

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2320-b-040-014

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：謝易修 中山醫學院生化學科

計畫參與人員：江慧玲 中山醫學院醫技系

楊順發 中山醫學院生化所

一、中文摘要

我們研究室以 kinase activity assay 和 western blot 分析人類肝癌組織之 PKC，結果發現 kinase 總活性上昇，PKC α isoform 的量顯著下降，而 PKC ζ & PKC δ 則是顯著上昇，顯示 PKC 異構型酵素在癌瘤發展上扮演重要的角色，所以本計畫中同時以 specific PKC isoform antibodies 進行 immunohistochemistry 分析，以獲知接種 S-180 癌瘤細胞之老鼠個臟器之 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化與 PKC isoforms 變化是否相關？

結果顯示：(1). 以 immunoblot 分析 tissues 中 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化得知其變化量與 tumor progression 的程度有相關性 (2). 以 enzyme assays 分析 tissues 中 CA 活性得知 CA 活性隨著 CAI, CAII 及 CAIII 蛋白量的變化而改變 (3). 以 immunohistochemistry 分析組織中 CAI, CAII 及 CAIII 獲知 tissues 中 CAI, CAII 及 CAIII 細胞分佈情形及變化 (4). 以 immunohistochemistry 組織中 PKC isoforms 的變化，獲知 PKC 蛋白表現量變化關鍵性角色

關鍵詞： 癌瘤, CA 及 PKC 異構型酵素, 差異表現分析

Abstract

The expressions of CAI and CAII have been most frequently investigated in a variety of tumor cells and cell lines, but it has been difficult to find a clear-cut relationship between the expression of CA isoenzymes in normal and malignant cell. However, no evidence of a direct relationship between normal and malignancy. CA expression has been presented for CAs I through VII. It appears that only the recently characterized isoform CAIX and CAXII are exceptional, as it expression can be associated with tumorigenesis.

We also found that the level of membrane-bound PKC α in the cancer tissue significantly decreased as compared with that in the adjacent normal tissue, whereas there was no alternation in the cytosolic PKC α . In addition, there was a significant correlation between the level of PKC α and the tumor size. The levels of PKC ζ and PKC δ significantly increased in both cytosolic and membrane. In this project, we examined the protein and the

messenger RNA (mRNA) levels of cytosolic CAs (including CAI, CAII and CAIII) that was correlated to PKC expression in the organs of S-180 bearing mice. We also examined the protein expression of cytosolic CA by immunohistochemical methods. The possibility that cytosolic CA serving as an indicator for a favorable treatment outcome in the organs of S-180 bearing mice were obtained.

二、計畫緣由與目的

至今已確定有 12 種 PKC 異構體 (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 θ 、 ι 、 λ 、 η 及 μ) 存在，這些異構體在不同的組織或細胞中有不同的分佈及功能 (1-3)。例如 PKC α 、 δ 及 ζ 普遍的存在許多細胞及組織中，但像 PKC γ 、 η 及 θ 則特異性的只存在一種或少數的組織中 (4)。此外，大部份的細胞會確實的出現某一些固定的 PKC 異構體，但其表現會受到不同的刺激而表現不同。例如在 Swiss 3T3 纖維母細胞中，bombesin、platelet-derived growth factor (PDGF) 和 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 都會誘發細胞增殖，然而這些刺激物卻藉由不同 PKC 異構體進行增殖作用；bombesin 和 PDGF 是藉由 PKC δ 及 PKC ϵ 進行反應 (5)，而 PMA 是藉由 PKC α 進行反應 (6)。

已知一些腫瘤細胞的增殖也與 PKC 異構體的表現有關，這些異構體具有促進或抑制腫瘤細胞生長的能力；例如在增殖狀態中的 C6 glioma cells 與

PKC α 大量表現有關 (7)。另外在大白鼠的 hepatoma cell line MH1C1 中，若以 PKC α anti-sense oligonucleotide 處理，會造成細胞生長停止 (8)。若在 HT29 colon cancer cell line 中大量表現 PKC β II，會使腫瘤的生長受到抑制 (9)。這些結果顯示 PKC 異構體在腫瘤形成中扮演重要的角色。

有關 CAs 與各種 Tumors 之間關係如何？目前研究顯示 CAs 在 nervous system tumors 因變異性太大故無顯著相關性 (10, 11)；在 Pancreatic and colorectal tumors 中 CAI & CAII 則是顯著降低 (12)，所以可當作 cell proliferation index (13)；而 CAIX (MN protein) 在 cervical carcinoma 如 HeLa cells (14)、colorectal tumors (15) 及 renal cell carcinoma (16) 中則是顯著升高，故可當成 tumor marker；以及 CAXII 在 renal cell carcinoma 中被發現有 overexpression 現象 (17)；至於與 hepatocellular carcinoma 的關係直至目前尚未有文獻提出。我們研究室先前以 kinase activity assay 和 western blot 分析人類肝癌組織之 PKC，結果發現 kinase 總活性上昇，PKC α isoform 的量顯著下降，而 PKC ζ & PKC δ 則是顯著上昇，所以本計畫目的：(1). 以 immunoblot 分析 S-180 bearing mice tissues 中 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化以及探討其變化量是否與 tumor progression 的程度有相關性？(2). 以 enzyme assays 分析 S-180 bearing mice tissues 中 CA 活性是否隨著 CAI, CAII 及 CAIII 蛋白量的變化而改變 (3). 以 immunohistochemistry 分析 S-180 bearing mice tissues 中 CAI, CAII 及 CAIII 以獲知

tissues 中 CAI, CAII 及 CAIII 實際上細胞分佈情形及變化 (4). 以 immunohistochemistry 分析 S-180 bearing mice tissues 中 PKC isoforms 的變化, 以獲知 PKC 是否扮演著 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化關鍵性角色

三、結果與討論

本計畫完成了 (1). S-180 bearing mice tissues 中冷凍檢體及切片標本收集及製作, 包括肝臟, 腎臟, 肺臟, 心臟, 脾臟, 胰臟, 腦, 肌肉等組織 (2). 完成了 polyclonal CAI, CAII 抗體的製備 (3). 完成了 S-180 bearing mice tissues 中 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 之 Western blotting 分析, 同時將結果量化 (4). 完成了 S-180 bearing mice tissues 中 CA 活性變化分析, 包括肝臟, 腎臟, 肺臟, 心臟, 脾臟, 胰臟, 腦, 肌肉等組織 (5). 完成了 S-180 bearing mice tissues 中 PKC 之 Western blotting 分析變化分析, 包括肝臟, 腎臟, 肺臟, 心臟, 脾臟, 胰臟, 腦, 肌肉等組織

結果顯示: (1). 以 immunoblot 分析 tissues 中 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化得知肝臟 CAIII 變化量與 tumor progression 的程度有顯著相關性 (2). 以 enzyme assays 分析 tissues 中 CA 活性得知 CA 活性隨著 CAI, CAII 及 CAIII 蛋白量的變化而改變, 並呈現正相關性 (3). 以 immunohistochemistry 分析組織中 CAI, CAII 及 CAIII 獲知 tissues 中 CAI, CAII 及 CAIII 細胞分佈情形及變化 (4). 以 immunohistochemistry 分析組織中 PKC isoforms 的變化, 獲知 PKC 蛋白表現量變化隨著 tissues 中 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化, 並呈現正相關性.

四、計畫成果自評

依照預期完成之目標及進度完成達成預期成果

五、參考文獻

1. Nishizuka, Y. (1988) *Nature*, 334:661-665.
2. Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 1149-1153.
3. Wetsel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M., Negro-Vilar, A., and Hannum, Y.A. (1992) *J. Cell Biol.*, 117: 121-133.
4. Hug, H., and Sarre, T.F. (1993) *Biochem. J.*, 291(Pt 2): 329-343.
5. Olivier, A.R., and Parker, P.J. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269: 2758-2763.
6. Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Meinardi, E., and Calle, R. (1996) *Biochem. J.*, 315: 513-516.
7. Baltuch, G. H., Dooley, N. P., Rostworowski, K. M., Villemure, J. G., and Yong, V. W. (1995) *J. Neurooncol.*, 24: 241-250.
8. Perletti, G.P., Smeraldi, C., Porro, D., and Piccinini, F. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1589-1594.
9. Choi, P.M., Tchou-Wong, K.M., and Weinstein, I.B. (1990) *Mol. Cell Biol.*, 10: 4650-4657.
10. Kumpulainen, T., Nystrom, S.H.M.

- (1981) *Brain Res.* 220:220-225.
11. Naksgawa, Y., Perentes, E., and Rubinstein, L.J. (1987) *J. Neuropathol. Exp. Neuro.* 46:451-460.
 12. Gramlich, T.L., Hennigar, R.A., Spicer, S.S., and Schulte, B.A. (1990) *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114:415-419.
 13. Mori, M., Staniunas, R.J., Barnard, G.F., Jessup, J.M., Steele, G.D., and Chen, L.B. (1993) *Gastroenterology* 105:820-826.
 14. Zavada, J., Zavadova, Z., Malir, A., Kocent, A. (1972) *Nature New Biol.* 240:124-125.
 15. Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Haukipuro, K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kairaluoma, m.I., and Karttunen, T.J. (1998) *Amer. J. oathol.* 153:279-285.
 16. McKiernan, J.M., Buttyan, R., Bander, N.H., Stifelman, M.D., Katz, A.E., and Chen, M.W. (1997) *Cancer Res.* 57:2363-2365.
 17. Turcei, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A.K., Shan, G.N., Grubb, J.H., Pfreundschuh, M., and Sly, W.S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7608-7613