

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

卵巢癌基因晶片資料前處理與分析(1)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2218-E-009-021-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立交通大學奈米科技研究所

計畫主持人：黃國華

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 10 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

卵巢癌基因晶片資料前處理及分析

(Pre-processing and analysis of microarray datasets for ovarian cancers)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC93-2218-E-009-021-

執行期間：93年8月1日至94年7月31日

計畫主持人：黃國華

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立交通大學奈米科技研究所

中華民國 94 年 10 月 日

卵巢癌基因晶片資料前處理及分析

(Pre-processing and analysis of microarray datasets for ovarian cancers)

摘要

微陣列分析實驗可用來檢測正常卵巢、良性卵巢腫瘤和第 I 到第 III 期卵巢癌。藉著處理良性卵巢癌當做癌前期病變並與後期卵巢癌相比較，我們鑑定出在早期癌症過度表現的 46 個基因；我們也鑑定出在卵巢腫瘤及癌症期所有過度表現的基因，這些過度表現的基因或許可以當做開發早期診斷標記的替代選擇。在抑制狀態(down-regulated)的基因群組中，JUN 和核受體亞群基因一直重複被鑑定，顯示出它們在卵巢腫瘤生成過程中扮演重要的調控角色。

一、前言

卵巢癌在美國是造成婦科疾病死亡的主要原因。整體五年的存活率大約是 46% 而且 25 年來都未曾改變過。大部份患者在接近癌症進展期才被診斷出來，而導致不好的卵巢癌預後。這部份歸因於這疾病沒有明顯的早期症狀並且缺乏靈敏且具專一性的檢驗方法。CA125 是目前一般用來偵測卵巢癌的方法之一；然而它的靈敏度和專一性是不夠的。所以極需要一個可提供良好靈敏度和專一性的新標記並和 CA125 結合做早期偵測。

微陣列實驗可同時呈現十到千個基因體表現的調控基因。這技術讓癌症研究員可比對正常與惡性組織之間的基因表現且可快速鑑定在參與癌症形成過程中不同的調控基因。微陣列實驗的資料集也可根據腫瘤外型用來分類腫瘤並為其機制研究提供可用的生物學、診斷學和先兆症狀資訊。

卵巢癌的基因表現已被許多團隊研究出來。在這項研究的關鍵重點在於證明基因產物可以表現並當成卵巢癌專一性標記。從正常組織區別、辨識早期癌症基因，也許可以教授我們關於卵巢癌的發生與進展。微陣列實驗無疑是目前有希望且使用廣泛的檢測工具；然而卻無有說服力的新標記來證明。取得足夠數量較早期的惡性卵巢組織是鑑定早期腫瘤癌症標記的重點。

我們相信這是我們證明早期表現卵巢癌致病性基因相關標記的最好機會。將微陣列實驗應用在各時期，尤其是早期大量組織的分析目標可能可以達成通過。對統計的重要性而言，相對的難以取得足量的臨床早期惡性組織。大量頻繁的良性腫瘤分析是因為良性腫瘤在臨床可能被認為是癌前期病變，雖然這尚未被證實但它會階段性的發生在早期癌組織且又分享類似的基因體表現。

這假說強調當前的研究是微陣列實驗對各種卵巢組織分析的應用，包括良性腫瘤、統計學應用、群組分析及辨認鑑定早期卵巢癌組織的基因。

二、材料與方法

1. 組織

這項研究由中國醫藥大學附設醫院共同評鑑委員會規範為人體受測實驗。組織的取得來自於簽妥同意書的病人。在 2001 年到 2003 年間中國醫藥大學附設醫院外科和病理科的合作下收集取得卵巢組織、陰道組織、子宮頸組織和子宮肌層組織。在手術後，將組織放在液態氮並做病理學試驗。正常卵巢組織主要收集上皮部份，避免小囊泡和黃體囊腫。所有組織一次完全去除，且仔細進行解剖、分離，並直接予於冷凍。外科分級法是根據國際婦產科學聯盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)而決定。在當前的研究中，使用 5 個正常卵巢組織、5 個良性卵巢腫瘤(OVT)、5 個第 I 期卵巢癌(OVCAI)及 5 個第 III 期卵巢癌(OVCAIII)。

表 1. 卵巢癌的臨床病理特徵總結

Age	Pathology	Stage
-----	-----------	-------

44	Mucinous cytadenoma, borderline	IA
39	Serous cytadenoma, borderline	IA
46	Mucinous cytadenoma, borderline	IA
26	Mucinous cytadenoma, borderline	IIIB
36	Mucinous cytadenoma, borderline	IA
51	Serous cystadenocarcinoma, Grade	IIIC
58	Clear Cell carcinoma, Grade 3/3	IC
62	Serous cystadenocarcinoma, Grade	IIIC
53	Clear cell carcinoma, Grade 3/3;	IIIC
61	Serous cystadenocarcinoma, Grade	IIIC

2. 人類 cDNA 微陣列

所有微陣列實驗皆在中國醫藥大學附設醫院中一個恆溫恆溼的潔淨室進行。微陣列的設計、實驗程序和數據處理皆根據 MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment, 微陣列實驗資料的欄位標準) 為指導方針。

一個定序的確定，包含 9600 種人類 cDNA 克隆的 cDNA library 是來自國家衛生研究院 (National Health Research Institute of Taiwan, NIH)。透過經銷商得知，這個克隆原本是來自 IMAGE (標記表現序列資料庫)。

3. RNA 萃取與標定

總 RNA 是使用 TRI-reagent (Molecular Research Center, Inc.) 萃取。萃取出 RNA 是以洋菜膠體電泳及 OD (吸光值) 260/280 定量 (比值在 2.0 以上)。對於每個標準品標定，在總體積 20 μ L 中，每 0.5 μ g 的總 RNA 和 0.5 μ g 的 polydT 煉合 (Annealed)。cDNA 的合成是在 50 μ L 混合液中，包括 dATP、dCTP、dGTP 各 1mM；dTTP、DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim) 各 40mM、10mM DTT、每 μ L 0.5 單位的人類胎盤核糖核酸水解酶抑制劑 (HT Biotechnology Ltd., UK) 和 50 單位的 Superscript 反轉錄酶，並將混合物放入 42 $^{\circ}$ C 反應 90 分鐘、熱處理 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘。

4. 微陣列實驗雜合和訊號放大作用

微陣列實驗在 30mL 前置雜合緩衝液 (在 50mL 離心管中含 25% formamide, 5X SSC, 0.1% SDS and 0.1 mg/mL BSA) 前置雜合反 (pre-hybridized) 42 $^{\circ}$ C 1 小時。雜合探針混合 20 μ g polydA (10) 和 20 μ g 的 human Cot-1 DNA (Gibco BRL) 並在 95 $^{\circ}$ C 進行變性 5 分鐘。將變性後的探針弄乾並使其懸浮在 20 μ L 前置雜合緩衝液中。在 Corning hybridization chamber 進行雜交 42 $^{\circ}$ C 反應 12~16 小時 (放置至隔夜)。用 30mL 2XSSC 清洗玻片 2 次，以 0.1% SDS 在室溫處理 5 分鐘，隨後在 42 $^{\circ}$ C 清洗 20 分鐘，每次用 30mL 0.1X SSC 0.1% SDS 洗 3 次。所有的清洗過程皆在 50ml 圓錐管進行並輕柔的震盪。

TSA 放大系統 (Tyramide Signal amplification) 是根據 Micromax TSA labeling kit (NEN Life Science, Inc.) 進行並做了小小的修飾。玻片在室溫用 30 mL TNT 緩衝液清洗 5 分鐘 (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5、0.15 M NaCl、0.05% Tween-20)，隨後用 300 μ L TNB-G (0.5% NEN blocking reagent、10% goat serum in TNT) 反應 10 分鐘。5 分鐘後洗掉 TNT，用含稀釋 1000X 的 HRP-conjugated mouse anti-DIG IgG (Gibco BRL) 的 TNB-G 緩衝液 300 μ L 反應 30 分鐘。玻片以 TNT 緩衝液清洗，每 5 分鐘 3 次，再以 300 μ L Cyanine-3 Tyramide Solution (1 μ L Cyanine-3 Tyramide [Micromax amplification kit, NEN] into 500 μ L Amplification Diluent provided by NEN) 反應 10 分鐘。玻片經過每 5 分鐘 3 次的清洗後風乾。掃瞄螢光是使用 Axon Genepix 4000B (生物晶片雷射掃瞄儀)。螢光影像是由 GenePix Pro 3.0 處理原始表現資料集。平均值強度與平均背景值被用做數據處理。正常卵巢平均化強度當

做標準化基準。我們使用全球微陣列實驗強度做標準化控制。使用局部線性迴歸方法做非線性標準化。對數比即根據上述 2 個方法計算出來。

5. 卵巢癌/腫瘤的差異表現

我們用統計分析腫瘤與癌症組織，當做和正常卵巢組織比較的單一類別，確定良性卵巢腫瘤和卵巢癌的基因差異性表現。對於癌組織抗正常組織的基因表達比率是決定於 *t*-test(檢定平均值的差異，兩兩樣本間的差異或樣本與母體平均值的差異)。共有 37 個表現抑制基因，因為高強度標準(信號強度在平均強度 20%以上)、相異比(減掉至少整體 2 倍的標準偏差)和變異係數(小於整體)被挑選出來。這些抑制基因有參與轉錄調控(*EGR1*、*FOSB*、*NR4A1*、*JUNB*、*JUND*、*NR4A3*)、有活化類固醇荷爾蒙受器的(*NR4A1*、*NR4A3*)和調控細胞週期/細胞增生有關的(*FOSB*、*JUNB*、*AXL*、*RGS2*)。

6. 早期表達基因

我們將微陣列實驗用在不同外科分期的各種卵巢腫瘤和癌症上。這讓我們可以專一性的辨認外科分期的基因表現。在各期卵巢癌基因差異性表現可能可做為早期診斷標記的依據。藉著 SAM 挑選卵巢腫瘤、第 I 期和第 III 期卵巢癌表現良好的基因群組。我們找出在早期呈現過度表現但晚期又降低的 46 個基因。這些時期專一性基因和通道/孔洞運輸活性(*CLIC2*、*GRIN2D*、*SLC14A1*、*TRPC3*)有關聯，也包括生物程序基因，如：膠原蛋白(*COL8A1*、*COL16A1*)、細胞和細胞間的訊息傳遞(*EPO*、*GRIN2D*、*MLN*、*NCAM1*)、細胞吸附(*OSF-2*、*COL8A1*、*COL16A1*、*NCAM1*)、細胞通訊(*OSF-2*、*GNB5*、*COL8A1*、*COL16A1*、*EPO*、*GRIN2D*、*MLN*、*NCAM1*)、形態發生(*OSF-2*、*COL8A1*、*FOXC1*、*RTN4*)、自然凋亡(*RTN4*、*API5*)、轉錄調控(*WDHD1*、*FOXC1*、*HMGB3*、*HIST2H2BE*)、蛋白質代謝分解(*CPNI*、*FNTB*)和細胞生長修復(*SYCP2*、*CLIC2*、*GRIN2D*、*NCAM1*、*SLC14A1*、*TRPC3*、*HIST2H2BE*)。

表 2 在卵巢腫瘤/癌被抑制的基因

Gene	OVT		OVCAI		OVCAIII	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
<i>ARHB</i>	-0.71	0.89	-1.27	0.79	-1.00	0.83
<i>BCL2</i>	-0.79	0.61	-0.39	0.70	-1.12	1.06
<i>RAB9</i>	-0.65	0.64	-0.93	0.33	-0.65	0.42
<i>NDUFAB1</i>	-0.65	0.87	-1.08	0.83	-1.52	0.68
<i>ARGBP2</i>	-0.78	0.61	-0.94	0.46	-0.85	0.45
<i>SCAMP3</i>	-1.29	1.00	-1.69	0.64	-1.01	0.84
<i>HPIP</i>	-1.02	1.20	-0.99	0.89	-1.22	0.88
<i>ACLY</i>	-1.17	1.19	-1.29	0.94	-0.88	1.07
<i>CBLN1</i>	-0.98	1.29	-0.93	0.96	-0.89	0.89
<i>ISGF3G</i>	-1.07	0.83	-0.73	1.04	-1.43	0.66
<i>IGFBP5</i>	-0.91	0.97	-1.42	0.92	-2.27	0.56
<i>JUN</i>	-1.10	0.84	-1.48	1.20	-1.86	0.41
<i>SEPP1</i>	-1.14	0.74	-1.76	0.74	-2.18	0.60
<i>AXL</i>	-1.51	0.91	-1.55	0.72	-1.79	0.58
<i>FOSB</i>	-1.60	0.86	-1.78	1.36	-2.36	0.42
<i>JUND</i>	-1.20	0.84	-1.76	0.99	-1.91	0.62

<i>JUNB</i>	-1.95	0.86	-1.97	1.16	-2.57	0.59
<i>EGR1</i>	-1.88	0.89	-2.42	0.90	-2.67	0.70
<i>IDH3A</i>	-2.01	1.01	-2.25	0.47	-2.61	0.45
<i>NR4A1</i>	-1.97	1.14	-2.40	0.79	-2.74	0.45
<i>JUNB</i>	-1.38	1.12	-1.93	0.64	-1.77	0.64
<i>JUNB</i>	-1.61	1.03	-2.25	0.86	-2.30	0.49
<i>ETFA</i>	-1.34	0.88	-1.73	0.87	-1.95	0.89
<i>NR4A2</i>	-1.31	0.77	-1.14	0.62	-1.45	0.53
<i>NR4A3</i>	-1.78	1.15	-2.00	0.59	-2.04	0.86
<i>KCNK5</i>	-0.97	0.57	-1.12	0.39	-1.06	0.76
<i>TSC22</i>	-0.92	0.68	-1.14	0.70	-1.35	0.76
<i>SERPINB6</i>	-0.88	0.90	-1.39	0.96	-0.94	0.94
<i>RPL32</i>	-1.04	1.11	-1.54	0.98	-1.57	0.88
<i>RPS25</i>	-1.01	1.03	-0.97	0.95	-1.68	0.56
<i>PFKL</i>	-0.92	0.87	-0.97	0.98	-1.16	0.51
<i>INDO</i>	-0.84	0.80	-0.78	0.95	-1.13	0.70
<i>ANKTM1</i>	-0.83	0.62	-1.07	0.69	-0.90	0.81
<i>TED</i>	-0.83	0.74	-1.04	1.27	-1.34	1.02
<i>GNG11</i>	-0.58	1.03	-1.35	0.75	-1.72	0.86
<i>ID2</i>	-0.63	0.99	-1.27	0.72	-1.70	0.55
<i>BALAP3</i>	-1.09	1.47	-1.13	1.35	-0.18	1.36

表 3.在早期卵巢癌過度表現的基因

Symbol	OVT/CAI	CA III	Difference
<i>COL16A1</i>	1.80	-0.15	-1.95
<i>HIST2H2BE</i>	1.85	-0.01	-1.86
<i>POSTN</i>	1.11	-0.73	-1.84
<i>TRPC3</i>	0.13	-1.77	-1.90
<i>RTN4</i>	0.44	-1.60	-2.04
<i>RWDD1</i>	0.67	-0.90	-1.58
<i>API5</i>	1.11	-0.63	-1.73
<i>SRRM2</i>	0.92	-1.50	-2.42
<i>COL8A1</i>	0.98	-0.78	-1.77
<i>GRIN2D</i>	0.44	-1.24	-1.68
<i>WDHD1</i>	0.77	-0.91	-1.68
<i>SYCP2</i>	0.21	-1.62	-1.82
<i>EPO</i>	0.85	-1.16	-2.01
<i>GNB5</i>	0.76	-0.97	-1.73
<i>HAS2</i>	0.23	-1.49	-1.72
<i>NCAMI</i>	0.51	-1.37	-1.88
<i>FNTB</i>	0.35	-1.32	-1.67
<i>PVT1</i>	0.64	-1.02	-1.67

<i>CLIC2</i>	0.55	-1.16	-1.71
<i>CPN1</i>	0.41	-1.18	-1.59
<i>MLN</i>	0.79	-1.20	-1.99
<i>NAV3</i>	0.68	-1.34	-2.02
<i>HMGB3</i>	0.64	-1.20	-1.84
<i>FOXC1</i>	1.22	-0.83	-2.04
<i>SLC14A1</i>	1.79	-0.05	-1.84

三、 結論

抑制基因顯示一個相對少量的功能性基團，如：v-Jun、jun-B、jun-D、FosB、Bcl-2、ras 同族基因和核受體家族基因。jun-B 是紅血球分化的重要調控者；jun-B 會增強 BRCA1 活性區域通過 coiled-coil-mediated 相互作用的功能。jun-D 是 AP1 轉錄因子複合體禿功能性的組成；它的功能是自 P53 依賴衰老和自然凋亡保護細胞。v-Jun 的基因產物以被證實其結構和功能相同於促效蛋白，AP1。Fos 基因家族可以編碼出 leucine zipper 蛋白二聚成 JUN 家族，因此形成轉錄因子複合體 AP1。抑制基因共同參與細胞增生調控、分化、轉形和凋亡。

核受器亞群基因的角色較不清楚。這些基因會編碼成固醇/甲狀腺素—視紫質受器超級家族。編碼蛋白也許可做為轉錄因子。這些基因的突變和多巴胺(dopaminergic)失調障礙相關聯，包括：帕金森氏症、精神分裂症和躁鬱症。SF-1 是其中的成員之一，在體外已被證實和所有卵巢類固醇基因調控有關。

時期專一性表現基因從早期到末期可能放出光分子機制。在早期相對性高度表現基因的功能性分析顯示，通道/膜運輸者也許在進展成末期癌症時扮演著重大的角色。另外，基因與矩陣、細胞成長、訊息傳遞和蛋白質代謝分解也許跟這個過程有關聯且有貢獻。

一個理想的早期偵測標記應該在早期有高度表現，但不會在正常組織或末期癌症表現。在表 3 的候選基因中對於早期偵測標記顯示理想的表現模式。

尋找一個靈敏且專一性早期標記做為癌症的研究是很困難的，特別是在卵巢癌怎早期難以診斷的情況下。同樣的道理，早期惡性腫瘤組織是很少用來做為研究的。對當前的研究重點是，使用大量卵巢腫瘤當做惡性腫瘤的早期組織。我們證明用做早期偵測卵巢癌的候選基因可以適用在這個程序上。

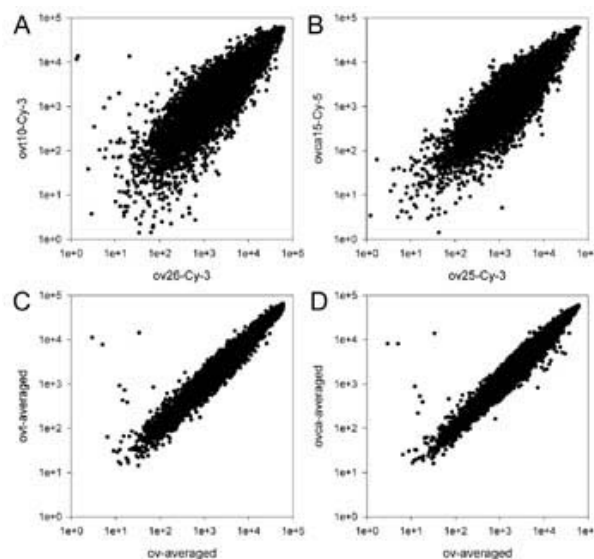


圖 1.典型的微陣列資料集散佈圖。微陣列資料集的獲得是使用 MICROMAX TSA kit。

Ov26 (Cy-3) versus ovt10 (Cy-3) in logarithmic scale (A); ov25 (Cy-3) versus ovca15 (Cy-5) (B);

globally averaged datasets of OV versus OVT (C); averaged datasets of OV versus OVCA (D).