

科技部補助專題研究計畫成果報告

期末報告

探討內質網壓力誘導nucleobindin-2過量表現的機制及對肝癌治療的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-041-004-

執行期間：106年08月01日至107年10月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學生物科技系(含碩士班)

計畫主持人：洪瑞祥

共同主持人：黃溫雅

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：張慧敏

大專生-兼任助理：曹秀萍

大專生-兼任助理：林淳堂

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 108 年 01 月 08 日

中文摘要：過去研究指出在許多的疾病或腫瘤可以觀察到內質網壓力如肝癌或和糖尿病，許多的因子如突變蛋白、病毒感染、低氧、低葡萄糖或化學物質可能干擾內質網內正確的蛋白質折疊。當大量累積未正常摺疊的蛋白質所造成的內質網壓力會透過活化ATF6、PERK及Ire1訊息傳遞路徑。最近的研究顯示Nucleobindin-2 (NUCB-2) 在臨床腫瘤樣本中發現有過量表現的情形如胃癌、腎臟惡性腫瘤、子宮內膜癌細胞、大腸癌、前列腺癌和乳癌。在高NUCB-2表現的癌症病人其存活率比低NUCB-2的癌症病人低，然而NUCB-2在腫瘤細胞過量表的機制和影響尚未釐清。所以在本計劃我們想要去確認NUCB-2在腫瘤細胞中過量表現的新奇的角色及機制。我們的初步結果指出tunicamycin及brefeldin A這兩個內質網壓力誘導劑可以增加Huh-7、MCF-7及HepG2細胞株和動物模式下NUCB-2的表現。利用RT-PCR及real-time PCR確認內質網壓力誘導NUCB-2 mRNA的表現量，並且在內質網壓力下NUCB-2蛋白質表現量也明顯的增加。更進一步的也觀察到在內質網壓力下NUCB-2有入核的情形。我們也去探討NUCB-2在內質網壓力誘導細胞凋亡所扮演的角色，利用NUCB-2 shRNA來降低Huh-7細胞NUCB-2表現量可以促進內質網壓力所誘導細胞凋亡情形。除此之外，我們利用在Huh-7細胞表現B型肝炎表面突變蛋白(pre-S2)來誘導內質網壓力，結果顯示透過pre-S2所誘導的內質網壓力其NUCB-2表現量也有意義的增加，進一步我們在人類肝腫瘤組織裡也可觀察到NUCB-2表現量與內質網壓力有關係。

在本計畫中我們將著重於三個主軸：(1) 分析NUCB-2在內質網壓力所扮演的角色。(2) 確認在內質網壓力下NUCB-2的誘導機制。(3) 探討NUCB-2過量表現對於化學治療要處理之影響。我們希望利用內質網壓力的環境來探討NUCB-2與腫瘤發展的關係，這樣的結果可以提供一個重要的資訊可以提供未來應用在腫瘤生成及化學治療方面。總結而論，這樣的機制研究可以提供一個生物標記及分子基礎來研發新的癌症治療藥物給這一群高NUCB-2表現的病人。

中文關鍵詞：關鍵字：肝癌；Huh-7；HepG2；MCF-7；nucleobindin-2；hepatitis B virus；Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein；內質網壓力；XBP-1；293T；tunicamycin；brefledin A

英文摘要：Previous studies have indicated that the induction of endoplasmic reticulum stress was observed in many disease or tumors such as hepatocellular carcinoma or diabetes. Many factors may interfere with proper protein folding activity in the endoplasmic reticulum (ER) such as mutant proteins, viral infection, hypoxia, low glucose or chemical compounds. Accumulation of unfolded protein will activate ATF-6, PERK and Ire1 signaling pathways in response to ER stress. Recently many studies have indicated that overexpression of nucleobindin-2 (NUCB-2) is observed in clinical tumor samples such as gastric cancer, prostate cancer, renal cell carcinoma, endometrial carcinoma cells, colon cancer and breast cancer. The survival rate of high-level expression of NUCB-2 in cancer patients was lower

than cancer patients with low-level expression of NUCB-2. However, the effect of NUCB-2 overexpression on tumor cells is still unclear. In this project, we want to identify the novel role and mechanisms of NUCB-2 overexpression in hepatoma cells. Our preliminary results indicated that two ER stress inducers, tunicamycin or brefeldin A, increased NUCB-2 expression in three cell lines (Huh-7/MCF-7/HepG2) and in vivo. NUCB-2 mRNA expression level was induced by ER stress as determined with RT-PCR and real-time PCR, and induction of NUCB-2 protein level was significantly increased by ER stress. Furthermore, nuclear translocation of NUCB-2 was observed during ER stress. The role of NUCB-2 in mediating tunicamycin-induced apoptosis was also investigated, and downregulation of NUCB-2 expression by NUCB-2 shRNA significantly promoted tunicamycin-induced apoptosis in Huh-7 cells. In addition, induction of ER stress by HBV large surface mutant protein pre-S2 was observed in Huh-7 cells. The result has shown that increased ER stress by pre-S2 protein was significantly enhanced NUCB-2 expression. We also observed that the overexpression of NUCB-2 was corrected with ER stress in human hepatocellular carcinoma tumor samples.

In this project, we will focus on three aims: (1) To analyze the role of NUCB-2 in response to ER stress. (2) To determine the mechanism of induction of NUCB-2 overexpression by ER stress. (3) To investigate the effect of NUCB-2 overexpression on the action of chemotherapeutic agents. We hope to identify the relationship between NUCB-2 and tumor development in response to ER stress, and these results could provide important insight in tumorigenesis and chemotherapy. Consequently, this mechanistic research may provide a molecular basis to develop a biomarker and novel cancer chemotherapeutic agent for high level expression of NUCB-2 in cancer patients.

英文關鍵詞：Keywords: Hepatocellular carcinoma; Huh-7; HepG2; MCF-7; nucleobindin-2; hepatitis B virus; Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein; endoplasmic reticulum stress; XBP-1; 293T; tunicamycin; brefledi A

科技部補助專題研究計畫成果報告
(期中進度報告/期末報告)

探討內質網壓力誘導nucleobindin-2過量表現的機制及對肝癌治療的影響

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-041-004 -

執行期間：106 年 08 月 01 日至 107 年 10 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理大學/生物科技系

計畫主持人：洪瑞祥

共同主持人：黃溫雅

計畫參與學生：張慧敏、曹秀萍、林淳堂

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

科技部補助專題研究計畫成果報告

中文題目：探討內質網壓力誘導nucleobindin-2過量表現的機制及對肝癌治療的影響

英文題目：**To investigate the effect of nucleobindin-2 overexpression by endoplasmic reticulum stress on hepatocellular carcinoma treatment**

一、中文摘要

過去研究指出在許多的疾病或腫瘤可以觀察到內質網壓力如肝癌或和糖尿病，許多的因子如突變蛋白、病毒感染、低氧、低葡萄糖或化學物質可能干擾內質網內正確的蛋白質折疊。當大量累積未正常摺疊的蛋白質所造成的內質網壓力會透過活化 ATF6、PERK 及 Ire1 訊息傳遞路徑。最近的研究顯示 Nucleobindin-2 (NUCB-2) 在臨床腫瘤樣本中發現有過量表現的情形如胃癌、腎臟惡性腫瘤、子宮內膜癌細胞、大腸癌、前列腺癌和乳癌。在高 NUCB-2 表現的癌症病人其存活率比低 NUCB-2 的癌症病人低，然而 NUCB-2 在腫瘤細胞過量表的機制和影響尚未釐清。所以在本計劃我們想要去確認 NUCB-2 在腫瘤細胞中過量表現的新奇的角色及機制。我們的初步結果指出 tunicamycin 及 brefeldin A 這兩個內質網壓力誘導劑可以增加 Huh-7、MCF-7 及 HepG2 細胞株和動物模式下 NUCB-2 的表現。利用 RT-PCR 及 real-time PCR 確認內質網壓力誘導 NUCB-2 mRNA 的表現量，並且在內質網壓力下 NUCB-2 蛋白質表現量也明顯的增加。更進一步的也觀察到在內質網壓力下 NUCB-2 有入核的情形。我們也去探討 NUCB-2 在內質網壓力誘導細

胞凋亡所扮演的角色，利用 NUCB-2 shRNA 來降低 Huh-7 細胞 NUCB-2 表現量可以促進內質網壓力所誘導細胞凋亡情形。除此之外，我們利用在 Huh-7 細胞表現 B 型肝炎表面突變蛋白(pre-S2Δ)來誘導內質網壓力，結果顯示透過 pre-S2Δ所誘導的內質網壓力其 NUCB-2 表現量也有意義的增加，進一步我們在人類肝腫瘤組織裡也可觀察到 NUCB-2 表現量與內質網壓力有關係。

在本計畫中我們將著重於三個主軸：(1) 分析 NUCB-2 在內質網壓力所扮演的角色。(2) 確認在內質網壓力下 NUCB-2 的誘導機制。(3) 探討 NUCB-2 過量表現對於化學治療要處理之影響。我們希望利用內質網壓力的環境來探討 NUCB-2 與腫瘤發展的關係，這樣的結果可以提供一個重要的資訊可以提供未來應用在腫瘤生成及化學治療方面。總結而論，這樣的機制研究可以提供一個生物標記及分子基礎來研發新的癌症治療藥物給這一群高 NUCB-2 表現的病人。

關鍵字： 肝癌；Huh-7；HepG2；MCF-7；nucleobindin-2；hepatitis B virus；Hepatitis B virus pre-S2Δ large mutant surface protein；內質網壓力；XBP-1；293T；tunicamycin；brefeldin A

Abstract

Previous studies have indicated that the induction of endoplasmic reticulum stress was observed in many disease or tumors such as hepatocellular carcinoma or diabetes. Many factors may interfere with proper protein folding activity in the endoplasmic reticulum (ER) such as mutant proteins, viral infection, hypoxia, low glucose or chemical compounds. Accumulation of unfolded protein will activate ATF-6, PERK and Ire1 signaling pathways in response to ER stress. Recently many studies have indicated that overexpression of nucleobindin-2 (NUCB-2) is observed in clinical tumor samples such as gastric cancer, prostate cancer, renal cell carcinoma, endometrial carcinoma cells, colon cancer and breast cancer. The survival rate of high-level expression of NUCB-2 in cancer patients was lower than cancer patients with low-level expression of NUCB-2. However, the effect of NUCB-2 overexpression on tumor cells is still unclear. In this project, we want to identify the novel role and mechanisms of NUCB-2 overexpression in hepatoma cells. Our preliminary results indicated that two ER stress inducers, tunicamycin or brefeldin A, increased NUCB-2 expression in three cell lines (Huh-7/MCF-7/HepG2) and *in vivo*. NUCB-2 mRNA expression level was induced by ER stress as determined with RT-PCR and real-time PCR, and induction of NUCB-2 protein level was significantly increased by ER stress. Furthermore, nuclear translocation of NUCB-2 was observed during ER stress. The role of NUCB-2 in mediating tunicamycin-induced apoptosis was also investigated, and downregulation of NUCB-2

expression by NUCB-2 shRNA significantly promoted tunicamycin-induced apoptosis in Huh-7 cells. In addition, induction of ER stress by HBV large surface mutant protein pre-S2 Δ was observed in Huh-7 cells. The result has shown that increased ER stress by pre-S2 Δ protein was significantly enhanced NUCB-2 expression. We also observed that the overexpression of NUCB-2 was corrected with ER stress in human hepatocellular carcinoma tumor samples.

In this project, we will focus on three aims: (1) To analyze the role of NUCB-2 in response to ER stress. (2) To determine the mechanism of induction of NUCB-2 overexpression by ER stress. (3) To investigate the effect of NUCB-2 overexpression on the action of chemotherapeutic agents. We hope to identify the relationship between NUCB-2 and tumor development in response to ER stress, and these results could provide important insight in tumorigenesis and chemotherapy. Consequently, this mechanistic research may provide a molecular basis to develop a biomarker and novel cancer chemotherapeutic agent for high level expression of NUCB-2 in cancer patients.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; Huh-7; HepG2; MCF-7; nucleobindin-2; hepatitis B virus; Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein; endoplasmic reticulum stress; XBP-1; 293T; tunicamycin; brefeldi A

二、前言

肝癌 (Hepatocellular carcinoma)

肝癌是全球排名第六常見的惡性腫瘤，而肝癌更在癌症死亡原因裡為排名第三的癌症，在全球每年約有 70 萬人被診斷為肝癌[1]。肝癌的危險因子主要有病毒感染、過量酒精攝取、基因、暴露於致癌物質及環境化學物質等[2, 3, 4]，而大約 70-90% 的肝癌的產生主要為患者有慢性肝臟疾病，在亞洲及非洲地區大約有 80% 的肝癌病人主要因 B 型肝炎病毒(hepatitis B virus)及同時暴露於黃麴毒素(aflatoxin B1)所造成[5]，而在北美、歐洲及日本地區主要因感染 C 型肝炎(hepatitis C virus)合併酒精攝取的因素來造成肝癌[6]。目前肝癌治療上主要有手術、肝動脈栓塞術、經超音波指引的局部消除療法、放射線治療及化學治療。在化學治療上如 sorafenib 是目前對於肝癌標靶治療效果較顯著之藥物，也是第一個由 FDA 核准用於治療肝癌的標靶藥物[7]。最近的研究指出 sorafenib 主要作用的目標可分為細胞膜上的 receptor tyrosine kinase 及細胞內的 kinases 等，在細胞膜上 sorafenib 可以抑制 VEGFR、PDGFR- β 、RET receptor、c-KIT receptor 及 FLT-3 等接受器[8, 9]。此外 sorafenib 也可以抑制 Ras/MAPK 的訊息傳遞路徑，另一方面 sorafenib 也可以抑制細胞內的 serine/ threonine kinases 如 Raf-1 及 B-Raf[10]。最近的研究也發現 sorafenib 與 EGFR-STAT3 訊息傳遞的活化有關係，STAT3 在調控基因表現扮演重要的角色，如參與腫瘤細胞的增生與存活。STAT3 可以被 EGFR、FGFR 及 PDGFR 所調控來活化，活化的 STAT3 可以調控許多和 apoptosis 相關的蛋白質如 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1、survivin 及 cyclin D1 的表現，此外 STAT3 訊息傳遞路徑可以被 protein tyrosine phosphatases 調控例如 SHP-1 及 SHP-2。研究人員發現許多肝癌細胞對抗腫

瘤藥物 Recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)都有抗藥性的情形，而 sorafenib 可以透過 SHP-1 來降低 STAT3 磷酸化，進而增強肝癌細胞對 TRAIL 的敏感度，然而研究更進一步發現當 EGFR-STAT3 路徑如果無法被抑制的話會造成肝癌細胞對 sorafenib 較不敏感[11, 12]。在其他的訊息傳遞方面顯示，研究顯示 NF- κ B 的活化對於腫瘤的發展扮演著重要的角色，而當以 sorafenib 合併 triptolide 處理 Huh-7 細胞時可以明顯地降低 nuclear factor κ B 的活性[13]。此外在免疫方面而言則 NF- κ B 可以去改變 host innate immune components 如 macrophage，藉此腫瘤細胞可以逃脫免疫的攻擊，因此降低 NF- κ B 的活性可以抑制腫瘤的發展[14, 15]。在另一方面研究顯示，sorafenib 除了單獨用在處理肝癌細胞外，最近有一些研究人員試著以 sorafenib 來合併其他的化學藥物來增強 sorafenib 在治療的效果，例如以 sorafenib 合併 doxorubicin、octreotide、oxaliplatin、tegafur/uracil、cisplatin、gemcitabine、rapamycin、HDAC inhibitor 或 ERK inhibitor 等[16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]。另外在肝癌治療上也常使用肝動脈化學栓塞法(TACE; Transarterial chemoembolization)來對肝腫瘤細胞進行化學處來，而肝動脈化學栓塞法常使用的化學藥物為 doxorubicin。最近的臨床研究發現當以 sorafenib 合併肝動脈化學栓塞時可以明顯提高末期肝癌病患的存活率[24]。然而肝癌治療上常常會遇到抗藥性的產生或預後率偏低的情形，因此開發新的治療策略也是目前科學家一直在研究的重點。

內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress; ER stress)

內質網是一個具有多重功能的胞器，內質網裡面是一個相當特殊的一個環境，除含有高濃度的 Ca^{2+} 外，它是一個氧化環境的胞

器因而可以幫助蛋白質雙硫鍵的形成、摺疊及分泌。在粗糙內質網內有一些 Ca^{2+} -dependent 伴隨蛋白(chaperones)和摺疊酵素(folding enzymes)的蛋白質如 GRP78 (glucose-regulated protein 78)、GRP94 (glucose-regulated protein 94)及 calreticulin 可以幫助穩定蛋白質的摺疊過程，而當有折疊不正常的蛋白質時則會被留在內質網進行修復或分解[25, 26]。目前研究發現當細胞內氧化還原異常、內質網 Ca^{2+} 濃度改變、病毒感染、胺基酸缺乏、葡萄糖缺乏、化學物質、缺氧、基因突變及其他等因素作用下則會造成不完全摺疊的蛋白質(unfolded protein)大量堆積在內質網中，因而造成內質網壓力(endoplasmic reticulum stress, ER stress)。當內質網壓力產生時會引發細胞內三種特殊的訊息傳遞路徑，分別為(1)不完全蛋白質摺疊反應(unfolded protein response)(2)內質網超載反應(ER-overload response, EOR)(3)內質網相關的蛋白質分解機制(ER-associated degradation, ERAD)[27, 28, 29]。目前研究指出有三條主要跟內質網壓力相關的訊息傳遞路徑的蛋白質為 Ire1、PERK 及 ATF-6，這三種主要蛋白質在無內質網壓力時會跟 chaperone 蛋白質 GRP78 結合，當感受到內質網壓力時就會和 GRP78 分離後被活化，而分離的 GRP78 會去幫助那些不正常摺疊的蛋白質摺疊。活化的三條路徑之作用如下：第一為 ATF6，它跟 GRP78 分離後會被送到高爾基體(Golgi)，然後被 S1P 及 S2P 蛋白酶切割後釋放出 C 端片段的活化態 ATF6，活化態 ATF6 則會進入細胞核成為一個 transcription factor 來啟動不完全蛋白質摺疊反應(UPR)相關基因表現如 GRP78 及 XBP-1[30]。第二條被活化的路徑為 PERK，它可以誘導 eIF2 α 的磷酸化，當他被磷酸化時就會造成蛋白質合成的停滯來降低內質網壓力。第三種被活化的路徑為 Ire1，被活化的 Ire1 可以把 XBP-1 mRNA

進行 Splicing 然後形成 mature XBP-1 mRNA，而 mature XBP-1 mRNA 則表現合成 XBP-1 蛋白質，然後 XBP-1 蛋白質在進入細胞核內去誘導啟動不完全蛋白質摺疊反應(UPR)相關基因表現[31, 32]。

過去的研究顯示在腫瘤組織中常可以觀察到內質網壓力(endoplasmic reticulum stress)的情形，包含有肺癌、乳癌、大腸癌、胰臟癌及肝癌。許多的因素可以誘導腫瘤產生內質網壓力如葡萄糖缺乏、低氧、低 pH、基因突變、病毒蛋白質及其他因素等的情況，此外最近也發現在人類肝腫瘤組織中可以發現 ATF-6 及 GRP78 在肝腫瘤癌化程度越嚴重表現量越明顯的增加，此外也發現 GRP78 過量表現的肝腫瘤細胞在藥物處理時比較容易存活下來，這顯示內質網壓力下所誘導的基因表現對腫瘤發展及藥物治療效果扮演重要角色[33, 34]。另外在我們過去的研究也發現內質網壓力肝癌的關係如內質網壓力可以誘導 Cyclooxygenase -2 的表現、誘導 Apurinic endonuclease 的表現、增加 Bcl-2 的表現及增加肝臟脂肪合成等[35, 36, 37, 38]。這結果顯示內質網壓力在肝癌的發展與治療上扮演重要的角色。

Nucleobindin-2 (NUCB-2) 結構與功能

Nucleobindin 是一類 EF-hand motif containing Ca^{2+} 結合蛋白，但目前為止有兩種 nucleobindin 分別為 NUCB-1 及 NUCB-2，兩個蛋白質之間相似度為 62%，NUCB-1 已經被證實在自體免疫及細胞凋亡中扮演重要角色，而 NUCB-2 到目前完就為止主要和食慾有關，其他研究尚未被釐清 [39]。NUCB-2 是一個由 396 個胺基酸所組成的蛋白質，也被稱作 NEFA (DNA binding/EF-hand/acidic protein)，人類 NUCB2 蛋白質序列與大鼠及小鼠相似度高達 85% 以上，過去研究顯示 NUCB-2 蛋白質具有 signal peptide (SP)、DNA

binding domain (DNA)、two helix-loop-helix EF-hand domains (EF-1 及 EF-2)、leucine zipper motif (LZ) 和 c-terminal domain (c-term) 的結構區域部分，EF-hand domain 可以和鈣離子結合因此增加 α -helix 二級結構的含量。其他的研究也發現 NUCB2 也可以被 posttranslational modification 切出 nesfatin-1、nesfatin-2 及 nesfatin-3 的三個部分，nesfatin-1 主要發現可以釋放出去到血液循進入中樞神經系統而來降低食慾及影響能量代謝，但 nesfatin-2 及 nesfatin-3 則功能尚不清楚[40, 41]。到目前為止 NUCB-2 在細胞或生理所扮演的角色如下：

1. NUCB-2 被切割後的 nesfatin-1 可以調控食物攝取及能量代謝 [40]。
2. NUCB2 被證實在胃癌組織中有過量表現的情形，且可以透過 mTOR 訊息傳遞路徑來調控它的表現量 [42, 43]。
3. 在中樞神經系統，NUCB-2 可以當作神經內分泌的角色 [44]。
4. NUCB-2 基因突變被證實可導致孩童嚴重肥胖 [45]。
5. Troglitazone (a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- γ / oral insulin-sensitizing antidiabetic agents) 可以透過 ERK1/2 來增加 NUCB-2 mRNA 的穩定性 [46]。
6. NUCB-1 及 NUCB-2 可以被 caspase 切割修飾 [47]。
7. 在乳癌組織中發現 NUCB-2 過量表現，並且這一群高 NUCB-2 表現病人在術後存活率較低 NUCB-2 表現的病人來的低 [48]。
8. 分析 180 位前列腺癌後約有 50% 為高 NUCB-2 表現的病人，且這一群高 NUCB-2 表現的前列腺癌病人在放射治療後，其存活率偏低 [49, 50]。
9. NUCB-2 可以誘導 chondrocyte 細胞可以誘

導 IL-6 MIP-1 α mRNA 及 COX-2 等發炎相關基因的表現[51]。

10. NUCB2 過量表現與臨床上 clear cell renal cell carcinoma 病人低存活率有高對相關性 [52]。
11. 在 NUCB-2 轉殖鼠給予高脂肪食物後發現 NUCB-2 與 insulin resistance 及 fat deposition in the liver 有關 [53]。
12. NUCB2 的表現量與子宮內膜癌細胞 (endometrial carcinoma cells) 增生有相關，並且為子宮內膜癌細胞病人的 independent prognostic factor [54]。
13. NUCB-2 透過 LKB1/AMPK/TORC1/ZEB1 訊息傳遞路徑來增強大腸癌細胞的爬行、侵犯及上皮細胞間質轉移(EMT)的能力[55]。

截至目前為止在 NUCB-2 上的研究大約可分成兩大群，一為和食物攝取相關另一個和腫瘤細胞相關，最近研究顯示在乳癌、胃癌、腎臟惡性腫瘤、子宮內膜癌細胞、大腸癌及前列腺癌的腫瘤組織中有 NUCB-2 過量表現的情況，但在腫瘤細胞內所扮演的角色尚未被完整的釐清。綜合這些研究可推論出 NUCB-2 在有壓力情況下會扮演重要角色來保護細胞，而在面臨如內質網壓力或化學藥物所誘導的內質網壓力中，NUCB-2 在細胞存活上可能會扮演重要的功能。另外值得注意的是下列幾點(1)在粗糙內質網內有一些 Ca^{2+} -dependent 伴隨蛋白 (chaperones) 和摺疊酵素 (folding enzymes) 的蛋白質如 GRP78、GRP94 及 calreticulin 可以幫助穩定蛋白質的摺疊過程。(2)而這些伴隨蛋白和摺疊酵素基因可以被內質網壓力所活化的 ATF-6 及 XBP-1 所誘導來增加表現，而我們也觀察到 NUCB-2 promoter 也有 ATF-6 及 XBP-1 結合的位置。(3)此外其他研究顯顯示在很多腫瘤中常可觀察到 GRP78 過量表現並且增加癌細胞的抗藥性。因此我們觀察到 NUCB-2 也是一個可以和 Ca^{2+} -dependent 的蛋白質，加上我

們進一步分析 NUCB-2 的 promoter 時也發現有 ATF-6 及 XBP-1 等結合的位置，所以我們推測 NUCB-2 在內質網壓力可能尚未被證實扮演類似 chaperone 全新的角色(類似 GRP78)。另外 NUCB-2 蛋白質也具有 DNA binding domain，是否在內質網壓力下具有調控基因表現的功能也值得我們更進一步的去探討。越來越多的研究顯示很多腫瘤組織的發展與治療與 NUCB-2 表現量有關，且我們初步結果發現內質網壓力可以誘導 NUCB-2 的表現。另外在很多的化學治療藥物處理時都可以誘導內質網壓力的產生，此時 NUCB-2 因藥物處理所誘導的內質網壓力所增加表現，因此 NUCB-2 在化學治療時所扮演的角色也變得非常重要，本計畫期望 NUCB-2 能當作生物標記及開發新的治療的策略，期望能提供更完整資訊給 NUCB-2 過量表現的病人。

三、材料與方法

RT-PCR 及 real-time PCR

把經過處理後細胞以 Trizol (invitrogen) 來收集 RNA，以 1 μ g 的 RNA 來進行 RT，之後以 1ml 的 cDNA 來當作 temple 進行 PCR 反應，引子序列如下：NUCB-2

forward 5'tgggaggctaaaggcaaaac 3'； NUCB-2
reverse : 5'tcttgcttcctgggtgatt 3'。另外以

G3APDH 當作控制組，其序列如下：G3APDH

forward 5'-tgaaggcgttgtgaacggatttgc-3'；

G3APDH reverse

5'-catgtaggccatgaggccaccac-3'。PCR 後產物將以 1-1.2% agarose 來分析之。在 real-time PCR 方面，引子序列如下：

Huh-7 NUCB-2 forward 5'-GGACCACCAAGCTCTTCTAAACCA-3'；

Human NUCB-2 reverse

5'-TGTTGCCGCTTGATTAGCA-3'。GRP78

forward

5'-CCACCAAGATGCTGACATTGA-3'；

GRP78 reverse

5'-AGGCCTGCACCCATAGA-3'。

GAPDH forward

5'-CCATCTCCAGGAGCGAGATC-3'；

GAPDH reverse

5'-GCCTCTCCATGGTGGTGAA-3'。

real-time PCR 以 ABI 系統來完成實驗。

西方點墨分析法

收集經處理過的細胞後以 SDS lysis buffer (0.1 M Tris (pH 6.8), 0.4% SDS, and 20% glycerol) 來抽取蛋白質。再以 Micro BCATM protein assay reagent kit (pierce, IL, USA) 定量後取 15–25 μ g 細胞蛋白萃取液來進行西方點墨。一級抗體 (anti-NUCB-2, anti-GRP78, anti-p65, anti-pp65 ser 276, pp65 ser 311, anti-ERK, anti-pERK, anti-Akt, anti-pAkt, anti-ATF-6, anti-Ire1, anti-eIF2 α , anti-peIF2 α 及 anti-tubulin) 稀釋後在 4°C 下反應 16 小時，以 Tris-buffered saline (TTBS) 進行 10 分鐘連續三次清洗後，加入二級抗體 (1:2000) 後在室溫下震盪反應一小時，再以 TTBS 進行 10 分鐘連續三次清洗後，利用 ECL (Amersham Biosciences) 偵測系統來進行分析。

MTT assay

細胞毒殺效應測試由 MTT assay 來完成。首先 3×10^5 的腫瘤細胞 (Huh-7/HepG2/MCF-7) 種植於 24 孔平底，16 小時後分別以不同濃度之 TM 或 BFA 或藥物來處理細胞，經過在 37°C 培養 24 及 48 小時後去除培養基，再加入含 0.5 mg/mL MTT 的培養基以 37°C 在 5% 二氣化氮培養培養 4 小時，之後去除培養基再加入 500 μ l DMSO 溶解之，最後取 100 μ l 到 96 孔平底培養盤裡以波長 570 nm 來測量其吸收光，吸收值愈高代表細胞存活率高而吸光值低則反之。

免疫螢光法

首先 3×10^5 的腫瘤細胞(Huh-7/HepG2) 種植於 64 孔平底，16 小時後分別以不同濃度之 TM 或 BFA 來處理細胞，經過在 37°C 培養 24 小時後去除培養基以 3.7% paraformaldehyde 處理時分鐘後再以 PBS 清洗三次，之後在以冰甲醇及過氧化氫處理後在加入 NUCB-2 抗體，此外我們為了觀察 NUCB-2 的分布位置，我們同時間會分別以內質網壓力標記物 (ER tracker; cell signaling cat. 8787)、粒線體標記物 (GM130 antibody) 及高基斯體標記物 (COX IV antibody) 來同時進行作用。在 4°C 培養 16 小時後以 PBS 清洗三次後加入 anti-mouse FITC-conjugated 抗體在室溫下反應一小時，在以 PBS 清洗後在螢光及共軛焦顯微鏡顯微鏡下觀察 NUCB-2 的分佈及表現情形。

細胞質及細胞核蛋白質分離

我們將把經處理過藥物之細胞進行細胞質及細胞和蛋白質分離，主要方法是根據 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagent kit (Pierce) 來進行實驗。簡單的描述，把 1×10^6 Huh-7 細胞給於 tunicamycin or BFA 之後，再分別經過 0、3、6、12、24 小時的處理，把細胞收集後經 PBS 清洗過後以 200 μl 的 cytoplasmic reagent I solution 來把細胞打散後置於冰上 10 分鐘，之後再加入 11 μl 的 Cytoplasmic Extraction Reagent II solution 並置於冰上一分鐘後以 16000g 離心五分鐘，上清液即為細胞質蛋白質萃取液。剩餘的 pellet 再加入 100 μl Nuclear Extraction Reagent 至於冰上 40 分鐘後以 16000g 離心 10 分鐘，所得到上清液即為細胞核內的蛋白質，所獲得之細胞質及細胞和蛋白質定量後以西方點墨方法來分析 NUCB-2 及 GRP78 在細胞內的分佈情形，以 β -actin 及 topoisomerase II 來當作細胞質

及細胞核的 internal control 並觀察細胞的分離是否完整。

以動物模式誘導內質網壓力

以 3 隻 BALB/c 老鼠為一組分並分成控制組 (給予 PBS) 及 實驗組 (給予 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 tunicamycin)，以腹部方式注射後觀察 24 小時，之後在分別收及兩組動物的肝臟，再加入液態氮磨碎後以 trizol 來萃取 total RNA，取 1 μg RNA 進行 reverse transcription 後以 real-time PCR 來分析 NUCB-2、GRP78 及 GAPDH 的表現量。

以 xenograft model 動物模式來進行藥物試驗

把 1×10^6 的 Huh-7、Huh-7 NUCB-2、Huh-7 shNUCB-2 及 Huh-7 NLS-NUCB-2 細胞注射至 SCID mice 的背部，等待一個星期後隨機分組老鼠，每一組實驗為 5 隻老鼠，一共分成控制組與藥物處理組別 (sorafenib: 25 及 50 mg/kg); doxorubicin: 3 及 6 mg/kg)。隨後每隔兩天以腹部方式注射藥物，連續觀察 40 天並且每五天測量腫瘤大小，同時需記錄各組老鼠的死亡時間，40 天後在分別收動物的腫瘤組織備用。

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Cells were plated into 100 mm-diameter dishes for overnight incubation and stimulated with or without 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Brefeldin A for 0, 3, 9, and 24 h. The ChIP assay was performed according to the supplier's directions (Millipore-Upstate, Billerica, MA). Briefly, treated cells were fixed in serum-free medium containing 1% formaldehyde for 10 minutes at 37°C. Huh-7 cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. The cells were then harvested, lysate, and sonicated to shear

genomic DNA into fragments of 200-1000 base pairs. An aliquot was also retained as an input sample to normalize PCR reactions and analyze shearing efficiency. 400 µg of each remaining chromatin preparation was incubated overnight at 4°C with 2 µg of anti-AFT-6 or anti-XBP-1 antibodies. Both immunoprecipitated and input DNA samples were analyzed by real-time PCR to determine the relative amounts of DNA from the NUCB-2 gene promoter region present in the samples. The primers used for amplification by real time PCR were:

forward primer: 5'-ctccggtaagcttaggaaag-3'

reverse primer: 5'-aagctgtggagcctggtg-3'.

Plasmid transfection and lentivirus production

從中研院RNAi core 購置的 shRNA、pMD2.G 及 psPAX2 質體與 lipofectamine 3000 混合後靜置15分後，DNA混合液加入293T細胞中，在37°C培養4小時後更換新鮮的30%血清培養基，再經過24小時培養後收集培養基，之後再將收集含有 lentivirus 的培養基與 polybrene 混合後去感染細胞，感染後的細胞以1 µg/ml puromycin處理2星期後收集細胞 total RNA 或 total protein 以 real-time PCR 或 western blotting 方法分析相關基因的表現。(shRNA序號請見 **Plasmid及stable clone的建立**)

NUCB-2 promoter 的建立與活性分析

我們將分別把不同長度的 NUCB-2 的 promoter 建立在 pGL-3-basic luciferase reporter plasmid 來分析當在內質網壓力下表現的情形，首先把 NUCB-2 promoter (pNUCB-2 Luc reporter plasmid)送入 Huh-7 細胞中，之後再以 tunicamycin 及 BFA 來處理細胞，分別經過 0、3、6、12 小時後，以 Dual-Luciferase Reporter Assay

System (Promega)來分析之。質體建構的引子序列如下：

A.

1. -1315 ~ -1: forward-Kpn I- 5'-ggc gcg ggt acc aca gac aag gac atg gag gc-3'
- 2.-900 ~ -1: forward-Kpn I- 5'-ggc gcg ggt acc cag att ggt ctc aaa ttt ttg -3'
3. -450 ~ -1: forward-Kpn I- 5'-ggc gcg ggt acc cca agg cgg agg acg ggg gtg t-3'
4. -175 ~ -1: forward-Kpn I- 5'-ggc gcg ggt acc tcc aca gct tcg gcc ctc ctc-3'

B.

1. reverse-Bgl II-5'- cct aag aga tct gcc cca cca ccc gcc gcg -3'

Plasmid及stable clone的建立

首先我們將把 NUCB-2 基因以下列引子

- 1 (1-396 amino acid): NUCB-2 forward-Hind III 5'-ggc gcg aag ctt atg gtg cct att gac ata gac -3' ; NUCB-2 reverse-Not I 5'-cct aag gcg gcc gcg a aat gtg tgg ctc aaa ctt caa-3'
- 2 (85-396 amino acid): NUCB-2 forward-Hind III 5'-ggc gcg aag ctt atg ggg agg cta agc aaa gaa -3' ; NUCB-2 reverse-Not I 5'-cct aag gcg gcc gcg a aat gtg tgg ctc aaa ctt caa-3'
- 3 (166-396 amino acid): NUCB-2 forward-Hind III 5'-ggc gcg aag ctt atg gaa cac tat gac aag ac-3' ; NUCB-2 reverse-Not I 5'-cct aag gcg gcc gcg a aat gtg tgg ctc aaa ctt caa-3'

放大後經酵素切後的 NUCB-2 再轉接到 pCMV-HA plasmid (gift from Ming-Derg Lai)，此外我們將建立不同長度的 NUCB-2 蛋白質，其引子序列如下：NUCB-2 formard-Hind III 5'-ggc gcg aag ctt ggg agg cta agc aaa gaa c-3' (85aa-396aa)；NUCB-2 formard-Hind III 5'- ggc gcg aag ctt ctg gaa cac tat gac aag act cg-3' (166aa-396aa)。Huh-7 shRNA stable 的建立，shRNA 在中研院國家型干擾性核糖核酸核心

設施中心購得的質體分別如下
NUCB-2shRNA: TRCN0000055526 及
TRCN0000300120 ; ATF6-shRNA:
TRCN0000017853 、 TRCN0000017854 及
TRCN0000017855 ; XBP-1 shRNA:
TRCN0000019804 、 TRCN0000019807 及
TRCN0000019808 。 KAP1 shRNA:
TRCN0000013159 及 TRCN0000329913 ;
STAT3 shRNA: TRCN0000329887 及
TRCN0000329886; FOXM1 shRNA:
TRCN0000273982 及 TRCN0000015544; ATF2
shRNA: TRCN0000013713 及
TRCN0000218254; GATA3 shRNA:
TRCN0000273944 及 TRCN0000273991。首先
將這些 plasmid 製成的 lentivirus 分送入 Huh-7
cells 後以 puromycin 篩選 2 周後，以 real-time
PCR 方式來確認表現量。在 p3XFLAG-CMV-NUCB-2-NLS 方面，我們先
把 NUCB-2 及 SV40 NLS 請廠商化學合成後
放置於 pUC-NUCB-2-NLS，我們再以 HindIII
及 KpnI 限制酶轉接至 p3XFLAG-CMV 輽體
上面。

Annexin V/propidium iodide assay

For assessment of apoptosis, both floating
and adherent cells were collected and analyzed.
Briefly, 5×10^5 cells per dish were plated onto
6-cm dishes and incubated at 37°C for 16 h. The
cells were treated 5-fluorouracil for time
indicated. The cells were washed twice with
PBS and collected by trypsinization. After
centrifugation at 400 × g for 5 min at room
temperature, the cells were stained with
Annexin V and propidium iodide (1 µg/mL).
The cell apoptosis distributions were determined
on a FACScort flow cytometer and analyzed by
ModFitLT V3.0 software program.

細胞週期 analysis.

To determine cell-cycle distribution
analysis, 5×10^5 cells in 6 cm dish were treated
with various concentrations of tunicamycin for
24 h. After incubation, the supernatant was
removed, and the cells were then fixed in 70%
ethanol/PBS, pelleted, and resuspended in
buffer containing RNase A and propidium
iodide. Cell-cycle distribution was determined
by flow cytometry analysis, and the percentages
of cells were determined using the WinMDI
software.

caspase-3 活性分析

利用 PE active caspase-3 apoptosis kit (BD
Pharmingen)來偵測 Caspase-3 的活性。將 $1 \times$
 10^6 Huh7、Huh-7 Luc、Huh-7 NUCB-2 shRNA
和 Huh-7 NUCB-2 EGFP 細胞培養在 10 公分
培養皿後，在給予不同藥物濃度處理 24、48
小時後，收集細胞並以 0.5 ml
Cytofix/Cytoperm 打散後放在冰上 20 分鐘，
之後再給予含 20 µl caspase-3 antibody 的
100 µl Perm/Wash buffer，在室溫下反應 30
分鐘後在加入 400 µl Perm/Wash buffer 後，直
接以流式細胞移分析之。

Colony formation assay

首先把 1000 的腫瘤細胞(Huh-7-control /
Huh-7-NUCB-2 shRNA / Huh-7-NUCB-2
EGFP)種植於 6 孔平底盤上，在 10% FBS-
supplemented DMEM 培養基培養 24 小後，在
換成含有藥物的培養基在 37°C 作用 24 小時
後，已 PBS 清已兩次後換成一般的培養基
(10% FBS-supplemented DMEM) ，之後以每
隔兩天更換一次培養基，經過 14 天培養後以
3.7% formaldehyde 固定後，再以 crystal violet
進行染色，之後再計算每一個孔盤上的總細
胞 colony 的數目。

統計分析

Results were presented as the mean \pm S.D., and statistical comparisons were made using the Student's *t* test. Significance was defined at the $p < 0.05$, 0.01 or 0.001 levels.

四、研究成果與討論

1. 肝癌與 NUCB-2 表現的關係

首先為了分析肝癌與 NUCB-2 表現的關係在過去的研究，我們分別利用不同的生物資料庫來搜尋有關肝癌與 NUCB-2 表現的關係。

首先利用 ProteinAtlas 資料庫 (<http://www.proteinatlas.org/>) 去分析 NUCB-2 在人類腫瘤組織中表現的情形，分析結果顯示在肝腫瘤組織切片中可以明顯觀察到 NUCB-2 有過量表現。此外我們也利用 SurvExpress 網站 (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp>) 來分析 NUCB-2 mRNA 在過去在肝癌病人檢體中表現的情形，結果顯示在 225 肝癌組織病人資料庫中顯示有過量表現的情形。另一方面，我們利用生物資料庫中的數據去分析 NUCB-2 表現量與肝癌病人存活率的關係，我們利用 PROGgene (<http://watson.compbio.iupui.edu/chirayu/proggene/database/index.php>) 來分析 81 為肝癌病人，結果顯示紅色線為高 NUCB-2 表現的病人其存活率明顯比綠色線的低 NUCB-2 表現肝癌病人來的低。因此我們分別利用三種不同生物資料庫去分析肝癌與 NUCB-2 的關係，結果顯示當肝癌組織有 NUCB-2 過量表現的情形且與肝癌病人存活率有高度的相關性。

2. 內質網壓力誘導NUCB-2 mRNA表現

首先我們利用 TM 與 BFA 來處理 Huh-7、HepG2 及 MCF-7 細胞，經 0、6、12、24 小時處理後分析 NUCB-2 mRNA 的表現情形，我

們發現內質網壓力可以明顯的誘導 APE1 mRNA 的表現。另一方面，我們也同時間分析在內質網壓力下 APE1 蛋白質表現的情形，我們以 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tunicamycin 來處理 Huh-7 及 HepG2，經過 0、3、6、12 及 24 小時的培養後以 RT-PCR 及 real-time PCR 來分析 NUCB-2 mRNA 的表現量，結果顯示經 tunicamycin 處理下 6-24 小時 NUCB-2 mRNA 有明顯增加的現象，更進一步的我們也以 real-time PCR 來分析 NUCB-2 mRNA 的表現，結果也顯示內質網壓力可以明顯誘導 NUCB-2 的表現。

3. 內質網壓力誘導NUCB-2 蛋白質表現

前面我們已觀察到內質網壓力可以誘導 NUCB-2 mRNA 表現，因此進一步的我們想要去觀察 NUCB-2 蛋白質表現量。我們以 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tunicamycin 來處理 Huh-7、MCF-7 及 HepG2，經過 0、3、6、12 及 24 小時的處理後分析 NUCB-2 蛋白質的表現量，結果顯示在三株細胞我們都可觀察到內質網壓力可增加 NUCB-2 的表現。這樣結果顯示內質網壓力可以誘導 NUCB-2 mRNA 及蛋白質的表現，並且這樣的表現屬於是屬於廣泛性的。

4. 在動物模式下內質網壓力誘導NUCB-2 蛋白質表現

另一方面，我們除了利用肝癌細胞細胞株來分析內質網壓力下 NUCB-2 過量表現的情形，我們同時也以動物模式來觀察在內質網壓力下 NUCB-2 表現的情形。我們以 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 tunicamycin 純化 BALB/c 老鼠，經過 24 小時後以 real-time PCR 分析老鼠器官的細胞中 NUCB-2 的表現情形，結果顯示在動物模式下我們分別可以發現內質網壓力可以誘導肝臟組織細胞 GRP78 及 NUCB-2 的過量表現情形，此外我們也測試其他組織，在心臟組織也觀察到相似的結果。

5. 內質網壓力透過transcription機制來誘導NUCB-2表現

為了先確認內質網壓力誘導NUCB-2過量表現是透過哪一種的方式來增加NUCB-2 mRNA的表現量，所以我們以transcription inhibitor actinomycin D來與tunicamycin共同處理後，進一步來觀察在內質網壓力下NUCB-2 mRNA表現的情形，RT-PCR分析結果顯示在合併處理tunicamycin及actinomycin D時NUCB-2 mRNA表現量明顯的被抑制了，同時我們也已real-time PCR來分析Huh-7細胞單獨給予TM或者合併處理actinomycin D後NUCB-2的表現，結果顯示NUCB-2 mRNA表現被抑制，這樣結果代表內質網壓力誘導NUCB-2表現是透過transcription的方式。

6. 在內質網壓力降低NUCB-2表現會增加細胞死亡

接下來為了測試內質網壓力下所誘導的NUCB-2過量表現在細胞所扮演的角色，我們將以shRNA的方式來降低NUCB-2的表現，進一步去觀察細胞存活情形。結果顯示shRNA可以明顯的在內質網壓力下降低NUCB-2的表現，但GRP78表現量不受到影響，更進一步的觀察細胞存活情形發現，在內質網壓力下當降低NUCB-2表現量時可以促進細胞的死亡。

7. 在內質網壓力誘導NUCB-2轉入細胞核內

先前其他研究人分析NUCB-2的蛋白質結構具有DNA binding domain，推測應該在NUCB-2過量表現時會對基因的調控扮演著重要功能，所以我們初步先把Huh-7細胞給予tunicamycin分別為0、3、6、12、24小時後，把細胞質後細胞核蛋白質分離後分析NUCB-2的表現及分布情形，結果顯示當隨著內質網壓力誘導NUCB-2過量表現時，NUCB-2也可觀察到明顯入核的現象，所以我

們推測NUCB-2進入細胞核後可能在基因調控上可能扮演著重要的功能，未來我們將進一步的分析進入細胞核內的NUCB-2所扮演的角色。

8. 在人類肝腫瘤組織中觀察到內質網壓力與NUCB-2過量表現的情形

前面我們已觀察到內質網壓力可以誘導肝癌細胞株中NUCB-2過量表現的情形，所以在另一方我們想去驗證在人類肝腫瘤樣品本是否觀察到類似現象，所以我們以人類肝腫瘤組織來分析內質網壓力的情形及NUCB-2表現量(人類肝腫瘤組織蛋白質由成大賴明德教授實驗室提供)，經過分析後我們發現在有明顯內質網壓力的肝腫瘤也可觀察到NUCB-2表現量也相對增加。

9. B型肝炎表面突變蛋白pre-S2Δ誘導內質網壓力產生及NUCB-2的過量表現

另一方面，除了利用化學藥劑來誘導內質網壓力去觀察NUCB-2表現情形外，我們也同時間也利用B型肝炎表面突變蛋白pre-S2Δ來誘導內質網壓力，進一步的去觀察NUCB-2表現情形。結果顯示在表現有pre-S2Δ的Huh-7細胞中可以誘導內質網壓力，同時可以明顯發現NUCB-2的表現量比控制組來的多，此外pre-S2Δ的表現也誘導NF-κB、ERK及AKT過度磷酸化的現象。

10. 以pEGFP-NUCB-2質體在細胞中過量表現

此外我們進一步想觀察在過量表現NUCB-2時對細胞的影響，所以我們利用pEGFP-NUCB-2質體轉染送入細胞中過量表現來觀察對細胞的影響。首先我們以293T細胞來進行DNA轉染，再以螢光顯微鏡來觀察NUCB-2-EGFP表現情形，結果顯示NUCB-2可以明顯在細胞中過量表現。進一步的我們以

western blot方法來分析，結果也顯示NUCB-2在細胞中有成功表現。

11. 降低 Huh-7 細胞中 NUCB-2 表現可以增加 sorafenib 毒殺效果

我們進一步觀察當以NUCB-2 shRNA來降低Huh-7細胞中NUCB-2表現，進一步觀察肝癌標靶藥物sorafenib對低NUCB-2表現細胞的影響。我們把Huh-7、Huh-7 Luc shRNA、Huh-7 NUCB-2 shRNA以7000顆細胞種植於96中，再以1、5和10 μM 的sorafenib來處理，之後利用MTT來分析細胞存活率，結果顯示在20 μM sorafenib處理時可以明顯觀察到sorafenib可以誘導更多Huh-7 NUCB-2 shRNA細胞死亡。

12. Huh-7細胞過量NUCB-2表現可以減少 sorafenib 毒殺效果。

我們進一步觀察當以pEGFP-NUCB-2質體來增加Huh-7細胞中NUCB-2表現，進一步觀察肝癌標靶藥物sorafenib對高NUCB-2表現細胞的影響。我們把Huh-7、Huh-7-EGFP、Huh-7-NUCB-2-EGFP以7000顆細胞種植於96中，再以1、5和10 μM 的sorafenib來處理，之後利用MTT來分析細胞存活率，結果顯示過量表現NUCB-2可以明顯減少sorafenib處理時所誘導的細胞死亡。

13. 在內質網壓力下 XBP-1 調控 NUCB-2 表現

從先前的NUCB-2 promoter分析發現有兩個與內質網壓力相關的transcription factor，分別為ATF-6及XBP-1。我們先以lentivirus建立以Huh-7 XBP-1 shRNA細胞株，利用內質網壓力誘導劑TM處理後再以real-time PCR分析NUCB-2的表現量。結果顯示當把XBP-1表現量降低時在有無內質網壓力皆可明顯降低NUCB-2的表現，顯示XBP-1在內質網壓力下

對NUCB-2表現扮演重要的角色。

14. 臨床肝癌檢體的分析

先前初步分析人類肝腫瘤蛋白質檢體後我們發現在有明顯內質網壓力的肝腫瘤也可觀察到 NUCB-2 表現量也相對增加，同時我們利用生物資訊方式去搜尋生物資料庫中也發現肝癌組織中有 NUCB-2 過量表現的情形，但目前生物資料庫在研究肝癌與 NUCB-2 的量不夠大，為了增加樣本數來觀察多數肝癌病人檢體中 NUCB-2 表現情形，我們將由國家衛生院所成立的台灣肝癌網單位，目前我們已剛由國衛院購買 240 組已經去連結的肝癌病人的檢體 RNA，將利用 real-time PCR 方法來分析 120 組肝癌檢體中 NUCB-2、GRP78 及 GAPDH 的表現量，藉此我們可以更釐清在內質網壓力下的人類肝腫瘤組織中 NUCB-2 表現的情形，這結果可以增加我們以肝癌細胞株所證實數據的應用性及重要性。

五、計畫成果自評

本計畫探討探討內質網壓力誘導 nucleobindin-2過量表現對肝癌治療的影響，計畫申請三年期研究計畫，而審核通過一年。目前我們已有重要的突破，我們已經發現內質網壓力下如何誘導NUCB-2的表現之機制，且過量表現NUCB-2的細胞對肝癌標靶藥物具有抗藥性，因此對於肝癌在治療時具有重要的資訊。目前我們已在分析臨床上的檢體，預計我們將完成細胞、動物及臨床檢體的分析，相信可以爭取質量相當高的期刊論文，目前已經著手撰寫。此外本計畫共有1位研究生和2位大學部專題生參與，大學部因完成部分成果而順利考上研究所，研究生也因為本計畫的執行而獲得相當多的知識及訓練，今年畢業後也順利找到工作。

最後非常感謝科技部對於此計畫的支持讓我們有機會深入探討NUCB-2在肝癌所辦癌的角色，期望未來能也機會將此知識應用在肝癌的治療上來造福國人，此外也要感謝有機會參加國際研討會與各國學者交流。

六、文獻

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; **127**: 2893–2917.
2. Kao JH, Chen DS. Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver Int* 2005; **25**: 696-703.
3. Chen CJ, Wang LY, Lu SN, Wu MH, You SL, Zhang YJ, Wang LW, Santella RM. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; **24**: 38-42.
4. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; **31**: 339-346.
5. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011; **365**: 1118–27.
6. Tanaka Y, Kurbanov F, Mano S, et al. Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality. *Gastroenterology* 2006; **130**: 703–14.
7. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; **359**: 378-390.
8. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* 2005; **407**: 597-612.
9. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 835-844.
10. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; **64**: 7099-7109
11. Tai WT, Cheng AL, Shiao CW, Liu CY, Ko CH, Lin MW, Chen PJ, Chen KF. Dovitinib induces apoptosis and overcomes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma through SHP-1-mediated inhibition of STAT3. *Mol Cancer Ther* 2012; **11**:452-463.
12. Ezzoukhry Z, Louandre C, Trécherel E, Godin C, Chauffert B, Dupont S, Diouf M, Barbare JC, Mazière JC, Galmiche A. EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int J Cancer* 2012; **131**:2961-2969.
13. Alsaied OA, Sangwan V, Banerjee S, Krosch TC, Chugh R, Saluja A, Vickers SM, Jensen EH. Sorafenib and triptolide as combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2014; **156**:270-279.
14. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nat Immunol* 2011; **12**:715-723.
15. Hoesel B, Schmid JA.

- The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013; **12**:86.
16. Lee JE, Bae SH, Choi JY, Yoon SK, You YK, Lee MA. Epirubicin, cisplatin, 5-FU combination chemotherapy in sorafenib-refractory metastatic hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. *World J Gastroenterol* 2014; **20**:235-241.
17. Schmid I, Häberle B, Albert MH, Corbacioglu S, Fröhlich B, Graf N, Kammer B, Kontny U, Leuschner I, Scheel-Walter HG, Scheurlen W, Werner S, Wiesel T, von Schweinitz D. Sorafenib and cisplatin/doxorubicin (PLADO) in pediatric hepatocellular carcinoma. *Pediatr Blood Cancer*. *Pediatr Blood Cancer* 2012; **58**:539-544.
18. Prete SD, Montella L, Caraglia M, Maiorino L, Cennamo G, Montesarchio V, Piai G, Febbraro A, Tarantino L, Capasso E, Palmieri G, Guerrasi R, Bianco M, Mamone R, Savastano C, Pisano A, Vincenzi B, Sabia A, D'Agostino A, Faiola V, Addeo R. Sorafenib plus octreotide is an effective and safe treatment in advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II So.LAR. study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; **66**:837-844.
19. Martin-Richard M, Gallego R, Pericay C, Garcia Foncillas J, Queralt B, Casado E, Barriuso J, Iranzo V, Juez I, Visa L, Saigi E, Barnadas A, Garcia-Albeniz X, Maurel J. Multicenter phase II study of oxaliplatin and sorafenib in advanced gastric adenocarcinoma after failure of cisplatin and fluoropyrimidine treatment. A GEMCAD study. *Invest New Drugs* 2013; **31**:1573-1579.
20. Hsu CH, Shen YC, Lin ZZ, Chen PJ, Shao YY, Ding YH, Hsu C, Cheng AL. Phase II study of combining sorafenib with metronomic tegafur/uracil for advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2010; **53**:126-131.
21. Gulhati P, Zaytseva YY, Valentino JD, Stevens PD, Kim JT, Sasazuki T, Shirasawa S, Lee EY, Weiss HL, Dong J, Gao T, Evers BM. Sorafenib enhances the therapeutic efficacy of rapamycin in colorectal cancers harboring oncogenic KRAS and PIK3CA. *Carcinogenesis* 2012; **33**:1782-1790.
22. Ngamphaiboon N, Dy GK, Ma WW, Zhao Y, Reungwetwattana T, DePaolo D, Ding Y, Brady W, Fetterly G, Adjei AA. A phase I study of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor entinostat, in combination with sorafenib in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2014; [Epub ahead of print]
23. Schmieder R, Puehler F, Neuhaus R, Kissel M, Adjei AA, Miner JN, Mumberg D, Ziegelbauer K, Scholz A. Allosteric MEK1/2 inhibitor refametinib (BAY 86-9766) in combination with sorafenib exhibits antitumor activity in preclinical murine and rat models of hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 2013; **15**: 1161-1171.
24. Zhang L, Hu P, Chen X, Bie P. Transarterial chemoembolization (TACE) plus sorafenib versus TACE for intermediate or advanced stage hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; **9**: e100305.
25. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 2005; **569**: 29-63.
26. Kleizen B, Braakman I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**: 343-349.
27. Cox JS, Chapman RE, Walter P. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 1805-1814.
28. Pahl HL, Baeuerle PA. The ER-overload response: activation of NF- κ B. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 63-67.
29. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*

- 2000; **101**: 249-258.
30. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 2007; **22**: 193-201.
31. Liu C, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Clin Invest* 2003; **116**: 1861-1862.
34. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002; **415**: 92-96.
32. Olga Balague, O, Mozos A, Martinez D, Hernandez L, Colomo L, Mate JL, Teruya-Feldstein J, Lin O, Campo E, Lopez-Guillermo A, Martinez A. Activation of the Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Transcription Factor X Box-Binding Protein-1 Occurs in a Subset of Normal Germinal-Center B Cells and in Aggressive B-Cell Lymphomas with Prognostic Implications. *Am J Pathol* 2009; **174**: 2337-2346.
33. Luk JM, Lam CT, Siu AF, Lam BY, Ng IO, Hu MY, Che CM, Fan ST. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics* 2006; **6**: 1049-1057.
34. Al-Rawashdeh FY, Scriven P, Cameron IC, Vergani PV, Wyld L. Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; **22**:1099-1105.
35. Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, Huang W, Chang WC, Chang YS, Chen CC, Lai MD. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 46384-46392.
36. Cheng TL, Chen PS, Li RH, Yuan SS, Su IJ, Hung JH. Induction of apurinic endonuclease 1 overexpression by endoplasmic reticulum stress in hepatoma cells. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 12442-12457.
37. Hung JH, Teng YN, Wang LH, Su IJ, Wang CC, Huang W, Lee KH, Lu KY, Wang LH. Induction of Bcl-2 expression by hepatitis B virus pre-S2 mutant large surface protein resistance to 5-fluorouracil treatment in Huh-7 cells. *PLoS One* 2011; **6**: e28977.
38. Chang YS, Tsai CT, Huangfu CA, Huang WY, Lei HY, Lin CF, Su IJ, Chang WT, Wu PH, Chen YT, Hung JH, Young KC, Lai MD. ACSL3 and GSK-3 β are essential for lipid upregulation induced by endoplasmic reticulum stress in liver cells. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 881-893.
39. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; **443**:709-712.
40. Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H, Henkel T, Karabinos A, Kratzin H, Barnikol HU, Hilschmann N. Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; **375**: 497-512.
41. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009; **150**: 662-671.
42. Linē A, Stengrēvics A, Slucka Z, Li G, Jankevics E, Rees RC. Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes. *Br J Cancer* 2002; **86**: 1824-3018.
43. Li Z, Xu G, Li Y, Zhao J, Mulholland MW, Zhang W. mTOR-dependent modulation of gastric nesfatin-1/NUCB2. *Cell Physiol Biochem* 2012; **29**: 493-500.

44. García-Galiano, D., Navarro, V.M., Gaytan, F., Tena-Sempere, M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 2010; **45**: 281-290.
45. Zegers D, Beckers S, de Freitas F, Jennes K, Van Camp JK, Mertens IL, Van Hoorenbeeck K, Rooman RP, Desager KN, Massa G, Van Gaal LF, Van Hul W. Identification of mutations in the NUCB2/nesfatin gene in children with severe obesity. *Mol Genet Metab* 2012; **107**: 729-734.
46. Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma}, stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. *Endocrinology* 2010; **151**: 2494-2503.
47. Valencia CA, Cotten SW, Duan J, Liu R. Modulation of nucleobindin-1 and nucleobindin-2 by caspases. *FEBS Lett* 2008; **582**: 286-290.
48. Suzuki S, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Akahira J, Ebata A, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T. Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci* 2012; **103**: 136-143.
49. Zhang H, Qi C, Li L, Luo F, Xu Y. Clinical significance of NUCB2 mRNA expression in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; **32**: 56.
50. Zhang H, Qi C, Wang A, Li L, Xu Y. High expression of nucleobindin 2 mRNA: an independent prognostic factor for overall survival of patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2014; **35**: 2025-2028.
51. Scotece M, Conde J, Abella V, López V, Lago F, Pino J, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. NUCB2/nesfatin-1: a new adipokine expressed in human and murine chondrocytes with pro-inflammatory properties, an in vitro study. *J Orthop Res* 2014; **32**: 653-660.
52. Fu H, Zhu Y, Wang Y, Liu Z, Zhang J, Wang Z, Xie H, Dai B, Xu J, Ye D. High NUCB2 expression level represents an independent negative prognostic factor in Chinese cohorts of non-metastatic clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget*. 2016 Oct 28.
53. Shimizu H, Tanaka M, Osaki A. Transgenic mice overexpressing nesfatin/nucleobindin-2 are susceptible to high-fat diet-induced obesity. *Nutr Diabetes* 2016; **6**: e201.
54. Takagi K, Miki Y, Tanaka S, Hashimoto C, Watanabe M, Sasano H, Ito K, Suzuki T. Nucleobindin 2 (NUCB2) in human endometrial carcinoma: a potent prognostic factor associated with cell proliferation and migration. *Endocr J* 2016; **63**: 287-299.
55. Kan JY, Yen MC, Wang JY, Wu DC, Chiu YJ, Ho YW, Kuo PL. Nesfatin-1/Nucleobindin-2 enhances cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition via LKB1/AMPK/TORC1/ZEB1 pathways in colon cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 31336-31349.

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：107 年 10 月 25 日

計畫編號	MOST 106-2320-B-041-004 -		
計畫名稱	探討內質網壓力誘導nucleobindin-2過量表現的機制及對肝癌治療的影響		
出國人員姓名	洪瑞祥	服務機構及職稱	嘉南藥理大學生物科技系/副教授
會議時間	107 年 5 月 11 日至 107 年 5 月 13 日	會議地點	日本橫濱
會議名稱	(中文)亞太肝臟研究協會：肝癌新時代的策略 (英文) The Asian Pacific Association for the Study of the Liver. HCC: Strategy in the New Era		
發表題目	(中文)探討 nucleobindin-2 在肝癌細胞中的機制及功能 (英文) To Investigate the Mechanism and Function of Nucleobindin-2 in Human Hepatoma Cells		

一、 參加會議經過

本會議由亞太肝臟研究協會協會所舉辦，會議地點在日本橫濱國際會議中心，會議中有來自相當多的國家的研究人員參與，本會議的主軸為以肝癌為主題來去探討及分享未來在肝癌檢測治療上新的策略。首先在該會議網站註冊參加該會議後並把要發表的海報摘要上傳，經過大會審查我將發表海報的摘要，在通過審查後開始著手飯店和機票的預定，最後選擇從高雄小港機場出發到東京成田機場的班機，之後再搭乘巴士到橫濱。而住宿方面，因此我選擇在橫濱中國城附近住宿，主要因為在此地區飯店價格相對較為便宜。在 5/10 日抵達橫濱後並且完成所有住宿事項，先去即將舉辦會議的地方先參訪並熟悉周邊的交通設施，會議 45/11 開始舉辦並於會議中邀請如台灣、日本、中國、韓國及美國等各國在肝癌研究上傑出的學者來分享其多年的研究成果。會議中同時有多場相當精彩的演講讓與會研究人員參與，而我的海報報告時間在 5/12 號晚上 16:40-17:40 這段時間開始，有機會與各國研究人員交流且獲益良多，尤其會海報過程中與來自美國的臨床醫師討論他多年觀察肝癌形成的機制，也與我分享她正在進行的肝癌治療藥物之開發。而會議也於 5/14 結束後我從東京成田機場返台。

二、與會心得

肝癌症在台灣每年造成相當多人的死亡，目前在治療肝癌的方法有手術、移植、放射線治療、酒精注射、血管栓篩及化學治療。但由於肝腫瘤具有高的抗藥性及低的存活率，因此須更進一步研發尋找出一些新的治療機制及做作用目標。我們最近的研究發現探討內質網壓力可以誘導肝癌細胞 nucleobindin-2 的過量表現，而 nucleobindin-2 在過去研究顯示在乳癌、前列腺癌及胃癌都有過量表現情形，此外我們分析臨床檢體也發現 nucleobindin-2 在男性的表現量比女性來的高。而亞太肝臟學會所舉辦的會議主要在探討目前肝癌新的治療方式，會議中有相當多的全世界學者展示其在肝癌治療上的研究成果，會議中有多學者分享基因表現與肝腫瘤發展上的影響，也有臨床醫師分享其在肝癌治療病人上的數據分析。例如其中一位日本臨床醫師 Hiroshi Yatsuhashi 界分享 HBV 在日本的情況，再經日本國家數據資料庫分析在 2015 年約有 22252 肝癌病人與 HBV 慢性感染有關，然而約有 80320 的肝癌病人是與 HCV 感染有關係，進一步統計分析 2012-2015 年與 HBV 和 HCV 導致的肝癌病人數發現，HCV 所導致的肝癌之病人數下降了 11%，然而因 HBV 感染所導致的肝癌病人數卻增加了 15%，這樣臨床的統計數據對於肝癌治療上有重大意義，因為在 2014 年的 HCV Sovaldi 治療藥物上市有關，因為此藥物可以有相當高的比例可以治癒 HCV 帶原的病人，因此 HCV 導致的肝癌病人才會明顯下降。此外另一位臨床醫師也分享了在肝癌治療上的結果，sorafenib 是肝癌治療上

的標靶抑制劑，可以抑制多重的酪胺酸激酶，但在臨床治療上常可以發現當病人服用 sorafenib 後有些病人會出現 hand-foot syndrome，因此 Chikara Ogawa 醫師就去分析在肝癌利用 sorafenib 治療後有無出現 hand-foot syndrome 與病人存活率的關係，結果顯示當給予 sorafenib 治療時有出現 hand-foot syndrome 的肝癌病人其存活率明顯比沒有 hand-foot syndrome 的病人來的好。此外會議中也看到一位來自台灣慈濟大學的研究，主要探討咖啡的攝取對慢性 HBsAg 帶原者之肝硬化的發展和肝癌發展風險的評估，他們分析的 339 的病人顯示在高度咖啡攝取的病人和不喝咖啡的人相比其血清中 AST、APRI 及 FIB4 明顯有降低的情形，然而經過 5 年追蹤發現高度咖啡攝取的病人在肝硬化的發展上不會去改變 AST、APRI 及 FIB4 的表現量，他們的研究顯示咖啡的攝取與 HBsAg 帶原者之肝硬化的發展和肝癌發展風險無明顯的關係。在此會議有部分的臨床醫師分享的統計分析結果，也有基礎研究的學者發表其對肝癌治療上新的可能治療的方式，此外我在壁報討論時也與一位來自美國的醫師在肝癌發展上有相當程度的探討，該醫師分享其觀察肝癌在發展上獨特的見解讓我收穫相當的多。

三、 發表論文全文或摘要

會議摘要：

To Investigate the Mechanism and Function of Nucleobindin-2 in Human Hepatoma Cells

Jui-Hsiang Hung*, Ren-Hao Li, Chih-Han Li, Hut-Min Chang,

¹Department of Biotechnology, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan

Hepatocellular carcinoma is a common malignancy affecting approximately one million people worldwide annually. Recent studies have shown that appetite-associated nucleobindin-2 (NUCB-2) is over-expressed in clinical tumor samples such as gastric cancer, prostate cancer, renal cell carcinoma, endometrial carcinoma cells, colon cancer and breast cancer. The survival rate of high-level expression of NUCB-2 in cancer patients was lower than cancer patients with low-level expression of NUCB-2. In addition, overexpression of NUCB-2 was observed in liver cancer by using bioinformatics analysis. The liver cancer patients with NUCB-2 overexpression are associated with poor prognosis. However, the effect of NUCB-2 overexpression on tumor cells is still unclear. In this project, we want to identify the novel role and mechanisms of NUCB-2 overexpression in hepatoma cells. Our preliminary results indicated NUCB-2 mRNA expression level was induced by ER stress as determined with RT-PCR and real-time PCR, and induction of NUCB-2 protein level was significantly increased by ER stress. Increased ER stress by pre-S2 Δ protein was significantly enhanced NUCB-2 expression. We also observed that the overexpression of NUCB-2 was corrected with ER stress in human hepatocellular carcinoma tumor samples. Consequently, this mechanistic research may provide a molecular basis to develop a biomarker and novel cancer chemotherapeutic agent for high level expression of NUCB-2 in cancer patients.

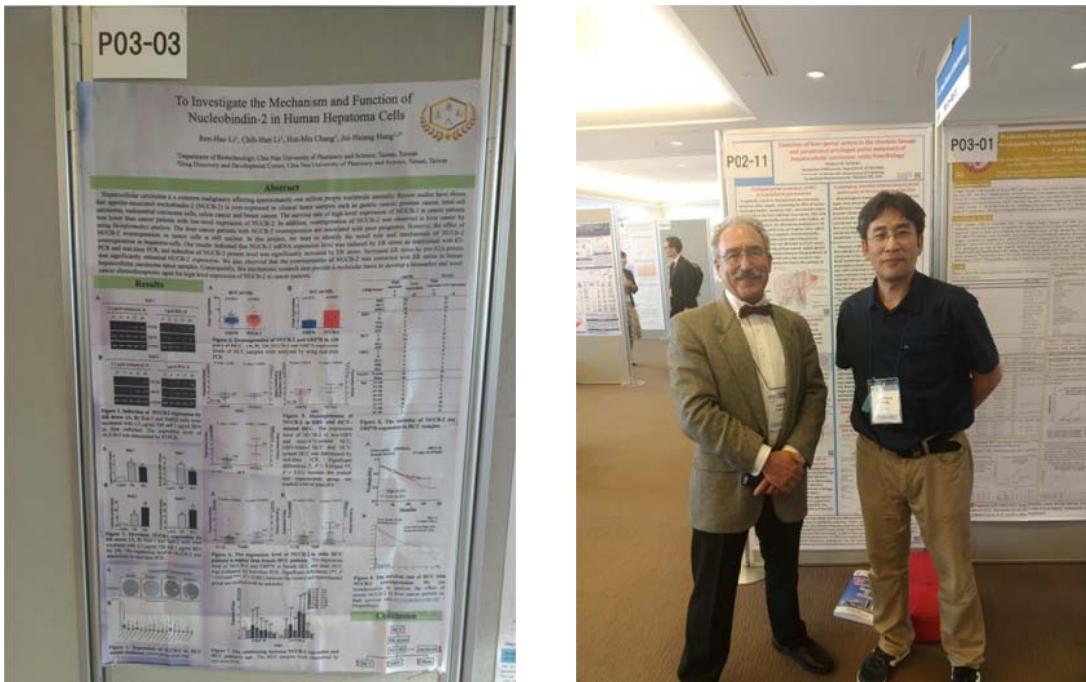
keyword : Endoplasmic reticulum stress; Nucleobindin-2; real-time PCR; RT-PCR; HBV large surface mutant protein pre-S2 Δ ; Hepatocellular carcinoma; Huh-7; HepG2; MCF-7; Tunicamycin; Brefeldin A.

四、 建議

感謝科技部計畫的資助讓我們可以有機會參與這次與我個人正在執行的計畫相關之研討會，未來希望能給我們技職體系的老師有更多機會出國與其他學者交流來提升研究的世界觀並且把最新的學術資訊融入課程中。

五、攜回資料名稱及內容

攜回資料有全部議程表，其內容刊登出各國學者的研究題目、會議進度、會議主題、海報張貼時間等。



10028	Oral	May 11	15:56-16:03	Takayuki Kawai	Tracking keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using ¹⁸ F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography
10030	Oral	May 12	15:42-15:49	Hiroshi Kawamoto	Identification of SOX9-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using osteopontin
10031	Poster			Ching-Sheng Hsu	Coffee consumption is not associated with fibrosis progression and HCC risk in chronic HBsAg carriers
10032	Poster			Koshiro Morino	Appraisal of Long-term Survival in Intrahepatic Cholangiocarcinoma
10033	Poster			Jui-Hsiang Hung	To Investigate the Mechanism and Function of Nucleobindin-2 in Human Hepatoma Cells
10034	Poster			Sung Kwan Bae	HBV reactivation after hematopoietic stem cell transplantation and rituximab-containing chemotherapy: A 12-year study
10035	Oral	May 11	16:45-16:52	Haruki Ujöima	Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein in decompensated cirrhosis
10037	Oral	May 11	8:14-8:21	Eslam Habba	liver cancer recurrence after ablation

The Asian Pacific Association
for the Study of the Liver




APASL Single Topic Conference on **HCC:** **Strategy in the New Era**

Program & Abstracts



Term: May 11-13, 2018
 City: Yokohama, Japan
 President: Shuichiro Shiina, MD., PhD.
Professor,
Department of Gastroenterology, Juntendo University

HCC: Strategy in the New Era

Term May 11-13, 2018

City Yokohama, Japan

P03-03 10033

start 20:00

To Investigate the Mechanism and Function of Nucleobindin-2 in Human Hepatoma Cells

*Jui-Hsiang Hung, Ren-Hao Li, Chih-Han Li, Hui-Min Chang

Department of Biotechnology, Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan

Hepatocellular carcinoma is a common malignancy affecting approximately one million people worldwide annually. Recent studies have shown that appetite-associated nucleobindin-2 (NUCB-2) is over-expressed in clinical tumor samples such as gastric cancer, prostate cancer, renal cell carcinoma, endometrial carcinoma cells, colon cancer and breast cancer. The survival rate of high-level expression of NUCB-2 in cancer patients was lower than cancer patients with low-level expression of NUCB-2. In addition, overexpression of NUCB-2 was observed in liver cancer by using bioinformatics analysis. The liver cancer patients with NUCB-2 overexpression are associated with poor prognosis. However, the effect of NUCB-2 overexpression on tumor cells is still unclear. In this project, we want to identify the novel role and mechanisms of NUCB-2 overexpression in hepatoma cells. Our preliminary results indicated NUCB-2 mRNA expression level was induced by ER stress as determined with RT-PCR and real-time PCR, and induction of NUCB-2 protein level was significantly increased by ER stress. Increased ER stress by pre-S2D protein was significantly enhanced NUCB-2 expression. We also observed that the overexpression of NUCB-2 was corrected with ER stress in human hepatocellular carcinoma tumor samples. Consequently, this mechanistic research may provide a molecular basis to develop a biomarker and novel cancer chemotherapeutic agent for high level expression of NUCB-2 in cancer patients.



The Asian Pacific Association for the Study of the Liver

**APASL Single Topic Conference on
HCC:Strategy in the New Era**



Certificate of Attendance

This is to certify that

attended on

*The Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single
Topic Conference on "HCC: Strategy in the New Era"
which has been held on May 11-13, 2018 in Yokohama, Japan.*

May 13, 2018

*Shuichiro Shiina, M.D., Ph.D.
President, APASL Single Topic Conference in Yokohama
Professor, Department of Gastroenterology, Juntendo University*

六、其他

最後感謝科技部的支持讓我能有充電的機會並了解最新的研究趨勢。

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：洪瑞祥			計畫編號：106-2320-B-041-004-			
計畫名稱：探討內質網壓力誘導nucleobindin-2過量表現的機制及對肝癌治療的影響						
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	1		1. 會議名稱: The Asian Pacific Association for the Study of the Liver. HCC: Strategy in the New Era 地點: 日本橫濱 / 日期: 2018/05/11~05/13 / 題目: To Investigate the Mechanism and Function of Nucleobindin-2 in Human Hepatoma Cells。	
		專書	0			
		專書論文	0			
		技術報告	0			
		其他	0			
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
		新型/設計專利			0	
		商標權			0	
		營業秘密			0	
		積體電路電路布局權			0	
		著作權			0	
		品種權			0	
		其他			0	
技術移轉	件數			件		
	收入			千元		
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇		
		研討會論文	0			
		專書	0			
		專書論文	0			
		技術報告	0			
		其他	0			
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
		新型/設計專利			0	
		商標權			0	
		營業秘密			0	

	積體電路電路布局權	0		
	著作權	0		
	品種權	0		
	其他	0		
	技術移轉	件數 0	件	
		收入 0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	
		碩士生	0	
		博士生	0	
		博士後研究員	0	
		專任助理	0	
	非本國籍	大專生	2	人次
		碩士生	1	
		博士生	0	
		博士後研究員	0	
		專任助理	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。)				

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

肝癌在國內一直是相當重要的健康醫療問題，開發新的檢測基因或治療目標是一項治療肝癌重要的議題，因此在本計畫中我們已經觀察到肝癌組織中常有內質網壓力的情形，而我們實驗證實內質網壓力又可以誘導NUCB-2的過量表現，進一步的我們利用大數據分析觀察到高NUCB-2表現的肝癌患者其存活率明顯的偏低，進一步的我們也發現NUCB-2過量表現可以導致亞洲肝癌患者存活率偏低，然而白人卻無此現象。進一步我們也發現高NUCB-2可以亞洲男性且有病毒感染患者之存活率明顯的偏低。其而這個結果對於未來臨床肝癌治療上可以應用在檢體的分析與觀察，能提供在臨床治療上更多的資訊並期望能夠提高這類病人的存活率。

4. 主要發現

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

說明：（以150字為限）

我們目前已觀察到高NUCB-2表現在對亞洲男性有明顯的影響，但目前詳細機制正釐清中，未來相關訊息傳遞路徑釐清後可以對這亞洲男性在臨床治療上有幫助的資訊或診斷。