



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

利用敏感性核醣核酸技術篩選人類口腔
癌細胞特異性生物標記

Sensitized RNAi screening for human oral cancer to
identify novel biomarkers

指導教授：李妙蓉 教授

共同指導教授：高銘欽 教授

研究生：林文揚

中華民國九十八年一月

中文摘要

口腔癌已成為全球重視的衛生課題，世界衛生組織預估，罹患口腔癌的病人將逐年攀升。在台灣，口腔癌已成為國人癌症死因的第六位，成為台灣目前所極需解決的問題之一。

在本篇的研究中，我們與中央研究院 RNAi 核心設施中心合作，利用大規模 RNAi 篩選技術，來觀察調控生物體生長的蛋白質、蛋白質激酶與蛋白質磷酸水解酶。共有 6502 個針對 1236 個基因(其中 737 個是蛋白質激酶、209 個蛋白質磷酸水解酶、30 個雙重功能的基因)所設計的 shRNA 序列。以慢病毒 (Lentivirus) 載體將各個 shRNA 轉染至人類口腔癌細胞 HSC-3 細胞株，再以細胞存活試劑 (CCK-8 kit) 測試細胞存活率。

篩選結果，有 51 個 shRNA 標地基因處理的細胞存活抑制率大於 90%，我們稱之為促進癌細胞生長基因。再將篩選出的 51 個促進癌細胞生長基因，利用 GeneGo 分析軟體，推導四條可能促進口腔癌生長細胞的訊息傳導路徑，分別為 IPP-1、TGF beta receptor II、EGFR、FLT-3，其中以 TGF beta receptor II 為主要可能參與口腔癌細胞增生的路徑。之後，需要進一步由分生或細胞生物實驗證實。本研究提供了系統化的方式篩選口腔癌化之分子訊息傳導路徑，這些推測的訊息傳導路徑及相關基因在口腔癌化的角色，及發現未來臨床藥物治療的新標靶。

Abstract

Oral cancer is an important worldwide health problem. WHO predicts a continuing worldwide increase in the number of patients with oral cancer. In Taiwan, oral cavity cancer is also a critical health issue because it is the sixth leading cause of cancer death.

In this study, through collaborating with the RNAi Core of Academia Sinica, we used a large-scale RNAi approach to identify kinases and phosphatases that regulate cell survival in the human oral cancer HSC-3 cell line. A total of 6502 shRNA clones targeting to human kinases and phosphatases, covering 1236 genes with 737 kinases, 209 phosphatases and 30 dual function genes, were screened in this project. Lentivirus-shRNA constructs of these genes were used to infect HSC-3 cells and cell viabilities were assessed using CCK-8 Assay kit.

Amongst the 1236 genes, silencing of 51 genes were found to inhibit cell growth rate greater than 90%. We designated those genes as tumor growth promotion genes. Later, these growth promotion genes were analyzed by GeneGo software for their molecular pathway. We have obtained four putative pathways (IPP-1, TGF-beta receptor II, EGFR, and FLT-3) resulting from the GeneGo analysis, and TGF-beta receptor II may be the main pathway involved in cancer proliferation. Further studies are required to verify these candidate pathways and genes involved during oral oncogenesis. This study provides a systematic way to unravel the molecular mechanism leading to oral cancer and further finding for new targets for clinical oral cancer therapy.

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III~IV
圖片索引.....	V~VI
表格索引.....	VII
附錄索引.....	VIII
序言.....	IX

第一章 緒論 (Introduction)

第一節 癌症及口腔癌 (Cancer & Oral cancer).....	1~17
第二節 癌症基因治療 (Cancer Gene Therapy).....	18~19
第三節 慢病毒載體之基因轉移 (Lentivirus mediated gene transfer).....	20~22
第四節 核醣核酸干擾現象 (RNA interference; RNAi)	23~33
第五節 實驗目的 (Experimented Aim).....	34~35

第二章 實驗材料及方法 (Materials & Methods)	
第一節 實驗流程 (Experimented flow chart)36
第二節 實驗材料 (Materials)37
第三節 病毒力價實驗 (Virus tittering)38~42
第四節 shRNA 大規模轉染實驗 (Lentivirus-based shRNA screening)43~44
第五節 生物資訊軟體 GeneGo 分析 (Bioinformatics analysis-GeneGo)45
第三章 實驗結果 (Results)46~59
第四章 討論 (Discussion)	
第一節 RNAi 大規模篩選平台討論60~62
第二節 實驗結果討論63~66
第三節 口腔癌特異性生物標記評估67
第四節 未來研究方向68
第五章 圖表 (Figures & Tables)69~98
第六章 引用文獻 (References)99~102
第七章 附錄103~119

圖片索引

圖一、癌細胞增生擴散過程.....	3
圖二、細胞週期 G1/S 管制點調控.....	4
圖三、國人口腔癌歷年死亡率.....	8
圖四、九十六年國人癌症粗死亡率.....	8
圖五、口腔癌之診斷方式, 病理組織切片.....	9
圖六、慢病毒感染細胞過程.....	22
圖七、RNA interference 運作機轉.....	24
圖八、RNAi 的放大及傳遞作用.....	25
圖九、RNAi 作用於染色體上.....	27
圖十、RNAi 載體使用分類.....	28
圖十一、RNAi collection 的策略聯盟.....	29
圖十二、TRC 設計的 shRNA 載體及序列.....	30
圖十三、慢病毒載體結構.....	37
圖十四、NF- κ B 分子傳遞路徑.....	66
圖十五、shLuc VSV-G 假型慢病毒感染細胞時所用之體積和細胞存活率的關係.....	69
圖十六、病毒力價及細胞存活率線性分析.....	70
圖十七、1236 個 shRNA 基因篩選結果(51 個促進癌細胞生長基因)73	
圖十八、GeneGo分析51個促進細胞生長基因的分子路徑.....	74
圖十九、GeneGo統計分析51個促進癌細胞生長基因的分子路徑.....	76

圖二十、 GeneGo評估 51個基因的細胞生理功能.....	77
圖二十一、51 個基因調控組織修復的分子路徑.....	77
圖二十二、TGF-beta 藉由 MAPK 引起 EMT 的路徑圖.....	78
圖二十三、TGF-beta 訊息傳遞路徑圖.....	79
圖二十四、TGF-beta 調控細胞增生機轉(正常或病態條件).....	80
圖二十五、TGF-beta receptor II 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	82
圖二十六、TGF-beta receptor II 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制 率.....	82
圖二十七、SMAD 4 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	84
圖二十八、SMAD 4 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率.....	84
圖二十九、MAPK9 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	86
圖三十、 MAPK9 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率.....	86
圖三十一、MAPK14 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	88
圖三十二、MAPK14 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率.....	88
圖三十三、MAP2K1IP1 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	90
圖三十四、MAP2K1IP1 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率.....	90
圖三十五、MAP3K13 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	92
圖三十六、MAP3K13 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率.....	92
圖三十七、MARK4 之 shRNA 作用後的細胞存活率.....	94
圖三十八、MARK4 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率.....	94
圖三十九、IKBKB (IKK-beta)之 shRNA 作用後的細胞存活.....	96
圖四十、 IKBKB (IKK-beta)之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率....	96
圖四十一、1236 個 shRNA 基因篩選結果(11 個功能未明的基因)....	98

表格索引

表一、 細胞週期表.....	5
表二、 國人歷年口腔癌死亡人數、死亡率.....	7
表三、 化療藥物分類.....	16
表四、 標靶藥物分類.....	17
表五、 基因載體分類.....	20
表六、 病毒載體分類.....	21
表七、 各種 RNAi 的比較.....	26
表八、 1236 個 shRNA 基因分類.....	35
表九、 71 盤病毒使用量.....	42
表十、 1236 個 shRNA 基因篩選結果(51 個促進癌細胞生長基因)	71~72
表十一、 GeneGo 統計分析 51 個 GeneGo 促進癌細胞生長基因 的分子路徑.....	75
表十二、所有 TGF-beta receptor II 的 shRNA 作用結果比較.....	81
表十三、所有 SMAD 4 的 shRNA 作用結果比較.....	83
表十四、所有 MAPK9 之 shRNA 作用結果比較.....	85
表十五、所有 MAPK14 之 shRNA 作用結果比較.....	87
表十六、所有 MAP2K1IP1 的 shRNA 作用結果比較.....	89
表十七、所有 MAP3K13 的 shRNA 作用結果比較.....	91
表十八、所有 MARK4 的 shRNA 作用結果比較.....	93
表十九、所有 IKBKB 的 shRNA 作用結果比較.....	95
表二十、1236 個 shRNA 基因篩選結果(11 個功能未明的基因).....	97

附錄索引

附錄一、HIV-1 基因組態與轉植載體比較

附錄二、1263 個基因的功能分類表

附錄三、1236 個 shRNA 基因篩選結果表格(42 個抑制癌細胞生長基因)

附錄四、GeneGo統計分析42個抑制癌細胞生長基因的分子路徑

附錄五、GeneGo評估42個基因的細胞生理功能表

附錄六、GeneGo評估42個基因的細胞週期調控表

附錄七、1236 個 shRNA 基因篩選結果圖(42 個抑制癌細胞生長基因)

附錄八、GeneGo 分析 42 個抑制細胞生長基因的分子路徑

附錄九、GeneGo 統計分析 42 個抑制癌細胞生長基因的分子路徑

附錄十、ERBB 家族的分子傳遞路徑圖

附錄十一、HIF 藉由受器調控的分子路徑圖

附錄十二、EIF2調控轉錄層次的分子路徑圖

附錄十三、GeneGo評估42個基因的細胞生理功能圖

附錄十四、GeneGo評估42個基因的細胞週期調控圖

附錄十五、NEK 所參與的細胞週期調控路徑

序言

很榮幸能夠就讀中國醫大的醫學研究所，在這兩年多的時間內學習到許多寶貴的知識，特別感謝生化科所有的老師與學長姊，以及我的指導老師李妙蓉老師，細心的叮嚀與教導。也感謝高銘欽老師、葉明翰學長以及實驗室所有同仁的幫助，使本人的論文能夠完成。

研究所的兩年是我人生的轉捩點，在碩一下學期時，我的母親發現輸卵管癌末期，從治療到結束整個過程，使我對人生有不一樣的看法。感謝同學們的打氣，如果沒有你們的幫助，我想自己可能無法完成碩士的學程。感謝我的父親放下工作日夜的照顧，召會中的弟兄姐妹的禱告與扶持，叫我認識神的愛。盼望將這論文送給我摯愛的父母，感謝你們的養育之恩，特別感謝母親從小到大的呵護與照顧，使我能快樂的成長。最後要謝謝主耶穌，認識主使我得著人生的真諦實意，祂是我們人生的牧人，帶領我走過死蔭的幽谷，使我重享救恩之樂，感謝神，願一切的榮耀歸給祂！

” 只是從前我以為對我是贏得的，這些，我因基督都已看作虧損。... 我因祂已經虧損萬事，看作糞土，為要贏得基督。” <腓三 7~8>

第一章 緒論 (Introduction)

第一節 癌症及口腔癌 (Cancer & Oral cancer)

癌症流病簡介

二十年來，癌症已經成為決定人類生命期望值 (life expectancy) 的主要原因。癌症是全球主要死亡原因，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 預估在 2015 年，大約將有一百二十五萬人口死於癌症。在台灣每四人就可能有一人得到癌症，根據國民健康局的統計，過去十年來，三十至五十九歲的罹癌人數已增長 81%；根據行政院衛生署統計，從民國七十一年起，癌症已經成為國人十大死亡原因的第一位(16,559 人)，並且死亡人數逐年攀升，至民國九十六年(2007)，死亡人數已達 40,306 人。研究發現，癌症並非突然間造成的，反而比較類似慢性病，是致病因素經年累積而成的，除了先天遺傳的問題外，像是抽煙、過度飲酒、不當飲食、環境污染、不正常的生活作息等，都是促使癌症成為近代可怕殺手的致病因素。所以對於癌症的預防篩檢與早期治療，便成為這世代一門重要的功課。

癌症細胞生物學

癌症的發生過程是多重步驟，目前確信是因調控細胞生長的蛋白質失去原本正常的功能，造成細胞不正常的增生，並且癌細胞大約生成至 10^9 個(約 1 克)為醫學上可檢測的腫瘤大小 [1]。因著腫瘤快速的增生，必須藉由無氧糖解來獲得能量來源，之後藉由釋放血管生成因子 (VEGF) 等蛋白質的訊

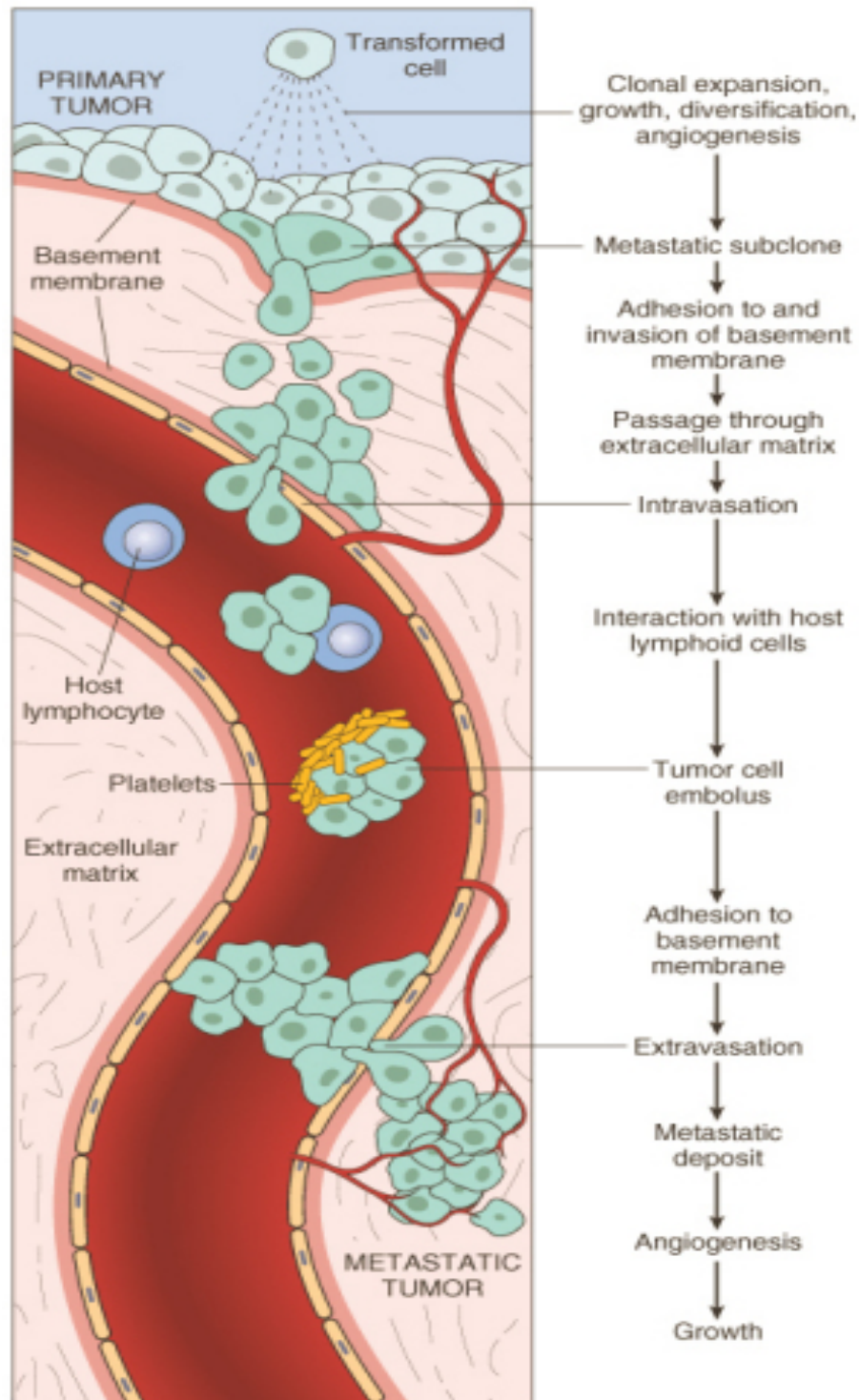
號，來進行血管新生作用 (angiogenesis) 以得到血液的養分供應(圖一)。

研究發現不論在腫瘤的增生、血管新生或轉移 (Metastasis)，都是藉由細胞內一連串複雜的訊息傳遞所造成的。

文獻指出蛋白質激酶 (kinase) 與蛋白質磷酸水解酶 (phosphatases) 是調節細胞傳遞路徑 (cell signaling) 與細胞週期生長 (cell cycle) 的重要因子，促使癌細胞產生增生、凋亡等現象發生。一般由外來的蛋白質分子與細胞表面的受體 (Receptor) 結合，這樣的受體大概分為三類：離子通道蛋白 (Ion channel receptor)、G 蛋白 (G protein-linked receptor)、激酶催化性蛋白 (Tyrosine kinase receptor)，包含：EGF、Insulin、IGF、PDGF、M-CSF、FGF、VEGF 等磷酸化蛋白受體。在經過細胞受器接受外來分子訊號後，細胞內會產生訊號傳遞(Transduction)，藉由一連串的磷酸化作用，如：RAS、MAPK、PKA、IP3、JAK-STAT、NF-kB、SMAD 等，將訊號蛋白送入細胞核內，而進一步產生細胞週期的調控、細胞移動、存活、死亡等生理作用。

Cell signal process	
Receptor	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ion channel 2. G protein-linked 3. Enzyme linked receptor(Tyrosine kinase)
Transduction	Amplification of the cell signal by: <ol style="list-style-type: none"> 1. Protein phosphorylation(or dephosphorylation) 2. Small molecules& ions as “second messengers”
Response	<ol style="list-style-type: none"> 1. Produce or control the cellular activities 2. Turn on or off the “Gene” 3. Resulting in cell growth, cell death, invasion, metastasis...

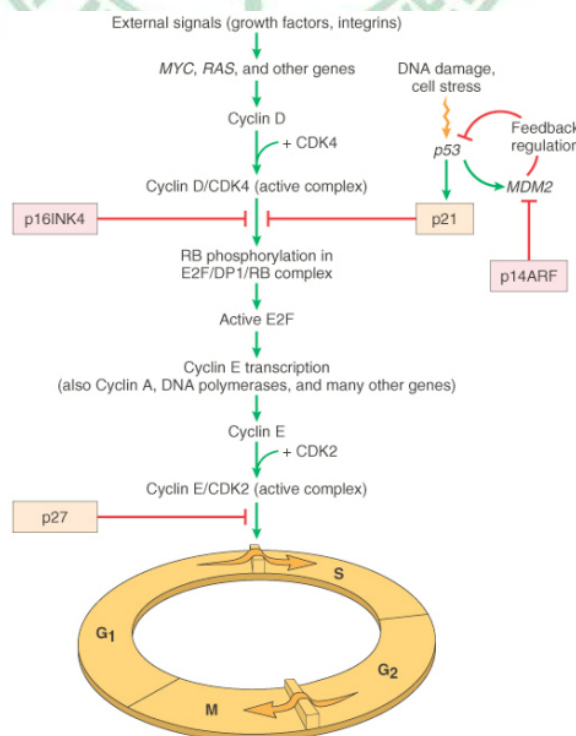
圖一、癌細胞增生擴散過程 [2]



細胞週期調控

細胞的生長在人體內是由細胞週期所調控，分為四個時期，G0、G1、S、G2、M 期。如果細胞發生問題，在細胞內有管制點 (check point)，停止細胞週期的運作，亦是由一些蛋白質來調控管制點的運作 (表一)。細胞週期會受到 Cyclin-CDK 蛋白的調控。研究發現 G1/S 管制點調控是藉由外來分子的刺激，使細胞內產生訊息傳遞蛋白，如 Ras 等，促進 Cyclin D 與 CDK4 結合並活化，CyclinD- CDK4 使 Rb 蛋白磷酸化。Rb 蛋白與 E2F 結合時，造成 Histone deacetylation(去乙醯基化)，使 DNA 包裹緊密，不能產生複製。一旦 Rb 磷酸化後，會與 E2F 分開，使 DNA histone acetylation，並使 E2F 蛋白活化。E2F 會促使 CyclinE 與 CDK2 結合並活化，使細胞通過 G1 期的限制點 (Restriction point)，而促使 DNA 的複製 (圖二)。

圖二、細胞週期 G1/S 管制點調控 [2]



而已知一些蛋白質，如 p53、p21、p27 等，會抑制此細胞生長的訊號，一但這些蛋白的基因被破壞，會使細胞不受控制的大量生長，而造成癌化的結果產生。

表一、細胞週期表

Stage	Major Features	
Interphase		
G0 phase		正常細胞大多處於此期，預備分裂所需物質，穩定
G1 phase		細胞準備期，此時細胞開始生長，形態會變大 ; G1/S 檢查點
S phase		此時DNA開始複製，染色體濃縮
G2 phase		細胞生長，形態會變大; G2/M 檢查點
M phase		
Prophase		染色體濃縮，紡錘體形成；染色體交換
Prometaphase		細胞核瓦解，紡錘體維繫固定染色體中心的著絲點
Metaphase		染色體排列成一直線
Anaphase		姊妹染色體分開，並且往紡錘體兩軸靠攏
Telophase		細胞核膜重新合成，並且染色體呈現放鬆狀態
Cytokinesis		細胞質平均分配到兩個細胞中，細胞分裂完成；植物細胞壁於此時完成

(參考: Genetics -a concepture approach; Benjamin A. Pierce)

口腔癌簡介

口腔癌已成為世界衛生組織 (W.H.O.) 所重視的課題，並且罹患者有逐年增加的趨勢，美國官方預估每年口腔癌上升率 31,000/每年，其引發原因主要是飲酒、抽煙、病毒感染 [3]。在亞洲地區，口腔癌發生率較西方更為普遍。台灣地區每年皆有 2400 人死於口腔癌，吃檳榔、抽煙、喝酒是常見的致癌原因。根據行政院衛生署的統計，口腔癌的死亡率有逐年增加的趨勢 (圖三)；民國七十五年癌症登記報告顯示，國內口腔癌的死亡人數為 423 人，死亡率為每十萬人 2.2，比鼻咽癌高，佔癌症死亡率的第十一位 (表二)，及至九十六年，死亡人數已經高達 2312 人，死亡率為每十萬人 10.1，成為所有癌症死因的第六名 (圖四)。其中男性更高達 2152 人，死亡率達每十萬人 18.6，並成為男性癌症死亡原因的第四名 (表二)。

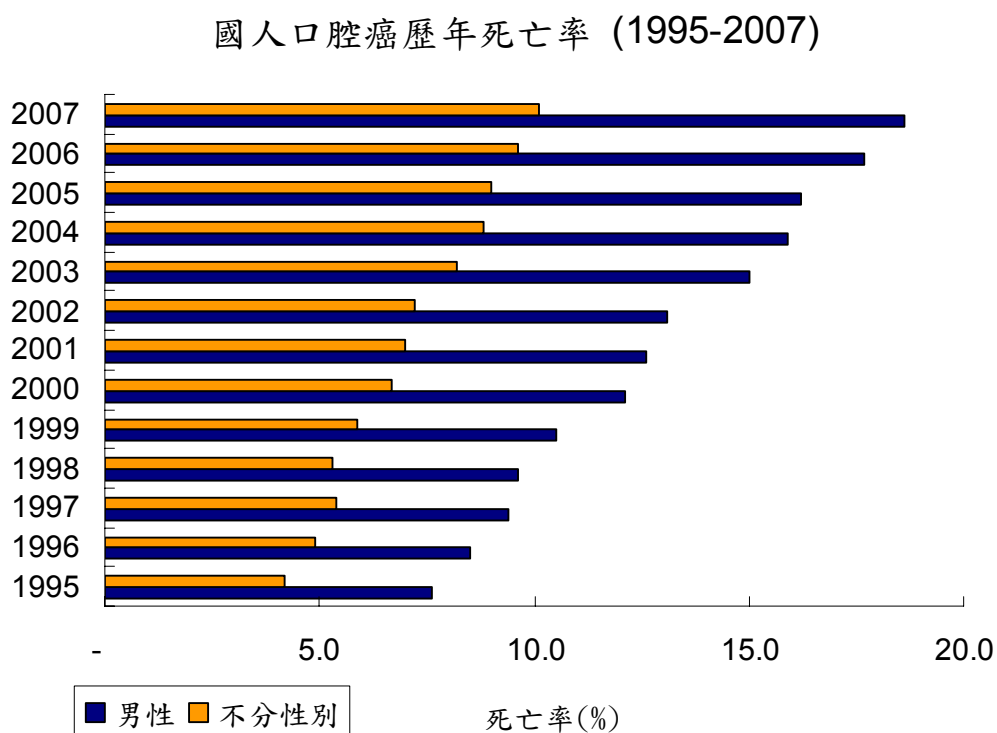
口腔癌的種類有鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma)、疣狀癌 (verucous carcinoma)、腺樣囊狀癌 (adenoid cystic carcinoma)、黏液表皮樣癌 (muco-epidermoid carcinoma) 等，以鱗狀上皮細胞癌最多，其次為腺樣囊狀癌，疣狀癌，黏液表皮樣癌。各種口腔癌男女發生機會在鱗狀上皮細胞癌為男多於女，黏液表皮樣癌男女幾乎相等，腺樣囊狀癌則女多於男。鱗狀上皮細胞癌在口腔的發生部位以舌部最多，其次為頰粘膜、牙齦、顎、口底部及口唇，而牙齦癌左右比為 1:2，右側偏高。牙齦癌及頰粘膜癌比率偏高，可能和嚼檳榔有關 [4]。

表二、國人歷年口腔癌死亡人數、死亡率

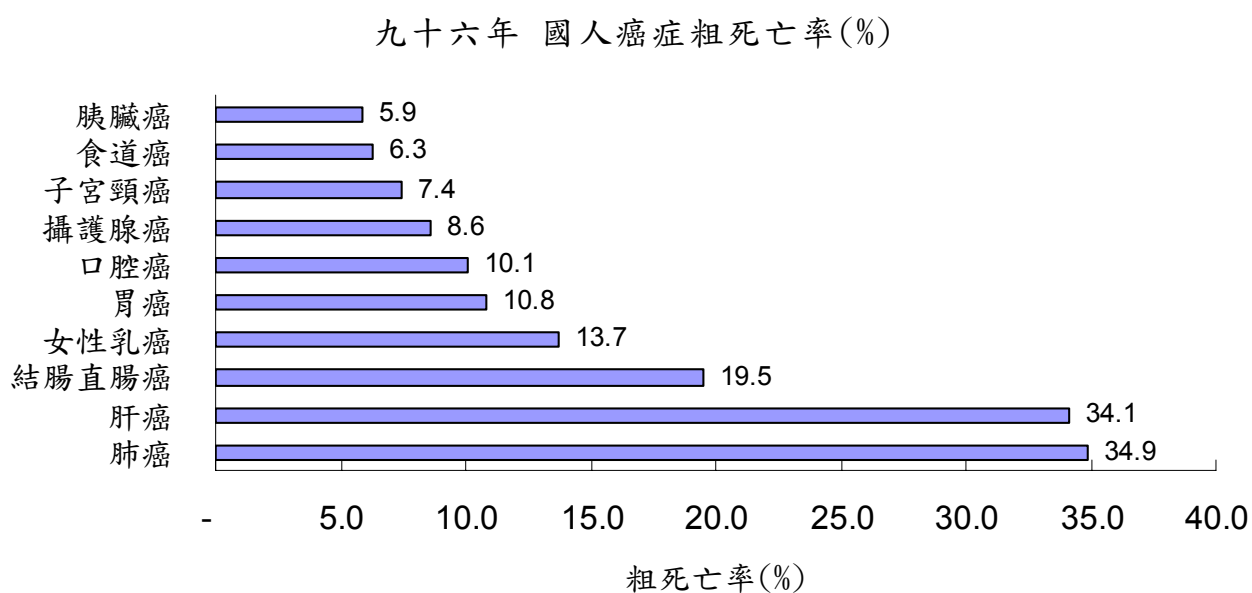
年別 Year		男性			不分性別		
		口腔癌 死亡人數	順位	口腔癌 死亡率	口腔癌 死亡人數	順位	口腔癌 死亡率
75年	1986	349	8	3.5	423	11	2.2
76年	1987	379	7	3.7	445	11	2.3
77年	1988	408	7	4.0	464	12	2.3
78年	1989	457	7	4.4	521	10	2.6
79年	1990	386	7	3.7	452	12	2.2
80年	1991	494	7	4.7	549	10	2.7
81年	1992	547	6	5.1	626	8	3.0
82年	1993	631	5	5.9	694	8	3.3
83年	1994	689	5	6.3	779	8	3.7
84年	1995	830	5	7.6	902	7	4.2
85年	1996	941	5	8.5	1,042	7	4.9
86年	1997	1,041	5	9.4	1,163	7	5.4
87年	1998	1,076	5	9.6	1,167	7	5.3
88年	1999	1,186	5	10.5	1,298	7	5.9
89年	2000	1,375	5	12.1	1,494	7	6.7
90年	2001	1,436	5	12.6	1,560	7	7.0
91年	2002	1,501	5	13.1	1,613	7	7.2
92年	2003	1,723	4	15.0	1,860	7	8.2
93年	2004	1,838	4	15.9	1,993	6	8.8
94年	2005	1,874	4	16.2	2,041	6	9.0
95年	2006	2,044	4	17.7	2,202	6	9.6
96年	2007	2,152	4	18.6	2,312	6	10.1

(來源：行政院衛生署, 2008.10)

圖三、國人口腔癌歷年死亡率



圖四、九十六年國人癌症粗死亡率



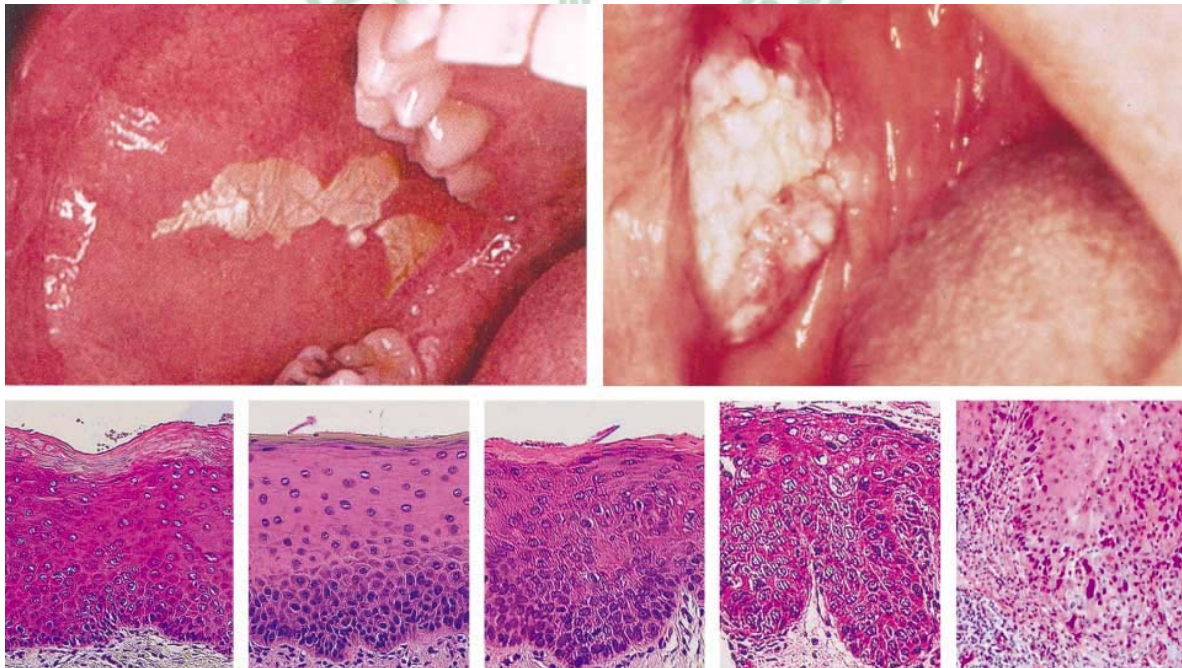
(來源：行政院 衛生署, 2008.10)

根據國家衛生研究院在民國八十七年，發表的“口腔癌臨床治療共識”一文中，提及口腔癌的臨床判定及相關治療原則 [5]。正常口腔黏膜是粉紅色或紅色柔軟組織，如果變厚、變成突起不透明白色的斑塊，便是口腔白斑(圖五)；如果有變薄或略為潰爛的紅色斑塊，便是紅斑，兩者可能是癌前病變，可惡化成口腔癌。口腔癌的臨床表徵是難癒合的潰瘍或突出的潰爛硬塊，常伴有轉移的頸部淋巴腫塊。早期常不覺疼痛，偶而出現帶血的唾液，因此不痛的潰瘍或突出硬塊才可怕，常常有人因不痛而忽略早期癌症的存在，錯失早期診斷、正確治療的良機。

圖五、口腔癌之診斷方式, 病理組織切片 [6]

Oral Leukoplakia(白斑)

Oral Cancer



Hyperplasia
(增生、肥大)

→ Mild
Dysplasia
(輕微異生)

→ Moderate
Dysplasia
(中度異生)

→ Severe
Dysplasia
(重度異生)

→ Cancer
(癌症)

口腔癌臨床分期

口腔癌分期的主要目的在確立治療方式的選擇，評估預後及比較不同治療方式的結果。目前口腔癌的分期是依據原發腫瘤大小 (T)、頸部淋巴結轉移與否 (N)、是否有遠隔轉移 (M) 的TNM系統 (UICC, AJCC 1988分期) 來決定。共分五期；零 期：即原位癌，腫瘤細胞局限在口腔黏膜上皮內。第一期：腫瘤的最長徑小於或等於2公分，且無頸部淋巴結 (或遠隔) 轉移。第二期：腫瘤的最長徑大於2公分但大於4公分，且無頸部淋巴結 (或遠隔) 轉移。第三期：腫瘤的最長徑大於4公分或已轉移到同側頸部的淋巴結，此淋巴結之最長徑不超過3公分。第四期：包含以下任何一種情形 (1) 腫瘤侵犯鄰近的組織 (如：穿過骨外層，深入深層肌肉、上頷竇、皮膚)。(2) 頸部淋巴結轉移的數目超過一個 (不論是在原發病灶的同側、對側或兩側都有)、或是淋巴結的最大徑已超過3公分。(3) 已發生遠隔轉移 [5]。

口腔癌的治療

臨床上常見的有外科治療、放射治療、化學治療，其他像是免疫療法、基因療法，或其他較新穎的生物療法尚未成熟，仍在研究階段，臨床上較少使用。

1. 外科治療

手術切除是治療口腔癌最重要的步驟，依期數的不同而有不同程度的切除：

- A. 原位癌：只做病變處切除。
- B. 第一期：只做病變處切除，視病情需要，加做頸部淋巴結切除。
- C. 第二期：病變處及上頸部淋巴結切除。
- D. 第三期：廣泛病變處切除及頸部廓清術。
- E. 第四期：大範圍切除病變處及頸部廓清術，可能包括臉部皮膚，或部分上、下顎骨。

2. 放射治療

除了少數例外，放射治療可用於不同大小的口腔癌，對於小的局限性腫瘤，手術切除及放射治療都是一有效的療法，但需要考慮到病人的年齡，對於手術或放射治療的意願及容忍性。對於第三及第四期的病人，則視情形可能需要合併手術及放射治療。手術後如有危險因素，如：手術切口邊緣仍有殘存腫瘤細胞、淋巴結轉移（二粒以上）、淋巴結膜外侵犯、神經周圍或淋巴血管侵犯者，需行手術後放射治療。病患在行放射治療前都要會診牙科或口腔顎面外科醫師，評估牙齒及牙齦的狀況，如果有嚴重的牙齦疾病或蛀牙，需在放射治療前治療牙科疾病或拔牙，待傷口完全復原後才可開始放射治療 [5]。

3. 化學藥物治療

傳統化學藥物治療目的在於導致細胞性毒害，以阻止癌細胞生長，通常是直接對抗癌細胞增殖之代謝機制。一般臨床治療癌症會先以外科手術切除及放射治療，之後再以化學藥物減少並控制殘餘在體內的癌細胞數目。然而，化療藥物針對所有在進行複製中的細胞，對癌細胞並不具有專一性，所以正常人體快速合成的細胞也會遭受藥物攻擊，而產生癌症惡病質 (Cachexia)。例如：口腔黏膜、骨髓、腸胃黏膜及毛囊細胞等，造成骨髓造血系統功能下降、免疫系統失調、口炎、嘔吐、掉髮、對心臟、腎臟產生毒性等嚴重的副作用。並且長期服用低劑量藥劑會使腫瘤細胞受到篩選，而產生對藥物的抗藥性 (Drug resistance)。所以在惡性腫瘤的病人身上，化療藥物只能使病情控制，並延長患者的生命。臨床上常見以合併用藥 (Combinations of drugs) 來減低單一藥物濃度，以減緩化療副作用，並避免抗藥性發生。

許多種類的化學治療藥物對口腔癌有部份的效果，有效的化學治療藥物包含了抗代謝類 (anti metabolites) (例如：methotrexate, 5-Fu, Gemcitabine)；含鉑類 (例如：cisplatin, carboplatin)；alkylating agents (例如：ifosfamide)；taxane 類 (例如 paclitaxel, docetaxel)；Bleomycin；Vinblastine；Vinorelbine…等(表三)。

綜合多個研究系列顯示：手術前或手術後的化學治療可能可以減少部分遠隔轉移，增加少許病人的存活。但是對於頭頸癌而言，局部控制是最重要的；目前有研究發現放射合併化學治療對於晚期頭頸癌 (第三、四期)，可

增加局部控制率、顯著增加病人的存活率 [5]。單一藥物化學治療的反應率大約在20~40%之間，其中絕大部份都只有部分反應 (partial response)，而中位存活期大約6個月。合併數種藥物組合的化學治療可以提高反應率大約達到50%~70%左右，中位存活期卻沒有多大的改變，但是藥物的副作用與毒性相對也比較大。常用於口腔癌治療的藥物有 Cisplatin，5-FU及Bleomycin [7]。

4. 口腔癌的標靶治療

傳統化療藥物會對全身快速生長的細胞造成毒殺作用，不僅殺死癌細胞，更是對身體造成了嚴重的副作用。因此，相對於化療藥物，標靶藥物就像能瞄準目標的導彈一般，直接對準癌細胞進行作用，一個理想的分子標靶應有下列特點：(1) 大多數癌細胞有此標靶且大量表現，(2) 與癌症的致病機轉相關，(3) 與癌細胞的生存功能有關，(4) 其功能對正常細胞則非必要或較少表現，(5) 此分子標靶在腫瘤中少有變異性或突變率低，(6) 不易由細胞表面脫落或分泌。

在標靶治療還沒有發展出來前，醫界只能判別腫瘤的期別，並無法依個人體質、癌症指標給予不同的治療方式。未來透過監測腫瘤標記於血清濃度高低，以及病理切片，免疫組織化學染色 (IHC staining)，判斷腫瘤抗原表現，作為腫瘤生物標記；使醫師在選擇傳統化療藥物或標靶藥物時，做為參考，以便更能對症下藥，並達到”個人化癌症治療”，首次開啟癌症小分子標靶藥物先例，是在 1999 年針對慢性病骨髓性白血病藥物基立克

(Glivec)。之後，各類標靶藥物的研發更加迅速，目前主要的方向有三；第一，能專一辨識癌細胞表面抗原的單株抗體 (Monoclonal antibody)，送入體內對抗癌細胞增生，如 Herceptin 對 Her-2/neu 的結合，能夠阻斷乳癌細胞的訊息傳遞，造成癌細胞死亡；第二，阻斷癌細胞訊息傳遞路徑的 kinase inhibitor，如 艾瑞莎 (Iressa) 阻斷 EGFR 細胞內側磷酸化；第三，抑制腫瘤血管新生作用 (Angiogenesis)，對於已經轉移的癌細胞有明顯的抑制，如，癌思停 (Avastin) 結合至人類血管內皮生長因子 (VEGF)，而達到抑制腫瘤血管新生作用 (表四)。不僅如此，藥物標地設計也由單標靶邁向多標靶，例如：新藥 Nexavar 能夠同時阻斷細胞分裂與血管新生。其他如中研院院長翁啟惠團隊開發的醣脂抗癌新藥，以細胞上的醣脂類結構為作用標地；以及能夠提升體內免疫系統對抗癌細胞，並減低許多副作用和抗藥性的免疫療法，也是研究人員邁進的方向之一。在臨床上，合併使用化療藥物加上新型標靶藥物，是近來癌症治療的新概念 [8]，或者同時使用兩種以上的標靶藥物治療，以 EGFR/Her-2 inhibitor 治療乳癌病患為例 [9]。

在最近從 2008 年 Head & Neck 期刊發表一篇文章，是關於頭頸部癌症的標靶藥物使用。標靶藥物對於頭頸部並口腔癌相關的癌症治療上，目前還是比較少被注意。但在一些研究中已發現針對 EGFR 的 tyrosine kinase 抑制劑 (Iressa)，在細胞實驗能有效抑制口腔癌細胞生長，還能增加放射線治療的效果 [10]。Erbix(又 Cetuximab)是一種標靶治療藥物 (EGFR)，而最近研究發現此藥物在臨床上不僅能使用於大腸直腸癌患者，也能延長鱗狀細胞頭頸癌病患生命，發表的研究報告指出對進行性的鱗狀細胞頭頸癌，

Erbix 合併放射線治療比只有進行放射線治療存活期從 29.3 個月延長到 49 個月。近來亦有以 P-glycoprotein 為口腔癌細胞的藥物標地 [11]。另外研究發現，使用 celecoxib (COX-2 ; Selective inhibitor) 能夠提升 HSC-2 細胞對於放射線的敏感性 [10]。



表三、化療藥物分類 一般化療藥物可分大約可分為六大類 [1]

分類	常見藥物	作用機轉
抗代謝物藥劑 (antimetabolites)	1Cytarabine Fludarabine 5-Fluorouracil 6-Mercaptopurine Methotrexate 6-Thioguanine	抑制 DNA 或 RNA 合成中所需要的 Purine 或 Purimidine 之前驅物的合成，或是與它們互相競爭。對於細胞週期中的 S 期最具專一性。
抗生素 (antibiotics)	Bleomycin Dactinomycin Daunorubicin Doxorubicin Idarubicin Palicamycin	與 DNA 作用而破壞 DNA 功能。屬於細胞週期專一性(cell-cycle specific)
烷基化劑 (alkylating agents)	Carmustine & iomustine Cyclophosphamide & Ifosfamide Mechlorethamine Streptozotocin	將 DNA 烷基化(-CH ₃)而造成細胞毒殺作用
微管體抑制劑 (microtubule inhibitors)	Navelbine Palitaxel(Taxol) Vinblastine Vincristine	藉由影響細胞有絲分裂期間之微小管(microtubule)聚合而造成細胞死亡。
激素類 (hormones)	Aminoglutethimides Estrogens Flutamide Goserelin Leuprolide Prednisone Tamoxifen	對於類固醇荷爾蒙敏感的癌細胞，使用專一性荷爾蒙後會使癌細胞退化。若是荷爾蒙依賴型，移除其刺激則引起癌細胞退化
其他	Cisplatin & Carboplatin Etoposide(vp-16)	Ciplatin 進入細胞內與 DNA N ⁷ -guanine 結合，抑制 DNA 及 RNA 合成，以 G1 及 S 期的細胞最易受到傷害。Etoposide 與 DNA topoisomerasell 結合，造成 DNA 不可回復的斷裂，阻斷 S-G2 期。

表四、標靶藥物分類 [12]

藥名	分類	作用標地	適用癌症
Erbix (爾必得舒)	單株抗體	EGFR	大腸直腸癌、鱗狀細胞頭頸癌
Panitumum-ab		EGFR	大腸直腸癌
Herceptin(賀癌平)		Her2/neu	乳癌、卵巢癌
MabThera(莫須癌)		B 細胞上 CD20 表面抗原	非何杰金氏淋巴瘤
Avastin(癌思停)		VEGF(anti-angiogenesis)	轉移型大腸直腸癌
Mylotarg(滅髓瘤)		CD33 表面抗原	急性骨髓性白血病
Tarceva(得舒緩)	酪胺酸激酶抑制劑	EGFR(細胞內側磷酸化)	非小細胞肺癌、胰臟癌
Iressa(艾瑞莎)		EGFR(細胞內側磷酸化)	非小細胞肺癌、肺腺癌
Nexavar(蕾莎瓦)		RAF、VEGFR-2, VEGFR-3 PDGFR-β、KIT 和 FLT-3	腎細胞癌、肝癌
Sutent(紓癌特)		VEGFR、PDGFR、KIT, FLT3, colony-stimulating factor 1 (CSF-1), and RET	移轉性腎細胞癌、末期肝癌病患、 乳癌、大腸癌、肺癌、黑色素瘤、以及鱗狀 細胞癌
Glivec(基立克)		佔據 Bcr-Abl TK 上 ATP 的結合 位置	慢性骨髓性白血病 腸胃道基質瘤
Tasigna(泰息安)		佔據 Bcr-Abl TK 上 ATP 的結合 位置	慢性骨髓性白血病
Velcade(萬科)	蛋白解體抑制劑	抑制 26S proteasome 的 chymotrypsin site 干擾 NF-kappa B 的活化 (proteasome inhibitor)	多發性骨髓癌

第二節 癌症基因治療 (Cancer Gene Therapy)

人體內的去氧核糖核酸 (DNA) 帶著遺傳密碼。某些特定片段的 DNA 決定了人類的遺傳特徵和身體功能，例如髮色、身高、智力、心臟是否健全等。這些特定片段的 DNA 稱為基因 (Gene)。基因攜帶的遺傳訊息控制細胞蛋白質、激素、受體等的生產和作用。有很多疾病，是因為遺傳到缺陷的基因或是基因產生突變，致使蛋白質、激素、受體等的生產和調控出差錯。藉由將**完整正常的基因**引入病人適當的細胞內，讓正常基因取代缺陷基因的功能，來治療病人的症狀，稱為基因治療 (Gene therapy)。不過因為人類基因表現和調控非常複雜，科學家尚無法完全明白，再加上將基因引入人體內使之穩定表現的技術還不算完全成熟，因此過去的基因治療成果失敗者眾。

1980 年代，French 等人用以治療”嚴重複合性免疫缺陷症”，這是一種由於腺苷酸脫月安酶 (ADA) 的失常而造成 T 和 B 細胞死亡，也因而帶領了一股基因治療的風潮。有的學者希望基因治療能應用在癌症上，但癌症發生是多基因的失控，因此治療效果不彰。基因治療 (Gene therapy) 主要以單一基因變異疾病為治療對象。然而，1999 年賓州大學以腺病毒 (Adenovirus) 載體進行臨床實驗，造成一名少年死亡。基因治療從此蒙上一層陰影。2008 年，研究人員於<新英格蘭醫學雜誌>發表在臨床上治療 6 名患有 (Leber's congenital amaurosis) 的病人接受了基因療法的試驗治療，其中 4 人視力有明顯改善。此案例為基因治療 (Gene therapy) 帶來新的曙光 [13, 14]。然而，在基因載體 (Gene vector) 的使用與開發上，仍有許多發展空間 (表五、表六)。

美國國家衛生院 (National Institutes of Health) 下屬國家癌症研究中心 (National Cancer Institute) 的 Steven Rosenberg 的團隊，於 2006 年在科學雜誌 (Science) 上發表利用免疫療法成功抑制黑色素瘤 (melanoma) 癌症。Rosenberg 團隊主要是利用基因工程方式來修改淋巴細胞。利用反轉錄病毒當載體 (retrovirus)，將 T 細胞受器 (T cell receptor ; TCR) 的基因轉植至周邊血液的淋巴細胞，因著 TCR 能夠辨識腫瘤組織表面上的抗原，所以基因轉植後的淋巴細胞能夠辨識黑色素瘤上抗原，並破壞癌細胞生長。他們已經能利用相同的技術，製造能辨識其他癌症的 T 細胞，包含半數目前已知的癌症都能利用這項技術來產生 T 細胞進行基因治療。這是基因治療應用於免疫療法的例子。不過此方法有其限制，因為並不是每一個癌細胞都會表現特定的表面抗原，修改過的 T 細胞將無法發覺沒有表現癌細胞表面抗原的突變癌細胞 [15]。

目前，核醣核酸干擾現象 (RNA interference, RNAi) 是在基因治療中的另外一項突破，可大規模篩選所有疾病相關的基因，改進以往缺乏對疾病多種基因調控的認知，所造成的治療失敗 [16]。

第三節 慢病毒載體之基因轉移 (Lentivirus mediated gene transfer)

在基因治療基因送入活體中主要有三種方式 (表五): 純化 DNA 後利用基因槍 (Gene gun) 將 DNA 送入特定的部位, 或是直接注射 DNA, 但效果不彰。後來研發出的病毒載體 (Virus vector) 能有效率的將基因送入目的地, 並長時間產生基因沉默, 常見的有 Retrovirus (反轉錄病毒)、Adenovirus (腺病毒)、還有反轉錄病毒的一種 Lentivirus (慢病毒)。製備病毒載體時必須將其致病的序列剔除, 但仍有其風險存在。反轉錄病毒只能感染分裂中的細胞 (mitotic cell); 腺病毒能感染分裂中的細胞或非分裂中的細胞 (Non-mitotic cell) 如: 幹細胞 (stem cell), 但由於大部分的人都感染過腺病毒, 導致以腺病毒為載體時, 體內會有免疫反應的情況發生。並且因著之前的意外事故發生, 現在此病毒載體已較少使用 (表六)。之後研發出的微脂質體 (Liposome) 能改善轉染的毒性問題, 為目前常見的轉染載體, 但其轉染效率並沒有病毒載體高。

表五、 基因載體分類

Gene Transfer & Vector	
Virus vectors	<ul style="list-style-type: none"> • high efficient • toxic risk (ex. Retrovirus, Adenovirus, Lentivirus...)
Non-viral vectors	Naked DNA <ul style="list-style-type: none"> • purified DNA(ex. VEGF) • gene gun
	Liposome <ul style="list-style-type: none"> • control toxicity • lower efficient than virus • lower intergretion

病毒載體

現今基因治療中的基因轉移工具多採用病毒載體，大約分為三大類：腺病毒相關病毒 (Adeno-associated virus)、腺病毒 (Adenovirus)、反轉錄病毒 (Retrovirus)。以下是它們作為載體的優缺點比較：

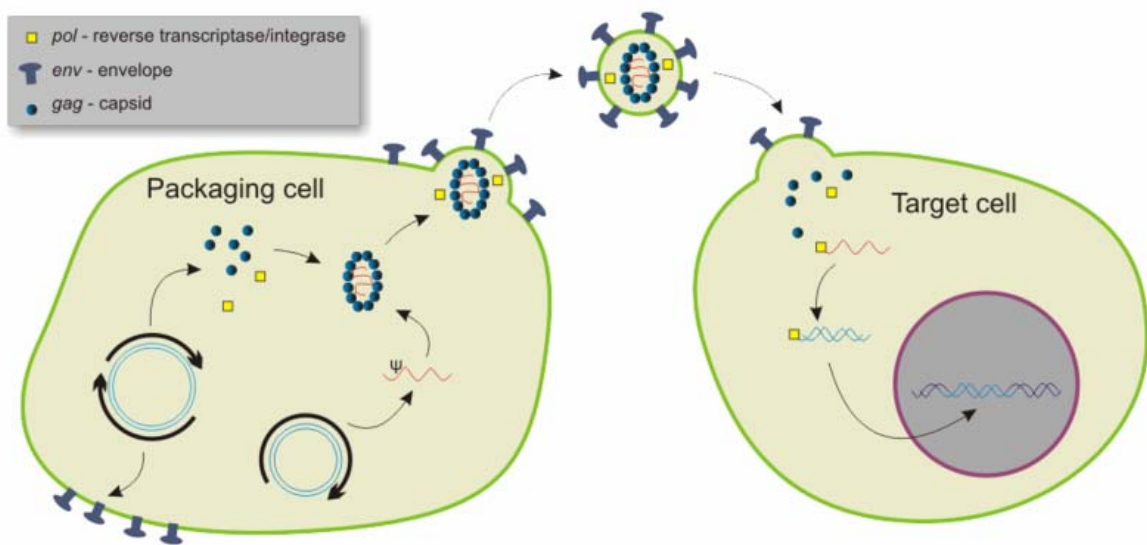
表六、病毒載體分類

	Adeno-associated virus	Adenoviral (腺病毒)		Retroviral (反轉錄病毒)	
分類	AAV	Adeno (1st & 2nd gen.)	Adeno (Gutless) (無腸腺病毒)	Lenti (慢病毒)	Onco
DNA 或 RNA 病毒	ssDNA	dsDNA	dsDNA	RNA	RNA
基因容量 (kb)	< 4.7	~ 8.3+	27-29	~ 7.5 - 9+	~ 7.5+
染色體鑲嵌性	No (Yes?) *	No	No	Yes	Yes
是否感染非分裂中細胞	Yes	Yes	Yes	Yes	No
作用表現的時間	Long	Short	Long	Long	Long
是否引起身體免疫反應 (毒殺型 T 細胞反應)	No	Yes	Yes	No	No
一般人有感染過?	Yes	Yes	Yes	No‡	No
安全性考量	Insertional mutagenesis?	Inflammation cytotoxicity		Insertional mutagenesis	

慢病毒載體

不是每一種細胞都以傳統轉染 (Transfection) 進行 DNA 轉植，其在細胞內與動物體中產生之影響 (例如，基因沉默作用)，常常在細胞實驗為有明顯效果，但在動物中則不然，並且有某些特定的細胞轉染效果不彰。本篇實驗所用的慢病毒載體，是反轉錄病毒之一員，有許多良好載體特點；它不僅能感染分裂中或非分裂的細胞，並且能感染的細胞種類多元，轉染效率高，適用於動物活體中及分化過程中的細胞，如幹細胞。2003 年，Douglas A. 等人利用慢病毒載體的 RNAi 技術觀察哺乳類細胞、幹細胞、與基因轉殖小鼠的功能性基因 [16]。圖六為其感染細胞的過程 (圖六)。

圖六、慢病毒感染細胞過程



第四節 核醣核酸干擾現象 (RNA interference, RNAi)

RNAi 簡介

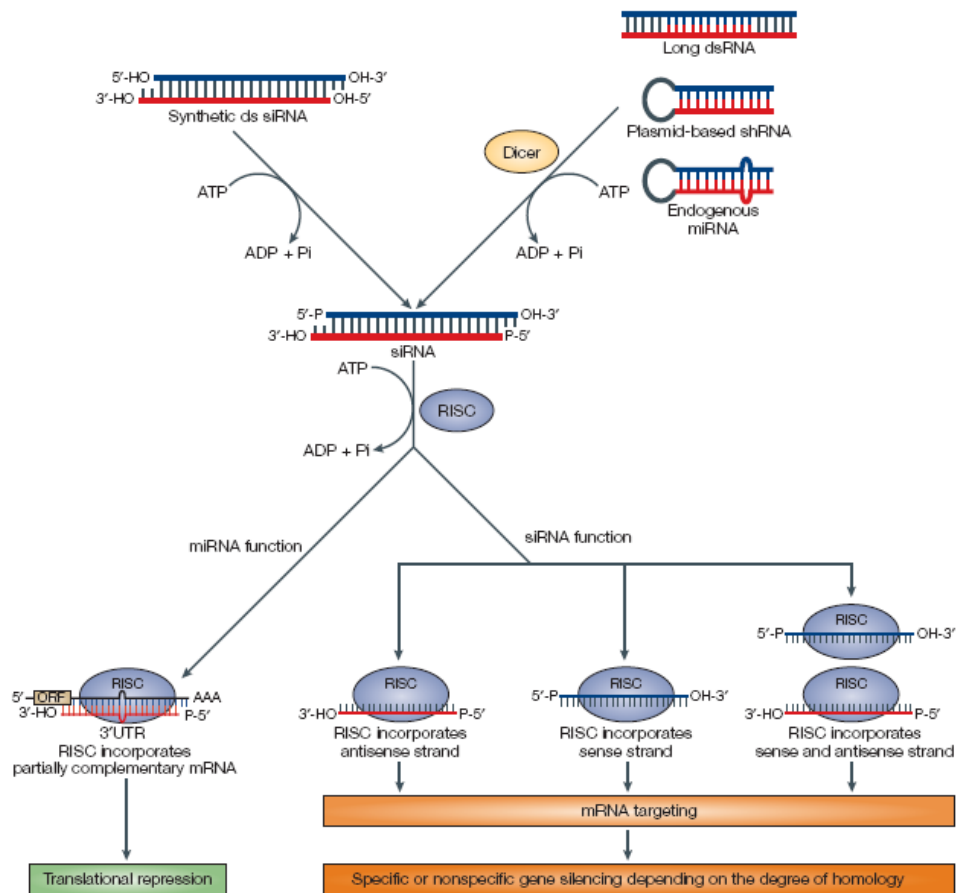
RNA 干擾 (RNA interference, 縮寫為 **RNAi**) 是指一種分子生物學上由雙股 RNA 誘發的基因沉默現象。當細胞中導入與內源性 mRNA 編碼區同源的雙股 RNA 時, 該 mRNA 發生降解而導致基因表達沉默。RNAi 現象在生物中普遍存在, RNAi 與轉錄後基因沉默 (post-transcriptional gene silencing and transgene silencing) 在分子層面上證實是同一種現象。

RNA 干擾現象是 1990 年由 R. Jorgensen 研究小組在研對花青素合成速度的影響時, 為得到顏色更深的矮牽牛花而過量表達查爾酮合成酶 (Chalcone synthase), 結果意外得到了白色和白紫雜色的矮牽牛花, 此外, 他們發現轉植了過量查爾酮合成酶基因的矮牽牛花, 其查爾酮合成酶的濃度比正常矮牽牛花中的濃度反而低 50 倍。因而推測外源轉入的編碼查爾酮合成酶的基因同時抑制了花中內源查爾酮合成酶基因的表達 [17]。1992 年, Romano 和 Macino 也在粗糙鏈孢霉中發現了外源導入基因可以抑制具有同源序列的內源基因的表達 [18]。1995 年, Guo 和 Kempfues 在線蟲中也發現了 RNAi 現象 [19]。1998 年, Andrew Z. Fire 等在秀麗隱桿線蟲 (*C.elegans*) 中進行反股 RNA 抑制實驗時發現, 作為對照加入的雙股 RNA 相比正股或反股 RNA 顯示出了更強的抑制效果, 並將種現象命名為 RNA 干擾 [20]。2006 年, Andrew Z. Fire 與 Craig C. Mello 由於在 RNAi 機制研究中的貢獻獲得諾貝爾生理及醫學獎。

而最早研究證明確認 RNAi 的作用機轉是需要經過四個步驟, 乃是藉由果蠅胚胎細胞 (S2 cells) 所得到的生化實驗研究結果。它的反應起始步驟

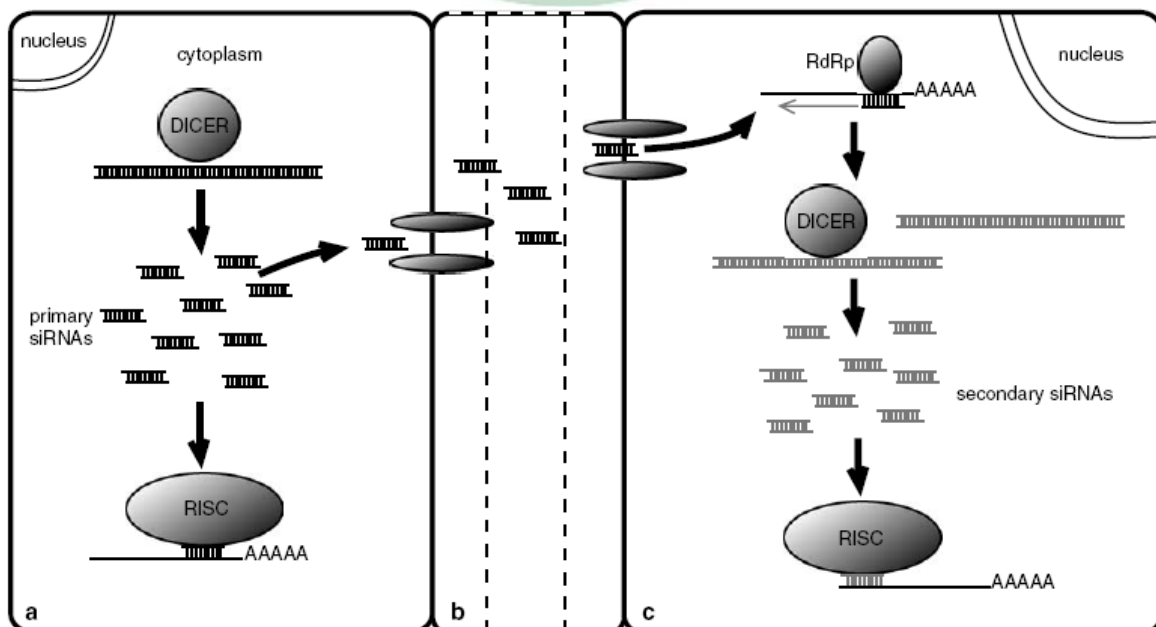
是 ATP-dependent，經由 dicer (RNase III family of dsRNA-specific endonucleases) 將長片段的 dsRNA 剪成小片段(21-25 nucleotide)的 dsRNA 稱為 siRNAs (small interfering RNAs)。而這些 siRNA duplexes 隨後與一些目前尚未確定與 RNAi 有關的一些 protein complex 結合在一起。接著這個 siRNA duplex 經由 ATP-dependent 進行 remodeling 解開整個纏繞結構，形成 active RNA-induced silencing complex (RISC)，最後可能需要少量的 ATP 幫助下，active RISC 可以辨認及切割 target RNA 將 specific target gene 以"Knockdown" [20] (圖七)。

圖七、RNA interference 運作機轉 [21]






另有研究發現，RNAi 現象在人體中內生性 (endogenous) 的發生，而調控體內的生理現象者，同樣為 21-25 nt 片段，稱之為微小型 RNA (micro RNA, miRNA)，與外源性 siRNA 不同的是，miRNA 藉由結合 mRNA 的 3'UTR，或者藉由阻止蛋白合成 (Translational repression)，而造成基因沉默現象；而一般的 siRNA 是與 mRNA 產生完美性結合 (perfect match) 造成 mRNA 的降解 [22, 23] (見表七)。在植物與線蟲 (nematodes) 的研究中發現 RNAi 具有傳遞性。細胞內 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 會藉由原本的 siRNA 當作引子 (Primer)，合成出新的 siRNA，作用類似 PCR 放大效應；或者可能直接由 RdRp 合成新的 siRNA 片段，造成 mRNA 的降解。並且，這樣的 siRNA 會在 2~5 個細胞之間傳遞，或者有更遠距離的傳遞效果 (圖八) [22]。此外在秀麗隱桿線蟲 (*C.elegans*) 上實驗時還可使子一代產生基因突變。

圖八、RNAi 的放大及傳遞作用 [22]

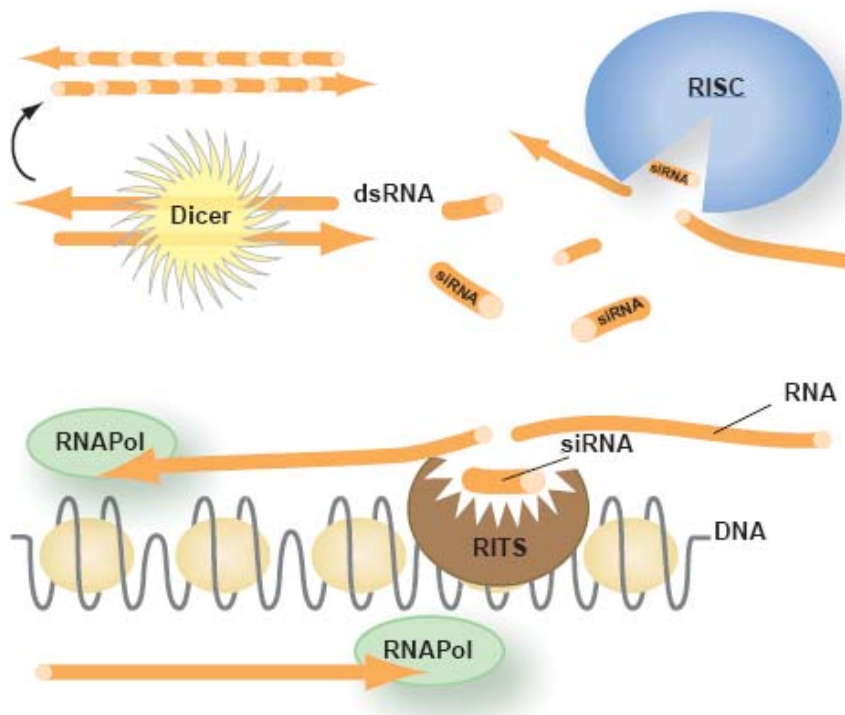


表七、各種 RNAi 的比較 [22, 23]

RNAi 比較	作用機轉	結合位置	轉染效率
<p>siRNA (small interfering RNA)</p>	 <p>Ds-RNA 藉由 (cholesterol、liposome、antibody) 送入細胞的 Cytosol 中 → Dicer 切成 21-23 的片段 → Risc 結合 → 降解 mRNA</p>	<p>Perfect match</p>	<p>Transient 效率較低</p>
<p>shRNA (short hairpinRNA)</p>	<p>外 源 性</p>  <p>Plasmid-based shRNA Ds-RNA (設計在 plasmid DNA 中) 藉由 virus vector 送至細胞的 Nucleus 中 → RNA Pol III 進行 transcription → 至 Cytosol → Dicer 切成 21-23 的片段 → Risc 結合 → 降解 mRNA</p>	<p>Perfect match 或 3' UTR</p>	<p>Stable 效率較高</p>
<p>miRNA (microRNA)</p>	<p>內 生 性</p>  <p>Endogenous miRNA 細胞內自身合成 在 Nucleus 中 → RNA Pol II 進行 transcription → 至 Cytosol → Dicer 切成 21-23 的片段 → Risc 結合 → 降解 mRNA (或是直接抑制蛋白質合成)</p>	<p>3' UTR</p>	

在 2002 年研究發現， RNAi 現象不僅發生在 post-transcriptional 層次，由 Dicer 切割後的 siRNA 會與 RNA-induced initiation of gene silencing (RITS) complex 結合，在染色體上進行 RNA transcript 降解作用，稱之為 Epigenetic silencing (圖九)。此外，還有研究發現，siRNA 參與 DNA 的甲基化作用 (methylation) [24]。

圖九、RNAi 作用於染色體上 [24]

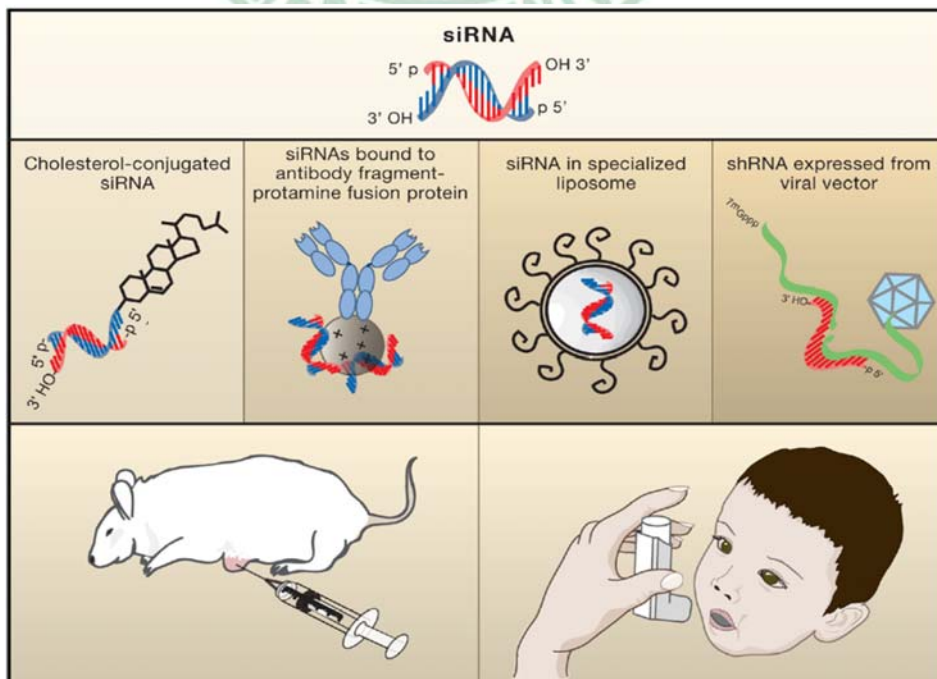


RNAi 之載體設計

根據 RNAi 的作用特性，科學家們可以針對特定標記基因設計 shRNA (見表七)，藉由病毒感染作用 (Virus infection)，將建構好的 shRNA 載體直接送入細胞核內，由 RNA polymerase III 合成 shRNA，送至細胞質中。或者是可以直接合成標地基因的 siRNA，由轉染作用 (Transfection) 直接將 ds-RNA 送入細胞的 Cytosol 中，藉 Dicer 切成 21-23 的片段，再與 Risc 結合，至終達到降解 mRNA，產生特定基因的沉默現象。

siRNA 使用載體較多樣化：有結合在 Cholesterol (膽固醇) 上，也有與抗體結合，較常見的試用 liposome (微脂質體)。而 shRNA 則以病毒載體為主。而動物實驗中，則以載體結合好的 siRNA 或 shRNA 在定位注射，或者在小鼠的尾巴靜脈注射之(圖十)。

圖十、RNAi 載體使用分類 [25]



在早期的分子生物學家對於研究蛋白的生物功能之最常見的方法，是利用突變技術將該基因進行突變，再觀察該基因的突變表現型 (mutant phenotype) 對生物個體的影響，此技術稱為 forward genetics (Silva et al., 2004)。但是這項技術耗時且不具成本效益，故隨著 1998 年線蟲基因體計畫 (*C. elegans* genome project) 的完成後，科學家便積極的開發找尋一些快速及有效率的方法來進行大規模基因體 (Large-scale genome) 的研究。在國內，中央研究院於 2004 年代表臺灣加入美國麻省理工學院/哈佛大學的 Broad 研究所發起的核糖核酸干擾聯盟國際合作計畫 (TRC) (圖十一)。至 2011 年前台灣可從此聯盟獲得 (一) 可沉默人類及老鼠各 16,000 基因的 shRNA RNAi 試劑庫 (10 shRNAs/ gene)；(二) 獲得全部 shRNA RNAi 試劑庫之 knockdown 資料庫。圖十二為 TRC 設計的 shRNA 載體 (圖十二)。

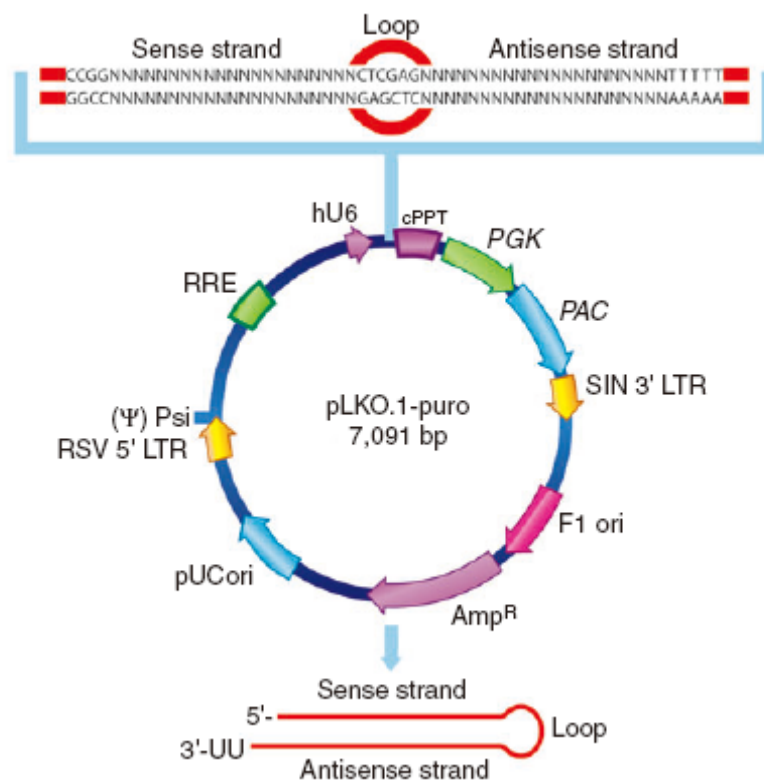
圖十一、RNAi collection 的策略聯盟 [26]

Table 1 | Publicly available large-scale mammalian RNAi collections

Collection*	Genome coverage	URL	Refs
<i>Mus musculus</i>			
Hannon-Elledge Whole Genome Retroviral shRNA-mir library	~85,000 constructs	http://www.openbiosystems.com and http://codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl	22
The RNAi Consortium (TRC) Lentiviral shRNA library and MISSION shRNA Mouse library	~40,000 constructs targeting ~8,000 genes	http://www.openbiosystems.com , http://www.sigmaldrich.com and http://www.broad.mit.edu/rnai_platform/	28
siGENOME and siARRAY libraries	Various gene families	http://www.dharmacon.com	
Silencer siRNA libraries	Various gene families	http://www.ambion.com	
Qiagen GenomeWide siRNA	Various gene families	http://www1.qiagen.com	
GeneNet Lentiviral Human siRNA library	150,000 siRNAs targeting 39,000 mouse mRNA transcripts	http://www.systembio.com	
<i>Homo sapiens</i>			
Hannon-Elledge Whole Genome Retroviral shRNA-mir library	~90,000 constructs	http://www.openbiosystems.com and http://codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl	22
Netherlands Cancer Institute Retroviral RNAi library	~22,000 constructs targeting ~7,000 genes	http://www.biomedicalgenetics.nl/Members/Bernards/bernards.html	25
The RNAi Consortium (TRC) Lentiviral shRNA library and MISSION shRNA Human library	~60,000 constructs targeting ~13,000 genes	http://www.openbiosystems.com , http://www.sigmaldrich.com and http://www.broad.mit.edu/rnai_platform/	28
Silencer siRNA libraries	Human genome in pre-defined sets (for example, druggable genome)	http://www.ambion.com	
siGENOME and siARRAY libraries	~22,000 genes targeted with smartPOOL technology	http://www.dharmacon.com	
GeneNet Lentiviral Human siRNA library	200,000 siRNAs targeting 47,400 human mRNA transcripts	http://www.systembio.com	
Qiagen GenomeWide siRNA	Various gene families	http://www1.qiagen.com	
Adenovirus based library	Unknown	http://www.galapagos.be	27

*Some defined gene sets for *Rattus norvegicus* are also available through Dharmacon, Ambion and Qiagen. RNAi, RNA interference; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, short interfering RNA.

圖十二、TRC 設計的 shRNA 載體及序列 [27]



RNAi 的應用

RNAi 可用來作為疾病治療的方式之一，有越來越多的研究證實 RNAi 作為基因療法的潛力。主要應用在 (1.) 癌症、(2.) 病毒感染性疾病、以及 (3.) 基因突變相關疾病、(4.) 大規模致病基因的篩選 [28, 29]。不過，在許多研究中發現，RNAi在細胞轉染過程中有偏離標地反應 (Off-target effect) [30, 31]，可能是內生性 miRNA 所造成的影響，所以在同一種基因的 siRNA 設計上，一般會有2~5個針對同樣基因但序列些許不同的 siRNA，從中選擇基因抑制率最高的作為實驗的序列。另外，siRNA 轉染至活體中，會有誘發干擾素 (Interferon ; IFN) 所產生的免疫反應；設計小於30個核苷酸長度的 siRNA 序列，可避免誘導此免疫反應的發生 [30]。

已報導的RNAi應用如下：

1. 設計抑制B型肝炎病毒的shRNA

在2003年，學者 McCaffrey, A.P. 等人設計針對人類B型肝炎病毒 (Hepatitis B virus ; HBV)表面抗原的 shRNA。細胞實驗中人類B型肝炎病毒表面抗原 (HBV surface antigen ; HBsAg) 有94.2%的抑制率；而在動物實驗中，血清中的 HBsAg 有84.5%的抑制率。之後，從小鼠肝臟組織切片作組織免疫螢光染色 (Immunohistochemistry)，發現大於99% HBsAg 被抑制 [32]。

2. 設計抑制呼吸道感染之病毒的 siRNA

在 2005 年，學者 Bitko, V. 等人設計針對兩種呼吸道感染病毒 (Respiratory syncytial virus ; RSV 和 parainfluenza virus ; PIV) 的 siRNA 序列。這兩種病毒於當時並無適當的疫苗或抗病毒藥物，研究發現經 siRNA 處理的細胞比起未加 siRNA 的控制組細胞，其 RSV 與 PIV 有明顯的下降；動物實驗亦有類似的結果 [33]。

3. 設計抑制神經性退化疾病 ALS 突變基因 SOD1 的 shRNA

Ralph, G.S. 等人，於 2005 年發表的研究成果。乃針對神經性退化疾病 ALS 突變基因 SOD1 設計 shRNA。在 ALS 小鼠模式實驗中，注入能夠抑制突變基因 SOD1 之 shRNA 的小鼠的存活率大於控制組的小鼠。並且從小鼠腦幹與脊髓之組織染色切片後發現，注入抑制突變基因 SOD1 之 shRNA 的小鼠，其神經元的正常型態及存活率大於控制組小鼠 [34]。

4. RNAi 方式大規模篩選致病基因

在 2005 年 Jeffrey 等人用 RNAi 方式大量篩選 Hela cell 中的蛋白質激酶與蛋白質磷酸水解酶基因，(650 個蛋白質激酶，222 個蛋白質磷酸水解酶)，得到了一些新的細胞凋亡調控蛋白質；在他們的實驗中發現了具有化療抗藥性的基因；另外，他們利用篩選出來能夠抑制癌細胞生長基因的序列，與低劑量化療藥物合併使用後，產生藥物協同作用，可以促使 Hela cell 發生細胞凋亡的現象 [35]。在 2007 年 Susan E. 等人，同樣用 RNAi 方式篩選 3700 個基因於三種不同的癌細胞株: H1299 (肺癌細胞)、MDA-MB-468

(乳癌細胞)、DLD (直腸癌細胞)的影響。發現了三個基因 (Ran,TPX2,SCD1) 可以作為癌細胞的生物標記 [36]。Moffat,J. 團隊於 2006 年發表利用 shRNA 來篩選調控癌細胞的基因的研究成果。他們利用核醣核酸干擾聯盟國際合作計畫 (TRC)所合成 5000 個慢病毒載體的 shRNA 序列 (針對 1028 個基因)，轉至 HEK293T 細胞株內，篩選出 100 多個調控細胞分裂的基因 [37]。



第五節 實驗目的 (Experimented Aim)

隨著分子生物研究的進步，越來越多疾病的探討已朝向基因體層次發展，以找出真正的致病機轉，癌症也不例外。由於癌症是由許多基因的突變產生的，且具有高度生長及變異性，為臨床醫學治療上的一大難題，現有傳統的化學治療已經無法應付。雖說癌症在臨床上的藥物治療，已逐漸進入標靶藥物的時代，但現今在藥物的開發與使用上，仍處於萌芽階段，只有少數幾種藥物在臨床上被使用。

近十年來，藉由分子生物方法，找出各種癌細胞的作用機轉，進而研發出許多針對癌細胞分子標地的藥物。大部份研究乃是針對乳癌、肝癌、肺癌，在口腔癌方面系統性的研究尚處於萌芽階段。在 2004 年，學者 Warner, G.C 等人利用 cDNA microarray 方式，找到口腔癌轉移相關蛋白質 CLDN1 [38]。之後在 2006 年，學者 Lo, W-Y 等人蛋白質體學方法，藉由正常檢體與癌症檢體的蛋白質二維電泳膠的分析比較後，找到幾個在口腔癌中過度表現的蛋白質，作為生物標記；再利用 LC-MS/MS 分析其蛋白質的胺基酸序列。其中 Vimentin、Tropomyosin2、MnSOD、HSP27 等蛋白質被發現有過度表現的現象 [39]。2008 年，學者 P Holfman 等人，利用 Tissue microarray 的方式，找到 actin-binding Src substrate - Cortactin 作為頭頸癌的臨床生物標記 [40]。

由於目前國人口腔癌的罹患率有節節升高的趨勢，但對於口腔癌的分機轉及生物指標並無全面性的研究，因此本研究乃由中央研究院國家基因體

中心 RNAi 核心設施 (National RNAi core facility) 購入敏感性干擾性核糖核酸庫 (sensitized RNAi library)，以大規模的 RNAi 技術篩選口腔癌的特異性基因。本研究總共使用 6502 個 shRNA clone constructs 的部份 shRNA 慢病毒 (Lentivirus) 載體，乃針對有 1236 個基因所設計；包括 737 是蛋白質激酶、209 蛋白質磷酸水解酶 和 30 基因有雙重功能 (表八)。偵測各個 shRNA 對癌細胞生長的影響。再藉由生物資訊軟體 GeneGo 分析篩選可能的致病基因間的相互關係與訊息傳遞路徑。我們認為本研究將有助於早期診斷口腔癌的檢測試劑的開發，或是發展出更多對抗此標的分子 (Therapeutic targets) 的標靶藥物。

表八、1236 個 shRNA 基因分類

Gene Category	Gene number	Percentage
Kinase	737	59.63%
Phosphatase	209	16.91%
Kinase & Phosphatase	30	2.43%
Subtotal	976	78.96%
Transcription factor	37	2.99%
Tumor suppressor	16	1.29%
Transcription factor & Tumor suppressor	15	1.21%
Subtotal	68	5.50%
None	64	5.18%
Others	128	10.36%
Total	1236	100.00%

第二章 實驗材料及方法 (Materials and Methods)

第一節 實驗流程 (Experimented flow chart)

實驗流程圖 [26]

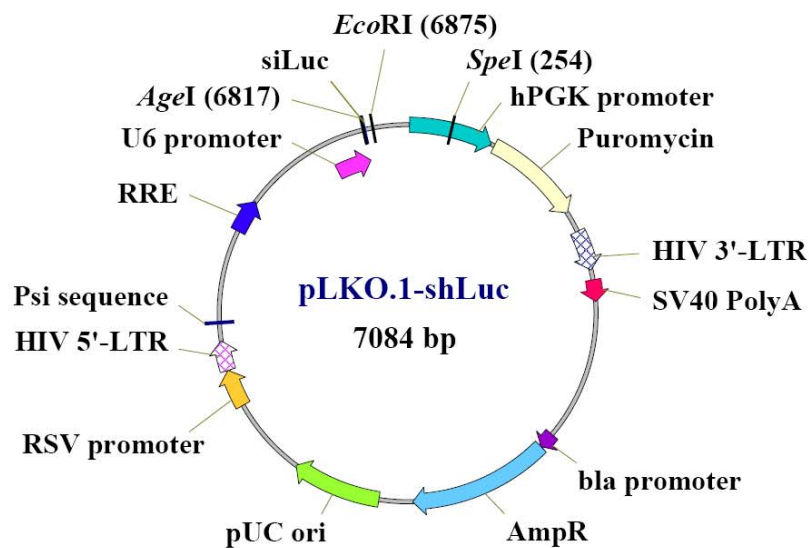


第二節 實驗材料 (Material)

細胞株 (cell line)

HSC-3 為一惡性度高的舌癌細胞，從高雄醫學院獲得，以 DMEM/F12 培養液含 10% FBS (Hyclone) 培養。細胞培養箱的溫度為 37°C，CO₂ 濃度為 5%。

慢病毒載體結構；(圖十三)



Description:

PLKO.1-shLuc is a luciferase shRNA-expressing plasmid. AgeI and EcoRI sites are retained on this plasmid, thus it can be used as a cloning vector for constructing your shRNA of interest.

Location of features:

- Human phosphoglycerate kinase (hPGK) promoter: 1-507
- Puromycin: 529-1128
- HIV 3' long terminal repeat (HIV 3'-LTR): 1255-1499
- SV40 polyA: 1561-1691 bla promoter: 2551-2649
- Ampicillin resistance (AmpR): 2650-3507
- pUC origin of replication (pUC ori): 3711-4251
- RSV promoter: 4736-4964
- HIV 5' long terminal repeat (HIV 5'-LTR): 4965-5145
- RNA packaging signal (Psi) sequence: 5256-5300
- Rev response element (RRE): 5821-6025
- U6 promoter: 6571-6818
- shLuc: 6822-6868

(中央研究院 RNAi 核心設施提供)

第三節 病毒力價實驗 (Virus tittering)

實驗目的

病毒對於每種細胞株有不同的感染力，為了使用最適合的病毒劑量，可藉由不同濃度的 shLuc 慢病毒感染細胞後，藉由細胞存活率試驗，作出一標準曲線。以算出病毒相對定量的單位 (R.I.U.)，再經由公式計算，可得知實驗中病毒感染的最佳劑量。

實驗材料

1. HSC-3 細胞
2. shLuc VSV-G 假型慢病毒(Pseudotype Lentivirus)
3. 細胞培養液 DMEM/F12 培養液含 10% FBS (Hyclone)
4. Polybrene
5. Puromycin
6. CCK-8 試劑
7. P2 級實驗室 (由 14F 中國醫藥大學醫技系 提供)

實驗流程

將 3000 顆 HSC-3 細胞種至 96 孔盤中，以 DMEM/F12 培養液含 10% FBS (Hyclone) 置於恆溫培養箱一天；24 小時後，將 shLuc 慢病毒原液以培養液兩倍稀釋成不同濃度 (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ; $\mu\text{L} / 5 \mu\text{L}$)，如下表所列。

Dilution No.	Virus stock or previous dilution (μL)	Media (μL)	Total Volume(μL)	Volume removed (μL)	Volume remaining (μL)	μL virus per 5 μL
1	80	20	100	50	50	4
2	50	50	100	50	50	2
3	50	50	100	50	50	1
4	50	50	100	50	50	0.5
5	50	50	100	50	50	0.25
6	50	50	100	0	100	0.125
Blank	0	50	50	0	50	0

將細胞培養液加入polybrene (陽離子聚合物，增加細胞轉染效率)，濃度分別用5 µg/mL與10 µg/mL，以得到較佳病毒感染實驗條件。之後，將原來細胞培養液換成含有 polybrene 的培養液，再依序將剛剛稀釋好的病毒液加入96 孔盤中。24小時後，換成含有 puromycin 的細胞培養液，濃度分別用5 µg/mL與10 µg/mL，篩選轉染成功的細胞。(shLuc慢病毒載體序列帶有 anti-puromycin 的基因，所以加入 puromycin 後仍能繼續生長；未轉染成功的細胞，在含 puromycin 的培養液中則會死亡)。48小時後，加入細胞存活率檢測試劑 CCK-8 (10 µL)。CCK-8為一 tetrazolium salt 與活細胞內的 dehydrogenase 作用後，產生黃色的 formazan 物質，顏色越深表示活的細胞數越多。作用3小時後，用 ELISA reader 於波長nm 450條件下，分析細胞的存活率。用Excel畫出病毒濃度與細胞存活率的標準曲線，比較不同試劑條件的轉染效率，並計算出HSC-3的病毒相對定量單位 (R.I.U.)。

(詳細步驟流程請參閱 National RNAi core facility, TRC protocol)

實驗步驟

1. 將 3000 顆 HSC-3 種於 96 孔盤(含 100 µL 之 DMEM/F12+10% FBS 培養液)，置於細胞培養箱。
2. 24小時後,將原來的細胞培養液換成45 µL含10 µg/ml polybrene 或含 5 µg/ml polybrene的細胞培養液，置於細胞培養箱。
3. 稀釋病毒原液(shLuc VSV-G 假型慢病毒， 1.8×10^4 R.I.U/µl、4 µL/ 5 µL；中央研究院 RNAi 核心設施)；成不同濃度(2, 1, 0.5, 0.25, 0.125,

0.0625 μL / 5 μL)。依序將稀釋好的病毒加 5 μL 於 96 孔盤中，置於細胞培養箱。

- 24小時後，取出細胞培養液並用 DPBS (100 μL) 清洗殘餘的病毒，置換成含有 puromycin 的培養液 100 μL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，置於細胞培養箱。
- 48小時後，加入 CCK-8 試劑 (10 μL)，置放於細胞培養箱 3 小時後，以 ELISA reader 在波長 450 nm 條件下，測量吸光值並分析細胞的存活率。
- 用 Excel 軟體畫出病毒濃度與細胞存活率的標準曲線，比較不同試劑條件的轉染效率，並計算出 HSC-3 的病毒相對定量單位 (R.I.U.) (參考下列公式)。

病毒相對定量單位(R.I.U.)的計算

從中央研究院 RNAi 核心設施所訂購的 71 盤 shRNA 慢病毒的病毒濃度是已知，乃是以 A549 細胞株測試的 averages R.I.U. 值 (relative infection unit)。R.I.U 是計算病毒感染細胞的相對定量單位。但是因為同一種病毒感染不同的細胞株，所需的單位劑量皆有所不同，所以我們利用下面的公式，將 71 盤 A549 細胞株測試的 averages R.I.U. 值，轉換成 HSC-3 細胞株的 R.I.U 值，使病毒感染實驗的劑量使用更加準確。先從 HSC-3 的病毒力價實驗中所測得的標準曲線中，在線性的範圍中選擇病毒體積為 1 μL 時，所對應的細胞存活率(例如:為 46.51%)，算出 HSC-3 control virus (shLuc) R.I.U，再利用 71 盤 A549 細胞株測試的 averages R.I.U. 值，轉換成 HSC-3 細胞株的 R.I.U 值，詳細步驟如下：

病毒相對定量單位 (R.I.U.) 的計算公式:

1. 計算 HSC-3的 control virus (shLuc) R.I.U

$$\begin{aligned} & (46.51\% \text{ 細胞存活率} \times 3000 \text{ 細胞數}) / 1\mu\text{L}(\text{病毒體積}) \\ & = 1395.3 \text{ R.I.U./} \mu\text{L} \end{aligned}$$

2. 轉換 A549的R.I.U值成HSC-3的R.I.U.值

$$R.I.U_N = R.I.U_O \times (R.I.U_{\text{remeasured}} / R.I.U_{\text{standard}})$$

N = New (實驗細胞的R.I.U.值)

O = 中研院用A549測出的平均R.I.U.值

remeasured = 利用shLuc病毒力價實驗測得HSC-3的R.I.U.

standard = 中研院提供的shLuc病毒標準劑量(1.8×10^4 R.I.U./ μL)

舉例說明:

中研院提供我們KP001盤的A549平均R.I.U = 5513 R.I.U./ μL

$$\begin{aligned} R.I.U_N &= 5513 \times (1395.3 / 1.8 \times 10^4) \\ &= 427.38 \text{ R.I.U./} \mu\text{L} \end{aligned}$$

3. M.O.I 的建議使用值為2~3，我們取M.O.I = 3 (M.O.I, the multiplicity of infection；病毒感染劑量，指感染一個細胞所需的病毒量；M.O.I = 3表示感染一顆細胞需要三個病毒)。

$$\text{KP001 盤} = (3000 \text{ cells} \times 3) / 427.38 = 21.06 \mu\text{L}$$

所以，我們之後利用此公式，算出每一盤的使用體積，詳見表九。

表九、71 盤病毒使用量

KP no.	KP1	KP2	KP3	KP4	KP5	KP6	KP7	KP8	KP9	KP10
平均 RIU	5513	7149	13085	6957	8943	12882	10619	13004	17136	16933
RIU	427.38	554.17	1014.32	539.25	693.27	998.60	823.15	1008.02	1328.33	1312.61
ul(MOI=3)	21.06	16.24	8.87	16.69	12.98	9.01	10.93	8.93	6.78	6.86
KP no.	KP11	KP12	KP13	KP14	KP15	KP16	KP17	KP18	KP19	KP20
平均 RIU	10988	18170	8909	12718	9921	6399	13429	13975	13725	13024
RIU	851.76	1408.48	690.58	985.87	769.06	496.01	1040.94	1083.26	1063.94	1009.59
ul(MOI=3)	10.57	6.39	13.03	9.13	11.70	18.14	8.65	8.31	8.46	8.91
KP no.	KP21	KP22	KP23	KP24	KP25	KP26	KP27	KP28	KP29	KP30
平均 RIU	10662	12303	16153	19878	10559	17620	17581	18140	21586	18832
RIU	826.51	953.70	1252.11	1540.85	818.51	1365.82	1362.79	1406.17	1673.25	1459.82
ul(MOI=3)	10.89	9.44	7.19	5.84	11.00	6.59	6.60	6.40	5.38	6.17
KP no.	KP31	KP32	KP33	KP34	KP35	KP36	KP37	KP38	KP39	KP40
平均 RIU	17904	19521	12040			7580	16754	17166	17692	16652
RIU	1387.82	1513.19	933.28			574.84	1281.75	1330.62	1371.40	1285.94
ul(MOI=3)	6.48	5.95	9.64			15.66	7.02	6.76	6.56	7.00
KP no.	KP41	KP42	KP43	KP44	KP45	KP46	KP47	KP48	KP49	KP50
平均 RIU	19116	15298	12593	13301	15523	17771	15749	15264	12727	17213
RIU	1481.82	1185.88	976.15	1031.05	1203.30	1377.52	1220.81	1183.23	986.59	1334.32
ul(MOI=3)	6.07	7.59	9.22	8.73	7.48	6.53	7.37	7.61	9.12	6.74
KP no.	KP51	KP52	KP53	KP54	KP55	KP56	KP57	KP58	KP59	KP60
平均 RIU	17396	18889	17733	14606	13601	18862	11848	15154	14151	12847
RIU	1348.47	1464.23	1374.58	1132.18	1054.32	1462.09	918.38	1174.71	1096.93	995.82
ul(MOI=3)	6.67	6.15	6.55	7.95	8.54	6.16	9.80	7.66	8.20	9.04
KP no.	KP61	KP62	KP63	KP64	KP65	KP66	KP67	KP68	KP69	KP70
平均 RIU	23877	19947	18416	19983	13908	19553	20334	18477	18435	21457
RIU	907.82	1538.26	1419.99	1538.57	1091.94	1515.35	1578.06	1423.59	1422.76	1647.94
ul(MOI=3)	9.91	5.85	6.34	5.85	8.24	5.94	5.70	6.32	6.33	5.46
KP no.	KP71	KP72	KP73							
平均 RIU	19017	12716	8781							
RIU	1462.34	1002.90	983.78							
ul(MOI=3)	6.15	8.97	9.15							

第四節 shRNA 的大規模轉染實驗 (Lentivirus-based shRNA screening)

實驗目的

以慢病毒 (lentivirus) 為載體的 RNAi 篩選平台，進行全面性分析調控人類口腔癌細胞的生長與凋亡的特異性蛋白質基因，總共使用 6502 個 shRNA 序列個標靶 1236 個基因，其中 737 個是蛋白質激酶、209 個蛋白質磷酸水解酶、30 個雙重功能的基因。

實驗材料

1. HSC-3 細胞
2. KP001~073 (共 71 盤 shRNA 慢病毒，於-80°C 冰箱保存)
3. 含 10% FBS (Hyclone)之 DMEM/F12 細胞培養液
4. Polybrene (10 µg/ml)
5. Puromycin (5 µg/ml)
6. CCK-8 試劑
7. P2 級實驗室 (14F 中國醫藥大學醫技系 提供)

實驗流程

根據前述之 shLuc 病毒力價實驗，我們得知 shLuc 病毒劑量，並計算求得各盤之病毒 RIU 值。以及最佳病毒感染實驗條件為 (3000 顆 HSC-3 細胞、polybrene 10 µg/ml 、 puromycin 5 µg/ml)。類似於前述之病毒力價實驗步驟，將 3000 顆 HSC-3 細胞種入含 100 µL DMEM /F12 /10% FBS 培養液之 96 孔盤中，置於恆溫培養箱一天；24 小時後，換掉原來的培養液，加

入 100 μL 含 polybrene (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培養液後，加入剛解凍的 shRNA 慢病毒載體 (MOI=3，參考表九所計算出每盤應加的病毒體積)，每次約處理 5 盤病毒二重覆實驗。24 小時後，去除細胞培養液並用 DPBS (100 μL) 清洗殘餘的病毒，置換成含有 puromycin (濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培養液 100 μL 以篩選轉染成功的細胞。48 小時後，加入細胞存活率檢測試劑 CCK-8 (10 μL)。反應 3 小時後，用 ELISA reader 測量 OD_{450} ，分析細胞的存活率。實驗結果以 Excel 檔分析整理。

實驗步驟

1. 將 3000 顆 HSC-3 種於 96 孔盤(培養液 DMEM/F12+10% FBS 100 μL)，置於細胞培養箱。
2. 24 小時後，將原來的細胞培養液換成 100 μL 含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene 的細胞培養液，置於細胞培養箱。
3. 解凍 96 孔盤中的 shRNA 慢病毒載體；每次約處理 5 盤(二重覆)，(每盤取量之病毒體積請參考表九)，以 pipette 混合均勻，置於細胞培養箱。
4. 24 小時後，取出細胞培養液並用 DPBS (100 μL) 清洗殘餘的病毒，置換成含有濃度 puromycin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培養液 100 μL ，置於細胞培養箱。
5. 48 小時後，加入 CCK-8 試劑 (10 μL)，以 pipette 混合均勻後，置放於細胞培養箱 3 小時。以 ELISA reader 在波長 450nm 條件下，測量吸光值並，分析細胞的存活率。
6. 用 Excel 整理細胞存活率資料。

第五節 生物資訊軟體 GeneGo 分析 (Bioinformatics Analysis-GeneGO)

GeneGO 簡介 (網址: portal.genego.com)

隨著基因體學及蛋白質體學的發展，有越來越多龐大的數據需要分析，生物資訊分析軟體如雨後春筍不斷推陳出新。GeneGo 是付費線上軟體，其分析資料方便又快速，將相關的資料及基因名稱輸入 Excel 檔，上傳後，軟體可推測可能的分子機轉，並統計分析最有可能的分子作用路徑，還可以比較不同實驗數據的相關性，這對於分析大規模篩選工作的研究人員，無疑是一大福音。

實驗流程

1. 以 Shortest Path 分析可能的分子傳遞路徑。軟體將上傳的資料自動延伸 2~3 個推估的相關基因，經過人為的判斷後，保留與癌症關聯性較高的連結基因，作為初步的分子路徑推測。
2. 以 GeneGo Pathway Maps 評估上傳的資料，出現在那一種已知的分子路徑中，我們可以從圖中了解基因在分子路徑中扮演的角色。軟體能分析數據中的基因大部分參與那些分子路徑，並加以統計分析並列出順位，我們可以藉此進一步判斷篩選的 51 個基因在 HSC-3 細胞中的分子傳遞路徑。
3. 以 GeneGo Pathway Map Folders 分析基因的功能性。軟體將先前分析所有基因參與的分子傳遞路徑，以統計分析預測大部分的路徑所參與的生理功能並列出順位。藉此進一步判斷所篩選的基因影響細胞那些功能。

第三章 實驗結果 (Results)

1. 病毒力價實驗 (Virus titering)

由於 shLuc lentivirus 含有篩選用的 puromycin resistance gene (附錄一)，可使成功感染病毒的細胞在 puromycin 篩選後存活。由初步的 control virus (shLuc VSV-G pseudovirus) 之感染實驗得知較佳實驗條件為 3000 顆 HSC-3 細胞、polybrene 10 µg/ml、puromycin 5 µg/ml。根據此條件，進行病毒力價實驗，分析結果數據，得到口腔癌細胞株 HSC-3 細胞存活率以及 shLuc lentivirus 之 virus titer 的關係圖 (圖十五)，由此可求得感染 HSC-3 的病毒使用劑量及感染成功率之間的比例。將 450 nm 所測得的 O.D. 值和加入的 virus 體積以線性回歸分析 $R^2 = 0.998$ (圖十六)。

Virus stock (µl)	O.D. ₄₅₀	Viability
4	0.458	100.00%
2	0.43566667	95.12%
1	0.213	46.51%
0.5	0.10033333	21.91%
0.25	0.06566667	14.34%
0.125	0.019	4.15%
0.0625	0.016	3.49%
0	0.003	0.66%

取線性部分的病毒濃度為 1 µL / 5 µL 時，對應於 Y 軸的細胞存活率為 46.51%。由此可求得 KP001~KP073 中每盤要加的病毒體積，計算公式如下：

$$1. (46.51\% \text{ 細胞存活率} \times 3000 \text{ 細胞數}) / 1 \mu\text{L (病毒體積)} \\ = 1395.3 \text{ R.I.U.} / \mu\text{L}$$

$$2. \text{KP001 之 R.I.U.}_N = 5513 \times (1395.3 / 1.8 \times 10^4) = 427.38 \text{ R.I.U.} / \mu\text{L}$$

(說明: 5513 是 RNAi core 提供之 KP001 盤的相對病毒(力價)濃度)

3. 當細胞之 MOI = 3 時，用KP001盤病毒感染細胞所需要的病毒溶液體積為：
 $(3000 \text{ cells} \times 3) / 427.38 = 21.06 \mu\text{L}$ (M.O.I=3)

此乃以 KP001 盤作為說明，其餘各盤欲使用病毒體積，以相同方式計算可得知。所得到各盤之 VSV-G pseudotyped lentivirus 感染 HSC-3 的最適當體積（詳見表九）。

2. 1236個shRNA基因篩選流程

篩選數據整理過程如下，以KP-001盤說明：

依照 MOI = 3 時，各盤病毒應使用的體積量來感染HSC-3細胞 1 天，經 puromycin處理 2 天後，分析細胞之存活率，下表乃是以ELISA reader (450 nm) 讀取細胞存活率試驗結果(二重覆實驗)

KP-001-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.153	0.15	1.024	0.152	0.153	0.666	0.84	0.665	1.131	0.827	0.496	0.178
B	0.689	0.759	0.164	0.69	1.131	0.97	0.829	0.944	0.929	0.173	0.526	0.374
C	0.837	0.161	0.756	0.745	0.833	0.859	0.89	1.276	1.133	0.154	0.462	0.361
D	1.025	0.836	0.177	0.691	0.554	0.456	0.574	0.74	0.755	1.21	0.9	0.518
E	0.568	0.9	0.79	1.077	0.931	0.71	0.834	0.574	1.386	0.975	0.664	0.756
F	0.451	0.483	0.895	0.986	0.62	0.943	0.582	0.713	0.679	0.754	0.548	0.564
G	0.495	0.343	0.303	0.479	0.867	0.397	0.327	0.541	0.741	0.953	0.565	0.148
H	0.156	0.585	0.692	0.265	0.648	0.656	1.394	1.246	0.759	0.916	0.148	0.148

KP-001-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.141	0.152	0.981	0.152	0.16	0.398	0.782	0.675	0.964	0.923	0.276	0.181
B	0.598	1.496	0.698	0.901	0.75	0.79	0.777	0.903	1.388	0.176	0.437	0.578
C	0.642	0.165	1.745	1.12	0.804	0.612	0.768	0.57	0.796	0.154	0.375	0.515
D	0.802	0.898	0.181	0.839	0.534	0.498	0.731	0.776	0.719	0.7	0.744	0.657
E	0.588	0.855	0.841	0.946	0.868	0.622	0.94	0.839	0.587	0.764	0.577	0.865
F	0.372	0.451	0.814	1.02	0.73	0.98	1.034	0.832	0.806	0.816	0.596	0.56
G	0.309	0.366	0.35	0.498	0.742	0.46	0.422	0.593	0.574	0.807	0.672	0.151
H	0.142	1.339	0.968	0.318	0.596	0.756	1.505	1.415	0.828	0.774	0.152	0.15

求二重覆實驗結果平均值，如下表：

mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.15	0.15	1.00	0.15	0.16	0.53	0.81	0.67	1.05	0.88	0.39	0.18
B	0.64	1.13	0.43	0.80	0.94	0.88	0.80	0.92	1.16	0.17	0.48	0.48
C	0.74	0.16	1.25	0.93	0.82	0.74	0.83	0.92	0.96	0.15	0.42	0.44
D	0.91	0.87	0.18	0.77	0.54	0.48	0.65	0.76	0.74	0.96	0.82	0.59
E	0.58	0.88	0.82	1.01	0.90	0.67	0.89	0.71	0.99	0.87	0.62	0.81
F	0.41	0.47	0.85	1.00	0.68	0.96	0.81	0.77	0.74	0.79	0.57	0.56
G	0.40	0.35	0.33	0.49	0.80	0.43	0.37	0.57	0.66	0.88	0.62	0.15
H	0.15	0.96	0.83	0.29	0.62	0.71	1.45	1.33	0.79	0.85	0.15	0.15
									0.82		0.15	

黃色部份: 控制組病毒 shLuc，所帶的 shRNA 不影響細胞 mRNA 的運作。將

兩個數據平均後，得到 O.D = 0.82。

橘色部份: Blank 值(不含細胞，只有細胞培養液)，平均值為 0.15

將平均結果換算成細胞存活率及生長抑制百分比

細胞存活率% = (平均吸光值 - Blank 值) / (控制組病毒shLuc吸光值 - Blank 值)

生長抑制率% = 1 - 細胞存活率%

Viability	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0%	0%	127%	0%	1%	57%	98%	77%	134%	108%	35%	4%
B	73%	146%	42%	96%	118%	109%	97%	115%	150%	3%	49%	48%
C	88%	2%	164%	116%	99%	87%	101%	115%	121%	0%	40%	43%
D	114%	107%	4%	91%	58%	48%	75%	90%	87%	120%	100%	65%
E	63%	108%	99%	128%	111%	77%	110%	83%	124%	107%	70%	98%
F	39%	47%	105%	127%	78%	121%	98%	93%	88%	94%	63%	61%
G	37%	30%	26%	50%	97%	41%	33%	62%	75%	109%	70%	0%
H	0%	121%	101%	21%	70%	83%	194%	176%	96%	103%	0%	0%

Growth inhibition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	99%	-27%	99%	98%	42%	1%	22%	-34%	-8%	64%	95%
B	26%	-46%	57%	3%	-18%	-9%	2%	-15%	-50%	96%	50%	51%
C	11%	97%	-64%	-16%	0%	12%	-1%	-15%	-21%	99%	59%	56%
D	-14%	-7%	95%	8%	41%	51%	24%	9%	12%	-20%	-0%	34%
E	36%	-8%	0%	-28%	-11%	22%	-10%	16%	-24%	-7%	29%	1%
F	60%	52%	-5%	-27%	21%	-21%	1%	6%	11%	5%	36%	38%
G	62%	69%	73%	49%	2%	58%	66%	37%	24%	-9%	29%	100%
H	100%	-21%	-1%	78%	29%	16%	-94%	-76%	3%	-3%	99%	100%

統整資料

將細胞存活率與生長抑制率的結果與中研院給我們 KP 001-073 共 71 盤中所有 shRNA Lentivirus 標靶的基因清單合併，成為我們的篩選資料庫，以下列舉 KP001 為範例。

KP plate Name			Gene Name abbreviation	Viability (%)	Growth inhibition (%)
KP001	A	1	DDX3X	-0.37%	100.37%
KP001	A	2	DDX3X	0.22%	99.78%
KP001	A	3	DDX3X	127.36%	-27.36%
KP001	A	4	DDX3X	0.37%	99.63%
KP001	A	5	DDX3X	1.05%	98.95%
KP001	A	6	DHX15	57.11%	42.89%
KP001	A	7	DHX15	98.77%	1.23%
KP001	A	8	DHX15	77.72%	22.28%
KP001	A	9	DHX15	134.08%	-34.08%
KP001	A	10	DHX15	108.32%	-8.32%
KP001	A	11	SNRP70	35.31%	64.69%
KP001	A	12	SNRP70	4.48%	95.52%
KP001	B	1	SNRP70	73.76%	26.24%
KP001	B	2	SNRP70	146.02%	-46.02%
KP001	B	3	SNRP70	42.03%	57.97%
KP001	B	4	PRPF18	96.45%	3.55%
KP001	B	5		118.10%	-18.10%
KP001	B	6	PRPF18	109.07%	-9.07%
KP001	B	7	PRPF18	97.57%	2.43%
KP001	B	8	PRPF18	115.57%	-15.57%
KP001	B	9	DDX3Y	150.65%	-50.65%
KP001	B	10	DDX3Y	3.73%	96.27%
KP001	B	11	DDX3Y	49.57%	50.43%
KP001	B	12	DDX3Y	48.75%	51.25%
KP001	C	1	DDX3Y	88.09%	11.91%
KP001	C	2		2.02%	97.98%
KP001	C	3	DHX8	164.39%	-64.39%

KP001	C	4	DHX8	116.91%	-16.91%
KP001	C	5	DHX8	99.89%	0.11%
KP001	C	6	DHX8	87.50%	12.50%
KP001	C	7	THOC1	101.46%	-1.46%
KP001	C	8	THOC1	115.49%	-15.49%
KP001	C	9	THOC1	121.69%	-21.69%
KP001	C	10	THOC1	0.67%	99.33%
KP001	C	11	THOC1	40.16%	59.84%
KP001	C	12	EWSR1	43.08%	56.92%
KP001	D	1	EWSR1	114.07%	-14.07%
KP001	D	2	EWSR1	107.13%	-7.13%
KP001	D	3	EWSR1	4.40%	95.60%
KP001	D	4	EWSR1	91.90%	8.10%
KP001	D	5	SF3B4	58.90%	41.10%
KP001	D	6	SF3B4	48.90%	51.10%
KP001	D	7	SF3B4	75.10%	24.90%
KP001	D	8	SF3B4	90.85%	9.15%
KP001	D	9	SF3B4	87.72%	12.28%
KP001	D	10	KHDRBS1	120.27%	-20.27%
KP001	D	11	KHDRBS1	100.41%	-0.41%
KP001	D	12	KHDRBS1	65.40%	34.60%
KP001	E	1	KHDRBS1	63.98%	36.02%
KP001	E	2	KHDRBS1	108.70%	-8.70%
KP001	E	3	RNPS1	99.44%	0.56%
KP001	E	4	RNPS1	128.70%	-28.70%
KP001	E	5	RNPS1	111.98%	-11.98%
KP001	E	6	RNPS1	77.12%	22.88%
KP001	E	7	RNPS1	110.12%	-10.12%
KP001	E	8	SF3A3	83.17%	16.83%
KP001	E	9	SF3A3	124.97%	-24.97%
KP001	E	10	SF3A3	107.50%	-7.50%
KP001	E	11	SF3A3	70.32%	29.68%
KP001	E	12	SF3A3	98.69%	1.31%
KP001	F	1	SF3A2	39.12%	60.88%
KP001	F	2	SF3A2	47.41%	52.59%
KP001	F	3	SF3A2	105.26%	-5.26%
KP001	F	4	SF3A2	127.44%	-27.44%
KP001	F	5	SF3A2	78.46%	21.54%

KP001	F	6	KIN	121.24%	-21.24%
KP001	F	7	KIN	98.32%	1.68%
KP001	F	8	KIN	93.02%	6.98%
KP001	F	9	KIN	88.54%	11.46%
KP001	F	10	KIN	94.89%	5.11%
KP001	F	11	SF3B3	63.08%	36.92%
KP001	F	12	SF3B3	61.59%	38.41%
KP001	G	1	SF3B3	37.70%	62.30%
KP001	G	2	SF3B3	30.61%	69.39%
KP001	G	3	SF3B3	26.43%	73.57%
KP001	G	4	SF3B1	50.62%	49.38%
KP001	G	5	SF3B1	97.80%	2.20%
KP001	G	6	SF3B1	41.66%	58.34%
KP001	G	7	SF3B1	33.59%	66.41%
KP001	G	8	SF3B1	62.34%	37.66%
KP001	G	9	SFRS2	75.85%	24.15%
KP001	G	10	SFRS2	109.07%	-9.07%
KP001	G	11	SFRS2	70.03%	29.97%
KP001	G	12	SFRS2	0.00%	100.00%
KP001	H	1	SFRS2	-0.07%	100.07%
KP001	H	2	SFRS2	121.31%	-21.31%
KP001	H	3	SFRS2	101.61%	-1.61%
KP001	H	4	SFRS2	21.20%	78.80%
KP001	H	5	SFRS2	70.55%	29.45%
KP001	H	6	SFRS2	83.09%	16.91%

將不同 shRNA 序列按基因名稱排列分析

(舉例)

SMAD 4：送入 shRNA 後，生長抑制率平均 = 94.435 %

KP plate Name	Gene Name abbreviation	viability	growth inhibition
KP063	SMAD4	33.50%	66.50%
KP063	SMAD4	21.82%	78.18%
KP063	SMAD4	17.19%	82.81%
KP064	SMAD4	3.04%	96.96%
KP064	SMAD4	8.09%	91.91%
KP067	SMAD4	82.98%	17.02%
KP067	SMAD4	52.84%	47.16%
KP067	SMAD4	17.68%	82.32%

TGFBR2：送入 shRNA 後，生長抑制率平均 = 96.735 %

KP plate Name	Gene Name abbreviation	viability	growth inhibition
KP015	TGFBR2	121.94%	-21.94%
KP015	TGFBR2	195.27%	-95.27%
KP015	TGFBR2	154.52%	-54.52%
KP015	TGFBR2	179.46%	-79.46%
KP015	TGFBR2	134.30%	-34.30%
KP020	TGFBR2	127.87%	-27.87%
KP020	TGFBR2	143.09%	-43.09%
KP020	TGFBR2	1.37%	98.63%
KP020	TGFBR2	5.16%	94.84%
KP020	TGFBR2	100.10%	-0.10%
KP068	TGFBR2	56.08%	43.92%
KP068	TGFBR2	112.92%	-12.92%
KP068	TGFBR2	121.74%	-21.74%

中研院的 shRNA 篩選系統內，針對每個基因設計 5~13 個 shRNA。我們將二重覆的實驗結果平均之後，分析每個 shRNA 對於 HSC-3 的生長抑制率 (Growth inhibition)，先將大於 90% 抑制率的序列選取後，再標選出兩個以上的 shRNA 序列抑制相同之基因，取其平均值後製作圖表。

3. 1236 個 shRNA 篩選得到 51 個促進癌細胞生長基因

國家型干擾性核糖核酸核心設施 (National RNAi core facility) 採用干擾性核糖核酸技術聯盟 (The RNAi Consortium; TRC) 的 Lentiviral vector 系統，針對每個基因設計 5~8 個 shRNA。我們將二重覆的實驗結果平均之後，分析每個 shRNA 對於 HSC-3 的生長抑制率 (Growth inhibition)，篩選對於 HSC-3 有重要影響的基因以及細胞訊息傳遞路徑。實驗結果共有 51 個基因共 (123 個 shRNA constructs) 對於 HSC-3 的增殖有重大的影響，當送入這些基因的 shRNA 之後，會抑制 HSC-3 生長達 90% 以上 (表十、圖十七)，圖十七是將這些基因的 shRNA 中對於 HSC-3 生長抑制率達 90% 以上的數據平均後所得到的分析圖，我們推測這些基因在 HSC-3 為促進癌細胞生長基因 (tumor growth promotion genes)。

另外，我們也發現有 42 個基因 (142 個 constructs)，當其 shRNA 被送入細胞後，會造成 HSC-3 細胞存活率上升 (大於 200% 以上)，我們推測這些基因原本在 HSC-3 中應為抑制癌細胞生長基因 (tumor growth inhibition genes)。(附錄三、四；中國醫藥大學高銘欽老師實驗室未發表的研究成果)。

4. 51個促進癌細胞生長基因以TGF-beta為主要訊息傳遞路徑

上述的初步篩選結果共得到 123 個 (對應於 51 genes) 對於 HSC-3 增殖有顯著抑制作用的 shRNA constructs (> 90% growth inhibition)。為了瞭解 51 個基因對 HSC-3 增殖的分子機制及細胞訊息傳遞路徑的影響，使用 GeneGo 軟體來分析預測這些基因彼此之間的關連性。我們先將 51 個促進癌細胞生長基因上傳 GeneGo 分析軟體，以 Shortest Path 模式分析可能的分子傳遞路徑，結果預測了四條可能的訊息傳導路徑 (IPP-1、TGF beta receptor II、EGFR 及 FLT-3)，主要經過 Shc/src 調控下游蛋白質 SMAD4 (圖十八)。再以 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 51 個促進癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，評估其統計意義。分析後，TGF-beta 參與的分子路徑調控，佔所有具有統計意義分子路徑前三名 (表十一、圖十九)，分別是(1) TGF-beta 藉由 MAPK 引起 Epithelial-mesenchymal transition (EMT)的路徑 (圖二十二)。EMT 是一種細胞移動現象，常見於細胞發育過程，與癌細胞的轉移侵犯有關 [41]。共有五個篩選出的基因參與 TGF-beta 藉由 MAPK 引起 EMT 路徑 (TGF-beta receptor type II、Shc、JNK、PTEN、P38MAPK)。 (2) TGF-beta 訊息傳遞路徑(圖二十三)，有六個篩選出的基因參與 TGF-beta 訊息傳遞路徑 (TGF-beta receptor typell、Shc、IKK-beta、P38MAPK、SMAD4、P21)；(3) TGF-beta 調控細胞增生機轉(正常或病態條件下) (圖二十四)，共有五個篩選出的基因參與 (TGF-beta receptor typell、Shc、P38MAPK、SMAD4、JNK)。因此我們 51 個促進癌細胞生長基因以 TGF-beta 為主要訊息傳遞路徑。我們可以推測 TGF-beta 所參與的分子傳遞路徑，對於口腔癌細胞 HSC-3 的生長促進，有明顯的影響。再以 GeneGo Pathway Map Folder 模式分析這 51 個基因

的功能性，其中排名第五的是組織修復與傷口癒合的功能 (圖二十)，而參與此生理功能的分子路徑為 TGF-beta 訊息傳遞路徑 (圖二十一)。

再將 51 個初步篩選的促進癌細胞生長基因中，參與上述推測之三個 TGF-beta 分子傳遞路徑的基因 TGF-beta receptor type II、SMAD4、IKK-beta (IKBKB)、P38MAPK (MAPK 14)、JNK (MAPK9)選出，將針對同一基因之所有 shRNA 序列，比較其對於口腔癌細胞之存活率並生長抑制率的差異。另外將 51 基因中其他 MAP 相關蛋白 (MAP2K1IP1、MAP3K13、MARK4)，加以分析比較所有 shRNA 序列，比較其對於口腔癌細胞之存活率並生長抑制率的差異。

將比較結果整理於下：

(1) 兩個 TGF-beta receptor II 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

共 13 個針對 TGF-beta receptor II 設計的 shRNA 序列，TGFBR2-a 至-m (表十二)。其中 TGFBR-h 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 98.63%；TGFBR-i 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 94.84% (圖二十五、二十六)。

(2) 兩個 SMAD 4 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

共有 8 個針對 SMAD 4 設計的 shRNA 序列，SMAD-a 至-h (表十三)。其中 SMAD 4-d 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 96.96%；SMAD 4-e 的 shRNA 序列對 HSC-3 生長抑制率為 91.91% (圖二十七、二十八)。

(3) 兩個 MAPK9 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

10 個針對 MAPK9 設計的 shRNA 序列 (MAPK9-a 至-j)，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAPK9 的 mRNA，抑制其轉譯作用(表十四)。其中 MAPK9-i 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 90.33%；MAPK9-j 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率 96.65%；平均生長抑制率為 93.49%(圖二十九、三十)。

(4) 三個 MAPK14 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

9 個對 MAPK14 設計的 shRNA 序列 (MAPK14-a 至-i)，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAPK14 的 mRNA，抑制其轉譯作用 (表十五)。其中 MAPK14-g 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 97.94%；MAPK14-h 為 99.52%；MAPK14-i 為 100.48%；平均生長抑制率為 99.31% (圖三十一、三十二)。

(5) 兩個 MAP2K1IP1 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

4 個對 MAP2K1IP1 設計的 shRNA 序列 (MAP2K1IP1-a 至-d)，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAP2K1IP1 的 mRNA，抑制其轉譯作用 (表十六)。其中 MAP2K1IP1-c 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 96.66%；MAP2K1IP1-d 為 99.62%；平均生長抑制率為 98.14% (圖三十三、三十四)。

(6) 兩個 MAP3K13 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

5 個針對 MAP3K13 設計的 shRNA 序列 (MAP3K13-a 至-e)，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAP3K13 的 mRNA，抑制其轉譯作用 (表十七)。其中 MAP3K13-d 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 96.64%；MAP3K13-e 為 99.43%；平均生長抑制率為 98.03% (圖三十五、三十六)。

(7) 兩個 MARK4 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

5 個針對 MARK4 設計的 shRNA 序列 (MARK4-a 至-e)，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MARK4 的 mRNA，抑制其轉譯作用 (表十八)。其中 MARK4-d 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 95.78%；MARK4-e 為 99.18 %；平均生長抑制率為 97.48% (圖三十七、三十八)。

(8) 三個 IKBKB (IKK-beta) 的 shRNA 對 HSC-3 細胞生長抑制達到 90%

5 個針對 IKBKB 設計的 shRNA 序列 (IKBKB-a 至-e)，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 IKBKB 的 mRNA，抑制其轉譯作用 (表十九)。其中 IKBKB-c 的 shRNA 對 HSC-3 生長抑制率為 96.99%、IKBKB-d 為 99.84%；IKBKB-e 為 99.95 %；平均生長抑制率為 98.92% (圖三十九、四十)。

5. 1236 個 shRNA 篩選得到 11 個功能未名的促進癌細胞生長基因

有11個基因(THOC1、CPSF6、SRRM2、ZMAT2、HNRPF、HNRPA3P1、C17orf31、BCL2L11、SHC1、TINF2、Gabra1)是目前未詳知其生理功能的，同樣有生長抑制率達 90% 以上的結果 (表十六、圖三十四)。



第四章 討論 (Discussion)

本篇論文首先以 RNAi 篩選平台，找出可能調控口腔癌細胞生長的基因，並分析其分子致癌機轉。由所篩選出的 51 個促進癌細胞生長基因中，推測 TGF-beta 相關分子路徑為之後主要研究口腔癌標靶的方向，其中 TGF-beta receptor typell、SMAD4、MAPK9、MAPK14、MAP2K1IP1、MAP3K13、MARK4、IKK-beta 可能是主要參與的基因，需進一步證實其是否可作為生物標記 (Biomarker)。

第一節 RNAi 大規模篩選平台討論

1. RNAi 篩選平台的優缺點

由 TRC 設計的 RNAi 篩選平台有許多的優點。主要針對蛋白質激酶(Kinases)及蛋白質磷酸水解酶 (Phosphatases)等 1236 個基因所的合成 6502 個 shRNA 序列，平均一個基因設計約有 5 個不同 mRNA 結合位置的 shRNA，以避免所謂的偏離標地效應 (Off-target effect)。所有的 shRNA 序列由假慢病毒載體攜帶，置放於 96 孔盤中(共 71 盤)，每盤還附有兩孔是 no-targeted 的控制組病毒 shLuc。只需將細胞種於另一 96 孔盤後，將病毒的 96 孔盤轉染至細胞。在實驗操作上避免了如 cDNA microarray 所需抽取細胞的 mRNA，或 Proteomics approach 需要抽蛋白並跑二維電泳等步驟。並且由慢病毒為載體的 shRNA 轉染效率較好，篩選出來的基因若需要進一步由動物實驗證實，亦可直接把以慢病毒為載體的 shRNA 注入動物體內，無需再另外設計載體。實驗的二重覆結果相近，可能有不錯的再現性。有其缺

點為，(1) 因著以病毒為 shRNA 載體，需在 P2 級實驗室全程操作，假若實驗操作不慎，可能造成人體的傷害；(2) 病毒存放於 -80°C 並冰箱存放，使用前需先解凍，若實驗需多次存放，可能造成其感染力下降，所以在轉染過程中，儘量一次完成。在病毒轉染過程，需以人工操作，一批實驗一次只能操作五盤，二重覆(共 71 盤)，如此一個轉染過程耗時五天，在連續的轉染實驗，花了將近兩到三個月的時間才完成，相當費時，若有機械手臂操作，71 盤可一次轉染完成，總共只需五天的時間。在資料的統整與分析上，亦為另一耗時的工作。

2. cDNA microarray 篩選平台的優缺點

過去已有學者藉由基因微陣列 (cDNA microarray) 方式，來篩選口腔癌的特異性生物標記 [42]。此篩選平台是利用抽取口腔癌的組織或細胞的 mRNA，與正常組織的 mRNA，轉成 cDNA 後，與 DNA 晶片上的設計的成千至萬的 DNA 片段進行雜合作用 (Hybridization)，由雜合後產生的螢光加以比對，同樣的需要由生物資訊方法 (Bioinformatics) 分析有顯著差異的基因，作為特異性生物標記 [38]。此平台的優點是能夠大量 (可設計含蓋所有人類基因體的 DNA 片段) 篩選，並且作用時間較短，雜合作用時間大約 16 小時，較為省時。然而其缺點乃是在抽取 mRNA 並轉成 cDNA 的過程較為繁瑣，在實驗過程中需非常小心，避免所抽取的 mRNA 受到污染或破壞；並且其實驗結果的再現性較差，每次的結果可能稍有出入。

3. Proteomics approach 篩選平台的優缺點

相對於基因體醫學，蛋白質體研究方法是直接針對細胞內異常表現的蛋白質，加以比較分析。將疾病組織中粹取的蛋白質(與正常組織的蛋白質)，經由二維凝膠電泳分離後，以 2D 膠體影像分析軟體加以分析比對蛋白質表現差異，選取差異度較高的蛋白作為生物標記，再將膠片上的蛋白質挖取並水解後，用 MALDI-TOF 分析 [39]。同樣地需以生物資訊方法(Bioinformatics) 分析，作進一步的判斷。此平台的優點是由 MALDI-TOF 分析蛋白質，不僅可比較致病蛋白質在量上的增減，也可以明白蛋白質是否有在修飾上的差異。其缺點是在製備二維膠體與蛋白分離過程需注意，避免人為污染膠片，造成膠體黑點，以致誤判結果。



第二節 實驗結果討論

在本實驗中，以 RNAi 大規模篩選口腔癌特異性生物標記，初步篩選 51 個基因對於 HSC-3 細胞有大於 90% 的生長抑制率。之後，由生物資訊軟體分析可能的分子傳遞路徑；我們找出有興趣的路徑，由軟體推測出 TGFBR2 引起 SMAD4 磷酸化作用造成細胞增生；也可能由 TGFBR2 引發 MAPK 相關蛋白磷酸化(或是 NF-KB 分子路徑磷酸化)。此推測的分子傳遞路徑待後續實驗證實。

1. TGFBR2 分子傳遞路徑

TGF-beta 是一種細胞激素(cytokine)，在正常細胞胚胎參與發育調控 (embryonic development)與組織間的恆定(tissue homeostasis) [43]。TGF-beta 的分子傳導路徑的發生，是由 TGF 的分子蛋白 (有四種 TGF-beta 1、2、3、4；TGF-beta 1 常見於癌細胞的調控)，與細胞膜上的受器 TGF-beta receptor type II 結合後，磷酸化受器 TGF-beta receptor type 1，在細胞內進行一連串的訊息傳遞，主要是藉由 SMAD 蛋白作為傳遞分子(亦有非依賴 SMAD 蛋白型的 TGF-beta 訊息傳遞，如 MAPK 等蛋白)，產生癌細胞增生、移動或轉移等現象。研究發現 TGF-beta 的訊息傳遞效應，在癌細胞有促進或抑制的效果，在癌症初期大部份是抑制的作用，而在晚期時反而會促進癌細胞生長並擴散 [44]。在我們的實驗中 TGF-beta receptor type II 的兩個 shRNA(TGFBR2-h、TGFBR2-i)與 SMAD4 的兩個 shRNA(SMAD4-d、SMAD4-e) 抑制 mRNA 的表現後，會造成人類口腔癌細胞 HSC-3 的死亡。

在 GeneGO 軟體推測的分子路徑圖中(圖二十二、二十四)，TGFBR2 會磷酸化下遊的 p38MAPK 即(MAPK 14)，使細胞產生移動的現象。在我們的研究中，TGFBR2 是否會磷酸化口腔癌細胞 HSC-3 的 MAPK14 蛋白，需要進一步由西方墨點法 (Western blot)證實。並且 TGF-beta receptor II 的分子傳遞路徑在口腔癌細胞中的功能性(促進增生、血管新生、腫瘤轉移)也待進一步實驗評估。

2. MAP 相關磷酸化蛋白

MAPK9 (JNK2)

MAP 磷酸化蛋白家族的一員，參與多項細胞處理過程，如：細胞增生、分化、轉錄調控與細胞發育過程。此激酶會與轉錄因子 (transcription factor) 作用，造成細胞不同的表現 (NCBI, Entrez Gene)。過去已有研究發現 MAPK9 (JNK2)在人類頭頸癌細胞中活性增加，會造成癌細胞增生，且與 EGFR、VEGF、IL8 有關，被探討其抑制劑作為頭頸癌的藥物治療的可能性[45]。

MAPK14 (p38)

MAP 磷酸化蛋白家族的一員，參與多項細胞處理過程，如：細胞增生、分化、轉錄調控與細胞發育過程。藉由環境的壓力或發炎反應相關的細胞激素刺激後，由 MAP kinase kinases (MKKs)磷酸化作用或自體磷酸化作用而活化。它的受質有轉錄調控因子 ATF2、MEF2C、MAX；細胞週期調控蛋白質 CDC25B，與抑癌蛋白 p53 (NCBI, Entrez

Gene)。研究發現，若抑制 p38 的活性，會提升癌細胞對放射線治療的敏感性[46]。

MAP2K1IP1

Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1，活化 MAPKK，目前較少研究發現其功能性 (NCBI, Entrez Gene)。

MAP3K13 (LZK)

為 serine/threonine 蛋白激酶家族一員，含有 leucine-zipper motif，其基因位於染色體 3q27。可磷酸化 MAPK8/JNK、MAP2K7/MKK7，於 JNK/SAPK 分子路徑中扮演 MAPKKK (NCBI, Entrez Gene) [47]，目前較少研究其參與癌細胞的作用機轉的相關性。

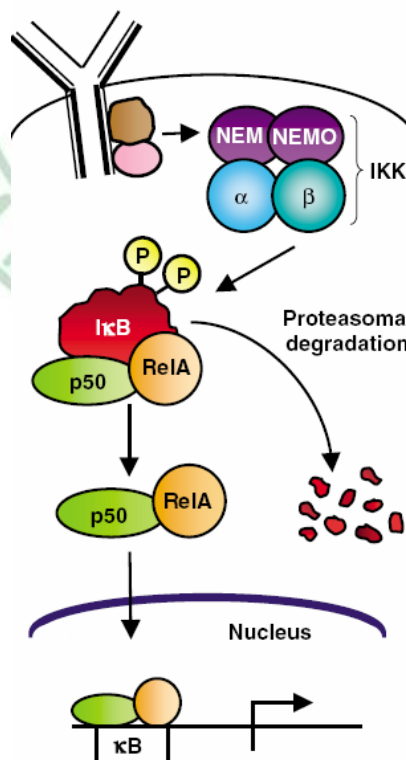
MARK4

MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4，研究指出 MARK4 在大腦中影響神經細胞微管束的形成，可能參與 Alzheimer's disease 中 Tau 蛋白磷酸化的過程[48]。目前較少研究其參與癌細胞的作用機轉的相關性。

3. NF- κ B 分子傳遞路徑

IKBKB (IKK-beta)

IKBKB (IKK-beta)是 NF- κ B 分子傳遞路徑的下游蛋白。在細胞質內 NFKB1 (p50) 或 NFKB2 (p52) 與 Rel 蛋白或 RelA (p65) 或 RelB 結合成為 NF- κ B 複合體蛋白 (NF- κ B complex)；藉由細胞膜上的受器與受質結合活化 IKBKA 或 IKBKB 蛋白質後，使 NF- κ B 複合體蛋白中的 I κ B α 磷酸化，由 ubiquitination 作用將其分解。此時 NF- κ B 複合體蛋白成為活化態，進入細胞核內與特定的 DNA 區段 (response elements ; RE) 結合，影響 DNA 轉錄作用，引起細胞發炎反應或增生等現象。已有許多的研究發現 NF- κ B 傳遞路徑調控頭頸癌細胞的增生作用 [49]。



圖十四、NF- κ B 分子傳遞路徑 [50]

第三節 口腔癌特異性生物標記評估

將以上八個基因之 shRNA 送入細胞後，產生細胞生長抑制的現象。我們推測其原來在 HSC-3 細胞中應是促進癌細胞的增生。由相關的文獻搜尋，得知 IKBKB、TGFB2、SMAD4、MAPK9 (JNK2)、MAPK14 (p38)，已經確定與頭頸癌細胞 (HNSCC) 的增生有關。其中 IKBKB、TGFB2、SMAD4 亦參與頭頸癌細胞的移動與擴散作用。而 MARK4、MAP3K13、MAP2K1IP1，目前尚未研究發現其參與口腔癌的增生作用。

其中 TGFB2、MAPK9、MAPK14，針對不同 mRNA 結合部位設計的 shRNA，有兩極化的結果。TGFB2-a 至-g、TGFB2-l 至-i 造成細胞存活率上升，而 TGFB2-h 與 TGFB2-i 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞存活率下降至 10% 以下；MAPK9-a 至-c 造成細胞存活率上升，而 MAPK9-d 至-j 是抑制細胞生長作用；MAPK14-a 至-c 造成細胞存活率上升，而 MAPK14-d 至-i 是抑制細胞生長作用。這樣的現象可能與不同 shRNA 之非專一性標地有關。

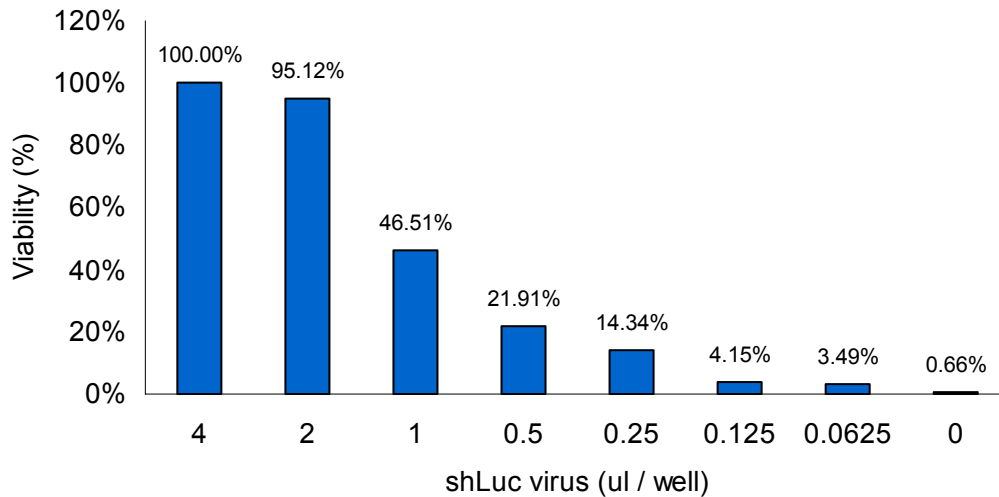
然而，針對 SMAD 4、MAP2K1IP1、MAP3K13、MARK4、IKBKB 不同 mRNA 結合部位設計的 shRNA，皆有相同抑制細胞生長的作用。其中針對 IKBKB 所設計的五個 shRNA 序列，對於口腔癌細胞 HSC-3 的生長現象，均能有效抑制達 50% 以上，為一良好的口腔癌標靶之生物標記。

第四節 未來研究方向

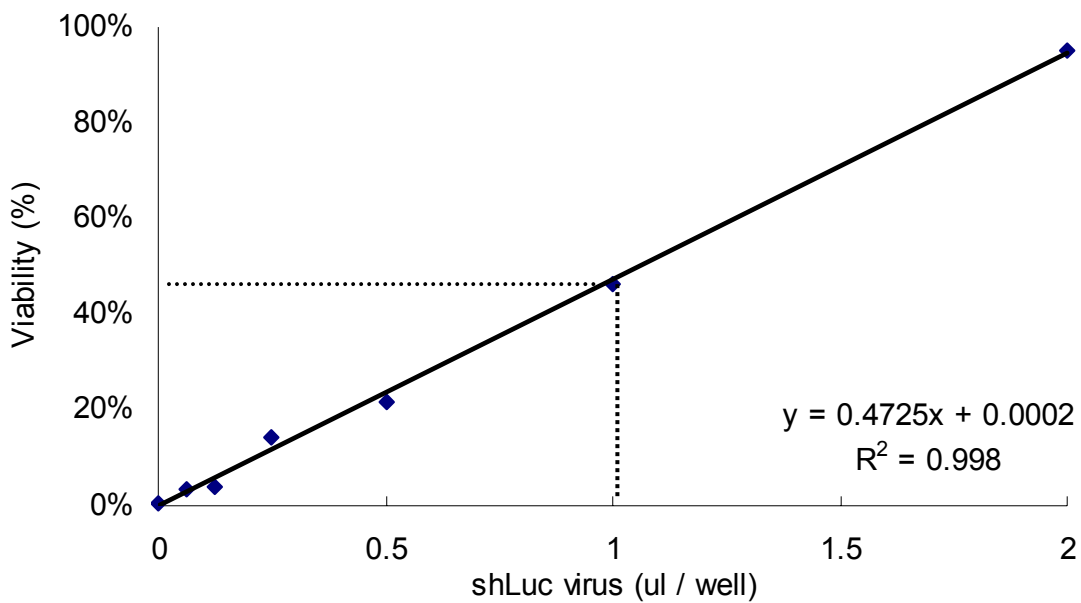
由於本研究只是以口腔癌 HSC-3 細胞株作為 shRNA 篩選對象，所找到 51 個促進口腔癌細胞增生的基因，是否對其他不同癌化或部位之口腔癌細胞亦具同樣之功效，需進一步由實驗來確認之。並且本實驗結果尚未確認將 shRNA 送入細胞後之 mRNA 與蛋白質，其表現量是否因 shRNA 的作用而降低。在動物活體內是否有同樣的抑制作用，亦需實驗進一步評估之。

1. 藉由同樣 shRNA 轉染方法確認在不同口腔癌細胞株中，SMAD 4、MAP2K1IP1、MAP3K13、MARK4、IKBKB 是否具有同樣的作用，找出新穎的口腔癌生物標記。
2. 以 Western blot 確認口腔癌細胞是否藉由 TGFBR2 磷酸化分子路徑(SMAD 4、MAPK、IKBKB)。
3. 以 Transwell assay 分析，受到 TGFBR2、SMAD4、MAPK9 等 shRNA 作用後癌細胞的移動力，藉此研究它們對口腔癌轉移的影響。
4. 以 Flowcytometry method 分析，受到 TGFBR2、SMAD4、MAPK9 等 shRNA 作用後，對於細胞週期的調控與 apoptosis 的影響。
5. 藉由口腔癌誘發小鼠模型，評估 SMAD 4、MAP2K1IP1、MAP3K13、MARK4、IKBKB 的 shRNA，能否有效抑制腫瘤生長，並延長小鼠存活率。
6. 研發針對與口腔癌標地結合的新型臨床治療藥物。

第五章 圖表 (Figures & Tables)



圖十五、shLuc VSV-G 假型慢病毒感染細胞時所用之體積和細胞存活率的關係
將3000顆HSC-3細胞種至96孔盤中，以DMEM/F12 培養液含10% FBS (Hyclone) 置於恆溫培養箱一天；24小時後，將shLuc慢病毒原液以培養液兩倍稀釋成不同濃度 (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ; $\mu\text{L} / 5 \mu\text{L}$)。後，將原來細胞培養液換成含有polybrene的培養液，再依序將剛剛稀釋好的病毒液加入96孔盤中。24小時後，換成含有 puromycin 的細胞培養液，濃度分別用5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，篩選轉染成功的細胞。48小時後，加入細胞存活率檢測試劑 CCK-8 (10 μL)，作用3小時後，用 ELISA reader 於波長nm 450條件下，分析細胞的存活率。



圖十六、病毒力價及細胞存活率之線性分析

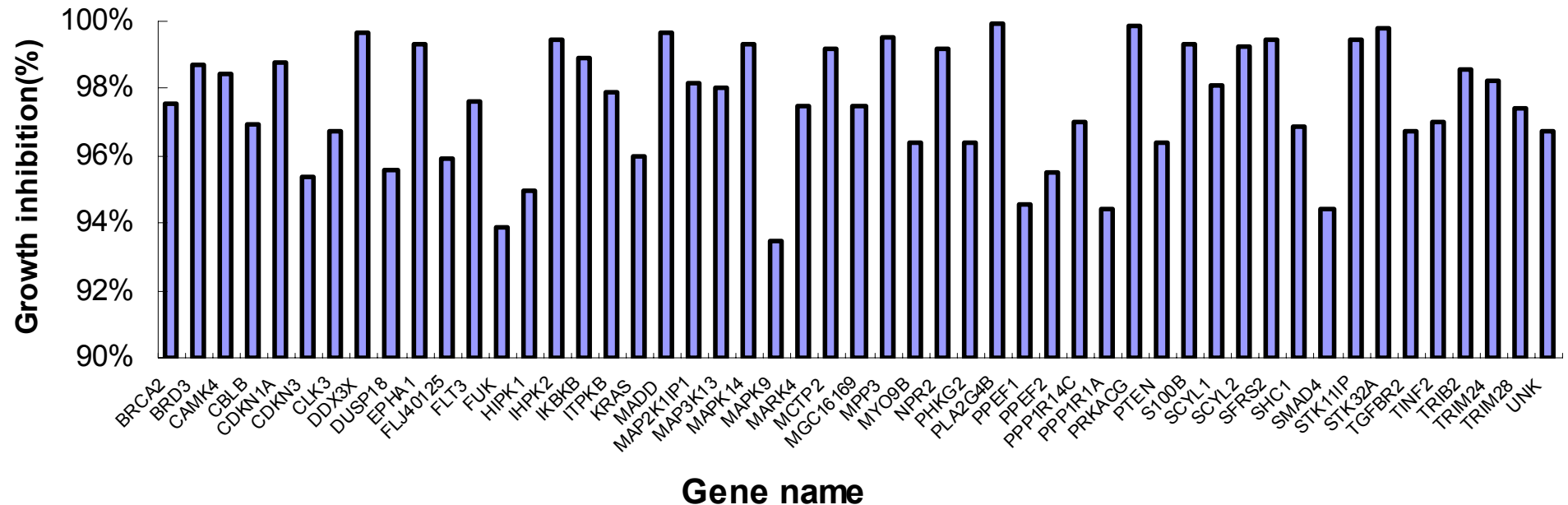
將圖十五的病毒力價實驗及細胞存活率實驗結果轉換成線性， R^2 理想值是大於0.9，本實驗結果是 $R^2=0.998$ 。取線性部分的病毒濃度為 $1 \mu\text{L} / 5 \mu\text{L}$ 時，對應於Y軸的細胞存活率為46.51%。以此得知，KP001~KP073每盤要加的病毒體積。(請參考第二章第三節 病毒相對定量單位 R.I.U.的計算)

表十、1236 個 shRNA 基因篩選結果(51 個促進癌細胞生長基因)

Gene Name Abbreviation	Gene Name	Mean of growth inhibition(%)
BRCA2	breast cancer 2, early onset	97.58%
BRD3	bromodomain containing 3	98.74%
CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	98.43%
CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	96.93%
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	98.76%
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	95.39%
CLK3	CDC-like kinase 3	96.73%
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	99.68%
DUSP18	dual specificity phosphatase 18	95.57%
EPHA1	EPH receptor A1	99.30%
FLJ40125	hypothetical protein FLJ40125	95.90%
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3	97.60%
FUK	fucokinase	93.85%
HIPK1	homeodomain interacting protein kinase 1	94.96%
IHPK2	inositol hexaphosphate kinase 2	99.47%
IKBKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	98.92%
ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	97.90%
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	95.96%
MADD	MAP-kinase activating death domain	99.69%
MAP2K1IP1	mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1	98.14%
MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	98.03%
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	99.31%
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	93.49%
MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	97.48%
MCTP2	multiple C2 domains, transmembrane 2	99.17%
MGC16169	hypothetical protein MGC16169	97.47%
MPP3	membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)	99.52%
MYO9B	myosin IXB	96.38%
NPR2	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atriuretic peptide receptor B)	99.16%

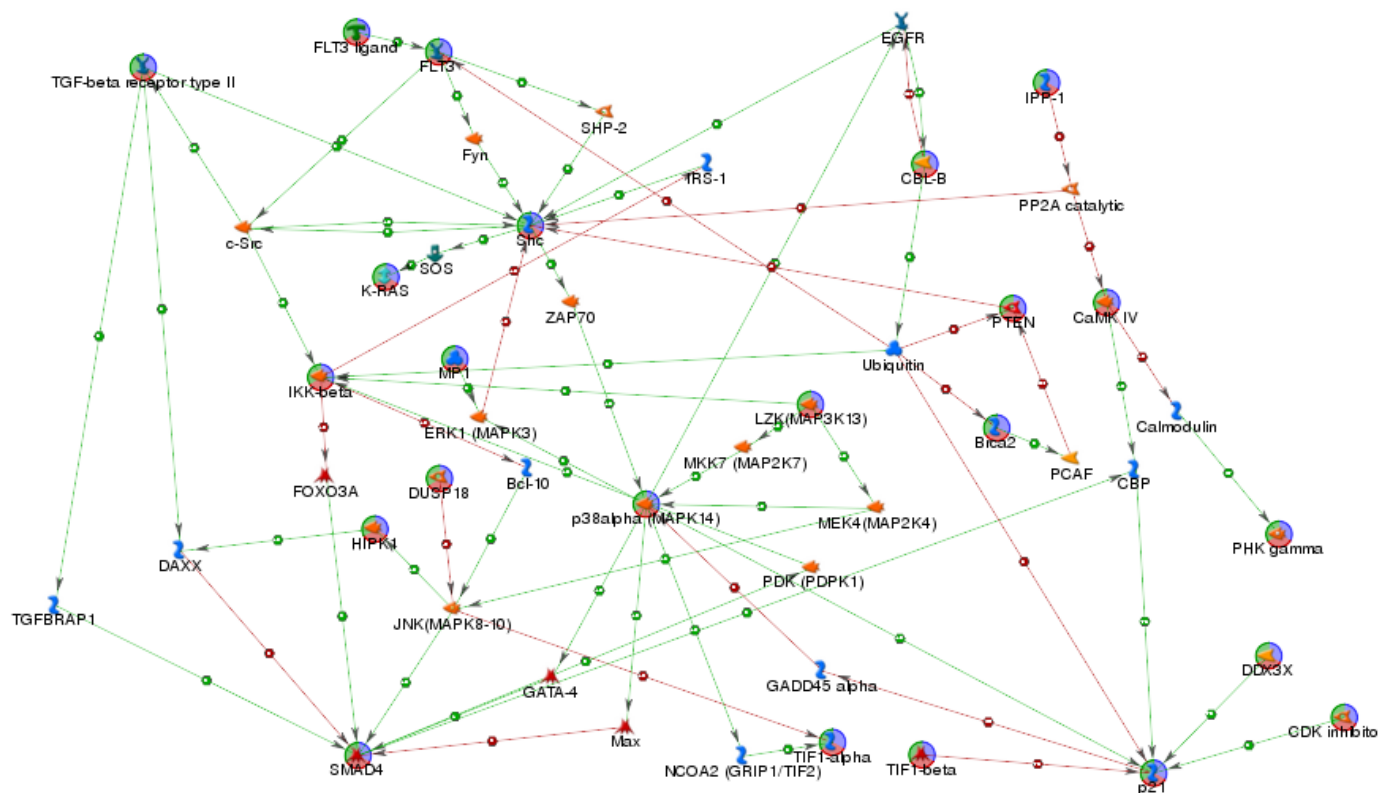
PHKG2	phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)	96.40%
PLA2G4B	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	99.96%
PPEF1	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1	94.53%
PPEF2	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 2	95.53%
PPP1R14C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C	96.98%
PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	94.40%
PRKACG	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma	99.88%
PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	96.36%
S100B	S100 calcium binding protein, beta (neural)	99.33%
SCYL1	SCY1-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	98.09%
SCYL2	SCY1-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	99.25%
SFRS2	splicing factor, arginine/serine-rich 2	99.42%
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	96.86%
SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	94.44%
STK11IP	serine/threonine kinase 11 interacting protein	99.44%
STK32A	serine/threonine kinase 32A	99.78%
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	96.73%
TINF2	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2	96.98%
TRIB2	tribbles homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	98.56%
TRIM24	tripartite motif-containing 24	98.20%
TRIM28	tripartite motif-containing 28	97.39%
UNK	UNK	96.74%

Genes with >90% growth inhibition effect



圖十七、1236 個 shRNA 基因篩選結果(51 個促進癌細胞生長基因)

共有 6502 個針對 1236 個基因 (其中 737 個是蛋白質激酶、209 個蛋白質磷酸水解酶、30 個雙重功能的基因) 設計的序列。以慢病毒 (Lentivirus) 載體將各個 shRNA 轉染至人類口腔癌細胞 HSC-3 細胞株，再以細胞存活試劑 (CCK-8 kit) 測試細胞存活率。我們將二重覆的實驗結果平均之後，分析每個 shRNA 對於 HSC-3 的生長抑制率 (Growth inhibition)，與控制組 non-targeted shLuc 比較後，共有 51 個基因 (123 個 shRNA 序列) 對於 HSC-3 生長抑制率達 90% 以上的數據平均後所得到的分析圖，我們推測這些基因在 HSC-3 為促進癌細胞生長基因 (tumor growth promotion genes)。



圖十八、GeneGo分析51個促進細胞生長基因的分子路徑

上述的初步篩選結果共得到 123 個對於 HSC-3 增殖 (proliferation) 有重要影響的基因的 shRNA constructs (對應於51 genes) (> 90% growth inhibition)。使用 GeneGo 軟體來分析預測這些基因彼此之間的關連性。我們先將51個促進癌細胞生長基因上傳GeneGo分析軟體，以 Shortest Path 模式分析可能的分子傳遞路徑，產生了四條推測的訊息傳導路徑 (IPP-1、TGF beta receptorII、EGFR、FLT-3)，主要經過 Shc/src 調控下游蛋白質 SMAD4，促進細胞的生長。

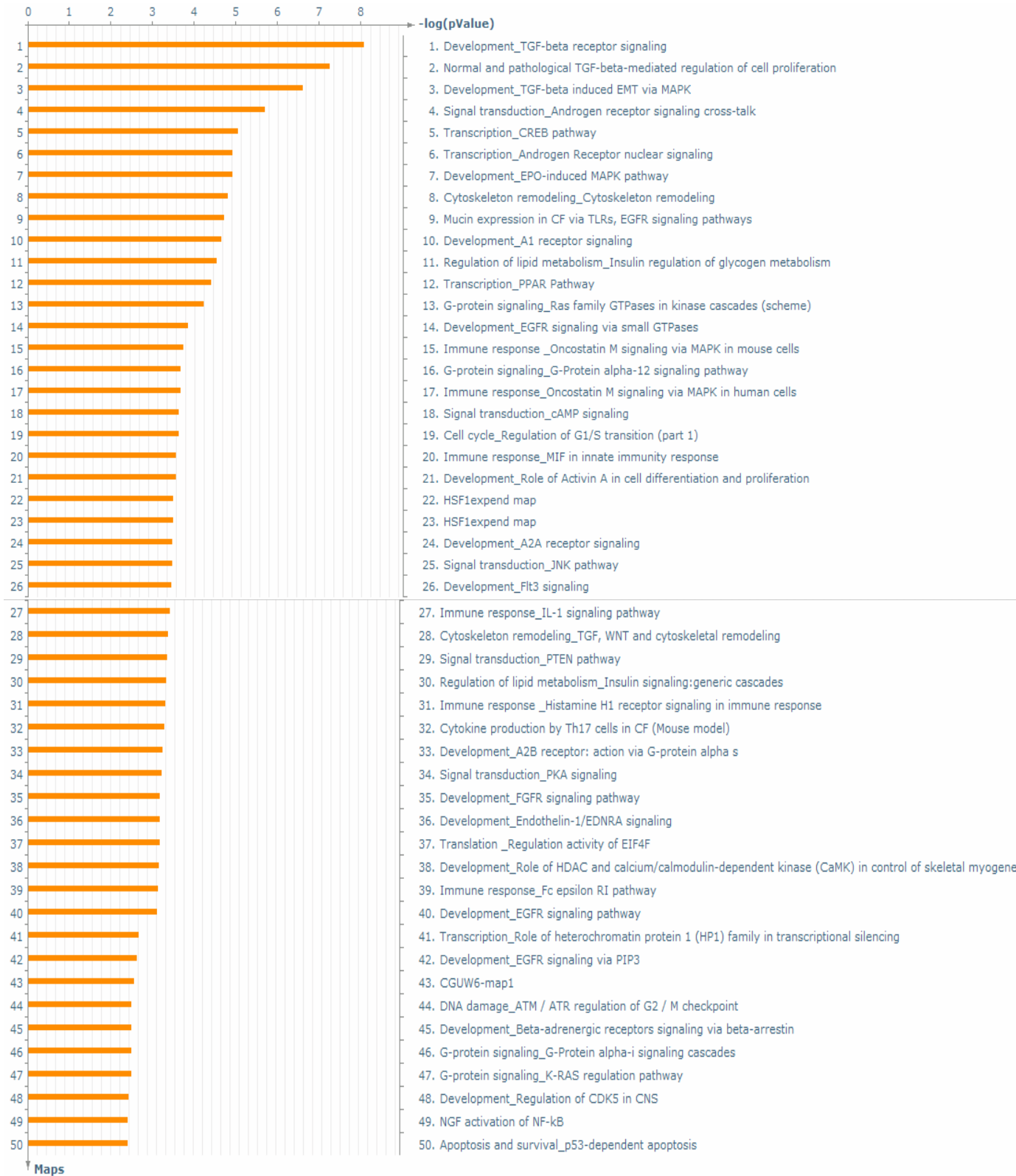
表十一、GeneGo統計分析51個GeneGo促進癌細胞生長基因的分子路徑

	Name	pValue	Network objects
1	Development_TGF-beta receptor signaling	0.00000001	6/49
2	Normal and pathological TGF-beta-mediated regulation of cell proliferation	0.00000005	5/33
3	Development_TGF-beta induced EMT via MAPK	0.00000022	5/44
4	Signal transduction_Androgen receptor signaling cross-talk	0.00000185	5/67
5	Transcription_CREB pathway	0.00000833	4/42
6	Transcription_Androgen Receptor nuclear signaling	0.00001101	4/45
7	Development_EPO-induced MAPK pathway	0.00001101	4/45
8	Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling	0.00001477	5/102
9	Mucin expression in CF via TLRs, EGFR signaling pathways	0.00001823	4/51
10	Development_A1 receptor signaling	0.00002127	4/53
11	Regulation of lipid metabolism_Insulin regulation of glycogen metabolism	0.00002651	4/56
12	Transcription_PPAR Pathway	0.00003726	4/61
13	G-protein signaling_Ras family GTPases in kinase cascades (scheme)	0.00005536	3/24
14	Development_EGFR signaling via small GTPases	0.00013340	3/32
15	Immune response _Oncostatin M signaling via MAPK in mouse cells	0.00017490	3/35
16	G-protein signaling_G-Protein alpha-12 signaling pathway	0.00020680	3/37
17	Immune response_Oncostatin M signaling via MAPK in human cells	0.00020680	3/37
18	Signal transduction_cAMP signaling	0.00022400	3/38
19	Cell cycle_Regulation of G1/S transition (part 1)	0.00022400	3/38
20	Immune response_MIF in innate immunity response	0.00026120	3/40

表十一、 GeneGo統計分析51個GeneGo促進癌細胞生長基因的分子路徑

以 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 51 個促進癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，評估其統計意義。分析後， TGF-beta 參與的分子路徑調控，是所有相關的分子路徑的前三名，分別是 (1) TGF-beta 藉由 MAPK 引起 EMT 的路徑(圖二十二)； (2) TGF-beta 訊息傳遞路徑(圖二十三)； (3) TGF-beta 調控細胞增生機轉(正常或病態條件下) (圖二十四)。

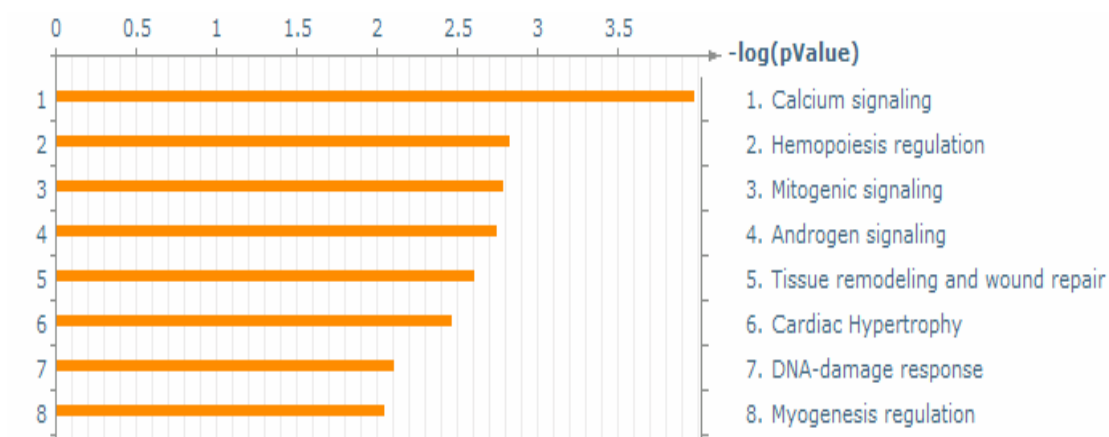
圖十九、GeneGo統計分析51個促進癌細胞生長基因的分子路徑



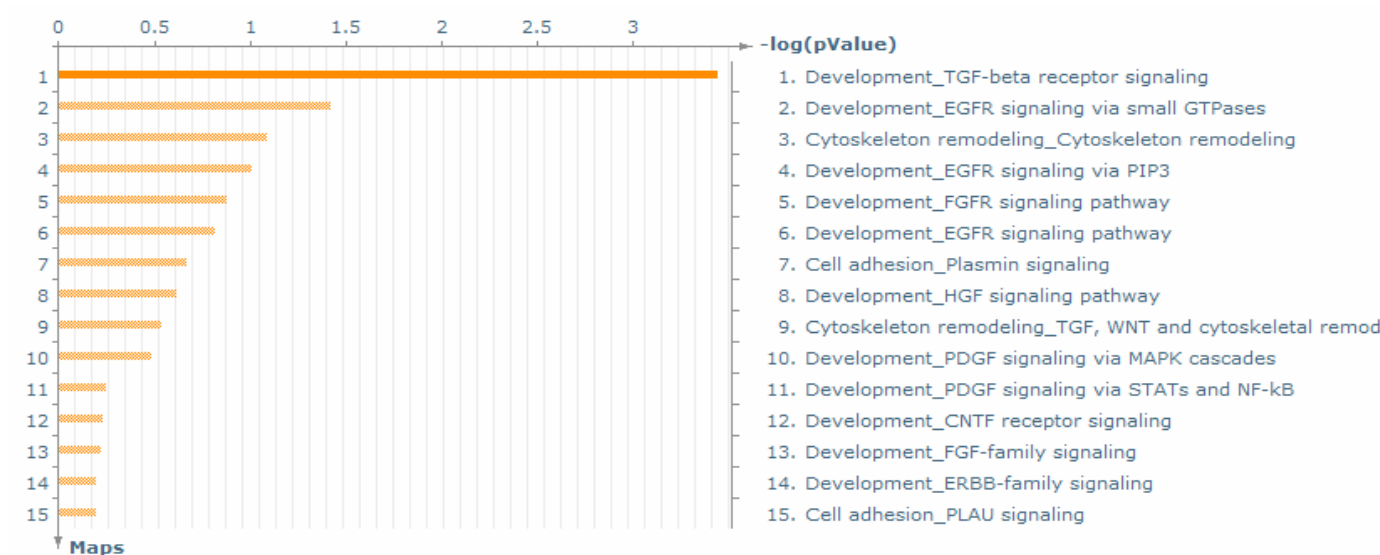
GeneGo統計分析51個促進癌細胞生長基因的分子路徑

表十一的圖表化整理，長條圖方式呈現。

圖二十、GeneGo評估 51個基因的細胞生理功能

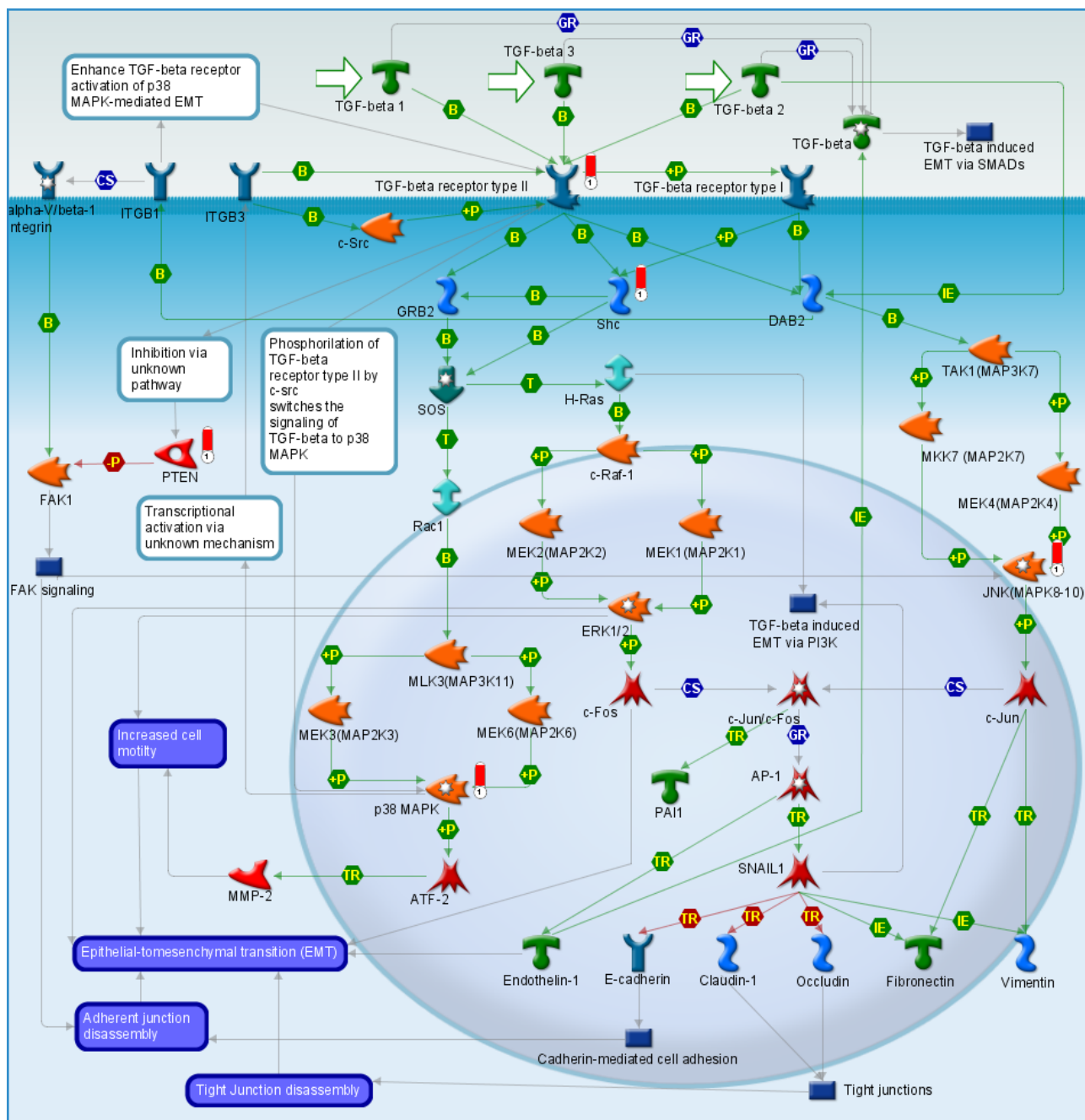


圖二十一、51 個基因調控組織修復的分子路徑



圖二十、二十一 以 GeneGo Pathway Map Folder 模式分析基因的功能性，第五名是組織修復與傷口癒合的功能(圖二十)；參與此生理功能的分子路徑為 TGF-beta 訊息傳遞路徑(圖二十一)。

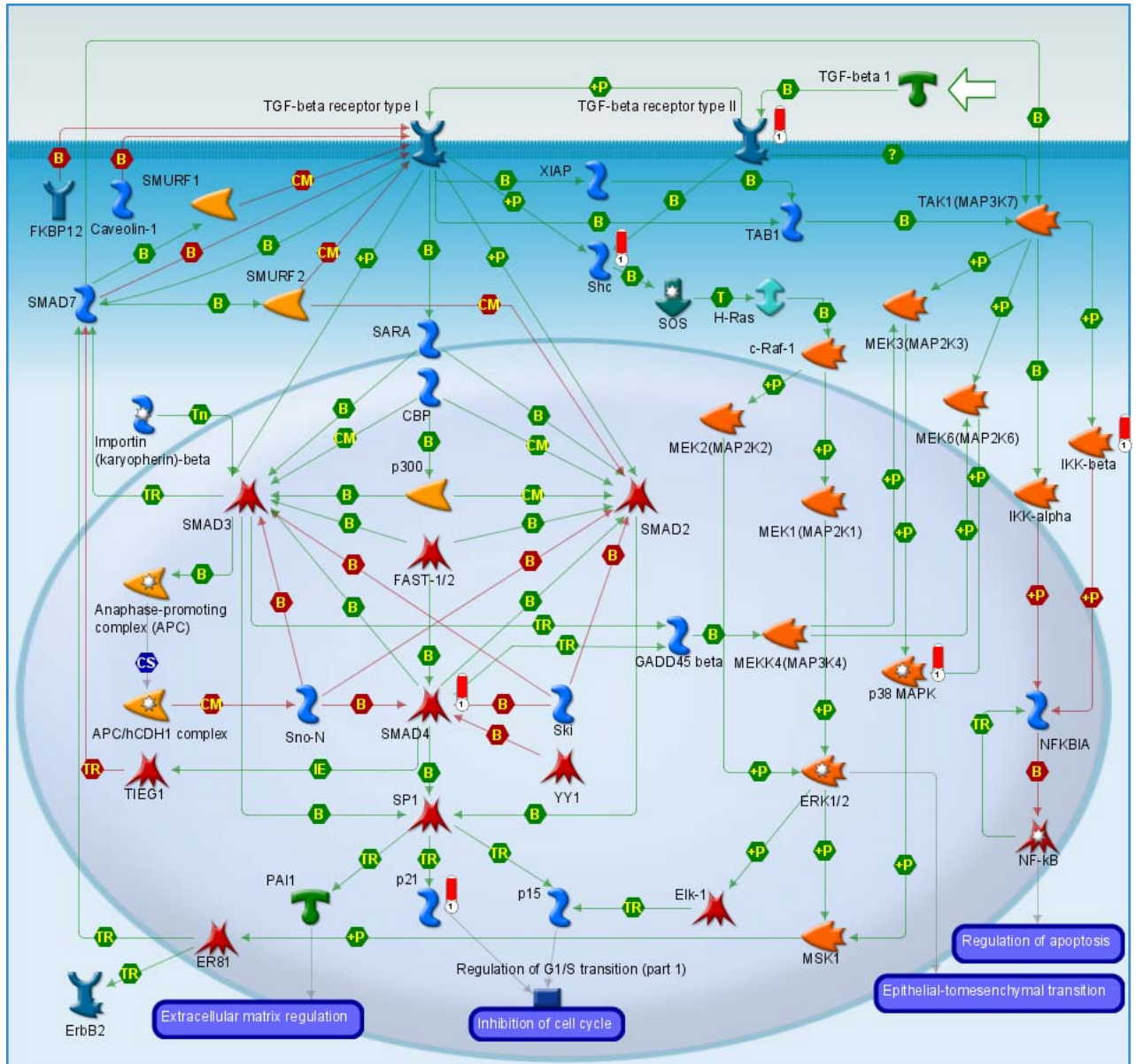
圖二十二、TGF-beta 藉由 MAPK 引起 EMT 的路徑圖



圖二十二、TGF-beta 藉由 MAPK 引起 EMT 的路徑圖

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 51 個促進癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，共有五個基因參與 TGF-beta 藉由 MAPK 引起 (Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT) 的路徑，由圖中紅色長條物所標示的 (TGF-beta receptor typell、Shc、JNK、PTEN、P38MAPK)。

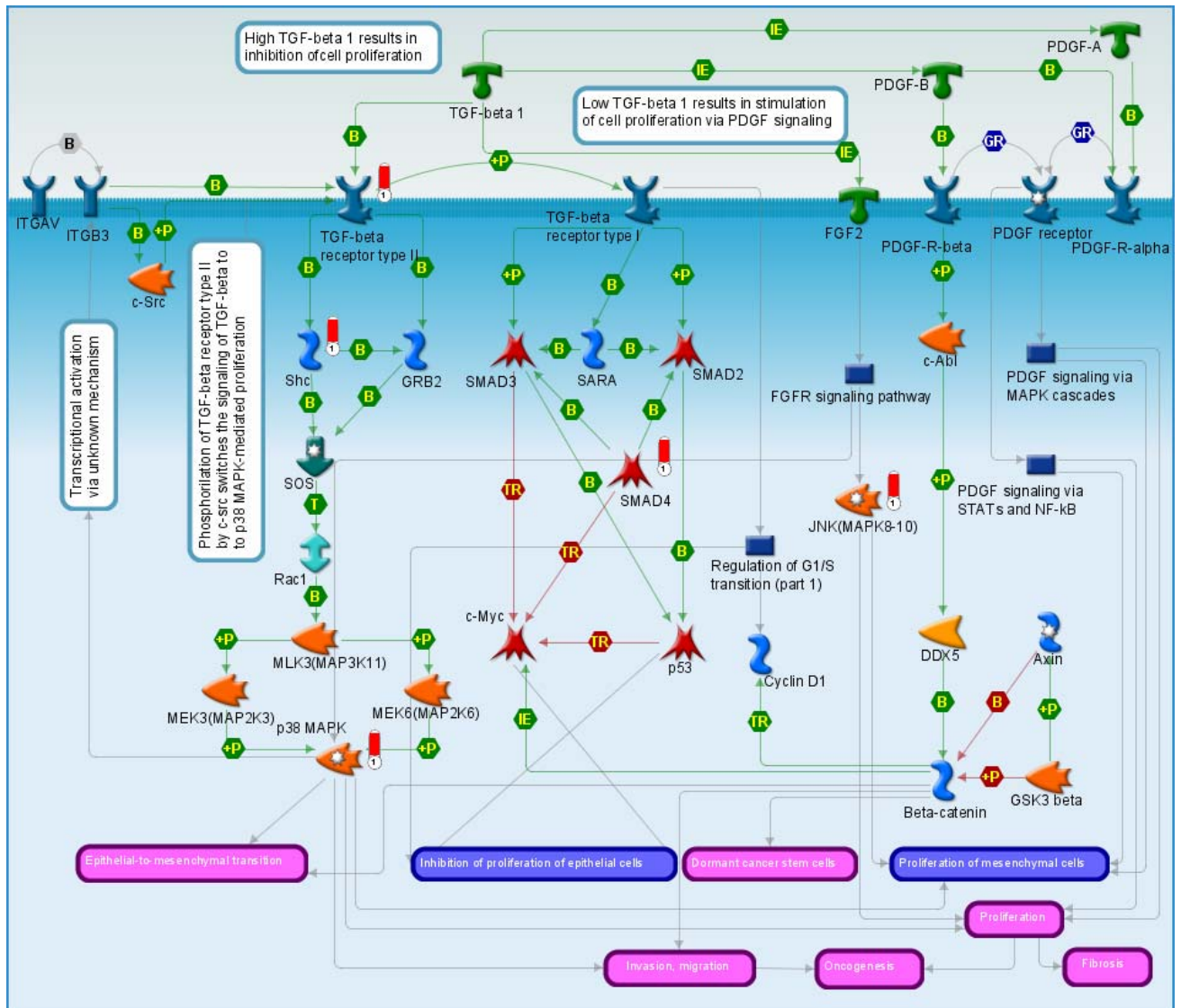
圖二十三、TGF-beta 訊息傳遞路徑圖



圖二十三、TGF-beta 訊息傳遞路徑圖

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 51 個促進癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，共有六個基因參與 TGF-beta 訊息傳遞路徑，由圖中紅色長條物所標示的 (TGF-beta receptor typell、Shc、IKK-beta、P38MAPK、SMAD4、P21)。

圖二十四、TGF-beta 調控細胞增生機轉(正常或病態條件)



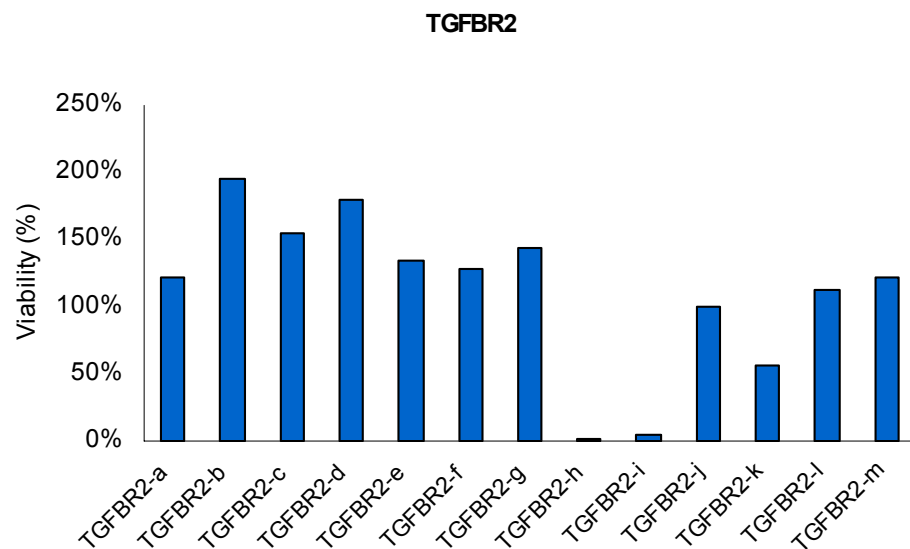
圖二十四、TGF-beta 調控細胞增生機轉(正常或病態條件)

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 51 個促進癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，共有五個基因參與 TGF-beta 調控細胞增生機轉，由圖中紅色長條物所標示的 (TGF-beta receptor typell、Shc、P38MAPK、SMAD4、JNK)。

shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
TGFBR2-a	KP015	G04	TRCN0000040008	CCTGACTTGTTGCTAGTCATA	CDS	121.94%	-21.94%
TGFBR2-b	KP015	G05	TRCN0000040009	GCAAGATACATGGCTCCAGAA	CDS	195.27%	-95.27%
TGFBR2-c	KP015	G06	TRCN0000040010	CGTTCAGAAGTCGGTTAATAA	CDS	154.52%	-54.52%
TGFBR2-d	KP015	G07	TRCN0000040011	GCAGAACACTTCAGAGCAGTT	CDS	179.46%	-79.46%
TGFBR2-e	KP015	G08	TRCN0000040012	GCCTGGTGAGACTTTCTTCAT	CDS	134.30%	-34.30%
TGFBR2-f	KP020	D06	TRCN0000000830	GCTCCCTAAACTACCAAAT	CDS	127.87%	-27.87%
TGFBR2-g	KP020	E06	TRCN0000000831	GAAGAATATAACACCAGCAAT	CDS	143.09%	-43.09%
TGFBR2-h	KP020	F06	TRCN0000000832	TGTGGCTGTATGGAGAAAGAA	CDS	1.37%	98.63%
TGFBR2-i	KP020	G06	TRCN0000000833	GTCGCTTTGCTGAGGTCTATA	CDS	5.16%	94.84%
TGFBR2-j	KP020	H06	TRCN0000000834	CTTCTACTGCTACCGCGTTAA	CDS	100.10%	-0.10%
TGFBR2-k	KP068	D02	TRCN0000010444	CAACAACGGTGCAGTCAAGTT	CDS	56.08%	43.92%
TGFBR2-l	KP068	E02	TRCN0000010445	AATGACGAGAACATAACT	CDS	112.92%	-12.92%
TGFBR2-m	KP068	F02	TRCN0000010446	AGTATGCCTCTTGAAGACA	3UTR	121.74%	-21.74%

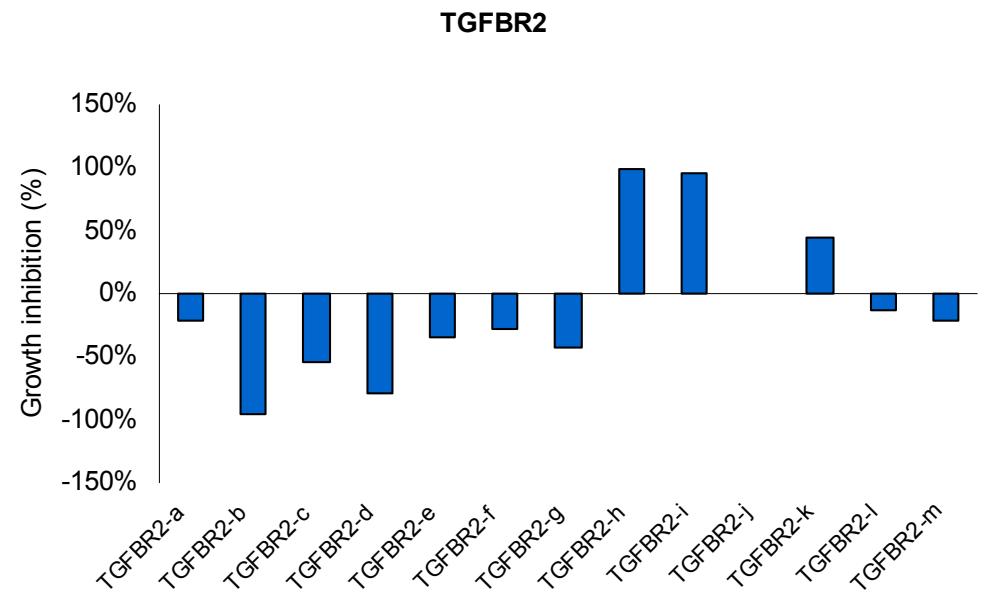
表十二、所有 TGF-beta receptor II 之 shRNA 作用結果比較

13 個針對 TGFBR2 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 TGFBR2 的 mRNA，抑制其轉譯作用。TGFBR2-h 與 TGFBR2-i 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞存活率下降，抑制細胞生長高達 90% 以上。



圖二十五、TGF-beta receptor II 之 shRNA 作用後的細胞存活率

大部份的 TGFB2 的 shRNA 作用於細胞後，皆會使細胞存活率上升。但 TGFB2-h 與 TGFB2-i 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞存活率下降 (<10%)。



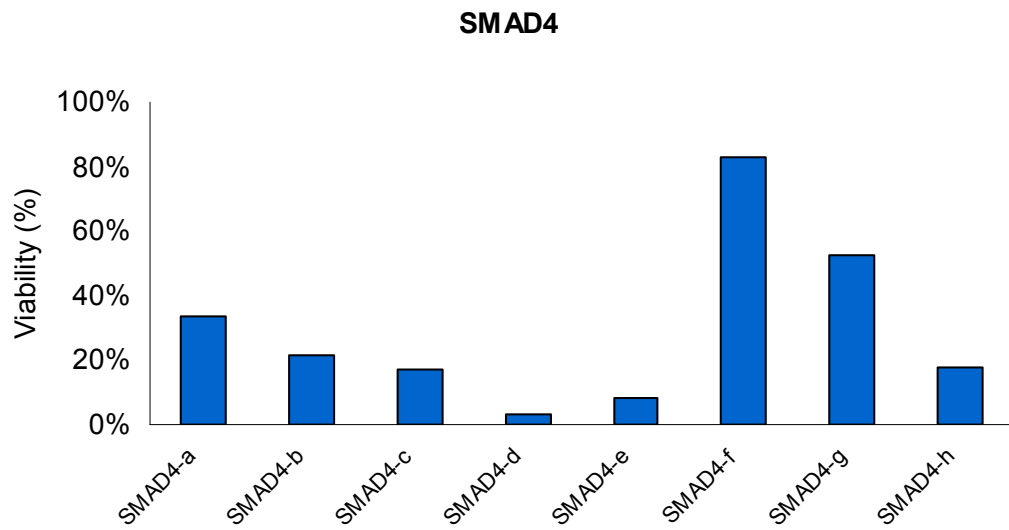
圖二十六、TGF-beta receptor II 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率

大部份的 TGFB2 的 shRNA 作用，並不會造成細胞生長抑制。TGFB2-h 與 TGFB2-i 的 shRNA，抑制細胞生長高達 90% 以上 (h. 98.63%、i. 94.84%、平均生長抑制率 96.73%)。

shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
SMAD4-a	KP063	A12	TRCN0000040029	CCTGAGTATTGGTGTTCATT	CDS	33.50%	66.50%
SMAD4-b	KP063	B12	TRCN0000040030	GCTGCTGGAATTGGTGTGAT	CDS	21.82%	78.18%
SMAD4-c	KP063	H11	TRCN0000040028	GCAGACAGAACTGGATTA	3UTR	17.19%	82.81%
SMAD4-d	KP064	A01	TRCN0000040031	CGAGTTGTATCACCTGGAATT	CDS	3.04%	96.96%
SMAD4-e	KP064	B01	TRCN0000040032	GTACTTCATACCATGCCGATT	CDS	8.09%	91.91%
SMAD4-f	KP067	E02	TRCN0000010321	TACCATACAGAGAACATTGGA	CDS	82.98%	17.02%
SMAD4-g	KP067	F02	TRCN0000010322	TATGCATACTCAGGATGAGTT	CDS	52.84%	47.16%
SMAD4-h	KP067	G02	TRCN0000010323	CAGATTGTCTTGCAACTTCAG	3UTR	17.68%	82.32%

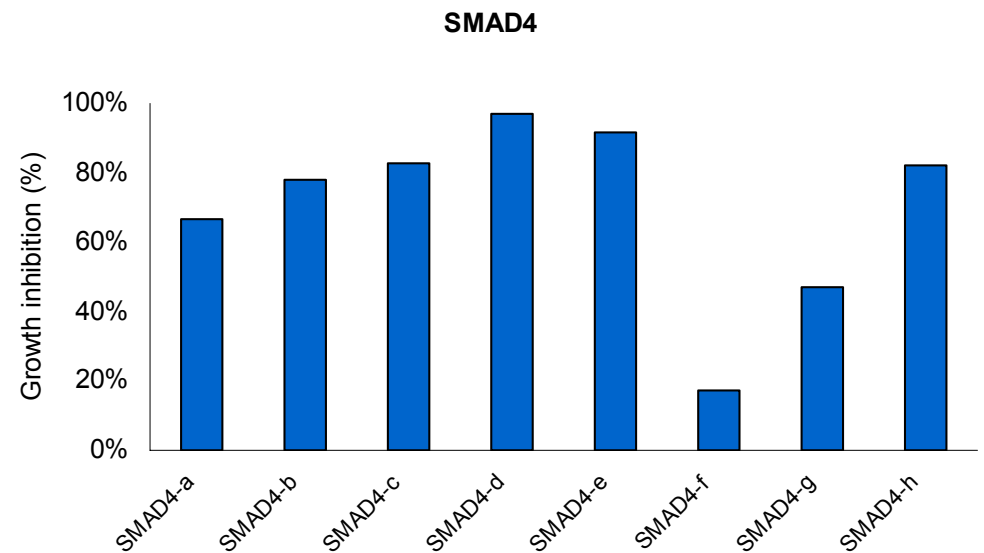
表十三、所有 SMAD 4 之 shRNA 作用結果比較

8 個針對 SMAD 4 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 SMAD 4 的 mRNA，抑制其轉譯作用。SMAD4-d 與 SMAD4-e 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞存活率下降，抑制細胞生長高達 90% 以上。



圖二十七、SMAD 4 之 shRNA 作用後的細胞存活率

大部份 SMAD 4 的 shRNA 作用細胞後，降低細胞的存活率。其中 SMAD 4-d 與 SMAD 4-e 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞存活率低於 10 % (d. 3.04% ; e. 8.09%)。



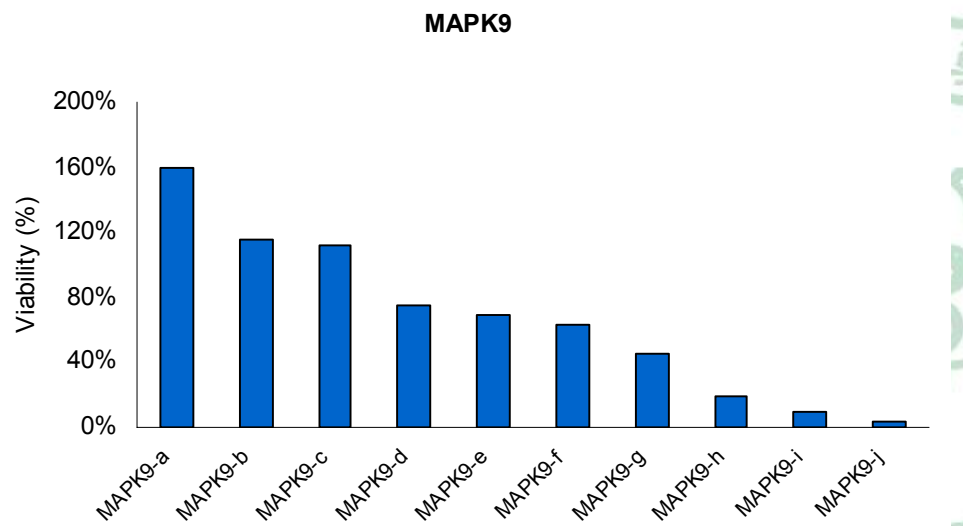
圖二十八、SMAD 4 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率

大部份 SMAD 4 的 shRNA 作用細胞後，使細胞生長抑制率上升。其中 SMAD 4-d 與 SMAD 4-e 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞生長抑制率大於 90 % (d. 96.96%、e. 91.91%、平均生長抑制率 94.44%)。

shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
MAPK9-a	KP022	C07	TRCN0000001013	GATGTGTATTTGGTTATGGAA	CDS	158.99%	-58.99%
MAPK9-b	KP021	E09	TRCN0000000943	GCTGTTCGATGATAGGTTAGAA	3UTR	116.01%	-16.01%
MAPK9-c	KP022	F07	TRCN0000001016	GTTATTCACATGGAGCTGGAT	CDS	111.80%	-11.80%
MAPK9-d	KP021	H09	TRCN0000000946	AGGGATTGTTTGTGCTGCATT	CDS	74.98%	25.02%
MAPK9-e	KP021	G09	TRCN0000000945	CTGTGAGGAATTATGTCGAAA	CDS	69.63%	30.37%
MAPK9-f	KP021	F09	TRCN0000000944	GATGTGTATTTGGTTATGGAA	CDS	62.74%	37.26%
MAPK9-g	KP021	A10	TRCN0000000947	GTTATTCACATGGAGCTGGAT	CDS	45.21%	54.79%
MAPK9-h	KP022	D07	TRCN0000001014	CTGTGAGGAATTATGTCGAAA	CDS	19.11%	80.89%
MAPK9-i	KP022	E07	TRCN0000001015	AGGGATTGTTTGTGCTGCATT	CDS	9.67%	90.33%
MAPK9-j	KP022	B07	TRCN0000001012	GAGCAGTTAGAGTAGGTGAAT	3UTR	3.35%	96.65%

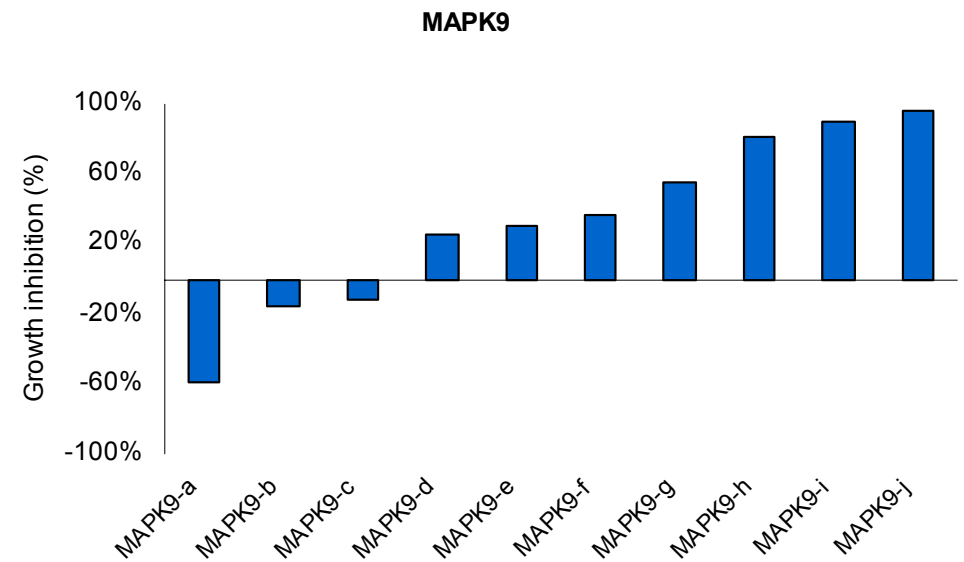
表十四、所有 MAPK9 之 shRNA 作用結果比較

10 個針對 MAPK9 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAPK9 的 mRNA，抑制其轉譯作用。MAPK9-a 至-c 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞存活率上升；MAPK9-i 至-j 的 shRNA 使細胞存活率下降(< 10%)，其細胞生長抑制率高達 90%以上。



圖二十九、MAPK9 之 shRNA 作用後的細胞存活率

MAPK 9-a 至-c 的 shRNA 作用細胞後，使細胞的存活率上升。其中 MAPK9-i 至-j 的 shRNA 使細胞存活率降低 (< 10%)。



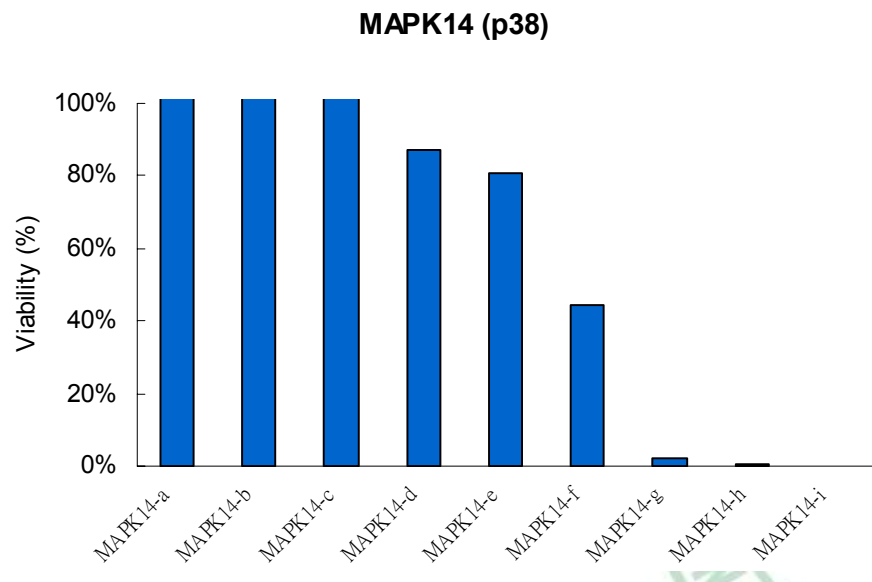
圖三十、MAPK9 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率

MAPK9 -i 與 MAPK9-j 的 shRNA 會使 HSC-3 細胞生長抑制率上升，抑制細胞生長高達 90% 以上(i. 90.33%、j. 96.65%、平均生長抑制率 93.49%)。

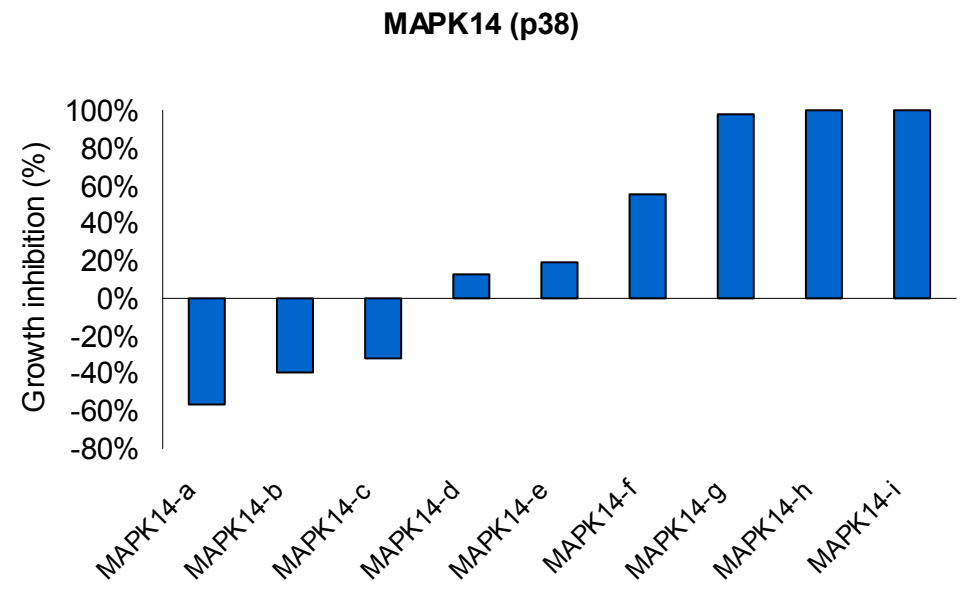
shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
MAPK14-a	KP071	H4	TRCN0000010053	GACATAATTCACAGGGACCTA	CDS	156.62%	-56.62%
MAPK14-b	KP071	H5	TRCN0000010054	CTCGGCACACAGATGATGAAA	CDS	139.92%	-39.92%
MAPK14-c	KP005	G12	TRCN0000000512	CGAGGTCTAAAGTATATACAT	CDS	131.68%	-31.68%
MAPK14-d	KP005	G11	TRCN0000000511	CCATGAGGCAAGAACTATAT	CDS	86.97%	13.03%
MAPK14-e	KP005	G9	TRCN0000000509	GCCGTATAGGATGTCAGACAA	3UTR	80.55%	19.45%
MAPK14-f	KP005	H1	TRCN0000000513	CCATTTTCAGTCCATCATTTCAT	CDS	44.36%	55.64%
MAPK14-g	KP005	G10	TRCN0000000510	CCATGTTCAGTTCCTTATCTA	CDS	2.06%	97.94%
MAPK14-h	KP071	H2	TRCN0000010051	GTTACGTGTGGCAGTGAAGAA	CDS	0.48%	99.52%
MAPK14-i	KP071	H3	TRCN0000010052	GTTTCAGTTCCTTATCTACCAA	CDS	-0.48%	100.48%

表十五、所有 MAPK14 之 shRNA 作用結果比較

9 個對 MAPK14 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAPK14 的 mRNA，抑制其轉譯作用。其中 MAPK14-a 至 -c 的 shRNA 使 HSC-3 細胞存活率上升；MAPK14-g 至 -i 的 shRNA 使細胞存活率下降 (< 10%)，其細胞生長抑制率高達 90% 以上。



圖三十一、MAPK14 之 shRNA 作用後的細胞存活率
 MAPK14-a 至 -c 的 shRNA 使 HSC-3 細胞存活率上升；
 MAPK14-g 至 -i 的 shRNA 使細胞存活率下降(< 10%)。

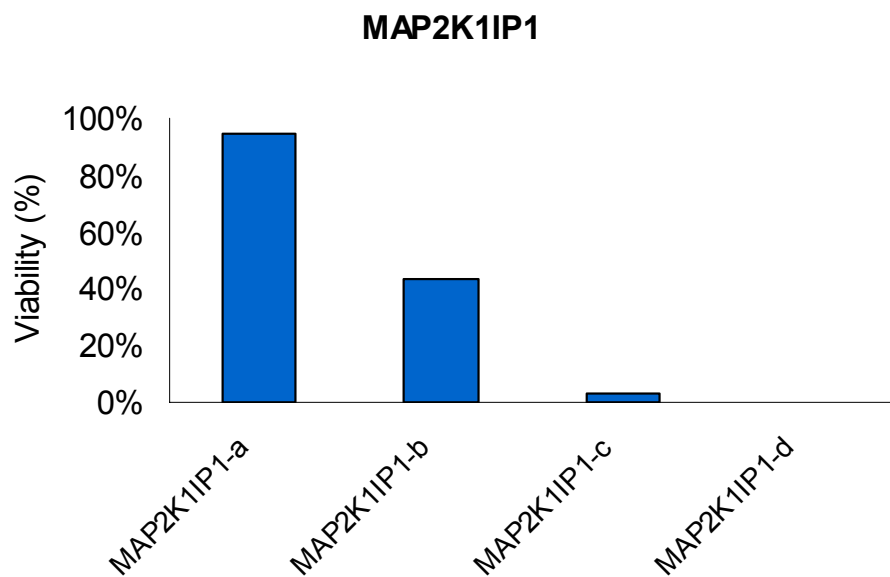


圖三十二、MAPK14 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率
 MAPK14-g 至 -i 的 shRNA 生長抑制率大於 90%。g. 97.94%、
 h. 99.52%、i. 100.48%、平均生長抑制率 99.31%。

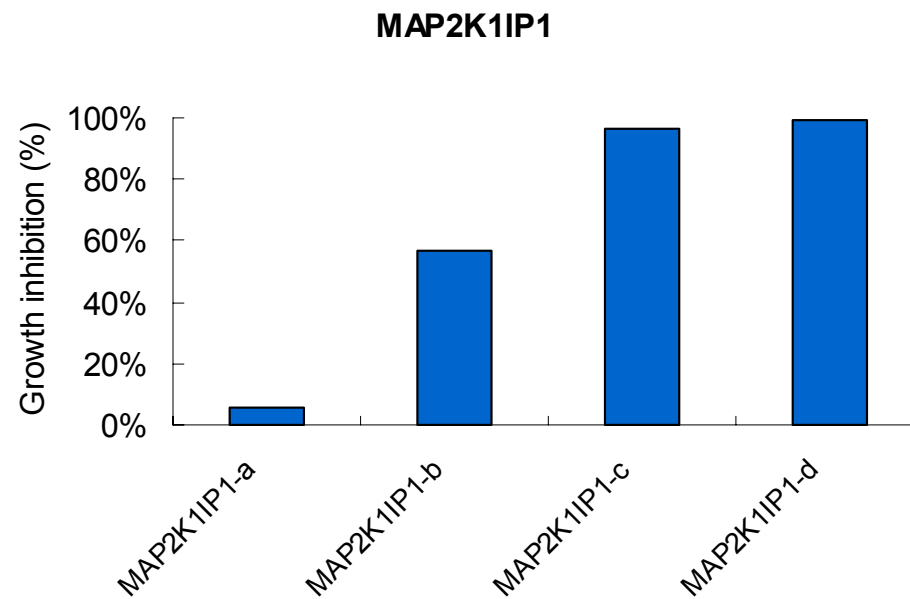
shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
MAP2K1IP1-a	KP059	E11	TRCN0000037885	GCAGTGCCAATACAGGACTAA	CDS	94.51%	5.49%
MAP2K1IP1-b	KP059	F11	TRCN0000037886	GCAACAGACCAAGGAAGCAAA	CDS	43.25%	56.75%
MAP2K1IP1-c	KP059	G11	TRCN0000037887	TGAGACAAGTTGTGGAAGTTT	CDS	3.34%	96.66%
MAP2K1IP1-d	KP059	D11	TRCN0000037884	CCTGTTATTAAAGTGGCAAAT	CDS	0.38%	99.62%

表十六、所有 MAP2K1IP1 的 shRNA 作用結果比較

4 個對 MAP2K1IP1 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAP2K1IP1 的 mRNA，抑制其轉譯作用。其中 MAP2K1IP1-a 的 shRNA 使 HSC-3 細胞存活率上升；MAP2K1IP1-c 至-d 的 shRNA 使細胞存活率降低(< 10%)，細胞生長抑制率高達 90%以上。



圖三十三、MAP2K1IP1 之 shRNA 作用後的細胞存活率
 MAP2K1IP1-a 的 shRNA 使 HSC-3 細胞存活率上升
 (94.51%)；c. 3.34%、d. 0.38%對細胞生長有抑制作用。

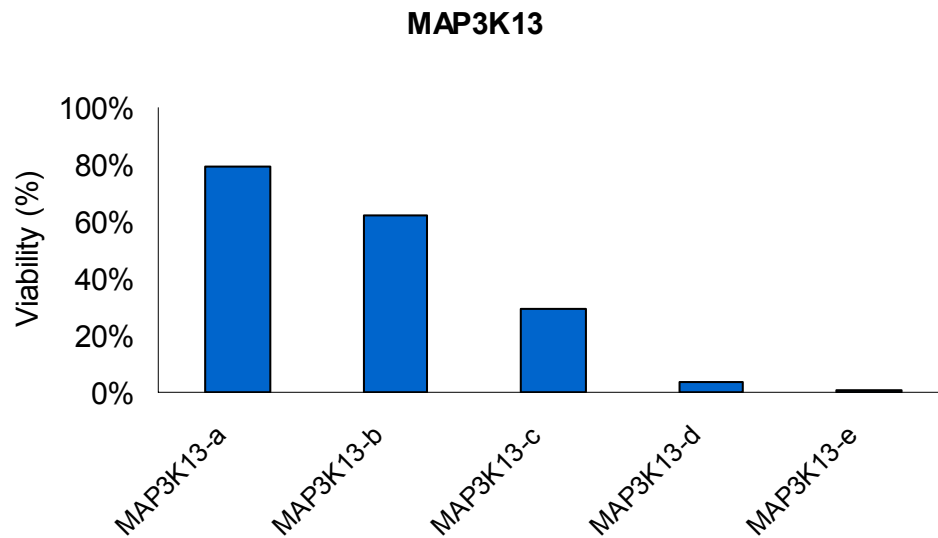


圖三十四、MAP2K1IP1 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率
 MAP2K1IP1-c 為 96.66%、MAP2K1IP1-d 為 99.62%、平
 均細胞生長抑制率為 98.14%。

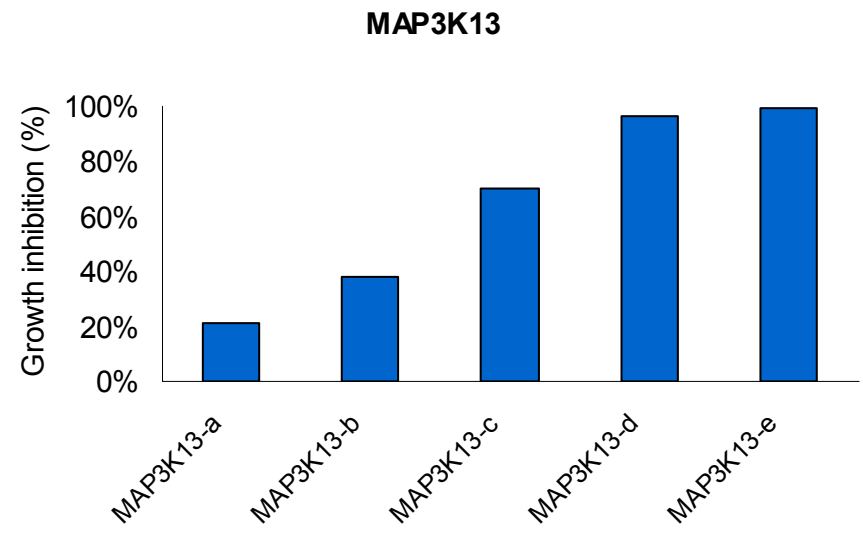
shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
MAP3K13-a	KP051	F10	TRCN0000007102	CCTGAAGATCTCGTGA CTATA	3UTR	79.01%	20.99%
MAP3K13-b	KP051	B11	TRCN0000007106	CCAGAACAGTATGGGTCCTTA	CDS	62.33%	37.67%
MAP3K13-c	KP051	H10	TRCN0000007104	CGTCCTATCATCCATCCCAAT	CDS	29.58%	70.42%
MAP3K13-d	KP051	G10	TRCN0000007103	GCACCCTAACATCATCGCATT	CDS	3.36%	96.64%
MAP3K13-e	KP051	A11	TRCN0000007105	CCCACAAGAACTTACTTCAA	CDS	0.57%	99.43%

表十七、所有 MAP3K13 的 shRNA 作用結果比較

5 個針對 MAP3K13 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MAP3K13 的 mRNA，抑制其轉譯作用。其中 MAP3K13-d 至-e 的 shRNA 使 HSC-3 的細胞存活率降低 (< 10%)，其細胞生長抑制率高達 90% 以上。



圖三十五、MAP3K13 之 shRNA 作用後的細胞存活率
MAP3K13-d 至- e 的 shRNA 使 HSC-3 的細胞存活率降低 (< 10%) ; d. 3.36%、e. 0.57 %。

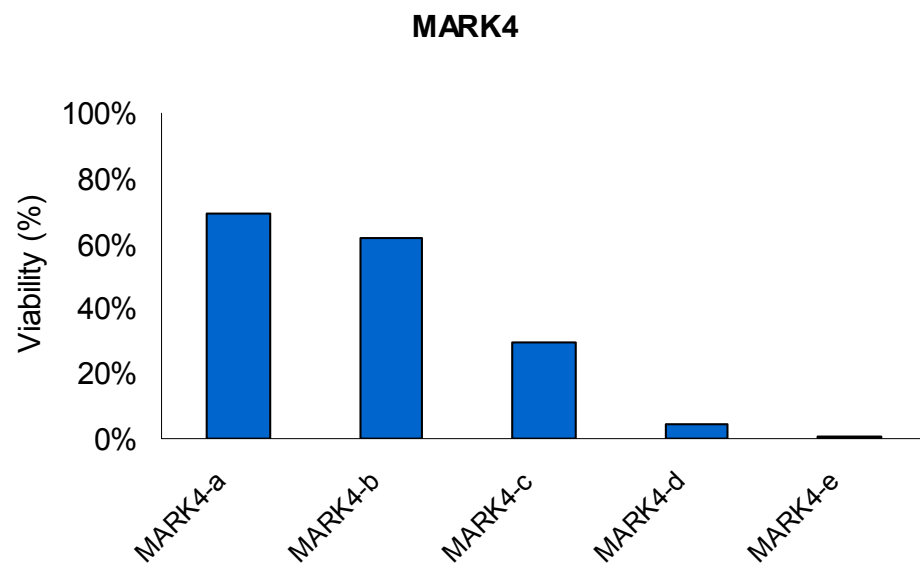


圖三十六、MAP3K13 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率
MAP3K13 -d 至- e 的 shRNA 使 HSC-3 細胞生長抑制率上升 (> 90 %) ; d. 96.64%、e. 99.43%、平均生長抑制率 98.03%。

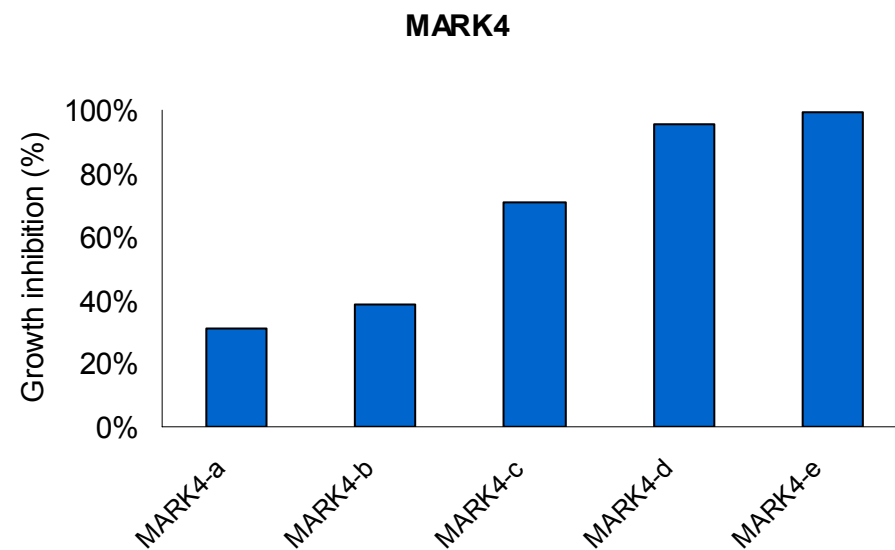
shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
MARK4-a	KP052	D06	TRCN0000007158	GCCATCTACCTTGGGATCAAA	CDS	69.27%	30.73%
MARK4-b	KP052	E06	TRCN0000007159	CCCAACATCGTGAAGCTCTTT	CDS	61.37%	38.63%
MARK4-c	KP052	F06	TRCN0000007160	CAGAACTCTAACCGCTGTGTT	CDS	29.40%	70.60%
MARK4-d	KP052	C06	TRCN0000007157	GCCATCAAGATTATCGACAAA	CDS	4.22%	95.78%
MARK4-e	KP052	B06	TRCN0000007156	CCCTTTATCATCACCTCAGTT	3UTR	0.82%	99.18%

表十八、所有 MARK4 的 shRNA 作用結果比較

5 個針對 MARK4 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 MARK4 的 mRNA，抑制其轉譯作用。其中 MARK4-d 至-e 的 shRNA 使 HSC-3 的細胞存活率降低 (< 10%)，其細胞生長抑制率高達 90% 以上。



圖三十七、MARK4 之 shRNA 作用後的細胞存活率
MARK4-d 至- e 的 shRNA 使 HSC-3 的細胞存活率降低 (< 10%) ; MARK4-d 為 4.22%、MARK4-e 為 0.82%。

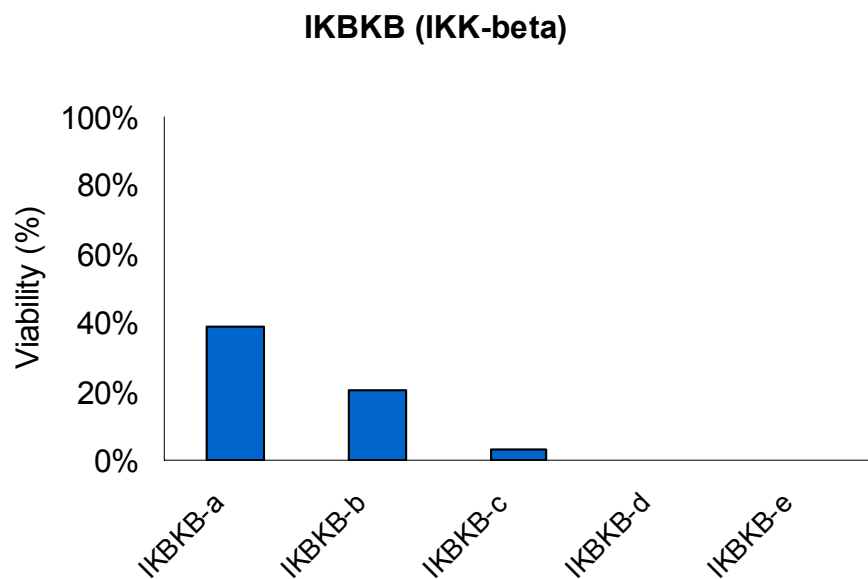


圖三十八、MARK4 之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率
MARK4-d 至- e 的 shRNA 使 HSC-3 細胞生長抑制率上升 (> 90%) ; d. 95.78%、e. 99.18%、平均生長抑制率 97.48%。

shRNA sequences	KP plate Name		TRC Clone number	Target sequence	Target sequence location	Viability (%)	Growth inhibition (%)
IKBKB-a	KP052	G09	TRCN0000018915	GCACTGGGAAAGTATCTGAAA	3UTR	38.94%	61.06%
IKBKB-b	KP052	H09	TRCN0000018916	CCAGCCAAGAAGAGTGAAGAA	CDS	20.34%	79.66%
IKBKB-c	KP052	C10	TRCN0000018919	CCATGATGAATCTCCTCCGAA	CDS	3.01%	96.99%
IKBKB-d	KP052	A10	TRCN0000018917	GCTGGTTCATATCTTGAACAT	CDS	0.16%	99.84%
IKBKB-e	KP052	B10	TRCN0000018918	CGGAAGTACCTGAACCAGTTT	CDS	0.05%	99.95%

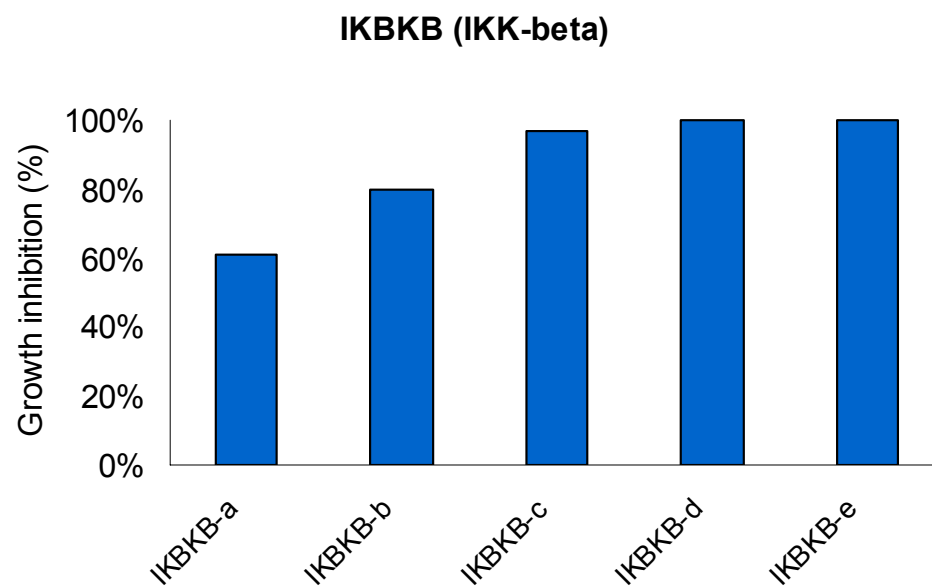
表十九、所有 IKBKB 的 shRNA 作用結果比較

5 個針對 IKBKB 設計的 shRNA 序列，藉由慢病毒載體轉染至 HSC-3 細胞後，裂解細胞內 IKBKB 的 mRNA，抑制其轉譯作用。所有的 IKBKB 之 shRNA 皆會抑制 HSC-3 的生長，其中 IKBKB-c 至-e 的 shRNA 使 HSC-3 的細胞存活率降低 (< 10%)，其細胞生長抑制率高達 90% 以上。



圖三十九、IKBKB (IKK-beta)之 shRNA 作用後的細胞存活率

IKBKB-c 至- e 的 shRNA 使 HSC-3 的細胞存活率降低 (< 10%) ; c. 3.01%、d. 0.16%、e. 0.05%。



圖四十、IKBKB (IKK-beta)之 shRNA 作用後的細胞生長抑制率

所有的 IKBKB 之 shRNA 皆會抑制 HSC-3 的生長。其中 IKBKB-c 至- e 的 shRNA 抑制 HSC-3 的細胞生長，抑制細胞生長高達 90% 以上。c. 96.99%、d. 99.84%、e. 99.95%、平均生長抑制率 98.92%。

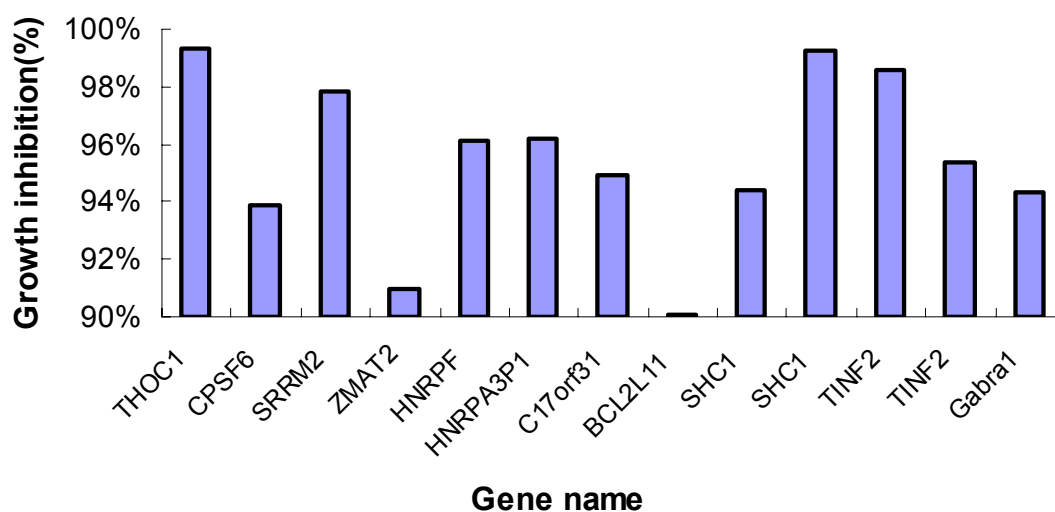
表二十、 1236 個 shRNA 基因篩選結果(11 個功能未明的基因)

Gene Name Abbreviation	Gene Function	Growth Inhibition (%)	Mean of Growth Inhibition (%)
THOC1	NONE	99.33	99.33
CPSF6	NONE	93.86	93.86
SRRM2	NONE	97.86	97.86
ZMAT2	NONE	90.93	90.93
HNRPF	NONE	96.10	96.10
HNRPA3P1	NONE	96.19	96.19
C17orf31	NONE	94.95	94.95
BCL2L11	NONE	90.04	90.04
SHC1	NONE	94.44	96.86
SHC1	NONE	99.29	
TINF2	NONE	98.61	96.98
TINF2	NONE	95.36	
Gabra1	NONE	94.36%	94.36

1236 個 shRNA 基因篩選結果(11 個功能未明的基因)

1236 個 shRNA 篩選得到 11 個功能未名的促進癌細胞生長基因有 11 個基因 (THOC1、CPSF6、SRRM2、ZMAT2、HNRPF、HNRPA3P1、C17orf31、BCL2L11、SHC1、TINF2、Gabra1) 是目前未詳知其生理功能的，同樣有生長抑制率達 90% 以上的結果。

Novel genes with >90% growth inhibition effect



圖四十一、1236 個 shRNA 基因篩選結果(11 個功能未明的基因)

1236 個 shRNA 篩選得到 11 個功能未名的促進癌細胞生長基因有 11 個基因 (THOC1、CPSF6、SRRM2、ZMAT2、HNRPF、HNRPA3P1、C17orf31、BCL2L11、SHC1、TINF2、Gabra1) 是目前未詳知其生理功能的，同樣有生長抑制率達 90% 以上的結果。

第六章 引用文獻

1. Richard D. Howland , M.J.M., *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, Third Edition*. p. 455.
2. Kumar, A., Fausto, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease(seven edition)*.
3. Sciubba, J.J., *Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment*. Am J Clin Dermatol, 2001. **2**(4): p. 239-51.
4. 黃振勳、郭英雄, *口腔癌在台灣*.
5. *口腔癌臨床治療共識*. 1998(國家衛生研究院).
6. Lippman, S.M. and W.K. Hong, *Molecular markers of the risk of oral cancer*. N Engl J Med, 2001. **344**(17): p. 1323-6.
7. 紀昭全, *口腔癌治療準則*. 高雄榮民總醫院 癌症防治中心.
8. Dedes, K.J., et al., *Bevacizumab in combination with paclitaxel for HER-2 negative metastatic breast cancer: An economic evaluation*. Eur J Cancer, 2009.
9. Arnedos, M. and A.D. Seidman, *Emerging targeted therapies for breast cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2007. **21**(2): p. 321-40.
10. Hamakawa, H., et al., *Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer*. Head Neck, 2008. **30**(6): p. 800-9.
11. Bebawy, M. and D.M. Sze, *Targeting P-glycoprotein for effective oral anti-cancer chemotherapeutics*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(1): p. 47-52.
12. Gerber, D.E., *Targeted therapies: a new generation of cancer treatments*. Am Fam Physician, 2008. **77**(3): p. 311-9.
13. Bainbridge, J.W., et al., *Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis*. N Engl J Med, 2008. **358**(21): p. 2231-9.
14. Pang, J.J., et al., *Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis*. Molecular Therapy, 2006. **13**(3): p. 565-572.
15. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
16. Rubinson, D.A., et al., *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference (vol*

- 33, pg 401, 2003). *Nature Genetics*, 2007. **39**(6): p. 803-803.
17. Jorgensen, R., *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. *THE PLANTED CELL*, 1990. **2**(4): p. 279-289.
 18. Romano, N. and G. Macino, *Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(22): p. 3343-53.
 19. Guo S, K.K., *par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed*. *Cell*, 1995.
 20. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
 21. Mittal, V., *Improving the efficiency of RNA interference in mammals*. *Nature Reviews Genetics*, 2004. **5**(5): p. 355-365.
 22. Buchon, N. and C. Vaury, *RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements*. *Heredity*, 2006. **96**(2): p. 195-202.
 23. McAnuff, M.A., G.R. Rettig, and K.G. Rice, *Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo*. *J Pharm Sci*, 2007. **96**(11): p. 2922-30.
 24. Dawe, R.K., *RNA interference on chromosomes*. *Nature Genetics*, 2004. **36**: p. 1141.
 25. Dykxhoorn, D.M. and J. Lieberman, *Knocking down disease with siRNAs*. *Cell*, 2006. **126**(2): p. 231-5.
 26. Moffat, J. and D.M. Sabatini, *Building mammalian signalling pathways with RNAi screens*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(3): p. 177-87.
 27. Root, D.E., et al., *Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library*. *Nat Methods*, 2006. **3**(9): p. 715-9.
 28. Takeshita, F. and T. Ochiya, *Therapeutic potential of RNA interference against cancer*. *Cancer Sci*, 2006. **97**(8): p. 689-96.
 29. Hannon, G.J. and J.J. Rossi, *Unlocking the potential of the human genome with RNA interference*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 371-8.
 30. Derek M. Dykxhoorn, J.L., *Knocking down Disease with siRNAs*. *Cell*, July 28,2006. **126**.

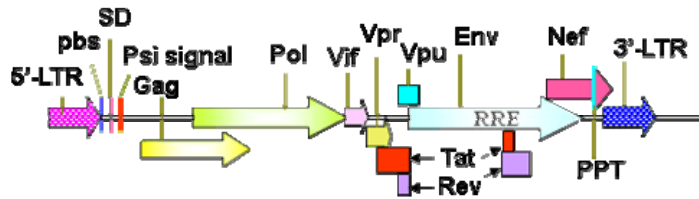
31. Jackson, A.L. and P.S. Linsley, *Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs?* Trends Genet, 2004. **20**(11): p. 521-4.
32. McCaffrey, A.P., et al., *Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 639-44.
33. Bitko, V., et al., *Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA.* Nat Med, 2005. **11**(1): p. 50-5.
34. Ralph, G.S., *Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model.* NATURE MEDICINE, April, 2005. **11**.
35. MacKeigan, J.P., L.O. Murphy, and J. Blenis, *Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 591-600.
36. Morgan-Lappe, S.E., et al., *Identification of ras-related nuclear protein, targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen.* Cancer Research, 2007. **67**(9): p. 4390-4398.
37. Moffat, J., *A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen.* Cell, 2006. **124**.
38. Warner, G.C., et al., *Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis.* International Journal of Cancer, 2004. **110**(6): p. 857-868.
39. Lo, W.Y., et al., *Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis.* Clin Chim Acta, 2007. **376**(1-2): p. 101-7.
40. Hofman, P., et al., *Prognostic significance of cortactin levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status.* Br J Cancer, 2008. **98**(5): p. 956-64.
41. Vernon, A.E. and C. LaBonne, *Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions.* Curr Biol, 2004. **14**(17): p. R719-21.
42. Molinolo, A.A., et al., *Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis.* Oral Oncol, 2008.

43. Massague', J., *HOW CELLS READ TGF- β SIGNALS*. Nature reviews ,molecular cell biology, 2000. **1**.
44. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain, *TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 117-29.
45. Gross, N.D., et al., *Inhibition of Jun NH2-terminal kinases suppresses the growth of experimental head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(19): p. 5910-7.
46. Kim, M.J., et al., *c-Src-p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Is Required for Akt Activation in Response to Ionizing Radiation*. Molecular Cancer Research, 2008. **6**(12): p. 1872-1880.
47. Ikeda, A., et al., *Genomic organization and fine-mapping of the human leucine zipper-bearing kinase (LZK) gene*. J Biochem Mol Biol Biophys, 2002. **6**(2): p. 113-7.
48. Trinczek, B., et al., *MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(7): p. 5915-5923.
49. Allen, C.T., et al., *Role of activated nuclear factor-kappaB in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2007. **29**(10): p. 959-71.
50. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.

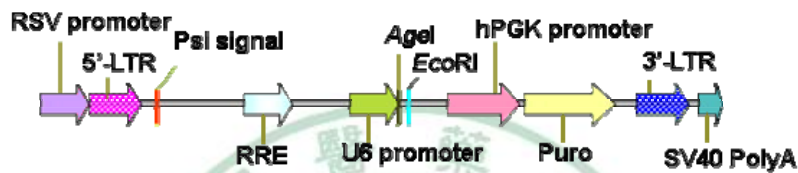
第七章 附錄

附錄一、HIV-1 基因組態與 pCMV Δ R8.91 包裹質體及 pLKO.1-puro 轉植載體比較圖。

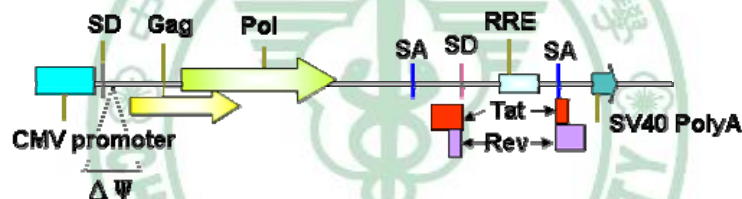
HIV-1 WT Genome:



pLKO.1-Puro:



pCMV Δ R8.91:



如圖所示 pCMV Δ R8.91 保留了 HIV-1 的 Gag、Pol、Tat 與 Rev 蛋白質序列，但是卻刪除或截短 HIV-1 的 Vif、Vpr、Vpu、Env 與 Nef 等蛋白使其無法轉譯出來。與 HIV-1 病毒複製所需的 cis elements 如 HIV-1 LTR、pbs (primer binding site)、PPT (polypurifying tract)、包裹序列 (Ψ package signal)、RRE (rev response element) 等均被排除於此質體中。相對地，pLKO.1-puro 只保留了 HIV-1 與反轉錄作用、 Ψ 包裹訊號、RRE、與整合插入到染色體等相關序列；且此質體不會表達任何一種 HIV-1 的蛋白，加上大部份的 U3 序列已從此質體刪除，因此，反轉錄作用形成後的縮小版 HIV-1 LTR 不具有啟動子功能，使得 Lentiviral Vector 安全性提高了一層，此類載體稱之為自我限制病毒載體 (self-inactivating viral vector; SIN)。這些因素加起來，使得此系統產生的 Lentiviral Vector 生物安全性非常高。

(來源:中央研究院 RNAi 核心設施)

附錄二、1263 個基因的功能分類表 (中研院基因體中心 提供)

Function Category =113	Gene number	% of total genes
Kinase	737	59.63%
Phosphatase	209	16.91%
NONE	64	5.18%
kinase&Phosphatase	30	2.43%
spliceosome	15	1.21%
androgen	11	0.89%
hydrolase	8	0.65%
geneCards.disease	8	0.65%
transcriptionFactor;nuclearHormoneRecpt;nucHR;youngLabTF;receptor	7	0.57%
tumorSuppressor;geneCards.disease;tumorSupp.dbEst	6	0.49%
transcriptionFactor;youngLabTF	5	0.40%
isomerase	4	0.32%
tumorSuppressor;geneCards.cancer;geneCards.disease;tumorSupp.dbEst	4	0.32%
transcriptionFactor;TF;youngLabTF	4	0.32%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;TF;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	4	0.32%
transcriptionFactor;nuclearHormoneRecpt;geneCards.disease;nucHR;youngLabTF;receptor	4	0.32%
geneCards.disease;cytokinesAndReceptors	3	0.24%
ubiquination;E2E3	3	0.24%
proteinDegrad;protease;proteaseInhibitor;ubiqAncillary;meropsProtInhib;proteinDegradation;E2E3ancillary	3	0.24%
geneCards.disease;spliceosome	2	0.16%
protease;alzheimer;meropsProtease	2	0.16%
geneCards.disease;receptor	2	0.16%
transcriptionFactor;geneCards.cancer;geneCards.disease;youngLabTF	2	0.16%
tumorSuppressor;geneCards.cancer;geneCards.disease;RAS;tumorSupp.dbEst	2	0.16%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;geneCards.cancer;geneCards.disease;TF;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	2	0.16%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;geneCards.cancer;geneCards.disease;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	2	0.16%
gpcr;GPCRdb	2	0.16%
ionChannel;ionChan;receptor	2	0.16%
transcriptionFactor;geneCards.disease;TF;youngLabTF	2	0.16%
cytokinesAndReceptors	2	0.16%
protease;geneCards.disease;proteinase;meropsProtease	2	0.16%
proteinDegrad;geneCards.disease;proteinDegradation	2	0.16%
geneCards.disease;hydrolase	1	0.08%
transcriptionFactor;geneCards.disease;youngLabTF	1	0.08%
nuclease	1	0.08%

oxidase;oxygenase;geneCards.disease;androgen	1	0.08%
dehydrogenase;hydrogenase;dehydrogenase;hydrogenase;androgen;dehydro	1	0.08%
gpcr;androgen;receptor	1	0.08%
ionChannel;androgen;calciumBinding;ionChan	1	0.08%
gpcr;gProtein;androgen;gProt	1	0.08%
proteaseInhibitor;androgen;meropsProtInhib	1	0.08%
geneCards.cancer;geneCards.disease;androgen;hydrolase	1	0.08%
transferase;aminase	1	0.08%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;androgen;TF;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	1	0.08%
transcriptionFactor;geneCards.disease;androgen;TF;youngLabTF	1	0.08%
protease;androgen;receptor;meropsProtease	1	0.08%
transcriptionFactor;androgen;youngLabTF	1	0.08%
alzheimer;internalPh;isomerase	1	0.08%
proteinDegrad;alzheimer;ubiquination;geneCards.disease;E2E3;proteinDegradation	1	0.08%
androgen;hydrolase	1	0.08%
transferase;androgen	1	0.08%
transferase;geneCards.disease;androgen	1	0.08%
reductase;androgen;reduct	1	0.08%
transcriptionFactor;rho;GEF;youngLabTF	1	0.08%
transcriptionFactor;acetylase;transferase;youngLabTF	1	0.08%
tumorSuppressor;geneCards.disease;rasGap;tumorSupp.dbEst	1	0.08%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;ubiquination;ubiqAncillary;gpcrPathway;tumorSupp.dbEst;youngLabTF;E2E3ancillary	1	0.08%
geneCards.disease;synthase	1	0.08%
geneCards.disease;ligase	1	0.08%
polymerase	1	0.08%
oxidase;geneCards.disease	1	0.08%
lipase	1	0.08%
internalPh;spliceosome	1	0.08%
transcriptionFactor;spliceosome;TF;youngLabTF	1	0.08%
protease;deubiquination;deubiq;meropsProtease	1	0.08%
spliceosome;nuclease	1	0.08%
gpcr;geneCards.disease;receptor;chemokinesAndRecept	1	0.08%
geneCards.disease;internalPh;receptor	1	0.08%
gpcr;geneCards.disease;receptor	1	0.08%
internalPh;receptor	1	0.08%
transcriptionFactor;nuclearHormoneRecpt;geneCards.cancer;geneCards.disease;nucHR;youngLabTF;receptor	1	0.08%
protease;cytokinesAndReceptors;meropsProtease	1	0.08%
gpcr_ancillary;geneCards.disease;gpcrAncillary;chemokinesAndRecept	1	0.08%
transcriptionFactor;geneCards.disease;youngLabTF;receptor	1	0.08%
ubiquination;geneCards.disease;E2E3;ligase	1	0.08%
geneCards.cancer;geneCards.disease;cytokinesAndReceptors;receptor	1	0.08%

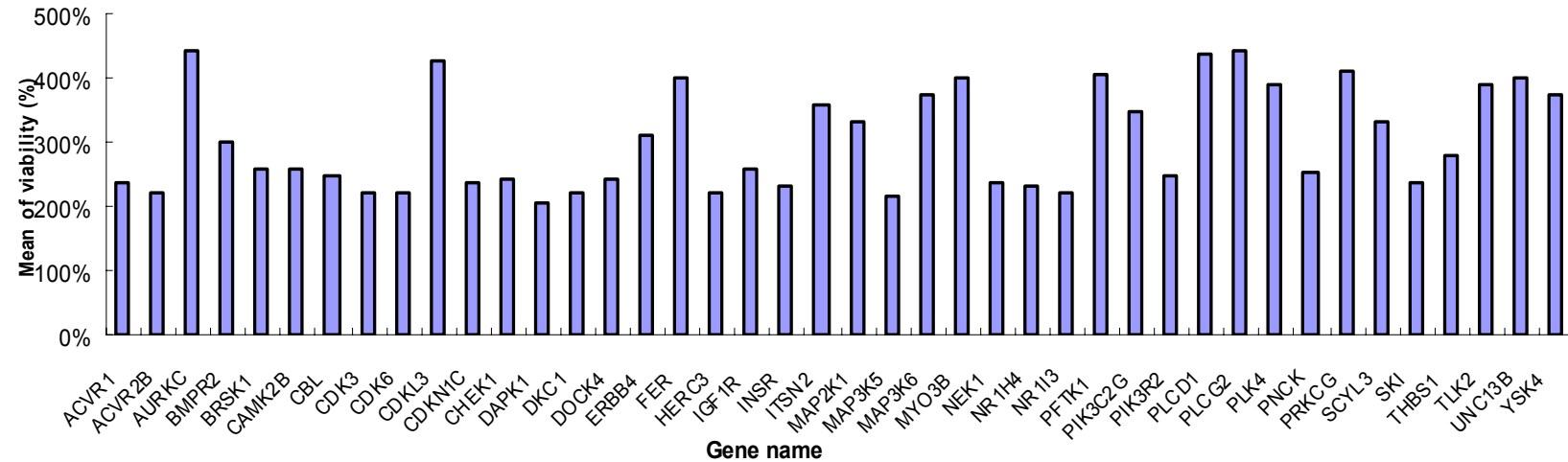
ubiquination;E2E3;receptor	1	0.08%
transcriptionFactor;proteinDegrad;geneCards.disease;TF;proteinDegradation;youngLabTF	1	0.08%
proteinDegrad;geneCards.disease;proteinDegradation;nuclease	1	0.08%
proteinDegrad;ubiqAncillary;geneCards.disease;proteinDegradation;E2E3ancillary	1	0.08%
transcriptionFactor;proteinDegrad;tumorSuppressor;ubiquination;geneCards.cancer;geneCards.disease;TF;tumorSupp.dbEst;proteinDegradation;youngLabTF	1	0.08%
proteinDegrad;geneCards.disease;synthase;proteinDegradation	1	0.08%
proteinDegrad;geneCards.cancer;geneCards.disease;proteinDegradation;cytokinesAndReceptors;receptor	1	0.08%
gpcr;proteinDegrad;geneCards.cancer;geneCards.disease;proteinDegradation;receptor	1	0.08%
gpcr;proteinDegrad;geneCards.disease;rho;proteinDegradation	1	0.08%
transcriptionFactor;proteinDegrad;geneCards.cancer;geneCards.disease;proteinDegradation;cytokinesAndReceptors;youngLabTF	1	0.08%
proteinDegrad;rasGap;proteinDegradation	1	0.08%
dehydrogenase;proteinDegrad;dehydrogenase;hydrogenase;geneCards.disease;proteinDegradation;dehydro	1	0.08%
transcriptionFactor;proteinDegrad;proteinDegradation;youngLabTF	1	0.08%
proteinDegrad;ubiqAncillary;proteinDegradation;E2E3ancillary	1	0.08%
tumorSuppressor;geneCards.disease;tumorSupp.dbEst;cytokinesAndReceptors	1	0.08%
RAS	1	0.08%
protease;deubiquination;geneCards.cancer;geneCards.disease;deubiq;meropsProtease	1	0.08%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;geneCards.disease;TF;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	1	0.08%
tumorSuppressor;tumorSupp.dbEst	1	0.08%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;ubiquination;geneCards.disease;TF;tumorSupp;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	1	0.08%
calciumBinding	1	0.08%
hydrolase;nuclease	1	0.08%
geneCards.disease;hydrolase;nuclease	1	0.08%
geneCards.disease;mutase	1	0.08%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;ubiquination;geneCards.cancer;geneCards.disease;TF;E2E3;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	1	0.08%
gProtein;gpcr_ancillary;gpcrAncillary;gProt	1	0.08%
transcriptionFactor;ubiquination;acetylase;geneCards.cancer;geneCards.disease;TF;youngLabTF	1	0.08%
transcriptionFactor;tumorSuppressor;tumorSupp.dbEst;youngLabTF	1	0.08%
hydrogenase;dehydrogenase;hydrogenase;geneCards.disease;dehydro	1	0.08%
tumorSuppressor;cyclin;geneCards.disease;tumorSupp.dbEst	1	0.08%
acetylase	1	0.08%
ionChannel;ionChan	1	0.08%
geneCards.disease;synthase;ligase	1	0.08%
synthase;ligase	1	0.08%
transcriptionFactor;geneCards.cancer;geneCards.disease;TF;youngLabTF	1	0.08%
synthase	1	0.08%
esterase	1	0.08%

附錄三、1236 個 shRNA 基因篩選結果(42 個抑制癌細胞生長基因)

Gene Name Abbreviation	Gene Name	Mean of Viability(%)
ACVR1	activin A receptor, type I	234.64%
ACVR2B	activin A receptor, type IIB	221.65%
AURKC	aurora kinase C	440.70%
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	301.70%
BRSK1	BR serine/threonine kinase 1	256.54%
CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta	260.20%
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	247.57%
CDK3	cyclin-dependent kinase 3	222.11%
CDK6	cyclin-dependent kinase 6	223.56%
CDKL3	cyclin-dependent kinase-like 3	424.84%
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	234.86%
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	242.71%
DAPK1	death-associated protein kinase 1	206.80%
DKC1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	222.41%
DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	242.43%
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	311.55%
FER	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)	401.96%
HERC3	hect domain and RLD 3	222.88%
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	259.76%
INSR	insulin receptor	230.28%
ITSN2	intersectin 2	360.18%
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	331.76%
MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	214.58%
MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	376.08%
MYO3B	myosin IIIB	402.29%
NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	239.39%
NR1H4	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	229.67%
NR1I3	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	221.50%
PFTK1	PFTAIRE protein kinase 1	404.20%
PIK3C2G	phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	346.37%
PIK3R2	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (p85 beta)	249.70%
PLCD1	phospholipase C, delta 1	437.77%
PLCG2	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	441.04%
PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	388.73%
PNCK	pregnancy upregulated non-ubiquitously expressed CaM kinase	252.70%
PRKCG	protein kinase C, gamma	408.73%
SCYL3	SCY1-like 3 (S. cerevisiae)	332.10%
SKI	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)	237.40%
THBS1	thrombospondin 1	276.89%
TLK2	tousled-like kinase 2	388.66%
UNC13B	unc-13 homolog B (C. elegans)	399.67%
YSK4	Yeast Sps1/Ste20-related kinase 4 (S. cerevisiae)	372.61%

附錄四

Growth promotion effect

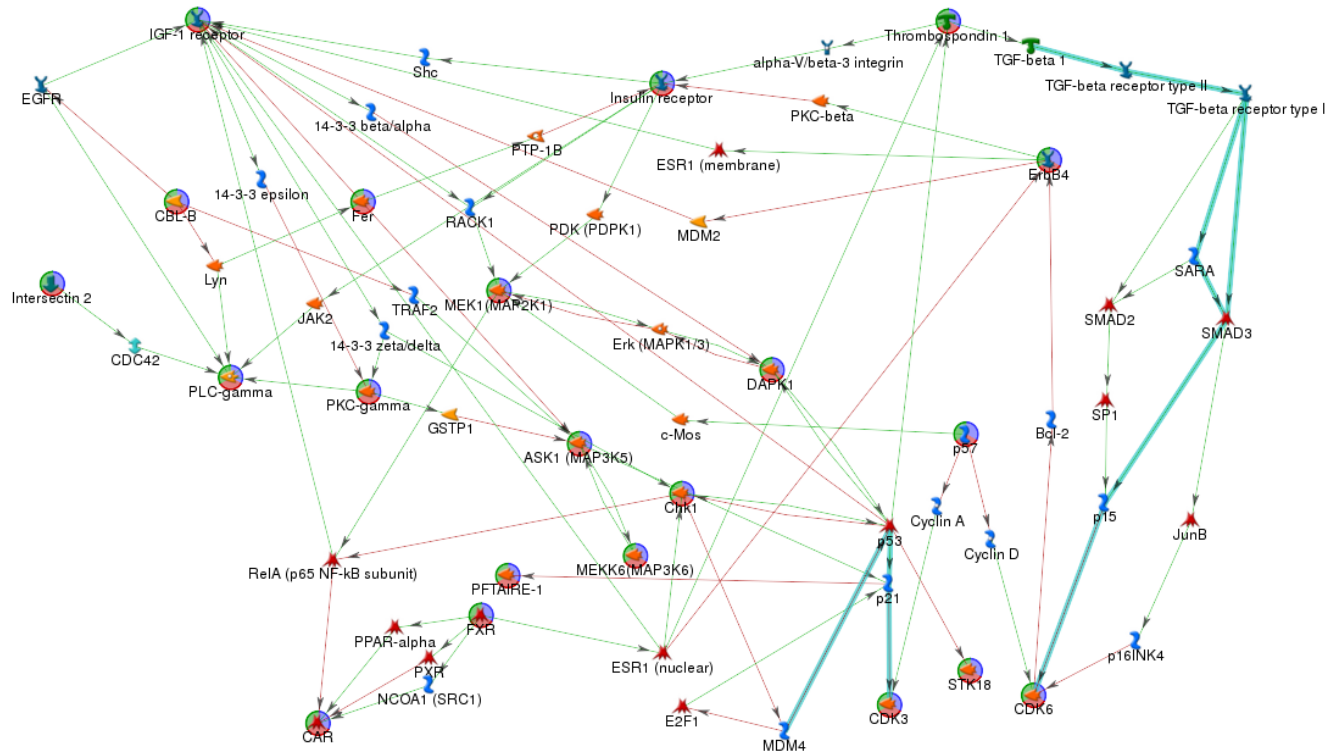


1236 個 shRNA 基因篩選結果(42 個抑制癌細胞生長基因)

共有 6502 個針對 1236 個基因（其中 737 個是蛋白質激酶、209 個蛋白質磷酸水解酶、30 個雙重功能的基因）設計的序列。以慢病毒（Lentivirus）載體將各個 shRNA 轉染至人類口腔癌細胞 HSC-3 細胞株，再以細胞存活試劑（CCK-8 kit）測試細胞存活率。142 個 shRNA 序列（對應於 42 genes），轉染至 HSC-3 細胞後，細胞存活率大於 200%（與控制組 non-target shLuc 比較）。我們稱之為抑制癌細胞生長基因（tumor growth inhibition genes）。

（中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果）

附錄五



GeneGo分析42個抑制細胞生長基因的分子路徑

42個抑制癌細胞生長基因，我們以 GeneGo 的 Shortest Path 模式分析可能的分子傳遞路徑分析，產生了三條主要的訊息傳遞路徑 (Insulin receptor、IGF-1 receptor、ErbB4)，主要經過 MAPK pathway 調控 CDK-3 的活性，來抑制口腔癌細胞的生長。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄六

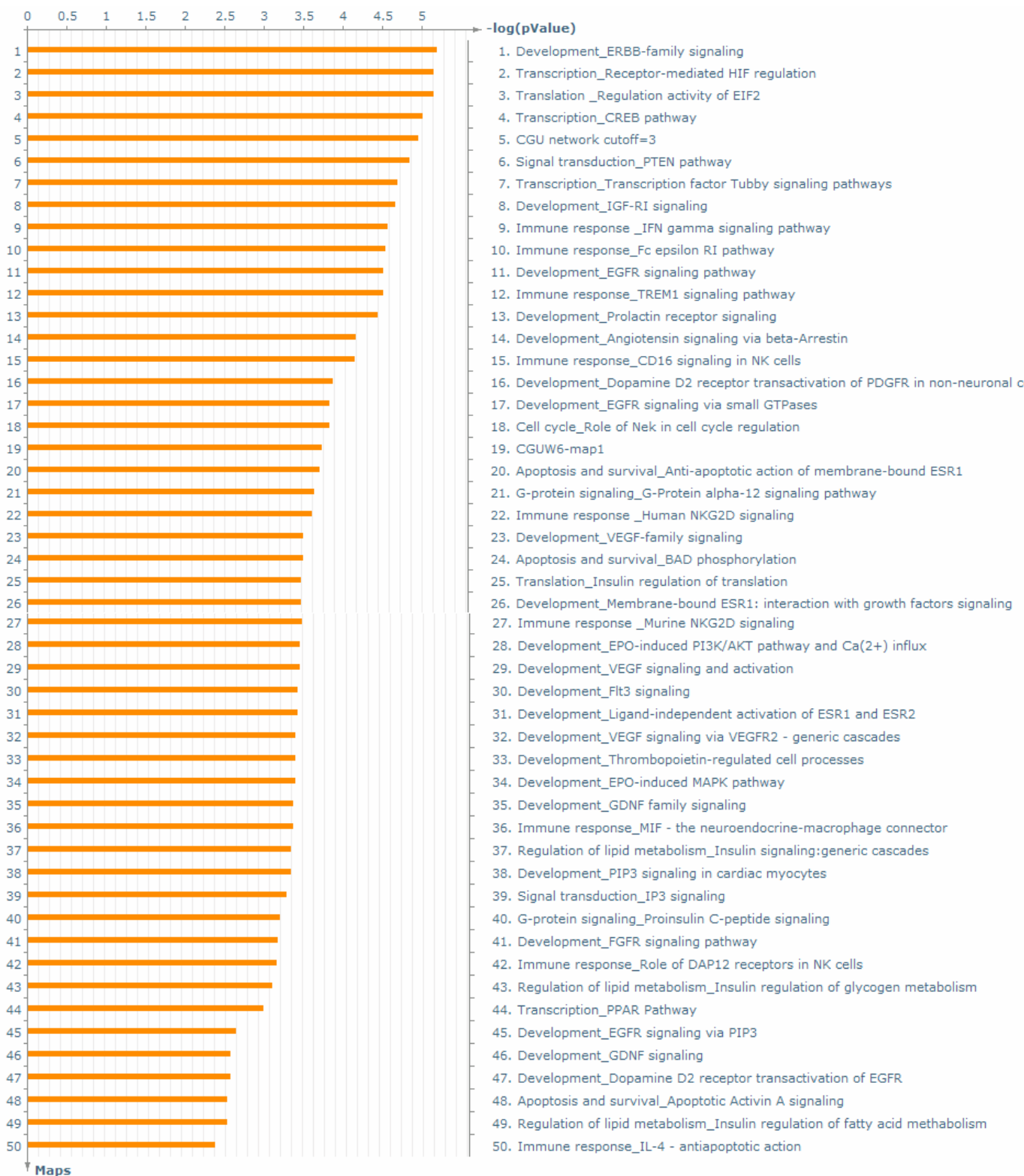
	Name	pValue	Network objects
1	Development_ERBB-family signaling	0.000007	4/38
2	Transcription_Receptor-mediated HIF regulation	0.000008	4/39
3	Translation_Regulation activity of EIF2	0.000008	4/39
4	Transcription_CREB pathway	0.000011	4/42
5	CGU network cutoff=3	0.000013	5/92
6	Signal transduction_PTEN pathway	0.000016	4/46
7	Transcription_Transcription factor Tubby signaling pathways	0.000024	3/17
8	Development_IGF-RI signaling	0.000024	4/51
9	Immune response_IFN gamma signaling pathway	0.000031	4/54
10	Immune response_Fc epsilon RI pathway	0.000033	4/55
11	Development_EGFR signaling pathway	0.000036	4/56
12	Immune response_TREM1 signaling pathway	0.000036	4/56
13	Development_Prolactin receptor signaling	0.000041	4/58
14	Development_Angiotensin signaling via beta-Arrestin	0.000078	3/25
15	Immune response_CD16 signaling in NK cells	0.000081	4/69
16	Development_Dopamine D2 receptor transactivation of PDGFR in non-neuronal cells	0.000151	3/31
17	Development_EGFR signaling via small GTPases	0.000166	3/32
18	Cell cycle_Role of Nek in cell cycle regulation	0.000166	3/32
19	CGUW6-map1	0.000209	4/88
20	Apoptosis and survival_Anti-apoptotic action of membrane-bound ESR1	0.000217	3/35

GeneGo統計分析42個抑制癌細胞生長基因的分路徑

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 42 個抑制癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，評估其統計意義。分析後，前三名的分子路徑分別是 (1) ERBB 家族的分路徑 (圖三十)；(2) HIF 藉由受器調控的分路徑 (圖三十一)；(3) EIF2 調控轉錄層次的分路徑 (圖三十二)。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄七

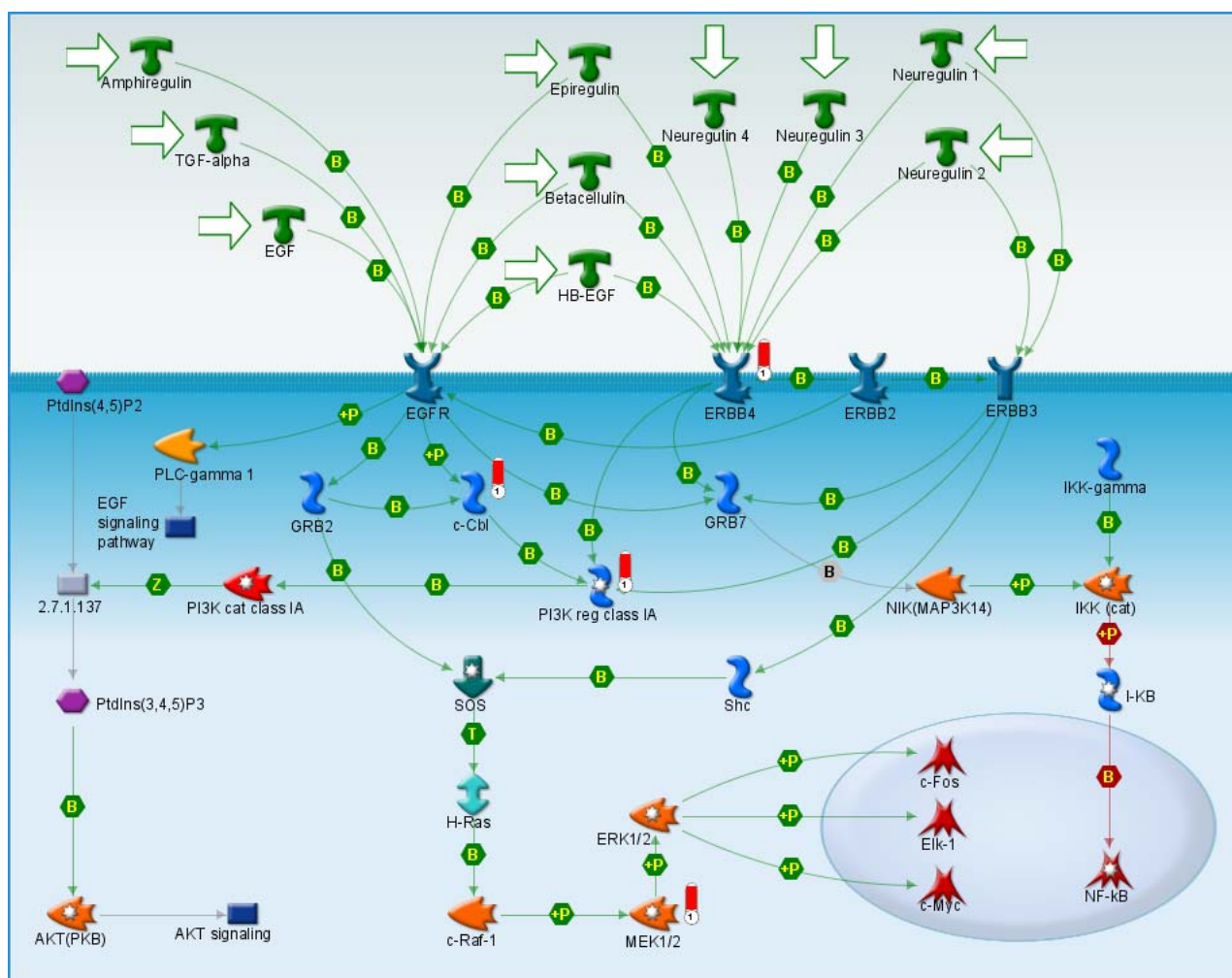


GeneGo 統計分析 42 個抑制癌細胞生長基因的分分子路徑

附錄六的圖表化整理，長條圖方式呈現。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄八

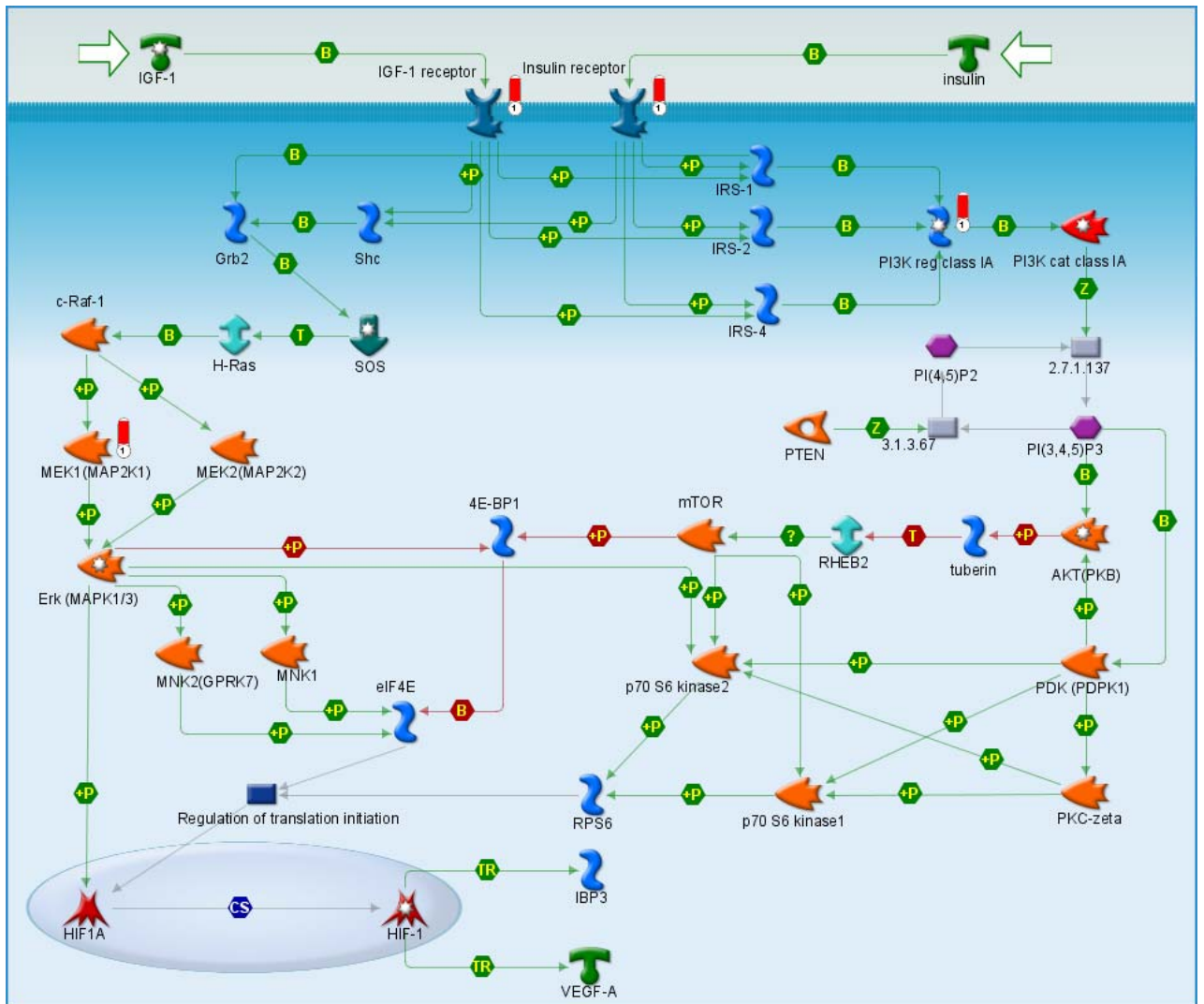


ERBB 家族的分⼦傳遞路徑圖

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 42 個抑制癌細胞生長基因所參與的每一條分⼦傳遞路徑，共有四個基因參與 ERBB 家族的分⼦傳遞路徑，由圖中紅色長條物所標示的(ERBB4、cCtI、PI3K reg class IA、MEK1/2)

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄九

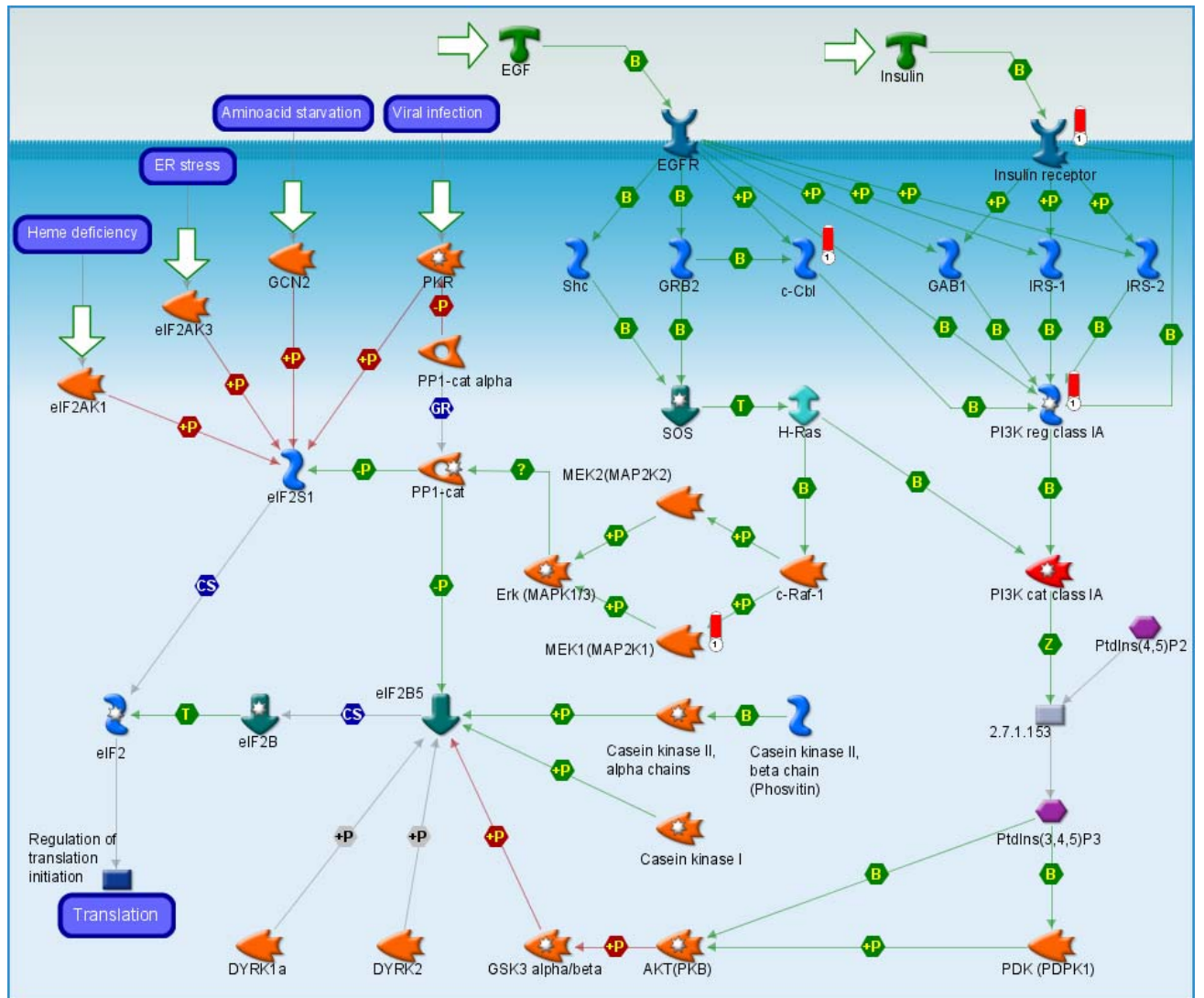


HIF 藉由受器調控的分子路徑圖

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 42 個抑制癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，共有四個基因參與 HIF 藉由受器調控的分子路徑，由圖中紅色長條物所標示的 (IGF-1 receptor、Insulin receptor、PI3K cat class IA、MEK1)。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄十



EIF2 調控轉錄層次的分子路徑圖

用 GeneGo Pathway Maps 模式，分析 42 個抑制癌細胞生長基因所參與的每一條分子傳遞路徑，共有四個基因參與 EIF2 調控轉錄層次的分子路徑。由圖中紅色長條物所標示的 (Insulin receptor_r、c-Ctl、PI3K reg class IA、MEK1)。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄十一

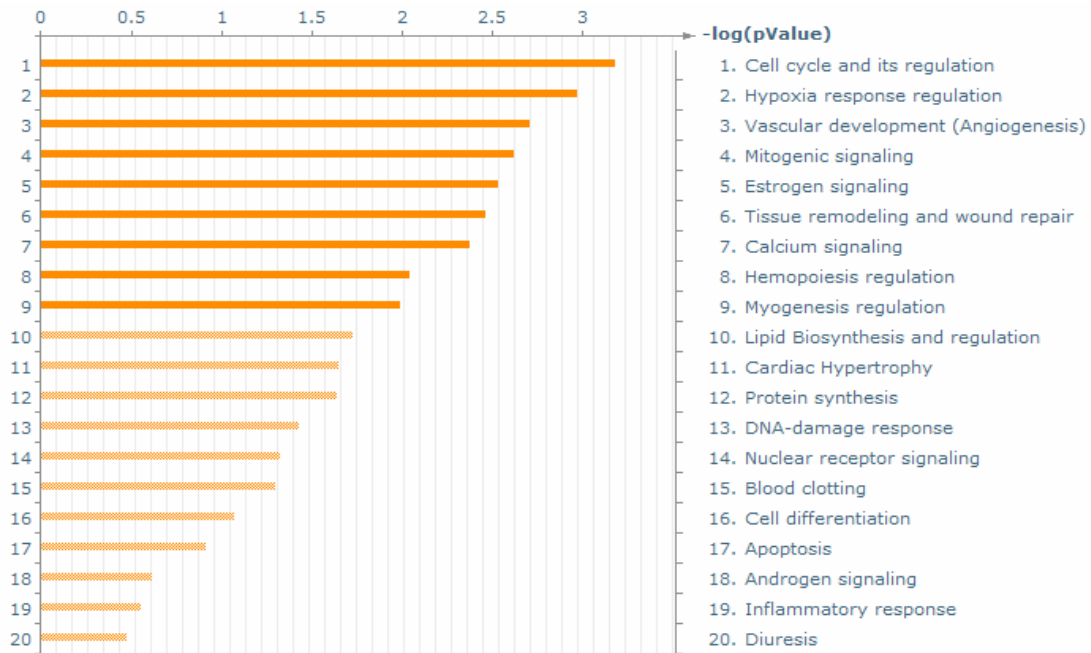
	Name	pValue	Network objects
1	Cell cycle and its regulation	0.000669	6/252
2	Hypoxia response regulation	0.001080	4/105
3	Vascular development (Angiogenesis)	0.001975	9/687
4	Mitogenic signaling	0.002417	11/1012
5	Estrogen signaling	0.002973	7/456
6	Tissue remodeling and wound repair	0.003506	10/898
7	Calcium signaling	0.004259	7/486
8	Hemopoiesis regulation	0.009151	6/423
9	Myogenesis regulation	0.010270	3/103
10	Lipid Biosynthesis and regulation	0.019050	7/643
11	Cardiac Hypertrophy	0.022580	4/248
12	Protein synthesis	0.023120	5/377
13	DNA-damage response	0.037770	5/429
14	Nuclear receptor signaling	0.047660	7/776
15	Blood clotting	0.050190	4/319
16	Cell differentiation	0.084920	12/1848
17	Apoptosis	0.123000	8/1154
18	Androgen signaling	0.245700	2/214
19	Inflammatory response	0.279800	6/1003
20	Diuresis	0.335300	1/91

GeneGo評估42個基因的細胞生理功能

以 GeneGo Pathway Map Folder 模式分析基因的功能性，細胞週期 (cell cycle) 的調控是最主要抑制癌細胞生長的因素。其中由 NEK 所參與的細胞週期調控路徑，是主要的分子調控路徑 (表十五、圖二十九、圖三十三)。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄十二



GeneGo評估42個基因的細胞生理功能

附錄十一的圖表化整理，長條圖方式呈現。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄十三

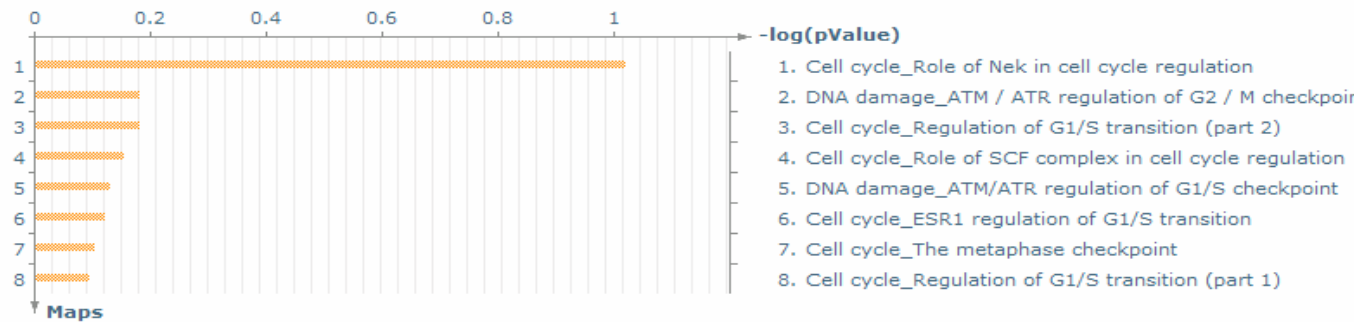
	Name	pValue	Network objects
1	Cell cycle_Role of Nek in cell cycle regulation	0.094940	3/32
2	DNA damage_ATM / ATR regulation of G2 / M checkpoint	0.661300	1/26
3	Cell cycle_Regulation of G1/S transition (part 2)	0.661300	1/26
4	Cell cycle_Role of SCF complex in cell cycle regulation	0.705100	1/29
5	DNA damage_ATM/ATR regulation of G1/S checkpoint	0.744100	1/32
6	Cell cycle_ESR1 regulation of G1/S transition	0.756100	1/33
7	Cell cycle_The metaphase checkpoint	0.789300	1/36
8	Cell cycle_Regulation of G1/S transition (part 1)	0.809300	1/38

GeneGo評估42個基因的細胞週期調控

以 GeneGo Pathway Map Folder 模式分析基因的功能性，細胞週期 (cell cycle) 的調控是最主要抑制癌細胞生長的因素。其中由 NEK 所參與的細胞週期調控路徑，是主要的分子調控路徑。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄十四

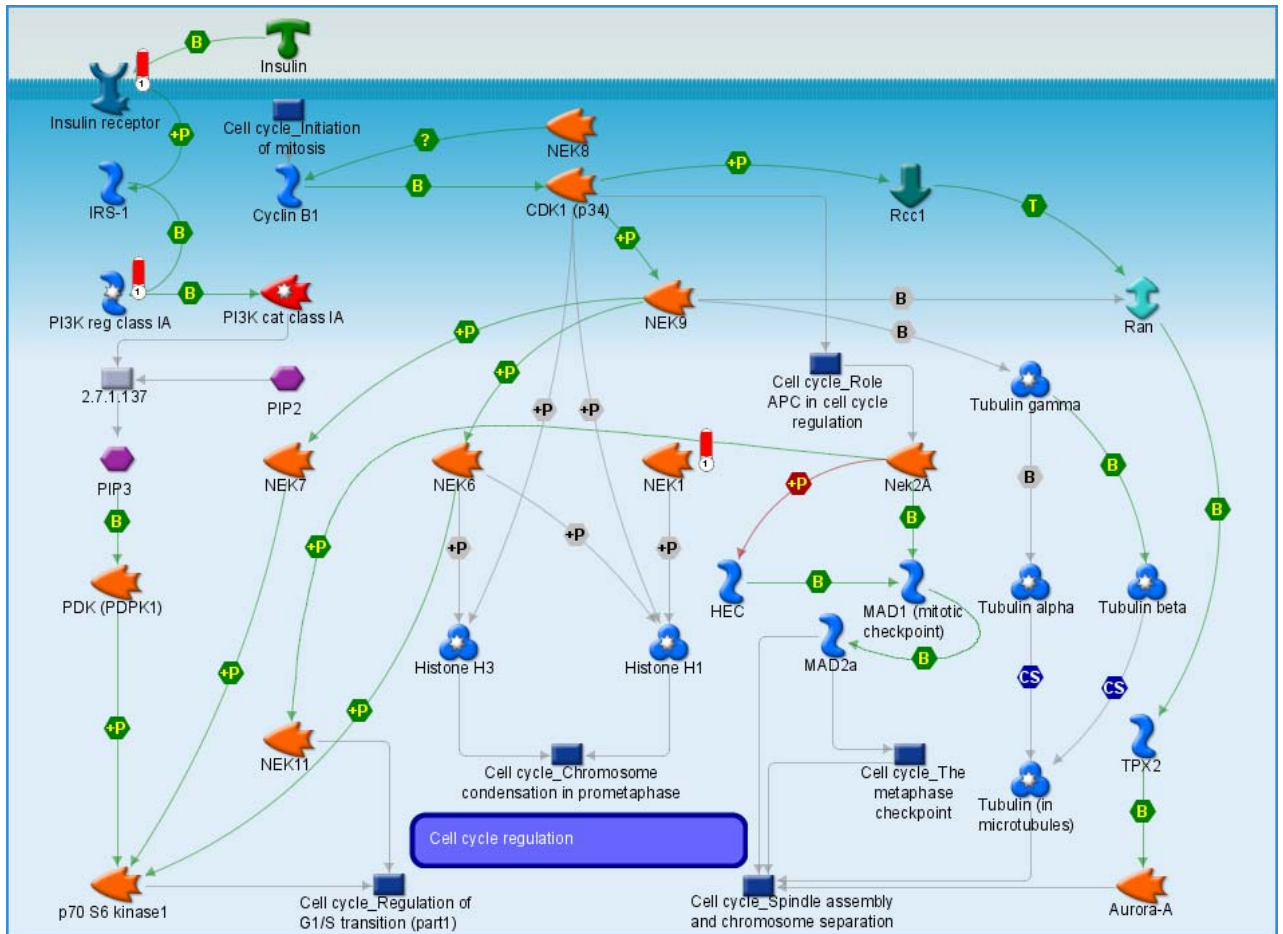


GeneGo 評估 42 個基因的細胞週期調控

以 GeneGo Pathway Map Folder 模式分析基因的功能性，細胞週期 (cell cycle) 的調控是最主要抑制癌細胞生長的因素。其中由 NEK 所參與的細胞週期調控路徑，是主要的分子調控路徑。附錄十三的圖表化整理，以長條圖方式呈現。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)

附錄十五



NEK 所參與的細胞週期調控路徑

用 GeneGo Pathway Map Folder 模式，分析 42 個抑制癌細胞生長基因的功能性，細胞週期 (cell cycle) 的調控是最主要抑制癌細胞生長的因素。其中由 NEK 所參與的細胞週期調控路徑，是主要的分子調控路徑。共有三個基因參與，由圖中紅色長條物所標示的 (Insulin receptor、PI3K cat class IA、NEK1)。

(中國醫藥大學 高銘欽老師實驗室 未發表的研究成果)