



中國醫藥大學  
免疫學研究所  
碩士學位論文

使用 MicroRNA 微陣列分析來觀察在惡性膠原母  
細胞瘤中整體 MicroRNAs 的表現情況

**Expression Profile of MicroRNAs in  
Glioblastoma Multiforme Tissues**

指導教授：邱紹智 教授

研究生：李宗祐

中華民國一百年七月

## 摘要

惡性膠原母細胞瘤(GBM)是一種具高度侵襲性的常見腦部腫瘤，即使結合許多有效的抗癌治療，平均存活時間仍然只有大約一年。MicroRNAs 是一種細胞原生的小片段 RNA，且不帶有轉譯編碼，並藉由結合 mRNA 3'UTR 區域的方式來減少目標基因的蛋白質表現。近來的研究發現 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤的許多生物性功能上中扮演了相當重要的調節角色，包含了癌細胞增生、癌細胞轉移、癌幹細胞生長及血管新生。在這個研究中，希望藉由比較 microRNAs 在正常腦組織和惡性膠原母細胞瘤之間表現情況的差異來找出表現量在兩者間有異常變化的 microRNAs。利用 microRNAs 微陣列分析同時監測 716 個 microRNAs 在七個臨床病人檢體、兩個臨床檢體的初帶培養細胞及一個正常腦組織的表現情形。從結果中得知，有十三個 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤檢體中具有顯著的表現量下降。利用即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time PCR)對這十三個 microRNAs 的微陣列分析的結果確認，結果只有部分 microRNAs 的表現情況較吻合，其中 miR-137 和 miR-7 在各檢體中皆完全符合。而這些 microRNAs 具有成為在惡性膠原母細胞瘤上的 biomark 的潛力。為了進一步研究這些 microRNAs 所影響到的生物性功能，結合 microRNAs 目標基因的預測網站及惡性膠原母細胞瘤基因表現的資料庫，預測出了數個 microRNAs 的目標基因，在 Real-Time PCR

的結果中以 TBX2 基因為 miR-7 的目標基因的可能性最大，未來將更加的證實 TBX2 與 miR-7 的關係，並找出 TBX2 與 miR-7 在惡性膠原母細胞瘤中所扮演的角色。



## **Abstract**

Glioblastoma multiforme (GBM), is highly aggressive with a median survival of one year, even with the most effective combined therapies. MicroRNAs (miRNAs) are short endogenous noncoding RNAs that silence the production of proteins by binding to mRNA 3'UTR regions. miRNAs have been shown their roles in the regulation of biological properties in glioblastomas, including cell proliferation, invasion, cancer stem cell growth, and angiogenesis. In this study, we compared the expression levels of microRNAs between clinic GBM tissues and normal brain tissues. For acquiring the profiles of different expression levels of global miRNAs, 7 clinic samples from GBM patients, 1 normal brain tissue and 2 primary cells derived from GBM tissues were processed and analyzed by use of the miRNAs microarray system. In our results, expression levels of 13 microRNAs were shown to downregulate significantly in GBM tissue samples. These results from miRNA array analysis were also confirmed by use of qRT-PCR analysis. The expression levels of 6 miRNAs were the same as the findings in the miRNA array system. In summary, a panel of differentially expressed miRNAs derived from the microRNAs expression profile may serve as the potential molecular biomarkers for the therapy target of glioblastoma. By use of computational algorithm, we further predicted potent genes which are targeted by 13 miRNAs. And use published DNA microarray database in GBM to distinguish the genes affected by miRNAs. Some of predicted genes had been shown to play key functions in proliferation, cell cycle, development, cell survival and migration. And further studies to investigate the effect of these miRNAs on glioblastomas biology are necessary.

## 致謝

很快的兩年的研究所生活就結束了，我這兩年裡在實驗室的學習也讓我學到了不少寶貴的知識。能順利完成碩士學位最要感謝的就是我的父母的支持，除了維持生活所需的費用及學費的幫助，不時給予我鼓勵及關心也是支持我取得學位的重要動力。感謝指導教授邱紹智老師，從老師身上我學到了探討科學應有的態度及許多新的想法跟觀點，在完成這份碩士論文上也給我莫大的幫助。感謝跆拳道隊戴偉國教練的指導與訓練，讓我在課業之餘有良好的發洩管道及鍛鍊健康的身體來繼續我未完成的學業。感謝已畢業的閔智、振偉兩位學長及佩玲學姊，在我剛進入實驗室面對未知的新領域時，帶領我、給予我指點。感謝同屆的同學藝涵、涵尹、澄琿、千祐及美芸兩年來的陪伴與幫助，你們為枯燥的實驗室帶來很多的樂趣及笑聲，讓我每天都能開開心心的進實驗室學習。感謝免疫所的學弟妹佳慧、建勇跟雅賢，謝謝你們在我忙於畢業論文時幫忙維持實驗室的運作，有你們的陪伴使我的生活充滿樂趣與歡笑。也謝謝大實驗室的助理學長姐們，維持實驗室的各種雜務總是麻煩你們了。離開免疫所讓我感到相當的依依不捨與傷感，在此祝各位往後的日子一帆風順、身體健康。

## 目錄

摘要 .....	I
Abstract .....	III
致謝 .....	IV
目錄 .....	V
圖目錄 .....	VIII
表目錄 .....	IX
第一章 前言 .....	1
第一節 研究背景 .....	1
1.1.1 惡性膠原母細胞瘤的分類介紹 .....	1
1.1.2 惡性膠原母細胞瘤的病理介紹及診斷 .....	1
1.1.3 惡性膠原母細胞瘤的治療 .....	2
1.1.4 MicroRNAs的發現及分類 .....	3
1.1.5 MicroRNAs的形成機制與調控 .....	6
1.1.6 MicroRNAs和癌症的關係 .....	8
1.1.7 MicroRNAs應用於癌症治療 .....	10

第二節 實驗目的 .....	12
第二章 實驗材料與方法 .....	13
第一節 實驗材料.....	13
2.2.1 惡性膠原母細胞瘤檢體及細胞株 .....	13
2.2.2 實驗藥品與試劑 .....	14
2.2.3 實驗儀器 .....	15
第二節 研究方法 .....	17
2.2.1 細胞培養及繼代(Cell culture).....	17
2.2.2 初代培養(Primary culture).....	17
2.2.3 RNA萃取(RNA extraction) .....	18
2.2.4 人類microRNA微陣列分析 (Human microRNA microarray) .....	19
2.2.5 反轉錄聚合酶反應 (Reverse transcription) .....	20
2.2.6 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR).....	21
2.2.7 Real-time PCR數據分析 .....	21
第三章 研究結果 .....	24
第一節 利用miRNA微陣列(microarray)來觀察 716 個microRNAs在 惡性腦瘤組織的表現。 .....	24
第二節 篩選在microRNAs microarray 結果中表現量變化具有意義	

的microRNAs。	24
第三節 以Real-Time RCR來證實miRNA微陣列的結果。	25
第四節 使用網路資料庫預測可能受microRNAs調節的基因。	26
第五節 使用惡性腦瘤基因表現的資料庫和預測的microRNAs目標 基因進行交叉比對並篩選。	27
第六節 檢測預測的miR-137 候選基因CREM及miR-7 的目標基因 PKC $\beta$ 1、TBX2 在惡性腦瘤組織中的表現。	27
第四章 討論	30
參考文獻	36
附錄	53





## 圖目錄

圖 一：716 個 MicroRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情況。.....	42
圖 二：用 Real-Time PCR 來觀察 miR-126、miR-137、miR-145 及 miR-146 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情形。.....	43
圖 三：用 Real-Time PCR 來觀察 miR-221、miR-222、miR-7 及 miR-9 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情形。.....	44
圖 四：使用 Real-Time PCR 來觀察 CREM 在惡性膠原母細胞瘤組織中 的 mRNA 表現情況。.....	45
圖 五：使用 Real-Time PCR 來觀察 PKC $\beta$ 1 在惡性膠原母細胞瘤組織中 的 mRNA 表現情況。.....	46
圖 六：使用 Real-Time PCR 來觀察 TBX2 在惡性膠原母細胞瘤組織中的 mRNA 表現情況。.....	47
圖 七：檢定 RNA 的品質狀況是否良好。.....	48
圖 八：觀察重要基因在各檢體的表現來判斷 Microarray 的可信程度。 .....	49

## 表目錄

表 一：惡性膠原母細胞瘤臨床病人檢體的資料列表.....	50
表 二：13 個在惡性膠原母細胞瘤病人中具兩倍變化量的 microRNAs。 .....	51
表 三：miR-137 和 miR-7 的候選目標基因 .....	52



## 第一章 前言

### 第一節 研究背景

#### 1.1.1 惡性膠原母細胞瘤的分類介紹

根據世界衛生組織(WHO)的分類，腦部的神經上皮腫瘤主要可以分為十種類型及四十幾種子類型，但在臨床上的發現，有超過 60%的病人是屬於其中的神經膠質瘤(Astrocytic tumors)，其源自神經膠細胞(Gliocell)，而神經膠細胞是腦組織中的支持性組織。神經膠質瘤以外觀形態及臨床表現而言，可以分為四級如下：第一級-毛狀星細胞瘤 (Pilocytic Astrocytoma)，第二級-星細胞瘤 (Astrocytoma) 屬低惡性腫瘤，第三級-分化不良星細胞瘤 (Anaplastic Astrocytoma; AA)，第四級 -多型性神經膠母細胞瘤 (Glioblastoma Multiform; GBM) 屬惡性腫瘤。低惡性腫瘤生長速度慢且容易治療病痊癒，而惡性腫瘤生長速度快、癒後易復發。隨著分類的等級越高，病人的生存時間越短且腫瘤的侵略性越強[1]。

#### 1.1.2 惡性膠原母細胞瘤的病理介紹及診斷

在病理上的癥狀，由於整個腦部被頭骨所包覆，大型腦腫瘤或腦瘤腫脹伴隨的腦水腫會導致顱內壓升高，臨床上會造成頭痛、嘔吐、意識狀態改變 (嗜睡、昏迷) 亦或是瞳孔病變。且根據腫瘤發病的位置所造成的壓迫，都有可能直接損害腫瘤生長部位及附近的腦結構，導致局部

神經癱狀的發生，如：認知和行為能力的下降、個性變化、偏癱、感覺遲鈍、失語症、視野變小以及顏部癱瘓等[2, 3]。

發病機制上，目前的研究仍無法完整的解釋癌症是如何生成的，在腦腫瘤的研究當中，最常發現的是 p53 基因的突變或表現變少，p53 主要功能為確保 DNA 在細胞分裂時能正確的複製，並在 DNA 受到無法還原的傷害時，將細胞進行破壞。當 p53 基因本身發生突變或異常時，其他基因的突變便可以很容易的出現。在 GBM 上 p53 的突變通常會伴隨著 Epidermal growth factor receptor (EGFR) 基因的大量異常表現，EGFR 會刺激細胞進行增生，而大量的 EGFR 表現則會對細胞過度刺激而使增生失去控制。

診斷方面，目前沒有特定的臨床癱狀可以直接判讀腦腫瘤的發生，通常由顱內壓的產生或加重做為警訊，並進一步結合影像檢查(電腦斷層掃描、核磁共振攝影...等)及切片檢查來進行診斷，由於診斷不易，所以確診時，通常已經形成了一定大小的腫瘤或造成顱內壓。其中 GBM 在確認病症後的平均壽命只有十四個月，僅 5% 的病人能存活五年以上 [1]。

### 1.1.3 惡性膠原母細胞瘤的治療

在確診後的治療方法上可分為手術治療、放射線治療以及化學治療。但由於多種原因導致神經膠質瘤的治療非常困難，如：傳統的療法可能

導致腦部損傷、腦部的修補回復能力有限、許多藥物無法通過腦血管屏障(Brain Blood Barrier)來對腫瘤起作用[4]。治療的第一步通常為手術治療，也就是對原發性的腫瘤給予外科手術切除，盡可能移除腫瘤細胞，避免細胞增生，並可以增加病人的存活率[5]，但 GBM 這種高惡性腫瘤常常有復發的現象，因此切除後必須結合放射線治療及化學治療。放射線治療是利用腫瘤細胞對放射線較敏感，容易受放射線傷害來殺死腫瘤細胞，且接受放射線治療的病人可延長近一倍的存活時間[6]，目前放射線治療已經發展至隨型或定位的方式，但惡性腦瘤仍需進行大範圍腦部甚至全顱放射線治療。而化學治療由於腦血管屏障的阻礙，任何化學藥物只能經由藥物本身的脂溶性來通過腦血管屏障，用藥上仍受許多的限制，目前的治療方式有口服用藥的 Temozolomide (Temodal)，Temodal 可以順利通過 BBB 到達腦部，其主要的藥理作用為在鳥嘌呤上的 N-7 或 O-6 位置進行甲基化，造成 DNA 的損傷使腦瘤細胞走向細胞凋亡 (apoptosis)[7]，或在手術切除後直接在顱內腫瘤切除處放入 Gliadel 卡莫司汀藥物晶片來延長腫瘤的復發，Gliadel 卡莫司汀藥物晶片主要由釋放內含的 carmustine (BCNU)提供藥效，藉由晶片溶解緩慢釋出 BCNU，進行持續性的化學治療，BCNU 和 Temodal 一樣事藉由 DNA 的甲基化來使腫瘤細胞走向細胞凋亡[6]。

#### 1.1.4 MicroRNAs 的發現及分類

MicroRNAs 最早被描述的時間是 1993 年，是一個被稱為 lin-4 的基因，當時還未被命名 MicroRNAs 並歸類在 Small RNA 中，lin-4 為可以轉錄(transcription)出 non-coding RNAs 並負向調控 lin-14 的蛋白質，lin-14 基因是 *C. elegans* 在發育時期很重要的基因，lin-14 藉由表現量不同的方式來決定 *C. elegans* 頭部及尾部的發育方向，在文獻中指出在 lin-14 的 3' UTR 部份有一段序列和 lin-4 互補，而 lin-4 就藉由這互補的序列來進行 RNA 與 RNA 之間的交互作用，進而影響 lin-14 的蛋白質產生的量[8, 9]。到了 2000 才又在 *C. elegans* 上發現了一個新的 MicroRNAs，名稱為 let-7，使 let-7 的表現量上升可以讓 *C. elegans* 的發育提早，let-7 轉譯的 RNA 為只有 21 nt 大小的 non-coding RNAs，且和 lin-14、lin-28、lin-41、lin-42 及 daf-12 的 3' UTR 有完全互補的序列，且文獻中更進一步利用 lin-41 的 3' UTR 製作成報導基因(reporter gene)的方式，更明確的證實了 let-7 和 lin-41 在 RNA 階段有直接的交互作用[10]。至此，MicroRNAs 藉由調控目標基因的 mRNAs 來進行負向調控的觀念有了明確的証實，之後隨著定序技術的發展及生物技術上的突破，有越來越多的 MicroRNAs 陸續被發現及定序，其中也有部分 MicroRNAs 的生物性功能及其目標基因已經被確定了。

MicroRNAs 是屬於 Small RNA 的一員，Small RNA 一詞分類上的定義相當廣泛，主要用在形容 non-coding RNAs，早期還包含了後來分類

上被獨立出來的 small nuclear RNAs (snRNAs)及 transfer RNAs (tRNAs)。

那要如何分辨及定義參與在 RNA 階段調節中的 Small RNA？主要是用 RNAs 的長度 (~20-30 nucleotides (nt))以及是否有和 Argonaute (Ago)蛋白質家族有交互關係來定義這群 Small RNA。Ago 蛋白質家族還可以被分為兩個子族群，分別為 Ago 子族群以及 Piwi 子族群。而參與了 RNA 調節的 Small RNA 還可以再根據其生物性功能以及和哪一種類型的 Ago 蛋白質家族交互作用來細分為三的類型：MicroRNAs (miRNAs)、endogenous small interacting RNAs (endo-siRNAs)及 Piwi-interacting RNAs (piRNAs)，但近期的一些新發現逐漸把這三種分類的界線模糊了 [11]。miRNAs 的生成須經由兩種 RNase III-type protein，Drosha 及 Dicer 的作用才能成熟 (mature miRNAs)，成熟的 miRNAs 會跟 Ago 進行結合，之後再跟 mRNA 結合並進行轉譯(translation)前的調節。三種分類中長度最長的為 piRNAs (24~31 nt)，piRNAs 是跟 Piwi 子族群進行結合，且 piRNAs 在形成的過程中不需 Dicer 的參與，piRNAs 經常在微生物上被發現，且部份 piRNAs 已經被證實跟 transposon 的抑制及造成 RNA 的不穩定有關[12]。endo-siRNAs 經常在果蠅上研究，另外也在老鼠的卵母細胞(oocyte)及胚胎幹細胞(embryonic stem cells)上有發現[12-14]，endo-siRNAs 和 miRNAs 一樣是跟 Ago 進行結合，但不同的地方在於 endo-siRNAs 來自較長的雙股 RNA(double-stranded RNAs)且形成的過程中只需 Dicer 而不需 Drosha[15-17]，長度上也是三種中最短的(~21 nt)，

一些 endo-siRNAs 也被證實跟 RNA 轉錄前的調節有關。

### 1.1.5 MicroRNAs 的形成機制與調控

MicroRNAs 的生成如同一般的 RNA，須由 DNA 經過轉錄作用方能形成，MicroRNAs 在轉錄過程中主要是依靠第二型 RNA 聚合酶(RNA polymerase II)來進行轉錄作用，因此第二型 RNA 聚合酶在調控 MicroRNAs 的產生上扮演了相當重要的角色[18, 19]。MicroRNAs 和基因一樣有 isoforms 的存在，以 let-7 舉例來說，let-7 在人類的基因體上就有 12 個位置能轉錄出 let-7 家族，這些 isoforms 的共通點在 5' 會有 2~7 個序列是相同的，而這位子上有六個核酸(nucleotide)被稱之為 seed，主要作用為跟 mRNA 進行互補的結合。但這些 isoforms 在 3' 常有不同的表現且 MicroRNAs 的 3' 在幫助 MicroRNAs 鎖定特定的 mRNA 時幫助，但這些 isoforms 的 3' 表現不同對 MicroRNAs 的功能有什麼影響仍需進一步的研究[20]。經過第二型 RNA 聚合酶轉錄後成為 primary MicroRNAs (pri-miRNA)，pri-miRNA 通常擁有幾千個 base 並擁有一個 stem-loop 的結構，接著的步驟為在核質內切割 pri-miRNA，在 stem 的部分進行切割並去除 3' 及 5'，留下 hairpin 及部分 stem 結構，此結構稱之為 pre-miRNA[21]，而進行切割所必需的是第三型的 nuclear RNase 蛋白質 Drosha[22]，而 Drosha 的作用需要一些協同因子的幫助才能進行，在人類中的協同因子為 DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8)



[23-26]，Drosha 和 DGCR8 結合後會形成一個大小約 650 kDa 的複合物稱之為 Microprocessor complex[24, 25]，典型的 pri-miRNA 由一個大約 33 base pair 的 stem，一個 loop 及兩側的單股 RNA(ssRNA)所組成，Microprocessor complex 主要藉由 DGCR8 來辨識 stem 及 ssRNA 的結構並和 pri-miRNA 結合，接著由聯結在一起的 Drosha 在 stem 結構上切除大約 11 bp[27, 28]。形成 pre-miRNA 後接著要從核質轉移到細胞質中[29]，pre-miRNA 要穿過核膜須要 exportin 5 (EXP5)的幫助[30-32]，EXP5 最早被發現是有協助 tRNA 離開核膜的功能[33, 34]，在新的研究中發現 EXP5 其主要的運輸目標為 pre-miRNA[30-32]，EXP5 會在核內與 pre-miRNA 的 3' 進行結合並形成 GTP，等運送到細胞質後，GTP 進行水解並釋放 pre-miRNA[31, 35-37]。在細胞質中的 pre-miRNA 要進行最後一步的修飾，由 Dicer 將 pre-miRNA 的 loop 結構切除並留下大約 22 nt 的雙股 miRNA[38-42]，Dicer 在真核生物中時常被發現，包含動物及植物，有些生物的 Dicer 有 isoform 的產生，Dicer 的 isoform 都有相當不一樣的功能，例如 Dicer 1 是 miRNA 生成時必須的，而 Dicer 2 則參與在 siRNA 的形成[43]。在人類，Dicer 須和 TAR RNA-binding protein (TRBP)或 PRKRA 結合才能有功能[44-49]，但這蛋白質詳細的生物功能仍未清楚。被 Dicer 切割完後的雙股 RNA 會進入 Ago 蛋白質裡並形成最後有功能的複合物 RNA-induced silencing complex (RISC)，雙股 RNA 裡與 miRNA 互補的那一股會在 Ago 蛋白質中被降解，接著 mature miRNA 以單股

RNA 的方式出現[50-52]，RISC 裡包含了 Ago、Dicer、TRBP (或 PRKRA) 及 mature miRNA，形成 RISC 後接著要和目標基因的 mRNA 結合並對其進行調控[47, 53-56]，除了 miRNA 會利用互補的序列跟目標 mRNA 進行結合，其他 RISC 是如何辨識並結合上 mRNA 的機制目前尚無詳細的研究指出。

在含有 mature miRNA 的 RISC 形成後，會和目標基因的 mRNA 結合並進行對 mRNA 的調節，RISC 調控的方式大致上可以分為兩種：切除尾端的 poly-A 或阻止轉譯的進行，RISC 在結合後 mRNA 會引來蛋白質 CCR4-NOT 並切除尾端的 poly-A[57]，使 mRNA 變得較不穩定，最後被降解。RISC 調控轉譯的另一種方式為干擾 initiation 或 elongation 始轉譯無法正常進行，如抑制 eukaryotic initiation factor 4E (EIF4E) 或使 ribosome 無法和 mRNA 進行穩定的結合[58-60]，最終導致目標基因的蛋白質表現量下降。自今已有近千個 MicroRNAs 被確立了，但只有少部分的 MicroRNAs 被確認其詳細的功能及作用機制，而這些被確定的 MicroRNAs 控制了細胞生長、細胞發育、分化、細胞增生、細胞凋亡、代謝調控...等許多重要的生物性功能。

### 1.1.6 MicroRNAs 和癌症的關係

癌症的形成原因包含失去控制的細胞增生及受損細胞獲得異常的生存能力。細胞發展了許多防衛機制來確保能正確的進行或調節細胞分

裂、細胞分化及細胞凋亡，其中許多調節因子在這些功能上扮演著有如開關的角色，當這些調節因子的基因受損，就會造成上述功能發生異常，進而導致癌症。而這些重要調節因子的基因統稱為 tumor suppressor genes 或 oncogenes，tumor suppressor genes 及 oncogenes 一樣須經由 DNA 轉錄成 RNA 再轉譯成蛋白質來發揮影響，而在 RNA 層級有 MicroRNAs 會對其進行調節，且 MicroRNAs 也被證實扮演著許多重要生物性功能的調節者，因此 MicroRNAs 也扮演著 tumor suppressors 或 oncogenes 的角色[61]。而許多 MicroRNAs 及與 MicroRNAs 相關的蛋白質如：Dicer，也被發現在許多的癌症上有異常的表現，且這些異常表現跟腫瘤的形成及維持有很直接的關連。以最早被指出和癌症有關的 miR-15 及 miR-16 為例，大約有 68% 的 leukemia 的 miR-15 及 miR-16 會經常性的出現表現量低或是被剔除的情況[62]，miR-15 及 miR-16 在腦下垂腫瘤中也都是低表現量，且其表現量和腫瘤大小成反比、和 p43 的釋放量成正比，p43 能引發局部發炎反應及活化巨噬細胞，miR-15 及 miR-16 表現量低下導致 p43 表現量也低下，說明了 miR-15 及 miR-16 會影響腫瘤的生長[63]。之後 miR-15 及 miR-16 更進一步被發現可以直接和 Bcl2 的 mRNA 進行交互作用並抑制 Bcl2 基因的表現，而 Bcl2 基因的功能為引發細胞凋亡[64]。綜觀 miR-15 和 miR-16 的相關研究，miR-15 和 miR-16 經常在癌症中呈現低表現量，且其表現量低對癌細胞是有利的，因此 MicroRNAs 在癌症中扮演著相當於 tumor suppressors 及 oncogenes 的重要角色。而

在 GBM 的研究中也已經發現部分 MicroRNAs 在 GBM 中有異常的表現且具相當重要的影響，如：miR-7 能直接抑制 Epidermal growth factor receptor (EGFR)及 Akt pathway 且在 GBM 中呈現低表現量，miR-128 會抑制細胞自我更新因子(self-renewal factor) Bmi-1 進而抑制 GBM 的細胞增生及自我更新的能力[65, 66]。儘管已經發現許多跟癌症有相關的 MicroRNAs，但和癌症形成最具關鍵性的 MicroRNAs 仍未被證實。

### 1.1.7 MicroRNAs 應用於癌症治療

腫瘤的形成及惡化往往是有一些關鍵的基因產生異常所引導，藉由這些關鍵的基因導致一連串下游基因的異常，因此藉由修補這些關鍵的基因可以達到治療癌症的目的，這是基因治療的主要原理。在許多文獻已指出 microRNAs 調控了許多的 tumor suppressors 及 oncogenes 的表現，因此發展藉由調控 microRNAs 來修補其下游基因的新治療手段是具有相當大的可行性。因為相較於其他的治療方式，以 microRNAs 為基準的治療方法理論上可以藉由透過控制一個 microRNAs 來調控多個基因的表現，藉此來影響整個基因網絡[67]。利用 cDNA microarray 已證實單一個 microRNAs 可以調節多個的基因表現，如在子宮頸癌細胞株 HeLa 中大量表現 miR-124 會使整體基因表現類似大腦細胞，而在 HeLa 大量表現 miR-1 則是使整體基因表現傾向骨骼肌細胞，而在正常的大腦細胞及

骨骼肌細胞中也分別發現原生的 miR-124 及 miR-1 的表現量是較高的 [68]。所以單一 microRNAs 不但具有同時調控多個基因的能力，且這些被調控的基因的功能一致的現象，所以以 microRNAs 目標的治療方式最終目標是期望可以找到能同時調節多個關鍵致癌基因的單一 microRNAs，如此只需針對一個 microRNAs 進行修補便能影響整個致癌的基因網絡並達到治療癌症的目的。



## 第二節 實驗目的

隨著越來越多的 microRNAs 相關研究及實驗技術上的突破，有越來越多的 microRNAs 逐漸被發現並確認，至今約有八百多個 microRNAs 被確認了，且絕大部分的功能仍未明瞭。由於影響惡性膠原母細胞瘤的形成及惡化的關鍵 microRNAs 尚未被發現，及過往的大規模 microRNAs 表現篩檢並沒有包含後來陸續新確立的 microRNAs，因此我們希望藉由 microRNAs microarray 的方式來將截至目前已知的 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤的表現情況做一個大規模的篩檢，希望藉此找出那具關鍵性角色的 microRNAs，以及進一步的探討其 microRNAs 所影響調控的下游基因及其參與的生物性功能，並藉由對其在生理功能上全面的了解來為 microRNAs 為基礎的癌症治療方式提供一個有潛力的治療目標。

## 第二章 實驗材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 2.2.1 惡性膠原母細胞瘤檢體及細胞株

惡性膠原母細胞瘤檢體：

CMUH-04

CMUH-08

CMUH-09

CMUH-10

CMUH-18

CMUH-28

CMUH-38

CMUH-49



以上檢體皆來自中國醫藥大學附設醫院(表一)。

惡性膠原母細胞瘤細胞株：

GBM 8401

GBM 8901

GBM G5T

DBTRG

CMUH-04 primary culture cell

CMUH-08 primary culture cell

CMUH-10 primary culture cell

CMUH-18 primary culture cell

CMUH-28 primary culture cell

CMUH-38 primary culture cell

### 2.2.2 實驗藥品與試劑

Human MicroRNA Microarray Kit V2 (Agilent)

SYBR<sup>®</sup> GreenER<sup>™</sup> qPCR SuperMix for ABI PRISM<sup>®</sup> (Invitrogen, #11760)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, #4366596)

KAPA<sup>™</sup> PROBE FAST ABI Prism<sup>™</sup> qPCR Kit (KAPAbiosystems, #KK4705)

TaqMan<sup>®</sup> Ribosomal RNA Control Reagents VIC<sup>™</sup> Probe (Applied Biosystems, #4308329)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-126 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-137 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-145 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-146 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-221 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-222 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-7 (Applied Biosystems, #4395274)

TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay has-miR-9 (Applied Biosystems, #4395274)

RNaseZap<sup>®</sup> Solution (Applied Biosystems, #AM9780)

TRI Reagent<sup>®</sup> Solution (Applied Biosystems, #AM9738)

TRIZOL Reagent (Invitrogen, #15596-026)

CREM primer



PKC $\beta$ 1 primer

TBX2 primer

MEM (Thermo, #AVE10659)

Fetal bovine serum (Thermo, #10437)

Sodium pyruvate (Thermo, #P5280)

DMSO

### 2.2.3 實驗儀器

無菌操作台 (laminar flow)

高速離心機 (centrifuge)

二氧化碳細胞培養箱 (CO<sub>2</sub> incubator)

液態氮儲存槽 (liquid nitrogen tank)

-80°C 低溫冷凍冰箱 (-80°C deep freezer)

-20°C 低溫冷凍冰箱 (-80°C deep freezer)

4°C 冰箱 (4°C freezer)

微量吸引器 (pipette aid)

水浴槽 (water bath)

乾式加熱器 (dry bath incubator)

高溫高壓滅菌釜 (autoclave)

顯微鏡 (microscopy)

純水製造機 (Millipore Milli-Q Plus)

烘箱 (oven)

震盪器 (vortex mixer)



## 第二節 研究方法

### 2.2.1 細胞培養及繼代(Cell culture)

GBM 細胞株 13T0CXII 以含有 10% fetal bovine serum (FBS,胎牛血清,GIBCO)、Non-Essential Amino Acid (NEAA)、Sodium pyruvate、L-glutamine 的 MEM (minimal essential medium)培養液及培養皿，置於培養箱(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)中進行培養，每兩天更換新鮮培養液，以確保細胞生長所需之養分。當細胞生長至八、九成滿時須進行繼代，以 1X PBS (每公升含有 NaCl 80 克、KCl 2 克、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g 克、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 21.6 克)清洗細胞表面，去除清洗用的 PBS 後，加入 Trypsin-EDTA 在 37°C 下作用 2 分鐘，作用完畢後使用新鮮的培養液來中止 Trypsin 作用並將細胞沖下收集至培養液中，接著移至 15 C.C.離心管後離心(1000rpm, 10 分鐘, 25°C)，去除上清液後再加入新鮮的培養液回溶細胞，之後取三分之一至四分之一含細胞的培養液加入新的培養皿中，放回培養箱(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)繼續培養。

### 2.2.2 初代培養(Primary culture)

GBM 病患腫瘤患部的初代細胞培養，共六位病人檢體來自中國醫藥大學附設醫院。在手術取下病人腦腫瘤後放置在 serum-free

HBSS(Hank's balanced salt solution)中，置於 4°C 並保持無菌狀態。兩個小時後，將腦腫瘤組織取出並用預冷過的 HBSS 進行三次表面的清洗，目的為洗去表面的血球細胞。接著用無菌的剪刀將腦腫瘤組織剪成長寬高皆小於 1 mm 的碎片，然後置於含有 collagenase 的 MEM (10% fetal bovine serum、Non-Essential Amino Acid、Sodium pyruvate、L-glutamine) 培養液中並保持懸浮，作用 30 到 40 分鐘使被剪碎的腦腫瘤組織分離成單一顆的細胞。接著離心(1000rpm, 10 分鐘, 25°C)，去除上清液後將細胞培養在含有 2.5%病人自體血清的 MEM 並放於培養箱(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 進行培養，當細胞長滿後進行繼代，分三盤 dish，培養及繼代方式同細胞株培養，以此方式繼代二到三次將細胞量放大後，便可以將細胞冷凍進行保存。之後再依實驗所需來進行解凍及培養，初代培養必須保持低繼代次數並收集進行實驗以免繼代代數過高導致細胞變性。

### 2.2.3 RNA 萃取(RNA extraction)

在 10 公分的細胞培養皿中加入 PBS，搖晃清洗細胞後將 PBS 吸乾。加入 1ml TRIzol (invitrogen) 並搖晃使均勻覆蓋在培養皿上，移至 eppendorf 中，快速沖吸 TRIzol solution 使細胞破裂，室溫下靜置 5 分鐘作用。加入 200µl 氯仿(chloroform, TRIzol solution : chloroform = 2 : 1) 並劇烈震盪 30 秒，之後靜置室溫作用 5 分鐘，然後離心(12000rpm, 20 分

鐘, 4°C), 離心完後取上清液至新的 eppendorf 中並估算體積, 加入等體積的 isopropanol 且溫和的混合, 室溫下靜置 15 分鐘作用, 接著離心 (12000rpm, 10 分鐘, 4°C)。離心完之後可見 RNA pellet 沉澱在底部, 小心的去除上清液, 保留 RNA pellet, 加入 1ml 75%酒精清洗, 搖晃 5 秒後離心(7500rpm, 10 分鐘, 4°C), 去除上清液後再重複 75%酒精清洗一次。離心結束後去除上清液並仔細的將殘留的酒精清除乾淨, 之後室溫下倒扣風乾。加入 10 $\mu$ l Nuclease free water 回溶後, 取出 1 $\mu$ l 稀釋 100 倍, 其餘凍-80°C 備用。將稀釋後的 RNA 溶液以 O.D. 260 進行濃度測定(O.D. 260 值為 1 時, RNA 為 40ng/ $\mu$ l), 並測定 O.D. 280, 以 O.D. 260/ O.D. 280 的比值來判定 RNA 純度是否足夠(正常比值範圍在 1.8~2)。

#### 2.2.4 人類 microRNA 微陣列分析 (Human microRNA microarray)

萃取檢體的 total RNA 後, 每份檢體取 100 ng 的 RNA 進行人類 microRNA 微陣列分析。利用 T4 RNA 接合酶(T4 RNA ligase)在 RNA 的 3'端接上一個螢光物質 Cyanine 3-pCp, 接著純化接上 Cyanine 3-pCp 的 RNA 並乾燥, 使用 nuclease-free water 回溶 RNA 後加入緩衝溶液, 將準備好的 RNA 溶液加進人類 microRNA 微陣列晶片, 在 55°C 下雜合作用 20 個小時。結束後用 GE 緩衝液清洗晶片, 清洗結束將晶片用儀器 (Microarray Scanner, Agilent)進行螢光讀值的測定。

## 2.2.5 反轉錄聚合酶反應 (Reverse transcription)

為了增加 microRNAs 在 Real-TimePCR 中能順利的被 probe 偵測到，在此研究中的反轉錄酶鏈式反應須分為兩部分：

(1) 使用 Taq®MicroRNAs Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)來將存在於 RNA 中的 microRNAs 反轉錄成 cDNA，並預備接下來的即時定量聚合酶鏈式反應(Real-time PCR)使用，在此反應中會使用針對個別的 microRNAs 所設計的引子(primer)來進行反轉錄使 microRNAs 能順利得合成 cDNA。將 RNA 的濃度加 Nuclease-free water 稀釋成 20 ng/μl 備用，每份反應需加入 0.15μl 100mM dNTPs、1.5μl RT buffer、8.16μl Nuclease-free water、1μl RT enzyme、0.19μl RNase inhibitor、1μl RNA (20 ng/μl)、3μl primer (miR-126、miR-137、miR-145、miR-146、miR-221、miR-222、miR-7、miR-9)，混合均勻後使用機器進行反應(Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems)，反應條件為 16°C 作用 30 分鐘、42°C 作用 30 分鐘、85°C 作用 5 分鐘，反應完成後-80°C 冰箱保存備用。

(2) 使用 SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (invitrogen)來將 mRNA 反轉錄成 cDNA，以備接下來做為即時定量聚合酶鏈式反應(Real-time PCR)中的 endogenous control (18S ribosome)。由原

本的 RNA 溶液中取 2 $\mu$ g RNA 並加 Nuclease-free water 補至 4 $\mu$ l，之後在這 4 $\mu$ l 的 RNA 溶液中加入 5 $\mu$ l 2X RT buffer、1 $\mu$ l RT enzyme，混合均勻後使用機器進行反應(Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems)，反應條件為 25 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘、50 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘、85 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘，反應完成後放 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存備用。

### 2.2.6 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)

每份取 2 $\mu$ l cDNA 加入 10 $\mu$ l KAPA Probe Fast qPCR Master Mix(2X)-ABI Prism (KAPABiosystems)、7 $\mu$ l Nuclease-free water、1 $\mu$ l primer + probe (miR-126、miR-137、miR-145、miR-146、miR-221、miR-222、miR-7、miR-9)，endogenous control 為 18S ribosome，使用儀器為 Step One Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems) 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘、接著以 95 $^{\circ}$ C 作用 3 秒、60 $^{\circ}$ C 作用 30 秒為一迴圈，共進行 40 個迴圈，分析方式為 Comparative Ct Experiments。

### 2.2.7 Real-time PCR 數據分析

由於傳統的聚合酶連鎖反應(PCR)反應最終會因材料耗盡而到達飽和，因此無法作為定量分析使用，而即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time PCR)由於可以在每一個迴圈(cycle)後進行螢光的讀值偵測，因此較能反

映基因的真實表現。在每一份的即時定量聚合酶連鎖反應中都會含有 ROX 螢光物質作為 loading control，作為排除實驗上的操作誤差。當反應結束，每個迴圈的螢光讀值皆偵測完畢後，接著將對螢光讀值進行標準化(normalization)，方法為將檢體的螢光讀值除以 ROX 的螢光讀值，稱之為 Normalized fluorescence (Rn)，目的為排除每份反應之間試劑量上的誤差。由於 cDNA 的量在反應前期尚太少，因此每個迴圈所產生的螢光太弱而無法被機器判讀，在尚未被機器偵測到螢光讀值之前的迴圈會無持一樣的螢光讀值，這些迴圈相同的螢光讀值在標準化後的 Rn 稱之為 baseline。接著將每一個迴圈的 Rn 皆減去 baseline 的值，得到每一個迴圈的  $\Delta Rn$ ，由於相減後的 baseline 部分會是零，因此能剔除螢光強度還無法被機器偵測的迴圈。接著用每一個迴圈及其  $\Delta Rn$  作圖，稱為 Amplification plot。在 Amplification plot 中可以看見  $\Delta Rn$  的曲線呈 S 型，曲線前段呈指數上升的部分為 Exponential phase，此階段的螢光讀值因為 cDNA 不斷被放大而倍數的增強，接著曲線的上升趨緩，此階段稱為 Linear phase，趨緩的原因為試劑中的材料逐漸不足所導致，最後趨於緩的部分為 Plateau phase，此時試劑中的材料以幾乎用盡，曲線平緩。Exponential phase 的階段由於材料充足，螢光訊號增強穩定，因此可信的程度最高，而傳統的 PCR 由於只能看到最後 Plateau phase 的產物，因此無法做定量，而 Real-Time PCR 由於可以即時監測每一個迴圈的螢光讀值，因此可以使用可信度最高的 Exponential phase 來進行定量。在



Exponential phase 的範圍內指定一個固定的  $\Delta Rn$  作為閾值(Threshold)，當反應的  $\Delta Rn$  超過閾值時，曲線與閾值相交的點為稱之為 Threshold cycle (Ct)，因此每一個獨立的反應都會有一個 Ct。得到 Ct 後，將著要將 Ct 進行標準化，因為細胞所處的環境等因素會影響細胞整體的 RNA 表現量，例如當細胞處在分裂的階段時，由於 DNA 正在進行複製，因此整體的 RNA 表現量會下降，為了排除這個因素，所以要將 Ct 進行標準化，利用細胞原生且會大量且持續表現的基因作為整體 RNA 表現的基準，如 actin、18 S ribosome 皆為典型的例子，而本實驗利用 18 S ribosome 作為 Real-Time PCR 的 endogenous control。標準化的方式為將每一個使用同一種檢體的反應的 Ct 減去該檢體 18 S ribosome 的 Ct，並得到  $\Delta Ct$ 。由於  $\Delta Ct$  已經標準化，因此不僅該次實驗中可以用來做比較，只要反應條件相同，不同次的實驗之間的  $\Delta Ct$  也可以用來互相做比較。算出每一個反應的  $\Delta Ct$  後，接著便可以將實驗組及對照組進行比較，比較的方式為每一組檢體的  $\Delta Ct$  皆減掉對照組的  $\Delta Ct$ ，減完後的值稱之為  $\Delta\Delta Ct$ 。接著將  $\Delta\Delta Ct$  帶入公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  後便能得知該檢體與對照組之間表現量的差異。因為在反應時，每經過一個迴圈，cDNA 的量會以倍數的方式成長，因此相差一個迴圈就相當於表現量相差兩倍，所以  $\Delta\Delta Ct$  作為 2 的指數，且迴圈數越大代表表現量越低，所以在公式上  $\Delta\Delta Ct$  要帶上一個負號。 $\Delta\Delta Ct$  帶入公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  後便可以求得實驗組相對於對照組的表現情形。

### 第三章 研究結果

#### 第一節 利用 miRNA 微陣列(microarray)來觀察 716 個 microRNAs 在惡性腦瘤組織的表現。

為了同時監測大量的 microRNAs 在惡性腦瘤腫中的表現情況，我們將使用 microRNA microarray 來進行這部分實驗，收集 6 個惡性膠原母細胞瘤組織、2 個惡性膠原母細胞瘤組織初代培養細胞株及 2 個腦組織的 RNA 後，首先須將 RNA 轉換成 cDNA，接著使用 cDNA 進行 Human MicroRNAs microarray (Agilent)，來分析一共 716 個 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情形，比較的對象為正常的腦組織。經由分析軟體將晶片數據化，將所有的數據整合成 hit map 以方便觀察整個 Human MicroRNAs microarray 的結果(圖一)。從結果可以看出有相當多的 microRNAs 在惡行腦腫瘤中有異常表現，且同一 microRNAs 在不同的檢體上也會有表現量上升或下降不一的情況，因此必須進一步的進行篩選來找出變化量具重要意義的 microRNAs。

#### 第二節 篩選在 microRNAs microarray 結果中表現量變化具有意義的 microRNAs。

接著我們要從 716 個 microRNAs 中選出在惡性膠原母細胞瘤裡變化量有顯著差異的 microRNAs，初步的篩選為的條件為在十個檢體中至少有八的檢體呈現兩倍以上的變化量(見附錄表一)，接著進一步挑選在各檢體間的變化量上升或下降須有一致性的 microRNAs。在這條件下符合的 microRNAs 有十三個(表二)，其中 miR-137 及 miR-7 已有文獻指出在惡性膠原母細胞瘤中表現量較低，這與我們 microRNAs microarray 的結果相符，進一步的說明了這 microRNAs microarray 是具有相當可信度的。

### 第三節 以 Real-Time RCR 來證實 miRNA 微陣列的結果。

為了進一步的驗證 microRNAs microarray 的結果，我們針對篩選完後的十三個 microRNAs 進行 Real-Time RCR 做進一步的証實，這裡我們從之前選出來的十三個 microRNAs 中選出表現量變化最高的八個 microRNAs 來進行，這八個 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中的表現量皆為是低表現。同時為了更廣泛的觀察這些 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中的普遍表現情況，除了惡性膠原母細胞瘤的組織外，也收集了更多的檢體來進行實驗，其中包括了病人惡性膠原母細胞瘤組織的初代培養細胞及四株惡性膠原母細胞瘤的細胞株。從 Real-Time RCR 結果中可以看出大部分 microRNAs 表現量在檢體中也都呈現低表現量(圖二、圖三)，其中除了 miR-146、miR-221、miR-222 在各檢體中的表現量上

升或下降較無一致性，其他的 miR-126、miR-137、miR-145、miR-7、miR-9 在八成以上的檢體上呈現了較低的表現量，當中 miR-137 及 miR-7 在所有檢體中皆呈現低表現量，這表示 miR-137 及 miR-7 的低表現量在惡性膠原母細胞瘤中是普遍的現象，因此我們對 miR-137 及 miR-7 特別感到興趣。

#### 第四節 使用網路資料庫預測可能受 microRNAs 調節的基因。

證明了這些 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中的表現確實有變化後，也必須找出這些 microRNAs 的目標調節基因，確定了哪些基因會受影響才能在更進一步的探討這些 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中所扮演的角色。因此在使用 Real-Time RCR 來對 microRNAs microarray 的結果進行進一步證實的同時，也著手進行這些 microRNAs 的目標基因的篩選，首先我們將對篩選後的十三個 microRNAs 進行目標調節基因的預測。利用網路資源 TargetScan (ver. 1.0 beta) 及 MicroTar (ver. 0.9.4) 來預測 microRNAs 可能的調節目標基因，其預測的方式為利用 microRNAs 在 5' 端會有一段長度為 6 個核苷酸的序列稱為 seed，而這個 seed 序列為 microRNAs 與目標 mRNA 3'UTR 有完美的序列互補，且是進行結合時必要的。以 microRNAs 的 seed 序列來比對整個人類基因序列資料庫並找出與在 3' UTR 有和 seed 序列互補的基因作為候選的 microRNAs 目標基因，且根據互補位子的多寡最為評分的依據，互補位子越多則分數越

高。預測的結果，由於每個 microRNAs 的預測基因數量相當多，因此我們只挑選系統評分最高的前一百個預測基因，並以此作為之後進一步篩選比對的基準。

#### **第五節 使用惡性腦瘤基因表現的資料庫和預測的 microRNAs 目標基因進行交叉比對並篩選。**

挑選完十三個 microRNAs 各一百個候選的預測基因後，接著將配合這些基因在惡性膠原母細胞瘤的表現情況進行進一步的篩選，以縮小預測的範圍。利用三個公開的資料庫來取得預測後共一千三百個候選基因在惡性膠原母細胞瘤中的表現情形。當 microRNA 表現量下降時，被其所調整的基因的表現會增加，以此為基準做為篩選的條件來選出更加符合條件的候選基因。而所使用的這三個基因資料庫都是利用 cDNA 微陣列分析(cDNA microarray)的方式來檢測所有的人類基因在惡性腫瘤中相較於正常腦組織的表現情況，cDNA 微陣列可以用來偵測基因的 mRNA 表現量。將之前預測的 microRNAs 的候選基因與資料庫進行交叉比對，並以基因的 mRNA 表現量在惡性膠原母細胞瘤中具兩倍變化量作為篩選條件，最後挑選出預測排名在前一百高且同時在惡性膠原母細胞瘤中 mRNA 表現量具兩倍以上變化的候選基因(表三)。

#### **第六節 檢測預測的 miR-137 候選基因 CREM 及 miR-7 的目標基因**

## PKC $\beta$ 1、TBX2 在惡性腦瘤組織中的表現。

經由 Real-Time PCR 的結果，由於 miR-137 和 miR-7 在所有惡性膠原母細胞瘤檢體中皆一致呈現表現量低下，因此我們認為 miR-137 和 miR-7 的表現量低下較為普遍因此感到有興趣，從經過篩選比對後的 miR-137 和 miR-7 的候選基因中，挑選變化量為上升且變化幅度較多的基因來做為進一步研究的目標，因為在惡性膠原母細胞瘤中 miR-137 及 miR-7 的表現量低的結果，會導致其目標基因的 mRNA 因為無法被抑制及降解而使表現量相較於正常的腦組織，在惡性膠原母細胞瘤中會有較高的表現量。其中 miR-137 以 CREM (cAMP responsive element modulator) 的上升量最多，而 miR-7 以 PKC $\beta$ 1 (protein kinase C, beta 1) 及 TBX2 (T-box 2) 的上升量最多，因此我們預測這三個基因分別為 miR-137 和 miR-7 的調節基因。使用 Real-Time PCR 來觀察這三個基因相較於正常腦組織，在惡性膠原母細胞瘤組織中是否有 mRNA 表現量上升的現象。從結果來看(圖四~圖六)，CREM 及 PKC $\beta$ 1 的 mRNA 表現量在惡性膠原母細胞瘤組織中皆較低，與假設的情況相反，因此判定 CREM 及 PKC $\beta$ 1 並非 miR-137 及 miR-7 的目標調節基因。只有 TBX2 在許多檢體中出現了 mRNA 表現量升高的現象，因此我們認為 TBX2 為 miR-7 的目標調節基因的機會相當的大，但由於 TBX2 mRNA 表現量上升的幅度和 miR-7 下降的幅度不成正比，且並不是全部的檢體都是表現量上升的現

象，因此在未來實驗上必須測試更多的檢體來證實 TBX2 的 mRNA 表現量在惡性膠原母細胞瘤中有上升，且也必須從 TBX2 蛋白質的表現量上升來更進一步的證時 miR-7 和 TBX2 之間的關係。



#### 第四章 討論

從 microRNAs 被確立以來的十年間，microRNAs 上的研究相當興盛，有越來越多的 microRNAs 被發現及確認，至今有近千個 microRNAs 被發現，也有不少的 microRNAs 在生理上的功能已被明確的指出，microRNAs 所參與的生物性功能相當廣泛，因此也和不少 tumor suppressors 及 oncogenes 的調控有關係，而也已經有許多的研究說明 microRNAs 確實在癌症上有異常的表現，且其所調控的基因及對癌細胞形成的影響也十分明確。為了找出在惡性膠原母細胞瘤上有異常表現的 microRNAs，我們利用 Human MicroRNA Microarray (Aligent)來快速的監測一共 716 個 microRNAs 的表現。從結果來看，的確有不少的 microRNAs 在惡性膠原母細胞瘤上有異常的表現，但由於在各檢體之間表現情況不一，且 Human MicroRNA Microarray 為了進行大規模的監測，因此靈敏度會有所不足，為了找出在惡性膠原母細胞瘤中真正有表現量異常的 microRNAs，我們在挑選完各檢體間表現情況較一致的 microRNAs 後，必須要用 Real-Time RCR 來做進一步的證實。在 Human MicroRNA Microarray 及 Real-Time RCR 雙重的證實下，只有 miR-137 及 miR-7 在各檢體間皆有一致表現量下降的現象，因此我們認為 miR-137 及 miR-7 的異常低表現在惡性膠原母細胞瘤是屬於較普遍的現象，所以優先針對 miR-137 及 miR-7 進行目標調節基因的預測與證實。



但在癌症的相關研究上，許多對癌症的生成或維持有重大影響的基因及其機轉目前已研究的相當清楚，且在臨床案上這些基因並非都出現一致異常的現象，例如重要的腫瘤抑制基因 p53 在所有癌症病例上也不是全部都有發現異常或突變的現象。所以雖然其他的 microRNAs 在各檢體間表現異常的情況不是那麼的一致，仍不能忽略其在惡性膠原母細胞瘤上扮演著重要角色的可能性，只是本研究優先挑選表現異常現象較一致的 microRNAs 來進行初步的分析探討，其他的 microRNAs 日後仍有深入研究的價值。

為了確保 MicroRNA Microarray analysis 結果的可信程度，因此在進行 Microarray 實驗前必須先確定從檢體萃取的 RNA 品質狀況是否良好，以在所有 RNA 占大多數的三個 rRNA 族群(28S、18S 及 5S)的表現情況來判斷 RNA 的品質是否良好及降解的情況是否嚴重，利用質譜儀測定 RNA 的組成，接著將結果以影像的方式呈現(圖七)，從圖中可以看見在 1、3、4 及 5 的檢體中皆可以清楚的 28S、18S 及 5S 三的主要組成族群的表現，而 2 的檢體則無明顯出現這三個族群的表現，這說明了這個檢體的 RNA 被降解的情況十分嚴重，因此不適合用來進行 MicroRNA Microarray analysis。此外在 Microarray 中也安排了幾個人類的基因作為對照組，監測 MicroRNA 表現的同時也對這些基因進行觀察，而這些基因為細胞重要的基因，因此理論上在各檢體間表現情況應該是相同的，

從螢光讀值得數據來看(圖八)，幾個重要基因的表現情況在各檢體間差異並不大，因此證實了這些檢體的可信程度。

但在早先的文獻中，已經報導 miR-137 及 miR-7 在惡性膠原母細胞瘤中為低表現量，且其調控的基因及參與的生物性功能也已經在許多癌症上被發現並證實，例如 miR-7 會抑制 EGFR 的表現及間接的影響 Akt pathway 的傳導[66]。但在眾多有關 microRNAs 的文獻中可以發現，有些 microRNAs 在不同的研究中發現的目標調控基因不同，且這些文獻都有強力的證據來證實這些不同的基因皆為同一種 microRNAs 所調控，這說明了單一 microRNAs 具有調節多個基因的能力。所以雖然我們所感到興趣的 miR-137 及 miR-7 已經有幾篇研究報導，但這些被報導過基因並不在我們所預測的基因裡。基於為癌症治療上提供一個可行的方向，我們希望可以找出更多被 miR-137 及 miR-7 所調控的基因及所影響的生理功能，藉由對 miR-137 及 miR-7 更進一步的了解來做為 microRNAs 治療上的價值及其可能帶來的負作用的評估。

要尋找被 microRNAs 所調節的基因猶如大海撈針，是一件不容易的事情，由於生物資訊技術上的成熟，目前有數個網站(TargetScan、MicroTar...等)提供了預測 microRNAs 目標基因的服務，拜人類 DNA 序列解讀工程的功勞，這些網站可以利用 microRNAs 上的 seed 序列和人類基因資料庫進行全面的比對，主要利用基因的 3' UTR 和 seed 序列是

否有互補來評估該基因為 microRNAs 調節目標的可能性。利用預測網站雖然可以去除大量較無相關性的基因，但預測完後近千個的候選基因在驗證上仍然是一大難題。為了快速且準確的篩選這些候選基因，我們結合了三個利用 cDNA microarray 的方式分析在惡性腦瘤中整體基因表現的資料庫來協助篩選這些龐大的預測基因。microRNAs 調節基因的結果會導致該基因無法表現，其無法表現的具體情況為該基因的蛋白質表現量大幅下降造成功能無法發揮。因此在研究 microRNAs 與其所調節的基因時，最直接的證據就是 microRNAs 是否影響了其調節的基因的蛋白質表現量。但由於目前尚無可以大規模的監測整體蛋白質表現線像的工具，因此在我們篩選這些利用網站所預測的 microRNAs 目標基因時要利用蛋白質表現來做為依據是有困難的。由於 microRNAs 在和 mRNA 結合時會導致部分 mRNA 的不穩定並造成降解，所以利用觀察 mRNA 的表現量為依據來判斷這些預測基因是否真的為 microRNAs 的目標基因是可行的。因此我們利用三個公開的資料庫來取得在惡性膠原母細胞瘤上大量的基因 mRNA 表現的資料，用此方法能對數量龐大的預測基因進行比對篩選，並有效率的縮小範圍。在範圍縮小之後，便能針對篩選後剩下較少量的預測基因進行蛋白質表現量的測定，有了蛋白質表現符合的證據能更有力的說明 microRNAs 和其目標基因之間的相關性。

基因TBX2全名為T-box2，為T-box基因家族的一員，T-box基因家族皆帶有相似的DNA-binding domain並參與在發育上的調控[69]。其中

T-box 基因家族的只有 TBX2 及 TBX3 為轉錄抑制因子 (transcription repressor)，其餘皆為轉錄活化因子 (transcription activator)。TBX2 參與了早期的胚胎發育，文獻上也指出 TBX2 和 transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )、fibroblast growth factor (FGF) 及 Wnt 這些細胞繁殖、分化及早期胚胎發育中很重要的的訊息傳遞有密切的關聯性[70]。也因為 TBX2 在發育上的角色十分重要，因此也暗示了 TBX2 在腫瘤生成上的重要性。而許多研究也報導了 TBX2 在眾多癌症上有異常高表現量的現象[71-74]。TBX2 的表現會抑制 ARF 基因的表現，而 ARF 蛋白質表現低下便無法和 MDM2 蛋白質進行結合，最終導致 p53 蛋白質的不穩定，使細胞凋亡 (apoptosis) 停止、細胞週期 (cell cycle) 及生長無法控制而出現癌細胞的特性，同時 TBX2 也可以結合上 p53 的下游基因 p21 的啟動子 (promoter) 並抑制 p21 的表現，有此可知 TBX2 對 p53 的功能有相當大的負面影響[74]。TBX2 也和轉錄因子 Early growth response 1 (EGR1) 有關係，EGR1 具有調節 TGF $\beta$ 1、p53 及 PTEN 的能力並扮演了腫瘤抑制 (tumor suppressor) 的角色[75]，在癌症上 EGR1 的表現可以造成 DNA 損傷的壓力並使細胞進行細胞凋亡，而 TBX2 蛋白質可以直接和 EGR1 蛋白質進行結合，使 EGR1 失去活性而無法進行細胞凋亡。這些研究支持了 TBX2 為一個 oncogene，且 TBX2 參與的多個訊息傳導路徑皆和腫瘤的生成有關，因此 TBX2 為一個良好的癌症治療目標。因此除了 TBX2 在惡性膠原母細胞瘤中 mRNA 表現量有上升外，TBX2 本身對腫瘤生成的貢獻也是我們將它挑選為 miR-7 可

能的調節基因的原因之一，由於其它目前已知被miR-7所調控的基因與癌症的生成皆有重要的關係，如果證實了TBX2的確為miR-7所調節的基因的一員，那將可以進一步提升miR-7作為癌症治療目標的潛力，為針對microRNAs進行癌症治療的方式提供一個好的方向。



## 參考文獻

1. Stiles, C.D. and D.H. Rowitch, *Glioma stem cells: a midterm exam*. *Neuron*, 2008. **58**(6): p. 832-46.
2. Chamberlain, M.C. and P.A. Kormanik, *Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas*. *West J Med*, 1998. **168**(2): p. 114-20.
3. Nakamura, M., et al., *Analysis of prognostic and survival factors related to treatment of low-grade astrocytomas in adults*. *Oncology*, 2000. **58**(2): p. 108-16.
4. Lawson, H.C., et al., *Interstitial chemotherapy for malignant gliomas: the Johns Hopkins experience*. *J Neurooncol*, 2007. **83**(1): p. 61-70.
5. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. *J Neurosurg*, 2001. **95**(2): p. 190-8.
6. Walker, M.D., et al., *Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial*. *J Neurosurg*, 1978. **49**(3): p. 333-43.
7. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N. Engl. J. Med.*, 2005. **352**: p. 987-996.
8. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
9. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 855-62.
10. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
11. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(2): p. 126-39.
12. Vagin, V.V., et al., *A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline*. *Science*, 2006. **313**(5785): p. 320-4.
13. Babiarz, J.E., et al., *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs*. *Genes Dev*, 2008. **22**(20): p. 2773-85.
14. Tam, O.H., et al., *Pseudogene-derived small interfering RNAs*

- regulate gene expression in mouse oocytes. Nature, 2008. 453(7194): p. 534-8.*
15. Czech, B., et al., *An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. Nature, 2008. 453(7196): p. 798-802.*
  16. Kawamura, Y., et al., *Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. Nature, 2008. 453(7196): p. 793-7.*
  17. Okamura, K., et al., *The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. Nature, 2008. 453(7196): p. 803-6.*
  18. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA, 2004. 10(12): p. 1957-66.*
  19. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J, 2004. 23(20): p. 4051-60.*
  20. Ventura, A., et al., *Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. Cell, 2008. 132(5): p. 875-86.*
  21. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J, 2002. 21(17): p. 4663-70.*
  22. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 2003. 425(6956): p. 415-9.*
  23. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature, 2004. 432(7014): p. 231-5.*
  24. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature, 2004. 432(7014): p. 235-40.*
  25. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev, 2004. 18(24): p. 3016-27.*
  26. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. Curr Biol, 2004. 14(23): p. 2162-7.*
  27. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell, 2006. 125(5): p. 887-901.*
  28. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. J Biol Chem, 2005. 280(30): p. 27595-603.*
  29. Kim, V.N., *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. Trends Cell Biol, 2004. 14(4): p. 156-9.*
  30. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a*

- RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.* RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
31. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors.* Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
  32. Yi, R., et al., *Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs.* RNA, 2005. **11**(2): p. 220-6.
  33. Bohnsack, M.T., et al., *Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm.* EMBO J, 2002. **21**(22): p. 6205-15.
  34. Calado, A., et al., *Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA.* EMBO J, 2002. **21**(22): p. 6216-24.
  35. Basyuk, E., et al., *Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(22): p. 6593-7.
  36. Gwizdek, C., et al., *Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs.* J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5505-8.
  37. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(16): p. 4776-85.
  38. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.* Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
  39. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing.* Cell, 2001. **106**(1): p. 23-34.
  40. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.* Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
  41. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans.* Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
  42. Knight, S.W. and B.L. Bass, *A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans.* Science, 2001. **293**(5538): p. 2269-71.
  43. Lee, Y.S., et al., *Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways.* Cell, 2004. **117**(1): p. 69-81.
  44. Forstemann, K., et al., *Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein.* PLoS Biol, 2005. **3**(7): p. e236.

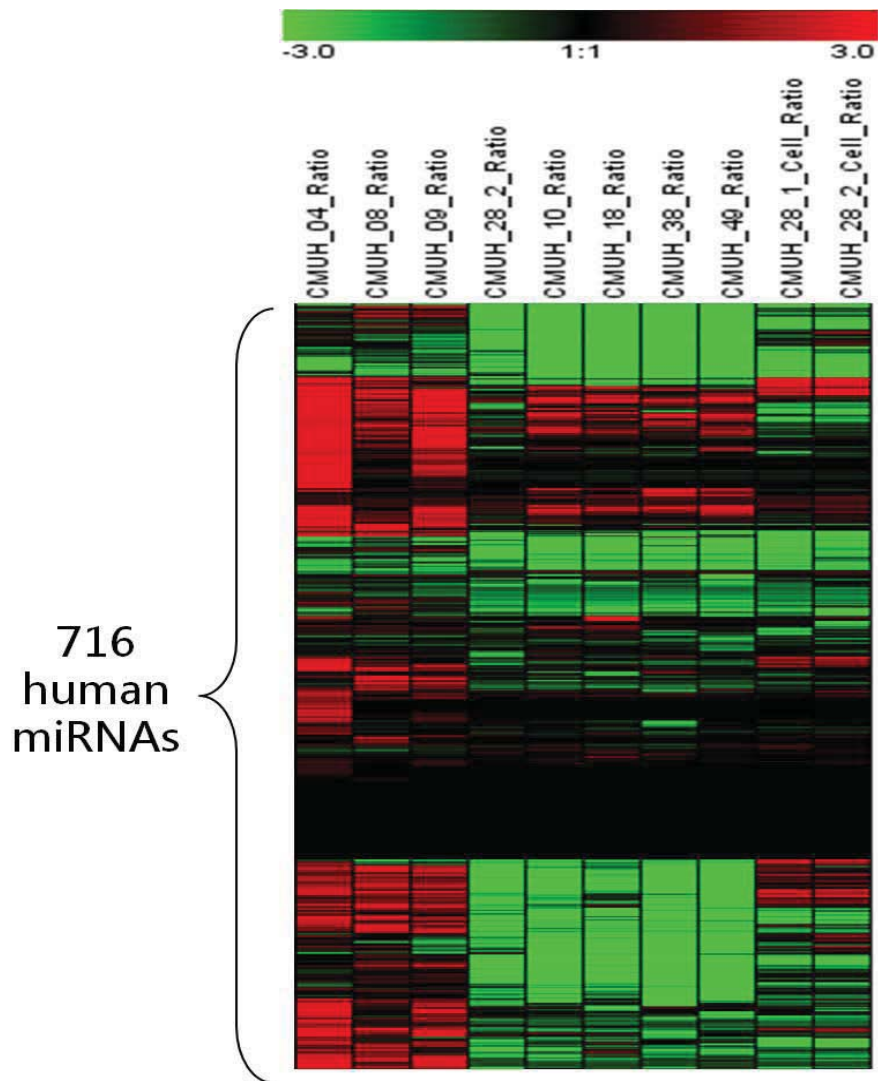


45. Jiang, F., et al., *Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila*. Genes Dev, 2005. **19**(14): p. 1674-9.
46. Saito, K., et al., *Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells*. PLoS Biol, 2005. **3**(7): p. e235.
47. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
48. Haase, A.D., et al., *TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing*. EMBO Rep, 2005. **6**(10): p. 961-7.
49. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 522-32.
50. Aza-Blanc, P., et al., *Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 627-37.
51. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
52. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
53. Maniataki, E. and Z. Mourelatos, *A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA*. Genes Dev, 2005. **19**(24): p. 2979-90.
54. MacRae, I.J., et al., *In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 512-7.
55. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
56. Tomari, Y., et al., *A protein sensor for siRNA asymmetry*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1377-80.
57. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1885-98.
58. Chekulaeva, M., M.W. Hentze, and A. Ephrussi, *Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles*. Cell, 2006. **124**(3): p. 521-33.
59. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. Nature, 2005. **433**(7025): p. 477-80.
60. Cho, P.F., et al., *A new paradigm for translational control: inhibition*

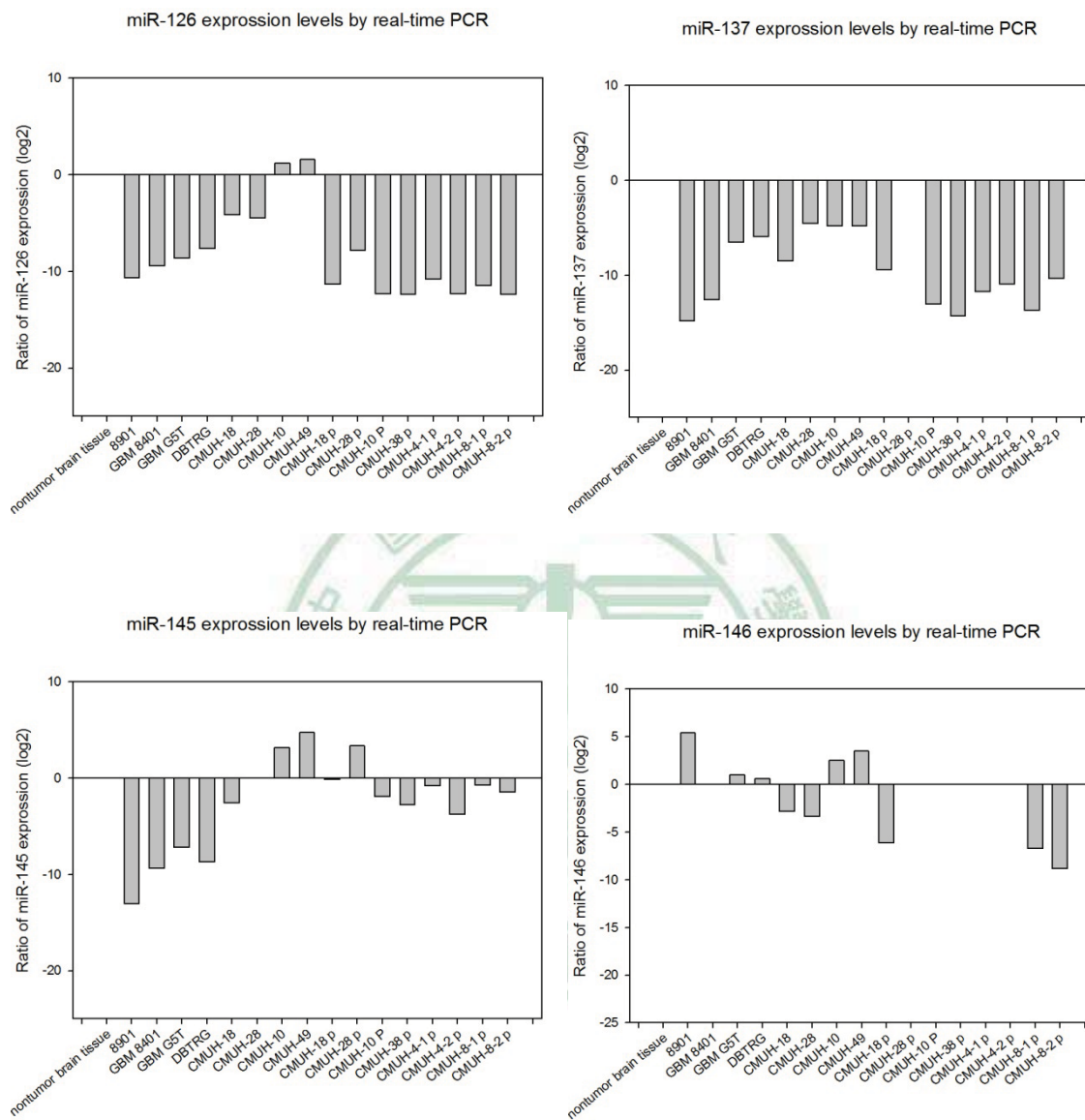
- via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 411-23.
61. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(4): p. 259-69.
  62. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
  63. Bottoni, A., et al., *miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas*. *J Cell Physiol*, 2005. **204**(1): p. 280-5.
  64. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
  65. Godlewski, J., et al., *Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal*. *Cancer Res*, 2008. **68**(22): p. 9125-30.
  66. Kefas, B., et al., *microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3566-72.
  67. Tong, A.W. and J. Nemunaitis, *Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy?* *Cancer Gene Ther*, 2008. **15**(6): p. 341-55.
  68. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. *Nature*, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
  69. Smith, J., *T-box genes: what they do and how they do it*. *Trends Genet*, 1999. **15**(4): p. 154-8.
  70. Abrahams, A., M.I. Parker, and S. Prince, *The T-box transcription factor Tbx2: its role in development and possible implication in cancer*. *IUBMB Life*, 2010. **62**(2): p. 92-102.
  71. Redmond, K.L., et al., *T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2010. **29**(22): p. 3252-62.
  72. Sinclair, C.S., et al., *TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors*. *Cancer Res*, 2002. **62**(13): p. 3587-91.
  73. Duo, S., et al., *Expression and clinical significance of tbx2 in pancreatic cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009. **10**(1): p. 118-22.
  74. Carreira, S., et al., *Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(9): p. 5099-108.
  75. Baron, V., et al., *The transcription factor Egr1 is a direct regulator of*

*multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. Cancer Gene Ther, 2006. 13(2): p. 115-24.*

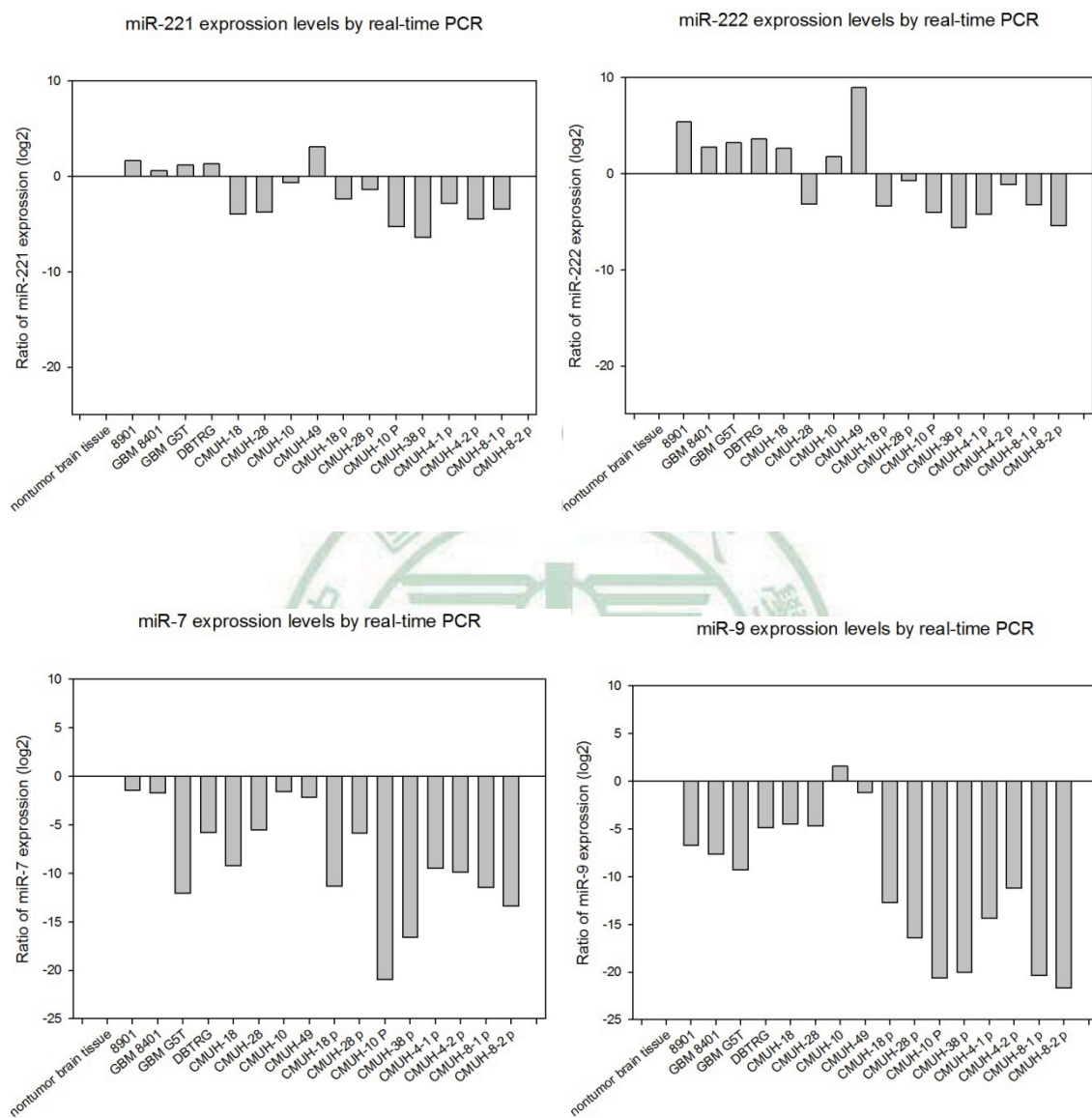




圖一：716 個 MicroRNAs 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情況。將 human microRNA microarray 的讀值結果圖型化。紅色為在惡性膠原母細胞瘤中為高表現量，綠色為低表現量，比較基準為正常的腦組織。



圖二：用 Real-Time PCR 來觀察 miR-126、miR-137、miR-145 及 miR-146 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情形。縱軸為檢體與正常腦組織的表現量的比率(-log<sub>2</sub>)，P 為 primary cell culture。



圖三：用 Real-Time PCR 來觀察 miR-221、miR-222、miR-7 及 miR-9 在惡性膠原母細胞瘤中的表現情形。縱軸為檢體與正常腦組織的表現量的比率(-log<sub>2</sub>)，P 為 primary cell culture。

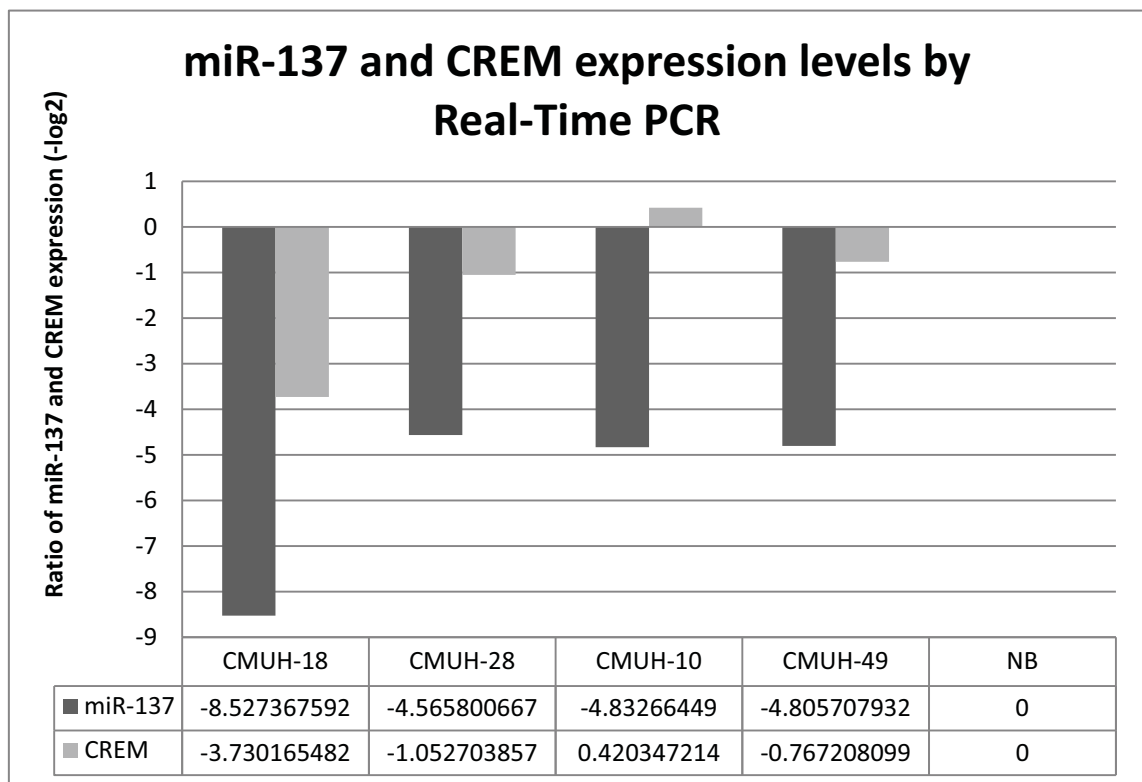


圖 四：使用 Real-Time PCR 來觀察 CREM 在惡性膠原母細胞瘤組織中的 mRNA 表現情況。藍色為 miR-137 的表現情況、紅色為 CREM 的表現情況，將 miR-137 放入是為了方便和 CREM 一起做比較。

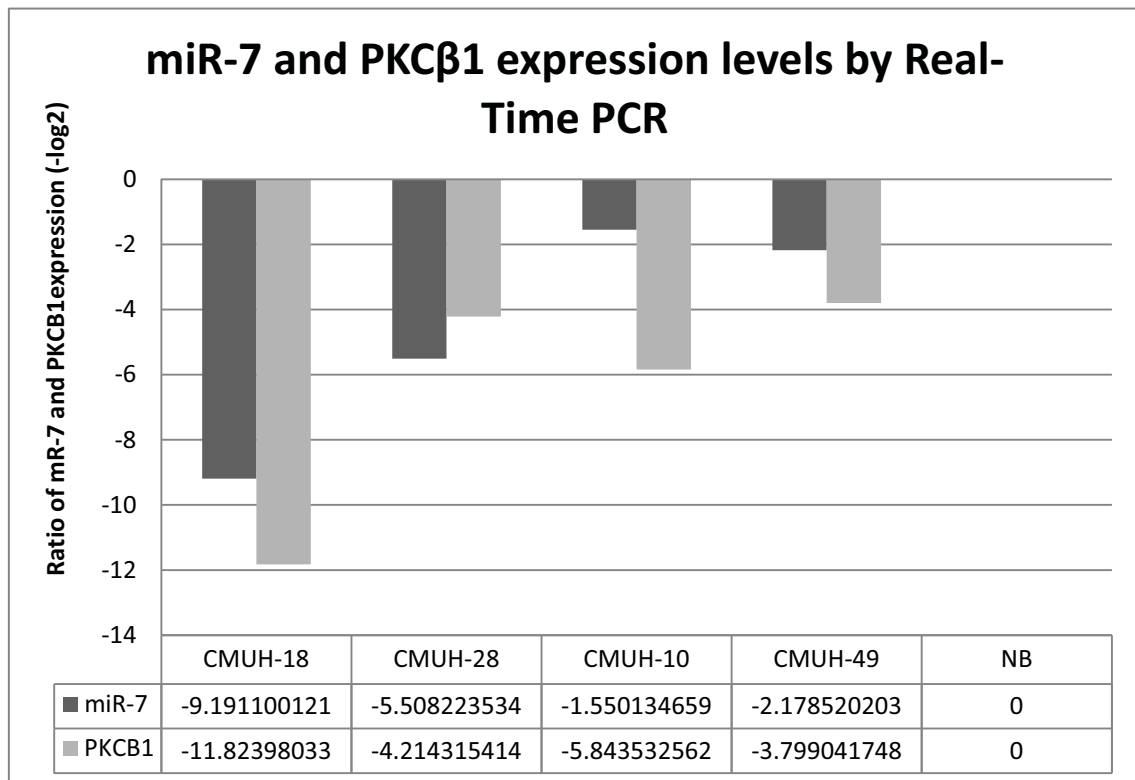
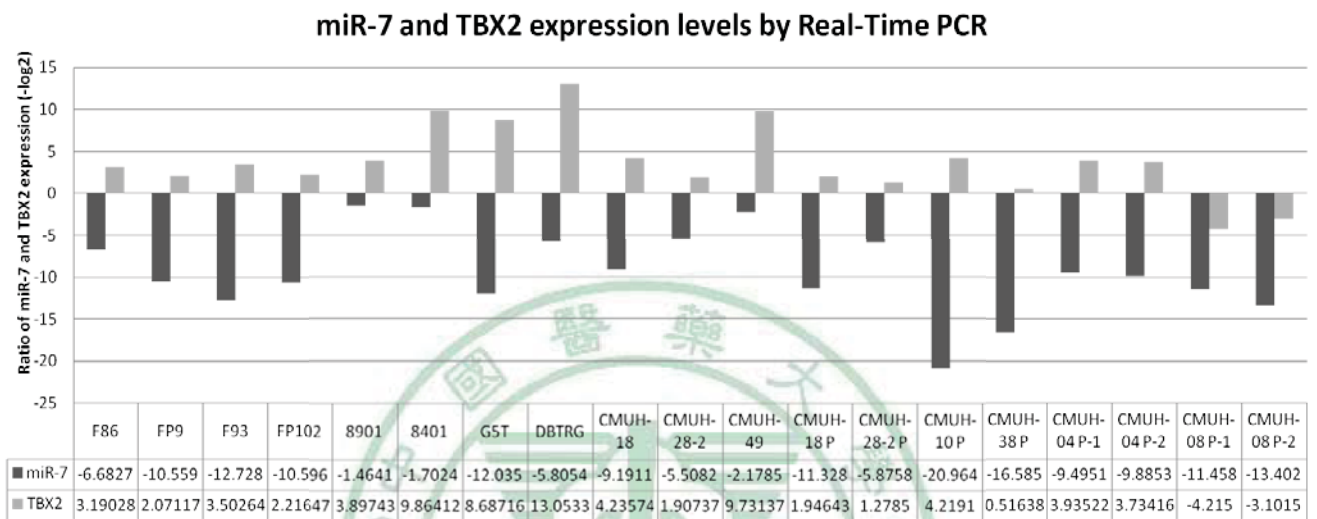


圖 五：使用 Real-Time PCR 來觀察 PKC $\beta$ 1 在惡性膠原母細胞瘤組織中的 mRNA 表現情況。藍色為 miR-7 的表現情況、紅色為 PKC $\beta$ 1 的表現情況，將 miR-7 放入是為了方便和 PKC $\beta$ 1 一起做比較。





圖六：使用 Real-Time PCR 來觀察 TBX2 在惡性膠原母細胞瘤組織中的 mRNA 表現情況。為藍色為 miR-7 的表現情況、紅色為 TBX2 的表現情況，將 miR-7 放入是為了方便和 TBX2 一起做比較。

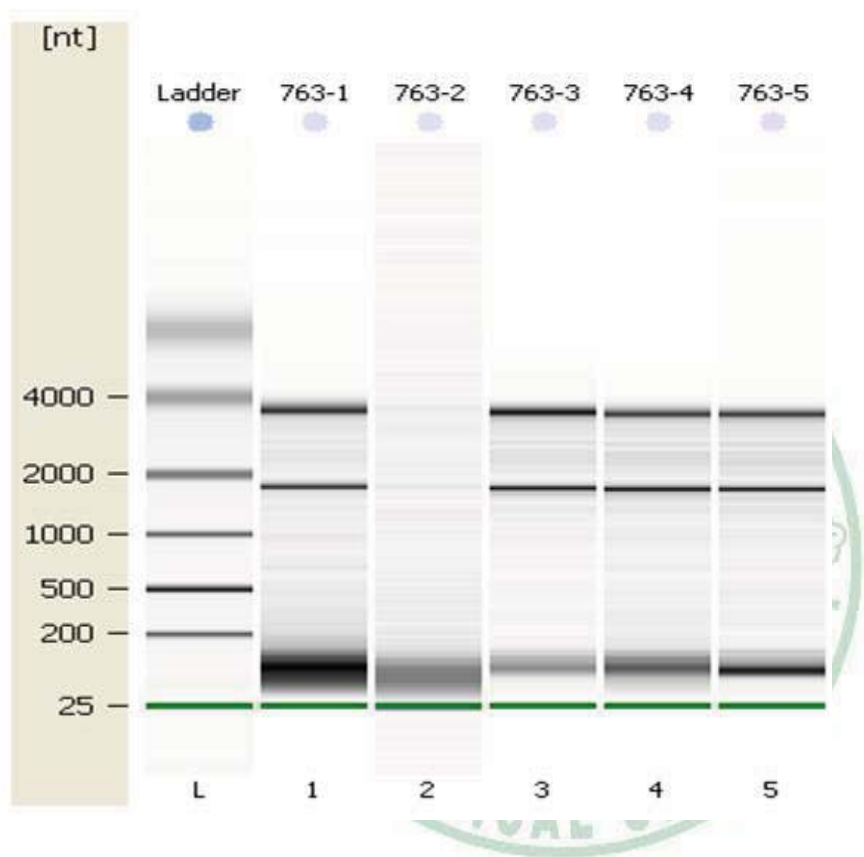


圖 七：檢定 RNA 的品質狀況是否良好。利用質譜儀測定 RNA 組成，在質譜儀測定 RNA 的組成後，將數據整理成影像的方式呈現，三個主要的群落由上而下分別為 28S、18S 及 5S，以其表現明顯與否為用來判斷 RNA 品質的指標。

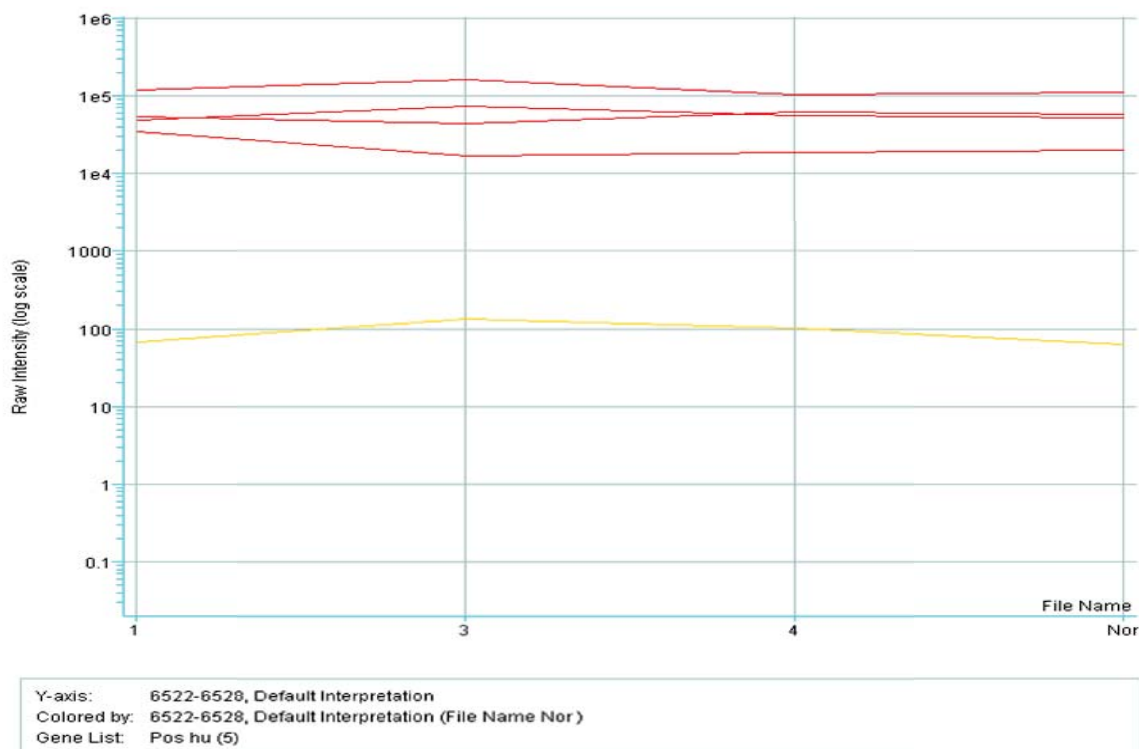


圖 八：觀察重要基因在各檢體的表現來判斷 Microarray 的可信程度。  
 比較各檢體之間四個重要基因的表現情況，以螢光讀值作為基因表現的  
 指標。

復發	受試編號	性別	受試時 年齡	確診日期	存活月 數	Expired	死亡原因	Gamma Knife	Temado	病灶位置
0	CMUH-04	女	41	2005/8/25	>63	N	-	N	Y	Left frontal
0	CMUH-08	女	34	2006/1/26	19	Y	Mutiple metastasis	Y	N	Right frontal
0	CMUH-10	男	41	2005/10/21	>61	Y	-	Y	Y	Left basal
0	CMUH-18	女	61	2007/6/6	22	Y	中樞衰竭	Y	Y	Left parietal and occipital
0	CMUH-28	男	63	2008/3/20	20	Y	中樞衰竭	Y	Y	Left temperal and occipital
0	CMUH-38	女	64	2007/9/17	20	Y	中樞衰竭	Y	Y	Right temperal

表一：惡性膠原母細胞瘤臨床病人檢體的資料列表

miR-ID	CMUH-10	CMUH-18	CMUH-28	CMUH-38	CMUH-49	CMUH-04	CMUH-08	CMUH-09	CMUH-28P	CMUH-28P	NB
miR-124	-11.637	-13.292	-6.648	-13.292	-13.292	-8.464	-2.239	-4.083	-13.292	-13.292	0
miR-126	-4.875	-4.176	-4.287	-8.25	-7.625	0.596	-0.706	0.41	-5.424	-4.751	0
miR-137	-7.669	-7.669	-6.766	-7.669	-7.669	-5.171	-0.673	-3.833	-8.359	-4.101	0
miR-138	-6.835	-6.835	-5.419	-6.835	-7.35	-0.623	-2.599	-2.782	-6.835	-6.835	0
miR-145	-3.591	-3.97	-1.734	-4.813	-7.595	1.321	-0.967	-0.457	0.388	-0.852	0
miR-146	-4.793	-4.656	-4.793	-4.793	-4.793	3.845	1.675	1.91	0.421	0.049	0
miR-149	-4.573	-4.907	-3.185	-5.503	-6.621	-1.637	-1.382	-2.956	-6.076	-5.98	0
miR-212	-4.875	-4.304	-4.988	-5.148	-5.177	-0.257	-0.245	-0.661	-3.458	-2.975	0
miR-221	-7.109	-4.597	-3.312	-5.554	-6.952	0.819	-2.021	-2.226	-0.564	-0.395	0
miR-222	-9.53	-4.355	-4.252	-4.664	-6.132	1.376	-2.027	-1.144	-1.784	-1.903	0
miR-630	4.642	4.342	1.709	3.484	5.394	9.067	3.77	6.506	0.258	-0.787	0
miR-7	-9.294	-8.322	-5.304	-8.322	-8.322	-1.166	-0.837	-2.017	-3.741	-5.233	0
miR-9	-7.364	-8.428	-7.656	-11.826	-11.826	0.681	3.154	2.929	-11.826	-11.826	0

表 二：13 個在惡性膠原母細胞瘤病人中具兩倍變化量的 microRNAs。

從 human microRNA microarray 中的 716 個 microRNA 中，挑選至少在

八個惡性膠原母細胞瘤檢體中有兩倍以上變化量且現象一致的

microRNAs。表內的數值皆是  $\log_2$  後的數值，P 為 primary cell culture，

NB 為 normal brain tissue。

miR-137		miR-7		
ADSS	KIAA0774	ACBD3	HERPUD2	RBMS3
ANK3	MYST2	AKAP10	IDE	RYK
BACH2	NAT5	ALDOC	IKZF3	SEPT1
CREM	NUP35	AP4B1	MAP3K7	SLC15A2
CRKRS	PPIH	C2orf42	PCK1	SNX3
DACH2	RALA	COPB2	PFTK2	STRN3
DR1	RBMS3	DAZL	PPI4	TBX2
FAM100A	SLMAP	DET1	PRKCB1	USP25
HMBOX1		DLG3	PUM2	USP9X
		GLCCI1	RBM9	XPO5

表 三：miR-137 和 miR-7 的候選目標基因

## 附錄

表一：在 microRNA microarray 的結果中，各檢體的 microRNAs 的表現量相較於正常腦組織具兩倍以上差異的 microRNAs 的列表，表中數值為各檢體與正常腦組織的比值取  $\log_2$ 。

檢體 miRNA	CMUH 10	CMUH 18	CMUH 28-2	CMUH 38	CMUH 49	CMUH 04	CMUH 08	CMUH 09	CMUH 28-1 Cell	CMUH 28-2 Cell
let-7a	-2.706	-1.45	-5.397	-4.613	-5.431	0.902	1.225	1.425	1.815	1.757
let-7a*	-3.531	-3.191	-4.478	-3.067	-3.191	0.058	1.426	0.449	-2.758	-2.335
let-7e*	-2.046	-4.132	-1.661	-4.442	-5.506	-1.888	0.222	-0.042	-1.689	-2.011
let-7f	-3.652	-2.823	-5.087	-5.81	-6.15	1.042	1.33	1.49	1.23	1.188
let-7i	-3.28	-2.025	-2.962	-5.257	-5.418	1.654	2.152	1.217	2.321	2.381
miR-100	-2.146	-0.591	-2.195	-2.728	-6.401	1.352	1.825	1.764	3.407	3.53
miR-103	-4.434	-3.092	-3.49	-7.98	-8.335	-0.974	0.793	0.368	-0.7	-0.732
miR-106b	-3.547	-2.267	-8.168	-7.332	-5.676	2.721	3.716	2.901	1.405	0.658
miR-107	-4.665	-3.133	-3.95	-7.915	-8.087	-0.686	0.534	0.501	-1.133	-1.152
miR-10b	1.544	0.402	-2.937	-2.748	-2.937	7.276	6.626	6.083	-2.937	-2.761
miR-1225-5p	2.591	1.862	-0.994	1.984	2.212	3.867	1.345	3.191	0.146	1.278
miR-1228*	3.016	1.084	-1.124	3.999	3.199	4.357	1.99	3.286	-1.124	-1.124
miR-124	-11.637	-13.292	-6.648	-13.292	-13.292	-8.464	-2.239	-4.083	-13.292	-13.292
miR-125a-3p	-0.975	-2.066	-2.416	-2.317	-1.322	2.57	0.918	1.09	-2.39	-1.708
miR-125a-5p	-3.428	-2.112	-2.583	-4.331	-7.778	-1.338	-0.221	0.053	-1.974	-2.035
miR-125b	-2.244	-1.27	-6.708	-3.234	-7.707	0.062	1.652	1.838	-0.846	-0.646
miR-125b-2*	-3.728	-1.706	-2.486	-6.659	-1.636	1.408	1.472	1.983	-1.998	-1.892
miR-126	-4.875	-4.176	-4.287	-8.25	-7.625	0.596	-0.706	0.41	-5.424	-4.751
miR-126*	-8.029	-6.34	-6.34	-6.34	-10.984	0.691	-0.873	0.43	-6.34	-6.918
miR-127-3p	-5.091	-5.371	-1.866	-3.248	-5.223	0.008	-0.407	-2.06	-1.569	-0.12
miR-128	-7.214	-7.622	-4.251	-13.838	-10.894	-3.692	-1.123	-1.453	-5.586	-5.553
miR-129-3p	-7.095	-5.593	-4.061	-7.239	-8.161	-7.701	-3.751	-0.296	-8.194	-8.178
miR-129-5p	-6.904	-7.384	-2.05	-3.558	-5.206	-3.661	-3.094	-0.146	-8.694	-8.694
miR-129*	-6.939	-6.378	-3.069	-6.885	-7.629	-8.705	-5.647	-3.843	-7.734	-7.334
miR-130a	-3.84	-2.607	-3.597	-9.337	-8.185	1.961	2.655	2.577	1.969	1.638
miR-130b	-1.561	-0.592	-7.278	-5.094	-5.094	2.476	3.769	1.875	2.004	1.175
miR-132	-5.392	-4.172	-2.222	-5.594	-8.301	-0.578	-1.71	-1.16	-3.271	-3.117
miR-132*	-6.92	-7.546	-4.325	-5.961	-13.069	-1.604	-1.663	-1.05	-4.249	-4.028
miR-133a	-1.882	-2.356	-1.959	-1.985	-2.888	-2.74	-3.363	-3.21	-2.579	-2.307
miR-133b	-5.519	-5.248	-3.041	-5.253	-7.276	-3.574	-5.028	-3.793	-3.556	-5.636
miR-134	2.386	1.243	1.124	1.401	2.56	4.001	1.319	2.637	0.705	1.723

miRNA \ 檢體	CMUH 10	CMUH 18	CMUH 28-2	CMUH 38	CMUH 49	CMUH 04	CMUH 08	CMUH 09	CMUH 28-1 Cell	CMUH 28-2 Cell
miR-135a	-7.278	-7.158	-8.033	-7.573	-6.04	-0.568	2.448	1.795	-6.89	-5.883
miR-135a*	2.633	2.907	1.169	1.75	3.546	7.312	3.025	5.944	1.471	2.046
miR-135b	-2.975	-3.58	-5.165	-3.246	-3.423	1.666	3.529	0.328	-5.41	-2.332
miR-136	-10.868	-8.031	-7.151	-6.855	-7.974	-0.433	0.644	-0.443	-1.618	-0.264
miR-137	-7.669	-7.669	-6.766	-7.669	-7.669	-5.171	-0.673	-3.833	-8.359	-4.101
miR-138	-6.835	-6.835	-5.419	-6.835	-7.35	-0.623	-2.599	-2.782	-6.835	-6.835
miR-139-5p	-8.502	-11.709	-2.121	-10.709	-8.765	-4.314	-0.93	-0.491	-8.765	-8.765
miR-142-3p	-0.238	-5.736	-8.416	-5.822	-4.89	3.42	3.704	3.921	-6.527	-6.745
miR-145	-3.591	-3.97	-1.734	-4.813	-7.595	1.321	-0.967	-0.457	0.388	-0.852
miR-146a	-4.793	-4.656	-4.793	-4.793	-4.793	3.845	1.675	1.91	0.421	0.049
miR-146b-5p	-7.918	-5.13	-6.19	-7.632	-6.274	1.203	0.363	0.943	-5.642	-4.587
miR-149	-4.573	-4.907	-3.185	-5.503	-6.621	-1.637	-1.382	-2.956	-6.076	-5.98
miR-150*	1.648	1.543	0.202	-0.075	1.802	5.006	1.837	3.588	2.755	4.393
miR-154*	-6.292	-5.263	-5.263	-5.777	-9.099	-1.053	-0.458	-2.453	-0.062	1.003
miR-15a	-4.494	-4.193	-6.525	-8.261	-6.261	1.675	2.336	2.682	0.482	-0.142
miR-15b	2.557	4.313	-0.718	0.566	-1.002	2.661	2.836	1.495	2.888	2.234
miR-16	-2.092	-0.147	-3.487	-4.778	-3.38	2.318	2.394	2.321	1.629	0.938
miR-181a*	-2.981	-4.472	-3.037	-9.087	-5.487	-0.181	1.133	0.367	-2.017	-1.765
miR-181a-2*	-0.765	-2.249	-3.335	-3.827	-3.291	2.006	3.284	3.035	-1.924	-0.745
miR-181c	-5.412	-4.199	-3.169	-7.33	-7.33	-0.057	1.172	1.702	-3.527	-3.031
miR-181c*	-5.306	-3.906	-4.335	-4.306	-4.306	0.566	1.417	1.682	-3.149	-2.13
miR-181d	-4.349	-5.409	-0.956	-2.262	-4.041	0.548	1.232	1.41	-1.565	-1.419
miR-186	-6.202	-5.323	-7.846	-10.846	-6.202	0.597	1.39	1.221	-2.545	-2.634
miR-188-5p	2.569	1.741	0.472	1.998	2.693	5.095	1.216	3.785	-1.235	-0.936
miR-193b*	-0.851	-1.426	-0.245	-2.972	-2.847	4.224	0.411	2.526	-2.972	-2.215
miR-195	-5.693	-2.972	-3.897	-7.513	-10.365	0.664	2.276	3.128	-0.94	-1.702
miR-197	-3.225	-1.877	-1.114	-2.662	-4.477	-1.505	0.495	-0.042	-1.39	-1.42
miR-198	3.336	3.283	1.048	3.86	4.011	6.644	2.016	4.533	1.044	-1.205
miR-199a-5p	-3.248	-2.773	-3.009	-4.432	-6.57	4.99	0.499	0.351	4.217	4.874
miR-199b-5p	-2.654	-1.625	-2.777	-1.236	-1.475	5.399	1.403	-0.885	-3.182	-2.099
miR-19a	-5.082	-6.893	-6.893	-6.893	-5.858	2.063	3.192	2.102	1.308	0.251
miR-19b	-4.238	-6.277	-8.628	-12.464	-5.448	1.896	2.798	2.168	1.09	0.307
miR-204	-8.333	-4.46	-1.789	-5.001	-5.626	-0.114	-3.875	-4.084	-6.659	-6.125
miR-20a	-3.131	-3.722	-6.229	-8.724	-4.931	2.043	3.15	2.763	1.342	-0.089
miR-20b	-3.529	-2.1	-10.74	-6.097	-7.314	2.205	2.906	2.3	-0.468	-1.794
miR-21	-2.424	-3.024	-6.582	-2.944	-1.872	5.952	5.313	5.708	4.932	4.387



miRNA \ 檢體	CMUH 10	CMUH 18	CMUH 28-2	CMUH 38	CMUH 49	CMUH 04	CMUH 08	CMUH 09	CMUH 28-1 Cell	CMUH 28-2 Cell
miR-21*	-0.01	-1.121	-1.121	3.043	1.084	6.054	4.401	3.828	5.239	4.408
miR-206	3.342	1.893	-0.744	4.01	3.003	4.009	1.56	2.685	-0.744	-0.744
miR-210	-2.717	0.593	-2.386	-1.198	-3.55	3.012	1.378	2.099	2.446	2.484
miR-212	-4.875	-4.304	-4.988	-5.148	-5.177	-0.257	-0.245	-0.661	-3.458	-2.975
miR-214	2.129	1.992	1.222	2.618	-2.285	5.199	0.295	1.548	5.606	5.62
miR-215	-3.502	-6.687	-3.502	-3.502	-4.591	1.252	0.848	1.473	-3.576	-1.531
miR-219-2-3p	-4.484	-8.029	-3.594	-3.387	-5.962	-3.683	-1.536	-0.3	-8.029	-8.029
miR-219-5p	-8.872	-9.194	-5.855	-9.194	-9.283	-3.189	-0.427	0.786	-6.869	-7.33
miR-22	-7.567	-4.93	-5.501	-7.937	-8.011	0.449	0.085	0.347	0.621	1.035
miR-221	-7.109	-4.597	-3.312	-5.554	-6.952	0.819	-2.021	-2.226	-0.564	-0.395
miR-221*	-2.996	-0.458	-2.758	-2.996	-2.996	1.897	-2.156	-1.07	2.117	2.532
miR-222	-9.53	-4.355	-4.252	-4.664	-6.132	1.376	-2.027	-1.144	-1.784	-1.903
miR-23a	-3.233	-0.766	-2.855	-3.82	-5.093	2.045	1.644	2.807	3.285	3.528
miR-23b	-4.415	-2.715	-4.236	-7.164	-9.132	-0.775	-0.382	0.018	-1.362	-0.537
miR-23b*	-1.699	-0.652	-0.772	-1.885	-1.563	0.164	-1.563	-0.318	-1.23	1.151
miR-24	-4.863	-2.627	-3.715	-8.144	-7.955	0.663	0.593	1.45	2.462	2.64
miR-25	-1.177	1.653	-2.217	-2.574	-4.227	2.987	3.843	2.771	1.171	0.606
miR-26a	-7.071	-4.831	-4.705	-9.189	-11.349	0.578	1.054	0.578	-2.366	-2.303
miR-26b	-4.427	-5.844	-6.002	-9.025	-6.672	1.283	1.594	2.086	-0.02	-0.081
miR-27a	-4.409	-2.153	-4.953	-5.512	-4.951	2.613	2.355	3.432	4.58	4.666
miR-28-3p	-1.128	-1.128	-1.128	-1.128	0.72	5	2.641	3.033	-1.128	-1.128
miR-28-5p	-3.706	-2.518	-3.847	-9.017	-5.181	1.671	2.437	2.383	1.122	0.929
miR-299-5p	-4.98	-4.463	-1.38	-6.787	-6.271	-0.295	-0.196	-2.453	-0.851	0.613
miR-29a	-5.233	-3.531	-4.869	-6.516	-7.556	-0.159	0.256	1.086	0.501	0.802
miR-29a*	-4.353	-3.457	-4.164	-4.909	-5.019	-0.676	0.863	1.831	-3.684	-3.025
miR-29b	-7.048	-11.476	-6.651	-10.306	-10.212	-1.422	-0.244	0.624	-1.337	-1.15
miR-29b-1*	-0.219	-1.65	-2.356	2.24	0.174	1.647	1.317	1.288	1.483	1.853
miR-29c	-5.859	-7.869	-5.644	-10.796	-9.587	-1.585	-0.49	-0.096	-1.33	-1.517
miR-29c*	-6.454	-6.082	-3.692	-6.578	-9.246	-2.833	-1.08	-1.023	-3.707	-3.762
miR-301a	-7.087	-7.087	-7.087	-7.087	-7.087	0.666	3.299	2.517	-0.526	-0.939
miR-302a	1.141	-0.062	-1.748	-0.426	-1.076	2.607	-0.104	-0.062	2.049	1.592
miR-30a	-7.26	-4.52	-5.278	-8.855	-8.556	0.925	1.338	1.513	0.101	-0.167
miR-30a*	-5.874	-2.849	-3.415	-5.874	-5.874	0.515	1.012	1.724	-0.116	-0.248
miR-30b	-5.66	-5.102	-4.764	-8.63	-8.679	0.486	1.041	1.557	-1.918	-2.275
miR-30b*	0.29	-0.12	-1.111	2.552	1.025	2.443	1.113	1.748	-2.433	-2.088
miR-30c	-5.952	-4.437	-4.123	-7.315	-8.405	-0.018	1.059	1.354	-4.039	-4.215

miRNA \ 檢體	CMUH 10	CMUH 18	CMUH 28-2	CMUH 38	CMUH 49	CMUH 04	CMUH 08	CMUH 09	CMUH 28-1 Cell	CMUH 28-2 Cell
miR-30c-1*	1.699	1.678	-0.405	2.26	2.322	4.003	0.751	2.135	-4.378	-1.378
miR-30d	-4.191	-4.105	-3.352	-5.512	-6.429	-0.042	1.043	0.676	-2.715	-2.896
miR-30e	-7.313	-7.306	-9.495	-8.277	-8.277	0.493	1.457	1.18	-1.303	-1.257
miR-30e*	-6.386	-8.172	-4.612	-6.386	-6.386	0.05	1.182	1.505	-2.051	-1.633
miR-31	-5.44	-2.464	-7.44	-1.884	-5.201	-1.122	-2.865	-2.433	2.724	3.677
miR-32*	1.88	0.127	-2.214	2.579	2.269	2.728	1.255	2.756	-3.631	-4.274
miR-323-3p	-6.441	-6.629	-0.273	-6.916	-6.916	-0.98	-1.197	-2.502	-3.99	-2.235
miR-324-3p	-2.133	-1.554	-1.571	-1.862	-3.215	0.73	0.683	0.594	-1.172	-1.281
miR-324-5p	-4.26	-4.868	-2.623	-6.671	-6.671	0.03	1.123	1.033	-0.171	-0.355
miR-326	-3.765	-5.087	-3.502	-4.143	-4.143	-2.236	-0.876	-1.713	-5.929	-4.143
miR-328	-3.045	-3.332	-1.13	-4.086	-3.615	-2.857	-1.035	-0.733	-3.195	-3.267
miR-329	-5.319	-5.36	-1.41	-5.715	-6.422	-1.29	-0.725	-2.568	-2.678	-1.31
miR-335*	-2.445	-3.008	-3.617	-5.14	-3.27	2.498	1.416	0.785	-3.314	-3.026
miR-337-3p	-1.198	-0.794	-0.688	-1.82	-0.999	2.836	2.15	-0.192	1.205	2.677
miR-338-3p	-10.635	-12.691	-6.754	-12.024	-11.691	-4.079	-2.482	-2.007	-12.024	-12.459
miR-340*	-5.195	-5.256	-4.287	-6.005	-5.47	-0.349	1.283	0.619	-3.679	-3.231
miR-342-3p	-4.64	-2.658	-3.199	-4.317	-8.09	-1.501	0.297	-0.031	-4.289	-3.502
miR-342-5p	-3.414	-1.925	-0.455	-4.605	-6.717	-0.765	0.144	0.009	-5.028	-4.492
miR-346	-3.112	-3.951	-1.64	-5.68	-5.228	-2.899	-0.803	-1.966	-4.869	-4.265
miR-361-3p	-2.352	-1.547	-0.401	-2.672	-6.003	0.864	-0.049	0.779	-1.357	-1.416
miR-361-5p	-3.905	-2.658	-1.821	-6.216	-7.638	0.588	1.309	1.038	-1.018	-0.784
miR-363	-1.979	-0.201	-2.996	-5.579	-7.398	1.798	1.511	0.537	-6.587	-7.348
miR-365	-4.235	-2.503	-1.761	-4.199	-5.02	-0.098	0.132	-1.02	0.046	0.691
miR-369-5p	-2.766	-3.299	-1.461	-4.277	-3.105	0.868	0.26	-1.086	0.418	1.957
miR-373*	3.315	2.272	-3.322	1.151	1.664	4.026	2.114	2.703	2.217	4.675
miR-374b	-6.219	-2.681	-4.094	-6.219	-6.219	2.001	2.991	1.948	-0.15	-0.374
miR-374b*	-1.642	1.155	-7.285	-1.642	-1.642	0.68	1.805	0.547	-1.642	-3.241
miR-378	-3.146	-5.419	-3.93	-4.945	-4.945	2.99	0.411	0.88	-2.536	-2.628
miR-381	-6.268	-6.05	-3.936	-6.05	-6.05	0.404	-0.162	-1.903	0.48	1.669
miR-383	-3.006	-5.201	-2.576	-0.649	-2.87	-2.429	-1.559	0.483	-5.201	-5.201
miR-409-3p	-3.8	-3.765	-0.904	-7.891	-5.832	0.941	0.135	-1.322	0.368	1.547
miR-410	-7.929	-7.546	-1.98	-7.394	-7.394	-1.579	-0.945	-2.424	-1.541	-0.323
miR-421	-6.41	-4.603	-8.41	-5.258	-10.58	0.171	0.989	-0.679	-3.866	-3.281
miR-423-3p	-2.7	-1.273	-2.7	-2.79	-2.7	2.566	1.943	2.166	-3.987	-2.004
miR-424	-2.985	-2.488	-3.554	-4.763	-4.161	3.675	2.959	2.655	3.411	2.229
miR-424*	-0.58	2.485	-0.58	-0.58	1.438	8.76	3.277	7.366	-0.58	-0.58

miRNA \ 檢體	CMUH 10	CMUH 18	CMUH 28-2	CMUH 38	CMUH 49	CMUH 04	CMUH 08	CMUH 09	CMUH 28-1 Cell	CMUH 28-2 Cell
miR-432	-3.009	-3.46	-0.407	-1.801	-3.438	-0.024	0.173	-1.386	-1.199	-0.055
miR-450a	-3.235	-1.984	-1.984	-5.306	-3.927	5.38	3.071	1.667	1.596	1.486
miR-451	-1.172	1.617	-4.531	-3.431	-1.381	4.381	3.156	1.666	-11.237	-8.692
miR-483-3p	3.183	3.159	1.033	0.758	0.884	4.857	1.197	-1.604	1.593	0.964
miR-483-5p	1.722	2.017	-0.331	0.564	1.678	4.037	0.324	2.244	-2.958	-3.399
miR-484	-1.93	-2.327	-2.531	-2.485	-2.871	0.441	1.664	1.105	-1.57	-1.593
miR-485-3p	-3.261	-2.836	-1.092	-4.836	-4.379	-2.262	-1.419	-3.524	-3.999	-2.554
miR-486-5p	2.638	5.24	-0.121	1.516	1.28	2.857	1.752	1.066	-3.13	-2.485
miR-487b	-6.287	-6.126	-1.386	-6.676	-12.691	-0.479	-0.422	-1.258	-0.6	0.456
miR-491-3p	-1.874	-6.933	-3.058	-7.518	-1.874	1.069	2.884	1.742	-1.874	-1.647
miR-495	-6.59	-7.303	-3.778	-6.59	-6.59	-0.233	-0.046	-1.158	-0.716	0.466
miR-497	-4.477	-2.696	-3.208	-7.417	-7.943	0.151	2.248	2.647	-2.284	-2.927
miR-500	-1.565	-0.97	-4.99	-3.99	0.342	4.212	1.421	2.152	-3.348	-2.195
miR-500*	-6.144	0.496	-1.84	-4.871	-3.085	2.346	1.78	0.941	-1.159	-0.74
miR-501-3p	-4.587	1.36	-2.861	-1.644	-1.644	3.884	1.691	1.724	-1.644	-2.334
miR-501-5p	-0.631	0.338	-2.14	-6.28	0.443	4.354	1.379	2.041	-1.459	-1.114
miR-502-3p	-2.728	0.401	-2.441	-6.202	-2.728	2.479	1.716	1.041	-1.447	-0.798
miR-502-5p	-3.08	-1.613	-4.997	-1.509	-1.524	1.286	1.765	-0.46	-1.373	-0.621
miR-505	-2.183	-1.43	-3.907	-2.838	-6.73	2.09	2.521	1.436	0.628	0.545
miR-505*	0.294	1.079	-3.112	-1.597	-1.597	2.81	1.646	1.855	0.219	0.966
miR-509-3p	0.218	2.682	0.218	1.049	-2.967	2.188	0.218	0.218	0.218	0.218
miR-513a-5p	2.678	1.956	-1.69	-1.17	-0.214	7.126	2.903	5.341	-7.158	-3.715
miR-513c	1.62	0.023	-1.915	1.823	0.581	7.04	2.444	5.232	-1.915	-1.915
miR-518c*	2.662	1.727	1.419	-1.157	1.733	5.585	1.889	3.929	-2.013	-2.013
miR-519d	-3.312	-1.942	-1.782	-2.081	-1.851	-2.249	-2.166	-3.144	-3.159	-1.233
miR-525-5p	-1.56	-1.776	-1.342	-1.342	-0.786	2.968	0.553	1.231	-1.342	-1.342
miR-532-3p	-1.306	1.461	-1.293	-2.073	-3.383	1.296	1.918	0.414	-2.138	-1.151
miR-539	-2.029	-3.362	-3.293	-1.224	-2.544	-0.714	-1.051	-2.346	-1.524	-0.133
miR-550*	-1.522	1.233	-3.522	-2.538	-2.433	2.122	1.097	0.261	-0.613	-1.659
miR-551b	-3.776	-4.876	-4.563	-5.325	-4.786	2.125	3.729	2.952	0.952	2.169
miR-563	1.203	1.172	0.665	1.074	1.154	-1.511	-1.511	-1.511	0.941	1.216
miR-572	3.43	1.045	0.114	1.621	3.884	2.176	0.472	1.554	1.363	1.063
miR-576-5p	-0.8	3.909	-0.482	-0.126	0.064	-0.632	-0.632	-0.632	0.294	0.309
miR-584	-4.409	-3.177	-3.311	-4.002	-3.487	0.578	-2.015	-0.732	-4.196	-3.838
miR-595	2.781	1.193	-0.376	3.834	2.823	2.047	1.448	1.118	-0.914	-1.346
miR-610	0.022	-1.041	-2.285	1.035	0.641	4.528	3.111	3.884	-2.285	-2.285

miRNA \ 檢體	CMUH 10	CMUH 18	CMUH 28-2	CMUH 38	CMUH 49	CMUH 04	CMUH 08	CMUH 09	CMUH 28-1 Cell	CMUH 28-2 Cell
miR-617	1.042	0.707	-3.283	-2.029	2.136	3.874	0.815	2.544	-1.339	-1.339
miR-622	4.563	4.028	1.423	2.013	6.85	5.828	1.741	4.242	-0.153	-0.687
miR-625	-4.808	-3.919	-3.682	-5.01	-5.296	0.963	-0.295	-1.103	-1.392	-1.687
miR-629*	0.942	1.646	-1.597	-0.52	1.634	5.267	2.405	3.991	3.08	3.455
miR-630	4.642	4.342	1.709	3.484	5.394	9.067	3.77	6.506	0.258	-0.787
miR-634	-1.291	-1.424	-1.925	-1.577	-1.531	-1.311	-0.87	-0.995	-1.655	-1.62
miR-654-3p	-3.932	-4.58	-2.545	-7.135	-5.076	2.068	2.056	-0.481	1.371	2.75
miR-656	-5.076	-4.986	-3.387	-7.446	-6.33	-0.467	-0.868	-1.604	-3.088	-1.316
miR-659	3.372	1.905	0.589	0.633	1.745	4.722	1.567	3.549	-1.111	-1.111
miR-671-5p	1.641	1.238	1.24	0.449	2.654	3.683	0.902	2.231	-2.858	-2.888
miR-7	-9.294	-8.322	-5.304	-8.322	-8.322	-1.166	-0.837	-2.017	-3.741	-5.233
miR-708	-0.701	-2.58	-1.454	-2.097	0.137	1.986	2.624	2.317	-3.475	-4.01
miR-744	-6.522	-4.142	-1.443	-6.55	-6.55	-1.562	-0.287	-0.621	-3.029	-2.792
miR-765	2.564	1.692	1.509	0.643	2.52	4.746	1.505	3.322	-5.209	-5.135
miR-768-5p	-1.124	-1.103	-0.799	-2.953	-1.853	0.867	1.525	2.499	-2.119	-1.905
miR-769-5p	-6.628	-6.106	-2.374	-7.227	-8.743	-2.981	-1.726	-1.756	-3.418	-3.277
miR-874	-2.239	-2.908	-1.899	-4.072	-2.295	1.278	-1.222	-0.131	-1.984	0.216
miR-877	3.539	3.519	-1.736	2.926	3.331	3.704	0.698	2.563	1.379	2.203
miR-885-3p	1.074	-0.66	-1.245	2.745	0.415	2.881	1.698	2.619	-1.245	-1.245
miR-885-5p	-3.948	-4.131	-1.587	-6.057	-6.561	-3.171	-1.607	-2.911	-5.641	-5.805
miR-886-3p	-6.679	-3.555	-4.956	-2.639	-3.147	3.951	-0.917	-1.807	1.613	1.56
miR-887	-1.652	-3.874	-1.459	-2.927	0.086	5.021	1.929	3.284	-0.04	2.153
miR-892b	-1.601	-1.45	-2.548	-6.669	-0.365	4.496	1.114	1.957	-1.331	-1.192
miR-9	-7.364	-8.428	-7.656	-11.826	-11.826	0.681	3.154	2.929	-11.826	-11.826
miR-9*	-5.325	-8.4	-6.517	-10.051	-9.781	1.114	2.773	3.096	-10.938	-10.938
miR-93	-1.49	0.508	-2.754	-5.589	-7.376	2.377	3.835	2.532	1.139	0.193
miR-936	0.86	1.73	-0.453	-2.196	1.796	4.521	1.641	3.536	-2.506	-5.062
miR-940	-1.345	-1.422	-1.607	-1.58	-1.322	1.365	1.553	2.254	-1.086	-0.544
miR-96	-1.709	-0.952	-1.709	-1.738	-2.653	3.567	8.817	5.211	-1.738	-0.961
miR-98	-7.105	-5.293	-4.726	-7.538	-7.538	0.772	1.346	0.817	-0.539	-0.423
miR-99b*	0.184	-1.348	-5.072	-1.68	-1.428	3.637	1.792	2.462	-2.236	-0.83