2019 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　080001

參展科別　生物化學

作品名稱　藉由雙硫化物交聯製成的植物核酸奈米粒子可當作穀胱甘肽誘發的抗癌藥物載體

得獎獎項　大會獎：三等獎

就讀學校　國立臺南家齊高級中等學校

指導教師　鄭順彰、陳宇楓

作者姓名　張以玟、毛胤禎、鄭惠方

關鍵詞　核酸、奈米水膠、藥物載體

作者簡介





我們來自臺南，就讀家齊高中三年級第三類組。因為對生物化學有熱忱，所以開始接觸相關知識，在老師們的幫助及鼓勵下，我們學習到很多科學性的思考和培養出團隊合作的默契。在一年前，我們參加了區科展，在化學科中獲得優等，並用這份作品在校內的海報比賽中獲得自然科老師的青睞，得到第一名的佳績。在這過程中，我們逐漸成長，克服種種的困難，而在實驗室中的日子也成為難能可貴的回憶。

摘要

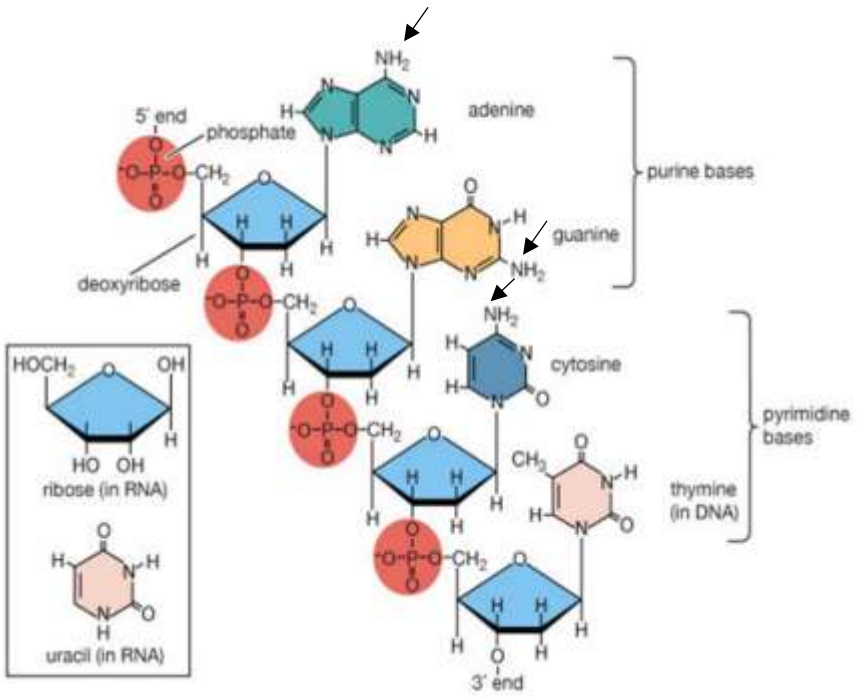
由於人工合成的化學材料在包覆藥物進行人體醫療測試時，不可分解性會帶來體內累積的毒性，搜尋各類化合物的結構後，發現核酸上的含氮鹼基具有一級胺結構，可和天然交聯劑京尼平或 DTSSP 進行反應，因此，本研究抽取水果的核酸進行實驗，利用界面活性劑乳化的過程中將阿黴素(DOX)，包覆進入交聯後的核酸水膠，穿透式顯微鏡的結果顯示交聯後的水膠結構是球狀，平均粒徑大約是 120 奈米，核酸本身帶負電，水膠有包覆藥物的界面電位稍微減少負電，利用人類正常肺上皮細胞進行水膠共同培養，2 毫克/毫升的水膠溶液在連續培養 48 小時後，並不會造成細胞死亡，奈米水膠在 pH 值 5.5 釋放 DOX 的量比 pH 值 7.4 還要高出 27%，有奈米水膠包覆 DOX 的情況下，更能有效率進入癌細胞內與引起癌細胞毒性，本水果核酸製成的奈米水膠在生物體可分解的無毒包覆材料上，於未來可提供一個新的藥物載體參考。

Abstract

Non-decomposable synthetic drug carriers lead to cumulative toxicity in the body. After screening of various compounds, nitrogenous bases in nucleic acids, with their primary amine functional group, were found to allow genipin- or DTSSP-facilitated cross-linking. The nucleic acids of the kiwi fruit were subsequently extracted to analyze their bioapplication. In the process of emulsification with surfactant, doxorubicin (DOX) was encapsulated in the cross-linked DNA nanogel. This nanogel presented spherical geometry under transmission electron microscope. The average particle size was about 120 nm and the zeta potential revealed a negative charge. Of interest, the DNA nanogel containing DOX presented a reduced negative charge in comparison with DNA nanogel alone. DNA nanogel concentrations of 2 mg/ml didn't cause normal cell death after 48 hours. The amount of DOX released by the nanogel at pH 5.5 was higher than at pH 7.4. by up to 27% after 20 hours. Moreover, the DNA-DOX nanogel delivered DOX efficiently with greater cytotoxicity towards cancel cells than free DOX. As such, we present a nanogel made of fruit nucleic acid with decomposable and non-toxic properties that can be a new alternative drug carrier in the near future.

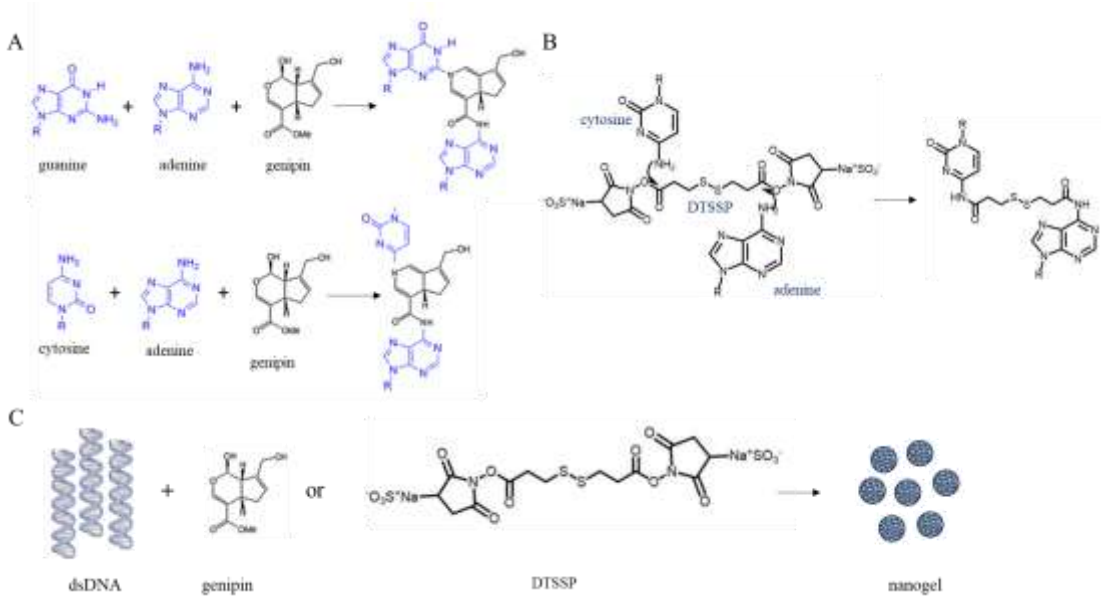
（一）、前言（含研究動機、目的）

當藥物不易溶於體液中時，科學家會利用一些具有促進溶解度的載體來包覆藥物，來增加細胞對藥物的吸收能力，但是有些藥物載體被發現在體內會造成毒性(1,2)。為解決人工合成物對身體造成的累積毒性以及增加藥物的溶解度，我們以水膠作為研究對象。水膠(hydrogel)是一種親水性聚分子經過交聯的產物，除了其保水性經常作為面膜、乳液等的材料，也可以作為在物理化學特性上無毒害的藥物載體(3)。常見製作水膠的材料有天然聚合物如澱粉、纖維素、蛋白質；合成聚合物如聚丙烯酸，一般現在醫療上使用的水膠取自於合成聚合物，使用後也經常產生污染，因此我們首次嘗試使用天然聚合物中的核酸來當作水膠的原料。核酸分子可以藉由交聯含氮鹼基中腺嘌呤、鳥糞嘌呤、胞嘧啶上的一級胺形成奈米水膠(如下圖一)，其中一方面核酸容易取得（本次實驗由奇異果果肉純化粗萃取），另一方面核酸具有可降解性，在自然情況下可以被生物所分解(利用核酸酶)，將大幅減少對環境的污染。另外，查詢文獻後，我們也找到一種萃取自中藥梔子果實裡無毒害的化合物(京尼平，Genipin) (4)與 DTSSP (5)當作交聯劑，進行圖二的實驗構想。



圖一、五種核甘酸結構，含氮鹼基的上的胺官能團，其中腺嘌呤(A)、鳥糞嘌呤

(G)、胞嘧啶(C)含有一級胺($R\text{-}NH_2$)結構(黑色箭頭處)，胸腺嘧啶(T)和脲嘧啶(U)則是含有二級胺(R-NH)結構。



圖二、(A)兩種核苷酸經由京尼平交聯反應後聚合的示意圖；(B)兩種核苷酸經由 DTSSP 交聯反應後聚合的示意圖；(B)雙股螺旋 DNA 經由兩種交聯劑交聯後變成球狀膠體的示意圖。

（二）、研究方法或過程

1. 萃取奇異果核酸(藥物載體)

(1). 奇異果 1 顆(約 100 克)削皮後放果汁機中，加 100 mL 蒸餾水攪碎。

(2). 破壞果肉細胞：果汁倒入 200 mL 燒杯中，加 2.5 mL 洗碗精(界面活性劑)，用玻棒攪拌 5 分鐘使其充分混合均勻。

(3). 使細胞萎縮：上述混合液加 5 M 食鹽水(2.93 g NaCl+10 mL ddH_2O) 5 mL，用玻棒攪拌 5 分鐘。

(4). 分解蛋白質：上述混合液加 20 mg 鳳梨含酵素溶在 5 mL ddH_2O 持續攪拌至少 5 分鐘。

(5). 收集核酸濾液：雙層紗布過濾上述混合液至 100 mL 燒杯(DNA 存於濾液中)。

(6). 析出核酸：取 15 mL 濾液倒入玻璃管，再加入 30 mL 95%冰酒精，溶液分層且在酒精與水的交界處出現白色雲狀物，即凝聚析出之核酸，以吸管吸出保存於盛有 70%酒精的玻璃瓶。

(7). 以純水進行透析，將殘留溶劑和鹽類去除。

(8). 利用冷凍乾燥機將水分抽乾。

2. 進行京尼平(Genipin)或 DTSSP 交聯與化合物包覆反應

(1). 各秤 DNA 50 mg (對照組)和 DNA 50 mg+阿黴素(doxorubicin/DOX)50 mg (實驗組)，放入 5 mL 塑膠管，加入 2 mL 蒸餾水，均勻震盪混合。

(2). 以微量分注器取(100 mg span80 + 50 mg tween80 + hexane) 3 mL，裝入塑膠管，混合均勻。

(3). 將[2]加入[1]，以破膜機進行超音波均質，震 5 秒，休息 10 秒，重複 12 次循環(因超音波會產生高溫所以在冰上進行)。

(4). 秤重 20 mg 的京尼平(交聯劑)裝入玻璃瓶。

(5). 將[3]倒入含有京尼平或 DTSSP 的玻璃瓶，放入磁石，用石蠟膜封好，放在攪拌機上攪拌隔夜。

(6). 分裝在 8 瓶 2 mL 離心管中，再加 1 mL hexane 到每管中進行離心(7000 rpm，30 sec)。

(7). 移去管中上方液體，洗去界面活性劑(span80 + tween80)。

(8). 再加入 1 mL hexane 離心，重覆 4 次，充分洗去界面活性劑。

(9). 洗完後，指管底部有水膠沉澱，加入無菌純水，進行振盪。

(10). 剪取一段透析袋(1000 Da)，以酒精消毒後，倒入水膠懸浮液，並用夾子固定透析袋。

(11). 在 10 L 純水中，透析隔夜。

3. 利用圓二色光譜儀(Circular Dichroism，CD)進行結構鑑定

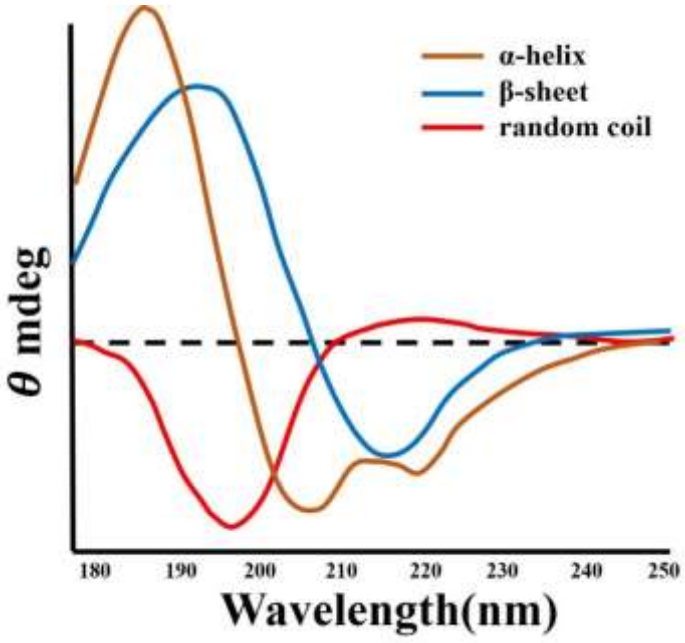
(1). 使用的型號為 J-815 spectrometer(JASCO, Japan)。

(2). 將 DOX、奇異果核酸和核酸包覆 DOX 後的水膠，溶於水後，濃度分別是 1, 0.5, 和 0.5 mg/mL，再上機分析。

(3). 圓二色光譜儀的結果判讀如下：

不同二級結構造成的 CD 訊號

α-helix	於 190 nm 處產生正訊號，於 208 nm 及 222 nm 處產生負訊號。僅代表鑑定的樣品中含有大量芳香族。
β-sheet	整體訊號較弱，於 195nm 處產生正訊號，於 180 nm 與 217 nm 處產生負訊號。用以探討 β-sheet 結構的扭曲程度。
random coil	於 200 nm 處產生負訊號，為最容易判斷的結構。



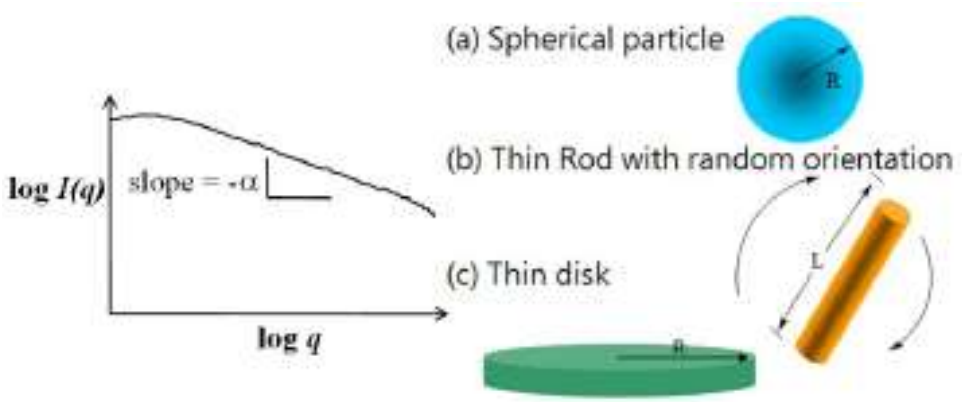
不同二級結構的 CD 光譜

4. 利用小角度 X 光散射（Small-Angle X-ray Scattering, SAXS）進行奈米尺度結構分析

(1). 使用的型號為 NanoSTAR U System (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany)

(2). 將交聯後的核酸和核酸包覆 DOX 後的水膠，溶於水後，兩者濃度是 2 mg/mL，再上機分析。

(3). 小角度 X 光散射結果判讀如下：



斜率 α 值為 4，2 與 1，分別是球體、棒狀粒子與碟形。

5. 穿透式電子顯微鏡觀察水膠的外觀形狀：

(1). 以純水稀釋 5 倍後，將奈米水膠進行超音波震盪。

(2). 分別取 20 μL 點在銅網上，利用防潮箱除去水份，由研究人員協助上機。

6. 奈米水膠對正常人類細胞株(BEAS-2B)的影響

(1). 培養人類正常肺上皮细胞 BEAS-2B。

(2). 將細胞鋪在 96 孔盤上(1×10^4 細胞/孔)，加入 10%胎牛血清的細胞培養液，37℃，5% CO_2 隔夜培養。

(3). 以細胞培養液配置各種濃度的奈米水膠溶液，進行濃度序列(0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL)分析。

(4). 加入細胞內，以細胞培養箱進行 37℃，5% CO2，共同連續培養 48 小時。

(5). 移去細胞培養混合液，加入細胞呈色劑 100 μL， 0.5 mg/ mL 的 MTT 試劑(溶在沒有胎牛血清的細胞培養液)中，反應 1 小時。

(6). 移去上清液，加入二甲基亞碸(dimethyl sulfoxide/DMSO)150 μL 到 96 孔盤，錫箔紙包覆，避光搖晃反應 10 分鐘。

(7). 以酵素免疫分析儀進行波長 570 的吸光值偵測。

7. 藥物釋放實驗：

(1). 取阿黴素(DOX)，以水當溶劑，製作兩倍稀釋檢量線 (0, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 mg/mL)。

(2). 取 1 mL 阿黴素 DNA 奈米水膠夾在透析袋內，放在 30 mL 的無菌水溶液。

(3). 利用 1N HCl 調整阿黴素 DNA 水膠的 pH 值為 5.5 (癌細胞微環境酸鹼值)和 7.4 (正常人體體液酸鹼值)。

(4). 在第 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 20 小時取透析袋外面的無菌水 1 mL 進行吸光值 (480 nm)偵測，再將 1 mL 放回透析袋外面溶液。

8. 細胞存活率測試：

(1). 將 BEAS-2B(人類正常肺上皮细胞)，A549(人類肺腺癌細胞)，H1299(人類非小細胞肺癌细胞)和 LL2(小鼠路易斯氏肺腺癌細胞)四種細胞取 100 μL (約 10^4 個細胞)加到每一個 96 孔盤中的一個微孔，隔夜培養。

(2). 分別利用細胞培養液稀釋阿黴素和阿黴素 DNA 奈米水膠(DNA-DOX NPs)為 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg/mL 的濃度，取 100 μL 加到微孔中，進行 24 小時共同培養。

(3). 移去混合液，利用生理食鹽水將細胞沖洗三次，加入 100 μL 的 WST-8 細胞呈色液，反應 1 小時。

(4). 將細胞呈色液移到新的 96 孔盤，進行吸光值 450 nm 的偵測和光學顯微鏡拍照。

9. 藥物輸送細胞實驗

(1). 取 0.5 mL 的 H1299 細胞(約 2×10^5 個細胞/mL)到 12 孔盤內，隔夜培養。

(2). 利用細胞培養液稀釋阿黴素和阿黴素 DNA 奈米水膠(DNA-DOX NPs)為 5 μg/mL 的濃度，取 0.5 mL 加到 12 孔盤中，進行 1 小時共同培養。

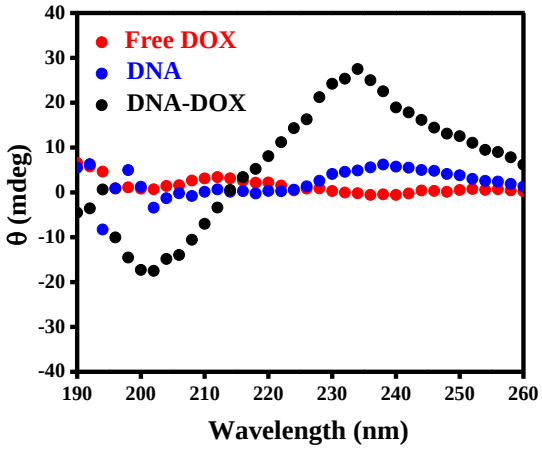
(3). 移走混合液，利用生理食鹽水進行三次沖洗，加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI，DNA 強力結合的螢光染料)，使最後 DAPI 濃度為 1 μg/mL，避光下進行細胞核染色 15 分鐘。

(4). 移走混合液，利用生理食鹽水進行三次沖洗，在螢光顯微鏡下進行藍色(DAPI)和紅色(DOX)螢光在細胞的分布觀察。

(5). 加入 0.2 mL 的 0.1% Trypsin-EDTA 到細胞 12 孔盤上，反應 5 分鐘，再取 0.5 mL 生理食鹽水將細胞沖下來，收集在 15 mL 離心管內，進行 1000 rpm，5 分鐘離心，移去上清液，再加入 1 mL 生理食鹽水清洗細胞，1000 rpm，5 分鐘離心，移去上清液，最後回溶 1 mL 生理食鹽水，進行細胞流式儀上機分析。

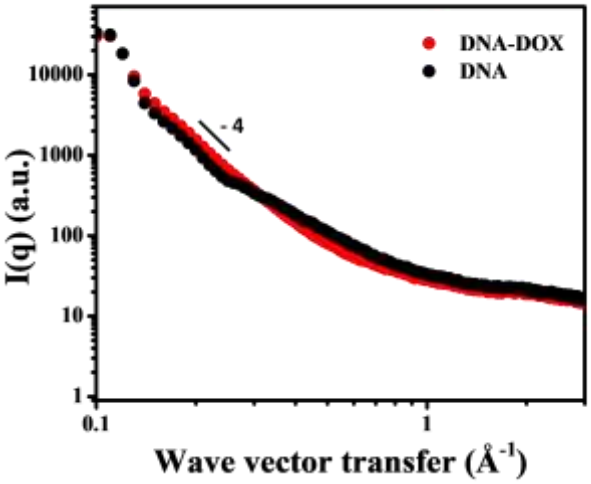
（三）、研究結果與討論

1. 圓二色光譜儀分析結果



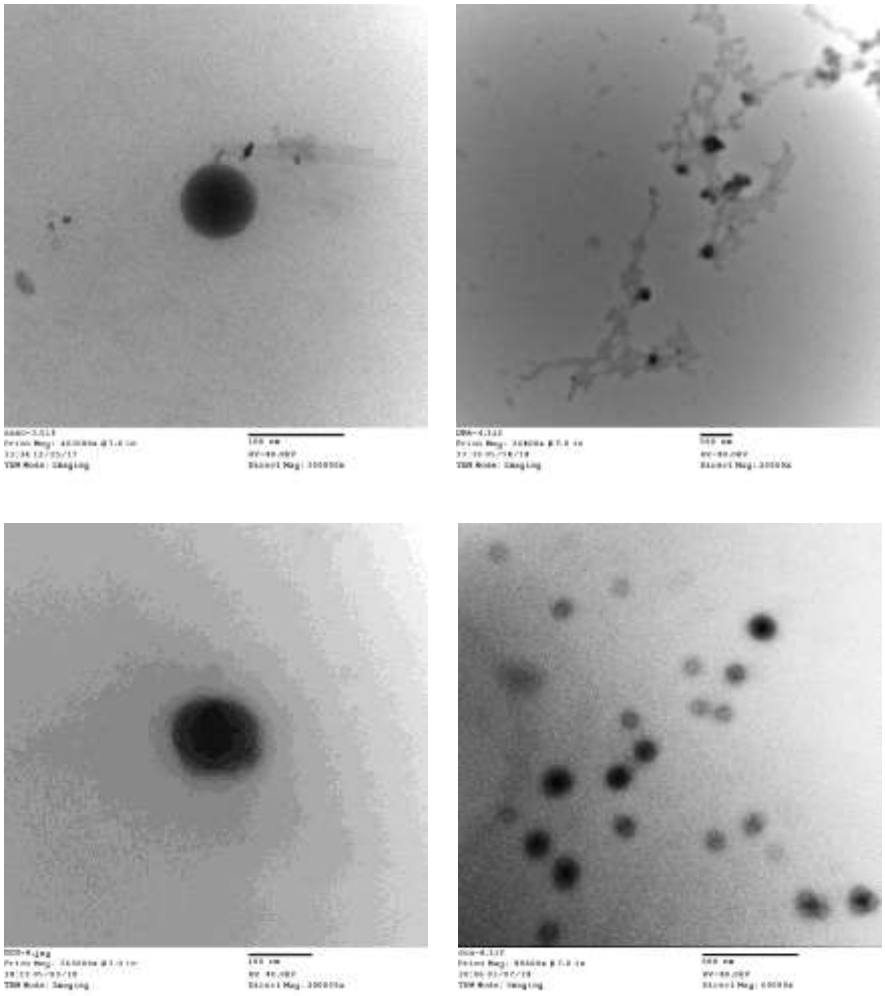
結果與討論：水膠包覆 DOX 在 200 nm 處產生負訊號，其他兩組沒有，因此奇異果核酸經由交聯有產生結構上的變化，初步判斷是隨機線圈(random coil)的型態，但還需藉由其他方法進行分析。

2.小角度 X 光散射奈米尺度結構分析結果



結果與討論：核酸和核酸包覆 DOX 後的水膠，其斜率呈現-4，判讀為球體結構。

3.穿透式電子顯微鏡觀察水膠的外觀形狀，結果如下：



表一、DNA 水膠和有包 DOX 藥物的 DNA 水膠在粒徑與界面電位的比較

溶劑，酸鹼值	ddH $_2$O, pH7				PBS, pH5.5				PBS, pH7.4			
交聯劑	genipin		DTSSP		genipin		DTSSP		genipin		DTSSP	
奈米水膠	DNA	DNA-DOX	DNA	DNA-DOX	DNA	DNA-DOX	DNA	DNA-DOX	DNA	DNA-DOX	DNA	DNA-DOX
粒徑 (nm)	82	117	95.53	91.6	91.5	198.2	74.4	118.2	58.4	112.6	110.6	116.5
界面電位 (mV)	-69.21	-54.22	-32.40	-30.2	-5.09	-4.67	-9.77	-5.6	-6.27	-1.57	-14.6	-12.9

結果與討論：(1)由穿透式電子顯微鏡得知，DNA 水膠為球狀。(2)在對照組(未包藥物)的粒徑和界面電位和實驗組(有包 DOX 藥物)相比，明顯不同，有包藥物的粒徑大致上比較大，而且表面帶電度有有被帶正電的 DOX 稍微中和。以過去研究顯示，帶負電對細胞的毒性較低，但正電的毒性較高，因為細胞內有一粒線體胞器，負責呼吸作用涉及電子傳遞，亦是呈現帶負電 (6)，若奈米粒子帶正電，易通過細胞膜後以正負電相吸原理，來干擾正常電子傳遞，使細胞無法執行正常生理功能。

4.奈米水膠對正常人類細胞株(BEAS-2B)的影響

(1). 光學顯微鏡 100x照相，如下圖。

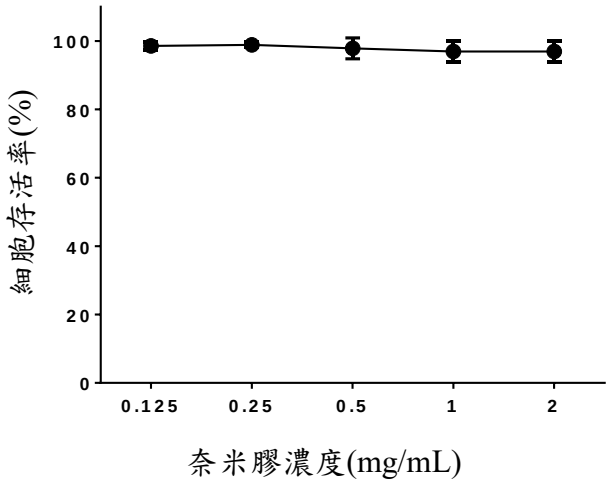


對照組 (不加奈米水膠)　0.125 mg/mL　0.25 mg/mL



0.5 mg/mL　1 mg/mL　2 mg/mL

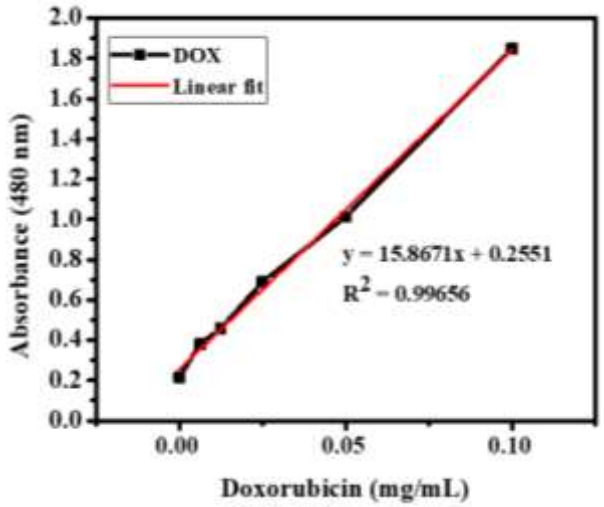
(2). 以吸光值分析細胞存活率，如下圖。



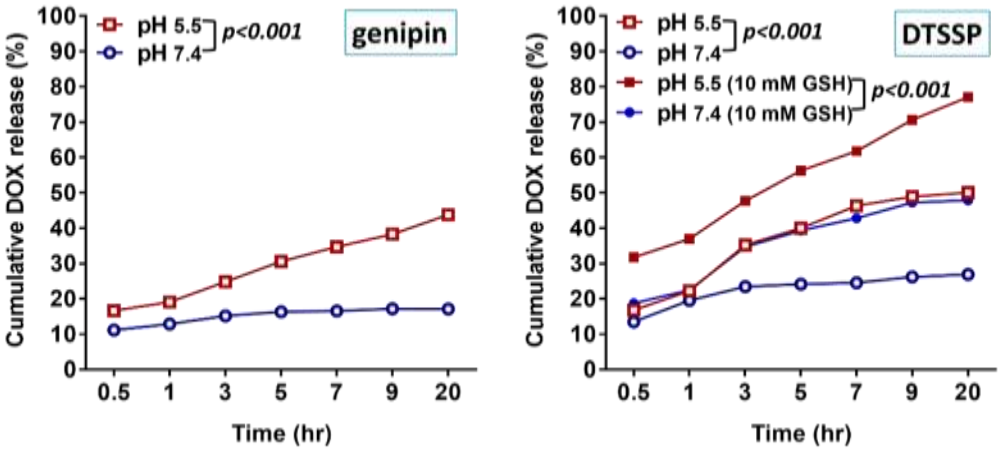
結果與討論：奈米水膠在濃度 0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 時沒有造成正常人類細胞株(BEAS-2B)死亡現象。胰液中含有核酸酶，胰液在消化過程中會注入小腸，若此核酸奈米水膠將來應用在口服的藥物傳輸中，推測可以包覆小腸吸收的藥物，在腸道中被釋放出來；而且在與人類正常細胞共同培養的測試中，沒有造成細胞死亡，所以應該有不錯的應用價值。

5. 藥物釋放實驗：

(1). 阿黴素(DOX)檢量線



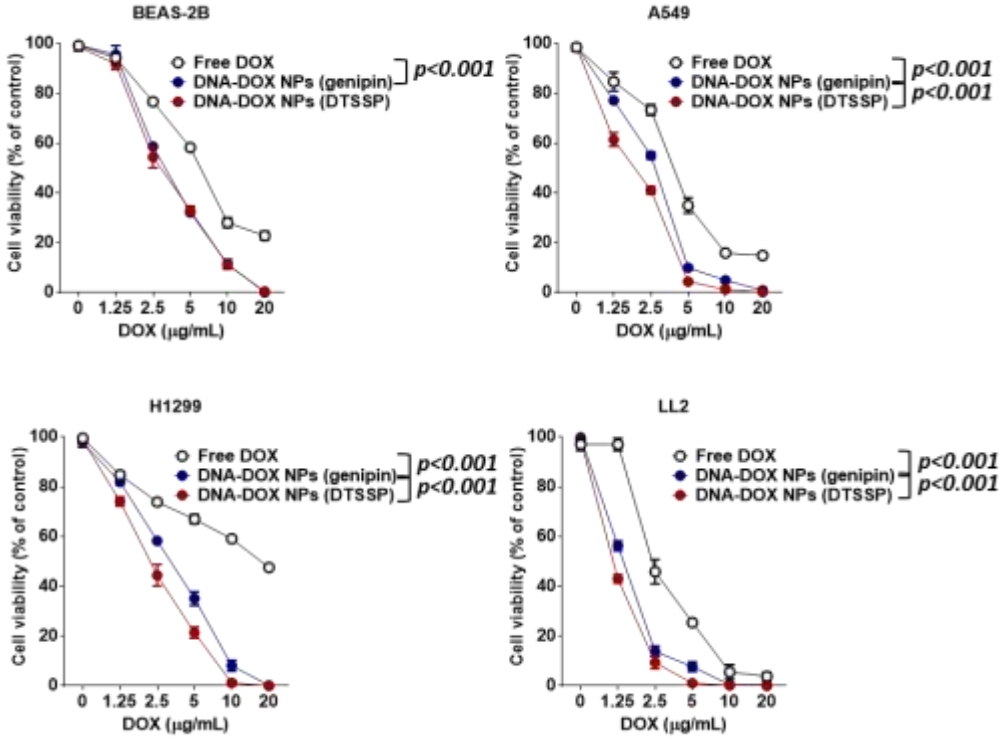
(2). 在不同 pH 值的阿黴素 DNA 水膠的阿黴素(DOX)釋放百分比



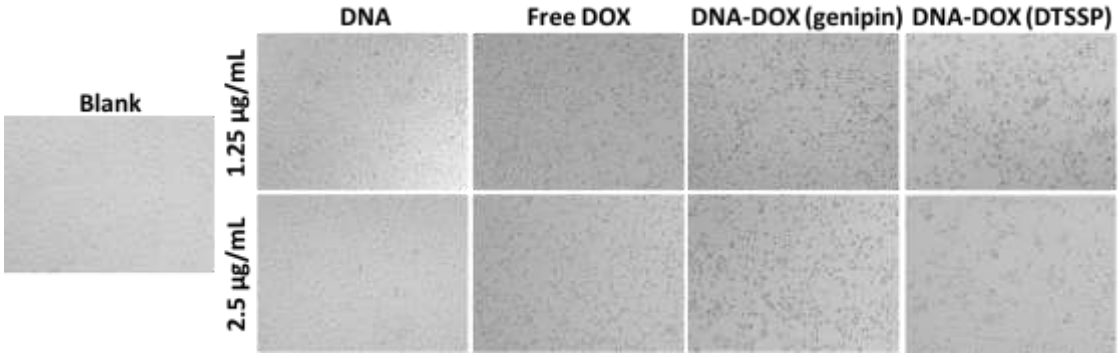
結果與討論：(1) 阿黴素化合物(DOX)的檢量線 R^2=0.99656。(2) DNA-DOX(genipin)水膠的 DOX 釋放比例在 pH5.5 比 pH7.4 高，在第 20 個小時，多了 27%的 DOX 被釋放出來，在 DTSSP 組中，也是顯示 DOX 釋放比例在 pH5.5 比 pH7.4 高(25%)，另外加入 10 mM GSH 也可以促進 DOX 釋放(31%)，顯示此奈米水膠應用在癌細胞的藥物輸送會比正常細胞的微環境效果更好。

6.細胞存活率測試：

(1). 四種細胞在 DOX 和 DNA-DOX 奈米水膠(genipin/DTSSP)的存活率比較



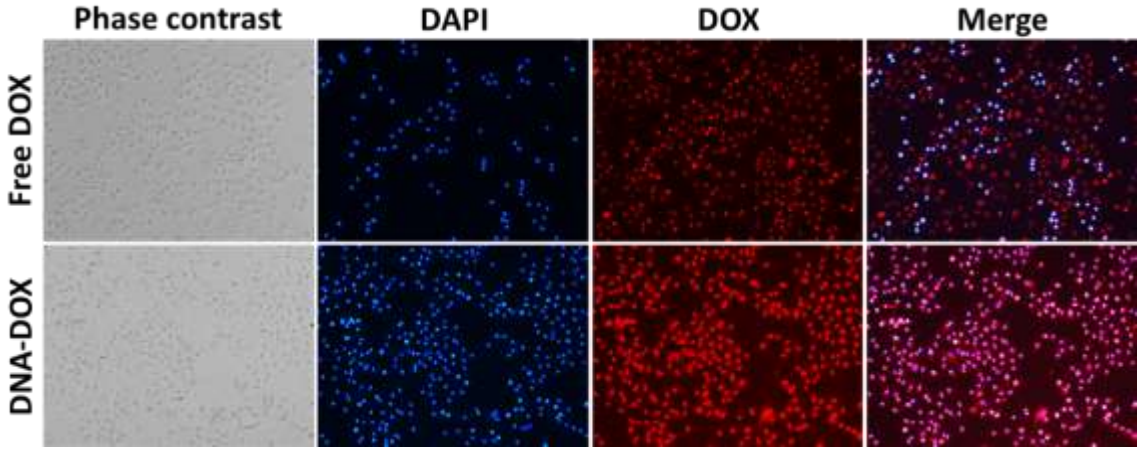
(2).以光學顯微鏡(100×)拍攝 H1299 細胞在處理 DNA 奈米水膠、阿黴素和阿黴素 DNA 奈米水膠(1.25 和 2.5 μg/mL)，共同培養 24 小時後的細胞形態。



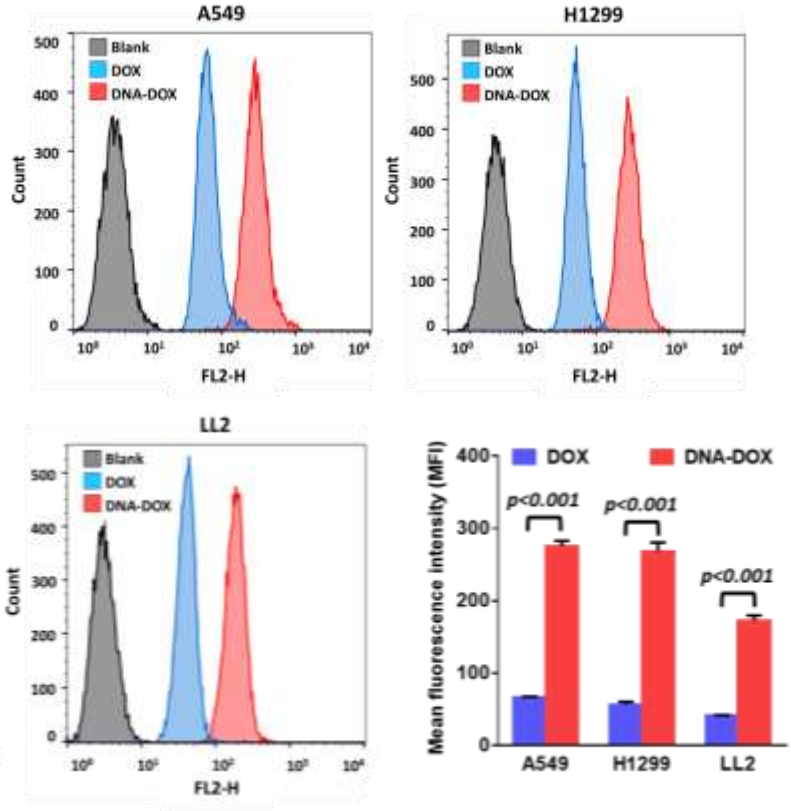
結果：(1)依統計軟體 Graphpad prism 分析， DNA 水膠(DNA-DOX NPs)比阿黴素(Free DOX)組，在相同的 DOX 濃度時，引起更高的細胞毒性(不論正常或癌細胞)，具有顯著差異(p 值<0.001)。(2)在 DOX (1.25 和 2.5 μg/mL)共同培養 24 小時後的細胞，顯示 DNA 組和不加任何物質的對照組(Blank)細胞型態相似，而 DNA-DOX NPs 比 DOX 組造成更多的細胞破裂，而 DTSSP 比 genipin 組效果更佳。

7.藥物輸送細胞實驗

(1).螢光顯微鏡(100×)拍攝 H1299 細胞的藍色(DAPI)和紅色(DOX)螢光在細胞的分布觀察。



(2).流式細胞儀進行紅色(DOX)螢光的細胞數量分析。



結果：(1)螢光顯微鏡在癌細胞的觀察顯示，DNA-DOX NPs 比 DOX 組更有效率輸送 DOX 藥物到癌細胞內。(2)流式細胞儀分析顯示，DNA-DOX NPs 比 DOX 組在 DOX 5 μg/mL 濃度之下，使細胞獲得更多量的 DOX，也就是，DNA-DOX NPs 輸送藥物到細胞內的能力較好。

（四）、結論與應用

藉由本實驗，我們利用一級胺可以交聯為聚合物的概念，來抽取奇異果的核酸，因為核酸中的腺嘌呤、鳥糞嘌呤、胞嘧啶含氮鹼基上具有一級胺，可利用天然交聯劑京尼平/DTSSP，將雙股螺旋 DNA 交聯成球狀，並在界面活性劑乳化過程中將化療藥物 DOX 進行包覆，粒徑上大約在 120 nm，因核酸本身帶負電，界面電位在有包覆 DOX 的情況下比原來帶較少負電，穿透式電子顯微鏡證實奈米膠為球狀，在與人類正常細胞共同培養的測試中，2 mg/mL 的奈米膠並不會造成細胞死亡現象，在接近癌症微環境的 pH 值 5.5 奈米水膠釋放 DOX 的量比正常人體 pH 值 7.4 還要高出 27%，有奈米水膠包覆 DOX 的情況

下，更能有效引起癌細胞毒性，其中 DTSSP 組可以被癌細胞內高量的 GSH 切斷雙硫鍵更專一性的將 DOX 釋放在癌細胞內，造成癌細胞死亡，螢光顯微鏡與細胞流式儀分析也顯示奈米水膠更能有效率進入到癌細胞內，故本研究可提供藥物攜帶系統一個新的天然無毒的材料。

（五）、參考文獻

1. Hu, Q., Guo, F., Zhao, F., Tang, G. and Fu, Z. (2017) Cardiovascular toxicity assessment of poly (ethylene imine)- based cationic polymers on zebrafish model. *J Biomater Sci Polym Ed*, **28**, 768-780.
2. Yokoyama, M. (2014) Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *J Drug Target*, **22**, 576-583.
3. 林鴻儒. (2018) 神奇的水膠. *科學發展月刊*, **542**, 77-83.
4. Chiono, V., Pulieri, E., Vozzi, G., Ciardelli, G., Ahluwalia, A. and Giusti, P. (2008) Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J Mater Sci-Mater M*, **19**, 889-898.
5. Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M.D. and Morgensen, S. (1993) A practical approach to crosslinking. *Mol Biol Rep*, **17**, 167-183.
6. Michelakis, E.D. (2008) Mitochondrial medicine - A new era in medicine opens new windows and brings new challenges. *Circulation*, **117**, 2431-2434.

【評語】080001

1. 本研究主題利用奇異果果肉萃取核酸，以梔子果實萃取交聯劑，探討兩者形成的核酸水膠擔任抗癌藥物載體的可行性。

2. 研究主題明確具新穎性，研究方法適切，條列式書面報告陳述流暢清晰。

3. 建議宜有更多實驗數據闡明核酸水膠的生物及物理化特性，例如如何證明是核酸水膠而非它物。

4. 奈米水膠進入細胞之評估相當完整。

5. 奈米水膠作為藥物載體具應用潛力。