

ส่วนที่ 1 หน้าปก

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด และความสัมพันธ์กับการรอด
ชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง

Expression of 14-3-3 proteins in lung cancer tissues and association with
survival rate in Thai patients with lung cancer

คณะนักวิจัย

ดร. ปฤษณา เรืองรัตน์
รศ.พญ. ปารมี ทองสุกใส
นพ. ศรายุทธ ลูเซียน กีเตอร์
พญ. มัลลิกา ภูแก้วล้วน
รศ.ดร. สุภาพร สุวิวัฒน์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ.....2554.....รหัสโครงการ.....MED5406775.....

1. ชื่อโครงการวิจัย

ภาษาไทย: การแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด และความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง

ภาษาอังกฤษ: Expression of 14-3-3 proteins in lung cancer tissues and association with survival rate in Thai patients with lung cancer

2. คณะผู้วิจัยและสัดส่วนที่ทำงานวิจัย

หัวหน้าโครงการ : ดร. ปฤษณา เรืองรัตน์	ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ (50%)
ผู้ร่วมวิจัย : 1. รศ.พญ. ปารมี ทองสุกใส	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ (10%)
2. นพ. ศราวุธ ลูเซียน กิเตอร์	ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ (20%)
3. พญ. มัลลิกา ภูแก้วล้วน	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ (10%)
ที่ปรึกษาโครงการ : รศ.ดร. สุภาพร สุวิวัฒน์	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ (10%)

3. กิติกรรมประกาศ

This study was funded by a grant from the Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand and supported by the Excellent Research Laboratory of Cancer Molecular Biology. The Chulabhorn Research Institute was acknowledged for research facilities and guidance.

4. บทคัดย่อ

ภาษาไทย :

กลุ่มโปรตีน 14-3-3 มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ และ 14-3-3 γ และการพยากรณ์โรคในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็กก็ยังไม่มีการรายงาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 กับลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก ด้วยเทคนิค immunohistochemistry จากชิ้นเนื้อ (formalin-fixed paraffin-embedded tissue)

โปรตีน 14-3-3 σ : จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 167 คน มีผู้ป่วยระยะ 1-2 คิดเป็น 8.98%, ระยะ 3-4 คิดเป็น 89.82% และระยะระยะไม่ได้ คิดเป็น 1.20% มีผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอดชนิดสแควมัสเซลล์ 57 คน (34.13%), ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา 105 คน (62.87%) และระยะชนิดไม่ได้ 5 คน (2.99%) มีผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ คิดเป็น 83.83% และมีความสัมพันธ์กับเพศ ($P = 0.032$) และชนิดของโรค ($P = 0.002$) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ด้วยการสร้างเส้นโค้งการอยู่รอดด้วยวิธี Kaplan-Meier พบว่า ผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ มีแนวโน้มการรอดชีวิตสูงกว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ ($P = 0.100$) เมื่อวิเคราะห์เพื่อหาตัวแปรที่อิสระ ด้วยสถิติการวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) พบว่า อายุ, การผ่าตัด, การรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด, และการรักษาด้วยวิธีฉายแสง เป็นตัวแปรอิสระที่นำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 σ ไม่มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค

โปรตีน 14-3-3 γ : จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 153 คน มีผู้ป่วยระยะ 3 คิดเป็น 54.3% และ ระยะ 4 คิดเป็น 45.8% มีผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอดชนิดสแควมัสเซลล์ 51 คน (33.3%), ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา 98

คน (64.1%) มีผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 γ ในระดับสูง คิดเป็น 59.5% และมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลือง (P = 0.01) และการแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่น (P = 0.017) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ด้วยการสร้างเส้นโค้งการอยู่รอดด้วยวิธี Kaplan-Meier พบว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 γ ในระดับสูงมีแนวโน้มการรอดชีวิตต่ำ (P=0.055) เมื่อวิเคราะห์เพื่อหาตัวแปรที่อิสระ ด้วยสถิติการวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) พบว่า อายุ, การรักษา, และ การแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 γ เป็นตัวแปรอิสระที่นำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ นอกจากนี้ จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกที่สูงของโปรตีน 14-3-3 γ ยังมีความเกี่ยวข้องกับการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง

โดยสรุป การแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 γ และ 14-3-3 σ มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกของโปรตีน 14-3-3 γ ยังมีความเกี่ยวข้องกับการบุกรุกของเซลล์มะเร็งและการพยากรณ์โรคที่แย่นั้นโปรตีน 14-3-3 γ อาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดโรคมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็กในผู้ป่วยระยะท้ายได้

ภาษาอังกฤษ :

14-3-3 proteins have been shown to involve in cancer cell process; however, the relationship between 14-3-3 σ and 14-3-3 γ expression and prognosis in non small cell lung cancer (NSCLC) remains unidentified. In this study, we investigated the association between these proteins and the clinicopathological features of patients with NSCLC by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Survival curves were estimated using Kaplan-Meier method and tested by Log-rank. Multivariate analysis was analyzed by Cox's regression model to obtain independent of factors. P value < 0.05 was considered as significance.

For 14-3-3 σ , a total 167 patients were included. There were 8.98% of stage I-II, 89.82% of stage III-IV, and 1.20% of unknown stage. Fifty-seven cases (34.13%) were squamous cell carcinoma, 105 cases (62.87%) were adenocarcinoma, and 5 cases (2.99%) were unidentified NSCLC type. Negative 14-3-3 σ expression was shown in 83.83% that correlated to gender (P = 0.032) and histology type (P = 0.002). In Kaplan-Meier analysis, negative 14-3-3 σ expression showed a trend of a significantly increase survival time compared to that of the positive 14-3-3 σ expression with an interesting trend (P = 0.100). In multivariate analysis, age, surgery, chemotherapy, and radiotherapy showed independent prognostic parameters. However, 14-3-3 σ expression did not show any prognostic significance.

For 14-3-3 γ , a total 153 patients were studied, with 54.3% being stage III and 45.8% stage IV. Fifty-one cases (33.3%) were squamous cell carcinomas, and 98 cases (64.1%) were adenocarcinomas. High 14-3-3 γ expression was seen in 59.5% and significantly correlated with lymph node metastasis (P=0.010) and distant metastasis (P=0.017). On

Kaplan-Meier analysis, high 14-3-3 γ expression was associated with poorer survival with a marginal trend toward significance (P=0.055). On multivariate analysis, age, treatment, and 14-3-3 γ expression proved to be independent prognostic parameters. In vitro experiments indicated that 14-3-3 γ overexpression also played a potential role in cancer invasion.

In conclusion, the expression of 14-3-3 γ and 14-3-3 σ is associated with NSCLC tumorigenesis; in particular the 14-3-3 γ overexpression is associated with invasion and a poor prognosis. Therefore, 14-3-3 γ may be a potential prognostic marker of advanced non-small cell lung cancer.

5. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

5.1 บทนำ

Lung cancer is globally the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in males. About 1.6 million (13% of the cases) cancer cases and 1.4 million (18% of the deaths) cancer deaths were estimated in 2008. There are two major types of lung cancer, small cell lung cancer and non small cell lung cancer (NSCLC). About 85% of lung cancer cases worldwide, including Thailand are NSCLC. Although several advanced techniques have been made to reduce the mortality rates, the rates of mortality are still high. Thus, identifying new markers for detecting tumors at an early stage or providing a prognosis is important.

The 14-3-3 family is a group of proteins consisting at least 7 isoforms in mammalian cells, including β , ϵ , γ , η , σ , τ/θ , and ξ . These proteins are spontaneously self-assembled as homo- or heterodimers. As a result, they can bind to various cellular proteins and regulate mostly via their phosphoserine/threonine binding activity. Association between 14-3-3 proteins and other proteins in cellular system has been shown in a number of pathways such as cell cycle progression, signal transduction and apoptosis, all of which are critical mechanism in tumorigenesis and cancer progression. Among these isoforms, 14-3-3 σ has been most directly related to cancer connection. However, the expression pattern and its correlation with clinical outcome are different in different cancers. 14-3-3 σ overexpression and its correlation with poor prognosis has been reported in oral cancer, colorectal carcinoma, and gastric cancer while down-regulation of 14-3-3 σ predicting poor survival has been reported in nasopharyngeal carcinoma and esophageal cancer. Similarly, 14-3-3 γ overexpression is reported to be significantly associated with a poor prognosis in breast cancer and hepatocellular carcinoma.

In lung cancer, 14-3-3 γ and 14-3-3 σ expressions have been shown to be expressed differently in cancerous tissues compared to normal. In addition, 14-3-3 σ expression

increases during malignant progression from in situ adenocarcinoma to early-invasive adenocarcinoma of lung. Thus, 14-3-3 and 14-3-3 σ may be involved with lung tumorigenesis, and its specificity may be used as prognostic factor and targets for therapy. However, the data on the prognostic role of 14-3-3 σ expressions is limited to the study of Ramirez et al. who evaluated prognostic significance of 14-3-3 σ methylation status of pretreatment circulating DNA in advanced NSCLC. Therefore, in this study, we aimed to investigate the 14-3-3 σ and 14-3-3 γ expression by immunohistochemistry in NSCLC and their potential as prognostic factors.

5.2 วัตถุประสงค์

1. To evaluate the 14-3-3 σ and 14-3-3 γ expression in NSCLC tissues.
2. To investigate the association of 14-3-3 σ and 14-3-3 γ expression and clinicopathological features of NSCLC patients
3. To determine the association of 14-3-3 σ and 14-3-3 γ expression and 5-year overall survival of NSCLC patients

5.3 สรุป (แยกตามชนิดของโปรตีน)

5.3.1 Results of 14-3-3 σ expression

Expression of 14-3-3 σ in NSCLC tissues

Immunostaining of 14-3-3 σ proteins was predominantly observed in cytoplasm. In some cells, nuclear staining was also observed. The frequencies of 14-3-3 σ expression showed no expression in 140 cases (83.83%), weak expression in 19 cases (11.38%), moderate expression in 6 cases (3.59%), and strong expression in 2 cases (1.20%). Therefore, most of the cases had a negative expression of 14-3-3 σ (83.83%).

Correlation of 14-3-3 σ and clinicopathological variables

Positive expression of 14-3-3 σ was significantly associated with gender (P = 0.032) and histology (P = 0.002). No significant associations between 14-3-3 σ expression and other clinicopathological variables, namely age, clinical stage, LN metastasis and all treatments were observed.

Prognostic significance of 14-3-3 σ expression

Median survival time was 5.7 months for all patients. The expression patterns of 14-3-3 σ in NSCLC tissues were further correlated with the overall survival of the patients by Kaplan–Meier estimates. There was no significant correlation of 14-3-3 σ expression on overall survival with P-value 0.10. In subgroup analysis of histology type, the negative 14-3-3 σ expression in ADC showed a trend towards significance (P = 0.13) with a good overall survival compared to positive 14-3-3 σ expression. In contrast to SCC, no trend of correlation with overall survival was observed (P = 0.60). In univariate analysis, there was a significant correlation of overall survival

with histology, clinical stage, surgery, and chemotherapy. Multivariate analysis showed that age and treatments were significant independent prognostic parameters. However, 14-3-3 σ expression did not show a prognostic significance both univariate and multivariate analyses.

หมายเหตุ กำลังเตรียมตีพิมพ์ในหัวข้อ 14-3-3 σ is not associated with survival outcome in non-small cell lung cancer ([เอกสารแนบ 1](#))

5.3.2 Results of 14-3-3 γ expression

Expression of 14-3-3 γ protein

Immunostaining of 14-3-3 γ protein was observed in the cytoplasm. In a few cases, nuclear staining was also observed. High expression was observed in 91 cases (59.48%) and low expression was observed in 62 cases (40.52%).

Correlation of 14-3-3 γ with clinicopathological variables

High expression (moderate to strong expression) was significantly associated with lymph node metastasis ($P = 0.010$) and distant metastasis ($P = 0.017$). A moderate trend toward significance was shown in histology and clinical stage with P -value 0.087 and 0.063, respectively. No significant associations between 14-3-3 γ expression and other clinicopathological variables, namely gender, age, and treatment were observed.

Association of 14-3-3 γ expression with overall survival

Median survival time was 5.7 months. A Kaplan-Meier curve showed that advanced NSCLC patients with high 14-3-3 γ expression had a poorer overall survival compared to that of low expression with marginal significance ($P = 0.055$). In univariate analysis, only treatment was significantly associated with overall survival ($P < 0.001$). In addition, there was an association of 14-3-3 γ expression with overall survival with a marginal trend toward significance ($P = 0.054$). Multivariate analysis showed that age, treatment and 14-3-3 γ expression were significant independent prognostic parameters. High expression of 14-3-3 γ was significantly associated with a poor survival with a risk ratio of 1.56 (95% CI, 1.11-2.20).

Regulation of cell invasion by 14-3-3 γ expression in NSCLC cells

The significant association between high 14-3-3 γ expression and metastasis was observed. Since cancer invasion is a critical step in metastatic process, we further determined the role of 14-3-3 γ on invasion of NSCLC cells. We used siRNA to knockdown 14-3-3 γ in A549 human NSCLC cells. At 24 h after transfection, a 66% reduction of 14-3-3 γ expression was observed in A549 cells transfected with 14-3-3 γ siRNA at 20 nM. The

14-3-3 γ siRNA transfected cells showed a significant decrease in invasion capability by 78% (P = 0.047) compared with control siRNA transfected cells.

หมายเหตุ ตีพิมพ์แล้วในหัวข้อ Prognostic significance of 14-3-3 γ overexpression in advanced non-small cell lung cancer (**Reprint**)

6. ภาคผนวก

6.1 สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (ดั่งเอกสารแนบ Reprint)

6.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ (ดั่งเอกสารแนบ 1)

6.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ดำเนินการต่อยอดงานวิจัยเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำโปรตีน 14-3-3 γ ไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) การกลับมาเป็นซ้ำหรือติดตามความรุนแรงของโรคมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก ซึ่งขณะนี้ทีมผู้วิจัยกำลังดำเนินการศึกษา

6.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (ไม่มี proceeding นำเสนอในรูปแบบ poster ดั่งเอกสารแนบ 2)