

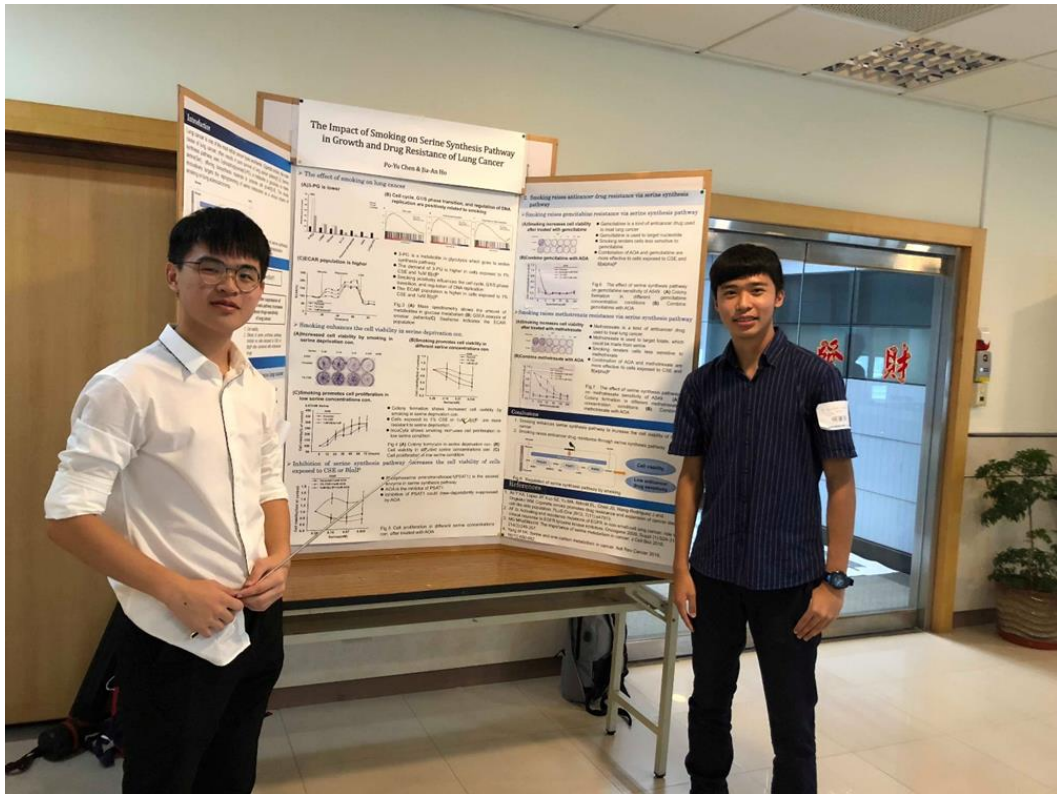
# 2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090005  
參展科別 醫學與健康科學  
作品名稱 探討吸菸調控絲胺酸合成路徑影響肺癌生長及抗藥性  
得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺中市立臺中第一高級中學  
指導教師 黃偉謙、黃俊奇  
作者姓名 陳柏宇、何家安

關鍵詞 肺癌、絲胺酸合成路徑、抽煙

## 作者簡介



(左為陳柏宇，右為何家安)

我叫陳柏宇，今年就讀臺中一中二年 24 班數理資優班，平時對生物領域相關知識有濃厚的興趣。自高中一年級開始在中國醫藥學院附設醫院從事癌症相關的研究，並對鑽研調控癌症的相關機轉與蛋白質表現的運作機制十分熱衷。希望自己的研究對醫界有所貢獻，發揮研究精神價值，並從中找尋研究對於自己的意義。

大家好，我是何家安，目前就讀台中一中高二數理資優班，從高一我就參加很多校內外醫學跟生物相關的活動，也開始了我在肺癌方面的研究，藉由這次機會滿足我在醫學的好奇心。

## 摘要

肺癌為全球死亡率最高的癌別之一。抽菸，肺癌的主要危險因子，臨床上造成抗癌藥效不佳並導致病患的低存活率與不良預後。然而，抽菸影響肺癌的機制仍不清楚。代謝重整最近被視為是癌症的新興特點。絲胺酸合成路徑為葡萄糖代謝的分支之一，參與生物合成材料之製造，並和癌症的惡化有密切的關連性，但缺乏詳細的相關研究。本研究探討抽菸是否透過影響絲胺酸合成路徑來導致肺癌生長，並測試絲胺酸合成路徑抑制劑是否能增強化療藥物吸菸相關肺癌細胞的治療效果。我們的研究發現，抽菸和絲胺酸合成路徑在肺癌中有正相關性且與臨床上的低存活率有關，並證實抽菸調控絲胺酸合成路徑而促進肺癌生長與化療抗性，此現象可因合併給予絲胺酸合成路徑抑制劑而獲得緩解。此研究成果顯示抑制絲胺酸合成路徑可能成為治療吸菸相關肺癌的新策略。

## Abstract

Lung cancer is one of the highest mortality cancer types. Cigarette smoking, the main risk factor of lung cancer, causes the low survival rate and poor prognosis in the clinic. However, the underlying mechanisms of smoking-induced cancer progression of lung cancer still are not fully understood. The reprogramming of metabolism is deemed as the new therapeutic target for cancer. Serine synthesis pathway (SSP) is a branch of glucose metabolic pathway, and is used to synthesize biomaterial. Our research found that exposure to cigarette smoke enhanced tumor progression and chemoresistance through involving glucose metabolism and SSP pathway. The SSP-related gene expression correlated with the poor survival of lung cancer patients especially in smoker group. Co-targeting SSP pathway reduced the cancer growth and increased chemosensitivity of lung cancer. This study revealed SSP as a potential therapeutic target for lung cancer patients.

# 壹、前言

## 研究動機

吸菸是全球很重要的健康議題，自從二十世紀以來，吸菸已成為全球男性及女性肺癌主要的危險因子[1]，香菸由超過 7000 種化學物質混合而成，在這些混合物中，超過 60 種化合物被認為是肺泡上皮細胞的致癌物[2]，這些與香菸相關的致癌物可以結合並修飾 DNA 來造成 DNA 的損傷，或引發 ras 基因 G 到 T 的突變，進而導致肺部基因體不可逆的損害[3,4]。然而，透過基因突變或啟動子過度甲基化，這些致癌物也會減少 DNA 修復基因 p53 的能力且導致長期的突變[5]。在香菸暴露下的癌症發展期間，菸草煙的主要致癌成分尼古丁會促進癌症細胞周期、增生、血管增生、和轉移[6,7]。暴露於香菸環境下不只會促使癌症發展，還會降低化療或 EGFR TKIs 的抗癌效果，導致肺癌病患產生較差的預後與存活率[8,9]。雖然長久以來提出過許多香菸促進的致癌作用和增生的機制，我們至今仍不清楚如葡萄糖、胺基酸、脂質的生物合成燃料是否與抽菸有關的癌症發展有關連以提供快速生長所需的更高能量和生物材料。

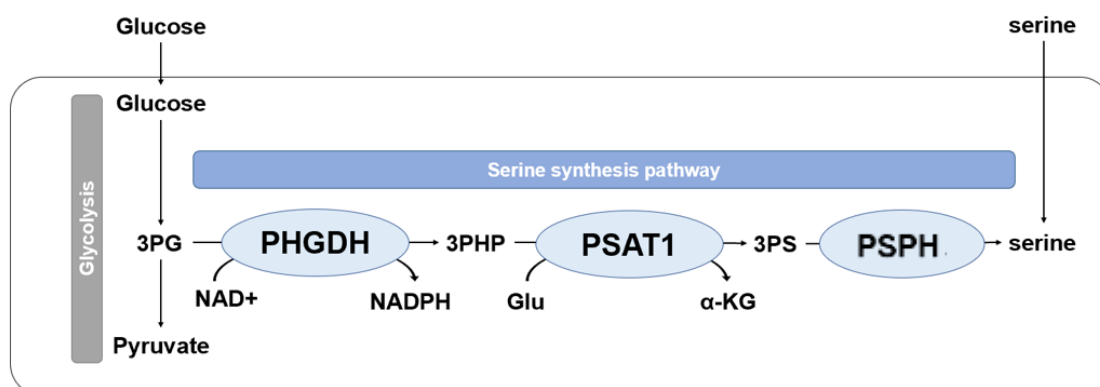
香菸會引起代謝重整來增加代謝症候群和腫瘤發展。暴露於香煙與許多疾病的發生有關，包括心血管疾病、代謝症候群、呼吸性疾​​病及癌症[10]。許多證據顯示重度吸菸者的身高體重指數 (BMI) 會增加，因為抽菸會增加其胰島素的耐受性及周圍脂肪的堆積，引發代謝症候群和第二型糖尿病的形成[11]。抽菸也導致肺發炎和引發血中各式發炎因子如腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及第六介白素 (interleukin-6) 的表現，並導致胰島素耐受性[12]。除了代謝症候群之外，吸菸也導致肺內氧化物—抗氧化物的不平衡，而引發慢性阻塞性肺疾病(COPD)。粒線體呼吸是細胞中氧化還原體內平衡其中一個主要過程，暴露在煙中會改變肺細胞內主要的代謝路徑而促進 NADPH 的產生，為造成氧化壓力的分子機制[13,14]。暴露在香菸及其致癌成分 benzo[ $\alpha$ ]pyrene 會破壞粒線體膜電位，增加 palmitate 進入粒線體的傳輸而進行  $\beta$ -oxidation，導致肺泡細胞癌化[15, 16]。此外，吸菸增加有氧糖解和粒線體的不正常功能而參與食道癌的發生[17]。然而，我們需要更多研究來了解抽菸如何改變能量代謝而參與癌化，希望藉此能發展新穎的代謝治療策略，以提高肺癌病人的存活率。

癌症發展中不正常的管理絲胺酸合成路徑，重整能量代謝而透過製造更多燃料及生長材料來加速細胞分裂跟增生，被視為一個新興的癌症特點[18]。涉及糖解和粒線體呼吸的葡萄糖代謝是細胞生長能量生成的主要來源。然而，癌細胞即使在有氧狀況下仍主要利用糖解作用[19,20]。雖然相較周圍的正常細胞下，癌細胞消耗更多的胞外的葡萄糖，但是其也攝取更多的胺基酸來當作增生、生長的氮與碳的來源[21]。為了得到更多的胺基酸以供癌症發展，胺基酸運輸者的過度表現是很重要的，其透過酵素的表現，傳遞胞外胺基酸和提升胺基酸的生物合成，如麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、精胺酸、proline 代謝路徑酵素。累積的證據顯示，麩醯胺酸和絲胺酸在腫瘤選擇的代謝路徑中扮演很重要的角色，並且在腫瘤發展中比起其他胺基酸被攝取更高的比例[22]。

絲胺酸屬於一種哺乳類的非必需胺基酸，在各種生物合成過程中扮演關鍵的角色，如其參與了 cysteine 和甘胺酸的合成、磷脂質和 sphingomyelin 的製造、進入單碳循環以參與核苷酸合成，S-adenosyl methionine (SAM) 產生提供甲基來源以及抗氧化作用 [23]。為了提高絲胺酸在體內的利用，絲胺酸可以透過胺基酸運輸者被運送到細胞內或由糖解代謝產物 3-Phosphoglyceric acid (3PG) 新合成。絲胺酸合成路徑(SSP)包含 PHGDH、PSAT1、PSPH 催化的三個主要反應酵素(圖一)。接著，胞內的絲胺酸透過絲胺酸羧甲基轉移酶(SHMT)的反應(SHMT1 在細胞質液;SHMT2 在粒線體)轉變成甘胺酸，其有助於葉酸的單碳循環提供甲基 [24]，葉酸的單碳循環會進一步合成核苷酸並透過 NADPH 的生成來降低活性氧類 reactive oxygen species (ROS)[24]。外源的絲胺酸是僅次於麩醯胺酸在細胞及癌細胞增生中消耗最快的胺基酸 [22]。已知參與 SSP 的多個酵素被增強或過度表現而促進腫瘤生成。高表現的 PHGDH 增加絲胺酸的新合成，也跟粒線體還原動態平衡、腫瘤幹細胞的維持、生長和轉移有關，其過度表現也與乳癌、黑色素瘤和肺腺癌患者的治療成果較差和生存率降低有密切相關性[25-28]。過度表現的 PSAT1 和 PSPH 也對腸胃癌的不良預後有關 [29,30]。雖然大眾都知道香菸會加速肺癌發展且使病人的情況惡化，但 SSP 是否參與其中尚不清楚。

吸菸導致肺癌已儼然成為嚴重的公共健康問題。暴露在香菸和其致癌成分下，會藉由基因變異使抑癌和致癌基因失調來增加細胞生長而導致癌症發展，並減少對抗癌藥物的敏感度。

我們實驗室先前研究的結果顯示，香菸萃取物(CSE)與其中的內含致癌成分 benzo- [α]-pyrene (B[α]P)可能藉由過度表現 SGLT1 和 GLUT3 等葡萄糖運輸蛋白而提高癌細胞對葡萄糖的利用率，加速糖解和粒線體呼吸作用產能。然而，目前尚不清楚吸菸是否透過促進葡萄糖代謝影響 SSP 作用而增加肺癌細胞中的 DNA 複製，最後導致癌細胞快速生長。在我們先前的基因集富集分析 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)的結果中，吸菸患者的肺癌組織比不抽菸患者組織有較高的細胞週期、G1/S 過渡期、DNA 複製等相關功能基因組的表現；另外，胺基酸合成的功能性基因組的表現量亦在抽煙病人組織中較高，在這些增加表現的基因中，SSP 的關鍵酵素 PSAT-1 排名第一，其蛋白表現亦因給予 CSE 或 B[α]P 而提高，肺癌病人的預後較差也與 PSAT-1 的高表現有關。因此，我們的研究目標是探究吸菸是否藉由重整 SSP 路徑而影響肺癌細胞的生長及對抗癌藥物的敏感性。本研究不僅可了解抽菸如何調控代謝來造成肺癌的惡化，並或許有助於發展新穎的 PSAT-1 抑制劑來提高肺癌病患的治療效果。



圖一. 絲胺酸合成路徑(Serine Synthesis Pathway; SSP)

## 研究目的

腫瘤代謝重整 (Tumor metabolic reprogramming) 被視為癌症發展過程中的重要特徵之一，是癌細胞對營養素的需求和代謝的調節與改變，提供癌細胞快速生長所需的生物材料與能量，並平衡細胞內的氧化還原狀態。已知葡萄糖及胺基酸(常見麩醯胺酸和絲胺酸)代謝是主要供應癌細胞增生所需的材料。抽煙除了誘導肺癌生成外，也降低肺癌細胞對於抗癌藥物的敏感性，進而增加病患的死亡率。先前研究結果發現，香煙可能藉由過度表現葡萄糖轉運蛋白 SGLT1 及 GLUT3 而提高癌細胞對葡萄糖的利用，加速癌細胞生長。另外，我們的初步結果發現，肺癌細胞在香煙的刺激下可能透過活化糖解作用所衍生絲氨酸合成路徑，而增加細胞週期的 S 期。然而，目前尚未釐清過度活化絲氨酸合成路徑是否扮演重要角色於抽煙增加癌細胞中的 DNA 複製，最終導致肺癌細胞快速生長。因此，我們的**研究目標是探究吸菸是否藉由重整 SSP 路徑而加速肺癌細胞的生長甚至減少抗癌藥物的敏感性**。在本研究中，我們將著重探討：

- 一、探討吸菸是否提高 SSP 路徑活性而增加 DNA 複製與細胞增生。
- 二、測試抑制 SSP 路徑是否增加肺癌細胞對化療的敏感性。

## 貳、研究方法或過程

### 研究設備及器材

用途	儀器設備
細胞培養	顯微鏡
	細胞培養箱(incubator)
	無菌細胞操作台(Laminar flow)
	離心機
細胞存活測試	ELISA reader
	readerIncucyte
	流式細胞儀(Flow cytometry)
蛋白表現量分析	各式抗體及試劑
	影像擷取系統超音波震盪儀(sonicator)
	Bio-Rad 西方點墨法系統
	數位光電感應器(CCD)影像擷取系統
乾浴槽	
蛋白位置分佈觀察	Confocal 顯微鏡
生長觀察	Incucyte assay
	MTT assay

表一. 研究器材與設備列表

## 研究過程或方法及進行步驟

一、探討吸菸是否提高 SSP 路徑活性而增加 DNA 複製與細胞增生。

1-1 分析暴露於 CSE 及 B[α]P 肺癌細胞的生長速率

- 以 MTT assay 及細胞成株試驗觀察癌細胞生長
- 以流式細胞儀觀察細胞週期

1-2 分析 CSE 在肺癌細胞中參與 SSP 代謝酵素表現

- 利用 qRT-PCR 及 western blotting 觀察 PHGDH、PSAT1 和 PSPH 的 mRNA、蛋白質表現

1-3 分析 SSP 代謝酵素在香煙誘導肺癌發展模式的貢獻度

- 利用 Leading Edge Analysis 分析 PHGDH、PSAT1 及 PSPH 的貢獻程度

1-4 分析 SSP 代謝酵素的表現量對於肺癌病人存活率之影響

- 利用 Kaplan-Meier Plotter 分析三個重要酵素的表現量是否影響有無抽菸病史的肺癌病人存活率

1-5 觀察抑制 PSAT1 表現對香煙處理肺癌細胞的毒殺效果

- 以 AOA 抑制 PSAT1 活性及 shRNA 抑制 PSAT1 表現再利用 MTT assay/細胞成株試驗觀察肺癌細胞的生長



## 二、測試抑制 SSP 路徑是否增加肺癌細胞對化療的敏感性

### 2-1 單獨觀察化療藥物對香煙處理肺癌細胞的毒殺效果

- 利用 MTT assay/細胞成株試驗觀察化療藥物(methotrexate 或 gemcitabine)單獨對肺癌細胞毒殺效果



### 2-2 抑制 PSAT1 表現合併化療藥物觀察是否對香煙處理肺癌細胞

- 利用 MTT assay/細胞成株試驗觀察抑制 PSAT1 合併化療藥物對於香煙處理肺癌細胞加成毒殺的影響



### 2-3 觀察抑制 PSAT1 合併化療藥物對於細胞凋亡的影響

- 利用 western blotting 觀察細胞凋亡標記蛋白(如 PARP 及 caspase-3 等)的變化於合併抑制 PSAT1 表現與處理化療藥物的肺癌細胞

## 研究方法及步驟

### (一)、細胞培養

從 American Type Culture Collection (ATCC) 購買 A549 和 H292 肺癌細胞株。為了建立暴露於抽煙模式的肺癌細胞，我們以濃度 1% 的香菸萃取物培養液長時間培養肺癌細胞株至少三個月。另培養一組處理 DMSO 為控制組。H292 肺癌細胞株養植在含有 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 10 mM sodium pyruvate, 10% FBS (fetal bovine serum), 100 units/ml penicillin 及 100 µg/ml streptomycin 的 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培養液。另外，A549 肺癌細胞株培養於含有 10% FBS、100 unit/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 Nutrient Mixture (DME/F12) 之培養液。所有的細胞都放置在 5% CO<sub>2</sub>、37° C 之細胞箱培養。

### (二)、製備香菸萃取培養液(Cigarette smoke extract, CSE)

利用 25 根香菸的燃燒煙霧用幫浦持續融進 250 ml 的培養液。另外，將香菸萃取物培養液的 pH 值調整至 pH7.4，並以孔徑 0.22 µm 的過濾器來移除香菸萃取培養液內的大顆粒。我們將此香煙萃取培養液視為 100% 原液並存放於 -20°C 冰箱備用。

### (三)、基因富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)

我們從 PubMed 的 GEO dataset 下載已發表的肺癌病人組織基因晶片 (microarray) 資料 (GSE31210)，並將這些病人分組為有抽煙病史與無抽煙病史，利用 GSEA 軟體 (下載於 <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) 分析資料裡基因富集程度。

#### (四)、細胞存活率測試(MTT assay)

將  $8 \times 10^3$  顆的控制組與 CSE 及 B[ $\alpha$ ]P 處理的肺癌細胞養植於 96 孔盤在細胞培養箱放置隔夜。隔天，去除培養液，加入實驗設計之藥品培養 3~5 天。之後，吸除含有藥物的培養液並加入 MTT 試劑反應 3 小時。去除 MTT 試劑，加入 100  $\mu$ l DMSO 溶解活細胞與 MTT 試劑反應而形成的紫色結晶，再利用 ELISA reader 測定吸光值 570 nm 去評估細胞存活率。

#### (五)、細胞成株試驗(colony formation assay)

將 1000 顆以 CSE 及 B[ $\alpha$ ]P 長期處理的肺癌細胞種在 6 孔盤一段時間至形成細胞群落(colony)。在用 1% 結晶紫溶於 30% 酒精溶液固定細胞並染色 30 分鐘後，用清水將背景的結晶紫染色清洗乾淨，置乾後以冰醋酸溶解結晶體，並已 ELISA reader 判讀實驗組與控制組吸光值的差異。

#### (六)、細胞週期分析

收集經藥物處理後的肺癌細胞並以 1000 rpm 離心五分鐘。室溫下，移除上清液，再加入 75% 的冰乙醇充分均勻混合細胞並存放於  $-20^{\circ}$  C 冰箱一天。將以冰乙醇固定的細胞離心並去除上清液，加入 PI staining buffer (含 1% Triton X-100, 0.1 mg/mL PureLink<sup>TM</sup> RNase A, and 20  $\mu$ g/mL propidium iodide, 混合在 1X PBS) 均勻混合細胞，室溫下避光反應 30 分鐘，利用流式細胞儀分析細胞週期。

### (七)、定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析 (qRT-PCR assay)

mRNA 從經 CSE 處理過的肺癌細胞加入 TRIzol 試劑萃取出。為了要合成第一股 cDNA，將 500ng 的 mRNA 樣品均勻混合含有 dNTP 及 Oligo-dT 的 DEPC 水。把這些混合物加熱至 65°C 五分鐘，再快速冷卻至 4°C 五分鐘。再加入含有 DTT 及 M-MLV RT Enzyme 的 5X First-Strand Buffer，再以分別 37°C 反應 2 分鐘, 25°C 反應 10 分鐘, 37°C 反應 50 分鐘，最後以 70°C 反應 15 分鐘形成完整的 cDNA 產物。接著，以 SYBR Green Master Mix 標記 cDNA 產物並利用聚合酶連鎖反應偵測特定基因的表現。利用 18s rRNA 當作參考基因。

### (八)、西方墨點法分析 (Western blotting analysis)

將細胞裂解液所取得的上清液做蛋白質定量分析，接著取質量 10~60 $\mu$ g 之蛋白質進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)。隨後利用轉印槽，以固定電壓 100 伏特轉印 3 小時，使凝膠上的蛋白質轉印到 PVDF 膜上。接著使用含有 5% 脫脂奶粉之 TBS-T(Tris-buffered saline/Tween-20) 緩衝液覆蓋 PVDF 膜。目的是將 membrane 上非專一性抗體結合覆蓋住，此 blocking 步驟於室溫下進行 1 小時。Blocking 結束後，倒掉奶粉溶液，以 TBS-T 沖洗膜三次，每次 10 分鐘。之後加入以 5% BSA 稀釋一級抗體(Primary antibodies)，運用免疫沉澱法之原理，於 4°C 冷房中反應 8 小時以上或過夜，使一級抗體結合在預測之蛋白質上。反應完畢，回收一級抗體溶液，以 TBS-T 清洗膜三次，每次 10 分鐘。接著加入 Horseradish peroxidase(HRP) 所接合的二級抗體奶粉溶液，於室溫下反應 1 小時，隨後亦以 TBS-T 沖洗膜三次，每次 10 分鐘，洗淨之 membrane 最後加入化學發光底物(ECL)作用 1 分鐘，利用影像系統偵測目標蛋白的表現。

### 參、研究結果與討論

#### 一、探討吸菸是否提高絲胺酸合成路徑活性而增加 DNA 複製與細胞增生

為了瞭解 SSP 在有抽菸的臨床肺癌病患中所扮演的角色，GSEA 分析顯示代謝路徑在抽菸病患被活化最多（圖二 A）；其中，在胺基酸代謝，PSAT1(SSP 第二步驟酵素)增加幅度最大（圖二 B）。絲胺酸會進入單碳循環合成核苷酸，圖三表示抽菸患者的細胞週期及 DNA 複製相關酵素表現也增加。而在比較病患存活率與 SSP 酵素的表現量高低的關聯時時，有抽菸的病患中，高表現的 PHGDH (SSP 第一步驟酵素)和 PSAT1 影響患者的低存活率，然而此關聯性在不抽菸的病患中不明顯（圖四）。其顯示 SSP 和抽菸肺癌病患的相關性。

再者，用細胞模式探討肺癌細胞中抽菸與 SSP 的關聯性。質譜儀顯示在 A549 CSE 細胞中，SSP 反應物 3-PG 減少，而其產物之一 a-KG 增加（圖五）。SSP 為糖解作用的分支，在海馬生物能量測定分析進一步分析，A549 CSE 細胞的糖解作用能力較強（圖六）。A549 CSE 細胞細胞週期中的 S 期也有增加（圖七）。由上推論抽菸於肺癌中促進 SSP 的表現。

為進一步了解 SSP 在暴露於香菸的肺癌細胞的角色，以 MTT 觀察細胞毒殺效果。絲胺酸可從外界被吸收，因此降低培養液中的絲胺酸，使細胞為了獲得絲胺酸必須更依賴 SSP，由此可以間接測試 SSP 的活性。A549 CSE 細胞在低絲胺酸濃度下細胞存活率較高，且在低絲胺酸濃度情況下生長較快（圖八）。觀察抑制 SSP 對於細胞的影響，合併 AOA(PSAT1 抑制劑)可以抑制低濃度絲胺酸條件下抽煙細胞的存活。

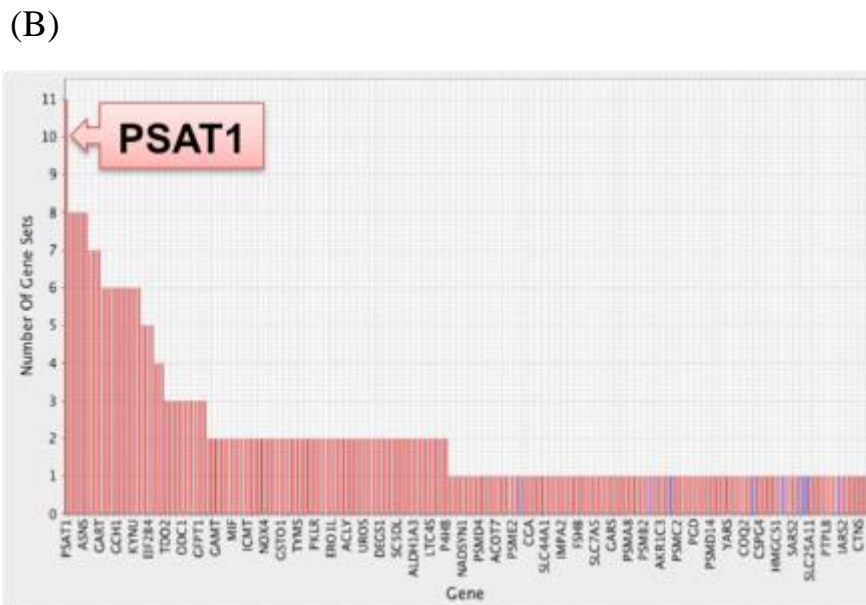
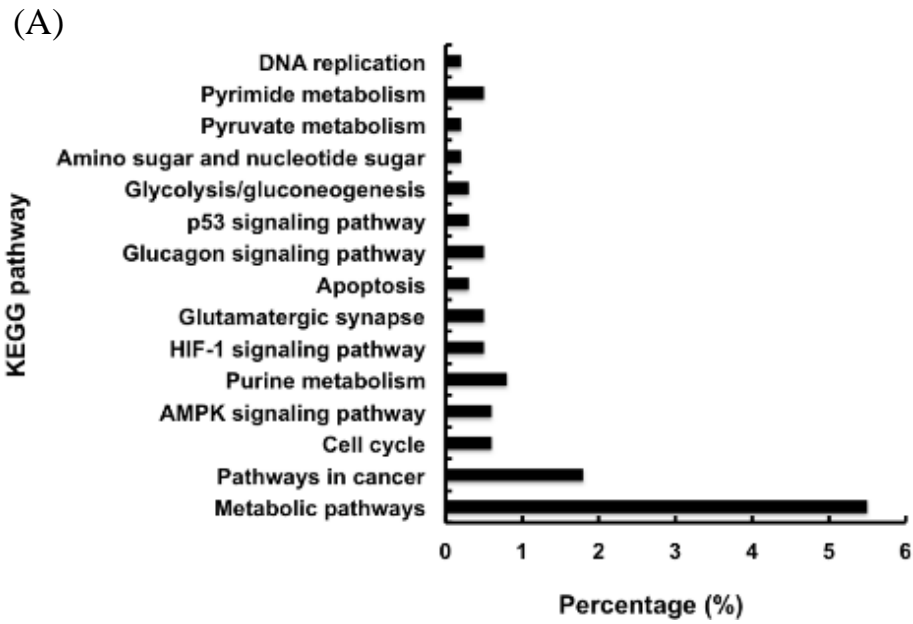
## (二) 測試抑制 SSP 路徑是否增加肺癌細胞對化療的敏感性

Gemcitabine 是一種用來標的核苷酸的化療藥物，用來治療肺癌。為了瞭解抽煙與對 Gemcitabine 抗藥性的關係，我們藉由 MTT assay (圖十 A) 分析 Gemcitabine 對 A549 肺癌細胞的毒殺效果，可以發現 CSE 細胞對 Gemcitabine 有較低的敏感性。

Methotrexate 是一種用來標的葉酸的化療藥物，而葉酸可由絲胺酸製造。為了瞭解抽煙與對 Methotrexate 抗藥性的關係，我們藉由細胞成株試驗分析 Methotrexate 對 A549 肺癌細胞的毒殺效果 (圖十一 B)，可以發現 CSE 細胞對 Methotrexate 有較低的敏感性，這可能是抽菸細胞透過重整 SSP 代謝路徑產生的結果。

在我們前面分析增加表現的基因中，SSP 的關鍵酵素 PSAT1 排名第一，其蛋白表現亦因給予 CSE 而提高，肺癌病人的預後較差也與 PSAT1 的高表現有關，因此從前兩點找到抽煙與抗藥性的關係後，我們嘗試利用 shRNA Virus Infection knockdown PSAT1 的基因，並比較不同藥物對他們的毒殺效果。由 Western Blotting 的圖 (圖十二) 我們可以看出 knockdown 是有效的，也因此可以做表現量的比較。而接下來比對 A549 Parental 的 MTT assay (圖十三)，然而因為 Parental 本身對化療藥物就比較敏感，knockdown 後也看不出明顯的不同。而同樣地在細胞成株試驗中，比對 knockdown 前後也看不出差異 (圖十四)。

為了進一步探討抽菸如何影響肺癌細胞對化療藥物的敏感性，我們也嘗試了 CSE 細胞的 knockdown，並比較其 MTT assay 和細胞成株試驗 (圖十五) (圖十六)，CSE 本身對化療藥物不敏感，但我們卻無法看出明顯不同，其可能原因有二，第一我們還沒確認 knockdown 效率好不好，若效率不好，便看不出敏感性的不同。第二，若 knockdown 效率好，便意味著 CSE 可能不是依賴 SSP 路徑對化療藥物的敏感性，而這也是我們日後將確認的問題。

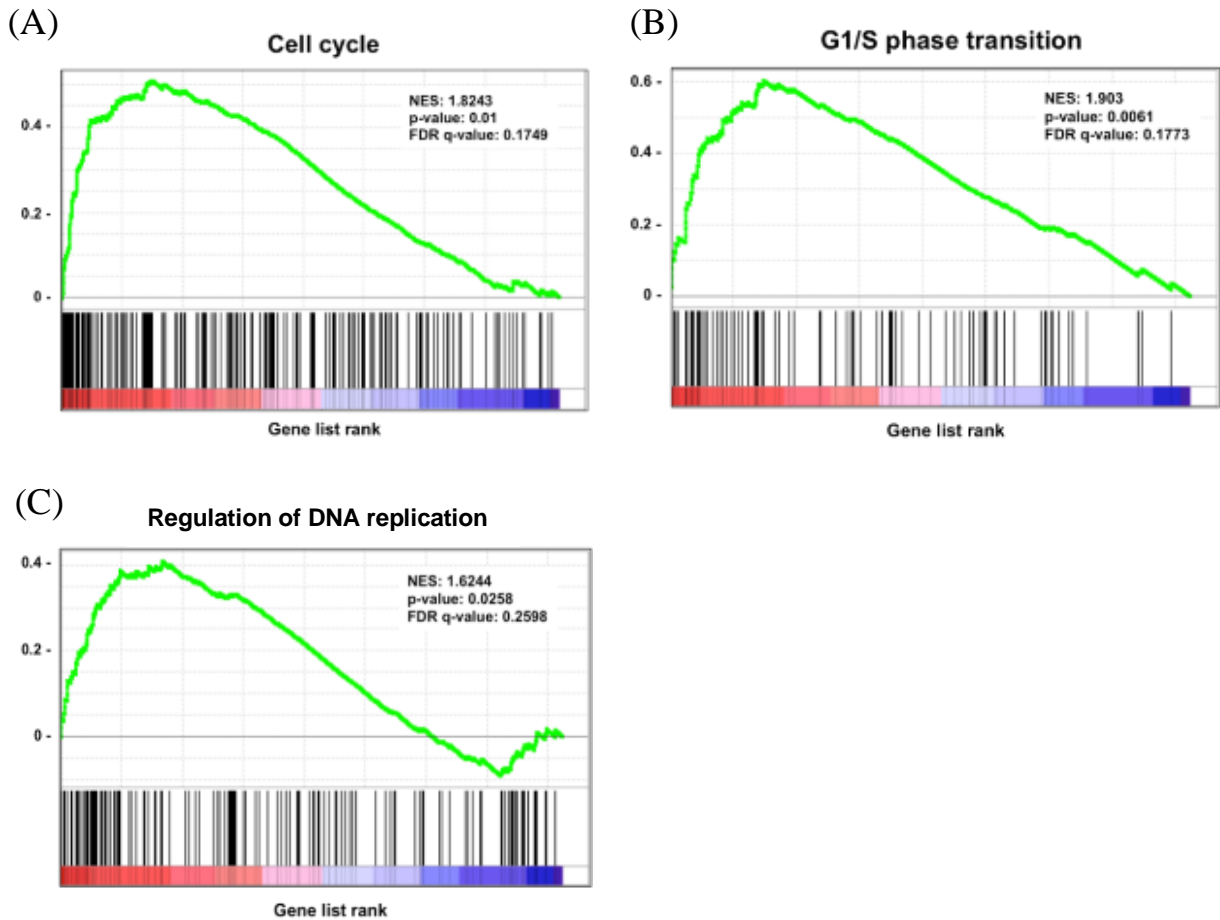


圖二. 臨床數據顯示抽菸患者的能量代謝路徑及其中的酵素-PSAT1 會大量表現。

分析 GSEA database 中，抽菸肺癌患者的酵素表現。

(A) 抽菸肺癌患者被活化的路徑分析。

(B) 抽菸肺癌患者的胺基酸代謝酵素表現分析。



圖三. 臨床上抽菸肺癌患者的細胞週期及 DNA 複製相關酵素表現增加。

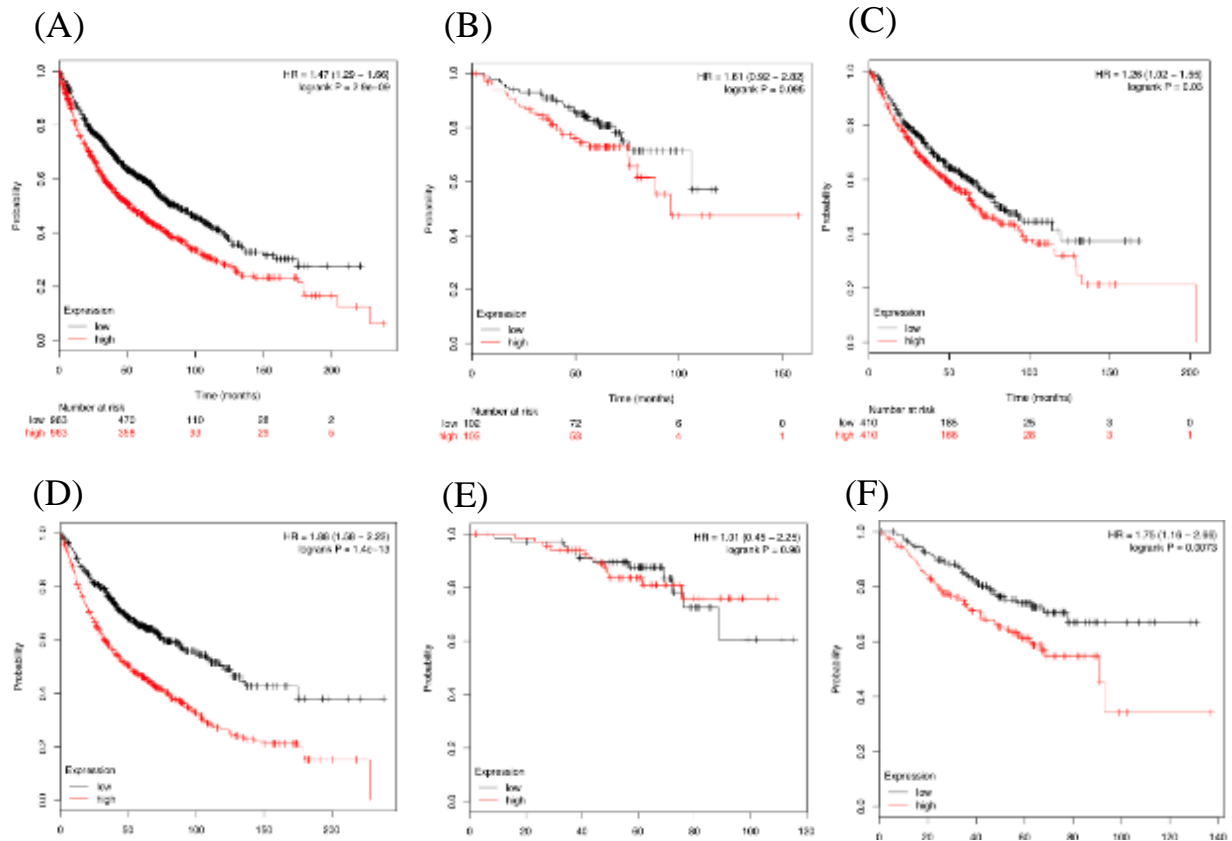
分析 GSEA database 中抽菸肺癌患者細胞週期及 DNA 複製相關酵素表現。

(A) 抽菸肺癌患者的細胞週期酵素分析。

(B) 抽菸肺癌患者的 G1/S phase transition 酵素分析。

(C) 抽菸肺癌患者調控 DNA 複製的酵素分析。





圖四. 在抽煙的患者中，發現有高表現 PHGDH 及 PSAT1，病人存活率比較差。

分析 KM-plotter database 肺癌患者的 mRNA 表現及其存活率。

(A) 全部肺癌患者的 PHGDH 表現高低及其存活率之分析。

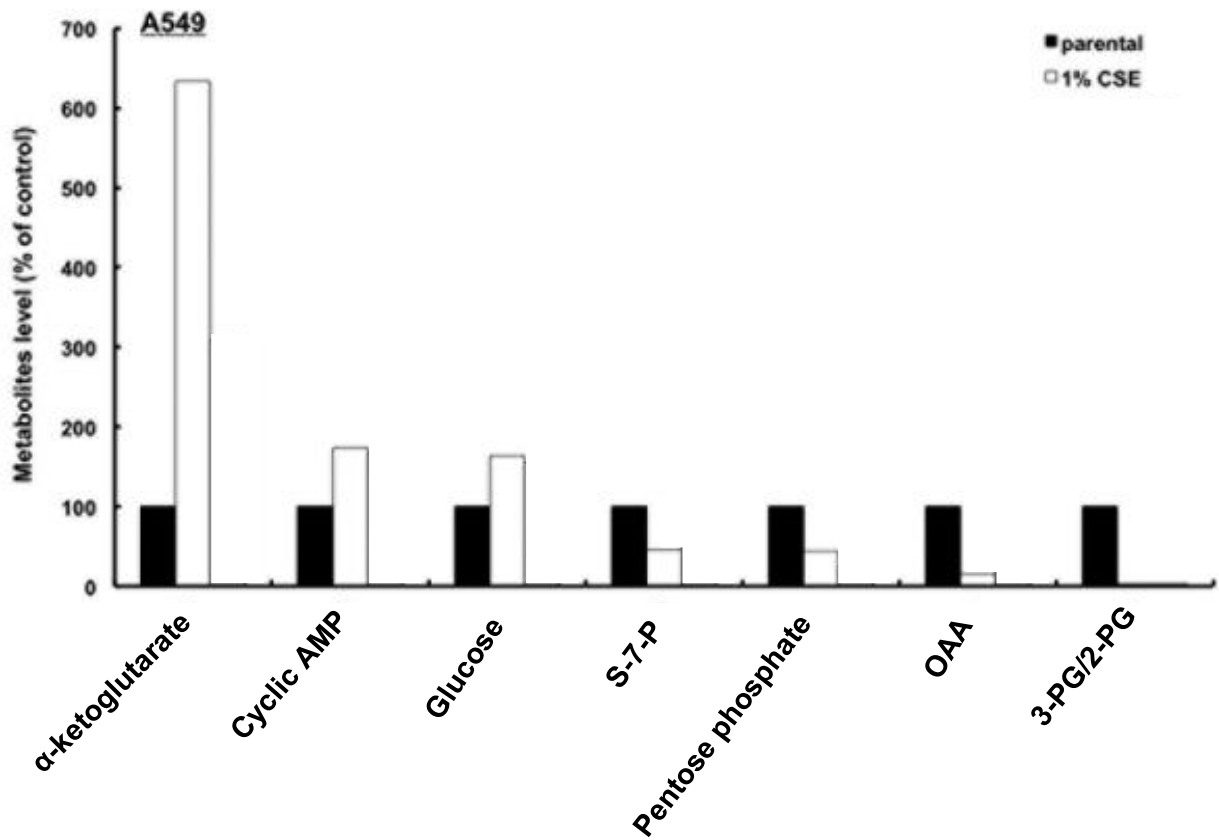
(B) 不抽菸肺癌患者的 PHGDH 表現高低及其存活率之分析。

(C) 抽菸肺癌患者的 PHGDH 表現高低及其存活率之分析。

(D) 全部肺癌患者的 PSAT1 表現高低及其存活率之分析。

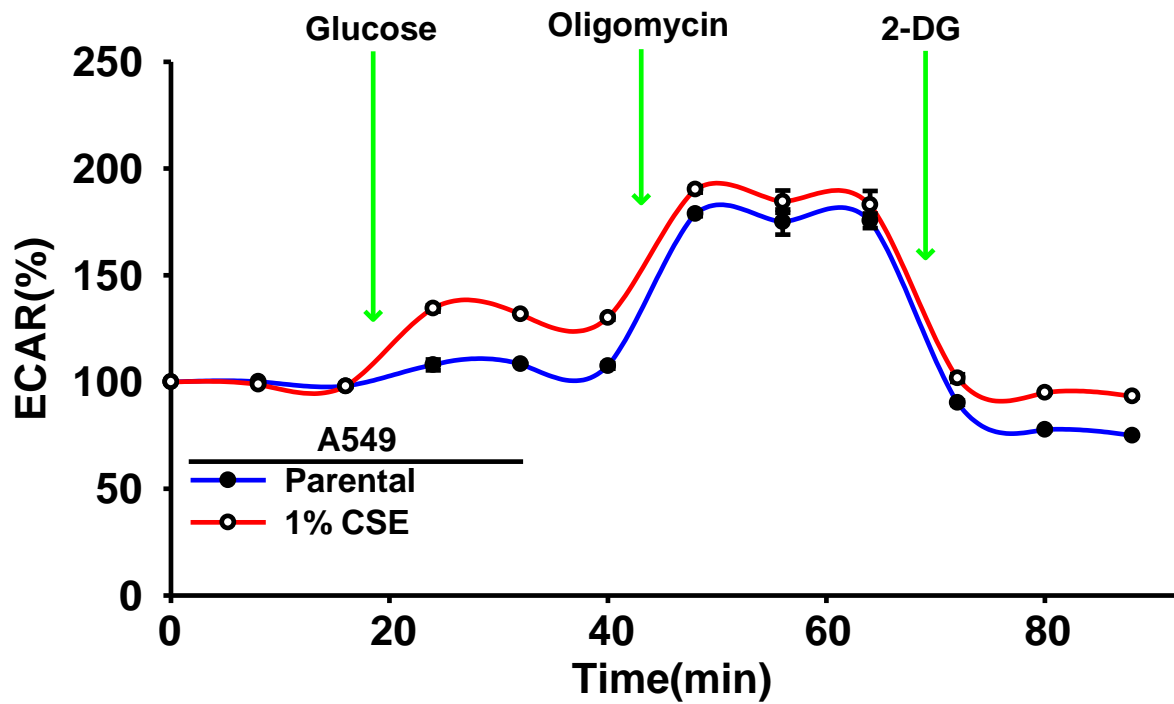
(E) 不抽菸肺癌患者的 PSAT1 表現高低及其存活率之分析。

(F) 抽菸肺癌患者的 PHGDH 表現高低及其存活率之分析。



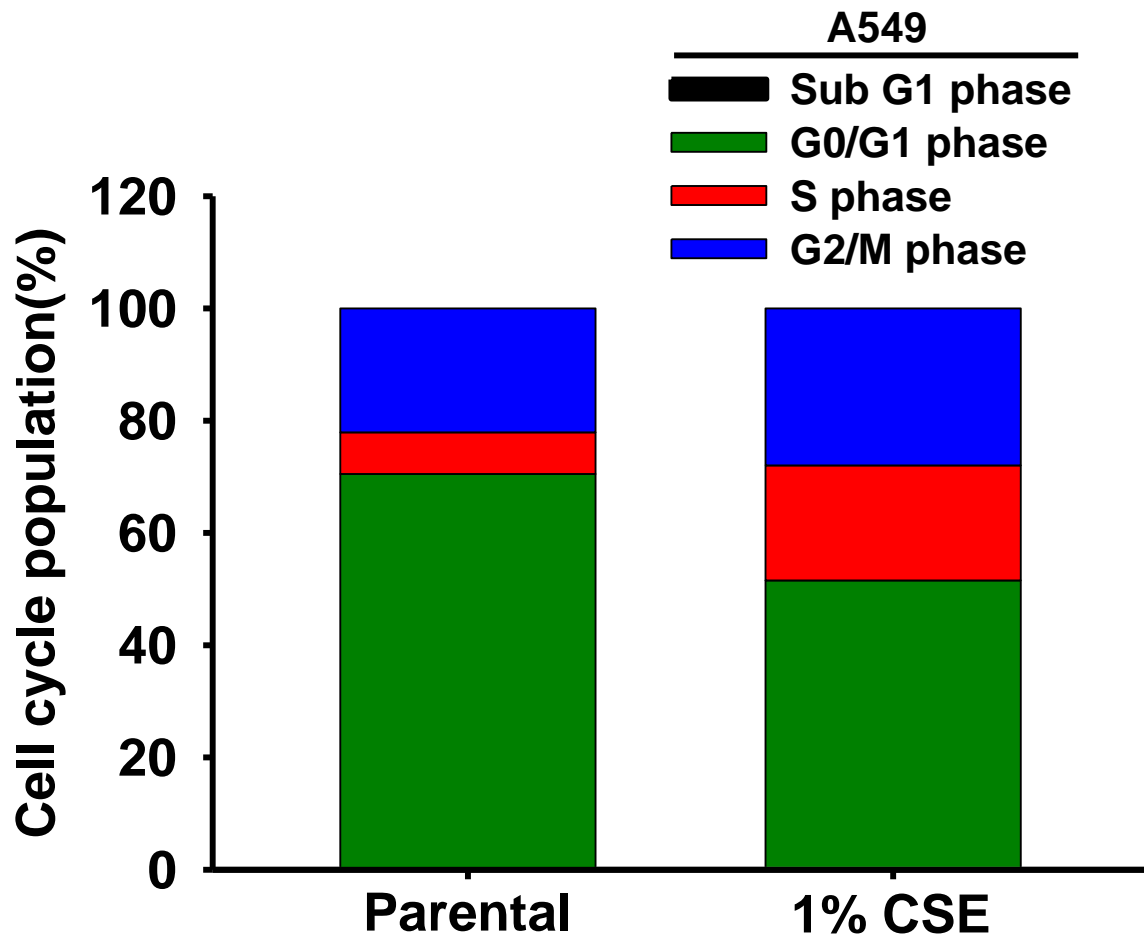
圖五. 在抽菸的細胞 SSP 的反應物 (3-PG) 減少和產物 ( $\alpha$ -KG) 增加，間接證明 SSP 的促進。

以質譜儀分析 A549 肺癌細胞中葡萄糖代謝相關物質的含量。



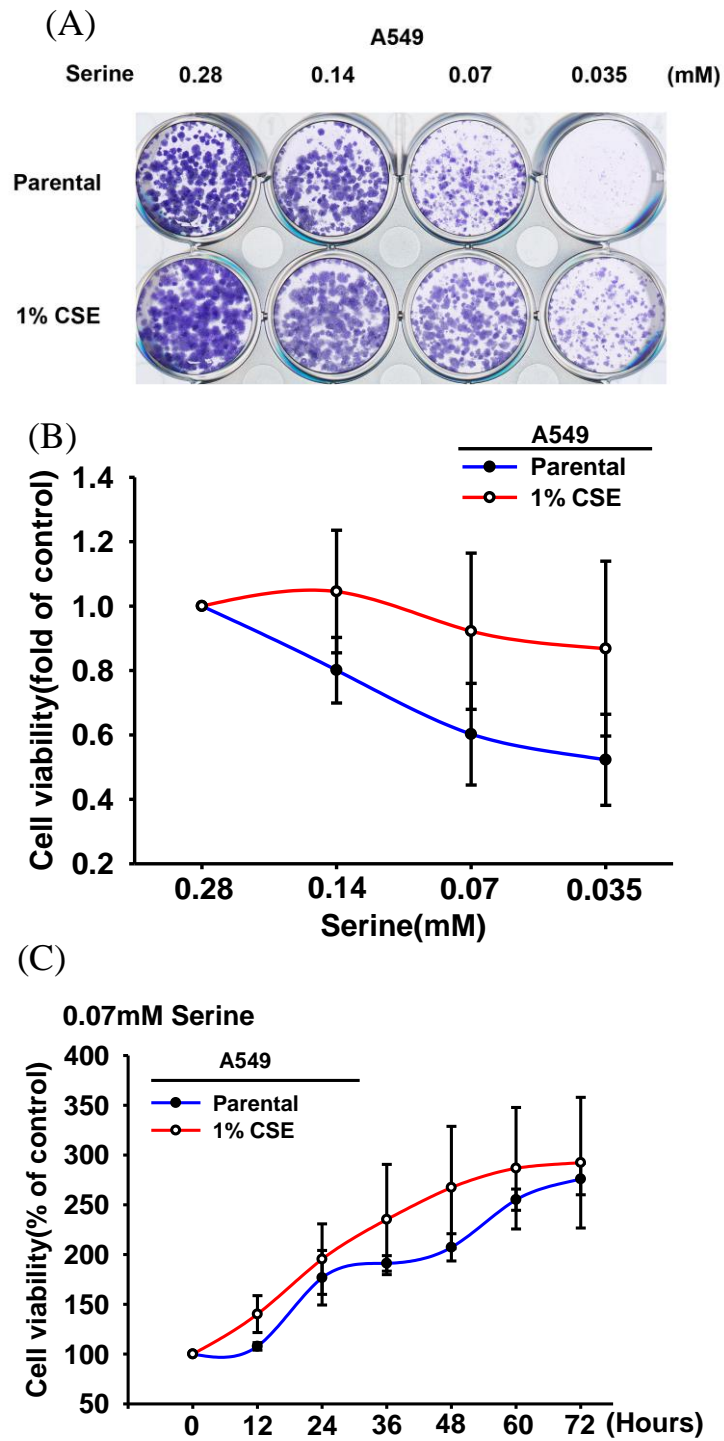
圖六. 糖解作用在抽煙的細胞中表現比較高。

以海馬生物能量測定分析檢測 A549 肺癌細胞的糖解作用。



圖七. 抽菸會增加肺癌細胞細胞週期中的的 S 期。

以流式細胞儀分析 A549 肺癌細胞的細胞週期。

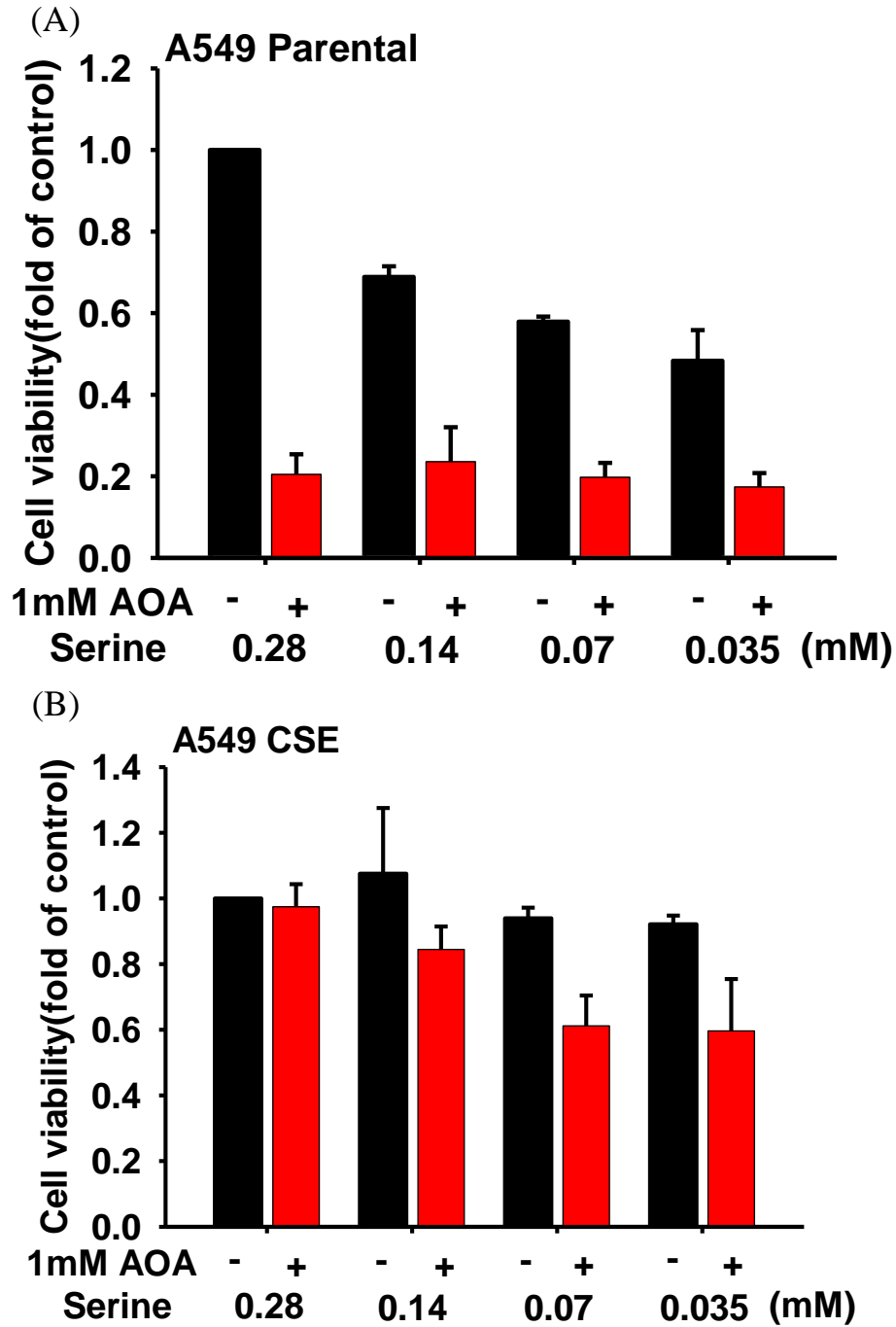


圖八. 抽煙的細胞株對低濃度的絲胺酸有較高的耐受度。

(A)利用細胞成株試驗分析 A549 肺癌細胞於不同絲胺酸濃度下的生長。

(B)分析 A549 肺癌細胞於不同絲胺酸濃度下的生長。

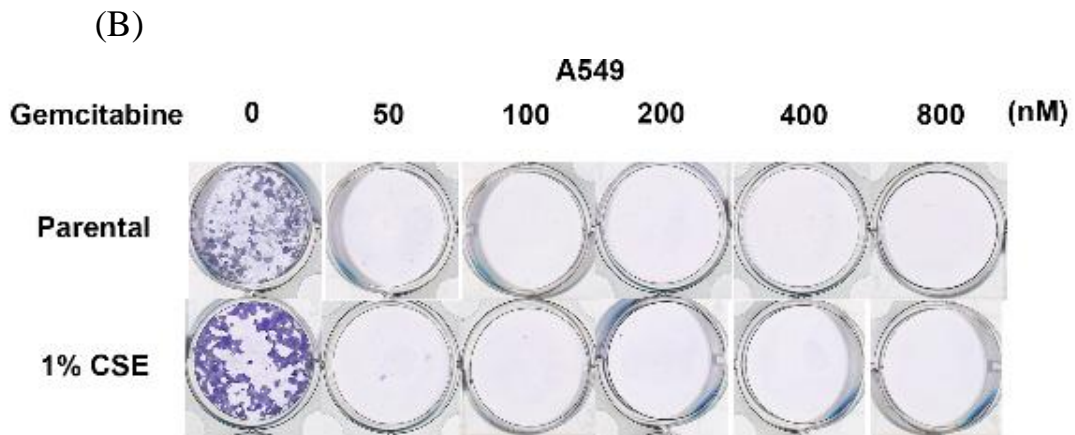
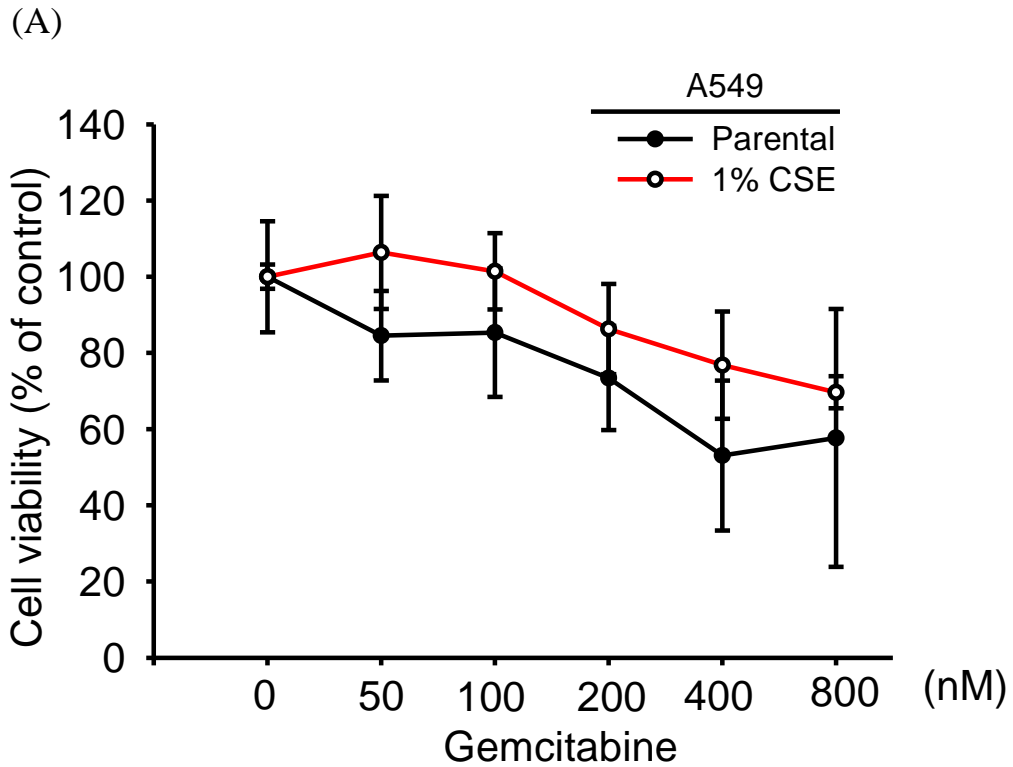
(C)分析低絲胺酸濃度下 A549 肺癌細胞的生長曲線。



圖九. 合併 AOA 可以抑制低濃度絲胺酸條件下抽煙細胞的存活。

(A) 分析 A549 Parental 肺癌細胞在不同濃度絲胺酸下以 AOA 抑制 PSAT1 的存活。

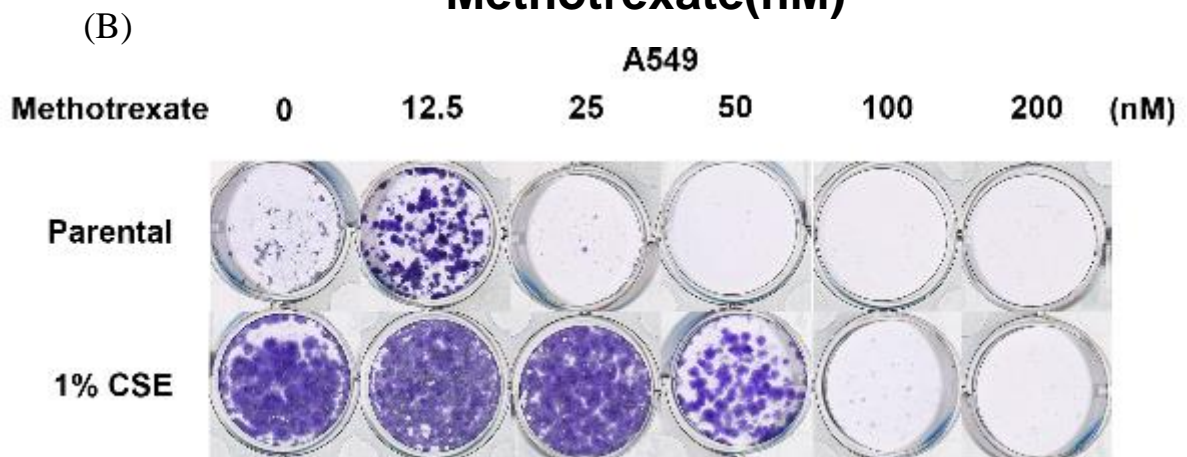
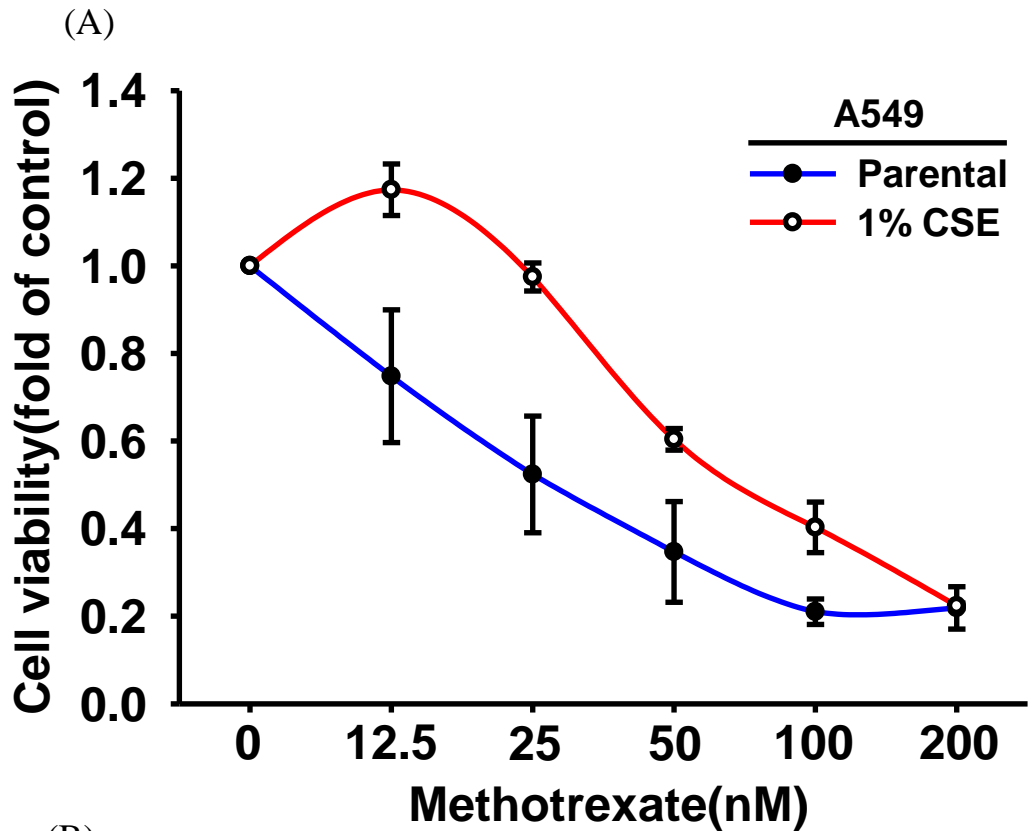
(B) 分析 A549 CSE 肺癌細胞在不同濃度絲胺酸下以 AOA 抑制 PSAT1 的存活。



圖十. A549 細胞在抽菸的情況下對化療藥物 gemcitabine 敏感度較差。

(A) 以 MTT 方式分析 A549 肺癌細胞在不同 Gemcitabine 濃度下的存活率。

(B) 以 Colony formation 方式分析 A549 肺癌細胞在不同 Gemcitabine 濃度下的存活率。



圖十一. A549 細胞在抽菸的情況下對化療藥物 Methotrexate 敏感度較差

(A) 以 MTT 方式分析 A549 肺癌細胞在不同 Methotrexate 濃度下的存活率。

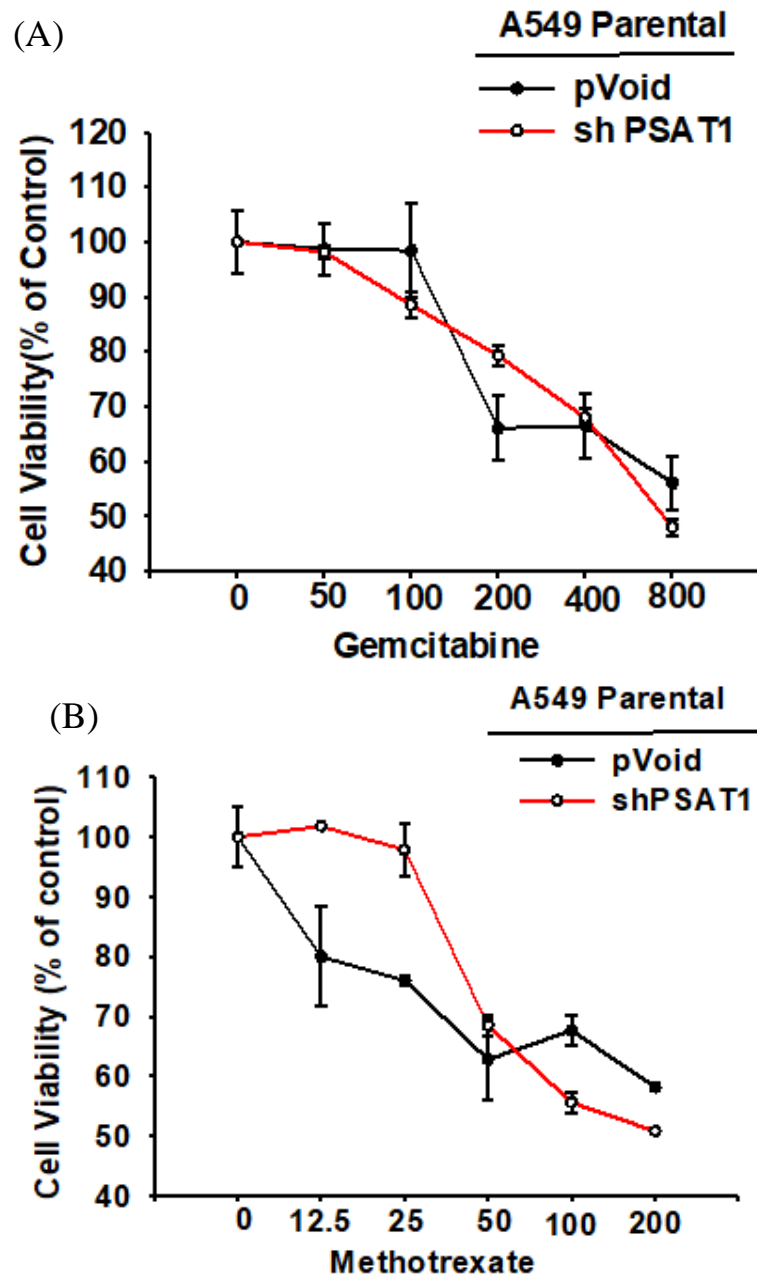
(B) 以 Colony formation 方式分析 A549 肺癌細胞在不同 Methotrexate 濃度下的存活率。





圖十二. 確定 sh PSAT1 的 knockdown 效果。

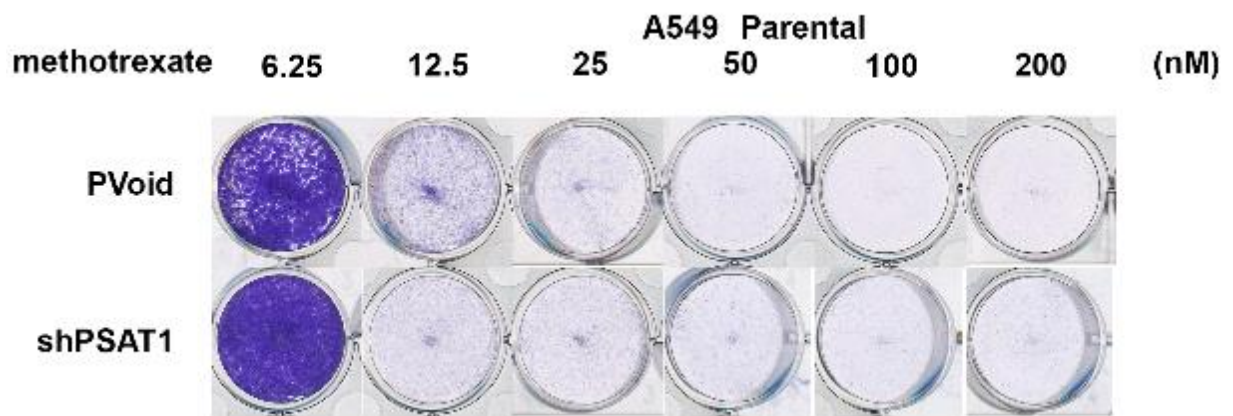
以西方墨點法驗證 sh PSAT1 利用病毒感染的方式的確可以成功抑制 PSAT1 的蛋白表現。



圖十三. knockdown PAST1 後在合併化療藥物並不影響 parental 的細胞存活

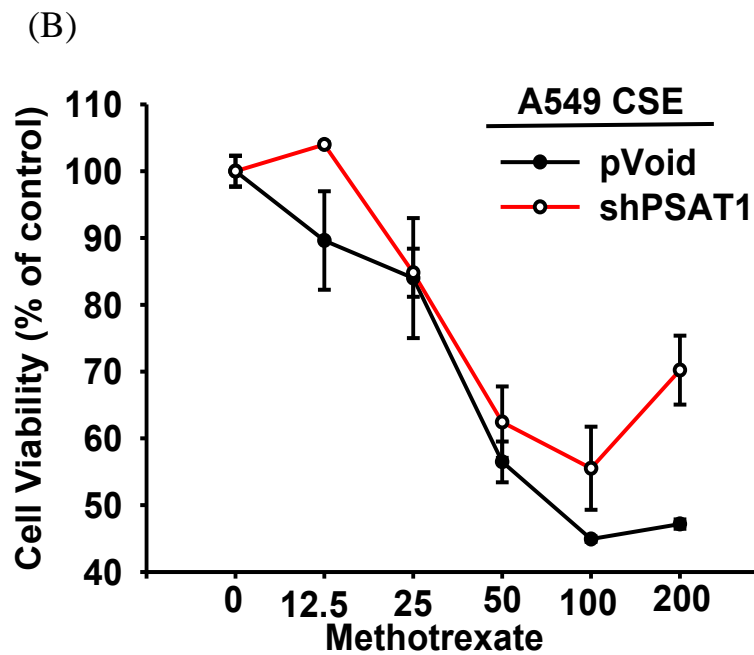
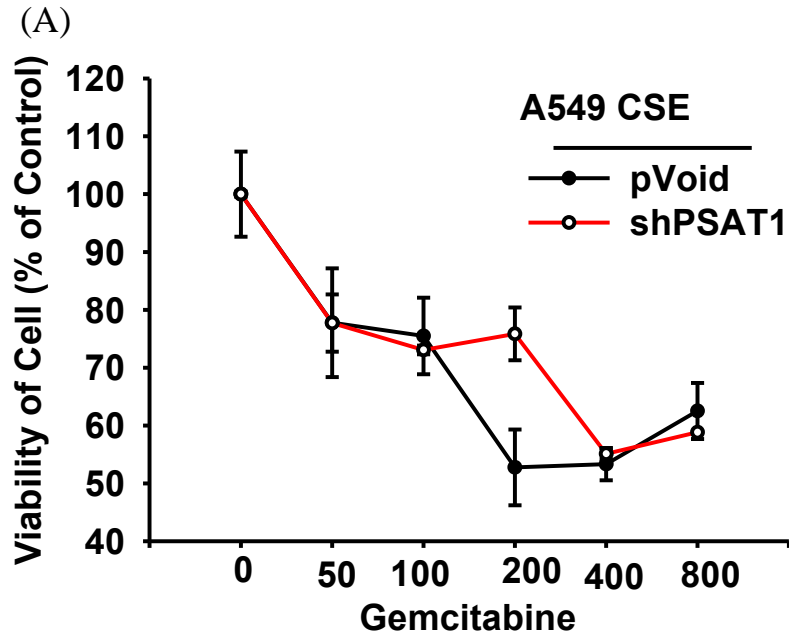
(A) 分析 A549 Parental 肺癌細胞在 knockdown PSAT1 前後給予不同 Gemcitabine 濃度下的存活率。

(B) 分析 A549 Parental 肺癌細胞在 knockdown PSAT1 前後給予不同 Methotrexate 濃度下的存活率。



圖十四. knockdown PAST1 後在合併化療藥物並不影響 parental 的細胞成株生長。

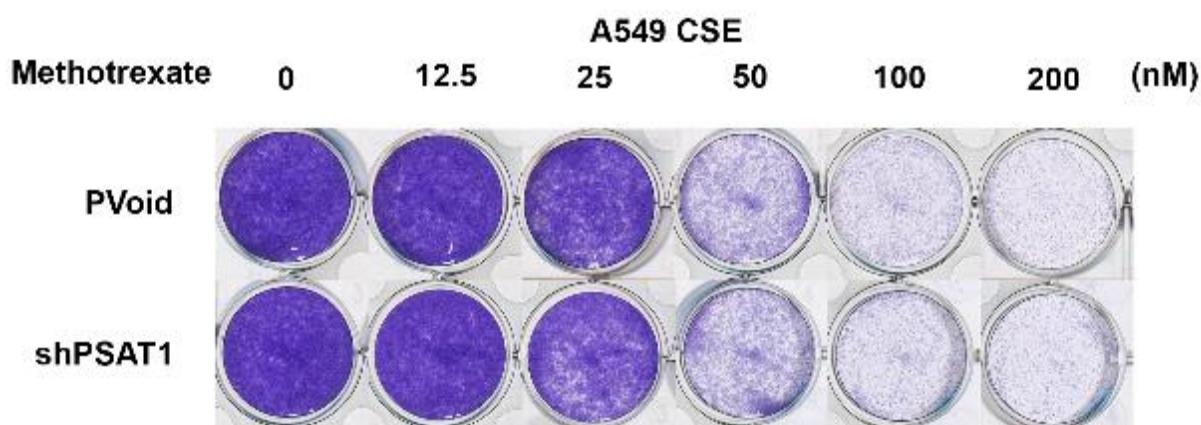
以細胞成株試驗分析 Methotrexate 對 knockdown 前後的 A549 Parental 肺癌細胞生長的影響。



圖十五. knockdown PAST1 後在合併化療藥物並不影響 CSE 的細胞存活

(A) 分析 A549 CSE 肺癌細胞在 knockdown PSAT1 前後給予不同 Gemcitabine 濃度下的存活率。

(B) 分析 A549 CSE 肺癌細胞在 knockdown PSAT1 前後給予不同 Methotrexate 濃度下的存活率。



圖十六. 比較 A549 CSE knockdown 前後的細胞成株試驗。

以細胞成株試驗分析 Methotrexate 對 knockdown 前後的 A549 CSE 肺癌細胞生長的影响。

## 肆、結論與應用

### 結論

- (一) 吸菸提高絲胺酸合成路徑活性而增加 DNA 複製與細胞增生。
  1. 絲胺酸合成路徑在抽菸的肺癌患者被促進，且高表現的絲胺酸合成酵素造成患者的低存活率。
  2. 吸菸促進肺癌的 DNA 複製及糖解作用，其與絲胺酸有高度的關聯。
  3. 絲胺酸合成路徑的抑制會對肺癌細胞有負面影響。
- (二) 化療藥物合併抑制絲胺酸合成路徑未來可能成為治療吸菸相關肺癌的新策略。
  1. A549 細胞在有抽菸對情況下會有較差的敏感性，不管是 gemcitabine 還是 Methotrexate，而我們推論有可能是因為 SSP 路徑。
  2. 日後補足的方向：利用 shRNA virus infection knockdown，我們將找出其中的路徑及其關鍵酵素，比對 CSE 和 Parental 的細胞。

3.未來若能結合相關酵素的抑制劑及化療藥物，可能可以得到加倍的效果，幫助臨床上的肺癌治療。

## 應用

本研究以肺癌為主題，癌症目前已躍居國人十大死亡原因之首，而且絕大多數病患在被診斷為肺癌時，僅有 1/4 病患為早期，因此肺癌的治療為今人需面對的重要課題。

本研究之創見性在於，以基因層面切入肺癌相關代謝機制的變化，近年來，SSP 代謝在癌症發展上有其重要性，已知參與 SSP 的多個酵素被增強或過度表現而促進腫瘤生成。增加絲胺酸的新合成，也跟粒線體還原動態平衡、腫瘤幹細胞的維持、生長和轉移有關，其過度表現也與肺腺癌患者的治療成果較差和生存率降低有密切相關性，因此，找出 SSP 中關鍵基因以進行抑制，對未來癌症研究也有很好的發展性。我們的研究將首次證明抽煙是否影響肺癌 SSP 路徑的活性，探討其是否會增加 DNA 複製與細胞增生，甚至影響對抗癌藥物的敏感，藉此找出新穎的治療標的。

在於未來應用方面，可朝向下列三個方向進行：

- 一、 找出潛在治療標的，發展有效且較不具副作用的抗癌藥物。
- 二、 發展 SSP 相關的抑制劑，合併化療藥物，增強其治療效果。
- 三、 利用 SSP 相關基因表現，作為預測病人存活率的生物指標。

## 伍、參考資料 (文獻) 及其他

1. Ezzati M HS, Lopez AD, Thun MJ.: Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int J Cancer* 2005, 116(6):963-971.
2. MC A: Biologic damage resulting from exposure to tobacco smoke and from radon: implication for preventive interventions. *Oncogene* 2002, 21(48):7365-7375.
3. Izzotti A PA: Molecular damage and lung tumors in cigarette smoke-exposed mice. *Ann N Y Acad Sci* 2015, 1340:75-83.
4. Mass MJ, Jeffers AJ, Ross JA, Nelson G, Galati AJ, Stoner GD, Nesnow S: Ki-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by benz[j]aceanthrylene and benzo[a]pyrene in the lungs of strain A/J mice. *Molecular carcinogenesis* 1993, 8(3):186-192.
5. Pfeifer GP DM, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P: Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002, 21(48):7435-7451.
6. Davis R RW, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, Chellappan S.: Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLoS One* 2009, 4(10):e7524.
7. Cattaneo MG CA, Vicentini LM, Clementi F, Sher E.: Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1993, 53(22):5566-5568.
8. An Y KA, Lopez JP, Kuo SZ, Yu MA, Abhold EL, Chen JS, Wang-Rodriguez J and Ongkeko WM: Cigarette smoke promotes drug resistance and expansion of cancer stem cell-like side population. *PLoS One* 2012, 7(11):e47919.
9. AF G: Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009, Suppl (1):S24-31.
10. Mokdad AH MJ, Stroup DF, Gerberding JL: Actual causes of death in the United States, 2000. . *JAMA* 2004, 291(10):1238-1245.
11. Chioloro A FD, Paccaud F and Cornuz J: Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 2008, 87(4):801-809.
12. Sun T WX, Liu Z, Liu S, Zhang J.: Patterns of cytokine release and evolution of remote organs from proximal femur fracture in COPD rats. *Injury* 2011, 42(8):825-832.

13. Jz H XW, J F, Bj R, Km W, Sc T, Jg P, Ra C, M L, M H: Metabolite Signatures in Hydrophilic Extracts of Mouse Lungs Exposed to Cigarette Smoke Revealed by <sup>1</sup>H NMR Metabolomics Investigation. *Metabolomics (Los Angel)* 2015, 5(2):pii: 143.
14. Barupal DK PK, Hood C, Kind T, Fiehn O: Environmental Tobacco Smoke Alters Metabolic Systems in Adult Rats. *Chem Res Toxicol* 2016, 29(11):1818-1827.
15. Hardonnière K SE, Lemarié A, Fernier M, Gallais I, Héliès-Toussaint C, Mograbi B, Antonio S, Bénit P, Rustin P, Janin M, Habarou F, Ottolenghi C, Lavault MT, Benelli C, Sergent O, Huc L, Bortoli S and Lagadic-Gossmann D: The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces a Warburg-like metabolic reprogramming dependent on NHE1 and associated with cell survival. *Sci Rep* 2016, 6:30776.
16. Agarwal AR YFaCE: Short-term cigarette smoke exposure leads to metabolic alterations in lung alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014, 51(2):284-293.
17. Myoung Sook Kim YH, Juna Lee, Xiaoli Zhong, Wei-Wen Jiang, Edward A. Ratovitski and David Sidransky: Cellular transformation by cigarette smoke extract involves alteration of glycolysis and mitochondrial function in esophageal epithelial cells. *Int J Cancer* 2010, 127(2):269-281.
18. Weinberg DHaRA: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674.
19. O W: On the origin of cancer cells. *Science* 1956, 123(3191):309-314.
20. O W: On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, 124(3215):269-270.
21. H E: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 1955, 122(3168):501-514.
22. Hosios AM HV, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, Manalis SR, Vander Heiden MG.: Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell* 2016, 36(5):540-549.
23. MG MKaSMaVH: The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol* 2016, 214(3):249-257.
24. Yang M VK: Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016, 16(10):650-662.
25. Zhang B ZA, Hydbring P, Ambroise G, Ouchida AT, Goiny M, Vakifahmetoglu-Norberg H, Norberg E: PHGDH Defines a Metabolic Subtype in Lung Adenocarcinomas with Poor Prognosis. *Cell Rep* 2017, 19(11):2289-2303.
26. Possemato R MK, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM.: Functional



genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 2011, 476(7360):346-350.

27. Mullarky E MK, Vander Heiden MG, Cantley LC, Locasale JW.: PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011, 24(6):1112-1115.

28. Samanta D PY, Andrabi SA, Shelton LM, Gilkes DM, Semenza GL: PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer Res* 2016, 76(15):4430-4442.

29. Liao KM CT, Tian YF, Lin CY, Lee SW, Chuang HY, Chan TC, Chen TJ, Hsing CH, Sheu MJ, Li CF: Overexpression of the PSAT1 Gene in Nasopharyngeal Carcinoma Is an Indicator of Poor Prognosis. *J Cancer* 2016, 7(9):1088-1094.

30. Sato K MT, Hu Q, Tobo T, Kidogami S, Ogawa Y, Saito T, Nambara S, Komatsu H, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Hayashi N, Iguchi T, Eguchi H, Ito S, Nakagawa T, Mimori K: Phosphoserine Phosphatase Is a Novel Prognostic Biomarker on Chromosome 7 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2017, 37(5):2365-2371.

## 【評語】 090005

1. The author provides sufficient data to support the proposal. Statistics methods, sample number, and p-value have to include in the Materials and Methods, and Results sections.
2. solid results.
3. recommended.