

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫名稱：台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織之 miR-135a/b、APC 基因突變及 APC 基因表現與其臨床因子之相關性 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 林佑誠  
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-043-B  
研究期間： 101 年 07 月 01 日至 102 年 02 月 28 日止，計 8 個月  
指導教授： 林俊哲

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學研究所

中華民國 102 年 04 月 03 日

## (一) 摘要

結直腸癌(colorectal cancer)是目前台灣癌症第三大死亡原因，僅次於肺癌與肝癌。生活型態與飲食習慣的改變是罹患結直腸癌的重大因素。

Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息路徑被認為是結直腸癌致病過程的開端，Wnt 蛋白被活化後，會抑制 GSK3 $\beta$  磷酸化  $\beta$ -catenin，使其進入細胞核調控細胞增殖、分化相關基因的表現而使細胞癌化。在 Wnt 訊息路徑中，Adenomatous polyposis coli (APC) 會與腫瘤抑制因子 Axin、serine-threonine kinases GSK3 $\beta$  和 CK1 形成複合體，使  $\beta$ -catenin 磷酸化而被降解。APC 基因突變是結直腸癌中導致 APC 基因不表現的主要原因，但台灣大腸直腸癌患者的 APC 突變率遠低於西方國家僅 35%。研究指出，miR-135a/b 在結直腸癌細胞中會大量表現，是 APC 的負調控者，影響 Wnt 訊息路徑並導致結直腸腺癌生成。本研究結果發現在台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織中，APC 基因表現量與年齡呈正相關，而 miR-135b 明顯與性別及淋巴轉移有明顯正相關。因此 miR-135a/b 在台灣大腸直腸癌形成過程中，可能扮演加速癌化的角色，藉由抑制 APC 表現，參與大腸直腸癌腫瘤化。

## (二) 研究動機與研究問題

APC 基因突變是結直腸癌中導致 APC 基因不表現的主要原因，但台灣大腸直腸癌患者的 APC 突變率較低。過去以 43 個結直腸癌樣本與 18 個大腸正常上皮的研究發現若增加 miR-135a 與 miR-135b 的表現量，會導致 APC 的表現量下降，顯示 miR-135a/b 可能藉由抑制 APC 基因的表現而影響 Wnt 訊息路徑(NAgel et al., 2008)。因此本研究分析台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織之 miR-135a/b、APC 基因突變及 APC 基因表現與其臨床因子之相關性，以釐清台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織中的 APC 不表現與 miR-135a/b 之關係，並了解 miR-135a/b 在台灣大腸直腸癌形成過程中所扮演的角色。

## (三) 文獻回顧與探討

### 1. 結直腸癌介紹

大腸是人體消化器官之一，包含盲腸、結腸、直腸，主要功能為吸收水分、

排除人體無法吸收之糞便。大腸癌，學名為結直腸癌(colorectal cancer)，是世界癌症發生率排行男性第三名，女性第二名的惡性腫瘤，截至2008年為止，約有超過120萬個新增病例，造成60萬以上的死亡，且男性明顯高於女性(Jemal et al., 2011)。在台灣，結直腸癌的死亡率逐年攀升，民國99年已達到4,676人(死亡率20.2人/每十萬人)，是目前台灣死亡率僅次於肺癌與肝癌的惡性腫瘤(衛生署, 2010)。研究顯示，除了少數基因缺陷或遺傳導致的結直腸癌，生活型態與飲食習慣的改變是罹患結直腸癌的重大因素。酒精、脂肪、紅肉的攝取會增加罹患結直腸癌的機率；而食用新鮮蔬果、運動則可以降低危險性(Watson et al., 2011)。

## 2. Wnt 訊息路徑機轉

結直腸癌的發生需要許多基因的突變，其中 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息路徑被認為是其致病過程的開端。在正常細胞中，細胞質的  $\beta$ -catenin 會被 glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )與 casein kinase I $\alpha$  (CK I $\alpha$ )磷酸化，與 ubiquitin 結合，進而被 proteasome 降解 (Huang et al., 2010)。而 Wnt 蛋白被活化後，會阻止 GSK3 $\beta$  磷酸化  $\beta$ -catenin，使其進入細胞核，與 transcription including T cell factor/lymphocyte enhancer factor (Tcf/ Lef)形成複合體，調控細胞增殖、分化、凋亡，使細胞癌化 (Huang et al., 2010)。目前已有許多研究找出 Wnt/ $\beta$ -catenin 路徑上的各種調控因子，其中發現 adenomatous polyposis coli (APC)基因是大腸直腸癌中最常見發生突變的 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息路徑基因(Markowitz et al., 2009)。

## 3. APC 調控 Wnt 訊息路徑

Adenomatous polyposis coli (APC)是一個重要的抑癌基因，具有2843個胺基酸，包括4段15個胺基酸重複(15R)、7段20個胺基酸重覆(20R)和3段 SAMP(Ser - Ala- Met - Pro)重複序列。其中15R和20R是與  $\beta$ -catenin結合的位置，而SAMP與Axin結合。在Wnt 訊息路徑中，APC會與腫瘤抑制因子Axin、serine-threonine kinases GSK3 $\beta$ 和CK1形成複合體，使  $\beta$ -catenin磷酸化，進

而被降解(Minde et al., 2011)。APC的突變多為終止密碼子的提早轉譯，產生缺少  $\beta$ -catenin結合位的APC蛋白(Rubinfeld et al., 1997)，或是APC基因上的促進子區域的甲基化(Derks et al., 2006)，使得  $\beta$ -catenin不會被降解，進入細胞核與T cell factor/lymphocyte enhancer factor (Tcf/Lef)形成複合體，參與結直腸癌的發生。

#### 4. miR-135a/b 與 APC

MicroRNAs (miRNA)是一種小片段的RNA，約有20個核苷酸組成，會結合在目標mRNA的3'末轉譯端，導致mRNA轉譯受到抑制或是降解，被認為參與細胞發育、分化、增殖和凋亡的過程(Nagel et al., 2008)。miR-135b 位於1q32.1的LEM domain containing 1 (LEMD1)基因，而miR-135a則包含兩種：第一種位於3p21的stabilin 1 (STAB1)基因，另一種位於12q23的rhabdomyosarcoma 2 - associated transcript (RMST)基因。研究指出miR-135 a/b在結直腸癌細胞中具有大量表現(Nagel et al., 2008)。miR-135a/b 會標的APC之 3' 端，近而抑制APC蛋白生成。miR-135a/b的作用，如同APC發生喪失功能之突變，會使  $\beta$ -catenin進入癌化機轉，導致結直腸腺癌生成(Huang et al., 2010)。

#### 5. 研究目的

上述研究發現miR-135a/b在結直腸癌細胞中有大量表現，為APC的負調控者。本計畫擴大樣本數分析台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織之miR-135a/b、APC基因突變及APC基因表現與其臨床因子之相關性，以釐清台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織中的APC不表現是否與miR-135a/b有關，並了解miR-135a/b在台灣大腸直腸癌形成過程中所扮演的角色。

##### (四)研究方法及步驟

#### 1. RNA 萃取

取適當大小的結直腸癌組織放入微量離心管，加入適當金屬珠與 300  $\mu$ l TRIzol，以均質機打碎組織。打碎以後，加入 700  $\mu$ l TRIzol，靜置 30 分鐘。接著加入 200  $\mu$ l 氯仿並搖晃 5 分鐘，離心取上清液。加入絕對酒精 500  $\mu$ l，

低溫沉澱 30 分鐘。離心去上清液之後，加入 1000  $\mu$ l 的 70%DEPC-酒精清洗。  
最後離心去上清液，加入適當 DEPC 水溶解。

## 2. TaqMan MicroRNA RT-PCR:

### a. 合成 cDNA 以進行 TaqMan MicroRNA Real-time PCR

材料(每一個樣本)

成分	體積/15 $\mu$ l
100mM dNTPs	0.15
Reverse Transcriptase, 50U/ $\mu$ l	1.00
10X RT Buffer	1.50
RNase Inhibitor	0.188
Nuclease Free Water	4.162
5X TaqMan MicroRNA RT Primer	3.00'
Total RNA Sample	5.00
Total	15.00

### b. 反應條件

步驟	時間(分)	溫度( $^{\circ}$ C)
1	30	16
2	30	42
3	5	85
4	$\infty$	4

### 3. TaqMan MicroRNA Real-time PCR 測 miR-135a/b 表現量

#### a. 材料(每一個樣本)

成分	體積/20 $\mu$ l
TaqMan 2X Universal PCR MasterMix	10.00
Nuclease Free Water	7.67
TaqMan MicroRNA Assays 20X TaqMan Assay	1.00
RT Product	1.33
Total	20.00

#### b. 反應條件

步驟	AmpliTaq Gold Enzyme Action	PCR	
	HOLD	40Cycles	
		Denature	Anneal/Extend
時間	10 分鐘	15 秒	60 秒
溫度(°C)	95	95	60

### 4. High Capacity cDNA RT-PCR 合成cDNA以進行SYBR Green qPCR

#### a. 材料

成分	體積/10 $\mu$ l
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix(100mM)	0.8
10XRT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Nuclease-free Water	3.2
Total per Reaction	10.0

b. 反應條件

步驟	溫度(°C)	時間
1	25	10分鐘
2	37	120分鐘
3	85	5分鐘
4	4	∞

5. SYBR Green qPCR測量APC表現量

a. 材料

成分	體積/50 $\mu$ l
Master Mix	25
Forward primer, 10 $\mu$ M	1
Reverse primer, 10 $\mu$ M	1
ROX Reference Dye	1
DEPC-treated water	17
cDNA	5

b. 反應條件

步驟	溫度(°C)	時間
1	50	2分鐘
2	95	2分鐘
3	95	15秒
4	60	60秒
5	重複3.4步驟40次	

## 6. DNA 萃取

首先取適當大小的結直腸癌組織放入微量離心管。加入適當金屬珠、300  $\mu$ l GenoMaker 和 50  $\mu$ l RNase，以均質機打碎組織。再加入 700  $\mu$ l GenoMaker 和 5  $\mu$ l Proteinase K，靜置 30 分鐘。接著加入 200  $\mu$ l 氯仿，搖晃 5 分鐘，離心取上清液。之後加入絕對酒精 500  $\mu$ l 與 NaOAc 150  $\mu$ l，低溫沉澱 30 分鐘，離心去上清液。加入 1000  $\mu$ l 的 75%酒精清洗，離心去上清液，再加入適當水溶解。

## 7. APC 突變分析

APC突變狀態分析是藉由定序密碼子1286~1513之間的mutation cluster region (MCR) 序列，為了標定這個區域，將使用：(1) Fwd CAG ACT TAT TGT GTA GAA GA, Rev CGC TCC TGA AGA AAA TTC AAC (2) Fwd GA GCT GGC AAT CGA ACG ACT, Rev GAA GTT CCA GCA GTG TCA CAG C (3) Fwd GCT CAG ACA CCC AAA AGT CC, Rev ATT TTT AGG TAC TTC TCG CTT G (4) Fwd AA ACA CCT CCA CCA CCT CC, Rev C ATT CCC ATT GTC ATT TTC C 四種primer進行PCR反應。將PCR產物以2% agarose 電泳膠確認所需產物。之後將產物DNA以Glass Milk純化，進行Big Dye反應，將螢光探針接上DNA。完成後進行酒精沉澱去除雜質，上機(Sequencer 3100型，ABI 公司)定序DNA。

### (五)實驗結果

利用 TaqMan MicroRNA Real-time PCR 方法檢驗 miR-135a 表現量，並利用中位數-卡方檢定與臨床因子進行分析，結果發現臨床因子與 miR-135a 表現量均無統計上的相關性( $P$ -value > 0.05)，(table 1, figure 1)。

以同樣方式檢測 miR-135b 表現量並分析之，得到以下結果：miR-135b 表現量與性別、腫瘤分期、淋巴轉移情形有顯著相關( $P$ -value = 0.025(gender); 0.035(Stage); 0.036(Cn Stage))。其中男性相對於女性，高 miR-135b 表現量比例較高(39.7% < 58.1%)；而晚期病人高 miR-135b 表現量具有較高比例(Stage I, 44.0% ; Stage II, 39.7% ; Stage III, 61.4% ; Stage IV, 62.5



%)；淋巴轉移的病人高 miR-135b 表現量的比例也明顯較高(N0, 41.2%；N1, 65.7%；N2, 58.3%)，其他臨床因子雖然無顯著相關(table 2, figure 2)。

已知 APC 基因為 miR-135a/b 所調控之基因，因此利用 SYBR Green qPCR 方法檢驗 APC 表現量，並利用中位數-卡方檢定進行分析，以釐清其相關性。由分析結果發現：APC 表現量與年齡具有顯著相關( $P$ -value = 0.038)，年齡較大，APC 高表現量的比例較高(42.9% < 59.5%)。而其他臨床因子與 APC 表現量無顯著相關 (table3 , figure 3)。

APC 突變是大腸直腸癌常見的致癌機轉，因此藉由 APC 突變分析，來了解其與臨床因子的關係。發現：APC 突變與臨床因子並無顯著相關( $P$ -value > 0.05) (table 4, figure 4)。

利用中位數-卡方統計法分析 APC 表現量與與大腸直腸癌相關 MicroRNA、基因的相關性，發現 miR-21、Wnt1、 $\beta$ -catenin、PTEN、E-cadherin、Zeb2 等與 APC 有顯著相關，其中 Wnt1、 $\beta$ -catenin、PTEN 高表現量組的病人之高 APC 表現量的比例較高(for Wnt1, 29.9% < 72.2%,  $P$ -value = 0.000; for  $\beta$ -catenin, 18.2% < 83.5%,  $P$ -value = 0.000; for PTEN, 28.6% < 73.4%,  $P$ -value = 0.000)；而 miR-21、E-cadherin、Zeb2 之低表現量組具有較高比例之高 APC 表現量(for miR-21, 61.0% > 41.8%,  $P$ -value = 0.016; for E-cadherin, 66.2% > 36.7%,  $P$ -value = 0.000; for Zeb2, 84.2% > 21.4%,  $P$ -value = 0.020)。(table 5, figure 5)。

同樣分析 APC 突變與其他大腸直腸癌相關 MicroRNA、基因的相關性。發現 miR-21 與 APC 具有顯著相關，高 miR-21 表現量組中 APC 無突變者佔較高比例 (55.8% < 74.7%,  $P$ -value = 0.014)，其他基因、MicroRNA 與 APC 突變無明顯相關(table 6, figure 6)。

#### (六)討論分析

在大腸直腸癌腫瘤機轉中，APC 是重要的抑癌基因，也是 miR-135a/b 所調控的下游基因。我們分析臨床因子發現：APC 表現量與年齡的相關性具有顯著正相

關，是高APC表現量的明顯指標，且雖然不具顯著意義，年齡較高，APC發生突變的機率較低，而miR-135a/b會隨著年齡增加，表現量提高。研究指出miR-135a/b會抑制APC轉譯成蛋白質，使其喪失功能(Huang et al., 2010)。顯示可能隨著年齡增加，APC、miR-135a/b表現量皆會提高，但因為APC受到miR-135a/b抑制而喪失功能，使得其在大腸直腸癌致病機轉上的角色會變得較不重要，而與APC突變較無關，可以與先前研究相互印證(NAgel et al., 2008)。

在許多癌症中，腫瘤罹患率都與性別差異有關，結直腸癌罹患率男性明顯高於女性(Jemal et al., 2011)。我們發現：男性病人之miR-135b表現量明顯較女性高，miR-135a雖無顯著相關，仍有男性較高表現量的現象，APC表現量也是男性高過女性，而與依據年齡比較的差異處是高APC表現量的男性之APC突變比例較高。研究顯示，生活型態與飲食習慣的改變是罹患結直腸癌的重大因素。酒精、脂肪、紅肉的攝取會增加罹患結直腸癌的機率；而食用新鮮蔬果、運動則可以降低危險性(Watson et al., 2011)。因此，可能是因為生活型態與飲食習慣的差異導致男性miR-135a/b表現量增加，抑制APC表現，或是APC突變引發的功能喪失，進而導致結直腸癌的發生。

根據我們的實驗結果，APC、miR-135a/b與腫瘤發生的直接關係如下：就腫瘤分期來看，晚期病人的高APC表現量比例較低，顯示APC的不表現可能會導致病人進入結直腸癌晚期，而miR-135a/b表現量、APC突變比例較高，可能因此加劇癌症惡化的過程，此可證明APC在大腸直腸癌Wnt訊息路徑中，扮演重要角色(Minde et al., 2011)。進一步分析病人TNM，我們發現：病人淋巴轉移的現象會隨著miR-135a/b表現量增加而提高，尤其淋巴轉移與miR-135b表現量具有明顯正相關，同時APC表現量會下降，突變比例會增加；而遠處轉移的樣本雖占群體少數，但高APC、miR-135a/b表現量與APC突變皆有較高比例的情形；腫瘤大小不受miR-135a/b高表現量的影響，其APC表現量則隨著腫瘤變大而提高，突變比例也會增加。三者的意義在於：APC表現量降低可能是一種啟動機轉，導致腫瘤細胞進行淋巴轉移；遠處轉移與腫瘤變大的時候，APC表現量增加啟動抑癌機轉，但

受到miR-135a/b、APC突變調控使其失去功能。從以上現象看來，APC表現量下降可能會使大腸直腸癌趨向惡化，而miR-135a/b、APC突變則是加劇這個過程的重要因子。

miR-135a/b、APC突變皆會導致APC的功能喪失(Markowitz et al., 2009; Huang et al., 2010)，根據我們的實驗結果，年齡增加，大腸直腸癌罹患率會因為miR-135a/b抑制APC表現而增加；APC突變會使APC不表現，進而導致腫瘤變大。除了上述兩者，其他臨床因子皆無法看出其APC功能喪失主要是受到何者調控。因此，我們直接比較APC表現量、miR-135a/b表現量以及APC突變的相關性，發現：雖然無顯著意義，但miR-135a/b與APC具有正相關，而兩者與APC突變呈現負相關。我們推定大腸直腸癌病人APC之所以功能喪失，miR-135a/b抑制APC表現為主要原因。

另外，除了淋巴轉移，其他臨床因子的分析皆可得到大腸直腸癌在罹患或是惡化時，APC表現量會變高的結果。可能原因是在大腸直腸癌調控機轉偵測到腫瘤發生或是惡化的可能性時，提高APC表現量，以抑制其發生或惡化，但因同時發生了miR-135a/b表現量增加，或是因大量複製，APC發生突變，進而導致APC喪失功能。因為看到其相關性的趨勢，但未明確得到顯著相關的結果，所以其中相關的機轉需要進一步研究。

在分析APC表現量、miR-135a/b表現量以及APC突變之相關性的同時，我們也就大腸直腸癌致病機轉中常見的調控因子，分析它們與APC表現量、APC突變的相關性。發現miR-21、Wnt1、 $\beta$ -catenin、PTEN、E-cadherin、Zeb2等與APC表現量有顯著相關，其中Wnt1、 $\beta$ -catenin、PTEN與APC具有正相關，而miR-21、E-cadherin、Zeb2為負相關。同樣分析APC突變，只有miR-21與APC具有顯著相關，高miR-21表現量組中APC無突變者佔較高比例。我們可以就這些分析的基礎，進行進一步研究，有助於了解大腸直腸癌的分子致病機轉，為大腸直腸癌的預防提供有效的預防策略。

總而言之，在台灣大腸直腸癌患者腫瘤組織中，年齡是APC表現量提高的重

要指標，而 miR-135b 明顯與性別，淋巴轉移有顯著正相關。且分析所有臨床因子發現：APC 表現量下降可能會使大腸直腸癌趨向惡化，miR-135a/b、APC 突變是加劇這個過程的重要因子，其中 miR-135a/b 抑制 APC 表現為主要原因。APC 表現量變高，可能是為了抑制大腸直腸癌發生或惡化，但受到 miR-135a/b 表現量增加，導致 APC 喪失功能。所以，miR-135a/b 在台灣大腸直腸癌形成過程中，可能扮演加速癌化的角色，藉由抑制 APC 表現，使癌化過程加劇，並阻止 APC 之增加表現量阻止癌化的過程。

#### (七)參考文獻

1. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R. *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. *Cancer Res*. 2008 Jul 15;68(14):5795-802.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. Epub 2011 Feb 4.
3. 衛生署, 2010
4. Watson AJ, Collins PD. *Colon cancer: a civilization disorder*. *Dig Dis*. 2011;29(2):222-8. Epub 2011 Jul 5.
5. Huang K, Zhang JX, Han L, You YP, Jiang T, Pu PY, Kang CS. *MicroRNA roles in beta-catenin pathway*. *Mol Cancer*. 2010 Sep 21;9:252.
6. Markowitz SD, Bertagnolli MM. *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer*. *N Engl J Med*. 2009 Dec 17;361(25):2449-60.
7. Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG, Maurice MM. *Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer?* *Mol Cancer*. 2011 Aug 22;10:101.

8. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. *Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene.* Cancer Res. 1997 Oct 15;57(20):4624-30.
9. Derks S, Postma C, Moerkerk PT, van den Bosch SM, Carvalho B, Hermsen MA, Giaretti W, Herman JG, Weijnenberg MP, de Bruïne AP, Meijer GA, van Engeland M. *Promoter methylation precedes chromosomal alterations in colorectal cancer development.* Cell Oncol. 2006;28(5-6):247-57.

(八)相關表格與圖表

Table 1. 大腸直腸癌病人 miR-135a 表現量之臨床分析(中位數-卡方)

Parameter	miR-135a		P-value
	< 79.8	≥ 79.8	
Age (years)			0.752
< 65	39(50.6%)	38(48.1%)	
≥ 65	38(49.4%)	41(51.9%)	
Gender			0.111
female	36(57.1%)	27(42.9%)	
male	41(44.1%)	52(55.9%)	
Stage			0.637
I	11(44.0%)	14(56.0%)	
II	33(56.9%)	25(43.1%)	
III	26(45.6%)	31(54.4%)	
IV	7(43.8%)	9(56.3%)	
Ct Stage			0.926
T1	4(57.1%)	3(42.9%)	
T2	11(42.3%)	15(57.7%)	
T3	49(51.0%)	47(49.0%)	
T4	13(48.1%)	14(51.9%)	
Cn Stage			0.875
N0	44(51.8%)	41(48.2%)	
N1	14(40.0%)	21(60.0%)	
N2	19(52.8%)	17(47.2%)	
Cm Stage			0.637
negative	70(50.0%)	70(50.0%)	
positive	7(43.8%)	9(56.3%)	

Table 2. 大腸直腸癌病人 miR-135b 表現量之臨床分析(中位數-卡方)

Parameter	miR-135b		<i>P</i> -value
	<237.9	≥237.9	
Age (years)			0.202
<65	42(54.5%)	35(45.5%)	
≥65	35(44.3%)	44(55.7%)	
Gender			<b>0.025</b>
female	38(60.3%)	25(39.7%)	
male	39(41.9%)	54(58.1%)	
Stage			<b>0.035</b>
I	14(56.0%)	11(44.0%)	
II	35(60.3%)	23(39.7%)	
III	22(38.6%)	35(61.4%)	
IV	6(37.5%)	10(62.5%)	
Ct Stage			0.752
T1	4(57.1%)	3(42.9%)	
T2	12(46.2%)	14(53.8%)	
T3	46(47.9%)	50(52.1%)	
T4	15(55.6%)	12(44.4%)	
Cn Stage			<b>0.036</b>
N0	50(58.8%)	35(41.2%)	
N1	12(34.3%)	23(65.7%)	
N2	15(41.7%)	21(58.3%)	
Cm Stage			0.318
negative	71(50.7%)	69(49.3%)	
positiveb	6(37.5%)	10(62.5%)	

Table 3. 大腸直腸癌病人 APC 表現量之臨床分析(中位數-卡方)

Parameter	APC expression		P-value
	low	high	
Age (years)			<b>0.038</b>
<65	44(57.1%)	33(42.9%)	
≥65	32(40.5%)	47(59.5%)	
Gender			0.920
female	31(49.2%)	32(50.8%)	
male	45(48.4%)	48(51.6%)	
Stage			0.740
I	11(44.0%)	14(56.0%)	
II	27(46.6%)	31(53.4%)	
III	32(56.1%)	25(43.9%)	
IV	6(37.5%)	10(62.5%)	
Ct Stage			0.766
T1	4(57.1%)	3(42.9%)	
T2	12(46.2%)	14(53.8%)	
T3	45(46.9%)	51(53.1%)	
T4	15(55.6%)	12(44.4%)	
Cn Stage			0.452
N0	39(45.9%)	46(54.1%)	
N1	18(51.4%)	17(48.6%)	
N2	19(52.8%)	17(47.2%)	
Cm Stage			0.345
negative	70(50.0%)	70(50.0%)	
positive	6(37.5%)	10(62.5%)	



Table 4. 大腸直腸癌病人 APC 突變之臨床分析(中位數-卡方)

Parameter	APC mutation		<i>P</i> -value
	yes	no	
Age (years)			0.652
< 65	28(36.4%)	49(63.6%)	
≥ 65	26(32.9%)	53(67.1%)	
Gender			0.537
female	20(31.7%)	43(68.3%)	
male	34(36.6%)	59(63.4%)	
Stage			0.133
I	6(24.0%)	19(76.0%)	
II	19(32.8%)	39(67.2%)	
III	22(38.6%)	35(61.4%)	
IV	7(43.8%)	9(56.3%)	
Ct Stage			0.907
T1	4(57.1%)	3(42.9%)	
T2	6 (23.1%)	20(76.9%)	
T3	34(35.4%)	62(64.6%)	
T4	10(37.0%)	17(63.0%)	
Cn Stage			0.419
N0	26(30.6%)	59(69.4%)	
N1	15(42.9%)	20(57.1%)	
N2	13(36.1%)	23(63.9%)	
Cm Stage			0.419
negative	47(33.6%)	93(66.4%)	
positive	7(43.8%)	9(56.3%)	

Table 5. 大腸直腸癌病人 APC 表現量之相關性

Parameter	APC expression		<i>P</i> -value
	low	high	
miR-135a			0.635
low	39(50.6%)	38(49.4%)	
high	37(46.8%)	42(53.2%)	
miR-135b			0.635
low	39(50.6%)	38(49.4%)	
high	37(46.8%)	42(53.2%)	
miR-21			<b>0.016</b>
low	30(39.0%)	47(61.0%)	
high	46(58.2%)	33(41.8%)	
miR-200a			0.427
low	40(51.9%)	37(48.1%)	
high	36(45.6%)	43(54.4%)	
Wnt1			<b>0.000</b>
low	54(70.1%)	23(29.9%)	
high	22(27.8%)	57(72.2%)	
$\beta$ -catenin			<b>0.000</b>
low	63(81.8%)	14(18.2%)	
high	13(16.5%)	66(83.5%)	
PTEN			<b>0.000</b>
low	55(71.4%)	22(28.6%)	
high	21(26.6%)	58(73.4%)	
E-cadherin			<b>0.000</b>
low	26(33.8%)	51(66.2%)	
high	50(63.3%)	29(36.7%)	
Zeb1			0.140
low	53(45.3%)	64(54.7%)	
high	25(61.0%)	16(39.0%)	
Zeb2			<b>0.020</b>
low	65(45.8%)	77(54.2%)	
high	11(78.6)	3(21.4%)	

Table 6. 大腸直腸癌病人 APC 表現量之相關性

Parameter	APC mutation		<i>P</i> -value
	yes	no	
miR-135a			0.431
low	29(37.7%)	48 (62.3%)	
high	25(31.6%)	54(68.4%)	
miR-135b			0.431
low	29(37.7%)	48(62.3%)	
high	25(31.6%)	54(68.4%)	
miR-21			<b>0.014</b>
low	34(44.2%)	43(55.8%)	
high	20(25.3%)	59 (74.7%)	
miR-200a			0.373
low	24(31.2%)	53(68.8%)	
high	30(38.0%)	49(62.0%)	
APC			0.908
low	27(35.1%)	50(64.9%)	
high	27(34.2%)	52(65.8%)	
WnT1			0.579
low	25 (32.5%)	52(67.5%)	
high	29(36.7%)	50(63.3%)	
PTEN			0.826
low	26(33.8%)	51(66.2%)	
high	28(35.4%)	51(64.6%)	
Zeb1			0.652
low	28(36.4%)	49(63.6%)	
high	26(32.9%)	53(67.1%)	
Zeb2			0.652
low	28(36.4%)	49(63.6%)	
high	26(32.9%)	53(67.1%)	

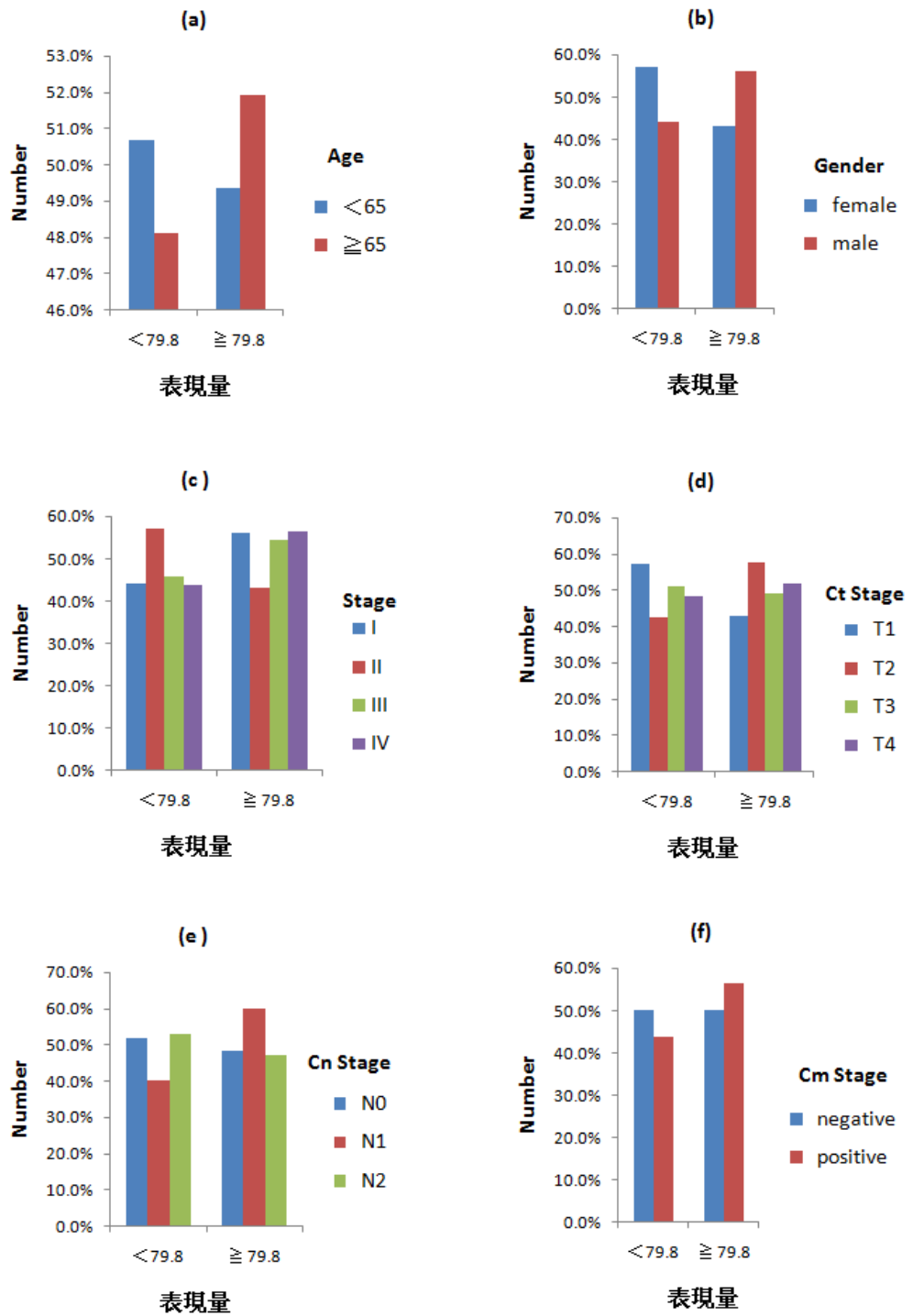


Figure 1. 大腸直腸癌病人miR-135a臨床分析百分位圖

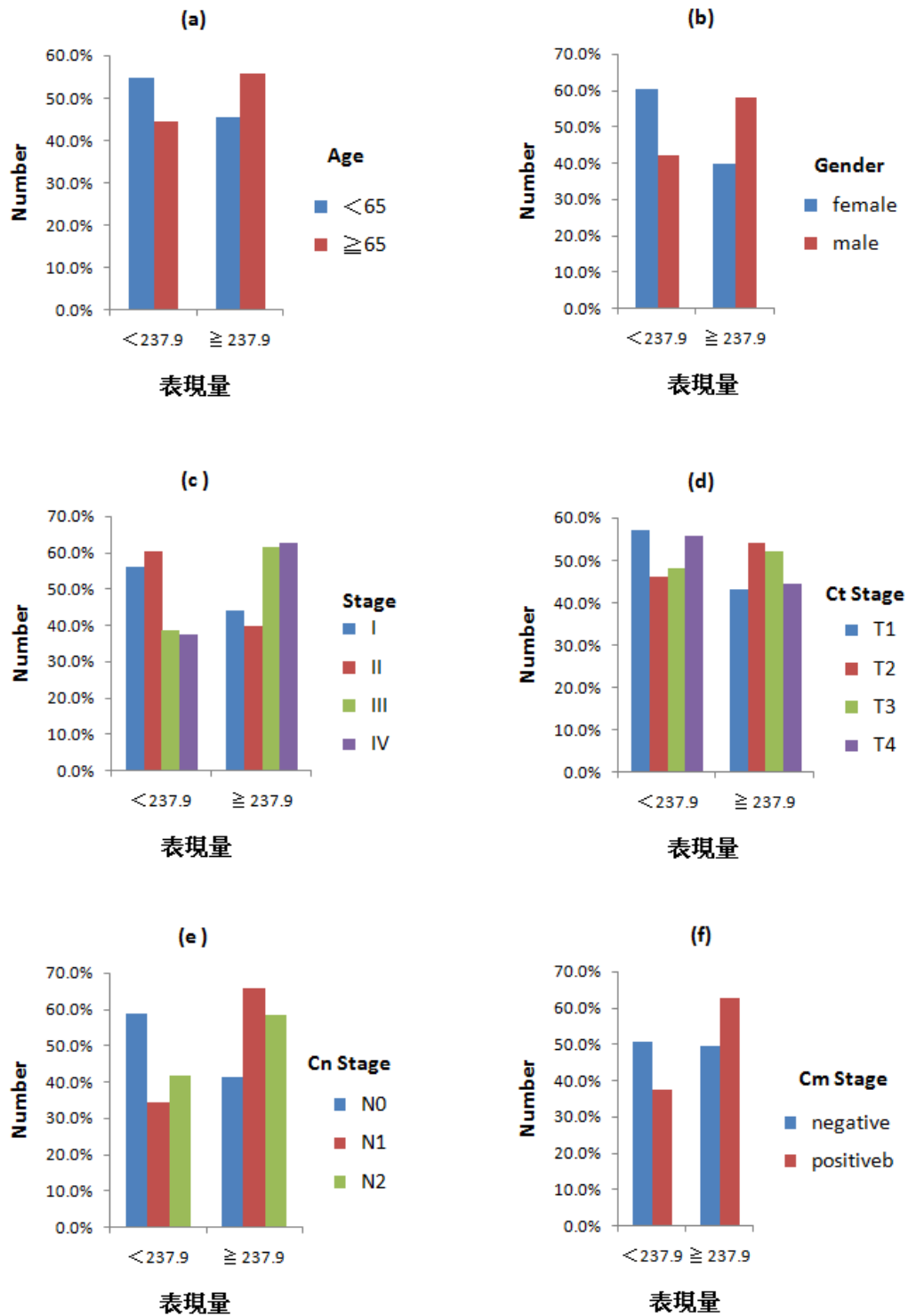


Figure 2. 大腸直腸癌病人miR-135b之臨床分析百分位圖

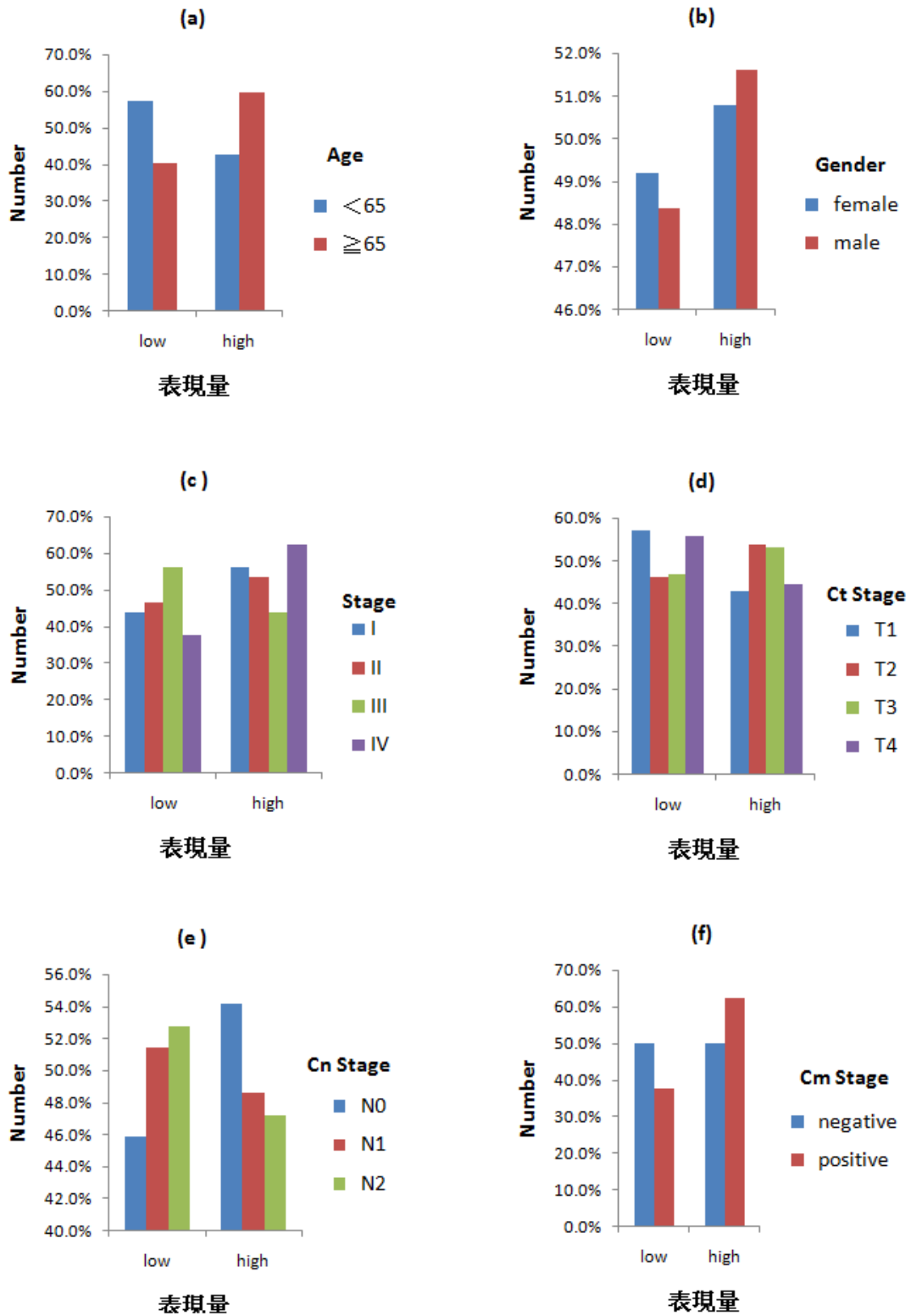


Figure 3. 大腸直腸癌病人APC之臨床分析百分位圖

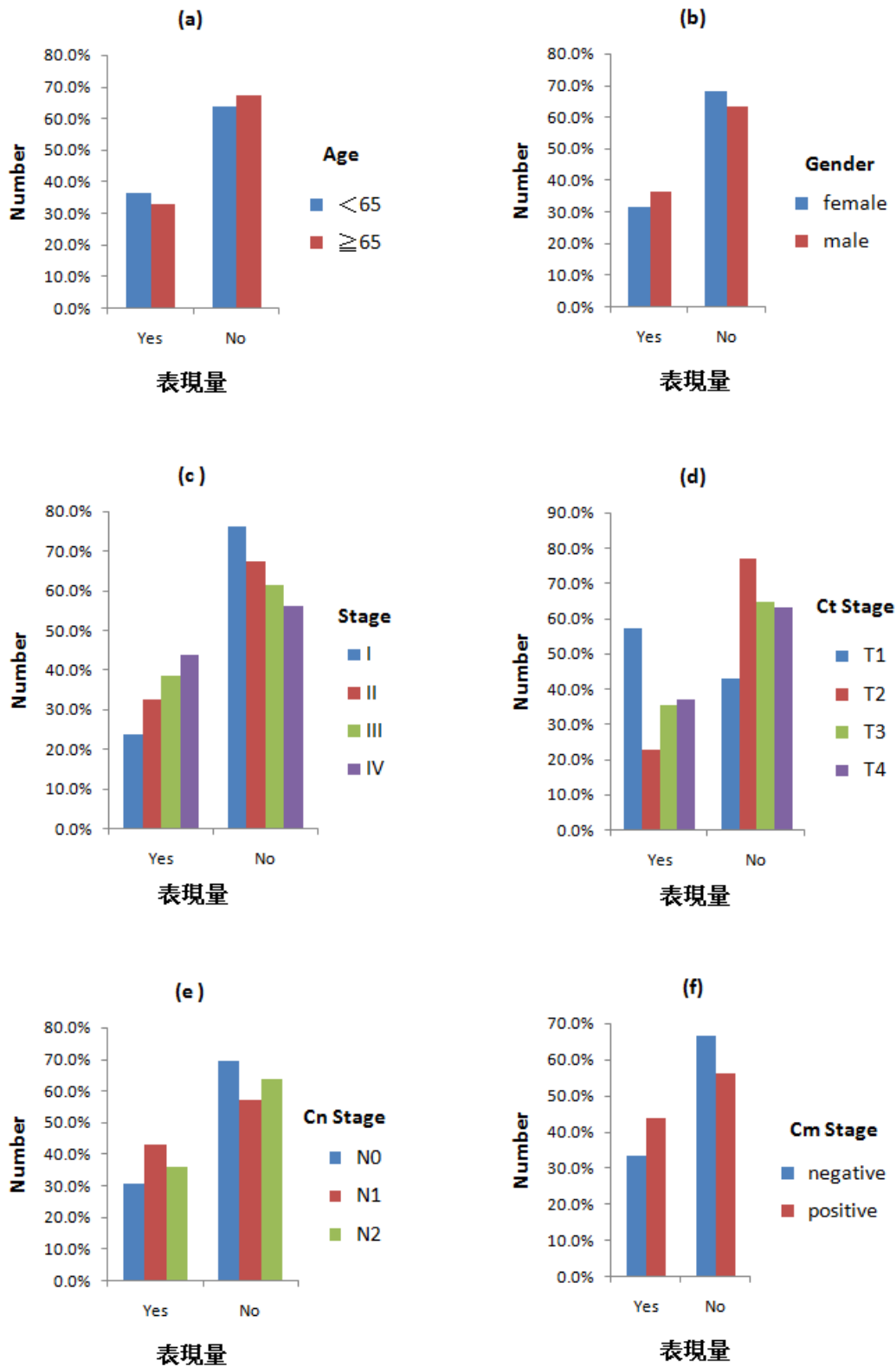


Figure 4. 大腸直腸癌病人APC突變之臨床分析百分位圖