

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090019
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	YKT6與癌纖維母細胞的「泌」密關係
得獎獎項	四等獎

就讀學校	國立臺南女子高級中學
指導教師	陳郁淳
作者姓名	張家榛

關鍵詞 YKT6、外泌體、CAFs

作者簡介



我是台南女中二年級的張家榛。因為高一時參加中研院的生物培養計畫，讓我有機會進入成大實驗室，從小就對科學實驗有濃厚的興趣，所以這次科展，我投入一整年的時間，每天下課跑實驗室，與細胞相處已經成為我的日常。感謝一路上教授與學姐的指導與幫忙。此次經歷，讓我收穫到科學研究的知識與技術、了解到堅持與熱情的重要。

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會
研究報告

區別：

科別：醫學與健康科學

作品名稱：YKT6 與癌纖維母細胞的「泌」密關係

關鍵詞：YKT6、外泌體、CAFs

編號：

YKT6 與癌纖維母細胞的「泌」密關係

摘要

本研究以人類肺癌 A549 細胞株和纖維母細胞模擬體內腫瘤微環境，挖掘纖維母細胞如何促進癌細胞的生長。從病人的正常和癌組織提取癌相關纖維母細胞（cancer-associated fibroblasts, CAFs）和正常纖維母細胞（Normal Fibroblasts, NFs），經過基因序列一對對作分析，開發新的治療策略和潛在的靶點。利用核糖核酸定序（RNA-Seq）分析發現 CAFs 會比 NFs 分泌更多 SNARE 蛋白 YKT6，而更深入地探究獲悉 YKT6 會透過活化 $YKT6^{+}$ CAFs 途徑促進肺癌 A549 細胞惡化，此惡化過程包括誘導及提升癌細胞的生殖（proliferation），轉移(migration)和入侵(invasion)能力。

此外，在 CAFs 中敲除 YKT6 基因，減弱 CAFs 的外泌體（exosome）釋放，從而調節了其對肺癌細胞 A549 的腫瘤促進作用。本研究發現靶向 YKT6 並抑制外泌體分泌，從而降低 CAFs 對肺腺癌細胞的腫瘤支援功能可以為肺癌治療提供一種新的策略。

Abstract

This study uses the human lung cancer A549 cell line and fibroblast models to simulate the in vivo tumor microenvironment, exploring how fibroblasts promote cancer cell growth. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) were extracted from both normal and cancerous tissues of patients alongside normal fibroblasts (NFs). New therapeutic strategies and potential targets were developed through paired gene sequencing analysis.

RNA sequencing revealed that CAFs secrete more SNARE protein YKT6 compared to NFs. Further investigation showed that YKT6 activates the ^{YKT6+}CAF pathway, exacerbating lung cancer A549 cell malignancy. This process includes inducing and enhancing cancer cells' proliferation, migration, and invasion capabilities.

Additionally, knocking out the YKT6 gene in CAFs diminished their exosome release, thereby modulating their tumor-promoting effects on A549 lung cancer cells. The findings suggest that targeting YKT6 and inhibiting exosome secretion could reduce CAFs' supportive role in lung adenocarcinoma treatment, offering a new therapeutic strategy for lung cancer management.

壹、前言

一、研究背景

(一) 根據 111 年台灣衛福部公布的資料顯示，惡性腫瘤(癌症)位居國人十大死因之首，最新統計，2023 年癌症在台灣奪走 5 萬 3126 條性命，相當於每 9 分 53 秒就有 1 人死亡，癌症死亡時鐘比 2022 年快轉 14 秒，癌症十大死因中，肺癌連續 20 年排名第一。如何對抗這個疾病已經是一個重要的全球健康問題，它佔全球癌症相關死亡人數的 18%。腫瘤更被視為“不癒合的傷口”。肺癌是一種生長於肺、氣管、支氣管或肺泡的惡性腫瘤，在組織型態上則分為「小細胞癌」與「非小細胞癌」兩大類。

1. 小細胞肺癌：肺癌患者中大概只佔 5%。與吸菸關係非常密切
2. 非小細胞肺癌：肺癌患者中佔 95%，其中包含鱗狀細胞肺癌、肺腺癌、大細胞癌。最常見的就是肺腺癌，沒有吸菸者罹患的肺癌多為此類，尤以女性居多。而且在非小細胞癌中，又有 7、8 成為肺腺癌，所以幾乎可以說，肺腺癌就等於是肺癌的總稱了。

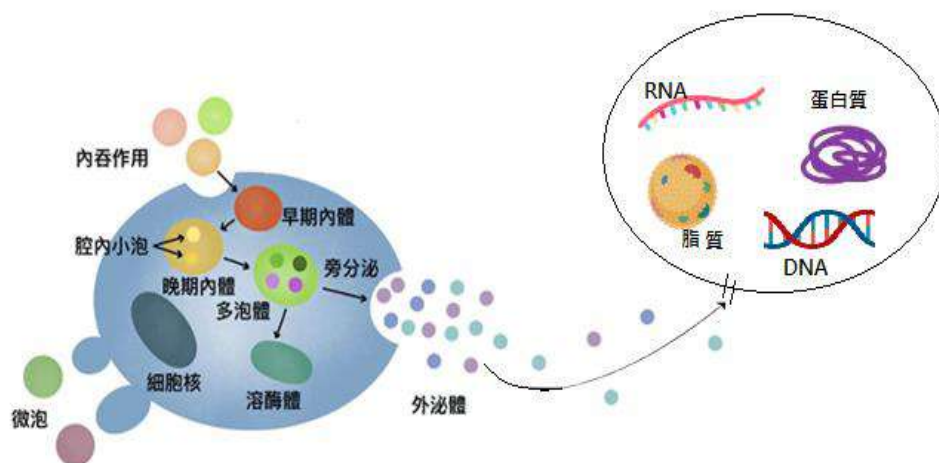
肺癌前期的症狀不明顯，1A 期肺癌患者五年存活率可達 90%以上，1B 期肺癌患者五年存活率約 85%，2 期則降到 60%左右，3 期則會降至 50%以下，可見復發風險仍然嚴峻，患者死於轉移性疾病，分子機制的闡明驅動 迫切需要細胞的轉移擴散來設計診斷和治療策略。

(二)腫瘤微環境 (TME) 主要由腫瘤內的非惡性宿主細胞組成，包括成纖維細胞、免疫細胞、血管內皮細胞和脂肪細胞，以及細胞外基質 (ECM)。其中，成纖維細胞是腫瘤微環境的重要組成部分，在癌症進展和轉移中起著關鍵作用。癌症相關成纖維細胞 (CAFs) 通

過分泌促進癌細胞增殖、侵襲、轉移、血管生成和治療耐藥性的因數，在促進肺癌生長中起關鍵作用。

(三)外泌體

腫瘤微環境中的外泌體在癌症進展中扮演重要角色。外泌體是一種直徑約 30-150 nm 的細胞外囊泡，由癌症相關纖維母細胞（CAFs）、免疫抑制性細胞、內皮細胞等釋放。這些外泌體攜帶癌症相關的分子，如特定的蛋白質、miRNA 和 DNA 片段，有助於促進腫瘤的生長、血管生成、轉移，並能幫助腫瘤逃避免疫系統的攻擊。其中 CAFs 釋放的外泌體攜帶特定的信號分子，可以促進腫瘤細胞的侵襲能力並改變腫瘤微環境，增強腫瘤進展。癌細胞可以透過外泌體將「抗藥性」特徵在腫瘤間進行傳遞，而 YKT6 作為一種與囊泡運輸相關的蛋白質，在調控炎症反應和 CCL2/ IL-6/CXCL1/CXCL10 的分泌中，通過參與囊泡運輸、膜融合及胞吐作起著重要作用。



圖一：外泌體分泌機制。外泌體從細胞分泌小囊泡，而囊泡包含 RNA、DNA、脂質、蛋白質……等等。(圖片來源：左圖 Su Yu-sheng, et al.,2016，右圖研究者自繪。)

二、研究動機

在癌症的初期階段，許多患者往往沒有明顯的症狀，因此難以早期發現。這使得許多癌症在被診斷時，可能已經發展到較晚期或開始擴散。癌症的擴散和轉移對治癒率有著顯著影響，因為一旦癌細胞擴散到身體其他部位，治療難度會大大增加，所以轉移性癌症的治癒率顯著降低，五年生存率可能降至 30% 甚至更低。在癌症晚期，抗藥性是治療中最具挑戰性的問題之一，對患者的治療效果和預後有著深遠的影響。當癌細胞對化療、放療或靶向治療產生耐藥性時，導致治療效果下降或失效。許多病患面臨顯著的藥物副作用，如噁心、嘔吐、疲勞、食欲不振，甚至神經損傷或器官功能受損等嚴重症狀，這些身體不適加劇了患者的痛苦，也使得治療更加困難。已經有根據相關報導顯示，腫瘤微環境中的癌症相關纖維母細胞（CAFs）在腫瘤的擴散與移轉中扮演著很重要的角色。

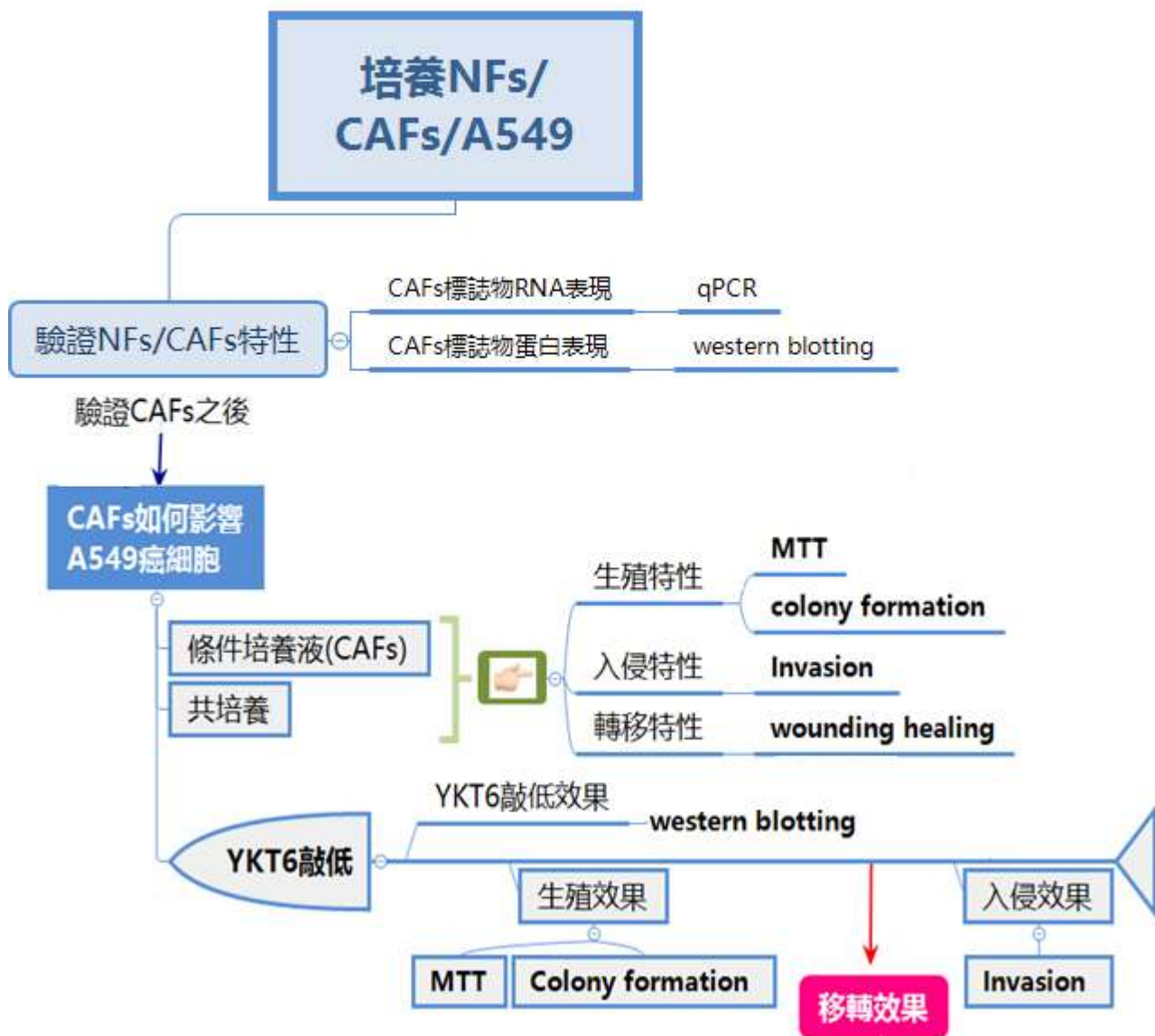
為了解決獲得 CAF 如何通過分泌外泌體和細胞因子，推動腫瘤細胞的移轉與擴散，進一步發展抗藥性進而減弱藥物的治療效果，我們探討 CAFs 如何促進癌細胞的移轉，擴散和生殖的關鍵機制，特別是 CAFs 如何通過外泌體釋放來影響腫瘤細胞。YKT6 作為一種 SNARE 蛋白，參與囊泡運輸和外泌體釋放，並在調控肺癌細胞 A549 外泌體的分泌中發揮重要作用。研究發現 YKT6 的抑制顯著減少了 CAFs 外囊泡的分泌，顯示出 YKT6 在 CAFs 釋放外泌體的過程中扮演了關鍵角色。為了進一步闡明 ^{YKT6+} CAF 與肺癌細胞之間的串擾，我們用細胞實驗來測定 CAF 中多種細胞因子的表達與分泌。數據顯示，當 YKT6 在 CAF 中被敲低時，蛋白表達和分泌均顯著降低。通過 qPCR 和 Western Blot 驗證其對細胞因子的有調控作用。本研究揭示了 ^{YKT6+} CAFs 通路在肺癌介導腫瘤微環境中的潛在作用，為未來的抗腫瘤治療提供了新的生物標誌物和治療靶點，也為緩解癌症病患的治療挑戰提供了新的方向。

三、研究目的

- (一) 比較 CAFs 和 NFs 的生殖，轉移，和入侵的特性。
- (二) 闡明 $YKT6^{+}$ CAF 與肺癌之間的串擾。

貳、研究過程與方法

一、實驗流程圖



(資料來源:研究者自繪)

二、研究材料及器材設備

(一) 研究材料：

細胞株（A549、NFs、CAFs）：本實驗採用的肺腺癌 A540 細胞株和由實驗室以前研究生自組織中提取得到的正常和癌相關的纖維母細胞。進行繼代培養並擴增後，可用於獲得外泌體，儲存於液態氮中，作為本研究主要材料來源。

(二) 研究器材設備

用途	器材設備
細胞培養	顯微鏡
	細胞培養箱
	無菌細胞操作台
	離心機
侵襲測定	Transwell 穿孔膜
遷移測定	康寧 BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber
MTT	酶標儀
外泌體分離	外泌體分離試劑
西方點墨法	蛋白轉移裝置
	1 抗: (beta-Actin , FAP , alpha-SMA , YKT6)
	2 抗 : (goat anti-Mouse , goat anti-rabbit)
qPCR	qPCR 儀器
預測軟體	Image J , prism

三、實驗方法

(一) **細胞繼代培養** (Passage) MCE USA 肺癌細胞株 A549 (CCL-185) 購自 American Type Culture Collection (ATCC)。用 RPMI 培養基加入 10%胎牛血清和 1%抗生素(P.S.)，在含 5% CO₂ 的恆溫培養箱中進行培養。每 3 天更換一次新鮮培養基，新鮮細胞培養液且於單層滿時進行細胞繼代 (subculture)。

1. 將培養液將從含 5% 二氧化碳 (CO₂) 的 37 °C 培養箱 (incubator) 中拿出，置於 37°C 的水浴槽回溫。
2. 以顯微鏡確認其情形 (觀察細胞數)。
3. 吸取培養盤中原先的培養液。
4. 加入 10mL PBS (Phosphate buffered saline, PBS) ，搖晃均勻後，將殘餘的培養液吸出。
5. 再加入 5mL 的胰蛋白酶 (trypsin) ，並放入含 5% 二氧化碳 (CO₂) 的 37 °C 培養箱 (Incubator) 中反應 10 分鐘後取出。
6. 加入 20 mL 含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的培養液，並以移液器 (pipette) 將細胞混合均勻。

拿 1cc pipet, 和自動 pipet

1. 開馬達，燈 (有三段，UV/關/Led)
2. 由內往外擦，物品左進右出
3. 開 suction(平行管線)
4. 觀察細胞

5. 吸取 medium (大拇指食指夾住上蓋，中指撐著，開口朝內)
6. pbs 清洗 (打開大拇指食指旋開，中指拿瓶蓋，大拇指食指拿瓶子)
7. 搖一搖，pbs 和培養皿，再吸掉
8. 加 1cc trypsin 搖晃均勻
9. 放到 37 度冰箱，3 分鐘等待脫落
10. 拿新的培養皿
11. 分裝 medium 到 50cc 離心管，加入 8-10cc medium 到 10cc dish 中 (用自動 pipet)
12. 寫盤子資料：細胞名/pn 代數/名字
13. 拿 15cc 離心管
14. 加 1cc 和 trypsin 的 medium，沖洗細胞盤面 (斜斜的拿，吸一段吐一段)
15. 吐到 15cc 離心管
16. 離心 (1000-1200，3 分鐘)
17. 每個動作間都要換 tip
18. Auto pipet 插進去後，刻度朝向自己
19. suction 掉廢液 (tube 慢慢傾斜)
20. 在 tube 加 1cc 的 medium 回溶
21. pipement 吸大於一半 (中間有刻度線，pipet 20 下，最後吐兩段排空)
22. 加入新的 (加 1/10 的細胞進入新的 dish，搖米字)
23. 顯微鏡下觀察
24. 放入 37 度冰箱

25. 用 parafilm 封藥劑

26. 關所有東西

(二) qPCR

使用 qPCR 識別癌相關纖維母細胞 (CAFs) 和正常纖維母細胞 (NFs)。前一天，CAFs 和 NFs 細胞接種至 6 孔板中隔天達 80% 滿。準備 RNA 提取試劑盒(RNA kit)。

1. RNA 提取和純化：利用 RNA 提取試劑盒抽 CAFs / NFs RNA

- (1) 從 6 孔板取出上清液，用 PBS 清洗一次，然後抽掉 PBS。
- (2) 加入 350ul 溶解緩衝液,確保每口並完全覆蓋。用顯微鏡檢查細胞是否溶出。
- (3) 在每個井中加入 350ul 的 70%乙醇,上下移動移液管以確保其完全混合。
- (4) 組裝重力空管柱,並將組合的 700ul 樣品轉移到柱子上。將盤子以直立的角度放置,以便在底部收集核酸。
- (5) 在~1000rpm 離心 1 分鐘，丟棄底部濾液，重複使用離心。
- (6) 加入 500ul 的 RNA 洗滌緩衝液。離心機在 10,000rpm 1 分鐘。丟棄濾液並重複
- (7) 重複上述步驟,但使用 RNA 洗滌緩衝液 II,並重複兩次。
- (8) 洗滌兩次後，儘可能丟棄多的濾液，以確保收集管乾燥。或者使用新的收集管。
- (9) 加入 20ul 無核酸酶的 DD 水到柱子。不要用移液管觸摸濾紙。接著，用移液管垂直地將水添加到濾紙的中心。

用 Nanodrop 測量，得到 CAFs RNA 有 281 ng / μ l 和 NFs RNA : 296 ng / μ l 的 RNA，然後將樣品儲存在 -80°C 冷凍室。

2. cDNA 合成 (RNA 反轉錄為 cDNA)

用反轉錄試劑盒，將提取的總 RNA 反轉錄為 cDNA。

cDNA 保存在-20°C 以保持活性，按照試劑盒說明書準備反應混合物，通常包括：RNA 樣品、隨機引物或 oligo (dT) 引物、反轉錄酶、dNTP 混合物、反應緩衝液等 5 倍濃縮 (使用時需要稀釋到 1X 的工作濃度)，要稀釋這些溶液，請將濃度視為整體的一部分。這意味著如果解決方案是 5x，則需要將其降低到 1x，故需要 4 份水和 1 份原料。這樣，它就會變弱 5 倍，並降低到 1 倍。若溶液是 10x，則使用 9 份水加 1 份原液。

(1)計算 RNA 樣本的體積(X) 以配製含 500ng RNA 溶液

- i. 無核酸酶 H₂O = 8-X
- ii. 5 x PrimeScript RT master mix(預混液) =2
- iii. RNA sample(500ng) =X

	Concentration	Protein needed 500ng	H ₂ O	Buffer 5x
CAFs RNAs	281 ng/μl	1.78 μl	6.22 μl	2 μl
NFs RNAs	296 ng/μl	1.69 μl	6.31 μl	2 μl

(2)將反應體系放入 PCR 儀中，按照以下溫度程序進行反轉錄反應：

初始變性：95°C， 2-3 分鐘。 迴圈 40 次

退火： 55-60°C， 30-60 秒。

延伸：在 72 °C 下 20 秒至 1 分鐘。

合成的 cDNA 可以直接用於後續的 PCR 或 qPCR 實驗，或在-20°C 下保存以備之後使用。

3. qPCR 實驗：使用的引子序列

Gene	Primer	Sequences (5' to 3')
ACTA2	F'	5' GTGTTGCCCCCTGAAGAGCAT-3'
	R'	5' GCTGGGACATTGAAAGTCTCA-3'
FAP	F'	5' TCAGTGTGAGTGCTCTCATTGTAF-3'
	R'	5' GCTGTGCTTGCCTTATTGGT-3'
β -action	F'	5' GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	R'	5' ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

(1)準備 qPCR 反應體系：

在 qPCR 反應管中加入以下成分：

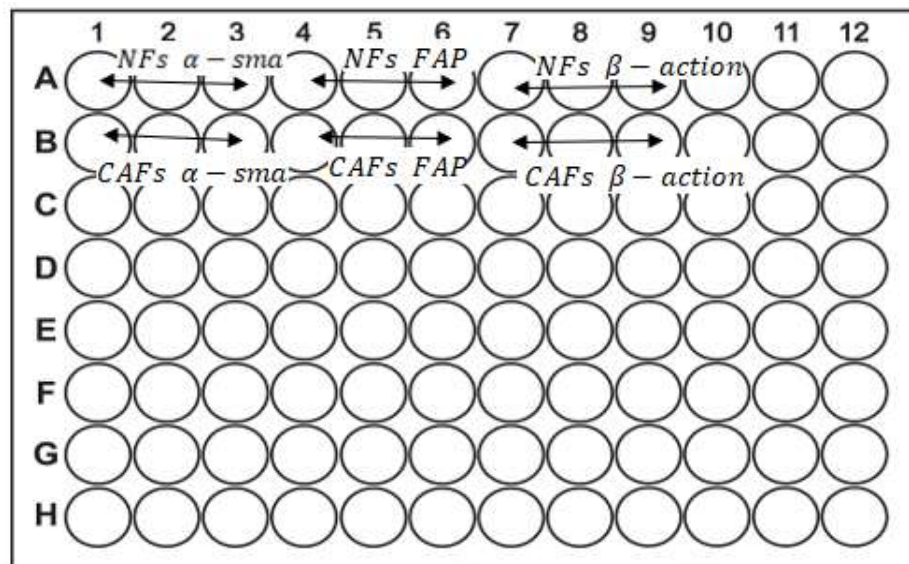
- 樣本 cDNA（從前一天製備的 cDNA 中取得）。

（針對目標基因 ActA2/FAP 和內參基因 β -action）。

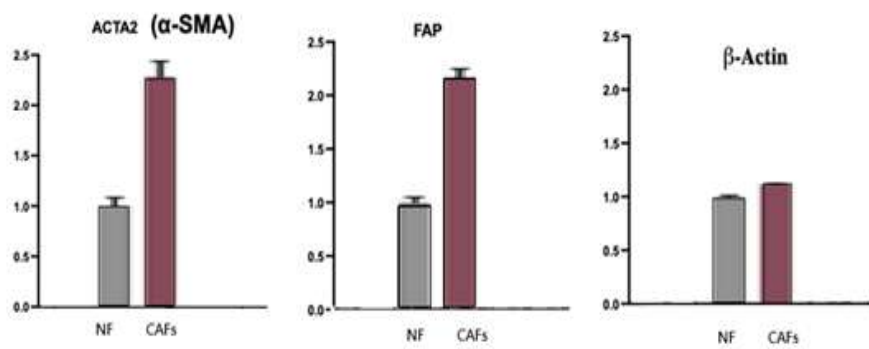
準備 qPCR Master Mix（TaqMan 探針、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂等）。

無核酸酶 DD 水（補足總反應體積 10-20 μ L）

qPCR 配置示意圖（資料來源:研究者自繪）



ACTA2 和 FAP 和 β -Actin 的基因表達 (資料來源:研究者整理)



(2) 數據分析：放進機器跑數據資料

(三)western blotting 西方點墨法

將兩組樣品通過 qPCR 或 Western blotting 驗證

1. 使用材料: One-step PAGE Gel Fast Preparation Kit 一步法 PAGE 凝膠快速製備試劑盒、ECL Chemiluminescence Kit 化學發光試劑盒
2. 第一天種細胞
 - (1) 在 6 孔板中種植 NFs 和 CAFs 細胞，確保每個孔中都有足夠數量的細胞用於後續的蛋白提取和分析。
 - (2) 將細胞在 37°C、5% CO₂的孵箱中孵育 48 小時。
3. 第三天收集 NFs 和 CAFs 的細胞蛋白
 - (1) 從粘附細胞中丟棄細胞培養基。
 - (2) 用 PBS 清洗細胞兩次。然後,盡可能多的 PBS 從板上移除。
 - (3) 在細胞中加入適量的溶解緩衝液，每口井在 6wp 中加入 100ul。旋轉盤子以均勻地分配。
 - (4) 將樣品存放在 -20°C，直到準備好使用。準備運行和堆疊凝膠。
 - (5) 架膠台，下膠加完膠加先做封膜 在上方加入乙醇，等待 30 分鐘。
 - (6) 下膠凝固後倒掉乙醇，接著做上膠，插齒梳。

- (7) 把膠裝到電泳槽，齒梳朝內，放入跑膠的槽內。
- (8) 倒入 running buffer，拔齒梳。
- (9) 加入 NFs 和 CAFs 的細胞蛋白，空的補 buffer。
- (10) 組裝電泳室，蓋上蓋子連上電極，黑色對黑色紅色對紅色。
- (11) 開始施加 75V 的電壓,使蛋白質通過加載凝膠遷移。這確保了混合物中的所有蛋白質在同一點上開始遷移。約 20 分鐘。
- (12) 一旦蛋白質帶通過加載凝膠遷移,就可以將電壓提高到 125V。約 40 分鐘。

4. 第四天進行 Western blotting

- (1) 準備轉印裝置，組裝凝膠膜“三明治”：
 - i. 小心用鑷子處理薄膜。
 - ii. 將三明治夾板打開，黑網朝下，組件徹底浸泡在轉移緩衝區(transfer buffer)中。
 - iii. 從下到上依序放白網-菜瓜布-圖畫紙-PVDF-gel-圖畫紙-菜瓜布-黑網。
 - iv. 確保膜接近正極（紅色），凝膠接近負極（黑色）。
 - v. 使用小滾筒去除任何氣泡。
- (2) 在 320V、約 78A 下運行轉移，持續 2 小時。
- (3)從轉印裝置取出凝膠和膜。將膜放入容器，蓋上阻塞緩衝液，室溫下封閉 15 分鐘。
- (4) 在阻斷緩衝液中稀釋一級抗體，覆蓋膜，加入一抗。
- (5)在 4°C 輕輕搖動過夜。
- (6) 倒掉一抗，TBST wash 3 次，用 TBST 清洗膜 3 次，每次 5 分鐘。
- (7)在緩衝液中用 TBST 稀釋二級抗體覆蓋膜。
- (8) 用 TBST 再次清洗膜 3 次，持續 10 分鐘。

5. 檢測設備

- (1)打開成像系統，取出托盤。
- (2)使用鑷子輕輕將膜放在對摺紙上。
- (3)在膜上塗上 ECL 溶液，並用機器捕獲圖像。
- (4) 顯影結束用 DD 水洗膜。

6. 注意： 準備 SDS-PAGE 凝膠

- (1)戴手套，避免接觸未凝固的凝膠（含神經毒素）。凝膠凝固後無毒。
- (2)載入蛋白樣品到凝膠中，確保樣品量一致。運行電泳分離蛋白。

7. 注意：轉移蛋白

- (1)將蛋白從凝膠轉移到 PVDF 或硝酸纖維素膜上。
- (2)配製轉移緩衝液：按照順序加入水、甲醇和 10X 轉移緩衝液，最終稀釋至 1X。
- (3)提前在 4°C 或-20°C 預冷緩衝液。

8. 蛋白檢測，使用抗體檢測 α -SMA 和 FAP 蛋白， β -Actin 作為內參對照。

9. 結果分析: Western blot 結果顯示，CAFs 中 α -SMA 和 FAP 蛋白的表達水平顯著高於 NFs，證明成功提取 CAFs 並驗證其特異性標誌物的高表達。

β -Actin 作為內參對照，確認了實驗的成功及蛋白定量的準確性。

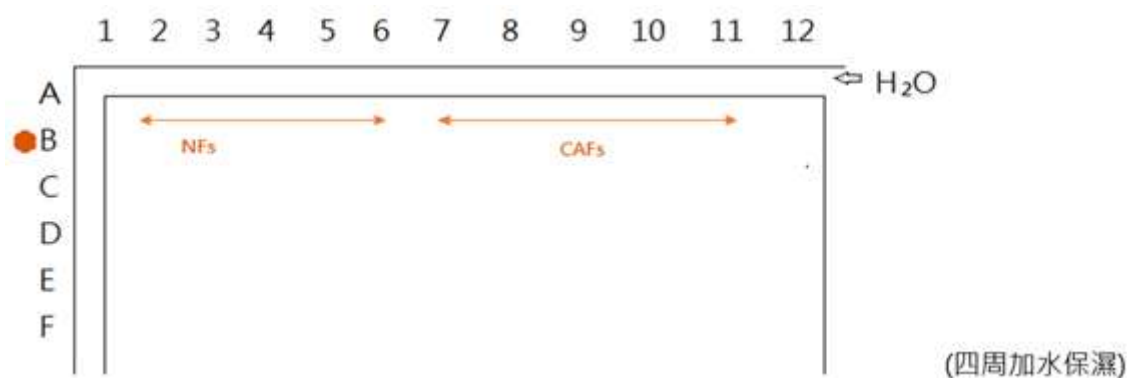
(四)生殖特性 Proliferation Assay (MTT)

MTT(proliferation Assay) Cell Viability Assay 功能測定

1. 細胞種在 96 孔盤中， 體積 100ul/well, 細胞 7 成滿(3000-5000 顆細胞)。

〔 96well 的邊邊不要種，因為測吸光值較不準 〕。種完要搖晃細胞比較會均勻分散。

預孵化板在加溼培養箱(e.g.at 37°C， 5%， CO₂) 。



(資料來源:研究者自繪)

1. 在密度為 $10^4 \sim 10^5$ 的 96 孔板中,在 100 μ L 的培養基中種細胞。在 37°C 的 CO₂ 培養箱中培養細胞 24 小時。
2. 將 10 μ L 各種濃度的待測物質添加到板材中。
3. 在孵化器中孵化的時間(24 小時)。
4. 使用重複移液器將 10 μ L 的 MTT 溶液添加到板材的每個井中。小心不要把氣泡引入井中，因為它們干擾了 O.D.讀數。
5. 在孵化器中孵化 1 小時。
6. 在讀盤子之前，重要的是在軌道振動器上輕輕振動混合。
7. 測量 450nm 處的吸光度。為了以後測量吸光度，請在每口井中添加 0.1m HCl。
8. 覆蓋板放在室溫下保護其免受光線照射。24 小時內不跟親到吸光度變化。
9. 在 37°C、5% CO₂ 條件下孵育 1 小時，以允許 MTT 試劑被細胞還原成紫色的 formazan。
10. 測定光密度，量完 MTT 放回到 37°C、5% CO₂ incubator 培養箱，繼續培養，等 Day 2 重複測量 OD 值，以觀察細胞增殖的變化。以此類推。

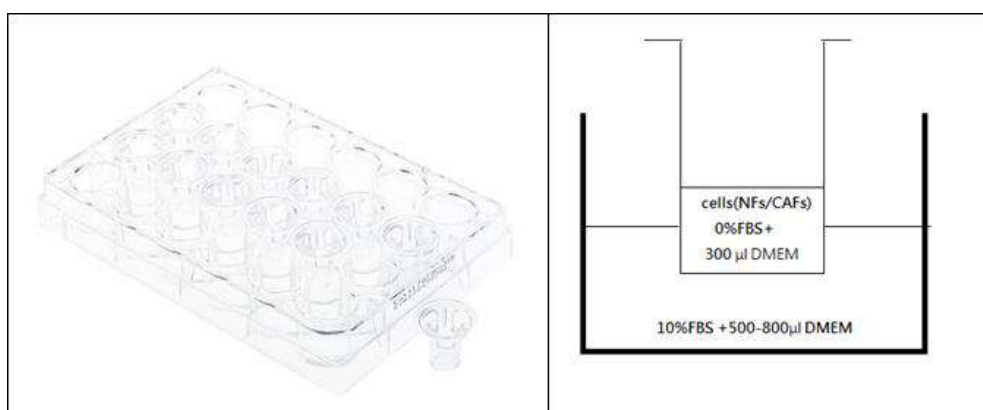
11. 測吸光值

- (1)細胞貼附後 overnight 測 DAY0，將 medium 吸掉後加入 MTT 混合 medium。
- (2)加 MTT 的要避光 incubate 2h 後吸掉 medium 加入 100ul DMSO(可在外面 bench 加)。
- (3) shaker 搖 5mins(也可不搖)後測吸光值 570nm。
- (4)隔 24h 後測 DAY1，以此類推。

12. 第四天，收集的 OD value 利用 Prism 計量。可以看到 CAFs 的 Prolifeform 比 NFs 來的高，說明 CAFs 長的比 NFs 快。確定 CAFs 比 NF 有更高的 cell viability。

(五) NFs/CAFs 的侵襲實驗: CAFs 促進肺癌細胞遷移和細胞侵襲實驗

1. 材料準備: Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion chamber



(資料來源: 左圖研究者拍攝，右圖研究者自繪)

2. Day 1

- (1) 取出儲存在-20°C 的 Invasion chamber，特別注意 MatriGel 層的完整性。使用前確保其已恢復到室溫，以避免損壞。
- (2) 在上室 (invasion chamber) 中小心種植 NFs 和 CAFs 細胞，分別使用 0% FBS (胎牛血清)+ 300 μ L DMEM 培養基。
- (3) 在下室加入 10% FBS + 500~ 800 μ L DMEM 培養基，以吸引細胞侵襲。
- (4) 將細胞在 37°C、5% CO₂的孵箱中孵育 48 小時。

3. Day3

- (1) 小心地倒掉下室的培養基 medium。
- (2) 在上室中加入 300 μ L 0.5% 結晶紫染液，室溫下染色 15 分鐘。
- (3) 準備一盆清水，將上室的 chamber 小心地夾起，倒掉 medium 染液，然後在水中輕輕沖洗，直到沖洗出的水中不再有紫色。
- (4) 用棉花小心擦乾上室內的表面，去除未侵襲的細胞。注意不要擦到 chamber 外部的膜，以免影響實驗結果。
- (5) 將樣品放在空氣中晾乾，或使用 65°C 的烘箱輕輕烘乾。
- (6) 樣品乾燥後，用顯微鏡拍照記錄結果。
- (7) 使用後，將 Invasion chamber 妥善清理並重新儲存在 -20°C，確保 MatriGel 層的完好。

結果顯示，CAFs 的細胞數量明顯多於 NFs，這表明 CAFs 具有更高的侵襲能力。這種結果可能反應了 CAFs 的高遷移性和侵襲性，通常與其在腫瘤微環境中的作用有關。

CAFs 通過分泌促侵襲因數、重塑細胞外基質（ECM）以及與癌細胞進行相互作用，促進癌細胞的入侵和轉移。因此，CAFs 在侵襲性高的腫瘤中可能起到關鍵的推動作用，進一步證明其在癌症進展中的重要性。

(六)菌落形成能力實驗 colony formation assay

1. 菌落形成能力實驗是一種基於單個細胞生長在體外環境中增殖存活測定並形成細胞克隆（群體）的能力的實驗。
2. 從培養瓶中收集細胞，用胰蛋白酶消化並收集細胞懸液。用培養基中和胰蛋白酶，將胰蛋白酶加入培養瓶，室溫或 37°C 孵育 10 分鐘，輕輕敲打培養瓶底部，幫助細胞脫落。
3. 離心並重懸細胞於新鮮培養基中。加入等體積的培養基中和胰蛋白酶，確保所有細胞都懸浮在溶液中。

4. 第一天，種細胞在 6 孔盤中，每孔接種 10 個的細胞懸液加入 2ml 10% FBS+RPMI-1640。確保均勻分佈細胞，輕輕搖晃培養板以避免細胞集中於一處。
5. 將培養板放入 37°C、5% CO₂ 的細胞培養箱中，通常培養 2 周，直到形成明顯的細胞克隆（直徑約為 0.5~1mm）。
6. 培養期結束後，培養期結束後，小心吸棄培養基。拿掉培養基。加入 1 mL PBS 緩衝液洗滌每個孔的細胞，輕輕搖晃培養盤。
7. 吸棄 PBS 後，再重複洗滌一次。加入 1 mL PBS 緩衝液洗滌每個孔的細胞，輕輕搖晃培養盤。吸棄 PBS 後，再重複洗滌一次。
8. 加入結晶紫染色液覆蓋細胞層，室溫染色 15 分鐘。用自來水輕輕沖洗去除未結合的染色劑，直到染色背景變清。沖洗後將培養板倒置於紙巾上，靜置空氣乾燥。
9. 在 5X 顯微鏡下觀察培養板，手工計數每孔中形成的克隆數量。根據克隆的數量和大小，計算克隆形成率（克隆數量/接種細胞數）評估細胞的增殖能力。
10. 從“肉眼可見”，CAFs 形成的集落比 NFs 多，這可能意味著 CAFs 細胞的增殖能力更強。同時，這也暗示著每個 NFs 集落中的細胞可能並未具備『無限』分裂的能力。

(七) 使用 C.M 和共培養平台上對 A549（肺癌細胞）的侵襲

invasion in vitro 體內和體外的轉移-細胞遷移和細胞侵襲	
CAFs 促進肺癌細胞遷移 invasion 侵襲實驗	
材料	Cat no. 354480
	Item. Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers with 8.0 μm PET
	Membrane in two 24-well Plates, 12/Pack, 24/Case
	康寧 BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber，配備 8.0 μm PET 膜的兩塊 24 孔板，12 塊/包，24 塊/箱，適用於需要蛋白質塗層的細胞表面應用，如細胞粘附、生長、侵襲、遷移和/或分化。建議儲存溫度為-20°C。

	Invasion Chambers 是帶有 Matrigel 塗層的孔室，用於模擬體內基質，以評估細胞（如癌細胞）的侵襲能力。 兩塊 24 孔盤，每個孔室都塗有 Matrigel 並配有 8.0 μm 的 PET 膜，這些孔室配有 8.0 微米孔徑的 PET（聚對苯二甲酸乙二醇酯）膜，這種孔徑允許細胞穿過膜但阻擋較大的細胞團。
條件培養液	由 Transwell 插入物和多孔膜（孔徑 8 μm 的聚碳酸酯膜，底部有微孔允許細胞通過）組成
培養基	上室細胞： A549/ CAFs/NF 無血清或低血清培養基，避免化學誘導因素的干擾。
	下室細胞： CAFs/NF or not：含有化學誘導劑（如 10% FBS 或特定的趨化因數）的培養基，以吸引細胞侵襲。
細胞接種	將 A549/ CAFs/NF 細胞懸浮在無血清培養基中，然後將 8 成滿，將細胞接種到每個塗覆有 Matrigel 的 Transwell plate 插入物中。 下室細胞： CAFs/NF or not_種 8 成滿。
孵育	將裝有細胞的 Transwell 插入物放入下室培養基中，放入 37°C 的培養箱中孵育。 孵育 48 小時，讓細胞有足夠時間通過 Matrigel 並穿過膜。 孵育期間， A549/ CAFs/NF 細胞會通過上室的孔膜，遷移到下室中。
侵襲測有兩種裝置	
(1)條件培養基 (2)共培養測定	
NFs/A549 分別單獨培養在 15cm² dish，加入 15ml 10% 血清 RMPI-1640 培養基， 48 小時後收集培養基（條件培養基, conditional medium , C.M.），進行過濾以去除任何細胞碎片，並立即使用或保存在-80°C 下。 1.NFs 組：NFs 種在下室，A549 細胞種在上室養。 2.CAFs 組： CAFs 種在下室，A549 細胞種在上室養。	
Day1	1.把 A549 種上室，上室加入 300ul 不含血清 RMPI-1640 培養基 2. 下室加入條件培養基或是種上 CAFs/NFs(加入 10%FBSDMEM) 約 500-800 μl ，孵育 48 小時。

Day3 染色與 成像	1.下室 Chambers medium 倒掉，加入結晶紫染色劑(500 μ l)，在室溫 15 分鐘
	2.用鑷子夾起上 Chambers,用水沖洗至紫色去掉。
	3.移除上室，並使用棉簽輕輕擦去插入物上層未穿過膜遷移的細胞。
	對穿過孔膜並粘附在膜底部的細胞進行染色，使用結晶紫染色劑對穿過膜並粘附在膜底部的細胞進行染色。 再用 PBS 洗上室內，用棉簽輕輕擦掉上室內室細胞。
數據分析	使用顯微鏡拍攝並拍攝圖片，並計數穿過膜的細胞。
	通過顯微鏡下計數穿過膜的細胞數目，計算每個插入物中的平均遷移細胞數。再加 image J 分析。
通過比較正常細胞和癌細胞的侵襲能力，評估癌細胞的侵襲性和轉移潛力。	

(八) A549（肺癌細胞）的創傷愈合

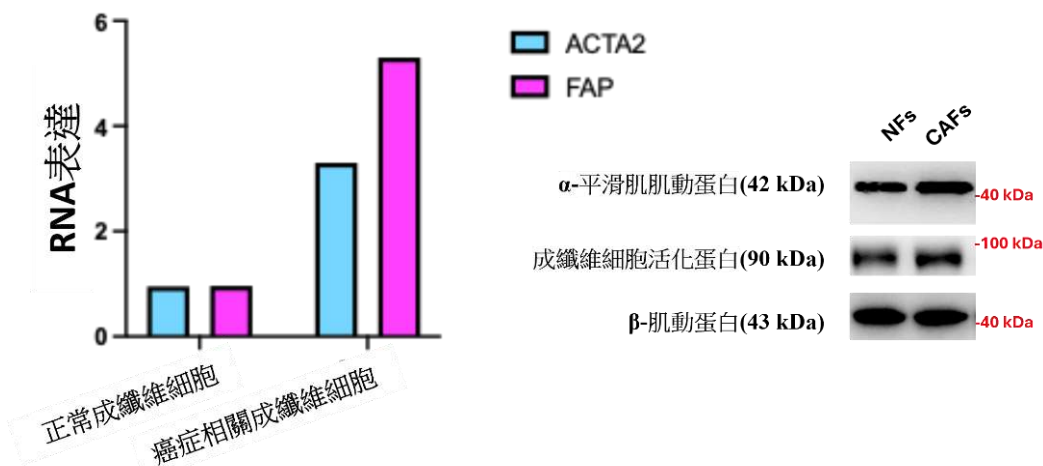
1. 劃痕（傷口），在 well 中使用無菌的 200 μ L 移液槍頭在 A549/CAFs/NFs 細胞單層上垂直劃出一條線。在每個井中以相同的壓力劃痕，以保持傷口寬度的一致性。
2. 用 PBS 輕輕洗滌孔板 1 次，以去除漂浮的細胞碎片，防止其干擾後續的成像和分析。
3. 再加入 10%FBS DMEM。
4. 使用 10X 倒置顯微鏡拍 0 小時刮痕傷口區域的圖像，記錄傷口寬度和形態。
5. 將細胞置於 37°C、5% CO₂ 養箱中，允許細胞在傷口處遷移。
6. 在 24 小時和 48 小時拍攝傷口區域的圖像，測量並記錄此時的刮痕寬度，收集 3 個時間點，再用 imageJ 跑數據資料分析。

參、 研究結果與討論

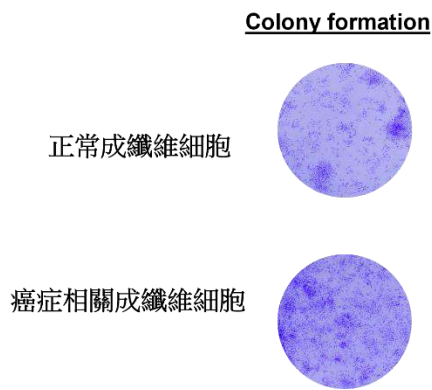
一: 比較 CAFs 和 NFs 的生殖，轉移，和入侵的特性

首先獲得一對正常成纖維細胞（NFs）和癌症相關成纖維細胞（CAFs）進行功能分析。為了確認我們細胞培養液的正常和癌相關的纖維母細胞 NFs/CAFs 的身份，我們使用 qPCR 和 western blot 來研究已知的 CAF 標記物 ACTA2 和 FAP 的表達。我們發現，與 NFs 相比，CAFs 表達了相對較多的 ACTA2/FAP RNA。我們還觀察到 CAF 中 ACTA2 和 FAP 的高表達(圖一)。我們的結果顯示，與 NFs 相比，這些標記物在 CAF 樣品中的表達增加，支持它們的身份。綜合來看，這證實了我們的 CAFs 的身份。

圖一、NFs 和 CAFs 的 qPcr 和 WB 結果 (資料來源:研究者整理)

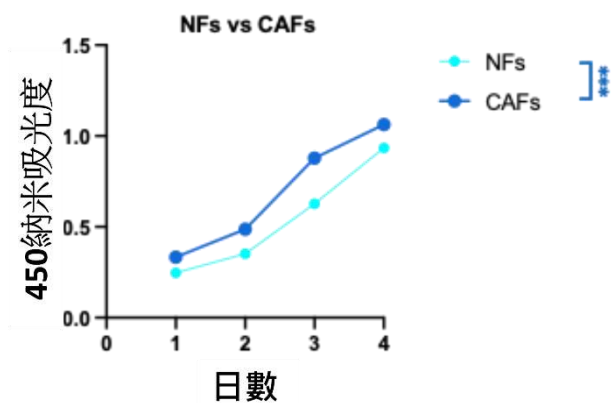


接下來，我們進行了一個菌落形成實驗來比較 NFs 和 CAFs 之間的增殖能力。該實驗檢查了單個細胞形成集落的能力。菌落形成後，加入一種紫染料使菌落可視化，將培養的細胞放入機器中生成吸光度值。產生的吸光度值與菌落的大小有關，從而給出了增殖能力的定量測量。此外，還拍攝了菌落的圖像，以對增殖進行定性測量。我們觀察到，與 NFs 相比，CAF 形成的菌落更大，數量更多，這反映在 CAF 在 4 天內顯示出更大的吸光度值(圖二)。這表明，與 NFs 相比，CAFs 具有更大的增殖能力。另外也使用 MTT 測量 NFs 和 CAFs 的生殖率，我們收集了四天的結果，CAF 明顯比 NFs 的生殖率高(圖三)。



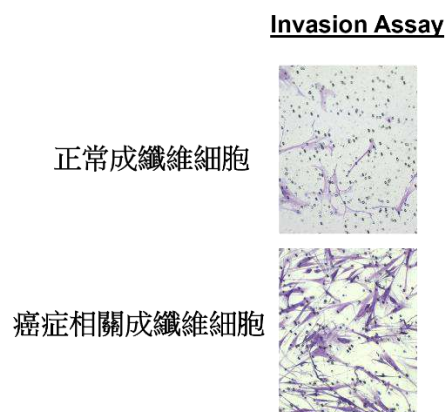
圖二、NFs 和 CAFs 的菌落形成實驗

(資料來源:研究者整理)



圖三、NFs 和 CAFs 的生殖實驗

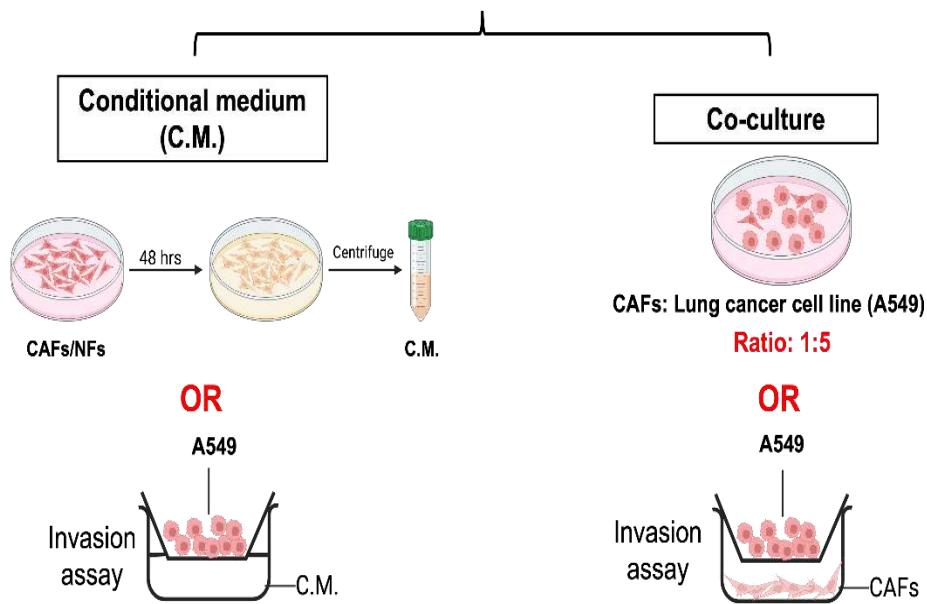
最後，我們進行了一組實驗來比較 CAFs 和 NFs 侵襲。我們在下室中添加含有化學引誘劑的培養基，然後在上面放置含有細胞的“上室”。將細胞放置一段時間，使它們能夠從上室的頂端向基底外側擠壓/侵入。在成像和計數前，將未侵入的細胞移除，將侵入的細胞固定並染色。侵襲試驗與遷移試驗的不同之處在於其插入物包含細胞外基質蛋白和基底膜，從而使研究者能夠類比癌細胞跨越細胞外膜的侵襲。研究結果顯示，與 NFs 相比，CAFs 表現出更大侵襲能力，通過上室入侵細胞數量是 NFs 的 2~3 倍(圖四)。由此我們已經證明，與 NFs 相比，CAFs 具有更強的增殖和侵襲能力。



圖四、NFs 和 CAFs 的入侵實驗結果 (資料來源:研究者整理)

我們假設如果 CAFs 確實促進 A549 細胞的運動能力，它可能是通過釋放某些基因產物來實現的，這一過程涉及外排作用。我們假設如果 CAFs 確實促進 A549 細胞的運動能力，那麼它可能通過外排作用釋放某些基因產物來實現。為此，我們修改了之前的侵襲實驗(圖五)。

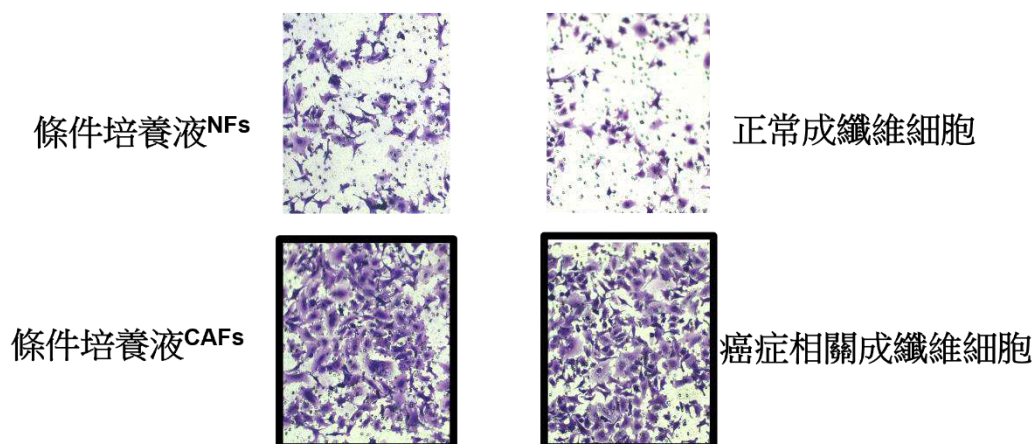
To investigate whether NFs/CAFs promote lung cancer cell proliferation, invasion and migration.



圖五、實驗結果設計 (資料來源: 研究者繪製, Created in BioRender.com)

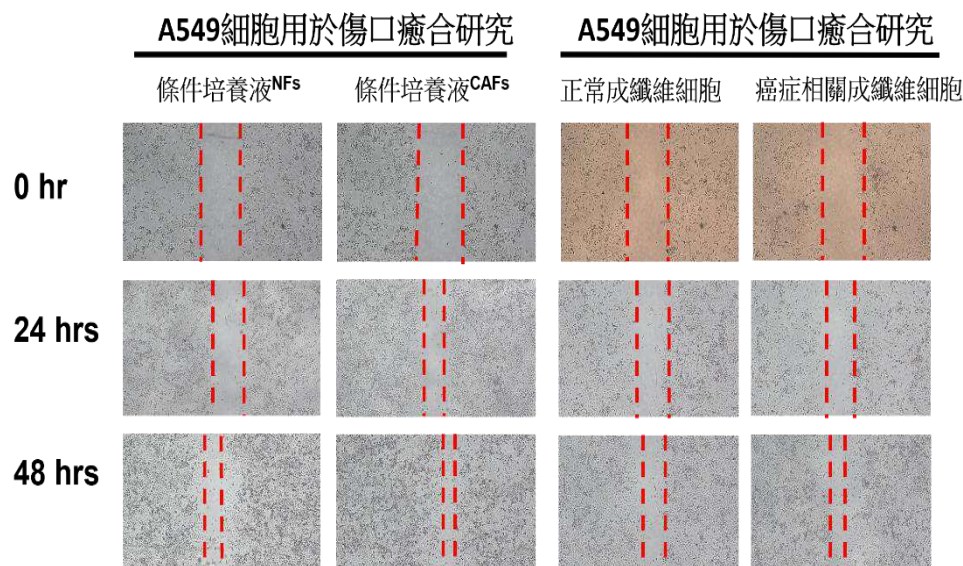
在一個實驗設置中，我們將 CAFs 或 NFs 接種在培養皿中，然後在上方的插入物中接種 A549 細胞。我們觀察到，當培養皿中接種的是 CAFs 時，A549 細胞穿越膜遷移的數量明顯高於接種 NFs 的培養皿。我們發現，在使用 CAFs 條件培養基的培養皿中，穿越插入物的 A549 細胞數量顯著高於使用 NFs 條件培養基的培養皿。這些觀察結果顯示，CAFs 表現出比 NFs 更強的侵襲能力(圖六)。此外，我們證明 CAFs 可以通過分泌可溶性因子來誘導鄰近癌細胞更強的運動性。總體而言，這些發現表明 CAFs 在促進癌細胞惡性行為方面扮演著重要角色。

A549細胞侵襲



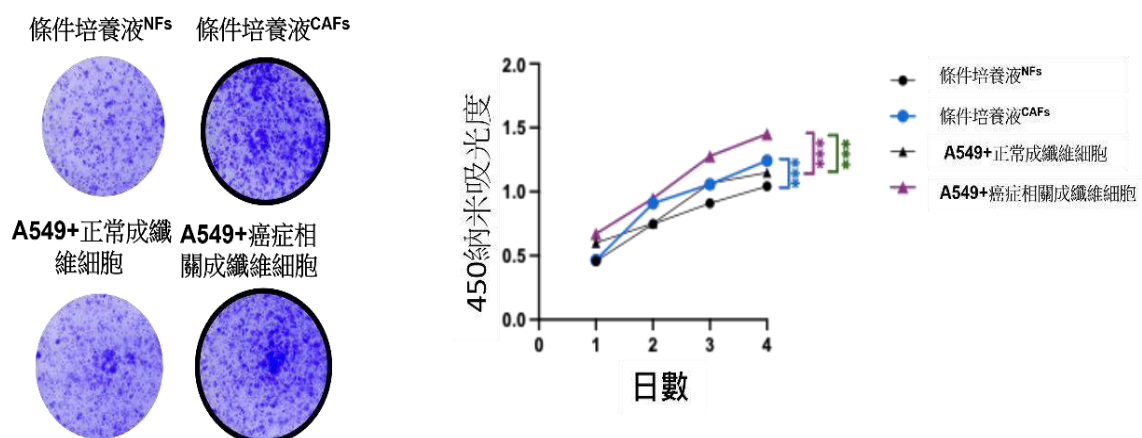
圖六、共培養和條件培養液實驗: CAFs 和 NFs 如果影響 A549 癌細胞的入侵行為
(資料來源:研究者整理)

接著我們進行了創傷癒合實驗，設置方式類似於我們的侵襲實驗。我們在 A549 細胞的匯合單層中製作了一個劃痕，並測量裂隙閉合的速度。觀察到用 CAF 條件培養基孵育的 A549 細胞在 48 小時後比用 NF 條件培養基孵育的細胞更快閉合裂隙。與 CAFs 共培養的 A549 細胞也表現出類似的效果(圖七)。這一發現與我們在侵襲和遷移實驗中觀察到的增強侵襲和遷移能力一致。



圖七、共培養和條件培養液實驗: CAFs 和 NFs 如果影響 A549 癌細胞的轉移行為
(資料來源:研究者整理)

最後，在我們進行了集落形成實驗和 MTT 實驗。集落形成實驗顯示，CAFs 形成的集落比 NFs 更大且更多，表明其增殖能力增強。MTT 實驗也顯示 CAFs 的代謝活性高於 NFs，進一步支持了其增強的增殖能力(圖八)。



圖八、共培養和條件培養液實驗: CAFs 和 NFs 如何影響 A549 癌細胞生殖行為
(資料來源:研究者整理)

總之，我們的結果表明，CAFs 相比於正常成纖維細胞表現出更強的增殖、遷移和侵襲能力。重要的是，我們還展示了 CAFs 可能通過分泌可溶性因子來促進肺癌細胞的遷移和侵襲。這些發現強調了腫瘤微環境和 CAFs 在推動癌症進展中的關鍵作用。

二: 闡明 ^{YKT6+} CAF 與肺癌之間的串擾

如前所述，在 CAF 條件培養基中接種的 A549 細胞增強了增殖和運動能力，這表明 CAFs 確實會將基因產物釋放到細胞外，這些產物可能通過內吞作用被鄰近的肺癌細胞吸收。近期的研究指出，CAFs 可以通過釋放 CAF 衍生的外泌體來影響腫瘤微環境。研究顯示，外泌體在細胞間通信中扮演重要角色，可以影響多種細胞過程。它們由多種細胞類型分泌，包括成纖維細胞，其攜帶的貨物可以調節受體細胞的表型。我們的結果與這些發現一致，表明 CAFs 可能通過釋放外泌體或其他可溶性因子來促進肺癌細胞的惡性行為。

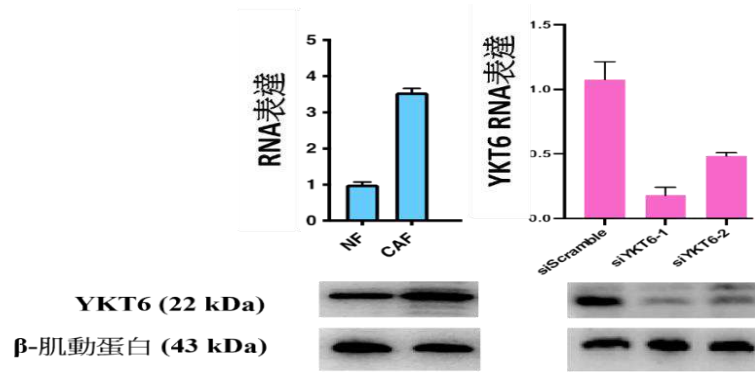
為了更好地了解 CAFs 如何影響肺癌，我們對患者來源的 CAF/NFs 進行了 RNA 測序。我們測序並量化每種 RNA 的表達，發現與外排作用相關的 RNA 在 CAFs 中上調，支持了我們之前的數據。其中一個上調的基因是 Ykt6——SNARE 家族的一員。SNARE 蛋白在囊泡運輸和外排作用過程中的脂質膜融合中起關鍵作用。特別是 Ykt6 已被證明能調節細胞外泌體的釋放。因此，我們假設 CAFs 通過上調 Ykt6 增強外泌體分泌，從而調節腫瘤微環境並促進肺癌轉移。

為了研究 Ykt6 在肺癌進展中的貢獻，我們計劃進行 Ykt6 的敲低研究。我們的敲低策略涉及使用 siRNA(如下表)。

Knock Down YKT6	
物種	人類
siYKT6-1	5' GAGAAGCUGAUCCCAUGACUATT3' 5' UAGUCAUGGGAUCAGCUUCUCTT3'
siYKT6-2	5' CGCAUACGAUGUGUCUCCUUTT3' 5' AAGGAAGACACAUCGUAUGCGTT3'
siScramble	5' GGCCUUUACCUUGCUGGAGAATT3' 5' UUCUCCAGCAAGGUAAGGCCCTT3'

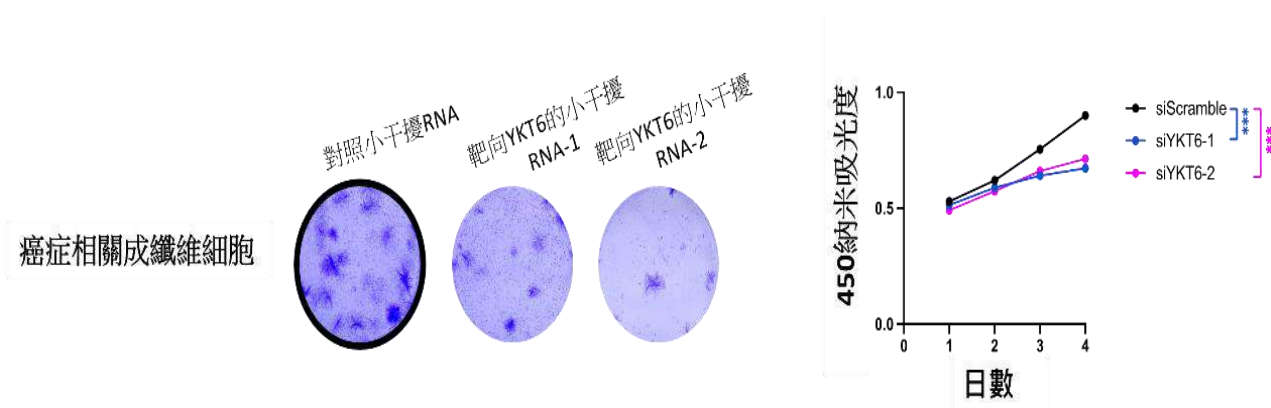
如前所述，我們發現 CAFs 的存在促進了相鄰肺癌細胞的增殖和遷移。我們假設外泌體的釋

放可能是 CAFs 與肺癌細胞之間相互作用的潛在機制。為了驗證我們的 CAF 敲低模型的有效性，我們進行了 qPCR 和 Western blot 實驗，以測量轉染 Ykt6 特異性 siRNA 後 YKT6 的基因表達。我們設計了兩種 YKT6 特異性的 siRNA (siYKT6-1; siYKT6-2)，以及一種作為陰性對照的 siRNA (siScramble)。正如預期，轉染 YKT6 特異性 siRNA 的細胞中，Ykt6 的相對表達水平較轉染非特異性 siRNA 的細胞顯著降低。我們的 Western blot 結果同樣可靠(圖九)。



圖九、YKT6 的敲低效果 (資料來源:研究者整理)

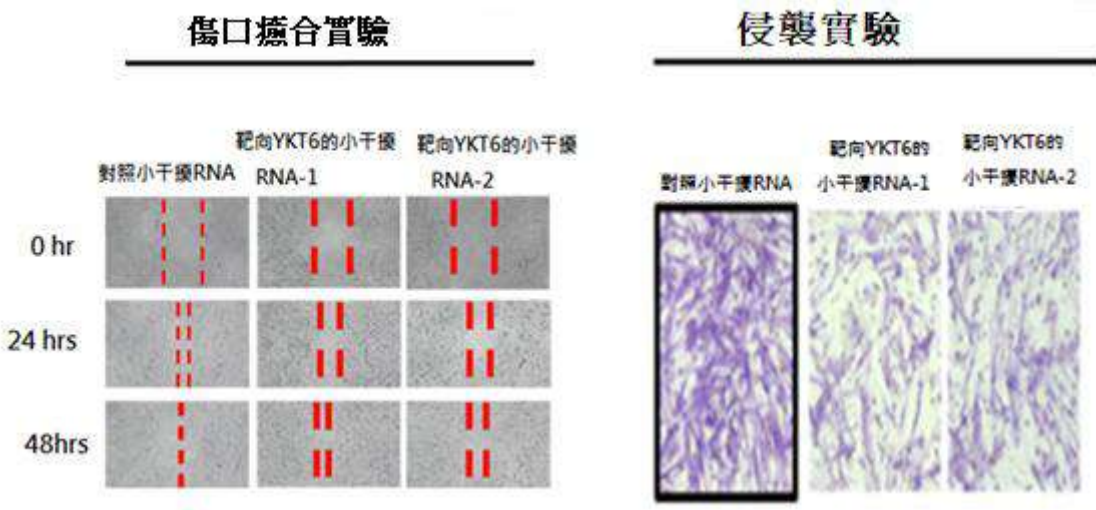
在建立我們的敲低模型後，我們對 CAFs 進行了增殖實驗 (MTT 測試和克隆形成實驗)。結果發現，轉染 siRNA 的 CAFs 在 4 天後的增殖速率低於轉染非特異性 siRNA 的 CAFs。這一結果表明，Ykt6 的敲低可以降低 CAFs 的增殖能力。進一步觀察到，在形成克隆的能力上也顯著低於陰性對照的 CAFs(圖十)。這顯示了 YKT6 在維持 CAFs 增強增殖能力中的重要性。



圖十、YKT6 的敲低的 CAFs 的生殖特性效果 (資料來源:研究者整理)

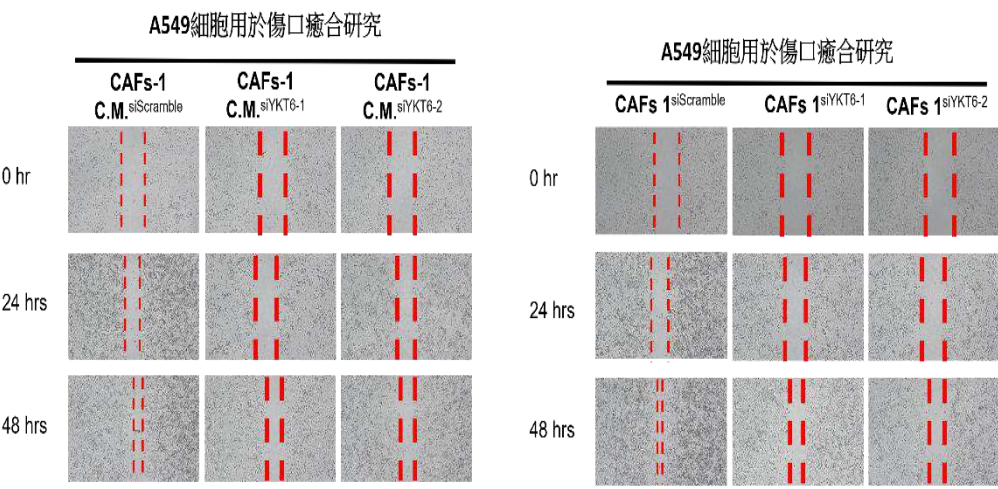
為了測量敲低 YKT6 對 CAFs 移動性的影響，我們進行了傷口癒合實驗 (圖十一左)。我們觀察到，與對照 CAFs 相比，YKT6 敲低的 CAFs 在閉合傷口間隙的能力上有所下降，這表明它

們的遷移能力減弱。此外，我們還進行了侵襲實驗，發現陰性對照 CAFs 的擠出能力明顯高於 YKT6 敲低的 CAFs (圖十一右)。總之，這些結果表明 YKT6 在支持 CAFs 增強的增殖、遷移和侵襲能力中扮演著關鍵角色。



圖十一、YKT6 的敲低的 CAFs 的轉移和入侵特性效果 (資料來源:研究者整理)

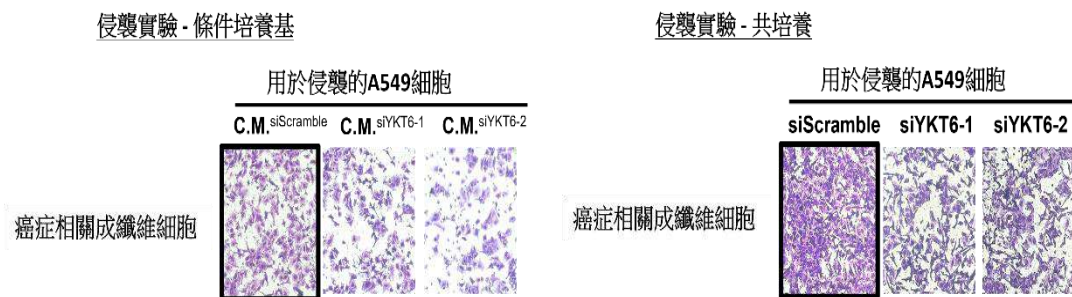
首先，我們進行了一項傷口癒合實驗，將 A549 細胞處理於來自轉染了 siScramble、si YKT6-1 或 si YKT6-2 的 CAFs 培養基。我們觀察到，與對照 CAFs 培養基相比，與 YKT6 敲低的 CAFs 培養基共同培養的 A549 細胞在 48 小時後閉合傷口的速度較慢 (圖十二左)。在與 YKT6 敲低的 CAFs 共同培養的 A549 細胞中，也發現了類似的現象 (圖十二右)。



圖十二、共培養和條件培養液實驗: YKT6 敲低的 CAFs 如何影響 A549 癌細胞生殖行為

(資料來源:研究者整理)

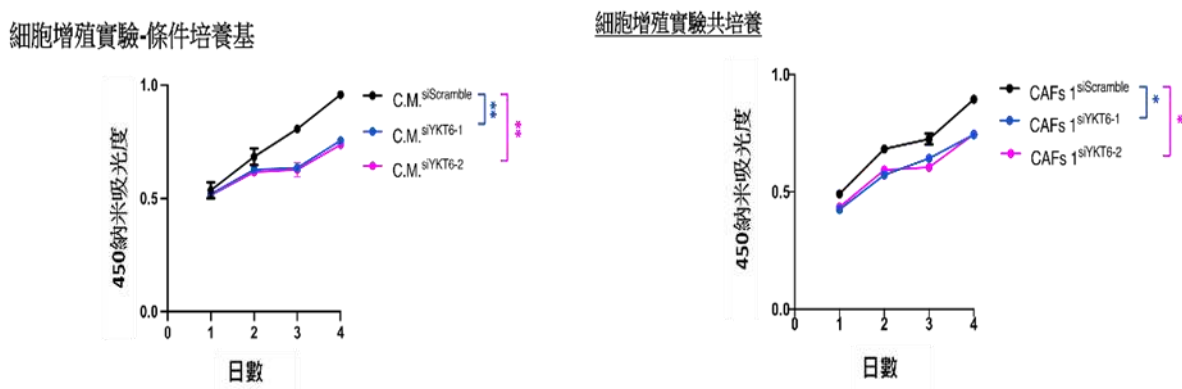
為了測試 YKT6 敲低對肺癌細胞侵襲能力的影響，我們使用 A549 細胞進行了侵襲實驗。我們觀察到當孔盤中添加 YKT6 敲低 CAFs 培養基時，A549 細胞穿過膜插入的程度減少。這一觀察在添加 YKT6 敲低 CAFs 的孔盤中同樣存在（圖十三）。



圖十三、共培養和條件培養液實驗: YKT6 敲低的 CAFs 如何影響 A549 癌細胞入侵行為

(資料來源:研究者整理)

我們以與上述相似的方式重複了增殖實驗，發現與 YKT6 敲低 CAFs 培養基共同培養的 A549 細胞在四天內的增殖速率較慢（圖十四左）。在與 YKT6 敲低 CAFs 共同培養的 A549 細胞中也觀察到了類似的情況（圖十四右）。



圖十四、共培養和條件培養液實驗: YKT6 敲低的 CAFs 如何影響 A549 癌細胞生殖行為

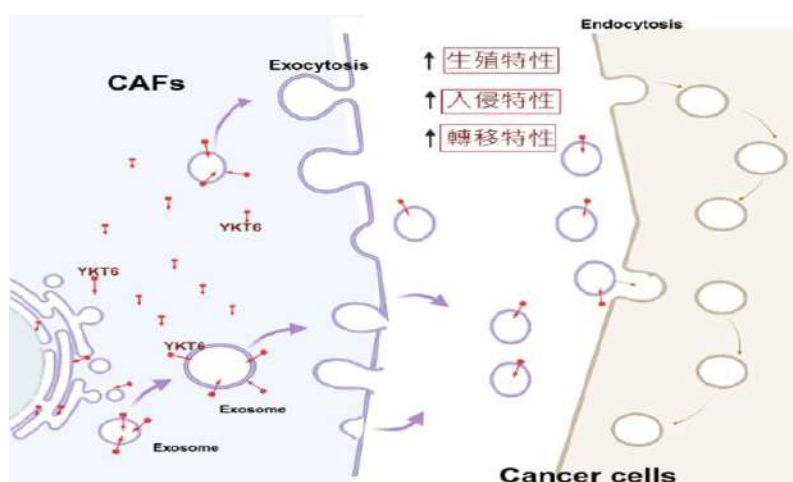
(資料來源:研究者整理)

總之，我們的結果表明，YKT6 作為外泌體釋放中的一個關鍵組件，介導了 CAFs 在肺癌進展中促進腫瘤形成的功能，包括增強增殖、遷移和侵襲能力。

綜合來看，我們的數據表明，通過抑制 YKT6 來針對 CAFs 中的外泌體分泌途徑，可能成為限制肺癌進展的一條有前景的治療途徑。

肆、結論

1. YKT6 在調節 CAF 外泌體釋放中的關鍵作用。
 2. YKT6 在 CAF 和肺癌之間的作用根據 qPCR 分析顯示，CAFs 表達高水平，ACTA2 (α -平滑肌肌動蛋白) 和 FAP (纖維母細胞活化蛋白)，這些標記物證實了 CAFs 的活化狀態。結果表明，CAFs 支持肺癌細胞的增殖、侵襲和遷移。
 3. 條件培養基和共培養顯示，CAFs 促進了肺癌細胞的侵襲能力。傷口癒合試驗證明，與 NFs 相比，CAFs 能顯著提高 A549 細胞的遷移能力。
 4. MTT 實驗測定結果表明，CAFs 釋放的外泌體對肺癌細胞有促進作用，且 YKT6 在 CAFs 中的表達水平高於 NFs。
 5. 敲低 CAFs 中的 YKT6 會顯著降低其對肺癌細胞的促進作用，顯示 YKT6 對 CAFs 的增殖、侵襲和遷移能力有重要影響。
 6. Western blot 數據顯示，YKT6 敲低後，CAF 標誌物、細胞週期相關標誌物和外泌體標誌物的蛋白質表達顯著下降。
- 總結： YKT6 在調節 CAFs 外泌體釋放方面扮演關鍵角色，影響 CAFs 的功能以及它們對肺癌細胞的影響。 YKT6 的表達水平直接關聯於 CAFs 促進肺癌細胞增殖、侵襲和遷移的能力。 這些結果支持 YKT6 作為 CAFs 功能調節中的關鍵因子的假設，並揭示了其在腫瘤微環境中的潛在作用和機制。



圖十五、YKT6 在調節 CAFs 外泌體釋放在腫瘤微環境中的潛在作用和機制

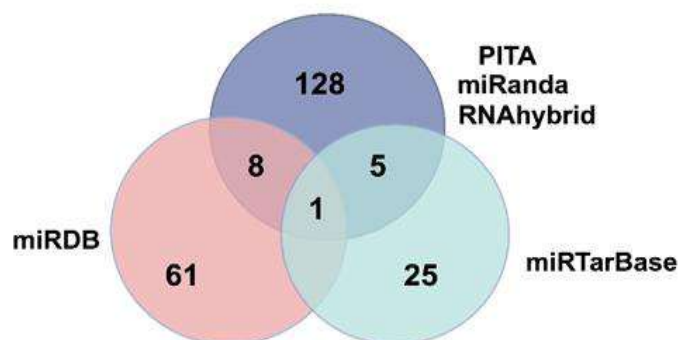
(資料來源: 研究者繪製，Created in BioRender.com)

伍、討論

一直以來研究都圍繞癌細胞本身，卻忽略了癌症的產生是多方面形成，牽涉的細胞不單一種卻是多種如免疫細胞和腫瘤微環境的癌症相關成纖維細胞（CAFs）。今年三月, *Charles Swanton, et al* 在《Cell》期刊發表的文章強調了癌症研究中的一些複雜性，稱之為「clouds of complexity, 複雜性的雲朵」。這些是尚未完全理解的重要方面。文章提到腫瘤微環境（TME）作為討論腫瘤複雜性的一部分，因此癌症相關成纖維細胞（CAFs）是非常值得探討的課題。

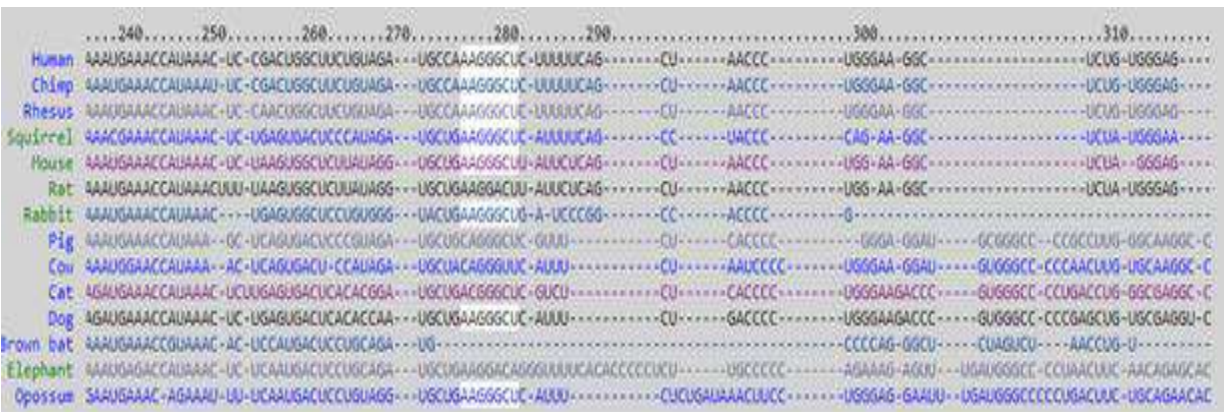
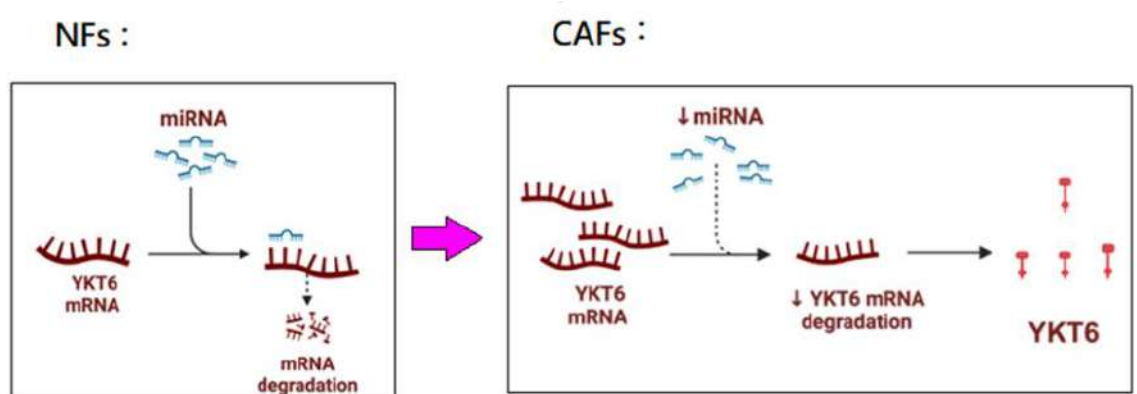
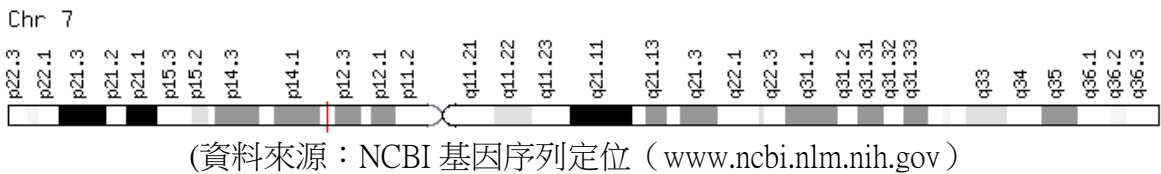
癌症相關成纖維細胞（CAFs）如何影響癌細胞生殖、入侵和轉移特性，主要是癌症相關成纖維細胞（CAFs）分泌 cytokine 如 TGF- β 等細胞因子，促進癌細胞的上皮-間質轉化（EMT）表型，使其能夠轉移〔10〕。這表明 CAFs 部分通過增加細胞因子和其他因子（如外泌體）的分泌來發揮促腫瘤作用，這些因子可以作用於鄰近的癌細胞，增強其增殖、遷移和侵襲能力。我們發現促進 CAFs 中外泌體分泌的 Ykt6 對這些促腫瘤效應至關重要。在 CAFs 中敲低 Ykt6 會降低其促進肺癌細胞增殖、遷移和侵襲的能力。

另外針對 YKT6 基因的具體轉錄因數還需進一步研究。YKT 由 miRNA 介導，該 miRNA 能調節 CAFs 的分泌能力，最終影響其促腫瘤作用。針對 CAFs 中的外泌體分泌途徑，通過抑制 Ykt6，可能代表一條有前景的治療途徑，以限制肺癌的進展。〔10〕〔11〕這為未來的癌症治療提供了潛在的靶點，也揭示了 miRNA 在調節 TME 中 CAF 功能的關鍵作用。我們利用了五個線上 miRNA 預測軟體分析出 miR-122-5p 是最有可能結合 YKT6 mRNA, 從而抑制 YKT6 蛋白表現。(圖十六)



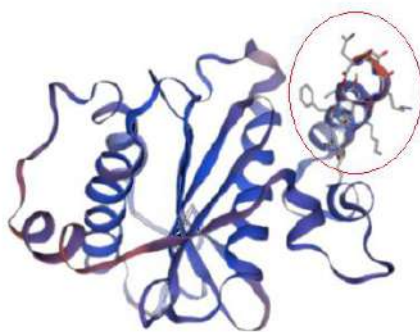
圖十六、五個線上 miRNA 預測軟體分析結果 (資料來源:研究者整理)

我們進入 TargetScan 網站， 通過基因的 Ensembl ID 來搜索目標基因。 查看 miRNA 結合位點。 我們把靶向位點所住在 miR-122-5p 在 YKT6 mRNA 上結合。 該頁面會顯示 mRNA 的 3'UTR 區域，miRNA 與 mRNA 的結合區域，以及 miRNA 與 mRNA 的鹼基配對圖（seed 區域）。 因此我們推測 miR-122-5p 是最有可能結合 YKT6 mRNA。以後也會朝這方面繼續研究。（圖十七）



圖十七、miR-122-5 p 在 YKT6 mRNA 上結合區域配對圖

結合的位置我們用 swiss-model 模擬，確切位置和結合的方式，經程式模擬過後，找到最有可能的區域(圖十八)。



圖十八、SWISS-MODEL 模擬 YKT6 蛋白質結構域圖。圈起來的地方為可能的結合區域

(資料來源：SWISS-MODEL 建模結果)

在癌症研究中，對於腫瘤微環境（TME）及其組成成分的深入探討，顯示出癌症的形成和發展並非僅僅依賴於癌細胞本身。相反，癌症相關成纖維細胞（CAFs）和其他免疫細胞共同構成了一個複雜的生物網絡，彼此之間的相互作用對於腫瘤的增殖、入侵和轉移有著至關重要的作用。隨著對這些細胞功能的理解逐漸深入，未來的研究應該更加注重探索腫瘤微環境中各種細胞之間的交互作用及其對癌症進展的影響。

此外，針對 CAFs 和 Ykt6 在腫瘤微環境中的角色進行進一步研究，不僅有助於揭示其促腫瘤機制，也為未來的治療策略提供了潛在靶點。特別是 miRNA 在調節 CAFs 功能方面的重要性，為開發新的癌症治療方法提供了新的視角。通過精確地靶向這些分子，可能會有效地限制肺癌等腫瘤的進展，從而改善患者的癒後。

總之，未來的癌症研究應該更加全面地考慮腫瘤微環境中的多種因素，特別是免疫細胞和 CAFs 之間的相互作用，以期找到更有效的治療方案來對抗這一複雜疾病。

參考文獻 References

- [1] Jieqiong Gao and Christian Ungermann , Function of the SNARE Ykt6 on autophagosomes requires the Dsl1 complex and the Atg1 kinase complex. 2020.
- [2] Martha Gschwandtner , More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. 13 December 2019.
- [3] Farshid Jaberiansari , Comparison of the efficiency of ultrafiltration, precipitation, and ultracentrifugation methods for exosome isolation
- [4] Xuezhong Zhang, MD, A pan-cancer analysis of the oncogenic role of YKT6 in human tumors
- [5] Zahra Abbasi-Malati, Tumorigenic and tumoricidal properties of exosomes in cancers; a forward look
- [6] Nayden G. Naydenov, A membrane fusion protein, Ykt6, regulates epithelial cell migration via microRNA-mediated suppression of Junctional Adhesion Molecule A
- [7] Jieqiong Gao, Function of the SNARE Ykt6 on autophagosomes requires the Dsl1 complex and the Atg1 kinase complex
- [8] Lena Cords, Cancer-associated fibroblast classification in single-cell and spatial proteomics data
- [9] Mohammed Rabiul Hosen, Circulation: miRNA-122-5p in circulating extracellular vesicles is associated with a lack of improvement in cardiac function after transcatheter aortic valve replacement
- [10] Marina T. Broz, Metabolic targeting of cancer associated fibroblasts overcomes T-cell exclusion and chemoresistance in soft-tissue sarcomas.2024.
- [11] Jitendra Thakur, Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA.2021
- [12] Charles Swanton , Embracing cancer complexity: Hallmarks of systemic disease.2024
- [13] Su Yu-sheng, Ying-Chuan Wang, Lan Ping , Study on the mechanisms and medical applications of exosomes in Alzheimer's disease.2016

【評語】 090019

1. 創新性與重要性：

本研究聚焦於癌相關纖維母細胞 (CAFs) 在肺癌微環境中的作用，特別是探討了 SNARE 蛋白 YKT6 的關鍵角色，這一研究方向具有重要的創新性和臨床意義。通過比較 CAFs 和正常纖維母細胞 (NFs) 的基因表達差異，研究發現 YKT6 在 CAFs 中的高表達及其對肺癌 A549 細胞惡性行為的促進作用。這種從腫瘤微環境角度探索癌症發展機制的方法，為理解腫瘤進展和開發新的治療策略提供了創新的思路。特別是，研究揭示了 YKT6 通過調控 CAFs 的外泌體釋放來影響肺癌細胞的生長、轉移和入侵能力，這一發現為靶向腫瘤微環境治療肺癌提供了新的潛在靶點。

2. 優點：

該研究採用了多層次的研究方法，從病人組織樣本提取細胞，進行基因序列分析和 RNA-Seq，再到細胞功能實驗，全面探討了 YKT6 在 CAFs 中的作用。其次，研究不僅確定了 YKT6 的高表達，還通過基因敲除實驗證實了其在 CAFs 外泌體釋放中的關鍵作用，這種因果關係的建立增強了研究結論的可靠性。此外，研究利用多種

生物信息學工具預測可能與 YKT6 相互作用的 miRNA，為後續研究提供了方向。最後，研究結果直接指向了一個潛在的治療策略：通過靶向 YKT6 抑制 CAFs 的外泌體分泌，從而減弱其對肺癌細胞的支持作用，這為肺癌治療提供了新的思路。

3. 待改進的部分：

YKT6 在 CAFs 外泌體釋放中的具體分子機制和調控途徑尚未完全闡明，需要進一步研究其上游調控因子和與其他信號通路的交互作用。其次，研究未深入探討 CAFs 外泌體中具體哪些分子對肺癌細胞具有促進作用，這限制了對 YKT6 作用機制的全面理解。此外，YKT6 作為胞內蛋白，開發直接靶向藥物可能面臨挑戰，其非特異性抑制可能導致不可預期的副作用，這些問題需要在未來研究中加以考慮。在實驗設計方面，除圖 9 外，其他實驗均未進行 3 次重複，這可能影響結果的可靠性。最後，研究發現 ACTA2 與 FAP 蛋白質在 CAFs 中的表達量與 NFs 相比沒有顯著增加，這一結果需要進一步解釋或驗證。總的來說，這些改進將有助於增強研究的完整性和可靠性，為 YKT6 作為肺癌治療靶點的潛力提供更堅實的科學基礎。