

第一章 前言

第一節 台灣肺癌的流行病學

根據衛生署最新的統計資料顯示，自民國七十一年以來，惡性腫瘤就已經越居國內十大死亡原因的首位。早在 1955 年全台灣肺癌的男、女性年齡標準化每十萬人口死亡率為 2.67 和 1.25 人；而 2001 年則已增加到 40.28 和 17.91 人。在這四十五年之間，肺癌的死亡率竟然暴增了十四倍到十五倍之多 (1)，已經是惡性腫瘤所造成死亡中增加速度最顯著的一種癌症。而九十一年最新的死亡統計資料指出，肺癌仍舊蟬連國人惡性腫瘤死亡原因之首，約占 19.87%；分別是男性的第二位，占 21.63% 及女性的第一位，占 17.91% (表一)。肺癌目前是世界每年死亡人數最高的一種惡性腫瘤。據估計，每年大約有將近 1,000,000 人死於肺癌。而同時，全世界約有 6,000,000 人死於其他的惡性腫瘤。

根據世界衛生組織最新的分類，原發型肺癌依其組織形態主要可區分為兩大類型：分別為小細胞肺癌 (Small Cell Lung Cancer, SCLC) 與非小細胞肺癌 (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)。小細胞肺癌多發生於男性，與抽菸有密切關係。小細胞肺癌生長的很快，且容易擴散到其他器官。在臨床上，約有 95% 的小細胞癌發生於大支氣管週邊，其在全部肺癌中約佔了 20% 至 25%。當罹患小細胞肺癌時，因其在癌症初期即具有廣泛的擴散活性，容易擴散到其他器官，包括縱膈腔淋巴結組織或是遠端的器官轉移，比較不易以外科手術方式完全切

除治療 (2)，而多以化學藥物合併放射線治療為主。相對地非小細胞肺癌約佔肺癌的 75% 至 80%，生長較慢，其擴散轉移的發生也較慢。我們若是根據腫瘤細胞組織分化之型態又可分成下列三種：鱗狀上皮細胞癌 (Squamous Cell Carcinomas)、腺癌 (Adenocarcinomas) 與大細胞癌 (Large Cell Carcinomas)。所有肺癌中以鱗狀上皮細胞癌與腺癌最多，但近年來可能由於吸菸人口降低，肺腺癌的罹患率正在逐漸增加中。

總括來講肺癌病人整體的五年存活率全世界僅有 10-15% 左右 (3)。對於非小型細胞肺癌來說，目前最有效的治療的方法，是在腫瘤早期，臨床上還沒有遠端器官轉移或者是仍侷限在原發地方時，以手術將腫瘤病灶根除性切除依然是目前最有效的治療。而若是到了晚期，或是腫瘤範圍已經超出手術可以控制的範圍時，就必須要加上或是改為化學治療亦或是鈷六十的放射線治療為主了。然而，很不幸的，通常肺癌在被診斷發現時，大約有 80% 以上的病人已經超出疾病的早期。大部分病人不是已經有遠端轉移，就是其他器官被侵犯的一些症狀，如惡性肋膜積水 (malignant pleural effusion)、聲音沙啞 (hoarseness)、對側縱膈腔的淋巴腺侵犯 (contralateral mediastinal lymph nodes invasion) 或是上腔靜脈症候群 (SVC syndrome) 等等手術切除的禁忌症了。這是由於我們仍缺乏肺癌有效的早期診斷的腫瘤標記 (tumor marker) 以及治療手段所致 (4)。雖然傳統上一般認為抽菸是引起肺癌的最主要因子之一，可能還有其他

的危險因子，也會促使這些患者發病。如流行病學的研究指出，中國女性肺癌發生與其烹調的方式、烹調時的油煙大小及烹調用油都有關(5)。此外，已有許多研究發現，二手菸與肺癌形成有關(6)。研究指出二手菸的成分大致和主動吸入之香菸成分相似，但因燃燒溫度較低，因此許多致癌物之濃度甚至較主動吸入之濃度更高，因此二手菸引起之細胞毒性及致突變性亦較主動吸入之香菸高。除了抽菸、油煙及二手菸之外，與肺癌形成有關的因子還包括職業暴露(金礦工人、煉銅礦工人、製造殺蟲劑工人)、放射線物質(鈾礦、氮氣)、空氣污染、營養因素(維生素A)及肺結核等等。

第二節 肺癌的分子致病機轉

除了上述的環境因子與肺癌的生成可能有關外，肺癌在分子生物學上的病理生成機轉方面，是本研究論述的重點之一。通常被認為一方面是致癌因子(Oncogene, K-ras, MYC)的活化，另一方面是腫瘤抑制因子(tumor suppressor gene, p53, p16^{INK4a}, and Rb)的去活化所交互作用而成(7)。也就是說，肺癌的形成事實上是由各種癌病生成機轉的多個步驟所癌病化而成的最終結果。在這一個步驟當中，至少有三個種類的細胞基因與其相關，其中包括：原生型的致癌基因(proto-oncogene)，腫瘤抑制基因(tumor suppressor gene, TSGs)，以及染色體修補基因(DNA repair genes)等等。而致癌基因的活化通常可以藉由突變(mutation)的產生而造成，舉例來說譬如點突變(point mutation)，基因的增生(proliferation)，增殖(gene

amplification), 或是重組排列 (rearrangement) 等等。對於腫瘤抑制因子來說, 傳統上可能是因為它被抑制, 被去活化以後造成一系列的癌病生成機轉。原因通常是因為掉落了一個相對位置的基因碼 (code deletion), 或是微小的突變甚至會是甲基化 (methylation) 的去活化 (inactivation) 等等變化而造成腫瘤抑制基因的失去功能。更有甚者, 在基因表現上的調控失效 (譬如說增加或是減少表現的程度) 也能夠在以上的情形中發生 (8)。

而在腫瘤生成的形態學 (morphological preneoplastic changes) 上來說, 一般認為它是由循序多發個步驟 (multistep) 所慢慢演進而成的。即所謂的增生 (hyperplasia), 化生 (metaplasia), 異生 (dysplasia), 到原位癌 (carcinoma in situ) 的產生。臨床上, 一個成形的肺癌生成以前, 一般我們可以在支氣管的上皮細胞 (epithelial cell) 來觀察到癌病化 (tumorigenesis) 這樣的情形。這在鱗狀上皮肺癌細胞尤其常見。而這些所謂的癌症前期細胞以及支氣管上皮細胞的變化, 事實上即代表著一連串基因上的突變或者變化: 而也因為近年來在分子生物學以及對於基因方面的深入了解, 我們假設出所謂的癌病化乃可能是致癌因子及腫瘤抑制因子之間的促進、拮抗等交互作用所產生而來。舉例來說 (表二), 包括所謂的致癌因子 MYC 以及 RAS 的增生, cyclin D1 的表現, 以及腫瘤抑制因子 p53 的變異, 細胞凋亡基因 BCL-2 的過度表現加上 DNA 的 Aneuploidy 單股呈現等等。而在腫瘤的形成過程中, Kras 致癌基因的活化通常會出現

在腫瘤形成的最初期。當細胞受到外在環境的刺激，譬如說空氣污染或是抽菸的刺激，使得肺泡壁發生異常增殖時，便會造成潛在性癌前病灶的產生，而通常在它的病灶中我們可以發現 MYC 的突變（9）。事實上有許許多多的生長因子或是調節性的 peptide 以及他們的接受體的表現來參與調控，包括腫瘤本身及其鄰近的正常肺臟細胞附近，在此它們提供了一個類似自體內分泌 (autocrine) 或是旁內分泌 (paracrine) 生長刺激的一種回饋機制。而這樣的訊息鍊 (signal pathway) 的一些構成因子，通常就被認定為原始致癌因子的產物。舉例來說例如 ERBB1, ERBB2, MET, 以及 Kit。他們在肺癌發生的時候都是被異常的激化，原因乃在於眾多的不正常的基因上的變異包括點突變，基因的增殖或是過度表現以及其他尚未被認定的一些機制或過程等等（10）。

RAS 基因家族包括 KRAS, HRAS 和 NRAS，都是有關於肺癌生成的重要致癌因子。而 RAS gene 通常是被點突變所活化，而其密碼子 (codon) 的位址在於 12, 13, 61 的位置，通常表現佔肺腺癌的 20% 到 30%，以及非小細胞癌整體的 15%至 20%，但是卻很少出現在小細胞肺癌中。而此基因的突變會造成此蛋白質被永久鎖定在開 (lock on) 的位置，造成訊息鍊的沒有辦法傳導而導致細胞分裂的停滯。而 KRAS 大概佔所有此家族變易的 90%。大部分此等基因的突變，約有大於 70% 是有關於 G-T 的倒置 (transversion)，也就是說正常的氨基乙酸 (Glycine, GGT) 被 (Cysteine, TGT) 或是纈草胺酸 (Valine, GTT) 所置換；而類似的倒置

也發現在 p53 變異所影響造成的肺癌組織裏頭。他們通常代表的是細胞染色體受到傷害後，所形成的一個巨大的染色體加合物(adduct)而其傷害的源頭通常是因為空氣污染造成的多環碳氫化合物(polycyclic hydrocarbons)、吸菸的苯并芘(benzopyrene)或是亞硝胺(nitrosamine)化合物等。值得注意的是，在臨床上 RAS 突變常常會造成化學治療的抗藥性以及放射線治療效果不甚理想的結果(11)，當 RAS 的訊號傳遞下來的時候，將會引起一連串的反應(cascade)而最後將會激發位於細胞核裏頭的原生型致癌產物(proto-oncogene)，譬如說 MYC 家族。MYC family 基本上屬於 leucine-zipper 類的轉錄因子(transcription factor)，它通常可以跟 MAX 形成一個二聚體(dimerization)，然後可以在染色體上的特定位址(DNA motif)結合，之後可以促進激發轉錄特殊的蛋白質或其他轉錄因子。而它的功能大概會介入一般細胞週期(cell cycle)的進展，細胞的分化以及細胞的凋亡(programmed cell death)等等。而 MYC 的發現也是主要從肺癌的細胞株而來，包括小細胞肺癌以及非小細胞肺癌(12)。

談到鼎鼎有名的 p53 腫瘤抑制基因，它位於染色體 17p13.1 的位置，全長為 20 kb，含有 11 exon，可轉譯出 393 個氨基酸，形成 53 kDa 的核蛋白。p53 蛋白的功能，在於促進一些基因的表現，例如 p21^{WAF1}、cyclin G、Bax 和 mdm2，而這些基因皆參與細胞週期(cell cycle)及細胞凋亡(apoptosis)。原本應該是基因體裏面負責維持染色體整體性的一個重要的機制。當染色體面對外界如致癌物質(carcinogen)的攻

擊以及放射線、紫外線等等照射污染影響，以致於受到傷害或破壞時的一種反應機制。這時 p53 基因會被活化，使細胞週期停留在 G1 期，以便進行 DNA 之修復作用；並會迅速的激化一些蛋白質的產生，造成一些特別的訊息鍊的傳達比如說它會刺激 p21，MDM2，GADD45，以及 BAX 產生。但若 DNA 傷害過大而無法修復時，p53 便會促使細胞走向凋亡(apoptosis)。整體來講，這些基因的功能都是在調節細胞周期，比如說 G1/S 期的過程以及細胞凋亡（13）。所以如果 P53 產生突變的話將會使基因體受到傷害以後，沒有辦法很適當的做修復或是存活下來，也就是有可能會存留一些癌病化的細胞，所以說 P53 基因在肺癌的生成上扮演著十分重要的角色。然而，也是最常發生基因突變或蛋白表現異常的基因（14）。我們可以在大約 15% 到 25% 的肺癌病人當中，發現有 p53 的抗體存在，這顯示 p53 的突變基因的過度表現將會導致人類免疫系統的一種反應。這種 p53 的抗體產生在臨床上大部分與鱗狀上皮肺癌比較相關，然而此等抗體產生的價值在臨床上到底可以用來當成一種診斷的工具或是做為預後評估的指標，目前還沒有定論（15）。

第二章 研究動機

第一節 研究緣起

承上所述，由於肺癌病人目前最有效的治療方式，大多建議以外科手術治療為主，期能早期發現、早期切除治療。但以現有的診斷方式，臨床上要在肺癌初發時就能被清楚發現，目前仍有相當困難。就以台灣各醫學中心甚至國外相關機構有關肺癌病患確立診斷時可以接受開刀切除的比率仍不到 20% 可見一斑；況且即使可以接受開刀的非小細胞肺癌之病例，手術後的腫瘤復發率還是相當的高。截至目前為止，手術後被病理診斷為第一期的早期肺癌病人的五年存活率，最好的結果也只有將近 60% 左右，令人不甚滿意，也急欲深入探討箇中的原因。肺癌至今雖然已經有很多的腫瘤標記被提出來作為診斷或者是評估預後的一個工具。譬如說 CEA(carcinoembryonic antigen)、Urokinase plasminogen activator、SCC(squamous cell carcinoma antigen)、CYFRA 21(cytokeratin 19 fragment) (16) 但在臨床運用的效果上，仍然不夠理想，似乎還有很大的空間值得我們繼續努力。因此，如果以現有診斷方式，要早期發現肺癌似乎仍有相當的困難度。但是衡量肺癌的早期發現又對於肺癌治療以及預後情況具有關鍵性的影響，因此探究如何以現代分子醫學技術，建立早期肺癌的診斷指標，是今後重要之研究課題。

本研究室在近年來，便一直積極致力於應用新的分子生物學上的技術，思索如何應用在肺癌的研究上面。之前我們曾經運用肺癌組織中

的 mRNA 的差異表現(differential display)技術，找出在肺癌組織以及成對的正常肺臟組織細胞中所差異表現的特定 mRNA 片段。然後將它們反轉錄成 cDNA 後以聚合酶連鎖反應(PCR)的方式放大，最後再跑電泳(electrophoresis)分離、找出相對差異表現的基因片段。再經過一連串的轉殖(cloning)，PCR amplification，定序(sequencing)以及北方墨點試驗來確定基因片段的存在；或者以螢光原位雜交免疫組織染色(FISH)的方法來確定基因片段在肺組織中確實存在的比率以及位置等等(17)。而幸運的是，藉由如此的方法，我們已經獲得許多新的，有效的基因片段，正深入研究分析各個基因的臨床意義中。並帶領我們走向更高級肺癌的分子生物學的研究領域。其中包括有 D.D.(dihydrodiol dehydrogenase) 這個解毒的脫氫酶，而相關的論文也已經發表在國外著名的科學雜誌 Cancer Research 上(18)。雖然如此，鑑別差異表現仍然有其先天上邏輯設計的缺點，其中包括：一、由於對於所有的基因片段一視同仁地運用 PCR 來放大，所以可能對於某些微量表現的 mRNA 靈敏度較低，容易被忽略而無法挑選出來，二、偽陽性(false positive)太多(19)，這點可能與所選定用來切斷合酸序列的限制酶(Restriction endonuclease)的特性以及 Primer 的結構有關，再經由極大倍數放大所致。但可以使用墨點雜交(blotting method)的方法來確定選出基因片段確實由原來之組織而來；也可以較為繁複地以所選出基因片段，製成抗體進行原位免疫組織染色來確立來自組織或細胞的位置，從而彌補此方法的不足之處。因此即使

differential display 是很常用的技術，但若實驗要偵測微量差異表現的基因，大多數人不會選擇使用 differential display，反而扣減雜交 (subtractive hybridization) 是一個非常好的選擇。

利用扣減雜交來鑑別差異表現的基因的技術已經行之有年了，而且也有許多相關修飾過的實驗方法已經發表來適用於各種特殊需要。扣減雜交的優點在於對於一些微量表現的基因，它的靈敏度比較高，同時伴隨產生的偽陽性也比較少，而缺點則是不能同時偵測正向調控和負向調控的基因，因為實驗中需要扣減掉兩者相似的背景基因或是家務基因 (housekeeping gene)，同時需要較多量而且純的 mRNA (19)。

第二節 研究目的

綜合上面的論述，雖然到目前為止肺癌不僅僅是全世界死亡率最高的惡性腫瘤之一；而如果照目前因為工業進步所造成的環境污染以及空氣污染、臭氧層破壞和許許多多的致癌物質散佈來說，在可以預見的未來，有關於肺癌的篩檢、診斷、治療、直到下世紀仍將是人類所面臨的一大課題。尤其是在東歐以及開發中的國家來說，由於環境污染的不受控制以及抽菸人口的持續增多等等問題，情況將會更形嚴重 (20)。而在台灣，依照行政院衛生署的統計報告，以九十一年最新的資料來說，台灣目前每年死於肺癌的人口已經超過 6 千 5 百人之多。而跟全世界其他地區相同的是，大部份罹患肺癌的病人通常都是因為在診斷時已經進入疾病的末期無法有效治療以致死亡 (21)。然而對於其他少數能夠在疾病的早期就被偵測出來的病人，在歷經正統外科的

手術切除治療後。不幸的是，最後仍有極大的機會將可能死於疾病的復發或者是遠處器官的轉移等等問題（22）。在前言中，我們已經大概討論過肺癌的生成機轉，其中包括有基因學上的、環境因素的、致癌物的、以及分子生物學上種種有關致癌因子以及腫瘤抑制因子等等的交互作用。但是到目前為止，我們所能夠達到的共識 (consensus) 就是：惡性腫瘤應該是一個多發基因變異以及交互作用影響所造成的一個結果（23）。而疾病的進展、惡化則可能被持續的或者是相互影響的病理生理控制調節失序所影響而成。所以如何利用在分子生物學上的最新技術，更進一步的研究探討，找出所謂致癌因子的表現和異常細胞生長之間的因果關係將是一個重要的課題（24）。而眼前我們所面臨的主要問題是：不管如何，想辦法確認、找出並具體描述造成惡性腫瘤持續進展的一些相關基因，探究它的本質到底是如何，以及它們之間的相互作用又是如何等等。所以我們便將努力放在如何找出有關肺癌新的標的物或是腫瘤致病因子，作為臨床早期偵測肺癌的方法或是改善治療的指標等等。甚至希望能夠利用在分子生物學上的研究，提供一個嶄新的治療的方式以及更好的治療成果。

第三章 研究設計

第一節 差異表現基因選殖的技術

細胞在生長與分化的過程當中，是被許許多多不同基因的差異表現所精確調控著。不管是正向的促進調控，或是反向的抑制調控，大多數這些基因會短暫地表現出一些特定的訊號，而且細胞也可能會在任何時期表現出一些特殊、差異的基因產物。倘若我們可以分離並且鑑別一些外型相似、有微小突變的物種間或是同一生物體不同刺激或是生長期所呈現的這些差異表現的基因，不僅可以幫助我們了解這些基因的功能，同時也能了解在一些獨特生物系統中的分子調控機制。而在本研究中，就是要藉由篩選肺癌差異基因的方法來探究肺癌的致病機轉，尋找可能的致癌基因以及腫瘤抑制基因突變之間的調控以及差別表現的情況。

事實上，在過去十幾年來，已經有許多的實驗在不同的生物系統中被提出，來研究如何找出以及確認這些差異表現的基因。到目前為止，至少包括：differential display, representational difference analysis, subtractive hybridization (SH) , suppression subtractive hybridization (SSH) , differential screening and microarray (25) 等技術被提出。雖然這些實驗技術和方法都可以成功的將差異表現的基因給確認出來，然而，每一種方法都有它先天上的致命傷以及缺點。包括再生性 (reproducibility) 的不穩定，高偽陽性 (false positive) 比率，稀有的基因片段容易失落，沒有辦法

同時分析一種以上的基因片段等等，以及價格比較貴或是因為來源比較特殊等因素使得推廣不易等等。綜合以上的種種限制，在在限制了我們在運用個別技術來做為實驗方法時候的考量，同時有一些研究人員則甚至開始考慮運用兩種以上的技術相結合使實驗的結果能夠更為完善。例如本研究所採用的抑制性扣減雜交反應配合生物晶片的篩選，來構成一個尋找腫瘤組織差異表現基因的強大利器，就是一個近來漸漸被廣為使用的分子生物技術。這裡我們來討論兩種比較具有效能的技術可以用來鑑別或找出有差異表現的基因的方法，即鑑別差異表現 (differential display) 和扣減雜交反應 (subtractive hybridization)，兩者各有其優缺點，而都已經被廣泛的使用。

Differential display，最早是在 1992 年時被研發改良出來 (26)，是現在最常被用來鑑別差異表現的基因的技術之一。它的優點包括：只需要少量的 total RNA 即可偵測已知和未知的基因、可同時偵測正向與負向調控的基因、可同時比較兩個以上的 mRNA population。而缺點則有，對於微量表現的 mRNA 靈敏度較低，偽陽性太多等，所以即使 differential display 是很常用的技術，但若實驗要偵測微量差異表現的基因，則大多數人都不會使用 differential display，反而扣減雜交是一個非常好的選擇。

第二節 扣減雜交方法和其演進

Subtractive hybridization 或 subtractive cDNA library 是一種在特定組織或細胞中，分離或鑑別出差異表現基因的好方法。在早

期的扣減雜交中，相同的 mRNA 會在 cDNA-mRNA 進行雜合反應後，利用磷灰石色層分析法 (Hydroxyapatite chromatography) (27) 或是 卵白素 - 維生素 H (avidin-biotin) (28) 等系統將雙股雜合物排除，而最後剩下的 mRNA 即為可能有差異表現的基因。即使已有許多重要的基因利用早期扣減雜交的方法可以很成功的被篩選出來，但是由於早期扣減雜交方法所得到的 mRNA，其數量仍不足以做更進一步的分析，因為早期扣減雜交需要大量原始的 mRNA，而且必須經過多次的雜合過程，如此一來，可能會造成一些表現量較少的基因喪失。所以近年來，透過許多新技術的改良，包括帶有 oligo-dT 磁珠的應用 (29)，與 PCR (30) 的應用 等，都可以改善早期扣減雜交造成 mRNA 不足的缺點。

而最近幾年，扣減雜交又有更進一步的改良發展。加入常態化 (normalization) 並省略分離單雙股核酸序列的步驟，推出所謂的抑制性扣減雜交。Suppression subtractive hybridization (SSH)，已經成為目前篩選差異表現基因最常用的方法之一 (31)。一般來說，扣減雜交主要是由兩種 sample population 參與，一稱為測試者 (tester)，一稱為驅趕者 (driver)。將一個 sample population (tester) 的 cDNA 或 mRNA 和另一個 sample population (driver) 的 cDNA 或 mRNA 進行雜合作用，其中表現相同的基因序列則因為是互補 (complement) 的關係，可互相的再結合 (reassociation) 在一起成為雙股構造而被分離出來；而未雜合的 cDNA 或 mRNA 即代表在 tester 會表現出來，但在 driver 則不會表現或是表現量很低，就是所

謂有差異表現 (differential expression) 的基因。之後再使用 HAP、Avidin-biotin binding、oligo(dT)-latex beads 等方式來分離單股未雜交及雙股已雜交之核酸序列完成整個過程，稱為扣減雜交 (圖一)。扣減雜交的優點在於對於一些微量差異表現的基因，靈敏度較高，同時其產生的偽陽性也比較少。缺點則是扣減後不能同時偵測正向調控或負向調控的基因，並且需要較多量且純的 mRNA，所以若是檢體比較稀少或珍貴的話，可能就要小心操作。

第三節 核酸序列再結合的動力學探討

自從 1953 年 Watson 跟 Crick's 提出染色體是由雙股的去氧核糖核酸序列 (DNA) 所螺旋黏合構成以後 (32)，我們知道這兩股的 DNA 可以被完整地分解開來。而在往後的數年間，很多的研究者也慢慢地發現了染色體的一些構造和物理化學特性。而在西元 1960 年，便有人開始發現分開的雙股染色體，可以再被重新的黏合在一起，而能保有原來染色體的一些物理以及生物的特性 (33)。另外，科學家也發現不同物種之間的 DNA 也可以做跨物種的雜交黏合 (cross-hybridize)，這個特性可以被用來作為物種之間血緣親疏的分析研究 (34)。到了 1968 年，Britten 及 Kohne 等科學家把染色體再黏合的動力學 (kinetics of reassociation) 介紹出來 (35)。這個方法提供我們評估整個基因體不同序列之間所能夠造成黏合的動力學情形，同時也被迅速的應用在有關 mRNA 的黏合實驗當中。

首先，我們來看看，什麼樣的因素，可以影響兩個核酸序列它們之

間再黏合的速度。

1. 濃度：兩個互補的核酸序列它們彼此之間再結合的速度取決於它們的濃度。也就是說濃度愈高的話，兩個樣本粒子的結合碰撞的機會越高，也就是雜交的速度越快。因此有關於再結合的方程式乃決定於有多少個不同的核酸序列參與反應，以及每個序列所含有的量的多寡。
2. 比例：在兩種以上不同核酸序列的再結合反應當中，不同序列之間相對濃度的關係也影響著整個的再結合速度。舉例來說，當含有兩種樣本的再結合實驗當中，兩者之間比率如果是 1 比 1 的話將會遠遠慢於兩者之間的比率是 10 比 1 的實驗(圖二)。
3. 數目：如果參與反應的序列數目越多的話，由於每種不同序列所占的濃度將相形地越低，所以整個再結合的速度將會越慢。所以參與反應的核酸序列數目越多，則反應速度越慢(圖三)。
4. 複雜性：每一條核酸序列由不同的去氧核糖核酸或是核糖核酸所構成，序列越長的話，複雜性將越高。所以我們以不同的核酸序列個數，乘上所有的核酸序列的長度，來表示核酸序列的複雜性。而複雜度越高將表示再結合的速度越慢。而由於再結合的速度取決於核酸片段的長度，所以一般實驗的設計常常會限制核酸序列長度在 300 至 500 nt 之間，以控制實驗的結果以及效能。

5. 溫度：再結合的速度，也因為溫度的高低而有所變化，所以實驗時需要有一定的標準化程序，並且依照對照表來做修正。
6. 離子濃度：反應的溶液當中，離子濃度的多寡也會影響實驗的結果，因此我們通常將標準訂在 0.18 M Na⁺以及溫度設定在 60 °。

而事實上，以上種種變數的分析，乃是根據利用數學程式上的分析，來對於再結合的動力學做一個推測性的評估(36) 我們稱它為 Cot 或是 Rot 的分析。而這樣的假定，在有一個絕對多數核酸序列(driver excess)的時候可以較為簡便，程式如下列所見：

$$dC / dt = -k C_0 R_0 \quad 1$$

K=常數；C₀ 單股 Tracer 起始濃度；R₀單股 Driver 起始濃度

因為 R₀ 無限大，可以視為常數，所以

$$C / C_0 = e^{-kR_0 t} \quad 2$$

因此，由方程式 2 我們可以畫出 C / C₀對應 Rot 的座標圖，而得知一個特定核酸序列的再結合速率。

第四節 抑制性扣減雜交簡介

雖然傳統的扣減雜交方法可以很成功的用在許多實驗中，而且效果也不錯，但這個方法因為需要經過多次的雜合作用，比較浪費時間，並且比較不合適鑑別少量表現的訊號(37)。所以近年來，有一個新的

改良式扣減雜交方法被發展出來(38)，這個方法可以選擇性的放大複製差異表現的基因，並且可以同時抑制非差異表現基因的複製，所以克服了一些傳統扣減雜交的技術限制。這新的扣減雜交方法最少只需要 0.5 μ g-2.0 μ g 的 polyA⁺ RNA，整個實驗也只需要 3-4 天，並且不會用到任何物理性的方法來分離單股和雙股雜合分子，所以不會喪失一些表現量少的分子。並且，利用 PCR 的抑制效應(PCR suppression effect)，可以在放大複製所要的分子時，防止不相關分子的複製(39)，如此可以增加正確性，降低偽陽性的機率。這整個方法，稱為抑制性扣減雜交(suppression subtractive hybridization, SSH) (圖四)。參考附圖可以了解整個抑制性扣減雜交的原理和流程。而 SSH 主要就是靠著設計完善的 adaptor 與 PCR suppression effect 兩大因素，完美的展現其效能。SSH 所用的兩個 adaptor 是經過特殊設計的 adaptor1 及 adaptor2R (圖五)，adaptor 含有兩段序列，可以提供之後進行 PCR 時，PCR primer 黏合的位置。而 adaptor 中也有一些特殊的限制酶切位，可以提供和載體進行的接合作用，以便進行轉殖篩選。整個 SSH 發展的根據，就是 PCR suppression effect。而 suppression 作用發生在單股 cDNA，因為這個 cDNA 的兩端 adaptor 有互補的序列，當 primer 在黏合的過程中，雜合動能(hybridization kinetics)會強烈的讓只有一端擁有 adaptor 的單股核酸序列，形成自體雜交的動作 (auto-hybrid)，而傾向形成一種 pan-like 的二級結構來防止 primer 的黏合。但若 primer 可以黏合成功並開始延長，新合成的一股兩端仍

然還是有互補序列，還是會繼續形成 pan-like 的二級構造，所以在 SSH 的實驗中，在經過 PCR 反應後，非專一性的分子便會被抑制，只有兩端有不同 adaptor 的 cDNA 分子，才會被專一的放大複製，得到的 PCR 產物也即是我們所要求的差異表現基因。所以 SSH 可以很快速、很精確地找出差異表現的基因，同時 SSH 的增強效能大概是傳統扣減雜交的 100-1000 倍之多，所以自然地已經成為現今所有找尋有趣基因的實驗中，一個非常有效的技術。

第五節 抑制性扣減雜交設計的原則

第一項 分離雜交後雙股雜合物的技術

有關於如何分離雜交後的單雙股核酸序列，能夠有效率、完全、而又不會喪失一些稀少而重要的片段，已經有許多的科學家提供很多的方法。雖然本實驗運用 PCR suppression effect 的抑制性扣減雜交技術，並不需要特別傷腦筋來思索分離單雙股雜合物的方法，還是讓我們來看看各種已經發展出來的分離技術和他們各自的優缺點。

1. 紫外線的吸光度：由於核酸含有鹼基，它們對於紫外線在接近 260 nm 的地方會有最大的吸光度。而從單股的核酸結合成雙股時，由於基因之間緊密規則的排列，鹼基對的環狀構造彼此之間造成干擾以及鍵結，使得吸光度會減少大約 40%。因此我們利用這樣的特性，可以觀察到在雜交結合的過程當中，吸光度的絕對值會因為核酸從單股變成雙股以致於吸光度減少的程

度，可以評估結合成雙股的比率大小（40）。

2. 磷灰石（HAP）的結合作用：由於核酸當中的磷酸根可以跟磷灰石中的鈣離子相結合。而雙股的核酸與磷灰石的結合作用比單股更為強烈。所以我們可以利用這樣鍵結的強弱來分離單股以及雙股的核酸序列。然而缺點是，由於磷灰石在操作時必須要有高溫，實驗程序比較麻煩。另外，這樣的方法，並沒有辦法移除多餘的單股 driver。當然，這在以 RNA 為 driver 時，顯然並不是一個難題。
3. 維生素 H 的親和性：我們可以將 Biotin 加入以 DNA 或是 RNA 作為 driver 的核酸序列中，然後在雜交反應以後，可以藉由 avidin 或是 streptavidin 跟 biotin 之間的強烈親和性，來移除雜交的產物或是多餘的 driver。當然如此的做法仍然有它的缺點。第一，biotin 的濃度在核酸序列當中並不高，大約只有 1/300 左右，所以移除 driver 的效果可能不盡理想；第二，物質與 biotin 在照光以後，反應物是疏水性而且不溶於水溶液，可能造成操作上的一些困擾。
4. 固定式方法：我們可以使用固定在硝化纖維素膜上的 driver，使得雜交以後的剩餘的 tracer 可以被萃取出來。而固定的方法，可以包括使用纖維素；乳膠、磁珠等等。然而這個做法的缺點是，因為雜交反應是在固態的 driver 上反應，使得反應的動力學與液態的雜交反應有所不同。

5. 核酸限制分解? : 我們可以取用特別針對單股核酸來做為分解消化的酵素, 例如 S1 核酸?, 利用它來分辨單股以及雙股核酸。

而目前我們所建議的策略是, 考慮選擇以 RNA 來當成 driver, 因為 RNA 比較不穩定, 它容易被移除衰減, 我們可以用酵素來分解或甚至簡單的使用鹼性溶液就可以讓它沉澱移除。但如果像本實驗使用 PCR 來放大特定基因片段, 可以免除以上分離的考量步驟。但是實際上仍然有一些缺點要列入考量。因為 PCR 由於作用原理的關係, 它容易放大屬於中小型片段的核酸序列, 造成整個序列的不均等放大, 容易造成結果的誤差。而另外 cDNA libraries 所產生完整序列的核酸, 可能由於核酸序列較長, 複雜性較高, 使得在進行扣減雜交的時候, 需要較長的反應時間。

第二項 抑制性扣減雜交的反應流程

抑制性扣減雜交技術, 實在不失為是一個簡單而且有效的工具, 可以將不管表現高、低的的差異表現基因給鑑別出來。它擁有很高的增強效果, 又因為在實驗中具有常態化的步驟, 所以對於那些表現稀少的差異性基因, 使用抑制性扣減雜交的技術, 就是一個適合的方法。而在一般的經驗當中, SSH 的增強效果大概有 1,000-5,000 倍之多。現在, 我們就嘗試著利用圖解的方式, 來詳細說明整個抑制性扣減雜交實驗方法的步驟原則。

所謂的差異表現的 cDNA，也就是我們的標的物，它是存在於測試者 (tester) cDNA 溶液中，而在驅趕者溶液中不存在或是存在量非常稀有的意思。如圖六所示，整個實驗的流程大概可以包括了以下幾個步驟：

首先從組織中或是從細胞株中萃取 mRNA，將它反轉錄成 cDNA，然後將測試者以及驅趕者的雙股 (ds) cDNA 用一種含 4 個鹼基對的核酸限制酶來分解成核酸片段，例如 RsaI 或是 HaeIII。然後我們將測試者的 cDNA 片段分成兩個組別，再分別黏合上兩個不同的接合器，分別標記成測試者 1 以及測試者 2R。而這些接合器的末端都被設計成不含磷酸根分子，如此一來它就只能黏合上核酸片段的 5' 端。

總共需要經由兩次雜交的過程。首先是將絕對多數的驅趕者溶液加入方才標記的每一個測試者的溶液之中，然後將樣本加熱使其雙股結構分解開來，並允許等待它們作再黏合 (reanneal) 的過程。這時形成單股的 cDNA 測試者核酸片段會被常態化 (normalization)，意味著原本有高低濃度表現的 cDNA 會因再黏合的動作而變的大抵上較為平均。這種常態化的發生。推論一般是因為在黏合的過程當中，有所謂自體雜交的情形發生所導致。如同圖四中的 b 片段，核酸序列可以被自己再黏合而使高濃度的核酸片段變低。再者，在測試者溶液中的單股 DNA 因為如此雜交的過程，而被差異性的增強表現出來。這也是由於一般不具差異性的共同的基因片段彼此雜交黏合所導致的結果。

所謂第二次的雜交反應，是將之前進行過雜交反應的兩個溶液，把

它們再混合在一起。這時候溶液裡頭將只剩下經過常態化，以及差別反應的單股測試者 cDNA 存在，而能夠來進行再黏合的動作。如圖四所顯示的片段 b 以及片段 c，還有新形成的片段 e 的雜交物。這時我們將再一次倒入經過解離 (denatured) 的驅趕者溶液，這樣的程序將可以再一次增強差異表現基因片段的的存在濃度。我們來注意看看新形成的片段 E，最重要的是它前後分別擁有接合器 1 以及接合器 2R，使它不同於片段 b 以及片段 c 雜交物，那是在第一次雜交反應就形成的。而由於片段 E 的這個特性，分別有不同的接合器在它的兩股序列上端。因此在我們進行 PCR 時，因為分別加入適合接合器 1 以及接合器 2R 的 primer1 以及 primer 2R，這時 e 雜交物將會有非常的優勢來進行指數性的放大(exponential amplification)，而將這個差異表現的核酸片段特別地增強放大出來。

如果我們進一步探討兩次雜交反應後，所產生的基因片段以及雜交形成的情形，可以發現有片段 a、b、c、d 以及第二次雜交後的新形成的 e 片段。我們把它詳細研究後，分別發現，片段 d 因為不具有接合器，無法接上 PCR 所需要的 primer，所以無法進行 PCR 反應。片段 c，由於僅具有兩個接合器的其中一個，因此在進行 PCR 反應時，只能夠呈現線性的增強放大。而片段 b，雖然可形成雙股雜交結構，但它因為兩邊接上相同的接合器，由於實驗設計的關係，這樣的片段將有可能形成所謂自體雜交，使得基因片段無法伸展開來，PCR 也無從發生。(圖五) 因此，僅有分別具有接合器 1 以及接合器 2R，並且順利雜交形成

的片段 e，可以在投入特殊設計 primer 的 PCR 反應中，呈現指數性的放大而被鑑別表現出來，這就是 SSH 的精神所在。

第六節 抑制性扣減雜交方法的優缺點

SSH 主要是藉由 suppression PCR effect 的原理，來選擇性的複製所要的 cDNA 片段，並且同時抑制（不放大）不相關 cDNA 的複製，所以 false positive 的機率就會少很多。然而，SSH 還是有其缺點的，與 mRNA differential display 相比，SSH 的操作步驟較為緊湊，比較花時間，而且 SSH 並不能同時篩選正向和負向差異表現的基因。在 SSH 的過程中會用特定的 blunt end 限制酵素進行切割，所以最後得到的扣減 cDNA 會比較小（約 0.1-2 kb），造成最後進行基因比對的困擾。然而即使有這些缺點，SSH 還是受到許多實驗室的歡迎，因為 SSH 真的可以降低 false positive 的機率，同時又經過 differential screening 的步驟，所以最後扣減出來的 cDNA，是正確有差異表現基因的比例就很高了。

另外最近的生物技術又有一大突破，就是 cDNA Microarray 的發展，DNA Microarray 利用 mRNA 與 cDNA 雜合後染色的原理，使用電腦掃描、照相、比對而可以快速、大量篩選出許多已知的基因。所以如果將 SSH 和 DNA Microarray 相結合，便可將已經 SSH 所得到大量各種不同的扣減 cDNA Libraries，再由 Microarray 偵測的方式，可以很快速並方便地先在已知的基因資料庫中，確認篩選出差異表現的基因（41）（42）。結果將大量地降低篩選差異基因所需花費的時間並增加

其準確性。由此看來，SSH 結合生物晶片技術的運用，在許多方面，包括人類疾病的發生或生理調控功能的基因表現研究，將有很大的實用價值，並對於未來人類在疾病的預防治療上，應該會有無可限量的助益。

第四章 研究材料和方法

第一節 研究材料

第一項 非小細胞肺癌組織的取得與製備

從 2002 年 7 月到 2002 年 12 月之間，我們實驗室選擇了 11 位屬於非小細胞肺癌的肺腺癌（Adenocarcinomas）病人的組織切片作為研究材料。這些組織切片，都是在肺癌手術切除時，從病人的腺癌組織中切取約半公分見方的樣本，裝瓶封口後，直接投入零下-70 的液態氮桶中冰存；另外我們在病人取下的肺癌標本中，在同一個肺葉標本的正常肺臟周邊肺組織部分，切取同樣半公分見方的樣本，也同樣立即冰存在液態氮桶中。而所有的組織標本都經由臨床病理醫師的檢驗後，確定病人的惡性腫瘤全為肺腺癌，並確認病人被取下的正常肺部分組織裏，沒有證據顯示惡性腫瘤的侵犯。而以上病人的組織樣本收集，在手術切除前，都經由病人填具同意書，表示知曉並願意接受組織樣本之捐贈以及處理。

我們首先從其中五個肺癌病人的腫瘤組織中，依照 Clontech 公司出產的 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 的步驟操作，建構向前（forward subtraction）以及向後扣減（backward subtraction）雜交的 cDNA 基因庫。接著應用生物晶片技術，同時篩檢千百個基因。最後將挑選出來的特別差異表現的基因，以 RT-PCR 在所有 11 個肺腺癌病人的組織中做半定量的表現程度偵測。另外並以 Met 基因的抗體在

43 個非小細胞肺癌組織中進行螢光原位雜交免疫組織染色 (FISH) 結果計算 FISH 陽性率的方法則依我們研究團隊先前發表在 Cancer Research 上, 有關非小細胞肺癌中 Dihydrodiol Dehydrogenase 過度表現文章中所使用的技巧, 來對組織螢光染色的呈色情形作半定量的分析比較 (18)。再結合以上肺癌病人的臨床病理資料等, 以 χ^2 (卡方檢定) 進一步做為統計上的分析研究。

第二項 萃取肺組織中 mRNA 的步驟

取適當大小之零下 -70 液態氮儲存的手術後冰存之肺癌標本及同一病患取下之相對正常肺組織, 置於研鉢中磨碎, 以 SNAP RNA column (Invitrogen, San Diego, CA. USA) 及氯仿 (chloroform), 將 RNA 萃取出來。這時候注意要全程戴手套處理, 避免污染造成 RNA 或是 cDNA 被 Nucleases 所崩解 (degradation)。而切記高純度的 polyA⁺ RNA 才能合成高品質的 cDNA。

萃取出之 total RNA 以及 polyA⁺ RNA 先以 1% 的 formaldehyde denaturing agarose/EtBr gel 跑電泳 (electrophoresis) 來確定萃取出來的 RNA 含量以及品質。一般哺乳類動物的 RNA 會出現核糖體的 28S 和 18S RNA 兩條典型的亮條紋, 分別位於 4.5 kb 以及 1.9 kb 附近, 同時並以紫外線光譜儀 (ultraviolet spectrophotometry) 測定 RNA 在 260nm 和 280nm 的吸光值, 兩者比率應該約在 1.5-2.5:1 之間。純度不高的 RNA 將會導致扣減雜交後的背景雜值太高, 應該儘量避免。

第二節 實驗方法

整個 SSH 的實驗方法乃是使用 CLONTECH 公司所出的「Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit」(Clontech Lab., Inc.) 來進行實驗。並且依照其使用手冊及注意事項逐一操作，步驟描述如下：

第一項 合成 first-strand cDNA

分別從 tester, driver 以及對照組 Control PolyA⁺ RNA(from human skeletal muscle) 各取 2 μ g 的 PolyA⁺ RNA 作為模板 (template), 藉由 1 μ l (10 μ M) 的 cDNA Synthesis Primer 為引子, 以 AMV(Avian Myeloblastosis Virus) reverse transcriptase 反轉錄? 加入 5X First-Strand Buffer、dNTP Mix 補水, 加熱至 42 作用 1.5 小時來合成單股 cDNA。

第二項 合成 second-strand cDNA

取上述合成 first-strand cDNA 之各組試管, 分別加入 5X Second-Strand Buffer、dNTP Mix 20X Second-Strand Enzyme Cocktail 混合後靜置於 16 兩個小時 再加入 2 μ l 的 T4 DNA Polymerase 於 16 下反應半小時來複製 second-strand cDNA, 然後加入 4 μ l 的 20X EDTA/Glycogen Mix 來終止製程 這時以 100 μ l 的 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 搖勻後離心至 14,000 轉 10 分鐘, 將上清液小心到入 0.5 ml 離心試管中 再加入 100 μ l 的 chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 重複離心後以 ethanol 沉澱出 cDNA。最後以 PCR 的方

式，運用 SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) 來產生雙股 cDNA。

第三項 以 RsaI 切割核酸片段

我們依照前面所描述的方法，分別來製備測試者 cDNA 溶液以及驅趕者的 cDNA 溶液。這邊所謂的測試者溶液，指的是以病人腫瘤組織為來源，萃取它的 RNA 然後依照前面所描述的步驟，反轉錄成 cDNA 所製備而成的雙股 cDNA 溶液；同樣的，從病人相對的正常肺組織所萃取 RNA，反轉錄成 cDNA 所製備而成的溶液我們稱為驅趕者溶液。在這裡，我們分別從各個製備的溶液中取出 43.5 μ 的雙股 cDNA 溶液，然後加入 1.5 μ 的 RsaI 核酸限制酶和 5.0 μ 10X RsaI Restriction Buffer 將雙股核酸序列分解成核酸片斷。這個步驟我們利用一個特殊的限制酶 - RsaI，將 cDNA 切割成較小的片段，並將 cDNA 的末端切割成 blunt-end，以便將來順利進行扣減雜交反應時，可以依此與接合器進行黏合 (ligation) 作用。然後我們將已經經過限制酶消化分解成片段以後的測試者溶液平均分配成兩部分。

第四項 黏合 Adaptor

在黏合接合器的過程中，我們將平均分配成兩個部分的測試者 cDNA 溶液，分別加入接合器 1 以及接合器 2R。並且將它加入黏合反應緩衝液 (2 μ l 5X Ligation Buffer and 1 μ l T4 DNA ligase) 充分混合以後，置於 16 後過夜反應。這樣的黏合反應最後在加入 1 μ EDTA / glycogen 混和均勻後終止反應。同時我們將它加熱到攝氏 72，持續

5 分鐘來使黏合酵素 (Ligase) 去活化。之後稍微離心，並以 -20 保存。注意只有 tester 的 cDNA 才要與 adaptor 進行 ligation 作用，而 driver 的 cDNA 則不需要和 adaptor 進行 ligation 作用。

第五項 第一次雜合反應 (First Hybridization)

第一次的雜合反應前，應該先測試接合器 (adaptor) 黏合的效率如何，否則必須要再重複上一個步驟，以免影響結果。操作時分成兩個實驗組，由佔有絕對濃度優勢 (excess) 的驅趕者 cDNA 溶液，將它分別倒入之前所製備的測試者 cDNA 溶液當中。(已經分別接上接合器 1 以及接合器 2R)，倒入 4X Hybridization Buffer，然後我們將溫度升高到 98 持續 1 分半鐘來達成解離變質 (denatured) 成單股 cDNA 的效果。接著將溫度降到 68 持續 8 個小時之久 (不能超過 12 小時)，來使雜合的緩衝液可以充分進行雜合反應。這時溶液中的單股 cDNA 也就是具有差異表現的基因片段，將可因為雜合而產生明顯的相對濃度增強作用 (enrichment)。

第六項 第二次的雜合反應

第二次的雜合反應，乃是將先前所分別進行第一次雜合反應的 Adaptor1-ligated Tester1 和 Adaptor2R-ligated Tester2 兩種溶液混合在一起，另外再加入一些新鮮的驅趕者 cDNA 溶液後，使之前描述的增強作用更加明顯。不必要再經過特別的變質 (denatured) 過程，也不需移除雜合物，將溫度控制在 68 置放過夜使其反應均勻完全。最

後置於 -20 保存，此即為已扣減成功的 cDNA 溶液。

第七項 PCR 增強放大

有關於聚合？連鎖反應，在整個實驗當中，總共必須進行了兩次循環。分為 primary PCR 和 secondary PCR，第一次 PCR 先將產物複製出來，增加其專一性，第二次 PCR 再進一步地抑制背景值而且再一次地增強產物。我們在每一次雜合作用以後都進行一次 PCR 的反應。而初次的 PCR 是用來篩選並增強那些含有差異表現的基因序列，只有那些兩端具有不同接合器的雙股 cDNA，才可以經由 PCR 指數性的放大而被篩選出來。而整個 PCR 的作用是使用一個熱循環器 (Thermal cycler(Perkin Elmer 480)。設定如下：75 作用 7 分鐘(使 primer 可以接上 adaptor)，然後依照以下的設定做 30 個循環，包括 94 反應 30 秒，68 反應 30 秒以及 72 反應 1 分半鐘。最後再以 72 5 分鐘最終延長。然後置於 -20 保存。

第八項 生物晶片雜合染色(Microarray hybridization)

所謂生物晶片是一個嶄新發展出來的技術，它允許我們在同一次的檢測當中，利用精密的機器操作以及結合電腦強大的運算能力，可以同時在 2 英吋見方的範圍大小，同時解讀超過 10,000 個基因的表現情形，是解讀未知基因的一個強大工具。藉由這樣的過程，我們甚至可以免除轉殖、選株、聚合酶連鎖反應放大，還有墨點試驗的種種過程。不僅可以節省人力時間成本而且可以快速簡便提早獲得實驗的結果。

在實驗中，我們先使用前面步驟所描述的細節，來製備病人腫瘤組織以及正常肺組織的抑制性扣減後 cDNA 基因庫溶液，就可以用來與鑲嵌在生物晶片上的 cDNA 作雜合反應。而由於雜合後的染色反應，在透過電腦強大的辨識力以及運算能力處理後，可以快速有效的獲得全部差異表現基因的資訊。結果可以是生物晶片規則排列的呈色圖譜、可以是基因分佈的座標圖、也可以是已知基因序列的豐富資訊，提供全面的差異表現基因的大概。而如果比對後仍沒有特定已知基因的序列，則可能是一個嶄新的基因表現 (Novel gene)，適合經過轉殖、複製、定序、墨點試驗或是製作抗體進行原位染色來確認。相信那將會是更令吾人感興趣而有意義的發現，或許會有意想不到收穫。

第九項 以 RT-PCR 確認並偵測表現程度

最後我們為了進一步確定所偵測挑選出來的差異表現的基因來自於測試者製備溶液，在經過核酸限制酶的切割，扣減雜交的增強，以及聚合酶連鎖反應放大以後是不是會有基因片段的遺失或是偽陽性的產生。於是我們依所選定的 3 個特定基因 Tankyrase-1、Met 和 Decorin 的核酸序列，分別設計 5' 端以及 3' 端的 Primer，將它應用在 11 個非小細胞肺癌病人的組織製備萃取液裏，用來進一步確定，並且做半定量 (semi-quantitative) 的偵測，以確定該基因在組織當中的差異表現情形。

第十項 以 Met 基因的抗體行螢光原位雜交免疫組織染色

最後，回到臨床病理機轉的探討上，我們選用 Met 基因的抗體在 43 個非小細胞肺癌的組織中進行螢光原位雜交免疫組織染色 (FISH)。這時候，正常肺組織的螢光染色結果被當成陰性對照組 (negative control)。而反應結果的玻片 (slide) 則分別由兩位不知道有關組織臨床病理資料的情形下的不同觀察者獨立判斷。通常以超過百分之十以上的腫瘤細胞被染色為陽性，反之則為陰性。最後，將以上肺癌病人腫瘤組織的螢光原位雜交免疫組織染色結果與一些臨床病理的變數作卡方檢定 (χ^2 test) 的統計分析研究。

第五章 研究結果

第一節 抑制性扣減雜交的效力

第一項 扣減雜交的增強作用

如圖七所示，我們分別將扣減雜交反應之前 之後使用 PCR 複製放大溶液中的核酸片段，發現在扣減雜交作用後，無論是向前扣減 (forward subtraction) 抑或是向後扣減 (backward subtraction) 都呈現出特定序列的專一性放大效果，而明亮的條紋則隨扣減雜交後明顯變少，此即是 SH 的增強以及降低背景干擾的作用。

第二項 PCR 複製放大所需的循環次數測試

如圖八所示，在實驗操作中最後的 PCR 複製放大作用，讓我們可以將特定的差異表現基因突顯出來，同時抑制其他沒有接合器附著的非特定核酸片段 (PCR suppression)。然而跑 PCR 的過程到底需要多少次循環才適當，則需要進一步作滴定。一般大概要三十次左右，才可以達到特定放大又能避免其他雜值的干擾。本實驗測試結果如圖八，在 29 次時即達明顯之效果，但超過 35 次以上便又開始出現背景干擾。

第二節 肺癌組織中的差異表現基因分佈

如圖十、十一所示，我們分別將含有腫瘤組織萃取製備的測試者溶液和含有正常組織的驅趕者溶液作扣減雜交稱為 forward subtraction，相反的若是將前兩者的角色對調，以正常組織來扣減腫

瘤組織的話便是 backward subtraction。如此可分別篩選出腫瘤或是正常組織中的差異表現基因，也可以作為一種自我檢測目的，減少偽陽性產生的機會。本實驗依前述分別進行扣減雜交後，使用生物晶片作快速之基因篩檢動作，得出如圖十之生物晶片經過雜交染色後之呈像情形；以及如圖十一之扣減後基因分佈的座標圖。大抵上，在腫瘤組織中過度差異表現的基因，可能與疾病的生成有關，類似致癌基因；而相對的在正常組織中高度表現的基因，就可能與抵抗疾病有關，類似一般所謂的腫瘤抑制基因。

第三節 抑制性扣減雜交後的肺癌特定基因

如圖九所示，本實驗結合抑制性扣減雜交反應和生物晶片雜交染色技術，可以在 5 位非小細胞肺癌的組織切片萃取製備溶液中，發現至少三個具有臨床意義的差異表現基因。他們分別是在腫瘤組織裡頭過度表現的 Tankyrase-1 和 Met 基因；以及在正常組織表現較為明顯的 Decorin。

第一項 Tankyrase-1

Tankyrase-1 指的是 TRF1-interacting ANKYrin-related ADP-ribose polymerase 是位於端粒 (Telomere) 附近的特殊蛋白質 (圖十三)。近來被發現廣泛存在於人類的惡性腫瘤組織當中，它可以促進端粒酶 (telomerase) 的作用來延長端粒的長度，使得腫瘤細胞不會受限於細胞分裂時鐘 (Mitotic clock) 的限制，可以繼續存活下來。而其

作用的機轉是藉由與端粒酶抑制因子 TRF1 的結合來協同端粒酶的作用，結果可以正向控制延長端粒的長度（43）。

Tankyrase-1，原意就是 TRF1 的結合蛋白質，擁有 24 個重複序列的 ankyrin(ANK)，可以調節蛋白質與蛋白質之間的交互作用的特殊構造。Tankyrase-1 就是用中間這些重複序列的 Ankyrin 來結合 TRF1（44）。總結來說，Tankyrase 可以促進 TRF1 從端粒結合的 DNA 上掉落下來，然而端粒的延長則需要 Tankyrase-1 尾部 PARP 功能區域的催化反應。但是這樣的反應如果在於沒有端粒酶活性的細胞當中也不會發生。由此看來，TRF1，Tankyrase-1，以及端粒酶三者共同存在交互作用，缺一不可。可以廣泛的在人類的各種組織細胞裏頭找到它的存在（45）。

近年來發現在大約 85% 的全部人類腫瘤和腫瘤衍生而來的細胞株中，發現含有端粒酶活性。然而相反地在很多的正常體細胞(somatic cell)中，並沒有端粒酶活性的存在。因此，根據近年來研究的成果顯示端粒酶極可能在哺乳動物細胞的腫瘤形成(tumorigenesis)及癌化(carcinogenesis)過程和細胞老化的進行過程(aging)，扮演了一個很重要的角色，希望能夠更進一步地去研究端粒酶基因的調控機制，透過抑制端粒酶的表現或活性，而發展出有效的抗癌療法（46）。

第二項 Met(HGF receptor)

Met 是一種鑲嵌在細胞膜的氨基酸磷酸酶(Tyrosine Kinase)的接

受體，鍵結物就是 HGF (47)，它可以刺激 Met 接受體而導致一連串的增殖、延長細胞的生命、改變細胞的活動力、它被認為可以刺激腫瘤的生成以及局部侵犯的生長移動等等，我們可以在很多實質的腫瘤發現它有過度活化表現的跡象，是一種原生性致癌因子 (48)。一般來講我們可以在正常肺臟以及肺癌細胞當中找到它的存在；而 HGF 絕大部分是在非小細胞肺癌裏頭表現，如此的結果顯示出對於非小細胞肺癌來說，它扮演著一種自體內分泌回饋機制的循環刺激 (49)。而臨床上高濃度的 HGF 通常伴隨著比較差的預後，對於可以切除的非小細胞肺癌來說，它事實上代表著一種比較惡性的預後，包含惡性腫瘤的局部侵犯和遠處轉移的能力兩部分 (50)。

第三項 Decorin

Decorin 是在 1986 年由 Krusius 和他的同伴所發現的 (圖十六)，是一種富含白胺酸 (Leucine) 的醣蛋白 (proteoglycan) 原生型，它位於細胞膜表面的基質當中，承接一些外來的訊息傳導因子，調整或啟動無數重要的生物活性，在腫瘤細胞的生長、轉移、侵犯上有著及其重要的角色 (51)，可以藉由和上皮生長因子的接受體 (EGF receptor) 結合產生交互作用而激發出一個訊息路徑，導致生長的遲滯 (52)。另外如影響細胞外基質的整合或是結合膜上的胺基酸的磷酸酶來參與細胞一些關鍵的生理步驟 (53)。我們也可以把 Decorin 想像是一種可以引起特殊訊息傳遞系統的一種對抗致癌因子的蛋白質、允許整個系統

反應來讓細胞可以清楚知覺到在細胞膜外微細環境中的變化同時可以對於這些刺激作出反應（圖十七）。而細胞外基質裏頭的醣蛋白即扮演這種角色，他們不只可以調控生長因子的活性同時另外也提供一種生理以及生物活性的自然障礙來將惡性腫瘤細胞摒除在外（54）。因此，腫瘤細胞侵犯的組織附近，通常可以發現有 Decorin 的表現增加的情形，我們認為這個即是 Decorin 因應外在環境的調整，增加它的表現以用來對抗腫瘤細胞的一個現象（55）。也就是說，它扮演著一種類似自體分泌系統的調節機制來抑制生長。Decorin 可以經由直接刺激 p21 來影響以及改變整個細胞生命週期。p 21 是一種強力的 CDK 抑制劑（56）。已經有實驗證實，假若我們將基因中的 Decorin 基因去除同時加上腫瘤抑制因子 P53 的去除，則我們發現將會加速腫瘤的生成（57）。

第四節 Met 基因的螢光原位雜交免疫組織染色

我們運用 Met 基因的抗體在 43 位非小細胞肺癌進行的螢光原位雜交免疫組織染色結果如圖十二所示。另外再將組織螢光染色的結果與一些臨床病理的變數，包括性別、年齡、抽煙與否、組織學差異、分化情形、有無復發或轉移等，列表並作卡方檢定（ χ^2 test）的統計分析如表四。

結果我們發現以螢光原位雜交免疫組織染色方法偵測 Met 基因在非小細胞肺癌細胞的分佈情形，其過度表現的陽性比率大約在 84%

(37/43) 左右。而其結果與一些選定的臨床病理變數之間，在本研究中則似乎沒有明顯的相對關係 ($p = 0.05$)。如表四所列，在所有臨床病理因子的卡方檢定下，僅有組織學 (Histology) 的不同，即病人之肺癌究竟為肺腺癌或是鱗狀上皮癌的這個變數，可能會對於 Met 基因在肺癌中的表現程度有所影響 ($p = 0.20$)，其餘之變數則都不具有統計上有意義之差異。這一點跟許多已經發表的有關 Met 基因對於惡性腫瘤的影響方面，主要在惡性程度 (high grade of malignancy) 以及容易轉移 (metastasis) 兩方面有所不同。

第六章 討論

第一節 特定差異表現基因討論

第一項 Tankyrase-1

由於 Tankyrase-1 事實上乃是端粒長度的正向控制因子，可以經由結合 TRF1 來促使端粒？作用在染色體尾端，增加端粒長度而使細胞可以無限分裂生殖，不受分裂時鐘的端粒長度衰減所限制。對於人類惡性腫瘤來說是一個致癌因子，可以廣泛存在於人類的惡性腫瘤組織當中。因此要討論 Tankyrase-1 就不得不從端粒以及端粒？說起。

第一點 端粒 (Telomere)

Telomere 是於 1938 年時，首先由 Hermann J. Muller 提出假說，他舉果蠅為例，認為染色體的穩定需要一個特別的末端結構，他稱此結構為 Telomere。1972 年 Watson 發現傳統的 DNA polymerase complex 無法將線性 DNA 的末端複製完全，換句話說新合成的 5' 端的 DNA 將較原來的短，他稱此為 DNA 末端複製問題 (end-replication problem) (58) (圖十四)。到了西元 1973 年，Olovnikov 提出假設，認為細胞分裂的終止是因為染色體終端基因的持續性耗損而停止。這是因為在雙股染色體合成時，聚合？ (polymerase) 只能夠由 5' 端到 3' 端單一個方向來合成新的染色體，所以在模組這一端需要有一段較為短小的 RNA 做 primer 以便啟動反方向 DNA 的合成，所以如圖十四所示，模組端在反向合成到終點的時候將會有一小段不完整的序列掉落 (59)。而

這樣的情形將會導致染色體在複製子代染色體時，隨著複製的次數使得反向染色體末端逐漸短小的情形。到了 1978 年，Blackburn 報告一個在纖毛蟲 (Tetrahymena) 所發現的端粒 DNA 序列以後，我們對於端粒的結構才逐漸的了解 (60)。而人類端粒的重複序列直到 1988 年由 Moyzis 等人發現，端粒事實上是藉由在單股染色體上重複排列的 TTAGGG 所構成，大小從 50 到 150 個核酸的序列 (61)。而幾乎可以確認在每一次複製後都會短少 25 到 200bp 左右 (62)。從此以後，因為染色體端粒的持續性減少就被當成是一種所謂的細胞分裂的時鐘 (Mitotic clock) (63)。

在端粒的結構上除了剛剛所提到的有規則重複排列的核酸序列以外，另外有一些與 DNA 結合的蛋白質 (binding protein) 用來穩定單股或雙股染色體終端，它們以非共價鍵結 (non-covalent binding) 的方式，形成如圖十三右上角所謂的 T-loop 以及 D-loop 用來穩定端粒的構造。所謂的 TRF1 以及 TRF2 (telomeric repeat binding factor)，指的是端粒重複序列結合分子，它的基因類似 Myb 蛋白質，功能就像是一個端粒的抑制因子 (repressor)。TRF2 它在分子生物的作用上也是類似 Myb 蛋白質，可以防止染色體的融合，同時維持單股染色體的 G 尾部構造 (64)。在進一步的研究當中顯示，TRF1 的功能可以被所謂的 Tankyrase-1 所抑制，而且將其解離開來，因此 Tankyrase-1 的作用可以讓端粒附近的 DNA 與端粒酶相結合而達成延長端粒的作用 (65)。所以總結來說，TRF1 以及 TRF2 兩者一方面扮演著穩定端粒的構造，同時

分別可以形成所謂的 D-loop 以及 T-loop。如此一來，一些不經意的 DNA 傷害就看可以被避免掉。

第二點 端粒？（Telomerase）

如前所述，Tankyrase-1 將 TRF1 從與端粒結合的狀態分離，就是要讓 Telomerase 可以作用在染色體末端，來延長端粒的長度。就我們所知，在正常的細胞分裂時期，如果沒有端粒酶活性介入的話，則在 3' 端的染色體端粒將會因為半保存 (semi-conservative) 複製的關係形成持續的縮短（圖十四）。而這種持續的縮短一般被認為是一種內在的細胞時鐘 (cellular clock) 機制所控制，它可以引導細胞走向衰老也就是正常細胞的老化 (Senescence) (63)。但相反的，我們發現胚胎細胞，大部分的幹細胞 (stem cell)，以及絕大部分的惡性細胞他們卻都擁有一種稱為端粒酶的活性酵素，可以用來代償一般端粒因為持續細胞分裂而造成的短缺問題。如此一來，就可以讓細胞避免走向死亡而造成永生-Immortality。

整個端粒酶的複合體 (holoenzyme) 是一個構造特別的染色體末端的反向轉錄酶（圖十三）。由三個部分所組成，它有一個 RNA 做成的模版 (hTR)，以及 TP1 和 hTERT 所結合而成。比較特別的是，hTERT 這個具有活性部分的蛋白質，已被証實具有調控端粒酶的作用，而它也被認為是可以用來評估肺癌在臨床上的惡性度的一個指標 (66)。而高活性的端粒酶同時也關係著細胞持續增殖分裂的能力以及臨床上惡性度較高的病理分期等等。hTERT 擁有一個特別的反轉錄酶，一般相信

這是端粒酶活性的一個速率決定步驟，非常重要。

我們在一個日本人對於非小細胞肺癌的端粒酶活性研究當中發現，作者以 PCR 測量 TRAP 的方法來表示 telomerase 的活性度，得到以下的結果：他發現在所有的非小細胞肺癌組織當中，大約有 82.5% 的組織可以測出端粒酶的活性，而在惡性度越高的肺癌組織當中所測得的陽性率越高。因此他獲得這樣的一個結論：假定病人的肺癌組織裏頭，端粒酶的活性是陰性的話，那病人將會有一個比較好的預後。他認為端粒酶的活性可以被用來當成是非小細胞肺癌的一個有用的預後指標，可以找出潛在惡性度比較高的病人在手術後儘早給於追加化學治療（67）。

由於端粒酶的活性，可以廣泛的在各種惡性腫瘤細胞株當中被偵測出來，所以我們就利用端粒酶的這個特性想辦法來抑制它。讓端粒可以經由正常的分裂來縮短，最後能夠導致細胞走向衰老或靜止。由於在正常的組織當中，端粒酶的活性幾乎不到百分之 0.5，也就是說，如此的藥物抑制對於正常的細胞，它的副作用非常的小，非常適合做為抑制腫瘤生長的藥物治療標的（68）。

第三點 Tankyrase-1

人類端粒的功能需要 TRF1 以及 TRF2 來協助完成。兩者的分別，在於它們的終端氨基酸序列，TRF1 是酸性的；而 TRF2 則是為鹼性的。TRF2 可以保護染色體的終端防止它的融合；而 TRF1 的功能在於調控端粒的

長度。我們可以從具有端粒酶活性的細胞株當中發現，TRF1 的過度表現可以促使端粒的長度縮短，而當我們抑制 TRF1 的表現時，便可以加長端粒的長度 (69)。Tankyrase-1，指的是 TRF1 的結合蛋白質，它擁有 1327 個氨基酸序列，分子量大概是 142 kDa。在它中間的範圍裏擁有 24 個重複序列的 ankyrin(ANK)、是一種由 33 的胺基酸功能序列所組合成，可以調節蛋白質間的交互作用的特殊構造。Tankyrase-1 就是用中間這些重複序列的 Ankyrin 來結合 TRF1。所以，總結來說，Tankyrase-1 可以促進 TRF1 從端粒結合的 DNA 上脫離，然而端粒的延長則需要尾端 PARP 功能區域的催化反應和端粒酶的活性。由此看來，TRF1，Tankyrase，以及端粒酶三者必須共同存在，缺一不可。

種種的實驗可以顯示出，Tankyrase-1 大概可以被當為是一種有關於端粒長度的正向調控，我們在長期有 Tankyrase-1 過度表現，以及端粒酶是陽性反應的人類細胞當中發現，端粒的長度會有逐漸而持續性的延長作用 (43)。另外，位於 Tankyrase-1 末端的 PARP 它的功能，現在被認為可能在 DNA 受到傷害的時候，所產生的一種適當的保護作用。

第二項 Met(HGF receptor)

HGF 乃是屬於細胞膜蛋白質磷酸酶 (Tyrosine Kinase) 的一種，通常可以促進上皮細胞增殖增生，移動，以及從事一連串複雜的分化過程。HGF 原先被認為可能是一種特別的細胞素(cytokine)，可以促進上皮細胞的生長以及移動。第一次被發現是 1984 年在老鼠(rat)切除

下來的肝臟裏面，所發現的具有促進細胞分裂能力的一種潛在因素，所以被命名為肝生長因子（70）。後來在其他許多的實驗當中，發現它也可以在老鼠的血小板，人類的血清當中被發現。而因為 HGF 擁有潛在的能力可以促進細胞分裂（Mitogenesis），細胞成形（Morphogenesis）以及血管生成（Angiogenesis）等等，所以一直以來被認為是理想的參與細胞發展甚至惡性腫瘤生成的過程當中的一種具有決定性的因子（71）。而在胚胎時期的肺臟成熟過程當中，HGF 也扮演著一種肺臟器官成形（Pulmotrophic）的因子（72）。一般在成熟的肺臟當中所謂 HGF 的濃度是維持在一個低的水平。然而若是肺臟本身或是遠處受到傷害便會形成一個反應性的促進分泌，所以它在人體內扮演著類似一種自體內分泌腺體的一種調節效果（73）。

在結構上來說（圖十七），Met 是由雙硫鍵(disulfide)所鍵結而成的經細胞膜（Transmembranous）Tyrosine Kinase 接受器，經由蛋白質水解作用（proteolytic cleavage）後，將單鏈的前驅蛋白質分裂為 以及 兩個次單位， 的分子量大概在 190 kDa 左右（74）。而在 subunit 這部分分子量為 145 kDa，它負責嵌入細胞膜，以雙硫鍵結一個突出細胞外的 次單位，同時擁有細胞膜上的磷酸化活性。而這個接受體的鍵結物(ligand)就是所謂肝細胞生長因子。HGF 可以刺激 Met 接受體而導致一連串的增殖、延長細胞的生命、改變細胞的活動力、增加細胞對於細胞外基質的侵犯能力等等。另外也可以經由改變多種細胞骨架（cytoskeleton）的相關分子如 ezrin, paxillin focal

adhesion kinase 和 β -catenin 以及細胞表面的黏合分子如 integrins 進而改變細胞表面也就是細胞外基質的蛋白質表現 (75)。而 Met 的過度活化表現以及被活化前成熟的步驟，現在被認為可能是導致惡性腫瘤生成的一種過程。當然它的活化、成熟是需要多步驟的。而這個接受體可以經由自體的磷酸化 (autophosphorylation) 過程來活化，同時也可以激化其他幾個訊息傳遞的中間物質 (intermediates) 譬如說 Grb2, PI3k 的 p85 次單位, Stat-3, 以及 Gab1 (76)。Met 在接受 HGF 的刺激活化的時候, 它的生理表現像是一種旁腺體 (paracrine) 的自體內分泌腺的刺激方式。在非小細胞肺癌當中我們可以看到 Met 的表現以及被 HGF 刺激、活化所造成細胞的生長, 分散 (scattering) 和局部侵犯的情形。所以 HGF 和 Met 的過度表現通常代表臨床上惡性度較高的 NSCLC, 可以作為評估腫瘤惡性度的一個指標 (77)。

第三項 Decorin

Decorin (圖十五) 是一種小分子的細胞膜醣蛋白 (proteoglycans), 人類的 Decorin 總共包含有 359 個氨基酸序列, 可以大概被分為 4 個功能部份。它存在於正常的細胞外基質 (Extracellular matrix) 當中, 而且由於它可以跟一般的膠原 (collagen) 的第一、二及四型結合, 促進纖維的形成, 增加穩定度並且改變溶解度, 通常可參與組織骨架的固定作用 (78)。它一般被認為是微小富含白胺酸醣蛋白家族 (small leucine-rich proteoglycans family) (SLRP) 裏面的一種原生型 (prototype) 成員, 分子由 10 到 12

個前後排列串連而成的白胺酸所構成。他的蛋白核心則結成一種類似弓形(arch)的結構(圖十七),使它能夠跟許多細胞外基質的蛋白質交互作用如 fibronectin 和 thrombospondin,而生長因子和它的接受體以及 TGF- β 也包括在內(圖十六)(79)。

Decorin 如何降低 EGFR 的活性,可以分成幾點來說,一、Decorin 可以直接結合 EGFR 降低它的活性;二、Decorin 可以改變細胞膜外面的醣蛋白質,而將 EGFR 結合住;三、Decorin 可以藉由 TGF- β 的鍵結來影響,甚至掩蓋細胞對於 EGF 的需求;四、Decorin 可以藉由 ErbB 這個因子來降低 EGF 對於細胞的作用。

由於 Decorin 具有抑制 EGFR 的效果,所以近幾年來,已有許多的實驗被提出,包括基因轉殖,或利用腺病毒來帶領基因植入人類腫瘤細胞的細胞株,來研究其抑制腫瘤的效果(80)。而在一個對於人類大腸癌基因轉殖的實驗當中,證實 Decorin 的植入的確有很明顯的抑制腫瘤生長的效果。實驗當中我們可以發現,在植入基因株當中,有一些腫瘤外型上的改變,這些改變包括腫瘤的週邊變得較為尖銳,它的局部侵犯性變得較為減少,同時它的血管生成變少,而且發現有一些細胞出現比較良好的分化現象(81)。

因此 Decorin 可藉由與 EGFR 結合以後持續性的抑制由 EGFR 所產生的一些訊息路徑的傳導。一般認為同時也會經由抑制 ErbB2 以及 TGF- β 的效應,以致 Decorin 有非常明顯的腫瘤抑制效果。然而若要作為一個有效的腫瘤抑制劑,在臨床治療上仍然有一些優缺點要考量。包

括它是一個自然的產物所以對於人體沒有毒性也不會有一些免疫排斥的作用；再者它的溶解性效果不錯，使得它可以深入組織當中，作為一種自體內分泌腺體的效果；最後它對於許多的腫瘤細胞不管在實驗當中或在動物的模型當中，都有它一定的抑制效果。而在缺點方面由於 Decorin 本身是一個廣泛存在細胞膜外基質的醣蛋白分子，所以它可以跟很多的細胞膜表面的接受器相結合。所以如何有效的將 Decorin 送到意欲作用的細胞位置，增加其有效度，而不讓它在路徑當中稀釋或被結合衰減便是一個課題（81）。

另外 Decorin 藉由結合住 TGF- β 的接受器複合體來干擾其訊息傳導，或是免疫抑制的活性（82）。我們也在實驗中發現，Decorin 可以回復因為感染結核桿菌所造成的 T 淋巴球免疫功能失效的情形。Decorin 也可以經由競爭性的抑制細胞與 thrombospondin-1 的附著來阻止腫瘤細胞的轉移 (metastasis) 活性，而這樣的局部侵犯機轉對於乳房腫來說是明顯而可以觀察得到的（83）。又因為 TGF- β 可以和 Thrombospondin-1 形成一個複合體，加速轉移的形成，所以藉著 Decorin 可以降低 TGF- β 的活性；同樣也可以降低腫瘤細胞轉移的發生（84）。在另一方面，腫瘤細胞造成的 TGF- β 的過度表現，可以造成化學治療藥劑的抗藥性。由於 Decorin 可以阻止 TGF- β 的活性，所以在實驗動物的模型當中已經顯示，加入 Decorin 的細胞株可以增加其化學治療的敏感度，抑制腫瘤生長（85）。

而眾多的研究也顯示，當 Decorin 過度表現的時候，通常顯示附近

有腫瘤細胞的生長，同時對於腫瘤生長因子所激化的增殖產生抑制作用。Decorin 可以讓細胞的生命週期停留在 G1 這一期，而生長的壓抑則如前所述通常可以用 Decorin 的反向基因序列(anti-sense)結合使其失效而恢復生長。總之，它藉由以下幾個方式與機轉來控制細胞的生長：1、經由與 EGFR 的結合來中和 TGF β 的活性並且可以促進 P21 腫瘤抑制因子的表現；2、藉由與 Thrombospondin-1 的競爭性的結合，降低腫瘤的轉移活性或者是血管生成現象；3、經由腫瘤刺激而過度表現的 TGF- β 所造成的一些化學治療藥劑的抗藥性，可以經由 Decorin 的治療來克服。

第二節 抑制性扣減雜交方法的討論

第一項 影響結果的一些設計技巧

第一點 增進雜交速度

為了獲得比較理想的雜交結果，控制 tracer 跟 driver 之間的比例至少在 1 比 10 以上是必須的（圖二）。由於雜交動力方程式的關係，我們必須儘可能的使 driver 的量以及濃度盡可能的增大，使得它可以控制整個反應。而另外單股核酸序列相對地比雙股的核酸序列進行雜交的速度較快並且所需的時間較短。

第二點 增加扣減效率

為了增加扣減時的效率，解決方法之一是加入化學溶劑酚 (phenol)，增加核酸再結合的速率。而這樣增加雜交的速度，乃是因

為減小水溶液的含水量。另外也可以想辦法使含有 tester 的溶液中，大小不同的核酸片段能夠擁有類似的濃度，如常態化之步驟，可以促使一些稀有的序列被表現出來。

第三點 選擇特定限制？切成片段

Cohesive restriction sites 的操作方式，是只有允許 tester 和 tester 的雜交物可以被成功篩選出來。這是因為在 tester 作準備的時候，就先以特定的核酸限制？來作分解，以便產生出特定的黏合接口，準備後來的 Primer 接合之用。相反的，在 driver 的製備上，是以其他像超音波震盪的方法讓 driver 變成不規則的片段序列。因此在雜交後就只有被特定限制？分割的切口，可以使用 DNA 黏合酵素來連結，也只有如此可以經由特別的 Primer 被 PCR 複製放大，以即特殊選定之載體(vector)來成功的轉殖(cloning)。

第四點 選擇 PCR 時的 Primer

如同上一點所陳述，這個方法是指我們可以選擇性的使用聚合？連鎖反應，放大 tester 跟 tester 的雜交物。假定我們用特定限制？切出的核酸序列切口，只可以接上特別的 adaptor，而這個 adaptor 則設計成只可以接受特殊的 PCR Primer。如此一來，只有差異表現的 tester 的雜交物因為擁有兩端的接合器，所以可被 PCR 反應呈指數性的放大而主動選取出來。相對的，如果是 tester 跟 driver 的雜交物，則因為只擁有一邊的接合器，所以進行 PCR 後只能夠呈現線性的增

加。而同理可證，driver 跟 driver 的雜交產物，則因為沒有任何連接在上的 adaptor 的緣故，所以對於 PCR 過程沒有任何的反應。

我們若是以增強(enrichment)的比率，來定量分析一個扣減雜交或是主動選取的方法的效率的話，通常可以用南方墨點染色的方法，來計算特定核酸在扣減反應前後的量的比值變化；或是以單一探針來做雜交前後的評比。而實驗步驟到底可以增強反應到多少倍，則大部分取決於核酸序列的複雜性以及相同相異處。複雜性越低而相異性越少的兩個核酸序列，扣減雜交以後的增強效果越強。而一般保守的預估，通常第一和第二次的扣減雜交步驟，大概可以增強五十到一百倍左右。

第二項 SSH 方法的限制性

最原始的扣減雜交設計，乃是以 cDNA 的一股當成是標的物(target)，而以 mRNA 當成是驅趕者(driver)。同時以磷灰石來移除雜交後的雙股核酸序列。這個方法現在仍然有效，但是卻受限於要能夠取得足夠的原始組織及樣本量。如果實際取得樣本有困難的話，就必須有所調整。而如果來源樣本的組成較為複雜，我們可以多跑幾次扣減雜交來去除共同的複雜的序列。然而反覆的扣減操作，卻容易使得 target 的量變小，需要再一次的加強放大，使用 PCR 或使用 cDNA libraries。因為反覆的扣減程序，或是在 PCR 放大時的相對不均等放大，都會造成結果的誤差。

第三項 各種尋找差異表現基因方法的比較

根據估計，在一個高等生物體裡面，大約含有至少 100,000 個以上不同的基因組成。而當中僅有小部分，大約 15%，可以被實際的表現出來。因此如何選擇基因來表現以及何時來表現，將反應一個生物體發展以及分化，維持體內恆定(homeostasis)，反應外在傷害以及細胞調控，甚至步向衰老或是細胞凋亡(programmed cell death)等等過程的重要訊息。我們知道目前對於惡性腫瘤生成的理論，大概傾向於多發突變以及多步驟癌病化機轉影響所成，因此基因的差異表現就自然引起我們極大的興趣。所謂的差異表現可以是細胞與細胞之間的，可能是相同細胞的不同時期表現，像是正常細胞與癌症前期細胞之間的差異；也可以是細胞對於相同的外在傷害作出不一樣的表現，如化學治療、外科手術或是放射治療後的變化等等。如果我們對於細胞的基因表現有更深入的一層瞭解的話，不僅可以掌握細胞生成發展，腫瘤發生，以及細胞與細胞之間的相互影響。更可以發展出如何早期檢測細胞的異常發展，甚至可以控制生命的發展（17）。

打開分子生物發展的歷史發現，在 PCR 發明以前和以後在尋找兩個基因體之間差異表現基因方法是有很大大進步的。早在 1984 年 Lamar and Palmer（86）就在細胞雜誌上發表有關差異轉殖的學說。他們先運用限制酶將 DNA 切成特定片斷再用大量的 driver DNA 來混合，而經由染色體解離以及重新粘合（reanneal）的過程後，由於新的雙股的染色體的形成，如此一來，原則上只有被限制酶切過的 tester 雙股 DNA

才能夠順利的接受轉植，因此也才能夠得到我們想要的 target 基因片段。但是總括來說這樣的方法得到的結果是非常稀少微量，而沒有辦法做較進一步的處理或觀察的。而它轉殖放大的倍率大概就等於 driver DNA 基因與 tester DNA 之間的比例。當然這是在聚合？連鎖反應發明以前的時期，但基本上它已經具有所謂的異性轉植概念。

鑑別差異表現 (Differential display) 的方法，目標是找出實驗組與對照數細胞當中 mRNA 的差異表現。由於 mRNA 可以主導蛋白質的生成，從而調控細胞的一切生理活動。事實上，它便是一個細胞基因體的活性表現。實驗以反轉錄？將 mRNA 轉錄成 cDNA，使用 PCR 的技術，選用較短而且任意排列的 primer 放大成 cDNA 的基因庫。然後跑電泳以放射同位素成像的方法將差別表現的 cDNA 顯現出來。鑑別差異表現的特點在於：第一，用來觀察差異表現的片段，是直接代表基因活性的 mRNA，也就是主導生理反應的蛋白質表現。第二，由於 cDNA 可以被快速的定序、比對出可能的基因庫，有其使用上的價值。第三，每一個感光的片段都含有 cDNA，可以被直接用來作為轉殖(cloning)用的材料或者是作為北方墨點反應的探針用，有使用上的便利性。

雖然在尋找差異基因方面，傳統的扣減雜交 (SH) 方法已經成功的應用在很多實際的研究方面。但是因為傳統的扣減雜交實驗過程較為繁瑣，需要多次的雜交反應程序，同時對於組織來源較為稀少的生物體，操作起來也有其限制性。因此在 1995 年，就有 Siebert 提出結合 PCR 與 SH 一起運用，稱為 Suppression Subtraction Hybridization

(87)。這個方法是利用 cDNA 來做為扣減雜交標的，而以 PCR 來選擇性的放大差異表現的 cDNA 片段，而在實驗同時抑制其他的基因片段表現 (PCR suppression)。可以藉由 adaptor 的設計，或是基因片段尾端的設計來達成。所以 SSH 一方面不但克服了傳統 SH 需要一定數量以上組織來源的問題，同時由於在實驗過程當中有所謂常態化 (normalization) 的程序，藉由第二次的雜交，使得一些原本含量不均勻的差異表現基因，可以經由自體雜交讓差異基因的濃度可以常態化。因此到目前為止，SSH 已經成為現代分子生物學想要尋找差異基因表現時的一種不可或缺的生物技術 (38)。

晚近 cDNA 的微排列生物晶片，提供我們可以一次同時檢驗數千個基因的差異表現，然後透過電腦的強大掃描、運算能力，經由特殊 cDNA 雜交染色以後的呈色反應，解讀出溶液中所有基因的特性。當然這樣的方法看似非常強力有效但是也有它的侷限性。就是組織含量較多的基因或者是表現較為強烈的基因，將會主導整個結果，而掩蓋住其他含量較少或是表現較為低度的關鍵基因。因此，為了同時可以增加檢驗出表現過度或是表現較少的基因的存在，於是吾人便將扣減雜交反應以及生物晶片作一個結合，以彌補生物晶片的缺點，如同本實驗所設計的精神一般 (88)。

第四項 可以改進的空間

抑制性扣減雜交反應，當然也有它在設計上的潛在缺點。它們包括：一、我們以此法在比較兩個細胞、或是生物體之間的差異時，通

常需要數 mg 的 poly(A)⁺ RNA 來做為初始的工具。二、有時候由於組織來源的取得不易，需要將組織作前置放大的步驟，然而這樣的處置常常會造成許多有意義的基因掉落的情形，應該要儘量避免。三、在實驗的步驟當中，我們選擇特定的核酸限制？來將 cDNA 分解成片段，當然選擇哪一種限制酶，需要跟往後要接合的 primer 一併作考慮，而限制？將基因片段切成的大小，也關係著整個實驗的結果表現。一般來說比較大的基因片段會讓雜交的過程變得較為緩慢而複雜；但是比較小的基因片段，又擔心它無法代表整個基因的情形。



第七章 結論

綜合以上的論述，本實驗所使用的 SSH 不但具有 PCR 放大的效果、不需借助其他物理化學的方式來分離單雙股 cDNA，避免無謂的差異表現基因喪失；同時因其具有特定增強、常態化步驟以及 PCR 抑制的作用，在實際使用上也極為簡便，效果顯著因而運用日廣。若再配合生物晶片雜合染色的電腦分析技術，將構成一個尋找腫瘤組織差異表現基因的強大利器。而我們初步研究的結果也顯示，此法的確提供我們一個快速、強大而有效的尋找差異基因表現的工具。相信在研究肺癌癌病化、尋找有意義的致癌基因或是突變的腫瘤抑制基因的過程當中，這將是一個合適、有效的分子生物技術。