

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以 DNA 微陣列探討與卵巢癌惡化相關之基因並建立台灣地區婦女卵

巢癌組織基因表現之資料庫

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-376

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：謝長堯

共同主持人：魏凌鴻

計畫參與人員：周佳宏

執行單位：臺大醫學院婦產部

中華民國九十二年十月十五日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以 DNA 微陣列探討與卵巢癌惡化相關之基因並建立台灣地區婦女卵巢癌組織基因表現之資料庫

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-376

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：謝長堯 執行機構及單位名稱：臺大醫學院婦產部

共同主持人：魏凌鴻 執行機構及單位名稱：臺大醫學院腫瘤部

計畫參與人員：周佳宏 執行機構及單位名稱：臺大醫學院婦毒理所

一、中文摘要

卵巢癌為國內婦女越來越常見的疾病，其致病機轉與新的治療及預防策略有待臨床與基礎的研究。如何利用基因體醫學的新知識及新技術，解決卵巢癌的問題是我們當務之急，本計畫自九十一年八月起至九十二年七月共收集了 16 組有效檢體，分別包含以檢體採集部位分為：正常組織部位、原發部位、轉移部位，又可區分為原發性、復發性，16 組檢體中有 6 例為復發性，其中的 3 例我們在之前有收集到原發時的檢體。這些檢體組織在收集後皆依照相同的模式在最快時間內進行 RNA 萃取及進行 cDNA 轉錄、DNA 微陣列分析，我們得到了共有來自 16 個 Cases 共 31 個檢體的 DNA 微陣列分析資料，所得的資料進一步以生物資訊學方式運算篩選具有意義的點利用群集分析歸納整理，得到對於卵巢癌之 DNA 微陣列分析資料。我們以國際相關文獻認定的標準分別探討正常組織部位、原發部位、轉移部位及依照病人臨床資訊判斷抗藥性等因素擷取最有探索潛力的基因將在接下來的研究計畫中進行探討。我們也

初步達成了建立台灣地區婦女卵巢癌組織基因表現資料庫之預期目標，此研究成果具有很好的學術及應用價值但仍需更進一步研究使整體計畫更趨完整。我們認為由此計畫所衍生的大量資訊，對於國內卵巢癌醫學領域有很高的應用價值

關鍵詞：DNA 微陣列、卵巢癌、台灣、基因資料庫

二、英文摘要

Epithelial ovarian cancer is increasing in numbers among women in Taiwan. Since epithelial ovarian cancer is the most fatal gynecological cancer, it is mandatory for us to investigate the underlying pathophysiology of ovarian cancer, develop new treatment modalities and preventive strategies by both clinical and basic researches. Fortunately, novel information and technology derived from the rapidly progressive genomic medicine have shed light on this important issue. From August 2002 to July 2003, we have

carefully collected tissue samples, including normal ovarian tissues, primary ovarian cancer tissues and metastatic part, from 16 epithelial ovarian cancer patients. Among these, six cases were recurrent disease, and three of them have primary tumor tissues collected in our tissue bank. All of these samples were efficiently processed to extract good quality RNA. Using cDNA transcription and microarray analysis, we have acquired 31 comparison pairs of DNA microarray data from these 16 patients. Furthermore, the comparison results from clustering analysis showed that several genes are different expression in cancer and

三、計畫緣由與目的

人類基因體計畫 (Human Genome Project) 完成後，醫學已邁入所謂的後基因體時代 (post-genome era)。目前已知人類基因約有三萬多個左右。藉由基因及蛋白的調控及交互作用，人類得以控制正常的發育及生長，執行各種正常的生理機能。而疾病的產生，也導因於基因與蛋白的異常。雖然我們已知人類基因序列，但大部份基因的真正功能及其與疾病的關係，則尚未能了解。如何利用人類基因體計畫所衍生的大量資訊，應用於醫學領域，了解疾病的發生原理及其基因之變異，進而能找出有療效的標的分子，開發新的診斷方法及治療藥物，為後基因世代轉譯研究最重要之課題。卵巢癌為國內婦女越來越常見的疾病，其致病機轉與國外是否有顯著之不同。如何利用基因體醫學的新知識及新技術，解決卵巢癌的問題，提

metastatic or recurrent tissue, these genes would be investigated in the future study. We have started to establish the gene expression profile database of epithelial ovarian cancer patients in Taiwan. Our preliminary results provide valuable information for both research interests and application potential. However, further studies are needed to make more solid and thorough conclusions. We believe the bioinformation herein will provoke the studies of epithelial ovarian cancer in Taiwan.

Keywords: DNA microarray、ovarian cancer、Taiwan、gene bank

出新的治療及預防策略，仍是我們當務之急。卵巢癌無早期症狀，直到腫瘤壓迫膀胱及直腸才產生症狀，當有腹部轉移時會使得腸胃不適，胃口不好，噁心、嘔吐，此時必須以內診及肛門檢查卵巢大檢測 CA-125 腫瘤標記，並以超音波檢查卵巢異常。發現異常後進一步檢查腹水、腹部腫瘤、網膜餅、腸阻塞是否有淋巴、肺部、乳房檢查等情況評估治療方式。由於目前臨床上對於卵巢癌的治療情況及效果並不理想，因此需要大力推廣卵巢癌早期檢測：包括對大於 35 歲有家族史之婦女應接受骨盆超音波檢查檢測、CA-125、CEA、 α -FP、HCG、LDH 等腫瘤標記檢測，胸部 X 光、直腸鏡、婦科超音波檢查或近年來發展出的 BRCA-1 基因篩選。另一方面則是由加強卵巢癌治病機轉的研究尋求更有效的治療方法，近年來隨著細胞分子生物學的快速進展，分子層次的機轉探

討確實對惡性腫瘤的治療帶來了新的希望，DNA 微陣列技術是基因體學迅速發展的關鍵，在研究計畫中我們就卵巢癌為研究主軸以 DNA 微陣列分析配合生物資訊學與分子生物學方法期望篩選出與卵巢癌發生、轉移與惡性度、抗藥性有關的基因。我們接下來將針對這些基因在蛋白層次的的作用進行探討，此結果不僅將增進我們對卵巢癌的理解，也為卵巢癌的診斷和治療導入新的範疇對於卵巢癌的長期及整體研究，我們計畫經由基因體學、蛋白體學、和生物資訊學，奠定台灣地區卵巢癌研究的基礎，進而開拓卵巢癌之預後、診斷、和治療的新世紀。

四、結果與討論

研究結果

一、病人檢體收集

二、本計畫自九十一年八月起至九十二年七月共收集了 16 組有效檢體，分別包 DNA 微陣列分析

這些檢體組織在收集後皆依照相同的模式在最快時間內進行 RNA 萃取及進行 cDNA 轉錄、DNA 微陣列分析，我們得到了共有來自 16 個 Cases 共 31 個檢體的 DNA 微陣列分析資料，如。所得的資料進一步以生物資訊學方式運算篩選具有意義的點利用群集分析歸納整理，得到對於卵巢癌之 DNA 微陣列分析資料。

含以檢體採集部位分為：正常組織部位、原發部位、轉移部位，又可區分為原發性、復發性，16 組檢體中有 6 例為復發性，其中的 3 例我們在之前有收集到原發時的檢體。

我們以國際相關文獻認定的標準擷取最有探索潛力的 20 個基因：

(1) 正常組織部位與原發部位

(2) 正常組織部位與轉移部位

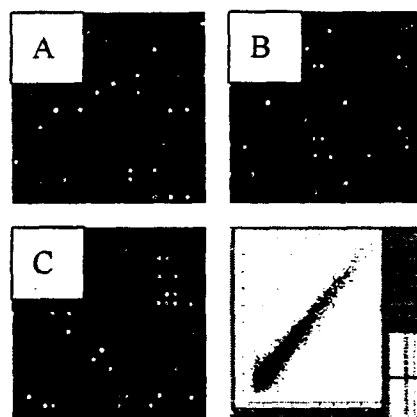
(3) 原發部位與轉移部位

(4) 原發與復發性

(5) 依照病人臨床資訊判斷抗藥性之因素

三、以 RT-PCR 確認 DNA 微陣列分析結果

我們篩選了 15 個由文獻資料已知功能的基因作為確認 DNA 微陣列分析結果的標準以 RT-PCR 的方式確認這些基因在腫瘤組織的表現使用下列引子：我們的測試結果顯示我們的分析結果與外國所進行之相關研究結果相似，顯示對於 DNA 微陣列分析技術之應用具一定水準及可性度，因此我們再各項分析所得之結果值得更進一步由蛋白質層次進行相關研究。



(圖一) DNA 微陣列，(A) 正常組織部位 (B) 原發部位 (C) 轉移部位及回歸分析確認結果之可性度。

五、計畫成果自評

本計畫為利用 DNA 微陣列探討與卵巢癌惡化相關之基因並建立台灣地區婦女卵巢癌組織基因表現之資料庫，我們自九十一年八月起至九十二年七月共收集了 16 組有效檢體，分別包含以檢體採集部位分為：正常組織部位、原發部位、轉移部位，又可區分為原發性、復發性，16 組檢體中有 6 例為復發性，其中的 3 例我們在之前有收集到原發時的檢體。檢體部份比預期之二十例少了四例，一部分原因為 SARS 期間無法收集到檢體，然而我們仍將收集到的檢體按研究內容進行研究，整體過程與原計畫相符、我們也初步達成了建立台灣地區婦女卵巢癌組織基因表現之資料庫之預期目標，此研究成果具有很好的學術及應用價值但仍需更進一步的研究整理才能發表於學術期刊。我們認為由此計畫所衍生的大量資訊，應用於卵巢癌醫學領域，了解卵巢癌的發生原理及其基因之變異，進而能找出有療效的標的分子，開發新的診斷方法及治療藥物。相信對於國內卵巢癌醫學領域有很高的應用價值

六、參考文獻

1. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46 : 467-473
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1985; 1:27-31
3. O'Reilly MS, Holmgren L, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis' lung carcinoma. *Cell* 1994; 79:315-328
4. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med* 1996; 2:689-692
5. Dvorak HJF, Brown LF, Deumr M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-1039
6. Leung DW, Cachianes G, Kuany W J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309
7. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1998;76:1410-5
8. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1237-45
9. Cheng WF, Chen CA, Lee CN, Su YN, Wei LH, Kung CC, Hsieh FJ, Hsieh CY. Correlation between vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma patients. *Obstet Gynecol* in press
10. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB,

- Kurman RT. Human papilloma virus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-37.
11. Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, Di Paolo. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papilloma virus type 16 DNA. *J Virol* 1987; 61: 1061-6.
12. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus type-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243:934-7.
13. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papilloma virus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-9.
14. Nair P, Gangadevi T, Jayaprakash PG, Nair MB, Nair MK, Pillai MR. Increased angiogenesis in the uterine cervix associated with human papilloma virus infection. *Pathology, Research & Practice* 1999; 195(3):163-9.
15. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36
16. Auersperg N, Edelson MI, Mok SC, Johnson SW, Hamilton TC. The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1998;25:281-304
17. Xu Y, Fang XJ, Casey G, Mills GB. Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochem J* 1995;309:933-40.
18. Xu Y, Gaudette DC, Boynton JD, Frankel A, Fang XJ, Sharma A, et al. Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 1995;1:1223-32
19. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 1993;291:677-80
20. Goetzl EJ, An S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J* 1998;12:1589-98
21. Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma F, Zondag GC. Lysophosphatidic acid: G-protein signaling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:168-73
22. An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Molecular cloning of human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:619-22
23. An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1998;273:7906-10
24. Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, Edg7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999;274:27776-85