

**The study of PLEK2 gene promotes lung cancer cells CL1-0 migration and invasion ability.**

**PLEK2 基因促進肺腺癌細胞 CL1-0 轉移和侵入能力之研究**

作者:黃正誠、唐琬琿、黃皓瑜、傅沛琦、鄭宇哲、李泰林、蔡孟峯

所屬機關:大葉大學分子生物科技學系

聯絡地址:彰化縣大村鄉學府路 168 號

電子郵件: F9861017@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

癌症是基因引起的疾病，當調控細胞生長的基因發生突變或損壞時，使得細胞失去控制，持續的生長及分裂而產生腫瘤。調控細胞生長主要有兩大類基因—致癌基因(Oncogene)以及腫瘤抑制基因(Tumor Suppressor Gene)。致癌基因(Oncogene)主要是一些參與促進細胞成長、進行有絲分裂的基因。腫瘤抑制基因(Tumor Suppressor Gene)，則是負責抑制細胞生長或是調控細胞分裂進行。一般而言，突變需要發生在調控細胞生長的重要基因上，才有機會使一個正常細胞轉化成癌細胞。根據衛生署的統計，肺癌是死亡率最高的癌症之一，即使肺癌患者接受治療，超過五年的存活率仍低於 15%。與其他癌症一樣，肺癌細胞轉移是肺癌病患存活的關鍵因素。癌細胞轉移(Metastasis)過程需要許多複雜步驟的參與，其中亦牽涉到許多不同功能的基因。到目前為止，已經有許多參與癌細胞侵入以及轉移作用的基因或蛋白質被驗證及定性出來，這些癌轉移相關的基因其功能大部分與細胞附著，細胞生長，凋亡，血管新生，訊息傳導有關。為進一步瞭解肺癌轉移的分子作用機制，我們針對肺癌轉移相關的基因進行篩選。以肺腺癌細胞株 CL1-0,及 CL1-5 作為模式細胞利用基因微陣列技術進行分析，發現 PLEK2 在 CL1-5 細胞比 CL1-0 細胞高出 54.22 倍的表現量。PLEK2 主要功能在於調控 PI3K。前人的文獻指出，很多附著性細胞中皆有 PLEK2 的大量表現。PLEK2 是否與肺癌細胞轉移具有相關性，以及它在肺癌細胞中所參與的分子作用機制都是值得進一步探討的課題。本實驗室針對 PLEK2 基因在肺癌細胞中的分子機制進行探討，首先建立大量表現 PLEK2 的肺癌細胞株系統並利用傷口癒合(Wound Healing Assay)與 Transwell Migration 以及 Invasion 分析細胞的轉移與侵入能力。結果顯示 PLEK2 確實能促進肺腺癌細胞的轉移和侵入的能力。未來將嘗試建立 PLEK2 基因可能參與的分子作用機制，所得結果將可幫助我們進一步瞭解 PLEK2 基因在肺癌細胞中所扮演的角色且有助於我們了解肺癌致發機制以及癌症的預防與治療。

關鍵字：肺癌，PLEK2，癌轉移，PI3K

## 1.前言

### 1.1 癌症

癌症在醫學上又稱為惡性腫瘤，是一群生長不受到控制的細胞無限制的增生，且會透過血液或淋巴系統轉移至各部位進而危害生物個體存活(1)。癌症細胞有別於正常的細胞，根據HanaHan and Weinberg 2011年的整理資料顯示癌細胞會持續不斷分裂、逃避抑制生長的訊號、逃避細胞凋亡、會侵入及轉移、持續表現端粒、誘導血管新生、躲避免疫細胞的攻擊、細胞內能量的產生失去控制、genome不穩定累積的突變以及產生慢性發炎的十種主要特性(2)。

目前研究報告指出日常飲食習慣、外來有害物質、生理荷爾蒙的調節甚至是遺傳變異導致的代謝疾病都有可能是致癌的原因。嗜吃檳榔以及長期酗酒也都是導致癌症的危險因子(3)，而長期接觸化學藥劑或是在過量放射線環境下滯留過久也被証實是造成癌症重要的危險因子(4)。不良飲食習慣如高溫油炸、燒烤、煎烤時，產生的高溫可能讓蛋白質變性，使某些物質變成致癌物，如多環芳香族碳氫化合物(PAH)，這種物質可能和腸胃道癌症有關。油炸澱粉類食物會產生一種稱為丙烯胺(acrylamide)的成分，可能會致癌。醃漬、豆類發酵、鹽漬的食物某些成分，會與亞硝酸鹽一起作用，形成致癌物；而且這些高鹽食物也是癌細胞的促進因子。

根據調查發現，因肺癌死亡的男性患者有80%為抽菸所引起，不論個人抽菸或吸入二手煙都是重要的危險致癌因子，由於香菸本身含有四百種以上的致癌物質，菸草燃燒時產生的致癌物會破壞肺部細胞進而產生病變。實驗已經證明，抽菸量越大、菸齡越久，產生肺癌的可能性也就越高(5)。然而因肺癌死亡的女性患者，只有15%與抽菸有關，一般認為女性罹患肺癌的主要因為廚房的油煙以及二手菸等因素造成。近年來亦有學者提出空氣污染、職業暴露、生活作息改變、家族遺傳史以及放射線物質等都是女性罹患肺癌可能的危險因子；尤其是日益嚴重的空氣污染，可能是導致肺癌罹患率逐年提升的主要原因之一(6)。

### 1.2 肺癌之分類與臨床症狀

根據行政院衛生署 (<http://www.doh.gov.tw/>) 今年五月公佈的一百年國人十大死因統計，惡性腫瘤（癌症）連續三十年蟬聯國人十大死因榜首，其中肺癌更從民國八十六年到民國一〇一年已連續十四年為癌症死因第一位，每年死於肺癌的婦女比死於乳癌者還多，且肺癌病人五年內的存活率低於 15% (7)。根據美國地區的統計數據顯示，2008 年死於肺癌的病人數比死於前列腺癌、乳癌、直腸癌的總和還要多。

肺癌的種類依據其細胞型態不同可分為兩大類：非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)及小細胞肺癌(small cell lung cancer)。約有20% 肺癌病例被歸類為小細胞肺癌其主要特徵為細胞生長快速並且非常容易轉移。此外非小細胞肺癌則佔約80%，可細分成鱗狀細胞癌(Squamous cell lung cancer；SCC)、肺腺癌(Lung adenocarcinoma)以及大細胞癌(Large cell carcinoma)等三類，其

細胞生長及轉移情形較為緩和，但與其他癌症相比，非小細胞肺癌的轉移能力仍相當高。肺腺癌約佔所有肺癌的40%，且與鱗狀細胞癌相比，腺癌主要出現在肺部周圍，而鱗狀細胞癌主要出現在肺部較中心的部位(8)。總體而言，肺癌病患具有高死亡率與高轉移率的特徵。肺癌初期不會有明顯症狀，常見的症狀初期是咳嗽，之後伴隨著聲音沙啞、吞食不易、體重減輕、全身無力、疼痛、呼吸困難、咳血、上胸腔症候群以及併發惡性肋膜腔積水等。

### 1.3 癌轉移

肺癌在癌細胞發生轉移前被診斷出來並治療，五年整體存活率大概有50-70%，然而一旦發生癌轉移，五年整體存活率則降至5%以下。因此如同其他癌症一般，癌細胞轉移為影響肺癌病患存活的關鍵因素。從病理學角度來看，當癌細胞增生到一定程度會藉由侵入與移動能力進入血管內，經由血液循環運送到身體其他組織器官部位，在這些部位在次增生並伴隨血管新生(Angiogenesis)的發生(9)，癌細胞的侵入與移動能力，也和癌細胞的生存、發展、轉移有著息息相關。細胞移動包含幾個重要步驟：伸展(Protrusion)、黏附(Adhesion)、牽引(Traction)、與收縮(Retracton)四部份；伸展(Protrusion)：附著在細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)當細胞爬行時會向前伸出以肌動蛋白絲(actin)為骨架的偽足。黏附：偽足表面上細胞黏附分子integrin會與細胞基質上的受體(receptor)形成非共價鍵結，產生focal adhesion。牽引：偽足與actin filaments連接，形成stress fibers，使細胞能向前移動。而肌凝蛋白(myosin)具有同時黏附在兩個肌動蛋白絲上同時進行移動的能力，並提供細胞前進所需能量。收縮：細胞被牽引向前進時，在細胞後方與受體非共價鍵結分離，使細胞可以向前爬行。接著細胞繼續進行前進、牽引、收縮的循環動作(10)。癌細胞脫離原來組織進入血管或淋巴系統，在血液循環系統或淋巴系統中生存，部份細胞游移到遠端的微血管停留，或穿過血管、淋巴管壁而侵入到另一組織中，轉移後的腫瘤細胞局部會有新生血管形成，在新的組織中生存並持續生長。

目前對於癌轉移的作用機制已有初步了解，但在基因分子層次上之間的相互調節與影響的關係還需要進一步的探討。癌轉移是目前外科手術、放射治療、化學治療，各種治療方法失敗的主要原因。我們希望研究癌轉移機制，尋找與肺癌轉移有關的基因，來改善治療的方法。利用已建立之高侵入及轉移傾向和低侵入及轉移傾向之各類腺癌細胞株株(CL1-0, CL1-5)、cDNA微陣列技術，找尋與癌轉移相關之新基因。

### 1.4 致癌基因與腫瘤抑制基因

癌症中常可以觀察到致癌基因(oncogene)或腫瘤抑制基因(tumor suppressor gene)的異常表現；致癌基因活化後可以使細胞抵抗凋亡(Programmed cell death、apoptosis)的作用使細胞能不受控制的增生，而腫瘤抑制基因表現若是被抑制，則原本控制細胞凋亡的功能不再，細胞失去正常細胞週期(cell cycle)而促使細胞走向癌化之過程。在肺癌研究中常見致癌基因有：K-Ras基因點突

變(point mutation)後，大約30%患者不會被誘導產生細胞凋亡或衰老情形(11)；COX-2，藉由靜脈注射免疫不全小鼠，使COX-2表現量下降而導致癌轉移受到抑制(12)。相對的腫瘤抑制基因，較常被提及的有p53基因，當p53受到破壞使細胞週期不受控制，使細胞產生突變(13)；RB，為腫瘤抑制子，調控細胞增生、分化、凋亡以避免DNA損壞；VEGFA表現增加會經由PI3K/AKT訊號傳遞路徑增加細胞的遷移和侵入能力(14)。當這些基因片段的缺失(deletion)、突變(mutation)、或甲基化(methylation)時，會導致基因表現被抑制或去活化，使腫瘤抑制基因失去功能，造成癌症發生(15)。

### 1.5 磷脂酰肌醇(PI)3激酶 (Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase) PI3K

在磷脂酰肌醇(PI)3激酶 (Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase) PI3K家族中，I型PI3K和其下游分子絲氨酸/蘇氨酸蛋白激酶Akt(或PKB)所組成的信號傳遞路徑因其與腫瘤發生發展具相關性，I型PI3K又分為IA和IB兩個亞型，分別從酪氨酸激酶連接受體和G蛋白連接受體傳遞信號。IA型PI3K是由催化亞單位p110和調節亞單位p85所組成的二聚體蛋白，具有類脂激酶和蛋白激酶的雙重活性。PI3K通過兩種方式活化，一種是與具有磷酸化酪氨酸殘基的生長因子受體或連接蛋白相互作用，引起二聚體構象改變而被活化；另一種是通過Ras和p110直接結合導致PI3K的活化(16)。PI3K被活化後將在質膜的PI(4,5)P2肌醇環的D3位置產生PI(3,4,5)P3，PIP3與細胞內含有pleckstrin homology (PH domain)的信號蛋白Akt和PDK1(phosphoinositidedependentkinase-1)結合，促使PDK1磷酸化，Akt蛋白的Ser308會導致Akt的活化。Akt還能通過PDK2(如整合素連接激酶ILK)對其Thr473的磷酸化而被活化(17)。活化的Akt通過磷酸化作用活化或抑制其下游Bad、Caspase9、NF- $\kappa$ B、GSK-3、FKHR、p21Cip1和p27Kip1等，進而調節細胞的增殖、分化、凋亡以及遷移等。若PI3K/Akt信號傳遞路徑在人類腫瘤中缺失，將導致細胞分化、增殖和存活。此信號傳遞路徑與腫瘤的侵入與轉移的行為也具有密切的關係。

### 1.6 Pleckstrin

磷脂酰肌醇(PI)3激酶 (Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase) 是重要的信號傳遞分子之一，磷酸化PI(4,5)P2肌醇環的D3位置產生PI(3,4,5)P3對胞外促效劑反應，如生長因子和細胞外基質(ECMs)。許多PI3K的下游因子已經確定含有pleckstrin homology(PH) domain (18)。PH domain為球狀蛋白質domain，由100至120個胺基酸組成，在其他大約252人類的蛋白質已經確定，並發現許多含PH domain的分子參與了細胞信號傳導、細胞骨架排列、膜運輸和磷脂修飾作用。經常地結合多聚磷酸肌醇到PH domain與細胞膜上的蛋白質定位分子，其最先於pleckstrin 1的PH domain發現。

Pleckstrin的調控是獨特的，因為它是唯一被描述為蛋白質的PH domain由相鄰的磷酸化位點調控。Pleckstrin 1是一個350個氨基酸序列的蛋白，可分為三個部位：PH domain在其氨基和羧基末端和DEP( Dishevelled, Egl-10, 和 pleckstrin) domain在中央。為血小板、白血球，單核球，

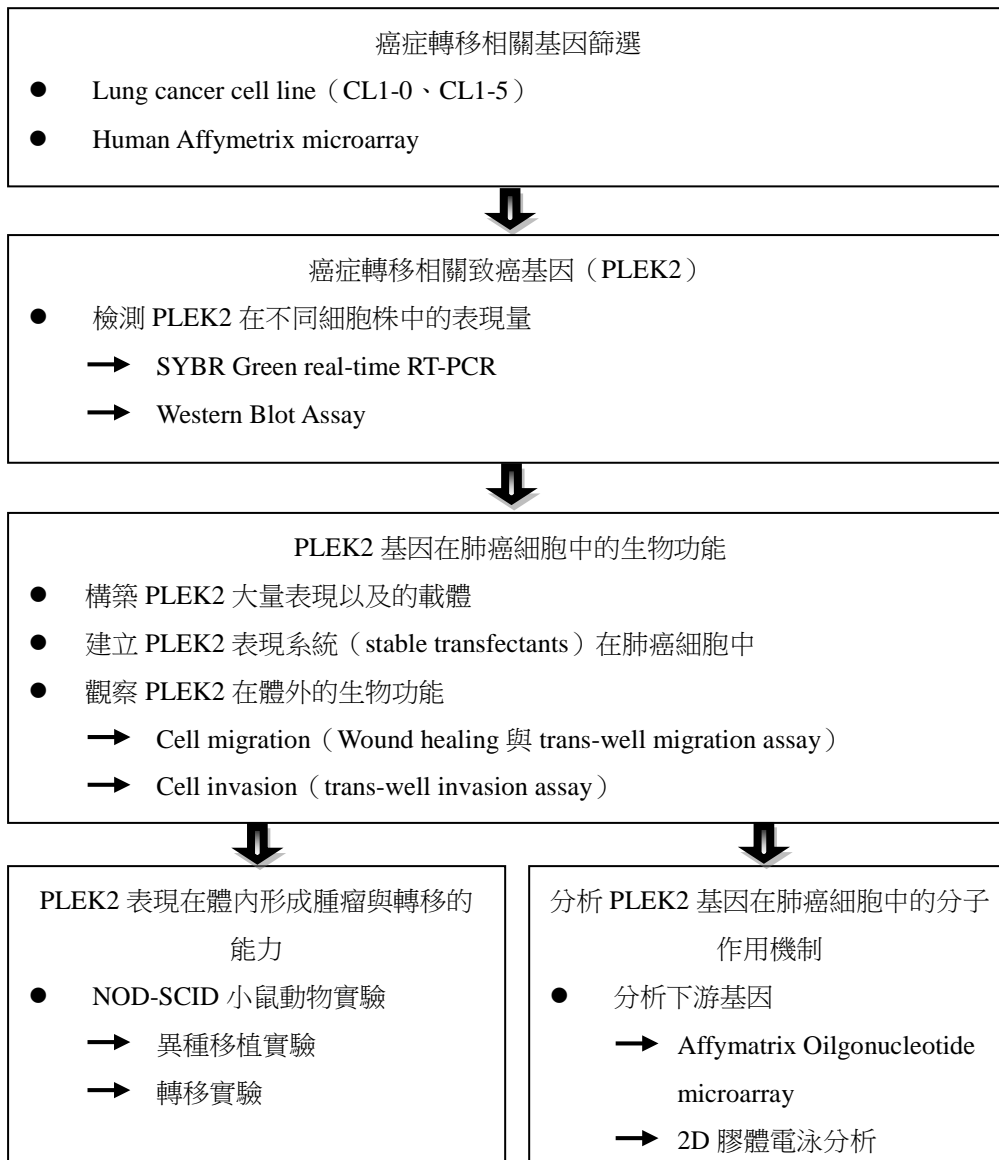
巨噬細胞，淋巴細胞和粒細胞的蛋白激酶C(PKC)一個主要基質，其磷酸化一直被用來作為血小板活化的標記。PLEK1過度表現和顯微注射研究顯示為膜定位，與PI3K路徑雖不相關但需要Rac的活性。已被證實參與肌動蛋白重排但不需要羧基端PH domain，是完全受PKC的磷酸化(氨基PH domain 和DEP domain之間一小段胺基酸有3個蛋白激酶C磷酸化的位置Ser113，Thr114和Ser117)調控肌動蛋白重排誘導F-actin轉向細胞皮層，並參與片狀偽足的產生。

一個 PLEK1 旁系同源，pleckstrin 2(PLEK2)，是一個 353 個胺基酸蛋白，同源性為 65%和 39%與 PLEK1 相同。PLEK1 的表現被限制在血小板和白血球，而 PLEK2 mRNA 存在於各種貼附性細胞的類型，骨髓和胸腺。儘管 PLEK2 在結構上其主要序列、組織同源性和 PLEK1 很相似，但 PLEK2 不是 PKC 一個有效的基質。在先前研究發現 PLEK2 為 PI(3,4,5)P3 的結合蛋白，PLEK2 表現在 Jurkat T 細胞株誘導 PI3K 依賴的 F-actin 重組和細胞擴散，此外，PLEK2 的 PH domain 結合膜磷脂，集結整合素，促進片狀偽足細胞形成，最終透過 PI3K 的依賴性途徑使細胞擴散。PLEK2 極化免疫突觸經由對其 PH domain 以及與 F-actin 的共定位。我們提出 PI3K 產物生成包含 PLEK2 在細胞膜的離散區域，使其有助於細胞膜延展，細胞擴散和免疫突觸的形成。雖然 PLEK2 在很多細胞株皆有發現，但它與肺癌相關的研究卻從未發表過，所以我們透過大量表現 PLEK2 的系統了解它在肺腺癌細胞株 CL1-0 的生物功能，進一步分析其分子作用機制。

## 2.研究動機

癌症的治療與研究一直是各國之間很熱門的課題，原因不外乎是因為癌症的治療困難及死亡率高；而在台灣也同樣面臨這個問題，癌症一直是國人十大死因的第一位，且有逐年升高的趨勢。本實驗室利用微陣列晶片(Microarray)分析找出在肺腺癌細胞株 CL1-0 以及 CL1-5 中表現量差異高於五倍的基因進行分析，許多文獻報告指出，PLEK2 為 PI(3,4,5)P3 的結合蛋白，PLEK2 表現在 Jurkat T 細胞株誘導 PI3K 依賴的 F-actin 重組和細胞擴散，此外，PLEK2 的 PH domain 結合膜磷脂，集結整合素，促進片狀偽足細胞形成，最終透過 PI3K 的依賴性途徑使細胞擴散。然而 PLEK2 在肺癌細胞相關研究相當缺乏，特別是 PLEK2 基因影響肺腺癌分子的分子作用機制。此研究將針對在肺癌細胞中 PLEK2 的基因功能特性進行研究，並進一步探討 PLEK2 在肺癌細胞內所參與的分子作用機制，期望透過這些研究使我們對肺癌的生長和轉移能有更多瞭解，並利用相關研究資料將有助於肺癌患者的治療。

### 3. 實驗流程



## 4.結論

本實驗我們建立了大量表現 PLEK2 的系統，並以生物功能性分析證明在肺腺癌細胞中 PLEK2 基因的表現明顯促進了肺腺癌細胞的轉移以及侵入能力。這與我們一開始的假說結果一致。而 PLEK2 會藉由 PI3K-Akt 的訊號傳遞路徑，去調控 PLEK2 最下游的基因 BCL2，BCL2 是一個抑制細胞凋亡的基因，而當 PLEK2 大量表現時 BCL2 也會大量表現使的癌細胞不能進行 Apoptosis，進而不斷的增生。更進一步的了解 PLEK2 與 BCL2 之間的分子作用機制則是我未來的工作。

PLEK2 在肺癌細胞相關研究仍相當缺乏，特別是 PLEK2 基因影響肺腺癌的分子作用機制。希望未來能更進一步探討 PLEK2 在肺癌細胞內所參與的分子作用機制以及其相關的下游路徑。期望透過這些研究使我們對肺腺癌的生長和轉移能有更多瞭解，同時也希望此相關研究資料能夠幫助於肺腺癌患者的治療。

## 5.未來展望

5.1 根據訊號傳遞圖指出經由 PLEK2 活化 PI3K-Akt 的訊號傳遞路徑可知道 BCL-2 為 PLEK2 的下游基因，進一步的了解 BCL2 作用。

5.2 根據先前的文獻指出，當 PLEK2 大量表現在 HCC2998 細胞時會有 Epithelial-mesenchymal transition (EMT)的現象產生，而 EMT 的現象又與 SLUG 基因的調節有關，因此將進一步的了解 PLEK2 對 SLUG 的作用關係。

5.3 建立 knockdown PLEK2 基因表現的系統

5.4 PLEK2 基因表現之生物功能已大致了解，目前對於其影響的分子作用機制還未進一步分析，利用 Microarray 以及 two-dimensional gel electrophoresis 分析主要的作用機制是必要的。

5.5 利用動物實驗，我們將研究 PLEK2 基因表現在腫瘤生長和轉移扮演的角色。

5.6 研究 PLEK2 基因表現是否可以作為肺癌診斷以及預後的 Marker。



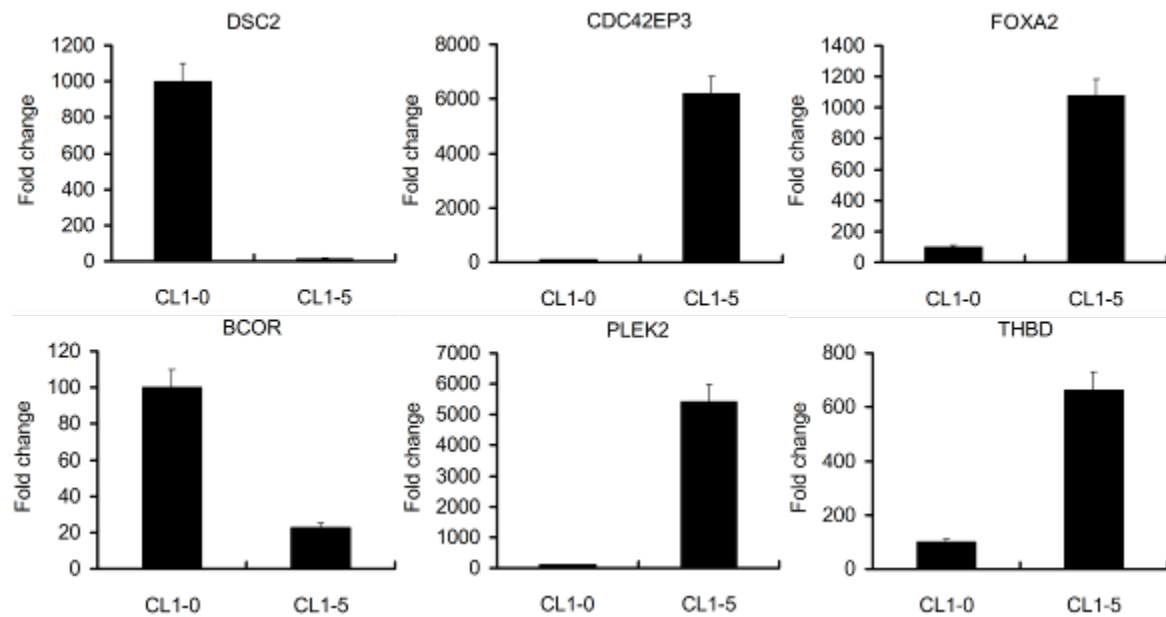
圖一(A)

A partial list of differential expression genes in lung cancer cell (CL1-5/CL1-0)

GenBank accession No.	HGNC	Gene name	Function	CL1-5/CL1-0 (Fold change)
NM_024422	DSC2	desmocollin2	cell adhesion	0.016
NM_001123385	BCOR6	BCL6 corepressor	transcription factor	0.23
NM_006449	CDC42EP3	CDC42 effector protein 3	Pseudopodia formation	62.02
NM_016445	PLEK2	pleckstrin2	cell adhesion	54.22
NM_021784	FOXA2	forkhead box A2	transcription factor	10.79
NM_000361	THBD	thrombomodulin	endothelial membrane protein	6.63

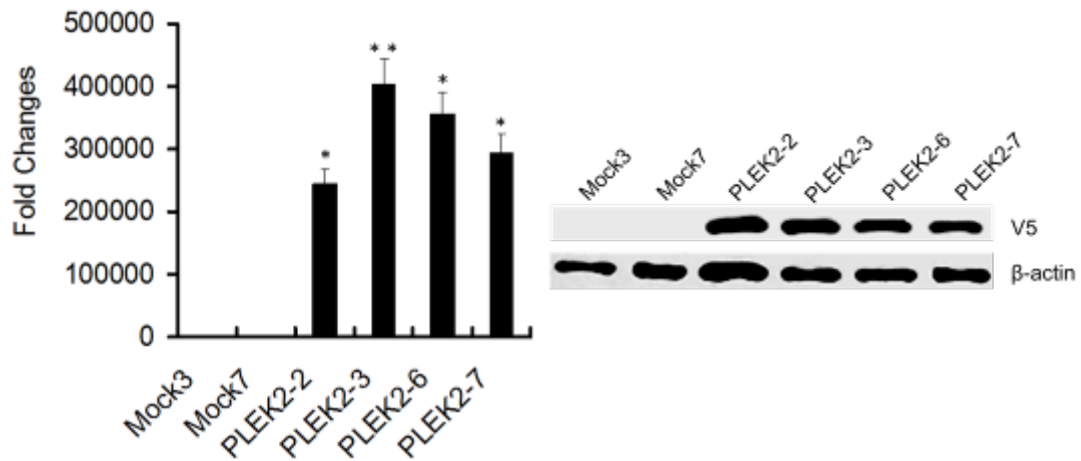
圖一(A)、以 Microarray 分析在肺腺癌細胞株 CL1-0,CL1-5 中有明顯表現量差異的基因，其 PLEK2 在 CL1-5 比 CL1-0 多出 54.22 倍。

圖一(B)



圖一(B)、藉由即時定量 PCR 的方式去分析 CL1-5 以及 CL1-0 肺癌細胞中的基因表現情形，藉此驗證 Microarray 的結果。

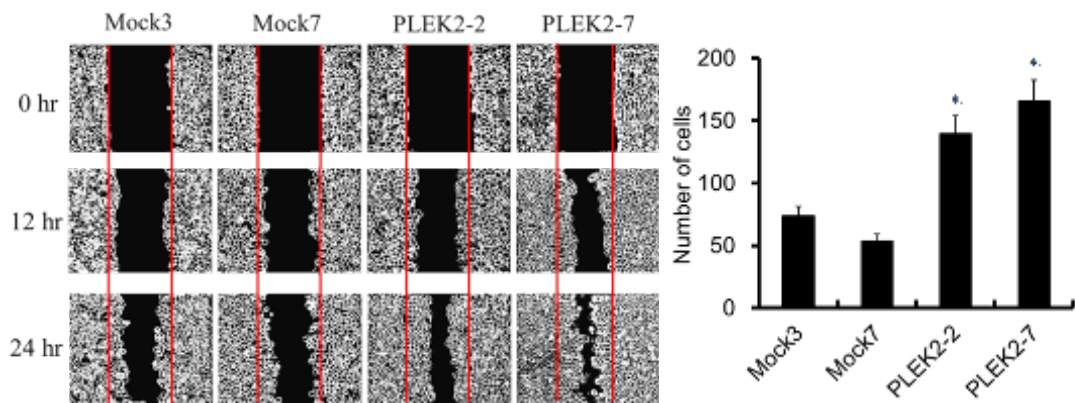
圖二



圖二、分析大量表現 PLEK2 在肺腺癌 CL1-0 細胞表現情形。

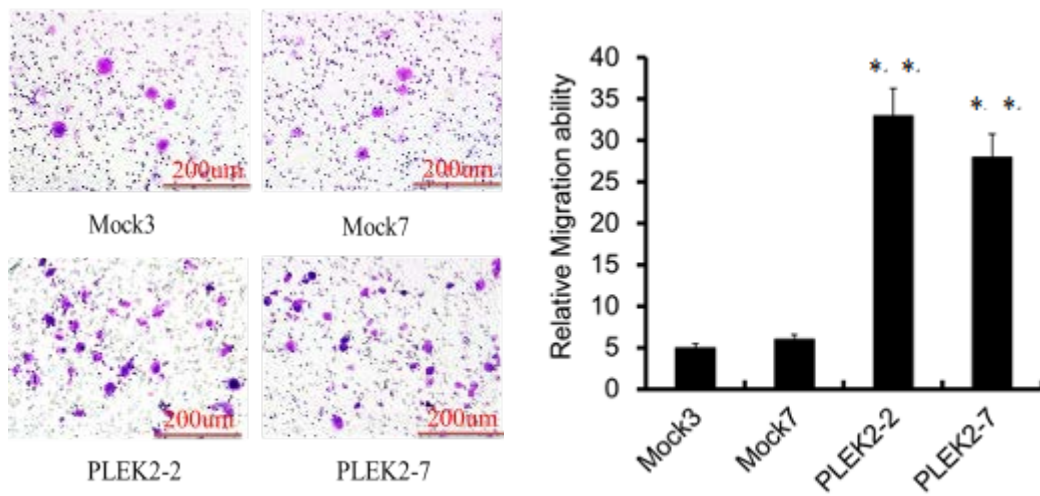
以即時定量 RT-PCR 以及西方墨點法分析肺腺癌細胞 CL1-0 轉染 PLEK2 基因之後，其 stable clone 2、3、6、7 會大量表現 PLEK2。(\*  $p < 0.05$ )

圖三



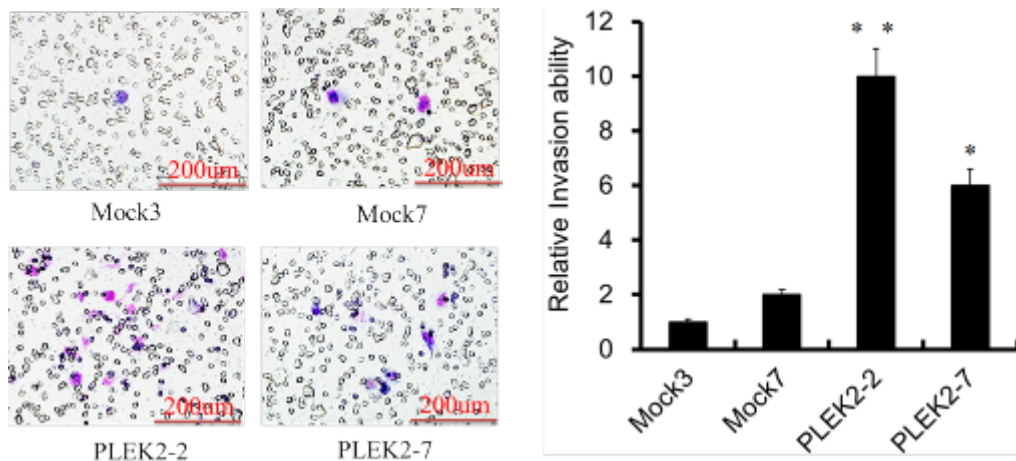
圖三、以傷口癒合分析(wound healing assay)分析 PLEK2 大量表現系統之細胞轉移能力。結果顯示大量表現 PLEK2 會明顯的促進肺腺癌細胞 CL1-0 之轉移能力。(\*  $p < 0.05$ )

圖四



圖四、以 Transwell Migration Assay 分析 PLEK2 大量表現系統之細胞轉移能力。結果顯示大量表現 PLEK2 會明顯的促進肺腺癌細胞 CL1-0 之轉移能力。(\* p < 0.05)

圖五



圖五、以 Transwell Invasion Assay 分析 PLEK2 大量表現系統之細胞侵入能力。結果顯示大量表現 PLEK2 會明顯的促進肺腺癌細胞 CL1-0 之侵入能力。(\* p < 0.05)

## 參考文獻

1. Sleeman J, Schmid A, Thiele W (2009). Tumor lymphatics. *Semin Cancer Biol.*
2. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100.
3. Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, et al. (1995). Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 24:450-453.
4. Boffetta P (2006). Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res* 608:157-162.
5. Hecht, S.S., Hochalter, J.B., Villalta, P.W., and Murphy, S.E. (2000). 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12493-12497.
6. Travis WD, Travis LB, Devesa SS (1995). Lung cancer. *Cancer* 75:191-202.
7. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37 Suppl 8:S4-66.
8. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007). Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 75:56-63.
9. Chambers, A.F., Naumov, G.N., Vantghem, S.A., and Tuck, A.B. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res* 2,400-407.
10. by D. Bray, Garland Science (2002). Cell movement, 2nd ed.
11. Rodenhuis, S., and Slebos, R.J. (1990). The ras oncogenes in human lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 142, S27-30.
12. Wun, T., McKnight, H., and Tuscano, J.M. (2004). Increased COX-2: a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 28, 179-190.
13. Moll, U.M., and Schramm, L.M. (1998). p53—an acrobat in tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 9, 23-37.
14. Chen, C.H., Lai, J.M., Chou, C.K., Whang-Peng, J., et al. (2009). VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway. *PLoS One* 4, e5052.
15. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
16. Ward SG, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as the therapeutic agents. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3:426-434.
17. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function downregulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003; 63: 2139-2144
18. Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yoyoi, Bunkyo-ku, Tokyo (2007) 113-8657, Japan.