

國立臺灣大學醫院生物化學暨分子生物學研究所

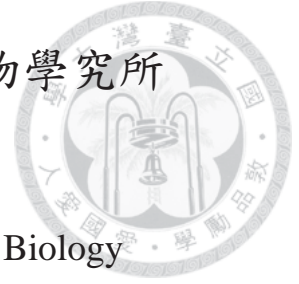
碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



利用核醣核酸干擾篩選技術探討肝癌模式中對 Sorafenib 具感  
受性之基因

Identification of sorafenib-sensitizing genes in hepatocellular  
carcinoma by RNAi screening

研究生：曾聖為

Student: Sheng-Wei Tseng

指導教授：周綠蘋 博士

Advisor: Lu-Ping Chow, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July 2013



國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

利用核醣核酸干擾篩選技術探討肝癌模式中對  
Sorafenib 具感受性之基因

Identification of sorafenib-sensitizing genes in  
hepatocellular carcinoma by RNAi screening

本論文係 曾聖為 君(學號 R00442008)在國立臺灣大學  
生物化學暨分子生物學研究所完成之碩士學位論文,於民國一  
百零二年七月二十六日承下列考試委員審查通過及口試及  
格,特此證明

口試委員:

周綠蘋

(簽名)

俞松良

(指導教授)

顏伯勳

系主任、所長

林敬賢

(簽名)



## 謝誌

時光飛逝，當提筆寫下這段謝誌時，也象徵著碩士班生涯即將畫上句點，而在這不長不短的七百多個日子中，也發生了遠多於預期的事。或許人生總是充滿了驚喜與酸甜苦辣，這種感覺在做實驗時尤其明顯。兩年來，真的要感謝許多人的幫忙與指導，讓我能順利完成學業。

首先要感謝指導教授周綠蘋老師，感謝老師在我必須更換指導老師時讓我加入這個實驗室，提供完善的設備與環境，讓我能專心地做研究，除此之外，老師無論在研究的邏輯、態度、精神和論文寫作上，都給我很好的建議和典範。

接著，感謝俞松良老師和顏伯勳老師，謝謝兩位老師在忙碌之餘尚能抽空來幫我做口試審核，給予我的論文許多良好建議，而能使論文內容更趨完善。尤其俞老師在統計分析上的協助讓我對於學習數據的分析與篩選受益良多！也感謝腫瘤所的徐志宏醫師，謝謝您提供我許多寶貴的意見，讓我能深入思考研究的方向。

在兩間實驗室的生活都很充實愉快，感謝麗茶學姊、晴語學姊，在我剛進實驗室時教我許多技術；宜璇學姊認真的態度和效率一直是我學習的目標；偉孝學長無論是在實驗的觀念和方法上都不厭其煩的將經驗傳授給我，每次遇到困難時，更熱心的和我討論、提供很多實用的建議；也感謝彥輝學長、玫心學姊、有朋、書柔，無論是打球、聊天、活動…你們的熱情與幽默也令人難忘。

而在基因體的生活更讓碩二這一年精采充實；感謝昭圻學長、文雅學姊，從你們身上學到的東西，遠超過書本與課堂，與你們討論完總是得到不同的啟發；感謝治達學長的熱心與親切，與你聊天、喝飲料總是能讓我緊張的心情放鬆不少；文麒學長就像實驗的萬事通，也是最熟悉我的研究題目的人之一，感謝你不斷地陪我腦力激盪，和我討論研究與思考的方向；景光學長、成洲學長、郁鈴學姊豐富的學識與開朗的態度都讓我獲益良多，生活上許多事也感謝你們的協助。

感謝共同走過這段時間的碩二戰友們：玫君、子杰、文瑾、靖雅、有朋，有你們的陪伴，讓我知道我們不是孤軍奮鬥，每當遇到挫折與瓶頸，互相的加油打氣與支持，都是我再度奮戰的動力；同時也感謝實驗室的學弟妹：俊堯、芳瑛、靖慧，與你們相處融洽，相信未來你們也會有更好的研究成果。

益友難得，這一路上也感謝彥宏、良卉、韋廷、建緯、碧玲、侑澄、讀修的諸多協助與支持，因為有你們而讓生活充滿了無價的回憶。

感謝我的父母親，含辛茹苦地栽培我，成長的路上，始終是你們在背後無怨無悔的支持，未來我也會繼續努力、不讓你們擔心；最後，我想向天上的林育誼老師說，感謝您一年的指導，無論研究或做人處事的態度上，我會永遠記得您的教誨，能夠當您的學生，也是我最值得驕傲的事情之一！

天行健，君子以自強不息，經過兩年的學習與鍛鍊，期望自己能帶著自信與勇氣踏上下一段旅程、迎接接下來的挑戰，也願身邊的人皆平安順心。

聖為 2013 夏

## 摘要



肝癌在人類社會中已成為盛行率及死亡率高的癌症之一，在國內亦是危害國人健康的頭號殺手。然而，由於我們對於造成肝癌的因子，包含相關基因、蛋白質分子、細胞狀況甚至環境的機轉及交互作用仍缺乏全面性的了解，導致其治療困難且預後不佳。而目前經 FDA 核准的唯一一個肝癌標靶治療藥物是蕾莎瓦 (sorafenib)，為一個多種激酶(kinase)的抑制劑，可抑制肝癌細胞生長並促進細胞死亡；然而，其療效仍然有限，因此探討其可能影響的未知分子標的已成為肝癌治療上重要的研究課題之一。

近年來，利用核糖核酸干擾技術探討基因間的交互作用，以及鑑定對藥物具感受性的基因已被廣泛應用，在此基礎上，我們希望能建立在異種移植動物模式 (xenograft model) 中進行核糖核酸干擾篩選的平台。因此，初步我們挑選了 96 種激酶(kinase)，並以小髮夾 RNA(shRNA)庫抑制其基因表現，比較在小鼠中經藥物處理前後的腫瘤其 shRNA 對於基因抑制的變化情形。

經次世代定序(next-generation sequencing)與統計分析後，發現 3 個基因的 shRNA 讀值在經藥物處理前後有顯著改變，而其中脾酪胺酸激酶(Syk)於先前的研究被指出在某些癌症中是具潛力的藥物標靶，因此我們挑選了 Syk 進行後續實驗。

我們首先利用 shRNA 與抑制劑分別抑制 HuH-7 細胞中的 Syk 表現並以西方墨點法確認抑制效果。之後利用細胞生存試驗比較正常細胞與 Syk 受抑制的細胞，發現 Syk 被抑制後細胞對 sorafenib 的感受性增加，50%抑制濃度(IC<sub>50</sub>)由 6.7 $\mu$ M 下降至 4.0 $\mu$ M。另外我們也發現，和正常的 HuH-7 細胞相比，單純抑制 Syk 並不會對細胞生長造成影響，但若同時加入 sorafenib，則會使細胞生長受明顯抑制，雖然其中的詳細機制及 Syk 在肝癌中可能扮演的角色、功能仍須進一步探討，但期望此平台能應用於更大規模的篩選及其他疾病的研究中。


關鍵詞：肝細胞癌、核糖核酸干擾篩選技術、蕾莎瓦、脾酪胺酸激酶

## Abstract



Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most lethal and prevalent cancers in humans. Despite its significance, there are only limited numbers of effective therapeutic options, partially because our understanding of the genetic, molecular, cellular and environmental mechanisms that drive disease pathogenesis is far from comprehensive. So far, the only one molecular targeted therapy drug for HCC is sorafenib, which is a multi-kinase inhibitor. However, the mechanism underlying the therapeutic effect of sorafenib remains unclear, and several “off-targets” were recently discovered. Thus, to identify targets that sensitize to sorafenib may provide important information on HCC treatment.

Recently, genome-wide target gene knocked down by the pooled RNAi Consortium (TRC) shRNA library has been widely used, and it can be combined with drug treatment to become a platform for identifying potential drugs with synergistic effect. Based on this technology, we want to identify the sorafenib-sensitizing targets in HCC by *in vivo* RNAi screening. In our study, we transfected the pooled shRNA packaged by lentivirus into a HCC cell line, HuH-7 and injected these resulting cells subcutaneously into nude mice to knock down 96 kinases. After tumors grew, the nude mice were then divided into two groups, control and sorafenib treatment. After analyzing the genomic DNA of tumors by next-generation sequencing, three genes were



found that their shRNA ratios were dramatically different between treatment and control groups. Although the functional roles of these genes among the list in resistance to sorafenib are still undetermined, Syk has been reported as a potent modulator of epithelial cell growth and may be a potent molecular target in cancers.

We then used shRNA and its specific inhibitor, BAY 61-3606, to knock down Syk activity in HuH-7 cells. By cell viability assay, the HuH-7 cells are more sensitive to sorafenib, and the  $IC_{50}$  of sorafenib drops from  $6.7\mu\text{M}$  to  $4.0\mu\text{M}$  as Syk is inactivated.

Furthermore, the growth rate of Syk silenced HuH-7 cells was also much slower than that of HuH-7 control cells, which suggested that Syk may have a synergistic effect with sorafenib on cell growth or survival and may be a potential target in HCC treatment. Although the regulation mechanisms and functions of Syk still need to be further elucidated, the screening platform in this study can provide us some potential targets on disease treatment.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma, RNA interference screening, sorafenib, Syk

## 縮寫



BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HCC	Hepatocellular carcinoma
Kb	Kilo base pairs
kD	Kilo Dalton(s)
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NGS	Nest-generation sequencing
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate-buffered saline
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
SDS	Sodium dodecylsulphate
shRNA	short hairpin RNA
Syk	Spleen tyrosine kinase
TEMED	N,N,N',N''-tetramethylene diamine
TN	Tris and NaCl buffer
TNT	Tris, NaCl and Tween buffer
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane

## 目次



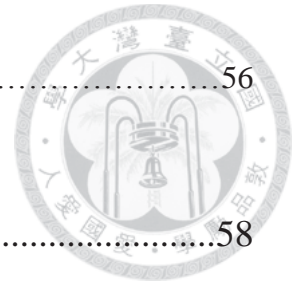
口試委員會審定書.....	i
謝誌.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
縮寫.....	vi
<b>第一章 導論.....</b>	<b>1</b>
1.1 肝癌 (liver cancer).....	1
1.2 肝癌形成過程中的重要分子機轉.....	5
1.3 肝癌的治療與蕾莎瓦 (sorafenib).....	9
1.4 核醣核酸干擾篩選技術 (RNA interference screening).....	17
1.5 研究動機與目的.....	20
1.6 研究策略.....	21
<b>第二章 實驗材料.....</b>	<b>23</b>
2.1 生物材料.....	23
2.2 儀器及設備.....	23
2.3 酵素及抗體.....	24
2.4 藥品與試劑組.....	25
2.5 軟體.....	26





<b>第三章 實驗方法</b> .....	27
3.1 肝癌細胞株的培養.....	27
3.2 小髮夾 RNA(shRNA)抑制目標基因.....	27
3.3 抗生素篩選.....	30
3.4 基因組 DNA(genomic DNA)萃取.....	30
3.5 異種移植(xenograft)動物模式.....	32
3.6 聚合酶鏈鎖反應、產物濃縮及膠體純化回收.....	34
3.7 次世代定序 (Next-generation sequencing, NGS)及結果分析.....	38
3.8 蛋白質分析法.....	39
3.9 細胞生存能力試驗 (MTT Assay).....	42
<b>第四章 結果</b> .....	44
4.1 利用異種移植(xenograft)動物模式進行核醣核酸干擾篩選.....	44
4.2 以次世代定序(Next-generation sequencing)及統計方法分析核醣 核酸干擾篩選之結果.....	44
4.3 以西方墨點法初步驗證動物實驗篩選.....	45
4.4 以小髮夾 RNA(shRNA)抑制酪胺酸激酶(Syk)之基因表現.....	45
4.5 以細胞生存能力試驗(MTT assay)驗證結合 sorafenib 與抑制 Syk 基因對肝癌細胞株之影響.....	46
<b>第五章 討論</b> .....	48
5.1 研究策略之探討.....	48
5.2 脾酪胺酸激酶 (Spleen tyrosine kinase, Syk)之功能.....	52
5.3 其他具有潛力之標的.....	55

5.4 結論與未來展望.....	56
第六章 參考文獻.....	58
圖表.....	64



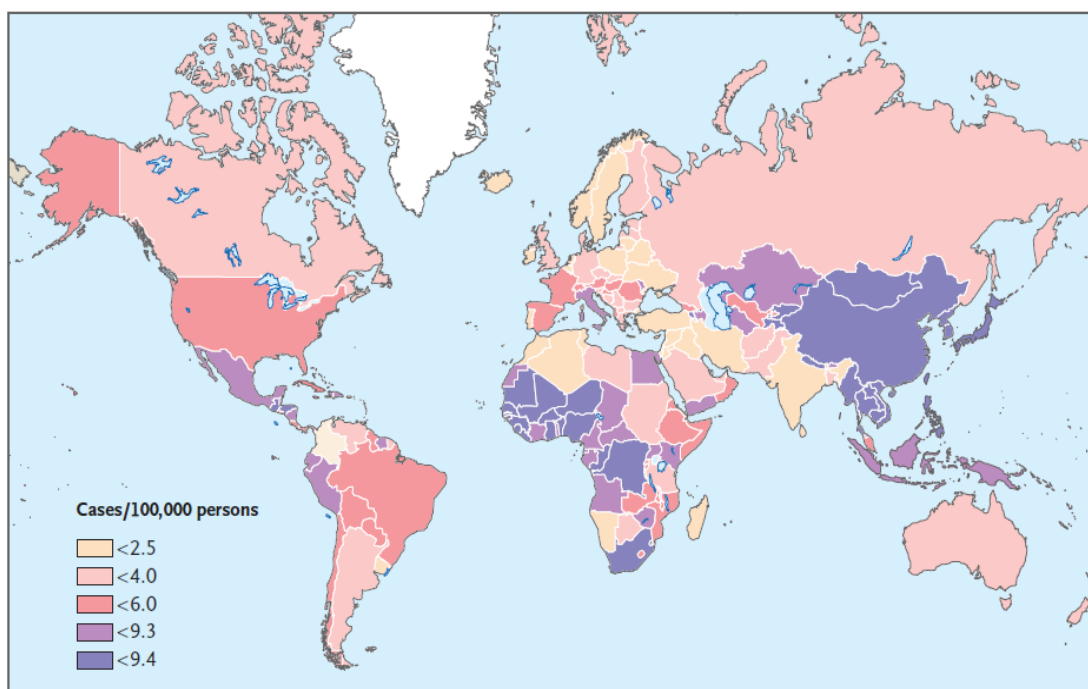
# 第一章 導論



## 1.1 肝癌(liver cancer)

截至 2011 年為止，在所有惡性腫瘤中，肝癌的罹患率在全世界男性人口中為第五名，在女性則為第七名，於過去二十年中，發生率亦有明顯的上升趨勢[1]。其中，尤以東亞以及薩哈拉沙漠周圍的非洲地區發生率最高，其次為南歐地區與印度尼西亞群島，而北美、美洲及澳洲地區的盛行率較低[1,圖 A]。

每年全世界約有超過一百四十萬人死於肝癌，並且以每年新增八十萬人的病例持續增加中[2]。而在台灣地區，根據衛生署最新統計，民國一百零一年國人因肝癌而死亡的人數有八千一百二十一人，死亡率約百分之三十五，為所有癌症死因排名第二，在男性與女性罹患癌症的比例中亦為第二名[3]，顯見肝癌對於



(圖 A：肝癌之區域分布。盛行率由藍色至淡紅色減少。單位：10 萬人；[1])

國人健康威脅甚鉅。另外，肝癌於男性發生的機率為女性之二至四倍，且好發於 45 至 60 歲之間。



### 1.1.1 肝癌之分類

依照肝癌的來源，可分為兩大類：由肝臟內細胞所引發的原發性肝癌(primary liver cancer)，以及肝外癌細胞透過血液或體液擴散至肝臟所引發的轉移性肝癌(metastatic liver cancer)。原發性肝癌依照細胞種類可再分為肝細胞癌(hepatocellular carcinoma；HCC)、膽管細胞癌(cholangiocarcinoma)以及較為罕見的肝臟血管瘤(hemangiosarcomas)與肝胚細胞瘤(hepatoblastomas)。其中肝細胞癌約佔肝癌發生率的85%至90%[4, 5]，本論文中所稱的「肝癌」即為「肝細胞癌」之簡稱，常見於慢性肝細胞發炎且發生肝硬化(cirrhosis)之患者。

### 1.1.2 肝細胞癌的危險因子(risk factor)

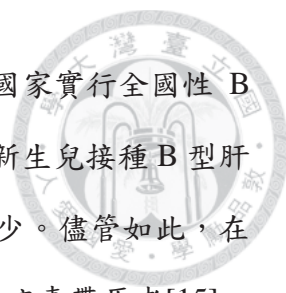
#### 1.1.2.1 肝硬化 (cirrhosis)

70%至80%的肝細胞癌患者併有肝硬化[5]。肝細胞可能因感染肝炎病毒、長期酗酒和非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis；NASH)[5-7]而受到損傷，肝細胞經修補再生而纖維化或硬化。此外，罹患遺傳性血色[8, 9](hereditary hemochromatosis)； $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏症(alpha1-antitrypsin deficiency)[9, 10]；自體免疫性肝炎(autoimmune hepatitis)[11]；紫質症(porphyrrias)[10, 11]；威爾森式症(Wilson's disease)[12, 13]這些類型的罕見疾病患者中，也有肝硬化的情形。然而，台灣地區的肝硬化患者大部分是感染肝炎病毒所引起[3]。

#### 1.1.2.2 肝炎病毒

##### 1.1.2.2.1 B型肝炎病毒(hepatitis B virus；HBV)

全世界最常見的肝癌基本病因是B型肝炎病毒。根據世界衛生組織(World Health Organization；WHO)估計，世界上有超過二十億人曾受到B型肝炎病毒感染。



染，其中約有三億人形成慢性 B 型肝炎[14]。超過一百六十個國家實行全國性 B 型肝炎預防接種計畫，台灣更是在 1984 年成為世界上第一個對新生兒接種 B 型肝炎疫苗的國家，自此之後感染 B 型肝炎病毒的幼兒人數大幅減少。儘管如此，在亞太地區(Asia-Pacific region)仍有 10%至 20%的人口為 B 型肝炎病毒帶原者[15]，大部分是由 B 型肝炎病毒帶原者母體傳給新生兒的垂直感染(vertical transmission)或是在嬰兒幼兒期感染所致[16]。而在歐洲、北美等其他高度開發國家，B 型肝炎病毒常暴露傳染於成年期，媒介多透過血液或體液的平行傳染(horizontal transmission)[17]，暴露於 B 型肝炎病毒者通常發展成急性 B 型肝炎或是隱性感染(inapparent infections)，再轉變成慢性 B 型肝炎患者或是帶原者。慢性肝炎可能發展成肝硬化(cirrhosis)、肝功能代償不全(hepatic decompensation)及肝細胞癌[18]。

#### 1.1.2.2.2 C 型肝炎病毒(hepatitis C virus ; HCV)

C 型肝炎病毒為正股 NRA 病毒，感染人體後，使宿主基因在轉錄過程中發生錯誤而突變[19]，使 75%以上的患者發展成慢性肝炎[20]。由於 C 型肝炎病毒突變機率高且基因變異型大，到目前為止仍無有效之預防疫苗[21]。2003 年的台灣臨床研究報告指出，調查呈陽性 C 型肝炎病毒的男性罹患肝細胞癌的機會較陰性者高出 15-20 倍[22]。世界上約有 3%的人口感染 C 型肝炎病毒[23]，與 B 型肝炎病毒傳染相比，C 型肝炎病毒多為水平感染，感染者有超過 60%至 80%的機會成為慢性 C 型肝炎患者，而 B 型肝炎病毒感染者只有約 10%[24]。目前對於 B 型肝炎病毒患者是否透過肝硬化，最後形成肝細胞癌仍無定論，但慢性 C 型肝炎患者約有 20%發展為肝硬化，這些肝硬化的病人中，有 1%至 3%最後得到肝細胞癌[25]。

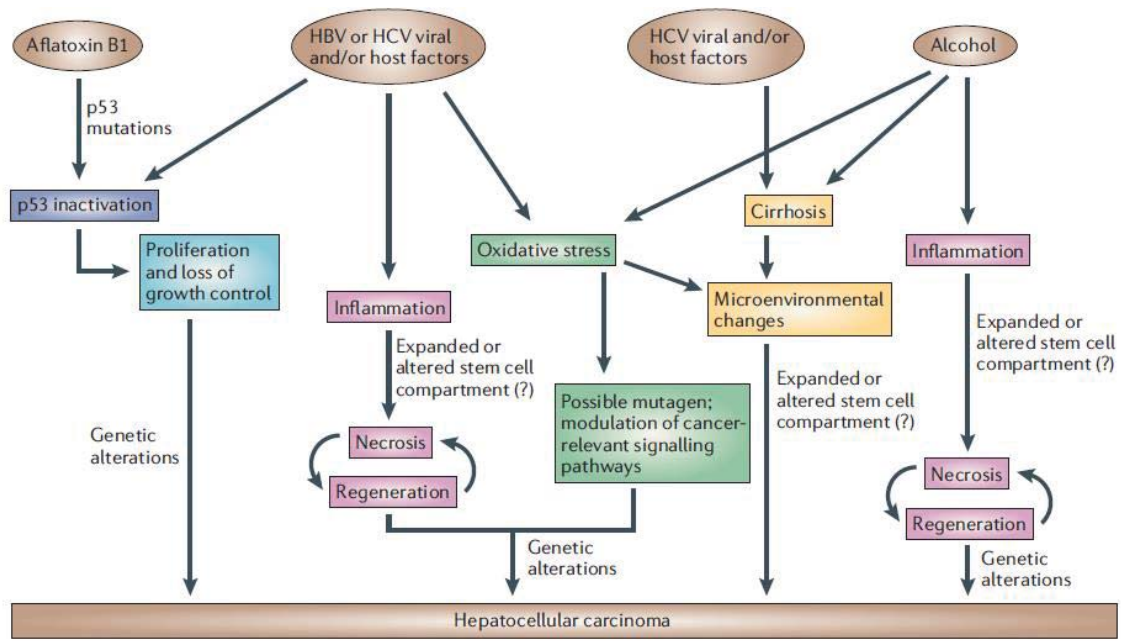
#### 1.1.2.3 黃麴毒素(aflatoxin)

黃麴毒素在非洲及東南亞地區是肝細胞癌肇生主要原因，這類毒素常見於發霉的食物如小麥、穀物、花生中。此外，醃製的食物如豆腐乳、醬油此類的發酵食品，及醃菜類如梅乾菜、鹹菜，在加工過程中亦容易受到黃麴毒素的汙染[26]。



### 1.1.3 肝癌化過程(hepatocarcinogenesis)與病理組織特徵

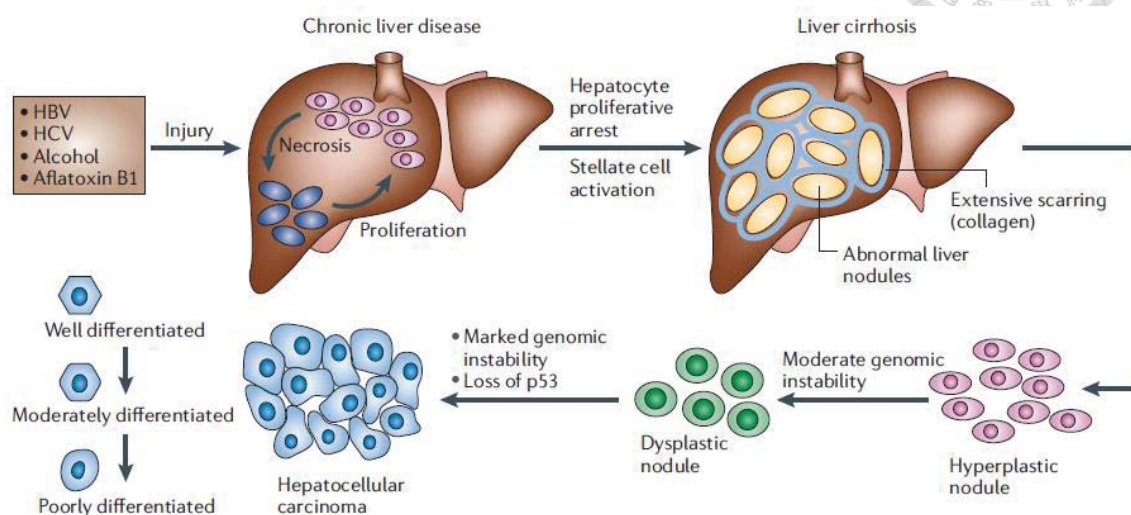
肝癌隨不同的危險因子影響而有不同肝癌化過程[27,圖 B]。酗酒者因為單細胞(monocyte)的活化而產生前發炎性細胞激素(proinflammatory cytokine)，同時內毒素(endotoxin)濃度亦增加活化了庫佛氏細胞(kupffer cell)使之釋放細胞激素與趨向素(chemokine)[28]，導致兩種結果：一為肝細胞在壞死與再生循環下，基因突變造成肝癌；另一為產生氧化壓力使微環境改變或是影響訊息傳遞而造成基因突變，亦造成肝癌。另外，黃麴毒素因會使 p53 基因突變後失活，影響生命週期，也是致癌物之一[29]。B 型肝炎的致癌途徑則較複雜，除了使 p53 基因失活外[30]，慢性感染後肝細胞在壞死與再生循環下，基因的突變也是造成癌症的原因之一[31]；或是產生氧化壓力使微環境改變、影響訊息傳遞而造成基因突變亦可能導致肝癌[32]。C 型肝炎病毒致癌機轉則較為單純，大多透過肝硬化而致癌[24, 32]。



(圖 B：肝癌化過程機轉；[27])

由病理組織觀察肝癌化過程細胞狀態，可知當刻種危險因子加諸肝細胞使其受傷後，肝細胞會不斷的循環再生與壞死，形成慢性肝炎[27,圖 C]。而後密集受傷使肝細胞再停止，星狀細胞(stellat cell)活化後形成疤痕(scarring)、膠原蛋白降解以

及不正常結節(abnormal nodules)，形成肝硬化。最後可觀察到肝臟增生性結節(hyperplastic nodule)，接著形成不良性結節，最後形成肝癌[33]。



(圖 C：肝癌病理組織在不同致癌階段的特性；[27])

## 1.2 肝癌形成過程中的重要分子機轉

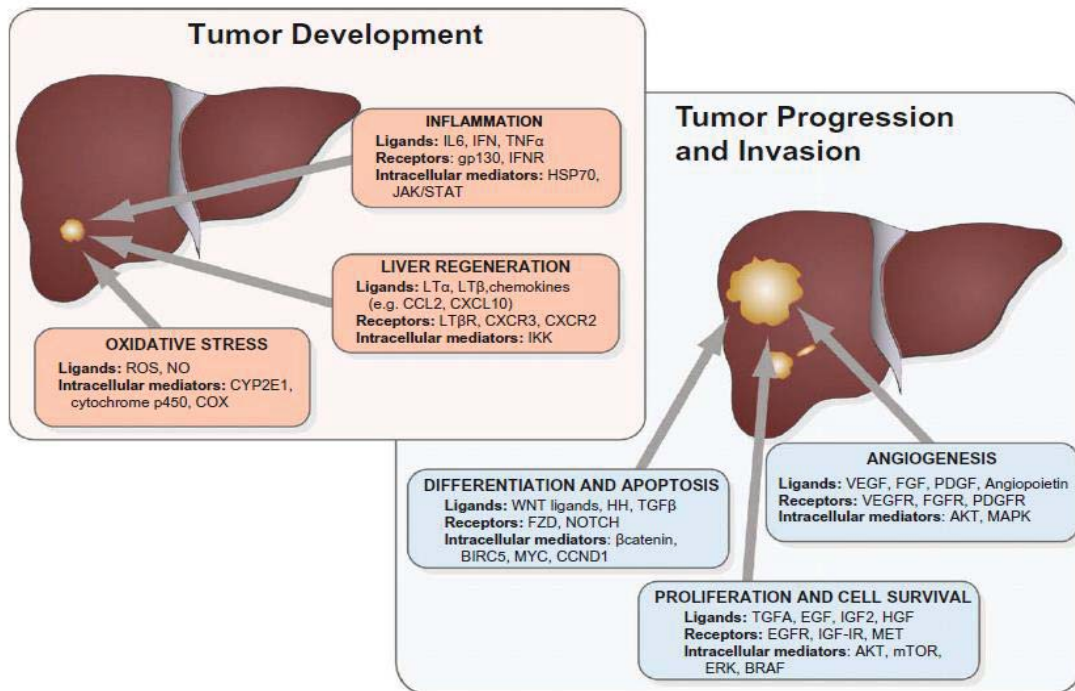
肝癌形成過程中，多種分子及訊息傳遞路徑受到異常活化或調控，由功能分類主要可分為細胞存活與增生、分化、發炎、血管新生以及抑癌基因 p53 等五部分[34,圖 D]。而目前治療肝癌的唯一標靶藥物蕾莎瓦(sorafenib)即是以抑制細胞增生及血管新生為治療標的。

### 1.2.1 細胞存活與增生之重要分子

#### 1.2.1.1 上皮生長因子(Epidermal growth factor, EGF)

在許多肝癌病患中，上皮生長因子(EGF)的大量產生為一重要的衡量指標，研究顯示 EGF 大量活化為造成肝癌的重要機制之一[35]。而從基因體學證據顯示，肝癌病患的七號染色體也會大量增加，EGF 的受體(EGFR)即位於此染色體上[36]。另外，有個案研究報告也指出，若天生帶有較多 EGF 的單一核苷多型性(single

nucleotide polymorphism, SNP), 罹患肝癌的風險也會顯著上升[37], 且此種 SNP 會使細胞中 EGF 的 mRNA 較為穩定, 表示 EGF 更能透過 EGFR 開啟下游的訊息傳遞路徑。而在肝癌的動物異種腫瘤移植模型(xenograft model)中發現, 阻斷 EGFR 的訊號可有抑制細胞增生及引發細胞凋亡的效果[38], 而目前 EGFR 的抑制劑亦已在進行臨床實驗中[39, 40]。



(圖 D：肝癌中常見的異常訊息傳遞路徑及分子；[34])

#### 1.2.1.2 類胰島素生長因子(Insulin-like growth factor, IGF)

IGF 對生長及發育為一必要的調控因子[41], 主要可分為兩型, IGF1 及 IGF2, 而其受體為 IGFR。在正常生理中, IGF2 的表現量在胚胎發育時會大量增加, 而在發育完成後即會下降[42]。在肝癌形成的過程中, 有一異常情形為 IGF2 之大量表現[43]。另外, 近年研究也發現在 C 型肝炎所導致的肝癌中, 利用單株抗體阻斷 IGF1 受體的訊號可使腫瘤形成能力下降[44]。





### 1.2.1.3 肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)

HGF 對肝臟發育而言是重要的生長因子，且為肝細胞生長因子接受體(MET)的唯一配體(ligand)。MET 經由 HGF 活化後，會使細胞間的連結被破壞而移位，對於胚胎發育時的細胞遷移(migration)扮演重要腳色。近年的研究指出 HGF/MET 分子的活化在癌化時會促進腫瘤的生長、入侵及轉移[45]。而在癌症中，MET 的活化除了透過配體之外，也可能藉體細胞或生殖細胞之突變、MET 不正常增生等方式產生，使得即使在缺乏 HGF 的情形下，MET 仍能活化[46]。

在肝癌中，若和周圍的正常細胞比較，癌細胞中的 MET 表現量約多了 20%至 48%，而大量表現 MET 也會使腫瘤出現肝內轉移，進而使手術後的存活率下降[47]。針對 MET 設計藥物或為一可行方式，然而目前並無相關藥物。

### 1.2.1.4 絲氨酸激酶(Akt)及有絲分裂原活化蛋白激酶(MAPK)之活化

細胞外的訊號可透過 EGFR，IGFR 或 MET 的活化而造成下游的 Akt、MAPK 等激酶活化。此訊息傳遞路徑的過度活化為導致 HCC 的最主要因子。這些訊息傳遞路徑中的分子對人類而言大多為致癌基因，如著名的 Ras 基因，由於上游的生長因子受體活化，經由 Ras 可活化下游的蛋白如 RAF、MEK、ERK (MAPK pathway) 等，這些均與細胞生長、增生有關，若過度活化會導致細胞不斷生長，甚至可抵抗正常的細胞凋亡而形成癌細胞[48]，但目前尚無直接針對 Ras 的藥物或療法。

在這些下游分子中，Akt 在許多病患中已被認為是腫瘤經手術切除後是否復發的重要指標[49]，而 mTOR 則是 Akt 下游一重要分子，其複合體可分為兩型：mTORC1 及 mTORC2；由於 Akt-mTOR 之訊息傳遞路徑中有許多回饋機制，造成多種癌症的分子機制在研究上較為困難。在人類的肝癌中，有研究指出 mTORC1 的活化扮演重要角色[35]，而一些 mTOR 的抑制劑在肝癌動物模式的效果也已證實此結果[50]。



### 1.2.2 與肝臟發育及細胞分化相關的分子

根據目前研究結果顯示，在肝癌中和細胞分化相關而會受到異常調控者主要為 Wnt 的訊息傳遞路徑，而除了和細胞分化相關外，Wnt 也在肝臟發育中扮演重要角色[51, 52]。在肝癌中，CTNNB1 及 AXIN1 是兩個常被發現會突變的基因，突變的結果使 Wnt 下游的  $\beta$ -catenin 不會被泛素標定(ubiquitination)而降解，因而累積在細胞核內使和細胞分化及增生的相關轉錄因子被活化，進而促進細胞過度分化及生長[36, 53]。另一和 Wnt 類似，亦與細胞分化相關的訊息傳遞路徑為 Hedgehog(HH)，在肝癌中也會大量活化。

### 1.2.3 與發炎反應相關之分子

發炎反應可視為肝硬化現象的特徵，也因此肝癌中，有許多發展治療的方式為利用化學療法針對發炎反應相關的訊息傳遞路徑分子，然而目前並無較成功之方法。在肝臟的發炎反應中，介白素-6(interleukin-6, IL-6)扮演重要角色，其為一種多功能的細胞激素，會促進免疫反應，透過下游的 Stat3 會使肝癌細胞具有類似幹細胞不斷再生的功能，也因此被認為和手術切除腫瘤後存活率卻低下及腫瘤再復發相關[54]。而由於雌性激素會抑制 IL-6 的產生，肝癌在女性的發生率低於男性[55]。在某些肝癌患者中，IL-6 會活化下游的 JAK/Stat3 分子，促進細胞分化、生長及存活，而使癌細胞不會死亡。因此發炎反應相關分子在肝癌形成過程中亦扮演重要角色。

### 1.2.4 與血管新生相關之分子

血管新生亦被視為是肝癌的重要特徵之一。在肝癌中，會促進血管新生的主要為血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor, FGF)，其中以 VEGF 及其受體 VEGFR 的大量表現為最主要之因子。另外，大量表現的 VEGF 和疾病的嚴重程度相關性高，而其在血清中的含量也為預測手術後療效及復原情形的標的之一[56]。另外，亦有研究指出



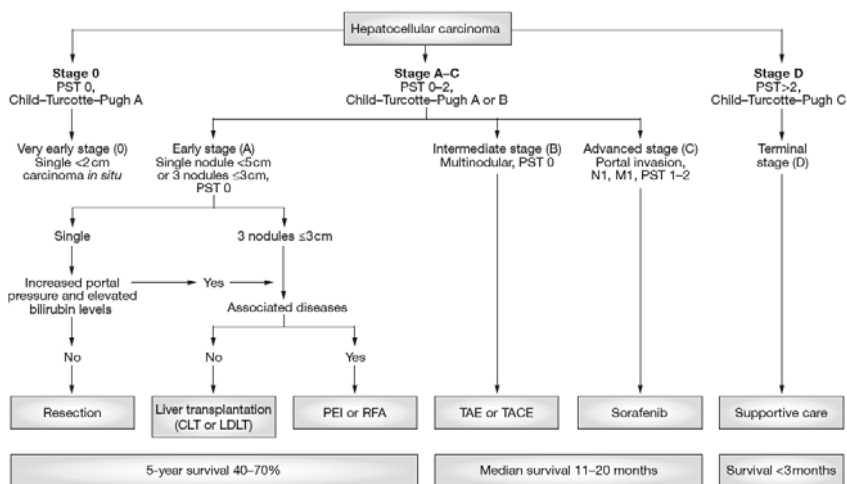
FGF 可能會和 VEGF 有加成作用，使腫瘤的血管新生情形更旺盛[57]。

### 1.2.5 p53 抑癌基因

P53 抑癌基因在超過 50% 的癌症中被發現有突變現象。由於其具有穩定基因體的功能，被視為是基因體之保護者。當 DNA 受到傷害時，p53 基因會活化促進細胞凋亡或使細胞循環停滯(cell cycle arrest)，待 DNA 修復而令細胞不會癌化[58]。在一些食物中常含有黃麴毒素的地區，如中國及環撒哈拉沙漠，許多肝癌患者被檢測出其 p53 基因突變[59]；另外，B 型肝炎病毒中的 X 蛋白亦被證實會和 p53 結合而阻斷其和 DNA 結合的功能，使 p53 無法引發細胞凋亡。

### 1.3 肝癌的治療與蕾莎瓦(sorafenib)

在診斷上，原則上是需要病理組織學之診斷，但在病患具肝癌危險因子如肝硬化存在，若配合典型的影像學檢查，則可以逕行做肝癌的臨床診斷(clinical diagnosis of HCC)。此外偵測甲型胎兒蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、脫羧基凝血酶(des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, DCP)[60]與甲型胎兒蛋白異質體 3(AFP-L3)[61, 62]三種常用肝癌腫瘤標誌，也有助於肝癌之診斷。而在臨床上，肝癌目前可分為五個階段，Stage 0、Stage A、Stage B、Stage C 及 Stage D，各有其對應的不同治療方式[63，圖 E]。



(圖 E：肝癌的各階段及現行治療方式；[63])



### 1.3.1 肝癌的治療

肝癌的治療，最理想的是早期發現，早期治療。若能在沒有症狀的情況下早期發現，手術切除是最理想的選擇，治療時通常都會根據患者肝功能的好壞，腫瘤大小及位置、患者年齡及其他生理狀況來決定[1]。

#### 手術切除(Surgical resection)

手術切除是目前肝癌治療之第一選擇。一般而言，單獨一顆腫瘤的肝癌較適合開刀，多發性腫瘤的肝癌則須依每個人病況不同而做個別評估。腫瘤的大小並非影響可否開刀的主要決定的因素。如果肝癌已經侵犯到肝門靜脈主幹，則不適合開刀。一般選擇沒有肝硬化或是肝功能代償良好之患者。最理想的病人是沒有症狀、肝功能正常的單一腫瘤(< 5公分)及沒有明顯肝門靜脈高壓而且膽紅素正常的人。手術中會以超音波來偵測額外的小型腫瘤並做切除以消除未被認出的局部散佈[63]。

#### 肝臟移植(Liver transplantation)

目前國內肝移植準則，患者必須在65歲以下，且單一肝癌不超過5公分，或多發性肝癌不超過3顆且任1顆直徑不超過3公分，同時未侵犯到血管與遠端轉移。適當選擇的病人5年存活率可以達到70%而復發率低於15%。根據研究資料顯示，肝臟移植對於大型肝癌的治療效果不佳，日後復發的機會很高，對於小型肝癌而言，治療效果較好[63]。

#### 酒精注射治療(Percutaneous ethanol injection, PEI)

肝癌體積很小時(腫瘤直徑小於3公分且腫瘤數目在3個以下)較適宜在超音波指引下做純酒精注射治療。純酒精能使肝細胞內的蛋白質凝固變質，造成肝細胞壞死。治療的反應率取決於腫瘤直徑，通常 $\leq 3$ 公分的病灶達到100%，因此小型腫瘤的存活最好[63]。



## 射頻燒灼術(Radiofrequency Ablation, RFA)

射頻燒灼術對 $\leq 3$ 公分的腫瘤效果與酒精注射相同。對3公分以上的腫瘤完全反應率不到50%，因此對於治療體積較大腫瘤的效果不如手術切除。

射頻燒灼術是利用電流通過探針前端的加熱器，由電燒探針的尖端直接將熱傳導到周圍的組織，而其組織的傷害則依賴探針所釋放出的熱量而定。射頻治療所用的方式有時被稱作冷電燒，在超音波指引或電腦斷層指引下，將治療探針(probe)穿過皮膚，插入腫瘤組織中，然後接上電源放出交流電，當交流電經過組織時，使得組織當中的電子被激盪，當電子依循電流方向的改變而前進時，電子激盪造成了對包圍在電極周圍的組織產生了摩擦熱。此過程會產生高熱，電極本身並不產生熱量，而只有組織被加熱，但組織可將一部份熱傳導傳回探針，當組織接受足夠量的熱度而溫度達到攝氏50-100 $^{\circ}\text{C}$ 時，受治療的組織會產生凝固性壞死(coagulation necrosis)，癌細胞便被固定而死亡。

此種療法的優點是傷口小，治療時間短，可以一次將腫瘤組織完全殺死，做完治療後若沒有發生併發症，24小時內即可出院，縮短住院天數。然而和其他腫瘤消除方法相同，射頻治療用於肝硬化病人或者腫瘤靠近主要的膽道系統時，須審慎評估。當腫瘤很靠近肝臟表面，位於肝臟包膜之下時，射頻治療的過程中發生出血的機會較高，可能促進腹膜內腫瘤散佈。對於大血管旁的腫瘤，射頻治療若以經皮治療的方式，則靠大血管旁的腫瘤細胞可能會因血管的冷卻效應而使溫度提升不足，殺滅腫瘤的能力便會減弱，可能導致治療不完全。若腫瘤很靠近中空臟器，例如胃或結腸，積極的治療或許會導致腸管或中空臟器的傷害，導致穿孔。出血是最常見的併發症，依照術中射頻治療的觀察，在射頻的電極針拔出後，電極針穿過組織之通道出血的機會可達29.8%，但出血量都很少(小於5cc)，同時都可以用電針在肝臟穿刺位置燒灼而控制。極少數的病人在治療後一週之內會再度發生出血[63]。



## 經動脈(化療)栓塞(Trans-arterial (chemo)Embolization, TAE/TACE)

TAE目的在於止血或使腫瘤缺血而壞死。目前常應用在肝臟腫瘤的栓塞治療。由於肝臟的血液供應是雙軌的，對正常人而言，肝臟血液大約75%來自肝門靜脈，25%來自肝動脈。肝動脈、肝門靜脈各供給50%氧氣。反之，惡性腫瘤所需的血液，幾乎完全由肝動脈供給，若把腫瘤之供應動脈堵塞，不但可使腫瘤缺血壞死(ischemic necrosis)，亦不會引起正常肝組織之完全梗塞(infarction)。因此，利用血管攝影術，由股動脈穿刺放入導管，將肝腫瘤的肝動脈或主要分支用明膠予以阻塞可以使腫瘤產生缺血性壞死，使腫瘤變小或消失。目前栓塞是除了手術切除，治療肝癌的主要選擇之一，尤其是在肝機能不良，肝硬化厲害或腫瘤位置不佳不適合手術切除之病例可考慮栓塞治療。其缺點是肝癌不易完全壞死，殘留的腫瘤有再繼續生長的可能性。對於多發性肝癌，肝動脈栓塞是全身性治療外，局部治療中唯一的選擇[63]。

## 經肝動脈化學治療

此法主要是針對無法經由手術切除之肝臟惡性腫瘤的病人，在肝臟動脈內放置一條可供化療使用的導管，如此可使大部分的化療藥物直接進入肝臟之腫瘤細胞內以達到治療效果，進而減少化療藥物之劑量並減少化療藥物所引起之全身性副作用。此療法主要適用於尚未肝外轉移之原發性惡性腫瘤，如肝細胞癌及膽道細胞癌，或是其他惡性腫瘤之肝臟轉移[63]。

## 全身性化療

肝細胞癌為全身性治療最為困難之實質腫瘤之一，化學治療的效果目前仍在積極研究中。曾有研究顯示，以某幾種化療劑加上干擾素的治療，使用於進展性肝炎不能切除的肝癌患者身上，部份反應率佳。惟肝癌患者通常併有肝硬化，對化學治療的耐受性也因器官的受損而變差，成為全身性化療的最大問題[63]。



## 標靶治療

標靶治療因其副作用低，可針對特定之分子機制，因此近年在治療及研究上受到重視，而目前肝癌的標靶藥物主要有兩類：

### (一)阻斷癌細胞訊息傳遞路徑的標靶治療藥物

1. Sorafenib (Nexavar, 蕾莎瓦)：為一種口服的多激酶抑制劑，主要對抗血管內皮生長因子受體，血小板衍生生長因子受體的作用機轉，抑制與腫瘤生長、腫瘤血管新生有關的激酶。在亞洲晚期肝癌試驗的結果顯示治療組整體存活期可達 6.5個月，比對照組的4.2個月提升47%，平均治療2.8個月後，治療組才開始出現肝癌惡化，優於對照組的1.4個月。可能的副作用包括手足症(hand-foot syndrome), 疲勞, 下痢等。此藥物是目前對於肝癌標靶治療效果較顯著之藥物，也是第一個由FDA核准用於治療肝癌的標靶藥物[64]。
2. Sunitinib (Sutent, 紓癌特)：為一種口服的多激酶抑制劑，主要針對內皮生長因子受體，血小板衍生生長因子受體以及c-kit蛋白等。可能的副作用包括手足症，高血壓，下痢等。
3. Erlotinib (Tarceva, 得舒緩)：為一種口服的EGFR激酶抑制劑，可藉由抑制表皮生長因子受器阻斷Ras/MAPK訊息傳遞路徑，導致肝癌細胞的死亡。可能的副作用包括出疹，心肌梗塞，下痢等。

### (二) 抑制血管新生的標靶治療藥物

目前用來治療肝癌的主要是 bevacizumab (Avastin, 癌思停)，為一人工合成之對抗血管內皮生長因子(VEGF)之單株抗體，可抑制血管新生。由於肝癌為富含許多血管之腫瘤，因此利用此類抑制血管新生的藥物來治療肝癌。可能的副作用包括高血壓，血栓等。

理論上使用標靶藥物治療癌症，可精確作用在癌細胞而不影響正常細胞，使療效大為提高，且副作用減少。但實際上，目前標靶治療對於肝癌的療效仍不盡理



想；然而，由於標靶治療副作用較低且病患耐受性較佳，目前許多相關研究仍致力於改善標靶藥物的療效，或是結合標靶藥物與其他療法，以達到更好的治療效果。

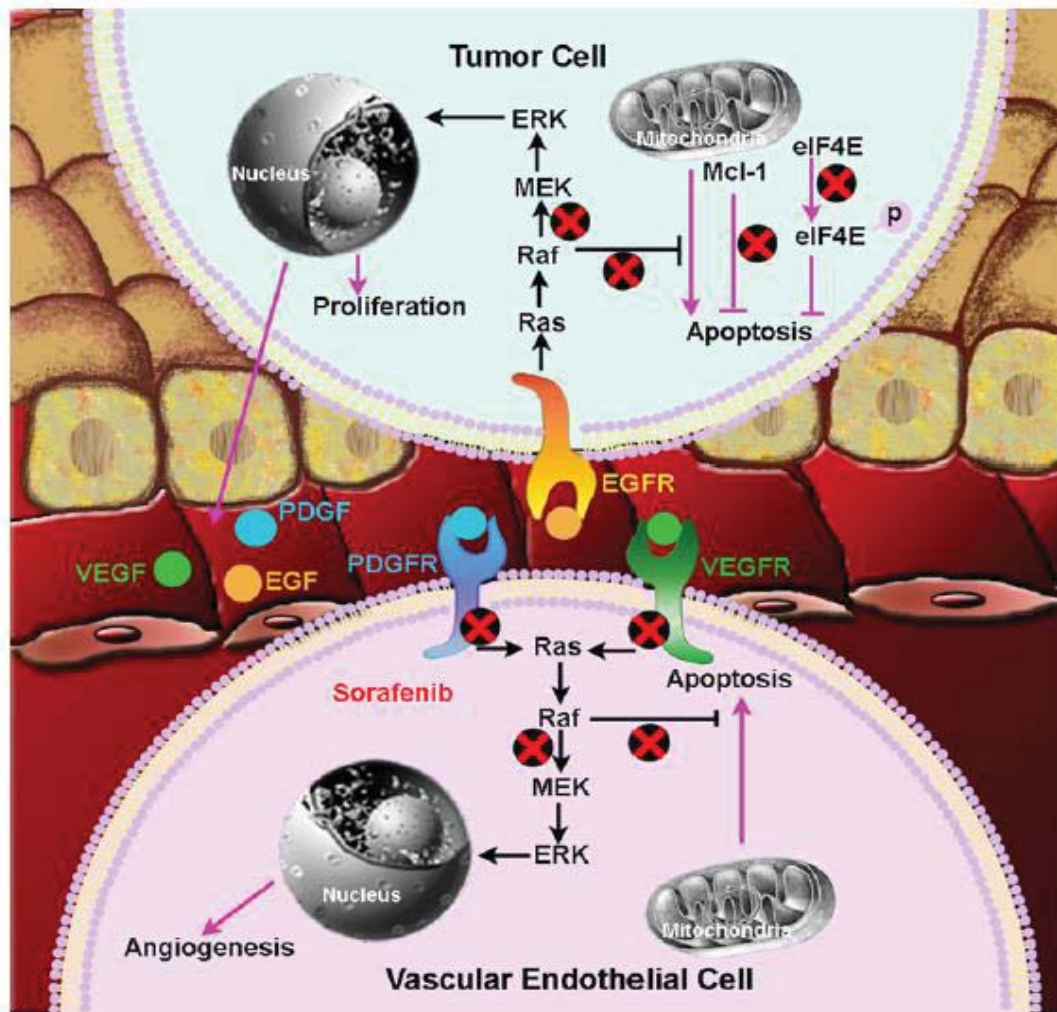
### 1.3.2 Sorafenib (Nexavar, 蕾莎瓦)

#### 1.3.2.1 Sorafenib的作用機制

對於肝癌的形成而言，Raf/MEK/ERK此MAPK訊息傳遞路徑的活化扮演了非常重要的角色，此訊息傳遞路徑直接調控了細胞的生長與凋亡，當受到一些不正常的影響，如上游的致癌基因Ras活化[64, 65]、一些生長因子(如血小板衍生生長因子、血管內皮生長因子等)及其受體大量表現、以及一些由B型或C型肝炎病毒所引發的刺激等[66, 67]，均會造成此訊息傳遞路徑開啟，而直接促進細胞增生及存活，或經由增加血小板衍生生長因子(PDGF)和血管內皮生長因子(VEGF)的產生而造成血管新生的現象[68, 圖F]；因此，針對此路徑的標靶藥物即為治療肝癌的重要且具潛力的可行方法之一[69]。

Sorafenib的結構為聯芳基尿素(bi-aryl urea)化合物，而其作用機制如圖F所示，在腫瘤細胞中，sorafenib會阻斷Raf/MEK/ERK此訊息傳遞路徑而抑制細胞生長，同時也會抑制Raf的異構物(isoform, 如Raf-1及B-RAF等)、真核轉譯因子4E (eIF4E)的磷酸化，以及Mcl-1等與抵抗細胞凋亡相關的蛋白，使腫瘤細胞停止生長並走向死亡；而在血管內皮細胞中，sorafenib則會抑制PDGF及VEGF的酪胺酸激酶受體(receptor tyrosine kinase)，進而阻斷下游的訊息傳遞，導致血管新生作用被抑制。綜合此二機制，sorafenib可作用於腫瘤細胞及血管內皮細胞而達到使癌細胞凋亡及阻斷血管新生的治療效果。

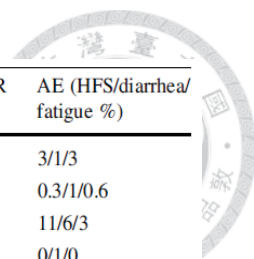




(圖F：sorafenib的作用標的；[64])

### 1.3.2.2 Sorafenib的療效與抗藥性

由臨床研究的資料顯示，在肝功能尚正常(以Child-Pugh score評估為A級)、年齡主要在70歲以下的男性肝癌患者中，使用sorafenib治療和安慰劑相比的確能達到具一定成果的療效[64，表A]。



Phase of trial	No. of patients	Male (%)	Median age (years)	CPS (A/B/C %)	Etiology (HBV/HCV %)	OS (months)	TTP (months)	DCR (%)	AE (HFS/diarrhea/fatigue %)
3 (RPC)	Sor 299	87	65	95/5/0	19/29	10.7	5.5	43	3/1/3
	PI 303	87	66	98/2/0	18/27	7.9	2.8	32	0.3/1/0.6
3 (RPC)	Sor 150	85	51	97/3/0	71/11	6.5	2.8	35	11/6/3
	PI 76	87	52	97/3/0	78/4	4.2	1.4	16	0/1/0
2	137	71	69	72/28/0	17/48	9.2	4.2	36	5/8/10
2	16	88	72	NR	NR	>15	>3	64	6/6/6
2	51	88	56	71/26/3	90/6	5.0	3.0	26	16/20/8 <sup>a</sup>
1	27	93	70	48/52/0	15/74	15.6	4.9	82	27/0/0
1	13	100	64	92/NR/NR	0/23	>2	NR	62	18/82/91 <sup>a</sup>

(表A：sorafenib於HCC之治療效果；[64])

在兩個較大型的第三期臨床試驗中，經過sorafenib治療的病患，其平均存活率(overall survival, OS)提高2.3至2.8個月，腫瘤復發時間(time to tumor progression, TTP)延長1.4至2.7個月，疾病控制率(disease control rate, DCR)則提高11%至19%。而目前sorafenib對於女性病患、70歲以上患者及具有肝硬化的患者之療效仍缺乏相關資料。

雖然sorafenib可延長肝癌患者的平均存活時間，然而卻也會造成患者產生抗藥性。目前產生抗藥性的機制主要有四種[70]：

#### PI3K/Akt 訊息傳遞路徑活化

此機制是目前已知較主要會對sorafenib產生抗藥性的途徑，由於此路徑直接調控了細胞存活與細胞凋亡，當其活化時，會使細胞生長且存活率上升，並抑制細胞凋亡，而使癌細胞不會死亡。隨著sorafenib濃度的上升，野生型的肝癌細胞株如HuH-7、Hep3B及PLC5等均會走向細胞凋亡，然而若長時間以sorafenib處理細胞，則會產生抗藥性，且磷酸化的Akt表現量上升，表示PI3K/Akt被活化而使細胞存活[71]。亦有研究結果證實若在細胞中加入Akt的抑制劑(如MK-2206)則可使細胞sorafenib的感受性提升而減低此現象。



## EGFR及HER-3表現量上升

此兩種受體的表現量上升時，會使肝癌細胞對sorafenib產生抗藥性。近年研究也發現在細胞實驗和疾病動物模型中，若結合運用此兩種受體的抑制劑與sorafenib，能使癌細胞的死亡增加[72]。

## Epithelial-mesenchymal transition, EMT現象

EMT為上皮細胞轉變為間葉細胞之現象，有些肝癌細胞株如HepG2在發生此現象後型態改變、且侵入能力更強，並會對sorafenib有抗藥性[73]；然而，有些研究卻也顯示，於動物模型中，sorafenib會抑制EMT，並使和轉移有關的因子TGF- $\beta$ 含量下降[74]，顯示sorafenib可抑制EMT，但細胞若產生抗藥性則會繼續發生EMT現象。

## 自體吞噬作用

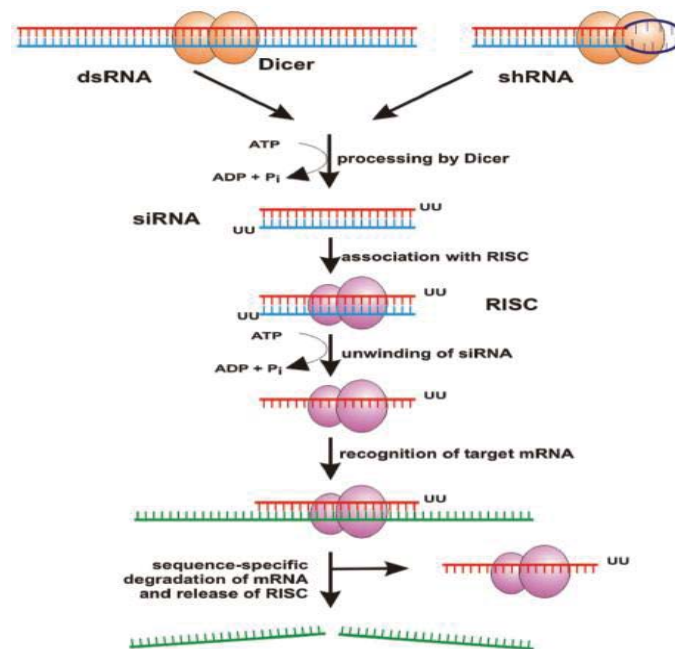
自體吞噬(autophagy)是指細胞可藉由本身的溶酶體(lysosome)將自身的胞器(organelle)或其他物質進行分解，被認為是調控細胞生長、分化、體內平衡(homeostasis)重要機轉，而此機制卻也能使癌細胞在缺乏營養時存活(部分胞器被分解，生長停滯，但不會死亡)。近年有研究顯示sorafenib會促進肝癌細胞的自體吞噬作用，進而導致抗藥性產生[75]，然而詳細的機制仍未清楚。

綜合上述有關sorafenib的作用機轉、療效及抗藥性之研究，可現sorafenib雖於肝癌中有一定療效，但其作用機制與抗藥性的產生尚有未詳盡之處，且能使用的患者及其存活率仍偏低，因此若能更深入了解sorafenib是否有其他共同作用的分子及訊息傳遞路徑，對於改善sorafenib於肝癌之療效或能有進一步之突破。

## 1.4 核糖核酸干擾篩選技術 (RNA interference screening)

核糖核酸干擾現象(RNA interference, RNAi)最早在植物中發現，主要為一種對於病毒感染的免疫反應。當病毒入侵時，植物細胞內的一些短片段雙股RNA可使

特定mRNA分解，藉此阻斷病毒基因的表現，此作用機制即稱為RNA干擾現象。RNAi可用於抑制特定基因的表現，在細胞內，較長的雙股RNA(dsRNA)或由外送入的小髮夾RNA(shRNA)首先會被Dicer酵素辨認而切割成較短的雙股核苷酸，稱之為siRNA，接著siRNA會和RNA誘導沉默複合體(RNA-induced silencing complex, RISC)結合，使雙股構造打開，而siRNA的其中一股會留在RISC中，並和目標基因的mRNA結合，使目標基因的mRNA被降解或不轉譯而達到抑制該基因表現的功能 [76,圖G]。

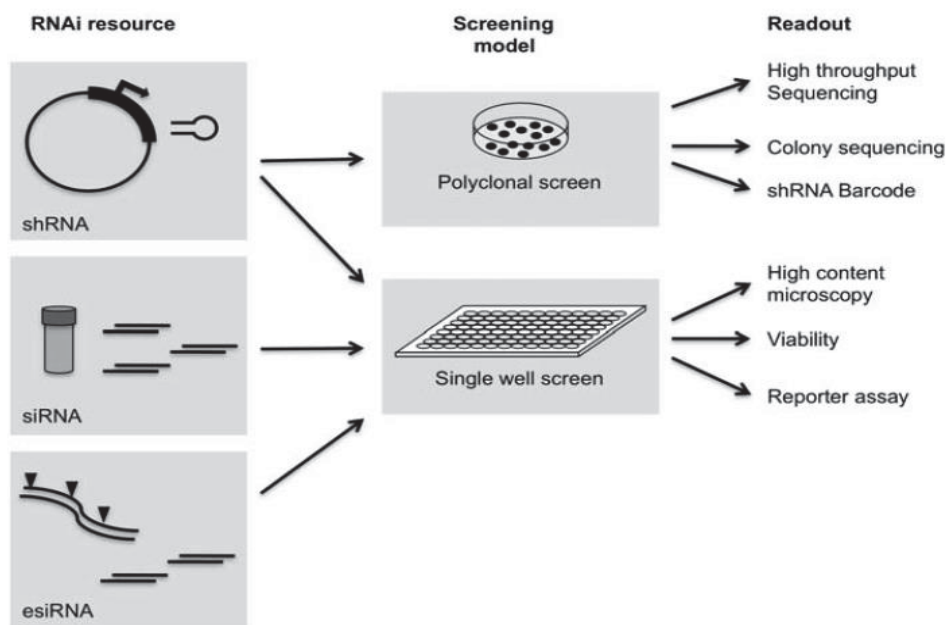


(圖G：RNAi作用機制；[76])

應用此機制，RNAi可被應用於模擬基因功能缺失(loss-of-function)之情形，藉以了解基因的功能及表型(phenotype)，近年來，由於人類及老鼠的全基因組RNAi庫已被建立完成，可應用於哺乳類動物細胞的基因體功能相關研究。而在利用RNAi技術的研究上主要有兩種方式，分別為化學合成的短干擾RNA(siRNA)以及與載體結合的小髮夾RNA(shRNA)，各有其優缺點與適合的實驗方式[77,圖H]。siRNA可直接且快速作用到目標基因而不需再經細胞內的酵素切割，但只適合較短期的細胞實驗，且價格較昂貴；而shRNA除價格較低外，也較能在細胞中被穩定表現，

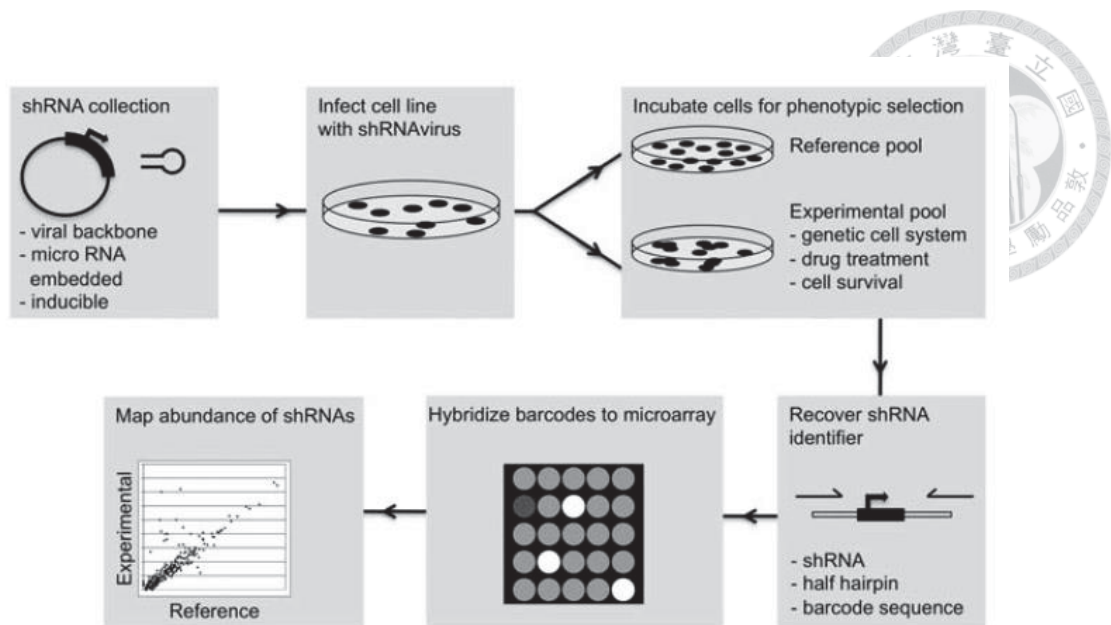


因而適用於長時間的細胞實驗，如腫瘤形成測試(colony formation assay)及抗藥性測試(drug resistance assay)、動物實驗等[78]。



(圖H，RNAi種類與適用實驗；[77])

而目前許多利用shRNA庫研究基因功能的方式為先將選定好的shRNA接入載體中(vector)，接著以直接轉染(transfection)或利用慢病毒(lentivirus)包裹shRNA並感染細胞以將shRNA送入細胞中，待細胞穩定表現送入的shRNA後即可進行實驗，如對藥物的反應、特定基因抑制後對細胞存活率的影響等，待實驗結束後即可萃取對照與實驗組之基因組DNA(genomic DNA)進行後續分析，目前常用的方式有微陣列(microarray)及次世代定序(next-generation sequencing)，由於可控制每顆細胞只表現一特定shRNA序列，藉由辨認特定序列即能分析各基因對生長的作用或藥物影響下的改變，或進一步探討不同基因之間的交互作用[77,圖I]。在本研究中由於將進行較長時間的細胞及動物實驗，因此即選用含有192株shRNA庫之病毒為工具進行研究。




(圖I：shRNA進行篩選之流程；[77])

### 1.5 研究動機與目的

肝癌的早期診斷較困難且致死率高，目前在國人罹患的癌症中已成為第二名，近年來世界上因各種不同原因而罹患肝癌的人口也快速成長；儘管如此，由於目前我們對於造成肝癌的詳細原因，包含基因與蛋白質分子的作用機制、對細胞的影響以及是否還有外在環境因子會促使疾病產生尚缺乏全面性的了解，使得對肝癌治療的方法及功效仍然有限。其中，sorafenib這個多種激酶的抑制劑是唯一由FDA許可用於肝癌治療的分子標靶藥物，可延長患者的生命且提高疾病的控制率 (disease control rate, DCR)；然而，此藥物卻也有其限制[70]：

1. 許多病人對藥物的反應率差，只有部分病人適用(只有在約5%的患者中有抑制或控制病情的效果)，且肝功能狀況亦會影響是否適合用藥及結果。
2. 能使用的劑量範圍小，人體血液中最多容許10 $\mu$ M
3. 容易產生抗藥性

目前對於sorafenib作用機制之了解主要在於抑制MAPK訊息傳遞路徑使細胞死亡，但對於是否有其他非預期的作用標的(off-target)所知有限，而由於sorafenib的限制及療效不佳，許多研究單位或藥廠亦積極開發肝癌治療之新藥，如舒癌特



(Sutent)，然而臨床研究結果卻顯示效果不如sorafenib，且有更嚴重之副作用，因此，目前除sorafenib外仍無其他有效或已被核可之藥物，亦突顯sorafenib之重要性，積極改善其療效以治療晚期肝癌之急迫性不言可喻；而由於近年來利用核醣核酸干擾技術探尋基因之間的交互作用或對藥物的反應已被廣泛利用於疾病研究，另外許多正在發展中的藥物係以激酶(kinase)為標的，因此，本研究應用核醣核酸干擾技術，並以激酶為標的，在腫瘤動物模式中進行篩選，期望能在肝癌細胞中鑑定對sorafenib具感受性之基因，除對於sorafenib的作用機制能有更深入之了解外，亦可藉此改善上述問題之方法，希望對於未來治療肝癌上有所貢獻。

#### 1.6 研究策略

由於本研究為在肝癌動物模型中建立核醣核酸干擾篩選平台的先導研究，故在設計上先以小量的激酶為標的進行篩選，在統計計算時降低複雜性與藥物處理後的隨機效應，初步先挑選了96個基因，每個基因依照抑制的效果選擇了2支shRNA以病毒包裹、感染肝癌細胞株HuH-7；經抗生素篩選後以皮下注射方式植入小鼠體內，待腫瘤形成至大小約100mm<sup>3</sup>後以藥物處理，之後萃取出組織的DNA進行分析，依照統計結果篩選出具潛力之基因進行進一步之驗證[圖J]。

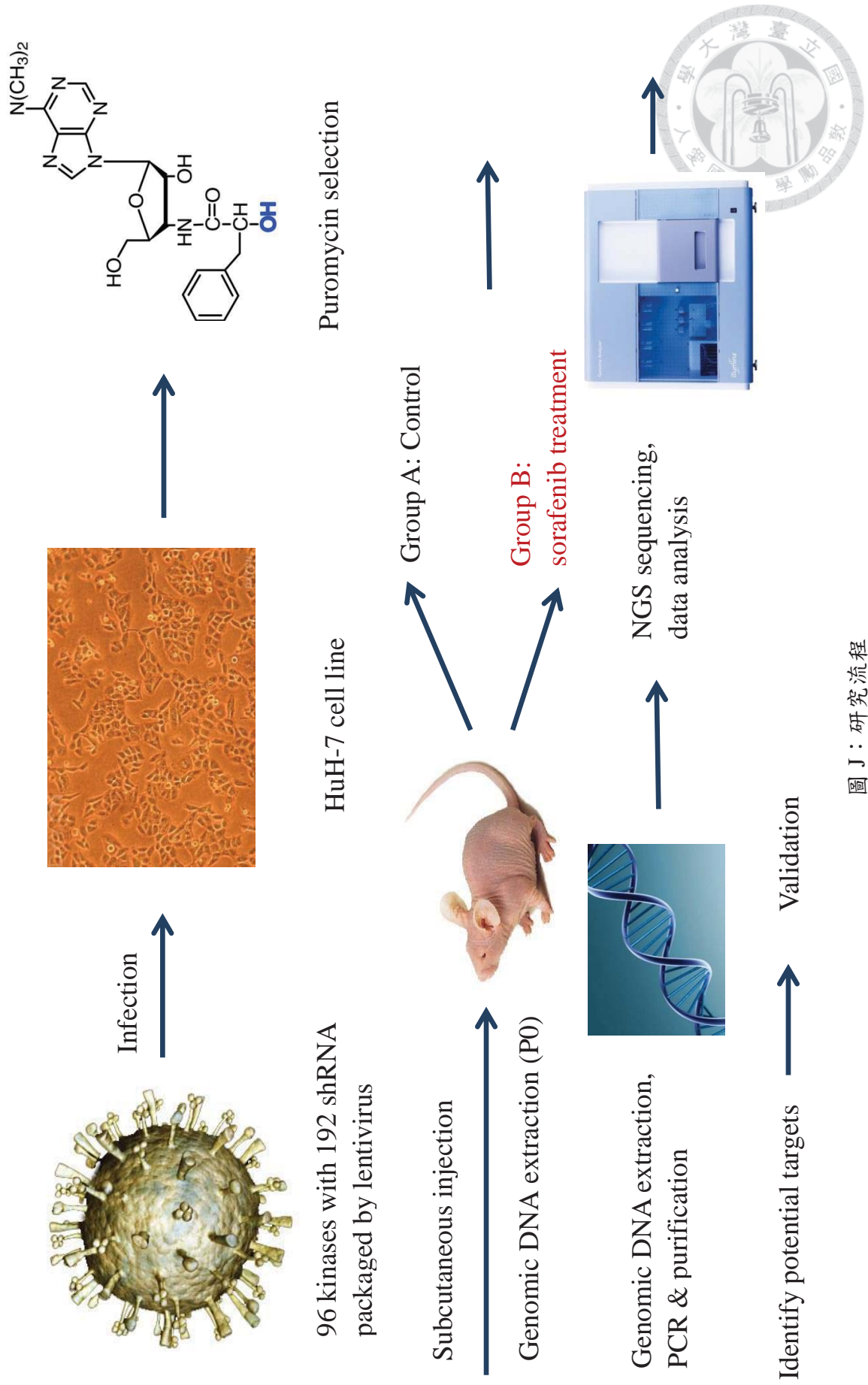


圖 J：研究流程



## 第二章 實驗材料



### 2.1 生物材料

品名	來源
192 shRNAs pooled lentivirus	中央研究院RNAi 核心實驗室
BALB/cAnN.Cg- <i>Foxn1</i> <sup>nu</sup> /CrlNarl mice	國家動物中心
HuH-7 cell line	Health Science Research Resources Bank (JCRB0403; Osaka, Japan)
HEK 293T cell line	American Tissue Culture Collection (ATCC)
pLKO.1-shRNA clones	中央研究院RNAi 核心實驗室
pMD.G	中央研究院RNAi 核心實驗室
pCMV- $\Delta$ R8.91	中央研究院RNAi 核心實驗室

### 2.2 儀器及設備

儀器及設備	廠牌
Automated cell counter	Bio-rad
B3 Mini gel system	Thermo
BD Ultra-Fine Needle	BD Bioscience
Digital Caliper Mitutoyo	Shinetch
DMIL Inverted Microscope	Leica
DTX 880 Multimode Detector	Beckman Coulter
Dry bath incubator	Major science
Electrophoresis Apparatus	NIHON EIDO
Finnpipette Multichannel Pipetters	Thermo

Himac CF15R centrifuge  
 Hybridization incubator  
 Hybridization oven  
 Oral Feeding Needle  
 Pipet aid  
 Pipetman  
 Sonics  
 Tissue Lyser II  
 Veriti Thermal Cycler  
 Vortex-2 Genie

Hitachi  
 Conoco  
 Firstec Scientific  
 Shineteh  
 Drummond Scientific  
 Gilson  
 Vibra cell  
 Qiagen  
 Applied Biosystems  
 Scientific Industries



### 2.3 酵素及抗體

酵素	廠牌
Trypsin-EDTA	Gibco
Taq polymerase	Takara
初級抗體	廠牌
anti-Akt	Santa Cruz
anti-Syk	Cell signaling
anti-GSK3- $\beta$	Cell signaling
anti-actin	Santa Cruz
anti-GAPDH	Santa Cruz

次級抗體

廠牌

HRP conjugated IgG anti-mouse

Cell signaling

HRP conjugated IgG anti-rabbit

Cell signaling



## 2.4 藥品與試劑組

藥品

廠牌

Acrylamide

Amresco

Agarose

Amersham Bioscience

BAY 61-3606

Santa Cruz

Cremophor

Sigma

Diphenyltetrazolium Bromide

Sigma

DMEM

Thermo

DMSO

Merck

dNTP

Takara

Ethidium Bromide

Sigma

Fast Green

Sigma

FBS

Gibco

Low Molecular Weight Standards

Amersham Bioscience

Matrigel

BD bioscience

PBS

Gibco

Penicillin/Streptomycin

Gibco

Pentobarbital

Sigma

Polybrene

Sigma

Puromycin

Sigma

Sorafenib	LC laboratories
TB broth	MO bio
TEMED	Merck
Tween 20	Sigma
Urea	USB



試劑組	廠牌
ECL-detection kit	Millipore
Purelink Genomic DNA Mini Kir	Invitrogen
QIAamp DNA Blood Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Pierce
PureLink Genomic DNA Kit	Invitrogen
Plasmid mini kit	Geneaid
Plasmid midi kit	Geneaid

## 2.5 軟體

- a. ImageQuant (GE Healthcare)
- b. Matlab R2010a
- c. Origin Pro 9

## 第三章 實驗方法



### 3.1 肝癌細胞株的培養

#### 3.1.1 培養基(medium)的配置

使用購買於Thermo公司之hyclone DMEM培養基，保存時冷藏於4°C，使用時須先於水浴槽(water bath)加熱至37°C，並加入5%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)以及1%的青黴素與鏈黴素(penicillin/streptomycin, PS)。

#### 3.1.2 細胞的培養

肝癌細胞株以直徑為10cm之培養皿(Tissue culture dish, Advangene™)並置於37°C，5% CO<sub>2</sub>的培養箱中培養。細胞於培養皿中長至八、九分滿，以10mL PBS沖洗兩次，加入1.5mL含0.2% EDTA、0.5% 胰蛋白酶的緩衝溶液 (trypsin-EDTA)，在37°C下處理10分鐘，將細胞剝落(trypsinization)下來。之後加入7mL培養基，停止胰蛋白酶對細胞的作用。以1,500rpm離心五分鐘去除胰蛋白酶，小心吸除上清液，並用5-10mL培養基將細胞沉澱打散回溶。根據實驗所需，重新分配適量細胞至各式培養容器中繼代培養(sub-culture)，或至細胞培養皿以進行實驗。

#### 3.1.3 細胞的計數

取等體積的細胞懸浮液與錐藍染色液(trypsin blue)混合均勻，染色後，以細胞計數器(cell counter)計算細胞數目。

### 3.2 小髮夾RNA(shRNA)抑制目標基因

#### 3.2.1 抑制單一基因之shRNA建立

##### 3.2.1.1 菌株培養


向中央研究院RNAi核心實驗室購買抑制目標蛋白之shRNA兩組，Clone ID為(1)

TRCN0000196401, (2) TRCN0000003163, 載體為pLKO.1-puro。取得後為冷凍於-80°C之大腸桿菌(*E.coli*)菌株形式，以塗菌環輕輕沾取菌液，塗於含有100 $\mu$ g/mL之Ampicillin培養基盤中，置於37°C 恆溫培養箱中培養，16小時後取出，以微量滴管挑取直徑約0.5mm之單一菌落，置於含有3mL LB培養液中，並加入上述濃度之Ampicillin，以37°C震盪培養。待16小時後，再將菌液移至100ml LB培養液中(亦含上述濃度之Ampicillin)，37°C震盪培養16小時。

### 3.2.1.2 含shRNA之中量質體DNA萃取

試劑組內容物	容量/數量
PM1 Buffer	110 mL
PM2 Buffer	110 mL
PM3 Buffer	110 mL
PEQ Buffer	130 mL
PW Buffer	360 mL
PEL Buffer	220 mL
RNase A (50 mg/mL)	200 $\mu$ L
Plasmid Midi Column	25 pcs

以Geneaid plasmid midi kit由培養完成之菌液中萃取質體。首先將菌液以轉速6,000g離心15分鐘，過程中先將Plasmid midi column置於50mL離心管中，加入5mL PEQ buffer使之全部順重力自然流下，將流入離心管之PEQ buffer倒掉。離心完後去除上清液，加入4mL PM1 buffer(內含RNase A)並震動使菌懸浮。之後加入4mL PM2 buffer，上下輕搖10次後靜置於室溫2分鐘使細胞完全裂解，而後加入4mL PM3 buffer並均勻搖晃約10秒，再以6,000g於室溫離心20分鐘。離心完後將上清液移至column中，順重力自然流下並去除。待液體流盡後加入12mL PW buffer，順重力自



然流下並去除，之後將column移至新的離心管，並加入8 mL PEL buffer將DNA沖  
堤至離心管中，之後丟棄column並加入6mL Isopropanol至離心管中，混合均勻後在  
4°C下以15,000g離心30分鐘。之後再去除上清液，並以5mL 75%酒精沖洗，在4°C  
下以15,000g離心10分鐘。離心完後去除上清液並在室溫下使DNA自然乾燥約10分  
鐘，最後加入200μL TE buffer，回溶質體DNA。

### 3.2.1.3 shRNA製備

將人類胚胎腎細胞(HEK 293T cell line)培養於10公分培養皿中，約八成滿時即  
可進行共質體轉染(co-transfection)實驗。轉染前30分鐘至1小時先換5mL新鮮含有  
血清及抗生素之DMEM。每一10公分培養基需要4μg質體及250μL Maestofection  
transfection reagent。首先取pCMV-ΔR8.91質體(包覆質體)1.8μg、pMD.G質體(封套  
質體)0.2μg及pLKO.1-shRNA(含目標基因之shRNA)質體2μg至微量離心管，並加入  
250μL不含血清及抗生素之DMEM培養基。之後將取轉染試劑12μL與250μL不含血  
清及抗生素之DMEM混合於另一微量離心管，之後加至含有質體之離心管混合均  
勻。最後將質體-試劑複合體加入細胞中，於37°C，5% CO<sub>2</sub>之恆溫培養箱12~18小  
時，再換新鮮含有血清及抗生素的培養基，於轉染後48小時及72小時收取培養液，  
通過0.22μm細胞培養專用無菌濾膜，此即包覆有目標基因shRNA之慢病毒。

### 3.2.2 抑制多目標之混合shRNA庫建立

向中研院RNAi核心實驗室購買客製化之慢病毒，其已包覆具有抑制目標的96  
個激酶(詳見Table 3)之192組shRNA，病毒價數為42409(pfu/mL)。

### 3.2.3 以包覆shRNA之慢病毒感染肝癌細胞株

將肝癌細胞株培養於6公分培養皿中，待細胞約六成滿時，即可進行病毒感染  
實驗。感染時先吸除培養皿中全部的培養基，之後加入新鮮培養基與含病毒之培



養基各1mL，並加入基因轉染增強劑polybrene以協助病毒進入細胞中，濃度為0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。感染後24小時置換成新鮮培養基，48小時即感染完成。

### 3.3 抗生素篩選

由於shRNA clone帶有抗抗生素之基因，利用抗生素puromycin篩選感染成功之肝癌細胞株可去除未成功感染之細胞，以利後續實驗進行。將感染完的細胞進行繼代培養，約取5至6成，但最後將細胞打散之培養基及加入新培養容器之培養基均置換成含有抗生素之培養基(預先在培養基加入抗生素puromycin，濃度為1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，隔天即可見未成功感染之細胞死亡漂浮，移除培養基並置換新鮮培養基(含puromycin)，持續三天，三天後可再繼代或直接進行後續實驗(視情況可將換回正常培養基或減低抗生素濃度以維持效果)。

### 3.4 基因組DNA(genomic DNA)萃取

#### 3.4.1 細胞基因組DNA萃取

試劑組內容物	容量/數量
QIAamp Midi Spin columns	100
Collection tubes	100
AL Buffer	330 mL
AW1 Buffer	98 mL
AW2 Buffer	81 mL
AE Buffer	60 mL
QIAGEN Protease	4 vials

以QIAamp DNA Blood Midi Kit進行細胞基因組DNA萃取。將細胞以胰蛋白酶




剝落、培養基回溶後，以1,500rpm離心5分鐘並去除培養基後，再以500 $\mu$ L PBS回溶；另準備100 $\mu$ L protease加入至15mL離心管。PBS回溶完後將細胞液加入至離心管中，再加入1.2mL AL buffer，上下快速搖晃約15次使細胞與緩衝溶液混和均勻，並於70 $^{\circ}$ C下放置10分鐘。10分鐘後加入1 mL乙醇，震盪或劇烈搖晃使溶液均質化。之後將離心管內所有溶液移至QIAamp Midi column中，並置於內附的15mL離心管，以1850g離心3分鐘。離心完後去除濾液，加入2mL AW1 buffer，再以4,500g離心1分鐘，離完後加入2mL AW2 buffer，再以4,500g離心15分鐘。而後丟棄濾液，將column移至新的15mL離心管，並加入200 $\mu$ L二次蒸餾水，在室溫下放置5分鐘後以4,500g離心2分鐘，即可得到由細胞之基因組DNA，保存於-20 $^{\circ}$ C。

#### 3.4.2 動物組織基因組DNA萃取

試劑組內容物	容量/數量
PureLink <sup>R</sup> Genomic Lysis/Binding Buffer	10 mL
PureLink <sup>R</sup> Genomic Digestion Buffer	9 mL
PureLink <sup>R</sup> Genomic Wash Buffer 1	10 mL
PureLink <sup>R</sup> Genomic Wash Buffer 2	7.5 mL
PureLink <sup>R</sup> Genomic Elution Buffer	10 mL
RNase A (20 mg/mL)	1 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	1 mL
PureLink <sup>R</sup> Spin Columns with Collection Tubes	50 each
PureLink <sup>R</sup> Collection Tubes (2.0 mL)	100

由實驗動物取出之組織，冷凍保存於液態氮中，並以PureLink Genomic DNA Kit進行動物組織基因組DNA萃取。首先取約0.3mg之動物組織，放入微量離心管中，並於水浴槽中以55 $^{\circ}$ C加熱5分鐘，之後將組織放入2mL離心管，加入一直徑5mm



之鋼珠，並以組織均質機(Tissue lyser II, Qiagen)震盪將組織均質化(頻率15Hz，20秒，震盪一至二次)。待組織均質化完成後，加入180 $\mu$ L PureLink Genomic Digestion Buffer以及20 $\mu$ L Proteinase K，再於水浴槽中震盪培養5分鐘。之後在室溫下以145,000rpm離心3分鐘，並將上清液移至經滅菌過的微量離心管中，加入20 $\mu$ L RNase A，均勻混合後靜置於室溫2分鐘。之後加入200 $\mu$ L PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer，快速搖晃以混合均勻，後再加入200 $\mu$ L高濃度乙醇，震盪以混合均勻，至此完成組織裂解。

接續為DNA鍵結與洗滌步驟，首先將PureLink Spin Column放置於 Collection Tube中，並將經上述步驟取得之組織溶液加入管柱中，在室溫下以10,000g離心1分鐘。之後丟棄下部之收集管，將管柱移至另一新的收集管，加入500 $\mu$ L Wash buffer 1，並在室溫下以10,000g離心1分鐘。丟棄濾液，再加入500 $\mu$ L Wash buffer 2，在室溫下以145,000rpm離心3分鐘。

最後為DNA沖提步驟，將spin column放入一新的1.5mL微量離心管中，加入200 $\mu$ L PureLink Genomic Elution Buffer，於室溫下靜置1分鐘，再以145,000rpm離心1分鐘，即可得到由動物組織純化之基因組DNA，保存於-20 $^{\circ}$ C。

### 3.5 異種移植(xenograft)動物模式

#### 3.5.1 細胞植入準備

將經慢病毒感染後之肝癌細胞株培養於225 cm<sup>2</sup>培養瓶(T-225 flask, corning)，經抗生素篩選過後形成穩定細胞群(stable pool)，待細胞生長至九成滿後，以胰蛋白酶剝落、補回培養基離心後，計數細胞，而後移除培養基，以PBS沖洗而使細胞均勻懸浮於PBS溶液中，每2  $\times$  10<sup>6</sup>顆細胞以50 $\mu$ L PBS沖洗並分裝至微量離心管中；另外將基底膜基質膠(matrigel)以每管50 $\mu$ L分裝至微量離心管，置於冰上，完成動物實驗之細胞準備部分。



### 3.5.2 實驗動物

本研究之實驗動物選擇品系為BALB/cAnN.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/CrINarl之小鼠10隻，其特徵為先天性胸腺缺陷而使T細胞缺陷，較不會有免疫排斥反應，適合異種移植動物模式，外表無毛(即裸鼠)，來源為國家動物中心，飼養地點為台大醫學院小動物中心SPF區域，週齡為五週，待實驗動物適應環境後(約2~3天)開始進行實驗。

### 3.5.3 麻醉與皮下注射

將實驗動物小鼠以單手保定，並將戊巴比妥(pentobarbital)以70mg/kg之劑量進行腹腔注射，待小鼠麻醉完全後，將準備好之細胞與基質膠混合。每隻小鼠所注射細胞-基質膠混合物之體積為100 $\mu$ L，注射位置為小鼠右後背側之皮下，注射完成後可觀察見注射部位出現圓形腫塊，而後將小鼠放回籠中飼養，隔天再觀察確認小鼠狀態，約1至2天後腫塊消失。

### 3.5.4 腫瘤大小量測及管餵藥物

小鼠的腫瘤形成後，以電子游標尺測量腫瘤大小，公式為 $a \times (\frac{b}{2})^2$ ，a為腫瘤長，b為腫瘤寬，單位為mm，每日記錄腫瘤大小，待小鼠腫瘤生長至100mm<sup>3</sup>以上後，平均分為實驗組與對照組，開始進行管餵藥物。

本動物實驗用以觀察對腫瘤影響之藥物為sorafenib，配製時首先將cremophor與高純度乙醇以1:1混合，之後秤取適量sorafenib粉末並加入混合的溶劑中，總濃度為20 $\mu$ g/ $\mu$ L，待溶解後再以滅菌水4倍稀釋，最終的藥物濃度為5 $\mu$ g/ $\mu$ L。對照組餵以溶劑，實驗組則餵以配製完成之sorafenib，劑量為30mg/kg/day(由小鼠前一天之體重調整每日餵食體積)。管餵食首先將小鼠保定，使其頭部、頸部和身體成一直線，保定完成後以不鏽鋼質管餵針吸取藥物，深入小鼠食道餵食以防止藥物溢出或嘔出。每日均測量腫瘤體積及小鼠體重並記錄兩組間腫瘤大小差異，待腫瘤大小出現明顯差異(體積差一半以上)後即可犧牲動物。



### 3.5.5 實驗動物犧牲與腫瘤組織分離

以頸椎脫臼法(cervical dislocation)實行實驗動物安樂死，確認小鼠死亡後，以解剖用具將含有腫瘤之皮膚剪開，分離腫瘤與皮膚及肌肉層相連部分，將腫瘤取出並置於冷凍小管中，保存於液態氮中以進行後續實驗。

## 3.6 聚合酶鏈鎖反應、產物濃縮及膠體純化回收

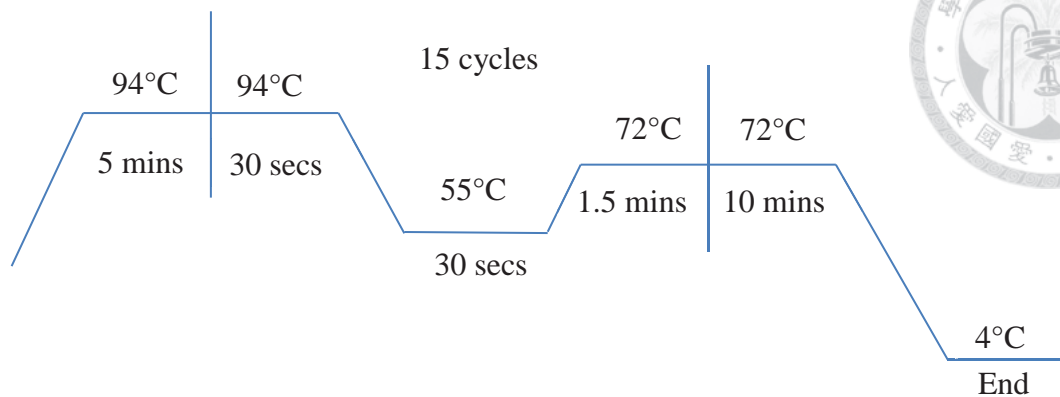
### 3.6.1 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

以由細胞及組織純化出之基因組DNA為模板，進行兩次PCR反應，第一次為將全基因組中帶有shRNA及抗抗生素基因的片段放大，由於需較高濃度進行後續純化，每一基因組檢體均以體積600 $\mu$ L進行PCR反應，各反應試劑量及PCR條件如下：

#### Step 1 – Target/Puro Enrichment

gDNA	0.4 $\mu$ g (視不同檢體濃度決定體積)
Forward primer (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Reverse primer (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
10X ExTaq Buffuer	10 $\mu$ L
dNTP Mixtrue	8 $\mu$ L
Ex-Taq	0.5 $\mu$ L
DMSO	5 $\mu$ L
ddW	54.5 $\mu$ L
<hr/>	
Total	100 $\mu$ L X 6 = 600 $\mu$ L

反應條件：



引子(primer)序列：(Table 1)

Forward: 5'-TTCACCGAGGGCCTATTTCCCATG-3'

Reverse: 5'-CGTGAGGAAGAGTTCTTGCAGCTC-3'

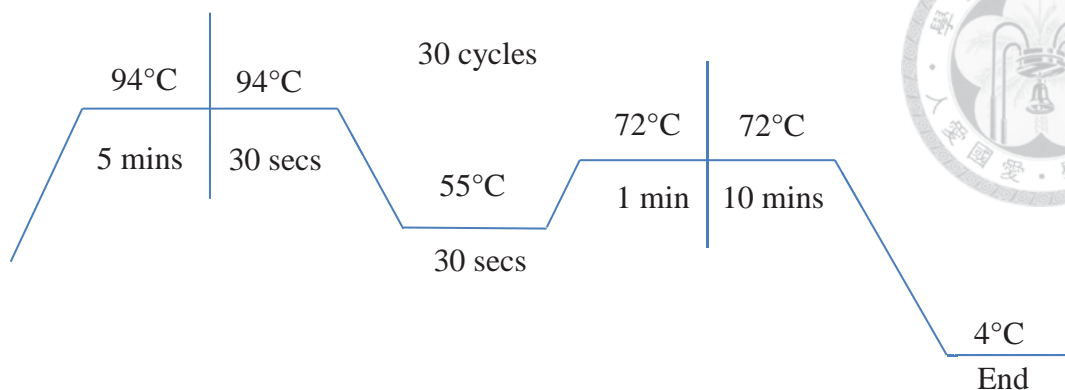
反應完成後，所得產物經濃縮即為第二次PCR反應之模板。

#### Step2 – Full-hairpin Library Generation

第二次 PCR 反應為將第一次 PCR 反應後之 DNA 作為模板，目的為將帶有 shRNA 之片段放大，反應完後產物大小為180bps。

Target enriched template	3 $\mu$ L
Forward primer (7.5 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
Reverse primer (7.5 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
10X Ex Taq Buffuer	10 $\mu$ L
dNTP Mixture	8 $\mu$ L
Ex Taq	1 $\mu$ L
ddW	68 $\mu$ L
<hr/>	
Total	100 $\mu$ L X 6 = 600 $\mu$ L

Target enriched template為第一次PCR後經濃縮之DNA，反應條件如下：



引子序列：(Table 1)

Forward: 5'- AATGGACTATCATATGCTTACCGT-3'

Reverse: 5'- TGTGGATGAATACTGCCATTTGTCTCGAGGTC-3'

### 3.6.2 PCR產物濃縮 (PCR Purification)

試劑組內容物	容量/數量
QIAquick Spin Columns	250
PB Buffer	150 mL
PE Buffer	55 mL
Collection Tubes (2mL)	250

本研究使用 QIAquick PCR Purification Kit 將 PCR 反應完之產物進行濃縮純化。首先將PCR反應後之600 $\mu$ L產物混合在一15mL離心管中，並加入五倍體積(3,000 $\mu$ L)之PB buffer。之後取三管Qiagen MinElute Column，於每管中分別加入600 $\mu$ L混和好後的溶液，以145,000rpm離心1分鐘並丟棄濾液，將溶液全部處理完需兩次離心。之後在每管中加入750 $\mu$ L PE buffer進行沖洗，並以145,000rpm離心1分鐘，丟棄濾液後再離心3分鐘。最後將column置換到乾淨的微量離心管中，每管加入10 $\mu$ L經滅菌後的二次蒸餾水，於室溫下靜置1分鐘，再以145,000rpm離心1分鐘即可得到濃縮純化後的產物，保存於-20°C。



### 3.6.3 膠體純化回收

#### 3.6.3.1 膠體電泳 (Electrophoresis)


首先配製2%洋菜膠體，秤取1.2g洋菜膠(agarose gel)於錐形瓶中並加入60mL 0.5X TAE buffer (0.02 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH8.0)，微波1至3分鐘使膠體完全溶於緩衝溶液中，後加入1.2 $\mu$ L Ethidium Bromide使膠體可於紫外光下呈色，之後將溶液搖晃均勻，稍微冷卻後，倒入電泳槽中並插上尺梳，靜置使膠體凝固。

待膠體冷卻凝固後，在電泳槽中倒入0.5X TAE buffer，使之蓋過膠體，並將欲純化之樣品加入染劑，比例為1:6，全部注入尺梳所形成之孔隙中，另留一格為DNA marker (Qiagen)，樣品與marker均注入後，蓋上電泳槽上蓋並與電源供應器連接，開始進行膠體電泳，電壓設定100V，時間90分鐘。

#### 3.6.3.2 純化回收 (Gel extraction)

試劑組內容物	容量/數量
QIAquick Spin Columns	250
QG Buffer	500 mL
PB Buffer	150 mL
PE Buffer	100 mL
Collection Tubes (2mL)	250

接續將以QIAquick Gel Extraction Kit進行DNA純化回收。在電泳跑完後，打開電泳槽取出膠體並置於UV台上，以UV光照射，對照marker位置，將樣品位於180bps左右的亮帶(band)切下，盡量縮小體積以提高純化效率。之後將含有欲回收DNA之膠體放入微量離心管，加入3倍體積之 QG buffer (直接以膠體重量3倍為體積，例如膠體重300mg，則加入900 $\mu$ L QG buffer)，在乾浴槽中以55°C加熱15分鐘，每5



分鐘取出搖晃數次，確認膠體已完全溶於緩衝溶液中，將溶液加至Spin Column中，以145,000rpm離心1分鐘並去除濾液。而後加入500μL PB buffer，以相同速度離心1分鐘，再加入750μL PE buffer，離心1分鐘，結束後再離心5分鐘，去除濾液。最後將管柱移至新的微量離心管中，加入30μL滅菌後二次蒸餾水，於室溫下反應3分鐘，再離心3分鐘，即可取得膠體純化後之DNA，測量濃度並保存於-20°C。

### 3.7 次世代定序 (Next-generation sequencing, NGS)及結果分析

#### 3.7.1 次世代定序

將樣品純化完成後，委託台大醫學院第二共同研究中心進行DNA定序，確認樣品中shRNA之前後序列是否正確，產物大小為180bps；之後將樣品委託源資國際生物科技股份有限公司進行次世代定序，定序內容為經192組shRNA感染之細胞基因組DNA，以及經動物實驗後得到實驗組與對照組腫瘤組基因組DNA共10組樣品。

#### 3.7.2 資料處理與統計分析

針對次世代定序結果進行資料處理分析，共可分成四部分。第一部分為利用Matlab軟體統計每一shRNA序列在每一樣本中出現之次數及每一樣本中所能讀到之shRNA序列總數。

第二部分為將同一樣本中，每一shRNA序列除以讀到的總數，意即 $\frac{shRNA\ reads}{Total\ reads}$ ，可知每個shRNA clone在該樣本中佔的比例。

第三部分為以第二部分所得之值除以相同基因在細胞基因組DNA(P0)中的比例，意即 $\frac{shRNA\ reads}{Total\ reads} / \frac{shRNA\ reads\ in\ P0}{Total\ reads\ in\ P0}$ ，可得出每組shRNA序列在各樣本中，經動物實驗後，其比例和細胞相比的變化，並以此製表，可得一192X10之矩陣。

第四部份則是先以主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)去除實驗組





及對照組組內變數較大、分布結果與其餘樣本差異太大者，再針對保留下來之樣本(相關性較高的)以T-test檢驗進行統計分析，計算p-value，以及shRNA比例在實驗組及對照組之倍數差異。

### 3.8 蛋白質分析法

#### 3.8.1 樣品製備

##### 3.8.1.1 由細胞裂解取得蛋白質

細胞於培養皿生長至八長滿以上時，可收取蛋白質。首先將培養基移除，並以PBS沖洗兩次，之後加入細胞溶解液(lysis buffer, 6M urea)600 $\mu$ L，並將細胞刮取，移入微量離心管中，之後以超音波震盪數次，使細胞裂解完全，再以145,000 rpm於4 $^{\circ}$ C離心20分鐘，取出上清液即為蛋白質，保存於-20 $^{\circ}$ C。

##### 3.8.1.2 由組織研磨取得蛋白質

組織先以PBS沖洗數次，將血液洗去，並取約100mg置於研鉢中，之後加入液態氮並以瓷杵研磨，將組織磨成粉狀並移微量離心管中，加入細胞溶解液300 $\mu$ L，以超音波震盪數次，最後以145,000 rpm於4 $^{\circ}$ C離心20分鐘，取出上清液即為蛋白質，保存於-20 $^{\circ}$ C。

#### 3.8.2 蛋白質濃度測定 (BCA Protein Assay)

以Pierce BCA Protein Assay Kit進行蛋白質濃度定量，將BSA蛋白標準品以序列稀釋，之後加入A劑及B劑混和液，於37 $^{\circ}$ C避光培養30分鐘後測吸光值，由標準曲線計算蛋白質濃度。

#### 3.8.3 十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

兩塊平面玻璃(mini gel: 10X10.5公分)洗淨，以二次蒸餾水潤濕、烘乾後，以



凹型軟質膠片(12X15X0.1公分)作為間隔條(spacer)，以鐵夾夾住玻璃兩側，再將此裝置直立放置。依據下表將預先配置好的A液、B液和C液混合進行膠體製作，配置分離膠體(separating gel)及堆積膠體(stack gel)：

A液：30% acrylamide, 0.8%N,N'-methylene-bis-acrylamide

B液：1.5M Tris-HCl, pH8.8 緩衝液及0.4% SDS溶液

C液：0.5M Tris-HCl, pH6.8 緩衝液及0.4% SDS溶液

試劑	分離膠體(10%)	堆積膠體
A液	2.7 mL	0.3 mL
B液	2.0 mL	—
C液	—	0.5 mL
ddH <sub>2</sub> O	3.4 mL	1.2 mL
TEMED	5 μL	5 μL
10% APS	55 μL	10μL

首先配製分離膠體：按照上表於燒杯中加入A液、B液、二次蒸餾水、TEMED及10% APS，混和均勻後，迅速將溶液倒入玻璃裝置中至距頂端約2公分處，並在凝膠溶液上方加入甲醇使膠體平整。室溫下靜置待分離膠體凝固形成介面之後，即可倒去甲醇，準備注入堆積膠體。

接著配製堆積膠體：按照上表加入A液、C液、二次蒸餾水、TEMED及10% APS，混和均勻後，迅速將溶液注入已凝固的分離膠體之上，並插入尺梳(comb)以形成樣品槽。室溫下靜置待堆積膠體凝固後，即可拔下尺梳，準備注入蛋白質樣品。

將蛋白質樣品加入等體積之2X sample buffer (0.5M Tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 50% glycerol, β-mercaptoethanol, trace bromophenol blue)，於100°C加熱15分鐘。將鑄膠完成之玻璃片周圍膠條拿掉，玻璃片以鐵夾固定於電泳裝置上，使有凹槽的一面朝向電泳槽，上下電泳槽鑄滿電泳緩衝液(25mM Tris, 250mM glycine, 0.1%

SDS, pH8.3)並在樣品槽中加入處理完成之蛋白質樣品。電泳槽上層接負極，下層接正極，固定每片膠以15毫安培電流進行電泳，且限制電壓不超過150V。待指示劑移至膠片底部後，停止通電，完成電泳。



#### 3.8.4 西方墨點法 (Western blotting)

剪裁與分離膠體大小相同的聚偏二氟乙烯膜(PVDF membrane)，以100% 甲醇浸潤，使聚偏二氟乙烯膜由原來的疏水性轉成具有親水的特質後，再將其浸泡於轉印緩衝液(10mM CAPS, 10% MeOH, pH11.0)中。由下而上依序自下層石墨版鋪蓋：  
(1) 三張浸泡過轉印緩衝液的濾紙、(2) 聚偏二氟乙烯膜、(3) 分離膠體、以及 (4) 另外三張浸泡過轉印緩衝液的濾紙，鋪蓋過程中應避免產生氣泡或使聚偏二氟乙烯膜變乾。最後蓋上已接上負極之上層石墨板，並將下層石墨板接上正極。轉印所使用的電流大小依據分離膠體面積而定，每平方公分膠體約需1毫安培電流，通電時間為4小時。轉印完成後取出聚偏二氟乙烯膜，先以Fast green(Fast green, Acetic acid, Ethanol (95%), Distilled water)染劑進行染色確定蛋白轉印效率及位置，再裁切聚偏二氟乙烯膜進行抗體偵測。

裁切好正確分子量的偏二氟乙烯膜後，以100% 甲醇浸潤聚偏二氟乙烯膜使其親水，以二次蒸餾水潤洗一次後，將其泡在含有5%脫脂奶粉的TN緩衝溶液(0.15M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.5)中，於室溫搖晃一小時進行填塞作用(blocking)。初級抗體以含有1%脫脂奶粉的TNT緩衝溶液(0.15M NaCl, 0.5% Tween-20, 20mM Tris-HCl, pH7.5)做適當稀釋。抗體比例：anti-Syk(1:500)、anti-GAPDH(1:1000)、anti-actin(1:10000)。倒掉填塞溶液後，換成初級抗體溶液，並於4°C下搖晃過夜，使抗體與膜上目標蛋白結合。隔天倒掉初級抗體容液並以TNT緩衝容液漂洗聚偏二氟乙烯膜6次，每次10分鐘。次級抗體以含有4%脫脂奶粉的TNT緩衝容液做適當稀釋；加入次級抗體溶液並於室溫下搖晃1小時進行結合反應。之後倒掉次級抗體溶液，以TNT緩衝容液漂洗聚偏二氟乙烯膜6次，每次10分鐘；最後以TN緩衝容液

漂洗5分鐘。

最後進行呈色反應，移去聚偏二氟乙烯膜上多餘的TN緩衝液，並在其上均勻加適量受質溶液(Western Lightning Plus-ECL)。反應1分鐘後，將多餘受質溶液洗掉，把聚偏二氟乙烯膜置入暗盒(cassette)中，並裁剪是當大小的X光底片(Fujifilm)進行壓片。之後將底片放入顯影液(developer)中直到可見陽性反應，以水漂洗後再放入定影液(fixer)中，直到底片背景透明。最後將底片用水洗淨，自然風乾或烘乾保存。另外，將底面掃描後，可以Image Quant 軟體定量蛋白的相對表現量。

### 3.9 細胞生存能力試驗 (MTT Assay)

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)為一種黃色化合物，能接受氫離子而被還原呈色的細胞染料，因此MTT可與只存在活細胞粒線體呼吸鏈中的琥珀酸脫氫酶(Succinate dehydrogenase) 和細胞色素C(Cytochrome C)作用，產生藍紫色的結晶。結晶的生成量與活細胞數目呈正比，因此可利用偵測此藍色結晶溶解後的吸光值得知活細胞數目，所以MTT assay可當作細胞存活生長率的指標。

#### 3.9.1 MTT reagent 配製

將100mgMTT粉末用20mLPBS緩衝液配成5mg/mL之reagent，將其以0.22 $\mu$ m filter過濾之後，避光分裝存放在-20 $^{\circ}$ C備用。使用前再用PBS將濃度稀釋為2.5mg/mL。

#### 3.9.2 細胞準備

將正常及經包覆shRNA之慢病毒感染後的細胞以trypsin切下，計算細胞數後平均種入96-well培養皿，約1500/well，每個well體積為100 $\mu$ L，隔天可進行藥物處理或進行生長曲線實驗。



### 3.9.3 sorafenib

前一天種入96-well培養皿之細胞，第二天加入sorafenib藥物處理，濃度為0 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M，將藥物配製於培養基中，體積為100 $\mu$ L，加入well後使總體積為200 $\mu$ L；若同時有加入抑制劑BAY 61-3606，則將抑制劑直接與配好的sorafenib混合，濃度為50nM；藥物加入後三天可偵測活性。

### 3.9.4 生長曲線試驗

種入96-well培養皿之細胞分為兩組，一組為以病毒感染不具任何抑制能力之shRNA(Mock)，另一組為以病毒感染包覆具有抑制Syk能力之shRNA，種在同一盤中，各種15個well、共種四盤，標示Day0至Day3。隔天即偵測Day0之活性；其餘同樣以sorafenib處理，濃度為0 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 10 $\mu$ M，各三重複，之後每天測定一盤，持續三天，比較不同濃度藥物處理時兩組細胞的生長能力。

### 3.9.5 細胞存活率分析

將細胞培養基吸去150 $\mu$ L，再於每個well中加入50 $\mu$ L MTT reagent (2.5mg/mL)，37 $^{\circ}$ C避光反應2小時後，吸掉反應液，加入100 $\mu$ L DMSO將紫色晶體回溶，15分鐘之內偵測OD<sub>595</sub> nm吸光值。吸光值正比於活細胞數目，利用在不同時間點下或不同藥物濃度處理後得到的吸光值或作圖，可以計算其生長趨勢或藥物對生長的影響情形。另外，紀錄不同藥物濃度與存活率，可利用Origin Pro 9此軟體計算IC<sub>50</sub>值。

## 第四章 結果



### 4.1 利用異種移植(xenograft)動物模式進行核醣核酸干擾篩選

本研究針對96個激酶(kinase)進行篩選(Table 3)，為進行此篩選，首先以包覆192組shRNA庫的慢病毒感染肝癌細胞株HuH-7，並以抗生素篩選7天(期間曾繼代培養一次)以去除未感染成功者，7天後將細胞以皮下注射方式植入小鼠後背側皮下，共10隻，同時留存一些細胞抽取基因組DNA，以作為對照用。

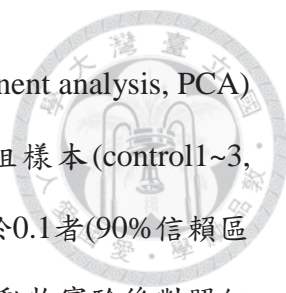
肝癌細胞約於2至3週後陸續形成腫瘤，待腫瘤大小生長至100 mm<sup>3</sup>後，開始進行分組，對照組4隻(一隻未形成腫瘤)，實驗組5隻，分別管餵以溶劑及sorafenib，並每日測量小鼠體重與腫瘤大小；31天後，發現腫瘤大小出現明顯差距(Fig.1)。之後將小鼠犧牲，取出腫瘤進行後續實驗。

### 4.2 以次世代定序(Next-generation sequencing)及統計方法分析核醣核酸干擾篩選之結果

由經慢病毒感染之HuH-7細胞及小鼠腫瘤組織中分別萃取出基因組DNA，並進行兩次聚合酶鏈鎖(polymerase chain reaction, PCR)反應，第一次係由全基因組中放大帶有shRNA庫序列及抗抗生素之片段，以大量體積反應並純化後，進行第二次PCR反應，將帶有shRNA庫之序列片段放大，產物大小約180bps，共10組樣品，經膠體純化回收後測定其濃度及280/260、260/230吸光值。其濃度平均為200 ng/μL，280/260吸光值均大於1.8、260/230吸光值均大於1.7，顯示合乎定序標準(Table 4)。

將純化完成之DNA樣品委託源資國際生物科技股份有限公司進行次世代定序，而後以Matlab軟體(R2010a版本)分析定序結果。首先計算各shRNA序列於各樣品中出現之次數及總讀到次數(reads)，並相除得知每組shRNA序列在各樣品中出現之比例。之後將此比例與該序列在參考細胞中之比例相除，此即經動物實驗後該shRNA序列之比例變化(Table 5)。

由於計算結果顯示組內變化大，若干樣本相關性低，為使分析具統計意義且



挑選出具潛力之研究標的，首先運用主成分分析(Principal component analysis, PCA)去除組內相關性低之樣本，由對照組及實驗組內各選出3組樣本(control1~3, treatment3~5)以Student T-test進行統計分析，並篩選出p-value小於0.1者(90%信賴區間)，共有3基因符合此條件(Table 2)，另外也計算shRNA序列經動物實驗後對照組與實驗組比例的差(treatment/control)，發現Syk的改變比例最大，因此最後選擇酪胺酸激酶(Spleen tyrosine kinase, Syk)進行進一步分析。

#### 4.3 以西方墨點法初步驗證動物實驗篩選

進一步分析具潛力的標的基因前，我們先以西方墨點法初步驗證是否動物實驗所得到之shRNA讀值與蛋白表現量趨勢一致，在此除了選擇Syk進行初步驗證外，也挑選實驗室已具備之抗體GSK3- $\beta$ 同步進行驗證。分別取出對照組與實驗組中相關性較高的6顆腫進行分析，經組織研磨後萃取出對照組與實驗組腫瘤組織蛋白，並以西方墨點法偵測蛋白質表現量。由分析結果可知，Syk與GSK3- $\beta$ 的shRNA讀值在實驗組中均高於對照組(Table 5)，而以西方墨點法驗證後亦發現蛋白表現量在實驗組較低，顯示蛋白表現量與動物實驗篩選結果相符合(Fig.2)。

#### 4.4 以小髮夾RNA(shRNA)抑制酪胺酸激酶(Syk)之基因表現

為進一步驗證當肝癌細胞株中的Syk受到抑制時，是否對細胞的生長造成直接影響以及結合sorafenib處理後對細胞存活之影響，我們首先以shRNA抑制HuH-7細胞中Syk基因的表現。由中央研究院RNAi核心實驗室的網路資料庫，我們選擇了2組shRNA序列，皆針對Syk基因，將冷凍的菌株培養、放大並萃取質體，之後以慢病毒包裹、感染細胞，經過3天抗生素篩選後得到穩定表現shSyk的細胞。接著收取細胞蛋白，以西方墨點法驗證抑制的效率，結果顯示和無抑制效果之shRNA相比，兩組shRNA皆能抑制Syk表現(Fig.3A)。同時，我們將底片掃描並以ImageQuant軟體定量，經與控制組(Mock)的內生性蛋白GAPDH常態化(normalization)後，發現



第二組shRNA對Syk基因抑制的效果較佳且標準差較小、效率穩定，抑制能力達到70%以上(Fig.3B)，因此選擇此一shRNA進行後續實驗。

#### 4.5 以細胞生存能力試驗(MTT assay)驗證結合sorafenib與抑制Syk基因對肝癌細胞株之影響

經驗證shRNA對於Syk基因的抑制效果後，我們利用shRNA使肝癌細胞株HuH-7中的Syk基因受到抑制，同時也將野生型細胞感染不具任何抑制效果之shRNA，作為對照(Mock)。將感染完的細胞同時進行細胞生存能力試驗，分別以不同濃度的sorafenib藥物處理細胞，以藥物濃度0 $\mu$ M的細胞為對照組，加藥後培養三天，三天後偵測MTT活性。結果顯示，和對照組相比，抑制Syk基因的細胞，對sorafenib的敏感性提高，意即在相同的藥物濃度下，Syk受到抑制的細胞存活率下降、死亡率上升(Fig.4)。另外，我們也以Origin Pro 9軟體計算兩組細胞的50%抑制濃度(IC<sub>50</sub>)，分別為6.7 $\mu$ M(對照組)及4.0 $\mu$ M(實驗組)，下降約40%，顯示抑制Syk後可使sorafenib殺死細胞或使細胞停滯不生長的能力上升。

而為進一步了解sorafenib對Syk基因受抑制後的肝癌細胞生長之影響，我們進行細胞生長曲線的測定。同樣將細胞分成對照組(Mock)與實驗組(shSyk)，以較少的細胞數種入96-well培養盤，並以不同濃度sorafenib處理細胞，測定加藥前(day0)與加藥後三天(day1至day3)細胞的MTT活性。實驗結果顯示，在不加藥的情形下，肝癌細胞株中Syk基因受到抑制時對於生長並無影響；而在不同濃度的藥物處理後，可發現Syk基因受抑制之細胞，偵測到的數量也會明顯下降，其中以藥物濃度在5 $\mu$ M時最為顯著(Fig.5)，與對照組相比，約降低25%，表示當細胞中的Syk基因被抑制後，5 $\mu$ M的sorafenib就會使其生長受到顯著影響，而此濃度也低於sorafenib對野生型肝癌細胞株HuH-7的50%抑制濃度。

而為更確認抑制Syk基因時會使HuH-7細胞對sorafenib敏感性上升，我們由參考文獻中挑選了一種Syk的抑制劑，BAY 61-3603[79]，此為一種針對Syk的專一抑



制劑，不影響其上下游分子，避免其他因素干擾實驗結果。細胞生存能力試驗的結果顯示，當抑制劑濃度為50nM時，可使HuH-7細胞對sorafenib的敏感性上升 (Fig.6)，且在5 $\mu$ M時的差異最大，而此結果也與利用shRNA抑制HuH-7細胞Syk的結果類似，顯示抑制Syk基因對於sorafenib與細胞間之作用確有影響。

## 第五章 討論



有鑑於肝癌在世界上及國內的發生率日益成長，而治療方法及功效仍然有限，目前唯一的肝癌標靶藥物sorafenib於治療時又易產生抗藥性，因此本研究欲透過動物模式進行核糖核酸干擾篩選，探討其未知作用標的，進而加強療效。

### 5.1 研究策略之探討

#### 5.1.1 研究標的選擇

激酶(kinase)於生物體內許多生化反應中扮演重要調控角色，藉由磷酸化其受質，可加速或開啟下游反應，亦可抑制或終止下游反應。蛋白質為基因表現之最終產物，其生成或降解過程亦有許多激酶參與其中；另外，激酶抑制劑也為許多疾病之臨床用藥或發展中的藥物；因此，本研究首先選擇激酶作為篩選對象，期望篩選出之標的於詳細驗證後能有機會較快速應用於進一步的藥物開發中。

#### 5.1.2 藥物劑量

在實驗設計上，由於本研究欲嘗試改善目前sorafenib於肝癌治療時所面臨之瓶頸(如前文1.5所述)以加強療效，因此在動物實驗中使用一般劑量，而結果如先前研究所報導，肝癌細胞株HuH-7所形成之腫瘤與對照組相比明顯縮小[80]，其中對sorafenib具感受性之基因則會被篩選出來(本身就存在，因藥物處理而被放大，並非突變而來)；為模擬此狀況，本研究以shRNA抑制了所選定之目標基因，並在藥物處理使腫瘤大小出現明顯改變時即取出分析，篩選出其中shRNA讀值差異性較大的基因進行進一步驗證。

另外，對照組與實驗組之細胞雖經慢病毒感染而使基因受到抑制，但對照組與實驗組所形成之腫瘤生長線圖(Fig.1)理論上應與野生型HuH-7細胞(及加藥)相似，表示用以篩選的基因大部分對腫瘤生長無顯著影響，也較符合此類高通量篩選的基本原則，未來若再進行篩選應同時與野生型HuH-7細胞之腫瘤生長線圖相比較。

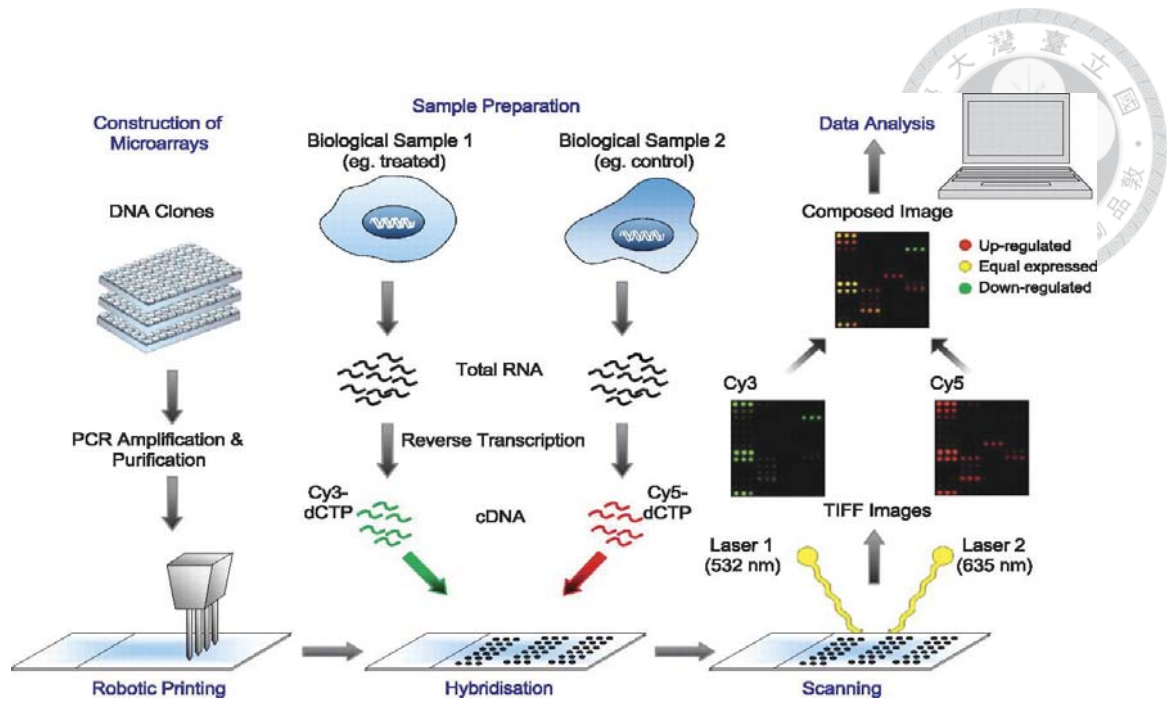


### 5.1.3 小鼠數目

於動物實驗過程中，本次對照組與實驗組的小鼠數目皆為五隻，預期將有10組腫瘤樣品可供分析，然而此設計未考慮到細胞在小鼠體內可能不生長之狀況。結果顯示，其中一隻小鼠並未長出腫瘤，導致對照組最後獲得的腫瘤數較預期為少；另外，腫瘤生長的時間、速度與對小鼠造成的負擔亦不一致，有些腫瘤形成較早，導致其他小鼠的腫瘤大小生長至 $100\text{mm}^3$ 時，較早形成之腫瘤已至數百 $\text{mm}^3$ ，而使實驗中對照組的腫瘤大小變異較大，因此線圖上對照組之標準差也較大；而當腫瘤太大時(超過 $2000\text{mm}^3$ )，可能開始對小鼠身體造成負擔，導致食慾下降、體重下滑導致過瘦情形，嚴重者可能使小鼠在實驗結束前提死亡，使該樣品無法進行後續分析；除此之外，定序結果在組內的變異性大，也是動物隻數少的問題之一；因此未來若再進行動物模式的核糖核酸干擾篩選，應增加每組的動物隻數，使樣品數增加，以避免上述問題，同時也能在分析過程中取得一致性較高且符合統計意義的結果。

### 5.1.4 DNA微陣列(DNA microarray)與次世代定序(next-generation sequencing)之特性比較

DNA微陣列是用以分析基因體學之常用工具之一，其原理是將數千至數萬種核酸探針(probe)以高密度點陣固定在玻璃片或矽晶圓片上，受測樣品則為互補DNA (complementary DNA, cDNA)。其過程為先由細胞中萃取RNA，經反轉錄作用形成cDNA，並以螢光標定後，於晶片上進行雜交試驗(hybridization)，與探針互補的序列即會被固定在晶片上，之後洗去未反應的cDNA，即可得知基因表現量；另外，以不同顏色標定cDNA亦可比較不同實驗條件之基因表差異[81,圖K]。



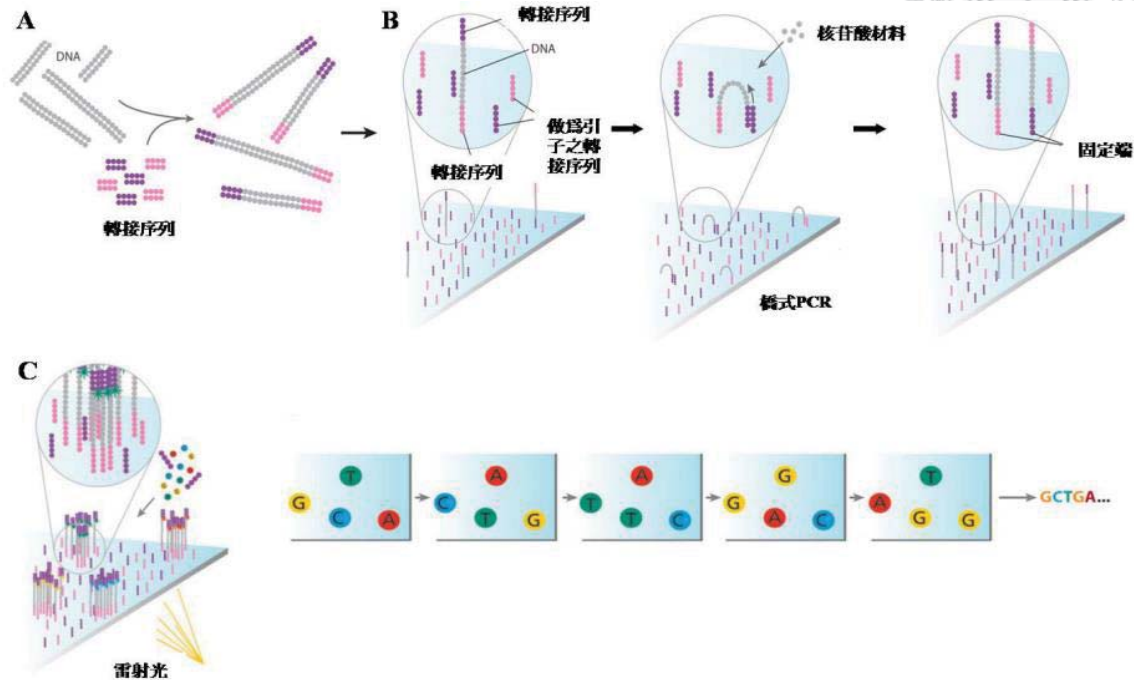
[圖K：DNA微陣列流程；81]

而本次研究採用 Illumina 公司之次世代定序儀器進行樣品分析。首先，將待測 DNA 打斷為 200-500 bp 的小片段，並於兩端接上轉接序列(adaptor)。將已接上轉接序列的待測基因小片段，置入表面帶有互補轉接序列的晶片，透過橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)進行增幅，接著置入依不同鹼基而標記特定且可移除螢光分子的去氧核苷酸材料與反應試劑，如此反覆進行螢光標記移除、試劑置換與偵測，以快速讀取大量之定序結果，最後輔以資訊軟體系統，即可分析配對出完整之 DNA 序列[82，圖L]。

與DNA微陣列相比，次世代定序之特性為：

1. 可在基因組序列未知的情況下進行定序，而微陣列技術則需已知的基因組序列以設計晶片上的探針。
2. 所得結果可包含未知序列，而微陣列技術只能檢測晶片上已有的序列訊息，無法檢測未知序列。
3. 分辨率可達單一鹼基，而微陣列技術由於使用雜交原理，在檢測相似序列時分辨率較低。
4. 樣品需求量較低，且所得結果的背景訊號值也較低[83]。

基於上述特性，本研究選擇使用次世代定序作為分析工具，可以少量樣品即獲得較精確的shRNA序列變化情形。



[圖L：Illumina定序技術與流程；82]

### 5.1.5 統計分析

原先實驗設計所欲篩選之標的除激酶外，尚有去磷酸化酶(phosphatase)、轉錄因子(transcription factor)、細胞激素(cytokine)等2132個基因，但由於當樣本數放大時，較容易出現隨機效應(random effect)，意即shRNA讀值變化並非藥物處理後之影響結果，而單純因其他因素造成某些shRNA讀值異常增加或減少，導致後續的驗證可能與篩選結果不符，因此在挑選進一步試驗之目標基因時，p值(p-value)需再另外校正(false discover rate, FDR)[84]，但由於動物實驗本身變化性較大，若樣本數放大，統計校正的條件相對嚴苛，某些重要基因可能在此過程中被捨棄；因此若能縮小篩選的基因數量，使樣本空間變小，較能減少實驗過程中發生之隨機效應，且p-value之校正也可暫時被忽略，具研究潛力之標的較容易被保留在分析

的結果中。因此，本研究先以較少量標的進行篩選，同時考慮激酶之重要性，因此最後選擇96種激酶作為此研究的篩選對象。

而在統計分析部分，首先以PCA分析去除與組內差異太大者，在對照組與實驗組中共去除3組樣本，以避免計算出無意義之p-value，最後各以3組樣本進行Student T-test檢定分析。由於數值變動較大，將信賴區間放寬至90%，意即保留p-value小於0.1者(通常選擇p-value小於0.05或0.01)，同時也計算倍數變化作為參考(Table 2)。其中，Syk雖然p-value較大(約0.06，若以0.05為標準則在邊界)，但其讀值的倍數變化也最顯著，因此最後選擇Syk進行進一步分析；然而，由於母體的樣本數少，無法確定資料的分布情形，若未來的研究樣本數量可增加，在分析上也可較容易找到具潛力之標的。

## 5.2 脾酪胺酸激酶(Spleen tyrosine kinase, Syk)之功能

源於1991年，日本科學家由豬脾臟cDNA中分離出Syk，其編碼蛋白(encoding protein)為一種非受體型酪氨酸激酶，故被命名為脾酪氨酸激酶 [79]。Syk過去常被認為只表現於造血細胞，然而近年來發現其在許多腫瘤的形成中有異常表現。研究顯示，Syk可能與腫瘤形成及轉移相關，但分子機制大部分仍未明，而近年臨床研究亦發現，Syk之表現量降低與腫瘤轉移呈現正相關，顯示Syk可能為一潛在的腫瘤抑制因子，另外許多研究亦以Syk為目標發展標靶藥物，因此Syk的研究也越顯重要[85]。

### 5.2.1 Syk的結構與功能

人類細胞的Syk基因位於第9號染色體，而Syk蛋白包含629個氨基酸，分子量為72kDa。Syk在細胞中的功能主要包括：

- (1) 抑制細胞的分裂與增值
- (2) 對細胞的遷移(migration)有關鍵作用



- (3) 影響某些細胞因子的分泌
- (4) 抑制腫瘤細胞形成腫瘤的能力
- (5) 影響細胞的分化。

近年來多項研究顯示，Syk 能在人類乳腺癌、胃癌和淋巴造血系統腫瘤中表現，而且其表現與腫瘤的發生、發展和預後關係密切。亦有文獻報導 Syk 基因及蛋白在侵襲性的乳腺癌組織中表現量降低甚至不表現[86]。而若表現野生型的 Syk 基因到高成瘤性和高轉移性的乳腺癌細胞中，則可抑制腫瘤的生長和轉移。相反，在 Syk 表現量較高的細胞中，若有蛋白激酶缺陷的 Syk 大量表現，則會使腫瘤的發生率和生長速度上升。此外，Syk 在黑色素瘤、結直腸癌、胰腺癌和肝細胞癌[87]中也會表現，且隨著腫瘤的惡化，其表現量會逐漸降低乃至缺失的狀態。因此，Syk 具有抑制腫瘤生長和擴散的作用，而表現 Syk 的某些腫瘤細胞，其生長和轉移直接受到抑制。然而，Syk 也會作為免疫受體的關鍵介質並在和發炎相關的細胞如 B 細胞、肥大細胞、巨噬細胞中表達，這些免疫受體包括免疫球蛋白 Fc 受體和 B 細胞受體（BCR），與過敏性和抗體誘導的自體免疫性疾病密切相關，因此抑制 Syk 之表現對治療這些疾病大有益處，包括風濕性關節炎、哮喘、過敏性鼻炎、淋巴瘤、白血病、惡性上皮腫瘤、腫瘤轉移等等[88]。

### 5.2.2 Syk 與 B 細胞淋巴瘤(B cell lymphoma)之關係

當人體 B 細胞的生長不受控制時，即有可能形成腫瘤(B 細胞淋巴瘤)，其形成過程中有部分是由 Syk 所調控，而 Syk 是異常的 B 細胞生長和存活機制的重要訊號。藉由抑制 Syk，減少此訊號，異常的 B 細胞可不再增殖。Syk 與 B 細胞的發展和成熟有關，並可能放大 B 細胞抗原受體信號，因此這可能是某些 B 細胞淋巴瘤存活的重要機制[89]。哺乳動物雷帕黴素蛋白（mTOR）是當前腫瘤治療中很重要的標的，有研究指出 Syk 在 mTOR 的活化中扮演重要的角色，相對於正常或慢性淋巴性白血病，Syk 在 B 細胞淋巴瘤中的表現量和功能大大提高。研究顯示

Syk-mTOR 訊息傳遞路徑在濾泡淋巴瘤生存中發揮重要作用，而 Syk 將可能成為利用標靶藥物治療 B 細胞淋巴瘤的新標的[89]。

另外，Gururajan 等人[90]探討薑黃素調節 B 淋巴瘤生長的能力。其研究顯示薑黃素在 B 細胞淋巴瘤中會作用於 Syk，由於 Syk 在原發腫瘤和 B 淋巴瘤細胞中會持續被活化，而薑黃素可抑制 Syk 的活性，同時伴隨著抑制 Akt 的活性，進而使腫瘤細胞的生長被抑制。這些研究顯示了 Syk 可能在 B 淋巴瘤中促進腫瘤細胞生長。因此，針對 Syk 發展標靶治療藥物是一項可行的治療策略。另外，Young 等人發現，若以 RNAi 抑制人類 NHL(Non-hodgkin lymphoma)腫瘤細胞中的 Syk，則會使存活率下降，而在動物體內，若腫瘤細胞缺乏 Syk 則無法持續成長。他們也發現，Syk 抑制劑在動物體內可以引起不正常 B 細胞的凋亡，使腫瘤縮小。因此，在人類 NHL 細胞中透過 RNAi 和藥物抑制與動物模型得到的結果一致，均顯示 Syk 為腫瘤生長所必需的重要蛋白[90]。

### 5.2.3 Syk 在肝癌中扮演角色

由研究顯示，Syk 在不同癌症中所扮演的角色不盡相同，可能為抑癌基因，亦可能為致癌基因，而目前 Syk 的小分子抑制劑亦有許多藥廠或研究單位正積極發展[92]。曾有文獻曾指出，Syk 在肝細胞中會和血管緊張素 II(angiotensin II)作用，能活化下游的 ERK 分子而促進細胞生長及存活能力[91]，然而相關文獻較少，詳細的機制及 Syk 在肝癌的形成過程中扮演的角色也仍未清楚。

而在本研究中發現，當 Syk 被抑制後，HuH-7 細胞會對 sorafenib 之感受性提升，但由於 Raf 為 sorafenib 之作用標的，抑制 Syk 而影響 Raf 造成細胞凋亡的可能性較低；由文獻指出，Syk 在 B 細胞中可活化 PI3K/Akt 此訊息傳遞路徑[90]，使細胞存活並抵抗細胞凋亡，顯示 Syk 可能為 PI3K/Akt 之上游分子，因此在肝癌細胞中，當 Ras/Raf 受 Sorafenib 抑制而對細胞存活造成壓力時，可能開啟此訊息傳遞路徑，然而若 Syk 受抑制可能造成此路徑無法活化，因而使細胞在 sorafenib 作用下無法以另外機制生

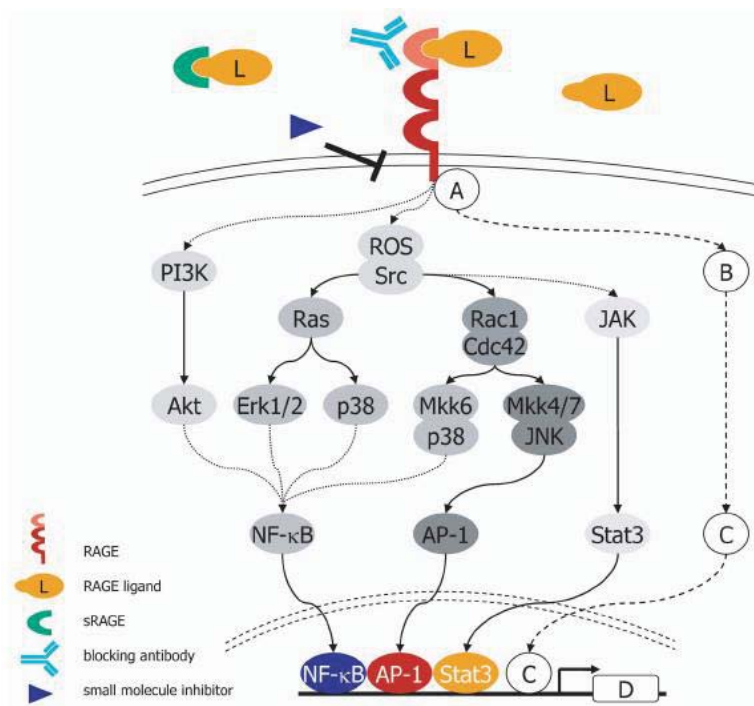




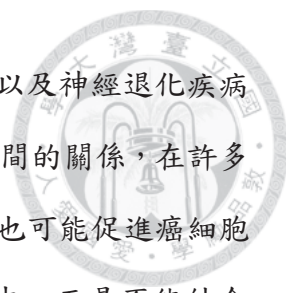
存，進而較野生型HuH-7存活率低；另外，由於Syk下游調控之分子眾多，抑制後所造成的影響亦不僅限於單一訊息傳遞路徑，是否可能有分子間相互作用而影響細胞生存仍有待進一步驗證。

### 5.3 其他具有潛力之標的

除了本研究所選擇的Syk外，在動物實驗篩選結果中，高醣化終產物受體 (receptor for advanced glycation end products, RAGE)也是具潛力的標的之一，且在對照組與實驗組中的倍數變化亦顯著。RAGE為免疫球蛋白家族的成員之一，其活化機制主要有兩種，一為細胞膜外的配體(ligand)與之結合，目前所知的RAGE配體主要有高醣化終產物(AGE)、HMGB1、S100B及Mac-1等蛋白；另一則為當細胞受各種壓力、發炎或免疫反應影響時亦會活化。而其下游所調控的訊息傳遞路徑繁多，目前已知有PI3K/Akt、ROS、JAK/Stat3等，但由於RAGE本身結構有部分未明，直接作用之標的仍尚未確認[93,圖M]。



(圖M：RAGE下游的訊息傳遞路徑；[93])




文獻指出RAGE和各類發炎反應、糖尿病、中風、動脈硬化以及神經退化疾病有關，但近年來亦有許多文獻探討RAGE連結發炎反應和癌症之間的關係，在許多癌症中RAGE也被發現有大量表現的情形，另外，RAGE的活化也可能促進癌細胞生長、增生、遷移及入侵，相關研究及小分子抑制劑也在開發中，而是否能結合sorafenib與抑制RAGE而加強sorafenib治療肝癌的效果也是未來可行的研究[93]。

#### 5.4 結論與未來展望

肝癌的盛行與發生率，已是許多國家關注的議題；其在治療方法上的瓶頸，更是相關的基礎醫學研究團隊正積極解決的目標；而在本研究中，我們建立了在肝癌的異種移植動物模式中進行核糖核酸干擾篩選的平台，並以改善sorafenib的療效為目的，先挑選了96種激酶基因作為篩選標的，希望由其中能找到對sorafenib具感受性的基因，以對sorafenib的機制及可能影響到的未知分子更進一步了解。

而經過次世代定序及統計分析之後，我們挑選了脾酪胺酸激酶(Syk)作進一步的驗證。在將肝癌細胞株HuH-7中的Syk基因分別以shRNA或抑制劑抑制後，發現對於細胞的正常生長並無影響，但當結合sorafenib的處理後，則會使細胞對sorafenib的感受性上升， $IC_{50}$ 值下降；除此之外，經過抑制後的細胞，生長緩慢，速度遠低於正常細胞，而其中以 $5\mu M$ 的sorafenib處理時可使這兩個現象差異最大，此濃度也低於一般sorafenib於治療肝癌上的劑量，表示Syk的確為對sorafenib具感受性的基因且有一定的效果。

而在未來研究方向上，主要可分為兩部分延伸。其一為Syk的深入研究，由目前研究結果可知Syk對sorafenib具感受性，然而其詳細的機制及影響的功能則須進一步探討，如細胞生存能力的試驗中所示，抑制Syk會使細胞生長緩慢，但是否會使細胞凋亡(apoptosis)或是使細胞停滯在細胞循環中(cell cycle arrest)則有待進一步驗證釐清，另外，由於sorafenib在細胞實驗中可使肝癌細胞形成腫瘤的能力下降(tumorigenesis)[70]，因此，未來可再進一步以腫瘤形成能力試驗(colony formation)




assay)探究若結合Syk抑制及sorafenib處理是否會對此有更顯著之影響，以了解其作用機制；而結合兩者後的一些功能性試驗(functional assay)，如對細胞遷移(migration)能力及入侵其他組織的能力(invasion)等是否與單純sorafenib處理有所不同，皆為未來可再進一步驗證的方向。

而另一方面則為更大規模的篩選及其他疾病的應用，由於本研究首先針對較小規模的基因作篩選，若此方式日益成熟，可再擴大至全基因組或針對大規模目標進行篩選，或許可鑑定出更有潛力的基因，使研究更趨完備，或是將此平台應用於其他未解決疾病的研究，期能對醫學進展及藥物應用皆有所助益。


## 第六章 參考文獻

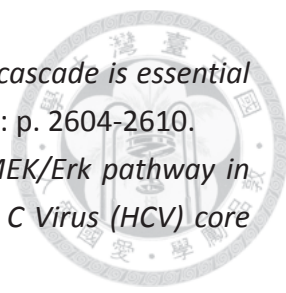


1. El-Serag, H.B., *Hepatocellular Carcinoma*. The new england journal of medicine, 2011. **365**(12): p. 1118-1127.
2. Bartosch, B., *Hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1504-1509.
3. Department of Health, E.Y., R.O.C.(Taiwna), *Cause of Death Statistics*. 2012: Department of Health, Executive Yuan, R.O.C.(Taiwna).
4. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-538.
5. Society, A.C., *Cancer Facts and FIGS 2012*. 2012, American Cancer Society.
6. Amarapurkar, D.N., et al., *How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences?* J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(6): p. 788-793.
7. Chen CH, et al., *Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in an Adult Population of Taiwan: Metabolic Significance of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Nonobese Adults*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(8): p. 745-752.
8. Köhler, H.-H., et al., *Hepatocellular Carcinoma in a Patient with Hereditary Hemochromatosis and Noncirrhotic Liver. A Case Report*. Pathology - Research and Practice, 1999. **195**(7): p. 509-513.
9. Dragani, T.A., *Risk of HCC: Genetic heterogeneity and complex genetics*. Journal of Hepatology, 2010. **52**: p. 252-257.
10. Evert, M. and F. Dombrowski, *Hepatocellular carcinoma in the non-cirrhotic liver*. Pathologie, 2008. **29**(1): p. 47-52.
11. Ohira, H., et al., *Clinical features of hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis in Japan*. J Gastroenterol, 2013. **48**(1): p. 109-114.
12. Haruyo IWADATE, et al., *Hepatocellular Carcinoma Associated with Wilson's Disease*. Internal Medicine, 2004. **43**(11): p. 1042-1045.
13. Alessandro Tagger, P.D., et al., *Prevalence of GB Virus-C/Hepatitis G Virus Infection in Patients With Cryptogenic Chronic Liver Disease and in Patients With Primary Biliary Cirrhosis or Wilson's Disease*. THE AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 1999. **94**(2): p. 484-488.
14. Organization, W.H., *Hepatitis B*. 2012, World Health Organization.
15. Gust, I.D., *Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia*. Gut, 1996: p. 18-23.
16. Lavanchy, D., *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and*

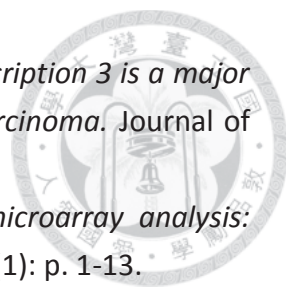
- 
- current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis*, 2004. **11**: p. 97-107.
17. Yun-Fan Liaw and C.-M. Chu, *Hepatitis B virus infection*. *Lancet*, 2009. **373**: p. 582-592.
  18. Samal, J., M. Kandpal, and P. Vivekanandan, *Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(1): p. 142-163.
  19. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(6): p. 453-463.
  20. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**: p. 2436-2441.
  21. Poynard, T., et al., *Viral hepatitis C*. *The Lancet*, 2003. **362**(9401): p. 2095-2100.
  22. Sun, C.A., *Incidence and Cofactors of Hepatitis C Virus-related Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study of 12,008 Men in Taiwan*. *American Journal of Epidemiology*, 2003. **157**(8): p. 674-682.
  23. Tanaka, Y., et al., *Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(3): p. 703-714.
  24. Rehmann, B. and M. Nascimbeni, *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(3): p. 215-229.
  25. Freeman, A.J., et al., *Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 809-816.
  26. Rogers, A.E. and P.M. Newberne, *Nutrition and Aflatoxin Carcinogenesis*. *Nature*, 1971. **229**(5279): p. 62-63.
  27. Farazi, P.A. and R.A. DePinho, *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(9): p. 674-687.
  28. Craig J. McClain, et al., *Monocyte activation in alcoholic liver disease*. *Alcohol*, 2002. **27**(1): p. 53-61.
  29. David J. Kurz, et al., *Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells*. *Journal of Cell Science*, 2004. **117**(11): p. 2417-2416.
  30. Mark A Feitelson, et al., *Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis*. *Oncogene*, 2002. **21**(16): p. 2593-2604.
  31. Block, T.M., et al., *Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma*. *Oncogene*, 2003. **22**(33): p. 5093-5107.
  32. Ryuya Shimoda, Makoto Nagashima, and M. Sakamoto, *Increased Formation of Oxidative DNA Damage, 8- Hydroxydeoxyguanosine, in Human Livers with Chronic Hepatitis*. *Cancer Research*, 1994. **54**(12): p. 3171-3172.
  33. Ahmad, W., et al., *A brief review on molecular, genetic and imaging techniques*

- for HCV fibrosis evaluation. Virol J*, 2011. **8**(8): p. 1-16.
34. Lars Zender, et al., *Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology*, 2010. **52**(6): p. 921-929.
  35. Villanueva, A., et al., *Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology*, 2008. **135**(6): p. 1972-83, 1983 e1-11.
  36. Chiang, D.Y., et al., *Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Cancer Research*, 2008. **68**(16): p. 6779-688.
  37. Tanabe KK, et al., *Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. JAMA*, 2008. **299**(1): p. 53-60.
  38. Villanueva A, et al., *Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. Semin Liver Dis*, 2007. **27**(1): p. 55-76.
  39. Philip PA, et al., *Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. J Clin Oncol*, 2005. **23**(27): p. 6657-6663.
  40. Thomas M, et al., *Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. Cancer*, 2007. **110**(5): p. 1059-1067.
  41. M, P., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(12): p. 915-928.
  42. Sachdev D and Y. D., *Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(1): p. 1-12.
  43. De Souza AT, et al., *M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. Nat Genet*, 1995. **11**(4): p. 447-449.
  44. Tovar V, et al., *IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. J Hepatol*, 2010. **52**(4): p. 550-559.
  45. Takayama H, et al., *Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(2): p. 701-706.
  46. Lutterbach B, et al., *Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. Cancer Research*, 2007. **67**(5): p. 2081-2088.
  47. Ueki T, et al., *Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. Hepatology*, 1997. **25**(4): p. 862-866.
  48. Johnson GL and L. R., *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science*, 2002. **298**(5600): p. 1911-1912.
  49. Nakanishi K, et al., *Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Cancer*, 2005.

- 
- 103(2):** p. 307-312.
50. G, T., *mTOR inhibitors for hepatocellular cancer: a forward-moving target*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9(2):** p. 247-261.
  51. KS, Z., *Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation*. Nat Rev Genet, 2008. **9(5):** p. 329-340.
  52. Zaret K and G. M, *Generation and Regeneration of Cells of the Liver and Pancreas*. Science, 2008. **322(5907):** p. 1490-1494.
  53. Boyault S, et al., *Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets*. Hepatology, 2007. **45(1):** p. 42-52.
  54. Hoshida Y, et al., *Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma*. The new engl and journa l o f medicine, 2008. **359(19):** p. 1995-2004.
  55. Naugler WE, et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. Science, 2007. **6(317):** p. 121-124.
  56. Poon RT, et al., *Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma*. Br J Surg, 2004. **91(10):** p. 1354-1360.
  57. Yoshiji H, et al., *Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2002. **35(4):** p. 834-842.
  58. W., S., et al., *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004. **432(7015):** p. 307-315.
  59. Aguilar F, et al., *Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver*. Science, 1994. **264(5163):** p. 1317-1319.
  60. Liebman HA, et al., *Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma*. The new Engl and journal o f medicine, 1984. **310:** p. 1427-1431.
  61. Michael L. Volk\*, et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: A comparison of AFP, DCP, and AFP-L3*. Cancer Biomarkers, 2007. **3(2):** p. 79-87.
  62. Sterling, R.K., et al., *Clinical utility of AFP-L3% measurement in North American patients with HCV-related cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2007. **102(10):** p. 2196-205.
  63. Cabibbo, G., et al., *Multimodal approaches to the treatment of hepatocellular carcinoma*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2009. **6(3):** p. 159-169.
  64. Xie, B., D.H. Wang, and S.J. Spechler, *Sorafenib for treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Dig Dis Sci, 2012. **57(5):** p. 1122-1129.
  65. DS, G., *The molecular perspective: the ras oncogene*. Oncologist, 1999. **4(3):** p. 263-264.

- 
66. Stöckl L, et al., *Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression*. *oncogene*, 2003. **22**(17): p. 2604-2610.
67. Giambartolomei S, et al., *Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein*. *Oncogene*, 2001. **20**(20): p. 2606-2610.
68. Gollob JA, et al., *Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway*. *Semin Oncol*, 2006. **33**(4): p. 392-406.
69. Wilhelm SM, et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis*. *Cancer Research*, 2004. **64**(19): p. 7099-7109.
70. Gauthier, A. and M. Ho, *Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update*. *Hepatol Res*, 2013. **43**(2): p. 147-154.
71. Chen KF, et al., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **337**(1): p. 133-161.
72. Blivet-Van Eggelpoël MJ, et al., *Epidermal growth factor receptor and HER-3 restrict cell response to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells*. *J Hepatol*, 2012. **57**(1): p. 108-115.
73. van Malenstein H, et al., *Long-term exposure to sorafenib of liver cancer cells induces resistance with epithelial-to-mesenchymal transition, increased invasion and risk of rebound growth*. *Cancer Lett*, 2013. **329**(1): p. 74-83.
74. Chen YL, et al., *Sorafenib inhibits transforming growth factor  $\beta$ 1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes*. *Hepatology*, 2011. **53**(5): p. 1708-1718.
75. Shimizu S, et al., *Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(3): p. 548-557.
76. Rutz, S. and A. Scheffold, *Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems*. *Arthritis Res Ther*, 2004. **6**(2): p. 78-85.
77. Mullenders, J. and R. Bernards, *Loss-of-function genetic screens as a tool to improve the diagnosis and treatment of cancer*. *Oncogene*, 2009. **28**(50): p. 4409-4420.
78. Rao, D.D., et al., *siRNA vs. shRNA: similarities and differences*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(9): p. 746-759.
79. Riccaboni, M., I. Bianchi, and P. Petrillo, *Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs*. *Drug Discov Today*, 2010. **15**(13-14): p. 517-530.



- 
80. Wei-Tien Tai, et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma*. Journal of Hepatology, 2011. **55**(5): p. 1041-1048.
81. White, C.A. and L.A. Salamonsen, *A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology*. Reproduction, 2005. **130**(1): p. 1-13.
82. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
83. Git, A., et al., *Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression*. RNA, 2010. **16**(5): p. 991-1006.
84. Noble, W.S., *How does multiple testing correction work?* Nat Biotechnol, 2009. **27**(12): p. 1135-1137.
85. Wang Hua-Yi and Z. Zhao-Xiang, *Functions of Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Gene and Its Correlation to Neoplasms*. Chinese Journal of Cancer, 2007. **26**(5): p. 555-560.
86. Coopman PJ, et al., *The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 742-747.
87. Hoeller C, et al., *The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(6): p. 1293-1299.
88. Masuda ES and S. J, *Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis*. Pulm Pharmacol Ther, 2008. **21**(3): p. 461-467.
89. Leseux L, et al., *Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4156-4162.
90. Gururajan M, et al., *Spleen tyrosine kinase (Syk), a novel target of curcumin, is required for B lymphoma growth*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 111-121.
91. Yanagi, S., et al., *Syk expression and novel function in a wide variety of tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(3): p. 495-8.
92. Riccaboni, M., et al., *Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs*. Drug Discovery Today, 2010. **15**(13): p. 517-530.
93. Riehl, A., et al., *The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer*. Cell Commun Signal, 2009. **7**(12): p. 12-18.



## 圖表

< Tables >

Table 1 Primer list

Puro enrichment	Forward: 5' - TTCACCGAGGGCCTATTTCCCATG - 3'
	Reverse: 5' - CGTGAGGAAGAGTTCTTGCAGCTC - 3'
Full hair-pin library	Forward: 5' - AATGGACTATCATATGCTTACCGT - 3'
	Reverse: 5' - TGTGGATGAATACTGCCATTTGTCTCGAGGTC - 3'

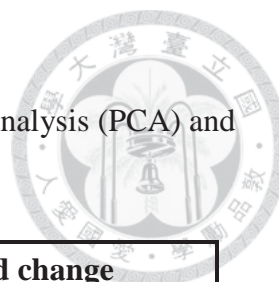


Table 2 P-value and fold change analyzed by Principal Component Analysis (PCA) and T-test

<b>Gene</b>	<b>T-test p-value</b>	<b>Fold change</b>
Rage	0.000891112	0.023579517
FASTKD5	0.001418046	-
Syk	0.069732117	107.0906868



Table 3 Screening list of the 96 kinases

Symbol	NCBI_geneId	Function
CSNK2A2	1459	Casein kinase II subunit alpha
RAGE	5891	MAPK/MAK/MRK overlapping kinase
GSK3B	2932	Glycogen synthase kinase-3 beta
YES1	7525	Tyrosine-protein kinase Yes
SLK	9748	STE20-like serine/threonine-protein kinase
CIT	11113	Citron Rho-interacting kinase
PBK	55872	Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase
CCNH	902	Cyclin-H
CSNK1D	1453	Casein kinase I isoform delta
JAK1	3716	Tyrosine-protein kinase JAK1
ROR2	4920	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2
PFKFB1	5207	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1
RP2	6102	Protein XRP2
RPS6KA1	6195	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1
TAF9	6880	Adenylate kinase isoenzyme 6
CDC42BPA	8476	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha
AURKB	9212	Serine/threonine-protein kinase 12
TRPM7	54822	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7
RFK	55312	Riboflavin kinase
PANK2	80025	Pantothenate kinase 2, mitochondrial
ADPGK	83440	ADP-dependent glucokinase
CMPK2	129607	UMP-CMP kinase 2, mitochondrial
CSNK1E	1454	Casein kinase I isoform epsilon
DTYMK	1841	Thymidylate kinase
GRK6	2870	G protein-coupled receptor kinase 6
MPP1	4354	55 kDa erythrocyte membrane protein
STK16	8576	Serine/threonine-protein kinase 16
TRIM24	8805	Transcription intermediary factor 1-alpha
RPS6KC1	26750	Ribosomal protein S6 kinase delta-1
PI4K2B	55300	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta
WNK1	65125	Serine/threonine-protein kinase WNK1

MLK4	84451	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4
PRPS1L1	221823	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3
EFEMP1	2202	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
FKBP1A	2280	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A
ITPK1	3705	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase
MST1R	4486	Macrophage-stimulating protein receptor
ROR1	4919	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1
POLR2I	5438	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9
MAPK1	5594	Mitogen-activated protein kinase 1
FASTKD5	60493	FAST kinase domain-containing protein 5
AXL	558	Tyrosine-protein kinase receptor UFO
EPHA7	2045	Ephrin type-A receptor 7
MET	4233	Hepatocyte growth factor receptor
PI4KA	5297	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
POLR2L	5441	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC5
NME6	10201	Nucleoside diphosphate kinase 6
NRBP1	29959	Nuclear receptor-binding protein
DDR1	780	Epithelial discoidin domain-containing receptor 1
EPHB6	2051	Ephrin type-B receptor 6
PRPS2	5634	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
ROCK1	6093	Rho-associated protein kinase 1
SEPHS1	22929	Selenide, water dikinase 1
COASY	80347	Bifunctional coenzyme A synthase
UHMK1	127933	Serine/threonine-protein kinase Kist
CDK6	1021	Cyclin-dependent kinase 6
EGFR	1956	Epidermal growth factor receptor
ALDH18A1	5832	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
SRPK2	6733	Serine/threonine-protein kinase SRPK2
STK17B	9262	Serine/threonine-protein kinase 17B
AATK	9625	Serine/threonine-protein kinase LMTK1
TRIM28	10155	Transcription intermediary factor 1-beta
PRKD2	25865	Serine/threonine-protein kinase D2
CRIM1	51232	Cysteine-rich motor neuron 1 protein
MAGI3	260425	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3

CSK	1445	Tyrosine-protein kinase CSK
ENG	2022	Endoglin
FGFR1	2260	Basic fibroblast growth factor receptor 1
GAK	2580	Cyclin-G-associated kinase
NEK3	4752	Serine/threonine-protein kinase Nek3
NME1	4830	Nucleoside diphosphate kinase A
PIK3C2B	5287	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit beta
POLR2J	5439	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11-a
DGKE	8526	Diacylglycerol kinase epsilon
PDXK	8566	Pyridoxal kinase
MAP3K6	9064	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
BMP2K	55589	BMP-2-inducible protein kinase
CAD	790	CAD protein
LTBP1	4052	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1
CDK16	5127	Cyclin-dependent kinase 16
PTK2	5747	Focal adhesion kinase 1
PAPSS1	9061	3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Synthase 1
LATS1	9113	Serine/threonine-protein kinase LATS1
CHEK2	11200	Serine/threonine-protein kinase Chk2
NAGK	55577	N-acetyl-D-glucosamine kinase
CAMKV	79012	CaM kinase-like vesicle-associated protein
CDK9	1025	Cyclin-dependent kinase 9
DAPK1	1612	Death-associated protein kinase 1
ERBB2	2064	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
ERBB3	2065	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3
MNAT1	4331	CDK-activating kinase assembly factor MAT1
PDK1	5163	[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 1, mitochondrial
PFKFB2	5208	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
PRKAG1	5571	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1
SYK	6850	Tyrosine-protein kinase SYK
MAP3K7	6885	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7



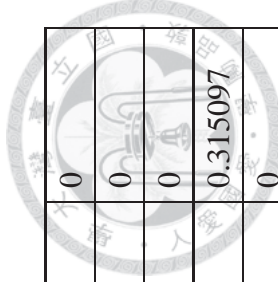
Table 4 Concentration and quality of genomic DNA

Name	Concentration (ng/ $\mu$ L)	260/280 (>1.8)	260/230 (>1.7)
Cell (reference)	343.1	1.94	2.13
Control 1	196.2	1.84	2.24
Control 2	235.8	1.85	2.23
Control 3	209.5	1.81	1.78
Control 4	206.8	1.86	2.20
Treatment 1	213	1.84	2.38
Treatment 2	186.3	1.85	2.38
Treatment 3	203	1.85	2.25
Treatment 4	384.4	1.82	2.25
Treatment 5	178.6	1.85	2.33



Table 5 Reads of each sample and ratios of each shRNA clone in the two groups

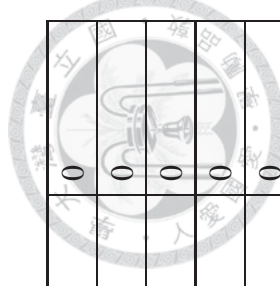
	Reference	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Treat 1	Treat 2	Treat 3	Treat 4	Treat 5
(CSNK2A2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CSNK2A2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RAGE)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RAGE)	1	34.19693	33.43077	28.12124	0.021724	24.99004	0.063298	1.077333	0.001638	1.178743
(GS3K-beta)	1	0	0	0	0	0	0	0	2.429005	0.016157
(GS3K-beta)	1	0	0.00034	0.000347	0.001054	0.124382	0	0.003025	0.001413	0.043365
(YES1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(YES1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SLK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SLK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CIT)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CIT)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PBK)	1	0.001552	0.015563	0.008892	0.127823	43.38547	0.007322	0.020114	0	0.046077
(PBK)	1	0	0	0.002998	0	0	0	0	0	0
(CCNH)	1	0	0	0.003458	0	0	0	0	0.004687	0
(CCNH)	1	0	0	0	0	0	0	0.028427	0	0.000184
(CSNK1D)	1	0.013379	0	0	0	0	0	0.12664	0	0
(CSNK1D)	1	0	0	0.002262	0	0	0	0.003581	0	0
(JAK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0



(JAK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ROR2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ROR2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PFKFB1)	1	0	0.002526	0.000483	0.002281	0	0	0	0	0.011989	0	0	0	0	0	0	0.315097	0	0	0	0	0
(PFKFB1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RP2)	1	0	0	0.001647	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RP2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001606	0	0	0	0	0	0.000637	0	0	0	0	0	0
(RPS6KA1)	1	0	0	0.000943	0.000477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RPS6KA1)	1	0	0	0.001797	0.000908	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000423	0	0	0	0	0	0
(TAF9)	1	0	0.000874	0.000892	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.006303	0	0	0	0	0	0
(TAF9)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CDC42BPA)	1	0	0.000733	0	0	0	0	0	0	0.00095	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CDC42BPA)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(AURKB)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(AURKB)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(TRPM7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(TRPM7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RFK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(RFK)	1	0	0	0.001215	0.000614	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PANK2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PANK2)	1	0	0	0	0.002783	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.134299	0.006782	0	0	0	0	0	0
(ADPGK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(ADPGK)	1	0	0	0.047357	26.484019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000519
(CMPK2)	1	0	0	0.000546	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000515
(CMPK2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CSNK1E)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.004813
(DTYMK)	1	0	0	0.005939	0.012011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.002797
(DTYMK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.432456	0.01484	0	0	0	0.010315
(GRK6)	1	0	0	0.002948	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(GRK6)	1	0	0	0.000953	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MPP1)	1	0.001982	0	0	0.003281	0.002727	0	0.023117	0.004398	133.97588	0	0	0	0	0	0
(MPP1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(STK16)	1	0	0	0.005621	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(STK16)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(TRIM24)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.014922	0	0	0	0	0
(TRIM24)	1	0	0	0.067547	26.902356	0	0	0.005093	0	0.006818	0	0	0	0	0	0
(RPS6KC1)	1	0	0	0.002286	0	0	0	0	0	0	0	0.020652	0	0	0	0
(RPS6KC1)	1	0.00043	0.000345	0.000705	0.000713	0.002369	0	0.066944	0.26528	0.000664	0	0	0	0	0	0
(PI4K2B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PI4K2B)	1	0	0	0.001249	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(WNK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.004167
(WNK1)	1	0	0	0.007404	0.007487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MLK4)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MLK4)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(PRPS1L1)	1	0	0	0.005219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PRPS1L1)	1	0	0	0.000387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(EFEMP1)	1	0	0	0.000795	0.008839	0.003006	0.008702	0.001258	0.000539	0.004492	0.001354	0.002268	0.000539	0.001258	0.000539	0.004492	0.001354	0.002268	0.000539	0.001258	0.000539	0.004492	0.001354	0.002268
(EFEMP1)	1	0.029198	0	0.014556	4.572289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(FKBP1A)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.011437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(FKBP1A)	1	0	0	0.002299	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ITPK1)	1	0	0	0.00079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001071	0	0	0	0	0	0	0	0
(ITPK1)	1	0	0	0.001136	0	0	0	0.152932	0.17327	0	0	0	0	0.152932	0.17327	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MST1R)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MST1R)	1	0	0	0	0	0	0	0.31259	0	0	0	0	0	0.31259	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ROR1)	1	0	0.001165	53.46761	0.009616	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ROR1)	1	0	0	0.001127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001062
(POLR2I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(POLR2I)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MAPK1)	1	0	0	0.005907	0.002987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MAPK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(FASTKD5)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001227	0.00189	0.00146	0.001227	0.00189	0.00146	0.001227	0.00189	0.00146	0.001227	0.00189	0.00146
(FASTKD5)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.004291
(AXL)	1	0	0	0.000346	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000977
(AXL)	1	0	0.033903	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(EPHA7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(EPHA7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



(MET)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MET)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PI4KA)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PI4KA)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(POLR2L)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(POLR2L)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.108513
(NME6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(NME6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(NRBP1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.005441
(NRBP1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(DDR1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(DDR1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(EPHB6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.002788
(EPHB6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PRPS2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PRPS2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ROCK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ROCK1)	1	0	0.005724	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SEPHS1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SEPHS1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(COASY)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(COASY)	1	0	0	0	0	0.000667	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(UHMK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.008365	0.006894	0	0
(UHMK1)	1	0	0	0.00123	0	0	0	0	0	0	0	0	0.011688	0	0
(CDK6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CDK6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(EGFR)	1	0	0	0	0.001104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(EGFR)	1	0	0	0	0.001104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ALDH18A1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001533	0	0
(ALDH18A1)	1	0	0	0.007745	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.014593	0
(SRPK2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SRPK2)	1	0	0	0.000276	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000438	0	0
(STK17B)	1	0	0.000544	0.000555	0.000281	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(STK17B)	1	0	0.000544	0.000555	0.000281	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(AATK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.026949	0	0
(AATK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(TRIM28)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.003222	0	0
(TRIM28)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.003245	0	0
(PRKD2)	1	0	0	0.190981	25.508374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PRKD2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.070084	0
(CRIM1)	1	0	0	0.005187	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CRIM1)	1	0	0	0.018468	0	0	0	0	0	0	0	0	0.248557	0.012516	0
(MAGI3)	1	0	0	0.0006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001413
(MAGI3)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(CSK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CSK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.228087	0	0	0	0	0	0	0	0
(ENG)	1	0	0	0	0	0.001973	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ENG)	1	0.00495	0.001222	0.000156	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000616	4.071911	0.002535	0.000252	0.089124	0	0	0
(FGFR1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(FGFR1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(GAK)	1	0	0	0	0	0	0	0.000225	0.000616	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(GAK)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(NEK3)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00282	0	0	0	0	0	0	0	0
(NEK3)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.798053	0.016075	0	0	0	0
(NME1)	1	0	0.006669	0.006804	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(NME1)	1	0.007055	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PIK3C2B)	1	0	0	0.000421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PIK3C2B)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(POLR2J)	1	0	0	0.003509	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(POLR2J)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(DGKE)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(DGKE)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PDXX)	1	0	0	0.00416	0.008414	0	0	0	0	0	0	3.095742	0	0	0	0.003919	0	0	0	0
(PDXX)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.056617	0	0	0	0	0	0	0	0
(MAP3K6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MAP3K6)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(BMP2K)	1	0	0	0	0.004332	0	0	0	0	0	0	0.030862	0	0.007142
(BMP2K)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CAD)	1	0	0	0	0.00514	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CAD)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.060476	0.007006
(LTBP1)	1	0	0	0	0.001769	0.003578	0.003717	133.48237	0.630242	0.004796	0.004167	0	0.004167	0
(LTBP1)	1	0.003259	0	0	0.013338	0.169959	0	0	0	0.039773	0.098019	0	0.039773	0.098019
(CDK16)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CDK16)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.125004	0	0	0
(PTK2)	1	0	0	0	0.00108	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PTK2)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PAPSS1)	1	0	0	0	0.005782	0.025338	0	0	0	0	0	0	0	0
(PAPSS1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(LATS1)	1	0	0	0	0.068372	7.732923	0	0	0.027937	0.005979	0	0	0.027937	0
(LATS1)	1	0	1.254313	0	0.001882	0	0	0	0.01043	0	0	0	0	0
(CHEK2)	1	0	0	0	0.002032	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(CHEK2)	1	0.000569	0	0	0.001397	0.008832	0	0	0.039642	0.000947	0.000219	0	0.039642	0.000219
(NAGK)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(NAGK)	1	0.017098	0	0	0.000373	0	0	0	0.001477	0	0	0	0.001477	0
(CAMKV)	1	0	0	0	0.002296	0	0	0	0	0.119809	0.012979	0	0.119809	0.012979
(CAMKV)	1	0	0	0	0.010471	0.010589	0	0	0	0.007096	0	0	0.007096	0
(CDK9)	1	0	0	0.00082	0	0	0	0	0.001986	0.007933	0	0	0.001986	0
(CDK9)	1	0	0	0	0.001328	0	0	0	0	0	0.002501	0	0	0.002501





(DAPK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
(DAPK1)	1	0.000674	0	0.000551	0	0	0	0.004365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ERBB2)	1	0	0	0.000349	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ERBB2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ERBB3)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(ERBB3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MNAT1)	1	0.000237	0	0.000971	0	0	0	0.145683	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.029992
(MNAT1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PDK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PDK1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.038847	0	0	0.00075
(PFKFB2)	1	0	0	0.004377	0.004426	0.002452	151.19505	3.252358	0.011864	0	0	0	0	0.636375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PFKFB2)	1	0	0.087205	0.007061	0.07284	0	0	0	0.001914	0	0	0	0	0.000665	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PRKAG1)	1	0	0.000971	0.005946	0.106726	0	0	0.000784	0.002015	0	0	0	0	0.000934	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(PRKAG1)	1	0	0	0	0.002309	0	0	0.03254	0.052615	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SYK)	1	0.286668	7.351106	0.462621	307.38443	0.005635	0.234436	129.76367	380.10952	357.60366	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(SYK)	1	0	0	0.004604	0	0	0	4.439895	0.006241	0.002169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MAP3K7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(MAP3K7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reads	214441	208896	260369	255191	252344	303615	221379	161172	188278	270865	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<Figure Legends>

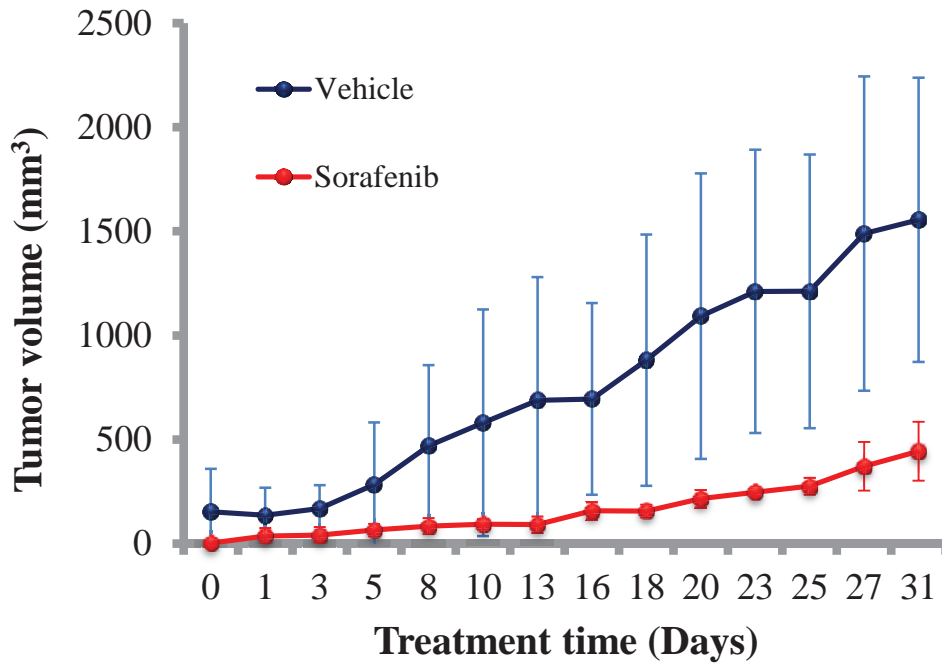


Figure 1 Growth curve of tumors derived from HuH-7 cells infected with 192 shRNA library pools. Cells were injected subcutaneously into nude mice. After tumors grew to 100 mm<sup>3</sup>, mice were divided into two groups. In the control group (n=4), mice were treated with vehicle. In the treatment group (n=5), mice were treated with sorafenib with the dose of 30mg/kg/day. Error bars indicate the SD.



Sorafenib (30mg/kg)

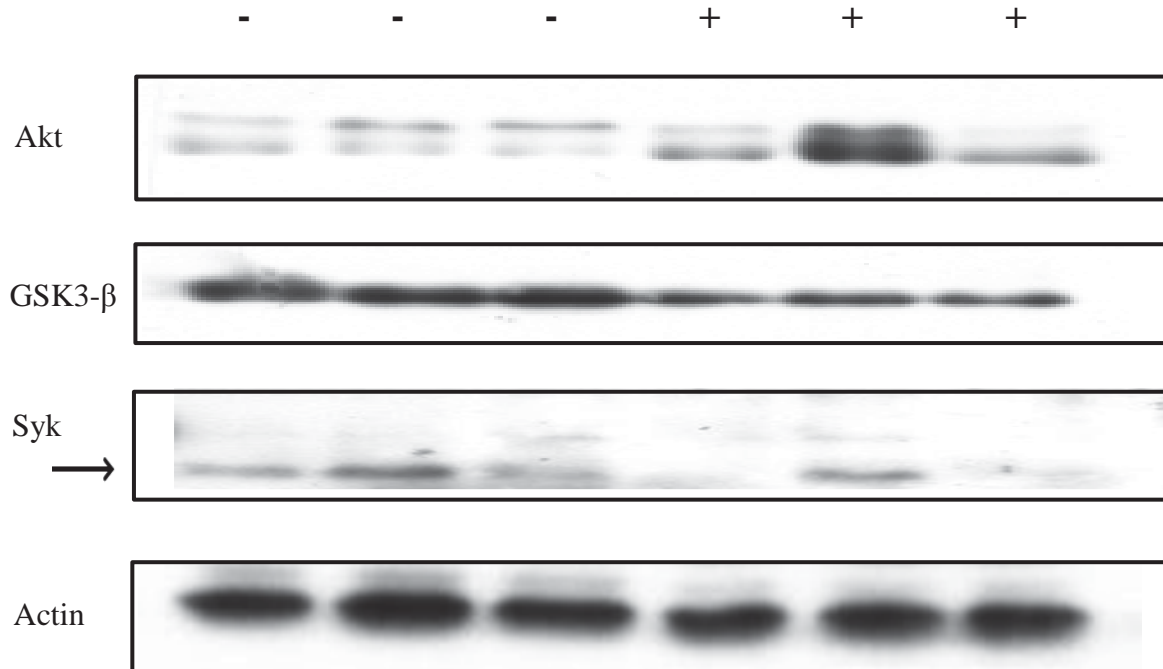
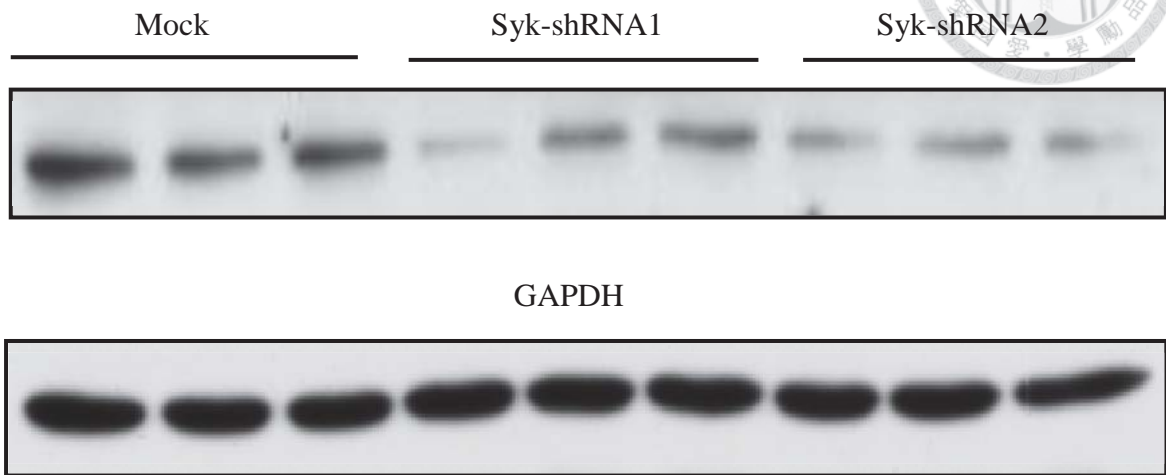


Figure 2 Protein expression levels of spleen tyrosine kinase (Syk) and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) from tissue lysates slightly reduced in the treatment group.

(A)



(B)

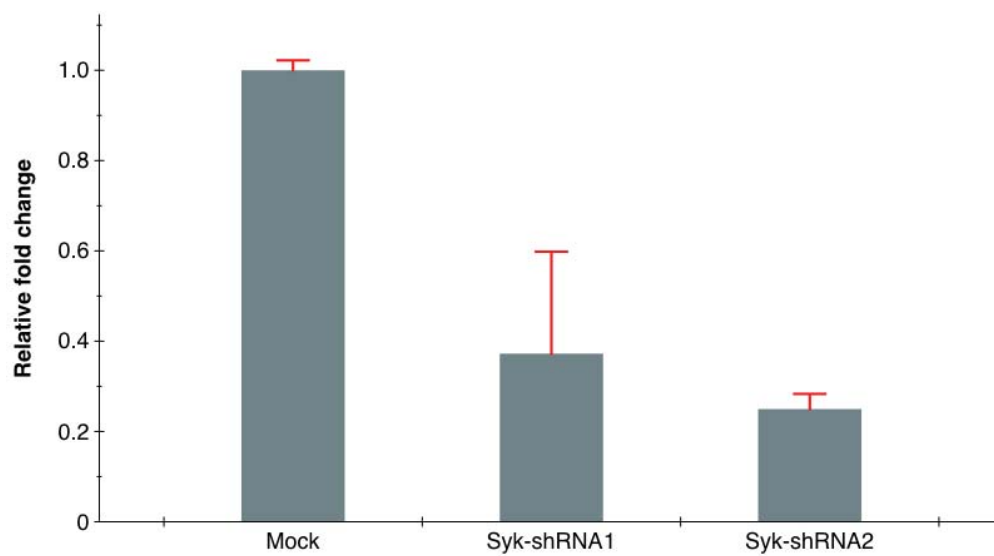


Figure 3 Validation of gene silencing by Syk shRNA. (A) Lysates from Syk lentiviral shRNA infected HuH-7 cells were prepared after puromycin selection and analyzed by western blot for Syk protein expression using an anti-Syk antibody. (B) Knock down efficiency of the two shRNA clones were detected by subtracting the expression levels of Syk with the control GAPDH.

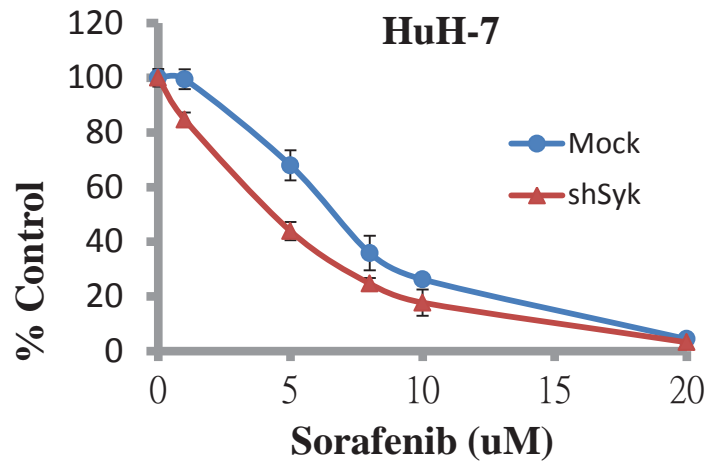


Figure 4 Validation of Syk as a sensitizing target to sorafenib in HuH-7 cell line. HuH-7 cells were infected by lentiviral shRNA of Syk and non-silencing shRNA (Mock). After puromycin selection, cells were treated with varying concentrations of sorafenib and incubated for an additional 72 hours. Cell number was assessed and data was normalized to shRNA plus vehicle control and plotted. Silencing of Syk showed potentiation of sorafenib response as seen by the shift in the dose response curves.

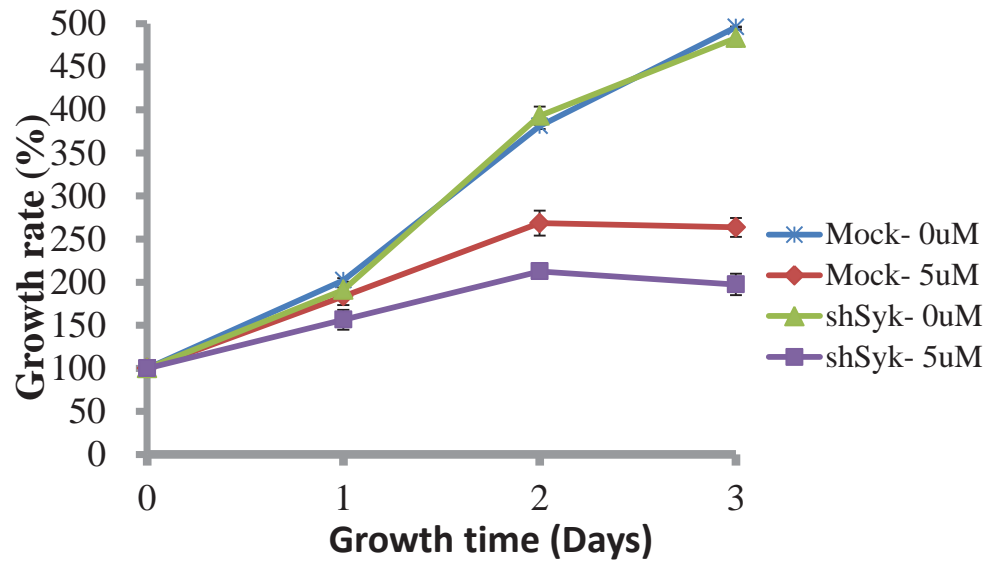


Figure 5 Growth rate of shSyk treated with 5 uM sorafenib is lower than Mock. HuH-7 cells were infected with lentiviral shRNA of Syk and Non-silencing shRNA (Mock). Cells are treated with vehicle or 5 uM sorafenib and incubated for 24, 48, 72 days respectively. Cell number was assessed and data was normalized to day 0.

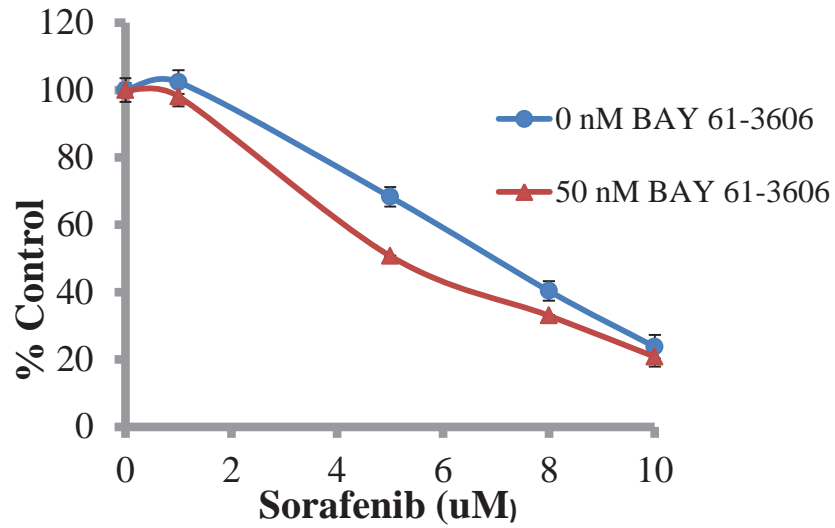


Figure 6 Syk inhibitor potentiates sorafenib response. Treatment of HuH-7 cells with Syk specific inhibitor BAY 61-3606 in combination with varying concentrations of sorafenib resulted in a shift of the dose response curve suggesting potentiation of the sorafenib response. Cell number was assessed and data was normalized to vehicle control and plotted.