

# 中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

052002

「肽」強了—Q4-15a-1 抗癌胜肽輔助化療藥物  
對胃癌的作用與其機制探討

學校名稱：國立宜蘭高級中學

作者： 高二 林宥李 高二 林奕辰	指導老師： 陳馨
-------------------------	-------------

關鍵詞：胃癌、抗癌藥物、抗癌胜肽

## 摘要

胃癌是國人常見的癌症之一，常見的化學藥物治療常造成嚴重的抗藥性，而標靶藥物雖效果較好但價格昂貴，我們欲探討胜肽 Q4-15a-1 能否與化療藥物 5-FU (5-Fluorouracil) 達到協同抑制癌細胞的效果，並找出 Q4-15a-1 的胞內作用機制，希冀未來可降低 5-FU 的使用量。本研究使用 AGS ( Adenocarcinoma gastric cell line ) 胃癌細胞株，由細胞存活率結果可知單獨給予 Q4-15a-1 在 30.88  $\mu\text{M}$  可抑制細胞生長；單獨給予 5-FU 則在 9.14  $\mu\text{M}$  能抑制細胞生長。而同時給藥時，達最佳抑制效果僅需 12.04  $\mu\text{M}$  Q4-15a-1 與 3.56  $\mu\text{M}$  5-FU。在探討 Q4-15a-1 抑癌機制中，Annexin V-FITC/PI 雙染法及細胞週期實驗得知 Q4-15a-1、5-FU 和藥物組合可皆促使細胞走向凋亡；再以西方墨點法確認凋亡途徑，由凋亡調控蛋白表現量推測，Q4-15a-1 誘發外源性凋亡；藥物組合誘導的是內源性凋亡及 Parthanatos 途徑。

## 壹、 前言

### 一、研究動機

胃癌為世界癌症罹患率第七名，以及全球癌症死亡人數第四名，也居於宜蘭縣癌症罹患率第四位，是國人常見的惡性腫瘤。(衛生福利部, 2021) 胃癌的主要治療方針為化學療法，以注射化學藥物抑制癌細胞的增生和阻斷其自我修復的能力。但長期使用會有抗性細胞產生的問題，隨著治療時間增加，藥物作用效果遞減。因此，解決此抗藥性問題為臨床實務的當務之急。

目前有癌症研究發現一種新型藥物——抗癌胜肽，可以利用其傾向接負電物質之特性有效抑制腫瘤細胞的生長。( Tornesello, A. L. et al, 2020 )

然而，其製造成本過高，尚不適合量產，因此若能將胜肽混和化療藥物一起使用，找到抑制胃癌細胞生長效果最好之濃度，如此可以解決化療藥物的抗藥性問題，增加藥物的抑癌效果，同時亦可以處理胜肽價格昂貴的情況。此外，我們的目標還包含更進一步破解胜肽 Q4-15a-1 抑制癌細胞的胞內途徑，未來能更精準的改良 Q4-15a-1，使其優化版能達到更好的抑癌效果。

## 二、目的

- (一)、探討分別處理胜肽 Q4-15a-1 和化療藥物 5-FU 對 AGS 細胞存活率之影響。
- (二)、探討胜肽 Q4-15a-1 與化療藥物 5-FU 混和處理對 AGS 細胞是否能達到協同抑制效果，並訂出兩種藥物之最佳比例。
- (三)、探討胜肽 Q4-15a-1、5-FU 化療藥物及藥物組合啟動細胞死亡之途徑。

## 三、文獻回顧

- (一)、腺病毒胃上皮細胞癌細胞 ( Adenocarcinoma gastirc cell line, AGS )

AGS，腺病毒胃上皮細胞癌細胞，細胞週期約為 20~24 小時，有絲狀偽足，可藉由錨定型連接 ( anchoring junction )貼盤。而胃癌的產生，與生活習慣相關，例如幽門螺桿菌感染、飲酒和吸煙等。根治性手術和化學療法為早期胃癌主要治療方法。患有晚期胃癌並無法接受手術的患者，會施予新輔助化療、放射性療法或分子標靶治療。然而，大多數被診斷出患有晚期胃癌的患者，即使療程結束，由於其轉移潛能高，導致療效不佳。(Pan, W. R. et al, 2015)

## (二)、化療藥物 5-FU ( 5-Fluorouracil )

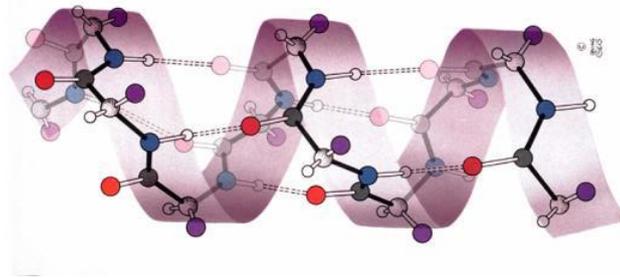
5-氟尿嘧啶 ( 5-FU ) 是一種抗癌藥物，已普遍用於胃癌和結腸癌之治療。5-FU 為尿嘧啶類似物，透過相同的途徑轉運到細胞內。5-FU 可抑制胸苷酸合酶 ( Thymidylate Synthase, TS ) 結合 RNA 和 DNA，並誘導快速生長的癌細胞死亡。但是，在新穎的胃癌治療中 5-FU 的藥物反應率低於 32%，主要因為多種因素引起的 5-FU 抗藥性，包括二氫嘧啶脫氫酶降解 5-FU、增加脫氧尿苷三磷酸酶活性抑或胸苷酸合成酶過度表現等。雖然可增加劑量使藥效回復，但副作用也隨之提升。(Kim, D. Som et al, 2020)

## (三)、抗癌胜肽 ( Anticancer peptide )

抗癌胜肽是胜肽的一種，而胜肽是較短的胺基酸序列所形成之小型陽離子及兩性分子，大多由 12-50 個胺基酸組成。陽離子胜肽會和帶負電的癌細胞膜結合，以區分正常細胞和癌細胞並選擇性進入癌細胞。此外，許多胜肽也能夠藉由形成鍵結來觸發癌細胞釋放細胞毒性訊號，進而讓細胞走向程序性的死亡。依作用對象分為兩大類，其一為對細菌、癌細胞有毒性但對哺乳類細胞無影響，另一類是對三者都有毒性的胜肽。( Tornesello, A. L. et al, 2020 )

現在約有 2400 種抗癌胜肽，依據結構分為四大類： $\alpha$  螺旋 (  $\alpha$ -helical )、 $\beta$  摺板 (  $\beta$ -sheet )、環狀胜肽 ( cyclic ) 以及無特定結構 ( unstructured )。 $\alpha$  螺旋抗癌胜肽佔大多數，可在水中有穩定的形狀並呈螺旋狀作用在細胞膜上。 $\beta$  摺板抗癌胜肽有 2~10 個半胱氨酸 ( Cys ) 排列形成五個雙硫鍵。無特定結構為可彎曲或伸長的線狀的抗菌胜肽，擁有罕見的胺基酸。環狀胜肽是透過一兩個的雙硫鍵來形成環狀的結構。本研究使用的胜肽 Q4-15a-1 為  $\alpha$  螺旋抗癌胜肽，前人曾測試過 Q4-15a-1 在 100  $\mu$ M 下才對哺乳類紅血

球細胞有抑制率 50% 的效果，如此可知，我們所用的胜肽在低濃度（10~30  $\mu\text{M}$ ）下對體細胞而言是安全的。(Ke, P. Y., 2019)



圖一、 $\alpha$  螺旋的結構圖。(Tornesello, A. L. et al, 2020)

在實驗室過去利用胜肽殺癌細胞的研究中，大部分抗癌胜肽的作用有兩種，其一，在細胞外透過特定胺基酸序列、結構、靜電荷、兩親性來破壞細胞膜。其二，干涉細胞膜的通道蛋白讓胜肽進到細胞裡作用並殺死細胞。而有正電荷的抗癌胜肽可輕鬆地和癌細胞膜上的負電物質形成鍵結，會傳遞訊息讓癌細胞自主性的將胜肽吸收入胞內。(Tornesello, A. L. et al, 2020)

#### (四)、細胞凋亡 (Apoptosis)

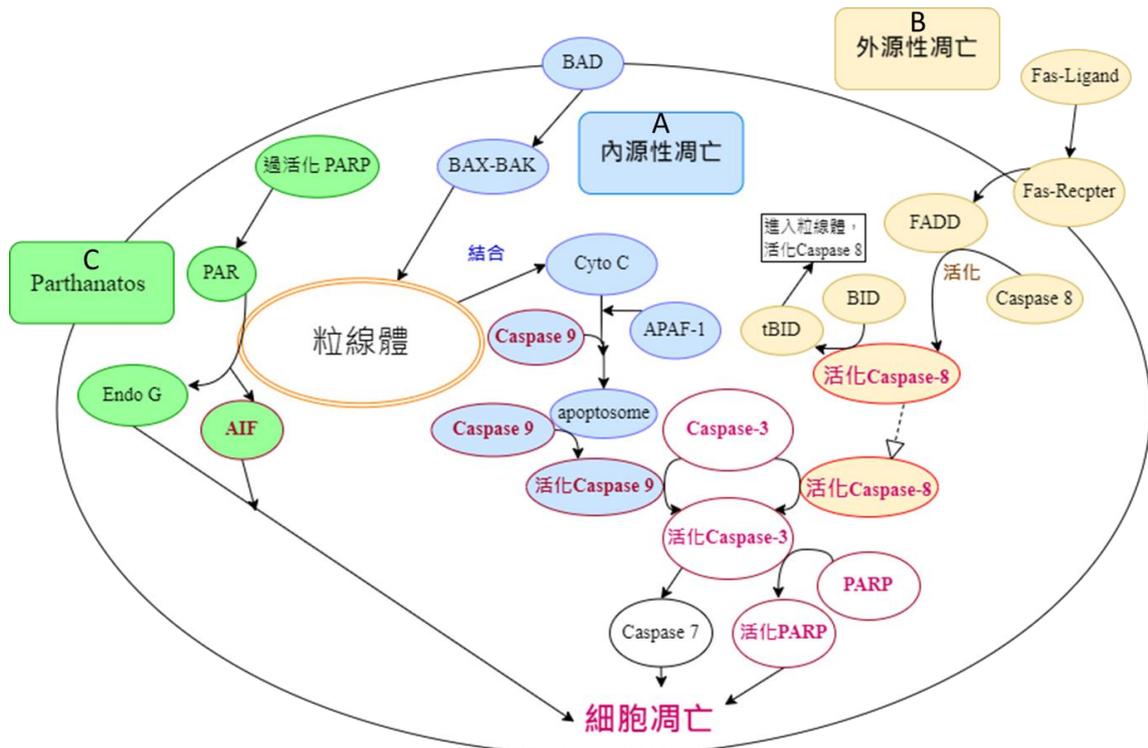
細胞凋亡為一種細胞程序性死亡，目前的研究指出發生凋亡的途徑可分為外源性 (Extrinsic pathway) 和內源性 (Intrinsic pathway)。

外源性途徑中，細胞膜上的死亡受體 (Death ligand) 如 Fas-Receptor 接收到外部死亡訊息 (Fas-Ligand)，FAS 會和胞內接合蛋白 (Fas-associated death domain, FADD) 形成複合體。再活化下游的 Caspase-8，而活化態的 Caspase-8 可以活化 Caspase-3，進而切割許多細胞中重要的蛋白質。或是透過 Caspase-8 切割重組 BH3 結構域凋亡誘導蛋白 (BH3-Interacting Domain Death Agonist, BID)，形成 tBID (truncacated BID)，讓 tBID 進到粒線體，使 Caspase-8 活化，再使 Caspase-3 被活化，形成一系列的

切割，如圖二所示。(Alfons, L. et al, 2003)

內源性途徑中，當細胞受到氧化壓力或 DNA 損傷的刺激時，會活化膜上的 BH3-only protein 家族（如 BAD），促進下游的 BAX-BAK 複合體結合粒線體，使粒線體的膜電位下降，進而使粒線體的細胞色素 C（Cytochrome C, Cyto C）釋放到細胞質中。而細胞色素 C 和 APAF-1（Apoptotic protease activating factor 1）結合後促進去氧核甘酸三磷酸腺苷（tATP）與 APAF-1 產生作用，進而使 APAF-1 的半胱天冬酶募集結構域前體（Caspase Activation and Recruitment Domain, CARD）裸露出來。因此，Caspase-9 的 CARD 可以和 APAF-1 的 CARD 結合，形成凋亡複合體（apoptosome），再使 Caspase-9 被活化，而 Caspase-9 又可以讓 Caspase-3、Caspase-7 被活化，而活化 Caspase-3 可以將 DNA 修復酶 PARP（Poly ADP-ribose polymerase）由 116 kDa 水解成 85 kDa，造成 PARP 失去其原本修復受損 DNA、調控細胞死亡、細胞增殖和維持基因體穩定的作用。(Elmore, S. et al 2006)

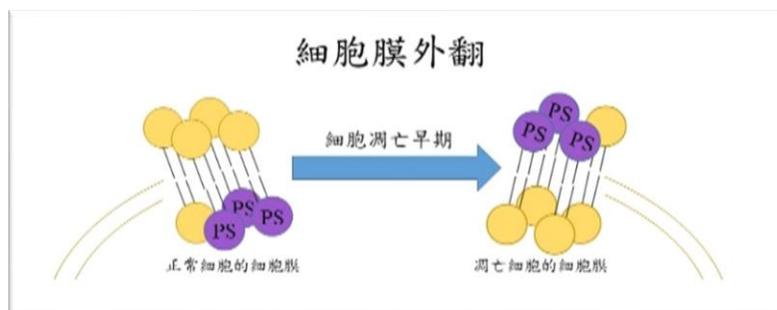
除了常見的凋亡途徑，也有其他較特殊的途徑，如圖二 C Parthanatos 途徑，此為非 Caspase 家族參與而由凋亡誘導因子 Apoptosis-inducing factor (AIF) 調控的途徑。當 DNA 先被破壞，使過活化 PARP 吸收能量使多聚 ADP 核糖（Poly ADP-ribose, PAR）聚合，干擾粒線體機制產生 AIF 及 Endo G，AIF 催化內切核酸酶（Endonuclease G, Endo G）使染色體凝聚及 DNA 片段化。(David, K. K. et al 2009)



圖二、細胞凋亡的三種途徑。

A 為典型內源性的細胞凋亡，B 為外源性的細胞凋亡。典型內源性及外源性在下游皆會使 Caspase 3 活化，並啟動接下來的 Caspase 7 和 PARP，促使細胞凋亡。而 C 為 Parthanatos 途徑，並非透過 Caspase 家族，而是由 AIF 等相關因子形成凋亡。

此外，細胞凋亡以發展進程又分早期和晚期。早期凋亡的細胞，會使其細胞膜會部分外翻，導致帶陰離子的磷脂絲胺酸 Phosphatidylserine ( PS ) 會顯露在外，讓巨噬細胞辨識並吞噬；到了晚期，細胞膜就成不均勻狀，甚至破裂。(Alfons, L. 2003)



圖三、細胞凋亡早期的細胞膜外翻現象圖。

分布在細胞膜內部的磷脂絲胺酸 ( PS ) 會因凋亡而外翻裸露。

## (五)、細胞壞死 (Necrosis)

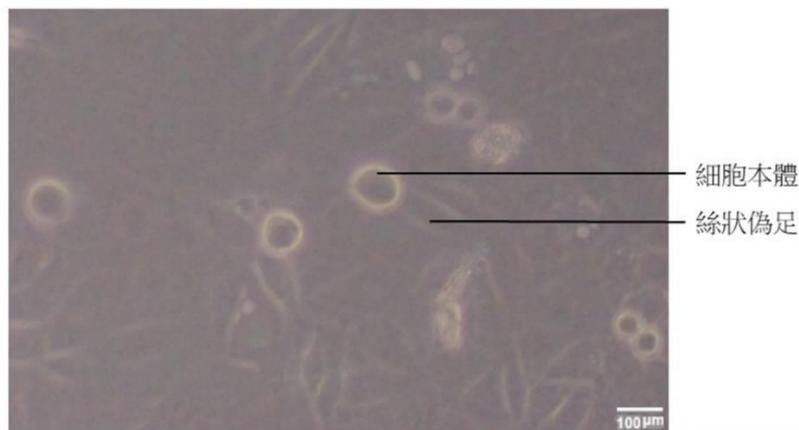
在損傷因子的作用下，細胞的死亡方式稱為壞死。能引起損傷的因子有：物理因子、化學因子、生物因子、缺氧和免疫反應等作用，達到一定強度或持續足夠時間，使細胞的代謝完全停止時，即可引起細胞的死亡。壞死的形態改變包含細胞核和細胞質的改變。細胞核的改變是細胞壞死的主要標誌，會有濃縮及溶解的現象，使染色質分布在細胞質中。而細胞質的基質會崩解，膠原纖維開始腫脹，使細胞膜破裂。(Ke P. Y. et al 2019)

## 貳、 研究設備及器材

### 一、實驗材料

#### (一)、細胞株： Adenocarcinoma gastirc cell line ( AGS )

來自於生物資源保存及研究中心



圖四、AGS 細胞生長狀況。圖中可見 AGS 細胞伸出絲狀偽足。

#### (二)、胜肽：Q4-15a-1

來自於科奈羅公司， Q4-15a-1 是  $\alpha$  螺旋的胜肽 Q4-15 (序列為 KKFATIAKKFINYLW-OH ) 的改良版，把 Tyrosine ( Y ) 替換成帶正電的 Lysine ( K )，並且將 C 端之 -OH 優化為  $-NH_2$  使胜肽多帶一個正電。這新藥稱之為 Q4-15a-1。我們使用 Q4-15a-

1 抗癌胜肽來確認能否有效抑制癌細胞生長，並進行 Q4-15a-1 和 5-FU 藥物組合試驗。

(三)、化療藥物：5-Fluorouracil

來自於友和貿易公司

## 二、實驗藥品

名稱	名稱
二甲基亞砜 ( Dimethyl sulfoxide, DMSO )	放射免疫沉澱法緩衝液 ( Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA )
MTT	ddH <sub>2</sub> O
Medium ( RPMI-1640+FBS+10%抗生素+麩醯胺酸 )	丙烯醯胺( Acrylamide )
磷酸鹽緩衝生理鹽水 ( Phosphate buffered saline , 簡稱為 PBS )	雙丙烯醯胺( Bis-acrylamide )
胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 ( Trypsin-Ethylene diamine tetraacetic acid, Trypsin-EDTA	聚偏二氟乙烯膜( Polyvinylidene Difluoride, PVDF )
十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠 ( SDS-polyacrylamide gel )	過硫酸胺溶液( Ammonium Persulfate, APS )
四甲基乙二胺 ( Tetramethylethylenediamine, TEMED )	牛血清白蛋白( Bovine serum albumin, BSA )
考馬斯亮藍( Coomassie Brilliant Blue )	Running Buffer ( SDS 、 Glycine 、 Tris )
Sharp Protein Marker II	Precision Plus Protein Standards
Transfer Buffer ( 甲醇 、 Glycine 、 Tris )	三羥甲基胺基甲烷 ( Tris Hydrochloride )
Blocking Buffer	6X Protein Sample Dye ( DTT )
四甲基羅丹明乙酯 ( Tetramethylrhodamine, ethyl ester, TMRE )	解偶聯劑 ( Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP )
胎牛血清( Fetal Bovine Serum, FBS )	Annexin V-FITC binding buffer
抗凝血蛋白膜粘連蛋白-5+異硫氰酸熒光素 ( Annexin V-fiber in the curb, Annexin V-FITC )	碘化丙啶 ( Propidine iodide, PI )

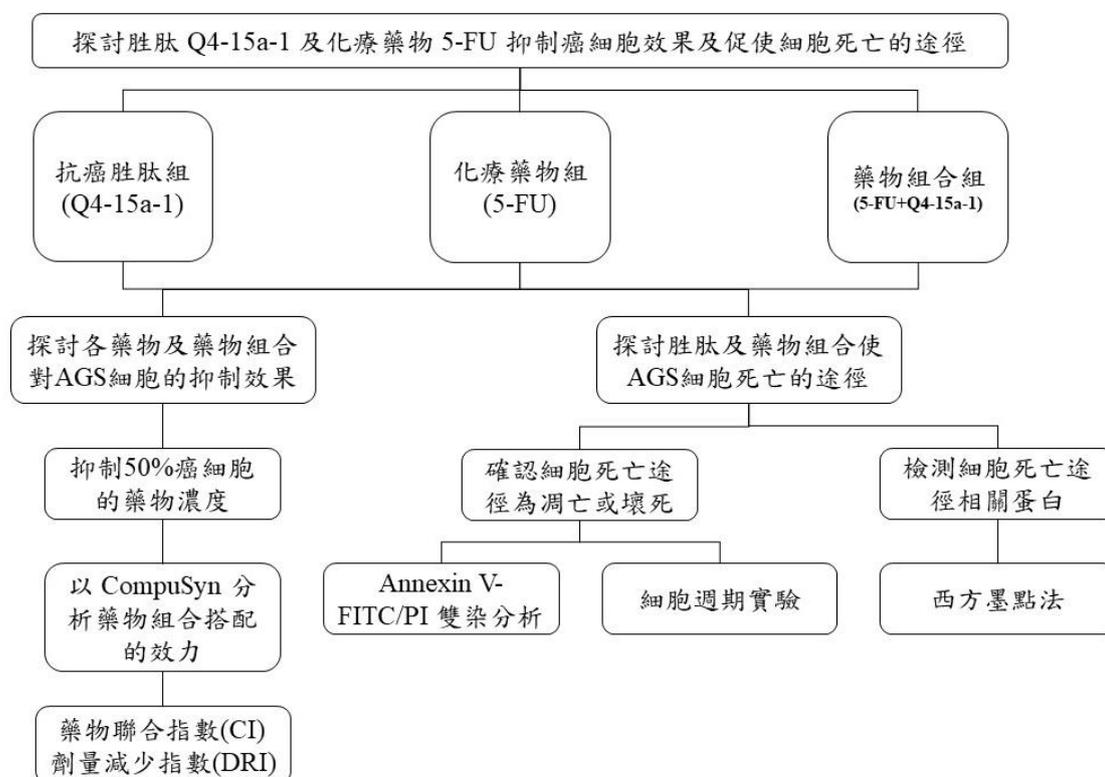
## 三、實驗器材

名稱	名稱	名稱	名稱
離心機	酒精燈	細胞計數盤	流式細胞儀
細胞培養箱	培養皿	載玻片	塑膠吸管(5 和 10 c.c.)

無菌操作台	96-well plate	試鏡紙	照膠系統
光學顯微鏡	ELISA reader	加熱槽	刮杓
電泳槽	-80°C 冰箱	4°C 冰箱	Tube
pipette(電動式與手動式)	離心管	封口膜(Parafilm)	計數器
培養盤	6-well plate	八爪 pipette	鋁箔紙

## 參、研究方法

### 一、實驗架構圖



圖五、實驗架構圖

### 二、研究方法步驟

#### (一)、藥物製備

使用 1.8 mg 的 Q4-15a-1 以 200  $\mu$ L PBS 回溶，並配置成 5 mM 溶液，保存於 -20°C 冰箱。

#### (二)、細胞培養

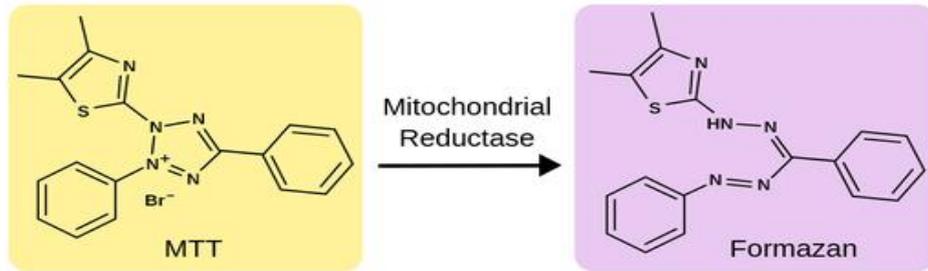
從液態氮取出 AGS 細胞，放入水浴槽回溫於 37°C。再將細胞培養於培養液中，並置於 37°C 中。細胞培養約一次之細胞週期 (24 hr) 時，進行繼代培養 (subculture)。吸取培養皿中的培養液，以 5 ml 的 PBS 清洗一次，去除剩餘培養液。在培養皿加入 1 ml 0.05% trypsin-EDTA，置於 37°C 恆溫培養箱，作用 5 分鐘。再加入 5ml 培養液，終止 trypsin-EDTA 作用。抽取 20  $\mu$ l 細胞液加到 1.5 ml 微量離吸管並加入 20  $\mu$ l trypan blue，進行細胞計數，在計數盤上加入適量的混合液，利用複式顯微鏡估算回容量。其餘細胞液收置 15 ml 的離心管中離心 1500 rpm、5 分鐘。吸去上清液，重新加入培養液回溶並將細胞混合使其均勻分散。吸取 1 ml 細胞液加入含有 9 ml 的培養液之培養皿，再將培養盤置於 37°C 培養箱。

### (三)、細胞存活率分析 (MTT assay)

此方法常用於測出細胞存活率。現今可在細胞毒性試驗、新藥篩選和細胞功能測試與篩選的研究及分析上使用。

#### 1. 原理

MTT ( 3- ( 4,5-Dimethylthiazol-2-yl ) -2,5-diphenyltetrazolium bromide ) 是一種黃色的化合物，也是常見的細胞染料。MTT 與活細胞粒線體作用，使 MTT 還原成非水溶性的藍紫色甲臍 (Formazan) 結晶，並沉積在細胞中。再以 DMSO 有機溶劑將紫色結晶溶解，產生紫色液體。藉由 ELISA reader 測定吸光值，而吸光值代表粒線體的活性，對應活細胞數目，因此即可評估細胞活性。死細胞無法產生琥珀酸脫氫酶，不能使 MTT 發生還原反應，故其吸光值較小。利用藥物作用組吸光值除以控制組來換算 AGS 細胞的存活率。(Mahshid, G. et al 2021)



圖六、 MTT 原理圖。

MTT 被粒線體內的還原酶還原成甲臆。( LABSTER theory, 2018 )

## 2. 步驟

將細胞以  $1 \times 10^4$  cells/well 的密度並以 10% 培養液培養於 96-well 細胞培養盤 24 小時。接著分別加入 100、50、25、12.5、6.25、0  $\mu\text{M}$  的 Q4-15a-1 或是 100、20、4、0.8、0.16  $\mu\text{M}$  的 5-FU，分別培養 48 小時。而藥物組合是先利用前述實驗測出單獨藥物處理之半抑制濃度 ( **Half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>** )，在另一個 96 well 中，分別加 IC<sub>50</sub> 值的 4 倍、2 倍、1 倍、0.5 倍和 0.25 倍的 Q4-15a-1 和 5-FU 至含 0.2% MTT 200  $\mu\text{L}$  的培養液中，作用約二小時後移除培養液。待兩小時後，再加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO 使紫色結晶溶解 ( 避光 ) 十分鐘。最後以 ELISA reader 檢測波長 570 nm 之吸光值，計算細胞存活率。

## 3. CompuSyn ( IC<sub>50</sub>、CI、DRI 值的計算程式 )

CompuSyn 軟體利用質量作用定律的中值效應原理進行簡單的計算機化分析模擬及其組合指標定理。該程式能藉由細胞存活率和藥物濃度，以方程式計算出 IC<sub>50</sub>、藥物聯合指數 ( **combination index, CI** ) 以及劑量減少指數 ( **dose reduction index, DRI** ) ；CI 和 DRI 再分別對致死率 ( **fatality rate, FA** ) 作圖，可分別得出藥物聯合指數曲線和劑量減少指數曲線，作為 Q4-15a-1 和 5-FU 是否有協同抑制癌細胞生存作用之依據。

藥物聯合指數曲線可預測雙藥物之最佳作用濃度與比例，當

CI 值在 1 以下時，代表兩種藥物間有協同作用，一起使用可以造成更好的抗癌效果。劑量減少指數曲線可判斷兩種藥物彼此是否有相互加乘之效果，當 DRI 值在 1 以上時，表示兩者共同使用可以減少彼此的劑量達到該有的致死量，並維持各藥物單獨處理之效果。

由圖七， $D$  (dose) 代表藥物濃度， $fa$  (fatality rate) 為該濃度處理下的細胞抑制率， $fu$  為該濃度處理下的細胞存活率， $D_m$  (dose of median-effect) 為  $IC_{50}$ ， $m$  (move) 是  $fa / fu = (D / D_m)^m$  的次方係數。帶入  $D$ 、 $fa$  和  $fu$  得出  $D_m$  和  $m$ 。由圖八， $(D)_1$  是 Q4-15a-1 的濃度， $(D)_2$  是 5-FU 的濃度， $(D_x)_1$  是藥物組合中 Q4-15a-1 的濃度， $(D_x)_2$  是藥物組合中 5-FU 的濃度。透過輸入藥物濃度，將單一藥物的濃度 ( $D$ ) 放分子，藥物組合的濃度 ( $D_x$ ) 放分母，兩者相加即為 CI 值，公式為  $(D)_1 / ((D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2) = CI$ 。由圖九，透過輸入藥物濃度，將單一藥物的濃度 ( $D$ ) 放分母，藥物組合的濃度 ( $D_x$ ) 放分子，其值為 DRI 值，公式為  $(D_x)_1 / (D)_1 = DRI$ 。(Zhang, N. et al., 2015)

All parameters are calculated from the median-effect principle and equation of the mass-action law  
 $f_a/f_u = (D/D_m)^m$  or  $D = D_m [f_a/(1-f_u)]^{1/m}$  (Chou equation)  
 $\log(f_a/f_u) = m \log(D) - m \log(D_m)$

Thus, the Median-effect Plot (MEP):  $x = \log(D)$   $y = \log(f_a/f_u)$   
gives the slope  $m$ , and the x-intercept  $\log D_m$ , then the antilog of the X-intercept gives the  $D_m$  value.

圖七、 $IC_{50}$  計算法。(Zhang, N. et al., 2015)  
計算法為  $fa / fu = (D / D_m)^m$  並以  $\log$  方便計算。

Combination Index Equation for Two Drugs

$$\frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = CI \quad (3.6)$$

Where in the denominators,  $(D_x)_1$  is the doses of Drug<sub>1</sub> alone that inhibits  $x\%$ . Likewise,  $(D_x)_2$  is the dose of Drug<sub>2</sub> alone that inhibits  $x\%$ . In the numerators,  $(D)_1$  is the portion of Drug<sub>1</sub> in combination  $(D)_1 + (D)_2$  also inhibits  $x\%$ . Again, likewise  $(D)_2$ . Thus  $(D)_1 + (D)_2$  also inhibits  $x\%$ .

圖八、CI 值計算法。(原創力文檔, 2021)  
計算法式為  $(D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 = CI$

$$(DRI)_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1}, \quad (DRI)_2 = \frac{(D_x)_2}{(D)_2}$$

$$(DRI)_1 = \frac{(D_m)_1 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_1}}{(D)_1}, \quad (DRI)_2 = \frac{(D_m)_2 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_2}}{(D)_2}$$

圖九、DRI 值計算法。(Zhang, N. et al, 2015)  
計算法式為  $(D_x)_1 / (D)_1 = DRI$

(四)、Annexin V-FITC/PI 雙染分析

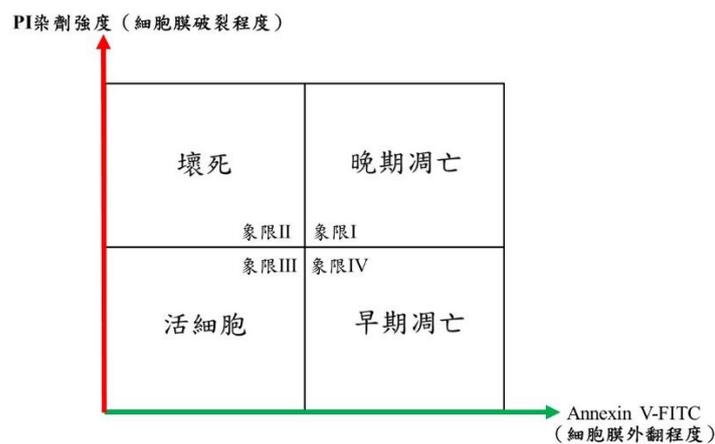
Annexin V-FITC / PI 雙染分析是使用流式細胞儀來進行測量的方法，此分析法可以偵測壞死和凋亡的細胞，常用於藥物途徑檢測，界定藥物使細胞致死機制為壞死還是凋亡。

1. 原理

Annexin V 是一種  $Ca^{2+}$  依賴性磷脂結合蛋白可以和磷脂絲胺酸 (Phosphatidylserine, PS) 結合，綠色螢光 FITC 則用於標記 Annexin V。而 Propidium Iodide Solution (PI) 是 DNA 紅色染劑，其不能自由穿透細胞膜。當細胞和兩染劑都沒有反應時，代表細胞膜完整且細胞正常存活。若細胞只染上 PI，代表細胞膜嚴重破壞且 DNA 裸露，為細胞壞死現象。若細胞只有染上 Annexin V-FITC，代表細胞膜上

朝向細胞內的 PS 外翻，為早期凋亡現象。當細胞同時染上兩種染劑時，則細胞可能處於晚期凋亡。我們利用 Annexin V-FITC/PI 雙染分析了解 Q4-15a-1、5-FU 和藥物組合使癌細胞死亡的方式是凋亡還是壞死。(Emine, K. 2018)

在圖十中，由紅線畫出的四個象限分別為：第一象限代表 Annexin V-FITC 及 PI 皆表現出高螢光強度，為晚期細胞凋亡的特徵；第二象限為 PI 螢光强度高，Annexin V-FITC 螢光強度較低，代表細胞壞死途徑；第三象限中 Annexin V-FITC 及 PI 的螢光強度較低，代表是活細胞；第四象限為 Annexin V-FITC 螢光强度高，PI 所產生的螢光強度較低，為早期細胞凋亡的特徵。



圖十、Annexin V-FITC/PI 雙染分析圖

縱軸為 PI 值，代表細胞破裂程度，破裂程度越大，和 DNA 結合量越高；橫軸為 Annexin V-FITC 值，代表細胞膜外翻程度，外翻程度越大，和 PS 的結合量越高。

## 2. 步驟

將 AGS 細胞培養在兩個 6 well 的培養盤中 24 小時，每個 well 種約 10 萬個細胞。化療藥物組以 9.14  $\mu\text{M}$  的 5-FU、 胜肽組以 30.88  $\mu\text{M}$  的 Q4-15a-1 和藥物組合組之最佳比例濃度：Q4-15a-1 為 12.04  $\mu\text{M}$  及 5-FU 為 3.56  $\mu\text{M}$  加藥作用在 6 well 中，作用時間長分

別為 24 及 48 小時。其中 2 個 well 當對照組。染色時，在每個 well 中加入 300  $\mu\text{L}$  的 Annexin V-FITC binding buffer，加入 Annexin V-FITC 與 PI 染劑各 5  $\mu\text{L}$ ，避光 15 分鐘後，使用流式細胞儀進行分析。

#### (五)、細胞週期試驗

細胞週期進行時，DNA 含量會隨著細胞在不同週期而有增減，利用螢光對細胞進行相對 DNA 含量測定，可以分析細胞各個週期的百分比，並以此檢測死亡方式為凋亡或壞死。

##### 1. 原理

核染劑—PI 可標定核酸，無論是 RNA 或是 DNA 都會被標記。為了避免 RNA 影響結果，使用核糖核酸酶使 (RNase) RNA 水解成小分子，以便觀測 DNA 含量的變化。並利用酒精將細胞的死亡狀況凍住，藉此偵測細胞週期變化。若偵測到的螢光數值小於 DNA 的正常套數 ( $2n$ )，表示有 DNA 片段化的現象發生，死亡方式為凋亡。(Kim, D. Som, et al 2020)

##### 2. 步驟

將 AGS 細胞培養在兩個 6 well 的培養盤中 24 小時，每 well 種約 10 萬個。化療藥物組以 9.14  $\mu\text{M}$  的 5-FU、胜肽組以 30.88  $\mu\text{M}$  的 Q4-15a-1 和藥物組合組之最佳比例濃度：Q4-15a-1 為 12.04  $\mu\text{M}$  及 5-FU 為 3.56 $\mu\text{M}$  加藥作用在 6 well 中，作用時間長分別為 24、48 小時。其中 2 個 well 當對照組。作用時間結束時將每個 well 中的細胞液加入不同的 tube 中，並以酒精 (100%) 3.5 ml 凍住細胞狀態。染色時，在每個 tube 中加入 300  $\mu\text{L}$  的 PBS，加入 RNase 40  $\mu\text{L}$  和 PI 染劑 28  $\mu\text{L}$ ，避光 15 分鐘後，使用流式細胞儀進行分析。

## (六)、西方墨點法 ( Western blot )

又名蛋白質轉漬法、免疫墨點法 ( immunoblot )，是分子生物學、生物化學和免疫遺傳學中常用以檢測蛋白質表現量的方法。利用特定抗體專一結合其抗原蛋白質的原理來對樣品進行著色。通過分析著色的位置和著色深度，獲得特定蛋白質在所分析的細胞或組織中表現情況的資訊，分析檢測特定蛋白質的生物學檢測技術。應用於檢測疾病、訊號傳遞路徑研究及分析、生物標記的發現及驗證。(Thomas, H. S., 2015)

### 1. 原理

採用十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 ( sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE )，而電泳是利用蛋白質和其他分子中所帶不同的電荷或分子量，影響物質在電場中的移動距離 ( 帶電顆粒會往電極相反處移動 )。將經過 SDS-PAGE 分離的蛋白質樣品，轉漬到聚偏二氟乙稀 ( Polyvinylidene fluoride; PVDF ) 膜上，再利用不同宿主所製造出的一級抗體針對特定的蛋白質做專一性結合，而帶有辣根過氧化物酶 ( Horseradish peroxidase; HRP ) 的二級抗體，會針對其不同宿主所製造出的一級抗體再做專一性的結合，最後用化學發光 ( Enhanced-chemiluminescence; ECL ) 上的基質與 HRP 結合，會發出冷光訊號並且將其蛋白質訊號放大，再利用顯影劑維持產生的冷光訊號，經由冷光照膠系統偵測顯影，分析該蛋白質在生物體內的相對變化量。利用西方墨點法檢測 Q4-15a-1 和藥物組合有沒有使 PARP 和 Caspase 3 活化。(Brianna, K., 2017)

### 2. 步驟

在進行電泳前先建立實驗組，包括純勝肽組 ( AGS/peptide )

及以 Q4-15a-1 與 5-FU 之抑制最佳比例濃度進行加藥的藥物組合組 ( AGS/MIX )。純勝肽組的建立方式，以 Q4-15a-1 之 IC<sub>50</sub> 藥量 ( 30.88  $\mu$ M ) 加藥於 4 盤含有 50 萬個 AGS 細胞、培養液的培養皿中，作用時間分別為 6、12、24、48 小時，和一盤無藥之對照組 ( 0 小時)。而藥物組合組以 12.04  $\mu$ M 的 Q4-15a-1 與 3.56  $\mu$ M 的 5-FU 之抑制最佳比例。加藥作用在 4 盤含約有 50 萬個 AGS 細胞的培養皿中，作用時間分別為 6、12、24、48 小時，和一盤無藥物之對照組 ( 0 小時)。分別在 6、12、24、48 小時，各取一盤以刮杓刮細胞，經過 PBS 清洗，以 15 ml tube 離心後再吸入 1.5 ml tube。接著在 1.5 ml tube 之細胞液中加 RIPA Buffer 30  $\mu$ l，離心後吸取上清液加入新的 1.5 ml tube，完成製作 sample 的步驟。

在等待 sample 製作的同時，先行準備鑄膠所用的溶液。其中，下膠需要先加入電泳槽，其成分包含 ddH<sub>2</sub>O 3820  $\mu$ l、30% Acrylamide-0.8%-Bis-acrylamide 5840  $\mu$ l、1.5M Tris-HCl 3500  $\mu$ l、10%SDS 140  $\mu$ l、APS ( 10 mg/ml ) 700  $\mu$ l、TEMED 6  $\mu$ l。上膠等下膠凝固後再加入，其成分包含 ddH<sub>2</sub>O 1770  $\mu$ l、30% Acrylamide-0.8%-Bis-acrylamide 300  $\mu$ l、1.5 M Tris-HCl 750  $\mu$ l、10%SDS 30  $\mu$ l、APS ( 10mg/ml ) 150 $\mu$ l、TEMED 8 $\mu$ l。最後再插入齒梳。

鑄膠後隔天先進行定量測量，以固定濃度的 BSA 加入 bradford 200 $\mu$ l，靜置 10 分鐘後，以 ELISA reader 測吸光值 ( 595nm ) 並算出趨勢線。再以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋 sample ( 1 : 59 )，取 10 $\mu$ l 加至 96 well，再加入 Coomassie Brilliant Blue 200 $\mu$ l，靜置 10 分鐘後測吸光值 ( 595nm )，並求出蛋白含量濃度。取 PCR tube 加入各組求出的溶劑與溶質，以 PCR 控溫 95°C、10 分鐘。

10 分鐘後先以 running buffer 測膠的漏水狀況，再將電泳槽中的齒梳拔除，在兩側空格中加入 3 $\mu$ l Sharp Protein Marker II 及 Precision Plus Protein Standards，並在其餘格中加入 18 $\mu$ l sample。在 70V 電壓下跑電泳 30 分鐘；在 120 V 電壓下跑電泳 90 分鐘。電泳期間，以甲醇活化 PVDF 膜 15 分鐘，以 transfer buffer 活化厚濾紙 10 分鐘。接著進行轉漬（濕轉漬），以 ddH<sub>2</sub>O 洗膠（30 分鐘每 10 分鐘換水）後，將海綿、濾紙、PVDF 膜及 SDS 凝膠夾入轉漬片，在轉漬槽中加入 transfer buffer，在 4 $^{\circ}$ C 環境以 300 mA 進行 2 小時。

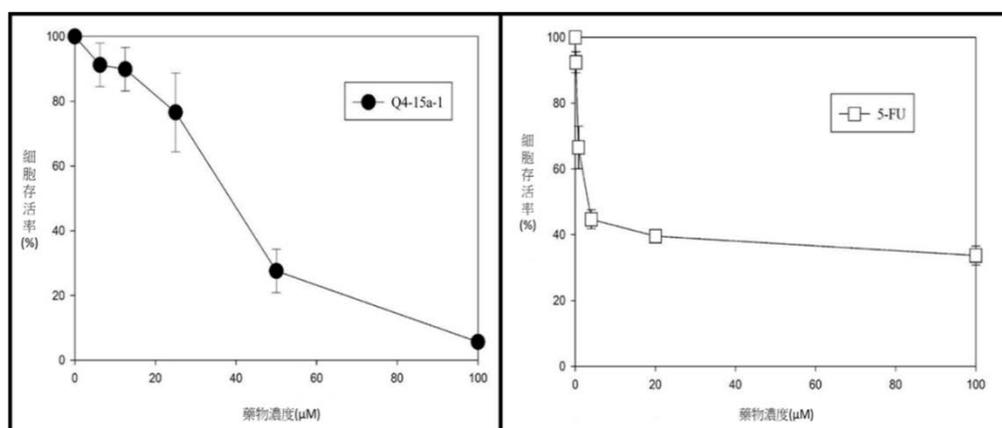
轉漬後以蛋白質分子量裁切 PVDF 膜，再以 blocking buffer 作用 2 小時，加抗體 1（Caspase 9、Caspase 8、Caspase 3、PARP、AIF 和  $\beta$ -actin）作用 17 小時。以 PBST 清洗後，加抗體 2（若抗體 1 之來源為 rabbit，抗體 2 使用 anti-rabbit）作用 1 小時。最後加顯影劑 A、B(ECL) 以冷光照射。

## 肆、 研究結果

### 一、Q4-15a-1、5-FU 對 AGS 細胞存活率之結果

利用 MTT assay 並以 0  $\mu$ M（控制組）、6.25  $\mu$ M、12.5  $\mu$ M、25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M 的 Q4-15a-1 及 0  $\mu$ M（控制組）、0.16  $\mu$ M、0.8  $\mu$ M、4  $\mu$ M、20  $\mu$ M、100  $\mu$ M 的 5-FU 個別加入 AGS 細胞作用 48 小時。從圖十一可知，隨著 Q4-15a-1 劑量增加，對 AGS 細胞有抑制存活的效果。尤其在 25  $\mu$ M ~ 50  $\mu$ M 之間抑制 AGS 細胞生長的效力驟升。5-FU 在 0.04  $\mu$ M ~ 4  $\mu$ M 時對於抑制 AGS 細胞的成長亦有明顯上升的趨勢，但其劑量於 20  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 時並沒有因劑量提高而更加抑制 AGS 細胞，維持在 30%~40%。並由計算得出 Q4-15a-1 的 IC<sub>50</sub> 為 30.88  $\mu$ M；5-FU 的 IC<sub>50</sub> 為 9.14

μM。



圖十一、Q4-15a-1 及 5-FU 對 AGS 細胞存活率的影響。

縱軸為存活率，單位為%。橫軸為濃度，單位為 μM。

## 二、Q4-15a-1 與 5-FU 藥物組合對 AGS 的協同抑制效果之結果

利用 MTT 試驗將 Q4-15a-1 和 5-FU 組以 IC<sub>50</sub> 濃度做 4 倍、2 倍、1 倍、0.5 倍和 0.25 倍的處理，如 1 倍之組別是以 30.88\*1 μM Q4-15a-1 和 9.14\*1 μM 5-FU 進行加藥，並使用 0 μM 當控制組，如表一。實驗結果在 CompuSyn 計算後，得藥物組合組的 IC<sub>50</sub> (Q4-15a-1 和 5-FU 的最佳比例)，並加以作圖。

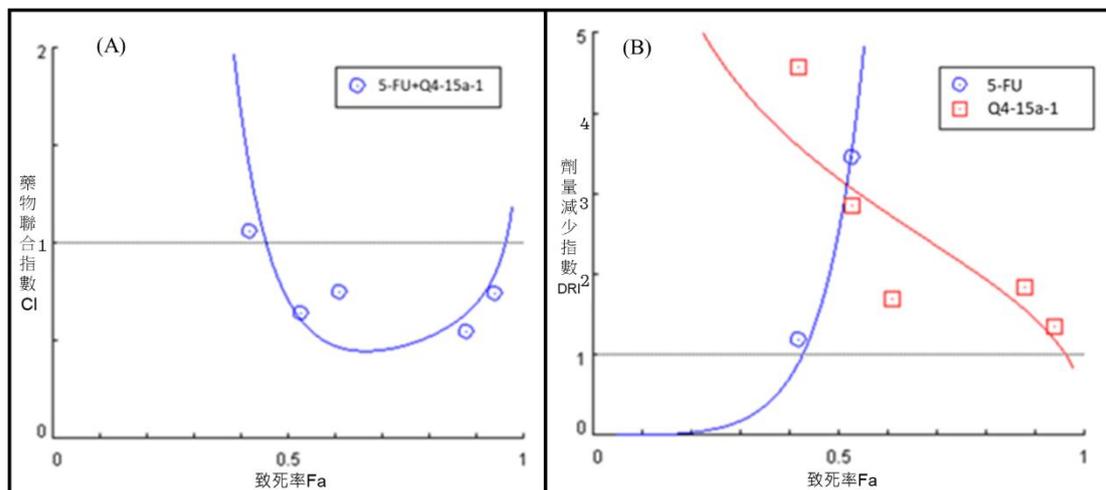
圖十二可顯示當藥物組合的致死率在約 0.45~0.95 間時，CI 值在 1 以下，代表藥物組合的效果比單一藥物的作用更好。Q4-15a-1 組的劑量減少指數持續下降，5-FU 組則持續上升，並顯示致死 0.45~0.9 之間，DRI 值在 1 以上，暗示藥物組合可以減少各自的使用量已達到該有的效果。表二中顯示當 Q4-15a-1 和 5-FU 各別在 12.04 μM 和 3.56 μM 時，可以達到致死率 50% 的效果。

表一、Q4-15a-1 和 5-FU 組合處理的實驗濃度。

	Q4-15a-1 濃度 (μM)	5-FU 濃度 (μM)
4 倍	123.52	36.56
2 倍	61.76	18.28
1 倍 ( 各自的 IC <sub>50</sub> )	30.88	9.14
0.5 倍	15.44	4.57
0.25 倍	7.72	2.29

表二、Q4-15a-1 組、5-FU 組及藥物組合組 IC<sub>50</sub> (半抑制劑量) 所需濃度。

	Q4-15a-1 濃度 (μM)	5-FU 濃度 (μM)
單獨處理平均	30.88	9.14
組合處理平均	12.04	3.56

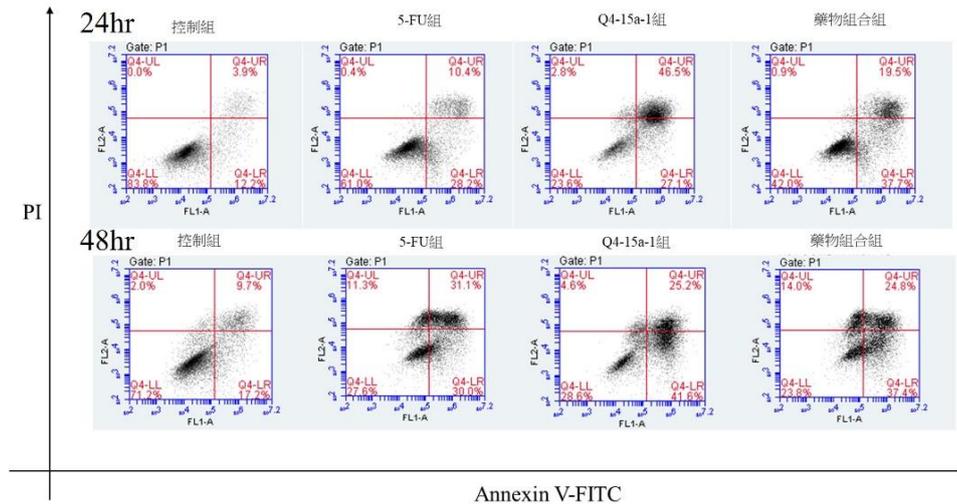


圖十二、(A) 圖為雙藥物組合的藥物聯合指數 (CI) 曲線。(B) 圖為雙藥物組合的劑量減少指數 (DRI) 曲線。Fa 是致死率, 把 % 轉成小數, 故無單位。CI 值、DRI 值是透過存活率計算出來的, 同樣沒有單位。

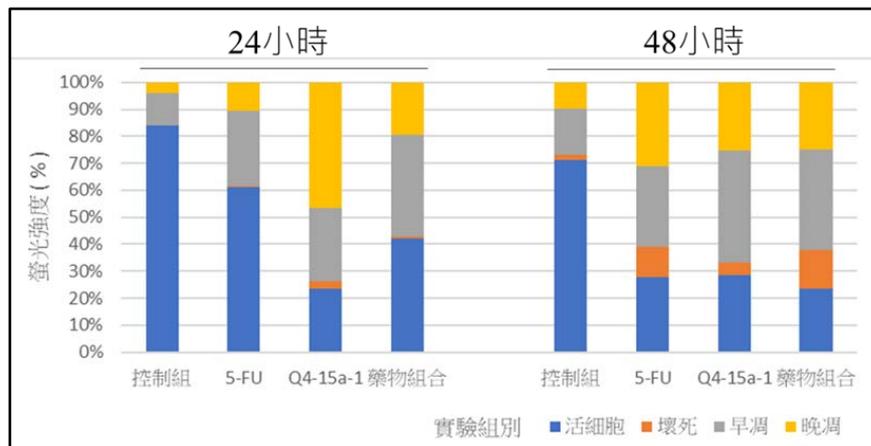
### 三、胜肽 Q4-15a-1 啟動細胞死亡之途徑

#### (一)、以細胞膜結構是否完整確認細胞死亡之途徑為凋亡

利用 Annexin V-FITC/PI 雙染分析, 由圖十三、四, 可知在 Q4-15a-1 進入細胞作用 24 小時後, 使細胞走向晚期凋亡路徑 (46.5%), 然而有一些數據落於第二象限 (2.8%), 代表胜肽亦可破壞到細胞核膜; 5-FU 原應為作用 48 小時才有效的藥物, 在此圖中可知其在作用 24 小時時, 仍能使細胞走向凋亡 (38.6%); 藥物組合中, 可看出兩種藥物的搭配依然仍使細胞進行晚期凋亡途徑 (19.5%)。由圖十三、四, 可知在作用 48 小時後各個凋亡現象有明顯增加的狀況: 5-FU 組中走向晚期凋亡者達 31.1%; Q4-15a-1 組走向晚期凋亡者達 25.2%, 而因為藥物作用時間久使 DNA 片段化, 因此在 Q4-15a-1 組中第四象限的數據點佔 41.6%; 藥物組合組中細胞走向凋亡者達 62.2%。



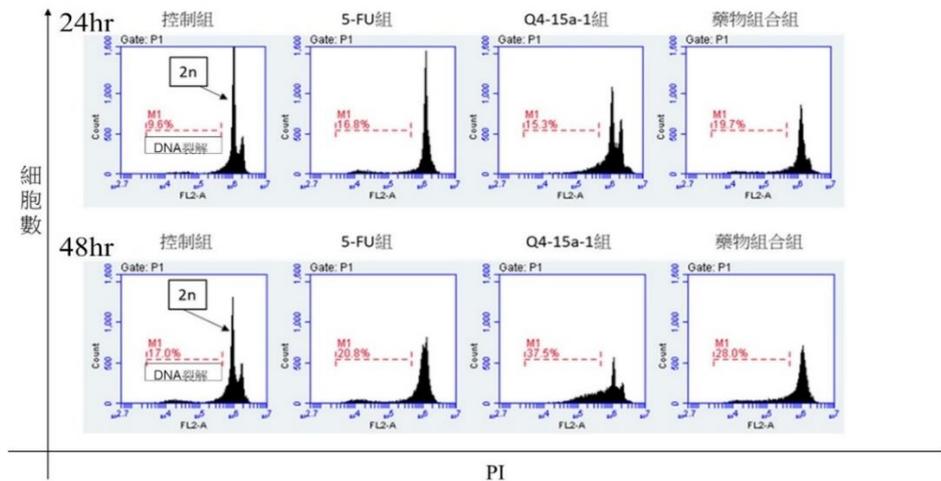
圖十三、 24 及 48 小時 Annexin V-FITC/PI 雙染分析結果。縱軸為 PI 值螢光強度，橫軸為 Annexin V-FITC 螢光強度。



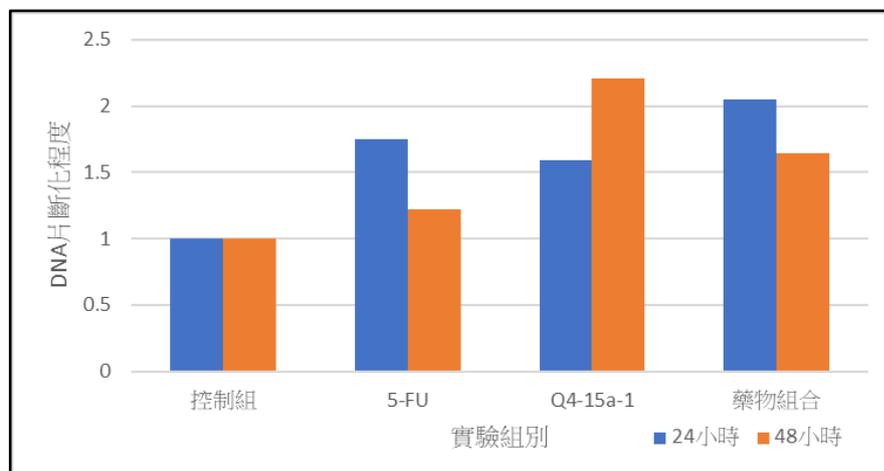
圖十四、 24 及 48 小時雙染分析法量化結果。縱軸為螢光強度，橫軸為各個實驗組別。

(二)、以 DNA 片段化程度確認細胞死亡之途徑為凋亡

我們以流式細胞儀進行第二道確認。由圖十五、六，在作用 24 小時後，5-FU 組與控制組相比，帶 DNA 片段化的細胞多了 1.75 倍；Q4-15a-1 組多了 1.59 倍；藥物組合組則多了 2.05 倍。而在作用 48 小時後，5-FU 組與控制組相比 DNA 裂解現象多了 1.22 倍；Q4-15a-1 組多了 2.21 倍；藥物組合組則多了 1.65 倍。總體而言，化療藥物 5-FU、抗癌胜肽 Q4-15a-1 及藥物組合組皆可誘導細胞凋亡。而且，在圖十五中，5-FU 組的圖譜與藥物組合相似，所以我們推測在混合藥物中，是以 Q4-15a-1 輔佐 5-FU 殺害細胞。



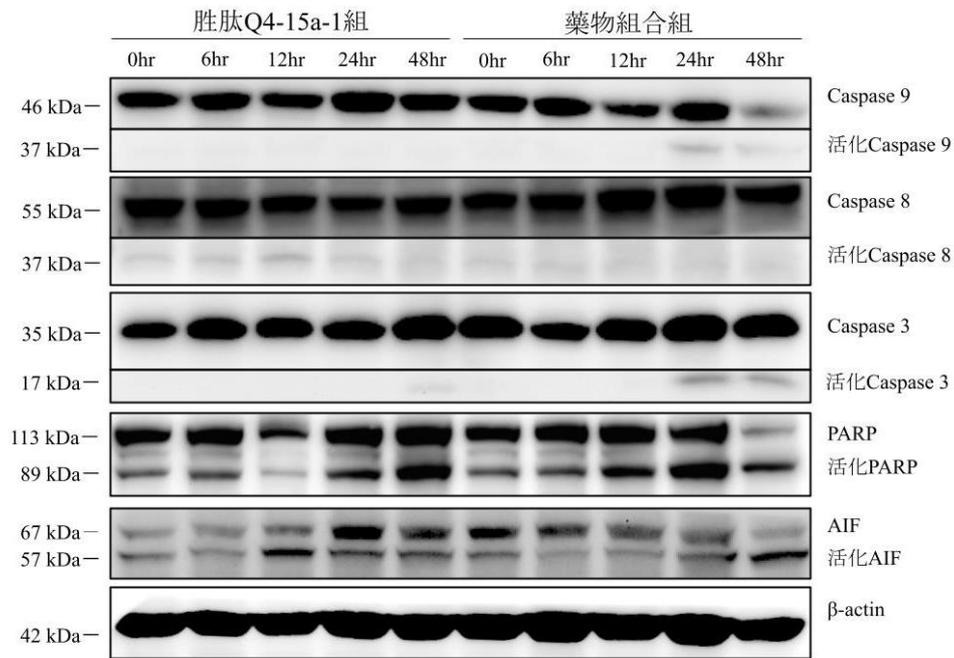
圖十五、 24 及 48 小時細胞週期分析結果圖。  
縱軸為細胞數。橫軸為 PI 螢光強度。



圖十六、 24 及 48 小時細胞週期分析量化結果圖。  
縱軸為 DNA 片段化程度，橫軸為實驗組別。

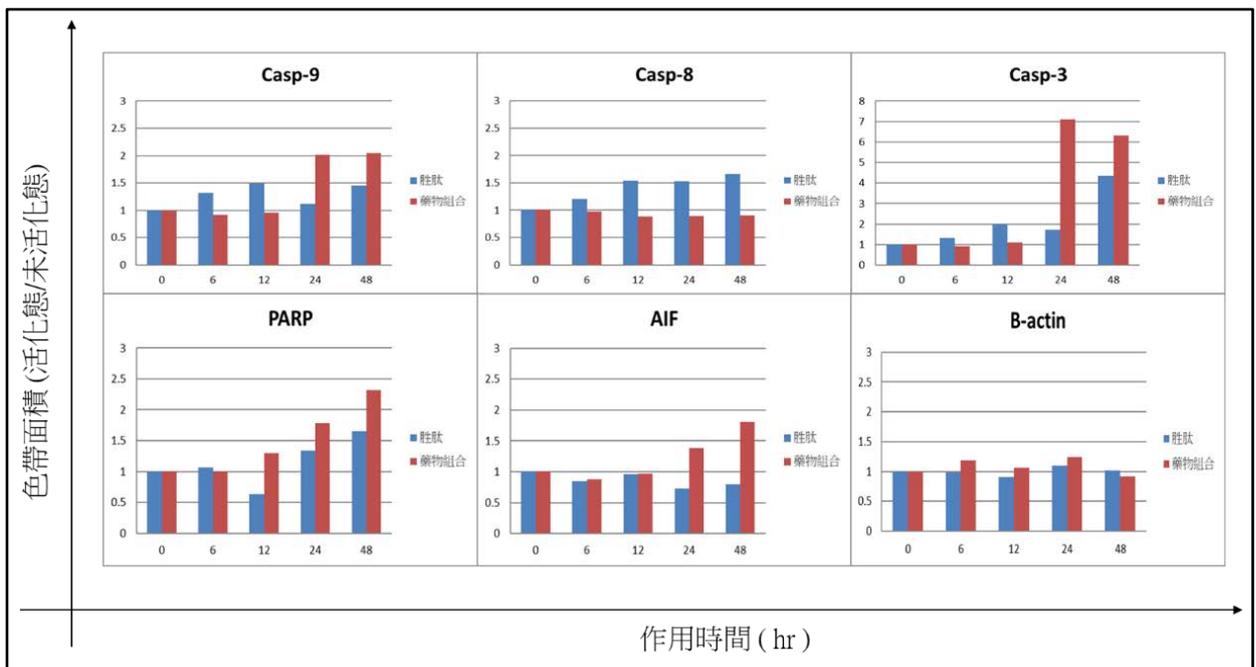
(三)、以細胞凋亡途徑中之調節蛋白表現量確認細胞死亡之途徑為凋亡

我們藉由西方墨點法作為檢測凋亡途徑的第三道驗證。由圖十七、八可知，在 Q4-15a-1 胜肽組結果中，與 0 小時相比，胜肽作用 12 小時後，其外源性途徑的上游蛋白活化 Caspase 8 表現量增加；作用 24 小時後，凋亡途徑下游蛋白，活化型態的 PARP 表現量增加；作用 48 小時後，活化型態的 Caspase 3 表現量增加。在藥物組合組結果中，與 0 小時相比，藥物組合作用 24 小時後，其內源性途徑的上游蛋白活化 Caspase 9 表現量增加，且下游蛋白活化 PARP 與活化 Caspase 3 皆表現量增加，並且，上游蛋白活化 AIF 也表現量增加。



圖十七、胜肽組與藥物組合組的西方墨點法結果。

控制組  $\beta$ -actin 表現量正常，胜肽組中有活化態之 Caspase 3 、 Caspase 8 、 PARP 表現；藥物組合組中有活化態之 Caspase 3 、 Caspase 9 、 PARP 、 AIF 表現。



圖十八、西方墨點法中胜肽組及藥物組合組之各蛋白與其活化蛋白之比值。

## 伍、 討論

### 一、 探討 5-FU、Q4-15a-1 和藥物組合處理對胃癌 AGS 細胞的影響

根據結果顯示 Q4-15a-1 和 5-FU 皆可以對無抗性的 AGS 細胞有抑制的效果，並且在達到半致死率時都不需要太高的濃度。經由藥物組合實驗，原本預計 IC<sub>50</sub> 濃度應該為各自一半的 IC<sub>50</sub> 值：Q4-15a-1 為 15.44 μM 及 5-FU 為 4.57 μM，但結果顯示藥物組合的實際 IC<sub>50</sub> 值為：Q4-15a-1 12.04 μM 及 5-FU 3.56 μM，比原本預期的更低；而且在 CompuSyn 的計算下，藥物組合的 CI 值和 DRI 值在細胞致死率 0.45~0.9 範圍間有顯著殺害癌細胞的跡象，表示在範圍中，Q4-15a-1 和 5-FU 之抑制癌細胞效果有提升，並能在更少的劑量下達到同樣的致死率，顯示出 Q4-15a-1 和 5-FU 兩者有藥物協同作用。

### 二、 探討胜肽 Q4-15a-1、5-FU 化療藥物和藥物組合處理使細胞死亡之途徑

#### (一)、 以細胞膜結構是否完整確認細胞死亡之途徑為凋亡

根據 Annexin V-FITC/PI 雙染分析法，在 Q4-15a-1 作用 24 小時後，第一象限數據較多，也有些微數據落於第二象限，代表 Q4-15a-1 可能有破壞到細胞膜。而 48 小時後，第四象限的數據反而變多，表示在 24~48 小時間都在作用；5-FU 組在作用 24 小時後，有約 38% 數據位於第一和第四象限之中，多數在第三象限，表示作用才剛開始。但作用 48 小時後數據落於第一象限明顯增加，而第三象限的數據明顯減少，表示 5-FU 應為作用 48 小時的藥物；而藥物組合中，可看出兩種藥物的搭配依然仍使細胞進行凋亡途徑，並且在作用 24 小時，相對於 5-FU 比，藥物組合的數據在第一和第四象限增加許多，代表 Q4-15a-1 可以使 5-FU 更快開始作用。48 小時的藥物組合也是第一、第四象限偏多。因此推測胜肽 Q4-15a-1、5-FU

化療藥物和藥物組合組都是以凋亡的方式使細胞死亡。整體而言，藥物組合組的結果和 5-FU 組的結果，其數據落點較相似，暗示藥物組合中是以 **Q4-15a-1 輔佐 5-FU**，不是 5-FU 輔佐 Q4-15a-1。

## (二)、以 DNA 片段化程度確認細胞死亡之途徑為凋亡

透過細胞週期試驗，在藥物作用 24 小時，各實驗組的 DNA 片段化現象較不明顯。而 5-FU 組、Q4-15a-1 組和藥物組合組分別作用 48 小時後，皆偵測到帶 DNA 片段化之細胞，尤其是 Q4-15a-1 最為明顯，與控制組相比下從 1.59 倍增加到 2.21 倍。由上述結果我們推測在三種藥物處理下，皆誘導的是細胞凋亡。由於藥物組合和 5-FU 組的圖譜較相似，我們亦推測在藥物組合中，Q4-15a-1 扮輔佐 5-FU 的角色。

## (三)、胜肽組誘導之細胞凋亡為典型之外源性途徑，藥物組合組所誘導之細胞凋亡包含典型之內源性途徑及非典型之 **Parthanatos** 途徑。

我們在進行西方墨點法前，參考了前學者的蛋白質微晶片分析，發現 Q4-15a-1 所誘導之凋亡機制中，粒線體間隙蛋白 Apoptosis Inducing-factor (AIF) 蛋白在胜肽作用後表現量增加，暗示此胜肽所誘導的細胞凋亡途徑與一般典型 Caspase 依賴型之途徑有所不同。(Ke & Chen, 2019)

另一位學者曾利用 ELISA 實驗，檢測 5-FU 作用下活化態之 Caspase 8 和 Caspase 9 表現量增加，表示 5-FU 會誘導內源性及外源性途徑。(Lin, C. T., et al 2018)

在花費近半年的努力搜尋下，我們發現一條途徑與我們結果——無 Caspase 3 表現——相符合，是與典型凋亡途徑不同並由過活化 PARP 所誘導與 AIF 蛋白相關的途徑，稱為 Parthanatos。如圖二的 C。(David, K.K. et al, 2009)

根據以上文獻，我們除了偵測外源性途徑中的調控蛋白：Caspase 8、Caspase 3、PARP；以及內源性途徑中的調控蛋白：Caspase 9、Caspase 3、PARP；還偵測了 Parthanatos 途徑中的上游蛋白——AIF，以驗證我們所推測的凋亡途徑。

#### (四)、以細胞凋亡途徑中之調節蛋白表現量確認細胞死亡之途徑為凋亡

透過西方墨點法，我們發現 Q4-15a-1 胜肽組結果中，活化態 5 之 PARP、Caspase 3 和其上游蛋白活化態之 Caspase 8 表現量有增加。然而，活化 Caspase 9 卻無表現。我們亦在藥物組合組中發現下游蛋白活化態 PARP、Caspase 3 及上游蛋白活化態 AIF、Caspase 9 皆有表現。

由上述所提之文獻及西方墨點法結果，我們推測 Q4-15a-1 胜肽可使胃癌細胞走向外源性凋亡；藥物組合可誘導癌細胞走向內源性凋亡，並能放大 Parthanatos 作用在胜肽組中 AIF 蛋白有表現，但是表現量不高，而在藥物組合組中可以明顯看到 AIF 蛋白表現量上升。此現象暗示胜肽與化療藥物同時處理時，改變了凋亡路徑。

#### (五)、未來展望

未來我們希冀能繼續探討胜肽及組合藥物之途徑，以確認胜肽組合化療藥物後是否為導致凋亡途徑改變的原委。

## 陸、 結論

- 一、胜肽 Q4-15a-1 和化療藥物 5-FU 皆可抑制 AGS 細胞生長。
- 二、胜肽 Q4-15a-1 和化療藥物 5-FU 雙藥物處理會對癌細胞產生協同抑制作用，並降低彼此劑量即可達到 50%抑制率的效果。
- 三、胜肽 Q4-15a-1 具有輔助化療藥物 5-FU 之效果。
- 四、胜肽 Q4-15a-1、化療藥物 5-FU 及藥物組合皆能導致細胞凋亡，其中胜肽之致死機制可能為 Caspase 家族調控的典型外源性凋亡，藥物組合可能包含 Caspase 家族調控的典型內源性途徑及非 Caspase 調控的 Parthanatos 途徑。

## 柒、 參考文獻資料

1. Alfons, L. (2003, August 13). *Apoptosis—an Introduction*. Bioessays.
2. Brianna, K. (2017, May 14). *Western Blot Techniques*. Springerlink
3. David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). *Parthanatos, a Messenger of Death*. Michael, O. G. (1990). Flow Cytometry.
4. Elmore, S. (2006). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology, 35:495–516, 22.
5. Emine, K. (2018, October 21). *The Detailed Comparison of Cell Death Detected by Annexin V-PI Counterstain Using Fluorescence Microscope, Flow Cytometry and Automated Cell Counter in Mammalian and Microalgae Cells*. SpringerLink
6. Lin, C. T., Ming, ying chiu, & Yun, T. H. (2018). *Gallic Acid Induces Apoptosis in Human Gastric Adenocarcinoma Cells*. Anticancer Research. 38 (4) 2057-2067
7. Ke, P. Y., & Chen, W. J. (2019). *Optimizing Cationic Anticancer Peptide Sequences to Enhance Their Anticancer Activity against Gastric Cancer Cell Line AGS and Evaluation of Their Combinatorial Effects with Chemotherapeutic Drugs*.
8. Kim, D. Som, Min, K., & Lee, S. K. (2020). *Cell Cycle Dysregulation Is Associated With 5-Fluorouracil Resistance in Gastric Cancer Cells* (40: 3247-3254). ANTICANCER RESEARCH.

9. Pan, W. R., Chen, Y. S., Hsu, H. C., & Chen, W. J. (2015). *Antimicrobial Peptide GW-H1-Induced Apoptosis of Human Gastric Cancer AGS Cell Line Is Enhanced by Suppression of Autophagy* (400:77-86). *Mol Cell Biochem*.
10. Thomas, H. S. (2015). *The Western Blot*. Springerlink.
11. Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. Maria, & Tornesello, Maria Lina. (2020). *Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities*. *Molecules*.
12. Zhang, N. (2015, September 28). *CompuSyn Report*. Sample Illustration of the “CompuSyn Report” of Two-Drug Combinations in Vitro.
13. Mahshid, G. (2021, November 26). *The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis*. NCBI.
14. 109 年國人死因統計結果. (2021). 衛生福利部單位網站.
15. 药物联合指数(CI)--CompuSyn 软件使用教程.Pptx. (2021, October 17). 原創力文檔.
16. *MTT assay* (2018). LABSTER theory

## 【評語】 052002

1. 本次研究主旨在於 Q4-15a-1 抗癌胜肽與化療藥物 5-Fluorouracil 具有協同抑制胃癌細胞的探討。胃癌是國人常見的癌症之一，常見的化學藥物治療常造成嚴重的抗藥性。欲探討胜肽 Q4-15a-1 能否與化療藥物 5-FU (5-Fluorouracil) 達到協同抑制癌細胞的效果，並找出 Q4-15a-1 的胞內作用機制，希冀未來可降低 5-FU 的使用量。
2. 研究作品的題目名稱相當有趣，容易吸引讀者目光。唯此作品大量參考一篇 Wu et al (2021)的論文。作品說明書內應該要引用此篇文章，或者說明本研究與該論文之間的關係。
3. 實驗結果顯示胜肽 Q4-15a-1 和化療藥物 5-FU 雙藥物處理會對癌細胞產生協同抑制作用，並降低彼此劑量即可達到 50%抑制率的效果，可以看到初步成果，如果再加上一些對照實驗更好。
4. 使用一種細胞株很難得到可信的結果，建議使用兩種以上不同分化程度的胃癌細胞株來做實驗可能比較好。
5. 西方墨點實驗(圖十七)應該放進單獨 5-FU 這一組，作為對照。
6. 可以增加測試其他的細胞功能，比如說細胞的增殖、遷移等。

## 作品簡報

「肽」強了—

Q4-15a-1 抗癌胜肽輔助化療藥物對胃癌的作用  
與其機制探討

科  
組

別：動物與醫學科

別：高級中等學校組

# 研究問題

- 胃癌是常見的惡性腫瘤，主要以化學藥物治療。
- 長期作用下有抗藥性細胞產生，降低治療作用。
- 新型化療藥物—抗癌胜肽出現。

↓

抗癌胜肽可否輔助化療藥物達到協同抑制效果？

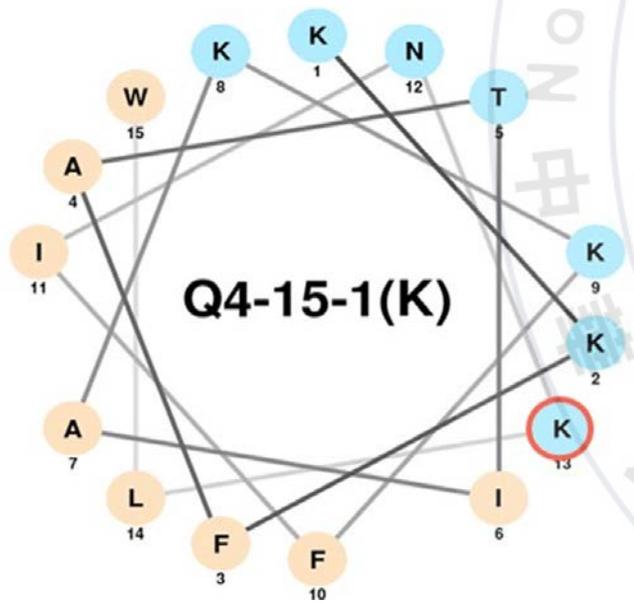
## 研究目的

-  探討分別處理 Q4-15a-1 和 5-FU 對 AGS 細胞存活率之影響
-  探討 Q4-15a-1 與 5-FU 之藥物組合對 AGS 細胞是否能達到協同抑制效果
-  探討 Q4-15a-1 與藥物組合啓動殺死細胞之途徑

# 研究背景

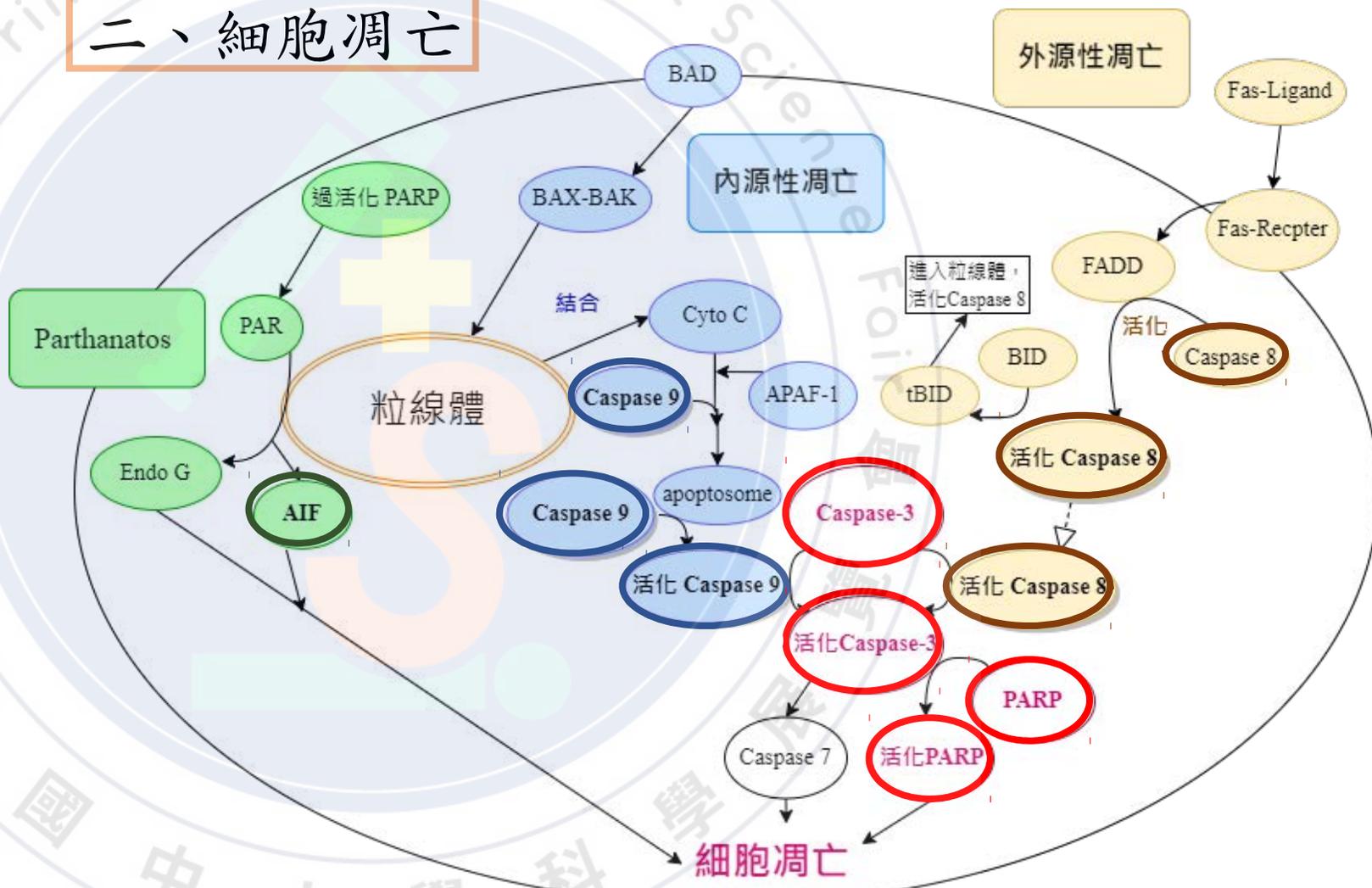
## 一、抗癌胜肽

Q4-15a-1 在  $100 \mu\text{M}$  下才對正常細胞有害。



圖二、胜肽螺旋圖

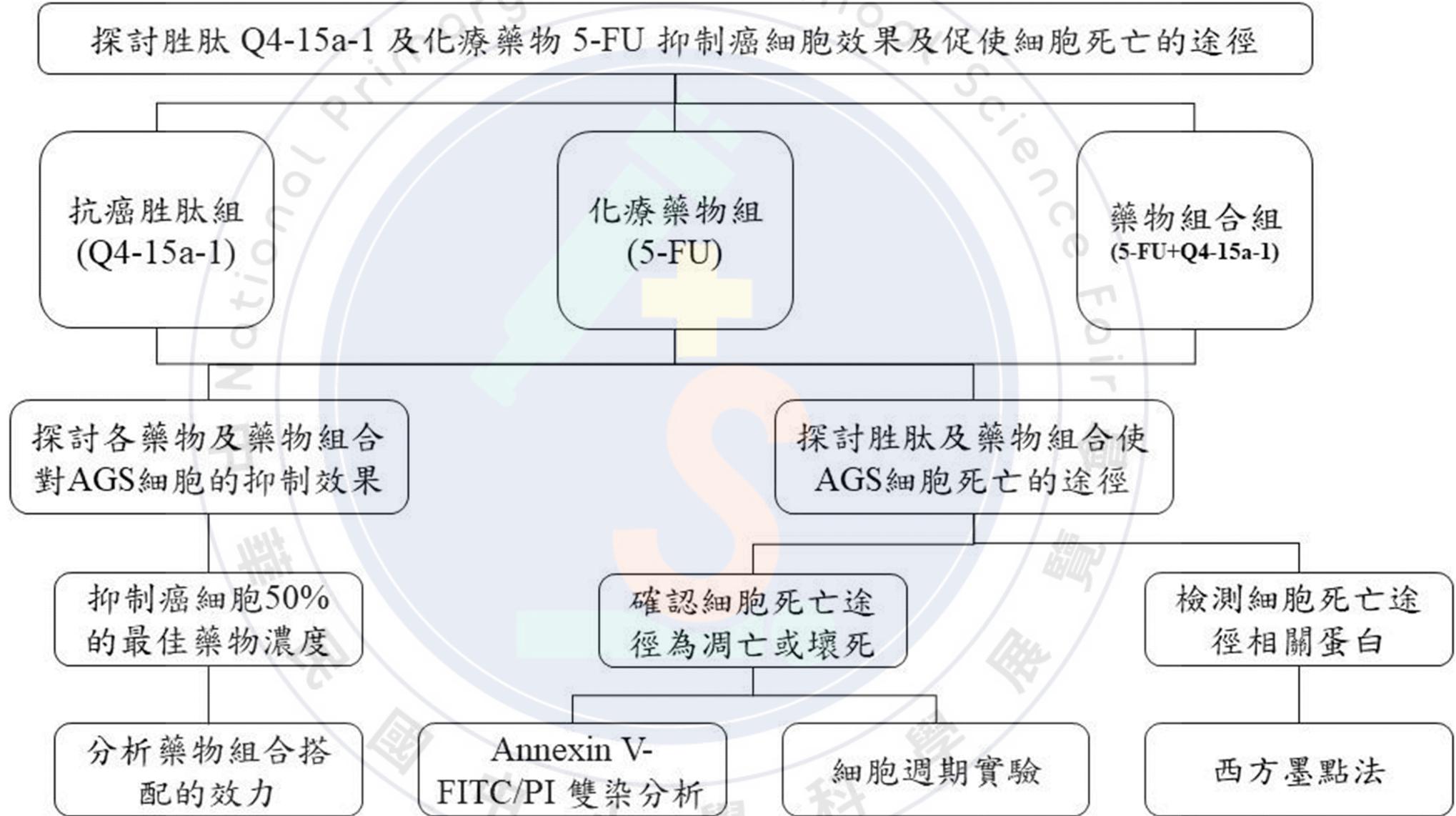
## 二、細胞凋亡



圖三、外源性和內源性的細胞凋亡圖



# 研究架構

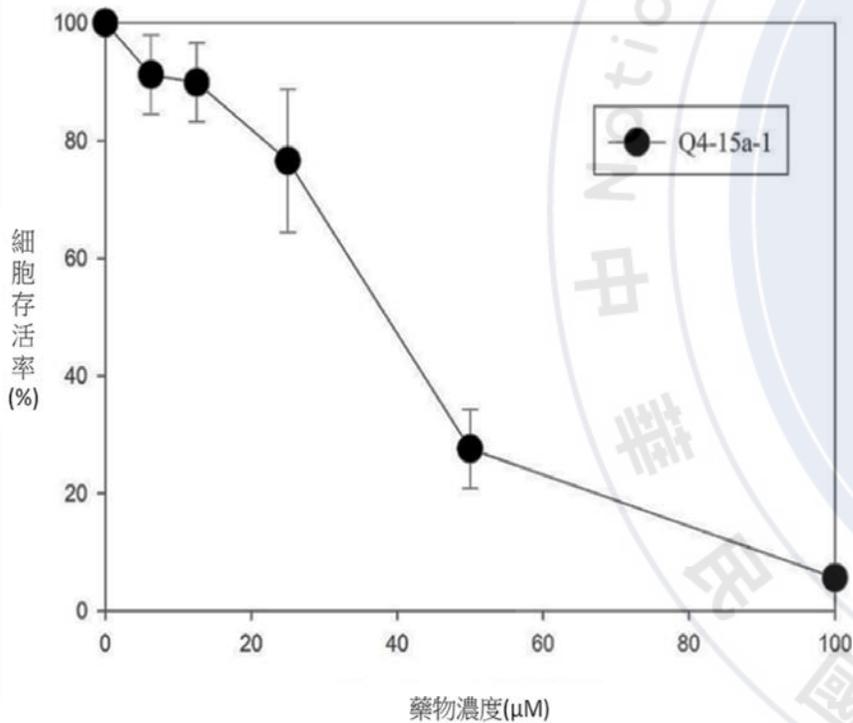


圖一、實驗架構圖

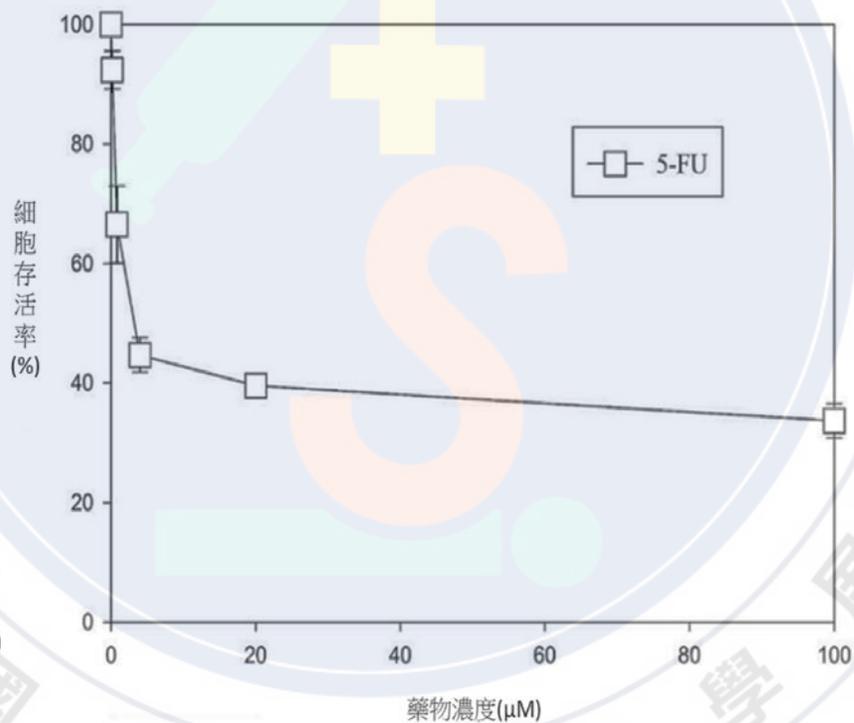


# 結果一、探討 Q4-15a-1、5-FU 對 AGS 細胞存活率之影響

- Q4-15a-1 在 20  $\mu\text{M}$  ~ 30  $\mu\text{M}$  之間抑制 AGS 細胞存活率 50%
- 5-FU 在 0.04  $\mu\text{M}$  ~ 4  $\mu\text{M}$  時抑制 AGS 細胞存活率 50%。



圖四、Q4-15a-1 的 MTT 試驗圖



圖五、5-FU 的 MTT 試驗圖

表一、Q4-15a-1 和 5-FU 的  $\text{IC}_{50}$

$\text{IC}_{50}$	$\text{IC}_{50}$ 值 ( $\mu\text{M}$ )
Q4-15a-1 (n=4)	30.8829
5-FU (n=4)	9.14244

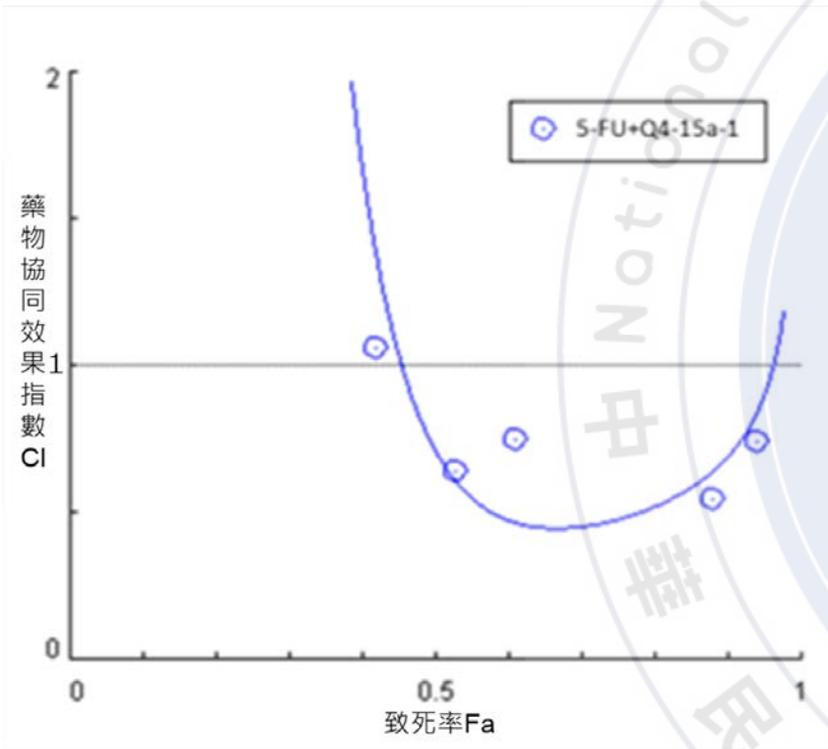


# 結果二、探討 Q4-15a-1 與 5-FU 藥物組合是否能協同抑制 AGS

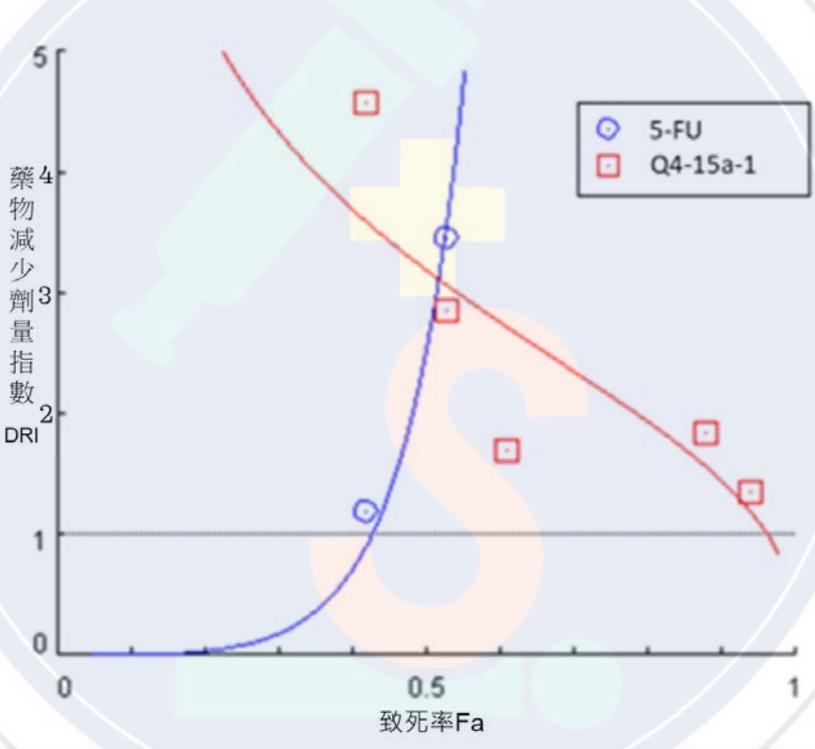
- 藥物組合之致死率約 0.45~0.95 間時，CI 值在 1 以下。
- 藥物組合之致死率約 0.45~0.9 之間時，DRI 值在 1 以上。

表二、藥物組合的 IC<sub>50</sub>

	IC <sub>50</sub> 值 ( μM )
Q4-15a-1 ( n=2 )	12.0385
5-FU ( n=2 )	3.55949



圖六、藥物組合的 CI 值



圖七、藥物組合的 DRI 值圖

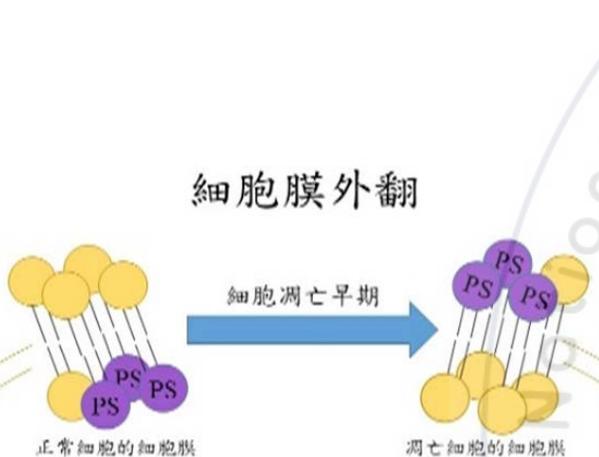
下降比例  
高達 60 %

1. 胜肽和化療藥物在低濃度下即可對 AGS 細胞有抑制的效果。
2. 藥物組合有協同抑制效果並可以降低彼此劑量。

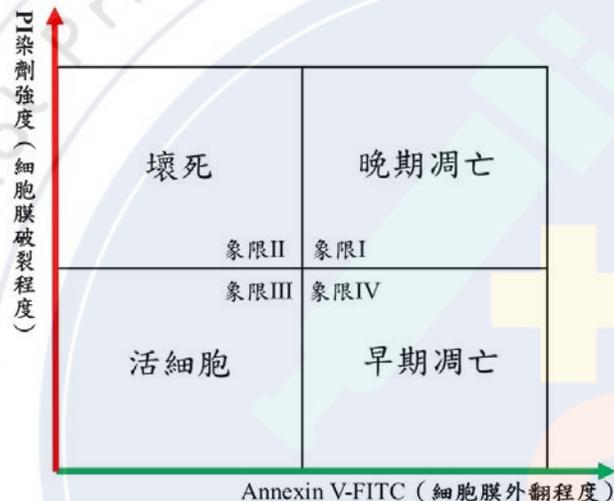


# 結果三、探討胜肽 Q4-15a-1 啓動殺死細胞之途徑

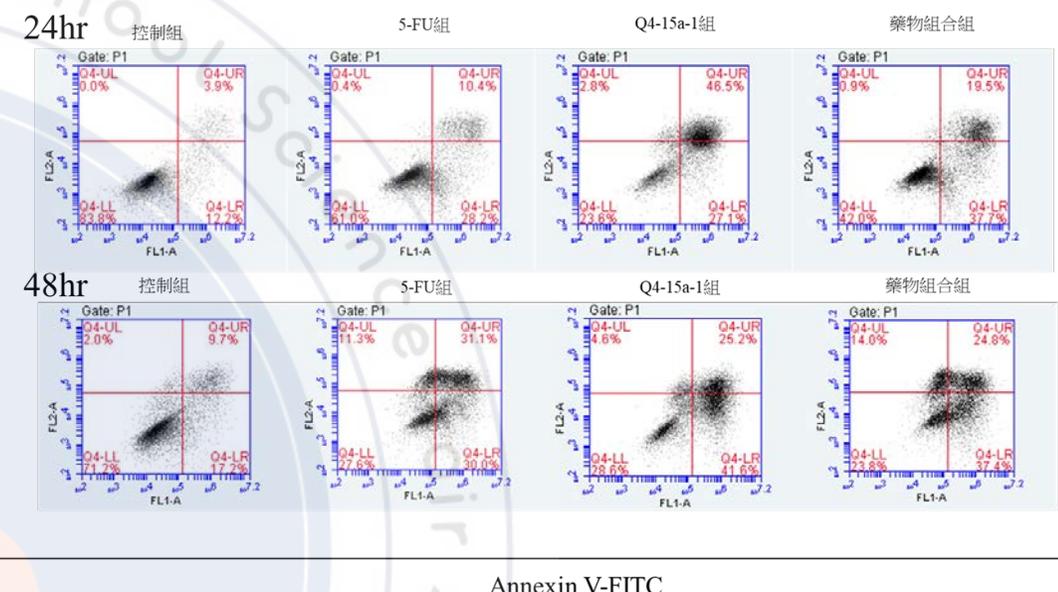
## (一) Annexin V-FITC/PI 雙染分析法



圖八、細胞膜外翻圖



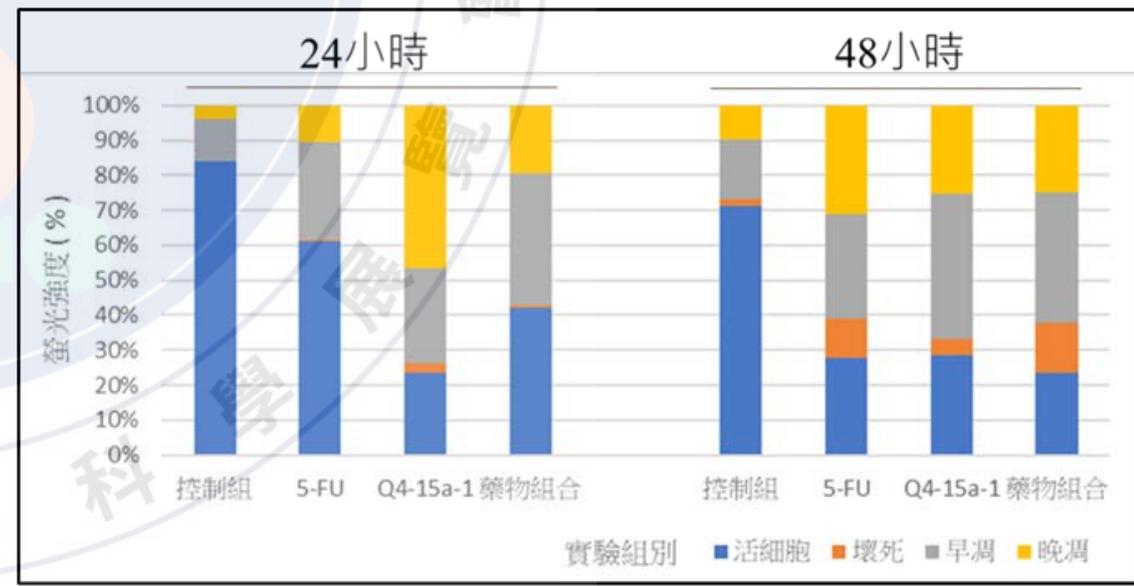
圖九、各象限代表圖



圖十、Annexin V-FITC/PI 雙染分析結果圖

- 化療藥物作用 48 小時有明顯凋亡程度。
- 胜肽作用 24-48 小時的過程中凋亡程度上升。
- 藥物組合作用 24 小時就有比化療藥物還明顯的凋亡現象，且在 48 小時時凋亡程度上升。

**推測三種處理使細胞死亡之途徑皆為凋亡，且胜肽可使化療藥物提前作用。**



圖十一、24 及 48 小時雙染分析法量化結果。



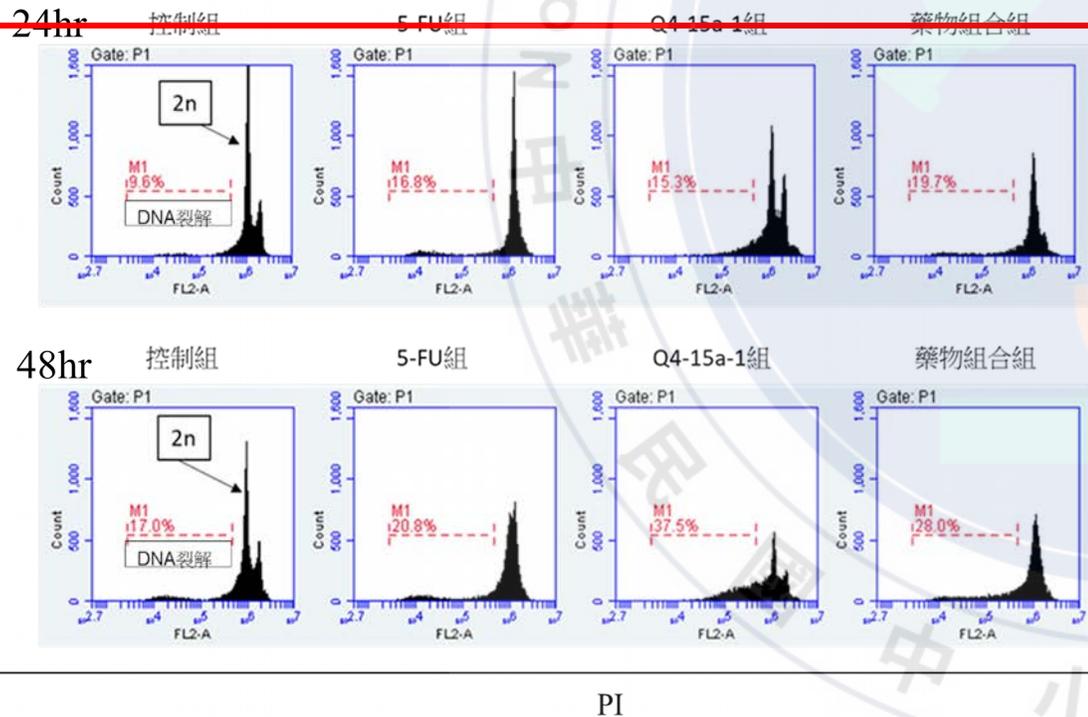
# 結果三、探討胜肽 Q4-15a-1 啓動殺死細胞之途徑

## (二) 細胞週期試驗

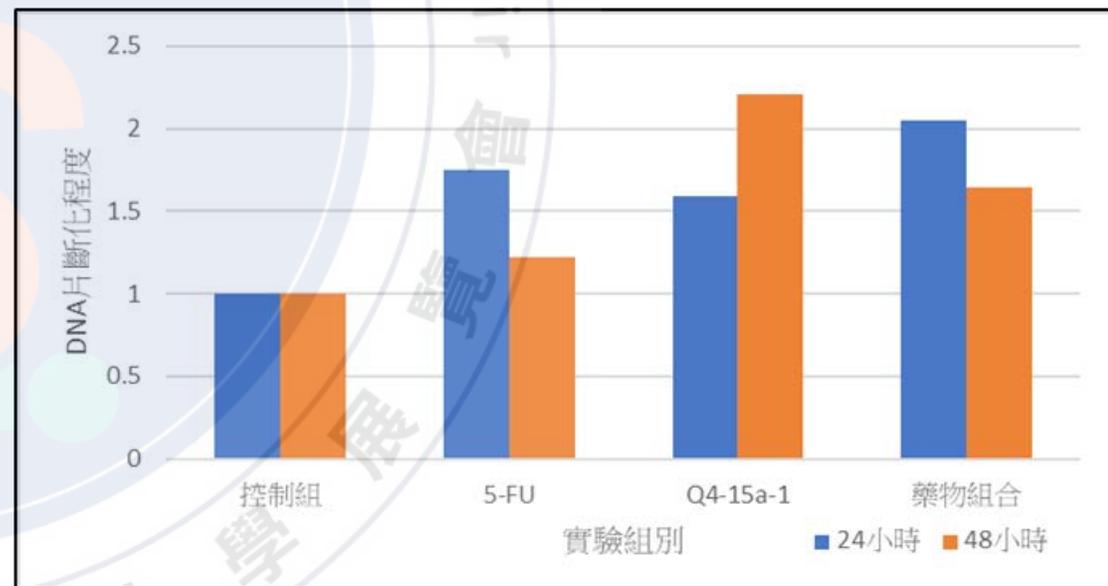
- 作用 24 與 48 小時後，各藥物組與控制組相比，皆有明顯的 DNA 片斷化現象。

可知化療藥物組、胜肽組及藥物組合組皆可使細胞死亡之途徑為凋亡。

細胞數



圖十二、細胞週期試驗結果圖



圖十三、24 及 48 小時細胞週期分析量化結果圖



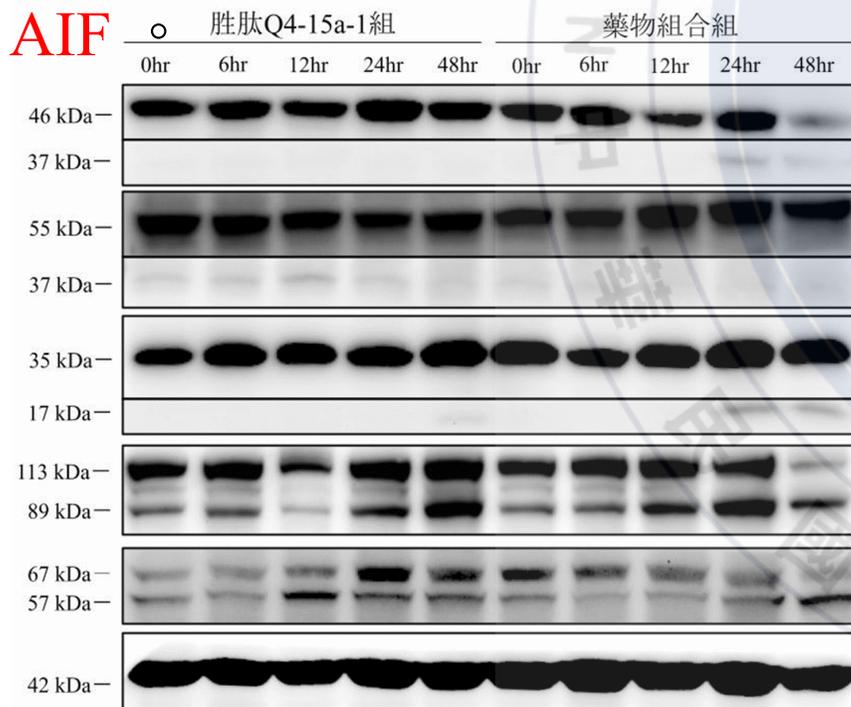
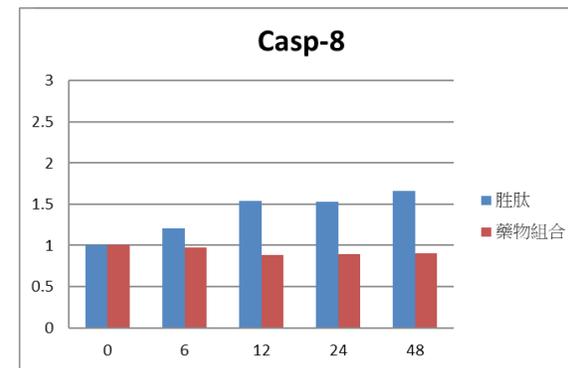
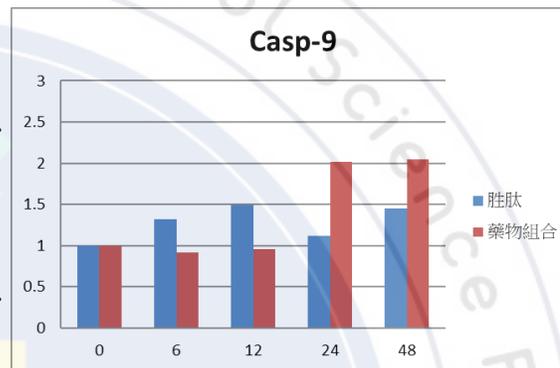
# 結果三、探討胜肽 Q4-15a-1 啓動殺死細胞之途徑

## (三) 西方墨點法

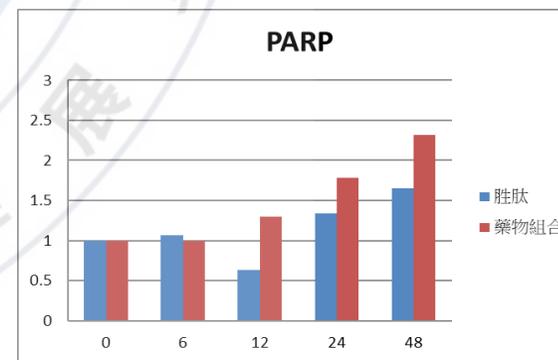
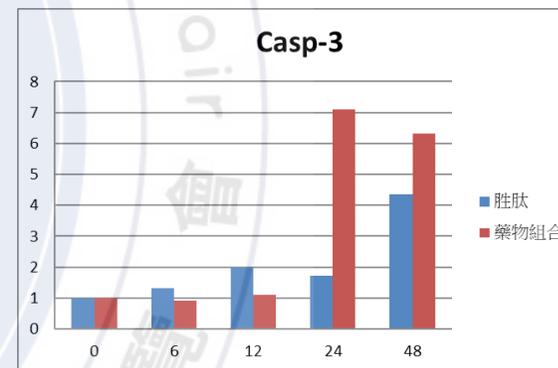
- 胜肽組中，**外源性途徑**之調控蛋白表現量增加活化態之 Caspase 8、PARP、Caspase 3。
- 藥物組合中，**內源性途徑**調控蛋白表現量增加活化態之 Caspase 9、PARP、Caspase 3、

內源上游

外源上游



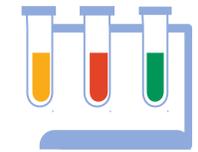
Parthanatos  
上游



凋亡下游

圖十四、 Q4-15a-1 組及藥物組合組的西方墨點法結果圖

圖十五、活化蛋白 / 未活化蛋白量化圖



## 西方墨點法結果分析

- 胜肽組誘導之細胞凋亡為典型之外源性途徑，藥物組合組所誘導之細胞凋亡包含典型之內源性途徑及非典型之 Parthanatos 途徑。
  1. 學者 ( Ke & Chen, 2019 ) 曾利用蛋白質微晶片分析，發現 Q4-15a-1 所誘導之凋亡機制中，粒線體間隙蛋白 AIF 蛋白在胜肽作用後表現量增加。
  2. 學者 ( Lin, C. T., et al 2018 ) 曾利用 ELISA 實驗檢測出 5-FU 使細胞死亡方式為內源性及外源性途徑。
  3. 在將近半年的努力搜尋下，我們發現一條途徑與我們結果——無 Caspase 3 表現——相符合，是與典型凋亡途徑不同並由過活化 PARP 所誘導與 AIF 蛋白相關的途徑，稱為 Parthanatos。(David,K.K. et al, 2009)
  4. 我們推論藥物組合組的細胞凋亡現象可能因為化療藥物與胜肽組合使凋亡路徑改變，導致 AIF 表現量增加，暗示同時給予化療藥物與胜肽會放大 Parthanatos 途徑。



## 結論

- 一、胜肽 Q4-15a-1 和化療藥物 5-FU 皆可**抑制** AGS 細胞**生長**。
- 二、胜肽 Q4-15a-1 和化療藥物 5-FU 合併處理會對癌細胞**達到協同抑制**，**降低彼此劑量**即可達到 50% 抑制率的效果。
- 三、**胜肽** Q4-15a-1 具有**輔助化療藥物** 5-FU 之效果。
- 四、胜肽 Q4-15a-1、化療藥物 5-FU 及藥物組合皆能導致**細胞凋亡**，其中**胜肽**之致死機制可能為**典型外源性凋亡**，**藥物組合**可能包含**典型內源性途徑**及 **Parthanatos 途徑**。



## 未來展望

未來我們希冀能繼續探討化療藥物、胜肽及藥物組合對癌細胞的**胞內訊息傳遞途徑**，並加以**研究 Parthanatos 途徑**探討胜肽及藥物組合對具有抗藥性的癌細胞之影響。

## 參考資料

1. David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Parthanatos, a Messenger of Death.
2. Ke, P. Y., & Chen, W. J. (2019). *Optimizing Cationic Anticancer Peptide Sequences to Enhance Their Anticancer Activity against Gastric Cancer Cell Line AGS and Evaluation of Their Combinatorial Effects with Chemotherapeutic Drugs.*
3. Kim, D. Som, Min, K., & Lee, S. K. (2020). Cell Cycle Dysregulation Is Associated With 5-Fluorouracil Resistance in Gastric Cancer Cells (40:3247-3254). ANTICANCER RESEARCH.
4. Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. Maria, & Tornesello, Maria Lina. (2020). Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. Molecules.

謝謝聆聽！！