



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 Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis

探討Semaphorin 6A二聚化

在誘導肺癌細胞內源性凋亡中的功能

To Study the Functions of Semaphorin 6A Dimerization
in Inducing Intrinsic Apoptosis in Lung Cancer Cells

徐資恆

Tzu-Heng Hsu

指導教授：蔡孟勳博士

Advisor: Mong-Hsun Tsai, Ph.D

中華民國114年5月

May, 2025



摘要

肺癌是一種最常見且致死率極高的癌症，在全球被視為最具挑戰性的公共衛生問題。儘管已有新的治療方法被開發出來，但腫瘤的多樣性和對治療的抗性等問題仍有待克服。因此，更深入地了解肺癌細胞中的分子調控機制，將有助於我們更全面地認識疾病的運作及進展，從而為未來的研究提供重要的見解。我們先前的研究顯示，Semaphorin 6A (SEMA6A) 在肺癌組織及細胞株中的表現量顯著降低，而過表達 SEMA6A full-length (SEMA6A-FL) 可顯著誘導肺癌細胞凋亡。當 SEMA6A-FL 失去 SEMA 域時，其胞內區域會與 FADD (Fas-associated death domain) 結合，進而透過裂解 Caspase-8 誘導細胞凋亡。然而，即使 SEMA6A-FL 在肺癌細胞中表現後可觀察到約 10% 的凋亡比例，其胞內區域卻並未透過 FADD 和 Caspase-8 誘導此過程。此外，先前研究發現 SEMA6A-FL 可誘發內質網壓力，因此我們推測 SEMA6A-FL 是透過內源性凋亡途徑引發細胞死亡。早期研究也顯示，SEMA6A-FL 可在細胞中以單體和二聚體的形式存在，並且 SEMA6A-FL 透過其 SEMA 域中第 415 位胺基酸形成二聚體，進而與 Plexin-A2 相互作用。這些結果表明，SEMA6A-FL 的單體和二聚體可能具有不同的生物學功能。因此，我們假設 SEMA6A-FL 的結構，尤其是其形成二聚體的能力，可能會顯著影響其誘導內源性細胞凋亡的機制。在本研究中，我們確認了兩個特定的突變——M415C (促進二聚化) 和 I322E (減少二聚化)——可以有效改變 SEMA6A-FL 的二聚化能力。為了探討這些結構對細胞功能的影響，我們進行了多項實驗，包括細胞生長測試、集落形成存活分析、細胞凋亡檢測、細胞週期分析以及凋亡相關蛋白的表現量測定。結果顯示，當 SEMA6A-FL 的二聚化能力被減弱時，細胞生長或凋亡與對照組相比並無顯著變化。然而，當 SEMA6A-FL 的二聚化能力增強時，肺癌細胞的生長顯著減少，且凋亡顯著增加。此外，我們製備了更容易形成二聚體的 SEMA6A-FL 截短版本，並將這些版本過表現於肺癌細胞中，結果顯示細胞生長顯著減少且凋亡增加，進一步強調了 SEMA6A-FL 二聚化在誘導細胞凋亡中的重要角色。另外，增加 SEMA6A-FL 二聚體會增強肺癌細胞內質網壓力的程度，而且，下游 Caspase-9 的裂解產物也跟著增

加。這代表 SEMA6A-FL 是透過二聚體結構引起內質網壓力，接著誘發肺癌細胞的內源性凋亡訊號。



中文關鍵字：肺癌細胞、Semaphorin 6A 膜蛋白、蛋白質二聚體、蛋白質單體、細胞凋亡

Abstract



Lung cancer is a common and deadly disease, representing a significant challenge to public health worldwide. Despite new therapies being developed, problems like tumor diversity and resistance to treatment still need to be overcome. Therefore, to better understand the molecular regulatory mechanisms in lung cancer cells will help us learn more about how the disease works and progress, leading to important insights for future research. Our previous research demonstrated that Semaphorin 6A (SEMA6A) expression is significantly reduced in lung cancer tissues and cell lines, while overexpression of SEMA6A-FL can trigger apoptosis significantly in the lung cancer cell lines. Although the intracellular domain of SEMA6A-FL does not interact with FADD, it has been shown to induce endoplasmic reticulum (ER) stress in lung cancer cells, suggesting that SEMA6A-FL may trigger apoptosis through the intrinsic pathway. Additionally, earlier studies have found that SEMA6A-FL exists in both monomer and dimer forms in the cells. It has also been shown that SEMA6A-FL dimerizes through a specific amino acid (415th position in the SEMA domain), which allows it to interact with another protein called Plexin-A2. These findings suggest that the monomer and dimer forms of SEMA6A-FL might have different biological functions. Based on this, we hypothesize that the structure of SEMA6A-FL, especially its ability to form dimers, may affect how it triggers intrinsic apoptosis. In the study, we confirmed that two specific mutations—M415C (which promotes dimerization) and I322E (which reduces dimerization)—can effectively change how SEMA6A-FL dimerizes. To see how these structures impact cell functions, we carried out several experiments, such as testing cell growth, clonogenic survival, apoptosis detection, cell cycle analysis, and measuring proteins involved in apoptosis. The results showed that when dimerization of SEMA6A-FL was reduced, there was no significant change in cell growth or apoptosis compared to the control group. However, when dimerization of SEMA6A-FL was increased, cell growth was significantly reduced, and apoptosis was greatly increased in the lung cancer cells. We also created truncated versions of SEMA6A-FL that are more likely to dimerize, and overexpressing these versions in lung cancer cells caused a significant reduction in cell growth and an increase in apoptosis, further highlighting the role of SEMA6A-FL.

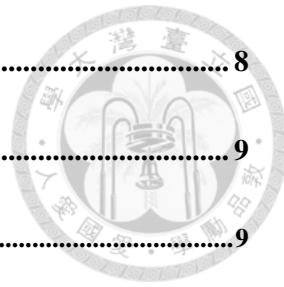
dimerization in inducing cell death. Moreover, an increase in SEMA6A-FL dimerization enhances the degree of ER stress, accompanied by an increase in the cleavage products of downstream Caspase-9. This suggests that SEMA6A-FL induces ER stress through its dimeric structure, thereby triggering the intrinsic apoptotic signaling pathway in lung cancer cells.

Key words: Lung cancer cells, Semaphorin 6A, protein dimer, protein monomer, apoptosis.

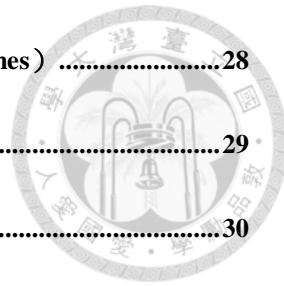
目次



摘要	I
Abstract	III
目次	V
表次	XI
圖次	XII
第一章、文獻回顧與研究背景	1
1.1、肺癌的全球挑戰與臨床現狀	1
1.2、肺癌在台灣的流行病學特徵	2
1.3、肺癌的致病原因	3
1.4、肺癌的分類	4
1.4.1、肺腺癌（Adenocarcinoma）	4
1.4.2、鱗狀細胞癌（Squamous Cell Carcinoma）	4
1.4.3、大細胞癌（Large Cell Carcinoma）	5
1.4.4、小細胞肺癌（SCLC）	5
1.5、肺癌治療的挑戰	5
1.6、目前肺癌分子機制的治療策略	6
1.7、探索肺癌潛在的未知分子機制	6
第二章、SEMA6A 與細胞凋亡的研究背景	8



2.1、	Semaphorin 蛋白質家族	8
2.2、	SEMA6A 的生物學背景及其在癌症中的角色.....	9
2.2.1、	SEMA6A 的研究背景	9
2.2.2、	SEMA6A 在肺癌中扮演的角色	10
2.3、	細胞凋亡 (Apoptosis) 的訊號途徑	14
2.3.1、	Extrinsic Apoptosis Pathway (外源性細胞凋亡途徑)	14
2.3.2、	Intrinsic Apoptosis Pathway (內源性細胞凋亡途徑)	14
第三章、	研究動機與目的	16
3.1、	SEMA 域參與 SEMA6A 二聚化	16
3.2、	探討 SEMA6A-FL 誘導的凋亡路徑	19
3.3、	研究目的	21
第四章、	材料與方法	23
4.1、	細胞培養 (Cell Culture)	23
4.1.1、	製備培養基 (Medium Preparation)	23
4.1.2、	細胞株 (Cell Lines)	24
4.1.3、	細胞繼代 (Cell Subculture)	24
4.2、	重組質體的製作方法 (Cloning of Recombinant Plasmids)	25
4.2.1、	製作 SEMA6A 的截短片斷 (Truncated SEMA6A Amplification)	25
4.2.2、	SEMA6A-FL 點突變 (Point Mutation of SEMA6A-FL)	26
4.2.3、	連接領導勝肽 (Signal Peptide Elongation)	27



4.2.4、	雙重限制酶消化 (Double Digestion Using Restriction Enzymes)	28
4.2.5、	連接反應 (Ligation)	29
4.2.6、	細胞轉型 (Transformation)	30
4.2.7、	質體製備 (Plasmids Preparation)	30
4.2.8、	Agarose gel、LB agar 和 LB broth 的製備	31
4.3、	慢病毒轉染系統 (Lentivirus Transduction System)	32
4.3.1、	病毒製備 (Viruses Production)	32
4.3.2、	細胞感染 (Cell Infection)	32
4.4、	mRNA 基因表達分析 (mRNA Expression Analysis)	33
4.4.1、	RNA 萃取 (RNA Extraction)	33
4.4.2、	反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription PCR)	34
4.4.3、	及時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-Time PCR, qPCR)	35
4.5、	蛋白質表達分析 (Protein Expression Analysis)	36
4.5.1、	蛋白質萃取 (Protein Extraction)	36
4.5.2、	蛋白質定量 (Protein Quantification)	36
4.5.3、	蛋白質變性 (Protein Denaturation)	36
4.5.4、	SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	37
4.5.5、	西方免疫點墨法 (Western Immunoblotting)	38
4.5.6、	製備 SDS-PAGE 緩衝液 (Preparation of SDS-PAGE Buffer)	38
4.6、	細胞功能分析 (Cell Functional Analysis)	39
4.6.1、	細胞增殖實驗 (Cell Proliferation Assay)	39



4.6.2、	克隆形成實驗 (Clonogenic Assay)	39
4.6.3、	XBP1 剪切實驗 (XBP1 Splicing Assay)	40
4.6.4、	細胞遷移實驗 (Migration Assay Using Transwell)	41
4.7、	流式細胞儀分析 (Flow Cytometry Analysis)	41
4.7.1、	雙重胸腺嘧啶阻斷 (Double Thymidine Blocking)	41
4.7.2、	細胞週期實驗 (Cell Cycle Assay)	42
4.7.3、	細胞凋亡實驗 (Apoptosis Assay)	42
4.8、	統計分析 (Statistical Analysis)	43
第五章、	實驗結果	44
5.1、	成功構建 SEMA6A-FL M415C 及 I322E 點突變體	44
5.2、	SEMA6A-FL M415C 和 I322E 分別增強與減弱蛋白質二聚化的能力	44
5.3、	SEMA6A-FL 二聚體抑制肺癌細胞的生長能力	45
5.4、	SEMA6A-FL 的結構改變不顯著影響細胞週期進展	45
5.5、	SEMA6A-FL 透過二聚體誘導細胞凋亡	46
5.6、	成功構建二種與二聚化相關的 SEMA6A 截短變異體	46
5.7、	二種 SEMA6A 截短變異體皆具增強其二聚化能力	47
5.8、	過表達二種 SEMA6A 截短變異體皆顯著抑制肺癌細胞的生長活性	47
5.9、	二種 SEMA6A 截短變異體均不顯著影響細胞週期進展	47
5.10、	過表達二種 SEMA6A 截短變異體皆顯著促進細胞凋亡	48
5.11、	SEMA6A-FL 結構改變不影響 Caspase-8 裂解活性	48



5.12、	SEMA6A-FL 二聚體增加內質網壓力及 Caspase-9 裂解產物	49
5.13、	缺失 SEMA6A 365-462 氨基酸片段顯著抑制肺癌細胞的遷移能力.....	49
第六章、	討論	50
6.1、	SEMA6A 點突變於肺癌細胞凋亡功能中的探討.....	50
6.1.1、	SEMA6A-FL 單體與二聚體間可能存在結構動態平衡	50
6.1.2、	SEMA6A-FL 是否正確定位於細胞膜尚待驗證.....	50
6.1.3、	SEMA6A-FL 二聚體提升 ER Stress 並促進 Caspase-9 裂解.....	50
6.1.4、	SEMA6A-FL 與 6Acyto 和 6AΔsema 誘導之凋亡路徑存在差異	51
6.1.5、	SEMA6A-FL M415C 誘導凋亡之訊號傳遞方向仍待明確釐清	51
6.2、	對內源性（粒線體依賴性）凋亡路徑的討論	52
6.2.1、	需謹慎評估過表達基因所致 ER Stress 之實驗性假象可能性	52
6.2.2、	探討造成 Mitochondrial Damage 的其他原因	53
6.3、	提出蛋白質功能調控的新解釋機制	54
6.4、	SEMA6A 截短體對肺癌細胞凋亡及細胞遷移的討論	55
6.4.1、	SEMA6A 截短體之功能驗證顯示其促進二聚化並誘導凋亡	55
6.4.2、	SEMA6A 二聚體形成可能受其他結構區域調控	55
6.4.3、	SEMA6A 第 365-462 位氨基酸片段可能參與肺癌細胞遷移機制	56
第七章、	未來研究方向	57
7.1、	探討 SEMA6A-FL 誘導內源性凋亡過程中 Cytochrome c 的釋放.....	57
7.2、	探討其他造成 Mitochondrial Damage 的原因.....	57



7.3、	製備高純度 SEMA6A-FL 單體與二聚體	58
7.4、	利用純化 SEMA6A-FL 單體與二聚體比較其細胞功能	58
第八章、	結論	59
	實驗結果圖	60
	引子序列表	81
	參考資料	83



表次

表 1、特異性放大 SEMA6A 365-1030 和 462-1030 片段的 PCR 配方	25
表 2、SEMA6A-FL M415C 和 I322E 點突變的 PCR 配方	26
表 3、在 SEMA6A 365-1030 和 462-1030 的 5'端接上領導勝肽的 PCR 配方	27
表 4、Double digestion 的配方.....	28
表 5、Ligation 反應之配方.....	29
表 6、Colony PCR 的配方.....	30
表 7、DNase I treatment 的配方	33
表 8、Reverse transcription PCR 的配方	34
表 9、Real time-PCR 的配方	35
表 10、Polyacrylamide Gel 的配方	37
表 11、XBP1 RT-PCR 的配方	40
表 12、構建重組質體、qPCR，及 XBP1 splicing 所用的引子及其序列	81

圖次



圖 I、2022 年 GLOBOCAN 統計之癌症發生率及死亡率	1
圖 II、2020 年人類發展指數與肺癌罹患率之關係	2
圖 III、Semaphorin 蛋白質家族的結構.....	8
圖 IV、肺癌細胞轉染不同載體後的 SEMA6A 和 HMOX1 表達及其遷移能力 ...	10
圖 V、NRF2 和 HMOX1 在肺癌細胞中的基因表現及其對遷移能力的影響	11
圖 VI、肺癌細胞過表達 SEMA6A-FL 後的細胞增殖能力及凋亡細胞比例.....	12
圖 VII、6Aect 和 6Acyto 的結構示意圖及其對細胞凋亡的影響	12
圖 VIII、外加 SEMA 域對過表達 6AΔsema 的肺癌細胞凋亡能力的影響	13
圖 IX、外源性和內源性細胞凋亡路徑.....	15
圖 X、Semaphorins 於正常生理狀態下的結構.....	16
圖 XI、SEMA6A 胞外區域晶體結構及 SEMA6A-FL M415C 的二聚化分析	18
圖 XII、SEMA6A-FL I322E 的二聚化分析	19
圖 XIII、在肺癌細胞中轉染不同 SEMA6A 構建體後的凋亡相關蛋白質表現....	20
圖 XIV、在肺癌細胞中過表達 SEMA6A-FL 後的 XBP1 剪切分析	21
圖 1、SEMA6A-FL M415C 和 I322E 的構建示意圖及其慢病毒載體.....	60
圖 2、SEMA6A-FL 及其點突變體在 H1299 細胞中的基因表現量評估	62
圖 3、H1299 細胞過表達 SEMA6A-FL 及其點突變體的生長表現分析	63
圖 4、H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其點突變體後的細胞週期進程	66
圖 5、評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其點突變體後的凋亡細胞比例	67
圖 6、兩種 SEMA6A 截短體的構建策略示意圖及其慢病毒載體.....	69



圖 7、SEMA6A 365-1030 及 462-1030 在 H1299 細胞中的基因表現量分析	70
圖 8、H1299 細胞過表達 SEMA6A-FL 及其截短體後的細胞增殖能力分析	71
圖 9、評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其截短體後的細胞週期進程	74
圖 10、評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其截短體後的細胞凋亡	75
圖 11、分析 Caspase-8 蛋白質的表達	76
圖 12、分析內源性凋亡相關的蛋白質表達	78
圖 13、分析過表達不同載體後 H1299 的遷移能力及 HMOX1 蛋白質表現	79



第一章、文獻回顧與研究背景

1.1、肺癌的全球挑戰與臨床現狀

在現代醫學中，肺癌被視為全球最具挑戰性的公共衛生問題之一。根據 2022 年全球癌症報告（global cancer observatory, GLOBOCAN）的統計數據，該年新增的肺癌病例高達 240 萬例，約占所有癌症病例的 12.4%，同時每年約有 180 萬人死於肺癌，占所有癌症死亡總數的 18.7%（[圖 I](#)）。這些數據突顯了肺癌不僅是全球發病率最高也是死亡人數最多的惡性腫瘤（[1](#)）。肺癌的發病率和死亡率在全球的分布因地區和國家而異，主要受該地區的吸菸行為、空氣汙染和生活環境影響。吸菸被認為是肺癌的主要致癌因子，而空氣污染和工業廢氣的暴露也與肺癌的高發生率密切相關（[2](#)）。

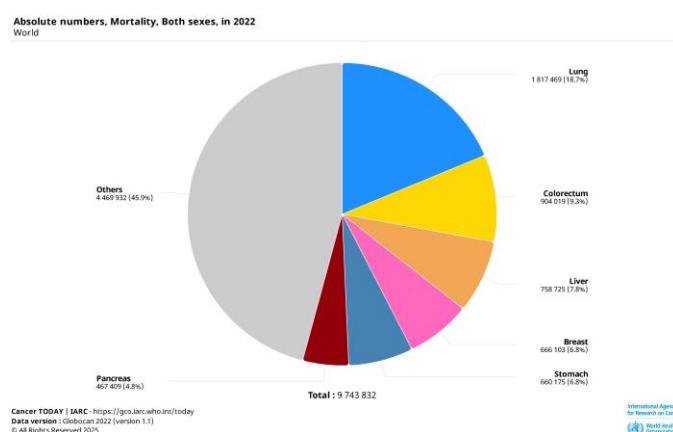
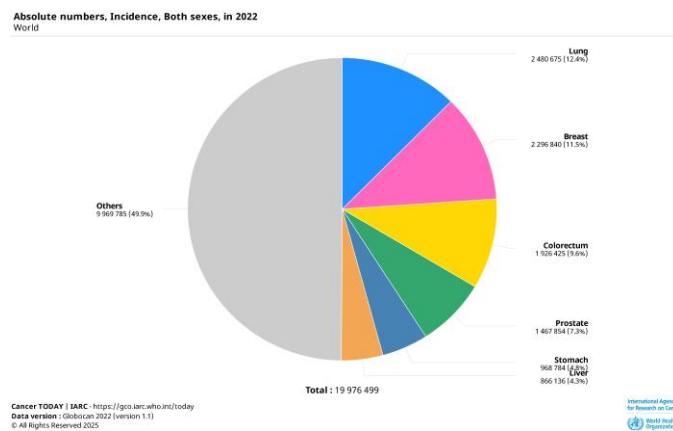


圖 I、2022 年 GLOBOCAN 統計之癌症發生率及死亡率（[1](#)）

根據人類發展指數 (HDI) 的數據，高收入國家的肺癌發病率大約是低收入國家的三倍（[圖 II](#)）。這可能與吸菸行為的普及性、工業化進程和空氣污染暴露的程度有關。隨著醫療技術的進步和公共衛生政策的推進，一些經濟已開發國家（如美國和歐洲國家）的肺癌發病率已逐漸下降。這一現象可能與控煙政策的實施有關。值得注意的是，儘管早期被診斷為肺癌的患者其五年存活率可達 56%（[1](#)），但早期肺癌的症狀不明顯（如輕微的咳嗽或胸痛，容易被忽視），導致許多患者在確診時已處於中晚期，錯過早期治療的黃金時機（[2](#)）。

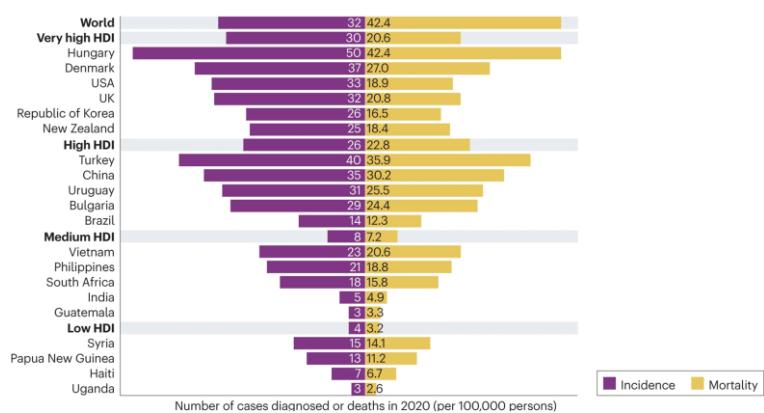


圖 II、2020 年人類發展指數與肺癌罹患率之關係（[2](#)）

1.2、肺癌在台灣的流行病學特徵

根據台灣衛生福利部的統計數據，肺癌自 2010 年代起穩居癌症死因榜首。台灣肺癌的發病率和死亡率在近幾十年間持續攀升（[3](#)）。截至 2023 年，台灣死於肺癌的人數接近 10,000 人，其死亡率高達 44.3%（[4](#)）。這使得肺癌成為台灣最具威脅性的癌症之一，並且其五年存活率僅約為 15% 至 20%。儘管政府已推動多項檢測和預防措施，例如低劑量電腦斷層掃描（LDCT），但肺癌早期的診斷率仍然偏低。這一現象促使科學界不斷探索會促使肺癌生長的未知潛在機制，以期改善早期診斷的靈敏度和有效性。



1.3、肺癌的致病原因

肺癌的致病因素十分多樣，其中吸菸被認為是最主要的因子之一。研究顯示，吸菸者罹患肺癌的風險是非吸菸者的 15 至 30 倍（[5](#)）。這是因為菸草燃燒時會釋放多環芳香烴（polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）和亞硝胺（nitrosamine）等致癌物質，這些致癌物可損害肺部組織的 DNA，誘發細胞的癌變（[6](#)）。二手煙的暴露也被公認為肺癌的危險因子。長期暴露於二手煙環境中的非吸菸者，其罹癌風險明顯升高（[7](#)）。值得注意的是，隨著各國強化對菸草的管制（如禁菸政策的推行），肺癌的發病率在部分地區有所下降（[8](#)）。

除了吸菸，空氣污染也是引發肺癌的重要環境因子。在城市化的推進下，空氣中的工業排放物、交通廢氣、PM_{2.5}懸浮微粒和有毒物質（如二氧化氮 NO₂）被證實與肺癌的發病密切相關（[9](#)）。流行病學研究表明，長期暴露於高濃度的 PM_{2.5}環境中會顯著增加罹患肺癌的風險。另外，隨著全球工業化和城市化的加速，特別是在工業污染嚴重的地區和交通擁堵的城市，肺癌的發病率顯著上升，因為工業中與特定化學物質的接觸（例如石棉、氯氣、砷、鎬和鎳）會顯著提高罹患肺癌的風險（[10](#)）。此外，在一些經濟不發達地區，未經加工的生物質燃料（例如木材、煤炭的燃燒排放物）會釋放多種致癌物質，這些物質進入人體後，可能會透過誘導細胞基因突變的方式促進肺癌的發生（[11](#)）。

除了環境因素外，遺傳易感性（hereditary susceptibility）也在肺癌的致病過程中扮演著重要角色。家族中有肺癌病史者的肺癌風險顯著增加，其風險可提升至無家族病史者的 1.51 倍（[12](#)）。這主要與某些關鍵基因的突變有關，例如 EGFR（epidermal growth factor receptor）、TP53（tumor protein 53）和 KRAS（kirsten rat sarcoma virus）等基因的突變會導致細胞增殖失控和凋亡抑制。在東亞地區，EGFR 突變的比例較高，而 KRAS 突變在全球肺癌病例中約占 27%（[2](#)）。此外，基因組關聯分析（genome-wide association study, GWAS）的研究數據顯示，有 18 個與肺癌家族風險相關的基因位點，這些基因位點的變異可能會導致 12% 的家族性肺癌。



病例（[13](#)）。這些基因突變不僅會導致肺癌的發生，還可能促進肺癌的進展，並且與治療反應和預後密切相關（[14](#)）。

1.4、肺癌的分類

根據組織學特徵的差異，肺癌可分為兩大類型：非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）和小細胞肺癌（small cell lung cancer, SCLC）。其中，NSCLC是最常見的肺癌類型，約占所有肺癌的85%。NSCLC可進一步細分為三種主要亞型，分別是腺癌（adenocarcinoma）、鱗狀細胞癌（squamous cell carcinoma）和大細胞癌（large cell carcinoma）（[15](#)）。

肺癌亞型的致病因素與吸菸有著密切的關聯，多數小細胞肺癌和鱗狀細胞癌的發生與吸菸行為高度相關。肺腺癌的情況略有不同，它是不吸菸者中最常見的肺癌亞型（[16](#)、[17](#)）。

1.4.1、肺腺癌（Adenocarcinoma）

肺腺癌是NSCLC中最常見的亞型，在女性和不吸菸者中發生率較高（[18](#)）。肺腺癌起源於肺泡上皮細胞，這些細胞的主要功能是分泌黏液以維持肺部的正常生理功能。與其他亞型相比，肺腺癌的生長速度相對較慢，但由於早期症狀不明顯，如輕微的咳嗽或胸悶症狀，患者常在腫瘤發展至晚期後才被診斷出，因此五年存活率較低（[19](#)）。

1.4.2、鱗狀細胞癌（Squamous Cell Carcinoma）

鱗狀細胞癌常見於吸菸者，其腫瘤來源於支氣管的上皮細胞（[20](#)）。與其他NSCLC亞型相比，鱗狀細胞癌的增長速度較快，且癌細胞具有較高的侵襲性，容易擴散至鄰近組織，導致鱗狀細胞癌的預後表現不佳。



1.4.3、大細胞癌（Large Cell Carcinoma）

大細胞癌是 NSCLC 中較為罕見的亞型，其細胞形態異常大且具有高度異質性，這使得腫瘤的診斷和分型較為困難（[21](#)）。大細胞癌的細胞不具備腺癌和鱗狀細胞癌的典型形態特徵，因此常被歸類為未分化的肺癌細胞。由於腫瘤的未分化特性，大細胞癌的增長速度較快，且容易發生遠端轉移，這使得患者的預後較差（[22](#)）。

1.4.4、小細胞肺癌（SCLC）

SCLC 僅佔所有肺癌病例的 15%，但其惡性程度遠高於 NSCLC（[23](#)）。SCLC 的特徵包括細胞小、增殖速度極快，並具有高度的侵襲性和轉移性。幾乎所有 SCLC 病例都與吸煙有關，且常常在早期就擴散至其他器官（[24](#)、[25](#)）。雖然 SCLC 對化學療法和放射治療的初期反應較好，但其高復發率使得預後極為不佳，兩年內的生存率低於 10%（[26](#)）。

1.5、肺癌治療的挑戰

肺癌的早期症狀（如咳嗽、胸痛和呼吸急促）與其他呼吸系統疾病類似，許多患者直到晚期才確診（[27](#)），使得患者錯過了早期治療的黃金時機，大幅降低治療成功的可能性。現今肺癌的傳統治療方式有手術切除、放射治療和化學治療，其中手術為早期非小細胞肺癌（NSCLC）患者的首選治療方法，而放射治療與化學治療則用於輔助或晚期患者（[28](#)）。目前，傳統治療手段對於無法進行手術或晚期患者的療效不彰（[29](#)），且肺癌的遺傳特異性和快速演變，使得單一治療手段無法完全控制腫瘤的發展。

隨著分子生物學的進步，奈米藥物、標靶治療、光熱療法和免疫療法等新興治療策略逐漸興起。標靶治療和免疫療法雖然在臨床應用中取得一定的成效，但肺癌細胞的耐藥性使其療效受限（[30](#)）。例如，接受 EGFR 抑制劑（如 gefitinib 和 erlotinib）



的 NSCLC 患者，雖在初期治療階段顯示良好反應，但隨著治療的持續進行，肺癌細胞中 T790M 等耐藥突變體逐漸出現，最終導致患者的治療效果下降（[31](#)）。同樣地，免疫療法(如 PD-1/PD-L1 抑制劑)中也觀察到免疫逃逸現象(immune evasion)，癌細胞會通過調控腫瘤微環境中的免疫訊號來抑制免疫細胞的活性，最終導致免疫治療的成效降低（[32](#)）。

1.6、目前肺癌分子機制的治療策略

針對肺癌發展相關的細胞訊號分子已進行大量研究，旨在探索新的靶向治療策略以有效對抗肺癌。目前，epidermal growth factor receptor (EGFRs) 和 phosphoinositide 3-kinase (PI3Ks) 是研究最多的細胞訊號分子，而其他受到廣泛關注的分子包括 mammalian target of rapamycin (mTOR) 、vascular endothelial growth factor receptor(VEGFRs)、mitogen-activated protein kinase(MAPK)、mitogen activated protein kinase phosphatase(MKPs)、matrix metalloproteinase(MMPs)以及 peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs)（[33](#)）。針對這些分子的藥物可能成為潛在的肺癌治療工具。雖然每年都有大量具有潛力的新分子靶點被報導，但至今只有極少數靶向藥物進入臨床階段。這些失敗的原因可能包括：與肺癌進展有關的訊號通路尚有未知的潛在變異點，以及靶向分子的特異性不足（[34](#)），導致癌細胞在治療過程中發生基因突變、遠端轉移、復發，和亞型的改變等等（[35](#)）。這些現象在暗示我們，即使某些訊號傳遞被藥物阻斷，肺癌細胞可能透過激活其他通路來逃避免疫攻擊。

1.7、探索肺癌潛在的未知分子機制

以上現象提示了潛在的未知促癌機制可能在肺癌細胞中發揮關鍵作用，使其在抗癌的環境中仍能生存。因此，探索肺癌的分子調控機制和未知促癌因素，不僅

能幫助識別新型的分子靶點，還能為肺癌治療策略的開發提供新的方向和理論依據。

為此，我們致力於探索肺癌中尚未被揭示的分子調控機制，期望在肺癌發展中提供新的視野與突破。先前，我們實驗室針對 172 對非吸菸女性肺癌患者的腫瘤和配對的正常組織進行基因表達分析，試圖找出與肺癌發展相關的基因。分析結果顯示，Semaphorin 6A (SEMA6A) 在肺癌組織及肺癌細胞株中的基因表達顯著降低 ([36](#))。有趣的是，先前報導指出 SEMA6A 在神經系統中，與心臟神經細胞的移動和軸突的發展有關 ([37](#))，但該基因與肺癌的發展有何關聯？這問題引起我們一直以來的興趣與關注。因此，我們先前研究了 SEMA6A 對肺癌發展的影響性，本篇也將在後續章節中，深入探討 SEMA6A 的生物學特性及其在肺癌細胞中的功能。

第二章、SEMA6A 與細胞凋亡的研究背景



2.1、Semaphorin 蛋白質家族

Semaphorin 蛋白質家族是一個由分泌型、跨膜型和膜連接型蛋白質組成的多樣化家族。根據其在不同物種中的表現情況，Semaphorins 可分為八個亞型，其中第一類和第二類存在於無脊椎動物中，而第三至第七類則廣泛存在於脊椎動物中（38）（圖 III）。

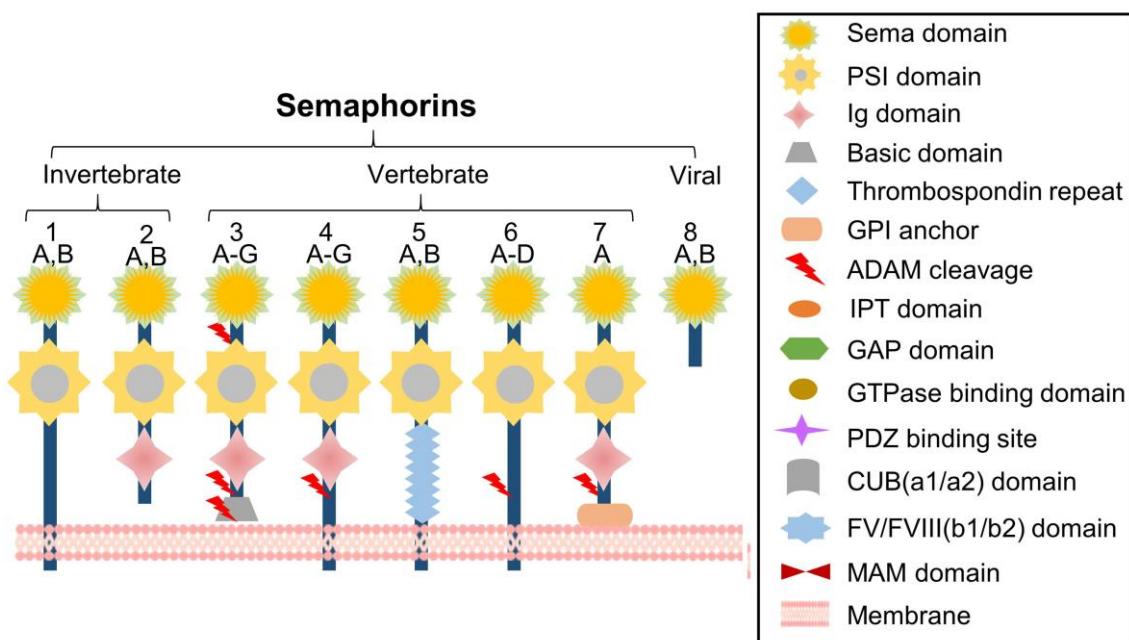


圖 III、Semaphorin 蛋白質家族的結構

Semaphorin 蛋白質家族可分為八大類，其中第二、第三和第八類屬於分泌型蛋白質，第四至第六類則為跨膜型蛋白質，而第七類為唯一的 GPI 鐨定型蛋白質。除第八類病毒型 Semaphorins 外，其餘所有類型均包含一個 SEMA 結構域及一個 Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI) 結構域。

圖 III 修改自（39）。

Semaphorins 的功能多樣且廣泛參與多個生物學過程，包括：心臟神經細胞的遷移、軸突的發育、血管生成和腫瘤微環境的調節（[37](#)、[40](#)）。在這些過程中，Semaphorins 通過與 Plexins 或 Neuropilins 蛋白質的結合發揮作用，觸發順向訊息傳遞（forward signaling）。Semaphorins 和 Plexins 的交互作用方式靈活多樣，不僅可以在不同細胞之間形成反式（trans）相互作用，也可以在同一細胞表面上通過順式（cis）進行調控（[41](#)、[42](#)）。此外，Semaphorins 的胞內結構域也可以與下游蛋白質作用進一步啟動反向訊息傳遞（reverse signaling），使其在細胞內外皆能參與訊號的傳導。這種多樣的結合模式顯示出 Semaphorins 在細胞間和細胞內部的動態調節扮演著重要角色。

2.2、 SEMA6A 的生物學背景及其在癌症中的角色

2.2.1、 SEMA6A 的研究背景

第六類 Semaphorins (class 6 Semaphorins) 是一群跨膜蛋白質，其成員包括 SEMA6A、SEMA6B、SEMA6C 和 SEMA6D。這些蛋白質的典型結構包括胞外區域 (SEMA 域和 PSI 域)、跨膜區域和胞內區域，並透過與 Plexin-A1、A2、A3 和 A4 受體的結合來觸發細胞的訊號傳遞（[43](#)）。SEMA6A 作為第六類 Semaphorins 的重要成員，能與鄰近細胞膜上的 Plexin-A2 受體結合，來執行其正向訊息傳遞 (forward signaling)，進一步調節神經元的遷移、導向與發育（[44](#)）。

隨著研究的深入，SEMA6A 在腫瘤微環境中的功能逐漸受到重視。在多數癌症中，例如黑色素瘤 (melanoma)（[45](#)）、肝癌 (hepatocellular carcinoma)（[46](#)）、胃癌 (gastric cancer)（[47](#)）和口腔癌 (oral squamous cell carcinoma)（[48](#)）等，SEMA6A 的過度表達皆與腫瘤的增殖、轉移和不良的預後有關。然而，SEMA6A 的腫瘤生物學功能具有雙面性。在某些癌症中，SEMA6A 的表達反而抑制了腫瘤的生長，例如在肺癌（[49](#)）和膠質母細胞瘤 (glioblastoma)（[50](#)）。在肺癌小鼠模型中，SEMA6A 的表達上調會縮小腫瘤體積（[36](#)）。此外，不吸菸的肺癌患者中，

SEMA6A 的表現量比週遭正常組織低（[51](#)），這現象可以得知 SEMA6A 在肺癌細胞的進展中成為潛在的抗癌分子。



2.2.2、SEMA6A 在肺癌中扮演的角色

我們先前的研究發現，SEMA6A 在肺癌組織中的基因表達顯著降低，暗示其可能在肺癌的發展過程中具有重要影響（[36](#)）。進一步研究顯示，過表達 SEMA6A-full length (SEMA6A-FL) 會上調 HMOX1 (heme oxygenase 1) 和 NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 基因的表達，進而抑制肺癌細胞的遷移能力（[圖 IV](#)、[V](#)），這說明 SEMA6A 能影響肺癌細胞的運動行為（[49](#)）。

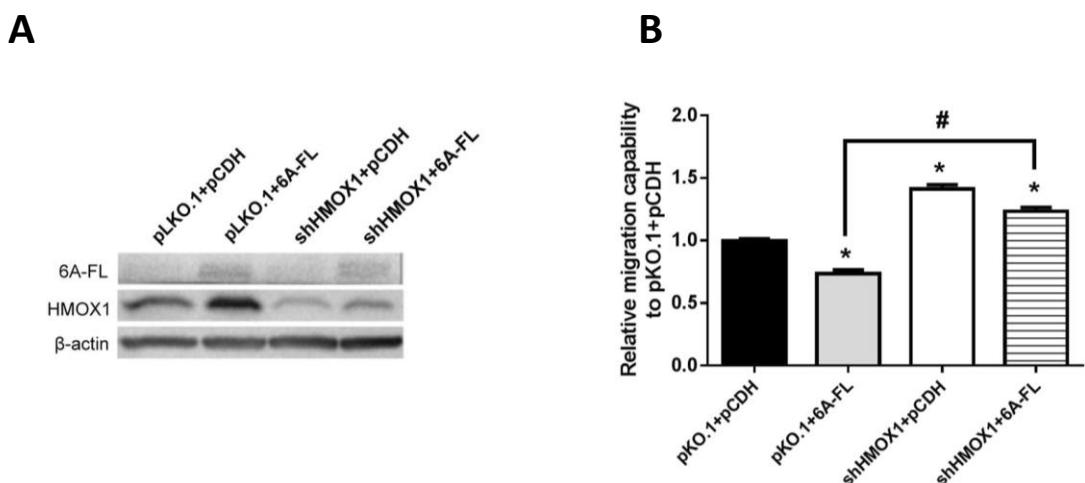


圖 IV、肺癌細胞轉染不同載體後的 SEMA6A 和 HMOX1 表達及其遷移能力

(A) 在肺癌細胞中，SEMA6A-FL 過表達顯著上調了 HMOX1 的基因表現。(B) 過表達 SEMA6A-FL 會抑制肺癌細胞的遷移能力，另外，利用 shRNA 降低 HMOX1 的表達則能恢復並促進細胞遷移能力。

圖 IV 修改自（[49](#)）。

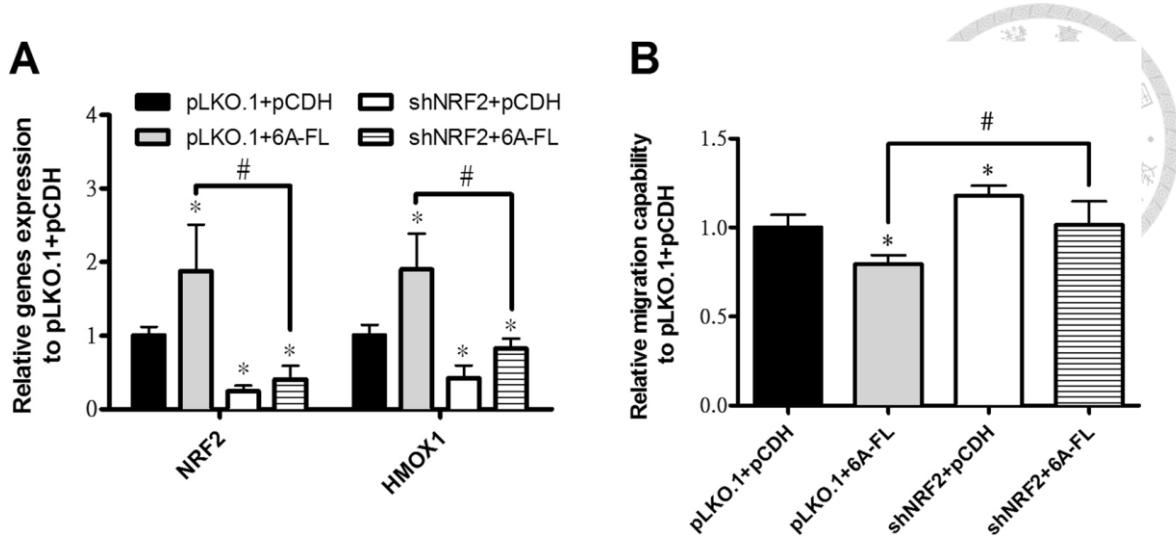


圖 V、NRF2 和 HMOX1 在肺癌細胞中的基因表現及其對遷移能力的影響

(A) 在肺癌細胞中，SEMA6A-FL 的過表達顯著上調了 NRF2 及其下游基因 HMOX1 的表現，此外，通過 shRNA 抑制 NRF2 的表達會同步降低 HMOX1 的基因表現。(B) 降低 NRF2 的表達水平能顯著增強肺癌細胞的遷移能力。

圖 V 修改自 (49)。

SEMA6A 除了會影響肺癌細胞的運動之外，另一項研究顯示，過表達 SEMA6A-FL 也會誘導肺癌細胞發生凋亡（圖 VI）。該研究進一步發現，當肺癌細胞表達只有胞內區域的 SEMA6A (6Acryo) 時，其細胞凋亡比例高達 23%；相較之下，表達 SEMA6A 胞外區域 (6Aecto) 的肺癌細胞，其凋亡比例僅為 5%（圖 VII）。這些結果表明，SEMA6A 是透過其胞內區域傳遞凋亡訊號。

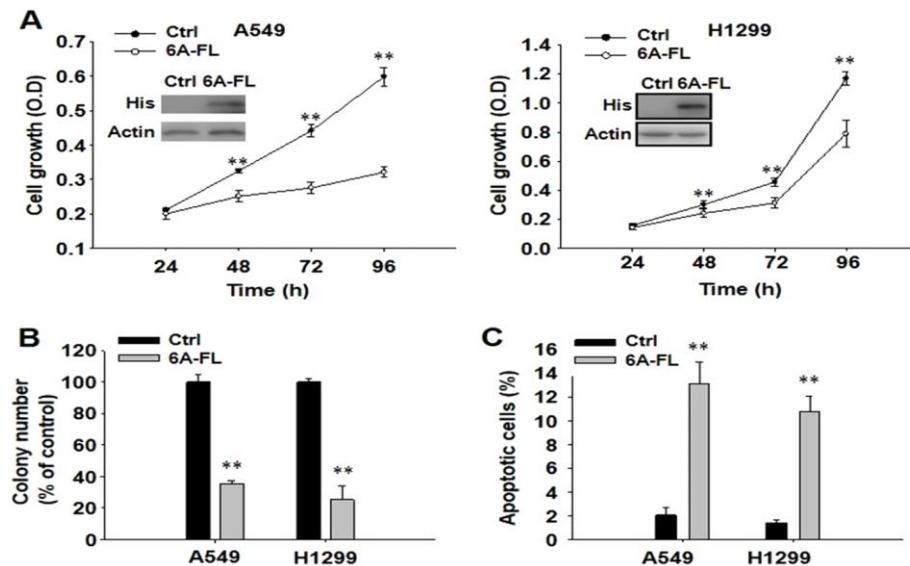


圖 VI、肺癌細胞過表達 SEMA6A-FL 後的細胞增殖能力及凋亡細胞比例

(A) 在肺癌細胞中，SEMA6A-FL 的過表達顯著抑制了細胞的生長能力。(B) 過表達 SEMA6A-FL 顯著降低了肺癌細胞的集落形成效率。(C) SEMA6A-FL 的大量表達顯著增加了肺癌細胞的凋亡比例。

圖 VI 修改自 (36)。

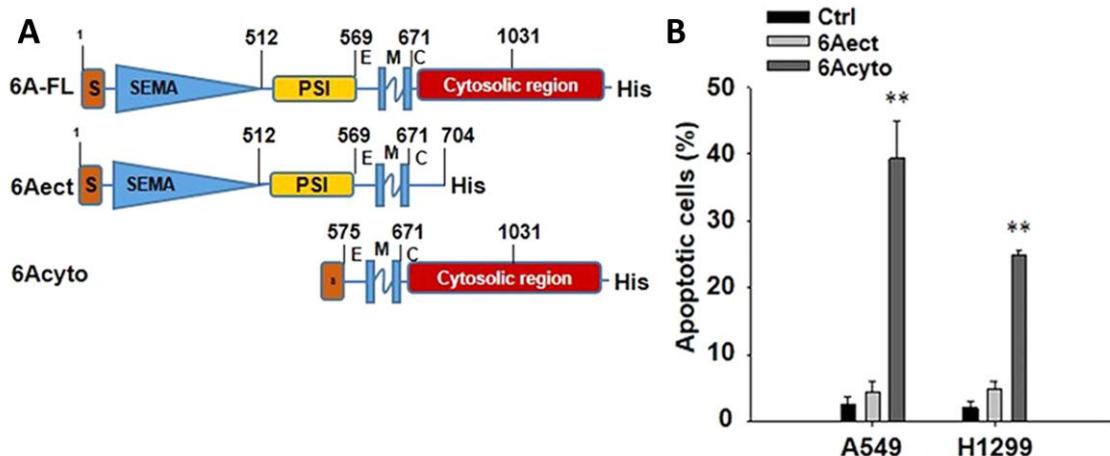


圖 VII、6Aect 和 6Acyto 的結構示意圖及其對細胞凋亡的影響



(A) SEMA6A-FL、6Aect 和 6Acyto 的結構示意圖，顯示完整 SEMA6A 及其胞外區域和胞內區域的分佈。(B) 在肺癌細胞中，過表達 6Acyto 顯著提高了細胞凋亡的比例。

圖 VII 修改自 (36)。

有文獻表明，SEMA6A 依賴 SEMA 域的重要胺基酸，透過二聚化與 Plexin-A2 結合來傳遞細胞訊號 (52)，在當時，尚不明確 SEMA6A 是否也仰賴 SEMA 域來啟動 SEMA6A 的凋亡訊號。進一步的實驗結果顯示，去除 SEMA 域的 SEMA6A (6A Δ sema) 顯著增強了肺癌細胞的凋亡效應，並且外加 SEMA 域蛋白質能顯著抑制 6A Δ sema 所引起的凋亡現象 (圖 VIII)。這些結果表明，SEMA6A 的凋亡訊息傳遞不僅依賴於其胞內區域的直接作用，胞外 SEMA 域也占了很重要的地位。

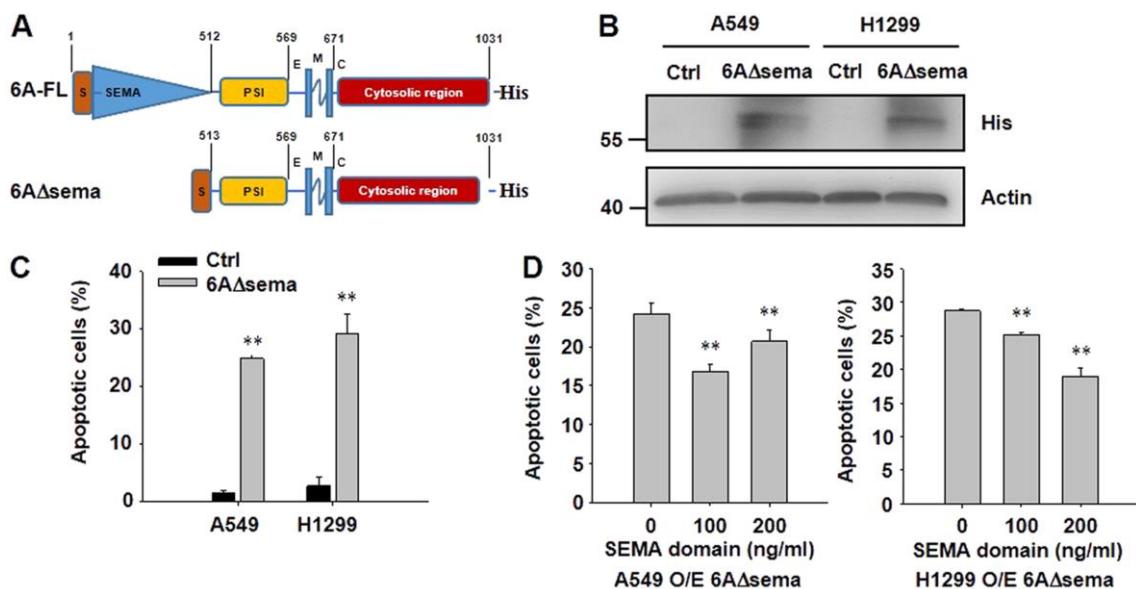


圖 VIII、外加 SEMA 域對過表達 6A Δ sema 的肺癌細胞凋亡能力的影響

(A) 缺失 SEMA 域的 SEMA6A (6A Δ sema) 構建示意圖。(B) 透過西方點墨法確認過表達 6A Δ sema 後的基因表現量。(C) 過表達 6A Δ sema 顯著增加肺癌凋亡細胞的比例。(D) 重新補充 SEMA 域蛋白質後，顯著抑制 6A Δ sema 誘導的凋亡效應。

圖 VIII 修改自 (36)。



2.3、細胞凋亡（Apoptosis）的訊號途徑

細胞凋亡是一種由細胞自行啟動的程序性死亡，與細胞壞死（necrosis）不同，細胞凋亡是一種受到嚴格調控且不引起發炎反應的死亡形式（[53](#)）。粒線體是掌管細胞存活的胞器，其受損與細胞凋亡有直接的關聯（[54](#)）。依照粒線體受損的有無，分為粒線體非依賴性（mitochondrial-independent）/外源性細胞凋亡（extrinsic apoptosis pathway）和粒線體依賴性（mitochondrial-dependent）/內源性細胞凋亡（intrinsic apoptosis pathway）（[53](#)）。

細胞凋亡由一種名為胱天蛋白酶（caspases）的特殊蛋白裂解酶執行（[55](#)）。細胞凋亡使多細胞生物能夠清除不必要的或受損的細胞，在胚胎發育過程中發揮重要作用（[56](#)）。細胞凋亡的失調與多種疾病相關，例如癌症、自體免疫疾病以及神經退化性疾病（[57](#)）。

2.3.1、Extrinsic Apoptosis Pathway（外源性細胞凋亡途徑）

外源性細胞凋亡是由細胞外訊號啟動，通過特定的死亡受體（death receptors）傳遞凋亡信號。這些死亡受體屬於腫瘤壞死因子（TNFR）受體家族，例如 Fas（Apo1 或 CD95）、TNF 受體 1（TNFR1）、DR3、DR4、DR5 和 DR6（[58](#)、[56](#)）。死亡受體的進一步特徵，在於其胞質部分存在一個約 70 個胺基酸的「死亡結構域（death domain）」（[59](#)）。當 Fas 受體與其配體 FasL 結合後，會招募 FADD（Fas-associated death domain）和 Procaspace-8 形成死亡誘導訊號複合體（DISC）。在 DISC 中，Procaspace-8 被激活為 Caspase-8，進而直接啟動下游的 Caspase-3，或透過裂解 Bid 為 tBid，促使其與內源性凋亡路徑交互作用，進一步加強凋亡信號（[57](#)）（[圖 IX](#)）。

2.3.2、Intrinsic Apoptosis Pathway（內源性細胞凋亡途徑）

內源性路徑則主要由線粒體主導，並在粒線體受損時啟動，如氧化壓力、內質網壓力、輻射、DNA 損傷，以及營養缺乏等（[60](#)）。該路徑的核心調控因子是 Bcl-2 蛋白質家族，該家族由兩大類蛋白質組成，它們皆含有 Bcl-2 同源性結構（BH 區

域）。擁有 3 個 BH 區域的為促凋亡蛋白質（如 Bax 和 Bak）；擁有 4 個 BH 區域的則是抗凋亡蛋白質（如 Bcl-2 和 Bcl-xL）（[61](#)）。

在正常情況下，Bcl-2 與 Bax 之間維持著巧妙的平衡，Bcl-2 會阻止 Bax 聚集在粒線體外膜外側（[61](#)）。在細胞凋亡過程中，Bax 的表達會增強，Bax 會在線粒體外膜聚集並形成二聚體，接著改變粒線體外膜的通透性，導致粒線體膜電位喪失和細胞色素 c（Cytochrome c）的釋放（[61](#)）。細胞色素 c 釋放到細胞質後，會與 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 結合，形成凋亡小體（apoptosome）。隨後，凋亡小體激活 Procaspace-9，進而啟動下游的 Caspase-3 和 Caspase-7，最終引發細胞的程序性死亡（[57](#)）（[圖 IX](#)）。

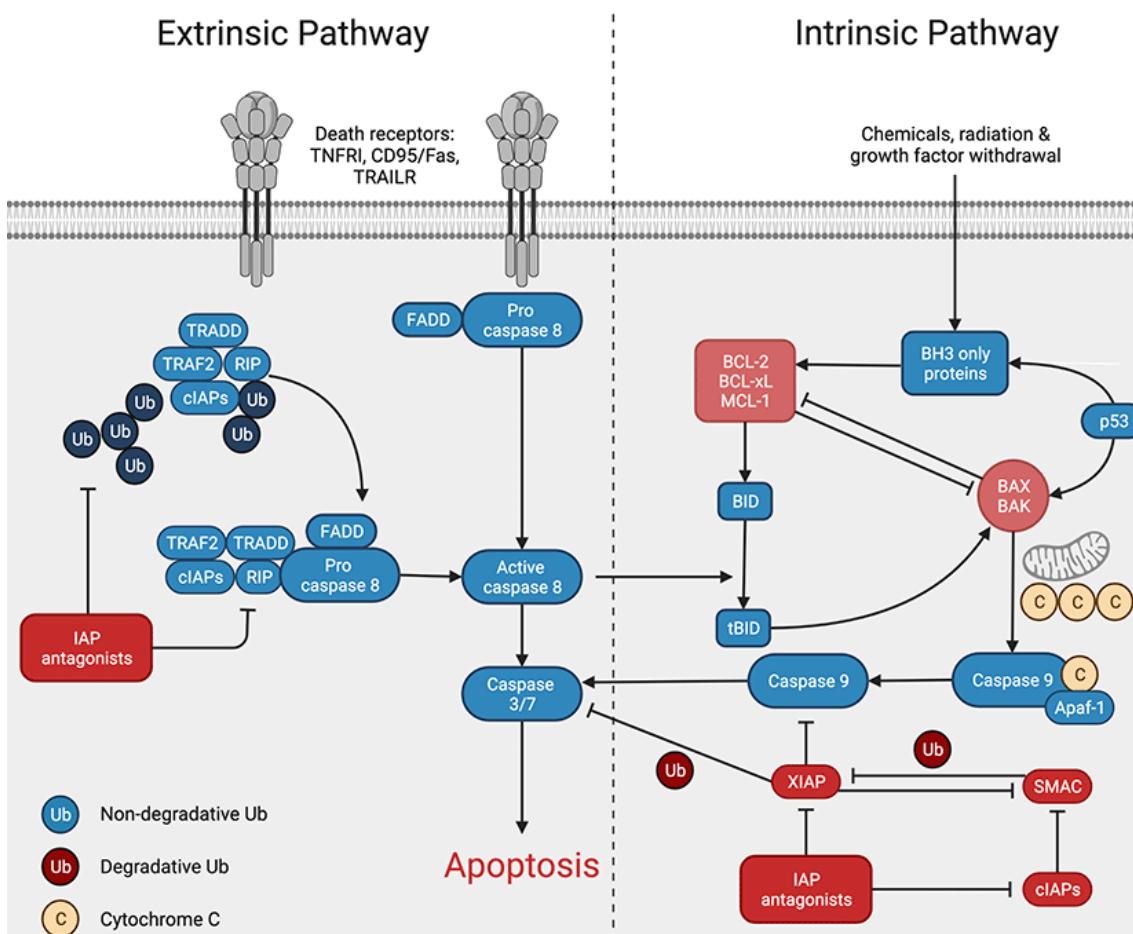


圖 IX、外源性和內源性細胞凋亡路徑

圖 IX 來自 ([62](#))

第三章、研究動機與目的



3.1、SEMA 域參與 SEMA6A 二聚化

有文獻報導 SEMA6A 在正常的生理條件下，會同時以單體和二聚體的形式存在（[圖 X](#)）（[63](#)）。該文獻提到，SEMA6A 中連接 PSI 域和跨膜區域的位點缺乏會形成雙硫鍵的半胱氨酸（cystein），而且 SEMA6A 的胞外區域也缺乏在其他類別（如 SEMA2a、SEMA2b、SEMA3A、SEMA4D 及 SEMA7A）中已被證明對二聚化至關重要的 Ig-like 結構域（[63](#)）。所以該文獻作者推測第六類 Semaphorins 的二聚化能力可能較弱，認為第六類 Semaphorins 以單體和二聚體的混合形式存在於細胞表面（[63](#)）。因此，SEMA6A 可能在單體與二聚體之間達成動態平衡。

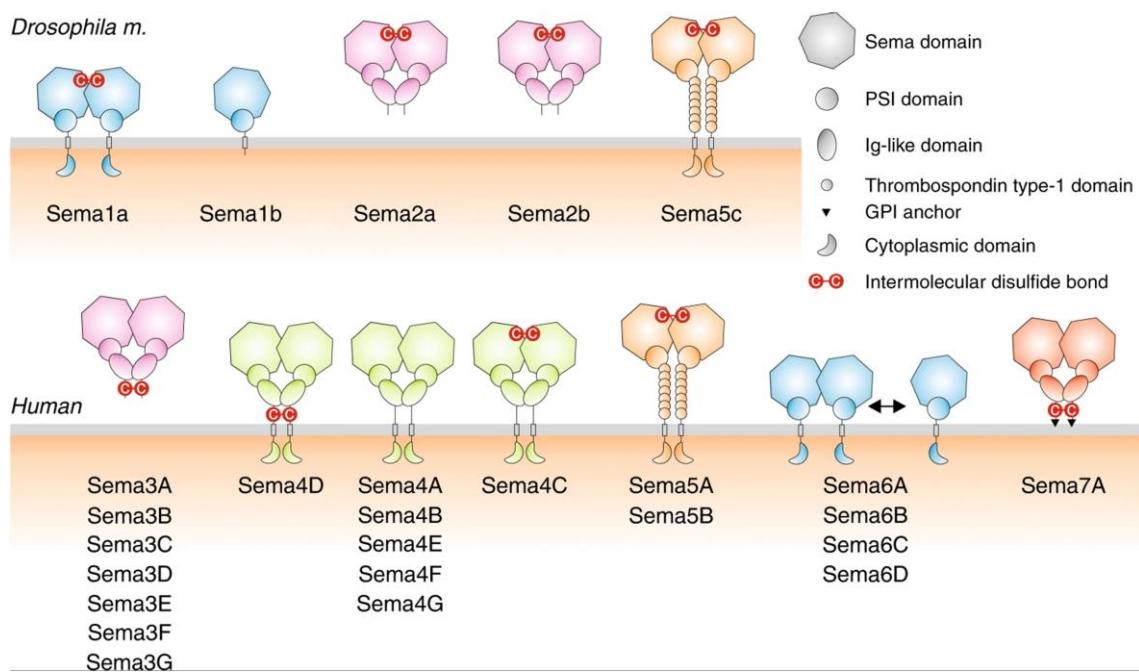


圖 X、Semaphorins 於正常生理狀態下的結構

圖 X 修改自（[63](#)）。



此外，根據蛋白質結構生物學的核心概念，蛋白質的結構變化往往與其功能密切相關。許多蛋白質會通過單體和二聚體之間的轉換來調控其生物活性，這一現象在訊號傳導蛋白、轉錄因子和細胞受體中尤為常見（[64](#)）。

有一篇關於蛋白質晶體結構的研究指出，SEMA6A_{SP}（只有 SEMA 和 PSI 域）會依賴 SEMA 域中的 415 號胺基酸，以面對面的方式形成同源二聚體結構。進一步研究發現，當 SEMA6A-FL 的 415 號胺基酸由 methionine 突變為 cysteine (M415C) 時，二聚體介面會形成共價雙硫鍵，進一步增強二聚化的穩定性和強度，這突顯該位置在 SEMA6A-FL 二聚體形成的過程中扮演關鍵角色（[圖 XI](#)）。同源二聚體結構的 SEMA6A-FL 與 Plexin-A2 結合能誘導 Plexin-A2 的訊號傳遞（[52](#)），這結果暗示 SEMA6A-FL 的二聚體及單體在生物學活性之間存在不同的功能。另有文獻指出，當 SEMA 域中的 322 號胺基酸由 isoleucine 突變為 glutamate (I322E) 時，該突變會破壞二聚體界面的相互作用，導致 SEMA6A-FL 的二聚體結構解離成單體（[圖 XII](#)），這顯示 322 號胺基酸在維持二聚體穩定中的重要性（[64](#)）。

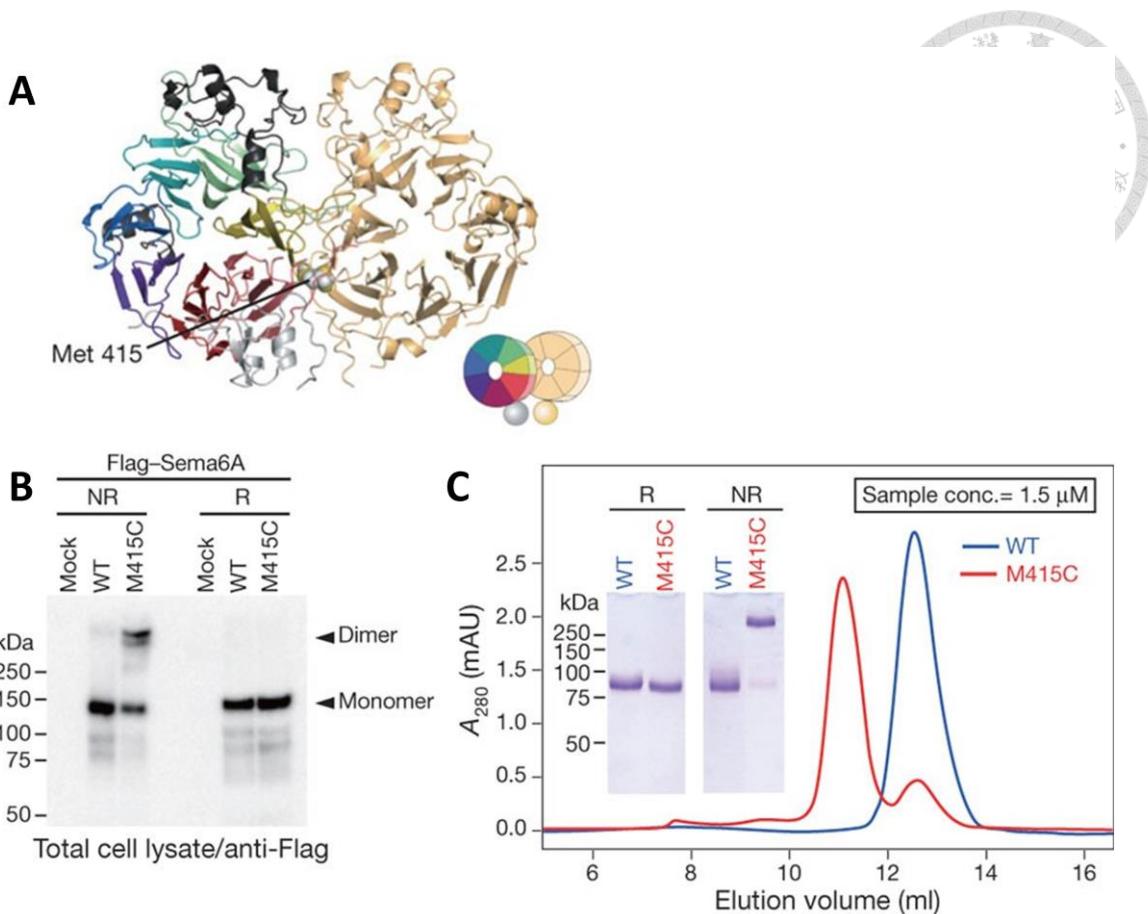


圖 XI、SEMA6A 胞外區域晶體結構及 SEMA6A-FL M415C 的二聚化分析

(A) 顯示 SEMA6A_{SP} (僅含 SEMA 和 PSI 域) 的晶體結構，兩個面對面排列的 SEMA6A_{SP} 同源二聚體以 M415 氨基酸為中心進行連接，形成穩定的二聚體構型。

(B) 在非還原 (NR) 的 SDS-PAGE 條件下，M415C 突變顯著促進 SEMA6A-FL 二聚體的形成；而在還原條件 (R) 下，SEMA6A-FL 二聚體結構均解離為單體。

(C) 使用凝膠過濾層析 (gel filtration chromatography) 根據分子量分離蛋白質，大分子先洗脫，小分子後洗脫。結果顯示 SEMA6A_{SP} M415C 突變顯著促進蛋白質形成大分子結構。

圖 XI 修改自 ([52](#)) 。

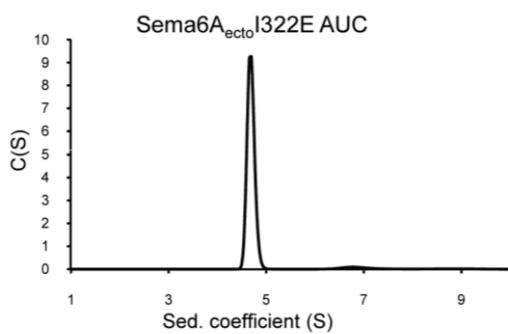


圖 XII、SEMA6A-FL I322E 的二聚化分析

利用沉降速度分析超速離心（sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, SV-AUC）方法區分蛋白質中的單體與二聚體結構。由於單體的分子量較二聚體小且分子形狀較為展開，因此其沉降係數低於二聚體。從圖中可觀察到主波峰位於左側，而次波峰位於右側，顯示 SEMA6A-FL I322E 突變體以單體結構為主。

圖 XII 修改自 ([64](#)) 。

由這些證據可以得知，SEMA 域含有與 SEMA6A-FL 二聚化相關的重要胺基酸。單體和二聚體同時存在的現象可能意味著 SEMA6A-FL 在不同環境或細胞狀態下會傾向變為其中一種結構，甚至可能與肺癌的進展或抑制有潛在關聯。這一點引發了我們對 SEMA6A-FL 的結構轉換是否會影響其誘導凋亡反應的興趣。

3.2、探討 SEMA6A-FL 誘導的凋亡路徑

除了研究促使 SEMA6A-FL 誘發凋亡的原因之外，還需要釐清 SEMA6A-FL 是透過何種凋亡路徑導致細胞凋亡。先前研究表明，當 6Acryo 表達於肺癌細胞時，6Acryo 的胞內區域會與 FADD 發生相互作用，並透過裂解 Caspase-8 誘導細胞凋亡。值得注意的是，儘管在肺癌細胞過表達 SEMA6A-FL 後的凋亡比例約有 10%，SEMA6A-FL 的胞內區域卻不會透過 FADD、Caspase-8 的方式誘導凋亡（[圖 XIII](#)）（[36](#)）。

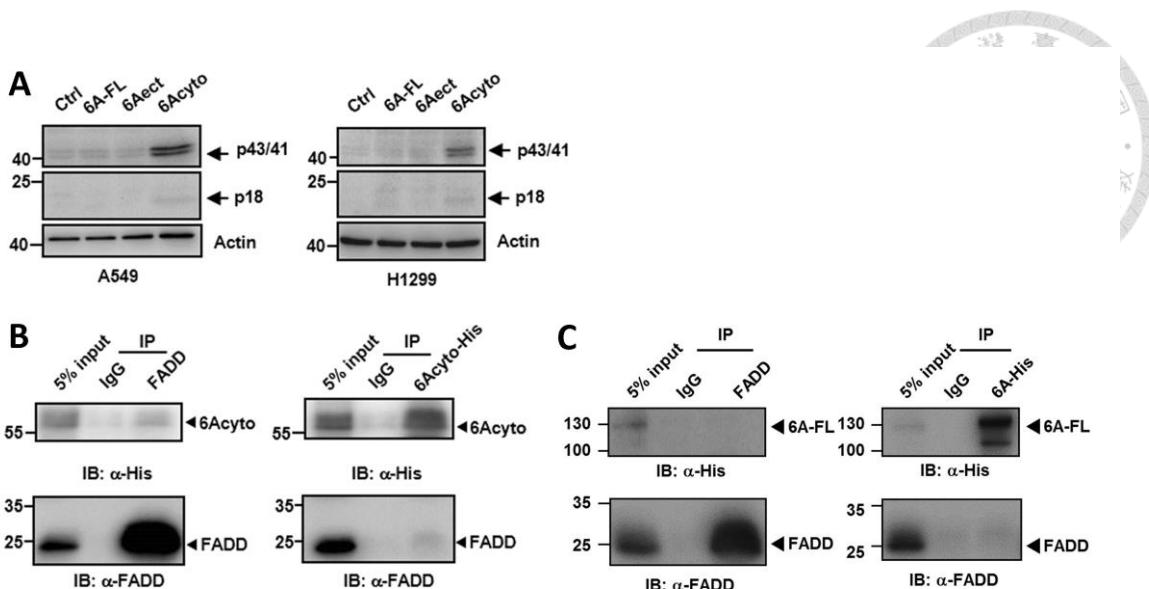


圖 XIII、在肺癌細胞中轉染不同 SEMA6A 構建體後的凋亡相關蛋白質表現

(A) 在肺癌細胞中，過表達 6Acyto 顯著增加了 Caspase-8 的裂解產物。(B) 6Acyto 的胞內區域會與 FADD 發生相互作用。(C) 免疫共沉淀的結果顯示，SEMA6A-FL 的胞內區域不會與 FADD 結合，也不會裂解下游的 Caspase-8。

圖 XIII 修改自 ([36](#)) 。

根據先前研究的初步結果，當肺癌細胞過表達 SEMA6A-FL 時，會產生內質網壓力 (ER stress) ([65](#))。當細胞處於 ER stress 環境下，XBP1 基因的一個外顯子會被切除，所以經過 DNA 電泳分離後，會有一條 unspliced XBP1 和一條 spliced XBP1 (圖 XIV)。許多文獻皆指出，內質網壓力會引起內源性細胞凋亡路徑，因此，我們推測 SEMA6A-FL 可能是透過內源性路徑來誘發肺癌細胞的凋亡。本篇研究將會觀察各種與凋亡相關的蛋白質表達，包括：extrinsic 路徑的 Caspase-8，以及 intrinsic 路徑的 Bcl-2、Bax 和 Caspase-9。

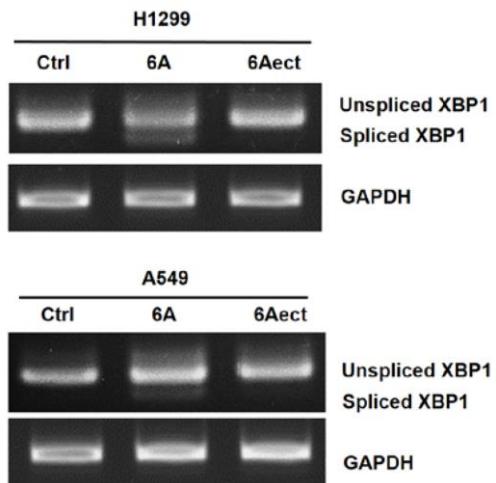


圖 XIV、在肺癌細胞中過表達 SEMA6A-FL 後的 XBP1 剪切分析

用 RT-PCR 將 XBP1 和 GAPDH 基因特異性放大後，經過 3% 瓊脂糖凝膠電泳分離。

圖 XIV 修改自 ([65](#))

3.3、研究目的

整理先前研究發現的問題及文獻證據：SEMA 域是 SEMA6A 誘發細胞凋亡的關鍵，去除 SEMA 域 ($6A\Delta sema$) 能啟動凋亡訊號，並且外加 SEMA 域能抑制 $6A\Delta sema$ 誘發的凋亡現象，然而 SEMA6A-FL 的 SEMA 域在未去除的情況下仍然有凋亡發生。隨著 SEMA 域參與 SEMA6A-FL 結構變化以及 SEMA6A-FL 同時存在單體和二聚體的證據被提出，我們推測 SEMA 域引發的結構改變可能參與了 SEMA6A-FL 凋亡訊號的動態調控。另一方面，SEMA6A-FL 可能透過增加 ER stress 來啟動內源性凋亡路徑，讓細胞死亡。

基於上述證據和理論框架，目前尚不清楚 SEMA6A-FL 在肺癌細胞中大量表達時發生的凋亡是否與其單體或二聚體相關，也不明確 SEMA6A-FL 是否透過內源性路徑導致細胞凋亡。因此，本研究旨在探討 SEMA6A-FL 的結構改變是否顯著影響其誘導肺癌細胞凋亡的能力，並進一步釐清其參與的凋亡路徑。本研究的創新

是首次系統性地比較 SEMA6A-FL 單體與二聚體在細胞凋亡中的功能差異。為此，我們計劃利用基因工程技術構建能增強及減弱 SEMA6A-FL 二聚化的突變體，並將其大量表達於肺癌細胞中，檢測其對細胞增殖和凋亡的影響。具體實驗設計包括量化細胞增殖率及凋亡細胞的比例，並結合細胞凋亡相關訊號通路的基因分析。本研究的結果將揭示 SEMA6A-FL 二聚化與細胞凋亡之間的關聯，對 SEMA6A 在未來的進一步研究提供支撐。

第四章、材料與方法



4.1、細胞培養 (Cell Culture)

4.1.1、製備培養基 (Medium Preparation)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GibcoTM) 和 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; GibcoTM) 的配方如下。DMEM 的製備過程為：將 13.5 g 的 DMEM 粉末與 1.5 g 的碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 加入約 800 mL 的高壓滅菌 Milli-Q 水中，使用磁力攪拌器攪拌直至粉末完全溶解。隨後，使用 pH 計測量溶液的酸鹼度，並透過逐滴添加 1 N 的氫氧化鈉 (NaOH) 或鹽酸 (HCl) 將 pH 值調整至 7.4，當 pH 值穩定後，補加 Milli-Q 水至最終體積 1 L，並再次攪拌均勻。RPMI 1640 也以相似的方式製備，將 10.4 g 的 RPMI 1640 粉末與 2 g 的 NaHCO_3 加入約 800 mL 的高壓滅菌 Milli-Q 水中攪拌至完全溶解，然後使用 pH 計、NaOH 和 HCl 調整 pH 值到 7.4，最後以 Milli-Q 水補足至 1 L。

10X Phosphate-buffered saline (PBS) 的配製方法如下：將 80 g 氯化鈉 (NaCl)、2 g 氯化鉀 (KCl)、14.2 g 磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4) 和 2.4 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 加入約 800 mL 的高壓滅菌 Milli-Q 水中，並使用磁力攪拌器持續攪拌，直至所有化學粉末完全溶解。隨後，使用 pH 計、NaOH 和 HCl 調整 pH 值到 7.4。當 pH 值穩定後，使用 Milli-Q 水將溶液的最終體積調整至 1 L，並充分攪拌確保溶液均勻。配置完成的 10X PBS 儲存於 4°C。為配置 1X PBS，先將 10X PBS 置於 37°C 水浴槽回溫，讓析出的結晶再次溶解。隨後，200 mL 的 10X PBS 加入 1800 mL 的高壓滅菌水中，並且用磁石攪拌均勻。

製備完成的 DMEM、RPMI 1640 和 1X PBS 溶液分別使用 0.22 μm 的 Steritop[®] 濾膜 (Merck Millipore) 進行無菌過濾，過濾後的培養液和 PBS 分裝至無菌培養瓶中儲存於 4°C。為進行細胞培養，將 450 mL 的 DMEM 或 RPMI 1640 培養基添加 50 mL 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; GibcoTM，最終濃度 10%) 和 5 mL 的



青黴素-鏈黴素溶液 (penicillin-streptomycin, PS; GibcoTM, 最終濃度 1%)。該操作過程需在無菌操作台中完成，以避免細菌、黴菌或支原體等污染。最後，充分搖勻並置於 4°C 冷藏。

4.1.2、細胞株 (Cell Lines)

本研究使用的肺癌細胞株 H1299 由台灣新竹的生物資源典藏與研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Hsinchu, Taiwan) 取得，並在含有 10% FBS 和 1% PS 的 RPMI 1640 培養基中培養。人類胚胎腎細胞株 HEK-293T 則從美國典型細胞庫 (American Type Culture Collection, ATCC) 購得，並於含有 10% FBS 和 1% PS 的 DMEM 中培養。所有細胞均於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中維持生長，且每月定期檢測黴漿菌污染，所有細胞均確認無黴漿菌污染。

4.1.3、細胞繼代 (Cell Subculture)

兩種細胞株皆在 10 cm 培養皿中進行貼附式培養，當細胞達到 80% confluence 時進行繼代。繼代前，將 RPMI 1640 培養基、DMEM 培養基、PBS 緩衝液及 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 溶液 (trypsin-EDTA; GibcoTM) 於 37°C 水浴中預熱。將培養皿中的舊培養基完全移除後，加入 2 mL PBS 清洗細胞，去除殘留的血清和代謝廢物，隨後加入 1 mL 胰蛋白酶溶液，並於 37°C 下孵育約 1 分鐘，直至細胞明顯鬆動和脫離。接著，加入 3 倍胰蛋白酶體積的培養基抑制酵素活性，並使用微量吸管輕輕吹打使細胞完全懸浮，將細胞懸浮液轉移至 15 mL 離心管中。為了回收培養皿內的殘留細胞，使用 2 mL 培養基沖洗培養皿，並將沖洗液合併至同一離心管，此時細胞懸浮液的總體積為 6 mL。懸浮液以 100 g 離心 3 分鐘，棄去上清液後，將細胞沈澱重懸於 5 mL 新鮮培養基中，並取 100 μL 懸浮液進行細胞計數確定細胞的濃度和存活率。將適量的細胞接種至新的 10 cm 培養皿中，且補充培養基至 10 mL。為確保細胞的適當生長環境，須避免細胞的 confluence 不超過 80%。



4.2、重組質體的製作方法（Cloning of Recombinant Plasmids）

4.2.1、製作 SEMA6A 的截短片斷（Truncated SEMA6A Amplification）

為了構建 SEMA6A 的截短片段（6A 365-1030 和 6A 462-1030），使用 KAPA HiFi HotStart PCR Kit (Roche) 進行聚合酶連鎖反應 (PCR)。PCR 反應體系的最終體積為 20 μL，包含以下成分：

表 1、特異性放大 SEMA6A 365-1030 和 462-1030 片段的 PCR 配方

Reagents	Concentration	Volumn
pCDH-CMV-MCS-EF1-SEMA6A-FL	5 ng/μL	4 μL
Forward primer (表 11)	5 μM	1 μL
Reverse primer (表 11)	5 μM	1 μL
5X HiFi buffer	5X	4 μL
dNTPs	10 mM	1 μL
HotStart DNA Polymerase	1 U/μL	0.5 μL
Nuclease-free water		8.5 μL
Total		20 μL

PCR 程序的熱循環條件設定如下：首先在 98°C 進行 2 分鐘的初始變性，以確保雙股 DNA 的完全解鏈；隨後進行 25 個循環，每個循環包括 98°C 變性 30 秒、58°C 黏接引子 30 秒和 72°C 延伸 90 秒；最後，在 72°C 額外孵育 2 分鐘以確保 DNA 完全合成完畢。完成反應後，PCR 產物保存在 4°C。

為了檢測 PCR 是否成功，將反應產物進行 1% 琼脂糖凝膠 ([4.2.8](#)) 電泳，並使用 6X DNA loading buffer (Biolabs) 染劑標記 DNA 條帶，透過紫外光照射觀察片



段的大小是否與預期一致。若截短後的片段會把領導序列 (signal peptides) 切除，後續會進行領導序列連接步驟 (4.2.3)。

4.2.2、SEMA6A-FL 點突變 (Point Mutation of SEMA6A-FL)

點突變 (M415C 和 I322E) PCR 使用 KAPA HiFi HotStart PCR Kit (Roche) 進行。PCR 反應體系的最終體積為 20 μL，配方如下：

表 2、SEMA6A-FL M415C 和 I322E 點突變的 PCR 配方

Reagents	Concentration	Volumn
pCDH-CMV-MCS-EF1-SEMA6A-FL	5 ng/μL	4 μL
Forward primer (表 11)	10 μM	1 μL
Reverse primer (表 11)	10 μM	1 μL
5X HiFi buffer	5X	4 μL
dNTPs	10 mM	1 μL
HotStart DNA Polymerase	1 U/μL	0.5 μL
Nuclease-free water		8.5 μL
Total		20 μL

PCR 程序的熱循環條件為：98°C 進行 2 分鐘的預變性，隨後進行 20 個循環，每個循環包括 98°C 變性 30 秒、65°C 黏接引子 30 秒和 72°C 延伸 5 分鐘，最後在 72°C 進行 2 分鐘的最終延伸，並於 4°C 保存反應產物。

為了去除已甲基化的模板 DNA，並且保留新合成的 DNA 產物。在點突變 PCR 產物中加入 1 μL 的 DpnI (Biolabs) 和 5 μL 10X rCutSmart buffer (Biolabs)，補足無核酸酶水至 50 μL。在 37°C 孵育 15 分鐘消化已甲基化的舊 DNA，隨後，80°C 加熱 5 分鐘使 DpnI 失活。為了進一步純化 PCR 產物，可選擇使用 QIAquick® PCR

Purification Kit (QIAGEN) 去除反應混合物中的酵素和試劑，接著透過 1% 琼脂糖凝膠電泳進行檢測，確認點突變後的質體大小是否與原本的一致。



4.2.3、連接領導勝肽 (Signal Peptide Elongation)

為了在 SEMA6A 365-1030 和 SEMA6A 462-1030 的 5'端 (N 端) 接上領導勝肽，本研究使用 KAPA HiFi HotStart PCR Kit (Roche) 延伸 DNA 序列。PCR 反應體系的最終體積為 20 μL，反應混合物的組成包括：

表 3、在 SEMA6A 365-1030 和 462-1030 的 5'端接上領導勝肽的 PCR 配方

Reagents	Concentration	Volumn
Truncated SEMA6A DNA fragments	PCR products from 4.2.1	Add 1 μL directly
Forward primer (表 11)	5 μM	1 μL
Reverse primer (表 11)	5 μM	1 μL
5X HiFi buffer	5X	4 μL
dNTPs	10 mM	1 μL
HotStart DNA Polymerase	1 U/μL	0.5 μL
Nuclease-free water		11.5 μL
Total		20 μL

PCR 的熱循環條件設置如下：98°C 進行 2 分鐘的初始變性，隨後進行 25 個熱循環，每個循環包括 98°C 變性 30 秒、58°C 反應 30 秒讓引子接上和 72°C 延伸 90 秒，最終在 72°C 反應 2 分鐘以確保片段的完全延伸，反應產物保存在 4°C。擴增完成後，將 PCR 產物進行 1% 琼脂糖凝膠電泳，並使用 6X DNA loading buffer (Biolabs) 進行 DNA 染色，透過紫外光觀察條帶是否正確。



如果 DNA 電泳觀察到多重條帶，將目標條帶切下進行膠體純化，並使用 QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) 純化含有目標 DNA 的膠體，以去除非特異性擴增產物和膠體污染；若電泳顯示單一條帶，則可跳過膠體純化步驟，直接使用 QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) 清除反應混合物中的殘留試劑。這一策略確保了高質量的 DNA 模板可用於後續的擴增和基因構建步驟。若要進一步延伸領導勝肽片段，則會在純化 PCR 產物後進行第二次 PCR，直到整段領導勝肽在 truncated SEMA6A 的 5'端成功延伸完畢。

若難以繼續延伸領導勝肽（很多雜 band 且主 band 訊號很弱），可以先將該 DNA 片段克隆至 cloning vector (pJET 或 pGEM-t) ([4.2.5](#))，隨後轉型到大腸桿菌 ([4.2.6](#))，藉由細菌的生長擴增該 DNA 片段。之後將質體萃取出來 ([4.2.7](#))，再繼續延伸領導勝肽。

4.2.4、雙重限制酶消化 (Double Digestion Using Restriction Enzymes)

此方法的目的是要讓 SEMA6A-FL 點突變及截短片段接上全新的 pCDH 輽體（因為多次的 PCR 可能在 pCDH 輽體上出現錯誤，或者原本不是使用 pCDH 進行 PCR 擴增）。使用 BamHI 和 NotI 限制酶 (Biolabs) 對載體和插入片段進行消化處理。消化反應的總體積為 50 μL，反應混合物的組成如下：

表 4、Double digestion 的配方

Reagents	Concentration	Volumn
Truncated or mutated SEMA6A plasmid		Add 1 μg
BamHI	20 U/μL	1 μL
NotI	10 U/μL	1 μL
10X NEBuffer r3.1 (Biolabs)	10X	5 μL
Nuclease-free water		Adjust to 50 μL

Total 50 μL

反應在 37°C 下進行 120 分鐘，隨後在 65°C 下孵育 20 分鐘讓酵素失活。消化完成後，使用 1% 琼脂糖凝膠進行電泳分離 DNA 片段，並檢測目標條帶和載體條帶的位置和大小。針對具有正確分子量的目標 DNA 條帶，使用無菌刀片在紫外光下小心切下。接著，根據 QIAGEN 製造商的操作說明，使用 QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) 對目標條帶進行純化，以去除瓊脂糖和其他雜質。純化後的 DNA 用無核酸酶水溶解，並通過 Nanodrop 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) 測定 DNA 的濃度和純度，檢查其 A260/A280 比值，確保其適合用於後續的載體連接和細胞轉型步驟。

4.2.5、連接反應 (Ligation)

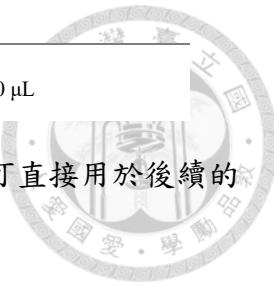
為了將經過限制酶處理的 pCDH 輽體 (pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro) 與截短的 SEMA6A 或點突變的 SEMA6A-FL 基因片段進行連接，使用 T4 DNA 連接酶 (Promega) 進行連接反應。反應總體積為 10 μL，包含經 BamHI 和 NotI 消化的載體與目標基因片段（加入之體積經由下方公式計算）。

$$\text{式 1 : } \frac{A \mu L \times \text{concentration of insert}}{\text{base pairs of insert}} = 3 \times \frac{B \mu L \times \text{concentration of vector}}{\text{base pairs of vector}}$$

$$\text{式 2 : } A \mu L \times \text{concentration of insert} + B \mu L \times \text{concentration of vector} = 100 \text{ ng}$$

表 5、Ligation 反應之配方

Reagents	Concentration	Volumn
insert		A μL (A + B = 4 μL)
vector		B μL (A + B = 4 μL)
T4 DNA ligase	3 U/μL	1 μL
2X ligation buffer (Promega)	2X	5 μL



Total

10 μL

連接反應在 22°C 下孵育 30 分鐘。反應完成後，連接產物可直接用於後續的大腸桿菌 DH5α 轉型。

4.2.6、細胞轉型 (Transformation)

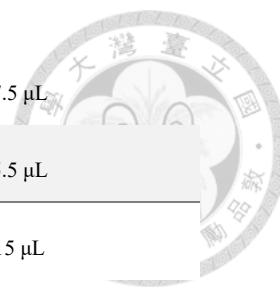
為了進行大腸桿菌 DH5α 的轉型，首先將 Fast-Trans™ Competent E.coli DH5α 勝任細胞 (Protech) 從 -80°C 取出，於冰上解凍至半退冰狀態。隨後，將 2 μL 的連接反應產物加入至 100 μL 的勝任細胞中，輕彈混合均勻，並在冰上靜置孵育 30 分鐘。接著，進行 42°C 的熱休克 45 秒，以暫時改變細胞膜的通透性，然後迅速將細胞置於冰上孵育 5 分鐘，使細胞膜得以恢復穩定。之後，加入 1 mL 經 37°C 預熱的 SOC 培養基 (super optimal broth with catabolite repression; Protech)，並在 37°C、220 rpm 的振盪器中振盪培養 1 小時，促進細胞的恢復和質體的表達。一小時後，將菌液以 8000 rpm 離心 1 分鐘，去除 1 mL 的上清液，隨即將剩下的 100 μL 懸浮菌液塗抹於含有 0.1% ampicillin (SIGMA) 的 LB 瓊脂盤 ([4.2.8](#)) 上。置於 37°C 恒溫培養箱中培養 13~15 小時，使抗性菌株形成單一菌落。

4.2.7、質體製備 (Plasmids Preparation)

進行菌落 PCR 確認轉型成功與否，使用 Fast-Run™ 2X Taq Master Mix with Dye (Protech) 作為聚合酶反應試劑。

表 6、Colony PCR 的配方

Reagents	Concentration	Volumn
Transformed E.coli colony		Use a pipette tip to pick up
Forward primer (表 11)	5 μM	1 μL
Reverse primer (表 11)	5 μM	1 μL



2X Taq Master Mix	2X	7.5 μ L
Nuclease-free water		5.5 μ L
Total		15 μ L

PCR 的反應條件設定為 95°C 變性 2 分鐘，隨後進行 20 個循環，每個循環包括 95°C 30 秒、58°C 30 秒及 72°C 3 分鐘的反應階段，最終在 72°C 延伸 2 分鐘，並在 4°C 保留樣品。

PCR 產物經 1% 琼脂糖凝膠電泳進行分離，藉由觀察目標條帶的大小確認轉型是否成功。確認成功後，挑取正確的單一菌落，將其接種於 500 μ L 含 0.1% ampicillin 的 LB 液體培養基（[4.2.8](#)）中，於 37°C 和 220 rpm 的條件下振盪培養 8 小時。隨後，將該培養液以 1:1000 的比例稀釋至 400 mL 含 0.1% 抗生素的 LB 培養基中，於 37°C 和 180 rpm 的條件下孵育 16 小時。孵育結束後，透過 EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) 對質體進行純化，純化後的質體儲存於 -20°C 以備後續實驗之用。為進一步確認重組質體的序列準確性，所有重組質體均進行 Sanger 定序，並與目標序列比對，確保基因序列及插入片段是否正確。

4.2.8、 Agarose gel、LB agar 和 LB broth 的製備

1% Agarose gel 的配置方法如下：0.25 g Agarose 粉末加進 25 mL 1X Tris-acetate-EDTA 緩衝液 (TAE buffer) 中，接著用微波爐加熱溶解。待溫度降至室溫後，加入 2 μ L healthy dye 並搖晃均勻，最後倒入模具中靜置凝固。LB broth 的配置流程如下：10 g LB 粉末加進 400 mL Milli-Q 水，隨後進行高壓滅菌，使用前再添加 0.1% 抗生素。若要製備 LB agar 則要在滅菌前額外添加 agar 粉末，滅菌後添加 0.1% 抗生素，將 LB agar 液體倒入養菌盤中待其冷卻凝固。這三樣實驗材料皆放置於 4°C 儲存。



4.3、慢病毒轉染系統（Lentivirus Transduction System）

4.3.1、病毒製備（Viruses Production）

為了製備慢病毒，將 4×10^6 個 HEK-293T 細胞接種於含有 15 mL DMEM 的 15 cm 培養皿中，並於 37°C、5% CO₂ 的培養箱內培養過夜。次日，依據 Mirus Bio 的操作說明進行共轉染，準備包含 1 mL Opti-MEM (Gibco)、8 µg 重組質體、6 µg 包裝質體 (psPAX2)、2 µg 包膜質體 (pMD2G) 和 40 µL TransIT-X2® (Mirus Bio) 的轉染混合物。將上述混合物在室溫、避光條件下靜置孵育 25 分鐘，隨後將轉染混合物加入培養皿中，輕輕搖晃確保充分混合。轉染後，細胞於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中繼續培養，並於第 48 小時和第 72 小時分別收集含有病毒顆粒的培養液。為去除細胞殘留和大顆粒污染物，上清液透過 Millex®-HA 0.45 µm 濾膜 (Merck) 進行過濾，隨後將過濾後的病毒液分裝並儲存於-80°C，供後續實驗使用。為確保病毒的品質和穩定性，避免反覆凍融。

4.3.2、細胞感染（Cell Infection）

首先，將 2×10^4 個 H1299 細胞接種於 24 孔培養盤的每個孔中，並在 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養過夜。次日，根據實驗需求，將適量含有病毒顆粒的上清液與 5 µL 濃度為 2 µg/µL 的 polybrene (hexadimethrine bromide; SIGMA) 一同加入至每個孔中。隨後，在室溫下用 2000 rpm 離心 60 分鐘確保病毒顆粒與細胞充分接觸。離心後，將細胞於 37°C 下繼續培養 4 小時，4 小時後去除含有病毒的上清液和化學試劑，並更換為新鮮的培養基。接下來，將感染後的 H1299 細胞於 37°C、5% CO₂ 的培養箱內進一步孵育 48 小時，讓外源基因的表達趨於穩定。後續透過觀察 mRNA 和蛋白質的表現量確認感染效率。



4.4、mRNA 基因表達分析 (mRNA Expression Analysis)

4.4.1、RNA 萃取 (RNA Extraction)

將細胞培養液去除並用 PBS 清洗後，使用 TRIzol 試劑（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）進行細胞裂解。將細胞完全裂解後，加入 1/10 倍 TRIzol 體積的 1-bromo-3-chloropropane (SIGMA)，在振盪器上劇烈震盪 30 秒。充分混合後以 13,200 rpm、4°C 離心 15 分鐘。收集上層的水相，並轉移至新的無 RNA 酶微量離心管中，加入等體積的冰冷異丙醇以沉澱 RNA，並在 13,200 rpm、4°C 下離心 15 分鐘。接著，使用 75% 冰冷乙醇清洗 RNA 兩次，隨後將 RNA 溶解於 35 μL 的無核酸酶水中。為進一步去除 RNA 中殘留的 DNA，進行 DNase I 處理。

表 7、DNase I treatment 的配方

Reagents	Concentration	Volumn
RNA crude extracts		35 μL
DNA digest buffer (Geneaid)	10X	4 μL
DNase I (Geneaid)	2 U/μL	1 μL
Total		40 μL

於 37°C 孵育 10 分鐘，接著在 65°C 孵育 5 分鐘讓酵素失活。為了獲得更純淨的 RNA，加入 100 μL 冰冷的絕對乙醇和 14 μL 濃度為 0.3 M 的醋酸鈉，以進一步沉澱 RNA，並在 13,200 rpm、4°C 下離心 15 分鐘。接著，使用 75% 冰冷乙醇清洗兩次，待風乾後，將純化的 RNA 沉澱溶解於無核酸酶水中。使用 NanoDrop 分光光度計 (spectrophotometer; J&H Technology Co., Ltd) 測量 RNA 的濃度和純度，記錄 A260/A280 和 A260/A230 的比值。



4.4.2、反轉錄聚合酶連鎖反應（Reverse Transcription PCR）

為了合成 cDNA (complementary DNA，互補 DNA)，依據廠商的說明，使用 SuperScriptTM III Reverse Transcriptase Kit (InvitrogenTM) 進行反轉錄反應。反應混合物的最終體積為 20 μL，成分包含：

表 8、Reverse transcription PCR 的配方

Reagents	Concentration	Volumn
RNA		Add 1 μg
Random primer (表 11)	50 ng/μL	1 μL
5X RT buffer	5X	4 μL
dNTPs	10 mM	1 μL
DTT (dithiothreitol)	100 mM	1 μL
RNase inhibitor	40 U/μL	0.5 μL
SuperScript III reverse transcriptase	200 U/μL	0.5 μL
Nuclease-free water		Asjust to 20 μL
Total		20 μL

反轉錄反應的程序設置如下：首先在 65°C 加熱 5 分鐘，讓 RNA 變性成單股結構，隨後在 4°C 冷卻 10 分鐘。接著，反應混合物在 23°C 孵育 10 分鐘，促進引子與 RNA 的結合，之後在 55°C 進行 30 分鐘的合成反應，讓 SuperScript III 反轉錄酶將 RNA 反轉錄為 cDNA。最後，加熱至 80°C 孵育 10 分鐘，讓酵素徹底失活確保反應的終止。完成的 cDNA 樣品儲存於-20°C，供後續的基因表達檢測使用。

4.4.3、及時定量聚合酶連鎖反應（Quantitative Real-Time PCR, qPCR）

qPCR 反應使用 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA) 進行，以 96 孔盤作為反應平台。

表 9、Real time-PCR 的配方

Reagents	Concentration	Volumn
cDNA from 4.4.2	Dilute cDNA products in 1:20 ratio	2 μ L
Forward primer (表 11)	5 μ M	0.3 μ L
Reverse primer (表 11)	5 μ M	0.3 μ L
2X SYBR Green PCR Master Mix	2X	7.5 μ L
Nuclease-free water		4.9 μ L
Total		15 μ L

qPCR 的反應程序設定為：在 50°C 孵育 2 分鐘，隨後在 95°C 加熱 10 分鐘以活化 DNA 聚合酶，接著進行 40 個循環，每個循環包含 95°C 變性 1 秒和 60°C 反應 1 分鐘的步驟。為了確保擴增產物的特異性，實驗在 PCR 後進行 melting curve 分析，設定條件為：95°C 15 秒，60°C 30 秒和 95°C 30 秒。18S rRNA 基因作為內部參照基因，用於相對定量分析，以校正樣品間的基因表現差異。為提高數據的準確性和重現性，每個實驗組別均進行四重複。所有 qPCR 反應均在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 系統上進行，並使用 $\Delta\Delta Ct$ 進行基因表達的分析。



4.5、蛋白質表達分析 (Protein Expression Analysis)

4.5.1、蛋白質萃取 (Protein Extraction)

進行蛋白質萃取時，使用含有 5 mM 正钒酸鈉 (sodium orthovanadate, Na_3VO_4)、10 mM β -甘油磷酸鹽 (β -glycerophosphate) 和 1% 蛋白酶抑制劑的 100 μL RIPA 裂解緩衝液 (Merck Millipore) 處理細胞。在冰上將細胞培養液取出，隨後用冷 PBS 清洗附著的細胞，接著將裂解緩衝液加入細胞培養皿中，用塑膠刮刀把細胞刮下來後，將含有細胞的 RIPA 緩衝液移至 1.5 mL 微量離心管。為了促進細胞膜的裂解並釋放胞內蛋白質，在振盪器上劇烈震盪 30 秒。裂解液隨後在 4°C 下以 13,200 rpm 離心 30 分鐘，以去除細胞碎片和不溶性物質。收集含有蛋白質的上清液，並將其轉移至新的離心管中作為蛋白質樣品，儲存於-80°C 以備後續分析。為確保樣品的穩定性和蛋白質的完整性，裂解和離心過程均在低溫條件下進行。

4.5.2、蛋白質定量 (Protein Quantification)

採用 Bradford 蛋白質定量法 (Bio-Rad) 測定總蛋白質濃度，並以 0 至 12 μg 牛血清白蛋白 (BSA; Thermo) 作為標準品生成標準曲線以計算樣品中的蛋白質濃度。接著，將 1 μL 的蛋白質樣品加入 1 mL 的 Bradford 試劑中，充分混合後在室溫下靜置 5 分鐘，使染料與蛋白質結合形成穩定的藍色複合物。隨後，使用 ELISA 讀取器 (VARIOSKAN LUX; Thermo) 於 595 nm 波長測量吸光度 (OD_{595})。每個樣品的吸光值與 BSA 標準曲線進行比對，計算總蛋白質濃度。

4.5.3、蛋白質變性 (Protein Denaturation)

為進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析，需先製備上樣混和液。每個樣品的混和液包含 20 μg 的總蛋白質、5 μL 的 4X 上樣緩衝液，該緩衝液的組成為 1.5 M Tris (pH 6.8，最終濃度 20%)、10% SDS、30% 甘油 (glycerol)、30% β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol) 及 0.05% 溴酚藍 (bromophenol blue)。使用無菌水將上樣混和液總體積補至 20 μL 。樣品的變性條件為 98°C 加熱 5 分鐘，以確保蛋白質處於一級

結構。對於在非還原條件下分析的樣品，則不加入 β -mercaptoethanol，並於 37°C 下變性 30 分鐘，以保留蛋白質的四級結構。

4.5.4、 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

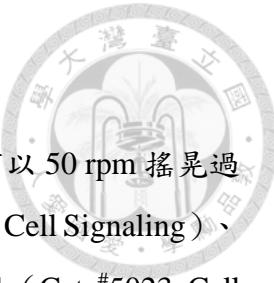
變性後的上樣混和液透過 6%、8% 和 12% 的 SDS-PAGE 進行分離，6% 凝膠用於分離 his-tagged 蛋白質，8% 凝膠用於分離 β -肌動蛋白 (β -actin)，12% 凝膠則用於分離小分子蛋白質。

表 10、Polyacrylamide Gel 的配方

Seperating gel :	6% (10 mL)	8% (10 mL)	12% (10 mL)	Stacking gel :	(3 mL)
Sterilized water	5.3 mL	4.6 mL	3.3 mL	Sterilized water	2.1 mL
30% acrylamide mix	2.0 mL	2.7 mL	4.0 mL	30% acrylamide mix	0.5 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	1 M Tris (pH 6.8)	0.38 mL
10% SDS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	10% SDS	0.03 mL
10% ammonium persulfate	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	10% ammonium persulfate	0.03 mL
TEMED	0.008 mL	0.006 mL	0.004 mL	TEMED	0.003 mL

表 10 修改自 ([66](#))。

電泳條件為：初始電壓 70 V，待上樣混和液的染劑前沿進入分離膠 (seperating gel) 後，電壓增至 100 V，直至蛋白質充分分離。為了將蛋白質從 SDS-PAGE 凝膠轉移至 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (0.45 μ m; Merck Millipore)，PVDF 膜需先泡在甲醇中活化。在冰浴環境中，施加 350 mA 的恆定電流，轉移時間為 40 分鐘。轉移完成後，依照不同蛋白質的分子大小將 PVDF 膜切割。接著，把 PVDF 膜置於含有 5% 脫脂奶粉的 TBST 緩衝液 ([4.5.6](#)) 中，在 50 rpm 的室溫震盪平台上搖晃 30 分鐘，以阻斷非特異性抗體結合的部位。接著，PVDF 膜用 1X TBST 洗滌三次，每次 5 分鐘，搖晃速度為 70 rpm。



4.5.5、西方免疫點墨法（Western Immunoblotting）

將 PVDF 膜置於含有一級抗體的 TBST 溶液中，並在 4°C 下以 50 rpm 搖晃過夜孵育。使用的主要抗體為 is-Tag XP® Rabbit mAb (Cat. #12698S; Cell Signaling)、 β -Actin Mouse mAb (Cat. #3700S; Cell Signaling)、Bax Rabbit mAb (Cat. #5023; Cell Signaling)、Bcl-2 Rabbit mAb (Cat. #4223; Cell Signaling)、Cleaved Caspase-8 Rabbit mAb (Cat. #9496; Cell Signaling) 和 Caspase-9 Antibody (Cat. #9502; Cell Signaling)，抗體的稀釋濃度依廠商建議調製。隔日，回收一級抗體，PVDF 膜再次用 TBST 洗滌三次，每次 5 分鐘，以去除未結合的抗體。接著將 PVDF 膜置於含有 HRP 標記的二級抗體溶液中，並在室溫下以 50 rpm 震盪孵育 2 小時。對 β -actin 的檢測，使用 Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody (Cat. #7076S; Cell Signaling) 作為二級抗體；對其他蛋白質的檢測，均使用 Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cat. #7074S; Cell Signaling)。孵育完成後，再次用 TBST 洗滌三次，每次 5 分鐘。最後，使用 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 和 Immobilon Western 冷光顯影系統 (GeneGnome XRQ) 檢測 HRP 的活性，並記錄目標蛋白質的表達條帶。

4.5.6、製備 SDS-PAGE 緩衝液（Preparation of SDS-PAGE Buffer）

1X Running buffer：100 mL 10X Tris-glycine SDS buffer 和 900 mL Milli-Q 水混和均勻。

10X Transfer buffer：將 60.6 g Tris 和 288 g glycine 溶解於 1800 mL Milli-Q 水中。使用 pH 計、NaOH 和 HCl 調整 pH 值到 8~8.5，最後以 Milli-Q 水補足至 2 L。配置完成放在 4°C 冰箱保存。

1X Transfer buffer：100 mL 10X Transfer buffer、200 mL 甲醇和 700 mL Milli-Q 水混和均勻，使用前先放在 4°C 冷卻。

10X TBS buffer：將 60.5 g Tris、87.6 g NaCl 溶解於 800 mL Milli-Q 水，使用 pH 計、NaOH 和 HCl 調整 pH 值到 7.5，最後以 Milli-Q 水補足至 1 L，儲存於 4°C。

1X TBST buffer：將 50 mL 10X TBS、450 mL Milli-Q 水和 0.5 mL Tween[®]-20 (Sigma) 充分混和，儲存於 4°C。



5% Blocking buffer：2 g 脫脂奶粉溶解於 40 mL 1X TBST 中，須提前配製並充分震盪確保完全溶解。

4.6、細胞功能分析 (Cell Functional Analysis)

4.6.1、細胞增殖實驗 (Cell Proliferation Assay)

為了評估 H1299 細胞的增殖能力，將穩定表達外源基因的 H1299 細胞以每孔 1×10^4 個細胞的密度接種於 24 孔培養盤，並在 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養 24、48、72 和 96 小時。在每個指定的時間點，將原培養基更換為含有 0.5 mg/mL MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide; Protech) 的新鮮培養基，並於 37°C 下孵育 2 小時，使存活細胞粒線體中的去氫酶將 MTT 轉化為不溶於水的紫色甲臘 (formazan) 晶體。2 小時後，去除含有 MTT 的培養基，並加入 1 mL DMSO (dimethyl sulfoxide; J.T.Baker) 溶解結晶，在振盪器上用 70 rpm 搖晃 10 分鐘以促進晶體的完全溶解。最後，使用酵素免疫分析儀 (ELISA reader; Thermo) 測量 570 nm 波長的吸光值 (OD₅₇₀) 作為細胞增殖活性的指標。該實驗每組均進行六重複測試，數據以平均值和標準差表示。

4.6.2、克隆形成實驗 (Clonogenic Assay)

將穩定表達外源基因的 H1299 細胞以每 100 個細胞的密度接種於 6 cm 培養皿中，並在 37°C、5% CO₂ 的培養箱中培養 14 天，期間不更換培養基以維持穩定的細胞生長環境。14 天後，去除培養液並用 PBS 輕柔清洗培養皿內的細胞，隨後加入固定溶液 (甲醇：醋酸=3:1) 固定細胞 15 分鐘，使細胞形態穩定。固定後，使用 0.05% 結晶紫溶液 (crystal violet; SIGMA) 避光染色細胞 30 分鐘。隨後用清水

輕輕沖洗培養皿，去除多餘的染劑，並在室溫下使其自然晾乾。顯微鏡下計數每個集落內細胞數量大於 50 個的，將其定義為一個有效的克隆。克隆形成效率 (colony formation efficiency, CFE) 計算方式為克隆數量除以接種的總細胞數，並根據接種效率（即克隆數量除以感染空病毒細胞的克隆數）進行標準化調整。每次獨立實驗均至少重複三次

4.6.3、 XBP1 剪切實驗 (XBP1 Splicing Assay)

此方法用於評估細胞裡的內質網壓力 (ER stress)。先將肺癌細胞的總 RNA 反轉錄成 cDNA，再利用 XBP1 和 GAPDH 特異性引子放大兩個基因。

表 11、XBP1 RT-PCR 的配方

Reagents	Concentration	Volumn
cDNA	1X	Add 1 μ L directly
Forward primer (表 11)	5 μ M	1 μ L
Reverse primer (表 11)	5 μ M	1 μ L
5X HiFi buffer	5X	4 μ L
dNTPs	10 mM	1 μ L
HotStart DNA Polymerase	1 U/ μ L	0.5 μ L
Nuclease-free water		11.5 μ L
Total		20 μ L

接著，在 3% 琼脂糖凝膠電泳中分離，未剪切及剪切的 XBP1 基因大小約相差 26 鹼基對。



4.6.4、細胞遷移實驗（Migration Assay Using Transwell）

為了評估 H1299 細胞的遷移能力，實驗前先用不含 FBS 的 serum-free 培養液使細胞飢餓 24 小時，隔天，將 5×10^4 個 H1299 細胞種於上層腔室的 $200 \mu\text{L}$ serum-free 培養液中，下層腔室則加入 $750 \mu\text{L}$ 含 10% FBS 的培養基。在 37°C 、5% CO_2 的培養箱中培養 1 天。隔天小心的將培養液丟棄並用 PBS 清洗，接著用含有 10% 甲醇的 10% 醋酸溶液固定細胞 15 分鐘。隨後用 PBS 清洗固定溶液，並用 0.05% 結晶紫溶液避光染色 30 分鐘。用棉花棒小心地擦拭上層腔室的未遷移細胞。最後用 1 mL 10% 醋酸溶解細胞呈色，在 ELISA Reader 中測量 OD_{580} 。

4.7、流式細胞儀分析（Flow Cytometry Analysis）

4.7.1、雙重胸腺嘧啶阻斷（Double Thymidine Blocking）

為了分析 H1299 細胞的細胞週期進程，將穩定表達外源基因的 H1299 細胞以 25% confluence 接種於 6 孔培養盤，並在 37°C 、5% CO_2 的培養箱中過夜培養。次日，加入經 $0.22 \mu\text{m}$ 濾膜過濾的 thymidine 溶液，使最終濃度達 2 mM ，並在 37°C 、5% CO_2 環境下孵育 18 小時以同步化細胞。隨後，將含有 thymidine 的培養基移除，用 PBS 洗滌細胞兩次，並更換為新鮮的 RPMI 1640 培養基，在相同條件下繼續孵育 9 小時以解除同步化。接著，重新加入 thymidine（最終濃度 2 mM ），再次孵育 18 小時以完成雙 thymidine 阻斷。此時，所有細胞將停滯在 G1 期。孵育結束後，移除含 thymidine 的培養基，使用 PBS 洗滌兩次，並加入新鮮的 RPMI 1640 培養基恢復細胞生長。根據實驗設計，分別在指定的時間點（0、2、6、10、14 和 24 小時）收集細胞樣本，進行後續的細胞週期分析。



4.7.2、細胞週期實驗 (Cell Cycle Assay)

首先，去除過表達外源基因的 H1299 細胞培養液，並用 PBS 清洗細胞，以去除殘留的培養基成分。隨後，加入適當體積的胰蛋白酶，並在 37°C 孵育 1 分鐘，使細胞從培養皿中脫離。加入三倍體積含有 10% FBS 的培養基終止胰蛋白酶活性，並用微量吸管輕輕吹打，確保細胞完全懸浮。將懸浮的細胞轉移至 15 mL 離心管中，於 100 g 離心 5 分鐘，然後棄去上清液，並用 PBS 清洗兩次以去除殘留的 FBS 和酵素。之後，吸取 1×10^6 個細胞進行固定，將 1 mL 70% 冰乙醇（由無菌 Milli-Q 水製備）緩慢且逐滴加入至震盪狀態的細胞沉澱中，避免因快速加入酒精而造成細胞聚集或蛋白質沉澱。細胞在 -20°C 固定至少 1 小時，確保細胞膜的透化。固定完成後，將細胞於室溫下解凍 10 分鐘，並用 4°C、300 g 離心 5 分鐘，為了避免細胞在離心過程中重新漂浮，離心時不啟用煞車 (break) 功能。離心後，去除上清液，用冷 PBS 清洗細胞一次以去除殘留的乙醇，接著加入 1 mL 的 PI 染色液對細胞進行染色。PI 染色液為含有 50 µg/mL 碘化丙啶 (propidium iodide, PI; Invitrogen)、0.1% Triton X-100 (Amersham Biosciences) 和 100 µg/mL RNase A (ribonuclease A; Sigma) 的 PBS。在 37°C 下避光孵育 30 分鐘，以確保 DNA 充分和 PI 結合。染色完成後，將細胞懸浮液通過 40 µm 的細胞篩網過濾，去除細胞聚集體和大顆粒，以提高流式細胞儀的檢測準確性。最後，使用 BD ContolII 流式細胞儀 (BD Biosciences) 進行數據採集，並使用 FlowJo 軟體對細胞週期的分佈進行分析，以量化 G1、S 和 G2/M 期的細胞比例。每次獨立實驗均至少重複三次。

4.7.3、細胞凋亡實驗 (Apoptosis Assay)

為了進行細胞凋亡分析，首先將培養過表達外源基因的 H1299 細胞的培養上清液（含有懸浮的死細胞）收集至 50 mL 離心管中。隨後，對培養皿中的貼附細胞進行處理，先用 PBS 清洗，然後加入適量胰蛋白酶並在 37°C 孵育 1 分鐘。隨後，加入三倍體積含有 10% FBS 的培養基，終止胰蛋白酶的活性。利用微量吸管輕輕吹打，使細胞懸浮後，將懸浮的細胞轉移至與之前收集的死細胞相同的離心管中。將細胞懸浮液以 300 g 在 4°C 下離心 5 分鐘，去除上清液，然後用 PBS 清洗

兩次。接著，將 1×10^6 個細胞重懸於 500 μL 的 PI/Annexin V 染色溶液中，該溶液的成分為：450 μL 無菌水、50 μL 10X Annexin V 結合緩衝液（BD Biosciences）、1 μL 碘化丙啶（propidium iodide, PI）溶液和 1 μL Annexin V-FITC 溶液（BD Biosciences）。將細胞混合物在室溫、避光條件下孵育 15 分鐘，確保細胞完全標記。為了去除細胞團塊和大顆粒，將染色後的細胞懸浮液通過 40 μm 的細胞篩網過濾。最終，使用 BD ContolII 流式細胞儀（BD Biosciences）進行數據收集，並利用 FlowJo 軟體進行後續的數據分析，以區分早期凋亡細胞（Annexin V-FITC 陽性，PI 陰性）、晚期凋亡細胞（Annexin V-FITC 和 PI 雙陽性）、壞死細胞（PI 陽性，Annexin V-FITC 陰性）以及存活細胞（雙陰性）的比例。每次獨立實驗均至少重複三次。

4.8、統計分析（Statistical Analysis）

統計圖表使用 SigmaPlot 軟體進行，數據以平均值±標準差（mean±SD）表示。所有實驗均至少進行三次獨立重複，並確認組間變異趨於一致。為了評估組間差異的顯著性，採用雙尾 Student's t 檢驗進行比較。當 p 值小於 0.05 時，認為兩組之間的差異具有統計學顯著性（ $p < 0.05$ ）。所有分析均在雙尾假設檢定的基礎上進行，確保結果的準確性和可靠性。

第五章、實驗結果



5.1、成功構建 SEMA6A-FL M415C 及 I322E 點突變體

根據先前研究，SEMA6A-FL 形成二聚體的能力與第 415 號胺基酸的穩定作用密切相關。將此位置由甲硫胺酸（methionine, M）突變為半胱胺酸（cysteine, C）可促進雙硫鍵的形成，進而提升二聚化能力（[52](#)）。相對地，將第 322 號異白胺酸（isoleucine, I）突變為麩胺酸（glutamate, E）已被證實可削弱二聚體的形成（[60](#)）。本研究據此設計並構建兩種 SEMA6A-FL 點突變體：M415C（預期增強二聚化）與 I322E（預期降低二聚化）（[圖 1A](#)），用以探討突變對其二聚體比例的影響。

為進一步評估這些點突變體於肺癌細胞中的表現與功能，我們將各構築片段克隆入 pCDH 慢病毒載體（[圖 1B](#)），並以 Sanger 定序確認序列正確性。經雙酶切分析後，觀察到預期大小之載體與插入片段條帶，顯示重組質體已成功構建（[圖 1C](#)）。

5.2、SEMA6A-FL M415C 和 I322E 分別增強與減弱蛋白質二聚化的能力

將空載體（empty control）、SEMA6A-FL 原型、以及兩種突變體（M415C 與 I322E）分別導入肺癌細胞後，我們藉由 qPCR 與 Western blot 確認重組基因於 mRNA 與蛋白質層級皆有穩定過表達（[圖 2A-B](#)）。

為評估蛋白質的二聚化狀態，進行非還原性 SDS-PAGE（NR SDS-PAGE）分析。該方法可在不添加還原劑的條件下保留蛋白質間的共價鍵結構，使二聚體在電泳中維持穩定存在。比對還原與非還原條件下的蛋白質條帶後發現，SEMA6A-FL 及其兩種突變體皆可偵測到單體與二聚體的條帶（[圖 2C](#)）。定量分析顯示，M415C 突變體呈現顯著增強之二聚體比例，伴隨單體比例下降；而 I322E 則顯示相反趨

勢，二聚體減少、單體相對上升（[圖 2D](#)）。上述結果證實，SEMA6A-FL M415C 點突變可促進二聚體形成，而 SEMA6A-FL I322E 點突變則削弱此能力。



5.3、SEMA6A-FL 二聚體抑制肺癌細胞的生長能力

為探討 SEMA6A-FL 的二聚化對肺癌細胞生長的影響，我們比較過表達不同 SEMA6A 構型後的細胞增殖曲線。結果顯示，I322E 突變體與空載體組相似，皆表現出較高的生長速率；而 M415C 與原型 SEMA6A-FL 則顯著抑制細胞生長（[圖 3A](#)）。長期集落形成實驗結果亦一致，SEMA6A-FL 與 M415C 顯著降低肺癌細胞形成集落的能力，而 I322E 則無此抑制效果（[圖 3B](#)）。綜合結果顯示，SEMA6A-FL 主要透過其二聚體結構抑制細胞增殖，而非依賴單體形式發揮作用。

5.4、SEMA6A-FL 的結構改變不顯著影響細胞週期進展

為評估 SEMA6A-FL 二聚體形成是否會影響肺癌細胞的細胞週期分布，我們以雙胸腺嘧啶（double thymidine block）同步化策略將細胞週期同步至 G1 期，並觀察其隨時間推移的週期進展（[圖 4A](#)）。初始（0 h）時，各組約 25% 細胞停滯於 G1 期，其餘主要分布於 S 期與 G2/M 期。至 2 小時後，G1 期細胞已逐步進入 S 期及 G2/M 期；6 小時時，多數細胞進入下一輪週期。

在不同時間點比較各組細胞週期變化，SEMA6A-FL、M415C 與 I322E 組於 2 與 6 小時出現輕微週期延緩，惟後續時間點與對照組間無顯著差異（[圖 4B](#)）。儘管初始同步效率有限，結果仍可推論 SEMA6A-FL 結構變異並未顯著干擾細胞週期的正常進程。



5.5、SEMA6A-FL 透過二聚體誘導細胞凋亡

為釐清 SEMA6A-FL 二聚體抑制細胞生長是否與細胞凋亡相關，我們進行 PI/Annexin-V 雙染流式細胞儀分析。結果顯示，I322E 突變體與空載體組的凋亡細胞比例相近；相對地，SEMA6A-FL 原型與 M415C 組之凋亡比例皆顯著提升（[圖 5A-B](#)）。

此結果顯示，SEMA6A-FL 及其具增強二聚化能力的突變體能有效誘導肺癌細胞進入凋亡途徑，而降低其二聚化能力則可阻斷此現象，支持 SEMA6A-FL 二聚體於凋亡誘導中扮演關鍵角色。為進一步驗證此現象，我們構建並分析兩種 SEMA6A 截短變異體，探討其與二聚體形成的關聯性。

5.6、成功構建二種與二聚化相關的 SEMA6A 截短變異體

為進一步驗證 SEMA6A 二聚體在凋亡訊號傳遞中的功能性，我們設計了兩種 SEMA6A 截短變異體，分別包含與排除第 415 位胺基酸。根據文獻指出，第 415 位殘基為維持 SEMA6A-FL 二聚結構的關鍵位置（[52](#)）。我們構建的 SEMA6A 365-1030 片段保留第 415 位胺基酸，而 SEMA6A 462-1030 則將該區域完全刪除（[圖 6A](#)）。

上述片段皆成功克隆至 pCDH 慢病毒載體中，並經 Sanger 定序驗證無突變（[圖 6B](#)）。後續透過限制酶雙重切割與電泳分析，確認質體構築之完整性，並可見明確之載體與插入片段條帶（[圖 6C](#)）。本實驗藉由這兩種結構變異體，進一步驗證 SEMA6A 是否透過其二聚體結構調控細胞凋亡相關訊號。



5.7、二種 SEMA6A 截短變異體皆具增強其二聚化能力

為探討 SEMA6A 截短變異體於細胞內的表現與二聚化能力，我們將空載體、SEMA6A-FL、SEMA6A 365-1030 及 SEMA6A 462-1030 經慢病毒系統導入肺癌細胞中。qPCR 與 Western blot 分析結果顯示，兩種截短變異體均在 mRNA 與蛋白質層級大量表達（[圖 7A-B](#)），證實轉染效率良好。

進一步利用非還原性 SDS-PAGE 與 Western blot，觀察蛋白質二聚體與單體之比例。條帶定量分析結果顯示，SEMA6A 365-1030 與 462-1030 之二聚體比例皆顯著高於 SEMA6A-FL，且相對單體比例明顯下降（[圖 7C-D](#)）。此結果顯示，即使缺乏 SEMA6A 部分區段，其截短構型依然具備高度二聚化潛能，甚至優於全長蛋白。

5.8、過表達二種 SEMA6A 截短變異體皆顯著抑制肺癌細胞的生長活性

為評估 SEMA6A 截短變異體對細胞生長的影響，我們進行短期細胞增殖實驗與長期集落形成測試。結果顯示，過表達 SEMA6A 365-1030 與 462-1030 之肺癌細胞，其增殖能力明顯低於 SEMA6A-FL 原型（[圖 8A](#)）。此外，兩變異體亦顯著抑制單一細胞形成集落的能力，與短期結果一致（[圖 8B](#)）。

由於兩種截短變異體皆展現出增強的二聚化能力，此結果進一步支持 SEMA6A-FL 藉由二聚體結構抑制肺癌細胞生長之推論。

5.9、二種 SEMA6A 截短變異體均不顯著影響細胞週期進展

為釐清細胞生長下降是否與細胞週期調控有關，我們以雙胸腺嘧啶同步化法評估各組別細胞週期之進展情形（[圖 9A](#)）。在 0 小時時，各組約 25% 細胞處於 G1

期，多數細胞分布於 S 期及 G2/M 期。至 2 小時時，G1 期細胞開始進入後續週期階段，6 小時後大部分細胞已完成週期轉換。

SEMA6A-FL、365-1030 與 462-1030 三組在 2 與 6 小時時間點雖出現輕微延遲現象，但與空載體組比較，整體週期進展並無統計顯著差異（[圖 9B](#)）。因此，我們推論 SEMA6A 截短變異體抑制細胞生長之作用，並非經由改變細胞週期進程所致。

5.10、過表達二種 SEMA6A 截短變異體皆顯著促進細胞凋亡

PI/Annexin-V 雙重染色之流式細胞儀結果顯示，SEMA6A 365-1030 與 462-1030 之過表達顯著提升肺癌細胞的凋亡比例，較空載體組呈現統計顯著差異（[圖 10A-B](#)）。此結果表明，SEMA6A 截短構型亦能有效誘導細胞凋亡，且與其高度二聚化能力相符。

綜合結果，SEMA6A-FL 誘導肺癌細胞凋亡的關鍵機制與其二聚體形成密切相關，截短變異體進一步驗證此假說。

5.11、SEMA6A-FL 結構改變不影響 Caspase-8 裂解活性

為評估 SEMA6A-FL 誘導凋亡是否涉及外在途徑，我們檢測了 Caspase-8 的裂解情形。結果顯示，過表達 SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C 與 SEMA6A-FL I322E 後，細胞中 Caspase-8 裂解產物與對照組（empty）相比並無顯著差異（[圖 11A-B](#)）。

該結果顯示，SEMA6A-FL 結構改變不會影響 Caspase-8 依賴之外在凋亡途徑的活化，暗示 SEMA6A-FL 誘導肺癌細胞凋亡可能主要透過內在途徑進行。

5.12、SEMA6A-FL 二聚體增加內質網壓力及 Caspase-9 裂解產物

進一步探討 SEMA6A-FL 二聚化是否與內源性凋亡相關，我們分析了 ER stress 指標及內在凋亡關鍵蛋白的變化。結果顯示，過表達 SEMA6A-FL M415C 可顯著提升 spliced XBP1 mRNA 表現（[圖 12A](#)），顯示細胞內內質網壓力上升。

此外，SEMA6A-FL M415C 組細胞中，Caspase-9 的裂解產物明顯高於對照組（[圖 12B](#)），顯示內在性凋亡途徑被活化。進一步分析 Bax/Bcl-2 在蛋白質表達（[圖 12C](#)）和 mRNA 表達（[圖 12D](#)）的比值作為內在凋亡活性的指標，結果顯示 SEMA6A-FL 與 M415C 組之比值高於 empty 與 I322E 組。

綜合以上數據可推論，SEMA6A-FL 透過其二聚體結構，引發內質網壓力反應，並促進內源性凋亡訊號之活化，進而抑制肺癌細胞生長。

5.13、缺失 SEMA6A 365-462 氨基酸片段顯著抑制肺癌細胞的遷移能力

先前研究指出，HMOX1 為調控細胞遷移之關鍵因子，其可上調 E-cadherin 與 β -catenin 表現，增強細胞間連結並抑制細胞偽足形成（[48](#)）。SEMA6A-FL 已被證實可藉由上調 HMOX1 以抑制肺癌細胞之遷移（[48](#)）。

本研究進一步發現，SEMA6A-FL M415C 與 I322E 組之細胞遷移能力與 SEMA6A-FL 無顯著差異；然而，過表達 SEMA6A 462-1030（缺乏 415 號氨基酸）之細胞，其遷移能力顯著低於 SEMA6A 365-1030 組（[圖 13A](#)），顯示該構型在抑制細胞遷移上具有更強效果。

qPCR 與 Western blot 進一步驗證 HMOX1 於 SEMA6A 462-1030 組中表現顯著上升（[圖 13B-D](#)），支持其透過上調 HMOX1 來抑制細胞移動性。此結果突顯 SEMA6A 上的 365-462 氨基酸片段對細胞遷移的功能影響，並指出缺失該片段可能啟動額外訊號路徑以強化抑制效應。

第六章、討論



6.1、SEMA6A 點突變於肺癌細胞凋亡功能中的探討

6.1.1、SEMA6A-FL 單體與二聚體間可能存在結構動態平衡

根據 SDS-PAGE 分析結果，SEMA6A-FL 在不同點突變構型下並未完全轉換為單一形式，反映其於細胞內可能同時以單體與二聚體形式共存。此動態平衡特性亦已在其他蛋白質系統中觀察到，並被證實對其功能調控具關鍵意義（[63](#)、[67](#)）。例如 DLC8 蛋白研究指出，其二聚化狀態可因 pH 值變動導致組氨酸殘基質子化，使界面結構鬆動，促進二聚體解離為單體（[67](#)）。由此推測，SEMA6A-FL 亦可能受胞內環境變化調控其聚合狀態，進而影響其下游訊號功能。

6.1.2、SEMA6A-FL 是否正確定位於細胞膜尚待驗證

SEMA6A-FL 為典型的第一型跨膜蛋白，其生理功能高度仰賴於膜定位正確與否。本研究雖已於質體構築中加入 N 端訊號肽序列，以期導引其進入內質網並嵌入膜系統（[69](#)），然實際定位尚未實驗證實。後續可透過螢光標記融合蛋白（如 GFP-SEMA6A-FL）進行螢光顯微鏡觀察（[70](#)），或採細胞分餾搭配 Western blot 分析膜分離物中是否含有 SEMA6A-FL（[71](#)），以確立其於細胞膜的表現情形。雙重驗證有助於釐清其是否具備膜受體之功能基礎，並進一步闡明其二聚化對細胞訊號傳遞的影響途徑，強化本研究對其功能機制的解釋力。

6.1.3、SEMA6A-FL 二聚體提升 ER Stress 並促進 Caspase-9 裂解

為探討 SEMA6A-FL 二聚化與細胞凋亡相關蛋白的表達，本研究進一步評估 Cleaved Caspase-9、Bax 與 Bcl-2 等指標表現，並發現 SEMA6A-FL M415C 突變構型於肺癌細胞中引發明顯 ER stress 與 Caspase-9 裂解產物升高。此現象與文獻所述 ER stress 可先行引發 UPR，再間接造成粒線體通透性改變，促使 Cytochrome c

釋出，進而活化 Caspase-9 一致 (59、61)。此外，Bax/Bcl-2 比值提升亦為凋亡敏感性上升的指標 (61)。

本研究結果整體顯示，SEMA6A-FL 二聚化結構可能成為引爆內源性凋亡訊號的關鍵上游事件。綜合以上結果可推論，SEMA6A-FL 二聚化不僅與 ER stress 相關，也可能透過調控粒線體相關凋亡機制，參與肺癌細胞的凋亡訊號傳遞。

6.1.4、SEMA6A-FL 與 6Acyto 和 6A Δ sema 誘導之凋亡路徑存在差異

進一步分析外源性凋亡訊號蛋白 Caspase-8 後，發現 SEMA6A-FL 及其突變構型並未顯著改變 Cleaved Caspase-8 之表現量，暗示其並不透過 FADD/Caspase-8 經典軸線進行凋亡訊號傳導。此與先前針對 SEMA6A 截短體(如 6A Δ sema 和 6Acyto)可與 FADD 結合並誘導 Caspase-8 活化的報導相左 (36)。

與去除 SEMA 結構域（如 6Acyto 與 6A Δ sema）誘導 FADD 介導外源性凋亡路徑不同，SEMA6A-FL 完整構型主要透過提升內質網壓力與 Caspase-9 活化(59)，引導細胞進入內源性凋亡流程。6Acyto 無法引發顯著 ER stress，即完整構型與截短構型在凋亡途徑的啟動模式上具有明確差異性。

因此，我們推論，SEMA6A 的細胞凋亡訊號傳導與其結構狀態密切相關：當 SEMA6A 缺乏 SEMA domain 時，主要透過外源性途徑引發細胞凋亡；而完整構型的 SEMA6A-FL 則較可能經由內源性途徑發揮其促凋亡功能。

6.1.5、SEMA6A-FL M415C 誘導凋亡之訊號傳遞方向仍待明確釐清

作為一典型跨膜訊號蛋白，SEMA6A 具備雙向訊號傳遞的潛力，包括由細胞外區域啟動胞內訊號的 forward signaling，與由胞內區域調控的 reverse signaling(36、52)。本研究所使用之 M415C 與 I322E 突變體皆為 SEMA6A-FL 全長構型，故無法判定其凋亡訊號為順向或反向傳遞。為釐清此訊號方向性，未來建議建立對應胞外區域突變體（如 6Aecto M415C 和 6Aecto I322E），若其於缺乏胞內區域條件下



仍可誘發細胞功能改變，將支持 SEMA6A 為 forward signaling 主導；反之，則顯示其促凋亡效應主要透過 reverse signaling 途徑實現。

6.2、對內源性（粒線體依賴性）凋亡路徑的討論

6.2.1、需謹慎評估過表達基因所致 ER Stress 之實驗性假象可能性

內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress) 是指當內質網中出現過量未正確摺疊的蛋白質時，細胞所啟動的一系列壓力反應機制。此現象會活化未摺疊蛋白質反應 (unfolded protein response, UPR) ([72](#))，以維持細胞內的蛋白質恆定。UPR 的啟動包含三條主要訊號通路：IRE1 (inositol-requiring Enzyme 1) 、PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) 與 ATF6(activating transcription factor 6) ([73](#))。這三者可協助暫停總體蛋白質合成，同時促進分子伴侶蛋白 (如 BiP/GRP78) 的表達，並加速錯誤摺疊蛋白的降解，以避免細胞損傷或死亡 ([74](#))。

然而，在外源性基因過度表現的情況下，大量目標蛋白的合成會迅速增加內質網的負荷，超出其處理能力，進而導致人工性 ER stress 的發生 ([75](#)、[76](#)、[77](#))。此種情形可能不具備真實生理意義，而僅為技術性干擾所造成的假陽性結果。文獻報導指出，強啟動子 (如 CMV promoter) 驅動下的重組蛋白過度表現，會導致蛋白質於內質網中聚集，進而誘發非特異性 UPR 反應，這對研究信號蛋白與 ER stress 間的關聯性造成干擾 ([78](#))。這種情況下產生的內質網壓力，很可能為實驗條件所導致的非生理性反應。

因此，在本研究中觀察到的 SEMA6A-FL M415C 造成 ER stress 的現象，需進一步排除此為蛋白質過度表現所致的假象。可行的策略包括調整基因轉染量、使用不同載體系統、或採用內生性誘導物 (如 Thapsigargin 或 Tunicamycin) 為 ER stress 陽性對照、或是加入蛋白質摺疊抑制劑 ([75](#))，以釐清蛋白質與 ER stress 間的真

實關聯。透過上述控制可釐清觀察到的 ER stress 現象是否為 SEMA6A 本身功能導致，抑或僅為技術性高表現之副作用，從而提升本研究結果的解釋力與可信度。

6.2.2、探討造成 Mitochondrial Damage 的其他原因

粒線體損傷為啟動內源性凋亡路徑的核心事件，亦即當粒線體膜潛能(MMP)喪失、膜通透性增加，Cytochrome c 等促凋亡因子釋出至細胞質，即可活化 Apaf-1，組成 apoptosome 複合體，進而活化 Caspase-9 及下游 Caspase-3，引發細胞凋亡([79](#))。本研究觀察到 SEMA6A-FL M415C 表現後粒線體損傷增加，且 Cleaved Caspase-9 與 Bax/Bcl-2 比值上升，支持 SEMA6A 二聚體與內源性凋亡間具直接關聯。然而，粒線體損傷不僅僅受限於 ER stress 所誘導，尚涉及多種分子與環境因子共同調控，其潛在機制包括：

(1) 活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)累積

粒線體為主要 ROS 產生部位，在代謝壓力、環境毒素或訊號異常時會導致 ROS 大量釋放。過量 ROS 會引發脂質過氧化、mtDNA 損傷及膜通透性升高，最終引發凋亡([80](#)、[81](#))。尤其 Bax 活化可促進 ROS 進一步產生，形成正回饋迴路([82](#))。在 SEMA6A 相關研究中尚未明確觀察 ROS 變化，未來可驗證此機制是否參與 SEMA6A 所致凋亡。

(2) 鈣離子(Ca²⁺)失衡

ER 為細胞內主要的 Ca²⁺儲存庫，當 ER stress 發生時，Ca²⁺可能大量外洩至細胞質並轉運入粒線體，導致粒線體過載，引發 MPTP 開啟與膜電位崩解([83](#)、[84](#))。

(3) 粒線體品質控制異常

粒線體自身蛋白質品質控制機制有關，例如 UCPs (uncoupling proteins) 或 HSP60 等伴護蛋白異常，會妨礙粒線體內蛋白質正常摺疊與穩定性維持，進一步



影響能量代謝與存活能力（[85](#)）當粒線體蛋白摺疊錯誤或功能衰退，若未能有效清除，亦會造成細胞凋亡（[86](#)）。

（4）發炎訊號與代謝壓力

腫瘤微環境中細胞經常暴露於低氧、高乳酸、炎性細胞激素等條件下，這些皆可透過 NF-κB、HIF-1 α 等路徑加劇粒線體壓力，並降低抗凋亡蛋白表現（[81](#)、[87](#)）。若 SEMA6A 調控此類基因轉錄活性，則可能與代謝壓力相關的粒線體損傷路徑互為因果。

綜合上述，粒線體損傷不僅僅源於 ER stress，而是多種細胞壓力因素交互作用的結果。因此，未來若能進一步釐清 SEMA6A 與上述機制之間的潛在關聯，將有助於全面理解其參與內源性凋亡訊號的分子網絡與調控機制。

6.3、 提出蛋白質功能調控的新解釋機制

本研究結果顯示，SEMA6A-FL I322E 之二聚體比例明顯低於 SEMA6A-FL，且其誘導肺癌細胞凋亡的能力亦顯著下降。此現象暗示 SEMA6A-FL 之凋亡誘導效應可能與其二聚體形成具有正相關。

然而，進一步比較 SEMA6A-FL 與其強化二聚化構型 SEMA6A-FL M415C 後發現，儘管後者二聚體比例顯著上升，兩者在誘導細胞凋亡的能力上並無顯著差異。此結果反映出，SEMA6A-FL 的二聚體比例與凋亡活性間可能非線性相關。我們推論，當二聚體比例超過特定臨界值後，細胞對其所引發的凋亡反應或已達到功能飽和的狀態。

為此，本研究提出「蛋白質功能飽和假說」，認為當蛋白質構型（如二聚體）比例超過細胞所能有效回應的臨界值後，其所引發的生理效應將不再隨比例上升

而增加。此假說可合理解釋 SEMA6A-FL M415C 雖具較高二聚體比例，卻未進一步提升凋亡效應之現象。

多項研究已指出，許多蛋白質在細胞中以單體與二聚體形式共存，其比例受蛋白質濃度與細胞環境影響，並對功能具有調控作用。例如，HSP27 的單體與二聚體比例影響其與目標蛋白的結合能力，且受脂肪酸和熱應激調控（[88](#)、[89](#)、[90](#)）。此外，二聚化可引發構象變化，進而影響功能（[91](#)），但當二聚體比例超過臨界值時，效應可能達到飽和（[92](#)）。這種現象類似於酵素動力學中的酵素飽和理論，表明蛋白質功能可能存在一個「飽和點」（[93](#)）。

6.4、SEMA6A 截短體對肺癌細胞凋亡及細胞遷移的討論

6.4.1、SEMA6A 截短體之功能驗證顯示其促進二聚化並誘導凋亡

本研究構建 SEMA6A 兩種截短變異體（365-1030 與 462-1030）以探討其特定區段對二聚化能力與細胞凋亡功能之貢獻。非還原性 SDS-PAGE 結果顯示，兩種截短體均顯著提升二聚體比例，並相對降低單體比例。進一步透過 PI/Annexin V 雙染與流式細胞儀分析發現，上述兩構型皆能顯著促進肺癌細胞凋亡，並抑制其生長能力。整體而言，二種 SEMA6A 截短體皆能提升二聚化與誘導凋亡功能，支持本研究假說：SEMA6A 藉由其二聚體構型參與凋亡路徑之調控，進而抑制肺癌細胞生長。

6.4.2、SEMA6A 二聚體形成可能受其他結構區域調控

實驗結果指出，無論是否保留第 415 號胺基酸，二種截短變異體皆呈現高比例的二聚體訊號。值得注意的是，SEMA6A 462-1030 已缺失包含第 415 號胺基酸之片段，但其仍具顯著的二聚體形成能力。此結果提示，除了 365-462 片段外，在 SEMA6A 其他區域中，可能仍存在促進二聚化之重要胺基酸殘基。

6.4.3、SEMA6A 第 365-462 位胺基酸片段可能參與肺癌細胞遷移機制

SEMA6A-FL 已被證實具有抑制肺癌細胞增生與遷移之功能（[48](#)）。本研究進一步發現，SEMA6A 462-1030 變異體亦具類似抑制遷移的效果，並伴隨顯著上調 HMOX1 之 mRNA 與蛋白質表現量。由於 SEMA6A 462-1030 與 365-1030 之主要差異為一段勝肽片段的缺失，推測該區段可能包含調節細胞遷移之關鍵胺基酸序列。這些發現為進一步研究 SEMA6A-FL 的結構與功能關係提供了新線索，並暗示該胺基酸片段可能在抑制細胞遷移過程中發揮重要作用。

第七章、未來研究方向



7.1、探討 SEMA6A-FL 誘導內源性凋亡過程中 Cytochrome c 的釋放

在內質網壓力條件下，促凋亡蛋白 Bax 會聚集於粒線體外膜表面，使其通透性上升，進而促使 Cytochrome c 釋放至細胞質，啟動內源性凋亡路徑。Cytochrome c 為內源性凋亡的重要生物標誌，因此，其釋放動態能有效反映細胞是否進入凋亡程序。

未來實驗將聚焦於肺癌細胞過表達 SEMA6A-FL 後，Cytochrome c 是否由粒線體釋放至細胞質，以及其釋放程度與凋亡程度是否具一致性。預期實驗將透過離心分級程序，結合商用粒線體與胞質分離試劑盒，以有效區分胞器來源之蛋白質，再搭配針對 Cytochrome c 之高專一性抗體，透過 Western blot 定量分析其表現位置與量變化。此研究可作為驗證 SEMA6A-FL 是否經由典型內源性凋亡路徑作用的關鍵依據。

7.2、探討其他造成 Mitochondrial Damage 的原因

除了 ER stress 之外，也需要探討其它會引發內在凋亡路徑的因素。ROS 可透過 DCFDA 染劑量測細胞內氧化壓力程度（[94](#)），驗證此機制是否參與 SEMA6A 所致凋亡。鈣離子 (Ca^{2+}) 失衡可能導致粒線體的膜電位崩解（[83](#)、[84](#)）。未來可使用 Fluo-4 AM 螢光染劑偵測細胞質與粒線體中的 Ca^{2+} 濃度變化。另外，若 SEMA6A 會調控發炎類基因的轉錄活性，也可能造成粒線體損傷。綜上所述，未來可納入 ROS 量測、 Ca^{2+} 成像、MMP 分析 (JC-1)、autophagy marker 偵測（如 LC3-II）、以及抗氧化劑（如 NAC）或 MPTP 抑制劑（如 CsA）的干擾實驗，以全面驗證 SEMA6A 調控粒線體功能的多重機制，強化本研究對凋亡機轉之理解深度。



7.3、製備高純度 SEMA6A-FL 單體與二聚體

獲得純化且結構穩定的 SEMA6A-FL 單體與二聚體，將有助於後續探討其構型特異性功能，亦能提高相關實驗之準確性與重現性。未來規劃使用快速蛋白質液相層析（fast protein liquid chromatography, FPLC）技術，以分離並純化 SEMA6A-FL 不同構型，做為後續功能性測試之材料來源。

7.4、利用純化 SEMA6A-FL 單體與二聚體比較其細胞功能

獲得高純度的 SEMA6A-FL 單體與二聚體後，可針對不同構型進行功能性比較，進一步驗證「蛋白質功能飽和假說」。預計未來將分別外加不同濃度的 SEMA6A-FL 二聚體於肺癌細胞中，觀察其對細胞生長與凋亡的劑量—反應曲線，藉此探討是否存在效應飽和點，並驗證 SEMA6A-FL 是否以二聚體形式啟動凋亡路徑。

第八章、結論

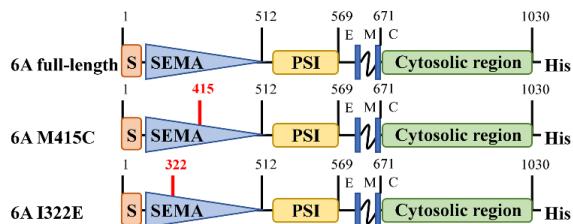


本研究首次比較了 SEMA6A-FL 的二聚體與單體對於肺癌細胞生長的影響，並提出了 SEMA6A-FL 二聚體在訊號傳遞中的潛在調控機制。透過點突變和截短片段的實驗設計，我們成功建立了能增強二聚化 (M415C) 與減弱二聚化 (I322E) 的 SEMA6A-FL 重組基因，並使用 pCDH 慢病毒表達載體進行基因大量表現。結果顯示，SEMA6A-FL M415C 的二聚體比例顯著增加，而 SEMA6A-FL I322E 的二聚體比例則顯著減少，這證實了這些突變位點在 SEMA6A-FL 二聚化中的關鍵角色。更重要的是，肺癌細胞在過表達 SEMA6A-FL I322E 後，細胞的生長活性顯著高於 SEMA6A-FL，並且細胞凋亡的比例與內質網壓力皆顯著降低，這表明 SEMA6A-FL 透過二聚體啟動內源性細胞凋亡來抑制肺癌細胞的生長。另一方面，肺癌細胞在過表達 SEMA6A-FL M415C 後，細胞凋亡與 SEMA6A-FL 相比無顯著差異。基於這些發現，我們提出「蛋白質飽和」的假說，認為當 SEMA6A-FL 的二聚體比例達到特定臨界值後，其生物學效應不再隨比例的增加而增強，類似於酵素飽和的概念。最後，由於 SEMA6A-FL 會誘發內源性凋亡訊號，未來將進一步檢測 Cytochrome c 釋放到細胞質的程度，以及其他與粒線體傷害有關的原因，並運用 RNA 測序來闡明 SEMA6A-FL 在肺癌細胞中的具體功能機制。本研究不僅闡明了 SEMA6A-FL 二聚化在肺癌中的調控作用，也為未來探討 SEMA6A-FL 與腫瘤微環境的相互關係提供了新的視野，並為後續的分子調控機制研究提供了關鍵的實驗依據。

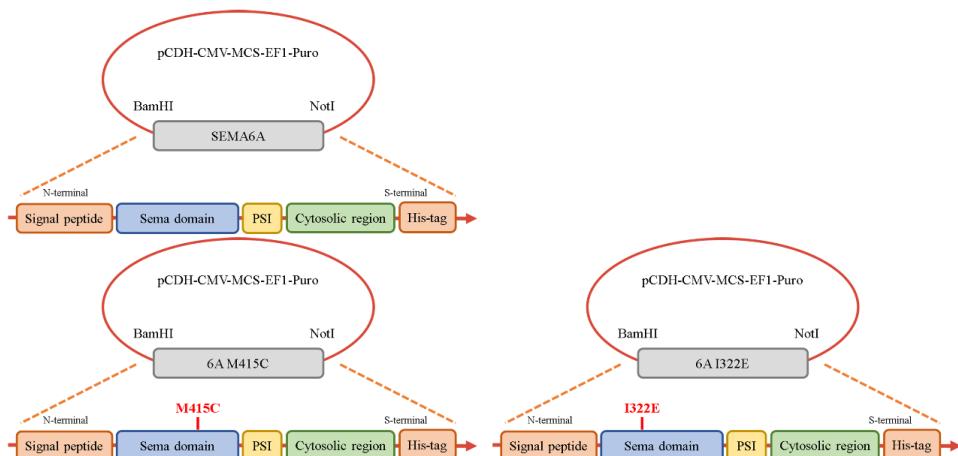
實驗結果圖



(A)



(B)



(C)

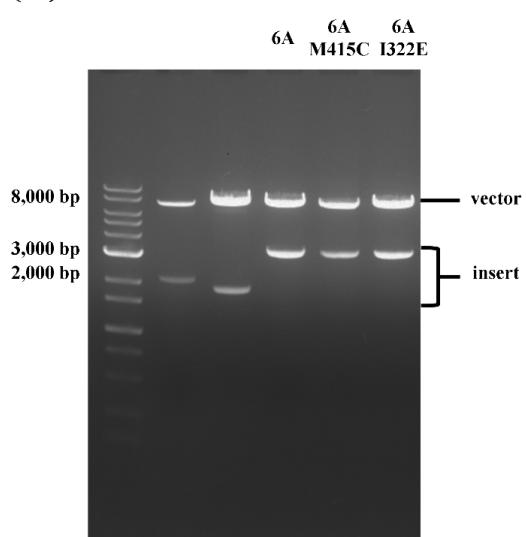


圖 1、SEMA6A-FL M415C 和 I322E 的構建示意圖及其慢病毒載體

(A) SEMA6A-FL 的 SEMA 域中有兩個關鍵點突變位點，分別為第 322 位(I322E)和第 415 位氨基酸(M415C)，這些位置可能與 SEMA6A-FL 的二聚化能力相關。
(B) 將 SEMA6A-FL 的野生型基因、SEMA6A-FL M415C 及 SEMA6A-FL I322E 紛點突變體分別克隆至 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 慢病毒表達載體中。 (C) 重組的 SEMA6A-FL 質體經 1% 瓊脂糖凝膠電泳分離。

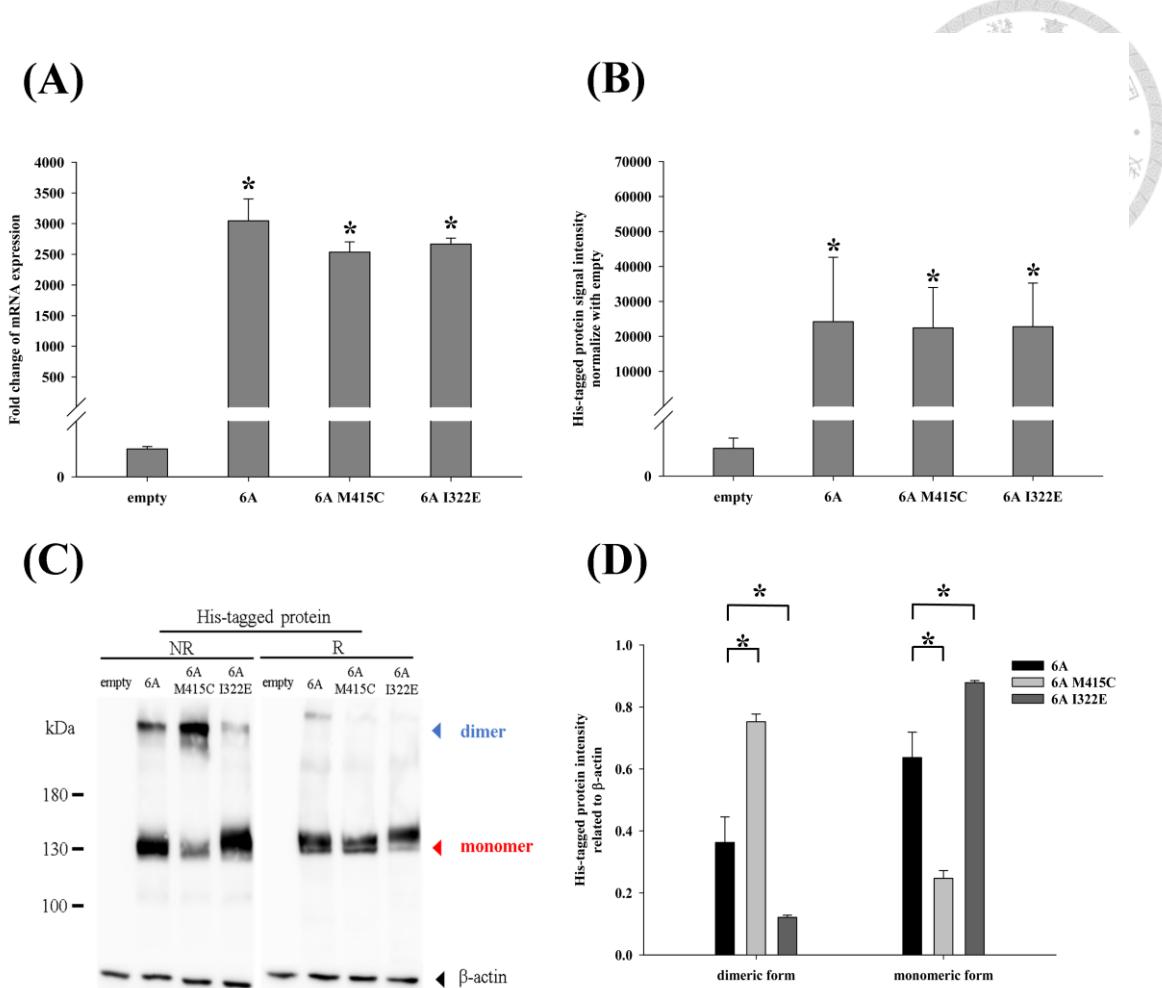


圖 2、SEMA6A-FL 及其點突變體在 H1299 細胞中的基因表現量評估

在 H1299 細胞中分別過表達空載體 (empty)、SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C 和 SEMA6A-FL I322E。 (A) 利用 qPCR 檢測 mRNA 的表現量，基因表現量對 18S 進行標準化 (N=3)。 (B) 利用 Western blot 檢測蛋白質的表現量，使用 ImageJ 軟體對還原性 SDS-PAGE (R) 中的蛋白質條帶進行量化分析，並將蛋白質表現量對 β -actin 進行標準化 (N=8)。 (C) 分別在非還原性 (non-reducing, NR) 和還原性 (reducing, R) 條件的 SDS-PAGE 分離蛋白質。 (D) 使用 ImageJ 軟體量化非還原性 SDS-PAGE (NR) 中的蛋白質條帶，並對 β -actin 進行標準化 (N=3)。長條圖中的數據以雙尾 Student's t 檢定進行統計分析，*表示 $p<0.05$ 。

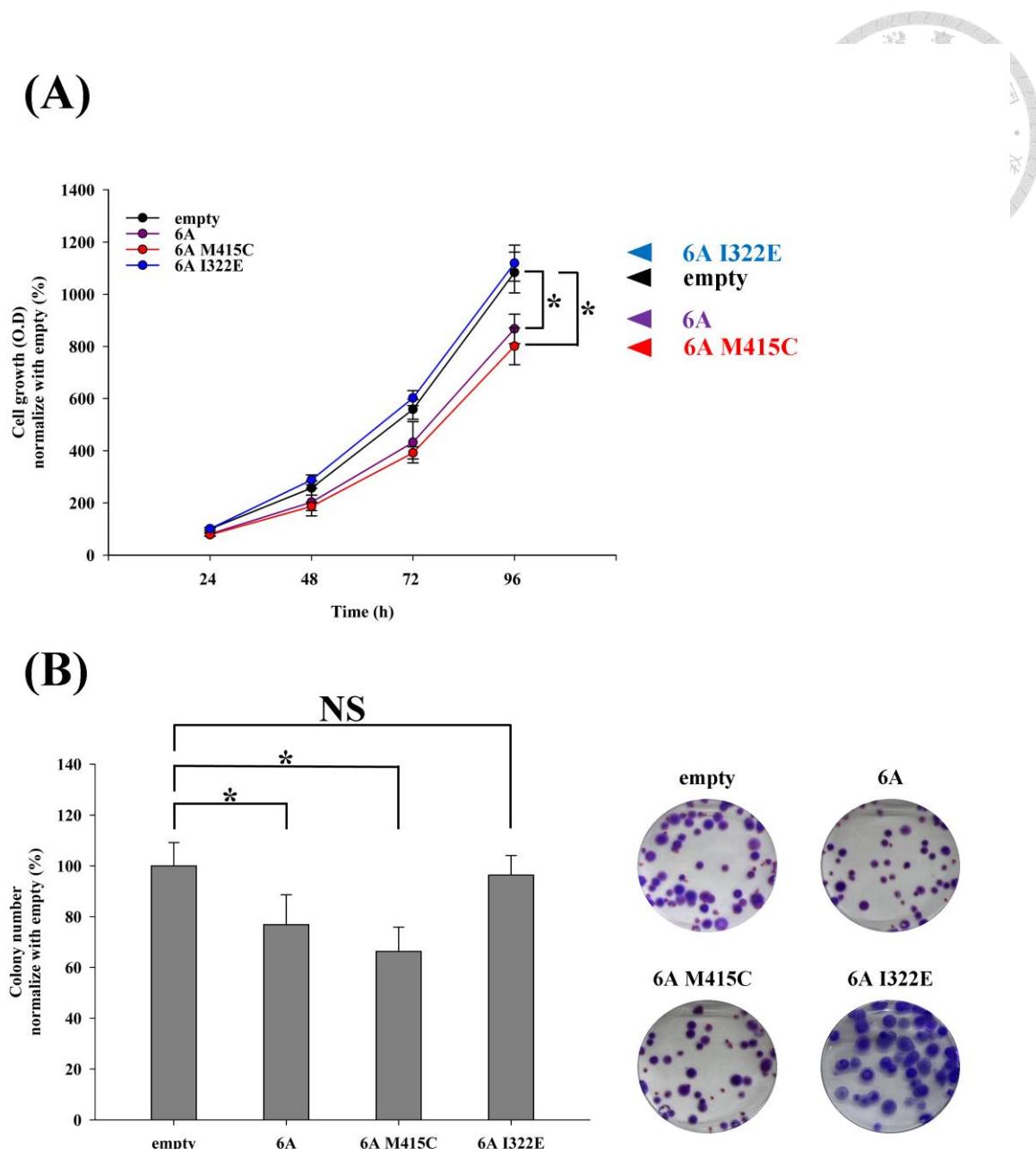
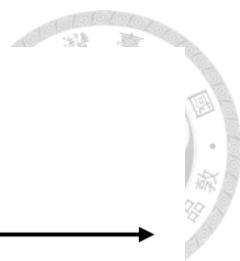


圖 3、H1299 細胞過表達 SEMA6A-FL 及其點突變體的生長表現分析

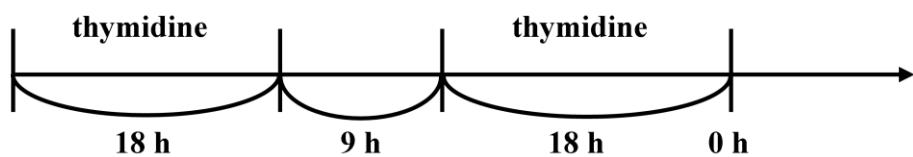
評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C 及 SEMA6A-FL I322E 後的細胞增殖。(A) 透過 MTT 方法在 24、48、72 和 96 小時的時間點檢測細胞活性，並將結果以折線圖呈現 ($N=7$)。(B) 克隆形成實驗則是 H1299 細胞在培養 14 天後，以 0.05% 結晶紫對細胞集落染色。染色後，計算細胞集落數量（細胞數 >50 定義為一個集落），並繪製成長條圖 ($N=3$)。所有實驗數據均以雙尾 Student's t 檢

定進行統計分析，長條圖和折線圖中的*表示 $p<0.05$ ，顯示組間具有顯著差異，NS 表示 $p>0.05$ 。





(A)



(B)

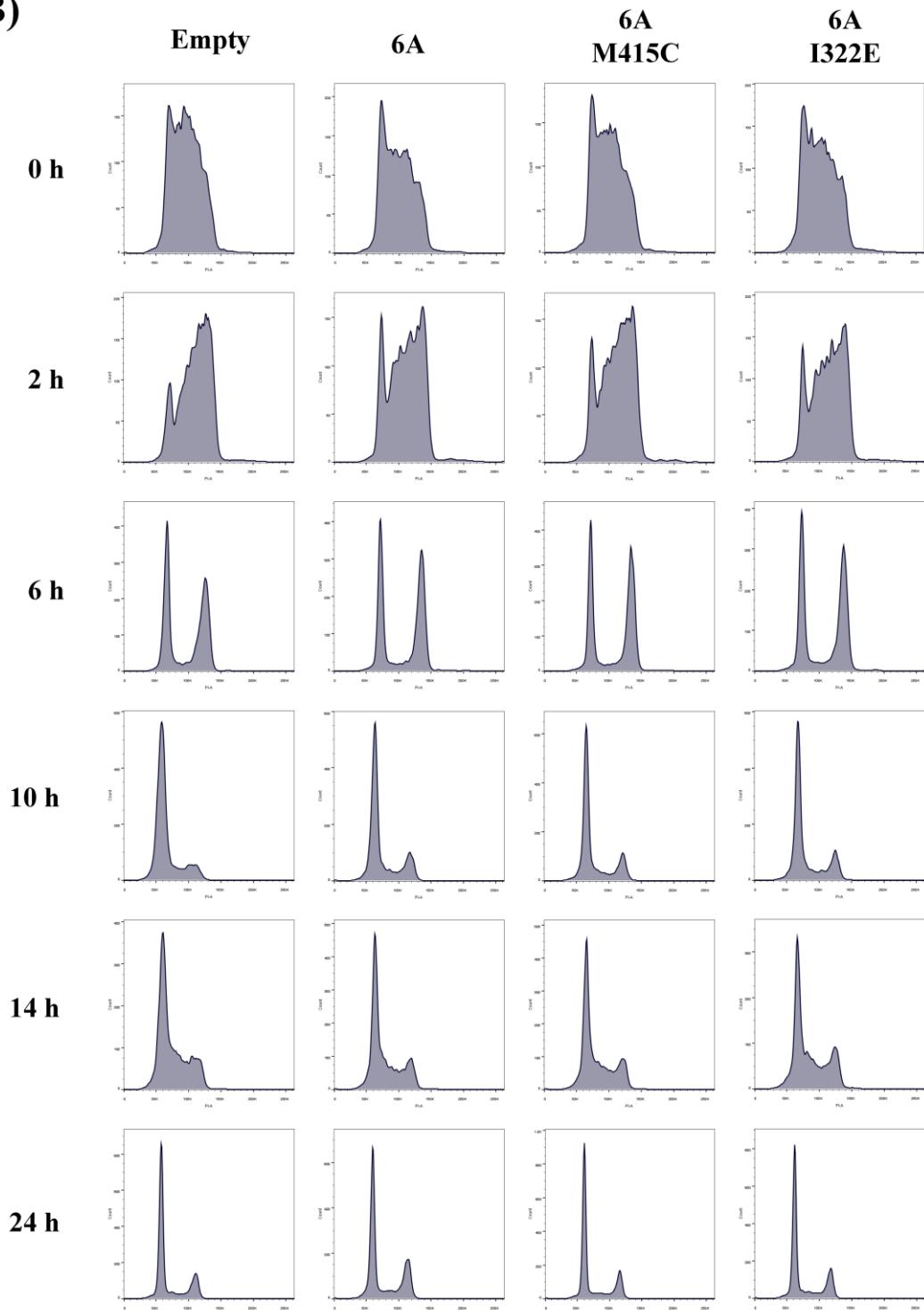


圖 4、H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其點突變體後的細胞週期進程

(A) 實驗的雙胸腺嘧啶阻斷設計時間軸包括兩次 18 小時的阻斷處理與一次 9 小時的細胞恢復過程，使細胞同步於 G1 期。(B) 在過表達不同外源基因 (empty、SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C 和 SEMA6A-FL I322E) 的肺癌細胞中，進行雙胸腺嘧啶阻斷處理後，於指定時間點 (0、2、6、10、14 和 24 小時) 收集細胞，使用 PI 染色進行 DNA 含量測定，並透過流式細胞儀分析各細胞群體在不同細胞週期階段的比例分佈。

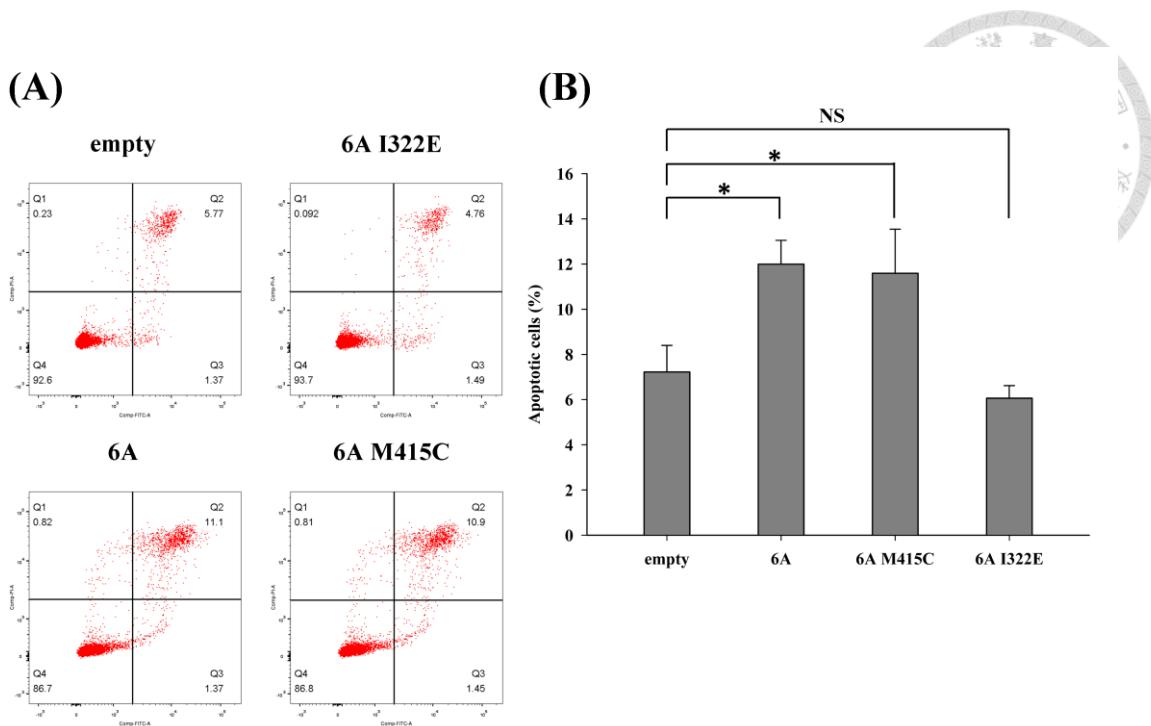
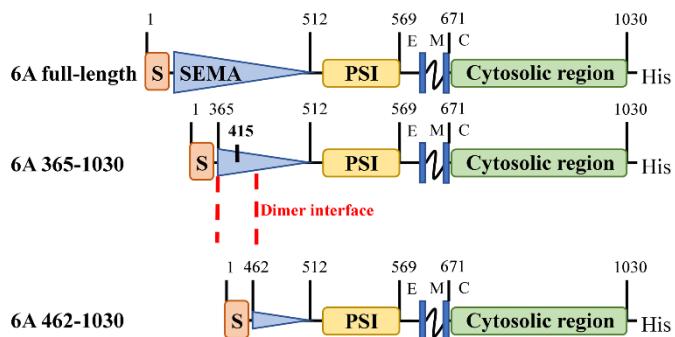


圖 5、評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其點突變體後的凋亡細胞比例

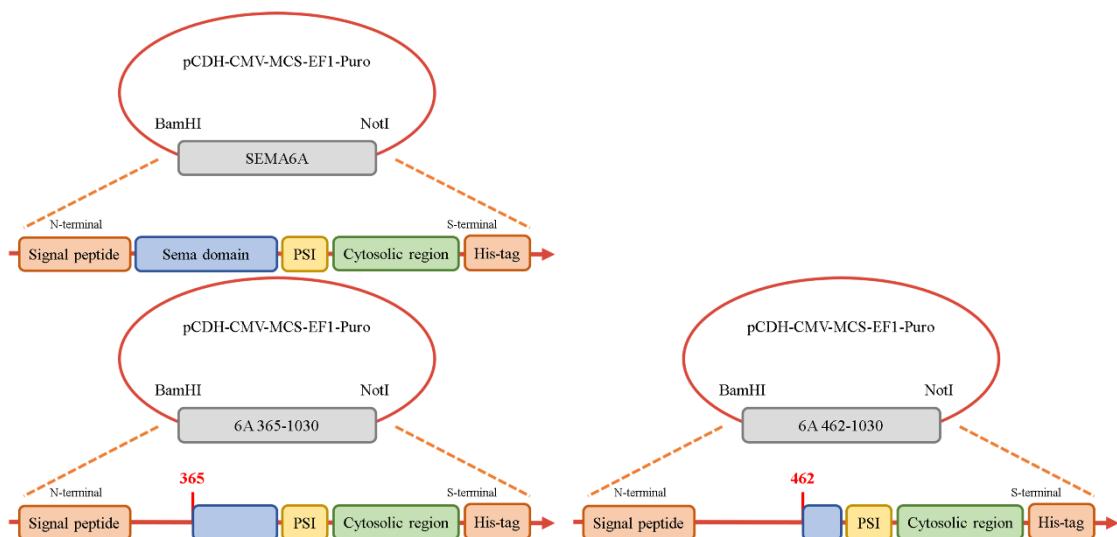
(A) 使用 PI/Annexin V 雙重染色法區分活細胞、早期凋亡細胞、晚期凋亡細胞和壞死細胞。透過流式細胞儀分析細胞群體，(B) 並計算凋亡細胞（早期和晚期凋亡的總和）比例，將其繪製成長條圖 ($N=3$)。所有實驗數據均以雙尾 Student's t 檢定進行統計分析，長條圖中的*表示 $p<0.05$ ，顯示組間具有顯著差異，NS 表示 $p>0.05$ 。



(A)



(B)



(C)

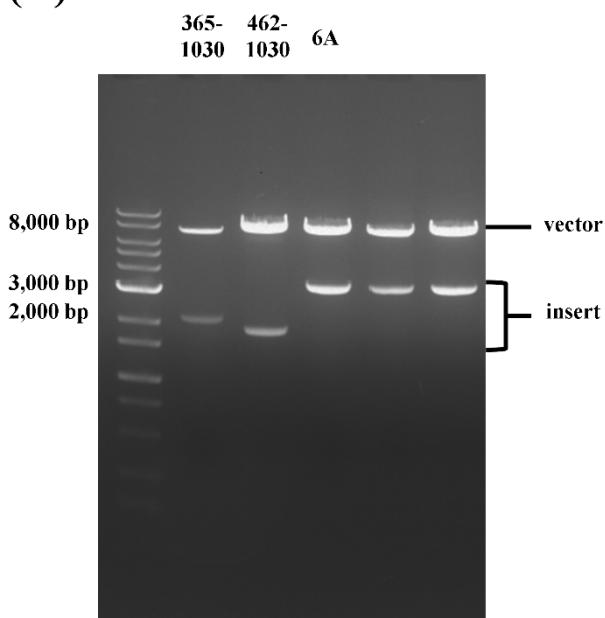




圖 6、兩種 SEMA6A 截短體的構建策略示意圖及其慢病毒載體

(A) 依據 SEMA6A_{SP} 的二聚體結構特徵，第 415 號胺基酸為兩個 SEMA6A 面對面形成二聚體的核心區域，並基於此設計兩個 SEMA6A 截短片段。SEMA6A 365-1030 保留第 415 號胺基酸，而 SEMA6A 462-1030 則不包含。(B) SEMA6A 365-1030 和 SEMA6A 462-1030 的基因片段分別克隆至 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 慢病毒表現載體中。(C) 透過 1% 琼脂糖凝膠電泳檢測兩個重組質體的構建情形。

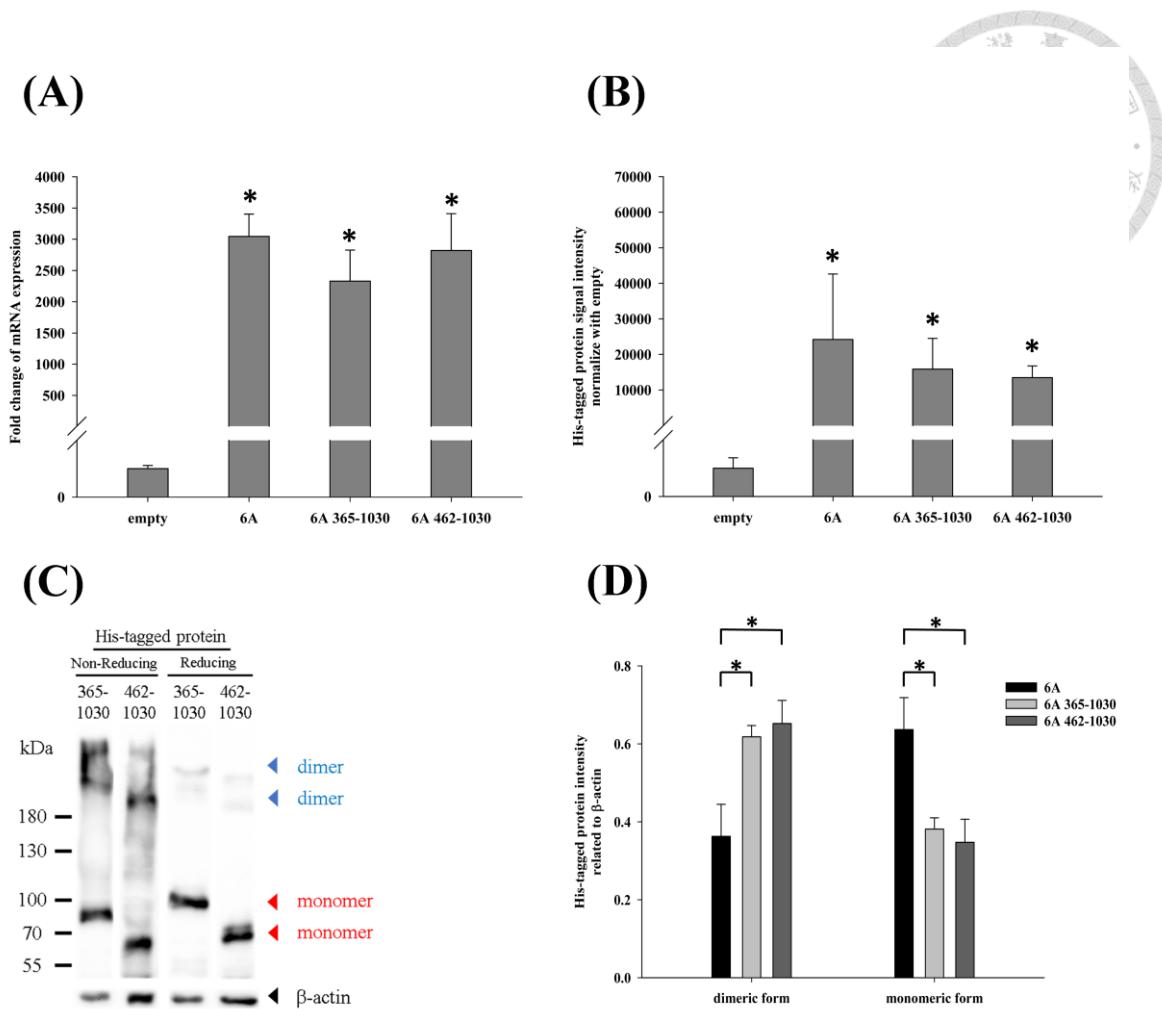


圖 7、SEMA6A 365-1030 及 462-1030 在 H1299 細胞中的基因表現量分析

H1299 細胞過表達空載體 (empty)、SEMA6A-FL、SEMA6A 365-1030 和 SEMA6A 462-1030 後，進行基因表現分析。(A) 使用 qPCR 檢測 mRNA 表現，數據以 18S 進行相對定量，並計算平均值與標準差 ($N=3$)。(B) 藉由 western blot 檢測蛋白質表現。在還原性 SDS-PAGE (R) 中，利用 ImageJ 對蛋白質條帶的強度進行量化，並以 β -actin 作為內部參照標準 ($N=8$) 繪製成長條圖。(C) 利用還原性和非還原性條件的 SDS-PAGE 確認 SEMA6A 截短變異體的四級結構。(D) 在非還原性 SDS-PAGE (NR) 中，使用 ImageJ 量化蛋白質條帶的相對強度，並以 β -actin 作為對照 ($N=3$) 繪製成長條圖。所有條形圖中的數據均以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 呈現，並使用雙尾 Student's t 檢定進行統計分析，* $p<0.05$ 表示具有顯著性差異。

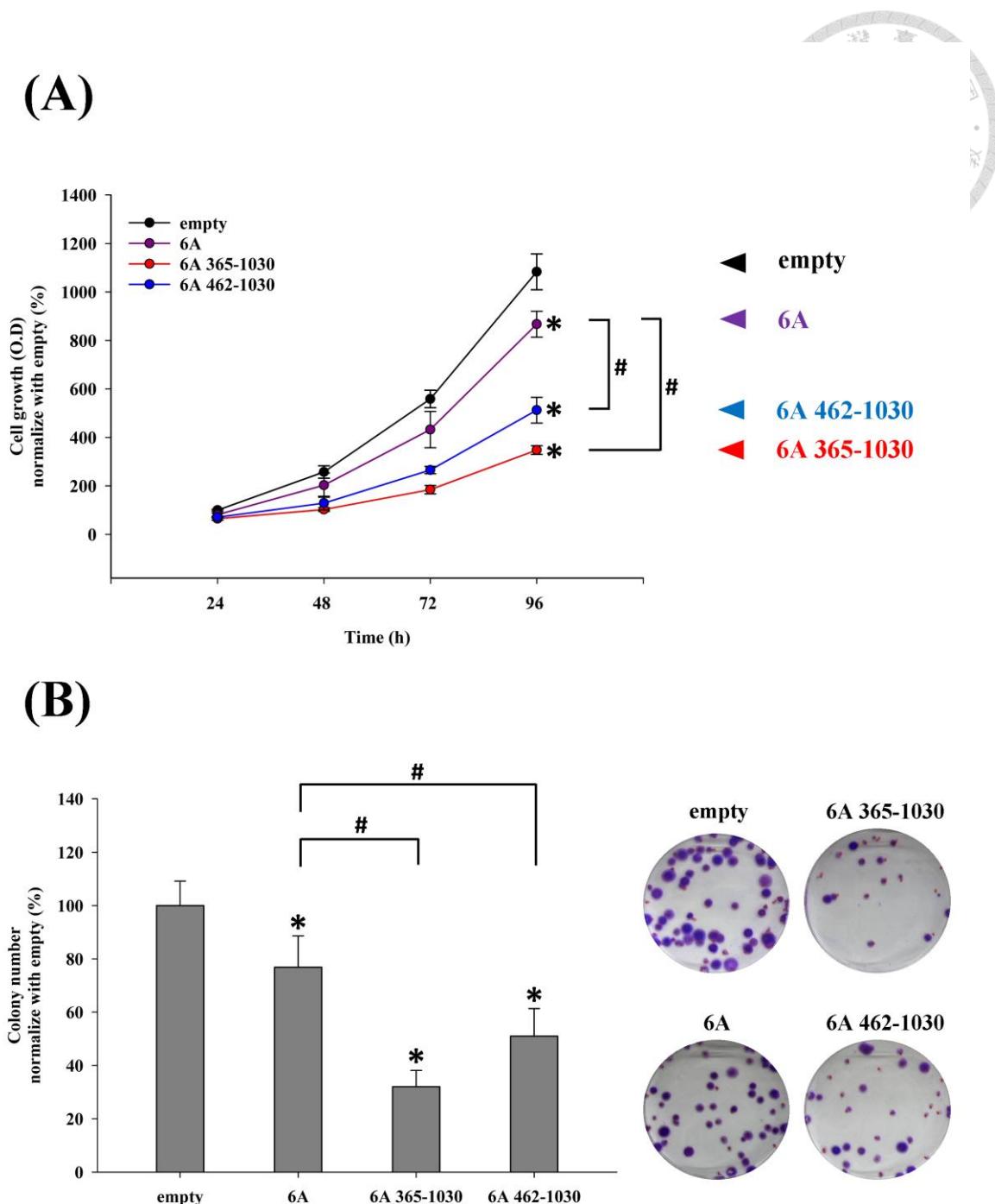
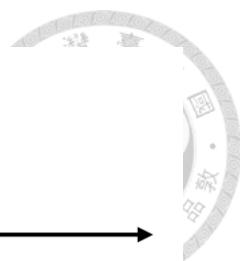


圖 8、H1299 細胞過表達 SEMA6A-FL 及其截短體後的細胞增殖能力分析

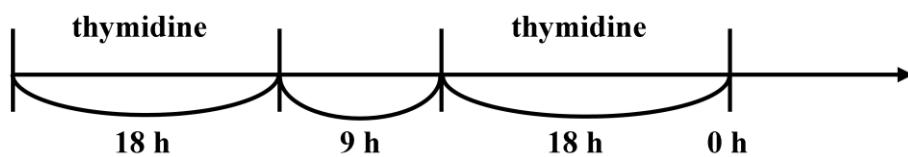
在 H1299 細胞中，過表達空載體（empty）、SEMA6A-FL、SEMA6A 365-1030 和 SEMA6A 462-1030，並評估細胞增殖的能力。（A）利用 MTT 分析法評估細胞活性，分別於 24、48、72 和 96 小時的時間點測量 OD₅₇₀ 值，並繪製細胞增殖的生長曲線（N=7）。（B）進行集落形成測試，將過表達外源基因的 H1299 細胞接種於

6 cm 培養皿中，經 14 天培養後，使用 0.05% 結晶紫進行染色，顯示形成的細胞集落，並計算形成的集落數量。數據以長條圖表示 ($N=3$)。所有統計分析均採用雙尾 Student's t 檢定，*和#代表 $p<0.05$ ，組內具有顯著性差異。





(A)



(B)

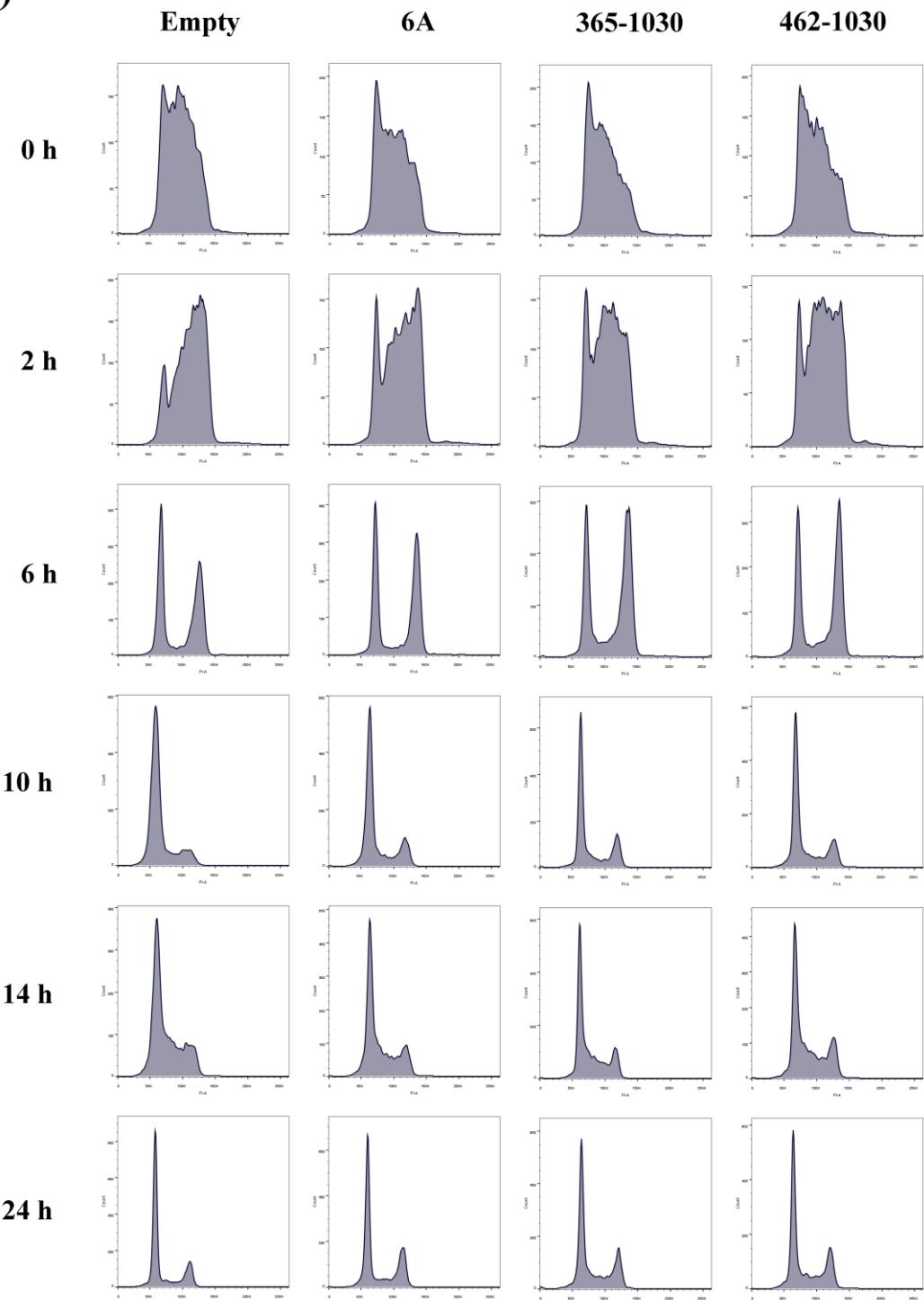


圖 9、評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其截短體後的細胞週期進程

(A) 雙胸腺嘧啶阻斷的實驗設計時間軸包括兩次各 18 小時的阻斷處理及一次 9 小時的細胞恢復階段，旨在同步細胞於 G1 期。(B) 在過表達不同外源基因(empty、SEMA6A-FL、SEMA6A 365-1030 和 SEMA6A 462-1030) 的肺癌細胞中，進行雙胸腺嘧啶阻斷後，分別於指定時間點 (0、2、6、10、14 和 24 小時) 收集細胞，進行 PI 染色以測定 DNA 含量，並透過流式細胞儀分析各組細胞在不同細胞週期階段的分佈比例。

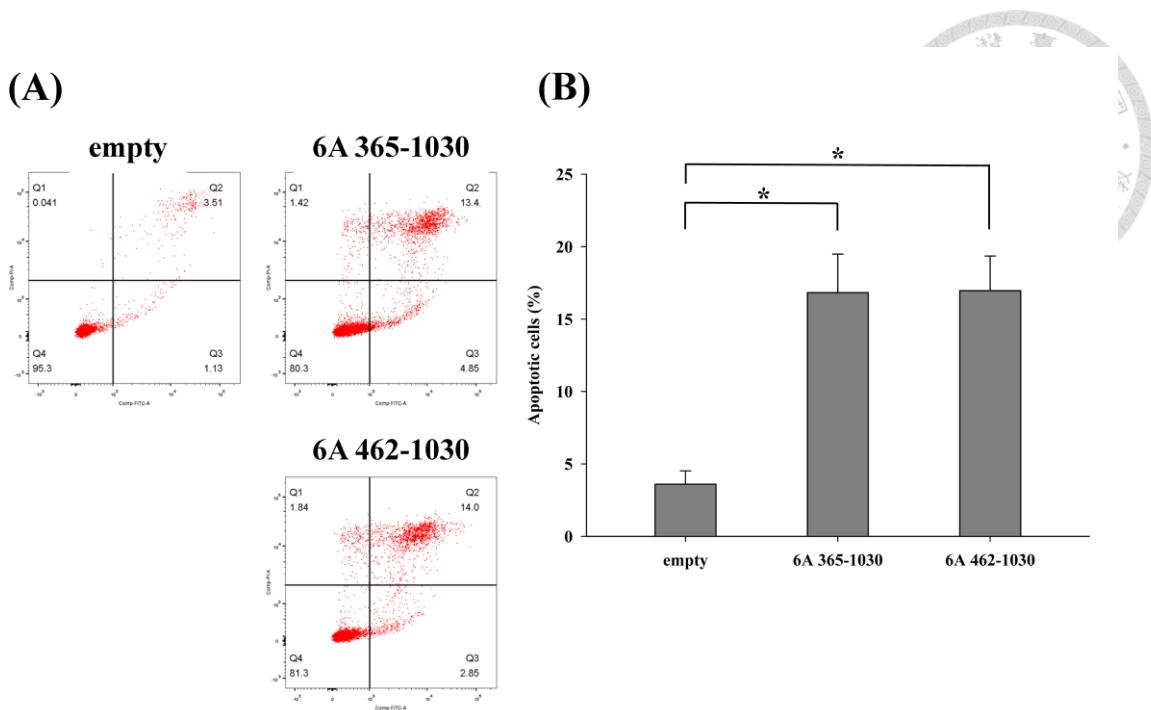
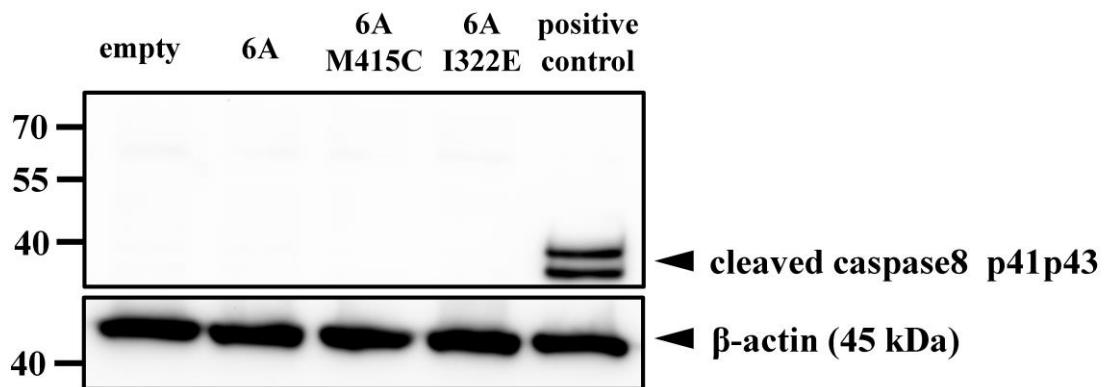


圖 10、評估 H1299 過表達 SEMA6A-FL 及其截短體後的細胞凋亡

(A) 透過 PI/Annexin V 雙重染色法，將活細胞、早期凋亡細胞、晚期凋亡細胞和壞死細胞進行區分，(B) 並計算早期與晚期凋亡細胞的比例。數據以 mean \pm SD 的長條圖表示 (N=3)，並使用雙尾 Student's t 檢定進行統計分析，*p<0.05 表示具有顯著性差異。



(A)



(B)

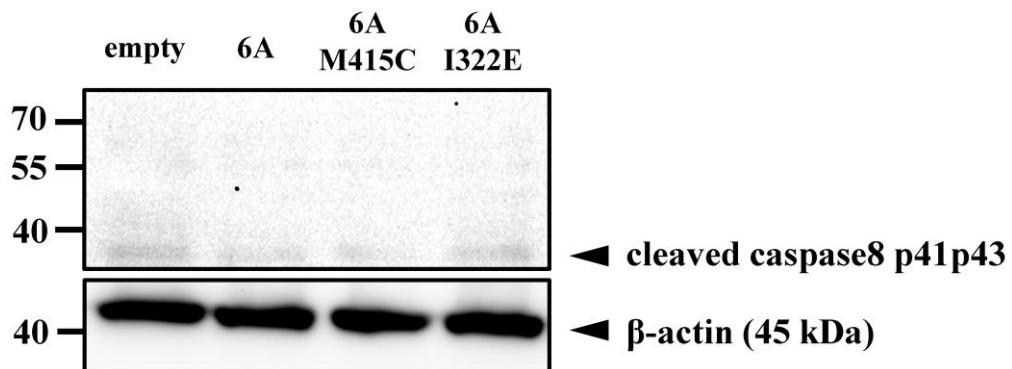
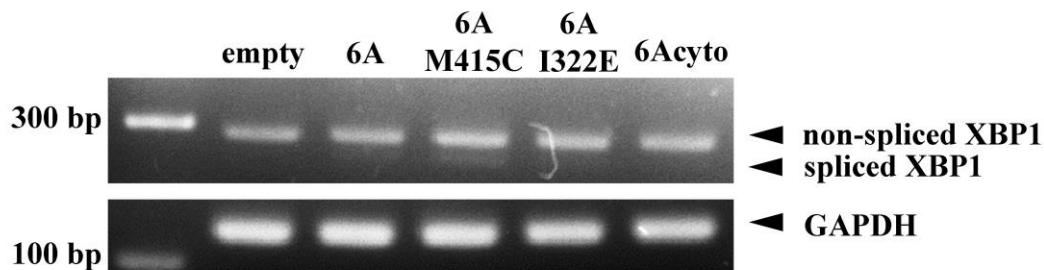


圖 11、分析 Caspase-8 蛋白質的表達

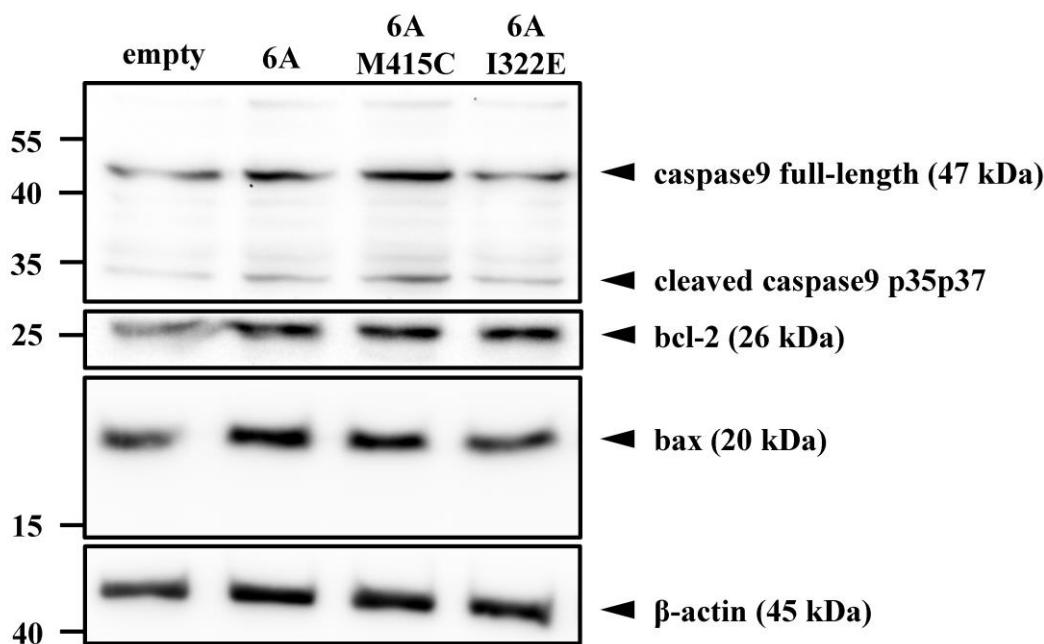
將外源基因（empty、SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C、SEMA6A-FL I322E 和 6Acryo）分別轉染至肺癌細胞中。（A）利用 Western blot 檢測各組細胞中 Caspase-8 蛋白質的裂解產物。（B）用白紙將 positive control 蓋住再次重新曝光，藉此提高其它組別的訊號程度。



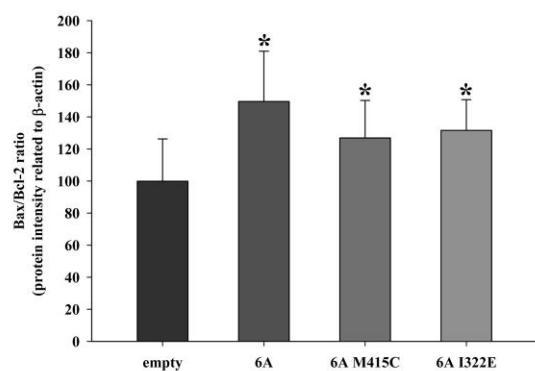
(A)



(B)



(C)



(D)

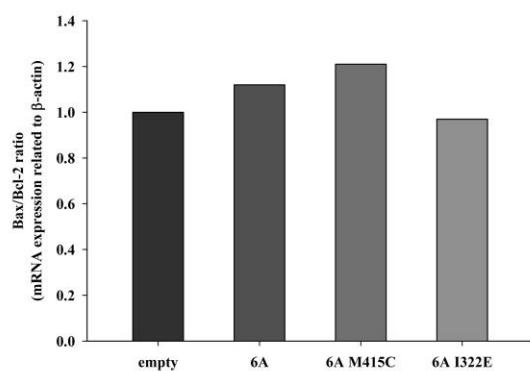


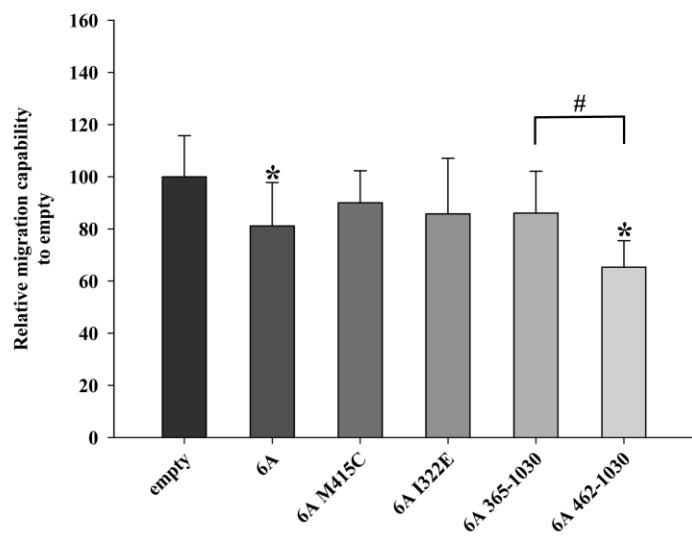


圖 12、分析內源性凋亡相關的蛋白質表達

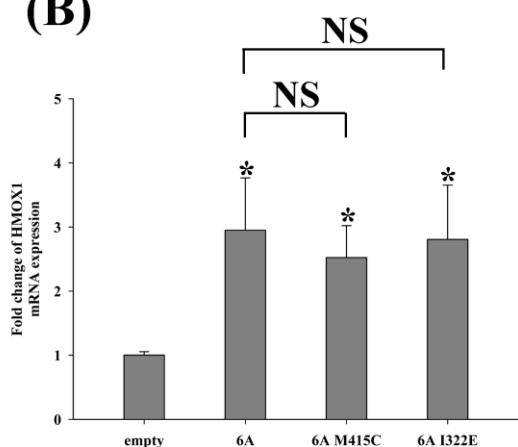
將外源基因 (empty、SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C 和 SEMA6A-FL I322E) 分別轉染至肺癌細胞中。(A) 藉由 RT-PCR 放大 XBP1 及 GAPDH 基因，並在 3% DNA 凝膠電泳中分離。(B) 利用 Western blot 檢測各組細胞中 Caspase-9 蛋白質的裂解產物，以及 Bax 和 Bcl-2 的蛋白質表達。(C) 根據 Bax 和 Bcl-2 的蛋白質表達量，評估 Bax/Bcl-2 比值，數據用 mean \pm SD 的長條圖呈現 (N=3)，並使用雙尾 Student's t 檢定進行統計分析。(D) 根據 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表達量，評估 Bax/Bcl-2 比值 (N=1)。



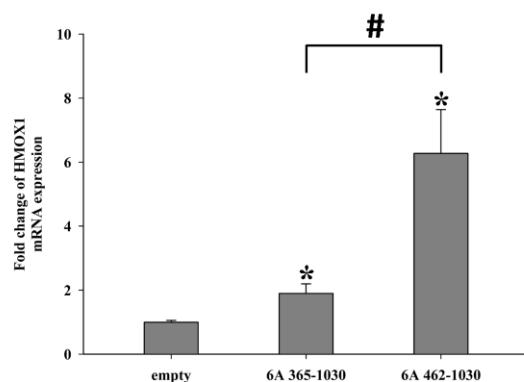
(A)



(B)



(C)



(D)

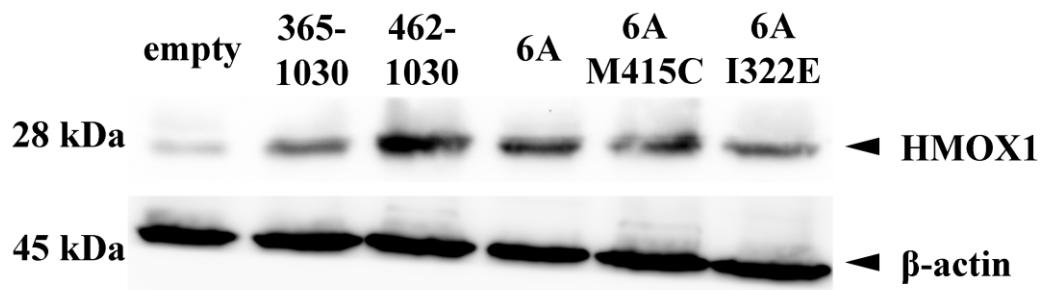


圖 13、分析過表達不同載體後 H1299 的遷移能力及 HMOX1 蛋白質表現

在 H1299 細胞中分別過表達空載體(empty)、SEMA6A-FL、SEMA6A-FL M415C、SEMA6A-FL I322E、SEMA6A 365-1030 和 SEMA6A 462-1030 後，(A)用 transwell 方法測試細胞遷移的能力。(B-C)利用 qPCR 檢測 HMOX1 的 mRNA 表現量。基因表現數據經 18S 標準化處理(N=3)。此外，(D)透過 Western blot 分析 HMOX1 的蛋白質表現量，並以 β -actin 作為內部參照。長條圖數據以雙尾 Student's t 檢定進行統計分析，*和[#]表示 $p<0.05$ 、NS 表示 $p>0.05$ 。

引子序列表



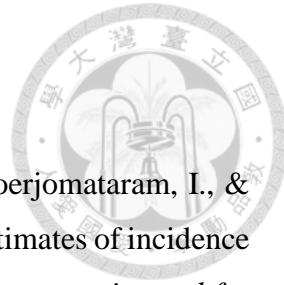
表 12、構建重組質體、qPCR，及 XBP1 splicing 所用的引子及其序列

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
6A 365-1030-F	AGGCCAGGTTGCTGTGCTG
6A 462-1030-F	GACAGCCTTCCTGGAGGAGA
His-tag-Not1-R	ATGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATG
BamH1-Kozak-F	CATGGATCCGCCACCATGAGGTCAGAACGCC
6A-FL M415C mut-F	GGTCCTGAGAACATGTGTCAGATAACCGCCT
6A-FL M415C mut-R	CCAAGGACTCTTGTACACAGTCTATGGCGGA
6A-FL I322E mut-F	CACCTTATAACAGCGAACCTGGGTCTGCAGT
6A-FL I322E mut-R	ACTGCAGACCCAGGTCGCTGTTATAAGGTG
365-1030 signal peptide-F	GGGCTGGTTCCCAGAAAGGCCAG
462-1030 signal peptide-F	GGGCTGGTTCCCAGAACAGACAGCC
Signal peptide-1-F	TGCTGGGCTGGTTCCCAGAA
Signal peptide-2-F	TTCACACTGCTACACTTGCTGGGCTGGT
Signal peptide-3-F	CTTGCTGCTATATTCACACTGCTAC
Signal peptide-4-F	ATGAGGTCAGAACGCCTGCTGCTATAT



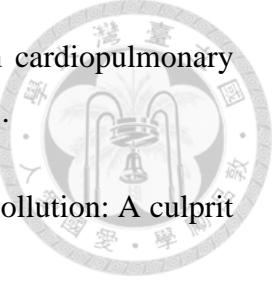
Sema domain qPCR-F	CTGGAGGAGATGAGTGTTCAC
Sema domain qPCR-R	GGTAGAGAACGCAACATACA
18S qPCR-F	TCAACTTCGATGGTAGTCGCCGT
18S qPCR-R	TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTCT
HMOX1 qPCR-F	ACCAAGTTCAAGCAGCTCTAC
HMOX1 qPCR-R	GCAGTCTTGGCCTCTCTATC
pCDH sequencing-F	CGGTAGGCGTGTACGGT
pCDH sequencing-R	CTTTCCCAGTTACCCCGC
pJET sequencing-F	CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC
pJET sequencing-R	AAGAACATCGATTCCATGGCAG
XBP1-F	TTACGAGAGAAAACTCATGGCC
XBP1-R	GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC
GAPDH-F	TCTCCTCTGACTCAACAGCGACA
GAPDH-R	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

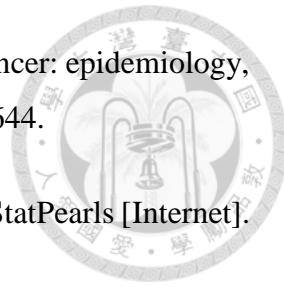
參考資料



1. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
2. Leiter, A., Veluswamy, R. R., & Wisnivesky, J. P. (2023). The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature reviews Clinical oncology*, 20(9), 624-639.
3. Liu, H. I., Chiang, C. J., Su, S. Y., Jhuang, J. R., Tsai, D. R., Yang, Y. W., ... & Lee, W. C. (2023). Incidence trends and spatial distributions of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in Taiwan. *Scientific reports*, 13(1), 1655.
4. Ministry of Health and Welfare. Analysis of Causes of Death in Taiwan, 2023. <https://www.mohw.gov.tw/cp-16-79055-1.html> (2023).
5. Centers for Disease Control and Prevention. What are the risk factors for lung cancer? CDC https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm (2022).
6. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889-902.
7. Öberg, M., Jaakkola, M. S., Woodward, A., Peruga, A., & Prüss-Ustün, A. (2011). Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *The Lancet*, 377(9760), 139-146.
8. Wang, X., Ricciuti, B., Nguyen, T., Li, X., Rabin, M. S., Awad, M. M., ... & Christiani, D. C. (2021). Association between smoking history and tumor mutation burden in advanced non–small cell lung cancer. *Cancer research*, 81(9), 2566-2573.
9. So, R., Andersen, Z. J., Chen, J., Stafoggia, M., de Hoogh, K., Katsouyanni, K., ... & Mehta, A. J. (2022). Long-term exposure to air pollution and mortality in a Danish

nationwide administrative cohort study: Beyond mortality from cardiopulmonary disease and lung cancer. *Environment International*, 164, 107241.

- 
10. Xue, Y., Wang, L., Zhang, Y., Zhao, Y., & Liu, Y. (2022). Air pollution: A culprit of lung cancer. *Journal of hazardous materials*, 434, 128937.
 11. Dement, J. M., Ringen, K., Hines, S., Cranford, K., & Quinn, P. (2020). Lung cancer mortality among construction workers: implications for early detection. *Occupational and environmental medicine*, 77(4), 207-213.
 12. Coté, M. L., Liu, M., Bonassi, S., Neri, M., Schwartz, A. G., Christiani, D. C., ... & Hung, R. J. (2012). Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *European journal of cancer*, 48(13), 1957-1968.
 13. McKay, J. D., Hung, R. J., Han, Y., Zong, X., Carreras-Torres, R., Christiani, D. C., ... & Amos, C. I. (2017). Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. *Nature Genetics*, 49(7), 1126-1132.
 14. Zhang, P., Chen, P. L., Li, Z. H., Zhang, A., Zhang, X. R., Zhang, Y. J., ... & Mao, C. (2022). Association of smoking and polygenic risk with the incidence of lung cancer: a prospective cohort study. *British journal of cancer*, 126(11), 1637-1646.
 15. Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., & Wistuba, I. I. (2016). Diagnosis and molecular classification of lung cancer. *Lung cancer: treatment and research*, 25-46.
 16. Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of thoracic oncology*, 10(9), 1240-1242.
 17. Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International journal of cancer*, 131(12), 2724-2732.



18. Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605-644.
19. Myers, D. J., & Wallen, J. M. (2023). Lung adenocarcinoma. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
20. Aros, C. J., Paul, M. K., Pantoja, C. J., Bisht, B., Meneses, L. K., Vijayaraj, P., ... & Gomperts, B. N. (2020). High-throughput drug screening identifies a potent Wnt inhibitor that promotes airway basal stem cell homeostasis. *Cell reports*, 30(7), 2055-2064.
21. Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605-644.
22. Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., & Wistuba, I. I. (2016). Diagnosis and molecular classification of lung cancer. *Lung cancer: treatment and research*, 25-46.
23. Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature reviews Disease primers*, 7(1), 3.
24. George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., ... & Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47-53.
25. Huang, R., Wei, Y., Hung, R. J., Liu, G., Su, L., Zhang, R., ... & Christiani, D. C. (2015). Associated links among smoking, chronic obstructive pulmonary disease, and small cell lung cancer: a pooled analysis in the International Lung Cancer Consortium. *EBioMedicine*, 2(11), 1677-1685.
26. Paz-Ares, L., Dvorkin, M., Chen, Y., Reinmuth, N., Hotta, K., Trukhin, D., ... & Wojtukiewicz, M. (2019). Durvalumab plus platinum–etoposide versus platinum–etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer

(CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The lancet*, 394(10212), 1929-1939.

- 
27. Wathon, N., Puluhulawa, L. E., Joni, I. M., Muchtaridi, M., Mohammed, A. F. A., Elamin, K. M., ... & Gozali, D. (2022). Monoclonal antibody as a targeting mediator for a nanoparticle targeted delivery system for lung cancer. *Drug delivery*, 29(1), 2959-2970.
 28. Zhu, X., Yu, Z., Feng, L., Deng, L., Fang, Z., Liu, Z., ... & Zheng, Y. (2021). Chitosan-based nanoparticle co-delivery of docetaxel and curcumin ameliorates anti-tumor chemoimmunotherapy in lung cancer. *Carbohydrate polymers*, 268, 118237.
 29. Li, Y., Yan, B., & He, S. (2023). Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 169, 115891.
 30. Kocher, F., Hilbe, W., Seeber, A., Pircher, A., Schmid, T., Greil, R., ... & Fiegl, M. (2015). Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung cancer*, 87(2), 193-200.
 31. Schneider, J. L., Lin, J. J., & Shaw, A. T. (2023). ALK-positive lung cancer: a moving target. *Nature Cancer*, 4(3), 330-343.
 32. Lei, J., Zhu, J., Hui, B., Jia, C., Yan, X., Jiang, T., & Wang, X. (2023). Circ-HSP90A expedites cell growth, stemness, and immune evasion in non-small cell lung cancer by regulating STAT3 signaling and PD-1/PD-L1 checkpoint. *Cancer immunology, Immunotherapy*, 72(1), 101-124.
 33. Mukherjee, T. K., Paul, K., & Mukhopadhyay, S. (2011). Cell signaling molecules as drug targets in lung cancer: An overview. *Current opinion in pulmonary medicine*, 17(4), 286-291.
 34. Le Chevalier, T. (2011). Non-small cell lung cancer: the challenges of the next decade. *Frontiers in Oncology*, 1, 29.

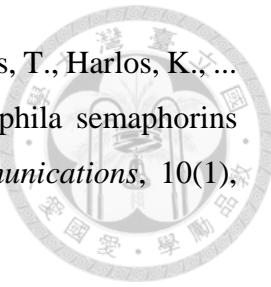
35. Chen, Y., Tang, W. Y., Tong, X., & Ji, H. (2019). Pathological transition is the mechanism for drug resistance in lung cancer. *Cancer communications*, 39, 1-13.
36. Shen, C. Y., Chang, Y. C., Chen, L. H., Lin, W. C., Lee, Y. H., Yeh, S. T., ... & Chuang, E. Y. (2018). The extracellular SEMA domain attenuates intracellular apoptotic signaling of semaphorin 6A in lung cancer cells. *Oncogenesis*, 7(12), 95.
37. Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B., & Bagnard, D. (2007). Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Axon growth and guidance*, 50-64.
38. Fard, D., & Tamagnone, L. (2021). Semaphorins in health and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 57, 55-63.
39. Hu, S., & Zhu, L. (2018). Semaphorins and their receptors: from axonal guidance to atherosclerosis. *Frontiers in physiology*, 9, 1236.
40. Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Makino, N., Takamatsu, H., ... & Kikutani, H. (2008). Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Developmental biology*, 321(1), 251-262.
41. Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., & Negishi, M. (2004). The Semaphorin 4D receptor, Plexin-B1, is a GTPase-activating protein for R-Ras. *Science*, 305(5685), 862-865.
42. Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Yabuki, M., Harada, K., ... & Kikutani, H. (2004). Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling. *Nature cell biology*, 6(12), 1204-1211.
43. Tanaka, T., Ekimoto, T., Nagatomo, M., Neyazaki, M., Shimoji, E., Yamane, T., ... & Nogi, T. (2022). Hybrid in vitro/in silico analysis of low-affinity protein–protein interactions that regulate signal transduction by Sema6D. *Protein science*, 31(11), e4452.



44. Hatanaka, Y., Kawasaki, T., Abe, T., Shioi, G., Kohno, T., Hattori, M., ... & Hirata, T. (2019). Semaphorin 6A–Plexin A2/A4 Interactions with Radial Glia Regulate Migration Termination of Superficial Layer Cortical Neurons. *IScience*, 21, 359-374.
45. Loria, R., Laquintana, V., Scalera, S., Fraioli, R., Caprara, V., Falcone, I., ... & Bon, G. (2022). SEMA6A/RhoA/YAP axis mediates tumor-stroma interactions and prevents response to dual BRAF/MEK inhibition in BRAF-mutant melanoma. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 41(1), 148.
46. Song, Z. B., Yu, Y., Zhang, G. P., & Li, S. Q. (2021). Genomic instability of mutation-derived gene prognostic signatures for hepatocellular carcinoma. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 728574.
47. Tian, R., Hu, J., Ma, X., Liang, L., & Guo, S. (2021). Immune-related gene signature predicts overall survival of gastric cancer patients with varying microsatellite instability status. *Aging (Albany, NY)*, 13(2), 2418.
48. Lim, H. S., Kim, C. S., Kim, J. S., Yu, S. K., Go, D. S., Lee, S. A., ... & DO KYUNG, K. I. M. (2017). Suppression of oral carcinoma oncogenic activity by microRNA-203 via down-regulation of SEMA6A. *Anticancer research*, 37(10), 5425-5433.
49. Chen, L. H., Liao, C. Y., Lai, L. C., Tsai, M. H., & Chuang, E. Y. (2019). Semaphorin 6A attenuates the migration capability of lung cancer cells via the NRF2/HMOX1 axis. *Scientific reports*, 9(1), 13302.
50. Zhao, J., Tang, H., Zhao, H., Che, W., Zhang, L., & Liang, P. (2015). SEMA6A is a prognostic biomarker in glioblastoma. *Tumor biology*, 36, 8333-8340.
51. Hasan, A. N., Ahmad, M. W., Madar, I. H., Grace, B. L., & Hasan, T. N. (2015). An in silico analytical study of lung cancer and smokers datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) for the prediction of differentially expressed genes. *Bioinformation*, 11(5), 229.

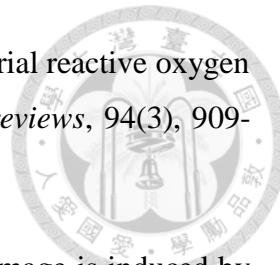


52. Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., ... & Takagi, J. (2010). Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature*, 467(7319), 1123-1127.
53. Lossi, L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical journal*, 479(3), 357-384.
54. Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, 112(6), 957-962.
55. Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
56. Nair, P., Lu, M., Petersen, S., & Ashkenazi, A. (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods in Enzymology* (Vol. 544, pp. 99-128). Academic Press.
57. Lossi, L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical journal*, 479(3), 357-384.
58. Blatt, N. B., & Glick, G. D. (2001). Signaling pathways and effector mechanisms are pre-programmed cell death. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(6), 1371-1384.
59. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
60. Pihán, P., Carreras-Sureda, A., & Hetz, C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell death & differentiation*, 24(9), 1478-1487.
61. Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.
62. <https://www.rockland.com/resources/apoptosis-pathway-antibodies/>



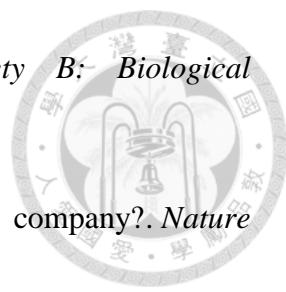
63. Rozbesky, D., Robinson, R. A., Jain, V., Renner, M., Malinauskas, T., Harlos, K., ... & Jones, E. Y. (2019). Diversity of oligomerization in *Drosophila* semaphorins suggests a mechanism of functional fine-tuning. *Nature communications*, 10(1), 3691.
64. Janssen, B. J., Robinson, R. A., Pérez-Brangulí, F., Bell, C. H., Mitchell, K. J., Siebold, C., & Jones, E. Y. (2010). Structural basis of semaphorin–plexin signalling. *Nature*, 467(7319), 1118-1122.
65. Shen, C. Y. (2017). 研究肺癌細胞內信息傳導之調控：1. 磷酸化 Akt 於 Mitomycin C 引起之不良反應所扮演的角色；2. Semaphorin 6A 於細胞凋亡之自我調控 [doctoral dissertation, National Taiwan University]. Airiti Library. <https://doi.org/10.6342/NTU201700179>
66. Harlow, E. D., & Lane, D. (1988). A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 579, 44.
67. Mohan, P. K., Barve, M., Chatterjee, A., & Hosur, R. V. (2006). pH-driven conformational dynamics and dimer-to-monomer transition in DLC8. *Protein science*, 15(2), 335-342.
68. Sato, S. B., Sugiura, M., & Kurihara, T. (2018). Dimer-monomer equilibrium of human HSP27 is influenced by the in-cell macromolecular crowding environment and is controlled by fatty acids and heat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and proteomics*, 1866(5-6), 692-701.
69. Paschen, W., & Mengesdorf, T. (2005). Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell calcium*, 38(3-4), 409-415.
70. Tao, X., Zhao, C., & MacKinnon, R. (2023). Membrane protein isolation and structure determination in cell-derived membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(18), e2302325120.

71. Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol, and problems. *Biotechniques*, 75(3), 99-114.
72. Read, A., & Schröder, M. (2021). The unfolded protein response: an overview. *Biology*, 10(5), 384.
73. Huang, W., Gong, Y., & Yan, L. (2023). ER stress, the unfolded protein response and osteoclastogenesis: a review. *Biomolecules*, 13(7), 1050.
74. Jeon, J. H., Im, S., Kim, H. S., Lee, D., Jeong, K., Ku, J. M., & Nam, T. G. (2022). Chemical chaperones to inhibit endoplasmic reticulum stress: implications in diseases. *Drug design, development and therapy*, 4385-4397.
75. Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., & Xia, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 352.
76. Ren, J., Bi, Y., Sowers, J. R., Hetz, C., & Zhang, Y. (2021). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nature Reviews Cardiology*, 18(7), 499-521.
77. Flessa, C. M., Kyrou, I., Nasiri-Ansari, N., Kaltsas, G., Kassi, E., & Randeva, H. S. (2022). Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic (metabolic-associated) fatty liver disease (NAFLD/MAFLD). *Journal of cellular biochemistry*, 123(10), 1585-1606.
78. Prasad, V., & Greber, U. F. (2021). The endoplasmic reticulum unfolded protein response–homeostasis, cell death, and evolution in virus infections. *FEMS microbiology reviews*, 45(5), fuab016.
79. Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J. L., & Mignotte, B. (2011). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Advances in mitochondrial medicine*, 157-183.



80. Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.
81. Kowaltowski, A. J., & Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage is induced by conditions of oxidative stress. *Free radical biology and medicine*, 26(3-4), 463-471.
82. Kim, H. R., Lee, G. H., Yi Cho, E., Chae, S. W., Ahn, T., & Chae, H. J. (2009). Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *Journal of Cell Science*, 122(8), 1126-1133.
83. Guo, C., Sun, L., Chen, X., & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage, and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 8(21), 2003-2014.
84. Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., & Chakraborti, S. (1999). Oxidant, mitochondria, and calcium: an overview. *Cellular signalling*, 11(2), 77-85.
85. Meriin, A. B., & Sherman, M. Y. (2005). Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders. *International journal of hyperthermia*, 21(5), 403-419.
86. Belenichev, I. F., Kolesnik, Y. M., Pavlov, S. V., Sokolik, E. P., & Bukhtiyarova, N. V. (2011). Disturbance of HSP70 chaperone activity is a possible mechanism of mitochondrial dysfunction. *Neurochemical journal*, 5(4), 251-256.
87. Michiels, C., Minet, E., Mottet, D., & Raes, M. (2002). Regulation of gene expression by oxygen: NF- κ B and HIF-1, two extremes. *Free radical biology and medicine*, 33(9), 1231-1242.
88. Wu, G., Li, F., Tang, B., & Zhang, X. (2022). Molecular engineering of noncovalent dimerization. *Journal of the American Chemical Society*, 144(33), 14962-14975.
89. Garton, M., MacKinnon, S. S., Malevanets, A., & Wodak, S. J. (2018). Interplay of self-association and conformational flexibility in regulating protein

function. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences*, 373(1749), 20170190.

- 
90. Kritikou, E. (2007). A universal or cargo-selective transport company?. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(2), 97-97.
 91. Buchler, N. E., Gerland, U., & Hwa, T. (2005). Nonlinear protein degradation and the function of genetic circuits. *Proceedings of the national academy of sciences*, 102(27), 9559-9564.
 92. Sergeev, Y. V., Dolinska, M. B., & Wingfield, P. T. (2014). Thermodynamic analysis of weak protein interactions using sedimentation equilibrium. *Current protocols in protein science*, 77(1), 20-13.
 93. Lazaridis, T., & Karplus, M. (2002). Thermodynamics of protein folding: a microscopic view. *Biophysical chemistry*, 100(1-3), 367-395.
 94. Figueroa, D., Asaduzzaman, M., & Young, F. (2018). Real-time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2', 7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFDA) assay. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 94, 26-33.