

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

052012

胃癌血紅的試驗

--利用巨量資料庫建立胃癌檢測基因組

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 林宸安 高二 陳頡霓	指導老師： 謝金山
-------------------------	--------------

關鍵詞：胃癌、癌症指標

摘要：

本實驗旨在尋找有潛力作為提高早期胃癌發現率的生物標誌物，得以應用在臨床上。首先，從 NCBI 下載資料，透過 R studio 分析胃癌細胞與癌細胞周邊非癌症細胞的基因表現量，篩選出胃癌細胞表現量與非癌症細胞表現量比值較高且其所製造的蛋白質為分泌型的基因，最終得出 10 個。

接著從 cBioPortal 網站下載基因的 mRNA 表現量與病患存活月數資料，分析病人存活率及無病存活率與基因表現量的關係，得出 FN1 及 CST1 的 P value 比其他基因來的低，且基因表現量與病人存活率呈現負相關。

後續進行細胞實驗，使用 qPCR，驗證 10 個基因在胃腺癌細胞(AGS)及侵襲能力較強的胃腺癌細胞(AGS-1)間表現量的差異，結果發現在 MUC13、MGP、PI3、SFRP4 及 CST1，在 AGS-1 的表現量較 AGS 高，尤其 MUC13、MGP 及 PI3 表現量差異特別顯著。

壹、研究動機

我們曾在生物課學到 DNA 經轉錄轉譯後可合成蛋白質分泌到血液裡，再上網查詢資料後發現，如今已有多種檢測癌症的方式，就血液檢測而言，已有 CA72-4 等生物標誌作為癌症指標，但靈敏度不夠高，難以發現早期的胃癌，因此我們決定研究提高早期胃癌發現率的檢測方法，希望找出增加胃癌發現率的胃癌標誌物。

貳、研究目的

- (一) 找出能夠製造出有潛力成為胃癌指標的蛋白質之基因
- (二) 尋找基因表現量與存活率之關係
- (三) 篩選出在較惡性的胃癌細胞裡表現量較高之基因

參、研究設備及器材

一、實驗器材

實驗儀器	用途
無塵抽氣操作台	避免細胞在進行實驗時被污染
CO ₂ 恆溫培養箱	培養細胞
微量離心機	降溫離心微量液體
超微量樣本分光光度計(NanoDrop 1000)	測量 RNA 濃度
電泳槽	進行凝膠電泳
影像分析儀 (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System)	凝膠照相
PCR machine	進行反轉錄 PCR 反應
Roche Lightcycler 480	進行即時聚合酶連鎖反應
電腦	分析數據
恆溫水浴槽	回溫藥品
恆溫乾浴器	將樣本加熱
顯微鏡	觀察細胞
-80°C 冰箱	保存樣本

▼ 無塵操作台



▼ CO₂恆溫培養箱



▼ 微量離心機



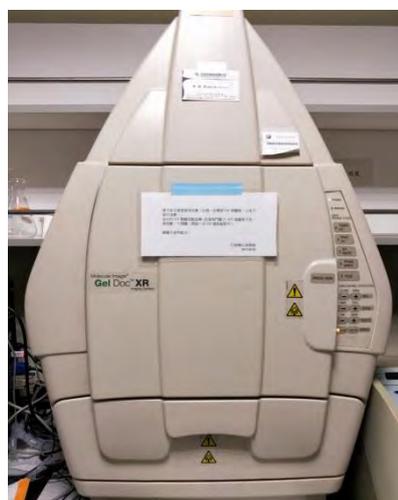
▼ 超微量樣本分光光度計



▼ 電泳槽



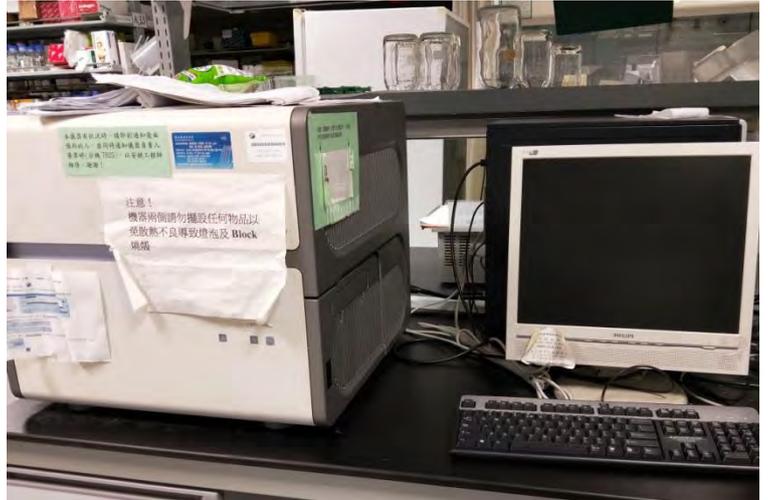
▼ 影像分析儀



▼ PCR machine



▼ Roche Lightcycler 480 及電腦



▼ 恆溫水浴槽



▼ 恆溫乾浴器



▼ 顯微鏡



▼ -80°C 冰箱



二、實驗用品

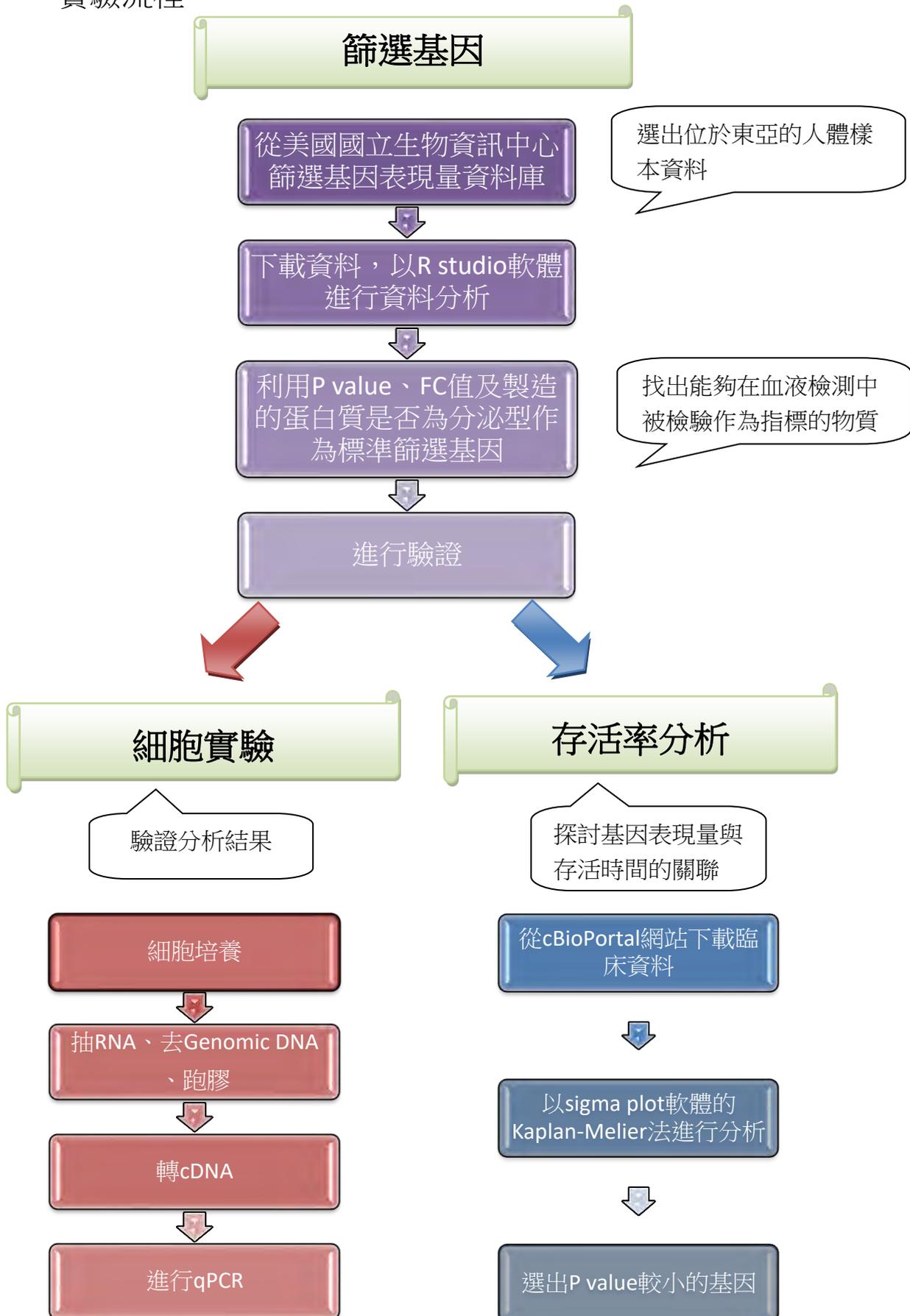
實驗用品	規格
微量離心管	1.5ml, 0.5ml
離心管	15ml
吸量管	5ml, 10ml
微量吸管	2 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l
細胞培養皿	直徑 10cm
微量多孔盤	384 孔
真空吸引器	吸廢液

三、實驗藥品

藥品	實驗
DMEM/F12	細胞培養
trypsin(胰蛋白酶)	細胞培養
PBS(磷酸鹽緩衝生理鹽水)	細胞培養、抽 RNA
isopropanol(異丙醇)	抽 RNA
chloroform(氯仿)	抽 RNA
TRIzol	抽 RNA
EtOH(酒精)	抽 RNA、去 genomic DNA
DEPC(焦碳酸二乙酯)	抽 RNA、去 genomic DNA
DNase I(去氧核糖核酸酶 I)	去 genomic DNA
DNaseI Reaction Buffer	去 genomic DNA
EDTA(乙二胺四乙酸)	去 genomic DNA
Sodium acetate(乙酸鈉)	去 genomic DNA
RNAase Out	反轉錄
Oligo Dt	反轉錄
DTT(二硫蘇糖醇)	反轉錄
M-MLV RT(反轉錄酶)	反轉錄
SYBR Green I	qPCR
DNA Gel Loading Dye (6X)	凝膠電泳
agarose powder(瓊脂粉末)	凝膠電泳
DNA Ladder RTU	凝膠電泳
RNA Ladder RTU	凝膠電泳

肆、研究過程及方法

一、實驗流程



二、實驗方法

(一) 資料分析—找出能製造出有潛力成為胃癌指標的蛋白質的基因

1. 尋找資料庫

從 NCBI(National Center for Biotechnology Information)中找尋與胃癌相關的資料庫，下載資料進行分析。

由於東亞國家的胃癌罹患率高，因此我們希望研究東亞胃癌病患的樣本，因而訂出了下列選擇資料庫的標準：

- (1)為人類樣本
- (2)除胃癌的樣本外亦有正常細胞的樣本可作為對照組，且樣本來自於同一病患
- (3)樣本來自於亞洲國家

2. 分析數據

使用 R studio 軟體統計及分析資料。將從 NCBI 下載的基因資料載入程式，將資料分類後，使用 Rank Prod 公式進行統整分析，得出各基因的 FC 值(fold change：胃癌細胞表現量/胃癌周邊非癌症細胞表現量)，及 P value<0.05 的基因(P value 值越小，資料可信度越高)，最後再將資料輸出。

3. 挑選基因

利用 Excel 整理分析統計完的資料，依據晶片編號作為排序標準，再從中篩選出適合的基因進行細胞實驗。

我們希望可以找出在不同期別皆有表現、隨著癌症的惡化，其表現量會有所變化，且越晚期表現量越顯著者為佳。此外，我們希望該基因所製造出來的蛋白質為分泌型，如此一來便能夠在血液中測得。

我們訂出了以下篩選標準：

- (1)五期裡(IB,IIA,IIB,III,IV)至少出現 4 期
- (2)至少有 3 個 FC 值大於 1.5
(癌細胞基因/胃癌周邊非癌症細胞基因表現量的數值)
- (3)表現量隨著癌症越晚期有增加的趨勢，或不同期別之間表現量差異不大但表現量高者
- (4)此基因所製造的蛋白質為分泌型蛋白質

(二) 分析臨床資料尋找基因表現量與存活率的關係

1.下載資料:

從 cBioPortal 網站找到胃癌相關研究的資料庫，下載各基因的存活率與與無病存活率的資料

2.利用 Excel 整理資料

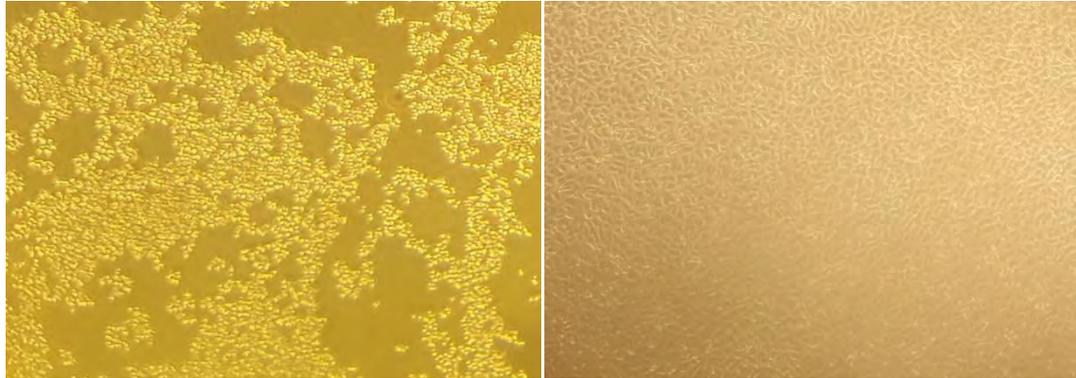
- (1)將存活月數為 0 的資料的 status 設為 0，其餘則設為 1(status 為 0 代表沒有病患的存活期資料)
- (2)除 status 為 0 的資料之 mRNA 表現量數據後，計算這筆資料裡所有病患的 mRNA 表現量平均
- (3)mRNA 表現量高於平均者歸類為 high，反之則為 low(包含 status 為 0 的數據)

3.使用 Sigma plot 12.5 軟體進行分析

- (1)將資料輸入 Sigma plot 12.5
- (2)使用 Kaplan-Meiler 法進行資料分析

(三) 篩選出在較惡性的胃癌細胞裡表現量較高的基因

1.細胞培養



AGS 細胞



AGS-1 細胞

將侵襲能力較低的胃癌細胞 AGS 及侵襲能力較高的胃癌細胞 AGS-1 培養於直徑 10cm 的培養皿，並使用 DMEM/F12 培養液。將細胞置於含 5%CO₂及飽和水蒸氣之 37°C 恆溫培養箱，每隔 3 天進行繼代培養。

2.抽 RNA



加入 TRIzol 的培養皿
(下方白色混濁液體代表已有細胞溶解)

待細胞長到八分滿時，取出培養皿，吸乾培養液，用 PBS 清洗後吸乾。在培養皿裡加入一毫升 TRIzol(使細胞裂解，但同時保有 RNA 的完整性)，將液體放入微量

離心管後加入 300 μ l 氯仿後搖到分層，在室溫下反應 5 分鐘之後以 12000g 4°C 離心 15 分鐘。此時管中分三層(上層是透明的水層、中間層、下方紅色的有機層。RNA 在水層，DNA 及蛋白質位於中間層與有機層)，取 400 μ l 上清液至新的微量離心管，加入 400 μ l 100%的異丙醇，混勻後在室溫下靜置 10 分鐘。接著以 12000g 4°C 離心 10 分鐘後，管底出現白色沉澱(RNA)，吸除上清液後，加入 1 μ l 75%乙醇清洗，以 12000rpm(13800g) 4°C 離心 5 分鐘，吸除上清液，待乙醇揮發後，加入 DEPC 水(DEPC-treated water)20-25 μ l (依沉澱量的不同而有所異)，並以 60°C 乾浴 15-20 分鐘，使白色沉澱溶於 DEPC 水。

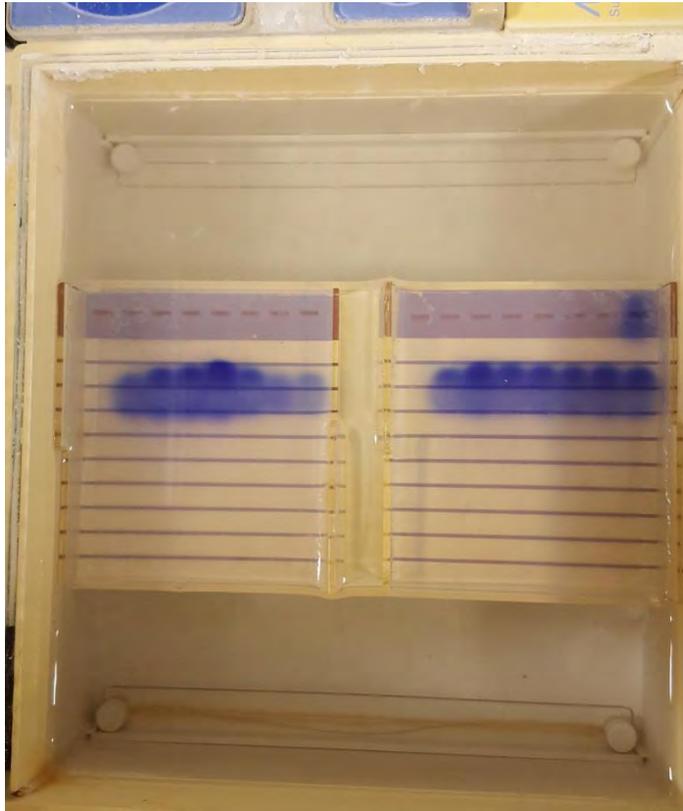
3.去 genomic DNA

為了避免有 DNA 殘留，抽完 RNA 後會去 genomic DNA 以提高 RNA 的純度。取 20 μ g RNA，加入去氧核糖核酸酶 I(DNase I)、10X DNaseI Reaction Buffer 再用 DEPC 水(DEPC-treated water)補到 50 μ l。以 37°C 乾浴 10 分鐘，使去氧核糖核酸酶將殘留的 DNA 降解，加入 0.5 M EDTA 1 μ l，以抑制核酸酶的作用，避免 RNA 被降解，接著以 75°C 乾浴 10 分鐘，再加入 3M 乙酸鈉 10 μ l 及 100% 乙醇 300 μ l。將溶液在-80°C 冰箱冰一小時使 RNA 慢慢沉澱後，以 13000 rpm(16200g) 4°C 離心 30 分鐘，並吸除上清液。沿管壁加 75% 乙醇 500 μ l 沖洗管壁，再以 13000 rpm(16200g) 4°C 離心 10 分鐘，將上述兩步驟再重複一次。加入 20 μ l DEPC 水將離心後沉澱在微量離心管底部的 RNA 回溶。

4.測 RNA 濃度

利用超微量樣本分光光度計(NanoDrop 1000)測 RNA 的濃度，程式為 NanoDrop 1000，清洗完儀器探測器後，每個樣本以 2 μ g RNA 測其濃度，若核酸與蛋白質量值的比值(260/280)，數值為 1.8-2.0 表示為 RNA。核酸與鹽離子量值的比值(260/230)數值為越靠近 2 表示其有機鹽離子濃度越低，有機鹽離子濃度越低越佳。

5.凝膠電泳



◀ 電泳槽跑膠

(1)樣本

AGS 及 AGS-1 的 RNA 各 $2\mu\text{g}$ ，分別放入微量離心管，加入總體積 $1/5$ 的 DNA Gel Loading Dye (6X)。

(2)電泳

使用 agarose powder 與 TBE buffer 配置的瓊脂凝膠，並加入 EtBr (嵌入核酸，照射紫外光時核酸有螢光反應)，待膠體凝固後加入樣本，樣本以電位差的原理從負極跑至正極。接著使用影像分析儀(Molecular Imager® Gel Doc™ XR System)照 UV 光及 Quantity One 軟體分析影像。

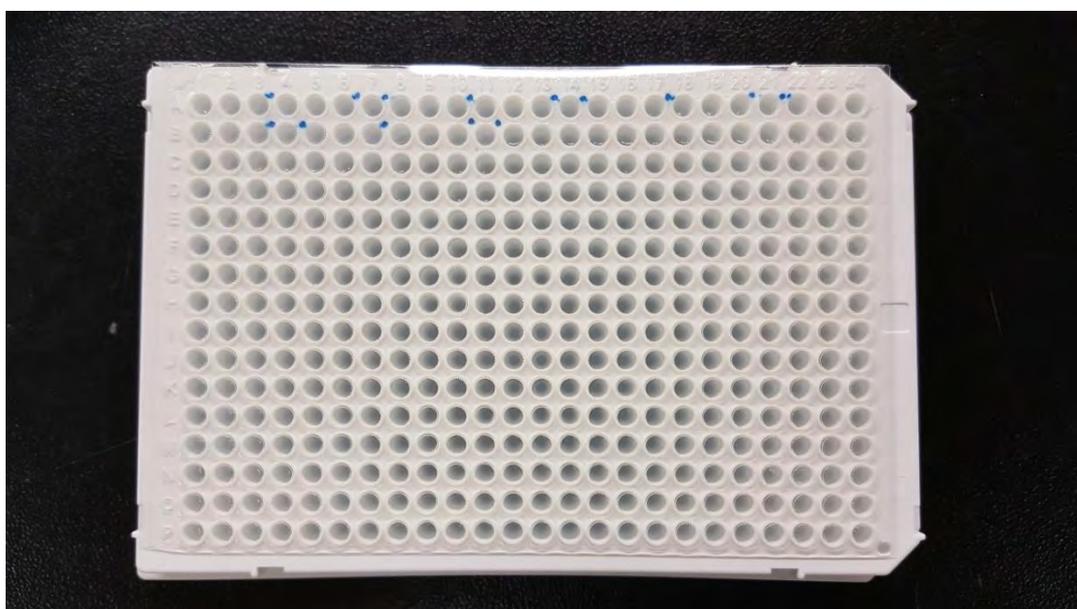
RNA：第一孔加入 $3\mu\text{l}$ 1Kb 的 RNA Ladder RTU 作為 marker，其他孔則加入與 $2\mu\text{g}$ RNA 與 dye 的混和液。

DNA：第一孔加入 $3\mu\text{l}$ 1Kb 的 DNA Ladder RTU 作為 marker，其他孔則加入與 $10\mu\text{l}$ DNA 與 dye 的混和液。

6.反轉錄

將 $1\ \mu\text{l}$ OligodT、 $1\ \mu\text{l}$ dNTP mix、RNA 2ug 加入微量離心管，以 DEPC 水將體積補到 $12\ \mu\text{l}$ 後混勻。使用 PCR machine 進行反轉錄，將機器設定在 65°C 並反應 5 分鐘，接著在冰上靜置一分鐘。加入 5X buffer $4\ \mu\text{l}$ 、DTT(Dithiothreitol) $2\ \mu\text{l}$ 及 RNase OUT $1\ \mu\text{l}$ ，以 37°C 反應 2 分鐘。加入反轉錄酶(MMLV) $1\ \mu\text{l}$ ，將機器設定成 37°C 50 分鐘接著 70°C 15 分鐘，最終得到 cDNA。

7.即時聚合酶連鎖反應(Q-PCR)



▲ 384 孔盤(已貼膠膜)

將 RNA 反轉錄得到 cDNA 後即可進行 Q-PCR 為了增加準確性，我們使用三重複的方式：我們所使用的是 384 孔微量多孔盤，而每個基因為一組，一組有 8 個孔，先在這 8 孔加入 SYBR Green $5\ \mu\text{l}$ 、該基因 forward 及 reverse 的 primer 各 $0.5\ \mu\text{l}$ ，接著在第一至三孔加入 AGS 的 cDNA $1\ \mu\text{l}$ 及滅菌水 $3\ \mu\text{l}$ ，第四至六孔加入 AGS-1 的 cDNA $1\ \mu\text{l}$ 及滅菌水 $3\ \mu\text{l}$ ，以比較基因在在不同侵襲能力的細胞裡表現量的差別。第七及第八孔為對照組，第七孔加入 RNA $1\ \mu\text{l}$ 及滅菌水 $3\ \mu\text{l}$ ，第八孔加入 $4\ \mu\text{l}$ 的滅菌水。除了我們所挑選的 10 個基因之外，會再做一組 Housekeeping gene,由於此基因不易受到外界環境的影響，因此可作為對照組，方

法同樣是三重複。而我們在實驗中所使用的 Housekeeping gene 是 β -Actin。
 SYBR Green 為螢光劑，會與雙股 DNA 結合，放出綠螢光，因此可透過測量螢光強度得知 DNA 含量。
 我們使用 Roche Lightcycler 480 機器與 Lightcycler 480 軟體測量螢光強度。

伍、成果與討論

(一) 資料分析—篩選出有潛力成為胃癌指標的蛋白質基因

1. 尋找資料庫

最終選定的資料庫為編號 GSE33429 的資料庫。

選擇此資料庫的原因如下：

- (1)符合首要篩選條件，為人類基因
- (2)除了胃癌樣本外，亦有來自同病患與胃癌相鄰的非胃癌組織可供比較
- (3)此資料庫的樣本來自中國上海，符合條件三

2. 基因挑選

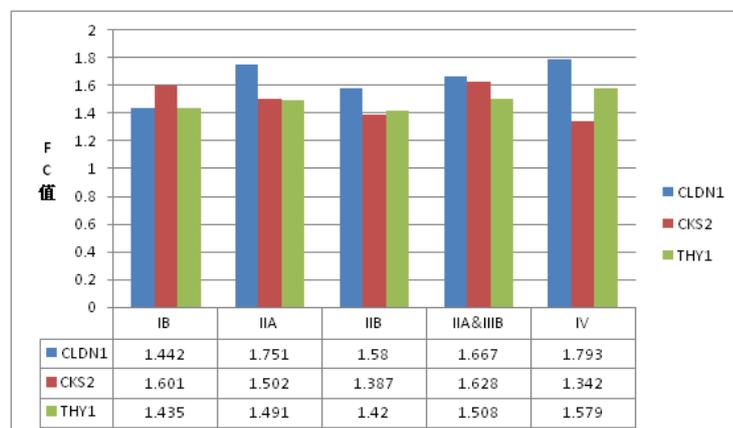
整理分析完畢的資料，並依據下列條件選出基因:

- (1)該基因至少出現於 4 個癌症期別(共五期)
- (2)至少有三期的 FC 值大於 1.5
 (FC 值:胃癌細胞與胃癌周邊非癌症細胞的基因表現量比值)
- (3)FC 值隨著癌症越晚期有增加的趨勢者或 FC 值極高者為佳

以下圖表(圖 A 至圖 F)為篩選結果：

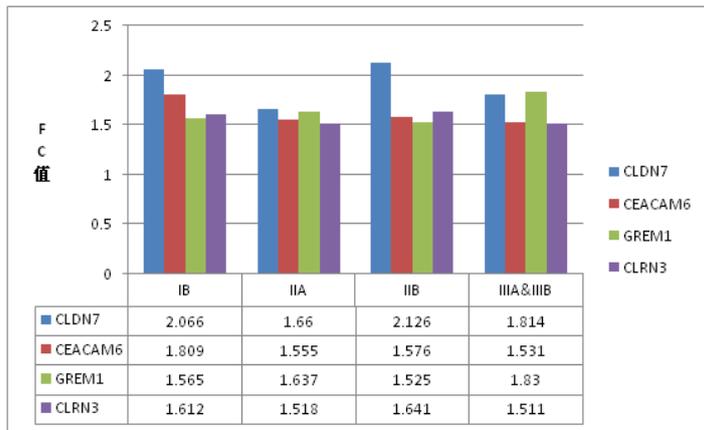
(1)出現五期的基因

(圖 A)

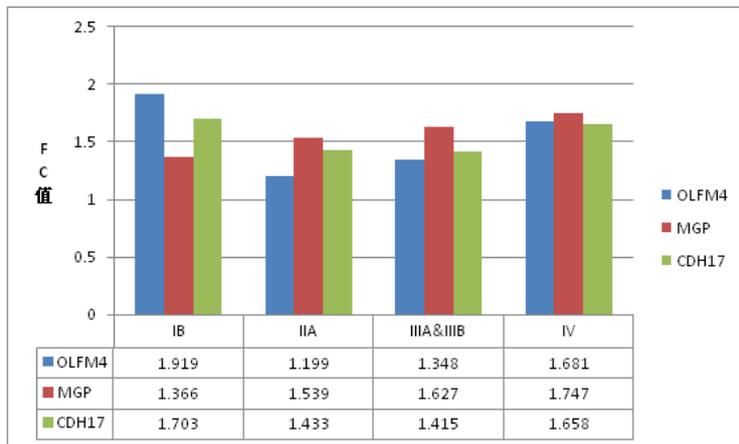


(1) 出現四期的基因

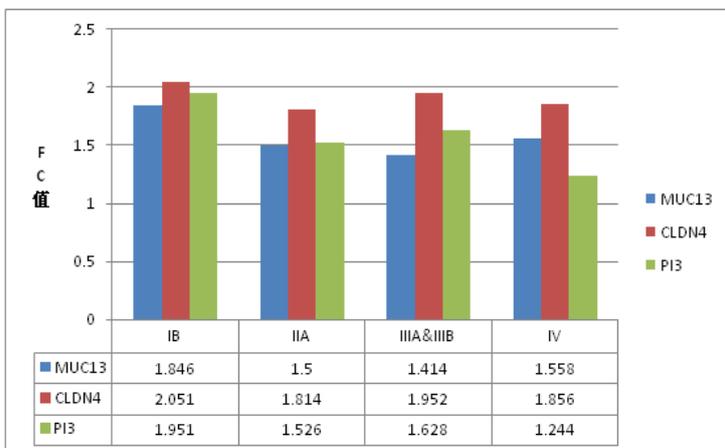
(圖 B)



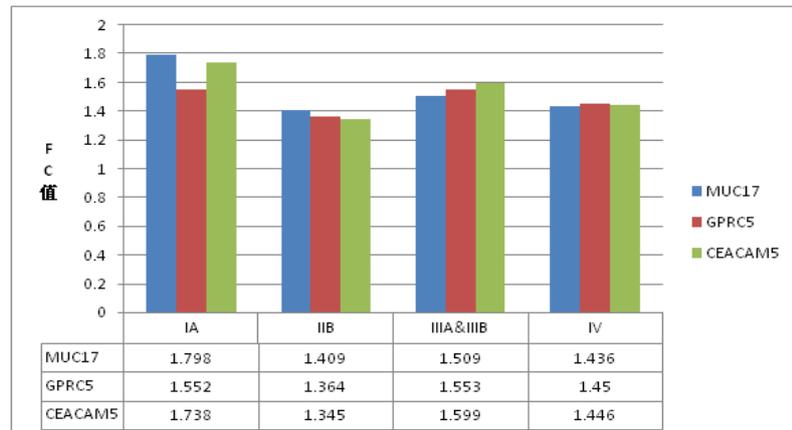
(圖 D)



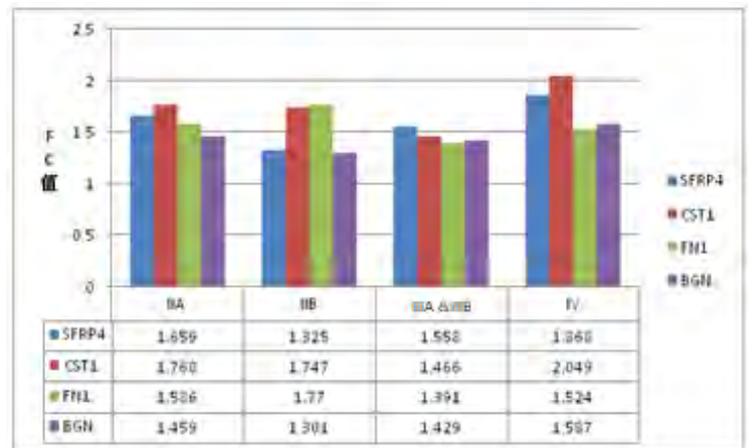
(圖 F)



(圖 C)



(圖 E)



*註:雖然 BGN 只有其中一個期別的 FC 值大於 1.5，但因為其表現量隨癌症越晚期而增加的趨勢明顯，且 BGN 在 IIA 以及 IIIA&IIB 的 FC 值與 1.5 相差不遠，因此仍列入候選基因

再從 UniProt 網站查出 P12 的圖表裡的基因所製造的蛋白質是否為分泌型
結果如下表：

基因名稱	蛋白質位置	分泌型
BGN	細胞外	v
CKS2	細胞核內、細胞質	
CDH17	細胞質膜	
CEACAM5	細胞質膜	
CEACAM6	細胞質膜	
GPRC5A	細胞質膜	
CLDN1	細胞質膜	
CLDN4	細胞質膜	
CLDN7	細胞質膜	
CLRN3	原生質膜	
CST1	細胞外	v
FN1	細胞外	v
GREM1	細胞外	v
MGP	細胞外	v
MUC13	細胞外	v
MUC17	細胞外	v
OLFM4	細胞外	v
PI3	細胞外	v
SFRP4	細胞外	v
THY1	細胞質膜	

(二) 分析臨床資料尋找基因表現量與存活率的關係

從 cBioPort 網站下載資料，利用 Sigma plot 軟體及 Kaplan-Meier 法分析各基因表現量與病患的存活率以及無病存活率的關係。

根據分析結果(見 P17 表一及表二)發現無論是存活率或是無病存活率，CST1 及 FN1 這兩個基因的 p value 明顯較其他基因的 p value 來的低，且兩者的存活率與基因表現量成負相關(見圖一至圖八)，說明兩個基因的表現量對於病人存活率及無病存活率的影響較顯著，且基因表現量較高時，病人有較低的存活率因此 CST1 及 FN1 更有能夠成胃癌指標的潛力。

FN1 為纖維蛋白，會結合細胞表面和各種化合物，包括膠原蛋白，纖維蛋白，DNA 和肌動蛋白。纖維蛋白參與細胞黏附，細胞運動，調理作用，傷口癒合和細胞形狀的維持[8]。

CST1 則可分泌半胱氨酸蛋白酶抑制劑，可以促進細胞衰老凋亡的活性，在蛋白水解酶活性調控中發揮重要作用。許多研究發現，它在多種類型腫瘤中存在異常表現，且與腫瘤發生、發展密切相關[9]。

表一:存活率與基因表現量的 p value

	Overall survival High v.s Low	p value (TCGA)	Overall survival High v.s Low	p value (TCGA pub)
BGN	<	0.240	無法辨別	0.452
CST1	<	0.045	<	0.254
FN1	<	0.051	<	0.072
GREM1	無法辨別	0.574	無法辨別	0.786
MGP	<	0.192	<	0.310
MUC13	無法辨別	0.752	無法辨別	0.511
MUC17	無法辨別	0.759	無法辨別	0.872
PI3	無法辨別	0.187	無法辨別	0.694
OLFM4	無法辨別	0.400	無法辨別	0.782
SFRP4	<	0.196	無法辨別	0.971

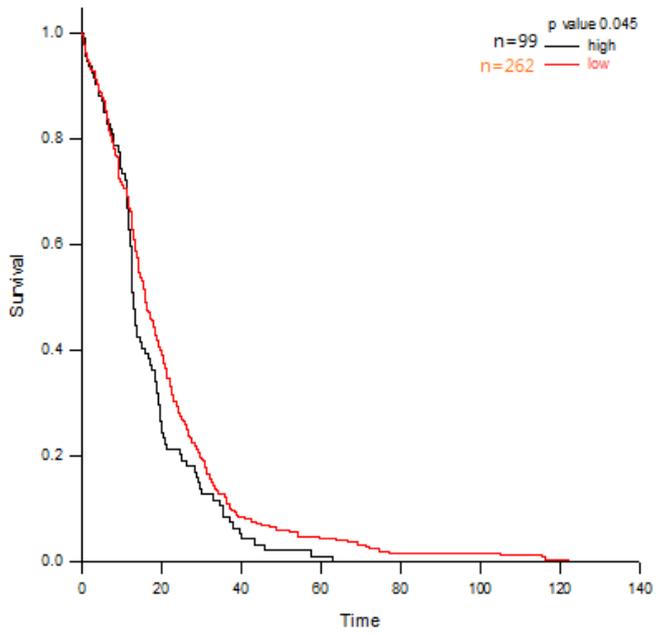
表二: 無病存活率與基因表現量的 p value

	Disease free Survival High v.s Low	p value (TCGA)	Disease free Survival High v.s Low	p value (TCGA pub)
BGN	<	0.240	<	0.604
CST1	<	0.003	<	0.009
FN1	<	0.257	<	0.072
GREM1	<	0.574	無法辨別	0.155
MGP	無法辨別	0.236	>	0.687
MUC13	無法辨別	0.158	>	0.09
MUC17	無法辨別	0.843	無法辨別	0.843
PI3	>	0.534	>	0.828
OLFM4	無法辨別	0.705	>	0.307
SFRP4	<	0.336	無法辨別	0.933

CST1

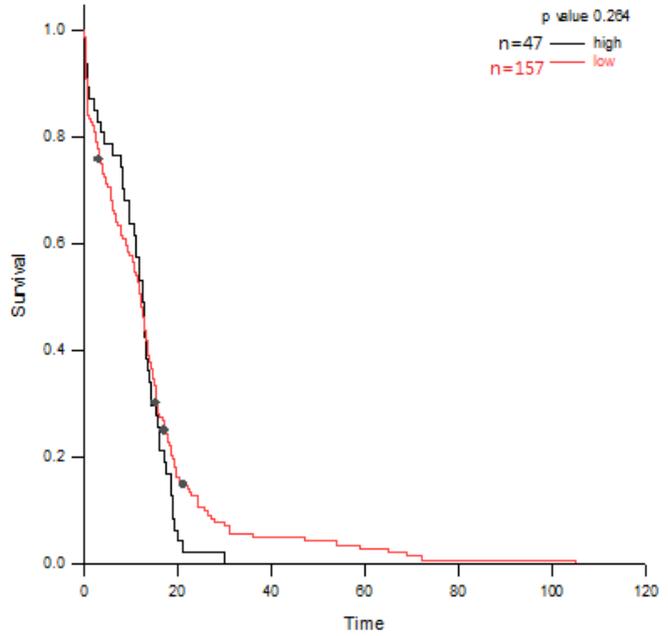
圖一: TCGA 資料庫 整體存活率

TCGA overall survival CST1
Survival Analysis



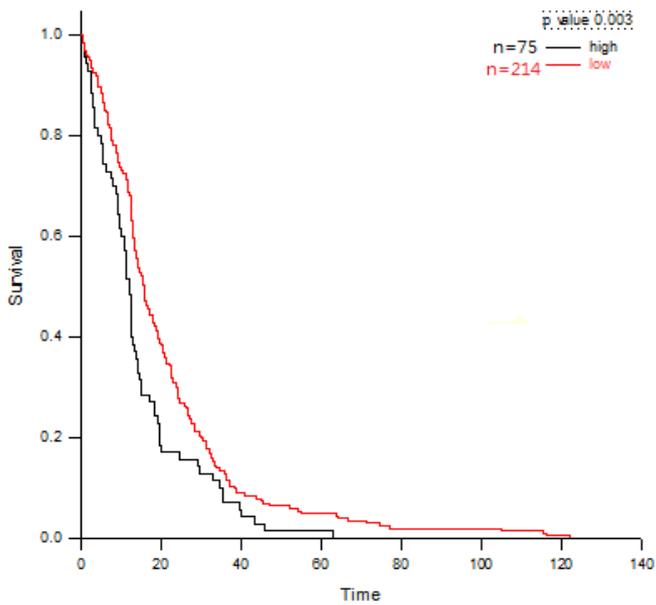
圖二: TCGA pub 資料庫 整體存活率

TCGA pub overall survival CST1
Survival Analysis



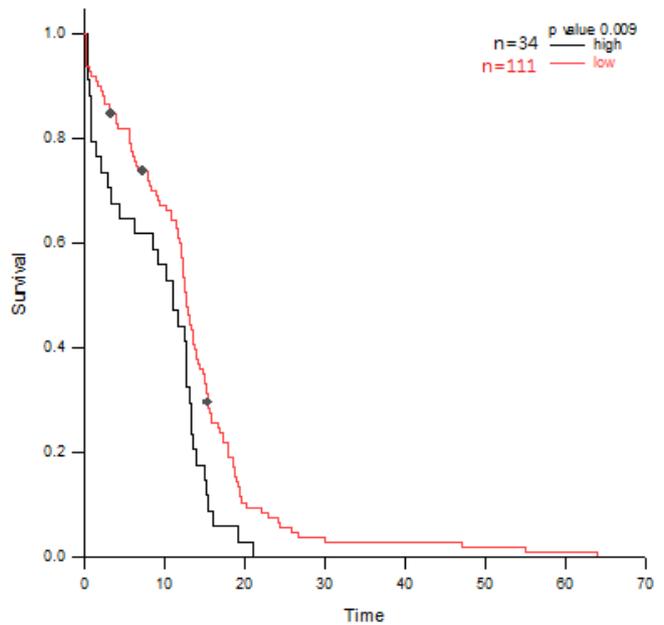
圖三: TCGA 資料庫 無病存活率

TCGA disease free CST1
Survival Analysis



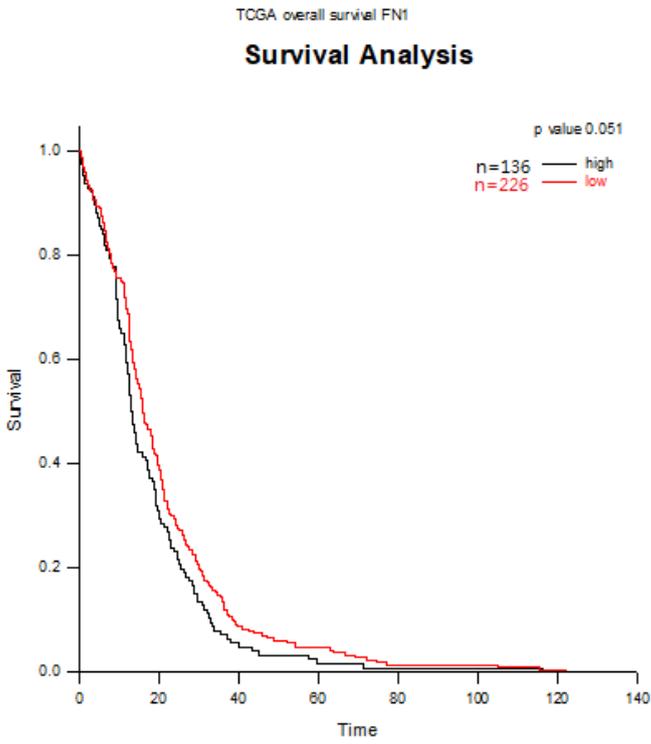
圖四: TCGA pub 資料庫 無病存活率

TCGA pub disease free CST1
Survival Analysis

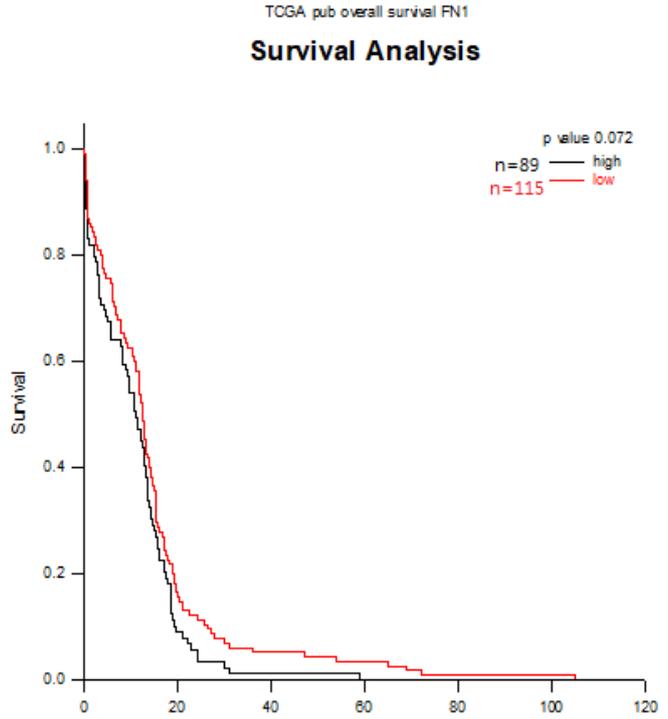


FN1

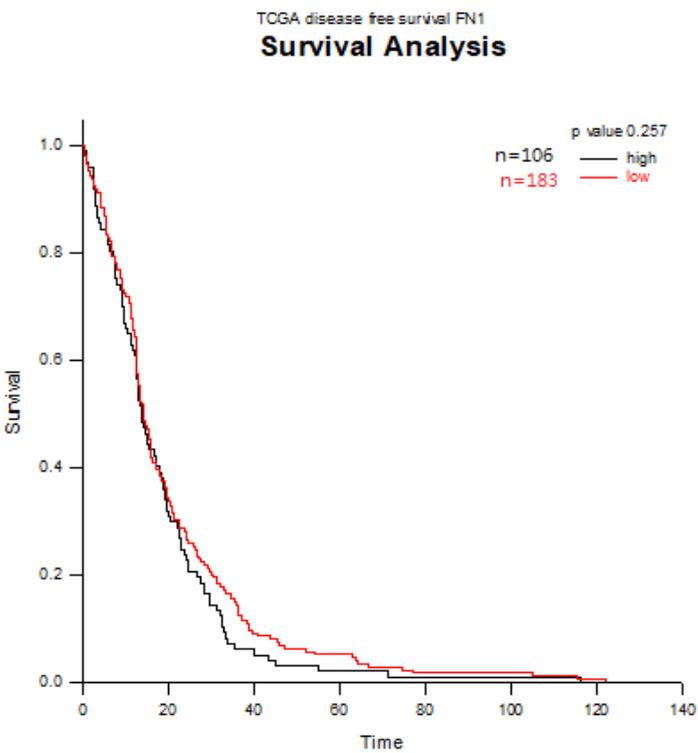
圖五:TCGA 資料庫 整體存活率



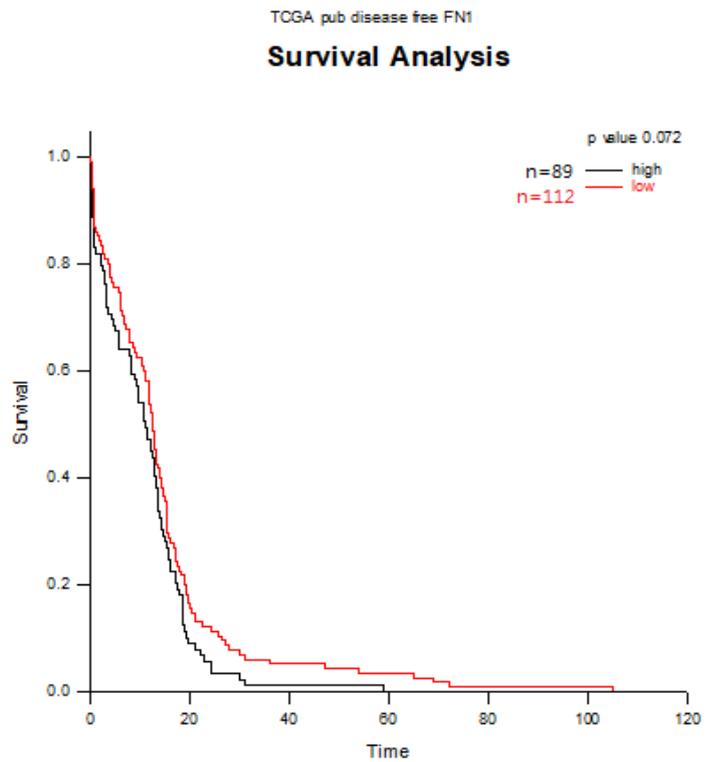
圖六:TCGA pub 資料庫 整體存活率



圖七 TCGA 資料庫 無病存活率



圖八 TCGA pub 資料庫 無病存活率

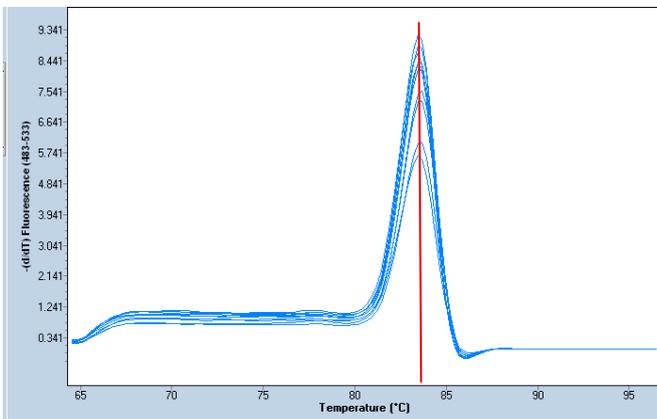


(四)篩選出在較惡性的胃癌細胞裡表現量較高之基因

透過 qPCR 上機的結果，我們將由 Melt Curve Genotyping(螢光反應偵測)得知兩者所夾出的基因片段是否相同，再藉由跑膠來確認所夾出的基因片段大小是否正確。

下面我們將以 MUC13 的數據來舉例：

由左下圖可知 MUC13 的 peak 位於大約 84 度的位置，且 AGS 及 AGS-1 兩者位置相同，而藉由右下圖的膠片結果藉由 Marker(第一排)得知，AGS cDNA(2-6 排)及 AGS-1 cDNA(7-11 排)位置介於 100bp 至 200bp 之間，符合我們所預期夾出的基因大小 130bp(12-16 排下方的亮紋為 dimer)，而右側 AGS 的 RNA(12、13 排)雖然也有於同位置夾出產物，但經過後續計算結果發現影響並不大，所以此次結果仍採計。



▲ Melting curve



▲ agarose gel lane

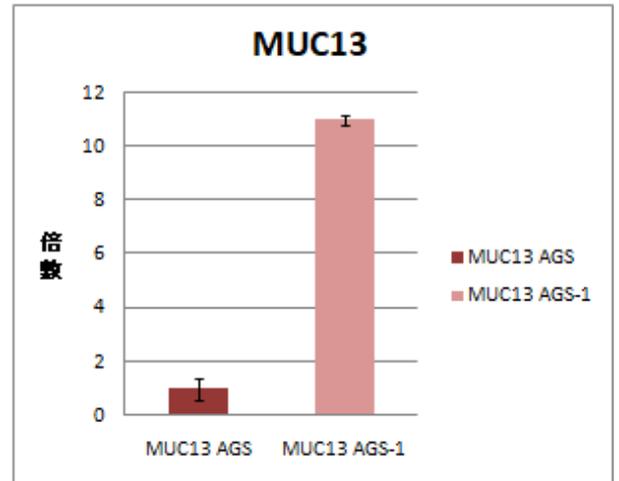
我們將符合上述檢驗的資料，計算表現量差異。

主要是以各基因在 Abs Quant/fit Points 的結果進行計算。我們將以各基因的 CP 值，也就是達到閾值的反應迴圈數來回推表現量差異。結果請見下頁圖表

1.MUC13

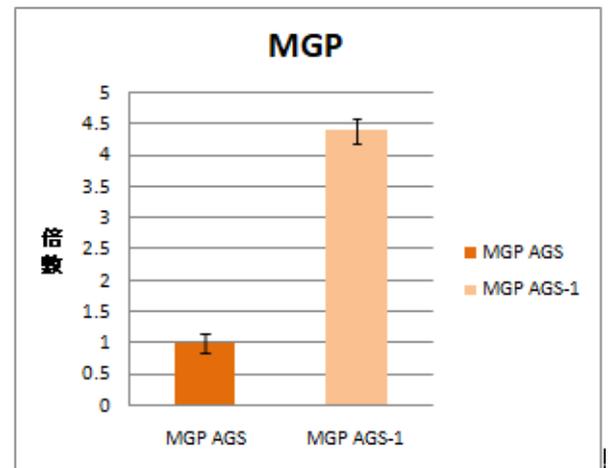
MUC 家族屬於重度糖基化的高分子量醣蛋白，在惡性腫瘤中有具有異常表現量。

而 MUC13 則是一種跨膜醣蛋白，主要與腸胃道相關，尤其在低分化的細胞及後期的癌症細胞中，表現量有較高的趨勢[1]，也有研究顯示，MUC13 會調節腸胃道的發炎症狀，在其中會促進發炎反應的發生[2]。



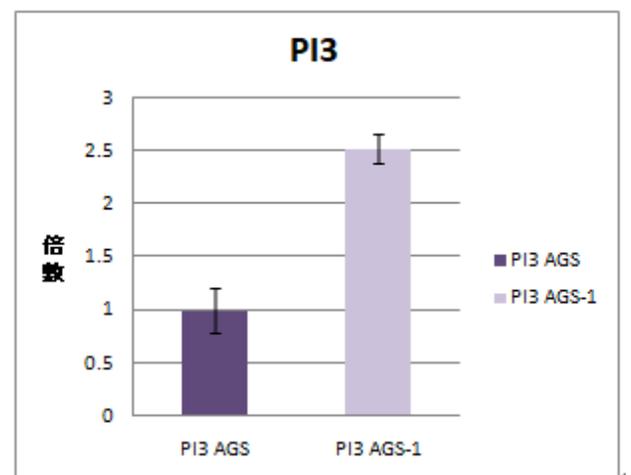
2. MGP

MGP 是一種維生素 K 依賴性蛋白質，由軟骨細胞和血管平滑肌細胞分泌[3]，另有相關研究顯示，MGP 在血管鈣化造成慢性腎病（CKD）患者心血管事件的發病機制中擔任重要角色[4]。



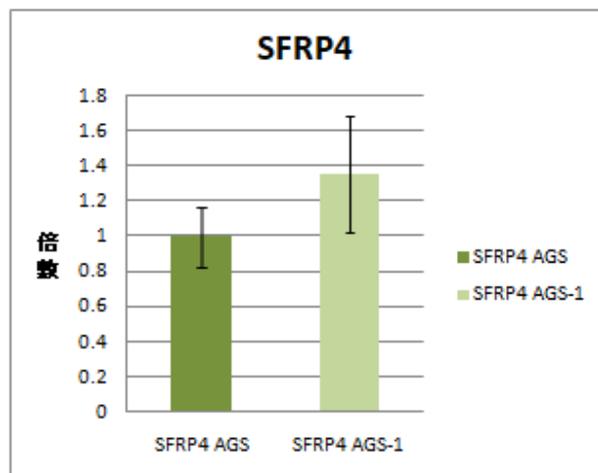
3.PI3

PI3 具有抑制嗜中性白血球彈性蛋白酶的功能，且在皮膚與肺部相關疾病及癌症中有潛在作用[5]。



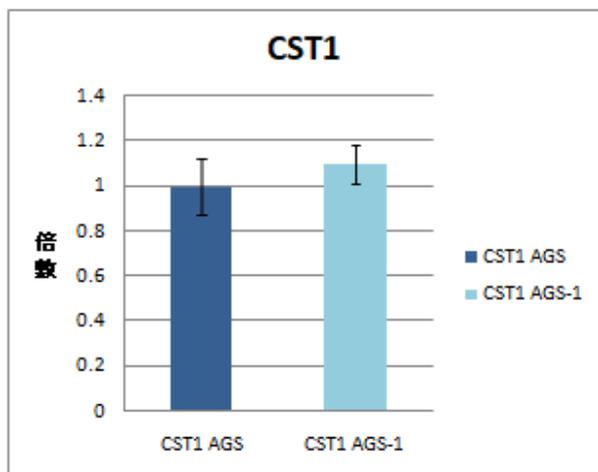
4.SFRP4

SFRP4 屬於 SFRP4 家族，是一種分泌型捲曲區相關蛋白，再心肌的表現量與細胞凋亡相關[6]，另外現今有研究認為 SFRP4 是人類第二型糖尿病相關基因中的樞紐基因，將影響到胰島素的分泌[7]。



5.CST1

半胱氨酸蛋白酶抑制劑 SN (CystatinSN) 是一種由 CST1 編碼的分泌型蛋白，具有促進細胞衰老凋亡的活性，在蛋白水解酶活性調控中發揮重要作用。許多研究發現，CystatinSN 在多種類型腫瘤中存在異常表達，且與腫瘤發生、發展密切相關[9]。



陸、結論

我們透過 R studio 軟體分析得出的 10 個符合所設條件的基因：BGN、CST1、FN1、GREM1、MGP、MUC13、MUC17、PI3、OLFM4、SFRP4，進行存活率與表現量的關係分析，發現 FN1 及 CST1 的表現量，與病人存活時間呈現負相關，且 P value 值小於 0.05，表示此分析結果的可信度高。最後再以細胞實驗，比較各基因在侵襲能力不同的胃腺癌細胞間之表現量，實驗結果顯示，MUC13、MGP、PI3 以及 SFRP4 以上四個基因，在 AGS-1 的表現量比 AGS 高出許多。

其中，CST1 雖然在細胞實驗中並沒有與細胞侵襲能力有顯著的相關，但我們推測，結果在正常胃腺細胞與胃腺癌細胞之間有顯著差異，而在 AGS 及 AGS-1 之間則否，可能是因為我們所使用的細胞樣本皆是胃腺癌細胞，才無法得出預期結果。因此我們認為 FN1、CST1、MUC13、MGP、PI3 以及 SFRP4 有潛力成為胃癌檢測基因組。

柒、參考資料及其他

一、參考資料

1 cBio Cancer Genomic Portal

<http://www.cbioportal.org/>

2. Cheng Lei : Cancer Samples vs. Matched Adjacent Noncancerous Samples

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE33429>

3.Cheng Lei : Gastric cancer tissue sample

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM824352>

4.蛋白質序列料庫

<http://www.uniprot.org/>

二、參考文獻

[1] Michael D. Walsh, BSc, Joanne P. Young, PhD, Barbara A. Leggett, MD, Stephanie H. Williams, PhD, Jeremy R. Jass, MD, Michael A. McGuckin, PhD: The MUC13 cell surface mucin is highly expressed by human colorectal carcinomas.

[2] Jörg Ringel and Matthias Löhr: The MUC gene family: Their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2003;2:9

[3] RefSeq, Sep 2016

[4] Brancaccio D.a • BiondiM.L.b • GallieniM.a • TurriO.b • GalassiA.a • CecchiniF.b • Russo D.c • AndreucciV.c • CozzolinoM.a: Matrix GLA Protein Gene Polymorphisms: Clinical Correlates and Cardiovascular Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. Am J Nephrol 2005;25:548 – 552

[5] Mahboob A Chowdhury, Helena Kuivaniemi, Roberto RomeroEmail author, Samuel Edwin, Tinnakorn Chaiworapongsa and Gerard Tromp: Identification of novel functional sequence variants in the gene for peptidase inhibitor 3. BMC Medical Genetics20067:49

[6] "Entrez Gene: SFRP4 secreted frizzled-related protein 4"

[7] Mahdi T, Hänzelmann S, Salehi A, Muhammed SJ, Reinbothe TM, Tang Y, Axelsson AS, Zhou Y, Jing X, Almgren P, Krus U, Taneera J, Blom AM, Lyssenko V, Esguerra JLS, Hansson O, Eliasson L, Derry J, Zhang E, Wollheim CB, Groop L, Renström E, Rosengren AH (November 2012). "Secreted Frizzled-Related Protein 4 Reduces Insulin Secretion and Is Overexpressed in Type 2 Diabetes". Cell Metabolism. 16 (5): 625 – 633.

[8].Debra J.Romberger : The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

[9]姜姗姗 辛彦：半胱氨酸蛋白酶抑制劑 S N 的功能及其與腫瘤的關係
《國際腫瘤學雜誌 2 0 1 7 年 3 月第 4 4 卷第 3 期》

【評語】 052012

實驗的目的在於，篩選出在較惡性的胃癌細胞裡表現量較高之基因，找出有潛力成為胃癌指標的蛋白質之基因，而且基因表現量與存活率之關係，由 NCBI 下載資料經 R studio 分析胃細胞與周邊非癌症細胞之基因表現比較，得癌細胞及非癌細胞表現較高蛋白質及分泌型蛋白質 10 種。再由 cBio Portal 網站下載得 mRNA 表現量以胃癌細胞(AGS-1)(侵襲能力較強)有 MUC13、MGP、P13、JFRP4 及 CST1 基因表現高，尤其 MUC13、MGP 及 P13 更明顯較高。

1. 已經有許多的實驗報導過類似的方向，應該找出跟以前報導不同的基因，和相同的基因表示你分析的正確性。
2. 這些基因和細胞惡性的程度的關係應該再深入探討。
3. 應該多比對不同的資料庫比較準確。
4. 分析出來的基因應該在臨床檢體上來驗證。
5. 對於統計方法的理解略顯不足，可更深入理解統計資料的意義，對實驗分析也會更有幫助。此外，圖片的解釋不足，造成閱讀上的不方便，今後撰寫論文應更加注意。
6. 欠缺文獻回顧與整理，對於研究的假設背後邏輯的陳述也較欠缺。與先前研究相比之創新性不明確。討論處對於研究結果的討論不夠深入，宜加入可能機轉等討論。

作品海報

摘要

本實驗旨在尋找有潛力作為提高早期胃癌發現率的生物標誌物，得以應用在臨床上。

首先從NCBI下載資料，透過統計分析軟體R studio分析胃癌細胞與其周邊非癌症細胞的基因表現量差異，篩選出在胃癌細胞裡FC值較高(fold change：胃癌細胞表現量/胃癌周邊非癌症細胞表現量)且其所製造的蛋白質為分泌型的基因，共有10個：BGN、CST1、FN1、GREM1、MGP、MUC13、MUC17、PI3、OLFM4、SFRP4。

接著從cBioPortal網站下載上述各基因表現量與病患存活月數的資料，分析病人的整體存活率及無病存活率與基因表現量的關係，得出FN1及CST1的p value比其他基因來的低，且基因表現量與病人存活時間呈現負相關。

利用qPCR(及時聚合酶連鎖反應)，比較我們所選出的十個基因在胃腺癌細胞(AGS)及侵襲能力較強的胃腺癌細胞(AGS-1)間表現量的差異，發現MUC13、MGP、PI3及SFRP4，在AGS-1的表現量為在AGS的數倍。

壹、研究動機及目的

如今已有多種檢測癌症的方式，就血液檢測而言，已有CA72-4等生物標誌作為癌症指標，但靈敏度不夠高，難以發現早期的胃癌，因此我們決定研究提高早期胃癌發現率的檢測方法，希望找出增加胃癌發現率的胃癌標誌物。

我們的實驗目的有三者：

- (一) 找出能夠製造出有潛力成為胃癌指標的蛋白質之基因
- (二) 尋找基因表現量與存活率之關係
- (三) 篩選出在較惡性的胃癌細胞裡表現量較高之基因

貳、實驗流程

篩選基因

選出位於東亞的人體樣本
資料庫：GSE33429

使用Rank Prod進行
統整分析

找出能夠在血液檢測中
作為指標的基因

從NCBI篩選
基因表現量
資料庫

下載資料，
以R studio軟
體進行資料
分析

利用p value、FC
值及蛋白質是否
為分泌型作為標
準篩選基因

進行驗證

細胞實驗

驗證分析結果

存活率分析

探討基因表現量與存
活時間的關聯

細胞培養

抽RNA、去Genomic
DNA、跑膠

轉cDNA

進行qPCR、跑膠

AGS及AGS-1基因表
現量比較

從cBioPortal網站下載
臨床資料

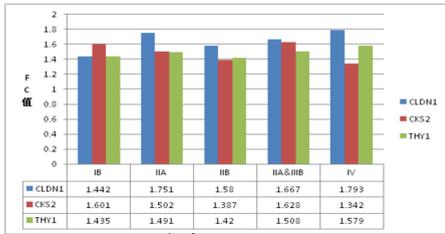
以sigma plot軟體的
Kaplan-Melior法進行
分析

選出P value較小的基
因

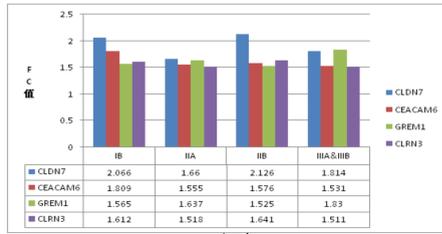
參、研究結果及討論

(一) 資料分析—篩選出有潛力成為胃癌指標的蛋白質基因

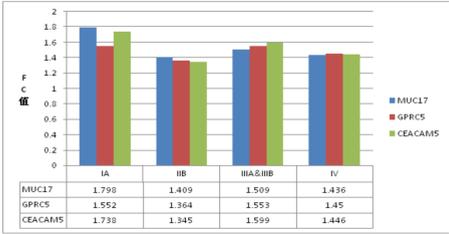
(1)出現五期的基因：圖A、出現四期的基因：圖B至圖F



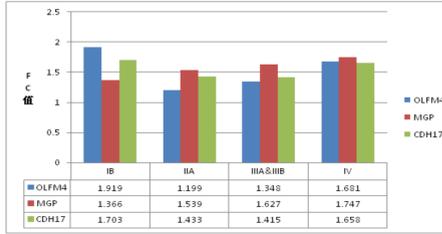
圖A



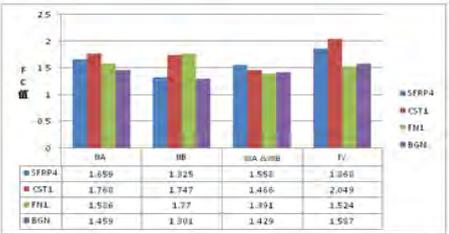
圖B



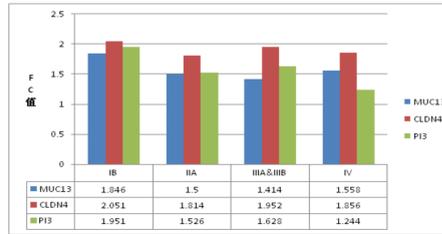
圖C



圖D



圖E



圖F

(2)蛋白質是否為分泌型

基因名稱	蛋白質位置	分泌型
BGN	細胞外	v
CKS2	細胞核內、細胞質	
CDH17	細胞質膜	
CEACAM5	細胞質膜	
CEACAM6	細胞質膜	
GPRC5A	細胞質膜	
CLDN1	細胞質膜	
CLDN4	細胞質膜	
CLDN7	細胞質膜	
CLRN3	原生質膜	
CST1	細胞外	v
FN1	細胞外	v
GREM1	細胞外	v
MGP	細胞外	v
MUC13	細胞外	v
MUC17	細胞外	v
OLFM4	細胞外	v
PI3	細胞外	v
SFRP4	細胞外	v
THY1	細胞質膜	

依上述結果挑出 BGN、CST1、FN1、GREM1、MGP、MUC13、MUC17、OLFM4、PI3、SFRP4 共十個基因進行細胞實驗

(二) 分析臨床資料尋找基因表現量與存活率的關係

1. 存活率及無病存活率與基因表現量關係

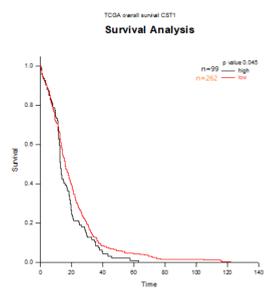
	Overall survival High vs Low	p value (TCGA)	Overall survival High vs Low	p value (TCGA pub)
BGN	<	0.240	無法辨別	0.452
CST1	<	0.045	<	0.254
FN1	<	0.051	<	0.072
GREM1	無法辨別	0.574	無法辨別	0.786
MGP	<	0.192	<	0.310
MUC13	無法辨別	0.752	無法辨別	0.511
MUC17	無法辨別	0.759	無法辨別	0.672
PI3	無法辨別	0.187	無法辨別	0.694
OLFM4	無法辨別	0.400	無法辨別	0.782
SFRP4	<	0.196	無法辨別	0.971

表一：基因表現量高及低的存活率比較及p value

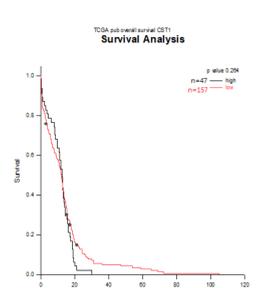
	Disease free Survival High vs Low	p value (TCGA)	Disease free Survival High vs Low	p value (TCGA pub)
BGN	<	0.240	<	0.604
CST1	<	0.003	<	0.009
FN1	<	0.257	<	0.072
GREM1	<	0.574	無法辨別	0.155
MGP	無法辨別	0.236	>	0.687
MUC13	無法辨別	0.158	>	0.09
MUC17	無法辨別	0.843	無法辨別	0.843
PI3	>	0.534	>	0.828
OLFM4	無法辨別	0.705	>	0.307
SFRP4	<	0.336	無法辨別	0.933

表二：基因表現量高及低的無病存活率比較及p value

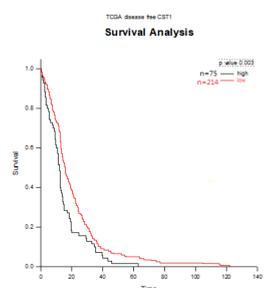
分析結果：CST1



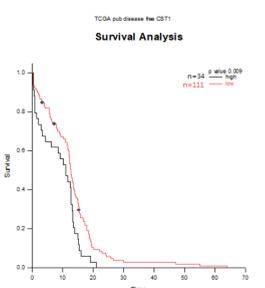
圖G：TCGA 資料庫 整體存活率



圖H：TCGA pub 資料庫 整體存活率

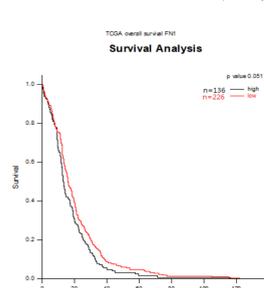


圖I：TCGA 資料庫 無病存活率

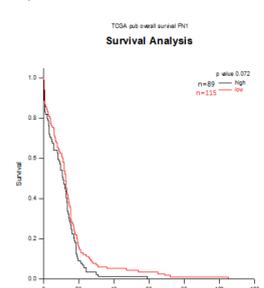


圖J：TCGA pub 資料庫 無病存活率

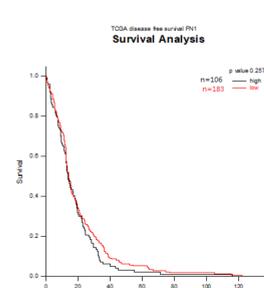
分析結果：FN1



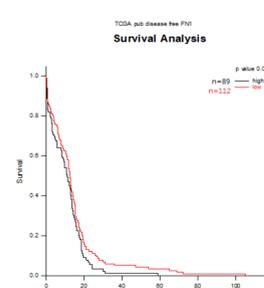
圖K：TCGA 資料庫 整體存活率



圖L：TCGA pub 資料庫 整體存活率



圖M：TCGA 資料庫 無病存活率

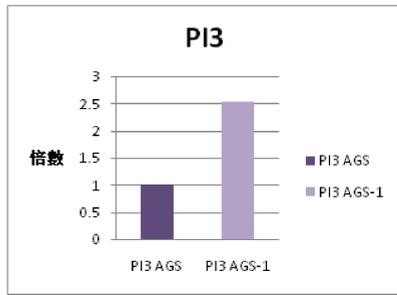
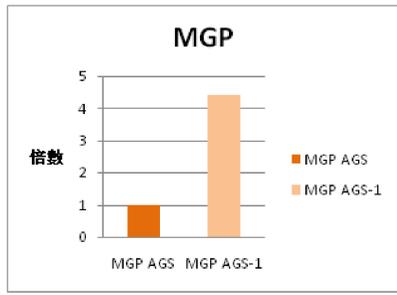
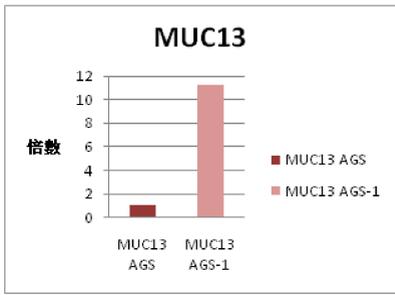


圖N：TCGA pub 資料庫 無病存活率

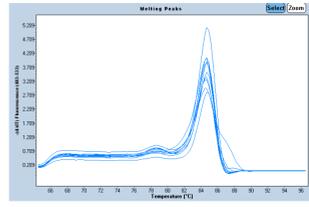
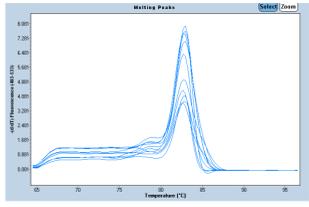
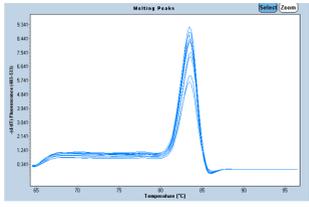
根據表一表二及圖G至N可發現：

無論是存活率或是無病存活率，CST1及FN1 p value 明顯較其他基因低，且兩者的存活率與基因表現量成負相關，說明兩個基因的表現量對於病人存活率及無病存活率的影響較顯著，且基因表現量較高時，病人有較低的存活率

(三) 篩選出在較惡性的胃癌細胞裡表現量較高之基因



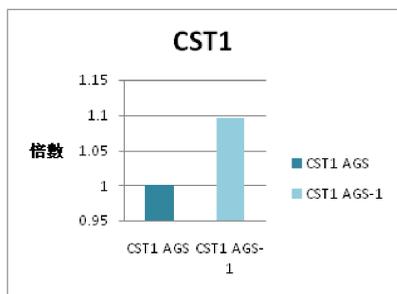
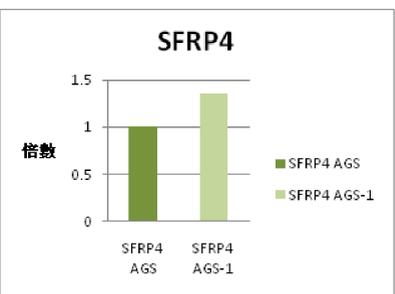
實驗設定	
Cycle	45
Denature	95°C
Annealing	65°C
Extension	72°C
Detection	81°C



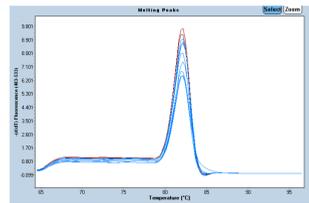
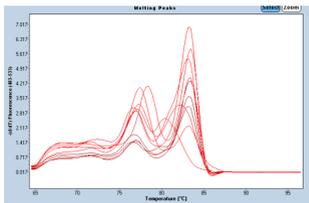
MUC13的表現量在AGS-1中是AGS的近**11**倍。

MGP的表現量在AGS-1中是AGS的近**4.5**倍。

PI3的表現量在AGS-1中是AGS的近**2.5**倍。



SFRP4及CST1雖然在AGS-1間的表現量只略高於AGS，但我們認為，這是受到我們的實驗皆採用胃癌細胞所影響，因此在非胃癌細胞及胃癌細胞之間，可能會有更顯著的差異。



Primer	Base pair
MUC13	123
MGP	116
PI3	116
SFRP4	133
CST1	130



肆、結論

- 一、BGN、CST1、FN1、GREM1、MGP、MUC13、MUC17、PI3、OLFM4、SFRP4以上十個基因在胃癌期別裡至少出現四期，至少三個期別裡胃癌細胞與正常細胞間的表現量比值大於1.5，且製造出的蛋白質為分泌型。
- 二、FN1及CST1的表現量對於病人存活率的影響較顯著，且基因表現量較高時，病人有較低的存活率。
- 三、MUC13、MGP、PI3、SFRP4以及CST1以上五個基因，在AGS-1的表現量比AGS高，尤其MUC13、MGP及PI3特別顯著。
- 四、FN1、CST1、MUC13、MGP、PI3、SFRP4有潛力成為胃癌檢測基因組。



伍、參考資料

- 1 cBio Cancer Genomic Portal
<http://www.cbioportal.org/>
2. Cheng Lei : Cancer Samples vs. Matched Adjacent Noncancerous Samples
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE33429>
- 3.Cheng Lei : Gastric cancer tissue sample
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM824352>
- 4.蛋白質序列料庫
<http://www.uniprot.org/>