

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 動物與醫學科

佳作

052003

癌細胞的「糖嗜好」~RNA-seq 技術探索糖分  
誘發癌細胞生長機制

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 蔡秉諭 高二 謝昕捷	指導老師： 邱伯勤
-------------------------	--------------

關鍵詞：cancer、RNA-seq、metabolic stress

## 摘要

糖影響癌細胞生長機制複雜，近年基因體研究技術發展，透過 RNA-seq 技術能全面分析癌細胞在不同糖濃度下基因表現變化，藉此窺探糖分誘發癌細胞生長機制。本研究以乳癌和肝癌細胞株為研究模式，低糖培養下癌細胞生長受阻，進而以 RNA-seq 技術分析，測得約 16,000 種表現基因，不同糖濃度培養分析組別，約 100~5,000 個基因表現差異，糖濃度越低基因改變越明顯，也發現乳癌和肝癌細胞基因變化情形不同。藉由富集分析，顯示表現變化基因功能主要與生長相關。經查詢文獻比對後，兩種癌細胞各挑選出十個新穎候選基因，並完成 qRT-PCR 驗證，確認實驗結果。本研究勾勒糖影響癌細胞生長之相關基因表現變化樣貌，並探索發現參與作用的新穎基因，有助於瞭解糖分誘發癌細胞生長的作用機制。

## 壹、研究動機

### 一、 研究背景與文獻探討

#### (一)、 癌細胞愛吃糖?

近 20 年來，台灣癌症時鐘年年增速，對比 2002 年每 8 分 24 秒一人罹癌；2022 年統計每 4 分鐘就有一人罹癌，增速之快，讓人吃驚。此外，癌症目前是全球死亡主因，台灣尤甚。癌逝者占死亡人數達 28%，高於全球 16.7%。癌細胞愛吃糖?是坊間盛傳的說法，是否正確?根據農委會統計，台灣每年消費的總糖量約為 60 萬公噸，每人每年平均吃掉 26 公斤的糖，換算成每天的攝取量為 72 克，是世界衛生組織(WHO)建議糖份攝取量 (25 克) 的將近 3 倍。臨床研究發現，攝取過多的糖會增加罹患乳癌的風險，而胰臟癌、食道癌、胸膜癌、小腸癌、子宮內膜癌等，研究證實也都與攝取過多糖有關 (Bose & Le, 2018)。高糖若與癌症發生有關，糖對癌細胞生長之影響及機制，非常值得深入探討。

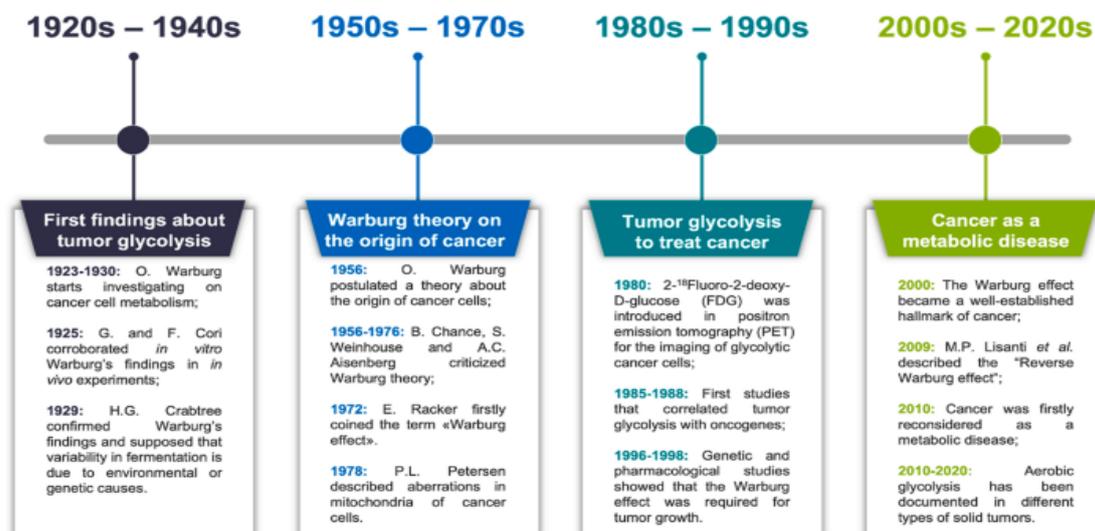
#### (二)、 從「瓦式效應」(Warburg Effect)談起

癌細胞愛吃糖? 盛傳於坊間的說法，由文獻搜尋中發現，1924 年德國著名的生理學家奧托·瓦爾堡(Otto Warburg)發現 (Warburg, 1924)，正常細胞代謝，重要的能量來源—葡萄糖—透過兩種代謝途徑來產生能量，絕大部分 (80%) 透過粒線體的有氧呼吸途徑，只有一小部分透過無氧的葡萄糖糖解代謝產生能量。但癌細胞正好相反，由於對能量的快速需求，癌細胞驅動了葡萄糖代謝機制的重塑，使葡萄糖糖解代謝的途徑比例增加到 85%，只有 5%左右透過粒

線體的有氧呼吸途徑。癌細胞以糖為能源的代謝方式，稱為糖酵解代謝，此代謝異常行為稱作「瓦式效應」(Warburg Effect)。

百年來科學家針對瓦式效應的糖酵解代謝進行非常多研究，在 2022 年最新的綜述文獻中 (Bononi et al., 2022)，F. Minutolo 等人整理了四個階段的研究進展 (圖一)，讓我們能全盤了解目前對瓦式效應的認知，進一步思考還有那些重要問題上尚未被釐清。從癌細胞偏好糖酵解代謝的發現，之後確認瓦式效應，過去研究已大致了解癌細胞的糖酵解反應是透過那些酵素參與反應進行，後續科學家針對其中重要執行酵素，陸續開發出臨床治療的標靶藥物。例如：糖解作用最後一個步驟，由丙酮酸激酶 (pyruvate kinase; PK) 催化磷酸烯醇丙產 ATP。目前已開發出七肽的 TLN-232/CAP-232 為 PKM 的抑制劑，與 PKM 結合，使 PKM 成為非活化之雙聚體(dimmer)形式，藉此延緩糖解速率，使糖解中間產物進入其他代謝途徑，進而抑制癌細胞生長，此藥物目前已進入腎細胞癌臨床試驗第二期，未來有可能成為臨床治療藥物 (Christofk et al., 2008)。

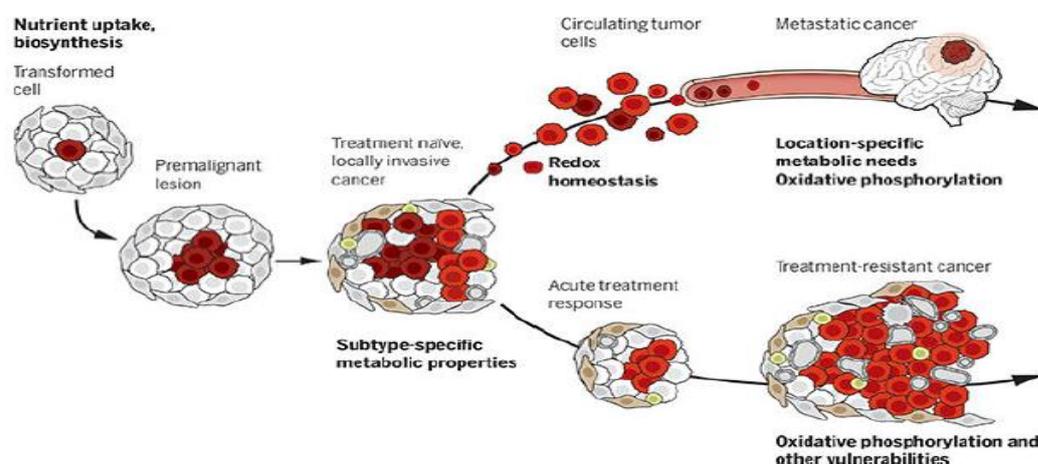
2000 年後，因瓦式效應的相關研究奠定，癌症由大家認知的基因疾病，發現癌症其實是代謝異常疾病 (Seyfried, Flores, Poff, & D'Agostino, 2014)。Seyfried T.N. 的研究補充了 Warburg 沒有觀察到的另一條癌細胞代謝途徑：癌細胞還通過酵解一種叫做谷氨醯胺的胺基酸得到大量能量，從而更新了 Warburg 的理論。他認為細胞呼吸功能不全，是癌症的起源。癌細胞能通過酵解作用得到能量，所有癌細胞都可以在無氧條件下生存 (Chinopoulos & Seyfried, 2018)。時至今日，癌細胞愛吃糖的探討，從瓦式效應的研究開展到癌細胞代謝異常的探究。



圖一、1920 年代至今，糖酵解代謝研究重要進展。

### (三)、 癌症其實是代謝疾病(Metabolic Disorder)

發現癌細胞在糖代謝的異常特性後，科學家進一步研究證實，癌細胞之所以能不斷快速生長及獲得移轉能力等癌化現象發生，是因為癌細胞具有重組代謝程序(metabolic reprogramming) 能力，這也是細胞癌化的重要指標。當癌細胞面對所處不同環境 (tumor microenvironment (TME))時，若處於代謝壓力 (metabolic stress)下，會改變代謝途徑因應，也就是啟動重組代謝程序，達到快速生長的目的。癌細胞在不同發展進程 (cancer progression) 中，也會調整不同的代謝路徑，達到存活、快速生長以及轉移等能力 (圖二) (Faubert, Solmonson, & DeBerardinis, 2020)。以低糖環境的代謝壓力為例，目前研究猜測，癌細胞在低糖環境下，為對抗惡劣生存環境，會透過各種基因表現的改變，傳遞訊號，進而改變細胞生長的基因路徑，達到存活目的 (Epner, Yang, Wagner, & Cohen, 2022)。因此，研究低糖環境的代謝壓力下，癌細胞透過重組代謝程序，改變了哪些基因的表現，進而達到快速生長的目的，是目前尚未被了解且重要的研究問題。

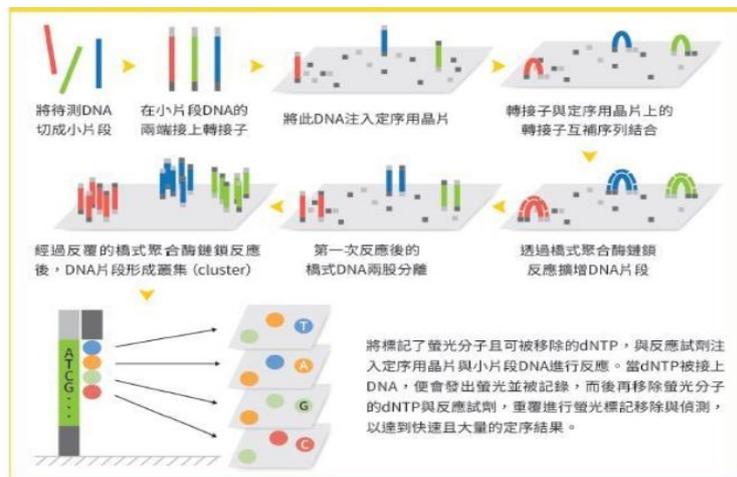


圖二、癌細胞不同發展進程的重組代謝程序

### (四)、 次世代基因定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 應用

1977 年，英國生物化學家桑格發明了第一代核酸定序技術「鏈終止法」 (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977)。他利用雙去氧三磷酸核苷酸(ddNTP)終止 DNA 合成，再藉由分析終止的產物片段反推其序列，使用方法簡單、快速，且反應成本較低。隨著定序技術的演進，美國在 1990 年發起了人類基因組計畫。第一代定序技術在通量、大量定序所耗費的成本及速度上，已無法滿足日益增長的大規模全基因組定序需求。因此在 2005 年，次世代定序技術被推出，由於此技術可同時定序大量 DNA，進而提升通量、降低成本、增加速度。

Illumina 為目前市場上主要應用技術 (Mardis, 2008)，此定序技術主要是利用大量的 DNA 短片段定序序列，利用物理性方式將 DNA 打斷成大約 300~500 個鹼基的小片段，並在兩端接上轉接子 (adaptor)，再把含有轉接子的序列，鋪到上方有轉接子互補序列的晶片上，透過橋式聚合酶鏈鎖反應 (bridge PCR) 進行擴增。再經由標記不同鹼基的特定序列，移除螢光分子的 dNTP 與反應試劑，重覆進行螢光標記移除與偵測，達到快速且大量的定序結果(圖三)。最後再用生物資訊技術分析資料，判別出每一條序列的正確鹼基對。隨著次世代定序技術的問世，大幅縮短了相關研究的解序時間，同時拓展了基因體研究不同面向的廣度與深度。NGS 技術除 DNA sequencing 外，也廣泛應用於 RNA sequencing，透過對細胞表現 mRNA 的定序，分析出每一種基因表現 mRNA 量，藉此比較出不同處理條件下，細胞之基因表現差異 (differential gene expression, DGE)(Stark, Grzelak, & Hadfield, 2019)。NGS 之 RNA-seq 技術與微陣列基因晶片 (cDNA microarray) 分析之目的相同，皆為進行全基因體的基因表現差異分析，但 NGS 之 RNA-seq 方法於偵測基因表現量的靈敏度與解析度皆較高，且能更全面分析，目前已被廣泛應用。



圖三、Illumina short-read sequencing technology

由生命現象的中心準則可知，細胞在受到外界刺激時，訊息通過傳導路徑傳入細胞核內，啟動基因表現調控，造成不同功能基因的 mRNA 表現量變化，細胞能應對所受到的刺激採取對策，比如改變蛋白的表現量，進而在代謝路徑產生作用功能改變。在還未發展基因體技術之前，想了解細胞如何應對外界刺激，只能猜測可能基因，一個個基因研究驗證，被戲稱為「瞎子摸象」。現在，透過 NGS 的 RNA-seq 技術，能在一次實驗中，完整分析出細胞應對所受到的刺激，所有表現基因。透過基因體技術的應用，能讓我們全面性且有效精準了解細胞在分子層次的基因作用機制 (Epstein & Butow, 2000)。

## 二、研究動機

甜食是許多人的最愛，我們也不例外。聽到「癌細胞愛吃糖」時，令人非常驚訝！因此，糖與癌細胞的「甜蜜關係」成為我們非常想研究的主題，也想知道糖對不同癌症的影響是否有差異。經過文獻搜尋後，了解百年前科學家發現了「瓦式效應」，也進而證實了癌症其實是代謝疾病。但癌細胞在人體內處於不同糖濃度環境的代謝壓力下，透過重組代謝程序，改變了哪些基因的表現，進而達到快速生長的目的，是目前尚未被了解且重要的研究問題。

我們觀察到：實驗室培養癌細胞是採用 25 mM glucose，而人體正常血糖濃度約為 4-7 mM。顯示癌細胞的「糖嗜好」，癌細胞在高糖 (25 mM glucose) 環境下生長狀況最佳，而癌細胞若處於人體的低糖環境 (4-7 mM glucose) 下，因此研究設計藉由調整實驗室培養癌細胞之培養液的糖濃度，能模擬高糖和低糖代謝壓力狀態下，猜測癌細胞會啟動重組代謝程序，改變基因的表現來面對。因此，我們選擇了已知高糖最易誘發的乳癌，和與糖份關聯性較低的肝癌細胞株作為研究模式。將癌細胞培養於 0-25 mM glucose 不同濃度條件下，模擬低糖生長環境，藉此觀察低糖對不同癌細胞生長影響。而面對高糖誘發癌細胞生長機制這複雜且難解的問題，我們選擇以次世代定序之 RNA-Seq 技術，進行全基因體基因表現分析。透過多種不同生物資訊分析方法，歸納、分類及篩選，找出與糖濃度影響癌細胞生長相關且過去未被發現參與作用的新穎基因。研究結果能讓我們更加了解糖對乳癌及肝癌細胞生長的影響，也進一步探索糖分誘發癌細胞生長的機制。

## 貳、研究目的

- 一、了解低糖培養環境對乳癌和肝癌細胞株生長的影響，並比較兩種癌細胞生長影響的差異。
- 二、應用全基因體基因表現分析技術，探索乳癌和肝癌細胞株在不同糖濃度生長環境，基因表現差異情形。
- 三、以富集分析法，了解乳癌和肝癌細胞株在不同糖濃度中，表現受影響之基因的功能分類及作用路徑關聯。
- 四、應用多種不同基因表現差異分析方法，篩選與糖濃度影響癌細胞生長相關且過去未被發現參與作用的新穎基因，並分析歸納出重要分子機制路徑。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗材料

#### (一)、實驗細胞株 (cell line) :

##### 1. Hep G2 細胞株

Hep G2 為人類肝癌細胞，此細胞株是由一個 15 歲白人的肝癌組織所分離純化培養。取得自 American Type Culture Collection (ATCC, USA)。

##### 2. MDA- MB-231 細胞株

MDA- MB-231 為人類乳腺癌細胞株，此細胞株是由一位 51 歲高加索女性所分離純化培養。取得自 American Type Culture Collection(ATCC, USA)。

#### (二)、培養基 :

##### 1. DMEM-High-Glucose

本研究於細胞培養時採用 DMEM-High-Glucose(4.5 g/l)，含 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)，以及添加抗生素(青黴素 100 U/mL 及鏈黴素 100 µg/mL)。

##### 2. DMEM-no-glucose(with Dialyzed FBS)

細胞於不同糖濃度培養實驗時則採用 DMEM-no-glucose，另外添加 10%透析胎牛血清(Dialyzed FBS)，是將 FBS 中小於 10,000 mw 的小分子包括葡萄糖等去除，含有抗生素 (青黴素 100 U/mL 及鏈黴素 100 µg/mL)。

#### (三)、qRT-PCR 引子 :

HSPA6-F	GCACAGGTAAGGCTAACAAGATCAC	18S rRNA-F	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT
HSPA6-R	CCTTGTAAGTCTCGGCTTCAT	18S rRNA-R	TGGCAAATGCTTTCGCTTT
HSPA1A-F	ACCTTCGACGTGTCCATCCTGA	KRT18-F	AAAGGCCTACAAGCCCAGAT
HSPA1A-R	TCCTCCACGAAGTGGTTCACCA	KRT18-R	CACTGTGGTGTCTCTCCTCAA
HSPA1B-F	ACCTTCGACGTGTCCATCCTGA	PDIA6-F	CACTAGGCGCTCACTGTTC
HSPA1B-R	TCCTCCACGAAGTGGTTCACCA	PDIA6-R	GAGGGATCTCGCTCCTGGAA
HSPA5-F	CTGTCCAGGCTGGTGTGCTCT	PDIA3-F	GTCAGCCACTTGAAGAAGCAGG
HSPA5-R	CTTGGTAGGCACCACTGTGTTC	PDIA3-R	TAGGAACTCGGAGTGAGCCTCA

HSP90B1-F	AGGCCGTGGTATCTCAGCGTCT	CALR-F	TCAAGGAGCAGTTTCTGGACGG
HSP90B1-R	TTGCCCGTCTGGTATGCTTGAG	CALR-R	GCATCCTGGCTTGTCTGCAAAC
DDIT3-F	GGTATGAGGACCTGCAAGAGGT	ACTG1-F	CATTGTCATGGACTCTGGAGAC
DDIT3-R	CTTGTGACCTCTGCTGGTTCTG	ACTG1-R	GAGGATCTTCATGAGGTAGTCG
COX2-F	CTCTTCCTCCTGTGCCTGAT	FN1-F	ACAACACCGAGGTGACTGAGAC
COX2-R	CTGAGTATCTTTGACTGTGGGAG	FN1-R	GGACACAACGATGCTTCCTGAG

備註: F 表示 Forward Primer , R 表示 Reverse Primer 。(委託波士特生物科技公司合成)

## 二、實驗器材與藥品

### (一)、實驗器材

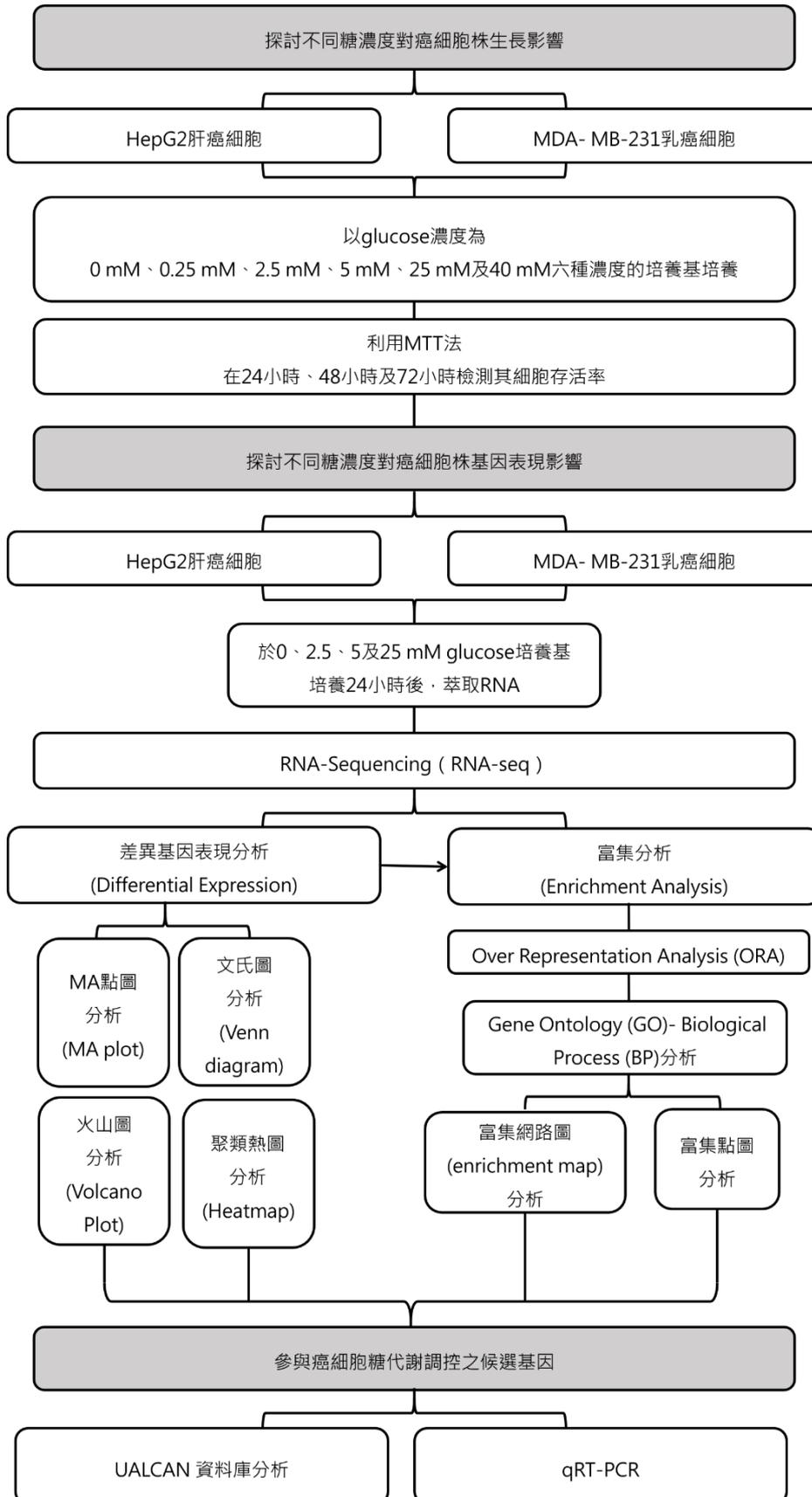
- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 細胞培養箱                                | 2. 無菌操作臺                      |
| 3. 離心機                                  | 4. 血球計數盤                      |
| 5. 4°C 冰箱                               | 6. -20°C 冰箱                   |
| 7. -80°C 冰箱                             | 8. pipetman                   |
| 9. pipetaid                             | 10. 10cm 培養盤                  |
| 11. 96-well plate                       | 12. QuantStudio™              |
| 13. QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System | 14. CHINCAN Nano-400A 微量分光光度計 |

### (二)、藥品

- |   |  |
|---|--|
| 1. 磷酸鹽緩衝液(PBS)(Merck Inc.)                        | 2. Trypsin( Invotrogene Inc.)  |
| 3. DMEM-High-Glucose(4.5 g/l)(Gibco Inc.)         | 4. DMEM-no-glucose(Gibco Inc.)                                       |
| 5. 透析胎牛血清(Dialyzed FBS)(Gibco Inc.)               | 6. 胎牛血清 (FBS)(Gibco Inc.)  |
| 7. SDS (Sodium dodecyl sulfate)<br>(Merck Inc.)   | 8. DEPC (Diethyl pyrocarbonate)<br>Treated Water ( Invotrogene Inc.) |
| 9. Pure Link™ RNA Mini Kit<br>( Invotrogene Inc.) | 10. One Step PrimeScript RT-PCR Kit<br>( Takara Inc.)                |
| 11. 葡萄糖 ( D(+)-Glucose) (Merck Inc.)              | 12. MTT( Invotrogene Inc.)   |
| 13. 2-巰基乙醇(Merck Inc.)                            |  |

# 肆、研究過程或方法

## 一、研究架構圖



## 二、實驗方法

### (一)、細胞繼代培養 (Passage)

本研究採用 HepG2 細胞株及 MDA-MB-231 細胞株作為研究模式。首先將細胞株凍管自液態氮中取出，置於恆溫槽中以 37°C 解凍回溫，完全解凍後以 1200 rpm，21°C 離心 3 分鐘，完成後移至無菌操作台內操作。去除上清液，加入 1mL 的培養基，使細胞懸浮，將懸浮細胞種到 10 cm 培養皿中加入 10 ml DMEM-High-Glucose，置於 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養。將細胞從培養箱中取出並觀察，若細胞已長至培養皿的七至八成即可繼代。先去除培養皿中的舊培養液，加入 5mL 10X PBS 輕微搖晃以潤洗細胞層，再將 PBS 去除，清洗步驟需重複兩次。清洗後加入 3mL Trypsin-EDTA 置於 37°C 培養箱中反應三分鐘，使用顯微鏡觀察細胞是否皆懸浮。加入與 Trypsin-EDTA 等量的培養基(3mL) 以抑制 Trypsin 繼續作用，將細胞收置 15 mL 離心管中，離心 1200rpm、3 分鐘。離心後，去除上清液，再加入新鮮培養基使細胞懸浮，將懸浮細胞液適量回種到 10 cm 培養皿中，再加入 10 mL DMEM-High-Glucose，搖晃使其均勻分佈，並置於 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養。

### (二)、細胞生長分析

本研究採用 MTT 法來檢測細胞生長情形。首先將細胞培養於 DMEM-high-glucose，並以 2500 cells/well 的密度種入 96 孔細胞培養盤中，在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養以待其貼附，24 小時後，將孔盤內培養基取出，以 100  $\mu$ L 1X PBS 潤洗細胞，將 PBS 取出後，用 DMEM-no-glucose (with Dialyzed FBS) 以及葡萄糖 (D(+)-Glucose) 配置濃度 0、0.25、2.5、5、25 及 40 mM 的培養基，再將培養基以 100  $\mu$ L/well 注入培養盤，在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養，分別於 24、48 及 72 小時後，在 96 孔盤中加入 MTT 試劑 15  $\mu$ L，3 小時後再加入 10%SDS 150  $\mu$ L，放回培養箱，12 小時後使用分光光度計以 OD595 測量其吸光值，計算出細胞生長率。

### (三)、RNA 萃取

將細胞以  $1 \times 10^6$  cells/dish 的密度種於 10 cm 培養皿中，並加入 10 mL DMEM-high-glucose，置於 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養 24 小時。待其貼覆後，將細胞從培養箱移至無菌操作台，去除舊培養基，用 DMEM-no-glucose (with Dialyzed FBS) 以及葡萄

糖 (D(+)-Glucose)配置濃度 0、2.5、5 及 25 mM 的培養基，分別以 10 mL/dish 加入培養皿，置於 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub>的細胞培養箱中培養 24 小時。將細胞從培養箱移出並置於冰上，以刮杓將細胞刮下並將細胞及培養基吸入 50mL 離心管，用 PBS 洗培養皿，再將之吸入前一步驟的離心管中，之後離心 1500rpm、1 分鐘。離心後去除上清液，將細胞用 1mL PBS 抽吸均勻，並轉移至 1.5mL 的離心管，離心 8000rpm、1 分鐘，再完全去除上清液。使用 Pure Link™ RNA Mini Kit，在剩餘沉澱的離心管中，加入 6 μL 的 2-巰基乙醇及 594 μL 的 Lysis Buffer，震盪直到細胞均勻分佈，再離心 13000rpm、5 分鐘，將上清液轉移到乾淨的無 RNase 離心管中。加入 600 μL 70%乙醇，震盪並打散加入乙醇後形成的沉澱物。將上述溶液 700 μL 轉移至 column 並放入集液管中，在室溫下離心 13000rpm、30 秒，離心後移除集液管中的液體，重複前述步驟至所有樣品皆完成。在 column 中加入 700 μL Wash Buffer I，在室溫下離心 13000rpm、30 秒，丟棄離心後的集液管，將 column 放入新的集液管中。在 column 中加入 500 μL 含乙醇的 Wash Buffer II，在室溫下離心 13000rpm、30 秒，離心後移除集液管中的液體，重複上述步驟一次。移除集液管中的液體後，在室溫下離心 13000rpm、2 分鐘，丟棄離心後的集液管，將 column 放入新的離心管中。在 column 中加入 20 μL 的 RNase-Free Water，並放在室溫下 1 分鐘，之後在室溫下離心 13000rpm、2 分鐘。離心後，離心管內即為萃取之 RNA，將之保存於-80°C 冰箱中。

#### (四)、RNA 定量

首先，使用 DEPC Treated Water 1mL 清洗 CHINCAN Nano-400A 微量分光光度計之感測器，清洗後，使用 2 μL 的 DEPC Treated Water 作為 Blank。清除感測器上的 DEPC Treated Water，加入 2 μL 的 RNA 樣品進行測定，使用 260 nm 及 280 nm 波長測量樣本並計算 RNA 濃度，以 260 nm / 280nm 測量所得數據比值測定其純度，其比值需大於 1.8，即完成 RNA 樣品濃度及品質測定。

#### (五)、RNA-seq (RNA Sequencing)

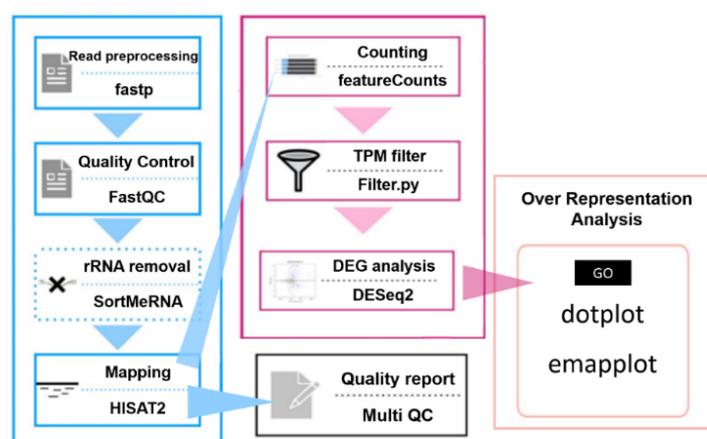
此實驗以研究服務方式委託基龍米克斯生物科技公司進行，應用次世代基因定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 技術，進行 mRNA 定序，所採用之實驗方法及數據分析如下所述:

## 1. 實驗流程：

以 1 mg Total RNA 應用 TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 製備，帶有 Oligo (dT) 之磁珠抓取 mRNA，並加熱使 mRNA 片段化。片段化後的 mRNA 作為模板，以隨機引子與反轉錄酵素合成出第一股 cDNA，隨後加入反應試劑、dNTPs、RNaseH 和 DNA polymerase 合成雙股 cDNA，並使用 AMPure XP (Beckman Coulter, Beverly, USA) 磁珠純化雙股 cDNA。之後，cDNA 進行末端修復與尾端修飾，並黏合上定序轉接子，以聚合酶連鎖反應擴增產物與磁珠純化後即完成 cDNA library 製備。隨後以 Agilent BioAnalyzer 2100 系統進行片段大小檢測，並利用 Real-Time PCR system 進行 cDNA library 濃度測定；完成品質確認後 cDNA library 於 Illumina NovaSeq 6000 定序儀進行規格 150 PE 定序。

## 2. 分析流程：

從定序儀產生出來的數據經過 bcl2fastq 轉檔程式，將 BCL/CBCL 轉換成常見的 FASTQ 格式，此 FASTQ 檔案稱為原始下機數據 (Raw data)。之後 Raw data 會經由 fastp 去除低品質鹼基、adapter、及含有太多未知鹼基 N 的 reads，得到 clean reads。接著移除 ribosomal RNA，之後才將濾除 rRNA 的 reads 與參考基因組比對，計算出 mRNA 表現量，流程如圖四。



圖四：分析流程

所計算出 mRNA 表現量數值，應用生物資訊方法，以 glucose 25 mM 培養條件為對照組，使用 ClusterProfiler 進行 ORA 之 GO function enrichment 等初步分析，以了解降低 glucose 濃度後，癌細胞之基因表現變化情形。

(六)、qRT-PCR (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay)

使用 One Step PrimeScript RT-PCR Kit，將 2X One Step TB Green RT-PCR Buffer 4.75  $\mu$ L/well、ROX Reference Dye II 0.3  $\mu$ L/well，以及測定目的基因之 PCR Forward Primer 0.6  $\mu$ L/well、PCR Reverse Primer 0.6  $\mu$ L/well，依比例混合加入 PCR 的八聯管中。將 RNA 以 50 ng/well 加入八聯管，使用 DEPC Treated Water 調整各管液體體積至 14.4  $\mu$ L/well，最後加入 0.6  $\mu$ L/well PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2，使總體積為 15  $\mu$ L/well。

以 QuantStudio™使用 QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System 進行 RNA 反轉錄及擴增 40 cycle 並即時定量，取得各樣本之 Ct 值，以 18S rRNA 為內參基因，25 mM-Glu 處理樣品為對照組，應用下列公式進行 Relative Quantification (RQ)值計算。

<b>RQ值計算公式</b>
$\Delta Ct = \text{待測樣品之目的基因Ct值} - \text{待測樣品之內參基因Ct值}$
$\Delta\Delta Ct = \text{待測樣品之}\Delta Ct - \text{對照組樣品之}\Delta Ct$
$RQ = 2^{-(\text{待測樣品之} - \Delta\Delta Ct)}$

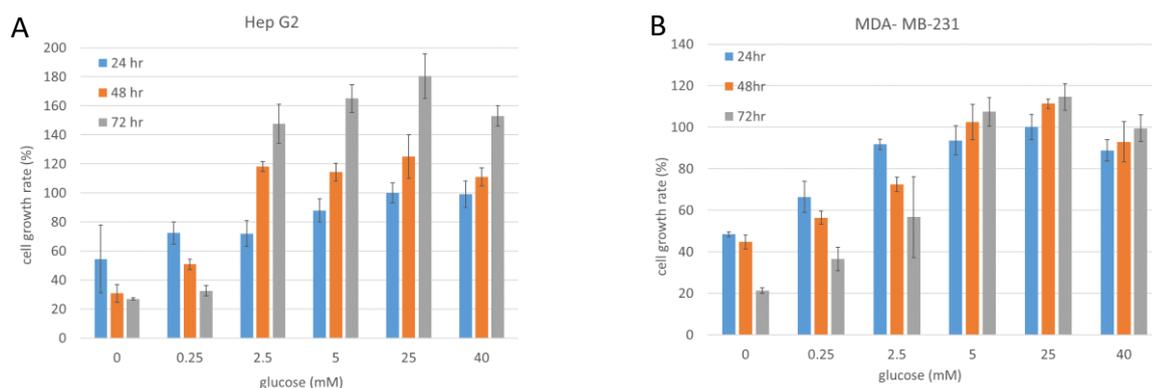
## 伍、研究結果

### 一、探討不同糖濃度對癌細胞株生長影響

為了解不同糖濃度對癌細胞生長的影響，實驗設計將 HepG2 細胞及 MDA- MB-231 細胞以 0 mM、0.25 mM、2.5 mM、5 mM、25 mM 及 40 mM glucose-DMEM 六種糖濃度，分別培養 24、48 及 72 小時，再以 MTT 法測定細胞生長率，並以 25 mM glucose-DMEM 也就是正常癌細胞培養基濃度，處理 24 小時之癌細胞樣本為對照組繪製生長趨勢圖，以觀察其隨時間變化之情形。

實驗結果發現，**25 mM 為最佳生長濃度**，且 MDA- MB-231 細胞及 HepG2 細胞在 0 mM 至 25mM 條件下，生長率隨糖濃度變低而下降，可知低糖濃度確實對癌細胞生長有負面影響。比較兩種細胞，HepG2 細胞在 0 mM 至 0.25 mM 的細胞生長率隨時間呈下降的趨勢，在 2.5 mM 之後則上升，推測這可能表示 HepG2 細胞維持生長所需的最低糖濃度介在 0.25 和 2.5 之間。至於 MDA- MB-231 細胞之隨時間生長率則在 5 mM 之後才有成長趨勢，由此**推測 MDA- MB-231 細胞對於糖的依賴需求較高**，相較之下 HepG2 細胞生長對糖則較不依賴。

亦由 MTT 實驗分析可得，兩種癌細胞於 40 mM glucose-DMEM 處理的生長情形並未優於 25 mM，推測此糖濃度過高，已無助於癌細胞生長。另外，單獨各時間點之 0 mM 至 0.25 mM 至 2.5 mM 處理的癌細胞生長趨勢皆為上升，並且在 24 小時培養之組別已可見整體生長趨勢，基於研究效益的考量，最終我們挑選 0 mM、2.5 mM、5 mM 及 25 mM glucose-DMEM 四種糖濃度處理 24 小時之癌細胞，作為後續基因表現分析之培養條件。



圖五、不同糖濃度及時間培養對癌細胞生長影響。(A)為不同糖濃度及時間培養對 HepG2 細胞生長的影響，(B)為不同糖濃度及時間培養對 MDA-MB-231 細胞生長的影響。將測定之癌細胞 2500 個/孔，以 DMEM-high-glucose 培養於 96 孔細胞盤，待其 24 小時貼附後，再換以不同濃度之 glucose-DMEM 100  $\mu$ l，分別培養 24、48 及 72 小時後，以 MTT 法分析細胞生長數。(數據呈現以各癌細胞之糖濃度 25 mM-24 小時為對照組)

## 二、應用 NGS RNA-seq 技術，分析生長於不同糖濃度癌細胞株的表現差異基因

將 MDA-MB-231 細胞及 HepG2 細胞以 0 mM、2.5 mM、5 mM 及 25 mM glucose-DMEM 四種糖濃度，培養 24 小時後，抽取 total RNA，並保存於-80 冰箱。之後以研究服務方式委託基龍米克斯生物科技公司，應用次世代基因定序技術，進行 mRNA 定序，實驗方法及數據分析如方法所述。以下為應用生物資訊方法，進一步分析基因表現差異及基因功能分群探索。

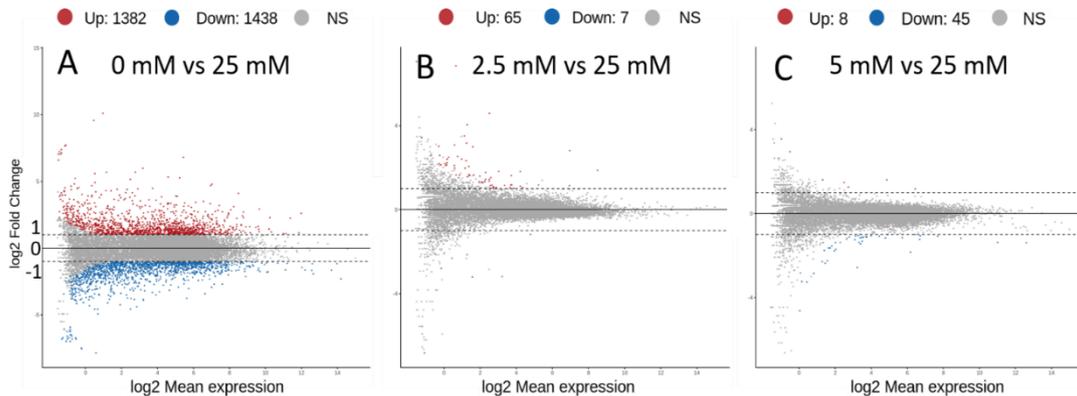
### (一)、差異基因表現 (Differential Expression) 分析

#### 1. MA 點圖 (MA plot) 分析

MA plot 是常用來表示「基因表現量」及「Fold Change(FC)」的分布，M 表示差異基因表達變化  $\log_2FC$ ，A 表示每個基因平均 read counts(標準化後)；每個點代表一個基因。MA plot 可以呈現基因豐富度與表現量變化的關係，當資料點越靠近右上或右下，表示基因表現量和表現差異越大。

(1) HepG2 :

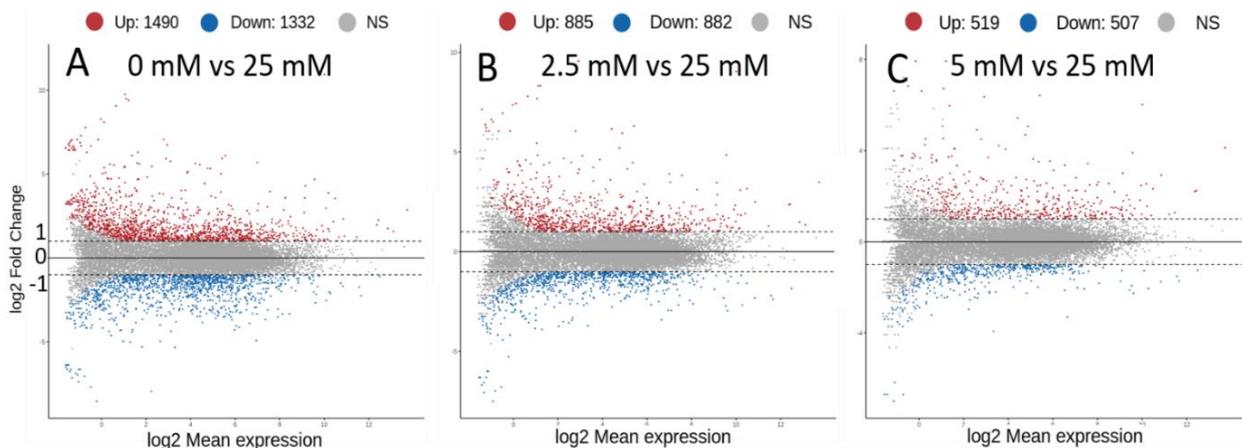
我們分析四種糖濃度，以 25 mM 濃度為對照組，分別與 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三個實驗組比較，由分析結果圖我們發現：所測得的 15,690 種基因中，在 0 mM 有非常多表現差異大的基因，包含眾多上調(紅點)與下調(藍點)基因，而 2.5 mM 之差異基因相較之下則大量減少，所剩多為上調基因，至 5 mM 時差異基因數又更為縮減，僅剩少數多為下調基因。2.5 mM 與 5 mM 之差異基因的表現趨勢不同，此現象值得深入探討。



圖六、不同糖濃度培養之 HepG2 細胞差異表現基因之 MA 點圖。(A)表示糖濃度 0 mM 組與 25 mM 組比對結果，(B)表示糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果，(C)則為糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果。縱座標為 log2 Fold Change，橫坐標為 log2 Mean expression。圖片虛線 log2FC 設為  $\pm 1$ ，紅點表示上調基因，藍點表示下調基因。

(2) MDA-MB-231 :

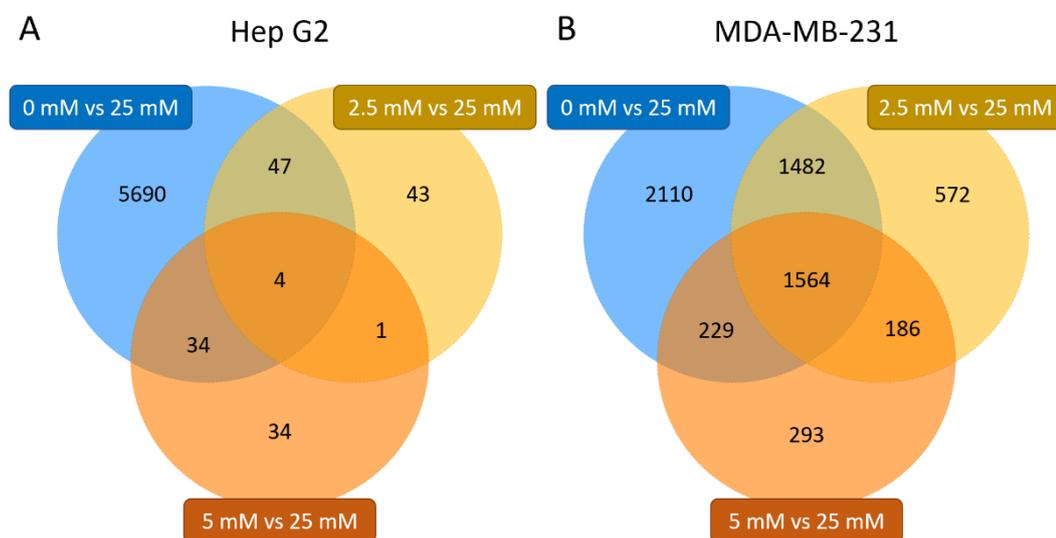
分析四種糖濃度，以 25 mM 濃度為對照組，分別與 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三個實驗組比較，由分析結果圖我們發現：所測得的 16,003 種基因中，在三種濃度皆有眾多上調(紅點)與下調(藍點)的差異基因，且隨濃度遞增，差異基因數遞減，與 HepG2 之實驗結果截然不同。此基因變化的結果可能與 MTT 實驗中，推測 MDA-MB-231 細胞對於糖的依賴需求較高，相較之下 HepG2 細胞生長對糖則較不依賴有關。



圖七、不同糖濃度培養之 MDA-MB-231 細胞差異表現基因之 MA 點圖。(A)表示糖濃度 0 mM 組與 25 mM 組比對結果，(B)表示糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果，(C)則為糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果。縱座標為 log2 Fold Change，橫坐標為 log2 Mean expression。圖片虛線 log2FC 設為  $\pm 1$ ，紅點表示上調基因，藍點表示下調基因。

## 2. 文氏圖 (Venn) 分析

文氏圖分析可呈現各組差異基因的交集聯集關係，結果呈現，Hep G2 細胞 0 mM Glu 組與對照組之差異基因數達 5,775 個，2.5 mM Glu 組與對照組之差異基因數減少為 95 個，5 mM Glu 組與對照組之差異基因數則降至 73 個，差異極大。相較之下，MDA-MB-231 細胞 0 mM Glu 組與對照組之差異基因數為 5,385 個，2.5 mM Glu 組與對照組之差異基因數為 3,804 個，5 mM Glu 組與對照組之差異基因數則有 2,272 個。由結果可得知，隨著實驗組之糖處理濃度越高，其與對照組之差異基因數越為減少，顯示糖濃度變化對 Hep G2 細胞與 MDA-MB-231 細胞的基因表現有一定的影響，其基因表現差異程度與對照組之糖濃度差呈正相關。但在不同糖濃度培養條件下，Hep G2 細胞的差異基因數隨著糖濃度升高而急遽減少，而 MDA-MB-231 細胞培養在 5 mM Glu 下變異基因的差異基因數仍達兩千多個。由文氏圖的交集與聯集關係的分析結果，呈現同樣趨勢，在三組實驗濃度與對照組之差異基因交集數，Hep G2 細胞有 4 個，MDA-MB-231 細胞則達 1,564 個，顯示 MDA-MB-231 細胞在低糖時的基因表現與其對照組相比，有較多的基因產生表現上的差異，推測原因可能和 MTT 分析結果之推測，MDA-MB-231 細胞其生長對糖濃度需求較高有關，而 Hep G2 細胞並沒有這樣的現象。



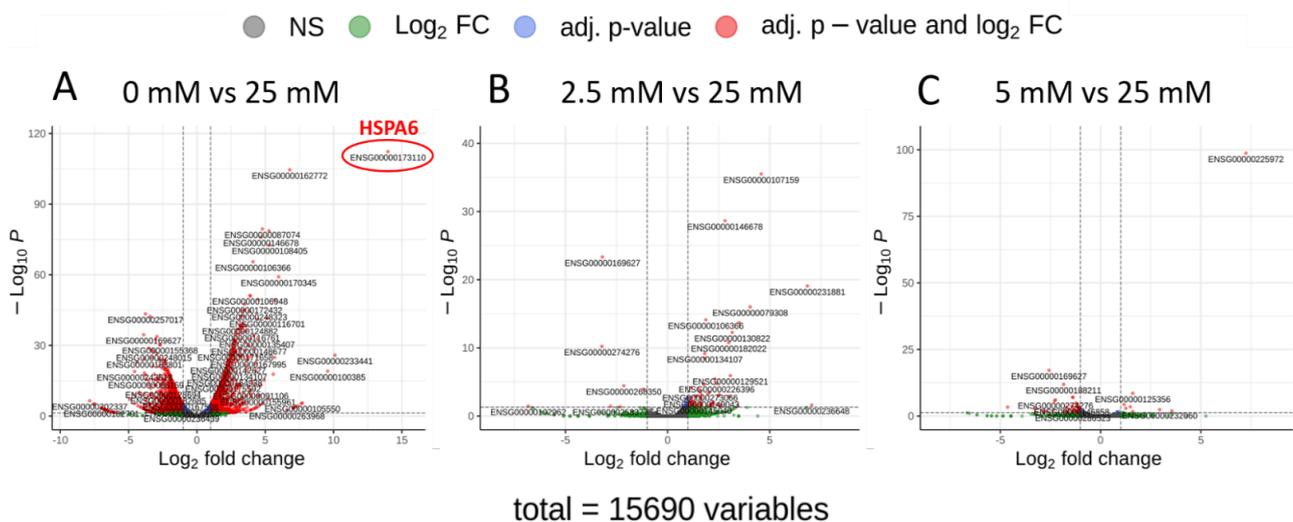
圖八、不同糖濃度培養之細胞差異表現基因之文氏圖分析。(A) 表示 HepG2 細胞處理 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三種糖濃度為實驗組，分別與處理 25 mM 對照組比較差異基因數所得之文氏圖，(B) 表示 MDA-MB-231 細胞處理 0 mM、2.5 mM 及 5mM 三種糖濃度為實驗組，分別與處理 25 mM 對照組比較差異基因數所得之文氏圖。

### 3. 火山圖 (Volcano Plot) 分析

藉由火山圖分析可以查看基因在兩個組別中的表現差異，以及此差異在統計上的顯著性。橫座標為差異倍數(Fold change)取  $\log_2$  值，縱座標為 p-value 取  $-\log_{10}$  值，若 p-value 越小代表統計上顯著的可信度越高，而  $-\log_{10}P$  的值也會越大。圖片虛線  $\log_2FC$  設為  $\pm 1$ ， $-\log_{10}P$  為 1.3 (p-value 為 0.05)。黑點表示無差異基因，綠點表示 p-value > 0.05 在統計上無顯著性，藍點表示差異過小的基因，紅點表示可參採之統計結果，圖上各色原點對應之數字為基因編號。分析結果可找出不同糖濃度培養條件下，表現變化差異顯著之基因，所篩選出的基因將於後續分析共同比較。

#### (1) HepG2 :

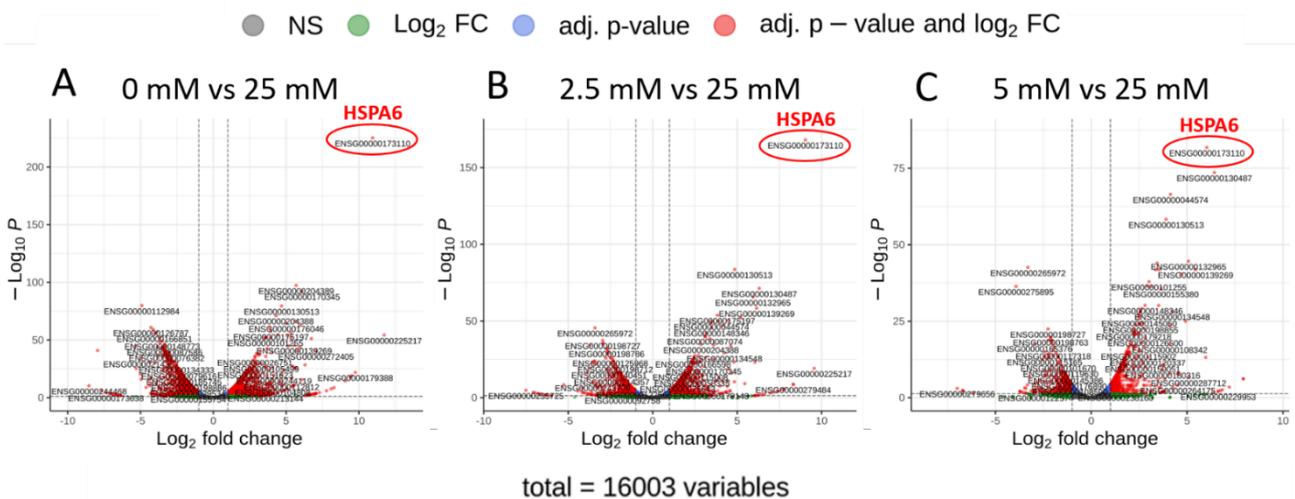
A 圖呈現在無糖培養條件下與對照組比較在表現增加及減少基因之數目極多，但隨著糖濃度增加急遽減少，與 MA plot 分析結果一致。但 Volcano plot 分析可清楚顯現單一基因差異顯著性，尤其在 A 圖右上角明顯大量表現基因因為 HSPA6，其  $\log_2FC$  值高達 13.9 倍，由縱軸  $-\log_{10}P$  值顯示具統計意義，在後續 MDA-MB-231 的實驗結果中也有同樣表現，因此後續將進一步分析。



圖九、不同糖濃度培養之 HepG2 細胞差異表現基因之火山圖。(A)表示糖濃度 0 mM 組與 25 mM 組比對結果，(B)表示糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果，(C)則為糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果。

(2) MDA-MB-231 :

在 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 糖濃度培養下，與 25 mM 糖濃度環境比較，具表現差異且統計顯著之基因 (紅點) 不論上調或下調的基因數目皆眾多，與 HepG2 細胞分析結果明顯不同，但同樣與 MA plot 分析結果一致。值得注意的是，在 A、B 及 C 圖中皆可發現右上角明顯大量表現基因為 HSPA6，其  $\log_2FC$  值分別為 10.9、9 及 6 倍，且縱軸  $-\log_{10}P$  值顯示具統計意義。此分析結果明確顯示:在 HepG2 細胞及 MDA-MB-231 細胞，於低糖濃度之代謝壓力下，HSPA6 (heat shock protein family A (Hsp70) member 6) (Song, Shen, Fu, & Fu, 2022)大量表現，經文獻搜尋後發現過去未有相關研究報導，後續值得深入探討。



圖十、不同糖濃度培養之 MDA-MB-231 細胞差異表現基因火山圖。(A)表示糖濃度 0 mM 組與 25 mM 組比對結果，(B)表示糖濃度 2.5 mM 組與 25 mM 組比對結果，(C)則為糖濃度 5 mM 組與 25 mM 組比對結果。

## (二)、富集分析 (Enrichment Analysis)

富集分析是指將基因按照先驗知識進行分類的一種分析方法，將基因分類後，能夠幫助我們查看尋找到的基因是否具有某方面的共同性。為了瞭解我們的候選基因所參與的代謝途徑，我們利用 Gene Ontology (GO)- Biological Process (BP)資料庫來進行分類分析。

Gene Ontology，簡稱 GO，是針對所有基因功能做出的國際分類標準，將基因做系統性地注釋，並用更豐富多元的方式來描述基因的性質，為每個基因提供三大方向的屬性分類，其中我們選擇的 Biological Process (BP) 是針對基因產物參與的生物程序進行分類。

常見的用來分析受影響基因與特定基因集相關性的方法主要有兩種，後續我們將應用 ORA 呈現富集點圖分析及富集網路圖分析。Over Representation Analysis (ORA)是一個較

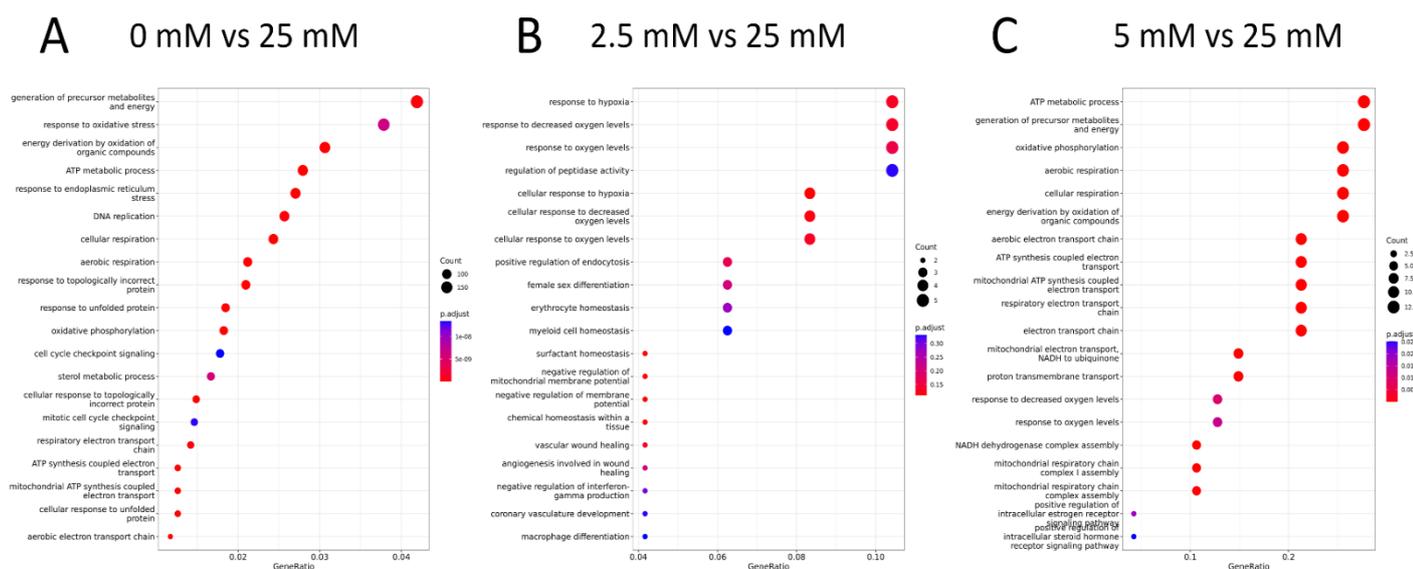
為傳統且被廣泛運用在分析受實驗影響基因集的方式，在取得不同基因在實驗組樣本及對照組樣本中的表現量後，利用統計方式計算 Fold change (FC) 以及顯著性檢定的 p-adjust 值，根據 FC 或 p-value 設定門檻篩選出差異表現基因後，檢定特定功能的基因集在總差異表現基因中佔的比例是否有顯著性。

### 1. 富集點圖分析

富集點圖分析能整理出在以 25 mM 糖濃度為基準比較的差異基因所屬功能分類排行，藉此了解低糖下主要變化基因所屬功能類別。圖形中橫軸 Gene Ratio 為該 GO-BP 類別下的差異表現基因數量佔所有總差異表現基因的比例，縱軸列出最顯著的前二十個 GO-BP 基因集類名，圓點顏色標示 p-adjust 大小，由小到大由藍至紅作為標記，圓點大小表示該 GO-BP 基因集下包含的基因數量。

#### (1) HepG2 :

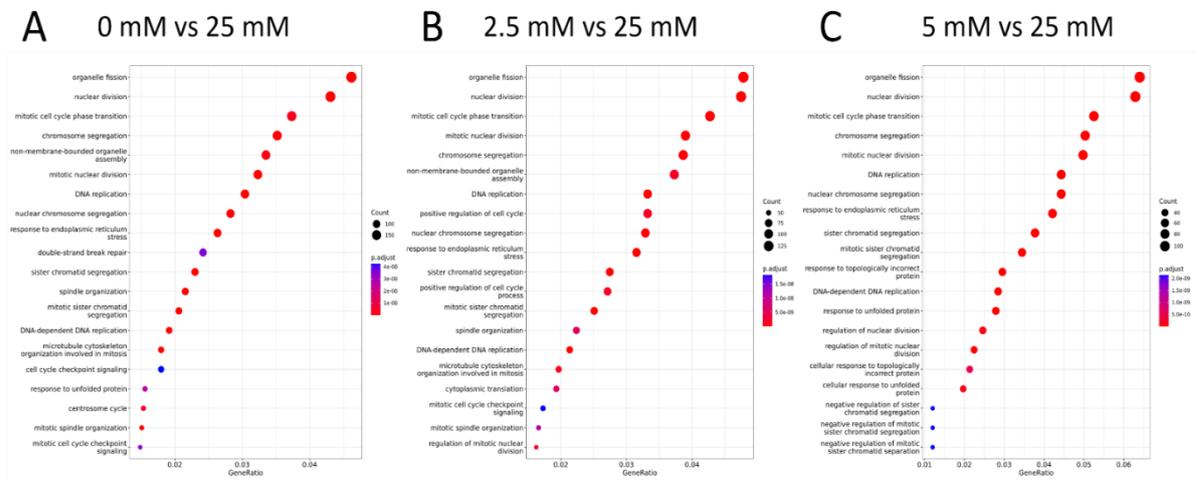
圖 A 呈現 0 mM 與 25 mM 糖濃度培養之最顯著差異基因，前二十個 GO-BP 基因集分類，B 及 C 圖因變異基因數過少，無連續性變化，不具統計意義。針對 A 圖，generation of precursor metabolites and energy 為最高之類別，顯示在無糖狀況下，HepG2 細胞引發代謝和能量產生之基因變化最為明顯。response to oxidative stress 次之，是否低糖之代謝壓力與氧化壓力引發改變之基因相同，值得探究。



圖十一、不同糖濃度培養之 HepG2 細胞差異表現基因 GO- BP 富集點圖分析。(A)表示處理 0 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集點圖分析(B)表示處理 2.5 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集點圖分析(C)表示處理 5 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集點圖分析。

(2) MDA-MB-231 :

三組不同糖濃度之 GO-BP 富集分析結果具高度重複性，顯示在不同低糖濃度下，細胞生長受阻所導致變化基因所屬功能類別相似，具有生理上的意義。organelle fission、nuclear division、mitotic cell cycle phase transition 及 chromosome segregation，表現變化基因功能分類之前四名，都和細胞生長有關，結果與我們預期相符。進一步比較 Hep G2 與 MDA-MB-231 的表現差異基因，所屬功能分類排行，有極大之不同，由此顯示糖濃度對於兩種癌細胞的生長影響功能不同。



圖十二、不同糖濃度培養之 MDA-MB-231 細胞差異表現基因 GO- BP 富集分析點圖。(A) 表示處理 0 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集點圖分析(B)表示處理 2.5 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集點圖分析(C)表示處理 5 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集點圖分析。

2. 富集網路圖 (enrichment map)分析

我們所分析的每個基因在細胞中可能具有不同的功能，因此一個基因會被重複列入不同的功能集中，富集網路圖分析能呈現基因在功能基因集中的重疊性，越多重複基因所在的功能基因集會被歸類在同一區塊，藉此我們能了解候選基因所在功能集的相關性。圖十三中基因集節點間連線表示基因集有共同基因，每個節點以顏色顯示出該基因集的 p-adjust，並以節點大小表示基因數量。

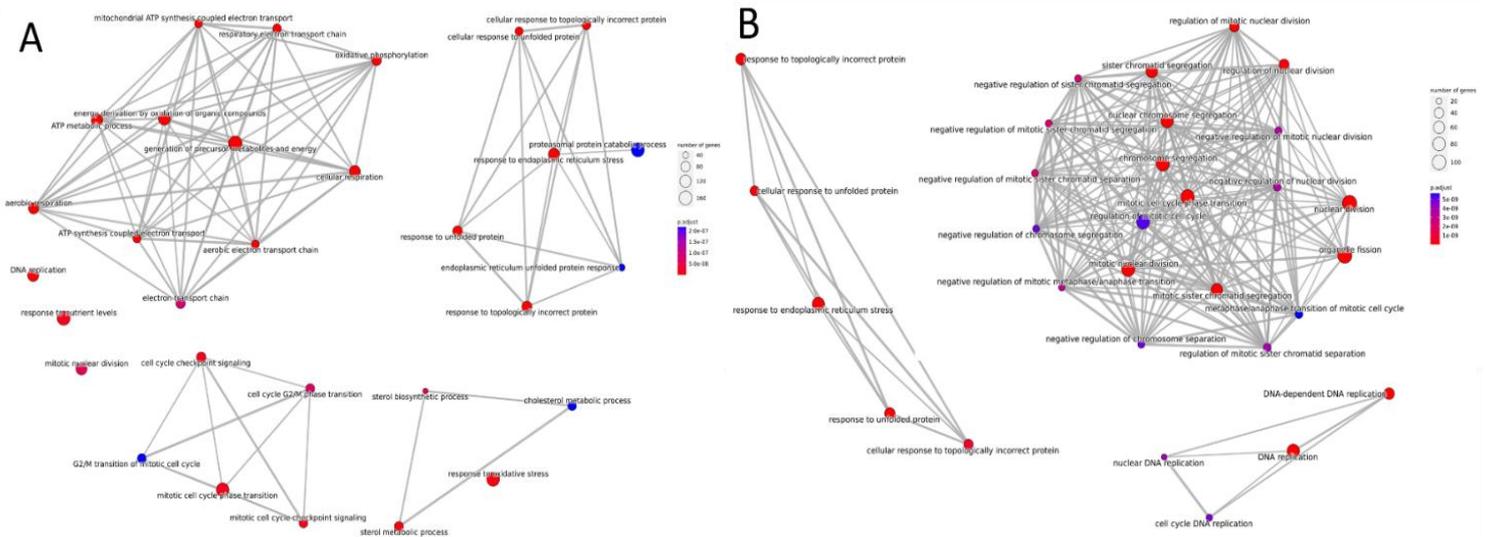
(1) HepG2 :

A 圖呈現 HepG2 細胞處理 0 mM 與 25 mM 糖濃度比較之差異基因所在最顯著的前三十個 GO-BP 基因集關聯性。網路圖主要呈現四個功能群組，而又以上方兩群最為多

數：左上方與細胞生長功能相關基因，右上方基因功能與細胞壓力反應有關，如 cellular response to unfolded protein，反映改變培養糖濃度狀態下，HepG2 細胞之生長相關基因表現受到明顯改變，以及應對壓力之基因表現也受到調節。

(2) MDA-MB-231：

B 圖呈現 MDA-MB-231 細胞處理 0 mM 與 25 mM 糖濃度比較之差異基因所在最顯著的前三十個 GO-BP 基因集關聯性。MDA-MB-231 細胞的富集網路圖與 G2 細胞明顯不同，集中呈現於一個主要的功能網絡，所包含的為細胞生長相關的基因功能集，主要功能有十個以上，包含範圍非常完整。顯示 MDA-MB-231 細胞在不同糖濃度培養條件，主要引發生長相關基因表現量改變。左側為與細胞壓力反應有關基因，數目明顯較少。



圖十三、處理 0 mM 與 25 mM 糖濃度之表現差異基因 GO-BP 富集分析網路圖。(A) 表示 HepG2 細胞之表現差異基因 GO-BP 富集分析網路圖 (B) 表示 MDA-MB-231 細胞之表現差異基因 GO-BP 富集分析網路圖。

3. 聚類熱圖 (Heatmap) 分析

應用 Heatmap 分析我們篩選不同實驗條件下差異明顯的 Top 100 基因，每列代表一個糖濃度條件，每行代表一個基因，標準化後的表現量(TPM)取 Z-score 值用不同的顏色表示，紅色表示表現量高，藍色表示表現量低，依變化差異趨勢聚集成類，此分析能協助我們找出有相似功能或參與相似生物調控的基因。

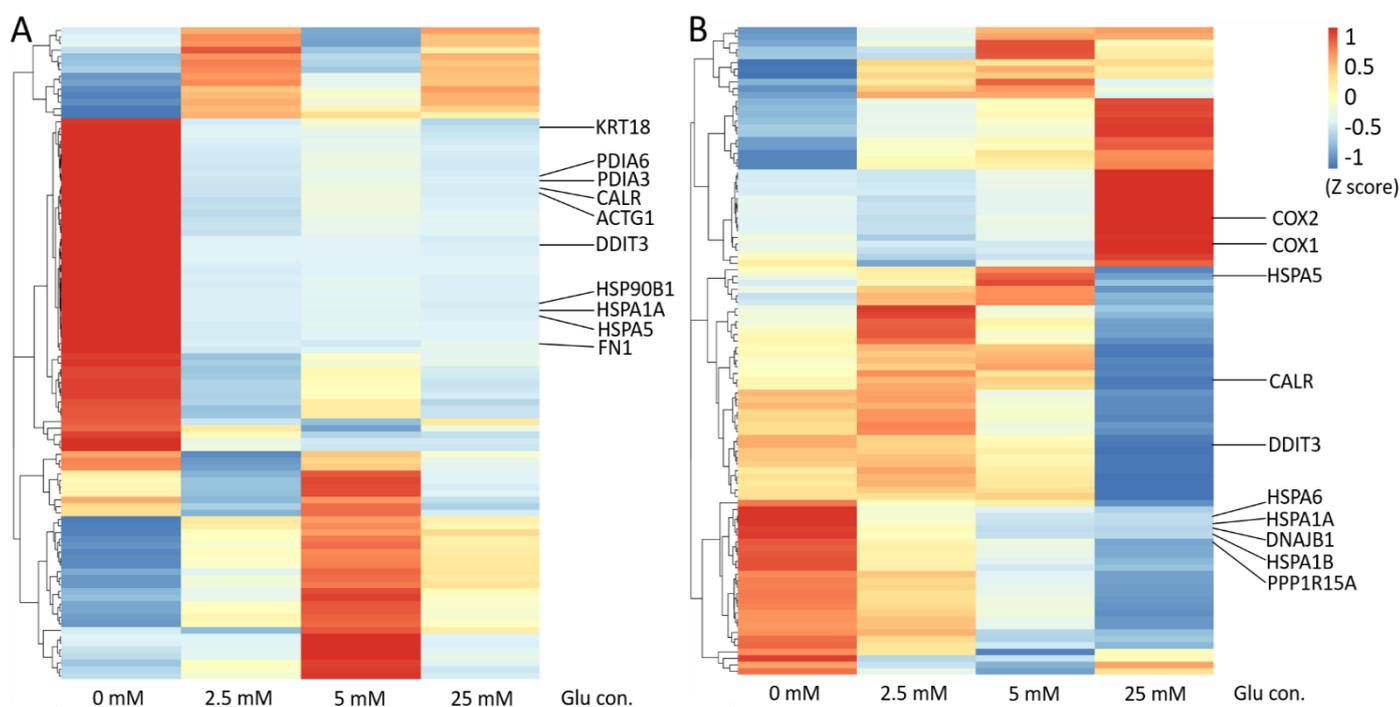
本研究目的為探討與糖濃度影響癌細胞生長之相關基因，因此優先挑選基因表現變化趨勢與生長趨勢一致之候選基因。針對表現趨勢與生長趨勢相符之基因群，我們制訂篩選策略，透過 NCBI 資料庫進行文獻搜尋比對（資料整理於表一及表二），以過去未有研究報導功能與糖影響癌細胞生長相關為前題，進一步篩選功能涉及細胞生長或已具與癌症相關研究報導的十個基因為候選基因。

(1) HepG2：

圖 A 結果可發現 0 mM 糖培養條件下，呈現大量表現增加基因，且此類群基因在糖濃度提升下，表現量大幅下降，基因表現具相似變化趨勢，且與糖濃度影響細胞生長情形一致，依據上述篩選策略，我們挑選出 KRT18 (Singh Bhangu et al., 2023)、PDIA6 (Mao, Wu, Gong, Yu, & Huang, 2021)、PDIA3 (Germon, Heesom, Amoah, & Adams, 2023)、CALR (Gao et al., 2022)、ACTG1 (Chen et al., 2020)、DDIT3 (B. Zhang et al., 2022)、HSP90B1 (Batzorig, Wei, Wang, Huang, & Chang, 2021)、HSPA1A (Ding et al., 2022)、HSPA5 (C. Zhang et al., 2022) 及 FN1 (Li, Chen, Chen, & Guo, 2022) 共十個基因（如圖 A 所示）。基因之功能及文獻發現與癌症相關研究，說明如表 1。此十個候選基因包含了三個熱休克蛋白 (heat shock protein, HSP)，雖屬不同蛋白家族，但表現變化趨勢相當接近，值得深入探討。

(2) MDA-MB-231：

圖 B 結果顯示不同糖濃度培養下基因變化呈現多元趨勢，與圖 A 明顯不同。依據上述篩選策略，我們挑選了表現量隨糖濃度升高而增加的 COX1 (Nasry et al., 2019) 及 COX2 (Nasry et al., 2019) 兩個基因，以及表現量隨糖濃度升高而減少的 HSPA6 (Song et al., 2022)、HSPA1A (Ding et al., 2022)、HSPA1B (Jagadish et al., 2016)、HSPA5 (C. Zhang et al., 2022)、DNAJB1 (Huang, Yu, Zhang, Zhao, & Huang, 2014)、DDIT3 (B. Zhang et al., 2022)、PPP1R15A (Korabiowska, Betke, Kellner, Stachura, & Schauer, 1997) 及 CALR (Gao et al., 2022) 八個基因，基因之功能及文獻發現與癌症相關研究，說明如表 2。此十個候選基因包含了五個熱休克蛋白，除 HSPA5 之外，其餘表現變化趨勢相當接近，值得深入探討。



圖十四、不同糖濃度培養之細胞差異表現基因之聚類熱圖分析。(A) 表示 HepG2 細胞分別處理 0 mM、2.5mM、5 mM 及 25 mM 四種糖濃度的聚類熱圖，(B) 表示 MDA-MB-231 細胞分別處理 0 mM、2.5 mM、5 mM 及 25 mM 四種糖濃度的聚類熱圖。

表一、HepG2 細胞篩選之 10 個新穎候選基因

Symbol	Description	文獻發現與癌症相關研究	GO-BP terms
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	在乳癌病人的血液中，表現量隨癌化程度增加；口腔癌組織中表現較高，與癌細胞生長和轉移有關	response to endoplasmic reticulum stress
HSPA5	heat shock protein family A (Hsp70) member 5	由資料庫分析發現，在多數癌症病人組織表現皆較高	response to endoplasmic reticulum stress
HSP90B1	heat shock protein 90 beta family member 1	大腸癌細胞株表現量增加	response to endoplasmic reticulum stress
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	於HepG2細胞發現作用與癌細胞凋亡有關	response to endoplasmic reticulum stress
CALR	calreticulin	誘發肺癌細胞生長	response to endoplasmic reticulum stress
PDIA6	protein disulfide isomerase family A member 6	於口腔癌細胞株中參與糖酵解作用及癌細胞生長	protein folding
PDIA3	protein disulfide isomerase family A member 3	於乳癌細胞表現增加與癌化作用有關	response to endoplasmic reticulum stress
FN1	fibronectin 1	胃癌組織中大量表現，表現量和癌症惡化程度有關	nucleotide metabolic process
KRT18	keratin 18	與肝癌轉移能力有關	liver development
ACTG1	actin gamma 1	表現量降低顯示和卵巢癌患者預後不良有關	regulation of actin filament bundle assembly

表二、MDA-MB-231 細胞篩選之 10 個新穎候選基因

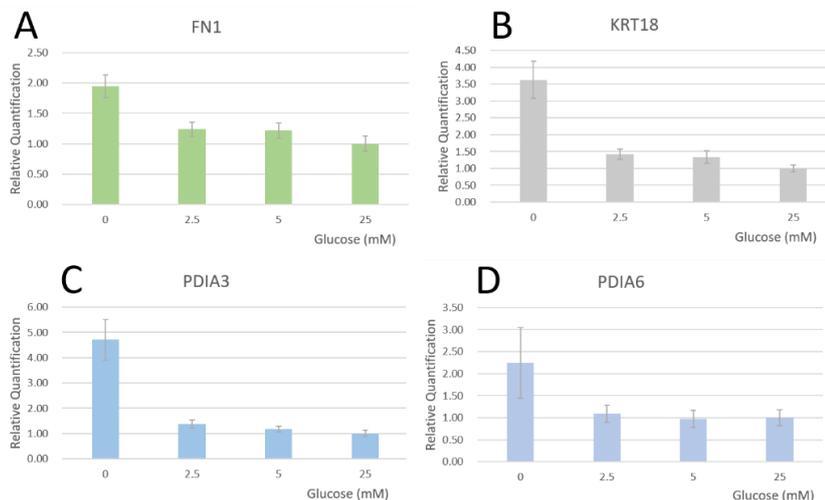
Symbol	Description	文獻發現與癌症相關研究	GO-BP terms
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	在乳癌病人的血液中，表現量隨癌化程度增加；口腔癌組織中表現較高，與癌細胞生長和轉移有關	response to endoplasmic reticulum stress
HSPA1B	heat shock protein family A (Hsp70) member 1B	大腸癌細胞株表現量增加	nuclear division
HSPA6	heat shock protein family A (Hsp70) member 6	cervical cancer, cholangio carcinoma, glioblastoma, pancreatic adenocarcinoma, kidney renal clear cell carcinoma 和 skin cutaneous melanoma表現增加，扮演致癌基因角色 lung cancer表現下降，為抑癌基因	response to endoplasmic reticulum stress
HSPA5	heat shock protein family A (Hsp70) member 5	由資料庫分析發現，在多數癌症病人組織表現皆較高	response to endoplasmic reticulum stress
DNAJB1	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1	在癌細胞株中發現與糖酵解反應的PKM結合，抑制作用，而影響癌細胞生長	response to endoplasmic reticulum stress
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	於HepG2細胞發現作用與癌細胞凋亡有關	response to endoplasmic reticulum stress
CALR	calreticulin	誘發肺癌細胞生長	response to endoplasmic reticulum stress
PPP1R15A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A	血癌細胞中表現增加並和p53共同作用	response to endoplasmic reticulum stress
COX1	cytochrome c oxidase subunit I	口腔癌組織及細胞株皆有大量表現	response to oxidative stress
COX2	cytochrome c oxidase subunit II	口腔癌組織及細胞株皆有大量表現	response to oxidative stress

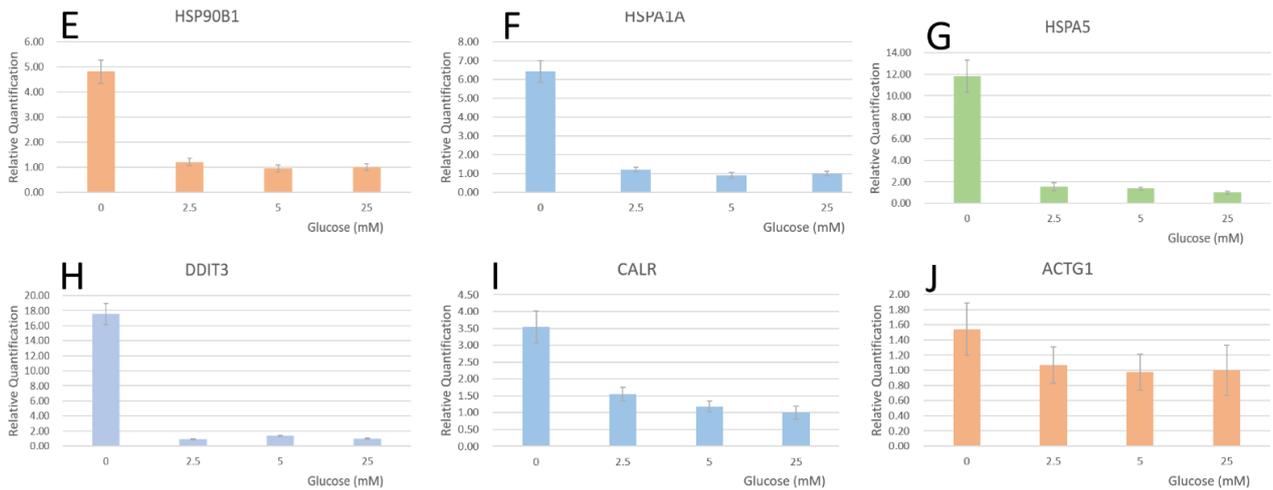
### 三、 qRT-PCR 驗證候選基因表現

由上述資料分析法篩選出之候選基因，我們進一步應用 qRT-PCR 技術進行基因表現變化量驗證。

#### (1) HepG2：

以不同糖濃度培養細胞 24 小時，萃取 RNA 後，針對所挑選之候選基因進行 qRT-PCR，所得之基因變化趨勢皆與 RNA-seq 分析之結果相符，此結果初步證明 RNA-seq 分析所得之基因變化差異之正確性。

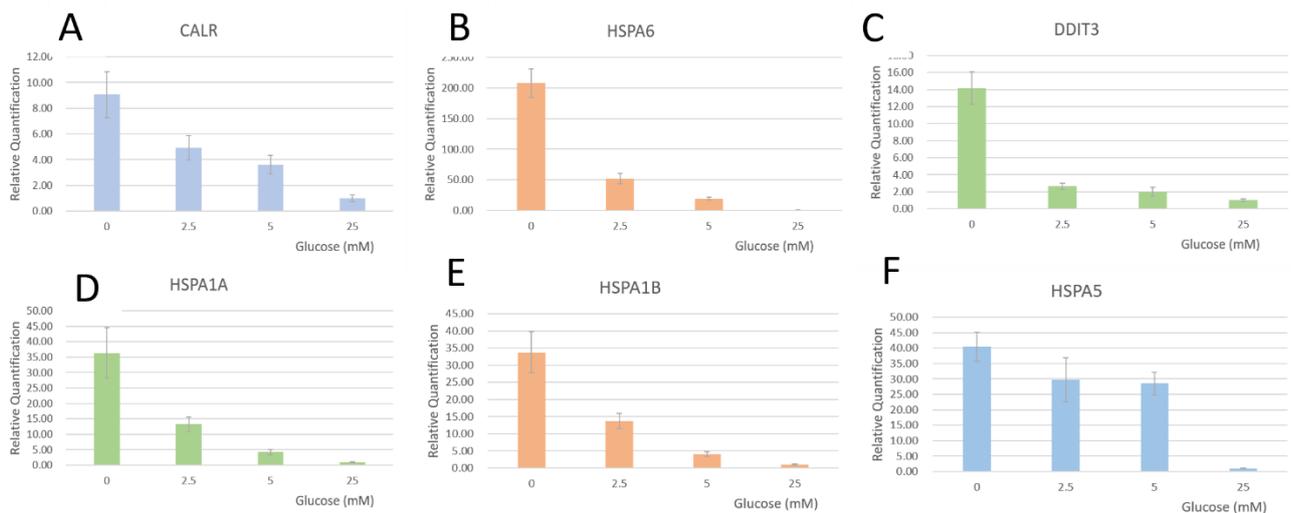




圖十五、以 0 mM、2.5 mM、5 mM 及 25 mM 糖濃度培養 24 小時之 HepG2 細胞相對基因表現量圖。(A)表示 FN1 基因相對表現量圖，(B) 表示 KRT18 基因相對表現量圖，(C) 表示 PDIA3 基因相對表現量圖，(D) 表示 PDIA6 基因相對表現量圖，(E) 表示 HSP90B1 基因相對表現量圖，(F) 表示 HSPA1A 基因相對表現量圖，(G) 表示 HSPA5 基因相對表現量圖，(H) 表示 DDIT3 基因相對表現量圖，(I) 表示 CALR 基因相對表現量圖，(J) 表示 ACTG1 基因相對表現量圖。橫坐標為細胞處理之糖濃度，縱座標為 RQ 值。

(2) MDA-MB-231：

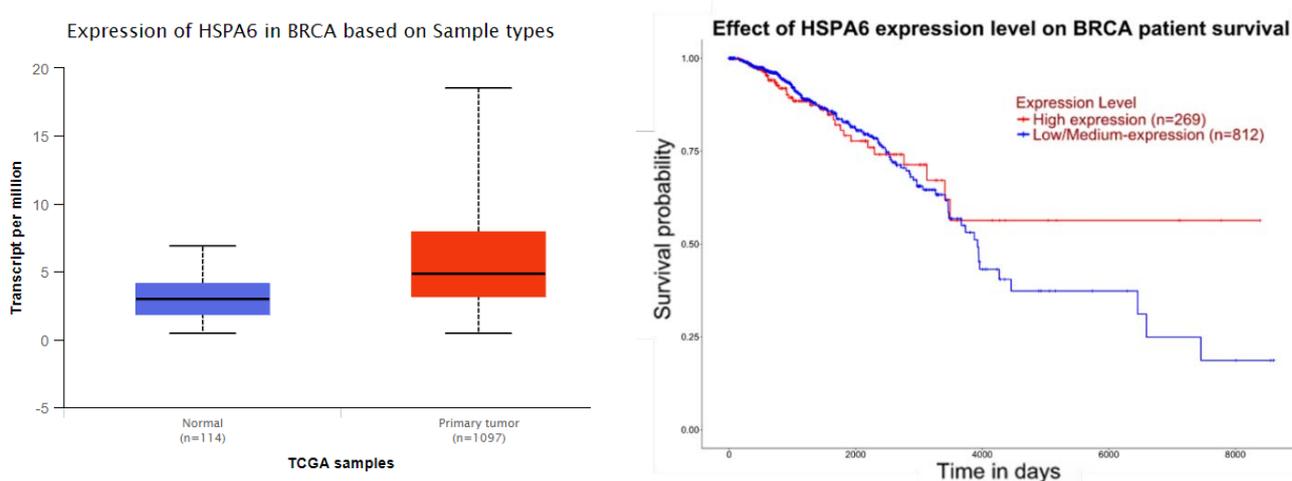
以不同糖濃度培養細胞 24 小時，萃取 RNA 後，針對所挑選之候選基因進行 qRT-PCR，所得之基因變化趨勢皆與 RNA-seq 分析之結果相符，此結果初步證明 RNA-seq 分析所得之基因變化差異之正確性。



圖十六、以 0 mM、2.5 mM、5 mM 及 25 mM 糖濃度培養 24 小時之 MDA-MB-231 細胞相對基因表現量圖。(A)表示 CALR 基因相對表現量圖，(B) 表示 HSPA6 基因相對表現量圖，(C) 表示 DDIT3 基因相對表現量圖，(D) 表示 HSPA1A 基因相對表現量圖，(E) 表示 HSPA1B 基因相對表現量圖，(F) 表示 HSPA5 基因相對表現量圖。橫坐標為細胞處理之糖濃度，縱座標為 RQ 值。

#### 四、UALCAN (The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal)資料庫分析

過去研究已知，HSPA6 於不同癌症可能扮演致癌或抑癌的角色，而此基因是否在臨床癌症病人身上具臨床意義?初步應用 UALCAN 之 TCGA 資料庫進行分析。針對 HSPA6 基因，分析結果發現，以乳癌臨床病人檢體分析，HSPA6 於癌組織中表現高於正常人，然資料庫中 HSPA6 高表達之乳癌病患的存活率大於低表達病人。初步可了解 HSPA6 於乳癌臨床病人具表現差異，針對此現象未來值得深入研究了解。



圖十七、HSPA6 於 UALCAN 之 TCGA 資料庫於乳癌組織表現量及病患存活率分析

## 陸、討論

本研究探討不同糖濃度對癌細胞生長影響，及癌細胞在不同糖濃度下，引發基因表現的差異。結果發現：肝癌細胞 (HepG2)及乳癌細胞 (MDA-MB-231)在 0~25mM 不同糖濃度培養下，細胞生長隨糖濃度降低而受到抑制。RNA-seq 技術分析測得約 16,000 種表現基因，隨不同糖濃度培養，各組別約有 100~5,000 個基因觀察到變化，糖濃度越低基因變化越明顯，也發現乳癌和肝癌細胞基因變化情形不同。以下針對研究結果，分別進行討論:

### (一)、糖濃度對不同癌細胞之生長影響不同

實驗結果發現，癌細胞培養在 0~25mM 不同糖濃度，觀察 24 - 72 小時，細胞仍有存活，但隨糖濃度下降生長被抑制。就單一糖濃度觀察細胞生長情形，HepG2 細胞在 0.25mM 糖濃度培養時，可觀察到細胞無法隨培養時間拉長而增加，但 MDA-MB-231 細胞在 2.5mM 糖濃

度時，已發生生長抑制情形。推測MDA- MB-231 細胞對於糖的依賴需求較高，相較之下HepG2 細胞生長對糖則較不依賴。此結果也與臨床上觀察到，高糖最易誘發乳癌發生，而肝癌發生與糖份關聯性較低相符。

## (二)、不同癌細胞在低糖代謝壓力下，產生重組代謝程序作用機制不同

應用 NGS RNA-seq 技術分析不同糖濃度癌細胞株基因表現差異，利用 25 mM 高糖培養為對照組，進行差異基因表現分析，MA 點圖分析結果發現，HepG2 肝癌細胞於無糖培養時有明顯上升及下調之基因表現差異，但糖濃度升高則不明顯。MDA-MB-231 乳癌細胞於 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三個糖濃度，皆有眾多的表現差異基因。此結果呈現在文氏圖的交集與聯集關係的分析結果，三組實驗濃度與對照組之差異基因交集數，Hep G2 細胞有 4 個，MDA-MB-231 細胞則達 1,564 個，顯示 MDA-MB-231 細胞在 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三個糖濃度，有高達 1,500 個基因皆受到調控產生基因表現差異。此結果顯示，不同癌細胞面對低糖引發的代謝壓力，所產生的重組代謝程序作用機制有所不同，也導致對細胞生長造成不同影響。

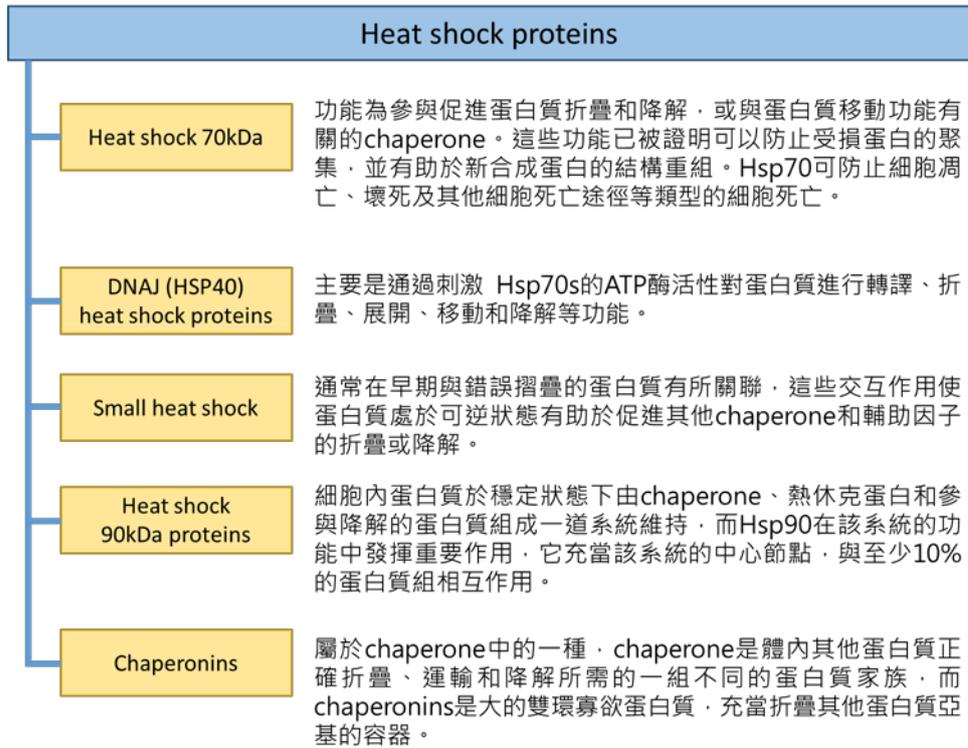
## (三)、熱休克蛋白(Heat shock protein, HSP) 參與糖影響癌細胞生長的作用

由火山圖分析結果意外發現，HSPA6 (heat shock protein family A (Hsp70) member 6) 基因在低糖濃度培養下，明顯大量表現。HepG2 肝癌細胞於無糖培養時發現，MDA-MB-231 乳癌細胞於 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三個糖濃度，皆為表現差異最高。HSPA6 過去並未被發現與癌細胞糖酵解作用或糖調控生長有關，本研究首度發現 HSPA6 在癌細胞低糖培養下，有大量表現的現象，為參與糖影響癌細胞生長的新穎基因。

透過聚類熱圖分析，研究中進一步篩選 mRNA 表現變化趨勢與生長趨勢一致的基因為新穎候選基因。其中在 HepG2 也找到 HSP90B1、HSPA1A、HSPA5 及 MDA-MB-231 找出 HSPA1A、HSPA1B、HSPA5、DNAJB1，皆為熱休克蛋白的家族成員，顯示熱休克蛋白參與的重要性，非常值得未來深入探討。

熱休克蛋白是在細胞於熱休克反應後，被發現誘導表現出之蛋白質，因而得名。熱休克蛋白家族依分子量共分為五類，分別為 HSP100，HSP90，HSP70，HSP60 以及小分子熱休克蛋白 small Heat Shock Proteins (sHSPs)(Iida, 1985)。研究發現，熱休克蛋白除具有保護細胞的功能外，也參與其他作用功能，而不同家族成員也有不同功能 (圖十八)。文獻搜尋中也

發現 (表一及表二)，本研究找出之熱休克蛋白，與不同癌症發生有關，尤其 HSPA6 與大部分癌症生長有關，HSPA1A 則在乳癌病患身上表現特別高，與本研究推測結果相符。



圖十八、熱休克蛋白家族不同功能介紹

#### (四)、不同糖濃度培養之表現差異基因，功能主要與細胞的生長和代謝壓力反應相關

富集點圖分析顯示出低糖下主要變化基因所屬的功能類別，Gene Ontology (GO)-Biological Process (BP)資料庫分析結果，最顯著的前二十個基因集，功能多與細胞生長有關，此結果也呈現於富集網路圖。HepG2 細胞在無糖培養時，主要表現變化基因的功能為：generation of precursor metabolites and energy 及 response to oxidative stress。MDA-MB-231 細胞三組低糖濃度變化基因則幾乎完全一致，主要功能類別為：organelle fission、nuclear division、mitotic cell cycle phase transition 及 chromosome segregation，判別這些功能皆與細胞的生長相關功能有關，但 HepG2 細胞與 MDA-MB-231 細胞分析所得結果截然不同，所代表之意義值得進一步了解。

#### (五)、本研究分析篩選出之新穎候選基因，為參與糖分影響癌細胞生長之新發現基因

研究中透過NGS RNA-seq結果之各項生物資訊軟體分析，以及文獻搜尋交抽比對結果，初步於 HepG2 及 MDA-MB-231 細胞各篩選出 10 個候選基因，其中 16 個基因已應用 qRT-PCR 進行分析，實驗結果均與 NGS RNA-seq 之結果相符，證明實驗結果的可信度。新穎候選基

因均尚未被發現參與糖影響癌細胞作用機制，研究結果提供了糖分誘發癌細胞生長機制研究的新方向。

## 柒、結論與應用

### 一、 結論

- (一)、 癌細胞於低糖環境培養中，生長受抑制，且抑制作用隨培養時間增加而更加明顯。實驗中發現，乳癌細胞在低糖環境下，細胞生長抑制現象較明顯，顯示對糖份依賴性相對比肝癌細胞較高。
- (二)、 在 NGS RNA-seq 技術分析結果中，肝癌細胞只在無糖培養下，基因表現明顯變化，而乳癌細胞則在 0 mM、2.5 mM 及 5 mM 三種糖濃度皆有明顯變化。
- (三)、 乳癌和肝癌細胞在低糖代謝壓力下，HSPA6 基因大量表現，同家族之 HSP90B1、HSPA1A、HSPA5 及 HSPA1B 基因，亦被誘發表現，此現象過去未被報導過，值得進一步探討。
- (四)、 乳癌和肝癌細胞在不同糖濃度表培養表現差異基因，功能主要與細胞的代謝壓力反應和生長相關。

### 二、 應用

癌症是全球主要死亡原因之一，2021 年全球癌症新發病例超過 2,000 萬例，癌症死亡病例也突破 1,000 萬例。2020 年，女性乳癌首次超過肺癌，成為全球最常見癌症。在台灣癌症已連續 40 年居十大死因首位，而肝癌已連續 42 年排名癌症死亡率前 2 名。癌症被認定是新陳代謝疾病後，為研究和治療開啟了新的視野。本研究應用 NGS RNA-seq 之全基因體分析技術，研究結果讓我們更加了解糖對乳癌及肝癌細胞生長的影響，也探索糖分誘發癌細胞生長的全新作用基因，藉此提供未來開發出更有效癌症治療藥物的線索。

## 捌、參考文獻資料

- Batzorig, U., Wei, P. L., Wang, W., Huang, C. Y., & Chang, Y. J. (2021). Glucose-Regulated Protein 94 Mediates the Proliferation and Metastasis through the Regulation of ETV1 and MAPK Pathway in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci*, 18(11), 2251-2261. doi:10.7150/ijms.56024
- Bononi, G., Masoni, S., Di Bussolo, V., Tuccinardi, T., Granchi, C., & Minutolo, F. (2022). Historical perspective of tumor glycolysis: A century with Otto Warburg. *Semin Cancer Biol*, 86(Pt 2), 325-333.

doi:10.1016/j.semcancer.2022.07.003

Bose, S., & Le, A. (2018). Glucose Metabolism in Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 1063, 3-12. doi:10.1007/978-3-319-77736-8\_1

Chen, S., Wang, X., Yuan, J., Deng, C., Xie, X., & Kang, J. (2020). Reduced levels of actin gamma 1 predict poor prognosis in ovarian cancer patients. *J Obstet Gynaecol Res*, 46(9), 1827-1834. doi:10.1111/jog.14353

Chinopoulos, C., & Seyfried, T. N. (2018). Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro*, 10, 1759091418818261. doi:10.1177/1759091418818261

Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., . . . Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230-233. doi:10.1038/nature06734

Ding, L. X., Zhang, J., Yang, S. S., Wu, J., Su, T., & Wang, W. M. (2022). Heat Shock Proteins 70 Regulate Cell Motility and Invadopodia-Associated Proteins Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 890218. doi:10.3389/fendo.2022.890218

Epner, M., Yang, P., Wagner, R. W., & Cohen, L. (2022). Understanding the Link between Sugar and Cancer: An Examination of the Preclinical and Clinical Evidence. *Cancers (Basel)*, 14(24). doi:10.3390/cancers14246042

Epstein, C. B., & Butow, R. A. (2000). Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge. *Curr Opin Biotechnol*, 11(1), 36-41. doi:10.1016/s0958-1669(99)00065-8

Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487). doi:10.1126/science.aaw5473

Gao, F., Mu, X., Wu, H., Chen, L., Liu, J., & Zhao, Y. (2022). Calreticulin (CALR)-induced activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway boosts lung cancer cell proliferation. *Bioengineered*, 13(3), 6856-6865. doi:10.1080/21655979.2022.2040874

Germon, A., Heesom, K. J., Amoah, R., & Adams, J. C. (2023). Protein disulfide isomerase A3 activity promotes extracellular accumulation of proteins relevant to basal breast cancer outcomes in human MDA-MB-A231 breast cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 324(1), C113-c132. doi:10.1152/ajpcell.00445.2022

Huang, L., Yu, Z., Zhang, T., Zhao, X., & Huang, G. (2014). HSP40 interacts with pyruvate kinase M2 and regulates glycolysis and cell proliferation in tumor cells. *PLoS One*, 9(3), e92949. doi:10.1371/journal.pone.0092949

Iida, H. (1985). [Molecular biology of the heat shock proteins]. *Seikagaku*, 57(9), 1282-1289.

Jagadish, N., Parashar, D., Gupta, N., Agarwal, S., Suri, V., Kumar, R., . . . Suri, A. (2016). Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) is a novel therapeutic target for colorectal cancer and is associated with tumor growth. *BMC Cancer*, 16, 561. doi:10.1186/s12885-016-2592-7

Korabiowska, M., Betke, H., Kellner, S., Stachura, J., & Schauer, A. (1997). Differential expression of growth arrest, DNA damage genes and tumour suppressor gene p53 in naevi and malignant melanomas. *Anticancer Res*, 17(5a), 3697-3700.

Li, J., Chen, C., Chen, B., & Guo, T. (2022). High FN1 expression correlates with gastric cancer

progression. *Pathol Res Pract*, 239, 154179. doi:10.1016/j.prp.2022.154179

Mao, L., Wu, X., Gong, Z., Yu, M., & Huang, Z. (2021). PDIA6 contributes to aerobic glycolysis and cancer progression in oral squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*, 19(1), 88. doi:10.1186/s12957-021-02190-w

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 387-402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359

Nasry, W. H. S., Wang, H., Jones, K., Tesch, M., Rodriguez-Lecompte, J. C., & Martin, C. K. (2019). Cyclooxygenase and CD147 expression in oral squamous cell carcinoma patient samples and cell lines. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 128(4), 400-410.e403. doi:10.1016/j.oooo.2019.06.005

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463

Seyfried, T. N., Flores, R. E., Poff, A. M., & D'Agostino, D. P. (2014). Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*, 35(3), 515-527. doi:10.1093/carcin/bgt480

Singh Bhangu, J., Macher-Beer, A., Schimek, V., Garmroudi, B., Tamandl, D., Unger, L. W., . . . Oehler, R. (2023). Circulating caspase-cleaved cytokeratin 18 correlates with tumour burden and response to therapy in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Clin Chim Acta*, 538, 53-59. doi:10.1016/j.cca.2022.11.009

Song, B., Shen, S., Fu, S., & Fu, J. (2022). HSPA6 and its role in cancers and other diseases. *Mol Biol Rep*, 49(11), 10565-10577. doi:10.1007/s11033-022-07641-5

Stark, R., Grzelak, M., & Hadfield, J. (2019). RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*, 20(11), 631-656. doi:10.1038/s41576-019-0150-2

Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften*, 12(50), 1131-1137. doi:10.1007/BF01504608

Zhang, B., Cao, J. T., Wu, Y. B., Gao, K. X., Xie, M., Zhou, Z. K., . . . Hou, S. S. (2022). Riboflavin (Vitamin B2) Deficiency Induces Apoptosis Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress and the CHOP Pathway in HepG2 Cells. *Nutrients*, 14(16). doi:10.3390/nu14163356

Zhang, C., Liu, Q., Zhou, Y., Hua, J., Su, R., & Ai, J. (2022). HSPA5 Could Be a Prognostic Biomarker Correlated with Immune Infiltration in Breast Cancer. *Dis Markers*, 2022, 7177192. doi:10.1155/2022/7177192

## 【評語】 052003

研究低糖環境的代謝壓力下，癌細胞透過重組代謝程序，改變了哪些基因的表現，進而達到快速生長的目的，是目前尚未被了解且重要的研究問題。透過 RNA-seq 技術能全面分析癌細胞在不同糖濃度下基因表現變化，藉此窺探糖分誘發癌細胞生長機制。以乳癌和肝癌細胞株為研究模式，低糖培養下癌細胞生長受阻，進而以 RNA-seq 技術分析，測得約 16,000 種表現基因。

該研究挑選出十個新穎候選基因，並使用 qRT-PCR 進行驗證。然而，基因的選擇過程可能存在主觀性和偏差，且只選擇了少數基因進行驗證。應更全面和系統性的驗證方法，如基因剔除或過度表達實驗，以及功能性試驗，可以進一步確定這些基因的作用和重要性，實驗數據缺乏分析統計。

選擇 HSPA6 之原因要說明，和細胞生長之相關，此外 HSPA6 之功能宜深入探討。

## 作品海報

# 癌細胞的「糖嗜好」～

RNA-seq技術探索糖分誘發癌細胞生長機制

# 摘要

糖影響癌細胞生長之機制複雜，近年基因體研究技術發展，透過RNA-seq技術，能全面分析癌細胞在不同糖濃度下基因表現變化，藉此窺探糖分誘發癌細胞生長機制。本研究以乳癌(MDA-MB-231)和肝癌(HepG2)細胞株為研究模式，低糖培養下，癌細胞生長受阻，進而以RNA-seq技術分析，測得約16,000種表現基因，不同糖濃度培養分析組別中，約有100~5,000個基因觀察到差異，糖濃度越低基因改變越明顯，也發現乳癌和肝癌細胞基因變化情形不同。藉由富集分析，顯示表現變化基因功能主要與生長相關。經文獻查詢比對後，兩種癌細胞各挑選出10個新穎候選基因，以qRT-PCR驗證，確認實驗結果，並分析HSP蛋白表現。本研究勾勒糖影響癌細胞生長之相關基因表現變化樣貌，並探索發現參與作用的新穎基因，有助於瞭解糖分誘發癌細胞生長的作用機制。

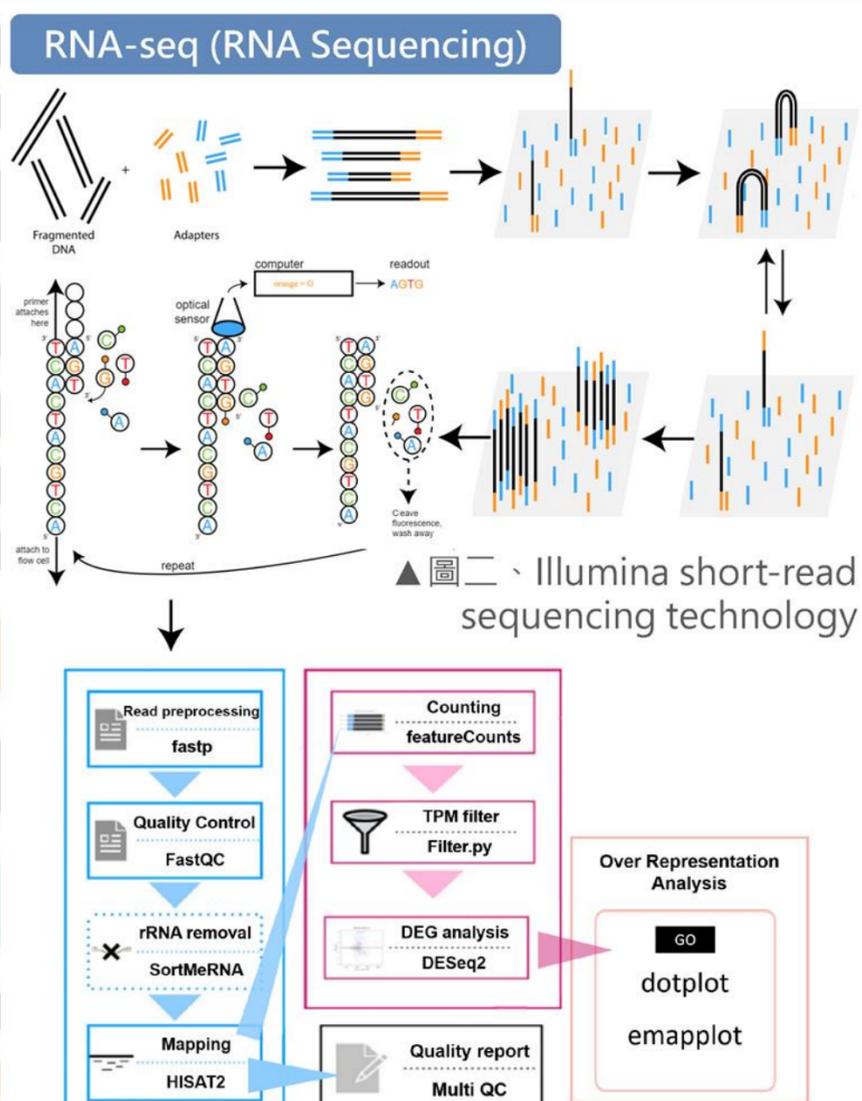
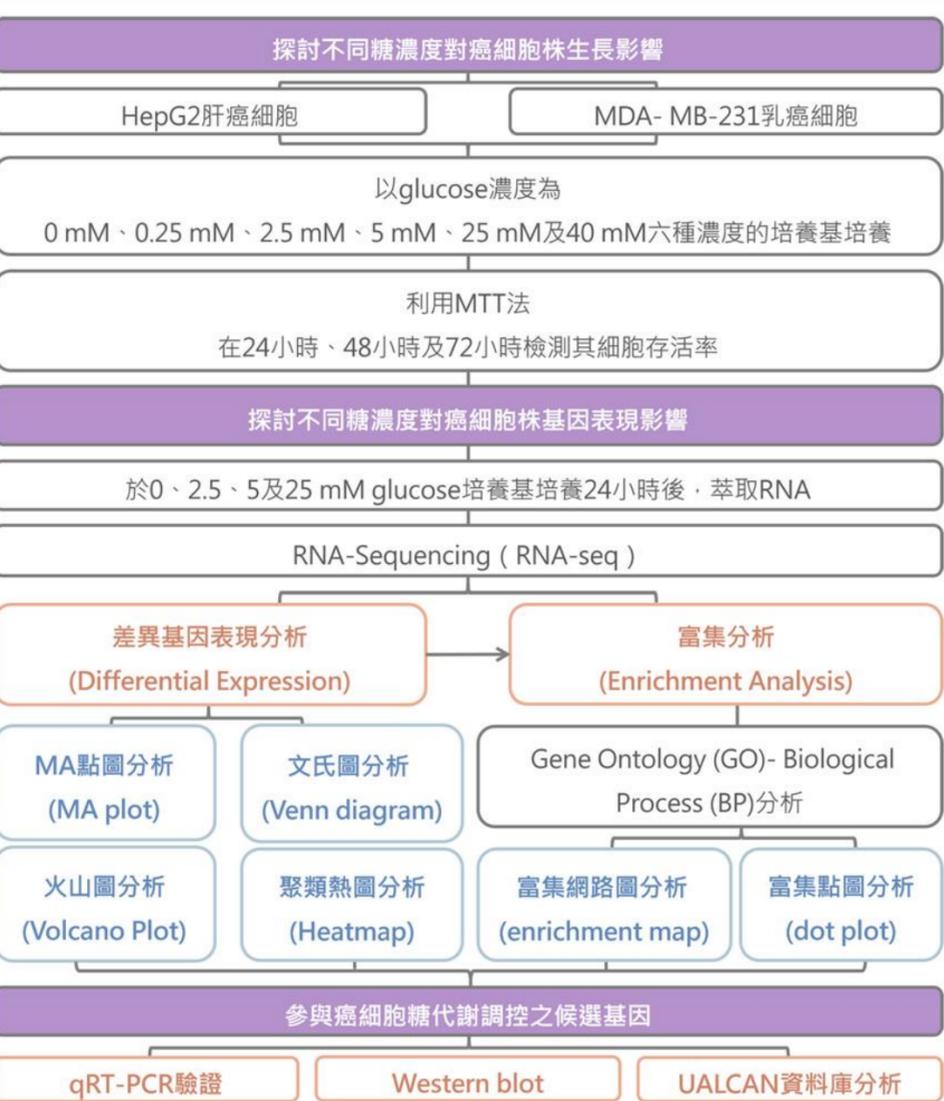
## 壹、研究動機

甜食是許多人的最愛，我們也不例外，然而研究證實**攝取過多的糖會增加罹癌的風險**。因此，糖與癌細胞的「甜蜜關係」成為我們非常想研究的主題，也想知道糖對不同癌症的影響是否有差異。經過文獻搜尋後，了解百年前科學家發現了「瓦式效應」，也進而證實了**癌症是代謝異常的疾病**。癌細胞在人體內處於不同低糖濃度環境的代謝壓力下，透過重組代謝程序，改變了哪些基因的表現，進而達到快速生長的目的，是目前尚未被了解且重要的問題。為了突破過去一個個基因研究「瞎子摸象」般的困境，我們選擇**以次世代定序之RNA-seq技術，進行全基因體基因表現分析**。希望應用現代基因體技術及大數據生物資訊分析方法，同時參酌過去文獻研究結果，抽絲剝繭，窺探不同癌細胞在低糖代謝壓力下，基因調控變化之樣貌，並提供未來癌症治療新的線索和方向。

## 貳、研究目的

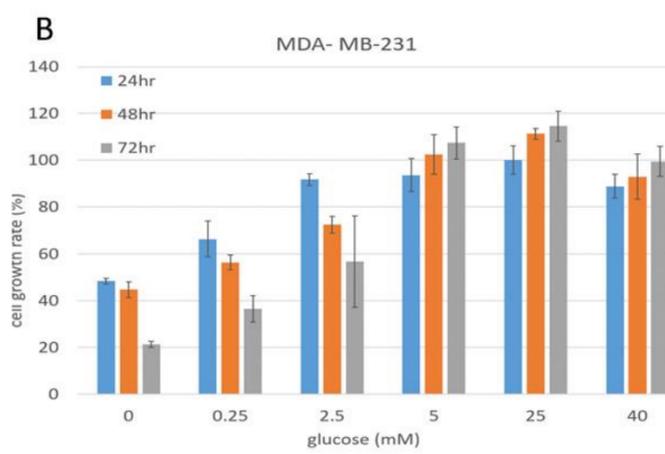
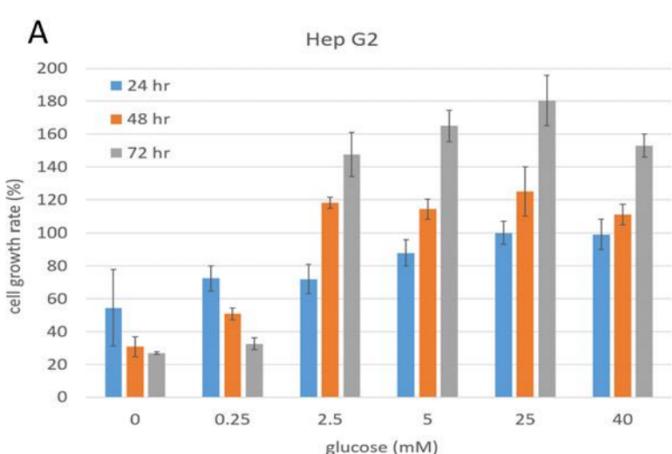
- 一. 了解低糖培養環境對乳癌和肝癌細胞株生長的影響及差異。
- 二. 應用RNA-seq技術，探索乳癌和肝癌細胞株在不同糖濃度生長環境，基因表現差異情形。
- 三. 以富集分析法，了解乳癌和肝癌細胞株在不同糖濃度中，表現受影響之基因的功能分類及作用路徑關聯。
- 四. 應用基因表現差異分析方法，篩選與糖濃度影響癌細胞生長相關，且過去未被發現參與作用的新穎基因。

## 參、研究過程與方法



## 肆、結果與討論

### 一、探討不同糖濃度對癌細胞株生長影響



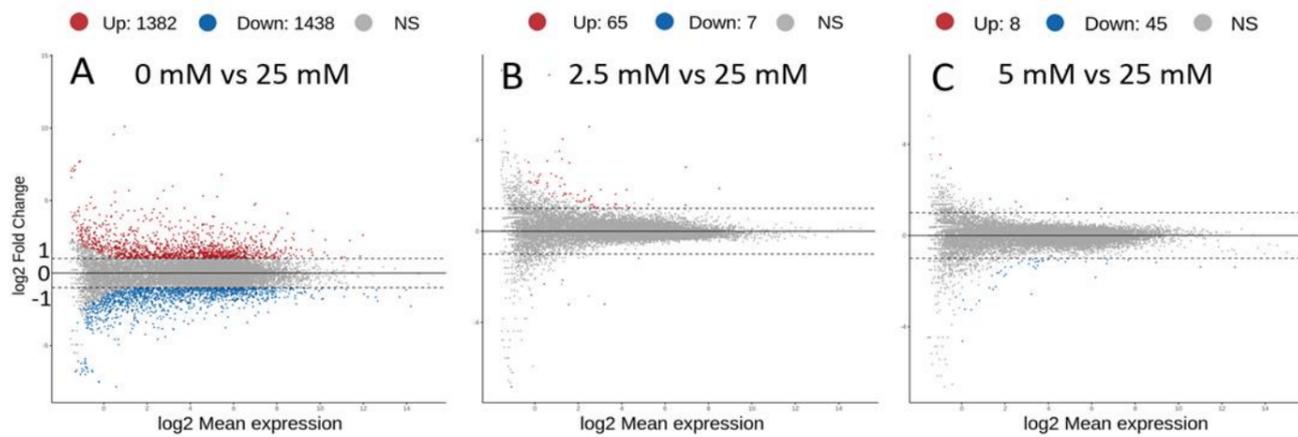
▲圖四、細胞生長率。  
25 mM糖處理為細胞最佳生長濃度，MDA-MB-231細胞對糖依賴需求較高，HepG2細胞生長對糖則較不依賴。

## 二、應用NGS RNA-seq技術，分析生長於不同糖濃度癌細胞株的表現差異基因

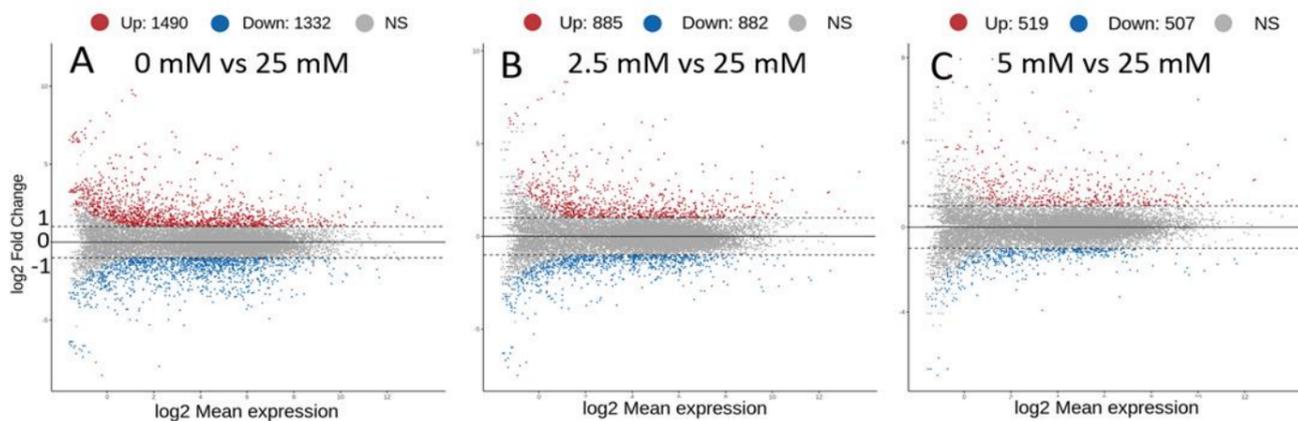
### (一)、差異基因表現 (Differential Expression) 分析

#### 1. MA點圖 (MA plot) 分析

##### (1) HepG2 :



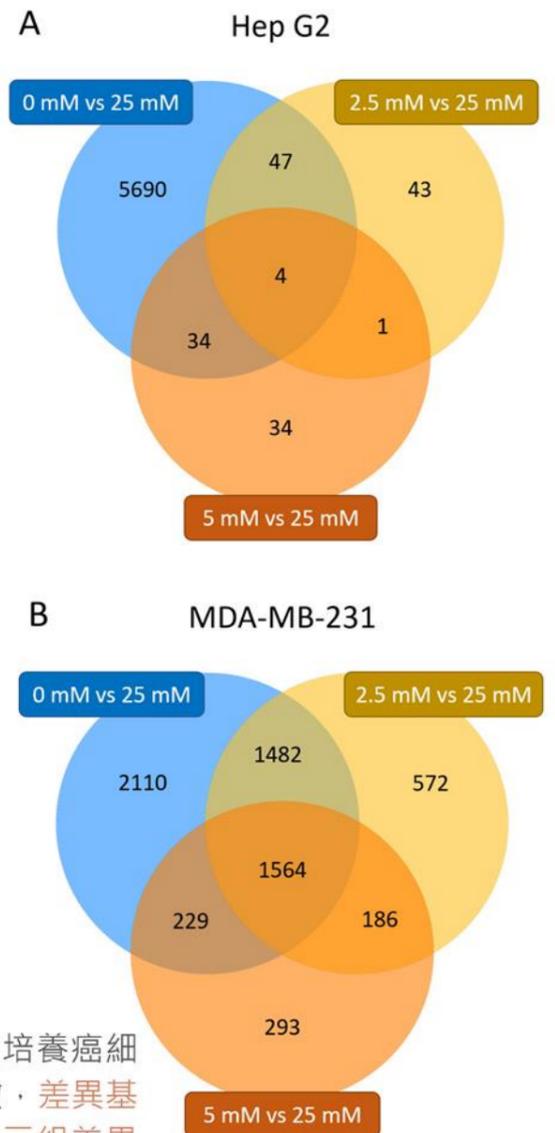
##### (2) MDA-MB-231 :



▲圖五、差異基因MA點圖。以25 mM為對照組，HepG2細胞僅於0 mM糖濃度培養環境之基因表現差異大，MDA-MB-231細胞則於各低糖濃度皆有眾多差異基因。

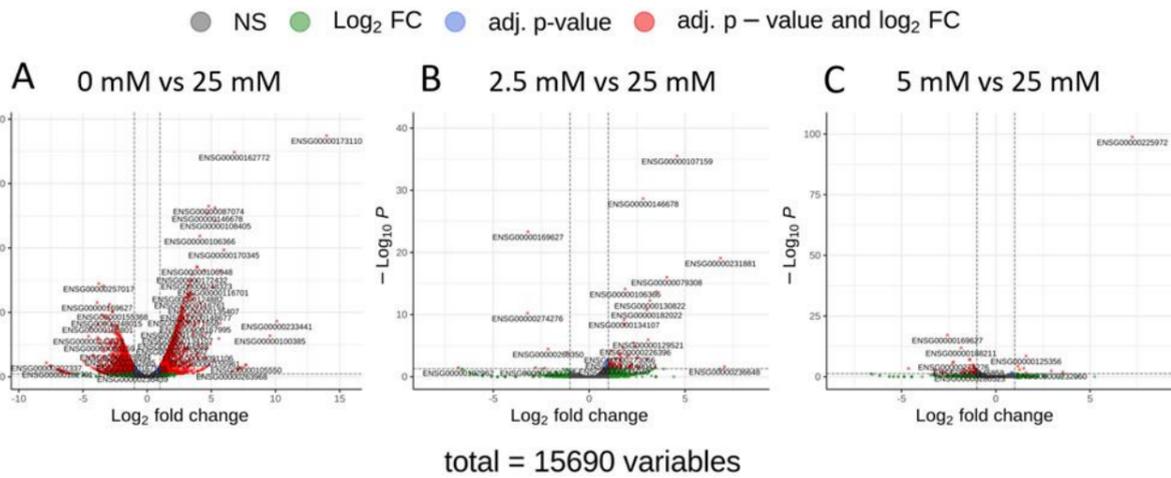
►圖六、差異基因文氏圖。不同糖濃度培養癌細胞，以25 mM為對照之表現差異基因數，差異基因數目與培養糖濃度差呈正相關。比較三組差異基因交集數，MDA-MB-231遠多於HepG2細胞。

#### 2. 文氏圖 (Venn) 分析

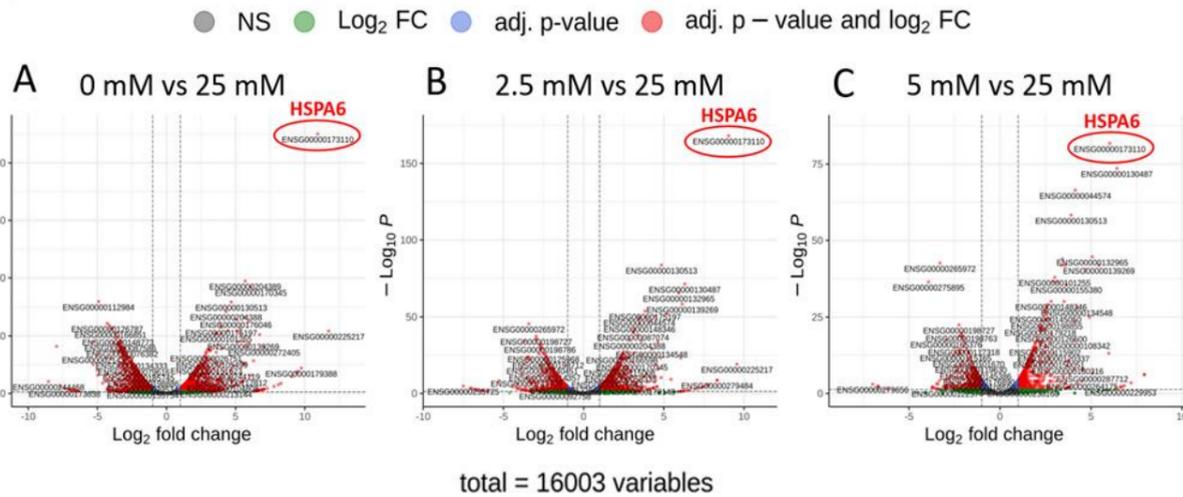


#### 3. 火山圖 (Volcano Plot) 分析

##### (1) HepG2 :



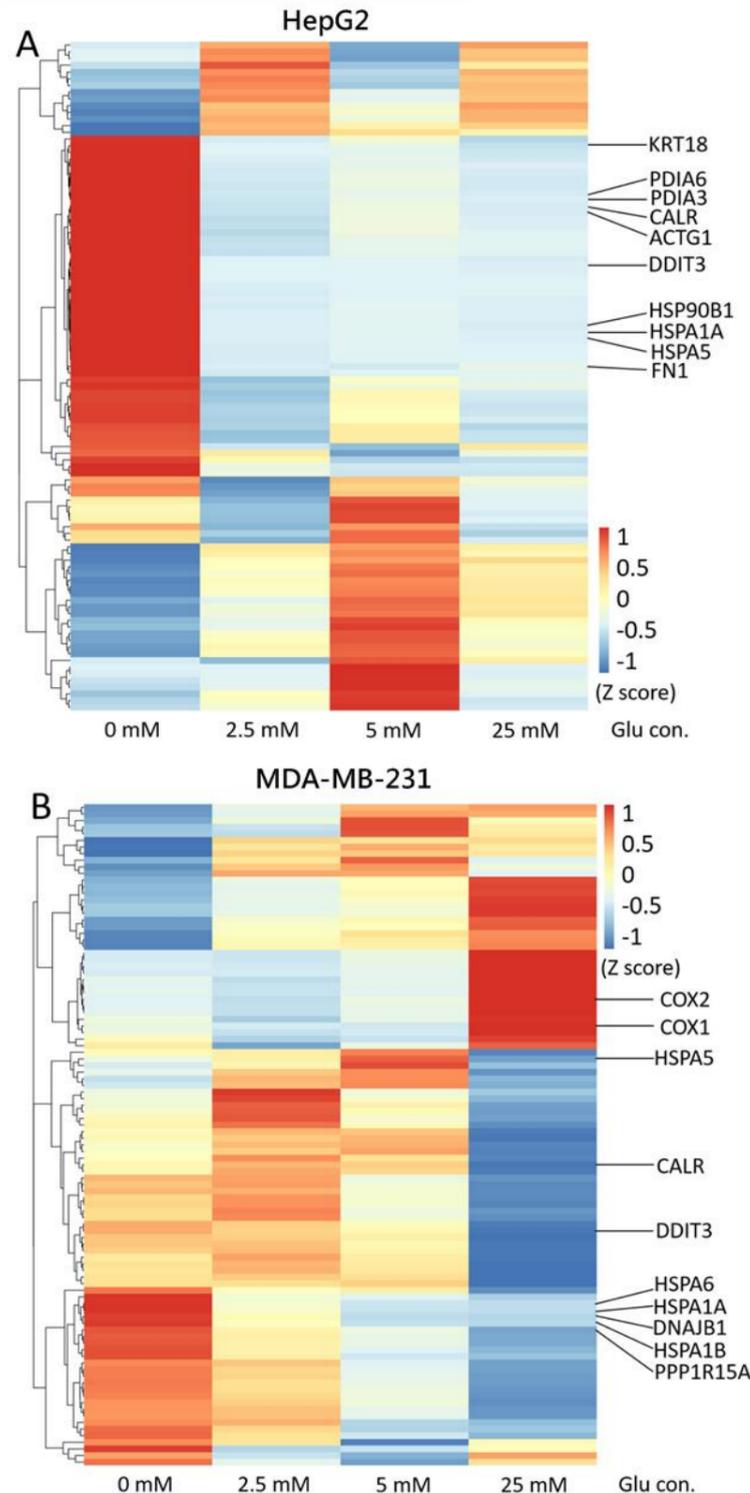
##### (2) MDA-MB-231 :



▲圖七、差異基因火山圖。低糖濃度之代謝壓力下，HSPA6 大量表現。

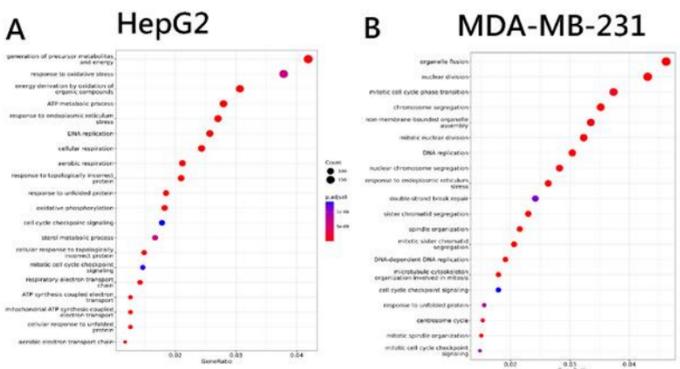
►圖八、差異基因聚類熱圖。此分析能協助我們找出有相似功能或參與相似生物調控的基因。本研究目的為探討與糖濃度影響癌細胞生長之相關基因，因此優先挑選基因表現變化趨勢與生長趨勢一致之候選基因。針對表現趨勢與生長趨勢相符之基因群，我們制訂篩選策略，透過NCBI資料庫進行文獻搜尋比對，以過去未有研究報導，基因功能與糖代謝相關為前題，進一步篩選功能涉及細胞生長或已有與癌症相關研究報導的十個基因為候選基因。

#### 4. 聚類熱圖 (Heatmap) 分析



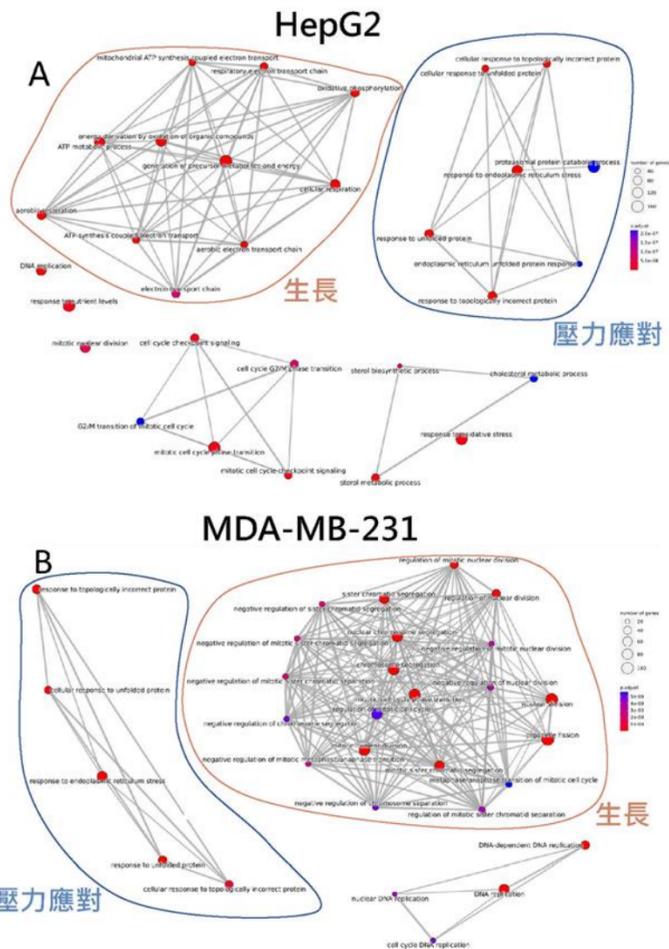
## (二)、富集分析 (Enrichment Analysis)

### 1. 富集點圖(dot plot)分析



圖九、差異基因GO-BP富集點圖。HepG2細胞引發代謝和能量產生之基因變化最為明顯，MDA-MB-231則多和細胞生長有關。

### 2. 富集網路圖 (enrichment map)分析

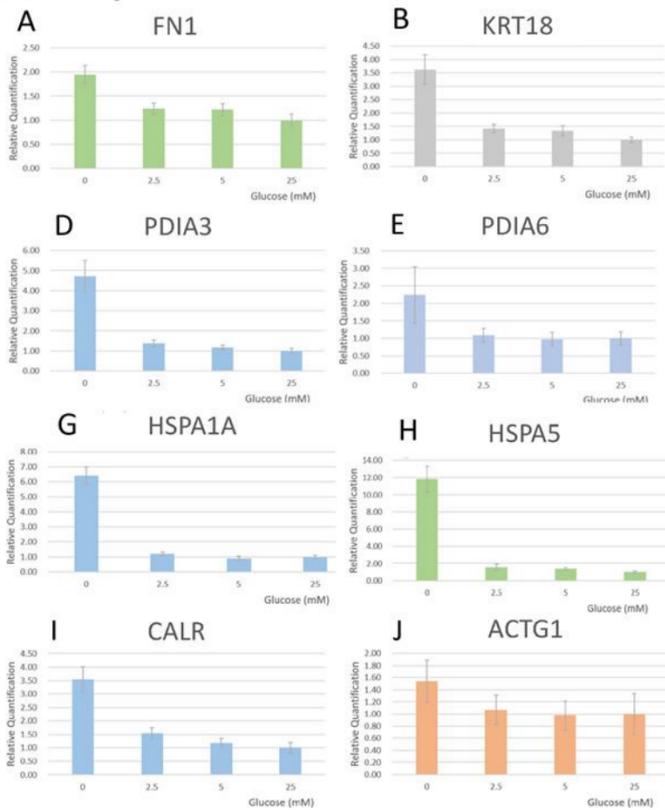


圖十、差異基因GO-BP富集網路圖。生長以及壓力應對相關基因表現受到明顯調節。

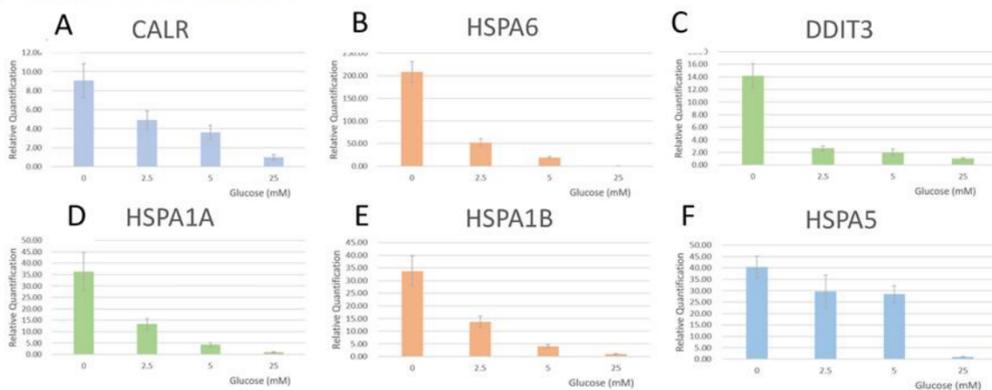
## 三、探討參與癌細胞糖代謝調控之候選基因

### (一)、qRT-PCR驗證

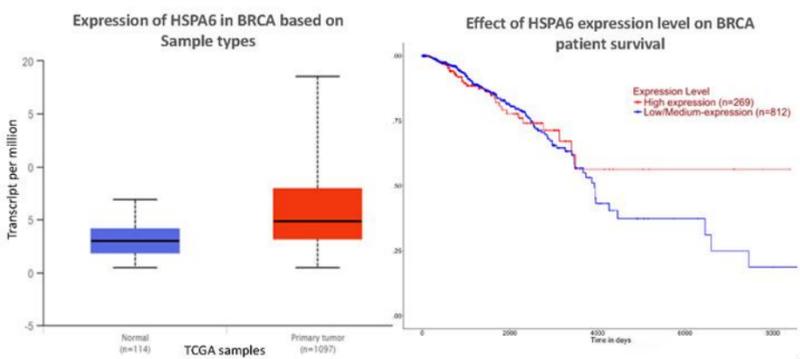
#### (1) HepG2 :



#### (2) MDA-MB-231 :



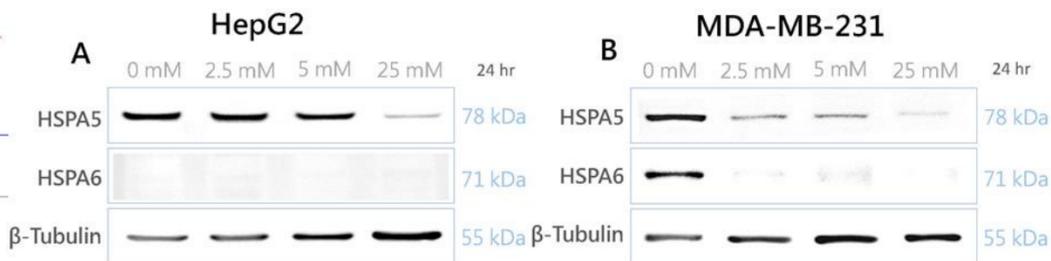
### (三)、UALCAN 資料庫分析



圖十三、HSPA6於UALCAN臨床資料庫之乳癌病患基因表現分析結果。以乳癌臨床病人檢體分析，HSPA6於癌組織中表現高於正常人，然而其高表達之病患存活率大於低表達病人。

圖十一、候選基因之mRNA表現量變化分析圖。細胞於不同糖濃度培養24小時後，針對所挑選之候選基因進行qRT-PCR。

### (二)、Western blot



圖十二、HSPA5及HSPA6蛋白表現分析結果。HSPA5在癌細胞低於5 mM糖濃度生長條件下，蛋白表現明顯增加，HSPA6則於MDA-MB-231無糖培養時，蛋白大量表現。

## 伍、結論與應用

- 實驗中發現，MDA-MB-231乳癌細胞在低糖環境下，細胞生長抑制現象較明顯，顯示對糖份依賴性相對比HepG2肝癌細胞高，此結果與臨床上觀察到，高糖易誘發乳癌發生，而肝癌發生與糖份關聯性較低現象相符。
- 由RNA-seq分析結果中發現，HepG2細胞只在無糖培養條件下，基因表現變化明顯，而MDA-MB-231細胞則在0 mM、2.5 mM及5 mM三種糖濃度生長時，基因表現皆有明顯變化。
- MDA-MB-231和HepG2細胞在低糖代謝壓力下，HSPA6基因大量表現，同家族之HSPA5、HSP90B1、HSPA1A及HSPA1B基因，亦被誘發表現。此現象過去未被報導過，值得進一步探討。
- MDA-MB-231和HepG2細胞不同糖濃度培養表現差異基因，功能主要與細胞的代謝壓力反應和生長相關。

癌症被認定是新陳代謝疾病後，為研究和治療開啟了新的視野。本研究應用NGS RNA-seq之全基因體分析技術，所得之研究結果讓我們更加了解糖對乳癌及肝癌細胞生長的影響，也探索糖分誘發癌細胞生長的全新作用基因，藉此提供未來開發出更有效癌症治療藥物的線索。

## 陸、參考文獻

- Bononi, G., S. Masoni, V. Di Bussolo, T. Tuccinardi, C. Granchi, and F. Minutolo. 2022. 'Historical perspective of tumor glycolysis: A century with Otto Warburg', *Semin Cancer Biol*, 86: 325-333.
- Mardis, E. R. 2008. 'Next-generation DNA sequencing methods', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9: 387-402.
- Epner, M., P. Yang, R. W. Wagner, and L. Cohen. 2022. 'Understanding the Link between Sugar and Cancer: An Examination of the Preclinical and Clinical Evidence', *Cancers (Basel)*, 14(24): 6042-6061.