

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以微陣列技術篩選與大腸直腸癌轉移有關基因的差異表現

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-246-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：梁金銅

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 12 月 3 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以微陣列技術篩選與大腸直腸癌轉移有關基因的差異表現

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-246

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：梁金銅 台大醫院 外科部

中文摘要：

在本研究中，我們應用微陣列技術來篩選與大腸直腸癌肝移轉有關的基因。我們首先分離正常大腸黏膜、大腸直腸癌原發病灶、以及大腸直腸癌的肝轉移病灶的 mRNA，然後製作成以化學螢光劑標定的互補性 DNA，然後將這些標定的 cDNA 與晶片上的各種基因片段結合，再由偵測器中偵測螢光訊號差異，再以電腦軟體換算成基因表現的差異。我們發現約有 70 個基因與大腸直腸癌的肝移轉有關，而比較確定者包括 nm23，TIMP1，VEGF，以及 cyclin E 的表現量增加，一些抑癌基因（如 p53，TOSO，以及 SIVA）表現量降低，以及一些與細胞黏附作用如 β -catenin，metallothionein 有關基因表現量的降低。經由本研究，我們覺得，微陣列的技術是目前找出癌細胞與移轉能力有關之指紋最有前景的方法，然有關實驗細節與結果的判讀，則仍需進一步發展。

關鍵字：微陣列技術、大腸直腸癌、肝轉移

英文摘要：

In this study, we examine the usability of microarray technique in screening the clusters of genes related to the liver metastasis of colorectal cancer. Complementary DNA probes were prepared from mRNA extracted from colonic cancer specimens, adjacent normal mucosa, and hepatic metastases and then were labeled with chemiluminescence. These labeled probes were allowed to bind to the gene fragments on the filter. A specialized scanning charge-coupled device camera measured the intensity of each chemiluminescent spot, which is an indicator of the degree to which a specific gene is expressed. Gene expression image was quantified into intensity of signals by using computer software. We found that an array of around 70 genes were related the metastatic ability of colorectal cancer cells. Up-regulation of nm23, TIMP1, VEGF, and cyclin E and down-regulation of some tumor suppressor genes (p53, TOSO, and SIVA), β -catenin, and metallothionein were observed in hepatic metastatic specimen when compared with colonic cancer specimen. Based on this experiment, we feel that microarray technique may be currently the most powerful

tool to find the fingerprint that is related to the live metastasis of colorectal cancer. However, the refinement of experimental technique and interpretation method need be further developed.

Key words : microarray, colorectal cancer, hepatic metastasis.

前言/目的/文獻探討：

大腸直腸癌高居國內各種癌症死亡率的第三位，早期的大腸直腸癌若能在癌細胞擴散前，及早治療，五年存活率可高達九成以上，可惜本國大腸直腸癌病患在診斷時約有六至七成為第一期或第二期，這些病患在經手術切除後約有 30% 左右會再發。再發型態以肝、肺、骨骼、腦部、淋巴結、或腹膜內轉移最為常見。因此，對大腸直腸癌進展及轉移機轉的進一步闡明，在臨床病患的診療或抗癌轉移藥物的研發上是深具意義的。基本上，學者們研究癌轉移機轉大都從比較轉移病灶與原發病灶細胞在基因表現的差異入手，然而，癌細胞本身基因種類及其表現相當浩繁，更遑論要比較不同細胞間基因表現的差異了。近年來，微陣列被廣泛用在研究正常細胞與癌症細胞的基因表現差異，此技術包含三個步驟：（1）基因晶片的製造：即從 Expression Consortium library 中調出大腸直腸黏膜細胞的 cDNA 序列，並黏附在晶片上；（2）標的 mRNA 的萃取：經逆轉錄酵素處理，加上螢光劑，以及與晶片中之 cDNA 進行 hybridization；（3）以免疫酵素呈色法進行判讀。目前不論在國外或本院，此項微陣列技術已逐漸發展成熟。值得注意的是 Vogelstein 的研究群最近報告 PRL-3 protein tyrosine phosphatase gene 與大腸直腸癌的轉移有關。另外，本院胸腔內科楊泮池教授的研究群也利用此種方法發現 Collapsin Response Mediator Protein-1 與肺癌細胞的轉移有關。由於這些研究成果的鼓勵，我們乃欲以微陣列的方法，對大腸直腸癌轉移機轉做進一步研究。在本計劃中，我們針對大腸直腸癌合併肝臟轉移的病患，首先分別萃取原發腫瘤細胞與肝轉移細胞的 mRNA，並經逆轉錄處理成攜帶螢光劑之 cDNA，再經微陣列的方法比較二者基因表現的差異。我們發現上述 PRL-3 protein tyrosine phosphatase gene 以及 Collapsin Response Mediator Protein-1 的表現確實在原發瘤與轉移病灶細胞間具顯著差異，即此技巧誠然可行。另外，一些非特異性（約 70 個基因）的基因群，亦在原發癌與轉移病灶間具顯著差異。接著，我們將進一步確定這些與大腸直腸癌轉移有關基因的真正意義。

研究方法：

A. 大腸癌標本與病患臨床病理資料的收集：

目前我們的標本銀行已有 30 例左右之大腸癌合併同時性或異時性肝轉移的標本，我們在此計畫已經比較原發大腸癌組織與肝轉移大腸癌組織之基因表現差異。在此比較過程中，我們已經注意到 Vogelstein 等人所發現之 PRL-3 protein tyrosine phosphatase gene 與楊泮池教授所發現之 collapsin response mediator protein-1 gene 確實與轉移有關，而且實驗步驟具再現性。目前我們經過初步比對大腸直腸原發癌與肝轉移病灶的基因表現差異已找到一些與轉移有關的 candidate genes（約 70 個左右）之後，然而這些基因是否為轉移作用特定基因則尚未知曉，更遑論其功能的研究了。因此，我們會進一步針對我們的 database 中約一百例的大腸直腸癌病患，以免疫螢光染色或西方點墨法測定這些 candidate

gene 表現量，並將這些數據與病患的臨床病理資料互相配合，相信此舉當有助於確定這些基因中哪些確實與大腸直腸癌的轉移有關。

B. Microarray Analysis

Microarrays containing 9600 cDNA sequences from the Integrated Molecular Analysis of Genome and their Expression Consortium libraries (Research Genetics, Huntsville, AL) were prepared on nylon membranes by arraying machine built inhouse as described previously (1-5). Experiments, in which a colorimetric detection method was used, were performed as described by Hong et al. (2) and Chen et al. Briefly, messenger RNA (mRNA) was isolated, and the time was minimized between removal of tumor and lysis. Total cellular RNAs were extracted with RNazol B (Biotech Laboratories, Houston, TX), and mRNAs were isolated with oligotex-dT resin (Qiagen, Hilden, Germany). Purified mRNA (5 μ g) derived from primary tumor and hepatic metastases were reversed transcribed and labeled with biotin. The microarray carrying the double-stranded cDNAs was prehybridized in 7mL of hybridization buffer (5 \times standard saline citrate [SSC], 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1% blocking reagent mixture manufactured by Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, and salmon-sperm DNA [50 μ g/mL]) at 68 $^{\circ}$ C for 1 hour. The biotin-labeled cDNA probes and hybridization solution (80 μ L) containing human COT-1 DNA instead of salmon-sperm DNA were sealed with a microarray in a hybridization bag, and the bag was incubated at 95 $^{\circ}$ C for 2 minutes, and then at 68 $^{\circ}$ C for 12 hours. After hybridization, the color reaction was initiated by incubating the membrane for 2 hours in 5 mL containing β -galactosidase-conjugated streptavidin (diluted 1:700; Life Technologies, Inc.), 4% polyethylene glycol (molecular weight, 8000; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and 0.3% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (pH=7.4). Color reactions were stopped by adding phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 mM EDTA. The microarray image was digitized by use of a drum scanner (ScanView, Foster City, CA); image analysis and spot quantification were then done by the MuCDA program written inhouse and available via anonymous ftp at <ftp://genestamp.ibms.sinica.edu.tw/marray/> software. Gene expression data were processed by use of the protocol and program described by Iyer et al. Gene were grouped on the basis of expression profiles by the self-organizing maps algorithm, described by Tamayo et al., and then genes whose expression profiles correlated either positively or negatively with the invasiveness of colorectal cancers were identified. We selected candidate metastasis-related genes for further study.

研究結果：

由於目前有關 microarray 的研究成本十分昂貴，我們主要是與進亞生物科技股份有限公司合作。我們定義 Signal/Bookground 值大於 2.5 者，其訊號品質較佳，當設定在肝轉移組織與大腸直腸癌腫瘤組織訊號插為 2 倍以上時，共篩選到 500 個以上基因在轉移病灶及原發腫瘤有表現差異，而若再設定差異在 10 倍以上時，則約有 130 個左右基因與大腸直腸癌的轉移有關 (表一)。至於個人知識所

及與大腸直腸癌轉移機轉較有關者，則約為 75 個基因左右。在這些結果中較會令人雀躍的包括在肝轉移病灶上，可以看到 nm23, TIMP1, VEGF, 以及 cyclin E 的表現量增強。另外，一些與細胞基質之蛋白質分解酵素亦可見表現量增強，而一些抑癌基因如 SIVA, TOSO, 以及 p53 亦可見有表現量降低的現象，至於台大楊泮池教授所發現之 collapsin response mediator protein-1 gene 與 Vogelstein 等人所發現之 PRL-3 protein tyrosine phosphatase gene 亦具有表現的顯著差異。

由於 microarray 技術的問世，有關大腸直腸癌腫瘤轉移 (metastasis) 的觀念亦有所轉變。傳統上以為大腸直腸癌的移轉是透過 adenoma-carcinoma sequence 的機序。不過，事實上是不然的，有些腫瘤雖原發病灶尚屬早期，某些癌細胞仍可以循環全身。癌轉移的表現型實在不是由少數幾個基因決定，這其中應該包含一大串的基因變化。Microarray 的技術也許可以有效率地找出這一大串基因，也就是說也許可以發現某些與轉移有關的基因指紋 (fingerprint) 而可以預測腫瘤的生物行為。

然而，由本實驗中，我們發現上述目標尚十分遙遠，首先是生物晶片目前仍十分昂貴，另外，microarray 所篩選的基因動輒上萬，舉例而言，當比較二個組織中 10,000 個基因時，當設定 $p < 0.05$ 為具有差異時，理論上，應有 500 個基因會有偽陽性的現象。因此，從基因的製備，實驗的進行結果的判讀，以及基因功能的 Specify, 目前尚屬起步階段，我們將更進一步研究改良。

表一：與大腸直腸癌轉移過程有關的基因

基因功能	基因名稱
Tumor suppressor genes/apoptosis	P53, RAD51, RAD54, MDM, DCC, Rb p110, Rb p107, Rb p130, Fas(Apo1), GADD45, FasL, TRAIL(Apo2L), TOSO, Daxx, FADD, TRADD, RAIDD, SIVA, RIP, RICK, FLIP, Bax, Bak, BID, Bim, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Bag-1, Mcl-1, caspase-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 -8, -9, -10, MACH 1,CEA
Cell cycle proteins	Ddk1, (Cdk4, Cdk6, cyclin A, cyclin B1, cyclin D1, cyclin E, cyclin G1, Cdc25A, MCM5, p21 (Waf 1), p27 (Kip1), p57 (kip2), PCNA, Ki-67
Regulatory transcription factors	c-fos, c-jun, EGR-1, STAT1, 2, 3, Egr-1, Smad 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9
Growth factor/cytokines	VEGF, PDGF , PDGF , IGF- , IGF- , IL-1 , IFN- , IP10, TARC, MIP-3 (LARC), MIP-3 (ELC), Mig, SLC
Membrane receptors	EGFR(c-erbB2), FGFR-2(K-sam), HER2 (neu) , Met
Protein kinases	Pim-1, Pim-2, Lck, PRL-3
GDP/GTP binding proteins	K-ras
Signaling intermediates	Cox1, Cox2, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, nm23, PAI-1, PAI-2, TIMP-1, TIMP-3, UPA, FNK(CNK, PRK), HES1, MDR1, CRMP-1
Metabolic enzymes	Metallothionein, -hexosaminase (Hexa)
Cell adhesion proteins	ICAM-1, E-cadherin, -catenin, -catenin, CD44 (HCAM)
Tumor rejection antigen	MAGE-1
HLA antigens	HLA-A, HLA-DR, HLA-DQ
Housekeeping genes	G3PDH, ALAS1, -actin, -tubulin, PxF protein, endonuclease G, ribosomal protein S9, ribosomal protein L13, elongation factor 1- , ubiquitin

參考資料：

1. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [published erratum appears in J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1549]. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 1731-7.

2. Hong TM, Yang PC, Peck K, Chen JJ, Yang SC, Chen YC, et al. Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 355-63.
3. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; 406: 532-5.
4. Shih JY, Yang SC, Hong TS, Yuan A, Chen JJ, Yu CJ, et al. Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1392-400.
5. Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St. Croix B, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 2001; 294: 1343-6.