

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

評估胞質型神經膠原致癌蛋白在國人大腸直腸癌腫瘤中之
角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-039-035-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中國醫藥大學醫學系

計畫主持人：高銘欽

共同主持人：許來發

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 11 月 1 日

評估胞質型神經膠原致癌蛋白在國人大腸直腸癌腫瘤 中之角色

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2320-B-039-035- —

執行期間： 2005 年 8 月 1 日至 2006 年 7 月 31 日

計畫主持人： 高銘欽

共同主持人： 許來發

計畫參與人員： 莊子超、李志瑋

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

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

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位： 中國醫藥大學醫學系生化學科

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

中文摘要

神經膠原致癌蛋白(HER2)是一種膜蛋白屬於酪胺酸激酶受體生長因子中重要的一員，其基因倍增與蛋白過度表現與許多類人類惡性腫瘤有關。然而神經膠原致癌基因(*HER2*)和其蛋白於大腸直腸癌的相關研究較為有限且結果也不一致。本研究試圖客觀有效地探討神經膠原致癌基因和蛋白於大腸直腸腺癌中的變化與其可能活性機轉。本研究選取六十七位大腸直腸腺癌病例，配合其不同癌症分期與臨床參數，以標準化螢光原位雜交法與Photoshop-數位化免疫組織染色法定量測量大腸直腸腺癌與相鄰非瘤上皮細胞間的相對神經膠原致癌基因與蛋白變化量；再由手術癌組織萃取蛋白經西方墨點法、免疫沉澱法、雙螢光染色法、雷射掃描共軛焦顯微鏡檢視等方法探討神經膠原致癌細胞路徑與生物機轉。最後以上述相關癌活性指標的病理分析結果與病人存活率統計加以分析以確立其臨床意義。結果顯示大腸直腸腺癌之神經膠原致癌基因和蛋白變化量與病人腫瘤體積、Dukes'分期和定性淋巴腺轉移呈正相關。標準化螢光原位雜交基因定量與Photoshop-數位化免疫組織染色蛋白定量呈現高度三次迴歸相關性，特別是Dukes' C晚期病人。依循此三次迴歸相關數學曲線算出十六位病人(16%)於此大腸直腸腺癌研究中屬於此高表現群[包括七例(10%)胞質型，四例(6%)胞膜型]。胞質型神經膠原致癌蛋白增加表現以具磷酸活性的氮端刪除片段 155kDa為主(95/112/122kDa為次)共構於clathrin/LAMP參與的胞飲溶小體代謝路徑。細胞暫時轉染隨神經膠原致癌表現增加(p185 先上升，p155 稍後上升)，退行性分化指標胚胎癌抗原(CEA)增加、DNA合成重要酵素-胸腺嘧啶核苷激酶(TK)有上升趨勢、惡性形態增加。結論指出以往有關神經膠原致癌蛋白免疫組織學的研究多數強調僅有胞膜型蛋白才判讀為陽性，然而本研究發現於大腸直腸腺癌胞質型亦有生物活性不宜忽視。此研究方式可提供客觀大腸腺癌輔助診斷、預測嚴重度、與選擇適合對抗神經膠原致癌基因或對抗受體蛋白治療之患者以期增加治療預後。

關鍵字: 神經膠原致癌蛋白，酪胺酸激酶受體，胞質型，大腸直腸腺癌，三次迴歸相關性

Abstract

HER2 encodes a transmembrane receptor tyrosine kinase. Its amplification and overexpression are associated with many types of human tumors. However, studies on colorectal adenocarcinomas (CRCs) remain controversial. Here we use a comparative investigation on relative changes of *HER2* gene and protein in CRCs as well as its possible biological mechanisms. To try to clarify the role played by *HER2* in CRC, sixty-seven CRC patients in Taiwan were analyzed. For this analysis, first, we used normalized dual-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and Photoshop-aided immunohistochemistry (IHC) between cancers and their autologous non-neoplastic epithelia. Next, we performed Western blotting, immunoprecipitation, double immunofluorescence, and laser scan confocal microscopy analyses on CRC lysates. Finally, we statistically analyzed different *HER2* grouping associated with proliferating Ki-67 / MIB-1 index and survival rate. The results showed both *HER2* gene gain and protein increases in CRC were significant in later stages in regards to volumetric progression and nodal-metastatic Dukes' stage. Little difference between LN and clinically suspicious visceral metastasis was observed. Overall, normalized FISH and IHC showed high cubic-regression correlation, especially in Dukes' C. Eleven (16%) patients had values above the cutoff point, including 7(10%) cases in cytosolic and 4(6%) cases in membranous *HER2* overexpression. The typical cytosolic *HER2* in CRC revealed partially NH₂-terminally truncated proteins (155kDa, followed by 95/112/122kDa) with functional phosphotyrosine activity (at least p-Y1248), which co-localized with clathrin/lysosome-associated membrane protein (LAMP) in early lysosomal pathway. Accompanying with p-*HER2* increase, the proteins of thymidine kinase (TK), Ki-67 and carcinoembryonic antigen (CEA) were elevated. In conclusion, our study showed that cytosolic staining of *HER2* also contributed biological activity. We provide a modified FISH method to autologously compare *HER2* change.

Key words: *HER2*/neu, receptor tyrosine kinase, cytosolic pattern, colorectal adenocarcinomas, cubic regression correlation

計劃緣由與目的

大腸直腸癌的現況與 HER2 相關報導

全世界癌症中大腸直腸癌男性發生率為第三位、女性發生率為第二位、死亡率為第四位(1)；臺灣發生率為第三位(2)。全球五年存活率為41%至60% (中國及開發中國家稍低，分別為32%和38%)(1)。大腸直腸癌中以中度分化(moderate differentiation)最常見(82.3%至88.4%)(3, 4)。然而HER2基因和蛋白於此常見之大腸直腸腺癌相關研究明顯較少且不同的研究方法結果也不一致，例如基因放大頻率由0%至57%和蛋白過度表現由0%至87%均有文獻報導。

神經膠原致癌蛋白(HER2/neu, 簡稱 HER2)屬於酪胺酸激酶受體之生長因子受體重要的一員,在乳癌、卵巢癌等腫瘤表現顯著;然而於大腸直腸腺癌初步病理工作觀察發現有下列相異處:乳癌之 HER2 蛋白胞膜型表現明顯且比例高、大腸直腸癌之 HER2 蛋白胞膜型表現不明顯且比例低,但大腸直腸癌 HER2 蛋白胞質型表現明顯且比例高;因而引發進一步研究的動機。希望能探究下列問題:大腸直腸癌 HER2 之胞質型表現是否有臨床意義、不同表現型式是否與大腸上皮細胞生物功能相關?是否有別於目前約定俗成的 HER2 基因與蛋白診斷標準,而邏輯地定義出診斷閾值?胞膜型與胞質型 HER2 結構和功能是否不同?建立大腸直腸癌 HER2 於胞內路徑、位置、傳送和代謝之研究模型,以期能瞭解其致癌生物機轉與建議治療方針?

方法與結果

病人及檢體 (Patients and specimens).

民國89年至93年間隨機選取110例大腸直腸病理切片檢體,其中67例為大腸直腸腺癌和43例良性診斷(輕微基質發炎,正常上皮細胞,用於非腫瘤上皮細胞實驗前比對測試用)。苗栗大千綜合醫院46例和國軍桃園總醫院21例大腸直腸癌病理切片檢體,共計44位男性及23位女性(男性較多佔66%,比率稍高於全球每十萬人男女發生率比:19.4 / 15.3)(10),含10例經內視鏡(endoscopic biopsy)切取標本診斷為黏膜內腺癌(intramucosal adenocarcinoma),為單獨病灶,切除後三年內無復發;57例大腸直腸切除術(segmental resection / colectomy)診斷腺癌標本,每例至少切取十個淋巴腺;病人年齡最小40最大98歲(平均69.6歲);所有病人手術前均未接受化學或放射線治療,且無癌前病變如潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis)或家族性腸息肉(familial polyposis)病史。

所有隨機選取的腫瘤均為最常見的中度分化大腸直腸腺癌為分析藍本,以期得到最廣泛性的分析結果。分期以原著Dukes'分類法(original Dukes' classification)為準。腫瘤以數位卡尺或顯微尺量出長度與寬度,再以公式:(長度)²x(寬度)÷2求得腫瘤體積。新鮮獲取組織經由10%中性福馬林緩衝液(10% neutral-buffered formalin)固定12至24小時,切取組織塊(同時含腫瘤和非腫瘤兩部份)經石臘包埋處理後,以4μm厚度之臘塊切片沾黏於一般玻片和膠膜玻片(organosilane slides),分別進行一般組織病理染色(hematoxylin and eosin, H&E stain)、免疫組織染色測定法(IHC)和原位螢光雜交測定法(FISH)。

建立大腸直腸癌 HER2 研究策略

首先以一般常用 FISH 與 IHC 統計臨床大腸直腸癌病人手術組織檢體,以瞭解其胞質與胞膜 HER2 的臨床意義,建立 HER2 基因與蛋白的關係曲線,並定義診斷閾值;再以分子生物方法研究大腸直腸癌組織與細胞株,以瞭解有活性作用的 HER2 分子量和致癌機轉;最後回歸臨床大腸直腸癌病人,研究 HER2 與其他核增生異常表現相關性,並進行存活率的探討。

本研究以標準化螢光原位雜交法(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)與Photoshop-數

位化免疫組織化學染色法(Immunohistochemical staining, IHC)定量測量大腸直腸腺癌與相鄰非瘤上皮細胞間的相對神經膠原致癌基因與蛋白變化量；再由手術癌組織萃取蛋白經西方墨點法、免疫沉澱法、雙螢光染色法、雷射掃描共軛焦顯微鏡檢視等方法探討神經膠原致癌細胞路徑與生物機轉。最後以上述相關癌活性指標的病理分析結果與病人存活率統計加以分析以確立其臨床意義。結果顯示大腸直腸腺癌之神經膠原致癌基因和蛋白變化量與病人年齡、性別、解剖位置、淋巴腺轉移個數比率無關；然而與腫瘤體積、Dukes'分期和定性淋巴腺轉移呈正相關。於初期大腸癌(Dukes' A)中，黏膜內腺癌較後續表淺侵犯癌可見HER2 蛋白有意義地升高，但其基因量則無顯著變化；隨著大腸癌進展至淋巴腺轉移，HER2 基因與蛋白同時有意義升高；但末期淋巴腺轉移與最後內臟轉移病患則差異不大。整體而言，大腸直腸腺癌較相鄰非瘤上皮細胞的相對HER2 基因與蛋白平均變化分別增加 1.53 和 1.81 倍。HER2 基因(88%)與蛋白(88%)正向調控也成對稱相關。大多數大腸直腸腺癌呈現中低度複點型HER2 基因增加與胞質型蛋白過度表現，。標準化螢光原位雜交基因定量與Photoshop-數位化免疫組織染色蛋白定量呈現高度三次迴歸相關性，特別是Dukes' C晚期病人。依循此三次迴歸相關數學曲線導出臨界點座標為(IHC比值:2.41, FISH比值:1.22)，HER2 蛋白與基因同時高於此比值定義為「基因倍增依賴型蛋白過度表現」，十六位病人(16%)於此大腸直腸腺癌研究中屬於此高表現群[包括七例(10%)胞質型，四例(6%)胞膜型]，高於此閾值的病人其細胞增生率(Ki-67 index)升高且存活率較低。胞質型HER2 蛋白增加表現以具磷酸活性的氮端刪除片段 155kDa為主(95/112/122kDa為次)共構於clathrin/LAMP參與的胞飲溶小體代謝路徑。細胞暫時轉染隨HER2 表現增加(p185 先上升, p155 稍後上升)，退化性分化指標胚胎癌抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)增加、DNA合成重要酵素-胸腺嘧啶核苷激活酶(TK)有上升趨勢、惡性形態增加。

討論

面對神經膠原致癌基因和蛋白(HER2/neu)多年於常見之大腸直腸腺癌相關研究結果不一致性頗高，我們期許發展出客觀正確容易判讀的方法，且邏輯地定義出診斷閾值。此篇研究提出一定量比較的方法研究HER2基因於大腸直腸腺癌與自身相鄰正常上皮間的差異，自身相鄰正常上皮可視為內部標準化校正因子(internal control)；使用的為雙色螢光原位雜交法(dual-color FISH)，其中第十七對染色體中間著絲區綠光點(CEP17 signals)為定量參考基因(reference gene)，如此將傳統成熟的螢光原位雜交法稍加修改實更加客觀正確，也改善了其他方法的缺點，例如(a)原PathVysion HER2 DNA probe kit (Vysis, Downers Grove, IL) FISH 方法僅測量腫瘤部分易忽略HER2 基因橙紅光譜探針(HER2-SpectrumOrange probe)偶有過淡螢光系統誤差(如圖2、所有正常上皮平均raw FISH ratio mean低於理論值「1」)，而假性降低比值；(b)傳統聚合酶鏈反應法(polymerase chain reaction, PCR)，缺乏與HER2共同於第十七對染色體的中間著絲區(centromere, CEP17)定量參考基因；(c)新發展的羅氏定量即時反轉錄酶聚合酶鏈反應(LightCycler quantitative polymerase chain reaction [Roche Molecular Biochemicals, Lewes, Sussex, UK])儀器雖然效率高，但軟硬體價格極為昂貴。且本實驗方法由有經驗的病理醫師配合組織型態基本H&E染色玻片對照，亦可改善以上(a)(b)(c)三種方法均有的無可避免缺點：如炎症間葉非上皮細胞干擾和可能發生的第十七對染色體多套畸形(chromosome 17 polysomy)誤差，此外本改良式螢光原位雜交法仍可提供基因放大體(amplicon)的分佈型態圖。由實驗結果得知大腸直腸腺癌之HER2基因倍增型以與染色體分離之複點(double-minute)型基因放大點為主(不同於乳癌以染色體內均質染色區基因放大型為主, HSRs / LCs)，容易在聚合酶鏈反應法與南方墨點法之前處理中遺漏。有關HER2基因測試的各種方法比較整理列表於後。

HER2 蛋白是一種眾所週知的胞膜糖蛋白受體，此胞膜受體於大多數文獻中被認為是唯一判讀HER2 蛋白過度表現(HER2 overexpression)的唯一標準。不同於乳癌，文獻中HER2 蛋白胞膜型較少表現於大腸直腸腺癌。本研究發現大腸直腸腺癌中HER2 蛋白 61%為胞質表現型 18%為胞膜表現型(表 2)，此觀察與先前美國與日本胞質表現比率(64-66%)接近；但比胞膜表現比率(2-5%)稍多(5,6)。HER2 蛋白胞質內表現的意義陸續於研究中發覺，包括：為胞膜糖蛋白受體中中期代謝物的聚合體(intermediate metabolites in the assembly) (4,7)，胞質

內HER2 位於線粒體脊部(mitochondrial cristae)和粗內質網區(rough endoplasmic reticula) (5)，交通往來(trafficking)於細胞膜與內質體(endosomes)的中間物(5)，為完整成熟HER2 蛋白(mature p185^{HER2})水解產物(4,7,8)或DNA替代接合的變體產物(alternative-splicing variants) (4,9)，為較低分子量(155kDa) (6,7)和分子量 95kDa的氮端刪除磷酸化HER2 蛋白(8)。上述不同胞質或胞膜表現或許與實際生物功能趨向有關：如正常腸細胞多以向內吸收水份養份為主，然而正常乳房上皮細胞多以向外分泌乳汁(lactating)為主。

本實驗發現標準化HER2 基因和蛋白變化量與僅考慮胞膜的第一類「CTA/HercepTest 標準」無統計相關性，與第二類「陰性-胞質陽性-胞膜陽性」(NCM)標準」呈統計相關性。例如某些病人的腫瘤與正常細胞均呈胞膜陽性染色(CTA score 2, 3)會顯示低標準化HER2 蛋白變化量(lower IHC index)；相反地，某些病人的腫瘤呈胞膜質性染色(CTA score 1)而正常細胞均呈低胞膜質性染色(CTA score 0, 1)可顯示出高標準化HER2 蛋白變化量(higher IHC index)。因為當初傳統半定量CTA評量系統(semi-quantitative scoring system, CTA-based HercepTestTM kit)應用於評估以表面胞膜HER2 蛋白專一性抗體(HerceptinTM)治療乳癌的適用性(10)，如此以特定藥物適用與否為導向的診斷標準(therapy-focused CTA criteria)似乎不足以反應由正常細胞癌化為腫瘤細胞過程的相對變化量。因此若僅有腫瘤部份可以評估，我們建議第二類「陰性-胞質陽性-胞膜陽性(NCM)」免疫組織染色標準較適用於大腸直腸癌判讀；然而若同時有腫瘤與正常上皮細胞，最佳的方式還是用此標準化HER2 蛋白變化量為宜，因為它可有降低傳統免疫組織染色干擾的問題：如炎症間葉非上皮細胞干擾(sampling contaminations)、初級抗體間(或不同批號間)敏感度不同、和抗原恢復染色步驟形成的假像(antigen retrieval artifacts)。

如果HER2基因放大(HER2 amplification)與蛋白過度表現(HER2 overexpression)嚴格地局限於一般傳統定義「螢光原位雜交法比值大於兩倍(FISH ratio ≥ 2.0)」和「細胞膜型免疫組織染色大於兩分(IHC score ≥ 2)」，則於大腸直腸癌研究中可能忽略許多重要資訊或主觀地出現偽陰性(false negative)。近年來，學者漸研究出果HER2基因與蛋白表現主要為定量而不單只是定性改變(quantitative rather than qualitative alterations) (11)，同時考量非腫瘤上皮細胞亦可強化HercepTestTM試驗的專一性。因此，雖然基因螢光原位雜交法與蛋白免疫組織染色實驗步驟較為繁瑣，但略為改善後(經自我非腫瘤上皮細胞標準化)仍不失為一有效客觀測量基因與蛋白變化量的優良工具。

本研究發現大腸直腸腺癌較相鄰非瘤上皮細胞的相對 HER2 基因與蛋白量有意義地增加，隨著 Dukes' A 進展到 Dukes' C 分期 HER2 基因與蛋白量也有意義地增加。

以螢光與雷射掃描共軛焦顯微鏡檢和免疫沉澱法觀察發現：大腸直腸癌細胞株之胞質內不同識別區的 HER2 分子與 clathrin 包覆之胞飲小體(endocytic vesicles, early endosomes)、和溶解小體(lysosome)之膜相關蛋白(membrane associated protein, LAMP)共構性(co-localization)(圖 4-5)，特別是胞質內仍存在最具活性磷酸化 HER2 分子(p-Y1248)。

生長因子酪胺酸激酶受體的作為順序為：配位體與接受體結合(ligand binding)→受體形成雙體(dimerization)→活化內生性激活酶(intrinsic kinase)→自我磷酸化碳端酪胺酸功能基(reference: Olayioye MA, breast cancer research, 2001, 3:385-389)，可知生成運送中的 HER2 為未成熟的單體分子(monomer)且無法活化產生自我磷酸化碳端酪胺酸功能基，於是本實驗 Ab-18(p-Y1248 專一識別)初級抗體所得結果均為經胞膜表面再內化(internalization)的分子，可忽略其位於分泌小體(secretory vesicles)的可能性。

針對以對抗酪胺酸磷酸激酶受體的治療策略，對於HER2 基因或蛋白有意義升高的大腸直腸癌病人應可增加療效與延長預後，此輔助治療可依其不同機轉對症下藥，包括：對於細胞膜型過度蛋白表現患者可使用受體胞膜外區域(against extracellular domains)專一性抗體藥物(例如HerceptinTM，已廣泛用於乳癌輔助治療)、對於胞質型蛋白過度表現患者可使用專一性HER2 蛋白酪胺酸磷酸激酶抑制劑(例如Emodin)(12)與作用於內質網HER2 抑制的單鏈抗體(single-chain antibody)(reference: Haynes NM, 1999, 47: 278-286)、對於HER2 基因倍增依賴型蛋白過度表現患者可使用專一性轉錄抑制劑治療(agents to block HER2 transcription) (例如：antisense、Ad5 E1A、SV40 LT425 或EBNA1) (13,12,14)與反意寡核苷酸(antisense oligonucleotides)(reference: Noonber SB, gene149: 123-126, 1994)。

計劃成果自評

以往學者多數強調僅有胞膜型 HER2 蛋白才判讀為陽性，然而本研究發現於大腸直腸腺癌胞質型亦有生物活性不宜忽視。大腸癌初期屬於非基因倍增依賴型蛋白過度表現，晚期則屬於基因倍增依賴型蛋白過度表現，具磷酸化活性的 HER2 氮端刪除片段伴有重要角色。大腸直腸癌於臺灣的年死亡率(annual mortality rate)為 10.5%略高於全世界死亡率 8.4%(1,2)；儘管本次實驗所發現的基因倍增依賴型蛋白過度表現(gene-amplification-dependent HER2 overexpression)大腸直腸癌比率不高(僅佔 16%)，此結果可預估 2003 年中華民國衛生署統計報告的總大腸直腸癌死亡 3711 人中約有 600 例為「基因倍增依賴性蛋白過度表現型」。

據吾人所知此研究為首篇針對致癌基因與其蛋白以三次迴歸曲線關聯性描述於腫瘤形成與淋巴腺轉移的影響，且以數學方程式定義出基因放大與蛋白過度表現的臨界點，高於此閾值的病人其存活率較低。我們相信依據不同機轉適當選擇過度表現致癌蛋白患者，施以合適抗 HER2 基因蛋白輔助治療，於未來臨床試驗上必可有效增進預後療效。

表 1、HER2 基因-蛋白表現與大腸直腸腺癌患者臨床特徵的關係表

項目/統計方法	細分類	人數/比例	FISH ratio [®]	FISH 中位數	FISH P-值	IHC index [#]	IHC 中位數	IHC P-值
			平均數±標準 差			平均數±標準 差		
性別 ¹	男性	44 (66%)	1.59 ± 1.51	1.26	0.303	1.78 ± 0.84	1.61	0.597
	女性	23 (34%)	1.41 ± 0.82	1.25		1.85 ± 0.81	1.73	
解剖位置 ²	盲腸-升結腸	10 (15%)	2.51 ± 3.05	1.47	0.454	2.02 ± 1.22	1.47	0.651
	橫結腸	10 (15%)	1.65 ± 1.18	1.29		1.91 ± 0.83	1.80	
	降結腸	10 (15%)	1.31 ± 0.32	1.27		1.78 ± 0.71	1.77	
	直腸-乙狀結腸	37 (55%)	1.29 ± 0.30	1.23		1.73 ± 0.75	1.61	
早期腺癌 ¹	黏膜內腺癌	10 (56%)	1.20 ± 0.28	1.14	0.859	1.82 ± 0.71	1.76	0.026*
	表淺結締組織侵犯 [§]	8 (44%)	1.14 ± 0.30	1.17		1.12 ± 0.47	0.98	
淋巴腺轉移 ¹	陰性	41 (61%)	1.25 ± 0.29	1.17	0.005*	1.59 ± 0.67	1.42	0.006*
	陽性	26 (39%)	1.97 ± 2.01	1.42		2.15 ± 0.94	1.84	
Dukes' 分期 ^{&, 2}	A 期	18 (27%)	1.17 ± 0.28	1.14	0.008*	1.51 ± 0.70	1.32	0.019*
	B 期	23 (34%)	1.31 ± 0.29	1.22		1.65 ± 0.65	1.61	
	C 期	26 (39%)	1.97 ± 2.01	1.42		2.15 ± 0.94	1.84	
腫瘤基因 放大型 ¹	小訊號點(MSSs)	54 (92%)	1.35 ± 0.25	1.27	<0.001*	1.76 ± 0.67	1.66	0.023*
	簇叢狀 (SCs+SSs, LCs)	5 (8%) [£]	4.50 ± 3.89	3.17		3.12 ± 1.43	3.04	

¹Mann-Whitney *U*-test; ²Kruskal-Wallis *H*-test; *有臨床統計意義($P < 0.05$).

[&]依創始Dukes'分期(A期:腫瘤生長仍限於腸壁內; B期:腫瘤生長已貫穿腸壁; C期:已淋巴腺轉移).

[§]於Dukes' A期中,除了黏膜內腺癌(intramucosal carcinoma)之外已有表淺結締/肌肉組織侵犯的大腸癌病人

[£]簇叢狀包括: SCs+SSs型 3(5%)例; LCs型 2(3%)例.

[®]標準化螢光原位雜交法比值計算公式為=[(具代表性腫瘤細胞紅螢光總點數)÷(同前腫瘤細胞綠螢光總點數)]÷[(具代表性自體相鄰正常大腸上皮細胞紅螢光總點數)÷(同前正常大腸上皮細胞綠螢光總點數)]

[#]標準化蛋白量比值計算公式為=(具代表性腫瘤細胞腫瘤初免疫組織染色強度Photoshop平均值)÷(具代表性鄰近正常大腸上皮細胞初免疫組織染色強度Photoshop平均值)

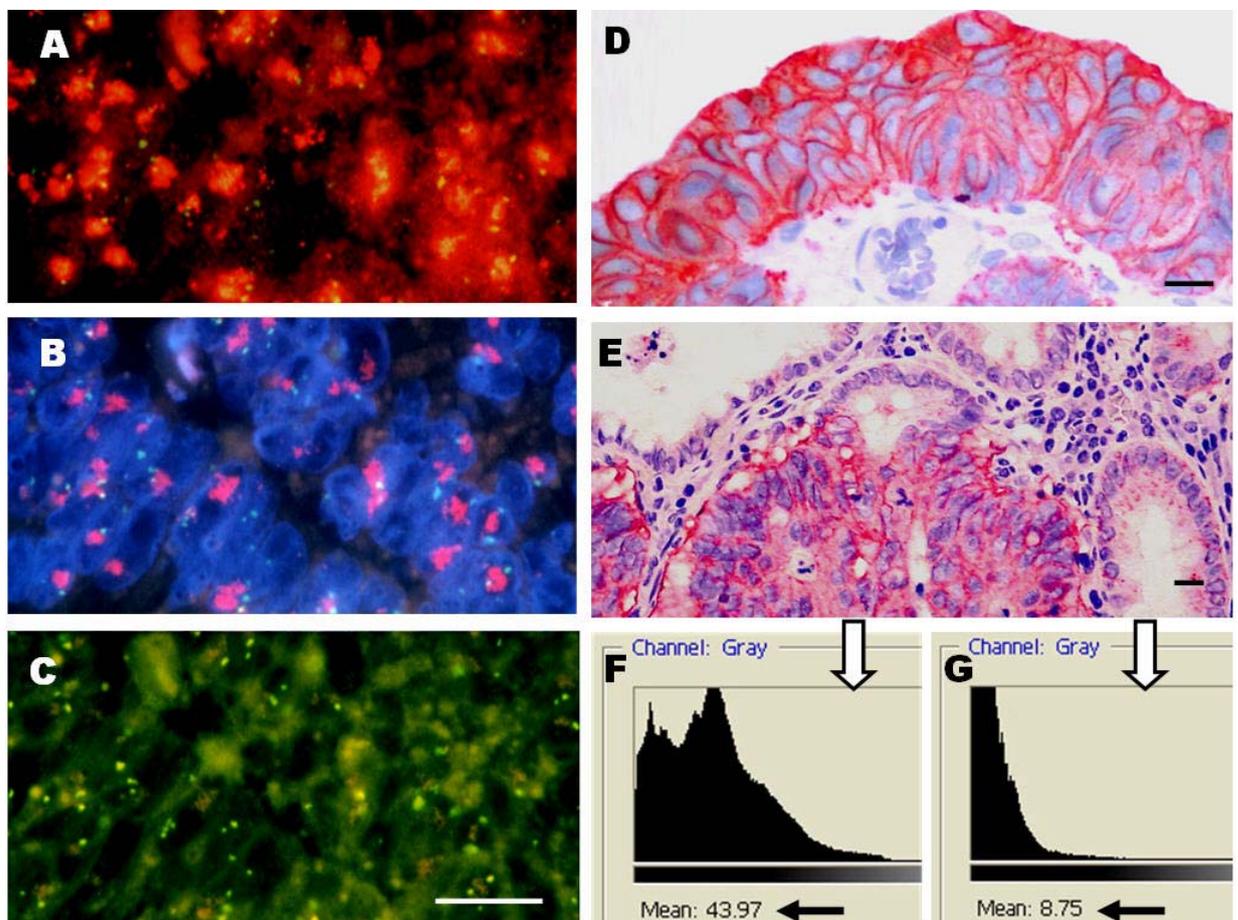


圖 1、一典型 LCs FISH 基因型合併胞膜 IHC 蛋白型(第九例, Dukes' C 分期)大腸直腸腺癌病例。雙色 FISH 顯示 *HER2* 專一基因探針圖示(rhodamine 濾鏡偵測, 橙紅訊號點) (A), 參考 CEP17 專一基因探針圖示(FITC 濾鏡偵測, 綠訊號點) (C), 和同一細胞核之 DAPI 藍螢光對照染色(counterstained nuclei with DAPI) (B)。癌細胞同時有 LCs 橙紅基因訊號點和兩套染色體的綠訊號點於同一細胞核內,代表 *HER2/neu* 基因放大呈 HSR 倍增型。以 Dako c-erbB-2 初級抗體(D)和以 Ab3 初級抗體(E 下半部) IHC 顯示類似腫瘤染色結果: 於 NCM 標準判讀為胞膜陽性,於 CTA/HercepTest 標準判讀為 score 3 陽性。以 Ab3 初級抗體和 AEC 呈色劑免疫組織染色顯示大腸直腸腺癌與相鄰非瘤上皮細胞間明顯不同的交界處(E), 其差異以

Photoshop 電腦軟體灰階(greyscale)黑白轉換(inverted transformation)量化之，大腸直腸腺癌(F)與相鄰非瘤上皮細胞(G)於組織圖(Histogram)中平均值(Mean)代表所有選取 HER2 蛋白光學總像素。經過計算過足夠代表性細胞區域後，可計算得標準化免疫組織染色指數(normalized IHC index)為 4.93。刻度尺代表 20 微米(μm)。

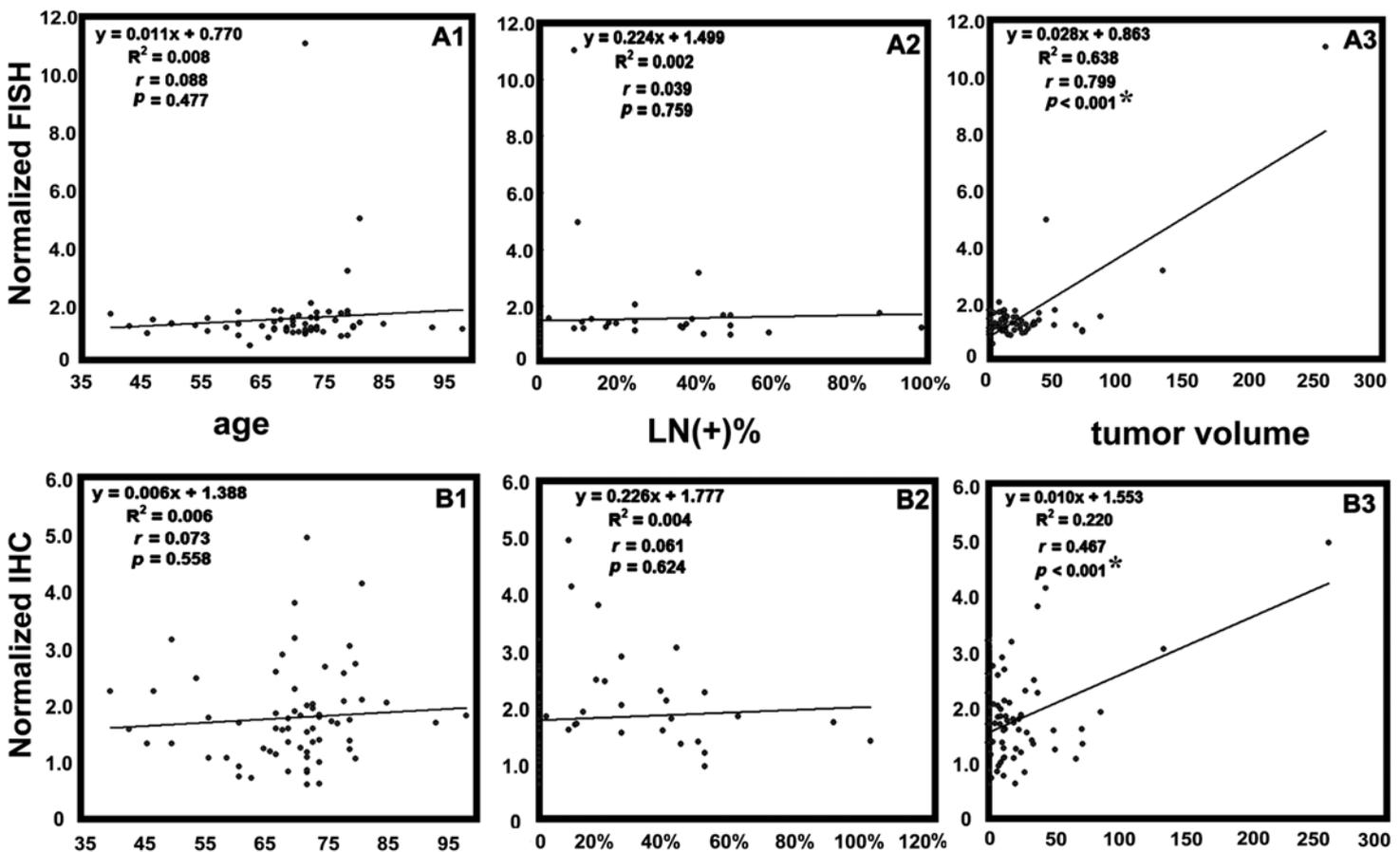


圖 7、HER2 基因-蛋白與大腸直腸腺癌病人臨床病理參數線性迴歸圖。Y 軸代表標準化 FISH 比值(A)和標準化 IHC 比值(B)；X 軸代表年齡(A1, B1)，淋巴腺轉移個數比率(A2, B2)和體積(cm^3) (A3, B3)。相關係數 r 與 P 值列於各別圖示中，僅見與腫瘤體積有相關性($P < 0.001$)^{*}。

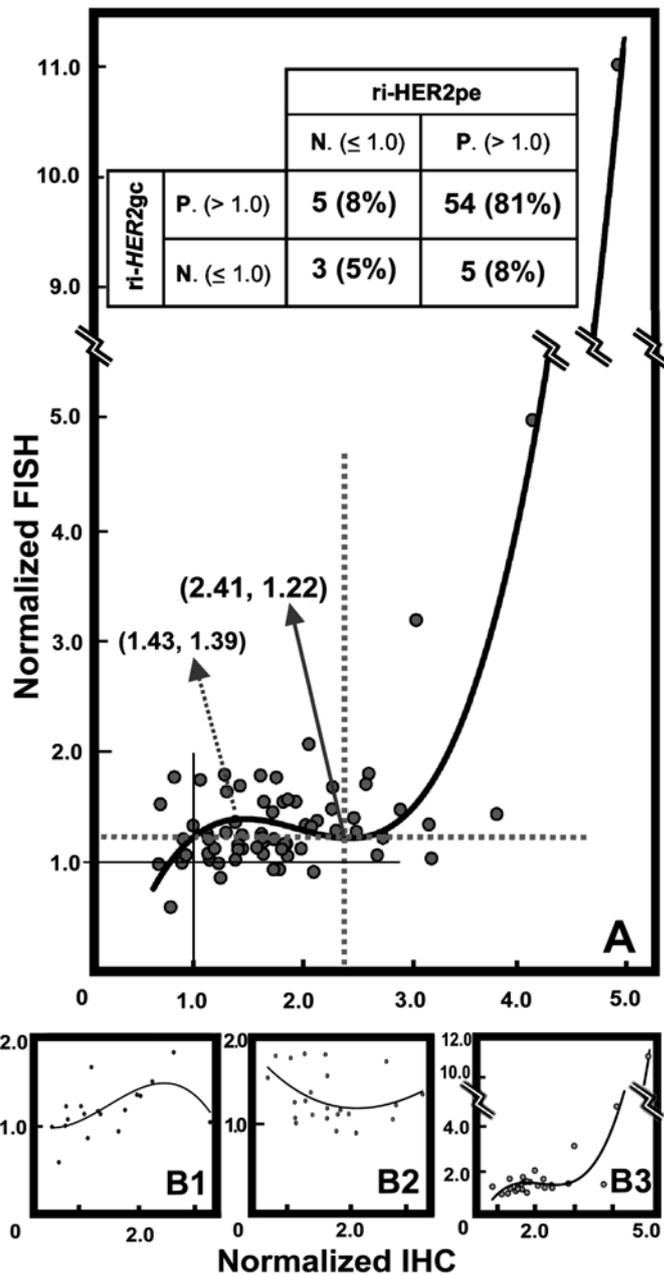


圖 8、標準化FISH基因和IHC蛋白比值之間三次迴歸相關性圖繪。Y軸代表標準化FISH比值和X軸代表標準化IHC比值。(A)於本研究的所有病例分析導出三次預估公式(third-degree predicted equation)為 $Y = 0.372 \times X^3 - 2.146 \times X^2 + 3.859 \times X - 0.824$ 二者成高度相關($R^2 = 0.890$, $P < 0.001$)。此曲線與零度斜率直線有兩個截(交)點,分別為第一點[作標:(1.43, 1.39)]波峰(點箭號)與第二點[座標:(2.41, 1.22)]波谷(實心箭號)。第二點(2.41, 1.22)波谷定義為「基因倍增依賴型蛋白過度表現gene-amplification-dependent HER2 overexpression」閥值臨界點,於圖右上象限有11病人屬此分類,他們有陡峭的斜率且無FISH與IHC正負方向不一致的情況發生。根據以上相同模式,將所有大腸直腸腺癌病人重新依癌症分期分為Dukes' A,B,C三組分析得: Dukes' A ($R^2=0.369$, $P=0.083$, B1), B ($R^2=0.172$, $P=0.300$, B2) 和C ($R^2=0.930$, $P<0.001$, B3)。另依據理論交會點(1.0, 1.0), ri-HER2gc和ri-HER2pe正負方向變化的一致性(dichotomous symmetric agreement)數量與比率(列表於A)。

表 2 · 標準化定量神經膠原致癌基因蛋白與傳統免疫組織染色診斷標準關係表列

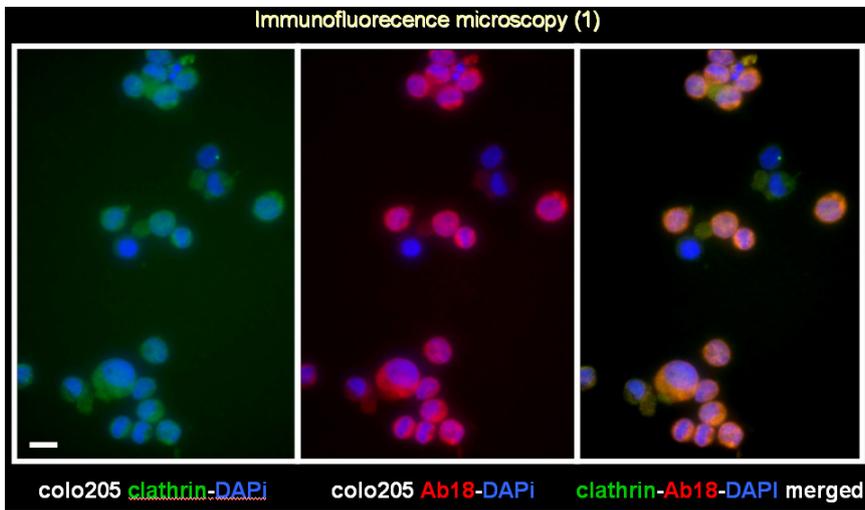
項目	細分類	人數/比例	FISH ratio [@] 平均數±標準差	FISH 中 位數	FISH P-值 ¹	IHC index [#] 平均數±標準差	IHC 中位數	IHC P-值 ¹
CTA IHC 標準 ²	陰性 (scores 0+1)	55 (82%)	1.32 ± 0.23	1.27	0.781	1.71 ± 0.66	1.62	0.266
	陽性 (scores 2+3)	12 (18%)	2.48 ± 2.95	1.24		2.25 ± 1.29	1.88	
NCM IHC 標準 ³	陰性 (N)	14 (21%)	1.20 ± 0.29	1.10	0.036*	1.04 ± 0.30	1.05	<0.001*
	陽性 (C+M)	53 (79%)	1.62 ± 1.45	1.29		2.01 ± 0.80	1.81	

¹統計方法:Mann-Whitney U-test; *有臨床統計相關性(P<0.05)

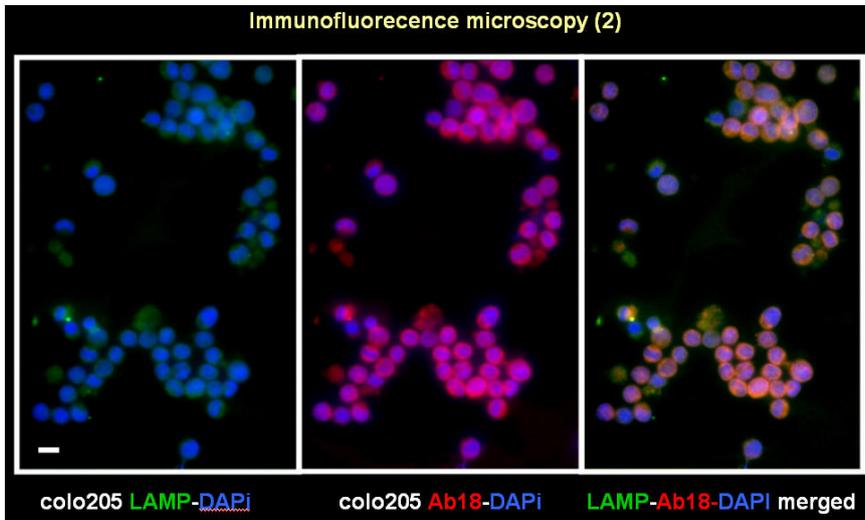
²臨床試驗分析(Clinical Trial Assay, CTA)亦即HercepTest™標準, 僅考量細胞膜染色部分:陰性[score 0, 35(52%)例; score 1, 20(30%)例]; 陽性[score 2, 10(15%)例; score 3, 2(3%)例].

³陰性-胞質陽性-胞膜陽性標準(negative-cytosolic-membranous criteria, NCM)同時考量胞質和胞膜:含 41(61%)例胞質型與 12 (18%)例細胞膜型.

^{@,#}計算公式同表 3



(A)

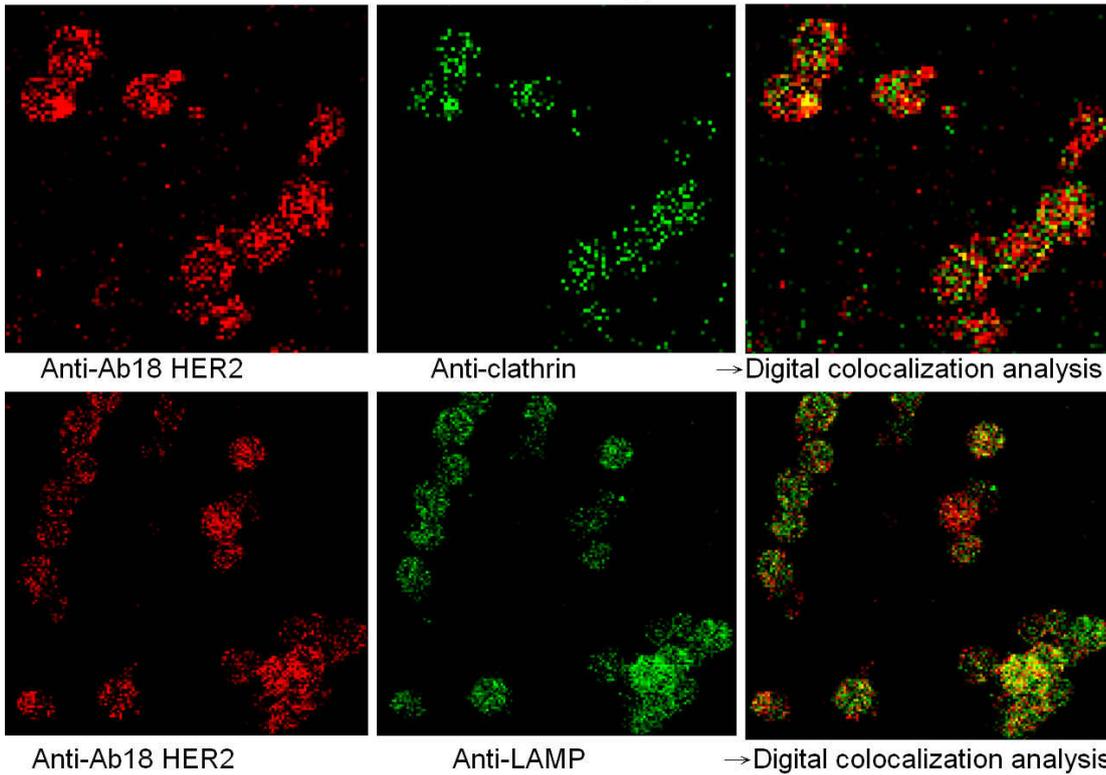


(B)

圖 4、人類大腸直腸腺癌細胞株 COLO205 之胞質磷酸化活性之 HER2 與 clathrin 或 LAMP 雙螢光染色檢視。(A)左側為 clathrin 包覆胞飲小體以 FITC 二次抗體標示為細胞質綠光,中間為磷酸化 HER2 (Ab18 初級抗體)以 Texas Red 二次抗體標示為紅光,DAPI 標示出藍色細胞核,三者合併(merged)影像為右側圖,胞質內黃色訊號顯示出 clathrin 包覆胞飲小體與具磷酸化活性之 p-Y1248-HER2 分子於胞質內有共構(co-localization)現象。(B)右側為 LAMP 標示吞噬小體以 FITC 二次抗體標示為細胞質綠光,中間為磷酸化 HER2 (Ab18 初級抗體)以 Texas Red 二次抗體標示為紅光,DAPI 標示出藍色細胞核,三者合併(merged)影像為右側圖,胞質內黃色訊號顯示出吞噬小體(lysosome)與具磷酸化活性之 p-Y1248-HER2 分子於胞質內亦有共構(co-localization)現象。放大倍率:400X。

(A)

Laser confocal microscopy—COLO205



(B)

圖 5、人類大腸直腸腺癌細胞株 COLO205 之胞質磷酸化活性之 HER2 與 clathrin 或 LAMP 雷射掃描共軛焦顯微鏡檢查。(A)左側為 clathrin 包覆胞飲小體以 FITC 二次抗體標示為細胞質綠光,中間為磷酸化 HER2 (Ab18 初級抗體)以 Texas Red 二次抗體標示為紅光,二者雙雷射光同時掃描影像為右側圖,胞質內黃色顆粒訊號顯示出 clathrin 包覆胞飲小體與部份具磷酸化活性之 p-Y1248-HER2 分子於胞質內有共構現象。(B)右側為 LAMP 標示吞噬小體以 FITC 二次抗體標示為細胞質綠光,中間為磷酸化 HER2 (Ab18 初級抗體)以 Texas Red 二次抗體標示為紅光,二者雙雷射光同時掃描影像為右側圖,胞質內黃色顆粒訊號顯示出局部吞噬小體與局部具磷酸化活性之 p-Y1248-HER2 分子於胞質內亦有共構現象。放大倍率:600X。