

การแสดงออกของยีน *Metastasis suppressor 1* ต่อความสัมพันธ์

ของข้อมูลทางคลินิกและการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

นันทนา มีศิริพันธุ์

อนงค์ เทพสุวรรณ

บทคัดย่อ *Metastasis suppressor 1* หรือ *MTSS1* คือ โปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแพร่กระจายมะเร็งไปยังบริเวณอื่น ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าโปรตีน *MTSS1* ควบคุมเซลล์มะเร็งอย่างไร ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *MTSS1* กับเพศ อายุ ลักษณะทางพยาธิวิทยา ระยะของโรคมะเร็ง การแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น ๆ และอัตราการรอดชีพ โดยศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSS1* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้หญิงที่เป็นมะเร็งเต้านม จำนวน 118 ตัวอย่าง อายุ 34-82 ปี (ค่าเฉลี่ย 53.2 ± 9.8 ปี) ลักษณะทางพยาธิของชิ้นเนื้อตัวอย่างเป็น *Invasive ductal carcinoma* 105 ตัวอย่าง (88.98%) ด้วยเทคนิค TaqMan real-time PCR ติดตามการรอดชีพของผู้ป่วยจากเวชระเบียนและทะเบียนราษฎร์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับตัวแปรต่าง ๆ พบว่า ยีน *MTSS1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.003-19.284 เท่า เมื่อเทียบกับยีน *beta-actin* (internal control) โดยตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระยะที่ 1 และ 2 จำนวน 84 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของยีน *MTSS1* เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.83 ± 2.89 เท่า และตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งระยะที่ 3 และ 4 จำนวน 34 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของยีน *MTSS1* เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.98 ± 3.65 เท่า จะเห็นได้ว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *MTSS1* ของผู้ป่วยมะเร็งระยะท้าย (ระยะที่ 3 และ 4) มากกว่าผู้ป่วยระยะแรก (ระยะที่ 1 และ 2) เล็กน้อย ($P=0.899$) ในส่วนของการกระจายของโรคพบว่า 19 ตัวอย่าง (16.10 %) มีการแสดงออกของยีน *MTSS1* เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่พบการกระจายตัวของโรค แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.413$) ขณะที่การแสดงออกของยีน *MTSS1* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอัตราการรอดชีพ ≤ 60 เดือน และกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพ > 60 เดือน พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.048$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการแสดงออกของยีน *MTSS1* ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ ลักษณะทางพยาธิวิทยา และการแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น ๆ แต่มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จึงอาจนำการแสดงออกของยีน *MTSS1* มาใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือพยากรณ์อัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้ (วารสารโรคมะเร็ง 2564;41:65-77)

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน *MTSS1* มะเร็งเต้านม อัตราการรอดชีพ

กลุ่มงานวิจัย ถ่ายทอดและสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

วันที่รับบทความ 16/4/2564, วันที่แก้ไข 8/6/2564, วันที่ตอบรับบทความ 29/7/2564

Expression of metastasis suppressor1 is associated with clinical data and overall survival of breast cancer patients

by **Nuntana Meesiripan , Anong Tepsuwan**

Division of Research and Academic Support, National Cancer Institute, Bangkok

Abstract Metastasis suppressor 1 or MTSS1 is a protein that plays an important role in cancer suppressor to metastasis. It is not currently known how MTSS1 controls cancer cells. Therefore, this study aimed to determine the association of *MTSS1* gene expression with sex, age, pathological characteristics, cancer stage, metastasis, and overall survival. The expression of the *MTSS1* gene was studied in 118 female fresh tissue samples with breast cancer aged 34-82 years (mean 53.2 ± 9.8 years). Pathological characteristics of fresh tissue samples were; invasive ductal carcinoma as 105 samples (88.98%) of all fresh tissue samples by TaqMan real-time PCR technique. Survival of patients was monitored from medical records, and civil registry. An analysis of the association with various variables showed that *MTSS1* gene expression increased from 0.003-19.284 times compared with beta-actin (internal control) gene. In 84 samples, *MTSS1* expression increased as 1.83 ± 2.89 fold, and fresh tissue samples from patients with stage 3 and 4 cancer showed a 1.98 ± 3.65 times increase in *MTSS1* gene expression. The expression of the *MTSS1* gene was slightly greater in patients with advanced cancer (stage 3 and 4) than in the first stage (stage 1 and 2), but there was no statistically significant difference ($P=0.899$). Cancer metastasis as 19 samples (16.10%) increased *MTSS1* expression than the group without metastasis. However, there was no statistically significant difference ($P=0.413$). The *MTSS1* gene expression was found in patients with less than or equal to 60-month survival rate and more than 60-month survival rate. There was a statistically significant difference ($P=0.048$), so it was concluded that *MTSS1* expression was not associated with age pathological characteristics and cancer metastasis, but correlated with overall survival. This result may be used to predict further or prognosis the survival rate of breast cancer patients. (*Thai Cancer J* 2021;41:65-77)

Keywords: *MTSS1* gene expression, breast cancer, overall survival

บทนำ	ลำดับขั้นตอนและยังไม่มีรายงานการวิจัยถึง
มะเร็งเต้านม เป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยที่สุดและเป็นสาเหตุนำไปสู่อุบัติการณ์ในการเพิ่มอัตราการตายที่สูงมาก พบในผู้หญิงที่มีอายุระหว่าง 45-55 ปี ¹ ความรุนแรงของโรคมะเร็งขึ้นกับความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็งจากจุดเริ่มต้น (primary tumour) ไปยังบริเวณอื่น ๆ (secondary sites) ของร่างกาย ² ซึ่งจะสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งโดยตรง โดยการแพร่กระจายนั้นเป็นขบวนการที่เกิดต่อเนื่อง (metastatic cascade) อย่างเป็น	กลไกการเกิดโรคมะเร็งเต้านมอย่างชัดเจน แต่ทราบว่าการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ เกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น ตัวกระตุ้นการแพร่กระจาย และตัวยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis suppressors) โดยเฉพาะการแพร่กระจายของมะเร็งเกี่ยวข้องกับอัตราการตายสะสมของผู้ป่วยมะเร็ง ³ ยีน ตัวยับยั้งการแพร่กระจาย (metastasis suppressor gene) ทำหน้าที่ในการยับยั้งการแพร่กระจายมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ ได้

หลากหลายระดับ ขึ้นกับชนิดของตัวยับยั้งการแพร่กระจายมะเร็งและวิถีของการเกิดโรค (metastatic cascade) ถูกค้นพบครั้งแรก โดย การนำโครโมโซมที่มียีนตัวยับยั้งการแพร่กระจายเชื่อมกับเซลล์ผู้รับเพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมขนาดเล็ก (microcell hybrids) ด้วย เทคนิค microcell-mediated chromosome transfer (MMCT)⁴⁻⁵ และใช้เทคนิค comparative genomic hybridization (cGH) และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในการแยกยีนตัวยับยั้งการแพร่กระจายออกจากโครโมโซมดังกล่าว เช่น ยีน breast cancer metastasis suppressor 1 (*BRMS1*)⁶ ยีน nucleoside diphosphate kinase (*NM23*)⁷⁻⁸ และยีน metastasis suppressor 1 (*MSST1*)⁹

Metastasis suppressor 1 หรือ MTSS1 เป็นโปรตีนที่ถูกรายงานครั้งแรกโดย YG Lee และคณะในปี ค.ศ. 2002 พบว่า สาย MTSS1 transcript (MTSS1 mRNA) จ าก metastatic bladder cancer หายไปในเซลล์เพาะเลี้ยง (tumour cell lines) ดังนั้นจึงเรียกว่า missing in metastasis (MIM) เป็น โปรตีน ตัวยับยั้ง (suppressor protein) การแพร่กระจายมะเร็ง¹⁰ แต่จากการศึกษาบทบาทเชิงหน้าที่ พบว่า โปรตีน MTSS1 เกี่ยวข้องกับการเรียงตัวของโปรตีนโครงสร้าง (cytoskeleton) โปรตีนเส้นใย (actin filament)¹¹⁻¹³ และการพัฒนาอวัยวะต่าง ๆ (organ development) ของร่างกาย¹⁴ ซึ่งหน้าที่ของโปรตีน MTSS1 ที่กล่าวมาเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งในระยะเริ่มต้น (early carcinogenesis)¹⁵ การศึกษาวิจัยในลำดับต่อมาของโปรตีน MTSS1 พบว่า มีบทบาทเป็น co-transcription factor โดยจับกับโปรตีน Gli เพื่อ

เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของยีน¹⁶⁻¹⁷ การค้นพบดังกล่าวบ่งชี้ว่าโปรตีน MTSS1 เป็น pro-oncogenic การศึกษาโปรตีน MTSS1 ใน solid carcinoma จากเต้านม ลำไส้ และกระเพาะปัสสาวะ พบว่าโปรตีน MTSS1 เกี่ยวข้องเชิงลบกับพารามิเตอร์ชนิดต่าง ๆ ในการพยากรณ์โรค (prognostic parameters) เช่น อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย (patient's survival)¹⁸⁻²⁰

หลังจากนั้นมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน MTSS1 ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น ๆ ในผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิดมากขึ้น เช่น มะเร็งเซลล์ต้นกำเนิด basal cell carcinoma¹⁷ มะเร็งต่อมลูกหมาก²¹ มะเร็งเต้านม² มะเร็งศีรษะและลำคอ²² และมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma¹⁹ โดยโปรตีน MTSS1 จะทำหน้าที่ควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในปี ค.ศ. 2009 Parr และคณะ ศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSS1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม พบว่า ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มียีน *MTSS1* แสดงออกในระดับต่ำจะมีการพยากรณ์โรคแย่ (poor prognosis, $P=0.024$) ส่วนผู้ป่วยที่มียีน *MTSS1* แสดงออกในระดับสูงจะมีอัตราการรอดชีพดีกว่า ($P=0.011$) และเพิ่มอัตราการรอดชีพปลอดโรค (disease-free survival) ที่ค่า $P<0.01$ ²⁰ ในปี ค.ศ. 2010 Liu และคณะศึกษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่า ผู้ป่วยที่มีเซลล์แบบ poorly differentiated มีก้อนมะเร็งขนาดใหญ่ หรือมีการกระจายของมะเร็ง จะไม่พบการแสดงออกของยีน *MTSS1* และมีอัตราการรอดชีพต่ำ²³ ในปี ค.ศ. 2010 Liu K และคณะ พบว่า ร้อยละ 70 ของมะเร็งระยะเริ่มแรกจะไม่พบการแสดงออกของยีน *MTSS1*²³ Xei และคณะ รายงานว่าในมะเร็งหลอดอาหารมีระดับของการแสดงออก

ของยีน *MTSS1* ต่ำ และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค²⁴ Dowson และคณะพบว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* เกี่ยวข้องกับ epithelial growth factor ทำให้เซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน *MTSS1* สูง จะมีระดับการแพร่กระจายตัวต่ำ (less proliferation)²² เพื่อที่จะศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน *MTSS1* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ดังนั้นเราจึงศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *MTSS1* ในระดับการถอดรหัส (*MTSS1* transcript) และลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกของชิ้นเนื้อมะเร็ง รวมทั้งการศึกษาอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ผลจากการศึกษาบ่งชี้ว่าการแสดงออกของยีน *MTSS1* ไม่ได้ขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์ชนิดต่าง ๆ ในการพยากรณ์โรค แต่มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพ ซึ่งอาจนำมาใช้ในการพิจารณาแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างชิ้นเนื้อสดได้มาจากผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านม จำนวน 118 ราย ซึ่งเข้ารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างปี 2550-2553 ขออนุญาตใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อสดต่อคณะกรรมการหน่วยธนาคารเนื้อเยื่อและสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยประสานงานกับเจ้าหน้าที่ธนาคารเนื้อเยื่อ ฯ และกลุ่มงานพยาธิวิทยา เพื่อคัดเลือกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ เป็นผู้ป่วยผู้หญิง อายุระหว่าง 34 ถึง 82 ปี ได้รับยาเคมีหลังการผ่าตัด และมีอัตราการรอดชีพเฉลี่ย 66.97 ± 19.04 เดือน

การคำนวณตัวอย่างและขนาดตัวอย่าง

$$N = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / C$$

$$\text{เมื่อ } C = 1/2 \ln[(1+r)/(1-r)]$$

$$\text{กำหนด Power} = 90\%, Z_{\beta} = 1.82$$

$$\alpha = 0.05, Z_{\alpha/2} = 1.92$$

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) = 0.3}$$

(มีค่าความสัมพันธ์ปานกลาง)

$$\text{คำนวณได้ } N = 78.6 \text{ ราย}$$

ดังนั้นในการศึกษานี้จะใช้ขนาดตัวอย่างจำนวนไม่น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง

เก็บรวบรวมข้อมูลทางพยาธิวิทยา (clinic pathology) และระยะเวลาการรอดชีพของผู้ป่วย

เก็บรวบรวมข้อมูลทางพยาธิวิทยา และข้อมูลทางคลินิกอื่น ๆ ของผู้ป่วย เช่น ความรุนแรงของโรค การกระจายของมะเร็งสู่อวัยวะอื่น ประวัติการได้รับยาเคมีหลังผ่าตัด มะเร็งเต้านม และระยะเวลาการรอดชีพของผู้ป่วย โดยประสานงานกับงานเวชระเบียนและขออนุญาตใช้ข้อมูลจากเวชระเบียนของผู้ป่วย รวมทั้งติดตามการรอดชีพ 5 ปี ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม โดยประสานขอข้อมูลผู้ป่วยที่มีภูมิลำเนาอยู่ในประเทศไทยจากหน่วยงานเขตของกรุงเทพมหานคร

การเตรียมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อสดมาเตรียมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ด้วยน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอ Ribozol® reagent (Gibco) โดยดำเนินการเตรียมอาร์เอ็นเอตามขั้นตอนและข้อกำหนดมาตรฐานของน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยเครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer รุ่น UV-1800 บริษัท Shimadzu, ญี่ปุ่น) และ

ศึกษาคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโตรโฟริซิส (gel electrophoresis)

การเตรียม complementary DNA (cDNA)

หลังจากการตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอแล้ว นำทั้งหมดมาเตรียม cDNA สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSS1* ด้วยวิธี real-time PCR โดยนำอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้จำนวน 1 ไมโครกรัม ไปบ่มกับ 1 X Reaction Buffer, dNTPs ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, oligo (dT)₁₈ primer ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 1 U ของเอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) จาก iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSS1* ด้วย

เทคนิค real-time PCR

นำ cDNA ที่เตรียมไว้ทั้งหมด 118 ตัวอย่าง ไปเพิ่มปริมาณเพื่อตรวจวัดการแสดงออกของยีน *MTSS1* และยีน *beta-actin* เป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในทุกเซลล์ (housekeeping gene) ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) สำหรับเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในร่างกายมนุษย์ ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ TaqMan real-time PCR kit (Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) และใช้เครื่อง StepOnePlus™ Real-time PCR system จ 1 ก Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) ถ้าค่านิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *MTSS1* และยีน *beta-actin*

(ตารางที่ 1) วิเคราะห์ผลการทำ Real-time PCR ด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real-time PCR system จ 1 ก Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกโดยการใช้อนุกรม Normalized Gene Expression ($\Delta\Delta CT$) Analysis ในการคำนวณระดับการแสดงออกของยีน *MTSS1* เปรียบเทียบกับยีน *beta-actin* ด้วยโปรแกรมจาก ABI software

การตรวจวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

ตรวจวิเคราะห์ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *MTSS1* ทางสถิติแบบข้อมูลพรรณนา ใช้สถิติความถี่ ค่าเฉลี่ย ค่ามัธยฐาน และ SD การหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร ใช้ค่า Spearman's rank correlation coefficient ส่วน survival data ใช้ Kaplan and Meier และใช้ Hazard ratio ในการวิเคราะห์ prognosis factor

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ตัวอย่างสำหรับการวิจัย

เพื่อศึกษาพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมจากผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมจำนวน 118 ราย ซึ่งมาทำการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในช่วงระหว่างปี 2550-2553 อายุระหว่าง 34 ถึง 82 ปี ค่าเฉลี่ยที่ 53.2 ปี พบว่า ชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมมีลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบ Invasive ductal carcinoma จำนวน 105 ราย (88.98%) และพยาธิวิทยาแบบอื่น ๆ จำนวน 13 ราย (11.02%) เมื่อศึกษาข้อมูลทางคลินิกอื่น ๆ เช่น ระยะของโรคมะเร็ง การกระจายของมะเร็งสู่อวัยวะอื่น รวมทั้งประวัติการได้รับยาเคมีหลังผ่าตัดมะเร็งเต้านม พบว่า

ระยะของโรคมะเร็ง 4 ระยะ คือ ระยะเริ่มต้น หรือระยะ 1 จำนวน 3 ราย ระยะที่ 2 จำนวน 81 ราย ระยะที่ 3 จำนวน 33 ราย และระยะ 4 หรือ ระยะสุดท้าย จำนวน 1 ราย โดยผู้ป่วยทั้งหมด ได้รับยาเคมีหลังจากการผ่าตัดมะเร็งเต้านม เมื่อ

ติดตามอัตราการรอดชีพหลังจากเสร็จสิ้น กระบวนการรักษา พบว่ามีอัตราการรอดชีพ ระหว่าง 16 ถึง 134 เดือน เท่ากับ 66.97 เดือน และพบมีการกระจายของมะเร็งไปอวัยวะอื่น 19 ราย (รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *MTSS1* และยีน *beta-actin* (TaqMan® Gene Expression Assays บริษัท Applied Biosystems, สหรัฐอเมริกา)

ยีน		ลำดับนิวคลีโอไทด์
MTSS1	HS00207341_m1	CCCTTCCCAAGTTTCAGATTATGAT
beta-actin	Hs99999903_m1	CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSS1* จาก ผู้หญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านม

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ยีน *MTSS1* มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการ แพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (anticancer)^{10, 22, 25} ดังนั้น เพื่อศึกษาหน้าที่ของ โปรตีน MTSS1 ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งใน ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จึงนำชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย มะเร็งเต้านม จำนวน 118 ราย มาศึกษาการ แสดงออกของยีน *MTSS1* ในระดับ การ ถอดรหัส (transcript) ด้วยวิธี TaqMan real-time PCR พบว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* เท่ากับ 0.003 ถึง 19.284 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีน *beta-actin* ในชิ้นเนื้อ เดียวกัน โดยมีค่ามัธยฐานที่ 0.50 เท่า ค่าเฉลี่ยที่ 1.86 เท่า และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ 3.11

เมื่อจำแนกกลุ่มผู้ป่วยตามอายุ พบว่า กลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี มีการ แสดงออกของยีน *MTSS1* เท่ากับ 0.42 เท่า (ค่ามัธยฐาน เท่ากับ 0.42 เท่า) กลุ่มที่มีอายุ

มากกว่า 60 ปี มีการแสดงออกของยีน *MTSS1* เท่ากับ 1.04 เท่า (ค่ามัธยฐานเท่ากับ 1.04 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *beta-actin* โดยการ แสดงออกของยีนทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.953$)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออก ของยีน *MTSS1* กับลักษณะพยาธิวิทยาคลินิก ของชิ้นเนื้อมะเร็ง

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะ พยาธิวิทยาคลินิกของชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมกับ การแสดงออกของยีน *MTSS1* ของผู้ป่วย โดย การวิเคราะห์ลักษณะพยาธิวิทยาคลินิกของชิ้น เนื้อมะเร็งเต้านมร่วมกับศึกษาผลการแสดงออก ของยีน *MTSS1* ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* ในชิ้นเนื้อ มะเร็งเต้านมที่มีลักษณะเซลล์แบบ moderately differentiated และ poorly differentiated มีการ แสดงออกของยีน *MTSS1* สูงกว่าเซลล์แบบ well differentiated อย่างไม่มีนัยสำคัญ ทาง ($P=0.354$ และ 0.733 ตามลำดับ)

การแสดงออกของยีน *MTSSI* ในชิ้นเนื้อปกติ

ศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSSI* ในชิ้นเนื้อปกติจากบริเวณใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งจำนวน 38 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *MTSSI* ในสภาวะปกติ (กลุ่มควบคุม คือ ไม่เป็นมะเร็ง) และสภาวะที่เป็นมะเร็ง (กลุ่มทดลอง คือ เป็นมะเร็ง) พบว่าการแสดงออกของยีน *MTSSI* ในชิ้นเนื้อปกติมีค่าเฉลี่ย (mean) สูงกว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งทุกระยะ 1.41 เท่า แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.145$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *MTSSI* จากชิ้นเนื้อปกติกับชิ้นเนื้อมะเร็งในระยะที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นระดับความรุนแรงของโรคมะเร็ง พบว่าการแสดงออกของยีน *MTSSI* ในชิ้นเนื้อปกติมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าชิ้นเนื้อมะเร็งในระยะที่ 3 และ 4 ถึง 3.16 เท่า แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.057$) ดังตารางที่ 4

ความสัมพันธ์ของยีน *MTSSI* และอัตราการรอดชีพของผู้ป่วย

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าการแสดงออกของยีน *MTSSI* มีผลต่ออัตราการรอดชีพของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ^{1,10} ดังนั้นจึงศึกษาอัตราการรอดชีพกับการแสดงออกของยีน *MTSSI* ในผู้ป่วยที่มีอัตราการรอดชีพ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 เดือน และกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพมากกว่า 60 เดือน พบว่า กลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 เดือน มีระดับการ

แสดงออกของยีน *MTSSI* แตกต่างจากกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพสูงกว่า 60 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.048$) โดยมีค่าเฉลี่ย (mean) การแสดงออกของยีน *MTSSI* เป็น 1.13 ± 3.03 และ 2.28 ± 3.10 เท่า สำหรับกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 เดือน และกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพสูงกว่า 60 เดือน ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

วิเคราะห์ค่าความเสี่ยง Odds Ratio (OR) ของการแสดงออกของยีน *MTSSI* ต่อตัวแปรต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ค่าความเสี่ยง Odds Ratio (OR) ของการแสดงออกของยีน *MTSSI* ต่อตัวแปรต่าง ๆ (ตารางที่ 3) พบว่า การแสดงออกของยีนในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 60 ปี มีโอกาสพบน้อยกว่าในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี เท่ากับ 0.44 และในกลุ่มที่มีลำดับความรุนแรงของโรกระยะที่ 2 และ 3 มีโอกาสพบการแสดงออกของยีน *MTSSI* สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีลำดับความรุนแรงของโรกระยะที่ 1 เท่ากับ 2.35 และ 3.10 เท่า ตามลำดับ รวมทั้งในกลุ่มที่มีการกระจายของมะเร็ง พบการแสดงออกของยีน *MTSSI* มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกระจายของมะเร็ง เท่ากับ 1.54 อย่างไรก็ตามเมื่อกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพมากกว่า 60 เดือน มีการแสดงออกของยีน *MTSSI* สูงกว่ากลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพต่ำกว่า 60 เดือน เท่ากับ 18.79 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของตัวอย่างที่ศึกษา

Characteristics		n	Means±SD/(%)	Range	Unit
Gender	Female	118	(100%)		cases
Age			53.19±9.75	34-82	Years
Histopathology	Invasive ductal carcinoma	105	(89%)		Cases
	Invasive lobular carcinoma	3	(2.5%)		Cases
	Ductal carcinoma <i>in situ</i>	2	(1.7%)		Cases
	Mixed Type	4	(3.4%)		Cases
	Others	4	(3.4%)		Cases
Staging	Stage I	3	(2.5%)		Cases
	Stage II	81	(68.6%)		Cases
	Stage III	33	(28.0%)		Cases
	Stage IV	1	(0.9%)		Cases
Metastasis	No	99	(83.9%)		Cases
	Yes	19	(16.1%)		Cases
Overall survival	Overall	118	66.97±19.04	16-134	Months
	Survive	93	67.59±17.55	33-134	Months
	Sensor	25	64.64±24.07	16-93	Months

ตารางที่ 3 การแสดงผลของยีน MTSS1 ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม

Variable		N	Means±S.D	P
MTSS1 expression		118	1.86±3.11	-
Age	≤60 y	94	1.85±3.3	0.953
	>60 y	24	1.89±2.28	
Histopathology	IDC	105	2.63±8.03	0.999
	DCIS	2	1±1.39	
	Mucinous	2	2.15±2.76	
	Metaplastic	1	0.09	
	ILC	3	1.89±1.07	

ตารางที่ 3 การแสดงออกของยีน *MTSS1* ในชั้นเนื้อมะเร็งเต้านม (ต่อ)

Variable		N	Means±SD	P
Staging	Mix type	4	0.68±1.15	0.899
	Forming mass	1	4.87	
	I	3	0.49±0.65	
	II	81	1.89±2.95	
	III	33	1.91±3.65	
Metastasis	IV	1	2.01	0.724
	No	99	1.82±2.85	
	Yes	19	2.09±4.32	
Overall survival	≤60 mo	42	1.13±3.03	0.048
	>60 mo	76	2.28±3.10	

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *MTSS1* กับตัวแปรต่าง ๆ

Variable		N	MTSS1 Expression		P
			Odds ratio	95% CI	
Age	≤ 60 years	94	1		0.072
	> 60 years	24	0.442	0.165-1.080	
Staging	I	3	1		0.508
	II	80	2.354	0.188-28.233	
	III	34	3.104	0.227-42.464	
Histopathology	IDC	105	1	0.034-29.807	1
	ILC	3	0.98	0.133-7.228	
IDC grade	well diff.	15	1		0.354
	moderated diff.	42	1.773	0.528-5.953	
	poorly diff.	48	1.164	0.486-2.787	
Metastasis	No	99	1		0.413
	Yes	19	1.543	0.545-4.368	
Overall survival	≤60 months	42	1		<0.001
	>60 months	76	18.79	3.991-90.074	

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน MTSS1 ระหว่างชั้นเนื้อมะเร็งและชั้นเนื้อปกติใกล้เคียง

Variables		n	MTSS1 expression		P
			(fold beta actin)		
			Means±SD		
			Normal	Cancer	
Total		38	2.94±3.26	2.09±3.61	0.145
Age	≤60y	33	3.17±3.37	2.07±3.64	0.118
	>60y	5	1.04±0.70	2.26±3.85	0.224
stage	1+2	32	2.66±3.18	2.20±3.79	0.305
	3+4	6	4.71±3.53	1.49±2.59	0.057
Metastasis	no	30	2.74±2.75	1.77±2.42	0.114
	yes	8	3.66±4.84	3.31±6.54	0.454
Overall	≤60 mo	5	1.44±1.61	3.78±8.19	0.247
Survival	>60mo	33	3.18±3.39	1.84±2.49	0.067

วิจารณ์และสรุป

มะเร็งเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติ ก่อเป็นเนื้องอกร้าย สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกายได้ โดยผ่านระบบน้ำเหลืองหรือกระแสเลือด มีรายงานการเป็นมะเร็งรายใหม่ 19.3 ล้านคนต่อปี และเสียชีวิตจากโรคมะเร็งถึง 10 ล้านคนต่อปี²⁶ มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยเป็นอันดับต้นของผู้หญิงในประเทศไทยและทั่วโลก โดยทุก ๆ ปี จะมีผู้หญิงทั่วโลกป่วยเป็นมะเร็งเต้านมมากกว่า 2.3 ล้านคนต่อปี²⁶ มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่สามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ได้ จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีน MTSS1 มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง²⁷ รวมถึงสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมไปยังอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกายได้^{12,20} โปรตีน MTSS1 จะแสดงออกมากในเนื้อเยื่อปกติและในเซลล์

เพาะเลี้ยงบางชนิดที่เป็นเซลล์มะเร็งแบบไม่สามารถแพร่กระจาย (non-metastatic cancer cell lines) อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของโปรตีน MTSS1 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MTSS1 ในมะเร็งที่อยู่ในระยะแพร่กระจาย เช่น มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer)²⁸ มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer)²¹ มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer)²³ และมะเร็งไต (kidney cancer)²⁹ ดังนั้นโปรตีน MTSS1 อาจจะทำหน้าที่เป็นโปรตีนด้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ การแสดงออกของโปรตีน MTSS1 ที่มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน² ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาวิจัยถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน MTSS1 ในสถานะต่าง ๆ ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจำนวน 118 ตัวอย่าง

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของ ยีน *MTSS1* ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม จำนวน 118 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค real-time PCR พบการแสดงออกของยีน *MTSS1* เพิ่มขึ้น 19.284 เท่า เมื่อเทียบกับยีน *beta-actin* โดยสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งที่พบว่าอัตราการรอดชีพสูงในขณะที่มีการแสดงออกของยีน *MTSS1* สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Parr และ Jiang ในปี 2009 ที่รายงานว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพของผู้ป่วย²

ในขณะที่การศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *MTSS1* กับระยะการดำเนินโรคทั้ง 4 ระยะ พบว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* ทั้ง 4 ระยะ ไม่มีความแตกต่างกัน ($P=0.899$) เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Parr และ Jiang ในปี 2009 ที่พบว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* ไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดระยะการดำเนินโรคมะเร็งเต้านมได้อย่างชัดเจน² แต่ในทางตรงข้ามการแสดงออกของยีน *MTSS1* สัมพันธ์กับระยะการดำเนินโรคมะเร็งหลอดอาหาร โดยยีน *MTSS1* ที่แสดงออกน้อยสัมพันธ์กับระยะการดำเนินโรคในขั้นต้น นั่นคือ สามารถพยากรณ์ระยะการดำเนินโรคมะเร็งหลอดอาหาร²⁴ และ โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร²³ ได้จากระดับโปรตีน *MTSS1* รวมทั้งการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *MTSS1* (gene expression profile) ใน ชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ระยะที่ 4 จำนวน 51 ราย ที่มีการรักษาด้วยยา doxorubicin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัด พบว่า ผู้ป่วยที่มีการตอบสนองการรักษาด้วยยา doxorubicin จะมีการแสดงออกของยีน *MTSS1* สูง³⁰

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง การแสดงออกของยีน *MTSS1* กับลักษณะพยาธิวิทยาคลินิกของชิ้นเนื้อมะเร็ง พบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่มีลักษณะเซลล์แบบ moderately differentiated และ poorly differentiated มีการแสดงออกของยีน *MTSS1* สูงมากกว่าเซลล์แบบ well differentiated (ตารางที่ 3) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ (head and neck squamous cell carcinoma) ที่การแสดงออกของยีน *MTSS1* เกี่ยวข้องกับ epithelial growth factor ทำให้เซลล์ที่มีโปรตีน *MTSS1* สูง จะมีระดับการขยายตัวต่ำ (less proliferation)²² ในทางกันข้ามการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะอาหารที่มีลักษณะเซลล์แบบ poorly differentiated ไม่พบการแสดงออกของยีน *MTSS1* แต่พบการกระจายตัวของมะเร็ง²³ ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *MTSS1* กับอัตราการรอดชีพของกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 เดือนและมากกว่า 60 เดือน พบว่า ในกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพมากกว่า 60 เดือน มีการแสดงออกของยีน *MTSS1* สูงกว่ากลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 เดือน ถึง 18.97 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

จากการศึกษานี้พบว่า การแสดงออกของยีน *MTSS1* ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม ไม่มีความสัมพันธ์กับระยะความรุนแรงการกระจายของโรค และลักษณะทางพยาธิสภาพ แต่พบว่ามี ความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพจากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) นอกจากนี้พบว่าในชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียงของกลุ่มที่มีระดับความรุนแรง

ของโรคมะเร็งสูง ($P=0.057$) และกลุ่มที่มีอัตราการรอดชีพมากกว่า 60 เดือน จะมีการแสดงออกของยีน *MTSS1* สูงกว่าในชิ้นเนื้อมะเร็ง ($P=0.067$) เนื่องจากการศึกษานี้เป็นงานวิจัยแบบ retrospective ซึ่งอาจมี confounding factor อื่นๆ ที่อาจจะมีผลต่ออัตราการรอดชีพนอกจากยีน *MTSS1* ได้เช่น การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด การฉายแสง หรือผ่าตัดที่ผู้ป่วยแต่ละคนอาจได้รับไม่เท่ากัน โรคประจำตัวอื่น ๆ ของคนไข้ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรศึกษาเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน *MTSS1* และหน้าที่ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการศึกษาการแสดงออกของยีน *MTSS1* เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดอัตราการรอดชีพในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกรมการแพทย์ ที่สนับสนุนโครงการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ขอขอบคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติและเจ้าหน้าที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติทุกท่านที่อำนวยความสะดวกให้กับโครงการนี้ รวมทั้งขอขอบคุณ คุณอนงค์ ปุณกันนท์ และคุณศรินวล ยิ้มจั่น ที่เป็นผู้ช่วยเหลือเตรียมอุปกรณ์และความพร้อมในการปฏิบัติงานตลอดโครงการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งขอขอบคุณผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้ง 118 รายในการวิจัยครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Ataollahi, M. R, Sharifi J, Paknahad M. R, Paknahad A . Breast cancer and associated factors: a review. J Med Life 2015;8:6-11. PMID: 28316699.
2. Parr C, Jiang G. W. Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and

- anti-metastatic properties in breast cancer. Eur J Cancer 2009; 45:1673-83. PMID: 19328678.
3. Du P, Ye L, Ruge F, Yang Y, Jiang W.G. Metastasis suppressor-1, MTSS1, acts as a putative tumour suppressor in human bladder cancer. Anticancer Res 2011; 31:3205-12. PMID: 21965727.
4. Fournier R. E, Ruddle F. H. Stable association of the human transgenome and host murine chromosomes demonstrated with trispecific microcell hybrids. Proc Natl Acad Sci U S A.1977;74: 3937-41.doi:10.1073/pnas.74.9.3937.
5. Fournier R. E, Ruddle, F. H. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. PNAS 1977;74:319-23.doi.org/10.1073/pnas.74.1.319.
6. Yan J, Yang Q, Huang Q. Metastasis suppressor genes. Histol Histopathol 2013; 28:285-92. PMID:23348381.
7. Freije JM, MacDonald NJ, Steeg PS. Nm 23 and tumour metastasis: basic and translational advances. Biochem Soc Symp 1998; 63:261-71. PMID: 9513729.
8. Gunduz M, Ayhan A, Gullu I, Onerci M, Hosal AS, Gursel B, Hosal IN, et al. Nm23 Protein expression in larynx cancer and the relationship with metastasis. Eur J Cancer 1997;33:2338-41. PMID: 9616278.
9. Lee YG, Macoska JA, Korenchuk S, Pienta KJ. MIM, a potential metastasis Suppressor gene in bladder cancer. Neoplasia. 2002;4:291-4. PMID:12082544.
10. Wang F, Liu Y, Zhang H. Loss of MTSS1 expression is an independent prog-

- nostic factor for Hilar cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 2013 ;19:815-20.PMID: 23852458.
11. Mattila P. K, Salminen M, Yamashiro T, Lappalainen P. Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J Biol Chem* 2002;278:82452-59.PMID: 12482861
 12. Lee SH, Kerff F, Chereau D, Ferron F, Klug A, Dominguez R. Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* 2007;15:145-55. PMID: 17292833.
 13. Mattila P. K, Pykäläinen A, Saarikangas J, Paavilainen V. O, Vihinen H, Jokitalo E, et al. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* 2007;176:953-64. PMID:17371834.
 14. Glassmann A, Molly S, Surchev L, Nazwar T.A, Holst M, Hartmann W, et al. Developmental expression and differentiation-related neuron-specific splicing of metastasis suppressor 1 (Mtss1) in normal and transformed cerebellar cells. *BMC Dev Biol* 2007;7:111. doi: 10.1186/1471-213X-7-111.
 15. Woodings JA, Sharp SJ, Machesky LM. MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem J* 2003;371:463-71.PMID:12570871.
 16. Kayser G, Csanadi A, Kakanou S, Prasse A, Kassem A, Stickeler E, et al. Down regulation of MTSS1 expression is an independent prognosticator in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2015;112:866-73. doi: 10.1038/bjc.2015.2.
 17. Callahan C. A, Ofstad T, Horng L, Wang J. K, Zhen H. H, Coulombe P. A, et al. MIM/BEG4, a sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev* 2004;18:2724-29. doi: 10.1101/gad.1221804.
 18. Cachin F, Prince H. M, Hogg A, Ware R. E, Hicks R. J. Powerful prognostic stratification by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with metastatic breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2006;24:3026-31. doi:10.1200/JCO.2005.04.6326.
 19. Ma S, Guan XY, Lee Tk, Chan KW. Clinicopathological significance of missing in metastasis B expression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2007;38:1201-6.
 20. Parr C, Jiang WG. Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and anti-metastatic properties in breast cancer. *Eur J Cancer* 2009;45:1673-83.
 21. Loberg R. D, Neeley C. K, Adam-Day L. L, Fridman Y, St John L. N, Nixdorf S, et al. Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and a functional role of MIM in prostate cancer cell. *Int J Oncol* 2005;26:1699-705.
 22. Dawson J. C, Timpson P, Kalna G, Machesky L. M. Mtss1 regulates epidermal growth factor signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2012; 31:1781-93. doi:10.1038/onc.2011.376.
 23. Liu K, Wang G, Ding H, Chen Y, Yu G, Wang J. Downregulation of metastasis suppressor 1(MTSS1) is associated with nodal metastasis and poor outcome in Chinese patients with gastric cancer. *BMC cancer* 2010;10:428.

24. Xie F, Ye L, Chen J, Wu N, Zhang Z, Yang Y, et al. The impact of Metastasis Suppressor-1, MTSS1, on oesophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *J Transl Med* 2011;9:1-10.
25. Cong Z, Zhao Q, Yang B, Cong D, Zhou Y, Lei X, et al. Ginsenoside Rh3 Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. *Pharmacology* 2020;105:329-38.
26. Sung H, Ferlay J, Siegel R. L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-49.
27. Zhong J, Shaik S, Wan L, Tron A. E, Wang Z, Sun L, et al. SCF β -TRCP targets MTSS1 for ubiquitination-mediated destruction to regulate cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget* 2013; 4: 2339-53.
28. Nixdorf S, Grimm M. O, Loberg R., Marreiros A, Russell P. J, Pienta K, et al. Expression and regulation of MIM (Missing In Metastasis), a novel putative metastasis suppressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett* 2004; 215:209-20.
29. Du P, Ye L, Li H, Yang Y, Jiang W. G. The tumour suppressive role of metastasis suppressor-1, MTSS1, in human kidney cancer, a possible connection with the SHH pathway. *J Exp Ther Oncol* 2012;10:91-9. PMID: 23350348.
30. Folgueira M. A, Carraro D. M, Brentani H, Patrão D. F, Barbosa E. M, Netto M. M, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11: 7434-43.