海藻多醣碳奈米膠於抗腫瘤轉移研究

(正式報告)

海洋委員會補助研究

中華民國 110 年 10 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考,並不代表該會政策,該會保留採用與 否之權利。」

OAC-110-006 (研究報告)

海藻多醣碳奈米膠於抗腫瘤轉移研究

學校:國立臺灣海洋大學

指導教授: 黃志清

學生:王晨祐

研究期程:中華民國110年04月至110年11月

研究經費:新臺幣七萬元整

海洋委員會補助研究中華民國 110 年 10 月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考,並不代表該會政 策,該會保留採用與否之權利。」

目錄

圖目	錄			4
摘要	<u> </u>			5
壹、		前言	-	7
	- \	•	研究緣起	7
	ニ、	•	研究目的	10
	三、	•	研究方法與流程	12
貳、		研究	[内容說明	13
	- \	•	本研究主題預期目標與進度說明	13
		1.	本研究主題原先預期完成目標	13
		2.	本研究主題修正預期完成目標	13
		3.	本研究主題目前完成目標	14
	ニ、	•	研究方法及過程	15
		1.	合成不同來源之 SP-CNGs	15
		2.	篩選 SP-CNGs 於細胞爬行試驗	16
		3.	篩選 SP-CNGs 之細胞存活率試驗	16
		4.	細胞侵襲試驗	16
		5.	細胞貼附試驗	17
		6.	SP-CNGs 之材料鑑定	17
		7.	小鼠 4T1 腫瘤轉移試驗	17
		8.	生物分布試驗	18
		9.	抗氧化活性測試	18
		10.	蛋白質體學	19
	三、	•	研究成果與發現	20
		1.	合成不同來源之 SP-CNGs	20
		2.	篩選 SP-CNGs 於細胞爬行試驗	21
		3.	篩選 SP-CNGs 之細胞存活率試驗	22
		4.	細胞侵襲試驗	22
		5.	細胞貼附試驗	23
		6.	SP-CNGs 之材料鑑定	26
		7.	4T1 腫瘤轉移試驗	29
		8.	生物分布試驗	30
		9.	抗氧化活性測試	34
		10.	蛋白質體學	35
	四、	•	結論	38
杂县	* 資米	1		40

圖目錄

°9
20
21
22
23
24
25
27
28
28
29
30
31
33
33
34
. • 35
36
36
37

摘要

關鍵字:癌症、海藻多醣、碳奈米膠、腫瘤轉移、腫瘤爬行

癌症歷年以來,一直常駐在國人十大死因之一,高死亡率與腫瘤惡化所造成的腫瘤細胞轉移密切相關,腫瘤細胞的轉移通常會伴隨著多重器官衰竭致死。然而目前治療癌症之化療藥物抑制腫瘤轉移的效果皆不佳,且副作用過大往往限制其療效。海藻之生物活性物質通常以海藻多醣為要,且已被證實具有抗凝血、抗氧化、降血脂、抗病毒、抗菌、免疫調節作用以及抗腫瘤生長或轉移等功能,但期卻不易保存、易水解、高溫不穩定,不同來源或萃取方法的多醣種類功能差異甚大,也會常出現再現性差等問題,在實際應用上遇到了許多瓶頸。將海藻多醣修飾上金屬奈米材料除了增加其抑制腫瘤轉移的效果外,還可以增長期保存時間,但殘留的金屬奈米粒子依然有生物毒性。近年研究指出將生物活性分子碳化成奈米粒子後,不但能保有原來生物活性,還可能被賦予更多的潛在功能,且也具有低細胞毒性和高生物相容性等優點。

因此本研究從學校周遭海域取得藻類,並萃取其多醣,製成具有抗腫瘤轉移活性的碳奈米膠,除了因藻類生長方便且快速,可降低成本,也因為是使用生物活性分子,可以有效減低化學藥物所帶來的副作用,相信搭配其他癌症療法,我們所製備碳奈米膠可有效降低腫瘤轉移,不僅提升癌症病人治療效果,也有望大大降低健保在癌症治療的花費。

本計畫技術能將不同來源的海藻多醣經由碳化後製成海藻多醣碳奈米膠 (seaweed polysaccharides-based carbon nanogels, SP-CNGs),合成出高效能、高穩定性、高生物相容性、易被吸收及腫瘤周邊高度滯留性的 SP-CNGs。因此我們利用本校附近易生長、分布廣泛且尚未具有明顯經濟價值的藻類,提取有抗腫瘤轉移潛力的活性多醣,經由特殊熱碳化加工,製成低成本、高生物相容性且具有抗癌活性的 SP-CNGs。

我們已合成同時具有高度抗腫瘤轉移潛力的 SP#001-CNGs,在初步的腫瘤 爬行試驗中有著極佳的抗腫瘤細胞爬行活性,因此我們預計朝相同具有豐富酚基 且有抗腫瘤轉移活性的類黃酮物質進行機制的探討,也會利用小鼠試驗進行生物 體的可行性以及生物安全性評估。

我們相信若此材料開發成功,藉由搭配其他癌症療法,我們所製備 SP-CNGs 可有效降低腫瘤轉移的風險,希望可以減緩癌症病人經由化學治療所帶來的身體 負擔同時也可以減輕健保的負擔。

壹、 前言

一、 研究緣起

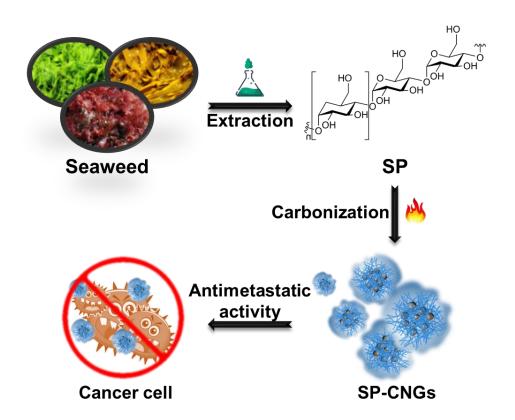
惡性腫瘤又名為癌症,因正常細胞受環境因素、遺傳或基因突變產生癌變,其中原致癌基因會被活化成致癌基因(oncogene),腫瘤抑制基因(tumor suppressor gene)突變而失去修復 DNA 功能,造成細胞不正常增生變成癌細胞而形成惡性腫瘤,並誘導附近細胞形成新血管,為腫瘤提供生長所需的養分與氧氣[1]。惡性腫瘤細胞在某些情況下能穿透體內屏障,侵入周遭環境後破壞四周的組織,稱為癌症轉移(tumor metastasis),通常伴隨許多併發症,被視為癌症的致命殺手,而肺癌(lung cancer)是最容易轉移也是死亡率最高的癌症[2],因此抑制癌症轉移成為癌症醫學上極為重要的議題。有些天然物如海藻多醣(seaweed polysaccharide, SP)被證實具有抑制癌症轉移的效果,但機制目前仍不明瞭。

國立臺灣海洋大學位在臺灣東北角,此區的海藻(seaweed)分布至少高達 52 種,本校於藻類領域的研究相當廣泛,包含藻類的取得、培養與萃取皆相對容易。 天然海藻經過萃取後所得之生物活性物質成分最高為 SP,不同藻類來源的 SP 結構主要為不同醣單元、碳酸根和硫酸根所組成,這些 SP 已被證實具有抗凝血、 抗氧化、降低血脂、抗病毒、抗菌、免疫調節作用以及抗腫瘤生長或轉移等功能 [3]。雖然 SP 有很好的生物活性,但也有諸多缺點,如保存不容易、容易水解、 高溫不穩定,且因不同來源或萃取方法的 SP 種類功能差異甚大,以及常常出現 批次之間 SP 的效果再現性差等問題,致使生醫應用上遇到了許多限制。

有文獻報導將 SP 修飾上金屬奈米材料能夠增加其抑制腫瘤轉移的效果,且穩定 SP 的結構來增長保存時間,但殘留的金屬奈米粒子於動物體依然對身體產生危害風險[4]。近年文獻顯示將生物活性分子碳化(carbonization)成奈米粒子(carbon quantum dot, CQD)後,不但能保有原來生物活性,還可能被賦予更多的潛在功能,且已被證實具低細胞毒性和高生物相容性等優點[5]。我們團隊在碳奈米材料上有很紮實的研究基礎。以特殊碳化合成法將亞精胺(spermidine, Spd)

製備成碳量子點(CQDspds),並用於細菌性角膜炎治療。由於超陽離子(supercationic)的 CQDspds 會誘導角膜上皮細胞緊密連接打開,所以可以用滴劑方式來治療細菌感染造成的眼部疾病[6]。以多胺(polyamine)和多巴胺(dopamine)為前驅物以一步煅燒後所得奈米材料具高黏附性、抗菌和抗氧化等多功能,可應用於隱形眼鏡抗菌保存液。修飾隱形眼鏡後,可治療細菌性角膜炎[7]。近期,我們以鹵素參混 CQDs 搭配白光 LED 照射,以快速(< 1 min)移除傷口處感染的多重抗藥性金黃色葡萄球菌(multiple resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)[8]。發展以薑黃素(curcumin, Cur)基底 CQDs(Cur-CQDs)於高危險性腸病毒71型(enterovirus 71, EV71)治療。相較於薑黃素前驅物,Cur-CQDs 有更低的生物毒性(降低100倍),以及更卓越的抗病毒能力(提升1000倍)[9]。

而本計畫擬將海洋大學周邊海域的大型藻類(marcoalgae)萃取出 SP 後,以本團隊獨有的技術將 SP 合成高效能、高穩定性、高生物相容性、易渗透及腫瘤周邊高度滯留性的海藻多醣碳奈米膠(seaweed polysaccharides-based carbon nanogels, SP-CNGs)於腫瘤轉移的抑制,期望碳奈米化後的 SP-CNGs 對於癌症治療上有所貢獻(圖一)。雖然 SP-CNGs 因合成方式多樣化,但我們團隊的特殊碳化合成法不但能夠保留 SP 原有官能基(如一OH、一COOH、一NH2),還可能轉換為類多酚類(phenol-like)或類萜(terpenoid)結構,兩者皆為更具經濟價值的化合物,且亦被證實具有抑制腫瘤轉移的功能(如薑黃素、山柰酚、槲皮素和紫杉醇等)。我們的技術能將不同來源的 SP 藉由碳化和聚合的程度來調控 SP-CNGs表面的官能基分布、種類和交聯結構,其通常具較高的穩定度、富有彈性的形狀(尺寸約20~200 nm)以及有著良好的生物活性(如抗菌、抗氧化、抗病毒、抗凝血、免疫調解和抗癌等),且能穩定放大(scale-up)製程。這些 SP-CNGs 還可能被賦予特殊的響應系統(如溫度、pH 與葡萄糖等),非常適合作為藥物遞送系統。於是我們堅信東北角周邊海藻之 SP 能夠被有效碳化轉換為更具經濟價值的 SP-CNGs,且有高度的潛力能夠應用於抗腫瘤轉移。



圖一、萃取之 SP 合成海藻多醣碳奈米膠(SP-CNGs)應用於抗腫瘤轉移之示意 圖。

二、 研究目的

目前治療癌症之藥物,多半以化學合成藥物為主,如小紅莓(doxorubicin), 常因其沒有標靶的特性造成通殺的結果導致副作用過大;因化學藥物為生物活性 分子,容易被生物體所分解,所以在血液中的滯留時間較短,為了維持藥效必須 要多次施打;另外腫瘤組織會在其附近形成微環境而使部分藥物不容易進入腫瘤 組織進行治療,以及化學藥物治療容易造成抗藥性腫瘤細胞的產生,以上情況往 往限制化學藥物治療癌症的效果和患者存活率。

天然海藻經過萃取後所得之海藻多醣已被證實具有抗氧化、抗腫瘤轉移等諸 多功能。雖然海藻多醣有很好的生物活性,但保存不易、易水解、高溫不穩定以 及常常出現批次之間再現性差等問題,在生醫應用上遇到了許多限制。

近年文獻顯示將生物活性分子碳化成奈米粒子後,不但能保有原來生物活性,還可能被賦予更多的潛在功能,且已被證實具低細胞毒性和高生物相容性等優點。 SP-CNGs 因合成方式多樣化,但我們團隊的特殊碳化合成法不但能夠保留 SP 原有官能基,還可能轉換為類多酚類或類萜結構,兩者皆為更具經濟價值的化合物,且亦被證實具有抑制腫瘤轉移的功能。我們的技術能將不同來源的 SP 藉由碳化和聚合的程度來調控 SP-CNGs 表面的官能基分布、種類和交聯結構,來合成具有較高的穩定度、富有彈性的形狀及尺寸以及有著良好的生物活性,且能穩定放大製程的 SP-CNGs。這些 SP-CNGs 還可能被賦予特殊的響應系統,非常適合作為藥物遞送系統。

因此若能從本校鄰近的海域取得外來或本土大型藻類,如銅藻、翼枝菜、冬青葉馬尾藻等,易生長分布多尚未有明顯經濟價值的藻類,如果能加以利用,提取有抗癌潛力的活性多醣,經由本團隊的技術進行特殊熱碳化加工,將有助於賦予其全新的價值,因此若能從學校周遭海域取得藻類,並萃取其多醣,製成具有抗腫瘤轉移活性的碳奈米膠,除了因藻類生長方便且快速,可降低成本,也因為是使用生物活性分子,也可以有效減低化學藥物所帶來的副作用,相信搭配其他

癌症療法,我們所製備碳奈米膠可有效降低腫瘤轉移,不僅提升癌症病人治療效果,也有望大大降低健保在癌症治療的花費。

三、 研究方法與流程

SP-CNGs 之合成與鑑定

- 1. 合成不同海藻多醣之 SP-CNGs
 - 2. 不同 SP-CNGs 之結構鑑定



SP-CNGs 於抑制腫瘤轉移測試

- 1. 用細胞存活率試驗篩選有效之 SP-CNGs
- 2. 用細胞爬行試驗篩選有潛力之 SP-CNGs
 - 3. SP-CNGs 之抑制腫瘤轉移機制探討



SP-CNGs 於動物試驗之可行性

- 1. 以小鼠試驗驗證 SP-CNGs 在生物體的可行性 2. 以小鼠試驗進行生物安全性之評估
- (1) 探討來自不同藻類間和不同萃取法所得之 SP,將其合成 SP-CNGs 後之形 狀、結構、電性、官能基分佈之關係。
- (2) 探討 SP-CNGs 於抗腫瘤轉移之效果,如細胞存活試驗、細胞爬行試驗、細胞侵襲試驗以及西方電泳試驗觀察腫瘤轉移相關蛋白質表現量。
- (3) 利用動物模式探討 SP-CNGs 作為抑制腫瘤轉移藥物之可行性分析。

貳、 研究內容說明

一、 本研究主題預期目標與進度說明

- 1. 本研究主題原先預期完成目標
- (1) 在紅藻、綠藻和褐藻間各萃取出五種不同結構組成的 SP 或硫酸化 SP。
- (2) 合成五種高產率 SP-CNGs,並成功鑑定其結構組成及物理特性。
- (3) 篩選出兩種有良好抑制腫瘤轉移效果的 SP-CNGs。
- (4) 探討 SP-CNGs 抑制腫瘤轉移的機制。
- (5) 在動物試驗中驗證具高生物相容性 SP-CNGs 能確實抑制腫瘤轉移(未來工作)。

在進行海藻活性多醣物質萃取,因礙於個人經驗不足,萃取產率極低且再現性也差,在與指導教授商討後,決定採取與藥商購買與我們的萃取方法所應得的理論產物相符的海藻多醣藥品來進行實驗,同時也會與我們自己所萃取的海藻多醣相互比較,且因藥廠的海藻多醣來源相同以及批次穩定的關係,而較容易通過法規驗證,並實際應用在癌症輔助治療上。但也因產率低導致後續實驗效益不佳,所以組別相對當初預期少了很多,因此決定直接以細胞實驗進行篩選,進而回頭探討為什麼,最後再看看能否優化萃取製成,來符合初衷,讓我們自己可以從易生長分布多尚未有明顯經濟價值的藻類,加以利用,提取大量有抗癌潛力的活性多醣,經由特殊熱碳化加工,賦予其全新的價值。

- 2. 本研究主題修正預期完成目標
- (1) 合成高產率 SP-CNGs, 並篩選出有良好抑制腫瘤轉移效果的 SP-CNGs。
- (2) 高產率 SP-CNGs 之鑑定其結構組成及物理特性。
- (3) 在動物試驗中驗證具高生物相容性 SP-CNGs 能否抑制腫瘤轉移。
- (4) 探討 SP-CNGs 抑制腫瘤轉移的機制。
- (5) 在紅藻、綠藻和褐藻間各萃取有特定活性成分組成的 SP 或硫酸化 SP,並

優化其製成(未來工作)。

- 3. 本研究主題目前完成目標
- (1) 合成高產率 SP-CNGs, 並篩選出有良好抑制腫瘤轉移效果的 SP-CNGs。
- (2) 高產率 SP-CNGs 之鑑定其結構組成及物理特性。
- (3) 在動物試驗中驗證具高生物相容性 SP-CNGs 能否抑制腫瘤轉移。
- (4) 探討 SP-CNGs 抑制腫瘤轉移的機制。

二、 研究方法及過程



1. 合成不同來源之 SP-CNGs

我們選擇了常從各種藻類所萃取出的多醣來進行篩選,分別命名為 SP#001 及 SP#002。為了合成具抑制腫瘤轉移功能的 SP-CNGs,我們選用較能保留原始分子官能基的以下至上合成法(bottom-up)來製備穩定的 SP-CNGs。SP 以不同熱轉換方式(如乾燒法、水熱法與微波法)合成 SP-CNGs,合成過程可與無機鹽類(硫酸根、含氮分子、鹵素等)或金屬離子混合,藉由調整溫度、時間、與溶液的 pH 值等參數來調控 SP-CNGs 的材料特性與官能基分佈。熱處理後的樣品以離心法與透析的方式取得較純且尺寸均勻的 SP-CNGs。綜觀來說,顏色越深代表碳化程度越嚴重,我們期待此 SP-CNGs 能同時保有原 SP 的良好生物相容性,但又被賦予其他生物應用(如抑制腫瘤轉移的功能)。

2. 篩選 SP-CNGs 於細胞爬行試驗

在抑制腫瘤轉移測試的材料篩選實驗中,以細胞爬行試驗(wound healing assay)為最常見,我們以最常被拿來做抑制腫瘤實驗的細胞株,BALB/c 小鼠 4T1 乳腺癌細胞(4T1 breast adenocarcinoma cells)培養在 RPMI 培養基。首先在24-well 孔盤中放置觀察細胞爬行用的 Culture-insert®(2 well)矽膠,此矽膠能製造出大小一致的細胞間隙(約500 μm)。將10⁵顆4T1細胞種在每個 Culture-insert®的 well 中,並於培養箱放置4小時等待細胞完全貼盤,貼盤後的細胞在顯微鏡下有明顯形狀展開且堆疊的情形,之後移除 Culture-insert®並置換新的培養基拍攝4T1細胞在0小時的照片,此時兩側細胞中間應該會有一致長度的間隙(約500 μm),再加入含有 SP-CNGs 的培養基培養12小時後,觀察細胞爬行情形。

3. 篩選 SP-CNGs 之細胞存活率試驗

透過驗證 SP-CNGs 是否有毒殺癌細胞的效果,來初步確認 SP-CNGs 是否因此原因而抑制腫瘤爬行。細胞存活率試驗為種下約2×10³顆細胞於96-well 中,在培養箱(37°C、5% CO₂)培養24小時後,移除舊的 RPMI,加入稀釋於 RPMI 中的材料培養72小時,培養後移除材料並加入細胞活性試劑(Prestoblue®)測量細胞存活率。

4. 細胞侵襲試驗

我們利用細胞侵襲試驗(cell invasion assay)來觀察 SP#001-CNGs 是否能抑制癌細胞降解細胞外基質(ECM)而轉移之效果驗證。首先在 24-well 中放入細胞侵襲試驗專門的 Transwell-insert®,並加入少許的基底膠(Matrigel)培養 2 小時使膠凝形成類 ECM 構造,之後加入由 SP#001-CNGs 和 10⁵ 顆 4T1 細胞混合之培養液種入 Transwell-insert® 培養 24 小時,此時上層 Transwell-insert® 中的胎牛血清(FBS)濃度較低,細胞會往 FBS 濃度較高地方轉移,之後以 PBS 潤洗和聚甲醛固定液(PFA)固定細胞,以染劑(Hochest®)染上細胞核,並以棉棒刮除上

層細胞,最後在螢光顯微鏡觀察下層細胞的侵襲狀況,控制組之細胞會因為 FBS 濃度差異而跑至下層 Transwell-insert®,所以會有很強的螢光。

5. 細胞貼附試驗

我們想透過這個實驗來觀察 SP#001-CNGs 與 4T1 細胞的作用力有多強,以及其會如何改變細胞的外觀型態,因此我們將 4T1 細胞以 4000 顆的數量培養在 48-well 細胞培養孔盤中,並與含有不同濃度 SP#001-CNGs Condition 5 的 RPMI 培養液 1:1 相互混和,培養 24 小時後,以生理食鹽水沖洗掉已死亡的懸附細胞,並在顯微鏡下觀察細胞型態的變化。

6. SP-CNGs 之材料鑑定

為了瞭解其不同來源 SP 所合成之 SP-CNGs 的材料特性分析,我們利用下列儀器設備鑑定所合成出的高產量 SP-CNGs 的物化特性,利用光譜法測量吸收峰與螢光特性,量測吸收觀察是否有碳核形成和比較螢光量子產率;FT-IR 鑑定其表面的官能基分佈;動態光散射粒徑分析儀(DLS)及界面電位分析儀(ζ-Potential)能量測大小、分散性和電性;穿透式電子顯微鏡(TEM、HR-TEM)能鑑定其 SP-CNGs 之均匀度、尺寸、形狀與晶格分析;元素分析儀(EA)能測量其原子組成比例(如 C、H、O、N、S)。因 SP-CNGs 屬於非常新穎的材料,藉由上述儀器鑑定能幫助我們更了解 SP-CNGs 的組成機制與可能腫瘤抑制的機制。

7. 小鼠 4T1 腫瘤轉移試驗

我們相信在細胞實驗成功驗證 SP#001-CNGs 之抗腫瘤轉移效果與分析其可能機制後,接下來我們以動物實驗驗證 SP#001-CNGs condition 5 之可行性分析,期間每組條件至少做 6 重複。4T1 乳腺癌細胞非常容易轉移至肺部中,形成轉移腫瘤結(tumor-node-metastasis),是很好的腫瘤轉移模型。首先我們將 10⁶ 顆 4T1 細胞以皮下注射至 4~5 周大的 BALB/c 小鼠,乳腺癌腫瘤約在 1 周內

形成(體積約 10^3 mm^3),隨後我們連續以 14 天鼠尾靜脈注射方式給予 50、 100 mg kg^{-1} 的 SP#001-CNGs condition 5 ,除了每天記錄老鼠體重變化和生理狀況評估外,在第14天將會犧牲小鼠取出腫瘤測量腫瘤大小、重量,以及觀察肺部表面的腫瘤結轉移數量,來評估 SP#001-CNGs 是否有達到抑制腫瘤轉移的效果。

8. 生物分布試驗

我們除了在小鼠 4T1 腫瘤轉移試驗中驗證 SP#001-CNGs 的腫瘤抑制效果之外,同時我們也需要去了解材料在生物體內的分布情況,看能否累績在目標器官進行治療,以及是否可以被累積在肝、腎進而被代謝排出體外。我們將 SP#001-CNGs 與 3-(ethyliminomethyleneamino)-N,N-dimethyl-propan-1-amine (EDC)、1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione (NHS)、Cyanine5.5 amine (Cy5.5),以 100:100:10:10 的比例進行混和,首先將 SP#001-CNGs 與 EDC 混和並在持續攪拌下反應 5分鐘,後添加進 NHS 反應 5分鐘,最後加入 Cy5.5 持續攪拌反應兩天,便製備完具有螢光標記的 SP#001-CNGs,並以 50 mg kg⁻¹ 的劑量在已經被植入腫瘤的老鼠以鼠尾靜脈注射的方式給藥,觀察在注射後 2、12、24、36 小時候的訊號表現量,並在 36 後犧牲取心、肝、脾、肺、腎、腫瘤等器官,看我們材料在各器官以及腫瘤的累積程度。

9. 抗氧化活性測試

在 FI-IR 中我們看到了於 condition 4-6 有 phenol 之波峰出現,先前的 文獻中有提到富含 phenol,如類黃酮等多酚物質,也有證明具有抗腫瘤轉移的 活性,但也不是所有的類黃酮都有此活性,因此對於機制的探討我們團隊想要 以類黃酮物質抗腫瘤轉移的機制著手,看能否找出些端倪,同時類黃酮類的物質,也有著很強的抗氧化活性,因此我們也好奇 SP#001-CNGs 是否也因 phenol 的出現,而被賦予了抗氧化活性。我們以 Folin-Ciocalteu 總酚含量試驗進行抗氧化活性的測試,將固定濃度的材料與 Folin-Ciocalteu 試劑互混反應 30 分鐘,

再加入最終濃度為 6.66% 的 Na₂CO₃ 反應 30 分鐘去除背景後,偵測波長為 760nm 的吸收值。

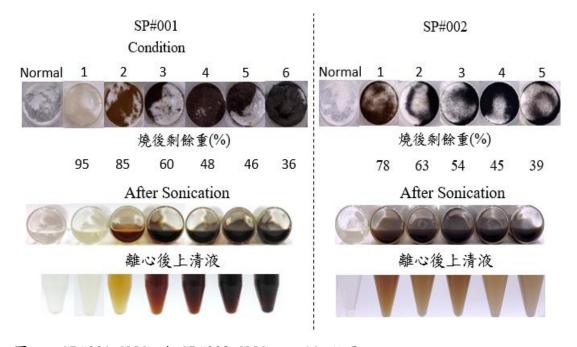
10. 蛋白質體學

我們將 4T1 細胞以 10^6 的數量培養在 10 cm 細胞培養盤上,在 37° C 5% CO₂ 培養 48 小時後,將原先培養液移除並置換成含有 SP#001 SP-CNGs 200、 $400\,\mu g\,ml^{-1}$ 的培養液, 37° C 5% CO₂ 培養 15 小時,然後將細胞收集起來,將培養液置換成 Lysis Buffer (Urea 8M, NaCl $150\,m$ M, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) $1\,m$ M, in Triethylamonium bicarbonat (TEAB) $100\,m$ M with $1\,x$ Protease inhibitor),冰浴反應 20 分鐘,再用超音波探針以強度 4 震盪 3 秒、靜置 30 秒,進行 4 個循環。將震盪完畢的細胞裂解液,進行 BCA 蛋白質定量,取約 $500\,\mu g$ 的蛋白,以 dithiothreitol (DTT) 及 indole-3-acetic acid (IAA) 進行蛋白質的線性化與衍生化,再添加胰蛋白酶,於 37° C 反應 16 小時將蛋白質切成小片段,後添加 trifluoroacetic acid (TFA) 終止反應,將蛋白水解液以 desalting HLB column 去除多餘的鹽分後,將純化蛋的白質取約 $50\,\mu g$ 進行 Label-free 的質譜分析,再取約 $100\,\mu g$ 的蛋白質使用 TMT labeling kit 在蛋白質上標記同位素,來增加質譜分析的準確性後,同樣進行質譜分析。

三、 研究成果與發現

1. 合成不同來源之 SP-CNGs

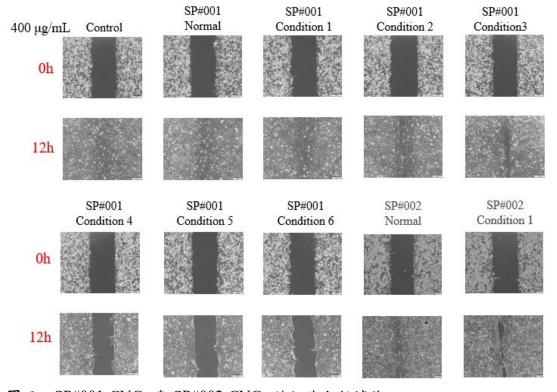
在經過我們不同溫度的熱反應處理之後,在圖二中我們可以發現,SP#001與 SP#002,在 Condition 1後都有明顯的碳化現象的,在經過覆水回溶並超音波震盪 後將其純化,取其上清液來觀察碳化奈米材料的對溶劑溶解度,在 SP#001中我們看到了其材料對溶劑溶解度較佳,離心完上清液與超音波震盪完顏色非常相似,但在 SP#002中,離心後的上清液反而與超音波震盪完的溶液顏色相差甚大且不同條件的上清液顏色相近,因此我們推測其剩餘條件碳化程度接近,但在 SP#001的組別中有發現剩餘條件的水溶液顏色為逐漸變成深褐色,因此我們選用了不同條件的 SP#001-CNGs 以及未碳奈米化的 SP#001,以及 SP#002碳奈米化後在 Condition 1剩餘比例較高的 SP#002-CNGs 及未碳奈米化的 SP#002,作為後續實驗所使用之組別。



圖二、SP#001-CNGs 與 SP#002-CNGs 之明視野圖。

2. 篩選 SP-CNGs 於細胞爬行試驗

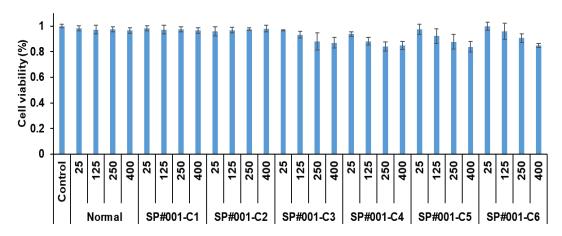
我們將不同溫度的熱反應處理 SP#001-CNGs 以及未碳奈米化的 SP#001,以及 SP#002碳奈米化後在 Condition 1剩餘比例較高的 SP#002-CNGs 及未碳奈米化的 SP#002,作為細胞爬行試驗的實驗組別,我們藉由不同 SP-CNGs 抑制細胞往中間爬行的速度來判定材料抑制腫瘤細胞爬行的效果,從圖三中可以得知在400 μg mL⁻¹的濃度下 Condition 4以後的 SP#001-CNGs 都有很明顯的抑制腫瘤細胞的爬行的活性,其抑制原因與調控此 SP 的碳化程度形成 SP-CNGs 有著高度相關,對此結果我們感到很興奮,因為在未奈米化的 SP#001並沒有觀察到此現象,因此我們成功的合成出了一個具有高度抗癌活性潛力的 SP-CNGs,後續我們會進行雙重確認,看看在其他也用來評估是否抑制腫瘤轉移的試驗也有同樣的結果,同時我們也好奇其材料是因為有什麼特殊的活性產生,才導致它有顯著的抗轉移活性。



圖三、SP#001-CNGs 與 SP#002-CNGs 的細胞爬行試驗。

3. 篩選 SP-CNGs 之細胞存活率試驗

首先我們先測試看看其抗腫瘤轉移的活性,可以從對癌細胞有無毒性去探討,這邊我們選用了 SP#001不同條件的 SP-CNGs 以及常溫未碳化處理的 SP#001作為實驗組別,在圖四中我們可以看到,目前篩選出的 SP-CNGs 在400 μg mL⁻¹細胞皆無明顯細胞毒性(>80%),表示 SP-CNGs 具良好生物相容性,但同時也表明了其材料並不是因為透過毒殺癌細胞而抑制腫瘤爬行,所以我們進一步對 SP-CNGs 進行鑑定,看是不是在經過了特殊的碳奈米化製成後被賦予了什麼新的活性,但不會使腫瘤細胞死亡卻會抑制腫瘤細胞的爬行活性。

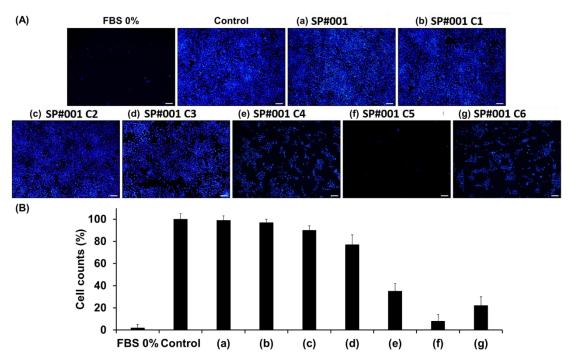


圖四、SP#001-CNGs(25-400 μg mL⁻¹)在 Condition 1-6(C1-C6)對於 4T1 在 72 小時下的細胞毒性試驗。

4. 細胞侵襲試驗

腫瘤轉移時,細胞外基質(ECM)扮演很重要的角色,腫瘤細胞會分泌蛋白(如MMP、uPA、cathepsin B)來促進 ECM 的降解而跑到適合轉移的組織器官中。隨著我們觀察到 SP-CNGs 組別的螢光量有較低情形(圖五),可以推論 SP#001-CNGs 有抑制細胞侵襲的效果,尤其是在 condition 5 的時候具有最顯著的效果,可以看到與 FBS 0% 的組別幾乎沒有明顯差異,有很顯著的抑制了 4T1 細胞的組織侵襲活性,因此我們將其材料進一步以小鼠動物模型進行驗證其材料在生物體內的效果。同時我們亦觀察到篩選之 SP#001-CNGs 能夠改變細胞表面的型態,使細胞聚集成團,如 condition 4、6 與控制組比較後有明顯的斑塊出現。綜上,

皆顯示 SP#001-CNGs 與 4T1 細胞的交互作用很強而有抑制其侵襲的現象。我們目前推測可能原因是 SP#001-CNGs 會和細胞膜表面作用,改變細胞的型態,使其抑制轉移情形,不過此推論仍尚待證實,我們未來還會探究其詳細機制。



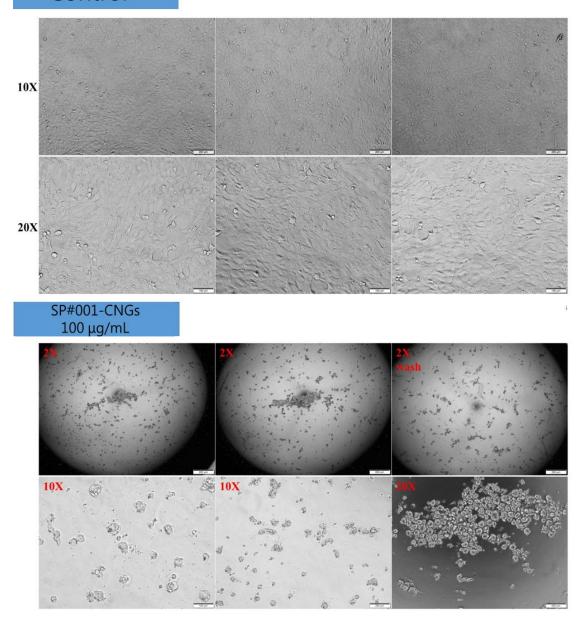
圖五、將 SP#001-CNGs 進行細胞侵襲試驗的結果。

5. 細胞貼附試驗

我們在細胞侵襲試驗中,我們看到了 SP#001-CNGs 能夠改變細胞表面的型態,使細胞聚集成團,如 condition 4、6 與控制組比較後有明顯的斑塊出現。因此我們想透過這個實驗來觀察 SP#001-CNGs Condition 5 除了可以抑制腫瘤細胞轉移外,是否也會改變細胞的型態。在圖三、四中,我們選擇了 100、400 以及更高濃度的 1000 μg ml⁻¹ SP#001-CNGs 看我們在細胞實驗所下的濃度使否有影響,以及選用更高濃度影響是否更為顯著。從圖六、七中我們可以看到,控制組為完好且正常的貼附在 48-well 細胞培養孔盤中,但在添加了我們材料後,可以發現細胞有明顯聚集的現象,這與我們在細胞侵襲試驗所發現的現象一致,在經過生理食鹽水沖洗掉懸浮的細胞後,發現還是有部分的細胞是貼附在細胞培養盤上的,但同樣也是聚集在一起。在更高濃度的組別中,我們也看到了同樣的現

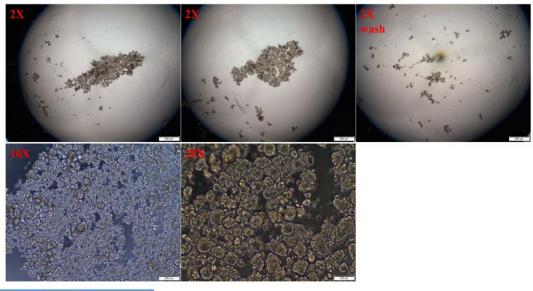
象,而且更為顯著,在經過生理食鹽水沖洗掉懸浮的細胞後,成功貼附的細胞也有明顯的下降,而在高倍率的視野下,也看到了細胞是有淡淡的褐色,我們推測是我們的材料會黏附在細胞上,進而影響細胞的生理活性,在 $1000~\mu g~ml^{-1}$ SP#001-CNGs 的組別甚至在 10 倍物鏡時就可以很清楚的看到細胞的顏色與控制組相差甚大。

Control

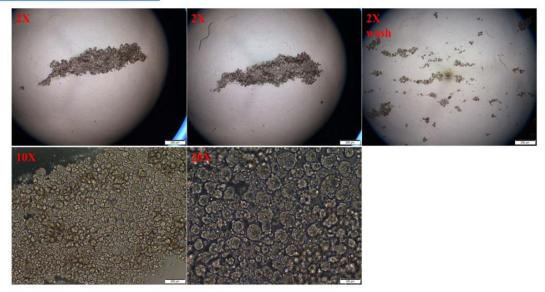


圖六、SP#001-CNGs Condition 細胞貼附測試結果。

SP#001-CNGs 400 μg/mL



SP#001-CNGs 1000 μg/mL

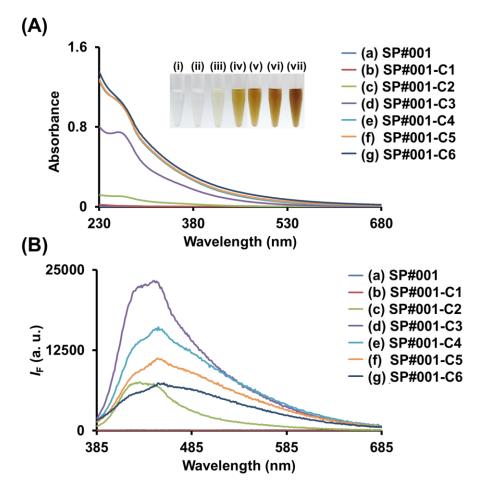


圖七、續圖三。

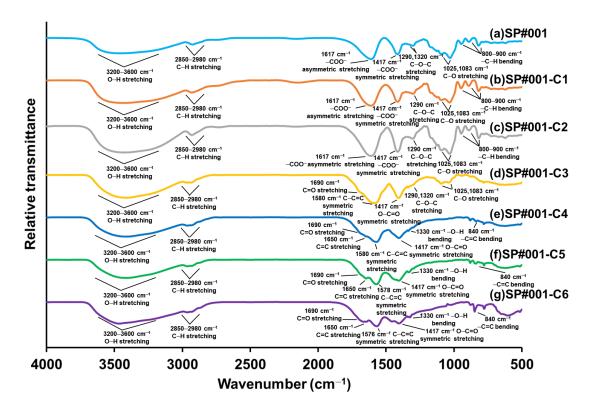
6. SP-CNGs 之材料鑑定

我們打算利用下列儀器設備鑑定所合成出的有抗癌症轉移潛力的 SP-CNGs 的物化特性,首先利用光譜法測量吸收峰與螢光特性,量測吸收觀察是否有碳核形成和比較螢光量子產率(圖八);FT-IR(圖九)量測其官能基變化;動態光散射粒徑分析儀(DLS)及界面電位分析儀(ζ-Potential)能量測物質大小、分散性和電性,並利用元素分析儀(EA)能測量其原子組成比例是否改變(圖十);穿透式電子顯微鏡(TEM、HR-TEM)來觀察 SP-CNGs 的均勻度、尺寸、形狀與晶格(圖十一)。

我們透過以上的儀器進行鑑定,在可見光吸收光譜與螢光光譜,看到了SP#001在經過碳奈米化形成SP-CNGs後,與未處理的SP#001有顯著的差異。FT-IR 的部分可以看到隨著條件的變化,FT-IR 的圖譜也會改變,在圖譜中我們也看到了,在SP#001 Condition4 6的組別中,出現了wavenumber(cm-1)1330的波峰,此波峰為酚基(phenol)之波峰。 5-Potential 中發現了隨著條件的變化我們的材料就會越趨向帶正電,DLS可以得知在經過碳奈米化的製程後,我們材料的尺度與未經過處理的SP#001的尺度小上許多,EA的部分也觀察到隨著條件的改變,碳氫氧的元素組成比例也隨之不一樣。TEM的圖中可以看到在不同條件底下,SP#001的結構會有明顯的變化,從原先類似片狀的結構形成了不規則的聚集膠狀物,HR-TEM中看到了會有晶格慢慢地形成。綜上所述,我們可以得知我們合成了一個與原先SP#001,不論是在物性還是化性都有著相當大的差異的材料,這可以告訴我們為何在抑制細胞爬行的試驗中,SP#001-CNGs與未處理的SP#001有著顯著的差異。



圖八、SP#001-CNGs(C1-C6)之可見光吸收光譜與螢光光譜。



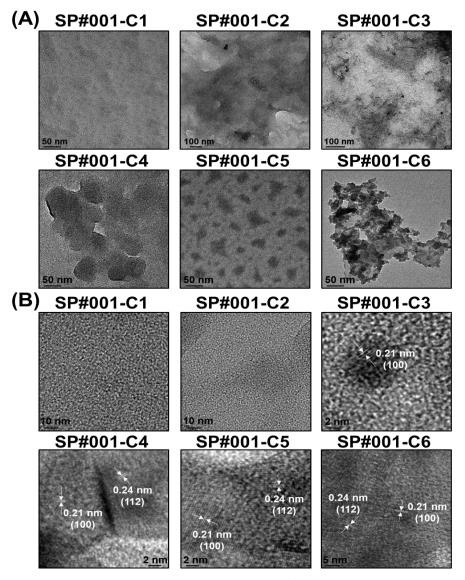
圖九、SP#001-CNGs(C1-C6)之 FT-IR 光譜圖。

		Product yield (%)	Zeta potential (mV; n = 15)	hydrodynamic diameter (nm)	Fluorescence QY (%) ^a	Elemental compositions (wt%)		
						C	Н	0
SP#001		-	-86.2±2.1	474.6±155.7	<0.01	29.98	5.02	55.33
	C1	95.2	-45.8±1.3	410.2±27.9	4.60	29.38	5.20	55.63
	C2	85.3	-41.8±2.4	163.4±28.5	14.30	30.74	5.00	54.61
CD#001	C3	60.9	-40.5±6.9	87.1±15.9	8.30	36.71	4.63	46.16
SP#001	C4	48.3	-34.2 ± 4.2	58.5±15.7	4.48	34.83	4.88	45.48
	C5	46.8	-31.7±5.1	54.3±11.3	3.22	33.53	4.81	44.57
	C6	36.1	-30.4±0.8	52.0±6.8	2.09	35.19	3.92	44.00

^a compared to quinine sulfate (QY: 54% in 0.1 M H₂SO₄).

圖十、SP#001-CNGs(C1-C6)的表面電位、水合半徑與元素分析數據。

^b determined by elemental analysis.

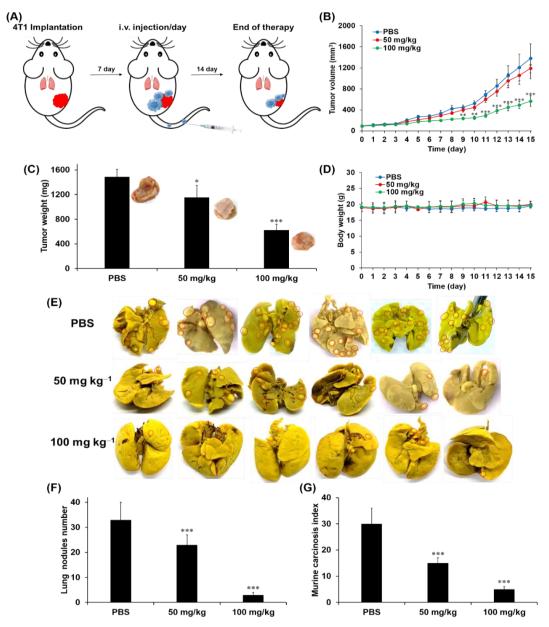


圖十一、SP#001-CNGs(C1-C6)的 TEM 與 High Resolution TEM。

7. 4T1 腫瘤轉移試驗

在小鼠動物實驗中,我們選用在細胞侵襲試驗效果最為顯著的 SP#001-CNGs condition 5 作為實驗組別,實驗流程圖如圖十二的 A 在老鼠的腹側注射 4T1 細胞,誘導腫瘤的形成,七天之後每天以 50、100 mg ml-1 的劑量以鼠尾靜脈注射的方式進行給藥,從圖五的 B-E 中看到,隨著靜脈注射的 SP#001-CNGs 劑量增高,腫瘤的生長速度下降,腫瘤的體積大小減少了,抑制了腫瘤的生長情況。在給藥期間體重也沒有明顯的變化,表明我們的材料不會對老鼠造成生理表徵上的影響,具有一定的生物相容性。而且在肺部的腫瘤節點數與 PBS 的組別

相較之下也明顯下降,表示說,我們的材料明顯在動物實驗抑制了由 4T1 細胞所誘導的乳癌轉移現象。因此我們可以得知我們成功的合成了一個材料海藻多醣碳奈米材料 SP#001-CNGs 在細胞試驗以及動物試驗都可以有效的抑制腫瘤的轉移,以及會減緩腫瘤的生長,同時生物相容性也相當不錯。

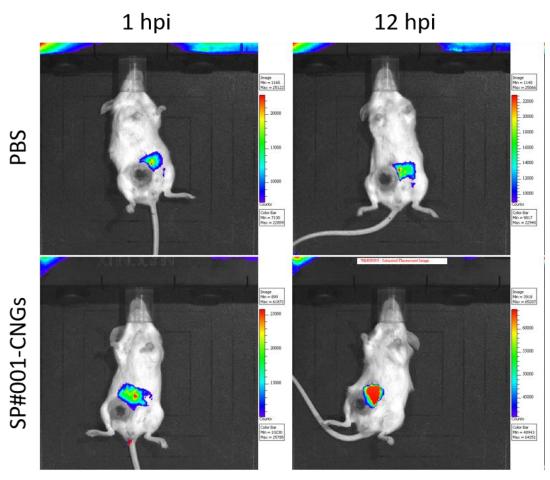


圖十二、將 SP#001-CNGs condition 5 作為最有潛力抑制腫瘤轉移的材料進行動物實驗的結果。

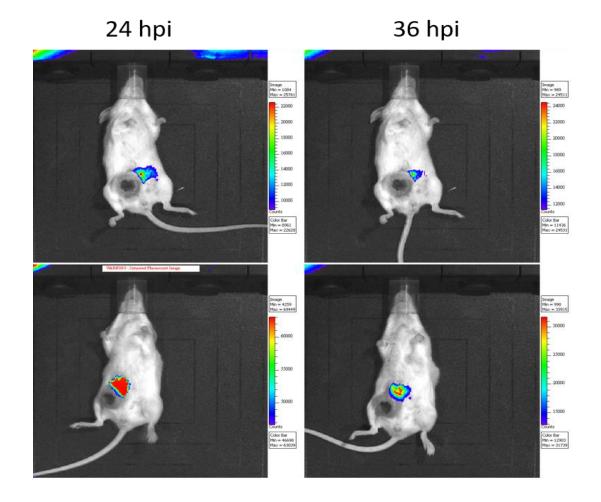
8. 生物分布試驗

我們在細胞貼附測試中看到了細胞上有淡淡的褐色,我們推測是材料黏附

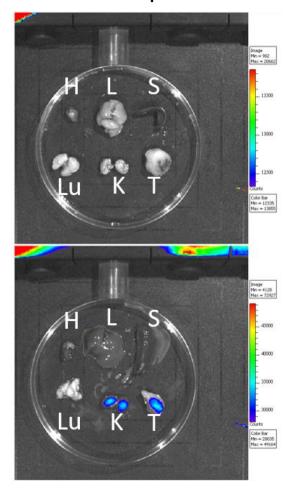
在細胞上面所造成的現象,進而影響了細胞的生理活性,像是貼附與爬行,但從結果來說,我們的材料似乎有標靶的特性,因此我們透過生物分布試驗除了想要知道我們的材料在生物體中是否會累積在腫瘤處,同時也想要看會不會被累積在肝臟或腎臟進而被代謝掉。從圖十三與十四的試驗中,將 SP#001-CNGs與注射 PBS 的組別相比,得以見得在經過注射後 1 小時,在並沒有明顯的訊號差異,然而在 12 與 24 小時腫瘤附近的與 PBS 組別相比的訊號量達到高峰,在 36 小時候訊號量有下降的現象,在圖十五中我們將注射後 36 小時的老鼠解剖犧牲取其心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟以及腫瘤等重要器官與目標組織進行觀察,我們發現在腎臟以及腫瘤都有明顯的訊號表現,也就是說我的材料會累積在腎臟以及腫瘤,因此我們可以合理的推斷,我們的材料會被生物體代謝掉,而且會在腫瘤組織累積,具有腫瘤的標靶性。



圖十三、SP#001-CNGs 生物分布試驗結果



36 hpi

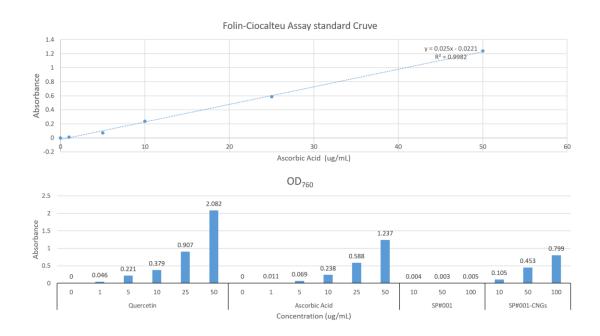


圖十四、續圖六。

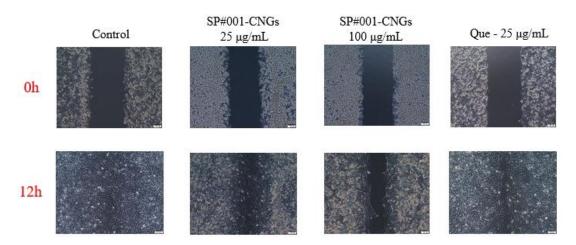
圖十五、續圖七,將 36 小時的老鼠犧牲取器官。H:心臟、L:肝臟、S:脾臟、Lu:肺臟、K:腎臟、T:腫瘤

9. 抗氧化活性測試

Folin-Ciocalteu 總酚含量試驗進行抗氧化活性的測試中,我們以 ascorbic acid 作為標準品,並同時測試 quercetin 以及 SP#001-CNGs 的抗氧化活性,在檢量曲線中,我們可以看到隨著 ascorbic acid 的濃度上升,吸收值會上升,因此吸收值越高表示抗氧化活性越強,在圖十六中我們可以看到 SP#001 在經過特殊碳奈米製程後形成 SP#001-CNGs 後被賦予了抗氧化活性,而且在 $100\,\mu\text{g/mL}$ 的 SP#001-CNGs 與 quercetin $25\,\mu\text{g/mL}$ 的活性相當,因此我們想知道抗氧化活是否會與抑制腫瘤轉移有直接相關,所以我們以抗氧化活性與 quercetin $25\,\mu\text{g/mL}$ 的 SP#001-CNGs $100\,\mu\text{g/mL}$,以及相同濃度的 SP#001-CNGs $100\,\mu\text{g/mL}$ 與 SP#001-CNGs $100\,\mu\text{g/mL}$ 與 SP#001-CNGs $100\,\mu\text{g/mL}$ 與控制組相比有明顯差異,且 SP#001-CNGs $100\,\mu\text{g/mL}$ 抑制效果較佳,因此可以見得抗氧化活性的有無與抑制腫瘤轉移有一定的相關性,但並非是直接相關。



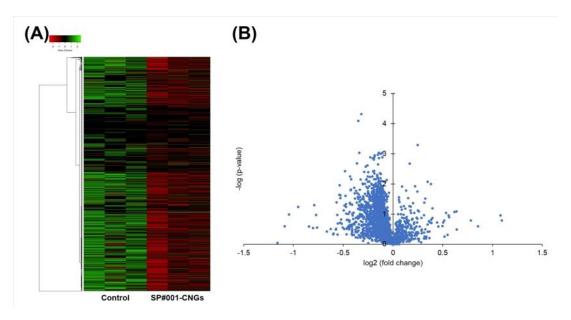
圖十六、以 SP#001-CNGs condition 5 進行 Folin-Ciocalteu 總酚含量試驗。



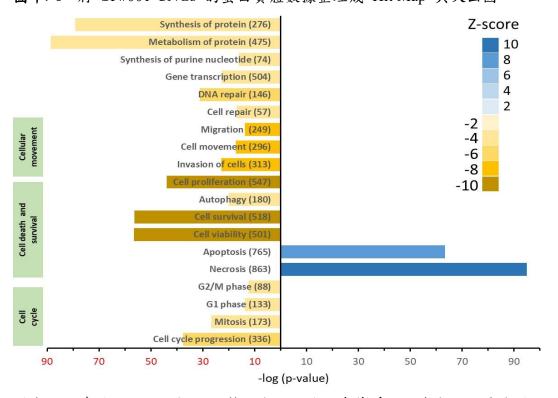
圖十七、選用與 SP#001-CNGs condition 5 抗氧化活性相當的 quercetin 比較其抑制腫瘤爬行的效果。

10. 蛋白質體學

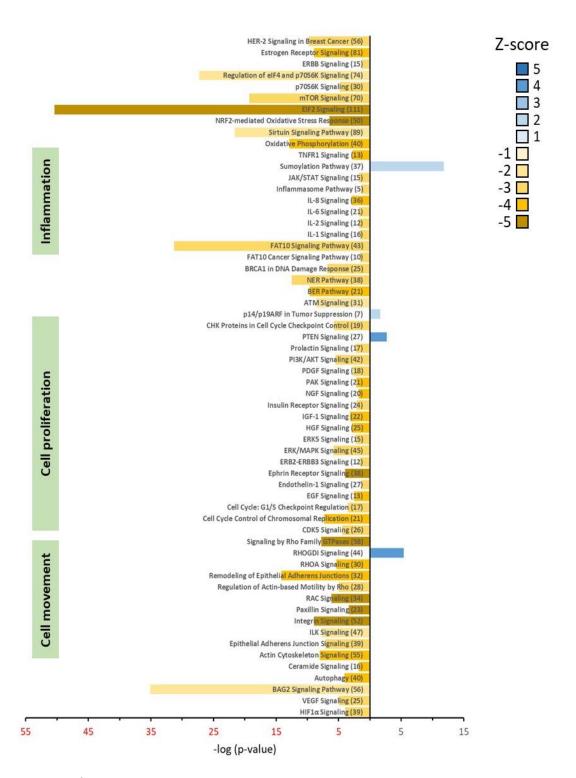
在圖十八至二十我們可以看到,將細胞與含有 SP#001-CNGs 的培養液進行培養後,進行蛋白質體學的分析,在有關於細胞存活與死亡的細胞訊息傳遞路徑之中,與細胞自噬作用與壞死相關的蛋白質表現都有相當顯著的提升,這可以明確的解釋進行動物實驗時所看到的,腫瘤有縮減的現象,但是卻與細胞存活率試驗的結果相互牴觸,因為細胞存活率試驗的結果顯示為對於 4T1 細胞沒有明顯的毒性。而在細胞爬行與侵襲試驗以及動物實驗中所造成的抑制現象,卻沒有在蛋白質體分析中看到與細胞自噬作用與壞死相關的蛋白質表現具有如此顯著性的變化。



圖十八、將 SP#001-CNGs 的蛋白質體數據整理成 Hit Map 與火山圖。



圖十九、續圖六,將 Hit map 整理成以細胞訊息傳遞路徑為分類的長條圖。



圖二十、續圖七。

四、結論

我們成功合成了一個海藻多醣碳奈米膠 SP#001-CNGs,我們在可見光吸收光譜與螢光光譜,看到了 SP#001在經過碳奈米化形成 SP-CNGs後,與未處理的 SP#001有顯著的差異。FT-IR 的部分可以看到隨著條件的變化,FT-IR 的圖譜也會改變,在圖譜中我們也看到了,在 SP#001 Condition4—6的組別中,出現了 wavenumber(cm⁻¹) 1330的波峰,此波峰為酚基(phenol)之波峰。ζ-Potential 中發現了隨著條件的變化我們的材料就會越趨向帶正電,DLS 可以得知在經過碳奈米化的製程後,我們材料的尺度與未經過處理的 SP#001的尺度小上許多,EA 的部分也觀察到隨著條件的改變,碳氫氧的元素組成比例也隨之不一樣。TEM 的圖中可以看到在不同條件底下,SP#001的結構會有明顯的變化,從原先類似片狀的結構形成了不規則的聚集膠狀物,HR-TEM 中看到了會有晶格慢慢地形成。綜上所述,我們可以得知我們合成了一個與原先SP#001,不論是在物性還是化性都有著相當大的差異的材料。

在細胞爬行試驗以及細胞侵襲試驗中,我們可以看到 SP#001-CNGs 展現出了高度的抗癌活性,在 4T1 腫瘤轉移試驗 也看到了一樣的活性,我們成功的驗證了 SP#001-CNGs 於複雜的生物體中也可以用來抵抗癌症的侵襲,我們進而去探討材料與癌細胞的作用機制為何,我們在細胞貼附實驗中看到了 SP#001-CNGs 對於 4T1 細胞有強的作用力,會改變細胞的外觀型態以及生理特徵,同時在生物分布試驗中除了證明了我們的材料會被代謝掉之外,也發現了我們的材料會累積在腫瘤,我們相信這與細胞貼附實驗的結果有絕對的相關性。我們嘗試從在 FI-IR 中我們看到了於 condition 4-6 有 phenol 之波峰來推論可能的機制,然而在先前的文獻有看到富含 phenol,如類黃酮等多酚物質都富含抗氧化活性,同時也被提出具有抗腫瘤轉移的活性,但也不是所有的類黃酮都有抑制轉移的活性,因此我們進行 Folin-Ciocalteu 總酚含量試驗 驗證了 SP#001-CNGs 被我們成功賦予了抗氧化活性,而且透過與 SP#001-CNGs

抗氧化活性相當的類黃酮 quercetin 同時比較其抑制 4T1 細胞的爬行,我們可以看到抗氧化活性與腫瘤的抑制能力有正相關性,因此我們團隊以類黃酮物質抗腫瘤轉移的機制開始著手,可惜的是關於類黃酮的抗氧化活性與抑制腫瘤轉移的機制尚待研究,但唯一可以確定的是,一般類黃酮的生物毒性都比較高,許多具有抑制轉移的現象都與類黃酮造成癌細胞死亡有著直接的相關性。後續從蛋白質體學的分析,出乎意料地發現 SP#001-CNGs 會顯著性的提高與自噬作用以及與細胞壞死相關的蛋白質表現,這結果和細胞存活試驗相互牴觸,可是對於腫瘤轉移相關的蛋白質表現,雖沒有如此顯著的差異,但在細胞爬行試驗、細胞侵襲試驗以及動物實驗都還是有著很卓越的抑制效果。不過 SP#001-CNGs 還是保持著良好的生物相容性,從初步的體重監測並沒有看到顯著的差異,將材料進行螢光標記並透過 IVIS 看到我們的材料是可以被代謝掉的,之後還會進行血液生化分析,看與肝腎功能相關的因子是否有異常,如 ALT 、AST、 GGT、T-BIL 以及 BUN 等等。

截至目前為止,我們團隊成功的合成了一個具有抑制癌症活性的海藻多醣碳奈米膠 SP#001-CNGs 而且其生物相容性極佳,雖然對於其材料如何與癌細胞作用的機制仍尚待研討,但我們相信在不久之後就會的到答案。

參考資料

- 1. He, X.; Xue, M.; Jiang, S.; Li, W.; Yu, J.; Xiang, S. Fucoidan Promotes Apoptosis and Inhibits EMT of Breast Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 442–447.
- 2. Popper, H. H. Progression and Metastasis of Lung Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2016**, *35*, 75–91.
- 3. Sun, Y.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Yang, C. Recent Development of Carbon Quantum Dots: Biological Toxicity, Antibacterial Properties and Application in Foods. *Food Rev. Int.* **2020**.
- 4. Geraldo, D. A.; Needhan, P.; Chandia, N.; Arratia-Pérez, R.; Mora, G. C.; Villagra, N. Green Synthesis of Polysaccharides-Based Gold and Silver Nanoparticles and Their Promissory Biological Activity. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2016**, *6*, 1263–1271.
- 5. Sun, Y.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Yang, C. Recent Development of Carbon Quantum Dots: Biological Toxicity, Antibacterial Properties and Application in Foods. *Food Rev. Int.* **2020**.
- Jian, H.-J.; Wu, R.-S.; Lin, T.-Y.; Li, Y.-J.; Lin, H.-J.; Scott, G. H.; Lai, J.-Y.; Huang, C.-C. Super-Cationic Carbon Quantum Dots Synthesized from Spermidine as an Eye Drop Formulation for Topical Treatment of Bacterial Keratitis. *ACS Nano* 2017, 11, 6703–6716.
- 7. Jian, H.-J.; Yu J.; Li, Y.-J.; Unnikrishnan, B.; Huang, Y.-F.; Luo, L.-J.; Ma, H.-K.; Scott G.H.; Chang H.-T.; Lin H.-J.; Lai, J.-Y.; Huang C.-C.. Highly Adhesive Carbon Quantum Dots from Biogenic Amines for Prevention of Biofilm Formation. *Chem. Eng. J.* **2020**, *386*, 123913.
- 8. Huang, H.-H.; Anand, A.; Lin, C.-J.; Lin, H.-J.; Lin, Y.-W.; Scott, G. H.; Huang, C.-C. LED Irradiation of Halogen/Nitrogen-Doped Polymeric Graphene Quantum Dots Triggers the Photodynamic Inactivation of Bacteria in Infected Wounds. *Carbon* **2021**, 74, 710–722.
- 9. Lin, C.-J.; Chang, L.; Chu, H.-W.; Lin, H.-J.; Chang, P.-C.; Robert, Y.; Wang, L.; Unnikrishnan, B.; Mao, J.-Y.; Chen, S.-Y.; Huang, C.-C. High Amplification of the Antiviral Activity of Curcumin through Transformation into Carbon Quantum Dots. *Small* **2019**, *15*, 41.
- Liskova, A.; Koklesova, L.; Samec, M.; Smejkal, K.; Samuel, S. M.; Varghese, E.;
 Abotaleb, M.; Biringer, K.; Kudela, E.; Danko, J.; Shakibaei, M.; Kwon, T. K.;
 Büsselberg, D.; Kubatka, P. Flavonoids in Cancer Metastasis. *Cancers* 2020, 12, 1498.