

科技部補助專題研究計畫報告

高糖微環境引起發炎反應有關的FPR1之子宮內膜癌研究

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 109-2629-B-182A-002-
執行期間：109年08月01日至110年07月31日
執行單位：長庚醫療財團法人婦產科

計畫主持人：趙安琪
共同主持人：黃聰龍、林嘉鴻

計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 110 年 11 月 01 日

中文摘要：在臺灣子宮內膜癌是女性發生率最快速上升且年輕化的惡性腫瘤之一，僅次於乳癌、肺癌與甲狀腺癌，而造成子宮內膜癌急遽增加的風險因子主要是肥胖造成相關合併症如：糖尿病、代謝症候群和高胰島素血症。

甲醯胜肽受體(FPR1)參與細胞發炎、癌症發生和感染有關，同時FPR1在許多癌細胞中有大量表現；我們合作的團隊也針對FPR1與發炎做了詳細的回顧。然而，目前尚未有文獻報導FPR1在子宮內膜癌的角色，再加上越來越多證據顯示FPR1造成癌症的發生是經由發炎過程所造成的。

因此本研究目標是要探討高糖微環境引起發炎反應有關的FPR1之子宮內膜癌研究，其具體目標（1）探討高糖環境與子宮內膜癌發炎反應的關係是否透過FPR1的路徑；（2）子宮內膜癌細胞上FPR1與腫瘤細胞生存的關係；並包括FPR1抑制的母鼠模型驗證（3）子宮內膜癌整體存活率與FPR1、糖尿病有無、嗜中性白血球與淋巴球比值(NLR)的關係。

我們的結果顯示在子宮內膜癌FPR1 幾乎不表現，加入高糖也不會因此增加FPR1的表現，反而在高糖環境中，在子宮內膜癌細胞株模式下，誘導增加LSD1表現，先前我們也已經發表文獻指出LSD1在癌化過程所扮演的角色，在這個計畫支持下，我們證實高糖會增加LSD1表現，最後導致癌細胞增生；因此標靶LSD1的活性可以有機會提供做為治療子宮內膜癌病人的選擇（已在Antioxidants雜誌投稿中）。

中文關鍵詞：子宮內膜癌、甲醯胜肽受體、高糖、LSD1

英文摘要：Endometrial cancer is one of the five most fast-rising malignancies and tending to be young onset after breast, lung, and thyroid carcinoma in Taiwan population. Many factors are considered as risk factors for endometrial cancer such as obesity-related comorbidities diabetes, metabolic syndrome and hyperinsulinemia. N-formyl peptide receptor 1 (FPR1) is involved in inflammation, cancer, and infection. Overexpressed FPR1 is associated with tumor progression in various cancers. Moreover, accumulating evidence demonstrates that FPR1 contributes to tumor progression by mediating tumor cell proliferation via promoting inflammation. Our team collaborator has reviewed FPR1-related inflammatory processes. However, the role of FPR1 in tumorigenesis of endometrial cancer remains unclear. The aim of this study is to investigate whether high glucose stimulates inflammation by increasing the expression and function of FPR1 in endometrial cancer specifically (1) to investigate high glucose-induced inflammation through FPR1; (2) to determine the correlation

between FPR1 expression and cancer cells viability along with female mice model (3) to analyze the association between FPR1 and neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) in diabetic and non-diabetic patients with endometrial cancer, and whether FPR1 is a prognostic factor in endometrial cancer.

Our data showed that FPR1 did not express in endometrial cancer under high glucose condition. However, we found that LSD1 protein levels were increased in higher glucose media. Since the expression levels of LSD1 is associated with tumorigenesis and considered as an oncoprotein as in our previous report (Oncotarget 2017). The results of this study unraveled LSD1 plays an important role in the development of endometrial cancer under high glucose condition. Targeting LSD1 activity may thus have potential roles in the management of endometrial cancer patients (Antioxidants, submitted).

英文關鍵詞：Endometrial cancer ; FPR1 ; high glucose 、LSD1

報告內容：包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議、執行計畫過程遇到之困難或阻礙）等。

前言

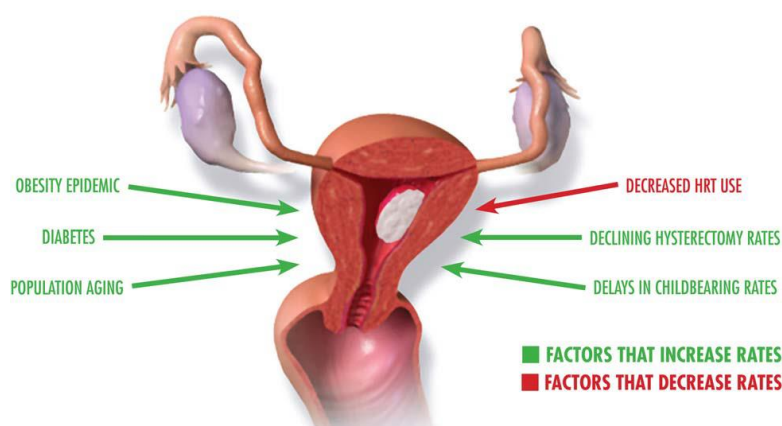
子宮內膜癌案例在台灣急速增加並且年輕化

子宮內膜癌(Endometrial cancer)是指從子宮體的內膜所產生出來的癌症，發生在平均年齡 55 歲的女性，近年來許多國家都在增加且有年輕化的趨勢(Lortet-Tieulent, Ferlay et al. 2018)。在美國，子宮內膜癌的發生率在 2007 至 2016 年以每年 1.3%增長(Lortet-Tieulent, Ferlay et al. 2018, Siegel and Miller 2020)，在台灣也是在增加中。2012 年 10 萬分之 16.6，在 2015 年發生率根據衛福部統計為 10 萬分之 20.7，在所有女性癌症中排名第六位(2017)。在長庚醫院北院區近十年婦癌登記人數表中，可以觀察到子宮體癌，近十年急遽增加，由 2009 年 200 位竄升到 2018 年的 300 位。

子宮內膜癌的危險因子

子宮內膜癌的危險因子包括老年、早於12歲有初經、晚於55歲停經、接受口服賀爾蒙治療、肥胖，糖尿病、多囊性卵巢及子宮內膜癌家族史(圖一)(McAlpine, Temkin et al. 2016)。

圖一：增加子宮內膜癌風險之可能因子(McAlpine, Temkin et al. 2016)

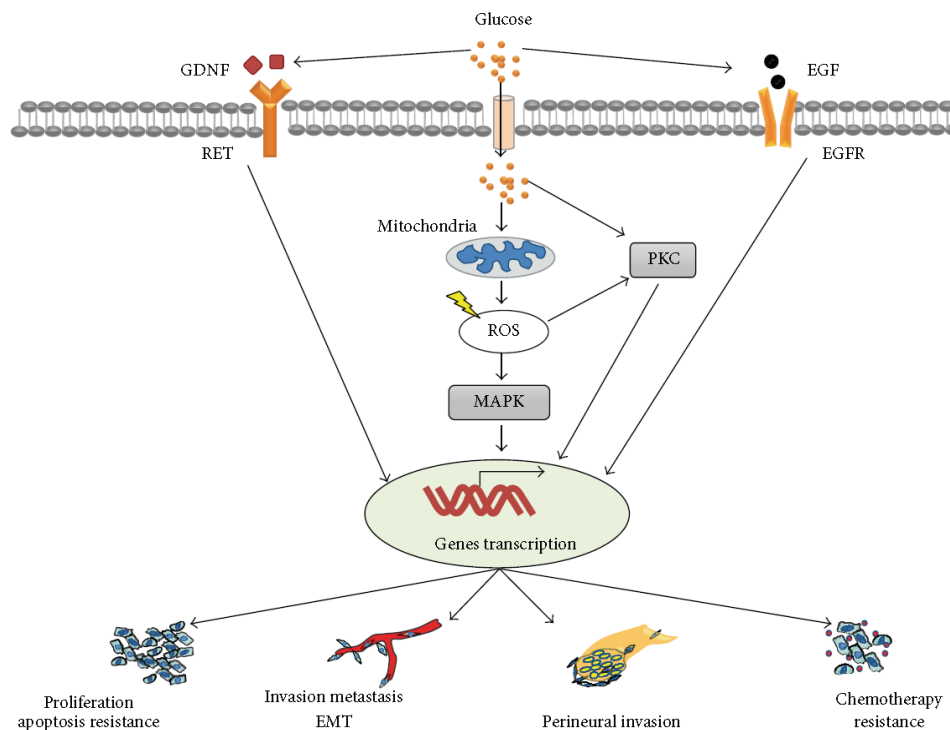


資料來源自 Cancer, 2016 (McAlpine, Temkin et al. 2016)

所有的危險因子中，代謝症候群是隨著近年來的肥胖人口增加造成子宮內膜癌

重要的原因。高血糖 (hyperglycemia)、高血壓(hypertension)及高血脂 (hyperlipidemia)與子宮內膜癌發生率也有相關(McAlpine, Temkin et al. 2016)。其中高血糖的病患發生子宮內膜癌的比率比血糖正常者高出2.12倍，而體重超重 (BMI \geq 25 kg/m²)的子宮內膜癌發生率則高於正常者2.45倍。若體重超重又加上高血壓，則罹癌機率比正常者高出3.5倍 (Duan, Shen et al. 2014, Yang and Wang 2019)。高血糖將會增加reactive oxygen species (ROS)的產生，上升的ROS會造成DNA 突變，進而促進細胞的癌化，活化下游的MAPK 訊號傳遞，使得腫瘤細胞增生、轉移甚至造成對化療藥物的抗藥性(圖二) (Duan, Shen et al. 2014, Lee and Chan 2015)。雖然目前可以看到很多臨床研究認為糖尿病與子宮內膜癌有正相關的關係(Rosato, Zucchetto et al. 2011, Liao, Zhang et al. 2014, Lee, Martinez-Outschoorn et al. 2018)，但對於高血糖對子宮內膜癌的致病機轉目前並不清楚，所以我們有必要去研究並了解相關的分子機制。

圖二、高血糖對腫瘤細胞訊號傳遞的影響



資料資源自 BioMed Research International, 2014(Duan, Shen et al. 2014)

代謝症候群及發炎反應與子宮內膜癌有關

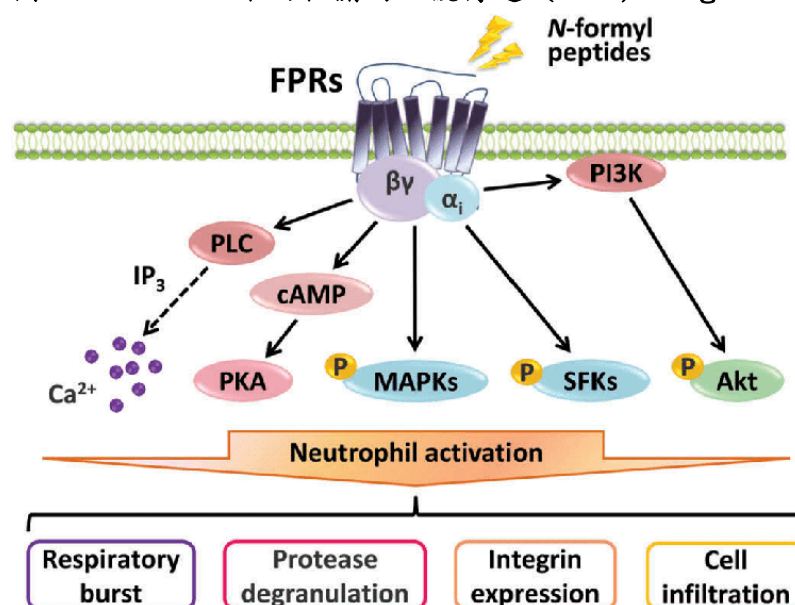
代謝症候群除了直接影響腫瘤細胞本身而造成腫瘤的發展外，對於腫瘤細胞的微環境(microenvironment)也有相當程度的影響。不正常數量的代謝產物將影響到不只是腫瘤細胞，包括免疫細胞造成發炎反應進而促進腫瘤細胞的生長(Heidari, Rabizadeh et al. 2019, Yang and Wang 2019)。Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR)在之前的相關研究發現與癌症的預後和存活率相關。在子宮內膜癌的患者當中，如果伴隨著有糖尿病 (Liao, Zhang et al. 2014)、高NLR對病人整體存活率較差(Aoyama, Takano et al. 2019)。另外，在卵巢癌的研究中發現，卵巢癌細胞將會促進Neutrophil的增生及活化，而其所造成的發炎反應會促進卵巢癌細胞轉移到周邊的網膜(omentum)。而抑制細胞微環境中的發炎反應能降低癌細胞的生長及轉移(Lee, Ko et al. 2019)，所以neutrophil所引發的發炎反應在腫瘤為環境中扮演了很重要的角色，我們想要進一步探討發炎反應在子宮內膜癌中扮演的角色。

FPR1與癌症相關

FPRs為七次穿膜之受體 (seven transmembrane receptors)屬於 G 蛋白耦聯受體 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的一種，GPCR 依據功能不同和活化的路徑不同可分成四類，包含：G_s、G_i、G_q、G₁₂G₁₃(He and Ye 2017, Weiss and Kretschmer 2018)；另外 FPRs 可分為三種類型，分別為 FPR1 及另外兩種類似於FPR1 (FPR1-like)：FRP2 (早期稱為 FPRL1) 和 FRP3 (早期稱為 FPRL2)，其中 FPR1 與 FPR2 具有69%的胺基酸序列相似度，FPR1 與 FPR3 則有 56%相似度。雖然 FPR1、FPR2 及 FPR3 之間分別具有相似的胺基酸序列，但它們會與不同的活化劑結合作用是一個細胞表面的接受器，在發炎反應中扮演重要的角色。通常出現在血球細胞的表面等。我們回顧當FPR1受到刺激物的刺激 (如細菌胜肽: *N*-formyl -methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF))時，將會活化下游的phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), transcription factor nuclear factor (NF)- κ B (Liu, Ma et al. 2012, Snapkov,

Oqvist et al. 2016, Tsai, Yang et al. 2016) ，促進免疫細胞生長並移動並促進 reactive oxygen species(ROS)及 nitric oxide(NO)的釋放(Zhang, Wang et al. 2017) ，其他跟FPR1相關的下游訊號傳遞如圖三 (Tsai, Yang et al. 2016) 。

圖三、FPR1以及下游相關的訊號傳遞 (Tsai, Yang et al. 2016)



資料來源自 Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2016 (Tsai, Yang et al. 2016)

除了血球細胞外， FPR1會表現在多種癌症細胞上，如glioblastoma，cervical cancer，breast cancer，gastric cancer，melanoma，colorectal cancer及ovarian cancer (Schepetkin, Kirpotina et al. 2014, Boer, van Marion et al. 2015, Li, Su et al. 2017, Ragone, Minopoli et al. 2017, Cao and Zhang 2018, Vecchi, Alves Pereira Zoia et al. 2018, Cai, Huang et al. 2019) 。FPR1在這些癌症中被發現它的過度活化將會促進MAPK/Erk, PI3K/Akt and P38-MAPK的活化及上升IL6和IL8的表現，促進腫瘤細胞的生長、轉移及抗藥性(Snapkov, Oqvist et al. 2016, Cao and Zhang 2018, Cai, Huang et al. 2019) 。而如果使用FPR1的抑制劑來做為治療，將有助於緩解與發炎反應相關的癌症，抑制癌症細胞的轉移及侵蝕正常組織(Schepetkin, Kirpotina et al. 2014, Minopoli, Botti et al. 2019) 。但對於FPR1在子宮內膜癌中所扮演的角色目前尚欠缺，故我們想要透過研究了解FPR1在子宮內膜癌中所扮演的功能，以及是否與病人糖尿病、NLR有關聯性，並且進一步探討FPR1抑制劑在

子宮內膜癌治療上面的幫助及效果。

研究目的

本研究目的是要探討高糖微環境引起發炎反應有關的 FPR1 之子宮內膜癌研究，其具體目標（1）探討高糖環境與子宮內膜癌發炎反應的關係是否透過 FPR1 的路徑；（2）子宮內膜癌細胞上 FPR1 與腫瘤細胞生存的關係；並包括 FPR1 抑制的母鼠模型驗證（3）子宮內膜癌整體存活率與 FPR1、糖尿病有無、嗜中性白血球與淋巴球比值(NLR)的關係。

我們希望這個研究可以瞭解到高糖環境對子宮內膜癌的癌化機轉以及標靶高糖誘導的基因可以有機會提供做為治療子宮內膜癌病人的選擇。

參考文獻

- (2017). "Health Promotion Administration Ministry of Health and Welfare Taiwan, Cancer Registry Annual Report, 2015 Taiwan; Health Promotion Administration Ministry of Health and Welfare Taiwan: Taipei, Taiwan."
- Aoyama, T., M. Takano, M. Miyamoto, T. Yoshikawa, K. Kato, T. Sakamoto, K. Takasaki, H. Matsuura, H. Soyama, J. Hirata, A. Suzuki, H. Sasa, H. Tsuda and K. Furuya (2019). "Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Was a Predictor of Lymph Node Metastasis in Endometrial Cancer Patients." Oncology **96**(5): 259-267.
- Boer, J. C., D. M. van Marion, J. V. Joseph, N. M. Kliphuis, H. Timmer-Bosscha, J. A. van Strijp, E. G. de Vries, W. F. den Dunnen, F. A. Kruijt and A. M. Walenkamp (2015). "Microenvironment involved in FPR1 expression by human glioblastomas." J Neurooncol **123**(1): 53-63.
- Cai, Y., J. Huang, H. Xing, B. Li, L. Li, X. Wang, D. Peng and J. Chen (2019). "Contribution of FPR and TLR9 to hypoxia-induced chemoresistance of ovarian cancer cells." Onco Targets Ther **12**: 291-301.
- Cao, G. and Z. Zhang (2018). "FPR1 mediates the tumorigenicity of human cervical cancer cells." Cancer Manag Res **10**: 5855-5865.
- Dorward, D. A., C. D. Lucas, M. K. Doherty, G. B. Chapman, E. J. Scholefield, A. Conway Morris, J. M. Felton, T. Kipari, D. C. Humphries, C. T. Robb, A. J. Simpson, P. D. Whitfield, C. Haslett, K. Dhaliwal and A. G. Rossi (2017). "Novel role for endogenous mitochondrial formylated peptide-driven formyl peptide receptor 1 signalling in acute respiratory distress syndrome." Thorax **72**(10): 928-936.
- Duan, W., X. Shen, J. Lei, Q. Xu, Y. Yu and R. Li (2014). "Hyperglycemia, a neglected

factor during cancer progression." BioMed Research International **2014**: 461917.

He, H. Q. and R. D. Ye (2017). "The Formyl Peptide Receptors: Diversity of Ligands and Mechanism for Recognition." Molecules **22**(3).

Heidari, F., S. Rabizadeh, M. A. Mansournia, H. Mirmiranpoor, S. S. Salehi, S. Akhavan, A. Esteghamati and M. Nakhjavani (2019). "Inflammatory, oxidative stress and anti-oxidative markers in patients with endometrial carcinoma and diabetes." Cytokine **120**: 186-190.

Lee, S. C. and J. C. Chan (2015). "Evidence for DNA damage as a biological link between diabetes and cancer." Chin Med J (Engl) **128**(11): 1543-1548.

Lee, T. Y., U. E. Martinez-Outschoorn, R. J. Schilder, C. H. Kim, S. D. Richard, N. G. Rosenblum and J. M. Johnson (2018). "Metformin as a Therapeutic Target in Endometrial Cancers." Front Oncol **8**: 341.

Lee, W., S. Y. Ko, M. S. Mohamed, H. A. Kenny, E. Lengyel and H. Naora (2019). "Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum." J Exp Med **216**(1): 176-194.

Li, S. Q., N. Su, P. Gong, H. B. Zhang, J. Liu, D. Wang, Y. P. Sun, Y. Zhang, F. Qian, B. Zhao, Y. Yu and R. D. Ye (2017). "The Expression of Formyl Peptide Receptor 1 is Correlated with Tumor Invasion of Human Colorectal Cancer." Sci Rep **7**(1): 5918.

Liao, C., D. Zhang, C. Mungo, D. A. Tompkins and A. M. Zeidan (2014). "Is diabetes mellitus associated with increased incidence and disease-specific mortality in endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis of cohort studies." Gynecol Oncol **135**(1): 163-171.

Liu, X., B. Ma, A. B. Malik, H. Tang, T. Yang, B. Sun, G. Wang, R. D. Minshall, Y. Li, Y. Zhao, R. D. Ye and J. Xu (2012). "Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases." Nat Immunol **13**(5): 457-464.

Lortet-Tieulent, J., J. Ferlay, F. Bray and A. Jemal (2018). "International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978-2013." J Natl Cancer Inst **110**(4): 354-361.

McAlpine, J. N., S. M. Temkin and H. J. Mackay (2016). "Endometrial cancer: Not your grandmother's cancer." Cancer **122**(18): 2787-2798.

Minopoli, M., G. Botti, V. Gigantino, C. Ragone, S. Sarno, M. L. Motti, G. Scognamiglio, S. Greggi, C. Scaffa, M. S. Roca, M. P. Stoppelli, G. Ciliberto, N. S. Losito and M. V. Carriero (2019). "Targeting the Formyl Peptide Receptor type 1 to prevent the adhesion of ovarian cancer cells onto mesothelium and subsequent invasion." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 459.

Ragone, C., M. Minopoli, V. Ingangi, G. Botti, F. Fratangelo, A. Pessi, M. P. Stoppelli, P. A. Ascierto, G. Ciliberto, M. L. Motti and M. V. Carriero (2017). "Targeting the cross-talk between Urokinase receptor and Formyl peptide receptor type 1 to prevent

invasion and trans-endothelial migration of melanoma cells." J Exp Clin Cancer Res **36(1)**: 180.

Rosato, V., A. Zucchetto, C. Bosetti, L. Dal Maso, M. Montella, C. Pelucchi, E. Negri, S. Franceschi and C. La Vecchia (2011). "Metabolic syndrome and endometrial cancer risk." Ann Oncol **22(4)**: 884-889.

Schepetkin, I. A., L. N. Kirpotina, A. I. Khlebnikov, N. Cheng, R. D. Ye and M. T. Quinn (2014). "Antagonism of human formyl peptide receptor 1 (FPR1) by chromones and related isoflavones." Biochem Pharmacol **92(4)**: 627-641.

Siegel, R. L. and K. D. Miller (2020). "Cancer statistics, 2020." CA Cancer J Clin **70(1)**: 7-30.

Snapkov, I., C. O. Oqvist, Y. Figenschau, P. Kogner, J. I. Johnsen and B. Sveinbjornsson (2016). "The role of formyl peptide receptor 1 (FPR1) in neuroblastoma tumorigenesis." BMC Cancer **16**: 490.

Tsai, Y. F., S. C. Yang and T. L. Hwang (2016). "Formyl peptide receptor modulators: a patent review and potential applications for inflammatory diseases (2012-2015)." Expert Opin Ther Pat **26(10)**: 1139-1156.

Vecchi, L., M. Alves Pereira Zoia, T. Goss Santos, A. de Oliveira Beserra, C. M. Colaco Ramos, B. Franca Matias Colombo, Y. C. Paiva Maia, V. Piana de Andrade, S. Teixeira Soares Mota, T. Goncalves de Araujo, F. Van Petten de Vasconcelos Azevedo, F. A. Soares, S. M. Oliani and L. R. Goulart (2018). "Inhibition of the AnxA1/FPR1 autocrine axis reduces MDA-MB-231 breast cancer cell growth and aggressiveness in vitro and in vivo." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1865(9)**: 1368-1382.

Weiss, E. and D. Kretschmer (2018). "Formyl-Peptide Receptors in Infection, Inflammation, and Cancer." Trends Immunol **39(10)**: 815-829.

Yang, X. and J. Wang (2019). "The Role of Metabolic Syndrome in Endometrial Cancer: A Review." Front Oncol **9**: 744.

Zhang, L., G. Wang, X. Chen, X. Xue, Q. Guo, M. Liu and J. Zhao (2017). "Formyl peptide receptors promotes neural differentiation in mouse neural stem cells by ROS generation and regulation of PI3K-AKT signaling." Sci Rep **7(1)**: 206.

研究方法

Cell culture

Human endometrial cell lines Ishikawa, ARK2 (type II EMCA) and HEC1B (type I EMCA) are obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). HL-60 was kindly provided from Tsong-Long Hwang (Graduate Institute of Natural Products, College of Medicine, Chang Gung University), ARK2 and HL-60 cells will be cultured in RPMI1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. HEC1B will be cultured in DMEM media supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. In glucose experiments, ARK2 will be cultured in RPMI1640 medium with glucose (5.5/11/22mM) for 4-8 days; and HEC1B will be cultured in DMEM medium with glucose.

Antibodies and chemicals

The antibodies used in this study were FPR1 (Abnova, Taiwan) and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). D-glucose and fMLP was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Western blot analysis

Cells will be lysed in a combination of radioimmunoprecipitation assay buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulphate [SDS], and 0.5% deoxycholate) and protease/phosphatase inhibitors (Bionovas, Toronto, Canada). The Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) will be used to determine the total protein concentration. Each sample (50 μ g of proteins for each) will be subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and resolved proteins will be transferred onto a nitrocellulose membrane. Labeled proteins will be visualized using enhanced chemiluminescence (Millipore, Bedford, MA, USA).

immunohistochemistry

Heat-induced epitope retrieval was performed at 100 °C using EDTA-based pH 9.0 buffer (BOND Epitope Retrieval Solution 2, Leica Biosystems). Sections were then stained with the FPR1 antibody using a BOND Polymer Refine Detection system (Leica Biosystems). Hematoxylin was used for counterstaining. A semiquantitative immunostaining score (histoscore) was calculated as the percentage of positive cells multiplied by their staining intensity (0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong). Consequently, the histoscore ranged from a minimum of 0 to a maximum of 300 (i.e., 100% multiplied by 3).

Flow cytometry

Cells were stained for FPR1-FITC or the corresponding isotype control and subsequently were sorted with BD FACSCanto II (Biosciences Europe, Erembodegem, Belgium) and the data were analyzed by using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

結果與討論（含結論與建議、執行計畫過程遇到之困難或阻礙）等

1. 執行此計畫中，發現 FPR1 在子宮內膜癌幾乎不表現，我們嘗試利用高糖來誘導 FPR1 的表現，或者經由建構表現 FPR1 的質體來增加 FPR1 的表現都沒有如預期大量表現 FPR1 的表現 (**Figure 1**)

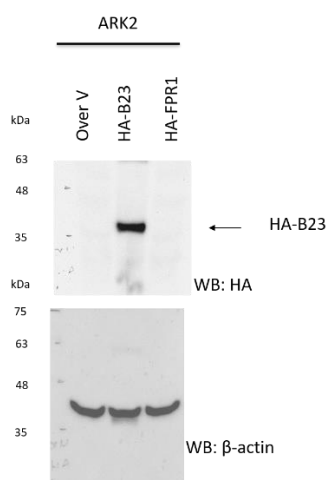
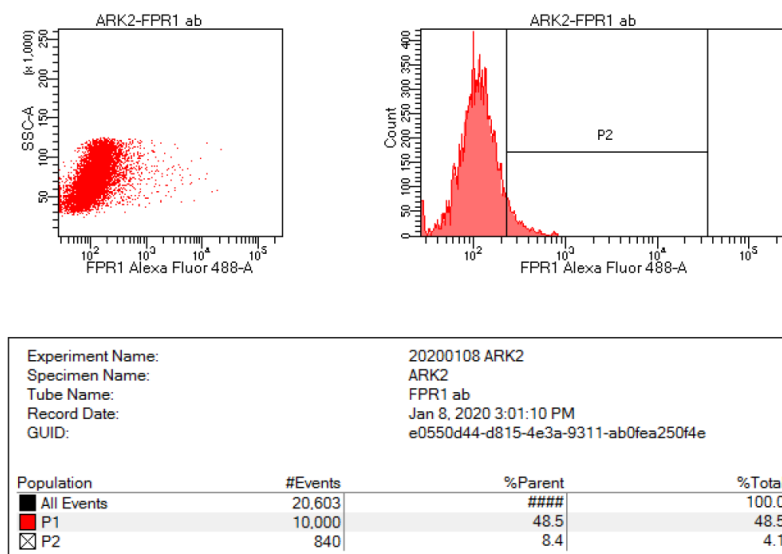


Figure 1. 在 ARK2 細胞中，大量表現 HA-FPR1，其中 HA-B23 作為 positive

control，證明 transfection 效率和抗體 HA 是可行的。

2. 因為懷疑是否因為 FPR1 是膜蛋白屬於 G-protein coupled receptor，一般使用 RIPA 裂解細胞溶液，無法完全萃取 FPR1，再加上 FPR1 為膜蛋白，因此我們接下來嘗試使用流式細胞儀進行分析，如 Figure 2 所示，FPR1 在子宮內膜癌細胞的表現量極低，在 ARK2 只有 8.4%而在 HEC1B 只有 3.5% FPR1 的表現量。

(a)



(b)

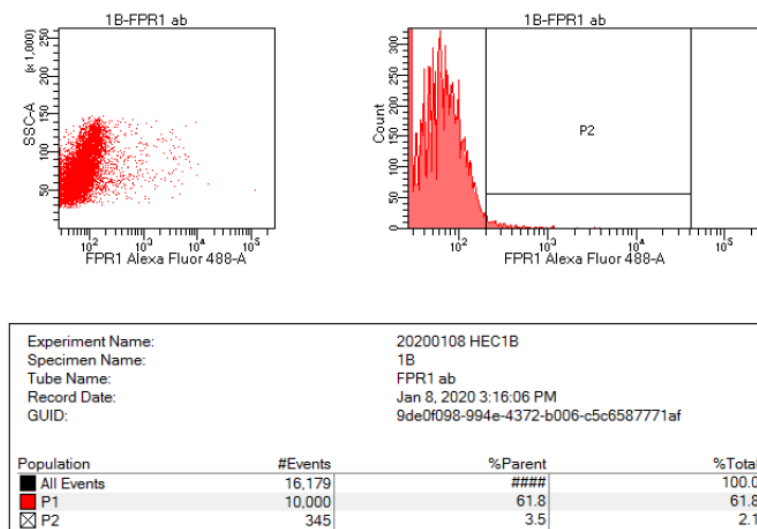
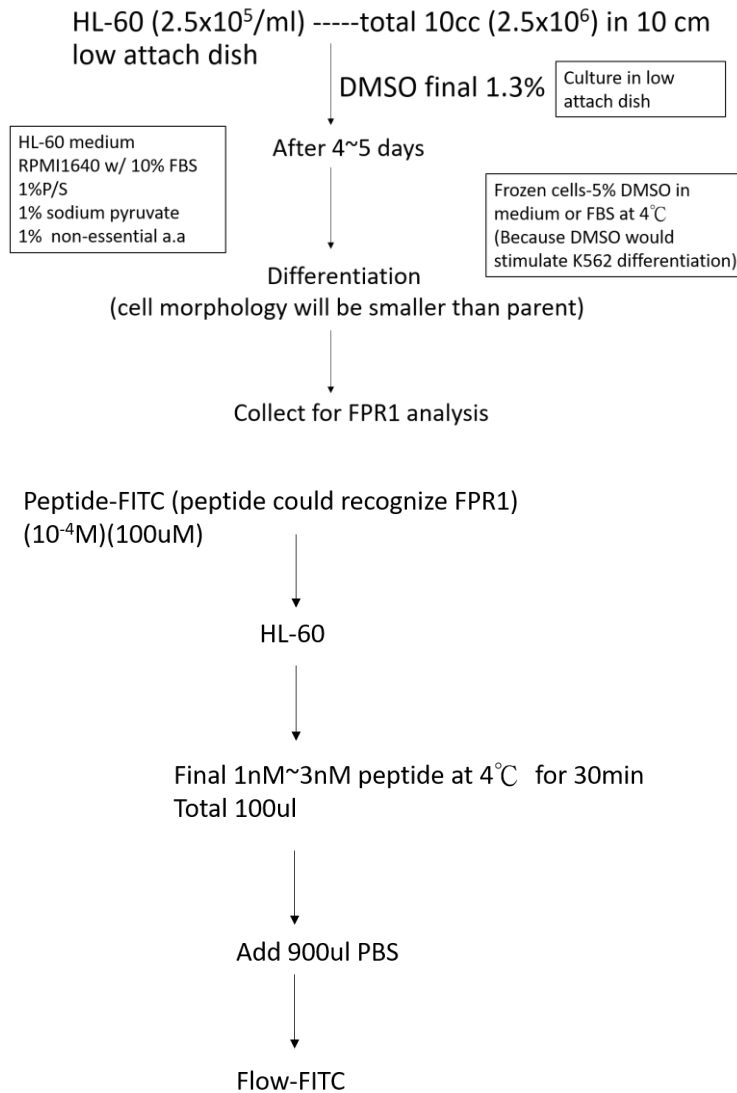


Figure 2. 利用流式細胞儀偵測 (a)ARK2 (b)HEC1B 的 FPR1 的表現量

3. 由於 FPR1 的表現極低，無法在子宮內膜癌的細胞株進行高糖對子宮內膜癌的影響，因此我們使用 HL-60 細胞株，此細胞株根據我們合作的團隊研究指出，加入 1.3% DMSO 可以誘導 HL-60 分化成 neutrophil，並高表現 FPR1 的蛋白，誘導方式如下：



我們也成功的誘導 HL-60 分化，並利用 Peptide-FITC (peptide could recognize FPR1)偵測的確有高表現 FPR1 (Figure 3)，而這樣的活化也可被 FPR1 的 agonist fMLP 競爭 peptide 位置，導致 FPR1 表現降低，代表 HL-60 活化的確是 FPR1 蛋白。

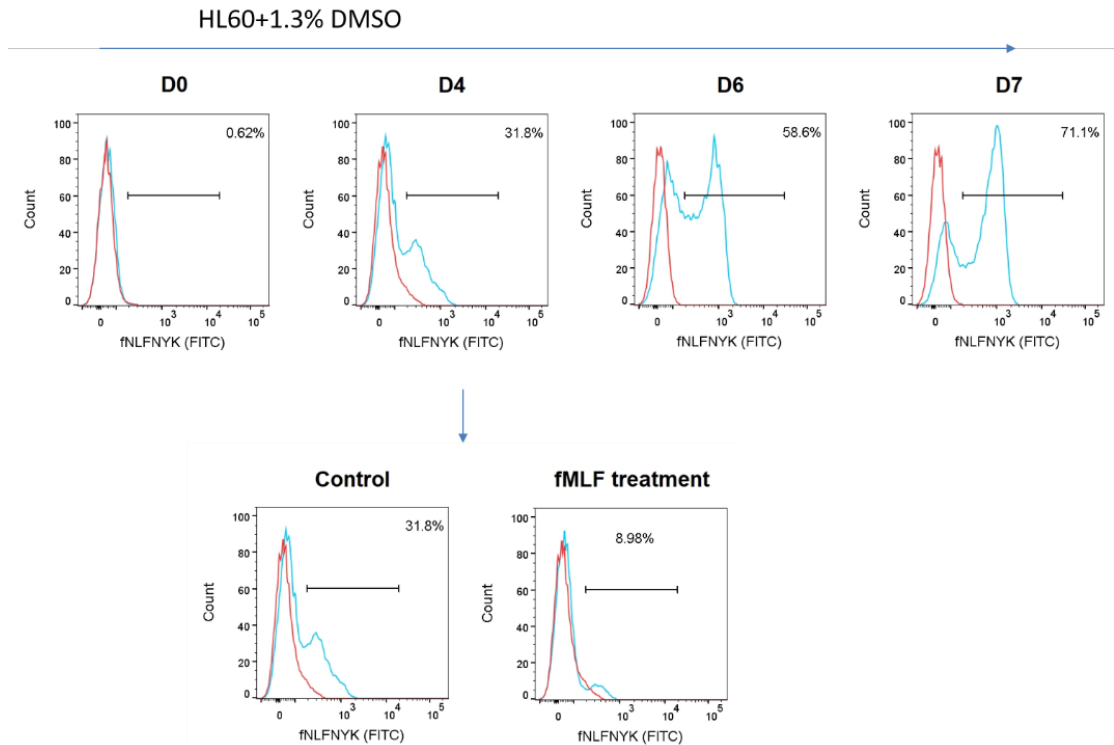


Figure 3. HL-60 分化後，經由流式細胞儀偵測 FPR1 的表現。

4. 有了 FPR1 表現後，我們假設高糖會透過 FPR1 而活化下游基因，因此當我們加入不同濃度的 glucose，很遺憾的是，並沒有如我們預期對下游基因有影響 (Figure 4)。

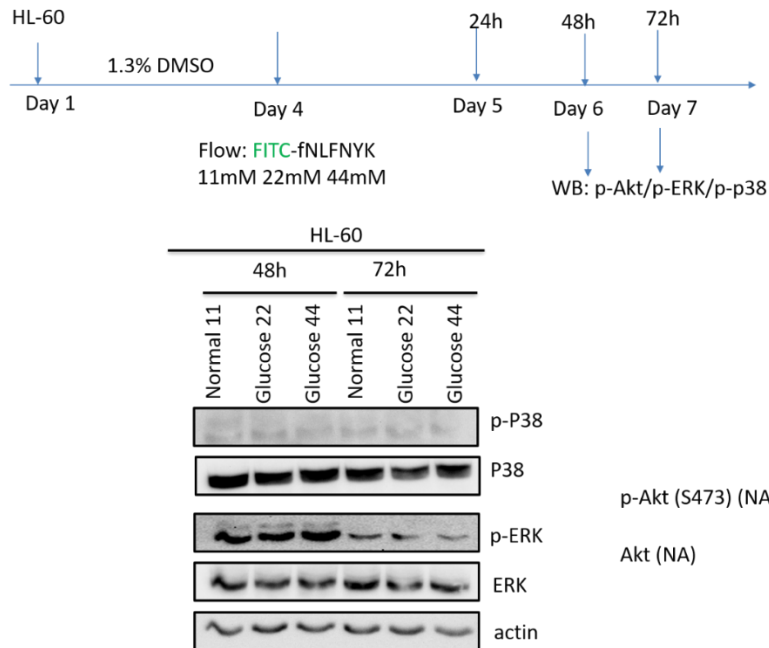


Figure 4. 不同糖的濃度對分化後帶有 FPR1 的 HL-60 的訊號傳遞

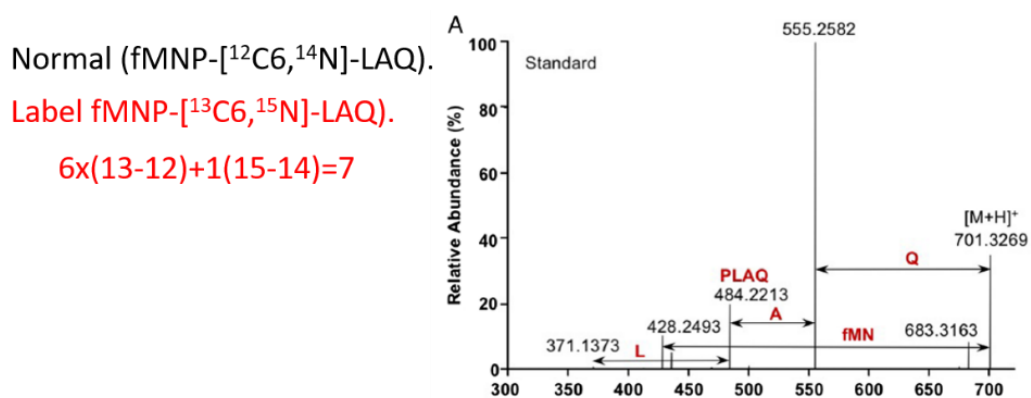
5. 細胞株模式無法觀察到高糖透過 FPR1 的影響，我們接下來直接觀察病人的 serum 中是否 fMLP 含量會因為病人發炎與否而有所改變，我們參考 Dorward DA, et al (Dorward, Lucas et al. 2017)發表在急性呼吸窘迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, 簡稱 ARDS) serum 會增加的表現，並合成在人類 serum 中存在的 fMNPLAQ，並用同位素標定 ^{13}C 與 ^{15}N ，相差 7kDa 作為 internal control，利用 LC-MS/MS 檢測子宮內膜癌病人高 NLR 的 serum 中 fMNPLAQ 含量，萃取 serum 步驟與萃取後進行後續流程與結果如 Figure 5 所示，在高 NLR 病人 serum 中，相較於健康受試者並沒有高表現 fMNPLAQ，推測可能原因是 fMNPLAQ 必須在急性發炎病人身上才檢測的到 (如:急性呼吸窘迫症候群)而慢性發炎(如:子宮內膜癌)並不會誘導 fMNPLAQ 增加。

(a) 從血液萃取 fMNPLAQ，並加入 Label fMNP- $[\text{}^{13}\text{C}_6, \text{}^{15}\text{N}]$ -LAQ).作為 internal control (Heavy)

Protocol

1. Cool the required volume of acetone to -20°C .
2. Place protein sample in acetone-compatible tube.
3. Add four times the sample volume of cold (-20°C) acetone to the tube.
4. Vortex tube and incubate for 60 minutes at -20°C .
5. Centrifuge 10 minutes at $13,000\text{-}15,000 \times g$.
6. Decant and properly dispose of the supernatant, being careful to not dislodge the protein pellet.
Optional: If additional cycles of precipitation are necessary to completely remove the interfering substance, then repeat steps 2-5 before proceeding to step 7.
7. Allow the acetone to evaporate from the uncapped tube at room temperature for 30 minutes. Do not over-dry pellet, or it may not dissolve properly.
8. Add buffer appropriate for the downstream process and vortex thoroughly to dissolve protein pellet.

(b) fMNPLAQ 在質譜的斷裂位置



(c) 操作流程

fMN sample 20200716入庫

B1, B2, B3, P3-1A, P3-1B, P3-2A, P3-2B

↓ B- Benign tumor's plasma
P3-pool from patient 1, 2 and 3 's plasma

送至CPC

- 以100 ul 10% ACN (0.1% TFA)回溶。
- 樣品過tip column+10ul Source 15RPC，以40% ACN (0.1% FA)、沖提並收集。
- 共7管，抽乾後，以3.5 ul 0.1% FA回溶，上樣3ul。



LC-MS/MS分析

(d)

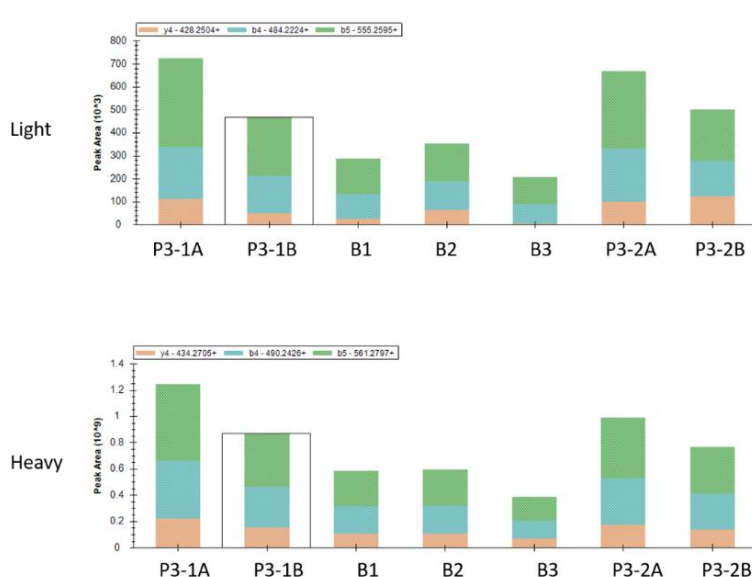


Figure 5. 利用 LC-MS 偵測病人 serum 中 fMNPLAQ 的含量。

6. 最後，我們利用高糖刺激找尋和子宮內膜癌癌化有關的基因-LSD1，在我們先前文獻證明 LSD1 為致癌基因，我們利用高糖刺激發現具有活化 LSD1 的與磷酸化的 p62 表現 (Figure 6)，同樣在用 Streptozotocin (STZ) 處理母鼠導致糖尿病的模式下，LSD1 的與磷酸化的 p62 表現也隨之增加(Figure 7)，這樣的結果代表在高糖的情況下(例如糖尿病鼠)可能透過調控 LSD1 與 p-p62

導致癌細胞增生，而這樣的結果會需要更多實驗再進一步證實。

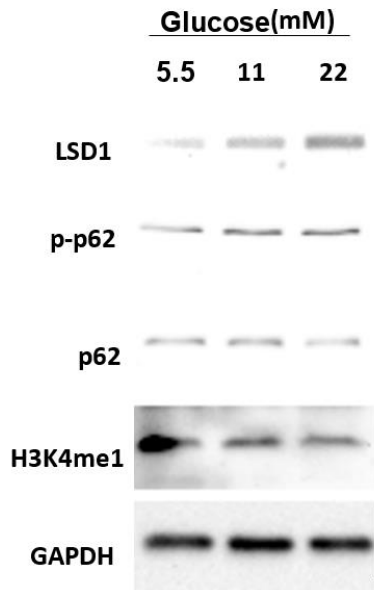


Figure 6. 在子宮內膜癌細胞株 Ishikawa 處理高糖誘導 LSD1 的表現

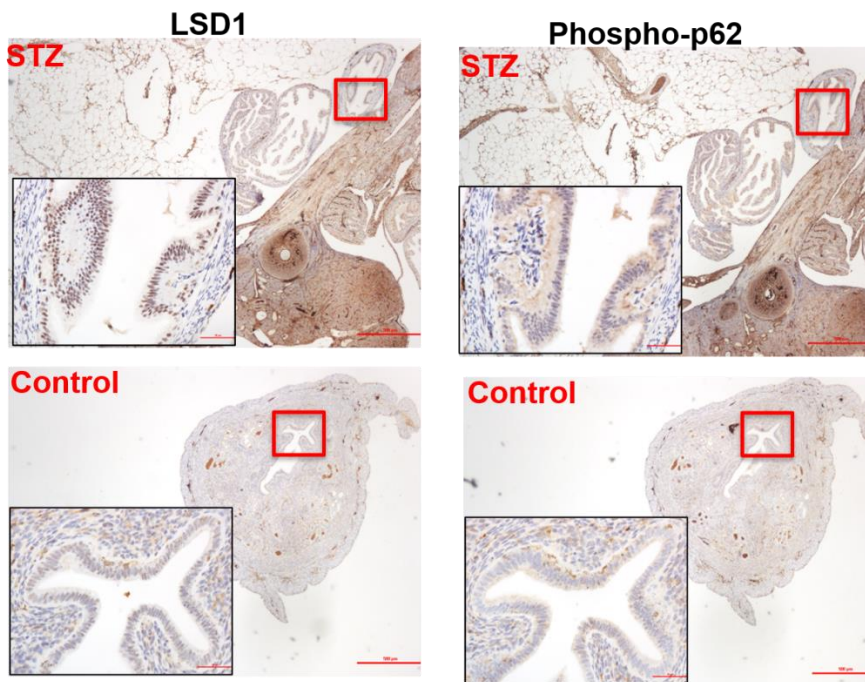




Figure 7. Streptozotocin (STZ)誘導糖尿病鼠的模式下，利用組織免疫染色 LSD1 與 p-P62 相較對照組較高表現量。

Submitted manuscript of LSD1 and high glucose to Antioxidants

[Antioxidants] Manuscript ID: antioxidants-1464523 - Submission Received  

Editorial Office <antioxidants@mdpi.com>

下午8:24 (2 小時前) 

 寄給 Chia-Lung、Chiao-Yun、Chen-Bin、Ren-Chin、Angel、Yun-Shien、Chi-Neu、Chih-Hao、Chih-Feng 

Dear Dr. Tsai,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Antioxidants

Manuscript ID: antioxidants-1464523

Type of manuscript: Article

Title: Glucose activates lysine-specific demethylase 1 through KEAP1/p62 pathway

Authors: Chiao-Yun Lin, Chen-Bin Chang, Ren-Chin Wu, Angel Chao, Yun-Shien Lee, Chi-Neu Tsai, Chih-Hao Chen, Chih-Feng Yen, Chia-Lung Tsai *

Received: 30 October 2021

antioxidants@mdpi.com  antioxidants@mdpi.com 

109年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：趙安琪		計畫編號：109-2629-B-182A-002-		
計畫名稱：高糖微環境引起發炎反應有關的FPR1之子宮內膜癌研究				
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇
		研討會論文	0	
		專書	0	本
		專書論文	0	章
		技術報告	0	篇
		其他	0	篇
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇
		研討會論文	0	
		專書	0	本
		專書論文	0	章
		技術報告	0	篇
	其他	1	篇	<p>Antioxidants (submitted as shown below)</p> <p>Editorial Office antioxidants@mdpi.com 10月30日 週六 下午8:24 (11 小時前)</p> <p>寄給 Chia-Lung、Chiao-Yun、Chen-Bin、Ren-Chin、Angel、Yun-Shien、Chi-Neu、Chih-Hao、Chih-Feng</p> <p>Dear Dr. Tsai,</p> <p>Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.</p> <p>Journal name: Antioxidants Manuscript ID: antioxidants-1464523 Type of manuscript: Article Title: Glucose activates lysine-specific demethylase 1 through KEAP1/p62 pathway Authors: Chiao-Yun Lin, Chen-Bin Chang, Ren-Chin Wu, Angel Chao,</p>

					Yun-Shien Lee, Chi-Neu Tsai, Chih-Hao Chen, Chih-Feng Yen, Chia-Lung Tsai * Received: 30 October 2021
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					