

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

藉基因微陣列篩選之基因 p40/EBP2/NoBP 與血管新生及腫瘤
發生之功能研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-002-270-

執行期間：93年08月01日至94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：陳炯年

共同主持人：蔡芷季

計畫參與人員：李明城

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 21 日

(一) 計畫中文摘要。(五百字以內)

p40/EBP2/NoBP 在胃癌發生及血管新生過程中角色之探討

p40/EBP2/NoBP 基因最早是發現自癌細胞中的細胞核蛋白，將它轉送到老鼠細胞中發現可以促進細胞的增生。在酵母菌中它參與了rRNA 和核糖體的合成，在動物細胞中它可以與鼻咽癌病毒蛋白EBNA1 結合，幫助病毒DNA 在細胞內的維持。

先前我們在研究在不同血管密度的胃癌組織裡基因表現的差異時，發現的*p40/EBP2/NoBP* 基因表現在胃癌組織中。為了探討*p40/EBP2/NoBP* 是否與胃癌的發生和血管新生之間的關係，我們在北方墨點實驗結果發現這基因在有些胃癌組織比正常組織中表現要高；且此基因的表現在已分化成微血管的內皮細胞是受到抑制，在免疫細胞分化過程中，在不具複製能力的已分化細胞也有相同的現象。我們以具有抑制血管新生的藥物15-d-PGJ₂ 刺激的內皮細胞，也發現*p40/EBP2/NoBP* 基因表現受到抑制。

根據先前文獻的發現以及我們實驗室的研究結果，在本計劃中有四個主要研究目的：第一個目的是要探討15-d-PGJ₂ 抑制*p40/EBP2/NoBP* 基因表現之機制。*p40/EBP2/NoBP* 基因啟動子上有許多Sp1 和c-Ets-1 轉錄因子結合位，15-d-PGJ₂ 對血管新生的抑制作用是否是藉由抑制內皮細胞Sp1 和c-Ets-1 的結合能力，而間接抑制*p40/EBP2/NoBP* 的表現，使得內皮細胞增生受到抑制。

第二個目的是要研究*p40/EBP2/NoBP* 調控細胞生長之機制。在動物細胞中，*p40/EBP2/NoBP* 基因的高度表現可以促進細胞的生長，但機制仍不清楚。且在不同物種之間此基因有很高的相似性。所以我們推論在不同物種細胞中，此基因可能以相同的機制調控細胞的生長。我們計劃以免疫沉澱技術來找到與它結合在一起的蛋白。

第三個目的目的是探討*p40/EBP2/NoBP* 基因表現與胃癌發生之關係。EBV 病毒與鼻咽癌和淋巴瘤有一定的相關性。在胃癌中的Gastric lymphoepithelioma-like carcinoma 幾乎也都有受到EBV 病毒的感染。鼻咽癌病毒又可藉著EBNA1 和*p40/EBP2/NoBP* 的結合，將病毒DNA 穩定的保存在上皮細胞裡。所以我們想要了解此基因是否在Gastric lymphoepithelioma-like carcinoma 形成過程中扮演重要的角色。

第四個目的是探討*p40/EBP2/NoBP* 基因是否為一前趨致癌基因(proto-oncogen)。

在我們的軟洋菜膠實驗中(Soft agar assay)發現它雖不能夠在形成細胞群落，但仍有能力在軟洋菜膠培養基上進行二到四次的細胞分裂。所以我們計劃將它與ras 一起送到細胞內，以觀察加上ras 基因的表現是否就可以幫助3T3 跨越細胞癌化的門檻。

以上的研究計劃成果，可以幫助我們進一步了解*p40/EBP2/NoBP* 基因在細胞生長調控、胃癌發生和血管新生過程中所扮演的角色。

關鍵字：*p40/EBP2/NoBP*、PPAR- γ 、胃癌、血管新生、細胞增生、腫瘤發生、基因調控

結論：

1. NoBP於HUVEC進行管狀化時有高表現之現象。
2. NoBP表現於細胞週期之interphase時集中於核仁，但於mitotic phase時散佈於細胞質。
3. non radioactive dot blot hybridization可用於胃癌檢體基因圖像之研究。

(二) 計畫英文摘要。(五百字以內)

Roles of p40/ EBP2/ NoBP in gastric cancer process and angiogenesis

The *p40/ EBP2/ NoBP* was firstly discovered from the nucleolus of cancer cell. Transfect this gene into animal cell could promote cell proliferation. In budding yeast, the gene function is essential for rRNA and ribosome synthesis. In EBV infected cell, it could interact with viral nuclear protein EBNA1 to maintain viral genome during cell division.

In our previous study of gene expression profile of gastric cancers with different vessel indexes, we discovered that *p40/ EBP2/ NoBP* expressed in gastric cancer tissue. In order to identify the relationship of *p40/ EBP2/ NoBP* with gastric cancer process and angiogenesis, In Northern blotting assay, we had found that *p40/ EBP2/ NoBP* overexpressed in some gastric cancer tissues. And its expression is downregulated in capillary-like HUVEC cultured on Matrixgel.

In monocyte – macrophage differentiation process, *p40/ EBP2/ NoBP* is also downregulated in differentiated macrophage. In gene expression study of HUVEC treated with 15-d-PGJ₂, a antiangiogenesis drug, we had found that *p40/ EBP2/ NoBP* was also inhibited .

According to the previous publication and our findings, there are four major objects in this project.

The first object is to identify the downregulation mechanism of *p40/ EBP2/ NoBP* in HUVEC treated with 15-d-PGJ₂. There are 8 Sp1 binding sites and 4 c-Ets-1 binding sites in promoter region of *p40/ EBP2/ NoBP* (-500 to +1). We hypothesize that 15-d-PGJ₂ maybe inhibit the binding activity of Sp1 and c-Ets-1, moreover, downregulate *p40/ EBP2/ NoBP* expression. Finally, the endothelial cell proliferation is stopped.

The secondary object is to study the mechanism of *p40/ EBP2/ NoBP* in cell growth control. There are many *p40/ EBP2/ NoBP*. homologues found in different species. And, this gene overexpression can promote animal cell proliferation, but, the mechanism still unknown.

We suggest that the cell growth mechanism controlled by *p40/ EBP2/ NoBP*. maybe be similar in different species. We will utilize immunoprecipitation assay of *p40/ EBP2/ NoBP* to identify its interaction protein for its function study.

The third object is to evaluate the relationship between *p40/ EBP2/ NoBP* expression and EBV infected gastric cancer. EBV infection is related to nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma.

There are publication reported that gastric lymphoepithelioma- like carcinoma almost had been infected by EBV. In EBV infected cells, viral protein EBNA1 can interaction with *p40/ EBP2/ NoBP* to help viral genome separation during cell division. So, we hypothesize that *p40/ EBP2/ NoBP* should play an important role in EBV infected gastric cancer.

The fourth object is to identify whether *p40/ EBP2/ NoBP* is a novel proto-oncogene. Our previous data shown that *p40/ EBP2/ NoBP* transfected 3T3 cell although can't form obvious colony in soft agar assay, but they can divided 2 to 4 times, then stop growth. We plan to cotransfect 3T3 with *p40/ EBP2/ NoBP* and ras, to monitor whether they can form colony. We predict these results can identify the roles of *p40/ EBP2/ NoBP* in gastric cancer process and angiogenesis.

Key words : *p40/ EBP2/ NoBP*, PPAR- γ , gastric cancer, angiogenesis, cell proliferation, tumorigenesis, gene control

(二)研究背景

一、研究*NoBP* 的起因與結果

胃癌是台灣地區一種很常見的癌症，目前甚至高居十大癌症的第四位，且至目前為止對其致病的分子機轉尚不清楚。臨床上除了較少數的早期胃癌病人之外，其它時期胃癌手術後的預後情形都不理想，五年內的存活率小於50%。因此要了解這種癌症的預後差異，從分子醫學研究的角度去分析不同癌症時期基因表現的差異是有其必要的。

根據我們先前的研究顯示，利用彩色杜卜勒超音波可以在不傷害病人的情形下觀察胃癌組織血管生長的情形，且藉由我們所發展出來的新參數，彩色杜卜勒血管密度(Color Doppler Vascularity index CDVI)可以用來觀察胃腸道腫瘤活體之血管新生程度，並發現高血管密度之病人之存活率顯著低於低血管密度者(1, 2)。

所以可將病人分為高和低血管密度兩組，為了強化其差異性，我們挑選五位及高血管密度之病人(CDVI>25%)且術後兩年皆已死亡，和五位極低血管密度者(CDVI<3%)且術後三年皆仍活著。來進一步想探討在這兩群的病人族群其癌組織那些的基因表現差異造成胃癌組織血管新生的多寡且和病人存活有重要影響。

我們已從這兩族群的病人胃組織中抽取出正常與癌組織的RNA，藉由微基因陣列晶片的技術將這四種不同的RNA 去比較8700 個基因的表現差異。經由基因分析結果，我們將結果分成九種不同組合的基因表現型。

A= HVI (tumor) = 群集1 +群集2 +群集3 +群集4

B= LVI (tumor) = 群集2 +群集3 +群集6 +群集7

C= HVI (normal) = 群集3 +群集4 +群集5 +群集9

D= LVI (normal) = 群集3 +群集7 +群集8 +群集9

群集1 = A (+) ; B (0) ; C (0) ; D (0) → 只在高血管組織表現的基因

群集2 = A (+) ; B (+) ; C (0) ; D (0) → 只在癌組織表現的基因

群集3 = A (+) ; B (+) ; C (+) ; D (+) → house keeping genes

群集4 = A (+) ; B (0) ; C (+) ; D (0)

群集5 = A (0) ; B (0) ; C (+) ; D (0) → 只在正常組織表現或個體差異表現基因

群集6 = A (0) ; B (+) ; C (0) ; D (0) → 只在低血管組織表現的基因

群集7 = A (0) ; B (+) ; C (0) ; D (+)

群集8 = A (0) ; B (0) ; C (0) ; D (+) → 只在正常組織表現或個體差異表現基因

群集9 = A (0) ; B (0) ; C (+) ; D (+) → 只正常組織表現的基因

我們最感興趣的族群是只會表現在高血管密度和在低血管密度癌組織的基因，分別是第一基因族群與第六基因族群。在第一基因族群有51 已知基因和123 個未知基因有表現，已知基因大概包括與細胞凋零、細胞週期、細胞骨骼、免疫反應激素和代謝有關的基因，例如：TGF-β 受器、Zf9、SKD1、IgG receptor、Trichohyalin 和INF inducible protein....等。

其中不少都與腫瘤形成有關(3-6)。未知基因中更有6 個基因的表現數值超果十萬以上，這些基因都值得我們進一步去探討。第六群集中有23 已知基因和84 個未知基因有表現，例如：IL-8、HSP 90、Thrombospondin 1...等。其中有些蛋白已知可以抑制血管新生(7)，這或許就是此族群腫瘤血管密度較低的原因之一。在未知基因中更有30 基因的表現數值超過十萬以上。

我們已挑選了基因表現數值超過十萬以上的基因來進一步確認其可信度。確認的實驗方法包括dot- blot assay、北方墨點和反轉錄聚合酵素連鎖反應實驗等。我們預定在多重確定基因表現的真實性後，再用RNA 同位雜交的實驗來確認這些基因在腫瘤組織中表現的位置。事實上，除了第一和第六群集之外，其它群集一樣很直得我們去研究。例如第二群集所表

現的基因可能就有些是oncogenes，第五、八和九有些可能就是Tumor suppressor genes。所以如果擁有足夠的研究經費，我們預定去探討在這第些可能存在的致癌基因和腫瘤抑制基因。相信所得結果無論在疾病的診斷上或是基礎的研究上都會有很大的貢獻。在這些差異基因中，我們挑選差異性最大的基因*NoBP* 來作其功能性研究，希望透過此研究了解其血管新生的功能及腫瘤形成之關係。之後才能進行其臨床應用，如藥品的研發及血管新生和存活之指標。

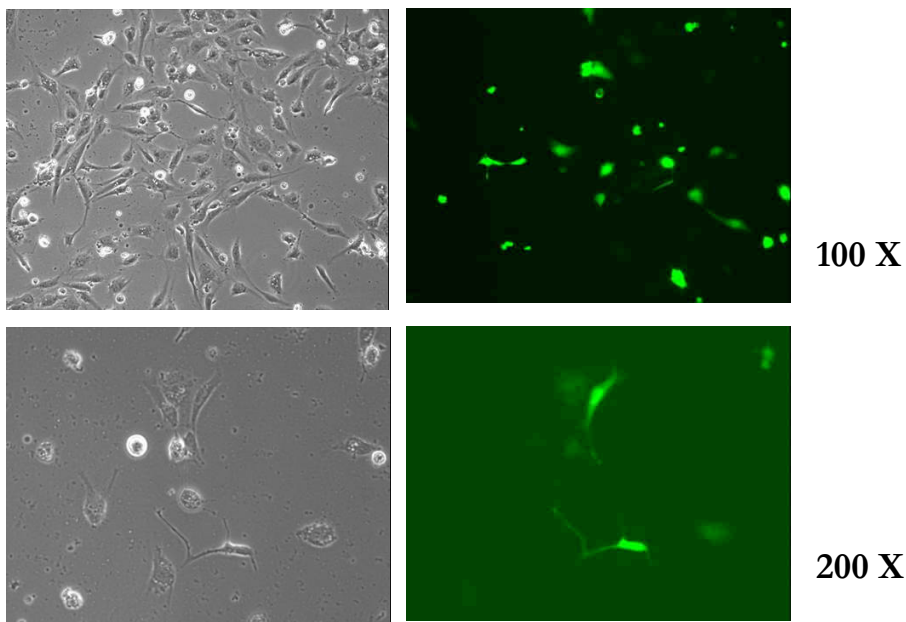
三、研究目的

根據上述國際期刊已發表的文獻和我們實驗室未發表的結果可知*p40/EBP2/NoBP*基因在細胞生長上扮演及重要的角色，進而也影響了細胞的分化能力。關於*p40/EBP2/NoBP* 基因表現是如何促進動物細胞的生長仍不清楚；另一方面，已知*p40/EBP2/NoBP*基因可以幫助EBV 病毒DNA 在感染細胞內的複製，那這基因的表現是否與有EBV 感染的胃癌發生有關呢？在本計劃中將提出四個主要的研究目的和其預定的解決策略。

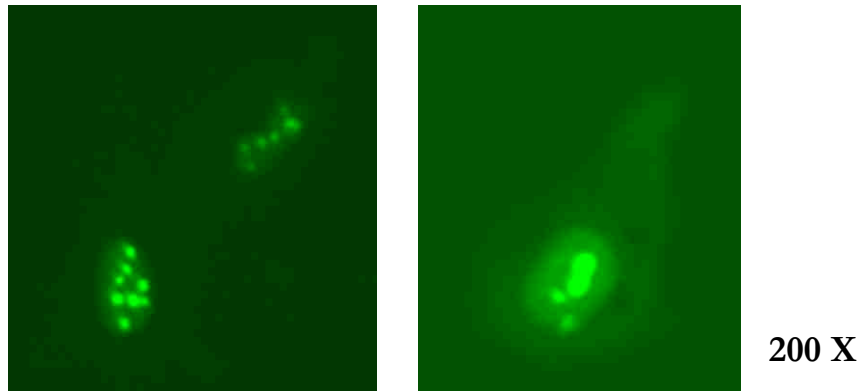
目的一：探討15-d-PGJ₂ 抑制內皮細胞*p40/EBP2/NoBP* 基因表現之機制。

p40/EBP2/NoBP 基因的表現影響了細胞的生長，且在不同物種之間此基因都有很高的相似性，由這基因在演化上的保守性可以看出此基因對細胞存活的重要性，因此更加強了我們想去探討此基因調控方式的必要性。有文獻報告指出*p40/EBP2/NoBP* 基因的啟動子(-661 到-187)片段對此基因的表現是必要的，可能是在此片段內含有八個Sp1和三個c-Ets-1轉錄因子的結合位置；亦有文獻報告說15-d-PGJ₂ 先活化了細胞表面的PPAR- γ ，PPAR- γ 在移動到細胞內抑制轉錄因子Sp1 和c-Ets-1 的活性，最後抑制了Sp1和c-Ets-1 所調控基因的表現(19-21)。因為在*p40/EBP2/NoBP* 基因的啟動子上並無發現PPAR- γ 的結合位置，所以我們推測在內皮細胞中，15-d-PGJ₂ 可能就是藉由這種方式間接抑制了內皮細胞*p40/EBP2/NoBP* 基因的表現，而減緩了內皮細胞的生長，因而抑制血管新生。

GFP vector alone transfection in HUVEC



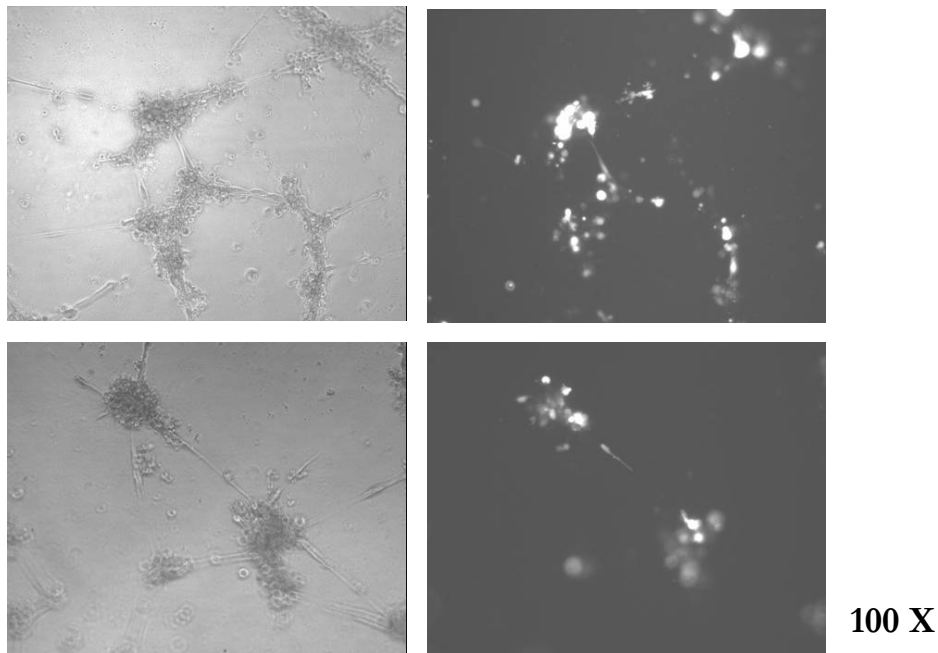
pNoBP- GFP transfection in HUVEC



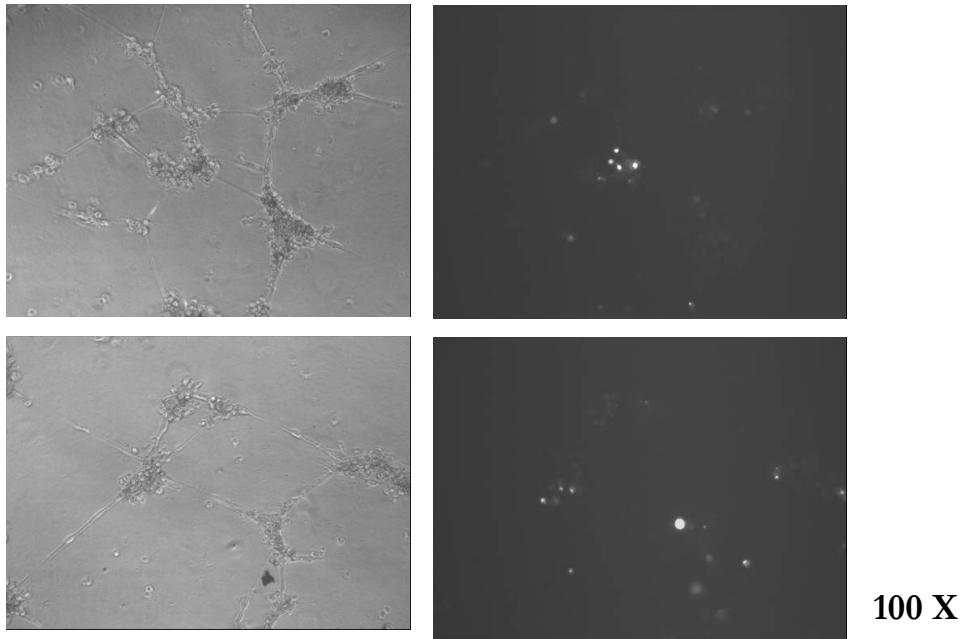
目的二：研究p40/ EBP2/ NoBP 調控細胞生長之機制。

關於p40/ EBP2/ NoBP 功能的探討，目前較肯定的結論是它可以促進動物細胞的增生，但是在其作用機轉仍完全不清楚。在酵母菌中，發現此基因的缺失可影響其核醣體與rRNA 合成，但是尚未找到與它一起作用的蛋白，來幫助了解其作用機制。所以在本計劃的第二研究目的，我們計劃要利用免疫沉澱法去尋找p40/ EBP2/ NoBP 的結合蛋白。

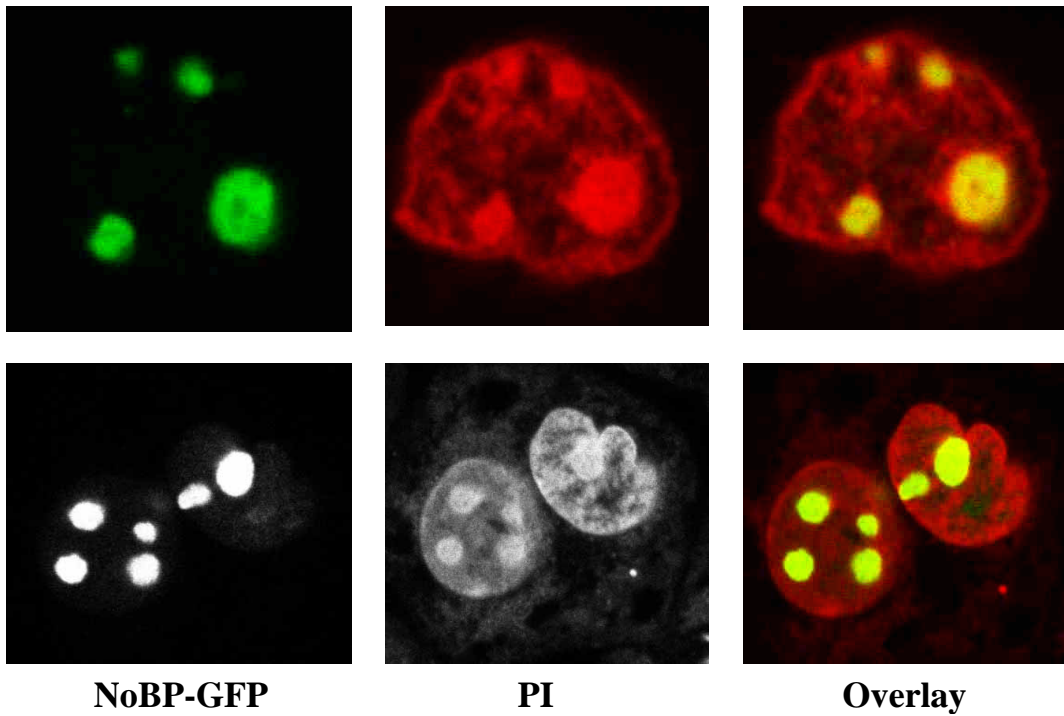
GFP vector alone transfection in HUVEC (cultured on Matrigel)



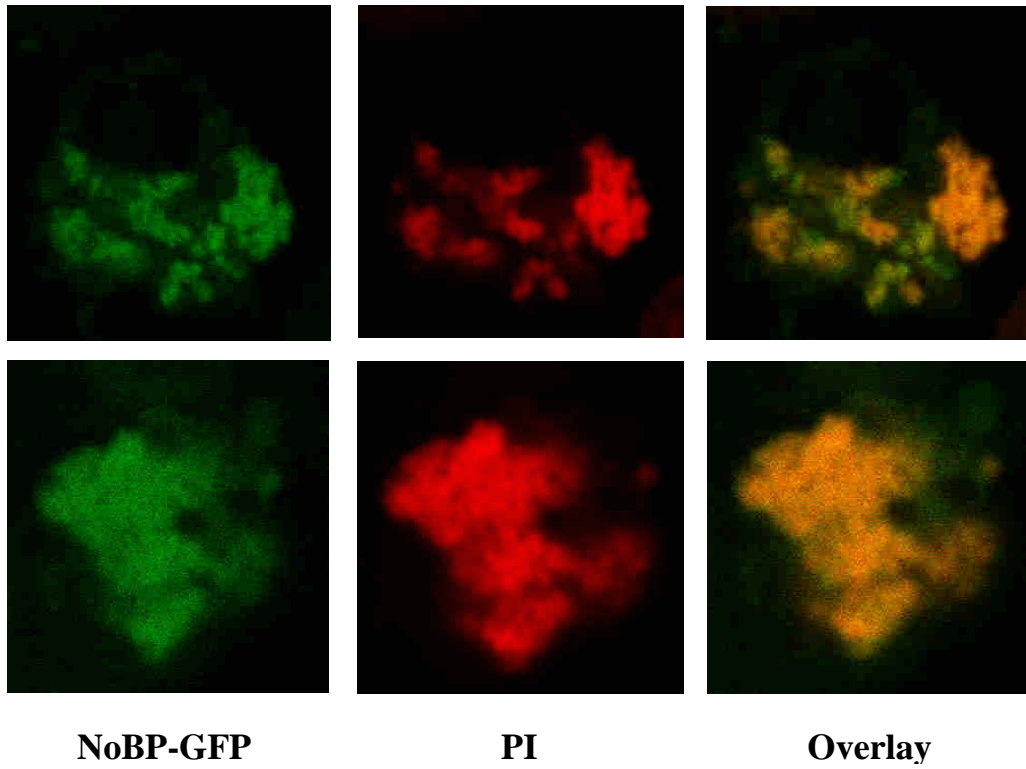
pNoBP- GFP transfection in HUVEC (cultured on Matrigel)



Distribution of p40/ EBP2/ NoBP in interphase

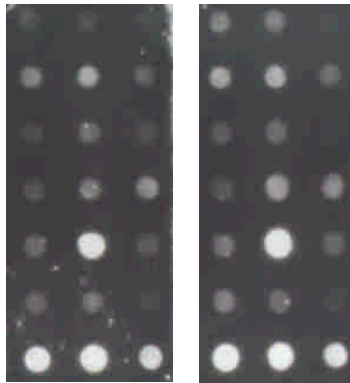


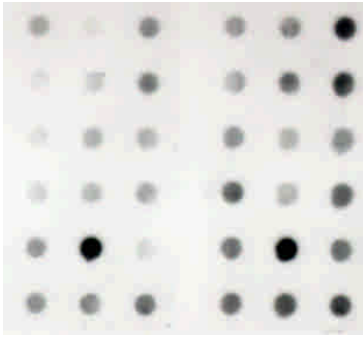
Distribution of p40/ EBP2/ NoBP in mitotic phase



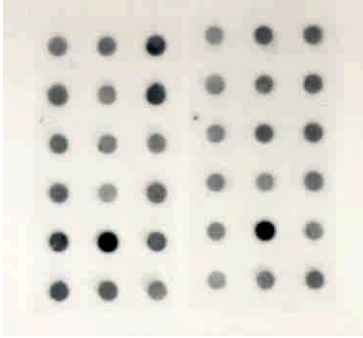
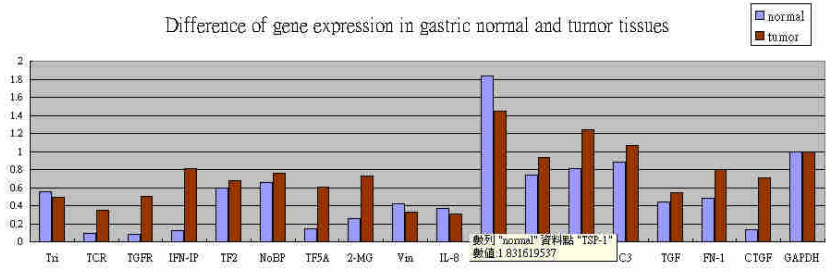
目的三：探討*p40/EBP2/NoBP* 基因表現與胃癌發生之關係。

N 87 gastric cell line were hypoxia for 48 hrs.

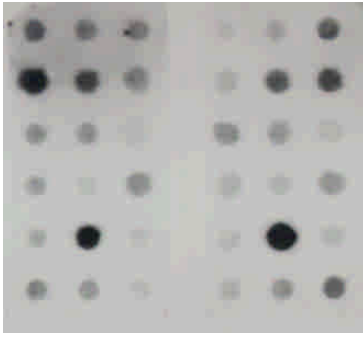
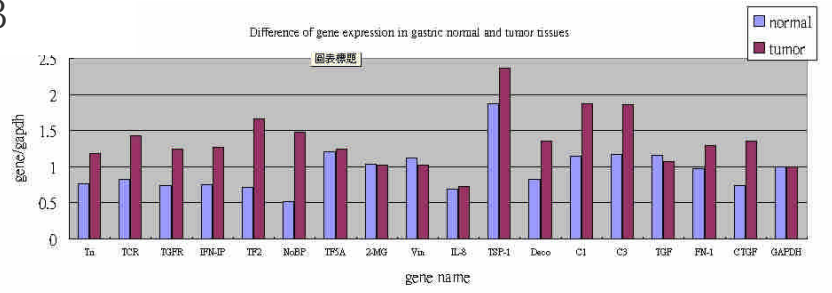




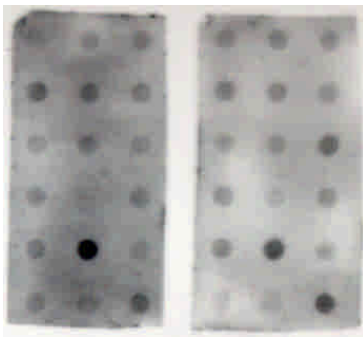
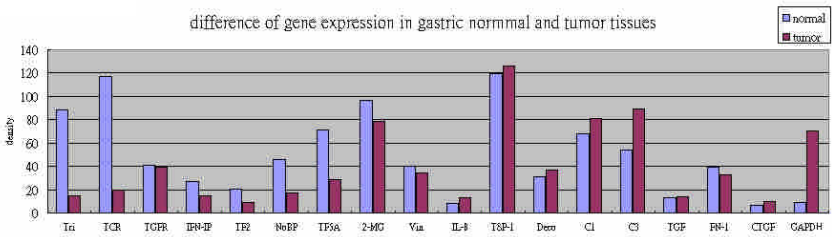
A



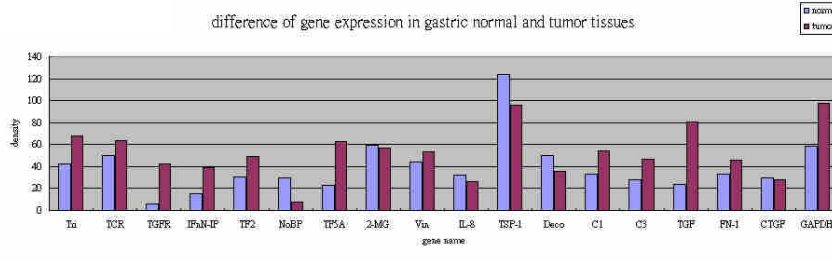
B



C



D



結論：

1. NoBP於HUVEC進行管狀化時有高表現之現象。
2. NoBP表現於細胞週期之interphase時集中於核仁，但於mitotic phase時散佈於細胞質。
3. non racliactive dot blot hybridization可用於胃癌檢體基因圖像之研究。