

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所微生物免疫組

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

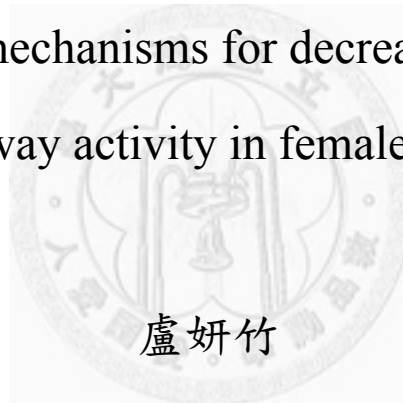
National Taiwan University

Master Thesis

探討女性肝細胞癌中雌激素路徑活性降低之機制研究

Investigate the mechanisms for decreasing the estrogen

pathway activity in female HCC



盧妍竹

Yen-Chu Lu

指導教授：葉秀慧 博士

Advisor: Shiou-Hwei Yeh, Ph.D.

中華民國 102 年 1 月

January , 2013

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：探討女性肝細胞癌中雌激素路徑活性
降低之機制研究

英文題目：Investigate the mechanism for decreasing the estrogen
pathway activity in female HCC.

本論文係盧圳竹君 (學號 R99445124) 在國立臺灣大學
微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 102 年 1 月 25 日
承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

蔡和慧

(簽名)

(指導教授)

陳亭璽

楊宏志

系主任、所長

鄧述章

(簽名)

致謝

兩年半的碩班生涯說長不長，說短不短，其中遇到了許多困難與挫折，也收到許多關懷與幫助，謹以此篇致謝感謝所有教導、幫助、陪伴跟支持我的人。

首先感謝葉秀慧老師這兩年半來的諄諄教誨，從日常生活的關懷到研究指引，以及生活態度的勸勉，都花了很多心血。不好意思，在您忙碌之餘，讓您操心了，謝謝您！

另外，感謝陳培哲老師、楊宏志老師在幾次進度報告中對此篇論文提出的建議及想法，也感謝吳君泰老師在 group meeting 報告的時候給了我寶貴的建議。

感謝實驗室學長姊在實驗及生活中的指導及幫助：感謝聖涵學長帶我做實驗以及傳授生存奧義；感謝巧玲學姊從實驗到報告，各方面的鼎力相助；感謝雅紋學姊、思嘉學姊、亞筠學姊、爾雅學姊在實驗上的指導與建議；感謝萬欣學長、柏任學長、韋志學長、佳欣學姊、珊珊學姊、煒翔學長在生活瑣事及實驗材料的幫助；感謝同時進實驗室的姿蓉、宜瑾、楷為在實驗及生活的討論及幫忙，忍受我的囉嗦，共同掙扎向前；感謝怡孜這一年多來的特別笑點與陪伴，也感謝靜如學姊跟雲姊在訂購物品及其他瑣事上的幫助，你們是我們的生命線。

感謝婉秀、友慧及愷珊在各自忙碌之餘的關心，宛霖、伊婷不遠千里的探視與陪伴，感謝大學好友卉汝、姿華、于庭、北一控、小黑、珣雅、大姊的寬慰與支持，兩年的室友怡真生活上溫馨的交錯，以及文瑄跟丸子無微不至的關心跟陪伴，各種建議與警示。

最後，由衷的感謝我的家人們，感謝你們不變的支持與關心，讓我能在挫折及疲累的時候有溫暖的臂膀可以依靠，也謝謝你們對我的信心，讓我能夠堅持過完我的碩班生涯。

妍竹

2013 年 1 月 31 日

摘要

肝細胞癌(HCC)為國內十大癌症死因之一，目前已發現肝細胞癌發生率在男女間有明顯差異：男性高於女性，其中又以 HBV 相關的肝細胞癌更為明顯，男女比可達約 7:1。性荷爾蒙被推測與性別差異相關。雌激素受體 α (Estrogen receptor α , ER α)與雌激素已被發現是一種肝細胞癌之保護因子，可使肝細胞癌在女性病患中有較低發生率。

先前實驗室研究發現，在約 60%女性肝癌病患中，相較於非腫瘤組織，腫瘤組織的雌激素受體 α 蛋白質表現量明顯下降，且此下降主要受微型核糖核酸-18a (miR-18a) 之調控。而本研究嘗試探討另外 40%有相對正常雌激素受體 α 表現量的患者，其雌激素通路的活性降低與否，及是否有其他機制使雌激素通路的對 HCC 的保護功能弱化。

本研究選定的是具有相對較多的雌激素受體 α 表現($T/N \geq 0.5$)、更年期前的女性肝癌病患(≤ 50 歲，以排除雌激素的變因)，測定雌激素受體 α 的目標基因表現量。結果顯示此群病患的雌激素受體 α 通路的功能也降低了。為了瞭解潛在的調控機制，我們首先檢驗在肝腫瘤區是否有雌激素受體 α 的體細胞突變或是負向抑制變體(dominant negative variants)的增加。但此兩種機制都不是在這群病人中使雌激素通路功能下降的原因。之後，我們檢查兩個雌激素受體 α 重要的共同因子—Foxa1/2 及 HNF4 α 在此群病人檢體中的表現情形。我們發現此二種蛋白質在大部分的病人的腫瘤區都有增加。接著，用細胞實驗證明活化的 HNF4 α 可以抑制雌激素受體 α 的轉錄因子的能力，為雌激素受體 α 較多的女性肝細胞癌，提供了可能的機制，而 Foxa1/2 在此機制中的作用仍需進一步探詢。

關鍵字：肝細胞癌(HCC)、雌激素受體 α 、Foxa1/2、HNF4 α

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) occurs mainly in men, which is even more evident in HBV-related HCC (with the male to female ratio up to 7 to 1). The sex hormones have long been implicated involved in regulating such gender difference. The estrogen and estrogen receptor α (ER α) were identified as protective factors for HCC and contributing for the lower tumor incidence of HCC in female patients. .

Our previous studies pointed out that the expression of ER α protein is decreased in about 60% of female HCC. This could be attributed by the elevation of miR-18a, which targets and decrease the expression of ER α protein. The current study is focused on the rest 40% HCC that have rather normal ER α protein level, aiming to investigate if the activity of estrogen pathway is also decreased in these patients, and moreover if there is any other mechanisms contributing to weaken the protective ability of estrogen pathway in these female HCC.

The female patients (age \leq 50) with high ER α in the HCC tissues were selected for assaying the expression level of specific target gene of ER α . The results indicated that the function of ER α pathway is also decreased in this subgroup of patients. To delineate the underlying mechanisms, we first checked if the somatic mutations or the increase of the dominant negative splicing variants of ER α occurs in the tumorous liver tissues. However, these two mechanisms might not contribute to the decrease of estrogen pathway activity in these HCC. We next examined any aberrations of two critical regulators for ER α function in liver, Foxa1/2 and HNF4 α , for their expression pattern in these HCC. Interestingly, the protein level of these two proteins was increased in many HCC. By cell culture based assay, we found that active HNF4 α can inhibit the transcriptional activity of ER α . It thus provides one possible mechanism for decreasing the function of ER α in female HCC with high ER α . The involvement of Foxa1/2 in this

novel regulatory mechanism awaits further investigation.

Keywords: hepatocellular carcinoma(HCC); ER α ; Foxa1/2; HNF4 α



目錄

口試委員審定書.....	I
致謝.....	II
摘要.....	III
Abstract.....	IV
第一章 序論	
1. 肝癌.....	1
2. 肝癌的性別差異與雌激素.....	1
3. 雌激素受體.....	2
4. 雌激素受體 α 與肝癌.....	3
5. 雌激素受體 α 之突變與癌症.....	3
6. 雌激素受體 α 之變體.....	3
7. Foxa 家族.....	5
8. 先驅因子 Foxa1/2、雌激素受體 α 與肝癌.....	5
9. 肝細胞核因子 4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4A)與雌激素受體 α	6
10. 研究目的及方向.....	7
第二章實驗材料與方法	
1.材料	
1.1 質體.....	8
1.2 細胞株.....	8
1.3 臨床檢體.....	8
1.4 抗體.....	10
1.5 引子.....	10
1.6 藥劑.....	12
2.方法	

2.1 細胞培養.....	12
2.2 質體轉型及抽取保存.....	12
2.3 轉染.....	13
2.4 RNA 干擾技術之慢病毒製備及感染.....	13
2.5 病毒感染.....	13
2.6 抽取 RNA.....	14
2.7 抽取基因體 DNA(gDNA)	14
2.8 RNA 反轉錄為 cDNA.....	15
2.9 定量聚合酶連鎖反應 qPCR	15
2.10 競爭性聚合酶連鎖反應.....	15
2.11 雌激素受體定序.....	16
2.12 蛋白質均質液的萃取.....	16
2.13 蛋白質定量.....	17
2.14 蛋白質膠體電泳.....	17
2.15 西方墨點法.....	17
2.16 雙螢光素酶報告基因檢測	18

第三章研究結果

1. 在女性肝細胞癌病患中 Foxa1/2 蛋白質表現增加.....	19
2. 在女性肝細胞癌中雌激素受體 α 普遍序列正常.....	19
3. 雌激素受體 α 的顯性抑制變體之表現量在腫瘤處未顯著增加.....	20
4. 在女性肝細胞癌組織中 Foxa1/2 蛋白質表現增加.....	20
5. 在女性肝細胞癌病患中 HNF4 α 表現量增加.....	21
6. HNF4 α 抑制雌激素受體 α 的轉錄因子功能.....	21
7. Foxa1/2 能幫助雌激素受體 α 行使轉錄功能並回復 HNF4 α 對雌激素受體 α 的抑制.....	22

第四章討論

1.HNF4 α 在女性肝癌中的可能扮演新的角色.....	23
2.Foxa1/2 可能調控 HNF4 α 對雌激素受體 α 的抑制.....	24
3.雌激素受體 α 與 HNF4 α 的交互作用可能會促成癌症的發生.....	25
4.其他能與雌激素受體 α 結合調控雌激素受體 α 的因子.....	25
5.總結及建議.....	26
6.臨床上的應用與重要性.....	26
參考文獻.....	27
圖附錄.....	30



第一章 序論

1. 肝癌

肝癌為世界常見的癌症之一，據 IARC 統計資料：在男性中肝癌為第五常見癌症，每年約有 523,000 人得到肝癌，約佔所有癌症的 7.9%；而在女性則為第七常見癌症，約佔所有癌症發生率的 6.5%[1]。據 2011 年的我國的衛生統計，肝癌分居國人男女前十大癌症死因第二名[2]，可知肝癌的重要性。

肝癌是一種多因性的癌症，可引起肝癌的危險因子包括年齡、性別、肝硬化、糖尿病等**宿主**狀態相關因子；B 型肝炎病毒或 C 型肝炎病毒分別或共同感染、共同感染 HIV、病毒量、病毒基因型等**病毒**狀態相關因子；及酒精及黃麴毒素等外在**環境**因子[3]。其中 B 型或 C 型肝炎病毒最重要的危險因子，約 75% 的肝癌與其感染相關[4]。B 型肝炎病毒盛行地區為亞洲，除日本外，在大部分亞洲國家中，如：中國、台灣、韓國、越南等。超過 50% 的肝癌病患都有感染 B 型肝炎病毒(HBsAg+)，在日本則類似歐美，肝癌病患中多感染 C 型肝炎病毒(68%)[5]。

2. 肝癌的性別差異與雌激素

大多數區域的肝癌的性別比例差異約為男性為女性的 2-4 倍[1, 6]，而相較之下 B 型肝炎病毒相關的肝癌男女差異較大，可達約 6.9:1；同研究中 C 型肝炎病毒相關的肝癌男女比約為 2.8:1[7]。

性別差異可能與性荷爾蒙相關，在流行病學研究中發現，更年期後及卵巢切除後的女性有相對較高的罹患肝癌的風險，且使用賀爾蒙替代療法 (Hormone replacement therapy, HRT) 的女性的罹肝癌風險較低[8]。另有研究指出，在大鼠模式中，供給 DEN 給卵巢切除組別的大鼠肝癌發生率(92.69%)遠大於正常的大鼠(58.62%)，而在卵巢切除但又施加雌激素的大鼠組別，肝癌發生率則可回降至(44.44%)，可由此看出雌激素對肝癌的保護作用[9]。

3. 雌激素受體

雌激素受體為固醇類受體，屬核受體超家族第三型(nuclear receptor superfamily class 3)，分布於細胞核及細胞質中，當配體(ligand)與受體結合時，可使受體形成同型二聚體(homodimer)入核，並結合於兩段直接重複序列，行使轉錄因子的功能。

雌激素受體具有八個外顯子(exon)，A-F 六個功能性 domain，其中 A/B 及 E domain 分別含有轉活化區(Activation function domain)，AF-1 及 AF-2，分別位於 N 端及配體結合區(Ligand-binding domain)，AF-1 行使配體獨立性轉活化(ligand-independent transcription activation)，不需與配體結合就可以與一些共同活化因子(Co-activators)如：AP-1、SP-1 結合，刺激下游目標基因的轉錄；而 AF-2 則行使配體依賴性轉活化(ligand-dependent transcription activation)功能，在與配體結合作用下，可以活化下游目標基因的轉錄。C domain 為 DNA 結合區(DNA-binding domain)，具有兩個 Zinc finger motif，用於結合 DNA。樞紐區(Hinge domain)即 D domain 帶有核定位訊號(nuclear localization signal)幫助雌激素受體轉位於細胞核中。配體結合區(Ligand-binding domain, LBD)，即 E domain，為雌激素及其他 SERMs(Selective estrogen receptor modulators)的結合位置，可使雌激素受體與配體結合後活化，行使配體依賴性的轉活化功能。[10, 11]。

目前已發現兩種雌激素受體，分別為雌激素受體 α 及雌激素受體 β ，此兩種亞型來自不同基因，雌激素受體 α 基因位於人類第六對染色體 q25.1 處，其中開放讀碼區(open reading frame, ORF)為 1785 個核苷酸可以轉譯為 595 個胺基酸組成的蛋白；而雌激素受體 β 基因則位於人類第 14 對染色體 q23.2，開放讀碼區含 1590 個核苷酸，可轉譯為 530 個胺基酸的蛋白質。此兩種類型的雌激素受體在 DNA 結合區有高於九成的相似度，而配體結合區則有五成左右的相似度[12]，但在各個組織間的分布不同，而扮演不同的角色。在肝臟中的表現型以雌激素受體 α 為主[13]，故本篇將著重於討論雌激素受體 α 。

4. 雌激素受體 α 與肝癌

在 2007 年，Naugler 教授團隊在施加 DEN (diethyl nitrosamine) 的小鼠肝癌模式中發現，相對於雌性小鼠，介白質-6(interleukin-6, IL-6) 在雄性小鼠中上升的幅度較高，雌激素受體 α 可以藉由抑制庫氏細胞(Kupffer cell)的介白質-6 轉錄而抑制肝細胞的發炎、轉型、以及增生，進而使雌性小鼠肝癌罹患率降低[14]。

而在臨床檢體中也發現藉由微型核糖核酸-18a(miR-18a)的調控，約 60% 女性肝癌病患在腫瘤部分雌激素受體 α 的蛋白質表現會下降，而且發現在肝癌細胞株 Huh-7 及 SNU-387 中增加 miR-18a 表現或是 si-ER α 皆會使細胞複製活性增加，而在乳癌細胞株 MCF-7 中則相反，可能與罹癌原因相關[15, 16]。

5. 雌激素受體 α 之突變與癌症

雌激素受體 α 突變會影響其功能，如在乳癌病人中發現 DNA 結合區上有兩至三個點突變，則其轉活化功能在配體結合後，可能會變得較弱[17]；而相對的，在樞紐區用 arginine、glutamine 或 alanine 取代 302、303 的 lysine 則可以增加轉活化的功能[18]。而在配體結合區的突變，除了沒有顯著功能的以外，則是會降低雌激素或其相似物對雌激素受體的結合能力。

在乳癌病患中，雌激素受體 α ，目前已經發現如：K303R、Y537N/Y537S 的功能性突變[17]，但乳癌檢體中發現的雌激素受體 α 的突變位置差異大，沒有集中發生突變的位點。

6. 雌激素受體 α 之變體

雌激素受體 α 可因選擇性剪接(alternative splicing)造成不同外顯子缺失的變體，有些會因為密碼子移位而造成提早終止的截斷型變體(truncated variants)，其中包含持續活化型(constitutively active form)的變體，如：外顯子-5 缺失；

以及顯性抑制變體(dominant negative variants)－除了本身沒有辦法行使正常的功能外，甚至會影響其於正常的雌激素受體的功能。包括：外顯子—3、7 缺失。

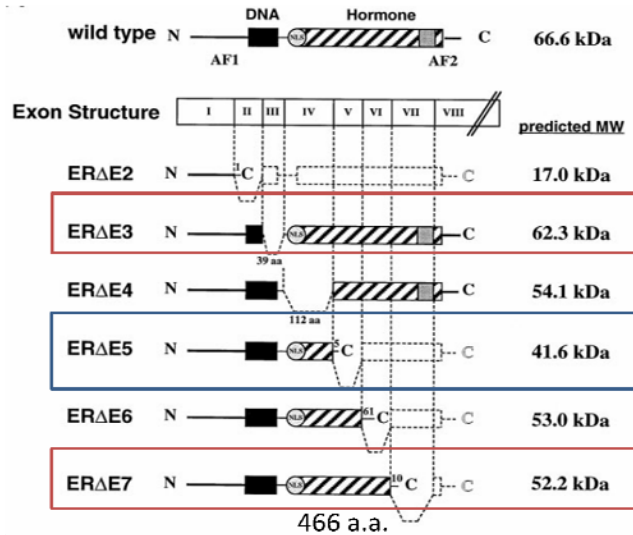


圖 1、ER α 各種變體示意圖

- 外顯子—5 缺失

外顯子—5 缺失喪失配體結合區的功能，且因密碼子移位造成提早終止的截斷型變體，也沒有 AF-2 domain，但有完好的 DNA 結合區，不需配體，可保持活化狀態，轉活化目標基因[19]。

- 外顯子—3 缺失

外顯子—3 可以轉譯成大部分的 DNA 結合區[17]，其缺失使雌激素受體無法與目標基因的雌激素反應元件結合(estrogen response element, ERE)，但此種變體與雌激素結合的能力不受影響，且 AF-1 仍具有轉活化功能，且會與野生型形成異雙元體，或與野生型競爭輔助活化因子。在 Hela 細胞中，以不同比例共轉染外顯子—3 缺失型與野生型，[20]可以證實外顯子—3 缺失型變體對野生型雌激素受體的轉錄抑制作用。

- 外顯子—7 缺失

為最常見的雌激素變體[21]，由於缺少 AF-2 及部分的配體結合區，可以在沒有配體的情況下與野生型結合，干擾野生型結合上 DNA，抑制野生型的

表現，且可隨著外顯子-7 缺失的表現比例增加而加強抑制野生型的功能 [22]。

7. Foxa 家族

Foxa 家族為 Fox(forkhead box)蛋白的其中一群，命名來自，成員 Foxa1、Foxa2、Foxa3，具有保留性極高的 wing helix DNA binding domain。其結構類似 linker protein H1 及 H5，可使 Foxa 蛋白結合於 DNA 上，但因為特定數個氨基酸與 H1 及 H5 不同，不能聚合 DNA，使其具有解開異染色質(heterochromatin)的功能，為先驅轉錄因子，調控其他轉錄因子及目標基因的轉錄[23]。

Foxa1 和 Foxa2 又稱 HNF3 α 和 HNF3 β ，兩者功能相似，可互相取代(functionally redundant)，與胚胎肝臟發育及成體後的代謝平衡相關，而 Foxa3 在肝臟的功能則較不重要[24, 25]。

8. 先驅因子 Foxa1/2、雌激素受體 α 與肝癌

先前研究在乳癌細胞中發現在雌激素受體結合位置的附近常會伴隨 Foxa1 之結合[26, 27]，且會結合在雌激素受體的目標基因的啟動子或加強子上，而 Foxa1 的結合與否雌激素受體結合及調控目標基因的轉錄扮演重要角色 [28]。

在 2012 年，Zhaoyu Li 等團隊意欲研究 Foxa1/2 在肝癌發生所扮演的角色，分別在 Foxa1/2 缺陷小鼠及正常小鼠中施用 DEN 以引發肝癌，與人類肝癌相似，肝癌發生率在公鼠中顯著高於母鼠，但在缺陷小鼠中，雌性小鼠反而增加肝癌的發生率及腫瘤大小，雄性小鼠則有降低腫瘤發生率的現象。且 Foxa1/2 的存在與否會對雌激素受體 α 及雄激素受體(androgen receptor, AR)對目標基因的表現模式(expression profile)產生顯著影響。此結果顯示，Foxa1/2 可能是女性調控雌激素通路對腫瘤保護作用，以及雄激素通路對男性的致癌性。另外，女

性肝癌病患中，Foxa2 在目標基因的的結合位置有 SNP 的出現，可能使 Foxa2 對 DNA 的結合能力變差，而使雌激素受體 α 對目標基因的調控改變，影響雌激素受體 α 對肝癌的保護能力[25]。

9. 肝細胞核因子 4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α)與雌激素受體 α

HNF4 α 又稱 NR2A1 為一種核受體，由位於 20q13.12 的 HNF4A gene 轉錄轉譯出，屬於肝富集轉錄因子(Liver enriched transcription factors, LETF)之一，linoleic acid 已被報導可能為 HNF4 支配體在哺乳類中有內生性配體 linoleic acid—為一種必須脂肪酸[29]，HNF4 α 會以同型二聚體結合上 DNA[30]，是肝中最多的 DNA 結合蛋白[31]，可調控胚胎的肝臟發育及肝細胞分化及代謝平衡[32]，基因剔除鼠。具有 P1 及 P2 兩個啟動子，隨著發育不同時期或在不同器官表現，可以轉錄出至少六種不同的變體(HNF4 α 1-3, HNF4 α 6-9,...)，在成人肝臟中由 P1 轉錄，而在胎兒肝臟則主要使用 P2 啟動子[33]。其蛋白質從 N 端到 C 端一樣可以分為 A-F 六個功能性 domain 與雌激素受體相似，唯 HNF4 α 的 F domain(C terminl)有抑制本身功能的作用，所以此 isoformHNF4 α 3，由於不具備正常的 F domain，HNF4 α 可持續呈現活化態[34]。

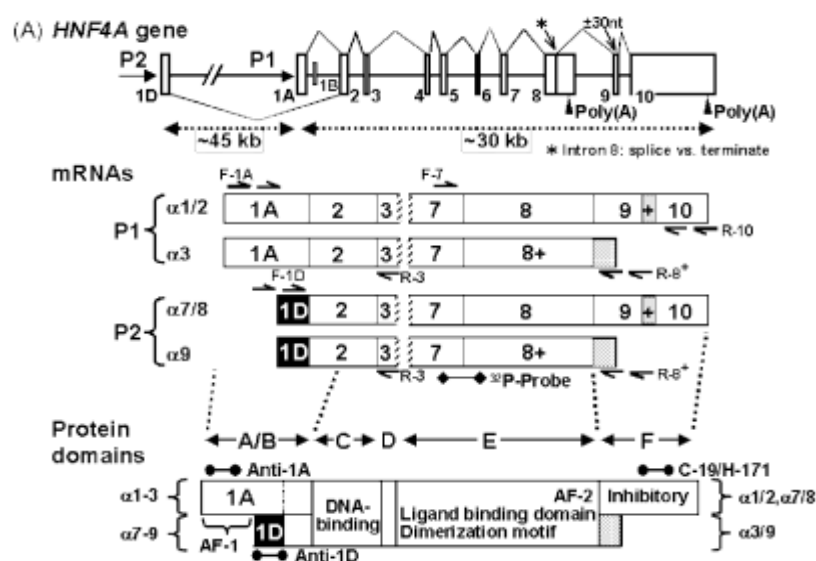


圖 2、HNF4 α 各種變體示意圖[35]

而在實驗室先前研究中以 co-IP 發現 HNF4 α 可以與雌激素受體 α 的樞紐區結合，而被雌激素受體 α 調控，以螢光素酶報告基因系統測定 HNF4 α ，其報告基因也會因加入雌激素受體 α 而表現量降低。而 ChIP 的結果發現，加入雌激素受體 α ，會減少 HNF4 α 結合下游基因的調控元件(regulating element)的數量[36]，為降低報告基因表現的原因。

10. 研究目的及方向

之前實驗室研究發現在約 60%女性肝細胞癌患者中，腫瘤部分的雌激素受體 α (ER α)蛋白質表現量會被微型核糖核酸-18a(mir-18a)調控而降低，而其他 40%患者的雌激素受體表現量則沒有顯著降低。而據先前研究所知，雌激素與雌激素受體對肝細胞癌有保護作用，本研究欲探討雌激素受體表現量未有顯著下降者(T/N \geq 0.5)，其雌激素受體 α 的功能是否也透過其他致癌機制調控，在腫瘤組織中降低

為了檢驗此假說，我們先選擇年齡不大於 50 歲(更年期前)的女性肝癌病患，首先檢驗雌激素受體 α 通路的功能性是否在雌激素受體 α 有顯著下降組的與未顯著下降組都降低。如果結果支持雌激素未顯著下降組也有雌激素受體 α 通路降低的情形，則進一步檢驗造成雌激素受體 α 功能不正常的原因。我們在此研究中提出三種可能性 (1) **體細胞突變**(somatic mutation)：在 HCC 中出現，會影響雌激素受體 α 功能性的突變。(2) **顯性抑制變體**(dominant negative variants)：在 HCC 中會增加，主要來自於 alternative splicing。(3)**輔助調節因子**(co-regulator)包括：先驅因子 Foxa1/2 (即肝細胞核因子 HNF3 α/β)和肝細胞核因子 4 α (HNF4 α)，為了此二者對此群病患雌激素受體功能性下降的關連性。

我們預期此研究可以找到除了雌激素受體 α 被 miR-18a 調控減少蛋白質表現外，其他新的使雌激素受體 α 功能性下降的機制。

第二章 材料與方法

1.材料

1.1 質體

pER, pHNF4A3, pHNF3B,pcDNA, pERE-Luc, pRenilla

si-HNF4 α , si-Foxa1, si-Foxa2

1.2 細胞株

Human breast cancer cell line: MCF-7

Human hepatoma cell line :HepG2

Heman embryonic kidney cell line: HEK-293T

Normal human embryonic liver cell line: CL-48

1.3 臨床檢體

	sample	age	Type	Female
1	676	33	HBV-HCC	F
2	761	44	HBV-HCC	F
3	1193	49	HBV-HCC	F
4	1358	42	HBV-HCC	F
5	1669	44	HBV-HCC	F
6	1742	50	HBV-HCC	F
7	1965	40	HBV-HCC	F
8	2038	44	HBV-HCC	F
9	2090	45	HBV-HCC	F
10	2157	49	HBV-HCC	F
11	748	45	HBV-HCC	F
12	1325	34	HBV-HCC	F
13	1403	50	HBV-HCC	F

14	1617	33	HBV-HCC	F
15	1735	50	HBV-HCC	F
16	1765	46	HBV-HCC	F
17	1822	49	HBV-HCC	F
18	1827	48	HBV-HCC	F
19	1861	49	HBV-HCC	F
20	1866	39	HBV-HCC	F
21	f1	50	HBV-HCC	F
22	f3	50	HBV-HCC	F
23	f9	27	HBV-HCC	F
24	f11	42	HBV-HCC	F
25	f17	17	HBV-HCC	F
26	N2		Hemangioma	F
27	N3		Hemangioma	F
28	N4		Hemangioma	F
29	N5		Hemangioma	F
30	143N		FNH	F
31	144T		FNH	F
32	145N		FNH	F
33	146T		FNH	F
34	147N		FNH	F
35	148T		FNH	F

(mention the source of the tissues, from TLCN, approved by IRB)

1.4 抗體

Anti-ER α (F10, sc-8002, Santa Cruz)

Anti-Foxa1(gtx100308,Genetex)

Anti-Foxa2(M-20, sc-6554,Santa Cruz)

Anti-HNF4A(H171, sc-8987 Santa Cruz)

Anti-HNF4A N'(NB100-1783, Novus)

Anti- β -Actin(C4, sc-47778, Santa Cruz)

1.5 引子

a. ER α :

◇ gDNA 放大及定序：

	Sequence	Amplicon	length
EXON1-F1	CCGTCCTCCAGCACCTTTGTAATG	1151 bp	24
EXON1-R1	CCAAGAGCGGACCTTCCCAAGTG		24
EX1-F	CGGTTTCTGAGCCTTCTGCCC	771 bp	21
EXON1-R2	TGCCTCTCGCACGGACGGTAAG		22
EXON2-F	GGATAAAGTGGATCTGCTGCATCTCC	351 bp	26
EXON2-R	CCTTCCTCAGTCGCTTTGGCTCTTAG		26
EXON3-F2	CAACATAGTAAGGCTGAGGAAGTGATAGG	445 bp	29
EXON3-R2	GCCATGTTAGAATTTCCAGTTCAGAC		27
EXON4-F2	TCACCTGTGCTTGAAAGTATTTCTTC	534 bp	26
EXON4-R2	CACTATTTCTCCCATGACATCACAAC		26
EXON5-F	GACCTTGTCAGTTCAAATCCCTGTTGC	373 bp	27
EXON5-R	CACCCCAATGCACTCTTTTGTTAAG		26
EXON6-F	ATGAACCCTTTCATGTCTTGTGGAAG	305 bp	28

EXON6-R	GCCTTTGGAGTGGGTAGATCGTATCTG		27
EXON7-F	TGGCTCATTGTTACATCCCATGAACAC	378 bp	27
EXON7-R	ACTCTCCATATGCAGGCACCAGTCC		25
EXON8-F	GTGTCTTTGGAGTTCCTCTTCCTTCCC	417 bp	27
EXON8-R	GACAGAATTTGGCTAAAGTGGTGCATG		27

✧ cDNA 放大及定序(nested)

134F	CCTCTAACCTCGGGCTGTGCTC
EX1F	CGGTTTCTGAGCCTTCTGCCC
1350R	GAGGGTCAAATCCACAAAGCC
1275R	GGTCAGTAAGCCCATCATCGAAGC

✧ 競爭 PCR(competitive PCR) :

6F	CTAACTTGCTCTTGGACAGGAACC
ER Total-R	TCAGACCGTGGCAGGGAAACCC

b. PBGD

PBGD-1070-F	CATGAAGATGGCCCTGAGGAT
PBGD-1266-R	GGCATCTGTGCCCCACAAACCAG

c. Lifr

hLifr-2753F	CCACCTGGTCTTGCGAGCCTA
hLifr-2870R	CACTGCCACTGGGATGAGAATG

d. Foxa1

hFoxa1-327F	GAAGATGGAAGGGCATGAAACCA
hFoxa1-520R	TGGCATAGGACATGTTGAAGGACG

e. Foxa2

hFoxa2-F	GAGCAGCTACTATGCAGAGC
----------	----------------------

hFoxa2-R	ACGACGACATGTTTCATGGAG
----------	-----------------------

f. Luciferase

Luc-DNA-F	GCACTCTGATTGACAAATACG
Luc-DNA-R	ATGGAACAACCTTTACCGACC

1.6 藥劑

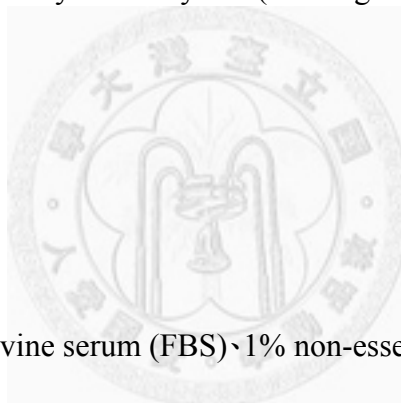
Lipofectamin™2000(Invitrogen, CA)

Genopure plasmid Maxi kit (Roche, Germany)

gDNA extraction kit (Geneaid, TW)

SuperScript™ First Strand Synthesis system(Invitrogen, CA)

Estrogen (SIGMA)



2.方法

2.1 細胞培養

以含 10% fetal bovine serum (FBS)、1% non-essential amino acids (NEAA)、1% L-Glutamin- PEN-STREP-AMPHO SOL.的 Dulbecco's 改良培養基(DMEM) 培養細胞於 37°C、5% CO₂ 的恆溫細胞培養箱中。繼代培養時，以 1× PBS 清洗細胞兩次，後以 0.05% 胰蛋白酶(Trypsin)處理細胞約一分半鐘於 37°C 使細胞懸浮，以十倍的培養液中和後，離心 1000 rpm、2 分鐘，取適當量的細胞，以固定比例持續繼代培養。

2.2 質體轉型及抽取保存

將 DH5α 勝任細胞(10 μL, Protech)由 -80°C 取出，加入 100 ng 質體 DNA，放置冰上 5-30 分鐘後，放入 42°C 水浴槽作用 45 秒，馬上置於冰上兩分鐘，之後於無菌抽氣櫃中加入 200 μL LB 培養液，放入 37°C 培養箱搖晃培養一小

時。取 20 μ L 菌液塗於含質體帶有的抗生素的洋菜培養基上，於 37°C 培養 14-16 小時，挑選單一菌落至含有特定抗生素的 LB 培養液 3 mL 培養 12-14 小時後，轉移至同樣含有抗生素的 LB 培養液 200 mL，培養 14-16 個小時後，將菌液裝入高速離心瓶，用高速離心機(7500 rpm, 20 分鐘)離心後，倒掉上清液，留下沉澱菌體，以 Genome plasmid maxi kit(Roche)抽取質體 DNA，以水或 TE buffer 在 4°C 回溶過夜，長期保存於 -20°C。

若為 si-clone 的質體，則一律改為使用 TB 培養液在 30°C 培養。

2.3 轉染(Transfection)

實驗前一天將細胞分成約八分滿，隔天 LipofectaminTM2000 以 2.5 μ L/1 μ g 質體 DNA 的比例轉染，先將 LipofectaminTM2000 加入適量的 opti-mem (GIBCO)中(以六公分盤為例，需 250 μ L，按比例增減)，靜置 5 分鐘，另取等量的 opti-mem 加入所需的質體 DNA，後將兩管混合，靜置二十分鐘，混合 10% FBS 未加抗生素的培養液加入細胞中，六小時後換盤，可換回加抗生素的培養液，但與賀爾蒙相關實驗，從轉染開始，皆以 5% 活性碳去除生長因子後的 FBS，加上不具酚紅的 DMEM 培養，以避免干擾。

2.4 RNA 干擾技術之慢病毒製備及感染(RNA interference : lenti-virus package)

實驗前一天先將 293T 細胞分為約五成滿，隔天以 LipofectaminTM2000 共同轉染 4 μ g shRNA、4 μ g pCMV Δ 8.91、0.4 μ g pMD.G(10 公分盤)，六小時後換一般細胞培養液 6 mL，24 小時後，取 4 mL 培養液離心 3000 rpm、10 分鐘，收集於 15 mL 離心管中，並將新的 4 mL 的細胞培養液補回盤中，依此收滿三天，可依據培養液的顏色縮減收取的間隔時間，最後一天將 6 mL 全部收取，儲存於 -80°C 待用。

2.5 病毒感染

同細胞繼代，以 1×PBS 清洗細胞兩次，後以 0.05% 胰蛋白酶(Trypsin) 處理細胞約一分半鐘於 37°C 使細胞懸浮，以十倍的培養液中和後，離心 1000 rpm、2 分鐘，取約三天滿量的細胞，加入 polybrene 及含病毒的培養液(8 µg/mL)，培養隔夜(16 小時以上)，以 1×PBS 清洗細胞兩次，換回正常細胞培養液，72 小時後以西方墨點法或定量聚合酶連鎖反應測定感染效率。

2.6 抽取 RNA

將細胞以 1×PBS 清洗兩次，加入 1 ml Rezol(10 cm dish)，靜置五分鐘，移至微量離心管後，加入 200 µL chloroform 激烈搖晃至均勻，靜置兩分鐘後，離心 13000 rpm、4°C 15 分鐘，取上清液置於新微量離心管中，與等量 isopropanol(J.T. Baker, NJ)混合均勻，靜置-80°C 沉澱過夜(16 小時)，以 13000 rpm、4°C 離心 20 分鐘後，去除上清液，加入 200 µL 70%酒精(MERCK, Germany)，以 13000 rpm、4°C 離心 10 分鐘潤洗沉澱物。在抽汽櫃中去除酒精，並待 RNA 風乾後，以 DEPC 水回溶於 55°C 10 分鐘，以 Nanodrop^R 測定濃度，並以 0.8% 瓊膠電泳去確定品質後，儲存於-80°C 待用。若要抽取組織 RNA，則加 1 mL Rezol 到 MagNA Lyzer Green Beads(Roche, Germany)管中，以 6500 rpm、15 秒重複打磨米粒大小組織 4 次，後移至新管加 chloroform，與細胞相同。

2.7 抽取基因體 DNA(gDNA)

將細胞以胰蛋白酶取下，並以培養液中和，以 1×PBS 清洗細胞後，以 Cell lysis buffer (Geneaid)加入細胞中(300 µL/10⁷ cells)，在 60°C 水浴中反應 10 分鐘，每三分鐘 vortex 一次直到透明。加入 RNase A 5µL (10 mg/mL) 靜置室溫 5 分鐘。加入 Protein removal buffer 100 µL，vortex 後迅速置於冰上 5 分鐘。以 13000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新管加入 300 µL 異丙醇(isopropanol)搖勻。再

離心 13000 rpm 5 分鐘，倒掉上清液，後以 70%酒精清洗沉澱，離心 13000 rpm 3 分鐘，去掉上清液，在抽汽櫃中風乾。最後以適當量的水或 TE buffer 在 60 °C 溶解 DNA 10-20 分鐘，保存於-20°C。

2.8 RNA 反轉錄為 cDNA

使用 SuperScript® First Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen, CA) 將 0.5 µL oligo(dT)、0.5 µL random hexamer、0.5 µL、10mM dNTP 加入 1 µg RNA 補 DEPC 水至 5µL，於 65°C 反應 5 分鐘後，靜置冰上 2 分鐘，加入 1 µL 10× RT buffer、1 µL 0.1M DTT、2 µL 25mM MgCl₂、0.5µLRNaseOUT™(40 U/µL)、0.5µL SuperScript®III Reverse transcriptase(200 U/µL)混合液(5 µL/rxn)，於 25°C 反應 5 分鐘，45°C 10 分鐘，50°C 50 分鐘，85°C 5 分鐘後置於冰上，加入 0.5 µL RNase H 於 37°C 反應 20 分鐘後儲存於-20°C 待用。

2.9 定量聚合酶連鎖反應 qPCR

使用 Light Cycler 1.5(Roche, MO)，以 SYBR Green I 偵測，以 PBGD 作為 Internal control，各反應以 25mM MgCl₂ 0.8 µL、10 µM forward primer 0.5 µL、10 µM reverse primer 0.5 µL、ddH₂O 6.2 µL、1a+1b 1 µL、模板 DNA 1 µL 混合，10 µL/rxn 為原則進行。

2.10 競爭性聚合酶連鎖反應(Competitive PCR)

以雌激素受體 α 外顯子 6 上的 forward 引子(6F)與外顯子 8 上的 reverse 引子(ER Total-R)，行使聚合酶連鎖反應，可得到野生型及外顯子(572 bp)－7 缺失型雌激素受體 α 兩種產物(388 bp)，跑 1.5%瓊膠電泳，比較兩產物的強度差異。

2.11 雌激素受體定序

從液態氮保存的臨床檢體肝組織塊中抽 gDNA，在每個外顯子前後設計引子，以聚合酶連鎖反應分別放大雌激素受體 α 的八個外顯子，跑瓊膠電泳確定大小後，以 illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) 純化，送至基隆米克斯定序。將結果比對 NCBI 的標準序列 NG_008493.1，確定序列是否正確，若發現不同序列，比對同病患的非腫瘤肝組織，確定是否為體細胞突變。另外，也以 cDNA 定序比對雌激素受體 α 標準序列 NM_000125.3，確認此突變是否會被表現。

2.12 蛋白質均質液的萃取

組織：

將米粒大小的組織塊加入 250 mL 8M Urea(Sigma, MO)、protease inhibitor(Roche, Germany)、phosphatase inhibitor(Calbiochem, Germany) 混合液中，用 MagNA Lyzer Green Beads(Roche, Germany) 以 6500 rpm、15 秒重複打磨組織 4 次，將混合液移至新微量離心管後，離心 4°C、13000 rpm、30 分鐘，將上清液再移至新微量離心管，儲存於-80°C。

細胞：

將細胞以冰的 1× PBS 清洗兩次，加入 lysis buffer(8M urea 或 Passive lysis buffer)、protease inhibitor(Roche, Germany)、phosphatase inhibitor(Calbiochem, Germany)，室溫反應 15 分鐘，拍擊培養盤或刮取細胞，將溶液移至新微量離心管，離心 4°C、13000 rpm、10 分鐘，取上清液至新微量離心管，儲存於-80°C。

2.13 蛋白質定量

以 Pierce BCA protein assay(Thermo scientific, IL)定量蛋白質，以牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)序列稀釋成標準液(2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL)，於 96 孔盤中加 10 μ L 待測液，在加入 200 μ L 試劑 A 與試劑 B 的混合物(50:1)，避光於 37°C 反應 30 分鐘後，以 562 nm 光源偵測吸光值，對照標準液換算出濃度。

2.14 蛋白質膠體電泳

SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

用 Hofer 系統做膠，將收好的蛋白質均質液，加入適量 sample dye，使最終濃度為一倍。於 100°C 加熱板上加熱 10 分鐘，4°C 離心冷卻後注膠。以 60 伏特跑完上膠後，以 80、100、125 依次增加伏特數，分開蛋白質。

2.15 西方墨點法

將跑完的 SDS-PAGE 膠體，以卡夾—海綿—濾紙—膠體—膜—濾紙—海綿—卡夾的順序夾起，以 120 伏特、80 分鐘將蛋白轉印至膜(Amersham Hybond™-C Extra membrane)上。以 5% 脫脂奶粉的 TBST 封閉(blocking)膜半小時，後以 5% 脫脂奶粉的 TBST 溶液適當稀釋一級抗體，將膜與抗體一起封入塑膠袋中，於 4°C 反應隔夜(>16 小時)後，取出膜於室溫中以 TBST 溶液清洗三次，每次 10-15 分鐘，再以 5% 脫脂奶粉的 TBST 適當比例稀釋之二抗室溫下搖晃 1.5 小時，每次 10 分鐘，後以 Western Lightning® Plus-ECL substrate(PerkinElmer, MA)呈色，以壓片(FUJIFILM, JP)或是 UVP 偵測訊號。

2.16 雙螢光素酶報告基因檢測(Dual-Luciferase Reporter assay)

以 Passive lysis buffer 收下細胞，取 15 μg 蛋白質均質液依次加入螢光素酶檢測試劑 II(Luciferase Assay Reagent II, LAR II)及 1 \times Stop&Glo[®] 基質，以 Dual-Luciferase[®]Reporter Assay System(Promega, UK)，分別測得 Luciferase 及 Renilla 兩種螢光值，前者作為基因表現的對照，後者作為均一化的對照。另外再用定量聚合酶連鎖反應定量各處理組中 gDNA 中的 luciferase 作為不同轉染組別的常態化標準。



第三章 實驗結果

1. 在雌激素受體 α 沒有顯著減少的女性肝細胞癌病患中，雌激素受體 α 的功能性有顯著降低

為了檢驗在雌激素受體 α 未顯著減少($T/NT \geq 0.5$)的更年期前女性肝細胞癌患者的肝臟中，雌激素受體 α 是否仍有正常的功能，首先，參照文獻選定①受雌激素影響②具有雌激素反應元件(ERE)的目標基因—白血病抑制因子受器(Leukemia inhibitory factor receptor, Lifr)，當作一個雌激素受體 α 的目標基因，檢測其 expression pattern，用以反應雌激素受體 α 的在組織中的功能並以雌激素受體 α 剔除小鼠對照正常小鼠，以定量聚合酶連鎖反應偵測此基因在肝組織中的表現量差異，結果發現在雌激素受體 α 剔除小鼠中，白血病抑制因子受器的表現量約為正常小鼠的一半，支持此基因在肝中的確受雌激素受體 α 調控。(圖一)(b)

之後，以定量聚合酶連鎖反應偵測白血病抑制因子受器在肝臟中腫瘤區與非腫瘤區的表現量，對照於雌激素受體 α 有顯著減少的女性肝細胞癌患者，並以肝臟血管癌患者的非腫瘤區作為正常對照組。發現不論在雌激素受體 α 有無顯著減少的組別中，白血病抑制因子相對於正常對照組，都有顯著的減少，腫瘤區的白血病抑制因子又比非腫瘤區的表現量更低，顯示無論雌激素受體蛋白質表現的量的多寡，雌激素受體 α 的功能在女性肝細胞癌患者中都有顯著的降低。此結果表示雌激素受體 α 的蛋白質沒有顯著降低的組別中，雌激素受體的功能也降低了(圖一(b))。

2. 體細胞突變並非雌激素受體 α 未顯著減少的女性肝細胞癌中雌激素受體功能下降的原因

為了研究雌激素受體未有明顯減少的更年期前女性肝癌病患中，雌激素受體 α 的功能降低是否來自突變造成的功能改變，選取 17 對(非腫瘤區/腫瘤區)年齡不大

於 50 歲的女性肝細胞癌病患組織抽取 gDNA，在每個外顯子前後設計引子，放大各外顯子後送定序，比對 NCBI 的雌激素受體 α 標準序列 NG_008493.1，發現在一組臨床檢體中有在第 667 個密碼子上有 G \rightarrow A 的單股單核苷酸變異(GGC \rightarrow AGC)，及在第 145 的胺基酸上，甘胺酸(Glycine)變為絲胺酸(Serine)(圖 2)。而在 cDNA 定序中也一樣的情形，確認此變異會被表現，但是在此組檢體中的腫瘤區及非腫瘤區都有表現此單股單核苷酸變異，所以並非為體細胞突變。其他檢體則沒有在雌激素受體 α 的外顯子區域找到任何突變，此結果顯示，體細胞突變不是讓雌激素受體 α 在雌激素受體沒有顯著減少，的女性肝癌中功能性降低的原因。

3. 雌激素受體 α 的顯性抑制變體之表現量在腫瘤處未顯著增加

在檢視各個檢體中的序列後，推斷雌激素受體 α 的突變不會是造成其功能性下降的主因。進而探討負向抑制變體外顯子-3 缺失型及外顯子-7 缺失型對雌激素受體 α 的影響。首先以跑瓊膠電泳檢驗聚合酶連鎖反應的結果，看此兩種缺失型是否存在肝癌組織中，發現只可以找到外顯子-7 缺失型的表現。接著利用可以同時放大野生型及外顯子-7 缺失型雌激素受體 α 的引子，進行競爭性聚合酶連鎖反應，再用瓊膠電泳檢視缺失型及野生型的在腫瘤區及非腫瘤區的相對亮度，發現在外顯子-7 缺失型在兩區之間沒有顯著的改變(圖三)，此結果指出雌激素受體的功能下降也非受負向抑制變體的影響。

4. 在女性肝細胞癌組織中 Foxa1/2 蛋白質表現增加

由於從臨床檢體中雌激素受體 α 本身沒有發現異常，推測雌激素受體的功能性下降可能來自於輔助因子的變異，在 Zhaoyu Li 等團隊的研究中發現若使 Foxa1/2 突變，則雌激素受體 α 對肝癌的保護作用消失，反而會轉變成利於腫瘤生成，可知 Foxa1/2 的存在對雌激素受體 α 發會對肝癌的保護作用功能非常重要[25]。因此，我們認為 Foxa1/2 有可能會是一個重要的 co-regulator，是造成在這組病人中造成雌

激素受體功能性降低的原因。為了估量此可能性，利用西方墨點法偵測臨床檢體中 Foxa1/2 在腫瘤區及非腫瘤區的表現量，發現在腫瘤區的 Foxa1/2 相對於非腫瘤區大多數會增加，而此增加現象在雌激素受體 α 沒有顯著下降的組織尤為明顯，是以雌激素受體 α 的功能性下降並非緣自於 Foxa1/2 的表現量減少(圖五)。

5. 在女性肝細胞癌病患中 HNF4 α 表現量增加

之前實驗室發現雌激素受體 α 的樞紐區可與 HNF4 α 結合，進而抑制 HNF4 α 與目標基因序列結合，行使轉錄因子的功能。而此機制可能也使雌激素受體 α 結合上目標序列的能力下降，為了檢驗 HNF4 α 是否也可能為一影響雌激素受體 α 功能的因子，故使用西方墨點法偵測臨床檢體中 HNF4 α 在腫瘤區及非腫瘤區的表現，發現在腫瘤組織中，大部分 HNF4 α 的表現量會上升，而此現象在雌激素受體 α 沒有顯著下降的組織尤為明顯(圖五)。此結果指出 HNF4A 的增加可能是雌激素受體功能性降低的原因，需進一步探討 HNF4 α 上升與雌激素受體 α 功能性下降的關連性。

6. HNF4 α 可抑制雌激素受體 α 的轉錄因子功能

我們接著利用細胞培養系統探討臨床檢體中發現在腫瘤組織中 HNF4 α 增加的現象是否會影響雌激素受體 α 的功能，將活性型的 HNF4 α 3 以及具有雌激素反應元件(ERE)的螢光素酶報告基因，轉染至具內生性雌激素受體 α 的 MCF-7 細胞中，以雙螢光酶報告系統檢測，活化的 HNF4 α 3 對雌激素受體 α 的轉錄活性的影響。結果發現加強 HNF4 α 3 的表現，會使雌激素受體 α 轉錄因子的功能下降(圖七)；另外，共同轉染 HNF4 α 3、雌激素受體 α 以及具有雌激素反應元件的螢光素酶報告基因至肝癌細胞株 HepG2 中，也可以看到 HNF4 α 3 對雌激素受體 α 功能的抑制(圖八(a))，且此抑制能力具有劑量依賴性(圖八(b))。

我們接著使用 loss of function 的方法，在 HepG2 中 knockdown HNF4 α ，可以

看到顯著的 Knockdown，但用雙螢光素酶報告系統無法偵測到雌激素受體 α 功能有顯著的改變(圖九)。

7. Foxa1/2 能幫助雌激素受體 α 行使轉錄功能並回復 HNF4 α 對雌激素受體 α 的抑制

為了進一步探討 Foxa1/2 是否會調控 HNF4 α 3 對雌激素受體 α 的抑制功能，選定沒有表現雌激素受體 α 、HNF4 α ，及 Foxa1/2 的胚胎肝細胞株 CL-48，轉染雌激素受體 α 、HNF4 α 、Foxa1/2 及具有雌激素反應元件的螢光素酶報告基因，發現增加 Foxa1/2 表現會增加 ERE-Luc 報告基因的表現，且能回復 HNF4 α 對雌激素受體 α 的抑制(圖十)，此結果指出，Foxa1/2 可能在 HNF4 α 對雌激素受體 α 的調控中扮演了某個角色。為了更清楚機制，另外在 HepG2 使用慢病毒系統 Knock-down Foxa1/2，可使螢光素酶報告基因在未轉染 HNF4 α 3 時表現量降低，而對轉染 HNF4 α 3 造成螢光素酶報告基因表現下降的影響不明顯(圖十一)。

第四章 討論

1.HNF4 α 在女性肝癌中的可能扮演新的角色

HNF4 α 對胚胎期肝臟的發育是不可或缺的，缺失會導致產前死亡；而成人後是維持代謝平衡的重要因子，缺失時易衍生第二型糖尿病；另外，HNF4 α 是幫助肝細胞分化所必需，缺失會致使腫瘤產生。

先前研究發現 HNF4 α 在肝細胞癌病患中或是小鼠模式中，腫瘤區表現量會減少[37-39]，此外，Bonzo 等團隊發現剔除 HNF4 α 會使肝細胞複製速率增加，且細胞凋亡的能力降低，因此認為 HNF4 α 有可能是肝癌的腫瘤抑制基因之一[40]。另外 Santangelo 等團隊發現 HNF4 α 可與 HNF1 α 共同作用抑制上皮間質轉換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的主要基因 Snail 表現，且當抑制 HNF4 α 在細胞中的表現量時，會促使 EMT 發生，而使腫瘤繼續發展或轉移[41]。在 Hatziapostolo 等團隊的研究中，HNF4 α 可透過 MicroRNAs (miR-124, miR-24, miR-629) 建立回饋的調控機制：HNF4 α 降低表現，可調控 miR-124 也被抑制，而使細胞可能透過 (IL-6)-IL-6R，增加 STAT3 的表現，進而增加 miR-24 及 miR-629 表現，抑制 HNF4 α ，而使細胞傾向轉型癌化[39]，也支持 HNF4 α 腫瘤抑制基因的功能。但是，也有研究發現在一些肝癌病患中 HNF4 α 有上升的現象[42]，目前對於 HNF4 α 對於肝癌所扮演的角色還有多處不明。

而在本研究中發現在 HBV 相關的女性肝細胞癌中，雌激素受體未顯著下降的群體中，HNF4 α 在腫瘤區不但沒有減少，反而有增加的現象，而此種增加似乎是較原本成人肝臟中表現的 HNF4 α 1/2 小的另外的 HNF4 的變體的增加，可能為 HNF4 α 7/8 這類原本在胚胎的肝臟中表現的變體，唯需以只能放大特定變體的引子，進行聚合酶連鎖反應，才能進一步確認。

而後我們用細胞實驗證明了過度表現有活性的 HNF4 α ，可以阻斷雌激素受體 α 的轉錄活性。HNF4 α 是否在這類群的女性肝細胞癌中是否相當於一種致癌基因，是造成雌激素受體 α 無法照常行使肝癌的保護作用的原因，值得進一步探討。

HNF4 α 在男性肝細胞癌病患中的表現跟分群也值得再探討，檢驗是否 HNF4 α 在不同類群的病患中可能扮演相反的角色，看看對肝癌的性別差異是否會有更清楚的機制的差別。

然而，在 HepG2 中 si-HNF4 α 並無法使 ERE-Luc 的活性增加。此結果與外送 HNF4 α 3 的結果並不一致，可能是因為送入的 isoform 為活化的 HNF4 α 3，而原先在 HepG2 中，較多的是 HNF4 α 1/2。在實驗中使用的是經過活性碳萃取過的 FBS，會去除油性的生長因子，而 HNF4 α 也是一種脂肪酸，有可能會被去除，而使 HNF4 α 1/2 無法發揮作用，所以有無 si-HNF4 α 並不會造成顯著影響。

2. Foxa1/2 可能調控 HNF4 α 對雌激素受體 α 的抑制

在本研究中發現 Foxa1/2 及 HNF4 α 都在雌激素受體 α 未顯著下降的組別中，在腫瘤區有增加的現象，而 Foxa1/2 的增加與 HNF4 α 對雌激素受體 α 的抑制是否相關仍需進一步探討。

In vitro 從研究結果可以知道在轉染 Foxa2 入細胞時可以稍微增加雌激素受體 α 的報告基因表現，且在同時轉染 HNF4 α 3 時，可以回復 HNF4 α 3 的抑制作用，欲進一步探討 Foxa2 對 HNF4 α 的調控方法，可使用①Co-IP 看看 HNF4 α 3 對 Foxa2 是否會直接作用，還是間接的調控。若為直接作用，可進一步分段找出交互作用的區域。②若此調控 Foxa1/2 會與目標基因上的結合位置結合共同作用，則突變掉 Foxa1/2 的結合位置，再觀察目標基因的表現情形。

In vivo 若想要先探討 HNF4 α 對雌激素受體的抑制作用可使用 HNF4 α 剔除小鼠，檢測雌激素受體 α 的目標基因的表現情形，與正常小鼠做對照。而接著以 Foxa1/2 基因剔除鼠，分別檢測雌激素受體 α 的目標基因及 HNF4 α 的目標基因，將所得結果與正常小鼠相較，可知 HNF4 α 對雌激素受體 α 、Foxa1/2 對 HNF4 α ，以及 Foxa1/2 對雌激素受體 α 的影響。

3. 雌激素受體 α 與 HNF4 α 的交互作用可能會促成癌症的發生

此研究中 HNF4 α 3 對雌激素受體 α 的抑制作用，可進一步用 ChIP(chromatin immunoprecipitation) 檢測 HNF4 α 3 存在會使雌激素受體 α 結合上 ERE 的數量減少，確定 HNF4 α 3 對雌激素受體 α 的作用方式。另結合實驗室先前研究，HNF4 α 3 的功能及與目標序列(EnhI) 結合能力都因加入雌激素受體 α 而降低。綜合兩者結果，推測①雖然此群病患，兩種已知的腫瘤抑制因子雖都有表現，但因為互相抑制的結果，卻不具備雌激素受體 α 或 HNF4 α 對肝癌的保護功能。HNF4 α 3 與雌激素受體 α 結合後是否能夠結合特定的序列，行使轉錄因子的作用，可用 ChIP 探討。

欲進一步證明，此機制的致癌性，In vitro 可先將肝細胞株轉染不同劑量的雌激素受體及 HNF4 α 3，再用 cell proliferation assay 及 soft agar colony forming assay，挑出生長速度有顯著增加或長出群落(colony)的組別。

4. 其他能與雌激素受體 α 結合調控雌激素受體 α 的因子

除 HNF4 α 外，其他共同因子也有可能用一樣的方法，抑制雌激素受體 α 的下游基因的能力與轉錄因子如 AP-1(activator protein-1)及 SP1 (Specific Protein-1)等可與雌激素受體 α 形成異型二聚體(heterodimer)，與本身的 DNA 結合序列結合，調控其下游基因[43]。而 NF-KB (Nuclear Factor-KappaB)則是與雌激素受體 α 結合後，無法結合於 IL-6 的啟動子，使 IL-6 無法表現[12]，與雌激素受體對 HNF4 α 的影響類似，皆會使轉錄因子在蛋白質存在的情況下，無法行使本身的轉錄功能，這些因子跟雌激素受體轉錄因子能力下降的關係可留待日後研究。

5. 總結及建議

此研究找到在女性肝細胞癌中除了透過 miR-18a 抑制雌激素受體 α 蛋白質表現量以外，另一種減少雌激素受體 α 保護作用的機制，也別除了較為不可能的機轉包括：雌激素受體 α 的體突變及負向抑制變體的調控。

然而，為了確認在女性肝細胞癌中雌激素受體 α 的功能正常與否，只用 Lifr 這個目標基因的表現量來判定，略顯不足，因在 Okamura 等團隊在 2010 年發現在部分的 HCC 病患中(23/48, 47.9%) Lifr 的啟動子會增加甲基化，進而抑制 Lifr 的轉錄，認為 Lifr 為一個 HCC 可能的腫瘤抑制基因[44]，所以其表現量下降，可能並非只來自雌激素受體的調控。另外，所增生的 HNF4 α 究竟是哪一型？不同的 HNF4 α 變體是否在肝細胞癌的過程中扮演相反的角色？還需要更進一步的透過實驗釐清。

6. 臨床上的應用與重要性

此研究所找到的減少雌激素路徑對女性肝細胞癌的不同的保護機制，可能可以藉此分類出不同機轉間，不同進程及預後的估計，達到診斷分群的可能性，進一步可能發展出可阻斷特定分群中腫瘤形成的標的。

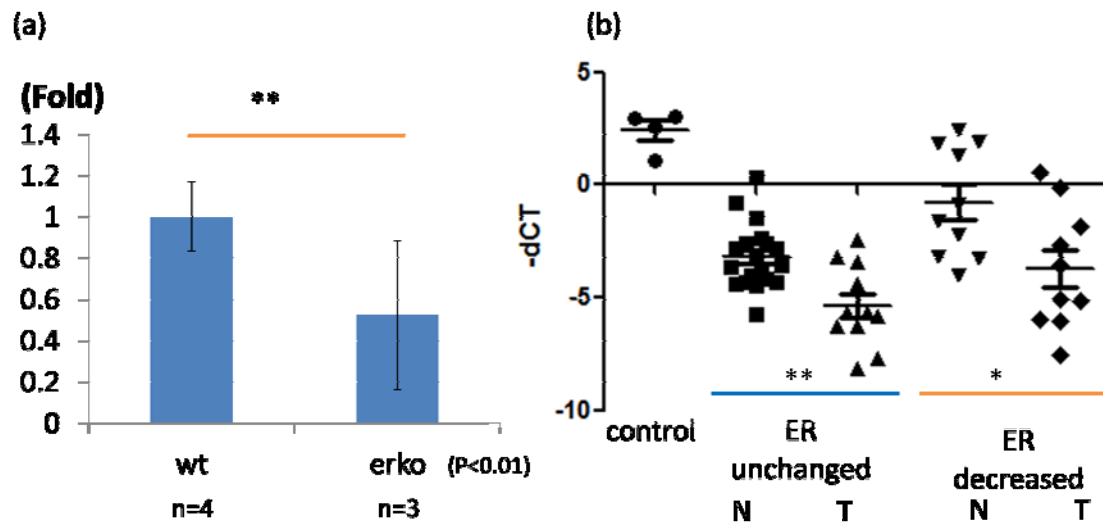
參考文獻

1. El-Serag, H.B., *Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2012. **142**(6): p. 1264-1273 e1.
2. Department of Health, E.Y., R.O.C., *Statistics of causes of death*. 2011.
3. Yu, M.C. and J.M. Yuan, *Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S72-8.
4. Bartosch, B., *Hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1504-9.
5. Raza, S.A., G.M. Clifford, and S. Franceschi, *Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Br J Cancer, 2007. **96**(7): p. 1127-34.
6. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
7. Lee, C.M., et al., *Age, gender, and local geographic variations of viral etiology of hepatocellular carcinoma in a hyperendemic area for hepatitis B virus infection*. Cancer, 1999. **86**(7): p. 1143-50.
8. Yu, M.W., et al., *Role of reproductive factors in hepatocellular carcinoma: Impact on hepatitis B- and C-related risk*. Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1393-400.
9. Wang, Y.C., et al., *Estrogen Suppresses Metastasis in Rat Hepatocellular Carcinoma through Decreasing Interleukin-6 and Hepatocyte Growth Factor Expression*. Inflammation, 2011.
10. Reid, G., et al., *Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(5): p. 821-31.
11. Aranda, A. and A. Pascual, *Nuclear hormone receptors and gene expression*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1269-304.
12. Marino, M., P. Galluzzo, and P. Ascenzi, *Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription*. Curr Genomics, 2006. **7**(8): p. 497-508.
13. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-70.
14. Naugler, W.E., et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. Science, 2007. **317**(5834): p. 121-4.
15. Liu, W.H., et al., *MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells*. Gastroenterology, 2009. **136**(2): p. 683-93.
16. Tsiambas, E., et al., *Significance of estrogen receptor 1 (ESR-1) gene imbalances in colon and hepatocellular carcinomas based on tissue microarrays*

- analysis*. *Med Oncol*, 2011. **28**(4): p. 934-40.
17. Herynk, M.H. and S.A. Fuqua, *Estrogen receptor mutations in human disease*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(6): p. 869-98.
 18. Wang, C., et al., *Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 18375-83.
 19. Villa, E., et al., *Variant estrogen receptors and their role in liver disease*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **193**(1-2): p. 65-9.
 20. Bollig, A. and R.J. Miksicek, *An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(5): p. 634-49.
 21. Klotz, D.M., et al., *Differential expression of wild-type and variant ER mRNAs by stocks of MCF-7 breast cancer cells may account for differences in estrogen responsiveness*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **210**(2): p. 609-15.
 22. Garcia Pedrero, J.M., et al., *The naturally occurring variant of estrogen receptor (ER) ERDeltaE7 suppresses estrogen-dependent transcriptional activation by both wild-type ERalpha and ERbeta*. *Endocrinology*, 2003. **144**(7): p. 2967-76.
 23. Lalmansingh, A.S., et al., *Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2012.
 24. Friedman, J.R. and K.H. Kaestner, *The Foxa family of transcription factors in development and metabolism*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(19-20): p. 2317-28.
 25. Li, Z., et al., *Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer*. *Cell*, 2012. **148**(1-2): p. 72-83.
 26. Laganier, J., et al., *From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that Foxa1 defines a domain of the estrogen response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(33): p. 11651-6.
 27. Carroll, J.S., et al., *Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein Foxa1*. *Cell*, 2005. **122**(1): p. 33-43.
 28. Hurtado, A., et al., *Foxa1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response*. *Nat Genet*, 2011. **43**(1): p. 27-33.
 29. Yuan, X., et al., *Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor*. *PLoS One*, 2009. **4**(5): p. e5609.
 30. Jiang, G., et al., *Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(9): p. 5131-43.
 31. Kaestner, K.H., *Making the liver what it is: the many targets of the transcriptional regulator HNF4alpha*. *Hepatology*, 2010. **51**(2): p. 376-7.

32. Hayhurst, G.P., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1393-403.
33. Eeckhoute, J., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms.* Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 1686-94.
34. Suaud, L., P. Formstecher, and B. Laine, *The activity of the activation function 2 of the human hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4alpha) is differently modulated by F domains from various origins.* Biochem J, 1999. **340 (Pt 1)**: p. 161-9.
35. Huang, J., et al., *Expression of HNF4alpha variants in pancreatic islets and Ins-1 beta cells.* Diabetes Metab Res Rev, 2008. **24**(7): p. 533-43.
36. Wang, S.H., et al., *Estrogen Receptor-alpha Represses Transcription of HBV Genes via Interaction with Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha.* Gastroenterology, 2012.
37. Lazarevich, N.L., et al., *Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors.* Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1038-47.
38. Ning, B.F., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma.* Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7640-51.
39. Hatziapostolou, M., et al., *An HNF4alpha-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis.* Cell, 2011. **147**(6): p. 1233-47.
40. Bonzo, J.A., et al., *Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4alpha in adult mice.* J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7345-56.
41. Santangelo, L., et al., *The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4alpha.* Hepatology, 2011. **53**(6): p. 2063-74.
42. Xu, L., et al., *Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma.* Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3176-81.
43. Gruber, C.J., et al., *Anatomy of the estrogen response element.* Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(2): p. 73-8.
44. Okamura, Y., et al., *Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) is detected as a novel suppressor gene of hepatocellular carcinoma using double-combination array.* Cancer Lett, 2010. **289**(2): p. 170-7.

圖附錄：

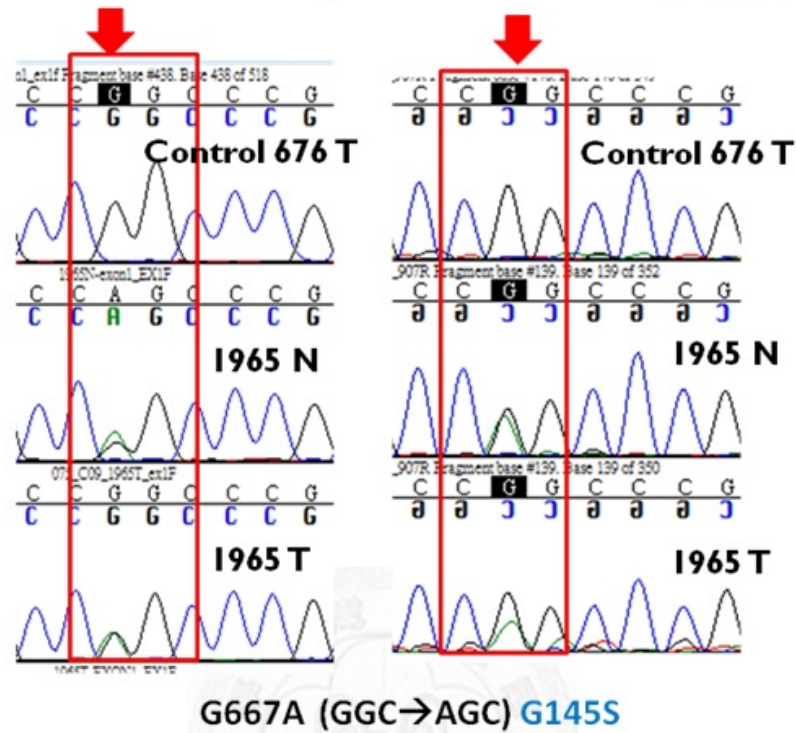


圖一、Lifr 的表現量

(a)經抽取 RNA、RT 後；以定量聚合酶連鎖反應測定在正常小鼠(wt, n=4)及雌激素受體 α 剔除小鼠(ERKO, n=3)肝臟中 ER α 的目標基因 Lifr 的表現量。在雌激素受體剔除小鼠中 Lifr 的表現量約降低為正常小鼠的一半。

(b)在年輕女性肝細胞癌患者(年齡 ≤ 50)中以 ER α (T/N ≥ 0.5 , n=16 分為 ER unchanged 組及 ER α decreased 組(T/N < 0.5 , n=10)，分別用定量聚合酶連鎖反應測定基因 Lifr 的表現情形，N2-N5 為女性 Hemangioma 非腫瘤區抽取的 RNA 當作正常控制組。

1965: G667A (GGC→AGC) G145S



圖二、定序 17 個女性肝細胞癌檢體找到的一個單股單核苷酸變異。

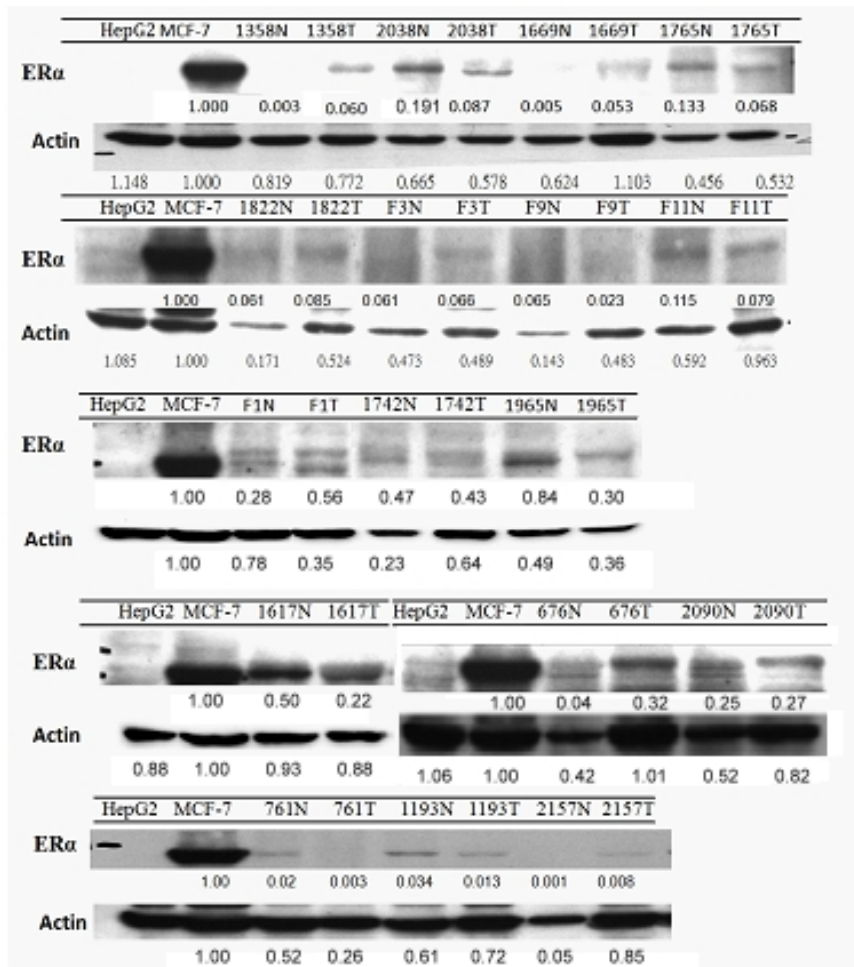
將此 17 個檢體的腫瘤區按照外顯子順序，分別定序其 gDNA，在 1965 這個檢體之中的 667G→A，再定序非腫瘤區做為對照。



圖三、以競爭性聚合酶連鎖反應探測外顯子-7 之表現

(a) 競爭性聚合酶連鎖反應引子設計及放大片段長度

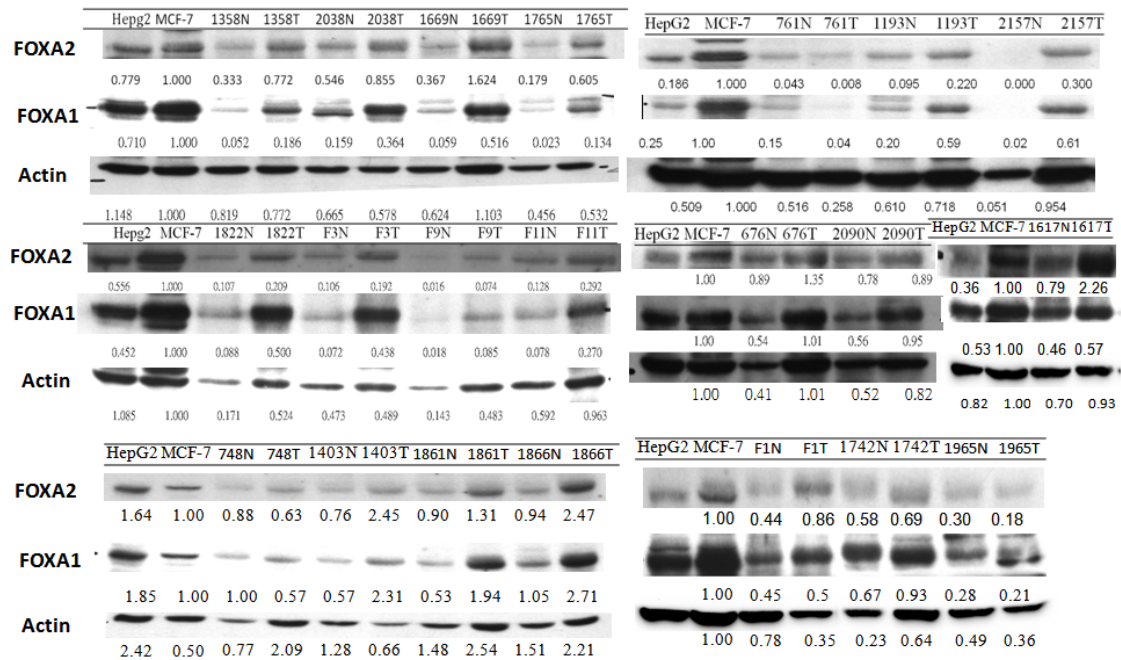
(b) 取 12 對年輕(年齡 ≤ 50)且 ER α 蛋白質沒有顯著下降的(T/N ≥ 0.5)的女性肝細胞癌肝組織取 RNA，RT 後進行競爭性聚合酶連鎖反應，得到的野生型及外顯子-7 缺失的雌激素受體 α ，MCF-7 為正控制組。— 為負控制組。N2-N5 為女性 Hemangioma 非腫瘤區抽取的 RNA 當作正常控制組。



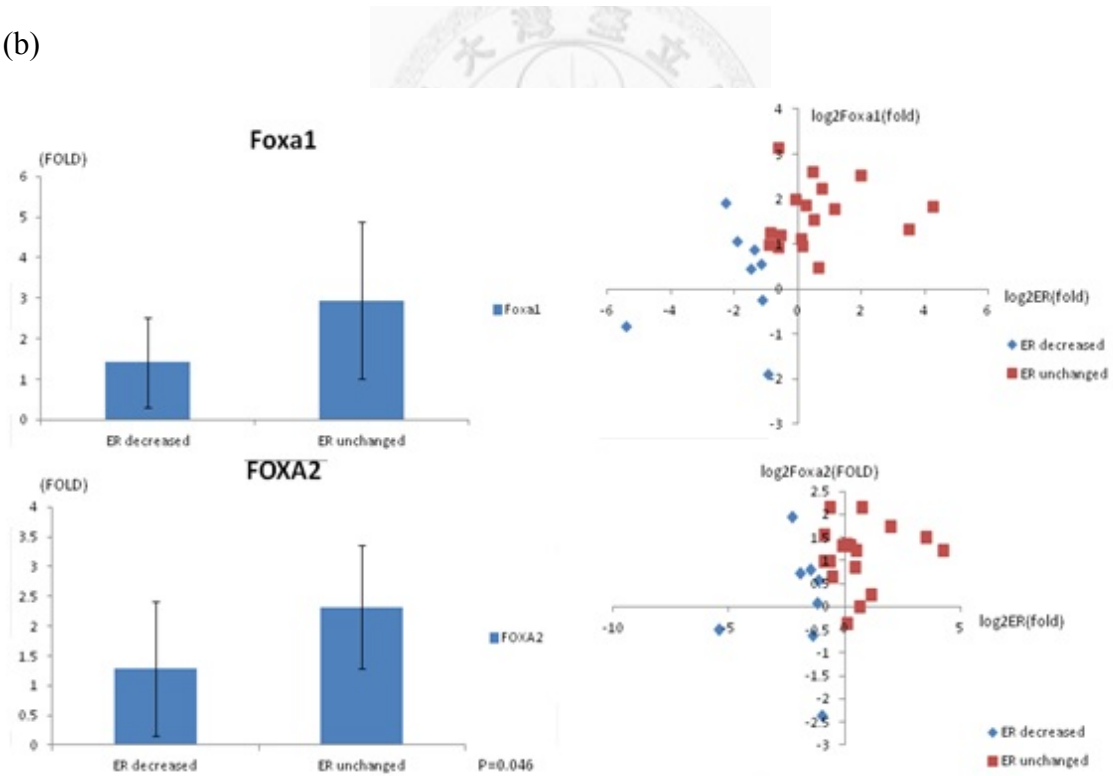
圖四、ER α 在臨床檢體中的表現情形

代表性西方點墨法偵測之雌激素受體 α 表現量，以總蛋白 50 μ g，10%跑膠。下方數字為以 MCF-7 50 μ g 為準，定量後的數值。

(a)



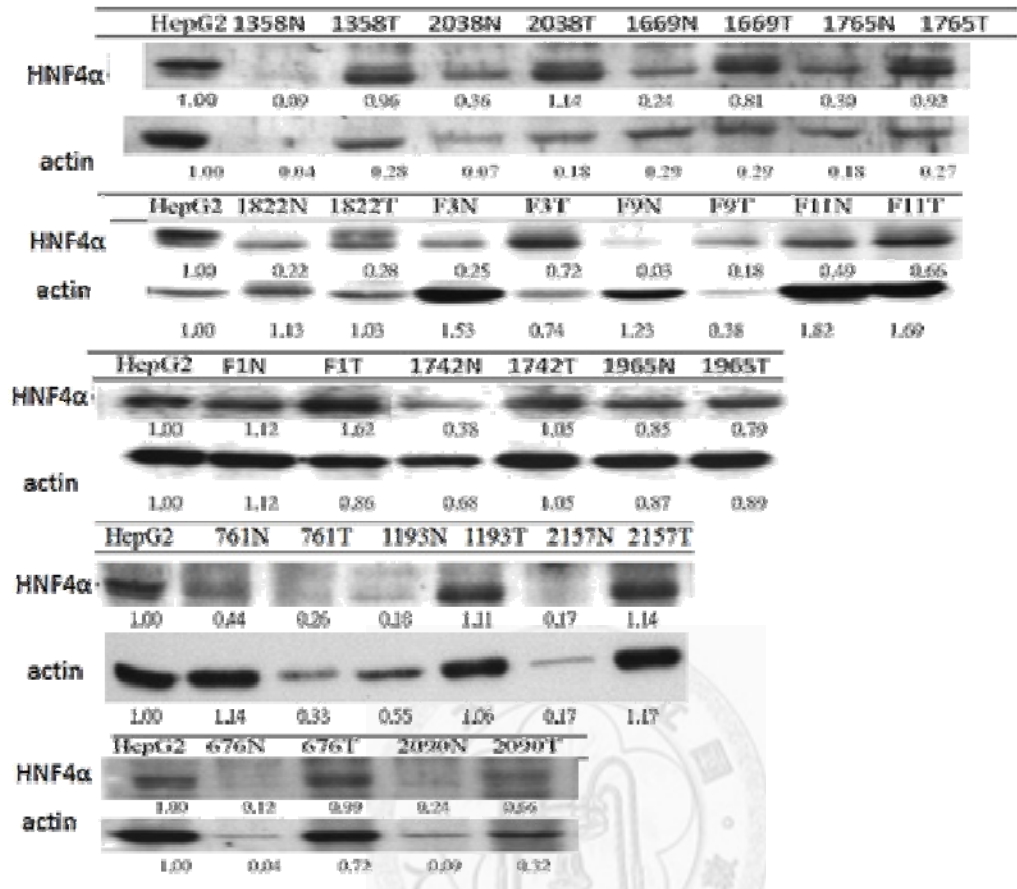
(b)



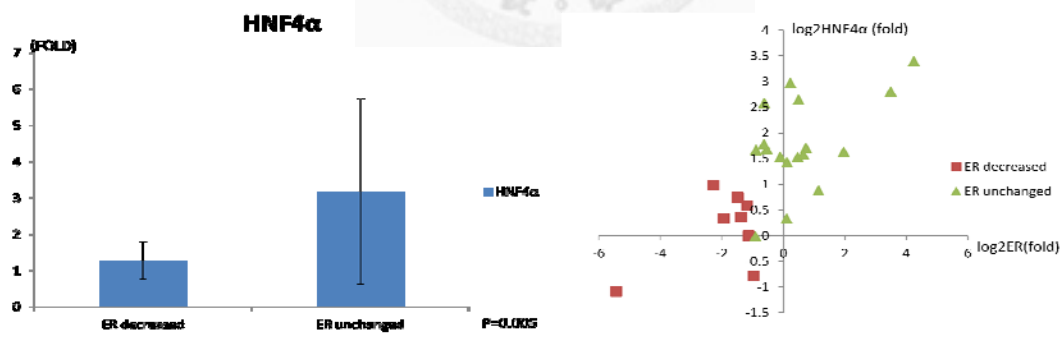
圖五、Foxa1/2 在臨床檢體中的表現情形

(a)以西方墨點法偵測 Foxa1/2 表現量，以 MCF-7 為控制組定量。(b)分析 ER 有明顯下降的(n=8)無明顯下降的組別(n=17)中的差異，上兩圖為 Foxa1，而下圖為 Foxa2 的分析。左以 T/N 的倍數差異作圖；右以 log2 做點狀分布圖。

(a)

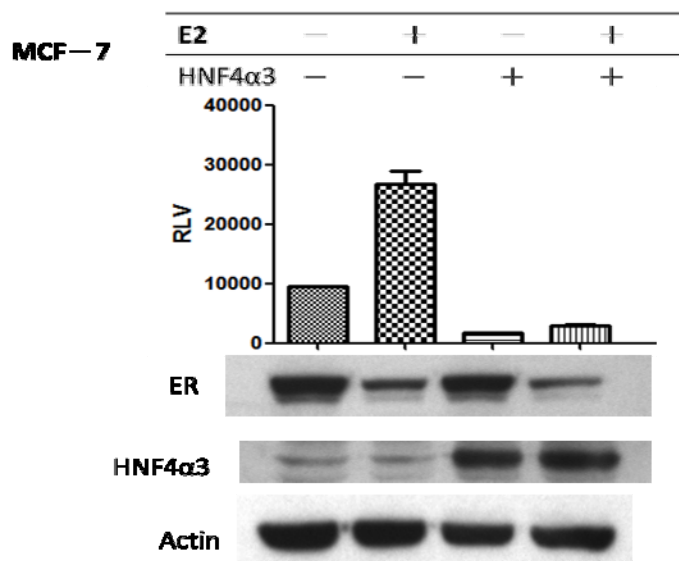


(b)



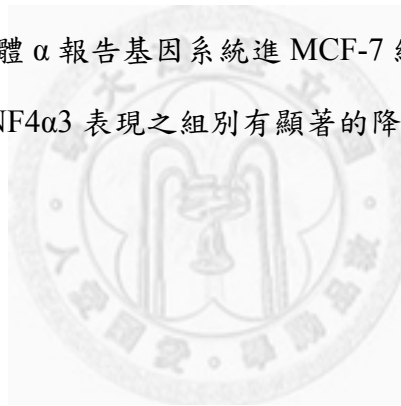
圖六、HNF4α 在臨床檢體中的表現情形

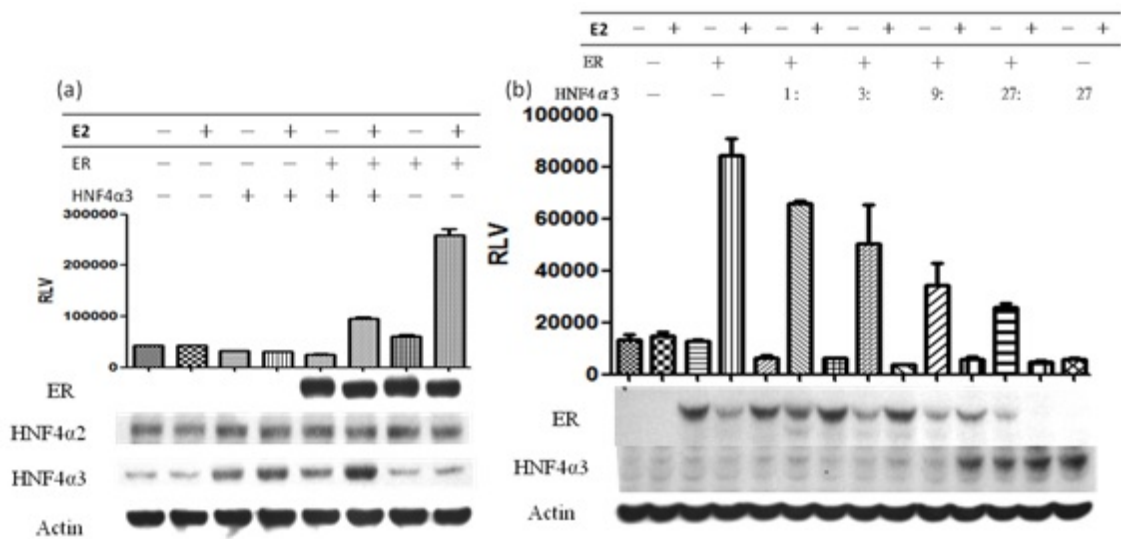
(a)以西方墨點法偵測臨床檢體 HNF4α 表現量之代表結果，以 HepG2 為控制組定量。(b)分析 ER 有明顯下降的(n=8)無明顯下降的組別(n=17)中的差異。左以 T/N 的倍數差異作圖；右以 log2 做點狀分布圖。



圖七、在 MCF-7 中加強 HNF4 α 3 表現對內生性雌激素受體 α 的影響

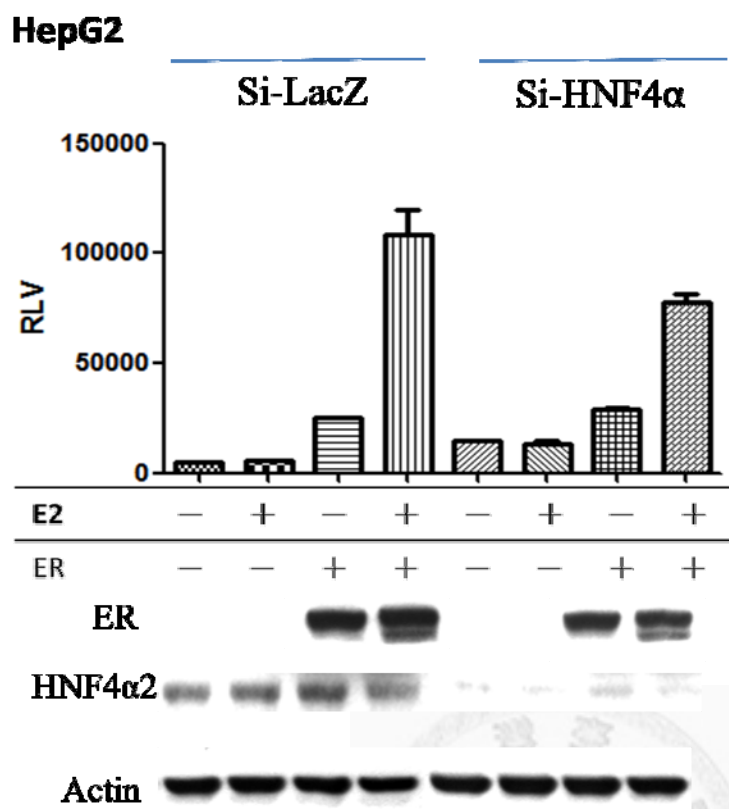
轉染 HNF4 α 3 及雌激素受體 α 報告基因系統進 MCF-7 細胞，可以看到雌激素受體 α 的報告基因表現加強 HNF4 α 3 表現之組別有顯著的降低。下以西方點墨法當作轉染效率的對照。





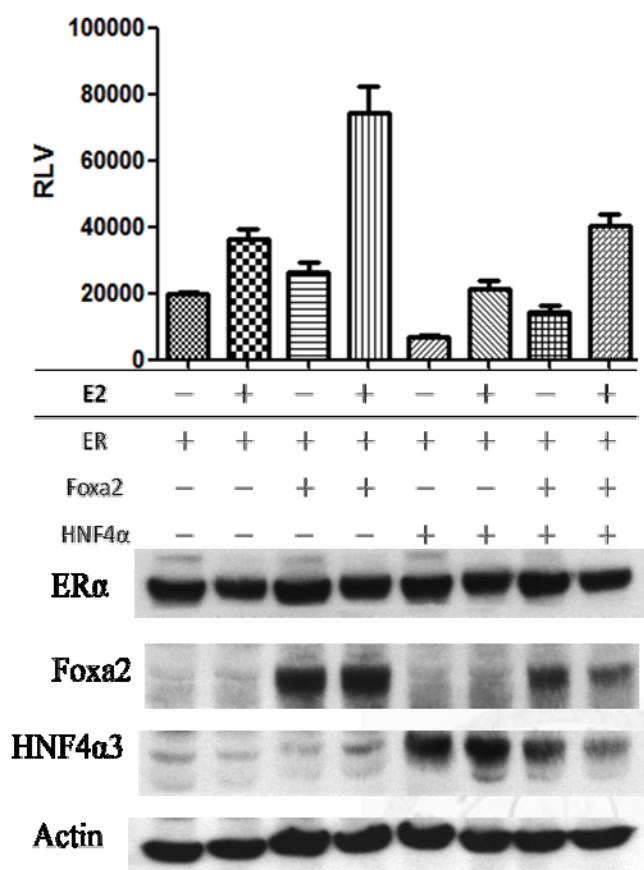
圖八、Over-express HNF4α3 對雌激素受體 α 的抑制能力及劑量依賴性

(a) 將固定量的雌激素受體 α 及 HNF4α3 送入 HepG2 細胞株中，以雙螢光素酶報告基因系統測 ERα 報告基因的表現量，並用西方墨點法當作轉染效率的對照。(b) 將表現固定量的雌激素受體 α 及等比增加的 HNF4α3 送入 HepG2 細胞株中，以雙螢光素酶報告基因系統測 ERα 報告基因的表現量，並用西方墨點法當作轉染效率的對照等比增加。



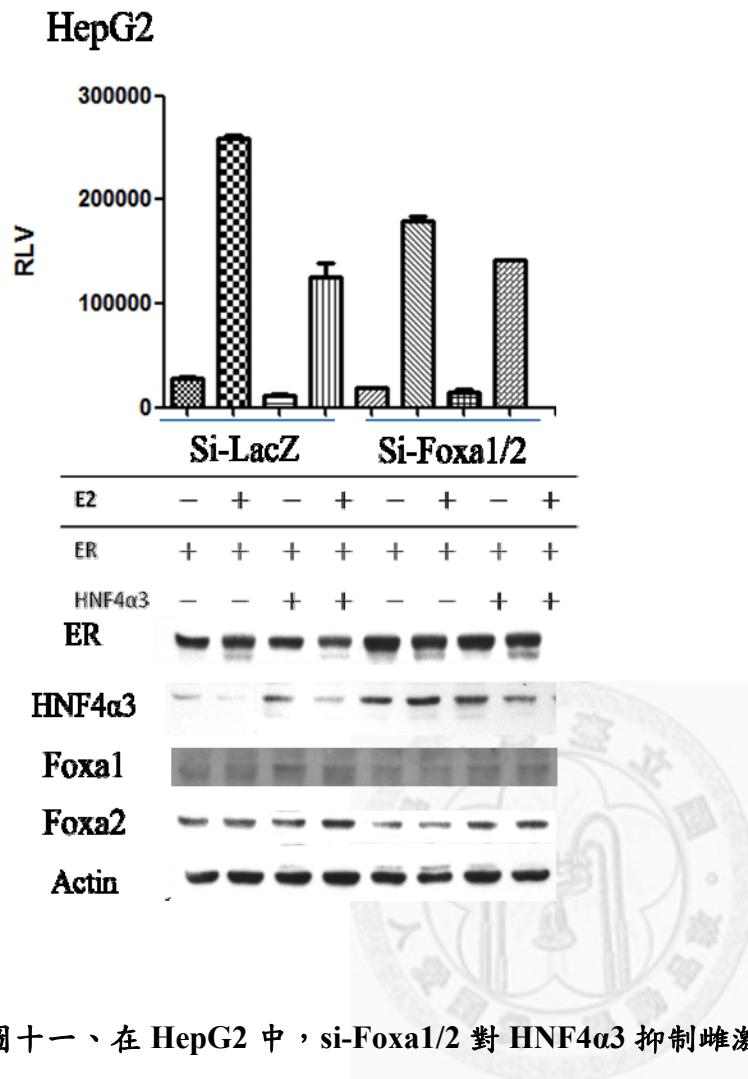
圖九、在 HepG2 中，si-HNF4 α 對抑制雌激素受體 α 的能力的影響

以慢病毒系統 knockdown HepG2 裡 HNF4 α 的表現，轉染 ER α 後用雙螢光素酶系統，看 ERE-Luc 的 RLV 值的變化，並以西方墨點法確定 knockdown 效率。

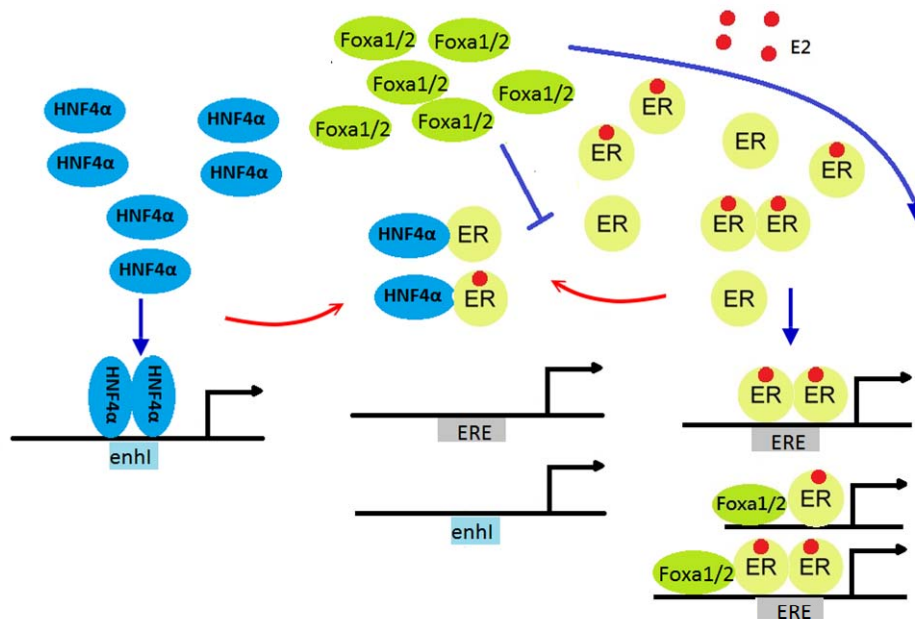


圖十、在 CL-48 中，Foxa2 對 HNF4α3 抑制雌激素受體 α 的影響

以 1:2:4 共同轉染雌激素受體 α、HNF4α3、Foxa2 及進 CL-48 細胞株，48 小時後利用雙螢光素酶報告基因系統測 relative luciferase value(RLV)，看 ERE-Luc 報告基因表現，另做西方點墨法當作轉染效率的對照。可從 lane1,2 及 lane5,6 知轉染的 HNF4α3 在此細胞株中仍會抑制雌激素受體 α 的功能，而此種抑制效果在有 Foxa2 的情況下會被回復。



圖十一、在 HepG2 中，si-Foxa1/2 對 HNF4α3 抑制雌激素受體 α 的能力的影響
 分別以 si-Foxa1/2 感染 MCF-7 及 HepG2 細胞株，感染後隔天換成正常培養液，後
 進行共同轉染雌激素受體 α、HNF4α3、ERE-Luc 再以雙螢光素酶報告基因檢測
 HNF4α 對雌激素受體的轉錄活性的影響。



圖十二、Foxa1/2 及 HNF4 α 對雌激素受體 α 關係示意圖

雌激素受體 α 與雌激素結合後可形成同型二聚體，結合於目標基因上，活化其轉錄功能，大部分雌激素受體調控的基因同時被 Foxa1/2 所調控。若有大量的 HNF4 α 存在，雌激素受體 α 可能會與 HNF4 α 結合，而無法結合上目標基因，使其轉錄因子的功能降低。且 Foxa1/2 的存在可使 HNF4 α 抑制的雌激素受體功能回復。