

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : Human mitochondrial NAD(P)+ malic enzyme 影響肺 *
* 名稱 : 癌細胞能量改變及對抗細胞凋亡機制之研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 王明彥

學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-044-B

研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月

指導教授： 劉光耀

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學微生物免疫研究所

中華民國

103年03月30日

(一)、英文摘要：

Cancer has been the first among the top ten leading causes of death for thirty years in Taiwan, and the highest mortality rate of it is lung cancer. Lung cancer is the second leading cause of cancer death in men, and the first leading cause of cancer death in women. Compared to occurrence rates of gastric cancer and cervical cancer, occurrence rate of lung cancer has increased year by year. The main categories of people suffering from lung cancer is adenocarcinoma, and it accounts for the proportion of 30% or more. Lung cancer which may not have early symptoms is mostly found after spreading throughout the body, and the prognosis of it is always not favorable. Malic Enzymes (MEs) can be divided into three isoforms, and one of its is Mitochondrial NAD(P)⁺-dependent Malic Enzyme (ME2) which affects rapidly proliferating tissues, intestinal mucosa, spleen, thymus and tumor cells. ME2 catalyzes the conversion of malate to pyruvate and CO₂, and uses NAD(P)⁺ as a cofactor accompanying with NADH or NADPH formation. NADH is oxidized to produce ATP directly provide cellular energy in electron transport chain of inner mitochondrial membrane, the process which is so called oxidative phosphorylation will have a chance to produce O₂⁻. O₂⁻ is catalyzed to generate H₂O₂ via Superoxide Dismutase (SOD), and H₂O₂ forms OH⁻ which is assisted with metal ions. Finally, it causes programmed cell death (apoptosis) by a damaged signal delivered from oxidized substance of cell. NADH which is produced by ME2 catalytic reactions is the main source of energy metabolism molecule ATP, while it may also play a important role in protection against damage induced by reactive oxygen species (ROS). NADH can assist the production of NADPH which prompt Glutathione (GSH) to maintain in reduced state to reduce damage caused by ROS, and NADPH which is directly produced by ME2 catalytic reactions may also participate in this action. The purpose of this study is to investigate whether knockdown or overexpression of ME2 can improve the ability to fight against ROS, thus, help reduce lung cancer cells apoptosis and increase the abilities of proliferation and metastasis. The results demonstrate that ME2 overexpressive lung cancer cells cultured in low glucose environments will acquire energy through ME2 catalytic reaction which transfer to utilize glutamate (Glutamine) as an additional energy source, and this reaction accompanies with formation of NADH or NADPH which have the ability to fight against apoptosis. Overall, these discoveries reveal a crucial role for ME2 in evading apoptosis.

Keyword: Mitochondrial NAD(P)⁺-dependent Malic Enzyme (ME2), ROS, apoptosis, lung cancer cell

(二)、前言：

癌症在各個已開發國家間已成為主要的死亡原因並歷時多年，而台灣也不例外，自從民國 70 年代整體衛生條件提升後，過去各種造成主要死亡原因的傳染性疾病已明顯減少，取而代之的是已高居國人十大死亡原因之首三十年的癌症，其中高居癌症死亡率第一位為肺癌，目前一年約有八千多人因為罹患肺癌而死亡，而且相較於胃癌與子宮頸癌其發生率的趨勢有逐年增加之情形。肺癌主要分為小細胞癌 15% 與非小細胞癌 85% (鱗狀上皮細胞癌、腺癌以及大細胞癌)其形成的原因主要為空污、菸癮及遺傳因素所造成，由於肺臟組織不正常地增生而引起氣體出入的阻塞，造成咳嗽、咳血痰、阻塞性肺炎、肋膜積水、呼吸困難等症狀，與他種癌症相比其棘手的是早期幾乎沒有明顯的症狀，而錯過了最佳治療期，到了後期症狀出現時，肺癌已侵蝕基底膜並藉由淋巴管及血管轉移至全身各處，這時手術、化療跟其他療法合併治療後，仍難以清除癌細胞，化療等療法因為對於正常細胞會造成基因突變再加上免疫力的低落，經過四、五年後常引起他種癌症的發生，所以整體五年存活率仍約只有百分之十二，所以發展新療法有其迫切性。多年來，世界各國的科學家們致力於尋找與開發各式新型抗癌

藥與療法，大幅延長癌症病人的壽命，像是廣泛應用於治療各種癌症的 fluorouracil (5-FU)，5-FU 具有抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶與鑲嵌 RNA、DNA 的作用，致使擁有快速分裂能力的腫瘤細胞的基因表達與有絲分裂的錯誤，並使癌細胞死亡。這些新抗癌藥物與療法的研發，皆有賴於科學家們先前對於癌細胞如何快速增生、抗細胞凋亡、抗老化等分子機制的研究才能有今天的結果，如果我們能將各種致癌基因、酵素研究的更透徹，將有助於抗癌新方法的研發。

蘋果酸酶(Malic Enzyme, ME)具有催化蘋果酸 (Malate) 氧化脫去羧基，生成 CO_2 與丙酮酸 (Pyruvate) 的能力，同時伴隨 NADH 或 NADPH 的產生，在反應過程需有 NAD(P)^+ 及鎂離子或錳離子做為輔因子 (Cofactor)幫助其反應順利進行 (Coleman et al., 2002)。蘋果酸酶發現於 1940 年代，是一種廣泛存在於細菌、植物、昆蟲和動物間的酵素，為 Housekeeping Gene (Butta et al., 2001; Loeber et al., 1994)，其中哺乳類動物的蘋果酸酶可分為 Cytosolic NADP^+ -dependent Malic Enzyme (ME1 or MEc)、Mitochondrial NAD(P)^+ -dependent Malic Enzyme (ME2 or MEem)、Mitochondrial NADP^+ -dependent Malic Enzyme (ME3)，其中 ME2 在一般生理條件下，主要以 NAD^+ 作為 Coenzyme 進行反應。人類粒線體蘋果酸酶 (ME2) 主要表達於各種快速增生的組織 (如：脾臟、胸腺以及存在於身體各處的黏膜細胞等) (Nagel et al., 1980)，腫瘤細胞在前人的論文中也指出 ME2 具有過量表達的情形並在能量代謝方面扮演不可或缺的角色 (Sauer et al., 1978; Ren et al., 2010)，許多腫瘤細胞能利用與一般細胞相同的糖解路徑獲得能量，當處於糖分缺乏的環境中也能利用穀胺酸 (Glutamine) 作為額外的能量來源，即蘋果酸酵素酶催化作用與穀胺酸的代謝有關，稱之為 Glutaminolysis (Randall et al., 1983)；而 ME1 在腫瘤細胞與正常細胞中的表現量並無明顯差異 (Loeber et al., 1994)。另外，也有文獻的研究結果顯示 Cytosolic NADP^+ -dependent malic enzyme (ME1) 與 Mitochondrial NADP^+ -dependent malic enzyme (ME3) 反應過程中伴隨產生的 NADPH 主要與抗 ROS (H_2O_2 、 O_2^- 、 OH^-) 與脂質的生成 (例如：磷脂質→細胞膜、粒線體膜) 相關 (Zhang et al., 2007; Stelmańska et al., 2007; Goodridge et al., 1986)；而 Mitochondrial NAD(P)^+ -dependent malic enzyme (ME2) 反應過程中伴隨產生的 NADH 主要與能量代謝相關 (Skorkowski et al., 1988; Feuers et al., 1988)，能透過電子傳遞鏈產生 ATP 提供細胞直接利用能量的來源，而 ME2 以 NADP^+ 作為 Coenzyme 進行反應，所伴隨產生的 NADPH，可能直接與抗 ROS 相關。

Reactive oxygen species (ROS) 為帶有不成對電子的含氧分子，具有不穩定與高活躍的特性，適量的 ROS 是維持身體正常生理機能所必需，例如：參與細胞內氧化還原反應、攻擊外來的病毒與細菌、作為訊號分子傳遞訊息進而促進增生 (Zamkova et al., 2013)；然而過量的自由基卻是具有危害性，例如：影響正常生理恆定、氧化細胞內的脂質與蛋白質、氧化 DNA 的含氮鹼基促使基因突變 (Yu et al., 2012)，因此 ROS 具有保護與傷害的雙重效果。細胞內的 ROS 主要來源：一、經有氧呼吸產生能量代謝分子 ATP 的同時，ROS 也會伴隨產生。二、NOX (NAD(P)H Oxidase) family 會氧化 NADH 或 NADPH，生成 NAD^+ 或 NADP^+ ，同時產生 ROS (Liu et al., 2012; Vaquero et al., 2004)。三、與發炎相關的 cyclooxygenase family，催化反應的過程中伴隨產生 ROS。四、Lipoxygenases family 催化不飽和脂肪酸的過程中也會伴隨產生 ROS。前人研究普遍認為高量的活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 會導致腫瘤的生成，近幾年的研究也顯示腫瘤細胞內的 Nrf2 有大量表現的情形，能對抗細胞內的 ROS，讓癌細胞能存活下來，避開進入細胞凋亡的可能 (DeNicola et al., 2011)，進而增生、轉移。

細胞質與粒線體中的 NADH 除了能經氧化磷酸化產生 ATP 外，在過程中也會產生 O_2^- ，而超氧歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 會將 O_2^- 催化轉變成 H_2O_2 ，接著 H_2O_2 再從金屬原子氧化反應得到電子，最後轉變為 OH^- ，此分子將進而對細胞內蛋白質、DNA、RNA 與脂質，形成氧化壓力造成傷害 (Murakami et al., 2011)。

程式性的計畫死亡 (Apoptosis) 在細胞生理運作上是一個極重要的機制，主要區分外源性

(Extrinsic pathway) 與內因性 (Intrinsic pathway) 兩種。外源性: 當細胞膜上的受體接收到死亡訊息分子, 例如 CD95 (Fas)、TNFR1 (TNF receptor-1) 和 TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), 就能活化細胞膜下的受體 Death domain, 將 Initiator Caspase 8 轉化為 Caspase 8, 進而活化下游的 Initiator Caspase 3 形成 Caspase 3 並進行 Apoptosis, 此外 Caspase 8 也能活化 Bcl 家族中 Proapoptotic BH3-only 之 Bid 蛋白形成, 破壞粒線體膜上 Proapoptotic protein 與 Antiapoptotic protein 的平衡, 促使細胞色素 Cytochrome c 的釋出, 活化下游的蛋白, 進行 Apoptosis (Beaudouin et al., 2013)。內因性: 當細胞遇到環境逆境, 例如 DNA damage、Hypoxia、Chemotherapy、UV 或 Oxidative stress (ROS) (Khan et al., 2012; Chan et al., 2012), 便會活化 Proapoptotic BH3-only protein (Bid、Bad、Noxa、Puma、Bim) 並進一步活化 Bax 與 Bak 蛋白連接到粒線體外膜上, 當粒線體外膜上的 Proapoptotic protein 累積超過 Antiapoptotic protein (Bcl-xL、Bcl-2), 破壞兩者之間的平衡後, 粒線體外膜的通透性便會改變, 這時細胞色素 (cytochrome c) 就能藉由 Bax、Bak 釋出, 結合到由 Apaf-1 與 Procaspase 9 組成的 Apoptosome, 此結合將促使 Procaspase 9 轉化為具有功能的 Caspase 9, 並進一步活化 Effector Caspase (Caspase 3), 切割核內的 Poly ADP-Ribose Polymerase-1 (PARP-1) 與 DFF45, 最後引發 DNA 的斷裂 (Sudhir et al., 2005; Zhou et al., 2012)。當細胞凋亡機制發生問題時, 受損的細胞不會被導向死亡, 反而使受損至一定程度的細胞癌化並形成腫瘤, 例如 DNA 受損時, 在細胞週期 G1 期的抑癌基因 P53 蛋白, 擁有監督 DNA 是否受損的功能, 若 P53 蛋白判定 DNA 已到達無法修復的程度, 就會誘發細胞凋亡的機制發生; 但若 P53 基因發生突變導致 P53 蛋白的表達受限並失去對細胞週期監控的作用, 便會讓帶有受損 DNA 的細胞進入 S 期, 繼續進行複製使細胞不正常增生, 而這些細胞產生的突變, 最後到達一定的程度後, 並躲過免疫系統的監控後, 便會引起細胞癌變 (Chen et al., 2013; Zhu et al., 2013), 因此細胞凋亡在人體腫瘤形成上扮演極重要的角色, 及具有避免其形成的功效。

粒線體在氧化磷酸化作用過程中產生 ATP 同時也會產生活性氧族 (Reactive Oxygen Species, ROS) (Venditti et al., 2013) 對粒線體 DNA 的核苷酸鹼基進行氧化, 造成傷害, 進而引起粒線體外膜通透性改變, 釋出細胞色素 (Cytochrome c) 活化 Caspase 9 與 Caspase 3, 誘發程式性的計畫死亡 (Apoptosis); 而在 ME2 催化反應中伴隨產生的 NADH 與 NADPH, 可能與腫瘤細胞能夠對抗 ROS 對粒線體 DNA 的傷害相關, NADH 有協助抗活性氧的功能, 將 NADP^+ 還原為 NADPH, NADPH 能被 ROS 氧化的氧化態 Glutathione (GSSH), 還原成 Glutathione (GSH), 讓 GSH 能繼續擔任抗氧化的角色。

(三)、研究目的及方向：

本研究將探討 ME2 在肺癌細胞中, 是否扮演抗細胞凋亡的角色。利用 pCMV-Tag shME2 或 pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株, 分別處理 H_2O_2 與 UV 後, 進行下列實驗證明 ME2 在癌症細胞中, 具有抗細胞凋亡的功能: (1) 利用顯微鏡與 trypan blue 染色法, 觀察細胞型態並進行細胞計數存活分析。(2) 利用 Acridine orange 染色法 (Acridine orange staining) 分析法, 觀察有無染色體濃縮之細胞凋亡現象出現。(3) 利用去氧核糖核酸的片段化分析法, 觀察有無 DNA 片斷化之細胞凋亡現象出現。

(四)、材料與方法：

(1) 細胞培養及試劑

人類非小細胞肺癌 (Human non-small lung cancer H1299 cell) 生長在含有 10% 去活性胎牛血清 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 的 low glucose DMEM 培養基培養於 37°C 下含 5% 二氧化碳培養箱。 H_2O_2 (Riedel-de Haën); UV (Spectroline)。

(2)細胞存活分析

首先溫和地將懸浮於培養基的細胞吸至 tube 中，剩下的黏著細胞利用 0.05% 的 trypsin 和 0.02% EDTA 處理五分鐘後，劇烈的 pipetting，並與先前已吸至 tube 中的溶液混和均勻，再使用 trypan blue 與懸浮細胞、黏著細胞 pipetting 均勻並使用細胞計數器計算。

(3) Acridine orange 染色法(Acridine orange staining)

培養皿中置入已經過酒精火烤滅菌後的玻片再種入 5×10^5 顆細胞，分別處理 H_2O_2 不同濃度及 UV 不同劑量後收集，吸除上清液後並以一倍濃度的 PBS 洗滌一次，加入福馬林固定 10 分鐘後，加入 acridine orange 染劑 10 μ l 至有細胞貼附的玻片上(acridine orange 在室溫做實驗)，置於暗處反應 10 分鐘，拭淨載玻片，將有細胞貼附的玻片放至載玻片上後，利用綠色螢光 (500~525 nm) 在螢光顯微鏡上觀察是否細胞核產生濃縮的現象以判斷是否為細胞凋亡的細胞並拍照存檔。

(4) 去氧核糖核酸的片段化

細胞處理後，溫和地將懸浮於培養基的細胞吸至 tube 中，剩下的黏著細胞利用 0.05% 的 trypsin 和 0.02% EDTA 處理五分鐘後，劇烈的 pipetting，並與先前已吸至 tube 中的溶液混和均勻進行離心並去除上清液，再利用一倍濃度 PBS 洗滌一次，1000rpm 4°C 離心 5 分鐘取得沉澱的細胞，這些細胞加入 50 μ l 細胞 DNA ladder 溶解性溶液 (50mM Tris-HCL, pH8.0, 10mM EDTA 和 0.5% sakosyl) 和 5 μ l 蛋白分解酶 K (0.5mg/ml) 後，放入 55°C 乾浴機，隔夜(14~16 小時)後再加入 2 μ l RNAase A (5 μ g/ml) 反應兩小時，之後加入等量 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) (57 μ l) 上下混合均勻後(萃取去氧核糖核酸)，以 12000rpm 離心 30 分鐘，將上清液取出後加上 DNA loading 溶液 (10X;20% Ficoll 400, 0.1M Na_2EDTA , 1% SDS, 0.25% bromophenol blue 和 0.25% xylene cyanol)，使用 2% agarose 以 50 伏特進行電泳分析(Liu et al., 1999)。

(5) 統計分析

統計資料利用 SPSS 10.0 版進行統計分析，當統計後數據 P value 值小於 0.05 或 0.01 時，則具有統計學上意義(P<0.05 時以*表示)。

(五)、結果：

H_2O_2 誘發 ME2 knock down 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株型態改變，並使存活率下降

構築表達粒線體蘋果酸酶 knock down 載體 (pCMV-Tag shME2) 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，並以粒線體蘋果酸酶 knock down 載體為實驗組，空載體為對照組，皆培養在 low glucose 的培養液中進行實驗觀察。 H_2O_2 具有可穿透細胞膜的特性，經胞內酵素催化反應後生成 OH^- ，對細胞內的物質造成氧化傷害。pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，經 H_2O_2 50 μ M 添加 24 小時後，shME2 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株型態上皆有明顯地改變，呈現許多細胞死亡的狀態(Fig1A)；隨著 H_2O_2 的濃度上升，pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株的存活率皆有下降的情形，而 shME2 與 vector 之間也具有統計學上的顯著意義(Fig1B、C)。由此初步結果可知，ME2 knock down 後，細胞對於 ROS 造成的傷害，抵抗力下降。

ME2 knock down 失去抵抗 H_2O_2 所誘發之細胞凋亡能力

pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，皆培養在 low glucose 的培養液中，癌細胞缺少利用葡萄糖做為能量獲得的途徑，轉而利用穀胺酸 (Glutamine) 作為額外的能量來源，即蘋果酸酵素酶催化作用，稱之為 Glutaminolysis。使 ME2 催化反應上升，並伴隨產生更多 NADH，抵抗 H_2O_2 對粒線體造成的傷害，避免進行細胞凋亡的機制。pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，經 H_2O_2 50 μ M 添加 24 小時後，pCMV-Tag shME2 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，因為缺少葡萄糖做為能量獲得的途徑，也缺少 ME2 利用穀胺酸 (Glutamine) 作為

額外的能量來源，shME2 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株型態上皆有明顯地改變，存活率也有下降的情形(Fig1A、B、C)；而細胞凋亡之重要指標 DNA 片斷化，pCMV-Tag shME2 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，所呈現的 DNA 片斷化情形也比 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株明顯(Fig2)。

ME2 overexpression 抵抗 H₂O₂ 與 UV 所導致的細胞死亡

接下來，我們利用 ME2 過度表達的形式，進行實驗。構築表達粒線體蘋果酸酶載體 (pCMV-Tag ME2) 之 H1299 肺癌細胞株，並以粒線體蘋果酸酶載體為實驗組，空載體為對照組，皆培養在 low glucose 的培養液中進行實驗觀察。pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株，經 H₂O₂ 50μM 添加 24 小時後，pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株型態上有明顯地改變，呈現許多細胞死亡的狀態(Fig3A)，而隨著 H₂O₂ 的濃度上升，pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株的存活率皆有下降的情形，ME2 與 vector 之間也具有統計學上的顯著意義(Fig3B)；UV 能提供能量，致使 H₂O 等物質的共價鍵斷裂形成帶有孤對電子的自由基，進而對細胞內的物質造成氧化傷害。pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株，經 UV 680J/m² 照射後 24 小時，pCMV-Tag vector H1299 肺癌細胞株與 pCMV-Tag ME2 H1299 肺癌細胞株相比之下，細胞型態有明顯地改變，呈現許多細胞死亡的狀態(Fig3A)，而隨著 UV 劑量的上升，pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株的存活率皆有下降的情形，ME2 與 vector 之間也具有統計學上的顯著意義(Fig3C)。

ME2 overexpression 抵抗 H₂O₂ 與 UV 誘發的細胞凋亡

Acridine orange(AO)是一種螢光染劑，具有可通透細胞膜的特性，其與細胞中 DNA 和 RNA 結合的不同，可發出不同顏色的螢光，與 DNA 結合呈現綠色螢光，與 RNA 結合則呈現桔黃色或桔紅色螢光。在螢光顯微鏡下觀察，AO 與 DNA 結合後，使細胞核呈綠色或黃綠色均勻螢光，而在凋亡細胞中，因染色質凝集或斷裂為大小不等的片斷，形成凋亡小體，AO 使其呈現緻密濃染的黃綠色螢光，或黃綠色碎片顆粒，在壞死細胞方面則是黃螢光減弱甚至消失。pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，皆培養在 low glucose 的培養液中，癌細胞缺少利用葡萄糖做為能量獲得的途徑，轉而利用穀胺酸 (Glutamine) 作為額外的能量來源，即蘋果酸酵素酶催化作用，稱之為 Glutaminolysis。使 ME2 催化反應上升，並伴隨產生更多 NADH，協助抵抗 ROS 對粒線體造成的傷害，避免進行細胞凋亡的機制。pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株皆培養於 low glucose 的培養液中，經 H₂O₂ 50μM 添加 24 小時或經 UV 680J/m² 照射後 24 小時並經 AO 染色處理後，pCMV-Tag ME2 之 H1299 肺癌細胞株與 pCMV-Tag vector H1299 肺癌細胞株相比之下，染色質凝集所呈現的緻密濃染黃綠色螢光，皆有明顯較少的情形(Fig4A、C)。

(六)、討論：

ME2 在腫瘤細胞中有大量表達的情形 (Ren et al., 2010)，因此透徹地了解 ME2 在腫瘤細胞所扮演的角色，將有助於開發新型的抗癌藥物與新療法為癌症病人帶來新希望。我們的實驗結果顯示在 ME2 knockdown 與 ME2 overexpression 的條件下，ME2 具有抵抗 ROS 對細胞造成傷害的能力，而避免細胞凋亡機制的產生，當腫瘤細胞處於缺少以葡萄糖作為能量獲得的環境中，便會利用 Glutamine 作為主要的能量獲得途徑(即蘋果酸酵素酶催化作用，稱之為 Glutaminolysis)(Medina et al., 1990)，而經 ME2 催化反應伴隨產生 NADH 與 NADPH，有助於抵抗經粒線體電子傳遞鏈氧化磷酸化所產生的 ROS，避免粒線體遭受氧化傷害，而引發程式性細胞凋亡的機制。

腫瘤的生成常伴隨粒線體 DNA 的突變，導致粒線體質質與粒線體 DNA 的拷貝數皆有增加(Passos et al., 2005)的情形，這是因為粒線體的耗氧量占細胞的 90%，產生的 ROS 比細胞其他部位來得多，再加上粒線體 DNA 缺乏組蛋白的保護且修復機制較差，使粒線體 DNA 的突變率極高，而且 ROS 會

將訊息傳遞至細胞核並且活化粒線體的增生，而粒線體增生導致經過電子傳遞鏈產生的 ROS 更多 (Wallace., 2012)，進而破壞粒線體、胞器與細胞核中的 DNA，並誘發細胞凋亡機制的產生，但腫瘤細胞卻能形成新的氧化還原平衡態(Wallace., 2012)，利用粒線體內的 IDH2 催化 CO₂ 與 α -ketoglutarate 生成 Isocitrate 並伴隨產生 NADPH，或者將 Isocitrate 運送至細胞質利用細胞質中的 IDH1 催化 Isocitrate 反應生成 CO₂ 與 α -ketoglutarate 並伴隨產生 NADPH，躲避 ROS 誘發的細胞凋亡機制，而 ME2 催化反應伴隨產生的 NADH 與 NADPH 也可能參與其中。

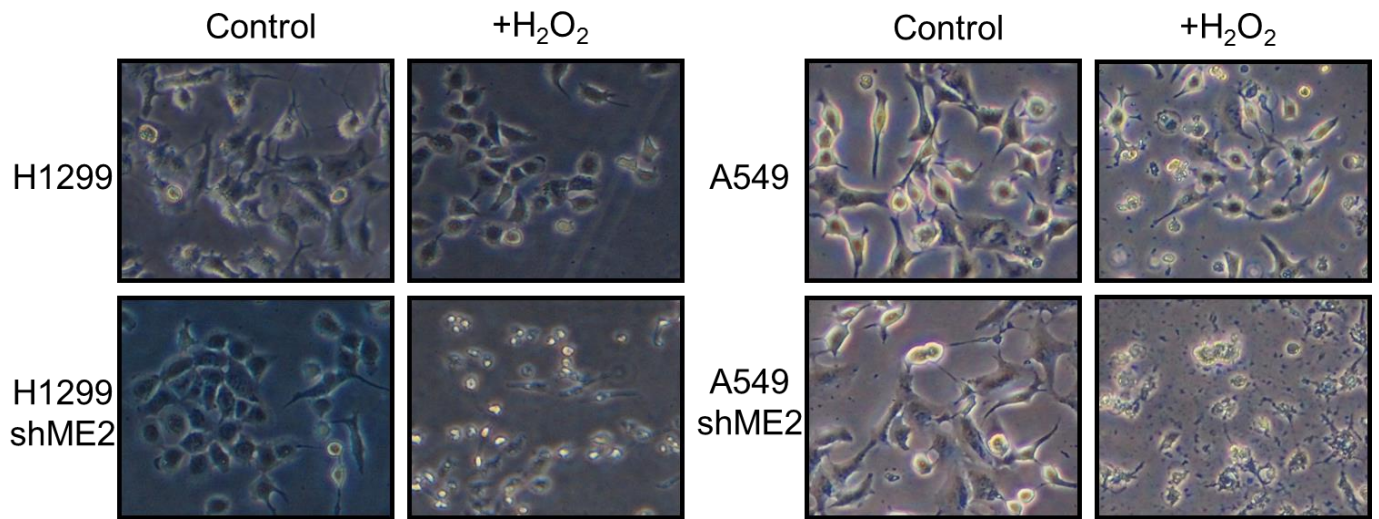
穀胱甘肽 (Glutathione, GSH) 是由穀胺酸、半胱胺酸及甘胺酸所構成的一種三肽分子 (Tripeptide)，其中第一個肽鍵與普通的肽鍵不同，是由穀胺酸的 γ -羧基與半胱胺酸的氨基組成的，在分子中半胱胺酸巰基是該化合物的主要功能基團，扮演動物細胞中抗氧化劑的角色。GSH 與 H₂O₂ 能經 Glutathione peroxidase (GPx) 催化形成氧化態穀胱甘肽 (Oxidized Glutathione, GSSG) 與 H₂O；GSSG 與 NADPH 能藉由 Glutathione Reductase (GR) 催化形成 NADP⁺ 與還原態穀胱甘肽 (Glutathione, GSH) 並能再次與 ROS 反應，有效避免細胞生理受損 (Quintana-Cabrera et al., 2013；Verma et al., 2013)。NADH 是能量代謝中非常重要的物質，同時在抗氧化功能也扮演一個協助的角色。在粒線體內 NADPH 的產生來源：一、NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase (IDH2)；二、Mitochondrial NADP⁺-dependent Malic Enzyme (ME3)；三、粒線體內膜上的 Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (NNT)，NNT 利用氫離子濃度梯度作為驅動力與 NADH 作為電子提供者將 NADP⁺ 還原成 NADPH，粒線體裡的 NADPH 有 50% 以上來自於 NNT 之催化作用，而粒線體內催化反應過程中會伴隨產生 NADH 的酵素有丙酮酸脫氫酶 (Pyruvate dehydrogenase)、異檸檬酸脫氫酶 (Isocitrate dehydrogenase)、 α -酮基戊二酸脫氫酶 (α -ketoglutarate dehydrogenase)、蘋果酸脫氫酶 (Malate dehydrogenase)(Wallace., 2012)，ME2 催化反應伴隨產生的 NADH，相對來說量較少，因此經 ME2 催化反應伴隨產生的 NADPH，雖然少量，但也可能具有不能輕忽之作用，這些大量的 NADPH 能還原 GSSH，GSH 就能繼續扮演清除 ROS 的角色 (Yin et al., 2012；Arkblad et al., 2005)。

穀胱甘肽 (GSH) 能有效清除活性氧自由基分子，而 NADPH 扮演還原 GSSH 促使穀胱甘肽能有效再次作用；在粒線體內膜上的 NNT 以 NADH 為電子提供者將 NADP⁺ 還原成 NADPH，作為有效供給細胞內 NADPH 的需求來源；而粒線體內 ME2 催化反應可獲得 NADH，前人研究亦顯示癌細胞中 ME2 為過量表達，因此 NADH 的產量較正常組織豐富。總結上述，癌細胞中的 ME2 可能具有抗 ROS 的角色，藉由提供豐富的 NADH 經 NNT 催化反應獲得 NADPH，再加上 ME2 催化反應伴隨產生的 NADPH，進而幫助穀胱甘肽的還原與再次清除活性氧自由基分子，有效減低細胞受損的程度與對抗細胞凋亡的發生；而經 ME2 產生的 NADH 也可能參與癌細胞對抗 Senescence、抗 Autophagy 和細胞增生的相關機制(Jiang et al., 2013)。

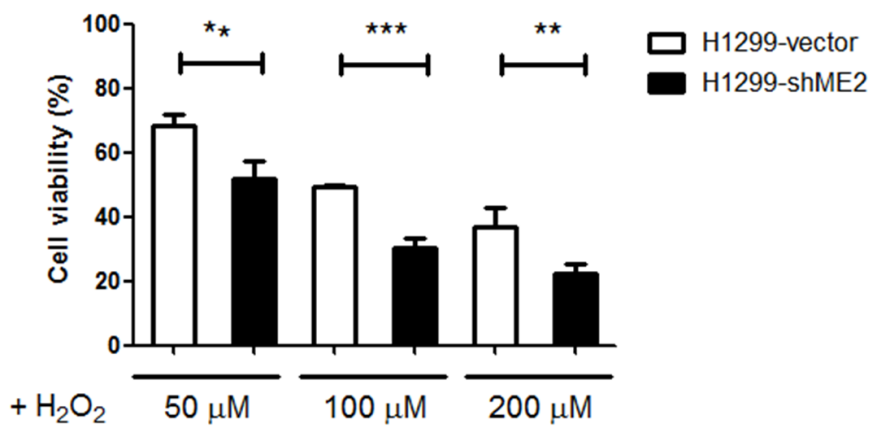
(七)、圖表：

Fig1

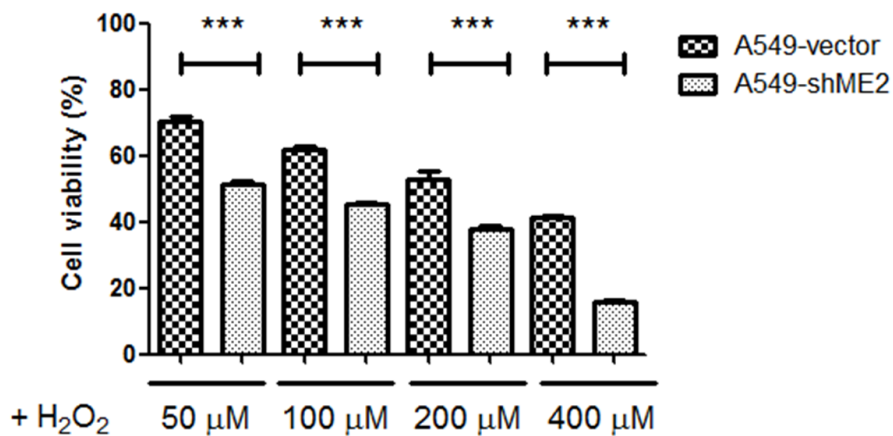
A



B



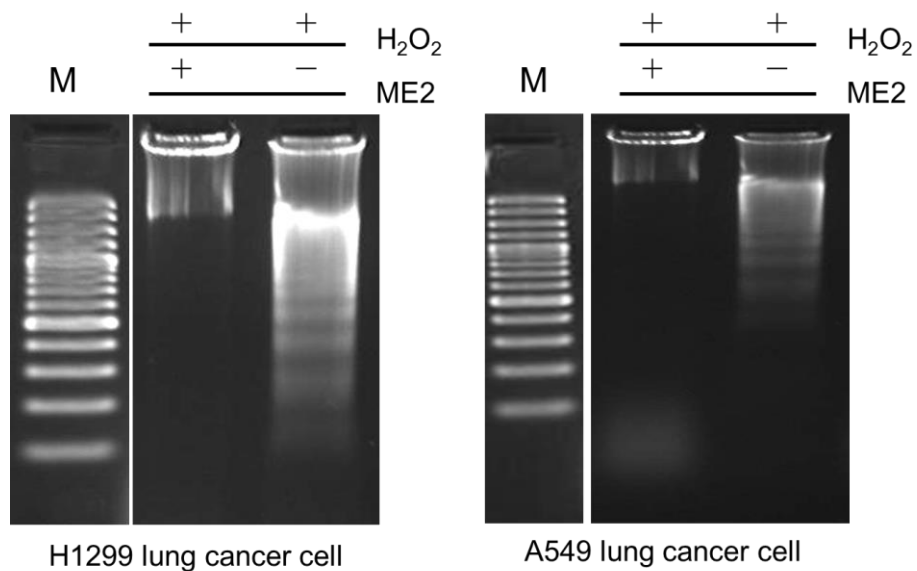
C



圖一、H₂O₂ 誘發 ME2 knock down 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株型態改變，並使存活率下降

(A)pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，經 H₂O₂ 50μM 添加 24 小時後之細胞型態。(B)pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 肺癌細胞株，經不同濃度 H₂O₂ 添加 24 小時後之存活率。(C)pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 A549 肺癌細胞株，經不同濃度 H₂O₂ 添加 24 小時後之存活率。

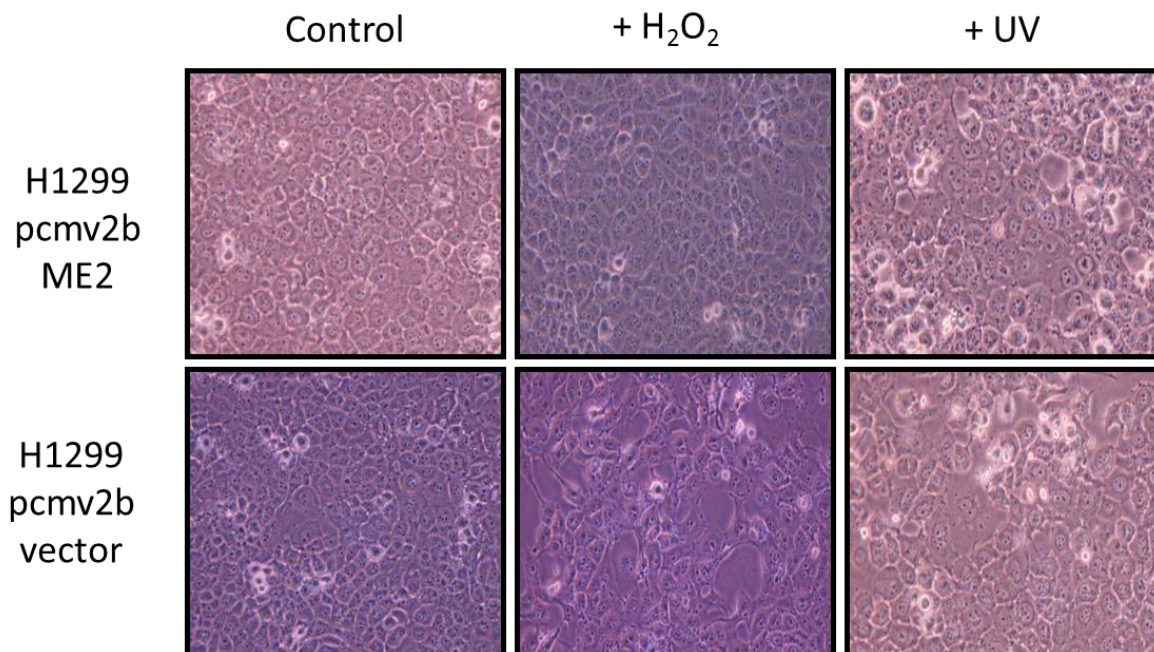
Fig2



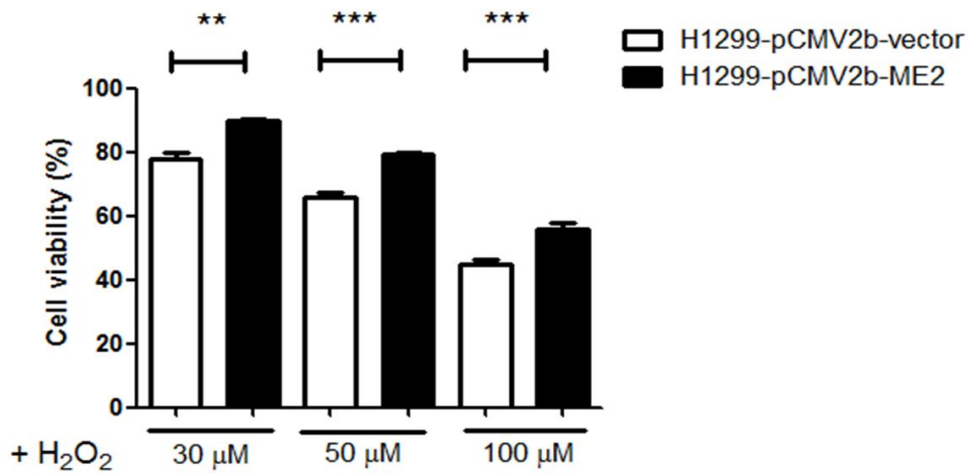
圖二、ME2 knock down 失去抵抗 H₂O₂ 所誘發之細胞凋亡能力
pCMV-Tag shME2 與 pCMV-Tag vector 之 H1299 與 A549 肺癌細胞株，經 H₂O₂ 50 μ M 添加 24 小時後，
利用 DNA 膠體電泳測定之 DNA 片斷化情形。

Fig3

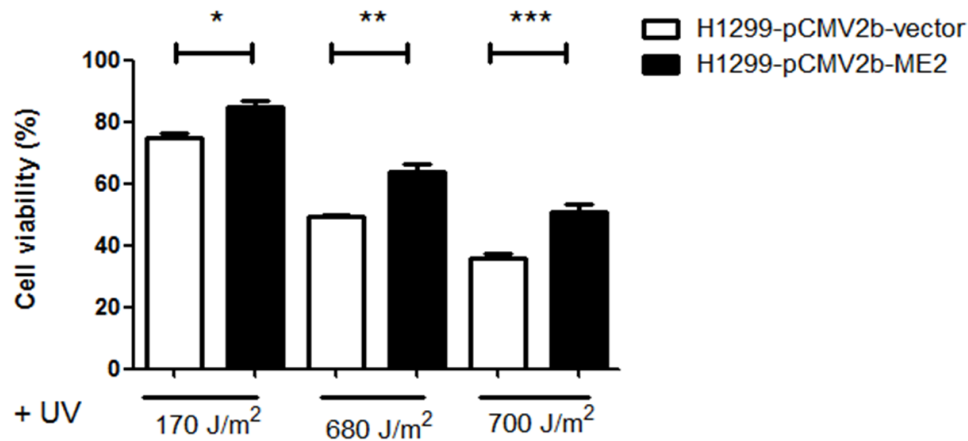
A



B



C

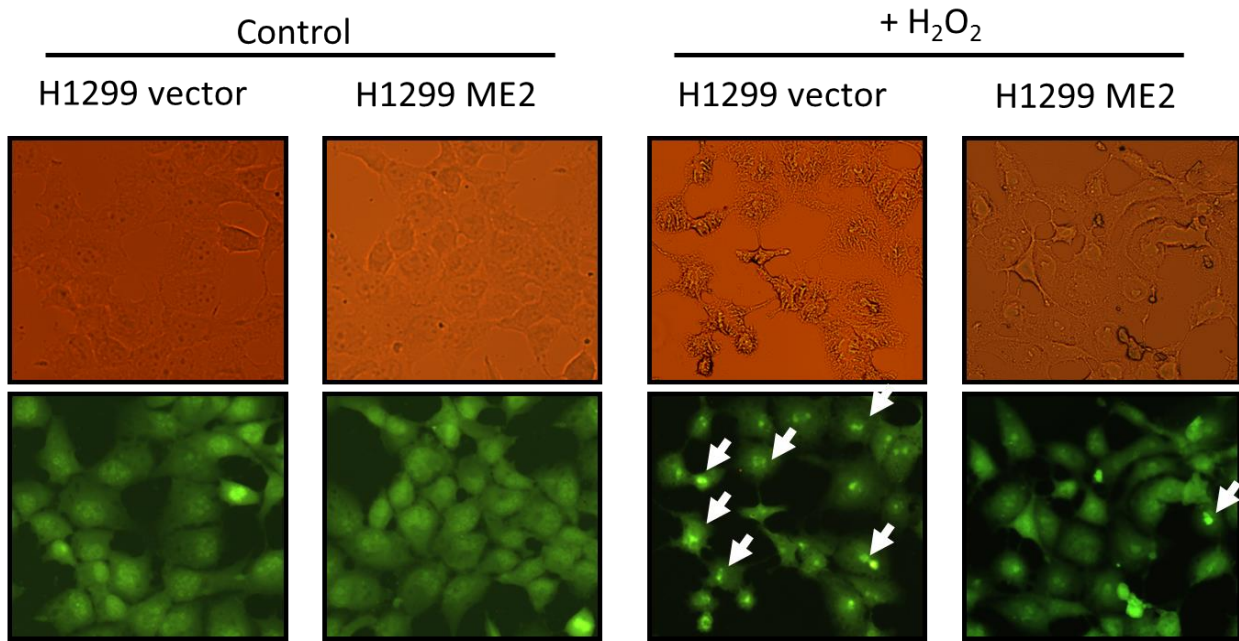


圖三、ME2 overexpression 抵抗 H₂O₂ 與 UV 所導致的細胞死亡

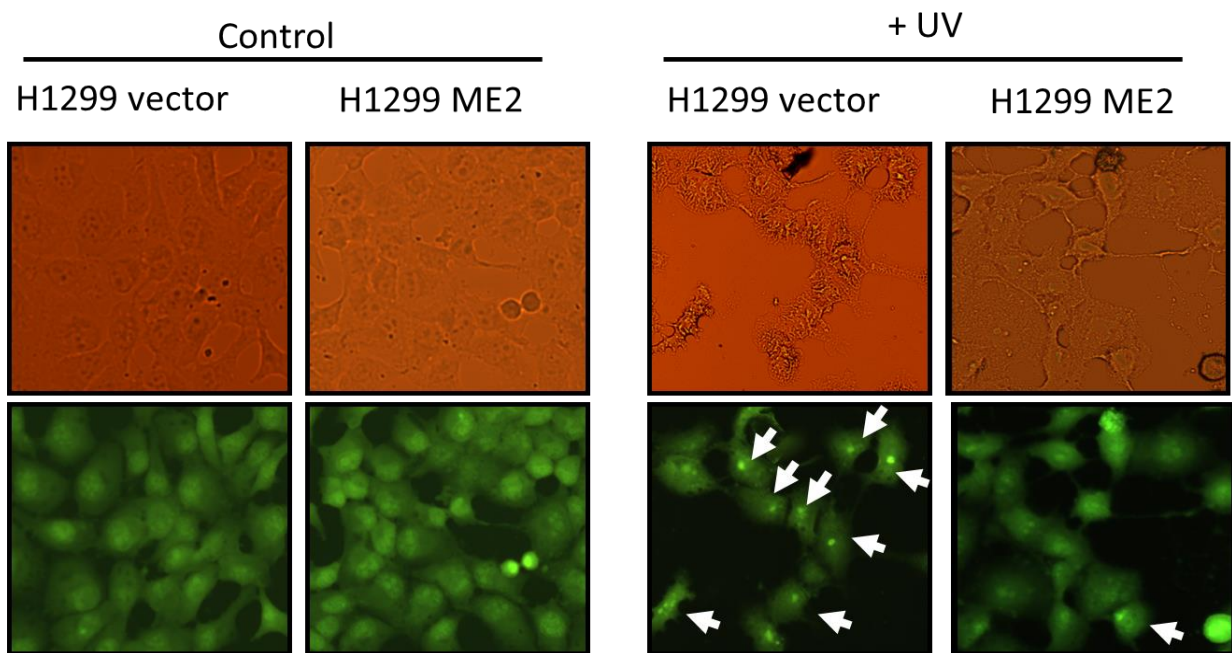
(A) pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 h1299 肺癌細胞株，經 H₂O₂ 50μM 添加 24 小時後之細胞型態。(B) pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 h1299 肺癌細胞株，經不同濃度 H₂O₂ 添加 24 小時後之細胞存活率。(C) pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 h1299 肺癌細胞株，經不同劑量 UV 照射 24 小時後之細胞存活率。

Fig4

A



B



圖四、ME2 overexpression 抵抗 H₂O₂ 與 UV 誘發的細胞凋亡之 DNA 凝集現象

(A)pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 h1299 肺癌細胞株，經 H₂O₂ 50 μ M 添加 24 小時後並使用 AO 染劑在螢光顯微鏡下觀察程式性細胞凋亡。(B) pCMV-Tag ME2 與 pCMV-Tag vector 之 h1299 肺癌細胞株，經 UV 680J/m² 照射 24 小時後並使用 AO 染劑在螢光顯微鏡下觀察程式性細胞凋亡。

(八)、參考文獻：

Arkblad, E.L., Tuck, S., Pestov, N.B., Dmitriev, R.I., Kostina, M.B., Stenvall, J., Tranberg, M., and Rydström, J. (2005) A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide

- transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 38(11):1518-25.
- Beaudouin, J., Liesche, C., Aschenbrenner, S., Hörner, M., and Eils, R. (2013) Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* doi: 10.1038/cdd.2012.156.
- Butta, N., González-Manchón, C., Arias-Salgado, E.G., Ayuso, M.S., and Parrilla, R. (2001) Cloning and functional characterization of the 5' flanking region of the human mitochondrial malic enzyme gene. Regulatory role of Sp1 and AP-2. *Eur J Biochem.* 268(10):3017-27.
- Chan, K.M., Hamzah, R., Rahaman, A.A., Jong, V.Y., Khong, H.Y., Rajab, N.F., Ee, G.C., and Inayat-Hussain, S.H. (2012) The pyranoxanthone inophyllin A induces oxidative stress mediated-apoptosis in Jurkat T lymphoblastic leukemia cells. *Food Chem Toxicol.* 50(8):2916-22.
- Chen, Y.C., Chan, J.Y., Chiu, Y.L., Liu, S.T., Lozano, G., Wang, S.L., Ho, C.L., and Huang, S.M. (2013) Grail as a molecular determinant for the functions of the tumor suppressor p53 in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* doi: 10.1038/cdd.2013.1
- Coleman, D.E., Jagannatha-Rao, G.S., Goldsmith, E.J., Cook, P.F. and Harris, B.G. (2002) Crystal Structure of the Malic Enzyme from *Ascaris suum* Complexed with Nicotinamide Adenine Dinucleotide at 2.3 Å Resolution. *Biochemistry.* 41:6928-38.
- DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., Scrimieri, F., Winter, J.M., Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S.E., Blair, I.A., and Tuveson, D.A. (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* 475(7354):106-9.
- Feuers, R.J., Duffy, P.H., Leakey, J.A., Turturro, A., Mittelstaedt, R.A., and Hart, R.W. (1989) Effect of chronic caloric restriction on hepatic enzymes of intermediary metabolism in the male Fischer 344 rat. *Mech Ageing Dev.* 48(2):179-89.
- Goodridge, A.G., Back, D.W., Wilson, S.B., Goldman, M.J. (1986) Regulation of genes for enzymes involved in fatty acid synthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 478:46-62.
- Giaccone, G., Battey, J., Gazdar, A.F., Oie, H., Draoui, M., and Moody, T.W. (1992) Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52(9 Suppl):2732s-36s.
- Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature.* 493(7434):689-93.
- Khan, M., Ding, C., Rasul, A., Yi, F., Li, T., Gao, H., Gao, R., Zhong, L., Zhang, K., Fang, X., and Ma, T. (2012) Isoalantolactone induces reactive oxygen species mediated apoptosis in pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *Int J Biol Sci.* 8(4):533-47.
- Lin, D.L., and Chang, C. (1996) p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily. *J Biol. Chem.* 271(25):14649-52.
- Loeber, G., Dworkin, M.B., Infante, A., and Ahorn, H. (1994) Characterization of cytosolic malic enzyme in human tumor cells. *FEBS Lett.* 344(2-3):181-6.
- Liu, F., Yu, G., Wang, G., Liu, H., Wu, X., Wang, Q., Liu, M., Liao, K., Wu, M., Cheng, X., and Hao, H. (2012) An NQO1-initiated and p53-independent apoptotic pathway determines the anti-tumor effect of tanshinone IIA against non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 7(7):e42138.
- Mazurek, S. (2011) Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor

- cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 43(7):969-80.
- Murakami, K., Shimizu, T., and Irie, K. (2011) Formation of the 42-mer Amyloid β Radical and the Therapeutic Role of Superoxide Dismutase in Alzheimer's Disease. *J Amino Acids.* 2011:654207.
- Medina, M.A., Núñez de C.I. (1990) Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. *Int J Biochem.* 22(7):681-3.
- Nagel, W.O., Dauchy, R.T., and Sauer, L.A. (1980) Mitochondrial malic enzymes. An association between NAD(P)⁺-dependent malic enzyme and cell renewal in Sprague-Dawley rat tissues. *J Biol. Chem.* 255(9):3849-54.
- Passos, J.F., von Zglinicki, T. (2005) Mitochondria, telomeres and cell senescence. *Exp Gerontol.* 40(6):466-72.
- Quintana-Cabrera, R., and Bolaños, J.P. (2013) Glutathione and γ -glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria. *Biochem Soc Trans.* 41(1):106-10.
- Ren, J.G., Seth, P., Everett, P., Clish, C.B., and Sukhatme, V.P. (2010) Induction of erythroid differentiation in human erythroleukemia cells by depletion of malic enzyme 2. *PLoS One:*e12520.
- Randall, W., Moreadith, S., and Albert, L. Lehninger (1983) The Pathways of Glutamate and Glutamine Oxidation by Tumor Cell Mitochondria. *J Biol. Chem.* 259(10):6215-21.
- Skorkowski, E.F. (1988) Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle. *Comp Biochem Physiol B.* 90(1):19-24.
- Stelmańska, E. (2007) Regulation of extramitochondrial malic enzyme gene expression in lipogenic tissues. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 61:664-71.
- Sudhir, G., Houfen, S., Ruifen, B., Sudhanshu, A., and Sastry, G. (2005) Life and death of lymphocytes: a role in immunosenescence. *Immunity & Ageing.* 12 doi:10.1186/1742-4933-2-12.
- Sauer, L.A., and Dauchy, R.T. (1978) Identification and properties of the nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)⁺-dependent malic enzyme in mouse ascites tumor mitochondria. *Cancer Res.* 38(6):1751-6.
- Venditti, P., Di-Stefano, L., and Di-Meo, S. (2013) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion.* pii: S1567-7249(13)00009-3.
- Vaquero, E.C., Edderkaoui, M., Pandol, S.J., Gukovsky, I., and Gukovskaya, A.S. (2004) Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol. Chem.* 279(33): 34643-54.
- Verma, A.K., and Prasad, S.B. (2013) Changes in Glutathione, Oxidative Stress, Mitochondrial Membrane Potential in Apoptosis Involving the Anticancer Activity Of Cantharidin Isolated From Red-Headed Blister Beetles, *Epicauta Hirticornis*. *Anticancer Agents Med Chem.* 13(7):1096-114.
- Wallace, D.C. (2012) Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer.* 12(10):685-98.
- Yin, F., Sancheti, H., and Cadenas, E. (2012) Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1817(3):401-9.
- Yu, H. (2012) Typical cell signaling response to ionizing radiation : DNA damage and extranuclear damage. *Chin J Cancer Res.* 24(2):83-9.
- Zhou, C., Pan, W., Wang, X.P., and Chen, T.S. (2012) Artesunate induces apoptosis via a Bak-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol.* 227(12):3778-86.

- Zhu, H.B., Yang, K., Xie, Y.Q., Lin, Y.W., Mao, Q.Q., and Xie, L.P. (2013) Silencing of mutant p53 by siRNA induces cell cycle arrest and apoptosis in human bladder cancer cells. *World J Surg Oncol.* 11(1):22.
- Zamkova, M., Khromova, N., Kopnin, B.P., and Kopnin, P. (2013) Ras-induced ROS upregulation affecting cell proliferation is connected with cell type-specific alterations of HSF1/SESN3/p21 (Cip1/WAF1) pathways. *Cell Cycle.* 12(5).
- Zhang, Y., Adams, I.P., and Ratledge, C. (2007) Malic enzyme : the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology.* 153(Pt 7):2013-25.