

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討內質網壓力誘導 AP-endonuclease (APE1/Ref-1) 過量
表現及其所扮演的角色

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2320-B-041-004-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系(所)

計畫主持人：洪瑞祥
共同主持人：賴明德
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：鄭凱升

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 102年10月30日

中文摘要：肝癌是一個在全世界常見的低治癒率的惡性腫瘤，主要為對化學治療藥物具抗藥性及對放射線治療效果差。從我們的先前研究指出，在肝癌組織可以觀察到內質網壓力及apurinic endoplasmic 1 (APE1)產生的現象。因此，本研究的主軸要去探討在肝癌細胞中內質網壓力跟APE1表現的關係。在此，我們可以看到在HepG2及Huh-7細胞裡內質網壓力可以誘導APE1的表現，我們利用內質網壓力誘導劑tunicamycin及brefeldin A兩種來在HepG2及Huh-7細胞中產生內質網壓力進而促進APE1及內質網壓力標記蛋白質GRP78的表現。APE1的表現是透過transcription level的方式來進行。我們利用免疫螢光來分析發現內質網壓力誘導APE1蛋白質表現是位於細胞核內。此外當我們利用APE1 shRNA來降低APE1的表現時可以觀察到低APE1表現的細胞比APE1過量的細胞更容易死亡。進更進一步，我們利用B型肝炎表面突變蛋白來誘導內質網壓力，在正常的肝細胞NeHepLxHT也可以誘導APE1及GRP78的表現，類似的我們也在人類的肝腫瘤組織中也發現當有內質網壓力時APE1表現量也會增加的情形。此外，我們也發現內質網壓力在MCF-7及Hela細胞可以增加p53的表現，且是透過NF- κ B來去調控，且內質網壓力所誘導p53的表現和內質網壓力誘導細胞死亡有關。在本研究，我們證實內質網壓力可以增加APE1的表現且可能在化學治療藥物的抗藥性及腫瘤發展上扮演一個重要的角色。因此，這樣的結果對內質網壓力和HBV pre-S2 Δ 關的腫瘤提供一個重要的化學治療策略。

中文關鍵詞：肝癌； Huh-7； HepG2； NeHepLxHT, hepatitis B virus； Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein； 內質網壓力； apurinic endonuclease 1； GRP78； NF- κ B； Apurinic / apyrimidinic endonuclease

英文摘要：Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide with poor prognosis due to resistance to conventional chemotherapy and limited efficacy of radiotherapy. From our previous study have indicated that induction of endoplasmic reticulum stress and apurinic endonuclease 1 (APE1) were observed in HCC. Therefore, the aim of this study was to investigate the relationship between endoplasmic reticulum and apurinic endonuclease 1 (APE1) in hepatocellular carcinoma (HCC). Here, we show that the expression of APE1 during ER stress in

HepG2 and Huh-7 cell lines. Tunicamycin or brefeldin A, two ER stress inducers, increased APE1 and GRP78, ER stress marker, expression in HepG2 and Huh-7 cells. Induction of APE1 expression was through transcription level in response to ER stress. We found APE1 nuclear localization during ER stress by using immunofluorescence assay in HepG2 cells. In addition, induction of APE1 expression was correlated cell death in ER stress by shRNA assay. Furthermore, expression of Hepatitis B virus pre-S2Δlarge mutant surface protein (pre-S2Δ, ER stress-induced protein, also increased GRP78 and APE1 expression in normal hepatocyte NeHepLxHT cell line. Similarly, clinical tumor sample showed higher expression of GRP78 and APE1 in liver tissue in vivo. In addition, ER stress increased p53 expression in MCF-7 and Hela cells, and ER stress-induced p53 expression was regulated by NF-κB. Induction of p53 expression by Brefeldin A was correlated to Brefeldin A-induced apoptosis. In this study, our result demonstrates that ER stress and HBV pre-S2Δincreased APE1 expression which may plays an important role in resistance to chemotherapeutic agents or tumor development. Therefore, these data provide an important chemotherapeutic strategy in ER stress and HBV pre-S2Δassociated tumor.

英文關鍵詞： Hepatocellular carcinoma； Huh-7； HepG2； NeHepLxHT, hepatitis B virus； Hepatitis B virus pre-S2Δlarge mutant surface protein； Endoplasmic reticulum stress； apurinic endonuclease 1； GRP78

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

(探討內質網壓力誘導AP-endonuclease (APE1/Ref-1) 過量表現及其所扮演的角色。)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： NSC 101-2320-B-041 -004 -

執行期間： 101 年 8 月 1 日至 102 年 7 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理科技大學生物科技系

計畫主持人：洪瑞祥

共同主持人：賴明德

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 102 年 10 月 25 日

中文摘要

肝癌是一個在全世界常見的低治癒率的惡性腫瘤，主要為對化學治療藥物具抗藥性及對放射線治療效果差。從我們的先前研究指出，在肝癌組織可以觀察到內質網壓力及 apurinic endoplasmic 1 (APE1)產生的現象。因此，本研究的主軸要去探討在肝癌細胞中內質網壓力跟 APE1 表現的關係。在此，我們可以看到在 HepG2 及 Huh-7 細胞裡內質網壓力可以誘導 APE1 的表現，我們利用內質網壓力誘導劑 tunicamycin 及 brefeldin A 兩種來在 HepG2 及 Huh-7 細胞中產生內質網壓力進而促進 APE1 及內質網壓力標記蛋白質 GRP78 的表現。APE1 的表現是透過 transcription level 的方式來進行。我們利用免疫螢光來分析發現內質網壓力誘導 APE1 蛋白質表現是位於細胞核內。此外當我們利用 APE shRNA 來降低 APE1 的表現時可以觀察到低 APE1 表現的細胞比 APE1 過量的細胞更容易死亡。進更進一步，我們利用 B 型肝炎表面突變蛋白來誘導內質網壓力，在正常的肝細胞 NeHepLxHT 也可以誘導 APE1 及 GRP78 的表現，類似的我們也在人類的肝腫瘤組織中也發現當有內質網壓力時 APE1 表現量也會增加的情形。此外，我們也發現內質網壓力在 MCF-7 及 Hela 細胞可以增加 p53 的表現，且是透過 NF- κ B 來去調控，且內質網壓力所誘導 p53 的表現和內質網壓力誘導細胞死亡有關。在本研究，我們證實內質網壓力可以增加 APE1 的表現且可能在化學治療藥物的抗藥性及腫瘤發展上扮演一個重要的角色。因此，這樣的結果對內質網壓力和 HBV pre-S2 Δ 相關的腫瘤提供一個重要的化學治療策略。

關鍵字：肝癌; Huh-7; HepG2; NeHepLxHT, hepatitis B virus; Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein; 內質網壓力; apurinic endonuclease 1; GRP78; NF-kappaB; Apurinic / apyrimidinic endonuclease

英文摘要

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide with poor prognosis due to resistance to conventional chemotherapy and limited efficacy of radiotherapy. From our previous study have indicated that induction of endoplasmic reticulum stress and apurinic endonuclease 1 (APE1) were observed in HCC. Therefore, the aim of this study was to investigate the relationship between endoplasmic reticulum and apurinic endonuclease 1 (APE1) in hepatocellular carcinoma (HCC). Here, we show that the expression of APE1 during ER stress in HepG2 and Huh-7 cell lines. Tunicamycin or brefeldin A, two ER stress inducers, increased APE1 and GRP78, ER stress marker, expression in HepG2 and Huh-7 cells. Induction of APE1 expression was through transcription level in response to ER stress. We found APE1-nuclear localization during ER stress by using immunofluorescence assay in HepG2 cells. In addition, induction of APE1 expression was correlated cell death in ER stress by shRNA assay. Furthermore, expression of Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein (pre-S2 Δ), ER stress-induced protein, also increased GRP78 and APE1 expression in normal hepatocyte NeHepLxHT cell line. Similarly, clinical tumor sample showed higher expression of GRP78 and APE1 in liver tissue *in vivo*. In addition, ER stress increased p53 expression in MCF-7 and Hela cells, and ER stress-induced p53 expression was regulated by NF- κ B. Induction of p53 expression by Brefeldin A was correlated to Brefeldin A-induced apoptosis. In this study, our result demonstrates that ER stress and HBV pre-S2 Δ increased APE1 expression which may plays an important role in resistance to chemotherapeutic agents or tumor development. Therefore, these data provide an important chemotherapeutic strategy in ER stress and HBV pre-S2 Δ -associated tumor.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; Huh-7; HepG2; NeHepLxHT, hepatitis B virus; Hepatitis B virus pre-S2 Δ large mutant surface protein; Endoplasmic reticulum stress; apurinic endonuclease 1; GRP78

背景

肝癌是一個常見的惡性腫瘤且每年在全球影響約一百萬人，造成肝癌的因素相當多如病毒感染、環境毒素、過量飲酒及 transgenic oncogenes [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]。B 型肝炎為主要一個導致肝癌的因素，慢性的 B 型肝炎帶原者約比正常人高出 100 倍的危險因子來得到肝癌，但機制到目前還沒被完全釐清 [8, 9]。在過去我們及合作實驗室發現在 B 型肝炎所導致的肝癌中可以發現 B 型肝炎表面蛋白質有突變的情形，而我們更進一步發現一個主要 B 型肝炎表面蛋白突變的區域，我們稱為 HBV pre-S2 Δ ，大約有三成的 B 型肝炎而產生的肝癌病人可以發現帶有 pre-S2 Δ ，進一步的研究也發現，當在肝細胞過量表現 pre-S2 Δ 會造成內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress; ER stress) [10, 11, 12]。

內質網是一個具有多重功能的胞器，內質網裡面是一個相當特殊的一個環境，除含有高濃度的 Ca²⁺外，它是一個氧化環境的胞器因而可以幫助蛋白質雙硫鍵的形成、摺疊及分泌。在粗糙內質網內有一些 Ca²⁺-dependent 伴隨蛋白 (chaperones) 和摺疊酵素 (folding enzymes) 的蛋白質如 GRP78、GRP94 及 calreticulin 可以幫助穩定蛋白質的摺疊過程，而當有摺疊不正常的蛋白質時則會被留在內質網進行修復或分解 [13, 14]。目前研究發現當細胞內氧化還原異常、內質網 Ca²⁺濃度改變、病毒感染、胺基酸缺乏、葡萄糖缺乏、缺氧及基因突變等因素作用下則會造成不完全摺疊的蛋白質 (unfolded protein) 大量累積在內質網中，因而造成內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress)，進而去影響到細胞正常的運作，過度嚴重的內質網壓力甚至可以威脅細胞的存活 [15, 16]。最近研究也發現在一些生理或疾病狀態下也被證實和內質網壓力有相關，例如 B cells 分化成 plasma cells、第二型糖尿病、病毒感染、腫瘤、缺氧、肥胖及退化性神經疾病。[17,18,19,20,21]。在先前的研究顯示 NF- κ B 在內質網壓力下扮演一個重要角色，尤其在內質網壓力訊息傳遞第二期及第三期。NF- κ B 為一群核內的 transcription factors 所組成，它可以被相當多的訊息傳遞或刺激所活化，並且在生理疾病過程如免疫、發炎、不同組織發育過程及腫瘤中扮演一個非常重要的角色。

APE1 是一種普遍存在細胞內的蛋白質，APE1 主要的功能為當細胞內 DNA 受到內在或外在因子如 alkylators 或氧化壓力的影響而導致 DNA 受損時可以被 base excision repair 系統有效率的修復，而 APE1 在 base excision repair 系統裡是其中之一的主要酵素。除此之外，APE1 也扮演著氧化還原的角色，在 oxidative stress 下可以被活化及對細胞的存活扮演重要角色 [22, 23]。另外，在一些的研究也發現，在一些腫瘤細胞中也常可觀察到 APE1 表現量增加的現象，當腫瘤細胞過量表現 APE1 時跟抗藥性有直接相關性，當利用 siRNA 技術把腫瘤細胞內的 APE1 表現量降低後，發現可以誘導腫瘤細胞死亡及增強腫瘤細胞對放射線或化學治療藥物的敏感度 [24, 25, 26, 27]。同時當把老鼠 APE1 基因剔除後發現老鼠在懷孕第 6-8 周時就會造成死胎的情形，這結果建議 APE1 對於細胞的生存非常的重要 [28,29]。所以綜合這些研究可推論出 APE1 在正常或有壓力情況下會扮演重要角色來保護細胞，而在面臨如內質網壓力或化學藥物所誘導的內質網壓力中 APE1 可能會扮演重要的功能。所以這部份我們將探討內質網壓力下 APE1 所扮演的角色和調控情形及對腫瘤細胞生長的影響。

研究目標

在本計畫中我們將利用內質網壓力誘導劑 tunicamycin 及 brefeldin A 來讓細胞內產生內質網壓力的環境，這兩種誘導劑在先前其他實驗室及我們過去幾年的研究已經大量及廣泛的使用來探討內質網壓力，這些內質網壓力誘導劑所誘導基因的表現基本上在有內質網壓力的腫瘤組織中也觀察類似的現象。另一方面，在過去的研究顯示在腫瘤常常可以觀察到 APE1 有過度表現的情況，初步的結果也顯示在內質網壓力下可以誘導 APE1 的表現，所以本實驗想進一步的去探討在內質網壓力下 APE1 如何被調控。所以接下來我們的研究將分下列幾個方向進行：

- (1) 內質網壓力下對 APE1 mRNA 及蛋白質表現情形及在細胞內之分佈情況。
- (2) preS2 Δ 及人類肝癌組織所產生的內質網壓力下 APE1 表現情形。
- (3) 降低 APE1 的表現量進一步觀察在內質網壓力下對細胞存亡的影響。

結果

1. APE1 與內質網壓力之關係

首先利用 TM 來處理 HepG2 細胞，經 0、6、12、24 小時處理後分析 APE1 mRNA 的表現情形，我們發現內質網壓力可以明顯的誘導 APE1 mRNA 的表現[Figure 1]。另一方面，我們也同時間分析在內質網壓力下 APE1 蛋白質表現的情形，我們以 2.5 μ g/ml tunicamycin 來處理 Huh-7 及 HepG2，經過 0、3、6、12 及 24 小時的處理後分析 APE1 蛋白質的表現量，結果顯示在兩株細胞我們都可觀察到內質網壓力可增加 APE1 蛋白質的含量，另外我們也以免疫螢光法來分析在內質網壓力下 APE1 的表現量及在細胞內的分佈情形 [Figure 2A, B]。

2. 在內質網壓力下 APE1 在細胞的分布情形

更進一步的我們利用免疫螢光法來分析當在內質網壓力下時 APE1 在細胞內分佈的情形，以 TM 或 BFA 來處理 HepG2 細胞後使用 APE1 抗體及 DAPI 來分析之。結果顯示 APE1 可以明顯被內質網壓力所誘導且分佈於核內 [Figure. 3 A, B]

3. APE1 在內質網壓力下所扮演的角色

更進一步的我們利用 APE1 shRNA 的方式來探討當 APE1 表現量下降時對細胞的影響，當我們以 APE1 shRNA 送入 HepG2 細胞後培養 48 小時，之後收集蛋白質並分析 APE1 的表現象。結果顯示 APE1 shRNA 可以明顯的降低 APE1 的表現量，更進一步的發現內質網壓力可降低 APE1 表現量下降的細胞的存活率[Fig. 4 A, B]

4. 利用 HBV preS2 Δ 來誘導內質網壓力並觀察 APE1 表現情形

先前以化學藥劑來產生內質網壓力，所以另一方面我們也使用 HBV pre-S2 Δ 蛋白質來產生內質網壓力，當把 HBV preS2 Δ 表現在 NeHepLxHT 細胞時可以發現 pre-S2 Δ 蛋白質可以誘導

GRP78 的表現，顯示可以誘導內質網壓力，進一步的觀察也發現 APE1 也有過量表現的情形 [Figure 5A]。此外我們也利用 pre-S2 Δ 轉殖鼠來分析，我們以免疫染色法(IHC)來分析之，結果也與前面的符合，在 pre-S2 Δ 轉殖鼠肝臟組織細胞 APE1 表現量也來的比較明顯一點。從此結果顯示當利用 pre-S2 Δ 來誘導內質網壓力，無論是細胞或老鼠肝組織皆可觀察到 APE1 過量表現的情形 [Figure 5B]，而這樣結果也與前面利用 TM 所產生的內質網壓力結果符合。

5. 分析肝腫瘤組織 APE1 及 GRP78 表現情形

同時我們也分析臨床腫瘤組織中有內質網壓力時 APE1 表現情形，我們收集病人腫瘤及正常組織後，收集蛋白質並分析 APE1 及 GRP78 表現情形，結果顯示當在內質網壓力下的腫瘤組織 APE1 表現量也明顯增加 [Figure 6]。

結論

本研究利用內質網壓力來探討 APE1 表現情形及其調控方式，我們證實內質網壓力可以誘導 APE1 表現，同時也證實內質網壓力可以透過 NF- κ B 來去增加 p53 的表現 (目前已發表在 PLoS one 期刊)，未來進一步的深入探討 APE1 在盒內的作用機制，期待能在疾病治療上能找出新的方向，利用新的治療策略來達到更好治療效果。

OPEN ACCESS Freely available online



Endoplasmic Reticulum Stress Stimulates p53 Expression through NF- κ B Activation

Wan-Chi Lin¹, Yu-Chi Chuang², Yung-Sheng Chang^{2,3}, Ming-Derg Lai^{2,3,4}, Yen-Ni Teng⁵, Ih-Jen Su⁶, Clay C. C. Wang⁷, Kuan-Han Lee⁸, Jui-Hsiang Hung^{9*}

文獻

1. Motola-Kuba, D., Zamora-Valdés, D., Uribe, M., Méndez-Sánchez, N. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann Hepatol* 2006, 5: 16-24.
2. Kao, J.H., Chen, D.S. Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver Int* 2005, 25: 696-703.
3. Chen, C.J., Wang, L.Y., Lu, S.N., Wu, M.H., You, S.L., et al. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1996, 24: 38-42.
4. Thorgeirsson, S.S., Grisham, J.W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002, 31: 339-346.
5. Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Lee, H.W., Park, W.S., et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005, 24: 1477-1480.
6. Feitelson, M.A., Sun, B., Satiroglu, Tufan. N.L., Liu, J., Pan, J., et al. Genetic mechanisms of

hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002, 21: 2593-2604.

7. Suzuki, K., Hayashi, N., Yukinori, Y., Yoshihara, H., Miyamoto, Y., et al. Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994, 20: 1231-1236.

8. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993, 53: 919-923.

9. Arbuthnot, P., Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2001, 82: 77-100.

10. Fan, Y.F., Lu, C.C., Chang, Y.C., Chang, T.T., Lin, P.W., et al. Identification of a pre-S2 mutant in hepatocytes expressing a novel marginal pattern of surface antigen in advanced diseases of chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000, 15: 519-528.

11. Fan, Y.F., Lu, C.C., Chen, W.C., Yao, W.J., Wang, H.C., et al. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology* 2001, 33: 277-286.

12. Abe, K., Thung, S.N., Wu, H.C., Tran, T.T., Le Hoang, P., et al. Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children. *Cancer Sci* 2009, 100: 2249-2254.

13. Schroder, M., Kaufman, R.J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 2005 569:29-63.

14. Kleizen, B., Braakman, I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004 16: 343-349.

15. Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* 2002 110: 1383-1388.

16. Tardif, K. D., Mori, K., Siddiqui, A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J. Virol.* 2002 76: 7453-7459.

17. Olga Balague, O., Mozos, A., Martinez, D., Hernandez, L., Colomo, L., Mate, J.L., Teruya-Feldstein, J., Lin O., Campo, E., Lopez-Guillermo A., Martinez, A. Activation of the Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Transcription Factor X Box-Binding Protein-1 Occurs in a Subset of Normal Germinal-Center B Cells and in Aggressive B-Cell Lymphomas with Prognostic Implications *Am J Pathol.* 2009 174: 2337-2346.

18. Özcan,U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.H., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S., Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 2004 306: 457-461.

19. Dimcheff, D.E., Askovic, S., Baker, A.H., Johnson-Fowler, C., and Portis J.L. Endoplasmic reticulum stress is a determinant of retrovirus-induced spongiform neurodegeneration, *J.Virol.* 77: 12617–12629, 2003.

20. Wang, H.C., Wu, H.C., Chen, C.F., Fausto, N., Lei, H.Y., Su, I.J. Different Types of Ground Glass Hepatocytes in Chronic Hepatitis B Virus Infection Contain Specific Pre-S Mutants that May

- Induce Endoplasmic Reticulum Stress. *Am J Pathol.* 2003 163: 2441-2449.
21. Watowich, S.S., Morimoto, R.I., and Lamb, R.A. Flux of the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein through the endoplasmic reticulum activates transcription of the GRP78-BiP gene, *J. Virol.* 65: 3590–3597, 1991.
 22. Ramana, C.V., Boldogh, I., Izumi, T., Mitra, S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95: 5061-5066.
 23. Robertson, K.A., Hill, D.P., Xu, Y., Liu, L., Van Epps, S., et al., Down-regulation of apurinic/aprimidinic endonuclease expression is associated with the induction of apoptosis in differentiating myeloid leukemia cells. *Cell Growth Differ.* 1997,8: 443-449.
 24. Wang D, Luo M, Kelley MR. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol Cancer Ther.* 2004 3: 679-86.
 25. Fung, H., Demple, B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell.* 2005 17: 463-470.
 26. Izumi, T., Brown, D.B., Naidu, C.V., Bhakat, K.K., Macinnes, M.A., Saito, H., Chen, D.J., Mitra, S. Two essential but distinct functions of the mammalian abasic endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 102: 5739-5743.
 27. Cun, Y., Dai, N., Xiong, C., Li, M., Sui, J., et al., Silencing of APE1 enhances sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to radiotherapy in vitro and in a xenograft model. *PLoS One.* 2013, 8:e55313.
 28. Xanthoudakis, S., Smeyne, R.J., Wallace, J. D., Curran, T., The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc. Natl. Sci. USA* 1996 93: 8919-8923.
 29. Demple, B., Sung, J.S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2005 4: 1442-1449.

Figure

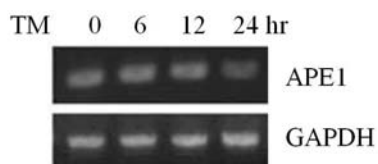


Figure 1. 內質網壓力對 APE1 mRNA 表現的影響。以 TM (tunicamycin)來處理 HepG2 細胞，經過 0、6、12 及 24 小時後收集其 total RNA 並以 RT-PCR 來分析 APE1 及 GAPDH 的表現量。

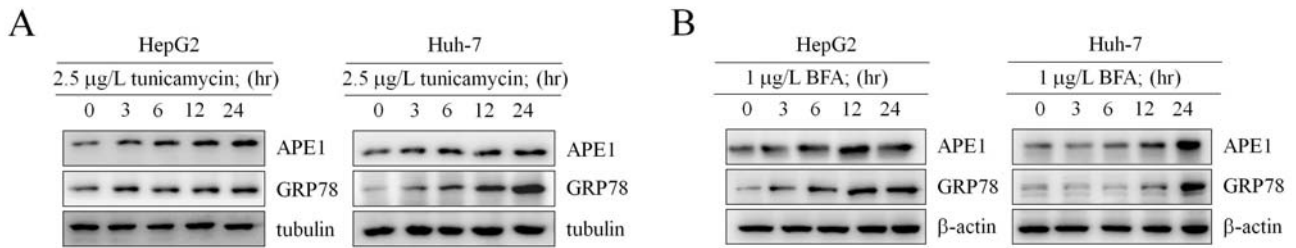


Figure 2. 內質網壓力對 APE1 表現的影響。(A, B) 以 TM 和 BFA 來處理 HepG2 及 Huh-7 細胞，經過 0、3、6、12 及 24 小時後收集其 cell lysate 並以西方墨點法來分析 APE1、GRP78 及 tubulin protein 的表現量。

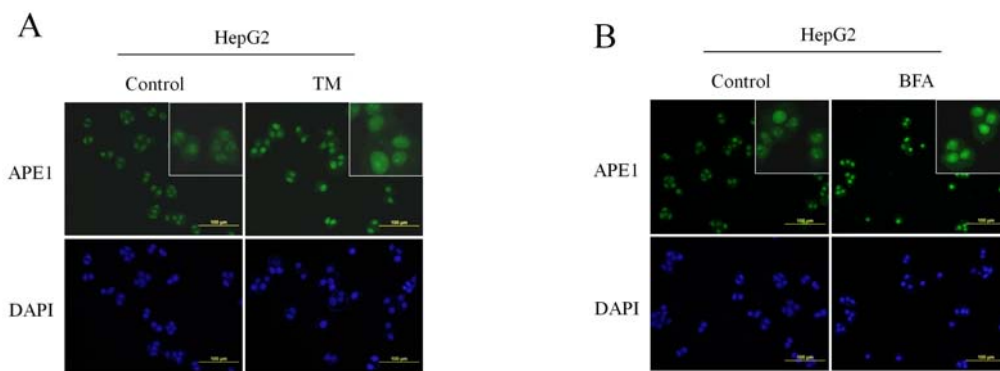


Figure 3. 內質網壓力下對 APE1 分佈的影響。(A, B) 以 TM 和 BFA 來處理 HepG2 細胞，經過 24 小時後以免疫螢光法來分析 APE1 的分佈情形。

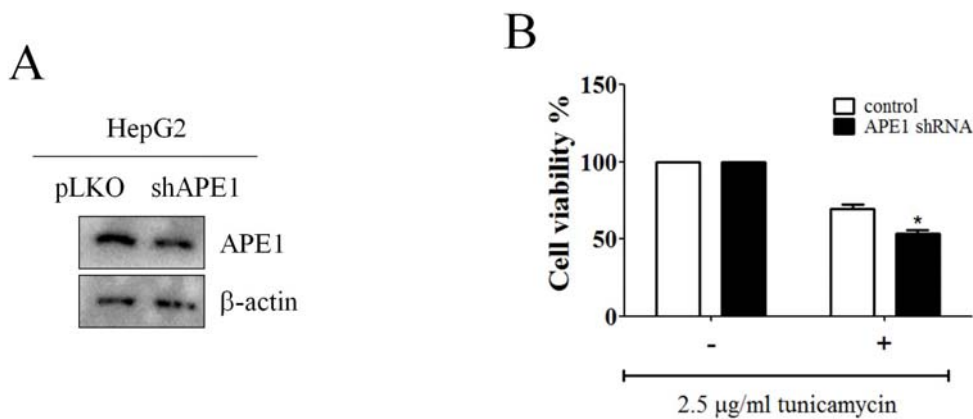


Figure 4. 以 APE1 shRNA 來探討 APE1 和內質網壓力對細胞的影響。(A) 首先以 APE1 shRNA plasmid 送入到 HepG2 細胞裡，經過 48 小時培養後收集蛋白質並以西方點墨法來分析 APE1 及 β-actin 表現量。(B) 同時我們也將這些轉殖有 APE1 的細胞給予 TM (tunicamycin) 經過 48 小時後以 MTT 來測量細胞存活率。 $n=3$, bars, SD (*, $P < 0.05$, Student's t test)。

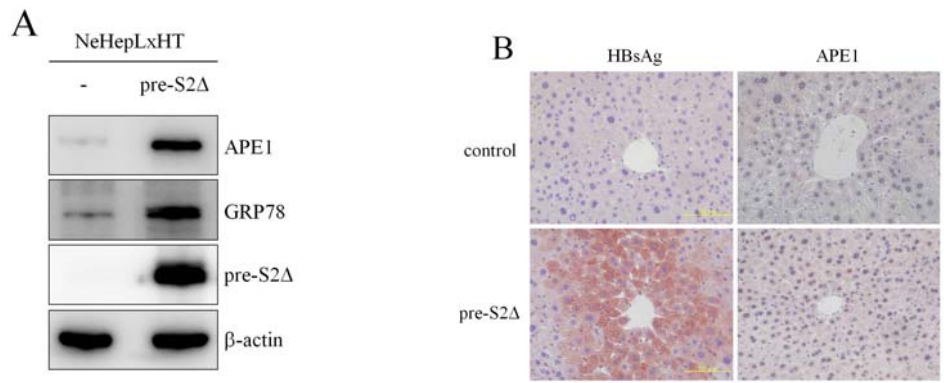


Figure 5. **HBV pre-S2Δ**誘導內質網壓力及 **APE1** 表現。(A)以 pre-S2D 蛋白質在 NeHepLxHT 細胞表現，之後分析以 western blotting 分析 APE1 及 GRP78 的表現。(B) 利用 Immunohistochemistry 分析 pre-S2Δ 轉殖鼠的 APE1 表現情形。

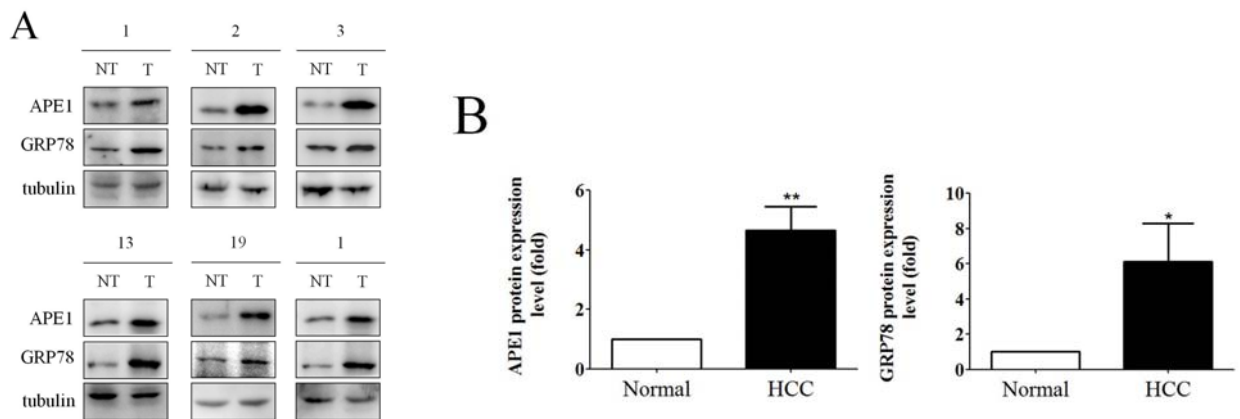


Figure 6. 人類肝腫瘤組織內質網壓力與 **APE1** 的關係。收集人類肝腫瘤細胞後取其 total cell lysate 後利用 western blotting 分析 APE1、GRP78 及 tubulin 表現情形。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/29

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討內質網壓力誘導AP-endonuclease (APE1/Ref-1) 過量表現及其所扮演的角色
	計畫主持人: 洪瑞祥
	計畫編號: 101-2320-B-041-004- 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：洪瑞祥		計畫編號：101-2320-B-041-004-				計畫名稱：探討內質網壓力誘導 AP-endonuclease (APE1/Ref-1) 過量表現及其所扮演的角色	
成果項目		量化			單位	備註 (質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數 (被接受或已發表)	預期總達成數 (含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 (外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>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。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限）

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）

本研究發現內質網壓力可以誘導 APE1 的表現，在過去的研究顯示在很多的腫瘤組織可以觀察到內質網壓力的情形，此外另一些研究也指出在一些腫瘤組織中也可以觀察到 APE1 的過量表現，最近也有一些研究人員把 APE1 表現量降低後發這這些低 APE1 表現的細胞對於放射線治療變得非常敏感且有效，因此在本實驗發現內質網壓力誘導 APE1 的表現，這對未來的藥物設計非常重要，針對內質網壓力誘導 APE1 的訊息傳遞路徑進行抑制即可降低 APE1 的表現，對未來化學治療可能會有更好的療效，因此本計畫提供一個可能的治療策略針對內質網壓力誘導 APE1 的機制。