

國立臺灣大學醫學院微生物學所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

利用Pooled RNAi Library尋找肝癌生長的特異基因

Identify Genes that are Specific to Hepatocellular Carcinoma

Growth by Using Pooled RNAi Library

郭芷華

Chih-Hua Kuo

指導教授：王錦堂 博士

Advisor: Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文  
口試委員會審定書

中文題目：利用 Pooled RNAi Library 尋找肝癌生長的特異基因

英文題目：Identify Genes that are Specific to Hepatocellular Carcinoma  
Growth by Using Pooled RNAi Library

本論文係郭世華君(學號 R04445105) 在國立臺灣大學微生物學所完成之碩(博)士學位論文，於民國 106 年 7 月 17 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：

王錦堂

(簽名)

(指導教授)

郭世華

蔡中喬

系主任、所長

鄧述詒

(簽名)

## 誌謝

能完成這篇論文，首先要感謝我的指導教授王錦堂老師，提供良好的實驗環境供我學習，並且指導我讓我的研究更有邏輯性，還有一起研究新的領域很有趣，令我獲益良多。感謝口試委員蔡丰喬老師、董馨蓮老師對我的研究的指導，給予我寶貴的意見與不同的思考方向。感謝佩芳學姊、稚容學姊的指引，提醒我應該注意的各種實驗細節，教導我如何解決實驗上遇到的問題，和我討論實驗結果並適時修正實驗內容，讓我的研究能夠順利進行。感謝依吟學姊、伊翔學長、俐吟學姊，教導我一些實驗技巧，讓我不至於手忙腳亂，也能更有效率、正確地得到實驗結果。感謝怡柔以及曼華不管是在實驗或是生活上的扶持，互相鼓勵、學習，碩士班的生活有你們很開心。感謝柏勳學弟、彥溥學弟、婉婷學妹的陪伴。最後要感謝我的父母支持我進入研究所學習，讓我無後顧之憂地在求學之路繼續深造。

## 中文摘要



肝癌為全球盛行癌症第五名，對於其治療或是基因檢測還沒有很好的指標，所以想要利用 human pooled shRNA lentiviruses library 以 negative selection 的方式尋找肝癌生長的特異基因。將 human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 分別感染四種不同的癌症細胞株，原本包含了 9984 個 shRNA，結果發現人類肝細胞癌細胞株 Huh7、人類肺腺癌細胞株 A549、人類子宮頸癌細胞株 HeLa、人類胃癌細胞株 SCM1 共同沒有比對到的 shRNA 有 423 個，涵蓋 307 個基因，而只有人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的 shRNA 則有 334 個，涵蓋 303 個基因。有研究顯示抑制色胺酸雙加氧酶(tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO2)可使 T 細胞重新獲得對抗腫瘤的能力，所以想要探討是否可以藉由 shRNA 抑制 *TDO2* 基因表現來抑制肝腫瘤的生長。利用定量及時聚合酶連鎖反應，發現 shRNA clone ID 874、33 分別抑制人類肝癌細胞株 Huh7、小鼠肝癌細胞株 Hep55.1c 和小鼠肝臟上皮細胞株 BNL1.MEA 的 *TDO2* 基因表現的效果最好。以西方墨點法偵測被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株以及未被感染的 Hep55.1c 細胞株之色胺酸雙加氧酶表現量，因為陽性控制組沒有明顯的 band，所以無法確定細胞色胺酸雙加氧酶表現量。以 MTT 試驗測定細胞增生，在第五天時，未被感染的 Hep55.1c 細胞株之粒線體活性比被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株和被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株數值高，且有顯著差異，表示未被感染的 Hep55.1c 細胞株生長速度較快。皮下注射動物實驗方面，在 C57BL/6 小鼠打入被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的細胞形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的細胞形成的腫瘤小，且在第十五天有顯著差異，但在 BALB/C 小鼠則沒有顯著差異。肝臟注射動物實驗方面，不管是在 C57BL/6 或 BALB/C 小鼠，打入被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的細胞形成的腫瘤大小與被 scramble shRNA 慢病毒感染後的細胞形成的腫瘤大小都沒有顯著差異。

關鍵字：肝細胞癌、基因組篩選、色胺酸雙加氧酶、小髮夾核糖核酸、慢病毒

## Abstract



Hepatocellular carcinoma is the fifth most prevalent cancer worldwide. So far, there are no good indicators for its treatment or early diagnosis. Therefore, we wanted to use human pooled shRNA lentiviruses library to identify genes that are specific to hepatocellular carcinoma growth by negative selection. Four different types of cancer cell lines were infected by human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 which had 9984 shRNA. There were 423 shRNA including 307 genes which were not aligned in Huh7, A549, HeLa and SCM1 cells. Additionally, there were 334 shRNA including 303 genes which were not aligned only in Huh7 cell. Previous studies showed that inhibiting tryptophan 2,3-dioxygenase (*TDO2*) allowed T cell to regain the ability to attack tumor. Thus, we wanted to investigate whether using shRNA to inhibit *TDO2* gene expression can repress the growth of hepatocellular carcinoma. By real time qPCR, we found that shRNA clone ID 874 and 33 inhibited the *TDO2* gene expression levels of Huh7, Hep55.1c and BNL1.MEA cells most efficiently respectively. The protein levels of tryptophan 2,3-dioxygenase of scramble shRNA treated Hep55.1c, shRNA clone ID 33 treated Hep55.1c and non-treated Hep55.1c cells were detected by western blot. We couldn't confirm the protein levels of tryptophan 2,3-dioxygenase of these cells because there wasn't a distinct band in positive control. Using MTT assay to detect the proliferation rate of non-treated Hep55.1c, scramble shRNA treated Hep55.1c and shRNA clone ID 33 treated Hep55.1c cells. We found that the activity of mitochondria in non-treated Hep55.1c cells was significantly higher than scramble shRNA treated Hep55.1c and shRNA clone ID 33 treated Hep55.1c cells at day 5 indicating that the proliferation rate of non-treated Hep55.1c cells was faster. In subcutaneous injection, the size of tumors derived from shRNA clone ID 33 treated cells was significantly

smaller than those from scramble shRNA treated cells at day 15 in C57BL/6 but not in BALB/C mice. However, in liver injection, there was no significant difference between the size of tumors derived from shRNA clone ID 33 treated cells and those from scramble shRNA treated cells in C57BL/6 or BALB/C mice.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, Genome-wide screening, Tryptophan 2,3-dioxygenase, Small hairpin RNA, Lentivirus

# 目錄



口試委員審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
中文摘要 .....	iii
Abstract.....	iv
目錄 .....	vi
圖目錄 .....	viii
表目錄 .....	ix
<b>第一章 緒論.....</b>	<b>1</b>
1.1 肝癌簡介 .....	1
1.2 基因治療載體 .....	1
1.3 小髮夾核糖核酸(Small hairpin RNA, shRNA)的作用機制 .....	3
1.4 Pooled RNAi library .....	3
1.5 色胺酸雙加氧酶(Tryptophan 2,3-dioxygenase).....	3
1.6 研究動機 .....	5
<b>第二章 材料與方法 .....</b>	<b>6</b>
2.1 材料 .....	6
2.1.1 細胞株.....	6
2.1.2 藥品 .....	6
2.1.3 Pool RNAi library 及 <i>TDO2</i> targeted shRNA .....	6
2.1.4 引子(Primers).....	6
2.2 利用 pooled shRNA library 尋找肝癌生長的特異基因 .....	7
2.2.1 以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 感染細胞 .7	
2.2.2 抽取細胞基因體 DNA(Genomic DNA) .....	7
2.2.3 以聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction)放大 shRNA 序列 ....8	
2.2.4 以限制酶切除 shRNA loop 結構 (Restriction enzyme digestion).....9	
2.2.5 Klenow .....	9
2.2.6 次世代定序(Next Generation Sequencing) .....	10

2.3	以 shRNA 抑制 <i>TDO2</i> 基因 .....	10
2.3.1	以包裹著 <i>TDO2</i> targeted shRNA 的慢病毒感染細胞 .....	10
2.3.2	抽取細胞 total RNA .....	11
2.3.3	反轉錄定量即時聚合酶連鎖反應(Reverse transcription- quantitative real time polymerase chain reaction , RT-qPCR) .....	11
2.3.4	萃取細胞蛋白質 .....	13
2.3.5	聚丙烯醯胺膠體電泳(Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis , SDS-PAGE)與西方墨點法(Western blot).....	14
2.3.6	MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試驗 .....	17
2.3.7	小鼠動物實驗 .....	17
<b>第三章</b>	<b>結果.....</b>	<b>18</b>
3.1	以次世代定序分析第二代樣本 .....	18
3.2	利用 RT-qPCR 測定針對 <i>TDO2</i> 基因之 shRNA 的抑制效果.....	19
3.2.1	以慢病毒感染人類肝細胞癌細胞株 Huh7，並測定 <i>TDO2</i> mRNA 的表現量 .....	19
3.2.2	以慢病毒感染小鼠肝癌細胞株 Hep55.1c，並測定 <i>Tdo2</i> mRNA 的表現量 .....	19
3.2.3	以慢病毒感染小鼠肝臟上皮細胞株 BNL1.MEA，並測定 <i>Tdo2</i> mRNA 的表現量 .....	19
3.2.4	shRNA 與 <i>TDO2</i> 基因序列分析.....	20
3.2.5	以西方墨點法偵測細胞色胺酸雙加氧酶(Tryptophan dioxygenase) 的表現量 .....	20
3.2.6	以 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)試驗測定細胞增生 .....	20
3.2.7	小鼠動物實驗 .....	21
<b>第四章</b>	<b>總結與討論 .....</b>	<b>23</b>
	參考文獻 .....	45
	附錄 .....	48



## 圖目錄

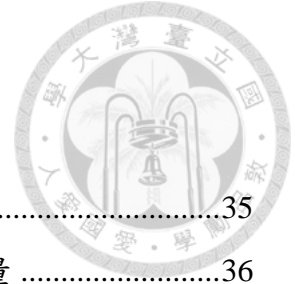


圖 一、以不同 shRNA 抑制 Huh7 細胞株 <i>TDO2</i> 基因的表現量 .....	35
圖 二、以不同 shRNA 抑制 Hep55.1c 細胞株 <i>Tdo2</i> 基因的表現量 .....	36
圖 三、以不同 shRNA 抑制 BNL1.MEA 細胞株 <i>Tdo2</i> 基因的表現量 .....	37
圖 四、Human <i>TDO2</i> targeted shRNA sequence 與人類 <i>TDO2</i> 基因序列比對結果 .	38
圖 五、Mouse <i>Tdo2</i> targeted shRNA sequence 與老鼠 <i>Tdo2</i> 基因序列比對結果.....	38
圖 六、以西方墨點法偵測細胞色胺酸雙加氧酶(tryptophan dioxygenase)的表現量	39
圖 七、以 MTT 試驗測定細胞增生 .....	40
圖 八、皮下注射至 C57BL/6 小鼠來觀察抑制 <i>Tdo2</i> 對腫瘤生成的影響 .....	41
圖 九、肝臟注射至 C57BL/6 小鼠來觀察抑制 <i>Tdo2</i> 對腫瘤生成的影響 .....	42
圖 十、皮下注射至 BALB/C 小鼠來觀察抑制 <i>Tdo2</i> 對腫瘤生成的影響 .....	43
圖 十一、肝臟注射至 BALB/C 小鼠來觀察抑制 <i>Tdo2</i> 對腫瘤生成的影響 .....	44

## 表目錄



表 一、人類 <i>TDO2</i> targeted shRNA 序列 .....	27
表 二、老鼠 <i>Tdo2</i> targeted shRNA 序列 .....	27
表 三、本研究所使用引子 .....	28
表 四、四種細胞株(Huh7、A549、HeLa、SCM1)共同沒有比對到的基因 .....	29
表 五、只有人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的基因 .....	33

# 第一章 緒論

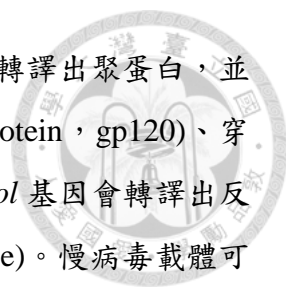


## 1.1 肝癌簡介

肝細胞癌為全球盛行癌症第五名[1]，但是在每個地區的發生率不太相同[2]，在亞洲、非洲每十萬人有十四到三十六人罹患肝細胞癌，而在歐洲、北美洲則分別是每十萬人約有五到十、二到五人罹患肝細胞癌[3]，男性平均的發生率是女性的二到四倍，此外在已開發國家肝細胞癌的好發年齡為六十到七十歲，而開發中國家則是三十到四十歲[4]。在台灣，肝癌在兩性十大癌症死亡率的排名為第二名，其中以肝細胞癌最常見，占原發性肝癌的百分之七十到八十五[5]。肝細胞癌的發生是多步驟、多因素協同作用的結果，造成肝細胞癌的原因有很多，包含 B 型肝炎、C 型肝炎、酒精性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、血鐵沉著症等等，這些原因會讓肝臟反覆發炎、壞死，再生能力下降，使得原本正常的肝細胞被發炎後產生的結締組織取代，導致肝臟纖維化，甚至形成硬化結節，造成肝硬化，最後導致肝細胞癌[6]。肝細胞癌的症狀包含了黃疸、右上腹痛、腹水、肝脾腫大、容易出血或瘀青、噁心、嘔吐、疲倦、發燒等等[7]。根據肝細胞癌的嚴重程度及病患本身的肝功能可以選用不同的治療方式[8]，包含外科手術切除腫瘤、肝臟移植、化療、放療、射頻灼燒法、經皮酒精注射法、經肝動脈栓塞治療、標靶藥物治療(例如蕾莎瓦，Nexavar (Sorafenib)、免疫療法等等，近年來也有使用基因治療的方式來抑制致癌基因或轉錄因子活化、活化抑癌基因來治療肝細胞癌[2, 9]。抑癌基因(例如: *p53*、*p21*、*p16*)失去活性、致癌基因或轉錄因子(例如: Ras、c-met、c-myc、NF- $\kappa$ B、phosphoinositol-3-kinase/Akt、Wnt/ $\beta$ -catenin、hedgehog)活化可能會造成肝細胞癌的形成[6, 10, 11]，但至今尚未找到特異的致癌基因活化或抑癌基因失去活性會直接導致肝細胞癌的形成[12]。

## 1.2 基因治療載體

常用的基因載體包含腺病毒載體、腺相關病毒載體、慢病毒載體[13]，慢病毒的基因含有 5'、3' long terminal repeat，*gag*、*pol*、*env*、跟 accessory protein 有關的基因，*gag* 基因會轉譯出聚蛋白(polyprotein)，並藉由蛋白酶將其切成基質蛋白



(matrix protein)、外殼(capsid)、核鞘(nucleocapsid)，*env* 基因會轉譯出聚蛋白，並藉由蛋白酶將其切成表面外套膜醣蛋白(surface envelope glycoprotein, gp120)、穿膜外套膜醣蛋白(transmembrane envelope glycoprotein, gp41)，*pol* 基因會轉譯出反轉錄酶(reverse transcriptase)、蛋白酶(protease)、整合酶(integrase)。慢病毒載體可攜帶轉基因(transgene, 長度可達 8 kb)，因為含有反轉錄酶，可將 RNA 反轉錄為 DNA，再藉由其整合酶將此 DNA 嵌入宿主細胞的 DNA，使宿主細胞持續地表現這段嵌入的 DNA[14, 15]。此外，慢病毒可以藉由 preintegration complex 將 dsDNA 從細胞質送到細胞核，所以可以嵌入分裂細胞和不分裂細胞[16]。將慢病毒的外套膜醣蛋白置換為口腔泡疹病毒(vesicular stomatitis virus)的外套膜 G 醣蛋白(envelope G glycoprotein)可改變慢病毒的趨性，讓慢病毒載體擁有廣大的趨性、很穩定，也可置換為狂犬病病毒(rabies virus)的醣蛋白，趨向神經系統，或置換為阿爾發病毒(alphaviruses)的醣蛋白，有抗原呈現細胞、神經細胞、肌肉細胞的趨性[17]。慢病毒載體包裹了送入質體(transfer plasmid)、包裹質體(packaging plasmid)、外套膜質體(envelope plasmid)，送入質體含有所有慢病毒繁殖及包裹所需的順式作用序列(cis-acting sequences)跟轉基因(transgene)，包裹、外套膜質體則含有所有慢病毒繁殖及包裹所需的反式作用序列(trans-acting sequences)[18]。近年來有些實驗室製作了無法進行整合的慢病毒載體(integration deficient lentiviral vector)，此慢病毒的整合酶為突變的整合酶，可以避免隨機整合(random integration)跟插入造成癌化(insertional oncogenesis)，或是使用同源重組(homologous recombination)來嵌入基因，降低插入造成癌化的可能性[19]。另外可以將順式作用序列、反式作用序列分別表現在不同的質體，減少質體之間的同源性(homology)可以降低同源重組發生，避免產生能夠進行複製的病毒(replicative-competent virus)[18]。將慢病毒的包裹、外套膜質體的 5'跟 3'LTR 剔除，送入質體的 3'LTR U3 region 跟 transcriptionally active sequences 剔除，還有將 accessory 基因剔除，可以讓慢病毒載體更加安全，變成自我失活載體(self-inactivating vector)，避免病毒在宿主內複製，讓基因治療更加安全[18, 20, 21]。慢病毒載體可以修改初代細胞(primary cell)的基因，更有效率地製造轉基因動物(transgenic animals)，不過也有可能導致插入造成癌化(insertional oncogenesis)，像是使用慢病毒載體成功治療了嚴重複合型免疫不全症(X-SCID)，但最後卻造成白血病(leukemia)[22]。

### 1.3 小髮夾核糖核酸(Small hairpin RNA, shRNA)的作用機制


我們可以設計一個小髮夾核糖核酸(small hairpin RNA, shRNA)片段，並藉由慢病毒載體將其送入細胞中，抑制基因的表現。當慢病毒感染宿主細胞時，其包裹的 shRNA 會被反轉錄為 cDNA，並藉由整合酶嵌入宿主的 DNA 中，當宿主細胞進行轉錄時，會將這段 cDNA 轉錄為 pre-shRNA，在藉由 Drosha (RNase III)將其轉變為 shRNA，shRNA 會經由 exportin 5 從細胞核到細胞質，接著 Dicer (RNase III) 會將 shRNA 的 loop (hairpin)結構切掉形成 20-25 個核苷酸的 siRNA，siRNA 會透過 Risc(RNA-induced silencing Complex)與 target mRNA 結合，藉由將 target mRNA 分解或抑制其轉譯來抑制其表現[23]。

### 1.4 Pooled RNAi library

雖然腫瘤有許多基因突變，但在這數些突變中只有某些是對於腫瘤的形成及維持有關，有許多研究利用 pooled RNAi library 做基因組的篩選，以尋找對於腫瘤生長的必要基因，並作為基因治療或檢測的指標[24, 25]，以 pooled RNAi library 做基因組的篩選時可以採用 positive selection 或是 negative selection，positive selection 為藉由 RNAi 保護細胞免於遭受到細胞毒性或抑制細胞生長的情況，適合用於篩選抑癌基因，較不適合用於篩選致癌基因，而 negative selection 則是利用 RNAi 抑制必要基因，會產生細胞毒性或是抑制細胞生長的情況，適合用於篩選致癌基因[26]。

### 1.5 色胺酸雙加氧酶(Tryptophan 2,3-dioxygenase)

色胺酸雙加氧酶(tryptophan 2,3-dioxygenase)是由人類的 *TDO2* 基因轉譯而成的[27]，為含有血基質的酵素(heme-containing enzyme)，通常只表現在哺乳類的肝臟，但某些哺乳類的腦也會表現，色胺酸雙加氧酶可以將 L-tryptophan 轉變為 N-formylkynurenine，此步驟在 kynurenine pathway 為第一及速率限制步驟，kynurenine pathway 負責處理人體內 90%的 L-tryptophan，且色胺酸雙加氧酶有高度的專一性，只會與 L-tryptophan、L-tryptophan 第五跟第六個位置被取代的衍生



物反應，色胺酸雙加氧酶對於調控人體內色胺酸(tryptophan)的濃度、kynurenine pathway、血清素等等來說是很重要的，色胺酸的濃度及其產生的代謝物，在生理上通常與身體的免疫反應、神經系統有關，此外也對疾病佔有重要的角色，像是白內障、癌症、神經退化性疾病、自體免疫疾病。某些病原菌對於色胺酸的濃度是很敏感的，所以當色胺酸被分解，病原菌會無法獲得養分，可以抑制病原菌生長[28]。色胺酸的代謝與免疫耐受(immune tolerance)有關，可以維持平衡(homeostasis)，避免自體免疫(autoimmunity)、免疫病理(immunopathology)的情形發生，當 T 細胞中的色胺酸濃度下降，會抑制 mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)，促使自噬作用(autophagy)，導致 T 細胞失能(nergy)，此外會活化 general control nondepressible-2 (GCN2)，限制或改變蛋白質轉譯，使 T 細胞的生長受到抑制，促進 de novo Treg 細胞分化和增加 Treg 細胞的活性；色胺酸的代謝物犬尿胺酸(kynurenine)會活化 aryl hydrocarbon receptor (AHR)，促使 Treg 細胞的形成，形成免疫抑制的微環境(immunosuppressive microenvironment)[29]。色胺酸雙加氧酶除了存在於肝、腦以外，也存在於許多腫瘤中，包含膽囊癌、乳癌、腎臟癌、大腸癌、頭頸癌、肝癌、黑色素瘤、間皮瘤、神經母細胞瘤、肉瘤、血癌等等[30]，腫瘤細胞中的色胺酸雙加氧酶會讓腫瘤微環境呈現低濃度的色胺酸、高濃度的犬尿胺酸的狀態，腫瘤細胞、抗原呈現細胞有 light chain glycoprotein-associated amino acid transporters，可以作為 TRP/KYN antiporters，此外抗原呈現細胞還有 high-affinity TRP transporters，會使色胺酸從 T 細胞中跑出，啟動上述在 T 細胞中的路徑，Treg 細胞及耐受性(tolerogenic)抗原呈現細胞藉由釋放免疫抑制細胞激素(immunosuppressive cytokines)、抑制性細胞表面蛋白(inhibitory cell surface proteins)，抑制對抗腫瘤的能力[31]。且在健康與癌症的情況下，TDO-reactive CD4<sup>+</sup> T 細胞會表現不同的功能，在健康的情況下，主要分泌 interferon- $\gamma$ 、tumor necrosis factor- $\alpha$ ，為 Th1 response，但在癌症的情況下不只會分泌這兩種物質還會分泌 interleukin-17、interleukin-10，為 regulatory T cell response[32]。已經有研究顯示，使用抑制劑像是基於吲哚(indole)或  $\beta$ -咔啉( $\beta$ -carboline)的衍生物，可以抑制色胺酸雙加氧酶，讓 T 細胞重新獲得對抗腫瘤的能力[33]。此外有研究顯示，抑制神經膠質瘤細胞(glioma cells)的 *TDO2*、*AHR* 基因，會抑制神經膠質瘤細胞的移動和生長能力，在裸鼠(nude mice)中，抑制 *TDO2* 基因的神經膠質瘤細胞形成的腫瘤比控制

組小，且將裸鼠中的 NK 細胞剔除，抑制 *TDO2* 基因的神經膠質瘤細胞形成的腫瘤依舊比控制組小，且有表現 *Tdo2* 的腫瘤，在 *Ahr*-proficient mice 比 *Ahr*-deficient mice 大，顯示 *TDO2* 可以透過 AHR 來促進腫瘤細胞的移動及生長[34]。但也有研究顯示，在免疫缺陷的小鼠，抑制 *Tdo2* 的細胞與控制組細胞形成的腫瘤大小沒有差異[27]。

## 1.6 研究動機

在台灣，不管是男性或女性的癌症死亡率，肝癌都是排在第二名，而且發現時通常都已經是癌症末期，無法早期發現早期治療，目前檢測肝癌的方法通常為電腦斷層、核磁共振、超音波、組織切片檢查等等，不易區分化生不良的結節與早期肝癌，而目前發現會造成肝癌的基因大多為常見的癌症基因(common tumor gene)，像是 *Ras*、*c-met*、*c-myc*、*Wnt/β-catenin*、*PIK3CA* 等等，不具特異性，所以想要藉由 human pooled shRNA lentiviruses library 以 negative selection 的方式去尋找肝細胞癌生長的特異基因，以作為治療或是基因檢測的目標。另外有研究發現使用抑制劑抑制色胺酸雙加氧酶(tryptophan 2,3-dioxygenase)，可以讓 T 細胞重新獲得對抗腫瘤的能力，所以我們想要進行動物實驗來探討是否可以藉由 shRNA 抑制 *Tdo2* 基因來抑制肝腫瘤的生長。

## 第二章 材料與方法



### 2.1 材料

#### 2.1.1 細胞株

使用人類肝細胞癌細胞株 Huh7 (human hepatocellular carcinoma cell)、人類肺腺癌細胞株 A549 (human lung adenocarcinoma cell)、人類子宮頸癌細胞株 HeLa (human cervix adenocarcinoma cell)、人類胃癌細胞株 SCM1 (human gastric carcinoma)、小鼠肝癌細胞株 Hep55.1c (mouse hepatocellular carcinoma)、小鼠肝臟上皮細胞株 BNL1.MEA (mouse liver epithelial cell)來進行實驗。此六種細胞株皆培養於添加 10% 去活化胎牛血清的 DMEM 培養液中，並在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

#### 2.1.2 藥品

試劑	用途	來源
Polybrene	幫助慢病毒感染細胞	Sigma-Aldrich
Puromycin	篩選出被慢病毒感染的細胞	Gibco
MTT	細胞增生實驗	Sigma-Aldrich

#### 2.1.3 Pool RNAi library 及 *TDO2* targeted shRNA

購買自中研院 RNAi core，使用慢病毒包裹 shRNA，含有三個質體，分別為包裹質體(packaging plasmid, pCMVdeltaR8.91)、外套膜質體(envelope plasmid, pMD.G)及送入質體(transfer plasmid, pLKO.1-puro TRC001、pLKO TRC005)，送入質體的骨架含有 shRNA，人類、老鼠 *TDO2* targeted shRNA 序列分別列於表一、表二。

#### 2.1.4 引子(Primers)

本研究所使用引子列於表三。



## 2.2 利用 pooled shRNA library 尋找肝癌生長的特異基因

將包裹著 shRNA 的慢病毒感染細胞，其反轉錄酶會將 shRNA 反轉錄為 cDNA，並藉由整合酶嵌入宿主的 DNA 中，因為慢病毒的骨架含有 puromycin resistance gene，所以可以使用 puromycin 來篩選出有成功被慢病毒感染的細胞。抑制對於細胞生長來說是必要的基因，會使細胞死亡，藉由抽取細胞基因體 DNA，並以聚合酶連鎖反應放大嵌在細胞基因體中的 shRNA 序列，再藉由次世代定序分析 shRNA 序列，便可得知哪些基因是細胞生長的必要基因。以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 感染 Huh7、A549、HeLa、SCM1 細胞株，此四種細胞株共同沒有比對到的基因可能為癌症細胞生長的必要基因，而只有人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的基因則可能為肝癌細胞生長的特異基因。

### 2.2.1 以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 感染細胞作法:

- (1) 接種  $8.3 \times 10^6$  個人類肝細胞癌細胞株 Huh7、人類肺腺癌細胞株 A549、人類子宮頸癌細胞株 HeLa、人類胃癌細胞株 SCM1 至 15 公分細胞培養皿中，於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養隔夜
- (2) 將慢病毒與細胞以  $\text{MOI} = 0.3$  於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養 24 小時
- (3) 吸掉培養液，並換成含有 puromycin 的培養液(Huh7 細胞株使用的 puromycin 濃度為 2.5 ppm，A549 細胞株為 0.75 ppm，HeLa 細胞株為 2 ppm，SCM1 細胞株為 2 ppm)
- (4) 每 2 天換一次培養液
- (5) 當細胞長約 8 成滿時，將 1/2 的細胞存成凍管，另外 1/2 的細胞則是繼續培養
- (6) 將細胞收至第二代

### 2.2.2 抽取細胞基因體 DNA(Genomic DNA)

試藥: QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen)

作法:

離心需使用 swing angle rotor

- (1) 將收好的第二代細胞以 1000g 離心 10 分鐘，吸除上清液並以 5 mL PBS 回溶



- (2) 加入 500  $\mu$ L protease，混合均勻
- (3) 加入 6 mL Buffer AL，上下翻轉 15 次並震盪 1 分鐘，使混和均勻
- (4) 於 70°C 水浴槽作用 2 小時
- (5) 加入 5 mL 100%酒精，上下翻轉 10 次並震盪 1 分鐘，使混和均勻
- (6) 將 QIAamp Maxi Cloumn 置於 50mL 離心管內，取步驟(5)之液體至 QIAamp Maxi Cloumn，並以 3000 rpm 離心 3 分鐘
- (7) 去除過濾液，加入 5 mL Buffer AW1，並以 5000 rpm 離心 1 分鐘
- (8) 去除過濾液，加入 5 mL Buffer AW2，並以 5000 rpm 離心 15 分鐘
- (9) 去除過濾液，將 QIAamp Maxi Cloumn 置於新的 50mL 離心管內，加入 600  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 於室溫中作用 5 分鐘，並以 5000 rpm 離心 2 分鐘
- (10) 取過濾液至 QIAamp Maxi Cloumn 於室溫中作用 5 分鐘，並以 5000 rpm 離心 5 分鐘
- (11) 以 OD<sub>260/280</sub> 吸光值估計 DNA 濃度與純度

### 2.2.3 以聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction)放大 shRNA 序列

作法:

Genomic DNA (250 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
5X KAPA HiFi Fidelity Buffer	10 $\mu$ L
2 mM dNTP Mix	5 $\mu$ L
Forward primers (20 $\mu$ M, TRC1& TRC2 Mix)	2.5 $\mu$ L
Reverse primer (20 $\mu$ M, LKO1&5)	2.5 $\mu$ L
KAPA HiFi DNA polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>28 <math>\mu</math>L</u>
Total volume	50 $\mu$ L

反應條件:

1. 98°C，3 分鐘
2. 98°C，30 秒
3. 69°C，30 秒
4. 72°C，20 秒
5. 重複步驟 2、3、4，28 個循環
6. 72°C，5 分鐘
7. 25°C，10 分鐘

利用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)回收 PCR product，並以 OD<sub>260/280</sub> 吸光值估計 DNA 濃度與純度。



#### 2.2.4 以限制酶切除 shRNA loop 結構 (Restriction enzyme digestion)

作法:

PCR product	32 $\mu$ L
10X CutSmart buffer	5 $\mu$ L
<i>XhoI</i> (20 U/ $\mu$ L, NEB)	1 $\mu$ L
<i>AscI</i> (10 U/ $\mu$ L, NEB)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	11 $\mu$ L
<hr/>	
Total volume	50 $\mu$ L

反應條件:

1. 37°C，3 小時
2. 65°C，20 分鐘

跑膠並利用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)回收限制酶作用後的產物，並以 OD<sub>260/280</sub> 吸光值估計 DNA 濃度與純度。

#### 2.2.5 Klenow

作法:

DNA	32 $\mu$ L
10X NEB buffer NO.2	5 $\mu$ L
2.5 mM dNTP Mix	0.7 $\mu$ L
Klenow (5 U/ $\mu$ L, NEB)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	11.3 $\mu$ L
<hr/>	
Total volume	50 $\mu$ L

反應條件:

1. 25°C，30 分鐘

利用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)回收 Klenow 作用後的產物，以 OD<sub>260/280</sub> 吸光值估計 DNA 濃度與純度，並將 DNA 以次世代定序分析。



## 2.2.6 次世代定序(Next Generation Sequencing)

分析的樣本是一段長度大概為 300 個鹼基對的序列，此序列含有送入質體的骨架和 shRNA 序列，shRNA 序列的 sense 跟 loop 結構有幾個固定的序列，分別為 CCGG、CTCGA，所以委託基龍米克斯將 CCGG、CTCGA 中間的序列與中研院 RNAi core 的資料庫做序列上的比對，Huh7、A549、HeLa、SCM1 細胞株共同沒有比對到的基因可能為癌症細胞生長的必要基因，而只有 Huh7 細胞株沒有比對到的基因則可能為肝癌細胞生長的特異基因。

## 2.3 以 shRNA 抑制 *TDO2* 基因

利用包裹著 *TDO2* targeted shRNA 的慢病毒感染細胞，因為慢病毒的骨架含有 puromycin resistance gene，所以可以使用 puromycin 來篩選出有成功被慢病毒感染的細胞。抽取細胞 total RNA，以 RT-qPCR 偵測細胞 *TDO2* mRNA 的表現量，看哪一個 clone 會使 *TDO2* mRNA 的表現量最低，並以西方墨點法偵測細胞色胺酸雙加氧酶 (tryptophan dioxygenase) 的表現量，利用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試驗來觀察抑制 *TDO2* 基因的細胞生長速度是否會比較慢，最後再將 *TDO2* mRNA 表現量最低的細胞以及被 scramble shRNA 慢病毒感染後的細胞以皮下、肝臟注射至小鼠體內，觀察腫瘤的生成。

### 2.3.1 以包裹著 *TDO2* targeted shRNA 的慢病毒感染細胞

- (1) 接種  $2 \times 10^6$  個人類肝細胞癌細胞株 Huh7、小鼠肝癌細胞株 Hep55.1c、小鼠肝臟上皮細胞株 BNL1.MEA 至 6 公分細胞培養皿中，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養隔夜
- (2) 將培養液換成含有 8 μg/mL polybrene 的培養液，並加入 100 μL 慢病毒於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 24 小時
- (3) 吸掉培養液，並換成含有 puromycin 的培養液(Huh7 細胞株使用的 puromycin 濃度為 2.5 ppm，Hep55.1c 細胞株為 2 ppm，BNL1.MEA 細胞株為 4 ppm)
- (4) 當細胞長約 8 成滿時，以 3 mL PBS 洗滌 6 公分細胞培養皿一次，再加入 2 mL Trypsin 將細胞打下來並接種至 T-75 flask

(5) 當細胞長約 8 成滿時，將 1/4 的細胞繼續培養，另外 3/4 的細胞則是將其抽取 total RNA



### 2.3.2 抽取細胞 total RNA

在實驗過程中為了避免 RNase 分解 RNA，需全程戴手套、口罩，且在實驗前以 RNase out 擦拭實驗桌及器具。此外，實驗中使用的 1.5mL 離心管及微量吸管皆以 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) ddH<sub>2</sub>O 浸泡作用隔夜，並以高溫滅菌處理。

試藥: Quick-RNA MiniPrep (ZymoResearch)

作法:

- (1) 將細胞以 1000g 離心 10 分鐘，吸除上清液
- (2) 以 600  $\mu$ L RNA lysis buffer 打散細胞，並以 10000 rpm 離心 1 分鐘
- (3) 吸上清液至 Spin Away Filter，並以 10000 rpm 離心 1 分鐘
- (4) 將過濾液加入 1X 體積的 100% 酒精，混和均勻
- (5) 將步驟(4)之液體吸至 Zymo Spin CG Column，並以 10000 rpm 離心 30 秒
- (6) 去除過濾液，加入 400  $\mu$ L RNA Wash Buffer，並以 10000 rpm 離心 30 秒
- (7) 製備 DNase I reaction mix，依序加入 5  $\mu$ L DNase I、75  $\mu$ L DNA digestion buffer
- (8) 去除過濾液，加入 80  $\mu$ L DNase I reaction mix 於室溫下作用 15 分鐘，並以 10000 rpm 離心 30 秒
- (9) 加入 400  $\mu$ L RNA Prep Buffer，並以 10000 rpm 離心 30 秒
- (10) 去除過濾液，加入 700  $\mu$ L RNA Wash Buffer，並以 10000 rpm 離心 30 秒
- (11) 去除過濾液，加入 400  $\mu$ L RNA Wash Buffer，並以 10000 rpm 離心 2 分鐘
- (12) 將 Zymo Spin CG Column 置於 1.5 mL 離心管內(RNase free)，加入 30  $\mu$ L Nuclease free H<sub>2</sub>O，以 13000 rpm 離心 2 分鐘
- (13) 以 OD<sub>260/280</sub> 吸光值估計 RNA 濃度與純度

### 2.3.3 反轉錄定量即時聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription-quantitative real time polymerase chain reaction , RT-qPCR)

qPCR 的原理為在 PCR 複製樣本 DNA 的同時，以光學系統即時偵測產物隨

PCR 循環數增加的螢光數值，藉由分析 PCR 循環數和螢光數值來推算樣本中起始基因的表現量。本實驗使用 Pro TECH Smart Quant Green Master Mix，利用 SYBR Green 螢光嵌入雙股 DNA 來標定產物，並以 ABI-7900 Real-time PCR 機器分析，在某一循環中螢光訊號的強度達到閾值，此時的 PCR 循環數稱為 Ct (Threshold Cycle)值，Ct 值與樣本中起始基因的表現量呈負相關，起始基因的表現量越多，達到閾值的循環數越少，也就是 Ct 值越小。本實驗以 *GAPDH* 的 Ct 值進行標準化 (normalization)，且於 qPCR 反應中搭配 melting curve 的分析，以確認是否有非專一性的 PCR 產物或是 primer dimer 形成。

作法:

(1) 加入下列反應物以合成 cDNA:

試藥: ABI High Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit

Total RNA (200 ng/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
10X RT buffer	2 $\mu$ L
10X random primer	2 $\mu$ L
25X dNTP Mix (100 nM)	0.8 $\mu$ L
RNaseOut <sup>TM</sup> Ribonuclease(40 U/ $\mu$ L, Invitrogen)	1 $\mu$ L
Multiscribe reverse transcriptase	1 $\mu$ L
Nuclease free H <sub>2</sub> O	11.2 $\mu$ L
Total volume	20 $\mu$ L

反應條件:

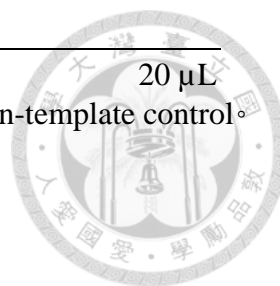
1. 25°C，10 分鐘
2. 37°C，120 分鐘
3. 85°C，5 分鐘

可將反轉錄後的 cDNA 保存於-20°C 冰箱。

(2) 加入下列反應物進行 qPCR:

試藥: Pro TECH Smart Quant Green Master Mix

cDNA	2 $\mu$ L
Smart Quant Green Master Mix	10 $\mu$ L
5 $\mu$ M Forward primer	1 $\mu$ L
5 $\mu$ M Reverse primer	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ L



Total volume

20  $\mu$ L

本實驗置於 96 孔盤中進行偵測，每個樣本會進行二重複，且帶 non-template control。

反應條件:

1. 50°C，2 分鐘
2. 95°C，10 分鐘
3. 95°C，15 秒、60°C，1 分鐘
4. 重複步驟 3，40 個循環
5. 新增 dissociation curve: 95°C，15 秒、60°C，15 秒、95°C，15 秒

以 ABI-7900 Real-time PCR 機器的使用說明操作並分析結果。以 *GAPDH* 基因的 Ct 值將同一樣本所測 *TDO2* 基因的 Ct 值標準化(normalization)，獲得  $\Delta$ Ct，再將被 *TDO2* targeted shRNA 慢病毒感染後的細胞與被 scramble shRNA 慢病毒感染後的細胞所得的  $\Delta$ Ct 相比較，計算  $\Delta\Delta$ Ct 以及 RNA 相對表現量。

### 2.3.4 萃取細胞蛋白質

試藥:

Protein lysis buffer

1M Tris (pH7.4)	0.5 mL
0.4 M EDTA (pH8.0)	0.625 mL
5M NaCl	0.5 mL
Triton X-100	0.5 mL
Protease inhibitor cocktail (Roche)	1 mL
ddH <sub>2</sub> O	21.875 mL
Total volume	25 mL

作法:

- (1) 吸除培養液，以 PBS 洗滌一次，再加入 Trypsin 將細胞打下來
- (2) 將細胞以 1000g 離心 10 分鐘，吸除上清液
- (3) 加入 100  $\mu$ L protein lysis buffer 混合均勻，置於冰上 30 分鐘
- (4) 以 4°C、12000rpm 離心 30 分鐘
- (5) 將上清液移至新的 1.5 mL 離心管，並置於 4°C 以備用

### 2.3.5 聚丙烯醯胺膠體電泳(Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)與西方墨點法(Western blot)

SDS-PAGE 的原理為利用分子量大小來分離蛋白質，因為 SDS 是界面活性劑，會在蛋白質外圍包裹上負電荷，使蛋白質變性，因此在 SDS-PAGE 系統中，蛋白質分子的泳動率就不受其原本所帶的電荷影響，僅取決於分子量，所以可用於測定樣本中變性蛋白質(denatured proteins)的分子量，並可藉由蛋白質染色法來粗估目標蛋白質的含量，或以西方墨點法更精確估量。西方墨點法的原理為利用一級抗體專一性地與目標蛋白質結合，再藉由酵素或同位素標記的二級抗體顯色或顯影來放大訊號，此方法敏感度高，能偵測微量的蛋白質。

試藥:

#### (1) SDS page gel (2 片的量)

##### Stacking gel (5% acrylamide)

ddH <sub>2</sub> O	2.633 mL
30% acrylamide	0.977 mL
0.5M Tris (pH6.8)	2.25 mL
10% SDS	0.06 mL
10% APS	0.06 mL
TEMED	0.006 mL
Total volume	6 mL

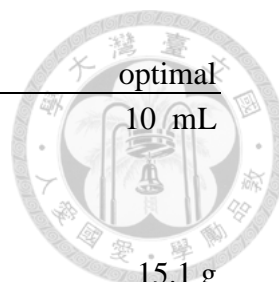
##### Separation gel (12% acrylamide)

ddH <sub>2</sub> O	4.9 mL
30% acrylamide	6 mL
1.5M Tris (pH8.8)	3.8 mL
10% SDS	0.15 mL
10% APS	0.15 mL
TEMED	0.006 mL
Total volume	15 mL

#### (2) Sample Dye (2X)

1M Tris-HCl (pH 6.8)	1 mL
100% Glycerol	2 mL
20% SDS	2 mL
DTT	2 mL
ddH <sub>2</sub> O	3 mL





Bromophenol blue

Total volume

optimal  
10 mL

(3) 5X Tris-glycine running buffer (pH 8.3)

Tris	15.1 g
Glycine	94.0 g
20% SDS	25 mL
ddH <sub>2</sub> O	
Total volume	1 L

(4) Western transfer buffer (pH 8.3)

Tris	5.8 g
Glycine	2.9 g
20% SDS	1.85 mL
Methanol	200 mL
ddH <sub>2</sub> O	
Total volume	1 L

(5) Blocking Buffer

1X PBS + 0.1% Tween20 + 5% 脫脂奶粉

(6) Washing Buffer

1X PBS + 0.1% Tween20

(7) Antibodies (diluted in blocking buffer)

抗體	稀釋倍率	用途	來源
Rabbit anti-TDO2	1: 1000	Primary antibody	Proteintech
Mouse anti-GAPDH	1: 8000	Primary antibody	EMD Millipore
HRP-tagged goat anti-rabbit IgG	1: 10000	Secondary antibody	Jackson ImmunoResearch
HRP-tagged anti-mouse IgG	1: 10000	Secondary antibody	Jackson ImmunoResearch

(8) Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (HRP substrate luminol)

reagent、HRP substrate peroxide solution) (EMD Millipore)



作法:

- (1) 將萃取的細胞蛋白質加入等體積的2X sample dye，置於乾浴槽(dry bath)上以100°C加熱10分鐘
- (2) 架設好Hoefer dual gel caster (General Electric Healthcare Life Science, U.S.A)，並製作SDS page膠體，先注入Separation gel，再注入Stacking gel
- (3) 待凝膠後，置於垂直電泳槽(SE250 Mighty Small II, Amersham Biosciences)中，加入1X running buffer與蛋白質樣品，在250V，50mA(25mA/gel)的條件下進行電泳約兩小時
- (4) 將filter paper和 Amersham Protran 0.45 $\mu$ m Nitrocellulose(NC) membrane (General Electric Healthcare Life Science, U.S.A.)依SDS page膠體的大小做適當剪裁後，浸於western transfer buffer中
- (5) 將filter paper、NC membrane、SDS page膠體、filter paper (正極→負極)依序堆疊於半乾式轉漬槽(HANDO)中，以12mV，13分鐘的條件，將膠體上的蛋白質轉印到NC membrane上
- (6) 將NC membrane放入含有blocking buffer的塑膠盒裡，於室溫下慢搖一小時
- (7) 移除blocking buffer後，將NC membrane放入含有一級抗體的blocking buffer裡，於4°C下慢搖雜交整夜
- (8) 移除含有一級抗體的blocking buffer後，以washing buffer洗NC membrane三次，每次15分鐘
- (9) 移除washing buffer後，將NC membrane放入含有二級抗體的blocking buffer裡，於室溫下慢搖一小時
- (10) 移除含有二級抗體的blocking buffer後，以washing buffer洗NC membrane三次，每次15分鐘
- (11) 將NC membrane浸入1:1混合均勻的HRP substrate luminol reagent、HRP substrate peroxide solution呈色試劑中，避光呈色1分鐘
- (12) 在暗房壓片成像

### 2.3.6 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試驗

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)試驗是一種測定細胞存活率或增生的方法，細胞粒線體內膜中的琥珀酸脫氫酶(succinate dehydrogenase)和細胞色素 C(cytochrome C)會將黃色化合物 MTT 結構中的四唑(tetrazolium)環切斷，生成藍紫色的 formazan 結晶，可以利用二甲基亞砜(DMSO)或異丙醇(isopropanol)將 formazan 結晶溶解，再利用測定吸光值得知 formazan 結晶的生成量(細胞還原 MTT 的能力)，此吸光值代表粒線體的活性，即活細胞的數目，故 MTT 試驗可用來測定細胞存活率或細胞增生。因為 MTT 試劑需要避光，操作實驗時需關閉操作台上的日光燈。

作法:

- (1) 接種  $5 \times 10^3$  個細胞至 24 孔細胞培養盤，於  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養
- (2) 在第一、三、五天時，將 50  $\mu\text{L}$  MTT reagent(5 mg/ml)加入培養液(500  $\mu\text{L}$ )中，與細胞反應一小時
- (3) 將培養液移除，再加入 200  $\mu\text{L}$  isopropanol，在 shaker 上搖晃五分鐘，確定紫色結晶完全溶解
- (4) 測量  $\text{OD}_{570}$  吸光值

### 2.3.7 小鼠動物實驗

- (1) 將細胞培養在 10 公分細胞培養皿，並培養至 7~8 成滿
- (2) 以 5 mL PBS 洗滌一次，再加入 3 mL Trypsin 將細胞打下來，並放入 50 mL 離心管中，以 1000 rpm 離心 10 分鐘
- (3) 將上清液吸掉，用 30 mL PBS 將細胞打散，並以 1000 rpm 離心 10 分鐘
- (4) 重複步驟(3)三次
- (5) 以 Hemocytometer 計數細胞數
- (6) 將  $2 \times 10^6$  或  $1 \times 10^6$  個細胞以 18  $\mu\text{L}$  PBS 及 2  $\mu\text{L}$  Matrigel 回溶，並以肝臟注射至 BALB/C 或 C57BL/6 小鼠體內；將  $2 \times 10^6$  個或  $1 \times 10^6$  個細胞以 198  $\mu\text{L}$  PBS 及 2  $\mu\text{L}$  Matrigel 回溶，並以皮下注射至 BALB/C 或 C57BL/6 小鼠體內

## 第三章 結果



### 3.1 以次世代定序分析第二代樣本

以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 1 感染人類肝細胞癌細胞株 Huh7，收集第一代至第十代樣本，委託基龍米克斯以次世代定序分析第一、二、五、八、九、十代樣本，分析的樣本是一段長度大概為 300 個鹼基對的序列，此序列含有送入質體的骨架和 shRNA 序列，shRNA 序列的 sense 跟 loop 結構有幾個固定的序列，分別為 CCGG、CTCGA，所以委託基龍米克斯將 CCGG、CTCGA 中間的序列與中研院 RNAi core 的資料庫做序列上的比對，在 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 1 中有 9984 個 shRNA，第一、二、五、八、九、十代，沒有比對到的 shRNA 序列分別為 3985、5039、3630、3351、3903、4379，顯示這六個時間點沒有比對到的 shRNA 序列數目差不多，而共同沒有比對到的 shRNA 序列有 2114 個，涵蓋 1250 個基因。以慢病毒感染 Huh7 細胞株並以 puromycin 篩選後，沒有比對到的 shRNA 序列比例在不同代數間相差不大，所以之後以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 進行實驗時，便以第二代作為分析的時間點。

以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 感染人類肝細胞癌細胞株 Huh7、人類肺腺癌細胞株 A549、人類子宮頸癌細胞株 HeLa、人類胃癌細胞株 SCM1，實驗方法是採用 Huh7 細胞株與另外三種癌症細胞株(A549、HeLa、SCM1) 來做比較，共同沒有比對到的基因可能為癌症細胞生長的必要基因，而只有 Huh7 細胞株沒有比對到的基因則可能為肝癌細胞生長的特異基因。收集第一代及第二代樣本，委託基龍米克斯以次世代定序分析第二代樣本，在 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 中有 9984 個 shRNA，Huh7 細胞株與另外三種癌症細胞株(A549、HeLa、SCM1)共同沒有比對到的 shRNA 序列有 423 個，涵蓋 307 個基因，如表 四所示，僅列出比對到兩次以上的基因名稱，其餘列於附錄，而只有 Huh7 細胞株沒有比對到的 shRNA 序列則有 334 個，涵蓋 303 個基因，如表 五所示，僅列出比對到兩次以上的基因名稱，其餘列於附錄。



## 3.2 利用 RT-qPCR 測定針對 *TDO2* 基因之 shRNA 的抑制效果

### 3.2.1 以慢病毒感染人類肝細胞癌細胞株 Huh7，並測定 *TDO2* mRNA 的表現量

以包裹著 clone ID 874、382、054、265 之 human *TDO2* targeted shRNA 的慢病毒感染 Huh7 細胞株，再以 RT-qPCR 測定 Huh7 細胞株 *TDO2* mRNA 的表現量，實驗結果圖 一所示，橫軸為 shRNA clone ID，縱軸為 *TDO2* mRNA 的相對表現量，以 scramble (randomly rearranging shRNA nucleotide sequence) 當作 1，clone ID 874 大約為 0.16，抑制 Huh7 細胞株 *TDO2* mRNA 表現的效果最好，並且與 scramble 組別比較具有顯著差異。

### 3.2.2 以慢病毒感染小鼠肝癌細胞株 Hep55.1c，並測定 *Tdo2* mRNA 的表現量

以包裹著 clone ID 33、34、35、36、37 之 mouse *Tdo2* targeted shRNA 的慢病毒感染 Hep55.1c 細胞株，再以 RT-qPCR 測定 Hep55.1c 細胞株 *Tdo2* mRNA 的表現量，實驗結果如圖 二所示，橫軸為 shRNA clone ID，縱軸為 *Tdo2* mRNA 的相對表現量，以 scramble 當作 1，clone ID 33 大約為 0.5，抑制 Hep55.1c 細胞株 *Tdo2* mRNA 表現的效果最好，但與 scramble 組別比較並沒有顯著差異。

### 3.2.3 以慢病毒感染小鼠肝臟上皮細胞株 BNL1.MEA，並測定 *Tdo2* mRNA 的表現量

以包裹著 clone ID 33、34、35、36、37 之 mouse *Tdo2* targeted shRNA 的慢病毒感染 BNL1.MEA 細胞株，再以 RT-qPCR 測定 BNL1.MEA 細胞株 *Tdo2* mRNA 的表現量，實驗結果如圖 三所示，橫軸為 shRNA clone ID，縱軸為 *Tdo2* mRNA 的相對表現量，以 scramble 當作 1，clone ID 33 大約為 0.5，抑制 BNL1.MEA 細胞株 *Tdo2* mRNA 表現的效果最好，但與 scramble 組別比較並沒有顯著差異。



### 3.2.4 shRNA 與 *TDO2* 基因序列分析

將 *TDO2* targeted shRNA sequence 與 *TDO2* 基因以 Vector NTI 進行序列上的比對，結果如圖 四、

圖 五所示，對照實驗結果，並不是越鄰近人類 *TDO2* 基因上游的編碼序列 (coding DNA sequence) 設計的 shRNA，抑制效果越好，無法直接從序列上得知哪一個 shRNA 的抑制效果最好。以老鼠 *Tdo2* 基因的 3' UTR 設計的 shRNA，抑制效果最好。

### 3.2.5 以西方墨點法偵測細胞色胺酸雙加氧酶(Tryptophan dioxygenase) 的表現量

將相同量的細胞蛋白質萃取物，以辨認色胺酸雙加氧酶的多株抗體來偵測蛋白質的表現量，結果如圖 六所示，以 Huh7 細胞株作為陽性對照組，HeLa 細胞株作為陰性對照組，色胺酸雙加氧酶大約為 48 kDa，因為陽性控制組 Huh7 細胞株沒有在 43-55 kDa 之間偵測到明顯的 band，無法確定在被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株以及未被感染的 Hep55.1c 細胞株偵測到的 band 就是色胺酸雙加氧酶蛋白質。

### 3.2.6 以 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試驗測定細胞增生

將被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株以及未被感染的 Hep55.1c 細胞株培養  $5 \times 10^3$  個細胞在 24 孔細胞培養盤，細胞粒線體內膜中的琥珀酸脫氫酶(succinate dehydrogenase) 和細胞色素 C(cytochrome C) 會將黃色的 MTT 還原為藍紫色的 formazan 結晶，以異丙醇(isopropanol) 將 formazan 結晶溶解，再利用測定吸光值得知 formazan 結晶的生成量，此吸光值正比於活細胞的數目。在第一、第三、第五天測定 OD<sub>570</sub> 吸光值，結果如圖 七所示，橫軸為天數，縱軸為 OD<sub>570</sub> 吸光值，在第一、第三天時，未被感染的 Hep55.1c 細胞株、被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株與被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株的 OD<sub>570</sub> 吸光值差不多，沒有顯著差異，而在第五天時，未被感染的 Hep55.1c 細胞株的 OD<sub>570</sub> 吸光值



比被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株高，而且具有顯著差異，表示未被感染的 Hep55.1c 細胞株細胞數較多，細胞增生速度較快。

### 3.2.7 小鼠動物實驗

將被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 或 BNL1.MEA 細胞株(*Tdo2* mRNA 表現量最低)以及被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 或 BNL1.MEA 細胞株分別以皮下注射或肝臟注射打入兩種小鼠(C57BL/6 或 BALB/C)，並觀察腫瘤的生成。

C57BL/6 小鼠皮下注射實驗結果如圖 八所示，橫軸為天數，縱軸為腫瘤大小，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤小，且在第十五天時具有顯著差異，但在第二十二、三十天時，被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤，五隻小鼠中有四隻小鼠縮小，而被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤，五隻小鼠中有三隻小鼠縮小，結果就沒有顯著差異。C57BL/6 小鼠肝臟注射實驗結果如圖 九所示，橫軸為天數，縱軸為腫瘤大小，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤小，但因為每隻小鼠間差異大，所以沒有顯著差異。

BALB/C 小鼠皮下注射實驗結果如圖 十所示，橫軸為天數，縱軸為腫瘤大小，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤小，但因為小鼠隻數只有兩隻，所以沒有顯著差異，且在第十五天之後，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤開始縮小，在第二十天之後，被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤也開始縮小。BALB/C 小鼠肝臟注射實驗結果如圖 十一所示，橫軸為天數，縱軸為腫瘤大小，在第十、十五、二十天時，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤大小與被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤大小差不多，但在第二十五、三十天時，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株

形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤大，但沒有顯著差異，另外被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤，五隻小鼠中有三隻小鼠縮小，而被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤，五隻小鼠中有一隻小鼠縮小。



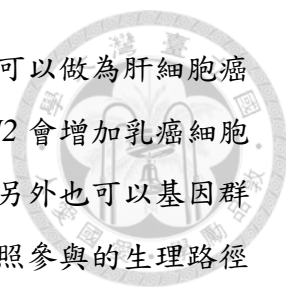


## 第四章 總結與討論




以 110K human pooled shRNA lentiviruses library 尋找肝癌細胞生長的特異基因，採用 negative selection 的方法，需要非癌症細胞當作對照組，原本選用人類肝臟上皮細胞株(THLE-3)，但是因為 THLE-3 細胞株的生長速度很慢，而且培養幾天後會有一些細胞死亡，不容易操作，改以人類肺臟上皮細胞株(BEAS-2B)來進行實驗，不過因為以慢病毒感染細胞並以 puromycin 篩選後，細胞剩餘的數目很少，且隨著培養的時間增加，剩餘的細胞也逐漸死亡，推測可能是因為非癌症細胞不容易被慢病毒感染所導致。所以之後選用人類肝細胞癌細胞株 Huh7 與另外三種癌症細胞株(人類肺腺癌細胞株 A549、人類子宮頸癌細胞株 HeLa、人類胃癌細胞株 SCM1)來進行實驗，Huh7、A549、HeLa、SCM1 細胞株共同沒有比對到的基因可能為癌症細胞生長的必要基因，而只有 Huh7 細胞株沒有比對到的基因則可能為肝癌細胞生長的特異基因。在先前使用 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 1 進行實驗發現，以次世代定序分析 Huh7 細胞株的第一、二、五、八、九、十代，顯示以慢病毒感染 Huh7 細胞株並以 puromycin 篩選後，沒有比對到的 shRNA 序列比例在不同代數間相差不大，所以之後以 110K human pooled shRNA lentiviruses library pool 2 進行實驗時，便以第二代作為分析的時間點。

在只有人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的基因中，已有研究顯示，抑制 *RPS24*[35]、*CDC45*[36]、*CNPY2*[37]、*DIAPH1*[38]、*GNL3*[39]、*PHB2*[40]、*TMEM97*[41]，會使癌症細胞的生長、移動、侵襲能力降低，促進癌症細胞凋亡，而過度表現 *WARS*[42]、*CD38*[43]、*NSA2*[44]，會使癌症細胞的生長、移動、侵襲能力增加。將 *UTP15*[45]、*COPS2*[46]突變會分別造成斑馬魚、小鼠在胚胎時期死亡。*BCAS2* 為抑癌基因 *p53* 的負調節子(negative regulator)[47]。其中 *GNL3* 已有研究顯示與肝細胞癌有關，*GNL3* 是 guanine nucleotide binding protein-like 3，肝細胞癌會表現較高的 *GNL3*，*GNL3* 會促進 p27 泛素化作用(ubiquitylation)、去活化。而 p27 是 cyclin dependent kinase inhibitor，負責調控細胞週期。抑制 *GNL3* 會使 p27 與 CDK2- Cyclin E complex 結合，CDK2 被抑制，導致細胞週期停止，抑制肝細胞癌生長[39]。也有研究指出，*GNL3* 會增強 MDM2 促進 p53 泛素化作用(MDM2-mediated p53 ubiquitination)，使 p53 分解，且過度表現 *GNL3* 時，會使肝



細胞癌細胞對於蕾沙瓦(Sorafenib)的抗性增加，認為 *GNL3* 可能可以做為肝細胞癌預後的指標[48]。另外有與我們結果不一致的研究，抑制 *PAFAH2* 會增加乳癌細胞轉移至肺的能力[49]，過度表現 *EIF3F* 會使癌症細胞凋亡[50]。另外也可以基因群 (gene cluster) 來分析沒有比對到的基因，將沒有比對到的基因依照參與的生理路徑來做分類。未來可以針對人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的基因，個別進行基因抑制(knockdown)或基因剔除(knockout)來觀察對腫瘤生成能力的影響。

先前的研究顯示，抑制神經膠質瘤細胞(glioma cells)的 *TDO2*、*AHR* 基因，會抑制神經膠質瘤細胞的移動和生長能力。在裸鼠(nude mice)，抑制 *TDO2* 基因的神經膠質瘤細胞形成的腫瘤比控制組小，且將裸鼠中的 NK 細胞剔除，抑制 *TDO2* 基因的神經膠質瘤細胞形成的腫瘤依舊比控制組小。且有表現 *Tdo2* 的腫瘤，在 *Ahr*-proficient mice 比 *Ahr*-deficient mice 大，顯示 *TDO2* 可以透過 AHR 來促進腫瘤細胞的生長，抑制癌症細胞的 *TDO2* 基因，AHR 便不會活化，可以降低癌症細胞生長[34]。有研究顯示，aryl hydrocarbon receptor (AHR)可以當作 mitogenic growth factor 的轉錄激活因子(transcriptional activator)，當 AHR 活化時，mitogenic growth factor 像是 vascular endothelial growth factor A (VEGFA)、platelet-derived growth factor (PDGF)、epiregulin、amphiregulin、fibroblast growth factor 9 (FGF9)的量會增加，促進細胞增生[51, 52]。將被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株以及被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株進行細胞增生實驗，結果顯示此兩種細胞的生長速度差不多，推測可能的原因是 Hep55.1c 細胞株的色胺酸雙加氧酶(tryptophan dioxygenase)表現量低，且使用 shRNA clone ID 33 抑制 *Tdo2* 基因，抑制效果最好但也只有使 *Tdo2* mRNA 的相對表現量下降大約一半，所以才沒有觀察到抑制 *Tdo2* 基因可抑制細胞生長的現象。由 Reference database for gene Expression Analysis(RefExA database)得知 Huh7 細胞株的 *TDO2* 為中度表現，HeLa 細胞株的 *TDO2* 則是低度表現，在西方墨點法偵測色胺酸雙加氧酶(tryptophan dioxygenase)的實驗，以 Huh7 細胞株當作陽性對照組，因為在大約 48 kDa 的位置，沒有偵測到明顯 band，所以我們無法確定在未被感染的 Hep55.1c 細胞株、被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株所偵測到的 band 就為色胺酸雙加氧酶，推測有可能為非專一性的抗原抗體反應。另外也推測 Hep55.1c 細胞株的色胺酸雙加氧酶表現量過低，無法



用西方墨點法偵測。雖然有研究顯示 *TDO2* 可以透過 AHR 來促進腫瘤細胞的生長，但也有研究顯示，在免疫缺陷的小鼠，抑制 *Tdo2* 的細胞與控制組細胞形成的腫瘤大小沒有差異[27]。也有些研究認為，活化的 AHR 會與 cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B)的啟動子結合，促進 p27 的表現。而 p27 會抑制 retinoblastoma protein(RB)磷酸化，抑制與 S phase 有關的基因表現，導致細胞週期停止在 G1 phase，抑制細胞生長。此外，活化的 AHR 會與  $\beta$ -catenin 結合，刺激 AHR 的 ubiquitin ligase 的功能，將  $\beta$ -catenin 泛素化(ubiquitylation)，分解  $\beta$ -catenin，抑制與細胞週期有關的基因表現，抑制細胞生長。目前對於 AHR 與細胞生長的研究都僅限於細胞培養模式，尚無研究是以體內(in vivo)模式進行。細胞位於細胞週期的哪一個階段，可能會影響 AHR 是促進或是抑制細胞生長，像是 RB 在 AHR 活化前是不是已過度磷酸化(hyperphosphorylated)[53]，所以目前對於 AHR 是否會促進細胞生長尚無定論。

在皮下注射 BALB/C 小鼠動物實驗的部分，雖然抑制 *Tdo2* 基因的表現會讓在皮下生成的腫瘤大小變小，但隨著實驗觀察的時間增加，發現不管是被 scramble shRNA 或是 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤最後都變小至消失不見。此外將未被慢病毒感染的 BNL1.MEA 細胞株以皮下注射打入小鼠體內，腫瘤也會隨著時間的增加而慢慢變小至消失不見，推測是因為細胞特性改變，導致形成腫瘤的能力不穩定。另外在肝臟注射的部分，不管是被 scramble shRNA 或是 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤，都有部分的腫瘤縮小，不過在第二十五、三十天時，卻有部分的腫瘤變大，我們認為是被 scramble shRNA、shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株在體內(in vivo)的生長速度變化大所造成。

在皮下注射 C57BL/6 小鼠動物實驗的部分，在第十五天時，被 scramble shRNA 與被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤大小有顯著差異，而在第二十二、三十天時，因為不管是被 scramble shRNA 或是 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤，都有部分的腫瘤縮小，被 scramble shRNA、shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株的生長速度趨緩，所以兩組間沒有顯著差異。而在肝臟注射的部分，被 scramble shRNA 與 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤沒有顯著差異，可能是因為個體

間差異大所導致。





表一、人類 *TDO2* targeted shRNA 序列

clone	序列(5'-3')
874	GAACATGCTTAAGGTTGTTTC
054	ATCATAACTCATCAAGCTTAT
382	GATGACCAAATGGAGATATAA
265	AGTGATAGGTACAAGGTATTT

表二、老鼠 *Tdo2* targeted shRNA 序列

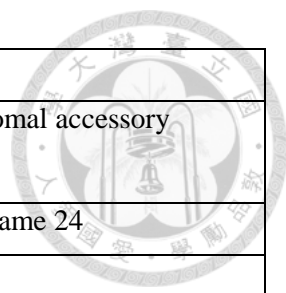
clone	序列(5'-3')
33	GTGAGCGATTAGGAGGATTAA
34	GCCTGGAAGAAGAATTTCTAA
35	CCAAAGATGAATCCGATCATT
36	GCTGGAAAGAACACCTGGTTT
37	GCGCAAGAACTTCAGAGTGAA

表 三、本研究所使用引子

引子名稱	序列(5'-3')	用途
Human <i>GAPDH</i> -F	AGCCTCAAGATCATCAGCAAT G	<i>GAPDH</i> RT-qPCR
Human <i>GAPDH</i> -R	ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTT	<i>GAPDH</i> RT-qPCR
Human <i>TDO2</i> -F	GGTTCCTCAGGCTATCACTACC	<i>TDO2</i> RT-qPCR
Human <i>TDO2</i> -R	CAGTGTCGGGGAATCAGGT	<i>TDO2</i> RT-qPCR
Mouse <i>Gapdh</i> -F	GCCTTCCGTGTTCCCTACCC	<i>Gapdh</i> RT-qPCR
Mouse <i>Gapdh</i> -R	TGAAGTCGCAGGAGACAACC	<i>Gapdh</i> RT-qPCR
Mouse <i>Tdo2</i> -F (Hep55.1c)	AGGCATGGCTGGAAAGAACA	<i>Tdo2</i> RT-qPCR
Mouse <i>Tdo2</i> -R (Hep55.1c)	GAGTCGGTTTTAGCCTGAATCC	<i>Tdo2</i> RT-qPCR
Mouse <i>Tdo2</i> -F (BNL1. MEA)	CTGGGGGATCCTCAGGCTAT	<i>Tdo2</i> RT-qPCR
Mouse <i>Tdo2</i> -R (BNL1. MEA)	TGTCACTGTACTCGGCTGTG	<i>Tdo2</i> RT-qPCR
TRC1-F	AGGCGCGCCGAGGGCCTATTTCCCATG	Amplify shRNA sequence
TRC2-F	AGGCGCGCCAGAGAGGGCCTATTTCCCATG	Amplify shRNA sequence
LKO1&5-R	TGTGGATGAATACTGCCATTTGTCTC	Amplify shRNA sequence

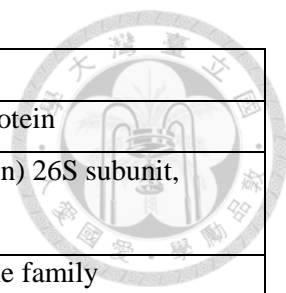
表 四、四種細胞株(Huh7、A549、HeLa、SCM1)共同沒有比對到的基因<sup>1</sup>

Symbol	shRNA percentage <sup>2</sup>	Clone percentage <sup>3</sup>	Gene description
<i>ACTR8</i>	4/423	4/5	ARP8 actin-related protein 8 homolog (yeast)
<i>GRAMD1A</i>	4/423	4/5	GRAM domain containing 1A
<i>PDCD6</i>	4/423	4/5	programmed cell death 6
<i>RPS15A</i>	4/423	4/5	ribosomal protein S15a
<i>TSTA3</i>	4/423	4/5	tissue specific transplantation antigen P35B
<i>ARCNI</i>	3/423	3/5	archain 1
<i>ARL2</i>	3/423	3/5	ADP-ribosylation factor-like 2
<i>ATP5E</i>	3/423	3/5	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit
<i>COPB2</i>	3/423	3/5	coatamer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)
<i>COX6B1</i>	3/423	3/5	Cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous)
<i>DDX56</i>	3/423	3/5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56
<i>EIF3B</i>	3/423	3/5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B
<i>EIF3M</i>	3/423	3/5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M
<i>FSTL1</i>	3/423	3/5	follistatin-like 1
<i>FUNDC1</i>	3/423	3/5	FUN14 domain containing 1
<i>NHLRC2</i>	3/423	3/5	NHL repeat containing 2
<i>NUSAP1</i>	3/423	3/5	nucleolar and spindle associated protein 1
<i>RPL11</i>	3/423	3/5	ribosomal protein L11
<i>RPL18</i>	3/423	3/5	ribosomal protein L18
<i>RPL23</i>	3/423	3/5	ribosomal protein L23
<i>RPS12</i>	3/423	3/5	ribosomal protein S12
<i>RPS18</i>	3/423	3/5	ribosomal protein S18
<i>TXLNA</i>	3/423	3/5	taxilin alpha
<i>ZMAT3</i>	3/423	3/5	zinc finger, matrin-type 3
<i>ACTA2</i>	2/423	2/5	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
<i>AQR</i>	2/423	2/5	aquarius homolog (mouse)
<i>ATP2A2</i>	2/423	2/5	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
<i>ATP5J</i>	2/423	2/5	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo



			complex, subunit F6
<i>ATP6AP2</i>	2/423	2/5	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 2
<i>C15orf24</i>	2/423	2/5	chromosome 15 open reading frame 24
<i>DBNL</i>	2/423	2/5	drebrin-like
<i>DCTD</i>	2/423	2/5	dCMP deaminase
<i>DDX54</i>	2/423	2/5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54
<i>EIF3A</i>	2/423	2/5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A
<i>EIF5B</i>	2/423	2/5	eukaryotic translation initiation factor 5B
<i>EXOSC8</i>	2/423	2/5	exosome component 8
<i>FAM113A</i>	2/423	2/5	family with sequence similarity 113, member A
<i>FAM113B</i>	2/423	2/5	family with sequence similarity 113, member B
<i>FAM136A</i>	2/423	2/5	family with sequence similarity 136, member A
<i>FAM8A1</i>	2/423	2/5	family with sequence similarity 8, member A1
<i>GDE1</i>	2/423	2/5	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
<i>GLA</i>	2/423	2/5	galactosidase, alpha
<i>GLB1L2</i>	2/423	2/5	galactosidase, beta 1-like 2
<i>GSTP1</i>	2/423	2/5	glutathione S-transferase pi 1
<i>GTF3C6</i>	2/423	2/5	general transcription factor IIIC, polypeptide 6, alpha 35kDa
<i>IFT57</i>	2/423	2/5	intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)
<i>JAZF1</i>	2/423	2/5	JAZF zinc finger 1
<i>JUP</i>	2/423	2/5	junction plakoglobin
<i>LDLR</i>	2/423	2/5	low density lipoprotein receptor
<i>MIA3</i>	2/423	2/5	melanoma inhibitory activity family, member 3
<i>MRPL22</i>	2/423	2/5	mitochondrial ribosomal protein L22
<i>NCEH1</i>	2/423	2/5	neutral cholesterol ester hydrolase 1
<i>NHP2L1</i>	2/423	2/5	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)
<i>NPLOC4</i>	2/423	2/5	nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)
<i>OBFC1</i>	2/423	2/5	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1
<i>OVCA2</i>	2/423	2/5	ovarian tumor suppressor candidate 2



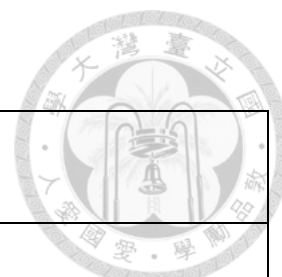


<i>PAPOLA</i>	2/423	2/5	poly(A) polymerase alpha
<i>PNN</i>	2/423	2/5	pinin, desmosome associated protein
<i>PSMD8</i>	2/423	2/5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8
<i>RAB8A</i>	2/423	2/5	RAB8A, member RAS oncogene family
<i>RALB</i>	2/423	2/5	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)
<i>RBPI</i>	2/423	2/5	retinol binding protein 1, cellular
<i>RPL10</i>	2/423	2/5	ribosomal protein L10
<i>RPL14</i>	2/423	2/5	ribosomal protein L14
<i>RPL27</i>	2/423	2/5	ribosomal protein L27
<i>RPS11</i>	2/423	2/5	ribosomal protein S11
<i>RPS23</i>	2/423	2/5	ribosomal protein S23
<i>RRM1</i>	2/423	2/5	ribonucleotide reductase M1
<i>RRP36</i>	2/423	2/5	ribosomal RNA processing 36 homolog (S. cerevisiae)
<i>RSRC1</i>	2/423	2/5	arginine/serine-rich coiled-coil 1
<i>RPL27</i>	2/423	2/5	ribosomal protein L27
<i>RPS11</i>	2/423	2/5	ribosomal protein S11
<i>RPS23</i>	2/423	2/5	ribosomal protein S23
<i>RRM1</i>	2/423	2/5	ribonucleotide reductase M1
<i>RRP36</i>	2/423	2/5	ribosomal RNA processing 36 homolog (S. cerevisiae)
<i>RPL27</i>	2/423	2/5	ribosomal protein L27
<i>RPS11</i>	2/423	2/5	ribosomal protein S11
<i>RPS23</i>	2/423	2/5	ribosomal protein S23
<i>TMEM120A</i>	2/423	2/5	transmembrane protein 120A
<i>TMEM49</i>	2/423	2/5	transmembrane protein 49
<i>TMEM70</i>	2/423	2/5	transmembrane protein 70
<i>WBP11</i>	2/423	2/5	WW domain binding protein 11
<i>WDR6</i>	2/423	2/5	WD repeat domain 6
<i>WLS</i>	2/423	2/5	wntless homolog (Drosophila)
<i>TMEM120A</i>	2/423	2/5	transmembrane protein 120A
<i>TMEM120A</i>	2/423	2/5	transmembrane protein 120A
<i>TMEM49</i>	2/423	2/5	transmembrane protein 49

1. 僅列出比對到兩次以上的基因名稱，其餘列於附錄
2. shRNA percentage: 四種細胞株(Huh7、A549、HeLa、SCM1)共同沒有比對到的 targeted shRNA sequence 的比例，共同沒有比對到的 targeted shRNA sequence 有 423 個
3. clone percentage: 此基因被比對到的次數，每個基因有 5 個 targeted shRNA sequence

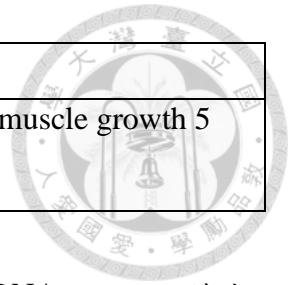


表 五、只有人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的基因<sup>1</sup>

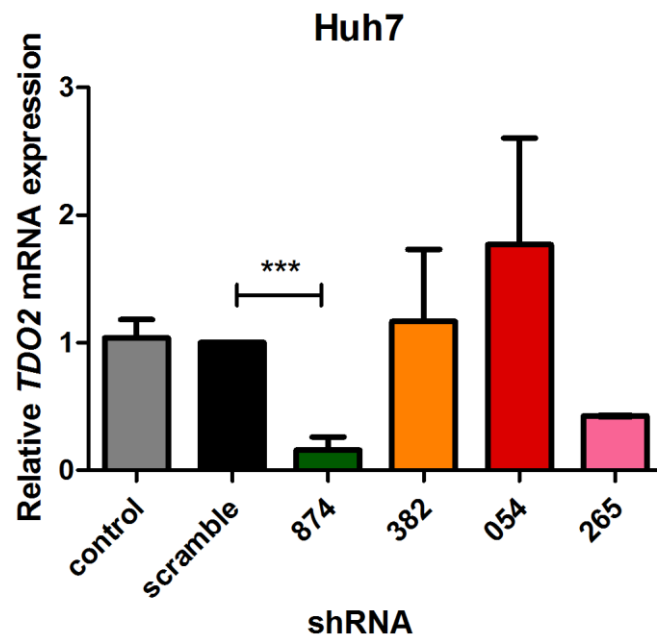


Symbol	shRNA percentage <sup>2</sup>	Clone percentage <sup>3</sup>	Gene description
<i>NUTF2</i>	4/334	4/5	Nucleartransport factor 2
<i>HAUS1</i>	3/334	3/5	HAUS augmin-like complex, subunit 1
<i>RPS24</i>	3/334	3/5	ribosomal protein S24
<i>UTP15</i>	3/334	3/5	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>WARS</i>	3/334	3/5	tryptophanyl-tRNA synthetase
<i>BCAS2</i>	2/334	2/5	breast carcinoma amplified sequence 2
<i>CD38</i>	2/334	2/5	CD38 molecule
<i>CDC45</i>	2/334	2/5	cell division cycle 45 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>CHMP2A</i>	2/334	2/5	chromatin modifying protein 2A
<i>CNPY2</i>	2/334	2/5	canopy 2 homolog (zebrafish)
<i>COPS2</i>	2/334	2/5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2 ( <i>Arabidopsis</i> )
<i>DIAPH1</i>	2/334	2/5	diaphanous homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
<i>EIF3F</i>	2/334	2/5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F
<i>EXOC3</i>	2/334	2/5	exocyst complex component 3
<i>GAR1</i>	2/334	2/5	GAR1 ribonucleoprotein homolog (yeast)
<i>GNL3</i>	2/334	2/5	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
<i>KDSR</i>	2/334	2/5	3-ketodihydrosphingosine reductase
<i>NSA2</i>	2/334	2/5	NSA2 ribosome biogenesis homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>PAFAH2</i>	2/334	2/5	platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa
<i>PHB2</i>	2/334	2/5	prohibitin 2
<i>PPHLN1</i>	2/334	2/5	periphilin 1
<i>PREB</i>	2/334	2/5	prolactin regulatory element binding
<i>RPS23</i>	2/334	2/5	ribosomal protein S23

<i>TMEM97</i>	2/334	2/5	transmembrane protein 97
<i>USMG5</i>	2/334	2/5	up-regulated during skeletal muscle growth 5 homolog (mouse)

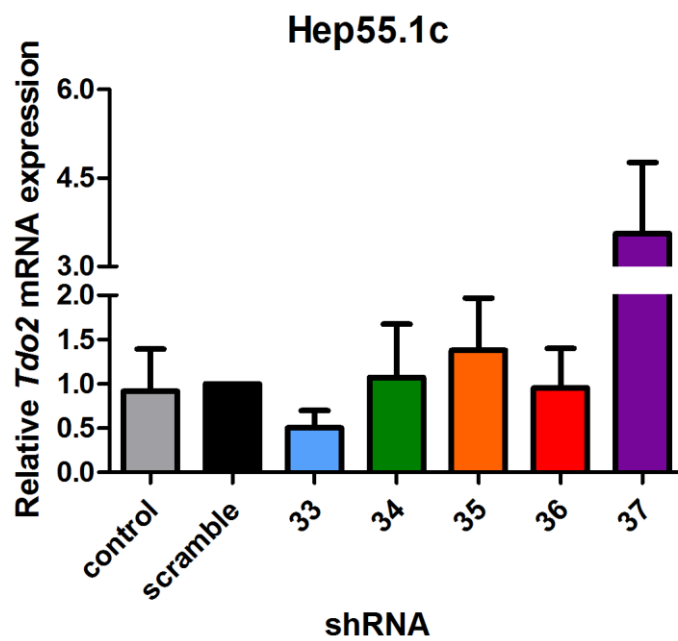


1. 僅列出比對到兩次以上的基因名稱，其餘列於附錄
2. shRNA percentage: 只有 Huh7 細胞株沒有比對到的 targeted shRNA sequence 的比例，只有 Huh7 細胞株沒有比對到的 targeted shRNA sequence 有 334 個
3. clone percentage: 此基因被比對到的次數，每個基因有 5 個 targeted shRNA sequence



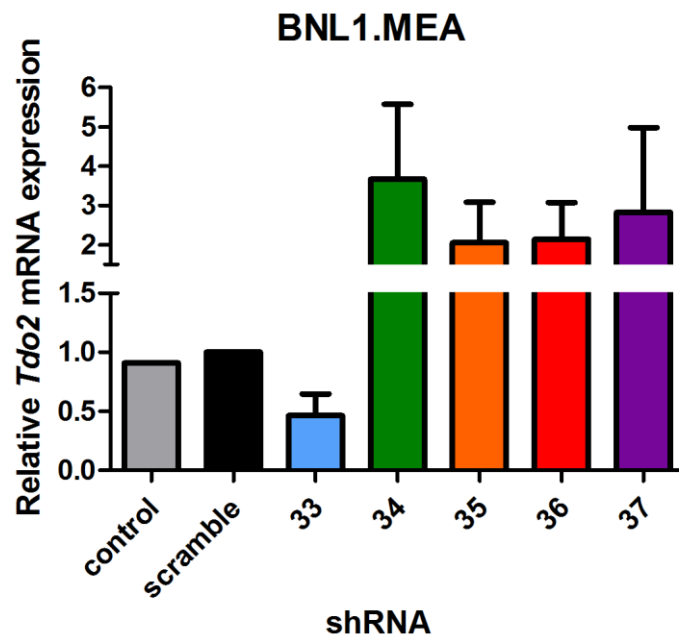
圖一、以不同 shRNA 抑制 Huh7 細胞株 *TDO2* 基因的表現量

被 clone ID 874 human *TDO2* targeted shRNA 慢病毒感染後的 Huh7 細胞株，*TDO2* mRNA 的相對表現量最低，大約為 0.16，且與 scramble 相比有顯著差異。



圖二、以不同 shRNA 抑制 Hep55.1c 細胞株 *Tdo2* 基因的表現量

被 clone ID 33 mouse *Tdo2* targeted shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株，*Tdo2* mRNA 的相對表現量最低，大約為 0.5。



圖三、以不同 shRNA 抑制 BNL1.MEA 細胞株 *Tdo2* 基因的表現量

被 clone ID 33 mouse *Tdo2* targeted shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株，*Tdo2* mRNA 的相對表現量最低，大約為 0.5。

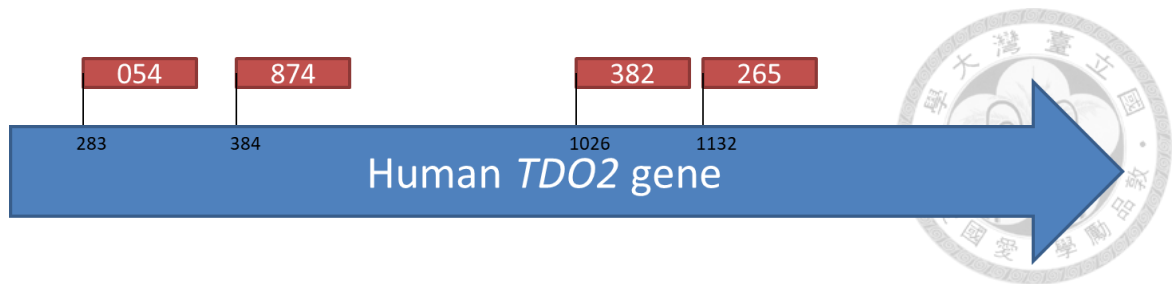


圖 四、Human *TDO2* targeted shRNA sequence 與人類 *TDO2* 基因序列比對結果

將 human *TDO2* targeted shRNA sequence 與人類 *TDO2* 基因以 Vector NTI 進行序列上的比對，由 *TDO2* 基因上游至下游，依序比對到的 clone 是 054、874、382、265。

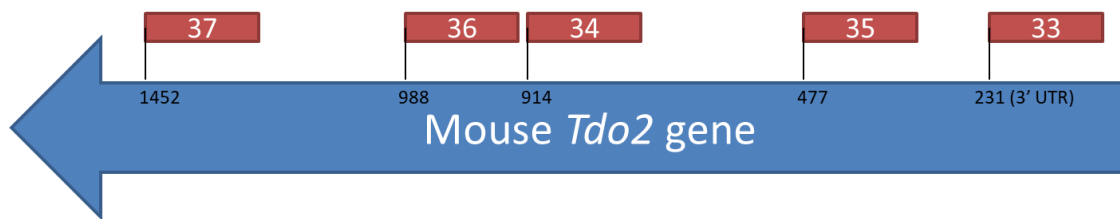
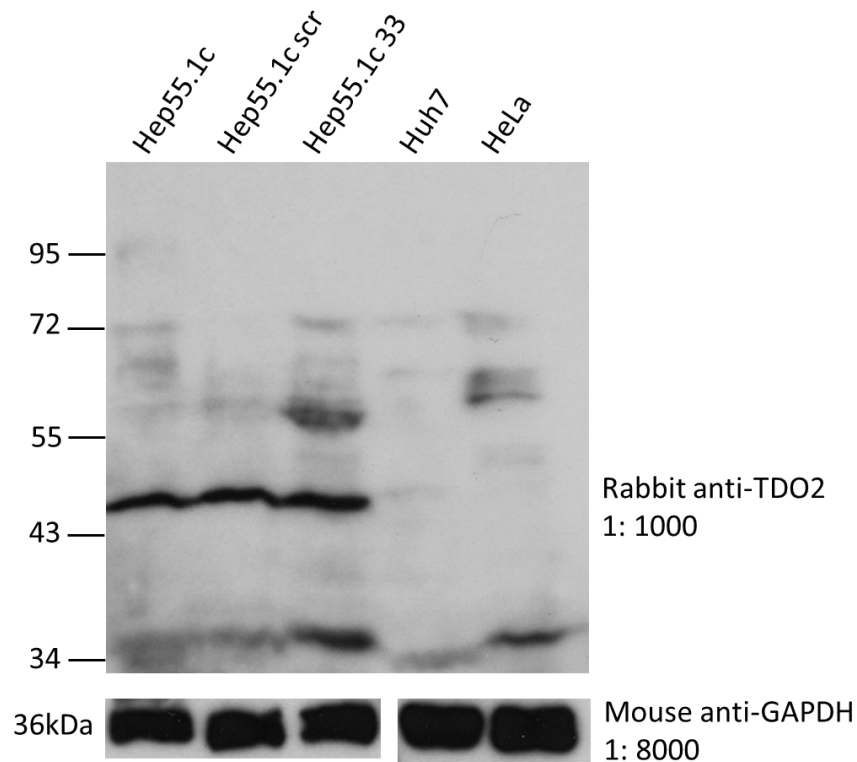


圖 五、Mouse *Tdo2* targeted shRNA sequence 與老鼠 *Tdo2* 基因序列比對結果

將 mouse *Tdo2* targeted shRNA sequence 與老鼠 *Tdo2* 基因以 Vector NTI 進行序列上的比對，由 *Tdo2* 基因上游至下游，依序比對到的 clone 是 33、35、34、36、37。





圖六、以西方墨點法偵測細胞色胺酸雙加氧酶(tryptophan dioxygenase)的表現量

將相同量的細胞蛋白質萃取物以辨認色胺酸雙加氧酶的多株抗體偵測蛋白質表現(第一列為未被感染的 Hep55.1c 細胞株；第二列為被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株；第三列為被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株；第四列為陽性控制組 Huh7 細胞株；第五列為陰性控制組 HeLa 細胞株)，色胺酸雙加氧酶的預期大小約為 48 kDa，GAPDH 作為 internal control。

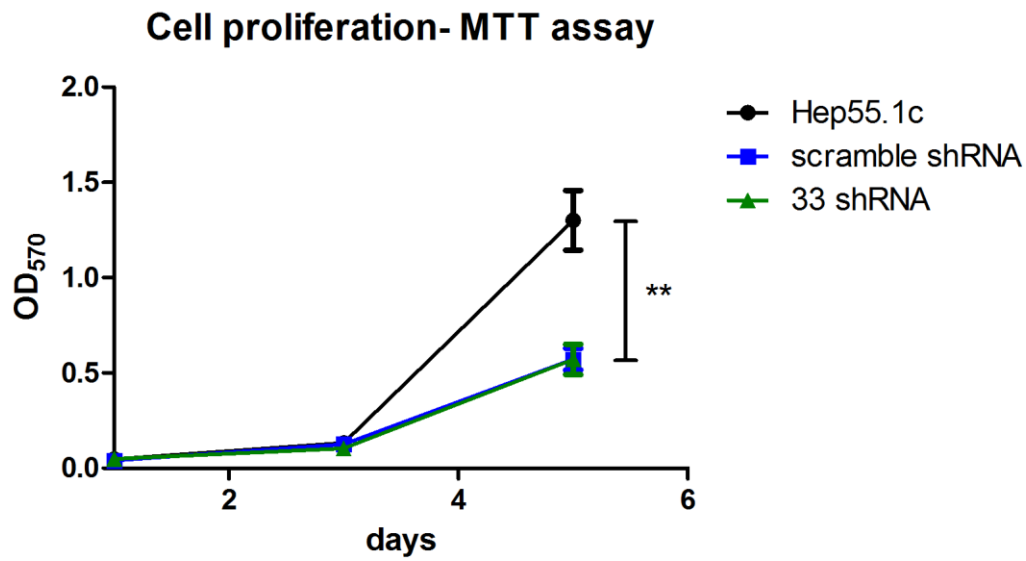
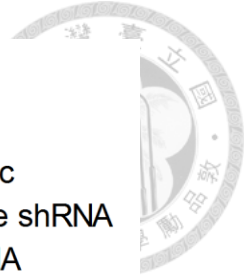


圖 七、以 MTT 試驗測定細胞增生

培養相同細胞數的未被感染的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株和被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株，並在第一、三、五天觀察細胞增生，在第五天時，未被感染的 Hep55.1c 細胞株的 OD<sub>570</sub> 吸光值比被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株、被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株高，且有顯著差異。

C57BL/6  
(subcutaneous injection:  $1 \times 10^6$  Hep55.1c cells)

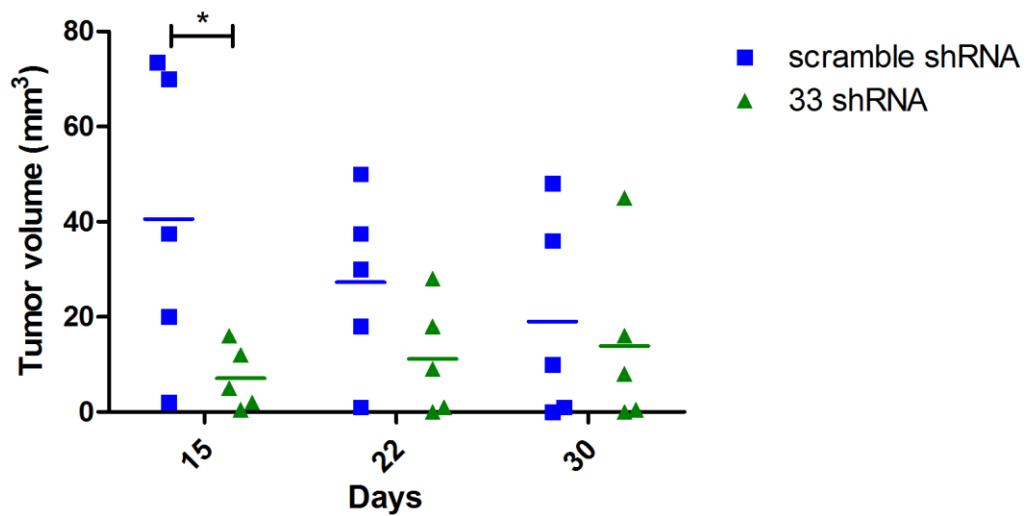


圖 八、皮下注射至 C57BL/6 小鼠來觀察抑制 *Tdo2* 對腫瘤生成的影響

被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤小，在第十五天具有顯著差異，但在第二十二、三十天時，沒有顯著差異。

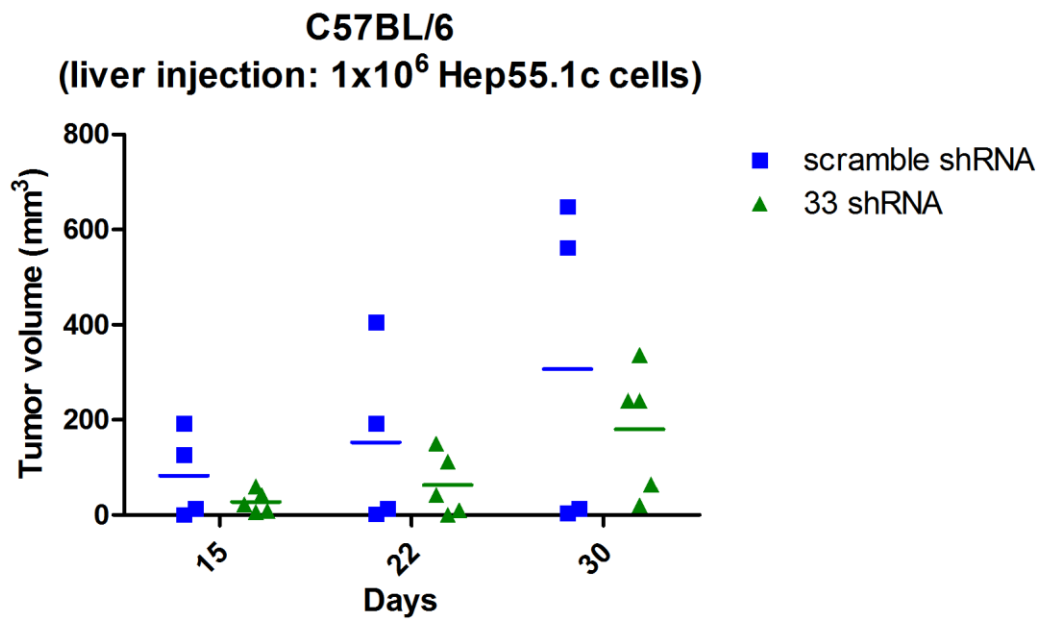


圖 九、肝臟注射至 C57BL/6 小鼠來觀察抑制 *Tdo2* 對腫瘤生成的影響

被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 Hep55.1c 細胞株形成的腫瘤小，但因為每隻小鼠間差異大，所以沒有顯著差異。

BALB/C  
(subcutaneous injection:  $2 \times 10^6$  BNL1.MEA cells)

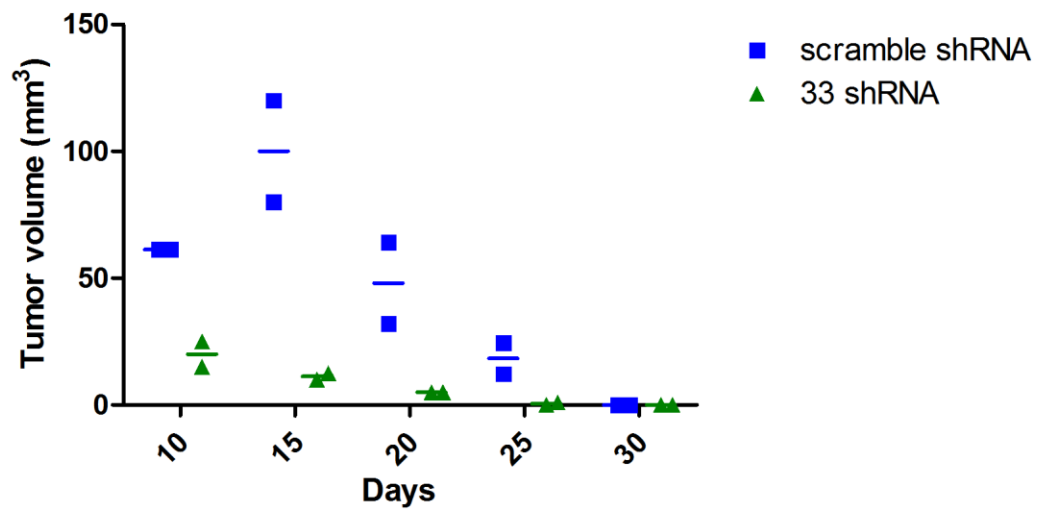


圖 十、皮下注射至 BALB/C 小鼠來觀察抑制 *Tdo2* 對腫瘤生成的影響

被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤小，但因為小鼠隻數只有兩隻，所以沒有顯著差異。

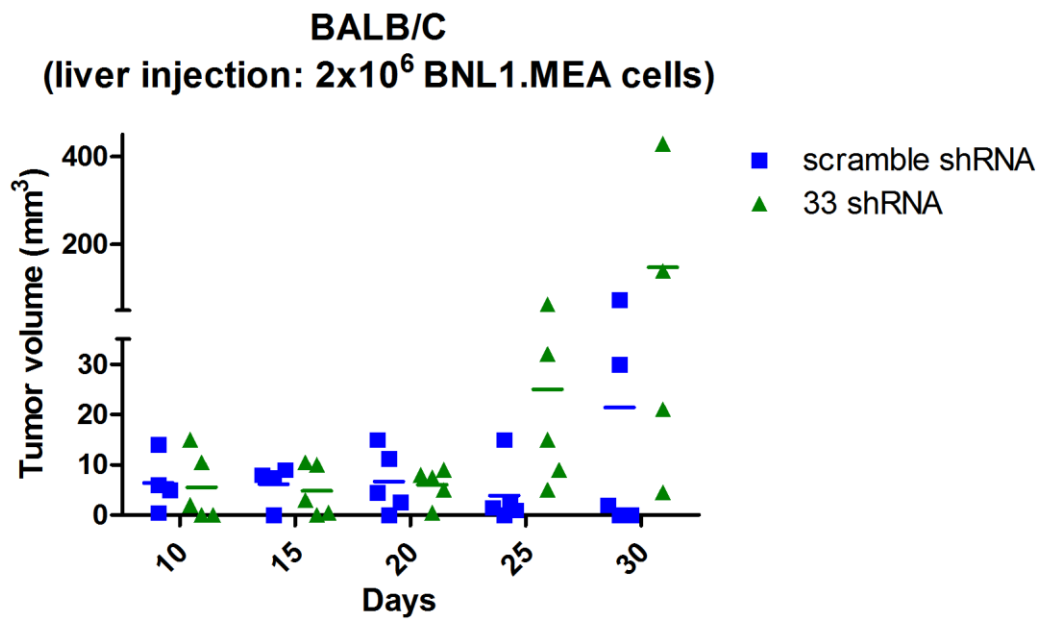
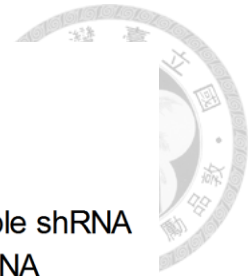


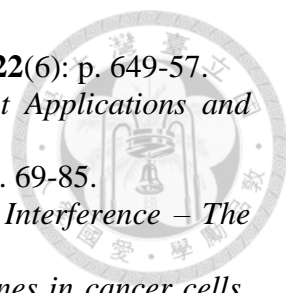
圖 十一、肝臟注射至 BALB/C 小鼠來觀察抑制 *Tdo2* 對腫瘤生成的影響

在第十、十五、二十天時，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤大小與被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤大小差不多，但在第二十五、三十天時，被 shRNA clone ID 33 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤比被 scramble shRNA 慢病毒感染後的 BNL1.MEA 細胞株形成的腫瘤大，但沒有顯著差異。

## 參考文獻



1. Zhou, H., et al., *A novel treatment strategy in hepatocellular carcinoma by down-regulation of histone deacetylase 1 expression using a shRNA lentiviral system*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(10): p. 17721-17729.
2. Ingle, P.V., et al., *Development and novel therapeutics in hepatocellular carcinoma: a review*. *Ther Clin Risk Manag*, 2016. **12**: p. 445-55.
3. Yuen, M.F., et al., *Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(3): p. 346-53.
4. Kew, M., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and risk factors*. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 2014: p. 115.
5. Venook, A.P., et al., *The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective*. *The Oncologist*, 2010. **15**(Supplement 4): p. 5-13.
6. Sanyal, A.J., S.K. Yoon, and R. Lencioni, *The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment*. *Oncologist*, 2010. **15 Suppl 4**: p. 14-22.
7. Kew, M.C., H.A. Dos Santos, and S. Sherlock, *Diagnosis of Primary Cancer of the Liver*. *British Medical Journal*, 1971. **4**: p. 408-411.
8. El-Serag, H.B., M.D., and M.P.H., *Hepatocellular Carcinoma*. *N Engl J Med*, 2011. **365**: p. 1118-1127.
9. Chhaniwal, N., et al., *Hepatocellular Carcinoma: Review of Current Treatment with a Focus on Transarterial Chemoembolization and Radiofrequency Ablation*. *Open Journal of Radiology*, 2015. **05**(01): p. 50-58.
10. Luedde, T. and R.F. Schwabe, *NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(2): p. 108-18.
11. Ye, H., et al., *Synergistic function of Kras mutation and HBx in initiation and progression of hepatocellular carcinoma in mice*. *Oncogene*, 2014. **33**(43): p. 5133-8.
12. European Association For The Study Of The Liver and European Organisation For Research Treatment Of Cancer, *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2012. **56**(4): p. 908-43.
13. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral Vectors for Gene Therapy*. *Pharmacol Ther*, 1998. **80**(1): p. 35-47.
14. Otto, W.M. and R. Mohamed Al, *Viral Vectors for Gene Therapy*. 2011.
15. Escors, D., et al., *Development of Retroviral and Lentiviral Vectors*. 2012: p. 11-28.
16. Luigi, N., *Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998. **9**: p. 457-463.
17. Cronin, J., X.-Y. Zhang, and J. Reiser, *Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(4): p. 387-398.
18. Tiscornia, G., O. Singer, and I.M. Verma, *Production and purification of lentiviral vectors*. *Nature Protocols*, 2006. **1**(1): p. 241-245.
19. Matrai, J., M.K. Chuah, and T. VandenDriessche, *Recent advances in lentiviral vector development and applications*. *Mol Ther*, 2010. **18**(3): p. 477-90.
20. Dropulic, B., *Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in*

- 
- laboratory and preclinical research. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(6): p. 649-57.
21. Goyvaerts, C., et al., *Targeted Lentiviral Vectors: Current Applications and Future Potential*. 2013.
  22. Kochan, G., et al., *Clinical Grade Lentiviral Vectors*. 2012: p. 69-85.
  23. Lingor, P., *Regulation of Cell Death and Survival by RNA Interference – The Roles of miRNA and siRNA*. 2010: p. 95-117.
  24. Luo, B., et al., *Highly parallel identification of essential genes in cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(51): p. 20380-5.
  25. Marcotte, R., et al., *Essential gene profiles in breast, pancreatic, and ovarian cancer cells*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(2): p. 172-89.
  26. Ngo, V.N., et al., *A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer*. *Nature*, 2006. **441**(7089): p. 106-10.
  27. Pilotte, L., et al., *Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(7): p. 2497-502.
  28. Thackray, S.J., C.G. Mowat, and S.K. Chapman, *Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 6): p. 1120-3.
  29. Moon, Y.W., et al., *Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer*. *J Immunother Cancer*, 2015. **3**: p. 51.
  30. Pantouris, G., J. Loudon-Griffiths, and C.G. Mowat, *Insights into the mechanism of inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase by isatin derivatives*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016: p. 1-9.
  31. Platten, M., et al., *Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors*. *Frontiers in Immunology*, 2015. **5**(673).
  32. Hjortso, M.D., et al., *Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)-reactive T cells differ in their functional characteristics in health and cancer*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(1): p. e968480.
  33. Dolusic, E., et al., *Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators*. *J Med Chem*, 2011. **54**(15): p. 5320-34.
  34. Opitz, C.A., et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. *Nature*, 2011. **478**(7368): p. 197-203.
  35. Wang, Y., et al., *RPS24 knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and proliferation in vitro*. *Gene*, 2015. **571**(2): p. 286-291.
  36. Feng, D., et al., *Inhibiting the Expression of DNA Replication-Initiation Proteins Induces Apoptosis in Human Cancer Cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(21): p. 7356-64.
  37. Yan, P., et al., *Decreasing CNPY2 Expression Diminishes Colorectal Tumor Growth and Development through Activation of p53 Pathway*. *Am J Pathol*, 2016. **186**(4): p. 1015-24.
  38. Lin, Y.N., et al., *Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells*. *Int J Cancer*, 2014. **134**(7): p. 1571-82.
  39. Hu, B., et al., *Nucleostemin/GNL3 promotes nucleolar polyubiquitylation of p27kip1 to drive hepatocellular carcinoma progression*. *Cancer Lett*, 2017. **388**: p. 220-229.
  40. Chen, W., et al., *Emerging role of microRNA-27a in human malignant glioma cell survival via targeting of prohibitin*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(1): p. 1515-23.
  41. Xu, X.Y., et al., *Down-regulated MAC30 expression inhibits proliferation and mobility of human gastric cancer cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **33**(5): p.



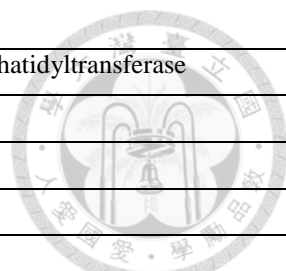
- 1359-68.
42. Lee, C., et al., *Overexpressed tryptophanyl-tRNA synthetase, an angiostatic protein, enhances oral cancer cell invasiveness*. *oncotarget*, 2015. **6**(26): p. 21979-92.
43. Vaisitti, T., et al., *The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting*. *Leukemia*, 2015. **29**(2): p. 356-68.
44. Li, W., et al., *A novel human TINP1 gene promotes cell proliferation through inhibition of p53 and p21 expression*. *Oncol Rep*, 2013. **30**(4): p. 1848-52.
45. Mouillesseaux, K. and J.N. Chen, *Mutation in utp15 disrupts vascular patterning in a p53-dependent manner in zebrafish embryos*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25013.
46. Lykke-Andersen, K., et al., *Disruption of the COP9 Signalosome Csn2 Subunit in Mice Causes Deficient Cell Proliferation, Accumulation of p53 and Cyclin E, and Early Embryonic Death*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(19): p. 6790-6797.
47. Kuo, P.C., et al., *Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor*. *Cancer Res*, 2009. **69**(23): p. 8877-85.
48. Hua, L., et al., *Upregulated expression of Nucleostemin/GNL3 is associated with poor prognosis and Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma*. *Pathol Res Pract*, 2017. **213**(6): p. 688-697.
49. Kispert, S.E., J.O. Marentette, and J. McHowat, *Enhanced breast cancer cell adherence to the lung endothelium via PAF acetylhydrolase inhibition: a potential mechanism for enhanced metastasis in smokers*. *AJP: Cell Physiology*, 2014. **307**(10): p. C951-C956.
50. Shi, J., et al., *Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells*. *Oncogene*, 2006. **25**(35): p. 4923-36.
51. Patel, R.D., et al., *The Aryl Hydrocarbon Receptor Directly Regulates Expression of the Potent Mitogen Epiregulin*. *Toxicological Science*, 2006. **89**(1): p. 75-82.
52. Wang, C., et al., *Aryl hydrocarbon receptor activation and overexpression upregulated fibroblast growth factor-9 in human lung adenocarcinomas*. 2009. **125**(4): p. 807-815.
53. Murray, I.A., A.D. Patterson, and G.H. Perdew, *Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe*. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(12): p. 801-14.

## 附錄



表 A、四種細胞株(Huh7、A549、HeLa、SCM1)共同沒有比對到的基因

Symbol	shRNA percentage <sup>1</sup>	Clone percentage <sup>2</sup>	Gene description
<i>AAGAB</i>	1/423	1/5	alpha- and gamma-adaptin binding protein
<i>ABCC2</i>	1/423	1/5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
<i>ABCF2</i>	1/423	1/5	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2
<i>ACO2</i>	1/423	1/5	aconitase 2, mitochondrial
<i>ADORA2B</i>	1/423	1/5	adenosine A2b receptor
<i>AGPAT2</i>	1/423	1/5	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)
<i>AMD1</i>	1/423	1/5	adenosylmethionine decarboxylase 1
<i>ANXA1</i>	1/423	1/5	annexin A1
<i>ANXA2</i>	1/423	1/5	annexin A2
<i>ANXA4</i>	1/423	1/5	annexin A4
<i>AP2A1</i>	1/423	1/5	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit
<i>APOL2</i>	1/423	1/5	apolipoprotein L, 2
<i>ARHGAP39</i>	1/423	1/5	Rho GTPase activating protein 39
<i>ARPC4</i>	1/423	1/5	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa
<i>ATP5G3</i>	1/423	1/5	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3 (subunit 9)
<i>ATP6V0D1</i>	1/423	1/5	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1
<i>B4GALT2</i>	1/423	1/5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2
<i>BAT1</i>	1/423	1/5	HLA-B associated transcript 1
<i>BEX4</i>	1/423	1/5	brain expressed, X-linked 4
<i>BST2</i>	1/423	1/5	bone marrow stromal cell antigen 2
<i>C18orf32</i>	1/423	1/5	chromosome 18 open reading frame 32
<i>C20orf30</i>	1/423	1/5	chromosome 20 open reading frame 30
<i>C5orf51</i>	1/423	1/5	chromosome 5 open reading frame 51
<i>CASC3</i>	1/423	1/5	cancer susceptibility candidate 3
<i>CBY1</i>	1/423	1/5	chibby homolog 1 (Drosophila)
<i>CCNK</i>	1/423	1/5	cyclin K
<i>CD151</i>	1/423	1/5	CD151 molecule (Raph blood group)
<i>CDC27</i>	1/423	1/5	cell division cycle 27 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>CDC42</i>	1/423	1/5	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
<i>CDC5L</i>	1/423	1/5	CDC5 cell division cycle 5-like ( <i>S. pombe</i> )
<i>CDCA3</i>	1/423	1/5	cell division cycle associated 3
<i>CDH19</i>	1/423	1/5	cadherin 19, type 2



<i>CDIPT</i>	1/423	1/5	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
<i>CHMP2A</i>	1/423	1/5	chromatin modifying protein 2A
<i>CHPT1</i>	1/423	1/5	choline phosphotransferase 1
<i>CLCN7</i>	1/423	1/5	chloride channel 7
<i>CLPTMIL</i>	1/423	1/5	CLPTM1-like
<i>CMAS</i>	1/423	1/5	cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase
<i>CMTM3</i>	1/423	1/5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
<i>CNDP2</i>	1/423	1/5	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)
<i>COMMD8</i>	1/423	1/5	COMM domain containing 8
<i>COPS4</i>	1/423	1/5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4 (Arabidopsis)
<i>COQ10A</i>	1/423	1/5	coenzyme Q10 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>COTL1</i>	1/423	1/5	coactosin-like 1 ( <i>Dictyostelium</i> )
<i>COX6C</i>	1/423	1/5	cytochrome c oxidase subunit VIc
<i>COX7A2L</i>	1/423	1/5	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like
<i>CRLS1</i>	1/423	1/5	cardiolipin synthase 1
<i>DDX49</i>	1/423	1/5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49
<i>DEMI</i>	1/423	1/5	defects in morphology 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>DHRS3</i>	1/423	1/5	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
<i>DIAPH1</i>	1/423	1/5	diaphanous homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
<i>DNM1</i>	1/423	1/5	dynamamin 1
<i>DPM2</i>	1/423	1/5	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit
<i>EIF1AX</i>	1/423	1/5	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked
<i>EIF2S2</i>	1/423	1/5	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa
<i>EIF3G</i>	1/423	1/5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G
<i>EMP3</i>	1/423	1/5	epithelial membrane protein 3
<i>EP400</i>	1/423	1/5	E1A binding protein p400
<i>EPB41L2</i>	1/423	1/5	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2
<i>EPRS</i>	1/423	1/5	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase
<i>ERCC1</i>	1/423	1/5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
<i>ESRRA</i>	1/423	1/5	estrogen-related receptor alpha
<i>EXOC3</i>	1/423	1/5	exocyst complex component 3
<i>EXOC7</i>	1/423	1/5	exocyst complex component 7
<i>EXOSC2</i>	1/423	1/5	exosome component 2
<i>FAM162A</i>	1/423	1/5	family with sequence similarity 162, member A
<i>FAM178A</i>	1/423	1/5	family with sequence similarity 178, member A
<i>FAM21C</i>	1/423	1/5	family with sequence similarity 21, member C
<i>FAM98C</i>	1/423	1/5	family with sequence similarity 98, member C
<i>FANCF</i>	1/423	1/5	Fanconi anemia, complementation group F

<i>FANCL</i>	1/423	1/5	Fanconi anemia, complementation group L
<i>FHIT</i>	1/423	1/5	fragile histidine triad gene
<i>FIP1L1</i>	1/423	1/5	FIP1 like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>GALNT1</i>	1/423	1/5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)
<i>GLDC</i>	1/423	1/5	glycine dehydrogenase (decarboxylating)
<i>GLTSCR2</i>	1/423	1/5	glioma tumor suppressor candidate region gene 2
<i>GNAI1</i>	1/423	1/5	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
<i>GNPDA2</i>	1/423	1/5	glucosamine-6-phosphate deaminase 2
<i>GNS</i>	1/423	1/5	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
<i>GPR115</i>	1/423	1/5	G protein-coupled receptor 115
<i>GRB14</i>	1/423	1/5	growth factor receptor-bound protein 14
<i>H2AFV</i>	1/423	1/5	H2A histone family, member V
<i>HARS</i>	1/423	1/5	histidyl-tRNA synthetase
<i>HAT1</i>	1/423	1/5	histone acetyltransferase 1
<i>HDHD2</i>	1/423	1/5	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2
<i>HINT1</i>	1/423	1/5	histidine triad nucleotide binding protein 1
<i>HIST1H2AC</i>	1/423	1/5	histone cluster 1, H2ac
<i>HMBS</i>	1/423	1/5	hydroxymethylbilane synthase
<i>HNRNPK</i>	1/423	1/5	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
<i>HPRT1</i>	1/423	1/5	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
<i>HSCB</i>	1/423	1/5	HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog ( <i>E. coli</i> )
<i>HSDL2</i>	1/423	1/5	hydroxysteroid dehydrogenase like 2
<i>IFT20</i>	1/423	1/5	intraflagellar transport 20 homolog ( <i>Chlamydomonas</i> )
<i>IL10RB</i>	1/423	1/5	interleukin 10 receptor, beta
<i>JMJD8</i>	1/423	1/5	jumonji domain containing 8
<i>KDELRI</i>	1/423	1/5	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1
<i>KIF13A</i>	1/423	1/5	kinesin family member 13A
<i>KIF3B</i>	1/423	1/5	kinesin family member 3B
<i>KNTC1</i>	1/423	1/5	kinetochore associated 1
<i>KPNA2</i>	1/423	1/5	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)
<i>LYPLA1</i>	1/423	1/5	lysophospholipase I
<i>LYPLA2</i>	1/423	1/5	lysophospholipase II
<i>MCM3AP</i>	1/423	1/5	minichromosome maintenance complex component 3 associated protein
<i>MEGF9</i>	1/423	1/5	multiple EGF-like-domains 9
<i>METAP2</i>	1/423	1/5	methionyl aminopeptidase 2
<i>MMS19</i>	1/423	1/5	MMS19 nucleotide excision repair homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>MPDU1</i>	1/423	1/5	mannose-P-dolichol utilization defect 1
<i>MPI</i>	1/423	1/5	mannose phosphate isomerase

<i>MRAP2</i>	1/423	1/5	melanocortin 2 receptor accessory protein 2
<i>MRPL24</i>	1/423	1/5	mitochondrial ribosomal protein L24
<i>MRPL4</i>	1/423	1/5	mitochondrial ribosomal protein L4
<i>MRT04</i>	1/423	1/5	mRNA turnover 4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>MTHFD1</i>	1/423	1/5	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase
<i>MYL5</i>	1/423	1/5	myosin, light chain 5, regulatory
<i>MYL6</i>	1/423	1/5	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
<i>N4BP1</i>	1/423	1/5	NEDD4 binding protein 1
<i>NAA10</i>	1/423	1/5	N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit
<i>NAF1</i>	1/423	1/5	nuclear assembly factor 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>NAGA</i>	1/423	1/5	N-acetylgalactosaminidase, alpha-
<i>NCAPG2</i>	1/423	1/5	non-SMC condensin II complex, subunit G2
<i>NCBP2</i>	1/423	1/5	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa
<i>NCOR2</i>	1/423	1/5	nuclear receptor corepressor 2
<i>NDFIP2</i>	1/423	1/5	Nedd4 family interacting protein 2
<i>NDUFS4</i>	1/423	1/5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
<i>NLN</i>	1/423	1/5	neurolysin (metallopeptidase M3 family)
<i>NNMT</i>	1/423	1/5	nicotinamide N-methyltransferase
<i>NNT</i>	1/423	1/5	nicotinamide nucleotide transhydrogenase
<i>NOC2L</i>	1/423	1/5	nucleolar complex associated 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>NQO2</i>	1/423	1/5	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2
<i>NUDT18</i>	1/423	1/5	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 18
<i>NUDT2</i>	1/423	1/5	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2
<i>NXN</i>	1/423	1/5	nucleoredoxin
<i>NXPH4</i>	1/423	1/5	neurexophilin 4
<i>ODC1</i>	1/423	1/5	ornithine decarboxylase 1
<i>ODF2</i>	1/423	1/5	outer dense fiber of sperm tails 2
<i>OPA1</i>	1/423	1/5	optic atrophy 1 (autosomal dominant)
<i>OS9</i>	1/423	1/5	osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum lectin
<i>OSBPL10</i>	1/423	1/5	oxysterol binding protein-like 10
<i>OSGEP</i>	1/423	1/5	O-sialoglycoprotein endopeptidase
<i>P4HB</i>	1/423	1/5	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
<i>PCMI</i>	1/423	1/5	pericentriolar material 1
<i>PFKM</i>	1/423	1/5	phosphofructokinase, muscle
<i>PGRMC1</i>	1/423	1/5	progesterone receptor membrane component 1
<i>PIGK</i>	1/423	1/5	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K
<i>PMAIP1</i>	1/423	1/5	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
<i>PNPLA4</i>	1/423	1/5	patatin-like phospholipase domain containing 4

<i>POLA1</i>	1/423	1/5	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit
<i>POLRMT</i>	1/423	1/5	polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)
<i>PPIB</i>	1/423	1/5	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
<i>PPIE</i>	1/423	1/5	peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)
<i>PRDX3</i>	1/423	1/5	peroxiredoxin 3
<i>PRPF6</i>	1/423	1/5	PRP6 pre-mRNA processing factor 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>PSMC6</i>	1/423	1/5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6
<i>PTPLAD2</i>	1/423	1/5	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
<i>PWP1</i>	1/423	1/5	PWP1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>PXN</i>	1/423	1/5	paxillin
<i>PYCR1</i>	1/423	1/5	pyrroline-5-carboxylate reductase 1
<i>RARS</i>	1/423	1/5	arginyl-tRNA synthetase
<i>RBM47</i>	1/423	1/5	RNA binding motif protein 47
<i>REXO2</i>	1/423	1/5	REX2, RNA exonuclease 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>RHBDF2</i>	1/423	1/5	rhomoid 5 homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )
<i>RICTOR</i>	1/423	1/5	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2
<i>RPL17</i>	1/423	1/5	ribosomal protein L17
<i>RPL26L1</i>	1/423	1/5	ribosomal protein L26-like 1
<i>RPL3</i>	1/423	1/5	ribosomal protein L3
<i>RPL37A</i>	1/423	1/5	ribosomal protein L37a
<i>RPL5</i>	1/423	1/5	ribosomal protein L5
<i>RPS17</i>	1/423	1/5	ribosomal protein S17
<i>RPS20</i>	1/423	1/5	ribosomal protein S20
<i>RSRC2</i>	1/423	1/5	arginine/serine-rich coiled-coil 2
<i>SCARF1</i>	1/423	1/5	scavenger receptor class F, member 1
<i>SCO1</i>	1/423	1/5	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1 (yeast)
<i>SDAD1</i>	1/423	1/5	SDA1 domain containing 1
<i>SEC61A1</i>	1/423	1/5	Sec61 alpha 1 subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>SERPINE1</i>	1/423	1/5	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
<i>SIAE</i>	1/423	1/5	sialic acid acetyltransferase
<i>SLC16A13</i>	1/423	1/5	solute carrier family 16, member 13 (monocarboxylic acid transporter 13)
<i>SLC23A2</i>	1/423	1/5	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2
<i>SLC25A14</i>	1/423	1/5	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, brain), member 14
<i>SLC35E2</i>	1/423	1/5	solute carrier family 35, member E2
<i>SLC39A7</i>	1/423	1/5	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7
<i>SLC50A1</i>	1/423	1/5	solute carrier family 50 (sugar transporter), member 1
<i>SMN2</i>	1/423	1/5	survival of motor neuron 2, centromeric
<i>SNRNP200</i>	1/423	1/5	small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)

<i>SNRNP27</i>	1/423	1/5	small nuclear ribonucleoprotein 27kDa (U4/U6.U5)
<i>SNRPC</i>	1/423	1/5	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C
<i>SNRPD2</i>	1/423	1/5	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa
<i>SNRPE</i>	1/423	1/5	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E
<i>SNX2</i>	1/423	1/5	sorting nexin 2
<i>SNX30</i>	1/423	1/5	sorting nexin family member 30
<i>SPPL3</i>	1/423	1/5	signal peptide peptidase 3
<i>SPSB1</i>	1/423	1/5	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1
<i>SRBD1</i>	1/423	1/5	S1 RNA binding domain 1
<i>SRGAP1</i>	1/423	1/5	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1
<i>SSR4</i>	1/423	1/5	signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta)
<i>SUSD1</i>	1/423	1/5	sushi domain containing 1
<i>SV2A</i>	1/423	1/5	synaptic vesicle glycoprotein 2A
<i>SYMPK</i>	1/423	1/5	symplekin
<i>TACC2</i>	1/423	1/5	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
<i>TAX1BP1</i>	1/423	1/5	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1
<i>TCPI1L1</i>	1/423	1/5	t-complex 11 (mouse)-like 1
<i>TGS1</i>	1/423	1/5	trimethylguanosine synthase 1
<i>TMCO1</i>	1/423	1/5	transmembrane and coiled-coil domains 1
<i>TMEM183A</i>	1/423	1/5	transmembrane protein 183A
<i>TMEM50B</i>	1/423	1/5	transmembrane protein 50B
<i>TMX2</i>	1/423	1/5	thioredoxin-related transmembrane protein 2
<i>TNFAIP2</i>	1/423	1/5	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
<i>TRIB3</i>	1/423	1/5	tribbles homolog 3 (Drosophila)
<i>TSPYL2</i>	1/423	1/5	TSPY-like 2
<i>TXN</i>	1/423	1/5	thioredoxin
<i>UQCRC2</i>	1/423	1/5	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II
<i>UTP11L</i>	1/423	1/5	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)
<i>VPS54</i>	1/423	1/5	vacuolar protein sorting 54 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>WBSCR16</i>	1/423	1/5	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16
<i>WDR11</i>	1/423	1/5	WD repeat domain 11
<i>WDR18</i>	1/423	1/5	WD repeat domain 18
<i>WDR46</i>	1/423	1/5	WD repeat domain 46
<i>WDR92</i>	1/423	1/5	WD repeat domain 92
<i>ZDHHC7</i>	1/423	1/5	zinc finger, DHHC-type containing 7
<i>ZMPSTE24</i>	1/423	1/5	zinc metalloproteinase (STE24 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )

1. shRNA percentage: 四種細胞株(Huh7、A549、HeLa、SCM1)共同沒有比對到的 targeted shRNA sequence 的比例, 共同沒有比對到的 targeted shRNA sequence 有 423

個

2. clone percentage: 此基因被比對到的次數，每個基因有 5 個 targeted shRNA sequence





表 B、只有人類肝細胞癌細胞株 Huh7 沒有比對到的基因

Symbol	shRNA percentage <sup>1</sup>	Clone percentage <sup>2</sup>	Gene description
<i>AADAT</i>	1/334	1/5	aminoadipate aminotransferase
<i>ABCB7</i>	1/334	1/5	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
<i>ABHD12</i>	1/334	1/5	abhydrolase domain containing 12
<i>ABHD5</i>	1/334	1/5	abhydrolase domain containing 5
<i>ACO2</i>	1/334	1/5	aconitase 2, mitochondrial
<i>ADIPOR1</i>	1/334	1/5	adiponectin receptor 1
<i>ADORA2B</i>	1/334	1/5	adenosine A2b receptor
<i>ADRM1</i>	1/334	1/5	adhesion regulating molecule 1
<i>AGRN</i>	1/334	1/5	agrin
<i>AHRR</i>	1/334	1/5	aryl-hydrocarbon receptor repressor
<i>AK3</i>	1/334	1/5	adenylate kinase 3
<i>AK4</i>	1/334	1/5	adenylate kinase 4
<i>AKAP12</i>	1/334	1/5	A kinase (PRKA) anchor protein 12
<i>ALDH18A1</i>	1/334	1/5	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1
<i>AMOTL1</i>	1/334	1/5	angiominin like 1
<i>ANKHD1</i>	1/334	1/5	ankyrin repeat and KH domain containing 1
<i>ANKRD11</i>	1/334	1/5	ankyrin repeat domain 11
<i>ANKRD13A</i>	1/334	1/5	ankyrin repeat domain 13A
<i>ANXA1</i>	1/334	1/5	annexin A1
<i>APIAR</i>	1/334	1/5	adaptor-related protein complex 1 associated regulatory protein
<i>APIG1</i>	1/334	1/5	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit
<i>APRT</i>	1/334	1/5	adenine phosphoribosyltransferase
<i>ARF4</i>	1/334	1/5	ADP-ribosylation factor 4
<i>ARG2</i>	1/334	1/5	arginase, type II
<i>ARHGAP19</i>	1/334	1/5	Rho GTPase activating protein 19
<i>ARHGDIG</i>	1/334	1/5	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma
<i>ARHGEF11</i>	1/334	1/5	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11
<i>ARL2</i>	1/334	1/5	ADP-ribosylation factor-like 2
<i>ARMCI</i>	1/334	1/5	armadillo repeat containing 1
<i>ATMIN</i>	1/334	1/5	ATM interactor
<i>ATP1B1</i>	1/334	1/5	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide
<i>ATP6AP1</i>	1/334	1/5	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 1
<i>AUH</i>	1/334	1/5	AU RNA binding protein/enoyl-CoA hydratase
<i>BOLA3</i>	1/334	1/5	bolA homolog 3 (E. coli)

<i>BRIP1</i>	1/334	1/5	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
<i>BTBD11</i>	1/334	1/5	BTB (POZ) domain containing 11
<i>BZW2</i>	1/334	1/5	basic leucine zipper and W2 domains 2
<i>C15orf24</i>	1/334	1/5	chromosome 15 open reading frame 24
<i>C21orf45</i>	1/334	1/5	chromosome 21 open reading frame 45
<i>C21orf70</i>	1/334	1/5	chromosome 21 open reading frame 70
<i>C5orf28</i>	1/334	1/5	chromosome 5 open reading frame 28
<i>C7orf27</i>	1/334	1/5	chromosome 7 open reading frame 27
<i>C9orf80</i>	1/334	1/5	chromosome 9 open reading frame 80
<i>C9orf91</i>	1/334	1/5	chromosome 9 open reading frame 91
<i>CAST</i>	1/334	1/5	calpastatin
<i>CCDC117</i>	1/334	1/5	coiled-coil domain containing 117
<i>CCDC34</i>	1/334	1/5	coiled-coil domain containing 34
<i>CCDC51</i>	1/334	1/5	coiled-coil domain containing 51
<i>CCNB2</i>	1/334	1/5	cyclin B2
<i>CD55</i>	1/334	1/5	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
<i>CDKN1A</i>	1/334	1/5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
<i>CEP63</i>	1/334	1/5	centrosomal protein 63kDa
<i>CEP68</i>	1/334	1/5	centrosomal protein 68kDa
<i>CES3</i>	1/334	1/5	carboxylesterase 3
<i>CFDP1</i>	1/334	1/5	craniofacial development protein 1
<i>CHST7</i>	1/334	1/5	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7
<i>COPG</i>	1/334	1/5	coatamer protein complex, subunit gamma
<i>COPS4</i>	1/334	1/5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 4 (Arabidopsis)
<i>COPS6</i>	1/334	1/5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 (Arabidopsis)
<i>COPZ1</i>	1/334	1/5	coatamer protein complex, subunit zeta 1
<i>COPZ2</i>	1/334	1/5	coatamer protein complex, subunit zeta 2
<i>CORO2A</i>	1/334	1/5	coronin, actin binding protein, 2A
<i>COX7A2</i>	1/334	1/5	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)
<i>CPLX2</i>	1/334	1/5	complexin 2
<i>CSE1L</i>	1/334	1/5	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
<i>CYBA</i>	1/334	1/5	cytochrome b-245, alpha polypeptide
<i>CYC1</i>	1/334	1/5	cytochrome c-1
<i>DAP</i>	1/334	1/5	death-associated protein
<i>DDX54</i>	1/334	1/5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54
<i>DDX56</i>	1/334	1/5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56
<i>DERL2</i>	1/334	1/5	Der1-like domain family, member 2

<i>DHX57</i>	1/334	1/5	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57
<i>DNAJC21</i>	1/334	1/5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 21
<i>DPM2</i>	1/334	1/5	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit
<i>DTL</i>	1/334	1/5	denticleless homolog (Drosophila)
<i>DUS4L</i>	1/334	1/5	dihydrouridine synthase 4-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>DYNC1L1</i>	1/334	1/5	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1
<i>ECHS1</i>	1/334	1/5	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial
<i>EEF1B2</i>	1/334	1/5	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
<i>EID1</i>	1/334	1/5	EP300 interacting inhibitor of differentiation 1
<i>EIF1AY</i>	1/334	1/5	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked
<i>EIF2B3</i>	1/334	1/5	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa
<i>EIF2B5</i>	1/334	1/5	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon, 82kDa
<i>ENAH</i>	1/334	1/5	enabled homolog (Drosophila)
<i>ENG</i>	1/334	1/5	endoglin
<i>ERBB2IP</i>	1/334	1/5	erbb2 interacting protein
<i>ESD</i>	1/334	1/5	esterase D
<i>EXOSC4</i>	1/334	1/5	exosome component 4
<i>EXOSC5</i>	1/334	1/5	exosome component 5
<i>EXOSC8</i>	1/334	1/5	exosome component 8
<i>EXTL2</i>	1/334	1/5	exostoses (multiple)-like 2
<i>FAM177A1</i>	1/334	1/5	family with sequence similarity 177, member A1
<i>FARSA</i>	1/334	1/5	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit
<i>FASTKD5</i>	1/334	1/5	FAST kinase domains 5
<i>FBLN7</i>	1/334	1/5	fibulin 7
<i>FNDC3B</i>	1/334	1/5	fibronectin type III domain containing 3B
<i>FPGS</i>	1/334	1/5	folylpolyglutamate synthase
<i>GAS8</i>	1/334	1/5	growth arrest-specific 8
<i>GFRA1</i>	1/334	1/5	GDNF family receptor alpha 1
<i>GINS4</i>	1/334	1/5	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)
<i>GLT25D1</i>	1/334	1/5	glycosyltransferase 25 domain containing 1
<i>GNAI1</i>	1/334	1/5	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
<i>GORASP2</i>	1/334	1/5	golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa
<i>GOT2</i>	1/334	1/5	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)
<i>GPATCH1</i>	1/334	1/5	G patch domain containing 1
<i>GPATCH3</i>	1/334	1/5	G patch domain containing 3
<i>GPI</i>	1/334	1/5	glucose-6-phosphate isomerase
<i>GPN1</i>	1/334	1/5	GPN-loop GTPase 1

<i>GPS1</i>	1/334	1/5	G protein pathway suppressor 1
<i>GRWD1</i>	1/334	1/5	glutamate-rich WD repeat containing 1
<i>GSPT1</i>	1/334	1/5	G1 to S phase transition 1
<i>GTF3C6</i>	1/334	1/5	general transcription factor IIIC, polypeptide 6, alpha 35kDa
<i>GTPBP4</i>	1/334	1/5	GTP binding protein 4
<i>GUF1</i>	1/334	1/5	GUF1 GTPase homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>GYG2</i>	1/334	1/5	glycogenin 2
<i>HEATR1</i>	1/334	1/5	HEAT repeat containing 1
<i>HINT2</i>	1/334	1/5	histidine triad nucleotide binding protein 2
<i>HMOX2</i>	1/334	1/5	heme oxygenase (decycling) 2
<i>HNRNPK</i>	1/334	1/5	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
<i>HSDL2</i>	1/334	1/5	hydroxysteroid dehydrogenase like 2
<i>IFIH1</i>	1/334	1/5	interferon induced with helicase C domain 1
<i>IFT88</i>	1/334	1/5	intraflagellar transport 88 homolog ( <i>Chlamydomonas</i> )
<i>IGF2BP3</i>	1/334	1/5	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
<i>IL1R1</i>	1/334	1/5	interleukin 1 receptor, type I
<i>IMMT</i>	1/334	1/5	inner membrane protein, mitochondrial
<i>IMPA2</i>	1/334	1/5	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2
<i>ITGB5</i>	1/334	1/5	integrin, beta 5
<i>JMJD6</i>	1/334	1/5	jumonji domain containing 6
<i>JUP</i>	1/334	1/5	junction plakoglobin
<i>KBTBD6</i>	1/334	1/5	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 6
<i>KRT17</i>	1/334	1/5	keratin 17
<i>LASP1</i>	1/334	1/5	LIM and SH3 protein 1
<i>LIG3</i>	1/334	1/5	ligase III, DNA, ATP-dependent
<i>LOC221710</i>	1/334	1/5	hypothetical protein LOC221710
<i>LOC388817</i>	1/334	1/5	peptidylprolyl isomerase A-like
<i>LRPAP1</i>	1/334	1/5	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1
<i>LSM12</i>	1/334	1/5	LSM12 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>LSM4</i>	1/334	1/5	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>MAEA</i>	1/334	1/5	macrophage erythroblast attacher
<i>MAT2B</i>	1/334	1/5	methionine adenosyltransferase II, beta
<i>MBNL2</i>	1/334	1/5	muscleblind-like 2 ( <i>Drosophila</i> )
<i>MCCCI</i>	1/334	1/5	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha)
<i>MCM3AP</i>	1/334	1/5	minichromosome maintenance complex component 3 associated protein
<i>MDK</i>	1/334	1/5	midkine (neurite growth-promoting factor 2)
<i>MFSD1</i>	1/334	1/5	major facilitator superfamily domain containing 1

<i>MGAM</i>	1/334	1/5	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)
<i>MGLL</i>	1/334	1/5	monoglyceride lipase
<i>MPDU1</i>	1/334	1/5	mannose-P-dolichol utilization defect 1
<i>MPHOSPH6</i>	1/334	1/5	M-phase phosphoprotein 6
<i>MPPE1</i>	1/334	1/5	metallophosphoesterase 1
<i>MRAP2</i>	1/334	1/5	melanocortin 2 receptor accessory protein 2
<i>MRPL23</i>	1/334	1/5	mitochondrial ribosomal protein L23
<i>MRPS33</i>	1/334	1/5	mitochondrial ribosomal protein S33
<i>MRPS35</i>	1/334	1/5	mitochondrial ribosomal protein S35
<i>MTMR12</i>	1/334	1/5	myotubularin related protein 12
<i>MYL12A</i>	1/334	1/5	myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric
<i>NCBP2</i>	1/334	1/5	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa
<i>NDUFS2</i>	1/334	1/5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
<i>NECAB3</i>	1/334	1/5	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3
<i>NFU1</i>	1/334	1/5	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>NICN1</i>	1/334	1/5	nicolin 1
<i>NNMT</i>	1/334	1/5	nicotinamide N-methyltransferase
<i>NOC2L</i>	1/334	1/5	nucleolar complex associated 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>NOL8</i>	1/334	1/5	nucleolar protein 8
<i>NRIP3</i>	1/334	1/5	nuclear receptor interacting protein 3
<i>NSUN4</i>	1/334	1/5	NOP2/Sun domain family, member 4
<i>NT5C3L</i>	1/334	1/5	5'-nucleotidase, cytosolic III-like
<i>NT5DC1</i>	1/334	1/5	5'-nucleotidase domain containing 1
<i>NUDT15</i>	1/334	1/5	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
<i>NUMA1</i>	1/334	1/5	nuclear mitotic apparatus protein 1
<i>OCIAD2</i>	1/334	1/5	OCIA domain containing 2
<i>OGT</i>	1/334	1/5	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)
<i>OSBPL11</i>	1/334	1/5	oxysterol binding protein-like 11
<i>OSGEP</i>	1/334	1/5	O-sialoglycoprotein endopeptidase
<i>P4HB</i>	1/334	1/5	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
<i>PAFAH1B1</i>	1/334	1/5	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kDa)
<i>PARVB</i>	1/334	1/5	parvin, beta
<i>PCDH18</i>	1/334	1/5	protocadherin 18
<i>PCDH7</i>	1/334	1/5	protocadherin 7
<i>PCDH9</i>	1/334	1/5	protocadherin 9
<i>PERP</i>	1/334	1/5	PERP, TP53 apoptosis effector

<i>PFAS</i>	1/334	1/5	phosphoribosylformylglycinamide synthase
<i>PFN2</i>	1/334	1/5	profilin 2
<i>PIGK</i>	1/334	1/5	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K
<i>PLP2</i>	1/334	1/5	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)
<i>PMM1</i>	1/334	1/5	phosphomannomutase 1
<i>PNN</i>	1/334	1/5	pinin, desmosome associated protein
<i>PNP</i>	1/334	1/5	purine nucleoside phosphorylase
<i>PNPLA4</i>	1/334	1/5	patatin-like phospholipase domain containing 4
<i>PPIA</i>	1/334	1/5	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
<i>PRPF3</i>	1/334	1/5	PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (S. cerevisiae)
<i>PSMC4</i>	1/334	1/5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4
<i>PSMC6</i>	1/334	1/5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6
<i>PSMD8</i>	1/334	1/5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8
<i>PSME1</i>	1/334	1/5	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
<i>PSME3</i>	1/334	1/5	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)
<i>PTGES2</i>	1/334	1/5	prostaglandin E synthase 2
<i>RAB27B</i>	1/334	1/5	RAB27B, member RAS oncogene family
<i>RAB38</i>	1/334	1/5	RAB38, member RAS oncogene family
<i>RAB5B</i>	1/334	1/5	RAB5B, member RAS oncogene family
<i>RAD51API</i>	1/334	1/5	RAD51 associated protein 1
<i>RALBP1</i>	1/334	1/5	ralA binding protein 1
<i>RBM47</i>	1/334	1/5	RNA binding motif protein 47
<i>RGL1</i>	1/334	1/5	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1
<i>RGS10</i>	1/334	1/5	regulator of G-protein signaling 10
<i>RICTOR</i>	1/334	1/5	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2
<i>RNPEP</i>	1/334	1/5	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)
<i>RPL23</i>	1/334	1/5	ribosomal protein L23
<i>RPL26L1</i>	1/334	1/5	ribosomal protein L26-like 1
<i>RPL4</i>	1/334	1/5	ribosomal protein L4
<i>RPL5</i>	1/334	1/5	ribosomal protein L5
<i>RPP38</i>	1/334	1/5	ribonuclease P/MRP 38kDa subunit
<i>RPP40</i>	1/334	1/5	ribonuclease P/MRP 40kDa subunit
<i>RPS12</i>	1/334	1/5	ribosomal protein S12
<i>RPS17</i>	1/334	1/5	ribosomal protein S17
<i>RPS20</i>	1/334	1/5	ribosomal protein S20
<i>RPS5</i>	1/334	1/5	ribosomal protein S5

<i>RRAGA</i>	1/334	1/5	Ras-related GTP binding A
<i>RRM2</i>	1/334	1/5	ribonucleotide reductase M2
<i>RRP12</i>	1/334	1/5	ribosomal RNA processing 12 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>RSL24D1</i>	1/334	1/5	ribosomal L24 domain containing 1
<i>SASS6</i>	1/334	1/5	spindle assembly 6 homolog ( <i>C. elegans</i> )
<i>SCARF1</i>	1/334	1/5	scavenger receptor class F, member 1
<i>SCCPDH</i>	1/334	1/5	saccharopine dehydrogenase (putative)
<i>SCRN3</i>	1/334	1/5	secernin 3
<i>SEC11A</i>	1/334	1/5	SEC11 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>SEC63</i>	1/334	1/5	SEC63 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>SETD8</i>	1/334	1/5	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8
<i>SEZ6L2</i>	1/334	1/5	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2
<i>SFT2D1</i>	1/334	1/5	SFT2 domain containing 1
<i>SH3BGRL2</i>	1/334	1/5	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2
<i>SLC22A4</i>	1/334	1/5	solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4
<i>SLC25A43</i>	1/334	1/5	solute carrier family 25, member 43
<i>SLC35B4</i>	1/334	1/5	solute carrier family 35, member B4
<i>SLC35E1</i>	1/334	1/5	solute carrier family 35, member E1
<i>SLC35F1</i>	1/334	1/5	solute carrier family 35, member F1
<i>SLC39A7</i>	1/334	1/5	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7
<i>SLC6A15</i>	1/334	1/5	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15
<i>SLC7A5</i>	1/334	1/5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 5
<i>SLIT2</i>	1/334	1/5	slit homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )
<i>SMC2</i>	1/334	1/5	structural maintenance of chromosomes 2
<i>SMS</i>	1/334	1/5	spermine synthase
<i>SNRPD2</i>	1/334	1/5	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa
<i>SNX8</i>	1/334	1/5	sorting nexin 8
<i>SPPL2A</i>	1/334	1/5	signal peptide peptidase-like 2A
<i>SRM</i>	1/334	1/5	spermidine synthase
<i>SSR2</i>	1/334	1/5	signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein beta)
<i>ST3GAL5</i>	1/334	1/5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5
<i>ST3GAL6</i>	1/334	1/5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
<i>SUPV3L1</i>	1/334	1/5	suppressor of var1, 3-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>SUPV3L1</i>	1/334	1/5	suppressor of var1, 3-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
<i>SUSD1</i>	1/334	1/5	sushi domain containing 1
<i>SWAP70</i>	1/334	1/5	SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit
<i>TCP11L1</i>	1/334	1/5	t-complex 11 (mouse)-like 1

<i>TGS1</i>	1/334	1/5	trimethylguanosine synthase 1
<i>THADA</i>	1/334	1/5	thyroid adenoma associated
<i>TIMELESS</i>	1/334	1/5	timeless homolog (Drosophila)
<i>TMCO1</i>	1/334	1/5	transmembrane and coiled-coil domains 1
<i>TMED2</i>	1/334	1/5	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2
<i>TMEM168</i>	1/334	1/5	transmembrane protein 168
<i>TNKS1BP1</i>	1/334	1/5	tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa
<i>TOP2A</i>	1/334	1/5	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
<i>TOPBP1</i>	1/334	1/5	topoisomerase (DNA) II binding protein 1
<i>TPD52L3</i>	1/334	1/5	tumor protein D52-like 3
<i>TUBB</i>	1/334	1/5	tubulin, beta
<i>TUBB2C</i>	1/334	1/5	tubulin, beta 2C
<i>TUBGCP3</i>	1/334	1/5	tubulin, gamma complex associated protein 3
<i>TXNL4A</i>	1/334	1/5	thioredoxin-like 4A
<i>UCKL1</i>	1/334	1/5	uridine-cytidine kinase 1-like 1
<i>UQCRCQ</i>	1/334	1/5	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa
<i>USP22</i>	1/334	1/5	ubiquitin specific peptidase 22
<i>VANGL1</i>	1/334	1/5	vang-like 1 (van gogh, Drosophila)
<i>WDR11</i>	1/334	1/5	WD repeat domain 11
<i>WDR77</i>	1/334	1/5	WD repeat domain 77
<i>WRB</i>	1/334	1/5	tryptophan rich basic protein
<i>ZBTB45</i>	1/334	1/5	zinc finger and BTB domain containing 45
<i>ZNF282</i>	1/334	1/5	zinc finger protein 282
<i>ZNF362</i>	1/334	1/5	zinc finger protein 362

1. shRNA percentage: 只有 Huh7 細胞株沒有比對到的 targeted shRNA sequence 的比例，只有 Huh7 細胞株沒有比對到的 targeted shRNA sequence 有 334 個
2. clone percentage: 此基因被比對到的次數，每個基因有 5 個 targeted shRNA sequence