

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

光動力療法調控之微型RNA於口腔癌及癌前病變之致病分子機轉
研究及臨床應用評估

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2314-B-040-013-
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學牙醫學系（所）

計畫主持人：余權航
共同主持人：余承佳、黃裕峰

中華民國 105 年 10 月 31 日

中文摘要：光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)為被視為治療口腔癌前病變及口腔癌中的另一種替代治療方法，因為光動力治療是非侵入性的，可反覆治療，沒有累積的副作用，其治療結果形成的結疤小。近年來發現，微型RNA (microRNAs, miRNAs)為重要癌症標記，可與其標的基因結合而降解其表現，具有促癌基因或抑癌基因的功能。本計畫初步研究結果發現利用微型RNA microarray及miRNA real-time RT-PCR分析發現光動力治療會提昇口腔癌細胞miR-200b、miR-93表現量及降低miR-203、miR-326表現量。而雙螢光素酶檢測顯示，miR-200b能特異性地與ZEB1 mRNA的3'-UTR結合，抑制其螢光素酶活性，同時光動力治療可降低口腔癌細胞ZEB1表現量。本轉譯研究計劃結合基礎及臨床研究期待驗證微型RNA例如miR-200b可作為口腔癌施行光動力療效之生物標誌，有助於個人化醫療發展。

中文關鍵詞：光動力療法

英文摘要：Photodynamic therapy (PDT) is another effective treatment option for human premalignant and malignant lesions because it is non-invasive, is well tolerated by patients, can be used repeatedly without cumulative side effects, and results in little scar formation. MicroRNAs (miRNAs)—highly conserved small RNA molecules that regulate gene expression—can act as cancer signatures, and as oncogenes or tumor suppressors depending on its main target genes. In our preliminary results, miRNAs microarray and miRNAs real-time RT-PCR analysis have demonstrated PDT treatment resulted in an increase in the levels of various miRNA including miR-200b and miR-93. PDT treatment also down-regulated miR-203 and miR-326 expression. Luciferase reporter assays showed that miR-200b decreased the luciferase activity of reporter plasmids containing full-length ZEB1 3' UTR and this phenomenon was not observed when the targeting site was mutated, confirming ZEB1 as the target of miR-200b in oral cancer cells. Accordingly, the protein level of ZEB1 was decreased in the miR-200b-overexpressing oral cancer cells. The translational study is to investigate that the therapeutic effect of PDT-regulated miRNAs for oral precancerous and cancerous lesions treatment.

英文關鍵詞：photodynamic therapy

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

計畫名稱：光動力療法調控之微型 RNA 於口腔癌及癌前病變之致病
分子機轉研究及臨床應用評估

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2314-B-040-013

執行期間：104 年 8 月 1 日至 105 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學牙醫系(所)

計畫主持人：余權航

共同主持人：余承佳

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，____（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 105 年 10 月 31 日

計畫中文摘要

光動力治療(Photodynamic therapy, PDT)為被視為治療口腔癌前病變及口腔癌中的另一種替代治療方法，因為光動力治療是非侵入性的，可反覆治療，沒有累積的副作用，其治療結果形成的結疤小。近年來發現，微型RNA (microRNAs, miRNAs)為重要癌症標記，可與其標的基因結合而降解其表現，具有促癌基因或抑癌基因的功能。本計畫初步研究結果發現利用微型RNA microarray及miRNA real-time RT-PCR分析發現光動力治療會提昇口腔癌細胞miR-200b、miR-93表現量及降低miR-203、miR-326表現量。而雙螢光素酶檢測顯示，miR-200b能特異性地與ZEB1 mRNA的3'-UTR結合，抑制其螢光素酶活性，同時光動力治療可降低口腔癌細胞ZEB1表現量。本轉譯研究計劃結合基礎及臨床研究期待驗證微型RNA例如miR-200b可作為口腔癌施行光動力療效之生物標誌，有助於個人化醫療發展。

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is another effective treatment option for human premalignant and malignant lesions because it is non-invasive, is well tolerated by patients, can be used repeatedly without cumulative side effects, and results in little scar formation. MicroRNAs (miRNAs)—highly conserved small RNA molecules that regulate gene expression—can act as cancer signatures, and as oncogenes or tumor suppressors depending on its main target genes. In our preliminary results, miRNAs microarray and miRNAs real-time RT-PCR analysis have demonstrated PDT treatment resulted in an increase in the levels of various miRNA including miR-200b and miR-93. PDT treatment also down-regulated miR-203 and miR-326 expression. Luciferase reporter assays showed that miR-200b decreased the luciferase activity of reporter plasmids containing full-length ZEB1 3'UTR and this phenomenon was not observed when the targeting site was mutated, confirming ZEB1 as the target of miR-200b in oral cancer cells. Accordingly, the protein level of ZEB1 was decreased in the miR-200b-overexpressing oral cancer cells. The translational study is to investigate that the therapeutic effect of PDT-regulated miRNAs for oral precancerous and cancerous lesions treatment.

研究計畫之背景及目的

1. 口腔癌及口腔黏膜下纖維化症

口腔癌為發生在口腔部位之惡性腫瘤之總稱，根據美國國家癌症研究院 (National Cancer Institute, NCI) 定義口腔癌的範圍包括：嘴唇、舌前三分之二、口底部、牙齦、頰黏膜、白齒後三角區以及硬腭。口腔癌 (oral cancer) 係指口腔部位細胞發生異常的分裂成長，侵犯到周圍正常的組織，甚至轉移到身體其他部位而影響個體正常功能，進而危及病患生命。依組織學區分包括：鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma)、疣狀癌 (verrucous carcinoma)、腺樣囊狀癌 (adenoid cystic carcinoma)、黏液表皮樣癌 (mucoepidermoid carcinoma)；其中口腔鱗狀上皮細胞癌所佔的比例超過 90%。全球癌症盛行率調查，口腔癌位居排行第六位，好發年齡層於 50 歲以上，口腔癌發生率男女性比例約 2.8:1 (Warnkulasuriya, 2009)。世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 統計，全球約有 26 萬口腔癌新增病例，約 128 萬人死於口腔癌 (1)。根據衛福部國民健康署統計，在 2010 年台灣有 2370 人罹患口腔癌而死亡，其中有 2198 人為男性。口腔癌為全人口癌症死因第五位；同時為男性惡性腫瘤死因第四位，且發生率和死亡率有逐年升高的趨勢。近十年來，台灣地區的癌症死亡年齡雖然有後延的趨勢，然而目前口腔癌患者平均死亡年齡中位數為 57 歲，較其他癌症早 10 年，口腔癌標準化死亡率也比十年前成長了 18.2% (國民健康署, 2011)。口腔癌的發生是漸進的，及早發現有惡性潛能的癌前病變或癌前狀態，可做較簡單、保護的處理與治療，而越晚期發現的口腔癌其治療預後及存活的机会也較差，由此可知口腔癌

預防篩檢之重要性。由過去國內相關醫療機構調查之患者資料顯示，在所有被發現罹患口腔癌接受手術治療的患者中，約有一半是屬於第三、四期。資料顯示第三、四期患者的5年存活率可分別低至約30%及15%上下，反觀第一、二期患者的治療預後5年存活率可高達70%以上。1985年國際癌症研究中心（International Agency for Research on Cancer, IARC）綜合各國研究結果，認定「嚼食含菸草的檳榔」或「同時有吸菸與檳榔習慣」對人類有致癌性，致癌部位主要在口腔、咽部以及食道(2)。2004年IARC綜合各國研究實證，發表專論中宣布檳榔子是第一類致癌物(3)。在國內研究發現有吸菸、喝酒、嚼檳榔三種習慣者，其罹患口腔癌之危險性較沒有此三種習慣者高123倍；若單獨來看，吸菸、喝酒、嚼檳榔之致癌危險分別為18倍、10倍、28倍(4)，亦顯示檳榔是導致口腔癌重要的危險因子。而另一種因嚼食檳榔所導致之疾病為口腔黏膜下纖維化症（oral submucous fibrosis, OSF），OSF是一種產生疤痕性纖維組織的慢性口腔疾病。組織病理學上可以看到兩大主要特徵，萎縮的上皮，與過度增生且堆積在上皮下方的固有層、黏膜下層、甚至肌肉層的膠原蛋白(5)。口腔黏膜下纖維化症(Oral submucous fibrosis, 簡稱OSF)被視為是一種口腔癌前期病變(6)，臨床上最常發生於頰黏膜，而黏膜僵硬主要是由於上皮下層結締組織中含有過量的膠原蛋白沉積，並伴隨著固有層或深部結締組織的局部發炎反應與肌肉組織的退行性變化(7, 8)，其致病機轉複雜至今尚無定論，遺傳因子、免疫反應、病毒感染、營養缺乏與致癌因子都被認為與OSF形成有關(9, 10)，從流行病學調查研究顯示，嚼食檳榔是導致OSF的主要原因(11, 12)。由此可知，倘若能夠以篩檢預防來發現口腔癌早期患者及口腔黏膜下纖維化之患者，而予以早期治療；並在所謂有抽煙、喝酒、吃檳榔之習慣，即易罹患口腔癌的「高危險群」中，進行有效篩檢，以達到早期發現早期治療，是當前降低因罹患口腔癌死亡最有效的辦法之一。因此尋找治療法有潛力成為對抗口腔癌及其癌前病變，有助於降低口腔癌的復發率與增加病人存活率。

2. 光動力治療

光動力治療(Photodynamic therapy)為新穎的癌症治療方式。光動力療法最主要的二個原素為光和光感物質(13)。施行此種療法時，患者通常先需服用一種光感物質製劑，讓腫瘤細胞吸收此種光感物質後，再以特殊波長的光，照射腫瘤細胞，加以激發及殺死腫瘤細胞。當腫瘤組織中的光感物質以特殊波長的光加以激發時，光會將其能量轉移至氧分子，導致形成活性氧物質，此活性氧物質即可將腫瘤細胞直接殺死，或可破壞腫瘤中的血管系統，形成血栓，造成腫瘤細胞壞死(13)。也有學者認為光動力治療，可以激發人體的免疫系統，以進一步殺死腫瘤細胞。5-氨基酮戊酸(5-aminolevulinic acid, ALA)為新研發的第二代光感藥物(photosensitizer)。ALA光動力治療可以成功的用於診斷及治療人體的癌症或癌前病變。根據過去學者之研究，利用ALA之光動力治療，可用於治療食道癌、膀胱癌，皮膚癌和口腔癌(13-18)。ALA本身並非光感物質，它是光感物質原紫質IX(protoporphyrin IX, PpIX)之前驅物質。通常全身性服用或局部塗抹ALA後，經過1.5至6個小時後，ALA會被代謝成PpIX，PpIX於腫瘤或變異上皮細胞中的濃度，通常會高於正常上皮細胞中的濃度，即可利用此種特性，以施行ALA媒介之光動力治療。ALA於服用後48小時內，可以被身體代謝清除乾淨，因此使用ALA之光動力治療，較無皮膚光過敏之問題存在。局部塗抹ALA相關的光感物質製劑，利用ALA之光動力治療是一種非侵入性的療法，它可以重複使用，而不會有累積的毒性，治療後外觀不會有太大的改變及結疤，且組織中PpIX的含量可以用螢光光譜偵測，如此我們可以知道，何時組織中之PpIX含量達到最高濃度，那個時間就是最佳的照光治療時間點。根據過去學者之研究，局部塗抹的ALA可以被口腔癌和口腔癌前病變組織選擇性的吸收，臺灣大學江俊斌教授及本人研究發現，ALA之光動力治療可以使用於口腔癌和口腔癌前病變例如口腔白斑(oral leukoplakia, OL)、紅白斑(oral erythroleukoplakia, OEL)及疣狀增生(oral

verrucous hyperplasia, OVH) 臨床治療，其療效都令人滿意 (13-18)。臺灣大學郭彥彬教授研究團隊證實ALA-PDT會透過NF- κ B誘發口腔癌細胞株Ca9-22 走向細胞凋亡 (19)。臺灣大學婁培人研究團隊ALA-PDT可降低口腔癌細胞轉移力(20)。然而ALA-PDT於口腔癌前病變之口腔黏膜下纖維化療效研究仍未知。

微型 RNA 調控上皮間質轉換過程、癌幹性及抗藥性

以往大部分的RNA一般被分成三類，mRNA、rRNA和tRNA。Messenger RNA (mRNA)主要負責基因訊息的轉錄；ribosomal RNA (rRNA)則是核糖體結構以及自我催化的部份(21)；而transfer RNA (tRNA)則扮演將mRNA轉譯成蛋白質合成的訊息傳遞。當然還有一些其他不同的RNA負責參與修飾以及訊息傳遞 (22, 23)。除此之外，在動植物基因組中廣泛存在一類非編碼蛋白的RNA基因，可產生長度大約為19-25個核苷酸的RNA，近來被命名為微型RNA (microRNA, miRNA)。這是一類具有調節其他基因表達活性的小RNA，在生物的發育過程中發揮著重要作用。1993年，Ambros等人在線蟲中發現第一個miRNA分子lin-4以後(24)，微型RNA的研究一直沒有任何進展，直到2000年，Ruvkun等人發現了第微型RNA分子let-7 (25)，才引起了關注。現在，微型RNA已經成為國際學術界炙手可熱的研究對象。研究發現，微型RNA與發育、造血、器官形成、細胞凋亡和繁殖以及腫瘤形成發展等過程密切相關，並可以應用於疾病的診斷和治療 (26)。最初發現miRNA參與癌症生成的研究是在慢性淋巴性白血病中，偵測到染色體13q14發生缺失，造成miR-15與miR-16的表現量下降，推測miR-15和miR-16扮演著抑癌基因的角色 (27)。另一研究則發現，在人類的B-cell淋巴瘤中，miR-155的表現量上升，促使細胞產生惡性轉型，因此miR-155在此處扮演致癌角色 (28)。其他還有許多微型RNA參與癌症調控的例子：miR-143和miR-145在結腸癌中表現量下降 (29)；微型RNA let-7則在超過一半以上的肺癌病例中，表現量降低(30)；而座落在染色體17q23的miR-21在乳癌和神經膠母細胞瘤中表現量上升 (31, 32)。由此可知微型RNA可以扮演癌症的促進者，也可以是致癌基因的抑制者，有些致癌病毒也編碼微型RNA影響宿主細胞，在腫瘤發生中可能具有重要的作用。癌細胞在轉移的過程中，會變得更具侵犯力和移行力，進而遠端轉移，轉移的癌細胞會與原位腫瘤脫離細胞間的連結，也會由原本上皮細胞 (epithelial cell) 表面的分子標記細胞特質轉換成間葉細胞 (mesenchymal cell) 的型態，這現象稱為 上皮間質轉換過程 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)。此轉換過程會導致細胞間的連接消失，細胞骨架重組以及上皮細胞特徵Epithelial-cadherin (E-cadherin) 表現量下降，Neuronal-cadherin(N-cadherin) 表現量上升 (33)。EMT過程是由細胞外信號所引發，如膠原蛋白分子之間的相互作用和生長因子，包括轉型生長因子- β (TGF- β)，纖維細胞生長因子 (FGF)，表皮生長因子 (EGF) 和血小板衍生的生長因子 (PDGF) A, B和D (34-37)。在另一項研究指出，PC3細胞藉由ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) 調控IGF-1活化EMT的表現 (38)。這些結果顯示EMT有助於腫瘤細胞的侵犯。然而相對應於原發性腫瘤的病理機制 (39)，間葉-上皮轉換 (MET) 具有間葉型態的轉移性腫瘤細胞被認為是進行反向的轉換，為腫瘤遠端轉移的關鍵。最近的研究顯示，具有轉移能力的原發性結腸癌細胞呈現混合性上皮間葉細胞的型態 (40)。膀胱癌TSU-PR1 (T24) 系列的細胞株在體內實驗過程發現，細胞透過全身循環增加轉移的能力(41)。在前列腺癌，Yates等人將高度惡性且具有轉移至骨頭能力的前列腺癌細胞株與肝細胞進行共培養，發現E-cadherin的表現量上升 (42)。因此， 前列腺癌的患者很有可能從原發部位透過EMT轉移到遠端，並表現MET的特性，(如從PC3和DU145細胞，分別最初轉移至骨和腦) (39)。轉錄因子在調控腫瘤EMT中發揮重要作用，目前研究認為參與EMT的轉錄因子包括Snail-1、Slug、SIP 1和Twist。Twist, Snail, Slug 為主要調控EMT轉錄因子，此類蛋白分子可以直接抑制E-cadherin基因的表現，Twist是屬於basic helix-loop-helix (bHLH)轉錄因子，主要促進EMT過程，抑制E-cadherin基因的表現，進而提升細胞的移行和侵襲，在乳癌、肝癌及黑色素細胞癌的研究中都發現Twist的過度表現。研究發現miR-200調控ZEB1和ZEB2 E-box結合位的啟動子來抑制E-cadherin的表現 (43)。另外，在乳癌上皮細胞株中，miR-205抑制ZEB1和ZEB2進而調控EMT (44)。此外，在胰腺癌和結直腸癌研究中發現ZEB1參與

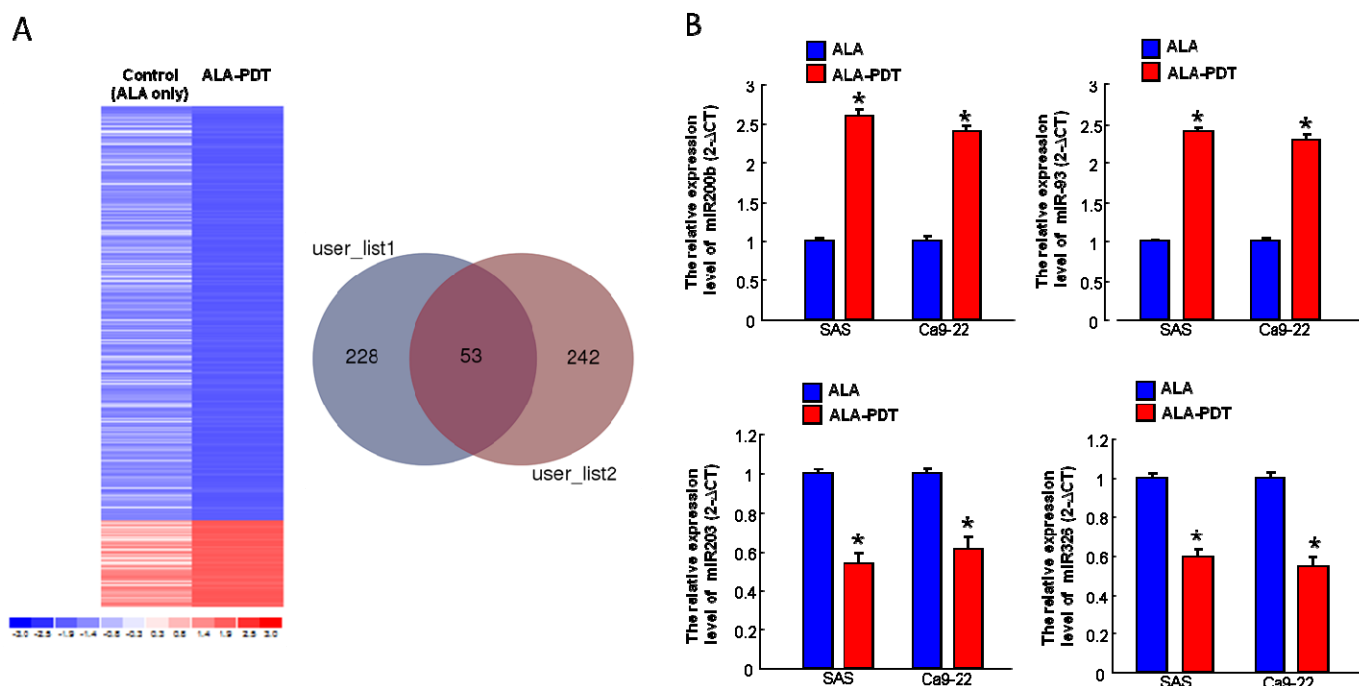
腫瘤細胞起始的過程。ZEB1不僅能抑制miR-200c的表現，同時也擁有調控“幹細胞”相關基因的表現，主要透過抑制miR-203和miR-183來調控Bmi1、Sox2和Klf4等基因的表達(45)。也有許多文獻指出微型RNA及其標的基因會調控癌幹性(cancer stemness)，癌幹性是造成腫瘤起始、復發、轉移、抗藥性的主因。微型RNA對癌幹性的調控與腫瘤抗藥性相關。ABC運輸蛋白家族(ATP Binding Cassette transporter superfamily, ABC)與腫瘤抗藥性密切相關。實驗證實在胃癌細胞MKN45中miR-27a可通過抑制P-glycoprotein的表達來增加其對Vincristine(VCR), Adriamycin(ADR)和5-Fluorouracil(5-FU)的化療敏感性(46)。抗藥性乳癌細胞株中miR-326低表現量且ABCC1蛋白高表達，轉染miR-326能下調腫瘤細胞ABCC1，可增加腫瘤細胞對Etoposide及doxorubicin的化療敏感性(47)。黑色素瘤細胞中的miR-200c過度表達能夠顯著下調ABCG2的表達以及抗藥性(48)。miR-215在人結腸癌幹細胞呈高表達且與化療抗藥性有關，進一步研究發現miR-215抑制DTL的表達，而提高了細胞對Methotrexate和Raltitrexed藥物敏感性(49)。miR-451透過調降COX-2和Wnt分子訊號，可減少結腸癌幹細胞形成和生長，進一步研究發現miR-451可標靶ABCB1(50)。光動力治療可調控HeLa細胞之miR-210及miR-296表現(51)，但之光動力治療於口腔癌細胞調控之微型RNA仍未知。

本研究計畫的動機：

隨著光動力治療在口腔癌和口腔癌前病變臨床治療中的廣泛應用，但雖然確切的作用機制還未完全闡明。而近期研究證實微型RNA為重要腫瘤抗藥性分子標誌及治療標靶。本兩年研究計畫期待驗證PDT調控微型RNA進而標靶上皮間質轉換及反轉抗藥性，另外光動力治療於口腔黏膜下纖維化症療效研究尚未探討，本計畫也將利用初代培養口腔黏膜下纖維化造纖維母細胞來測試光動力治療於口腔黏膜下纖維化症臨床應用前評估實驗，本計畫預期證實光動力治療抗口腔癌及其癌前病變的分子機制研究開啟新的觀點及方向。

計畫結果

1. 光動力治療作用口腔癌細胞可調控微型RNA表現



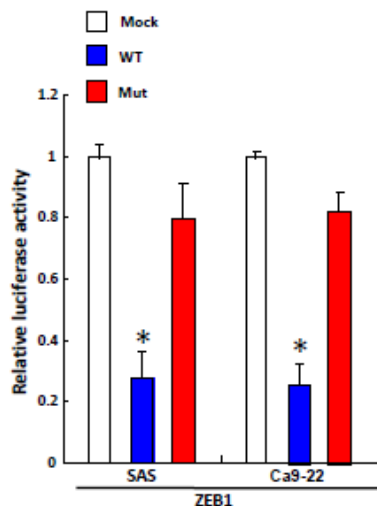
圖一:(A)利用 miRNA microarray鑑定出光動力治療作用口腔癌細胞調控之微型RNA、(B)利用miRNA real-time RT-PCR分析法鑑定出光動力治療作用可提昇miR-200b、miR-93表現量及降低miR-203、miR-326表現量。

2. 光動力治療調控miR-200b可標靶口腔癌細胞ZEB1表現

A

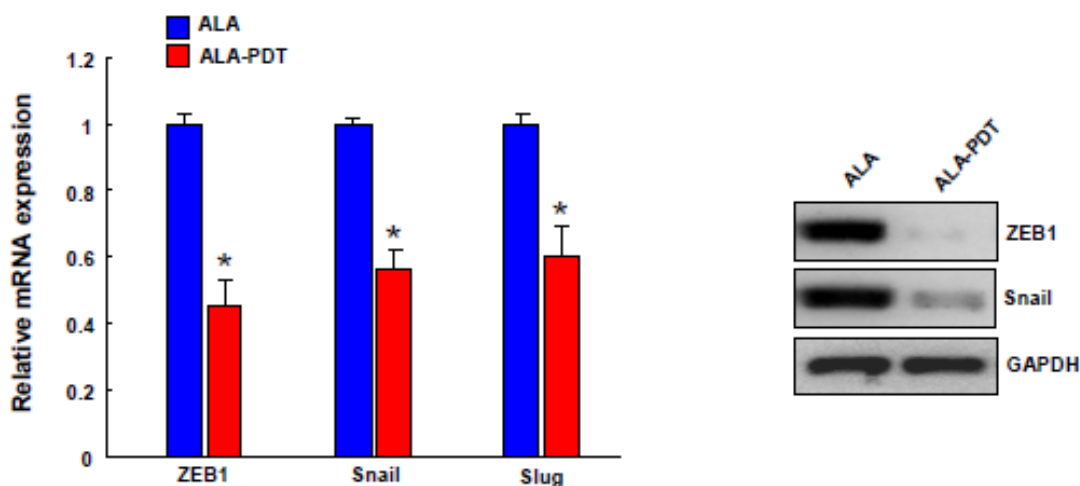
Gene	3'UTR Position	Target Site(s)
ZEB1	369-376	5'... AUUGUUUUUACUUUAUCAGUAUA...3' (wild type)
		3' AGUAGUA AUGGUCC-GUCAUAAU 5' (miR-200b)
		5'... AUUGUUUUUACUUUAUAACGCG A...3' (mutant)

B



圖二:(A)利用TargetScan軟體預測miR-200b可結合至ZEB1 3'UTR，因此假設ZEB1 為miR-200b目標基因，因而構建ZEB1 3'-UTR wild-type及mutated reporter plasmids (B)通過螢光素酶活性檢測觀察miR-200b對ZEB1 3'-UTR-螢光素酶活性的影響。

3. 光動力治療處理口腔癌細胞可抑制ZEB1表現量



圖三:(A)real-time RT-PCR分析法驗證光動力療法處理口腔癌細胞可降低上皮間質轉化因子表現量 (B)光動力療法處理口腔癌細胞對ZEB1 及SNAIL蛋白表達量的影響。

材料與方法

建構過度表現微型RNA

從人類基因組 DNA 中選殖出微型 RNA，並將其置入 pLV-EF1 α -GFP 載體中，建構成 pLV-EF1 α -GFP-miRNAs 之質體。利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 將 pCMV、pMDG 以及

pLV-EF1 α -EGFP-miRNAs 以 2:1:3 之濃度比例轉染 HEK293T cells。收集質體轉染後 48-72 小時之間之細胞培養液，以 1000 \times g 離心 5 分鐘以去除細胞殘渣，即為帶有 pLV-EF1 α -GFP-miRNAs 質體之病毒液。病毒液混合 8 μ g/ml polybrene (Sigma-Aldrich) 以轉染口腔癌細胞。轉染 48 小時後，利用 300 μ g/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 篩選成功轉染之口腔癌細胞。

細胞總量 RNA 萃取

細胞以胰蛋白酶 (trypsin) 處理使細胞懸浮後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘並吸去上清液，加入 1ml TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies)，混合後靜置 5 分鐘，之後加入 BCP (bromochloropropane) 100 μ l，上下搖晃使其混和均勻，靜置室溫 5 分鐘後以 12000 rpm (Eppendorf, F45-30-11) 在 4 $^{\circ}$ C 離心 15 分鐘，吸取上層液體到新的離心小管，再加入異丙酮 (isopropanol) 混和均勻靜置 5 分鐘，於 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm (Eppendorf, F45-30-11) 離心 10 分鐘，去除上清液，並且以 75% 酒精 500 μ l 清洗沈澱於管底的 RNA，再於室溫 12000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉酒精且於抽風櫃中風乾 RNA，RNA 沉澱物乾後加入 20 μ l diethylpyrocarbonate (DEPC) 處理過的水回溶，測量其 260 nm 吸光值並計算 RNA 濃度。

即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 分析

將 1 μ g 之 RNA 反轉錄為互補去氧核糖核酸 (cDNA)，然後於 PRISM ABI7700 Sequence Detecting System (美國 Applied Biosystems 公司) 進行定量即時聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time transcriptional PCR) 實驗。

蛋白質製備

吸去培養液，以預冷 PBS 液 (4 $^{\circ}$ C) 洗滌兩次，在預冷 PBS 液中 (1 ml)，以細胞刮匙 (rubber policeman) 刮取所有細胞，置入塑膠試管中，以 15000 r.p.m 離心 2 分鐘，吸棄上清液，加入 100 μ l 細胞溶解液 (內含 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 10 ng/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin; 1 x TNE: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP 40)，於冰桶內作用 30 分鐘，利用超音波震蕩器混合 10 分鐘，分離上清液。加入 5 倍體積 protein sample buffer (內含 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 ml; β -mercaptoethanol, 0.4 ml; 10 % SDS, 1.6 ml; Glycerol, 0.8 ml; 0.05 % bromophenol blue, 0.2 ml; 加入 ddH₂O 至 8 ml)，再以 95 $^{\circ}$ C 水浴加熱作用 5 分鐘，待冷卻後即可用。

膠凝體電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

將玻璃以 70 % 酒精擦拭乾淨後，架設 Bio-Rad mini-gel system 電泳裝置。配製 6 % 或 10 % separating gel 溶液 (以要觀察的蛋白質大小作為膠濃度依據)，注入玻璃片空隙，加入 70 % 酒精壓平膠體，待膠體凝固，倒去酒精。配製 5 % stacking gel 溶液，加於 separating gel 上層，插入齒梳 (comb)，待其凝固後裝置於電泳槽，加入含 10 % SDS 的 1 X running buffer。每格加入已用 6 X dye 染色的 15 μ g 蛋白質，每樣本利用 RIPA 調整至相同體積，進行電泳分析 (180 V, 1 hr)。

西方墨點法 (Western blot)

SDS-PAGE 完成後，切除 stacking gel，剪裁與膠片大小相當的 3 M 濾紙 2 張及 NC 紙 (nitrocellulose paper) 1 張，將 NC 紙以一次水浸泡 15 秒，依序以負極電板 \rightarrow 網狀夾板 \rightarrow 海綿組合，以 transfer buffer 浸濕，在依序擺上 3 M 濾紙 \rightarrow 膠體 \rightarrow NC 紙 \rightarrow 3 M 濾紙 \rightarrow 海綿 \rightarrow 網狀夾板 \rightarrow 正極電板，組合於 blotting system (Bio-Rad) 中，以電流 0.99 微安培、29 V 進行轉漬 (transfer) 1 小時。結束後將 NC 紙以 TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) 緩衝液泡製之 5 % 脫脂牛奶溶液於室溫搖晃進行 blocking 30 分鐘，接著以 TBST 緩衝液清洗，再加入含有適當濃度一級抗體與 5 % 脫脂牛奶溶液，置於室溫反應兩小時或於 4 $^{\circ}$ C 反應至隔天。以 TBST 緩衝液清洗，再加入適當濃度二級

抗體 (conjugated with horseradish peroxidase) 與 5 % 脫脂牛奶於室溫反應 1 小時，再以 TBST 緩衝液清洗，再以 ECL 呈色，與 X 光片進行曝光顯像，以 Image J 軟體分析該蛋白質表現。ECL-plus 用量為 0.1 ml / cm² (溶液 A : 溶液 B = 1 : 1)。

微型 RNA 的反轉錄聚合酶鏈鎖反應(miRNAs stem-looped TaqMan-RT-PCR)

使用 TaqMan RMicroRNA RNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行反轉錄，將 dNTP 0.15 μ l、RTase 1 μ l、10 \times buffer 1.5 μ l、RNase inhibitor 0.19 μ l、引子(miRNAs 以及 RNU 6B) 3 μ l、模板(總量 RNA) 5 μ l 以及 Nuclease free H₂O 4.16 μ l 等材料混合均勻之後，放入 PCR 機器中進行反應。反轉錄酶之作用條件為 16 $^{\circ}$ C 30 分鐘，再 42 $^{\circ}$ C 30 分鐘，接著 85 $^{\circ}$ C 5 分鐘終止反應，完成作用之後，存放於 4 $^{\circ}$ C 中保存。接下來在完成 RT 步驟的模板中加入 5 μ l Nuclease free H₂O，混合均勻之後，取 5 μ l 的模板和 20 \times 引子溶液 1 μ l、2 \times TaqMan PCR master mix 10 μ l 以及 Nuclease free H₂O 4 μ l 均勻混合後，吸取混合液 20 μ l(1 個孔的量)至 96 孔盤中，放入 Real-time PCR 機器(ABI StepOne Plus system, Applied Biosystems, CA, USA)中測定，擴增程式如下: Program 1: 95 $^{\circ}$ C, 10 分鐘(1 cycle), Program 2: 95 $^{\circ}$ C, 15 秒; 60 $^{\circ}$ C, 1 分鐘，偵測 FAM 激發光(40 cycle)。本研究利用 stem-looped TaqMan-RT-PCR 偵測細胞中 miR-24 之表現量，同時以 RNU6B 作為定量標準。首先利用 Ct_{miRNAs}- Ct_{RNU6B}(Δ Ct)將各別檢體標準化(Ct 值的含義: C 代表 Cycle, t 代表 threshold, 表每個反應管內的螢光信號達到所設定的域值時所經歷的循環數); 之後再將不同檢體間，標準化後的 Δ Ct 值相減得到 $\Delta\Delta$ Ct 值，一個循環的差異 ($\Delta\Delta$ Ct=1)表示起始模板濃度有兩倍的差異。此為之後實驗偵測 miRNAs 表現量之方法。

參考文獻

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer Journal international du cancer. 2010;127:2893-917.
2. Betel-quid and areca-nut chewing. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. 1985;37:137-202.
3. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2004;85:1-334.
4. Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1995;24:450-3.
5. Pindborg JJ, Sirsat SM. Oral submucous fibrosis. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1966;22:764-79.
6. Pindborg JJ, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Mehta FS. Oral submucous fibrosis as a precancerous condition. Scandinavian journal of dental research. 1984;92:224-9.
7. Canniff JP, Harvey W, Harris M. Oral submucous fibrosis: its pathogenesis and management. British dental journal. 1986;160:429-34.
8. van Wyk CW, Seedat HA, Phillips VM. Collagen in submucous fibrosis: an electron-microscopic study. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1990;19:182-7.
9. Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS. Etiology of oral submucous

- fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1995;24:145-52.
10. Chiang CP, Wu HY, Liu BY, Wang JT, Kuo MY. Quantitative analysis of immunocompetent cells in oral submucous fibrosis in Taiwan. *Oral oncology*. 2002;38:56-63.
 11. Sinor PN, Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB, Daftary DK, Mehta FS, et al. A case-control study of oral submucous fibrosis with special reference to the etiologic role of areca nut. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1990;19:94-8.
 12. Maher R, Lee AJ, Warnakulasuriya KA, Lewis JA, Johnson NW. Role of areca nut in the causation of oral submucous fibrosis: a case-control study in Pakistan. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1994;23:65-9.
 13. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3:380-7.
 14. Chen HM, Chen CT, Yang H, Kuo MY, Kuo YS, Lan WH, et al. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Oral oncology*. 2004;40:630-7.
 15. Chen HM, Yu CH, Tu PC, Yeh CY, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Lasers in surgery and medicine*. 2005;37:114-22.
 16. Lin HP, Chen HM, Yu CH, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Topical photodynamic therapy is very effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythroleukoplakia. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2010;39:624-30.
 17. Yu CH, Lin HP, Chen HM, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Comparison of clinical outcomes of oral erythroleukoplakia treated with photodynamic therapy using either light-emitting diode or laser light. *Lasers in surgery and medicine*. 2009;41:628-33.
 18. Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. *Oral oncology*. 2008;44:595-600.
 19. Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF-kappaB/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2011;40:483-9.
 20. Yang TH, Chen CT, Wang CP, Lou PJ. Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral oncology*. 2007;43:358-65.
 21. Beringer M, Rodnina MV. The ribosomal peptidyl transferase. *Molecular cell*. 2007;26:311-21.
 22. Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry*. 1986;55:1119-50.
 23. Smith CM, Steitz JA. Sno storm in the nucleolus: new roles for myriad small RNPs. *Cell*. 1997;89:669-72.
 24. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with

antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75:843-54.

25. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901-6.
26. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *The American journal of pathology*. 2009;174:1131-8.
27. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:15524-9.
28. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:1604-9.
29. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular cancer research : MCR*. 2003;1:882-91.
30. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*. 2004;64:3753-6.
31. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research*. 2005;65:6029-33.
32. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*. 2005;65:7065-70.
33. Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clinical & experimental metastasis*. 2007;24:587-97.
34. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290:C1532-42.
35. Fischer AN, Fuchs E, Mikula M, Huber H, Beug H, Mikulits W. PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. *Oncogene*. 2007;26:3395-405.
36. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney international*. 2002;61:1714-28.
37. Yang L, Lin C, Liu ZR. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell*. 2006;127:139-55.
38. Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, et al. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer research*. 2008;68:2479-88.
39. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of cellular physiology*. 2007;213:374-83.
40. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:10356-61.
41. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer research*. 2006;66:11271-8.

42. Yates CC, Shepard CR, Stolz DB, Wells A. Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. *British journal of cancer*. 2007;96:1246-52.
43. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports*. 2008;9:582-9.
44. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*. 2008;10:593-601.
45. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature cell biology*. 2009;11:1487-95.
46. Zhao X, Yang L, Hu J. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2011;30:55.
47. Liang Z, Wu H, Xia J, Li Y, Zhang Y, Huang K, et al. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochemical pharmacology*. 2010;79:817-24.
48. Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, Xu X. miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. *The American journal of pathology*. 2012;181:1823-35.
49. Song B, Wang Y, Titmus MA, Botchkina G, Formentini A, Kornmann M, et al. Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Molecular cancer*. 2010;9:96.
50. Bitarte N, Bandres E, Boni V, Zarate R, Rodriguez J, Gonzalez-Huarriz M, et al. MicroRNA-451 is involved in the self-renewal, tumorigenicity, and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*. 2011;29:1661-71.
51. Kushibiki T. Photodynamic therapy induces microRNA-210 and -296 expression in HeLa cells. *Journal of biophotonics*. 2010;3:368-72.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/31

科技部補助計畫	計畫名稱: 光動力療法調控之微型RNA於口腔癌及癌前病變之致病分子機轉研究及臨床應用評估
	計畫主持人: 余權航
	計畫編號: 104-2314-B-040-013- 學門領域: 牙醫
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：余權航			計畫編號：104-2314-B-040-013-			
計畫名稱：光動力療法調控之微型RNA於口腔癌及癌前病變之致病分子機轉研究及臨床應用評估						
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	
		研討會論文		0		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇
			研討會論文		0	
			專書		0	本
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
其他		0				

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)			本計畫研究成果整理中，準備投稿至績優國際學術期刊		

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

本轉譯研究計劃結合基礎及臨床研究期待驗證微型RNA可作為口腔癌及其癌前病變施行光動力療效之生物標誌，有助於個人化醫療發展

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）