

## 대장암 조직에서 대장암 관련 유전자 분석

정민정, 장희경

고신대학교 의과대학 병리학교실

# The Gene Profiling of Colon Cancer -Associated Genes From Colon Cancer Tissue

Min-Jung Jung, Hee-Kyung Chang

Department of Pathology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

### Abstract

**Background/Aim:** This study attempted to elucidate the new gene molecules involved the oncogenesis of colon cancer from cancer and non-neoplastic tissues which was obtained from Korean women underwent colectomy. Material and Method: Total RNA was extracted from fresh cancer and adjacent normal mucosal tissues from Korean women showed stage IIb without lymph node metastasis, perineural and vascular invasions, and made cDNA. The genefishing PCR was performed and cloning and amplification was done from bands on the electrophoresis. DNA sequencing was done from amplified DNA. The identification of new genes was through blast searching. Finally the genes were confirmed by RT-PCR.

**Results:** There were 8 DEGs with upregulation in normal tissue and 10 DEGs with upregulation in cancer tissues. The novel genes which has not reported the relationship with colon cancer were interferon induced transmembrane protein 1, nuclear matrix protein NRP/B(NRPB), Vacular ATPase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1). Second candidates rarely reported the association with colon cancer were human homeobox protein Cdx1, Homosapiens homeo box B6(HOXB6), homosapiens enrailed homolog 2(EN2), Homosapiens mucin 4(MUC4), Homosapiens translocation protein 1, Interleukin 1 receptor, type II, ribosomal protein S2, isolate C40 mitochondrion, myosin, heavy polypeptide 11, Homosapiens homeobox B13, Homeobox transcription factor 1 .

**Conclusions:** These results suggest that the future studies will be needed about the functional roles and clinical implications of novel genes showing non-metastasizing cancer tissue of Korean women are interferon induced transmembrane protein 1, nuclear matrix protein NRP/B(NRPB), Vacular ATPase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1) in colon cancer. Gene fishing was verified as a excellent tool to detect the novel genes contributing the development of cancer.

**Key words:** gene profiling, colon cancer, gene fishing

## 서 론

대장암은 현재 국내에서 남자는 4번째, 여자에서는 3 번째로 높은 발생 빈도를 나타내며, 더우기 계속 증가되는 추세에 있으며, 이는 식이 습관의 서구화 현상 때문이라고 풀이되고 있다.<sup>1)</sup> 대장암의 발생에 관여한다고 알려진 유전자로 APC, mismatch repair gene, p53, k-ras 등의 여러 유전자 들이 있다.<sup>2-6)</sup> 그러나, 현재는 Vogelstein의 경

로<sup>7)</sup>의 다른 경로로 발생되는 대장암에 대한 연구들<sup>8)</sup>이 보고되고 있으나, 전통적으로 대장암 호발 지역인 서구사람들과 비교하여 우리나라 사람들의 대장암 발생에서 관여하는 유전자 차이는 아직 보고 되지 않고 있다. 따라서 대장암 발생에 있어 우리나라와 서구인들의 유전자 발현을 비교하는 연구가 대장암 환자의 치료와 예방, 관리 측면에서 필요하다.

종양의 발생에 관여하는 새로운 유전자 검출과 유전자 발현 변화를 비교하는 연구 방법으로는 현재까지, differential display reverse transcription PCR(DDRT-PCR)<sup>9,10)</sup>, DNA chip<sup>10)</sup>, expressed sequence tag (EST) analysis 즉 gene fishing<sup>10-12)</sup> 등이 있다. 이

교신저자 : 장 희 경  
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지  
고신대학교 의과대학 병리학교실  
TEL : 051-990-6323

(생명윤리제정이전인 2004년 채취된 검체와 병원 IRB 구성이전에 시행된 연구임)

중 유전자 낚시법(gene fishing)은 비교 대상 시료간에 mRNA의 발현 차이를 보이는 모든 유전자를 검출할 수 있는 방법으로 microarray 보다 위반응성(false reactivity)에 대한 위험이 적은 differentially expressed gene (DEG)을 검출하는 방법으로 특정 유전자에 대한 정보가 없는 상태에서 선별 검사로서 좋은 유전자 검출 방법이다<sup>9-11)</sup>.

본 연구는 기존에 밝혀져 있지 않은 대장암 발생에 관여하는 유전자와 유전자 발현을 조사하기 위하여 정상 대장 점막 조직과 대장암 조직에서 mRNA를 추출하여 gene fishing DEG PCR(Seegene, Daegeon, Korea)을 이용하여 유전자 발현을 비교하여 한국인의 대장암 발생에 관여하는 유전자의 발현 변화를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

**1. 사용된 검체:** 대장 내시경 검사에서 선암으로 진단 받은 56세 여자 환자의 절제술후의 신선한 가검물(생명윤리제정이전인 2004년 채취된 검체와 병원 IRB 구성 이전에 시행된 연구임)을 절취하여 동결절편으로 확인한 암 조직과 정상 대장 점막 조직을 1x1x1cm 정도 취하여 질소 탱크에 보관하였다가 실험에 이용하였다. 나머지 조직은 10% 포르말린에 고정후 파라핀에 포매한 후 H-E 염색을 실시하고, 병리 조직 검사를 하였다.

### 2. Total RNA 추출

대장조직과 암조직의 total RNA는 TRI reagent(MRC, Cincinnati, OH)을 이용하여 추출하였다.

채취한 조직을 조직 분쇄기에 넣고, 2 ml의 Trizol(biotex, USA)을 첨가한 후 분쇄기를 이용하여 조직을 갈았다. 조직을 균질화 한 후 조직 용해액의 1/10의 chloroform(Sigma)에 넣고 혼합한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심하여 분리한다. 원심 분리후 상층액만을 취하고 동량의 100% isopropanol(Sigma)을 첨가한 후 -20° C에 16시간 이상 보관하여 RNA를 침전시켰다. 다시 원심 분리하여 상층액을 버리고, 75% ethanol로 침전된 RNA를 세척하고 건조시켰다. RNA-propanol 혼합액을 12,000 rpm 으로 15분간 원심 분리하여 RNA pellet을 만든 후 상층액을 제거하였다. 여기에 ice-cold

70% ethanol 을 1 ml 첨가하여 RNA pellet를 세척한 뒤 원심분리하여 상층의 ethanol 용액을 제거하고 RNA pellet을 diethyl pyrocarbonate-distilled water (DEPC-DW, sigma)에 녹인 후 분광광도계(UltroSpec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)로 260nm 파장에서 OD 값을 측정하여 RNA농도를 구하였다.

### 3) First strand cDNA 합성

Annealing Control Primer-1(ACP-1)을 이용하여 역전사반응에 의해 first strand cDNA를 합성한다. Total RNA 3ug에 5X RT buffer(Promega, Madison, WI, USA) 4 $\mu$ l, 2mM dATP 5 $\mu$ l, 2mM dGTP 5 $\mu$ l, 2mM dTTP 5 $\mu$ l, 2mM dGTP 5 $\mu$ l, MMLV reverse transcriptase(200U/l, Promega, USA) 1 $\mu$ l, RNase inhibitor(40U/ $\mu$ l, promega, USA) 0.5 $\mu$ l, 그리고, 10uM dT-ACP-1(5'-CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3')첨가하여 혼합액을 만든 후 20 $\mu$ l를 42° C에서 1.5h 동안 역전사 반응을 시켰다.

### 3. ACP-based GeneFishing™ PCR

Oligo-dT ACP1에 의해 합성된 cDNA를 20개의 arbitrary ACPs (Annealing Control Primer), dT-ACP2와 함께 94° C에서 40초, 65° C에서 40초, 72° C에서 40초 동안 40 cycle 반응하였다. 희석된 first strand cDNA 3-5 $\mu$ l(50ng), dT-ACP-2(10 $\mu$ m) 1 $\mu$ l, 10 $\mu$ m arbitrary ACP 1 $\mu$ l, 2x master mix(Seegene, Seoul, South Korea) 20 $\mu$ l을 50° C 1 cycle로 first-stage PCR 시행후, 94° C 1분, 50° C 3분, 72° C 1분으로 1 cycle을 진행한 후, 94° C 40초, 65° C 40초, 72° C 40초, 이후 72° C에서 5분간 방치하여 second stage PCR을 시행하였다.

### 4. Agarose gel elution과 sequencing 분석

Gene Fishing™ PCR을 수행후 PCR 생산물을 2% agarose gel에 전기 영동하여 뚜렷한 발현의 차이를 보이는 band를 잘라내어 재증폭한 후 TA cloning vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, USA)를 이용하여 클로닝하였으며, 클론된 플라스미드는 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA)로 자동 염기서열 분석을 수행하였다. 분석된 염기 서열을 NCBI BLAST software를 이용하여 분석하였다

**결 과**

**1. 병리조직 검사 결과**

종양은 중등도 분화를 보이는 선암세포가 대장 고유 근육층 밑에 있는 장막하 지방조직에 까지 침범된 소견을 보였으며, 24개의 림프절 중 전이는 없었으며, 혈관과 신경 주위 조직의 침범도 없었다. 병리 병기는 IIb이었다. (Fig.1)

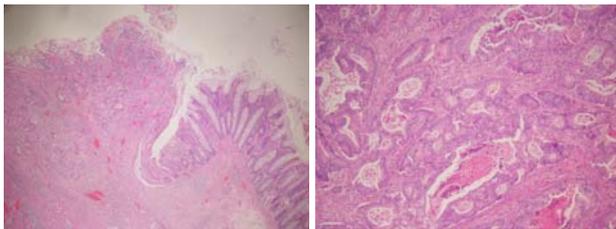


Fig.1. The microscopic finding of colon cancer used in the present study. The pathologic diagnosis was adenocarcinoma, moderately-differentiated.(left : H-E, x40, right H-E, x200)

**2. Differentially expressed amplified cDNA product**

정상 대장 점막과 암조직에서 60개의 primers로 구성된 Gene Fishing™ PCR 을 이용하여 정상 점막 조직에서 발현 증가를 보이는 8개와 암 조직에서 증가를 보이는 10개, 모두 18개의 DEGs를 확보하였다.(Fig. 2)

**3. Detection of gene from Cloning and Sequencing**

Gene Fishing™ RT-PCR을 수행후 뚜렷한 발현의 차이를 보이는 band의 mRNA를 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA) 를 이용하여 증폭시키고, 염기 서열을 분석한 후 NCBI Blast searching을 한 결과 기존의 연구 보고에서 아직 대장암과의 관계가 언급되지 않은 새로운 유전자로서 대장암에서 발현의 증가나 발현을 보이는 유전자들로(Table 1) interferon induced transmembrane protein 1, nuclear matrix protein NRP/B(NRPB), Ribosomal protein S2, chromosomal 5 RPII-2321.2, single stranded DNA binding protein 1, Vacular ATPase, C40 mitochondrion이였고, 정상조직에서 대장암 조직보다 발현의 증가를 보인 유전자로는(Table 2) Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1), Homosapiens mucin 4(MUC4), Homosapiens translocation protein 1, Interleukin 1 receptor, type II, Myosin heavy polypeptide 11, NFATC2 였으며, 나머지는 상기 유전자와 중복되었고, 1개의 DEG는 cloning에 실패하였다.

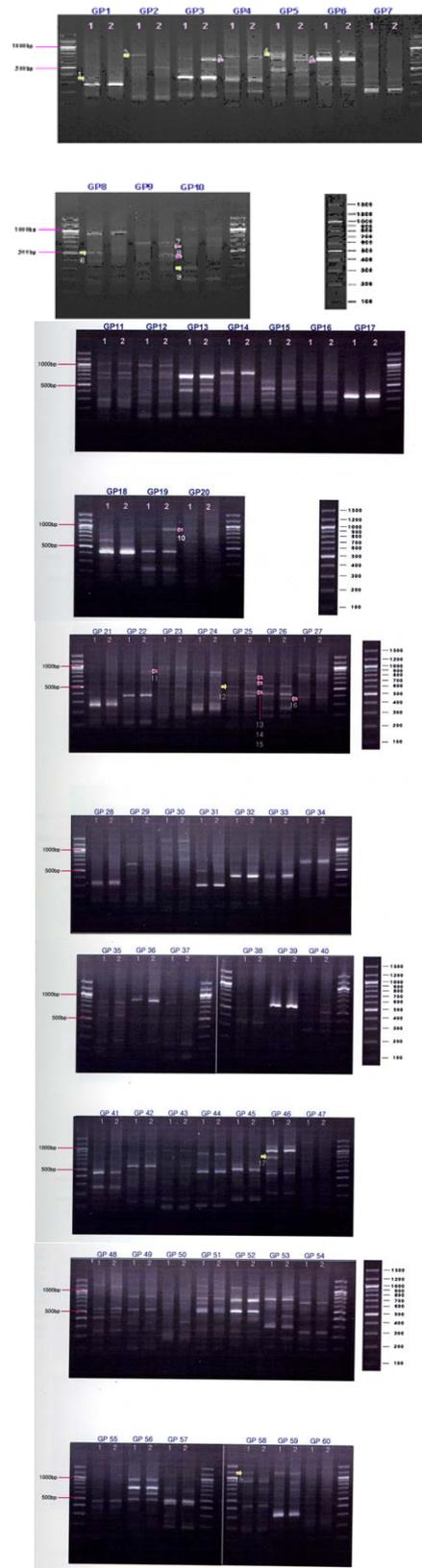


Fig. 2 The results of DEG discovery screening with 60 primers. : DEG ,3,5,7,8,10,11,13,14,15,16: upregulated gene in tumor, DEG 2,4,6(clove A) 6(clove B),9,12,17,18: upregulated gene in normal tissue (1:Non-neoplastic mucosa, 2: Tumor)



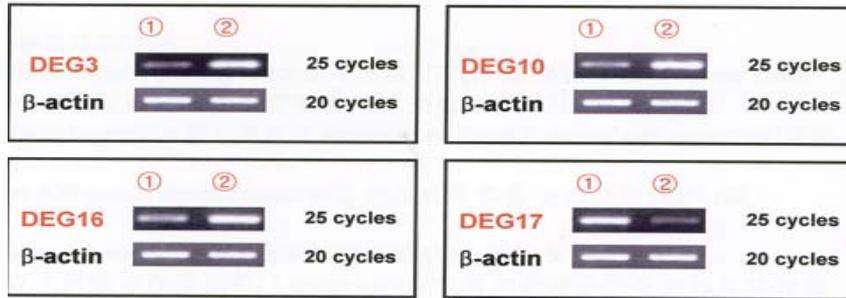


Fig. 4. Confirmation of DEG with prescreened cDNA: DEG 3,10, and 16 genes were upregulated in colon cancer tissue, whereas DEG 17 was upregulated in normal colon mucosal tissue. (1: Normal, 2: Tumor)

Table 1. Colon Cancer-Associated Genes with Expression and Upregulation in Tumor Tissue after Blast Searching of DEGs

DEG No.	GeneBank Accession No.	Sequence homology search
DEG 3	BC000897	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 1 (9-27), mRNA (cDNA clone MGC:5195 IMAGE:3464598), complete cds Length = 683
DEG 5		
DEG 7		
DEG 8	BC000897 (same as DEG3)	
DEG 10	AF059611	Homo sapiens nuclear matrix protein NRP/B (NRPB) mRNA, complete cds
DEG 11	BC071923	Homo sapiens ribosomal protein S2, mRNA (cDNA clone MGC:88608 IMAGE:5477295), complete cds Length = 950
DEG 13	AY714044	Homo sapiens isolate C40 mitochondrion, complete genome Length = 16570
DEG 14	AC116345	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-232L2, complete sequence Length = 161470
	AI928472 (EST)	wp02d05.x1 NCL_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2463657 3', mRNA sequence. Length = 443
DEG 15	BC000895	Homo sapiens single-stranded DNA binding protein 1, mRNA (cDNA clone MGC:5185 IMAGE:3464282), complete cds Length = 1030
DEG 16	D49400	Homo sapiens mRNA for vacuolar ATPase, complete cds Length = 680

Table 2. Colon Cancer-Associated Genes with Expression or Upregulation in Normal Tissues after Blast Searching of DEGs

DEG No.	GeneBank Accession No.	Sequence homology search
DEG 2	NM_138299	Homo sapiens mucin 4, tracheobronchial (MUC4), transcript variant 3, mRNA Length = 7217
DEG 4		
DEG 6	(CloneA) BC012035	Homo sapiens translocation protein 1, mRNA (cDNA clone MGC:21260 IMAGE:4706586), complete cds Length = 1444
DEG 6	(CloneB) BC039031	Homo sapiens interleukin 1 receptor, type II, transcript variant 1, mRNA (cDNA clone MGC:47725 IMAGE:5723005), complete cds Length = 1484
DEG 9		
DEG 12	HSJ994024	Human DNA sequence from clone RP5-994024 on chromosome 20 Contains part of the NFATC2 gene for cytoplasmic calcineurin-dependent (2) nuclear factor of activated T-cells and two CpG islands, complete sequence Length = 56415
DEG 17	AY794987	Homo sapiens phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (PCK1) gene, complete cds Length = 9278
DEG 18	BC080545	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle, mRNA (cDNA clone IMAGE:5814690), partial cds Length = 2369

Table 3. The primer sequences of the representatives of confirmed DEGs by RT-PCR DEG Sequences

<b>Primer</b>
<b>DEG3 (product:245bp)</b>
I3-51 : GTC TGG GCT TCA TAG CAT TCG I3-31 : GCA GGC TAT GGG CGG CTA CT
<b>DEG10 (product:541bp)</b>
I10-52 : CAT GTG CCG TCG TAG GTA TT I10-32 : TAG AGG ATT CAA GAA CAG AC
<b>DEG16 (product:469bp)</b>
I16-51 : CTG GTG GTG GAG AAG GAT AC I16-31 : AAC AGC ACA GGG AAG AGG TA
<b>DEG17 (product:469bp)</b>
I17-51 : CCT TCT TTG GCT ACA ACT TC I17-31 : TTA TGG ATG GGA AAG GGA AT
<b>Human <math>\beta</math>-actin (product:510bp)</b>

<b>Primer</b>
<b>DEG3 (product:245bp)</b>
I3-51 : GTC TGG GCT TCA TAG CAT TCG I3-31 : GCA GGC TAT GGG CGG CTA CT
<b>DEG10 (product:541bp)</b>
I10-52 : CAT GTG CCG TCG TAG GTA TT I10-32 : TAG AGG ATT CAA GAA CAG ACC C
<b>DEG16 (product:469bp)</b>
I16-51 : CTG GTG GTG GAG AAG GAT ACA I16-31 : AAC AGC ACA GGG AAG AGG TAG
<b>DEG17 (product:469bp)</b>
I17-51 : CCT TCT TTG GCT ACA ACT TCG I17-31 : TTA TGG ATG GGA AAG GGA AT
<b>Human <math>\beta</math>-actin (product:510bp)</b>
h $\beta$ -actin 5 : GAC TAT GAC TTA GTT GCG TTA h $\beta$ -actin 3 : GCC TTC ATA CAT CTC AAG TTG

## 고찰

DEG(Differentially Expressed Gene)는 비교할 시료간의 mRNA 발현 차이를 보이는 모든 유전자들을 일컫는 것으로 암과 같은 질병 유전자, 항생제 내성 유전자, 분화 관련 유전자등의 분야에서 DEG를 찾고자 하는 연구가 활발한데, 유전자 낚시법을 이용하는 경우가 대부분이다.<sup>10-13)</sup> 이때 유전자 낚시법의 PCR은 두 단계로 나누어지는 데, 첫단계는 annealing 온도 50°C 에서 오직 표적 부분만이 주형 cDNA에 특이하게 annealing하여 두 번째 가닥의 cDNA를 만들고 두 번째 PCR은 65°C에서 비표적부분만을 특이하게 annealing하여 기하급수적으로 dsDNA를 만들어 아가로즈 겔에서 결과로서 확인하게 된다.<sup>11-12)</sup>

본 연구에서는 대장암 조직과 주위 비종양성 대장 점막조직에서 18개의 DEG를 검출하였다. 이 DEG band의 염기 서열을 분석한 결과, 검출된 유전자들은 모두 발생이나 암과 관련된 유전자들이었다. DEG 2는 막성 점액 유전자군에 속하는 MUC 4 유전자로 이미 대장암, 위암, 췌장암등에서 발현이 보고되었으나, 아직 대장암과의 뚜렷한 관련성에 대한 보고는 접하기 힘들다.<sup>14,15)</sup> DEG3 은 Interferon induced transmembrane protein 1로 밝혀졌다. Interferon은 아포프토시스를 유도하고 세포증식을 억제하는 기능으로 대장암과의 밀접한 관련성이 이미 보고되고 있으나, 아직은 interferon과 관련이 있는 Interferon induced transmembrane protein 1 에 대한 보고는 없다.<sup>16,17)</sup> DEG 6은 interleukin 1 receptor, type II로 이미 종양의 신생혈관형성과 관련된 종양 성장 인자인 interleukin 1의 수용체로서 세포의 형태를 변화시키고, 액틴을 재배열시켜 세포의 이주를 촉진하여 대장암 발생과 진행과 관련이 있을 수 있다는 보고가 최근 있었으나, 아직은 대장암에서의 역할이 분명하게 규명되어 있지는 않다.<sup>18,19)</sup> DEG8은 Interferon induced transmembrane protein 1로 DEG3 와 동일하였다. DEG10은 nuclear matrix protein NRP/B (NRPB)로 밝혀졌는데, 이 유전자는 1998년에 밝혀진 새로운 nuclear matrix protein으로 human brain에서 주로 발현되고 신장과 췌장에서도 발현이 된다고 보고되고 있으나 아직까지는 대장에서 발현되었다는 보고는 없다.<sup>20,21)</sup> 그러나, 기존에 알려진 다른 많은 nuclear

matrix protein들은 대장암 발생과 연관성이 있다고 보고되어<sup>22,23)</sup> nuclear matrix protein NRP/B (NRPB)인 DEG10도 colon cancer와 연관성이 있을 것으로 유추해 볼수 있겠다. DEG 11은 ribosomal protein S2로 임상적 의미는 없으며, 또한 DEG 13은 C40 mitochondrion이었고, DEG14는 RP11-232L2유전자이고, DEG15는 single stranded DNA binding protein 1 으로서, 모든 세포에 존재하는 임상적 의미는 없는 유전자들이었다. DEG 12는 NFATC2(nuclear factor of activated T-cells and two CpG islands)로 integrin과 관련하여 종양의 침윤에 작용할 것이라고 알려진 전사인자 유전자<sup>24)</sup>로서 대장암에서 Cox-2 조절에 관여할 것이라는 보고가 있으나, 조절을 억제하기도 하고 조장하기도 할 것으로 추측되고 있으나, 그 정확한 조절기전은 규명되지 않고 있다.<sup>25)</sup> DEG16은 vacuolar ATPase 유전자로 밝혀졌다. 이 gene은 proton pump 기능을 통해 cellular pH regulator로 작용할<sup>26,27)</sup>뿐만 아니라 tumor cell의 cell proliferation, invasion, metastasis 및 apoptosis에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>28)</sup> 최근에 vacuolar ATPase inhibitor인 *hygrolidin* 연구를 통해 vacuolar ATPase가 tumor cell growth에 중요하다는 사실이 밝혀졌다<sup>28)</sup>. 이와 같은 사실에 비추어 vacuolar ATPase가 대장암의 발생과 진행과도 연관성이 있을 수 있을 것으로 유추할 수 있다. DEG17은 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (PCK1)으로 밝혀졌다. 이 유전자는 대장에서는 발현된다고 기존에 밝혀져 있으나 대장암에서의 역할은 아직 밝혀지지 않았다.<sup>29)</sup> Glucagon, insulin등 호르몬 조절과 관련이 있다는 보고가 있으며 제2형 당뇨병 및 비만과의 연관성도 연구되고 있으며, 세포의 형태변환에 관여할 것이라는 추측도 있으나, 작용기전이나 역할등에 대한 보고는 드물다.<sup>9,30)</sup> DEG 18은 myosin heavy polypeptide 11, smooth muscle 유전자로 임상적인 큰 의미는 없는 유전자였다.

2008년 Antonacopoulou등은<sup>31)</sup> microarray를 이용한 연구에서, 대장암의 예후와 관련이 있을 것으로 추측되는 새로운 molecule로 DNA-directed RNA polymerase II subunit F(POLR2F), a subunit of the VO domain of the vacuolar ATPase(ATP6VOA1), Prion protein(PRNP)를 보고하였다. 따라서 vacuolar ATPase는 대장암의 진행과 전이에 관련이 있을

것으로 추측되어, 본 연구 결과를 지지한다고 하겠다. 그 외 대장암에서 발현의 이상을 보이는 유전자로 본 연구 결과에서 밝혀진 interferon induced transmembrane protein 1, nuclear matrix protein NRP/B(NRPB), Vacuolar ATPase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1)등의 유전자는 대장암 발생과 진행, 예후등에서의 역할과 임상적 의의가 앞으로 연구 대상이 될 것으로 생각된다.

## 결론

기존에 밝혀져 있지 않은 대장암 발생에 관여하는 유전자를 조사하기 위하여 정상 대장 점막 조직과 대장암 조직에서 유전자 낚시법을 이용하여 유전자 발현을 비교하여 Interferon induced transmembrane protein 1, nuclear matrix protein NRP/B (NRPB), vacuolar ATPase, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (PCK1)의 유전자의 발현 이상이 대장암 발생에 관여함이 새로이 밝혀졌다. 이 유전자들의 대장암에서의 발현 양상과 임상적 의의를 검증하기 위한 다량의 표본들을 대상으로 한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것으로 생각한다.

## 참고문헌

- 1) 보건복지부. 한국중양암등록사업 연례보고서 2002.
- 2) Lindor NM, Peterson GM, Hadey DW, Kinney AY, Miesfeldt S., Lu KH, Lynch P, Burke W, Pres N.: Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systemic review. JAMA 296: 1507-17, 2006.
- 3) Gibson SL, Narayanan L, Hegan DC, Buermeyer AS, Liskay RM, Glazer PM.: Overexpression of the DNA mismatch repair factor, PMS2, confers hypermutability and DNA damage tolerance. Cancer Lett 244:195-202, 2006.
- 4) Samowitz WS, Wolff RK, MA KN, Anderson K. Caan B, Slattery M.: Polymorphism in insulin-related genes predispose to specific KRAS2 and TP 53 mutations in colon cancer. Mutat Res 595: 117-24, 2006.
- 5) Lonart ME, Vidal F, Gallardo D, Diaz-Futertes M, Rojo F, Cuatrecasas M, Lopex-Vicente L, Kondoh H, Blanco C, Carnero A, Ramon Y Cajal S.: New 053 related gened in human tumors; significant downregulation in colon and lung carcinomas. Oncol Rep. 16: 603-8, 2006.
- 6) Bongaerts BW, de Goeij AF, van den Brandt PA, Weijnenberg

- MP. Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the K-ras gene. *Alcohol* 38: 147-54, 2006.
- 7) Volgelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. *N E J Med* 319:525-32, 1988.
  - 8) Smith D, Ballal M, Hodder R, Selvachandran SN, Cade D.: The adenoma carcinoma sequence: an indoctrinated model for tumorigenesis, but is it always a clinical reality? *Colorectal Dis.*8:296-301, 2006.
  - 9) Hwang, K. C., X. S. Cui, S. P. Park, M. R. Shin, S. Y. Park, E. Y. Kim, and N. H. Kim.: Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system. *Mol. Reprod. Dev.* 69:43-51, 2004
  - 10) Hall IP.: Expression on profiling: fishing and chips. *Gut* 53: 917-8, 2004
  - 11) Hwang, I. T., Y. J. Kim, S. H. Kim, C. I. Kwak, Y. Y. Gu, and J. Y. Chun.: Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* 35:1180-1184, 2003
  - 12) Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang, and J. Y. Chun.: Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* 36:424-426, 428, 430, 2004
  - 13) Pohjanvirta, R.: Comparison of several hot-start Tag DNA polymerases for detection of differentially expressed genes by GeneFishing. *Biochemica* 2:17-18, 2004
  - 14) Nguyen MD, Plasil B, Wen P, Frankel WL.: Mucin profiles in signet-ring cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 130(6):799-804, 2006.
  - 15) Balague C, Cambus G, Carrato C, Porchet N, Aubert JP, Kim YS, Real FX.: Altered expression of MUC2, MUC4, and MUC5 mucin genes in pancreas tissues and cancer cell lines. *Gastroenterology.* 106(4):1054-61, 1994.
  - 16) Vekemans K, Braet F, Muylaert D, Wisse E.: Nitric oxide from rat liver sinusoidal endothelial cells induces apoptosis in IFN gamma-sensitized CC531s colon carcinoma cells. *J Hepatol.* 41(1):11-8, 2004.
  - 17) Juang SH, Wei SJ, Hung YM, Hsu CY, Yang DM, Liu KJ, Chen WS, Yang WK.: IFN-beta induces caspase-mediated apoptosis by disrupting mitochondria in human advanced stage colon cancer cell lines. *J Interferon Cytokine Res.* 24(4):231-43, 2004.
  - 18) Stadnyk AW, Yeung MM, Yan SR.: Human colon carcinomas constitutively express and shed type II IL-1 receptor, anIL-1 antagonist. *Dig Dis Sci.*48(9):1737-44, 2003.
  - 19) Abdul M, Hoosein N.: Relationship of the interleukin-1 system with neuroendocrine and exocrine markers in human colon cancer cell lines. *Cytokine.* 18(2):86-91, 2002.
  - 20) Kim TA, Lim J, Ota S, Raja S, Rogers R, Rivnay B, Avraham H, Avraham S.: NRP/B a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J Cell Biol.* 141(3):553-66, 1988.
  - 21) Liang XQ, Avraham HK, Jiang S, Avraham S.: Genetic alterations of the NRP/B gene are associated with human brain tumors. *Oncogene.* 23(35):5890-900, 2004.
  - 22) Brunagel G, Schoen RE, Getzenberg RH.: Colon cancer specific nuclear matrix protein alterations in human colonic adenomatous polyps. *J Cell Biochem.* 91(2):365-74, 2004.
  - 23) Brunagel G, Schoen RE, Bauer AJ, Vietmeier BN, Getzenberg RH.: Nuclear matrix protein alterations associated with colon cancer metastasis to the liver. *Clin Cancer res;* 8(10):3039-45, 2002.
  - 24) Duque J, Fresno M, Iniguez MA.: Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 11:280(10):8686-93, 2005
  - 25) Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A.: The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion *Nat Cell Biol.* 4(7):540-4, 2002.
  - 26) Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M.: Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta.* 1658(1-2):106-14, 2004.
  - 27) Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K.: Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 29(6):541-9, 2003.
  - 28) Kawada M, Usami I, Ohba S, Someno T, Kim J, Hayakawa Y, Nose K, Ishizuka M.: Hygrolidin induces p21 expression and abrogates cell cycle progression at G1 and S phases. *Biochem Biophys Res Commun.* 18:298(1):178-83, 2002.
  - 29) Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C.: Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Apr;15(3):129-35. Review. Erratum in: *Trends Endocrinol Metab.* 15(5):192, 2004.
  - 30) <http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>
  - 31) Antonacopoulou AG, Grivae PD, Skalas L, Kalofonos, Scopa CD, Kalofonos HP: POLR2F, ATP6VOA1, and PRNP expression in colorectal cancer: new molecules with prognostic significance? *Anticancer Res* 28:1221-7, 2008