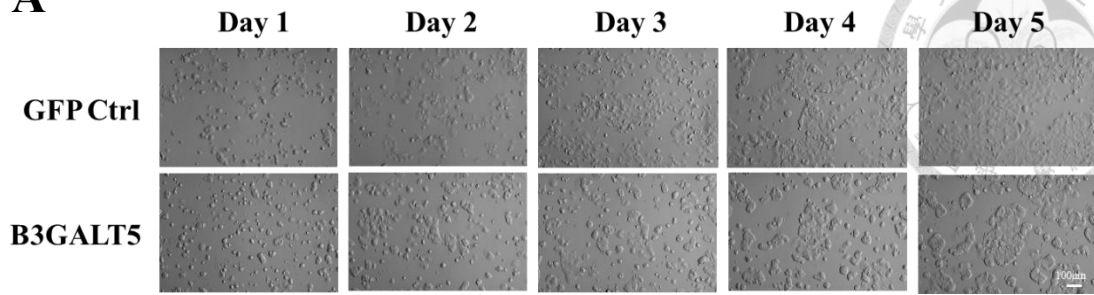
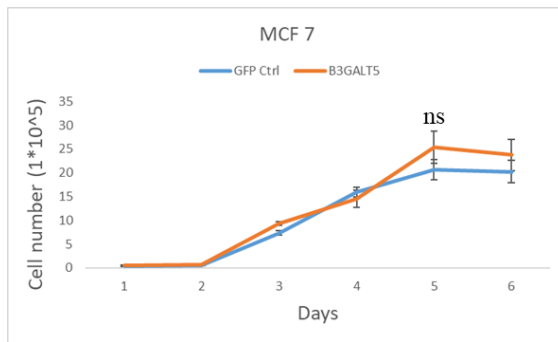
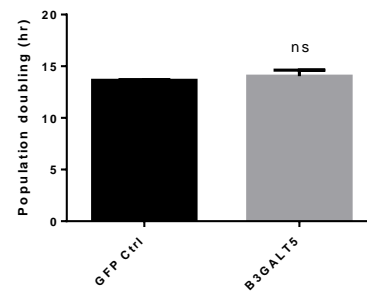


圖表 9. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5

(A) 使用 FACS 將表現 GFP 的 MCF-7 細胞從細胞池 (cell pool) 中分離出來。在過度表現 B3GALT5 組別及對照組中分別挑選 GFP 表現量相同的細胞 (綠色區間) 進行後續實驗。(B) 使用螢光顯微鏡確認分離出來的 MCF-7 是否有表現 GFP。(C) 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後使用西方墨點法對 B3GALT5 進行測量。(D) 使用 Tubulin 對 B3GALT5 進行標準化以進行相對定量，圖表以 means \pm SD 進行呈現 (Student's T test, *P<0.05)。所有統計來自三次獨立實驗。

Figure 9. Overexpress B3GLAT5 in MCF-7

(A) MCF-7 expressing GFP is separated by FACS. (B) Using fluorescence microscope image confirms GFP expressed in MCF-7. (C) After B3GALT5 overexpression, B3GALT5 was determined by western blotting. (D) The relative quantification for B3GALT5 expression was normalized to Tubulin and presented as relative fold change (Student's T test, *P<0.05). Data are expressed as means \pm SD. All data are from three independent experiments.

A**B****C**

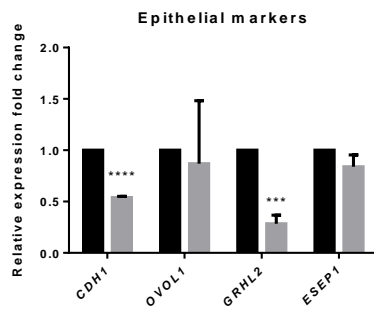
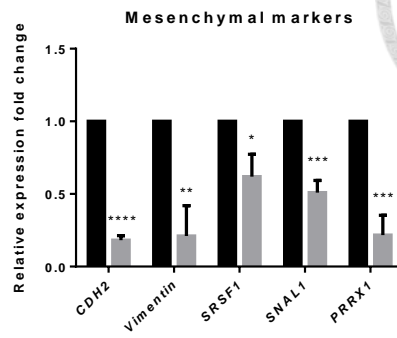
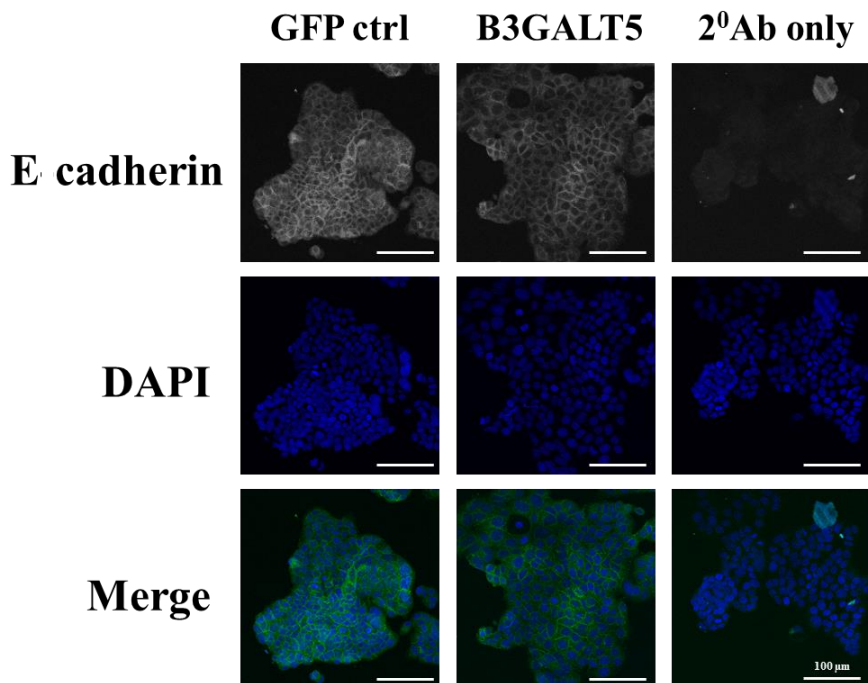
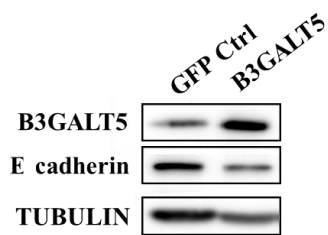
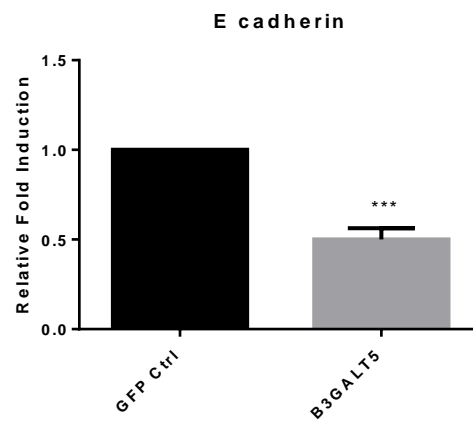


圖表 10. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後之細胞型態改變

(A) 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後，依照 seeding 後的不同時間點對細胞型態進行觀測，過度表現 B3GALT5 後 MCF-7 變得更加聚集且更為類似上皮細胞。
(B) 使用 trypan blue (counting dye technique) 對細胞生長速度進行觀測。(C) 過度表現 B3GALT5 後 MCF-7 的 doubling time 沒有顯著的改變，統計來自三次獨立實驗。圖表以 means \pm SD 進行呈現 (Student's T test, ns, not significant)。

Figure 10. The phenotype of MCF-7 becomes more epithelial-like after B3GALT5 overexpression

(A) B3GALT5 overexpression changes morphology of MCF-7 into more aggregate and dome at different time points. (B) Cellular growth curves were determined for MCF-7 cells by trypan blue (counting dye technique). (C) Doubling time of MCF-7 show not significant different after B3GALT5 overexpression (Student's T test, ns, not significant). Data are expressed as means \pm SD. All data are from three independent experiments.

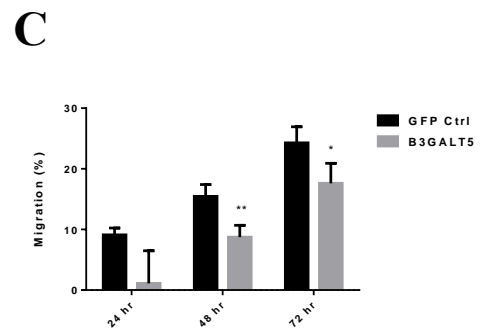
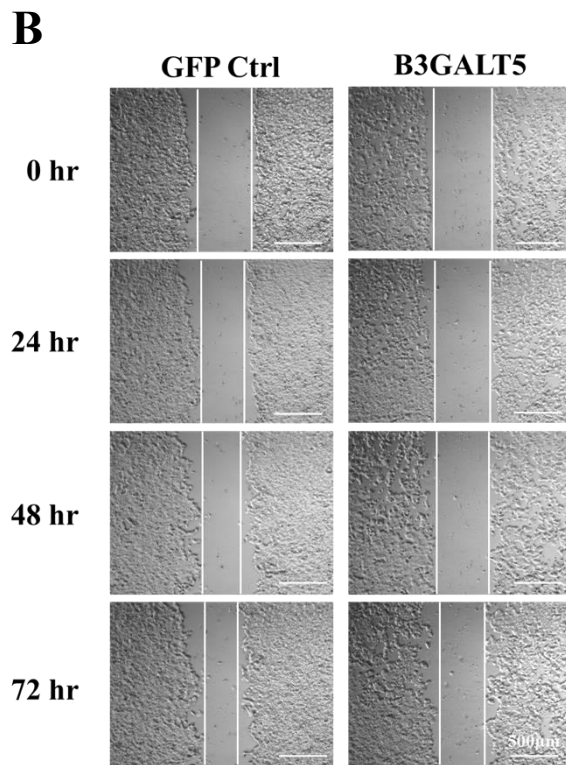
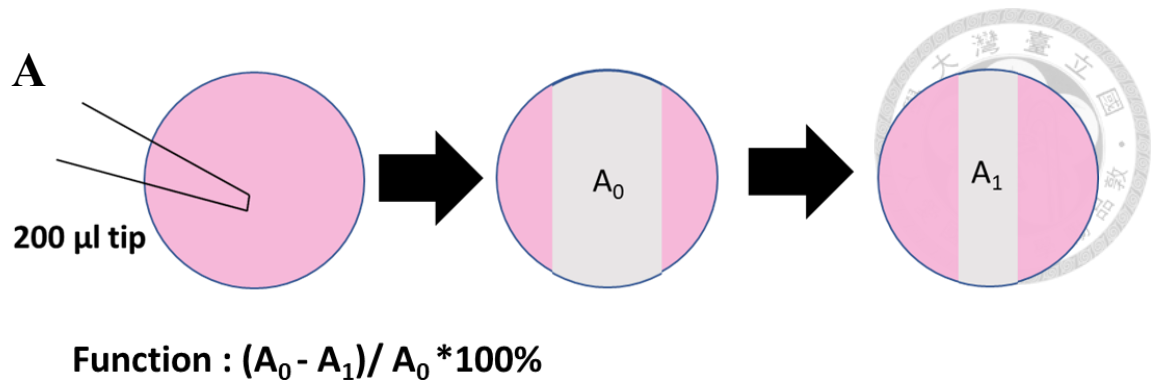
A**B****C****D****E**

圖表 11. 在 MCF-7 中過度表現 B3GLAT5 後 epithelial markers 與 mesenchymal markers 都顯著的降低

(A) 在 MCF-7 中過度表現 B3GLAT5 促使 epithelial markers 及 (B) mesenchymal markers 的 RNA 表現量降低。mRNA 的表現量使用 GAPDH 進行標準化，統計來自三次獨立實驗。(C) 使用免疫染色偵測 E cadherin 的表現量。(D) 使用西方墨點法探測 E cadherin 的表現量。(E) 使用 Tubulin 對 B3GALT5 進行標準化以進行相對定量，統計來自四次獨立實驗。圖表皆以 means ± SD 進行呈現 (Student's T test ; *p < 0.05 ; **p < 0.01 ***p < 0.001 ; ns, not significant)。

Figure 11. Both epithelial and mesenchymal markers decrease after B3GALT5 overexpression

(A) B3GALT5 overexpression decreases expression of epithelial and (B) mesenchymal markers in RNA level. mRNA expression was normalized to GAPDH. (C) Using immunostaining detects E cadherin expression. (D) E cadherin expression level decreases in protein level determined by western blotting. (E) The relative quantification for E cadherin expression was normalized to Tubulin and presented as relative fold change. Data are expressed as means ± SD. Student's T test, *p < 0.05, **p < 0.01 ***p < 0.001 ns, not significant. All data are from three independent experiments.

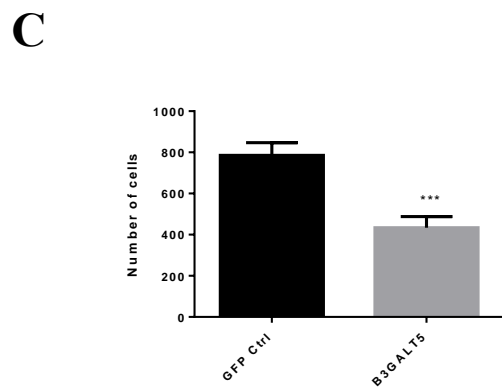
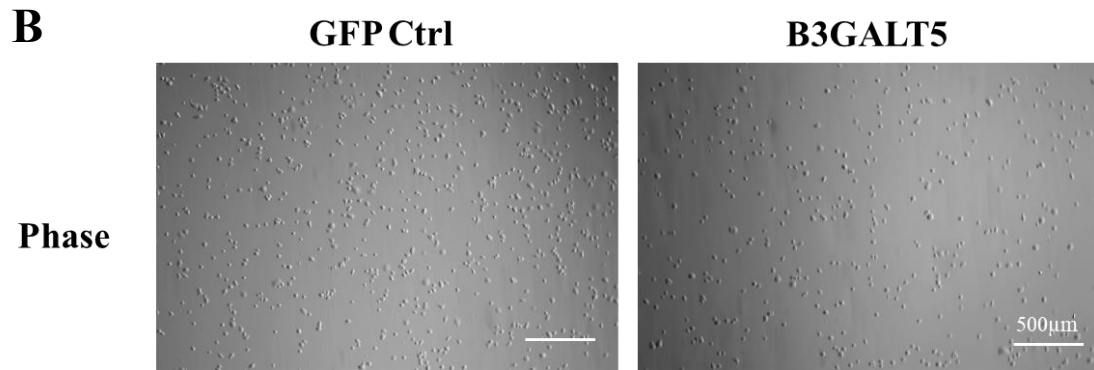
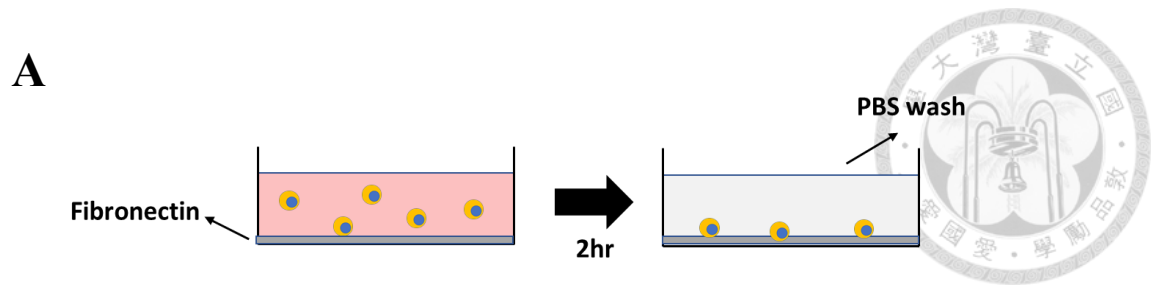


圖表 12. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後，MCF-7 的遷移能力降低

(A) Wound healing assay 示意圖。(B) 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後使用 wound healing assay 探測細胞的遷移能力，影像擷取時間點為 24 hr、48 hr 與 72 hr。(C) 使用 Image J 對圖 (B) 中間的刮取面積進行定量，圖表以 means \pm SD 進行呈現 (Student's T test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, not significant)。統計來自四次獨立實驗。

Figure 12. B3GALT5 overexpression decreases migration ability in MCF-7

(A) Illustration of wound healing assay. (B) Wound healing assay detects cell migration ability after B3GALT5 overexpression and image were recorded 24 hr, 48 hr and 72 hr after wounding. (C) Dark defines the areas lacking cells (wound area, ImageJ). Data are expressed as means \pm SD percentage wound area \pm SD. Student's T test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns, not significant. All data are from four independent experiments.

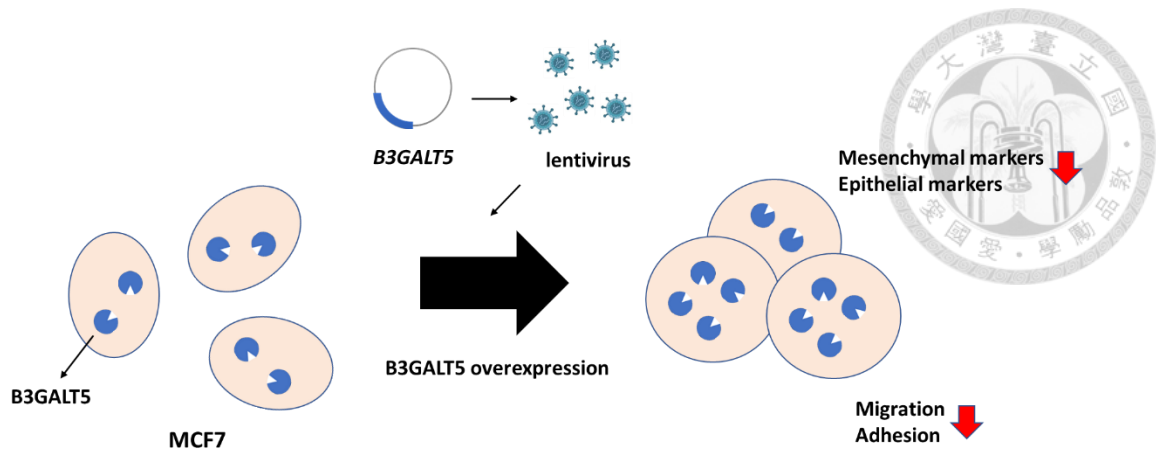


圖表 13. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後，MCF-7 對 ECM 的貼附能力降低

(A) Adhesion assay 示意圖，本次實驗使用 fibronectin 進行塗層。(B) 過度表現 B3GALT5 後對 MCF-7 進行 adhesion assay，以測試其對 ECM 的貼附能力。(C) 經過 PBS wash 後對貼附於培養盤底的殘餘細胞進行計算，圖表以 means \pm SD 進行呈現 (Student's T test *** $p < 0.001$)。統計來自四次獨立實驗。

Figure 13. B3GALT5 overexpression decreases adhesion ability in MCF-7

(A) Illustration of adhesion assay. (B) Representative pictures of adhesion assay of B3GALT5 MCF-7 after B3GALT5 overexpression. (C) Quantitation of adhesion cells per well were counted. Data are expressed as means \pm SD. Student's T test *** $p < 0.001$. All data are from four independent experiments.



圖表 14. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 導致細胞遷移以及貼附能力下降

使用慢病毒在 MCF-7 中過度表現 MCF-7 後發現 epithelial markers 及 mesenchymal markers 皆顯著的下降。此外，細胞聚落變得更加立體且細胞遷移與貼附能力皆顯著的降低。

Figure 14. Overexpression of B3GLAT5 suppresses the migration and adhesion of MCF-7

By using lentivirus to overexpress B3GLAT5 in MCF-7, We found that both epithelial markers and mesenchymal markers significantly decrease. Moreover, cell colony shows more stereoscopic, and the ability of cell migration and adhesion decrease.

3-4. 討論

在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後，進一步對 epithelial markers 以及 mesenchymal markers 表現量進行檢測，從實驗結果發現雖然 epithelial markers 表現量降低，此現象符合 EMT 對細胞帶來的改變。然而本實驗同樣發現 mesenchymal markers 的表現量也下降了，這代表增加 B3GALT5 表現量對細胞造成的影響並不完全符合 EMT 的特性。在第二章中誘導 MCF-7 進行 EMT 後同樣發現 B3GALT5 與 EMT 沒有顯著的關聯性。綜合上述結論發現，在 MCF-7 細胞中 B3GALT5 的表現量可能與 EMT 並無直接關聯。

在第二章中誘導 MCF-7 進行 EMT 會導致 B3GALT5 的表現量降低，根據此結果可推測，B3GALT5 的表現可能與 EMT 現象功能相反的 MET 現象有關連性，在此章節實驗中隨者 B3GALT5 表現量在 MCF-7 中上升，細胞型態逐漸變偏向 epithelial-like 的型態且細胞聚落也比較聚集且立體，並非如同 EMT 導致細胞變得更分散且扁平，此型態上的轉變在乳癌轉移過程中被認為是 MET 的標的之一 (Sannino *et al.*, 2017)。此外，癌細胞內 mesenchymal markers 表現量降低，一般也被認為是 MET 的生物標的之一 (Birchmeier *et al.*, 1996)，且在後續對過度表現 B3GALT5 的細胞株測量其遷移與貼附能力中，發現 B3GALT5 表現量的增加會降低細胞遷移的能力，同時也會降低其對於 ECM 的貼附能力。從上述結論中可推測，過度表現 B3GALT5 可能促使乳癌細胞株 MCF-7 進行了類似 MET 的轉變，此種轉變導致了細胞轉移能力的降低。

在先前研究中發現 B3GALT5 的表現與乳癌細胞的惡性程度有關聯，且過度表現 B3GALT5 可能會促進乳癌細胞進行 EMT (Liao *et al.*, 2021)。此外，另一篇文獻中也提及 B3GALT5 的表現會促進乳癌細胞遷移及貼附的能力 (Chuang *et al.*, 2019)。然而在本次實驗卻發現 B3GALT5 的表現與 EMT 現象無關，且可能與 EMT 功能相反的 MET 有所關聯。此外，B3GALT5 表現會抑制細胞遷移及貼附的能力。此結果之間的落差可能由於前人研究中使用較為惡性且在細胞型態上

更偏向於 mesenchymal like 的 MBA MB231 乳癌細胞株，而本試驗則是使用 MCF-7，相較之下是比較不惡性的乳癌細胞株，且其細胞更偏向於 epithelial-like 型態，推測 B3GALT5 在此不同種類乳癌細胞株的轉移中可能扮演了不同的角色，B3GLAT5 的表現在 epithelial 乳癌細胞中會導致細胞進行類似 MET 的現象，並且幫助細胞停留在次級器官完成癌細胞轉移，但此推論仍需進一步的實驗去證明。



第四章

乳癌細胞中 globo series GSLs 功能的探討

4-1. 前言

細胞表面醣基化的異常是癌細胞的特徵之一，由於這些異常表現的醣類專一表現在癌細胞表面，因此，被認為有潛力成為免疫治療或者標靶治療的標的 (Reis *et al.*, 2010)。針對乳癌的標靶治療當中，globo series GSLs 的下游產物 Globo H 已經被當作抗體的抓取標的，科學家們希望藉由 anti-Globo H 的抗體來發展癌症疫苗 (Danishefsky *et al.*, 2015)。因此，了解 globo series GSLs 在乳癌細胞中的功能，便顯得更加重要。前一章節中的研究結果發現過度表現 globo series GSLs 的上游關鍵酵素 B3GALT5 會導致 MCF-7 遷移能力與貼附能力的降低，但確切對於此現象有所影響的 globo series GSLs 為何者仍然未知。為了更進一步的探討 globo series GSLs 在 MCF-7 中的功能，試驗首先在過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 中觀測其 SSEA3、SSEA4 以及 Globo H 的表現量，有趣的是過度表現 B3GALT5 並不會增加其產物 SSEA3 的表現量，反而是更下游的產物 SSEA4 以及 Globo H 表現量上升。此結果表示過度表現 B3GALT5 後，可能是藉由促使 SSEA4 或者 Globo H 表現量上升導致 MCF-7 的遷移能力與貼附能力降低。為了確切了解對細胞移動有影響的醣脂質為何者，本試驗在過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 中分別對製做 SSEA4 與 Globo H 的酵素 ST3GAL2，以及 FUT1 進行 knockdown，希望藉由調控 SSEA4 及 Globo H 的表現量，來推測 globo series GSLs 中何者的表現會降低細胞遷移以及貼附的能力。



4-2. 材料與方法

細胞培養

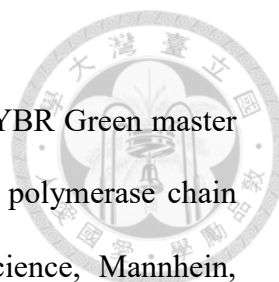
將 MCF-7 細胞貼附培養於 MEM 培養液 (11095-072, Gibco, United States) , 並且另外添加 Penicillin/Streptomycin (1%) (15140-122, Gibco, United States) 、sodium pyruvate (1%) (11360-070, Gibco, United States) 及 fetal bovine serum (FBS) (10%) (TMS-013-BKR, Germany)。細胞培養於含有 5 % CO₂ 的潮濕 37 °C 細胞培養箱。

免疫染色

使用 4% formaldehyde 進行 30 min 固定細胞，配置 blocking buffer [含有 2.5% bovine serum albumin (A9647, Sigma-Aldrich, United States) 、 Triton-X100 (X100, Sigma-Aldrich United States) 的 TBS 溶液] 。將初級抗體在 blocking buffer 中稀釋並且在室溫進行至少 2 小時的染色。使用 TBST 進行潤洗後加入，使用同樣由 blocking buffer 稀釋的二級抗體進行染色室溫兩小時，使用 TBST 進行潤洗。使用的初級抗體有：SSEA3 (MA1-020, Invitrogen, United States) 、SSEA4 (14-8843-80, Invitrogen, United States) 、Globo H (14-9700-82, Invitrogen, United States) 。二級抗體：Goat anti-Rat IgM-DyLight™ 594 (SA5-10012, Thermo, Taiwan) 、Goat anti-Mouse IgG - Alexa Fluor™ 594 (A-11005, Thermo, Taiwan) 。

RNA 抽取以及 RNA 反轉錄

使用 Azol (Azol. 200, Arrow tech, United Stated) 抽取 RNA 並且用 RQ1 Nase-free DNase I (M198A, Promega, United Stated) 去除殘餘的 genomic DNA 。成功抽取 RNA 後，使用 Goscript Reverse Transcription system (A276A, Promega, United Stated) 進行 RNA 反轉錄以獲取 cDNA 。



Real-time PCR

在每反應中加入 20 ng 的 cDNA 並且將 cDNA 與 Heff qPCR SYBR Green master mix (11203ES03, YEASEN shanghai, China) 並使用 quantitative polymerase chain reaction (the Roche Light Cycler, LC480, ROCHE Applied Science, Mannheim, Germany) 進行反應。Real-time PCR 的引子如附錄表格 17 所示。

流式細胞螢光分析與分選技術

使用胰蛋白酶 (trypsin) 將 10 cm 培養皿 (430167, Corning, United States) 的細胞從培養皿中解離，接著使用 5% FBS in DPBS 緩衝液將細胞回溶。加入初級抗體作用 30 min 並使用 5% FBS in DPBS 的緩衝液洗滌細胞，使用 0.45 篩孔 (mesh) 過濾互相沾黏的細胞，並使用流式細胞分選儀 (BD FACSAria III) 進行細胞分析以及分選。使用的初級抗體：SSEA3-PerCP5.5 (561564, BD Biosciences, Canada)、SSEA4-647 (560796, BD Biosciences) 以及 Globo H (14-9700-82, Invitrogen, United States)。二級抗體：Goat anti-Mouse IgG - Alexa Fluor™ 594 (A-11005, Thermo, Taiwan)。

Adhesion Assay

在 12 孔盤中 (353043, Corning, United States) 渡上一層 Fibronectin (33016-015, Gibco, United States) 一小時後將 4×10^5 的細胞種植於孔盤中 (全程使用 FBS free MEM)，靜置一小時等細胞貼附。使用 PBS 沖洗孔盤四次，然後使用顯微鏡拍攝並且計算殘存細胞數量。

Wound Healing Assay

在 12 孔盤 (353043, Corning, United States) 中種植 7×10^5 並且使用 200 μ l 的 tip 進行畫線分別在 0、24、48、72 小時進行拍照並且用 image J 對中間的劃線

面積進行定量，全程使用僅 1% FBS 的 MCF-7 進行實驗。面積計算公式： $(A0 - A1) / A0 * 100\%$ ，A0：起始中間畫線面積，A1:最終中間畫線面積。



ST3GAL2 以及 FUT1 knockdown

使用中央研究院製作的 ST3GAL2 shRNA (TRCN0000035636) (TRCN0000236093) 以及 FUT1 shRNA (TRCN0000036075) (TRCN0000036076) 病毒對 MCF-7 細胞進行感染。過程中添加 Polybrene (TR-1003, Sigma-Aldrich, United States) 幫助感染。感染細胞後使用 Puromycin 進行細胞篩選。

顯微鏡

本實驗使用 laser-scanning confocal microscope (Leica TCS SP 5 confocal II microscope)。

統計分析

本篇論文使用 unpaired one way ANOVA 和 Tukey's test，全部的實驗皆至少進行獨立的三次重複試驗，所有的 error bar 皆由標準差呈現，統計的顯著性: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。



4-3. 結果

4-3-1 過度表現 B3GALT5 並無改變 SSEA3 的表現但顯著提升了

SSEA4 表現量

試驗首先使用免疫染色法在過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 細胞株中測量 SSEA3 及其下游的 SSEA4、Globo H 表現量。從結果可發現當過度表現 B3GALT5 後，SSEA3 的表現量並無改變 (圖 15A)，然而更下游的 SSEA4 和 Globo H 卻有明顯的提升 (圖 15B, C)。更進一步地使用 FACS 分析 SSEA3、SSEA4 及 Globo H 的表現量 (圖 15D,E)，結果顯示表現 SSEA3 的細胞比例亦無顯著改變 (圖 15F)，但表現 SSEA4 的細胞比例提高了 4.02 倍(圖 15G $p < 0.001$)，表現 Globo H 的細胞比例提高了 11.97 倍 (圖 15H $p < 0.01$)，此等結果似乎暗示當 globo series GSLs 的上游關鍵酵素 B3GALT5 表現量上升時，推測細胞可能更傾向製做出更下游的 SSEA4 和 Globo H 而不會停留在 SSEA3 這個中間產物上。

4-3-2 過度表現 B3GALT5 分別抑制下游酵素 ST3GAL2 與 FUT1 的表現

本次實驗結果顯示過度表現 B3GALT5 後，對細胞型態及細胞遷移與貼附能力造成影響的並非 B3GALT5 的產物 SSEA3，而可能是更下游的 SSEA4 或者是 Globo H。為了更進一步的確認上述各因子彼此間的關聯性，本試驗在過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 細胞株中，使用 shRNA 對製做 SSEA4 的醣基轉移酶 ST3GAL2，及製做 Globo H 的醣基轉移酶 FUT1 進行 knockdown，希望藉由降低 SSEA4 以及 Globo H 相關的醣基轉移酶來降低 SSEA4 及 Globo H 的表現量，進而確認過度表現 B3GALT5 後直接影響乳癌細胞類似 MET 型態改變的 globo series GSLs 為何者。

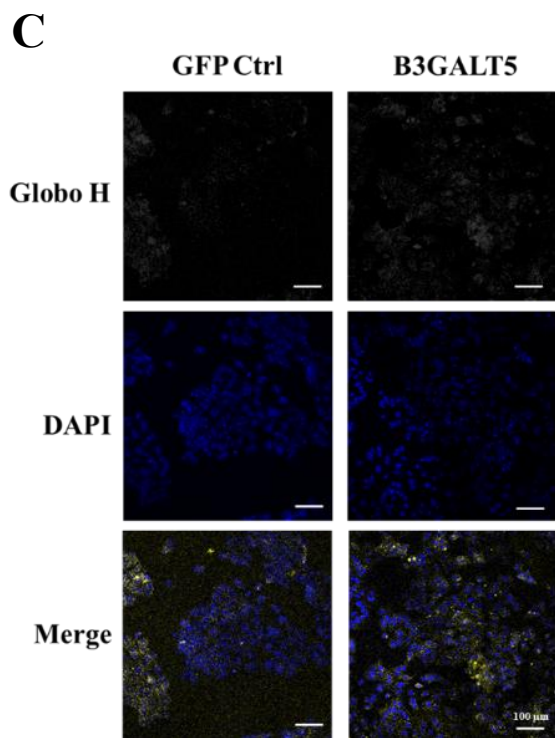
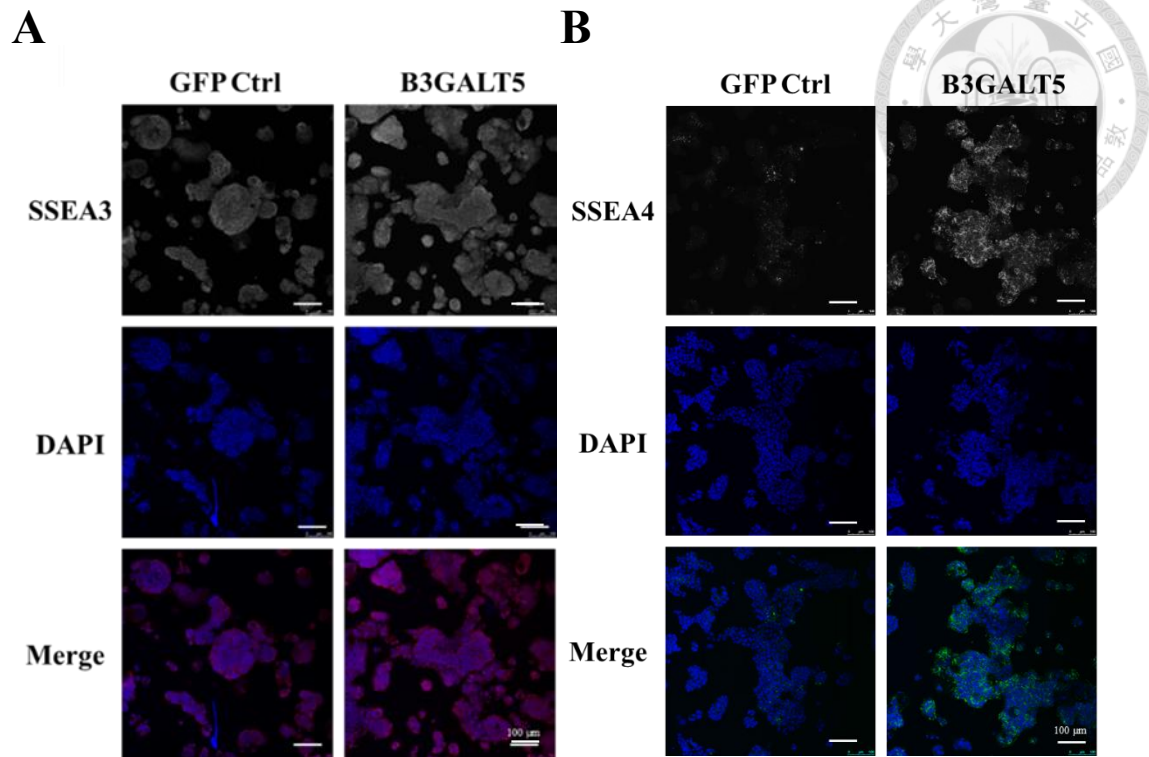
目前已知製造 Globo H 的關鍵酵素為 FUT1 以及 FUT2，然而，並非所有的乳癌細胞及乳癌細胞株中皆會表現這兩種酵素 (Chang *et al.*, 2008)。首先，本試驗觀測在 MCF-7 內 globo series GSLs 相關酵素的表現，結果顯示 MCF-7 細胞會表現製做 SSEA4 的 ST3GAL2 酵素，而製做 Globo H 的只有偵測到 FUT1 關鍵酵素的表現 (圖 16A)。因此，在後續的實驗中即針對 SSEA3 下游的 ST3GAL2 及 FUT1 進行 knockdown (圖 16B)。對過度表現 B3GALT5 的乳癌細胞分別進行 ST3GAL2 以及 FUT1 進行 knockdown 後，試驗首先測量 ST3GAL2 及 FUT1 的 RNA 表現量，從圖中可發現到 ST3GAL2 及 FUT1 表現量皆有顯著的下降 (圖 17A, B, $p < 0.001$)，此結果代表本研究成功建立 knockdown ST3GAL2 及 FUT1 的 MCF-7 細胞株。進行 ST3GAL2 及 FUT1 knockdown 後分別觀測 MCF-7 細胞表面 SSEA4 及 Globo H 表現量，結果顯示 knockdown ST3GAL2 及 FUT1 可以成功降低 SSEA4 以及 Globo H 表現量 (圖 17 C-F)。此外，細胞的型態並無明顯變化 (圖 17G)。

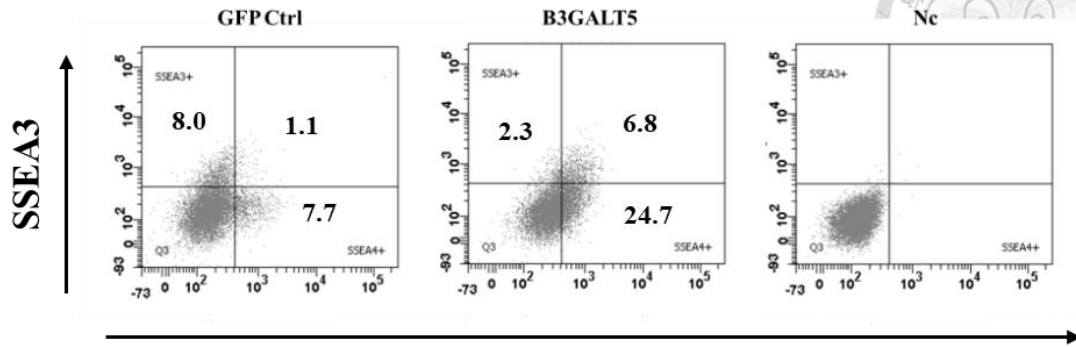
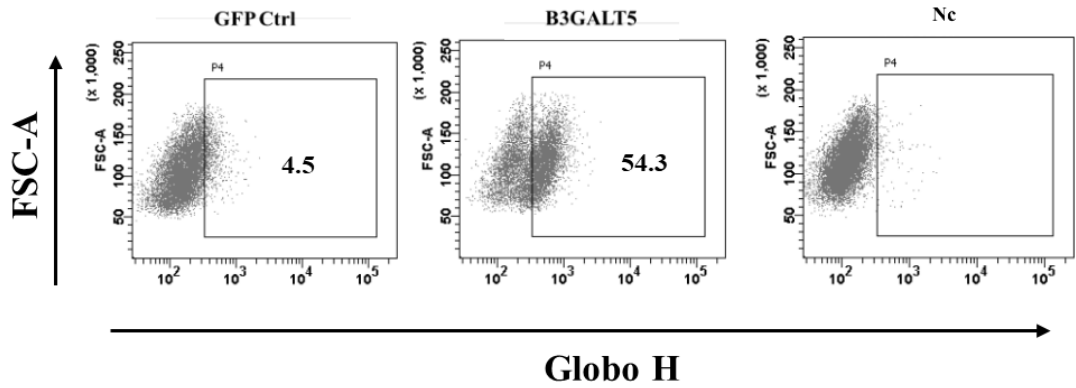
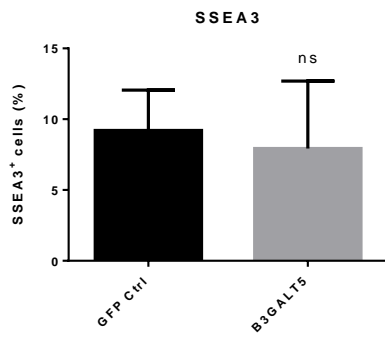
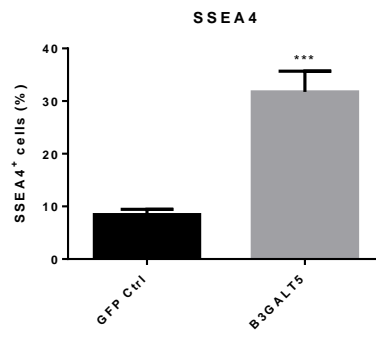
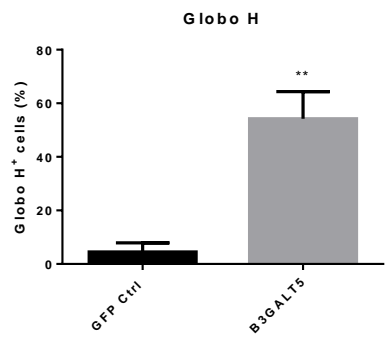
4-3-3 在過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 中 knockdown FUT1 促使細胞遷移及貼附能力回升

本試驗進一步對 knockdown ST3GAL2 及 FUT1 的 MCF-7 細胞株進行轉移能力及貼附能力的測試，首先，透過 wound healing assay 來測定細胞的遷移能力。從圖中可發現當細胞遷移實驗進入 24 hr 時，knockdown FUT1 的 MCF-7 細胞株遷移的速度相較於控制組有顯著的提升，然而 knockdown ST3GAL2 卻沒有顯著的改變 (圖 18A, B, $**p < 0.01$)。此外，當使用 adhesion assay 對 knockdown ST3GAL2 及 FUT1 的 MCF-7 細胞株分別測試其對於 ECM 的貼附能力時，試驗同樣發現只有 knockdown FUT1 的 MCF-7 細胞株貼附能力有顯著的增加 (圖 19A, B, $**p < 0.01$)。上述實驗結果發現只有 knockdown FUT1 會導致過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 細胞株遷移與貼附的能力有所回升 (圖 20)，此等結果也暗

示 Globo H 表現量的上升可能會促使細胞進行類似於 MET 的細胞型態轉換，進而降低乳癌細胞遷移及貼附的能力。





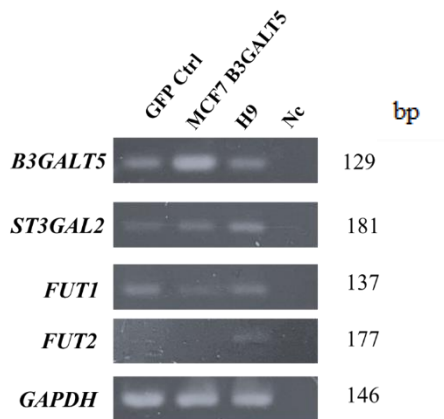
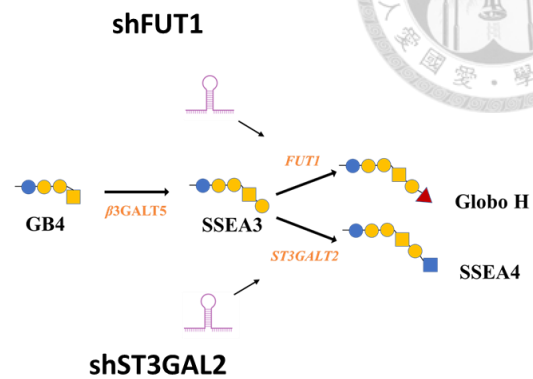
D**E****F****G****H**

圖表 15. 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後可使 SSEA4 和 Globo H 表現量上升

免疫染色結果顯示在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後 (A) SSEA3 表現量無明顯改變但 (B) SSEA4 和 (C) Globo H 表現量有明顯上升。(D) 在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 後使用 FACS 觀測 SSEA3、SSEA4 和 (E) Globo H 在 MCF-7 細胞表面的表現量。(F) (G) (H) 量化使用 FACS 觀測後有表現 SSEA3、SSEA4 和 Globo H 的細胞。圖表以 means \pm SD 進行呈現 (Student's t-test, **p < 0.01; ***p < 0.001 ; ns, not significant)。所有統計來自三次獨立實驗。

Figure 15. SSEA4 and Globo H increase after B3GALT5 overexpression

(A) After B3GALT5 overexpression, Immunostaining shows the expression of SSEA3 don't have significant different, but (B) SSEA4 and (C) Globo H expression increase (D) (E) The expression of SSEA3, SSEA4 and Globo H on MCF-7 surface after B3GALT5 overexpression was measured by FACS. (F) (G) (H) The positive cell proportion of SSEA3, SSEA4 and Globo H were presented. Data are expressed as means \pm SD. (Student's t-test, ***p < 0.001, ns, not significant). All data are from three independent experiments.

A**B**

圖表 16. MCF-7 中不表現 FUT2

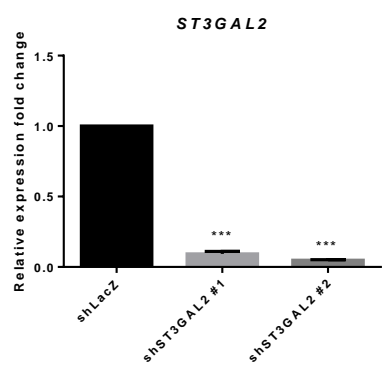
(B) 使用 (1%) 洋菜膠對 MCF-7 細胞中的 *B3GALT5*、*ST3GAL2*、*FUT1* 及 *FUT2* 的 cDNA 進行電泳。H9 細胞株為陽性控制組，Nc 為陰性控制組。(B) 對過度表現 *B3GALT5* 的 MCF-7 分別進行 *FUT1* 以及 *ST3GAL2* 的 knockdown。

Figure 16. MCF-7 does not express FUT2

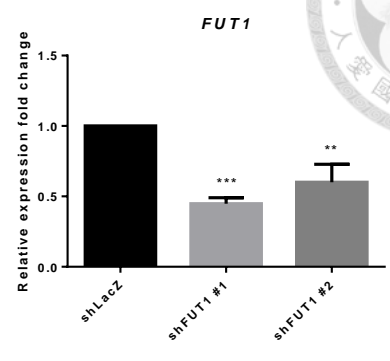
(A) Illustration of knockdown *FUT1* and *ST3GAL2* in *B3GALT5* overexpression MCF-7 cell line. H9 cell line : positive control. Nc : negative control. (B) Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR product of *B3GALT5*, *ST3GAL2*, *FUT1* and *FUT2* genes.



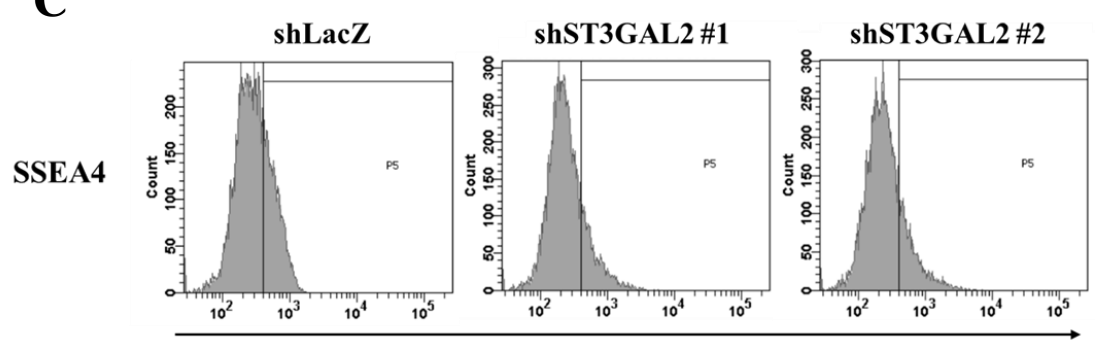
A



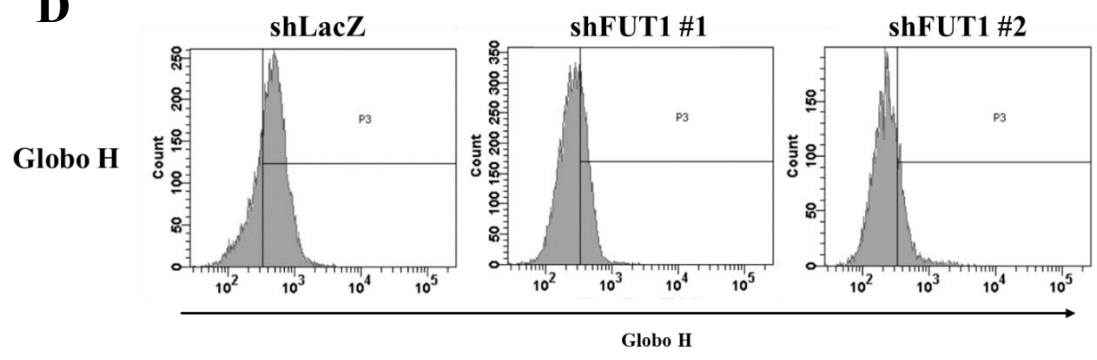
B



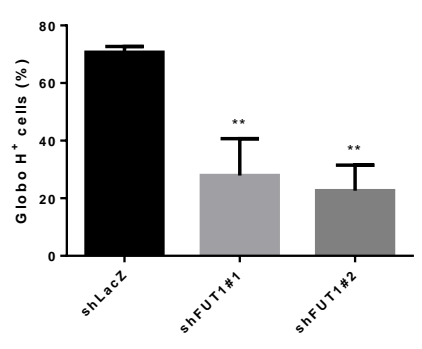
C



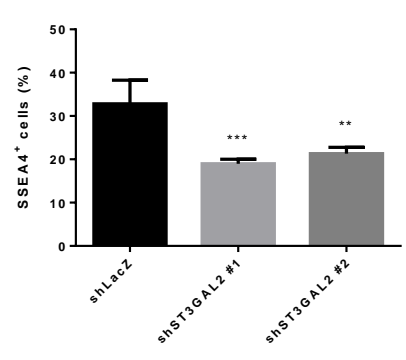
D



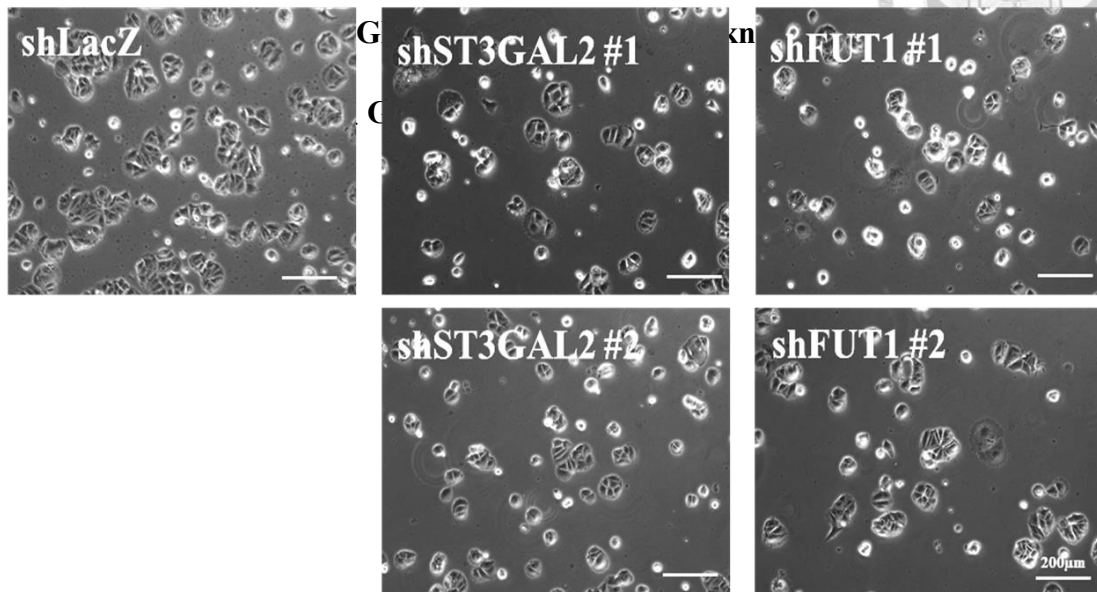
E



F



G

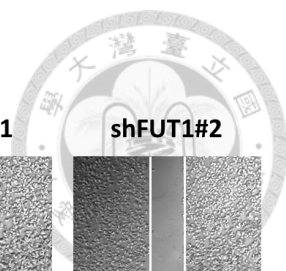


圖表 17. 在過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中分別 knockdown ST3GAL2 以及 FUT1 導致 SSEA4 及 Globo H 表現量降低

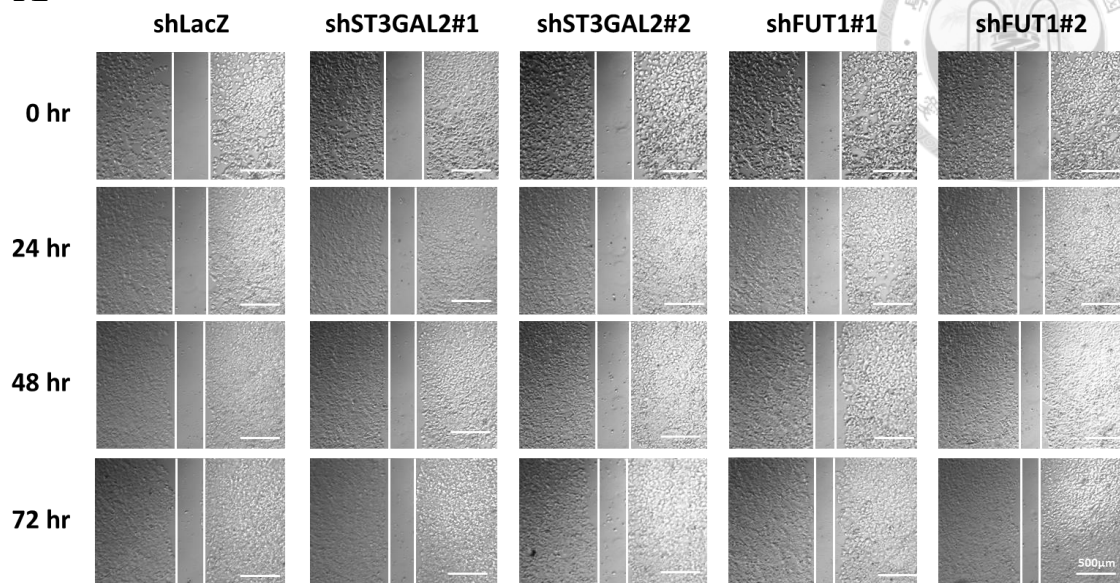
(A) 分別 knockdown ST3GAL2 及 FUT1 後，使用相對定量對 *ST3GAL2* 及 (B) *FUT1* 進行觀測，mRNA 的表現量使用 GAPDH 進行標準化。 (C) 分別 knockdown ST3GAL2 及 (D) FUT1 後，使用流式細胞儀測量 MCF-7 表面的 SSEA4 及 Globo H 表現量。 (E) 長條圖代表有表現 SSEA4 及 (F) Globo H 的細胞比例。 (G) knockdown ST3GAL2 以及 FUT1 後細胞型態無明顯改變。所有圖表以 means \pm SD 進行呈現 (one way ANOVA, **p < 0.01; ***p < 0.001)。統計來自三次獨立實驗。

Figure 17. Knockdown *ST3GAL2* and *FUT1* in B3GALT5 overexpression MCF-7 cell line

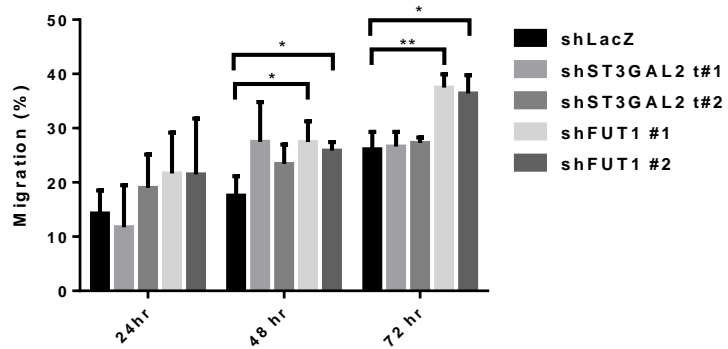
(A) The relative percentage of gene expression of *ST3GAL2* and (B) *FUT1* after knocking down the respective genes in B3GALT5 overexpression cell line. mRNA expression was normalized to GAPDH. (C) The expression of SSEA4 (D) Globo H on MCF-7 surface after *ST3GAL2* knockdown was measured by FACS. (E) The positive cell proportion of SSEA4 and (F) Globo H on B3GALT5 overexpression cell line after *ST3GAL2* knockdown. Data are expressed as means \pm SD. (Student's t-test, **p, 0.01, ***p < 0.001, ns). (G) The morphology of sh*ST3GAL2*, sh*FUT1* and sh*LacZ* cell line. All data are from three independent experiments.



A



B

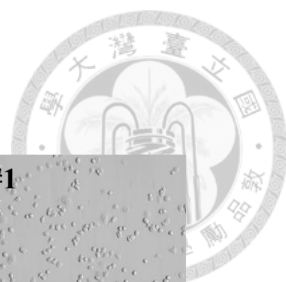


圖表 18. 過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中 knockdown FUT1 可使遷移能力回升

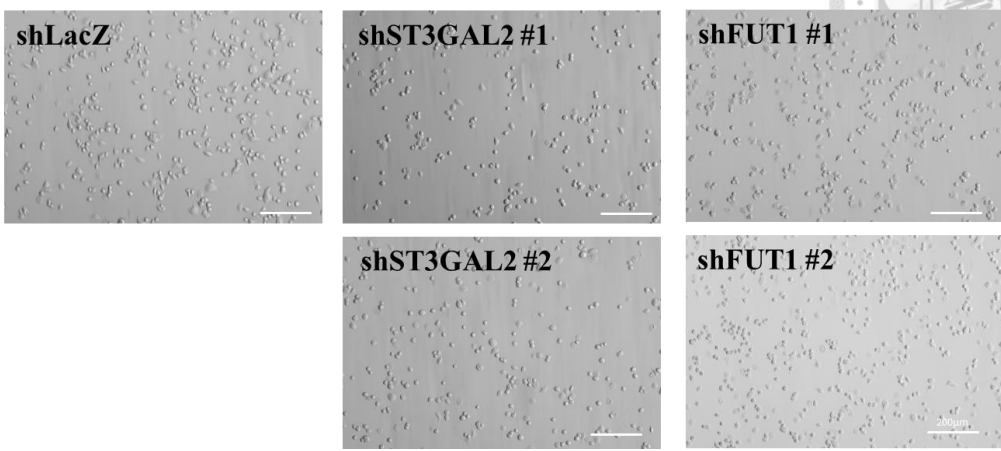
(A) 在過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中分別 knockdown *ST3GAL2* 以及 *FUT1*，並且使用 wound healing assay 測量其遷移能力，分別在實驗開始後 24 hr、48 hr 以及 72 hr 進行影像紀錄。(B) 使用 ImageJ 對中間的刮取面積進行定量，圖表以 means \pm SD 進行呈現 (one way ANOVA * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。統計來自三次獨立實驗。

Figure 18. Knockdown FUT1 in B3GALT5 overexpression cell line promotes migration ability

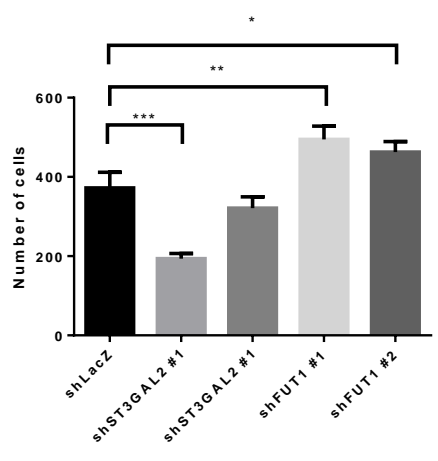
(A) Wound healing assay detects cell migration ability after knockdown *ST3GAL2* and *FUT1* in B3GALT5 overexpression cell line and image were recorded 24 hr, 48 hr and 72 hr after wounding. (B) Dark defines the areas lacking cells (wound area, ImageJ). Data are expressed as means \pm SD percentage wound area \pm SD. Student's T test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. All data are from three independent experiments.



A



B

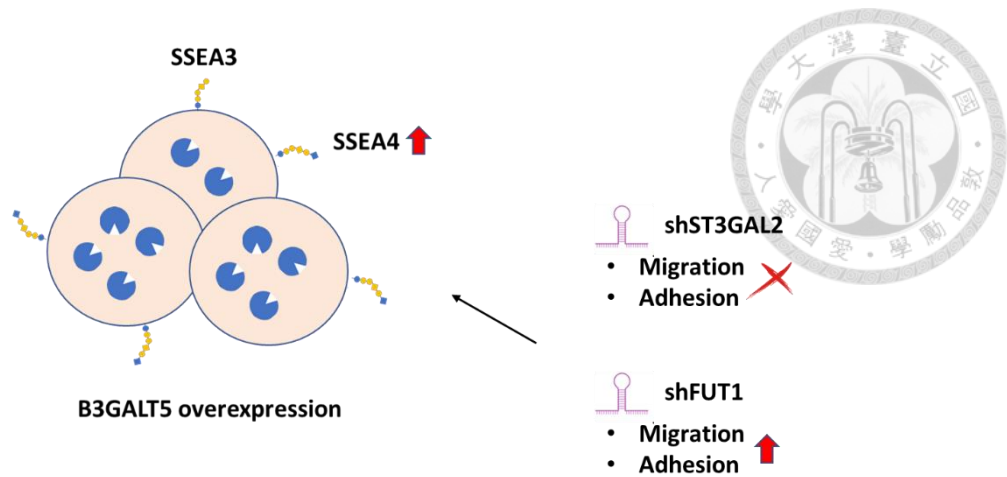


圖表 19. 過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中，knockdown FUT1 可使細胞對 ECM 貼附能力回升

(A) 分別對過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 進行 *ST3GAL2* 以及 *FUT1* knockdown，並使用 adhesion assay 測試其對 ECM 的貼附能力。(B) 經過 PBS wash 後對貼附於培養盤底的殘餘細胞進行計算，圖表以 means ± SD 進行呈現 (one way ANOVA；*p < 0.05；**p < 0.01；***p < 0.001)。統計來自三次獨立實驗。

Fig 19. Knockdown FUT1 in B3GALT5 overexpression cell line promotes adhesion ability

(A) Representative pictures of adhesion assay of B3GALT5 overexpression cell line after knockdown *ST3GAL2* and *FUT1*. (B) Quantitation of adhesion cells per well were counted. Data are expressed as means ± SD. Student's T test *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001. All data are from three independent experiments.



圖表 20. 在過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中抑制 FUT1 表現促使細胞遷移並對 ECM 貼附能力回升

過度表現 B3GLAT5 促使 SSEA4 及 Globo H 表現量上升。進一步在過度表現 B3GLAT5 的 MCF-7 中 knockdown 下游酵素 FUT1 可提升細胞遷移與貼附的能力。

Figure 20. Suppression of FUT1 in B3GALT5-overexpressed MCF-7 promotes migration and adhesion ability of MCF-7

Overexpression of B3GLAT5 increase the expression of SSEA4 and Globo H in MCF-7. Furthermore, knockdown of FUT1 forward migration and adhesion ability of MCF-7.

4-4. 討論

由本實驗可發現在 MCF-7 中製做 Globo H 的酵素只有偵測到 FUT1 的表現，但未發現 FUT2，此實驗結果於 Lai *et al* 在 2019 年的研究結果中亦有所提及 (Lai *et al.*, 2019)。此外，Cheung *et al* 在 2016 年的研究亦發現 knockdown B3GALT5 後，其下游酵素 ST3GAL2 與 FUT1 呈顯著的降低 (Cheung *et al.*, 2016)，但無文獻提及 globo series GSLs 上下游間的關聯性。由本實驗結果發現過度表現 B3GLAT5 後，SSEA3 的表現量並沒有顯著的改變，反而是 SSEA3 下游的 SSEA4 表現量增加，推測此結果代表 SSEA3 可能只是 globo series GSLs 的中間產物，相較於表現 SSEA3，MCF-7 細胞會更傾向於把其當作受質，進而產出 SSEA4 與 Globo H。

Globo H 是一種 tumor-associated blood group antigens (Danishefsky *et al.*, 2015)，而現在已知血型抗原 (blood group antigens) 及其前驅物與相關抗原皆會表現於大多數內胚層上皮細胞 (endodermal epithelial cells) 內 (Chang *et al.*, 2008)，且先前研究中亦發現乳癌細胞株越偏向 epithelial 型態，其 Globo H 表現量亦相對較高 (Chuang *et al.*, 2019)。Knockdown ST3GAL2 與 FUT1 後，發現只有 knockdown *FUT1* 的組別在遷移能力及對 ECM 的貼附能力上有所回升。此結果說明了在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 可能會導致細胞內 Globo H 表現量增加，進而促使細胞進行類似 MET 的型態轉換。綜合整體實驗結果發現，當細胞內 B3GALT5 表現量上升時，MCF-7 細胞表面的 globo series GSLs 並非 SSEA3 表現量上升，而是 SSEA4 或者可能是 Globo H 表現量會增加，且在 globo series GSLs 的最終產物 SSEA4 及 Globo H 中，Globo H 表現量的上升可能會促使乳癌細胞 mesenchymal markers 下降，且乳癌細胞的型態即變得更加類似於上皮細胞。此外，在細胞轉移能力上，也發現 Globo H 的表現會抑制乳癌細胞的遷移與貼附能力。癌細胞的轉移是導致乳癌病患致死的主要原因，MET 現象能幫助乳癌細胞在轉移過程中在次級器官形成聚落 (Gunasinghe *et al.*, 2012)。本研究的實驗顯

示在 epithelial 型態的 MCF-7 乳癌細胞株中，Globo H 表現與 MET 有一定程度的關聯性，此等結果對 globo series GSLs 在乳癌細胞轉移所扮演的角色提供進一步的理解。



綜合討論



本研究使用 TGF- β 誘導平台觀測 MCF-7 細胞株進行 EMT 後，觀察 B3GALT5 與 globo series GSLs 的表現量，並在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 以更進一步了解 B3GALT5 與 globo series GSLs 在乳癌細胞可能的功能。

在 EMT 誘導實驗中，首先對 TGF- β 的誘導條件進行優化。實驗結果發現 MCF-7 細胞培養液中胰島素的添加會抑制 MCF-7 細胞在 EMT 誘導過程中 E cadherin 表現量的下降程度，此結果代表胰島素的添加不利於 EMT 的誘導。此外，使用不同濃度 TGF- β 進行不同時間的 EMT 誘導，結果發現使用 10 ng/ml 的 TGF- β 濃度對 MCF-7 進行 24 hr 的誘導，能最大程度的降低 E cadherin 的表現量。針對 MCF-7 進行 EMT 誘導後，B3GALT5 的表現量顯著的下降，而 globo series GSLs 的表現量則無顯著改變，此結果代表 globo series GSLs 與 EMT 現象並無直接關聯性。然而 globo series GSLs 依然可能藉由其他路徑影響乳癌細胞的轉移能力，為了更進一步了解 globo series GSLs 是否參與乳癌細胞的轉移，本研究進而在 MCF-7 細胞株中過度表現 B3GALT5。結果顯示當細胞中 B3GALT5 表現量上升，MCF-7 細胞內 epithelial 及 mesenchymal markers 表現量皆呈顯著的降低，細胞生長變得更加集中，且細胞聚落也會變得更加立體，此等結果呼應 EMT 誘導實驗結果，表示 B3GALT5 及 globo series GSLs 與乳癌細胞的 EMT 現象沒有直接關聯性。另一方面，過度表現 B3GLAT5 後，細胞遷移及貼附能力皆顯著下降，此結果說明 globo series GSLs 在乳癌細胞的表現不僅與 EMT 現象無直接關聯，甚至會抑制乳癌細胞的轉移能力。有趣的是，過度表現 B3GALT5 後 MCF-7 表面的 B3GALT5 產物 SSEA3 並無顯著增加，反而是下游的 SSEA4 及 Globo H 表現量顯著提升，推測此結果代表過度表現 B3GALT5 後，抑制轉移能力的 globo series GSLs 為 SSEA4 或者是 Globo H。因此，後續實驗在過度表現 B3GALT5 的 MCF-7 乳癌細胞，分別 knockdown ST3GAL2 與 FUT1(生產 SSEA4 以及 Globo H 的酵素)，以了解何者的表現會抑制 MCF-7 的轉移能力。實驗結果發現只有

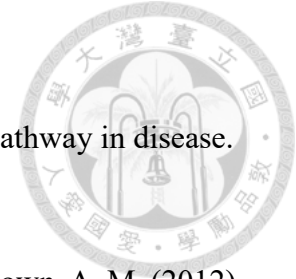
knockdown FUT1 的組別，細胞遷移能力與貼附能力有顯著的回升，此結果顯示 Globo H 的表現會抑制 MCF-7 遷移與貼附的能力。綜合以上實驗結果，B3GALT5 及 globo series GSLs 與 EMT 之間並沒有顯著的關聯性，並且在 MCF-7 中過度表現 B3GALT5 會導致下游的 Globo H 表現量提升，進而抑制 MCF-7 遷移與貼附的能力。

乳癌細胞株依據其型態可分為 mesenchymal 型態細胞株及 epithelial 型態細胞株，MDA-MB-231 屬於前者，而 MCF-7 屬於後者。前人文獻中發現在 MDA-MB-231 乳癌細胞株中 knockdown B3GALT5 會導致其的遷移能力與貼附能力下降 (Chuang *et al.*, 2019)。此外，另一篇文獻中也發現過度表現 B3GALT5 會導致 MDA-MB-231 的 epithelial marker ZEB1 表現量上升 (Liao *et al.*, 2021)。此結果與本研究在 MCF-7 此類偏向於 epithelial 的乳癌細胞株過度表現 B3GALT5 後 epithelial markers 表現量下降，細胞遷移與貼附能力下降的結果相反，推測 B3GALT5 及 globo series GSLs 在不同型態的乳癌細胞株中，可能扮演了不同功能，如欲探討此問題可能需要使用更多乳癌細胞株進行實驗並且搭配小鼠試驗以更進一步佐證 B3GALT5 及 globo series GSLs 在不同型態乳癌細胞內的功能。

總結與未來展望

由於 globo series GSLs 專一表現於許多癌細胞，因此在許多癌症研究上被高度的重視 (Liang *et al.*, 2010)。2006 年首度發現 SSEA3、SSEA4 以及 Globo H 專一的表現在乳癌細胞表面而非正常的乳腺上皮細胞 (Cheung *et al.*, 2006)，其後的研究更發現高度表現 B3GALT5 與 ST3GAL2 的乳癌檢體則具有較高的惡性程度 (Liao *et al.*, 2021; Aloia *et al.*, 2015)。另一方面，乳癌轉移是乳癌病患的主要死因之一，根據統計當乳癌細胞轉移到次級器官，病患的存活率會顯著的降低 (Sun *et al.*, 2017)。目前已知 B3GALT5 與 globo series GSLs 在乳癌細胞上的表現會影響乳癌細胞的轉移能力，深入了解 B3GALT5 與 globo series GSLs 在乳癌轉移中的機制，不僅可使 globo series GSLs 成為乳癌細胞轉移的生物標的，更有機會將其發展變成已轉移乳癌細胞標靶治療的潛在生物標記。近期研究已發現使用抗體抓取 globo series GSLs 能成功抑制小鼠體內的腫瘤生長 (Chuang *et al.*, 2019)，此外也有文獻探討 anti-Globo H 及 anti-SSEA4 抗體誘導免疫反應的潛能 (Lee *et al.*, 2021)。本研究發現 epithelial 型態乳癌細胞 MCF-7 進行 EMT 時，B3GALT5 與 globo series GSLs 表現量無顯著增加，且 epithelial 型態乳癌細胞中 Globo H 的表現量提升會抑制乳癌細胞的轉移能力。未來針對已轉移的乳癌細胞發展抗體標靶治療，或許能有效提升乳癌病患的存活率，屆時希望本研究結果能為此等標靶治療策略提供一些建設性資訊及判斷依據。

參考文獻



- Akhurst, R. J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signaling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 790–811.
- Allison, K. H., Kandalaft, P. L., Sitlani, C. M., Dintzis, S. M., and Gown, A. M. (2012). Routine pathologic parameters can predict Oncotype DX™ recurrence scores in subsets of ER positive patients: Who does not always need testing? *Breast Cancer Res. Treat.* *131*, 413–424.
- Aloia, A., Petrova, E., Tomiuk, S., Bissels, U., Déas, O., Saini, M., Zickgraf, F. M., Wagner, S., Spaich, S., Sütterlin, M., et al. (2015). The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features. *Breast Cancer Res.* *17*, 1–17.
- Bhushan, A., Gonsalves, A., and Menon, J. U. (2021). Current state of breast cancer diagnosis, treatment, and theranostics. *Pharmaceutics* *13*, 723.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., and Brand-Saberi, B. (1996). Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Cells Tissues Organs* *156*, 217–226.
- Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E. A., and Hopkins, A. M. (2010). Tight junctions: A barrier to the initiation and progression of breast cancer? *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*.
- Chaffer, C. L., San Juan, B. P., Lim, E., and Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *35*, 645–654.
- Chang, W. W., Chien, H. L., Lee, P., Lin, J., Hsu, C. W., Hung, J. T., Lin, J. J., Yu, J. C., Shao, L. E., Yu, J., et al. (2008). Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States

- of America (2008) 105, (11667-11672) DOI: 10.1073/pn. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 17206.
- Cheung, S. K. C., Chuang, P. K., Huang, H. W., Hwang-Verslues, W. W., Cho, C. H. H., Yang, W. Bin, Shen, C. N., Hsiao, M., Hsu, T. L., Chang, C. F., et al. (2016). Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) and β 3GalT5 are cancer specific and significant markers for breast cancer stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 960–965.
- Chuang, P. K., Hsiao, M., Hsu, T. L., Chang, C. F., Wu, C. Y., Chen, B. R., Huang, H. W., Liao, K. S., Chen, C. C., Chen, C. L., et al. (2019). Signaling pathway of globo-series glycosphingolipids and β 1,3-galactosyltransferase V (β 3GalT5) in breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 3518–3523.
- Colditz, G. A., Kaphingst, K. A., Hankinson, S. E., and Rosner, B. (2012). Family history and risk of breast cancer: Nurses' health study. Breast Cancer Res. Treat. 133, 1097–1104.
- Cumin, C., Huang, Y. L., Everest-Dass, A., and Jacob, F. (2021). Deciphering the importance of glycosphingolipids on cellular and molecular mechanisms associated with epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. Biomolecules 11, 1–19.
- Danishefsky, S. J., Shue, Y. K., Chang, M. N., and Wong, C. H. (2015). Development of Globo-H Cancer Vaccine. Acc. Chem. Res. 48, 643–652.
- DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., and Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. CA. Cancer J. Clin. 69, 438–451.
- Duncan, W., and Kerr, G. R. (1976). The curability of breast cancer. Br. Med. J. 2, 781–783.
- Fabisiewicz, A., and Grzybowska, E. (2017). CTC clusters in cancer progression and

- metastasis. *Med. Oncol.* *34*, 1–10.
- Fantozzi, A., and Christofori, G. (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* *8*.
- Fehm, T., Müller, V., Alix-Panabières, C., and Pantel, K. (2008). Micrometastatic spread in breast cancer: Detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res.* *10*, 1–10.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* *5*, 77–106.
- Gunasinghe, N. P. A. D., Wells, A., Thompson, E. W., and Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *31*, 469–478.
- Hakomori, S. (1991). Possible functions of tumor-associated carbohydrate antigens. *Curr. Opin. Immunol.* *3*, 646–653.
- Hamamura, K., Hotta, H., Murakumo, Y., Shibuya, H., Kondo, Y., and Furukawa, K. (2020). Ssea-3 and 4 are not essential for the induction or properties of mouse ipsc cells. *J. Oral Sci.* *62*, 393–396.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H., and Andrews, P. W. (2002). Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens. *Stem Cells* *20*, 329–337.
- Hill, C., and Wang, Y. (2020). The importance of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in cancer drug resistance. *Cancer Drug Resist.* *3*, 38–47.



- Ho, M. Y., Yu, A. L., and Yu, J. (2017). Glycosphingolipid dynamics in human embryonic stem cell and cancer: their characterization and biomedical implications. *Glycoconj. J.* *34*, 765–777.
- Keith, B., and Simon, M.C. (2015). Tumor Angiogenesis. *Mol. Basis Cancer Fourth Ed.* *358*, 2039–2049.
- Khanna, C., and Hunter, K. (2005). Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* *26*, 513–523.
- Lai, T. Y., Chen, I. J., Lin, R. J., Liao, G. S., Yeo, H. L., Ho, C. L., Wu, J. C., Chang, N. C., Lee, A. C. L., and Yu, A. L. (2019). Fucosyltransferase 1 and 2 play pivotal roles in breast cancer cells. *Cell Death Discov.* *5*.
- Lee, R. H., Wang, Y. J., Lai, T. Y., Hsu, T. L., Chuang, P. K., Wu, H. C., and Wong, C. H. (2021). Combined Effect of Anti-SSEA4 and Anti-Globo H Antibodies on Breast Cancer Cells. *ACS Chem. Biol.* *16*, 1526–1537.
- Li, Q., and Mattingly, R. R. (2008). Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in ras-transformed breast epithelial cells. *Neoplasia* *10*, 1444–1458.
- Liang, Y. J., Kuo, H. H., Lin, C. H., Chen, Y. Y., Yang, B. C., Cheng, Y. Y., Yu, A. L., Khoo, K. H., and Yu, J. (2010). Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 22564–22569.
- Liao, Y. M., Wang, Y. H., Hung, J. T., Lin, Y. J., Huang, Y. L., Liao, G. S., Hsu, Y. L., Wu, J. C., and Yu, A. L. (2021). High B3GALT5 expression confers poor clinical outcome and contributes to tumor progression and metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *23*, 1–13.

Lorusso, G., and Rüegg, C. (2012). New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 22, 226–233.

Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., and Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 303–315.

Nathanson, D. A., Gini, B., Mottahedeh, J., Visnyei, K., Koga, T., Gomez, G., Eskin, A., Hwang, K., Wang, J., Masui, K., et al. (2014). Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* (80-.). 343, 72–76.

Neophytou, C. M., Panagi, M., Stylianopoulos, T., and Papageorgis, P. (2021). The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers (Basel)*. 13, 2053.

Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., and Thiery, J. P. P. (2016). Emt: 2016. *Cell* 166, 21–45.

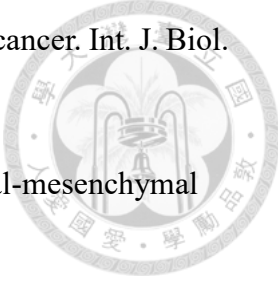
Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., et al. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 534, 47–54.

Nitta, T., Kanoh, H., Inamori, K. I., Suzuki, A., Takahashi, T., and Inokuchi, J. I. (2018). Globo-series glycosphingolipids enhance Toll-like receptor 4-mediated inflammation and play a pathophysiological role in diabetic nephropathy. *Glycobiology* 29, 260–268.

Nounou, M. I., Elamrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., and Syed-Shahattal, H. (2015). Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies supplementary issue: Targeted therapies in breast cancer treatment. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 9, 17–34.

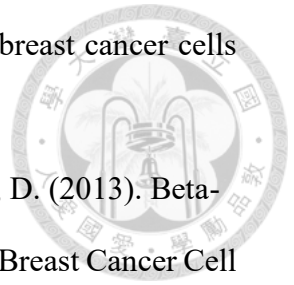
Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., and David, L. (2010). Alterations in

- glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J. Clin. Pathol.* *63*, 322–329.
- Ricciardi, M., Zanutto, M., Malpeli, G., Bassi, G., Perbellini, O., Chilosi, M., Bifari, F., and Krampera, M. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immunomodulatory properties in cancer cells. *Br. J. Cancer* *112*, 1067–1075.
- Rodriguez-Monterrosas, C., Díaz-Aragon, R., Leal-Orta, E., Cortes-Reynosa, P., and Perez Salazar, E. (2018). Insulin induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *J. Cell. Biochem.* *119*, 4061–4071.
- Sannino, G., Marchetto, A., Kirchner, T., and Grünewald, T.G.P. (2017). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transition in mesenchymal tumors: A paradox in sarcomas? *Cancer Res.* *77*, 4556–4561.
- Schmalhofer, O., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2009). E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 151–166.
- Sigal, D. S., Hermel, D. J., Hsu, P., and Pearce, T. (2022). The role of Globo H and SSEA-4 in the development and progression of cancer, and their potential as therapeutic targets. *Futur. Oncol.* *18*, 117–134.
- Sivasubramaniyan, K., Harichandan, A., Schilbach, K., Mack, A. F., Bedke, J., Stenzl, A., Kanz, L., Niederfellner, G., and Bühring, H. J. (2015). Expression of stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) defines spontaneous loss of epithelial phenotype in human solid tumor cells. *Glycobiology* *25*, 902–917.
- Smith, B. N., and Bhowmick, N. A. (2016). Role of EMT in metastasis and therapy resistance. *J. Clin. Med.* *5*, 1–17.
- Sulaiman, A., Yao, Z., and Wang, L. (2018). Re-evaluating the role of epithelial-mesenchymal-transition in cancer progression. *J. Biomed. Res.* *32*, 81–90.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.

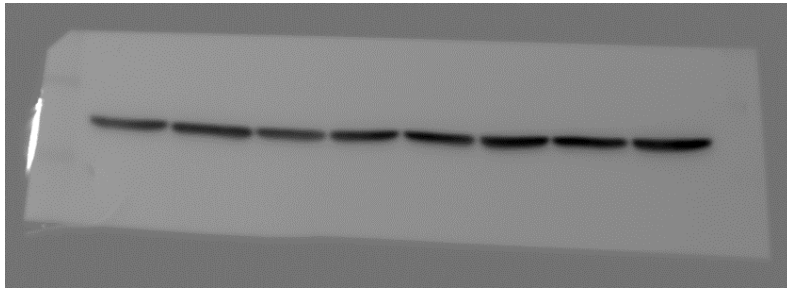
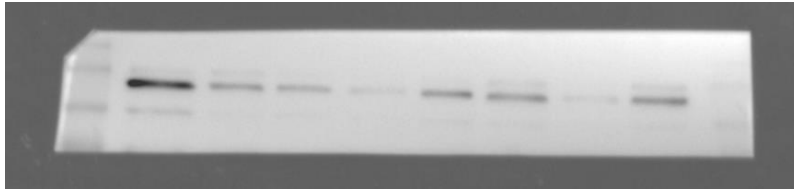
- 
- P., and Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *Int. J. Biol. Sci.* *13*, 1387–1397.
- Tam, W. L., and Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1438–1449.
- Theys, J., Jutten, B., Habets, R., Paesmans, K., Groot, A. J., Lambin, P., Wouters, B. G., Lammering, G., and Vooijs, M. (2011). E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells. *Radiother. Oncol.* *99*, 392–397.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* *139*, 871–890.
- Tian, K., Chen, P., Liu, Z., Si, S., Zhang, Q., Mou, Y., Han, L., Wang, Q., and Zhou, X. (2017). Sirtuin 6 inhibits epithelial to mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis via inactivating TGF- β 1/Smad3 signaling. *Oncotarget* *8*, 61011–61024.
- Tse, J. C., and Kalluri, R. (2007). Mechanisms of metastasis: Epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.* *101*, 816–829.
- Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Tang, S., Liu, H., Zhang, F., Mohammed, M. K., Huang, J., Guo, D., Lu, M., et al. (2016). Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. *Genes Dis.* *3*, 3–6.
- Witz, I. P. (2008). The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* *27*, 19–30.
- Wong, M., Xu, G., Park, D., Barboza, M., and Lebrilla, C. B. (2018). Intact glycosphingolipidomic analysis of the cell membrane during differentiation yields extensive glycan and lipid changes. *Sci. Rep.* *8*, 10993.
- Zhang, J., Liu, D., Feng, Z., Mao, J., Zhang, C., Lu, Y., Li, J., Zhang, Q., Li, Q., and Li,

L. (2016). MicroRNA-138 modulates metastasis and EMT in breast cancer cells by targeting vimentin. *Biomed. Pharmacother.* 77, 135–141.

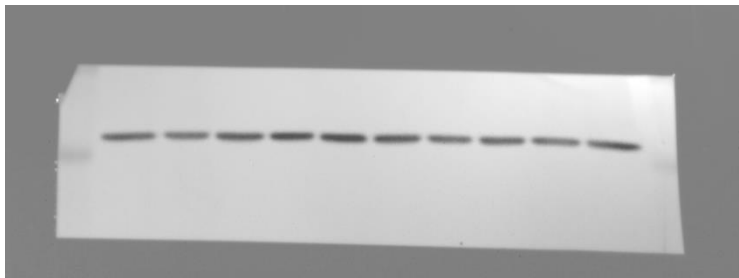
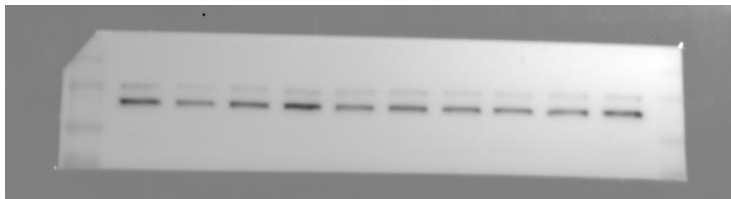
Zhang, X., Li, Y., Zhang, Y., Song, J., Wang, Q., Zheng, L., and Liu, D. (2013). Beta-Elemene Blocks Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 through Smad3-Mediated Down-Regulation of Nuclear Transcription Factors. *PLoS One* 8.



附錄

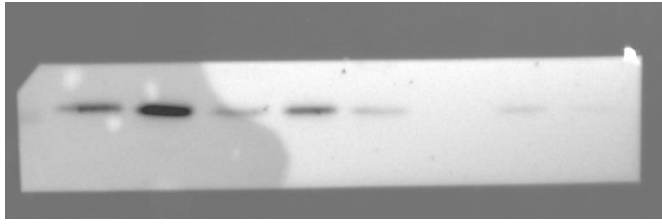


附錄圖表 1. 圖表 4A 原始資料

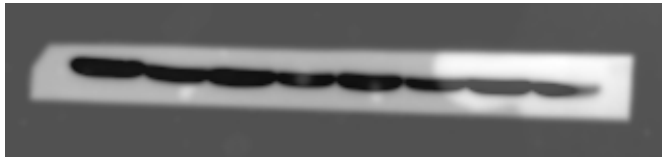


附錄圖表 2. 圖表 4B 原始圖像資料

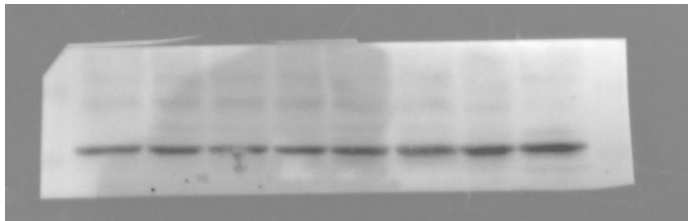
B3GALT5



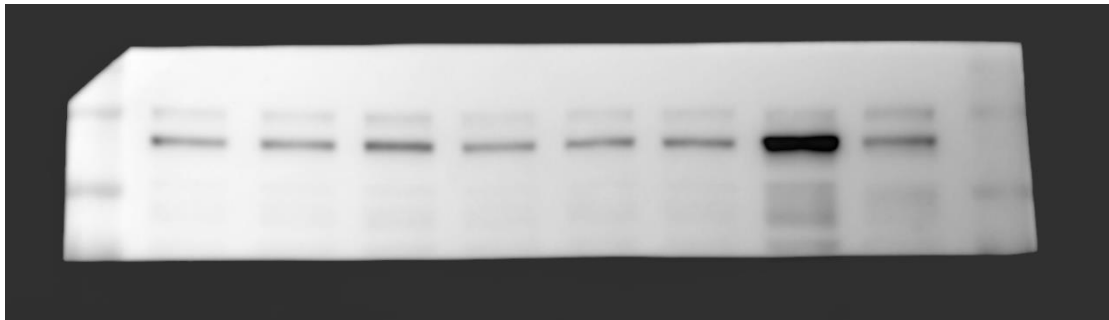
Tubulin



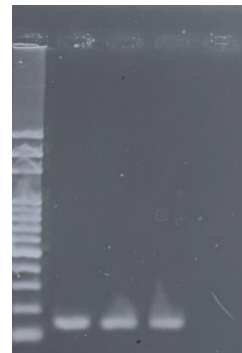
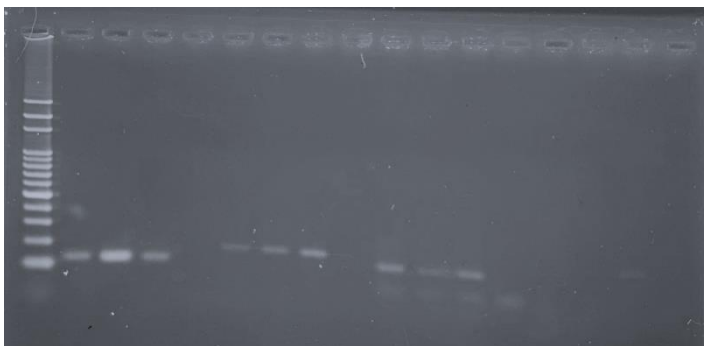
Vimentin



E cadherin



附錄圖表 3. 圖表 5B 原始資料



附錄圖表 4. 圖表 16A 原始資料



附錄表格 1. 圖表 5C-E 原始數據

	B3GALT5	E cadherin	Vimentin
Relative Fold Induction	0.278 ± 0.043	0.553 ± 0.122	1.478 ± 0.059

附錄表格 2. 圖表 6B 原始數據

	Positive cell (%)		
	SSEA3	SSEA4	Globo H
Vehicle Ctrl	4.300 ± 1.136	12.367 ± 4.252	2.367 ± 2.031
10 ng/ml TGF-β	3.167 ± 0.702	10.567 ± 4.105	2.633 ± 0.850

附錄表格 3. 圖表 9D 原始數據

	B3GALT5
Relative Fold Induction	2.295 ± 0.477

附錄表格 4. 圖表 10B 原始數據

	Cell number (1*10 ⁵)					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
GFP Ctrl	0.370 ± 0.060	0.532 ± 0.0534	7.354 ± 0.520	16.000 ± 1.023	20.667 ± 2.082	20.250 ± 2.385
B3GALT5	0.565 ± 0.083	0.722 ± 0.035	9.313 ± 0.380	14.542 ± 1.787	25.417 ± 3.403	23.750 ± 3.269

附錄表格 5. 圖表 10C 原始數據

	GFP Ctrl	B3GALT5
Population doubling (hr)	13.639 ± 0.061	14.049 ± 0.576

附錄表格 6. 圖表 11A 原始數據

	<i>CDH1</i>	<i>OVOL1</i>	<i>GRHL2</i>	<i>ESRP1</i>
Relative Expression	0.539 ±	0.869 ±	0.284 ±	0.839 ±
Fold Induction	0.013	0.613	0.084	0.116

附錄表格 7. 圖表 11B 原始數據

	<i>CDH2</i>	<i>Vimentin</i>	<i>SRSF1</i>	<i>SNAL1</i>	<i>PRRX1</i>
Relative Expression	0.182 ±	0.211 ±	0.620 ±	0.510 ±	0.217 ±
Fold Induction	0.031	0.208	0.153	0.084	0.137

附錄表格 8. 圖表 11E 原始數據

	E cadherin
Relative Fold Induction	0.501 ± 0.031



附錄表格 9. 圖表 12C 原始數據

	Migration (%)		
	24 hr	48 hr	72 hr
GFP Ctrl	9.104 ± 1.145	15.473 ± 1.948	24.292 ± 2.644
B3GALT5	1.111 ± 5.383	8.745 ± 1.950	17.622 ± 3.281

附錄表格 10. 圖表 13C 原始數據

	GFP Ctrl	B3GALT5
Number of cells	785.500 ± 30.690	434.100 ± 26.950

附錄表格 11. 圖表 15F-H 原始數據

	Positive cells (%)		
	SSEA3	SSEA4	Globo H
GFP Ctrl	9.200 ± 1.646	8.433 ± 0.578	4.533 ± 3.355
B3GALT5	7.933 ± 2.747	33.870 ± 1.260	54.267 ± 10.090

附錄表格 12. 圖表 17A, B 原始數據

	shST3GAL2	shST3GAL2	shFUT1	shFUT1
	#1	#2	#1	#2
Relative Expression	0.094 ±	0.048 ±	0.448 ±	0.601 ±
Fold Induction	0.017	0.004	0.043	0.127

附錄表格 13. 圖表 17E 原始數據

	shLacZ	shFUT1 #1	shFUT1 #2
Globo H ⁺ cells (%)	70.700 ± 2.000	27.900 ± 12.818	22.633 ± 8.849

附錄表格 14. 圖表 17F 原始數據

	shLacZ	shST3GAL2 #1	shST3GAL2 #2
SSEA4 ⁺ cells (%)	32.825 ± 5.458	18.975 ± 1.056	21.325 ± 1.445

附錄表格 15. 圖表 18B 原始數據

	Migration (%)				
	shLacZ	shST3GAL2 #1	shST3GAL2 #2	shFUT1 #1	shFUT1 #2
24 hr	14.276 ± 4.254	11.736 ± 7.762	18.980 ± 6.186	21.666 ± 7.540	21.466 ± 10.316
48 hr	17.572 ± 3.556	27.481 ± 7.326	23.399 ± 3.577	27.444 ± 3.808	25.842 ± 1.593
72 hr	26.104 ± 3.227	26.605 ± 2.690	27.290 ± 0.992	37.464 ± 2.471	36.406 ± 3.373

附錄表格 16. 圖表 19B 原始數據

	shLacZ	shST3GAL2 #1	shST3GAL2 #1	shFUT1 #1	shFUT1 #2
Number of cells	372.386 ± 39.486	193.714 ± 13.014	321.102 ± 28.595	494.7619 ± 33.728	462.780 ± 26.715

附錄表格 17. Cloning、PCR 以及 qPCR 所需引子

Primers	sequence5'~3'
5' <i>T2A-GFP</i>	GATGACAAGGGATCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAAC
3' <i>T2A-GFP</i>	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
5' <i>pSIN</i>	GACGAGCTGTACAAGTAATAATAGGCGGCCGCTCGAGAC
3' <i>pSIN</i>	GTCGTCCTTGTAGTCGACAGGCGGACAATCTTCCCCCGG
3' <i>pSIN FLAG</i>	TCCGGATCCCTTGTATCGTCGTCCTTGTAGTCGACAGGCGG
5' <i>CDH1</i>	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG
3' <i>CDH1</i>	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
5' <i>OVOL1</i>	TCTGAAGACATGGGCCACT
3' <i>OVOL1</i>	TGTGGCGGTTTCAGCATG
5' <i>GRHL2</i>	GGGCTGATGGCAACTGTAAT
3' <i>GRHL2</i>	TGGTGTAGGCTCTTCGGGTA
5' <i>ESRP1</i>	CAGGAGCACAGCAGCT
3' <i>ESRP1</i>	AGACCTCGAAGGCGTATACAG
5' <i>CDH2</i>	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC
3' <i>CDH2</i>	GTAGGATCTCCGCCACTGATTC
5' <i>Vimentin</i>	GGACCAGCTAACCAACGACA
3' <i>Vimentin</i>	TCCTCCTGCAATTTCTCCCG
5' <i>SRSF1</i>	GGAAGACGCGGTGTATGG
3' <i>SRSF1</i>	ATAGCGACCTCGGGGAG
5' <i>SNAI1</i>	CGAGTGGTCTTCTGCGCTA
3' <i>SNAI1</i>	CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA
5' <i>PRRX1</i>	CGGAAGACACTGAAAAGCGCC
3' <i>PRRX1</i>	TCAGTTGACTGTTGGCACCT
5' <i>ST3GAL2</i>	GGTTTGACAGCCACTTTGACG
3' <i>ST3GAL2</i>	CGGAAGCGGTAGGGGTTTC
5' <i>FUT1</i>	AGCAACGGCATGGAGTGGTGTA
3' <i>FUT1</i>	AAGCCGAAGGTGCCAATGGTCA

