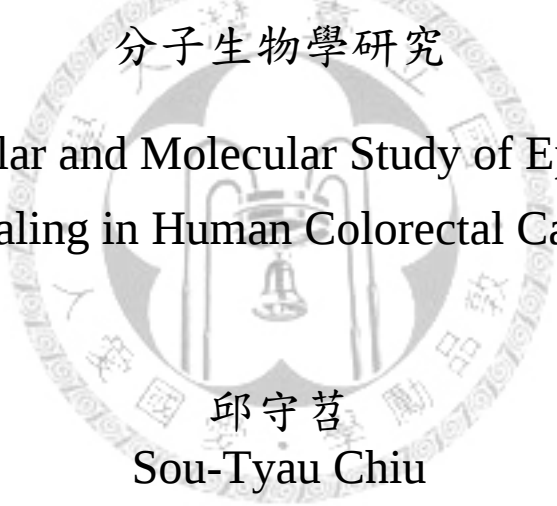


國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所
博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine
College of Medicine
National Taiwan University
Doctoral Dissertation

EphB3/ephrin-B分子訊息在人類大腸直腸癌之臨床和細胞
分子生物學研究

Clinical, Cellular and Molecular Study of EphB3/ephrin-B
Signaling in Human Colorectal Cancer



邱守苕
Sou-Tyau Chiu

指導教授：謝豐舟 教授
Fon-Jou Hsieh, M.D.
張金堅 教授
King-Jen Chang, M.D., Ph.D.
李鴻 教授
Hung Li, Ph.D.

中華民國九十八年十一月
November 2009

國立臺灣大學博士學位論文 口試委員會審定書

EphB3/ephrin-B 分子訊息在人類大腸直腸癌之臨床和細胞
分子生物學研究

Clinical, Cellular and Molecular Study of EphB3/ephrin-B
Signaling In Human Colorectal Cancer

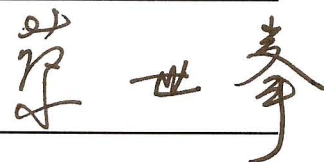
本論文係邱守苕君（學號 Q90421012）在國立臺灣大學
臨床醫學研究所完成之博士學位論文，於民國九十八年十一
月二日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

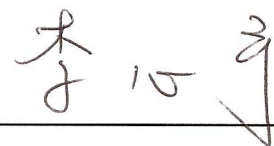


（簽名）

（指導教授）



張金堅



廖永豐

系主任、所長



（簽名）

誌謝與感恩

碩士班兩年，直升博士班再六年，終於畢業了。八年來，物換星移，而我內心對於科學的熱誠，未曾有一絲磨滅。醫學院的課室迴廊，中研院的一草一木，四分溪的潺潺流水，如今依然歷歷在目。每至夜深人靜，中研院的實驗室依舊燈火通明，而臺北盆地的另一端，急診室也是燈火通明，時而加上人聲鼎沸。多年來，我大部分的時間都在這兩個世界之間游移－醫院的急診室以及南港中研院分子生物研究所的 N517 實驗室。老婆要我多回家陪小孩，實驗室的老師要我多花一些時間待在實驗室，醫院日夜顛倒不分假日的急診班似乎永遠也上不完。

要感謝的對象實在太多了。首先要感謝老婆余佩玲醫師，一位馬來西亞拿督的千金，放棄了人生的自我實踐，以相夫教子為職志，因為她的寬容以及默默的支持，使我在攻讀學位的期間沒有後顧之憂，而我們那一對超級卡哇伊的兒女靖歲、靖華，正是她這幾年來最滿足的成就。接著要感謝署豐、慈濟以及臺北縣立醫院外科和急診醫學科同仁配合我更換上班時段以利修課和實驗的進行。感謝中研院李鴻老師的時時督促，直到他被肺腺癌擊倒的前一刻，還掛念著我的論文的投稿進度。感謝謝豐舟教授的醇醇叮嚀以及人生哲理的剖析，感謝張金堅教授的鼓勵，感謝論文指導委員蔡世峰教授、李心予教授和廖永豐教授提供他們寶貴的意見。感謝那些實驗小鼠，因為牠們的犧牲，促成了人類科學的進步以及我個人實驗的完成。感謝實驗室的資深助理蘇靜媛小姐以及那群年紀小我十來歲的研究生心嵐、遠達、偉政、弈軒、文政、雯雯、惠君和怡人，因為我的實驗技術以及資訊大都來自於他或她們直接的傾囊相授，而在 Lab. meeting 中他們毒舌裁判般的評論我拙劣的實驗結果，其實是我實驗進步的主要動力。我更要感謝實驗室的博士後研究員丁俊紘博士的鼎力相助，他所提供的技術支援幫助我獲致一些重要的證據證實 EphB3/ephrin-B signaling 在大腸直腸癌扮演促進 mesenchymal-to-epithelial transition 以及抑制腫瘤生長的雙重角色。

李鴻老師生前始終要求他實驗室學生的實驗水平要向 *Nature*、*Cell* 這些一流科學期刊的 papers 看齊，他常說，我們這邊（指中研院）什麼都有，沒有理由作不出來那些實驗。遺憾的是，我沒有遵循他的期望完成幹細胞的研究，也沒有培育出他期望的基因轉殖或是基因剔除小鼠。事實上，八年中有三年多的時間，我曾經熱中並埋首於幹細胞的研究；但是相較於世界頂尖的相關研究，我個人的實驗進度大都只能苦苦追趕、望塵莫及。心急如焚的我，向他提出回頭（接續碩士班）進行大腸癌相關研究的請求，終於獲得首肯。令人欣慰的是，論文題目經過再次更迭之後，一些重要的發現也陸續的出現，因而能夠順利的畢業。

最後，我要感謝我的父母。民國初年南京高考郵政科狀元的父親，一生淡薄名利；早年受他的影響，家中的兄姊皆以物理、化學、數學、氣象這些基礎科學作為攻讀學位的主軸，矢志成為科學家；而我個人原本亦就讀於生物科系，大三時父親因病逝世於臺大醫院，他如願以償地將遺體捐贈給臺大醫學院供病理以及大體解剖教學之用，因緣際會之下也再次的燃起了我習醫的渴望。三年之後，就在預官步兵排長退伍的那一年秋天，我進入高雄醫學院學士後醫學系就讀。父親的名字如今被刻在臺大醫學院大廳的“無我之愛”牆，永遠成為這所醫學院的一部分。而我的母親，一直為了這個家庭默默的付出，數十年如一日，生活檢樸到無以復出，每當我面臨生涯中的重要關卡，她總是我最重要的精神支柱。

直到去年，久居美國的二姊突然發送電子郵件給所有的兄弟姐妹們，提到父親以往之種種。我們才知道，原來父親的祖父是清光緒十二年（西元 1886 年）進士，而那一位進士的祖父也是一位進士（清道光十三年進士，西元 1833 年），但是這些資訊父親在生前從來都沒有主動提起過；從小父親只是告訴我們，沒有什麼東西會留給我們，唯有靠自己好好努力。中英鴉片戰爭清廷戰敗後，林則徐同黨等人被貶謫，父親的祖父的祖父亦遭遣戍新疆伊犁（後賜還中原）。百餘年之後的今日，我借用他的書懷對聯「無端風雨驚花落；更起樓台待月明」自勉，要為人生的更上一層樓作好準備。

謹誌於 2009 年 11 月

中文摘要

在已開發國家，大腸直腸癌是造成癌症死亡的主因之一。近年來，某些標靶治療藥物已被證實能夠以有效率且少副作用的方式來治療外科手術無法切除的癌細胞，而瞭解癌症分子訊息傳遞路徑乃是發展和臨床應用標靶治療的先決條件。本研究有兩個部分。第一部分乃分子流行病學之研究，目地在尋找及確認人類大腸直腸癌中和臨床病理因子相關的向上調控基因。第二部分則專注於 *EphB3* 基因功能的剖析。已知 *EphB3* 是一種細胞膜上的酪氨酸磷酸激酶受體，在消化道中只有小腸絨毛隱窩以及大腸黏膜隱窩底部的始祖細胞(幹細胞)會表現 *EphB3*。此外，*EphB3* 也被證實是一個腫瘤抑制基因。這兩項引人注意的特點使我們決定要進一步探索 *EphB3* 的生物學功能。我們的研究不但揭露了 *EphB3* 在腸道和癌症生物學的一個嶄新的角色 (*EphB3*/ephrin-B 分子訊息能夠促進細胞的極化以及上皮化，也就是所謂的間質上皮轉換)，同時也顯示活化此一分子訊息極有潛力成為標靶治療的新標地。

在研究的第一部分，我們利用四位病人的四組樣本進行 cDNA 微陣列實驗。在這四個 DNA 晶片上都呈現向上調控的基因共有 29 個。我們挑選其中 20 個基因進行晶片實驗後之二次確認。確認的方法是定量 RT-PCR 實驗，樣本共有 31 組，取自於原來 4 位病人以及另外 27 位病人的外科檢體。20 個基因中只有 8 個基因通過定量 RT-PCR 實驗的再確認。我們發現，經確認為向上調控的基因在 31 組樣本中，各有數組樣本沒有呈現向上調控，而這些樣本的腫瘤行為以及臨床病理特徵也不同於該基因呈現向上調控的其他腫瘤樣本。我們將 8 個基因在 31 組樣本中有或沒有呈現向上調控和 31 組樣本各自的 10 項臨床病理因子合或不合於某條件，利用卡方檢定或是費雪氏精密檢定進行統計學的相關分析。結果發現其中 6 個基因的向上調控與否可以對應到是否出現某特定腫瘤行為或是臨床特徵：*THY1* 以及 *PHLAD1* 的向上調控和大腸直腸癌病人出現貧血狀態有統計相

關 ($P = 0.036$ 以及 $P = 0.009$)；*HNRPA1* 的向上調控和位於右側的大腸癌有統計相關 ($P = 0.027$)；*GPX2* 的向上調控和大腸直腸癌腫瘤細胞分化程度較高有統計相關 ($P = 0.019$)；*c-MYC* 的向上調控和男性大腸直腸癌腫瘤有統計相關 ($P = 0.012$)；*GRO1* 的向上調控和病人年齡小於 65 歲的大腸直腸癌有統計相關 ($P = 0.010$)；此外，*GRO1* 的基因表現愈強，大腸直腸腫瘤的侵襲性及惡性程度有愈低的傾向 (傾向乃指 $0.05 < P < 0.1$)—即血中 CEA level 愈低、淋巴轉移愈少、Dukes' stage 愈早期 (P 值分別為 $P = 0.058$ 、 $P = 0.060$ 、 $P = 0.075$)。最後，我們也將 20 個基因在 31 組樣本中的 mRNA levels 利用統計學的迴歸分析兩兩互相進行統計檢定，期望找出 20 個基因之間那些基因在基因表現上相關。結果發現，*HNRPA1* 和 *c-MYC* 這兩個基因的基因轉錄強弱存在非常緊密的統計相關 (相關係數 $r = 0.948$)。本研究第一部分的結論如下：(1) 利用另外一種獨立的實驗方法來驗證 DNA 微陣列實驗的結果是必要的。(2) 利用統計學的相關分析可以找到和腫瘤生物行為以及臨床病理因子相對應的基因。

2005 年 Batlle 等人提出基因剔除小鼠的活體證據證明 *Ephb3* 是腫瘤抑制基因。同一組研究學者於兩年後又提出證據證明 EphB 是藉由一種新的機轉—EphB 媒介之腫瘤隔離作用 (EphB-mediated tumor compartmentalization) 來達到抑制腫瘤生長的效果。然而，是否還有其他因素能夠促成 EphB 媒介之腫瘤抑制作用則尚未有人報導。另一方面，Eph 家族中的 EphA4/ephrin-A 以及 EphB4/ephrin-B2 分子訊息已經被證實能夠促進間質上皮轉換。因此，我們假設 EphB3/ephrin-B 分子訊息也會有類似的作用，並且臆測此一作用能夠抑制腫瘤生長。在研究的第二部分，我們首先檢視大腸直腸癌病人腫瘤樣本中 EphB3 的表現狀態。我們發現 EphB3 基因的表現在整體上是高於正常大腸黏膜組織，但是如果將 36 組樣本依照腫瘤惡性程度分成 Dukes' stages B, C 和 D 三組，就會發現：早期未擴散的大腸直腸癌 (即 Dukes' B) 腫瘤組織有很高的 EphB3 基因表現，而局部擴散的大腸直腸癌腫瘤 (Dukes' C) 以及遠處轉移的大腸直腸癌腫瘤 (Dukes' D) 的 EphB3 基因表現都非常的微弱；這暗示 EphB3 在大腸直腸癌中扮

演腫瘤抑制基因的角色；此部分的臨床證據呼應了 Batlle 等人在 *Ephb3*^{-/-}; *Apc*^{Min/+} 基因剔除小鼠的實驗結果。接下來，我們將 EphB3 的表現質體轉染原本不會表現 EphB3 的 HT-29 人類大腸癌細胞株，並篩選出能夠持續表現 EphB3 的穩定細胞株。穩定細胞株可以同時表現 EphB3 receptor 以及其 ligands (wildtype HT-29 細胞本身即會表現 ephrin-B1 及 ephrin-B2 這兩種 EphB3 的 ligands)，所以 EphB3/ephrin-B 分子訊息在這些穩定細胞株是屬於同位交互作用 (interaction *in cis*)。分析這些穩定細胞株可以獲得和間質上皮轉換有關的細胞分子生物學證據。我們發現：持續表現 EphB3 能夠抑制 HT-29 細胞在培養皿平盤中的生長、在洋菜凝膠之中的懸浮生長，以及在裸鼠身上異種移植的腫瘤生長，並且誘發形態學、細胞行為以及分子傳遞訊息三個層面的變化，而這些變化都符合間質上皮轉換的條件。更專一的描述如下：持續表現 EphB3 能夠重組細胞骨架，包括將細胞的形態由伸展狀的外形變成上皮細胞的鵝卵石狀、構築細胞膜下層狀的肌動蛋白骨架 (cortical-actin-cytoskeleton)，以及極化細胞膜上的 E-cadherin 和 ZO-1 分子。持續表現 EphB3 也會誘發細胞功能的改變，包括降低細胞的爬行能力、增加細胞的凋亡，以及增加依賴鈣離子的細胞—細胞間黏合力；顯然的，這些功能上的改變皆有利於間質上皮轉換。持續表現 EphB3 還可以減少間質細胞的分子標記 (降低 fibronectin 以及 nuclear β -catenin)，增加上皮細胞的分子標記 (包括 ZO-1, E-cadherin 以及 plakoglobin)，並且將能夠促進上皮間質轉換的已知分子路徑 Crk—Rac1 pathway 去活化。最後，我們發現：持續表現 EphB3 可以透過 Wnt 分子路徑增加 ZO-1 的表現，進而幫助建構細胞之間的 tight junction。已知細胞之間 tight junction 的形成步驟是間質上皮轉換的最後一個環節，此步驟和 adherens junction、desmosome 以及 cortical-actin-cytoskeleton 的形成代表了細胞極化程式的執行完畢，是上皮細胞分化終點的一項指標。

值得注意的另外一個事實就是，這些促進間質上皮轉換的因子同時也扮演著抑制腫瘤生長的角色，而這種角色的重疊也就是間質上皮轉換參與腫瘤抑制作用的證據。本研究第二部分的結論如下：(1) EphB3/ephrin-B 分子訊息藉由重建上

皮細胞與細胞間的連接來促進間質上皮轉換，而此種間質上皮轉換的促進作用同時也促成了 EphB3 媒介的腫瘤抑制作用。(2) 活化 EphB3/ephrin-B 分子路徑能夠抑制大腸直腸癌的生長，EphB3 receptor 有潛力成為大腸直腸癌標靶治療的分子標地。

關鍵字：大腸直腸癌，向上調控基因，臨床病理因子，cDNA 微陣列實驗，微陣列實驗結果之再確認，定量 RT-PCR，EphB3，ephrin-B，間質上皮轉換，腫瘤抑制基因



英文摘要

Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer death in developed countries. Recently, targeted therapy has raised hopes for treating unresectable cancers, including colorectal cancer, more effectively with fewer side effects. Understanding the details of signaling transduction is prerequisite for development and clinical application of targeted therapy. The first part of this study aimed to find individual up-regulated genes responsible for clinicopathological variations in human colorectal cancer. The second part of this study aimed to disclose *EphB3* gene function. We provided evidence demonstrating that EphB3/ephrin-B signaling was able to promote apico-basal polarization and epithelialization (promote mesenchymal-to-epithelial transition) – a new role for EphB3 in the biology of the gut and cancer, and activation of such signaling has great potential for targeted therapy.

PART I. Clinical Correlates of Up-regulated Genes in Colorectal Cancer (A Forward or Classical Genetics Study)

We hypothesize that changes in the transcription of up-regulated genes are biologically meaningful and may be linked to variations in tumor behavior and clinical features.

Genes up-regulated concurrently in four microarray experiments were taken as candidate genes. Twenty candidate genes were verified using real-time RT-PCR in these 4 and another 27 pairs of samples. The presence or absence of up-regulation of these genes was correlated with ten clinicopathological variables from 31 patients. The mRNA transcript levels of these 20 candidate genes in the 31 paired samples were also correlated with each other to disclose any expression relationship.

40% (8/20) of candidate genes were verified by real-time RT-PCR to have a tumor/normal expression ratio > 2 . Up-regulation of *THY1* and *PHLAD1* was associated with the presence of anemia in colon cancer patients ($p=0.036$ and 0.009). Up-regulation of *HNRPA1* was more significant in cancer growing in the right sided colon than the left side ($p=0.027$). Up-regulated *GPX2* was related to a higher degree of tumor differentiation ($p=0.019$). *c-MYC* was significantly over-expressed in specimens from male rather than female colon cancer patients ($p=0.012$). *GRO1* was significantly up-regulated in patients younger than 65 years old ($p=0.010$) and was found to be frequently over-expressed when cancers were less invasive. In addition, we found normalized transcript levels of *HNPRA1* were tightly associated with that of *c-MYC* ($r=0.948$).

We conclude that validation of microarray data using another independent laboratory approach is mandatory and statistical correlation between gene expression status and patient's clinical features may reveal individual genes relevant to tumor behavior and clinicopathological variations in human colorectal cancer.

PART II. EphB3 Promotes MET and Suppresses Tumor Growth (A Reverse Genetics Study)

Receptor tyrosine kinase EphB3 is expressed in cells in the bottom of intestinal crypts near stem cell niches. Loss of *Ephb3* has recently been reported to produce invasive colorectal carcinoma in *Apc*^{Min/+} mice and EphB-mediated compartmentalization was demonstrated to be a mechanism suppressing colorectal cancer progression; however, it is unknown whether other factors contribute to EphB-mediated tumor suppression. EphA4/ephrin-A and EphB4/ephrin-B2 signaling have been reported to promote mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Here, we examine whether EphB3/ephrin-B interaction has a similar effect and investigate its role in tumor

suppression.

We found in a clinical cohort that EphB3 expression was significantly reduced in advanced Dukes' stage tumor specimens, so we over-expressed EphB3 in HT-29 cells by stable transfection. EphB3 over-expression inhibited HT-29 growth in monolayer cultures, anchorage-independent growth in soft agar, and xenograft growth in nude mice and initiated morphological, behavioral and molecular changes consistent with MET. Specifically, EphB3 over-expression reorganized cytoskeleton (converting spreading cells to a cobble-like epithelial morphology, patterning cortical-actin-cytoskeleton and polarizing E-cadherin and ZO-1), induced functional changes favoring MET (decreased Transwell migration, increased apoptosis and Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion), decreased mesenchymal markers (fibronectin and nuclear β -catenin), increased epithelial markers (ZO-1, E-cadherin and plakoglobin) and inactivated CrkL–Rac1, a known epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) signaling pathway. Additionally, crosstalk from Wnt signaling potentiated the restoration of epithelial cell-polarity. Noteworthy, the same factors contributing to MET, owing to EphB3 signaling, also facilitated tumor suppression.

We conclude that EphB3/ephrinB interaction promotes MET by re-establishing epithelial cell-cell junctions and such an MET-promoting effect contributes to EphB3-mediated tumor suppression.

Key words: colorectal cancer, up-regulated gene, clinicopathological factors, cDNA microarray, post-array validation, real-time RT-PCR, EphB3, ephrin-B, mesenchymal-to-epithelial transition, tumor suppressor gene

目 錄

論文口試委員審定書.....	i
誌謝與感恩.....	ii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	viii
博士論文內容	
第一章 緒論.....	1
1.1 研究背景	
1.2 研究動機	
1.3 研究的起始點	
1.4 研究的兩個階段	
1.5 研究的假說之一	
1.6 研究策略	
1.7 Eph 酪氨酸磷酸激酶受體家族簡介	
1.8 EphB3 protein 的組織學分佈以及已知的生理功能	
I. 消化道以外的組織	
II. 消化道	
1.9 研究的假說之二	
1.10 Eph 酪氨酸磷酸激酶受體參與間質上皮轉換的例子	
1.11 上皮間質轉換以及間質上皮轉換的定義	
1.12 上皮間質轉換的分子訊息傳遞路徑	
1.13 E-cadherin 是上皮間質轉換以及間質上皮轉換中的樞紐分子	
1.14 Wnt- β -catenin signaling pathway 是大腸直腸癌中最重要的分子訊息傳遞	
路徑	
1.15 上皮間質轉換在腫瘤生成所扮演的角色	

1.16 Crk adaptor protein 在上皮間質轉換以及致癌過程之中所扮演的角色

1.17 Rac1 在上皮間質轉換以及致癌過程之中所扮演的角色

1.18 Eph 磷酸激酶受體家族在癌變發生作用所扮演的角色

1.19 EphB2、EphB3 以及 EphB4 的腫瘤抑制作用

第二章 研究方法與材料..... 25

2.1 病人與臨床樣本

2.2 由組織樣本分離 total RNA

2.3 DNA 微陣列實驗

2.4 定量 RT-PCR 實驗

2.5 細胞株和細胞培養

2.6 EphB3 表現質體、細胞轉染、以及穩定細胞株的建立

2.7 細胞質細胞核分離，免疫沈澱法和西方墨點轉漬法

2.8 細胞免疫螢光染色以及雷射共軛焦顯微鏡實驗

2.9 細胞核內 β -catenin/TCF 活性的測定—報導基因表現分析實驗

2.10 RNA 干擾實驗

2.11 Rac1 活性試驗

2.12 Transwell 爬行試驗

2.13 E-cadherin-依賴性 (鈣離子-依賴性) 之細胞—細胞間黏著力強度的測量

細胞分離實驗

細胞凝聚實驗

2.14 細胞株於試管培養環境以及活體環境中之生長分析

培養皿培養下之生長分析

活體環境中之生長分析

2.15 細胞懸浮生長分析

2.16 細胞株於試管培養環境以及活體環境中細胞凋亡之偵測

培養皿培養環境下之細胞凋亡偵測

2.17 統計資料分析

第三章 結果..... 41

結果之第一部分 大腸直腸癌基因表現和臨床病理因子相關性之研究

- 3.1.1 本研究所蒐集並應用於分析的大腸直腸癌臨床案例及檢體是統計上的不偏樣本
- 3.1.2 Microarray 的實驗顯示，基因晶片上 8000 個基因的 Cy5 / Cy3 ratio 數值會構成一個常態分佈的曲線；而四個獨立 microarray 實驗共同篩選出來的向上調控基因，百分之四十可以通過 post-array analysis (定量 RT-PCR 實驗) 的再確認
- 3.1.3 將基因表現是否向上調控和病人或腫瘤有或沒有某項臨床病理特徵以統計學的卡方檢定或費雪氏精密檢定進行相關分析可以找出和腫瘤生物行為以及臨床病理因子變異有關的基因
- 3.1.4 迴歸分析顯示 *MYC* 和 *HNRPA1* 兩個基因的基因表現呈現強烈的線性正相關

結果之第二部分 正常大腸上皮組織和大腸直腸癌腫瘤組織中 EphB3 酪氨酸磷酸激酶受體 mRNA 及 protein 的表現以及其臨床意義之研究

- 3.2.1 組織免疫化學染色的研究結果顯示：在正常的大腸黏膜組織，EphB3 protein 僅分佈於大腸黏膜隱窩中未分化細胞的細胞膜，在已分化成熟的大腸上皮細胞並不表現此種細胞膜受體蛋白。另一方面，在大腸直腸癌腫瘤中，EphB3 protein 的表現呈現歧異的結果——從完全沒有表現到表現非常強烈皆有
- 3.2.2 EphB3 基因表現的臨床分子流行病學相關分析顯示：EphB3 在大腸直腸癌形成的早期扮演著腫瘤抑制基因的角色
- 3.2.3 在人類大腸直腸癌細胞株 HT-29 cells 建立穩定的 EphB3 over-expressing cell lines，持續表現 EphB3 的 HT-29 cells 可以產生

同位的 EphB3/ephrin-B 交互作用

結果之第三部分 EphB3/ephrin-B 分子訊息促進間質上皮轉換的細胞分子生物學證據

- 3.3.1 EphB3/ephrin 分子訊息引發細胞形態的變化符合間質上皮轉換的特徵
- 3.3.2 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘發之細胞內分子的重新分佈符合間質上皮轉換的特徵
- 3.3.3 EphB3/ephrin-B 分子訊息所引發的細胞行為改變符合間質上皮轉換的特徵
- 3.3.4 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘導的分子傳遞路徑以及分子生物學變化符合間質上皮轉換的特徵
- 3.3.5 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘導的分子傳遞路徑和 Wnt signaling pathway 之間的分子連繫
- 3.3.6 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠減弱間質細胞標記同時強化上皮細胞標記
- 3.3.7 EphB3/ephrin-B 分子訊息誘導間質上皮轉換在生物活體環境之分子生物學證據
- 3.3.8 利用 RNA 干擾技術在 L32 細胞株中敲除 EphB3 的基因表現能夠完全逆轉間質上皮轉換
- 3.3.9 利用 RNA 干擾技術在 LS174T 細胞株中敲除 EphB3 的基因表現能夠促進上皮間質轉換
- 3.3.10 利用 RNA 干擾技術在 HT-29 細胞株中敲除 EphB3/ephrin-B 的下游基因—CrkL 的基因表現能夠促進間質上皮轉換
- 3.3.11 EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑中調控 E-cadherin 的上游基因有待進一步的研究
- 3.3.12 EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑：一個初步的簡圖

結果之第四部分 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌的生長

- 3.4.1 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞生長的臨床證據
- 3.4.2 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞生長的 *in vitro* 證據
- 3.4.3 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞生長的 *in vivo* 證據
- 3.4.4 EphB3/ephrin-B 分子訊息促進大腸直腸癌細胞凋亡的 *in vitro* 證據
- 3.4.5 EphB3/ephrin-B 分子訊息促進大腸直腸癌細胞凋亡的 *in vivo* 證據

第四章 討論..... 63

- 4.1 在本研究的第一部分，我們將基因的向上調控和生物學表型（腫瘤生物行為以及臨床病理因子）進行統計相關分析，分析的結果可以告訴我們那些有用的資訊？
- 4.2 基因的 mRNA level 可以預測生物學表型 (phenotype) 嗎？—基因表現和生物學表型的統計相關研究可以指出下一步的研究方向以及可能的治療的分子標地
- 4.3 為什麼 EphB3 是在大腸直腸癌形成的早期扮演腫瘤抑制基因的角色？
- 4.4 Miao 等人對於 EphB3 分子訊息的研究著墨甚多，本研究之結果和 Miao 等人的實驗結果有何異同之處？
- 4.5 Eph/ephrin 這一對 receptor/ligand 的作用方式有兩種—同位交互作用以及異位交互作用，其間的差異為何？
- 4.6 上皮間質轉換或間質上皮轉換的研究報告愈來愈多，所提出來的證據也不盡相同，目前是否有公認的標準可以定義 EMT 或 MET？
- 4.7 為何本研究一再強調細胞接合黏著分子在 EphB3/ephrin-B 分子訊息中的重要性，尤其是 ZO-1 分子的角色？
- 4.8 在消化道中，EphB/ephrin-B 這一對 receptor/ligand 在細胞互斥現象以及共同表現於同一細胞這兩點上各有何生物學意義？
- 4.9 EphA2/ephrin-A1 分子訊息中有回饋抑制的作用，EphB3/ephrin-B 分子訊息可有類似之情形？

4.10 MET 參與腫瘤抑制作用的證據為何？哪些訊息傳遞分子同時扮演 MET marker 以及 tumor suppressor 之雙重之角色？

4.11 Noren 等人在乳癌 EphB4/ephrin-B2 分子訊息方面的研究和本研究有許多相似之處，其重要性為何？

4.12 Miura 等人在 EphA2 和 E-cadherin 調控的 cell-cell contacts 以及上皮細胞的極化這些方面的研究和本研究有許多相似之處，其重要性為何？

4.13 Cortina 等人最近提出腫瘤隔離作用，此為一嶄新的抑制腫瘤生長之機轉，其重要性為何？和本研究有何關聯？有何異同之處？

第五章 展望..... 87

5.1 本研究的結果在臨床醫學上提供了一個新的標靶治療的分子標地
兩種活化 EphB3 receptor 的方法：

I. 可溶性配位子

II. 激活性抗體

Eph receptor 作為治療標靶之策略在臨床應用上的限制以及其風險評估

5.2 本研究的結果在癌症研究方面提供了一個腫瘤間質上皮轉換的絕佳例子

5.3 本研究的結果確認腸隱窩一絨毛交接處之細胞同時表現 EphB/ephrin-B 在發育生物學上具有促進間質上皮轉換之功能

5.4 本研究的結果在臨床研究方法上提供了一個由 DNA 晶片實驗結果尋找研究標地的簡單策略

5.5 未來的研究方向

第六章 論文英文簡述..... 99

第七章 參考文獻..... 119

第八章 圖表..... 131

第九章 附錄..... 159

圖目錄

圖一、基因晶片上 8000 個基因的 Cy5/Cy3 ratio 數值構成一個常態分佈曲線

圖二、四個 DNA 晶片實驗中都呈向上調控的 29 個基因構成本研究中 post-array validation 的候選基因

圖三、八個通過 post-array validation 的基因的定量 RT-PCR 實驗結果

圖四、迴歸分析顯示 *MYC* 和 *HNRPA1* 兩個基因的基因表現呈現強烈的線性正相關

圖五、即使以正常組織的相關參數來標準化圖四的數據，*MYC* 和 *HNRPA1* 兩個基因的基因表現依舊呈現強烈的線性正相關

圖六、EphB3 protein 在正常大腸組織和大腸直腸癌腫瘤的表現—組織免疫染色實驗的結果

圖七、EphB3 mRNA 在正常大腸黏膜組織和大腸直腸癌腫瘤的表現—定量 RT-PCR 的實驗結果

圖八、EphB3 mRNA 在正常大腸黏膜組織和不同 Dukes' stages 大腸直腸癌腫瘤的表現—定量 RT-PCR 的實驗結果

圖九、在人類大腸直腸癌細胞株 HT-29 cells 建立穩定的 EphB3 over-expressing cell lines K6 & L32

圖十、相位差顯微鏡下可以清楚的看見持續表現 EphB3 的細胞株 L32 的細胞周邊有一層厚的透明帶狀區域

圖十一、EphB3/ephrin-B 分子訊息引發細胞形態的變化符合 mesenchymal-to-epithelial transition 的特徵

圖十二、EphB3/ephrin-B 分子訊息誘發細胞骨架的重組—F-Actin staining 在螢光顯微鏡下的影像

圖十三、圖十二的定量分析—93%的 L32 細胞株會失去細胞偽足以及延展的形態

而成為鵝卵石形狀的細胞

圖十四、EphB3/ephrin-B 分子訊息引起 E-cadherin 和 F-actin 的重新分佈及細胞膜上 E-cadherin 的極化

圖十五、EphB3/ephrin-B 分子訊息引起細胞內 β -catenin 的重新分佈—細胞質內的 β -catenin 明顯增多了

圖十六、EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠顯著的減低細胞的爬行能力—Transwell migration assay

圖十七、EphB3/ephrin-B 分子訊息對細胞—基質間黏合力沒有顯著的影響

圖十八、EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠強化細胞—細胞間黏合力—Cell dissociation assay

圖十九、EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠強化細胞—細胞間黏合力—Cell association assay

圖二十、EphB3/ephrin-B 分子訊息導致 Rac1 分子的去活化—Pulldown & Rac1 activity assay

圖二十一、EphB3/ephrin-B 分子訊息導致 CrkL 分子的去活化，增加 E-cadherin 的 protein level，並促使細胞核中的 β -catenin 及 γ -catenin 分子轉移到細胞質中—細胞核細胞質分離 & 西方墨點轉漬法

圖二十二、較多的 E-cadherin 分子能夠抓住較多的 β -catenin 分子—免疫沈澱實驗

圖二十三、EphB3/ephrin-B 分子訊息導致 β -catenin/TCF 活性的降低—報導基因表現分析實驗 (TOP/FOP luciferase reporter assay)

圖二十四、定量 Q-PCR 實驗的結果顯示：Ascl2 等八個已知為 β -catenin/TCF 分子傳遞路徑的下游基因不接受 EphB3/ephrin-B 分子訊息的調控

圖二十五、EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠增加 ZO-1 protein level 並促進細胞之間 tight junction 的形成以及驅動細胞的極化

圖二十六、EphB3/ephrin-B 分子訊息對三種間質細胞標記的影響：Fibronectin

有顯著降低，Vimentin 和 N-cadherin 則沒有改變

圖二十七、EphB3/ephrin-B 分子訊息誘導之分子變化—採自裸鼠身上腫瘤的活體
(*in vivo*) 證據

圖二十八、敲除 EphB3 的基因表現 (knockdown of EphB3) 能夠完全逆轉 L32 細胞的 mesenchymal-to-epithelial transition

圖二十九、在 LS174T 細胞株中敲除 EphB3 的基因表現能夠促進 epithelial-to-mesenchymal transition

圖三十、在 HT-29 細胞株中敲除 CrkL 的基因表現也能夠促進 mesenchymal-to-epithelial transition

圖三十一、在 EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑之中，*Twist*、*Slug*、*Snail*、*FOXC2* 和 *ZEB2* 均非調控 E-cadherin 的上游基因—定量 Q-PCR 的結果

圖三十二、EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑概要

圖三十三、EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞在培養皿平盤中的生長

圖三十四、EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞在 soft agar 中的懸浮生長

圖三十五、EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞在裸鼠身上的生長

圖三十六、EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制裸鼠身上大腸癌腫瘤細胞 Ki-67 proliferation marker 的表現

圖三十七、EphB3/ephrin-B 分子訊息誘發大腸直腸癌細胞的細胞凋亡—*in vitro* 的證據 (Trypan blue test)

圖三十八、EphB3/ephrin-B 分子訊息誘發大腸直腸癌細胞的細胞凋亡—*in vitro* 的證據 (Flowcytometry)

圖三十九、EphB3/ephrin-B 分子訊息誘發大腸直腸癌細胞的細胞凋亡—*in vivo* 的證據 (TUNEL assay)

圖四十、EphA2/ephrin-A1 以及 EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑都有類似但不盡相同的回饋抑制分子迴路 (feedback inhibition loops)

表目錄

表一、本研究所蒐集並應用於分析的大腸直腸癌臨床案例及檢體是統計上的不偏樣本

表二、四個 cDNA 微陣列實驗中都呈現向上調控的 29 個基因以及它們進行 post-array validation 的結果

表三、八個通過 post-array validation 的基因的定量 RT-PCR 實驗條件

表四、基因表現和臨床因子的列聯表相關分析，以 GRO1 基因為例

表五、本研究中所有和臨床病理因子在統計上有顯著相關的基因



第一章 緒論

1.1 研究背景

在現今的已開發國家，大腸直腸癌 (colorectal cancer, CRC) 一直名列癌症死因排名的前面幾名 (Kruzelock *et al.*, 2007)。在臺灣地區，癌症已經連續多年蟬連十大死亡原因的榜首，而大腸直腸癌在最近幾年已經成為臺灣地區繼肺癌以及肝癌之後排名第三的癌症死因 (死因統計公佈資料；行政院衛生署網站)。此外，臺灣地區大腸直腸癌的發生率也正在逐步的升高之中。

接受手術切除原發部位大腸直腸惡性腫瘤的病人，有超過一半以上病例的病理切片顯示癌細胞已經局部轉移到附近的淋巴結或者是遠距離轉移到肝臟、肺臟或是其他的器官。對於已經轉移而無法切除的癌細胞病灶，傳統上是給病人施予化學治療，然而化學治療不僅只有殺死癌細胞，還會以非選擇性的方式破壞正常細胞，因此，化學治療往往給病人帶來痛苦的副作用。近年來，癌症標靶治療 (targeted therapy) 的發展給予無法手術的癌症病患，包括大腸直腸癌，帶來了新的希望 (Kruzelock *et al.*, 2007)，而瞭解致癌過程的細胞訊息傳遞路徑 (signaling transduction pathway) 乃發展以及臨床應用標靶治療的先決條件。因此，任何能夠促進或是抑制腫瘤生長的細胞訊息傳遞路徑都值得深入研究，因為這些訊息傳遞路徑就是標靶治療的潛在分子標地。

1.2 研究動機

作者本身為消化系外科專科醫師，切除消化系統的腫瘤，包括大腸直腸癌，是常規的臨床工作。但是根據多年來的經驗以及觀察，作者深刻的體認到，外科手術僅能治療一部分的癌症病人。對於無法以外科手術切除的癌細胞，勢必要發展其他的治療方法。近年來，癌症的標靶治療在臨床上已經確實證明其療效，而發掘新的標靶治療分子標地也正在各先進國家如火如荼的進行之中。有別於實驗

室試管中培養的細胞株，臨床癌細胞腫瘤樣本包括了完整的腫瘤以及非腫瘤組織，因此含有癌細胞和宿主環境交互作用的重要資訊，能夠提供更接近於實際狀況、可應用於標靶治療的分子訊息傳遞知識。作者先前服務於署立醫院，屬於區域級教學醫院，雖然癌症病患的數目不如醫學中心那麼多，但是臨床上隨機蒐集到的原發病例 (primary cases) 可能更接近於所謂的不偏樣本 (本研究中有證實此點) — 即樣本之流行病學特徵和大腸直腸癌病例母群體 (指所有的大腸直腸癌病患) 相符。作者的研究動機起源於臨床工作，藉著研究臨床蒐集到的腫瘤樣本而跨入基礎研究的領域，並期望基礎研究的結果能夠成為臨床治療應用的根據。

1.3 研究的起始點

良性細胞會轉化成為癌細胞，主要是控制細胞生長和分化的基因表現發生錯亂，使得原本正常的細胞分裂和細胞分化不再受到控管。而研究癌變過程 (carcinogenesis) 的一個直接切入點就是比較惡性腫瘤細胞和鄰近正常組織細胞基因表現的差異。腫瘤愈惡性而某基因的表現量愈高通常暗示該基因可能是致癌基因 (oncogene)，相反地，在比較良性的腫瘤之中某基因的表現較強則暗示該基因可能是抑癌基因 (tumor suppressor gene)。

去氧核糖核酸微陣列分析 (DNA microarray) 是一種威力強大的實驗工具，近幾年來，無數的研究論文證實基因晶片(chip) 在推動生物醫學的進展方面功不可沒，此技術可以以高效率 (high throughput) 的方式直接找出癌細胞 (實驗組) 和正常細胞 (對照組) 之間表現差異的基因 (differentially expressed genes)，或是找出細胞株在以特殊實驗條件處理 (實驗組) 和不處理 (對照組) 之間表現差異的基因。隨著晶片硬體和微陣列資料分析軟體的進步，科學家現在可以憑藉此技術在短時間之內獲得龐大的數據資料作為後續研究的起始點。然而，如何在幾十個到數百個表現差異的基因之中挑選較具研究價值的目標基因 (target genes)，已經成為 DNA 微陣列實驗結束之後所有研究人員都要面對的課題。

1.4 研究的兩個階段

本研究的第一部分是屬於前期研究 (preliminary study)，目標鎖定在找出一些和大腸直腸癌相關的候選基因 (candidate genes) 以及確認基因 (confirmed genes)。我們的目的並不是要以基因表現的組合 (gene expression profiles) 去預測疾病的預後或是將腫瘤進行分子生物學的分類，而是要尋找並確認和癌變過程中相關的個別基因，從而發掘癌症標靶治療可能的新標地。

在研究的第二部分，我們將選擇一個標地基因 (target gene)，並且深入進行基因功能的研究 (functional study)，提出細胞分子生物學的證據，證明此基因的表現能夠促進或是抑制癌變過程。

因此，本研究的第一部分屬於分子流行病學類型之研究 (molecular epidemiology)，而第二部分則是綜合動物模式、細胞生物學以及分子生物學之研究，屬於因果關係的研究 (causal study)。第一部分是臨床醫師由臨床觀察的角度找出實驗室要研究的主題，而第二部分則是在實驗室由細胞分子生物學的角度證明此一分子標地在臨床上具有潛在的應用價值。

1.5 研究的假說之一

本研究第一部的進行乃基於以下之假說：向上調控基因其基因表現狀態 (以轉錄狀態 mRNA level 為基因表現量化的測量指標) 的改變具有生物學上的意義；也就是說，此一改變可以對應到腫瘤生物行為或是臨床特徵上的變異 (changes in the transcription of up-regulated genes are biologically meaningful and may be linked to variations in tumor behavior and clinical features)。

1.6 研究策略

在第一階段我們使用大腸直腸癌腫瘤組織和配對的正常大腸黏膜組織，進行互補去氧核糖核酸微陣列實驗 (cDNA microarray) 以便篩選出表現差異的基

因，然後再將個別基因是否向上調控和腫瘤是否出現十項臨床病理因子運用統計方法進行相關分析。個別基因之間基因表現的強弱程度也互相以回歸分析進行統計檢定以便找出細胞訊息傳遞路徑中可能的上下游基因。

在 cDNA 微陣列實驗中，我們使用來自於臨床外科手術的樣本 (surgical specimens) — 包括大腸直腸癌腫瘤組織和配對的正常組織，而不採用一般實驗室常用的細胞株 (cell lines)；理由是組織樣本較能夠反應出真實的腫瘤—微環境交互作用 (communication or interaction between tumor and surrounding microenvironment)，而此種腫瘤—微環境交互作用和相關之細胞分子訊息，在實驗室培養的細胞株 (只含單一細胞，缺乏腫瘤質塊中的血管細胞、基質細胞 stromal cells、腫瘤浸潤之免疫細胞、等等) 中是看不到的。然而，採用組織樣本也有其缺點：腫瘤質塊因為混雜了基質細胞，所以其異質性 (heterogeneity) 較高。

為了克服這個問題，我們採用一種簡單而且省錢的篩選策略來找出候選基因：先用少數 ($n \leq 5$) 的互補去氧核糖核酸微陣列晶片進行實驗，每一個晶片可以找到數百個表現差異的基因，為了將候選基因的數目減少到一個較小的數目，我們只挑選在每一個晶片上都呈現向上調控 (定義為 mRNA of tumor / mRNA of normal > 2) 的基因 (只要有一個晶片該基因不呈現向上調控即被剔除在候選基因的名單之外)。如此一來，表現差異的基因數目就只剩下數十個。

接下來，以符合統計學上大樣本數目 (large sample size, $n > 30$) 的臨床檢體，利用另外一種獨立的實驗技術 — 即時逆轉錄聚合鏈鎖反應 (real-time reverse transcription-PCR) — 來定量各個候選基因的 mRNA 在腫瘤質塊中相對於正常大腸上皮組織的相對含量。候選基因通過 real-time RT-PCR 的二次檢驗之後即成為“被確認的”大腸直腸癌向上調控基因 (confirmed up-regulated gene in colorectal cancer)，簡稱為確認基因 (confirmed genes)。

經確認為向上調控的基因在所有的樣本之中各有數組樣本並不呈現向上調控；我們發現，某基因沒有呈向上調控的那些腫瘤樣本，其腫瘤行為以及臨床特徵也不同於該基因呈向上調控的其他腫瘤樣本。我們將這些確認基因在所有樣本

中有或沒有向上調控和這些樣本各自的 10 項臨床病理因子合於某條件或不合於該條件，整理成列聯表，再利用統計學的卡方檢定或是費雪氏精密檢定進行相關分析。結果可以發現其中某幾個基因的向上調控與否可以對應到是否出現某特定腫瘤行為或是臨床特徵。

經過文獻回顧之後，我們選擇 EphB3 作為後續研究的標地基因。EphB3 是一種酪氨酸磷酸激酶受體 (receptor tyrosine kinase, RTK)，先前已知的酪氨酸磷酸激酶受體，例如上皮生長因子受體 (EGF receptor)，幾乎都有促進癌細胞生長的功能；但是，我們的臨床統計分析顯示 EphB3 似乎扮演著抑制大腸直腸癌生長的角色，故值得深入研究。

本研究的研究策略大致如下：由外科檢體取得大腸直腸癌組織和配對的正常大腸黏膜組織樣本 → 進行互補去氧核糖核酸微陣列實驗 → 篩選出候選基因 → 以定量逆轉錄聚合鏈鎖反應對微陣列實驗結果進行二次確認 → 通過二次確認實驗的即為確認基因 → 挑選一個標地基因，進行基因功能之研究 → 在低表現量的細胞株中持續表現標地基因以及在高表現量的細胞株中敲除標地基因的表現 → 觀察細胞以及分子生物層面的變化 → 對標地基因的生物學功能作出結論。

1.7 Eph 酪氨酸磷酸激酶受體家族 (Receptor tyrosine kinase Eph family) 簡介

Eph 是“產生紅血球生成激素的肝細胞癌 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma)”的縮寫，而命名的由來則是因為 Eph receptor 的 cDNA 最初就是由 erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell line 之中分離出來。現今已知 Eph family 是哺乳動物最大家族的 receptor tyrosine kinase family (Pasquale *et al.*, 2005)，而 EphB3 是 Eph 家族的成員之一。Eph receptors 最初是 1987 年在人類 cDNA library 中篩選病毒致癌基因 v-fps 的 tyrosine kinase domain 的同源序列時找到的 (Surawska *et al.*, 2004)。Eph family 依分子結構可以分為兩大類：EphA (包含 EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8)

以及 EphB (包含 EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB5, EphB6)。Eph 分子的細胞外結構是醣基化的 (glycosylated)，包括一個 ligand-binding domain (immunoglobulin-like motifs)、一個 cysteine-rich region、和兩個 fibronectin type III repeats。Eph 分子的細胞內結構包括一個 juxtamembrane domain 以及一個 tyrosine kinase domain (包含 sterile alpha motif [SAM], and PDZ binding motif [PSD-95 post-synaptic density protein, Discs large, Zona occludens tight junction proteins]) (Cheng *et al.*, 2002)。

EphA 和 EphB 是細胞膜上的受體，可以和它們結合的 ligands 分別叫作 ephrin-A 和 ephrin-B。ephrin-A 和 ephrin-B 也是位於細胞膜上的分子。Ephrin-A 分子是由 GPI (glycosylphosphatidylinositol) 固定於細胞膜上；ephrin-B 則是藉由分子本身穿過細胞膜而鑲嵌在細胞膜之上。研究發現，ephrin 分子和其結合受體 Eph 分子之間的特異性 (ligand-receptor specificity) 並非一對一的關係；例如，ephrin-B2 可以和 EphB2 結合，但是 ephrin-B2 也可以和 EphA4 結合。這種現象被稱之為 ephrin/Eph 的雜交特性 (promiscuity of ephrin-Eph interaction)。不過，大致上來說，大部分的 ephrin-A 還是和 EphA 結合而大部分的 ephrin-B 還是和 EphB 結合。

游離的 ephrin-A 和 ephrin-B 分子和 EphA 和 EphB receptors 互相結合時並不能活化這些酪氨酸磷酸激酶受體。唯有附著在細胞膜上的 ephrin (cell membrane-bound ephrin) 才能活化 EphA 和 EphB receptors 以及其下游的細胞分子訊息傳遞路徑。但是如果用抗體將游離的 ephrin 分子有效的聚合起來，叢聚的 ephrin (clustered ephrins) 也可以結合並活化 Eph receptors。

Eph receptor 和 ephrin 結合之後便會被活化，此時 Eph receptor 位於細胞內的部位會自我磷酸化 (autophosphorylation)，磷酸化的分子區塊 (domain) 會和特定的訊息承接蛋白 (adaptor protein) 結合，再向細胞內傳遞分子訊息。細胞膜上的 Eph receptors 活化之後會形成聚合體，早期認為是形成二聚體 (dimerization)，後來發現聚合體可以是更多的 Eph receptors 聚合在一起 (high-order clusters)。研

究也發現，多聚合體和二聚體會向細胞內傳遞不同的訊息；細胞訊息活化時 Eph receptors 的聚合體形成作用似乎和活化 Eph receptors 時 ephrins 必需叢聚的現象互相對應 (Stein *et al.*, 19988)。

和 Eph receptor 結合之後，位於細胞膜上的 ephrin 也會向細胞內傳遞訊息。由 Eph receptor 往其下游傳遞的分子訊息稱之為正向訊息 (forward signals)，由 ephrin ligand 往其下游傳遞的分子訊息稱之為逆向訊息 (reverse signals)。

早期對於 Eph family 的生物功能研究幾乎都集中於脊椎動物的胚胎發育，因為那時候科學家發現胚胎發育的分節 (segmentation)、後腦的發育等等都會有 Eph family 某些家族分子的參與。典型的 Eph/ephrin interaction 是引導 (guide) 神經細胞的移動或神經軸突的延伸 (此時 Eph receptors 往往位於 extending growth cone 或 leading filipodia or lamelipodia of a migrating cell 的表面上)，朝向組織環境中有 ephrin 的方向移動，此時的 ephrin 就是一種 guidance cue。有趣的是，當神經軸突或是移動的細胞 (細胞膜的前端有 Eph receptor) 遇見了 ephrin 之後，神經軸突的延伸或是細胞的移動的便會停止下來，形成一個不能跨越的界線。因此，先前的研究人員認為 Eph/ephrin 這一對 receptor/ligand 之間具有互斥作用 (repulsive interaction) (Nakamoto *et al.*, 2002)。

隨著研究的進展，科學家逐漸發現，Eph 磷酸激酶受體的生物功能其實非常的廣泛，在胚胎和成體的組織發育以及疾病的致病過程中調控著包括 cell proliferation, cell differentiation, cell migration, cell adhesion, neurogenesis (包括 axon guidance), angiogenesis...等過程的進行 (Pasquale *et al.*, 2005)。

自 1900 年代末期開始，Eph receptor 和癌症之間的關係開始受到人們的注意；因為研究學者發現，在很多癌症腫瘤中 Eph receptor 的表現量都異常的高。因此，最初幾年的報導皆認為 Eph receptor 有促進致癌作用的功能。然而，後來也開始出現一些刊登在極具盛名的科學期刊上的論文，報導 Eph receptor 有抑制癌細胞生長的功能。因此，在癌症方面扮演腫瘤抑制及腫瘤促進的双重角色 (dual role of Eph receptor in tumor promotion and tumor suppression) 使得 Eph receptor

的生物學功能變的撲朔迷離，也更難加以解釋。但是隨著愈來愈多證據的出現，此種腫瘤抑制及腫瘤促進双重角色的謎底終於被揭露，最近已經有學者提出可以同時解釋這兩種完全相反現象的分子模式 (Chen *et al.*, 2008)，其中的關鍵就在於是 ligand-dependent 或是 ligand-independent Eph signaling，前者是在沒有和 ligand 結合的情況之下，Eph receptor 的內在活性 (intrinsic activity) 透過影響其他的 receptor tyrosine kinase 而活化 MAPK 或是 RhoA 分子路徑來增加細胞的增殖和運動能力；後者是在和 ligand 結合的情況之下，Eph receptor 藉由活化 Abl—Crk 分子路徑，或將 MAPK 或是 RhoA 分子路徑去活化，以及穩定細胞—細胞間的黏合力而達到腫瘤抑制的效果。此點將會在本論文的 4.3 小節中再次提及。

1.8 EphB3 protein 的組織學分佈以及已知的生理功能

I. 消化道以外的組織：

因為 receptor tyrosine kinase Eph family 廣泛的分佈於各種組織，故一般推測 EphB3 receptor 於各種組織的分佈應該也相當的廣泛。雖然有人曾經報告 EphB3 在肺、腦、胰臟、肝臟、胎盤、腎臟、骨骼肌和心臟組織有基因表現 (Bohme *et al.*, 1993)，但是目前在消化道以外的器官，只有在神經系統 [包括脊椎 (Willson *et al.*, 2003) 以及大腦 (Willson *et al.*, 2006)] 有學者曾經對 EphB3 protein 的組織學分佈作過深入的研究；在神經系統和消化道之外的其他器官，EphB3 protein 的組織分佈還有待進一步的研究。

在神經系統的相關研究顯示，EphB3 和其 ligand 在胚胎發育的過程中以及成年個體神經受到損傷之後的修復過程中扮演著軸突導引分子 (axon guidance molecule) 的角色，其中又以神經受損之後所扮演的角色尤其引人注意。許多科學家利用切斷視網膜神經節細胞的軸突 (RGC axon, retinal ganglion cell axon) 的模式來研究成年個體神經受損之後的修復過程。視神經在胚胎發育的過程中是由間腦 (diencephalons) 向外突出逐漸發育形成，故屬於中樞神經，外面包裹的是中樞神經系統的寡突細胞，而非週邊神經系統的許旺氏細胞。

長久以來，視神經的損傷因為是屬於中樞神經的損傷，一直被認為是無法加以修復的；但是近幾年來的一些研究顯示，視網膜神經節細胞軸突被切斷之後，受損的軸突確實有進行修復的動作產生。研究人員發現，完整的視網膜神經節細胞不會表現 EphB3，但是被切斷軸突之後，視網膜神經節細胞就會開始表現 EphB3 (Liu *et al.*, 2006)。試管中的實驗顯示，EphB3 會幫助軸突的再生，活體中的實驗亦顯示，在缺少一個 EphB3 同位基因 (allele) 以及兩個 EphB3 同位基因都被剔除的實驗小鼠，視網膜神經節細胞軸突被切斷之後的軸突再生作用皆大幅度的減低。此外，在視神經軸突被切斷之後聚集到神經損傷處的巨噬細胞也能夠表現 EphB3，巨噬細胞製造的 EphB3 不但可以幫助視神經軸突的再生，也扮演著軸突導引分子 (axon guidance molecule) 的角色，因為巨噬細胞製造的 EphB3 會誘使受損的網膜神經節細胞表現 ephrin-B3，而 ephrin-B3 是 EphB3 的 ligand，會帶領著軸突往 EphB3 分子聚集之處延伸。

II. 消化道:

EphB3 receptor 在腸道僅分佈於特定的位置。運用免疫組織染色技術可以發現：只有在腸道隱窩 (intestinal crypt) 接近底部兩側邊的細胞會表現 EphB3 receptor。目前已知腸道隱窩底部附近的細胞是細胞分裂活躍但是還未進行細胞分化的腸始祖細胞 (intestinal progenitor cells)，一般相信腸道幹細胞即位於此幹細胞棲所 (stem cell niche)。因此，EphB3 protein 是分佈於正常腸道黏膜組織的隱窩—絨毛軸最下端靠近幹細胞的細胞增殖區細胞 (cells in proliferative region in the bottom of crypt-villus axis near stem cell niche) 的細胞膜上。

更有趣的是，這個細胞膜接受體分子的 ligands (指 ephrin-B1 及 ephrin-B2) 卻是分佈於隱窩—絨毛軸的另一端 (上半段以及頂端) 細胞的細胞膜上，而這些位於隱窩—絨毛軸上半段的細胞正在進行細胞分化轉變成腸道上皮細胞 (ephrin-B1 and ephrin-B2 are expressed in cells in differentiating region in the upper half of crypt-villus axis)。和 EphB3 分子結構最接近的同一家族受體 EphB2 的表現量，從隱窩—絨毛軸的底部向上到頂部，呈現梯度狀的遞減，而 ephrin-B1 及

ephrin-B2 的表現量則是由隱窩－絨毛軸的底部向上到頂部呈現梯度狀的遞增；也就是說，EphB2 及其 ligands (ephrin-B1 和 ephrin-B2) 的表現量是以相反的濃度梯度方式 (counter-gradient distribution) 分佈於隱窩－絨毛由下而上，或著是由上而下的縱軸 (Batlle *et al.*, 2002) (Booth *et al.*, 2002)。此種分佈的形態頗為特殊：即 receptor 及 ligand 在隱窩－絨毛軸各佔據下半段以及上半段，位置互補。

Receptor 和 ligand 在組織中的特殊分佈暗示可能有特殊的分子調控機制，而其中潛藏的秘密已經被 Batlle 等人所破解 (Batlle *et al.*, 2002)。Batlle 等人使用 microarray 來研究 β -catenin/TCF 的下游基因時發現，ephrin-B1 和 EphB2 以及 EphB3 同樣都是 β -catenin/TCF 的下游基因，但是確受到 β -catenin/TCF 完全相反的控制：當 β -catenin/TCF-4 (細胞核內的 transcriptional activator complex，能夠活化並起動其它的下流基因) 呈現“開啟”的狀態下，EphB2 及 EphB3 也會被“開啟”，但是 ephrin-B1 則會被“關閉”，此時細胞會表現 progenitor cells 的 phenotypes (Wetters *et al.*, 2002)；此一狀況發生在隱窩－絨毛軸的下半段。另一方面，當 β -catenin/TCF-4 呈現“關閉”的狀態下，EphB2 及 EphB3 也會被“關閉”，但是 ephrin-B1 則會被“開啟”，而此時細胞會表現 differentiated cells 的 phenotypes；此一狀況則是發生在隱窩－絨毛軸的上半段。換句話說，EphB2/3 及 ephrin-B 這一對 receptor/ligand 的表現是互斥的 (因為它們的上游總開關 β -catenin/TCF 就以互斥的方式表現這一對 receptor/ligand)，而此一基因表現的互斥現象剛好和它們在腸道隱窩－絨毛軸上的地理分佈各據一方 (EphB2/3 在腸道隱窩絨毛軸的下半段，即 proliferative region，而 ephrin-B 分佈於腸道隱窩絨毛軸的上半段，即 differentiating region) 的現象互相吻合。Batlle 等人進一步將 EphB 和 ephrin-B 這種分子分佈的 counter-gradient 現象解釋成這兩種分子之間具有互斥作用 (mutual repulsion of EphB and ephrin-B)；他們認為，表現 EphB 和表現 ephrin-B 的細胞會互相排斥，而這種細胞的互相排斥作用提供了維持腸道隱窩－絨毛軸組織架構的力量；然而，此種互斥作用的本質究竟是什麼，到目前為止並不清楚。

Batlle 的同事 Cortina 等人在隨後發表的論文之中也以試管中的實驗證實了這種細胞之間互相排斥的現象 (Cortina *et al.*, 2007)，但是，他們在深入的研究之後發現：表現 EphB 的細胞和表現 ephrin-B 的細胞之間並不是真的互相排斥，而是表現 EphB 的細胞其細胞和細胞之間的黏著力大幅度的增加，造成表現 EphB 的細胞自動的聚集並黏聚在一起；在如此的情況之下，表現 ephrin-B 的細胞就被動的被排擠到表現 EphB 的細胞團塊之外，造成一個細胞之間互相排斥的假象。

雖然 Batlle 等人以及 Cortina 等人在腸道中對 EphB(+)細胞和 ephrin-B(+)細胞的研究已經多所著墨，然而，一個直觀、基本、也很重要的問題卻仍然沒有答案。任何人都會有這樣的疑問：receptor/ligand 在生物界的基本功能應該是用來互相結合，藉此活化其下游的細胞分子訊息才是，用差異表現 receptor/ligand 來互相“排斥”細胞，應該是屬於 receptor/ligand 的另類特殊功能。

的確，在隱窩—絨毛軸的中段，即隱窩—絨毛交界處 (crypt-villus junction) 附近少數的過渡型細胞在同一細胞中會同時表現 EphB2 以及 ephrin-B，此點已經由共軛焦螢光顯微鏡下的觀察而獲得證實。Receptor 沒有和它的 ligand 結合，就沒有下游的細胞訊息。在腸道隱窩—絨毛軸中段的細胞會同時表現 (co-express) 這一對 receptor/ligand，必然有其極為重要的生物學意義存在。

由於在腸道隱窩—絨毛軸底端的 progenitor cells 是類間質表型 (mesenchymal-like)，在腸道隱窩—絨毛軸頂端的 differentiated cells 是上皮表型 (epithelial-like)，而 EphB/ephrin-B co-expression (有 co-expression 才有 receptor 和 ligand 的結合，也因此才會產生 EphB/ephrin-B 分子訊息) 又發生在此準間質上皮轉換 (quasi-mesenchymal-to-epithelial transition) 的過程之中，而非過程的開始或是結尾；因此我們可以合理的猜測 EphB/ephrin-B signaling 的一個生物學功能就是促進腸道隱窩細胞的間質上皮轉換。因此，運用細胞株來研究 EphB/ephrin-B 分子訊息對於腸道隱窩—絨毛軸細胞的影響便成為本研究第二部分的重點。

1.9 研究的假說之二

EphB3/ephrin-B 分子訊息在消化道一個重要的生物學功能是促進腸道隱窩細胞的間質上皮轉換；EphB3/ephrin-B 分子訊息也能夠促進大腸癌細胞的間質上皮轉換，而此一作用使得 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠抑制腫瘤的生長。

1.10 Eph 酪氨酸磷酸激酶受體 (Receptor tyrosine kinase Eph) 參與間質上皮轉換 [mesenchymal-to-epithelial transition (MET)] 的例子

已知 Eph family 參與 MET 的例子有兩個。第一，Barrios 等人曾經報告在斑馬魚的胚胎發育過程中，EphA4/ephrin-A 分子訊息負責調控體節形態發生 (somite morphogenesis) 的過程中的間質上皮轉換 (Barrios *et al.*, 2003)。第二，Noren 等人的研究提供了一個 EphB4/ephrin-B2 分子訊息促進間質上皮轉換的間接線索：Noren 等人在培養中的良性乳腺上皮細胞 (non-transformed mammary epithelial cells) 中加入 EphB4 Fc 或是一種會和 EphB4 receptor 結合的 peptide 去阻斷這些細胞膜上原本就存在的 EphB4/ephrin-B2 binding，造成這些細胞失去原有的 EphB4/ephrin-B2 分子訊息 (Noren *et al.*, 2006)。結果這些喪失了 EphB4/ephrin-B2 分子訊息的細胞也喪失了原有緊密的細胞-細胞連接 (cell-cell junction)。Noren 的實驗指出，活化的 EphB4/ephrin-B2 分子訊息能夠維持上皮細胞的 epithelial phenotype (指緊密的細胞-細胞連接)。

Eph family 參與間質上皮轉換的這兩個例子，使我們相信屬於同一分子家族的 EphB3/ephrin-B 分子訊息應該也會有同樣的作用。

1.11 上皮間質轉換以及間質上皮轉換 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT, and mesenchymal-to-epithelial transition, MET) 的定義

所謂的“上皮間質轉換 (EMT)”指的是細胞在胚胎發育過程中進行的一個轉變步驟 (cells undergo a developmental switch)：已特化具方向性 (polarized) 且細胞之間緊密結合、不會移動爬行 (immotile) 的上皮細胞轉變成不具方向

性、細胞間分散，結合鬆散且具爬行能力的間質細胞 (fibroblastoid or mesenchymal phenotype)。這種細胞轉變的目的是為了要使細胞獲得遷移能力，使之能夠移行至特定的地點去完成它們的特殊任務。任務乃指間質細胞進行再分化、轉變成特化的上皮細胞，形成功能性的組織和器官，也就是細胞再進行EMT的逆轉步驟—MET (Boyer *et al.*, 2000)。EMT的現象指出上皮細胞存在可塑性 (epithelial-cell plasticity)。此外，EMT以及MET不是只有在胚胎發育過程中才有，在成熟的個體也隨處可見；例如，幹細胞或始祖細胞 (progenitor cells) 移行至定點進行分化以修補受損的組織也是一種MET的過程。

上皮細胞以及間質細胞生物學特徵 (phenotypes) 的比較

	Epithelial cells	Mesenchymal cells
Proliferation	No	Yes
Differentiation	Yes	No
Morphology	Cobble-stone	Elongated, spreading
Lamellipodia	No	Yes
Cell motility	Non-motile	Highly motile
Cell-cell junction	Tight	Loose
Polarization	Yes	No
Molecular marker	E-cadherin, ZO-1	Vimentin, N-cadherin
Example	Interstitial epithelial cells	Fibroblast

1.12 上皮間質轉換 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 的分子訊息傳遞路徑

促進上皮間質轉換的分子訊息傳遞路徑已經逐漸的被揭露，這些分子訊息主

要來自於一些生長因子接受體或是自泌素/旁泌素 (autocrine/paracrine factors, 指分泌至細胞外的短距離游離訊息分子) 的刺激。

為了證實某些分子是關鍵性的上皮間質轉換促進分子並確立其因果關係, 科學家培育了很多的基因轉殖小鼠過度表現這些分子, 或是在試管培養的細胞株中過度表現這些分子, 然後在基因轉殖小鼠或培養的細胞株中觀察是否有上皮間質轉換的細胞分子生物學證據出現。

在這些能夠促進上皮間質轉換的分子路徑中, 研究的最為透澈的就是 TGF- β signaling (Massagué *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 2005)。和大腸直腸發育以及大腸癌致癌過程相關的 Wnt signaling 也已經被證實能夠促進上皮間質轉換。其它能夠促進上皮間質轉換的分子訊息傳遞路徑還有 Notch signaling 以及 Hedgehog signaling, 等等。不同的上皮間質轉換分子路徑之間也存在某一些分子聯繫 (molecular crosstalk); 隨著這些分子聯繫的發掘, 上皮間質轉換分子訊息傳遞路徑之間的網絡 (network) 已經儼然成形。(Kiemer *et al.*, 2001; Jechlinger *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 2007)。

這些和上皮間質轉換分子訊息相關的生長因子接受體、自泌素、旁泌素, 本身則是受到更上一層的調控, 這些更上游的調控來自於細胞核內的基因表現調控分子, 也就是一些轉錄因子 (transcriptional factors), 例如 NF- κ B, GSK-3 β , STAT3, LIV-1, 等等。所以這些轉錄因子也被視為上皮間質轉換的調節因子 (EMT regulators) (Huber *et al.*, 2005)。

1.13 E-cadherin 是上皮間質轉換以及間質上皮轉換中的樞紐分子

前面已經提到了上皮間質轉換的定義, 但是在實際層面上要如何去界定細胞是 epithelial 或是 mesenchymal (or fibroblastoid) 呢? 前面的表列 (1.11 小節) 中已經比較了 epithelial 和 mesenchymal 的 phenotypes, 其中最重要, 也是目前公認的上皮細胞分子標記就是細胞間的黏合分子 E-cadherin。

E-cadherin 是一種跨越並鑲嵌在細胞膜上的分子, 能夠以其細胞膜外的 Ig

domain 和鄰接細胞的 E-cadherin 分子的細胞外的 Ig domain 以 Ca^{2+} -dependent 的 homophilic interaction 交互作用方式互相結合。在細胞膜的內側，E-cadherin 則是靠著 α -catenin 以及 β -catenin 和細胞骨架分子 actin 相連結。

無數的證據已經顯示，當 E-cadherin 分子被向下調控之後（向下調控可能是因為 E-cadherin 的基因表現下降，或是 E-cadherin 分子不穩定—被 endocytosis 吞入細胞內，或者被 MMPs 等酵素所分解），細胞即會進行上皮間質轉換。另一方面，如果細胞有 E-cadherin 的增加和極化 (polarization) [通常 E-cadherin 分子會群聚在細胞膜側面靠近底端的位置 (basolateral membrane)]，細胞就會進行間質上皮轉換。

E-cadherin 之所以被認為是上皮間質轉換或是間質上皮轉換的主要程式設計師 (the master programmer of EMT or MET)，是因為促進上皮間質轉換或是間質上皮轉換的分子訊息傳遞路徑最後總是匯聚到 E-cadherin 的表現和/或功能的調控層次 (Guarino *et al.*, 2007)，而影響 E-cadherin 的基因表現和/或功能調控的機轉可以來自於兩大層面：genetic 或是 epigenetic。

細胞在喪失 E-cadherin 的功能之後，會產生以下幾項變化：細胞—細胞間黏合力的降低、細胞骨架的活化、細胞運動能力的增加、細胞外基質分解的增加。這些變化也完全符合上皮間質轉換生物學特徵上的變化。在分子的層面，E-cadherin 又是如何運作上皮間質轉換的進行呢？一般相信，E-cadherin 在喪失功能之後，原本和它結合的 β -catenin 分子就會由細胞膜的骨架上被釋放出來，成為細胞質中游離的 β -catenin 分子，游離出來的 β -catenin 分子會被送入細胞核內和其它 cofactors，例如 LEF/TCF，結合形成活化的轉錄因子複合物，再結合到某些下游基因的啟動子上啟動下游基因的表現。 β -catenin/TCF 的下游基因有很多，其中最重要的就是和細胞分裂、細胞分化相關的基因。由於 β -catenin 相當的重要，所以我們在下一小節中單獨來討論 β -catenin 分子的功能、地位以及所扮演的角色。

1.14 Wnt- β -catenin signaling pathway 是大腸直腸癌中最重要的分子訊息傳遞路徑

β -catenin 分子是 Wnt signaling pathway 中的主角。常久以來，各種研究報告均顯示： β -catenin 在細胞內的位置是決定細胞命運的一個重要因子 (intracellular distribution of β -catenin is a determinant of cell fate) (Reya *et al.*, 2005)。在幹細胞以及癌細胞中， β -catenin 分子主要是位於細胞核內，另一方面，在已分化的細胞中， β -catenin 分子則位於細胞核外，並和細胞膜上的 E-cadherin 結合在一起。細胞核外 β -catenin (cytoplasmic β -catenin) 的功能是作為細胞的骨架分子，此點已經無庸置疑。而細胞核內的 β -catenin (nuclear β -catenin) 的功能則是賦予幹細胞以及癌細胞去分化 (de-differentiation) 和/或癌化 (oncogenesis) 的生物特徵。

Wetering 等人的實驗使我們對於 nuclear β -catenin 如何控管細胞進行細胞分化有深入的瞭解 (Wetering *et al.*, 2002)。Wetering 等人在 LS174T 和 DLD-1 兩種大腸直腸癌細胞株中轉染可以誘導表現 dominant negative TCF4 (dnTCF4) 的表現載體，並取得穩定細胞株 (stable clones)。當加入 doxycycline 至培養基後，細胞便被誘導表現 dnTCF4 protein。dnTCF4 會取代正常的 TCF4 和 nuclear β -catenin 結合，dnTCF4/ β -catenin 為一喪失功能的 transcriptional activator complex，因此，TCF4/ β -catenin activity 被 “knockdown”。此變化一方面造成細胞分裂停止，使細胞週期停止在 G1 phase (G1 arrest)，另一方面也造成細胞開始進行分化。Wetering 等人證實，TCF4/ β -catenin activity 下降會造成 c-MYC 的向下調控，c-MYC 的向下調控則會釋放出活性的 p21，然後 p21 會誘導 G1 arrest 和 cell differentiation 的進行。Wetering 等人實驗的最大貢獻就在於證實 β -catenin/TCF4 分子訊息是腸道隱窩中的組織幹細胞調控細胞進行細胞增殖還是進行細胞分化 (proliferation or differentiation) 的主要開關 (master switch)。

除了調控細胞增殖/分化的功能之外， β -catenin 也是大腸直腸癌中最重要的致癌蛋白分子 (the master oncoprotein in colorectal cancer)，此點在許多論文中早已有深入的研究 (Clevers *et al.*, 2006)，故此處不再贅述。此外，nuclear β -catenin

也已經被證實和大腸直腸癌病人的臨床預後有統計上的顯著相關 (Wong *et al.*, 2004)。

1.15 上皮間質轉換在腫瘤侵襲作用所扮演的角色 (Role of EMT in tumor progression)

上皮間質轉換是正常的生理變化，而腫瘤形成 (tumorigenesis) 則是不正常的病理過程；然而，兩者都有非常多的相似共通點。所以早在上皮間質轉換的分子訊息傳遞路徑被揭露之前，不受調控的上皮間質轉換就被認為是造成腫瘤細胞擴散以及腫瘤侵襲能力提高的重要原因。我們將兩者生物特徵的相似點整理如下表：

上皮間質轉換和腫瘤侵襲作用共同的生物學特徵

Phenotypes	Epithelial-to-Mesenchymal Transition	Tumor Progression
Proliferation	increased	increased
Differentiation status	de-differentiation	de-differentiation
Cell morphology	spreading	spreading
Cell-cell junction	decreased	decreased
Cell motility	increased	increased

愈來愈多的證據顯示，促進上皮間質轉換的分子訊息傳遞路徑和促進腫瘤侵襲能力 (tumor invasion and progression) 的分子訊息傳遞路徑互相重疊。這暗示失去調控的上皮間質轉換的分子訊息將可以提高腫瘤的侵襲能力 (Thiery *et al.*, 2002)。最近幾年的研究發現，當腫瘤細胞在初始病灶進行上皮間質轉換，獲得轉移侵襲的能力並轉移至遠處器官之後，這些 mesenchymal-like cancer cells 會

再逆向轉變—即進行間質上皮轉換轉變成 epithelial-like cancer cells，然後再進行分裂增殖成為細胞間緊密接合的癌細胞團塊；也就是說上皮間質轉換和間質上皮轉換轉在某些癌細胞是一種可逆的過程 (Brabletz *et al.*, 2005; Hugo *et al.*, 2007)。上皮間質轉換讓癌細胞更容易進行轉移，而間質上皮轉換讓癌細胞在轉移抵達新大陸之後建立起它的殖民地。

1.16 Crk adaptor protein 在上皮間質轉換以及致癌過程之中所扮演的角色

Crk (CT10 regulated kinase) protein 是一種 adaptor protein，它是原致癌基因 (proto-oncogene) *Crk* 的蛋白質產物。*Crk* 的同源基因 *v-Crk* 最早是由鳥類肉瘤病毒 avian sarcoma virus CT10 (chicken tumor 10) 之中分離出來 (Mayer *et al.*, 1988)。近年來已經有許多研究報告指出 *Crk* 是促進上皮間質轉換的關鍵蛋白分子。Lamorte 等人報告，在 MDCK 細胞株中過度表現 *Crk* 之後，細胞膜下方緊密層狀的細胞骨架 “cortical-actin-cytoskeleton” 會消失，細胞形狀會變成延展狀 (cell spreading)，細胞邊緣也會產生細胞偽足 (lamellipodia)；除此之外，他們發現過度表現 *Crk* 也會造成 E-cadherin 和 β -catenin 由細胞膜骨架上解離下來 (Lamorte *et al.*, 2002)。利用 time-lapse analysis 技術追蹤偵測卵巢癌細胞株 MACS 中的 GFP-actin，Linghu 等人清楚的觀察到 *Crk* knockdown 會減少細胞的細胞偽足，使細胞的爬行移動變慢，也使得細胞在 soft agar 中的懸浮生長減少 (Linghu *et al.*, 2006)。Takino 等人在培養的神經膠質母細胞瘤 (glioblastoma) 細胞中也證實 *Crk* 能夠促進細胞的爬行移動以及細胞的侵襲能力 (Takino *et al.*, 2003)。Rodrigues 等人進一步證實 *CrkI* 和 *CrkII* 是癌細胞移行和侵襲能力的關鍵整合訊息分子 (Rodrigues *et al.*, 2005)。Noren 等人則證實了 EphB4/ephrin-B2 signaling 能夠將 *Crk* 磷酸化因此而將 *Crk* 去活化，他們並證實 *Crk* 去活化的狀態可以維持良性乳房上皮細胞 (non-transformed mammary epithelial cells) 的 epithelial phenotype (Noren *et al.*, 2006)。

1.17 Rac1 在上皮間質轉換以及致癌過程之中所扮演的角色

Rac1 是 Crk 的下游分子 (Lamorte *et al.*, 2002)。事實上，研究 Rac1 分子和上皮間質轉換之間的關係的科學論文遠多於 Crk。Rac1 是 Rho family 的成員之一，而 Rho family 又屬於 small GTPases of the Ras superfamily 的大分子家族。

在上皮間質轉換方面，Rac1 已經被證實能夠誘發上皮間質轉換的細胞學變化，包括分解 actin cytoskeleton (Iden *et al.*, 2008)，降低 cadherin-媒介的細胞－細胞間黏合 (cadherin-mediated cell-cell adhesion) (Fukata *et al.*, 2001)，促使上皮細胞極性 (apico-basal polarity) 的消失 (Iden *et al.*, 2008)，增加細胞偽足的形成 (Lamorte *et al.*, 2002；Miao *et al.*, 2005)，以及提升細胞的爬行能力 (Ridley *et al.*, 2001)。

在致癌作用方面，Rac1 在許多的癌症中有過度表現的情形，其中包括大腸直腸癌 (Ellenbroek *et al.*, 2008)。過去的研究已經證實 Rac1 不僅能夠誘導癌變發生作用 (initiate tumorigenesis)，也能夠增強腫瘤侵襲能力 (contribute to tumor progression)，以及抑制細胞凋亡 (Ellenbroek *et al.*, 2008)。

1.18 Eph 磷酸激酶受體家族在癌變發生作用 (carcinogenesis) 所扮演的角色

近年來快速累積的證據顯示，Eph family 對於腫瘤細胞的癌變發生作用也有廣泛的影響力；不過，此種影響力卻有兩種結果完全相反的報告。換句話說，一些研究顯示 Eph receptor tyrosine kinase 可以促進腫瘤細胞的癌變發生作用，而另一些則報導 Eph receptor tyrosine kinase 能夠抑制腫瘤細胞的癌變發生作用。

報導 Eph receptor 可以促進腫瘤細胞的癌變發生作用的研究論文，其主要證據幾乎都來自於對臨床腫瘤樣本 Eph receptor 的 mRNA 或 protein 表現程度的分析。這些作者指出，相對於正常的組織，他們研究的腫瘤樣本中 Eph receptor 的 mRNA 或是 protein 是過度表現的 (over-expressed)，因此他們認為 Eph receptor 會促進腫瘤細胞的癌變發生作用。例如 Stephenson 等人檢視了 10 個大腸直腸癌細胞株 EphB4 的 mRNA，發現在所有檢視的細胞株中 EphB4 都有表現，他們再

檢查 5 個大腸直腸癌病人的腫瘤和鄰近的正常大腸上皮組織的 EphB4 mRNA 和 protein 表現量，結果 EphB4 在腫瘤的表現都高於正常大腸直腸上皮組織。所以他們的結論是 EphB4 會促進大腸直腸癌的癌變發生作用 (Stephenson *et al.*, 2001)。

五年之後，Davalos 等人提出了類似的研究報告但是卻作出相反的結論。Davalos 等人指出大腸直腸癌病人腫瘤的 EphB4 愈高，病人的預後愈佳，存活率也愈高，他們的結論是 EphB4 會抑制大腸直腸癌的癌變發生作用 (Davalos *et al.*, 2006)。為何會有如此完全相反的結論呢？Stephenson 等人的研究因為樣本數太少 ($n = 5$) 以致於無法進行分層分析 (將樣本依腫瘤惡性程度分組，再分析不同組別樣本是否 EphB4 的表現量有所不同)。Davalos 等人用 125 個病人的樣本進行分層分析，以免疫染色的強度將腫瘤分成 EphB4 低表現以及 EphB4 高表現兩組病人，結果發現腫瘤 EphB4 表現量高的病人其腫瘤復發率較低，也有較佳的整體存活率，因此下結論說 EphB4 能夠抑制大腸直腸癌的癌變發生作用。

然而，在其他的癌症，還是有很多的文獻報告 EphB4 會促進癌變發生作用，例如乳癌 (Kumar *et al.*, 2006)、卵巢癌 (Kumar *et al.*, 2007)、子宮內膜癌 (Alam *et al.*, 2007)、前列腺癌 (Xia *et al.*, 2005)、膀胱癌 (Xia *et al.*, 2006)、間質細胞瘤 (Xia *et al.*, 2005) 以及頭頸部扁平細胞癌 (Yavrouian *et al.*, 2008)。一般推測有兩種可能的原因造成如此之結果。第一，EphB4 receptor 在沒有和其 ligand 結合的時候，本身就具有 ligand-independent signaling，而這一種 EphB4 本身就存在的 intrinsic activity 有促進癌變發生的作用。第二、EphB4 已經被證實有促進血管新生的作用，所以可能是 EphB4 的促進血管新生作用幫助了腫瘤的生長 (Noren *et al.*, 2007)。在小鼠身上進行人為分子突變的研究早就已經證實 EphB4，ephrin-B1 和 ephrin-B2 參與了胚胎發育中的血管生成作用 (vasculature)——和動脈血管，靜脈血管以及微血管的生成有關。

另外一個很好的例子則是由 Zelinski 等人所報導 (Zelinski *et al.*, 2001)。他們在一個未轉型的乳腺上皮細胞株 (non-transformed mammary epithelial cells) MCF-10A 中持續的過度表現 EphA2 protein，他們發現對照組的 MCF-10A 細胞

無法懸浮在在 soft agar 中生長，但是過度表現 EphA2 protein 的 MCF-10A 細胞卻可以。這表示 EphA2 over-expression 能將 MCF-10A 細胞由 non-transformed 轉變成 transformed cells。但是當加入可以和 EphA2 結合的 ligand (即 ephrin-A1) 之後，過度表現 EphA2 protein 的 MCF-10A 細胞能夠在在 soft agar 中懸浮生長的能力就減少了一半。此一事實表示，在沒有和 ligand 結合的情況下，EphA2 本身存在的內在活性 (intrinsic activity) 有促進癌變發生的作用，但是和 ligand 結合之後，EphA2/ephrin-A1 signaling 則會抑制腫瘤生長。如果 EphA2 本身就存在促進 tumorigenesis 的作用，那表示未磷酸化的 EphA2 也會向細胞內傳遞訊息。事實上，已經有人報告未磷酸化的 EphA2 可以和許多分子結合，這些分子包括 focal adhesion kinase (FAK), ephexin, AF6/afadin, Pick1, Syntenin 以及 Grip1 (Nakamoto *et al.*, 2002)，所以未磷酸化的 Eph receptor 的內在活性 (intrinsic activity) 確實是存在的，但是其本質尚待進一步的研究。

能夠在洋菜凝膠 (soft agar) 中進行懸浮式的生長 (anchorage-independent growth) 是癌細胞的生物學特性之一。FAK (focal adhesion kinase) 是賦予細胞懸浮生長能力的主要作用分子 (Xu *et al.*, 2000)。細胞質中游離的 FAK 固定到細胞膜上後 FAK 會被磷酸化並轉變成活化的 FAK 分子。Nakamoto 等人的研究指出 (Nakamoto *et al.*, 2002)，沒有和 ligand 結合的 EphA2 receptor (即未磷酸化、未活化的 EphA2 receptor) 能夠結合 FAK 並使之磷酸化 (因此而活化 FAK)，因而能夠賦予細胞懸浮生長的能力，並因此增加了細胞的惡性程度。另一方面，當 EphA2 receptor 和其 ligand 結合之後，磷酸化的 EphA2 receptor 便會釋放出 FAK，然後 FAK 游離到細胞質內轉變成去活化的 FAK，因此，細胞便失去了懸浮生長的能力，細胞的惡性程度也就跟著降低。

有人利用模仿 ephrin-A1 的單株抗體去和 EphA2 結合並藉此活化 EphA2 receptor (此種抗體一般稱之為 activating antibody)，結果腫瘤細胞的惡性程度降低了 (Carles-Kinch *et al.*, 2002)。Noren 等人利用 dimerized ephrin-B2 去和 EphB4 結合、藉以活化 EphB4 receptor，結果培養皿中的腫瘤細胞以及生長在免疫缺損

小鼠身上的腫瘤細胞的惡性程度都降低了 (Noren *et al.*, 2006)。這些例子告訴我們，以活化 Eph receptor 來抑制腫瘤生長的治療策略實際上是確實可行的。

1.19 EphB2、EphB3 以及 EphB4 的腫瘤抑制作用

2005 年至 2006 年，一共有三篇臨床分子流行病學的研究論文指出：愈惡性的大腸直腸腫瘤（腫瘤的 Dukes' stage 或是其他臨床病理指標愈惡性），其 EphB2 的表現量愈低。臨床數據也顯示，腫瘤 EphB2 表現量愈低的病人其長期存活率比 EphB2 表現量高的病人要差 (Jubb *et al.*, 2005; Lugli *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006)。這些報告間接的指出 EphB2 是一個腫瘤抑制基因。另一篇研究論文 (Alazzouzi *et al.*, 2005) 進一步指出：EphB2 promoter 的甲基化 (methylation) 是抑制 EphB2 這個腫瘤抑制基因表現的原因，因為研究人員發現，在大多數較惡性的腫瘤之中可以偵測到 EphB2 promoter 的過度甲基化 (hyper-methylation)。研究人員在原本 EphB2 表現量極低的大腸癌細胞株 SW620 的培養基中加入 DNA methyltransferase 的抑制藥物 5-aza-2'-deoxycytidine，結果 EphB2 promoter 上的甲基被移除，SW620 cells 也開始製造 EphB2。研究人員同時指出，腫瘤基因體的 microsatellite instability 是造成 promoter methylation 的原因。不久之後，又有報告指出，EphB4 在人類大腸直腸癌也扮演著和 EphB2 同樣的角色，而且來自於大腸直腸癌腫瘤樣本的分析，其中的 EphB4 promoter 也有過度甲基化的現象 (Davalos *et al.*, 2006)。雖然最近也有人報告在人類大腸直腸癌中，此類 promoter methylation 並不常見 (Wu *et al.*, 2007)，但是，腫瘤 EphB2 表現量少的病人其長期存活率比較差的事實仍然屹立不搖。

最關鍵性的研究則是 2005 年 6 月一篇刊載在科學期刊 “Nature” 上的短文 (letters) (Batlle *et al.*, 2005)；該論文作者將 *Ephb2* 或 *Ephb3* 基因剔除的小鼠和 *Apc*^{Min/+} 小鼠 [一種基因缺陷的小鼠，其腫瘤抑制基因 *Apc* 的兩個 alleles 一個是正常而另一個僅表現 *Apc* protein 非常微量，隨著小鼠成長，會在其成體的腸道長出良性的腺瘤 (adenoma)；研究大腸直腸癌的學者常將此種小鼠和某基因轉殖

或剔除的小鼠交配，再由其子代大腸直腸腫瘤的變化來推斷某基因是致癌基因或是抑癌基因] 互相交配，結果發現部分子代小鼠的大腸黏膜長出許多腺癌 (adenocarcinoma)。Batlle 等人並發現，隨著 *Ephb3* 剔除程度的增加，大腸黏膜長出腺癌的小鼠的比例也愈高 (percentage of mice bearing invasive carcinomas = 0% , 16%, and 47% in *Ephb3*^{+/+};*Apc*^{Min/+}, *Ephb3*^{+/-};*Apc*^{Min/+}, and *Ephb3*^{-/-};*Apc*^{Min/+} mice)。該篇研究提供了最堅強的活體實驗證據 (*in vivo* evidence) 證實 “ EphB2 和 EphB3 是大腸直腸癌的抑癌基因 ” 之因果關係 (causal effect)。然而，到目前為止，並沒有文獻報告 EphB3 receptor 在大腸直腸癌腫瘤臨床樣本的表現情形，因此，本研究即將對此一部分作資料的補充。我們分析了 30 多個大腸直腸癌腫瘤樣本，我們發現雖然在所有的樣本中，EphB3 的平均表現量比正常大腸上皮組織要高 (比例大於兩倍)，但是如果將這些樣本依其惡性程度的不同加以分組，我們發現，在比較惡性的大腸直腸癌腫瘤其 EphB3 的表現程度顯著的降低。綜合我們的臨床數據以及來自於 EphB3 基因剔除小鼠的證據 (Batlle *et al.*, 2005)，幾乎可以確定 EphB3 在大腸直腸癌是扮演腫瘤抑制基因的角色。然而，究竟 EphB3 分子訊息如何抑制腫瘤生長到目前為止仍然不是非常的清楚。因此，運用細胞株進行研究以找出 EphB3 分子訊息抑制腫瘤生長的機轉，便成為本研究第二部分的目標。



第二章 研究方法與材料

2.1 病人與臨床樣本 (Patients and clinical samples)

本研究中的病人與臨床樣本來自於本文作者先前服務的署立豐原醫院以及目前服務的臺北縣立醫院。這些大腸直腸癌病人在這兩家醫院的外科接受手術切除大腸直腸惡性腫瘤。大部分外科手術是常規手術，少部分是急診手術。手術醫師為作者本人或是該院外科的同事。本研究中的所有臨床樣本都是由作者本人所採集。每位病人都有一對樣本，包括腫瘤組織以及鄰近的正常大腸黏膜組織。採集方法是將手術切下來的組織立即用水清洗乾淨，然後用手術刀切下腫瘤組織以及鄰近的正常大腸黏膜組織（一般大腸直腸惡性腫瘤手術的廓清範圍包括了腫瘤本身和其前後相連的正常大腸組織，以及這些組織之淋巴及血管引流範圍內的腸繫膜），切下來的新鮮組織立刻用 -196°C 液態氮予以瞬間冷凍 (snap-frozen)，然後馬上冷藏於 -85°C 冰箱。

有下列情況之樣本即不予以採用（樣本之 exclusion criteria）：(1)組織樣本的重量 $< 500\text{ mg}$ ，(2) 腫瘤和相鄰的正常大腸黏膜之間界線不清楚的腫瘤組織（腫瘤組織有摻雜正常組織之可能），(3)組織被切下離開病人身體到組織用液態氮予以瞬間冷凍的時間 (warm ischemia) 超過 15 分鐘。每一位病人都有簽署“知情同意書 (informed consent)”，同意我們由其外科標本採取部分組織進行實驗室研究，而此採樣動作和整體研究計劃對於所有病人之大腸直腸癌手術及手術後的一切治療均無任何之影響。病人以及其腫瘤之臨床病理資料來自於病人之病歷、手術記錄以及病理報告。

2.2 由組織樣本分離 total RNA

將先前存放在 -85°C 冰箱的組織樣本置於盛有 -196°C 液態氮的研鉢中，然後磨碎成粉狀，接著加入TRIzol reagent (1 mL/50-100 mg tissue; Life Technologies

Inc., Gaithersburg, MD) 混合均勻，在20°C室溫下靜置15分鐘；此步驟之目的在使nucleoprotein complexes完全解離。接著加入chloroform (體積為TRIzol的五分之一) 並劇烈震盪試管 (chloroform會破壞蛋白質結構、使之去活性並將蛋白質沈澱於chloroform之中)，然後在4°C下以 $12000 \times g$ 離心10分鐘；此步驟之目的在使上下層分離：RNA會溶於上層的aqueous phase，蛋白質則溶於下層比重較重的chloroform (organic phase) 之中。離心完成之後，吸取上層的aqueous phase置於另外的試管之中，接著加入isopropanol (體積為TRIzol的二分之一) 並輕柔翻的轉試管使之混合，然後在20°C室溫下靜置10分鐘，接著在4°C下以 $12000 \times g$ 離心15分鐘；此步驟之目的在使RNA由 aqueous phase 中沈澱出來。吸去溶液之後，用75%的酒精沖洗貼在試管壁底部的RNA precipitate pellet，接著在4°C下以 $7500 \times g$ 離心5分鐘。然後吸走75%酒精並置於空氣中風乾，然後用diethyl pyrocarbonatetreated H₂O重新溶解 RNA pellet 成為 RNA solution。RNA solution平日都儲存於-85°C冰箱。用來進行 microarray 實驗之RNA樣本必須符合 total RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ > 1.6 之標準。

2.3 DNA 微陣列 (DNA microarray) 實驗

本研究採用取自四位病人的四組樣本 (一組樣本包括腫瘤組織以及鄰近的正常大腸黏膜組織) 所分離出來的 total RNA 進行四個獨立的 cDNA 微陣列實驗。首先利用 Dynal MPC-s kit (Dynal Biotech, Lake Success, NY) 將 mRNA 由 total RNA 之中分離出來，然後再用 Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Life Technologies) 將 mRNA 逆轉錄成為 cDNA；在此逆轉錄過程中也同時將腫瘤樣本 cDNA 加上 Cy5-之螢光分子標記，將正常組織樣本 cDNA 加上 Cy3-之螢光分子標記。然後將等量的 Cy5-labeled cDNA 及 Cy3-labeled cDNA 和購自 ABC (Asia BioInnovations Corporation, Taiwan) 公司的 cDNA 晶片 (Human UniversoChip 8k-1；含 8000 cDNA 片斷/每一晶片) 作雜化反應 (hybridization)。晶片上 Cy5-及 Cy3-的螢光強度分別由 GenePix 4000B Array Scanner (Axon Instruments, Union

City, CA) 進行掃描及記錄。DNA 晶片的資料則是由軟體 GenePix Pro 3.0.5.56 (Axon Instruments) 進行分析。藉由監控晶片雜化反應過程中之 signal-to-noise ratios，實驗品質得以獲得保證 [signal-to-noise ratios for the 635 nm = (F635Median-B635Median)/B635SD；signal-to-noise ratios for the 532 nm = (F532Median-B532Median)/B532SD]。初步的結果再用 Cy5-及 Cy3-之 labeling and detection efficiencies 加以標準化，最後得到 8000 個基因在 Tumor/Normal 表現差異之數據。如果某基因的 Cy5/Cy3 signal ratio > 2，該基因就被認定為向上調控基因 (up-regulated gene)。

2.4 定量 RT-PCR (Real-time Reverse Transcription-PCR) 實驗

本研究採用兩步驟的定量 RT-PCR 實驗：利用 Superscript preamplification system (Life Technologies) 將 2 µg 的 total RNA 逆轉錄成為 cDNA，然後再使用 Roche LightCycler system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 進行 quantitative real-time PCR。每一個樣本的 real-time PCR 都要先混合 12.6 µL of H₂O, 2.4 µL of MgCl₂ (stock solution of kit), 0.5 µL (10 pmol) of forward primer, 0.5 µL (10 pmol) of reverse primer, 2 µL of cDNA, and 2 µL of LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I 成為總體積 20µL 的反應混合液。軟體 MaxVector software (Accelrys, Inc., San Diego, CA) 負責設計每一個基因專一性的 primer pair (表三)。整個 PCR 的反應過程包括 denaturation at 95°C for 10 minutes，接著是 40 to 60 cycles of PCR amplification (每個 primer pair 各別的 annealing temperature、extension time 以及 fluorescence detection temperature 詳見於表三)，最後是 melting curve analysis (continuous fluorescence detection from 65°C to 95°C with a temperature slope of 0.1°C /second)。

每一回合的 PCR 反應結束之後，軟體會比較每一個別樣本和標準樣本 (共五個，包括未稀釋以及連續 10 倍稀釋四次的四個樣本) 的反應曲線然後計算出每一個別樣本 mRNA 的相對定量 (相對於標準樣本的倍數)；五個標準樣本構成

之標準曲線的相關係數 (correlation coefficient) 以及其 mean square errors 可以代表每一次相對定量實驗的精確度。本研究，95%的定量 PCR 實驗其標準曲線之相關係數 = 1 且 mean square error < 0.2，其餘 5%的定量 PCR 實驗其標準曲線之相關係數 = 0.99 且 mean square error < 0.4；如果定量 PCR 實驗的實驗標準曲線之相關係數 < 0.99，其結果不予以採用。

本研究選擇 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 作為樣本的 reference gene；每一個別基因之表現要再除以同一樣本之中 *GAPDH* 的表現，所以，某一基因標準化之表現 = mRNA level of the gene / mRNA level of *GAPDH* in the same sample。

2.5 細胞株和細胞培養

人類大腸癌細胞株 HT-29 以及 LS174T 皆購自於 American Type Culture Collection (Manassas, VA)。這兩種細胞株都是以 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; #12100-061, Invitrogen (Gibco), Grand Island, NY) 外加 10% fetal bovine serum 以及 1% penicillin/streptomycin 在 37°C 和 5% CO₂ 的環境之下培養。

2.6 EphB3 表現質體、細胞轉染、以及穩定細胞株的建立

EphB3 表現質體購自於 GeneCopoeia Inc. (#EX-A0825-M02, Germantown, MD)。質體由 CMV promoter 驅動表現 human EphB3 protein，EphB3 基因的 DNA 序列事先也經過我們進行基因解碼之後確認無誤。質體的細胞轉染 (transfection) 實驗是採用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 試劑，實驗是依照試劑製造廠商所建議的步驟進行。細胞在轉染質體之後，播種於含有 500 µg/ml G418 (Calbiochem, San Diego, CA) 的細胞培養基中，能夠生長成為獨立細胞群落 (colony) 的細胞會被個別挑選出來再經過繼代培養成為穩定細胞株 (stable clones)。

2.7 細胞質細胞核分離，免疫沈澱法和西方墨點轉漬法 (Cytoplasmic and nuclear fraction isolation, immunoprecipitation and Western blot analysis)

本研究中，我們是利用 modified RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% deoxycholic acid, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF/NaF/sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail; Roche) 來獲得細胞萃取液以及均質化 (指磨碎並溶於 lysis buffer) 的腫瘤組織 (來自裸鼠背上的腫瘤)。細胞質細胞核分離實驗則是採用購自於 Chemicon 公司的細胞核萃取實驗試劑組套 (nuclear extraction kit)，並依照試劑製造廠商所建議的步驟進行實驗。免疫沈澱實驗是利用 Catch and Release Reversible IP system (Upstate) 的實驗試劑組套進行。

全細胞萃取液、細胞質萃取液、細胞核萃取液以及免疫沈澱法洗提液 (IP eluates) 是依照下述之步驟進行西方墨點轉漬法：加熱 5 分鐘，在 8% gel 跑 SDS-PAGE，然後轉移到 (electrotransferred to) PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA)。接著將 blotting membrane 浸於 blocking solution (PBS, 5% non-fat milk or BSA, 0.2% Tween-20) 之中並在室溫下靜置 1 小時。然後加入一次抗體 [抗體名稱以及稀釋比例：anti-EphB3, 1:10,000; anti-ephrin-B1, 1:100; anti-ephrin-B2, 1:1,000; anti-phospho-Crk (Tyr207), 1:1,000; anti-CrkL (32H4), 1:1,000; anti-MMP-9, 1:1,000; anti-E-cadherin, 1:1,000; anti- β -Catenin, 1:2,000; anti-plakoglobin, 1:2,500; anti- α -tubulin, 1:15,000; anti-GAPDH, 1:20,000; anti-histone H1, 1:250; anti-ZO-1, 1:500] 並在 4°C 下作用至隔日。接著再加入 HRP 鍵結之二次抗體 [1:5,000 dilution (Chemicon)] 並在室溫下靜置 1 小時。然後用含 0.1% Tween-20 的 PBS 沖洗三次。最後利用強化之化學冷光系統 [enhanced chemiluminescence (ECL detection system; Perkin-Elmer, Waltham, MA)] 偵測二次抗體的訊號並呈現於 autoradiography (Fuji Medical X-ray film, Fujifilm, Tokyo, Japan)。在免疫沈澱實驗中我們是以 Rabbit IgG (Chemicon) 作為 type-specific control。

抗體名稱、產品型號以及製造廠商如下：Mouse monoclonal antibodies used in this study were anti- α -tubulin, clone DM1A (#05-829, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anti-EphB3, clone 1B3 (#H00002049-M01, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan), anti-CrkL, clone 32H4 (#3182, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-plakoglobin, clone PG-11E4 [#13-8500, Invitrogen (Zymed)], anti-GAPDH, clone 6C5 (#MAB374, Chemicon International Inc., Temecula, CA), anti-histone H1, clone AE-4 (#05-457, Upstate), anti-Ki67, clone MIB-1 (#M7240, DAKO Corp, Carpinteria, CA), and anti-ZO-1, clone ZO-1-1A12 [#33-9100, Invitrogen (Zymed)]. Rabbit polyclonal antibodies included anti-ephrin-B1(A20) (#sc-1011, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and anti-phospho-CrkL (Tyr207; #3181), anti-MMP-2 (#4022), anti-MMP-9 (#3852), anti-E-cadherin (#4065), and anti- β -catenin (#9587, all from Cell Signaling). Mouse polyclonal antibodies included anti-ephrin-B2 (#H00001948-A01, Abnova)

2.8 細胞免疫螢光染色以及雷射共軛焦顯微鏡實驗 (Fluorescence immunocytochemistry and confocal microscopy)

將細胞播種於 4-well chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY) (1×10^3 cells/well)，過夜培養之後，以 4% PFA 固定 15 分鐘，再加入含 0.3% Triton-X 100 的 PBS 作用 10 分鐘以增加細胞膜之通透性。用 5% BSA 作 blocking (阻隔非專一性的抗原) 之後，加入一次抗體 [抗體名稱、稀釋比例以及製造廠商：mouse anti-EphB3 (1:2000, Abnova), rabbit anti-E-cadherin (1:200, Cell Signaling), and rabbit anti- β -catenin (1:200, Cell Signaling)]，在 4°C 之下作用至隔日。用 TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) 沖洗三次，加入二次抗體 [Alexa Fluor 488 and 647 fluorescence dye-conjugated secondary antibodies (1:500, Molecular Probes) and Alexa Fluor fluorescence dye-conjugated 546 phalloidin (for F-actin staining)] 之後在室溫下作用 2 小時。接著以 DAPI

(Sigma) 將細胞核染色，再加上 fluorescent mounting medium (AbD, Serotec, Kidlington, UK)。螢光影像以共軛焦顯微鏡 LSM 510 laser-scanning confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) 捕捉並以軟體 MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 加以分析，細胞影像以 four-channel images 的方式呈現。

2.9 細胞核內 β -catenin/TCF 活性的測定－報導基因表現分析實驗 (TOP/FOP luciferase reporter assay)

利用 Lipofectamine 2000 試劑 (Invitrogen) 將以下之載體 TOP/FOP vector (2 μ g) 以及 pSV40-Renilla luciferase vector (0.2 μ g) 同時轉染 2×10^5 cells per experiment。細胞培養36小時之後，依照製試劑造廠商 (Promega, Madison, WI) 建議之標準程序測量細胞的相對螢光強度 (relative luciferase activities) [TOP = T cell factor reporter plasmid; FOP = reporter plasmid with mutant T cell factor binding sites]。

2.10 RNA干擾實驗 (RNA interference)

將細胞播種於 12-well plate，培養一直進行到 30~40%的底盤面積為生長的細胞所覆蓋。用於 RNA 干擾實驗的 Human EPHB3 siRNA 以及 CRKL siRNAs 購自於 Invitrogen (Stealth/siRNA duplex oligonucleotides) 公司。轉染實驗是依照製造廠商建議之標準程序進行 [轉染試劑：Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen)]。轉染 48 小時之後，收集細胞進行西方墨點轉漬法、免疫螢光染色以及其他相關實驗。

The siRNA sequences targeting the EphB3 human mRNA are shown below.

siRNA-1:

5' – AUU CAC AUU GGA GAU CAC ACC UCG G – 3'

5' – CCG AGG UGU GAU CUC CAA UGU GAA U – 3'

siRNA-2 :

5' – AAA GUC UGA GAC UUU GCA GAC CAG G – 3'

5' – CCU GGU CUG CAA AGU CUC AGA CUU U – 3'

siRNA-3 :

5' – CAU CCA GCC AAU CAC CAA CUG UCG U – 3'

5' – ACG ACA GUU GGU GAU UGG CUG GAU G – 3'

The siRNA sequences targeting the CrkL human mRNA were:

siRNA-1:

5' – AUA UUC AUC CUU GUG ACU UUC ACG A – 3'

5' – UCG UGA AAG UCA CAA GGA UGA AUA U – 3'

siRNA-2:

5' – AUA CAG AGU CCG UAC AUA UUC CAG G – 3'

5' – CCU GGA AUA UGU ACG GAC UCU GUA U – 3'

2.11 Rac1 活性試驗 (Rac1 activity assay)

我們採用實驗試劑組套 Rac Activation Assay Kit (# STA-401, Cell Biolabs, San Diego, CA) 來定量 Rac1 的活性。方法是定量 GTP-Rac1 (此為 Rac1 的 active form)：將細胞萃取液通過含有 PAK (p21-activated protein kinase) agarose beads 的透析管，PAK 分子中的 PBD (p21-binding domain) 可以專一性的和 GTP-bound Rac1 (active form of Rac1) 結合，接著再將 GTP-bound Rac1 由透析管中解離並沖出 (pulldown)，然後再用 anti-Rac1 抗體做西方墨點轉漬法。此時西方墨點轉漬法偵測到的 Rac1 就是 GTP-Rac1，也就是活性的 Rac1 的量。

2.12 Transwell 爬行試驗 (Transwell migration assay)

細胞爬行穿過 Matrigel 基底膜基質以及濾紙 (basement membrane matrix and filters) 的能力是以濾膜孔直徑為 8- μ m 的 Matrigel invasion chamber (#354480, BD

Biosciences, San Jose, CA) 來測量。Matrigel invasion chamber 由 -20°C 冰箱取出之後，先將細胞培養基液體 DMEM 加入上腔室 (upper chamber)，目的在將濾膜以及其上方覆蓋的 Matrigel 以細胞培養基浸潤飽和。2 小時之後倒掉上腔室裡的 DMEM，將含有 10% fetal bovine serum 的 DMEM 加入下腔室 (lower chamber) (0.75 ml/well)，將含有 1×10^5 cells 的 0.5 ml serum-free DMEM 加入上腔室。在 37°C 下培養 24 小時之後，取出上腔室，用 PBS 潤溼過的綿棒移除濾膜上方的 Matrigel 以及尚未爬過濾膜孔的細胞。用 100 倍的倒立顯微鏡 (Olympus IX70, Tokyo, Japan) 觀察爬過濾膜孔位於濾膜下方的細胞，每個濾膜隨機取 6 個視野照像並計算爬過濾膜孔的細胞數目。

2.13 E-cadherin-依賴性 (鈣離子-依賴性) 之細胞－細胞間黏著力強度的測量 [Measurement of strength of E-cadherin-dependent (Ca^{2+} -dependent) cell-cell adhesion]

細胞分離實驗 (Cell dissociation assay)

將細胞播種於 12-well plate 之中 (1×10^6 cells/well)，於 37°C 培養 24 小時。將長滿細胞的培養凹槽 (well) 分成兩組，分別加入 0.25% trypsin supplemented with 1 mM CaCl_2 in Hanks' balanced salt solution (1 ml/well; TC treatment) 或是 0.25% trypsin supplemented with 1 mM EDTA in Hanks' balanced salt solution (1 ml/well; TE treatment) 之後在 37°C 下再培養 30 分鐘。各培養凹槽加入含 10% fetal bovine serum 的 DMEM 作 10 倍稀釋，然後用吸管以 10 次的吸吐動作 (pipetting) 將原本黏在一起的細胞團塊打散成為單顆細胞懸浮液，然後以 100 倍顯微鏡隨機取 3 個視野照像計數。細胞分離的程度以 index $N_{\text{TC}}/N_{\text{TE}}$ 為代表。 N_{TC} = total particle number after the TC treatment ; N_{TE} = total particle number after the TE treatment。

細胞凝聚實驗 (Cell aggregation assay)

在培養皿平盤中加入 0.05% trypsin in the presence of 0.5 mM CaCl_2 (to protect

E-cadherin) 並在 37°C 下作用 30 分鐘，此步驟可以使原本附著在培養皿平盤底部的單層細胞脫離附著的表面成為細胞懸浮液，接著再用 Ca^{2+} and Mg^{2+} -free Hanks' balanced salt solution 沖洗細胞懸浮液使之成為單顆細胞懸浮液，然後將已經完全分離的單顆細胞重新懸浮於含有 1 mM Ca^{2+} 的 DMEM 之中，並分置於 24-well plate 的培養凹槽中 (2×10^5 cells/ml/well)。將培養皿平盤固定於旋轉盤，以 80 rpm 的速度旋轉，在 37°C 下培養 30 分鐘；此時分離的細胞將會重新凝聚成細胞團塊。細胞凝聚的程度是以 index of aggregation $1 - N_{30}/N_0$ 作為量化的指標。 N_0 = total particle number at 0 min； N_{30} = total particle number at 30 min。

2.14 細胞株於試管培養環境以及活體環境中之生長分析 (*In vitro* and *in vivo* growth analyses)

培養皿培養下之生長分析

在 Day 0 將野生型 HT-29 cells、control cells、K6 以及 L32 四種細胞播種於直徑 10-cm 的培養皿平盤 (1×10^6 cells/dish) 中培養，自次日起每日計數細胞的總數直到 Day 7。

活體環境中之生長分析

本研究中的雄性裸鼠 (male BALB/c nu/nu mice) 皆購自於國家動物中心 (National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)。所有的實驗小鼠均安置於標準之動物房中飼養。將 1×10^6 個 control cells 以及 1×10^6 個 EphB3 expressing HT-29 cells (K6 或 L32) 分別注射到年齡為 8 週的裸鼠背部左、右側的皮下組織中 ($n = 5$ mice/group)，注射的癌細胞會在裸鼠的背部逐漸長大成為腫瘤質塊。皮下注射 8 週之後，犧牲裸鼠，取出裸鼠背部左、右的一對腫瘤，稱重量，然後用福馬林溶液固定腫瘤並用石蠟包埋。由石蠟包埋製成的腫瘤組織切片以 anti-Ki-67 antibody (1:100) 進行免疫染色。在 400 倍的顯微鏡下隨機選取 5 個視野照像並計算 Ki-67 positive cells 的數目。一些取自裸鼠的腫瘤樣本以液態氮瞬間冷凍然後置於 -85°C 冰箱，以供後續之西方墨點轉漬法進行實驗分析。

2.15 細胞懸浮生長分析 (Anchorage-independent growth assay)

將 3 ml 含 0.5% agarose 的 DMEM 倒入直徑 6-cm 的培養皿平盤，凝固之後形成底層洋菜凝膠 (bottom agar)。再將 2 ml 含 0.3% agarose 的 DMEM 和 5000 個細胞在 37°C 下小心地混合之後加到底層洋菜凝膠之上，凝固之後形成上層洋菜凝膠 (top agar)，然後置於 37°C 以及 5% CO₂ 之培養箱中培養。每週加 0.5 ml DMEM 以保持上、下層洋菜凝膠之濕潤。3 週之後，上層洋菜凝膠之中會長出肉眼可見的細胞群落。利用解剖顯微鏡 (Zeiss) 隨機選取 5 個正方形視野 (area of each square = 1/35 area of a 6-cm dish) 照像並計數之。

2.16 細胞株於試管培養環境以及活體環境中細胞凋亡之偵測 (*In vitro* and *in vivo* apoptosis detection assay)

試管培養環境下之細胞凋亡偵測

將培養的細胞以 trypsin-EDTA 處理形成單顆細胞懸浮液，離心後將細胞再懸浮於 Annexin V staining buffer (濃度為 1×10^5 cells / 100 μ l) (BD Pharmingen, San Diego, CA)，然後以 5 μ l Annexin V-PE (PE = phycoerythrin) 和 5 μ l PI (PI = propidium iodide) 染色。接著使用流式細胞儀 FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA) 進行分析。每一次分析 1×10^4 cells。流式細胞儀偵測 PI 以及 PE 的波長分別為 650 nm 以及 570 nm。分析軟體為 FLOWJO software。

活體環境中之細胞凋亡偵測

利用 *in situ* cell apoptosis detection kit (FITC) (Promega, Madison, WI) 對石蠟包埋製成的腫瘤組織 (裸鼠背部取下之腫瘤) 切片進行 TUNEL (terminal uridine deoxynucleotidyl nick end-labeling) assay。在螢光顯微鏡下偵測到由 FITC 發出的綠色螢光即代表組織中進行凋亡之細胞。

2.17 統計資料分析 (Statistical data analysis)

數據以及資料是以統計軟體 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL)(本研究之第一部分) 以及 Prism 4 (GraphPad Inc., San Diego, CA) (本研究之第二部分) 進行分析。等距變項在各組之間的差異是否達到統計學上的顯著性是以 Student's *t*-test, paired *t*-test 或是 ANOVA 來分析。無母數統計分析中和 theoretical medians 之間的差異是否達到統計學上的顯著性則是以 Wilcoxon signed-rank test 來分析。當 $P < 0.05$, 差異即被認定達到統計學上之顯著水準。各項實驗、資料的個別統計分析方法詳述如下。

臨床病理因子之間的相關分析

本研究中和大腸直腸癌相關的臨床病理因子共有 10 項,我們將 30 多位病人的這些臨床病理因子整理成表一。比較本研究中的病人樣本以及大腸直腸癌母群體的病人樣本並分析其間有無顯著的差異,可以評估本研究中的研究對象(病人)是否存在著樣本偏差 [population (patients) bias]。倘若真有樣本偏差存在,其後續的統計分析推論就無法採信。結果顯示:本研究中的病人和大腸直腸癌母群體的病人在 10 項臨床病理因子的比較並無統計學上顯著之差異(詳見結果),這表示本研究的病人為一不偏樣本 (an unbiased sample),病人的蒐集過程為一不偏的取樣 (unbiased sampling)。

DNA 晶片實驗結果之二次確認

在 post-array validation 的部份,我們採用 30 多個樣本進行 real-time RT-PCR 實驗,因此,對某一基因來說,有 30 多個腫瘤樣本的某基因表現數值,也有 30 多個正常組織樣本的某基因表現數值,由於基因表現數值的母群體曲線不知是否為常態分佈,所以我們用 Wilcoxon signed ranks test (一種無母數分析之統計方法;相當於母數分析中之 *t*-test) 來比較腫瘤和正常組織之間某基因表現數值是否存在統計學上之差異。

向上調控基因和臨床病理因子的相關分析

本研究若某一基因符合以下的標準: normalized tumor/normal expression

ratio = (gene in tumor / GAPDH in tumor) / (gene in normal / GAPDH in normal) > 2, 該基因就被定義為向上調控基因。經過確認為向上調控的基因在所有的樣本之中各有數組樣本並非呈現向上調控；深入研究之後發現，某基因沒有呈現向上調控的那些腫瘤樣本，其腫瘤行為以及臨床特徵也不同於該基因呈現向上調控的其他腫瘤樣本。將基因在所有樣本中有或沒有呈現向上調控和所有樣本各自的 10 項臨床病理因子合於某條件或不合於該條件，整理成列聯表，再利用統計學的卡方檢定 (χ^2 test) 或是費雪氏精密檢定 (Fisher's exact test) 進行相關分析。

本研究中的臨床病理因子共有 10 項，大部分為類別變項，少部分原來是等距變項 (interval variables)，我們也在設定臨界值 (cutoff point values) 之後將它們轉換成為類別變項如下：(1) age (≤ 65 versus > 65 years old) (2) gender (male versus female) (3) tumor location (right side versus left side) (4) carcinoembryonic antigen (CEA) level (≤ 4.3 versus > 4.3 ng/mL) (5) tumor stage (Dukes' A, B, C, D) (6) tumor differentiation (well, moderate, or poor) (7) the presence or absence of anemia (anemia in male: Hb <12 ; anemia in female: Hb <11) (8) lymph node metastasis (9) distal metastasis 以及(10) concomitant polyp。

向上調控基因的迴歸分析

經過 DNA 晶片實驗結果二次確認後的每個 confirmed genes 在 31 個樣本有不同程度的基因表現 (指不同程度的 mRNA levels)。利用迴歸分析，我們可以找出基因表現密切相關的基因。基因表現密切相關指的是當 gene A 的 mRNA level 低的時候，gene B 的 mRNA level 就低；gene A 的 mRNA level 高的時候，gene B 的 mRNA level 就高。也就是 gene B 的表現會隨著 gene A 的表現而變動，或是 gene A 的表現會隨著 gene B 的表現而變動。

腫瘤樣本中 EphB3 expression levels 的分析以及以 Dukes' stages 為基準所進行的分層分析

36 對腫瘤以及正常組織樣本中 EphB3 expression levels 的分析是以無母數統計檢定 Wilcoxon signed-rank test with theoretical median = 2.0 來進行。當 36 對腫

瘤以及正常組織樣本被分成 Dukes' B, Duke's C 和 Dukes' D 三組時，三組樣本之間 EphB3 expression levels 的差異，則是利用 one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test (compared with stage B) 來進行統計檢定。

EphB3/ephrin-B 分子訊息重塑細胞骨架之分析

Cortical-actin positive cells 在 EphB(-) HT-29 cells 和 EphB(+) HT-29 cells 的比較是以 Student's *t*-test 進行統計檢定。

Transwell 爬行試驗分析

Wildtype HT-29、Vector control cells、K6 以及 L32 在 Transwell invasion chamber 中的爬行能力的比較是以 one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test (compared with control cells) 進行統計檢定。

細胞－細胞黏合力分析

Control cells 和 L32 cells 在細胞－細胞黏合力的比較 (包括 cell dissociation assay 以及 cell aggregation assay) 是以 Student's *t*-test 進行統計檢定。

***In vitro* 以及 *in vivo* 生長分析**

In vitro 生長分析 (包括在培養皿中的單層細胞生長以及在 soft agar 中的懸浮生長) 是以 one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test (compared with control cells) 進行統計檢定。*In vivo* 生長分析 (包括在裸鼠背部皮下腫瘤的生長以及腫瘤切片中 Ki-67 positive cells 的計數) 是以 Student's *t*-test 進行統計檢定。

***In vivo* 細胞凋亡分析**

In vivo 細胞凋亡分析 [裸鼠腫瘤切片中 TUNEL(+) cells 的計數] 是以 Student's *t*-test 進行統計檢定。

報導基因表現分析 (TOP/FOP luciferase reporter assay)

比較 Vector-FOP、K6-FOP 以及 L32-FOP 之間的螢光強度差異是以 one-way ANOVA and Tukey's post hoc test (compared with Vector-FOP) 進行統計檢定。比較 Vector-TOP、K6-TOP 以及 L32-TOP 之間的螢光強度差異也是以 one-way

ANOVA and Tukey's post hoc test (compared with Vector-TOP) 進行統計檢定。
Vector-TOP 和 Vector-FOP、K6-TOP 和 K6-FOP 以及 L32-TOP 和 L32-FOP 之間
差異的兩兩相比較 (TOP 和 FOP 相比) 則是以 two-way ANOVA and Bonferroni
post hoc test 進行統計檢定。





第三章 結果

結果之第一部分 大腸直腸癌基因表現和臨床病理因子相關性之研究

(Correlation of gene expression status and phenotypes in CRC)

3.1.1 本研究所蒐集並應用於分析的大腸直腸癌臨床案例及檢體是統計上的不偏樣本

要利用樣本進行統計上的相關分析，必須符合以下的前題：這個樣本是統計學上的大樣本 ($n > 30$)，並且是一個不偏的樣本 (an unbiased sample)。本研究的樣本來自於四十多位病人在接受外科手術時所切除的大腸直腸癌腫瘤以及相鄰的正常大腸上皮組織。去掉品質不佳的檢體 (見材料與方法章節中的排除條件) 之後，我們利用 31 個樣本進行了基因表現和臨床病理因子之間的統計相關分析。我們首先證實，這 31 個樣本的流行病學因子和大腸直腸癌母群體 (即目前已知的大腸直腸癌的統計資料) 的流行病學因子之間並無統計學上的差異 (表一)，這表示這些臨床案例以及檢體是統計學上的不偏樣本。例如：31 個大腸直腸癌病人的平均年齡為 67.4 歲，和大腸直腸癌的平均年齡 70 幾歲差不多；這個樣本的男女性別比例 male/female ratio = 1.38，也接近於臺灣地區大腸直腸癌患者的性別比率 (1.25 in Taiwan)。此外，樣本符合母群體流行病學特徵的其它項目還包括：45%的腫瘤發生在直腸，55%的腫瘤發生在直腸以外的結腸；發生在直腸的腫瘤大部分為男性，而發生在結腸的腫瘤則傾向為女性 ($P = 0.067$)；右側大腸長腫瘤的病人比左側大腸長腫瘤的病人更容易發生貧血 ($P = 0.008$)。另外，我們的數據亦顯示：大腸腫瘤長在左側的病人，其腫瘤指數 CEA 比大腸腫瘤長在右側的病人高 ($P = 0.036$)；腫瘤末期的病人，其腫瘤指數 CEA 也比腫瘤初期的病人要高 ($P = 0.043$)。

3.1.2 Microarray 的實驗顯示，基因晶片上 8000 個基因的 Cy5 / Cy3 ratio 數值會構成一個常態分佈的曲線；而四個獨立 microarray 實驗共同篩選出來的向上調控基因，百分之四十可以通過 post-array analysis (定量 RT-PCR 實驗) 的再確認

本研究中，microarray 可以辨識的基因有 8000 個，每一個基因在 Tumor/Normal 的對比差異可以用 Cy5 / Cy3 ratio 來呈現。如果某基因的 Cy5 / Cy3 ratio > 2 ，則該基因被定義為向上調控 (up-regulated)，如果 Cy5 / Cy3 ratio < 0.5 則表示該基因為向下調控 (down-regulated)。一個基因晶片上有 8000 個基因的互補片段，所以會有 8000 個 Cy5 / Cy3 ratio 的數值，如果將 X 軸代表 Cy5 / Cy3 ratio 數值的大小，Y 軸代表該 Cy5 / Cy3 ratio 數值的基因數目，我們可以看到這 8000 個基因的 Cy5 / Cy3 ratio 數值會構成一個常態分佈 (又稱高斯分佈) 的曲線 (圖一)。長態分佈的曲線稍微向右方偏移 (moderate skew to the right) 表示大腸直腸癌中向上調控基因的數目大於向下調控基因的數目。

我們將來自於四個病人的腫瘤樣本分別進行了四個獨立的 microarray 晶片分析，結果發現每一個晶片都有四百到八百多個向上調控基因；經過進一步的比對，我們發現有 29 個基因在這四個晶片中一致呈現向上調控 (圖二)。這 29 個基因即成為本研究中 post-array analysis 的候選基因 (candidate genes) (表二)。29 個基因之中的 9 個基因為無法找到適當的 primer pairs，所以最後只有 20 個基因接受了定量 RT-PCR (quantitative real-time RP-PCR) 的基因表現相對定量 (tumor 相對於 normal tissue) 分析實驗。我們以 31 組樣本 (原來進行 microarray 實驗的 4 組樣本再加上另外的 27 組樣本) 進行 real-time RT-PCR 實驗。通過 (表二中註記為**) 及未通過 (表二中註記為*) 定量 RT-PCR 實驗的基因在表二 Gene symbol 的那一行有明確的標示。

經過定量 RT-PCR 實驗之後，我們發現接受分析的 20 個基因中只有 8 個基因 (佔 $8/20 = 40\%$) 通過了 post-array analysis 的二次確認，成為本研究中的 confirmed genes，即確認該基因的 transcript level 為 Tumor/Normal ratio > 2 。這 8 個基因的 real-time RT-PCR 實驗條件詳列於表三，這 8 個基因的 real-time

RT-PCR 實驗結果則繪於圖三。

3.1.3 將基因表現是否向上調控和病人或腫瘤是否合乎某項臨床病理特徵以統計學的卡方檢定或是費雪氏精密檢定進行相關分析可以找出和腫瘤生物行為以及臨床病理因子變異有關的基因

通過 real-time RT-PCR 確認的向上調控基因共有 8 個，我們將每一個經過確認的基因和 10 項臨床病理因子分別以卡方檢定 (chi-square test) 或是費雪氏精密檢定 (Fisher's exact test) 測試其相關性，總共得到 $8 \times 10 = 80$ 個 2×2 或 2×3 或 2×4 列聯表 (contingency tables) 的相關分析結果。以 *GRO1* 為例，*GRO1* 向上調控與否 [*GRO1* (+) or *GRO1* (-)] 和 10 個類別變項以卡方檢定或是費雪氏精密檢的結果列於表四。相關分析顯示，*GRO1* 的基因表現在年齡 ≤ 65 歲病人的大腸直腸惡性腫瘤要明顯大於年齡 > 65 歲病人的大腸直腸惡性腫瘤 ($P = 0.01$)；此外，*GRO1* 的基因表現愈強，大腸直腸惡性腫瘤的侵襲性及惡性程度有愈低的傾向 (傾向乃指 $0.05 < P < 0.1$)，即血中 CEA level 愈低、淋巴轉移愈少、Dukes' stage 愈早期 (P 值分別為 $P = 0.058$ 、 $P = 0.060$ 、 $P = 0.075$)。

目前已知 *GRO1* 分子能夠吸引白血球聚集至產生發炎反應的病灶，也能夠強力的促進白血球細胞的增殖。根據我們的相關分析結果，我們可以假設：腫瘤引起的免疫反應會誘導大腸直腸癌細胞製造 *GRO1* protein，然後 *GRO1* protein 會吸引白血球聚集至腫瘤所在的地方，接著這些 tumor-infiltrating leukocytes 會抑制大腸直腸癌細胞的生長，因此大腸直腸腫瘤的惡性程度會比較低。免疫反應通常會隨著年齡的增加而減弱；因此，相對於小於 65 歲的病人，大於 65 歲病人的腫瘤免疫反應應該會比較弱，因此 *GRO1* protein 的表現也會比較弱。

其它和臨床病理因子有統計上顯著相關 (指 $P < 0.05$) 的基因還有：*MYC* (在不同的性別 *MYC* 的表現不同：表現量 male $>$ female; $P = 0.012$)，*HNRPA1* (在不同位置的大腸癌 *HNRPA1* 的表現不同：right-side colon $>$ left-side colon; $P = 0.027$)，*GXP2* (*GXP2* mRNA level 愈高，腫瘤細胞的分化愈好; $P = 0.019$)，*THY1*

(*THY1* 和病人的 anemia 有關：*THY1* 愈高，大腸直腸癌病人愈容易表現貧血； $P = 0.036$)，*PHLDA1* (*PHLDA1* 也和病人的 anemia 有關：*PHLDA1* 愈高，大腸直腸癌病人愈容易表現貧血； $P = 0.009$)。所有和臨床病理因子在統計學上有顯著相關的基因都歸納整理列於表五。

3.1.4 迴歸分析顯示 *MYC* 和 *HNRPA1* 兩個基因的基因表現呈現強烈的線性正相關

每一個 post-array confirmed gene 在 31 組樣本 (每一對組本包括了：大腸直腸癌 & 鄰近正常大腸黏膜組織) 都有 31 個該基因的表現數據。我們將每一個 post-array confirmed gene 的 31 個樣本的基因表現數據 (等距變項 interval variable) 和其它 post-array confirmed genes 的 31 個樣本的基因表現數據 (等距變項 interval variable) 運用統計學兩兩互相進行迴歸分析 (共有 8 個 confirmed genes，所以總共有 $8 \times 8 = 64$ 個迴歸分析檢定)。結果發現，大腸直腸腫瘤中 *MYC* 和 *HNRPA1* 兩個基因的基因表現呈現強烈的一次線性正相關 (圖四)，相關係數高達 $r = 0.948$ ；即使再以正常組織的相關參數來標準化以上的數據，這兩個基因的基因表現依舊呈現強烈的一次線性相關，而且相關係數仍舊高達 $r = 0.871$ (圖五)。

結果之第二部分 正常大腸上皮組織和大腸直腸癌腫瘤組織中 EphB3 酪氨酸磷酸激酶受體 mRNA 及 protein 的表現以及其臨床意義之研究

3.2.1 組織免疫化學染色的研究結果顯示：在正常的大腸黏膜組織，EphB3 protein 僅分佈於大腸黏膜隱窩中未分化細胞的細胞膜，在已分化成熟的大腸上皮細胞並不表現此種細胞膜受體蛋白。另一方面，在大腸直腸癌腫瘤中，EphB3 protein 的表現呈現歧異的結果—從完全沒有表現到表現非常強烈皆有

運用組織免疫染色技術，我們可以在組織切片上觀察到 EphB3 protein 在大腸組織中分佈的位置。我們發現，EphB3 protein 僅分佈於正常大腸黏膜隱窩中

未分化細胞 (progenitor cells) 的細胞膜，而已分化、成熟的大腸上皮細胞不會表現此種細胞膜受體蛋白。然而在大腸直腸癌腫瘤中，我們發現 EphB3 protein 的表現量則是從零到非常高都有(圖六)。在圖六中我們挑出同一片切片之中同時包含大腸直腸癌細胞和正常大腸黏膜細胞的一系列免疫染色切片；正因為位於同一切片，接受的染色條件一樣，癌細胞和正常細胞之間 EphB3 protein 量的對比差異才能夠客觀的加以比較。

3.2.2 EphB3 基因表現的臨床分子流行病學相關分析顯示：EphB3 在大腸直腸癌形成的早期扮演著腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的角色

圖六中我們展示了 tumor stages 分別為 Dukes' B, Dukes' C 和 Dukes' D，且同時包含大腸直腸癌細胞以及正常大腸黏膜細胞的 EphB3 組織免疫染色切片。我們發現：在早期、未擴散的大腸直腸癌腫瘤 (即 Dukes' B) 中有最高程度的 EphB3 protein 表現，其表現量也遠遠高於正常大腸黏膜細胞；但是 EphB3 protein 的表現量在局部擴散的大腸直腸癌腫瘤 (Dukes' C) 以及遠處轉移的大腸直腸癌腫瘤 (Dukes' D) 中就變成相當的弱，而且比正常大腸黏膜細胞還要弱。因為無法在所有的腫瘤樣本中都能夠獲得適合相對定量的 EphB3 組織免疫染色切片 (指能夠同時切到大腸直腸癌細胞和正常大腸黏膜細胞的切片)，因此，免疫染色切片的樣本數目很少，因而無法進行統計分析。因此我們決定再回過頭來用 mRNA 在腫瘤 versus 正常組織的相對定量來作為 EphB3 表現強度的指標。在本研究的第一部分我們只有 31 組樣本 (1 pair = tumor mass + adjacent normal mucosa)，由於樣本數目不夠多，造成 2×3 列聯表 (contingency table) 之中某些空格的數目太少因而無法進行統計分析 (指 EphB3 是否向上調控和腫瘤 Dukes's stage B, C, D 的相關分析)，因此，我們再加入 5 組新的樣本使總數成為 36 組樣本。在 36 組臨床樣本所做的定量 RT-PCR 實驗結果顯示：大腸直腸癌 EphB3 基因的表現在整體上要高於正常大腸上皮組織 (圖七； $P = 0.0005$, Wilcoxon signed-rank test with theoretical median = 2.0)。但是如果我們將這 36

對樣本依照 Dukes' stage 分成三組 (即分層分析)，我們將會發現：早期、未擴散的大腸直腸癌 (即 Dukes' B) 腫瘤組織有最高的 EphB3 基因表現，局部擴散的大腸直腸癌腫瘤 (Dukes' C) 以及遠處轉移的大腸直腸癌腫瘤 (Dukes' D) 的 EphB3 基因表現就變的很弱 (圖八；* 代表 $P < 0.05$, one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test compared to stage B)。此一結果暗示：EphB3 在大腸直腸癌形成的早期扮演著腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的角色，大腸直腸腫瘤在轉變成為更加惡性的癌細胞時，必須關閉 (silence) EphB3 的基因表現。

3.2.3 在人類大腸直腸癌細胞株 HT-29 cells 建立穩定的 EphB3 over-expressing cell lines，持續表現 EphB3 的 HT-29 cells 可以產生同位的 EphB3/ephrin-B 交互作用 (EphB3/ephrin-B interaction *in cis*)

前面一小節中的臨床分子流行病學相關分析顯示 EphB3 扮演腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的角色；然而，這僅只是統計推論 (statistic inference)。要得到科學推論 (scientific inference)，即因果推論 (causal inference)，就要嚴謹地進行因果關係的研究 (causal study)。所謂因果關係的研究就是操控自變項，然後觀察應變項的種種變化。在基因功能研究的領域中，可以進行的自變項操控有以下幾種：培育基因轉殖或基因剔除的實驗小鼠 (transgenic mice or knockout mice)，或是在培養的細胞株中導入載體過度表現某基因或導入 siRNA 以便敲除該基因的表現 (gene over-expression or knockdown)。

我們挑選人類大腸直腸癌細胞株 HT-29 cells 並送入以 CMV promoter 驅動而持續表現 EphB3 protein 的基因載體，然後挑選出能夠表現 EphB3 protein 的穩定細胞株 K6 及 L32 (圖九)。標示 Vector 的細胞株是導入空的載體 (empty vector)，在往後的實驗中我們將以此細胞株作為 K6 和 L32 的對照組 (control cells)。我們挑選 HT-29 cells 的原因是：wild-type HT-29 cells 幾乎沒有表現 EphB3，但卻會表現 EphB3 的 ligands (ephrin-B1 及 ephrin-B2)；因此，在 HT-29 cells 中持續過度表現 EphB3 可以產生 EphB3/ephrin-B interaction *in cis* (同位的 EphB3/ephrin-B 交

互作用)。In cis 指 receptor 和 ligand 在同一細胞；如果 receptor 和 ligand 在不同細胞則是 interact in trans (異位的 EphB3/ephrin-B 交互作用)。圖九的免疫沉澱實驗顯示，K6 和 L32 這兩個細胞株的 EphB3 分子被磷酸化，這證實這兩個細胞株的 EphB3 signaling 是被 “turn on”。獲得了持續穩定表現 EphB3 的細胞株之後，我們就著手進行後續的實驗，其結果如下。

結果之第三部分 EphB3/ephrin-B 分子訊息促進間質上皮轉換 (mesenchymal-to-epithelial transition) 的細胞分子生物學證據

3.3.1 EphB3/ephrin 分子訊息引發細胞形態的變化符合間質上皮轉換的特徵

在相位差光學顯微鏡下，我們可以清楚的觀察到：表現 EphB3 的細胞株 L32 的細胞周邊有一層厚的透明帶狀區域，這個特徵性的構造是對照組細胞株 (control cells，指 empty-vector transfected cells，在圖中標示為 Vector) 所不具有的 (圖十)。此外，表現 EphB3 的細胞株的外形也和對照組的細胞株截然不同。對照組的細胞株和野生型的細胞株一樣，表現出類似間質細胞的外形 (mesenchymal-like morphology)：伸常的外形，鬆散的細胞－細胞間接觸，明顯可見的細胞偽足 (lamellipodia)，延展的形態，和非常少的 cortical actin (elongated appearance, loose cell-cell contact, visible lamellipodia, spreading morphology and little cortical actin)。另一方面，表現 EphB3 的細胞株 K6 和 L32 則表現出類似上皮細胞的外形 (epithelial-like morphology)：鵝卵石的外形，緊密的細胞細胞間連接，很少的細胞偽足及延展的形態，和明顯的細胞膜下 cortical actin (cobble-stone appearance, tight cell-cell junctions, diminished lamellipodia and cell spreading, and prominent submembranous cortical actin) (圖十，圖十一，圖十二)。

F-actin 在 control cells 中是分散的分佈於細胞質中，但是在表現 EphB3 的細胞株中 F-actin 會形成緊靠著細胞膜下方的一層緊密的 cortical-actin-cytoskeleton (圖十二)。我們以 F-actin 螢光染色影像的細胞計數對細胞形態的變化進行量化，

我們發現，93%的 L32 細胞株會失去細胞偽足以及延展的形態並轉變成為卵圓形的細胞 (圖十三)，此一過程也可以稱之為 cell rounding。

3.3.2 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘發之細胞內分子的重新分佈 (intracellular molecular re-distribution) 符合間質上皮轉換的特徵

令人好奇的是，圍繞細胞周邊的透明帶狀區域究竟是什麼？共軛焦免疫螢光顯微鏡的研究顯示：此一圍繞細胞膜的透明帶狀區域堆積了 E-cadherin, β -catenin 以及 F-actin 分子 (圖十一、圖十二、圖十四和圖十五)。由圖十四的免疫螢光影像我們可以清楚的看到：EphB3/ephrin-B 分子訊息造成細胞膜上 E-cadherin 分子 (圖十四中的綠色螢光) 的聚集增加。E-cadherin 分子在細胞膜上的聚集增加是由兩種因素所造成：第一、E-cadherin protein level 的增加，此點會在之後的西方墨點轉漬法實驗中證實。第二、E-cadherin 由細胞質轉移到細胞膜。另外，由圖十四中的 Z-stack (即 Z-axis images) 可以看出，EphB3/ephrin-B 分子訊息也會造成細胞膜上 E-cadherin 分子的極化 (polarization, 指 E-cadherin 分子不是均勻的散佈於細胞膜上，而是集中分佈於細胞膜上的特定區域—basolateral membrane)，此點將會在後續研究 E-cadherin vs ZO-1 在 L32 cells 的細胞膜上的相對位置時，再度加以證實。此外，EphB3/ephrin-B 分子訊息也會驅使 F-actin 分子由細胞質轉移到細胞膜內側，形成緊靠著細胞膜下方的一層“緊密的細胞膜下皮層 actin 細胞骨架”(condensed submembranous cortical-actin-cytoskeleton) (圖十二以及圖十四中的紅色螢光)。

接著我們再進行 β -catenin 的免疫螢光染色 (圖十五)，目的是要了解 EphB3/ephrin-B 分子訊息如何影響 β -catenin 分子在細胞內的分佈。雖然圖十五的免疫螢光染色無法區分細胞核內的 β -catenin 分子是否有數量上的變化 (因為細胞核的區域太小了)，但是免疫螢光染色影像確實讓我們看到細胞膜上和細胞質中的 β -catenin 分子增多了。

由圖十四及圖十五的 DAPI staining (藍色橢圓形點狀物即為細胞核)，我們也

可以察覺到：細胞核－細胞核之間的距離減少了。這是細胞－細胞接觸 (cell-cell contacts) 更加緊密的結果，而造成此一結果的原因來自於大幅度強化的細胞－細胞連接 (cell-cell junctions)－包括結構上的以及功能上的。

3.3.3 EphB3/ephrin-B 分子訊息所引發的細胞行為改變符合間質上皮轉換的特徵

在本研究中，我們測試了細胞爬行 (cell migration)、細胞－細胞間黏著力 (cell-cell adhesion) 以及細胞凋亡 (apoptosis) 這三個和 epithelial-to-mesenchymal transition 或 mesenchymal-to-epithelial transition 有關的功能性標記 (functional markers)。細胞爬行和細胞－細胞間黏著力這兩項細胞生物功能的變化在此小節中會加以陳述，細胞凋亡因為和抑制癌細胞生長有更密切的關係，所以將在抑制癌細胞生長的段落中 (3.4.4 以及 3.4.5) 再加以描述。

圖十六是四種細胞株爬行能力的量化結果。細胞在 Matrigel invasion chamber 中必須先穿越一層類似於細胞外基質 (ECM) 的 Matrigel，然後再爬過 Transwell membrane 上直徑 $8\mu\text{m}$ 的小洞。 $8\mu\text{m}$ 是微血管的平均直徑，如果癌細胞能夠爬過此小洞就表示癌細胞在人體內也可以經由微血管進入到較大的血管再轉移到遠處。穿過 Transwell membrane 而位於 membrane 另一面 (下面) 的細胞可以用 100 倍的相位差光學顯微鏡觀察並拍下照片然後計算數目 (圖十六左側四小圖)。此數字圖形化成為圖十六中的 Y 軸，代表細胞株的爬行能力 ($n=3$ ***, $P < 0.001$ compared with control cells using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. Six random fields were counted for each Transwell membrane)。圖十六清楚的告訴我們：EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠顯著的減低細胞的爬行能力。此結果符合上一小節中提到的細胞形態上的變化：持續表現 EphB3 的結果使得細胞失去了它們的偽足 (lamellipodia)。失去了偽足的細胞，當然也就失去了爬行的能力。

接下來我們測試 EphB3/ephrin-B 分子訊息對於細胞－基質間黏著力以及細胞－細胞間黏著力的影響。在我們的實驗中，細胞－基質間黏著力並沒有發生改變 (圖十七)，我們是以 fibrinectin、collagen I 和 laminin 三種基質分子分別黏附

(coating) 於 96 孔的培養皿平盤底部作為細胞外基質的代表。為了評估細胞－細胞間黏著力這一項細胞生物學功能，我們進行了兩項細胞－細胞間黏著力實驗 (cell-cell adhesion assay)：細胞分離實驗 (cell dissociation assay) 以及細胞凝聚實驗 (cell aggregation assay)。圖十八是細胞分離實驗的結果：在含有 1 mM Ca^{2+} 的液體培養基中，表現 EphB3 的 L32 細胞比對照組細胞更不容易被胰蛋白酶 Trypsin 分解成單獨的細胞顆粒；如果液體培養基中沒有 1 mM Ca^{2+} 存在 (加入 EDTA，EDTA 會和游離的鈣離子結合)，則 Trypsin 分解 Control cells 和 L32 cells 的能力就沒有差別 ($n = 3$ ***, $P < 0.001$ by Student's *t*-test)。這表示，在 L32 細胞株被強化的細胞－細胞間黏著力是需要鈣離子來媒介的 (Ca^{2+} -dependent)，而鈣離子媒介的細胞－細胞間黏著力則是由大家所熟知的 E-cadherin 分子所控制。這又符合了前一小節中提到的細胞分子重新分佈的變化：持續表現 EphB3 的結果使得細胞膜上的 E-cadherin 分子大幅度的增加。在有鈣離子存在的條件之下，增加的 E-cadherin 便會造成細胞－細胞間黏著力的增加。圖十九是細胞凝聚實驗的結果：在含有 1 mM Ca^{2+} 的液體培養基中，表現 EphB3 的 L32 細胞比對照組細胞更容易聚集成細胞團塊 ($n = 3$ ***, $P < 0.001$ by Student's *t*-test)。這和前述的理由是一樣的：表現 EphB3 的 L32 細胞的細胞膜上有較多且極化的 E-cadherin 分子。

3.3.4 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘導的分子傳遞路徑以及分子生物學變化符合間質上皮轉換的特徵

在前面幾小節中，我們已經提出證據證實 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘導的細胞形態、行為以及功能上的變化都符合間質上皮轉換的特徵；在此一小節中，我們將更進一步探索其相對應的分子機轉，以便強化此研究之深度。探索的方法就是檢驗和 EMT (or MET) 相關之分子路徑的上下游分子在 control cells、K6 以及 L32 這三個細胞株中的表現 (量的增加或是減少) 或是狀態 (活化或是去活化) 是否有差異。

那些是目前已知和 EMT (or MET) 相關的上下游分子呢？到目前為止，已經累積（但是尚未完全瞭解）的證據顯示：Eph family receptor tyrosin kinase 促進間質上皮轉換的主要分子路徑是 Eph → Abl → Crk → Rho family GTPase → 誘發“形態、行為和功能上的變化”。

Rho family GTPase 是這條分子路徑中已知的最下游，因此，我們首先檢查 Rho family GTPase 在 K6 和 L32 這兩個細胞株中的變化情形。結果發現：Rho family GTPase 家族中被研究的最多的 Rac1 (全名為 ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) 在 control cells 中是處於活化的狀態，但是在 K6 及 L32 這兩個細胞株中是處於去活化的狀態。利用透析管中連接在 agarose beads 上的 p21-activated protein kinase (PAK) 分子，我們可以牢牢的抓住細胞萃取過濾液中的 GTP-bound Rac1 分子 [PAK 的 p21-binding domain (PBD) 可以專一性的和 GTP-bound Rac1 分子結合]，接著再將 GTP-bound Rac1 分子由透析管中解離並沖出 (pulldown)，然後再用 anti-Rac1 antibody 進行西方墨點轉漬法。實驗結果顯示：在 Vector，K6 及 L32 這三個細胞株中，後兩者具活性的 Rac1 (指 GTP-bound Rac1) 有明顯減少的現象 (圖二十)。此一結果顯示 EphB3/ephrin-B 分子訊息是透過 Rac1 的去活化來促進間質上皮轉換。已知 Rac1 的去活化可以誘發種種的細胞生物學變化，包括 cortical-actin-cytoskeleton 的形成，增強 cadherin 媒介的細胞－細胞間黏合力，促使 apical-basal polarity 的形成，減少細胞的偽足以及降低細胞的爬行能力。此外，先前的許多研究已經顯示，Rac1 的生物學活性會抑制細胞凋亡以及促進腫瘤的起始和發展 (tumor initiation and progression)；因此，EphB3/ephrin-B 分子訊息也可以透過將 Rac1 去活化而促進細胞凋亡以及抑制腫瘤的起始和發展。

目前已知 Rac1 的上游分子為 Crk，活化 Crk 便能夠活化其下游的 Rac1。我們在西方墨點轉漬法的實驗中發現，EphB3/ephrin-B 分子訊息可以將 CrkL 分子 [CrkL 屬於 Crk 分子的一種 subtype，全名為 v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like] 的第 207 個氨基酸—tyrosine (Y207) 加上磷酸根，而 CrkL

的磷酸化會使 CrkL 分子失去活性 (圖二十一, 此處的抗體只會和 Y207 被磷酸化的 CrkL 分子結合)。綜合以上的結果, 我們可以知道: EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠將 CrkL 去活化, 因此其下游分子 Rac1 也會被去活化; 也就是說, EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠將 CrkL-Rac1 pathway 去活化。CrkL-Rac1 pathway 為一目前已知能夠促進 EMT 的分子路徑, 所以 CrkL-Rac1 pathway 的去活化能夠驅動細胞進行 MET。

接下來我們以西方墨點轉漬法研究細胞的上皮分子標記 (epithelial marker) 是否產生變化, 這些上皮分子標記包括 E-cadherin、 β -catenin 和 γ -catenin (即 plakoglobin) (圖二十一)。我們發現, EphB3/ephrin-B 分子訊息會增加最重要的上皮細胞分子標記 E-cadherin 的 protein level。此外, EphB3/ephrin-B 分子訊息也能夠驅動 β -catenin 和 γ -catenin 由細胞核穿越核膜轉移到細胞質之中 (在細胞核細胞質分離以及西方墨點轉漬法的實驗中, 我們發現細胞核中的 β -catenin 和 γ -catenin 減少了, 另一方面, 細胞質中的 β -catenin 和 γ -catenin 卻增加了)。我們還發現 β -catenin 進行細胞質轉移 (cytoplasmic translocation) 的幅度要大於 γ -catenin。 β -catenin 和 γ -catenin 這兩種分子進行細胞質轉移的驅動力可能來自於細胞膜上數量增加並且極化的 E-cadherin, 因為已知細胞膜上的 E-cadherin 可以直接和 β -catenin 結合, 也可以間接和 γ -catenin 結合。為了證實此一觀點, 我們進行了免疫沈澱實驗 (immunoprecipitation): 先用可以和 E-cadherin 結合的抗體抓住 E-cadherin 分子, 此時, 能夠和 E-cadherin 緊密結合的分子, 例如 β -catenin, 也會被一起抓住; 接著將 E-cadherin 分子複合物 (包括 E-cadherin 以及和它緊密結合的分子) 沈澱出來 (由細胞萃取液中分離出來)。然後再用可以辨認 β -catenin 的抗體對此複合分子進行西方墨點轉漬法實驗。結果顯示, β -catenin 會被 E-cadherin 牢牢的抓住; E-cadherin 愈多, 抓住的 β -catenin 也就愈多 (圖二十二)。

3.3.5 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘導的分子傳遞路徑和 Wnt signaling pathway 之間的分子連繫 (crosstalk)

上一小節中我們已經證實 EphB3/ephrin-B 分子訊息可以減少細胞核中 β -catenin 分子的數量。這表示 Wnt 分子傳遞路徑會受到 EphB3/ephrin-B 分子訊息的影響，因為 β -catenin 是 Wnt signaling pathway 中的樞紐分子。在細胞核中， β -catenin 可以和其他的 cofactors 一起啟動 Wnt 分子路徑下游基因的轉錄。細胞核中 β -catenin 的功能性指標是 β -catenin 的活性 (β -catenin activity)，或更精確的說應該是 β -catenin/TCF 的活性 (β -catenin/TCF activity)，而非 nuclear β -catenin 的數量。事實上， β -catenin/TCF activity 可以等同於 Wnt 分子路徑下游基因的轉錄活性。如果我們要下結論說細胞核中 β -catenin 數量上的改變會影響 Wnt 分子訊息，光是以細胞核細胞質分離以及西方墨點轉漬法證實 nuclear β -catenin 在數量上面的降低是不夠的，還必需提出 β -catenin/TCF 活性測試的數據，而報導基因表現分析實驗 (reporter assay analysis; TOP/FOP luciferase reporter assay) 可以達到此一目的地。

圖二十三是測試 β -catenin/TCF 活性之報導基因表現分析實驗的實驗結果。相較於 control cells，在 K6 以及 L32 這兩個細胞株中，細胞核中 β -catenin 的分子數量較少，能夠結合 TOP (TCF reporter plasmid) 並且活化螢火蟲基因然後製造 luciferase 的能力因此大幅減低，所以測量到的螢光訊號強度也大幅的減弱。一般皆認為：報導基因表現分析的結果可以代表整個 Wnt 分子訊息的活性。因此，根據此一結果，我們可以做出以下的結論：EphB3/ephrin-B 分子訊息可以減低 Wnt 分子傳遞路徑的活性。

接下來我們要深入探討的問題是，那些 Wnt 分子路徑的下游基因受到了 EphB3/ephrin-B 分子訊息的調控？我們一共找了九個已知的 Wnt- β -catenin 分子路徑的下游基因 (*Ascl2*, *Axin2*, *c-Myc*, *cyclin D1*, *p21*, *fra-1*, *c-jun*, *uPAR* and *ZO-1*) 來偵測其基因表現在 control cells、K6 以及 L32 細胞株中有無改變。結果發現，其中 8 個基因的基因表現沒有顯著的變化 (圖二十四)，只有 *ZO-1* 的表現發生變

化。由圖二十五右側西方墨點轉漬法實驗的結果可知：ZO-1 的 protein level 在 K6 以及 L32 兩個細胞株中明顯的增加了。ZO-1 分子不但是 Wnt- β -catenin 分子訊息的下游基因，也是細胞-細胞黏合分子的重要成員。在分化成熟的上皮細胞，ZO-1 分子是位於細胞-細胞側邊接合處的最上（最外）一層，負責將上皮細胞密封，可以防止液體、離子以及分子滲透穿過細胞-細胞接合處。圖二十五的共軛焦螢光顯微鏡顯示：ZO-1 分子（綠色螢光）在 L32 細胞主要是分佈於細胞膜上，而且量有明顯的增多。共軛焦螢光顯微鏡在 Z 軸的連續切面影像（圖二十五最下面一排的螢光影像）更進一步顯示 ZO-1 分子的確是位於細胞-細胞側邊接合處的次頂端位置（subapical），而 E-cadherin 分子（紅色螢光）則是位於細胞-細胞側邊接合處的側邊以及基底側邊的位置（lateral and basolateral），這些細胞-細胞接合處之特徵只有在分化成熟之上皮細胞才觀察的到。

3.3.6 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠減弱間質細胞標記同時強化上皮細胞標記

除了扮演 Wnt 分子傳遞路徑中的關鍵分子，前述的 β -catenin 分子在 EMT 或 MET 的研究領域中同時又扮演著另外一個角色。目前細胞核內的 β -catenin (nuclear β -catenin) 分子已經被研究學者認可為間質細胞標記 (mesenchymal marker) 之一。所以 nuclear β -catenin 的降低，代表細胞的間質特性減弱。為了增加說服力，我們需要再尋找更多的間質細胞標記。結果我們發現，fibronectin (一種上皮細胞無法製造，但是間質細胞會生產及分泌的細胞間質基質蛋白，也是目前公認的間質細胞生化學標記之一) 的製造在表現 EphB3 的 K6 以及 L32 細胞有顯著減少的趨勢（圖二十六左側圖）。圖二十六左圖中 Y 軸的 FN1 乃指 fibronectin 基因。我們之所以採用 mRNA (以 real-time RT-PCR 來量化細胞中的 fibronectin mRNA) 而非以 protein 來定量 fibronectin 的表現，主要是因為 fibronectin protein 有許多不同的 isoforms，導致西方墨點轉漬法會偵測到許多 banding 而產生所謂實驗結果專一性不夠的問題。此外，我們也在 K6、L32、Vector 和 WT 細胞株測量另外兩種常見的間質細胞標記—vimentin 和 N-cadherin—的表現，但是並未觀

察到有顯著的差異存在 (圖二十六右側上及下圖)。相對於間質細胞標記的減弱，上皮細胞標記是否增加了呢？是的，前述的三種細胞—細胞間黏合分子 ZO-1、E-cadherin 和 plakoglobin (γ -catenin) 都是上皮細胞標記 (epithelial markers)，ZO-1 和 E-cadherin 在 K6 以及 L32 細胞之中的 protein level 都增高了，而 plakoglobin 在 K6 以及 L32 細胞的細胞質之中的量也增高了 (plakoglobin 由細胞核轉移到細胞質)。

3.3.7 EphB3/ephrin-B 分子訊息誘導間質上皮轉換在生物活體環境 (*in vivo*) 之分子生物學證據

上述的分子生物學證據皆來自於培養皿中培養的細胞。是否生物個體中的細胞也有相同的結果，值得進一步的研究。我們將 control cells 和持續表現 EphB3 的細胞株 K6 或 L32 同時注射到 8 週大的裸鼠背部的皮下組織，打入的細胞會逐漸長大形成背部的皮下腫瘤。兩個月之後犧牲裸鼠，將裸鼠背部的皮下腫瘤取出，萃取組織細胞中之蛋白質進行西方墨點轉漬法。結果我們發現 E-cadherin 在 L32 細胞株中呈現向上調控，phospho-CrkL 的量也顯著增加，但是 CrkL 的總量不變 (圖二十七)。在此圖中，以西方墨點轉漬法雖然可以看出 E-cadherin 和 phospho-CrkL 這兩個分子的 protein level 在 Vector-tumor 以及 L32-tumor 之間確實有差異存在，但是此差異並未達到統計學上的顯著水準。這主要是因為樣本數太小 ($n=3$) 以及腫瘤組織細胞的異質性 (heterogeneity) 所致。所謂腫瘤組織細胞的異質性乃指腫瘤組織包含了癌細胞和不同種類的基質細胞，例如血管內皮細胞、血管平滑肌細胞、纖維母細胞、以及外來的浸潤淋巴細胞等等。

3.3.8 利用 RNA 干擾技術在 L32 細胞株中敲除 EphB3 的基因表現 (knockdown of EphB3) 能夠完全逆轉間質上皮轉換

到目前為止所敘述的實驗結果都是來自於開啓基因功能 (gain-of-function) 這一類型的研究；為了進一步鞏固前述實驗結果之推論，我們還必須提出相反類

型—即關閉基因功能 (loss-of-function)—的研究證據，觀察是否在基因功能被關閉之後，細胞能夠回復原來的生物學表型 (phenotype)。

先前的 L32 cells 就是在野生型 HT-29 cells (wildtype HT-29 cells 呈現 mesenchymal-like phenotypes) 開啓 EphB3 基因功能之後轉型而成的穩定細胞株 (L32 cells 呈現 epithelial-like phenotypes)；因此，我們要進行的第一個反向實驗就是要關閉此細胞株的 EphB3 基因表現。利用 RNA 干擾技術，我們成功的在 L32 細胞株中敲除了 EphB3 的基因表現 (圖二十八)。圖二十八中的 f 小圖顯示：以小干擾 RNA (siRNA) 降低 EphB3 的表現之後，三個關鍵性的分子—E-cadherin、ZO-1 和 phospho-CrkL 的 protein level 也跟著降低了；這個實驗完全符合預期的結果。圖二十八中的共軛焦顯微鏡影像是一團接受 siEphB3 作用的 L32 細胞，其中右上角的一些細胞逃過了 siRNA 的作用 (b~e 小圖中弓箭符號所指之細胞叢，e 小圖中的白色框，和 g 小圖)，保持著 L32 細胞株緊密相接的形態。其他成功的被 siRNA 敲除了 EphB3 基因表現的細胞 (b~e 小圖中箭頭符號所標示之細胞叢，e 小圖中的紅色框，和 h 小圖)，則失去了 cortical-actin-cytoskeleton 和細胞膜上極化了的 E-cadherin (h 小圖)，同時伸張出細胞偽足，形態上轉變成和野生型 HT-29 細胞類似的外形。

3.3.9 利用 RNA 干擾技術在 LS174T 細胞株中敲除 EphB3 的基因表現 (knock-down of EphB3) 能夠促進上皮間質轉換

另外我們又找了一個原本就會大量表現 EphB3 的細胞株—LS174T (圖二十九)。野生型的 LS174T 是一種腺瘤樣 (adenoma-like) 的細胞，會表現大量的 EphB，其共焦顯微鏡影像幾乎和 L32 細胞一模一樣：有緊密的細胞—細胞接合，cortical-actin-cytoskeleton，和細胞膜上極化了的 E-cadherin (小圖 b、d、e、m)。當 LS174T 細胞的 EphB3 表現被 siRNA 成功的敲除之後 (小圖 k)，和 L32 細胞類似的 LS174T 細胞 (小圖 a~e) 轉變成了和野生型 HT-29 細胞類似的 LS174T 細胞 (小圖 f~j)，細胞偽足也伸展開來，細胞膜上極化的 E-cadherin 消失，E-cadherin

由細胞膜上解離到細胞質中，cortical-actin-cytoskeleton 的細胞骨架也分解消失 (小圖 g、i、j、n)。小圖 l 中弓箭符號所指之細胞叢是逃過 siRNA 的作用的一群細胞；小圖 l 中箭頭符號所指之細胞叢則是 EphB3 表現被 siRNA 成功敲除的一群細胞。

3.3.10 利用 RNA 干擾技術在 HT-29 細胞株中敲除 EphB3/ephrin-B 的下游基因—CrkL 的基因表現 (knockdown of CrkL) 能夠促進間質上皮轉換

CrkL 是一個已經被證實的 epithelial-to-mesenchymal transition 上游分子，在我們的實驗模型中，我們已經證實 CrkL 可以被 EphB3 分子訊息在其分子的第 207 個氨基酸 (酪氨酸 Y207) 加上磷酸根而轉變成去活性的 phospho-CrkL。為了證實 CrkL 在本研究模型中之角色，我們利用 RNA 干擾技術敲除 control cells (control vector 轉染的 HT-29 細胞，不具 EphB3/ephrin-B 分子訊息) 中 CrkL 的基因表現。此一動作可以造成 CrkL protein level 的降低，對細胞的效果理論上等同於 CrkL 被磷酸化而失去活性。圖三十即為實驗的結果：control cells 和野生型 HT-29 細胞一樣，都有伸展的外形和細胞偽足；但是當 control cells 被小干擾 RNA 成功的敲除了 CrkL 的基因表現之後，control cells 的外形緊縮，變成鵝卵石狀，細胞中散佈的 F-actin 也形成了特徵性的 cortical-actin-cytoskeleton 細胞骨架。這些細胞和 L32 細胞在外觀上幾乎一模一樣，只不過前者是 CrkL protein level 因為 siRNA 的作用而降低，而後者則是因為 EphB3/ephrin-B 分子訊息將 CrkL 去活化而造成。圖三十中的小圖 j 顯示：control cells 中 CrkL 的基因表現被敲除之後，細胞在 Transwell invasion chamber 中的爬行能力也會顯著的減低 ($n = 3$ ***, $P < 0.001$ by Student's *t*-test)。

3.3.11 EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑中調控 E-cadherin 的上游基因有待進一步的研究

調控 E-cadherin 的上游基因已經陸續的被科學家發現，已知的 E-cadherin 上

游調控基因有 *Twist*、*Slug*、*Snail*、*FOXC2* 和 *ZEB2* 等。圖三十一是這五個基因在有以及沒有 EphB3 表現的細胞株中的定量 RT-PCR 實驗結果。結果顯示，EphB3/ephrin-B 分子傳遞路徑中 E-cadherin 並不是受到這五個上游基因的調控。因此，負責調控 E-cadherin 的其他上游基因目前還有待進一步的研究。

3.3.12 EphB3/ephrin-B 分子訊息傳遞路徑：一個初步的簡圖

我們將本研究中的分子訊息傳遞路徑歸納成為圖三十二中一個初步的簡圖。由於已經有一些研究指出 Abl 是 Crk 的上游分子，所以我們也將 Abl 分子放入此簡圖之中；但由於本研究中尚未對此點加以驗證，所以在 Abl 的後面加上一個問號。

結果之第四部分 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌的生長

3.4.1 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞生長的臨床證據

此部分已經在結果之第二部分中的第二小段中 (3.2.2 小節) 有詳細的敘述。簡而言之，就是在我們的大腸直腸癌外科樣本中，較不惡性的腫瘤有較高的 EphB3 基因表現，在擴散、轉移、較惡性的腫瘤中，EphB3 的基因表現則是非常的弱。

3.4.2 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞生長的 *in vitro* 證據

當穩定表現 EphB3 的 HT-29 細胞株例如 K6、L32 被分離出來的時候，我們發現它們在培養皿中進行分裂生長的速度比起 control cells 要慢很多。其中的差異在播種細胞於培養皿之後的第三天即可以明顯的察覺到。到了第六、七天，control cells 幾乎已經長滿了培養皿平盤，但是 K6 和 L32 細胞只長滿了培養皿平盤的大約一半而已 (圖三十三)。

一般細胞必須貼附在培養皿平盤的底部才能夠生長，這種特性稱之為依賴貼

附表面的細胞生長 (anchorage-dependent growth)，沒有貼附而懸浮的狀態會造成未轉形細胞 (non-transformed cells) 的死亡。可是癌細胞卻可以不需要貼附在培養皿平盤的底部而能夠以懸浮的方式在培養基之中不斷地分裂生長，此種特性我們稱之為不依賴貼附表面的細胞生長 (anchorage-independent growth)，這是癌細胞在細胞培養過程中最重要的生物學表型之一。圖三十四是四個細胞株以懸浮方式播種在軟洋菜凝膠 (soft agar) 之中，再以一般方式培養 21 天之後細胞生長的情形。用解剖顯微鏡可以看到軟洋菜凝膠之中由單一顆細胞分裂增殖而形成的獨立細胞群落 (colony)，我們將解剖顯微的影像拍攝成照片，而一個照片的面積等於一個軟洋菜凝膠培養皿平盤總面積的三十五分之一。由圖三十四的結果可以明顯的看出：EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠抑制大腸直腸癌細胞在軟洋菜凝膠之中的懸浮生長，也就是能夠降低大腸直腸癌細胞的惡性程度。

3.4.2 EphB3/ephrin-B 分子訊息抑制大腸直腸癌細胞生長的 *in vivo* 證據

我們將 control cells 和穩定表現 EphB3 的細胞株 K6 以及 L32 打入免疫缺損的裸鼠背部的皮下組織 (control cells 打入裸鼠背部的左側，K6 或 L32 細胞打入裸鼠背部的右側)。八週之後，我們發現：由 K6 和 L32 細胞株長成的腫瘤團塊比由 control cells 長成的腫瘤團塊要小很多，大約只有 1/3~1/4 (圖三十五) [互相比較的成對腫瘤 (control vs K6 或 control vs L32) 皆採自於同一隻裸鼠的身上]。這個在裸鼠身上細胞生長差異的結果和前一小節所描述細胞在培養皿平盤中生長差異的結果是完全一致的。

我們也將取自裸鼠背部的腫瘤做成組織切片，再以組織免疫技術將組織切片以 Ki-67 染色 (Ki-67 是一種 proliferation marker)。結果顯示：組織切片中的 Ki-67 positive cells 在由 control cells 長成之腫瘤團塊比較多，在由 K6 cells 長成之腫瘤團塊和 L32 cells 長成之腫瘤團塊比較少 (圖三十六，Ki-67 免疫組織切片以 400× 顯微鏡拍攝)。這表示 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠抑制大腸直腸癌細胞的增殖 (proliferation)。我們用西方墨點轉漬法檢視這些細胞株中和 MAPK pathway 相關

的 Erk-1 和 Erk-2 分子以及其磷酸化型式之 phospho-Erk-1 和 phospho-Erk-2 的表現量，結果我們並未觀察到這些分子在四個細胞株中的表現量有顯著的差異（此項結果未予以陳列）。

3.4.4 EphB3/ephrin-B 分子訊息促進大腸直腸癌細胞凋亡的 *in vitro* 證據

在培養皿平盤中培養 K6 和 L32 細胞的時候，我們發現一個明顯的現象：在培養 K6 和 L32 細胞的液體培養基（此處用 DMEM 作為液體培養基）中用肉眼就可以看見許多沒有貼附在培養皿底部而飄浮在液體培養基中的細胞，而在 control cells 的液體培養基中則看不到這種飄浮的細胞。在培養的第六天，我們將四種細胞株的液體培養基全部換新；此刻剛換過的液體培養基中完全沒有飄浮的細胞。24 小時之後，液體培養基中會有新的飄浮細胞出現，我們收集液體培養基、加入 trypan blue dye，此種染劑分子只會滲透進入死亡的細胞而將之染成藍色 (trypan blue dye exclusion test)。我們發現：液體培養基中的飄浮細胞全部都被染成藍色；因此，我們可以確定這些飄浮細胞都是已經死亡的細胞（圖三十七）。然而，trypan blue (+) cells 並不完全等於進行細胞凋亡的細胞，其他原因造成死亡的細胞也會被包括在 trypan blue (+) cells 之中，因此，我們需要另一種偵測細胞凋亡更具專一性的實驗。

運用細胞流速儀 (flowcytometry) 測量 Annexin V(+) PI(−) cells 在全體細胞之中所佔的比例是一種測量試管培養細胞之細胞凋亡狀態的精密實驗。在正常細胞的細胞膜上，磷脂 [phosphatidyl serine (PS)] 的分佈是不對稱的，帶負電荷的磷脂位於正常細胞的細胞膜內側。在細胞凋亡過程的早期，細胞已經無力維持此種磷脂分佈的不對稱性，於是位於細胞膜內側的 PS 會外翻，朝向細胞膜的外側因此而暴露出來。Annexin V 是一種 Ca^{2+} -dependent phosphatidyl serine binding protein，最初發現它是一種具強力抗凝血特性的血管蛋白，對於磷脂類（例如 PS）具有很高的親合力可以和 PS 結合。另一方面，死亡（而非凋亡）的細胞其細胞膜上 PS 的不對稱性也會被破壞，PS 也會因為外翻而暴露在細胞外表，所以在計

數凋亡細胞的同時，必需將這類死亡的細胞加以排除。PI 指 propidium iodide，可以和死亡的細胞結合，PI(+) cells 即指死亡的細胞。因此，運用細胞流速儀偵測 Annexin V(+) PI(−) cells 就可以排除凋亡細胞之外的死細胞。圖三十八是細胞流速儀的實驗結果，和 trypan blue dye exclusion test 的實驗結果平行。結果顯示：EphB3 表現愈強的細胞株，細胞凋亡的程度（比例）也愈高。在細胞凋亡的分子生物學研究方面，我們進行了 bcl-2 的西方墨點轉漬法，但是在四個細胞株之中並沒有看到顯著的差異（結果未予以陳列）。因此，有關 EphB3/ephrin-B 分子訊息誘發之細胞凋亡的分子生物學還有待進一步的研究。

3.4.5 EphB3/ephrin-B 分子訊息促進大腸直腸癌細胞凋亡的 *in vivo* 證據

TUNEL assay 是偵測活體組織細胞凋亡的精密實驗。我們拿裸鼠身上取下的成對腫瘤做成的組織切片進行 TUNEL 免疫螢光染色。圖三十九是螢光顯微鏡下觀察到的影像，其中的藍色圓點是 DAPI 染出的細胞核，發亮的綠色螢光則是標示凋亡細胞的 FITC 訊號。很明顯的，由 L32 細胞長成的腫瘤組織含有較多的凋亡細胞。有了以上支持細胞凋亡的堅固證據，我們可以下結論說：EphB3/ephrin-B 分子訊息的腫瘤生長抑制作用，一部分是來自於 EphB3/ephrin-B 分子訊息所誘發的細胞凋亡。



第四章 討論

4.1 在本研究的第一部分，我們將基因的向上調控和生物學表型（腫瘤生物行為以及臨床病理因子）進行統計相關分析，分析的結果可以告訴我們那些有用的資訊？

以下我們將個別討論向上調控基因和其相對應的生物學表型之間的關係、意義以及可能的應用價值。

MYC versus Sex

我們的研究結果顯示：c-Myc 在 94% (17/18) 男性大腸直腸癌病人的樣本中呈現向上調控，但是在女性大腸直腸癌病人的樣本中只有 54% (7/13) 呈現向上調控。此一結果顯示：性別會影響 c-Myc 的基因表現。先前已經有一些研究證實男性激素 (androgen) 可以增加前列腺癌細胞中 c-Myc 的基因表現 (Silva *et al.*, 2001; Asadi *et al.*, 1995; Quarmby *et al.*, 1987; Grad *et al.*, 1999)。因此，極有可能男性激素對於大腸直腸癌細胞也有相類似的作用（增加 c-Myc 的基因表現）。支持此觀點的另一個間接證據來自於流行病學的統計資料：臺灣地區大腸直腸癌的男女相對危險（大腸直腸癌在男女性別發生率的比）為 1.25 : 1。

MYC versus HNRPA1

HNRPA1 是 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core protein A1 的縮寫，其分子結構中有兩個演化上保留下來的 RNA binding domains (Biamonti *et al.*, 1994)，HNRPA1 分子的功能是作為 RNA 載體，能夠將細胞核內的 RNA 穿過核膜運送到細胞質 (Michael *et al.*, 1995)。我們的研究結果顯示：c-Myc mRNA levels 和 HNRPA1 mRNA levels 之間存在強烈的線性正相關（相關係數 = 0.948）。這暗示轉錄因子 c-Myc 在啟動下游和癌變作用相關基因表現的同時，也會啟動 HNRPA1 基因，運用 HNRPA1 分子載體將轉錄出來和癌變作用相關的 RNA 分子輸送到細胞質中去進行接下來的轉譯作用製造相關的蛋白分子。先前

已經有人利用 *c-myc* antisense oligonucleotides 來抑制各種癌細胞（包括大腸直腸癌細胞）的生長 (Li *et al.*, 1995)；由以上 *c-Myc* 和 *HNRPA1* 基因表現之間存在緊密關係的事實，我們可以合理的推論：結合 *c-myc* 和 *HNRPA1* 的 antisense oligos 理論上會比單獨的 *c-myc* antisense oligos 能夠更有效的抑制癌細胞的生長。

GRO1 versus Age and Tumor stage + Lymph Node Metastasis + CEA Level

先前的研究已經指出：(1) *GRO1* gene 在大腸直腸癌中是向上調控的 (Zou *et al.*, 2002) (2) *GRO1* protein 在發炎疾病中能夠強力的吸引白血球聚集到病灶並且刺激白血球的增生 (Cuenca *et al.*, 1992)。(1) 和 (2) 顯示大腸直腸癌細胞能夠大量生產 *GRO1* protein 並藉以誘發腫瘤免疫反應，因此，*GRO1* protein 是腫瘤免疫學中一個重要的作用分子。本研究中的兩項發現使我們對於 *GRO1* 的生物學功能有更深入的了解：第一、*GRO1* gene 在小於 65 歲病人的大腸直腸癌腫瘤中過度表現。這表示大於 65 歲的病人的免疫反應較弱，所以生產 *GRO1* 免疫蛋白分子的能力也就比較差。第二、*GRO1* gene 在惡性程度較低、侵襲力較低 (less advanced in stage, lymph node metastasis, and CEA levels) 的大腸直腸癌腫瘤中有過度表現的傾向 (tendency to over-express)(傾向乃指 $0.05 < P < 0.1$)。這表示 *GRO1* 這一種免疫蛋白分子對大腸直腸癌具有保護作用，能夠防止大腸直腸癌腫瘤的擴張。我們可以合理的猜測 *GRO1* 是藉著吸引免疫細胞的聚集而產生抑制腫瘤生長的作用。此項臆測是否屬實值得更深入的研究。

GPX2 versus Differentiation

GPX2 基因主要在消化道的上皮細胞中表現。它的蛋白質產物 GPX-GI 是一種細胞內酵素—硒-依賴性穀胱甘肽過氧化酶 (selenium-dependent glutathione peroxidase)，此過氧化酶是一種還原劑，能夠將 H_2O_2 和 alkyl hydroperoxides 這些氧化物進行還原反應 (Chu *et al.*, 1993)。根據 Chu 等人的研究指出：當以化學致癌物 dimethylhydrazine 誘發實驗小鼠產生大腸直腸癌時，有的小鼠比較不容易誘發腫瘤，有的小鼠卻比較容易誘發腫瘤，Chu 等人發現：前者（指比較不容易產生腫瘤的小鼠）大腸直腸癌腫瘤的 *GPX2* mRNA levels 明顯的高於後者 (Chu

et al., 1997)。

本研究中我們發現：*GPX2* 基因的向上調控和腫瘤的高度分化有顯著相關。Chu 和我們的研究都顯示一個事實：*GPX2* 基因的表現不利於腫瘤的增生，原因可能來自於 *GPX2* 的促進細胞分化作用。Chu 等人在一個人類乳癌細胞株中也發現：具有促進細胞分化作用的維他命 A—retinoic acid 能夠誘發 *GPX2* 的基因表現 (*GPX2* 的基因序列有 retinoic acid 可以結合的調控部位) (Chu *et al.*, 1997)。因此，我們可以提出以下的猜測：retinoic acid → 誘發 *GPX2* 的基因表現 → 促進癌細胞分化 → 降低癌細胞的惡性程度。如果 retinoic acid 在大腸直腸癌細胞 (如同乳癌細胞株的實驗) 也可以誘發 *GPX2* 的基因表現，那麼臨床上給予 retinoic acid (維他命 A)，就能夠促進大腸直腸癌細胞的分化，兼具預防和治療的效果。

THY1 and PHLDA1 versus Anemia

THY1 gene 產生的 THY-1 蛋白，是 T cell、造血幹細胞、肝臟幹細胞以及急性骨髓性白血病的芽母細胞 (blast cells of acute myeloid leukemia) 所特有的細胞膜表面糖蛋白 (Petersen *et al.*, 1998; Kozii *et al.*, 1997)。*THY-1* 是免疫球蛋白超基因家族 (immunoglobulin supergene family) 中分子結構最簡單的 T 細胞抗原受體 (T cell antigen receptor) (Hood *et al.*, 1985)，但是這個 T 細胞表面抗原在免疫反應中的角色至今仍然不是很清楚。在實驗小鼠的研究中，已經證實 *PHLDA1* 是一個 T 細胞死亡相關基因 (T cell death-associated gene)，主要在腸道表現，*PHLDA1* protein 的分子結構和 T 細胞 epitope 有高度的相似性 (Kumar *et al.*, 2002)。由以上之事實我們可以知道 *THY1* 和 *PHLDA1* 這兩種免疫蛋白分子和 T 細胞免疫作用有密切的關係。

在本研究中，我們發現：*THY1* 和 *PHLDA1* 這兩個基因在大腸直腸癌腫瘤中都呈現向上調控，且這兩個基因的表現都和病人的貧血有統計上的顯著相關。因此，我們可以合理的推測：*THY1* 和 *PHLDA1* 是負責大腸直腸癌腫瘤和免疫系統之間分子交互作用 (molecular crosstalk) 的表面蛋白分子。我們也因此強烈的懷疑 *THY1* 和 *PHLDA1* 這兩種細胞的表面抗原分子能夠吸引腫瘤浸潤 T 細胞

(tumor-infiltrating T cells)，並且進一步造成腫瘤細胞壞死 (Golby *et al.*, 2002) 以及接下來的腫瘤團塊出血和病人的貧血。此項臆測是否屬實還有待進一步的研究。

4.2 基因的 mRNA level 可以預測生物學表型 (phenotype) 嗎？－基因表現和生物學表型的統計相關研究可以幫助我們找出下一步的研究方向以及可能的治療分子標地

傳統上基因的 mRNA level 等於基因的表現狀態，但是分子生物學教科書總是強調：mRNA level 並不等於 protein level，而後者才是生物功能的真正執行者。然而，以實驗技術層面來看，mRNA level 可以用定量 RT-PCR 實驗精確的加以測量，但是 protein level 的偵測需要用到專一性的抗體，而很多功能未知、尚待研究的基因它們所製造的 protein 並沒有現成可用的抗體可以用來進行偵測，或者是現成可以購得的抗體並不理想。因此，一個急需要釐清的事實就是：基因的 mRNA level 是否可以對應到特定的生物學表型 (phenotype)？由我們的研究結果顯示，以上的答案是肯定的。但是，這一些關於向上調控基因的臨床相關研究，其結果只是一種統計推論 (statistical inference)，我們需要更多的科學證據來確認這些臆測，也就是要經由品質良好的實驗才能夠作成因果推論 (causal inference)，亦即科學推論 (scientific inference)。但是經由上一小節的討論可以知道，經由基因表現和生物學表型的統計相關研究，的確能夠明確的找到許多有意義的研究方向以及可能的、可以運用於臨床治療的分子標地。以下開始，我們即專注於其中一個基因 (指 EphB3) 的探討，從臨床，細胞以及分子生物學的角度來研究 EphB3 基因的生物學功能。

4.3 為什麼 EphB3 是在大腸直腸癌形成的早期扮演腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的角色？

Eph 酪氨酸磷酸激酶受體家族 (Eph receptor tyrosine kinase family) 是現今已

知最大的 receptor tyrosine kinase 家族，此分子家族的成員眾多，而其多樣性的生物學功能在過去的十餘年裡，陸續的被科學家發現。從最早期在發育生物學領域，尤其是神經發育的過程中，Eph 扮演著引導分子 (guidance molecules) 的角色，到後來在血管新生、腫瘤生物學，以及幹細胞生物學，Eph family 的各個成員都展現出它們多才多藝的面貌。但是最令人困惑的是 Eph 在癌症所扮演的角色。因為大約一半的研究報告指出：Eph 受體的活性會促進癌化過程，而這些報告大多來自於較早期的研究；近年來另一半的研究則指出：Eph 分子訊息能夠抑制癌細胞的生長。這些完全相反的結果實在令人不解，但是隨著證據的逐漸累積，最近已經有人提出了可以同時解釋這兩種完全相反現象的分子模式 (Chen *et al.*, 2008)。簡單的說，就是當 Eph receptor 沒有和它的 ligand 結合的時候 (ligand-independent EphB3 signaling)，Eph receptor 的內在活性 (intrinsic activity) 能夠促進癌化過程；但是當 Eph receptor 和它的 ligand 結合時 (ligand-dependent EphB3 signaling)，其下游的分子訊息能夠抑制癌細胞的生長。

我們的研究結果，完全符合此一說法：在全部的 36 個大腸直腸癌樣本中，18 個樣本是 Dukes' B stage tumors，Dukes' B stage 表示癌細胞侷限在大腸壁，還未擴散到腸道以外的地方，所以癌細胞細胞膜上的 EphB3 receptor 沒有機會和其 ligands — ephrin-B1 或 ephrin-B2 結合；因此這個時候的 ligand independent signaling 能夠夠促進癌化過程，對癌細胞是有利的，我們觀察到的現象則是 EphB3 mRNA level 為 Tumor/Normal > 2。

另外 18 個樣本是 Dukes' C stage tumors，Dukes' C stage 代表近處轉移，表示癌細胞已經擴散到原發腫瘤附近的淋巴結。剩下的 6 個樣本是 Dukes' D stage tumors，Dukes' D stage 代表遠處轉移，表示癌細胞已經擴散到遠處器官例如肝臟、肺臟等。只要癌細胞擴散到腸道以外的地方，幾乎就不可避免的會碰上細胞膜上有 ephrin-B 的細胞。因為細胞膜上有 ephrin-B 的細胞廣佈於身體各組織之中，例如：成熟分化的腸道上皮細胞 (Batlle *et al.*, 2002; Cortina *et al.*, 2007)，動脈的內皮細胞 (Gale *et al.*, 2001)，以及其他組織 (Surawska *et al.*, 2004)，所以只

要癌細胞擴散到腸道以外的地方，細胞膜上有 EphB3 的癌細胞就會因為 EphB3/ephrin-B 的結合而活化 ligand-dependent EphB3 signaling 因而抑制癌細胞的生長。我們的研究結果顯示，在 Dukes' C 和 Dukes' D stage tumors，EphB3 的表現程度會降到很低，此現象對癌細胞是有利的，而我們觀察到現象的是 EphB3 mRNA level 為 Tumor/Normal < 2 。

當 36 個樣本混合在一起統計的時候，因為 50% (18/36) 的樣本是 Dukes' B，其 mRNA level 為 Tumor/Normal $>>> 2$ ，而剩下的 50% [(12+6)/36] 的樣本是 Dukes' C+D，其 mRNA level 為 Tumor/Normal < 2 ，所以如果不分 Dukes' stage 而將樣本混合在一起進行統計，就會得到圖七中 EphB3 mRNA level 為 Tumor/Normal > 2 的結果。綜合以上之觀察，我們可以做出以下的推論：EphB3 在大腸直腸癌形成的早期扮演腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的角色，如果大腸直腸癌細胞不在腫瘤的早期將表現 EphB3 的基因關閉，ligand-dependent signaling 將會阻礙癌細胞的增生。此外，還有兩個研究報告和我們的結果也十分雷同：第一、EphB2 和 EphB4 表現量最高的大腸直腸癌腫瘤是最早期的腫瘤 (Batlle *et al.*, 2005)，第二、EphB 媒介的腫瘤隔離作用 (EphB-mediated tumor compartmentalization) 發生在大腸直腸癌腫瘤的最早期 (Cortina *et al.*, 2007)。

大腸直腸癌細胞如何在腫瘤的早期關閉 EphB 基因？這個問題在 EphB2 和 EphB4 已經有人提出了答案。大腸直腸癌細胞在腫瘤的早期會將 EphB2 和 EphB4 基因的啟動子 (promoter) 過度甲基化 (hyper-methylation) 因而關閉基因的轉錄作用 (Alazzouzi *et al.*, 2005; Davalos *et al.*, 2006)。啟動子的甲基化是一種 epigenetic modification。是否大腸直腸癌細胞也是經由 EphB3 啟動子的甲基化而關閉 EphB3 的基因表現還有待進一步的研究。

4.4 Miao 等人對於 EphB3 分子訊息的研究著墨甚多，本研究之結果和 Miao 等人的實驗結果有何異同之處？

Miao 等人是在 HEK293 cells 中建立穩定表現 EphB3 和其突變分子的兩種細

胞株 (表現 mutant EphB3 的細胞株不會產生 EphB3 signaling)，然後用抗體聚合成多價的 ephrin-B1 (soluble pre-clustered ephrin-B1-Fc) 來刺激 HEK293 cells 細胞表面的 EphB3 receptor，再觀察細胞行為以及 Rho family small GTPase 相關分子的變化 (Miao *et al.*, 2005)。他們發現，ephrin-B1-Fc 和 293 cells 細胞膜上 EphB3 receptor 的結合可以使細胞的偽足縮回、使細胞失去伸展的形態變成鵝卵石般的外形 (cell rounding)，抑制細胞的爬行能力，造成細胞－基質間黏著力 (cell-matrix adhesion) 的減低，並造成 Rac1 (一種 small GTPase) 活性的明顯降低。

除了細胞－基質間黏著力這個變項之外，我們的研究結果和 Miao 等人的發現幾乎完全相同。在我們的實驗中，細胞－基質間黏著力並沒有發生改變 (圖十七)，我們是以細胞間基質分子 (我們一共測試了 fibronectin、collagen I 和 laminin 三種分子) 事先黏附於 96 孔培養皿平盤的底部，然後加入細胞懸浮液靜置兩小時，接著倒掉細胞懸浮液，再舒緩的沖洗掉沒有黏附在培養皿平盤小孔底部的細胞。黏附的細胞經過固定、打洞以及染色之後測量其光學密度 (optical density, OD)。我們這一項實驗的結果和 Miao 等人的結果有所差異 (細胞－基質間黏著力沒有減低 vs 減低)，原因可能有下列兩種：第一、不同細胞之間本質上的差異 (cell-type idiosyncrasy)，以及/或，第二、EphB3/ephrin-B 交互作用型式的不同——在 Miao 等人的研究中，EphB3/ephrin-B 是以 *trans* 的方式交互作用 (EphB receptor 和其 ligand 不在同一細胞上)，但是在我們的研究中 EphB3/ephrin-B 是以 *cis* 的方式交互作用 (EphB receptor 和其 ligand 位於相同細胞的細胞膜上，所以一個細胞之中會有兩種 signaling，即 EphB3 receptor 的 forward signaling 以及 ephrin-B1/B2 的 reverse signaling)。

4.5 Eph/ephrin 這一對 receptor/ligand 的作用方式有兩種——同位交互作用 (interaction in *cis*) 以及異位交互作用 (interaction in *trans*)，其間的差異為何？

本研究選擇 HT-29 大腸直腸癌細胞株作為研究的對象，因為野生型的 HT-29 細胞本身就會表現 ephrin-B1 和 ephrin-B2，而這兩種細胞膜分子正是 EphB3

receptor 的配位子。因此我們轉染 EphB3 的表現質體之後，這些細胞的細胞膜上就同時具有 EphB3 receptor 以及 ephrin-B ligand，此時 EphB3/ephrin-B 就是以 *cis* 的方式交互作用 (*interaction in cis*)，我們稱之為同位交互作用。

然而，許多的研究是以像 Miao 等人的實驗方式利用聚合的多價 ephrin 分子複合物代替細胞膜上的 ephrin 去活化 Eph receptor，此種交互作用的方式我們稱之為異位交互作用 (*interaction in trans*)。異位交互作用的研究模式有其優點：(1) 實驗的方法和技術比較簡單。(2) 在十幾到三、四十分鐘之內就可以看到 Eph/ephrin 交互作用的短期效應。(3) 在此研究模式之中，細胞只有 Eph receptor 下游的 forward signaling，沒有 reverse signaling (因為 ephrin 不位於細胞膜上，無法產生 reverse signaling)，因此，所觀察到的細胞行為以及分子生物學的變化全部都可以歸因於 Eph receptor 下游的 forward signaling。但是異位交互作用作為研究模式也有其缺點：(1) 用以活化 Eph receptor 的配位子 (聚合的多價 ephrin 分子複合物) 在自然界中並不存在，雖然聚合的多價 ephrin 分子複合物也被證實能夠引起 Eph receptor 的磷酸化，但是終究和細胞膜上的 ephrin 分子有所差異，所以在此種研究模式之下，要對實驗結果做出任何的結論都要非常的小心。(2) 利用聚合的多價 ephrin 分子複合物去刺激 Eph receptor，Eph receptor 被活化的時間很短，不易觀察到 Eph/ephrin 交互作用的長期效應，例如腫瘤的生長促進或生長抑制作用，在 soft agar 中要觀察至少 3 週，在裸鼠身上要觀察至少 8 週。

本研究中的實驗系統是讓 EphB3/ephrin-B 這一附 receptor/ligand 以 *cis* 的方式交互作用。事實上，近幾年來有愈來愈多的證據顯示，很多重要的生理恆定控制機轉是以 Eph/ephrin 的同位交互作用方式 (*interact in cis* = Eph and ephrin are co-express in the same cell) 來進行精確的調控。例如，神經再生過程之中的路徑尋找 (path finding) (Marquardt *et al.*, 2005)，胰臟的 β 細胞對血糖的調控 (Konstantinova *et al.*, 2007)，等等。此外，肺癌和大腸直腸癌已經被證實可以同時表現 (co-express) EphB 受體和其配位子 ephrin-B (Tang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002)。我們之所以會採用這種 EphB3/ephrin-B 在同一細胞表現、以同位交互作

用作為研究的模式，是因為此模式有其無法取代的優點：因為細胞株是由轉染質體穩定持續的表現 EphB 以及/或 ephrin-B，所以 EphB/ephrin-B 的分子訊息會比較強烈、持久，也永遠不會減弱消失，所以 (1) 一些 phenotypes 可能會因此有比較大的變化，(2) 可以看到 Eph/ephrin 交互作用的長期效應。然而，以同位交互作用作為研究模式的重大缺點就是，研究系統之中包括了兩種分子訊息：forward signaling 以及 reverse signaling，如果無法加以區分，就沒有辦法下結論說那一些細胞行為以及分子生物學上的變化是來自於其中的那一種分子訊息。如果兩種分子訊息對某一種細胞行為的效應是相反的，就可能會互相抵消，例如上一小節 (4.4) 中所討論的“EphB3 分子訊息對細胞－基質間黏著力”沒有影響，就有可能是兩種分子訊息的效應互相抵消的結果。。

事實上，要在以同位交互作用作為研究模式的系統中區分細胞行為以及分子生物學上的變化是來自於 forward signaling 還是 reverse signaling，理論上還是有辦法的。較簡單的方法就是分別加入阻隔抗體 (blocking antibody) (例如加入能夠和 EphB3 結合，但是無法活化 EphB3 forward signaling 的 soluble ephrin-B，以便去掉 forward signaling 或是 backward signaling 其中之一)，再觀察那一些細胞行為以及/或分子生物學的變項發生改變，則該變化就對應於所關閉的分子訊息。例如 Stokowski 等人對牙齒幹細胞中 EphB/ephrin-B 交互作用的研究就是利用到此種實驗方法 (Stokowski *et al.*, 2007)。另一種比較複雜的實驗方法就是將表現 mutant Eph receptor 或是 mutant ephrin 的質體轉染細胞，使細胞表現 mutant Eph receptor 或是 mutant ephrin；這些突變的 Eph receptor 或是突變的 ephrin 自己本身不能產生下游的分子訊息，但是卻可以刺激並活化相對應的 ephrin 或是 Eph receptor 使之產生分子訊息。

本研究中的 EphB3/ephrin-B 分子訊息是在同一個細胞之中有 forward signaling 也有 reverse signaling。究竟那一些細胞行為以及分子生物學的變化是由 forward signaling 所誘發，那一些細胞行為以及分子生物學的變化是由 reverse signaling 所導致，還有待後續的研究。

4.6 上皮間質轉換 (EMT) 或間質上皮轉換 (MET) 的研究報告愈來愈多，所提出來的證據也不盡相同，目前是否有公認的標準可以定義 EMT 或 MET？

對於上皮間質轉換或者間質上皮轉換，傳統的看法如下：第一項基本的變化是細胞的形態必須有所改變，上皮細胞具有鵝卵石般的外形而間質細胞則呈現伸展的形態並具有明顯的偽足；第二項基本的變化則是細胞的爬行能力，上皮細胞不會爬行，間質細胞因具有偽足以及適合運動的細胞骨架而具有顯著的爬行能力；第三項基本的變化在於細胞是否獲得或是失去上皮細胞或是間質細胞的生化學標記 (biochemical marker)。傳統上的上皮細胞生化學標記就是E-cadherin和ZO-1，間質細胞的生化學標記則是vimentin、N-cadherin或是fibronectin。另外還有一個重要的生化學標記就是 β -catenin，細胞核內聚集的 β -catenin分子是間質細胞的生化學標記，而細胞核內 β -catenin轉移至細胞質導致細胞核內 β -catenin分子數量的減少，則是上皮細胞的生化學標記。

近幾年來，隨著愈來愈多研究報告的出現，也有愈來愈多的項目被認可成為上皮間質轉換或者間質上皮轉換的標記。2005年10月在加拿大溫哥華舉行的EMT研討會中，許多的專家和學者提出他們的意見，將眾多的EMT標記歸類成五大類如下 (Lee *et al.*, 2006)：第一類、試管內的功能性標幟 (*in vitro* functional markers) — 包括細胞爬行能力 (migration) 的增加、侵襲性 (invasion) 的增加、細胞—細胞間的緊密接合消失變成散佈狀排列 (scattering)、細胞外形轉變成為伸展狀 (elongation)、對細胞凋亡產生抵抗性 (resistance to anoikis)。第二類、間質細胞生化分子標記的增加 — 這些間質分子標記蛋白包括N-cadherin、Vimentin、Fibronectin、Snail1 (Slug)、Snail2 (Slug)、Twist、Goosecoid、FOXC2、Sox10、MMP-2、MMP-3、MMP-9、Integrin $\alpha\beta$ 6。第三類、上皮細胞生化分子標記的減少 — 這些上皮分子標記蛋白包括E-cadherin、Desmoplakin、Cytokeratin、Occludin。第四類、細胞蛋白質分子活性的增加 — 這些蛋白分子包括ILK、GSK-3 β 、Rho。第五類、細胞核內特定蛋白質分子的聚集 — 這些核內蛋白分子包括 β -catenin、Smad-2/3、NK- $\kappa\beta$ 、Snail1 (Snail)、Snail2 (Slug)、Twist。以上是符合EMT條件最

新之共識，MET的符合條件也就是以上各細項相反的情況。如果某一分子訊息造成之效應可以符合以上五大類別的大部分條件或是相反情況的條件，那麼，此一分子訊息就可以歸納到EMT或MET相關之分子訊息。

本研究第二部分的研究主題為EphB3/ephrin-B分子訊息，此分子訊息符合上述五大類（相反情況）的條件為何？分別列舉如下：第一類、試管內功能性標記（*in vitro functional markers*）的變化—EphB3分子訊息造成細胞爬行能力的降低、侵襲性的減弱、細胞—細胞之間由鬆散狀排列變成緊密接合、細胞外形由伸展狀轉變成為鵝卵石狀、對細胞凋亡更加敏感。第二類、EphB3分子訊息造成間質細胞生化分子標記的減少—這些間質分子標記蛋白包括fibronectin。第三類、EphB3分子訊息造成上皮細胞生化分子標記的增加—這些上皮分子標記蛋白包括E-cadherin。除了E-cadherin之外，本研究也提出ZO-1和plakoglobin這兩種上皮分子標幟。ZO-1和plakoglobin雖然沒有列在上述第三類的分子標記名單之中，但是此兩種分子分別是tight junction和desmosome的主要分子結構之一，所以早已經被學者普遍接受作為上皮細胞的分子標記。第四類、EphB3分子訊息造成細胞蛋白質分子Rac1活性的降低。第五類、EphB3分子訊息造成細胞核內特定蛋白質分子的減少—核內 β -catenin的降低。

因為我們提出證據證明EphB3/ephrin-B分子訊息符合上述五大類別的條件，所以我們下結論認定EphB3/ephrin-B分子訊息能夠促進間質上皮轉換。

4.7 為何本研究一再強調細胞接合黏著分子 junctional adhesion molecules (JAM) 在 EphB3/ephrin-B 分子訊息中的重要性，尤其是 ZO-1 分子的角色？

上皮組織的結構是由一層（少數是多層）緊密接合的細胞平面（cell sheet）覆蓋在基底層之上所形成。上皮組織的功能是作為區隔器官實質和外部空間的屏障，有保護阻絕的效果；在一些特殊的器官，藉由特化功能的上皮細胞，上皮組織可以進行吸收（養分、物理訊息、生化訊息等等）和分泌（消化液、酵素、荷爾蒙等等）等生理機能。因此，細胞—細胞間的緊密接合是上皮細胞的特徵之

一，這種緊密接合可以防止水分子、離子、以及各種生物活性分子如荷爾蒙等穿越上皮細胞平面。細胞－細胞間的緊密接合是由細胞接合黏著分子 (Junctional adhesion molecules, JAM) 建構而成。

在細胞－細胞接合面的側邊，由上到下的特化細胞接合構造依序為緊密接合 (tight junction)、黏附接合 (adherens junction)、以及橋小粒接合 (desmosome)。這三種接合構造各有其特殊的接合黏著分子，分別以 ZO-1、E-cadherin、以及 plakoglobin 為代表。我們的研究顯示：EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠強化此三種分子在細胞－細胞接合面上建構細胞連接，其分子效應分別是：(1) ZO-1 蛋白分子總量的增加以及 ZO-1 由細胞質轉移到細胞膜上。(2) E-cadherin 蛋白分子總量的增加以及 E-cadherin 由細胞質轉移到細胞膜上。(3) plakoglobin 分子由細胞核轉移到細胞質造成細胞質和細胞膜上 plakoglobin 分子的增加。藉由共軛焦顯微鏡的光學切片 (optic section) 技術，我們也提出了強而有力的證據證明 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠藉由極化細胞膜上的 ZO-1 和 E-cadherin 而促進細胞的極化 (apico-basal polarity)——在共軛焦顯微鏡的 Z 軸光學切面影像 (Z-axis image) 可以清楚的看到 ZO-1 (代表 tight junction) 的螢光訊號出現在細胞膜上的次頂端區域 (subapical region)，而 E-cadherin (代表 adherens junction) 的螢光訊號則出現在細胞膜上的側面以及基底側面區域 (lateral and basolateral region)。

以上三種上皮分子標記的出現，外加細胞膜下層狀肌動蛋白細胞骨架 (submembranous cortical-actin-cytoskeleton) 的形成，已經構成了上皮細胞極化的條件，換句話說，上皮細胞符合這一些條件即表示細胞已經完成了細胞極化程式 (suggestive of a completion of the cell polarity program; Thiery *et al.*, 2007)，成為完全分化成熟的上皮細胞。事實上，Thiery 在其綜論性的科學文獻中 (Thiery *et al.*, 2007) 已經明白的指出：在上皮細胞，細胞－細胞之間 tight junction (以 ZO-1 分子為代表) 的分解是上皮間質轉換 (EMT) 的第一步，而 tight junction 的形成則是間質上皮轉換 (MET) 的最後一步。就在 tight junction 分解之後，上皮間質轉換的第二步驟就是 adherens junction 以及 desmosome 的分解，讓細胞之間完全分

開，形成分散狀的排列 (scattering)。能夠促進 EMT 進行的大多是一些生長激素或是細胞激素。Theiry 也指出：在 EMT 相反的過程中 (即 MET 的過程)，第一步是細胞—細胞間經由 E-cadherin 分子的初步接觸，第二步是活化 Rho-GTPase，重組細胞骨架，形成 cortical-actin-cytoskeleton，進而促進 E-cadherin 在細胞膜上的組裝；第三步是 desmosome 的形成；然後最後一步就是 tight junction 的形成，將細胞之間的縫隙完全予以密合，並排列成為具固定方向性 (極化) 的細胞。由此我們可以知道 ZO-1 在 MET 過程中扮演著決定性之角色。

除此之外，ZO-1 也是 Wnt- β -catenin/TCF signaling 分子路徑中的下游分子，這代表 EphB3/ephrin-B 分子訊息藉由影響 Wnt- β -catenin/TCF signaling 下游的 ZO-1 來促進 MET。Wnt- β -catenin/TCF signaling 是發育過程以及致癌過程，特別是大腸直腸癌中最為重要的少數幾個分子訊息之一；我們的證據證實 EphB3/ephrin-B 分子訊息和 Wnt- β -catenin/TCF 分子訊息之間確實有極重要的分子連結 (crosstalk)，而此一連結是透過 β -catenin 和 ZO-1 這兩個位居樞紐地位的分 子而構成。這些事實更加突顯了 EphB3/ephrin-B 分子訊息的重要性。

4.8 在消化道中，EphB/ephrin-B 這一對 receptor/ligand 在“細胞互斥現象 (repulsive interaction)”以及“共同表現於同一細胞 (co-expression in the same cells)”這兩點上各有何生物學意義？

Battle 等人於西元 2002 年在著名的科學期刊“Cell”發表的一篇論文中指出：在腸道隱窩 (crypt) 底部，未分化的細胞其細胞核中轉錄因子分子複合物 β -catenin/TCF4 呈現“活化”狀態 (可能由腸道隱窩底部附近的間質細胞分泌的旁泌素—Wnt 蛋白分子所造成)，活化的轉錄因子分子複合物 β -catenin/TCF4 會開啓其下游分子 EphB2 以及 EphB3 的基因表現，同時並關閉其下游分子 ephrin-B1 (ephrin-B1 也就是 EphB2 及 EphB3 receptors 的配位子) 的基因表現。在腸道隱窩的上半部位，已經分化成熟的腸上皮細胞中轉錄因子分子複合物 β -catenin/TCF4 呈現“去活化”狀態，細胞核中去活化的轉錄因子分子複合物

β -catenin/TCF4 會關閉其下游分子 EphB2 及 EphB3 的基因表現，同時並開啓其下游分子 ephrin-B1 (ephrin-B1 是 EphB2 及 EphB3 receptors 的配位子) 的基因表現。這一項發現可以完美的解釋免疫組織化學的發現：EphB receptor 主要分佈於腸道隱窩下半部位尚未分化的原始細胞，而其配位子 ephrin-B 主要分佈於腸隱窩—絨毛軸 (crypt-villus axis) 上半部位正在進行細胞分化以及已經分化成熟的細胞。Batlle 等人實驗的重要性在於他們的實驗證實了 β -catenin/TCF4 的單一開關可以同時控制 EphB/ephrin-B 這一對受體/配位子的表現與否，而且這一對受體/配位子的表現狀態是相反的，也就是當 EphB 表現強的時候，ephrin-B 的表現就很弱，當 EphB 表現弱的時候，ephrin-B 的表現就很強。

另外，Batlle 等人觀察 EphB2 以及/或 EphB3 基因敲除小鼠 (EphB3 knockout mice) 的腸道組織發現：原本位於腸隱窩—絨毛軸最底部的 Paneth cells 不再侷限於腸隱窩的底端，而是散漫的分佈於整個結構呈現雜亂形態的腸隱窩—絨毛軸上。

基於以上幾項發現，Batlle 等人作出以下之結論：EphB 和其 ligand 之間的交互作用是互斥的 (repulsive interaction)，而此一互斥作用構築了腸隱窩—絨毛軸下半部為未分化細胞以及上半部為分化成熟細胞，如此井然有序的排列分佈。

Batlle 等人雖然已經對相關的主題作出傑出的研究，EphB/ephrin-B 在腸道生物學的功能還有許多尚待探討的地方。一個直覺上的看法就是：EphB 是 receptor 而 ephrin-B 是 ligand，大自然創造 receptor 和 ligand 就是要讓它們互相結合，而不是互相排斥。所以，一個簡單問題馬上浮現：EphB3 和 ephrin-B 的表現是絕對互斥，還是相對互斥？要回答這個問題，就要回過頭來檢視 β -catenin/TCF4 調控 EphB/ephrin-B 表現的機轉。我們先問：EphB 的表現要“完全”關閉之後，ephrin-B 的表現才能夠開啓嗎？如果是這樣，那麼在腸隱窩—絨毛軸由下到上應該看不到會同時表現 EphB/ephrin-B 的細胞。但是，在已經發表的幾篇論文 (Batlle *et al.*, 2002; Holmberg *et al.*, 2006) 之中我們都可以明顯的發現：在腸隱窩—絨毛軸的中段 (即隱窩—絨毛交接的部位) 附近的細胞，確實在同一個細胞中同時表現

EphB 和 ephrin-B (證據來自於共軛焦顯微鏡下同一個細胞同時發出 EphB 和 ephrin-B 的螢光訊號)。同一個細胞中同時表現 EphB 和 ephrin-B 的證據否定了 EphB3 和 ephrin-B 的表現是絕對互斥。因此，EphB3 和 ephrin-B 的表現應該是相對互斥，且實際情況應該如下：當轉錄因子分子複合物 β -catenin/TCF4 的活性逐漸變小，EphB 的表現跟著逐漸變小 (由 100% $\rightarrow$ 0%)，同時 ephrin-B 的表現跟著逐漸變大 (由 0% $\rightarrow$ 100%)；當 β -catenin/TCF4 的活性變成一半時 (由 100% $\rightarrow$ 50%)，細胞會表現 50% EphB 以及 50% ephrin-B，而此種情形應該就發生在隱窩—絨毛交接部位附近的細胞 (隱窩—絨毛軸的中點)。這個事實顯示：在這一小段由未分化轉變成已分化過程中的細胞，EphB/ephrin-B co-expression 極可能就扮演著促進細胞分化的角色。而未分化的原始幹細胞類似於間質細胞 (mesenchymal-like)，分化成熟的腸上皮細胞即為標準的上皮細胞，所以在腸隱窩—絨毛軸由下往上的分化過程本身即可視為一種準間質上皮轉換 (quasi-MET)。而 EphB/ephrin-B co-expression 出現在此過程的中間，而不是開始 (腸隱窩—絨毛軸的底部) 也不是結束 (腸隱窩—絨毛軸的頂端)，也間接的暗示 EphB/ephrin-B co-expression (interact *in cis*) 是促進間質上皮轉換的重要因素。

4.9 EphA2/ephrin-A1 分子訊息中有回饋抑制 (feedback inhibition) 的作用，EphB3/ephrin-B 分子訊息可有類似之情形？

Macrae 等人在 28 個乳癌腫瘤樣本之中也發現類似於 EphB 和 ephrin-B 表現互斥的情形：表現 EphA2 很高的乳癌腫瘤樣本其 ephrin-A1 的表現就會很低，反之亦然 (Macrae *et al.*, 2005)。他們進一步發現：EphA2 和其 ligand (即 ephrin-A1) 都是 Ras-Raf-MAPK 路徑的下游分子，但是 Ras-Raf-MAPK 可以活化 EphA2 的轉錄但卻會抑制 ephrin-A1 的表現。此點可以解釋乳癌腫瘤樣本中 EphA2 和 ephrin-A1 表現互斥的現象。另外，他們也發現：EphA2 和其 ligand (即 ephrin-A1) 的結合，能夠減弱由其他生長因子活化的 Ras-Raf-MAPK 分子路徑，因此而減低乳癌細胞的惡性程度。進一步的分析顯示，EphA2 和其 ligand (即 ephrin-A1) 的

結合，透過弱化 Ras-Raf-MAPK 分子路徑而減少 EphA2 的表現，因此而形成一個負向回饋控制。若是在乳癌細胞中以人為的方式強迫表現 ephrin-A1，也能夠經由上述之回饋抑制作用減低 EphA2 的表現。因此，乳癌細胞必須關閉 EphA2 或是 ephrin-A1 其中之一的基因表現以便逃脫上述對腫瘤之負向效應。

由本研究之結果，我們可以推論在 EphB3/ephrin-B 分子訊息中，也有極為類似的回饋抑制作用（圖四十）。我們的結果顯示 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠降低細胞核中 β -catenin 的量（細胞質細胞核分離以及西方墨點轉漬法實驗）以及 β -catenin/TCF 的活性（報導基因表現分析實驗），而 Batlle 等人先前已經證明關閉 β -catenin/TCF-4 分子路徑能夠降低 β -catenin/TCF-4 下游的 EphB 的基因表現同時提升 β -catenin/TCF-4 下游的 ephrin-B 的基因表現。因此，EphB3/ephrin-B 分子訊息對於 EphB3 的回饋抑制作用的確是存在的，其 feedback loop 如下：(1) 過度表現 EphB3 $\rightarrow$ (2) EphB3/ephrin-B 分子訊息被活化 $\rightarrow$ (3) nuclear β -catenin 減少 $\rightarrow$ (4) β -catenin/TCF 的活性減少 $\rightarrow$ (5) EphB3 的表現降低，ephrin-B 的表現增加。上述的 (1)~(4) 是本研究的發現，而 (4)~(5) 是 Batlle 等人的發現。此種對 EphB3 的回饋抑制作用和對 ephrin-B 的回饋促進作用也是造成愈往腸隱窩一絨毛軸頂端，EphB(+) cells 愈少而 ephrin-B(+) cells 愈多的原因之一。

此外，Wetering 等人的實驗證明：關閉 β -catenin/TCF-4 會使細胞分裂停止然後進行細胞分化 (Wetering *et al.*, 2002)。如前所述，我們的實驗顯示 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠降低細胞核中 β -catenin 的量以及降低 β -catenin/TCF 的活性，如果加上 Wetering 等人的實驗結果，EphB3/ephrin-B 分子訊息理論上應該能夠使細胞分裂停止並進行細胞分化，而此推論也完全符合 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠促進間質上皮轉換的觀念。此為 EphB/ephrin-B 分子訊息在腸道生物學的新角色（指促進 MET）；而此一作用不止在腸隱窩一絨毛軸中段細胞有其顯著的效應，對於大腸直腸癌細胞也發揮了腫瘤抑制的作用。

4.10 MET 參予腫瘤抑制作用的證據為何？哪些訊息傳遞分子同時扮演 MET marker 以及 tumor suppressor 之雙重之角色？

本研究發現：一些訊息傳遞分子同時扮演 MET marker (或 MET effector) 以及 tumor suppressor 之雙重之角色，這種角色的重疊就是間質上皮轉換參與腫瘤抑制作用的證據。例如：E-cadherin 和 plakoglobin 既是 epithelial markers 也是已知的 tumor suppressors (plakoglobin 為一已知的 weak tumor suppressors)。又例如：CrkL, Rac1 以及 nuclear β -catenin 既是 EMT effectors 也是已知的 oncoprotein。又例如：降低 Transwell 爬行能力、增加細胞凋亡以及增加鈣離子依賴性的細胞-細胞黏合，這三種既是 MET 的功能性標記，也能夠抑制腫瘤細胞的生長。

4.11 Noren 等人在乳癌 EphB4/ephrin-B2 分子訊息方面的研究和本研究有許多相似之處，其重要性為何？

Noren 等人 (Noren *et al.*, 2006) 在其發表的論文中首先檢視七個常用於乳癌研究的細胞株，結果發現其中六個細胞株 EphB4 的表現是大量的，ephrin-B2 (即 EphB4 的 ligand) 的表現卻是微量的。只有一個非轉型的 (non-transformed)、形態學上呈現類上皮細胞狀 (epithelial-like) 的細胞株 MCF-10A 會同時表現大量的 EphB4 以及 ephrin-B2。MCF-10A 細胞株其 ephrin-B2 的表現量又高於 EphB4。在正常的大腸黏膜組織中，原始未分化的細胞表現 EphB2 和 EphB3，而已分化成熟的細胞則表現 ephrin-B1。因此，這一對 receptor 及 ligand 分別是未分化之原始細胞以及已分化成熟之細胞的分子標記。同樣的概念應用於乳癌的 EphB4/ephrin-B2 研究，也有一致性的發現：六個細胞株是 transformed 的惡性癌細胞，其 EphB4 的表現是大量的。另一方面良性的 non-transformed 的細胞株 HCF-10A，其 ephrin-B2 的表現是大量的；此外，MCF-10A 中 ephrin-B2 的表現又大於 EphB4，這表示 MCF-10A 細胞株是偏向於已分化成熟那一端的細胞。

一個明顯的問題馬上浮現：EphB4/ephrin-B2 在 MCF-10A 細胞株中的同位交互作用 (interaction in cis；指 MCF-10A 細胞能夠同時表現 EphB4 以及

ephrin-B2)，是否即是造成此細胞株呈現類上皮細胞生物學表型的分子路徑？Noren 等人於培養的 MCF-10A 細胞加入 EphB4 Fc 處理 24 小時，EphB4 Fc 會和 MCF-10A 細胞膜上的 ephrin-B2 結合因而阻斷 MCF-10A 細胞原有的 EphB4/ephrin-B2 結合以及 EphB4 下游的分子訊息（此點由磷酸化形式的 EphB4 的減少可以獲得證實），此時 MCF-10A cells 細胞—細胞間原有的緊密連接開始瓦解，形成接觸鬆散 (disorganized cell-cell junctions)、外形呈現伸展狀 (elongated) 的類間質細胞 (mesenchymal-like cells)。阻斷 MCF-10A 細胞原有的 EphB4/ephrin-B2 結合也造成了磷酸化形式 Crk 的減少，這表示非磷酸化的 Crk (即活性的 Crk) 增多了。Crk 是已知能夠促進上皮間質轉換的訊息分子，因此，Crk 的活化能夠將 epithelial-like MCF-10A cells 轉變成 mesenchymal-like MCF-10A cells。

本研究中的穩定細胞株 L32 同時表現 EphB3 以及其配位子 ephrin-B1 和 ephrin-B2。L32 cells 中的 EphB3/ephrin-B1 以及 EphB3/ephrin-B2 之同位交互作用 (interaction in cis) 即類似於 MCF-10A cells 中 EphB4/ephrin-B2 的同位交互作用。本研究利用小 RNA 干擾技術關閉 L32 cells 中的 EphB3 基因表現，打斷 EphB3 下游的分子訊息，此一研究策略和 Noren 等人於培養的 MCF-10A 細胞加入 EphB4 Fc 來阻斷 EphB4 下游的分子訊息是如出一轍。L32 cells 在 EphB3 下游的分子訊息被阻斷之後，如同用 EphB4 Fc 處理過的 MCF-10A cells，磷酸化形式的 Crk 的減少了，epithelial-like L32 cells 也轉變成 mesenchymal-like L32 cells。Noren 等人在 EphB4/ephrin-B2 的發現和本研究在 EphB3/ephrin-B1+ephrin B-2 的發現一致的指出 EphB/ephrin-B 分子訊息能夠促進間質上皮轉換；是否 EphB2/ephrin-B1 分子訊息也有相同之效應則有待進一步之研究 (EphB2 也已經被證實表現於隱窩—絨毛軸下半部的細胞)。

4.12 Miura 等人在 EphA2 和 E-cadherin 調控的 cell-cell contacts 以及上皮細胞的極化 (epithelial cell-polarity) 這些方面的研究和本研究有許多相似之處，其重要性為何？

前面的討論已經指出：EphB/ephrin-B 分子訊息能夠促進間質上皮轉換。那麼，令人好奇而且一定會問的問題就是：EphA 家族的分分子訊息是否也有相似的作用？最近 Miura 等人利用 MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells 進行了一系列這方面的研究 (Miura *et al.*, 2009)，而其結果也肯定了此項臆測。

MDCK cells 是一種本身就會表現 EphA2 以及其配位子 ephrin-A1 的細胞株 (類似於 MCF10A cells 會同時表現 EphB4/ephrin-B2；也類似於本研究中的 L32 cells 會同時表現 EphB3/ephrin-B1+B2)。他們首先發現，當 MDCK 細胞在低密度培養之下，EphA2 的磷酸化程度較低，當 MDCK 細胞在高密度培養之下，EphA2 的磷酸化程度就相對的提高了。原因不難了解：當 MDCK 細胞的培養密度愈來愈高，細胞－細胞間的接觸也就愈來愈緊密，因此 EphA2/ephrin-A1 的 receptor/ligand 結合以及其活化 (等於其磷酸化程度) 程度也就愈來愈高。Miura 等人發現：用 ephrin-A1-Fc 刺激的 MDCK 細胞和在高密度培養之下的 MDCK 細胞一樣，都有高程度磷酸化的 EphA2，更為緊密的細胞－細胞接觸，以及可以測量出來的細胞極化作用。細胞極化作用 (cell polarity) 的測量是比較細胞在高密度 vs 低密度或加入 ephrin-A1-Fc vs 未加入 ephrin-A1-Fc 處理下，MDCK 細胞在共軛焦螢光顯微鏡下細胞接合黏著分子 E-cadherin 和 ZO-1 的 Z 軸影像 (Z-axis images)。Z 軸影像明白的顯示：低密度培養環境以及沒有用 ephrin-A1-Fc 處理的 MDCK 細胞在培養皿中呈現扁平狀的外形，但是在高密度培養以及用 ephrin-A1-Fc 處理過的 MDCK 細胞在培養皿中就會變成四方形立體形狀的細胞，而且 ZO-1 位於四方立體形狀細胞膜的 subapical 區域，E-cadherin 則位於四方立體形狀細胞膜的 basolateral 區域。Miura 等人又以螢光標示一種 apical marker－Ezrin，結果共軛焦螢光顯微鏡的 Z 軸影像也清楚的顯示 Ezrin 的分子螢光標記位於四方立體形狀細胞的頂端區域。這些 Z 軸影像提供了細胞極化 (apical-basal

polarization) 的直接證據。

除了 Z 軸上細胞的高度增加、細胞由扁平狀變成四方立體狀，細胞在 EphA2/ephrin-A1 分子訊息作用之下，每一個細胞在 XY 平面上的面積都縮小了，看起來就像每一個細胞被壓縮 (cell compaction) 成比較小的細胞一樣。在我們的研究結果之中，也有完全一樣的發現：EphB3/ephrin-B 交互作用下的細胞株 L32 在共軛焦螢光顯微鏡的 XY 平面影像也是表現出細胞壓縮的呈像；如果只看染細胞核的 DAPI 螢光，也可以明顯的看出來，代表細胞核的藍點在 control cells 是比較分散的，相對的，代表細胞核的藍點在 L32 cells 是比較密集的。事實上，細胞並不是真的被壓縮，而是扁平的細胞要轉變成為立體四方形的細胞時，細胞在體積沒有改變的情況之下，細胞高度的拉高造成了細胞的水平面積自動的縮小，於是在 XY 平面就出現了細胞壓縮的影像。所以並非 Eph/ephrin 分子訊息真的把細胞壓縮了，而是把細胞的外形變的更立體了，更加立體化的細胞在其頂端、側面以及側底邊各有其專一性的分子 (polarity protein; Iden et al., 2008)，此即細胞的 apical-basal polarization。

4.13 Cortina 等人最近提出腫瘤隔離作用 (tumor compartmentalization)，此為一嶄新的抑制腫瘤生長之機轉，其重要性為何？和本研究有何關聯？有何異同之處？

Cortina 等人 (Cortina *et al.*, 2007) 將細胞膜表現 ephrin-B1 的細胞 (以紅色螢光 RFP—red fluorescence protein 標示) 和細胞膜表現 EphB2 或是 EphB3 的細胞 (以綠色螢光 GFP—green fluorescence protein 標示) 互相混合，結果發出綠色螢光的 EphB(+) cells 慢慢的聚集成為細胞團塊 (每一個細胞團塊 > 50 cells)，發出紅色螢光的 ephrin-B1(+) cells 則佔據了這些綠色螢光細胞團塊之外其餘的地方，看起來就像綠色螢光的 EphB(+) cells 被紅色螢光的 ephrin-B1(+) cells 包圍起來一樣；由另一個角度來看，也可以說是紅色螢光的 ephrin-B1(+) cells 將綠色螢光的 EphB(+) cells 圍堵起來；這種現象在上述的細胞培養系統中可以維持超過七天，

可以算是一種長期的效應。Cortina 等人將此種現象稱之為腫瘤隔離作用 (tumor compartmentalization)，是一種全新的抑制腫瘤生長機轉。

他們同時也提出了 *in vivo* 的證據：在 $Apc^{Min/+}$ mice [一種特殊的實驗小鼠，其腫瘤抑制基因 *Apc* 的對偶基因 (allele) 中有一個基因座正常而另一基因座只能表現微量的 *Apc* 蛋白分子，此種實驗小鼠發育成成鼠之後，其腸道會自然產生數百個腺瘤 (adenoma)] 的腸道免疫染色切片中，EphB(+) 的腺瘤細胞全都被 ephrin-B1(+) 的成熟上皮細胞所包圍；但是在 ephrin-B1 基因被剔除的 $Apc^{Min/+}$ mice 的腸道免疫染色切片，ephrin-B1(-) 的成熟上皮細胞就再也無法包圍住 EphB(+) 的腺瘤細胞了。

接下來的問題是：EphB(+) cells 聚集成細胞團塊的現象到底是由外力造成的 [由 ephrin-B1(+) cells 對 EphB(+) cells 產生排斥力而使 EphB(+) cells 聚集成團]？還是由內力所造成的 [由 EphB(+) cells 細胞與細胞之間的黏著力增加而使之聚集成團]？如果 EphB(+) cells 聚集成細胞團塊的現象是由這些細胞之間的黏著力增加而造成，那麼去除維繫細胞間黏著力的主要分子 E-cadherin 就可以使聚集成細胞團塊的 EphB(+) cells 再度分離成單顆細胞；如果沒有如此預期之結果，EphB(+) cells 聚集成細胞團塊的現象就可能是由外力所造成—即 ephrin-B1(+) cells 對 EphB(+) cells 廣泛的排斥作用力而使 EphB(+) cells 聚集成細胞團塊。Cortina 等人利用 RNA 干擾技術將 EphB 分子訊息呈活化狀態細胞的 E-cadherin 表現予以關閉，結果這些原本能夠聚集成團塊的細胞就只能分散單獨的存在，再也無法聚集在一起，這個結果表示，並沒有所謂“ephrin-B1(+) cells 對 EphB(+) cells 的排斥作用力”存在。也是說，造成 EphB(+) cells 聚集成團塊的所謂腫瘤隔離作用 (tumor compartmentalization) 的真正原因是因為 ephrin-B1(+) cells 細胞膜上的 ephrin-B1 活化 EphB(+) cells 的 EphB receptor，造成 EphB(+) cells 細胞膜上 E-cadherin 分子在結構以及功能上極度的強化，使得 EphB(+) cells 因為 cell-cell adhesion 大幅度增強而聚集成團塊；換句話說，就是 ephrin-B1(+) cells 活化 EphB(+) cells 使 EphB(+) cells 自己聚集成群，而非使 ephrin-B1(+) cells 對 EphB(+) cells

cells 施予排斥作用力。

此外，Cortina 等人還發現：用 soluble ephrin-B1 處理 EphB(+) cells 會導致 EphB(+) cells 的聚集 (cell clustering)、細胞外形壓縮 (cell compaction)、E-cadherin 分子由細胞質轉移到細胞膜的基底側邊 (basolateral membrane)，以及 F-actin 細胞骨架分子的重新分佈。這些結果在我們的研究中也有相同的發現。

但是以下的兩點，我們的發現卻不同於 Cortina 等人的發現。第一、我們發現 EphB3/ephrin-B 分子訊息會造成 E-cadherin 的 protein level 的增加，但是在 Cortina 等人的研究中 E-cadherin 僅僅只有轉移到細胞膜的特定位置而沒有 protein level 的變化。第二、我們證實 EphB3/ephrin-B 分子訊息會造成細胞核內 β -catenin 分子的明顯降低以及 β -catenin/TCF activity 的降低 (我們的證據證實了以下之事實：E-cadherin 的 protein level 的增加 $\rightarrow$ E-cadherin 分子轉移到細胞膜的基底側邊 $\rightarrow$ E-cadherin 抓住 β -catenin 分子 $\rightarrow$ 驅動細胞核內的 β -catenin 轉移到細胞質中 $\rightarrow$ 細胞核內 β -catenin 分子的明顯降低以及 β -catenin/TCF activity 的降低)；但是在 Cortina 等人的研究中，細胞核內的 β -catenin 分子並未明顯降低， β -catenin/TCF activity 也沒有任何的改變。

造成這些差異 (E-cadherin 增加 vs 沒有增加，以及 β -catenin/TCF activity 降低 vs 沒有降低) 的原因可能有以下三種：第一、不同實驗使用不同的細胞株，細胞株之間本質上即存在一定的差異 (cell-type idiosyncrasy)，以及/或，第二、EphB3/ephrin-B 交互作用型式的不同—在 Cortina 等人的研究中，EphB2/ephrin-B1 和 EphB3/ephrin-B1 是以 *trans* 的方式交互作用 (EphB 和其 ligand 不在同一細胞)，而我們的研究中 EphB3/ephrin-B 是以 *cis* 的方式交互作用 (EphB 和其 ligand 位在相同細胞的細胞膜上)，以及/或，第三、持續活化或暫時活化 EphB receptors—在 Cortina 等人的研究中，有部分實驗是用 soluble ephrin-B1-Fc 來處理 EphB(+) cells，這種方式只能夠暫時活化 EphB receptors，有可能分子訊息會因此而比較弱且短暫；另一方面，我們的實驗都是在穩定細胞株中進行，其 EphB receptor 是處於持續活化的狀態，因此，分子訊息會比較強且持久。

儘管有以上的差異，我們和 Cortina 等人的研究都證實了 EphB 分子訊息能夠將 E-cadherin 分子轉移至細胞膜上的特定位置 (指 basolateral membrane) 並在功能上強化細胞－細胞間接合。因此，這些結果顯示 E-cadherin 是 EphB 分子路徑下游中最重要的關鍵分子之一。事實上，E-cadherin 不止是一個細胞黏合分子，也是一個眾所周知的腫瘤抑制分子 (Perl *et al.*, 1998)，也是最重要的上皮細胞生化標記。在上皮間質轉換或間質上皮轉換的過程中，E-cadherin 也是主要的程式設計師 (master programmer)，因為能夠促進上皮間質轉換或間質上皮轉換的不同分子路徑最終都將聚焦於 E-cadherin 的調控 (Guarino *et al.*, 2007)。





第五章 展望

本研究有何價值、有何貢獻？本章中我們將會陳述本研究對於四個領域（臨床醫學、癌症研究、發育生物學以及臨床研究方法）的貢獻如下。

5.1 本研究的結果在臨床醫學上提供了一個新的標靶治療的分子標地 (a novel molecular target for targeted therapy)

臨床醫學講究實際層面的治療方法與功效。本研究的結果在臨床醫學上究竟有何應用價值？簡單的說，就是我們的研究結果確認了 **EphB3 receptor** 是潛在的癌症治療標地，因為我們的研究結果顯示：活化 **EphB3 receptor** 可以逆轉癌細胞成為較良性的細胞。

如何逆轉？根據我們所提出的證據，這種逆轉主要是透過促進細胞凋亡以及促進細胞進行分化這兩種作用而達成。後者（指促進細胞進行分化）也就是本文中一再提到的“間質上皮轉換”。要達到活化 **EphB3 receptor** 的目的，必須要能夠將 **EphB3 receptor** 磷酸化。最簡單而且臨床上實際可行的方法就是研發出可以活化 **EphB3 receptor** 的 soluble ligand，或者是可以活化 **EphB3 receptor** 的單株抗體分子。事實上，早就已經有發表的科學文獻指出以上兩種活化 **EphB3 receptor** 的方法是確實可行的：

第一、可溶性配位子 (soluble ligand)

Noren 等人在乳癌細胞株中進行的研究 (Noren *et al.*, 2006) 發現：將細胞膜上有表現 **EphB4 receptor** 但沒有 **ephrin-B2** 的乳癌細胞株以 clustered 或是 un-clustered **ephrin-B1 Fc** 處理之後，**EphB4 receptor** 的磷酸化會顯著的增加，而 **EphB4 receptor** 的磷酸化增加代表 **EphB4 receptor** 被活化。Noren 等人接著以 soluble dimerized **ephrin-B2 Fc** (實驗組) 或 **Fc** (對照組) 注射到免疫缺損小鼠的腹膜腔之中（每週注射兩次），這些免疫缺損小鼠的背

部皮下組織在兩週之前已經注射了乳癌細胞，而這些乳癌細胞已經形成了初步的皮下腫瘤。開始腹膜腔注射之後的第四週，Noren 等人發現，注射 soluble dimerized ephrin-B2 Fc 的實驗小鼠身上的腫瘤，其體積比注射 Fc 的小鼠身上的腫瘤要小很多（大約只有二分之一左右），也就是說注射 soluble dimerized ephrin-B2 Fc 在實驗動物身上確實可以抑制腫瘤的生長。因此，以靜脈注射 soluble dimerized ephrin-B2 Fc 或 soluble dimerized ephrin-B1 Fc 似乎極可能在人體試驗也能夠產生抑制腫瘤生長的療效。然而，也有其他科學文獻報導不太一樣但值得注意的結果。例如，Holmberg 等人 (Holmberg *et al.*, 2006) 由實驗小鼠的尾靜脈 (tail vein) 注射 monomeric recombinant mouse ephrin-B2, ephrin-B2-Fc, EphB2-Fc, or human Fc，結果發現注射 ephrin-B2, ephrin-B2-Fc 和 EphB2-Fc 都能夠減少 EphB2 receptor 的磷酸化，也就是說，注射 ephrin-B2, ephrin-B2-Fc 和 EphB2-Fc 會抑制 EphB2 receptor 的活性。但是在 Holmberg 等人發現：在他們的 *in vivo* 實驗系統中，此種抑制小腸和大腸細胞 EphB receptor 活性的處理方式同時也大幅度降低了腸道中細胞分裂的活性（降低了 50% 的 mitogenic activity）。Noren 等人和 Holmberg 等人的實驗結果其差異最大之處在於注射 ephrin-B Fc 之後，前者造成 EphB4 receptor 的磷酸化而後者造成 EphB2 receptor 的去磷酸化。此種差異可能來自於兩個因素：第一、研究所用的 ephrin-B Fc 不同 (dimerized vs monomeric ephrin-B Fc；前者的效應為 activating 而後者為 blocking)。第二、研究的對象不同（前者為 tumor 而後者為 normal intestine）。Noren 等人和 Holmberg 等人的實驗結果雖然存在很多差異，但其共通點是兩者都能夠抑制細胞增殖（前者為抑制 tumor 生長而後者為降低 normal intestine 細胞分裂的活性）。Noren 等人和 Holmberg 等人的實驗結果是否最終能夠有一致性的解釋還有待進一步的研究。

第二、激活性抗體 (activating antibody)

Zelinski 等人 (Zelinski *et al.*, 2001) 在 MCF-10A 乳癌細胞株中轉染表現 EphA2 的質體然後篩選得到穩定細胞株。這種 EphA2(+) MCF-10A 在 soft agar 中的懸浮生長能力會大幅度的增加，但是如果再加入 ephrin-A1 處理使 EphA2 receptor 的磷酸化程度增加，就會造成此種細胞在 soft agar 中的懸浮生長能力減低 (減低一半以上)。這表示 ephrin-A1 能夠抑制細胞膜上有 EphA2 receptor 之惡性腫瘤細胞的生長。Carles-Kinch 等人更針對 EphA2 receptor 在細胞膜以外部分的 epitopes 發展出專一性甚高的單株抗體 (Carles-Kinch *et al.*, 2002)。他們的單株抗體可以活化 EphA2 receptor、使之磷酸化，並且抑制乳癌細胞在 soft agar 中的懸浮生長。此外，他們也證實他們的單株抗體對於 non-transformed MCF-10A cells 沒有明顯的作用。

這表示針對表現 EphA2 的癌細胞進行標靶治療的策略是實際可行的。

就如同乳癌的標靶治療藥物有兩大類：(1) 單株抗體，例如賀癌平 (Herceptin)、癌思停 (Avastin) 等等... (2) 酪胺酸激酶抑制劑 tyrosine kinase inhibitor，例如 Lapatinib；針對 Eph receptor 的標靶治療藥物分子也有此兩大類，不同的是，針對 Eph receptor 的標靶治療藥物分子是要活化目標受體，而非抑制目標受體。

Eph receptor 作為治療標靶之策略在臨床應用上的限制以及其風險評估

如同以上所述，目前對於 Eph receptor tyrosine kinase family 的研究已經明確的告訴我們，無論是 EphA receptor 或是 EphB receptor，都可以作為癌細胞治療的分子標地；而且在動物實驗中，其投藥方式 (靜脈注射) 以及藥物動力學也沒有很大的問題 (將 dimerized ephrin-A Fc 或 ephrin-B Fc 注射至實驗小鼠的靜脈或腹膜腔內，ephrin-A 或 ephrin-B 分子能夠到達小鼠體內的正常腸道或是腫瘤組織，並且和細胞膜上的 Eph receptor 相結合，其中 ephrin-B Fc 還能夠增加 receptor 的磷酸化，活化這些受體)。然而，有兩大問題限制了此種治療策略。

第一、許多惡性癌細胞並不表現 Eph receptor

雖然無數的科學文獻報導惡性腫瘤“時常”過度的表現 Eph receptor (例如 EphA2 在許多乳癌中過度表現、EphB2 和 EphB3 在許多大腸直腸癌中過度表現、EphB4 在許多乳癌以及大腸直腸癌中過度表現)，但是近年來的一些臨床統計分析結果顯示：EphB2、EphB3 (EphB3 這一部分是本研究的結果) 和 EphB4 在早期的大腸直腸癌中表現量較高，在已經進行局部轉移 (Dukes' stage C) 或是遠處轉移 (Dukes' stage D) 的大腸直腸癌腫瘤中，EphB2、EphB3 和 EphB4 的表現量都非常的低，因為負責該基因表現調控區域的 promotor 被甲基化，基因表現也因此被關閉 (此點在 EphB2 和 EphB4 已經被證實)。這些已經脫離腫瘤原發位置且進行轉移的癌細胞本來就是標靶治療的主要目標，但是因為它們細胞膜上的 EphB receptors 已經非常稀少，所以限制了“活化 EphB receptors 可以將癌細胞逆轉成為較良性的細胞”的治療策略。是否 EphA2 receptor 的表現在人類乳癌也有類似於大腸直腸癌的情形 (指病理分期比較早期的乳癌細胞其 EphA2 的表現量較高，而病理分期比較晚期的乳癌細胞其 EphA2 的表現量較低)，還有待進一步的研究。雖然許多惡性癌細胞並不表現 Eph receptor，但以本研究的資料為例，仍舊有一半的大腸直腸癌腫瘤表現高量的 EphB3 receptor [指 Dukes' B 的病人佔全部病人 Dukes' B+C+D 的一半：Duke's B/Dukes' (B+C+D) = 18/(18+12+6) = 50%]，所以仍然具有應用價值。就如同乳癌的標靶治療藥物賀癌平 (Herceptin) 在臨床上使用於治療會過度表現 HER2 的乳癌細胞，即所謂 HER2 陽性乳癌，但是，HER2 陽性乳癌僅佔所有乳癌的 20~25%。

第二、投予 ephrin-A 或 ephrin-B 分子可能干擾正常腸道或其他組織細胞的正常生理功能運作

如同前面所述，Holmberg 等人 (Holmberg *et al.*, 2006) 將 monomeric recombinant mouse ephrin-B2 或 ephrin-B2-Fc 由實驗小鼠的尾靜脈打入小

鼠體內之後，這些 ephrin-B2 分子會到達腸黏膜隱窩 (intestinal crypt) 並和進行增殖分裂的腸始祖細胞細胞膜上的 EphB2 receptor 或是 EphB3 receptor 結合。三天之後，他們發現，原來位於腸黏膜隱窩底部的 Paneth cells 跑到了腸黏膜隱窩其他的位置 (EphB3 基因剔除小鼠的腸黏膜隱窩也有相同的情形)。更嚴重的是，注射 ephrin-B2 一天之後，腸黏膜隱窩中進行增殖分裂的細胞數目就減少了大約一半；小腸絨毛的長度在注射 ephrin-B2 的三天之後也變短了。Holmberg 等人的實驗結果顯示：注射 ephrin-B 雖然可以抑制腫瘤的生長，但是也同時會影響正常腸黏膜的更新 (指進行增殖分裂的細胞數目減少一半)，甚至於影響正常腸黏膜的吸收功能 (指小腸絨毛的長度變短)。

雖然有以上可能的副作用，但是以 Eph receptor 為分子標地的治療仍然深具潛力。因為，所有現今已經上市的標靶治療藥物在病人服用之後或多或少都會出現副作用。例如，接受賀癌平治療的病人，大約百分之四十的患者在第一次治療時會出現發燒、打寒顫等類似感冒的症狀。只要經過謹慎的風險評估以及藥物分子的修改來降低副作用的產生，以 Eph receptor 為目標的標靶治療，其遠景還是非常樂觀的。

5.2 本研究的結果在癌症研究方面提供了一個腫瘤間質上皮轉換 (tumor mesenchymal-to-epithelial transition) 的絕佳例子

研究上皮間質轉換 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 的分子路徑在過去幾年之中極為熱門，相關的科學文獻也如雨後春筍般的出現。許多生長激素受體的活化已經被證實能夠促進 EMT，使腫瘤細胞變的更為惡性、更具侵略性，這些都是 tumor EMT 的例子。另一方面，研究 tumor EMT 的逆向過程，即 tumor MET (mesenchymal-to-epithelial transition, MET) 的科學文獻至今仍是寥寥無幾；因此，本研究的結果提供了癌症研究領域中一個腫瘤間質上皮轉換的絕佳例子。

一般人常以為 MET 的起因就是原來誘發 EMT 的分子訊息被去活化所導致的逆轉過程；活化特定之細胞膜受體而能夠誘發 MET 的分子路徑則從未有人提出完整的報導。本研究的貢獻在於打破“MET 就等於 EMT 的逆轉過程”之觀念，證實 EphB3/ephrin-B 分子路徑的活化能夠獨立的誘發 tumor MET 的進行。雖然先前 Noren 等人已經提供了初步的證據 (Noren *et al.*, 2006) 證實非轉型的乳房上皮細胞中的 EphB4/ephrin-B2 分子路徑會一直保持在活化狀態之下，以實驗操作阻斷 EphB4/ephrin-B2 分子路徑將會使乳房上皮細胞失去上皮細胞的特徵；然而，Noren 等人並沒有在他們的實驗系統之中讓失去上皮細胞特徵的乳房細胞再重新獲得上皮細胞的特徵。本研究的價值即在於以完整的證據證明 EphB3/ephrin-B 分子路徑的活化能夠使腫瘤細胞重新再建立起上皮細胞的細胞-細胞間連接 (re-establish epithelial cell-cell junction)，並重新獲得上皮細胞的重要特徵-細胞極化 (cell polarity)。而我們建立的穩定細胞株提供了一個極為穩定的實驗平臺，未來還可以朝不同之方向作更深入的研究。

5.3 本研究的結果確認腸隱窩-絨毛交接處之細胞同時表現 EphB/ephrin-B 在發育生物學上具有促進間質上皮轉換之功能

我們的研究雖然是在大腸癌細胞株中進行，但就像一般利用細胞株的實驗一樣，實驗結果的意義和解讀可以延伸至正常的腸上皮細胞。其他學者先前的一些研究已經確認：隱窩-絨毛軸底端的細胞表現 EphB2 和 EphB3 receptors，隱窩-絨毛軸頂端的細胞則表現 ephrin-B (為 EphBs 的 ligand)；他們根據此種 EphB vs ephrin-B 位置分佈的相對性 (指隱窩-絨毛軸底端 vs 頂端) 作出 EphB 和 ephrin-B 之間具有互斥交互作用 (repulsive interaction) 的結論。然而，這種“互斥說”怎麼看都不合乎常理：因為 EphB 和 ephrin-B 是一對 受體/配位子，受體和配位子之間的關係應該是互相結合，而非互相排斥的。更何況，先前研究學者所提出的共軛焦螢光顯微鏡證據已經證實，位於腸黏膜 crypt-villus junction 附近的細胞可以同時表現 (co-express) 此對受體/配位子。但是這種受體/配位子的同

位交互作用 (interact *in cis*; 指細胞同時表現 receptor/ligand 時, receptor 和 ligand 的交互作用) 的生物學角色卻一直沒有人進行深入的探討。

本研究提出了許多證據證明 EphB3/ephrin-B 的同位交互作用能夠促進腸隱窩的原始細胞進行細胞分化, 其中的關鍵之處在於 EphB3/ephrin-B 同位交互作用能夠誘發 β -catenin 分子由細胞核內轉移到細胞質中, nuclear β -catenin 的減少活化了促進細胞分化的分子路徑, 也全面的促成 tight junction、adherens junction 以及 desmosome 三種細胞—細胞間接合構造的構築以及上皮細胞的極化 (極化乃指 apico-basal polarity 的形成)。細胞形態上的極化是細胞功能上特化的先決條件, 上皮細胞藉此特化成具吸收、分泌或其他特殊功能的細胞。

由於不同的 Eph receptors 和其 ligands 廣泛地分佈於全身各種器官組織之中, 因此, 我們相信: Eph / ephrin interaction 促進間質上皮轉換的角色應該不只侷限於腸黏膜隱窩, 未來在其他器官組織中類似的角色可能還會陸續的被證實。

5.4 本研究的結果在臨床研究方法上提供了一個由 DNA 晶片實驗結果尋找研究標地的簡單策略

本研究提供了一個由 DNA 晶片 (或稱為 DNA 微陣列) 實驗結果尋找研究標地的簡單策略, 其價值在於以最少量的 DNA 晶片和最少的定量 RT-PCR 實驗找到最具研究價值的基因。DNA 晶片其實就是在比較實驗組細胞和對照組細胞之間基因表現程度的差異, 而且這個差異的程度是被非常精確的數量化成 Cy5 / Cy3 ratio 的數值 (通常以 Cy5 標示實驗組細胞而以 Cy3 標示對照組細胞)。每一個基因都有一個 Cy5 / Cy3 ratio 的數值, 而目前大多數的研究將基因向上調控 (up-regulated) 的標準訂定為 $\text{Cy5} / \text{Cy3} > 2$ 。

一個 DNA 晶片含有的基因數目通常少則數千, 多則上萬; 如此設計的優點是讓 DNA 晶片可以進行高效率的篩檢 (high-throughput screening); 然而, 伴隨而來的結果卻是資料量過於龐大而造成資料分析上的困難, 因為每一個晶片實驗的結果, 幾乎都會找到幾百個向上或向下調控的基因。目前雖然已經有各種方法

可以將所得到的數據進行歸類分析比對，例如叢集分析 (cluster analysis) 可以將表現相類似的基因歸類到同一個叢集，再分析同一個叢集內所有基因的關聯性，但是如此分析方法所做出來的結論往往是將好幾個基因綁在一起用來預測某一種生物表型，例如癌症病人的長期存活率。這種結論似乎不合乎一般傳統的研究方式，那就是一次研究一個基因的生物學功能。

因此，在本研究之中，我們採用了一種最簡單、最經濟的策略，去找出和生物表型相關的單一基因 (此步驟屬於 classic or forward genetics 的研究)。找到單一基因之後，接下來的下一步就是挑選有興趣、有價值的標地基因去進行基因功能的研究了 (此步驟屬於 reverse genetics 的研究)。我們的策略來自於以下的邏輯：每一個 DNA 晶片實驗的結果大致上都會找到數百個向上調控的標地基因，如此龐大的資訊勢必要加以簡化，而簡化的第一步就是再加上一些限定條件來縮小標地基因的範圍。我們發現，當進一步限定標地基因為同時在 3~4 個獨立的 DNA 晶片實驗中都呈現向上調控時，符合此一條件的標地基因數目就只剩下數十個左右了。以本研究為例，我們只進行了四個獨立的 microarray 晶片 (材料來自於四個病人的外科手術樣本) 實驗，而每一個晶片有四百多到八百多個向上調控的基因；但是我們只挑選同時在 4 個獨立的 DNA 晶片實驗中都呈現向上調控的基因，此時，符合此限定條件的基因數目就只剩下 29 個了。如此“嚴選”的向上調控基因如果再用定量 RT-PCR 實驗 (材料來自於原來的 4 個病人和另外再加入的 27 個病人的外科手術樣本) 來確認其 DNA 晶片的結果，將使得這些基因誤判為向上調控的機率接近於零。上述的策略乃是用少數的 DNA 晶片進行共同篩選，得到數目適中 (約 30 個左右) 的標地基因，然後再運用定量 RT-PCR 實驗進行二次確認。DNA 晶片實驗和定量 RT-PCR 都是昂貴的實驗，但是依照上述之策略就可以用最少量的 DNA 晶片和最少量的定量 RT-PCR 耗材來達到“找到最具研究價值的基因”的目的。

Rajeevan 等人 (Rajeevan *et al.*, 2001) 曾經運用定量 RT-PCR 來對 DNA 晶片實驗所找到的向上調控基因做 post-array validation，結果有 71% (17/24) 的基因

可以通過定量 RT-PCR 的二次確認。但是在本研究之中，只有 40% (8/20) 的基因可以通過定量 RT-PCR 的二次確認。為什麼 Rajeevan 等人的實驗中，DNA 晶片的結果和定量 RT-PCR 的結果有很高的一致性 (71%)，而本研究中 DNA 晶片的結果和定量 RT-PCR 的結果只有不到一半 (40%) 相吻合？原因在於 Rajeevan 等人只用一對細胞株來進行 DNA 晶片實驗以及定量 RT-PCR 實驗，而且這一對細胞株還是兩個 keratinocyte 的 subclones。相對的，本研究中我們使用來自 4 個病人 (DNA 晶片實驗) 和 31 個病人 (定量 RT-PCR 實驗) 的組織樣本。組織細胞的異質性以及樣本一樣本之間的變異程度是造成本研究中 DNA 晶片的結果和定量 RT-PCR 的結果吻合度低的主要原因。

5.5 未來的研究方向

1. Ephrin-B 在臨床腫瘤樣本中的表現狀態

本研究提供了臨床腫瘤樣本中 EphB3 的表現狀態，但是卻缺乏腫瘤樣本中 ephrin-B 的表現狀態。Macrae 等人曾經研究 28 個乳癌細胞株中 EphA2 和 ephrin-A1 的表現 (Macrae *et al.*, 2005)，結果發現：這一對 receptor 和 ligand 在乳癌細胞株中的表現量是呈現反比的狀態 (EphA2 and ephrin-A1 expression is inversely proportional)，即某細胞株若 EphA2 的表現量高，其 ephrin-A1 的表現量就會很低，反之亦然。EphB2 和 EphB4 以及其 ligands—ephrin-B1 和 ephrin-B2 在腫瘤樣本中的表現是否也有類似之情形 (receptor 和 ligand 表現量互成反比) 則迄今尚未有完整的報導。但是控制 EphB 和 ephrin-B 表現呈反比的分子機轉已經在實驗室中被揭露：Batlle 等人將特別設計的質體轉染大腸癌細胞株，得到的穩定細胞株可以用培養基中是否加入 doxycycline 來控制 dnTCF (dominant negative TCF) 的表現與否，他們發現， β -catenin/TCF 呈開啓狀態 (dnTCF 未表現) 時，細胞就會表現 EphB2 以及 EphB3，此時 ephrin-B1 不會表現；當 β -catenin/TCF 呈關閉狀態時 (加入 doxycycline $\rightarrow$ 表現 dnTCF $\rightarrow$ β -catenin/TCF 呈關閉狀態)，細胞就不會表現

EphB2 以及 EphB3，但是會表現 ephrin-B1 (Batlle *et al.*, 2002)。

2. 釐清那些作用來自於 EphB3 receptor 的 forward signaling？那些作用來自於 ephrin-Bs ligands 的 reverse signaling？

本研究的細胞模式是在同一個細胞中表現 receptor—EphB3 和它的 ligand—ephrin-B1/B2，因此每一個細胞都有兩種分子訊息，即 receptor 下游的 forward signaling 以及 membrane-bound ligand 下游的 reverse signaling。所以我們觀察到的細胞形態、行為以及分子層面的改變是來自於兩種分子訊息的混合作用。如果要區別這兩種分子訊息各別對應於那些改變及作用，需要較複雜的實驗，例如將能夠表現 EphB3 mutant 的質體轉染 HT-29 cells，使 HT-29 cells 的細胞膜上有 EphB3 的突變分子能夠結合相鄰細胞上的 ephrin-B 並活化其下游分子訊息，此時 EphB3 的突變分子本身並無法活化本身的下游分子訊息；如此一來，所有的變化及效應皆只歸因於 ephrin-B 下游的 reverse signaling。

3. β -catenin 的下游標地基因

雖然本研究測試了九個已知的 β -catenin 下游基因，也找到了 ZO-1 此一關鍵性的 β -catenin 下游基因，足以說明 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠透過 Wnt signaling 來促進細胞的極化以及上皮化，但是其他 EphB3/ephrin-B 分子路徑中的 β -catenin 下游基因還有待進一步的發掘。已知 Wnt signaling 可以透過活化 β -catenin/TCF 控制不同的功能組模，包括促進細胞增殖、維持癌細胞或幹細胞的去分化狀態 (de-differentiation) (Reya *et al.*, 2005; Wetering *et al.*, 2002)、抑制細胞凋亡以及促進腫瘤的發展 (Fuchs *et al.*, 2005)。本研究的結果確定三個已知和細胞增殖有關的 β -catenin 下游基因 *Cyclin D1*，*c-Myc* 以及 *p21* 都不接受 EphB3/ephrin-B 分子訊息的調控，是否有其他和細胞增殖有關的 β -catenin 下游基因受到 EphB3/ephrin-B 分子訊息的調控還要需要深入的研究。此外，本研究發現 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠促進細胞凋亡，是否此一作用也是透過 β -catenin 下游的相關基因來達成也是一個有待探討的方向。

4. 是否 EphB3/ephrin-B 的下游分子路徑是 Abl—Crk—Rac1？如果是，Gleevec 的影響如何？

Noren 等人在其研究中已經證實 EphB4/ephrin-B2 分子訊息能夠活化 Abl，活化的 Abl 再將 Crk 分子磷酸化而使之去活化 (Noren *et al.*, 2006)，結果會抑制乳癌細胞的生長、促進其細胞凋亡，並維持 non-transformed HCF-10A cells 的上皮細胞特徵。本研究也證實了 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠將 CrkL 分子磷酸化而使之去活化，並確認 CrkL 的下游分子 Rac1 也會隨著 CrkL 的去活化而轉變成不具活性的型式；因為 EphB3/ephrin-B 分子訊息能夠將 CrkL—Rac1 pathway 去活化，所以能夠促進癌細胞進行間質上皮轉換、促進癌細胞進行細胞凋亡，並抑制大腸癌細胞的生長。EphB3 分子路徑和 EphB4 分子路徑極為相似，所以 EphB3/ephrin-B 的下游分子路徑也同樣是 Abl—Crk—Rac1 的可能性極高。Gleevec 是目前治療 stromal tumor 的標靶藥物，可以專一的和 Abl 結合並抑制 Abl 的活性；但是依照上述之分子路徑來看，抑制 Abl 的活性將會活化 Crk—Rac1 pathway 因而促使細胞進行上皮間質轉換，這將會使癌細胞變的更為惡性。此點著實讓人憂心，其他學著也曾提出關切 (Wang, 2006)，故在未來需要進一步加以研究。



第六章 論文英文簡述

Introduction

PART I. Clinical Correlates of Up-regulated Genes in Colorectal Cancer

Colorectal cancer is one of the leading causes of fatalities due to cancer in developed countries. Much effort has been devoted into researching its underlying molecular events. Understanding differences in gene expression between cancerous and normal cells are important for cancer research. cDNA microarray technologies can perform analyses of such differences at a transcriptional level with high throughput. Using microarrays, researchers have unveiled gene expression profiles and signatures that characterize colorectal cancer and its phenotypes. However, the individual genes responsible for tumor behavior and clinicopathological variations in colon cancer have not been reported so far.

The goal of this study was to identify up-regulated genes in human colorectal cancer and determine if there are individual genes linked to tumor behavior and patient clinicopathological factors. A simple and cost-saving strategy was adopted in this study to identify up-regulated genes: cDNA microarrays were taken as a genomic filter and real-time RT-PCR as a validation method for verifying array data; a large number tissue samples ($n > 30$) were used in post-array validation to minimized sample bias. To look for the relevance between up-regulated genes and clinical factors, a variety of clinicopathological parameters from 31 samples were correlated with the presence or absence of up-regulation of genes. In addition, the transcript levels of up-regulated genes were also analyzed in correlation with each other, using regression analysis, in an effort to determine if any relationship existed between these up-regulated genes.

We used fresh tissue samples instead of cultured cell lines as experimental material because cell lines may not express important surface molecules (antigens or receptors) and secretory molecules (matrix or signal molecules) related to the communication or interaction with the surrounding micro-environment, as found *in vivo* and that has recently been considered crucial to tumor progression and metastasis.

PART II. EphB3 Promotes MET and Suppresses Tumor Growth

EphB3, recognized in our prior microarray experiments as being differentially expressed in colorectal cancer, is a member of the largest receptor tyrosine kinase family Eph. Members of the Eph family have diverse biological functions in different organ systems. In mammalian gut, EphB3 is expressed in cells at the bottom of the intestinal crypts near stem cell niches. Physiologically, EphB3 and its closest homolog EphB2 are responsible for constructing and maintaining the architecture of the villus-crypt axis in the intestinal epithelium by repulsive interaction with their ligand ephrin-B. Pathologically, Battle *et al.* reported that loss of *Ephb3* allele was able to produce invasive colorectal carcinoma in *Apc*^{Min/+} mice. The clinical data presented here also show that EphB3 expression levels are significantly reduced in tumors at advanced Dukes' stages. Both these findings suggest EphB3 functions as a tumor suppressor. Recently, EphB-mediated compartmentalization was demonstrated to be a new mechanism suppressing colorectal cancer progression; however, it is still unknown whether other factors contribute to EphB-mediated tumor suppression.

Epithelial-to-mesenchymal transformation is a process by which polarized epithelial cells convert to non-polarized and motile cells to allow histogenesis, organogenesis and morphogenesis in embryonic development. During the past few years, many studies have shown that epithelial tumors, including colorectal cancer, implement a similar process, known as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT),

during dedifferentiation, invasion and metastasis in the process of tumor progression. A few molecular signals, mainly from growth factor receptors and autocrine factors including Wnt signaling, have been shown to contribute to EMT. However, mesenchymal-to-epithelial transition (MET), the reverse process of EMT, is rarely mentioned in cancer biology literature and its corresponding signaling mechanism is still unclear.

The physiologic process by which progenitor cells (mesenchymal-like) move upward, differentiate and acquire an epithelial phenotype along the crypt-villus axis in mammalian gut is in itself a quasi-MET. EphB and ephrin-B are co-expressed during this process (near the crypt-villus junction), but not in the beginning (bottom of crypt) or ending (top of villus) of the process indicating that EphB/ephrin-B signaling is involved in MET. EphA4/ephrin-A and EphB4/ephrin-B2 signaling have recently been demonstrated to promote MET. EphA4/ephrin-A signaling regulates MET during somite morphogenesis in zebrafish embryo development and EphB4/ephrin-B2 signaling is responsible for maintaining epithelial phenotypes in non-transformed mammary epithelial cells. Therefore, it is very likely that EphB3 has a similar signaling effect.

The goals of this study were to identify the MET-like changes in colorectal cancer cells due to EphB3 signaling, to disclose the molecular events underlying such changes and to investigate its role in tumor suppression. We found that alterations in morphology, cell behavior and signaling molecules, owing to EphB3 signaling, contributed to both MET and tumor suppression. Most importantly, we found that EphB3/ephrin-B interaction potentiated junctional adhesion molecules (JAMs) ZO-1, E-cadherin and plakoglobin, which are representatives of tight junctions, adherens junctions and desmosomes, respectively. In fact, the presence of these three epithelial markers, together with cortical-actin-cytoskeleton, is suggestive of a completion of

the cell polarity program. Therefore, EphB3/ephrinB interaction promotes MET through re-establishment of epithelial cell-cell junctions. It is not surprising that many factors presented in this study have dual roles: they are epithelial markers and also well-known tumor suppressors (E-cadherin, plakoglobin), or EMT effectors and also oncoproteins (CrkL, Rac1 and nuclear β -catenin), or functional markers favoring MET that also facilitate tumor suppression (decreased Transwell migration, increased apoptosis and Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion). The findings of this study provide an example of tumor MET and also support the hypothesis that MET participates in EphB/ephrin-B mediated tumor suppression.

To activate EphB3 signaling, the EphB3 receptor must bind to its membrane-bound ligand, ephrin-B. Eph receptors and ephrins (*Eph* receptor interacting proteins) can express in opposing cells (interact *in trans*) or coexpress in the same cell (interact *in cis*). Coexpression of Ephs and their ligands has been reported in normal tissue cells, including intestine, neurons, β cells in pancreatic islets and non-transformed mammary epithelial cells, and cancers. It has been postulated that autocrine and/or juxtacrine activation by EphB/ephrin-B coexpression might modulate biological behavior; however, the effect of coexpression is largely unknown. We chose HT-29 human colon cancer cells in this study as a reference cell line because wild-type HT-29 cells express ephrin-B1 and ephrin-B2 (both of which are cognate ligands of EphB3) but very little endogenous EphB3. Thus, the total effect of forced expression of EphB3 in HT-29 cells resembles that of cells in the vicinity of the villus-crypt junction where gut progenitor cells co-express EphB/ephrin-B, differentiate and acquire epithelial phenotypes when moving upward along the villus-crypt axis.

Results

PART I. Clinical features of patients in this study

The average age (67.4 y/o) was close to seventy. Tumors occurred with a mild predominance in males (males : females = 1.38 : 1). Forty-five percent of tumors occurred in the rectum and 55% in the colon. Tumors located in the rectum were largely in males, whereas colonic tumors had a female predominance ($p=0.067$). Patients with cancers of the right sided colon exhibited a preponderance to anemia, more so than those with cancers of the left sided colon ($p=0.008$). All these clinical features were consistent with the current epidemiological data concerning colorectal cancer. The consistency indicated the 31 patients in this study were unbiased samples from colorectal cancer populations. In addition, our data also showed significant elevation of serum CEA levels in patients with left sided colonic tumors ($p=0.036$), as well as in patients at a more advanced tumor stage ($p=0.043$).

PART II. Microarray experiments and real-time RT-PCR validation

Cy5/Cy3 ratios of 8000 genes showed a Gaussian distribution. The moderate skew to right in terms of distribution roughly indicates that the number of up-regulated genes was greater than the number of down-regulated genes in colorectal cancers. Those with Cy5/Cy3 signal ratios greater than 2 were arbitrarily defined as up-regulated genes in this study. More than four hundred genes were over-expressed in each array chip but only twenty-nine genes were concurrently up-regulated in all four array experiments. Of these 29 candidate genes, 20 genes were tested for post-array validation using real-time RT-PCR in 31 paired samples. 40% (8/20) of these genes were confirmed to have a tumor/normal expression ratio > 2 .

PART III. Correlation between up-regulated genes and clinicopathological factors

Among eight confirmed genes, six of them were linked to clinicopathological

factors. Up-regulation of *THY1* and *PHLAD1* were found to be associated with the presence of patients' anemia ($p=0.036$ and 0.009). Up-regulation of *HNRPA1* was significant in cancers growing in the right sided colon more so than the left side ($p=0.027$). Up-regulated *GPX2* was related to a higher degree of tumor differentiation ($p=0.019$). The *c-MYC* oncogene was up-regulated to a greater degree in specimens from male rather than female colon cancer patients ($p=0.012$). *GRO1* was significantly up-regulated in patients younger than 65 years old ($p=0.010$); tumor stage, lymph node metastasis and serum CEA levels were found to be frequently over-expressed when analyzed in correlation with *GRO1* ($p = 0.075, 0.060, 0.058$, respectively). The data shows that the less invasive the tumor (less advanced in stage, lymph node metastasis and CEA levels), the more prominent was *GRO1* over-expression.

PART IV. Expression relationship between up-regulated genes

Regression analysis of mRNA transcript levels between eight confirmed genes revealed a tight correlation between *c-MYC* and *HNPRA1* (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) in tumor tissue ($r=0.948$). When transcript levels of these two genes in normal tissue were taken as baselines, the adjusted mRNA levels of *c-MYC* and *HNPRA1* still showed a strong correlation ($r=0.871$). This finding suggested transcription of *HNPRA1* may be coupled to that of *c-MYC* in an unknown manner.

PART V. Clinical correlation analysis implies a tumor suppressive role of EphB3 in early stage of tumor progression

Methylation of *EphB2* and *EphB4* promoters silences *EphB2* and *EphB4* expression in advanced colorectal cancer; however, to our knowledge no report has investigated the expression of *EphB3* in colorectal patients. Therefore, we examined the expression of *EphB3* in a clinical cohort by semiquantitative reverse transcription-PCR. Epidemiologic parameters of our patients are consistent with those of the

current colorectal cancer population. The 36 patients in this study were, therefore, unbiased samples. The median value of the EphB3 mRNA tumor/normal ratio was greater than two in our 36 colon cancer specimens. However, when patients were sorted into three groups according to their Dukes' stages, high levels of EphB3 expression were only seen in non-spreading colorectal cancers (Dukes' B) and not in tumors with regional spreading (Dukes' C) or distal metastasis (Dukes' D). The finding in all 36 patients is consistent with reports that Eph receptors have intrinsic mitogenic or transforming activity when they do not bind with their ligands. The finding in 36 patients sorted into three groups, on the other hand, suggests that EphB3 expression must be silenced in colorectal cancer before undergoing local expansion or distal metastasis since binding with their ligands, which are widely distributed over cell surface of differentiated intestinal mucosal cells, arterial endothelial cells and many other tissues, in the route of metastasis reverses or inhibits the malignant capacity of Eph receptors. Therefore, our data in 36 patients sorted into three groups imply a tumor suppressive role of EphB3 in early stage of tumor progression if it does not play a role in the early promotion of colorectal cancer. This finding is similar to another two reports that the highest expression levels of EphB receptors and EphB-mediated tumor compartmentalization were found in the early stage of tumorigenesis. In summary, our findings agree with previous evidence that ligand-independent signaling of Eph receptors has tumor-promoting activity but ligand-dependent signaling of Eph has a tumor-suppressing effect, a notion similar to Chen's working model of dual roles of Eph receptors in tumor promotion and suppression. We also examined the expression of EphB3 at the tissue level in a small number of tissue sections. Comparison of EphB3 immunostaining between normal intestinal crypt cells and cancer cells in the same tissue sections clearly demonstrated that EphB3 was highly expressed in Dukes' B, but not in Dukes' C and Dukes' D

tumor specimens. To inspect the role of EphB3 in colorectal cancer, we established stable transfectants in which the long-term effects of EphB3/ephrin-B signaling could be well characterized. Ephrin-B1 and ephrin-B2, cognate ligands of EphB3, are constitutively expressed in wild-type HT-29 cells. Immunoprecipitation experiments revealed the level of EphB3 tyrosine phosphorylation in stable clones.

PART VI. Over-expression of EphB3 induces morphological changes and intracellular redistribution of molecules consistent with mesenchymal-to-epithelial transition

Under phase contrast microscopy, a broad transparent zone could be seen in the cell margin of EphB3 over-expressing cells, but not in control cells. Confocal microscopy demonstrated the transparent border was actually a result of increased accumulation of E-cadherin, β -catenin and F-actin over the cell periphery. Control cells (control vector-transfected cells) and EphB3 over-expressing cells also had distinctly different morphologies. Cells transfected with control vector exhibited mesenchymal-like morphology: elongated appearance, loose cell-cell contact, visible lamellipodia, spreading morphology and little cortical actin. By contrast, EphB3 over-expressing cells had a relatively epithelial-like morphology: cobble-stone appearance, tight cell-cell junctions, diminished lamellipodia and cell spreading, and prominent submembranous cortical actin. Cortical-actin-cytoskeleton is currently regarded as a MET effector because formation of such cytoskeleton is an important step in the progression of MET by which junctional adhesion molecules can re-establish epithelial cell-cell junctions. Polarization of E-cadherin, another important characteristic of epithelialization, was also detected in Z-axis confocal images. It is known that intracellular distribution of β -catenin is a determinant of cell fate: nuclear β -catenin induces stem cell and cancer cell de-differentiation and/or oncogenesis but cytoplasmic β -catenin functions as cytoskeleton in differentiated cells.

Although our confocal images could not quantify changes of β -catenin in cell nuclei, we did observe that more β -catenin had accumulated in the cytoplasm and cell margin in EphB3 over-expressing cells, suggesting there was a trend toward epithelial differentiation in these cells.

PART VII. Over-expression of EphB3 induces changes in cell behavior consistent with mesenchymal-to-epithelial transition and reduced invasive phenotypes

Migration is a fundamental ability of mesenchymal cells by which they can reach their destination to carry out their particular function. Increase in migratory ability also enhances cancer cells' invasiveness. We found EphB3 over-expressing cells had impaired migration in the Matrigel invasion chamber. Cell-cell adhesion is usually loose in mesenchymal and cancer cells. Here we found EphB3/ephrin-B signaling resulted in a significant increase in cell-cell adhesion. The increased adhesion was Ca^{2+} -dependent; therefore, increased cell-cell adhesion is E-cadherin-mediated. It is known that Rac1, a member of Rho family GTPases, is over-expressed in many cancers, including colon cancer and is responsible for initiating EMT, including depolymerizing actin cytoskeleton, decreasing cadherin-mediated cell-cell adhesion, facilitating loss of apico-basal polarity, increasing lamellipodia formation and promoting cell migration, as well as suppressing apoptosis and contributing to tumor initiation and progression. After pull-down from cell lysates and Western blot analysis, we observed a significant reduction in GTP-bound Rac1, the active form of Rac1, in EphB3 over-expressing cells, but not control cells. Therefore, EphB3/ephrin-B interaction could promote MET through reducing Rac1 activity and this finding provided an explanation for the morphological and phenotypic changes in EphB3 over-expressing cells.

PART VIII. Over-expression of EphB3 induces apoptosis, suppresses HT-29 growth in monolayer cultures, anchorage-independent growth in soft agar and xenograft

growth in nude mice

The difference in growth between EphB3 over-expressing cells and control cells was remarkable. In culture dishes, suppression of growth in EphB3 over-expressing cells could be observed as early as the third day. Anchorage-independent growth, one of the most important malignant features of cancer cells, was also found to be significantly reduced in EphB3 over-expressing cells. In nude mice, EphB3 over-expressing cells grew into smaller tumor masses than control cells. At the tissue level, expression of proliferation marker Ki-67, quantified by counting Ki-67 positive cells in a tissue section, paralleled the macroscopic findings. It has been reported that EphA2 and EphB4 signaling can induce apoptosis. In our study EphB3/ephrin-B signaling also induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Recently, resistance to apoptosis has been proposed as an *in vitro* functional marker of EMT. Increased apoptosis owing to EphB3/ephrin-B signaling is, therefore, consistent with MET.

PART IX. Over-expression of EphB3 induces molecular changes consistent with mesenchymal-to-epithelial transition, modifying the Wnt signaling pathway and completion of cell-polarity program

To explain the phenotypic changes, we examined several key molecules concerned with (i) tumor progression (E-cadherin, β -catenin and plakoglobin) and (ii) MET (E-cadherin, β -catenin, plakoglobin, CrkL and fibronectin), in EphB3 over-expressing and control cells. Western blots of cytoplasmic and nuclear extracts showed that E-cadherin was up-regulated in EphB3 over-expressing cells. More importantly, we found that cytoplasmic β -catenin was increased and nuclear β -catenin was decreased although the total amount of intracellular β -catenin was not changed. Immunoprecipitation experiment demonstrated that E-cadherin molecules could bind efficiently with cytoplasmic β -catenin and that the more E-cadherin molecules, the more cytoplasmic β -catenin molecules were sequestered, which may facilitate trans-

location of β -catenin from the nucleus to the cytoplasm. A reporter assay further demonstrated that β -catenin/TCF activity was reduced in EphB3 over-expressing cells, signifying a moderate down-regulation of Wnt signaling pathway. We next asked which β -catenin target gene(s) were responsible for the phenotypic changes in EphB3 over-expressing cells. Among 9 genes (*Ascl2*, *Axin2*, *c-Myc*, *cyclin D1*, *p21*, *fra-1*, *c-jun*, *uPAR* and *ZO-1*) that we examined, only *ZO-1*, a β -catenin downstream gene whose expression is inversely controlled by β -catenin, was up-regulated in EphB3 over-expressing cells. The tight junction-associated protein ZO-1 may potentiate epithelial polarization; hence, this finding confirms the role of EphB3/ephrin-B signaling in promoting epithelialization. In fact, dissociation of tight junction is considered to be the first step of EMT and formation of tight junction the final step of MET. Therefore, the presence of this marker indeed signals the completion of the cell-polarity program. It is known that tight junctions are located in the subapical region of the lateral membranes of epithelial cells, serving as paracellular barriers restricting movement of molecules across epithelial barriers. A series of Z-axis confocal images of ZO-1 and E-cadherin confirmed the three-dimension position of tight junctions (subapical region of the lateral membranes) and adherens junctions (basolateral region of the cell membranes) in EphB3 over-expressing cells, indicating a full restoration of epithelial cell polarity. Similar to β -catenin, a small fraction of γ -catenin (plakoglobin) was also found to relocate from nuclei to cytoplasm although the total amount remained unchanged. Crk, an upstream signaling molecule of EMT and also an oncoprotein, is able to promote loss of cortical actin, disassociate β -catenin and E-cadherin from adherens junctions, breakdown adherens junctions, facilitate lamellipodia formation and cell dispersal and augment migration, invasion and/or oncogenesis in epithelial and cancer cells. Moreover, Crk has been identified as an upstream molecule of Rac1 signaling and to be responsible for EMT phenotypes.

Here we found that over-expression of EphB3 inactivated CrkL by post-translational modification (phosphorylation at Tyr 207) and this finding, together with findings aforementioned, suggested that EphB3/ephrin-B signaling promoted MET by inactivating the CrkL–Rac1 pathway. Fibronectin, a component of extracellular matrix and also a mesenchymal marker, is manufactured by mesenchymal, but not epithelial cells. Our real-time RT-PCR data showed that fibronectin expression was significantly down-regulated in EphB3 over-expressing cell lines. Finally, we examined the changes of E-cadherin and CrkL in xenograft tumor samples and obtained similar results.

PART X. Knockdown of EphB3 reverses MET in EphB3 over-expressing cells and promotes EMT in cells with endogenous EphB3 activity

Successful knockdown of EphB3 almost completely reversed the molecular and morphologic aspects of the mesenchymal-to-epithelial transition, while cells that escaped EphB3 knockdown maintained their non-spreading morphology as well as the accumulation of E-cadherin and cortical actin in cell margin. We next applied EphB3 siRNA to LS174T, a human colon cancer cell line with high-level endogenous EphB3 expression. Wild-type LS174T cells exhibit tight cell-cell contact, cell margin-accumulated and polarized E-cadherin as well as prominent cortical actin, which resembles the L32 cell line. When EphB3 was successfully knocked down, epithelial-like LS174T converted into mesenchymal-like LS174T and polarization of E-cadherin disappeared.

PART XI. Effect of CrkL knockdown on HT-29 cells

To test the role of CrkL in our model, we knocked down CrkL in HT-29 control cells using siRNA. The control cells, like wild-type HT-29, displayed spreading morphology but cells with siCrkL treatment exhibited diminished cell spreading, tight cell-cell contact, and formation of submembraneous cortical actin. Application of

siCrkL also significantly reduced Transwell migration. These findings parallel the phenotypic changes due to inactivation of CrkL by phosphorylation and suggest its important role in EphB3 signaling.

Discussion

PART I. Clinical Correlates of Up-regulated Genes in Colorectal Cancer

Long lists of data obtained from microarray experiments help little by themselves in the understanding of clinical characteristics. However, analysis of gene expression in correlation with clinical or phenotypic variations may indicate biologically meaningful changes at a transcriptional level. Prior to this study, other array-based studies had demonstrated expression profiles or gene clusters associated with colorectal cancer; whereas, any relationship between individual genes and clinicopathological factors was never clarified. Singh *et al.* had utilized microarrays to identify genes that might predict the clinical behavior of a disease (prostate cancer), but there was no individual gene in their report whose expression correlated to the relevant clinical and pathological parameters. In this study, we validated eight up-regulated genes in colorectal cancer tissue and found six of them to be linked to clinicopathological variables.

In post-array validation of this study, we tested 20 candidate genes using real-time RT-PCR in 31 paired samples, including the same samples studied in the initial array experiments, plus an additional 27 new samples. The 20 candidate genes were up-regulated in all four chips; however, only 40% (8/20) of these candidate genes were post-array validated by real-time RT-PCR as being up-regulated in colorectal cancer. Previously, Rajeevan *et al.* had used real-time RT-PCR to test 24 selected candidate genes from their array data and 71% (17/24) of those genes passed the post-array

validation. Their high agreement between array data and real-time RT-PCR results was mainly due to the fact that they used only one pair of cultured cell lines (two keratinocyte subclones) in both array experiments and post-array validation. In the current study, we used tissue samples from different patients; heterogeneity of tissue cells and sample-to-sample variation led to the low agreement between array data and real-time RT-PCR results. Therefore, validation of microarray results using another independent laboratory approach with additional tissue samples is mandatory if few microarrays are carried out and tissues are used as sources of experimental samples.

In combination with previous reports, some connections, either between up-regulated genes and carcinogenesis or between gene expression and clinical factors, can be established from this study. Inferences based on our findings and evidence from others' studies are discussed below.

MYC vs Sex

In this study, *c-MYC* was over-expressed in 94% (17/18) of samples from male colon cancer patients, but only in 54% (7/13) of females. This suggests a gender-related influence on *c-MYC* expression. The role of androgen in increasing *c-MYC* expression has been investigated and confirmed in prostatic cancer by many authors. So it is likely that androgen may have a similar effect in colorectal cancer. In fact, epidemiological data concerning relative risk of colorectal cancer between males and females = 1.25 in Taiwan, supports this postulation.

MYC vs HNRNP A1

Our data also disclosed a strong linear correlation between mRNA transcript levels of *c-MYC* and that of *HNRPA1* (correlation coefficient = 0.948). HNRPA1, the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core protein A1, has a modular structure consisting of two conserved RNA binding domains and functions as a carrier for RNA during export of RNA to the cytoplasm. The strong correlation between

c-MYC and *HNPRA1* expression may indicate a tight association between the transcriptional factor and the RNA binding proteins trafficking in and out of the nuclear membrane. Many authors have reported using *c-myc* anti-sense oligonucleotides to inhibit cellular proliferation of various cancers, including colon cancer. From our data, a combined anti-sense oligo of *c-myc* and hnRNP A1 could be a strategy of treating colon cancer more effectively than *c-myc* anti-sense oligos alone.

GRO1 vs age and tumor stage+LN metastasis+CEA level

Up-regulation of the *GRO1* gene in colorectal cancer and that the *GRO1* protein functions as a potent mediator of leukocyte recruitment and proliferation in inflammatory diseases hint that the tumor growth of colon cancer might trigger an immune response together with *GRO1* over-expression. In this study, two findings indirectly support this speculation. First, our data showed *GRO1* was frequently up-regulated in less invasive cancers (less advanced in stage, lymph node metastasis and CEA levels). This implies *GRO1* may have a protective effect (the immune response against tumors) in preventing the progression of colon cancer. Second, we found the *GRO1* gene was significantly up-regulated in patients younger than 65 years old; the immune response of young people is generally stronger than the elderly, hence up-regulation of *GRO1* largely occurs in colon cancer patients younger than 65.

GPX2 vs differentiation

GPX2 expresses mainly in the epithelium of the gastrointestinal tract and its protein product, GPX-GI, functions as an intracellular selenium-dependent glutathione peroxidase that can reduce H_2O_2 and alkyl hydroperoxides. Previously, Chu *et al.* reported that *GPX2* mRNA levels in the colon of mice relatively resistant to dimethylhydrazine-induced colon cancer were higher than those in mice sensitive to chemical-induced colon cancer. In this study, we found an up-regulation of *GPX2* was related to a higher degree of tumor differentiation. Both Chu's study and ours suggest *GPX2*

gene expression has an adverse effect on tumor proliferation, maybe due to its differentiation-promoting effect. Chu *et al.* also identified three retinoic acid response elements (RARE) in this gene and demonstrated that retinoic acid, a vitamin with known pro-differentiation effects, could induce *GPX2* gene expression in a human breast cancer cell line. Therefore, if retinoic acid can induce *GPX2* over-expression in colon cancer cells just as it does in cultured breast cancer cells, vitamin A could possibly clinically be used to promote cell differentiation of colon cancer.

THY1 & PHLDA1 vs anemia

THY1 encodes THY-1, a surface glycoprotein characteristic of T cells, hematopoietic stem cells, liver stem cells and blast cells of acute myeloid leukemia. THY-1 is structurally the simplest of the T-cell antigen receptors in the immunoglobulin supergene family, but its role in immune response is unclear. *PHLDA1*, known in mice as the T-cell death-associated gene, is one of the gut-expressed proteins with high T-cell epitope homology. In this study, we found both *THY1* and *PHLDA1* were up-regulated in colon cancer tissue and both of them were relevant to patients' anemia statistically. This finding together with others' reports hint that *THY1* and *PHLDA1* products are two surface molecules responsible for crosstalk between colon cancer and the immune system.

Further work is required to determine whether the up-regulation of these two genes in colon cancer is related to tumor-infiltrating T cells being recruited, leading to increased tumor cell necrosis and subsequent tumor mass bleeding and patients' anemia.

The clinical correlates of up-regulated genes in this study are essentially statistical inference. More scientific evidence confirming the correlation and associated postulations are still necessary. However, the findings in this study provide clues to molecular events related to the carcinogenesis or clinical features of human colorectal

cancer and suggest possible therapeutic targets.

PART II. EphB3 Promotes MET and Suppresses Tumor Growth

Over the last few years increasing evidence has implicated EMT in the progression of primary tumors; however, little is known about the reverse process, MET. Here we report an example of tumor MET, resulting from EphB3/ephrin-B signaling, that is intimately associated with tumor suppression activity.

To investigate the role of EphB3 in colorectal cancer, we stably transfected HT-29 cells with EphB3-expressing vectors. After isolation of stable clones, we noticed that the EphB3 over-expressing cells were morphologically more epithelial-like and less mesenchymal-like than control vector-transfected cells. We then inspected the alterations of cell behavior due to EphB3 signaling. Miao *et al.* have reported that stimulation of EphB3 receptor with soluble pre-clustered ephrin-B1-Fc promoted cell rounding, inhibited cell migration, impaired cell-matrix adhesion and reduced Rac1 activity. In this study, we made similar findings regarding changes in cell morphology, migration and Rac1 activity, but we could not find a significant change in cell-matrix adhesion in our experimental model. The disparity in cell-matrix adhesion between these two studies may be due to a cell-type idiosyncrasy and/or difference in EphB3/ephrin-B interaction pattern (EphB3/ephrin-B interacted *in trans* in Miao's study but interacted *in cis* in the current study). Rac1 signaling is known to promote EMT, initiate tumorigenesis and contribute to tumor progression. Similarly, Crk (CT10 regulated kinase), the protein product of a proto-oncogene and its homolog v-Crk originally isolated from an avian sarcoma virus CT10 (chicken tumor 10), is an EMT effector and an oncoprotein. Rac1 is known to be a downstream molecule of Crk and inactivation of Crk–Rac1 signaling pathway promotes MET. Our data demonstrated that over-expression of EphB3 inactivated both CrkL and Rac1 and

knockdown of EphB3 activated CrkL by decreasing pCrkL. In addition, knockdown of CrkL resulted in similar morphological and functional alterations as EphB3 over-expression. We therefore suggest that EphB3/ephrin-B interaction promotes MET through inactivation of the CrkL–Rac1 signaling pathway. Recently, Noren's study of breast cancer demonstrated that EphB4 signaling suppresses tumorigenicity by activating the Abl–Crk pathway (EphB4/ephrin-B2 activates Abl which sequentially inactivates Crk by tyrosine phosphorylation) and such activation also confers an epithelial phenotype on non-transformed mammary epithelial cells. Whether EphB3 signaling promotes MET and suppresses tumor growth through the Abl-Crk-Rho-GTPases pathway need further investigation.

Recently, tumor compartmentalization through E-cadherin-mediated adhesion was identified by Cortina *et al.* as a new mechanism of tumor suppression in colorectal cancer. Here we provide the following additional interesting and important findings in support.

Firstly, E-cadherin is up-regulated in EphB3-overexpressing HT-29 cells. It is well documented that E-cadherin is not only an adhesion molecule, but also a tumor suppressor as well as the most important epithelial marker. E-cadherin is believed to be the master programmer of EMT (or MET) because signaling pathways contributing to EMT (or MET) converge on regulation of this molecule. Although some results concerning E-cadherin in our study differed from Cortina's study (*i.e.* change or no change in the amount of E-cadherin), both our data and Cortina's data demonstrated a redistribution of E-cadherin and reinforcement of the cell-cell junction. Thus, it is evident that E-cadherin plays a major role in the downstream effect of EphB3/ephrin-B signaling.

Secondly, EphB3 signaling changes the intracellular distribution of β -catenin. β -catenin is the central molecule of Wnt signaling. Various downstream effectors of

β -catenin/TCF constitute versatile functional modules of Wnt signaling, responsible for cell proliferation, de-differentiation, inhibition of apoptosis and tumor progression. β -catenin is currently regarded as the master oncoprotein in colorectal cancer and nuclear β -catenin is well correlated with tumor stages and patient survival. Nuclear β -catenin has also been shown to induce EMT and used as a mesenchymal maker. Furthermore, reduced β -catenin/TCF activity has been demonstrated to promote epithelial differentiation and restore epithelial cell polarity. It is known that E-cadherin-bound β -catenin cannot function as a Wnt signaling molecule and excess cadherin could interfere with Wnt signaling by competing for β -catenin binding. Here we reiterate that excess E-cadherin sequestered β -catenin to the cell margin and resulted in an increase of cytoplasmic β -catenin and a decrease of nuclear β -catenin in our experimental model. Thus, decreased β -catenin/TCF-mediated transactivation of Wnt responsive genes might be an explanation for tumor suppression, cell differentiation and/or other phenotypic changes. However, we did not find significant changes in expression of *cyclin D1*, *c-Myc* and *p21* (β -catenin targets related to cell proliferation) in our model (data not shown), but we did find that ZO-1, an epithelial marker and also a β -catenin target, was up-regulated in EphB3 over-expressing cells. Furthermore, ZO-1 fluorescence signaling in our confocal images demonstrated the formation and polarization of tight junctions and this event was equivalent to a completion of the MET process and restoration of epithelial cell polarity. Therefore, our result suggests that EphB3 signaling crosstalks onto Wnt signaling, activating the Wnt signaling module that governs cell differentiation. Other β -catenin target genes responsible for tumor suppression, differentiation and apoptosis remain to be elucidated. Taken together, EphB3/ephrin-B interactions might collectively exert their tumor suppression effect through compartmentalization, apoptosis and differentiation-promoting effect.

Plakoglobin (γ -catenin), which is generally accepted as an epithelial marker and a weak tumor suppressor, is a component of desmosomes and shares many common features with its close homolog, β -catenin. Simcha *et al.* demonstrated that the nuclear translocation and transactivation abilities of plakoglobin were weaker than β -catenin. In this study, we showed that the reverse process (cytoplasmic translocation of plakoglobin) is also weaker than β -catenin and that seems to be a reasonable explanation for its known role as a weak tumor suppressor. Increased cytoplasmic plakoglobin might also contribute to the formation of cortical actin in EphB3 over-expressing cells.

MET is a process consisting of a series of events that re-establish epithelial cell-cell junctions and restore epithelial cell polarity in a stepwise manner: cortical-actin-cytoskeleton reorganization, adherens-junction assembly, desmosome association and finally tight-junction formation. We have observed all of these events in the present study and identified that inactivation of the CrkL–Rac1 pathway is responsible for EphB3-mediated MET. We also found that crosstalk between EphB3 and Wnt signaling assists in constructing the cell-cell junction.

In summary, we have demonstrated EphB3/ephrin-B signaling promoted MET and suppressed tumor growth in the current experimental model. The MET-promoting effect could be seen in both cancer cells and cells near the crypt-villus junction in the normal intestine, suggesting a new role for EphB3 in the biology of the gut and in cancer.

第七章 參考文獻

- Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, Sato E, Tamaya T.** Overexpression of ephrinB2 and EphB4 in tumor advancement of uterine endometrial cancers. *Ann Oncol.* 2007 Mar;18(3):485-90.
- Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Konrad L, Laiho P, Espín E, Armengol M, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Arango D.** Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22): 10170-3.
- Asadi FK, Sharifi R.** Effects of sex steroids on cell growth and *C-myc* oncogene expression in LN-CaP and DU-145 prostatic carcinoma cell lines. *Int Urol Nephrol.* 1995;27(1):67-80.
- Barrios A, Poole RJ, Durbin L, Brennan C, Holder N, Wilson SW.** Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis. *Curr Biol.* 2003 Sep 16;13(18):1571-82.
- Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H.** Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 2002 Oct 18;111(2):251-63.
- Battle E, Bacani J, Beghtel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H.** EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature.* 2005 Jun 23;435(7045): 1126-30.
- Biamonti G, Ruggiu M, Saccone S, Della Valle G, Riva S.** Two homologous genes,

- originated by duplication, encode the human hnRNP proteins A2 and A1. *Nucleic Acids Res.* 1994 Jun 11;22(11):1996-2002.
- Böhme B, Holtrich U, Wolf G, Luzius H, Grzeschik KH, Streibhardt K, Rübsamen-Waigmann H.** PCR mediated detection of a new human receptor-tyrosine-kinase, HEK 2. *Oncogene.* 1993 Oct;8(10):2857-62.
- Booth C, Brady G, Potten CS.** Crowd control in the crypt. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1360-1.
- Boyer B, Vallés AM, Edme N.** Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct 15;60(8):1091-9.
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T.** Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1-2):56-65.
- Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, Kinch MS.** Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. *Cancer Res.* 2002 May 15;62(10):2840-7.
- Chen J, Zhuang G, Frieden L, Debinski W.** Eph receptors and Ephrins in cancer: common themes and controversies. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10031-3.
- Cheng N, Brantley DM, Chen J.** The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Feb;13(1):75-85.
- Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H.** Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Feb;14(2):437-43.
- Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS.** Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI.

J Biol Chem. 1993 Feb 5;268(4):2571-6.

Chu FF, Esworthy RS, Ho YS, Bermeister M, Swiderek K, Elliott RW. Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. Biomed Environ Sci. 1997 Sep;10(2-3):156-62.

Clevers H, Batlle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. Cancer Res. 2006 Jan 1;66(1):2-5.

Clevers,H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. Cell. 2006 Nov 3;127 (3):469-80.

Cortina C, Palomo-Ponce S, Iglesias M, Fernández-Masip JL, Vivancos A, Whissell G, Humà M, Peiró N, Gallego L, Jonkheer S, Davy A, Lloreta J, Sancho E, Batlle E. EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. Nat Genet. 2007 Nov;39(11):1376-83.

Cuenca RE, Azizkhan RG, Haskill S. Characterization of GRO α , β and γ expression in human colonic tumours: potential significance of cytokine involvement. Surg Oncol. 1992 Aug;1(4):323-9.

Davalos V, Dopeso H, Castaño J, Wilson AJ, Vilardell F, Romero-Gimenez J, Espín E, Armengol M, Capella G, Mariadason JM, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Arango D. EPHB4 and survival of colorectal cancer patients. Cancer Res. 2006 Sep 15;66 (18):8943-8.

Ellenbroek SI, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. Clin Exp Metastasis. 2007;24(8):657-72.

Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, Minamoto T. Oncogenic β -catenin signaling networks in colorectal cancer. Cell Cycle. 2005 Nov;4(11):1522-39.

Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Dec;2(12):887-97.

- Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, Yancopoulos GD.** Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol.* 2001 Feb 15;230(2):151-60.
- Golby SJ, Chinyama C, Spencer J.** Proliferation of T-cell subsets that contact tumour cells in colorectal cancer. *Clin Exp Immunol.* 2002 Jan;127(1):85-91.
- Grad JM, Dai JL, Wu S, Burnstein KL.** Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Mol Endocrinol.* 1999 Nov;13(11):1896-911.
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G.** The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology.* 2007 Jun;39(3):305-18.
- Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY, Chen X.** Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis.* 2006 Mar;27(3):454-64.
- Holmberg J, Genander M, Halford MM, Annerén C, Sondell M, Chumley MJ, Silvany RE, Henkemeyer M, Frisén J.** EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell.* 2006 Jun 16;125(6):1151-63.
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW.** Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):374-83.
- Hood L, Kronenberg M, Hunkapiller T.** T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell.* 1985 Feb;40(2):225-9.
- Huber MA, Kraut N, Beug H.** Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct;17(5):548-58.
- Iden S, Collard JG.** Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell

- polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Nov;9(11):846-59.
- Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N.** Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene.* 2003 Oct 16;22(46):7155-69.
- Jubb AM, Zhong F, Bheddah S, Grabsch HI, Frantz GD, Mueller W, Kavi V, Quirke P, Polakis P, Koeppen H.** EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 15;11(14):5181-7.
- Kiemer AK, Takeuchi K, Quinlan MP.** Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene.* 2001 Oct 11;20(46): 6679-88.
- Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, Meda P, Kucera T, Zarbalis K, Wurst W, Nagamatsu S, Lammert E.** EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell.* 2007 Apr 20;129(2):359-70.
- Kozii R, Wilson J, Persichetti J, Phelps V, Ball SE, Ball ED.** Thy-1 expression on blast cells from adult patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 1997 May; 21(5):381-5.
- Kruzelock RP, Short W.** Colorectal cancer therapeutics and the challenges of applied pharmacogenomics. *Curr Probl Cancer.* 2007 Sep-Oct;31(5):315-66.
- Kumar R, Eastwood AL, Brown ML, Laurie GW.** Human genome search in celiac disease: mutated gliadin T-cell-like epitope in two human proteins promotes T-cell activation. *J Mol Biol.* 2002 Jun 7;319(3):593-602.
- Kumar SR, Singh J, Xia G, Krasnoperov V, Hassanieh L, Ley EJ, Scehnet J, Kumar NG, Hawes D, Press MF, Weaver FA, Gill PS.** Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol.* 2006 Jul;169(1):279-93.
- Kumar SR, Masood R, Spannuth WA, Singh J, Scehnet J, Kleiber G, Jennings N,**

- Deavers M, Krasnoperov V, Dubeau L, Weaver FA, Sood AK, Gill PS.** The receptor tyrosine kinase EphB4 is overexpressed in ovarian cancer, provides survival signals and predicts poor outcome. *Br J Cancer*. 2007 Apr 10;96(7):1083-91.
- Lamorte L, Royal I, Naujokas M, Park M.** Crk adapter proteins promote an epithelial-mesenchymal-like transition and are required for HGF-mediated cell spreading and breakdown of epithelial adherens junctions. *Mol Biol Cell*. 2002 May;13(5):1449- 61.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW.** The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006 Mar 27;172 (7):973-81.
- Li BD, Budnick RM, Russo CA, Anderson GR, Stewart CC.** Quantifying c-myc expression in c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide-treated leukemic and colon cancer cell lines. *J Surg Res*. 1995 Oct;59(4):485-92.
- Linghu H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watanabe T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, Mochizuki N, Tanaka S.** Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. *Oncogene*. 2006 Jun 15;25(25):3547 -56.
- Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD, Ellis LM.** Co-expression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. *Cancer*. 2002 Feb 15;94 (4):934-9.
- Liu X, Hawkes E, Ishimaru T, Tran T, Sretavan DW.** EphB3: an endogenous mediator of adult axonal plasticity and regrowth after CNS injury. *J Neurosci*. 2006 Mar 22; 26(12):3087-101.
- Lugli A, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kiefer J, Huusko P, Azorsa D, Terracciano L, Sauter G, Kallioniemi OP, Mousses S, Tornillo L.** EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: high levels of

expression in gastrointestinal cancers. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6450-8.

Macrae M, Neve RM, Rodriguez-Viciana P, Haqq C, Yeh J, Chen C, Gray JW, McCormick F. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. Cancer Cell. 2005 Aug;8(2):111-8.

Marquardt T, Shirasaki R, Ghosh S, Andrews SE, Carter N, Hunter T, Pfaff SL. Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. Cell. 2005 Apr 8;121(1):127-39.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. Genes Dev. 2005 Dec 1;19(23):2783-810.

Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. Nature. 1988 Mar 17;332(6161):272-5.

Miao H, Strebhardt K, Pasquale EB, Shen TL, Guan JL, Wang B. Inhibition of integrin-mediated cell adhesion but not directional cell migration requires catalytic activity of EphB3 receptor tyrosine kinase. Role of Rho family small GTPases. J Biol Chem. 2005 Jan 14;280(2):923-32.

Michael WM, Choi M, Dreyfuss G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. Cell. 1995 Nov 3;83(3):415-22.

Moustakas A, Heldin C-H. Non-Smad TGF- β signals. J Cell Sci. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573-84.

Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. Cancer Sci. 2007 Oct; 98(10): 1512-20.

Miura K, Nam JM, Kojima C, Mochizuki N, Sabe H. EphA2 engages Git1 to

- suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*. 2009 Apr;20 (7):1949-59.
- Nakamoto M, Bergemann AD.** Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microsc Res Tech*. 2002 Oct 1;59(1):58-67.
- Noren NK, Foos G, Hauser CA, Pasquale EB.** The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8 (8):815-25.
- Noren NK, Pasquale EB.** Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. *Cancer Res*. 2007 May 1; 67(9):3994-7.
- Orlichenko LS, Radisky DC.** Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):593-600.
- Pasquale EB.** Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun;6(6):462-75.
- Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK.** Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology*. 1998 Feb;27 (2):433-45.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G.** A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998 Mar 12;392(6672):190-3.
- Quarmby VE, Beckman WC Jr, Wilson EM, French FS.** Androgen regulation of *c-myc* messenger ribonucleic acid levels in rat ventral prostate. *Mol Endocrinol*. 1987 Dec;1(12):865-74.
- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER.** Validation of arraybased gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn*. 2001 Feb;3 (1):26-31.

- Reya T, Clevers H.** Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):843-50.
- Ridley, A.J.** (2001) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*. 2001 Aug;114(Pt 15):2713-22.
- Rodrigues SP, Fathers KE, Chan G, Zuo D, Halwani F, Meterissian S, Park M.** CrkI and CrkII function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2005 Apr;3(4):183-94.
- Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM.** Androgen-induced cell growth and *c-myc* expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res*. 2001 Feb-May;27(1-2):153-69.
- Surawska H, Ma PC, Salgia R.** The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Dec;15(6):419-33.
- Stein E, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL, Daniel TO.** Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev*. 1998 Mar 1;12(5):667-78.
- Stephenson SA, Slomka S, Douglas EL, Hewett PJ, Hardingham JE.** Receptor protein tyrosine kinase EphB4 is up-regulated in colon cancer. *BMC Mol Biol*. 2001 Dec 21;2:15.
- Stokowski A, Shi S, Sun T, Bartold PM, Koblar SA, Gronthos S.** EphB/ephrin-B interaction mediates adult stem cell attachment, spreading, and migration: implications for dental tissue repair. *Stem Cells*. 2007 Jan;25(1):156-64.
- Takino T, Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Yamada KM, Sato H.** CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2335-7.
- Tang XX, Brodeur GM, Campling BG, Ikegaki N.** Coexpression of transcripts

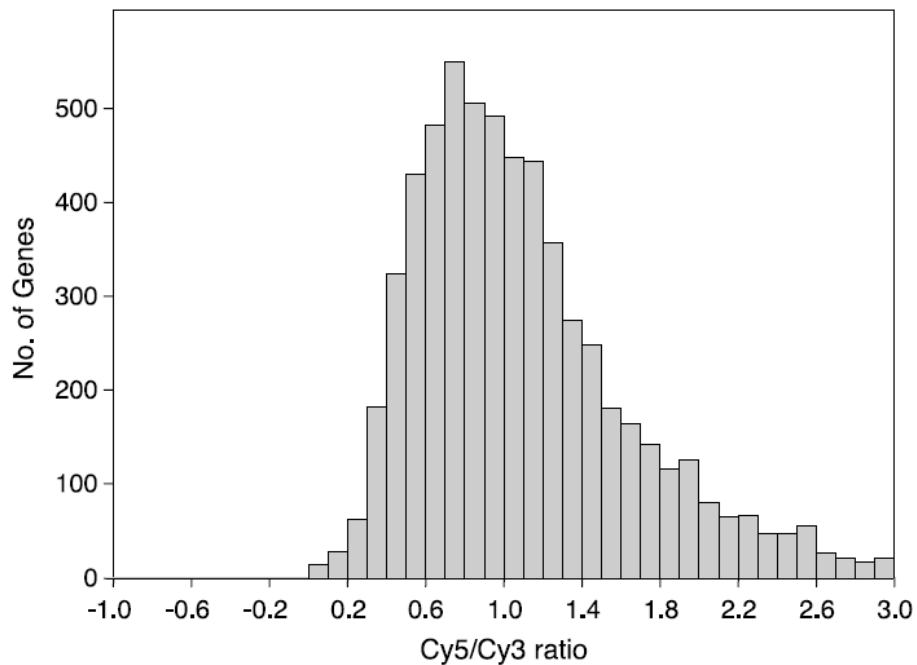
- encoding EPHB receptor protein tyrosine kinases and their ephrin-B ligands in human small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999 Feb;5(2):455-60.
- Thiery JP.** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.
- Thiery JP, Sleeman JP.** Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):131-42.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H.** The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):241-50.
- Wang JY.** Eph tumour suppression: the dark side of Gleevec. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8(8):785-6.
- Willson CA, Miranda JD, Foster RD, Onifer SM, Whittemore SR.** Transection of the adult rat spinal cord upregulates EphB3 receptor and ligand expression. *Cell Transplant*. 2003;12(3):279-90.
- Willson CA, Foster RD, Onifer SM, Whittemore SR, Miranda JD.** EphB3 receptor and ligand expression in the adult rat brain. *J Mol Histol*. 2006 Nov;37(8-9):369- 80.
- Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK, Hsiao WL.** Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1401-8.
- Wu Q, Lind GE, Aasheim HC, Micci F, Silins I, Tropé CG, Nesland JM, Lothe RA, Suo Z.** The EPH receptor Bs (EPHBs) promoters are unmethylated in colon and ovarian cancers. *Epigenetics*. 2007 Oct-Dec;2(4):237-43.
- Xia G, Kumar SR, Masood R, Zhu S, Reddy R, Krasnoperov V, Quinn DI,**

- Henshall SM, Sutherland RL, Pinski JK, Daneshmand S, Buscarini M, Stein JP, Zhong C, Broek D, Roy-Burman P, Gill PS.** EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4623-32.
- Xia G, Kumar SR, Masood R, Koss M, Templeman C, Quinn D, Zhu S, Reddy R, Krasnoperov V, Gill PS.** Up-regulation of EphB4 in mesothelioma and its biological significance. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4305-15.
- Xia G, Kumar SR, Stein JP, Singh J, Krasnoperov V, Zhu S, Hassanieh L, Smith DL, Buscarini M, Broek D, Quinn DI, Weaver FA, Gill PS.** EphB4 receptor tyrosine kinase is expressed in bladder cancer and provides signals for cell survival. *Oncogene.* 2006 Feb 2;25(5):769-80.
- Xu LH, Yang X, Bradham CA, Brenner DA, Baldwin AS Jr, Craven RJ, Cance WG.** The focal adhesion kinase suppresses transformation-associated, anchorage-independent apoptosis in human breast cancer cells. Involvement of death receptor-related signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30597-604.
- Yavrouian EJ, Sinha UK, Rice DH, Salam MT, Gill PS, Masood R.** The significance of EphB4 and EphrinB2 expression and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Sep;134(9):985-91.
- Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS.** EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2001 March 1;61(5):2301-3.
- Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ.** Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene.* 2002 Jul 18;21(31):4855-62.

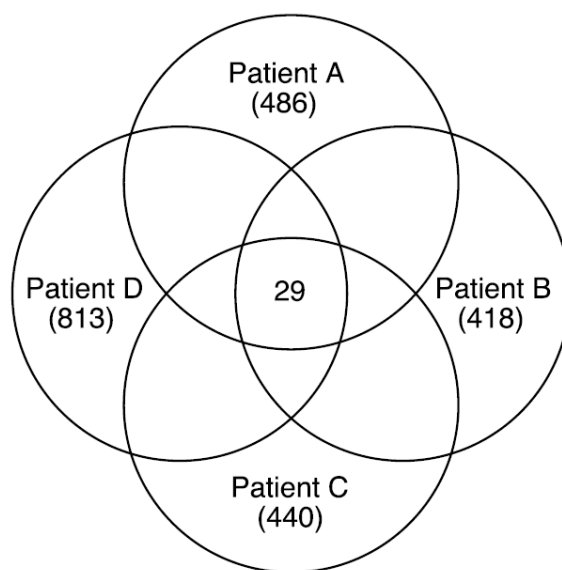


第八章 圖表

圖一、基因晶片上8000個基因的Cy5/Cy3 ratio數值構成一個常態分佈曲線



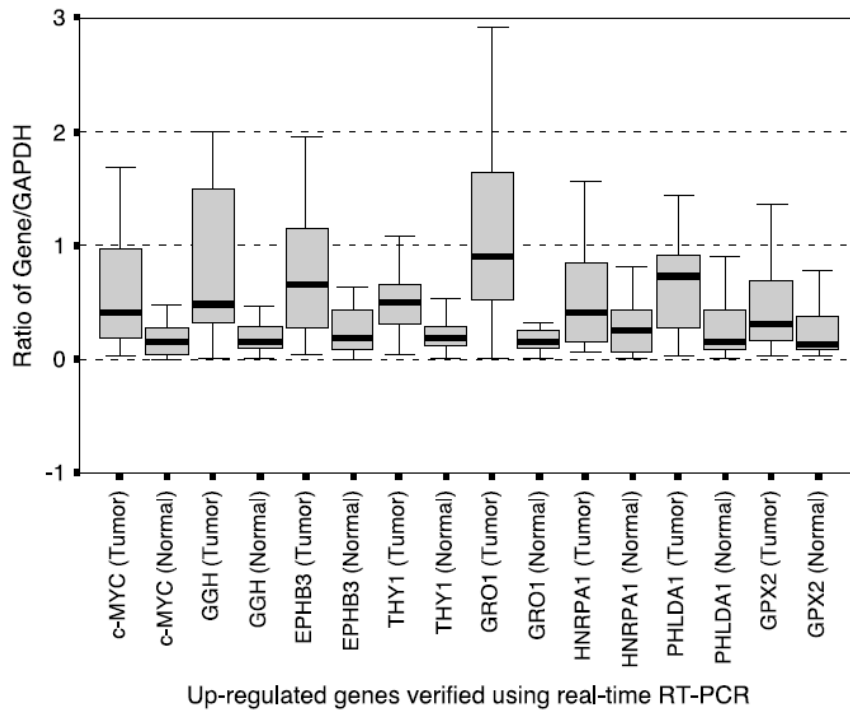
圖二、四個DNA晶片實驗中都呈向上調控的29個基因構成本研究中post-array validation的候選基因



括弧內的數字
表示單一晶片
中向上調控基
因的數目



圖三、八個通過post-array validation的基因的定量RT-PCR實驗結果



圖四、迴歸分析顯示MYC和HNRPA1兩個基因的基因表現呈現強烈的線性正相關

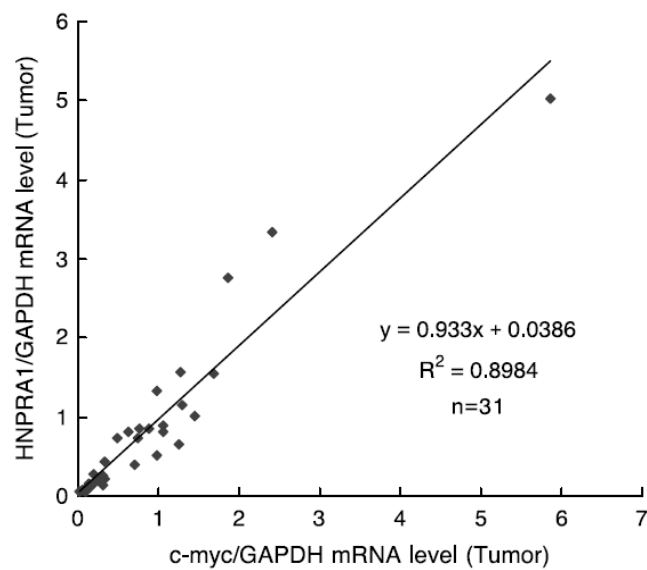


Figure 4. Correlation between the mRNA levels of *HNRPA1/GAPDH* and *c-MYC/GAPDH* in tumor tissue ($r = 0.948$; $n = 31$).



圖五、即使以正常組織的相關參數來標準化圖四的數據，*MYC*和*HNRPA1*兩個基因的基因表現依舊呈現強烈的線性正相關

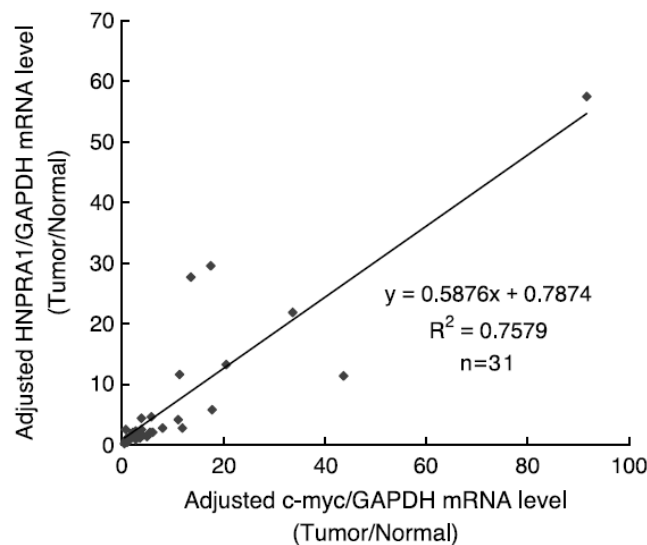
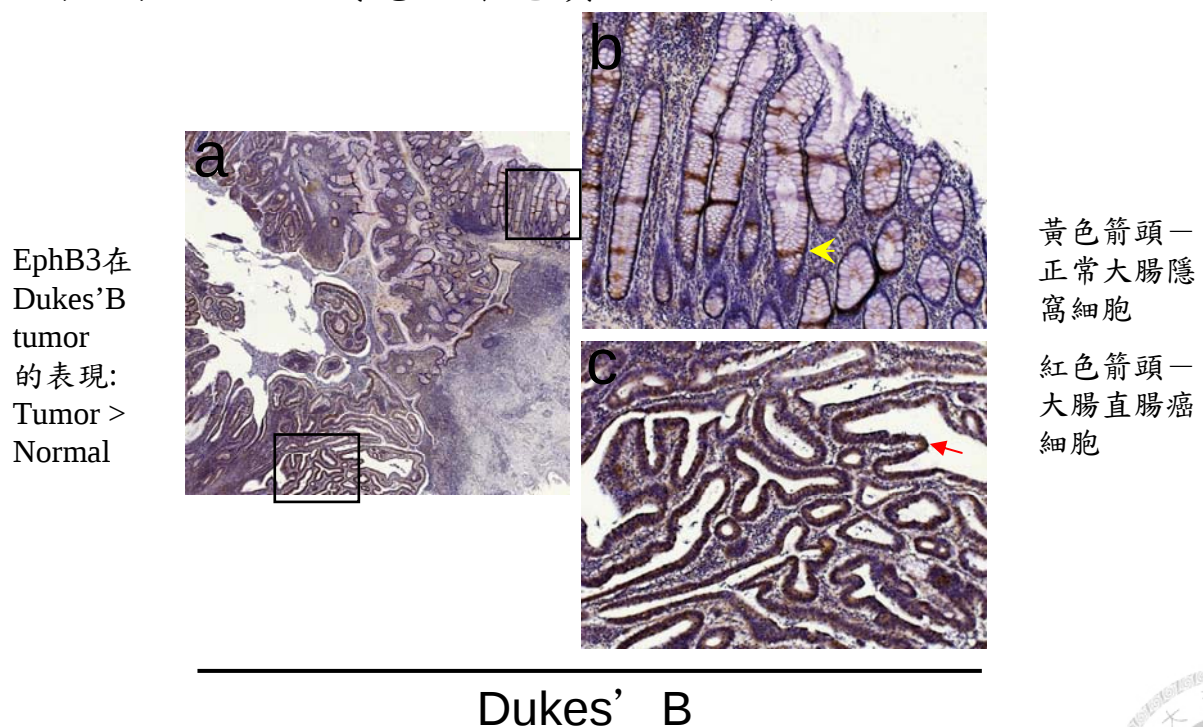
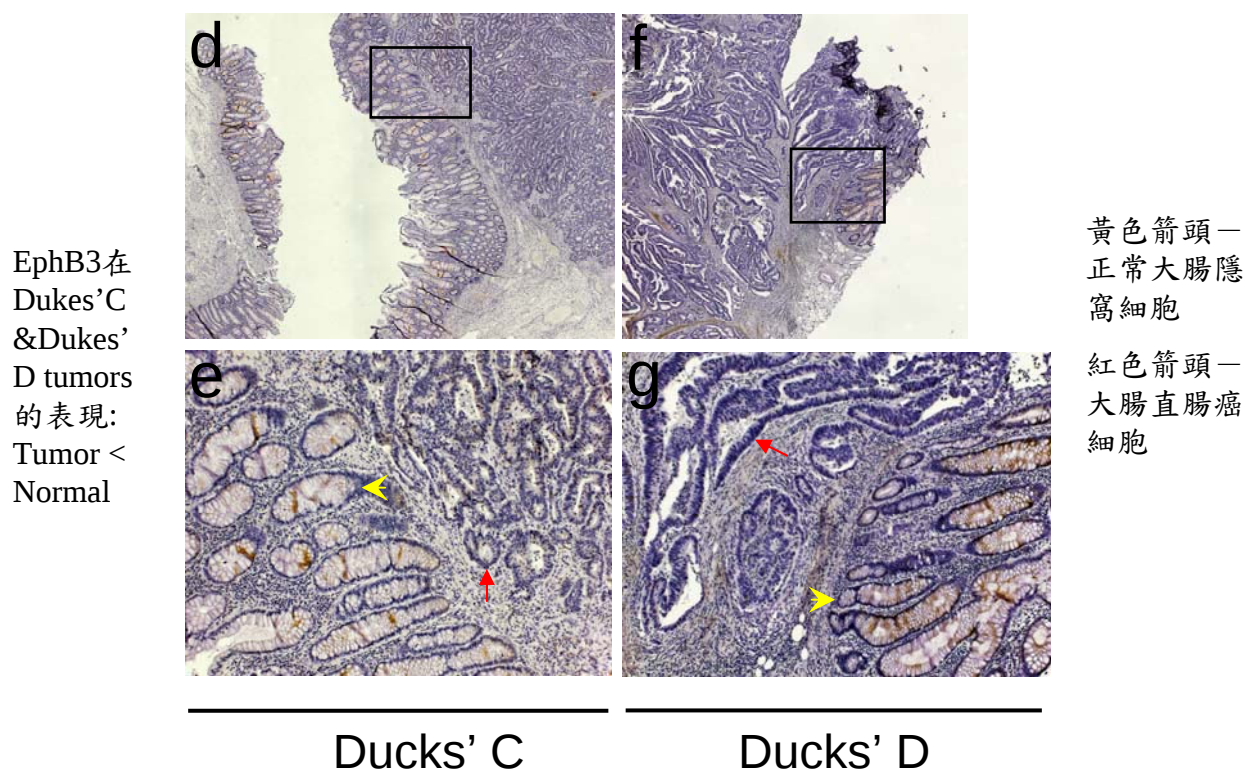


Figure 5. Correlation between the mRNA levels of adjusted *HNRPA1/GAPDH* and adjusted *c-MYC/GAPDH* (tumor/normal; $r = 0.871$; $n = 31$).

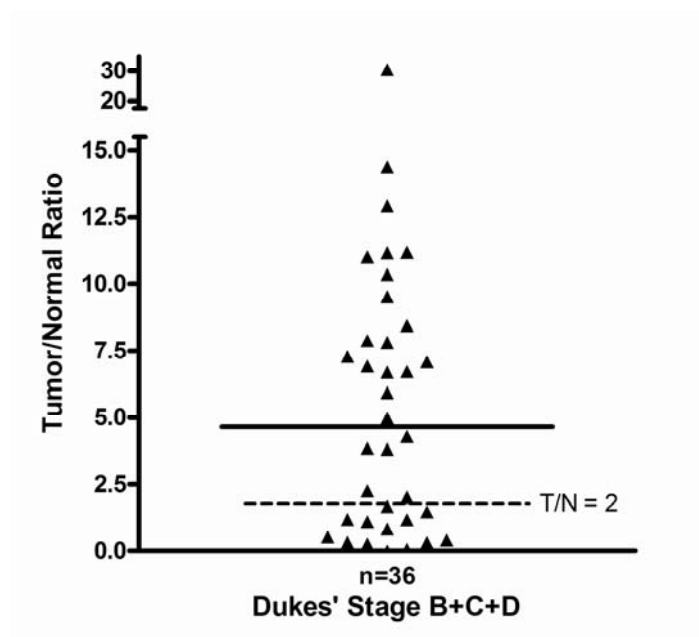
圖六、EphB3 protein在正常大腸組織和大腸直腸癌腫瘤的表現—組織免疫染色實驗的結果



圖六、(續上頁)



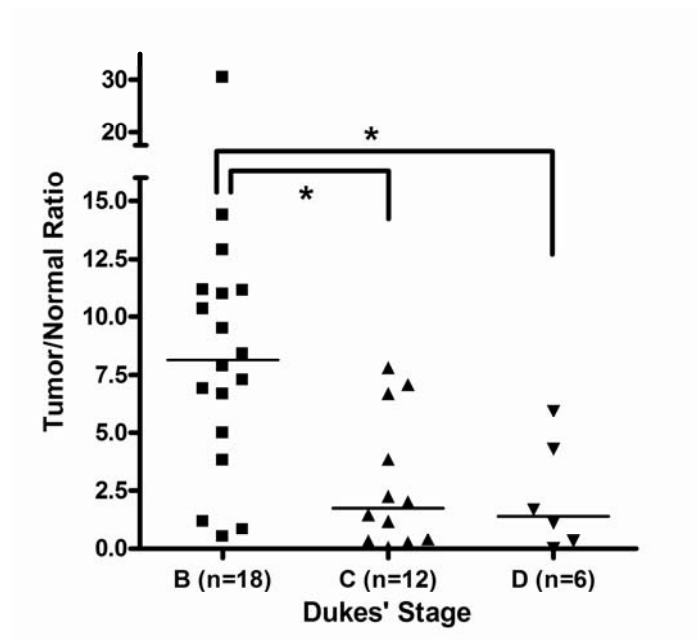
圖七、EphB3 mRNA在正常大腸黏膜組織和大腸直腸癌腫瘤的表現—定量RT-PCR的實驗結果



水平實線代表中位數 $P = 0.0005$ according to the Wilcoxon signed-rank test with theoretical median = 2.0

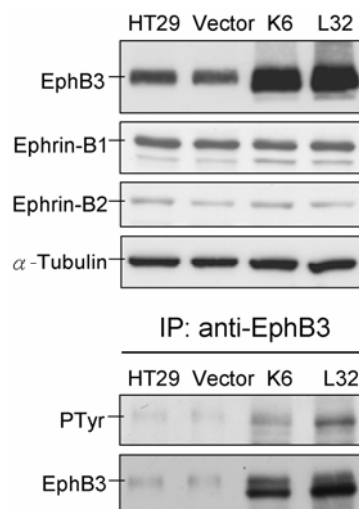


圖八、EphB3 mRNA在正常大腸黏膜組織和不同Dukes' stages大腸直腸癌腫瘤的表現—定量RT-PCR的實驗結果



水平實線代表各組的中位數 * , $P < 0.05$ using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test compared to stage B

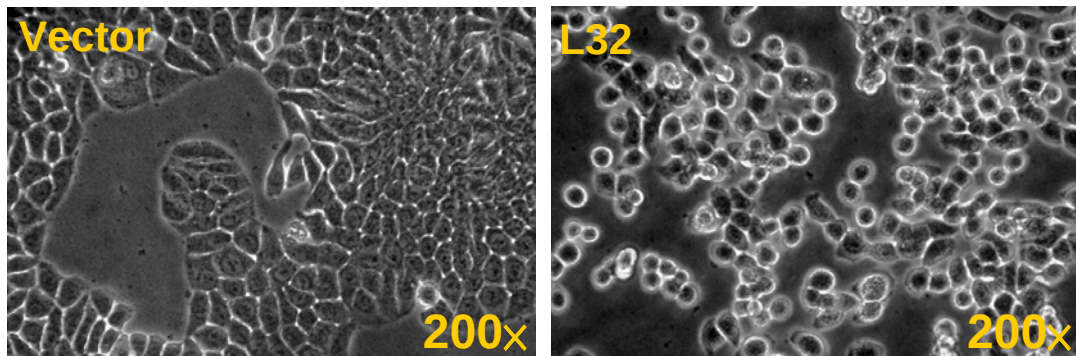
圖九、在人類大腸直腸癌細胞株HT-29 cells建立穩定的EphB3 over-expressing cell lines K6 & L32



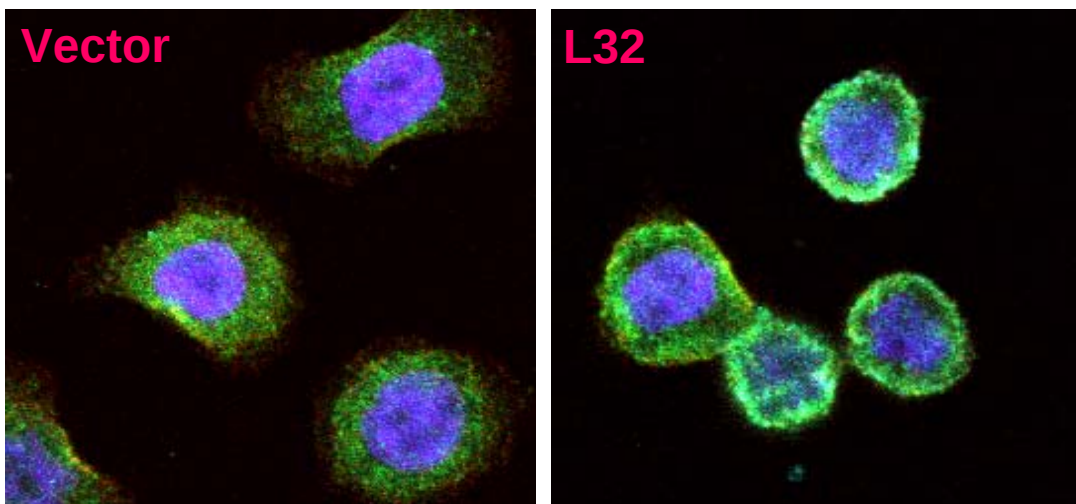
EphB3的磷酸化造成分子構形的改變以及gel上的band shift



圖十、相位差顯微鏡下可以清楚的看見持續表現EphB3的細胞株L32的細胞周邊有一層厚的透明帶狀區域

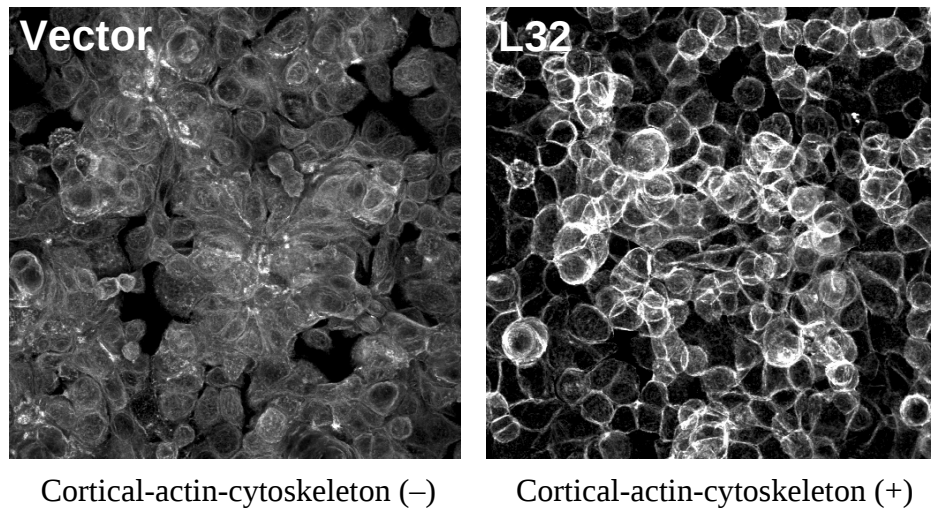


圖十一、EphB3/ephrin-B分子訊息引發細胞形態的變化符合mesenchymal-to-epithelial transition的特徵

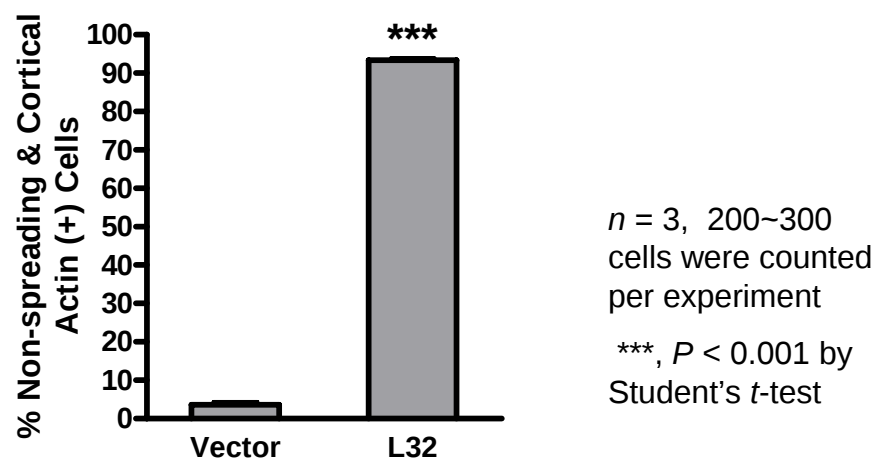


<i>Mesenchymal-like</i>	<i>Epithelial-like</i>
Elongated appearance	Cobble-stone appearance
Reduced cell-cell contact	Tight cell-cell junction
Cell spreading (+)	Cell spreading (-)
Lamellipodia (+)	Lamellipodia (-)
Cortical actin (-)	Cortical actin (+)

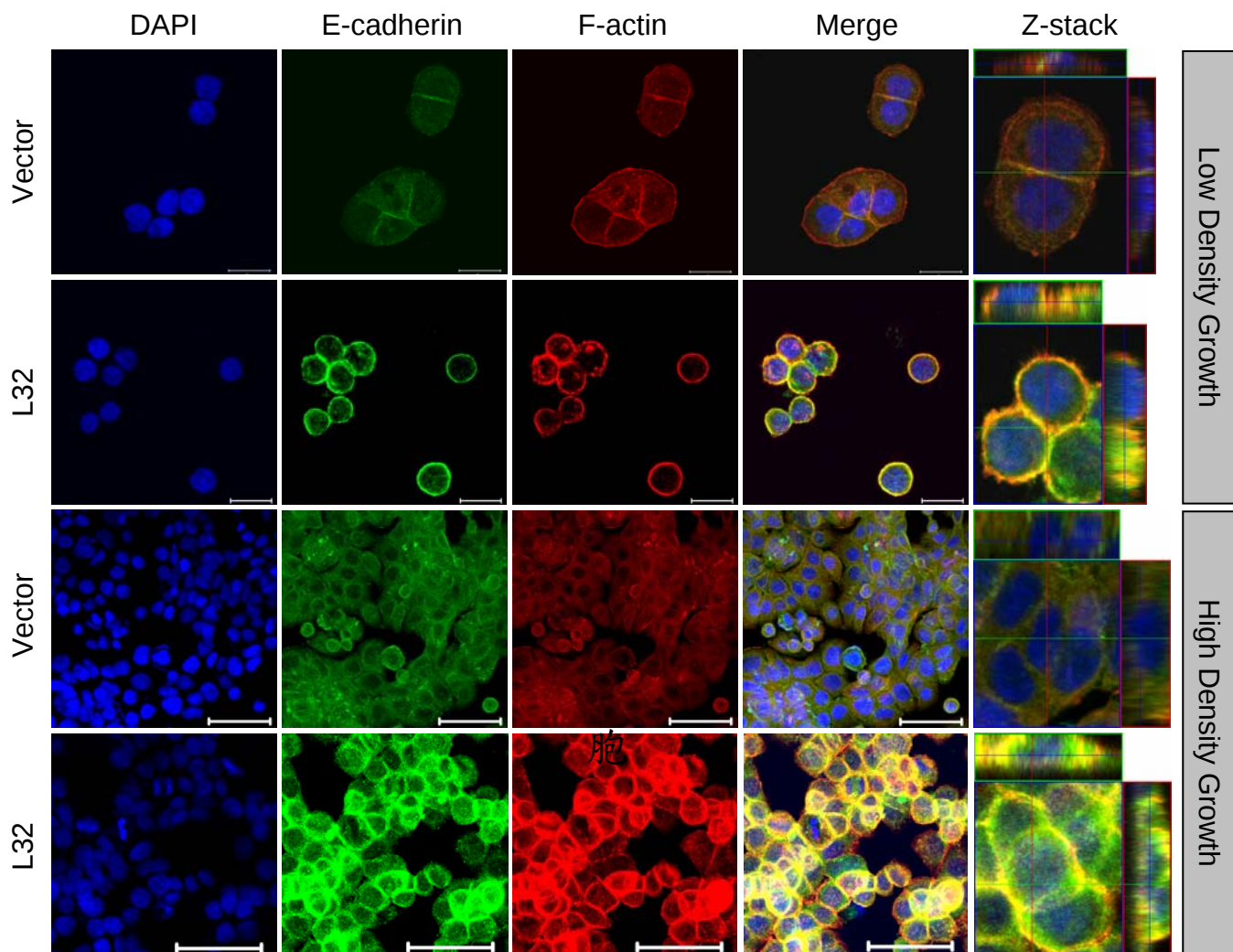
圖十二、EphB3/ephrin-B分子訊息誘發細胞骨架的重組－F-Actin staining在螢光顯微鏡下的影像



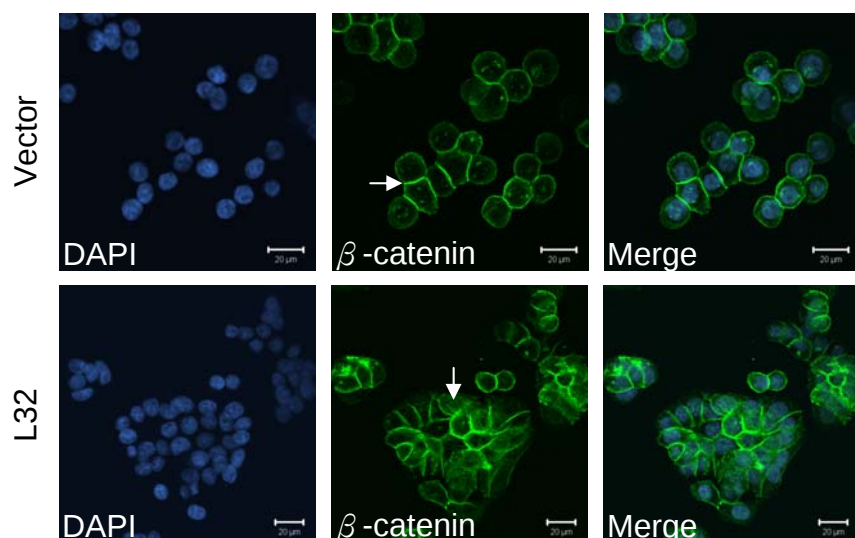
圖十三、圖十二的定量分析－93%的L32細胞株會失去細胞偽足以及延展的形態而成為鵝卵石形狀的細胞



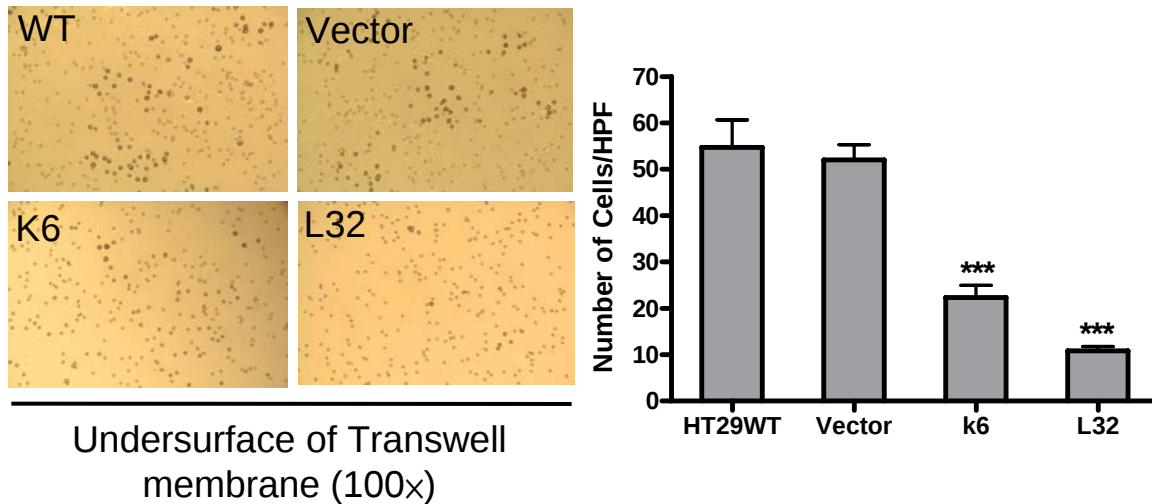
圖十四、EphB3/ephrin-B分子訊息引起E-cadherin和F-actin的重新分佈及細胞膜上E-cadherin的極化



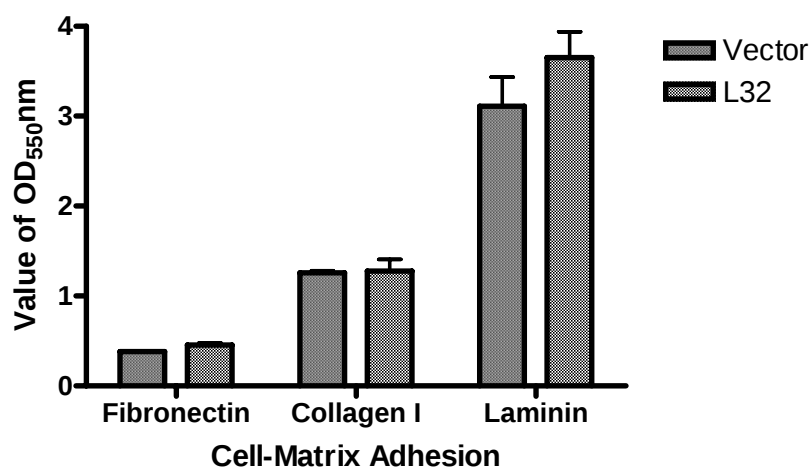
圖十五、EphB3/ephrin-B分子訊息引起細胞內 β -catenin的重新分佈—細胞質內的 β -catenin明顯增多了



圖十六、EphB3/ephrin-B分子訊息能夠顯著的減低細胞的爬行能力—Transwell migration assay



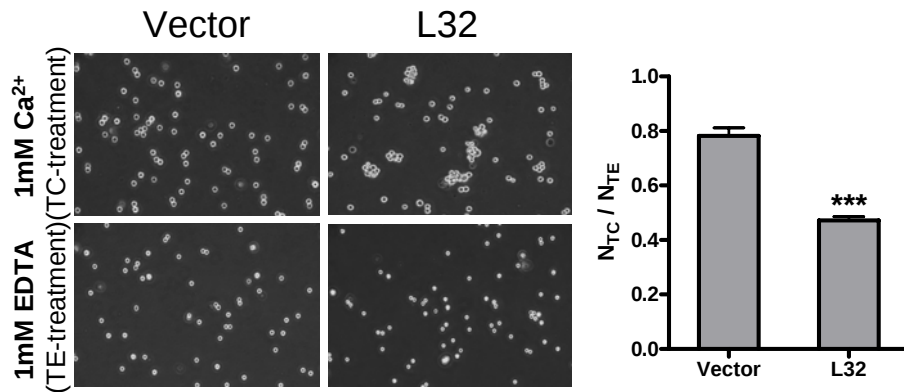
圖十七、EphB3/ephrin-B分子訊息對細胞—基質間黏合力沒有顯著的影響



$n = 3$, There is no statistical difference between Vector & L32 in each group of different extra-cellular matrix (FN, Col I and LN) using Two-way ANOVA and Bonferroni post-tests

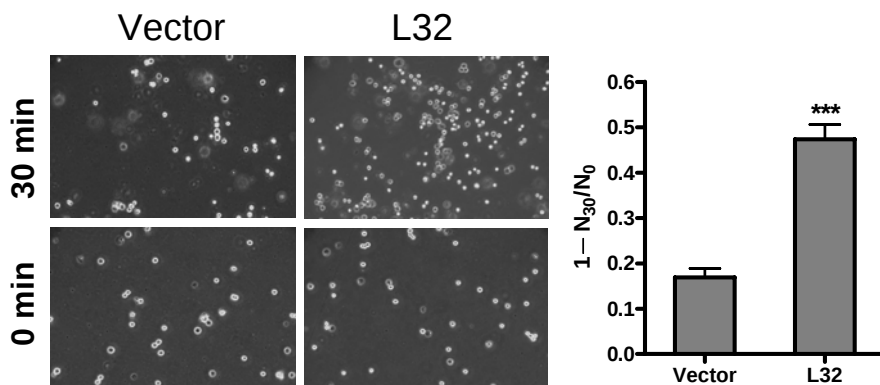


圖十八、EphB3/ephrin-B分子訊息能夠強化細胞－細胞間黏合力－Cell dissociation assay



說明：當 Ca^{2+} 存在時 (TC-treatment)，表現EphB3的L32細胞比對照組細胞更難被Trypsin分解成單獨的細胞顆粒；當 Ca^{2+} 不存在時 (TE-treatment)，上述之差異即消失 $n = 3$ ***, $P < 0.001$ by Student's t -test

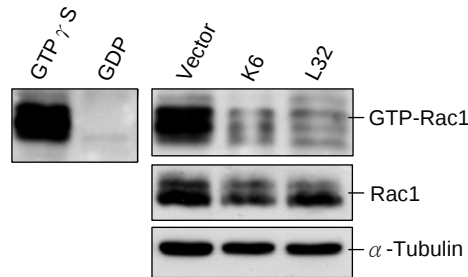
圖十九、EphB3/ephrin-B分子訊息能夠強化細胞－細胞間黏合力－Cell association assay



說明：當 Ca^{2+} 存在時，表現EphB3的L32細胞比對照組細胞更容易聚集成細胞團塊 $n = 3$ ***, $P < 0.001$ by Student's t -test



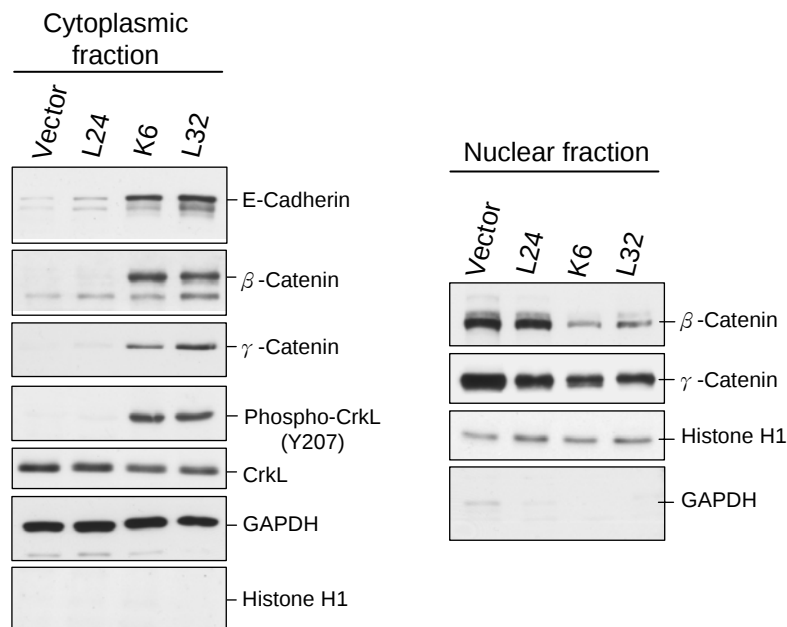
圖二十、EphB3/ephrin-B分子訊息導致Rac1分子的去活化—Pulldown & Rac1 activity assay



在Vector，K6及L32這三個細胞株中，後兩者其具活性的Rac1 (指GTP-bound Rac1) 有明顯減少的現象

GTP γ S and GDP are positive and negative control.

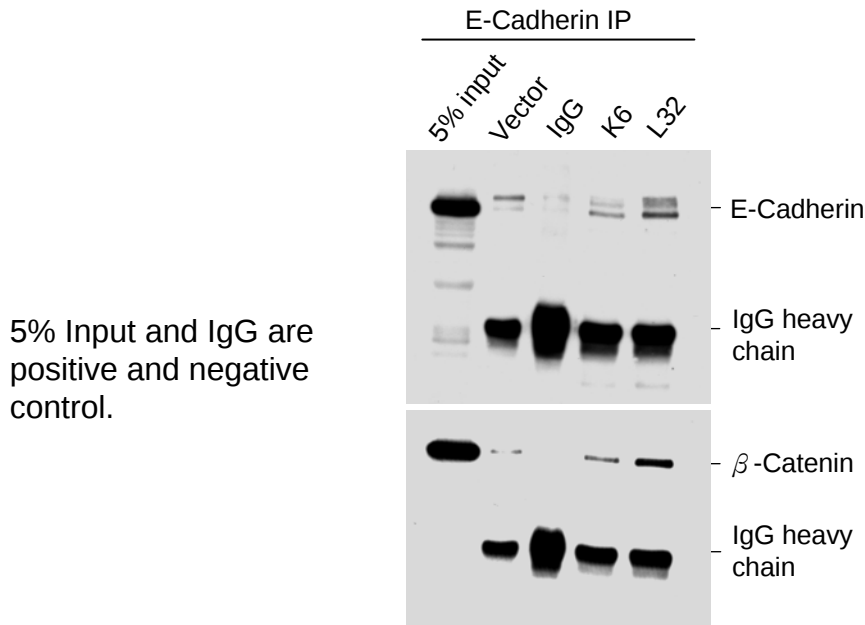
圖二十一、EphB3/ephrin-B分子訊息導致CrkL分子的去活化，增加E-cadherin的protein level，並促使細胞核中的 β -catenin及 γ -catenin分子轉移到細胞質中—細胞核細胞質分離 & 西方墨點轉漬法



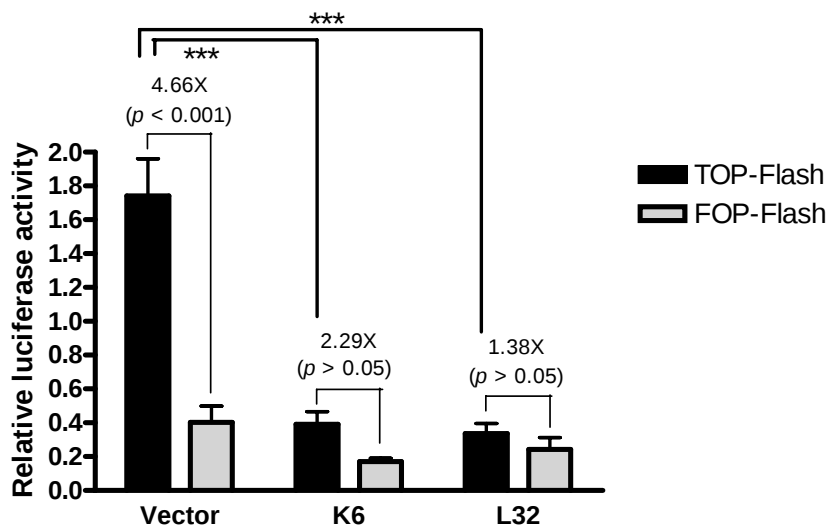
L24, a stable clone derived from EphB3 expressing-vector transfected cells but without EphB3 over-expression, was used as another control.



圖二十二、較多的E-cadherin分子能夠抓住較多的 β -catenin分子—免疫沈澱實驗



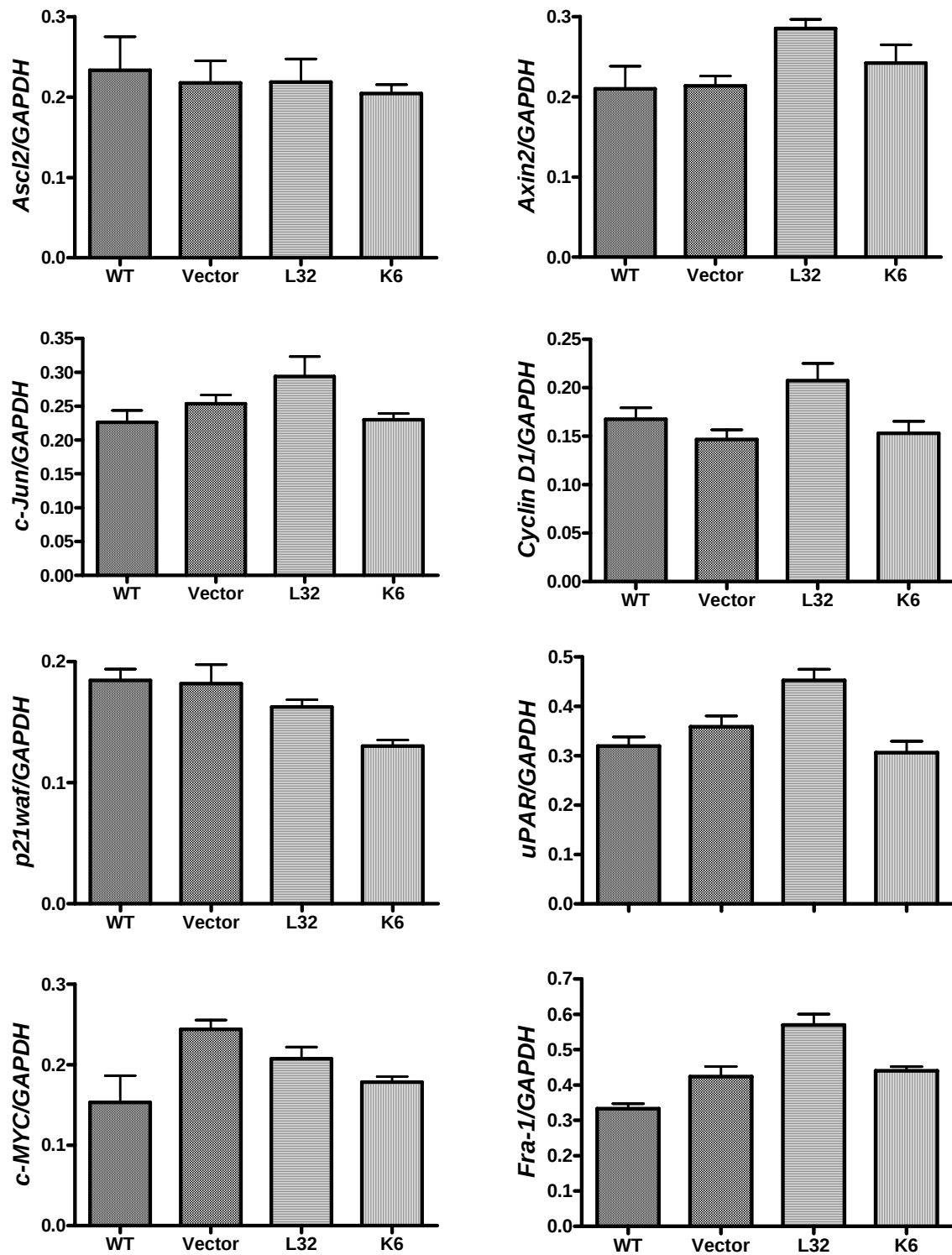
圖二十三、EphB3/ephrin-B分子訊息導致 β -catenin/TCF活性的降低—報導基因表現分析實驗 (TOP/FOP luciferase reporter assay)



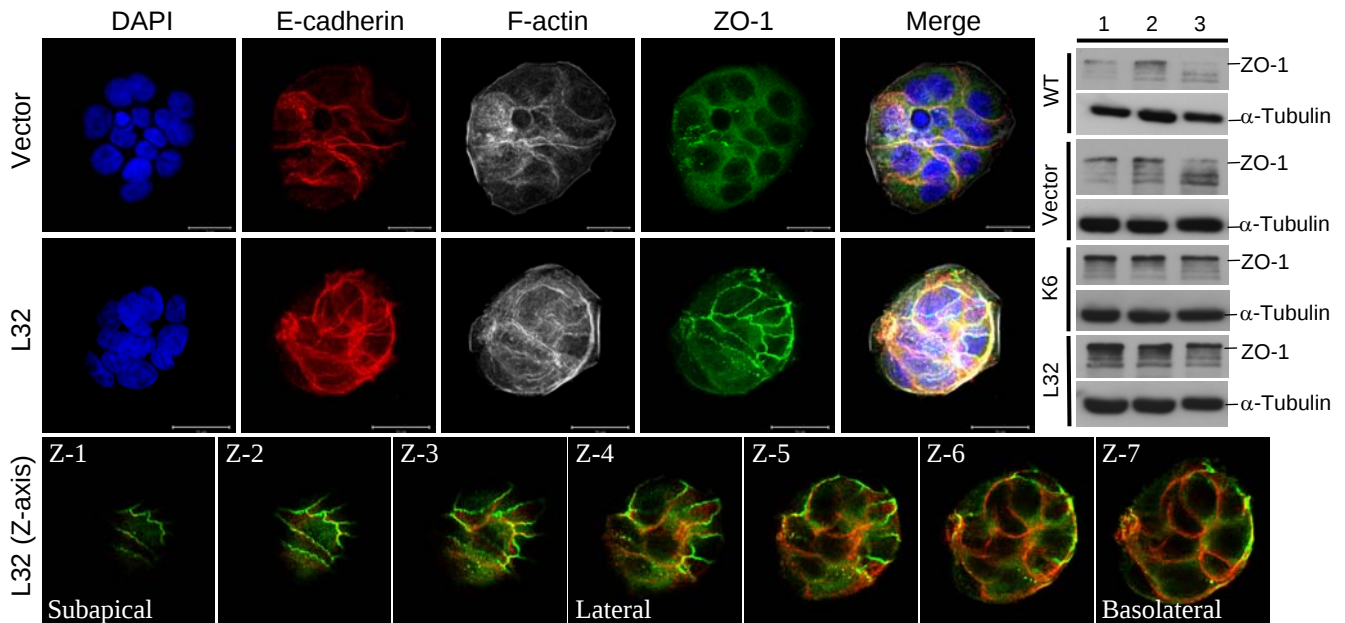
One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test showed there was no statistical difference between Vector-FOP, K6-FOP and L32-FOP but there were statistical differences (***, $P < 0.001$) between Vector-TOP and K6-TOP as well as Vector-TOP and L32-TOP. Using two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc tests, the difference between TCF-Luciferase reporter TOPFlash (black bars) and internal control FOPFlash (grey bars) was statistically significant in Vector ($P < 0.001$) but insignificant in K6 & L32 ($P > 0.05$). Numbers indicate relative activation (Top/Fop ratio) in each cell line ($n > 6$ for each bar).



圖二十四、定量Q-PCR實驗的結果顯示：*Ascl2*等八個已知為 β -catenin/TCF分子傳遞路徑的下游基因不接受EphB3/ephrin-B分子訊息的調控

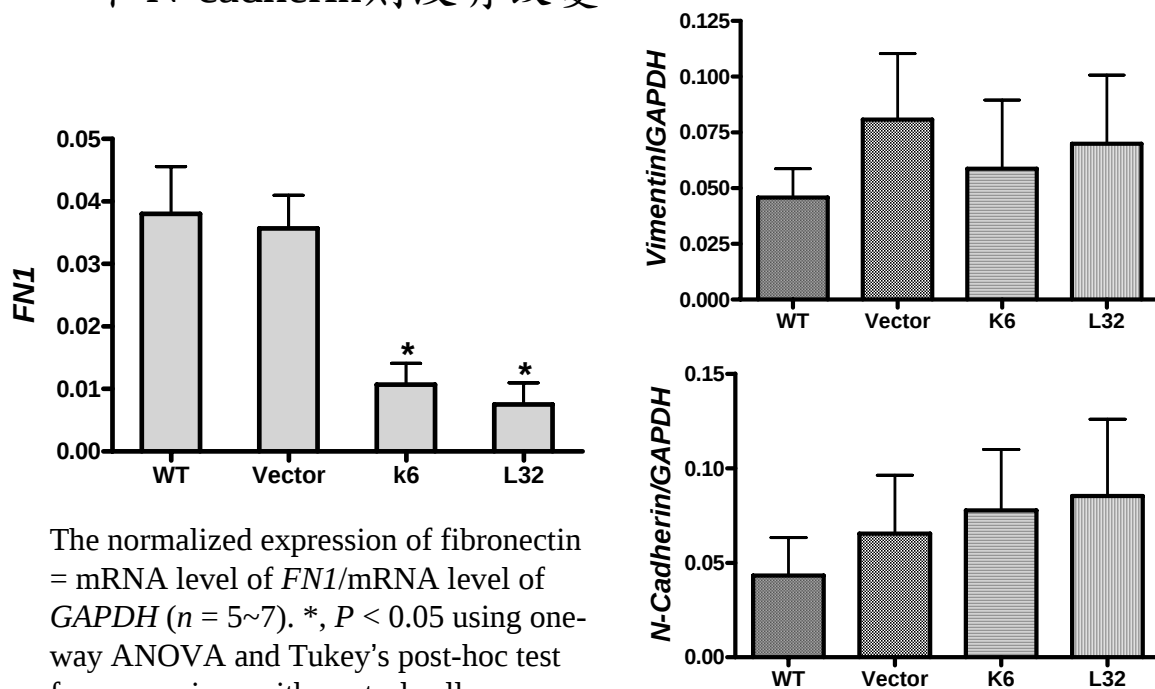


圖二十五、EphB3/ephrin-B分子訊息能夠增加ZO-1 protein level並促進細胞之間tight junction的形成以及驅動細胞的極化



Lane 1-3 in Western blot data indicates the protein samples that were collected from three independent experiments.

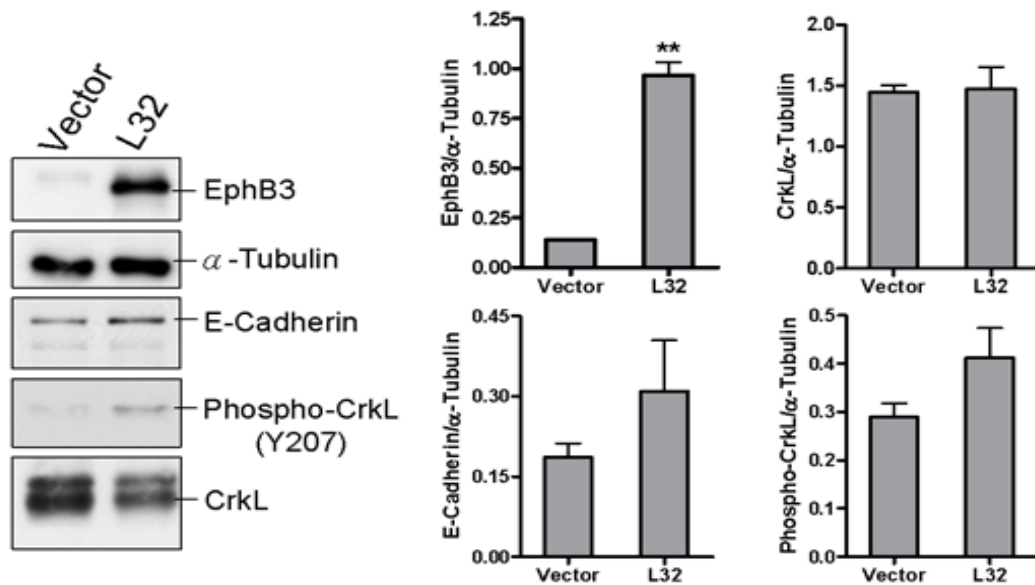
圖二十六、EphB3/ephrin-B分子訊息對三種間質細胞標記的影響：Fibronectin有顯著降低，Vimentin和N-cadherin則沒有改變



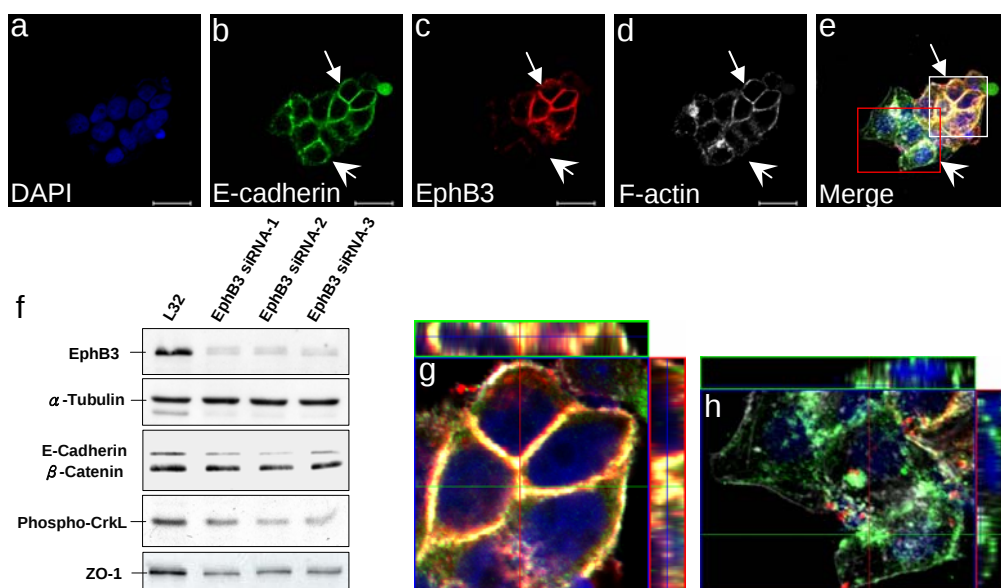
The normalized expression of fibronectin = mRNA level of *FN1* / mRNA level of *GAPDH* ($n = 5 \sim 7$). *, $P < 0.05$ using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test for comparison with control cells.



圖二十七、EphB3/ephrin-B分子訊息誘導之分子變化—採自裸鼠身上腫瘤的活體 (*in vivo*) 證據



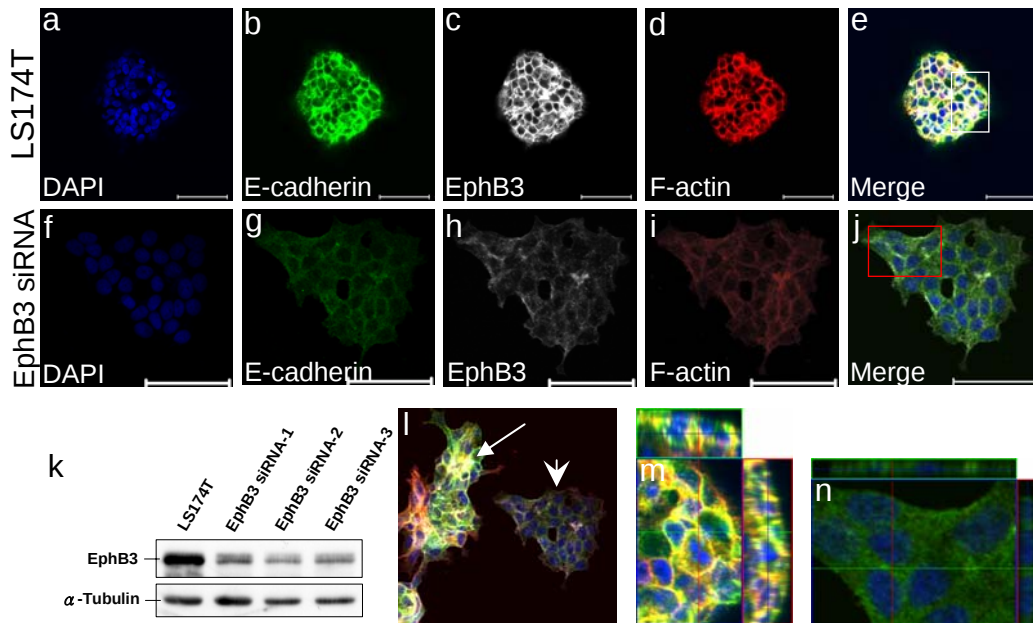
圖二十八、敲除EphB3的基因表現 (knockdown of EphB3) 能夠完全逆轉L32細胞的mesenchymal-to-epithelial transition



Arrowhead indicated cells with sufficient EphB3 knockdown.
Arrow indicated cells that escaped EphB3 knockdown.

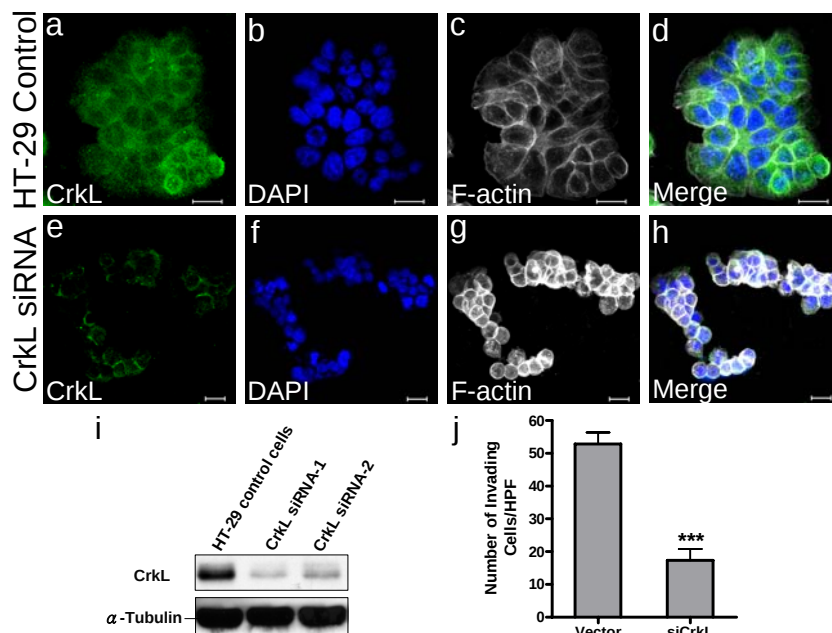


圖二十九、在LS174T細胞株中敲除EphB3的基因表現能夠促進epithelial-to-mesenchymal transition



Arrowhead indicated cells with sufficient EphB3 knockdown.
Arrow indicated cells that escaped EphB3 knockdown.

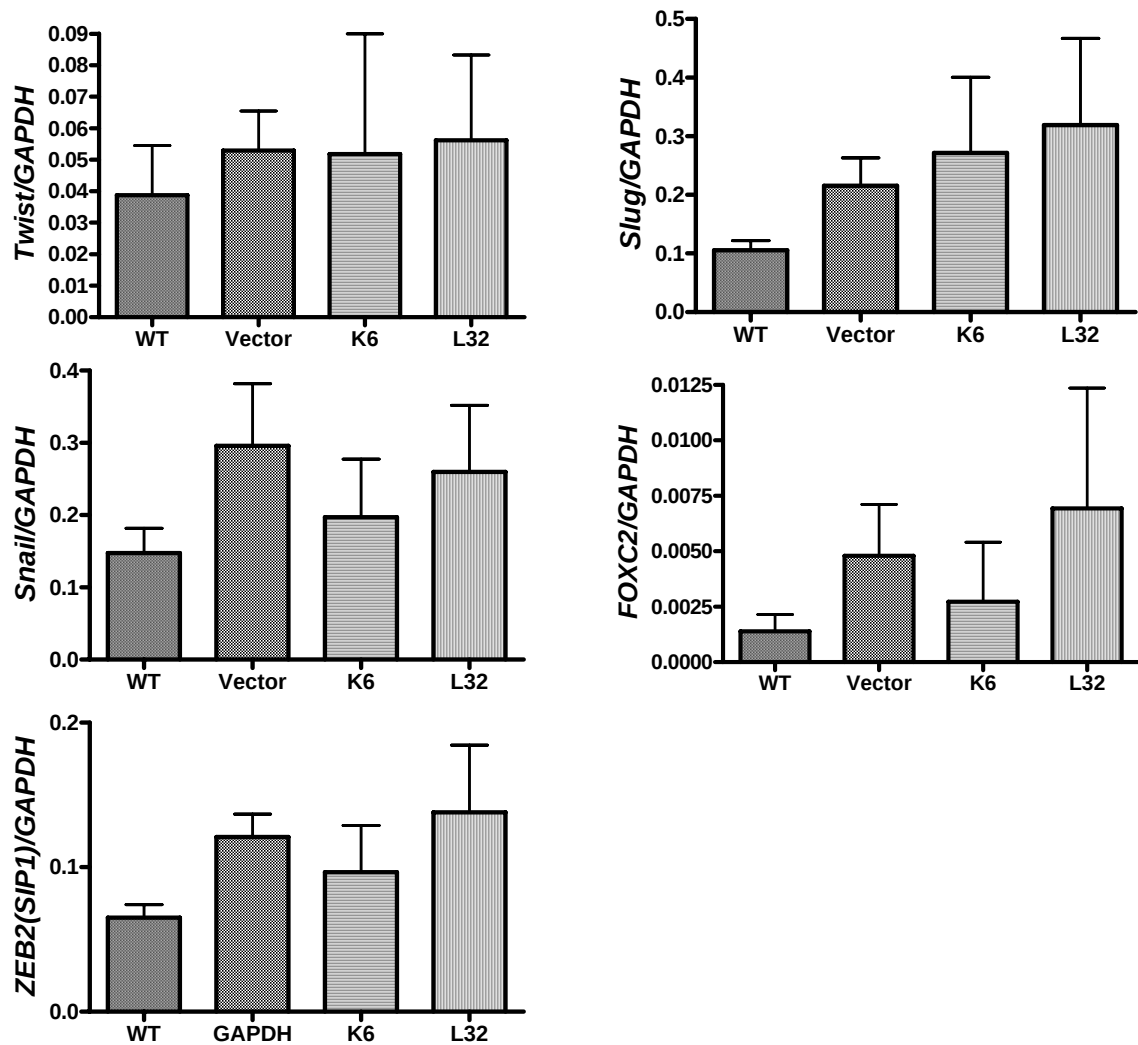
圖三十、在HT-29細胞株中敲除CrkL的基因表現也能夠促進mesenchymal-to-epithelial transition



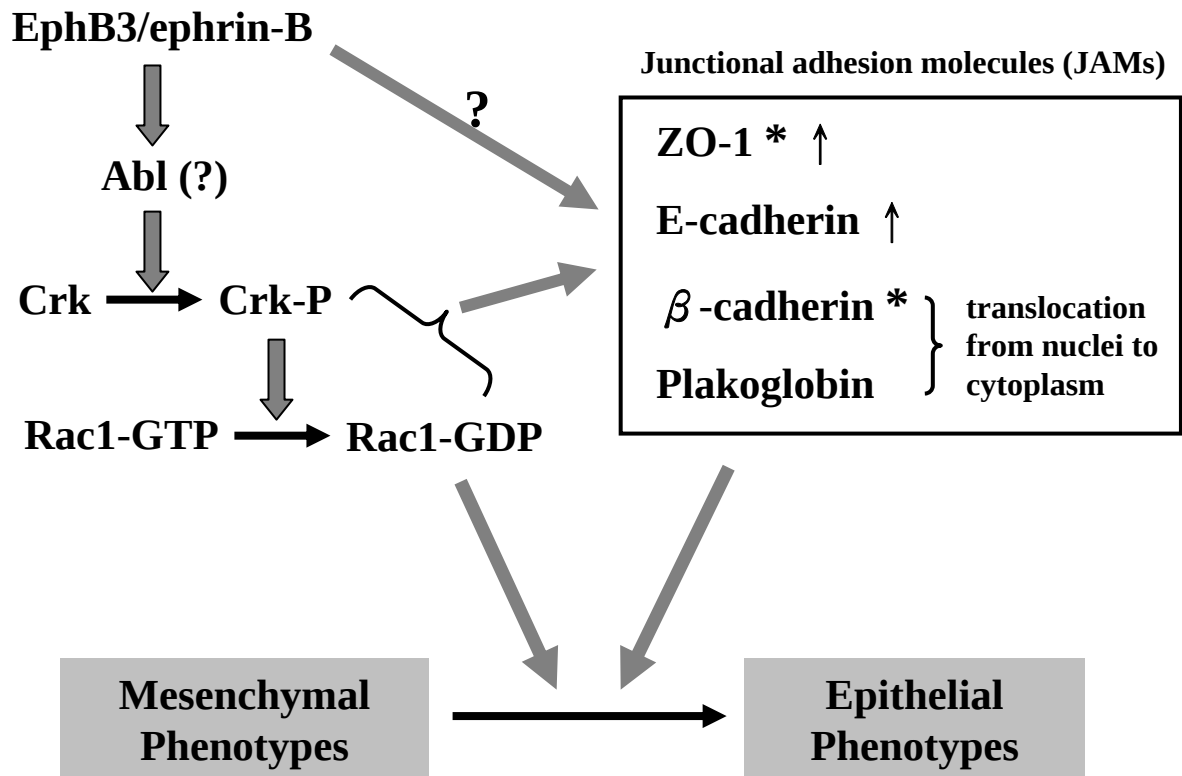
(j) CrkL knockdown significantly decreased Transwell migration $n = 3$ ***, $P < 0.001$ by Student's t -test



圖三十一、在EphB3/ephrin-B分子訊息傳遞路徑之中，*Twist*、*Slug*、*Snail*、*FOXC2*和*ZEB2*均非調控E-cadherin的上游基因—定量Q-PCR的結果



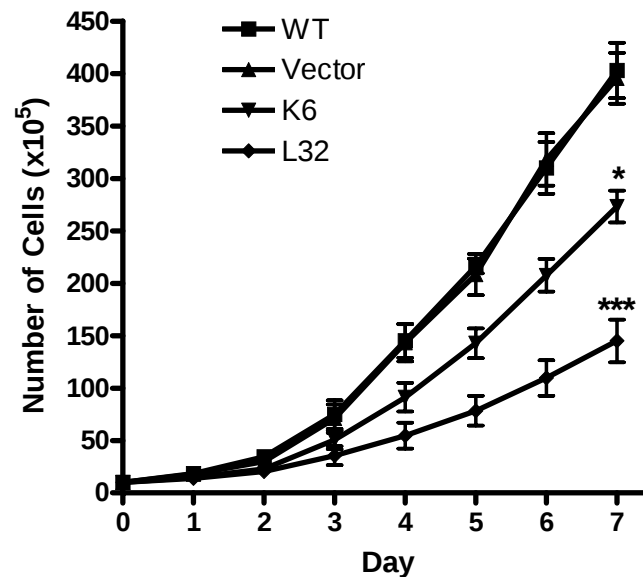
圖三十二、EphB3/ephrin-B分子訊息傳遞路徑概要



* Molecules that corstalk onto Wnt signaling

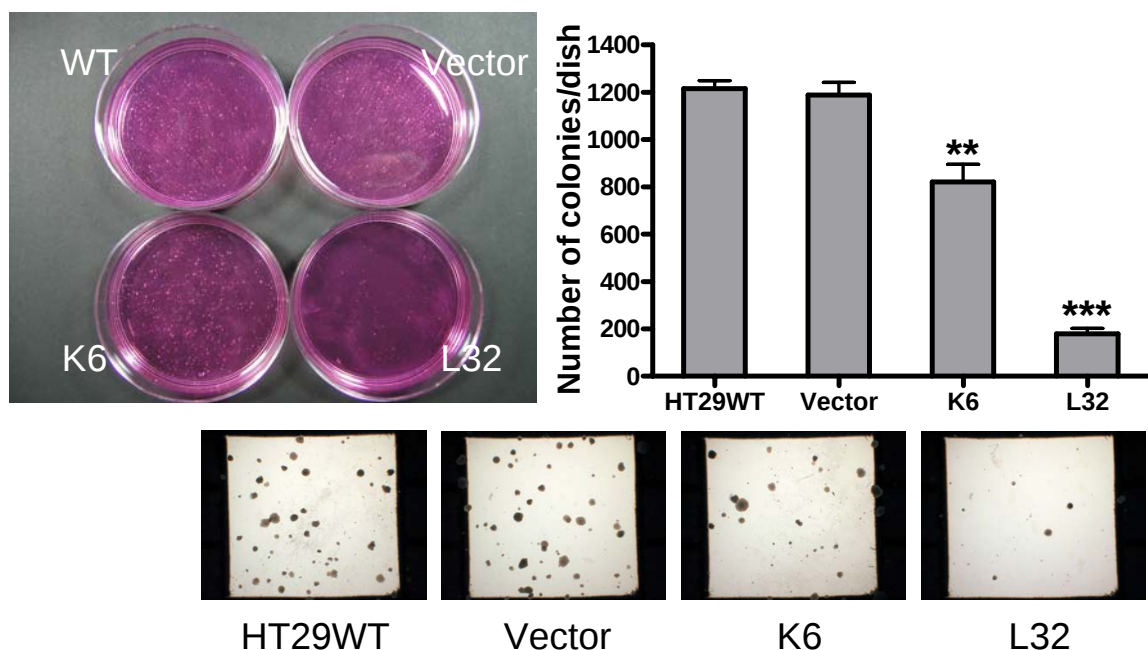


圖三十三、EphB3/ephrin-B分子訊息抑制大腸直腸癌細胞在培養皿平盤中的生長



$n = 3$ *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test for comparison with control vector-transfected cells on Day 7

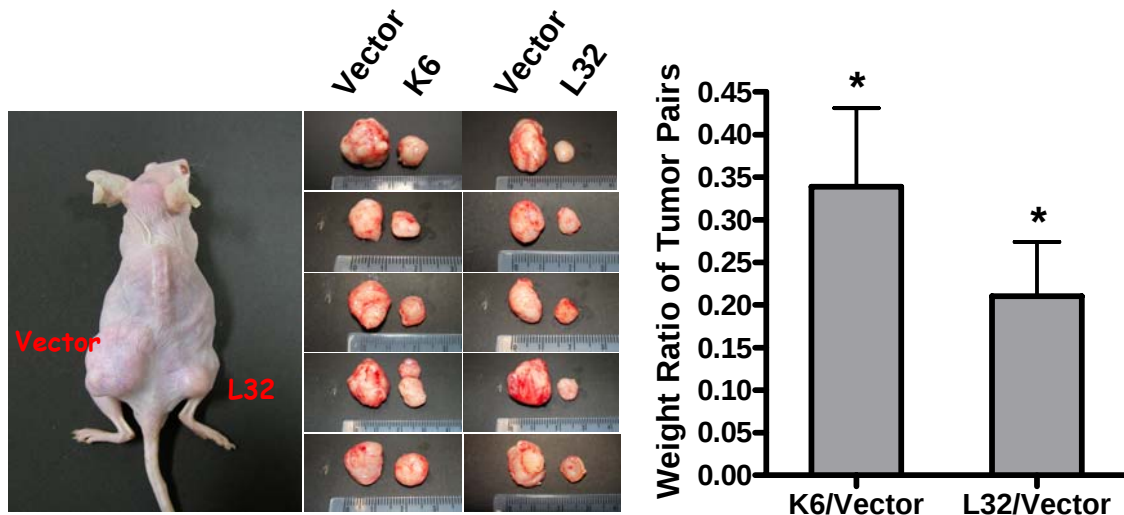
圖三十四、EphB3/ephrin-B分子訊息抑制大腸直腸癌細胞在soft agar中的懸浮生長



Area of a square = 1/35 area of a 6-cm dish. Five random square fields were counted for each 6-cm dish. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test for comparison with control vector-transfected cells.

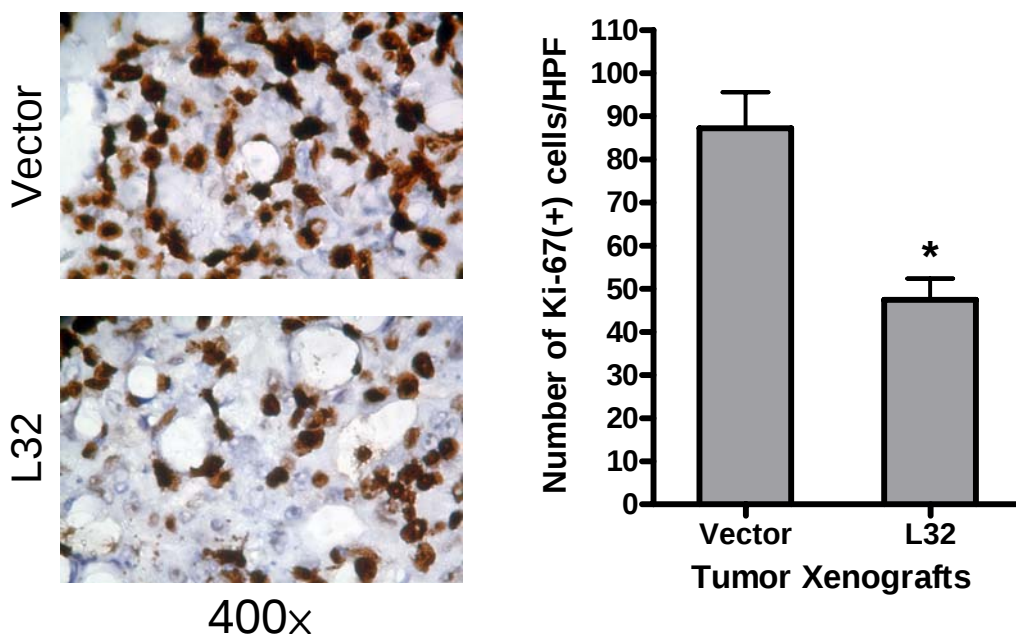


圖三十五、EphB3/ephrin-B分子訊息抑制大腸直腸癌細胞在裸鼠身上的生長



Growth suppression was quantified and is represented as weight ratio of tumor pairs (EphB3 over-expressing tumor/non-overexpressing tumor). Each pair of tumors was harvested from the same mouse. *, $P < 0.05$ by Wilcoxon signed-rank test with theoretical median = 1.0.

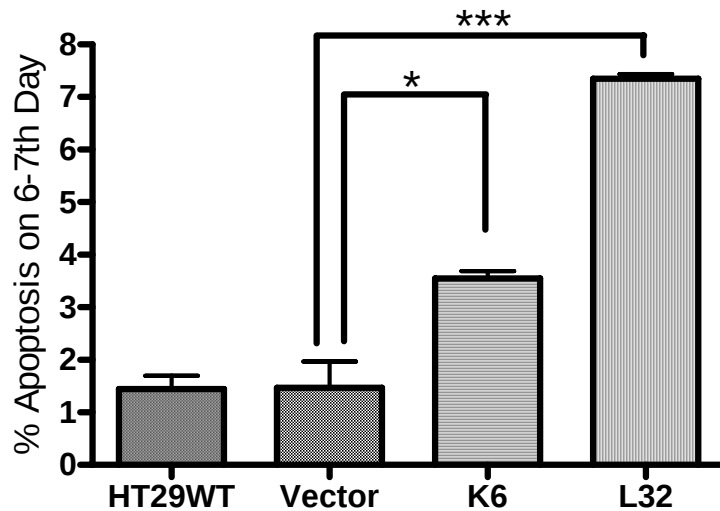
圖三十六、EphB3/ephrin-B分子訊息抑制裸鼠身上大腸癌腫瘤細胞Ki-67 proliferation marker的表現



$n = 5$ *, $P < 0.05$. Five random fields were counted for each tissue section.

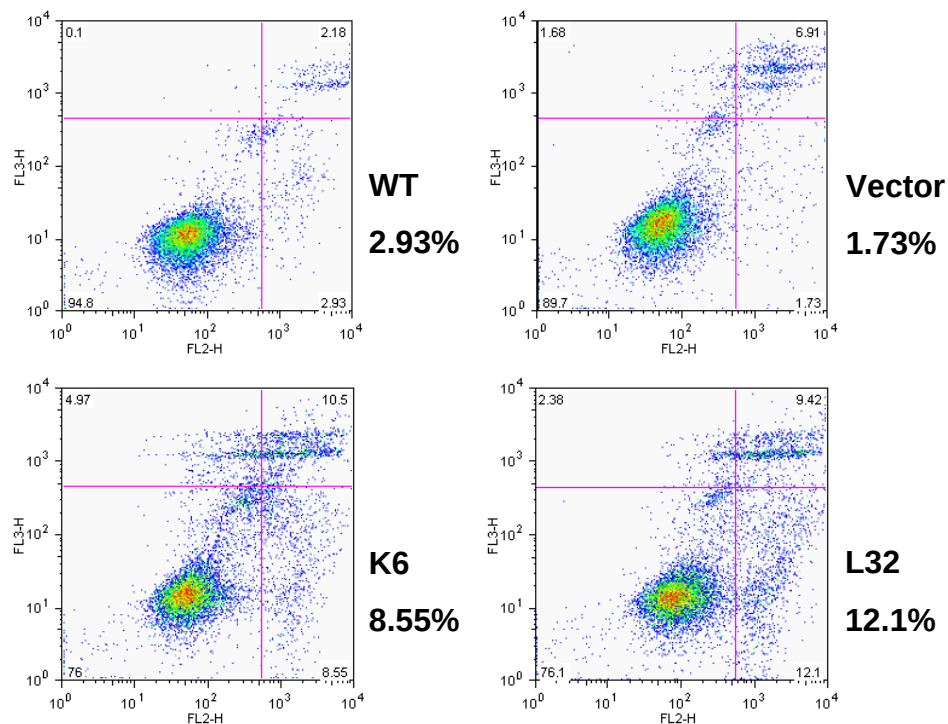


圖三十七、EphB3/ephrin-B分子訊息誘發大腸直腸癌細胞的細胞凋亡—*in vitro*的證據 (Trypan blue test)



$n = 3$ *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ compared with control cells using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test

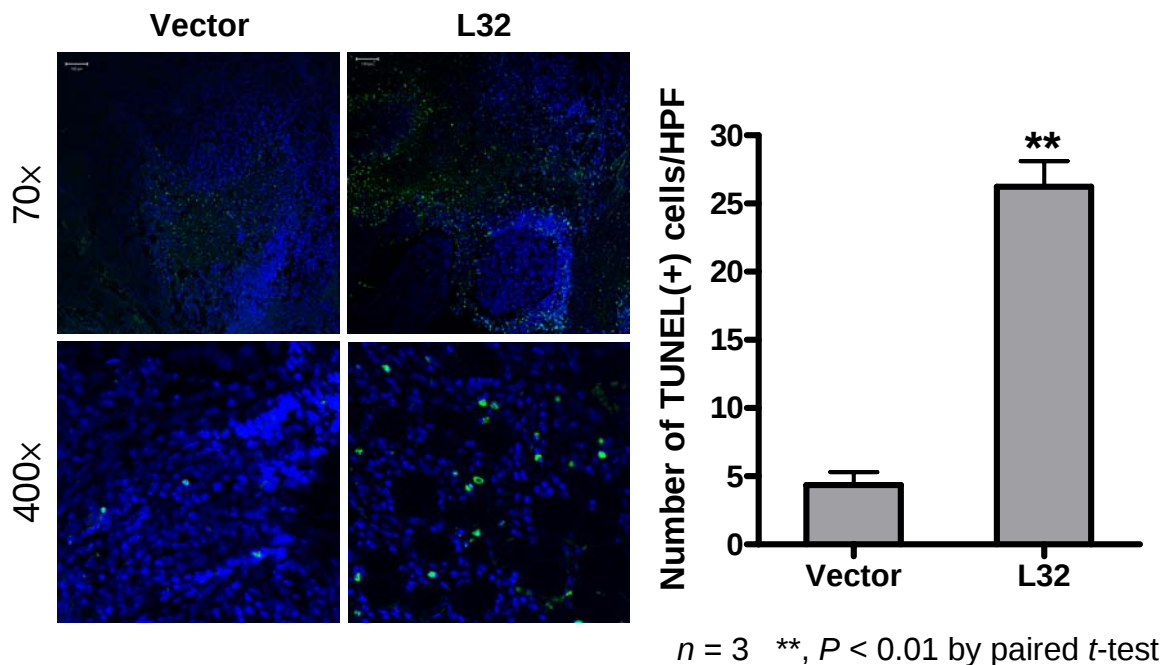
圖三十八、EphB3/ephrin-B分子訊息誘發大腸直腸癌細胞的細胞凋亡—*in vitro*的證據 (Flowcytometry)



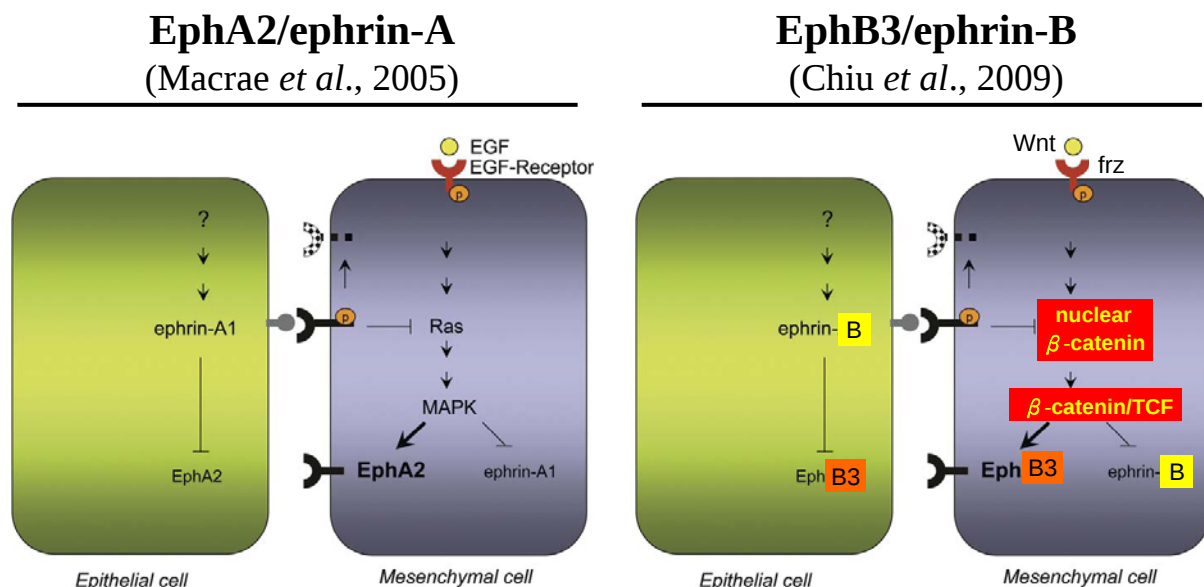
Numbers refer to the percentage of Annexin V(+) PI(-) cells.



圖三十九、EphB3/ephrin-B分子訊息誘發大腸直腸癌細胞的細胞凋亡—*in vivo*的證據 (TUNEL assay)



圖四十、EphA2/ephrin-A1以及EphB3/ephrin-B分子訊息傳遞路徑都有類似但不盡相同的回饋抑制分子迴路 (feedback inhibition loops)



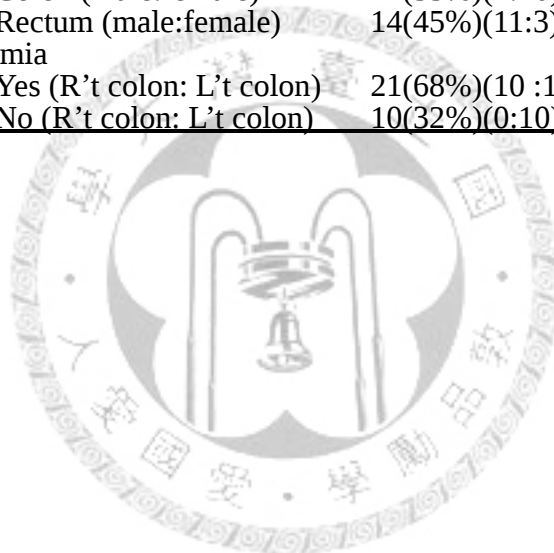
These feedback loops provide a driving force that decreases Eph expression and increases ephrin expression.



表一、本研究所蒐集並應用於分析的大腸直腸癌臨床案例及檢體是統計上的不偏
樣本

Table 1. Patient characteristics

	n (%)
Total number of patients	31(100%)
Age	
Range (years)	33-87
Mean±SD	67.4±12.4
Median	69
Mode	69
Gender	
Male	18(58%)
Female	13(42%)
Tumor location	
Colon (male:female)	17(55%)(7:10)
Rectum (male:female)	14(45%)(11:3)
Anemia	
Yes (R't colon: L't colon)	21(68%)(10 :11)
No (R't colon: L't colon)	10(32%)(0:10)



表二、四個 cDNA 微陣列實驗中都呈現向上調控的 29 個基因以及它們進行 post-array validation 的結果

Table 2. Twenty-nine genes up-regulated in four microarray experiments

Gene Name	Accession No.	Gene Symbol	Function Category
GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	W46900	GRO1 **	oncogene/chemokine
B-factor, properdin	AA401441	BF *	m-protease
Thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	AA461065	MPST *	m-transferase
Interferon-inducible protein 1-8D	AA862371	1-8D *	surface molecule
V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	AA464600	MYC **	oncogene/transcription factor/cell cycle
Human gamma-glutamyl hydrolase (hGH) mRNA, complete cds	AA455800	GGH **	m-hydrolase
Human ribosomal protein L10 mRNA, complete cds	AA434088	RPL15	structure protein/protein synthesis/RNA binding protein
Tropomyosin beta chain (skeletal muscle)	AA477400	TPM2	structure protein
Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	AA258396	PHLDA1 **	binding protein /cytoskeleton/apoptosis
Human gene encoding prepro form of corticotropin releasing factor	R45054	CRH *	stress protein
Glutathione peroxidase 2, gastrointestinal	AA135289	GPX2 **	peroxidase
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	AA127116	HNRPA1 **	RNA binding protein/transport
Ribosomal protein S5	AA456616	RPS5	structure protein/protein synthesis/RNA binding protein
Collagen, type IV, alpha 2	AA430540	COL4A2	structure protein
Human dystroglycan (DAG1) mRNA, complete cds	AA496691	DAG1 *	receptor
Prostacyclin-stimulating factor [human, cultured diploid fibroblast cells, mRNA, 1124 nt]	T53298	IGFBP7	binding protein
H.sapiens HEK2 mRNA for protein tyrosine kinase receptor	AA455591	EPHB3 **	receptor/kinase
H.sapiens mRNA for testican	AA699317	SPOCK *	cell matrix protein/cell adhesion /cell proliferation
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3	W76339	NFE2L3	transcription factor
H.sapiens ERF-1 mRNA 3' end	AA424743	BRF1	transcription factor
Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23,	AA669758	NPM1 *	RNA binding protein

numatrin)			
Nucleoside diphosphate kinase A	AA644092	<i>NME1</i> *	transcription factor
Heat shock factor protein 1	AA449119	<i>UBE2M</i> *	apoptosis
Immunoglobulin gamma 3 (Gm marker)	N92646	<i>CSF2RA</i> *	receptor
THY-1 membrane glycoprotein precursor	AA496283	<i>THY1</i> **	antigen
H.sapiens mRNA for D1075-like gene	AA422058	<i>METTL1</i> *	m-transferase
Ribosomal protein S14	H73727	<i>RPS14</i>	structure protein/protein synthesis/RNA binding protein
Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	AA496628	<i>NME2</i> *	kinase
Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	AA446108	<i>ENG</i>	receptor

* Gene failed to pass post-array validation

** Gene succeeded in passing post-array validation



表三、八個通過 post-array validation 的基因的定量 RT-PCR 實驗條件

Table 3. Primers and Experimental conditions of GAPDH and 8 up-regulated genes confirmed with quantitative RT-PCR in 31 paired samples

Accession No	Primer pair	Annealing Tm	Elongation time	Seg 4 detection*	p value
GAPDH	(F) 5'- TCCTCTGACTTCAACAGCGACACC -3' (R) 5'- GTCTCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGC -3'	59 ⁰ C	14S	84 ⁰ C	
AA464600	(F) 5'-TCTGGATCACCTTCTGCTGG-3' (R) 5'-TGTTGCTGATCTGTCTCAGG-3'	60 ⁰ C	12S	85 ⁰ C	< 0.001
AA455800	(F) 5'- AGACTATTTTCCTGTGTGGGGC -3' (R) 5'- CTCATAAGGTGCTTTCTCTGGATG -3'	61 ⁰ C	17S	82 ⁰ C	< 0.001
AA455591	(F) 5'- CAGAAGACCTGCTCCGTATTGG -3' (R) 5'- TCACCCCTCTCCTAATCCATC -3'	61 ⁰ C	16S	87 ⁰ C	0.001
AA496283	(F) 5'- CGTTGCTACTAAGTGGTTGGGGAG -3' (R) 5'- GGTGGTTCTTCCTGTTCTGTGACTG -3'	62 ⁰ C	14S	87 ⁰ C	0.004
W46900	(F) 5'- CACATACATTCCCCTGCCTTCAC -3' (R) 5'- CAACCCCAAGTTAGTTCAATCTGG -3'	63 ⁰ C	10S	81 ⁰ C	< 0.001
AA127116	(F) 5'- TTTGAGCAATGGGGAACGC -3' (R) 5'- GGGCACCTGGTCTTTGAGAATC -3'	61 ⁰ C	12S	83 ⁰ C	< 0.001
AA258396	(F) 5'- GCTGGCACACAATGAAAGTGTC -3' (R) 5'- CTTGGAGAATAAAAAAGGGCGG -3'	61 ⁰ C	6S	74 ⁰ C	< 0.001
AA135289	(F) 5'- GCAGGAGAGACAGAAGTAGCAAACC -3' (R) 5'- ACAAATGGCTTGGCTGGCTC -3'	64 ⁰ C	8S	82 ⁰ C	0.001

* Seg 4 detection temp = fluorescence detection temperature at the end of each PCR cycle

** Wilcoxon signed ranks test

表四、基因表現和臨床因子的列聯表相關分析，以 *GRO1* 基因為例

Table 4. Correlation between clinicopathological variables and expression status of the *GRO1* gene (n=31)

Factors	Patients	No. of Patients		<i>p</i> value
		<i>GRO1</i> (+)	<i>GRO1</i> (-)	
Age ^a				
≤ 65 y/o	12	12	0	0.010**
> 65 y/o	19	11	8	
Gender ^a				
Male	18	15	3	0.170
Female	13	8	5	
Tumor location ^a				
Right	10	8	2	0.483
Left	21	15	6	
Anemia ^a				
Yes	21	16	5	0.517
No	10	7	3	
CEA level ^a				
≤ 4.3 ng/ml	13	12	1	0.058*
> 4.3 ng/ml	18	11	7	
Duke's stage ^b				
A	0	0	0	0.075*
B	18	16	2	
C	10	5	5	
D	3	2	1	
LN metastasis ^a				
Yes	14	8	6	0.060*
No	17	15	2	
Distal metastasis ^a				
Yes	4	3	1	0.732
No	27	20	7	
Other polyp ^a				
Yes	16	13	3	0.303
No	15	10	5	
Differentiation ^b				
Well to moderate	11	9	2	0.724
Moderate	16	11	5	
Moderate to poor	3	2	1	

GRO1 (+): (GRO1/GAPDH of tumor)/(GRO1/GAPDH of normal) > 2

GRO1 (-): (GRO1/GAPDH of tumor)/(GRO1/GAPDH of normal) ≤ 2

* *GRO1* = growth-related oncogene-alpha

^a : Fisher's exact test

^b : chi-square test

* : trend forward significance

** : statistically significant (*p*<0.05)

表五、本研究所有和臨床病理因子有統計顯著相關的基因

Table 5. Summary of statistical correlation between up-regulated genes and clinicopathological Variables in 31 colorectal cancer patients

Gene Symbol (function)	Variable	<i>p</i> value (n=31)
<i>MYC</i> (oncogene/transcription factor)	Gender	0.012
<i>HNRPA1</i> (RNA binding protein/transport)	Tumor location	0.027
<i>GRO1</i> (oncogene/chemokine)	Age	0.010
	Tumor stage	0.075*
	LN meta	0.060*
	CEA elevation	0.058*
<i>GPX2</i> (peroxidase)	Differentiation	0.019
<i>THY1</i> (antigen)	Anemia	0.036
<i>PHLDA1</i> (binding protein /cytoskeleton/apoptosis)	Anemia	0.009

* trend forward significance ($0.05 < p < 0.1$)

There was no statistical correlation between clinicopathological factors and *GGH* (gamma-glutamyl hydrolase) or *EPHB3* (erythropoietin-producing hepatoma amplified sequence B3 = *HEK2*, human embryo kinase 2) in this study.

HNRPA1 = Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core protein A1

GRO1 = Growth-related oncogene-alpha

GPX2 = Glutathione peroxidase 2

THY1 = THY-1 T-cell antigen = Theta antigen

PHLDA1 = Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1

第九章 附錄

畢業相關論文

1. Chiu ST, Chang KJ, Ting CH, Shen HC, Li H, Hsieh FJ. Over-expression of EphB3 enhances cell-cell contacts and suppresses tumor growth in HT-29 human colon cancer cells. Carcinogenesis. 2009 Sep 1;30(9):1475-86.
2. Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Feb;14(2):437-43.

