

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

佳作

052003

「抑」生菌—探討 LP33 (*Lacticaseibacillus paracasei* 33) 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞增殖的影響及機制

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 蔡宜臻	指導老師： 呂億真
---------------	--------------

關鍵詞：LP33 (*Lacticaseibacillus paracasei* 33)、細胞外囊泡、三陰性乳癌細胞

摘要

細胞外囊泡是近期生物醫學的新星，具有疾病檢測或攜帶藥物等醫學上的應用，由益生菌釋放的細胞外囊泡曾被報導具抗腫瘤細胞增殖作用的潛力。本研究將探討副乾酪乳桿菌 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞增殖的影響。首先，利用 MTT 呈色法、台酚藍細胞計數分析研究 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞短期增殖的效應；再利用細胞群落形成能力實驗檢測其長期效應。接續，分別利用碘化丙啶染色搭配流式細胞儀檢測分析和西方墨點法，探討 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞之細胞週期分布和細胞週期調節蛋白表現的影響。統整這五項實驗結果得知，LP33 的細胞外囊泡可透過抑制細胞週期的進程進而抑制三陰性乳癌細胞的增殖。

壹、前言

一、文獻回顧

副乾酪乳桿菌 (*Lactocaseibacillus paracasei*)，又稱 LP 菌，在分類上為乳桿菌屬，是一種革蘭氏陽性菌。此菌耐胃酸且耐膽鹽，常見於人體口腔與腸胃道內。LP33 (*L. paracasei* 33) 為副乾酪乳桿菌的一種菌株，由臺灣的研究團隊自人體腸胃道中分離出來，經臨床研究證實具有改善過敏性鼻炎、氣喘、蕁麻疹、皮膚炎等過敏症狀，為市面上常見的益生菌。

細胞外囊泡 (Extracellular vesicles ; EVs) 是一類由細胞分泌釋放到周圍環境中的雙層脂質膜結構的微小囊泡，具多種亞型，其功能、攜帶物質與尺寸各有差異，主要分為外泌體 (Exosomes)、微泡 (Microvesicles ; MVs)、凋亡小體 (Apoptotic bodies)。外泌體，由細胞內的晚期內體 (late endosome) 內陷於多泡狀小體 (Multivesicular bodies) 形成腔內囊泡 (Intraluminal vesicles ; ILVs)，再透過與細胞膜融合向外釋放，其粒徑大小約為 30-150 奈米；微泡，由細胞膜直接向外出芽形成，粒徑大小約為 100-1000 奈米；凋亡小體，由細胞膜與細胞骨架分離而形成，粒徑大小約為 50-5000 奈米 (Gao, Y. *et al.*, 2021)。

細胞外囊泡攜帶物質包含蛋白質、核酸、多醣、脂質等訊息物質，可以在細胞間傳遞訊號以及調節細胞周圍的微環境，此外，近期研究表示這些物質也可以作為診斷癌症的生物標

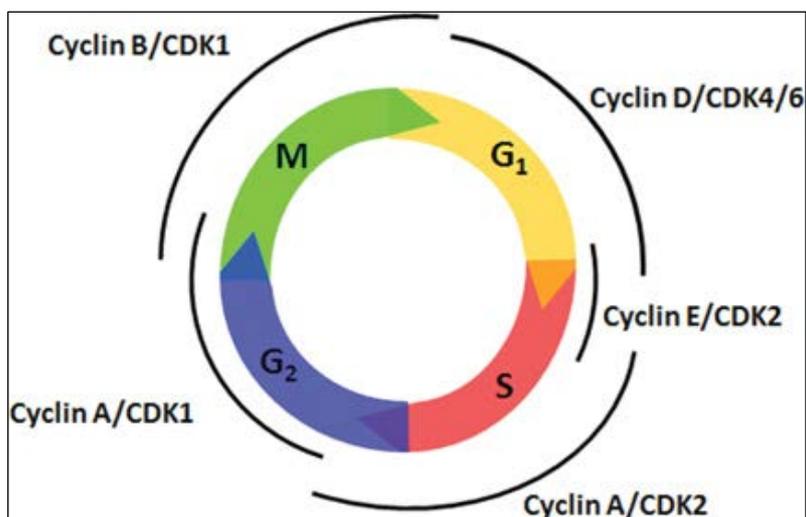
誌物，如口腔細胞釋放的細胞外囊泡中 α -2 巨球蛋白 (alpha-2-macroglobulin)、結合珠蛋白 (haptoglobin) 和粘液素-5B (mucin-5B) 的表現可診斷是否為口腔癌 (Doyle, L.M., & Wang, M.Z., 2019 ; Gao, Y. *et al.*, 2021)。

根據參考文獻，由細菌分泌釋放的細胞外囊泡稱為 Bacterial extracellular vesicles (BEVs)，可分為革蘭氏陰性菌釋放的細胞外囊泡和革蘭氏陽性菌釋放的細胞外囊泡兩類。前者依據不同的形成途徑可分為由革蘭氏陰性菌外膜起泡形成的外膜囊泡 (outer-membrane vesicles, OMVs)，含有外膜蛋白、脂蛋白和脂質，以及由革蘭氏陰性菌外膜和質膜突起分裂形成的內膜囊泡 (inner membrane vesicles, IMVs)，含有 DNA 和 ATP 等細胞質成分。而革蘭氏陽性菌，雖然無外膜且周圍有一層厚的肽聚糖細胞壁，但也會釋放細胞外囊泡，稱為膜囊泡 (membrane vesicles, MVs)，關於其形成途徑有待闡明，目前的假設有：(1) 膜囊泡攜帶特定酶使肽聚糖細胞壁降解，(2) 膜囊泡的積累產生膨壓，使其被釋放，(3) 膜囊泡變形使自身通過細胞壁上的小孔 (Doyle, L.M., & Wang, M.Z., 2019 ; Brown, L. *et al.*, 2015 ; Nahui Palomino, R.A. *et al.*, 2021 ; Chronopoulos, A. and Kalluri, R., 2020)。

近年來，有許多關於由細菌分泌釋放的細胞外囊泡的研究，表明其於臨床應用上的潛力與價值，其中包括參與免疫反應，如乾酪乳桿菌 (*Lactobacillus casei*) 的細胞外囊泡透過降低人類上皮細胞中 Toll 樣受體 9 (Toll-like receptor 9) 和 γ -干擾素 (interferon- γ) 的表現，並提高第一型輔助性 T 細胞之細胞激素 (IL-4 與 IL-10) 的表現來調節免疫反應 (Vargoorani, M.E. *et al.*, 2020)；副乾酪乳桿菌的細胞外囊泡通過降低人類結腸直腸癌細胞中促炎細胞激素 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2 及 TNF- α) 的表現、提高其抗炎細胞因子 (IL-10 與 TGF- β) 的表現與誘導其內質網應激相關蛋白的表現，抑制脂多醣介導的腸道炎症 (Choi, J.H. *et al.*, 2020)。此外，還包括對癌細胞增殖的影響，像大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的細胞外囊泡會抑制人神經母細胞瘤細胞在體外培養模式下的增殖與遷移，並透過提高細胞凋亡相關蛋白 (Caspase3) 促進細胞凋亡 (唐波等，2018)；鼠李糖乳桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 的細胞外囊泡對肝癌細胞在體外培養模式下具抗增殖作用，且通過降低抗凋亡蛋白 (Bcl-2) 的表現與提高促凋亡蛋白 (Bax) 的表現誘發細胞進入凋亡過程 (Behzadi, E. *et al.*, 2017)；經基因工程改造之大腸桿菌 (降低負責 lipid A acyltransferase 表現之 msbB 基因的活性) 的細胞外囊泡對患 4T1 乳癌肺臟

轉移動物模式的小鼠具有抑制肺臟轉移結節和原發性腫瘤增殖的特性 (Kim, O.Y. *et al.*, 2017)。

細胞週期由四個不同的階段組成，依序為 G₀/G₁ 期（間期）、S 期（DNA 合成期）、G₂ 期（間期）和 M 期（有絲分裂期），在各階段之間含有多個檢查點及限制點嚴格控制細胞週期的進程，以確保細胞僅在適當情況下發生細胞分裂，其受細胞週期蛋白-CDK 二聚激酶複合物的影響，其中 CDK (Cyclin dependent kinase) 為催化激酶亞基，細胞週期蛋白為激活亞基，如 Cyclin D-CDK4/6 複合物對 pRB 的初始磷酸化導致 E2F 的部分激活（pRB 通過結合和抑制 E2F 轉錄因子來抑制 G₁ 期至 S 期之進程），使 Cyclin E 基因（合成發生在 G₁ 晚期）開始轉錄，接著，Cyclin E 與 CDK2 相互作用，形成進一步磷酸化 pRB 的活性複合物，導致 E2F 完全激活，形成一個正反饋循環機制，而 Cyclin D-CDK4/6 複合物和 Cyclin E-CDK2 複合物通過不同位點的連續磷酸化使 pRB 失去活性，導致 pRB 介導的 E2F 抑制功能逐漸喪失，細胞週期從 G₁ 期進入 S 期；如圖一。癌細胞的增殖通過完成細胞週期達成，因此抑制細胞週期的進行可做為抗癌藥物的標的，如 CDK4/6 抑制劑 palbociclib、ribociclib 及 abemaciclib 用於雌激素受體陽性和 HER2 受體陰性晚期或轉移性乳癌的治療 (Ding, L. *et al.*, 2020；Suryadinata, R. *et al.*, 2010)。



圖一：細胞週期各階段與細胞週期蛋白-CDK 二聚激酶複合物的關係

（圖片來源：Suryadinata, R. *et al.*, 2010）

二、研究動機

三陰性乳癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 一直以來被醫師視為極其棘手的癌症之一。所謂的三陰性是指雌激素接受體 (estrogen receptor, ER)、黃體素受體 (progesterone receptor, PR) 和第二型人類上皮生長受體 (HER2) 這三種荷爾蒙或生長因子受體呈現陰性，並由於患者缺乏這些受體，因此患者無法採用荷爾蒙療法以及 anti-HER2 抗體標靶治療，大多只能選擇化學治療，然而，由於三陰性乳癌具有高度的基因變異性，且惡性度較高，患者接受化療後常面臨預後不佳、復發率高、腫瘤容易轉移到腦部與死亡率偏高等，治療效果不如預期，且目前針對三陰性乳癌的標靶藥物選擇較少，因此仍有開發針對三陰性乳癌治療藥物的需求。此外，大部分化療藥物通過誘導細胞凋亡以發揮作用，但它們通常對其他正常細胞具有毒性、免疫抑制、誘變等作用，故接受化療的患者經常產生副作用，如骨髓功能抑制、腹瀉、掉髮等。

此外，研究顯示益生菌可以抑制不同類型癌症的發生與發展，除了少數會對癌細胞產生直接作用外，其所釋放的生物活性成分被認定為引發抑制作用的重要物質，而細胞外囊泡不但攜帶來自母細胞的蛋白質、DNA 等生物活性成分，其雙層磷脂膜結構也能使其免於受到細胞外環境的不利影響，有效的將物質傳遞到靶細胞。此外，因癌症患者通常會有免疫力下降的情況，若直接使用益生菌進行癌症治療，可能會有伺機性感染的風險，而細胞外囊泡不具增生活性，可以避免潛在的感染風險。因此以益生菌的細胞外囊泡作為研究對象探討益生菌對癌細胞生長作用的研究，具有易傳遞進入癌細胞、避免感染風險等優勢(Doyle, L.M., & Wang, M.Z., 2019 ; Brown, L. *et al.*, 2015 ; Ñahui Palomino, R.A. *et al.*, 2021 ; Dean, S.N. *et al.*, 2020)。

經過一連串的文獻探討，我發現細菌分泌釋放的細胞外囊泡對癌細胞可能具抗增殖作用的潛力，並且可通過調節相關蛋白促進細胞凋亡，但對於三陰性乳癌，則未有相關研究證實益生菌細胞外囊泡的抗增殖功效，因此本研究將探討 LP33 的細胞外囊泡 (LP33 extracellular vesicles ; LP33 EVs) 是否會抑制三陰性乳癌細胞的增殖，並且進一步探討其可能的分子機制，著重於對三陰性乳癌細胞之細胞週期分布以及細胞週期調節蛋白表現量的影響。

三、研究目的

- (一) 分離 LP33 的細胞外囊泡並鑑定其粒徑大小與型態。
- (二) 研究 LP33 的細胞外囊泡是否抑制三陰性乳癌細胞的增殖。
- (三) 探究 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞細胞週期中各階段分布的影響。
- (四) 檢測 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞細胞週期調節蛋白表現的影響。

貳、研究設備及器材

一、研究材料：

- 1.樂亦康益生菌膠囊（購自景岳生物科技公司）
- 2.MDA-MB-231（三陰性乳癌細胞株）

二、設備與器材：

- 1.微量離心機（型號：Fresco™ 21 Microcentrifuge）
- 2.垂直落地型無菌操作台
- 3.低速離心機（型號：Labofuge™ 400 Centrifuges）
- 4.電泳照膠分析系統
- 5.流式細胞儀（型號：BD FACSCanto II）
- 6.奈米粒子追蹤分析儀
- 7.倒立式顯微鏡
8. 6 公分細胞培養皿
9. CO₂ 培養箱（型號：Sanyo MCO-18AIC(UV)）
10. 100K Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter
11. 0.2 μm 濾膜
12. 微量吸管
- 13.細胞計數盤
14. 12/96 孔細胞培養盤
- 15.微量盤檢測儀
16. 流式管
- 17.鑄膠模具
- 18.蛋白電泳裝置
- 19.轉漬裝置
- 20.水平搖床震盪器
21. PVDF 膜
- 22.金屬浴加熱器

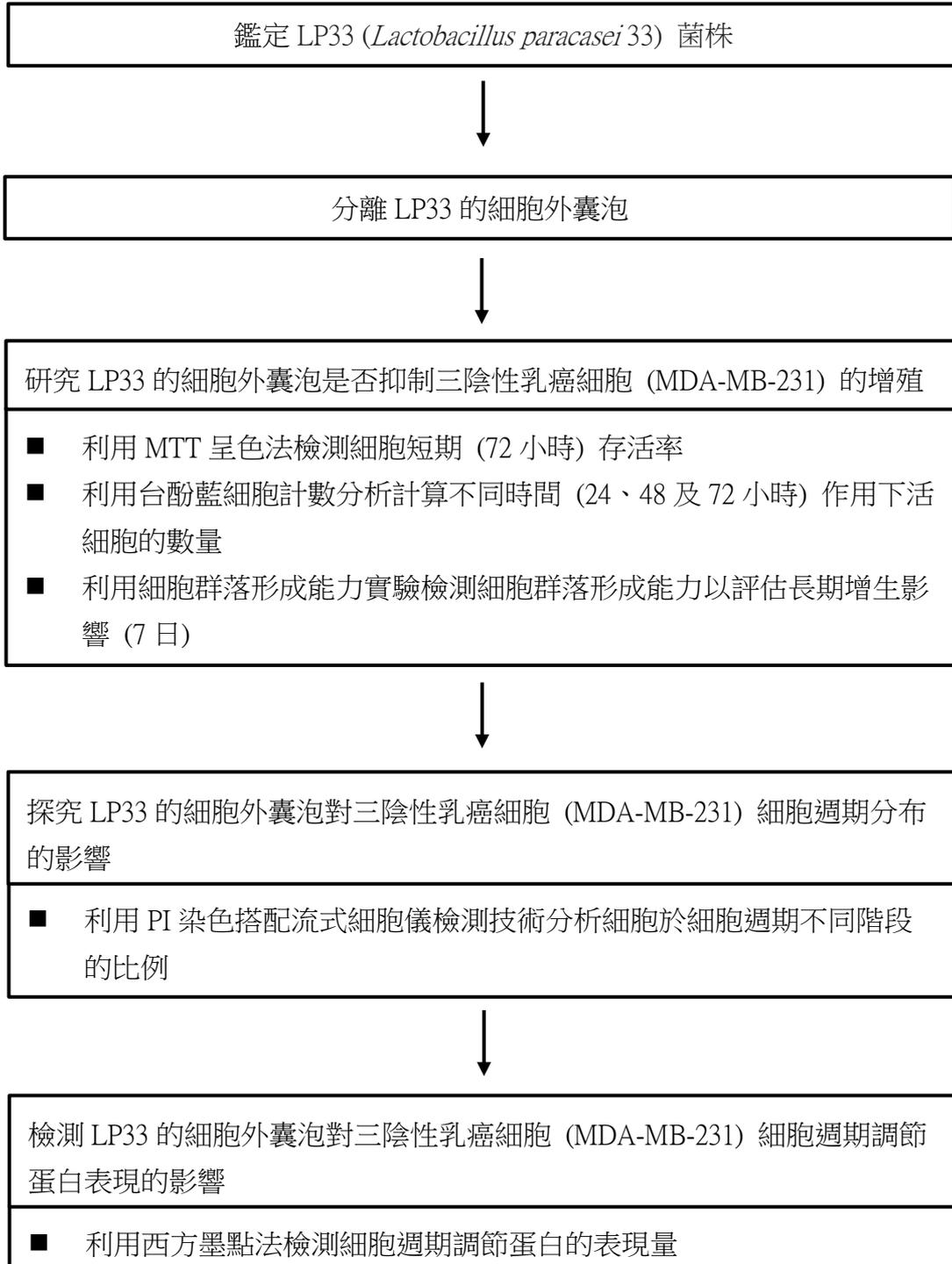
三、藥品：

- 1.胰蛋白酵素(Trypsin)
- 2.台酚藍(Trypan blue)
- 3.二甲基亞砷(DMSO)溶液
- 4.結晶紫(Crystal violet)
- 5.10%甲醛(Formaldehyde)
- 6.碘化丙啶(Propidium Iodide ; PI)
- 7.甘胺酸(Glycine)
- 8.三羥甲基胺基甲烷(Tris Base)
- 9.30%丙烯醯胺-雙丙烯胺溶液(Acrylamide mix)
- 10.核糖核酸酶(RNase)
- 11.四甲基乙二胺(Tetramethylethylenediamine ; TEMED)
- 12.過硫酸銨(Ammonium persulfate)
- 13.6X SDS loading buffer
- 14.蛋白質分子量標準液(protein marker)
- 15.一級抗體溶液
- 16.二級抗體溶液

17. 聚山梨醇酯二十(Tween 20)
18. 化學發光試劑(ECL)
19. 甲醇(Methanol)
20. 異丙醇(Isopropanol)
21. 細胞培養液：10%胎牛血清 + 1X sodium pyruvate + glutamine + 1X 抗生素
(Penicillin/Streptomycin/Amphotericin)
22. MRS 培養液：蛋白胨(peptone) + 酵母抽出物(yeast extract) + 牛肉抽出物(beef extract) + 葡萄糖 + 醋酸鈉 + Tween80 + Dipotassium Phosphate + Triammonium Citrate + Magnesium Sulfate + Manganese Sulfate
23. 10X 磷酸鹽緩衝液(Phosphate Buffered; PBS)：NaCl + KH₂PO₄ + Na₂HPO₄ + ddH₂O
24. 10X Running Buffer：Tris Base + Glycine + SDS + ddH₂O
25. 10X Transfer buffer：Tris Base + Glycine + ddH₂O
26. 1X Transfer buffer：10X Transfer Buffer + 甲醇 + ddH₂O
27. 10X TBS 溶液：Tris Base + NaCl + ddH₂O
28. 1X TBS-T：10X TBS + Tween 20 + ddH₂O
29. 1M Tris-HCl(pH6.8)：Tris base + ddH₂O
30. 1.5M Tris-HCl(pH8.8)/SDS：Tris Base + SDS + ddH₂O
31. 5% 脫脂牛奶：脫脂奶粉 + 1X TBS-T
32. 10% 硫酸十二酯鈉溶液(Sodium dodecyl sulfate ; SDS)：SDS + ddH₂O
33. 細胞裂解液(NETN lysis buffer)：150mM NaCl + 1mM EDTA + 20mM Tris-HCl(pH8.0)
+ 0.5% NP-40 + 100X protease inhibitor + 50X phosphatase inhibitor
34. 10% 過硫酸銨溶液：Ammonium persulfate + ddH₂O
35. 0.2% crystal violet 染劑：Crystal violet + 甲醇 + ddH₂O

參、研究過程或方法

一、研究流程



二、研究方法

(一) 細胞培養：

- 1.自-80°C 的冰箱中取出 MDA-MB-231，於室溫解凍。
- 2.將細胞培養於培養皿中，並置於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中。
- 3.當細胞生長至佔整個培養皿七到八成滿時，進行繼代培養。
- 4.去除培養皿中原有的細胞培養液。
- 5.加入 5mL 的 1X PBS（取 10X PBS 加 ddH₂O 稀釋）清洗，再吸乾丟棄，重複兩次。
- 6.加入 500 μL 的 Trypsin，並置於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中反應 1-2 分鐘，使貼附於培養皿底部的細胞懸浮。
- 7.加入 1mL 的細胞培養液終止 Trypsin 作用，再將培養皿中的液體吸入 15mL 的離心管中。
- 8.加入 5mL 的 1X PBS 溶液清洗，再吸入 15mL 的離心管中。
- 9.離心 1300 rpm、五分鐘。
- 10.去掉上清液，再加入 1mL 的細胞培養液，並混合均勻。
- 11.將細胞懸浮液加入培養皿中，搖晃均勻，並置於於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養。

(二) LP33 菌株鑑定：

- 1.將膠囊內菌粉（市面上的樂亦康益生菌膠囊，含有 LP33 (*L. paracasei* 33)、發酵乳桿菌 (*L. fermentum*)、嗜酸乳桿菌 (*L. acidophilus*) 冷凍乾燥菌粉) 以無菌 PBS 溶解分散。
- 2.取一些液體塗盤到 MRS 固態培養基，並放到 37°C 培養箱培養。
- 3.等長出菌落後，挑選 LP33 菌落，以下列引子對 (primers) 進行 PCR 反應。
5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (PAF primer)
5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3' (536R primer)
- 4.將 PCR 反應獲得的產物以 PAF 引子進行 DNA 定序。

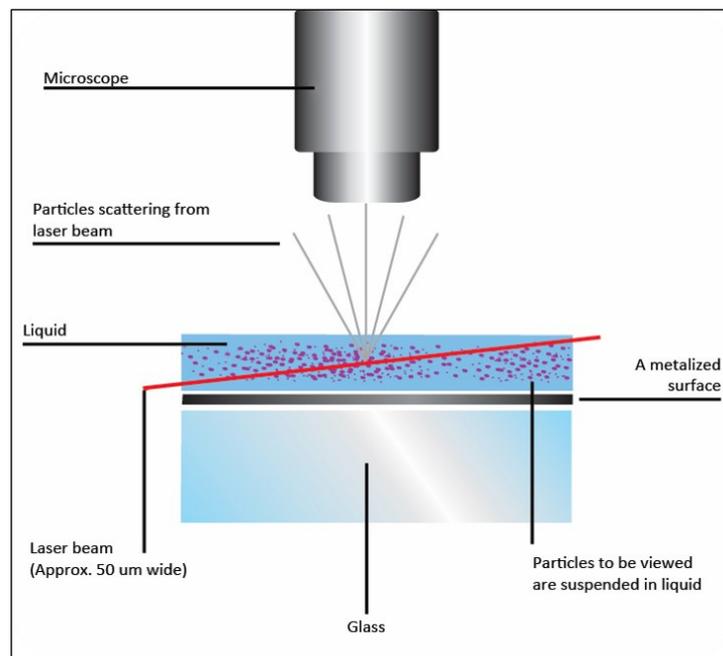
5.將 DNA 定序所得的核酸序列，以 NCBI Blast 網站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 進行比對。

(三) 超濾法：

- 1.將挑選出的 LP33 菌落以 MRS 液態培養基進行隔夜培養。
- 2.吸取培養基中的溶液（含菌），將其離心 6000XG、10 分鐘以初步去除菌體。
- 3.吸取離心後的上清液，過 0.2 μm 的濾膜以完整去除菌體。
- 4.離心 12000XG、5 分鐘，使過濾後的溶液過 100K Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter。
- 5.以 1X PBS 溶液置換，離心 12000XG、5 分鐘，重複三次。
- 6.倒蓋 100K Amicon Ultra-0.5 centrifugal filter，離心 1000XG、5 分鐘。
- 7.取得 LP33 EVs 溶液。

(四) 奈米粒子追蹤分析技術(Nanoparticle Tracking Analysis ; NTA)

1.原理：利用雷射光照射奈米顆粒，使其產生光散射，於顯微鏡下會呈現一顆顆的光點，藉由軟體追蹤這些光點的運動軌跡，提供高解析的粒徑分佈結果，即可計算出平均粒徑大小，又在固定的觀測體積下計算有幾顆粒子，即可獲得濃度訊息 (particles/mL)。

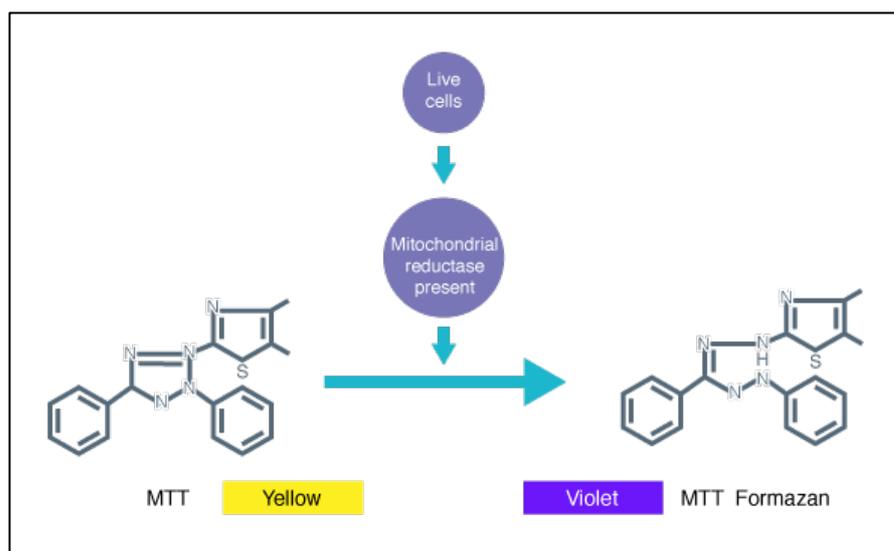


圖二：奈米粒子追蹤分析儀運作原理

2.步驟：將 LP33 EVs 溶液稀釋 400 倍配置成 1 mL 溶液，並注入樣品室中經奈米粒子追蹤分析儀分析粒子直徑分布及粒子濃度。

(五) 細胞存活率分析 (MTT 呈色法)

1.原理：利用比色法測量細胞代謝活性。MTT 為易溶於水之黃色化合物，全名是 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，是一種接受氫離子的染料，與活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶 (Succinate dehydrogenase ; SDH) 和細胞色素 C 作用後，產生氧化還原反應及產物非水溶性的藍紫色甲臍 (Formazan ; $C_{14}H_8N_4S$) 結晶，並沉積於細胞中。再藉由二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide ; DMSO) 有機溶劑將紫色結晶溶解，產生紫色液體，藉由 Microplate reader 測定波長 570 奈米的吸光值，評估細胞存活率，其中活細胞數量越多，顏色越深紫，吸光值的數值越高。



圖三：MTT assay 作用原理

2.步驟：

- (1) 取 MDA-MB-231 細胞並加入不同濃度之 LP33 EVs 溶液和 PBS 溶液/MRS 溶液，種植於 96 孔細胞培養盤中 (2000 細胞/孔)，於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養 72 小時。
- (2) 在每個孔中加入 10 μ L 的 MTT 溶液，於 37°C 反應 2 小時。
- (3) 將細胞培養盤從培養箱取出並移除溶液。

(4) 在每個孔中加入 100 μ L 的 DMSO 溶劑以溶解紫色結晶。

(5) 利用 Microplate reader 於波長 570 奈米下測定吸光值，作呈色分析。

(六) 台盼藍 (Trypan blue) 細胞計數分析

1.原理：利用台盼藍 (Trypan blue) 區分活細胞和死細胞，再透過顯微鏡和細胞計數盤計算細胞數量。因活細胞的細胞膜完整並具有選擇通透性，台盼藍無法進入細胞，因此不會被染色，而死細胞的細胞膜通透性較大，台盼藍染劑可進入細胞內，因此會被染成藍色。

2.步驟：

(1) 取 MDA-MB-231 分別處理 0.1 μ g/ μ L 的 LP33 EVs 溶液和佔總體積 2% 的 MRS 溶液，並種於 12 孔細胞培養盤中 (2x10⁴ 細胞/孔)，於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養 24、48、72 小時。

(2) 將細胞收下，取 10 μ L 細胞懸浮液與 10 μ L Trypan blue 混合均勻。

(3) 取少許混合液自細胞計數盤上方凹槽加入，蓋上蓋玻片。

(4) 於倒立式顯微鏡下觀察，用計數器計算四個大方格之細胞數量。

(5) 將數據轉換成每 mL 中細胞懸浮液之細胞數。

(公式：4 大格的細胞總數/4 x 稀釋倍數 x 10⁴=細胞數/ml)。

(七) 細胞群落形成能力實驗 (Colony formation assay)

1.原理：利用單個細胞可以在體外增殖、發展成細胞群落的特性，計算群落形成率，可表示細胞獨立增生的能力。

2.步驟：

(1) 取 MDA-MB-231 分別處理 0.2 μ g/ μ L 的 LP33 EV 溶液和佔總體積 2% 的 PBS 溶液，以 200 細胞/孔的細胞密度種於 12 孔細胞培養盤中，於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養 7 日，使其形成細胞群落。

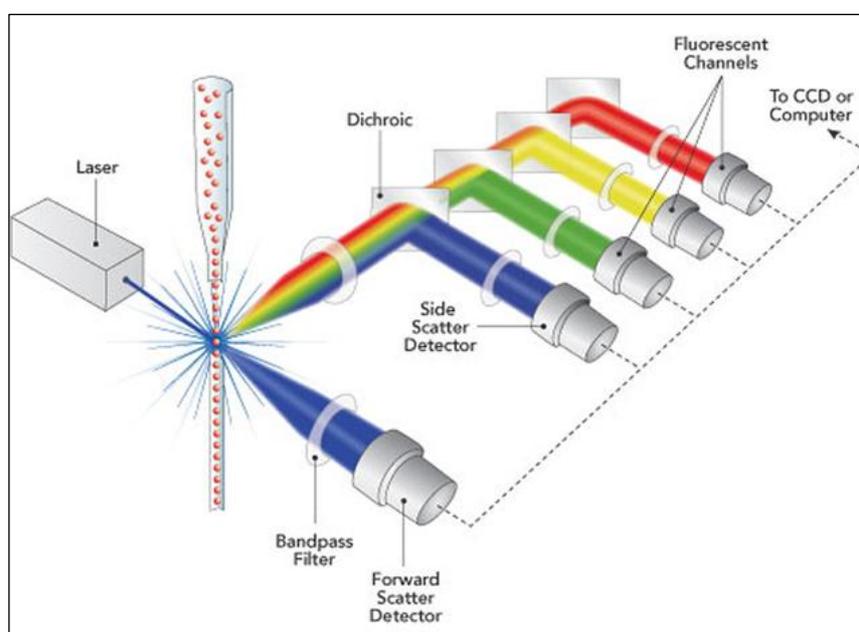
(2) 加入 200 μ L 的 10% formaldehyde 以固定細胞。

(3) 10 分鐘後將溶液移除。

- (4) 加入 50 μ L 的 0.2% crystal violet 染色 30 分鐘。
- (5) 用 1X PBS 溶液將多餘染劑洗去。
- (6) 拍照，並計算細胞群落數做分析。

(八) 流式細胞儀檢測技術

1.原理：以碘化丙啶 (Propidium Iodide ;PI) 對細胞的核酸進行染色，再透過流式細胞儀 (flow cytometry) 收取單細胞的光訊號（螢光訊號、光散射訊號），因 DNA 含量會隨著細胞進入細胞週期的不同階段而有增減，通過光訊號的強弱，可對細胞進行相對 DNA 含量測定，分析細胞於各階段的百分比。



圖四：流式細胞儀運作原理

2.步驟：

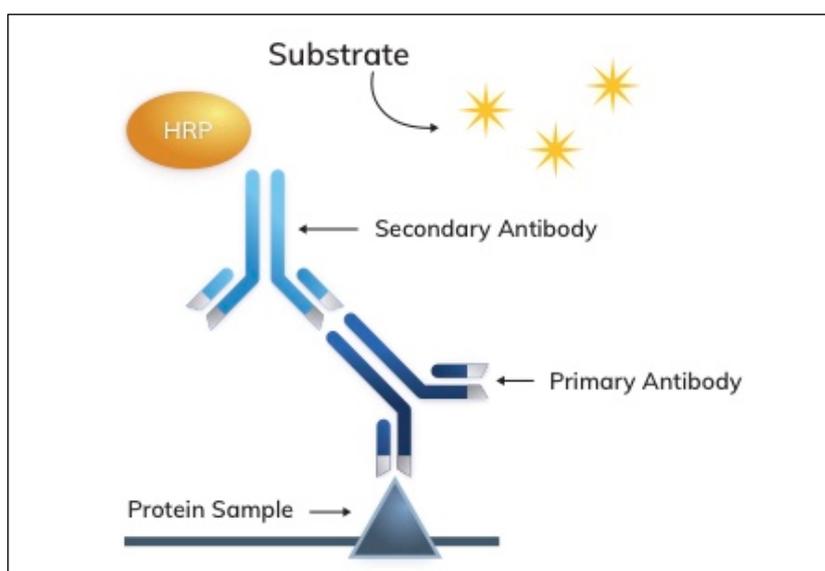
- (1) 將 2×10^5 個 MDA-MB-231 細胞株種於 6 公分培養盤。
- (2) 待隔日貼盤，分別處理 0.1 μ g/ μ L 的 LP33 EVs 溶液和佔總體積 2% 的 PBS 溶液，於 37°C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養 48、72 小時。
- (3) 收取細胞於流式管中，並加入 5 mL 的 70% 乙醇，固定一小時。
- (4) 離心 1000-1500 rpm、10 分鐘，去除上清液。
- (5) 用 1X PBS 清洗 2 次。

(6) 加入 RNase 和 PI 染色，室溫下避光反應 30 分鐘。

(7) 過篩以去除細胞團塊，並將單細胞懸浮液以流式細胞儀檢測 PI 螢光。

(九) 西方墨點法(Western blot)

1.原理：先透過十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) 使不同蛋白質依據分子量分離，將經由 SDS-PAGE 分離的蛋白質樣本轉漬到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride ; PVDF) 膜，再利用特定抗體能夠專一結合其抗原蛋白質的特性，使一級抗體與蛋白質做專一性結合，而帶有山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase ; HRP) 的二級抗體會與一級抗體做專一性結合，最後加入化學發光試劑 (Enhanced-chemiluminescence ; ECL)，其具有受質可於 HRP 的催化下會產生光訊號，通過分析成像的位置和訊號深淺，獲得特定的目標蛋白質在所分析的細胞或組織中表現與否和表現程度之資訊，為分析檢測特定蛋白質之分子檢測技術。



圖五：Western blot 顯色機制

2.步驟：

(1) 蛋白質收集：

- a. 取 2×10^5 個 MDA-MB-231 細胞株種於 6 公分培養盤，加入 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之 LP33 EVs 溶液進行培養。
- b. 72 小時後，去除細胞培養盤中的培養液。

- c. 加入 1 ml 的 1X PBS 溶液清洗，並吸出。
- d. 加入 50 μ L 的 NETN lysis buffer，搖晃均勻並放置冰上 10 分鐘。
- e. 用刮刀刮取細胞，並將細胞吸到微量離心管中。
- f. 離心 12000 rpm、15 分鐘，取上清液至新的微量離心管。
- g. 利用 BCA 定量法測定蛋白質濃度。
- h. 取 100 μ g 的蛋白與適量的 6X SDS loading buffer 混合均勻。
- i. 加熱 95°C 反應十分鐘，最後將樣品冰於 -20°C 保存。

(2) 膠體配置：

- a. 配置下膠溶液（10 mL, 10% 聚丙烯醯胺膠體）：4 mL 的 ddH₂O + 3.3 mL 的 30% 丙烯醯胺-雙丙烯胺溶液 (30% acrylamide mix) + 2.5 mL 的 1.5M Tris-HCl(pH8.8)/SDS + 0.1 mL 的 10% 過硫酸銨溶液 + 0.004 mL 的四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine ; TEMED)。將配置好的下膠溶液加入鑄膠模具中，並加入異丙醇壓平表面，等待 40-50 分鐘凝固。
- b. 去除異丙醇。
- c. 配置上膠溶液（2 mL）：1.4 mL 的 ddH₂O + 0.33 mL 的 30% 丙烯醯胺-雙丙烯胺溶液 + 0.25 mL 的 1M Tris-HCl(pH6.8) + 0.02 mL 的 10% 硫酸十二酯鈉溶液 + 0.02 mL 的 10% 過硫酸銨溶液 + 0.002 mL 的四甲基乙二胺。
- d. 倒入上膠溶液，並插入齒梳，等待 30 分鐘凝固。

(3) 電泳：

- a. 拔除齒梳，架設電泳裝置，倒入適量的 1X Running buffer（取 10X Running buffer 加 ddH₂O 稀釋）。
- b. 分別於 well 中加入蛋白質樣本和 protein marker。
- c. 以 80V 進行電泳約 20-40 分鐘。
- d. 以 100-140V 進行電泳約 120 分鐘。

(4) 轉漬：

- a. 將 PVDF 膜浸泡於甲醇中活化 1-2 分鐘。

- b. 拆膠，並去除上膠。
 - c. 依序將一片海綿、一張濾紙、膠體、PVDF 膜、一張濾紙、一片海綿由下往上疊放於轉漬匣中。
 - d. 於轉漬裝置中放入裝置好的轉漬匣，並使其浸泡於適量的 Transfer Buffer 中。
 - e. 以 100V 作用約 150 分鐘。
- (5) 封閉：於容器內放置 PVDF 膜，加入 5% 脫脂牛奶，於室溫下反應一小時，過程中需緩慢地搖晃，使其反應均勻。
- (6) 抗體反應：
- a. 於容器內放置 PVDF 膜，加入一級抗體溶液，4°C 反應過夜。
 - b. 用 TBS-T 清洗 PVDF 膜，一次 5-10 分鐘，重複三次
 - c. 於容器內放置 PVDF 膜，加入二級抗體溶液，於室溫下反應一小時，過程中需緩慢地搖晃，使其反應均勻。
 - d. 用 TBS-T 清洗 PVDF 膜，一次 5-10 分鐘，重複三次。
 - e. 加入 ECL。
- (7) 進行冷光顯影反應偵測冷光強度。
- (8) 利用軟體 Image J 進行訊號強度分析，以計算目標蛋白質的相對表現量。

肆、研究結果

一、LP33 菌株鑑定

關於核酸序列的比對結果，可以從圖六中的三個數值判斷。Expect 值表示隨機匹配的可能性，其值為 0.0，Identities 值為匹配的鹼基數佔總序列長的百分比，其值為 100%，Gaps 值表示插入或缺失的鹼基數佔總序列長的百分比，其值為 0%。故可知 LP33 菌株的核酸序列完全匹配，確認所挑選的菌落其物種皆為 *Lactobacillus paracasei*。

Lactobacillus paracasei strain ban4-YM-M-D12-67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [MT903047.1](#) Length: 1476 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 510 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
917 bits(496)	0.0	496/496(100%)	0/496(0%)	Plus/Plus

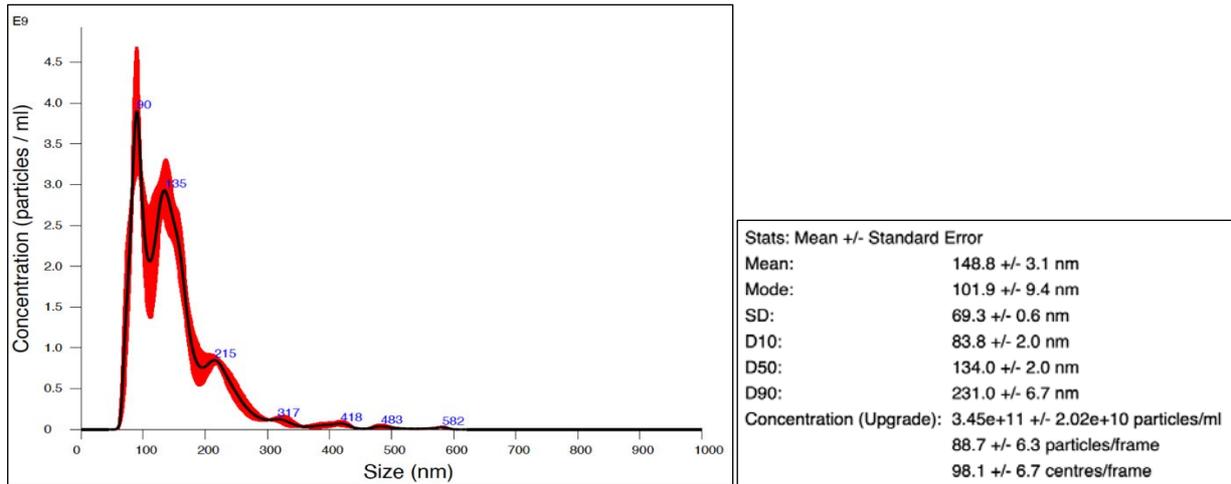
Query	6	GCTATACTGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTC	65
Sbjct	15	GCTATACTGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACCCGAGATTC	74
Query	66	TGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA	125
Sbjct	75	TGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA	134
Query	126	CATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAA	185
Sbjct	135	CATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAA	194
Query	186	GATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	245
Sbjct	195	GATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	254
Query	246	TGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT	305
Sbjct	255	TGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT	314
Query	306	GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA	365
Sbjct	315	GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA	374
Query	366	GTCGTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTGTGTT	425
Sbjct	375	GTCGTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTGTGTT	434
Query	426	GGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGTCGGCGTGACGGTATCCAACAGAAAAGCCA	485
Sbjct	435	GGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGTCGGCGTGACGGTATCCAACAGAAAAGCCA	494
Query	486	CGGCTAACTACGTGCC	501
Sbjct	495	CGGCTAACTACGTGCC	510

Query: 輸入的DNA 序列
Sbjct: 資料庫中比對到的序列

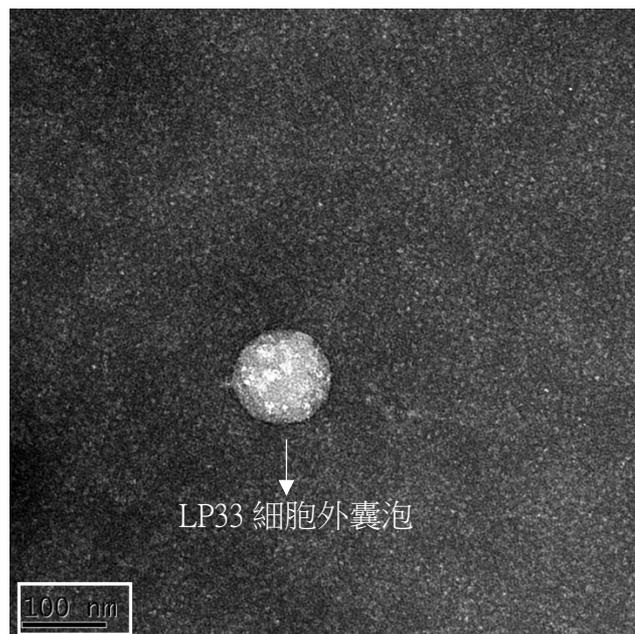
圖六：LP33 菌株核酸序列的比對結果。取菌盤上單一 LP33 菌落，抽取其染色體 DNA，以 PAF 及 536R 引子對進行 PCR 反應，純化 PCR 產物後進行定序分析，得到的 DNA 序列透過 NCBI Blast 網站進行比對。

二、LP33 EVs 粒徑大小和溶液濃度

利用奈米粒子追蹤分析技術 (NTA) 對收集之 LP33 細胞外囊泡 (EVs) 進行粒徑與粒子濃度分析，由圖七結果顯示，LP33 EVs 平均粒徑大小為 148.8 ± 3.1 奈米，LP33 EVs 溶液濃度為 $(3.45 \pm 0.2) \times 10^{11}$ particles/mL。圖八為 LP33 EV 利用穿透式電子顯微鏡觀察，透過圖中的比例尺可知其粒徑大小符合 NTA 分析結果。



圖七：NTA 分析結果。收取 LP33 培養上清液，利用超濾法分離細胞外囊泡溶液，稀釋 400 倍配置成 1 mL 溶液，注入樣品室中經奈米粒子追蹤分析儀分析粒子直徑分布及粒子濃度。



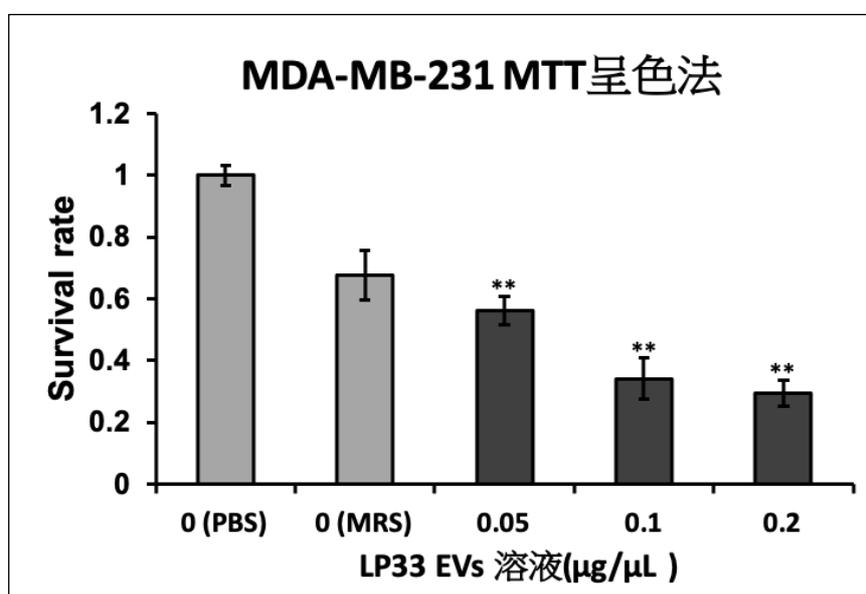
圖八：LP33 EV 的穿透式電子顯微鏡圖。將分離之 LP33 細胞外囊泡溶液檢送至國立成功大學貴重儀器中心進行穿透式電子顯微鏡影像掃描分析。

三、LP33 EVs 是否抑制 MDA-MB-231 的增殖

關於抑制 MDA-MB-231 增殖的研究，共使用三種實驗方法：MTT 呈色法、台酚藍細胞計數分析、細胞群落形成能力實驗(Colony formation assay)。以 MTT 呈色法與台酚藍細胞計數分析研究 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞的短期增生的影響；以細胞群落形成能力實驗檢測對三陰性乳癌細胞長期增生的效應。比較經 LP33 EVs 處理後 MDA-MB-231 的生長情況，進而研究 LP33 EVs 是否會抑制 MDA-MB-231 的增生。

(一) LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞存活率的影響

分別以佔總體積 2% 的 PBS 溶液、MRS 溶液（對照組）和總蛋白濃度為 $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液（實驗組）處理 MDA-MB-231，使其作用 72 小時，再以 MTT 呈色法分析細胞增生情形。實驗結果如圖九所示，實驗組的細胞存活率相較於對照組皆有下降的趨勢，且隨著 LP33 EVs 溶液濃度的增加，細胞存活率下降的趨勢越明顯，表示 LP33 EVs 對 MDA-MB 231 的增殖具抑制效果。

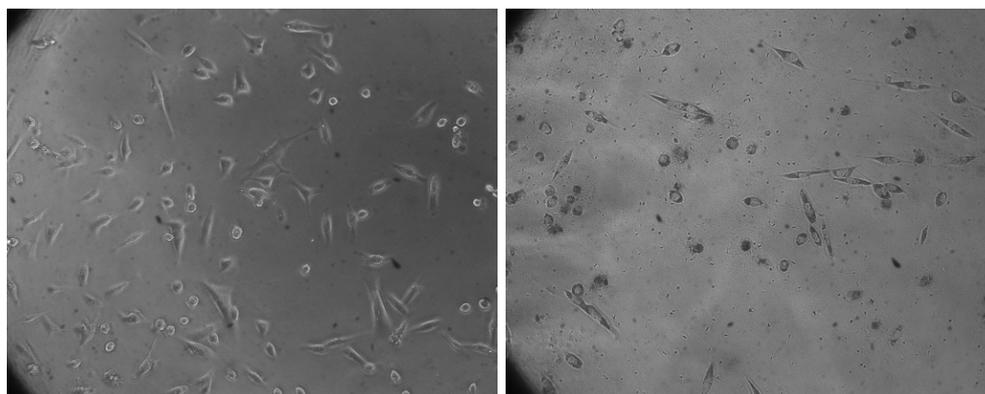


圖九：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞存活率的影響。將 MDA-MB-231 細胞以 2000 個／孔之細胞量注入 96 孔細胞培養盤，並加入不同濃度之 LP33 EVs 溶液或佔總體積 2% 的 PBS 溶液、MRS 溶液於 37°C 且有 5% CO_2 的恆溫培養箱中培養 72 小時，最後以 MTT 法分析細胞存活率。（數據呈現以佔總體積 2% 的 PBS 溶液處理組的 OD570 奈米平均讀值為固定檢定母體，**表示 $p < 0.01$ ）

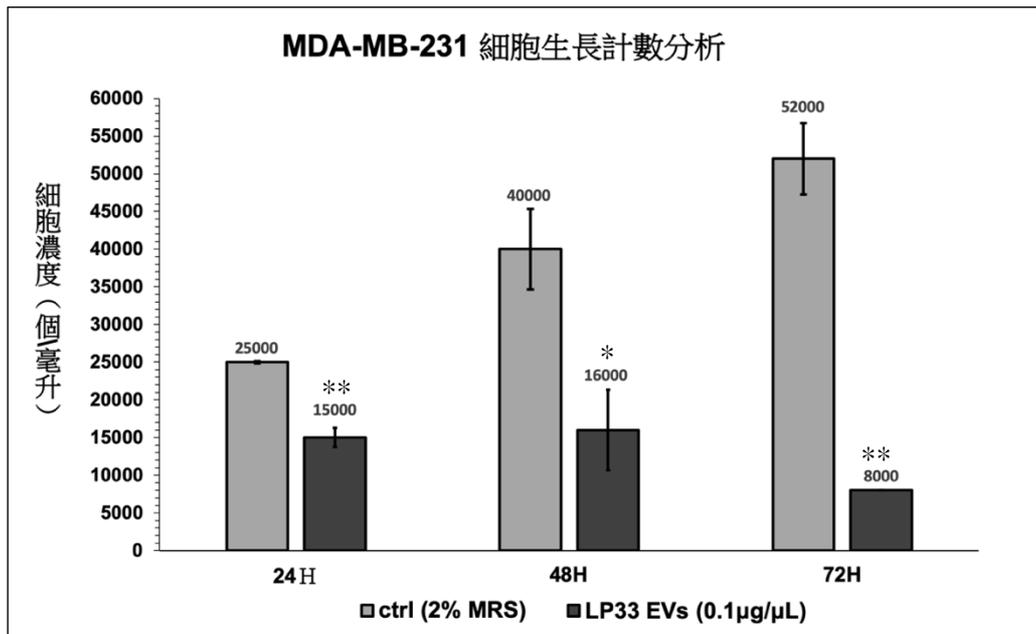
(二) LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞濃度的影響

分別以佔總體積 2% 的 MRS 溶液（對照組）和總蛋白濃度為 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液（實驗組）處理 MDA-MB-231，使其作用 24、48、72 小時。圖十為以顯微鏡觀察作用 72 小時的對照組和實驗組，可發現 MDA-MB-231 細胞量顯著減少。

透過 Trypsin 收取細胞，以台酚藍染色，再利用細胞計數盤觀察計算活細胞數量，結果如圖十一所示，對照組細胞濃度隨時間持續上升，細胞穩定生長分裂；實驗組存活細胞數量在三個檢測的時間點都顯著較對照組少，甚至在 72 小時的時間點存活細胞數量低於 24 或 48 小時，顯示 LP33 EVs 可顯著抑制 MDA-MB-231 細胞增生，且 LP33 EVs 溶液達有效作用的最短時間為 72 小時。



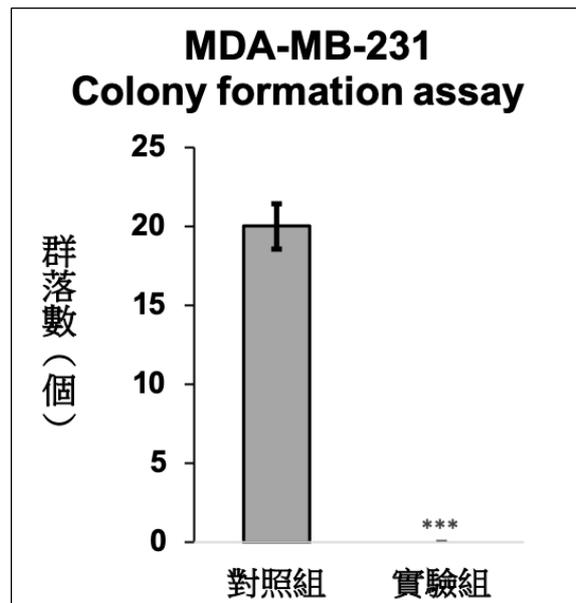
圖十：MDA-MB-231 細胞經 LP33 EVs 處理後的細胞型態。以 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之 LP33 EVs 溶液加入 MDA-MB-231 細胞培養基，作用 72 小時後，以倒立式顯微鏡進行拍照。對照組（左圖）和實驗組（右圖）的 MDA-MB-231 細胞（倍率：200X）



圖十一：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞濃度的影響。取 MDA-MB-231 細胞以 2×10^4 個/孔之細胞量種於 12 孔細胞培養盤中，並加入 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之 LP33 EVs 溶液，作用 24、48、72 小時後，收取細胞以台酚藍染色並進行細胞濃度計算。（數據呈現以各時間點的 MRS 溶液處理組的平均細胞濃度為固定檢定母體，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ）

（三）LP33 EVs 對 MDA-MB-231 群落形成能力的影響

分別以佔總體積 2% 的 PBS 溶液（對照組）和總蛋白濃度為 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液（實驗組）處理 MDA-MB-231，置於 37°C 且有 5% CO_2 的恆溫培養箱中培養 7 日。實驗結果如圖十二所示，於長時間培養後，對照組能夠形成群落，而實驗組則無法形成群落，表示實驗組細胞完全失去獨立增生的能力。

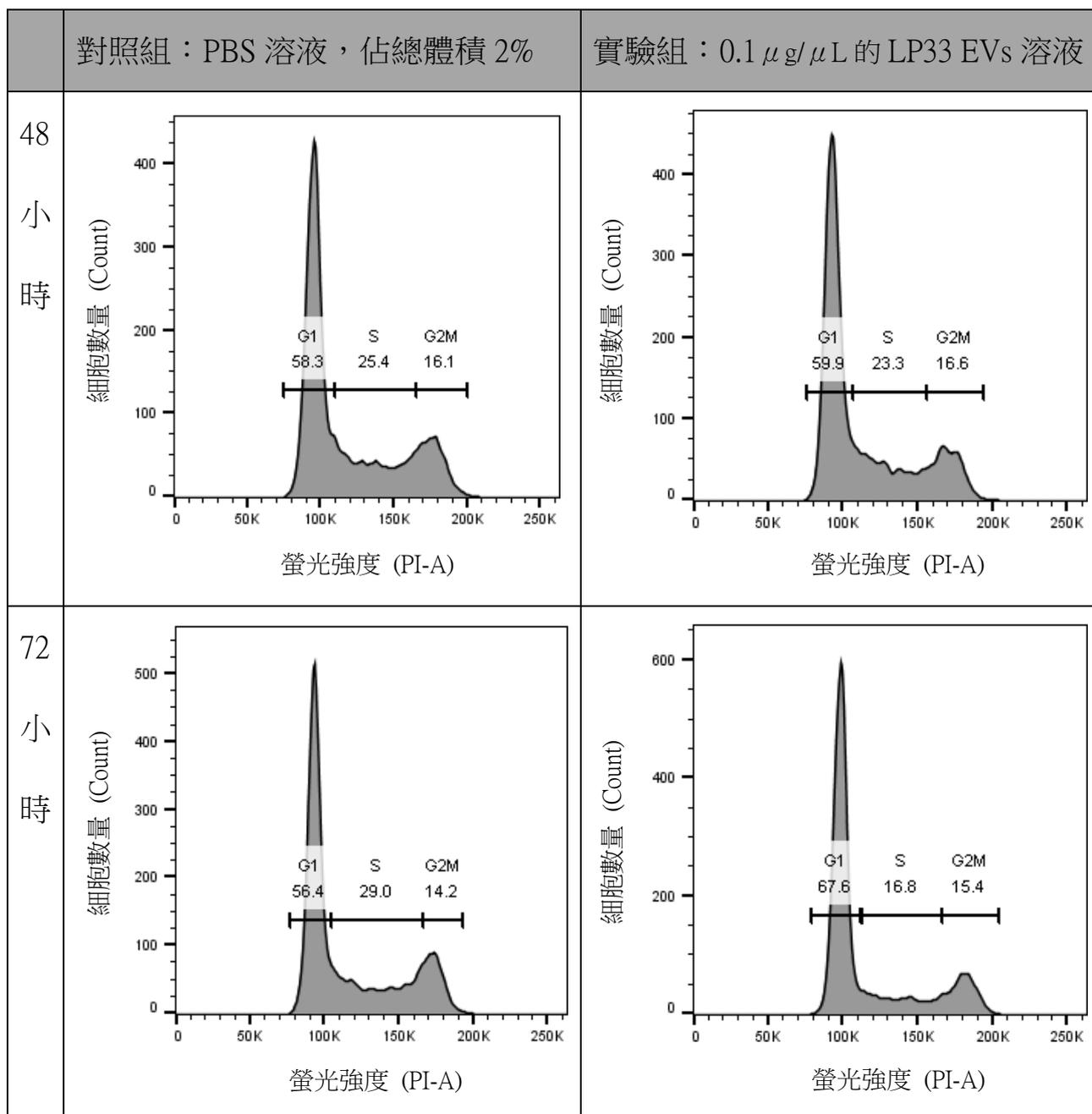


圖十二：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 群落形成能力的影響。取 MDA-MB-231 細胞以 200 個／孔之細胞量種於 12 孔細胞培養盤中，並加入 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之 LP33 EVs 溶液，置於 37 °C 且有 5% CO₂ 的恆溫培養箱中培養 7 日後，將細胞以結晶紫染劑進行細胞群落染色及計數。（數據呈現以佔總體積 2% 的 PBS 溶液處理組的平均細胞群落數為固定檢定母體，***表示 $p < 0.005$ ）

四、LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞週期分布的影響

根據上述實驗結果，接續欲了解 LP33 EVs 抑制 MDA-MB-231 的增殖，是否與 MDA-MB-231 細胞週期分布遭影響有關，故利用 PI 染劑搭配流式細胞儀檢測技術，分析細胞週期不同階段的分布比例。分別以佔總體積 2% 的 PBS 溶液（對照組）和總蛋白濃度為 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液（實驗組）處理 MDA-MB-231，使其作用 48、72 小時。實驗結果如表一所示，作用 48 小時的實驗組與對照組的分布沒有明顯的差異，表示尚未達到 LP33 EVs 的最佳作用時間，然而作用 72 小時的實驗組相較於對照組於 G1 期和 S 期皆有明顯的分布變化，停留在 G1 期的細胞比例（對照組：56.4；實驗組：67.6），顯示增加，進入 S 期的細胞比例（對照組：29.0；實驗組：16.8），顯示減少，顯示 LP33 EVs 的處理使 MDA-MB-231 產生 G1 期停滯。

表一：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞週期分布的影響。

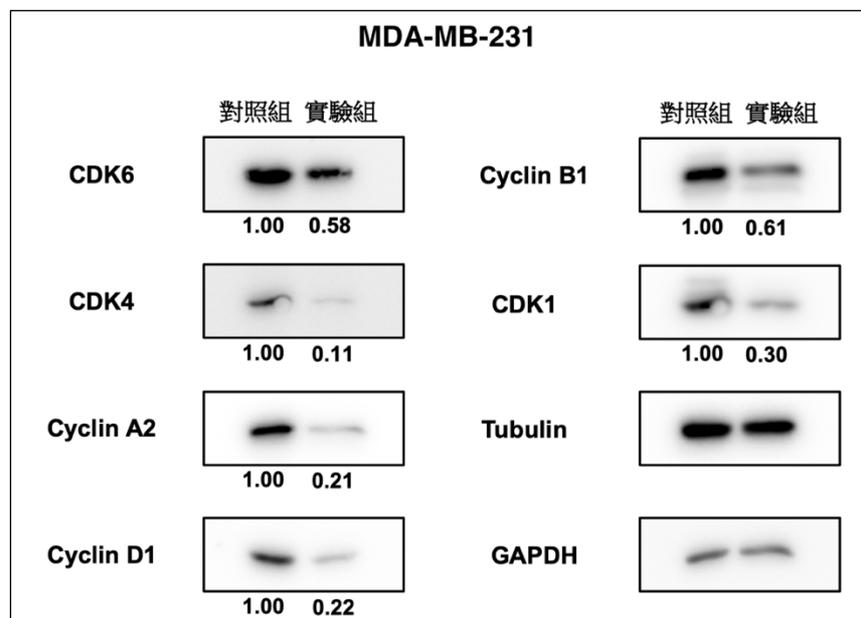


註：取 2×10^5 個 MDA-MB-231 細胞株種於 6 公分培養盤，加入 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之 LP33 EVs 溶液，作用 48、72 小時後，收取細胞以 PI 染色法及流式細胞儀分析細胞週期分佈，各細胞週期比例以 WINMDI 軟體進行統計分析。

五、LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白表現量的影響

根據流式細胞儀檢測技術實驗的結果，進一步探討 MDA-MB-231 細胞週期分布的差異，是否是因 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白表現遭抑制所致，故利用西方墨點法，檢測

LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白表現量的影響，分別以佔總體積 2% 的 PBS 溶液（對照組）和總蛋白濃度為 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液（實驗組）處理 MDA-MB-231，使其作用 72 小時，結果如圖十三所示。實驗組與對照組的 GAPDH 和 Tubulin 訊號相當，表示注入電泳齒槽的總蛋白量相同；實驗組的週期素蛋白（Cyclin A2、Cyclin B1 及 Cyclin D1）與週期素依賴性磷酸酶（CDK1、CDK4 及 CDK6）的表現量相較於對照組有明顯的減少，顯示 LP33 EVs 的處理能使 MDA-MB-231 關於細胞週期調節蛋白（Cyclin A2、Cyclin B1、Cyclin D1、CDK1、CDK4 及 CDK6）的表現受抑制，進而干擾細胞周期進行，致使細胞無法順利增生。



圖十三：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白表現量的影響。取 2×10^5 個 MDA-MB-231 細胞株種於 6 公分培養盤，加入 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之 LP33 EVs 溶液，作用 72 小時後，收取細胞以西方墨點法分析細胞週期調節蛋白的表現，圖中數值為訊號強度定量分析結果。

伍、討論

一、LP33 的細胞外囊泡具抑制三陰性乳癌細胞增殖的作用：

本研究結果證明 LP33 的細胞外囊泡具抑制三陰性乳癌細胞增殖的作用，且在同一作用時間下，LP33 的細胞外囊泡溶液濃度愈高，抑制增殖反應效果愈明顯，表示其具濃度依存性 (Concentration dependence)，而其可能機制為透過抑制細胞週期調節蛋白 (Cyclin D1、CDK4、CDK6) 的表現 (圖十二)，使細胞無法通過 G1 期進入 S 期的檢查點，因而停滯在 G1 期的細胞比例增加，這樣的細胞無法進行後續 DNA 複製、細胞分裂等階段，導致細胞無法順利增殖。

二、未來展望：

本研究使用的 LP33 菌株為經健康食品認證之益生菌，且景岳生物科技公司 (益生菌膠囊來源) 曾以小鼠脾臟細胞進行安全性測試，結果顯示對其存活無顯著影響。未來可選用人類正常細胞株 (如：MCF10A 人類正常乳腺上皮細胞和 HaCaT 人類正常表皮細胞) 進行檢測，以確定 LP33 細胞外囊泡對正常細胞無毒性反應。

過去針對革蘭氏陽性菌之細胞外囊泡對於宿主的影響，已知具有免疫調節的功能，未來將可以進一步探討 LP33 之細胞外囊泡對於抗癌免疫力的影響，例如是否可活化第一型輔助性 T 細胞，或增加自然殺手細胞的活性等。後續研究可著手於分析 LP33 細胞外囊泡的成分 (核酸、胜肽或蛋白質)，並針對 LP33 細胞外囊泡內用以抑制癌細胞之細胞週期調節蛋白表現的特定物質進行研究，可利用挑選對癌細胞較無抑制效果的其他副乾酪乳酸桿菌菌株作為對照組，以質譜法分析內含之蛋白/胜肽差異，或以次世代定序分析內含之核酸差異等，再利用合成胜肽或核酸片段驗證抗癌效果。然而，因革蘭氏陽性菌的細胞外囊泡仍是很年輕的領域，尚有一些基礎問題待闡明，若要清楚了解 LP33 的細胞外囊泡的作用機制尚需後續更多研究。在未來臨床醫學應用上，如 LP33 等益生菌的細胞外囊泡，有望成為輔助化學治療或放射線治療的藥物，藉由降低化療藥物、放射線使用劑量，減少副作用的產生。

陸、結論

一、本研究發現 LP33 的細胞外囊泡具以下性質：

- (一) 平均粒徑大小為 148.8 ± 3.1 奈米。
- (二) 可抑制三陰性乳癌細胞的增殖。
- (三) 抑制增生效果達一定差異的最短時間為 72 小時。
- (四) 使三陰性乳癌細胞停滯於 G1 期的比例增加。
- (五) 抑制三陰性乳癌細胞細胞週期調節蛋白 (Cyclin A2、Cyclin B1、Cyclin D1、CDK1、CDK4 及 CDK6) 的表現。

二、LP33 的細胞外囊泡抑制三陰性乳癌細胞增殖的可能機制：透過抑制細胞週期調節蛋白的表現，使停滯在 G1 期的細胞比例增加，導致多數細胞無法經歷完整的細胞週期，最後無法順利增殖。

柒、參考文獻資料

1. 唐波、何大維、李典、郭文浩、張丹、魏光輝（2018）。大腸桿菌胞外囊泡對人神經母細胞瘤 SK-N-SH 細胞增殖、凋亡和遷移的影響。 *南方醫學大學學報*, 38 (03), 334—339。 <https://www.j-smu.com/CN/Y2018/V38/I03/334>
2. Behzadi, E., Hosseini, H.S., & Fooladi, A.A.I. (2017). The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. *Microbial Pathogenesis*, 110, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.016>
3. Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 620 – 630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
4. Choi, J.H., Moon, C.M., Shin, T.S., Kim, E.K., McDowell, A., Jo, M.K., Joo, Y.H., Kim, S.E., Jung, H.K., Shim, K.N., Jung, S.A., & Kim, Y.K. (2020). *Lactobacillus paracasei*-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Experimental & Molecular Medicine*, 52, 423 – 437. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0359-3>
5. Chronopoulos, A., & Kalluri, R. (2020). Emerging role of bacterial extracellular vesicles in cancer. *Oncogene*, 39, 6951 – 6960. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01509-3>
6. Dean, S.N., Rimmer, M.A., Turner, K.B., Phillips, D.A., Caruana, J.C., Hervey IV, W.J., Leary, D.H., & Walper, S.A. (2020). *Lactobacillus acidophilus* Membrane Vesicles as a Vehicle of Bacteriocin Delivery. *Frontiers in Microbiology*, 11:710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00710>
7. Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2020). The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1960. <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>

8. Doyle, L.M., & Wang, M.Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7):727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
9. Forsberg, M.M., Björkander, S., Pang, Y., Lundqvist, L., Ndi, M., Ott, M., Escribá, I.B., Jaeger, M.C., Roos, S., & Sverremark-Ekström, E. (2019). Extracellular Membrane Vesicles from *Lactobacilli* Dampen IFN- γ Responses in a Monocyte-Dependent Manner. *Scientific Reports*, 9:17109. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53576-6>
10. Gao, Y., Qin, Y., Wan, C., Sun, Y., Meng, J., Huang, J., Hu, Y., Jin, H., & Yang, K. (2021). Small Extracellular Vesicles: A Novel Avenue for Cancer Management. *Frontiers in Oncology*, 11:638357. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.638357>
11. Kim, O.Y., Park, H.T., Dinh, N.T.H., Choi, S.J., Lee, J., Kim, J.H., Lee, S.W., & Gho, Y.S. (2017). Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nat Commun*, 8, 626. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>
12. Ñahui Palomino, R.A., Vanpouille, C., Costantini, P.E., & Margolis, L. (2021). Microbiota – host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language. *PLOS Pathogens*, 17(5): e1009508. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009508>
13. Suryadinata, R., Sadowski, M.C., & Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience Reports*, 30(4):243-55. <https://doi.org/10.1042/BSR20090171>
14. Vargoorani, M.E., Modarressi, M.H., Vaziri, F., Motevaseli, E., & Siadat, S.D. (2020). Stimulatory effects of *Lactobacillus casei* derived extracellular vesicles on toll-like receptor 9 gene expression and cytokine profile in human intestinal epithelial cells [Electronic version]. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19, 223 – 231. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00495-3>

圖二：https://ins.dksh.tw/stories_detail_13.htm

圖三：https://www.seeingbioscience.com/tech_1_2.html

圖四：<https://kknews.cc/science/zmabxrg.html>

圖五：<https://www.azurebiosystems.com/blog/beginning-chemiluminescent-western-blotting/>

【評語】 052003

研究 LP33 的細胞外囊泡 (LP33 *extracellular vesicles* ; LP33 EVs) 是否會抑制三陰性乳癌細胞的增殖，並且進一步探討其可能的分子機制。實驗的目的探究 LP33 的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞週期中各階段分布的影響、癌細胞的增殖、細胞週期調節蛋白表現的影響。課題本身具應用性，實驗方法說明詳盡可行。本作品研究主題清楚且聚焦，適時參考前人的文獻資料做討論。惟引用之圖說應註明出處。由實驗結果得知，LP33 的細胞外囊泡可透過抑制細胞週期中的 G1 期，進而抑制三陰性乳癌細胞的增殖。有以下建議：

1. 使用一種細胞株很難得到可信的結果，建議使用兩種以上三陰性乳癌細胞株來做實驗可能比較好。可以增加測試其他的細胞功能，如細胞外囊泡對遷移的影響。
2. 本研究已有粒徑大小的分析及穿透式電子顯微鏡的實驗結果，標題使用「外囊泡」應該可更細的判定是屬於外泌體或是微泡?最好有更多數據來證明你分離的是正確的細胞外囊泡。
3. 建議比較正常細胞當成對照組，可使用相同 0.1ug/uL 濃度處理人類正常細胞株，觀察是否會抑制正常細胞的增殖，以區別是對癌細胞專一性或者對所有細胞都有毒性?

作品簡報

「抑」生菌—

探討 LP33 (*Lactobacillus paracasei* 33)
的細胞外囊泡對三陰性乳癌細胞增殖的影響及機制

科別：動物與醫學學科

組別：高級中等學校組

前言

研究動機

- 一、三陰性乳癌具高度基因變異性，且患者之雌激素接受體、黃體素受體和第二型人類上皮生長受體呈陰性，可選擇的標靶藥物較少且化療的預後不佳。
- 二、研究顯示益生菌可以抑制不同類型癌症的發生與發展，其細胞外囊泡攜帶來自母細胞的生物活性成分，又雙層磷脂膜結構則能使其避免受到細胞外環境的不利影響。

研究目的

分析 LP33 細胞外囊泡的粒徑大小與型態，研究其是否抑制三陰性乳癌細胞(MDA-MB-231)的增殖，並進一步探討可能的分子機制，著重於對細胞週期分布和細胞週期調節蛋白表現的影響。

研究流程與方法

鑑定 LP33 菌株

從益生菌膠囊的內菌粉中培養並挑選 LP33 菌落，再利用 DNA 定序，進行序列比對。

分離 LP33 的細胞外囊泡
並分析粒徑大小和型態

自 LP33 的細胞培養液（含菌）分離細胞外囊泡，再分析粒徑大小與粒子濃度。

研究 LP33 的細胞外囊泡
是否抑制 MDA-MB-231 的增殖

- 短期效應：分析細胞存活率（72小時）與計算不同時間（24、48、72小時）作用下的細胞濃度。
- 長期效應：檢測細胞群落形成能力。

探究 LP33 的細胞外囊泡
對 MDA-MB-231 細胞週期
分布的影響

分析細胞於細胞週期不同階段的比例。

檢測 LP33 的細胞外囊泡
對 MDA-MB-231 細胞週期
調節蛋白表現的影響

檢測細胞週期調節蛋白的表現量。

研究結果

一、LP33 菌株鑑定

- 由 Expect 值 (隨機匹配的可能性)、Identities 值 (匹配的鹼基數佔總序列長的百分比) 及 Gaps 值 (插入或缺失的鹼基數佔總序列長的百分比) 判斷
- LP33 菌株的核酸序列完全匹配，即確認此菌落物種為 *Lactobacillus paracasei*。

Lactobacillus paracasei strain ban4-YM-M-D12-67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [MT903047.1](#) Length: 1476 Number of Matches: 1

Range 1: 15 to 510 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
917 bits(496)	0.0	496/496(100%)	0/496(0%)	Plus/Plus

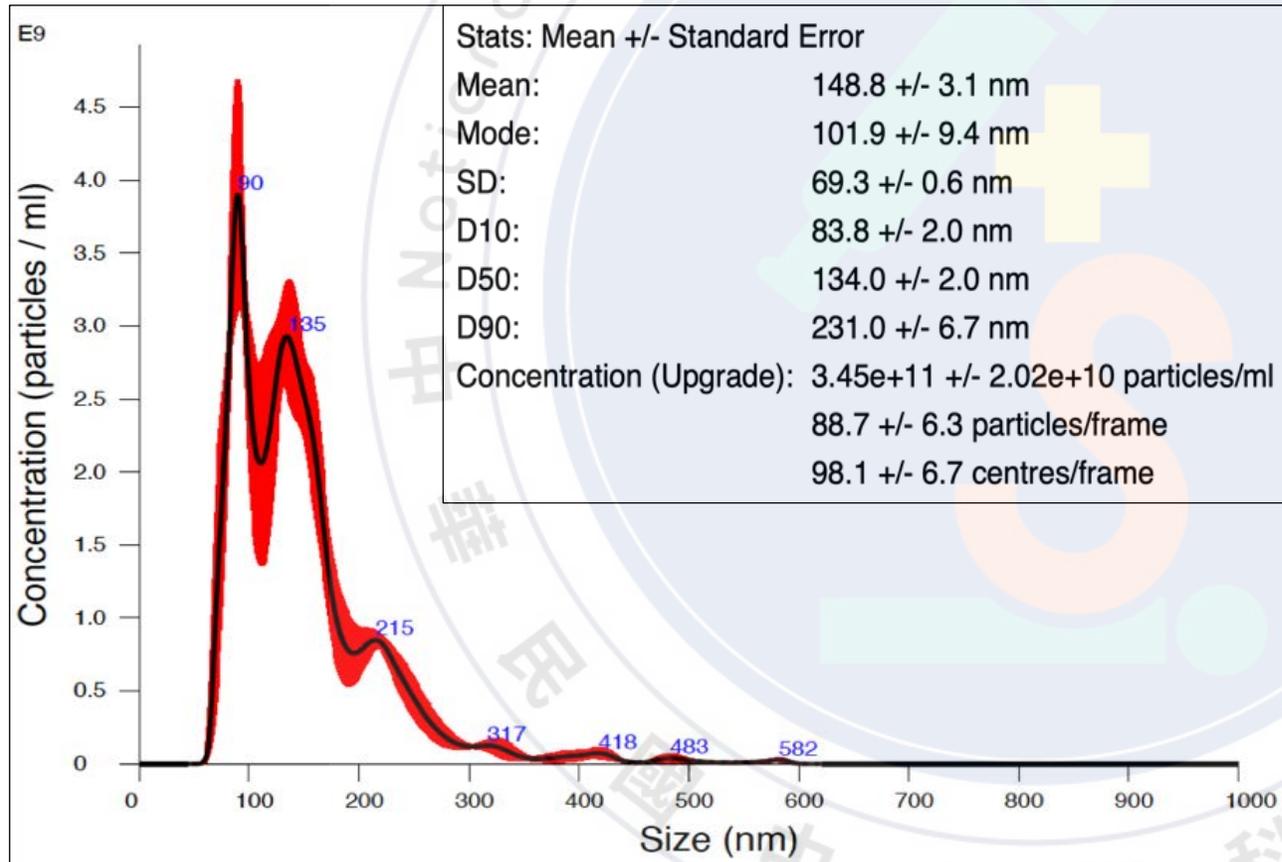
Query	6	GCTATACTGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACA	65
Sbjct	15	GCTATACTGCAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACA	74
Query	66	TGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA	125
Sbjct	75	TGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA	134
Query	126	CATTTGGAAACAGATGCTAATACCCGATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAA	185
Sbjct	135	CATTTGGAAACAGATGCTAATACCCGATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAA	194
Query	186	GATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	245
Sbjct	195	GATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	254
Query	246	TGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT	305
Sbjct	255	TGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT	314
Query	306	GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATGGACGCAA	365
Sbjct	315	GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCACAATGGACGCAA	374
Query	366	GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTT	425
Sbjct	375	GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTT	434
Query	426	GGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCA	485
Sbjct	435	GGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCA	494
Query	486	CGGCTAACTACGTGCC	501
Sbjct	495	CGGCTAACTACGTGCC	510

Query: 輸入的DNA序列
Sbjct: 資料庫中比對到的序列

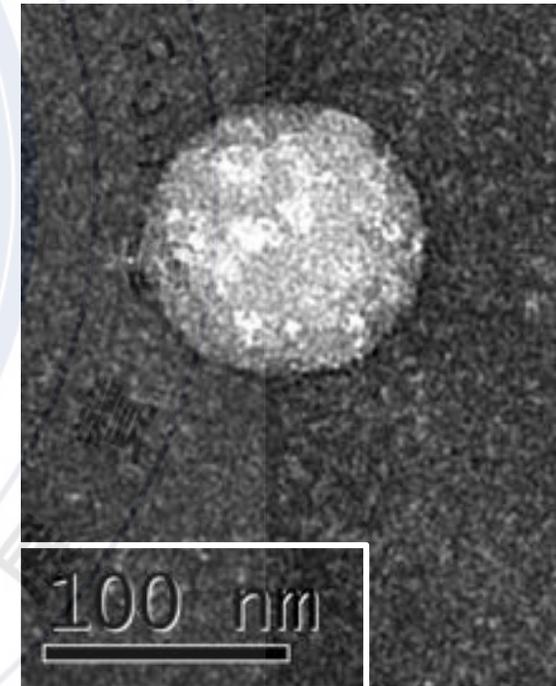
圖一：LP33 菌株核酸序列的比對結果

二、分析 LP33 細胞外囊泡 (EVs) 的粒徑大小與型態

- LP33 EVs 平均粒徑大小為 148.8 ± 3.1 奈米。
- 以穿透式電子顯微鏡觀察 LP33 EVs，透過圖三中的比例尺可知其粒徑大小符合粒徑分析儀分析結果。



圖二：粒徑分析儀分析結果

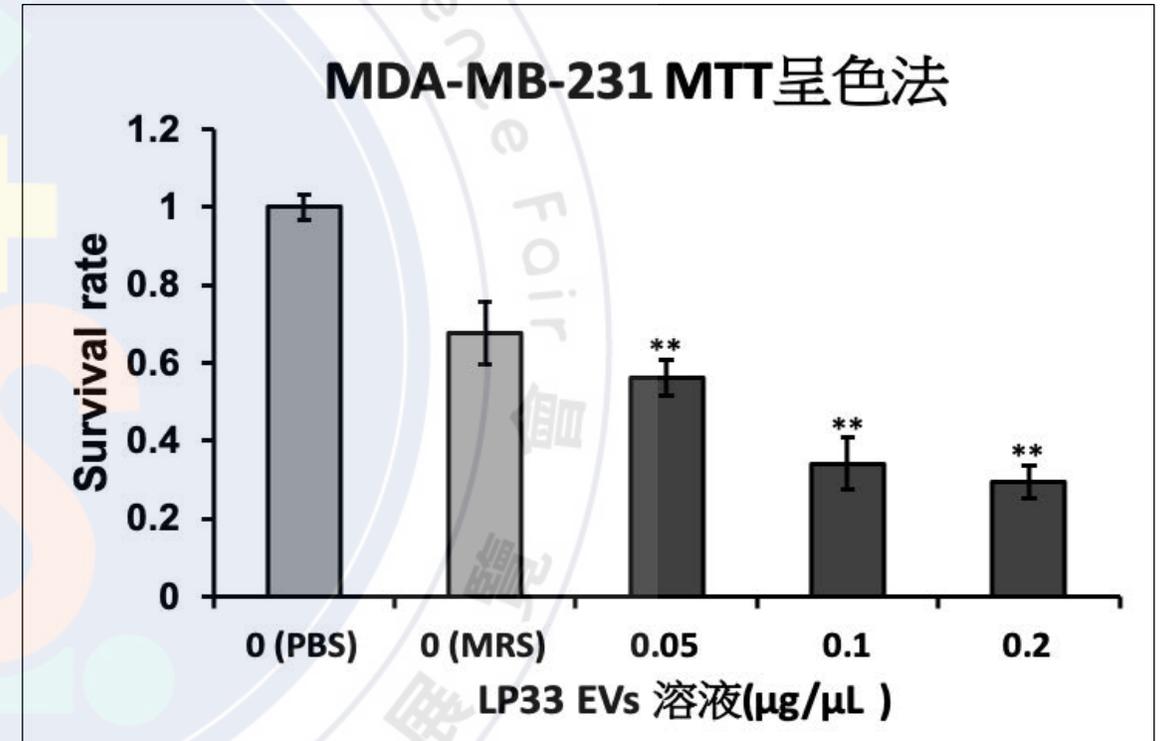


圖三：LP33 EVs 的穿透式電子顯微鏡圖

三、研究 LP33 細胞外囊泡是否抑制 MDA-MB-231 的增殖

(一) LP33 細胞外囊泡對 MDA-MB-231 細胞存活率的影響

- 對照組:佔總體積 2% 的 PBS 溶液與 MRS 溶液
- 實驗組:0.05、0.1及0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液
- 實驗組的細胞存活率相較於對照組皆有下降的趨勢，且隨著 LP33 EVs 溶液濃度的增加，下降的趨勢越明顯。
- LP33 細胞外囊泡會抑制 MDA-MB-231 的增殖。

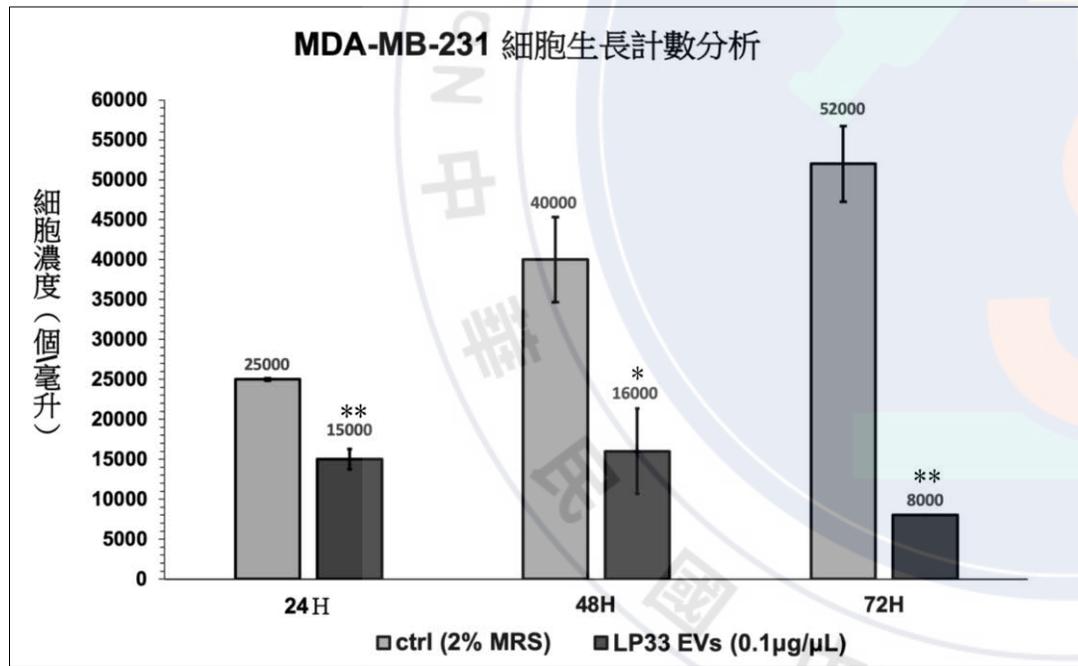


圖四：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞存活率的影響（以佔總體積 2% 的 PBS 溶液為固定檢定母體，**表示 $p < 0.01$ ）

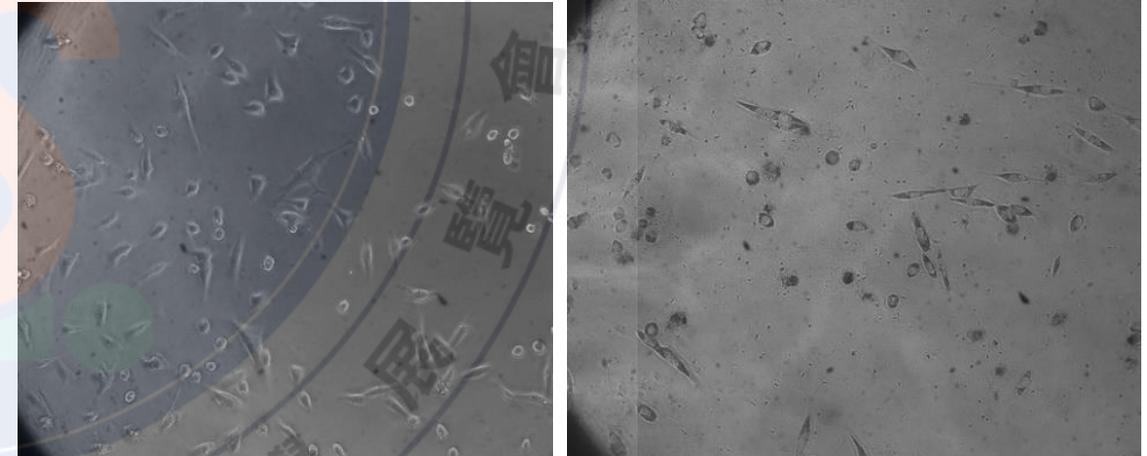
三、研究 LP33 細胞外囊泡是否抑制 MDA-MB-231 的增殖

(二) LP33 細胞外囊泡對 MDA-MB-231 細胞濃度的影響

- 對照組的細胞濃度隨時間持續上升；而實驗組的細胞濃度在三個檢測的時間點都較對照組少。
- LP33 細胞外囊泡可顯著抑制 MDA-MB-231 細胞增生。
- 以顯微鏡觀察作用 72 小時的 MDA-MB-231，可發現實驗組細胞量明顯減少。



圖五：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞濃度的影響
(*表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$)

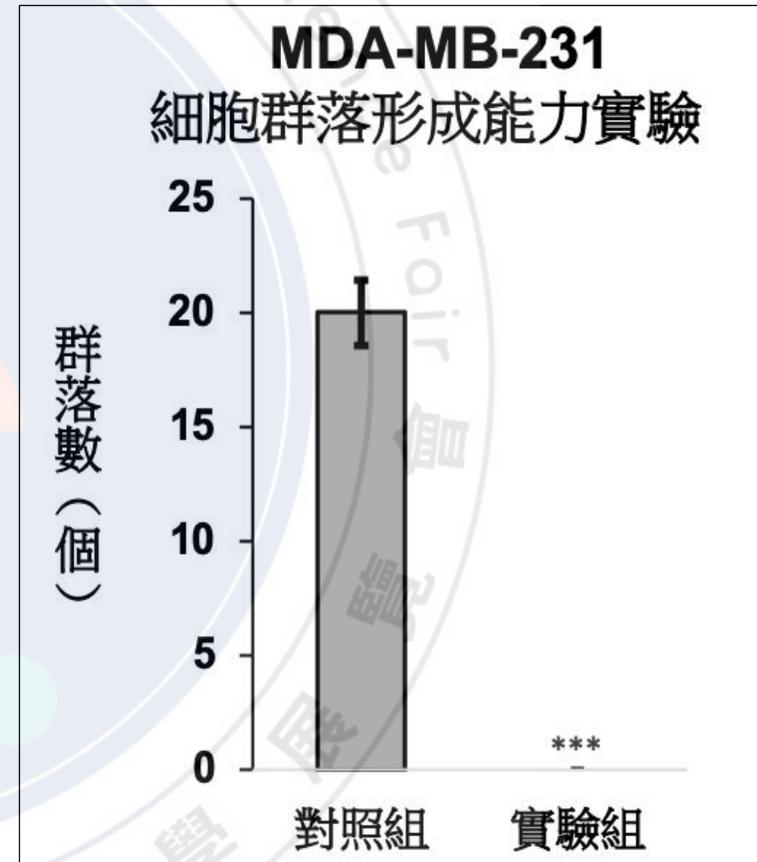


圖六：作用72小時的 MDA-MB-231 (倍率：200X)
(左) 對照組 (右) 實驗組

三、研究 LP33 細胞外囊泡是否抑制 MDA-MB-231 的增殖

(三) LP33 細胞外囊泡對 MDA-MB-231 群落形成能力的影響

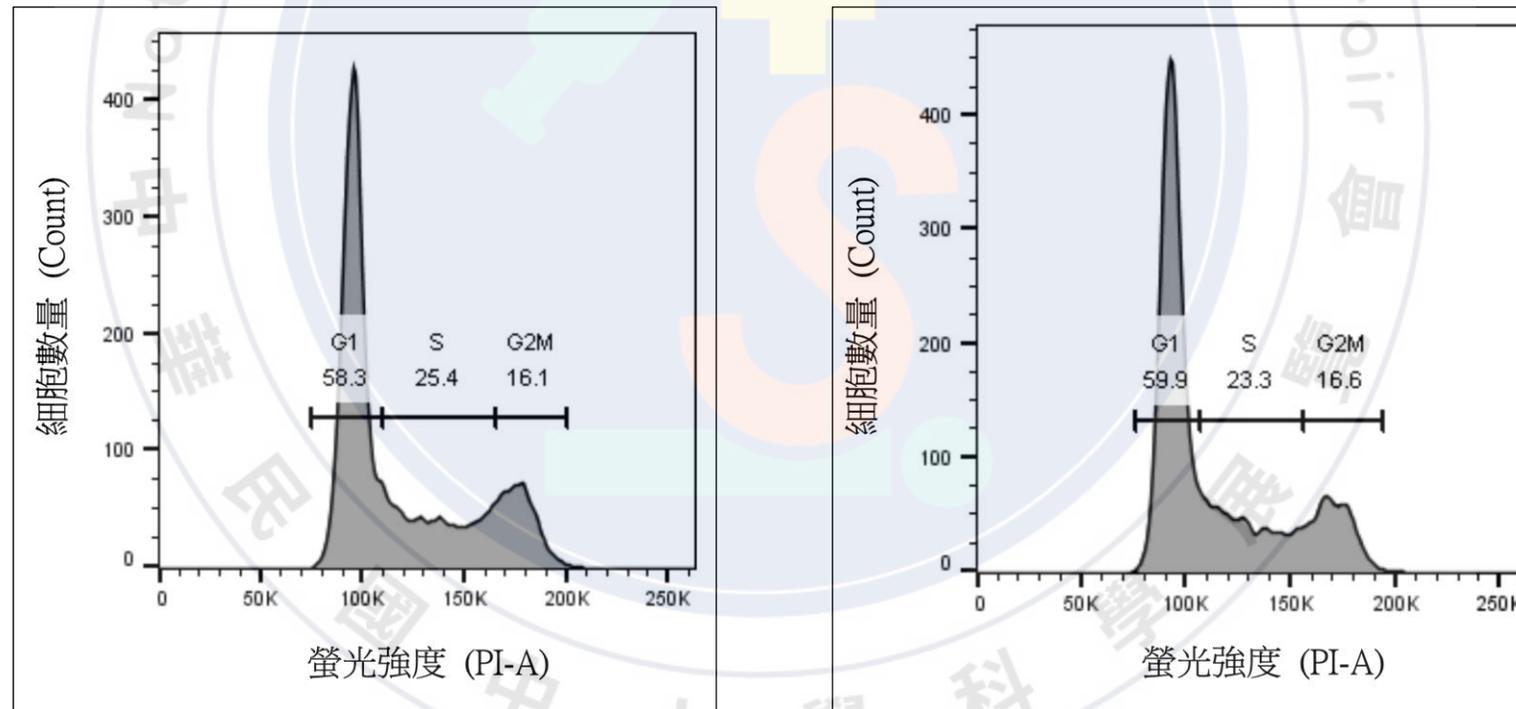
- 對照組:佔總體積 2% 的 PBS 溶液
實驗組:0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液
- 經長時間培養，對照組的細胞能夠獨立形成群落，而實驗組的細胞則無法。
- 經 LP33 細胞外囊泡處理之細胞會完全失去獨立增生的能力。



圖七：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 群落形成能力的影響 (***)表示 $p < 0.005$)

四、LP33 細胞外囊泡對 MDA-MB-231 細胞週期分布的影響

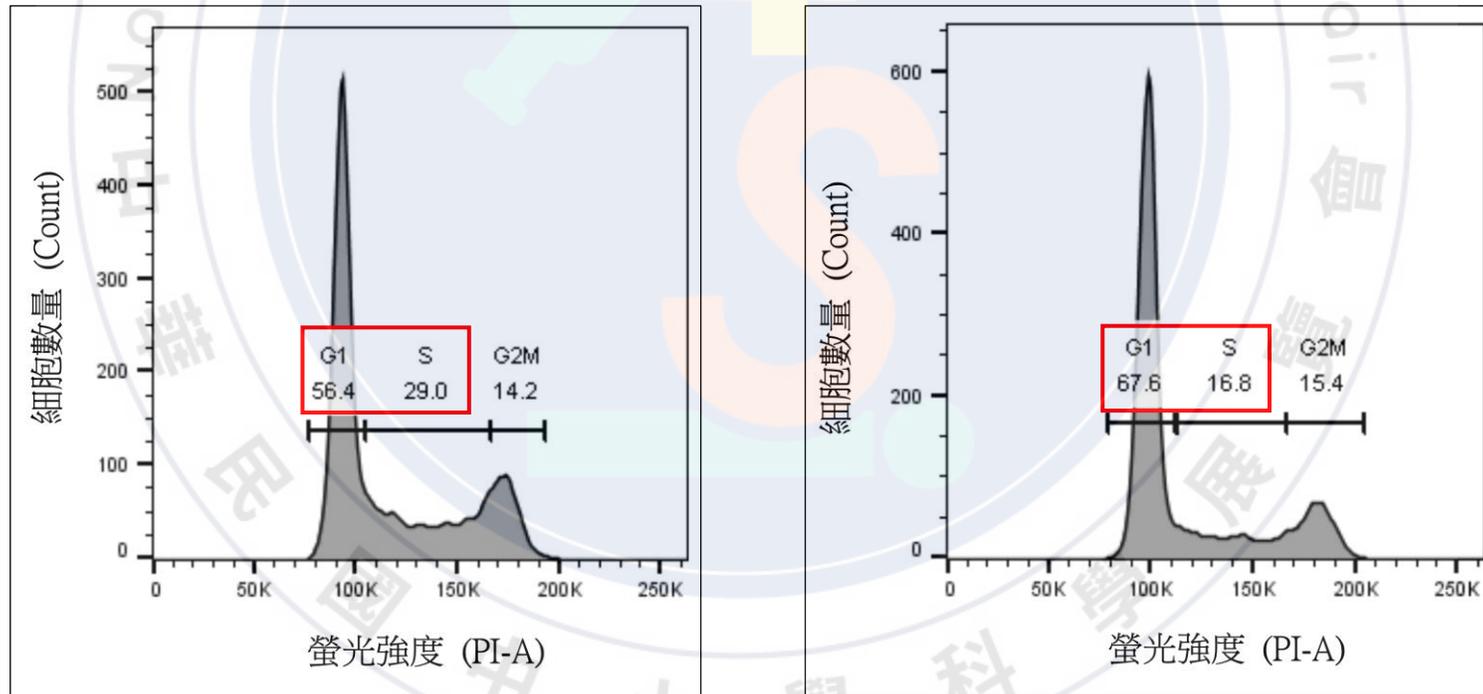
- 對照組:佔總體積 2% 的 PBS 溶液
實驗組:0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液
- 作用 48 小時後，細胞週期分布沒有明顯的差異，表示尚未達到 LP33 細胞外囊泡的最佳作用時間。



圖八：經 LP33 EVs 作用48小時的 MDA-MB-231 細胞週期分布 (左) 對照組 (右) 實驗組

四、LP33 細胞外囊泡對 MDA-MB-231 細胞週期分布的影響

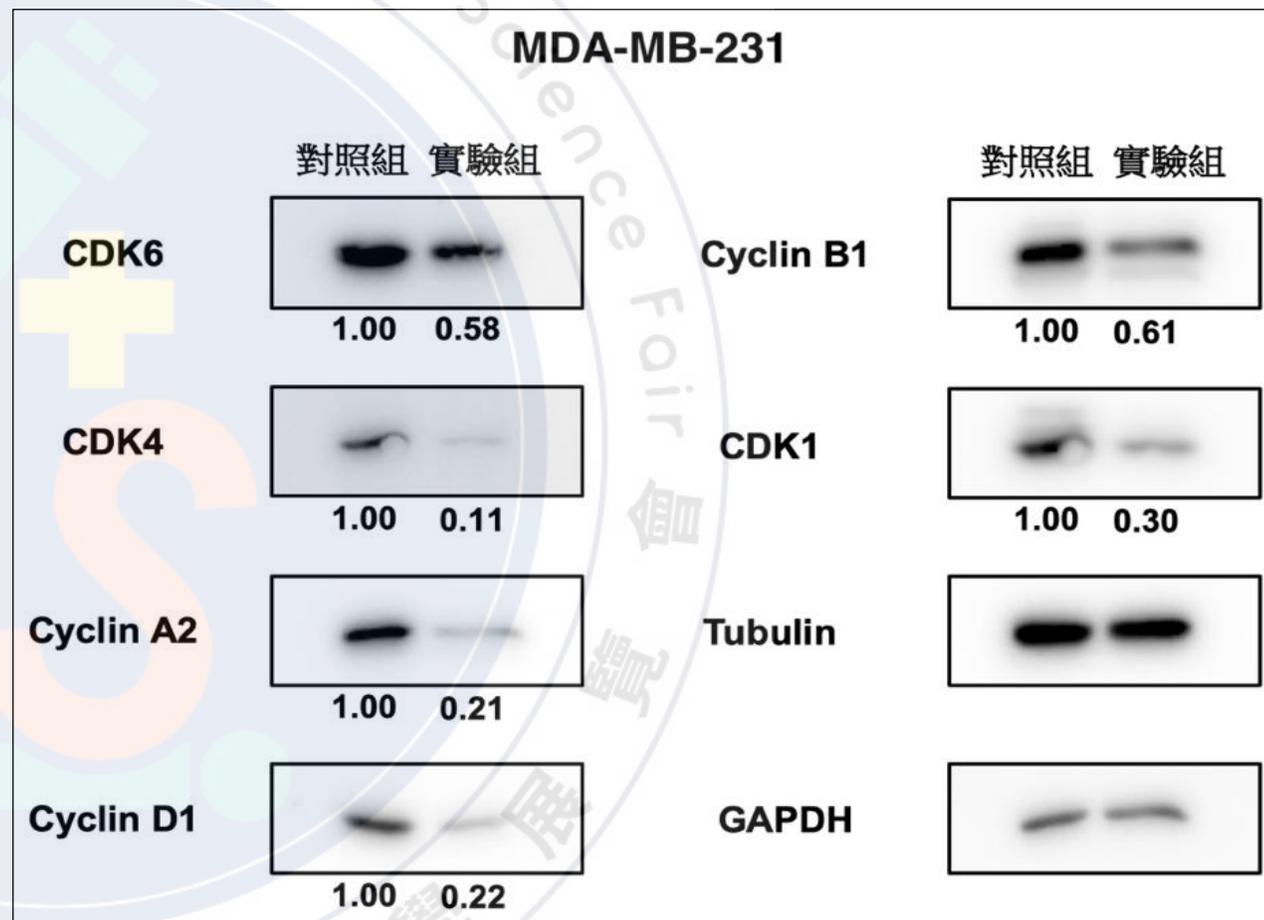
- 對照組:佔總體積 2% 的 PBS 溶液
實驗組:0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液
- 作用 72 小時後，停留在 G1 期的細胞比例增加，進入 S 期的細胞比例減少。
- LP33 細胞外囊泡的處理使 MDA-MB-231 產生 G1 期停滯。



圖九：經 LP33 EVs 作用72小時的 MDA-MB-231 細胞週期分布 (左) 對照組 (右) 實驗組

五、LP33 細胞外囊泡對 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白表現量的影響

- 對照組:佔總體積 2% 的 PBS 溶液
實驗組:0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LP33 EVs 溶液
- 實驗組與對照組的 GAPDH 和 Tubulin 訊號相當，表示注入電泳齒槽的總蛋白量相同。
- 實驗組的週期素蛋白與週期素依賴性磷酸酶的表現量相較於對照組明顯減少。
- LP33 細胞外囊泡的處理能抑制 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白的表現。



圖十：LP33 EVs 對 MDA-MB-231 細胞週期調節蛋白表現量的影響

結論

本研究發現 LP33 的細胞外囊泡可抑制三陰性乳癌細胞的增殖，而可能機制為透過抑制細胞週期調節蛋白的表現，使停滯在 G1期的細胞比例增加，導致多數細胞無法經歷完整的細胞週期，最後無法順利增殖。

未來展望

- 一、本研究使用的 LP33 菌株為經健康食品認證之益生菌，且景岳生物科技公司（益生菌膠囊來源）曾以小鼠脾臟細胞進行安全性測試，結果顯示對其存活無顯著影響。未來可選用人類正常細胞株進行檢測，以確定 LP33 細胞外囊泡對正常細胞無毒性反應。
- 二、分析 LP33 細胞外囊泡的成分，並針對 LP33 細胞外囊泡內能抑制癌細胞之細胞週期調節蛋白表現的特定物質進行研究。

參考文獻

1. 唐波、何大維、李典、郭文浩、張丹、魏光輝（2018）。大腸桿菌胞外囊泡對人神經母細胞瘤SK-N-SH細胞增殖、凋亡和遷移的影響。 *南方醫學大學學報*，38（03），334—339。
2. Behzadi, E., Hosseini, H. S., & Fooladi, A. A. I. (2017). The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. *Microbial Pathogenesis*, 110, 1-6.
3. Ñahui Palomino, R. A., Vanpouille, C., Costantini, P. E., & Margolis, L. (2021). Microbiota - host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language. *PLoS Pathogens*, 17(5): e1009508.