

2019 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 HER2/EZH2 訊號途徑調控 glutamine
代謝基因 GOT2 以影響胰臟癌細胞生長之
作用

得獎獎項 大會獎：一等獎
青少年科學獎
出國正選代表

就讀學校 臺中市立臺中第一高級中學

指導教師 黃偉謙、龔雍任

作者姓名 陳柏融

關鍵詞 胰臟癌、glutamine 代謝、GOT2 基因

作者簡介



我叫陳柏融，今年就讀臺中一中 3 年 24 班數理資優班，平常即喜歡進行生物方面的實驗。自從高一時專題研究課程開始即開始從事癌症方面的研究，探討癌細胞生長機制與調控的蛋白機制途徑相當熱衷，希望藉由自己的研究能夠提供醫療界發展的一部分，同時完成心中成就感與滿足感，發揮研究精神價值。

Abbreviations

AOA	Aminooxyacetic acid
AST	Aspartate aminotransferase
ATP	Ammonium persulfate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DZNep	3-deazaneplanocin
ECL	Enhanced chemoluminescence
ELISA	Enzyme-linked immune-sorbent assay
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FBS	Fetal bovine serum
GOT1	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1
GOT2	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 2
H3k27me3	tri-methylation of lysine 27 on histone h3
HER2	Human Epidermal Growth factor receptor 2
MS	Mass spectrometry
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenylterazolium bromide
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PBS	Phosphate buffered saline
p-HER2	Phosphate human Epidermal Growth factor receptor 2
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	Short hairpin RNA
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle
TEMED	Tetramethylethylenediamine
α -KG	α -ketoglutarate

摘要

根據世界衛生組織的統計，胰臟癌高居全球癌症死亡人數第四位，亦為臺灣十大癌症死因之一，為最具侵略性、致死性及預後不佳的癌症。HER2 為調控癌細胞增生重要致癌因子，在胰臟癌患者大量表現，其在乳癌細胞中可磷酸化並穩定負責調控組蛋白甲基化的 EZH2 蛋白表現；而 GOT2 已知在粒線體內調控麩醯胺酸(glutamine)代謝產生 α -ketoglutarate，並參與氧化磷酸化幫助胰臟癌生長。

本研究探討 HER2/EZH2 訊息傳遞途徑是否影響 GOT2 抑制對胰臟癌細胞之死亡作用，以及 HER2/EZH2 是否藉由甲基化 GOT2 調控 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環，找尋出 HER2 是否藉由 EZH2 調控 GOT2 活性而參與癌細胞 glutamine 代謝反應，觀察 HER2、EZH2、GOT2 訊息傳遞途徑。

研究結果發現細胞生長作用與 EZH2 表現較 HER2 表現具有相關性，並證實 EZH2 與 GOT2 確實存在交互作用關係，透過 EZH2 與 GOT2 結合並甲基化 GOT2 而調控其作用，增加活性表現與抗藥效果，顯示 EZH2 與 GOT2 參與胰臟癌細胞 glutamine 代謝機制重要角色。

Abstract

Pancreatic cancer has a very poor prognosis, as they are normally diagnosed at a late stage when the cancer is already locally advanced or has spread to other parts of the body; therefore, pancreatic cancer is one of the most malignant cancers globally. However, medical treatment nowadays cannot control this disease completely at early stage. According to previous studies, metabolic regulation by HER2/EZH2 pathway could play a predominant role in determining cellular states, showing that mitochondrial glutamine metabolism regulates proliferation and cell growth in pancreatic cancer. At the beginning of this study, mitochondrial GOT2 was identified as an interacting protein for EZH2 by Mass spectrometer. Also, HER2 expression status may be associated with the role of HER2 in glutamine metabolism in pancreatic cancer cells. EZH2, participating in histone methylation, was found to methylate GOT2. To address these questions, the role of signal transduction pathway through HER2-EZH2-GOT2 pathway in mitochondrial glutamine metabolism in pancreatic cancer was studied.

First of all, we found that EZH2 expression is important for cell proliferation or cell death when GOT2 was inhibited. In addition, we also explored that EZH2 signaling could methylate GOT2 to regulate glutamine metabolism and malate-Aspartate cycle. In this study, we further found that HER2, EZH2, GOT2 expression have clinical significance, and cell viability was influenced by knockdown and inhibition of GOT2. Nonetheless, HER2, EZH2 inhibitor could reduce GOT2 activity in cells, instead of protein expression at all. Besides, EZH2 could interact with GOT2 and methylate GOT2, implying that EZH2 activity may play an important role in the glutamine-deprivation status. Our findings indicated that EZH2/GOTs axis might be a potential therapeutic target for pancreatic cancer. Further detail investigations would be helpful to development a novel therapeutic strategy targeting on GOT2 for this disease.

一、前言

研究動機

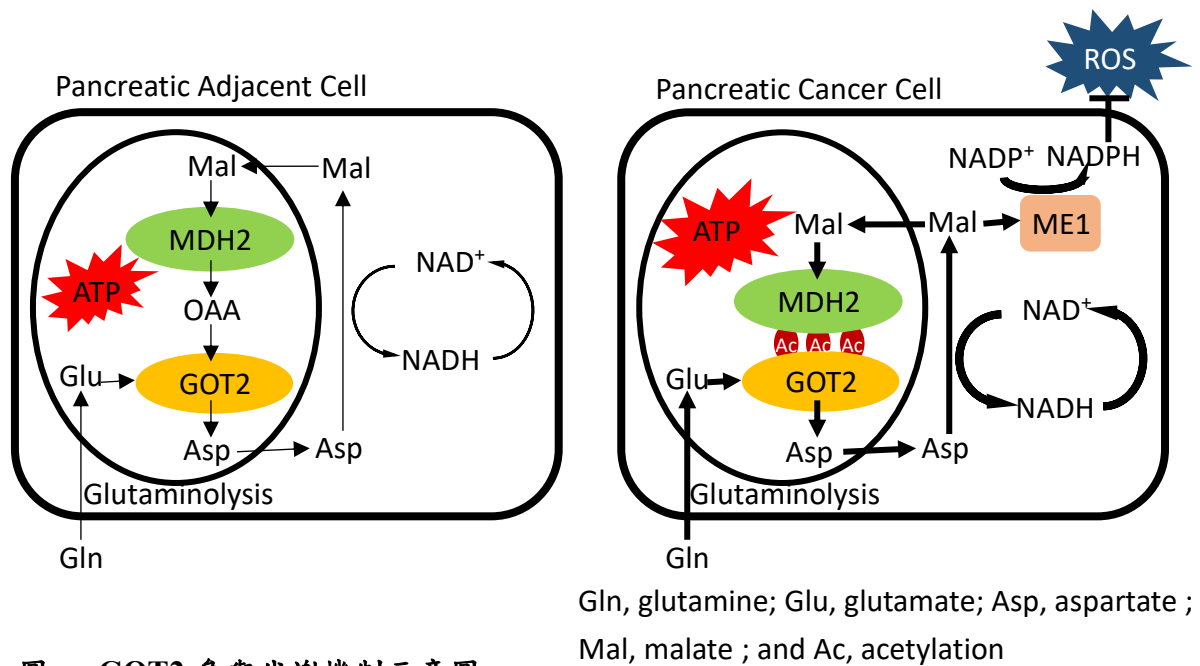
根據世界衛生組織的統計，胰臟癌高居全球癌症死亡人數第四位，亦為臺灣十大癌症死因之一，為最具侵略性、致死性及預後不佳的癌症。百分之八十五的胰臟癌病例在診斷確立後，已有遠處轉移或局部侵襲致鄰近器官的現象產生，僅極少部分能夠接受根治性手術治療，平均胰臟癌患者存活時間只有四到六個月，整體五年存活率小於百分之五，其低存活率現象仍為現今醫療界棘手難題。然而，在胰臟腫瘤惡化過程裡，癌細胞的快速增生已知非常依賴粒線體中的營養素代謝反應，迅速增殖的癌細胞會消耗麩醯胺酸 (glutamine) 來提供生長和增殖所需的能量；因此，調控 glutamine 的代謝已成為胰臟癌治療的可能策略[1]。

經由文獻得知粒腺體中的 Glutamic-oxaloacetic transaminase-2 (GOT2)在胰臟癌中對於 glutamine 的代謝扮演重要角色。蘋果酸(malate)-天門冬胺酸(Aspartate)循環對於氫離子穿透過粒線體內膜而參與電子傳遞鏈扮演重要的角色(圖一); 在細胞質中的 GOT1 首先將 α -ketoglutarate (α -KG) 與 aspartate 代謝成 oxaloacetic acid (OAA) 與 glutamate (glutamine 的下游產物), 其中 OAA 進一步被 MDH1 代謝成 malate 並將輔酶 NADH 氧化成 NAD^+ , 而 malate 與 glutamate 並分別經由 α -KG/malate antiport 與 Glu/Asp antiport 運送進入粒腺體內。在粒腺體中, malate 則會受到 MDH2 逆反應生成草醋酸(OAA), 同時將 NAD^+ 還原成 NADH 以進入電子傳遞鏈而產生 ATP。粒腺體內的 glutamate 則與 OAA 受到 GOT2 的代謝, 反應生成 aspartate 及 α -ketoglutarate (α -KG), 同樣分別經由 α -KG/malate antiport 與 Glu/Asp antiport 運送回細胞質內, 如此完成 malate-Aspartate 循環而轉換 NAD^+/NADH 及運送 H^+ 進入粒線體內, 以產生 ATP 供細胞迅速增殖; 同時, α -KG 亦會在粒線體中觸發 TCA cycle 的產生, 產生 ATP 以供細胞增殖需求。然而, GOT2 已被證明可減緩胰臟癌細胞老化現象, 透過抑制 reactive oxygen species (ROS) 以及 p27 來導致胰臟癌細胞產生抗老化效果, 因此抑制 GOT2 基因表現則會增加 ROS 及 p27, 使得胰臟癌細胞老化, 最終降低癌細胞生長速度, 導致細胞死亡現象[2]。

再者，GOT2 亦被發現受到乙醯化而使得 malate-Aspartate 循環代謝途徑強度增加，活性亦隨之提升；此作用起因於胰臟癌細胞中去乙醯化的酵素 SIRT3 減少，使得 GOT2 藉由乙醯化而增強與 MDH2 的結合，提高細胞代謝 glutamine 的能力[3]。這些文獻皆指出 GOT2 異常調控 glutamine 代謝對於胰臟癌細胞的增生扮演相當重要的地位，可能成為治療胰臟癌的潛力標的之一。然而，目前並沒有針對 GOT2 的專一性抑制劑。此外，GOT2 在正常細胞中對於 glutamine 的代謝也很重要，無選擇性的抑制 GOT2 可能會造成極嚴重的副作用。因此，找出 GOT2 在胰臟癌細胞中與正常細胞中的差異，除了可以進一步了解胰臟癌細胞中 GOT2 如何造成 glutamine 代謝異常而促進癌細胞生長，並有助於未來發展新穎的治療藥物，來改善胰臟癌病人的存活率。

HER2 基因除了在乳癌中大量表現，也大量表現於超過一半的胰臟癌腫瘤細胞中[4]。HER2 功能上會促進癌細胞的生長、降低細胞凋亡現象、增加癌細胞轉移、以及增加癌幹細胞的比例。然而，HER2 標靶藥物對於胰臟癌的效果不佳，顯示 HER2 可能透過非典型的訊息傳遞途徑，影響胰臟癌的生長；值得注意的是，HER2 發現在乳癌細胞調控 glutamine 代謝，但機制依舊未明[5]。在實驗室前人的研究成果中發現，乳癌細胞中 HER2 可磷酸化並調控 EZH2 的蛋白活性，形成訊息傳遞調控路徑，來促進癌症的惡化與幹細胞特性(投稿中)。有趣的是，EZH2 是調控 Histone 甲基化的酵素，可抑制許多抑癌基因，且會增加癌幹細胞的比例，透過改變組織局部 glutamine 濃度會降低 Histone 甲基化而減緩組織分化，顯示 EZH2 可能亦參與 glutamine 代謝而影響細胞分化[6]。而本研究中，我們進一步以質譜分析找出可與此 EZH2 磷酸化結合的蛋白種類，發現負責粒線體中 glutamine 代謝的 GOT2 是其中之一；因此，HER2-EZH2 與 GOT2 之間是否存在交互作用而影響胰臟癌細胞中的 glutamine 代謝作用，為本研究之探討目標。

本研究將分析在胰臟癌細胞中 GOT2 與 HER2 表現量的相關性，並探討抑制 GOT2 影響胰臟癌細胞 glutamine 代謝功能與細胞存活率是否與 HER2 有關，找尋出 HER2 是否藉由 EZH2 調控 GOT2 活性而參與癌細胞 glutamine 代謝反應，期望更詳細了解 GOT2 在胰臟癌細胞中受到異常調控的作用，以提供未來醫療新策略，冀望能在胰臟癌治療與藥物開發層面上提供新的研究視野。



圖一 GOT2 參與代謝機制示意圖

研究目的

綜觀文獻，雖然已得知 GOT2 會影響胰臟癌細胞 glutamine 代謝功能，造成癌細胞生長；然而，GOT2 如何受到異常調控導致癌細胞增生則尚未清楚。因此，本研究將以胰臟癌細胞為模式，探討 HER2 是否透過 EZH2 甲基化 GOT2 蛋白而影響胰臟癌細胞中的 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環。綜合以上，本研究將完成以下兩點研究目的：

- 一、 探討 HER2 表現是否影響 GOT2 抑制對胰臟癌細胞之死亡作用
- 二、 HER2/EZH2 是否藉由甲基化 GOT2 調控 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環

二、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
蛋白表現量分析	Bio-Rad 西方點墨法系統
	數位光電感應器(CCD)影像擷取系統
	超音波震盪儀(sonicator)
	乾浴槽
	各式抗體及試劑
蛋白位置分佈觀察	Confocal 顯微鏡
細胞生長觀察	MTT assay
	Clonogenic assay
代謝作用能力測試	海馬生物能量測定儀

表一. 研究設備與器材列表

研究過程或方法及進行步驟

一、探討 HER2 表現是否影響 GOT2 抑制對胰臟癌細胞之死亡作用

1-1 分析胰臟癌患者臨床病例資料表現情形及存活率影響

- 以 KM plotter 分析患者臨床資料庫中 RNA 表現情形及存活率



1-2 分析不同胰臟癌細胞中 HER2/EZH2/GOT2 蛋白表現情形

- 以西方墨點法比較不同胰臟癌細胞中相關基因表現量



1-3 分析不同胰臟癌細胞中 GOT2 活性差異

- 利用 GOT activity assay 觀察 HER2 與 GOT2 關聯性



1-4 分析 HER2 不同表現量的胰臟癌細胞的代謝型態差異

- 分析 OCR 及 ECAR 相關數值以觀察 HER2 是否影響代謝型態



1-5 觀察 AOA 抑制 GOT2 對胰臟癌細胞毒殺效果

- 利用 MTT assay/細胞成株試驗觀察以 AOA(GOT2 抑制劑)抑制 GOT2 對胰臟癌細胞毒殺效果是否與 HER2 表現有關



1-6 觀察以 shRNA 抑制 GOT2 對胰臟癌細胞毒殺效果

- 利用 incucyte assay/ MTT assay/細胞成株試驗觀察以 shRNA 抑制 GOT2 對胰臟癌細胞毒殺效果是否與 HER2 表現有關

二、HER2/EZH2 是否藉由甲基化 GOT2 調控 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環

2-1 分析 HER2 抑制劑對於 GOT2 表現及活性的影響

- 利用西方墨點法/GOT activity assay/clonogenic assay 觀察 HER2 抑制劑對於 GOT2 表現及活性的影響



2-2 分析 EZH2 抑制劑對於 GOT2 表現及活性的影響

- 利用西方墨點法/GOT activity assay/clonogenic assay 觀察 EZH2 抑制劑對於 GOT2 表現及活性的影響



2-3 觀察合併 EZH2 與 GOT2 抑制劑對胰臟癌細胞毒殺效果

- 利用 MTT assay 觀察合併 EZH2 與 GOT2 抑制劑對胰臟癌細胞毒殺效果以推得 EZH2 與 GOT2 交互作用及活性影響關係



2-4 檢視 GOT2 是否受 EZH2 甲基化

- 利用免疫沈澱與西方墨點法觀察 GOT2 是否受甲基化，並探討此作用是否受到 EZH2 抑制劑而減少

研究方法及步驟

(一)、細胞培養(Cell culture)

1. 細胞培養

將胰臟癌細胞株: PANC1、MIA PaCa-2 培養於含 10%Fetal Bovine Serum、100 unit/ml penicillin、100µg/ml streptomycin 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)之 medium

胰臟癌細胞株: Capan-1、CFPAC-1 則培養於含 10%Fetal Bovine Serum、100 unit/ml penicillin、100µg/ml streptomycin 的 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 之 medium

胰臟癌細胞株: Su.86.86、AsPC-1 培養於含 10%Fetal Bovine Serum、100 unit/ml penicillin、100µg/ml streptomycin 的 Roswell Park Memorial Institute medium(RPMI) 之 medium

使上述細胞株附著於培養皿上，並放置在 5%CO₂、37° C 之細胞箱培養。

2. 細胞繼代培養

將培養皿中的培養基移除後，以清洗緩衝液 PBS(Phosphate buffered saline)清洗一次，將 PBS 以及雜質吸除，並加入 1c.c 的胰蛋白酶 (trypsin)，放入恆溫培養箱(Incubator)中約 5 分鐘。準備培養皿並在其中加入 8c.c 的培養液，並標明細胞名、細胞代數、培養液與日期。再將放置於恆溫培養箱(Incubator)中的培養皿取出，吸取 1c.c 的培養液來回沖洗細胞，裝入 15c.c. 離心管並將其離心(13000 rpm、5 分鐘)。將上清懸浮液除後，吸取 1c.c 的培養液來回打散細胞，吸取足量細胞液後種回培養皿，稍微搖晃使液體均勻後放入恆溫培養箱。

(二)、細胞抽取物的製備(Preparation of cell extracts)

將培養皿中的培養基移除後，以清洗緩衝液 PBS 清洗一次，再放置冰上並加入適量的 cell lysis buffer。隨之將細胞刮取下來收至 1.5ml 之 eppendorf 高速離心管中，再以超音波震盪儀破壞細胞膜，遂將細胞溶解物離心(13000rpm、15min)，最後吸取上清液至新的高速離心管，捨棄沉澱底物。而預測定細胞溶解物中蛋白質的濃度採用 Bio-Rad Protein Assay，此法是利用 Bovine serum albumin(BSA)當標準品，利用 ELISA reader 於波長 595nm 測定吸光值，並依據吸光值做出回歸標準曲線，當迴歸標準曲線斜率 $R > 0.995$ 時才予以計算。

(三)、西方點墨法(Western blot 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 μ 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)。隨後將海綿、圖畫紙、凝膠、聚偏氟乙烯膜(PVDF membrane)依序治妥並放入轉印槽，使凝膠上的蛋白質轉印到 PVDF membrane 上。轉印槽中倒入 Transfer buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 20%methanol, 0.0375%SDS)，以固定電壓 100 伏特轉印 2~3 小時。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 membrane。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 membrane 三次，每次 5 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 冷房中作用 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 沖 membrane 三次，每次 2 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 1 小時，隨後亦以 TBS-T 沖洗 membrane 三次，每次 2 分鐘，洗淨之 membrane 最後加入化學發光底物(ECL)作用 1 分鐘，以專用之透明塑膠膜封住 PVDF membrane，並放入 X 光片夾(Hypercassette)中，在暗房內壓入高感度底片，再以自動沖片機顯像。

(四)、免疫共沉澱法(Co-immunoprecipitation)

欲探討細胞內特定蛋白質是否與其他蛋白質形成複合體，產生交互作用，進行定量後，取含 1000 μ g 蛋白質裂解液，再加入 IP binding buffer 將溶液補置總體積 1ml，在 eppendorf 中混合，之後加入蛋白複合體其中一種已知蛋白的一級抗體 1 μ g 與其在 4°C 下反應過夜。作用後，再加入 25 μ l 之純化用磁珠(Magnetic beads for purification)，置上機台緩慢旋轉 2.5 小時是均勻混合，分離出與抗體結合的複合體，接著架在磁座上 IP wash buffer 清洗三次，最後在乾浴槽加熱 5 分鐘，便可分離磁珠與蛋白複合體。萃取出脂蛋白複合體已 SDS-PAGE 和 Western blot 的方式轉印到 PVDF membrane 上，最後以帶有 HRP 的二級抗體偵測複合體中是否含有欲探討之蛋白質，與 ECL 反應後成像在底片上，如果有反應，就證明已知蛋白的確會與有興趣之其他蛋白質形成複合體，具有交互作用。

(五)、細胞存活率分析(MTT assay)

將細胞以 5×10^3 cells/well 種於 96well plate，經過一段時間後，去除培養液，以含 1%Crystal violet 之 30% ethanol 染色，置乾後已冰醋酸溶解結晶體，並以 ELISA reader 判讀實驗組與控制組吸光值的差異。

(六)、GOT 活性觀察(GOT activity assay)

將細胞含有 1×10^6 細胞數培養在 6 well 內，去除培養液後，各加入 200 μ l 的 assay buffer，將 sample 冷凍在 -80°C 冰箱 30 分鐘使細胞均質，在拿出來室溫回溫 10 分鐘，而這些動作將重複 3 次。在均質後將 sample 離心，13000g 10 分鐘，並且將離心好的上清液放置新的離心管。每一個 well 中加入 50 μ l sample 以及 100 μ l 反應物(developer, AST enzyme mix, AST assay buffer)後將待測物放置 37°C 培養箱避光反應，最後利用 ELISA reader 偵測 450 O.D 值。

(七)、細胞成株試驗(clonogenic assay)

將細胞 5×10^3 cells/well 種於 6well plate，經過一段時間後去除培養液，加入實驗設計之藥品，放置 7~10 天，並以 clonogenic assay 染劑(含 5%Crystal violet 之 50% ethanol)染色 20 分鐘，置於乾燥處，於風乾後觀察細胞成株情形。

(八)、海馬生物能量測定儀(Seahorse Bioscience XFe Analyzer)

將細胞培養在 Seahorse XF24-well microplate 內含有 2×10^4 細胞數中，待其累計 24 小時後更換實驗所需培養液及藥劑，等待 1 小時並存放於未含 CO_2 、 37°C 之細胞箱培養。再加入相關藥劑(consecutive addition of inhibitors of electron transport chain (ETC) (1 μM oligomycin, 1 μM FCCP and a mix of 1 μM rotenone/antimycin)及上機，並設定相關數據後，以 Seahorse XF24 Analyzer 分析並檢測細胞氧氣攝取量值(OCR)及氫離子濃度數值(ECAR)。

三、研究結果與討論

(一) 探討 HER2 表現是否影響 GOT2 抑制對胰臟癌細胞之死亡作用

為了了解 HER2/EZH2/GOT2 三者胰臟癌腫瘤組織中的相關性，針對 HER2、EZH2、GOT2 三者對於臨床上胰臟癌患者表現情形以及存活率之影響。發現在胰臟癌患者中三者皆呈高度表現，顯示癌化的惡性腫瘤皆會大量表現 HER2、EZH2、GOT2 三者基因（由圖二），其中 EZH2 與 GOT2 的 mRNA 表現在胰臟癌病患的腫瘤組織中呈現正相關，顯示可能兩者之間存在著調節作用（圖三）。

由於公開的 KM-plotter database 中尚無胰臟癌病人的存活率資料，因此我們選用同樣具有 HER2 大量表現的胃癌進行 HER2、EZH2、GOT2 表現對於患者存活率之相關性分析，GOT2 大量表現的病患有較差的整體存活率（圖四 A-C）以及復發後存活率（圖四 D-F），而這樣的現象只在 HER2 陽性的患者中較顯著（圖四 B 與 E），推測 HER2 表現會強化 GOT2 參與胰臟癌細胞代謝情形。

除了 mRNA 以外，我們進一步以細胞模式探討不同胰臟癌細胞中 HER2 表現及活性是否與 GOT2 的表現有關。其中 AsPC-1 胰臟癌細胞為 HER2 高度表現，Capan-1、Su.86.86、CFPAC-1、MIA PaCa-2 胰臟癌細胞為 HER2 中度表現，PANC1 胰臟癌細胞則為 HER2 低度表現；在這些細胞中，HER2 活性亦與其蛋白呈現正相關（圖五）。圖六中分析不同胰臟癌細胞中 HER2、EZH2、GOT2、GOT1 表現。而本研究選用之三種胰臟癌細胞株：AsPC-1 細胞 EZH2 表現量低、CFPAC-1 細胞 EZH2 表現量高、PANC1 細胞 EZH2 表現量中等。顯示乳癌細胞中所觀察到的 HER2/EZH2 蛋白調控作用可能不存在於胰臟癌細胞中，原因可能是在 90% 胰臟癌細胞中 HER2 下游的 Ras 大多出現 mutation 的現象，可能導致上游 HER2 對 EZH2 的調控作用沒有差別。因此，本研究選用 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 胰臟癌細胞作為 HER2 高度、中度、低度表現之研究對象，以進行相關後續實驗設計。以上三種作為未來實驗研究之基礎角色設定。

再者，我們分析胰臟癌細胞在基礎代謝狀態下 GOT2 活性表現（圖七），發現 CFPAC-1 細胞 GOT2 活性較 AsPC-1 細胞高，並在測量吸光值及繪製回歸直線後求得 glutamate 濃度，顯示在細胞基礎狀態下 GOT2 活性表現 CFPAC-1 細胞較活躍，並觀察與 EZH2 及 GOT2 蛋

白表現含量具有正相關性，代表其參與 glutamine 代謝途徑並扮演關鍵之腳色。

為了進一步分析胰臟癌細胞中不同 HER2/EZH2 表現狀況是否影響 glutamine 代謝的功能，在海馬生物能量測定分析中，發現加入 HER2 抑制劑 Lapatinib 處理會降低胰臟癌細胞 ECAR 與 OCR，顯示 HER2 可調控胰臟癌整體的能量代謝（圖八）。其中 Lapatinib 於 CFPAC-1 細胞中明顯抑制氧氣攝取量，顯示基礎粒線體功能受抑制（圖九、十）；而在 AsPC-1 細胞中則是明顯抑制細胞釋放出之氫離子濃度，顯示其醣解作用效能受影響（圖十一）。Lapatinib 處理後皆降低兩株細胞多重基礎粒線體功能：基礎粒線體呼吸作用、粒線體最大呼吸作用、離子流出現象、ATP 總產量、以及粒線體備用呼吸能力等情形接受 Lapatinib 藥物處理所影響（圖十）。因此，HER2 抑制劑 Lapatinib 可能會降低胰臟癌細胞基礎代謝反應及其能量產出，或許更進一步影響細胞之生存情形。

為了進一步了解 GOT2 是否對對胰臟癌細胞的存活扮演重要角色，以 MTT assay 觀察 GOT2 抑制劑 AOA 毒殺胰臟癌細胞的效果（圖十二）。結果顯示在加入 AOA 處理後，高 EZH2 表現的 CFPAC-1 細胞對 AOA 較不敏感，而低表現 EZH2 的 AsPC-1 細胞則容易受到 AOA 的抑制。這些結果推測 GOT2 可能受到 EZH2 甲基化後產生結構變異，進而影響 GOT2 的功能。為了更證明 GOT2 對胰臟細胞的重要性，以 shRNA 降低 GOT2 蛋白表現亦會明顯降低胰臟癌細胞的存活率，shGOT2 病毒對於 AOA 對於 EZH2 高度表現 CFPAC-1 胰臟癌細胞毒殺效果較不明顯，EZH2 中度表現 PANC1 胰臟癌細胞其次，而 EZH2 低度表現 AsPC-1 胰臟癌細胞則最為明顯，抑制程度與細胞表現 EZH2 蛋白量成反比，此結果與 GOT2 抑制劑造成的毒殺效果可相互驗證。無論是以 GOT2 抑制劑(AOA)或是以 shRNA 慢病毒(shGOT2)，均可發現在抑制 GOT2 對細胞的毒殺效果與 EZH2 蛋白含量可能較有直接關聯，與 HER2 蛋白表現較無直接相關性。。

(二) HER2/EZH2 是否藉由甲基化 GOT2 調控 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環

本研究證實 HER2/EZH2 訊息傳遞途徑雖不影響 GOT2 蛋白總量，卻可能導致 GOT2 活性增加，也許會進一步影響 NADH 總產量變化；接著欲探討 EZH2 是否對 GOT2 進行甲基化修飾作用，分析兩者之間的調控作用。

由圖十四中觀察 HER2 抑制劑 Lapatinib 處理雖不影響 EZH2、GOT2 蛋白總量表現，卻抑制其活性作用。已知 HER2 藉由本身磷酸化以增加其活性，由圖十四中可觀察到 Lapatinib 明顯抑制 pHER2(Y1196)與 pHER2(Y877)磷酸化，但不影響胰臟癌細胞中的 EZH2 表現表現 Histone H3K27 的甲基化，顯示 HER2 在胰臟癌中可能不參與 EZH2 的調控作用，此結果與前述臨床結果相符，可能是胰臟癌細胞中的 Ras 常有 mutation 導致。的確，Lapatinib 對三種胰臟癌細胞的存活率並沒有明顯的抑制作用。

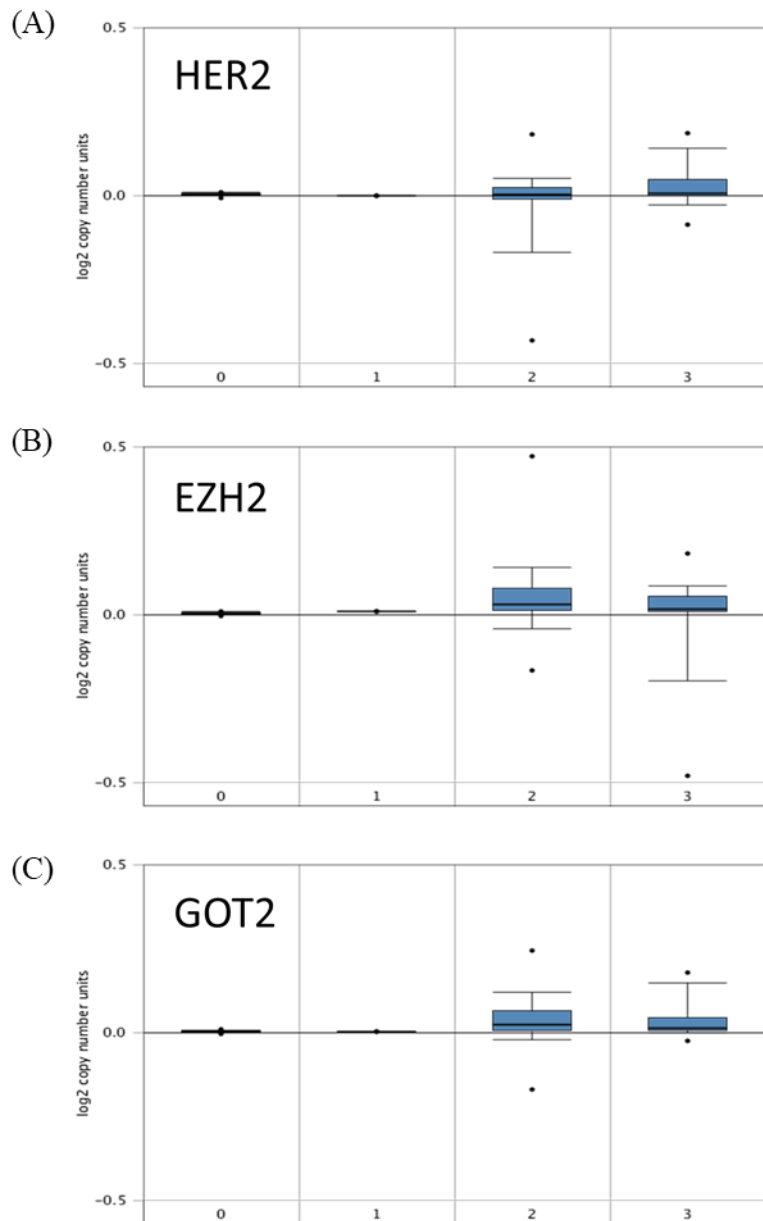
我們進一步測試 EZH2 與 GOT2 是否對胰臟癌細胞的存活率是否重要。已知 EZH2 具甲基轉移酶功能，透過催化組蛋白 H3k27 三甲基化(H3k27me3)而影響細胞內許多基因轉錄與蛋白活性，由圖十五及圖十六可觀察 EZH2 抑制劑 DZNep、GSK126 的確俱有抑制 H3K27 甲基化作用，證明其抑制 EZH2 的效果效果，但此兩種藥物雖不影響 GOT2 蛋白總量表現，仍可抑制胰臟癌細胞的存活率。有趣的是，對 GOT2 抑制劑 AOA 不敏感的 CFPAC1 細胞，在 EZH2 抑制劑的存在下，轉而受到 AOA 的明顯毒殺效果(圖十八)，這些實驗結果推測 DZNep、GSK126 可能經由改變 GOT2 的甲基化修飾而影響 GOT2 活性，進而導致胰臟癌細胞 glutamine 營養素代謝改變。

為了驗證 EZH2 可能藉由甲基化修飾 GOT2 而導致其活性變異，觀察在 AOA、GSK126 處理降低胰臟癌細胞粒腺體內 GOT2 活性表現(圖十七)，相較 Lapatinib 處理較無相關，顯示 glutamate 濃度受 GOT2 活性下降而降低，推得 EZH2 具有調控 GOT2 表現活性之現象。

最後於圖十九中可驗證 EZH2 與 GOT2 結合並甲基化 GOT2。得知 flag-GOT2 和 myc-EZH2 有交互作用，而在加入 DZNep 會降低兩者的結合作用。已知 EZH2 是甲基轉移酶，flag-GOT2 和 myc-EZH2 的結合可能增加 flag-GOT2 三甲基化的表現；由於 DZNep 有抑制 flag-GOT2 三甲基化作用存在，因此處理 DZNep 抑制 EZH2 活性後，會減少 flag-GOT2 三甲基化的表現，而使 flag-GOT2 單甲基化和雙甲基化的表現增加。

藉由 EZH2 甲基化 GOT2 改變其活性，可能導致胰臟癌細胞粒腺體內 glutamine 代謝增加，促使能量產量增加以供細胞快速增殖。未來將進一步研究 EZH2 調控 GOT2 的作用是否具有癌細胞專一性，期盼能運用於未來研究水平及醫療用藥。

本研究證實 HER2、EZH2、GOT2 三者皆在胰臟癌細胞中佔有重要調控機制作用，同時發現 GOT2 表現受到 EZH2 表現所調控現象較 HER2 表現明顯，推測 EZH2 藉由甲基化修飾 GOT2，導致 GOT2 結構變異而產生較強抗性；並發現 EZH2 高度表現胰臟癌細胞對於 AOA 抑制及 knockdown GOT2 較無細胞毒性，其受細胞毒殺效果較 EZH2 低度表現細胞不明顯。



圖二. 癌化的惡性腫瘤皆會大量表現 HER2、EZH2、GOT2 三者基因。

0: Normal(50), 1:Colloid Carcinoma of the Pancreas(1),

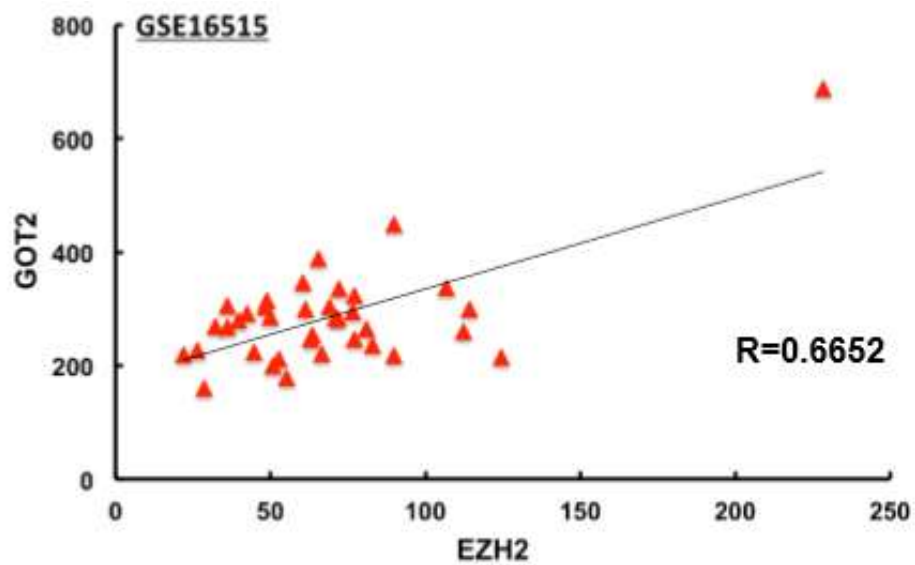
2: Pancreatic Adenocarcinoma(32), 3: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma(17)

分析 TCGA database(100 位胰臟癌患者，18,823 種測量基因)中 HER2、EZH2 及 GOT2 表現在胰臟癌患者中 mRNA 表現情形，製作盒狀圖及探討其是否具有臨床意義。

(A) 胰臟癌患者 mRNA 中 HER2 表現量分析。

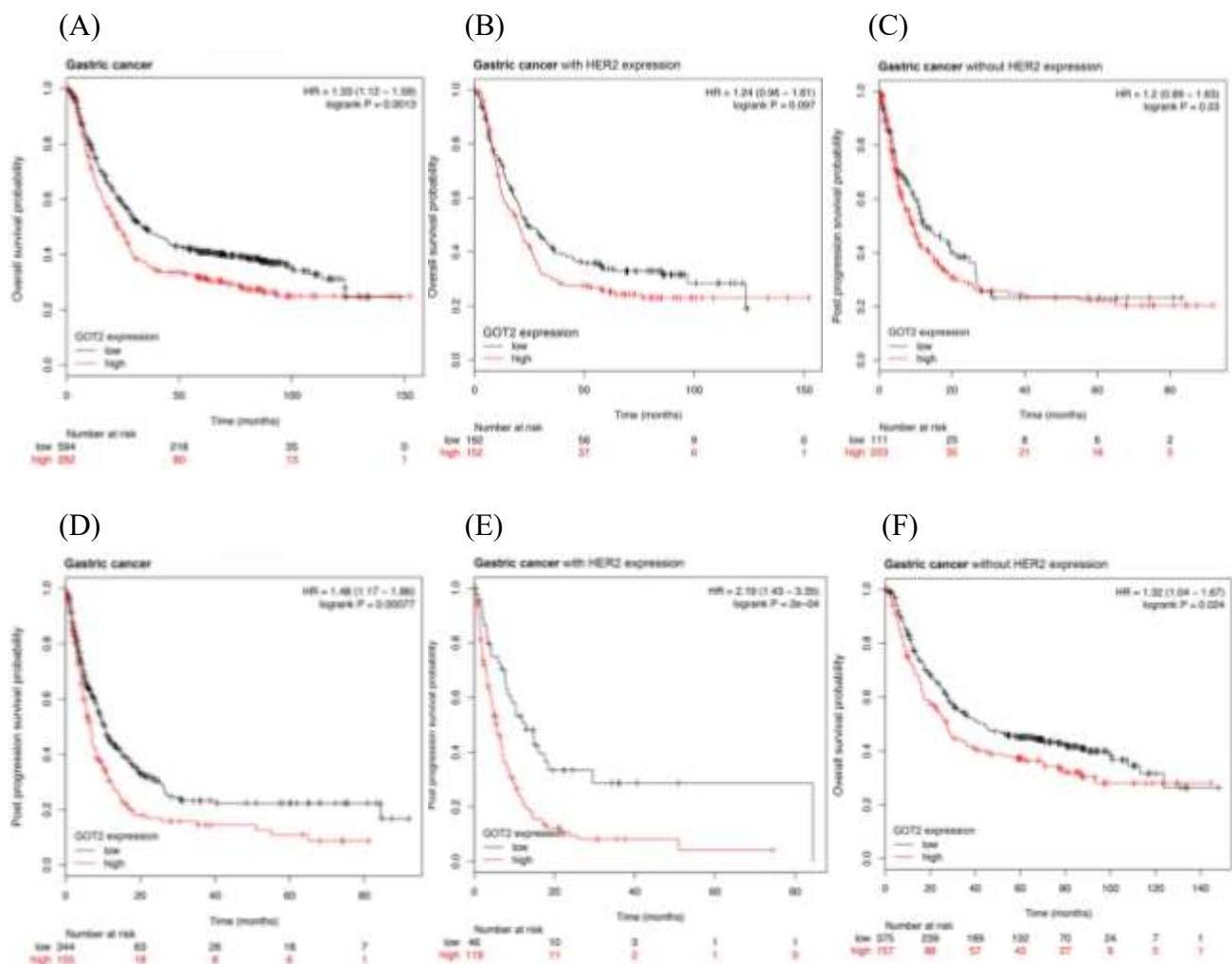
(B) 胰臟癌患者 mRNA 中 EZH2 表現量分析。

(C) 胰臟癌患者 mRNA 中 GOT2 表現量分析。



圖三. EZH2 及 GOT2 表現在臨床患者中上具有臨床意義。

分析 GEO database(GSE16515)中 EZH2 及 GOT2 表現在胰臟癌患者中 mRNA 表現情形，製作為線性迴歸關係圖及探討其是否具有臨床意義。



圖四. HER2 表現會強化 GOT2 參與胰臟癌細胞代謝情形並降低患者存活率。

分析 Oncomine database 胃癌患者 mRNA 表現及其存活率。

選定目標胃癌患者族群進行 mRNA 表現及存活率分析，觀察 HER2 及 GOT2 交互作用影響

(A) 胃癌患者 mRNA 以 GOT2 表現量分類之總存活率。

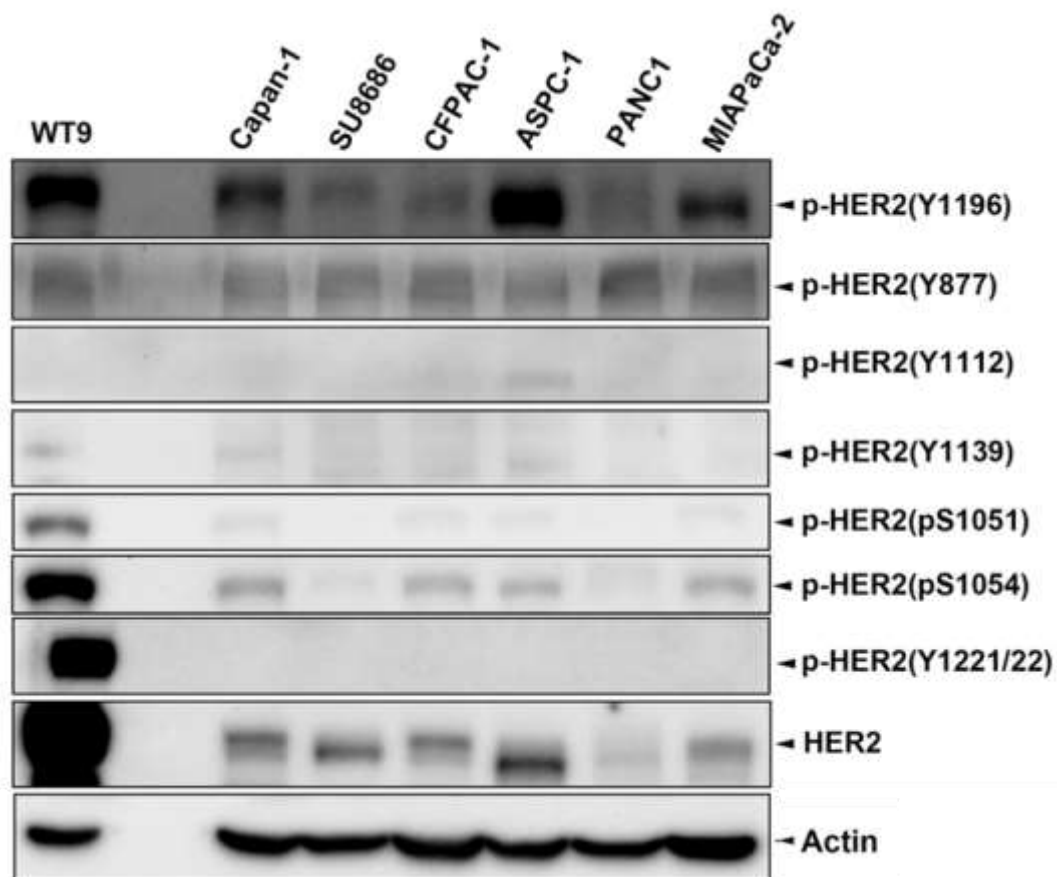
(B) HER2 高度表現胃癌患者 mRNA 以 GOT2 表現量分類之存活率。

(C) HER2 低度表現胃癌患者 mRNA 以 GOT2 表現量分類之存活率。

(D) 腫瘤復發的胃癌患者 mRNA 以 GOT2 表現量分類總存活率。

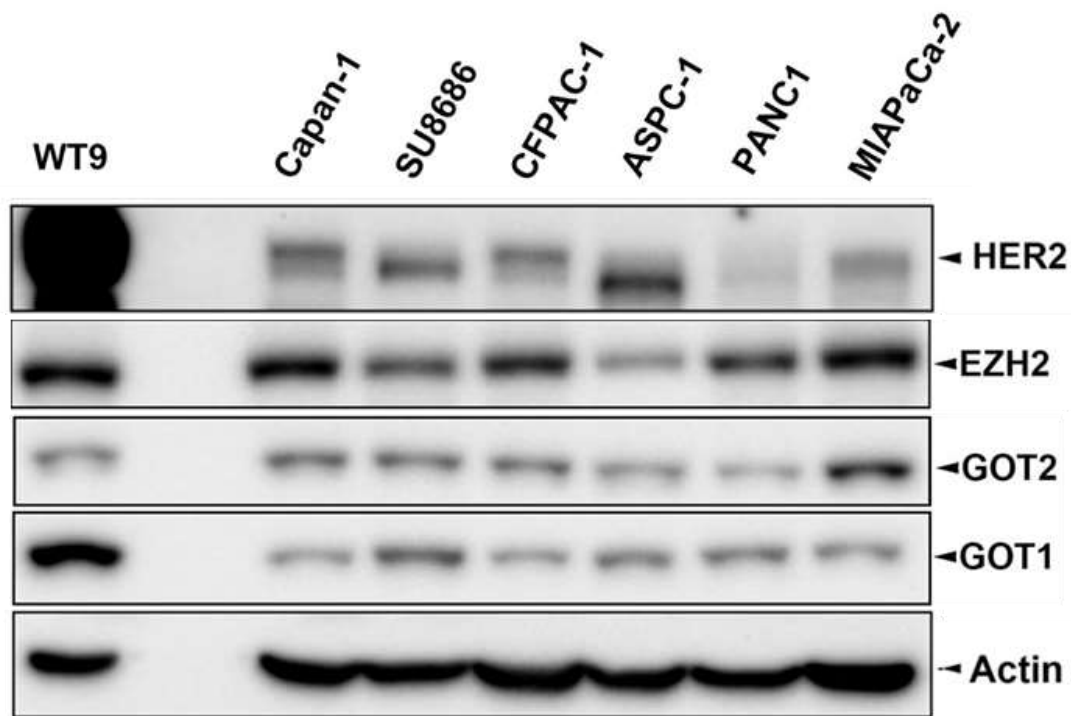
(E) 腫瘤復發的 mHER2 高度表現胃癌患者 RNA 以 GOT2 表現量分類之存活率。

(F) 腫瘤復發的 mHER2 低度表現胃癌患者 RNA 以 GOT2 表現量分類之存活率。



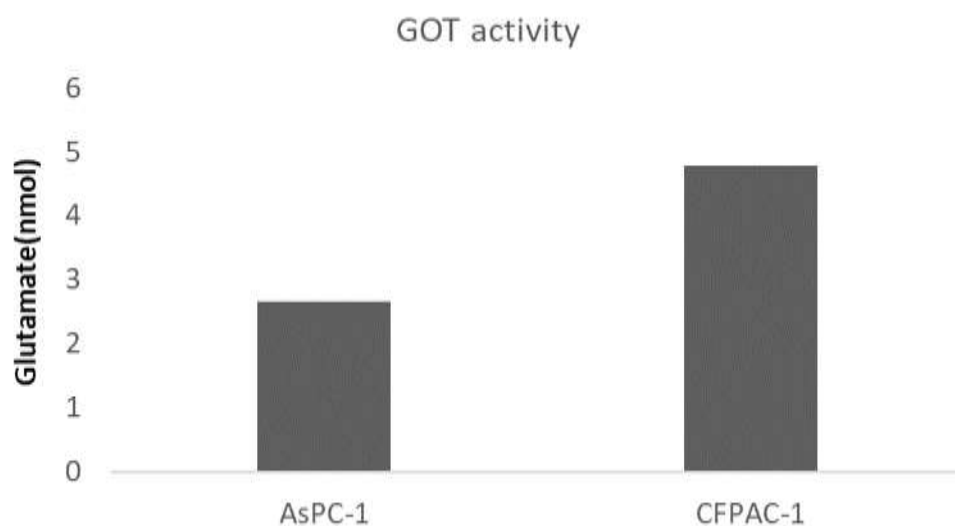
圖五. 不同胰臟癌細胞 HER2 表現及位點之磷酸化現象。

將胰臟癌細胞株：Capan-1、Su.86.86、CFPAC-1、AsPC-1、PANC1、MIA PaCa-2 六種細胞株進行培養，待其穩定生長後製作細胞抽取物。加入 RIPA 後刮取細胞並以超音波震盪儀 (sonicator) 破壞細胞膜，離心及抽取後進行蛋白定量，以西方墨點法分離不同分子量之蛋白，並加入一級抗體及二級抗體辨認後，觀察 HER2 表現及位點之磷酸化現象。



圖六. 不同胰臟癌細胞 HER2、EZH2、GOT2 含量比較。

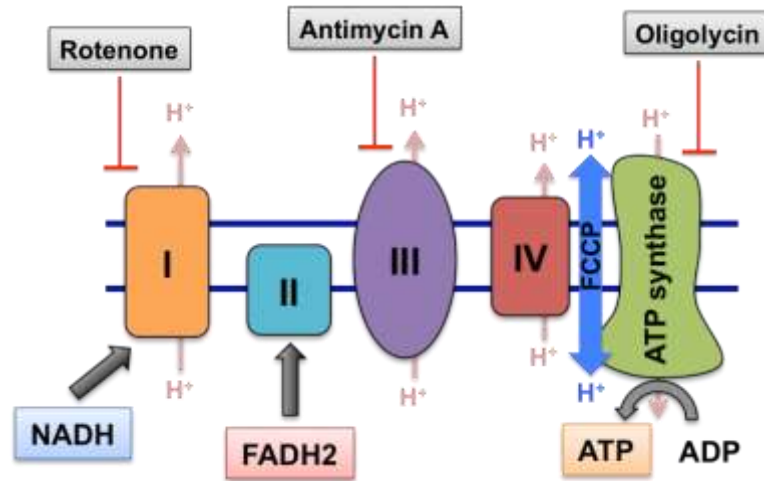
將胰臟癌細胞株：Capan-1、Su.86.86、CFPAC-1、AsPC-1、PANC1、MIA PaCa-2 六種細胞株進行培養，待其穩定生長後製作細胞抽取物。加入 RIPA 後刮取細胞並以超音波震盪儀 (sonicator) 破壞細胞膜，離心及抽取後進行蛋白定量，以西方墨點法分離不同分子量之蛋白，並加入一級抗體及二級抗體辨認後，觀察 HER2、EZH2、GOT2 含量比較。



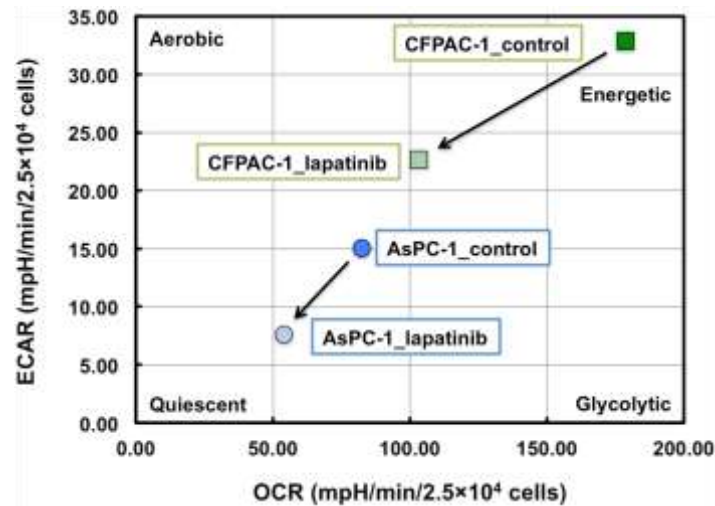
圖七. CFPAC-1 胰臟癌細胞 GOT2 活性較 AsPC-1 高。

將胰臟癌細胞株 AsPC-1 及 CFPAC-1 兩種細胞，以 GOT activity assay 觀察 GOT2 活性表現，在固定細胞數下觀察活細胞 GOT2 反應活性能力，以 O.D.值 450nm 測量吸光值及繪製回歸直線並求得 glutamate 濃度，比較在細胞基礎狀態下 GOT2 活性表現，並觀察與 HER2、EZH2 及 GOT2 蛋白表現含量是否具有正相關性。

(A)



(B)



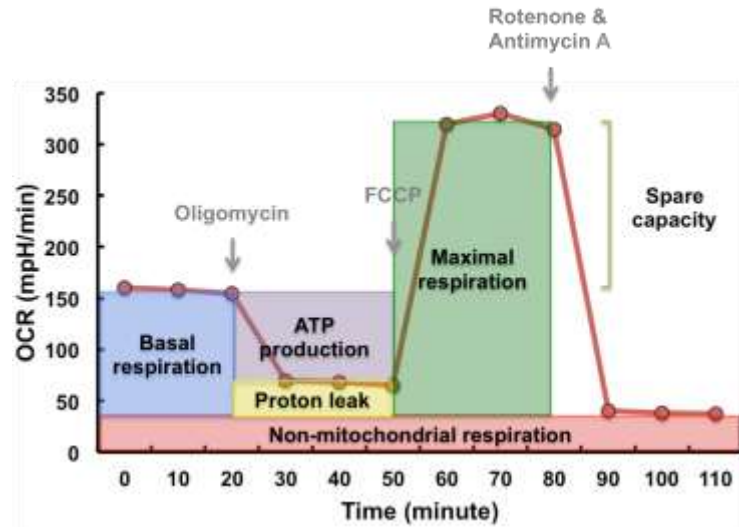
圖八. Lapatinib 處理會降低胰臟癌細胞能量代謝。

(A)粒線體電子傳遞鏈示意圖

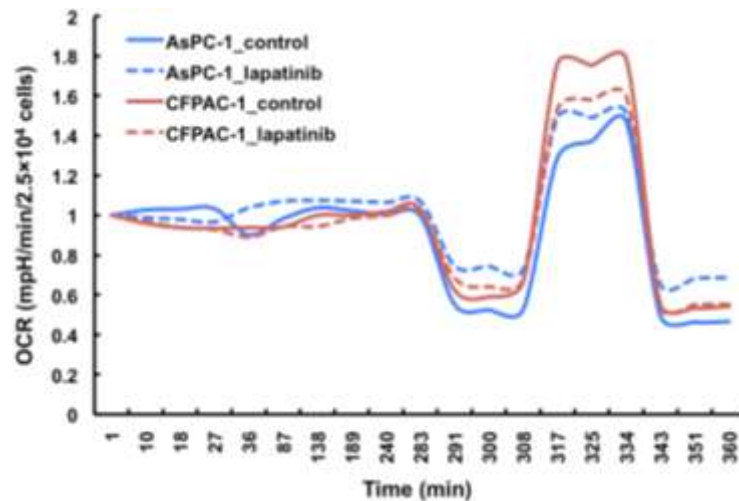
(B)AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞計數 2.5×10^4 顆細胞培養於 Seahorse XF24 細胞專用培養盤，隔日利用 Seahorse XF24e Analyzer 偵測細胞能量代謝現象。

AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞在處理 lapatinib 4 小時後，可觀察到細胞能量代謝現象受 lapatinib(HER2 抑制劑)所影響，其 OCR 值及 ECAR 值皆為下降之趨勢，顯示其耗氧量及 H⁺ 離子受 lapatinib 調控，呈現下滑之趨勢。

(A)



(B)



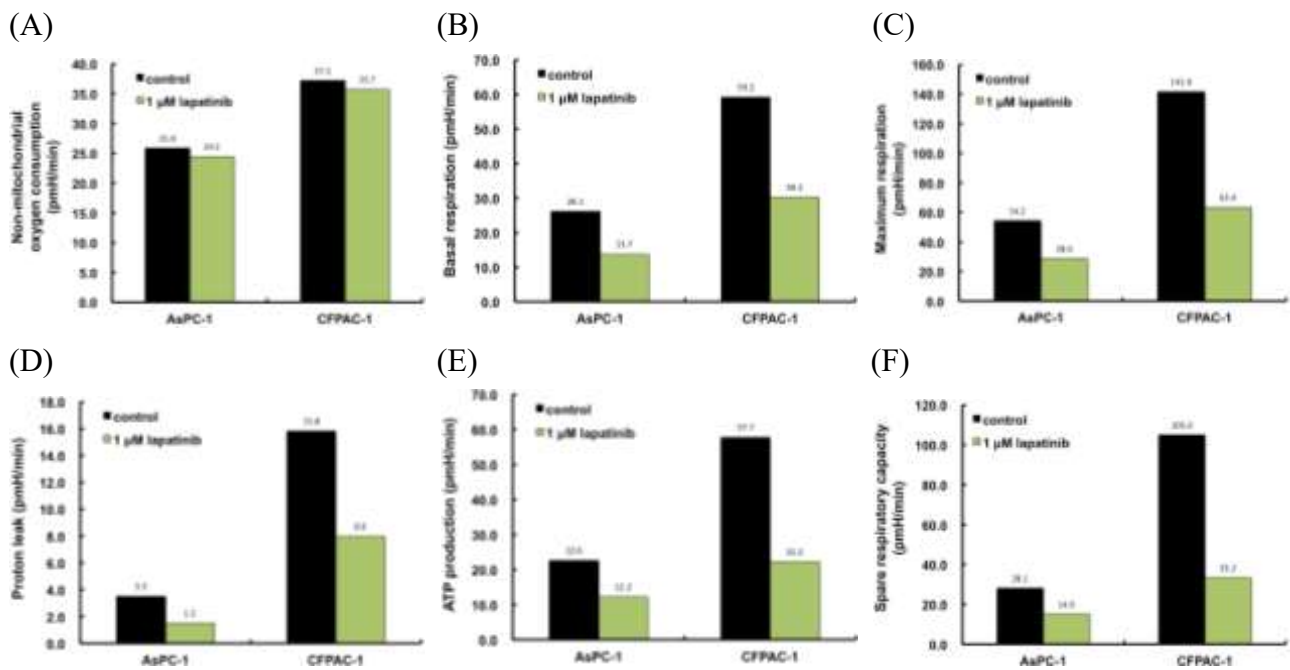
圖九. Lapatinib 處理會降低 CFPAC-1 胰臟癌基礎粒線體功能，但不影響 AsPC-1 胰臟癌細胞。

處理 lapatinib 4 小時後，各細胞基礎粒線體功能參數結果：

(A) 細胞外流量粒線體應激試驗參數示意圖

(B) 處理 lapatinib 4 小時後，胰臟癌細胞 OCR 整體現象

AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞在處理 lapatinib 4 小時後，可觀察藥物影響各細胞能量代謝現象，且 CFPAC-1 胰臟癌細胞在 lapatinib 處理後，基礎粒線體功能降低程度較 AsPC-1 胰臟癌細胞明顯，顯示其趨勢差異。



圖十. Lapatinib 處理會減少胰臟癌細胞整體的粒線體功能。

處理 lapatinib 4 小時後，各細胞外流量粒線體應激試驗參數結果：

(A)非粒線體氧氣攝取作用(Non-mitochondrial oxygen consumption)

(B)基礎粒線體呼吸作用(Basal respiration)

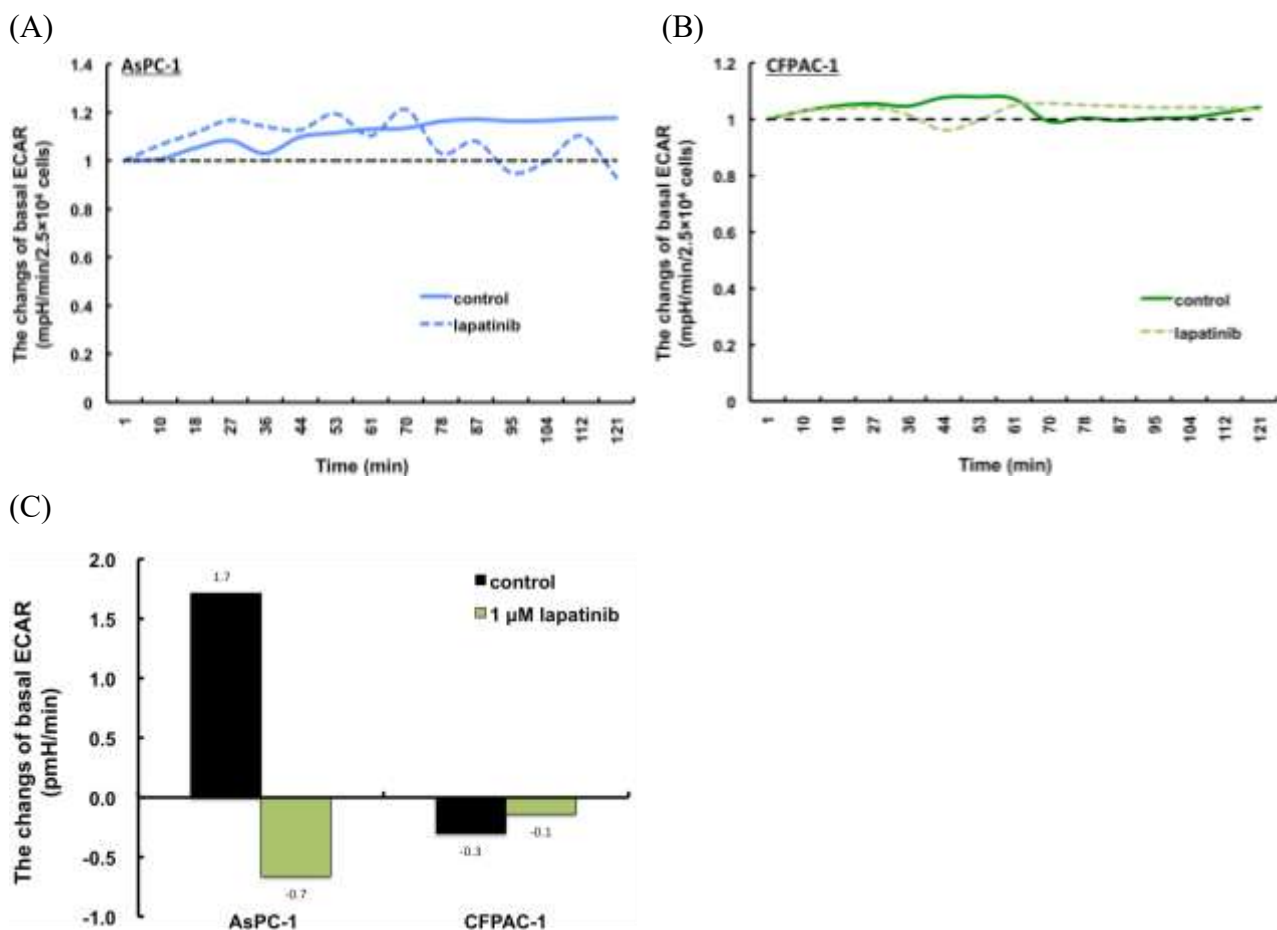
(C)粒線體最大呼吸作用(Maximum respiration)

(D)離子流出現象(Proton leak)

(E)ATP 產生量(ATP production)

(F)粒線體備用呼吸能力(Spare respiratory capacity)

AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞在處理 lapatinib 4 小時後，可觀察藥物處理抑制胰臟癌細胞整體的粒線體功能，且對於其他胞內代謝作用並無太大影響，驗證 AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞內呼吸作用皆會受 lapatinib 抑制，進而減少胰臟癌細胞整體的粒線體功能，影響呼吸傳遞鏈現象產生。



圖十一. Lapatinib 處理會減少 AsPC-1 胰臟癌細胞糖解作用能力，但不影響 CFPAC-1 胰臟癌細胞。

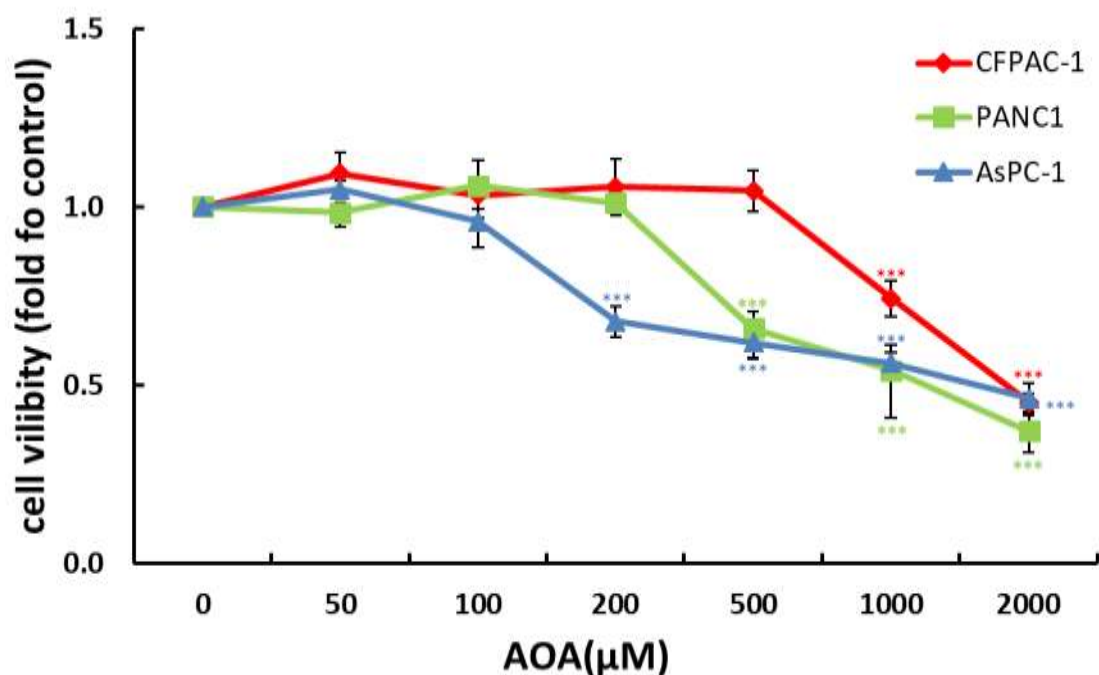
處理 lapatinib 4 小時後，各細胞糖解作用能力參數結果：

(A) 胰臟癌細胞 basal ECAR 受影響程度於 AsPC-1 胰臟癌細胞

(B) 胰臟癌細胞 basal ECAR 受影響程度於 CFPAC-1 胰臟癌細胞

(C) AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞量化圖

AsPC-1 和 CFPAC-1 胰臟癌細胞在處理 lapatinib 後，可觀察各細胞糖解作用能力，AsPC-1 胰臟癌細胞糖解作用能力降低程度，較 CFPAC-1 胰臟癌細胞明顯。且由於胞內呼吸傳遞鏈及糖解作用為拮抗作用，故可由圖十一與前述比較得此現象。



圖十二. AOA 抑制 GOT2 對於胰臟癌細胞 EZH2 含量產生不同細胞毒殺效果。

(* : p value < 0.05, ** : p value < 0.01, *** : p value < 0.001)

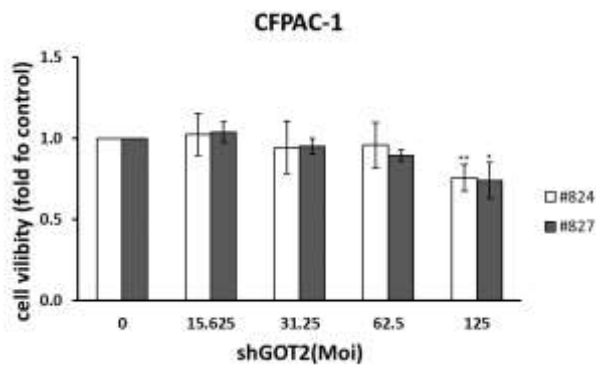
在 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 三組不同胰臟癌細胞中，加入 GOT2 抑制劑 AOA 處理 72 小時，並以 MTT assay 實驗方法測試，去除培養液，以含 1%Crystal violet 之 30% ethanol 染色，置乾後已冰醋酸溶解結晶體，並已 ELISA reader 判讀實驗組與控制組吸光值的差異。

cell	IC50-AOA(μl)
CFPAC-1	2081
PANC1	1101
AsPC-1	828

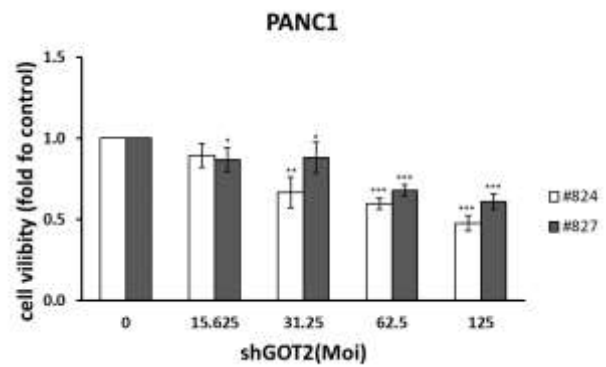
表二. 胰臟癌細胞 EZH2 含量產生不同細胞半存活濃度(IC50)與細胞毒殺效果。

在 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 三組不同胰臟癌細胞中，加入 GOT2 抑制劑 AOA 處理 72 小時，並以 MTT assay 實驗方法測試三重複後製作二維對數函數曲線，判斷細胞半存活所需之 AOA 藥品濃度，即細胞存活率恰達 50%時所需之 AOA 藥品濃度。

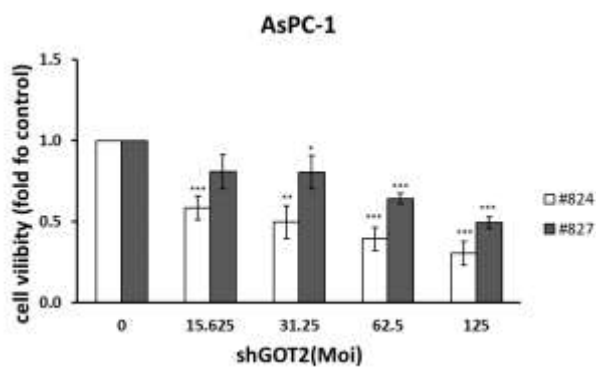
(A)



(B)



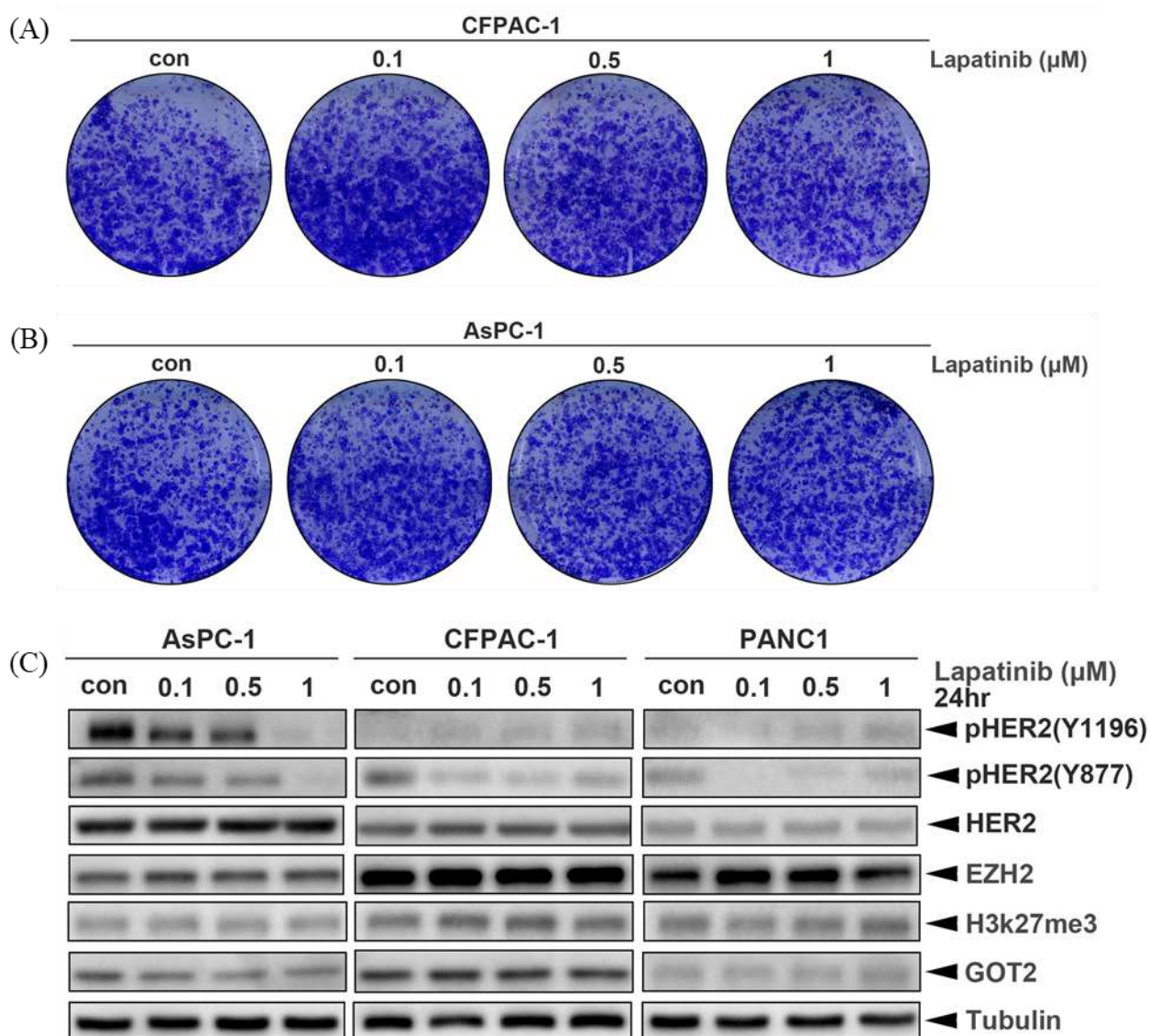
(C)



圖十三. 以 shRNA 慢病毒抑制 GOT2 對於胰臟癌細胞毒殺效果。

(*: p value < 0.05, **: p value < 0.01, ***: p value < 0.001)

在 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 三組不同胰臟癌細胞中，加入 shRNA 慢病毒抑制 GOT2 處理 72 小時，並以 MTT assay 實驗方法測試，去除培養液，以含 1%Crystal violet 之 30% ethanol 染色，置乾後已冰醋酸溶解結晶體，並已 ELISA reader 判讀實驗組與控制組吸光值的差異。



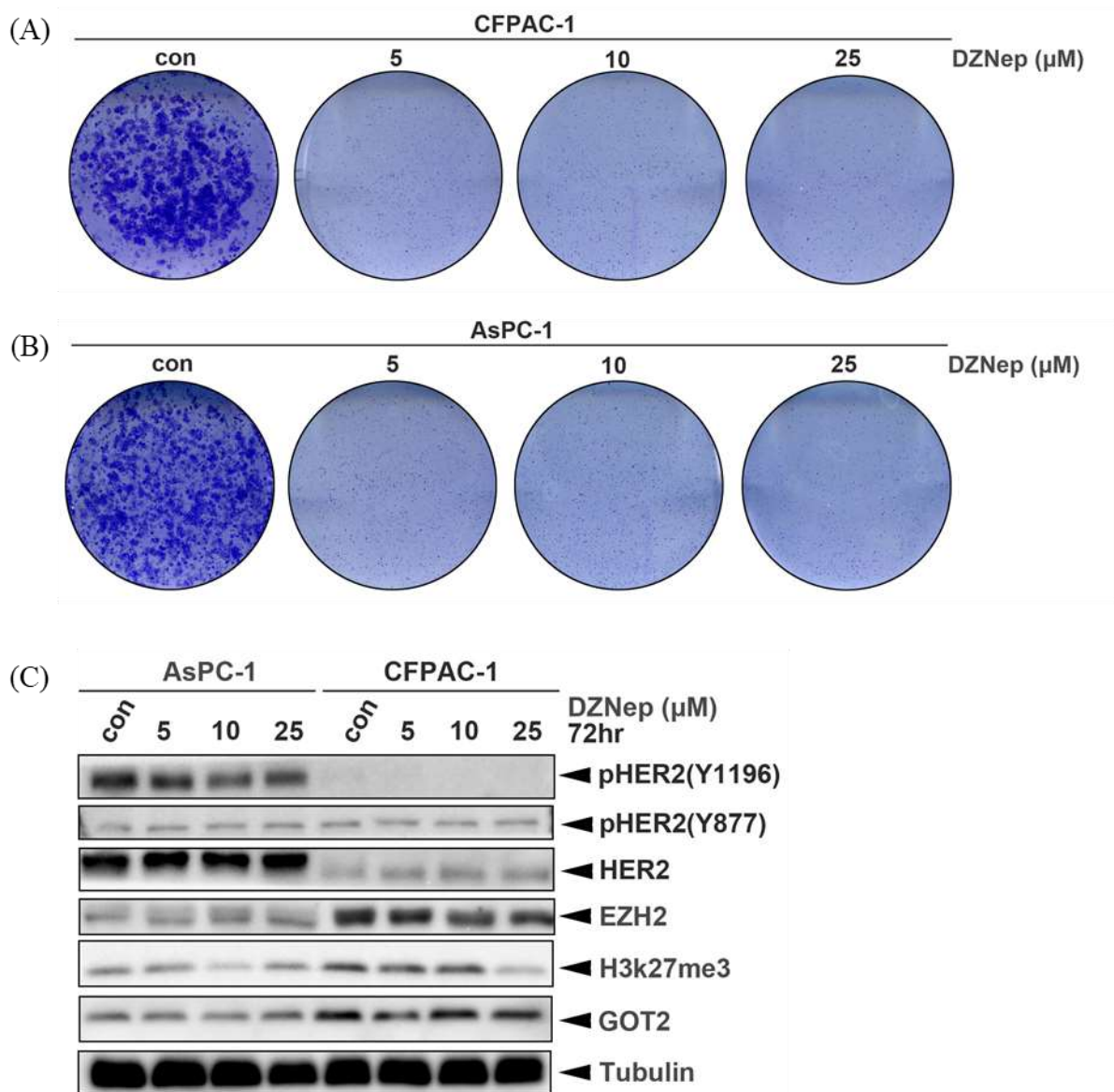
圖十四. Lapatinib 處理對於 HER2、EZH2、GOT2 蛋白表現量無明顯影響。

(A) CFPAC-1 胰臟癌細胞 Lapatinib 處理細胞成株現象

(B) AsPC-1 胰臟癌細胞 Lapatinib 處理細胞成株現象

(C) 胰臟癌細胞 Lapatinib 處理 24 小時蛋白含量表現

將 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 三組不同胰臟癌細胞株進行培養，待其穩定生長後製作細胞抽取物加入 HER2 抑制劑 Lapatinib 處理 24 小時。再加入 RIPA 後刮取細胞並以超音波震盪儀(sonicator)破壞細胞膜，離心及抽取後進行蛋白定量，以西方墨點法分離不同分子量之蛋白，並加入一級抗體及二級抗體辨認後，觀察 pHER2(Y1196)、pHER2(Y877)、HER2、EZH2、H3k27me3、GOT2 含量比較。Tubulin 作為蛋白量標準比較。



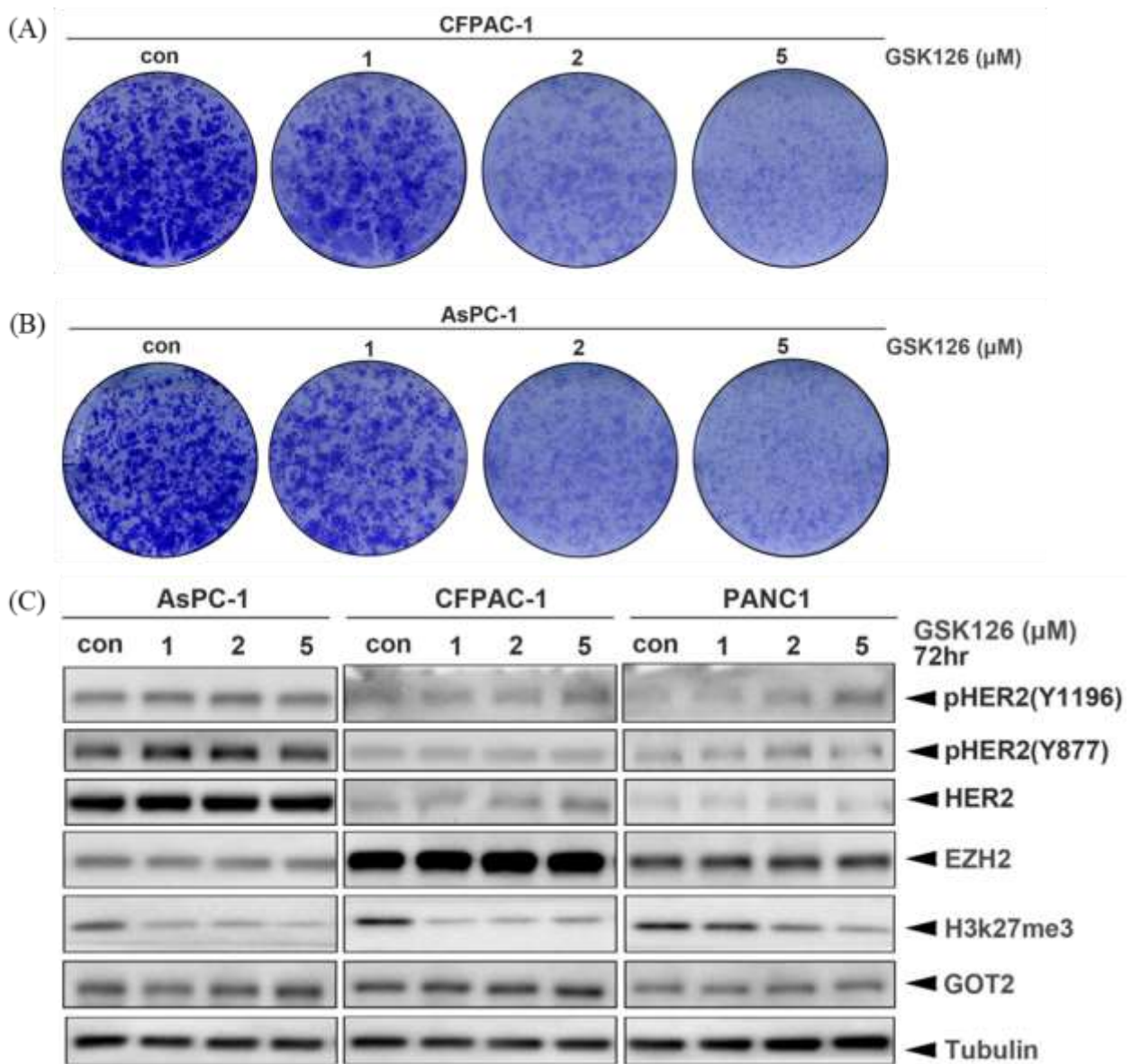
圖十五. DZNep 處理對於 GOT2 蛋白表現量無明顯影響。

(A) CFPAC-1 胰臟癌細胞 DZNep 處理細胞成株現象

(B) AsPC-1 胰臟癌細胞 DZNep 處理細胞成株現象

(C) 胰臟癌細胞 DZNep 處理 72 小時蛋白含量表現

將 AsPC-1、CFPAC-1 兩組不同胰臟癌細胞株進行培養，待其穩定生長後製作細胞抽取物加入 EZH2 抑制劑 DZNep 處理 72 小時。再加入 RIPA 後刮取細胞並以超音波震盪儀(sonicator)破壞細胞膜，離心及抽取後進行蛋白定量，以西方墨點法分離不同分子量之蛋白，並加入一級抗體及二級抗體辨認，觀察 pHER2(Y1196)、pHER2(Y877)、HER2、EZH2、H3k27me3、GOT2 含量比較。Tubulin 作為蛋白量標準比較。



圖十六. GSK126 處理對於 GOT2 蛋白表現量無明顯影響。

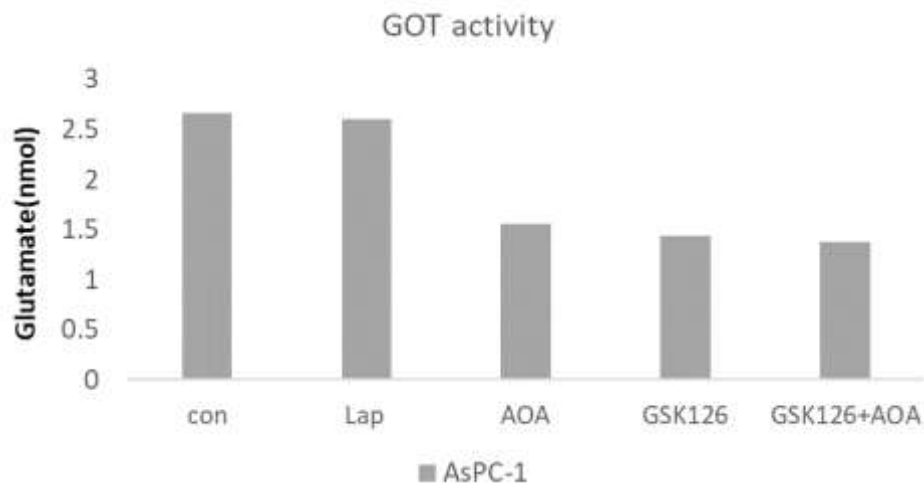
(A) CFPAC-1 胰臟癌細胞 GSK126 處理細胞成株現象

(B) AsPC-1 胰臟癌細胞 GSK126 處理細胞成株現象

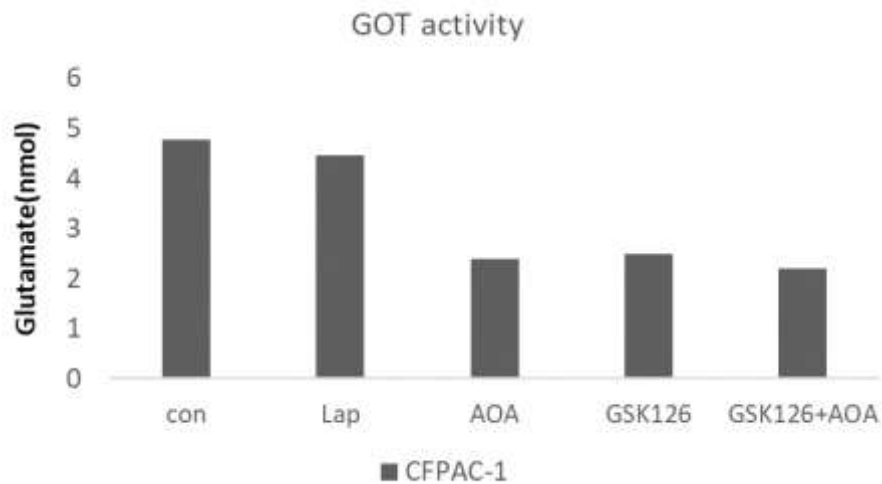
(C) 胰臟癌細胞 GSK126 處理 72 小時蛋白含量表現

將 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 三組不同胰臟癌細胞株進行培養，待其穩定生長後製作細胞抽取物加入 EZH2 抑制劑 GSK126 處理 72 小時。再加入 RIPA 後刮取細胞並以超音波震盪儀 (sonicator) 破壞細胞膜，離心及抽取後進行蛋白定量，以西方墨點法分離不同分子量之蛋白，並加入一級抗體及二級抗體辨認後，觀察 pHER2、HER2、EZH2、H3k27me3、GOT2 含量比較。Tubulin 作為蛋白量標準比較。

(A)



(B)

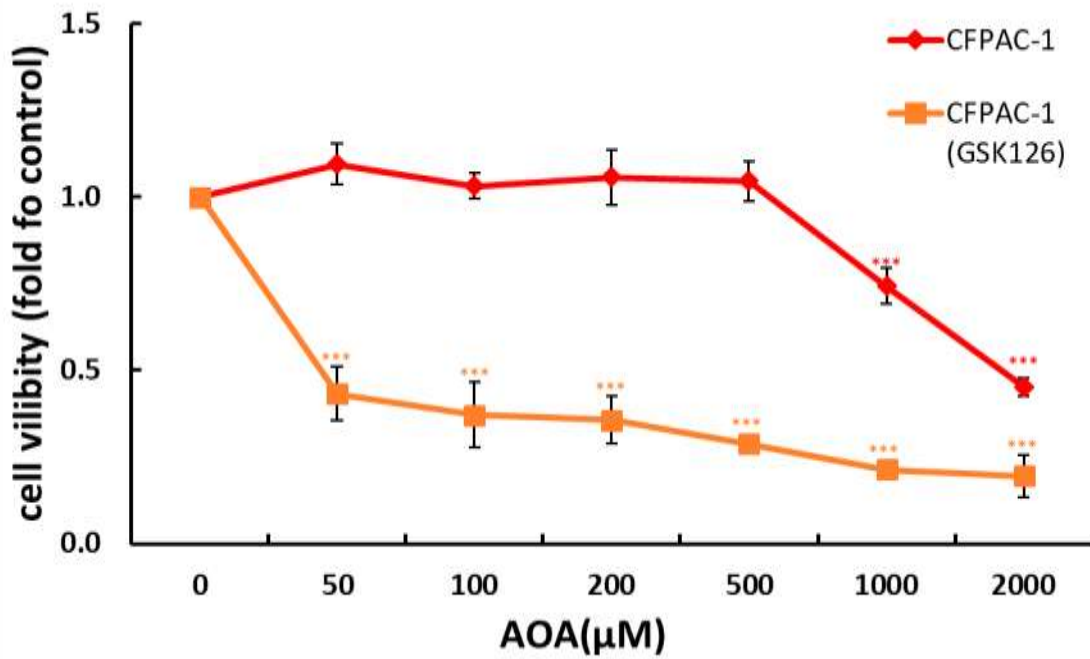


圖十七. GSK126 及 AOA 處理會抑制並降低 GOT2 活性，Lapatinib 則否。

(A) AsPC-1 胰臟癌細胞 GOT2 活性表現

(B) CFPAC-1 胰臟癌細胞 GOT2 活性表現

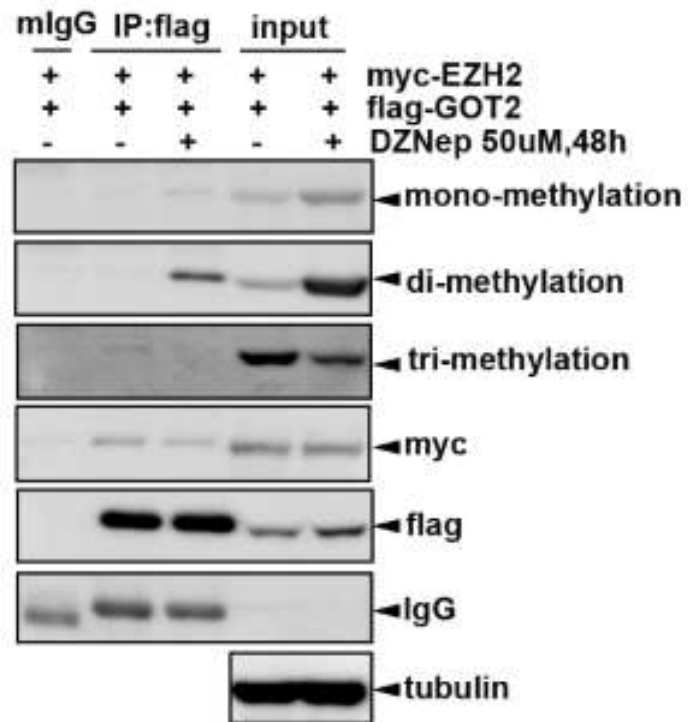
對於 AsPC-1、CFPAC-1 兩組不同胰臟癌細胞，加入 HER2 抑制劑 Lapatinib (1 μ M)、GOT2 抑制劑 AOA (1000 μ M)、EZH2 抑制劑 GSK126 (5 μ M) 與 GSK126 (2 μ M) 及 AOA (200 μ M) 合併加成處理 72 小時，以 GOT activity assay 觀察 GOT2 活性表現，在固定細胞數下觀察活細胞 GOT2 反應活性能力，以 O.D. 值 450nm 測量吸光值及繪製回歸直線並求得 glutamate 濃度，比較在細胞基礎狀態下 GOT2 活性表現，並觀察與 HER2、EZH2 及 GOT2 蛋白表現含量，以及與前述研究細胞毒殺效果能力測試是否具有正相關性。



圖十八. GSK126 與 AOA 加成對於高度 EZH2 表現胰臟癌細胞產生明顯細胞毒殺效果。

(* : p value < 0.05, ** : p value < 0.01, *** : p value < 0.001)

在 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 三組不同胰臟癌細胞中，加入 EZH2 抑制劑 GSK126 與 GOT2 抑制劑 AOA 合併加成處理 72 小時，並以 MTT assay 實驗方法測試，去除培養液，以含 1%Crystal violet 之 30% ethanol 染色，置乾後已冰醋酸溶解結晶體，並已 ELISA reader 判讀實驗組與控制組吸光值的差異。



圖十九. EZH2 與 GOT2 結合並甲基化 GOT2

在 293T 細胞中外送 myc-EZH2 和 flag-GOT2，再給予 EZH2 抑制劑 DZNep 50 μ M 48 小時。將細胞檢體用免疫沉澱法將帶有 flag 的 GOT2 蛋白分離出來，再利用西方墨點法觀察 flag-GOT2 和 myc-EZH2 的交互作用，以及 flag-GOT2 上不同程度甲基化的變化。

四、結論與應用

結論

(一) 探討 HER2 表現是否影響 GOT2 抑制對胰臟癌細胞之死亡作用。

1. 分析胰臟癌及胃癌患者 mRNA 臨床資料分析，證實 HER2、EZH2 及 GOT2 表現具有臨床意義，亦可發現三者調控作用及對患者存活率影響。
2. 篩選 HER2 不同表現量胰臟癌細胞，分別選用 AsPC-1、CFPAC-1、PANC1 胰臟癌細胞三者作為 HER2 高度、中度、低度表現作為後續實驗研究對象。
3. 比較 AsPC-1、CFPAC-1 胰臟癌細胞基礎 GOT2 活性表現，觀察得與 EZH2 及 GOT2 蛋白含量表現具有正相關性，以供後續實驗比較之基礎。
4. 驗證 Lapatinib 處理(HER2 抑制劑)對於癌細胞耗氧量及氫離子濃度產生影響，顯示其導致癌細胞 glutamine 代謝作用及糖解作用效果之變化。
5. 驗證 AOA 處理(GOT2 抑制劑)對於癌細胞毒殺效果及細胞半存活濃度產生影響，隨著藥品濃度增加細胞存活率降低，顯示趨勢所在，並發現 EZH2 含量多寡呈現正相關。
6. 驗證 shGOT2(GOT2 knockdown)對於癌細胞毒殺效果產生影響，隨著 sh 慢病毒量增加而細胞存活率降低，顯示趨勢所在，並發現 EZH2 含量多寡呈現正相關。

(二) HER2/EZH2 是否藉由甲基化 GOT2 調控 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環。

1. 在加入 Lapatinib 處理對於胰臟癌細胞生長情形無明顯影響，細胞成株效果沒有與藥品濃度趨勢相關的明顯差異，也不影響整體蛋白質表現。
2. 在加入 DZNep 與 GSK126 處理(EZH2 抑制劑)會對於胰臟癌細胞生長情形產生影響，細胞成株效果有與藥品濃度增加趨勢而減少，但也不影響整體蛋白質表現。
3. 比較 AOA、GSK126 處理降低胰臟癌細胞粒腺體內 GOT2 活性表現，顯示 glutamate 濃度因 GOT2 活性下降而降低，推得 EZH2 具有調控 GOT2 表現活性之現象。
4. 驗證 GSK126 與 AOA 兩種藥物合併處理對於癌細胞毒殺效果有明顯差異，可達到加成抑制的作用，顯示 GOT2 活性與 EZH2 活性之間的交互作用關係。
5. 證實 EZH2 與 GOT2 確實存在交互作用關係，透過 EZH2 與 GOT2 結合並甲基化 GOT2 而調控其作用，顯示 EZH2 與 GOT2 參與胰臟癌細胞 glutamine 代謝機制重要角色。

應用

(一) EZH2 與 GOT2 交互作用關係與 glutamine 代謝途徑參與是為醫療用藥水平之建議。

在研究階段中，本研究發現 GOT2 的活性表現與 HER2 表現較無明顯相關性；然而，與 EZH2 的表現量存有關聯性，同時亦證實 EZH2 會甲基化 GOT2，推測 EZH2 會透過甲基化修飾 GOT2 而改變其結構，導致其對於藥品產生較大抗性。在未來後續研究可觀察最佳藥品效價，包含作用位點探討以及多重變因下的調控路徑變化，瞭解深層機制及調控途徑，提供不同癌細胞惡化時期之胰臟癌患者用藥建議量，以降低醫療成本及患者服藥負擔。

(二) 本研究寄望提供對於預後極差的胰臟癌相關現象觀察及成因解釋。

研究過程中發現在加入 HER2 或 EZH2 抑制劑的實驗組中，皆需較高劑量之藥品濃度才可抑制效果，相較於他種癌別，胰臟癌確實是毒性較高、且缺乏治療對策的癌症種類。

於機制層面，HER2 會藉由磷酸化 EZH2 以提高其活性，促使 EZH2 甲基化 GOT2 並與之結合以強化其參與胰臟癌細胞 glutamine 代謝反應的活性及反應速率，透過 HER2/EZH2/GOT2 三者之間訊息傳遞途徑，以提供癌細胞高增殖速度之能量需求。

綜合上述現象及研究成果，推測 HER2 藉由磷酸化 EZH2 而強化其表現活性，進一步促使 EZH2 甲基化修飾能力增強；而甲基化修飾過後 GOT2 改變其結構，導致其對於藥品產生較大抗性。若能克服如此現象並搭配現今醫療研究技術應用，將是胰臟癌治療的新高度。

(三) 可作為胰臟癌惡化的生物標記，進一步給予適當治療模式及應變措施

本研究未來可拓展至胰臟癌治療策略上，觀察病患體內 HER2、EZH2 及 GOT2 三者的表現情形是否異常或為過度表現，作為生物標誌與資料庫分析，進行分類並篩選出多重類別患者族群，給予適當用藥和密切治療關注，期望能對於目前高侵略性、高致死率、以及末期才會被發現的胰臟癌提供治療方針，運用並擴展至同為特定基因高度表現之癌別水平。

五、參考資料（文獻）及其他

1. Cohen, R., et al., *Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma*. Oncotarget, 2015. 6(19): p. 16832-47.
2. Yang, S., et al., *Mitochondrial glutamine metabolism via GOT2 supports pancreatic cancer growth through senescence inhibition*. Cell Death Dis, 2018. 9(2): p. 55.
3. Yang, H., et al., *SIRT3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth*. EMBO J, 2015. 34(8): p. 1110-25.
4. Lei, S., et al., *Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival*. Int J Pancreatol, 1995. 17(1): p. 15-21.
5. Youngblood, V.M., et al., *The Ephrin-A1/EPHA2 Signaling Axis Regulates Glutamine Metabolism in HER2-Positive Breast Cancer*. Cancer Res, 2016. 76(7): p. 1825-36.
6. Simon, J.A. and C.A. Lange, *Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics*. Mutat Res, 2008. 647(1-2): p. 21-9.

【評語】 090005

在探討 HER2/EZH2 訊息傳遞途徑是否影響 GOT2 抑制對胰臟癌細胞之死亡作用，以及 HER2/EZH2 是否藉由甲基化 GOT2 調控 glutamine 代謝與 malate-Aspartate 循環，找尋出 HER2 是否藉由 EZH2 調控 GOT2 活性而參與癌細胞 glutamine 代謝反應，觀察 HER2、EZH2、GOT2 訊息傳遞途徑。研究結果發現細胞生長作用與 EZH2 表現較 HER2 表現具有相關性，並證實 EZH2 與 GOT2 確實存在交互作用關係，透過 EZH2 與 GOT2 結合並甲基化 GOT2 而調控其作用，增加活性表現與抗藥效果，顯示 EZH2 與 GOT2 參與胰臟癌細胞 glutamine 代謝機制重要角色。

1. 實驗數據充實，但是，是否能解釋所提的假說，還有待更多的實驗證據。
2. 宜突顯本實驗新發發現的地方，畢竟類似方向已有人報導。
3. 數據的呈現方式有待改，使得海報讓人更容易了解。