

國立臺灣大學生命科學院生化科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemical Sciences

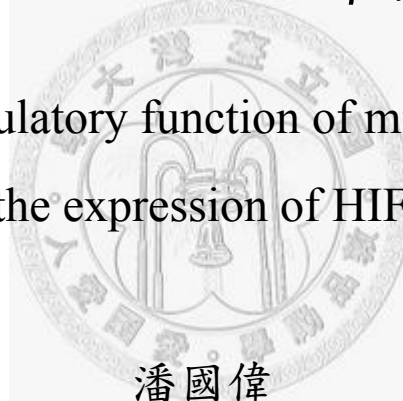
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

MicroRNA-221/222 調控 HIF-1 β 蛋白表現的探討

Studies of the regulatory function of microRNA-221/222
on the expression of HIF-1 β



潘國偉

GUO-WEI PAN

指導教授：余榮熾 博士

Advisor：LUNG-CHIH YU, Ph.D.

中華民國 97 年 6 月

June, 2008

致謝

本論文研究由國家科學委員會輔助進行。

特別感謝實驗室涂玉青學姐、謝粧衣學姐及王詩欣學姐在實驗及各方面的協助，也特別感謝每位口試評審委員的指正，完成本論文研究。



目錄

縮寫表.....	1
摘要.....	3
英文摘要.....	4
緒論	
一、miR-221/222 的生成與生理意義.....	5
1.miRNA 的生成.....	5
2.miRNA 的功能.....	6
3.miR-221/222 的生理意義.....	6
二、HIF-1 的組成與生理意義.....	7
1.HIF-1 的組成單元.....	7
2.HIF-1 的調控.....	8
3.HIF-1 的功能及生理意義.....	9
三、研究構想與目的.....	11
實驗材料與方法	
一、細胞培養.....	12
二、細胞蛋白萃取與西方點墨法 (Western blot) 分析.....	12
三、小片段 RNA 萃取及 miRNA 同步定量 RT-PCR.....	13
四、轉殖 miRNA mimic 及 miRNA inhibitor.....	13
五、構築報導質體與 Luciferase-Reporter assays.....	14
六、RNA 萃取及同步定量 RT-PCR 分析.....	15
七、腫瘤增生實驗.....	16
結果	
一、miR-221/222 可能的標的基因的預測.....	17
二、分析 HIF-1 β 蛋白質及 miR-221 在消化道癌細胞株中的表現.....	18

三、 miR-221 及 miR-222 對 HIF-1 β 蛋白表現的影響.....	19
四、 miR-221 及 miR-222 調控 HIF-1 β 基因表現的專一性探討.....	20
五、 miR-221/222 抑制 HIF-1 β 表現的機制探討.....	22
六、 miR-221/222 對胰臟癌細胞增生的影響.....	23
討論.....	25
參考文獻.....	41



圖表目錄

表 1. Primer 序列.....	29
表 2. 實驗中所選用的癌細胞株.....	30
圖 1. HIF-1 β 為 miR-221/222 的可能標的基因.....	31
圖 2. HIF-1 β 蛋白及 miR-221 在消化道癌細胞株中的表現.....	32
圖 3. 轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 抑制 HIF-1 β 表現.....	33
圖 4. 轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 回復 HIF-1 β 表現.....	34
圖 5. miR-221/222 對 Luciferase 報導基因表現的影響.....	35
圖 6. 以 Luciferase 活性變化分析預測的 seed site 對 miR-221/222 調控標的基因的 重要性.....	36
圖 7. 分析 miR-221/222 抑制 HIF-1 β 表現的機制.....	37
圖 8. 以 miR-221/222 inhibitor 抑制內生性 miR-221/222.....	38
圖 9. miR-221/222 對 MIAPaCa-2 胰臟癌細胞增生的影響.....	39
圖 10. miR-221/222 對 ASPC-1 胰臟癌細胞增生的影響.....	40
附圖 1. 細胞轉殖時間表.....	50
附圖 2. 報導質體 pGL3-control Map.....	51

縮寫表

3'-UTR	: 3'-untranslated region
Ago	: Argonaute
ARD-1	: Arrest-defective-1
ARE	: AU-rich element
ARNT	: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AHR	: Aryl hydrocarbon receptor
bHLH	: basic helix-loop-helix
BNip3	: Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3
CDK	: Cyclin-dependent kinase
CIP	: Calf intestinal alkaline phosphatase
CTAD	: C-terminal activation domain
DGCR8	: DiGeorge syndrome critical region gene 8
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
Exp5	: Expotin5
FBS	: Fetal bovine serum
FIH-1	: Factor inhibit HIF-1
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLUT1	: Glucose transporter-1
HIF-1	: Hypoxia-inducible factor-1
HRE	: Hypoxia response element
IGF-2	: Insulin-like growth factor 2
LDHA	: Lactate dehydrogenase A
LNA	: Locked nucleic acid
MiRNA	: microRNA

MiR-221/222 : microRNA-221/222

NTAD : N-terminal activation domain

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

M-PER : Mammalian protein extraction reagent

ODDD : Oxygen-dependent degradation domain

PACT : Interferon-inducible double stranded RNA dependent activator

PAS : Per/ARNT/Sim

PBS : Phosphate-buffered saline

PDH : Pyruvate dehydrogenase

PDK-1 : Pyruvate dehydrogenase kinase-1

PHD : Prolyl hydroxylation domain

Ran-GTP : Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate

RISC : RNA-induced gene silencing complex

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction

TGF- α : Transforming growth factor- α

Tfr : Transferrin receptor

TRBP : HIV-1 TAR RNA-binding protein

VEGF : Vascular endothelial growth factor

摘要

MicroRNAs (miRNAs) 為由 21~23 個核糖核酸所組成，不具轉譯意義的小片段單股 RNA，能藉由 translational repression 或 mRNA cleavage 的方式抑制標的基因的表現；它們被證實在人體內參與許多重要生理現象的調控，包括胚胎細胞的發育、細胞的分化及腫瘤細胞的生成和增生等。過去許多的研究顯示，microRNA-221/222 (miR-221/222) 於多種腫瘤細胞中呈現大量表現的現象。因此，本論文即以 miR-221/222 為目標；我們首先從 miRNA 資料庫中搜尋 miR-221/222 可能的標的基因，從其中我們篩選出了 *HIF-1 β* 基因為可能的標的基因。*HIF-1 β* 為組成 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) 轉錄因子的其中一子單元，HIF-1 轉錄因子在許多重要的細胞活動扮演重要的角色。

為證實 *HIF-1 β* 是否確實受到 miR-221/222 的調控，我們以消化道系統癌細胞株做為研究的細胞模型；我們於細胞株中轉殖 miR-221/222 mimic 或其 inhibitor，接著以西方點墨法分析 *HIF-1 β* 蛋白的表現；實驗的結果證實 *HIF-1 β* 蛋白的表現確可受到 miR-221/222 的抑制。而後我們建構載有正常或 miR-221/222 seed site 辨識序列突變的 *HIF-1 β* 基因 3'-untranslated region (3'-UTR) 片段的報導基因質體；報導基因活性分析的實驗，證實 *HIF-1 β* 確為 miR-221/222 的標的基因。我們也以即時同步定量 RT-PCR 分析 *HIF-1 β* 蛋白表現受 miR-221/222 抑制的細胞，其 *HIF-1 β* transcript 的表現量，來探討 miR-221/222 對 *HIF-1 β* 表現的抑制是藉由 translational repression 或 mRNA cleavage 的方式。

上述一系列的研究，顯示 miR-221/222 確實可調控 *HIF-1 β* 的表現；而這些初步的研究成果，也顯現了調控 HIF-1 轉錄因子活性的一條可能的新路徑。由於 miR-221/222 在胰臟癌癌化過程中，呈現大量表現的情形；因此我們也進一步以 miRNA inhibitor 抑制胰臟癌細胞株的內生性 miR-221/222，並將之注射至裸鼠，觀察 miR-221/222 對胰臟癌細胞增生的影響。但在兩種不同胰臟癌細胞株中我們卻觀察到不同的結果，一為明顯的抑制腫瘤細胞的增生，另一卻為促進。此項研究還需要未來更多的實驗進一步探討，但此兩種不同的結果皆已顯示 miR-221/222 對胰臟癌細胞增生的顯著影響。

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding, single-stranded RNAs of 21 ~ 23 nucleotides in length, which suppress the expressions of target genes through translational repression or mRNA cleavage. MiRNAs involve in the regulations of many important cellular activities, including embryo development, cell differentiation, tumorigenesis, and tumor cell proliferation, *etc.*. Previous investigations have shown that the expressions of microRNA-221 and microRNA-222 (miR-221/222) significantly elevate in the oncogenetic processes of several cancers; thus we focus on miR-221/222 in the present investigation. First, we searched for the potential target genes of miR-221/222 in miRNA databanks. HIF-1 β was selected for further investigation. HIF-1 β is one of the two subunits that constitute HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) transcription factor, which plays significant roles in many cellular activities.

We employed gastrointestinal cancer cell lines as study models to investigate whether miR-221/222 regulate the expression of HIF-1 β . MiR-221/222 mimics and specific inhibitors for miR-221/222 were transfected into the gastrointestinal cancer cells, and western blotting analyses for the expressions of HIF-1 β were followed. The results demonstrated the inhibitory function of miR-221/222 on HIF-1 β expression. In the successive experiments, the reporter plasmids bearing the 3'-untranslated region (3'-UTR) fragments, wild-type or miR-221/222-seed site mutated, of *HIF-1 β* gene were constructed, and the results obtained from the reporter gene activity assays of the constructs suggested that *HIF-1 β* gene is the target of miR-221/222. In addition, the expressions of *HIF-1 β* transcript in the cell models were quantitatively analyzed through real-time RT-PCR to elucidate which mechanism, translational repression or mRNA cleavage, leading to the suppression of HIF-1 β -protein expression by miR-221/222.

Our investigations demonstrate that miR-221/222 can inhibit the expression of HIF-1 β . This suggests a novel route through which the activity of HIF-1 transcription factor could be regulated.

As the significant elevation of miR-221/222 expressions in pancreatic cancer has been well documented, we used miRNA inhibitors to neutralize the endogenous miR-221/222 in pancreatic cancer cell lines, and employed human-nude mice xenograft model to examine the effects of miR-221/222 on the tumor formation of pancreatic cancer cells. However, opposite results were observed from the experiments of two different cell lines, with significant inhibition of tumor formation observed in one cell line while promotion in the other. More studies are expected for further exploration on this subject; nonetheless, the two opposite results obtained from the two cell lines both demonstrate the significant role of miR-221/222 in pancreatic cancer.

緒論

一、miR-221/222 的生成與生理意義

1. miRNA 的生成

在生物體內，miRNA 是指由 21~23 個核糖核酸所組成，不具轉譯意義的小片段單股 RNA (Bartel, 2004)，最早在 1990 年代於線蟲中被發現。miRNA 多位於基因中 intron 的位置，大部分與基因共用同一啟動子 (promoter)，利用 RNA polymeraseII 或 RNA polymeraseIII 進行轉錄，少部分 miRNA 具有自身的啟動子，能單獨進行轉錄 (Chen et al., 2004；Zeng, 2006)。與基因一同被轉錄出的 RNA 片段經 splicing 後，被切割成 miRNA 的前驅物 pri-miRNA，若為單獨進行轉錄的 miRNA 則不會再經 splicing 的修飾 (Lee et al., 2002)。在人類細胞核內，Drosha (RNaseIII type endonuclease)與 DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8)形成的 complex 辨識 pri-miRNA 形成的 stem-loop 結構的 stem 部位 (Zeng and Cullen, 2003；Denli et al., 2004；Han et al., 2004；Landthaler et al., 2004)，將 pri-miRNA 切成由 65~75 個核糖核酸所組成的 pre-miRNA，此時仍保有 stem-loop 的結構。Pre-miRNA 與 tRNA 結構相似，具有 3' overhang 形成 minihelix 結構 (Gwizdek et al., 2001)，核膜上的轉運蛋白 Exportin5 (Exp5)能辨識 3' overhang 結構 (Gwizdek et al., 2003)，以 ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate (Ran-GTP)作為 cofactor 將 pre-miRNA 送出核外 (Yi et al., 2003；Lund et al., 2004)。

Dicer-1 為 RNaseIII-like enzyme，位於細胞質中具有與 RNA 結合及剪切 RNA 的能力。送至細胞質的 pre-miRNA 會被 Dicer-1 與解螺旋酶、RNA 結合蛋白及其他功能性蛋白所組成的 complex-Argonaute (Ago)切割 loop 的結構 (Filipowicz et al., 2005；MacRae et al., 2006；MacRae et al., 2007)，形成長度 21~23 個核糖核酸的 miRNA duplexes (Billi et al., 2001；Provost et al., 2002；Zhang et al., 2002)。人類細胞中，Ago-miRNA duplexes 組成的 complex 會結合 HIV-1 TAR RNA-binding protein (TRBP)及 interferon-inducible double stranded RNA dependent activator (PACT)形成

RNA-induced gene silencing complex (RISC), 形成 RISC 後會中止 Dicer-1 的反應, 且進行最後的成熟 miRNA selection 及啟動成熟 miRNA 抑制標的基因 (target gene) 的功能 (Filipowicz, 2006 ; Lee et al., 2006)。

成熟 miRNA selection 的機制至今仍不明。過去曾有文獻指出, 成熟 miRNA selection 可能是藉由 RISC 中的解螺旋酶由 miRNA duplexes 兩端同時進行解螺旋, 5'端位於較易解開一端的 RNA 片段即為最終 mature form 的單股 miRNA (Khvorova et al., 2003 ; Schwarz et al., 2003)。此推測也解釋了為何成熟的 miRNA 於 5'端上常具有多個尿嘧啶 (Uridine)。

2. miRNA 的功能

在過去的文獻中指出, miRNA 能與標的基因所轉錄出的 mRNA 的 3'-UTR (3'-untranslated region)上特定序列配對, 形成 miRNA-RNA duplexes (Ha et al., 1996 ; Moss et al., 1997 ; Lai et al., 2002 ; Doench et al., 2004)。脊椎動物中 miRNA 與 RNA 配對時, miRNA 的 5'端前 8 mer 的吻合度被認為最為重要。其中, 第 1 個核糖核酸多由腺嘌呤 (adenosine)構成, 與標的序列 (target site)配對時可不須遵守 Watson-Crick pair (Grimson et al., 2007)。第 2 至第 8 個核糖核酸稱為 seed site (Lai et al., 2005), 為主要的配對核心, 決定 miRNA 能否調控標的基因。形成 miRNA-RNA duplexes 後, 則進一步藉由 translational repression (Lewis, 2003 ; Ambros, 2004 ; Sage et al., 2007)或 mRNA cleavage 抑制標的基因的表現。植物細胞中的 miRNA 與標的基因大多為完全配對, 走向 mRNA cleavage (Millar and Waterhouse, 2005)。動物細胞中大部分為部分配對, 走向 translational repression, 唯有少部分 miRNA 與標的基因配對程度較高, 或當中具有 AU-rich element (ARE) 序列的 mRNA, 能走向類似植物細胞中 mRNA cleavage 的途徑 (Bagga et al., 2005 ; Jing et al., 2005 ; Yekta et al., 2008)。

3. miRNA-221/222 的生理意義

在過去的研究中顯示, 許多腫瘤的生成肇因於 p27^{kip1} 的表現量降低 (Lloyd et

al., 1999 ; Blain et al., 2003) 。 $p27^{kip1}$ 為 cyclin-dependent kinase (CDK)/cyclin E complexes 的抑制蛋白，而 CDK/cyclin E 為控制細胞週期由 G_1 phase 晚期進入 S phase 的重要複合物。當細胞由 G_1 phase 晚期要進入 S phase 之前，須有 CDK/cyclin E 啟動 S phase 所需的基因；但若在細胞週期的檢查點中，細胞被發現基因上有無法修補的缺陷時，會啟動 $p27^{kip1}$ 基因，抑制 CDK/cyclin E，將細胞週期阻擋在 S phase 之前，使得細胞無法繼續複製。而一旦 $p27^{kip1}$ 的表現量大減，會使得基因有缺陷的細胞也能進行複製。在過去研究中雖然知道 $p27^{kip1}$ 表現降低會引發腫瘤，但卻極少發現是由於 $p27^{kip1}$ 基因自身的突變所造成，所以造成腫瘤生成的機制一直不明。直到最近的文獻中顯示， $p27^{kip1}$ 為 miR-221/222 的標的基因 (Sage et al., 2007)，且同時在 thyroid papillary carcinoma (Pallante et al., 2006 ; Visone et al., 2007)、pancreatic adenocarcinoma (Bloomston et al., 2007)、glioblastoma (Ciafre et al., 2005) 及 prostate carcinoma (Galardi et al., 2007) 等多種腫瘤細胞中發現 miR-221/222 呈現大量表現，才瞭解造成 $p27^{kip1}$ 表現量減少引發腫瘤生成的主因。

miR-221/222 除了造成腫瘤細胞的形成外，也對腫瘤細胞的生長速度有所影響。過去有文獻報導指出，若抑制 thyroid papillary carcinoma 中的 miR-221，可以使得腫瘤細胞增生速度顯著的降低 (Pallante et al., 2006)。

miR-221/222 不僅在腫瘤生成扮演重要的角色，miR-221/222 的表現也會經抑制 kit receptor 影響正常的紅血球及 erythroleukemic 細胞的生成 (Felli et al., 2005)。同時，miR-221/222 也能經抑制 kit receptor，抑制血管增生 (angiogenesis)，影響組織器官的發育 (Poliseno et al., 2006)。

二、HIF-1 的組成及生理意義

1. HIF-1 的組成單元

HIF (hypoxia-inducible factor) 為調控 hypoxia-inducible 基因表現的重要轉錄因子 (transcription factor)，由 α 子單元 (HIF- α) 及 β 子單元 (HIF- β) 兩個子單元組

成。過去的研究中發現，HIF 具有三種不同的異構物，分別為 HIF-1、HIF-2、HIF-3，其表現具有組織特異性，且功能也不盡相同，其中以 HIF-1 的功能最為重要，也最為常見 (Lee et al., 2004；Ke and Costa, 2006)。

HIF-1 中， α 子單元主要由四個 domain 組成，由 N 端至 C 端分別為 basic helix-loop-helix (bHLH)、Per/ARNT/Sim (PAS)、N-terminal activation domain (NTAD) 及 C-terminal activation domain (CTAD)，其中 HIF-1 α 蛋白上第 401~603 胺基酸之間的區域又稱為 Oxygen-dependent degradation domain (ODDD)，為調控 HIF-1 α 蛋白穩定性的重要區域。HIF-1 β 主要由兩個 domain 組成，由 N 端至 C 端分別為 bHLH 及 PAS (Huang et al., 1998；Willian and Kaelin, 2005)。HIF-1 α 與 HIF-1 β 利用 PAS domain 作結合 (Yang et al., 2005)，結合而成的 HIF-1 能以 bHLH 結合在 DNA 的 HRE (hypoxia response element) 上，調控基因的表現。HIF-1 主要的轉錄調控活性位於 HIF-1 α 的 CTAD 上，CTAD 能與 coactivator p300/CBP 結合，HIF-1 與 p300/CBP 結合後才具有轉錄因子的活性 (Kung et al., 2000)。

2. HIF-1 的調控

組成 HIF-1 的 HIF-1 α 及 HIF-1 β 在細胞中均處於持續表現的狀態，但 HIF-1 α 的轉錄調控活性及蛋白穩定性會受到氧分壓的影響，唯有細胞處在低氧狀態下 (hypoxia 狀態，氧分壓 0.5%~5%)，HIF-1 α 才能與 HIF-1 β 組成完整並且具有功能性的 HIF-1 (Jiang et al., 1996)。當處於低氧狀態下，HIF-1 α 蛋白能經由 p42/p43 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 於 Thr796 上作磷酸化 (phosphorylation) 修飾，經磷酸化修飾的 HIF-1 α 與 HIF-1 β 有較好的結合力，與 HIF-1 β 組合成完整的 HIF-1 (Hur et al., 2001；Gradin et al., 2002)。

若處於正常氧分壓狀態下 (nomoxia 狀態，氧分壓 6%~21%)，HIF-1 α 蛋白上的 Asn803 (於 CTAD 上) 會最先被 factor inhibit HIF-1 (FIH-1) 以氧分子為基質作氫氧化 (hydroxylation) 修飾，氫氧化修飾後的 CTAD domain 會失去與 p300/CBP 結合的能力，使得 HIF-1 失去轉錄因子的活性 (Lando et al., 2002)。隨著氧分壓的上

升，HIF-1 α 蛋白上的 Pro402 和 Pro564 及 Lys532 會接著被 prolyl hydroxylation domain (PHD)和 arrest-defective-1 (ARD-1)分別作氫氧化與乙醯基化(acetylation)修飾。經修飾之後的 HIF-1 α 能與 VHL(von Hippel-Lindau)蛋白結合(Jeong et al., 2002; Willian and Kaelin, 2005; Ke and Costa, 2006)。VHL 蛋白為 E₃ ligase family 的一員，VHL 與 HIF-1 α 結合後，會對 HIF-1 α 作 polyubiquitination 的修飾，而被 polyubiquitination 的 HIF-1 α 會很快的經 proteosome-dependent 的降解途徑被降解，此反應於細胞中十分的快速，於氧分壓 $\sim$ 20%的正常氧分壓狀態下，HIF-1 α 的半衰期僅約 5 分鐘 (Cockman et al., 2000; Tanimoto et al., 2000; Masson et al., 2001)。

相較於 HIF-1 α ，HIF-1 β 則十分的穩定，不受氧分壓的調控，且表現量十分高。

3. HIF-1 的功能及生理意義

HIF-1 為生物體內重要的轉錄因子，它藉由辨識基因上的 HRE 序列 (5'-RCGTG-3')活化 hypoxia-inducible 基因。最早被發現受 HIF-1 調控的基因為 *EPO* (erythropoietin)基因。*EPO* 為促進紅血球增生的重要因子。過去利用各種細胞模型的研究結果顯示，若當人體組織器官處於低氧狀態下時，*EPO* 會受到 HIF-1 的調控，表現大量的 *EPO* 蛋白，促進紅血球的增生，增加人體內能攜帶的氧氣總量 (Semenza et al., 1991)。而為了因應大量的紅血球增生，HIF-1 也會調控 transferrin receptor (Tfr)基因，表現大量的 Tfr，將與鐵離子結合的固鐵蛋白送入細胞內，提高細胞吸收鐵離子的能力，以得到足夠的鐵離子來生成紅血球所需的血紅蛋白 (Generale et al., 1999; Lok and Ponka, 1999)。除此之外，*VEGF* (Vascular endothelial growth factor)基因上也具有 HRE (Forsythe et al., 1996)，在低氧狀態下也同樣會受到 HIF-1 的調控。*VEGF* 為促進血管增生的重要因子，在低氧狀態下，HIF-1 能刺激 *VEGF* 大量表現，誘使血管增生，以增加氧氣的輸送率。

HIF-1 除了引發紅血球生成與血管增生外，HIF-1 對於腫瘤細胞存活、增生及轉移也有著密不可分的關係。過去的研究報告中指出，腫瘤細胞中的 core tumor

經常處於低氧環境下，呼吸作用的電子傳遞鏈會因無法得到足夠的氧作為電子接受者，造成 Reactive Oxygen Species (ROS)產物累積，為了避免過多 ROS 產物累積誘發死亡，腫瘤細胞中的 HIF-1 會促進 MXI-1 蛋白表現，藉由 MXI-1 蛋白抑制粒線體的生成，降低呼吸作用。正常細胞中，MYC 與 MAX 形成的 complex 能促進粒線體的生成。而腫瘤細胞能藉由大量表現 HIF-1 與 MAX 競爭 MYC 的方式，抑制粒線體的生成 (Zhang et al., 2007; Dang et al., 2008)。為了因應呼吸作用的降低，腫瘤細胞中的 HIF-1/MYC complex 會調控醣解代謝 (glycolysis)的酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)大量表現 (Lu et al., 2002)，加速醣解代謝。除了大量表現醣解代謝的酵素外，HIF-1 也會造成細胞的 glucose transporter-1 (GLUT1)大量表現，使腫瘤細胞能得到更多的醣進行代謝 (Chen et al., 2001)。而為了避免醣解代謝的最終產物 pyruvate 進入三羧酸循環走向呼吸作用，HIF-1 也會誘導 pyruvate dehydrogenase kinase-1 (PDK-1)及 lactate dehydrogenase A (LDHA)的大量表現，抑制 pyruvate dehydrogenase (PDH)，使 pyruvate 走向乳酸發酵的途徑，將主要產能途徑由呼吸作用轉換成無氧醣解作用，使腫瘤細胞得以在低氧環境下存活，也藉此淘汰無法於低氧環境下生存的腫瘤細胞 (Semenza et al., 1996; Kim et al., 2006; Semenza, 2007)。

腫瘤細胞中亦能藉由 HIF-1 誘導 VEGF 的表現，刺激血管增生，提供腫瘤細胞轉移的通道。HIF-1 也能誘導協助腫瘤細胞轉移時分解基底層 (basement membrane)及做貼附動作所需的蛋白大量表現，使腫瘤細胞轉移至其他位置 (Krishnamachary et al., 2003; Büchler et al., 2004; Postovite et al., 2008)。另外，HIF-1 與 insulin-like growth factor 2 (IGF-2)、transforming growth factor- α (TGF- α)在腫瘤細胞中，亦被證明存在著正向的相互調控關係，能促進腫瘤細胞的增生 (Feldser et al., 1999; Semeza, 2003)。若將 HIF-1 α 突變的癌細胞株注射至裸鼠，腫瘤生長的速度比具正常 HIF-1 α 的癌細胞株降低許多 (Maxwell et al., 1997; Zhang et al., 1997)。

HIF-1 除了能調控生長因子 (growth factor)，加速腫瘤細胞的增生外，也能藉由調控細胞凋亡因子，調控腫瘤細胞的死亡。在某些腫瘤細胞中，proapoptotic 蛋白 Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3 (BNip3) 呈現大量表現 (Sowter et al., 2001)；而 *BNip3* 基因的啟動子上也被證實具有 HRE，能在低氧狀態下受到 HIF-1 調控，控制腫瘤細胞凋亡 (Bruick, 2003)。如前段所述，許多腫瘤細胞擁有在缺氧狀態下誘發腫瘤細胞死亡的調控機制，而留有此機制的目的被推測可能是藉此淘汰無法於缺氧環境下生存的腫瘤細胞，但能在缺氧環境下生存腫瘤細胞如何抵抗此調控機制而生存下去，至今仍不明。

三、研究構想與目的

在腫瘤細胞中，miR-221/222 與 HIF-1 均扮演著極重要的角色，特別是在腫瘤細胞的生成與增生。我們於預測 miRNA 標的基因的資料庫中發現，HIF-1 中 HIF-1 β 子單元為 miR-221/222 的可能標的基因。於此，我們利用消化道系統的癌細胞株作為細胞模型，探討在腫瘤細胞中 miR-221/222 對 *HIF-1 β* 基因表現的影響。

實驗材料與方法

一、細胞培養

人類大腸直腸癌細胞株 HCT116、人類胰臟癌細胞株 MIAPaCa-2、人類腎臟癌細胞株 HEK293T 及非洲綠猴腎臟癌細胞株 COS-7，培養於含 10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO)、50 unit/mL penicillin (GIBCO) 及 50 µg/mL streptomycin (GIBCO) 的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO) 培養液中，置於含有 5% CO₂ 的 37°C 恆溫培養箱中培養。HCT116 及 HEK293T 細胞以 8.5×10^4 /mL 的細胞濃度做繼代培養；MIAPaCa-2 及 COS-7 細胞以 1×10^5 /mL 的細胞濃度做繼代培養。

人類胃癌細胞株 MKN45 及人類胰臟癌細胞株 ASPC-1 培養於含 10% FBS、50 unit/mL penicillin 及 50 µg/mL streptomycin 的 RPMI1640 (GIBCO) 培養液中。以 1×10^5 /mL 的細胞濃度做繼代培養。

二、細胞蛋白萃取與西方點墨法 (Western blot) 分析

將細胞由液態氮中取出，置於 37°C 水浴槽中解凍，於解凍後加入適量的培養液，離心移去培養液，加入適量體積的 1×PBS 做 wash，離心移去 PBS，收取沉澱的細胞。加入適量的 M-PER (Mammalian protein extraction reagent, Promega) 溶液至所收取的細胞中，冰上作用 5 分鐘裂解細胞，於 4°C 下以 KUBOTA 3700 離心機以 $14000 \times g$ 離心 3 分鐘，離心後收取 cell lysate，以 BIO-RAD Protein Assays 套組 (BIO-RAD) 作蛋白質定量，定量流程參考 BIO-RAD 實驗手冊。

取含 12 µg 蛋白質的 cell lysate 以 10% SDS-PAGE 做蛋白分離。將於 SDS-PAGE 分離好的蛋白以 iBlot™ Transfer Stack (Invitrogen) 轉印至 nitrocellulose 膜上。西方點墨法流程參照 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al*, 1996)。西方點墨法所用的 blocking reagent 為 5% 脫脂奶粉 (BD Biosciences)；一級抗體為 mouse anti-human HIF-1β (1:3000 稀釋, BD Biosciences)、mouse

anti-human α -tubulin (1:9000 稀釋, Abcam); 二級抗體為 goat anti-mouse IgG-HRP (1:10000 稀釋, Abcam)。以 Western LightingTM Chemiluminescence Reagent Plus Enhanced luminol 試劑(PerkinElmer)做冷光呈色。由於 HIF-1 β 與 α -tubulin 的蛋白大小有明顯差異, 我們於實驗中將膜裁開, 分別做抗體結合反應及冷光呈色。

三、小片段 RNA 萃取及 miRNA 同步定量 RT-PCR

細胞中小片段 RNA 以 *mirVana*TM PARISTM 套組 (Ambion) 萃取, 實驗流程參照 Ambion 實驗手冊。接續利用 TaqMan[®] MicroRNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems) 配合 TaqMan[®] Human MicroRNA Assays 套組 (Applied Biosystems) 中 hsa-miR-221、hsa-miR-222 及 hsa-U6 RNA 的專一性引子, 將小片段 RNA 合成 cDNA。Reverse transcription 的條件為 16°C 30 分鐘、42°C 30 分鐘、85°C 5 分鐘, 4°C 中止反應。以合成好的 cDNA 當作模板, 分別利用 TaqMan[®] Human MicroRNA Assays 套組中 hsa-miR-221、hsa-miR-222 及 hsa-U6 RNA 的專一性探針配合 TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 以 GenAmp 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 進行同步定量 PCR 分析。

四、轉殖 miRNA mimic 及 miRNA inhibitor

轉殖前 24 小時將細胞以約五分滿培養於 12 well plate (HCT116 為 6.5×10^4 /mL; MKN45 為 8×10^4 /mL; MIAPaCa-2 為 8×10^4 /mL; ASPC-1 為 1×10^5 /mL), 每個 well 含細胞培養液 1mL。由於轉殖 miR-221 inhibitor、miR-222 inhibitor 及 scramble-miR 的轉殖試劑細胞毒性較強, 若需同時轉殖 miRNA mimic 與 miRNA inhibitor 時, 我們優先轉殖 miRNA inhibitor。

MiRNA inhibitor 為來自 Exiqon 公司的 miRCURYTM LNA Knockdown probes, 具有能與 miRNA 互補的互補序列。將 miR-221 inhibitor、miR-222

inhibitor 或 scramble-miR 以 LipofectaminTM Transfection Reagent (Invitrogen) 搭配 PlusTM Reagent (Invitrogen) 轉殖至已貼附完成的細胞，轉殖濃度為 100 nM，作用體積 400 μ L，作用時間為 5 個小時。作用 5 個小時之後移去細胞培養液，以適量的細胞培養液清洗細胞表面一次，接著以 DharmaFECT[®] Transfection Reagent 2 (Dharmacon) 轉殖 miR-221 mimic、miR-222 mimic 或 random oligomer (Dharmacon)，轉殖濃度為 100 nM，作用體積 1 mL。於轉殖 72 個小時後收取細胞。(轉殖時間於附圖 1A)

五、構築報導質體與 Luciferase-Reporter Assay

1. 構築報導質體 pGL3-control HIF-1 β 3'-UTR

以 HCT116 細胞 cDNA 做為模板，*HIF-1 β* 3'-UTR 的專一性引子 ARNTf1-XbaI、ARNTTr1-XbaI (表 1)，放大 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 +1 bp 至 +2300 bp 片段 (以 stop codon TAG 之後的第一個位置為 +1)。PCR 條件為 95°C 5 分鐘，94°C 45 秒、54°C 30 秒、72°C 2 分 30 秒 (42 cycle)，於 4°C 中止反應。此 PCR 反應可得到 2.3 kb 的 *HIF-1 β* 3'-UTR 片段。利用 Xba-I (Promega) 限制酶對此片段與報導質體 pGL3-control (Promega，附圖 2) 做剪切，為了避免連接時報導質體發生自體接合，我們以 CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, BioLab) 對切開的報導質體做去磷酸化，之後再將質體及放大的片段混合在一起，於 16°C 以 T4 DNA Ligase (Promega) 做連接，構築成 pGL3-control HIF-1 β 3'-UTR (pH3U)。

2. 構築 seed site 突變的報導質體 pGL3-control HIF-1 β 3'-UTR mutant

為構築具有 miRNA seed site 所辨識序列突變的 *HIF-1 β* 3'-UTR 報導質體，我們以 MegaPrimer PCR 的方式放大此片段。我們以構築好的 pH3U 當做模板，利用 *HIF-1 β* 3'-UTR 的專一性引子 ARNTf4-mut (具突變序列，表 1) 及 ARNTTr1-XbaI 放大 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 +1868 bp 至 +2300 bp 片段。PCR 條件為 95°C 5 分鐘，94°C 30 秒、54°C 30 秒、72°C 35 秒 (40 cycle)，於 4°C 中止反應。此 PCR 反應可得到

442 bp 的第一次 PCR 產物。接續利用 *HIF-1 β* 3'-UTR 的專一性引子 ARNTf1-XbaI 與稀釋 100 倍的第一次 PCR 產物當作第二次 PCR 的引子，放大 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 +1 bp 至 +2300 bp 片段，PCR 條件為 95°C 5 分鐘，94°C 45 秒、54°C 45 秒、72°C 2 分 20 秒 (45 cycle)，於 4°C 中止反應。利用 Xba-I 限制酶切點將插入子與報導質體連接，構築成質體 pGL3-control *HIF-1 β* 3'-UTR mutant (pH3UM)。

3. Luciferase-Reporter Assay

轉殖前 24 小時將 COS-7 細胞株以細胞濃度 $8 \times 10^4/\text{mL} \sim 9 \times 10^4/\text{mL}$ 培養於 12 well plate，每個 well 含細胞培養液 1 mL。以 LipofectaminTM Transfection Reagent 搭配 PlusTM Reagent，同時轉殖報導質體 (0.5 μg) 與做為 internal control 的 PCH110 質體 (0.2 μg) 至已貼附完成的細胞，作用體積 400 μL ，作用時間為 5 個小時，於 5 個小時後加入細胞培養液至 1 mL。於轉殖報導質體後 24 個小時，轉殖 miRNA mimic 及 miRNA inhibitor。(轉殖時間於附圖 1B)

轉殖 miRNA mimic 及 miRNA inhibitor 的 48 個小時後收取細胞。加入 180 μL 的 Glo 1 $\times$ Lysis buffer (Promega) 至所收取的細胞中，室溫下作用 5 分鐘裂解細胞。於 4°C 下以 KUBOTA 3700 離心機以 $14000 \times g$ 離心 5 分鐘，收取 cell lysate 置於冰上。取 100 μL 的 cell lysate 至 96 well 黑色 ELISA plate，加入等體積的 BrightGloTM Luciferase System (Promega) 溶液，避光作用 5 min，利用 luminometer 以 560 nm 的波長偵測，分析細胞所表現的 Luciferase 活性。偵測由 PCH110 質體所表現的 β -galactosidase 活性，則取 50 μL cell lysate 至 96 well 白色 ELISA plate，加入等體積的 β -galactosidase 2 $\times$ Assay Buffer (Promega)，於 37°C 下作用呈色，待所有的 well 中均呈現肉眼可辨識的黃色，即利用 ELISA reader 以 405 nm 波長偵測，分析 β -galactosidase 的活性。

六、RNA 萃取及同步定量 RT-PCR 分析

細胞中的 RNA 以 QIAamp[®] RNA Blood Mini Kits (QIAGEN) 萃取，實驗流

程參照 QIAGEN 實驗手冊。將 2 μ g RNA 以 oligo(dT)₂₀ 做為引子，利用 High-Capacity cDNA Reverse transcription kits (Applied Biosystems) 合成 cDNA，Reverse transcription 條件為 25°C 10 分鐘，37°C 120 分鐘，85°C 5 秒，於 4°C 中止反應。

將構築好具有 *HIF-1 β* 及 *GAPDH* 基因片段的質體做一系列不同濃度的稀釋，分別以 TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 中 *HIF-1 β* (Hs01121912_m1，Applied Biosystems) 及 *GAPDH* (Hs99999905_m1，Applied Biosystems) 的專一性探針進行同步定量 PCR，所得實驗數據做為標準曲線。稀釋已合成好的細胞 cDNA，以同樣的探針進行同步定量 PCR，以先前已做好的標準曲線回算濃度。

七、腫瘤增生實驗

我們將注射轉殖 miR-221 inhibitor 和 miR-222 inhibitor 或 scramble-miR 的癌細胞株至裸鼠，檢視 miR-221 及 miR-222 對腫瘤細胞增生的影響。轉殖前 24 小時將細胞培養於 175T flask (MIAPaCa-2 為 1×10^5 /mL；ASPC-1 為 1.5×10^5 /mL)，每個 flask 含細胞培養液 30 mL。將 miR-221 inhibitor 和 miR-222 inhibitor 或 scramble-miR 轉殖至貼附好的細胞，轉殖濃度為 100 nM，作用體積 13 mL，作用時間為 5 個小時，5 個小時後加入細胞培養液至 30 mL，於轉殖後 36 個小時收取細胞。收取細胞前 2 個小時移去細胞培養液，以 1×PBS 清洗細胞表面兩次，加入 30 mL 細胞培養液，培養 2 個小時後，收取細胞。將收下的細胞懸浮於 1×PBS 中 (MIAPaCa-2 為 2.5×10^7 /mL；ASPC-1 為 5×10^7 /mL，細胞濃度為經實驗測試，經注射細胞後，能於裸鼠皮下形成腫瘤的細胞濃度)，以 200 μ L 為一劑注射至裸鼠(來自國家實驗研究院動物實驗中心)後肢。於注射後每週拍照觀察。

結果

一、miR-221/222 可能標的基因的預測

在過去的文獻報告中顯示，miR-221 及 miR-222 在許多腫瘤細胞，如 thyroid papillary carcinoma、pancreatic adenocarcinoma 及 glioblastoma 呈現大量表現的情形，且這兩種 miRNA 對腫瘤細胞的增生似乎扮演著重要的角色。我們利用 miRNA 資料庫 miRBase (Griffiths et al., 2006, microrna.sanger.ac.uk)，得知人類的 miR-221 和 miR-222 為同一 clustered member，座落於 X 染色體的 45490529 bp 至 45491417 bp 之間，兩個 miRNA 座落的位置相距 727 bp。在 miRBase 中我們也得到 miR-221 及 miR-222 的 secondary structure 及 pre-miRNA 的 stem-loop 結構，及得知成熟的 miR-221 和 miR-222 分別為 23 及 21 個核糖核酸所組成。

我們接著利用預測 miRNA 標的基因的資料庫 TargetScan (targetscan.org)、PicTar-Vert (pictar.bio.nyu.edu)及 miRNA Viewer (cbio.mskcc.org/mirnaviewer)，所提供 seed site match (Lewis et al., 2003)及運算後所得到的自由能、分數及可能性來判斷 miR-221 及 miR-222 的可能標的基因。其中，我們篩選出了 *HIF-1 β* 基因。此基因於 3'-UTR 上 +1868 bp 至 +1890 bp 之間，被預測為 miR-221 及 miR-222 可能的標的位置，其序列與 miR-221 及 miR-222 的 seed site 配對有 8 mer 吻合，且此序列在多種物種中具有高度的保留性，同時也符合了 conserved seed site match 多由 adenocine flanking 的條件 (Lewis et al., 2003)。配對的自由能約為 -20~-25 Kcal/mol，屬於穩定配對，也符合 miRNA-RNA duplexes 的自由能需低於 -20 Kcal/mol；conserved site 配對自由能需低於 -10 Kcal/mol 的條件 (Watanabe et al., 2006)。除此之外，*HIF-1 β* 在 PicTar-Vert 資料庫被預測為 miR-221 和 miR-222 標的基因的可能性大於 80% (圖 1A)。由於 HIF-1 β 與 HIF-1 α 組成的 HIF-1 轉錄因子對腫瘤細胞的形成、生存及轉移也具有相當重要的意義。後續我們將以各種實驗探討 *HIF-1 β* 是否確實為 miR-221 及 miR-222 的標的基因。

二、分析 HIF-1 β 蛋白質及 miR-221 在消化道癌細胞株中的表現

為了探討在腫瘤細胞中的 HIF-1 β 蛋白質的表現是否受到 miR-221 及 miR-222 的調控，我們利用西方點墨法分析 HIF-1 β 蛋白質的表現及同步定量 RT-PCR 分析 miR-221 的表現量，共檢視消化道系統中的胃癌、胰臟癌、大腸直腸癌三大類 11 種不同的癌細胞株 (表 2)，希望從中挑選出適合的細胞株當作後續實驗的細胞模型。

1. 利用西方點墨法分析 HIF-1 β 的表現量

我們分別萃取這 11 種細胞株細胞中的蛋白質，以西方點墨法進行分析，比較 HIF-1 β 的表現 (圖 2A)。其中大腸癌細胞株 C2BBel 及胃癌細胞株 MKN45，HIF-1 β 的相對表現量較高，大腸癌的 SW1417 及 SW48 和胃癌的 KATOIII 三細胞株屬於相對表現量較低的，其他細胞株的表現量則介於兩者之間。

2. 利用同步定量 RT-PCR 分析內生性 (endogenous) miR-221 的表現量

我們分別將這 11 種細胞株利用 *mirVana*TM PARISTM 套組萃取細胞中小片段 RNA，將這些小片段 RNA 利用 TaqMan® Human MicroRNA Assays 套組的 miR-221 專一性引子合成 cDNA，再以同步定量 PCR 作定量分析。實驗結果以 MKN45 細胞的內生性 miR-221 表現量當作基準值，其餘細胞相對於 MKN45 細胞的 miR-221 表現量顯示於圖 2B。由於 miR-221 及 miR-222 為同一基因座成員，且為使用同一起動子做轉錄，被認為是 polycistronic 基因，因此我們僅分析其中的 miR-221 的表現情形。

由於後續的實驗中，我們計劃外加入 miRNA mimic，了解 miR-221 及 miR-222 能否抑制 HIF-1 β 表現；為了此目的，我們根據西方點墨法及同步定量 RT-PCR 的結果選擇了 HCT116 及 MKN45 這兩種分別屬大腸癌及胃癌的細胞株，主要原因是此兩種細胞株內生性 miR-221 屬於相對表現量較低，且於我們過去的實驗經驗認為此兩種細胞株有較好的轉殖效率 (圖 2B)，在我們轉殖 miRNA mimic 時可能可以觀察到比較顯著的影響力；此外，此兩個細胞株的 HIF-1 β 的表現量，其中一

個為表現量較高，另一個為中等（圖 2A）。選用 HIF-1 β 表現量不同的兩種細胞株，是為了避免表現量高的細胞株在實驗結果中可能造成不易觀察的情形。我們將以這兩種細胞株當作細胞模型進行後續的研究。

三、miR-221 及 miR-222 對 HIF-1 β 蛋白表現的影響

為了驗證 miR-221 及 miR-222 在細胞中能否調控 HIF-1 β 的表現，我們轉殖 miR-221/222 mimic 及 miR-221/222 inhibitor 至細胞株中，觀察 HIF-1 β 表現所受的影響。

1. 轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 抑制 HIF-1 β 表現

在 HCT116 及 MKN45 細胞中轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 後，以西方點墨法比較的結果顯示，相對於只轉殖了 random oligomer 的控制組細胞，轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 的細胞，HIF-1 β 的表現量皆有顯著的下降（圖 3），其中又以 HCT116 細胞的反應較為顯著。根據此結果，我們可以判斷 miR-221 及 miR-222 的確可能抑制 HIF-1 β 的表現。

2. 轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 回復 HIF-1 β 表現

為了進一步確認 HIF-1 β 的表現量下降的確是受到轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 所造成的影響，我們轉殖與其相對應的 miRNA inhibitor。

我們將 miR-221 inhibitor、miR-222 inhibitor 及 scramble-miR (做為 negative control)轉殖入 HCT116 細胞、MIAPaCa-2 細胞及 ASPC-1 細胞中，再轉殖入與之相對應的 miRNA mimic，之後收取細胞以西方點墨法作定量分析。實驗的結果中可以觀察到，有轉殖相對應 miRNA inhibitor 的細胞相較於只轉殖 scramble-miR 的細胞，HIF-1 β 的表現量呈現回復的現象（圖 4），此結果證實一旦我們抑制了 miRNA mimic 的效果，HIF-1 β 的表現將不再受抑制。

我們也同時轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor，企圖抑制內生性的 miR-221 及 miR-222；將此種處理的細胞和只轉殖了 scramble-miR 的細胞做比較，

前者的 HIF-1 β 表現量也呈現微幅上升 (圖 4)。

上述實驗的結果顯示，當我們轉殖了 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 至癌細胞株時，可以抑制 HIF-1 β 的表現；若我們同時以 miRNA inhibitor 及 miRNA mimic 處理細胞的話，原本抑制 HIF-1 β 的 miRNA mimic 的抑制能力會被相對應的 miRNA inhibitor 消除。但是在 MIA PaCa-2 細胞中，同時轉殖 miR-221 mimic 及 miR-221 inhibitor 時，我們並未觀察到 HIF-1 β 表現量的回復，但在另一組轉殖 miR-222 mimic 及 miR-222 inhibitor 的實驗中，HIF-1 β 表現量確實呈現大幅回復 (圖 4B)。於此實驗中我們並無法得知轉殖 miR-221 inhibitor 沒有使 HIF-1 β 表現量回復的原因為何。由此細胞模型的研究結果我們可以判斷，HIF-1 β 的表現量的確可能會受到 miR-221 及 miR-222 的調控，但是否為專一性調控，以及是經由直接或間接調控，還需後續實驗的證明。

四、miR-221 及 miR-222 調控 HIF-1 β 基因表現的專一性探討

接續我們構築帶有 *HIF-1 β* 基因 3'-UTR 序列的報導質體，以 Luciferase 報導基因的表現量來確認 miR-221 及 miR-222 對標的基因的專一性調控。

1. 以 Luciferase 報導基因驗證 *HIF-1 β* 3'-UTR 上具有 miR-221/222 的標的序列

如實驗材料與方法中所述，我們利用 PCR 的方式，放大 *HIF-1 β* 的 3'-UTR 上 +1 bp 至 +2300 bp 片段 (包含資料庫所預測的標的位置)，以 Xba-I 限制酶切點將此片段接到報導質體 pGL3-control 中 Luciferase 報導基因下游，構築成 pGL3-HIF-1 β 3'-UTR (pH3U)。將質體 pH3U 與 miR-221/222 mimic 或 random oligomer 同時轉殖入 COS-7 細胞，以 Bright-GloTM Luciferase Assay System 進行 Luciferase 活性分析，觀察 miR-221 及 miR-222 對報導基因表現的影響。由實驗結果顯示，轉殖 miR-221/222 mimic 的 COS-7 細胞，相較於轉殖 random oligomer 的對照組細胞，所測得的 Luciferase 活性有顯著的下

降，其中又以 miR-221 造成的影響較為顯著，Luciferase 的活性減少了約 50% (圖 5A)，而 miR-222 造成 Luciferase 活性下降約 40% (圖 5B)。同樣的，為了確認 Luciferase 的活性下降是受到轉殖 miR-221/222 mimic 的影響所造成，我們也同時轉殖與之相對應的 miR-221/222 inhibitor，觀察能否回復 Luciferase 的活性。結果顯示，一但同時轉殖與之相對應的 inhibitor 到 COS-7 細胞中，Luciferase 活性呈現回復的情形。轉殖 miR-221 inhibitor 的細胞，Luciferase 活性回復到與控制組細胞近乎相同 (圖 5A)，而轉殖 miR-222 inhibitor 的細胞，Luciferase 活性回復到了約控制組的 90% (圖 5B)。

由於 COS-7 細胞本身並無表現 Luciferase 基因，應不存在能調控 Luciferase 蛋白表現及活性的調控機制，因此會影響 p3U 質體所表現出的 Luciferase 活性的因素，僅有實驗中所轉殖的 miR-221/222 mimic 及 miR-221/222 inhibitor。而在本來不會受到 miR-221 及 miR-222 調控的 Luciferase 基因下游接上 *HIF-1 β* 3'-UTR，即能使 Luciferase 的表現受到 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 的抑制；若以 miRNA inhibitor 抑制了 miRNA mimic 的抑制能力，Luciferase 的活性呈現回復的情形 (圖 5)。根據上述實驗結果可以判斷，miR-221 及 miR-222 確實可以作用於 *HIF-1 β* 3'-UTR 序列之上，而抑制其上游所轉譯的蛋白表現。

2. 突變標的序列使報導基因不受 miR-221/222 調控

MiRNA 被認為會與標的序列形成 miRNA-RNA duplexes，而在預測 miRNA 標的基因的資料庫中也指出，*HIF-1 β* 基因上可能為 miR-221 及 miR-222 的標的序列座落於 3'-UTR 上 +1869 bp 至 +1890 bp 之間。過去的文獻顯示，脊椎動物中 miRNA 與標的序列配對時，seed site 的配對最為重要，改變 seed site 的辨識序列將使 miRNA 無法調控標的基因。為了確認 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 +1869 bp 至 +1890 bp 間的序列是否為 miR-221/222 的標的，我們利用 PCR 的方式對 seed site 的辨識序列進行突變 (圖 6A)。同樣的，利用

Xba-1 限制酶切點將 seed site 辨識序列突變後的 *HIF-1 β* 3'-UTR 接至報導質體 pGL-3-control Luciferase 報導基因下游，構建成 pGL3-HIF-1 β 3'-UTR mutant (pH3UM)。分別將 pH3U 及 pH3UM 同時與 miR-221 mimic 轉殖到 COS-7 細胞中，觀察 miR-221 mimic 對兩種報導基因的影響。於實驗結果顯示，當 seed site 的辨識序列突變後，於轉殖 miR-221 mimic 及轉殖 random oligomer 的細胞中所測得的 Luciferase 活性並無改變。而在 wild-type 中，轉殖了 miR-221 mimic 的細胞相較於轉殖了 random oligomer 的控制組細胞，Luciferase 表現的活性明顯下降 (圖 6B)。

根據實驗結果，於資料庫中所預測的可能標的序列上的 miRNA seed site 的辨識序列進行突變後，miR-221 即失去了能調控報導基因的能力，由此實驗結果顯示，此段序列應為標的基因 3'-UTR 上 miR-221 的標的位置，在 miR-221 調控標的基因扮演著重要的角色。

五、miR-221/222 抑制 HIF-1 β 表現的機制探討

MiRNA 能經由 translational repression 或 mRNA cleavage 抑制標的基因的表現。在動物細胞中，miRNA 抑制標的基因的途徑大多為 translational repression，植物細胞則大多經由 mRNA cleavage。我們以同步定量 RT-PCR 及西方點墨法驗證 miR-221/222 抑制 *HIF-1 β* 的表現是經由哪一條路徑進行。

將轉殖 random oligomer、miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 的 HCT116 細胞收下後各分成兩部分，一部分以西方點墨法分析 HIF-1 β 蛋白表現量，另外一部分以 TaqMan® Gene Expression Assays 套組進行同步定量 RT-PCR，分析 *HIF-1 β* transcript 的表現情形。由實驗結果觀察到，轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 的細胞相較於轉殖 random oligomer 的控制組細胞，*HIF-1 β* mRNA transcript 與其蛋白產物均受到了抑制。

在過去的研究中，動物細胞中的 miRNA 大多被認為是藉由 translational

repression 的途徑抑制標的基因的表現，僅極少數例子為藉由 mRNA cleavage 的途徑，於此結果，我們很明確的確定 miR-221/222 是藉由哪一途徑抑制 HIF-1 β 的表現，此實驗還須往後的實驗做進一步的確認。

六、miR-221/222 對胰臟癌細胞增生的影響

在過去的文獻指出，miR-221/222 在胰臟癌癌化過程中呈現大量表現的情形。為進一步研究 miR-221/222 對胰臟癌細胞的增生是否具有影響，我們利用 miR-221/222 inhibitor 抑制癌細胞株的內生性 miR-221/222，將癌細胞株注射到裸鼠，觀察腫瘤的生長情形。

1. 抑制內生性 miR-221/222

我們首先轉殖 miR-221/222 inhibitor 至 MIAPaCa-2 及 ASPC-1 胰臟癌細胞中，收取細胞後，萃取細胞內的小片段 RNA，以同步定量 RT-PCR 分析內生性 miR-221/222 的表現情形。

於實驗結果顯示，當轉殖 miR-221/222 inhibitor 至細胞株中，可以極有效的抑制細胞中內生性的 miR-221/222，抑制效果達 90% (圖 8)。當轉殖的 inhibitor 濃度減半，miRNA 的表現量即增加一倍 (圖 8A 及 8B)，可以顯示 inhibitor 抑制 miRNA 的效果極具專一性。

2. miR-221/222 對腫瘤細胞增生影響

於 ATCC 資料庫中得知，將 MIAPaCa-2 及 ASPC-1 細胞注射至裸鼠皮下能生成腫瘤。我們收取轉殖 miR-221 inhibitor 和 miR-222 inhibitor 及 scramble-miR 的 MIAPaCa-2 及 ASPC-1 細胞，懸浮於 PBS 中，注射至裸鼠的後肢。轉殖 miR-221 inhibitor 和 miR-222 inhibitor 的癌細胞株注射至裸鼠右後肢；轉殖 scramble-miR 做為控制組的細胞注射至左後肢。

觀察腫瘤於裸鼠表皮生長情形顯示，轉殖 miR-221 inhibitor 和 miR-222 inhibitor 的 MIAPaCa-2 細胞相較於轉殖 scramble-miR 的控制組細胞，形成腫

瘤的速度較慢。於注射後第一週，左後肢開始形成能以肉眼辨識的腫瘤，而右後肢則否 (圖 9A)。至第五週，右後肢也漸漸形成能以肉眼辨識的腫瘤，但相較於左後肢的腫瘤，腫瘤尺寸較小且形狀較為平面 (圖 9B)。

但是在 ASPC-1 細胞中所顯示的結果卻與 MIAPaCa-2 細胞相反，轉殖 miR-221 inhibitor 和 miR-222 inhibitor 的細胞相較於轉殖 scramble-miR 的控制組細胞，增長的速度反倒顯著的快速許多 (圖 10)。



討論

MiRNA 從被發現以來，已被證實參與許多重要生理現象的調控，包括胚胎發育、細胞分化與腫瘤的生成等。在過去的研究中顯示，miR-221/222 在許多種類的腫瘤細胞中呈現大量表現，顯示對於腫瘤細胞可能有著重大的存在意義。在本論文的研究中，我們利用 miRNA 資料庫來預測及篩選 miR-221/222 的可能標的基因，從中我們篩選出了同樣對腫瘤細胞有著重大意義的 HIF-1 的 β 子單元，*HIF-1 β* 基因。

我們分析了 11 種消化道系統癌細胞株中 miR-221 及 HIF-1 β 蛋白的表現，從中選出了適合的癌細胞株作為研究的細胞模型。利用這些不同的癌細胞株，我們轉殖 miR-221/222 mimic 及 miR-221/222 inhibitor 至細胞內，觀察 HIF-1 β 蛋白表現所受的影響。由實驗的結果，我們觀察到 HIF-1 β 蛋白的表現量會依我們所轉殖的 miRNA mimic 或 inhibitor 而有所起伏，證實 HIF-1 β 蛋白的表現確實會受到 miR-221/222 的影響。

進一步的實驗中，我們構築具有 *HIF-1 β* 基因 3'-UTR 的報導質體，利用 reporter assays 進一步的確認 miR-221/222 對 HIF-1 β 調控的專一性。於實驗的結果證實了 *HIF-1 β* 的 3'-UTR 上具有 miR-221/222 的標的序列，且 miR-221/222 對 HIF-1 β 調控具有專一性。

過去的文獻中顯示，脊椎動物中 miRNA 與標的基因的配對以 miRNA 5'端的 seed site (Lai et al., 2005) 最為重要。我們將所預測 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 miR-221/222 標的序列上的 miRNA seed site 辨識序列作突變，構築成報導質體。結果顯示，seed site 辨識序列突變後，Luciferase 報導基因失去了被 miR-221/222 調控的特性。此實驗結果確認了 miR-221/222 的標的位置應於 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 +1869 bp 至 +1890 bp 之間，也驗證了 seed site 對 miRNA 調控標的基因確實具有重大的影響。

在過去的文獻中顯示，動物細胞中 miRNA 大多藉由 translational repression 來抑制基因產物的表現，少數則以 mRNA cleavage 的途徑達到此目的。我們利用

同步定量 RT-PCR 及西方點墨法分析 *HIF-1 β* transcript 的表現量以及蛋白質產物，了解 miR-221/222 是經由哪一途徑抑制 HIF-1 β 。實驗的結果顯示，*HIF-1 β* transcript 與 HIF-1 β 蛋白的表現均在轉殖 miR-221/222 mimic 後受到抑制。在過去的研究中，動物細胞中的 miRNA 被認為大多是經由 translational repression 的途徑抑制基因的表現，僅有極少數的例子是經由 mRNA cleavage 的途徑，miR-221/222 對 HIF-1 β 表現的抑制是否全然只藉由 mRNA cleavage 的途徑，或者 translation repression 也參與其中，還須往後的以重複的實驗或者是其他的實驗作進一步的驗證。

於上述實驗中，我們證實了 miR-221/222 於細胞中能調控 HIF-1 β 的表現。我們更重要的要進一步確認，HIF-1 β 的表現受到 miR-221/222 的抑制，是否對 HIF-1 轉錄因子活性造成影響。我們以 lentivirus 系統建立完成能同時大量表現 miR-221 及 miR-222 的 MIAPaCa-2 及 ASPC-1 胰臟癌細胞株；並計畫轉殖已預先構築好具 5 次重複 HRE 序列的報導質體，利用 Luciferase 報導基因的活性分析，檢視 HIF-1 轉錄因子活性是否受到影響。然而，由於我們選用的兩種胰臟癌細胞株，其內生性 miR-221 及 miR-222 的表現量皆已相當高，我們利用同步定量 RT-PCR 分析建立好的細胞株時，發現其 miR-221/222 的表現量僅為控制組細胞株的 3~5 倍之間，無法造成明顯的差異。此實驗還需要選擇內生性 miR-221/222 表現量較低的細胞株重新建立，以得到實驗組與控制組的 miR-221/222 表現差異較顯著的細胞株，用以檢視 HIF-1 轉錄因子活性是否因 HIF-1 β 受 miR-221/222 的抑制而確有受到影響。此項檢視，對驗證 miR-221/222 是否因調控 HIF-1 β 表現而進而調控 HIF-1 轉錄因子活性，至為重要。

在過去的文獻報導中顯示 (Visone et al., 2007)，抑制 thyroid papillary carcinoma 中 miR-221/222 的表現，會造成腫瘤細胞生長速度的大幅下降。由於 miR-221/222 於胰臟癌細胞中呈現大量的表現，因此我們利用 LNA (Locked nucleic acid) 結構合成的 miR-221/222 inhibitor，抑制胰臟癌細胞株中 miR-221/222 的表

現，並將之注射至裸鼠，觀察 miR-221/222 對於胰臟腫瘤的形成與生長速度的影響。但在我們所選用的兩種胰臟癌細胞株 MIAPaCa-2 及 ASPC-1，實驗結果卻呈現不同的現象。在 MIAPaCa-2 細胞中，抑制 miR-221/222 能使得腫瘤細胞生長速度降低。但在 ASPC-1 細胞卻觀察到與 MIAPaCa-2 相反的現象，抑制了 miR-221/222 後，甚至使得腫瘤細胞的生長速度更快。於此實驗中，我們雖然在兩種不同的細胞株中觀察到相反的現象，但無論是造成腫瘤細胞增生速度的加速或降低，都顯示著 miR-221/222 於此兩種胰臟癌細胞株中，均能影響其細胞的生長，對於腫瘤細胞的增生有著一定的影響力。MIAPaCa-2 與 ASPC-1 雖同為胰臟癌細胞株，但卻呈現出不同的結果，此不同的結果也許是因為誘發腫瘤形成及增生的複雜性，又或者是此兩種不同的細胞株其癌化機制有所不同所致。miR-221/222 於胰臟癌細胞增生中所扮演的角色，及其對胰臟癌增生的影響和機制，還需經未來重複的實驗做進一步的確認。

HIF-1 為細胞內重要的轉錄因子，在腫瘤細胞中扮演著極重要的角色。細胞大多藉由調控 HIF-1 α 子單元達到控制 HIF-1 轉錄因子活性的目的。除了過去文獻中指出，腫瘤細胞能藉由 HER2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) 經 PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase)/AKT 將 HIF-1 β 磷酸化，增加與 HIF-1 α 的結合之外 (Li *et al*, 2005)，細胞中極少發現藉由調控 HIF-1 β 來控制 HIF-1 的轉錄因子活性。於本論文研究中，發現了 miR-221/222 能調控 HIF-1 β 蛋白的表現，提供了一條調控 HIF-1 轉錄因子活性的可能新途徑。

HIF-1 在許多腫瘤細胞中呈現大量表現；HIF-1 也被證實了具有促進腫瘤細胞增生與腫瘤細胞凋亡的功能，此兩種功能對於腫瘤細胞的生存均為重要的，但腫瘤細胞如何調控這兩種相互抵觸的能力至今一直不明。當腫瘤細胞於低氧狀態下時，HIF-1 α 蛋白處於十分穩定的狀態，能與 HIF-1 β 組成 HIF-1，啟動各種 hypoxia-inducible 基因使得腫瘤細胞得以生存。而若腫瘤細胞無法於低氧狀態下生存時，HIF-1 也會啟動細胞凋亡的因子，淘汰此腫瘤細胞，僅留下能於低氧狀

態下生存的腫瘤細胞。為了避免長時間處於低氧狀態下的腫瘤細胞受到細胞凋亡因子的影響，應存在著能於低氧狀態下控制 HIF-1 活性的機制。在過去的文獻中顯示，miR-221/222 在許多中腫瘤細胞中呈現大量表現，於我們的研究中發現，*HIF-1 β* 為 miR-221/222 的標的基因，miR-221/222 的大量表現除了造成 p27^{kip1} 的表現異常引發腫瘤外，也許腫瘤細胞可藉由大量表現 miR-221/222 來抑制 *HIF-1 β* 基因產物的表現，調控於低氧環境下的 HIF-1 轉錄因子的活性，使之不至於誘發細胞凋亡因子，誘發腫瘤細胞的死亡。

HIF-1 β 又稱為 ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)，最早被發現能與腫瘤抑制蛋白 AHR (aryl hydrocarbon receptor) 結合。AHR 在過去已被證實能和許多環境毒素或致癌物結合，與這些物質結合後的 AHR 需與 HIF-1 β 結合，才能啟動代謝毒性物質、控制 cell cycle 及調控細胞凋亡因子等腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) (Chen et al., 2003; Marlower et al., 2004; Peng et al., 2008)，而腫瘤細胞中 miR-221/222 的大量表現也可能是為了阻止腫瘤抑制蛋白 AHR 功能，避免腫瘤抑制基因的啟動。然而上述的諸多推測，須進一步的設計實驗與研究方可確知。

於本論文研究中，我們發現 *HIF-1 β* 基因 3'-UTR 上 +1869 bp 至 +1890 bp 片段為 miR-221/222 的標的序列，miR-221/222 能藉由辨識此段序列調控 HIF-1 β 的表現，提供了細胞調控 HIF-1 活性一條新的可能途徑。在多種腫瘤細胞中，miR-221/222 呈現大量的表現，也許是藉此調控 HIF-1 β 的表現，控制 HIF-1 的活性，阻止腫瘤細胞的凋亡，影響腫瘤細胞的生長；又或者是為了使腫瘤抑制蛋白 AHR 失去功能，以達到使腫瘤細胞生存下去的目的，但這些推斷還需往後的實驗來進一步證明之。

表 1. Primer 序列

Primer名稱	Primer序列
ARNTf1-XbaI	5'-CGATtctagaAACTATTGGGGTGAGG-3'
ARNTr1-XbaI	5'-CGGTtctagaTCACTCATTTTAATCCAG-3'
ARNTf4-mut	5'-GGCAAAAATAATGACCGCCTATGAAGATTTTC-3'

小寫字母為設計的限制酶辨識切位，以陰影標示設計的突變。



表 2. 實驗中所選用的癌細胞株

胃 癌	MKN45
	KATOIII
胰 臟 癌	ASPC-1
	MIAPaCa-2
大 腸 癌	C2BBel
	Colo205
	DLD-1
	HCT116
	SW48
	SW480
	SW948
	SW1417



A

	seed match	Free energy of conserved match	Free energy of duplexes	Probability	Target conservation
miR-221 target <i>HIF-1β</i>	8mer	-12.0Kcal/mol	-22.7Kcal/mol	0.81	100%
miR-222 target <i>HIF-1β</i>	8mer	-17.3Kcal/mol	-24.4Kcal/mol	0.81	96%

B

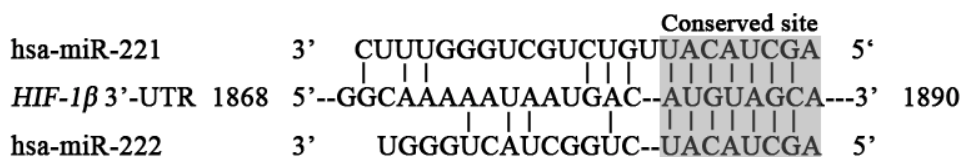


圖 1. *HIF-1β* 為 miR-221 及 miR-222 可能的標的基因

(A) Seed site match 由 TargetScan 提供；Free energy of conserved match 由 miRNA Viewer 提供；Free energy of duplexes 及 Probability 由 PicTar 提供；Target site conservation 由 miRNA Viewer 提供。

(B) miR-221 及 miR-222 在 *HIF-1 β* 上可能的標的位置。圖中顯示 *HIF-1 β* 3'-UTR 上 +1868 bp 至 1890 bp 序列 (以 stop codon 後第一個核酸位置為 +1)。miR-221/222 的第 1 至第 8 個核酸位置 (以陰影標示) 的配對序列於多種物種中具高度保留性, 為 conserved site。

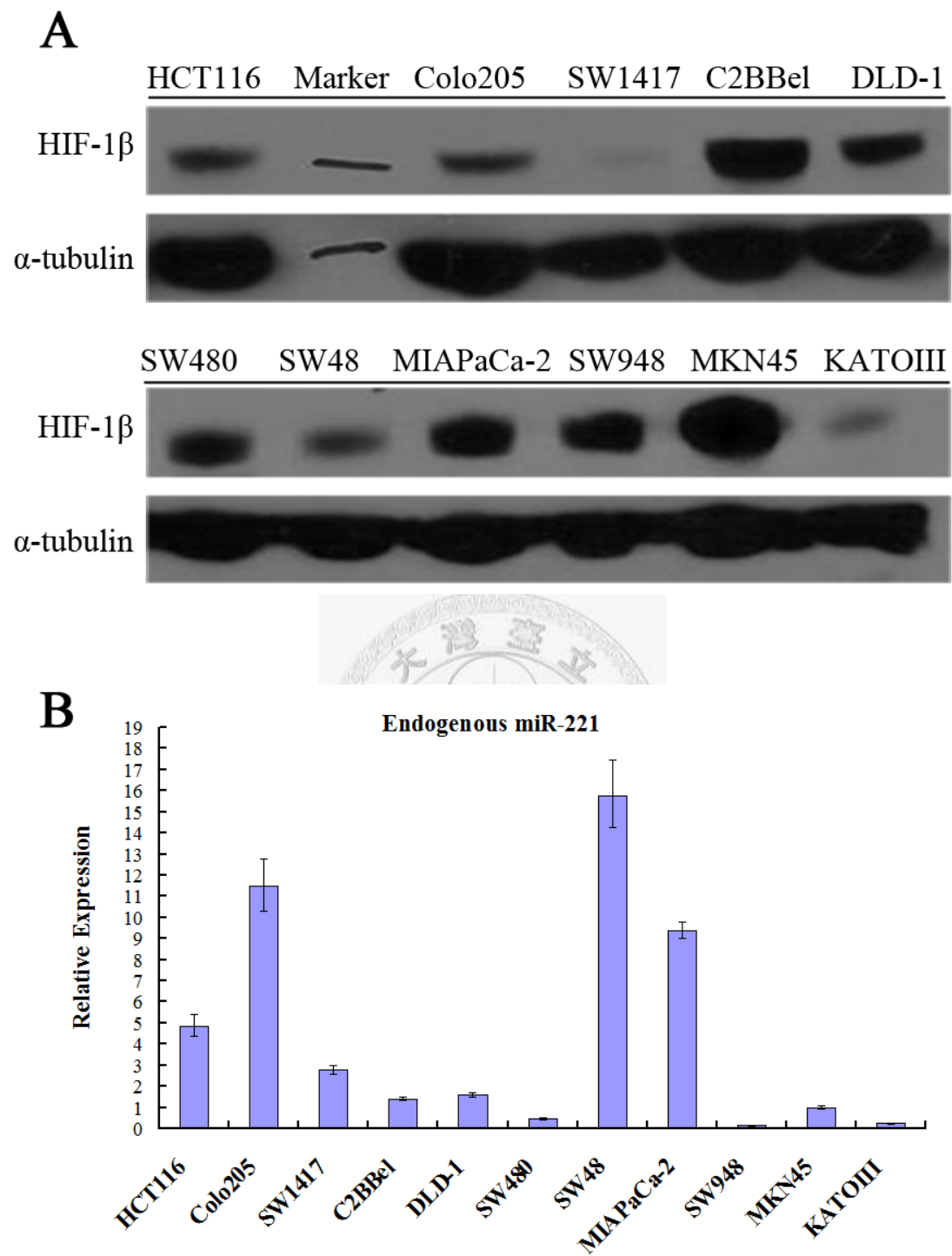


圖 2. HIF-1 β 蛋白及 miR-221 在消化道癌細胞株中的表現

- (A) 以西方點墨法分析 HIF-1 β 蛋白質表現量。 α -tubulin 表現量作為 internal control。HIF-1 β marker 標示的大小為 100 kDa； α -tubulin marker 標示的大小為 40 kDa。
- (B) miR-221 表現量。利用同步定量 RT-PCR 分析細胞中 miR-221 表現量，以 MKN45 的表現量當作基準。實驗結果為 4 次重複實驗數據計算所得的平均值及標準差。

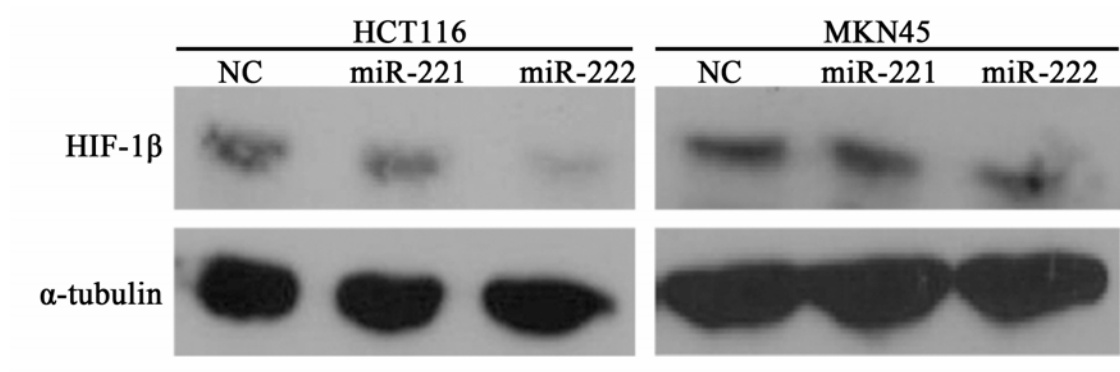
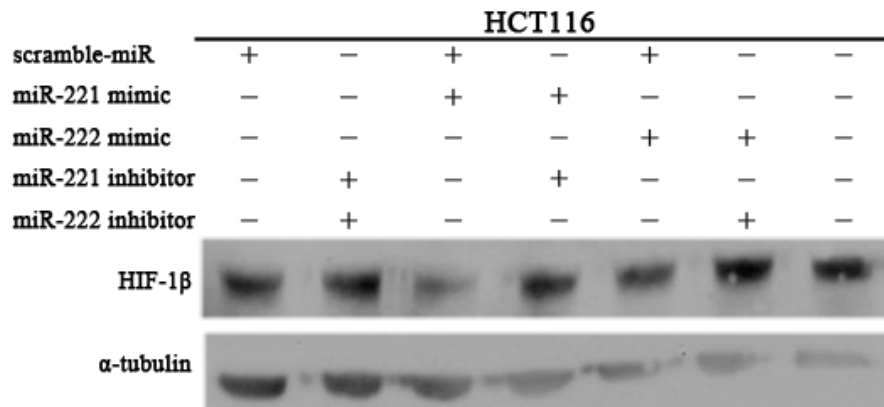


圖 3. 轉殖 miR-221 mimic 及 miR-222 mimic 抑制 HIF-1 β 表現

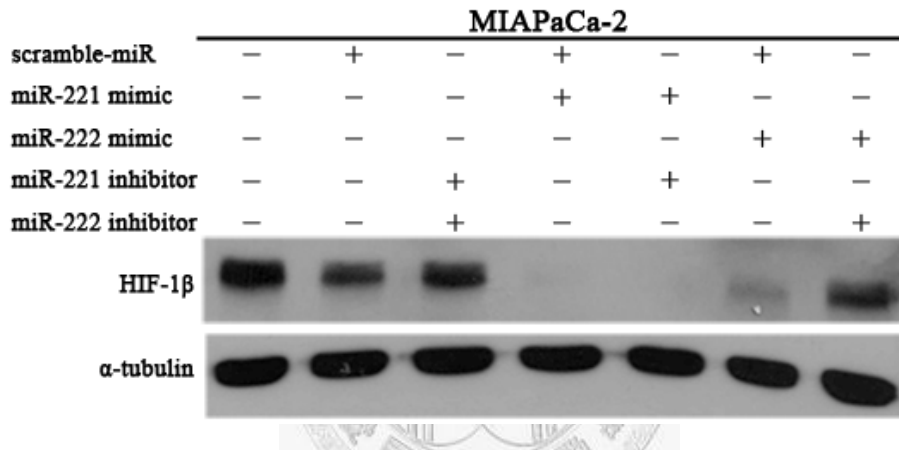
(A) 利用西方點墨法分析 HIF-1 β 表現量。NC 為轉殖 random oligomer；miR-221 為轉殖 miR-221 mimic；miR-222 為轉殖 miR-222 mimic。



A



B



C

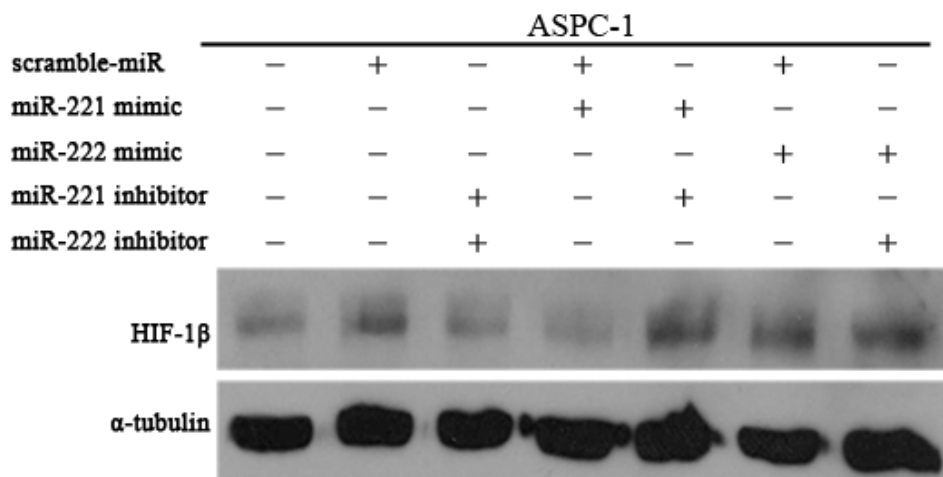


圖 4. 轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 回復 HIF-1 β 表現

利用西方點墨法分析轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 後，HIF-1 β 的表現情形。以 α -tubulin 為 internal control 作為定量較正。每一條 Lane 的細胞中所轉殖的 miRNA mimic 及 miRNA inhibitor 的濃度總合為 100 nM。(A)最右邊及(B)(C)最左邊的 Lane 為只以 transfection reagent 處理。

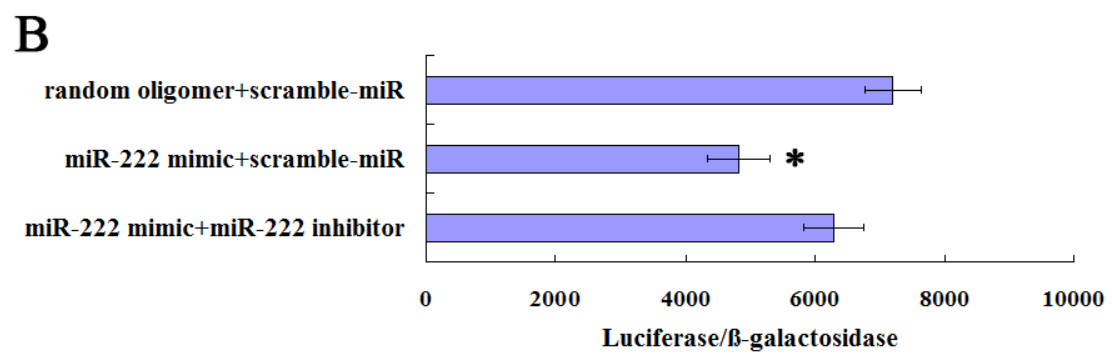
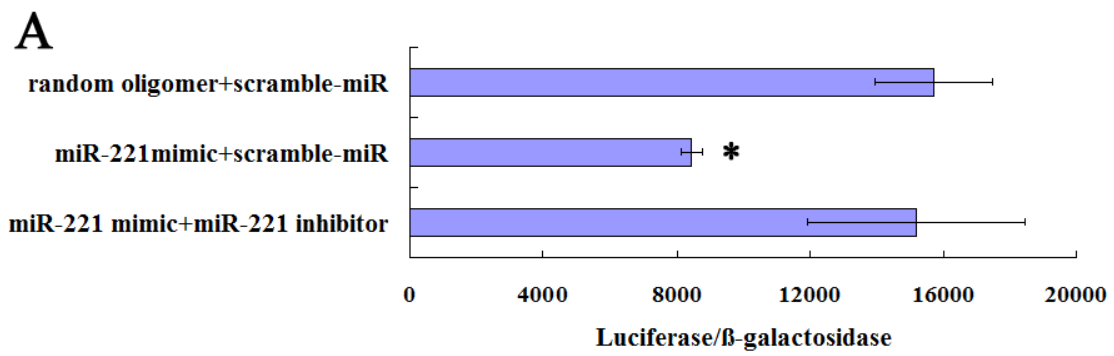


圖 5. miR-221/222 對 Luciferase 報導基因表現的影響

將報導質體 pH3U 與 PCH110 做同步轉殖，以 PCH110 表現的 β-galactosidase 作為 internal control。以 Luciferase 活性變化確認 *HIF-1β* 3'-UTR 上具有 miR-221 (A) 及 miR-222 (B) 的標的位置。實驗結果為 4 次重複實驗數據計算所得的平均值、標準差及以 Student's test 分析顯著差異 ($P < 0.05$)，星號代表與控制組有顯著差異。

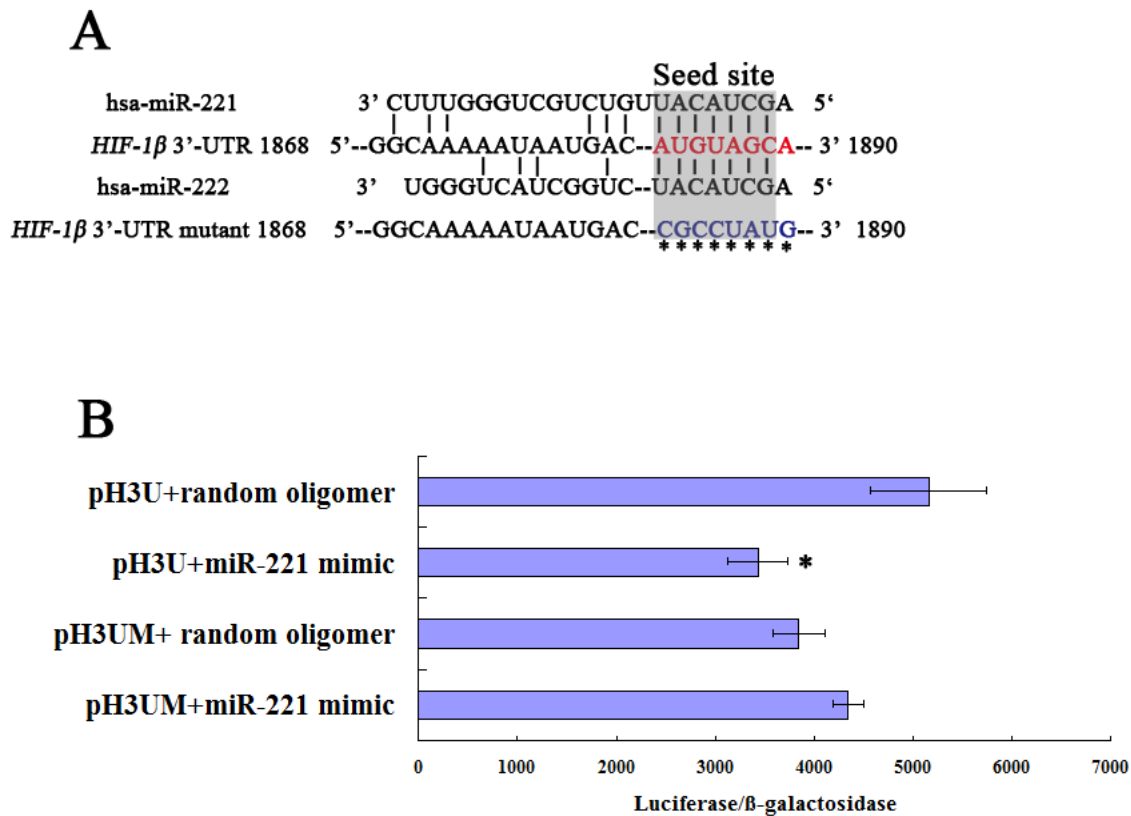


圖 6. 以 Luciferase 活性變化分析預測的 seed site 對 miR-221 調控標的基因的重要性

- (A) *HIF-1β* 3'-UTR 上 miR-221/222 seed site 的辨識序列及突變後的序列。星號為突變的位置。
- (B) 以 Luciferase 活性變化確認 miR-221 的標的位置。pH3U 為 pGL3-*HIF-1β* 3'-UTR; pH3UM 為 pGL3-*HIF-1β* 3'-UTR mutant。將報導質體 pH3U 或 pH3UM 與 PCH110 做同步轉殖，以 PCH110 表現的 β-galactosidase 作為 internal control。實驗結果為 4 次重複實驗數據計算平均值、標準差及以 Student's test 分析顯著差異 ($P < 0.01$)，星號代表與控制組有顯著差異。

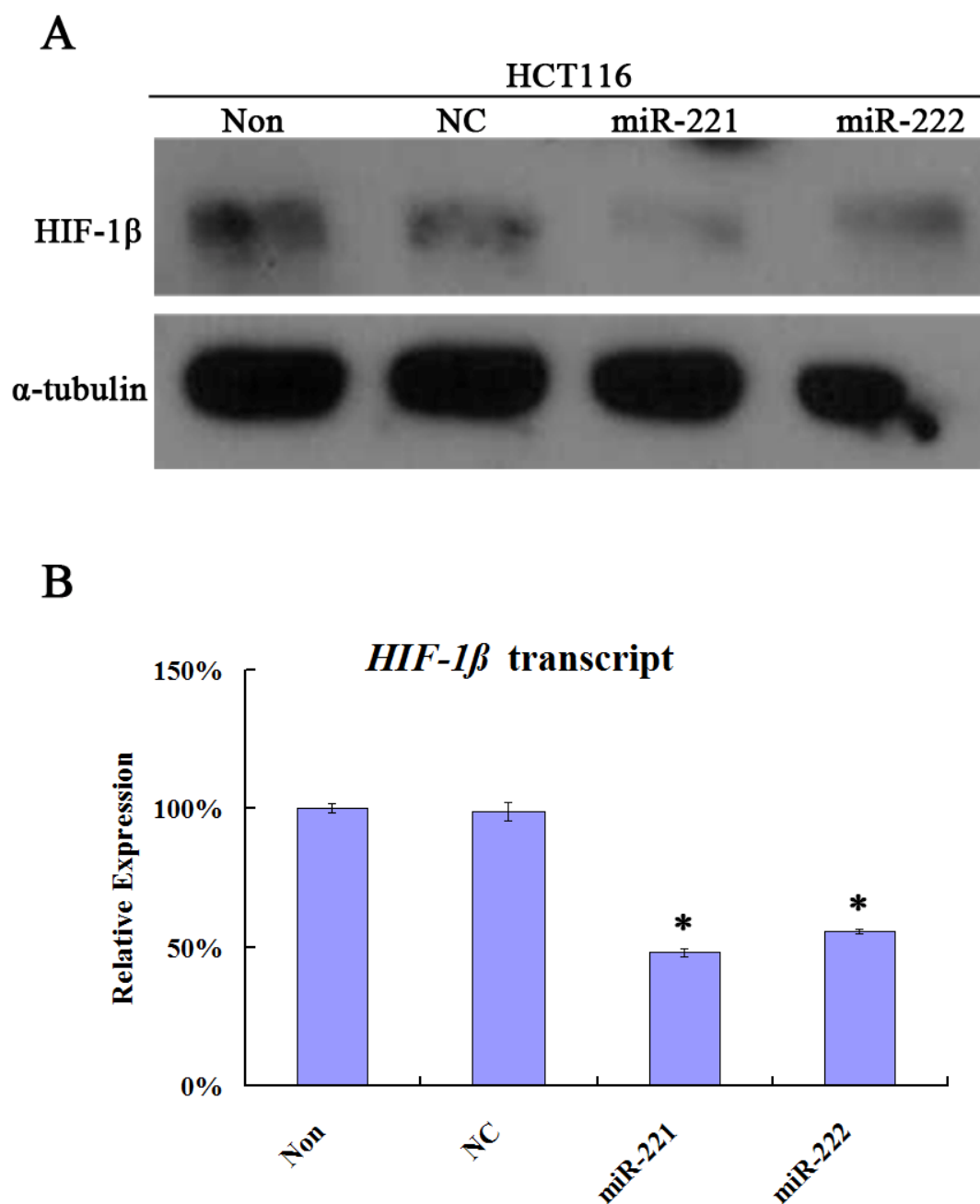


圖 7. 分析 miR-221/222 抑制 HIF-1 β 表現的機制

Non 為只以 transfection reagent 處理；NC 為轉殖 random oligomer；miR-221 為轉殖 miR-221 mimic；miR-222 為轉殖 miR-222 mimic。

(B) 利用西方點墨法分析 HIF-1 β 蛋白表現。 α -tubulin 作為 internal control。

(C) 利用同步定量 RT-PCR 分析 *HIF-1 β* transcript。以 *GAPDH* transcript 作為 internal control。實驗結果為 4 次重複實驗數據計算平均值、標準差及以 Student's test 分析顯著差異 ($P < 0.01$)，星號代表與控制組有顯著差異。

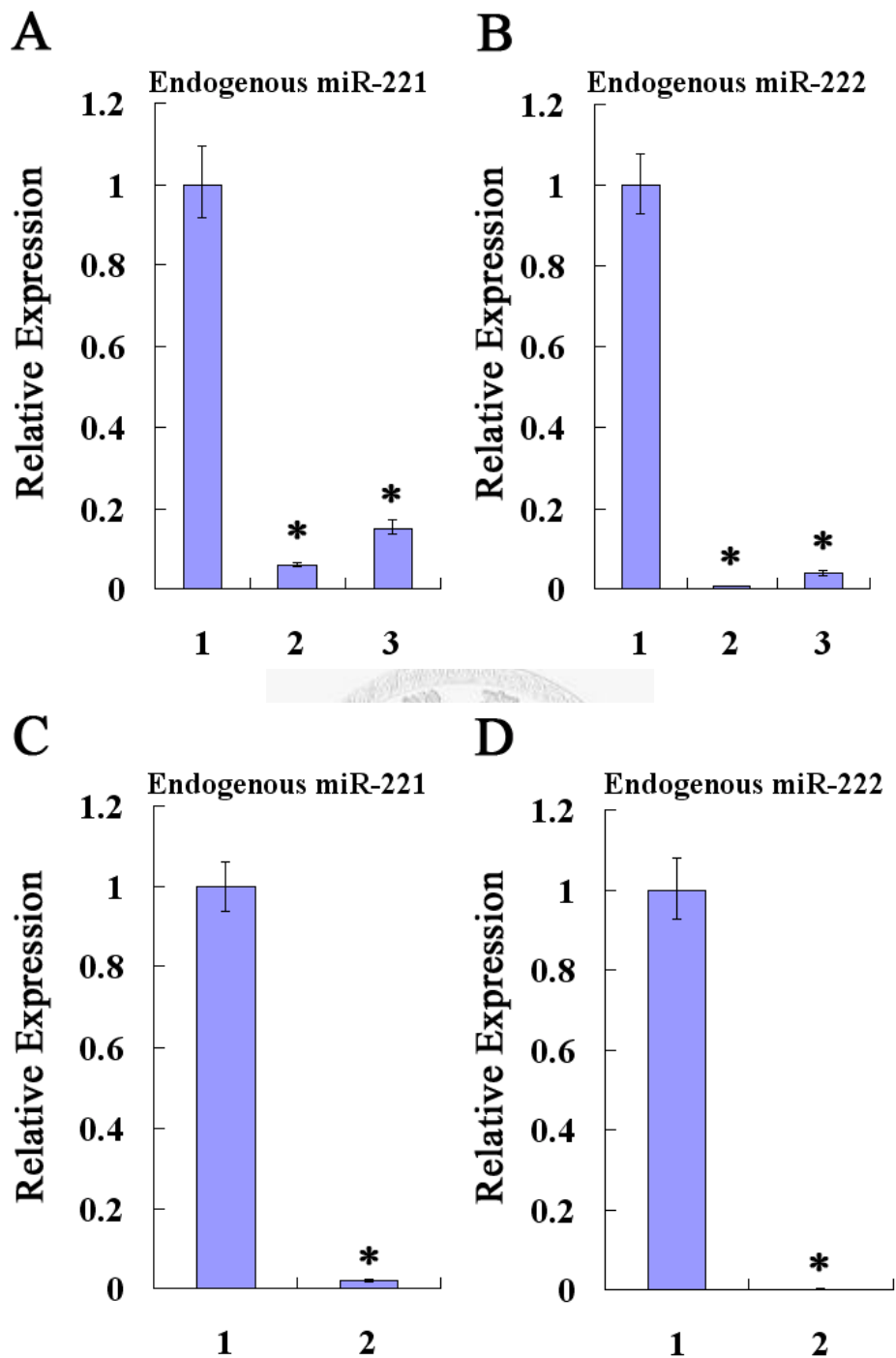


圖 8. 以 miR-221/222 inhibitor 抑制內生性 miR-221/222

每批細胞中轉殖的 inhibitor 濃度總量為 100 nM。利用同步定量 RT-PCR 分析 MIA PaCa-2 細胞內生性 miR-221 (A)及 miR-222 (B)以及 ASPC-1 細胞內生性 miR-221 (C)miR-222 (D)之表現量。(A) (C)之 bar 1 為轉殖 scramble-miR；bar 2 為轉殖 miR-221 inhibitor；bar 3 為轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor。(B) (D)之 bar 1 為轉殖 scramble-miR；bar 2 為轉殖 miR-222 inhibitor；bar 3 為轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor。實驗結果為 4 次重複實驗計算所得平均值、標準差及以 Student's test 分析顯著差異 ($P < 0.01$)，星號代表與控制組有顯著差異。

A



B

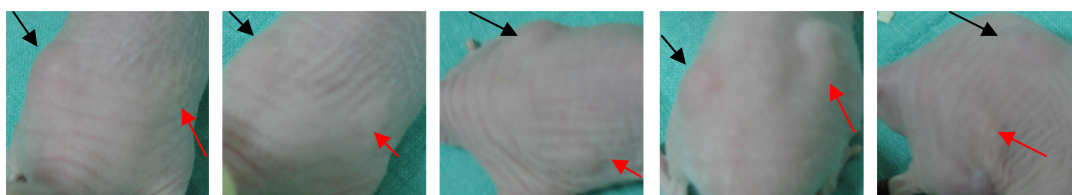


圖 9. miR-221/222 對 MIAPaCa-2 胰臟癌細胞增生的影響

以 5×10^6 個細胞為一劑注射。右後肢注射轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 的細胞；左後肢注射轉殖 scramble-miR 的細胞。黑色箭頭所指為注射轉殖 scramble-miR 的細胞後形成腫瘤的位置；紅色箭頭所指為注射轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 的細胞後形成腫瘤的位置。裸鼠隻數為 5。

(A) 注射 MIAPaCa-2 細胞至裸鼠後一週。

(B) 注射 MIAPaCa-2 細胞至裸鼠後五週。

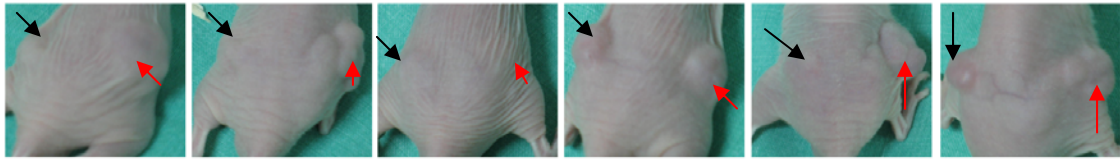
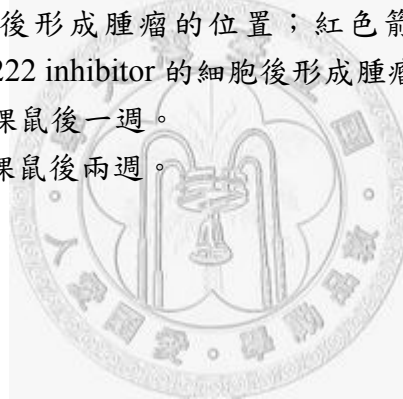
A**B**

圖 10. miR-221/222 對 ASPC-1 胰臟癌細胞增生的影響

以 1×10^7 個細胞為一劑注射。右後肢注射轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 的細胞；左後肢注射轉殖 scramble-miR 的細胞。黑色箭頭所指為注射轉殖 scramble-miR 的細胞後形成腫瘤的位置；紅色箭頭所指位置為注射轉殖 miR-221 inhibitor 及 miR-222 inhibitor 的細胞後形成腫瘤的位置。裸鼠隻數為 6。

(A) 注射 ASPC-1 細胞至裸鼠後一週。

(B) 注射 ASPC-1 細胞至裸鼠後兩週。



參考文獻

- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Ausubel, F.M., Brenet, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bagga, S., Bracht, J., Shaun, H., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281-297.
- Bianchi, L., Tacchini, L., and Cairo, G. (1999). Hif-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res.* 27, 4223-4227.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-strand RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14428-14433.
- Blain, S.W., Scher, H.I., Cordon-Carlos, C., and Koff, A. (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3, 111-114.
- Bloomston, M., Frankel, W.L., Petrocca, F., Volinia, S., Alder, H., Hagan, J.P., Liu, C.-G., Bhatt, D., Taccioli, C., and Croce, C.M. (2007). MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297, 1901-1907.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of MicroRNA- target recognize. *PLoS Biol.* 3, 404-418.
- Bruick, R.K. (2000). Expression of gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9082-9087.
- Büchler, P., Reber, H.A., Büchler, M.W., Frless, H., Lavey, R.S., and Hines, O.J. (2003). Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of

VEGF gene expression. *Cancer* 100, 201-210.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovltch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcllffe, P., Moons, L., Jaln, R.K., Collen, D., and Keshet, E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.

Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001). Regulation of *glut1* mRNA by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 276, 9519-9525.

Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.

Ciafrè, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C.-G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C.M., and Farace, M.G. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1351-1358.

Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., J.Ratcliffe, P., and Maxwell, P.H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 275, 25733-25741.

Dang, C.V., Kim, J.-W., Gao, P., and Yustein, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 51-56.

Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Kettling, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-511.

Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., and Semenza, G.L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 59, 3915-3918.

Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli,

V., Morsilli, O., Santori, S., Valtieri, M., Calin, G. A., Liu, C.-C., Sorrentino, A., Croce, C. M., and Peschle, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibitor normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 18081-18086.

Filipowicz, W. (2005). RNAi: The nuts and bolts of the RISC machin. *Cell* *122*, 17-20.

Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Cur. Opin. Struct. Biol.* *15*, 331-341.

Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of Vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4604-4613.

Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G.V., Ciafrè, S.A., and Farace, G.M. (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by target p27^{kip1}. *J. Biol. Chem.* *282*, 23716-23724.

Gradin, K., Takasaki, C., Yoshiaki, F.-K., and Sogawa, K. (2002). The transcriptional Activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J. Biol. Chem.* *277*, 23508-23514.

Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engle, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals : Determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* *27*, 91-105.

Gwizdek, C., Bertrand, E., Dargemont, C., Lefebvre, J.-C., Blanchard, J.-M., Singer, R.H., and Doglio, A. (2001). Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcription to the cell cytoplasm. *J. Biol. Chem.* *276*, 25910-25918.

Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A.M., Doglio, A., Bertrand E., Macara I.G., and Dargemon, C. (2003). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J. Biol. Chem.* *278*, 5505-5508.

Ha, I., Wightman, B., and Ruvkun, G. (1996). A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-4 temporal gradient formation. *Genes Dev.* *10*, 3041-3050.

Han, J., Lee Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016-3027.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 7987-7992.

Hur, E., Chang, K.Y., Lee, E., Lee, S.-K., and Park, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stability or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Pharmacol.* *59*, 1216-1224.

Jeong, J.-W., Bag, M.-K., Ahn, M.-Y., Kim, S.-H., Sohn, T.-K., Bag, M.-H., Yoo, M.-A., Song, E.-J., Lee, K.-J., and Kim, K.-W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1- mediated acetylation. *Cell* *111*, 709-720.

Jiang, B.-H., Semenza, G.L., Bauer, C., and Marti, H.H. (1996). Hypoxia- inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *271*, 1172-1180.

Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Padova, F.D., Lin, S.-C., Gram, H., and Han, J. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* *120*, 623-634.

Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* *70*, 1469-1480.

Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNA and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.

Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase : A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* *31*, 77-185

Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., and Semenza, G.L. (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* *63*, 1138-1143.

Kung, A.L., Wang, S., Klco, J.M., Kaelin, JR, W.G., and Livingston, D.M. (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat. Med.* 6, 1335-1340.

Lai, E.C. (2002). MicroRNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* 30, 363-364.

Lai, E.C., Tam, B., and Rubin, G.M. (2005). Pervasive regulation of *Drosophila* notch target gene by GY-box-, Brd-Box-, and K-Box-class microRNA. *Genes Dev.* 19, 1067-1080.

Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruck, R.K. (2002). HIF-1 is a asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 466-1471.

Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., and Whitelaw, M.K. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain : A hypoxia switch. *Science* 295, 858-862.

Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14, 2162-2167.

Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H., and Kim, K.-W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological function. *Exp. Mol. Med.* 36, 1-12.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation : stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663-4670.

Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, N.Y. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522-532.

Lewis, B.P., Shih, I.-H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2006). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.

Cell 120, 15-20.

Li, Y.M., Zhou, B.P., Deng, J., Pan, Y., Hay, N., and Hung, M.-C. (2005). A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res.* 65, 3257-3263.

Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., and Slingerland, J.M. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G₁ arrest. *Nat. Med.* 8, 1153-1160.

Lloyd, R.V., Erickson, L.A., Jin, L., Kulih, E., Qian, X., Cheville, J.C., and Scheithauer, B.W. (1999). p27^{kip1} : A multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am. J. Pathol.* 154, 313-413.

Lok, C.N., and Ponka, P. (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274, 24147-24152.

Lu, S., Gu, X., Hoestje, S., and Epner, D.E. (2002). Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1574, 152-156.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursor. *Science* 303, 95-98.

MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006). Structure basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.

MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, A. (2008). *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 512-517.

Marlower, J. L., Knudsen, E.S., Schwembergerll, S., and Puga, A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoter and represses S phase-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 29013-29022.

Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001).

Independent function of two destruction domain in hypoxia-inducible factor- α chain activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 20, 5197-5206.

Maxwell, P.H., Dachs, C.U., Gleadle, J.M., Nicholis, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumor and influence both angiogenesis and tumor or growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8104-8109.

Millar, A.A., and Waterhouse, P.M. (2005). Plant and animal microRNAs : similarities and differences. *Funct. Integr. Genomics* 5, 129-135.

Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. 1997. The cold shock domain protein Lin-28 control developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88, 637-646.

Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlignien, M.T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C.G., Santoro, M., Negrin, M., Croce, C. M., and Fusco, A. (2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 497-508.

Peng, L., Mayhew, C.N., Schneckenburger, M., Knudsen, E.S., and Puga, A. (2008). Repression of Ah receptor and induction of transforming growth factor- β gene in DEN-induced mouse liver tumor. *Toxicology* 246, 242-247.

Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., Mercatanti, A., Hammond, S., and Rainaldi, G. (2006). MicroRNA modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108, 3068-3071.

Postovit, L.-M., Abbott, D. E., Payne, S.L., Wheaton, W.W., Margaryan, N.V., Sullivan, R., Jansen, M.K., Csiszar, K., Hendrix, M.J.C., and Kirschmann, D.A. (2008). Hypoxia/reoxygenation: A dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J. Cell. Biochem.* 103, 69-1378.

Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Friendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* 21, 5964-5874.

Sage, C.I., Nagel, R., Egan, D.A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C.,

Maria, G., Mercatelli, N., Ciafrè, S.A., Farance, M.G., and Agami, R. (2007). Regulation of the p27^{kip1} tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promoter cancer proliferation. *EMBO J.* 26, 3699-3708.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Du, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

Semenza, G. L. (2003). Target HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721-732.

Semenza, G. L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondria respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* 405, 1-9.

Semenza, G.L., Neufelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factor bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 680-684.

Semenza, G.L., Jiang, B.-H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response element in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoter contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 32529-32537.

Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Wastson, P., Greenberg, A.H., and Harris, A.L. (2001). HIF-1-dependent regulation of Hypoxia induction of the cell death factor BNIP3 and NIX in human tumor. *Cancer Res.* 61, 6669-6673.

Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 19, 4298-4309.

Visone, R., Russo, L., Pallante, P., Martino, I. D., Ferraro, A., Leone, V., Borbone, E., Petrocca F., Alder, H., Croce, C. M., and Fusco, A. (2007). MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27^{kip1} protein levels and cell cycle. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 791-798.

Watanabe, Y., Yachie, N., Numata, K., Saito, R., Kanai, A., and Tomita, M. (2006). Computational analysis of microRNA target in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 365, 2-10.

Willian, G., and Jr. K. (2005). Proline hydroxylation and gen expression. *Annu. Rev.*

Biochem. 74, 115-130.

Yang, J., Zhang, L., Erbel, P.J.A., Gardner, K.H., Ding, K., Garcia, J.A., and Bruick, R.K. (2006). Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. J. Biol. Chem. 280, 36047-36054.

Yekta, S., Shin, I.-H., and Bartel, D.P. (2008). MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. Science 304, 594-596.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and shot hairpin RNAs. Genes Dev. 17, 3011-3016.

Zeng, Y. 2006. Principles of micro-RNA production and maturation. Oncogene 25, 6156-6162.

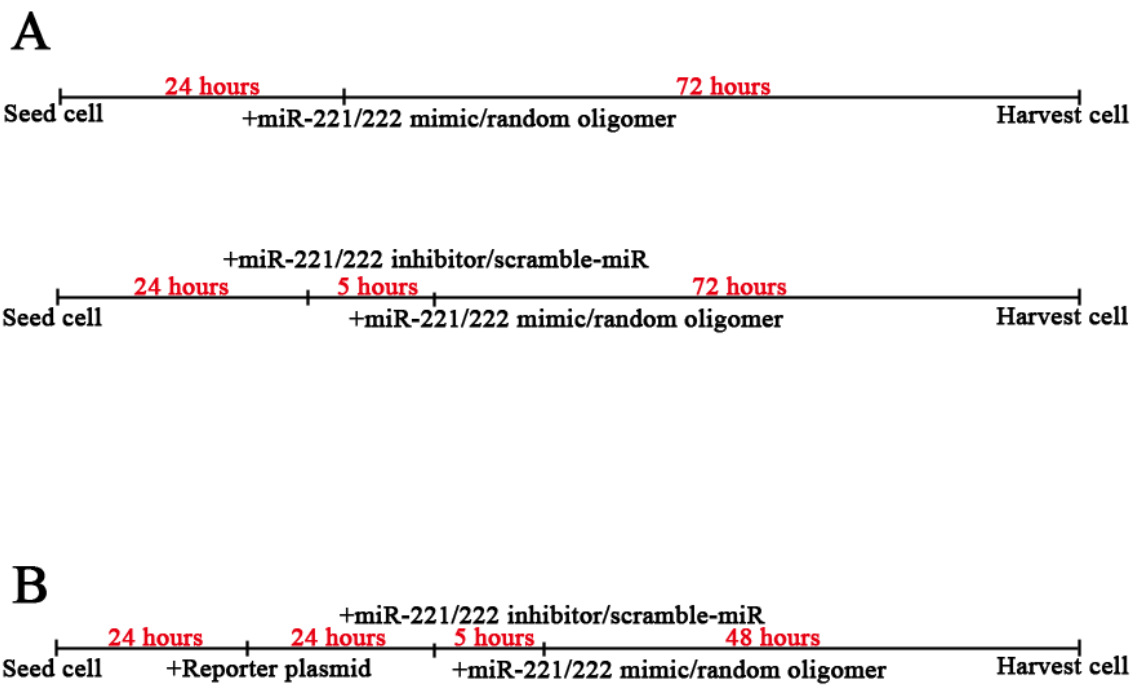
Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. RNA 9, 112-123.

Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNA at their termini without a requirement for ATP. EMBO J. 21, 5875-5885.

Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondria biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. Cancer Cell 11, 407-420.

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Kern, S.E., Hruban, R.H., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science 276, 1268-1272.

附圖 1. 細胞轉殖時間表



附圖 2. 報導質體 pGL3-control Map(節錄自 Promega Technical Manual NO.33)

