



國立臺灣大學生物資源暨農學院生物科技研究所

碩士論文

Institute of Biotechnology

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

研究癌細胞中細胞訊息傳遞路徑之調控：探討 *CD36*

在肺癌的機制以及 miR-548ba 在食道癌的機制

To study the mechanism of cell signaling in cancer: *CD36*

in lung cancer and miR-548ba in esophageal cancer

謝正陞

Cheng-Sheng Hsieh

指導教授：蔡孟勳 博士

Advisor: Mong-Hsun Tsai, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August, 2022

致謝

回首四年的碩士生涯終於告一段落，雖然過程艱辛但從中收穫許多。特別感謝我的指導教授—蔡孟勳老師，給予我在實驗上及論文撰寫上的建議與訣竅；再來感謝賴亮全老師、陳立涵老師以及莊曜宇老師給予我在實驗上的協助與照顧，使得我能完成這份論文，然而這些求學過程中老師所給予的肺腑之言及累積的學習經歷我必定能將這些精華學以致用於未來。

再來要感謝的是永華學長、星光學長、政瑩學長、玟君學姊、韻茹學姊、韋霓學姊以及航凱學長，提供實驗上的經驗及觀點；最後也非常感謝雨恩學長、語謙學姊、立儀、信和、雅婷、光彧、峻魁、兆榮、資恆以及盈喬，在實驗室中的噓寒問暖照料以外，更珍貴的是彼此意見交流從中增廣見聞的經驗，最後感謝若瑄，雖然你不是本科系，因此論文充斥許多妳看不懂的專有名詞，但妳還是會幫我看論文語句還有邏輯是否通順，且常常陪我一起準備論文到凌晨，此外每當我情緒低落時，妳的陪伴給予我依靠，讓我很快地打起精神來繼續往下走。

碩班只是人生的旅途裡其中的一個停靠站，未來我將會運用這四年所學應用於未來人生與職場中，由衷感謝實驗室裡的每位師長、夥伴及設備，祝福大家在未來的人生旅途中，一切順遂。


摘要



根據政府歷年統計資料顯示，從 70 年代開始至今癌症是台灣十大死因之首且癌症發生數連年增加，因此目前癌症發生最新統計資料顯示，和西元 2018 年相比，西元 2019 年台灣罹癌個數增加最多的是肺癌，且不論在台灣男性以及在台灣女性肺癌癌症發生數位居前三，此外根據最新癌症死亡數統計指出在西元 2021 年死亡率最高的癌症是肺癌。然而有些癌症好發於台灣男性，在西元 2019 年十大癌症發生率性別比差異最大的癌症為食道癌，男性罹患食道癌的機率為女性的 15 倍。雖然已經有許多研究探討肺癌以及食道癌發生之相關細胞訊號途徑，但是癌症細胞訊號途徑調控很複雜，所以本研究會分別探討 *CD36* 以及 miR-548ba 對肺癌以及食道癌細胞癌化之機制。

實驗室先前已經針對肺癌患者進行研究指出相較於正常肺細胞，*CD36* 低表現量可能在肺癌中扮演重要角色，因此本研究探討 *CD36* 低表現量於肺癌生長之影響及機制。首先我們發現 *CD36* 基因靜默(Silencing)會抑制 CL1-0 增生能力(Proliferation)，然而 *CD36* 大量表現(Overexpression)不會改變 CL1-5 的增生能力，但 *CD36* 大量表現會抑制 H1299 的增生能力。在細胞遷移能力實驗當中，使用 Transwell 發現 *CD36* 基因靜默會促進 CL1-0 遷移能力(Migration)，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 以及 H1299 的遷移能力。在細胞凋亡實驗(Cell Apoptosis Assay)當中，*CD36* 基因靜默會降低 CL1-0 死亡速率，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 的死亡速率。最後 *CD36* 基因靜默會減少 CL1-0 吞噬之葡萄糖量以及抑制醣解作用(Glycolysis)活性。

除了基因之外，許多研究也指出小分子核糖核酸(microRNA, miRNA)在各種人類癌症中也扮演重要的角色。因此實驗室先前透過次世代定序(Next-Generation Sequencing, NGS)以及即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, QPCR)驗證後發現相較於正常食道細胞，miR-548ba 高表現量可能在食道癌中扮演重要角色，因此本研究探討 miR-548ba 高表現量於食道癌生長之



影響及機制。由實驗結果發現 miR-548ba 大量表現會促進 CE81T 的增生能力以及增加 CE81T 細胞群落數目，但不會改變 CE81T 遷移能力。接著使用預測 miRNA 目標基因的軟體以及即時定量聚合酶連鎖反應驗證的發現，*MOB1B* 可能是 miR-548ba 的目標基因，然而 *MOB1B* 是否是 miR-548ba 的直接目標基因仍需後續實驗驗證。

綜合來看，首先 *CD36* 在不同肺癌細胞中所造成之細胞生理功能的影響也不同，此外 miR-548ba 會促進 CE81T 細胞增生能力，期望透過本研究能提供後人新的研究方向以找出新的肺癌以及食道癌致癌機制。

關鍵字：肺癌、食道癌、*CD36*、miR-548ba、*MOB1B*、細胞增生、細胞遷移。

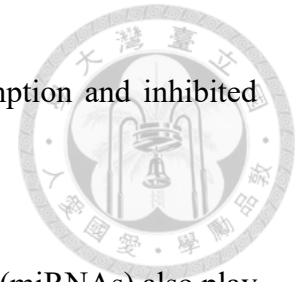
Abstract



According to the statistics released by government in the past few years, cancer is the majority of dead reason from 1980s to present in Taiwan. Moreover, the cancer incidence is increasing year after year. Based on the latest statistics of cancer incidence and cancer death released by the Health Promotion Administration in 2019 and 2021 respectively, lung cancer ranked the top three cancer incidence and cancer death in both gender in Taiwan. Additionally, the esophageal cancer incidence in male was fifteen times as much as the esophageal cancer incidence in female. Although most of cancer research focus on lung and esophageal carcinogenesis related cell signaling, the regulation of cancer cell signaling is complex. Thus, in this study, I would focus on the function of *CD36* and miR-548ba in lung and esophageal carcinogenesis respectively.

In our lab, previous study found that compared with normal lung cells, *CD36* low expression may play an important role in lung cancer. Therefore, we investigated the regulatory mechanism of *CD36* low expression in lung cancer. First, we found that *CD36* silencing inhibited CL1-0 proliferation, whereas *CD36* overexpression did not alter CL1-5 proliferation, but *CD36* overexpression inhibited H1299 proliferation. Using Transwell, we found that *CD36* silencing promoted CL1-0 migration, but *CD36* overexpression did not change CL1-5 and H1299 migration. In cell apoptosis assays, *CD36* silencing reduced the death rate of CL1-0, whereas *CD36* overexpression did not alter the death rate of CL1-

5. Finally, *CD36* silencing reduced the amount of glucose consumption and inhibited glycolysis activity in CL1-0.



Except for genes, many studies had also found that microRNAs (miRNAs) also play important roles in various human cancers. Therefore, in our lab previously found that the high expression of miR-548ba may play an important role in esophageal cancer compared with normal esophageal cells by next-generation sequencing and real-time quantitative polymerase chain reaction. Therefore, we investigated the regulatory mechanism of miR-548ba high expression in esophageal cancer. First, it was found that miR-548ba overexpression promoted CE81T proliferation and increases CE81T colony number, but did not change CE81T migration. Then, using the software for predicting miRNA target genes and the verification by real-time quantitative polymerase chain reaction and found that *MOB1B* may be the target gene of miR-548ba, but whether *MOB1B* is the direct target gene of miR-548ba still needs to be verified by subsequent experiments.

Overall, my study indicated that *CD36* had diverse effects on the physiological functions in different lung cancer cells, and miR-548ba could promote CE81T proliferation. Therefore, it is hoped that it can provide new aspects for researchers to find new lung and esophageal carcinogenesis mechanism in this study.

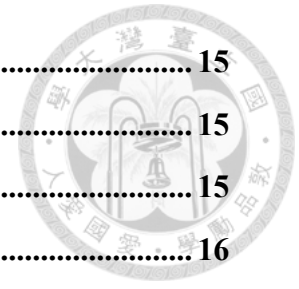
Keyword: Lung cancer, Esophageal cancer, *CD36*, miR-548ba, *MOB1B*, Cell proliferation, Cell migration.




目錄



致謝	i
摘要	ii
Abstract	iv
目錄	vii
圖目錄	x
表目錄	xi
1.前言	1
1.1 台灣肺癌及食道癌現況以及其介紹	1
1.2 高通量技術介紹以及其應用	2
1.2.1 去氧核糖核酸微陣列介紹及應用	2
1.2.2 次世代定序介紹以及應用	5
1.2.3 高通量技術挑選基因之策略以及後續分析	7
1.3 基因在癌症中所扮演的角色	8
1.3.1 <i>CD36</i> 在癌症中所扮演的腳色.....	8
1.3.2 小分子核糖核酸介紹	9
1.3.3 小分子核糖核酸在癌症所扮演的角色	9
1.3.4 小分子核糖核酸在食道癌所扮演的角色	10
2.基本原理以及目的	11
3.材料與方法	12
3.1 培養液配置	12
3.1.1 DMEM	12
3.1.2 RPMI 1640	12
3.2 磷酸鹽緩衝生理食鹽水配置	12
3.3 細胞培養	12
3.3.1 人類胚胎腎臟細胞(HEK293T).....	13
3.3.2 人類肺癌細胞(CL1-0、CL1-5、H1299).....	13
3.3.3 人類食道癌細胞(KYSE70、KYSE410).....	14
3.3.4 人類食道癌細胞(CE81T、CE81T 1-4).....	14



3.4 目標質體製備	15
3.5 慢病毒製備	15
3.6 慢病毒感染	15
3.7 小分子核醣核酸轉染	16
3.8 核醣核酸萃取	16
3.9 反轉錄聚合酶連鎖反應	17
3.9.1 基因	17
3.9.2 小分子核醣核酸	17
3.10 即時定量聚合酶連鎖反應	17
3.10.1 基因	18
3.10.2 小分子核醣核酸	18
3.11 蛋白質萃取	18
3.12 西方墨點法	18
3.12.1 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳配置	19
3.12.2 跑膠	19
3.12.3 轉漬	19
3.12.4 免疫染色	20
3.13 細胞增生實驗	20
3.14 細胞遷移實驗	20
3.15 細胞凋亡實驗	21
3.16 細胞群落形成實驗	21
3.17 細胞葡萄糖吞噬實驗	21
3.18 統計方法	21
4. 結果	23
4.1 偵測 <i>CD36</i> 在不同肺癌細胞之表現量	23
4.2 在 CL1-0 以及 CL1-5 改變 <i>CD36</i> 核醣核酸以及蛋白質表現量	23
4.3 探討在不同肺癌細胞中 <i>CD36</i> 對細胞增生能力以及死亡速率的影響	24
4.4 探討在不同肺癌細胞中 <i>CD36</i> 對細胞遷移能力的影響	25
4.5 探討 <i>CD36</i> 對 CL1-0 葡萄糖吞噬以及醣解作用活性的影響	25



4.6 偵測 miR-548ba 在不同食道癌細胞之表現量	25
4.7 在不同食道癌細胞改變 miR-548ba 核醣核酸表現量	26
4.8 探討在不同食道癌細胞中 miR-548ba 對細胞增生能力的影響	26
4.9 探討 miR-548ba 對 CE81T 細胞遷移能力的影響	26
4.10 探討 miR-548ba 可能的目標基因	26
5. 討論	28
5.1 探討 <i>CD36</i> 基因靜默會促進 CL1-0 遷移能力，但 <i>CD36</i> 大量表現不會改變 CL1-5 遷移能力的原因	28
5.2 探討 <i>CD36</i> 低表現量於肺癌扮演重要角色的原因	28
5.3 探討 <i>CD36</i> 對癌症醣解作用的影響	29
5.4 探討在食道癌 <i>LIFR</i> 不是 miR-548ba 直接目標基因的原因	29
6. 結論	31
圖	32
表	44
7. 參考資料	48

圖目錄



圖一、使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測不同肺癌細胞 <i>CD36</i> 相對內生性表現量，且以 CL1-0 <i>CD36</i> 內生性表現量為基準。.....	32
圖二、改變 CL1-0 以及 CL1-5 <i>CD36</i> 表現量。.....	33
圖三、 <i>CD36</i> 對 CL1-0、CL1-5 以及 H1299 細胞增生能力以及死亡速率的造成不同影響。.....	34
圖四、 <i>CD36</i> 對 CL1-0、CL1-5 以及 H1299 細胞遷移能力造成不同影響。.....	35
圖五、 <i>CD36</i> 對 CL1-0 葡萄糖吞噬以及醣解作用活性影響。.....	36
圖六、使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測不同食道癌細胞 miR-548ba 內生性表現量。.....	37
圖七、改變 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 miR-548ba 核醣核酸表現量。.....	38
圖八、miR-548ba 對 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 細胞增生能力影響。.....	39
圖九、miR-548ba 對 CE81T 細胞遷移能力影響。.....	40
圖十、使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 可能的目標基因。.....	43

表目錄

表一、進行小分子核醣核酸反轉錄聚合酶連鎖反應所使用之相關引子。.....	44
表二、進行基因即時定量聚合酶連鎖反應所使用之相關引子。.....	45
表三、進行小分子核醣核酸即時定量聚合酶連鎖反應所使用之相關引子。.....	47






1. 前言

1.1 台灣肺癌及食道癌現況以及其介紹

根據衛生福利部國民健康署歷年統計資料顯示，從 70 年代開始癌症已蟬聯多年台灣十大死因之首，且癌症發生數連年增加。目前最新癌症發生數統計資料顯示，和西元 2018 年相比，西元 2019 年台灣罹癌人數多增加約 5000 人，若依癌症部位來看，增加數前五名為肺癌、大腸癌、女性乳癌、攝護腺癌以及皮膚癌，其中癌症個數增加最多的是肺癌，多增加 888 人，且在西元 2019 年，不論在台灣男性以及在台灣女性肺癌癌症發生數位居前三，此外根據最新癌症死亡數統計指出在西元 2021 年死亡率最高的癌症是肺癌，肺癌的預防以及後續相關治療成為一大難題。然而有些癌症好發於台灣男性，在西元 2019 年十大癌症發生率性別比差異最大的癌症為食道癌，男性罹患食道癌的機率為女性的 15 倍[1]。雖然已經有許多研究探討肺癌以及食道癌發生之相關細胞訊號途徑，但是癌症細胞訊號途徑調控很複雜，所以本研究會再探討新的調控肺癌以及食道癌發生之細胞訊號途徑。

肺癌的風險因子有很多，例如抽菸以及空氣汙染(PM2.5)、長期接觸特定氣體(氬氣)、有肺部相關疾病史、有家族遺傳性肺癌、長期吸入炒菜油煙以及高齡[2-5]。一般罹患肺癌的主要原因為抽菸[6]，然而根據國民健康署公開的最新統計資料顯示，2020 年台灣男女抽菸比例卻分別只有約 22% 以及 3% [7]，由此可知大部分女性肺癌患者都無抽菸史。雖然已經有些研究針對無抽菸的肺癌患者找出相關的致癌基因，例如 *TP53* [8]、*EGFR* [9] 以及 *KRAS* [10] 這些基因中特定鹼基點突變，或是 *PIK3CA* [11] 拷貝數變異(Copy Number Variant)均和肺癌發生有關，然而癌症細胞訊號途徑調控很複雜，此外在臨床上仍然發現有些肺癌並無上述基因特定鹼基突變或是拷貝數變異等現象發生[12]，因此需要透過更多研究找尋新的與肺癌發生相關之基因並了解其機制。



食道沒有神經系統，因此癌症初期幾乎沒有任何感覺，然而進入中晚期，當腫瘤大到壓迫食道才會明顯症狀產生，且多半也轉移，因此食道癌的預後不佳[13-16]。雖然已經有些研究針對食道癌患者找出相關的致癌基因，例如除了 TP53[17]之外，FAM135B 特定鹼基點突變[18]，或是 GATA6 [19]以及 CDK6 [20]拷貝數變異和食道癌發生有關，然而癌症不會只受單一細胞訊號途徑調控，因此需要透過更多研究找尋新的與食道癌發生相關之基因並了解其機制。

1.2 高通量技術介紹以及其應用

雖然需要透過更多研究要找出新的和肺癌以及食道癌發生有關的基因並了解其機制，但是目前人體已知約 2 萬個基因，首先如何有效地以及快速地找出相關的基因是一大難題。人類基因體計畫當初使用第一定序總共花了 30 億美金以及 15 年的時間才正式完成，但現今使用高通量技術則可以在幾天內分析完成且花費也大幅減少。透過高通量技術，研究員在短時間內可一次獲得大量基因資訊，以進行大數據資料分析，因為其方便性，使得近年來高通量技術被大量運用在癌症研究上，期望透過高通量技術能更快速地發現更多和癌症相關之致癌基因並了解其機制，並用於癌症檢測以幫助醫師精準且快速地針對治療方法以及預後做評估，朝向個人化精準醫療[21-24]。

1.2.1 去氧核糖核酸微陣列介紹及應用

傳統的基因檢測是一個個基因進行即時定量聚合酶連鎖反應以得知其表現量，然而此方法只能一次知道一個甚至數個基因的表現量，人類目前已知基因約 2 萬個，如果 2 萬個基因一個個進行即時定量聚合酶連鎖反應則要花非常多的時間才能完成，但透過去氧核糖核酸微陣列(DNA Microarray)則可以讓研究人員更快速地一次得知大量基因的表現量，且也大幅縮短了實驗的操作時間、空間以及消耗。去氧核糖核酸微陣列為主要的高通量技術之一，其最初目的為基因檢測，檢測方法為以該基因特定序列作為探針(Probe)，樣本作為目標(Target)，偵測探針以及目標去

氧核醣核酸是否會雜合。以下為去氧核醣核酸微陣列操作流程以及簡略說明[22, 25-27]：

- A. 信使核醣核酸(Messenger RNA, mRNA)萃取：生物中心法則為去氧核醣核酸轉錄產生信使核醣核酸再轉譯產生蛋白質，因為信使核醣核酸以及蛋白質保有原本去氧核醣核酸的遺傳訊息，所以我們可以透過信使核醣核酸或是蛋白質的表現量以得知此基因表現量為何，也可以透過信使核醣核酸或是蛋白質的表現量比較兩個不同表現型之基因表現量差異，例如同器官之正常組織以及癌細胞。傳統信使核醣核酸萃取法是以酚-氯仿(Phenol-Chloroform)，然而因為毒性高，所以現今以 Trizol-1-溴-3-氯丙烷(1-Bromo-3-Chloropropane, BCP)取代之。
- B. 產生帶有螢光標記之互補去氧核醣核酸(Complementary DNA, cDNA)：因為信使核醣核酸不穩定易被分解，所以會將信使核醣核酸反轉錄產生有互補序列之去氧核醣核酸俗稱互補去氧核醣核酸，不僅穩定且保有遺傳訊息。此外為了得知雜合情形，因此需要利用螢光以量化。將螢光標記在互補去氧核醣核酸的方法可以分為直接(Direct)以及間接(Indirect)兩種方法。直接方法為加入帶有螢光分子，例如花青染料 3 (Cyanine 3, Cy3)或花青染料 5 (Cyanine 5, Cy5)的脫氧尿苷三磷酸(2'-deoxyuridine 5'-triphosphate, dUTP)，經由反轉錄產生帶有花青染料 3 或花青染料 5 的互補去氧核醣核酸。間接方法為加入額外帶有氨基(NH₂)的脫氧尿苷三磷酸後，經由反轉錄產生帶有氨基之互補去氧核醣核酸，接著再加入螢光染劑以置換氨基。
- C. 雜合反應：在雜合前要先確定探針以及目標去氧核醣核酸之濃度正確，濃度不對則雜合效率不佳，且探針量要充足以免訊號飽和。將適當濃度且等量的帶有不同螢光的二種互補去氧核醣核酸與微陣列上的目標去氧核醣核酸進行雜合反應。

D. 掃描雜合後的微陣列：雜合會釋放螢光，機器會依照每個點雜合的情況呈現每個點的螢光強度，接著再經過校正以及量化即可得知基因表現量。

去氧核糖核酸微陣列依照探針來源不同可分為 1. 互補去氧核糖核酸微陣列 (cDNA Microarray) 以及 2. 寡核苷酸微陣列 (Oligonucleotide Microarray)。互補去氧核糖核酸微陣列的去氧核糖核酸探針來自於聚合酶連鎖反應產物，所以片段長度為 500-2000 鹼基對 (Base Pair, bp)。雖然片段長導致雜合後的訊號強，但是也容易有非專一性雜合發生，導致偽陽性情形。為了改善此缺點，因而開發出寡核苷酸微陣列。寡核苷酸微陣列的去氧核糖核酸探針片段短，長度一般為 25-60 鹼基對且由化學合成產生，因此相比互補去氧核糖核酸微陣列較能避免非專一性雜合的發生，且因為是化學合成，所以事先需要知道該基因的特定完整序列。然而隨著科學研究越廣泛，對生物知識了解越多，發現探針長度 25-60 鹼基對仍有可能會有非專一性雜合的情形發生。為了能改善，因此後來有開發比 60 鹼基對更長之探針，使得探針專一性程度更高 [25, 26, 28]。雖然去氧核糖核酸微陣列最初的目的為基因檢測，但是隨著科學研究越廣泛，對生物知識了解越多，除了基因檢測外，去氧核糖核酸微陣列也可用於其他基因研究，以下是常見的去氧核糖核酸微陣列應用 [22, 25-28]：

- I. 基因研究：去氧核糖核酸微陣列最常見的應用是研究基因表現量是否顯著改變，例如用於癌症研究可了解同器官癌細胞相比正常細胞基因表現量改變情形，或是可了解癌細胞在化療成功後基因表現量改變情形。除了研究基因表現量顯著改變外，也可研究是否有甲基化、單核苷酸多態性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)、拷貝數變異以及和蛋白質交互作用。然而基因表現量改變不只在癌症發生，因此除了用於癌症研究之外，也可用於其他疾病研究，例如帕金森氏症。
- II. 藥品研發：因為去氧核糖核酸微陣列通量大以及快速的優點，所以可用於藥品研發，可以一次大量得知治療前後數千種基因表現量之變化，或是可以一次得知某藥物適合的劑量以及該劑量導致基因表現量改變情形。




III. 快速檢測：在了解癌症等其他重大疾病的致病機制後，可以利用去氧核糖核酸微陣列來快速檢測，以協助醫師快速的決定進行何種治療以及評估預後。

1.2.2 次世代定序介紹以及應用

除了去氧核糖核酸微陣列之外，另一個主要的高通量技術為次世代定序。次世代定序是以第一代定序方法為基礎所開發出來的新技術。第一代定序原理為在反應試劑中分別加入去氧核糖核酸聚合酶(DNA Polymerase)、引子(Primer)以及 4 種不同之脫氧核糖核苷三磷酸(2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate, dNTP)且以單股去氧核糖核酸為模板(Template)進行聚合酶連鎖反應，接著再加入少量且帶有螢光標記之四種不同雙脫氧核糖核苷三磷酸(2'-deoxy-3'-hydroxylribonucleoside 5'-triphosphate, ddNTP)。因為雙脫氧核糖核苷三磷酸相比於脫氧核糖核苷三磷酸缺少了一個氧，所以加入雙脫氧核糖核苷三磷酸會終止聚合酶連鎖反應。此外因為雙脫氧核糖核苷三磷酸量很少，所以聚合酶會隨機和雙脫氧核糖核苷三磷酸反應，因此造成不同大小的去氧核糖核酸片段，再透過去氧核糖核酸膠體電泳分離不同片段大小之去氧核糖核酸，依據電泳分離出的結果由最小片段去氧核糖核酸到最大片段去氧核糖核酸排列出完整的去氧核糖核酸序列[29-33]。然而第一代定序方法因為最多只能定到約 1000 鹼基對，因此若需要知道幾百萬鹼基對之序列，就需要花較多時間以及成本才能得知完整序列，影響其大規模之應用。因為次世代定序不再受限於基因序列片段長短，所以降低單一鹼基定序所需的成本，因此近幾年次世代定序在臨床上被廣泛地應用，例如偵測血液中游離的去氧核糖核酸以作為癌症檢測之方法，或是針對孕婦羊水進行產前檢測以了解胎兒是否有遺傳疾病[23, 24, 30, 33-35]。目前次世代定序技術已經純熟，因此市面上有許多廠牌都有推出次世代定序儀器，知名的廠牌例如 Illumina、ABI 以及 Roche，以下以 Illumina System 為例 [23, 29, 30, 33, 36, 37]：

A. 利用超音波震盪等外力將去氧核糖核酸隨機打斷成約 200-500 鹼基對的片段大小，然後在去氧核糖核酸片段兩端接上 Adapter 以製備序列樣本資料庫

- 
- B. 將有 Adapter 之去氧核糖核酸片段放到 Flow cell 上，接著進行橋式聚合酶連鎖反應。
- C. 加入有螢光標記之脫氧核糖核苷三磷酸，此脫氧核糖核苷三磷酸會隨機結合並終止聚合酶連鎖反應以釋放螢光，接著機器會瞬間捕捉螢光訊號。
- D. 蒐集機器所有的螢光數據並進行序列比對再將完整基因序列排出。

因為次世代定序可以大量且快速的做基因定序，再加上相較第一代定序無檢體限制，所以應用非常廣泛，以下列出常見之次世代定序的分析[23, 29, 30, 32, 36, 38-41]：

- I. 物種鑑定以及環境中總基因體學研究：在系統發生學研究中會使用 16s 核糖體核糖核酸(Ribosomal RNA, rRNA)作為物種鑑定的依據，一方面因為 16s 核糖體核糖核酸有高度保守區域，所以可以用演化樹區分物種，另一方面也有高度變異區，所以可以鑑定出新物種。利用次世代定序通量大且快速得知的特性，可以快速地得知環境中物種(動植物或微生物)豐富度，或是可以鑑定出新物種。
- II. 物種轉錄體研究：利用次世代定序快速且通量大的特性，研究員可以得知此物種(動植物或微生物)所有的核糖核酸序列，或是得知轉錄層級調控造成表現型差異，例如非編碼核糖核酸(Non-Coding RNA, NcRNA)或是選擇性剪接(Alternative Splicing)對癌症發生之影響。
- III. 物種基因庫建立：因為次世代定序迅速且量大的特性，研究員可以得知此物種(動植物或微生物)完整的去氧核糖核酸序列，或是得知去氧核糖核酸層級調控造成表現型差異，例如單核苷酸多態性或是拷貝數變異對癌症發生的影響。此外也可以了解外顯子(Exon)以及內含子(Intron)序列，進而了解對生物體的功能為何。
- IV. 物種表觀遺傳學研究：近年來表觀遺傳學研究非常熱門，例如同樣是雙胞胎為何表現型仍然有差別，後來才發現可能是非去氧核糖核酸序列上的調控所致，例如去氧核糖核酸甲基化。利用次世代定序快速且通量大的特性，研究員可以

得知此物種(動植物或微生物)去氧核糖核酸甲基化情形。此外甲基化有組蛋白的參與，所以也能了解物種內去氧核糖核酸以及蛋白質之交互作用的機制以及後續導致之影響。



1.2.3 高通量技術挑選基因之策略以及後續分析

不少在癌症基因的研究有使用去氧核糖核酸微陣列以及次世代定序，主要有兩個原因：第一是可得知特定癌症或其亞型基因表現量是否改變，再探討特定基因如何調控；第二是可得知治療前後或是轉移位置不同...等一變因情況下基因表現量是否改變[42]。因為高通量技術能快速得知大量基因資訊，所以選出適當的基因以進行後續生物研究是關鍵的一步。常見的挑選方法有兩種：一種為監督式分析(Supervised Analysis)，另一種為無監督式分析(Unsupervised Analysis)。使用監督式分析前提是已知相關基因等知識，再針對相關知識，根據數據挑選適合的基因，而無監督式分析則一開始不了解相關基因等知識，僅從數據挑選出基因[43]。監督式分析相較無監督式分析成功挑選出適合基因的可行性較高，因為是從已知相關基因等知識切入，然而先前已經有許多研究以監督式分析挑選基因，因此現今大多以無監督式分析挑選，但如何挑選是一大學問。實驗室先前首先從去氧核糖核酸微陣列找出差異表現基因(Differentially Expressed Genes, DEG)，接著使用 IPA(Ingenuity Pathway Analysis)從差異表現基因中，挑出前三個顯著被調控的細胞訊息傳遞途徑，接著再以基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)或是 sigPathway 驗證是否該細胞訊息傳遞途徑被調控的趨勢和從 IPA 發現的一致。在確定特定細胞訊息傳遞途徑後，先從原先去氧核糖核酸微陣列得知此細胞訊息傳遞途徑中有哪些分子顯著被調控，接著額外蒐集臨床檢體以即時定量聚合酶連鎖反應驗證。在確認特定基因後，先從其他網路上之資料庫確認該基因表現量改變是否會影響病人存活率，再從臨床檢體使用免疫組織化學染色法(Immunohistochemical Stain, IHC)驗證，並根據臨床上該基因表現量以及病人存活率畫圖，最後再和其他網路上之資料庫的存活分析圖比較。

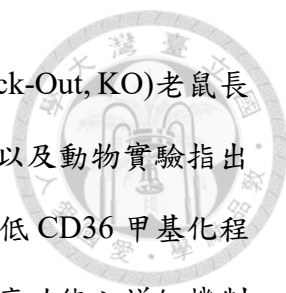


1.3 基因在癌症中所扮演的角色

選出基因後，接著探討該基因對癌症細胞功能之影響。一般在癌細胞中基因依照對癌細胞生長之影響可大致分兩種功能，一種是致癌功能，另一種是抑癌功能。有致癌功能之基因若突變，則導致過度表現時會造成癌症發生。例如 EGFR 基因突變而大量表現時會促進癌細胞腫瘤生成[44, 45]。有抑癌功能之基因主要為負責調控細胞生長，當發現細胞中的基因因為外力因素而導致基因突變，這時有抑癌功能之基因會活化其他基因啟動基因修復的功能，但若無法修復該基因，則啟動細胞死亡的機制，例如 TP53 基因突變導致表現量下降則導致癌症的發生[46, 47]。

1.3.1 CD36 在癌症中所扮演的腳色

為了找尋新的與肺癌發生相關之基因，實驗室先前已經針對肺癌患者進行研究，透過去氧核糖核酸微陣列以及生物資訊分析，例如 IPA...等等，後續分析發現 Axon Guidance 訊號傳遞途徑中的 SEM5A 表現量下降，病人存活率也會下降，因此 SEMA5A 低表現量可能在肺癌腫瘤生成扮演重要角色[6]，然而調控癌症細胞功能之細胞訊號途徑很複雜，所以承接該研究發現的差異表現基因，以 Log 的差異倍數(Fold Change)值大於 2.5 以及小於-2.5 之基因再次使用 IPA 發現相較於正常肺細胞中，有 10 個可能在肺癌細胞中細胞功能有改變的之基因網絡(Network)，我挑選排名第四的，因為前三的基因網絡顯示改變的細胞功能很常見，例如細胞增生或是細胞死亡，所以我挑排名第四的基因網絡且在肺癌中 CD36 低表現量可能扮演重要角色，有抑癌之功能，此外利用 Kaplan Meier Analysis 也發現 CD36 表現量低，則病人的存活率也較低。先前許多研究透過細胞實驗甚至動物實驗指出 CD36 有致癌之功能，例如在口腔癌[48]、子宮頸癌[49, 50]、乳癌[51-53]、胃癌[54-56]、卵巢癌[57]、胰臟癌[58]、肝癌[59]以及食道癌[60]發現 CD36 和癌症之腫瘤形成、轉移甚至抗藥性呈正相關。然而也有研究[61-64]發現相較周邊正常組織，在肺癌組織 CD36 表現量較低，因此有研究[65]藉由動物實驗發現將肺癌細胞株 LL2 打入老鼠



體內，相較於野生型(Wild Type, WT)老鼠，CD36 基因剔除(Knock-Out, KO)老鼠長的腫瘤較大且血管新生情形較強。另一篇研究[66]透過細胞實驗以及動物實驗指出肺癌中 CD36 低表現量是因為肺癌的 CD36 甲基化程度高，若降低 CD36 甲基化程度，則會抑制肺癌腫瘤生成，然而目前對 CD36 於肺癌中作為抑癌功能之詳細機制仍不清楚。

1.3.2 小分子核醣核酸介紹

除了基因之外，許多研究也指出小分子核醣核酸在人類癌症中也扮演重要的角色。小分子核醣核酸是細胞中不轉譯成蛋白質的短片段核醣核酸，小分子核醣核酸也來自去氧核醣核酸，經過核醣核酸反轉錄酶(RNA Polymerase)產生核醣核酸後，會產生小分子核醣核酸的前驅物 Pri-miRNA，然後再經過特定酵素作用，例如 Drosha 以及 Dicer，從 Pri-miRNA 到 Pre-miRNA 再到 Mature miRNA，且過程中會由細胞核運送至細胞質。Mature miRNA 是單股，會依照本身的序列結合於特定信使核醣核酸的 3'非轉譯區(Untranslated Region, UTR)上，並搭配核醣核酸誘導沉默複合體 (RNA-Induced Silencing Complex, RISC)以分解信使核醣核酸或抑制其轉譯作用[67]。

1.3.3 小分子核醣核酸在癌症所扮演的角色

研究發現小分子核醣核酸的表現量上升或下降可調控特定基因的表現，從而抑制各種癌症的生長甚至轉移，例如 miR-148a 會藉由抑制 *ROCK1* 的表現量以抑制胃癌的轉移能力[68]；miR-340 會藉由抑制致癌基因 *C-Met* 的表現量以抑制乳癌遷移以及轉移能力[69]；miR-342 藉由抑制去氧核醣核酸甲基化轉移酶(DNA Methyltransferase)以抑制大腸癌的生長以及轉移能力[70]。有些小分子核醣核酸則可增強細胞對抗癌藥物的敏感性，例如 miR-663b 在 Tamoxifen (TAM)抗性的乳癌表現量會上升，因此抑制 miR-663b 表現量會提升乳癌對 TAM 的敏感性以抑制乳

癌生長[71]，另外 miR-218-5p 會藉由抑制 *PRKDC* 表現量以增加肺癌細胞輻射敏感性[72]。



1.3.4 小分子核醣核酸在食道癌所扮演的角色

也有許多文獻發現小分子核醣核酸在食道癌也扮演重要的角色，例如相較於健康食道組織，miR-675-3p 的表現量在食道癌組織較高且會促進食道癌增生以及遷移能力[73]。此外小分子核醣核酸的表現量可用於食道癌的診斷以及預後，例如相較於正常組織，miR-148a-3p 的表現量在食道癌較低，且手術後 miR-148a-3p 的表現量也會較手術前高[74]。小分子核醣核酸的表現量也與食道癌的復發有關，因此可利用偵測血液中的小分子核醣核酸表現量作為食道癌患復發指標。例如 miR-331-3p 的低表現量齊無復發存活率較低，且相較於沒有復發的病患中，miR-331-3p 表現量在有復發的病患較低[75]。也有研究發現小分子核醣核酸和食道癌的抗藥性有關，例如 miR-125a-5p 會藉由抑制 *STAT3* 訊號途徑的活化以增加食道癌對 cisplatin 的敏感性[76]。因此為了瞭解小分子核醣核酸在台灣本土的食道癌病患中所扮演的角色，實驗室先前已經發現 miR-338-5p 對食道癌生長以及抗藥性扮演重要的角色[77]。然而調控癌症之細胞訊號途徑繁複，因此需要透過更多研究找尋新的與食道癌發生相關之小分子核醣核酸並了解其機制。因此實驗室先前透過次世代定序方法發現相較周邊正常組織，在食道癌組織中有 15 個平均表現量顯著差異的小分子核醣核酸，接著利用即時定量聚合酶連鎖反應驗證指出其中有 8 個小分子核醣核酸的平均表現量在腫瘤組織中比周邊正常組織來得高且有統計上的顯著差異。最後再進一步探討此 8 個小分子核醣核酸表現量與病患存活的關聯性，結果發現 miR-548ba 表現量高，則病人存活率較低。然而 miR-548ba 的文獻相當少，目前尚無與癌症相關的研究，因此對於在食道癌中 miR-548ba 的相關機制仍不清楚。



2. 基本原理以及目的

使用高通量分析平台的優點為能迅速地得知龐大的基因資訊。因此實驗室先前已經針對肺癌患者透過去氧核糖核酸微陣列以及生物資訊分析發現 Axon Guidance 訊號傳遞途徑中的 *SEMA5A* 低表現量可能在肺癌腫瘤生成扮演重要角色，然而不會只因為單一細胞訊號途徑即調控癌症細胞功能，所以承接該研究發現的差異表現基因，再次使用 IPA 發現相較於正常肺細胞，在肺癌中 *CD36* 低表現量可能扮演重要角色。先前研究指出 *CD36* 有致癌之功能，然而在肺癌中發現 *CD36* 會抑制腫瘤生成，有抑癌的功能，然而詳細機制目前仍不了解，因此本研究探討 *CD36* 低表現量於肺癌生長之影響及機制。

除了去氧核糖核酸微陣列，次世代定序也是常見的高通量技術。實驗室先前研究發現 miR-338-5p 對食道癌生長以及抗藥性扮演重要的角色。然而癌症細胞訊號途徑調控繁複，因此需要透過更多研究找尋新的與食道癌發生相關之小分子核糖核酸並了解其機制。為了找出與食道癌發生有關的小分子核糖核酸，實驗室先前透過次世代定序方法以及即時定量聚合酶連鎖反應驗證發現相較正常食道組織，miR-548ba 在食道癌組織表現量較高，接著又發現 miR-548ba 表現量較高則病人存活率較低。然而 miR-548ba 的文獻相當少，目前尚無與癌症相關的研究，因此對於在食道癌中 miR-548ba 扮演的角色以及相關機制仍不清楚，因此本研究探討 miR-548ba 高表現量於食道癌生長之影響及機制。



3. 材料與方法

3.1 培養液配置

3.1.1 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco)

一包 DMEM 粉末以及 1.5 g 碳酸氫鈉溶於滅菌之 900 ml 純水並使其攪拌均勻，接著 pH 值調整至 7.2，再使用 0.22 μm 過濾杯(Merck)進行過濾，以 450 ml DMEM 溶液為單位分裝至有滅菌過的血清瓶中。在進行細胞培養前，分別加入 10 %胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclone®, 50 ml)及 1 %盤尼西林-鏈黴素(Penicillin-Streptomycin, PS, GIBCO, 5 ml)至 450 ml 無菌 DMEM 血清瓶並混合均勻後，保存在 4 °C 冰箱中。

3.1.2 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 - Gibco)

一包 RPMI 粉末以及 2.0 g 碳酸氫鈉溶於滅菌之 900 ml 純水並使其攪拌均勻，接著 pH 值調整至 7.2，再使用 0.22 μm 過濾杯(Merck)進行過濾，以 450 ml RPMI 溶液為單位分裝至有滅菌過的血清瓶中。在進行細胞培養前，分別加入 10 %胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclone®, 50 ml)及 1 %盤尼西林-鏈黴素(Penicillin-Streptomycin, PS, GIBCO, 5 ml)至 450 ml 無菌 RPMI 血清瓶並混合均勻後，保存在 4 °C 冰箱中。

3.2 磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Phosphate Buffered Saline, PBS)

配置

8 g 的氯化鈉、0.2 g 的氯化鉀、1.42 g 的磷酸氫二鈉以及 0.24 g 的磷酸二氫鉀溶於滅菌之 900 ml 純水並使其攪拌均勻，接著 pH 值調整至 7.2，再使用 0.22 μm 過濾杯(Steritop® filter, Merck)進行過濾，以 450 ml 磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液為單位分裝至有滅菌過的血清瓶中，保存在 4 °C 冰箱中。

3.3 細胞培養



3.3.1 人類胚胎腎臟細胞(HEK293T)

在培養細胞前，將有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM、磷酸鹽緩衝生理食鹽水以及 1X 胰蛋白酶(Trypsin)放置於 37 °C 水浴槽回溫約 15 分鐘。將細胞從培養箱中取出並放入細胞操作台，首先抽吸舊的細胞培養液並捨棄，接著加入 5 ml 的磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗(稍微前後搖晃)，再抽吸磷酸鹽緩衝生理食鹽水並捨棄。加入 1 ml 1X 胰蛋白酶(稍微前後搖晃)，並放入有恆溫 37 °C 且有 5 % 二氧化碳培養箱中等待細胞懸浮，約一分鐘後取出細胞並放入細胞操作台，接著加入 3 ml 的有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 終止 1X 胰蛋白酶反應並離心 5 分鐘(1000 轉)，接著抽吸上清液並捨棄且加入新的 5 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 回溶底部細胞，接著取 1 ml 或 3 ml 之細胞液加入底部直徑 10 公分或 15 公分的培養皿中，再加入 9 ml 或 17 ml 之有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 並稍微搖晃使細胞混勻，最後將培養皿放回培養箱中。

3.3.2 人類肺癌細胞(CL1-0、CL1-4、H1299)

在培養細胞前，將有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI、磷酸鹽緩衝生理食鹽水以及 1X 胰蛋白酶(Trypsin)放置於 37 °C 水浴槽回溫約 15 分鐘。將細胞從培養箱中取出並放入細胞操作台，首先抽吸舊的細胞培養液並捨棄，接著加入 5 ml 的磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗(稍微前後搖晃)，再抽吸磷酸鹽緩衝生理食鹽水並捨棄。加入 1 ml 1X 胰蛋白酶(稍微前後搖晃)，並放入有恆溫 37 °C 且有 5 % 二氧化碳培養箱中等待細胞懸浮，約兩分鐘後取出細胞並放入細胞操作台，接著加入 3 ml 的有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 終止 1X 胰蛋白酶反應並離心 5 分鐘(1000 轉)，接著抽吸上清液並捨棄且加入新的 5 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 回溶底部細胞，接著取 1 ml 之細胞液加入底部直徑 10 公分的培養皿或 T-75 培養瓶中，再加入 9 ml 之有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 並稍微搖晃使細胞混勻，最後將培養皿或培養瓶放回培養箱中。



3.3.3 人類食道癌細胞(KYSE70、KYSE410)

在培養細胞前，將有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI、磷酸鹽緩衝生理食鹽水以及 1X 胰蛋白酶(Trypsin)放置於 37 °C 水浴槽回溫約 15 分鐘。將細胞從培養箱中取出並放入細胞操作台，首先抽吸舊的細胞培養液並捨棄，接著加入 5 ml 的磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗(稍微前後搖晃)，再抽吸磷酸鹽緩衝生理食鹽水並捨棄。加入 1 ml 1X 胰蛋白酶(稍微前後搖晃)，並放入有恆溫 37 °C 且有 5 % 二氧化碳培養箱中等待細胞懸浮，約三分鐘後取出細胞並放入細胞操作台，接著加入 3 ml 的有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 終止 1X 胰蛋白酶反應並離心 5 分鐘(1000 轉)，接著抽吸上清液並捨棄且加入新的 5 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 回溶底部細胞，接著取 1 ml 之細胞液加入底部直徑 10 公分的培養皿中，再加入 9 ml 之有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 並稍微搖晃使細胞混勻，最後將培養皿放回培養箱中。

3.3.4 人類食道癌細胞(CE81T、CE81T 1-4)

在培養細胞前，將有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM、磷酸鹽緩衝生理食鹽水以及 1X 胰蛋白酶(Trypsin)放置於 37 °C 水浴槽回溫約 15 分鐘。將細胞從培養箱中取出並放入細胞操作台，首先抽吸舊的細胞培養液並捨棄，接著加入 5 ml 的磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗(稍微前後搖晃)，再抽吸磷酸鹽緩衝生理食鹽水並捨棄。加入 1 ml 1X 胰蛋白酶(稍微前後搖晃)，並放入有恆溫 37 °C 且有 5 % 二氧化碳培養箱中等待細胞懸浮，約七分鐘後取出細胞並放入細胞操作台，接著加入 3 ml 的有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 終止 1X 胰蛋白酶反應並離心 5 分鐘(1000 轉)，接著抽吸上清液並捨棄且加入新的 5 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 回溶底部細胞，接著取 1 ml 之細胞液加入底部直徑 10 公分的培養皿中，再加入 9 ml 之有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 並稍微搖晃使細胞混勻，最後將培養皿放回培養箱中。




3.4 目標質體製備

首先將 DH5 α 從 -80 °C 冰箱中取出並使之快速溶解至半溶狀態，接著將 1 μ l 之目標質體加入並稍微輕彈管子幾下使之混勻，接著放在冰上 15 分鐘，然後取 15 μ l 均勻塗抹在有氨苄青黴素(Ampicillin, 100 μ g/ml)之 Luria-Bertani (LB) 培養基培養皿，接著在 37 °C 細菌培養箱中培養 16 小時。培養完再利用微量吸管尖從前天培養細菌之 Luria-Bertani 培養基培養皿勾取單一菌落至 3 ml 有氨苄青黴素(100 μ g/ml)之 Luria-Bertani 培養基培養液，接著在 37 °C 細菌培養箱中培養 16 小時。培養完再將前天培養細菌之 Luria-Bertani 培養基培養液倒入至 300 ml 有氨苄青黴素(100 μ g/ml)之 Luria-Bertani 培養基培養液，接著在 37 °C 細菌培養箱中培養 16 小時。培養完再使用 PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) 抽取質體。

3.5 慢病毒製備

第一天先將 4 x 10⁶ 之 HEK293T 細胞和 25 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 加入至底部直徑 15 公分之培養皿中，且在有恆溫 37 °C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 16 小時。第二天在細胞操作台且在避光條件下將 8 μ g 目標質體、6 μ g psPAX2、2 μ g pMD2.G、40 μ l TransIT®-2020 (Mirus) 以及 500 μ l Opti-MEM (Gibco) 混勻並靜置 20 分鐘，接著再分散加入至前一天培養之 HEK293T 中並於有恆溫 37 °C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 48 小時。將 48 小時的培養液全部收下至 50 ml 離心管中，再補 25 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM，50 ml 離心管使用封口膜(Parafilm)包裹並保存於 4 °C 冰箱中。過 24 小時後將培養液全部收下至前一天之 50 ml 離心管，先離心 5 分鐘(1000 轉)，再使用 30 ml 的針筒以及 0.45 μ m 過濾器(Merck)過濾上清液，並以 250 μ l 溶液為單位分裝再保存於 -80 °C 冰箱中。

3.6 慢病毒感染




第一天在細胞操作台先將 CL1-0、CL1-5 以及 H1299 細胞和有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 加入至 24 孔盤中，每孔加入 2×10^4 細胞以及 1 ml 之 RPMI 並稍微搖晃使細胞混勻，接著在有恆溫 37°C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 16 小時。第二天在細胞操作台先將 24 孔盤中每孔 50 μ l 培養液吸出，再將保存於 -80°C 冰箱中之慢病毒解凍回溫，24 孔盤中每孔再加入 50 μ l 慢病毒以及 5 μ l 聚凝胺 (Polybrene, Sigma-Aldrich)，並離心 1 小時 (22°C, 2300 轉)，再放回有恆溫 37°C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 6 小時，接著抽吸 24 孔盤中每孔培養基並捨棄，在細胞操作台加入新的 1 ml 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 並放回有恆溫 37°C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 48 小時。

3.7 小分子核糖核酸轉染

第一天在細胞操作台先將 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 細胞和有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 或 DMEM 加入至 6 孔盤中，每孔加入 2×10^5 細胞以及 3 ml 之 RPMI 或 DMEM 並稍微搖晃使細胞混勻，接著在有恆溫 37°C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 16 小時。第二天在細胞操作台且在避光條件下將 10 nM 濃度的 miRNA mimic (圖爾思) 或 mimic negative control (mirVana™ miRNA mimic, Negative Control #1, Thermo)、Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) 以及 Opti-MEM (Gibco) 混勻並靜置 10 分鐘，接著再分散加入至前一天培養之 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 中並於有恆溫 37°C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 48 小時。

3.8 核糖核酸萃取

使用細胞培養方法將細胞全部收下至 1.5 ml 離心管後，再離心 5 分鐘 (1000 轉)，接著抽吸上清液並捨棄，再加入 500 μ l TRIzol™ (Invitrogen) 和底部細胞混勻，接著再加入 50 μ l 1-溴-3-氯丙烷 (Thermo) 並使用震盪器混勻，再以 4°C 13000 轉離心 10 分鐘。將上層透明液體轉移至新的 1.5 ml 離心管，加入 250 μ l 異丙醇 (Isopropanol)，



IPA, Thermo)並混勻，然後再以 4 °C 13000 轉離心 10 分鐘，接著抽吸上清液並捨棄，再加入 500 µl 75 %酒精，再以 4 °C 13000 轉離心 10 分鐘以清洗底部沉澱物，接著抽吸上清液並捨棄且等待酒精揮發再加入 35 µl 無核酸酶水(Nuclease-Free Water, NFW, Qiagen)、4 µl RDD buffer (Qiagen)以及 1 µl 去氧核糖核酸酶(DNase I)並混勻且先在 37 °C反應 10 分鐘再 65 °C反應 5 分鐘。反應完後加入 14 µl 3M 醋酸鈉以及 100 µl 100 %酒精並混勻，再以 4 °C 13000 轉離心 10 分鐘，接著抽吸上清液並捨棄，再加入 500 µl 75 %酒精，再以 4 °C 13000 轉離心 10 分鐘以清洗底部沉澱物，接著抽吸上清液並捨棄且等待酒精揮發，以適量體積無核酸酶水回溶核糖核酸。

3.9 反轉錄聚合酶連鎖反應

3.9.1 基因

在微量離心管中加入 1000 ng 核糖核酸、0.5 µl RNaseOUT™ (Invitrogen)以及 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)並混勻再進行聚合酶連鎖反應。基因聚合酶連鎖反應程序：1. 25 °C 10 分鐘，2. 37 °C 2 小時，3. 85°C 5 分鐘。

3.9.2 小分子核糖核酸

在微量離心管中加入 1000 ng 核糖核酸、1mM 脫氧核糖核苷三磷酸、10mM 二硫蘇糖醇 (Dithiothreitol, DTT)、1X 反轉錄試劑(Reverse Transcription buffer)、50 U 反轉錄酶(Reverse Transcriptase)、0.25 µM 反轉錄引子(Reverse Transcription primer)以及 0.5 µl RNaseOUT™ (Invitrogen)並混勻再進行聚合酶連鎖反應。小分子核糖核酸聚合酶連鎖反應程序：1. 16 °C 30 分鐘，2. 30°C 30 秒，3. 42°C 30 秒，4. 50°C 1 秒，5. 2-4 60 cycle，6. 85°C 5 分鐘。使用的引子如表一。

3.10 即時定量聚合酶連鎖反應



3.10.1 基因

在 96 孔盤中加入 50 ng 核糖核酸、7.5 μ l PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)、4 μ l 目標基因之正向引子(Forward primer)和反向引子(Reverse primer)以及 1.5 μ l 無核酸酶水並混勻再進行即時定量聚合酶連鎖反應。基因即時定量聚合酶連鎖反應程序：1. 50 °C 2 分鐘，2. 95 °C 10 分鐘，3. 95°C 15 秒，4. 60°C 1 分鐘，5. 2-4 40 cycle。使用引子如表二。

3.10.2 小分子核糖核酸

在 384 孔盤中加入 50 ng 核糖核酸、1X KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)、1 μ M 目標小分子核糖核酸之正向引子以及 0.1 μ l Universal Probe #21 (ROCHE)並混勻再進行即時定量聚合酶連鎖反應。小分子核糖核酸即時定量聚合酶連鎖反應程序：1. 95 °C 10 分鐘，2. 95 °C 5 秒，3. 60°C 10 秒，4. 72°C 1 秒，5. 2-4 40 cycle。使用引子如表三。

3.11 蛋白質萃取

加入 10X RIPA lysis buffer (Merck)、200 mM 正钒酸钠(Sodium Orthovanadate, Na_3VO_4)、200 mM 五水 beta-甘油磷酸钠(β - Glycerophosphate, β -GP)以及蛋白酶抑制劑(Protease inhibitors, PI)並混勻以製備 1X modified RIPA lysis buffer。使用細胞培養方法將細胞全部收下至 1.5 ml 離心管後，再離心 5 分鐘(1000 轉)，接著抽吸上清液並捨棄再加入冰冷磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗兩次，加入 200 μ l 1X modified RIPA lysis buffer 和底部細胞混勻，再使用超音波盪儀將 1.5 ml 離心管內的細胞裂解液震盪，再以 4 °C 13000 轉離心 10 分鐘，將上層透明液體轉移至新的 1.5 ml 離心管。

3.12 西方墨點法



3.12.1 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis , SDS-PAGE)配置

將 4 ml 純水、3.3 ml 30 % 雙丙烯醯胺(Acrylamide/Bis solution, Bio Rad)、2.5 ml 1.5 M pH 8.8 三羥甲基胺基甲烷緩衝液(Tris buffer)、0.1 ml 10 % 十二烷基硫酸鈉溶液(SDS buffer)、0.1 ml 10 % 過硫酸銨(Ammonium Persulfate, APS)以及 4 μ l 四甲基乙二胺(TEMED)混勻以製備 10 % 下膠(Resolving Gel)。將 2.1 ml 純水、0.5 ml 30 % 雙丙烯醯胺、0.38 ml 1.5 M pH 6.8 三羥甲基胺基甲烷緩衝液、30 μ l 10 % 十二烷基硫酸鈉溶液、30 μ l 10 % 過硫酸銨以及 3 μ l 四甲基乙二胺混勻以製備 5 % 上膠(Stacking Gel)。

3.12.2 跑膠

使用 Bradford Assay 進行蛋白質定量，將 40 ng 之蛋白質液、4X 上樣緩衝液(Sample Loading Dye)以及 1X modified RIPA lysis buffer 混勻並以 100 °C 加熱 15 分鐘以製備蛋白質樣本。接著先將十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳架於西方墨點法樣品槽，並加入 1X 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳電泳緩衝液(Running Buffer)，再將樣本加入十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳以電壓 70 伏特跑膠，當樣本差不多跑至下膠時則以電壓 120 伏特跑膠。上樣緩衝液有溴酚藍(Bromophenol Blue)，使樣本呈現藍色，因此當溴酚藍跑出下膠即可停止跑膠。

3.12.3 轉漬

先使用甲醇活化聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene Difluoride, PVDF)，接著在濕式轉漬槽之卡夾內先放上 3 張已經泡過 1X 轉漬緩衝液(Transfer buffer)之濾紙，再放上下膠，接著為已活化之聚偏二氟乙烯，最後再放上 3 張已經泡過 1X 轉漬緩衝液之濾紙，接著使用滾輪將空氣排出再將卡夾放至濕式轉漬槽以 4 °C 400 mA 轉漬 70 分鐘。



3.12.4 免疫染色

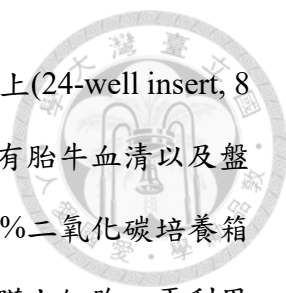
先將轉印完之聚偏二氟乙烯以有 5%脫脂牛奶之三羥甲基胺基甲烷-聚山梨醇酯 20 緩衝液(TBST)浸泡 1 小時，接著再加入有目標基因一級抗體之三羥甲基胺基甲烷-聚山梨醇酯 20 緩衝液(1：1000) 4 °C反應 16 小時。隔天三羥甲基胺基甲烷-聚山梨醇酯 20 緩衝液清洗 10 分鐘且清洗 3 次，再加入特定物種二級抗體之三羥甲基胺基甲烷-聚山梨醇酯 20 緩衝液(1：5000)室溫反應 1 小時，接著使用三羥甲基胺基甲烷-聚山梨醇酯 20 緩衝液清洗 10 分鐘且清洗 3 次，最後以電致化學發光 (Electrochemiluminescence, ECL)激發出光並拍照。

3.13 細胞增生實驗

第一天在細胞操作台先將 CL1-0、CL1-5、H1299、KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 細胞以及有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 或 DMEM 加入至 24 孔盤中，每孔加入 1×10^4 細胞以及 1 ml 之 RPMI 或 DMEM 並稍微搖晃使細胞混勻，接著在有恆溫 37 °C以及 5 %二氧化碳培養箱中培養 6、24、48、72 以及 96 小時。在每個觀測時間點先抽吸培養基並捨棄，再加入濃度為 0.5 mg/ml 的溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑) (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, MTT, Sigma) 試劑，並放入有恆溫 37 °C以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 2 小時，之後先抽吸溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)溶液並捨棄再加入二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 並避光搖晃 10 分鐘，最後再利用 酵素免疫分析儀 (ELISA Reader)檢測波長 570nm 的吸光值。

3.14 細胞遷移實驗(Transwell Assay)

第一天在細胞操作台先將 CL1-0、CL1-5、H1299、KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 細胞和只有盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 或 DMEM 加入至底面直徑為 6 公分的培養皿中，且在恆溫 37 °C以及 5 %二氧化碳培養箱中培養 16 小時。第二天使用細胞培養方法將細胞全部收下至 5 ml 離心管後，細胞以 1×10^5 和 200



μl 只有盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 或 DMEM 加入至 Transwell 膜上(24-well insert, 8 μm pore size, Corning), 再把膜放置 24 孔盤中且膜下放入 700 μl 有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 或 DMEM, 最後於有恆溫 37 °C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 16 小時。隔天加入 700 μl 的固定液(冰醋酸與甲醇)固定膜上細胞, 再利用 0.5% 的結晶紫(Crystal Violet)將細胞染色並用棉花棒將膜上細胞刮掉, 最後使用冰醋酸回溶結晶紫並利用酵素免疫分析儀檢測波長 570nm 的吸光值。

3.15 細胞凋亡實驗

使用細胞培養方法將細胞全部收下至 5 ml 離心管後, 先離心 15 分鐘(2200 轉), 接著抽吸上清液並蒐集再以磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗兩次並同樣蒐集。接著使用 FITC annexin V apoptosis detection kit (BD Pharmingen) 染劑作用 15 分鐘後過篩, 並用流式細胞儀(Beckman Coulter FC500)偵測凋亡的細胞比例。

3.16 細胞群落形成實驗(Colony Formation Assay)

第一天在細胞操作台先將細胞和有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 DMEM 加入至 6 孔盤中, 且在有恆溫 37 °C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 14 天。14 天後, 先抽吸培養液並捨棄, 再加入 1 ml 的固定液(冰醋酸與甲醇)固定細胞。接著使用清水清洗, 再利用 0.5% 的結晶紫將細胞染色, 最後再計算染色的細胞群落。

3.17 細胞葡萄糖吞噬實驗

第一天在細胞操作台先將 CL1-0 細胞和有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI 加入至底面直徑 6 公分的培養皿中, 且在有恆溫 37 °C 以及 5 % 二氧化碳培養箱中培養 6 小時。6 小時使細胞貼附, 再用磷酸鹽緩衝生理食鹽水清洗並加入新的有胎牛血清以及盤尼西林-鏈黴素之 RPMI, 且以換培養基的時間點作為 0 小時, 再培養 18 小時。最後只收 0 小時以及 18 小時的培養基以及細胞, 並使用 Glucose Assay Kit (Sigma) 偵測培養基中葡萄糖含量。

3.18 統計方法

本研究中所有實驗皆為三重複之平均值，數據以平均值還有標準差表示。所有的統計皆以同質性 Two tails Unpaired T-test 進行比較，以 $P < 0.05$ 代表統計上有顯著差異。






4. 結果

4.1 偵測 *CD36* 在不同肺癌細胞之表現量

實驗室先前在 *SEMA6A* 的研究使用 CL1-0 以及 CL1-5，此外一般用於肺癌研究的細胞為 H1299，所以首先偵測 *CD36* 在這三株肺癌細胞之相對內生性表現量。由圖一可看出 CL1-0 *CD36* 內生性表現量最高，在 CL1-5 以及 H1299 *CD36* 內生性表現量都很低。為了得知基因對細胞功能的影響，首先會改變細胞內該基因的表現量，接著偵測細胞增生能力、遷移能力等細胞功能是否改變。因為 CL1-0 *CD36* 內生性表現量高，所以先 *CD36* 基因靜默再偵測細胞功能，相反的因為 CL1-5 以及 H1299 *CD36* 內生性表現量低，所以先 *CD36* 大量表現再偵測細胞功能，其中以 CL1-5 為主，H1299 為輔。

4.2 在 CL1-0 以及 CL1-5 改變 *CD36* 核醣核酸以及蛋白質表現量

首先使用即時定量聚合酶連鎖反應驗證分別將 *CD36* 基因靜默之質體(sh*CD36*) 以及 *CD36* 大量表現之質體(OE *CD36*)送入細胞後，*CD36* 的核醣核酸表現量是否會改變。pvoid 以及 pCDH 分別是 *CD36* 基因靜默之質體以及 *CD36* 大量表現之質體的控制組。由結果發現 *CD36* 基因靜默則 CL1-0 *CD36* 核醣核酸表現量下降約 3 成(圖二 A)，*CD36* 大量表現則 CL1-5 *CD36* 核醣核酸表現量有顯著提升(圖二 B)。因為即時定量聚合酶連鎖反應只能得知基因的核醣核酸表現量，此外核醣核酸會轉譯成蛋白質，然而基因的核醣核酸表現量改變，蛋白質表現量未必會改變，所以再使用西方墨點法並使用 *CD36* 抗體驗證是否 *CD36* 蛋白質的表現量也會改變。先前使用此抗體的研究指出 *CD36* 蛋白質分子量約 100 kDa，再加上先前用即時定量聚合酶連鎖反應得知 CL1-0 以及 CL1-5 *CD36* 相對內生性表現量，所以由圖二 C 以及 E 發現在蛋白質分子量約 100 kDa 的位置，CL1-0 pvoid 確實有蛋白質被 *CD36* 抗體偵測出，但在 CL1-5 pCDH 則沒有蛋白質被 *CD36* 抗體偵測出，因此推測在蛋



白質分子量約 100 kDa 被偵測出的蛋白質為 CD36。由圖二 C 以及 D 發現 *CD36* 基因靜默則 CL1-0 *CD36* 蛋白質表現量下降約 1 至 2 成，而 *CD36* 大量表現則 CL1-5 *CD36* 蛋白質有顯著提升(圖二 E)。為了更進一步確認蛋白質分子量約 100 kDa 被偵測出的蛋白質真的是 CD36，因此再使用 His 抗體驗證。pvoid、pCDH、*CD36* 基因靜默之質體以及 *CD36* 大量表現之質體四個質體中只有 *CD36* 大量表現之質體會表現 His 蛋白質，此外 293T *CD36* 內生性表現量低所以當作負控制組，有轉染 *CD36* 大量表現之質體之 293T (Transfected 293T)當作正控制組。由圖二 F 發現首先在蛋白質分子量約 100 kDa，負控制組沒有蛋白質被 His 抗體偵測出，而正控制組在蛋白質分子量約 100 kDa 有一群蛋白質被 His 抗體偵測出，以被 His 抗體偵測到最多的蛋白質，即蛋白質帶(Band)顏色最深的當作主要蛋白質帶(Major Band，以紅色的箭頭標示)，且也只有 *CD36* 大量表現之質體組別在蛋白質分子量約 100 kDa 才有蛋白質被 His 抗體偵測出，因此應證前面使用 *CD36* 抗體壓出來的結果(圖二 C 以及 E)。綜合來說，從核醣核酸以及蛋白質層級來看，可透過質體改變 *CD36* 表現量。

4.3 探討在不同肺癌細胞中 *CD36* 對細胞增生能力以及死亡速率的影響

接著探討 *CD36* 對肺癌細胞功能的影響，首先探討細胞增生能力的影響。結果發現 *CD36* 基因靜默顯著地抑制 CL1-0 的增生能力，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 的增生能力(圖三 A 以及 B)。雖然 H1299 *CD36* 內生性表現量也低，但是 *CD36* 大量表現下降約 1 成 H1299 增生能力(圖三 C)。因為 *CD36* 基因靜默會抑制 CL1-0 增生能力，而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 增生能力，所以使用流式細胞儀進行細胞凋亡實驗驗證是否 *CD36* 基因靜默會促進 CL1-0 死亡速率，而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 死亡速率。由圖三 D - F 發現 *CD36* 基因靜默反而會減緩 CL1-0 約 1 成死亡速率，然而 *CD36* 大量表現並不會改變 CL1-5 死亡速率。綜合來

看，雖然 *CD36* 基因靜默會抑制 CL1-0 增生能力，但 CL1-0 死亡速率變慢；*CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 增生能力也不會改變 CL1-5 死亡速率，然而 *CD36* 大量表現卻會抑制 H1299 增生能力。



4.4 探討在不同肺癌細胞中 *CD36* 對細胞遷移能力的影響


除了細胞增生能力以及死亡速率會影響癌細胞生長外，細胞遷移能力也會影響癌細胞生長，因此接著探討 *CD36* 對肺癌細胞遷移能力的影響。使用 Transwell 發現 *CD36* 基因靜默會促進 CL1-0 約 4 成遷移能力，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 以及 H1299 的遷移能力(圖四 A - C)。

4.5 探討 *CD36* 對 CL1-0 葡萄糖吞嚥以及醣解作用活性的影響

細胞功能改變，細胞訊息傳遞路徑可能也會改變，此外先前研究[78]指出在大腸癌 *CD36* 表現量下降且促進大腸癌葡萄糖吞嚥並活化醣解作用活性，所以測試是否在 CL1-0 *CD36* 基因靜默後也會促進葡萄糖吞嚥並活化醣解作用活性。首先探討 *CD36* 對 CL1-0 葡萄糖吞嚥的影響，由圖五 A 發現 *CD36* 基因靜默則 CL1-0 減少 3 成葡萄糖吞嚥。接著探討 *CD36* 對 CL1-0 醣解作用的影響。醣解作用是葡萄糖經過許多酵素反應後產生丙酮酸(Pyruvate)。丙酮酸可以再經由酵素作用產生乳酸(Lactate)。為了偵測醣解作用活性是否改變，可偵測相關酵素核醣核酸表現量是否改變，此外在眾多酵素當中，丙酮酸激酶(Pyruvate Kinase M1/2, PKM)是速率限制酵素，其功能為產生丙酮酸。因此我選擇丙酮酸激酶以及產生乳酸的所需之酵素乳酸脫氫酶(Lactate Dehydrogenase A, LDHA)進行即時定量聚合酶連鎖反應，測試 *CD36* 基因靜默是否會促進丙酮酸激酶以及乳酸脫氫酶核醣核酸表現量。由圖五 B 以及 C 發現 *CD36* 基因靜默反而會抑制丙酮酸激酶以及乳酸脫氫酶核醣核酸表現量。綜合來看，*CD36* 基因靜默會減少 CL1-0 葡萄糖吞嚥以及抑制醣解作用活性。

4.6 偵測 miR-548ba 在不同食道癌細胞之表現量

實驗室先前在食道癌的研究使用 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-



4，所以首先偵測 miR-548ba 在這四株食道癌細胞之相對內生性表現量。由圖六 A 發現在這四株細胞 miR-548ba 表現量都偏低且 CT 值都約 38 (圖六 B)。為了得知小分子核糖核酸對細胞功能的影響，首先改變細胞內該小分子核糖核酸的表現量，接著偵測細胞增生能力、遷移能力等細胞功能是否改變。

4.7 在不同食道癌細胞改變 miR-548ba 核糖核酸表現量

因為 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 miR-548ba 內生性表現量都很低，因此首先使用即時定量聚合酶連鎖反應驗證分別將 miR-548ba mimic 送入四株食道癌細胞後，miR-548ba 的核糖核酸表現量是否會改變。NC 是控制組。由圖七 A - D 發現這四株細胞分別處理 miR-548ba mimic 後，miR-548ba 核糖核酸表現量都有顯著提升。


4.8 探討在不同食道癌細胞中 miR-548ba 對細胞增生能力的影響

接著探討 miR-548ba 大量表現對食道癌細胞功能的影響，首先探討細胞增生能力的影響。由圖八 A - D 發現 miR-548ba 大量表現只會促進 CE81T 約 1 至 2 成的增生能力，接著再使用細胞群落形成實驗也發現 miR-548ba 大量表現會增加 CE81T 約 1.2 成的細胞群落數目(圖八 E 以及 F)。

4.9 探討 miR-548ba 對 CE81T 細胞遷移能力的影響

既然 miR-548ba 大量表現只會促進 CE81T 增生能力，此外細胞增生能力會影響癌細胞生長外，細胞遷移能力也會影響癌細胞生長，接著探討 miR-548ba 大量表現對 CE81T 遷移能力的影響。由圖九可知 miR-548ba 大量表現並不會改變 CE81T 的遷移能力。綜合來說，由細胞實驗發現 miR-548ba 大量表現只會促進 CE81T 增生能力並不會改變 CE81T 遷移能力。

4.10 探討 miR-548ba 可能的目標基因



因為 miR-548ba 大量表現只會促進 CE81T 增生能力，此外小分子核醣核酸會依照自身序列以結合特定信使核醣核酸，並抑制該信使核醣核酸轉譯或是使該信使核醣核酸被分解，所以接著要探討 miR548ba 可能的目標基因為何。先前有研究 [79]發現在人類卵巢顆粒細胞中，透過即時定量聚合酶連鎖反應以及螢光素酶檢測法(Luciferase assay)發現 *LIFR* 是 miR-548ba 的直接目標基因，因此測試 miR-548ba 大量表現是否會抑制 *LIFR* 核醣核酸表現量。由圖十 A 發現 miR-548ba 大量表現反而會促進 *LIFR* 約 1.3 成核醣核酸表現量。因為 miR-548ba 大量表現會促進 *LIFR* 核醣核酸表現量，所以接著使用三個不同預測小分子核醣核酸目標基因的網路上資料庫，分別是 TargetScan、MIRDIP 以及 MIRDB 進行預測，並以文氏圖顯示在三個不同網路上資料庫中都有被預測到的基因。由圖十 B 發現共有 130 個基因在三個不同的網路上資料庫都有被預測到，我先以前 10 個被預測之基因(圖十 C)進行即時定量聚合酶連鎖反應，然而「C5orf15」為開放閱讀框(Open Reading Frame, ORF)，因此只會以剩下九個基因進行即時定量聚合酶連鎖反應，測試 miR-548ba 大量表現是否有基因表現量會顯著下降。由圖十 D - L 發現 miR-548ba 大量表現只會抑制 *MOB1B* 核醣核酸表現量，然而 *MOB1B* 是否為 miR-548ba 直接目標基因仍需透過螢光素酶檢測法驗證。



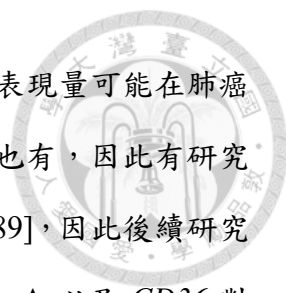
5. 討論

5.1 探討 *CD36* 基因靜默會促進 CL1-0 遷移能力，但 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 遷移能力的原因

先前研究[80]以細胞的侵襲(Invasion)能力將 CL1 細胞分出 CL1-0、CL1-1、CL1-2、CL1-3、CL1-4 以及 CL1-5，在這六株細胞株中 CL1-5 侵襲能力最好 CL1-0 侵襲能力最差。在我的研究中發現 *CD36* 基因靜默則會促進 CL1-0 的遷移能力，然而 *CD36* 大量表現則不會改變 CL1-5 的遷移能力。*CD36* 在許多研究[48-60]中發現有致癌的功能，然而也有研究[65, 66, 78, 81, 82]發現 *CD36* 有抑癌的功能。先前的研究指出 *CD36* 會和 *Thrombospondin 2* 結合[83]。另一篇研究發現 *CD36* 或 *Vitronectin Receptor* 會分別和 *Thrombospondin 2* 結合，其中以和 *Vitronectin Receptor* 結合為主，和 *CD36* 結合為次之，且不論和 *CD36* 或 *Vitronectin Receptor* 結合後都會促進 MAPK 訊號途徑的活化以促進胰臟癌轉移能力[84]。然而 CL1-0 與 CL1-5 相較之下內生性之 *Thrombospondin 2* 以及 *Vitronectin Receptor* 表現量較高[85]。因此 *CD36* 低表現量如何調控肺癌遷移能力仍然未知，需更多研究探討。

5.2 探討 *CD36* 低表現量於肺癌扮演重要角色的原因

先前研究在臨床上[61-64]以及實驗室先前研究[6]中發現 *CD36* 低表現量可能在肺癌中扮演重要的角色，然而根據我的研究結果指出 *CD36* 在不同肺癌細胞中對細胞生理功能造成不同的影響，因為先前研究不清楚 *CD36* 低表現量在肺癌中的調控機制，所以從其他癌症之先前文獻進行探討。有研究[82]發現乳癌細胞中 *CD36* 表現量較周邊正常組織低，該研究也發現相較正常組織的纖維母細胞，乳癌組織的纖維母細胞 *CD36* 表現量低。屬於結締組織中的纖維母細胞(Fibroblast)是構成乳房很重要的細胞，已經有研究發現腫瘤微環境中，纖維母細胞會影響癌細胞生理功能[86]，因此另一篇研究[81]發現 *CD36* 低表現量的纖維母細胞會釋放 Activin A，且將 *CD36* 低表現量的纖維母細胞以及乳癌細胞共培養發現會促進乳癌細胞的



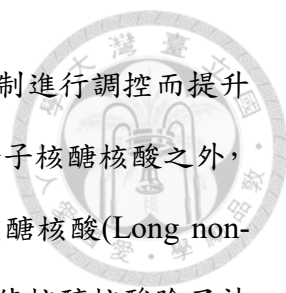
增生能力以及增加細胞群落數目。在臨床上也發現 Activin A 高表現量可能在肺癌扮演重要的腳色[87, 88]。纖維母細胞除了在乳房之外，在肺部也有，因此有研究針對肺癌的纖維母細胞探討轉錄體層級改變和肺癌發生之關聯[89]，因此後續研究可針對纖維母細胞和肺癌細胞共培養以探討纖維母細胞、Activin A 以及 CD36 對肺癌的發生影響以及相關機制。

5.3 探討 CD36 對癌症醣解作用的影響

先前研究發現[80]CL1-0 細胞侵襲能力較弱，CL1-5 細胞侵襲能力較強，此外有研究發現[90]CL1-0 利用較少葡萄糖以及產生較少乳酸，CL1-5 利用較多葡萄糖以及產生較多乳酸，再加上在大腸癌研究發現[78]，CD36 表現量下降會透過醣解作用活化以促進大腸癌腫瘤生成。因此我推測隨著 CD36 表現量下降，CL1 系列細胞株葡萄糖吞噬增加，醣解作用活性越強，CL1 系列細胞株侵襲能力越強。然而根據我的研究發現 CD36 基因靜默反而減少 CL1-0 葡萄糖吞噬，此結果與預測之假說不同。從先前文獻中發現卵巢癌細胞[57]會藉由 CD36 基因靜默會透過抑制 AMPK 訊號途徑以抑制卵巢癌細胞醣解作用活性，另外在肝癌[59]的研究也發現 CD36 基因靜默會透過抑制 Src/PI3K/AKT 訊號途徑以抑制肝癌細胞醣解作用活性，這些研究表示 CD36 在不同的癌症細胞對於糖解作用會截然不同的影響。我的研究也發現醣解作用相關的基因核醣核酸表現量下降，由此可知 CD36 基因靜默會抑制 CL1-0 醣解作用活性。然而目前在肺癌如何經由 CD36 調控醣解作用之相關機制仍需進一步做研究。

5.4 探討在食道癌 LIFR 不是 miR-548ba 直接目標基因的原因

先前研究[79]在卵巢顆粒細胞發現透過即時定量聚合酶連鎖反應以及螢光素酶檢測法證實 LIFR 是 miR-548ba 的直接目標基因，所以在我的研究中想探討在 CE81T LIFR 是否也是 miR-548ba 的直接目標基因，然而當 miR-548ba 大量表現反而 LIFR 核醣核酸表現量反而會上升，此外也發現 LIFR 之高表現量在食道癌扮演



重要角色[91-93]，因此推測在 CE81T *LIFR* 可能有受其他未知機制進行調控而提升表現量，而 miR-548ba 非主要調控者。先前研究發現[94]除了小分子核醣核酸之外，非編碼核醣核酸中的環狀核醣核酸(CircRNA)以及長鏈非編碼核醣核酸(Long non-coding RNA, LncRNA)也會和信使核醣核酸結合，因此同一條信使核醣核酸除了被特定小分子核醣核酸結合外，也有可能被特定長鏈非編碼核醣核酸結合以調控癌症生理功能[95, 96]。例如有研究發現在乳癌 LncRNA-CTD-210809.1 會結合 *LIFR* 的信使核醣核酸以促進 *LIFR* 核醣核酸以及蛋白質表現量[97]，另外在胃癌的研究發現 LncRNA-LOWEG 會結合 *LIFR* 的信使核醣核酸以促進 *LIFR* 核醣核酸以及蛋白質表現量[98]。因此我使用「ENCORI」找到在食道癌中有 11 個長鏈非編碼核醣核酸可能會和 *LIFR* 結合，其中有 8 個長鏈非編碼核醣核酸表現量和 *LIFR* 表現量呈正相關。非編碼核醣核酸除了會調控信使核醣核酸表現量之外，也會和小分子核醣核酸結合以抑制小分子核醣核酸表現進而調控小分子核醣核酸之目標基因表現量，以調控癌症生理功能，稱為小分子核醣核酸海綿(miRNA Sponge)[99-101]。使用「ENCORI」進行預測發現先前發現的 8 個長鏈非編碼核醣核酸都不會和 miR-548ba 結合，然而是否會結合可以透過螢光素酶檢測法驗證。綜合以上推測在食道癌 *LIFR* 可能透過其他機制調控，且 *LIFR* 並非 miR-548ba 直接目標基因。

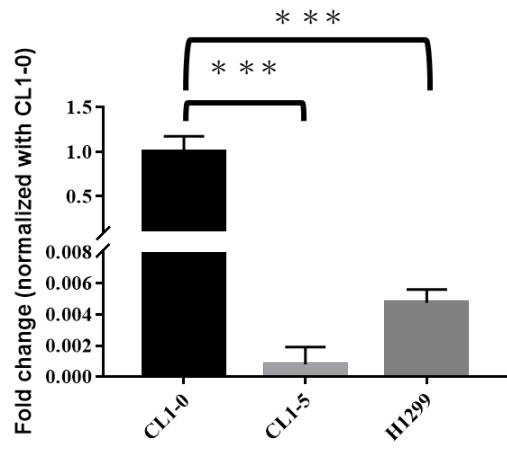


6. 結論

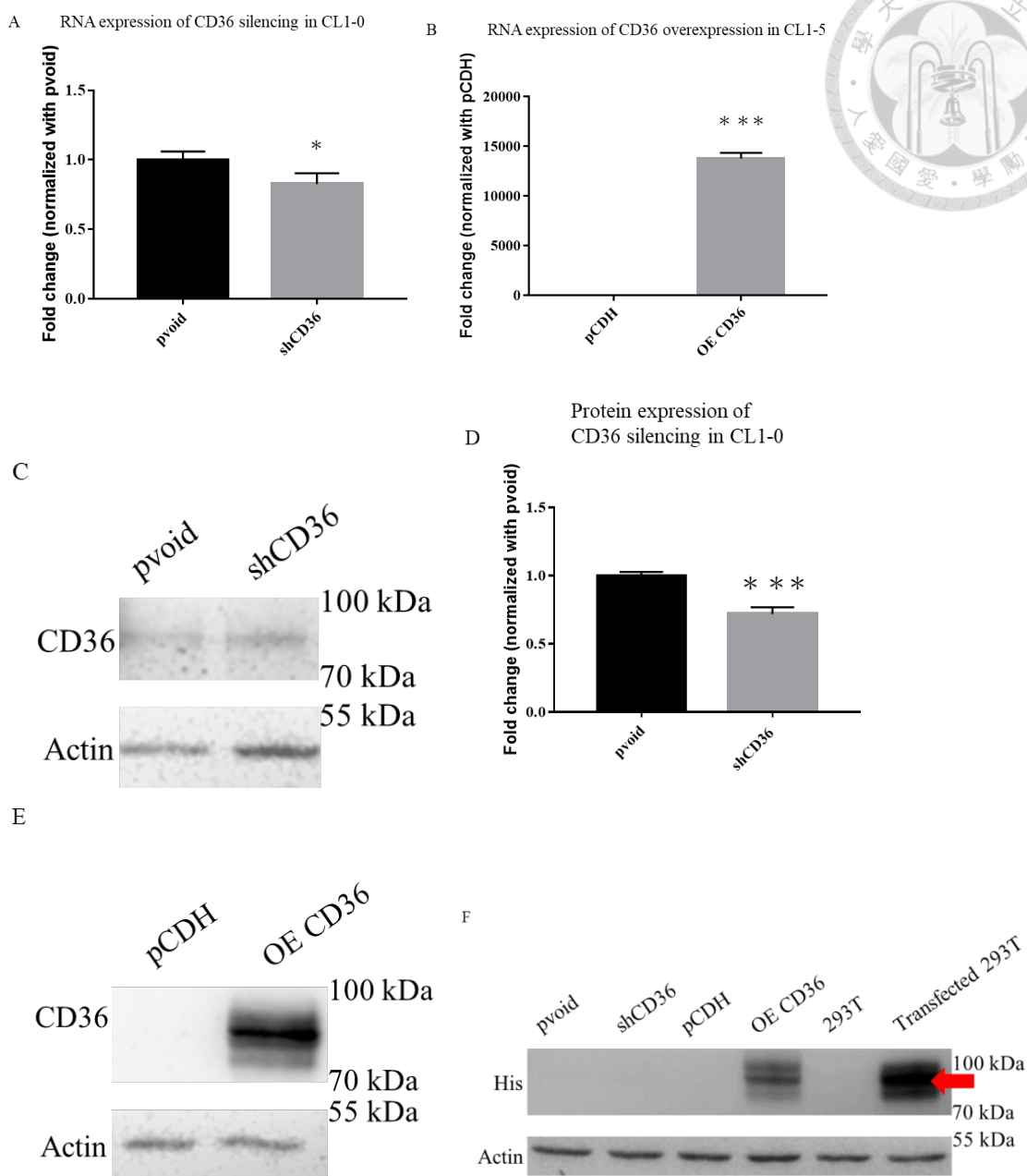
在細胞增生能力實驗當中 *CD36* 基因靜默會抑制 CL1-0 增生能力，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 的增生能力，但 *CD36* 大量表現會抑制 H1299 的增生能力。在細胞遷移能力實驗當中使用 Transwell 發現 *CD36* 基因靜默會促進 CL1-0 遷移能力，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 以及 H1299 的遷移能力。在細胞凋亡實驗當中 *CD36* 基因靜默會降低 CL1-0 死亡速率，然而 *CD36* 大量表現不會改變 CL1-5 的死亡速率。最後 *CD36* 基因靜默會減少 CL1-0 吞噬之葡萄糖量以及抑制醣解作用活性。綜合來看，*CD36* 在不同肺癌細胞中所造成之細胞生理功能的影響也不同。

miR-548ba 大量表現會促進 CE81T 的增生能力以及增加 CE81T 細胞群落數目，但不會改變 CE81T 遷移能力。接著由網路上預測小分子核糖核酸目標基因的資料庫以及即時定量聚合酶連鎖反應驗證發現，*MOB1B* 可能是 miR-548ba 的目標基因，然而 *MOB1B* 是否是 miR-548ba 的直接目標基因仍需後續實驗驗證。

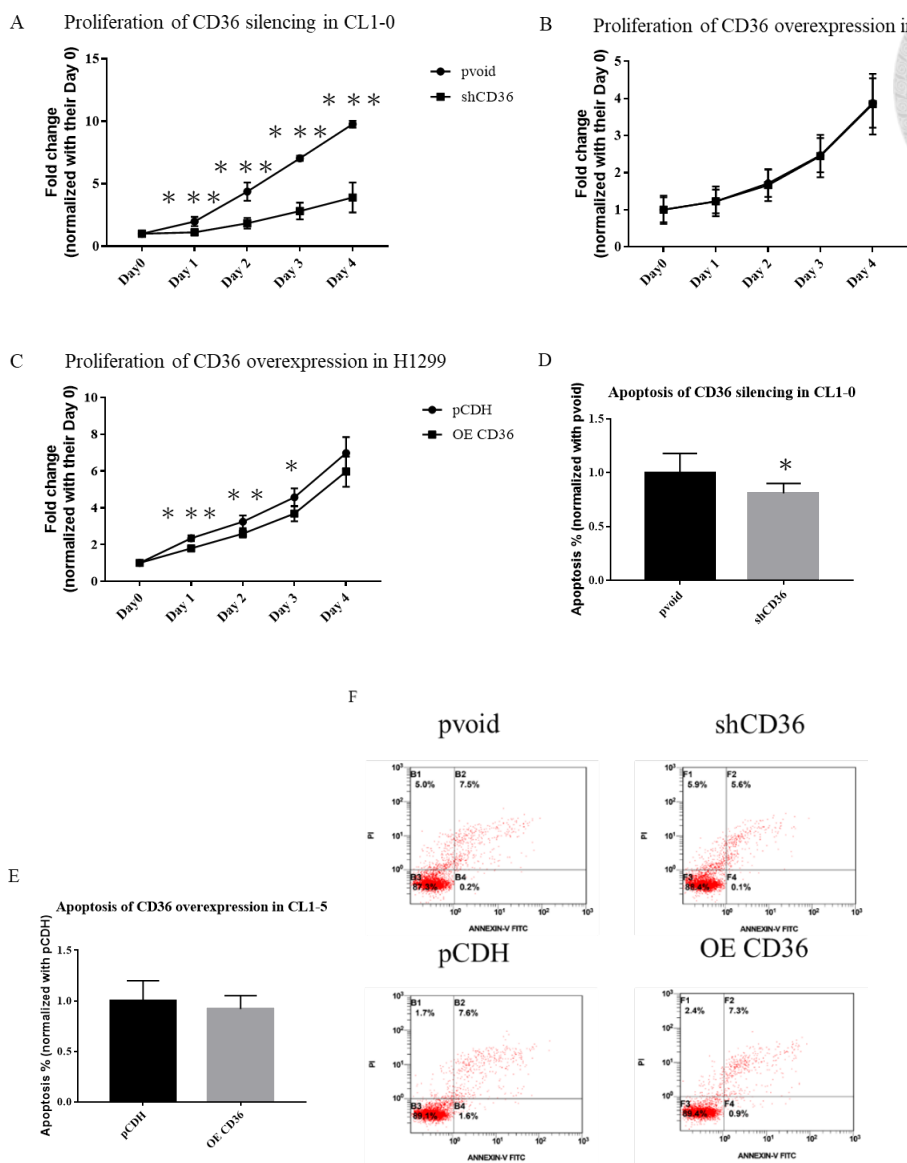
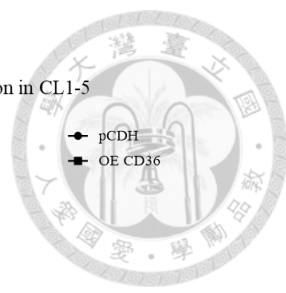
圖



圖一、使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測不同肺癌細胞 *CD36* 相對內生性表現量，且以 CL1-0 *CD36* 內生性表現量為基準。*** $p < 0.001$ 。

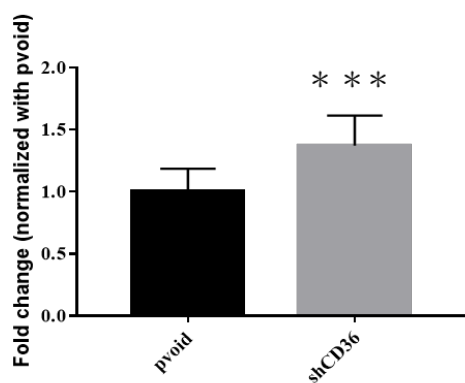


圖二、改變 CL1-0 以及 CL1-5 CD36 表現量。(A)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測在 CL1-0 CD36 基因靜默之 CD36 核糖核酸表現量。(B)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測在 CL1-5 CD36 大量表現之 CD36 核糖核酸表現量改變。(C)使用 CD36 抗體偵測在 CL1-0 CD36 基因靜默之 CD36 蛋白質表現量改變。(D)以 Actin 表現量為基準，量化(C)之西方墨點法結果。(E)使用 CD36 抗體偵測在 CL1-5 CD36 大量表現之 CD36 蛋白質表現量改變。(F)使用 His 抗體偵測 CL1-0 CD36 基因靜默以及 CL1-5 CD36 大量表現之 CD36 蛋白質表現量。* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$ 。

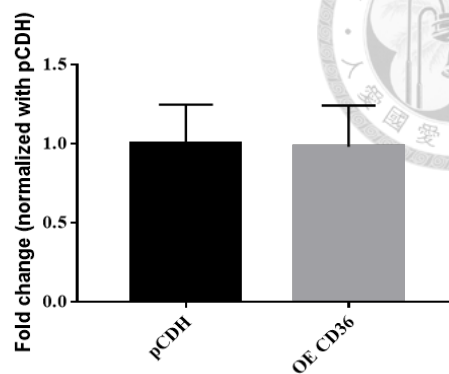


圖三、CD36 對 CL1-0、CL1-5 以及 H1299 細胞增生能力以及死亡速率的造成不同影響。(A)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 CD36 基因靜默對 CL1-0 細胞增生能力影響。(B)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 CD36 大量表現對 CL1-5 細胞增生能力影響。(C)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 CD36 大量表現對 H1299 細胞增生能力影響。(D)使用流式細胞儀偵測 CD36 基因靜默對 CL1-0 細胞死亡速率影響。(E)使用流式細胞儀偵測 CD36 大量表現對 CL1-5 細胞死亡速率影響。(F)使用 PI 以及 Annexin-V 染色之偵測 CD36 分別對 CL1-0 以及 CL1-5 細胞死亡速率影響的流式細胞儀代表圖。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

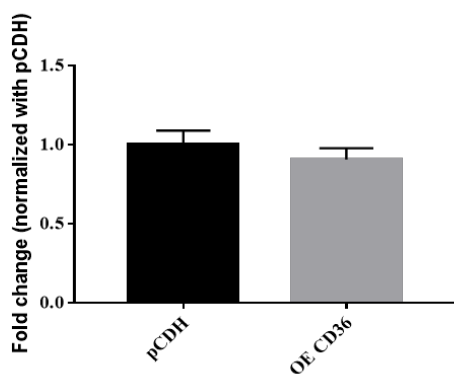
A Migration of CD36 silencing in CL1-0



B Migration of CD36 overexpression in CL1-5



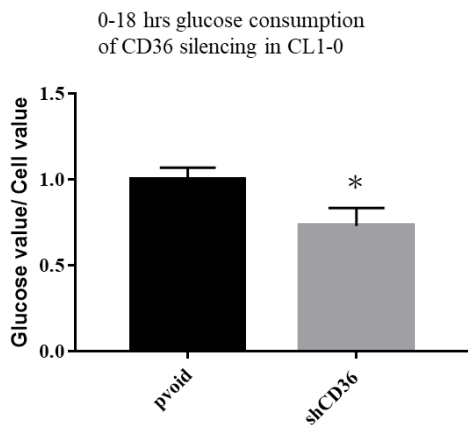
C Migration of CD36 overexpression in H1299



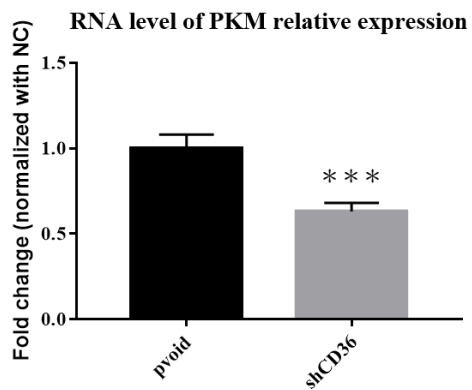
圖四、*CD36* 對 CL1-0、CL1-5 以及 H1299 細胞遷移能力造成不同影響。(A)使用 Transwell 偵測 *CD36* 基因靜默對 CL1-0 細胞遷移能力影響。(B)使用 Transwell 偵測 *CD36* 大量表現對 CL1-5 細胞遷移能力影響。(C)使 Transwell 偵測 *CD36* 大量表現對 H1299 細胞遷移能力影響。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。



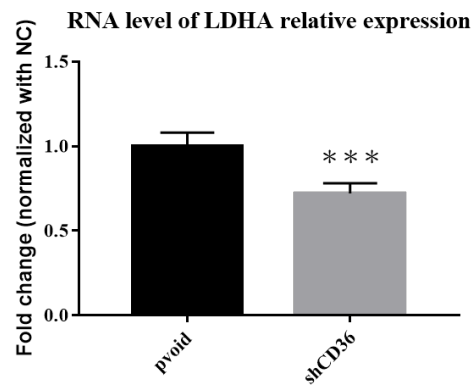
A



B



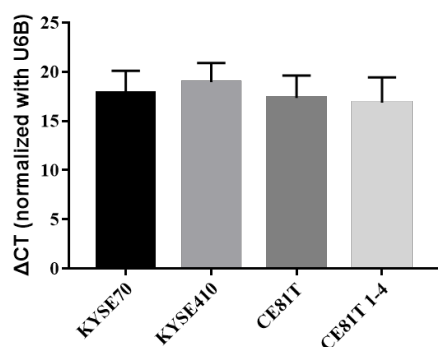
C



圖五、*CD36* 對 CL1-0 葡萄糖吞噬以及醱解作用活性影響。(A)偵測 *CD36* 基因靜默對 CL1-0 葡萄糖吞噬影響。(B)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 *CD36* 基因靜默之丙酮酸激酶核糖核酸表現量。(C)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 *CD36* 基因靜默之乳酸脫氫酶核糖核酸表現量。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。



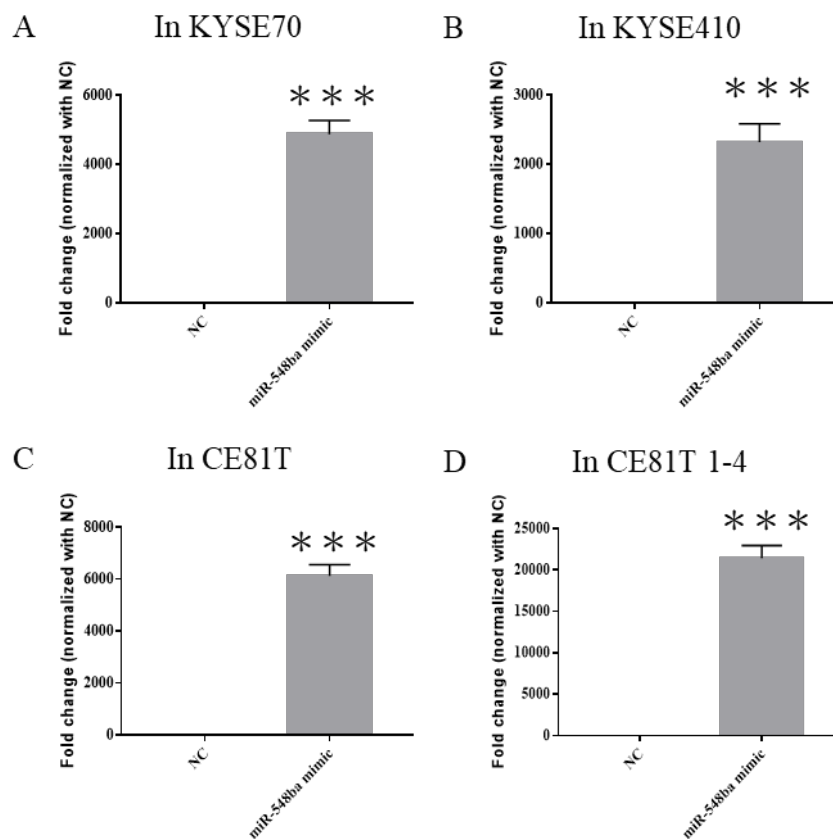
A miR-548ba relative expression



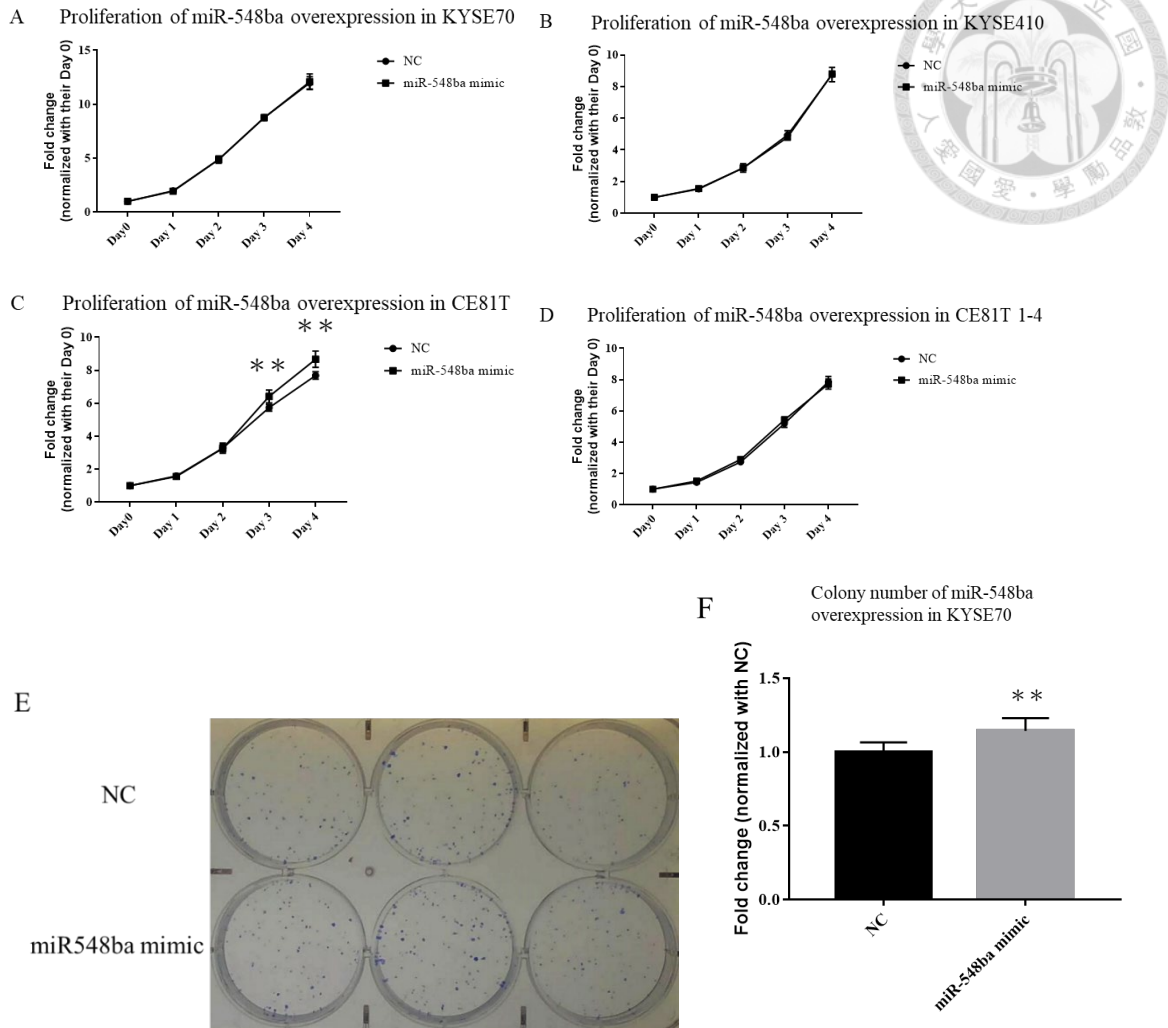
B Cell Lines CT Value (Average)

Cell Lines	CT Value (Average)
KYSE70	• 38.8
KYSE410	• 39.2
CE81T	• 38.8
CE81T 1-4	• 37.9

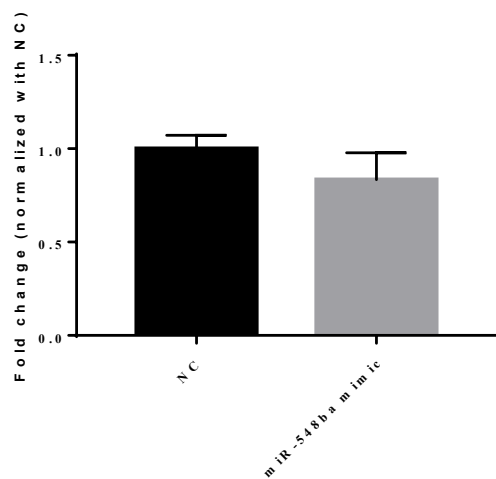
圖六、使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測不同食道癌細胞 miR-548ba 內生性表現量。(A) miR-548ba 相對內生性表現量，且以 *U6B* 表現量為基準。(B) miR-548ba CT 值。



圖七、改變 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 miR-548ba 核醣核酸表現量。(A)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測在 KYSE70 miR-548ba 大量表現之 miR-548ba 核醣核酸表現量。(B)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測在 KYSE410 miR-548ba 大量表現之 miR-548ba 核醣核酸表現量。(C)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測在 CE81T miR-548ba 大量表現之 miR-548ba 核醣核酸表現量。(D)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測在 CE81T 1-4 miR-548ba 大量表現之 miR-548ba 核醣核酸表現量。*** $p < 0.001$ 。



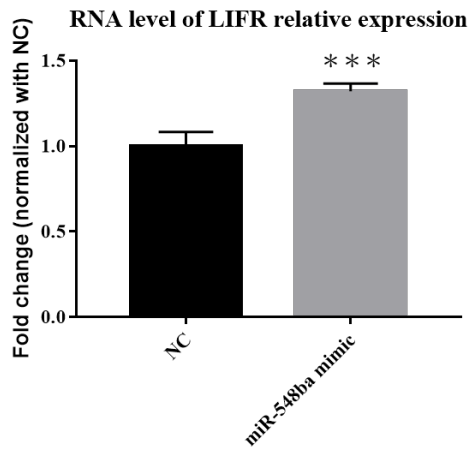
圖八、miR-548ba 對 KYSE70、KYSE410、CE81T 以及 CE81T 1-4 細胞增生能力影響。(A)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 miR-548ba 大量表現對 KYSE70 細胞增生能力影響。(B)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 miR-548ba 大量表現對 KYSE410 細胞增生能力影響。(C)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 miR-548ba 大量表現對 CE81T 細胞增生能力影響。(D)使用溴化-3-(4,5-二甲基-2-噻唑)試劑偵測 miR-548ba 大量表現對 CE81T 1-4 細胞增生能力影響。(E)使用細胞群落形成實驗偵測 miR-548ba 大量表現對 CE81T 細胞增生能力影響之代表圖。(F)使用細胞群落形成實驗偵測 miR-548ba 大量表現對 CE81T 細胞增生能力影響。** $p < 0.01$ 。



圖九、miR-548ba 對 CE81T 細胞遷移能力影響。



A



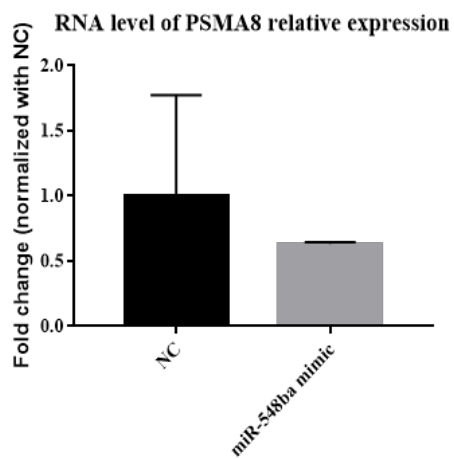
B



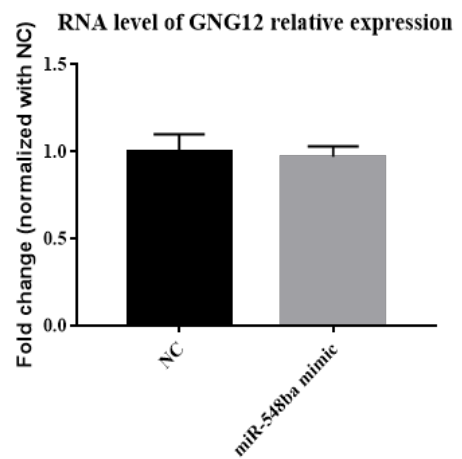
C

[Target Scan] and [miRDIP] and [miRDB]:
 PSMA8
 GNG12
 COX5A
 PABPC5
 MOB1B
 C5orf15
 PTAR1
 POLR3G
 KRAS
 CAV2

D

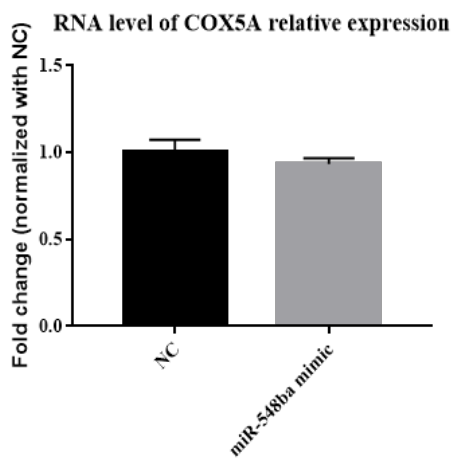


E

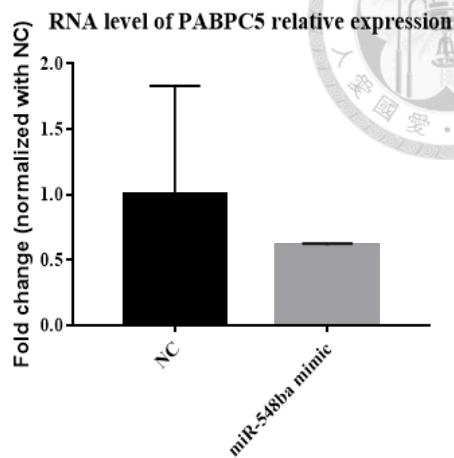




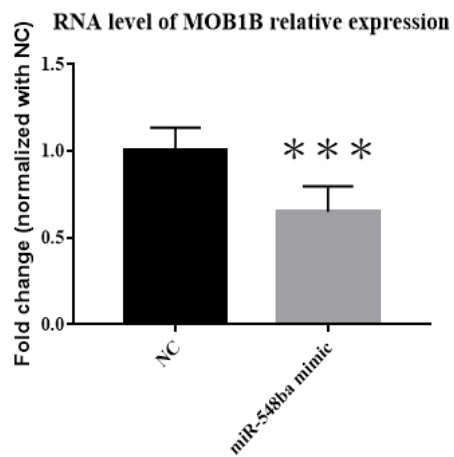
F



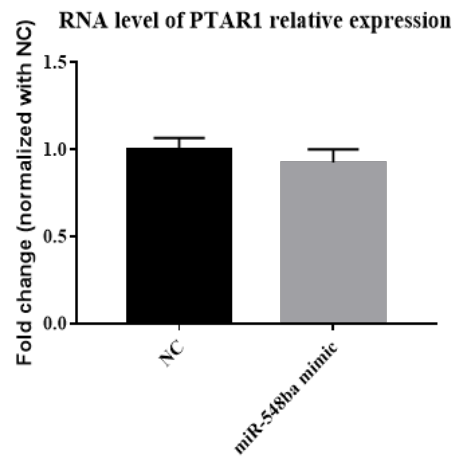
G



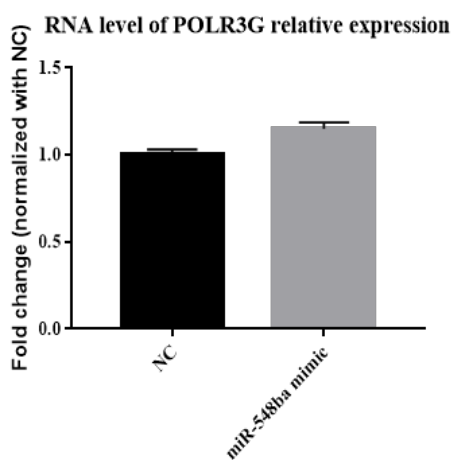
H



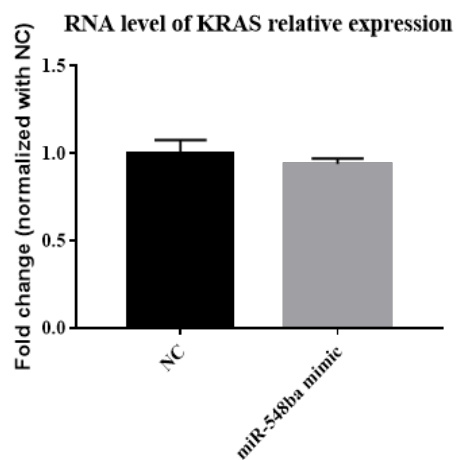
I



J

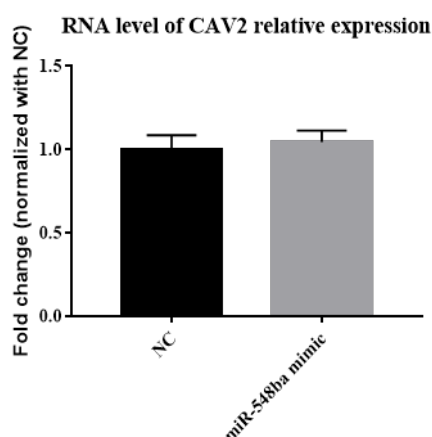


K





L



圖十、使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 可能的目標基因。(A)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *LIFR* 核醣核酸表現量。(B)分別使用 TargetScan、MIRDIP 以及 MIRDB 預測 miR-548ba 可能的目標基因，並以文氏圖顯示在三個不同網路上資料庫中都有被預測到的基因。(C) 130 個都有在 TargetScan、MIRDIP 以及 MIRDB 被預測到的基因中的前 10 個。(D)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *PSMA8* 核醣核酸表現量。(E)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *GNG12* 核醣核酸表現量。(F)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *COX5A* 核醣核酸表現量。(G)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *PABPC5* 核醣核酸表現量。(H)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *MOB1B* 核醣核酸表現量。(I)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *PTAR1* 核醣核酸表現量。(J)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *POLR3G* 核醣核酸表現量。(K)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *KRAS* 核醣核酸表現量。(L)使用即時定量聚合酶連鎖反應偵測 miR-548ba 大量表現之 *CAV2* 核醣核酸表現量。*** $p < 0.001$ 。



表

表一、進行小分子核醣核酸反轉錄聚合酶連鎖反應所使用之相關引子。

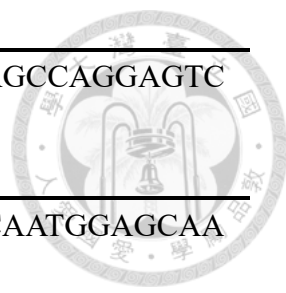
hsa-miR-548ba MIMAT0031175	序列
反轉錄引子	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACCAGAGCCAACAGCAA
<i>U6B</i> (Gene ID: 442906)	序列
反轉錄引子	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAACAAAATAT

表二、進行基因即時定量聚合酶連鎖反應所使用之相關引子。


基因名稱 (基因 ID)	正向引子	反向引子
<i>CD36</i> (Gene ID: 948)	GGCTGTGACCGGAAC TGTG	AGGTCTCCAACCTGGCATT GAA
<i>PKM</i> (Gene ID: 5315)	GACTGCCTTCATTCAG ACCCA	GGGTGGTGAATCAATGTCC AG
<i>LDHA</i> (Gene ID: 3939)	GGCCTGTGCCATCAGT ATCT	GGAGATCCATCATCTCTCCC
<i>LIFR</i> (Gene ID: 3977)	TGGAACGACAGGGGT TCAGT	GAGTTGTGTTGTGGGTCAC TAA
<i>PSMA8</i> (Gene ID: 143471)	ATGGCGTCTCGATATG ACAGG	TCAACTTGAAAAAGGTGTC CGT
<i>GNG12</i> (Gene ID: 55970)	AGCAAGCACCAACAA TATAGCC	AGTAGGACATGAGGTCCGC T
<i>COX5A</i> (Gene ID: 9377)	ATCCAGTCAGTTCGCT GCTAT	CCAGGCATCTATATCTGGCT TG
<i>PABPC5</i> (Gene ID: 140886)	TTCCGCCTTATGTGGT CTCAG	CATACGACTTTGCAGGACA GAA
<i>MOB1B</i> (Gene ID: 92597)	TCTCAATGAATGGGTT GCAGTT	TGTTTCGTTCCATCTGCCCAA T
<i>PTARI</i> (Gene ID: 375743)	CAGCGGGTTGTGAAG GACAT	ACATGGGATCAGGCCAATT TC
<i>POLR3G</i> (Gene ID: 10622)	CCAAGAGAGATGATG CCAAGAA	TAGTGAGTGGTGTGCCTTT G

<i>KRAS</i>	ACAGAGAGTGGAGGA	TTTCACACAGCCAGGAGTC
(Gene ID: 3845)	TGCTTT	TT

<i>CAV2</i>	AAGACCTGCCTAATGG	CTCGTACACAATGGAGCAA
(Gene ID: 858)	TTCTGC	TGAT



表三、進行小分子核糖核酸即時定量聚合酶連鎖反應所使用之相關引子。

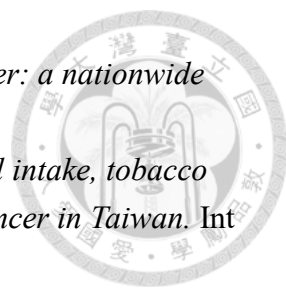


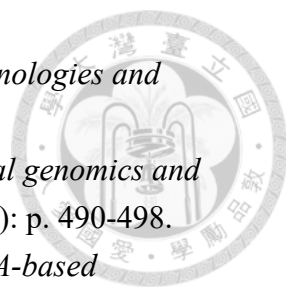
hsa-miR-548ba MIMAT0031175	序列
正向引子	GCCGCAAAGGTAAGTGTGATT
<i>U6B</i> (Gene ID: 442906)	序列
正向引子	TTCCTCCGCAAGGATGACACGC
Universal Probe #21	序列
反向引子	GTGCAGGGTCCGAGGT

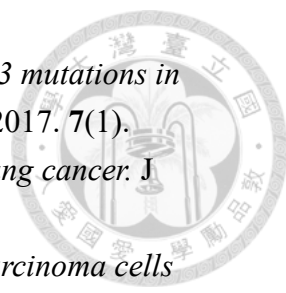


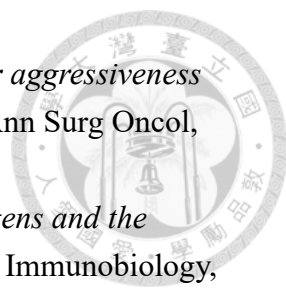
7. 參考資料

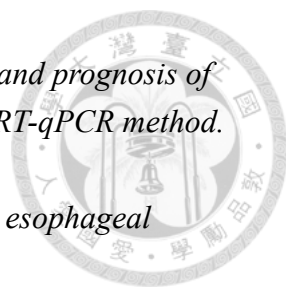
1. Health Promotion Administration, T., *Cancer registry annual report, 2019* December, 2021.
2. Malhotra, J., et al., *Risk factors for lung cancer worldwide*. Eur Respir J, 2016. **48**(3): p. 889-902.
3. Rivera, G.A. and H. Wakelee, *Lung cancer in never smokers*. Adv Exp Med Biol, 2016. **893**: p. 43-57.
4. Schabath, M.B. and M.L. Cote, *Cancer progress and priorities: lung cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019. **28**(10): p. 1563-1579.
5. de Groot, P. and R.F. Munden, *Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention*. Radiol Clin North Am, 2012. **50**(5): p. 863-876.
6. Lu, T.-P., et al., *Identification of a novel biomarker, SEMA5A, for non-small cell lung carcinoma in nonsmoking women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(10): p. 2590-2597.
7. Health Promotion Administration, T. *109 年 18 歲以上成人吸菸行為調查結果性別分析*. May, 2022.
8. P.Pfeifer, P.H.a.G., *Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke*. Carcinogenesis, March 2001. **22**(3): p. 367–374.
9. Shigematsu, H., et al., *Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(5): p. 339-346.
10. Eberhard, D.A., et al., *Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 5900-5909.
11. Yamamoto, H., et al., *PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers*. Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 6913-6921.
12. Wang, R., et al., *Analysis of major known driver mutations and prognosis in resected adenosquamous lung carcinomas*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(6): p. 760-768.
13. Cheng, Y.F., et al., *Esophageal squamous cell carcinoma and prognosis in Taiwan*. Cancer Med, 2018. **7**(9): p. 4193-4201.
14. Huang, F.L. and S.J. Yu, *Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment*. Asian J Surg, 2018. **41**(3): p. 210-215.

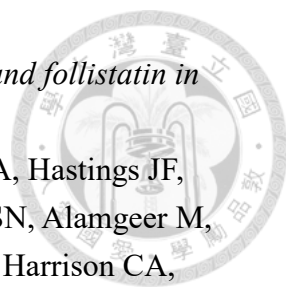
- 
15. Chen, M.F., et al., *Outcome of patients with esophageal cancer: a nationwide analysis*. *Ann Surg Oncol*, 2013. **20**(9): p. 3023-3030.
 16. Lee, C.H., et al., *Independent and combined effects of alcohol intake, tobacco smoking and betel quid chewing on the risk of esophageal cancer in Taiwan*. *Int J Cancer*, 2005. **113**(3): p. 475-482.
 17. Bregni, G. and B. Beck, *Toward targeted therapies in oesophageal cancers: an overview*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(6).
 18. Song, Y., et al., *Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer*. *Nature*, 2014. **509**(7498): p. 91-95.
 19. Lin, L., et al., *Activation of GATA binding protein 6 (GATA6) sustains oncogenic lineage-survival in esophageal adenocarcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(11): p. 4251-4256.
 20. Ismail, A., et al., *Early G(1) cyclin-dependent kinases as prognostic markers and potential therapeutic targets in esophageal adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(13): p. 4513-4522.
 21. Fathi, H., et al., *An efficient cancer classification model using microarray and high-dimensional data*. *Comput Intell Neurosci*, 2021. **2021**.
 22. Broadhead, M.L., et al., *Microarray: an instrument for cancer surgeons of the future?* *ANZ J Surg*, 2010. **80**(7-8): p. 531-536.
 23. Kamps, R., et al., *Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(2).
 24. Chen, M. and H. Zhao, *Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection*. *Hum Genomics*, 2019. **13**(1): p. 34.
 25. 周正中, 白., *微陣列生物晶片簡介及其應用*. *科儀新知*, 2002. **23**(5): p. 5-13.
 26. Wang, L., *IDENTIFICATION METHODS | DNA Hybridization and DNA Microarrays for Detection and Identification of Foodborne Bacterial Pathogens*, in *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014. p. 310-317.
 27. Dufva, M., *Introduction to microarray technology*. *Methods Mol Biol*, 2009. **529**: p. 1-22.
 28. 班仁知, 陳., *簡介微陣列在感染症之應用*. *生物醫學*, 2010. **3**(2): p. 405-411.
 29. Morganti, S., et al., *Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2019. **1168**: p. 9-30.
 30. 李曜珊, *簡介次世代定序技術及美國的法規管理*. *當代醫藥法規月刊*, September, 2017. **83**.
 31. Crossley, B.M., et al., *Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring*. *J Vet Diagn*, 2020. **32**(6): p. 767-775.


- 
32. Pareek, C.S., R. Smoczynski, and A. Tretyn, *Sequencing technologies and genome sequencing*. J Appl Genet, 2011. **52**(4): p. 413-435.
33. Bunnik, E.M. and K.G. Le Roch, *An introduction to functional genomics and systems biology*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(9): p. 490-498.
34. Leal, A., D. Sidransky, and M. Brait, *Tissue and cell-free DNA-based epigenomic approaches for cancer detection*. Clin Chem, 2020. **66**(1): p. 105-116.
35. Kustanovich, A., et al., *Life and death of circulating cell-free DNA*. Cancer Biol Ther, 2019. **20**(8): p. 1057-1067.
36. Desdouits, M., et al., *Novel opportunities for NGS-based one health surveillance of foodborne viruses*. One Health Outlook, 2020. **2**: p. 14.
37. Suarez-Ulloa, V., et al., *Bivalve omics: state of the art and potential applications for the biomonitoring of harmful marine compounds*. Mar Drugs, 2013. **11**(11): p. 4370-4389.
38. Chiu, C.Y. and S.A. Miller, *Clinical metagenomics*. Nat Rev Genet, 2019. **20**(6): p. 341-355.
39. Dziewulska, A., A.M. Dobosz, and A. Dobrzyn, *High-throughput approaches onto uncover (epi)genomic architecture of type 2 diabetes*. Genes (Basel), 2018. **9**(8).
40. Appiasie, D., et al., *"Multiomics" approaches to understand and treat COVID-19: mass spectrometry and next-generation sequencing*. BioChem, 2021. **1**(3): p. 210-237.
41. Frese, K.S., H.A. Katus, and B. Meder, *Next-generation sequencing: from understanding biology to personalized medicine*. Biology (Basel), 2013. **2**(1): p. 378-398.
42. Ziqi Tao, A.S., Rui Li, Yiqiu Wang, Xin Wang, Jing Zhao, *Microarray bioinformatics in cancer- a review*. J BUON, 2017. **22**(4): p. 838-843.
43. Piyush B Madhamshettiwar, S.R.M., Melissa J Davis, Antonio Reverter, Mark A Ragan, *Gene regulatory network inference: evaluation and application to ovarian cancer allows the prioritization of drug targets*. Genome Med, May, 2012.
44. Chong, C.R. and P.A. Janne, *The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1389-1400.
45. Xiaomin Liu, P.W., Caiyan Zhang, Zhongliang Ma, *Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer*. Oncotarget, 2017. **8**.

- 
46. Silwal-Pandit, L., A. Langerod, and A.L. Borresen-Dale, *TP53 mutations in breast and ovarian cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(1).
47. Mogi, A. and H. Kuwano, *TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**.
48. Sakurai, K., et al., *CD36 expression on oral squamous cell carcinoma cells correlates with enhanced proliferation and migratory activity*. Oral Dis, 2020. **26**(4): p. 745-755.
49. Yang, P., et al., *Dietary oleic acid-induced CD36 promotes cervical cancer cell growth and metastasis via up-regulation Src/ERK pathway*. Cancer Lett, 2018. **438**: p. 76-85.
50. Deng, M., et al., *CD36 promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF-beta*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 352.
51. Wang, B., et al., *Combination inhibition of triple-negative breast cancer cell growth with CD36 siRNA-loaded DNA nanoprism and genistein*. Nanotechnology, 2021. **32**(39).
52. Feng, W.W., et al., *CD36-mediated metabolic rewiring of breast cancer cells promotes resistance to HER2-targeted therapies*. Cell Rep, 2019. **29**(11): p. 3405-3420
53. Zhao, J., et al., *Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36*. Oncol Rep, 2017. **38**(4): p. 2105-2115.
54. Wang, J., et al., *Correction for: CD36 upregulates DEK transcription and promotes cell migration and invasion via GSK-3beta/beta-catenin-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer*. Aging (Albany NY), 2022. **14**(8): p. 3720-3721.
55. Pan, J., et al., *CD36 mediates palmitate acid-induced metastasis of gastric cancer via AKT/GSK-3beta/beta-catenin pathway*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 52.
56. Jiang, M., et al., *Fatty acid-induced CD36 expression via O-GlcNAcylation drives gastric cancer metastasis*. Theranostics, 2019. **9**(18): p. 5359-5373.
57. Ladanyi, A., et al., *Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis*. Oncogene, 2018. **37**(17): p. 2285-2301.
58. Kubo, M., et al., *Impact of CD36 on chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2020. **27**(2): p. 610-619.
59. Luo, X., et al., *The fatty acid receptor CD36 promotes HCC progression through activating Src/PI3K/AKT axis-dependent aerobic glycolysis*. Cell Death Dis, 2021. **12**(4): p. 328.

- 
60. Yoshida, T., et al., *CD36 expression Is associated with cancer aggressiveness and energy source in esophageal squamous cell carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2021. **28**(2): p. 1217-1227.
61. Pei, L., et al., *Discovering novel lung cancer associated antigens and the utilization of their autoantibodies in detection of lung cancer*. *Immunobiology*, 2020. **225**(2): p. 151891.
62. Mehan, M.R., et al., *Protein signature of lung cancer tissues*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35157.
63. Lv, M. and L. Wang, *Comprehensive analysis of genes, pathways, and TFs in nonsmoking Taiwan females with lung cancer*. *Exp Lung Res*, 2015. **41**(2): p. 74-83.
64. Chen, Y.J., et al., *Prognostic and immunological role of CD36: A pan-cancer analysis*. *J Cancer*, 2021. **12**(16): p. 4762-4773.
65. Hale, J.S., et al., *Context dependent role of the CD36--thrombospondin--histidine-rich glycoprotein axis in tumor angiogenesis and growth*. *PLoS One*, 2012. **7**(7).
66. Sun, Q., et al., *Hypermethylated CD36 gene affected the progression of lung cancer*. *Gene*, 2018. **678**: p. 395-406.
67. Julia Winter, S.J., Sarina Keller, Richard I. Gregory, Sven Diederichs, *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. *Nature Cell biology*, March, 2009. **11**: p. 228–234.
68. Zheng, B., et al., *MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(24): p. 7574-7583.
69. Wu, Z.S., et al., *miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met*. *Cancer*, 2011. **117**(13): p. 2842-2852.
70. Wang, H., et al., *MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(7): p. 1033-1042.
71. Jiang, H., et al., *MicroRNA663b mediates TAM resistance in breast cancer by modulating TP73 expression*. *Mol Med Rep*, 2018. **18**(1): p. 1120-1126.
72. Chen, X., et al., *miRNA-218-5p increases cell sensitivity by inhibiting PRKDC activity in radiation-resistant lung carcinoma cells*. *Thorac Cancer*, 2021. **12**(10): p. 1549-1557.
73. Xiao, Q., et al., *MicroRNA6753p promotes esophageal squamous cell cancer cell migration and invasion*. *Mol Med Rep*, 2018. **18**(4): p. 3631-3640.

- 
74. Lin, Z., et al., *Potential miRNA biomarkers for the diagnosis and prognosis of esophageal cancer detected by a novel absolute quantitative RT-qPCR method.* Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 20065.
75. Gu, J., et al., *Serum miR-331-3p predicts tumor recurrence in esophageal adenocarcinoma.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 14006.
76. Zhao, Y., et al., *MicroRNA-125a-5p enhances the sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin by suppressing the activation of the STAT3 signaling pathway.* Int J Oncol, 2018. **53**(2): p. 644-658.
77. Lin, W.C., et al., *miR-338-5p inhibits cell proliferation, colony formation, migration and cisplatin resistance in esophageal squamous cancer cells by targeting FERMT2.* Carcinogenesis, 2019. **40**(7): p. 883-892.
78. Fang, Y., et al., *CD36 inhibits beta-catenin/c-myc-mediated glycolysis through ubiquitination of GPC4 to repress colorectal tumorigenesis.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3981.
79. Rooda, I., et al., *Target prediction and validation of microRNAs expressed from FSHR and aromatase genes in human ovarian granulosa cells.* Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 2300.
80. Chu YW, Y.P., Yang SC, Shyu YC, Hendrix MJ, Wu R, Wu CW, *Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**: p. 353-360.
81. Cheng, Q., et al., *Overexpression of CD36 in mammary fibroblasts suppresses colony growth in breast cancer cell lines.* Biochem Biophys Res Commun, 2020. **526**(1): p. 41-47.
82. DeFilippis, R.A., et al., *CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues.* Cancer Discov, 2012. **2**(9): p. 826-839.
83. Simantov, R., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein.* Matrix Biol, 2005. **24**(1): p. 27-34.
84. Nan, P., et al., *Tumor-stroma TGF-beta1-THBS2 feedback circuit drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression via integrin alphavbeta3/CD36-mediated activation of the MAPK pathway.* Cancer Lett, 2022. **528**: p. 59-75.
85. Chen JJ, P.K., Hong TM, Yang SC, Sher YP, Shih JY, Wu R, Cheng JL, Roffler SR, Wu CW, Yang PC, *Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model.* Cancer Research, July 1, 2001. **61**: p. 5223–5230.
86. Wei, K., H.N. Nguyen, and M.B. Brenner, *Fibroblast pathology in inflammatory diseases.* J Clin Invest, 2021. **131**(20).

- 
87. Barany, N., et al., *Clinical relevance of circulating activin A and follistatin in small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2021. **161**: p. 128-135.
88. Marini KD, C.D., McCloy RA, Vaghjiani V, Gonzalez-Rajal A, Hastings JF, Chin V, Szczepny A, Kostyrko K, Marquez C, Jayasekara WSN, Alamgeer M, Boolell V, Han JZR, Waugh T, Lee HC, Oakes SR, Kumar B, Harrison CA, Hedger MP, Lorensuhewa N, Kita B, Barrow R, Robinson BW, de Kretser DM, Wu J, Ganju V, Sweet-Cordero EA, Burgess A, Martelotto LG, Rossello FJ, Cain JE, Watkins DN, *Inhibition of activin signaling in lung adenocarcinoma increases the therapeutic index of platinum chemotherapy*. Sci Transl Med, 2018 Jul 25. **10**(451).
89. Su, S.F., et al., *DNA methylome and transcriptome landscapes of cancer-associated fibroblasts reveal a smoking-associated malignancy index*. J Clin Invest, 2021. **131**(16).
90. Chang, Y.H., et al., *Comparative secretome analyses using a hollow fiber culture system with label-free quantitative proteomics indicates the influence of PARK7 on cell proliferation and migration/invasion in lung adenocarcinoma*. J Proteome Res, 2012. **11**(11): p. 5167-5185.
91. Kawazoe, T., et al., *Autocrine leukemia inhibitory factor promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via Src family kinase-dependent Yes-associated protein activation*. Mol Cancer Res, 2020. **18**(12): p. 1876-1888.
92. Amy M. Buckley, N.L.-L., Susan A. Kennedy, Margaret R. Dunne, John J. Aird, Emma K. Foley, Niamh Clarke, Narayanasamy Ravi, Dermot O'Toole, John V. Reynolds, Breandán N. Kennedy and Jacintha O'Sullivan, *Leukaemia inhibitory factor is associated with treatment resistance in oesophageal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2018. **9**(72): p. 33634-33647.
93. Zhao, Y., et al., *A novel prognostic mRNA/miRNA signature for esophageal cancer and its immune landscape in cancer progression*. Mol Oncol, 2021. **15**(4): p. 1088-1109.
94. Nie, J.H., et al., *Roles of non-coding RNAs in normal human brain development, brain tumor, and neuropsychiatric disorders*. Noncoding RNA, 2019. **5**(2).
95. Zhang, X., et al., *LncRNA TINCR/microRNA-107/CD36 regulates cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer via PPAR signaling pathway based on bioinformatics analysis*. Biol Chem, 2019. **400**(5): p. 663-675.
96. Dou, Y., et al., *Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 37982.

- 
97. Wang, M., et al., *Long non-coding RNA-CTD-210809.1 represses breast cancer metastasis by influencing leukemia inhibitory factor receptor*. *Cancer Sci*, 2018. **109**(6): p. 1764-1774.
98. Zhao, J.H., et al., *A novel long noncoding RNA-LOWEG is low expressed in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell invasion*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016. **142**(3): p. 601-609.
99. Ebert, M.S. and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: progress and possibilities*. *RNA*, 2010. **16**(11): p. 2043-2050.
100. Ebert, M.S. and P.A. Sharp, *Emerging roles for natural microRNA sponges*. *Curr Biol*, 2010. **20**(19): p. 858-861.
101. Misir, S., et al., *Circular RNAs serve as miRNA sponges in breast cancer*. *Breast Cancer*, 2020. **27**(6): p. 1048-1057.