

## 目錄

壹、中文摘要.....	1..
貳、英文摘要.....	2.
參、縮寫表.....	3
肆、前言.....	6
伍、實驗方法與材料.....	18
陸、實驗結果.....	29
柒、討論.....	34
捌、參考文獻.....	40
玖、圖表.....	54
附錄說明.....	74

## 壹．中文摘要

肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 在亞洲是一種非常普遍的癌症，而且在台灣地區的死亡率則是高居榜首。本實驗在最近的研究顯示肝癌的細胞膜中 PKC 的活性比正常肝細胞的細胞膜中 PKC 的活性低，且隨著肝癌組織的惡化其活性會隨之降低，此種現象與腫瘤大小及癌化的程度有關。本實驗想要確定 PKC 異構物在肝癌中扮演的角色。因此利用 RT-PCR 的技術來探討肝癌組織中 PKC 異構物和細胞增殖指標 mRNA 的表現。首先萃取 43 組肝癌組織及肝細胞癌鄰近正常組織的 mRNA，然後採用 RT-PCR 技術來偵測 PKC 異構物和細胞增殖指標在肝癌組織的表現量，同時以 DNA 定序儀定序確定其專一性。結果發現肝癌組織內 PKC mRNA 表現量比肝癌鄰近正常組織的表現量有明顯的增加，表示肝癌組織內 PKC $\alpha$  正處在活化的狀態。此外肝癌組織內 CPKC $\alpha$ 、PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$  及 PKC $\epsilon$  mRNA 表現量增加。另外 PKC 下游基因 (C-raf-1、MEK、MAPK) 的蛋白表現量和細胞增殖指標 (Cdc2、PCNA 及 cyclin D1) mRNA 的表現量增加，因此證明 PKC 異構物 mRNA 的過度表現 (overexpression) 可能參與在肝癌形成的過程。

## 貳 . 英文摘要

Human hepatocellular carcinoma ( HCC ) is one of the most common cancers in Asia . Our recent data had also showed that the decreased levels of membrane-bound PKC activity and PKC $\alpha$  protein in HCC were correlated with tumor stage and tumor size . To verify the role of PKC in HCC , this study was further determined the mRNA level of PKC isoforms and cell proliferation markers in HCC by use RT-PCR . The total mRNA was isolated from the surgical specimens of 43 patients of HCC and adjacent normal tissues . The product of RT-PCR was also checked by DNA sequence analysis . The result showed that the level PKC $\alpha$  mRNA in the cancer tissue were significantly higher than that in the adjacent normal tissue , specifying that the alteraions in the PKC $\alpha$  may signify their activation in liver cancer . Inaddition , the level of PKC $\beta$ 、 PKC $\gamma$ 、 PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  mRNA in the cancer tissue were also significantly higher than that in the adjacent normal tissue . Moreover , the protein expressions of the PKC down-stream gene( c-raf、 MEK、 MAPK )and the mRNA expression of the cell proliferation markers were also increased in cancer tissues. Thus , we suggested that the over-expression of PKC isoforms may be involved in the malignant progression of HCC.

## 參 . 縮寫表

**aPKCs : atypical PKCs**

**cPKCs : conventional PKCs**

**nPKCs : novel PKCs**

**cdc2 : cyclin-dependent kinase 1**

**CDK : cyclin-dependent kinase**

**DAG : diacylglycerol**

**DAB : diacylglycerol**

**EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid**

**FBS : fetal bovine serum**

**FN : fibronectin**

**HCC : hepatocellular carcinoma**

**HBV : hepatitis B virus**

**HCV : hepatitis C virus**

**HBx : hepatitis B X protein**

**HGF : hepatocyte growth factor**

**IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates**

**IGF-II : insulin growth factor**

**LHB : large surface proteins**

**MHB : middle surface proteins**

**MAPK : mitogen activated protein kinase**

**MSH : -mercaptoethanol**

**PKC : protein kinase C**

**PLC : phospholipase C**

**PCNA : proliferating cell nuclear antigen**

**PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride**

**SDS : sodium dodecyl sulfate**

**TEMED : tetramethyl ethylenediamine**

**VEGF : vascular endothelial growth factor**

**β<sub>2</sub>-MG : beta-2-microglobulin**

## 肆 . 前言

### 一 . 肝癌 ( hepatocellular carcinoma , HCC )

腫瘤 ( tumor ) 可分為良性腫瘤 ( benign tumor ) 和惡性腫瘤 ( malignant tumor ) 兩型。良性腫瘤的生長限制在它的原始的位置，成擴展性的生長，一般包覆在纖維莢膜且不會侵犯周圍正常組織，也不會延伸到其他身體各部分，他們是固定且不轉移，生長速度緩慢。惡性腫瘤即是一般所指的癌 ( cancer )，會侵襲 ( invasion ) 周圍組織，而且可轉移到其他組織器官並增生，最後導致宿主的死亡；而且惡性腫瘤細胞常具有退化性發育的傾向或是其他分化的現象。癌症死亡的原因大多與感染有關，這種感染常與免疫力下降或因阻塞而導致組織排流能力下降，其次癌症在血液方面的效應是造成貧血，主要是因為營養不良、腫瘤細胞侵犯到組織造成血液流失、自體免疫溶血以及血球細胞製造和存活率的降低，再者就是其他組織器官的失調如呼吸到阻塞、腸道阻塞及泌尿系統之失調無法正常排尿，另外如經過化學治療、放射線治療及疾病本身都有可能造成各器官組織的失調 ( 2 )。

人類肝細胞癌在亞洲地區是一種非常普遍的惡性腫瘤，以台灣地區而言則是常見的惡性腫瘤之一，原發性肝癌 ( hepatocellular carcinoma ; HCC ) 分為三種類型：肝細胞癌 ( hepatocellular carcinoma ;

HCC ) , 膽管癌 ( cholangiocarcinoma ) , 及肝細胞膽管癌 ( mixed hepatocholangio- carcinoma ) 。 這三種原發性肝癌中 , 以 HCC 的患者數最多 , 約佔 80% , 而其中 60%-80% 是由肝硬化轉變而來 , 根據統計數據來看 , 發現台灣 95% 以上的肝癌患者都有 B 形肝炎表面抗原 ( HBsAg ) 。 另外有研究報告指出男性罹患肝癌的機率比女性還要高 , 比例約 6:1 , 這種比例其中一定許多未知的因素 , 至今原因不明 ( 5,6 ) 此外有學者的研究報告指出人類肝細胞癌本身是一種多元誘因的疾病 , 可能與以下幾點因素有關 :

( 1 ) 黃麴毒素 ( Aflatoxin , AF ) :

黃麴毒素是由黃麴菌和寄生麴黴菌代謝後所產生的毒素 , 流行病學家研究指出 , 攝取含黃麴毒素的食物與肝癌發生有極密切的關係。另外有動物實驗指出 , 以受感染的食物或純黃麴毒素來為餵食實驗動物也會引起動物產生肝癌。

( 2 ) 抽煙和喝酒 :

抽煙對身體百害而無一利 , 由於香煙中的尼古丁在肝臟分解 , 並會造成肝臟的負擔。一旦患者又喝酒過量 , 就會造成肝臟的負擔增加 , 經過日積月累的結果 , 勢必會影響肝功能 , 導致脂肪肝、酒精性肝炎 , 甚至肝硬化進而導致肝癌的形成。

( 3 ) 肝炎病毒 ( HBV、HCV ) :

B 型肝炎病毒屬於環狀 DNA 病毒 ( 7 ) 。 1970-1980 年間 , 許多

流行病學家及病毒分子學家提出強烈的證據認為 HBV 的感染與肝癌的形成有密切關係 ( 8 )。但是整個感染的機制還尚不清楚，直到最近的研究報告指出插入到宿主細胞中的 HBV DNA 可能會引起細胞內致癌基因的活化 ( 9 )。因而導致肝癌的形成。而且 B 型肝炎可以寄生在人類及屬於靈長類的猩猩個體上，以體液及排泄物為主要感染媒介，其中包括血液、唾液及精液為主要因素；而打針注射、破損的黏膜皮膚、周產期感染及經由性行為接觸感染為另一種主要的傳染途徑。另外，C 型肝炎也是主要導致肝癌形成的原因之一，HCV 是一種 RNA 病毒，主要以人類為宿主。臨床上的證據顯示 C 型肝炎導致肝癌的因素主要是打針注射或者被污染的血液製劑傳染，並且發現日本人形成肝癌的主要因素來自於 C 型肝炎病毒的感染，所以至今的文獻中是導致日本人肝癌的主要原因。

所以綜合以上幾點原因可以得知整個肝癌的形成可能包含不同的致癌物 ( 抽煙、喝酒 ) 的產生、肝炎病毒 ( HBV、HCV ) 的侵襲及肝硬化的因素，都可能會造成肝癌的形成。但至今沒有文獻指出何種病毒或致癌物會直接誘導肝癌的證據 ( 10,11 )。目前為止，有許多學者極力在尋找肝細胞癌病人存活率的分子指標，至今發現一些肝癌中的致癌基因或轉錄因子活化可能影響肝癌的形成，例如：p53 ( 12 )，N-ras，H-ras,及 K-ras ( 13,14 )，c- erbA ( 15 )，c-met ( 16 )，c-myc 及



NF- $\kappa$ B (17) 等基因。但是至今還是無法確認某種專一性的致癌基因活化或抑癌基因的消失可以直接來導致肝癌的形成 (18)。此外有學者研究細胞週期蛋白 (cyclin, cyclin-dependent kinase (CDK) 和 CDK 抑制劑等基因) 發現可能與人類肝細胞癌的形成有關, 並且可以得知細胞如何控制生長及分化。細胞週期可分為四個時期(G1、S、G2、M) (19), 其中以細胞週期 G1 期及 G2/M 期的調節蛋白被認為最直接與肝癌的形成有關 (20,21)。cyclin D1 屬於細胞週期 G1 期的蛋白, 首次被發現是在位於 B 細胞且位在 chromosome 11q13 的位置, 有文獻指出 chromosome 11q13 位置會造成基因放大的現象, 因而導致癌症的產生, 例如食管癌 (22) 及乳癌 (23), 其中肝癌就是一例, 另外有學者利用 Northern blotting 及 immunohistochemical 的分析證實 cyclin D1 在肝癌中有超表現 (overexpression) 及基因放大 (amplification) 的現象 (24,25), 因而當作肝癌的預測指標 (prognostic marker) (26)。最近研究報導指出 MAPK/ERK 這條路徑會經由轉錄活化因子 c-fos 來調節 cyclin D1 的表現 (27) 更進一步證明 cyclin D1 是扮演腫瘤細胞分化的角色, 而不是之前認為 cyclin D1 是扮演腫瘤細胞增殖角色 (28)。另外一個細胞週期蛋白 cdc2 會與 cyclin A 及 cyclin B1 形成複合物是屬於細胞週期中的 G2-M 期的蛋白。文獻指出 cdc2 在整個肝癌形成的過程中是扮演細胞增殖角色, 並且可以當作腫

瘤復發偵測的指標( 29 ) 此外 PCNA( proliferating cell nuclear antigen ) 是一個 cyclin 及 DNA 聚合酵素 中的輔助蛋白，主要出現在增殖細胞內的細胞核，是屬於細胞週期的 G1 及 S 期的調節蛋白。有學者利用化學免疫染色法來證明 PCNA 在肝癌組織中是扮演一個腫瘤侵襲的預測指標 ( 30 )。其實至今整個肝癌所以已被發現的肝細胞癌分子指標，包含 c-met、p53、Ki-67、c-myc、PCNA、u-PA、cyclin A 等指標被證實都與病人存活率有關，而且在癌組織內的含量都較高。然而這些分子指標仍然無法完全指示病人存活的可能性，故尋找新的分子指標將是無可懈怠的工作。

## 二．蛋白激酵素 C ( PKC )

蛋白激酵素 C ( protein kinase C , 簡稱 PKC ) 是一種鈣和磷酸酯依賴的蛋白激酵素，它是於 1977 年首先被日本 Nishizuka 等人，從牛的小腦所發現之異於蛋白激酵素 A 的蛋白激酵素 ( 31 )，之後即受到廣泛的重視及研究。結果發現此酵素的活化需要細胞膜上的磷脂和 diacylglycerol ( DAG ) ( 32,33 )；當細胞受刺激之後，細胞表面的受體接受外來的荷爾蒙或神經傳導物質，使得受體活化磷脂酵素 C ( phospholipase C ; PLC )，接著磷脂酵素 C 將細胞膜上的磷脂激醇 ( phosphatidyl inositol ) 分解，產生第二訊息傳遞物 ( second

messages) DAG 和 IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-trisphosphate phosphates), DAG 進而活化蛋白激酶 C。因此蛋白激酶 C 的活化生理途徑已被確認, 而在陸續的研究中也發現除了經由活化磷脂酶 C 之途徑外, 磷脂酶 D 和 A<sub>2</sub> 也可以分別活化或加強此酶的活性。此外, tumor-promoting phorbol esters 如 TPA, 也可以活化蛋白激酶 C, 並造成此酶由細胞質轉移至細胞膜 (translocation) (34,35), 但是 TPA 長時間之作用反而造成其下降調節 (down-regulation) 蛋白激酶 C 在調節需要 Ca<sup>2+</sup> 參與的細胞功能上具有重要的角色, 它可以透過一些細胞外的訊息, 例如: 生長因子 (growth factor)、荷爾蒙 (hormone) 及神經傳導物質 (neurotransmitters) 等 (36,37), 在細胞膜上扮演傳遞訊息的角色。蛋白激酶 C 也被發現可誘導許多細胞的反應, 包括細胞的增殖 (proliferation)、分化 (differentiation)、基因的表現及腫瘤促進作用。蛋白激酶 C 活性過度表現可能造成多數大白鼠的纖維母細胞生長不正常 (38)。

已知蛋白激酶 C 至少含有 12 種異構體 (isoenzyme), 依其結構上的差異、序列的不同以及需要的活化因子不同, 可將其區分成三個類型: 1) 傳統型 (conventional, PKCs)  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\iota$ 、 $\kappa$ 、 $\lambda$  及  $\mu$ , 需要負價的磷脂, diacylglycerol 或 phorbol ester, 及鈣離子存在下才能夠活化 (39,40) 2) 新型 (novel, nPKCs)  $\nu$ 、 $\xi$ 、 $\sigma$ 、 $\tau$ 、 $\upsilon$  及  $\phi$ , 需

要負價的磷脂，diacylglycerol 或 phorbol ester 才能活化，但不需要鈣離子 (39-41) 3)異型 (atypical, aPKCs) 、 及 ，只要負價的磷脂，不需要鈣離子，diacylglycerol 或 phorbol ester 即可活化 (40)。

蛋白激酶 C 是由 C1-C4 四個不同的區域 (domain)所組成，C1 是假性受質 (pseudosubstrate) 及 phorbol ester 結合區，C2 是鈣離子結合區，C3 是 ATP 結合區，C4 是受質結合區，具有磷酸化轉移的功能 (41,42)。

蛋白激酶 C 異構體的差異在於具有或缺少某些區域而致使其表現不同，例如 nPKCs 及 aPKCs 缺少鈣離子結合區；cPKCs 及 nPKCs 在 phorbol ester 的結合位包含兩個 zinc fingers 之作用部位，而 aPKCs 只具有一個 zinc finger 之作用部位；蛋白激酶 C  $\mu$  則缺乏 pseudosubstrate 區。

此三類型異構體之性質、分佈及受活化之方式。因此不同的異構體可能各有不同功能 (43-46)。

例如 PKC $\alpha$ 、 及 普遍存在許多細胞與組織中，但像 PKC 、 及 則有特異性的存在一種或少種的組織中。此外，大部分的細胞會內含某些固定的 PKC 異構體，但其表現會受到不同的刺激而有不同的表現。最近報告指出個別的蛋白激酶 C 異構體參與修復細胞的增殖，例如：以 carbon tetrachloride 誘導肝再生時，發現蛋白激酶 C 表現量增加 (47)。

在部分的肝切除 (hepateomy)之後也可觀察到細胞核內的蛋白激酶 C 減少及

蛋白激酶 C 增加 ( 48 ) 當肝再生期間蛋白激酶 C 進行重新分佈，從可溶的細胞質部分轉移至微粒部分 ( 49,50 )。葉酸 ( Folic acid ) 誘導腎臟再生會誘導蛋白激酶 C 降低，但是蛋白激酶 C 不會改變 ( 51 )。肝臟及腎臟的再生也會誘導初期反應基因的表現，而這些基因的表現直接間接的透過蛋白激酶 C 的調控，例如：fos、myc、Tris1、Tris8 及 Tris11 ( 52-55 )。由以上資料顯示蛋白激酶 C 的活化可能發生在化學或機械式的誘導細胞增殖時期。

### 三．蛋白激酶 C ( PKC ) 與癌症的關係

已知一些腫瘤細胞的增殖與 PKC 異構體表現有關，而且 PKC 異構體也參與細胞內的訊息傳遞的路徑。例如：細胞增殖、基因表現、細胞凋亡、修飾細胞膜上的離子孔道及當任傳導者的工作等等，因此 PKC 異構體在細胞內扮演重要角色。最近的文獻報告中提到 PKC 與癌症之間的關係如下幾點：

#### 大腸癌 ( colon cancer )

一些研究報告指出在人類大腸癌中發現 PKC 的表現量減少會影響細胞的生長及腫瘤的形成 ( 56 )。另外，在活體實驗中發現 PKC $\alpha$  II 在大腸表皮細胞中有過度增生的情況 ( 57 )，而且也證明 PKC $\alpha$  II 參與在大腸癌的早期癌化過程中扮演一個重要的角色 ( 58 )。

## 攝護腺癌 ( prostate cancer )

攝護腺癌主要是中年男性的癌症之一。有研究報告指出利用攝護腺癌的組織切片來做免疫化學染色法，探索 PKC 異構體在攝護腺癌患者的表現量，結果發現 PKC $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  在早期的攝護腺癌患者有明顯的表現，顯示 PKC 這四種異構物的確參與攝護腺癌早期的形成機制中 ( 59 )。在活體外的實驗使用老鼠攝護腺癌細胞株 ( R-3327 ) 來證明 PKC $\beta$  在癌細胞的轉移及侵襲中所扮演的角色。實驗採用 Boyden chamber 的方法顯示當老鼠 R-3327 細胞株送入大量表達的 PKC $\beta$  時，的確會抑制攝護腺癌細胞的轉移及侵襲 ( 60 )。治療方面，發現 5.5-10mM 的 Tamoxifen 處理攝護腺癌的細胞株會抑制 PKC，因而造成 p21 的活化及 Rb 的去磷酸化，使得細胞週期的停止。所以 Tamoxifen 會抑制 PKC，進而抑制攝護腺癌細胞的生長 ( 61 )。

## 乳癌 ( breast cancer )

乳癌是一種危害婦女生命的惡性腫瘤，發病率約為成年婦女的 1%。至今對於乳癌與 PKC 方面的研究的卻很多，Rose 等人的研究報告指出先前有人發現含有 estrogen receptor 的 MCF-7 細胞中 PKC $\alpha$  及  $\beta$  的表現量有明顯下降。作者分別送入大量表現 PKC $\alpha$  及 erbB2 在三種不含 estrogen receptor 的 MCF-7 細胞。發現在不含有 estrogen receptor 的 MCF-7 細胞中 PKC $\alpha$  及  $\beta$  的表現量有明顯升高，表示細胞有增殖

的現象；而 PKC $\alpha$  的作用消失，則表示細胞有走向侵襲的現象。表示在人類乳癌細胞中要有 estrogen receptor 的保護下，才不會造成 PKC $\alpha$  及  $\beta$  有過度表現的現象，因而不會造成細胞增殖及侵襲（62）。最近的文獻指出人類乳癌細胞的增殖可能與 PI3-Kinase 途徑有相關，發現假使 PKC $\alpha$  在乳癌細胞有過度表現的現象，就會減弱 AKT 磷酸化，而無法走向 PI3-K/Akt 這條訊息傳遞路徑，造成細胞無法增殖（63），表示 PKC $\alpha$  在乳癌中扮演保護的角色。此外在先前文獻中提到在 MCF-7 細胞中用 PKC 活化劑來誘導 PKC 的表現時就會與 TNF 產生結抗作用，造成細胞死亡的能力減少，因而增加細胞增殖的能力（64）在治療方面，認為 tamoxifen 與 antiprogestin 結合比 tamoxifen 單獨作用還更加有治療乳癌的作用（65）。

## 四．蛋白激酵素 C (PKC) 與人類肝細胞癌 (HCC) 關係

許多研究報告指出 PKC 與細胞增殖有關，例如乳癌、攝護腺癌等等都有相關性的文獻報導。但是對於整個 PKC 與肝癌之間的關係至今還尚不清楚。到目前為止，認為直接導致肝癌形成的因素可能是肝炎病毒（HBV）。一些研究報告指出 B 型肝炎病毒本身是一個 DNA 病毒，具有兩個轉錄活化因子 HBx 和 PreS2（66,67）。其中 HBx 本身會促進細胞膜上的 DAG 表現量增加因而活化 PKC，此時處於活

化態的 PKC 會促進細胞核內的轉錄因子 C-jun 與 C-fos 的活化，因而造成細胞增殖的現象 (68-70)；最近的文獻證明 HBx 會活化 IGF-II 是經由 PKC 透過 MAPK (p44/p42) 的路徑 (71)。整個肝癌的發展過程，若缺少細胞與細胞間附著作用，就會形成癌細胞的轉移及侵襲，並由腺瘤細胞轉變成腫瘤細胞，所以有研究報告指出 HBx 會破壞由 Src 所引導一系列細胞與細胞附著的作用，並導致肝癌的形成 (72)。因此另外一個轉錄活化因子 PreS2 是由 LHB 及 MHB 兩種蛋白質所組成，PreS2 本身處於細胞質，當細胞質中的 PreS2 大量增加時會與細胞質中的 PKC $\alpha$  (未活化態) 作用，使得細胞質的 PKC $\alpha$  轉移到細胞膜上 (活化狀態)，進而活化 C-Raf-1/MAPK 路徑，來達到細胞增殖的現象 (73)。此外有報告指出利用活體外的實驗證明當 VEGF 基因轉入到 HCC 的細胞株，來探討 PKC $\alpha$  在對於腫瘤生成及心血管生成方面機制，結果證明 PKC $\alpha$  會促使 VEGF 的作用來促進肝癌腫瘤生成及心血管生成方面的作用 (74)。另外有學者採用 Hepatocyte growth factor (HGF) 針對四種肝癌細胞株 (Hep3B、HepG2、PLC 及 Huh-7) 來了解是否會造成癌細胞的轉移，結果發現 HGF 會刺激 Hep3B、HepG2 及 Huh-7 三種細胞的轉移，此種轉移不是透過 PKC 而是 PKC 的下游基因 PLC 來促進 c-Met 的磷酸化並活化 PI3-K 來達到細胞有存活的能力 (75)。有些報導指出 c-myc 和 ras



致癌基因在 HCC 中的表現都較正常肝細胞有顯著的增加 (76.77), 且 c-myc 和 ras 的表現也可能影響 PKC 異構物的表現 (78.79)。由此可見, PKC 異構物的表現變異是多方面, 並且也暗示著 PKC 異構體表現與 HCC 的形成有關。

因此由以上的論點得知台灣地區罹患人類肝細胞癌的因素很多, 但至今整個肝癌癌化的機制還尚未清楚。在之前的研究報告指出乳癌、攝護腺癌、腦下垂體癌、神經膠質瘤及肝癌等組織中的 PKC 異構體活性都有明顯的上升。這結果顯示 PKC 異構物可能參與腫瘤的生成有關。所以本實驗利用 RT-PCR 來探討肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織中 PKC 異構體 mRNA 的表現量是否與肝細胞癌組織的大小、重量及癌化程度有關; 同時偵測 B 型肝炎及 C 型肝炎的病人中 PKC 異構體的表現情況。此外, 可以從不同癌化時期的肝癌患者與 PKC 異構體之間做比較, 確認 PKC 異構體是否參與在不同癌化時期的肝癌組織內表現。由以上的結果希望能夠確認是否 PKC 異構體能當作臨床上偵測肝癌患者的指標。

## 伍、實驗材料與方法

### 一、實驗材料

(1) 人類肝癌組織及肝癌鄰近的正常組織，由台中榮民總醫院一般外科提供，所取得檢體冷凍並放入液態氮保存

(2) 購自美國 Sigma 公司 (台中縣大里市日新路 173 號)

2-Mercaptoethanol

EDTA ( Ethylenediaminetetraacetic acid )

Citric acid

Isoamyl alcohol

N-Lauroylsarcosine

GNTC ( Guanidine thiocyanate Sodium acetate )

Isopropanol anhydrous.

MOPS ( 3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid )

Formamide

37% Formaldehyde

DEPC ( Diethyl pyrocabonate )

Chloroform

Bovine serum albumin ( BSA )

Phenylmethylsulfonyl fluororide ( PMSF )

Leupeptin

Dithiothretiol ( DTT )

Triton X-100

Polyoxyethylenesorbitan monolaurate ( Tween 20 )

3,3' -Diamine benzidine ( DAB )

Sodium orthovanadate (  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  )

Aprotinin

( 3 ) 購自美國 Promega 公司 ( 台北市延平南路 37 號 2 樓 )

MMLV Reverse transcriptase

MMLV Reverse 5 × buffer

Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor

dATP dCTP dTTP dGTP

Anti-mouse IgG (H&L) AP conjugate

Anti-rabbit IgG HRP conjugate

( 4 ) 購自美國 USB 公司 ( 台中縣大里市日新路 173 號 )

Sodium acetate

Phenol pH=4

SDS ( Sodium dodecyl sulfate )

Agarose-LE

( 5 ) 購自美國 Gibco/BRL 公司 ( 台中市大墩十一街 662 巷 1 號 7F-1 )

Agarose

Fetal bovine serum ( FBS )

(6) 購自美國 Dyna 公司 ( 臺北市士林區承德路四段 306 號 3 樓 )

DNA polymerase

10 × PCR buffer

(7) 生工公司 ( 台北縣三重市大仁街七十號二樓 )

TBE solution ( 5× )

(8) 購自美國 BIO-RAD 公司 ( 台中市西屯區河南路二段 262 號

12F-6 )

30% Acrylamide-bisacrylamide ( 29:1 ) solution

Protein assay dye

Ammonium persulfate

TEMED

(9) 購自聯工化學廠股份有限公司 ( 新竹市千甲路 133 號 )

Sodium chloride ( NaCl )

Glycine

EDTA ( Ethylenediaminetetraacetic acid )

N,N,N',N'-tetraacetic acid ( EGTA )

Potassium chloride ( KCl )

Calcium chloride ( CaCl<sub>2</sub> )

Sodium phosphate ( Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O )

Magnesium chloride ( MgCl<sub>2</sub> )

Potassium phosphate, dibasic ( K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> )

Chloric acid ( HCl )

Potassium phosphate,monobasic (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  )

## 二、實驗儀器：

名稱	廠牌
GeneAmp PCR system 2400	Perkin Elmer
Spectrophotometer	Hitachi U-2001
Centrifuge	Kubota-1720
Centrifuge	Sigma-2K15
Shark	TKS
水浴加熱器	TKS WB201
Millipore	Micon
PCR tube	Scientific Specialtie Incorporated
高壓殺菌釜	Tomin TM322
PH meter	Jenco microcomputer model 6200
天平	Mettler AE 240
加溫攪拌器	Corning
Ultravidet transilluminator	Ultra . LUM
Homogenizer knots tissue grind	Wheaton
溫度循環器	Perkin Elmer
DNA 電泳槽	Mupid-2
數位影像儀	Kodak
單片垂直型電泳槽	OWL

水浴加熱器	TKS WB201
Transphor power supply	Hoefler
Power supply	Hoefler SX250

### 三．實驗方法：

#### 1．檢體收集：

- (1) 外科肝癌切除手術所獲得的人類肝癌組織及鄰近正常肝癌組織（指接近切除邊緣的正常組織），由台中榮民總醫院一般外科在不影響病人任何醫療過程下所提供。
- (2) 檢體運送過程以液態氮保存。
- (2) 由於需要病人的病歷資料來探討與生化相關的統計數據（附錄 1），所以病人姓名則以匿名的方式，並且以性別、年齡、B 型肝炎、C 型肝炎、腫瘤大小、腫瘤重量及腫瘤分化程度來做區分。

#### 2．萃取組織 RNA

先取得人類肝癌組織約 100 毫克置入研磨管，加入 2ml solution D [4 M Guanidine thiocyanate (GNTC), 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol] 研磨，研磨完後把組織連同 solution D 一起置入離心管，加入 500  $\mu$ l Sodium acetate (2 M, pH 4.0) 混合均勻，加入 1000  $\mu$ l chloroform-isoamyl (49:1) 混合均勻，再加入 500  $\mu$ l phenol (pH 4.0) 混合均勻後在冰上靜置一分鐘，再拿起來用手均勻搖 30 秒，重複冰上靜置及用手搖 30 秒達 10 分鐘後，再放到冰上 5 分鐘後，離心 (12000 g, 4 °C, 30 分鐘)，取分層的上層水層到新的離心管，並

加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，離心 (12000 g, 4℃, 30 分鐘)，吸取分層的上層水層到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到分層中看不見白色沉澱後，將水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol，混合均勻後放到 -20℃ 冰箱靜置 1 小時，之後離心 (12000 g, 4℃, 30 分鐘)，倒掉上清液，取沉澱物以 1 ml solution D 溶解後，再加入等體積的 isopropanol 混合完全後於 -20℃ 靜置 2 小時，之後再離心 (12000 g, 4℃, 45 分鐘)，取沉澱物加入 1 ml 75% ethanol 混合完全，離心 (12000 g, 4℃, 30 分鐘) 後取沉澱物，自然乾燥 1 小時，加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 溶解沉澱物，測量其吸光值 (OD<sub>260</sub>) 來換算 RNA 濃度。

RNA 濃度 (µg/ml) = 稀釋倍數 × RNA (OD<sub>260</sub> 值) × (40 µg/ml / OD<sub>260</sub>)

### **3. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

#### **3-1. Reverse Transcriptase Reaction :**

RT (reverse transcriptase) : 取 4 µg 的 RNA 加入 DEPC-H<sub>2</sub>O 17.75 µl，以 70℃ 處理 5 分鐘。加入 0.25 µl RNase inhibitor (Promega ; 40 U/µl), 10 µl 5X RT buffer (Promega ; 50 mM Tris-HC, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 和 10 mM DTT) 以及 4 µl dNTP (Promega ; 2.5 mM), 和 5 µl Oligo dT 後，於溫度循環機處理 42℃, 5 分鐘後加入 RT 酵素 (Promega) 1:1, 繼續在 42℃ 反應，1 小時之後再以 99℃ 作用 5 分鐘後以 4℃ 保存。

#### **3-2. 引子合成 (Primer synthesis) :**

本實驗所需的引子 ( primer ) 皆由生工公司訂製 ( 附錄一、二 ) .

### 3-3. 聚合酵素連鎖反應 ( Polymerase Chain Reaction )

取 10 ul cDNA 加入 39 ul DEPC-H<sub>2</sub>O , 加入 5 ul forward primer 和 5 ul reverse primer , 再加入 5 ul dNTP (10 mM) 以及 5ul 10X PCR buffer (DyNa ; 10 mM Tris-HCl , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> , 50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100) , 和加入 1 ul DNA polymerase (DyNa , 2U/ul ) 於溫度循環機前處理 94 °C , 5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94 °C 1 分鐘 , annealing 溫度 1 分鐘 ( 視 primer 的 T<sub>m</sub> 值而定 , 附錄一、二 ) , 並於 72 °C 反應 2 分鐘 , 此循環次數視不同 primer 而定 ( 附錄一、二 ) , 最後再處理 72 °C 反應 20 分鐘 , 4 °C 保存.

### 3-4 . DNA 電泳 :

配置電泳膠片 ( 附錄五 ) . 加入 DNA marker 和取 10 μl 的 PCR 產物加入 2 μl 的 6 倍 loading dye , 加到電泳膠片。電壓 100 V , 跑電泳膠片 30 分鐘 , 於 UV 光下對照 DNA marker 位置 , 檢查所要的位置是否有所表現。

## 4 . 萃取組織 DNA

先取得人類肝癌組織約 100 毫克置入研磨管 , 加入 0.5ml lysis buffer [ 20mM Tris , 10 mM EDTA , 0.5% SDS ] 研磨 , 研磨完後把組織連同 lysis buffer 一起置入離心管 , 離心 ( 12000 rpm , 4 °C , 20mins ) , 取上清液 , 加入 25 μl Proteinase K , 放置水浴 ( 50 °C , 6hrs ) , 再加入 500 μl Phenol/chloroform-isoamyl ( 25 : 24 : 1 ) 混合均勻 , 離心 ( 12000 rpm , 4 °C , 20mins ) , 吸取分層的上層到新的離心管 , 再加



入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻,重複此步驟直到分層中看不見白色沉澱後,將水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol,混合均勻後放到-20 冰箱靜置 1 小時,之後離心 (12000 g, 4 , 40 分鐘),取沉澱物加入 1 ml 75% ethanol 混合完全,離心 (12000 g, 4 , 30 分鐘)後,自然乾燥 1 小時,加入適量的 TE buffer 溶解乾燥物,測量其吸光值已得到 DNA 濃度。

#### 4-1. 引子合成 (Primer synthesis):

本實驗所需的引子 (primer) 皆由生工公司訂製(附錄三)。

#### 4-2 . 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

取 0.5ug DNA 加入 54ul ddH<sub>2</sub>O 混合,加入 5 ul forward primer 和 5 ul reverse primer,再加入 5 ul dNTP (10 mM)以及 5ul 10X PCR buffer (DyNa; 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100),和加入 1 ul DNA polymerase (DyNa, 2U/ul)於溫度循環機前處理 94 , 5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94 1 分鐘, annealing 溫度 1 分鐘 (視 primer 的 T<sub>m</sub> 值而定,附錄三),並於 72 反應 2 分鐘,此循環次數視不同 primer 而定 (附錄三),最後再處理 72 反應 20 分鐘,4 保存。

#### 4-3 . DNA 電泳:

配置電泳膠片 (附錄五)。加入 DNA marker 和取 10 μl 的 PCR 產物加入 2 μl 的 6 倍 loading dye,加到電泳膠片。電壓 100 V,跑電泳膠片 30 分鐘,於 UV 光下對照 DNA marker 位置,檢查所要的位置是否有所表現。

## 5 . DNA 定序

取 PCR 的產物 25ul, 加入到 DNA 電泳膠片, 電壓 50V, 跑電泳膠片 50 分鐘, 將 DNA 電泳膠片放入 EtBr 中染色 2 分鐘, 於 UV 光下對照 DNA marker 位置, 檢查所要的位置是否有所表現。利用美工刀切下電泳膠片上所要的位置, 放入 millipore ( Ultrafree-DA ), 離心 6000g, 20 分鐘。將所離心下來的 DNA 產物, 利用真空乾燥 2 小時後, 加入二次水將濃縮後的 DNA 產物溶解。再置入 DNA 電泳膠片, 電壓 100V, 跑電泳膠片 25 分鐘, 於 UV 光下對照 DNA marker 位置, 檢查是否有得到純化後的 DNA 產物。然後取純化 DNA 10 $\mu$ l 及各取 PKC 異構物 sense primer 2 $\mu$ l 及 anti-sense primer 2 $\mu$ l 送貴重儀器中心進行 DNA 定序。所得到結果與 NCBI 中的基因庫做比對, 來證明設計的引子所合成的 DNA 序列無誤。

## 6 . RNA 電泳

取 4 $\mu$ g RNA 加入 11.25 $\mu$ l Formamide、4 $\mu$ l 37% Formaldehyde 及 2.25  $\mu$ l 10 $\times$ MOPS, 以 55 $^{\circ}$ C 處理 15 分鐘, 快速置入冰上 5 分鐘, 離心 2 分鐘, 加入 2.5 $\mu$ l loading dye, 然後輕微振盪。取 25 $\mu$ l RNA 加入到電泳膠片。電壓 100V, 跑電泳膠片 35 分鐘, 於 UV 光下對照核糖體 RNA ( ribosome RNA ) 中的 28S 和 18S 的位置。檢查是否有 RNA 消失的現象。

## 7 . 萃取人類肝細胞癌蛋白質

取人類肝細胞癌組織 100 毫克加入 1 ml Buffer A ( 附錄七 ), 放

置研磨器研磨 30 次。吸取均質液至超高速離心機，離心（40,000 rpm，60 分鐘，4℃），收集上清液即為細胞質的成分。將離心下來的沉澱物加入 500  $\mu$ l Buffer B（附錄七）均質，步驟是放在冰浴上，每五分鐘搖晃一次，完成後離心（40,000 rpm，60 分鐘，4℃），取其上清液即為細胞膜的部分。收集到的細胞質、細胞膜成分都保存在 -70℃。

## 8. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量採用 Bradford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入五分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595 nm 可見光之析光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

## 9. 西方墨點（Western blotting）

樣品的處理是將 PKC 萃取液的細胞質部分取 30  $\mu$ g 及微粒部分取 15  $\mu$ g（大約兩倍的比例），分別加入 PBS solution 在與 5X Treating buffer（附錄八）混勻煮沸 10 分鐘，迅速置入冰浴中，再進行 SDS-聚丙稀胺板膠電泳分析。SDS-聚丙稀胺板膠電泳之上層膠體為 4% Stacking gel（附錄八），下層膠體為 10% Separating gel（附錄八）。將做好之板膠固定到電泳裝置上，並將電泳緩衝液（Electrode buffer，附錄八）注滿上下電泳槽，然將處理過的蛋白樣品溶液加入

板膠上所形成的 U 型槽中，以 140 伏特，35 mA 進行電泳。電泳結束後進行蛋白轉移，將膠體進入冰冷之 Electrotransfer buffer（附錄八）5 到 10 分鐘，將膠體平鋪在兩張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，此時將預先浸濕的消化纖維紙蓋在膠體上面，依次在覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻棒輕趕其間的氣泡後裝入 Transfer Holder，然後置於 Electrotransfer Tank（內含 Transfer buffer，附錄伍）於 4℃ 下，進行 100 mA 電轉移，電轉移過夜之後，取出消化纖維紙浸入 10 ml/cm 含 3%（w/v）FBS 之緩衝液（Blocking buffer，附錄八），在室溫下搖動一個小時。然後加入 1 級抗體於 20 ml 含 1%（w/v）FBS 之緩衝液，與消化纖維紙在室溫中反應三個小時，之後以緩衝液（Washing buffer，附錄八）清洗兩次，每一次 10 分鐘，最後再清洗一次到掉即可。接著再進一步加入有 20 μg 2 級抗體含 1%（w/v）FBS 之 20 ml 緩衝液，於室溫作用一個小時，然後以緩衝液（Washing buffer，附錄五）清洗兩次，每一次 10 分鐘，最後再清洗一次到掉即可。最後將消化纖維紙浸入 20 ml 的受質溶液（Substrate buffer，附錄伍）加上 1 ml DAB buffer（3,3'-Diaminobenzidine，附錄八）及 5 μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進行呈色反應，待消化纖維紙上有明顯的 band 出現，即可以去離子水終止反應，清洗乾淨後晾乾。

## 10. 統計分析

將病人臨床資料包含性別、年齡、腫瘤期數和大小、腫瘤轉移與否和 HBV 等資料與各種蛋白和 mRNA 含量，利用 t-test 和 Pearson correlation 分析其相關性。

## 陸 . 實驗結果

### 一 . 分析人類肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織中 PKC 異構物的表現量 :

我們針對 14 組具有原發性人類肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) 的患者, 自外科手術上取得其肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織, 並藉由萃取人類肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織的 mRNA, 以 RT-PCR 方式來測試 PKC 異構物 mRNA 的表現量, 並以  $\beta$ -MG 當作 internal control。採用 14 組肝癌患者的臨床病理級數及相關資料記錄於表一。由 RT-PCR 發現人類肝細胞癌組織中的 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  及 mRNA 表現量比肝細胞癌鄰近正常組織的 mRNA 表現量還高。PKC  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\mu$  的 mRNA 不論在肝癌組織或肝細胞癌鄰近正常組織的 mRNA 表現量都沒有太大的差異 (圖一.二.三)。再由定量圖 (圖四) 得知肝細胞癌組織內的 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  及 mRNA 表現量比肝細胞癌鄰近正常組織的 mRNA 表現量還高, 且具有統計上的意義 ( $P < 0.05$ ) (肝癌鄰近正常組織及肝癌組織的平均值; PKC  $\alpha$  0~0.46, 0.3~1.71; PKC  $\beta$  0~3.18, 0~3.29; PKC  $\gamma$  0.31~4.62, 0.38~5.59; PKC  $\delta$  0~0.95; 0.23~5.59; PKC  $\epsilon$  0~0.8, 0.3~3.34; PKC  $\zeta$  0~2.37; 0~2.16; PKC  $\eta$  0~4.24, 0~7.56; PKC  $\theta$  0~3.14; 0~7.45; PKC  $\mu$  0~1.24, 0~1.97; PKC  $\nu$  0~0.73, 0~1.19)。所以由以上的統計數據可知 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  是屬於及顯著差異 ( $P < 0.01$ ), PKC  $\delta$  及  $\epsilon$  是屬於顯著差異 ( $P < 0.01$ ), PKC  $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\mu$  是屬於無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (圖四)。

## 二. 分析人類肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織中轉錄活化因子 ( C-jun 及 C-fos ) 及細胞增殖分子 ( Cdc2、 PCNA 及 Cyclin D1 ) mRNA 的表現量 :

我們針對 14 組具有原發性人類肝細胞癌 ( hepatocellular carcinoma ) 的患者，自外科手術上取得其肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織，並藉由萃取人類肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織的 mRNA，以 RT-PCR 方式來測試轉錄活化因子 ( c-jun 和 c-fos ) 及細胞增殖分子 ( cdc2、 PCNA 及 Cyclin D1 ) 的表現量，並以  $\beta$ -MG 當作 internal control。採用 14 組肝癌患者的臨床病理級數及相關資料記錄於表三。由 RT-PCR 的結果發現 c-jun 在人類肝細胞癌組織中的表現量與人類肝細胞癌鄰近正常組織的表現量兩者相差不大 (  $P>0.05$  ) 表示無顯著差異；c-fos 在肝細胞癌鄰近正常組織的表現量比人類肝細胞癌組織內的表現量還低，表示有極顯著差異 (  $P<0.01$  ) ( 圖五、六、七、九 ) 在之前的文獻中提到 cdc2、 PCNA 及 cyclin D1 在癌組織中就有過度表現的能力，而且當作細胞增殖的指標。由 RT-PCR 的實驗結果得知 PCNA 及 cyclin D1 在人類肝細胞癌中的表現量比肝細胞癌鄰近正常組織還要高 ( 圖六、七、八 ) (  $P<0.05$  )，屬於顯著差異。而且 cdc2 在肝癌組織內有明顯的表現量 (  $P<0.01$  )，屬於極顯著差異 ( 圖十 )。

### 三．分析人類肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織中 PKC $\alpha$ 及信息傳遞蛋白 ( signal transduction protein ) 的蛋白質的表現

我們針對八位具有原發性人類肝細胞癌 ( hepatocellular carcinoma ) 的患者，來自外科手術上取得肝癌組織及鄰近的正常組織，萃取細胞質和細胞膜上的蛋白激酶 C，測定蛋白質的表現及 PKC 的訊息傳遞作用是會導致細胞增值及分化。所以為了解肝癌形成過程的機制是否是經由 MAPK 的途徑而導致肝細胞癌的增殖及分化，因此採用西方點墨法分析，結果發現在人類肝細胞癌組織內細胞質與細胞膜上的 PKC $\alpha$  與鄰近正常肝細胞癌組織的表現量並不相同。PKC $\alpha$  在肝癌組織中細胞膜部分的表現量比鄰近的正常組織來得低 ( 圖十、十一 )。此外 c-raf、MEK、MAPK、CA 在肝癌組織中細胞質部分的表現量比鄰近的正常組織來得高，c-raf 有顯著差異 (  $P < 0.05$  )，而 CA 也有極顯著的差異存在 (  $P < 0.01$  ) ( 圖十二 )。

### 四．比較 HBV 及 HCV 中 PKC 異構體及細胞增殖分子的表現 mRNA 的表現

在之前的實驗結果得知人類肝細胞癌中 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$  及  $\eta$  的表現量都比肝細胞癌鄰近的正常組織的表現還高。因此本實驗採用 43 個肝癌患者並將病人資料分成 HBV 及 HCV 的肝癌患者來做 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$  及 cdc2 來做比較，以  $\beta$ -2-MG 當作 internal

control, 利用統計來作分析。由 RT-PCR 的結果得知 HBV 的肝癌組織內 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  比 HCV 還高 (圖十三、十四、十五)。PKC  $\delta$ 、 $\epsilon$  在統計上是屬於極顯著差異 ( $P < 0.01$ ) (圖十六)。cdc2 不論在 HBV 或 HCV 的肝癌組織內的表現量是差不多 (圖十六)。並由定量圖分析得知 cdc2 是屬於無顯著差異。

#### 五．比較 PKC 異構體在不同癌化程度的人類肝細胞癌鄰近正常組織與肝細胞癌組織內的表現

在之前的實驗結果得知 PKC 異構體在肝癌組織內的表現有較高的勢，因此我們採用病歷資料表內不同癌化程度的檢體與 PKC 異構體間來相互作比較。由定量圖分析得知 PKC  $\alpha$ 、 $\beta$  在肝癌第三及第四期的表現較高 (圖十七)，而且有顯著差異 ( $P < 0.05$ )

#### 六．利用 PCR 方式來分析人類肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織中 PKC $\alpha$ DNA 的含量

採用彰化基督教醫院提供的肝癌檢體來萃取鄰近正常組織及肝癌組織內 DNA，利用 PCR 技術來探討 PKC $\alpha$  在肝細胞癌鄰近正常組織及肝細胞癌組織內是否有 DNA amplification 的現象。並以  $\beta$ -2-MG 當作 100% 來做統計分析。結果發現肝癌組織內的 PKC $\alpha$  DNA 的表現量比鄰近正常組織還高 (圖十八)。並且由定量圖得知，肝癌組織內



PKC $\alpha$  有顯著差異性 ( $P < 0.05$ ) (圖十九)。表示肝癌組織內的 PKC 有 DNA amplification 的現象。

## 柒.討論

本實驗室最近針對 9 位患有肝細胞癌的患者進行研究，由外科手術取其肝癌組織及鄰近的正常組織來測試它們的 PKC 活性，結果發現，在肝癌細胞的細胞膜上 PKC 活性較正常肝細胞的細胞膜中 PKC 的活性低，其隨著肝癌組織的惡化其活性有隨之降低的趨勢。另外進一步以西方墨點分析結果顯示肝癌組織的細胞膜上 PKC 活性降低是與 PKC 表現量降低有關，且與肝癌組織大小成反比，然而 PKC $\alpha$  及  $\epsilon$  不管在細胞膜或在細胞質上的表現量都要比鄰近正常組織來得多，而且具有統計上的意義。而且有文獻證明肝癌組織細胞膜上 PKC 活性降低與 Kusunoki 等人發現大腸癌和大腸腺癌內部顆粒部分的 PKC 活性呈現降低的現象相似。

本實驗利用 RT-PCR 的技術來探討 PKC 異構物在肝癌組織及鄰近的正常組織的表現。實驗以 RT-PCR 分析的結果顯示肝癌組織中 PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$ 、PKC $\gamma$ 、PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$  有明顯的表現量增加，且具有統計上的意義，這表示此五種 PKC 異構物在細胞膜上處於活化的狀態，暗示 PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$ 、PKC $\gamma$ 、PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$  可能參與增殖狀態中的肝癌組織的形成。在之前的文獻曾提到 PKC 的活化會走向 MAPK 路徑，因而活化細胞核中的轉錄因子 ( c-jun 及 c-fos ) 造成細胞增殖的現象。由 RT-PCR 分析的結果顯示 c-jun 在肝癌組織中的表現與鄰

近的正常組織的表現是差異不大。c-fos 在鄰近正常組織比肝癌組織的表現量還高，表示 c-fos 可能參與細胞增殖的過程。

肝癌的形成是需要透過細胞週期蛋白的參與，因而導致癌細胞增殖的現象。本實驗以 RT-PCR 技術分析結果顯示 cyclin D1、cdc2 及 PCNA 在肝癌組織的確有過度表現的現象，且具有統計上的意義，所以此三種細胞週期蛋白就可以當作細胞增殖指標，來確認正常細胞與癌細胞之間的差異，其中 cdc2 本身就是細胞增殖的分子，而且有文獻提出在腫瘤復發的患者可以偵測到癌細胞中的 cdc2 有大量表現，我們認為 cdc2 是一個在腫瘤細胞偵測上是非常好的指標。因此由以上的結果更進一步確認我們取自肝癌的檢體是無誤。

以上的實驗證明 PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$ 、PKC $\gamma$ 、PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$  及 cdc2、cyclin D1、PCNA 有明顯的表現，因此依照肝癌患者病歷表來比較 PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$ 、PKC $\gamma$ 、PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$ 、Cdc2 在 HBV 及 HCV 的肝癌患者的表現，結果顯示 HBV 的 PKC $\alpha$  及 PKC $\beta$  表現量比 HCV 表現量還高，這表示由 PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$  在 HBV 所引起的肝癌中可能是扮演重要的角色。cdc2、cyclin D1 及 PCNA 本身是細胞增殖的分子，所以不論在 HBV 或 HCV 所引導的肝癌中他們都會有大量表現，表示肝癌細胞正處於增殖的狀態。因此要往下繼續探討是否 HBV 或 HCV 的肝癌組織內 PKC 異構體與肝癌組織的大小、重量、癌化程度是否

有相關性。由數據統計比較得知 PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$  與肝癌組織大小、癌化程度無呈現正相關的關係，所以由肝癌 PKC $\alpha$  及 PKC $\delta$  可能與肝癌組織大小或癌化程度無正相關的關係。此外也發現在第 3 或 4 期的肝癌患者肝細胞癌組織內的 PKC $\alpha$ 及 $\delta$ 的表現較第 2 期的肝癌患者顯著增高，這表示當癌化達到三、四期時，可能是 PKC $\alpha$ 及 $\delta$ 的活化所造成的因素。而且發現一些文獻指出癌細胞的擴散或腫瘤的復發的可能原因可能是 metastasis 的作用，因為在癌細胞轉移的過程中發現初始的癌細胞會藉由 metastasis 的作用轉移到血管壁，因而造成癌細胞的擴張，導致癌細胞轉形成更惡化的型態（80）。有文獻指出 PKC 是屬於 Ser/Thr 的激酶，且必須藉由細胞內的 DAG 才能使 PKC 活化，一旦 PKC 活化便會造成腫瘤細胞的增殖與腫瘤轉移（81）。若 DAG 長時間的處理會影響細胞的生長、變形及基因的表達（82）。而且有四點的證據顯示 PKC 與 metastasis 的關係：【1】有研究報告利用動物的模式證明，PKC 必須藉由 phorbol ester 的作用來達到 PKC 的活化，此時的 phorbol ester 會增加癌細胞的 metastasis 的過程（83-84）。【2】在一些癌化的細胞株，例如 B16 amelanotic melanoma、MCF-7 及 rat 13762NF mammary adenocarcinoma 中發現 PKC 異構物可能參與在這些過程（85，86）。【3】PKC 異構物可能會調節與 metastasis 相關的蛋白間的作用（87）。【4】若找到 PKC 抑制劑或 downregulator 的話，

將可以抑制 metastasis 的形成 ( 88 , 89 )。因此有以上四點的理論來說明 PKC 及 metastasis 的關係後，有研究學者就更進一步利用 Knockout、Overexpression 及 inhibitor 等三種方法來證明 PKC 異構物在不同癌的細胞株與 metastasis 之間的關係。結果發現 Overexpression PKC $\alpha$  在正常的纖維母細胞中會增加 anchorage-dependent 及 anchorage-independent 的生長 ( 90 )，若 Overexpression PKC $\alpha$  及  $\beta$  便會抑制細胞生長 ( 91 )；相對而言，PKC $\alpha$  的 overexpression 便會增加人類的乳癌細胞 ( MCF-7 ) 的生長。因此由以上的結果得知 PKC 的 overexpression 的現象在不同的癌細胞株也會有不同的影響。另外一些研究者也證明 PKC 活性的增加會與致癌的過程有關，例如採用不同轉移型的細胞株 ( MTC 及 MTF7 ) 來探討 PKC 異構物活性在低度轉移細胞 ( MTC ) 及中度轉移細胞 ( MTF7 ) 的表現，結果發現 PKC $\alpha$  的活性增加，並加速癌細胞的轉移能力。由以上的證據顯示 PKC 異構物可能會參與在肝癌形成的機制，但是在何種癌化的程度還尚不清楚，所以未來的實驗可採用不同癌化程度的肝癌細胞株來探討 PKC $\alpha$  及  $\beta$  參與癌化的過程，並且可以採用 antisense sense 及 dominant negative 或 positive 的方式來探討整個 PKC 異構物參與癌細胞轉移的過程中所扮演的角色及機制。

目前肝癌的機制至今還尚不清楚，由以上的實驗看到 PKC 異

構物在整個訊息傳遞的過程中扮演非常重要角色。而且發現 PKC $\alpha$  在肝癌組織中有 DNA amplification 的現象，此種現象可能與 PKC $\alpha$  mRNA 大量表現 (overexpression) 有關。並且有文獻指出另一個基因 c-myc mRNA 在肝細胞癌組織內表現增加與 DNA amplification 和 mRNA 消退作用 (degradation) 減慢有關。另外有國內的學者利用 comparative genomic hybridization (CGH) 的方式來研究肝癌內的染色體有哪些位置是屬於增加或缺失 (92)，結果發現染色體上的 3q、6p、8q 及 17q 的位置是增加；染色體上的 4q 及 16p 是缺失。而 PKC $\alpha$  在染色體的位置是屬於 17q21，表示有過度表現的現象，此種證據更確定 PKC $\alpha$  及 PKC $\beta$  在肝癌組織內有 DNA amplification 的現象。因此我們認為 PKC $\alpha$  及 PKC $\beta$  表現增加可能與以下三點因素有關。(1). 轉錄的能力加快 (2). DNA 的 amplification (3). RNA 的降解 (degradation) 減慢。其中可能的原因應該是癌細胞染色體的基因突變，造成 DNA 複製的數目增多且突變的基因不斷複製，使得 PKC $\alpha$  及 PKC $\beta$  產生過度表現的現象；另一個原因可能是癌細胞內的 mRNA 消退的酵素減少，而造成許多基因表現相對增加。這結果也將有利我們分析病人存活率的相關性。所以之後的實驗還要提出更多的證據來證明 PKC 異構物能當作確認肝癌患者存活率的指標，並且繼續探討 PKC 活化的下游基因的表現，將有助於了解整個 PKC 在肝癌形成的

過程中所扮演的角色。目前許多與肝細胞癌有關的分子指標，在國外的研究團體已經發現與病人的存活率有關 (93)，但是不同國家不同種族甚至不同致癌物，都有可能造成不同種類的癌細胞。因此在台灣的肝癌患者是否也有相同的結果，不得而知。所以繼續探討其他分子指標與病人的存活率的相關性是非常重要的。同時探求新的分子指標及整個生化機制，因而建立國內獨特的分子指標。

cDNA microarray 的技術已應用在肝癌方面，並且發現至少有 23040 個基因在肝癌組織中有大量表現的現象。但是整個 cDNA microarray 的技術只是大約尋找到一些基因的表現，因此在未來本實驗室將採用 Differential-Display RT-PCR (DDRT-PCR) 技術來彌補 cDNA microarray 的不足，針對肝癌組織內發現的基因作深入的研究來探討整個肝癌癌化的機制。

## 捌 . 參考文獻

1. 譚建民 . ( 1999 ) 中西醫會診系列-肝炎 . 書泉出版社.
2. 謝海永 .( 1998 )碩士論文 . 人類乳癌組織藉由 TPA 可藉由 MMP-9 表現藉由 trypsin 活化 gelatin 分解酵素之研究. 中山醫學院生化所 . pp6-7
3. Chang, K.J., Lin, J.K., Lee, P. H., Heish, Y. S., Cheng, C. K., and Liu, J.Y. ( 1996 ) The altered activity of membran-bound protein kinase C in human liver cancer. *Cancer letter*. 105:211-215.
4. Tsai, J., Heish, Y., Kuo, S., Chen, S., Yu, S., Huang, C., Chang, A., Wang, Y., Tsai, M., and Liu, J.( 2000 ).Alteration in the expression of protein kinase C isoforms in human hepatocellular carcinoma. *Cancer letter*. 161(2) : 171-175.
5. Ng,O. L. I., Ng, M. M. T., Lai, E. C. S., and Fan, S. T. ( 1995 )Better survival in female patients with hepatocellular carcinoma. Possible causes from a pathologic approach. *Cancer (Phila )* .75 : 18-22.
6. Trevisani F , Caraceni P , Bernardi M , D' Intino PE, Arienti V , Amorati P , Stefanini GF , Grazi G , Mazziotti A , Fornale L , Fozzetti G (1993) . Gross pathologic type of Hepatocellular carcinoma in Italian patients . Relationship with demographic , environmental ,and clinical factor. *Cancer*. Sep 1 : 72 (5) : 1557-63 .
7. Mason, WS., Aldrich, C., Summer, J., Taylor, JM. ( 1982 ) Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver



- cells : Free minus strand DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 3997-4001.
8. Beasley., RP. ( 1988 ) Hepatitis B virus : the major etiology for hepatocellular carcinoma. *Cancer* . 61 : 1942-1956.
  9. Koshy., R, Hofschneider., PH. ( 1989 ) Transactivation by hepatitis B virus may contribute to hepatocarcinogenesis. *Curr. Topics . Microbiol. Immunol.* 144 : 265-281.
  10. Ochiya, T., Fujiyama, A., Fukushige, S., Hatada, I., Matsubara, K. ( 1986 ) Molecular cloning of an oncogene from a human hepatocellular Carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 4993-4997.
  11. Robinson WS. ( 1994 ) Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus associated hepatocellular carcinoma. *Annu. Rev. Med.* 45 : 297-323.
  12. Hosono, S., Lee, C. S., Chou, M. J., Yang, C. S., and Shih, C. H. ( 1991 ) Molecular analysis of the p53 alleles in primary human hepatocellular carcinoma and cell line. *Oncogene.* 6: 23.
  13. Hayashi, S., Mori, I., Nonoyama, T., and Mitsumori, K.( 1998 ).Point mutant of the c-H-ras gene in spontaneous liver tumors of transgenic mice carrying the human H-ras gene. *Toxicol. Pathol.* 26 : 556-561.
  14. Ogata, N., Kamimura, T., and Asakura, H.(1991). Point mutation, allelic and increased methylation of c-H-ras gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 13 : 31-37.

15. Huber, B. E., and Thorgeirsson, S. S. (1987). Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.* 47 : 3414-3420.
16. Twu, J. S., Lai, M. Y., Chen, D. S., and Robinson, W. S. (1993). Activation of proto oncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology.* 192 : 346-350.
17. Huber, B. E., and Thorgeirsson, S. S. (1987). Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.* 47 : 3414-3420.
18. Ding, S.F., and Habib, N, A. ( 1995 ) Loss of heterozygosity in liver tumors. *J. Hepatol.* 22 : 230-238.
19. Schmidt, M. L., Salwen, H.R., Manohar, C. F., Ikegaki, N., and Cohn, S.L. ( 1994 ) The biological effects of antisense N-myc expression in human neuroblastoma. *Cell. Growth. Differ.* 5 : 171-178.
20. Sherr, CJL ( 1996 ) : Cancer cell cycle. *Science.* 274 : 1672-1677.
21. Pardee AB. ( 1989 ) .G1 event and regulation of cell proliferation. *Science.* 246 : 603-608.
22. DelSal G, Loda M, Pagano M( 1996 ).Cell cycle and cancer : critical events at the G1 restriction point.*Critical. Reviews. In. Oncogenesis.* 7 : 127-142.
23. Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB. ( 1993 ) Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res.*

*Commun* 196 : 1010-1016.

24. Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M, et al. ( 1994 ) Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 54 : 3107-3110.
25. Sato Y, Itoh F, Hareyama M, Satoh M, Hinoda Y, Seto M, Ueda R, Imai K. ( 1999 ) Association of cyclin D1 expression with factor correlated with tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 34 : 486-493.
26. Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoyo H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M. ( 1998 ) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 27 : 951-958.
27. Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. ( 2001 ) .Cyclin D1 Overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver.* 21 : 89-95.
28. Yasuhiro Ito, Tsutomu Takeda, Masato Sakon, Morito Monden, Masahiko Tsujimoto, Nariaki Matsuura. ( 2000 ) Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1( Cdc2 )in hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 59 : 68-74.
29. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang Y-J, Lu S-H, Weinstein IB. ( 1992 ). Amplification and expression of the human cyclin D1 gene

- in esophageal cancer. *Cancer Res* 52 : 3980-3983.
30. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzof D, Struss M, Bartek J. (1994) .Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int. J. Cancer*. 57 : 353-361.
  31. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue. *J. Biol. Chem*. 252 : 7603-7609.
  32. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. and Nishizuka, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem*. 254 : 3692-3695.
  33. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 91 : 1218-1224.
  34. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol ester. *J. Biol. Chem*. 257 : 7847-7851.
  35. kraft, A. S. and Anderson, W. B. (1983) .Phorbol ester increase the amount of Ca<sup>2+</sup>, phospholipid-dependent proteinase kinase associated with plasma membrane. *Nature*. 301 : 621-623.
  36. Berridge, M. J. (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol:

- two interaction second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56 : 159-193.
37. Rozengurt, E.( 1989 )Signal transduction pathway in mitogenesis. *Brit. Med. Bull.* 45 : 515-528.
  38. Housey, G. M., Johnson, M. D., Hsiao, M. L., O, Brain, C.A., Murrhy, J. P., Kirschmerier, P. and Weinstein, I. B. ( 1988 ) Overproduction of protein kinase C cause disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell.* 52 : 343-354.
  39. Hug, H. and sarre, T. F. ( 1993 ) Protein kinase C isoenzymes : divergence in signal transduction. *Biochemistry.* 291 : 329-343.
  40. Jaken, S. ( 1996 ) Protein kinase C isoenzyme and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8 : 168-173.
  41. Johnnes, F.-J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P.and Pfizenmarier, K. (1994) PKC is a novel atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 269:6140-6148.
  42. Stabel, S( 1994 )Protein kinase C-an enzyme and its relatives. *Semin. Cancer. Biol.* 5 : 277-284.
  43. Azzi, A., Bosoboinik, D. and Hensey, C.( 1992 )The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Eur. J. Biochem.* 208 : 547-557.
  44. Huang, K. P., Huang, F. L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y. (1988) Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isoenzyme. *J. Biol. Chem.* 263:14839-14845.

45. Hidaka, H., Tanaka, T., Onoda, K., Hagiwara, M., Watanabe, W., Ohta, H., Ito, Y., Tsurudomw, M. and Yoshida, T. (1988) Cell type-specific expression of protein kinase C isoenzyme in the rabbit cerebellum. *J. Biol. Chem.* 26 : 4523-4526.
46. Hocever, B. A., and Fields, A. P. (1991) Selective translocation of beta II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 266 : 28-33.
47. Liyanage, M., Frith, D., Liveneh, E. and Stable, S. ( 1992 ) Protein kinase C group B members PKC-delta, -epsilon, -zeta and PKC-eta. *Biochem. J.* 283 : 781-787.
48. Sasaki, Y., Hayashi, N., Ito, T., Fusamoto, H., Dato, N. and Kamada, T.( 1989 )Heterogeneous activation of Protein kinase C during rat liver regeneration induced by carbon tetrachloride administration. *FEBS Lett.* 254 : 59-65.
49. Alessenko, A, Khan, W. A., Westel, W. W. and Hannun, Y. A. ( 1992 ) Selective changes in Protein kinase C isoenzymes in rat liver nuclei during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 : 1333-1339.
50. Okamoto, A., Nishimura, K., Nakagawa, M. and Nakano, H. ( 1988 ) Protein Kinase C in the regeneration rat liver. *Biochemistry.* 207 : 304-310.
51. Rush, J. S., Klen, J., Fanti, P., Bhat, N. R. and Waechter, C.J. ( 1992 ) Direct assay of membrane-associated protein kinase C activity in B

- lymphocyte in the presence of Brij 58. *Anal. Biochem.* 207 : 304-310.
52. Dong, L., Stevens, J. L., Fabbro, D. and Jaken, S. (1993) Regulation of Protein kinase C isoenzymes in kidney regeneration. *Cancer Res.* 53 : 4542-4549.
53. Kondo, T., Inui, H., Konishi, F. and Inagami, T. (1992) Phosphatase D mimics platelet-derived growth factor as a competence factor in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 267 : 23609-23616.
54. Carpenter, G. (1992) Receptor tyrosine kinase substrate : src homology domain and signal transduction. *FASEB J.* 6 : 3283-3289.
55. Cowley, B. D., Chadwick, L. J., Grantham, J.J. and Calvet, J. P. (1989) Sequence protooncogene expression in regeneration kidney following acute renal injury. *J. Biol. Chem.* 264 : 8389-8393.
56. Kujubu, D. A., Norman, J. T., Herschman, H. R. and Fine, L. G. (1991) Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia : evidence for different growth initiation processes. *Am. J. Physiol.* 260 : F823-F827.
57. Suga K, Sugimoto I, Ito H, Hashimoto E. (1998) Down-regulation of Protein Kinase C- $\alpha$  detected in human colorectal cancer. *Biochem. Mol. Biol.* 44(3) : 523-528.
58. Nicole, R., Murray, Laurie. A., Davidson, Robert. S., Chapkin, W., Clay, Gustafson., Diane, G., Schattenberg, and Alan, P. Fields. (1999). Overexpression of Protein Kinase C  $\alpha_{II}$  Induces Colonic Hyperproliferation and Increased Sensitivity to Colon Carcinogenesis.

- J. Cell. Biol.* 145: 699-711.
59. N, R.Murray et al., (1999). Gokmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP.( 2001 )Elevated protein kinase C betaII is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 61(4) : 1375-1381.
60. Cornford, P., Evans, J., Dodson, A., Parsons, K., Woolfenden, A., Neoptolemos, J., and Foster, CS.( 1999 )Protein Kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 154 ( 1 ) : 137-144.
61. Powell, CT., Gschwend, JE., Fair, WR., Brittis, NJ., Stec, D., Huryk, R., ( 1996 ) Overexpression of protein kinase C-zeta ( PKC-zeta ) inhibits invasive and metastatic abilities of Dunning R-3327 MAT-LyLu rat prostate cancer cells. *Cancer Res.* 56 ( 18 ) : 4137-4141.
62. Rohlf, C., Blagosklonny, MV., Kyle, E., Kesari, A., Kim, IY., Zelner DJ, Hakim, F., Trepel, J., and Bergan, RC.( 1998 )Prostate cancer cell growth inhibition by tamoxifen is associated with inhibited of protein kinase C and induction of p21(waf1/cip1). *Prostate.* 37(1) : 51-59.
63. Morse-Gaudio, M., Connolly, JM., Rose, DP. ( 1998 ) Protein kinase C and its isoforms in human breast cancer cells : relationship to the invasive phenotype. *Int. J. Oncol.* 12 : 1349-1354.
64. Mao, M., Fang, X., Lu, Y., Lapushin, R., Bast, RC., Jr, Mills. GB. ( 2000 ) Inhibition of growth-factor-induced phosphorylation and



activation of protein kinase B/Akt by atypical protein kinase C in breast cancer cells. *Biochem. J.* 352(2) : 475-482.

65. Akkaraju, GR., Basu, A. ( 2000 ) Overexpression of protein kinase C-eta attenuates caspase activation and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 279 : 103-107.
66. El, Etreby. MF., Liang, Y., Wrenn, RW., Schoenlein, PV. ( 1998 ) Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptosis pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 51 : 149-168.
67. Diamantis, ID., McGandy, CE., Chen, TJ., Liaw, YF., Gudat, F., and Bianchi, L. ( 1992 ) Hepatitis B X gene expression in hepatocellular carcinoma. *J.Hepatol.* 15 : 400-403.
68. Kekule, AS., Lauer, U., Meyer, M., Caselmann, WH., Hofschneider, PH., and Koshy, R.( 1990 )The PreS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature.* 343 : 457-461.
69. Lubber, B., Lauer, U., Weiss, L., hohne, M., Hofschneider, PH., Kekule AS. ( 1993 ) The hepatitis B virus transactivator HBx cause elevation of diacylglycerol and activation of protein kinase C. *Res Virol.* 144 : 311-321.
70. Kekule, AS., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B., Hofschneider, PH. ( 1993 ) Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter

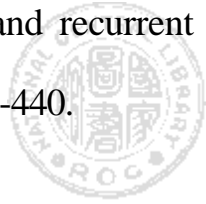
- signaling pathway. *Nature*. 361 : 742-745.
71. Twu, J. S., Lai, M. Y., Chen, D. S., and Robinson, W. S. (1993). Activation of proto oncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology*. 192 : 346-350.
  72. Kang-Park, S., Lee, JH., Shin, JH., Ik, Lee. Y. ( 2001 ) Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 Map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* . 283 303-307.
  73. Lara-Pezzi E, Roche S, Andrisani OM, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. ( 2001 ) The hepatitis B virus HBx protein induced adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene* . 20 : 3323-3331.
  74. Hildt E, Hofschneider PH. ( 1998 ) The PreS2 activators of the hepatitis B virus : activators of tumor promoter pathways. *Recent Results. Cancer. Res* . 154 : 315-329.
  75. Yoshiji H, Kuriyama S, Ways DK, Yoshii J, Miyamoto Y, Kawata M, Ikenaka Y, Tsujinoue H, Nakatani T, Shibuya M, Fukui H. ( 1999 ) Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res*. 59 : 4413-4418.
  76. Nakanishi K, Fujimoto J, ueki T, Kishimoto K, Hashimoto-Tamaoki T, Furuyama J, Itoh T, Sasaki Y, Okamoto E. ( 1999 ) .Hepatocyte growth factor promotes migration of human hepatocellular carcinoma via phosphatidylinositol 3-Kinase. *Clin. Exp. Metastasis*. 17 :

507-514.

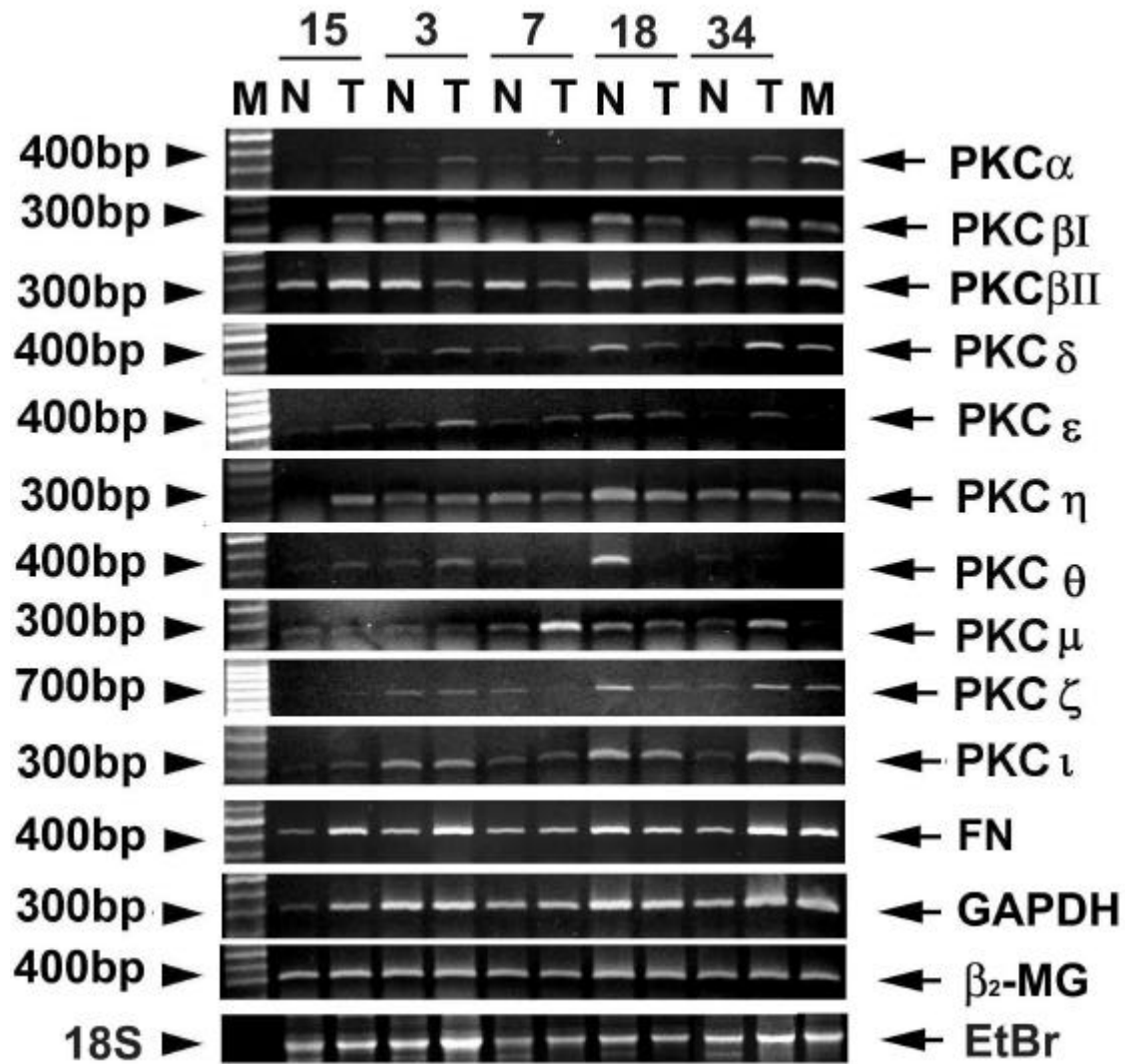
77. Tiniakos, D., Spandidos, D.A., Kakkanas, A., Pintzas, A., Pollice, L., and Tiniakos, G. ( 1989 ) .Expression of ras and myc oncogenes in human hepatocellular carcinoma and non-neoplastic liver tissues. *Anticancer Res.* 9 : 715-721.
78. Wu, B., Wang, M., You, W., and Yang, S. ( 1996 ) Overexpression of c-myc gene without gene amplification in human hepatocellular carcinoma. *Chin. Med. J.* 109 : 922-925.
79. Fernandes, E.R., and Ashendel, C.L. ( 1996 ) Ras downregulation of protein kinase C mRNA in C3H10T1/2 fibroblast. *Mol. Carcinog.* 17 : 23-24.
80. G.L. Nicolson ( 1982 ) Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 695 : 113-176.
81. Nishizuka, Y.. ( 1995 ) protein kinase C : protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. *FASEB J.* 9 : 484-496.
82. Weinstein, IB., Lee, L-S., Fisher, PB., Mufson, A., and Yamasaki, H. ( 1979 ) .*J. Supramol. Structure.* 12 : 527-540.
83. Gopalakrishna, R., Barsky, S.H. ( 1988 ) Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 612-616.
84. Takenaga, K., Takahashi, K. ( 1986 ) Effect of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on adhesiveness and

- lung-colonizing ability of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 46 : 375-380.
85. Liu, B., Renaud, C., Nelson, K.K., Nelson, Y.Q., Chen, R., Bazaz, J., Kowynia, J., Timar, C.A., Diglio, K.V. ( 1992 ) Protein kinase C inhibitor calphostin C reduces B16 amelanotic melanoma cell adhesion to endothelium and lung colonization. *Int. J. Cancer.* 52 : 147-152.
86. Mapelli, E., Banfi, P., sala. ( 1994 ) Effect of protein kinase C inhibitors on invasiveness of human melanoma clones expressing different level of protein kinase C isoenzymes. *Int. J. Cancer.* 57 : 281-286.
87. Blobe. G.C., Obeid, L.M., Hannun, Y.A.( 1994 )Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer. Metastasis. Rev.*13 : 411-431.
88. Dumont, J.A., Jones, W.D., Bitonti, A.J.Inhibition of experiment metastasis and cell adhesion of B16F1 melanoma cells by inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res.* 52 : 1195-1200.
89. Dumont, J.A., Jones, W.D., Bitonti, A.J.( 1994 )Modulation of human melanoma cell metastasis and adhesion may involve integrin phosphorylation mediated through protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 : 264-272.
90. Cacace, A.M., Guadagno, S.N., Krauss, R.S., Fabbro, D., and Weinstein, IB. ( 1993 ) *Oncogene.* 8 : 2095-2104.

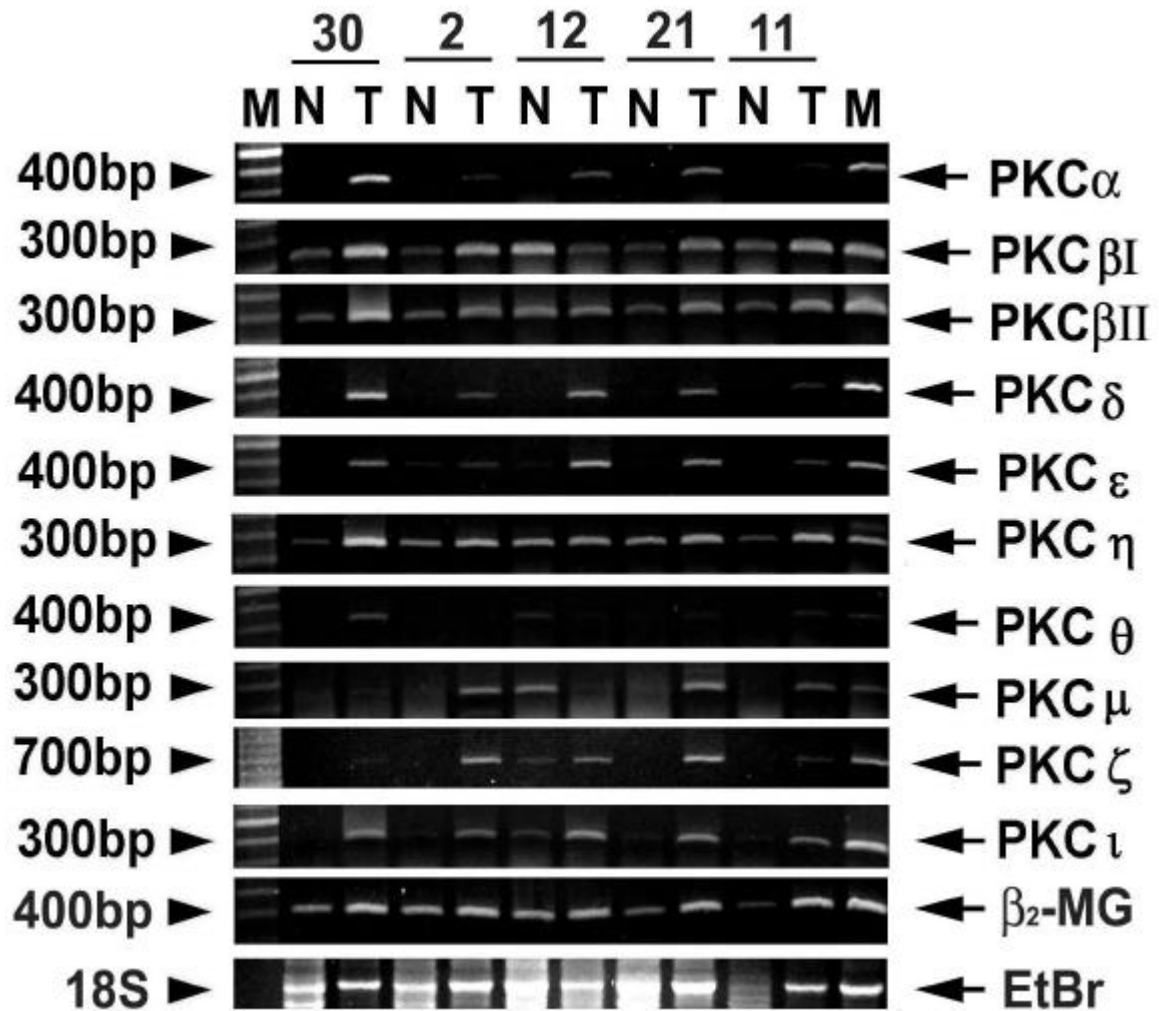
91. Chapline, C., Ramsay, K., Klauck, T., and Jaken, S. ( 1993 ) *J. Biol. Chem.* 268 : 6858-6861.
92. Yann-Jang, Chen., Shiou-Hwei, Yeh., Jung-Ta, Chen., Cheng-Chung, Wu., Ming-Ta, Hsu., Shih-Feng, Tsai., Pei-Jer, Chen., and Chi-Hung, Lin. ( 2000 ) Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 119 : 431-440.



## 玖、圖表

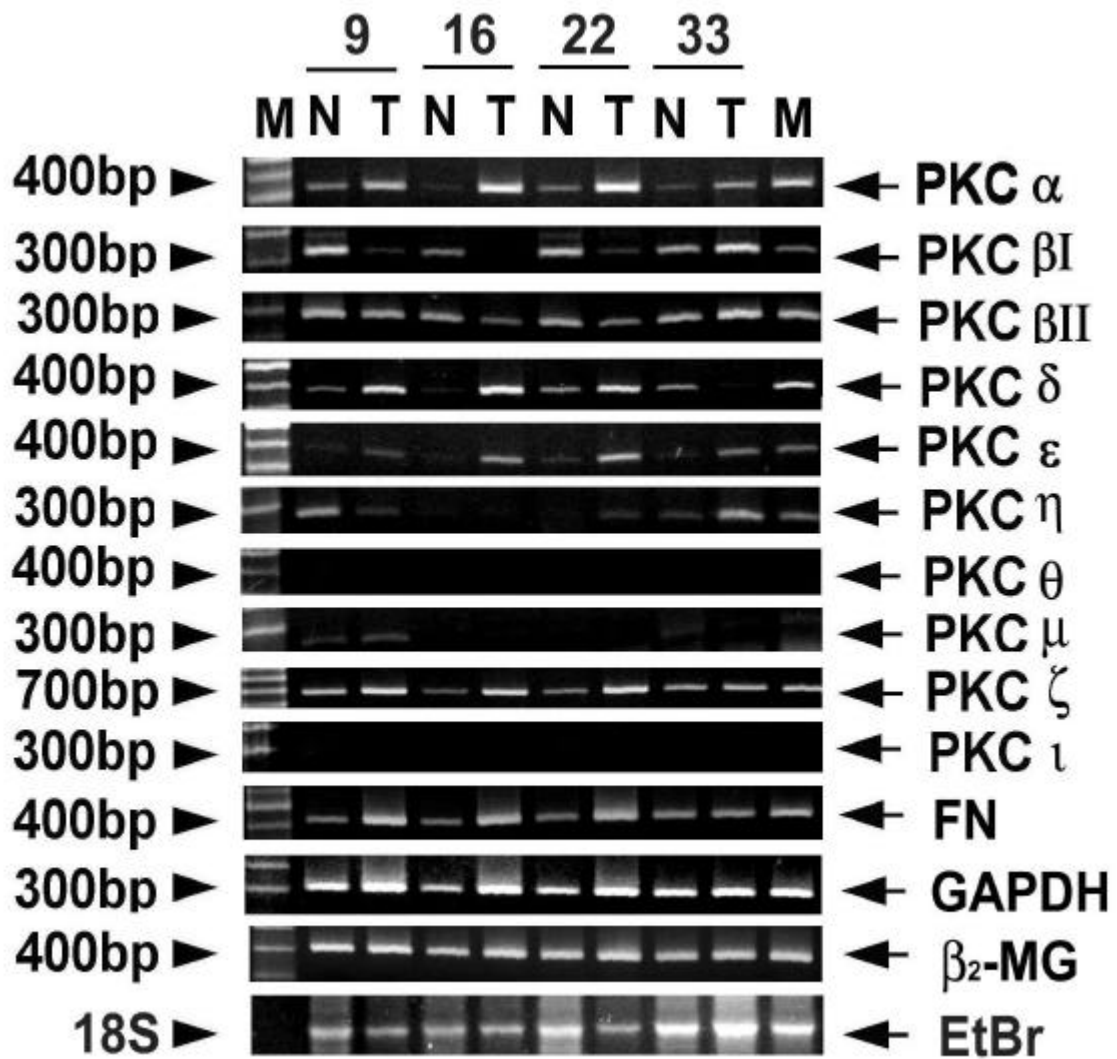


圖一 . RT-PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織 PKC 異構物 mRNA 的表現。N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。M : Marker。 Internal control 為  $\beta_2$ -MG。此實驗結果重複三次。

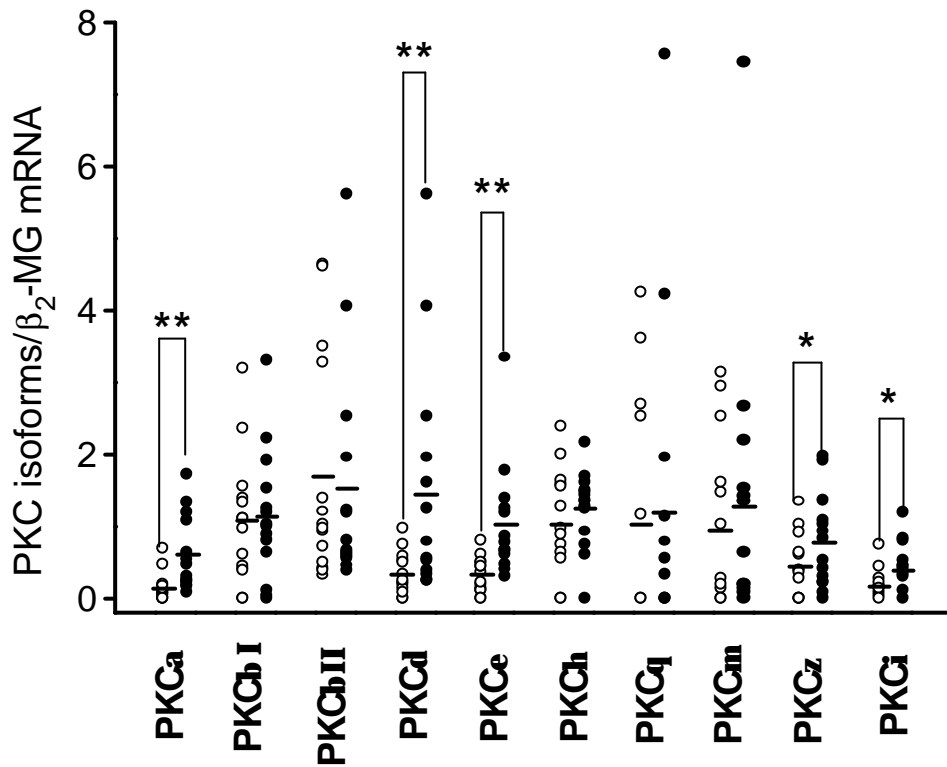


圖二 . RT-PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織 PKC 異構物 mRNA 的表現。N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。M : Marker。Internal control 為  $\beta_2$ -MG。此實驗結果重複三次。

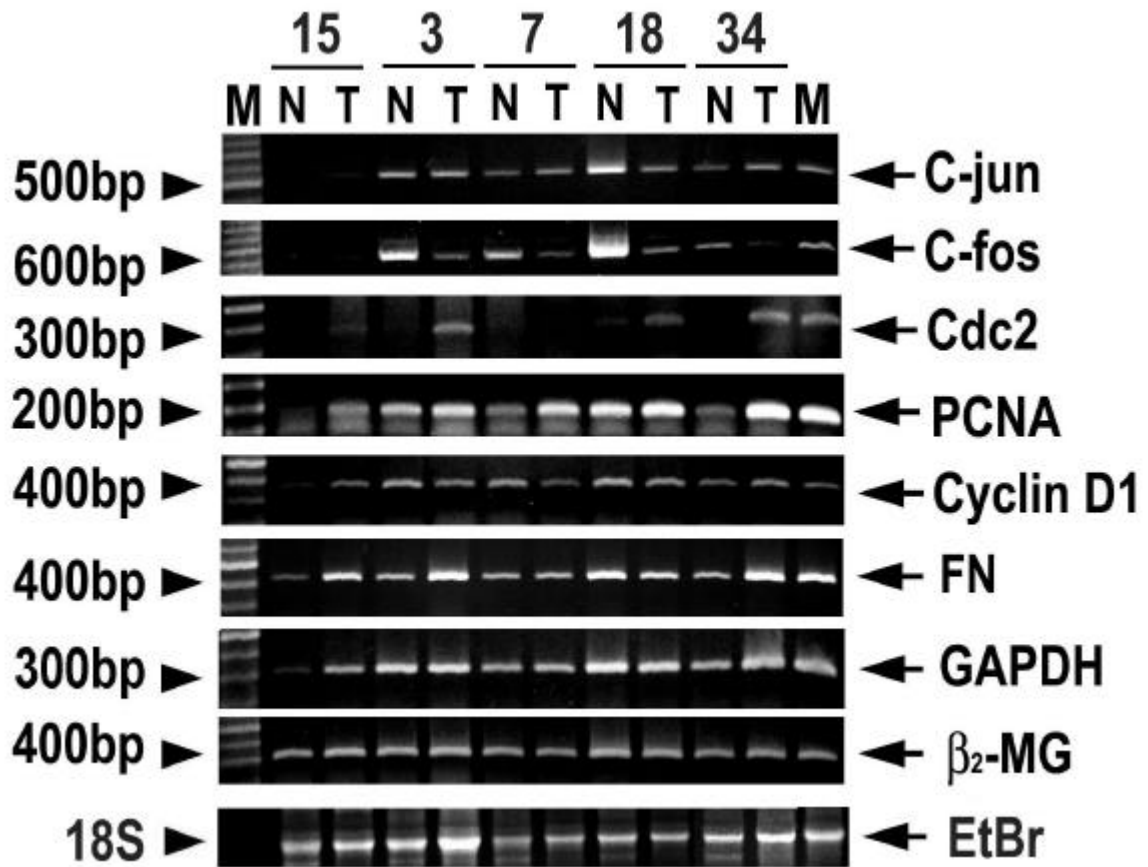




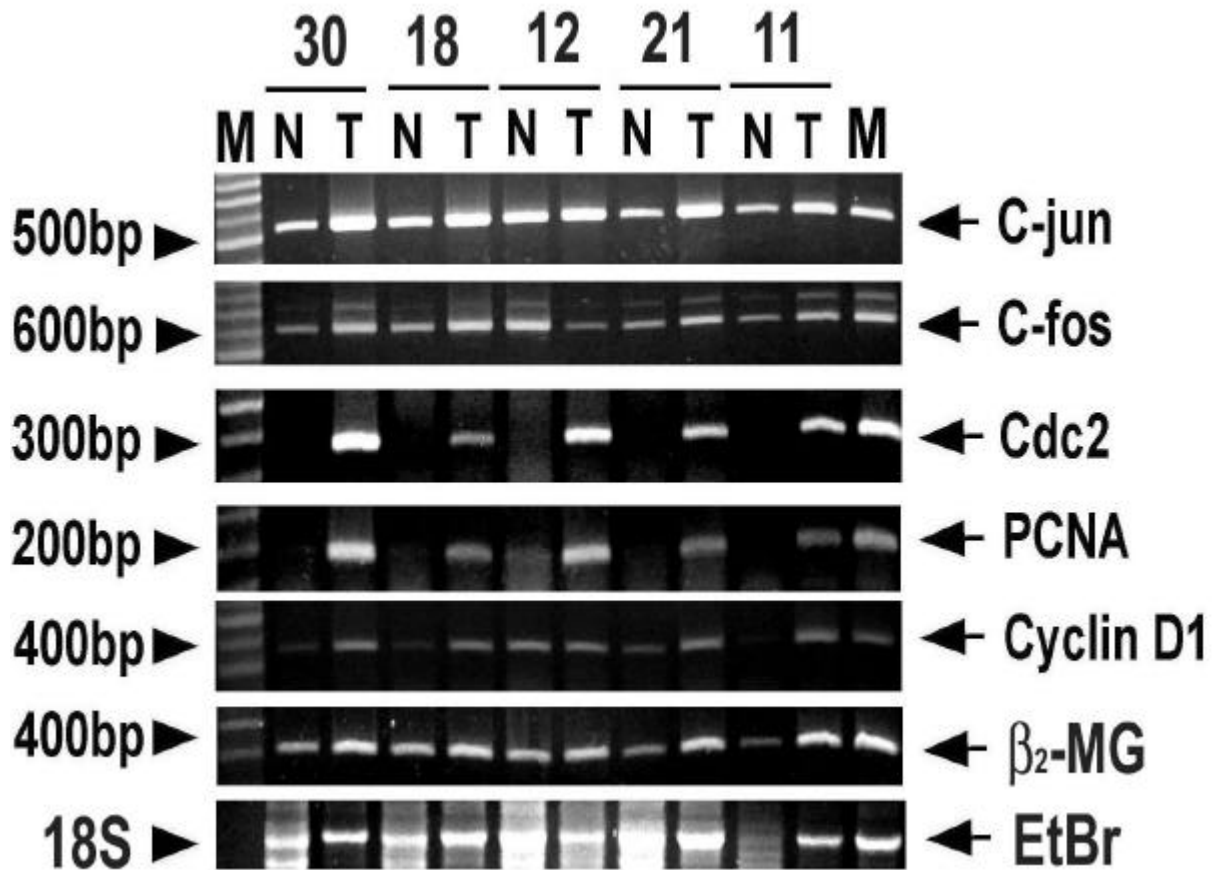
圖三 . RT-PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織 PKC 異構物 mRNA 的表現。N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。M : Marker。Internal control 為  $\beta_2$ -MG。此實驗結果重複三次。



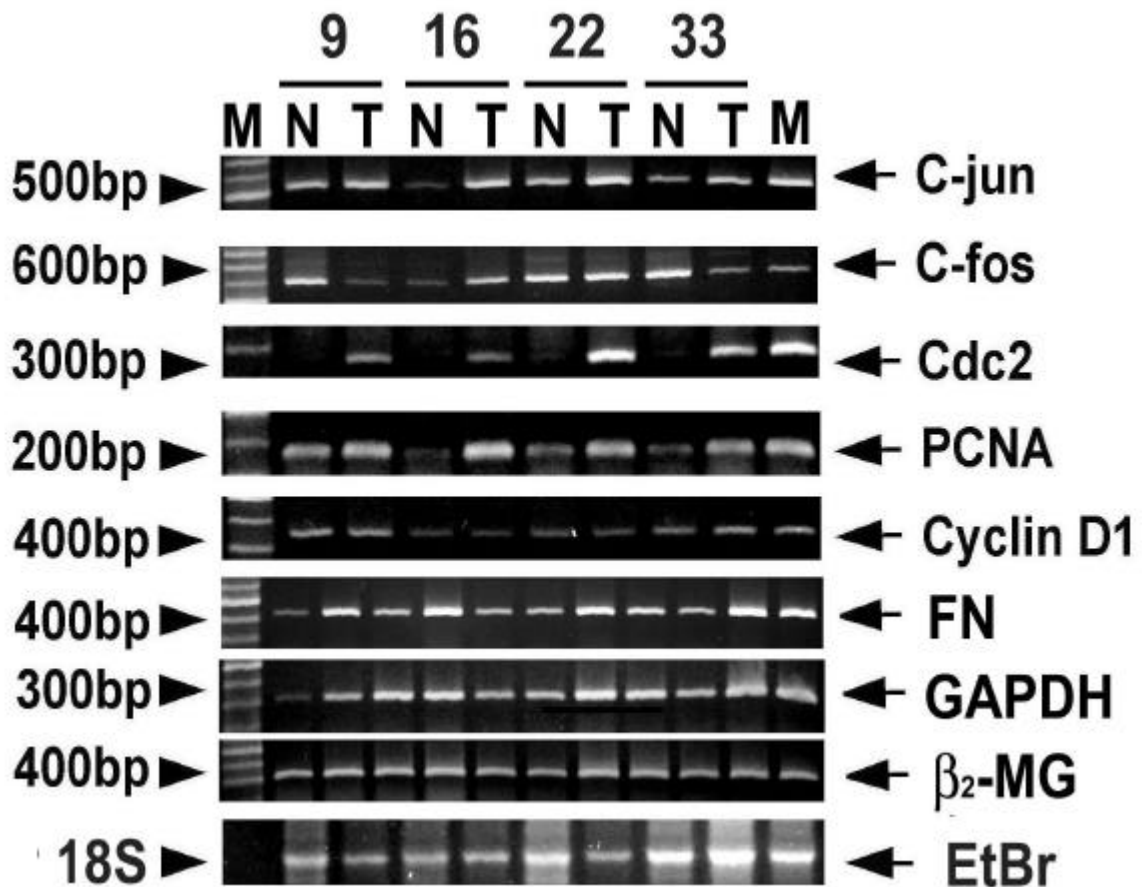
圖四 . 定量分析人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織 PKC 異構物 mRNA 的表現。 肝癌組織鄰近正常組織； 肝癌組織。  
 - 表示平均值。 \* . \*\* 分別表示顯著差異 (  $P < 0.05$  ) 及極顯著差異 (  $P < 0.01$  )。



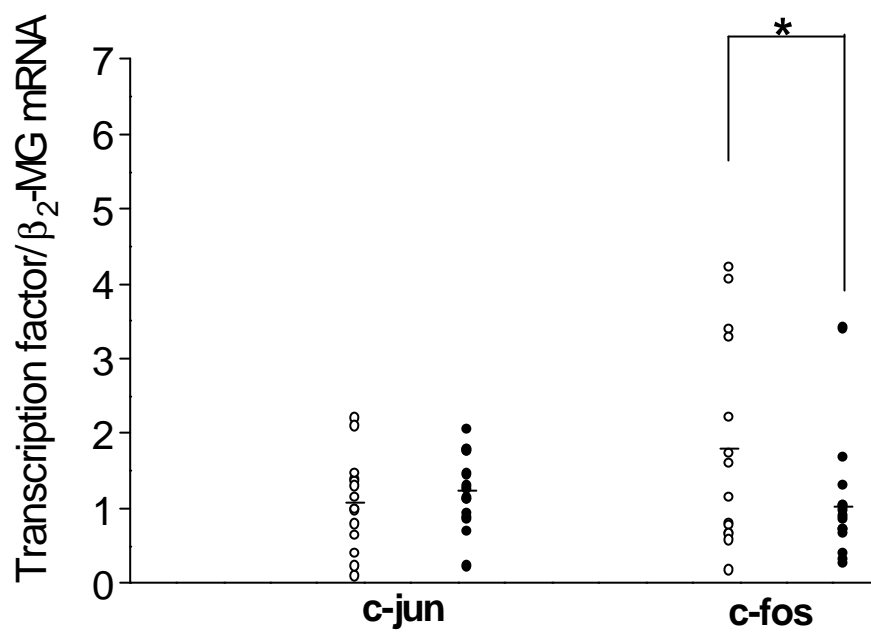
圖五 . RT-PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內轉錄活化因子 ( c-jun 及 c-fos ) 及細胞增殖分子 ( Cdc2、PCNA 及 Cyclin D1 ) mRNA 的表現。  $\beta_2$ -MG 為 internal control . N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。 M : Marker。此實驗結果重複三次。



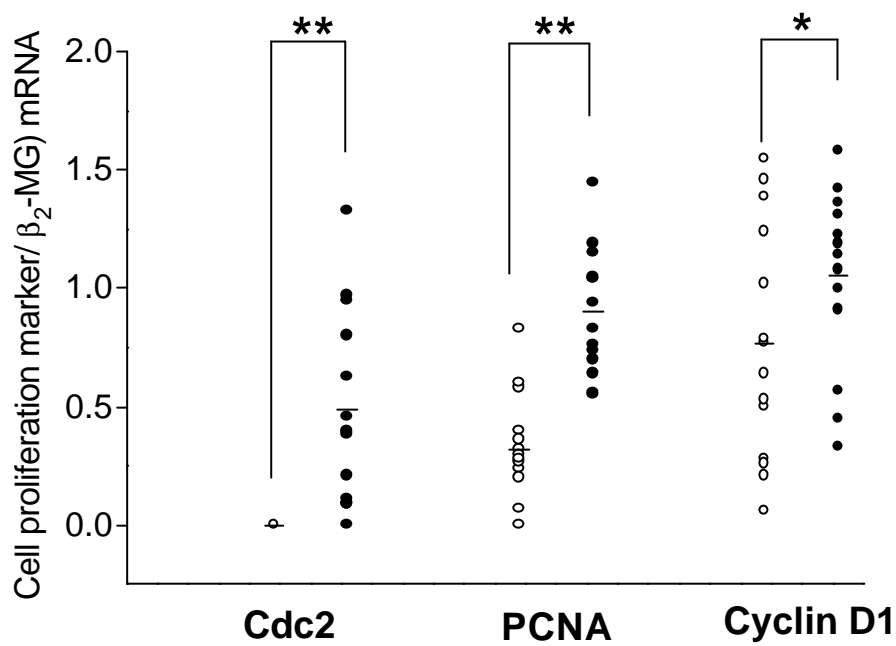
圖六 . RT-PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內轉錄活化因子 ( c-jun 及 c-fos ) 及細胞增殖分子 ( Cdc2、PCNA 及 Cyclin D1 ) mRNA 的表現。 2-MG 為 internal control . N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。 M : Marker。此實驗結果重複三次。



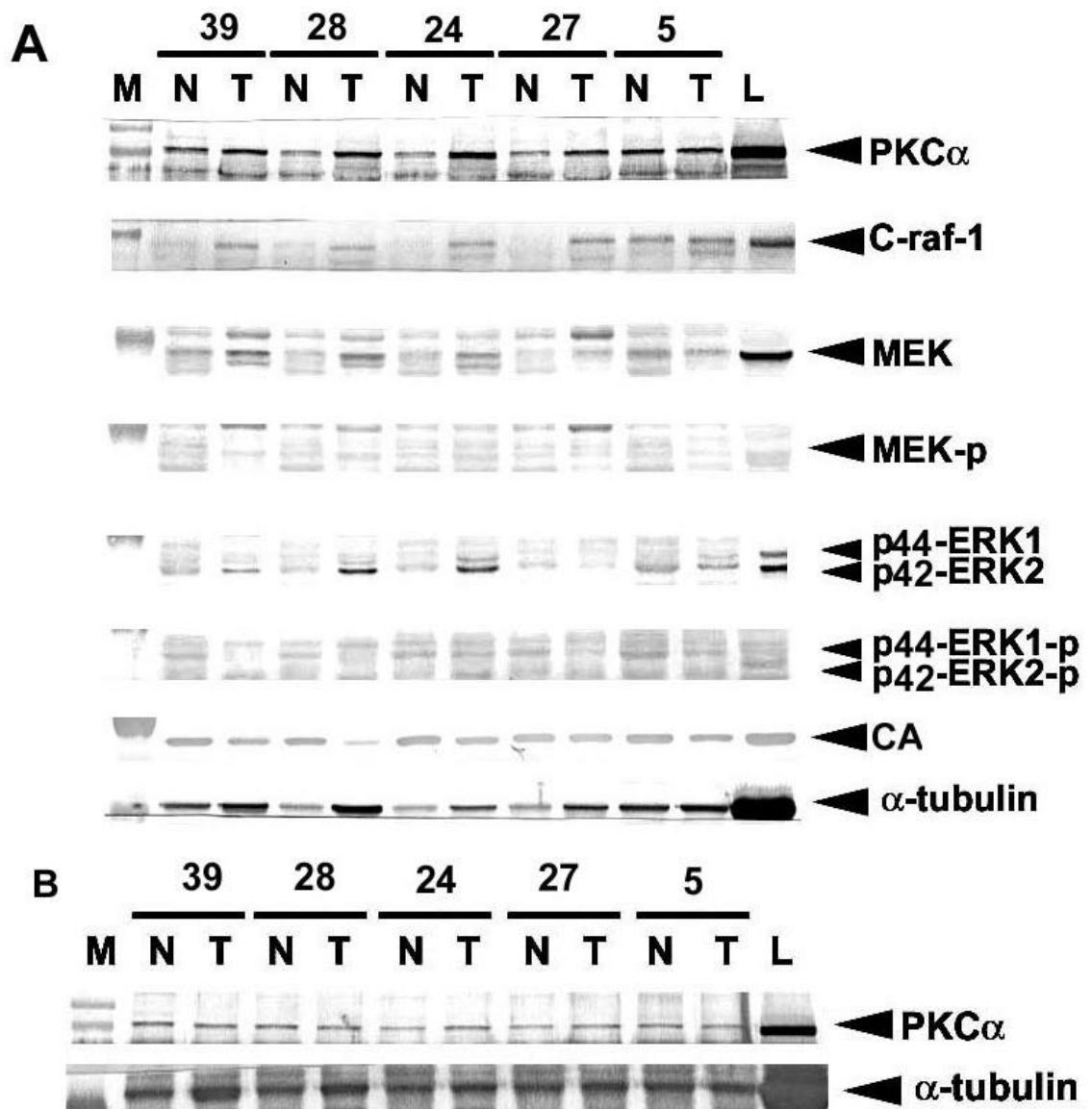
圖七 . RT-PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內轉錄活化因子 ( c-jun 及 c-fos ) 及細胞增殖分子 ( Cdc2、PCNA 及 Cyclin D1 ) mRNA 的表現。  $\beta_2$ -MG 為 internal control。N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。M : Marker。此實驗結果重複三次。



圖八 . 定量分析人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內轉錄活化分子 (c-jun 和 c-fos) mRNA 的表現 . 肝癌組織鄰近正常組織 ; 肝癌組織 . - 表示平均值。 \* 分別表示顯著差異 (  $P < 0.05$  )。

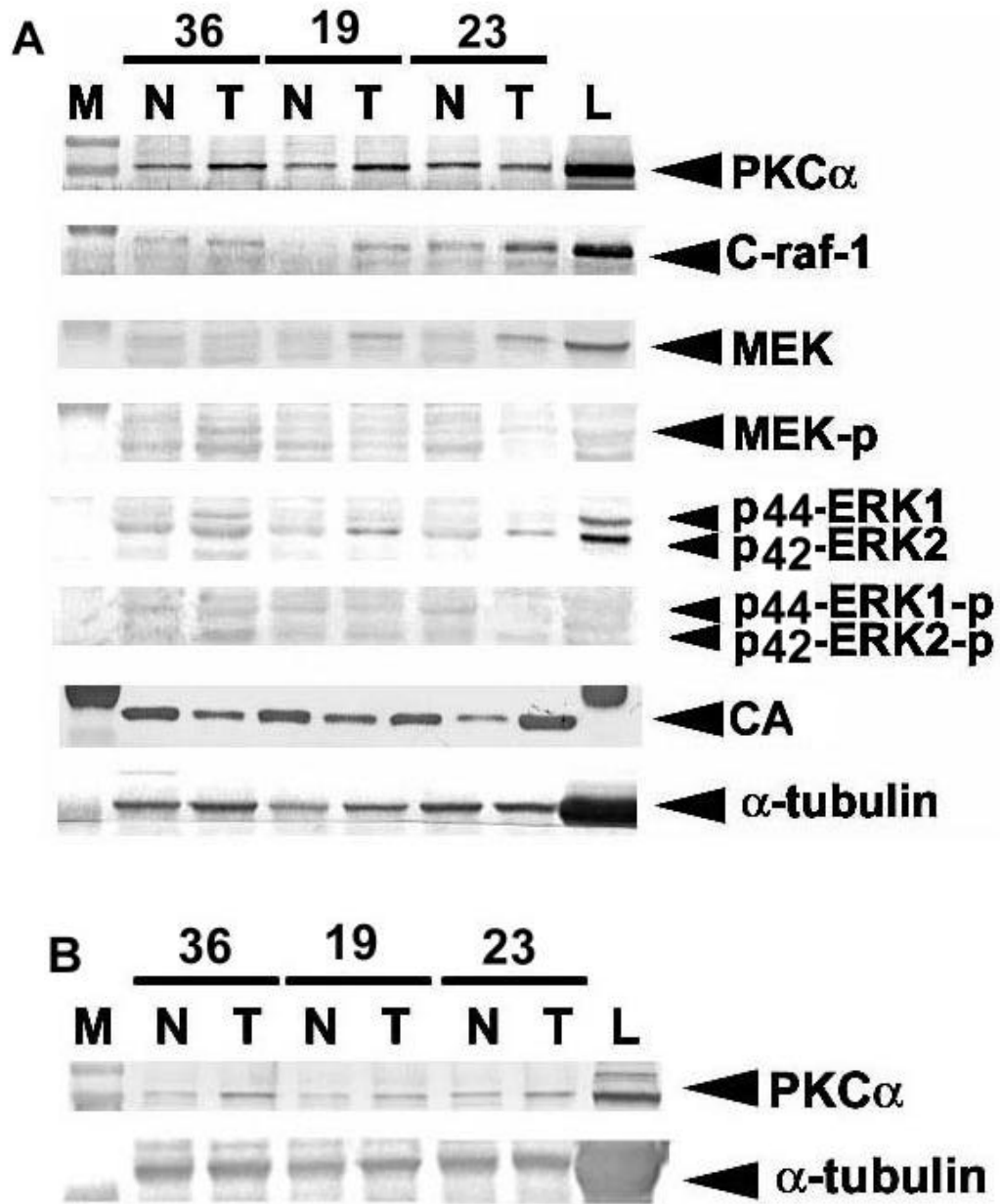


圖九 . 定量分析人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內細胞增殖指標 ( Cdc2、 PCNA 及 Cyclin D1 ) mRNA 的表現。 肝癌組織鄰近正常組織； 肝癌組織。 - 表示平均值。 \* . \* \* 分別表示顯著差異 ( P<0.05 ) 及極顯著差異 ( P<0.01 )。

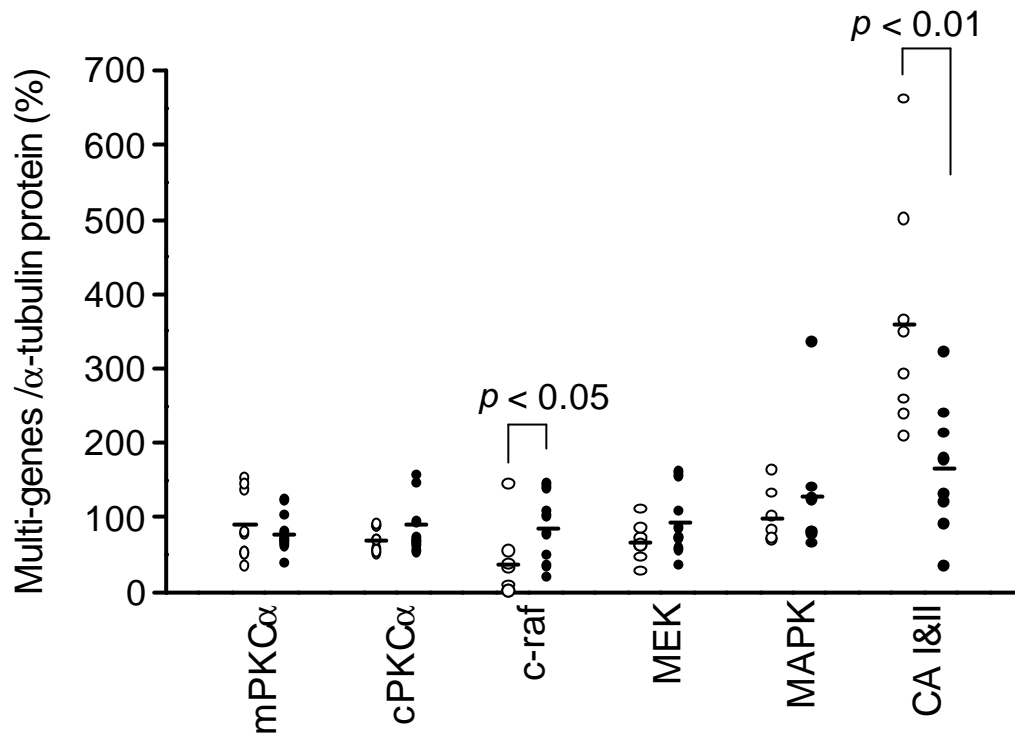


圖十 . 西方墨點分析人類肝癌組織內 PKC $\alpha$ 、C-raf-1、MEK、MAPK 及 CA 表現。人類肝癌組織經研磨萃取後進行 SDS-PAGE 並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC $\alpha$ 、C-raf-1、MEK、MAPK 及 CA 抗體。圖 A 為 1-5 組病人組織細胞質部分；圖 B 為細胞膜部分。M：Marker；L：Brain Lysate，當作 positive control；N：Normal tissue；T：Tumor tissue。

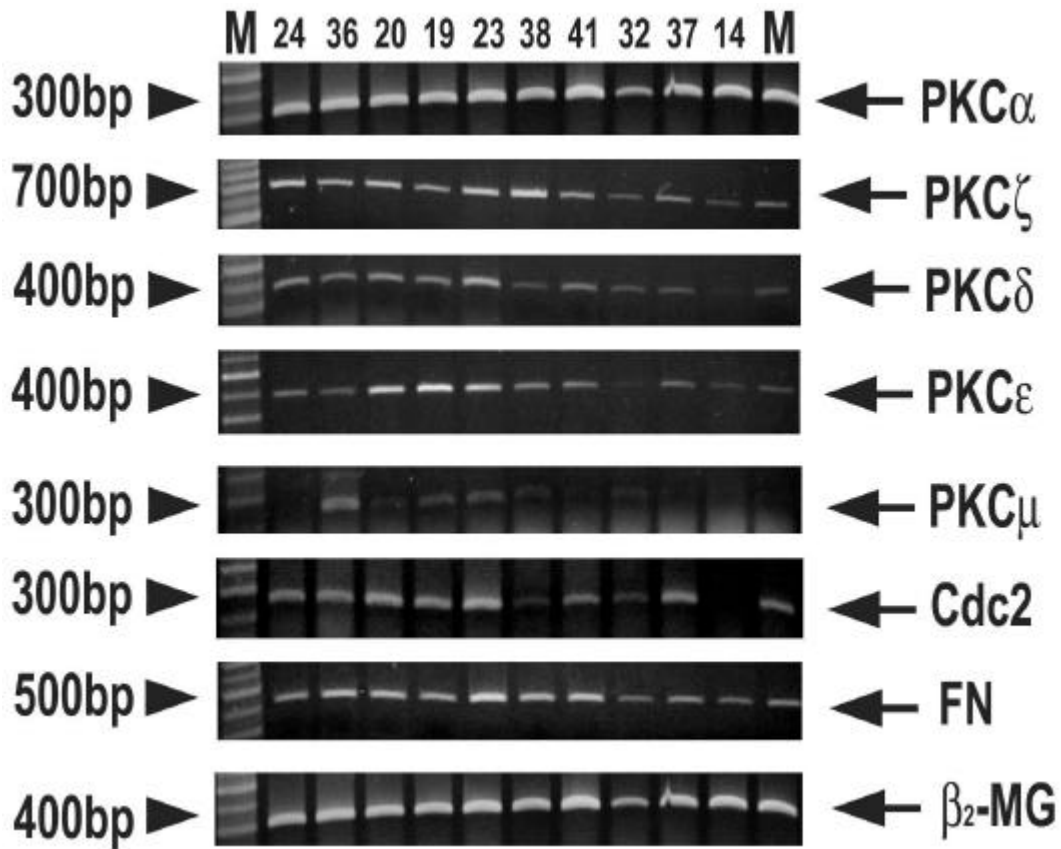




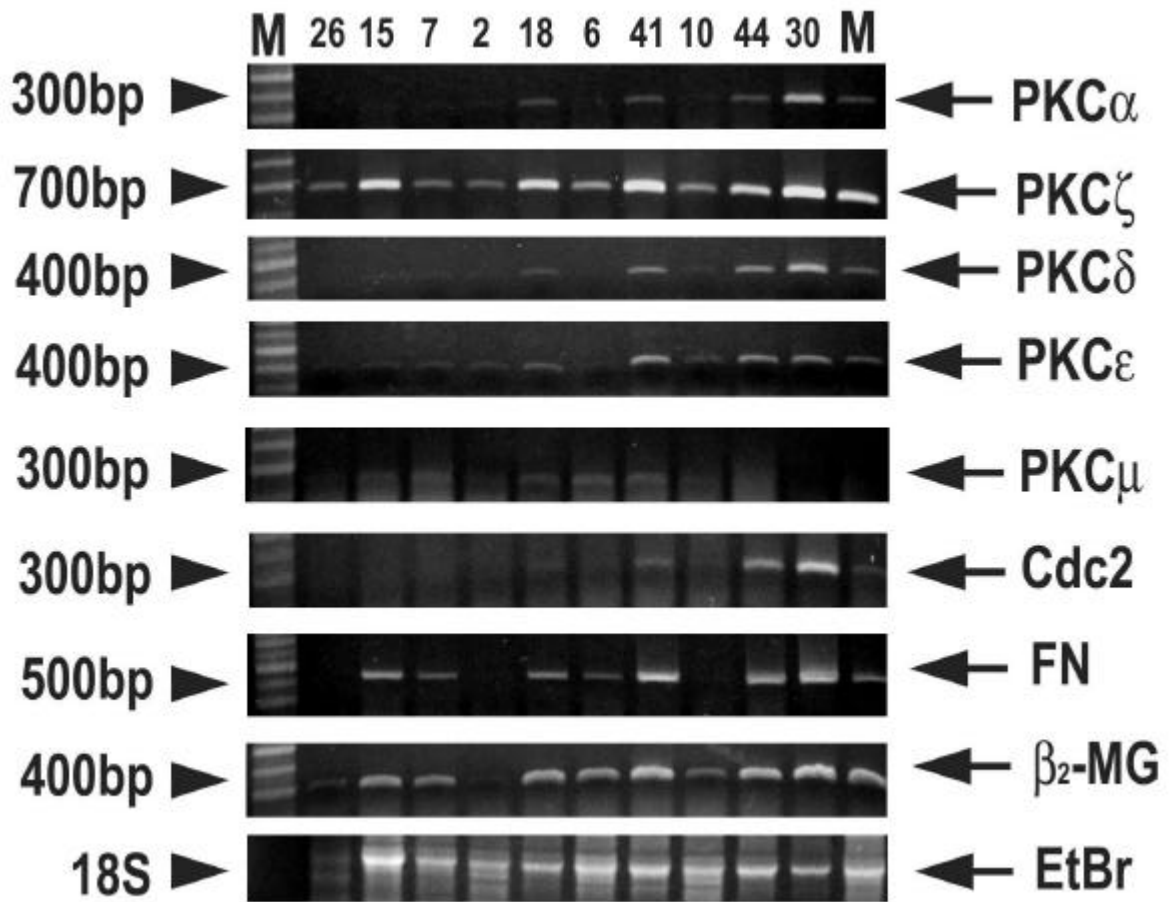
圖十一 西方墨點分析人類肝癌組織內 PKC $\alpha$ 、C-raf-1、MEK、MAPK 及 CA 表現。人類肝癌組織經研磨萃取後進行 SDS-PAGE 並轉移至硝化纖維紙，再染以專一性的 PKC $\alpha$ 、C-raf-1、MEK、MAPK 及 CA 抗體。圖 A 為 1-3 組病人組織細胞質部分；圖 B 為細胞膜部分。M：Marker；L：Brain Lysate，當作 positive control；N：Normal tissue；T：Tumor tissue。



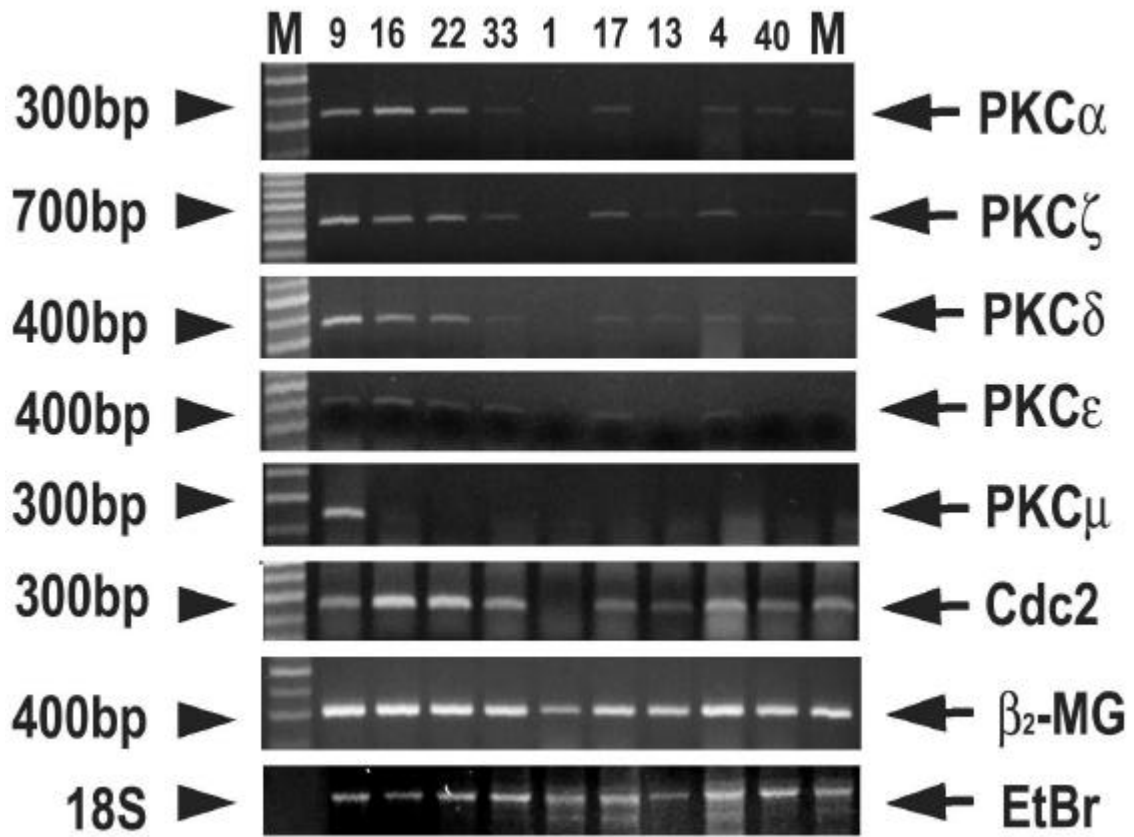
圖十二 . 人類肝細胞癌組織中細胞膜及細胞質內 PKC $\alpha$ 、c-raf、MEK、MAPK 及 CA 表現量化圖。經西方點墨分析後的細胞膜及細胞質內 PKC $\alpha$ 、c-raf、MEK、MAPK 及 CA 定量後以  $\alpha$ -tubulin 當作 100%。將八位病人的肝癌組織及鄰近正常組織的細胞質及細胞膜部分統計後，求其平均值及 P 值。 肝癌組織 鄰近正常組織； ● 肝癌組織。 - 表示平均值。P<0.05 表示顯著差異；P<0.01 表示極顯著差異。



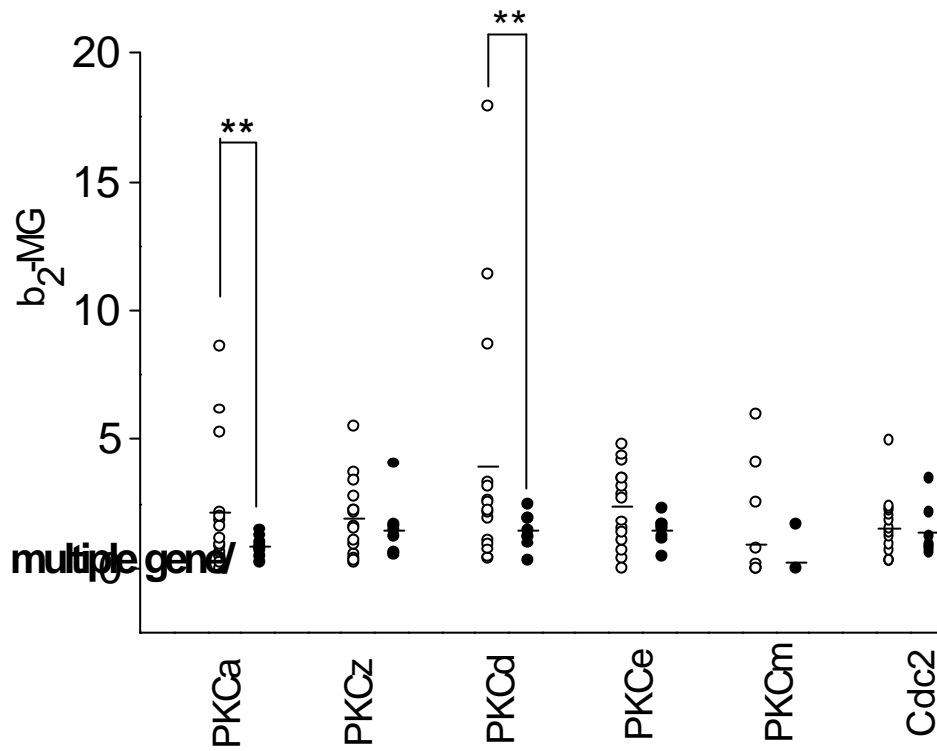
圖十三 . RT-PCR 測試肝癌患者的肝細胞癌組織內 PKC 異構物 (PKC $\alpha$  及  $\zeta$ ) 及 Cdc2 mRNA 的表現 .  $\beta_2$ -MG 為 internal control . 頂端為病例編號。M : Marker。此實驗結果重複三次。



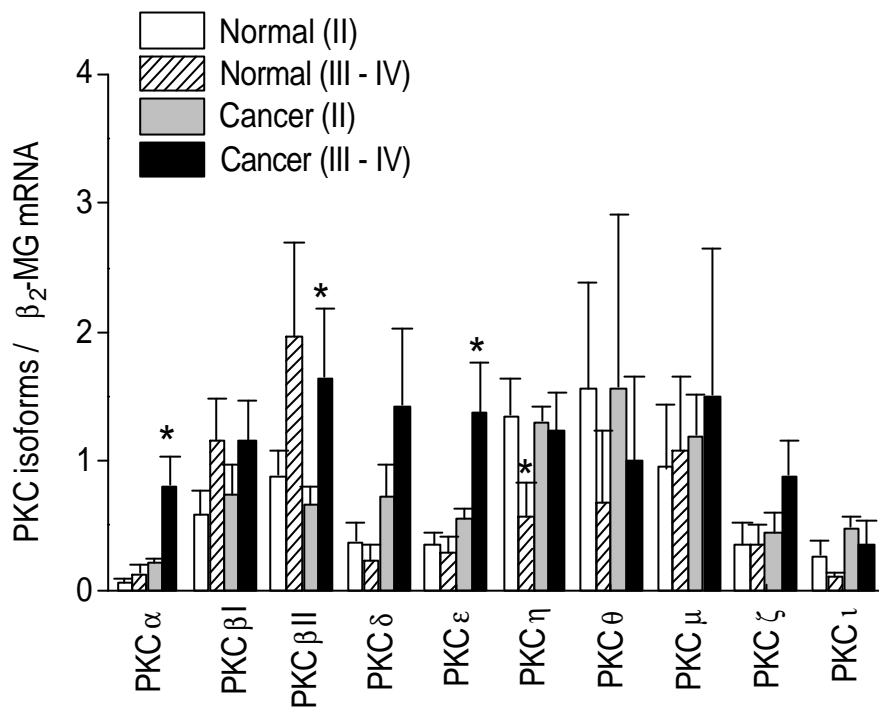
圖十四 . RT-PCR 測試肝癌患者的肝細胞癌組織內 PKC 異構物 (PKC $\alpha$ 、 $\zeta$  及  $\mu$ ) 及 Cdc2 mRNA 的表現 .  $\beta_2$ -MG 為 internal control . 頂端為病例編號。M : Marker。此實驗結果重複三次。



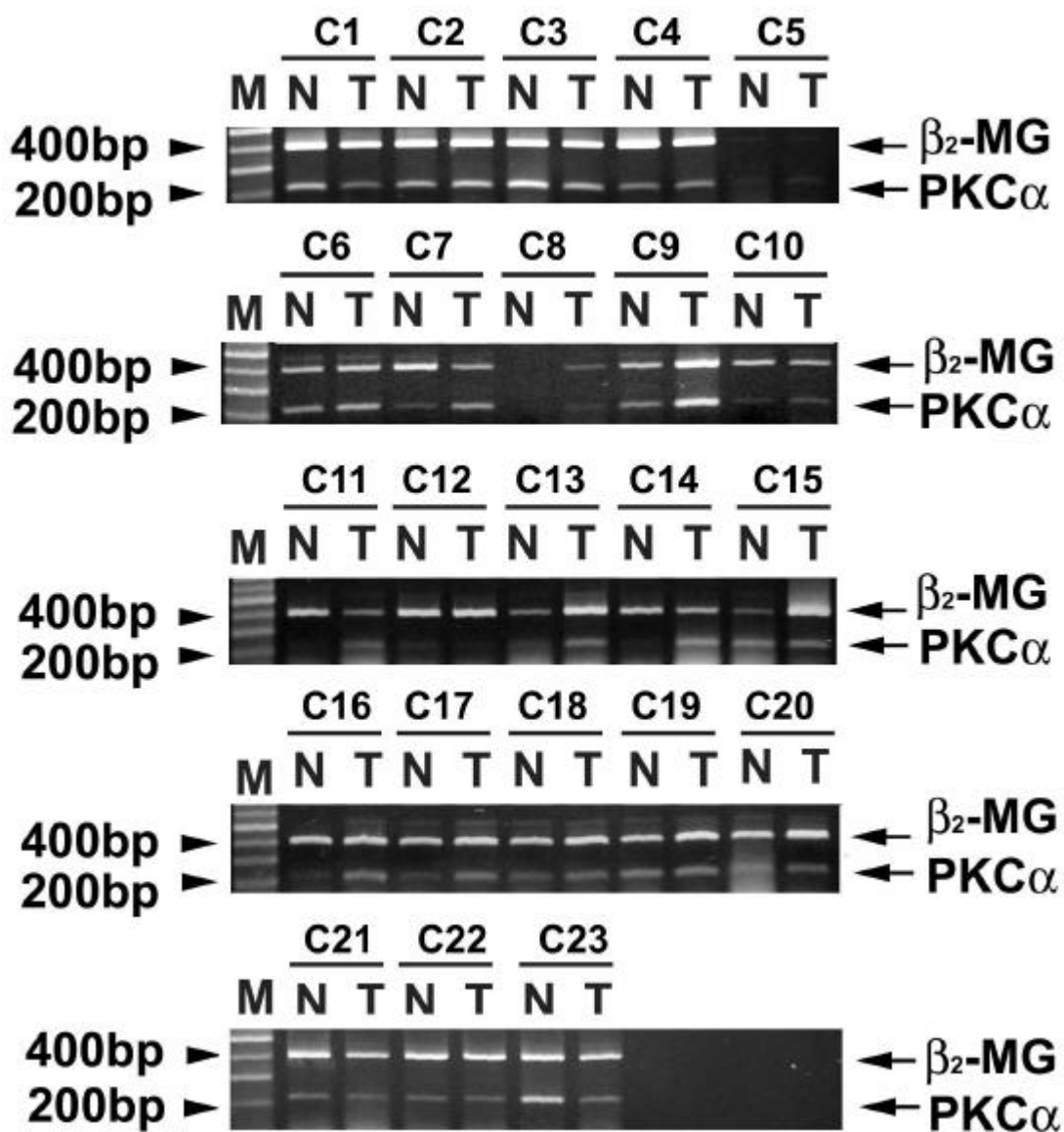
圖十五 . RT-PCR 測試肝癌患者的肝細胞癌組織內 PKC 異構物 (PKC $\alpha$ 、 $\zeta$ 、 $\delta$  及  $\mu$ ) 及 Cdc2 mRNA 的表現 .  $\beta_2$ -MG 為 internal control . 頂端為病例編號。M : Marker。此實驗結果重複三次。



圖十六 . 定量分析 HBV 及 HCV 的肝癌患者組織內 PKC 異構物 (PKCa、ä、æ及å)及 Cdc2 mRNA 的表現。 HBV ; HCV。 - 表示平均值。 \* , \*\* 分別表示顯著差異(P<0.05) 及極顯著差異 ( P<0.01 )。



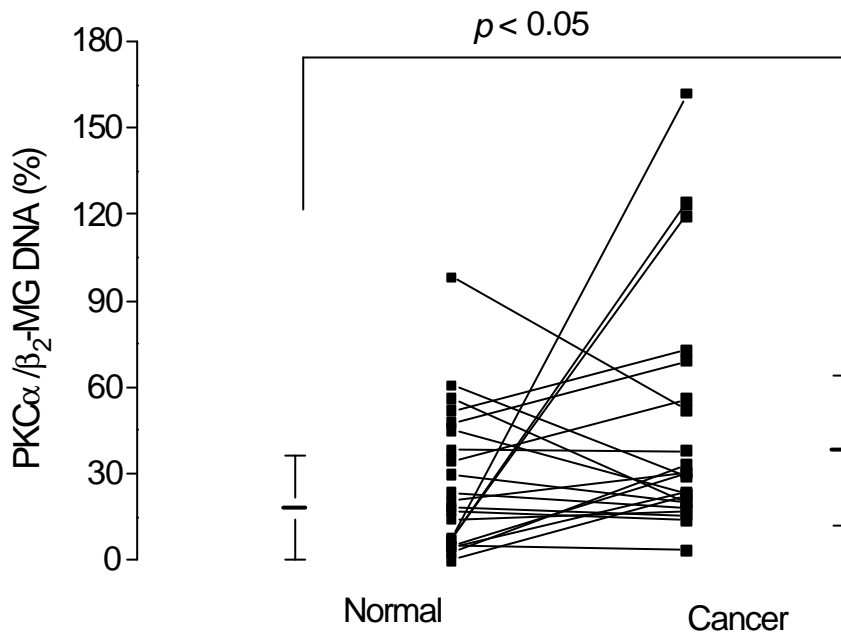
圖十七：定量分析不同癌化程度的人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內 PKC 異構體 mRNA 的表現。2-MG 為 internal control。M：Marker。\* 表示顯著差異 (P<0.05)。



圖十八 . PCR 測試人類肝癌組織鄰近正常組織及肝癌組織內 PKC $\alpha$

及  $\beta_2$ -MG 的 DNA 表現。  $\beta_2$ -MG 為 internal control。 N , 肝癌組織鄰近正常組織 ; T , 肝癌組織 . 頂端為病例編號。 M : Marker。





圖十九 . 定量分析肝癌患者組織內 PKC $\alpha$  DNA 的表現。將 23 組肝癌病人的 PKC $\alpha$  定量以  $\beta_2$ -MG 為 100%。並計算平均值及 P 值。 - 表示平均值。Internal control :  $\beta_2$ -MG。P<0.05 表示顯著差異。









## 附錄五、DNA Gel 製備

	1%,20 ml	1%,40 ml	2%,20 ml	2%,40 ml
Agarose power	0.2 g	0.4 g	0.4 g	0.8 g
DEPC-H <sub>2</sub> O	16 ml	32 ml	16 ml	32 ml
5X TBE buffer	4 ml	8 ml	4 ml	8 ml

## 附錄六、實驗藥品及溶液配製

### 2M sodium acetate

ddH <sub>2</sub> O	100ml
Sodium acetate	16.406g
Acetic anhydride	調 pH 值=4
DEPC	0.1ml
滅菌	

### Solution D

ddH <sub>2</sub> O	50ml	100ml
GNTC	23.64g	47.28g
Sodium citrate	0.368g	0.735g
N-Lauroylsarcosine	0.25g	0.5g
DEPC	0.05ml	0.1ml
PH=7		
滅菌		

### 10×MOPS

ddH <sub>2</sub> O	500ml	1000ml
MOPS	20.9g	41.8g
Sodium acetate	3.40g	6.80g
EDTA	1.86g	3.72g
DEPC	0.5ml	1ml
調 pH 值=7		
滅菌		

### Lysis buffer

20mM Tris  
10mM EDTA  
0.5% SDS

## 附錄七

### Homogenization Buffer A , pH 7.4

	Stock	10 ml
20 mM Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	30.0 mM	0.01 ml
2 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100.0 mM	0.20 ml
2 mM EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM DTT	500.0 mM	0.02 ml
250 mM Sucrose	342.3 M.W	0.86 g
10 μg/ml Leupeptin	1.0 mg/ml	0.1 ml



## Homogenization Buffer B , pH 7.5

	Stock	10 ml
20 mM Tris-HCl	200.0 mM	1.00 ml
0.03 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	30.0 mM	0.01 ml
5 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100.0 mM	0.50 ml
2 mM EDTA	100.0 mM	0.20 ml
0.5 mM EGTA	100.0 mM	0.05 ml
2 mM PMSF	200.0 mM	0.10 ml
1 mM DTT	500.0 mM	0.02 ml
5 mM NaF	100.0 mM	0.50 ml
10 µg/ml Leupeptin	1.0 mg/ml	0.1 ml
Triton X-100	0.1%	10 µl

## 附錄八、Western blotting-實驗溶液配置

<b>PBS, pH7.2</b>	<b>1 L</b>
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.2 g
任選一種	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.39 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.95 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.44 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.68 g

### Treatment buffer

	100 ml	100 ml
	1X	5X
62.5 mM Tris-HCl pH 6.8	757.1 mg	3.78 g
2 % SDS buffer	2 g	10 g
10 % glycerol	10 ml	50 ml
2-mercaptoethanol	0.35 ml	25 ml
0.001 % bromophenol blue		

## Separating Gel

	8%	10%	12.5%
1.5M Tris-HCl ( pH 8.8 )	5 ml	5 ml	5 ml
Ammonium Persulfate ( 10 mg/ml )	1 ml	1 ml	1 ml
30% Acrylamide-0.8% Bis-acrylamide	5.4 ml	6.7 ml	8.4 ml
dd H <sub>2</sub> O	8.4 ml	7.1 ml	5.4 ml
10% SDS buffer	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
TEMED	6.7 $\mu$ l	6.7 $\mu$ l	6.7 $\mu$ l

## Stacking Gel

	<u>10 ml</u>	<u>15 ml</u>
1.5M Tris-HCl ( pH 8.8 )	2.5 ml	3.75 ml
Ammonium Persulfate ( 10 mg/ml )	0.5 ml	0.75 ml
30% Acrylamide-0.8% Bisacrylamide	1.5 ml	2.25 ml
dd H <sub>2</sub> O	5.4 ml	8.1 ml
10% SDS buffer	0.1 ml	0.15 ml
TEMED	25 $\mu$ l	37.5 $\mu$ l

<b>Electrode Buffer, pH 8.3</b>	<b>5 L</b>
Tris-HCl	15.13 g
Glycine	72 g
SDS	5g
dd H <sub>2</sub> O	補至 5 L

<b>Transfer Buffer, pH 8.3</b>	<b>5 L</b>
Tris-HCl	15.12 g
Glycine	72 g
Methanol	1000 ml
dd H <sub>2</sub> O	補至 5 L

<b>Blocking Buffer, pH 7.4</b>	<b>500 ml</b>
FBS	15 ml
NaCl	4.5 g
Tween 20	0.5 ml
Tris-HCl	6.05 g
dd H <sub>2</sub> O	補至 500 ml

<b>Washing Buffer, pH 7.4</b>	<b>5 L</b>
Tris-HCl	60.54 g
Tween 20	5 ml
NaCl	45 g
dd H <sub>2</sub> O	補至 5 L

<b>Substrate Buffer, pH 9.5</b>	<b>400 ml</b>
Tris-HCl	4.84 g
NaCl	2.33 g
MgCl <sub>2</sub>	0.406 g
dd H <sub>2</sub> O	補至 400 ml

**DAB buffer**

3,3'-Diaminobenzidine	300 mg
50 mM Tris-HCl , pH 7.4	100 ml