

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

p53/14-3-3 路徑在肝癌發生角色之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-039-034-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學附設醫院內科部肝膽科

計畫主持人：彭成元

計畫參與人員：彭成元

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 30 日

一、中文摘要

肝癌是世界上最常見的人類癌症之一。許多肝癌的組織學特徵已經被描述。引起這些組織學上變化的分子機轉目前並不清楚。細胞內存在一些控制點調控機轉以維持基因的穩定。p53 具有不同的細胞週期控制點功能，例如可經由 p21 抑制各種 cyclin/cdk 的功能以活化 RB 蛋白。它至少可經由 p21, Gadd45 及 14-3-3 σ 三種基因導致 G2 細胞週期停滯。14-3-3 σ 可以結合 cyclin B/CDC2 並將其留置在細胞質內以防止有絲分裂發生。我們以及其他研究者先前發現 p53 在相當比例の後期肝癌中發生突變。這些控制點若有缺損容易導致基因不穩定，因此增加癌症發生的機會。我們提出本研究以探討 14-3-3 σ 在肝細胞癌發生過程的角色。我們分析肝癌組織中 14-3-3 σ 基因的突變狀態。我們採取兩種方法：1) 分析染色體變異事件如過度甲基化現象。2) 分析蛋白的表達程度。我們發現 14-3-3 σ 基因在所分析的 40 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中，38 個腫瘤(95%)及 40 個非腫瘤(100%) 中發生過度甲基化現象。我們進一步利用 real-time PCR 的方法來定量分析比較 14-3-3 σ 基因在 40 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中的 mRNA 相對表達量。我們發現 14-3-3 σ 基因在 27 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中腫瘤組織內的表達量遠低於非腫瘤組織內，在 13 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中則是非腫瘤組織內的表達量遠低於腫瘤組織內。我們進一步利用 Western blotting 分析 14-3-3 σ 蛋白在 11 個肝細胞癌細胞株的表達程度。我們發現 14-3-3 σ 基因僅在其中的 4 個細胞株中

有表達，其餘的 7 個細胞株中則喪失蛋白的表達。因此，14-3-3 σ 基因在肝細胞癌腫瘤及臨近非腫瘤組織中有極高比例發生過度甲基化現象。67.5% 的 14-3-3 σ 基因過度甲基化現象伴隨有腫瘤組織中 14-3-3 σ 基因低表達現象，32.5% 則反倒有腫瘤組織中 14-3-3 σ 基因高表達現象。14-3-3 σ 蛋白在 64% 的肝細胞癌細胞株中有喪失蛋白表達的現象。我們將在本年度的計劃進一步分析 14-3-3 σ 基因在肝細胞癌中過度甲基化現象的生物意義。本研究結果將有助於發掘診斷肝癌病變的分子標記以及將來治療肝癌的可能著手目標。

關鍵詞：肝癌，14-3-3 σ ，過度甲基化現象

二、緣由與目的

本計劃主要的目的是探討 14-3-3 σ 基因在腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中過度甲基化現象以及其 mRNA 的表達量，以及 14-3-3 σ 蛋白在肝細胞癌細胞株中喪失蛋白表達的現象。

三、結果與討論

我們利用 methylation-specific PCR 方法發現 14-3-3 σ 基因在所分析的 40 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中，38 個腫瘤(95%)及 40 個非腫瘤(100%) 中發生過度甲基化現象。這顯示 14-3-3 σ 基因在肝細胞癌的癌化過程中極高比例發生有過度甲基化現象。我們進一步利用 real-time PCR 的方法來定量分析比較 14-3-3 σ 基因在 40 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中的 mRNA 相對表達量。我們發現 14-3-3 σ 基因在 27 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中腫瘤組織內的表達量遠低於非腫瘤組織

內(67.5%)，在 13 對腫瘤及非腫瘤肝細胞癌組織中則是非腫瘤組織內的表達量遠低於腫瘤組織內(32.5%)。這顯示 14-3-3 σ 基因在 67.5%的肝細胞癌中發生低表達現象，在 32.5%的肝細胞癌中則反倒有高表達現象。顯示 14-3-3 σ 基因在肝癌發生中伴演某種角色，但是不必然一定要持續維持低表達現象，某些情形下反倒有高表達現象，高表達或許與腫瘤的 progression 有關。我們進一步利用 Western blotting 分析 14-3-3 σ 蛋白在 11 個肝細胞癌細胞株的表達程度。我們發現 14-3-3 σ 基因僅在其中的 4 個細胞株中有表達，其餘的 7 個細胞株中則喪失蛋白的表達。因此，14-3-3 σ 蛋白在 64%的肝細胞癌細胞株中有喪失蛋白表達的現象。14-3-3 σ 基因在肝細胞癌普遍發生喪失表達的現象，我們將進一步分析 14-3-3 σ 基因在肝細胞癌中過度甲基化現象的生物意義，尤其是對於肝細胞癌細胞株的 DNA damage response 的影響。本研究結果將有助於發掘診斷肝癌病變的分子標記以及將來治療肝癌的可能著手目標。

四、成果自評

本研究顯示 14-3-3 σ 基因在肝細胞癌普遍發生過度甲基化並伴隨有喪失表達的現象。p53 具有不同的細胞週期控制點功能，例如可經由 p21 抑制各種 cyclin/cdk 的功能以活化 RB 蛋白。它至少可經由 p21，Gadd45 及 14-3-3 σ 三種基因導致 G2 細胞週期停滯。14-3-3 σ 可以結合 cyclin B/CDC2 並將其留置在細胞質內以防止有絲分裂發生。因此，我們將進一步分析 14-3-3 σ 基因在肝細胞癌中過度甲基化

現象的生物意義，尤其是 14-3-3 σ 基因喪失表達對於肝癌細胞株的 DNA damage response 的影響。肝癌細胞株於接受化學治療藥物作用引起 DNA damage 後，可以經由不同的分子機轉導致 G2 細胞週期停滯，14-3-3 σ 基因喪失表達後是否會影響此反應有待進一步證實。藉由此路徑的調控或許可以提供一個對肝細胞癌化學治療的機會。

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common human cancers worldwide. Many histological characteristics of HCC have been elucidated. The molecular events that underlie these morphological changes are unclear. There exist some checkpoint control mechanisms that function to maintain genetic stability in response to various intrinsic or extrinsic genomic insults. Defects in these checkpoints decrease genetic stability and consequently increase the probability of tumor formation. Diverse checkpoint functions for p53 have been proposed, which could explain its frequent mutation in cancer. p53 induces G1 arrest mainly through p21, which inhibits cyclin/cyclin-dependent kinases and activate the retinoblastoma protein (RB). p53 induces G2 arrest at least through the transcriptional activation

of three genes, p21, Gadd45, and 14-3-3 σ . The protein 14-3-3 σ can bind to cyclin B/CDC2 and sequester it in the cytoplasm, thereby preventing the translocation of cyclin B/CDC2 into the nucleus, where it normally initiates mitosis. We and others have found that p53 is inactivated in a significant proportion of HCCs and it appears to be inactivated late in HCC development. We proposed this research project to elucidate the role of 14-3-3 σ in hepatocarcinogenesis. We analyzed the status of 14-3-3 σ through genomic hypermethylation analysis in 40 paired tumor/non-tumorous HCC tissues. We found that hypermethylation of 14-3-3 σ occurred in 38 tumors (95%) and in all 40 non-tumors (100%), respectively. We further analyzed the mRNA expression of 14-3-3 σ in these tumor/non-tumorous HCC tissues. 14-3-3 σ was relatively under-expressed in 27 tumors compared to non-tumorous tissues. By contrast, 14-3-3 σ was relatively over-expressed in 13 tumors compared to non-tumorous tissues. Western blotting analysis of 14-3-3 σ protein in 11 HCC cell lines showed that 14-3-3 σ protein was not expressed in 7 of these cell lines (64%). We will examine the

biological significance of 14-3-3 σ hypermethylation/loss of protein expression in response to DNA damage in HCC cell lines. Together, these will elucidate the role of 14-3-3 σ in hepatocarcinogenesis. The results of this study might help to identify potential molecular diagnostic markers for HCC and new molecular targets amenable to future therapeutic interventions to treat HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma, 14-3-3 σ , hypermethylation

References:

- 1) Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell* 1997; 88: 315-321.
- 2) Zhou BBS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433-439.
- 3) Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374.
- 4) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
- 5) Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-330.
- 6) Taylor WR, Stark GR. Regulation

- of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20: 1803-1815.
- 7) Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace Jr AJ, Harris CC. Gadd45 induction of a G2-M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3706-3711.
- 8) Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1: 3-11.
- 9) Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace Jr AJ. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/cyclin B kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999; 18: 2892-2900.
- 10) Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; 401: 616-620.
- 11) Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 σ gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 2000; 60: 4353-4357.
- 12) Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S, Ozeki I, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Imai K. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 σ gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 5298-5302.