

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

電位調控型離子通道蛋白失衡與human nonmetastatic clone
23 type 1的相互調控及其應用策略開發標靶治療子宮頸癌及其
預後之評估(第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 102-2314-B-040-014-MY3
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：王博輝
共同主持人：柯俊良
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：吳姿範
 博士後研究：吳芝嫻

中華民國 105 年 10 月 24 日

中文摘要：先前的研究發現nm23-H1會影響子宮頸癌的轉移及增生。本研究我們利用雙維電泳及液態質譜分析發現，在子宮頸癌細胞株中，nm23-H1的減少會增加Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)的表現，並以RT-PCR及western blot確認。我們收集子宮頸癌與high-grade和low-grade cervical intraepithelial neoplasia (high- and low-grade CIN)病人及正常對照組婦女之子宮頸組織蠟塊製作組織晶片，經免疫組織染色後，發現子宮頸癌組織的VDAC1表現量較正常子宮頸組織強。經分析發現子宮頸癌病人中，VDAC1表現量多寡與復發及存活有相關性，VDAC1表現較強時，有較差的復發及存活。在臨床病理特徵上，可以發現VDAC1的表現量與基質侵犯深度有關（侵犯深度超過10 mm）、腫瘤大小有關（腫瘤直徑超過4 cm）。將VDAC1表現量、臨床病理特徵及存活進行分析，可以發現VDAC1與基質侵犯深度呈現高度相關。於是我們阻斷子宮頸癌細胞的VDAC1，發現VDAC1會影響細胞增生及移行的能力。阻斷VDAC1後的子宮頸癌細胞株，粒線體膜電位會下降並增加活性氧（ROS）。雖然VDAC1的表現量下降，但並不影響細胞週期（cell cycle）及細胞自噬（autophagy）相關基因的表現。順鉑（cisplatin）的細胞毒性也會隨著VDAC1的減少而增強，且某些化合物會干擾VDAC1及hexokinase的結合。綜合言之：在子宮頸癌的治療策略上，可以將VDAC1做為標靶，減少細胞的增生及移行，提高順鉑的協同治療，並降低順鉑的使用量。

中文關鍵詞：Voltage-dependent anion channel 1、基因靜默、細胞生長、粒線體膜電位、子宮頸癌

英文摘要：Two-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry were performed to investigate the influence of human nonmetastatic clone 23 type 1 (nm23-H1), a metastasis-associated gene on proteomic alterations in cancer cells of the uterine cervix. It was validated by RT-PCR and Western blot analysis. The expression of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) was increased in nm23-H1 gene silenced SiHa or CaSki cervical cancer cells. The clinical implication was shown that cervical cancer tissues with positive VDAC1 immunoreactivity exhibited deep stromal invasion (>10 mm in depth) and large tumor size (> 4 cm in diameter). Cervical cancer patients with positive VDAC1 immunoreactivity displayed higher recurrence and poorer overall survival than those with negative VDAC1. Silencing of VDAC1 reduced cell proliferation and migratory ability. Mitochondrial membrane potential was decreased and reactive oxygen species generation was increased in the VDAC1 gene-silenced cervical cancer cells. Cell cycle progression and autophagy were not changed in VDAC1 silencing cells. The cytotoxicity of cisplatin was significantly enhanced by knockdown of cellular VDAC1 and the compounds that interfere with hexokinase binding to VDAC. Therapeutic strategies may be

offered using VDAC1 as a target to reduce cell growth and migration, enhance the synergistic therapeutic efficacy of cisplatin and reduce cisplatin dose-limiting toxicity.

英文關鍵詞： voltage-dependent anion channel 1, gene silencing, cell growth, mitochondrial membrane potential, uterine cervical cancer

行政院科技部補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

電位調控型離子通道蛋白失衡與 human nonmetastatic clone 23 type 1 的相互調控及其應用策略開發標靶治療子宮頸癌及其預後之評估

The regulation between imbalance of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) and human nonmetastatic clone 23 type 1 (NM-23H1): developing the stratgy on target therapy and prognosis in cervical cancer

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC102-2314-B-040-014-MY3

執行期間： 102 年 8 月 1 日至 105 年 7 月 31 日

計畫主持人：王博輝

共同主持人：柯俊良

計畫參與人員：吳姿範

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

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 105 年 10 月 17 日

附件二

可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：
可利用之產業 及 可開發之產品	

技術特點	
推廣及運用的價值	

- ※ 1.每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2.本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3.本表若不敷使用，請自行影印使用。

行政院科技部專題研究計畫成果報告

電位調控型離子通道蛋白失衡與 human nonmetastatic clone 23 type 1 的相互

調控及其應用策略開發標靶治療子宮頸癌及其預後之評估

The regulation between imbalance of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) and human nonmetastatic clone 23 type 1 (NM-23H1): developing the strategy on target therapy and prognosis in cervical cancer

計畫編號：NSC102－2314－B－040－014－MY3

執行期限：102年8月1日至105年7月31日

主持人：王博輝 中山醫學大學 醫學研究所

中文摘要：

先前的研究發現nm23-H1會影響子宮頸癌的轉移及增生。本研究我們利用雙維電泳及液態質譜分析發現，在子宮頸癌細胞株中，nm23-H1的減少會增加Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)的表現，並以RT-PCR及western blot確認。我們收集子宮頸癌與high-grade和low-grade cervical intraepithelial neoplasia (high- and low-grade CIN)病人及正常對照組婦女之子宮頸組織蠟塊製作組織晶片，經免疫組織染色後，發現子宮頸癌組織的VDAC1表現量較正常子宮頸組織強。經分析發現子宮頸癌病人中，VDAC1表現量多寡與復發及存活有相關性，VDAC1表現較強時，有較差的復發及存活。在臨床病理特徵上，可以發現VDAC1的表現量與基質侵犯深度有關（侵犯深度超過10 mm）、腫瘤大小有關（腫瘤直徑超過4 cm）。將VDAC1表現量、臨床病理特徵及存活進行分析，可以發現VDAC1與基質侵犯深度呈現高度相關。於是我們阻斷子宮頸癌細胞的VDAC1，發現VDAC1會

影響細胞增生及移行的能力。阻斷VDAC1後的子宮頸癌細胞株，粒線體膜電位會下降並增加活性氧（ROS）。雖然VDAC1的表現量下降，但並不影響細胞週期（cell cycle）及細胞自噬（autophagy）相關基因的表現。順鉑（cisplatin）的細胞毒性也會隨著VDAC1的減少而增強，且某些化合物會干擾VDAC1及hexokinase的結合。綜合言之：在子宮頸癌的治療策略上，可以將VDAC1做為標靶，減少細胞的增生及移行，提高順鉑的協同治療，並降低順鉑的使用量。

Key words: Voltage-dependent anion channel 1、基因靜默、細胞生長、粒線體膜電位、子宮頸癌

英文摘要：

Two-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry were performed to investigate the influence of human nonmetastatic clone 23 type 1 (nm23-H1), a metastasis-associated gene on proteomic alterations in cancer cells of the uterine cervix. It was validated by RT-PCR and Western blot analysis. The expression of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) was increased in nm23-H1 gene silenced SiHa or CaSki cervical cancer cells. The clinical

implication was shown that cervical cancer tissues with positive VDAC1 immunoreactivity exhibited deep stromal invasion (>10 mm in depth) and large tumor size (> 4 cm in diameter). Cervical cancer patients with positive VDAC1 immunoreactivity displayed higher recurrence and poorer overall survival than those with negative VDAC1. Silencing of VDAC1 reduced cell proliferation and migratory ability. Mitochondrial membrane potential was decreased and reactive oxygen species generation was increased in the VDAC1 gene-silenced cervical cancer cells. Cell cycle progression and autophagy were not changed in VDAC1 silencing cells. The cytotoxicity of cisplatin was significantly enhanced by knockdown of cellular VDAC1 and the compounds that interfere with hexokinase binding to VDAC. Therapeutic strategies may be offered using VDAC1 as a target to reduce cell growth and migration, enhance the synergistic therapeutic efficacy of cisplatin and reduce cisplatin dose-limiting toxicity.

Key words: voltage-dependent anion channel 1, gene silencing, cell growth, mitochondrial membrane potential, uterine cervical cancer

緒言：

先前的研究我們發現 nm23-H1 會影響子宮頸癌細胞株 SiHa 及 Caski 的增生，我們由基因晶片發現，nm23-H1 會影響 VDAC1 的表現，所以我們假說認為 VDAC1 和子宮頸癌有關。Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) 主要位於細胞粒線體外膜，組合成受電壓影響而改變離子通透之孔道。VDAC1 可能因與 pro-apoptotic 或 anti-apoptotic protein 結合，而影響子宮頸癌細胞凋亡、生長或存活。Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) 是粒線體重要成分，負責粒線體外膜(outer mitochondrial

membrane)的通透，調控細胞凋亡(apoptosis)或存活(survival)。

1. 探討子宮頸癌中，VDAC1 與子宮頸癌細胞增生、凋亡、轉移表徵、ROS 的關係。VDAC1 與 hexokinase 和 anti-apoptotic proteins 如 Bcl-2、Bcl-xL 是否會結合，進而對抗癌細胞凋亡。進一步探討 VDAC1 和自噬蛋白的相關性，藉以釐清 VDAC1 和自噬的關係。

我們第一年計畫已經培養出阻斷 VDAC1 之 SiHa 及 Caski 子宮頸癌細胞株 (shVDAC1 #128、#564、#418、#509)，並以 RT-PCR 及 Western blot 確認有確實阻斷 VDAC1 之表現。並使細胞的增生、轉移降低。使用 boyden chamber 及 wound healing assay，發現阻斷 VDAC1 的子宮頸癌細胞的移行能力呈現有意義的下降。第二年時有發現 VDAC1 的表現量不影響細胞週期，但會使粒線體膜電位下降，並於第三年發現，VDAC1 減少會增加 cisplatin 的細胞毒性。阻斷 VDAC1 後之 SiHa 細胞且有細胞自噬的現象。第三年計畫執行時，發現當 VDAC1 表現下降時，SiHa 之 ROS 表現量上升，但在 CaSki 細胞則無。

2. 分析子宮頸癌病人與 high-grade 和 low-grade cervical intraepithelial neoplasia (high- and low-grade CIN) 病人及正常對照組婦女，其 VDAC1 之表現差異，並和子宮頸癌化、臨床病理特徵或病人復發及存活作相關性分析。

將本院蒐集的子宮頸癌病人與 high-grade 和 low-grade cervical intraepithelial neoplasia (high- and low-grade CIN) 病人及正常對照組婦女，已完成製作三片組織晶片，並進行 IHC 染色，評估 VDAC1 之表現差異，並和子宮頸癌臨床病理特徵、轉移、復發及存活作相關性分析。

3. 分析子宮頸癌細胞中，VDAC1 based peptides、jasmonate family 和 clotrimazole，與 anti-apoptotic Bcl-2 family proteins 或 hexokinase 結合情形，藉以了解此兩類蛋白在

子宮頸癌治療的重要性，並應用 VDAC1-based peptides 於子宮頸癌病人之治療，改善病人預後。

第一年計畫發現阻斷 VDAC1 之子宮頸癌細胞株在 cisplatin 1.25 和 2.5 μM ，阻斷 VDAC1 的細胞的毒殺效果更強，在失去 VDAC1 功能的情況下，cisplatin 的毒殺效果似乎會加強，因為 VDAC1 會和 hexokinase，增加細胞的存活。若使用 VDAC-1 based peptides、jasmonate family 和 clotrimazole 等會干擾 VDAC1 和 hexokinase 結合的藥物，應該會增加 cisplatin 的毒殺作用。第二年以 methyl jasmonate 及 clotrimazole 共同處理 cisplatin，結果發現，共同處理 methyl jasmonate 或 clotrimazole，對子宮頸癌細胞的毒殺效果並沒有顯著提升。

4. 分析 VDAC1 與 cisplatin 抗藥性的關係，並進一步探討 VDAC1 表現和患者對抗癌藥物 cisplatin 反應及對病患預後是否有影響。並發展出新的藥物或治療模式，當作未來癌症治療用藥參考。

已經培養出阻斷 VDAC1 之 SiHa 及 Caski 子宮頸癌細胞株，發現阻斷 VDAC1 之子宮頸癌細胞株，處理 cisplatin 5 or 20 μM ，阻斷 VDAC1 的 Caski 的粒線體膜電位下降更為明顯，但在 SiHa 則無明顯變化。

實驗步驟：

一、雙維電泳分析

收取阻斷 nm23-H1 之子宮頸癌細胞株 SiHa 之蛋白，先以 IEF 將不同等電點的蛋白分離，再將作用完畢之 IEF 置於 SDS-PAGE 上，將 IEF 上分離之蛋白質再依不同分子量分離。分離後染色，再進行掃描分析。找出表現有差異之蛋白點，將蛋白點切割下來，以液態質譜分析並與資料庫比對。

二、細胞培養

將 Caski (子宮頸癌細胞株) 培養於 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Invitrogen)、SiHa (子宮頸癌細胞株) 及 293T (人類胚胎腎臟細胞) 培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen); 並且包含 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)、Sodium bicarbonate (Sigma, S4019)、L-glutamine (Sigma, G8540-25G)、penicillin (Sigma, P3032)、streptomycin (Sigma, S9137-25G)。

三、VSV-G pseudotyped lentivirus-shRNA system (1) VZV-G psudotyped Lentivirus shRNA production

293T 細胞 2.4×10^6 在 10 cm 培養皿上，取 16 μl jetPEI transfection reagent 利用 500 μl NaCl 稀釋；另外，取 4 μg shRNA plasmid 【RNAi 載體來自於中央研究院 RNAi 核心設施，shRNA 植體系菌株為 shVDAC1 (TRCN0000029128 : 5-CAAGTACAGATGG ACTGAGTA-3'、TRCN0000278564 : 5'-GC TTGGTCTAGGACTGGAATT-3'、TRCN0000297481 : 5'-GCAGTTGGCTACA AGACTGAT-3' 和 TRCN0000278509 : 5'-GCTATGGATTTGGCTTAATAA-3') 和 shLuc (TRCN0000072243)、0.4 μg pMD.G 以及 4 μg pCMV Δ R8.91 並以 500 μl NaCl 稀釋，接著將兩者混合，作用 15~20 分鐘後，加到 293T 細胞中，放置於 P2 實驗室的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱中，12 個小時後，更換新鮮培養液，再於 12 小時後，收集舊的培養液，換置新鮮培養皿，舊的培養液含有來自細胞所釋放並且帶有 shVDAC1 的 VSV-G psudotyped Lentivirus，利用 0.22 mm filter 過濾培養液，去除受損細胞，接者將培養液分裝於冷凍小管中，存放於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。再經過 12 個小時後，收集第二次的病毒，同樣將培養液用 0.22 mm filter 過濾培養液，去除受損細胞，將培養液分裝於冷凍小管中，存放於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。剩餘含有細胞的培養皿，則加入漂白水，滅菌後丟棄。以上實驗皆在 P2 實驗室中操作，所有碰過病毒的器材皆須過漂白水後再丟棄。

(2) Lentivirus shRNA infection of cell

接種 Caski 和 SiHa 細胞 5×10^5 在 6 cm 培養皿上，隔夜後，加入病毒效價 MOI 1 的病毒量，同時在每個孔洞也加入 $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ protamine sulfate 幫助病毒感染細胞。經過 24 小時後，加入含有 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin 的新鮮培養液進行篩選，若有感染病毒的細胞則不會死亡，48 小時後，收集蛋白進行西方點墨法，確認 shRNA 是否真的具有 knockdown 效果，以便進行基因 knockdown 實驗。病毒感染實驗皆在 P2 實驗室中操作，並且所有碰過病毒的器材皆須過漂白水後再丟棄。

四、西方點墨法(Western Blot)

取細胞以 5×10^5 數目種植至 60 mm 培養皿中，在 37°C 細胞培養箱中培養 16 小時，經 48 小時後，將便可將細胞收下。先以 PBS 清洗二次，去除上清液加入 $100 \mu\text{l}$ 的細胞均質緩衝液使細胞溶解，置於冰上待全部樣品皆以製備完畢後再以超音波均質機在 4°C 下將細胞完全打破，反覆兩次每次間隔 10 分鐘以上，之後再以 4°C 離心機轉速為 12000 rpm 離心 20 分鐘，小心吸取上清液，存放置另一乾淨滅過菌的 1.5 ml 微量離心管中並進行蛋白質定量。使用 Bio-Rad protein assay (#500-0006) 測蛋白濃度。接下來將樣品以 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法分析，並在電泳分析完畢前 20 分鐘，先準備一張大小相當的轉漬膜 PVDF membrane (PALL)，用甲醇浸潤一下約 15 秒，再浸泡於 transfer buffer 中約 10 分鐘備用。將分析完畢的電泳片小心取下，利用濕式轉漬器 Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell，透過電源供應器以 100 V 的條件下進行 60 分鐘，使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到轉漬膜上。將 transfer 好的轉漬膜浸泡在含有 5% 脫脂奶粉的 1 倍 TTBS buffer 中，於室溫下 shaking 1 小時，進行 blocking。將已 blocking 完成的轉漬膜分別加入專一性的

一級抗體。利用含有 5% 脫脂奶粉 TTBS buffer 稀釋一級單株(monoclonal)抗體於 4°C 下搖晃至少 16 小時。隔天取出轉漬膜，一級抗體以 1:100 的比例加入 2% 的 sodium azide 作為防腐劑後可回收重複使用，接著以 TTBS buffer 在相同條件下室溫清洗 2 次，每次 10 分鐘。再以 5% 脫脂奶粉之 TTBS buffer 稀釋二級抗體，於室溫下震盪作用 1 小時，重覆上述之清洗步驟。利用 E.C.L. 呈色劑，以 1:1 的方式加入 Enhanced luminol reagent 與 Oxidizing reagent 混合均勻，將 membrane 的正面朝下放入裝有呈色劑的盒子中作用 5 分鐘，以催化 HRP 呈色，並將螢光呈現在 X-光底片上，曝光時間約 3~5 分鐘，再以顯影劑及定影劑將影像沖洗出。

五、細胞增生實驗

(1) 細胞計數

取細胞以 2×10^4 數目種植於 60 mm 培養皿，在第 3、5、7 天，以 Trypsin 將細胞收下、離心，計算細胞的數量。

(2) MTT assay

取細胞以 5×10^3 數目種植於 96 孔盤，在第 2、4、6 天，以含 $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$ MTT (3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 細胞培養液加入細胞，於 37°C 培養箱中靜置 3 小時，將培養液移除，以 $50 \mu\text{l}$ DMSO 溶解，利用全波長酵素分析儀 ELISA reader 來分析，在波長 570 nm 下測其吸光值。

(3) CCK-8 (cell counting kit-8) assay

CCK-8 試劑中含有 WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]，其原理與 MTT 相同。

取細胞以 5×10^3 數目種植於 96 孔盤，在第 2、4、6 天，加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8，根據不同細胞粒線體活性強度，置於 37°C 培養箱中靜置 0.5~4 小時，利用全波長酵素分析儀 ELISA reader 來分析，在波長 450 nm 下測其吸光值。

六、粒線體膜電位 (mitochondrial membrane

potential, MMP) 之測定

細胞種植於 60 mm 培養皿中，在 37°C 細胞培養箱中培養，經 48 小時後，將便可將細胞收下。收細胞的前 10 分鐘加入親脂性陽離子 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) 螢光染劑，使用螢光顯微鏡與流式細胞儀 (FACSCalibur, BECTON DICKINSON) 進行觀察與定量。

粒線體膜電位下降為細胞凋亡過程早期現象之一，JC-1 的型態會隨粒線體膜電位變化而改變，在正常細胞中，帶正電的 JC-1 會進入帶負電的粒線體中並形成多聚體 (aggregated JC-1)，此時 JC-1 發紅色螢光；當粒線體膜電位下降時，JC-1 從粒線體中釋出並變成單聚體 (monomeric JC-1)，此時 JC-1 發綠色螢光。

七、ROS 測定

細胞種植於 60 mm 培養皿中，在 37°C 細胞培養箱中培養，經 48 小時後，將便可將細胞收下。收細胞的前 30 分鐘加入 ROS 染劑 (10 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H₂DCFDA)，使用流式細胞儀 (FACSCalibur, BECTON DICKINSON) 進行觀察與定量。

八、組織晶片 (tissue array) 製作

樣本經由福馬林固定 (Formalin-fixed) 並經由石蠟包埋 (paraffin-embedded) 之 96 孔組織晶片 (Tissue Microarray)。組織樣本來自於中山醫學大學醫院婦產科之病人群，經病理科醫師對所有經 H&E (hematoxyline and eosin) 染色的切片再次加以確認診斷，圈選出最具代表性的病灶部位，再回原包埋封存蠟塊中，找出相對應之病灶部位，以油性不褪色的記號筆做上標記。將蒐集之組織蠟塊置於 37°C 中，反應 30 分鐘，以直徑 1.5 mm 檢體採集專用穿刺

針取樣，依順序排列重新包埋製成陣列組織晶片蠟塊。這個組織晶片再經由切片機，以 5 μ m 厚度連續切片，將切出來的組織固定於特殊處理之玻璃片上，進行染色。

九、免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

在組織晶片中，我們利用組織免疫染色方法評估子宮頸檢體的免疫染色。組織晶片切片在二甲苯中脫蠟並且利用酒精脫水：100% 酒精 5 分鐘 2 次 → 95% 酒精 5 分鐘 2 次 → 80% 酒精 5 分鐘 → 75% 酒精 5 分鐘 → 復水 (rehydration) → 3% H₂O₂ 浸泡 15 分鐘，抑制內生性過氧化氫酶的活性，再利用檸檬酸鈉緩衝液 (2.1 g/100 ml; pH 6.0) 並微波加熱 60°C 5 分鐘處理兩次，每次五分鐘，促使抗原恢復表現。將組織晶片切片置於 VDAC1 抗體 (1:600, Anti-VDAC1/Porin antibody-Mitochondrial Loading Control (ab15895), Abcam Inc.) 中，於 4°C 下反應一個晚上。接著藉由卵白素-生物素過氧化酶 (streptavidin-biotin peroxidase, DAKO) 進行染色。產生的棕色是利用 0.04% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 當作受質，最後再利用吉爾氏蘇木素染色液 (Gill's Hematoxylin) 進行複染，使細胞核呈藍色。以 PBS 取代初級抗體當作陰性對照組。陽性對照組則使用人類肝組織組織玻片。

實驗結果：

一、雙維電泳及液態質譜分析

在之前的計畫，我們將 nm23-H1 阻斷後觀察 nm23-H1 在子宮頸癌細胞株中扮演何種角色。因此我們以雙維電泳及液態質譜分析找出 nm23-H1 會影響哪些蛋白的表現，選出 15 點進行 LC-MS 分析。在第 13 點的位置鑑定出為 VDAC1 蛋白表現增加，做為本次計畫的研究目標 (Figure 1)。並以 RT-PCR 及 western blot 證實。

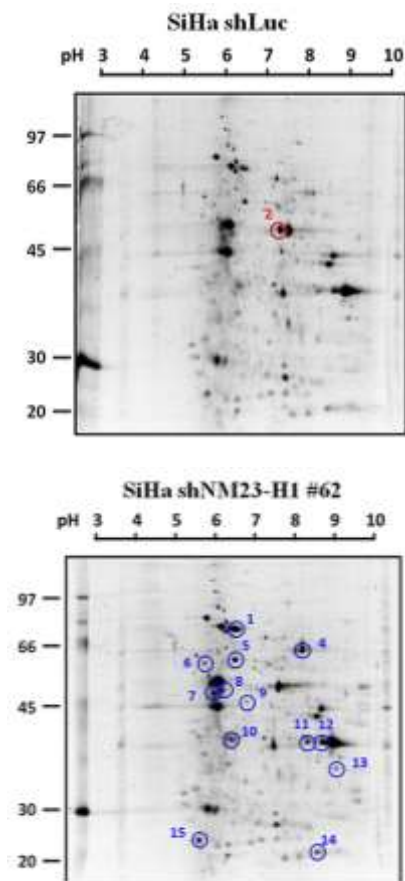


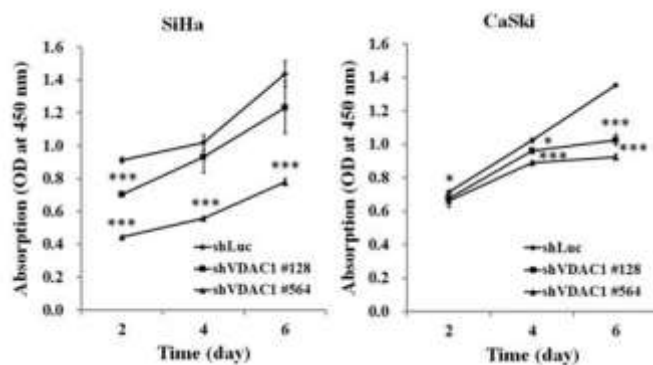
Figure 1. The influence of nm23-H1 on VDAC1. Two-dimensional gel analysis of the nm23-H1-correlated differentially expressed proteins. Equal amounts (150 μ g) of cell lysates were separated on 11-cm (pH 3-10) linear gradient IPG strips using 10% SDS PAGE. A molecular marker was loaded on the left-hand side. It revealed elevated (blue circle) and reduced (red circle) expressions of some proteins after SiHa cancer cells of the uterine cervix were infected with lentiviruses carrying shnm23-H1 #62 compared to those with control vector (shLuc). The point 13 denotes VDAC1.

二、阻斷 VDAC1 對細胞增生之影響

由於 VDAC1 會與 hexokinase、anti-apoptotic Bcl-2 family proteins 結合，因此 VDAC1 和細胞的代謝、ATP 的產生及細胞凋亡有關，因此我們阻斷子宮頸癌細胞之

VDAC1 後，第一年以 western blot 確認將 VDAC1 阻斷後，以細胞計數的方式來分析 VDAC1 是否會影響細胞的增生，結果發現，細胞中 VDAC1 表現量，會影響細胞的增生，VDAC1 越少，細胞增生越慢。經由 MTT assay 及 CCK-8 assay 的結果 (Figure 2A, B)，其結果與之前的細胞計數結果一致。

(A)



(B)

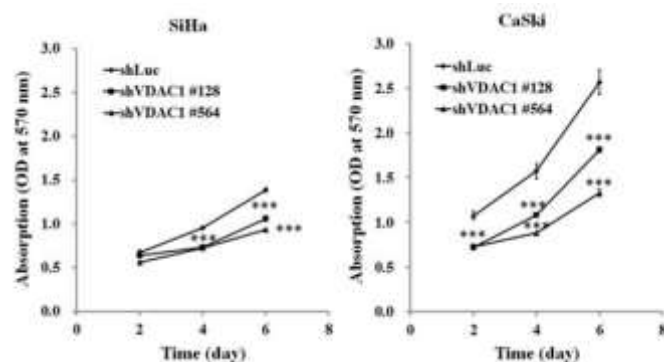
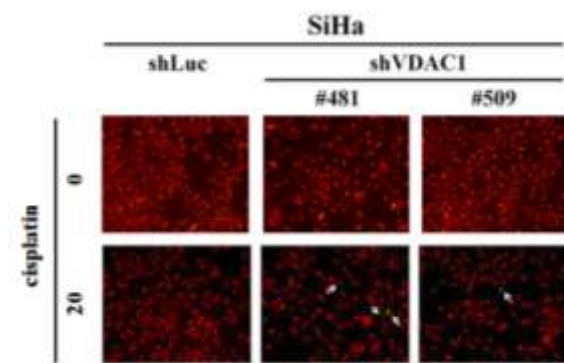


Figure 2. Effects of shVDAC1 on cell proliferation and viability in SiHa and CaSki cells. SiHa (left) and CaSki (right) shVDAC1 #128, #564 or shLuc cells (5×10^3 /well) were seeded in a 96 well plate and analyzed by A. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay and B. MTT assay every 48 h under monolayer culture conditions. Each growth curve represents the mean \pm SD of triplicate experiments. All values are means \pm SD from at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

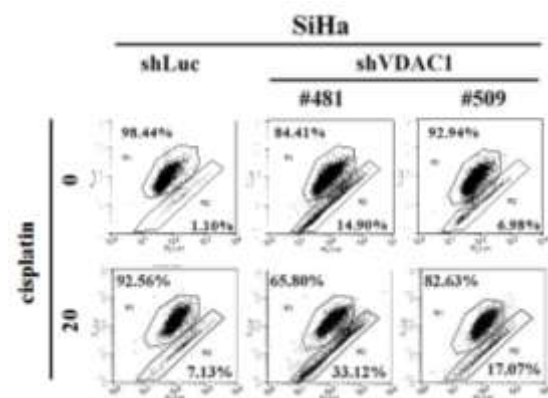
三、阻斷 VDAC1 處理 cisplatin 對粒線體膜電位之影響

由於 VDAC1 位於細胞粒線體外膜，組合成受電壓影響而改變離子通透之孔道，調控細胞凋亡(apoptosis)或存活(survival)。因此第二年將 VDAC1 阻斷後之 Caski 及 SiHa 子宮頸癌細胞株，使用 JC-1 染劑，觀察粒線體膜電位之變化。結果發現 VDAC1 阻斷後，粒線體膜電位明顯下降(綠色螢光部分)使用流式細胞儀分析可以發現有統計上的差異。第三年將 VDAC1 阻斷後，可以發現 SiHa (處理 cisplatin 20 μ M) 其粒線體膜電位有下降，紅色螢光變成綠色螢光訊號，量化後由 14.90%增加到 33.12% (Figure 3A, B)，然而 Caski (處理 cisplatin 5 μ M) 粒線體膜電位更明顯下降，量化後由 25.26%增加到 60.57% (Figure 3C, D)。

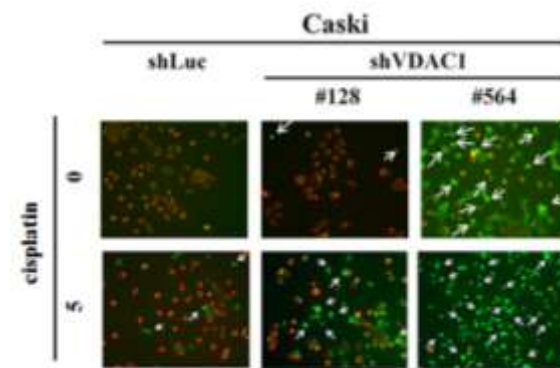
(A)



(B)



(C)



(D)

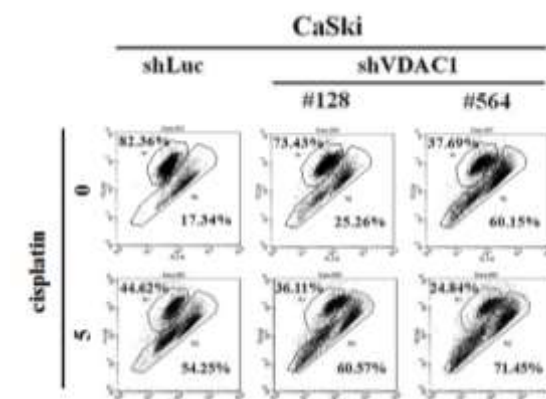


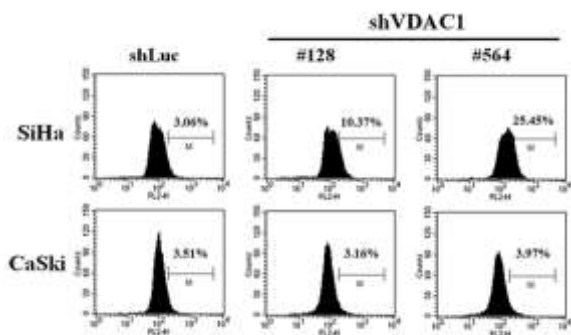
Figure 3. Effects of shVDAC1 on MMP in SiHa and CaSki cells. A. SiHa shVDAC1 #481 and #509 and C. CaSki shVDAC1 #128, #564 and shLuc cells were treated with cisplatin (5 or 20 μ M) for 48 hours. Representative images of SiHa shVDAC1 #481 and #509 and CaSki shVDAC1 #128, #564 and shLuc cells stained with JC-1 (magnification, $\times 100$). White arrows indicate green fluorescence (monomeric JC-1). B. SiHa shVDAC1 #481 and #509 and D. CaSki shVDAC1 #128, #564 and shLuc cells were treated with cisplatin (5 or 20 μ M) for 48 hours. Changes in MMP were assessed by the intensity of red fluorescence (R1) and green fluorescence (R2) of JC-1. VDAC1, voltage-dependent anion channel 1; MMP, mitochondrial membrane potential.

四、阻斷 VDAC1 對細胞活性氧 (ROS) 之影響

由於阻斷 VDAC1 會影響細胞的增生、移行及粒線體膜電位的變化，因此欲探討 VDAC1 的表現是否會影響子宮頸癌細胞株的活性氧。以流

式細胞儀觀測，阻斷 VDAC1 後細胞中 ROS 之表現。在 Caski 細胞中，ROS 的表現量並沒有顯著差異，但 SiHa 的 ROS 表現量則有明顯上升 (Figure 4A)。以 western blot 檢測 ROS 相關蛋白的表現，結果發現 Caski 的 NOX1、SOD2 及 GPX1/2 都沒有差異，只發現 catalase 表現量有明顯上升，SiHa 只有 shVDAC1 #564 之 catalase 略微上升 (Figure 4B)。故推測阻斷 VDAC1 後，CaSki 及 SiHa 之 ROS 表現量皆上升，但 CaSki 之 catalase 表現量上升以代謝 ROS。

(A)



(B)

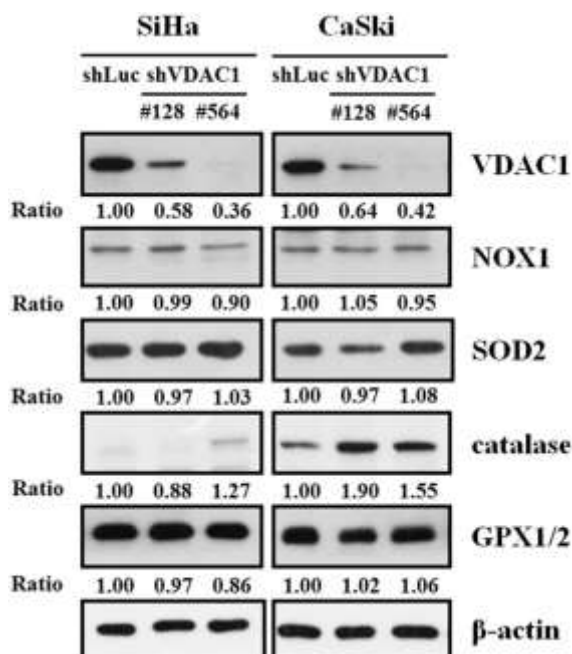


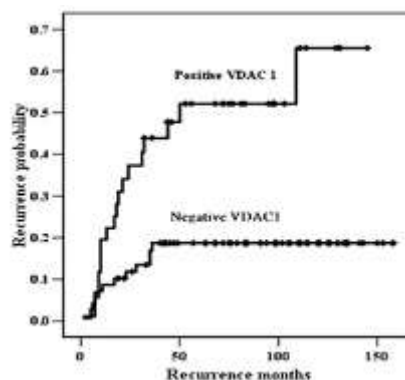
Figure 4. The effects of shVDAC1 on ROS. A. The ROS of SiHa and Caski shVDAC1 #128, #564 or shLuc cells was analyzed by

H₂DCFDA staining using flow cytometry. No significant change was found in VDAC1 gene silence CaSki cervical cancer cells. ROS express was significantly reduced after VDAC1 gene silence in SiHa cervical cancer cells. B. Effects of shVDAC1 on the metabolizing enzymes of reactive oxygen species. VDAC1, NOX1 (NADPH oxidase 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), catalase and GPX1/2 (glutathione peroxidase 1/2) protein levels were determined on Western blot using protein lysates from parental and VDAC1-knocked down cervical cancer cells. β -actin was used as the internal control. The relative ratios of VDAC1/ β -actin, NOX1/ β -actin, SOD2/ β -actin, catalase/ β -actin and GPX1/2/ β -actin are shown.

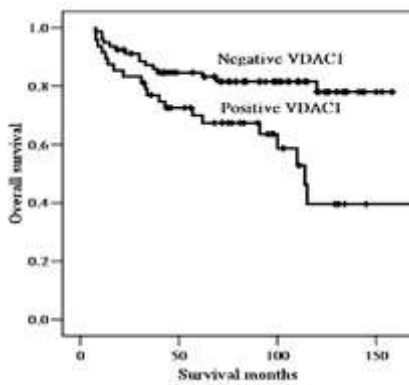
五、組織晶片免疫組織化學染色

利用組織免疫染色，分析組織檢體中 VDAC1 蛋白表現。結果發現，子宮頸癌組織的 VDAC1 表現量高於正常的子宮頸組織。以 SPSS 統計軟體分析，發現子宮頸癌病人中，VDAC1 表現量多寡與復發及存活有相關性，VDAC1 表現較強時，有較高的復發情形，且總存活率及經 Cox regression 調整後的存活率較差 (Figure 5A, B and C)。在臨床病理特徵上，可以發現 VDAC1 的表現量與基質侵犯深度 (侵犯深度超過 10 mm, $p < 0.001$)、腫瘤大小 (腫瘤直徑超過 4 cm, $p = 0.001$) 有關 (Table 1)。將 VDAC1 表現量、臨床病理特徵及存活進行多變量分析，可以發現 VDAC1 與基質侵犯深度呈現高度相關 ($p < 0.001$) (Table 2)。

(A)



(B)



(C)

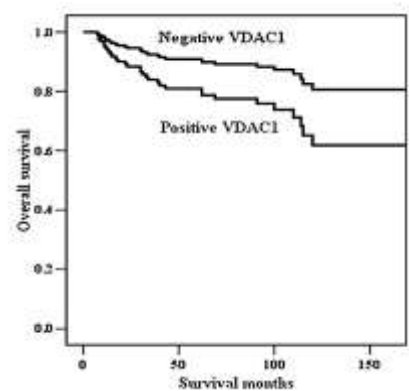


Figure 5. Kaplan-Meier curves for the probability of recurrence and overall survival in cervical cancer patients ($n = 150$) as well as the survival curves from a Cox proportional hazards model based on the VDAC1 protein expression in cancer tissue cores of the uterine cervix. A. Cervical cancer patients with positive VDAC1 immunoreactivity had a higher probability of recurrence ($p=0.0025$) compared to those with negative VDAC1 immunoreactivity. B. Cervical cancer patients with positive VDAC1 had worse overall survival ($p=0.0036$). The log-rank test was used for statistical comparisons for the Kaplan-Meier curves. C. After adjusting for other variables using the Cox proportional hazards model, cervical cancer patients with positive VDAC1 immunoreactivity had a

lower overall survival rate than those with negative VDAC1 immunoreactivity ($p=0.048$). VDAC1, voltage-dependent anion channel 1.

Clinicopathological variables ^a	VDAC1 ^b		<i>p</i> values	OR and 95% CI
	(+)	(-)		
Stage			0.334	
I	34	61		1.00
others	22	28		1.41 (0.66-3.00)
Pathologic type			0.080	
squamous cell carcinoma	53	71		1.00
adenocarcinoma	6	19		0.42 (0.13-1.21)
Depth of uterine invasion:			<0.001	
≤10 mm	12	46		1.00
>10 mm	40	37		4.14 (1.80-9.88)
Tumor diameter			0.001	
≤4 cm	30	66		1.00
>4 cm	24	14		3.77 (1.60-9.00)
Tumor grade			0.011	
well	3	18		1.00
moderate or poor	47	60		4.70 (1.25-26.11)
Parametrial invasion			0.141	
no invasion	41	73		1.00
invasion	17	17		1.78 (0.76-4.15)
Vaginal invasion			0.150	
no invasion	45	77		1.00
invasion	14	13		1.84 (0.73-4.66)
Pelvic lymph node metastasis			0.526	
no invasion	43	70		1.00
invasion	15	19		1.29 (0.54-2.99)

Table 1. The correlation of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) immunoreactivity in 150 cancer tissue microarrays with clinicopathological parameters of cancer of the uterine cervix.

Statistical analysis: chi-square test.

^aSome clinicopathological data could not be collected from the patients with cervical cancer due to incomplete records of medical charts.

^b(+): positive immunoreactivity; (-): negative immunoreactivity. The median value of all H scores in 150 cervical cancer cores was determined as the cutoff point to separate VDAC1 positive from VDAC1 negative tissue cores. Semiquantitative H score of VDAC1 immunoreactivity was calculated by multiplying the proportion score of stained cells by their immunoreactivity intensity.

OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Clinicopathological and VDAC1 variables*	Case number	5-year survival rate (%)	Hazard ratio	95% confidence interval	p value
Univariate analysis					
Stage					
I	82	83.8	1.00	Reference	0.25
other	45	70.7	1.47	0.75-2.88	
Pathologic type					
squamous cell carcinoma	107	82.7	1.00	Reference	0.38
adenocarcinoma	21	60.7	1.72	0.78-3.79	
Depth of stromal invasion					
≤10 mm	49	98.0	1.00	Reference	<0.001
>10 mm	70	67.0	6.62	2.63-28.6	
Tumor diameter					
≤4 cm	81	90.0	1.00	Reference	0.0068
>4 cm	36	60.9	2.56	1.26-5.21	
Tumor grade					
well	16	93.8	1.00	Reference	0.090
moderate or poor	96	78.4	4.78	0.65-35.71	
Parametrial invasion					
no invasion	95	85.9	1.00	Reference	0.003
invasion	32	59.4	2.65	1.36-5.18	
Vaginal invasion					
no invasion	103	80.2	1.00	Reference	0.44
invasion	25	75.8	1.35	0.61-2.88	
Pelvic lymph node metastasis					
no invasion	96	84.0	1.00	Reference	0.011
invasion	30	62.2	2.38	1.19-4.76	
VDAC1 immunoreactivity					
negative	80	84.7	1.00	Reference	0.0036
positive	48	70.0	2.61	1.33-5.12	
Multivariate analysis					
VDAC1 immunoreactivity					
negative	80	84.7	1.00	Reference	0.048
positive	48	70.0	2.22	1.01-4.90	
Depth of stromal invasion					
≤10 mm	49	98.0	1.00	Reference	0.002
>10 mm	70	67.0	6.79	2.04-22.6	

Table 2: Univariate and multivariate analyses of the influence of clinical parameters and voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) on survival of patients with cancer of the uterine cervix.

Statistical analysis: Kaplan-Meier product limit method and univariate and multivariate Cox regression models.

*Some clinicopathological data could not be collected from the patients with cervical cancer due to incomplete records of medical charts.

討論：

我們先前的研究發現，阻斷 SiHa 之 nm23-H1 的表現，會促進細胞增生。在本計畫中發現，阻斷 nm23-H1 會使 VDAC1 的

mRNA 及蛋白的表現量上升。有研究指出，阻斷 nm23 會影響基質金屬蛋白酶的表現，增加 Rac1 並與轉移有關之路徑，如 MAPK 及 SPKs [1]，且 nm23 活化會激發 TRPV5，產生鈣離子流 [2]，由於阻斷 nm23 導致 TRPV5 活性降低，為了調控鈣離子通透，而使 VDAC1 表現量增加 [3]。阻斷 VDAC1 會使粒線體膜電位下降，並產生 ROS。由於 VDAC1 是位於粒線體外膜的通道蛋白，可輸送離子、核苷酸及其他代謝物，因此 VDAC1 在代謝及能量的動態平衡上扮演重要的角色 [4, 5]。

我們的研究發現子宮頸癌的 VDAC1 表現量比正常組之高。有研究指出，除了子宮頸癌，VDAC1 在肺癌、甲狀腺癌和卵巢癌組織中有高度表現 [6]。VDAC1 表現量高的病人，其復發風險較 VDAC1 表現量低的高，且五年存活率也較差。以多變量分析其他臨床病理特徵，VDAC1 表現量高的病人其總體存活較差。亦有文獻指出，VDAC1 可做為乳腺癌、大腸癌及肺癌臨床病理及預後之生物指標 [7]，過度表現的 VDAC1 在非小細胞肺癌，復發及存活之時間較短 [8]。

將子宮頸癌細胞株 CaSki 及 SiHa 之 VDAC1 阻斷後，細胞的生長明顯受到抑制。有研究指出，T-Rex-293 細胞的 VDAC1 阻斷後，產生的 ATP 會減少，且細胞的生長受到抑制，當 VDAC1 的表現減少 90%，細胞的生長會非常緩慢 [9]。

VDAC1 存在於哺乳類細胞中，在癌細胞中高度表現 [9]，其通道開關，受到電壓調控，而有梨子選擇性，在低電壓 (10 mV) 下，通道會是打開的狀態 [10]。當 VDAC1、ANT 及 cyclophilin D 結合的通道長期處於打開的狀態，粒線體的通透性改變，進而使粒線體破裂，最後造成細胞死亡 [11]。此時粒線體之膜電位下降。

阻斷 VDAC1 後，ROS 明顯在 SiHa 細胞中增加，但 CaSki 則無。為了證實 ROS 在不同子宮頸癌細胞中之差異，我們檢測阻斷 VDAC1 之 CaSki 及 SiHa 其 ROS 代謝酶的表現，結果發現 CaSki 的 catalase 表現量上升，即阻斷 VDAC1 之 CaSki 細胞中會增加 catalase 的表現量以清除過氧化氫。有研

感謝科技部 NSC102 – 2314 – B – 040 –
014 – MY3

計劃提供此研究經費

以下為已發表著作：

1. Lin YS, Liu YF, Chou YE, Yang SF, Chien MH, Wu CH, Chou CH, Cheng CW, **Wang PH*** (2014, Sep) Correlation of chitinase 3-like 1 single nucleotide polymorphisms and haplotypes with uterine cervical cancer in Taiwanese women. PLoS One 9;9(9):e104038. (Impact factor: 3.534, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES, ranking: 8/55). (NSC 102-2314-B-040-014-MY3).
2. Yang SF, Wu TF, Tsai HT, Lin LY, **Wang PH*** (2014, Apr). New markers in pelvic inflammatory disease. Clin Chim Acta 20;431:118-24. (Impact factor: 2.764, MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGY, ranking: 7/31). (NSC 102-2314-B-040-014-MY3).
3. Su YF, Wu TF, Ko JL, Tsai HT, Tee YT, Chien MH, Chou CH, Lin WL, Low HY, Chou MY, Yang SF, **Wang PH*** (2014, Mar). The expression of ribonucleotide reductase M2 in the carcinogenesis of uterine cervix and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of cancer patients. PLoS One 9(3):e91644. (Impact factor: 3.534, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES, ranking: 8/55). (NSC 102-2314-B-040-014-MY3).
4. Wu CH, Ko JL, Chen SC, Lin YW, Han CP, Yang TY, Chien MH, **Wang PH*** (2014, Feb). Clinical implications of aldo-keto reductase family 1 member C3 and its relationship with

究指出，ROS會促進cytochrome c的釋放[12]，而過度表現的HK1及HK2可以抑制粒線體ROS的釋放[13]。在癌細胞中有Warburg效應，為高效的糖解作用導致乳酸的生成[14, 15]。Hexokinase (HK) 將葡萄糖磷酸化，在許多癌症發現HK1及HK2有過度表現，HK會與VDAC1結合[16]，HK可直接使用粒線體所產生之ATP將葡萄糖磷酸化，並可干擾VDAC1與Bax或Bak作用，防止cytochrome c的釋放，造成細胞死亡[17, 18]。HK2與VDAC1結合變少，會導致H₂O₂產生，使細胞死亡[13, 19]。因此，將VDAC1阻斷後，抑制了HK2和VDAC1的結合，降低糖解作用及能量的產生、增加ROS並抑制細胞的生長。但VDAC1的減少，並不會影響細胞週期及細胞自噬。

腫瘤細胞透過糖解作用產生乳酸，其被輸出細胞，產生低pH環境，此酸性微環境會保護腫瘤，使其免受免疫系統的攻擊，並對週遭正常細胞造成傷害[20]。當阻斷VDAC1後，HK2不能與VDAC1結合，即不能使用粒線體所產生之ATP使葡萄糖磷酸化，進而影響Warburg效應，影響細胞而無法移行。

我們發現，在阻斷VDAC1後之子宮頸癌細胞株CaSki及SiHa，會增加順鉑之細胞毒性。除了阻斷VDAC1的表現，我們還使用methyl jasmonate及clotrimazole這兩種干擾VDAC1及HK2結合的藥物，進而增強順鉑的細胞毒性。

經由本研究計畫的發現，VDAC1可以做為減少細胞生長、轉移的治療策略，使VDAC1表現降低可增強順鉑的協同治療效果，降低化療藥物的劑量及減輕化療的副作用。

誌謝：

lipocalin 2 in cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 132(2):474-82. (Impact factor: 3.687, OBSTETRICS & GYNECOLOGY, ranking: 7/78). (NSC 102-2314-B-040-014-MY3).

5. **Wu CH, Lin YW, Wu TF, Ko JL, Wang PH. (2016, Jan) Clinical implication of voltage-dependent anion channel 1 in uterine cervical cancer and its action on cervical cancer cells. *Oncotarget*, 7(4): 4210–4225. (Impact factor: 5.008, ONCOLOGY, ranking: 36/213). (NSC 102-2314-B-040-014-MY3).**

計畫參考論文：

1. Boissan M, De Wever O, Lizarraga F, Wendum D, Poincloux R, Chignard N, Desbois-Mouthon C, Dufour S, Nawrocki-Raby B, Birembaut P et al: Implication of metastasis suppressor NM23-H1 in maintaining adherens junctions and limiting the invasive potential of human cancer cells. *Cancer research* 2010, 70(19):7710-7722.
2. Cai X, Srivastava S, Surindran S, Li Z, Skolnik EY: Regulation of the epithelial Ca(2)(+) channel TRPV5 by reversible histidine phosphorylation mediated by NDPK-B and PHPT1. *Molecular biology of the cell* 2014, 25(8):1244-1250.
3. Keinan N, Pahima H, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V: The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 1833(7):1745-1754.
4. Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N: VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular aspects of medicine* 2010, 31(3):227-285.
5. Colombini M: VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 2012, 1818(6):1457-1465.
6. Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, Krelin Y, Tripathi SS: The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochimica et biophysica acta* 2015, 1848(10 Pt B):2547-2575.
7. Ko JH, Gu W, Lim I, Zhou T, Bang H: Expression profiling of mitochondrial voltage-dependent anion channel-1 associated genes predicts recurrence-free survival in human carcinomas. *PloS one* 2014, 9(10):e110094.
8. Grills C, Jithesh PV, Blayney J, Zhang SD, Fennell DA: Gene expression meta-analysis identifies VDAC1 as a predictor of poor outcome in early stage non-small cell lung cancer. *PloS one* 2011, 6(1):e14635.
9. Simamura E, Shimada H, Hatta T, Hirai K: Mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDACs) as novel pharmacological targets for anti-cancer agents. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2008, 40(3):213-217.
10. Gincel D, Silberberg SD, Shoshan-Barmatz V: Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2000, 32(6):571-583.
11. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 2007, 87(1):99-163.
12. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G: Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003, 17(15):2202-2208.
13. Sun L, Shukair S, Naik TJ, Moazed F, Ardehali H: Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II. *Molecular and cellular biology* 2008, 28(3):1007-1017.
14. Pedersen PL: Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2007, 39(3):211-222.
15. Brahim-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J: Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* 2007, 85(12):1301-1307.
16. Shoshan-Barmatz V, Zakar M, Rosenthal K, Abu-Hamad S: Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochimica et biophysica acta* 2009, 1787(5):421-430.
17. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL: The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective

therapies. *Biochimica et biophysica acta* 2010, 1797(6-7):1225-1230.

18. Pastorino JG, Hoek JB: Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2008, 40(3):171-182.
19. da-Silva WS, Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L, Oliveira MF, Galina A: Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279(38):39846-39855.
20. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/24

科技部補助計畫	計畫名稱: 電位調控型離子通道蛋白失衡與human nonmetastatic clone 23 type 1的相互調控及其應用策略開發標靶治療子宮頸癌及其預後之評估
	計畫主持人: 王博輝
	計畫編號: 102-2314-B-040-014-MY3 學門領域: 婦產科
無研發成果推廣資料	

102年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：王博輝			計畫編號：102-2314-B-040-014-MY3				
計畫名稱：電位調控型離子通道蛋白失衡與human nonmetastatic clone 23 type 1的相互調控及其應用策略開發標靶治療子宮頸癌及其預後之評估							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		5	篇	1. PLoS One (2014) 9;9(9):e104038. 2. Clin Chim Acta (2014) 20;431:118-24. 3. PLoS One (2014) 9(3):e91644. 4. Gynecol Oncol (2014) 132(2):474-82. 5. Oncotarget (2016) 7(4): 4210 - 4225.
			研討會論文		0		
專書			0	本			
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		

		商標權	0		
		營業秘密	0		
		積體電路電路布局權	0		
		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	1		
		專任助理	1		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

Wu CH, Lin YW, Wu TF, Ko JL, Wang PH. (2016) Oncotarget, 7(4): 4210 - 4225.

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

我們發現，在阻斷VDAC1後之子宮頸癌細胞株CaSki及SiHa，會增加順鉑之細胞毒性。除了阻斷VDAC1的表現，我們還使用methyl jasmonate及clotrimazole這兩種干擾VDAC1及HK2結合的藥物，進而增強順鉑的細胞毒性。經由本研究計畫的發現，VDAC1可以做為減少細胞生長、轉移的治療策略，使VDAC1表現降低可增強順鉑的協同治療效果，降低化療藥物的劑量及減輕化療的副作用。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）