



(21)申請案號：100121977 (22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 23 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/712 (2006.01)* *G01N33/574 (2006.01)*  
*A61P35/00 (2006.01)*

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)  
 高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：卓夙航 JUO, SUH HANG HANK (TW)；王照元 WANG, JAW YUAN (TW)；楊以屏 YANG, I PING (TW)；蔡祥麟 TSAI, HSIANG LIN (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

CN 101861401A WO 2009/108853A1

楊建軍等人，MicroRNAs 作為大腸癌生物標志物的研究進展，世界華人消化雜誌，2010 年 2 月 28 日，18(6)：568-575。

鄒健等人，MicroRNA 在人結腸癌幹細胞中的表達譜，世界華人消化雜誌，2010 年 1 月 18 日，18(2)：173-178。

于振濤等人，MicroRNA 在結腸癌組織的表達及其臨床意義，中華實驗外科雜誌 2008 年 7 月第 25 卷第 7 期。

李佩堯等人，人 microRNA 相關的遺傳變異與腫瘤，Hereditas(Beijing) Volume: 33 Issue: 8 Pages: 870-878 Published: 2011。

Jianyin Long ET AL., "Identification of MicroRNA-93 as a Novel Regulator of Vascular Endothelial Growth Factor in Hyperglycemic Conditions" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 30, pp. 23457-23465, July 23, 2010.

張伶等人，靶向細胞周期蛋白 bB1 的抗腫瘤研究，細胞生物學雜誌，2008 年第 5 期 574-580 頁。

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：3 項 圖式數：5 共 44 頁

(54)名稱

以微小去氧核糖核酸為基礎用於抗大腸直腸癌及大腸直腸癌預後的方法

MICRORNA-BASED METHOD FOR ANTI-COLORECTAL CANCER EFFECTS AND PROGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

(57)摘要

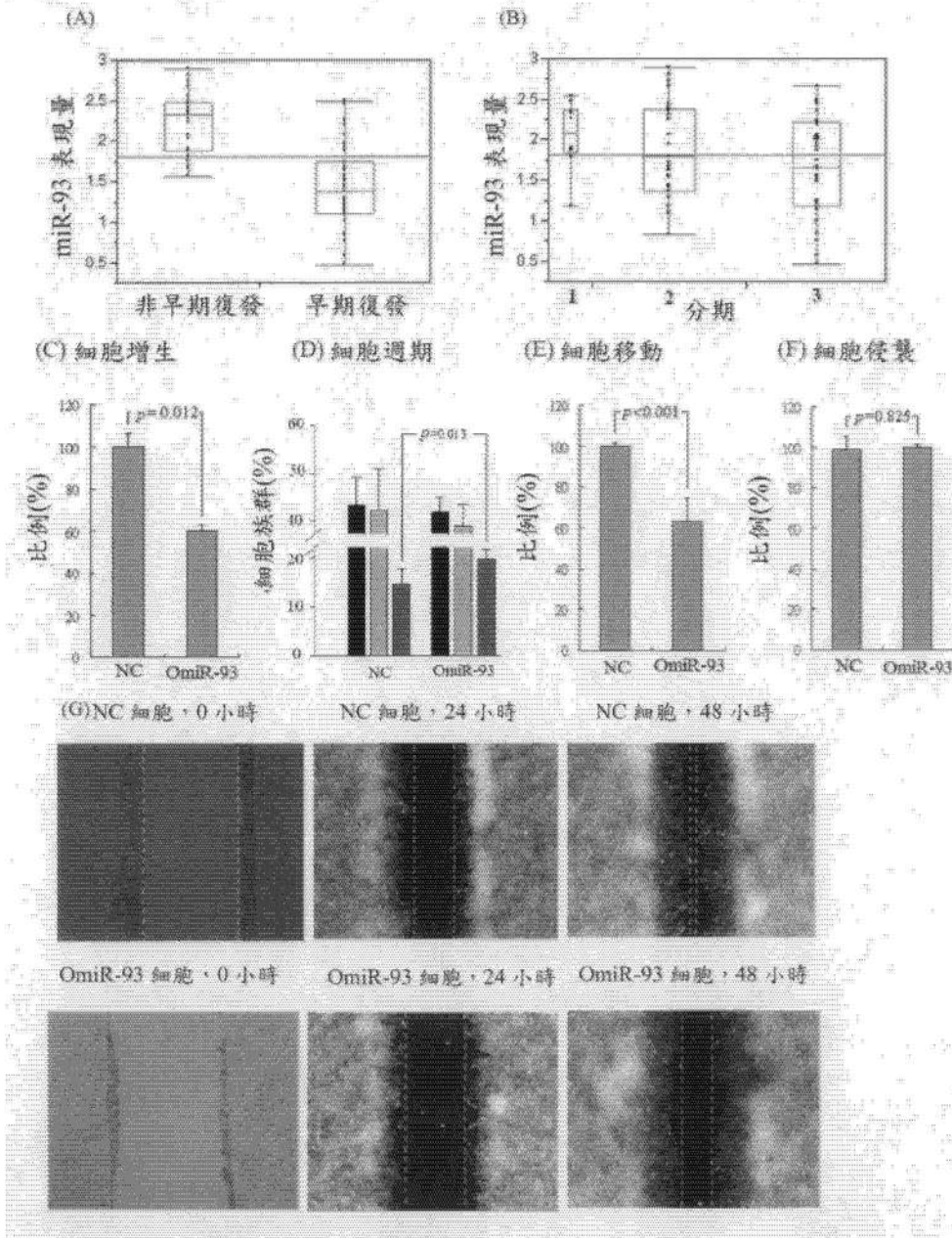
本發明揭示一種用於提供大腸直腸癌患者抗癌作用之醫藥組合物；本發明另揭示一種用於篩選抗大腸直腸癌藥物的方法；本發明進一步揭示一種判斷大腸直腸癌患者預後的方法。

The present invention discloses a method of providing anti-oncogenic effects in a subject suffered from colorectal cancer. The present invention also discloses a method for screening an anti-colorectal cancer

agent. The present invention further discloses a method of determining the prognosis of a subject with colorectal cancer.

指定代表圖：

圖 1



公告本
-----

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： (00)21977

A61K31/712 (2006.01)

※申請日： 100.6.23

※IPC 分類：

G01N33/374 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P35/00 (2006.01)

以微小去氧核糖核酸為基礎用於抗大腸直腸癌及大腸直腸癌預後的方法/  
MICRORNA-BASED METHOD FOR ANTI-COLORECTAL CANCER  
EFFECTS AND PROGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

### 二、中文發明摘要：

本發明揭示一種用於提供大腸直腸癌患者抗癌作用之醫藥組合物；本發明另揭示一種用於篩選抗大腸直腸癌藥物的方法；本發明進一步揭示一種判斷大腸直腸癌患者預後的方法。

### 三、英文發明摘要：

The present invention discloses a method of providing anti-oncogenic effects in a subject suffered from colorectal cancer. The present invention also discloses a method for screening an anti-colorectal cancer agent. The present invention further discloses a method of determining the prognosis of a subject with colorectal cancer.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種提供大腸直腸癌患者抗癌作用的方法；本發明另關於一種用於篩選抗大腸直腸癌藥物的方法；本發明進一步關於一種判斷大腸直腸癌患者預後的方法。

### 【先前技術】

微小去氧核糖核酸 (microRNA、miR) 是一段包含 17-25 個核苷酸的非編碼微小去氧核糖核酸，miR 可經由直接與基因的 3'端非轉譯區 (3'UTR) 結合而轉錄後調控多個目標基因的表現。miR 與 mRNA 結合會抑制蛋白質轉譯，但有時會促進 mRNA 剪切 (cleavage)。miR 對其目標基因的調控已被認為在癌症之癌發生 (carcinogenesis)、癌化 (progression) 及復發 (recurrence) 方面扮演重要角色，雖然過去幾年 miR 在生物醫學領域備受矚目，但大部份 miR 在疾病進展 (disease progress) 的作用仍未確認。

大腸直腸癌 (colorectal cancer, CRC) 是最常見的癌症之一，有非常高的復發率及致死率，若能有效區分不良預後的患者將有助於患者後續追蹤與治療，不過至今尚未有理想的生物指標 (biomarker) 能夠可靠地預測大腸直腸癌復發。

美國專利申請號 12/398852 揭示了用於鑑別特定病況 (如大腸直腸癌) 之 miRNA 圖譜之方法與組成，並使用該圖譜作為病況之診斷及/或預後 (如大腸直腸癌以及大腸直腸癌復發或對治療的反應)。該美國專利申請案使用微陣列 (microarray) 以雜合 (hybridization) 方法作大

規模篩選，不過由雜合實驗得到的微陣列數據容易得到偽陽性（false positive）結果，因此需要更具可信度的方法及更多功能性的研究以確認 miR 與大腸直腸癌復發之間的關聯。對於尋找抗腫瘤發生（tumorigenesis）或抗復發之較佳或其他替代方法一直都有需求，本發明藉由揭示一種抗大腸直腸癌或抗大腸直腸癌復發的方法、一種用於篩選抗大腸直腸癌藥物的方法以及一種判斷大腸直腸癌患者預後的方法來解決這些問題。

### 【發明內容】

目前世界上每年診斷出有將近一百萬個大腸直腸癌（CRC）的新病例，大約有一半的病例會因此而死亡。數十年來，美國癌症聯合委員會（American Joint Committee on Cancer, AJCC）及國際聯合抗癌組織（International Union Against Cancer, UICC）分期系統採用腫瘤侵襲深度（depth of tumor invasion）、局部淋巴結轉移（regional lymph node involvement）及遠端轉移（distant metastasis）的出現與否作為預測 CRC 患者術後復發的主要預後指標。雖然對局部疾病而言，手術切除是一種很有效的方法，不過有 25% 至 40% 的患者會在手術後復發，其中三分之一為局部復發，另外三分之二會發展成遠端轉移，CRC 復發大部分有時間限制（time-limited）的現象，40-50% 的復發發生在初次切除後一年內，目前研究顯示初次治療到復發的時間與患者生存率有很大的關聯，特別是在手術切除後的一年內。為了提供病患適當且有效的治療以改善病患預後，研究者持續致力於發展關於改善腫瘤早期偵測的方法，而目前並沒有理想的生物指標或指示劑（indicator）可區分

早期復發的病患與非早期復發病患，因此偵測術後早期復發之簡易且可靠的生物指標可幫助醫生進行更積極的治療而且也有助於病患安排其生活計畫。

CRC 的腫瘤發生涉及多步驟的基因體變異，包括致癌基因活化與腫瘤抑制基因失活。近年來，越來越多的證據指出 CRC 發病與缺少 miR 的調節功能相關，有許多研究報告顯示 miR 與 CRC 發展的關聯，但鮮有研究著重在 miR 與 CRC 早期復發之間的相關性。

本發明使用 miR 陣列比較早期復發與非早期復發之 CRC 組織之間的 miR 圖譜，界定早期或非早期復發的分界點是以根治性手術 (radical surgery) 切除後 12 個月內是否復發為依據，接著以組織樣本確認 miR-93 的作用，並進行一系列活體外 (in vitro) 與活體內 (in vivo) 的實施例以證實並說明 miR-93 在 CRC 復發中扮演的角色。MiR-93 在 CRC 早期 (術後 12 個月內復發) 與非早期復發之間的表現量有顯著的差異；進一步的實施例包含 35 個早期復發與 42 個非早期復發樣本，確認了非早期復發樣本中 miR-93 的表現量較早期復發樣本高；細胞實驗結果顯示 miR-93 大量表現 (overexpression) 會抑制大腸癌細胞增生 (proliferation) 及移動 (migration) 而不會抑制其侵襲 (invasion)；細胞週期結果顯示 miR-93 會造成 G2 期細胞族群大量累積，然而 miR-93 並不會誘導細胞凋亡 (apoptosis) 或壞死 (necrosis)；功能性結果顯示 miR-93 可抑制 CCNB1 (細胞週期蛋白 B1, cyclin B1) 蛋白質表現，造成細胞週期停滯在 G2 期；另外，miR-93 會抑制 ERBB2、p21 及 VEGF 的表現，這三種蛋白質皆與細胞增生有關；MiR-93 亦可抑制裸鼠腫瘤

細胞生長。綜觀以上結果，本發明顯示 miR-93 可抑制腫瘤發生與減低 CRC 早期復發，對 CRC 患者的預測和治療方式具有臨床應用價值。

本發明所指抗癌作用包括抑制癌細胞增生、移動、血管新生 (angiogenesis) 及腫瘤生長。

此處所用之「抗大腸直腸癌」一詞意指抑制癌細胞生長及/或抑制癌細胞轉移或抑制早期復發，其指任何經由施予抗大腸直腸癌藥物造成抑制腫瘤發生或延長癌症緩解或減少復發的行為。

因此，本發明提供一種用於提供大腸直腸癌患者抗癌作用之醫藥組合物，其包含具有藥理上有效劑量的 miR-93 或 miR-93 擬似物，其中該患者之癌細胞中 miR-93 之表現量較控制組低。於較佳實施例中，該患者為早期復發患者且該控制組為非早期復發患者；miR-93 負調控 CCNB1、ERBB2、P21 及 VEGF 基因。於更佳實施例中，該患者為人類。

如同此處所述，「擬似物」一詞指任何模擬內生成熟 miRNA 分子的核酸。

本發明亦提供一種用於篩選抗大腸直腸癌藥物之方法，其包含以一測試藥物處理細胞，並測量於大腸直腸癌細胞中表現量降低之至少一種微小去氧核糖核酸的量，其中該測試藥物處理的細胞相對於控制組細胞之該微小去氧核糖核酸表現量之增加係表示該測試藥物為抗大腸直腸癌藥物。於較佳實施例中，該微小去氧核糖核酸為 miR-93。

本發明進一步提供一種判斷大腸直腸癌患者預後的方法，其包含測量該患者之檢體中至少一種微小去氧核糖核酸之表現量，其中該至



少一種微小去氧核糖核酸表現量相對於控制組樣本相對應之微小去氧核糖核酸表現量之變化係預測大腸直腸癌復發之指標。於較佳實施例中，該微小去氧核糖核酸為 miR-93；該控制組樣本係來自非早期復發患者。於更佳實施例中，該患者為人類。

### 【實施方式】

以下實施例是用來呈現而非限制本發明的各個面向與特色。

#### 患者與腫瘤樣本

招募兩組 CRC 患者，第一組包括 77 個具有 UICC 分期 I 至 III 期的原發性 (primary) CRC 患者 (35 個術後非早期復發與 42 個術後早期復發)。新的手術後復發或病灶轉移之發展定義為術後復發；早期復發定義為根治性手術切除後 1 年內局部復發 (腫瘤生長侷限在吻合術或一期手術治療的區域) 或遠端轉移 (遠端轉移或瀰漫性腹膜種植 (diffuse peritoneal seeding))。第一組用於揭示 miR 與早期復發相關。為了測試可能的 miR 是否在同一患者之成對的腫瘤與非腫瘤大腸直腸樣本中也有差異性表現，進一步招募第二組進行實驗，由 45 個 CRC 患者組成。為了避免新輔助治療對 miR 表現的潛在影響，排除了在手術前接受過化學療法或放射療法的患者。所有患者為居住在台灣非特定民族之中國人，人體組織在手術切除後於液態氮中迅速凍結，所有臨床樣本皆經過患者知情同意下取得，且研究實驗計畫也經過當地人體試驗委員會 (Institutional Review Board) 核准。

#### 統計分析

連續變量表示為平均  $\pm$  標準差 (SD)，而二分變量 (dichotomous

variable)表示為數字及百分比。利用 JMP 軟體(版本 7.0.1, SAS Institute Inc., 美國)執行 ANCOVA 統計法以比較不同條件下 (CRC 病患的年齡、性別、癌症分期) 早期與非早期復發患者間 miR 表現量之平均值。雙尾檢定的 p 值小於 0.05 時具有統計顯著性。

### 結果：人口統計數據

第一組 77 個各自獨立的 CRC 患者 (35 個非早期復發與 42 個早期復發) 之特徵整理於表一中，其平均年齡為 66.4 歲，範圍從 24 到 86 歲，此組別早期復發的程度顯示於表二。第二組包含 45 個患者，用於比較來自同一個體之成對的腫瘤與非腫瘤大腸直腸樣本之間 miR-93 表現量的差異 (統整於表三中)。第二組的平均年齡為 65.8 歲，範圍從 37 到 84 歲。早期復發的患者之腫瘤分期較非早期復發患者後期，但其年齡與性別分佈並沒有顯著的不同。

表一、本實施例第一組 77 位 UICC<sup>a</sup> 分期 I-III 期之大腸直腸癌病患之臨床病理特徵

變數	數目 (%)
性別	
男/女	42(54.5)/35(45.5)
年齡 (y/o)	
<65/≥65	28(36.4)/49(63.6)
最大尺寸 (cm)	
<5/≥5	43(55.8)/34(44.2)
位置	
大腸/直腸	50(64.9)/27(35.19)
分期	
I/II/III	10(13.0)/35(45.5)/32(41.56)
侵襲深度	
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	2(2.6)/11(14.3)/60(77.9)/4(5.2)
血管侵襲	
無/有	56(72.7)/21(27.3)

神經旁侵襲	
無/有	55(71.4)/22(28.6)
組織學	
WD/MD/PD <sup>b</sup>	5(6.5)/63(81.8)/9(11.7)
腫瘤型態	
A/M <sup>c</sup>	68(88.3)/9(11.7)
早期復發	
無/有	35(45.5)/42(54.5)

<sup>a</sup> 國際聯合抗癌組織

<sup>b</sup> WD：分化良好；MD：中度分化；PD：分化不良

<sup>c</sup> A：腺癌（Adenocarcinoma）；M：粘液癌（Mucinous carcinoma）

表 2、非早期復發與早期復發大腸直腸癌患者之年齡、性別及 UICC 分期

	非早期	早期	P 值
個數	35	42	
年齡	68.3 ± 12.3	64.8 ± 13.9	0.25
性別（女/男）	17(48.6)	18 (42.9)	0.61
UICC <sup>a</sup>			
I 期	8 (22.9%)	2 (4.8%)	
II 期	19 (54.3%)	16 (38.1%)	0.003
III 期	8 (22.9%)	24 (57.1%)	

<sup>a</sup> 國際聯合抗癌組織

表三、本實施例第二組 45 位 UICC<sup>a</sup> 分期 I-III 期之大腸直腸癌病患之臨床病理特徵

變數	數目 (%)
性別	
男/女	27(60.0)/18(40.0)
年齡 (y/o)	
<65/≥65	18(40.0)/27(60.0)
最大尺寸 (cm)	
<5/≥5	23(51.1)/22(48.9)
位置	
大腸/直腸	34(75.6)/11(24.4)
分期	

I/II/III	7(15.6)/18(40.0)/20(44.4)
侵襲深度	
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> /T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	3(6.7)/5(11.1)/28(62.2)/9(20.0)
血管侵襲	
yes/no	15(33.3)/30(66.7)
神經旁侵襲	
yes/no	8(17.8)/37(82.2)
組織學	
WD/MD/PD <sup>b</sup>	0(0)/37(82.2)/8(17.8)
腫瘤型態	
A/M <sup>c</sup>	38(84.4)/7(15.6)

<sup>a</sup> 國際聯合抗癌組織

<sup>b</sup> WD：分化良好；MD：中度分化；PD：分化不良

<sup>c</sup> A：腺癌；M：粘液癌

### RNA 萃取與 cDNA 製備

根據使用說明取各組織約 100 mg 加入 1 mL TRIzol 試劑 (Invitrogen, 美國) 中, 利用桌上型組織均質機 (Polytron PT1600E, Kinematica AG, 瑞士) 均質化。以 Qiagen RNAeasy 管柱 (Qiagen, 德國) 純化包含 mRNA 與 miR 之總 RNA(total RNA)。miR 陣列中, 使用 Megaplex 反轉錄人類引子庫 A 與 B (Applied Biosystems Inc.) 進行 miR 之 cDNA 合成。個別 miR 檢測中, 利用 20 ng 總 RNA 與獨特引子(unique primer, Applied Biosystems Inc.) 合成個別 miR 之 cDNA。mRNA 定量分析中, 利用 1 μg 總 RNA、隨機六聚體引子及反轉錄酶 (Applied Biosystems Inc.) 合成 cDNA。

### miR 陣列

將三個患有原發性 CRC 患者 (一個非早期復發與兩個早期復發) 之樣本利用包含 667 個人類 miR 的 miR 陣列 (Applied Biosystems Inc.,

美國) 進行篩選, 確認 CRC 早期復發與非早期復發之間 miR 表現之差異。各陣列包含一哺乳動物的 U6 (U6b, SEQ ID NO: 2) 作為內部控制組 (internal control)。利用 Applied Biosystems 7900HT 即時 PCR 系統 (Real-Time PCR System) 進行即時定量 PCR (RT-qPCR) 並以 ABI 7900 序列偵測系統 (Real-Time PCR System, 軟體版本 2.4) 預設熱循環條件。

### 個別 miR 檢測

針對各個候選 miR, 利用 TaqMan miR RT-qPCR (Applied Biosystems Inc.) 進行 miR 定量分析。miR 之相對表現量係以內部控制組 U6b 為基準, 利用方程式  $\log_{10}(2^{-\Delta Ct})$  進行標準化 ( $\Delta Ct = (CT_{miR-93} - CT_{U6b})$ ), 並計算  $\log_{10}(2^{-\Delta Ct})$  之中位數、平均與標準差 (SD)。

### miR 陣列之結果與後續確認

利用 miR 陣列確認 CRC 早期復發與非早期復發之間多個差異性表現之 miR。在這些候選 miR 之中, miR-93 的表現量在早期復發樣本中較非早期復發樣本降低 3.5 倍。為了進一步確認 miR-93 表現量在早期復發與非早期復發患者之間是否不同, 另外檢測了 77 個人類 CRC 腫瘤樣本。結果顯示, 在非早期復發群組中之早期復發樣本之 miR-93 表現量降低 6.1 倍,  $\log_{10}(2^{-\Delta Ct})$  之中位數在非早期復發群組中為 2.323, 而在早期復發群組中為 1.483 (調整  $p < 0.0001$ , 圖 1A)。分析不同分期 (stage) CRC 腫瘤樣本之 miR-93 表現量, 發現 miR-93 表現量與 CRC 分期之間具有相關性 (調整  $p = 0.0325$ , 圖 1B), CRC 偏早期之 UICC

分期與 miR-93 之高表現量相關 (I 期、II 期、III 期之  $\log_{10} (2^{-\Delta Ct})$  中位數分別為 2.077、1.788、1.6649)。這些獨立的樣本證明 miR-93 在預測術後大腸直腸癌復發的實用性，也確保 miR-93 適合進行進一步的功能性實驗。

### 成對的樣本中之 miR-93

45 個腫瘤組織之 miR-93 之表現量較其對應之正常大腸直腸組織高出 1.66 倍 (成對 t 檢定  $p=0.03$ )，在這些成對的樣本之間，62.22% (28/45) 的 CRC 樣本相對於其對應的正常組織有較高的 miR-93 表現量 (圖 4A)。

### 目標預測

為了研究 miR-93 的生物功能，使用 miR 目標預測程式 miRDB、miRanda、miRWalk 與 TargetScanS 進行目標基因的檢索，並使用 KEGG 途徑 (pathway) 程式預測 miR 調控目標基因的途徑。

### 建構 miR-93 大量表現之質體

本實施例使用 pCDH 載體 (System Biosciences, 美國) 作為 miR-93 (SEQ ID NO: 1) 大量表現系統，評估 miR-93 大量表現的功能性結果。將 miR-93 PCR 產物 (包括 100bp microRNA 莖環上游與下游兩端之原生毗鄰序列 (native flank sequence)) 以 5' 端至 3' 端方向嵌入 pCDH 載體之多重選殖位置 (multiple cloning sites, MCS) 建構 pCDH-miR-93 質體。miR-93 之順向引子 (forward primer) 序列為 TCCTGAATTCAA CCTTCACTGAGAGGGTGGTTG，反向引子 (reverse primer) 為 CTAGG CGGCCGCGGGAGACCAGACCCTTTTGAAC，順向引子係由 5' 端延

伸並包含 GAATTC 序列以產生 *EcoRI* 限制酶切位，而反向引子係由 3' 端延伸並包含 GCGGCCGC 序列以產生 *NotI* 限制酶切位，該些建構係以直接 DNA 定序確認。

### 細胞培養

將人類大腸癌細胞株 Caco2 (ATCC, 美國) 培養於 DMEM (Gibco-BRL, 美國) 中並添加 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS, Gibco-BRL, 美國) 與 100 U/ml 盤尼西林 (penicillin), 細胞維持在 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 的環境中。

### 建立穩定細胞株

將 Caco2 ( $5 \times 10^5$ ) 接種至 6 孔盤 (6-well plate) 並培養隔夜，接著使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Inc., 美國) 以 400 ng 建構之質體 (negative scrambled pCDH 載體 (SEQ ID NO: 5) 或 pCDH-miR-93 質體) 轉染，於添加 12  $\mu\text{g/mL}$  嘌呤黴素 (puromycin, Sigma-Aldrich Co, 美國) 的標準培養基中篩選四週，篩選出含有 pCDH-NC 質體 (負控制組) 或 pCDH-miR-93 質體之穩定轉染 Caco2 細胞株，並以 miR 之 qRT-PCR 檢測確認。

### 細胞增生分析

利用 WST-1 法 (Roche Diagnostics, 美國) 測定細胞增生：將細胞接種於 96 孔盤中並培養 22 小時，接著以 1/10 體積的 WST-1 試劑於 37°C 培養 2 小時後，利用分光光度計測量 450 nm 的吸光度而定量。

### 細胞週期分析

利用碘化丙啶 (propidium iodide, PI, Sigma-Aldrich Co.) 染色後利用流式細胞技術 (flow cytometry) 檢測細胞週期：細胞經 36 小時培養後收穫細胞，以 PBS 沖洗並以  $10^5$ /ml 細胞密度懸浮於含有 0.1% triton X-100、0.02 mg/ml RNase 及 0.05 mg/ml PI 之 PBS 中，接著再以 PBS 清洗移除多餘 PI 染色並懸浮於 PBS 後，直接於 FACScan 流式細胞儀 (FACScan cytofluorimeter, Becton Dickinson, 美國) 中使用 CellQuest 軟體 (BD biosciences) 分析。

### 細胞凋亡分析

將細胞以冷甲醇固定、以冷 PBS 清洗並依使用說明培養於膜聯蛋白 (annexin) V-FITC (BD Biopharmingen) 與 PI (Sigma) 中，經染色的細胞利用流式細胞技術在 1 小時內於 FACScan 流式細胞儀 (FACScan cytofluorimeter) (Becton Dickinson, 美國) 中進行分析。

### 結果：miR-93 大量表現對細胞增生與細胞週期的影響

為了檢驗 miR-93 在腫瘤發生中扮演的角色，首先評估 miR-93 對 Caco2 細胞的影響。如圖 1C 所示，miR-93 大量表現選殖株 (OmiR-93) 培養 24 小時之增生速率僅為負控制組 (NC) 的 60% ( $p=0.012$ )。由於 miR-93 之預測目標基因與細胞週期及細胞生長有關，因此利用流式細胞分析評估 miR-93 對細胞週期的影響，結果顯示 miR-93 大量表現選殖株中 G2 期細胞族群累積顯著增加 (miR-93 大量表現選殖株為 19.8%、負控制組選殖株為 14.7%，圖 1D,  $p=0.013$ )。根據膜聯蛋白



V-FITC/PI 分析的結果，miR-93 大量表現不會誘導細胞凋亡或壞死（圖 4B）。上述結果顯示，miR-93 大量表現可藉由使細胞停在 G2 期而抑制大腸癌細胞生長，但無法引發 miR-93 調介之細胞凋亡。

### 細胞移動能力分析

根據使用說明，使用 Transwell 聚碳酸酯膜培養插入皿（polycarbonate membrane inserts，Millipore，德國）於 24 孔細胞培養盤中進行細胞移動能力實驗，將細胞以  $2 \times 10^4$ （細胞數/孔）的密度塗佈於 24 孔培養小室（millicell）上，使其在 37°C 培養 24 小時，移動能力較好的細胞會從培養小室內穿出至小室外，接著將插入皿以 1×PBS 潤洗，以 1% 胰蛋白酶（Trypsin）將細胞從小室外的膜層上移除，再以細胞培養裂解試劑（Promega，美國）裂解細胞，最後以分光光度計定量穩定轉植株的綠色螢光。

### 傷口癒合分析

將細胞以  $3 \times 10^5$  的密度塗佈於 6 孔盤上，在細胞形成單層之後，利用 200  $\mu$ l 微量吸管管嘴（micropipette tip）手動劃出傷口，接著更換培養基並在 37°C 培養，在不同時間點（0 小時、24 小時及 48 小時）於顯微鏡下觀察傷口的閉合並照相。

### 結果：miR-93 大量表現對細胞移動的影響

由 Transwell 檢測的結果（圖 1E）顯示，miR-93 大量表現穩定轉植株之細胞移動較控制組轉植株緩慢，細胞移動的比例為控制組轉殖

株的 63.3% ( $p < 0.001$ )。傷口癒合分析的結果也有抑制細胞移動的情況，控制組轉殖株與 miR-93 大量表現轉殖株之間隙距離分別為 0.43 mm 與 0.64 mm(24 小時)、0.08 mm 與 0.34 mm(48 小時)，顯示 miR-93 大量表現轉殖株的移動能力受到抑制，為負控制組轉殖株的 65%。以上結果一致顯示 miR-93 大量表現之後，細胞移動能力顯著下降 (圖 1G)。

### 基質膠侵襲實驗 (matrigel invasion assay)

利用 24 孔懸掛式細胞培養插入皿 (Transwell permeable supports, BD biosciences, 美國) 與 8- $\mu$ m 孔徑聚碳酸酯膜插入皿檢測細胞侵襲能力，根據使用說明將細胞以  $1 \times 10^4$  細胞數的密度塗佈於上層小室，在 37°C 培養 24 小時後移除未移動穿出膜層的細胞，將移動至膜下表面之細胞固定並以結晶紫染色，計算移動穿出細胞的數目並於顯微鏡下照相。實驗組與對照組均進行三重複實驗，而後拍照並計算移動細胞的數目。

### 結果：miR-93 大量表現對腫瘤細胞侵襲的影響

基質膠侵襲實驗顯示 miR-93 大量表現穩定轉殖株 (Omir-93) 與控制組轉殖株 (NC) 並無顯著差異，如圖 1F 所示，其結果顯示 miR-93 大量表現不會影響細胞侵襲的能力 ( $p = 0.825$ )。

### 活體內 (in vivo) 動物實施例

本實施例中使用之四週大 Balb/c 裸鼠 (體重為 12.6 至 15.6 g) 係

購自樂斯科生物科技股份有限公司（台灣）並飼養在無特定病原（specific pathogen free, SPF）環境中（合格証號第 26-99S029 號）。飼養至六週大後，將  $1 \times 10^7$  個 Caco2（NC 或 OmiR-93）細胞以皮下注射方式分別注入 Balb/c 裸鼠（每組四隻），每天測量其腫瘤直徑並且以體積 = 寬 × 長 × 高 / 2 的算式計算腫瘤體積 ( $\text{cm}^3$ )，動物經接種腫瘤細胞三週後犧牲，觀察腫瘤大小、拍照並移出腫瘤用於進一步檢測。

### 結果：miR-93 大量表現對裸鼠體內腫瘤細胞的影響

為了進一步檢驗 miR-93 在腫瘤發生中扮演的角色，評估 miR-93 大量表現對活體內腫瘤生長的影响。將穩定表現 miR-93 之 Caco2 細胞（OmiR-93）與具有雜亂（scrambled）pCDH-NC（負控制組，NC）之 Caco2 細胞皮下注射注入裸鼠中使腫瘤生長，接種 7 天後可透過觸摸察覺腫瘤並使其生長至第三週（圖 2A 及 2C），接種 OmiR-93 細胞之裸鼠癌腫塊（tumor lump）顯著小於接種 NC 細胞之裸鼠（ $p=0.005$ ，表 4，圖 2B 及 2C）。活體內結果進一步確認癌細胞中 miR-93 大量表現會造成實驗動物癌腫塊之細胞增生降低。

表四、大腸癌細胞株 Caco2 中 miR-93 的大量表現降低癌細胞在 Balb/c 裸鼠體內腫瘤發生的能力

	腫瘤細胞		P 值
	OmiR-93	NC	
N	4	4	
裸鼠重量(天數=21), gm	$21.62 \pm 0.79$	$22.24 \pm 1.84$	0.254
腫瘤大小*(天數=21), $\text{cm}^3$	$0.23 \pm 0.14$	$1.33 \pm 0.72$	0.0053

腫瘤大小=(高×寬×長)/2

### 結果：miR-93 大量表現對裸鼠體內腫瘤細胞的影響

利用反轉錄酶聚合酶連鎖反應 (reverse-transcriptase PCR) 隨後利用含有 SYBR Green 螢光染劑 (Applied Biosystems Inc.) 的即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 進行 mRNA 轉錄物定量。利用 1 µg 總 RNA、隨機六聚體引子及反轉錄酶 (Applied Biosystems Inc.) 合成 cDNA, PCR 反應使用的引子列於表五。

表五、引子序列

#### mRNA 定量分析

基因	順向引子	反向引子
<i>p21</i>	TTAGCAGCGGAACAAGGAGT	AGCCGAGAGAAAACAGTCCA
<i>CCNB1</i>	GCCTCTCCAAGCCCAATGGAAAC	ACATCAGAGAAAGCCTGACACAGG
<i>ERBB2</i>	CTACGGCAGAGAACCCAGAG	TTGATGCCAGCAGAAGTCAG
<i>GAPDH</i>	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	GATCTCGCTCCTGGAAGATG
<i>VEGF</i>	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT

#### 合成 3'UTR 雙股寡核苷酸全長

基因	順向引子	反向引子
<i>CCNB1</i>	AAAGACTAGTCTTGTAACCTTGAG TTGGAGTAC	AAAAGAGCTCTTTTGTATTTGAGTAT TGTTTTATTAAC
<i>ERBB2</i>	GCCAACTAGTACCAGAAGGCCAAG TCCG	GGCCGAGCTCTAGCTGTTTTCCAAAA TATATTTG

### 結果：建構報導質體 (reporter plasmid)

利用 pMIR-REPORT™ miRNA 報導載體系統 (Reporter Vector

System) (Applied Biosystems Inc.) 作為評估 miR-93 對蛋白質表現之影響之報導系統。利用表五所列之引子對合成各基因 3'UTR 雙股寡核苷酸全長，將 3'UTR 之 PCR 產物嵌入 pMIR 載體之多重選殖位置 (MCS) 以建構報導質體 (圖 3A)。

#### 暫時性轉染及螢光素酶 (luciferase) 檢測

使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 將 pMIR 建構體 (200 ng) 轉染進入細胞中，轉染後 24 小時溶解細胞並根據螢光素酶檢測系統 (Promega) 之使用說明測量螢光素酶活性，各實驗獨立重複三次且各樣本進行兩次實驗。

#### 蛋白質分離與西方墨點法 (western blotting)

利用裂解 (lysis) 緩衝液 (Cell Signaling, 美國) 處理細胞，由細胞裂解產物製備全蛋白質。使用 Bio-Rad 蛋白質分析定量蛋白質裂解物，於 10% SDS-PAGE 膠體中分離，轉漬至 PVDF 膜上並以含有 0.1% Tween 20、5% 脫脂牛奶蛋白質之 Tris 緩衝鹽溶液阻斷 (block)，蛋白質在 4°C 與一級抗體 (primary antibody) 混合隔夜，清洗轉漬膜並利用辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 接合的二級抗體 (secondary antibody) 與西方墨點基質 (Western Blotting Substrate) (Millipore, 美國) 顯像，暴露至 ECL 醫用 X 光膠片 (X-ray medical film) (Konica Minolta, 加拿大) 以顯現條帶 (band)，利用 GAPDH 蛋白的條帶強度作為蛋白質加入的量指標，用以確定蛋白質加入的量是等

量。

### 抗體

抗 GAPDH 抗體 (anti-GAPDH) 係購自 Sigma-Aldrich Co；抗-細胞週期蛋白 B1(anti-cyclin B1)抗體、抗-p21(anti-p21)抗體、抗-ERBB2 (anti-ERBB2)抗體及 Alexa Fluor 594 接合驢抗兔免疫球蛋白 G(Alexa Fluor 594 conjugated donkey anti-rabbit IgG) 購自 Cell Signaling Technology；而辣根過氧化酶接合山羊二級抗體係購自 Promega。

### 免疫螢光染色

免疫螢光染色係根據使用說明所述 (Cell Signaling) 進行，將細胞以冷甲醇溶液固定 20 分鐘，以冷 PBS 沖洗，並以浸泡於阻斷溶液 (3% BSA 溶於 TBS) 中 1 小時使其飽和。接著以 0.3% Triton X-100 滲透 5 分鐘後，將細胞與一級抗體混合培養 1 小時。沖洗後將切片與 Alexa Fluor 594 接合驢抗兔免疫球蛋白 G 混合培養，並以 DAPI (Cell Signaling) 染色。Caco2 之免疫染色係將切片置於 FluoView FV1000 共軛焦顯微鏡 (Olympus, 德國) 顯像。

### 結果：miR-93 之作用係透過 CCNB1、ERBB2、P21 及 VEGF 調介

以上實例顯示 miR-93 可在 Caco2 中抑制細胞增生與移動，並使癌細胞停留在 G2 期。接下來可找出 miR-93 目標基因以釐清 miR-93 的抗癌作用。藉由生物資訊分析 (bioinformatic analysis) 預測出多個可能的

miR-93 目標基因：*CCNB1* 及 *p21* 與細胞週期相關，*ERBB2* 與 *VEGF* 與細胞移動及增生、血管新生相關。OmiR-93 細胞中 *ERBB2* ( $p<0.0001$ )、*p21* ( $p=0.0002$ ) 與 *VEGF* ( $p=0.025$ ) 之 mRNA 表現量顯著低於負控制組 (NC) 中之表現量 (圖 2D)，而 *CCNB1* 之 mRNA 表現量雖然在兩種 Caco2 轉植株中無明顯差異 (圖 2D,  $p=0.167$ )，但 miR-93 造成 *CCNB1* 蛋白質量顯著的降低 (圖 3D)。這些結果顯示 miR-93 可利用轉錄後調控的方式抑制 *CCNB1* 之 mRNA，但不會降解其 mRNA。

已有實驗顯示 *p21* 與 *VEGF* 為 miR-93 目標基因，本實施例利用螢光素酶報導分析確認 *CCNB1* 與 *ERBB2* 為 miR-93 之直接目標基因：建構含有相同之 miR-93 預測結合序列 (CACUUU) 之 pLuc-*CCNB1* 與 pLuc-*ERBB2* 質體 (圖 3A 及 3B)，根據螢光素酶活性確認 miR-93 可直接作用在 *CCNB1* 與 *ERBB2* 之 3'UTR 並且負調控 (down-regulate) *CCNB1* 與 *ERBB2* 之表現量 (圖 3C)，西方墨點法亦顯示 *CCNB1*、*ERBB2* 與 *p21* 蛋白質量降低 (圖 3D)。以抗-*CCNB1* 抗體免疫螢光染色 Caco2，結果顯示 miR-93 負調控 Caco2 細胞內 (intracellular) 的 *CCNB1* (圖 5)，特別是在細胞核之處。

上述實施例僅係為了方便說明而舉例而已，本發明所主張之權利範圍自應以申請專利範圍所述為準，而非僅限於上述實施例。本發明已詳細描述並例示，熟習此技藝者可據以實施。在不背離本發明之精神與範疇下，各種改變、修飾與改善皆應屬本發明涵蓋範圍。

## 【圖式簡單說明】

圖 1、(A) 35 個非早期復發與 42 個早期復發 CRC 樣本之 miR-93 表現量：miR-93 相對表現量為  $\log_{10} (2^{-\Delta Ct})$ ， $\Delta Ct = (CT_{miR-93} - CT_{U6b})$  且 U6b 為標準化之內部控制組 (internal control)，早期復發樣本之表現量顯著降低 ( $p < 0.0001$ ，調整 CRC 腫瘤之年齡、性別及分期)；(B) 不同分期 CRC 樣本 miR-93 表現量之平均 (I 期：n=10、II 期：n=35、III 期：n=32)：隨 CRC 分期的演進表現量有單調遞減的現象 ( $p = 0.0325$  調整 CRC 腫瘤之年齡、性別)；(C) 根據 WST-1 分析 miR-93 抑制腫瘤細胞增生， $p = 0.012$ ；OmiR-93 表示大量表現 miR-93 穩定轉植株，NC 表示負控制組穩定轉植株；(D) miR-93 大量表現造成停留在 G2 期之細胞顯著累積， $p = 0.013$  (黑色：G0 期、淺灰色：S 期、深灰色：G2 期)；(E) 根據 Transwell 分析，miR-93 大量表現抑制腫瘤細胞移動， $p < 0.001$ ；(F) miR-93 大量表現不會影響腫瘤細胞侵襲， $p = 0.825$ ；(G) 腫瘤細胞移動之照片來自傷口癒合分析，24 小時及 48 小時具有較寬之間隙，顯示 miR-93 大量表現之細胞移動能力降低。

圖 2、動物模式中 miR-93 對腫瘤生長的影響以及 miR-93 目標基因之 mRNA 表現量，OmiR-93 表示大量表現 miR-93 穩定轉植株，NC 表示負控制組穩定轉植株：(A) 分別以 OmiR-93 細胞 (n=4，上方) 及 NC 細胞 (n=4，下方) 皮下注射之裸鼠於第 21 天拍攝之照片；(B) 第 21 天 OmiR-93 組別 (上方) 之癌腫塊較 NC 組別 (下方) 大幅地減小；(C) 21 天內 OmiR-93 (---) 與 NC (—) 細胞之腫



瘤 (cm<sup>3</sup>) 生長曲線 ( $p=0.005$ )；(D) 利用 qPCR 測定之 *ERBB2*、*p21*、*CCNB1* 及 *VEGF* 之 mRNA 表現量。相較於 NC (灰色)，OmiR-93 (黑色) 之 *ERBB2*、*P21* 與 *VEGF* 之 mRNA 表現量明顯較低 (分別為 NC 組的 27.9%、26.8%與 55.5%)，*CCNB1* 則否 (93.39%)。

圖 3、miR-93 結合 *CCNB1* 與 *ERBB2* 之 3'-UTR 並影響該些之蛋白質表現：(A) 3'-UTR 報導建構體之示意圖：將目標基因之 3'UTR 嵌入 pMIR 質體中螢光素酶基因的 3'端以進行螢光素酶活性分析；(B) 對列 (align) miR-93 以及 *CCNB1* 與 *ERBB2* 之 3'UTR 之間之預測的 miR-93 結合序列；(C) OmiR-93 表示大量表現 miR-93 穩定轉殖株，NC 表示負控制組穩定轉殖株。將 pLuc-UTR (400ng) 轉染至 OmiR-93 或 NC，具有 pLuc-*CCNB1* 質體之 OmiR-93 之螢光素酶活性 (66.9%) 顯著低於具有 pLuc-*CCNB1* 質體之 NC， $p=0.005$ 。同樣地，具有 pLuc-*ERBB2* 質體之 OmiR-93 之螢光素酶活性 (48.43%) 亦顯著低於具有 pLuc-*ERBB2* 質體之 NC， $p=0.003$ ；(D) 蛋白質表現之西方墨點分析：OmiR-93 之 miR-93 目標基因之蛋白質量較 NC 低。

圖 4、人類大腸直腸癌腫瘤中 miR-93 失去調控能力，而 miR-93 大量表現會影響 *CCNB1* 蛋白質表現但不會誘導細胞凋亡：(A) 利用 qPCR 偵測 45 組成對人類 CRC 患者之 miR-93 相對表現量，miR-93 相對表現量以  $\log_{10} (2^{-\Delta Ct})$  計算，淺灰色為一般 (非腫瘤) 組織

miR-93 表現量，深灰色為腫瘤組織 miR-93 表現量；(B) 使用膜聯蛋白 (annexin) V-FITC/PI 染色及流式細胞技術評估具有雜亂 miR (左) 與 miR 擬似物 (右) 之暫時性轉染之 Caco2 細胞凋亡，x 軸 (FL1 對數尺度) 表示膜聯蛋白 V-FITC 螢光、y 軸 (FL3 對數尺度) 表示 PI 螢光，早期凋亡 (膜聯蛋白 V-FITC-正/PI-負) 細胞出現在散點圖 (dot plot) 右下的象限 (A4)，晚期凋亡 (膜聯蛋白 V-FITC-正/PI-正) 細胞出現在散點圖 (dot plot) 右上的象限 (A2)，圖 4B 為來自 3 個獨立實驗的典型結果，由於出現在散點圖右半部的總族群數量沒有增加 (A2/A4)，顯示 miR-93 大量表現不會誘導細胞凋亡。

圖 5、使用 CCNB1 抗體進行免疫螢光染色，由共軛焦顯微鏡取得之結果顯示 OmiR-93 之 CCNB1 蛋白質表現量 (紅色螢光) 較 NC 低，藍色部份表示以 DAPI 染色的細胞核，OmiR-93 表示大量表現 miR-93 穩定轉殖株，NC 表示負控制組穩定轉殖株，降低的 CCNB1 蛋白質主要位於 OmiR-93 之細胞核，且細胞將停留在 G2 期。

#### 【主要元件符號說明】

無。

## 序列表

<110> 高雄醫學大學

<120> 以微小去氧核醣核酸為基礎用於抗大腸直腸癌及大腸直腸癌預後的方法

<130> 1390-KMU-US

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_RNA

<222> (1)..(23)

<400> 1

caaagugcug uucgugcagg uag

23

<210> 2

<211> 42

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> snRNA

<222> (1)..(42)

<400> 2

cgcaaggaug acacgcaaau ucgugaagcg uuccauauuu uu

42

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(33)

<220>

<221> mRNA

<222> (1)..(33)

<400> 3

tcctgaattc aaccttcact gagaggggtgg ttg

33

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(34)

<400> 4

ctaggcggcc gcgggagacc agaccctttt gaac

34

<210> 5

<211> 8189

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 載體

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(8189)

<400> 5

acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagitagca	60
acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttgggtggaag taaggtagta	120
cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga	180
attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc	240
tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta	300
agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcctgtctg ttgtgtgact	360
ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg	420
cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct	480
tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt	540
gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag	600
aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt	660
aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt	720
agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg	780
atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcattcaag	840
gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag	900
taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg	960
acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag	1020
caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag	1080
ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgcagcc tcaatgacgc	1140
tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgca gcagcagaac aatttgctga	1200
gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc	1260
aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg	1320
gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata	1380

aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa	1440
ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga	1500
acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aattggttta acataacaaa	1560
ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gttaagaat	1620
agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt	1680
tcagaccac ctcccaacc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg	1740
tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggttaacttt	1800
taaaagaaaa ggggggattg ggggttacag tgcaggggaa agaatagtag acataatagc	1860
aacagacata caaacataag aattacaaaa acaattaca aaaattcaa attttatcga	1920
tactagtatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac	1980
gtattagtca tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga	2040
tagcggtttg actcacgggg attccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg	2100
ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgtta acaactcgc cccattgacg	2160
caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac	2220
cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag attctagagc	2280
tagcgaattc gaatttaaat cggatccgcg gccgcaagga tctgcgatcg ctccggtgcc	2340
cgtcagtggg cagagcgcac atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc	2400
aattgaacgg gtgcctagag aagggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga tgtcgtgtac	2460
tggctccgcc tttttccga ggggtggggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg	2520
aacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgc agaacacagc tgaagcttcg aggggctcgc	2580
atctctcctt cacgcgccc cgcacctacc tgaggccgcc atccacgcc gttgagtcgc	2640
gttcgtccgc ctcccgctg tggtgctcc tgaactgcgt ccgccgtcta ggtaagtta	2700
aagctcaggi cgagaccggg cctttgtccg gcgctccctt ggagcctacc tagactcagc	2760

eggctctcca cgctttgctt gacctgctt gctcaactct acgtctttgt ttcgttttct	2820
gttctgcgcc gttacagatc caagctgtga ccggcgcccta cgctagacgc caccatggag	2880
agcgacgaga gcggcctgcc cgccatggag atcgagtgcc gcatcaccgg caccctgaac	2940
ggcgtggagt tgcagctggt gggcggcgga gagggcacc ccaagcaggg ccgcatgacc	3000
aacaagatga agagcaccaa aggcgcccctg accttcagcc cctacctgct gagccacgtg	3060
atgggctacg gcttctacca cttcggcacc taccocagcg gctacgagaa ccccttccctg	3120
cacgccatca acaacggcgg ctacaccaac acccgcatcg agaagtaaga ggacggcggc	3180
gtgctgcacg tgagcttcag ctaccgctac gaggccggcc gcgtgatcgg cgacttcaag	3240
gtggtgggca ccggcttccc cgaggacagc gtgatcttca ccgacaagat catccgcagc	3300
aacgccaccg tggagcacct gcaccccatg ggcgataacg tgctgggtggg cagcttcgcc	3360
cgcaccttca gcctgcgca cgccggctac tacagcttcg tggtagacag ccacatgcac	3420
ttcaagagcg ccatccacc cagcatcctg cagaacgggg gccccatgtt cgccttccgc	3480
cgcgtaggag agctgcacag caacaccgag ctgggcatcg tggagtacca gcacgccttc	3540
aagaccccca tgccttcgc cagatccgc gctcagtcgt ccaattctgc cgtggacggc	3600
accgccggac ccggctccac cggatctgc gagggcagag gaagtcttct aacatgcggt	3660
gacgtggagg agaatcccgg ccctatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgcacc	3720
cgcgacgacg tccccagggc cgtacgcacc ctcccgccg cgttcgccga ctaccccgcc	3780
acgcgccaca ccgtcgatcc ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc	3840
ttcctcacgc gcgtcgggct cgacatcggc aagggtgtgg tgcggacga cggcggcgg	3900
gtggcggctt ggaccacgcc ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcgc cgagatcggc	3960
ccgcgcatgg ccgagtigag cggttcccgg ctggccgcgc agcaacagat ggaaggcctc	4020
ctggcggcgc accggcccaa ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcggcc	4080
gaccaccagg gcaagggctt gggcagcgc gtcgtgtctc ccggagtgga ggcggccgag	4140

cgcgccgggg	tgccccctt	cctggagacc	tccgcgcccc	gcaacctccc	cttctacgag	4200
cggctcggct	tcaccgtcac	cgccgacgtc	gaggtgcccg	aaggaccgcg	cacctggtgc	4260
atgacccgca	agccccgtgc	ctgaaatcaa	cctctggatt	acaaaatttg	tgaaagattg	4320
actggtatc	ttaactatgt	tgctccitit	acgctatgtg	gatacgtctc	ttaaatgcct	4380
tigtatcatg	ctattgcttc	ccgtatggct	ttcattttct	cctccitgta	taaatccctg	4440
ttgctgtctc	tttatgagga	gttgtggccc	gtgtcaggc	aacgtggcgt	ggtgtgcact	4500
gtgtttgctg	acgcaacccc	cactggttgg	ggcattgcca	ccacctgtca	gtcctttcc	4560
gggactttcg	ctttccccct	ccctattgcc	acggcggaac	tcatcgccgc	ctgccttgcc	4620
cgctgctgga	caggggctcg	gctgttgggc	actgacaatt	ccgtgggtgt	gtcggggaag	4680
ctgacgtcct	ttccatggct	gctcgccctg	gttgccacct	ggattctgcg	cgggacgtcc	4740
ttctgctacg	tccttcggc	cctcaatcca	goggaccttc	cttcccggcg	cctgctgccc	4800
gctctgeggc	ctcttccgcg	tctccgcctt	cgcctcaga	cgagtgggat	ctccctttgg	4860
ccgcctcccc	gcctggtacc	tttaagacca	atgacttaca	aggcagctgt	agatcttagc	4920
cactttttaa	aagaaaagg	gggactggaa	gggctaattc	actccaacg	aaaataagat	4980
ctgctttttg	ctgtactgg	gtctctctgg	ttagaccaga	tctgagcctg	ggagctctct	5040
ggctaactag	ggaaccact	gcttaagcct	caataaagct	tgctttgagt	gcttcaagta	5100
gtgtgtgccc	gtctgtttg	tgactctggt	aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	5160
gtgtggaaaa	tctctagcag	tagtagttca	tgtcatctta	ttattcagta	tttataactt	5220
gcaaagaaat	gaatcagca	gagtgagagg	aacttgttta	ttgcagctta	taatggttac	5280
aaataaagca	atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	tttttccact	gcattctagt	5340
tgiggtttgt	ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct	ggctctagct	atcccccccc	5400
taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	tttatttatg	5460
cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	5520



gaggcctaga cttttgcaga gacggcccaa attcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg 5580  
 tgtgaaatg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgt 5640  
 aagccctgggg tgcctaata gtagagctaac tcacattaat tgcgttgogc tcaactgcccg 5700  
 ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga 5760  
 gaggcggitt gcgtattggg cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg ctgcgctcgg 5820  
 tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 5880  
 aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 5940  
 gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca 6000  
 aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 6060  
 ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 6120  
 tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc 6180  
 tcagttcggg ttaggtcgtt cgtccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc 6240  
 cagaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacctcgta agacacgact 6300  
 tatgccact gccagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg 6360  
 ctacagagtt ctggaagtg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggt 6420  
 tctgcgctct gctgaagcca gtaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 6480  
 aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 6540  
 aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg 6600  
 aaaactcacg ttaagggatt ttggatcaga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 6660  
 ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg 6720  
 acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 6780  
 ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 6840  
 gccccagtc tgcaatgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat ttatcagcaa 6900

taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgcctcca	6960
tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttgccagtt aatagtttgc	7020
gcaacgittgt tgccattgct acagggcatcg tgggtgcacg ctogtctgtt ggtatggctt	7080
cattcagctc cggttcccaa cgaicaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa	7140
aagcggttag ctccctcggg cctccgatcg ttgtcagaag taagtggcc gcagtgttat	7200
cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct	7260
tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga	7320
gttgcctctg cccggcgta atacgggata ataccggcc acatagcaga actttaaaag	7380
tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga	7440
gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct ttactttca	7500
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg	7560
cgacaaggaa atgttgaata ctcaactct tctttttca atattattga agcatttatc	7620
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag	7680
gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca	7740
tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tegtctcgcg cgtttcgggtg	7800
atgacgggta aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag	7860
cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgtggc ggggtgtcggg	7920
gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcgggtgtg	7980
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgcatcgc ccattcaggc	8040
tgcgcaactg tigggaaggg cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	8100
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	8160
gltgtaaac gacggccagt gccaaactg	8189

&lt;210&gt; 6

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)

<400> 6  
 ttagcagcgg aacaaggagt

20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)

<400> 7  
 agccgagaga aaacagtcca

20

<210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(23)

<400> 8  
gcctctccaa gcccaatgga aac 23

<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工合成序列

<220>  
<223> 引子

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)

<400> 9  
gcctctccaa gcccaatgga aac 23

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工合成序列

<220>  
<223> 引子

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)

<400> 10  
ctacggcaga gaacccagag 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工合成序列

<220>  
<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<400> 11

ttgatgccag cagaagtcag

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<400> 12

aaggtgaagg tcggagtcaa

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<400> 13

gatctcgctc ctggaagatg

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(21)

<400> 14

aggaggaggg cagaatcatc a

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(21)

<400> 15

ctcgattgga tggcagtagc t

21

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(33)

<400> 16

aaagactagt cttgtaaact tgagttggag tac

33

<210> 17  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(38)

● <400> 17  
 aaaagagctc ttttgtattt gagtattggt ttattaac

38

<210> 18  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成序列

<220>  
 <223> 引子

● <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(28)

<400> 18  
 gcccaactagt accagaaggc caagtccg

28

<210> 19  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工合成序列

<220>  
 <223> 引子

<220>

<221> misc\_feature

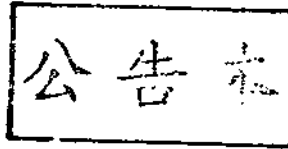
<222> (1)..(34)

<400> 19

ggccgagctc tagctgttt ccaaaatata ttg

34





七、申請專利範圍：

1. 一種 miR-93 用於製備提供早期復發大腸直腸癌患者抗癌作用之醫藥組合物的用途，其包含具有藥理上有效劑量的 miR-93，其中該早期復發大腸直腸癌患者之癌細胞中 miR-93 之表現量較非早期復發患者低。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該 miR-93 負調控 *CCNB1*、*ERBB2*、*P21* 及 *VEGF* 基因。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該患者為人類。

八、圖式：

圖 1

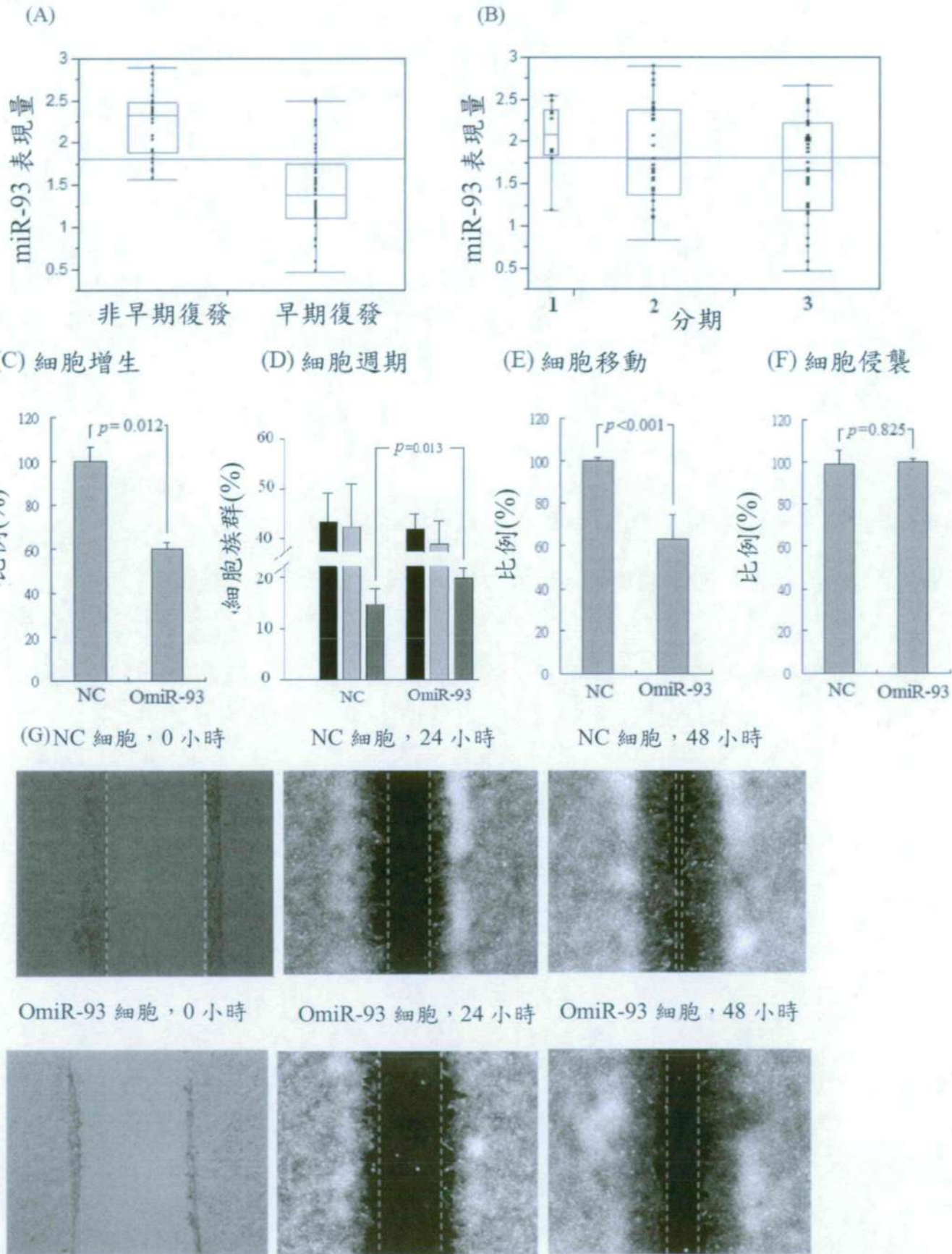
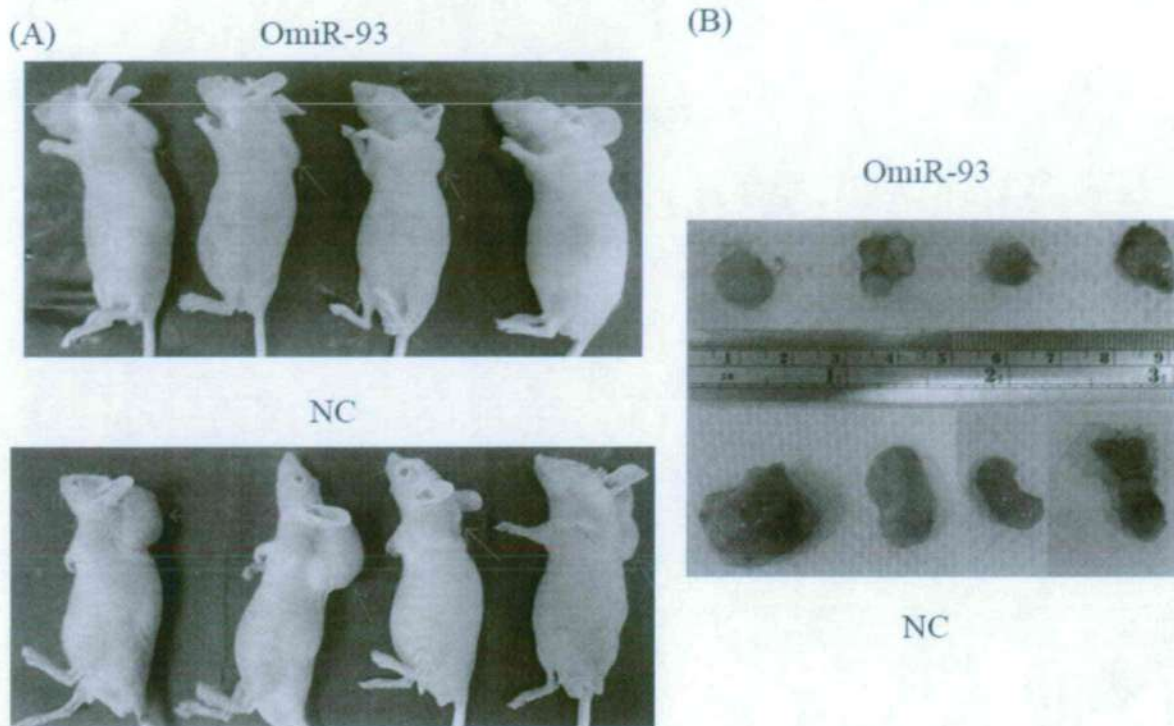
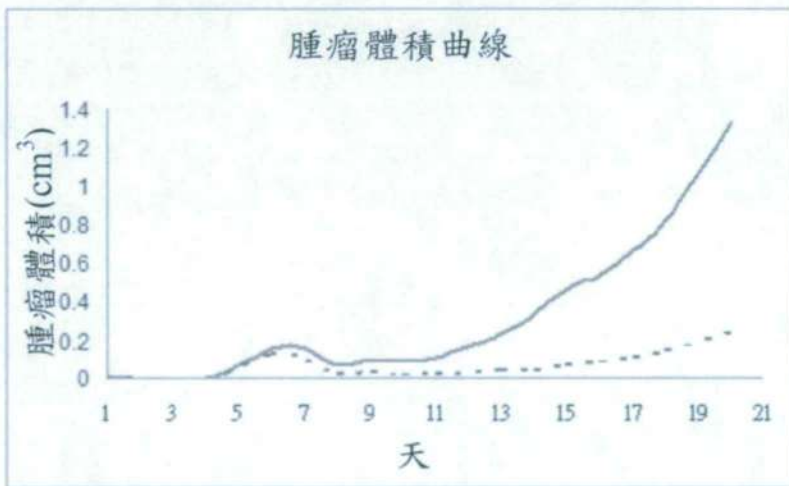


圖 2



(C)



(D)

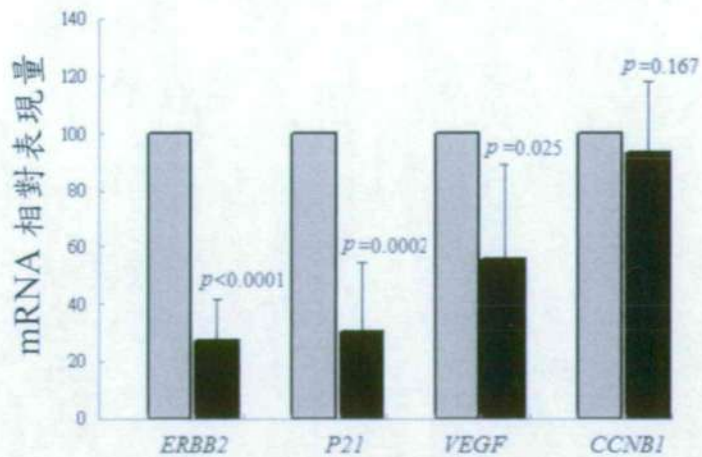
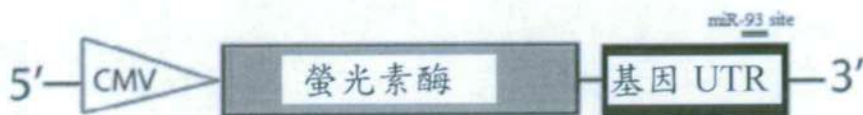
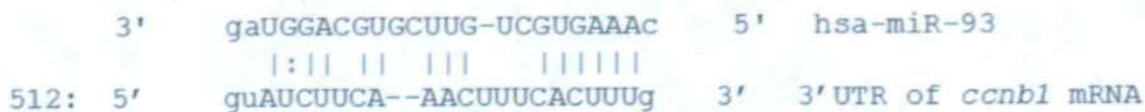


圖 3

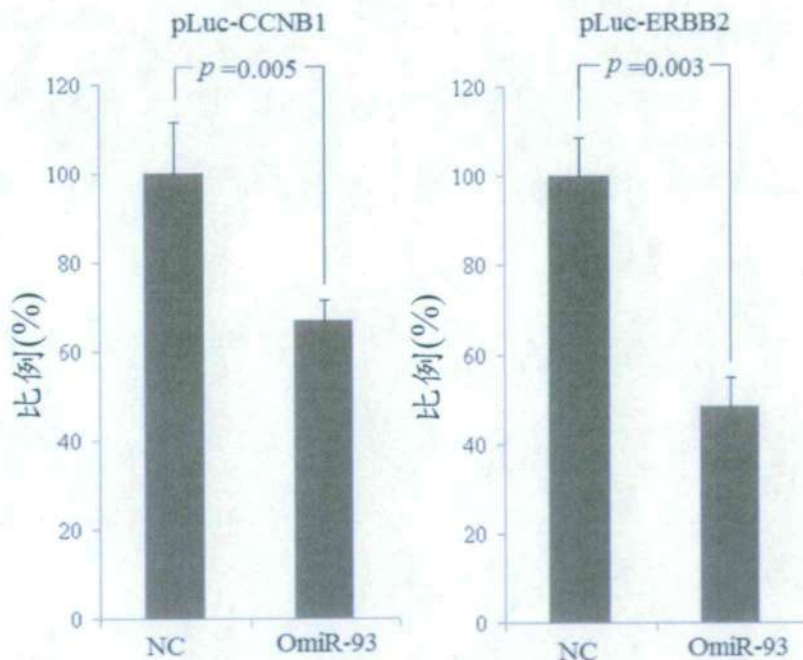
(A)



(B)



(C)



(D)

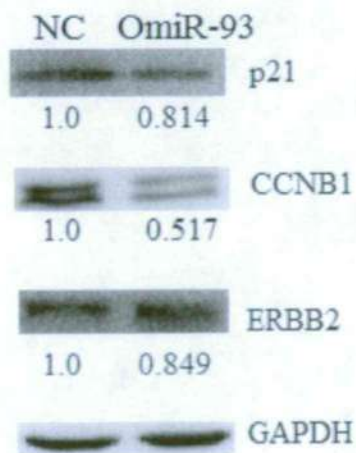
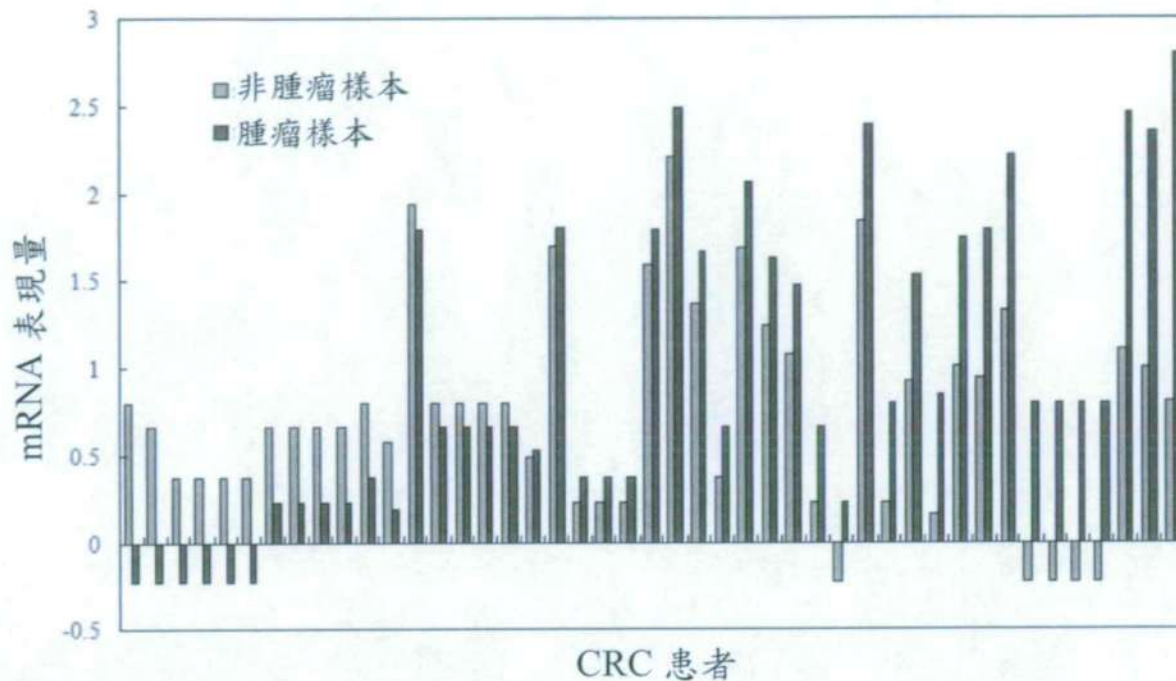


圖 4

(A)



(B)

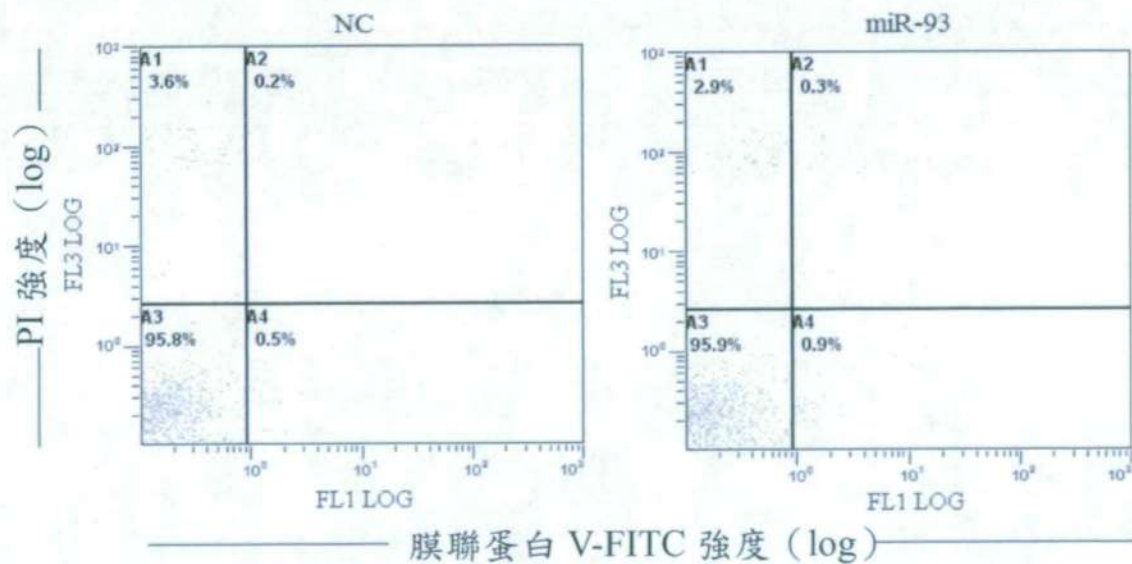


圖 5

