Thesis Title Biochemical Characterization and Properties of Intestinal Alkaline Phosphatase Isoenzyme in Patients with Colon Cancer

Author Miss Wallapa Lemtragool

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee Associate Professor Rujapa Nimsung Chairperson

Mr. Taned Chitapanarux Member

ABSTRACT

Human alkaline phosphatase(ALP; EC 3.1.3.1) comprises four related isoenzymes, the tissue non-specific (TNAP) , intestinal (IAP), placental (PLAP) and germ-cell ALP. The IAP isoenzyme is found approximatly 25% of the total ALP activity in human serum. It appears in the circulation more frequently in blood group B or O secretor than in non-secretor. Increase serum IAP activity is also observed in liver cirrhosis, chronic renal failure and various diseases of the digestive tract. However, the recognition of the possible presence of IAP in colon cancer is important for clinical diagnosis.

The purpose of this study was to characterize and study the properties of the IAP isoforms presented in normal, colon cancer sera with no regard to blood group secretor status. Another purpose was to compare the isoforms detected in serum of patient with those found in tumor and paired normal mucosal tissues of the same colon cancer patient.

In this study, normal sera were collected from thirty-two healthy volunteers. Colon cancer specimens with positive colonoscopy consist of five tumor and paired-normal mucosal tissues and the corresponding patient sera. All samples were taken from subjects during the fasting state, at least 8 hrs before specimen collections. Patient specimens were obtained from

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

the Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University by the informed consent of the patients (EC-Proforma 1, No.063/2004).

Total ALP activity of normal (n=32) and patient serum (n=5) determined in diethanolamine (DEA) buffer , pH 9.2 using ρ-nitrophenyl phosphate substrate (PNPP) were 183.87 ± 50.33 U/L (mean ± S.D.) and 271.60 ± 165.69 U/L , (mean ±S.D.) respectively. The difference between the mean of ALP activity in normal and colon cancer sera was statistically significant ($p<0.025$). Specific activity of ALP extracted from tumor and normal tissues of colon cancer patients were 5.48 ± 2.70 U/g (mean ± S.D.) and 3.00 ± 1.98 U/g, (mean ± S.D.) respectively. Mean of specific acticity of ALP extracted from tumor tissues was significantly higher than that of the ALP in normal tissue extracts ($p < 0.05$).

Heat inactivation and amino acid inhibition properties were studied using partial purified enzyme fractions separated by DEAE-Sephacel anion exchange column chromatography. Identification of IAP isolated from DEAE-Sephacel column was made by using agarose gel electrophoresis. The isolated enzyme showed single band of ALP migrated at the same mobility as IAP standard. The % remaining activities, after heat inactivation at 52^{o}C and 65 ^{o}C for 1 hr, of the IAP in normal sera (L-pheylalanine more positive) , patient sera and mucosal tissues of the fractionated enzyme in the first protein peak were greater than 42 % and 17.8 %, respectively. Those fractions containing IAP activity were more inhibited by L-phenylalanine than levamisole. IAP isoenzyme in group B normal serum and patient serum including tumor and normal tissue of patient with colon cancer reacted specifically with monoclonal anti-intestinal antibody (anti-IAP Ab). From the reactivity with anti-IAP Ab, it was shown that there were two isoforms of IAP appeared in serum of normal and patients, normal molecular weight (NIAP) and high molecular weight (HIAP) IAP. The NIAP isoform migrated after LAP (or BAP) isoforms to the anode and the HIAP isoform located at the application area on agarose gel electrophoresis.

There were two components of NIAP isoforms observed on both agarose and 7.5 % polycrylamide gel electrophoresis. One component which resisted to neuraminidase treatment , known as "Variant IAP", was found in some of normal sera and all patient sera. It seems that the other NIAP component which was neuraminidase sensitive was observed only in patient serum.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The tumor and normal colon tissues contained only the HIAP isoform which was neuraminidase sensitive.

The internal sugar of carbohydrate side chains of IAP in sera of normal, patient and tissues were also investigated. ALP isoenzymes in sera of normal, patients and tissues were preferentially precipitated with wheat germ agglutinine (WGA). It was found that varied amounts of ALP in normal and patient specimens were precipitated with concanavalin A (Con A). Therefore the intact samples containing IAP or without IAP were progressively applied on the Con A affinity column chromatography. The ALP activity of all specimens was markedly eluted in the first elution peak (unbound fraction). After treating with Phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) which was used to remove the lipid residues and glycosylphosphatidylinositol (GPI) moeities from the enzyme molecule, the pattern of elution profile was changed. For the extracted tumor tissue enzyme, after treating with PI-PLC, there were increased in the unbound, weakly and strongly bound fractions as compared with the untreated control and the pattern found in paired normal tissue enzyme extract. This result suggested that the internal sugar of carbohydrate side chain of the tumor IAP was heterogeneity with the N-linked sugar chain contained multi, biantennary complex type and a hybrid type with rich in mannose sugar.

The molecular sizes of IAP isoforms in normal sera with blood group B and patient sera , determined by Western bolt analysis, were similar in separating at 116, 205 and 225 kDa whereas the 205 kDa and a higher molecular size were detected in tumor tissue enzyme.

In conclusion, the biochemical characterization and properties (amino acid inhibition, heat inactivation, reactivity with anti-IAP Ab *etc*) of IAP isoforms found in normal sera (group B with secretor status), patient serum and tissues were similar. There were two isoforms of IAP found in normal and patient sera, NIAP and HIAP. The NIAP isoforms were expressed at least two components , migrated at the same mobility on agarose gel and reacted differentially with neuraminidase. The IAP in both normal and tumor tissue extracts which characterized by having high molecular weight was sensitive to neuraminidase treatment. These informations can be applied to use as a diagnostic tool for detecting the colon cancer in clinical laboratory. The proposed technique used for differentiating of these isoforms was the neuraminidase treated sample separated on 7.5 % PAGE with Triton X-100.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์คุณลักษณะทางชีวเคมี และคุณสมบัติของอินเทสทินอลอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสไอโซเอนไซม์ ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่บริเวณโคลอน

ชื่อผู้เขียน นางสาววัลลภา เหล่มตระกูล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. รุจาภา นิ่มสังข์ ประธานกรรมการ

อาจารย์ธเนศ ชิตาพนารักษ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatse; EC 3.1.3.1) ประกอบด้วย 4 ไอโซเอนไซม์ ได้แก่ tissue non specific (TNLP), intestinal (IAP), placental (PLP) และ germ cells ALP คนปกติมี IAP ประมาณ 25% ของ activity รวมของ ALP ในซีรัม และมักพบบ่อยในกระแสเลือดของผู้ที่มีหมู่เลือดบีและโอ ที่เป็น secretor นอกจากนี้ยังพบ activity ของ IAP สูงขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยโรคตับแข็ง ไตวายเรื้อรัง และพบอุบัติการณ์ที่มี IAP activity สูงขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามการได้พบ IAP ปรากฏขึ้นในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่จะมีความสำคัญสำหรับการวินิจฉัยโรคชนิดนี้ได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อทำการศึกษาถึงคุณลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ IAP isoforms ที่พบในซีรัมคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยไม่พิจารณาหมู่เลือดและการเป็น secretor นอกจากนี้ยังทำการศึกษาเปรียบเทียบไอโซฟอร์มที่พบในซีรัมกับที่พบในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่รายเดียวกันด้วย

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพสมบูรณ์ จำนวน 32 ราย และเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ตรวจพบเป็นผลบวกด้วยวิธี colonoscopy ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อมะเร็ง เนื้อเยื่อปกติ และซีรัมของผู้ป่วยรายเดียวกัน จำนวน 5 ราย ตัวอย่างผู้ป่วยเก็บจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยการอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรม (EC-Profoma 1 No. 063/2004)

การวิเคราะห์ Total ALP activityในซีรัมคนปกติ (n=32) และผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ (n=5) โดยใช้ Diethanolamine (DEA) buffer, pH 9.2 และ มี p-nitrophenyl phosphate (PNPP) เป็น substrate พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ Total ALP activity ในคนปกติคือ 183.87 $\pm$ 50.33 U/L (mean $\pm$ S.D.) และ ค่าเฉลี่ยในผู้ป่วยคือ 271 $\pm$165.69 U/L (mean $\pm$ S.D.) ตามลำดับ ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ ALP activity ในซีรัมปกติและผู้ป่วยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.025$) Specific activity ของ ALP แยกจากเนื้อเยื่อมะเร็ง และ เนื้อเยื่อปกติ มีค่าเท่ากับ 5.48 $\pm$ 2.70 U/g, (mean $\pm$ S.D.) และ 3.00 $\pm$ 1.98 U/g (mean $\pm$ S.D.) ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของ specific activity ของ ALP แยกจากเนื้อเยื่อมะเร็งสูงกว่าที่พบในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ด้วยความร้อน และกรดอะมิโนทำโดยใช้เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยวิธี DEAE-Sephacel anion exchanged column chromatography การพิสูจน์ลักษณะของ IAP ที่แยกโดย DEAE- Sephacel column ทำโดยวิธี Agarose gel electrophoresis เอนไซม์ที่แยกได้มีการเคลื่อนที่เป็นแถบเดี่ยวด้วยความเร็วซึ่งอยู่ที่เดียวกับ IAP standard จำนวนเปอร์เซ็นต์ remaining activity หลังจากนำ IAP ไปยับยั้งด้วยความร้อนที่ 52 องศาเซลเซียส และ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า IAP ในซีรัมปกติ (ถูกยับยั้งมากด้วย L-phenylalanine) ซีรัม และเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่แยกได้ในโปรตีน peak แรก มีค่ามากกว่า 42% ที่ 52 องศาเซลเซียส และมากกว่า 17.8% ที่ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์ใน fraction ที่นำไปทดสอบการยับยั้งโดยกรดอะมิโน พบว่าถูกยับยั้งโดย L-phenylalanine มากกว่า levamisole จากการศึกษาการทำปฏิกริยากับ monoclonal anti- IAP antibody (anti-IAP Ab) พบว่ามีการทำปฏิกิริยาของ anti-IAP Ab กับ IAP ในซีรัมของคนปกติผู้มีหมู่เลือดบี IAP ในซีรัม และ เนื้อเยื่อทั้งส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อปกติ และเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ ผลจากการทำปฏิกริยากับ anti-IAP Ab พบว่ามี IAP อยู่ 2 ไอโซฟอร์ม คือ normal molecular weight isoform (NIAP) และ high molecular weight isoform (HIAP) IAP เมื่อนำเอนไซม์ไปแยกโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่า NIAP จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกตามหลัง LAP (หรือ BAP) ส่วน HIAP จะเคลื่อนที่อยู่บริเวณ application point

เมื่อนำเอนไซม์ไปแยกโดย agarose gel และ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าในบริเวณที่แยกเป็น NIAP มีส่วนประกอบอยู่ 2 ส่วน ส่วนหนึ่งสามารถทนต่อ neuraminidase ซึ่งเป็น variant ALP ที่ตรวจพบในซีรัมคนปกติบางรายและผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ทุกราย ส่วนที่ไวต่อ neuraminidase (neuraminidase sensitive NIAP) จะพบเฉพาะในซีรัมของผู้ป่วยเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งจะพบแต่ HIAP เท่านั้นซึ่งจะมีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับ neuraminidase

การศึกษาถึงชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของสายคาร์โบไฮเดรทที่มีในโมเลกุลของ IAP พบว่า IAP ที่อยู่ในซีรัมของคนปกติ ซีรัมและเนื้อเยื่อของผู้ป่วย ทั้งที่เป็นเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็ง จะตกตะกอนได้ดีเมื่อทำปฏิกิริยากับ wheat germ agglutinin (WGA) แต่การตกตะกอนกับ concanavalin A (Con A) จะให้ผลที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำตัวอย่างไปทดลองต่อไปโดยผ่านลงใน Con A affinity column chromatography พบว่า activity ของเอนไซม์จะถูกชะออกมาในปริมาณมากใน peak แรก (unbound fraction) หลังจากให้ทำปฏิกิริยากับ Phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) เพื่อขจัดส่วนที่เป็นไขมันและส่วนที่เป็น glycosylphosphatidylinositol (GPI) ออกไป ลักษณะการถูกชะออกมาของเอนไซม์จะเปลี่ยนไป เอนไซม์จากส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อมะเร็งเมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ PI-PLC จะเพิ่มส่วนที่เป็น unbound, weakly bound และ strongly bound มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซมที่ไม่ถูกตัดด้วย PI-PLC และรูปแบบที่พบในเอนไซม์ที่แยกจากเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยรายเดียวกัน สรุปผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำตาลที่อยู่ในสายคาร์โบไฮเดรทของ IAP ในเนื้อเยื่อมะเร็งเป็น heterogeneity มีลักษณะเป็น N-linked sugar chain ประกอบด้วย multi-, biantennary complex type และ hybrid type ที่มีน้ำตาลแมนโนสมาก

ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ IAP ที่พบในซีรัมคนปกติหมู่เลือดบี และซีรัมผู้ป่วย ซึ่งตรวจโดยวิธี Western blot มีขนาดเท่ากัน คือ 116, 205 และ 225 kDa ส่วน IAP ที่มีขนาดโมเลกุล 205 kDa หรือมากกว่าพบเฉพาะในเนื้อเยื่อมะเร็งเท่านั้น

สรุปผลการศึกษาได้ว่า คุณลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่นการยับยั้งด้วยกรดอะมิโน การยับยั้งด้วยความร้อน และ การทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี และอื่นๆ ของ IAP ที่พบใน ซีรัมคนปกติหมู่เลือดบีและเป็น secretor ซีรัม และเนื้อเยื่อของผู้ป่วยมีความคล้ายคลึงกัน IAP ที่พบในซีรัมคนปกติและผู้ป่วย ทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม คือ NIAP และ HIAP ในส่วนของ NIAP พบว่ามี 2 ส่วนประกอบ ซึ่ง migrate อยู่ที่เดียวกันบน agarose gel จะทำปฏิกริยากับเอนไซม์ neuraminidase ได้แตกต่างกัน IAP ที่พบในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งจะเป็นชนิด high molecular mass ที่ไวต่อการทำปฏิกริยากับ neuraminidase ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถประยุกต์เพื่อนำไปใช้ช่วยการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่ทางห้องปฏิบัติการได้ โดยเทคนิคที่นำเสนอเพื่อใช้แยกความแตกต่างของ isoforms ทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำได้โดยอาศัยความแตกต่างของการทำปฏิกิริยากับ neuraminidase ก่อนการนำไปทำ PAGE บน 7.5% gel ที่มี Triton-X100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved