

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

Cytochrome c oxidase subunit Va 在非小型細胞肺癌轉 移所扮演之功能角色

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2314-B-009-001-MY2

執行期間：99 年 8 月 1 日至 101 年 7 月 31 日

執行機構及系所：交通大學生物科技學系

計畫主持人：陳文亮

共同主持人：王良順教授及周德盈教授

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 101 年 10 月 17 日

前言

肺癌為世界前十大死因之一，亦是國內死亡原因排名前一、二名。其中以非小型細胞肺癌約佔 80%，而小型細胞肺癌為 20% (1)。罹患肺癌之病患存活率低於五年為所有癌症當中最底。其主要原因為發現肺癌時已進入癌症末期，以致治療效果不彰。但值得注意的是早期肺癌病患存活率亦不高 (2)。故研究肺癌之預防或治療仍是一大挑戰，因此尋找並鑑定出有助於早期診斷之有效的腫瘤標記以及發展快速診斷方法成為其中重要研究範疇之一。

人類基因解碼計畫完成後，基因體提供了對癌症多方面的研究途徑，以了解細胞癌化過程可能之機制，以利發展新治療癌症之策略。然而基因體學之研究仍是不足的。科學家研究發現細胞的功能皆表現於蛋白質層次上，且 DNA 及 RNA 皆需要透過蛋白質之修飾及協助以執行其功能，因此由基因體學進入蛋白質體學。蛋白質體學常用於研究之技術包括二維電泳技術 (IEF-PAGE) 及質譜技術 (Mass)，提供大量且快速方式用以尋找與疾病相關之蛋白質 (3)。

文獻回顧

過去已有研究團隊利用蛋白質體學進行癌症相關研究。Chen et al. (4) 利用蛋白質體技術發現四種蛋白質負責調控 gluconeogenesis 及 glycolysis 且與細胞存活有相關性。此外 Chen et al 亦利用相同技術發現三種蛋白質可作為癌症 marker，其中 thymosin-beta 4 與癌細胞之增生有相關，而 small ubiquitin related modifier-2 則與 carcinogenesis 有關 (5)。於乳癌方面有研究團隊成功建立乳癌蛋白質圖譜預測癌細胞是否轉移至 lymph node (6)。另一方面亦有利用蛋白質體技術發現 candidate protein 與乳癌之 distant recurrence 有關，且可作為抗藥性之 marker (7)。肺癌方面，有研究報告利用蛋白質體技術於具有肺癌小鼠模組中發現可作為肺癌早期診斷之 marker (8)，但僅適用於小鼠並不適用於人體診斷用。此外更有研究團隊利用二維電泳技術研究人類肺癌病理組織，分析組織病理學上不同種類之肺癌細胞，發現不同組織病理類型細胞亦有不同的蛋白質表現圖譜。更發現專一性蛋白質僅出現在原發性肺腺癌 (primary lung adenocarcinomas) (9)。本計劃先導試驗中亦利用相同技術分析發現在七株非小型細胞肺癌細胞株中 invasion 及 migration 能力高之細胞株含有兩種顯著之蛋白質，其一為 Galectin-1、其二為 Cytochrome c oxidase subunit Va (COX Va)，Galectin-1 在先前研究中已被證明與癌細胞之 metastasis 有關 (10, 11)，而 COX Va 並無研究指出與癌細胞轉移相關，此為本實驗是首次發現，並將利用本計劃進一步證明與非小型細胞肺癌轉移相關。

Cytochrome c oxidase 為呼吸作用中電子傳遞鏈最終酵素，包含有十三種 subunit 其中三種 subunit 由粒線體 DNA 所轉譯出，包含四個氧化還原中心(Cu_A, Heme a, heme a₃ and Cu_B) (12, 13)，另十種 subunit 由細胞核所轉譯且部份具有組織專一性(tissue specific)，在先前研究中指出此 subunit 越多則增加呼吸作用調節酵素之複雜程度，在呼吸作用之調節有兩種調節機制 (14)。一、為 ADP 刺激 ATP 合成導致粒線體內外膜電位差增加，進而抑制呼吸作用。二、為 ATP/ADP 比率非利用電位差不同調控，當 ATP/ADP 比率增加時抑制 Cytochrome c oxidase 活性。此外呼吸作用亦可由 hormone 所控制，Soboll et al. 利用單株抗體證明 3,5-diiodothyronine (T2)能直接與 COX Va 結合，而抑制 allosteric ATP inhibition (14, 15)。T2 在先前研究中已被證實 thyroid hormone 能降低代謝速率(16-18)。然而 Hormone 主要藉由 Cytochrome c oxidase 之 cAMP-independent phosphorylation 啟動 allosteric ATP inhibition，而增加 Ca²⁺濃度藉由 calcium-induce dephosphorylation 關閉 allosteric ATP inhibition。(19-23)在能量代謝中轉移能力高之癌細胞會藉由訊號調控(如：HIF-1)oxidative phosphorylation 使之效率降低甚至停止 (24-26)，迫使癌細胞內能量代謝僅能利用糖解作用產生能量，而此訊號更能刺激癌細胞轉移 (27-29)。在研究中指出如 oxidative phosphorylation 效率增加會造成粒線體內外膜電位差降低，並且有較低 ROS 形成，然而如 oxidative phosphorylation 效率降低則粒線體內外膜電位差增加導致 ROS 形成增加(30-33)。ROS 則會破壞蛋白質、脂質、DNA 及誘發細胞 apoptosis，更與老化、阿茲海默症及癌症等相關疾病發生，此外 Svineng et al.研究發現 ROS 刺激 MMP 活性增加癌細胞轉移(34-40)。但 COX Va 尚未被直接證明與癌細胞相關，因此本計劃深入研究 COX Va 影響癌細胞轉移之機制，進而提供未來於癌症新藥開發及治療癌症上新思考模式。

其主要目標如下：

1. 分析 COX Va 對非小型細胞肺癌 migration and invasion 之關係。(第一年)
2. 探討 COX Va 影響 migration and invasion 之機制。(第一年及第二年)
3. 利用動物實驗模式探討 COX Va 與腫瘤轉移之關係。(第二年)
4. 病理學分析統計 COX Va 與非小型細胞肺癌相關性。(第一年及第二年)

研究方法

1. 分析 COX Va 對非小型細胞肺癌 migration and invasion 之關係。

參與非小型細胞肺癌 migration 及 invasion 相關之蛋白質種類眾多，如 PGE-2, COX-2,

EGFR, VEGF, 及 ErbBR 等, 其中包含粒線體內參與呼吸作用之蛋白質, 如 bcl-2 及 cytochrome c。在過去研究中癌細胞粒線體數目(copy number)或粒線體中蛋白質變異能影響其侵犯能力, 計畫申請人在先導試驗中利用 IEF-PAGE 分析六株非小型細胞肺癌, 其結果發現 COX Va 在 migration 及 invasion 能力較高之細胞之有高表現量, COX Va 為呼吸作用中電子傳遞鏈最終蛋白, 並能調控呼吸作用。因此本計畫將利用 COX Va inhibitor 抑制其功能, 並分析受抑制劑抑制後癌細胞之細胞增生及侵犯轉移能力, 此外更利用分子生物學 knock down 及 overexpression 之技術抑制或過度表現 COX Va 並分析對癌細胞之影響。其主要步驟如下:

COX Va inhibitor analysis

- (1) 分別培養不同特性之非小型細胞肺癌, 分別加入不同濃度之 COX Va inhibitor (3,5-Diiodothyronine)(0, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7}), 培養48小時。
- (2) 利用neutral red分析六株非小型細胞肺癌細胞受COX Va抑制後之純活率。
- (3) 利用transwell分析加入COX Va inhibitor後六株非小型細胞肺癌細胞之migration and invasion能力。
- (4) 利用zymography分析加入COX Va inhibitor後MMP activity。
- (5) 利用MMP array分析加入COX Va inhibitor所分泌之MMP種類。

COX Va gene overexpression analysis

- (1) 萃取六株非小型細胞肺癌細胞中COX Va表現量最高細胞株(H2009)之RNA。
- (2) 利用RT-PCR將COX Va gene複製出, 並將COX Va基因與pcDNA載體結合。
- (3) 將COX Va與pcDNA結合之載體transfection至COX Va表現量低之細胞株(H2126), 並挑選穩定之細胞株。
- (4) 利用transwell分析穩定細胞株migration and invasion之能力。
- (6) 利用zymography分析穩定細胞株之MMP activity。
- (5) 利用MMP array分析穩定細胞株所分泌之MMP種類。

COX Va gene knock down analysis

- (1) 利用基因體中心 siRNA 資料庫中挑選出四種不同 COX Va 之 siRNA。
- (2) 將四種不同 COX Va 之 siRNA 與 pcDNA 載體結合。
- (3) 將 COX Va siRNA 與 pcDNA 結合之載體 transfection 至 COX Va 表現量高之細胞株(H2009), 並挑選穩定之細胞株。

- (4) 利用 RT-PCR 及 Western blot 篩選可 knock down COX Va 之細胞株。
- (5) 將受 COX Va siRNA 抑制基因表現之穩定細胞株利用 transwell 分析 migration and invasion 之能力。
- (7) 利用 zymography 分析 COX Va siRNA 抑制基因表現之穩定細胞株 MMP activity。
- (6) 利用 MMP array 分析 COX Va siRNA 抑制基因表現之穩定細胞株所分泌 MMP 種類。

2. 探討 COX Va 影響 migration and invasion 之機制。

COX Va 功能為呼吸作用之調控，主要機制為 COX Va 藉由與氧氣及 ATP 結合導致蛋白質構型改變 (conformational change)，進而影響細胞內 cAMP-dependent phosphorylation 及鈣離子誘發 dephosphorylation 達到調控呼吸作用之目的。在先前研究指出 invasion 及 migration 能力高低與呼吸作用之調控相關，然而 COX Va 是否參與調控或調控癌細胞其他基因之表現 (如：ATP 合成酵素) 影響癌細胞 invasion 及 migration 能力尚未被研究，因此本計劃將利用 cDNA microarray 及 IEF-PAGE 分析癌細胞受 COX Va 抑制劑處理前後、COX Va knock down 及 COX Va overexpression 穩定細胞株基因及蛋白質表現，並利用可結合 phosphorylation 蛋白質之 column 分析已磷酸化之蛋白質，此外並將分析出之基因及蛋白質群組化歸納出 COX Va 影響之機制，且進一步證明此機制。其主要步驟如下：

分析受 COX Va 影響之基因及蛋白質

- (1) 利用 6 well culture plate 培養受 COX Va 抑制劑處理前後 (A,B)、COX Va knock down (C) 及 COX Va overexpression (D) 穩定細胞株。
- (2) 細胞培養 48 小時後萃取細胞之 RNA 及蛋白質。
- (3) 利用 cDNA microarray 分析受 COX Va 影響之基因表現。
- (4) 分別將細胞萃取出依 membrane, cytoplasm and nuclear protein 分離。
- (5) 利用 IEF-PAGE 分析 (A)(B)(C)(D) 細胞株中 membrane, cytoplasm and nuclear 不同蛋白質之表現。
- (6) 利用結合 phosphorylation 蛋白質之 column 分析受 COX Va 影響後磷酸化及去磷酸化之蛋白質。
- (7) 分析受 COX Va 影響表現之基因及蛋白質，並群組化歸納出 COX Va 影響之機制。

證明

- (1) 製作出所分析出受 COX Va 影響蛋白質之抗體。
- (2) 利用免疫染色分析此蛋白質與 COX Va 之關係。
- (3) 利用 overexpression 及 knock down 相關蛋白分析與 COX Va 之關係。
- (4) 分析及評估癌細胞之 invasion and migration。

3. 利用動物實驗模式探討 COX Va 與腫瘤轉移之關係。

Aim 1 and 2 中確認 COX Va 在非小型細胞肺癌細胞株之影響後，進一步利用動物模式探討。先前研究中分析癌細胞 invasion 及 migration 在 in vivo 中之能力為將癌細胞利用小鼠尾端靜脈注射方式，進一步分析小鼠肺部癌細胞所形成之病變區塊，形成多區塊之細胞株即 invasion 及 migration 能力高，形成少區塊或無區塊之細胞株形成則反之，因此本計劃將利用相同動物模式評估七株非小型細胞肺癌細胞株注射入小鼠靜脈內，並一併注射 COX Va 抑制劑對於癌細胞轉移及侵犯能力之影響，此外利用此模式對 COX Va 基因 overexpression 及 knock down 穩定細胞株相同評估，並進一步由肺部取出癌細胞所形成之區塊分析作免疫切片分析，確認並證實 COX Va 影響癌細胞之機制是否與 in vitro 相同。其主要步驟如下：

- (1).將 BALB/cAnN.Cg-Foxn1nu/CrlNarl 小鼠分五組，每組五隻小鼠，共二十五隻小鼠。
- (2).將 2×10^6 個癌細胞、癌細胞混合抑制劑、癌細胞內涵有 vector、overexpression 及 knock down 之癌細胞分別由小鼠尾部靜脈注射入體內。
- (3).注射後約二至三星期，將小鼠犧牲並解剖。
- (4).計算並評估癌細胞轉移至肺部之數目。
- (5).將小鼠肺臟製作免疫切片，並做免疫染色。
- (6).利用 COX Va 抗體分析轉移至小鼠肺臟之癌細胞 COX Va 表現。
- (7).利用所製作之受 COX Va 影響蛋白質之抗體分析 aim 2 所分析出之蛋白質。
- (8).分析評估 COX Va 與受 COX Va 影響蛋白質在小鼠中影響 invasion and migration。

4. 病理學分析統計 COX Va 與非小型細胞肺癌相關性。

在 aim 1, 2, and 3 分析及確認 COX Va 影響癌細胞 invasion 及 migration 之機制後，必須更進一步探討與臨床相關性，主要目的在於深入分析非小型細胞肺癌於不同發展時期 COX Va 之表現，並分析其他與 COX Va 相關因子(如：HIF-1, PDK-1, PDH, and LDH-5)和癌細胞 invasion 及 migration 之相關性，更可藉由探討不同病人病史(如：男或女、年齡、有無吸菸、

菸齡、tumor type、TNM 及預後等)及血液相關生化值(如：carcinoembryonic antigen (CEA)等)與 COX Va 及其他與 COX Va 相關因子之關連性，因此本計劃將利用 COX Va 及其他與 COX Va 相關因子之抗體與不同病人之腫瘤切片，經免疫染色後分析統計，腫瘤與 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子之關連性，再進一步結合病人知病史及血液相關生化值分析統計，以分析歸納出 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子在臨床上之實際意義，可提供未來治療癌症新藥開發及臨床醫師之參考。本計劃所採用不同病人之腫瘤切片(tissue array)由病人檢體由台北榮總病理部周德盈主任所提供，且台北榮總人體試驗委員會已通過使用該檢體。

主要步驟如下：

- (1).將製作出之辨識 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子(HIF-1, PDK-1, PDH, and LDH-5)單株抗體與不同病人之腫瘤切片(tissue array)，共 300 人(台北榮總病理部周德盈主任所提供)，利用免疫染色分析。
- (2).分析 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子在臨床檢體上之相關性
- (3).依癌症發生不同時期對 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子作歸類分析統計。
- (4).收集彙整病人血液生化分析報告、醫師臨床診斷報告及病人病史。
- (5).結合上述因素分析統計出 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子在臨床上之實際意義。
- (6).藉由此資料可分析出 COX Va 及其他和 COX Va 相關因子在腫瘤組織上之差異與效果，可提供未來治療癌症新藥開發及臨床醫師之參考。

結果與討論

一、分析六株非小性細胞肺癌 Migration 及 invasion 之能力

癌細胞 metastasis 中 migration and invasion 之能力最為被關注，因此利用 transwell 分析六株細胞 migration 及 invasion 之能力其結果如附件圖一及圖二所示，在圖一中發現 migration ability 可分成 migration ability 高及低兩組，其中 CL 1-1 and H2126 migration ability 較低，而 H23, H838, CL 1-5, and H2009 migration ability 較高，其中以 H838 and H2009 為六株細胞中較高者。在附件圖二 invasion ability 亦發現相同結果，但其中 CL-1-5 為 invasion ability 最高之細胞株。此結果說明相同特性細胞株應具有共同相似之蛋白質才會導致此相同之結果。

二、已分析六株非小型細胞肺癌之 MMP activity

影響癌細胞轉移具有多種因素，MMP activity 為其中一，然而 MMP activity 又以 MMP 2 and

MMP 9 最為重要，因此我們利用 gelatin zymography 分析六株不同細胞株之 MMP 2 and MMP 9 activity 其結果如附件圖三所示，發現 H23, H838, CL 1-5, and H2009 之 MMP 9 activity 遠比 CL 1-1 and H2126 活性高，此結果與 migration and invasion ability 相同，由附件圖三發現其 MMP 2 and MMP 9 活性六株細胞有顯著差異。

三、利用 IEF-PAGE 分析六株非小型細胞肺癌

由附件圖一、二及三結果發現六株不同細胞株可歸類成兩組，CL 1-1 and H2126 為一組，另一組為 H838, H23, CL 1-5, and H2009，因此我們再更進一步利用 IEF-PAGE 分析細胞株蛋白質之表現其結果如附件圖四所示，發現有十六種相同蛋白質在 H838, H23, CL 1-5, and H2009 有表現，而在 CL 1-1, and H2126 細胞株中不表現，其中以 COX Va and gelatin-1 兩種蛋白最為顯著。Gelatin-1 已被證明與癌細胞之 metastasis 有關，而 COX Va 並無報告指出與癌細胞轉移相關，因此進一步分析 Cytochrome c oxidase subunit Va 與癌細胞轉移之關係。

四、分析 COX Va 在六株非小型細胞肺癌之表現

為了更進一步分析附件圖四之結果，我們利用 RT-PCR, western blotting and immunocytochemistry staining 分析 COX Va 在不同細胞之表現其結果如附件圖五所示，發現 RT-PCR 中(附件圖五 A) H838, H23, CL 1-5, and H2009 細胞株含有 COX Va 基因之表現，western blot 中亦得到相同之結果，但在 CL 1-1 及 H2126 蛋白質表現量較低(附件圖五 B)，此外更進一步利用 immunocytochemistry staining 發現 COX Va 表現在細胞質內，其結果顯示在 H838, H23, CL 1-5, and H2009 表現量較 CL 1-1 and H2126 高(附件圖五 C)。由此結果更可推測 COX Va 與癌細胞轉移相關，因此本計畫將進一步證明此結果。

五、分析 COX Va 在非小型細胞肺癌病人檢體中之表現

與台北榮民總醫院病理部主任周德盈主任合作，利用非小型細胞肺癌組織分析 COX Va 在非小型細胞肺癌病人檢體中之表現，其中在 RT-PCR 分析結果如附件圖六所示，COX Va 在十組病人檢體中，其中八組檢體中 COX Va 癌組織有高表現，但在正常細胞並無表現，進一步利用免疫染色技術初步分析 300 位病人檢體，發現高達 80% 檢體中表現 COX Va，結果如附件圖七所示。更進一步發現與 COX Va 與淋巴轉移有顯著相關性。

六、COX Va knock down 穩定癌細胞株

為了探討 COX Va 與非小型細胞肺癌轉移之關係，共設計出四段 siRNA 抑制 COX Va 基因之表現。將此四段 siRNA 轉至進入 H 2009 非小型細胞肺癌中，並分析基因表現結果發現僅有一段

能成功抑制其基因表現約 40%，結果如附件圖七所示。並進一步分析 MMP 2 and MMP 9 之活性，發現將此轉殖成功之細胞株培養呈穩定細胞株 MMP 2 and MMP 9 之活性下將約 40%，因此更證明 COX Va 與癌細胞轉移有密切關係。此外並進一步利用 transwell 分析細胞 migration 能力，結果發現 COX Va 基因 knock down 之細胞，migration 能力亦降低 40%，證明 COX Va 與肺癌細胞之轉移有相關性，其機制已證明 COX Va 藉由降抑制 BCL-2 之基因表現，進而導致 MMP2 and MMP9 表現量，達到調控轉移之目的。。

References

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8–29.
2. Fry WA, Phillips JL, Menck HR. Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer* 1999;86:1867–1876.
3. Akhilesh Pandey, Matthias Mann. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-846.
4. Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG, Shedden KA, Misek DE, Taylor JM, Giordano TJ, *et al*. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:13537–13542.
5. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, *et al*. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2003; 362:433–439.
6. Taku Nakagawa, Sharon K. Huang, Steve R. Martinez, Andy N. Tran, David Elashoff, Xing Ye, Roderick R. Turner, Armando E. Giuliano, and Dave S.B. Hoon. Proteomic Profiling of Primary Breast Cancer Predicts Axillary Lymph Node Metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66(24):11825-30).
7. Nimeus E, Malmstrom J, Johnsson A, Marko-Varga, GFerno M. Proteomic analysis identifies candidate proteins associated with distant recurrences in breast cancer after adjuvant chemotherapy. *J Pharm Biomed Anal*. 2006 Nov 3; [Epub ahead of print]
8. Shaw AT, Kirsch DG, Jack T. Future of early detection of lung cancer: the role of mouse models. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:4999s-5003s.

9. Hirano T, Kato H. Present status of clinical proteomic analysis for the early detection and determination of therapeutic strategy in lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2006, 12:4-9.
10. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008. 13;10:e17
11. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006, 16:137R-157R.
12. Bernroitner M, Zamocky M, Pairer M, Furtmüller PG, Peschek GA, Obinger C. Heme-copper oxidases and their electron donors in cyanobacterial respiratory electron transport. *Chem Biodivers*. 2008. 5:1927-61.
13. Collman JP, Decréau RA. Functional biomimetic models for the active site in the respiratory enzyme cytochrome c oxidase. *Chem Commun (Camb)*. 2008. 7:5065-76.
14. Ludwig B, Bender E, Arnold S, Hüttemann M, Lee I, Kadenbach B. Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem*. 2001. 2:392-403.
15. Arnold S, Goglia F, Kadenbach B. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur J Biochem*. 1998. 252:325-30.
16. Moreno M, de Lange P, Lombardi A, Silvestri E, Lanni A, Goglia F. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*. 2008. 18:239-53.
17. Goglia F. Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T(2)). *Biochemistry (Mosc)*. 2005. 70:164-72.
18. YamauYamauchi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y, Seo H.chi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y, Seo H. Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Mol Endocrinol*. 2008. 22:893-903.
19. Samavati L, Lee I, Mathes I, Lottspeich F, Hüttemann M. Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 2008. 283:21134-44.

20. Lee I, Salomon AR, Ficarro S, Mathes I, Lottspeich F, Grossman LI, Hüttemann M. cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem.* 2005. 280:6094-100.
21. Arnold S, Kadenbach B. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem.* 1997. 249:350-4.
22. Evans AM. AMP-activated protein kinase and the regulation of Ca²⁺ signalling in O₂-sensing cells. *J Physiol.* 2006. 574:113-23.
23. Evans AM, Hardie DG, Galione A, Peers C, Kumar P, Wyatt CN. AMP-activated protein kinase couples mitochondrial inhibition by hypoxia to cell-specific Ca²⁺ signalling mechanisms in oxygen-sensing cells. *Novartis Found Symp.* 2006. 272:234-52.
24. Piantadosi CA, Suliman HB. Transcriptional Regulation of SDHa flavoprotein by nuclear respiratory factor-1 prevents pseudo-hypoxia in aerobic cardiac cells. *J Biol Chem.* 2008. 283:10967-77.
25. Garedew A, Moncada S. Mitochondrial dysfunction and HIF1alpha stabilization in inflammation. *J Cell Sci.* 2008. 121:3468-75.
26. Godinot C, de Laplanche E, Hervouet E, Simonnet H. Actuality of Warburg's views in our understanding of renal cancer metabolism. *J Bioenerg Biomembr.* 2007. 39:235-41
27. Hervouet E, Simonnet H, Godinot C. Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie.* 2007. 89:1080-8.
28. Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr.* 2007. 39:223-9.
29. Semenza GL. HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr.* 2007. 39:231-4.
30. Hervouet E, Cízková A, Demont J, Vojtísková A, Pecina P, Franssen-van Hal NL, Keijer J, Simonnet H, Ivánek R, Kmoch S, Godinot C, Houstek J. HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer. *Carcinogenesis.* 2008. 29:1528-37.
31. Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 2009. 9:265-76

32. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic Strategies by Modulating Oxygen Stress in Cancer and Inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Feb 25. [Epub ahead of print]
33. Neretti N, Wang PY, Brodsky AS, Nyguyen HH, White KP, Rogina B, Helfand SL. Long-lived Indy induces reduced mitochondrial reactive oxygen species production and oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106:2277-82.
34. Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O, Huseby NE, Winberg JO. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect Tissue Res.* 2008. 49:197-202.
35. Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Antioxidant Treatment Reduces Matrix Metalloproteinase-2-Induced Vascular Changes in Renovascular Hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2009 Feb 24. [Epub ahead of print]
36. Binker MG, Binker-Cosen AA, Richards D, Oliver B, Cosen-Binker LI. EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009. 379:445-50.
37. Radisky DC, Przybylo JA. Matrix metalloproteinase-induced fibrosis and malignancy in breast and lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2008. 5:316-22.
38. Stallings-Mann M, Radisky D. Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells. *Cells Tissues Organs.* 2007. 185:104-10.
39. Burlaka AP, Sidorik EP, Ganusevich II, Lestchenko YM, Burlaka AA, Osinsky SP. High formation of superoxide anion and nitric oxide, and matrix metalloproteinases activity in vascular wall of rectal carcinoma vessels. *Exp Oncol.* 2006. 28:323-5
40. Ke Z, Lin H, Fan Z, Cai TQ, Kaplan RA, Ma C, Bower KA, Shi X, Luo J. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. *Int J Cancer.* 2006. 119:8-16.

計畫成果自評部分

本計畫感謝國科會給予支持總執行年限為兩年，於本年度已將目標一及目標四 COX Va 對非小型細胞肺癌 migration and invasion 之關係及病理學分析統計 COX Va 與非小型細胞肺癌相關性各細胞特性分析完畢，其中在細胞中依特性可區分為兩組，CL1-1 及 H2126 為一組，另一組為 H838, H23, CL1-5 及 H2009，發現 COX Va 高表現之細胞株其 migration and invasion 能力較高，且在 clinical sample 中利用 COX Va 抗體染色，其結果發現在不同 stage 之 cancer 皆有高表現，表現量高達 80%。並發現與淋巴轉移有密切相關性。藉由 COX Va 及受 COX Va 影響之蛋白質影響癌細胞轉移之機制可提供未來抗癌藥物研發及癌症治療上新思考方式。其中 COX Va 在癌細胞轉移之相關機制亦在本計劃中證明出。因此在本計畫執行進度已達百分之百，此外本計畫已在分子細胞生物醫學年會、生物醫學年會及台灣外科醫學會中發表，並已在 BMC cancer 期刊中發表(IP:4)。其主要成果如下：

1. 已完成六株細胞株特性分析與 COX Va 之關係，其中包含癌細胞中 migration, invasion, MMP activity 與 COX Va 之關係。
2. 以完成臨床 sample 分析發現表現量高達 80%，並發現與淋巴轉移有密切相關性。
3. 目前已於分子細胞生物醫學年會及生物醫學年會中發表及台灣外科醫學會中發表，並已在 BMC cancer 期刊中發表(IP:4)。
4. 本計畫執行進度已達百分之百。

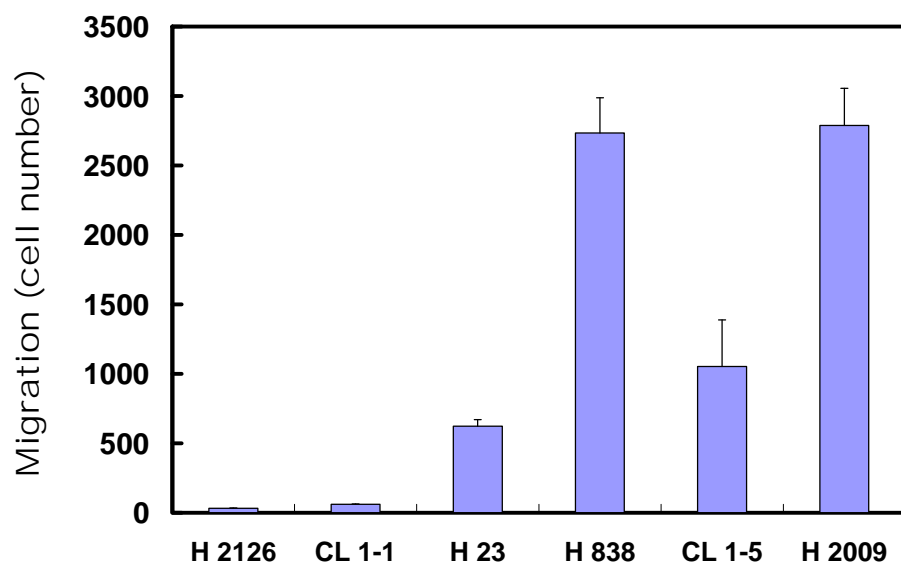
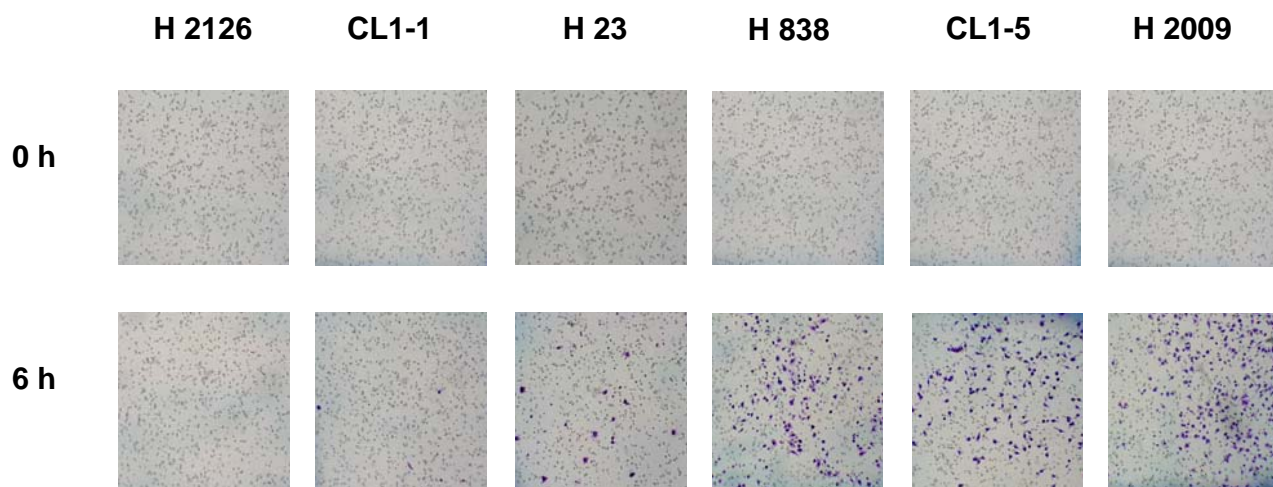


Figure 1

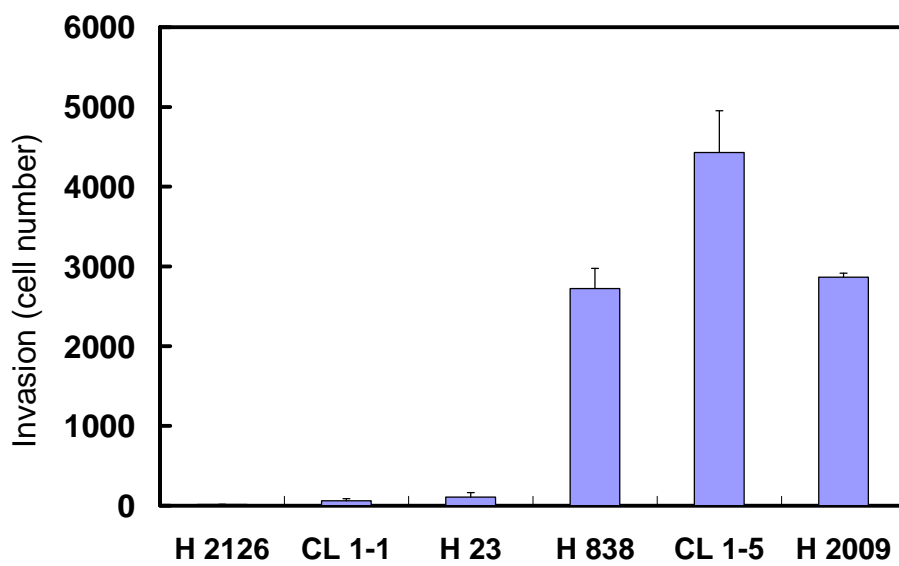
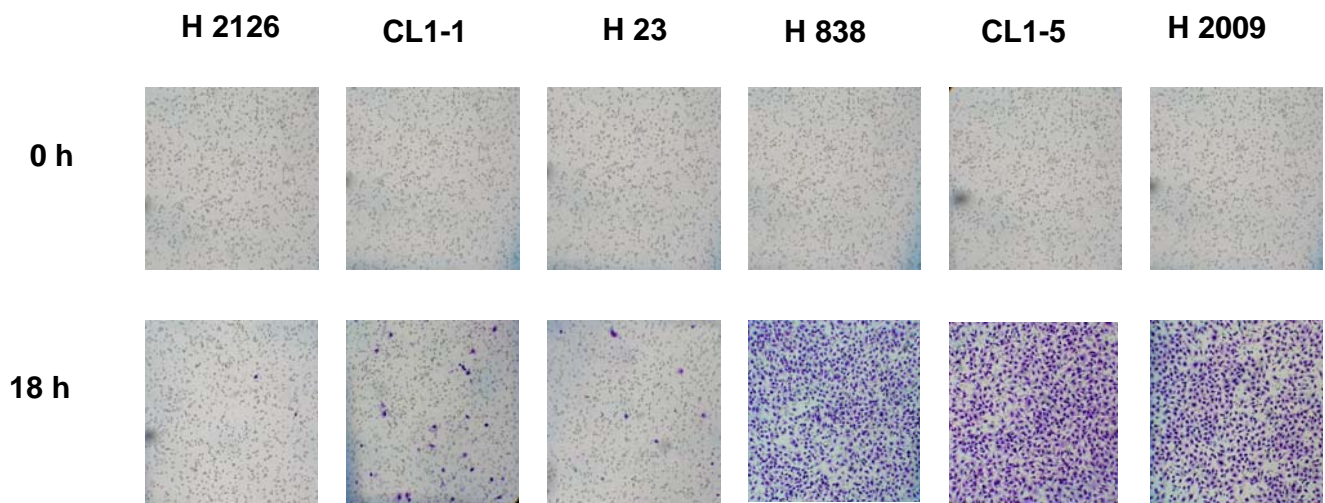


Figure 2

MMP Activity

H2126 CL 1-1 H23 H838 CL 1-5 H2009

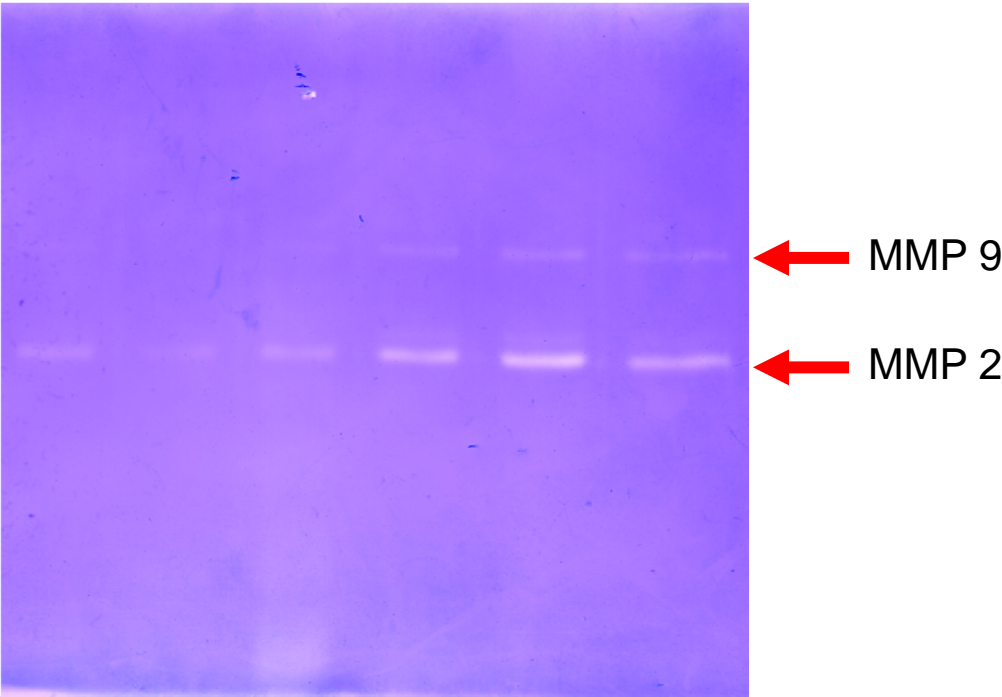


Figure 3

Low migration group



Highly migration group

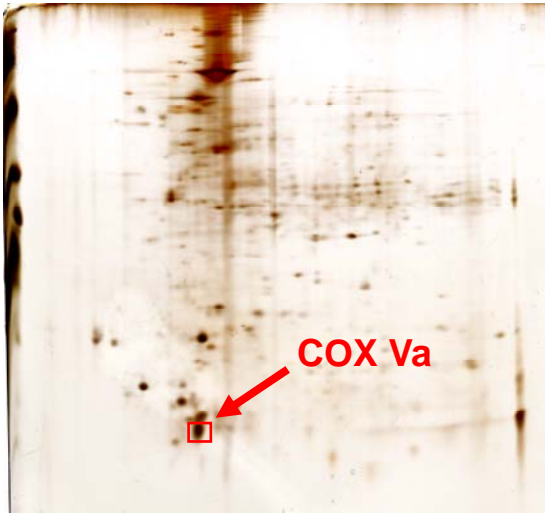
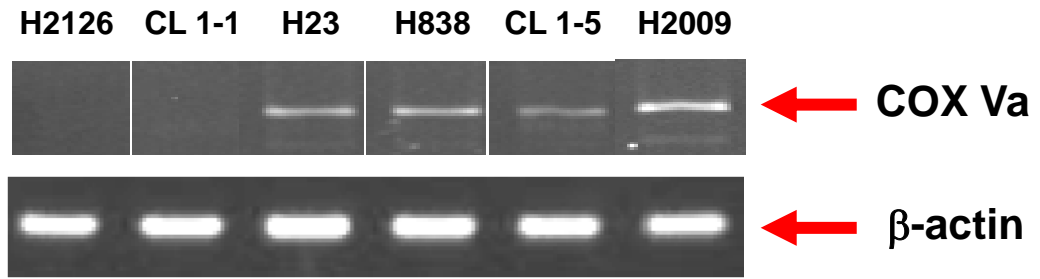
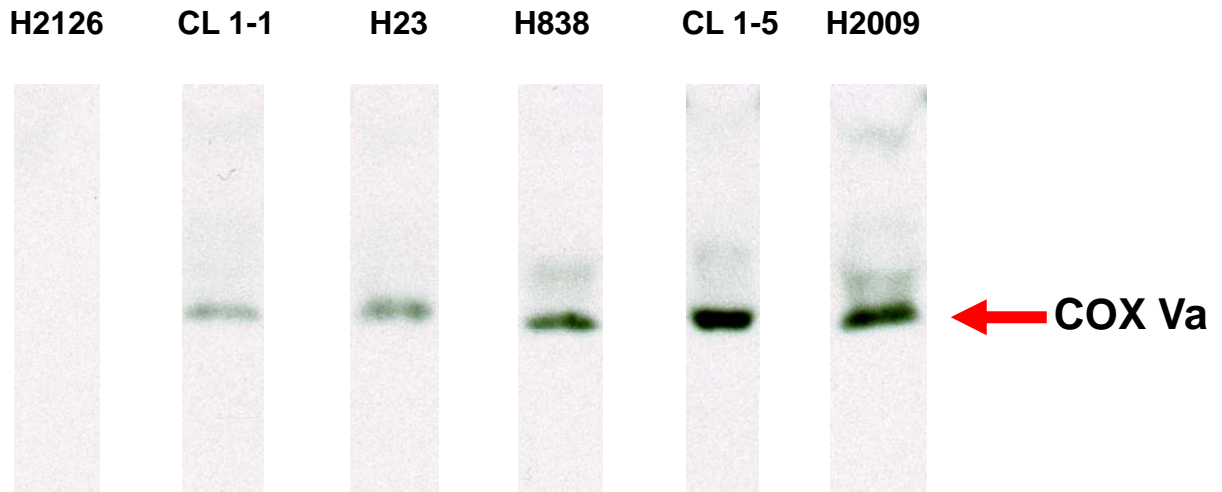


Figure 4

A. RT-PCR



B. Western blot



C. Immunostaining

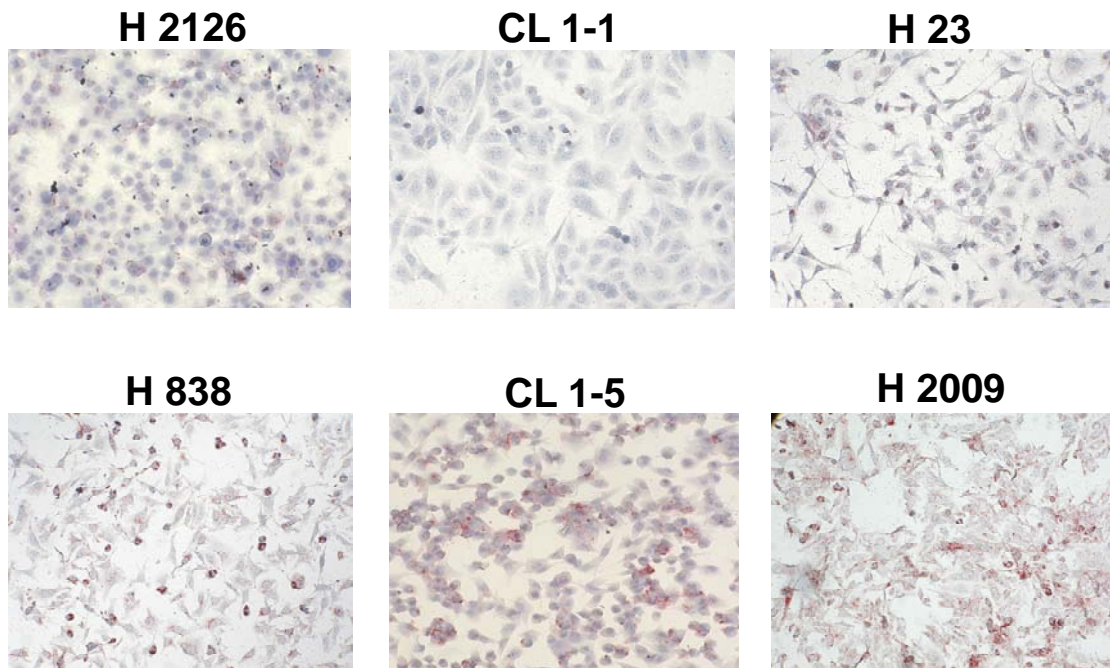


Figure 5

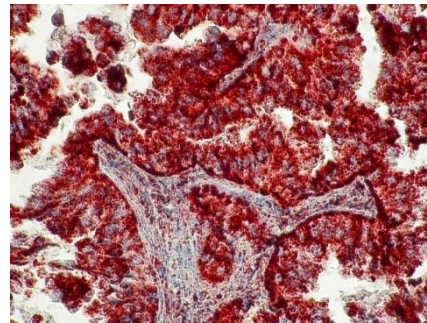
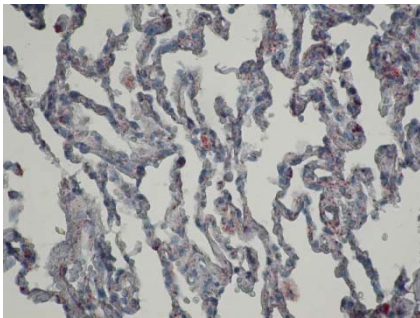
A. RT-PCR



B. Immunostaining

Normal area

Tumor area



C. Positive in Immunostaining (n= 247/300)

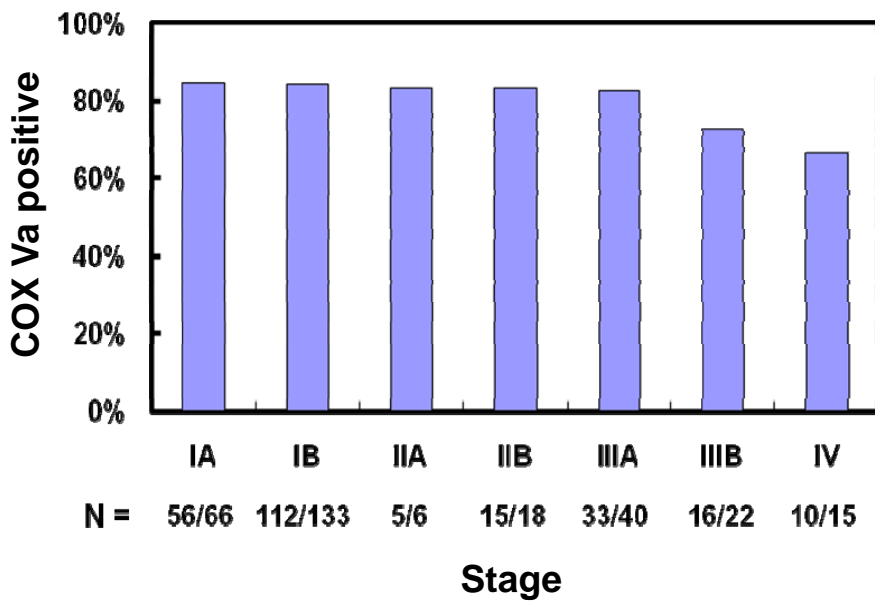
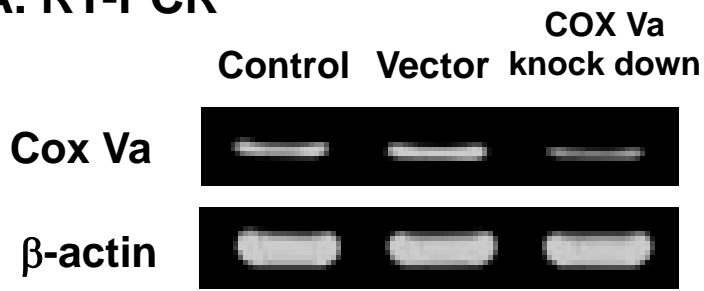
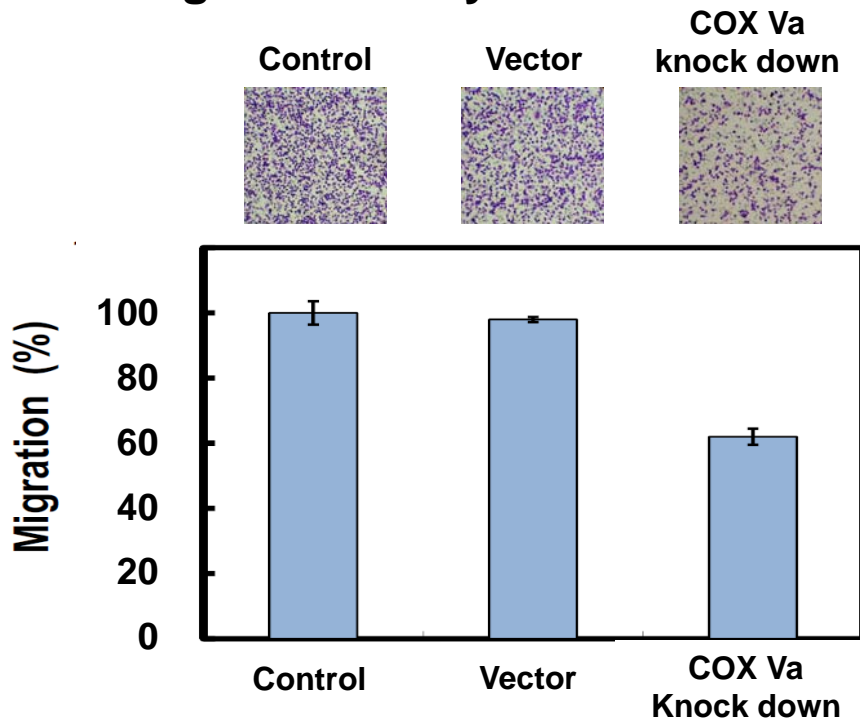


Figure 6

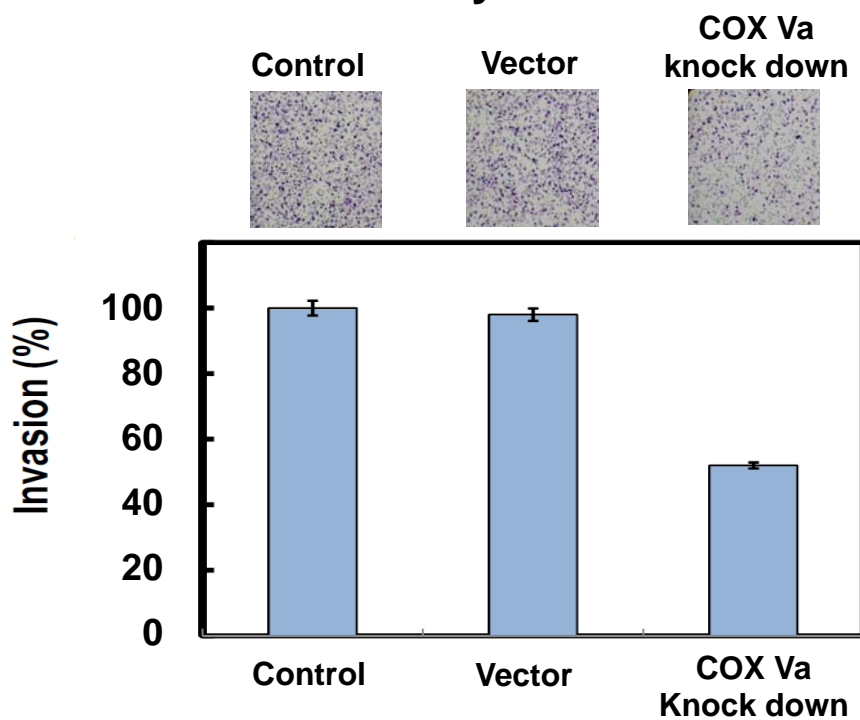
A. RT-PCR



B. Migration assay



C. Invasion assay



D. MMP assay

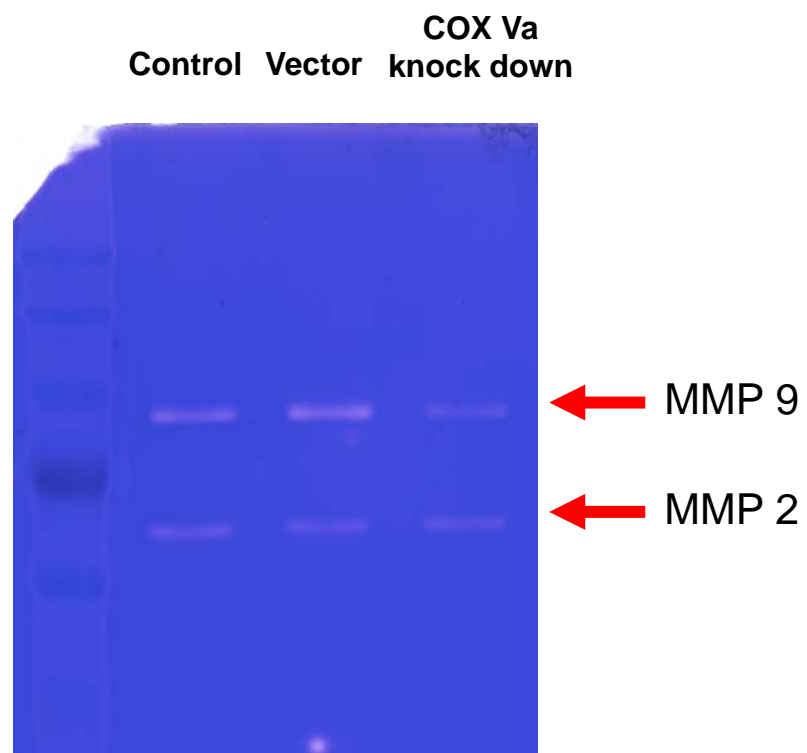


Figure 7

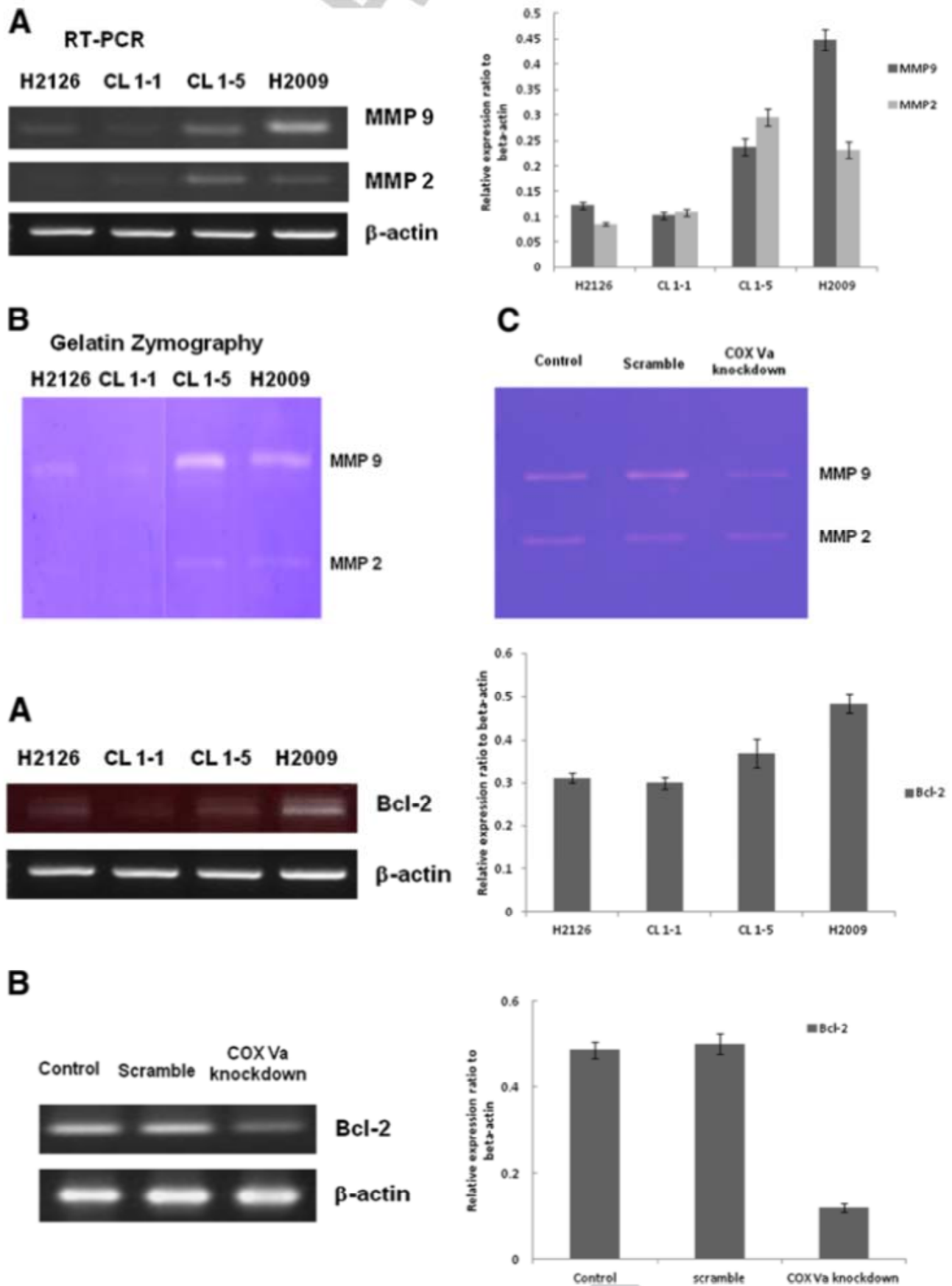


Figure 8