

# 中華民國第 63 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高中組 化學科

第二名

050205

二硫化合物交聯核酸在癌症藥物的應用

學校名稱：臺南市私立德光高級中學

作者：  高二 詹侑霖  高二 柯兆恒  高二 陳仕閔	指導老師：  侯美如
---	------------------

關鍵詞：醛基核酸、希夫反應、藥物包覆

## 摘要

化療為癌症主要的治療方式，對正常細胞常造成副作用。為了讓化療藥對癌細胞具選擇性，利用希夫反應的原理，將核酸的醛基和二硫化物的一級胺形成共價鍵結，來設計本實驗。先用鹽酸讓核酸露出醛基，再和二硫化物的一級胺進行交聯。因為癌症細胞內的穀胱甘肽量高於正常細胞，可催化二硫化物的雙硫鍵，使其斷鍵，而釋放出裡面包覆的化療藥。搭配乳化反應，藥物載體在電子顯微鏡下為球型，粒徑是 55.89~115.7 奈米，界面電位呈現負電。隨著 pH 值 3 往 10 變化，粒徑有變小和電位變更負的趨勢。載體在與兩種正常細胞共同培養後，呈現高存活率，顯示對生物體無毒。在模擬癌症的微酸環境中，二硫化物載體，相較於對照組，可釋放較多的化療藥。

關鍵字：醛基核酸、希夫反應、藥物包覆

# 壹、 前言

## 一、 研究動機

在一次觀看新聞報導時，我們看到了有關癌症的治療，患者因使用化學治療藥物後飽受副作用的折騰。而這問題已存在許久，這類的報導出現地如此頻繁，讓我對患者的痛苦感到十分不捨。久而久之，我們開始相對這方面有了更多的好奇，進而想辦法改善患者的生活品質。在一次課餘時間，我們去找老師詢問了癌症藥物方面的研究與計劃，也因此產生了這次的實驗研究。經過相關資料查詢後，我們發現現在治療癌症患者，化學治療是目前最普遍的治療方式，而這樣的治療造成極大的副作用。我們看到了患者在治療後體重減輕、嘔吐、掉髮等不良現象，搜尋後發現原來副作用產生的原因是因為藥物在毒殺癌細胞的同時也會影響到正常細胞的生長。因此我們也決定了我們要研究的方向，那就是找到具有選擇性的藥物治療方式以此減少對正常細胞造成的影響。

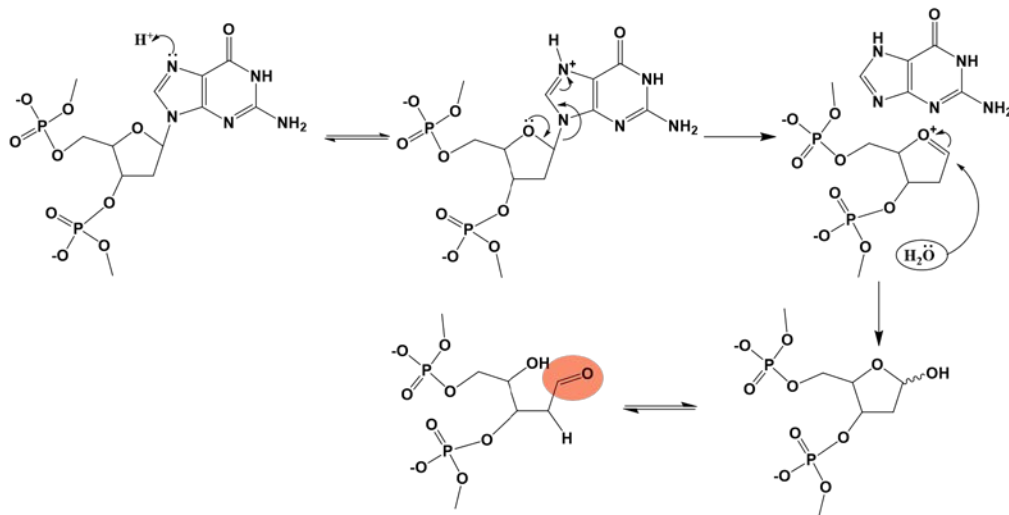
另外，在我們高一的化學課堂中老師有提到材料在奈米尺度下的特性與應用，課程例子中講到材料在奈米尺寸應用於醫療方面上的許多例子，所以想到我們可以藉由做出選擇性奈米尺寸的載體來避免副作用的產生，這也使我們增加了不少研究的啟發。另一方面，為了降低對環境的傷害，在討論後我們決定抽取植物中的核酸做為藥物載體的主要成分，來進行化療藥物包覆。主要原因是抽取核酸過程造成的環境污染低，對實驗人員安全性高，核酸具高生物相容性和易降解性，適合作為生醫材料等特性。

## 二、 研究目的

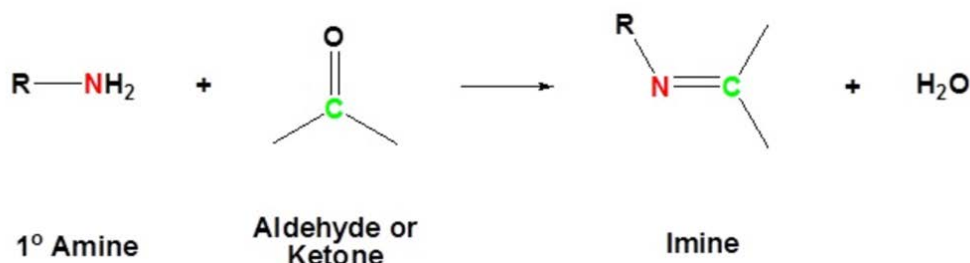
1. 萃取火龍果的核酸並加以改造，將其製作為無毒的藥物載體。
2. 利用二硫化物與改造後核酸進行希夫反應，並搭配乳化製程，將化療藥物進行包覆。
3. 探討及分析核酸藥物載體的物理化學特性。
4. 利用正常細胞株進行藥物載體的毒性測試。
5. 分析不同酸鹼值的溶液(中性或微酸環境)下，藥物載體所能釋放出的化療藥物濃度。

### 三、文獻回顧

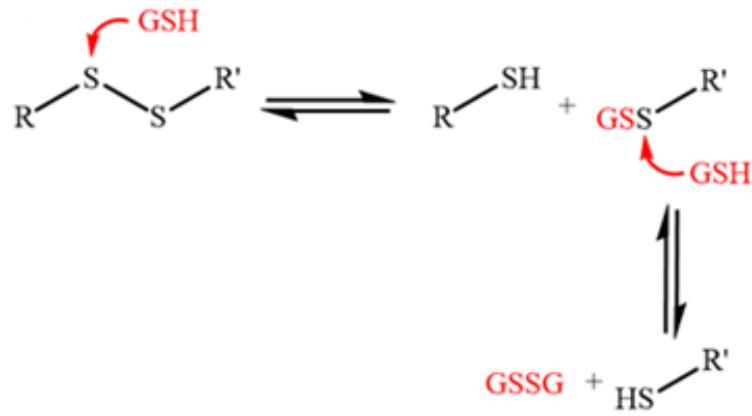
核酸由含氮鹼基、磷酸根和去氧核糖三個部分所組成，利用 1N 的鹽酸處理核酸後可以得到去氧核糖開環後的醛基[1]，如下圖一。接著我們找尋可以將這個醛基結構進行交聯的化學物質，參考希夫反應( Schiff reaction)，如下圖二，醛基和一級胺可以形成穩定的亞胺鍵[2]。以及，我們想要利用癌細胞內具有高量物質可以催化反應，讓載體裡面包覆的藥物釋放出來，而在正常細胞是少量表現的物質。經過文獻查詢，我們找到穀胱甘肽 (Glutathione，簡稱 GSH)，穀胱甘肽在癌細胞的含量是正常細胞的 100-1000 倍[3]，如下圖三，癌細胞內的穀胱甘肽可以將雙硫鍵氧化還原後斷鍵[4]。因此，我們挑選四種有機二硫化物，胱胺(Cystamine)、胱胺酸(Cystine)、甲脒二硫化物(Formamidine disulfide)或 4,4'-二硫代二苯胺(4,4'-Dithiodianiline)，當作醛基核酸的交聯劑，而二硫化物上面的雙硫鍵可以被癌細胞的穀胱甘肽催化斷鍵，而釋放化療藥到癌細胞內，搭配油包水的乳化製程，可以將化療藥進行包覆，製作流程如下圖四所示。



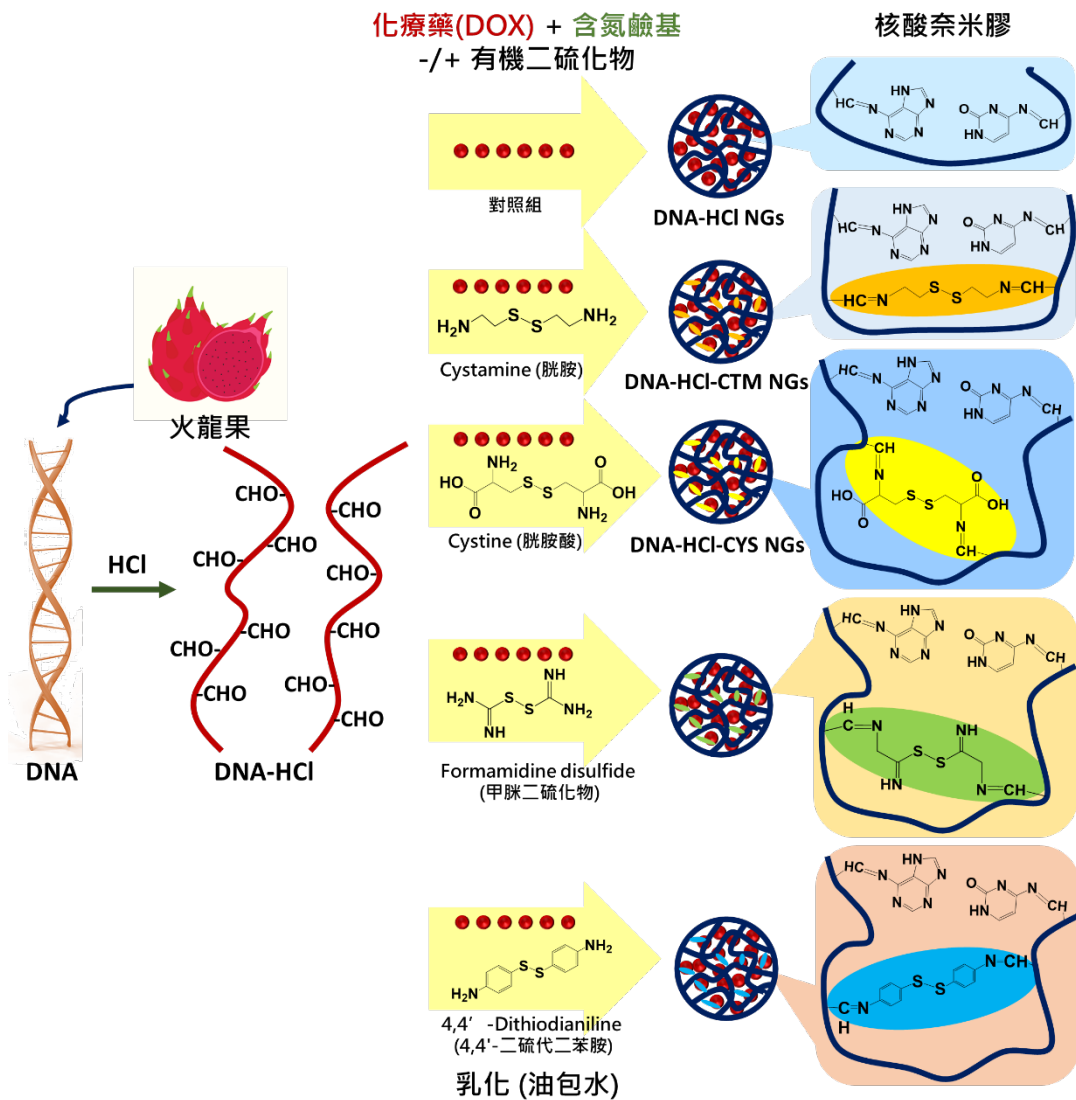
示意圖一、用 1N 鹽酸處理 DNA 核酸的化學反應流程(紅色標示為核酸醛基)。



示意圖二、希夫反應( Schiff reaction)，醛基和一級胺形成亞胺鍵。



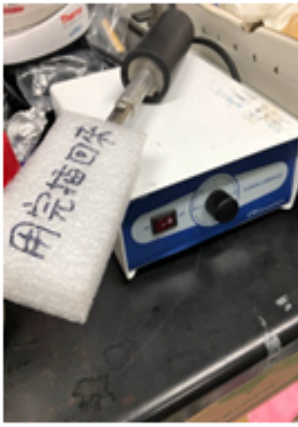
示意圖三、穀胱甘肽 (GSH) 可將雙硫鍵進行氧化還原反應而斷鍵。



示意圖四、抗癌奈米核酸載體的製作流程

## 貳、 研究設備及器材

### 一、 實驗器材



超音破細胞粉碎機



振盪器



離心機



內校式電子天秤



粒徑、界面電位分析儀



加熱攪拌器



烘箱



冷凍乾燥機



純水系統



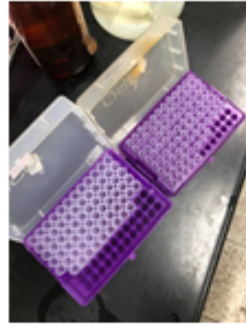
超音波震盪儀



穿透式電子顯微鏡



微量分注器



Tip (1 mL, 200  $\mu$ L)



透析袋 (3.5 kDa)



透析夾



恆溫水浴槽



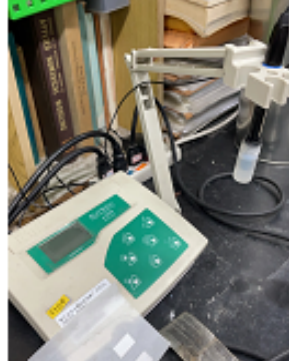
果汁機



細胞培養箱



拭鏡紙



酸鹼計



1.5 mL 指管



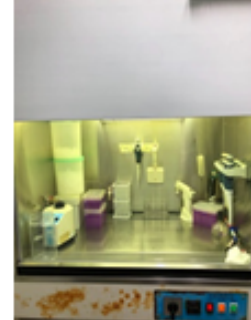
濾紙




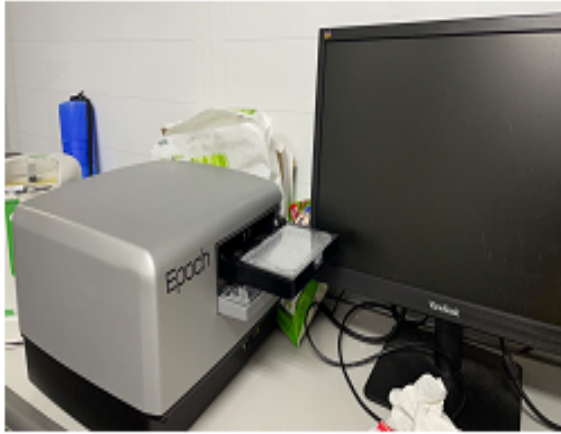

50 mL 離心管



15 mL 離心管



細胞無菌培養操作台

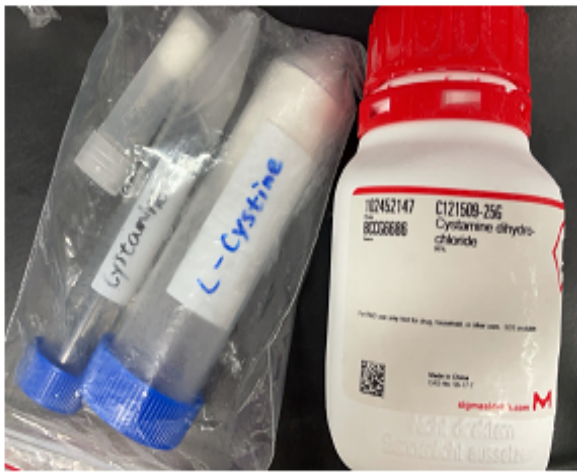
		
<p>玻璃樣品瓶↻</p>	<p>酵素免疫分析儀↻</p>	<p>盤式離心機↻</p>

## 二 實驗藥品

			
<p>界面活性劑 Tween80↻</p>	<p>界面活性劑 Span80↻</p>	<p>正己烷 n-Hexane↻</p>	<p>化療藥(DOX)↻</p>



界面活性劑 Tween80



界面活性劑 Span80

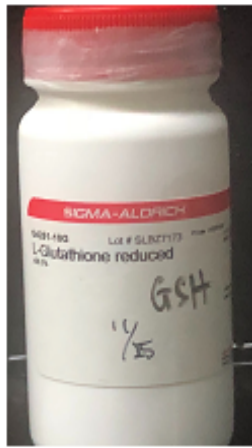
正己烷 n-Hexane



化療藥(DOX)



二硫化物(胱胺、胱胺酸)



CCK-8 呈色劑



細胞培養液

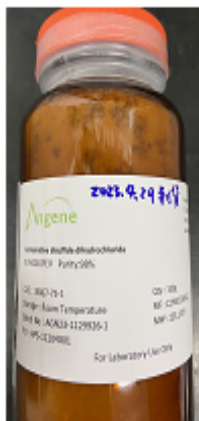


穀胱甘肽(GSH)

HCl

NaOH

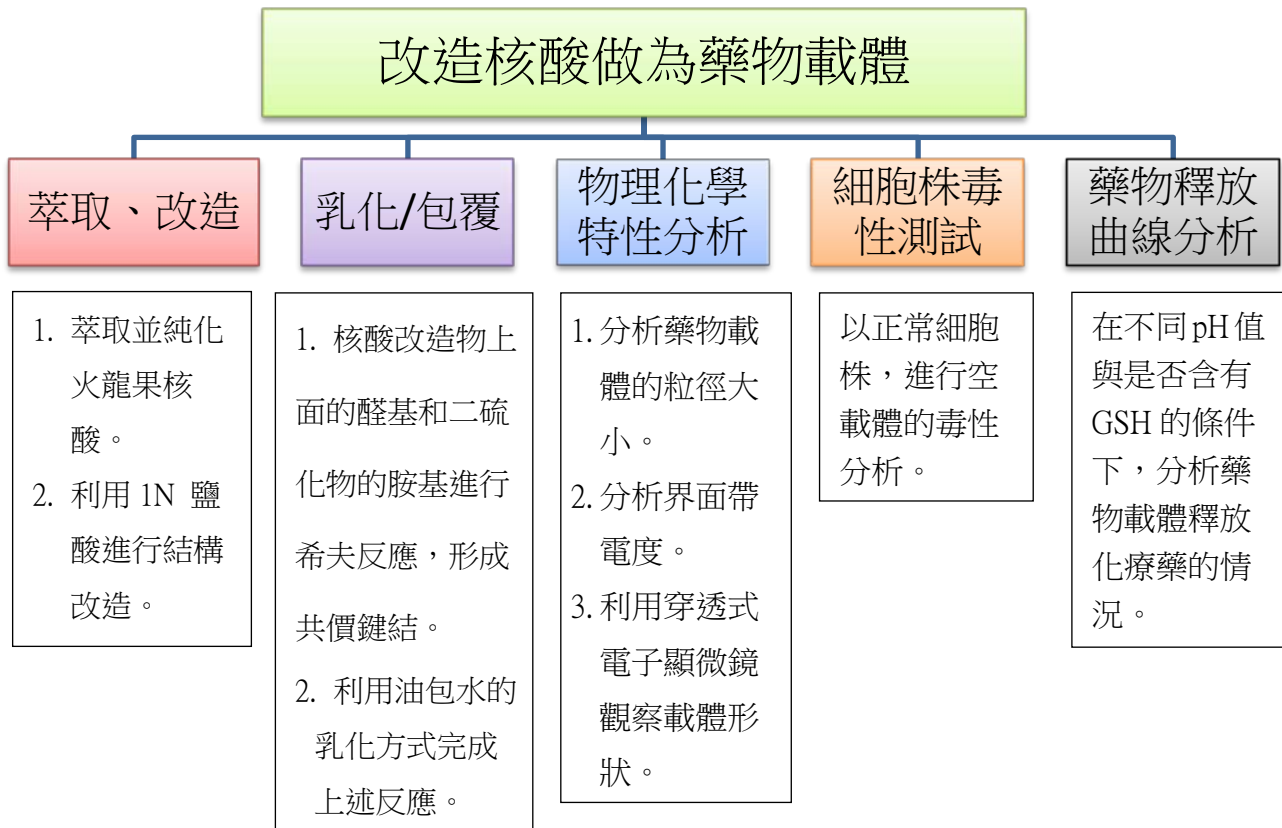
95%酒精



Formamidine disulfide (甲脒二硫化物)

4,4'-Dithiodianiline (4,4'-二硫代二苯胺)

## 參、 實驗流程圖



## 肆、 研究過程及方法

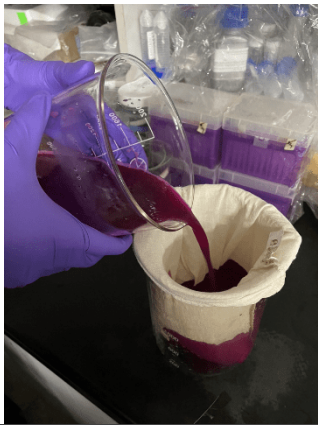
### 一、 實驗一、萃取並改造火龍果核酸做為藥物包覆載體

(一)、 動機：製備天然對人體無毒害的核酸當作生物材料，進行化療藥物(DOX)的包覆。

(二)、 步驟：

1. 破壞果肉組織：火龍果 5 顆(約 500 克)削皮後放入果汁機中，加 500mL 純水攪碎。
2. 破壞細胞間質：果汁倒入 1000 mL 燒杯中，加 12.5 mL 中性洗碗精(界面活性劑)，用磁石攪拌 10 分鐘使其充分混合均勻。
3. 使細胞萎縮：上述混合液加 5M 食鹽水(14.65g NaCl+50mL 純水)25mL，用磁石攪拌 10 分鐘。
4. 分解組織蛋白質：上述混合液加 100mg 鳳梨酵素，持續攪拌至少 10 分鐘。
5. 收集核酸濾液：利用濾袋過濾上述混合液至 1000mL 量杯(核酸存於濾液中)。
6. 析出核酸：取 75mL 濾液倒入透明燒杯，再加入 150mL 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，即凝聚所析出之核酸，

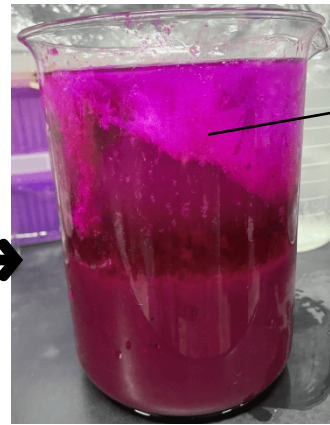
7. 收集核酸放入烘箱除去酒精，再用水回溶並透析，將殘留鹽類與葉綠素透掉。
8. 將整個冷凍核酸以冷凍乾燥的方式除水。
9. 核酸純化：將冷乾後的核酸加入溴化十六烷基三甲銨(簡稱 CTAB)，在 60°C 隔水加熱 1 小時。
10. 高速離心後取上清液，加入氯仿和異戊醇反應 30 分鐘，離心後取上清液。
11. 加入等量的異丙醇，置於 -20°C 冰箱反應 30 分鐘。
12. 離心後取下層已經析出的核酸，並用 70% 酒精洗核酸兩次。
13. 回溶純水後，進行冷凍乾燥，可以得到純度較高的核酸。
14. 將核酸以純水回溶，加入 1N 鹽酸，在室溫下，磁石攪拌 3 小時。
15. 利用純水透析核酸-鹽酸(DNA-HCl)溶液數次，將鹽酸除去後，利用酸鹼計測試酸鹼值達 7 之後，再開始進行冷乾。



利用濾袋過濾核酸混合液。(步驟 5)



濾液收集在透明燒杯，加入酒精。(步驟 6)



加入酒精後，析出核酸。(步驟 6)

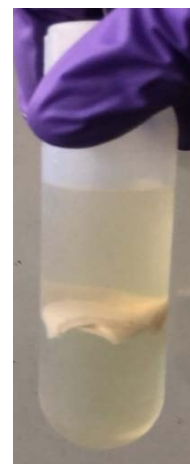
粗萃核酸



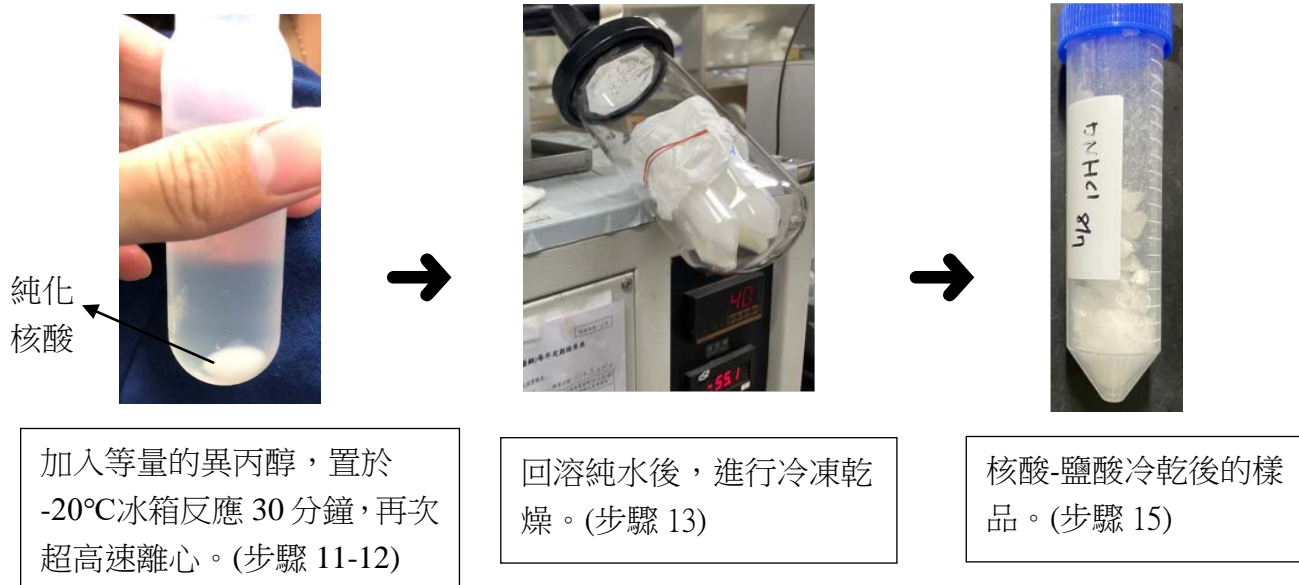
核酸加入 CTAB，在 60°C 隔水加熱 1 小時。(步驟 9)



高速離心後取上清液。(步驟 10)



加入氯仿和異戊醇反應 30 分鐘，離心後取上清液。(步驟 10)



## 二、 實驗二、 進行核酸-鹽酸、二硫化物與化療藥物的乳化包覆

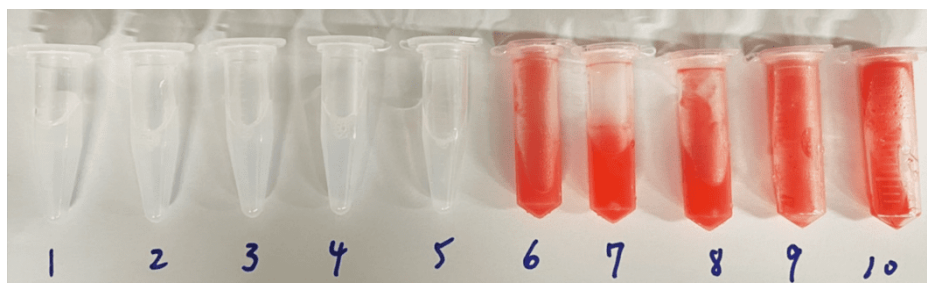
(一)、 動機：讓核酸-鹽酸(DNA-HCl)上的醛基(-CHO)和二硫化物的胺基(-NH<sub>2</sub>)進行希夫反應 (Schiff reaction)的同時，在油包水的條件下，將化療藥物(Doxorubicin, DOX)包覆在 DNA-HCl 載體內。

(二)、 步驟：

1. 先秤以下表所列的內含物進行油包水(Water-in-Hexane)的乳化反應

組別	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
添加物	DNA-HCl	DNA-HCl-C TM	DNA-HCl-C YS	DNA-HCl- FAD	DNA-HCl- DTD	DOX/DNA- HCl	DOX/DNA- HCl-CTM	DOX/DNA- HCl-CYS	DOX/DNA- HCl- FAD	DOX/DNA- HCl-DTD
DNA-HCl (mg)	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Cystamine (mg)	0	21.08	0	0	0	0	21.08	0	0	0
Cystine (mg)	0	0	33.26	0	0	0	0	33.26	0	0
Formamidine disulfide (mg)	0	0	0	30.88	0	0	0	0	30.88	0
4,4'-Dithiodia niline(mg)	0	0	0	0	34.37	0	0	0	0	34.37
DOX (mg)	0	0	0	0	0	20	20	20	20	20

- 2.將上述內容物放入 20 mL 樣品瓶，加入 1.5 mL 純水到 1-10 組，並利用震盪器充分混合均勻。
- 3.分別取 100 mg 親水性界面活性劑 Tween-80 和 200 mg 疏水性界面活性劑 Span-80 到 6 mL 的正己烷，混合均勻後加到 1-10 組。
- 4.將上述混合液，利用磁石攪拌 10 分鐘。
- 5.利用超音波粉碎機，在冰上進行乳化作用：震 5 秒，休息 10 秒，重複 36 次循環。
- 6.用石蠟膜封好，放在攪拌機上(轉速 300 rpm)低溫(4°C)攪拌隔夜。
- 7.將混合液收集在 15 mL 離心管中，進行離心(7000 rpm，1min)。
- 8.移去離心管中上方液體，加入 5 mL 正己烷，充分混合洗去界面活性劑。
- 9.離心(7000 rpm，1 min)，重覆 4 次，洗去界面活性劑，直到上層液呈現透明。
10. 洗完後，指管底部有水膠沉澱，加入無菌純水，進行振盪。
- 11.剪取一段透析袋，以 75%酒精消毒後，倒入水膠懸浮液，並用夾子固定透析袋。
- 12.在 2 L 純水中，進行 5 次透析，將未反應物移除。
- 13.將透析袋內藥物載體進行少量分裝如下圖：

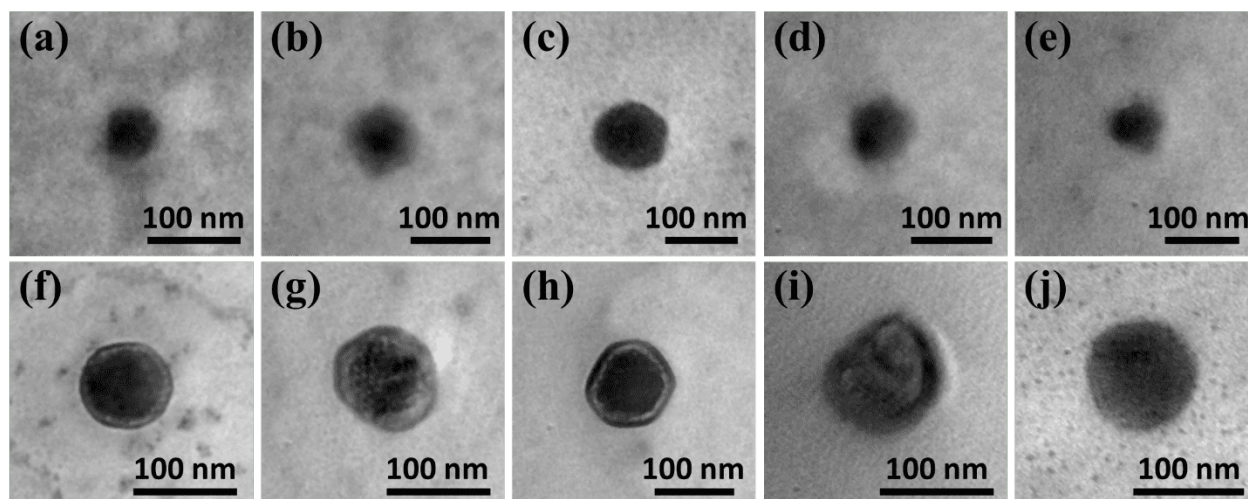


- 14.在研究人員的協助下操作，分別進行粒徑大小、表面帶電度和穿透式電子顯微鏡的觀察。三種分析皆需將原液稀釋 10 倍，再上機，粒徑和帶電度會用到 1 mL，電子顯微鏡只需要 10  $\mu$ L。

(三)、 結果：藥物載體的粒徑分布由 55.89 到 115.7 nm，界面電位皆為負電，應該是核酸裡面的磷酸根所造成的(表一)。由穿透式電子顯微鏡結果得知，5 種藥物載體皆為球型(圖一)。兩個數據皆顯示有包覆化療藥物(6-10 組)的粒徑會比沒包覆(1-5 組)的較大，而且界面電位更負電，顯示包覆 DOX 會影響表面帶電度。

表一. 藥物載體在粒徑大小與表面帶電度的分析

組別	平均粒徑 (nm)	界面電位 (mV)
1. DNA-HCl	55.89 ± 1.48	-15.2 ± 0.64
2. DNA-HCl-CTM	102.8 ± 2.36	-6.17 ± 0.67
3. DNA-HCl-CYS	97.89 ± 1.21	-14.1 ± 0.72
4. DNA-HCl-FAD	84.8 ± 3.21	-18.23 ± 0.54
5. DNA-HCl-DTD	95.8 ± 2.34	-18.1 ± 0.17
6. DOX/DNA-HCl	85.75 ± 0.87	-29.7 ± 3.42
7. DOX/DNA-HCl-CTM	108.0 ± 0.92	-18.0 ± 1.14
8. DOX/DNA-HCl-CYS	111.8 ± 0.71	-27.2 ± 2.39
9. DOX/DNA-HCl-FAD	105.1 ± 2.53	-30.4 ± 1.24
10. DOX/DNA-HCl-DTD	115.7 ± 3.17	-29.1 ± 2.47



圖一、穿透式電子顯微鏡觀察藥物載體：(a) DNA-HCl, (b) DNA-HCl-CTM, (c) DNA-HCl-CYS, (d) DNA-HCl-FAD, (e) DNA-HCl-DTD (f) DOX/DNA-HCl, (g) DOX/DNA-HCl-CTM, (h) DOX/DNA-HCl-CYS, (i) DOX/DNA-HCl-FAD (j) DOX/DNA-HCl-DTD.

### 三、 實驗三、 不同 pH 值下的粒徑和帶電度的變化

(一)、 動機：想了解酸鹼值是否會影響藥物載體的粒徑和表面帶電度變化

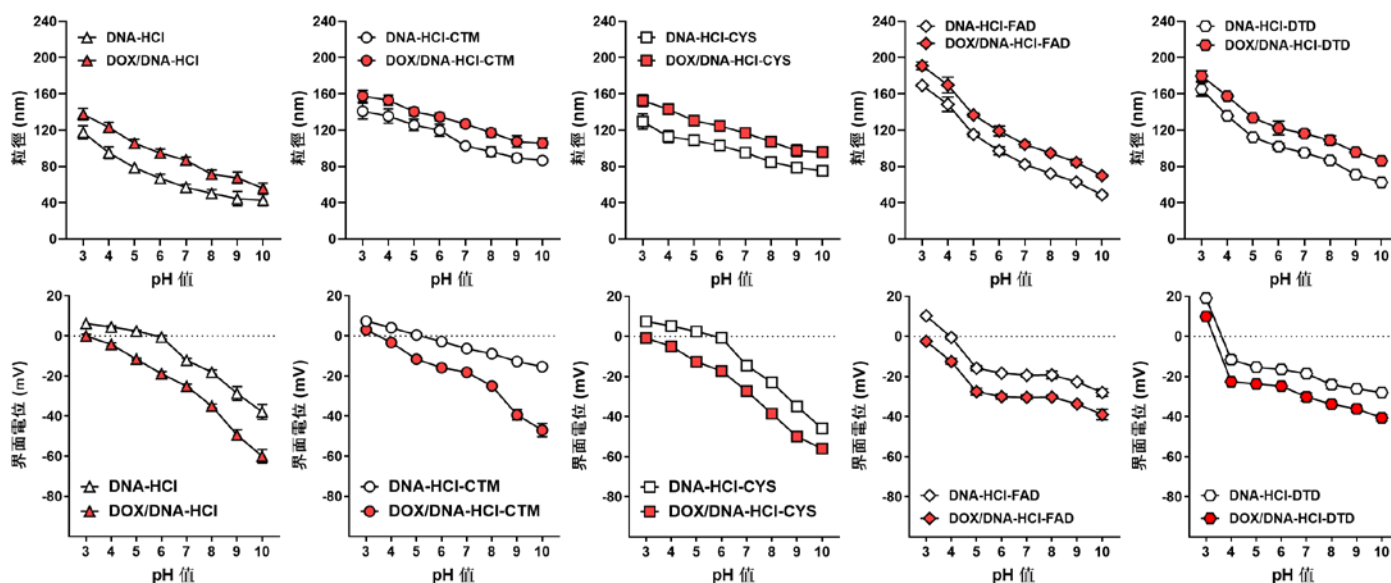
(二)、 步驟：

1.先使用 pH 值標準液(4.01, 7.0, 10.0)進行酸鹼計的校正。

2.分別使用 0.1 M HCl 或 0.1 M NaOH 進行藥物載體的 pH 值調整。

3.由 pH 值 3 往 10 的順序進行，在量測準確的 pH 值和超音波震盪後，先進行粒徑分析，再進行帶電度分析。

(三)、 結果：相同藥物載體(1 和 6, 2 和 7, 3 和 8, 4 和 9, 5 和 10)，有包 DOX 會比沒包的粒徑較大，而且隨著 pH 值變大，粒徑有變小的趨勢。在界面電位的分析，有包 DOX 會比沒包的帶電度更負，隨著 pH 值變大，界面電位有更負電的趨勢，三種藥物載體在粒徑和帶電度結果是相似的(圖二)。



圖二、藥物載體在 pH 值 3 到 10 的粒徑和界面電位變化

### 四、 實驗四、測試空載體(沒有包化療藥)對細胞的毒性

(一)、 動機：想了解未包藥物的空載體，雖然由對人體無毒害的核酸改造而來，不知是否具有細胞毒性。

(二)、 步驟：

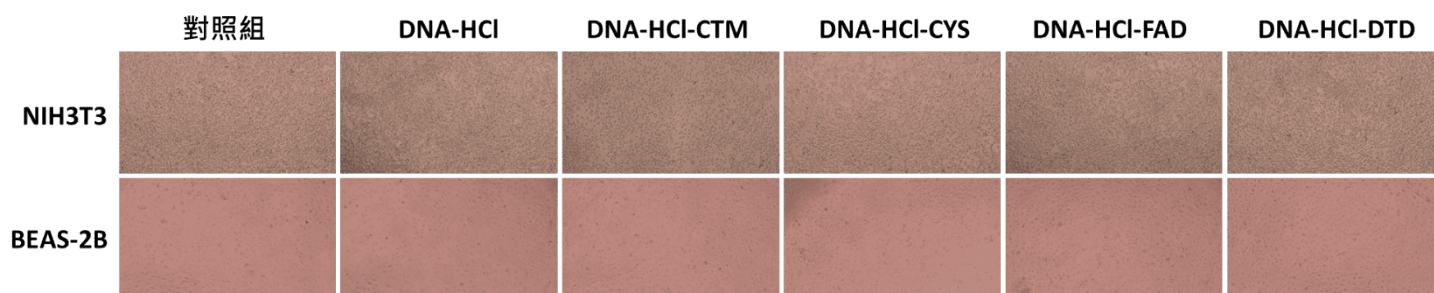
1. 培養兩株正常細胞：小鼠纖維母細胞(NIH3T3)和人類支氣管上皮細胞(BEAS-2B)，做為藥物載體細胞毒性的測試細胞。
2. 將細胞鋪在 96 孔盤上( $8 \times 10^3$  細胞/孔)，加入 10% 胎牛血清的細胞培養液，37°C，5% CO<sub>2</sub> 隔夜培養。
3. 以細胞培養液(含 10% 胎牛血清)配置各種濃度的藥物載體溶液。
4. 將對照組奈米水膠進行濃度序列稀釋(2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL)，如下表。

藥物載體最後濃度 (mg/mL)	0.125	0.25	0.5	1	2
細胞和細胞培養液	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL
藥物載體溶在細胞培養液	0.25 mg/mL 加入 100μL	0.5 mg/mL 加入 100μL	1 mg/mL 加入 100μL	2 mg/mL 加入 100μL	4 mg/mL 加入 100μL

5. 利用微量吸取器吸取空載體溶液後，加入細胞內，以細胞培養箱進行 37°C，5% CO<sub>2</sub>，共同連續培養 48 小時。
6. 配置 CCK-8 試劑：將原液以 10 倍稀釋方式，溶在沒有胎牛血清的細胞培養液中。
7. 移去細胞培養混合液，加入 100 μL 的細胞呈色劑(CCK-8)，反應 30-60 分鐘。
8. 盤子離心(1500 rpm, 3 分鐘)後，取 70 μL 到新的 96 孔盤。
9. 利用酵素免疫分析儀進行波長 450 nm 的吸光值偵測，並用 Excel 做圖分析。

(三)、 結果：在藥物載體濃度的 2 mg/mL 以下，三種藥物載體本身皆沒有造成兩株正常細胞株死亡，存活率可達 95% 以上，而且與不做任何處理的組別相比，細胞外觀沒有明顯差異。

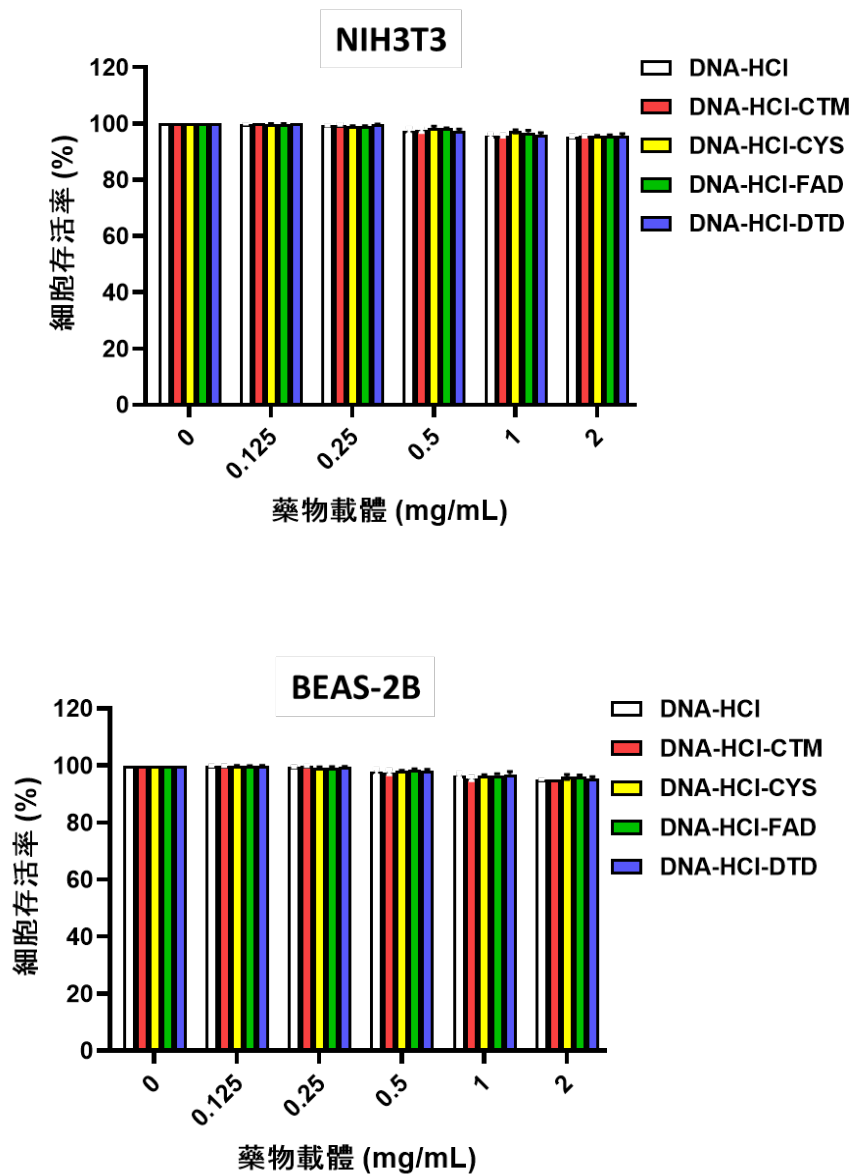
1. 光學顯微鏡 100×照相，如下圖三。



圖三、空的藥物載體(2 mg/mL)對兩種正常細胞的型態影響



2.以 CCK-8 試劑呈色後的吸光值(450 nm)分析細胞存活率，如下圖四。



圖四、空的藥物載體對兩種正常細胞的毒性分析

### 五、 實驗五、藥物釋放曲線

(一)、 動機：想了解包覆化療藥物的載體，能否對外在仿癌症微酸環境(pH6.5，含有 10 mM GSH)下，釋放化療藥物到溶液中。

(二)、 步驟：

1. 配置磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) 1 公升(pH7.4)：

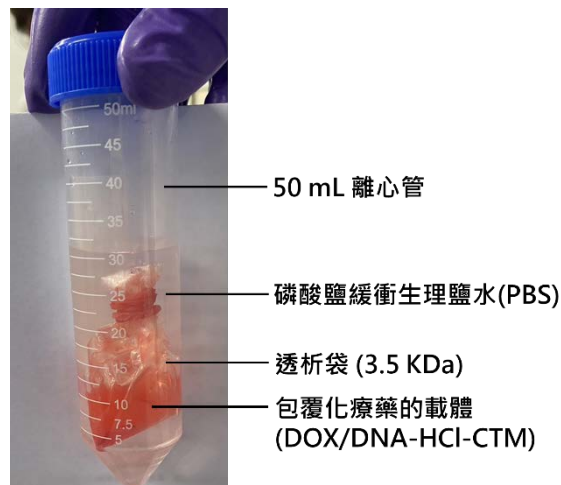
藥品	含量
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.27 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.42 g
$\text{NaCl}$	8 g
$\text{KCl}$	0.2 g

將上表藥品放到量杯內，先加 800 mL 的純水，混合均勻，利用 0.1 N HCl 將 pH 值調整為 7.4，再補水到 1000 mL。

2. 利用 50 mL 離心管，分別配置以下溶液，各三組，總共 12 組：

組別 內含物	pH6.5	pH7.4	pH6.5 (10 mM GSH)	pH7.4(10 mM GSH)
<b>PBS</b>	25 mL	25 mL	23.75 mL	23.75 mL
<b>0.1 M HCl 校正</b>	✓	×	✓	×
<b>200 mM GSH</b>	0	0	1.25 mL	1.25 mL
<b>總體積</b>	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL

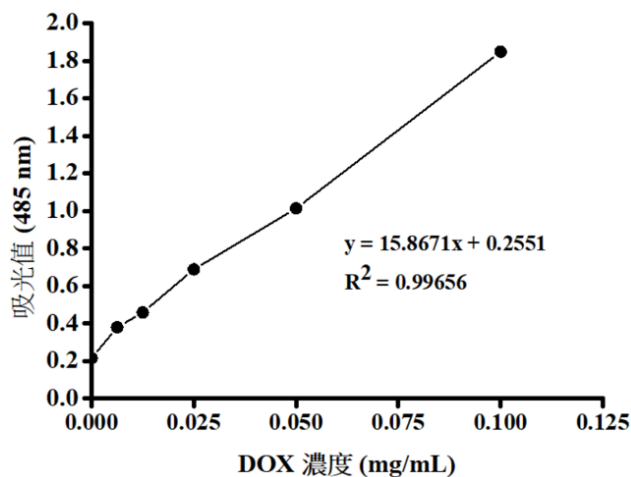
3. 取三組包覆化療藥物的藥物載體(DNA-HCl, DNA-HCl-CTM, DNA-HCl-CYS)2.5 mL，置入 3.5 KDa 的透析袋內。
4. 將上述 3 置入 50 mL 離心管內，放到 37°C 水浴槽內反應，每隔 2 小時取透析袋外面的液體，進行化療藥物(DOX)吸光值 485 nm 的偵測，測完再取回離心管裡面，裝置如下圖。



5. 製作標準曲線，特定的 DOX 濃度有特定的吸光值，可以利用吸光值來回推 DOX 的釋放濃度。
6. 將每個時間點的 DOX 濃度經由吸光值換算後，做成累積的 DOX 釋放量與時間點的對照圖。

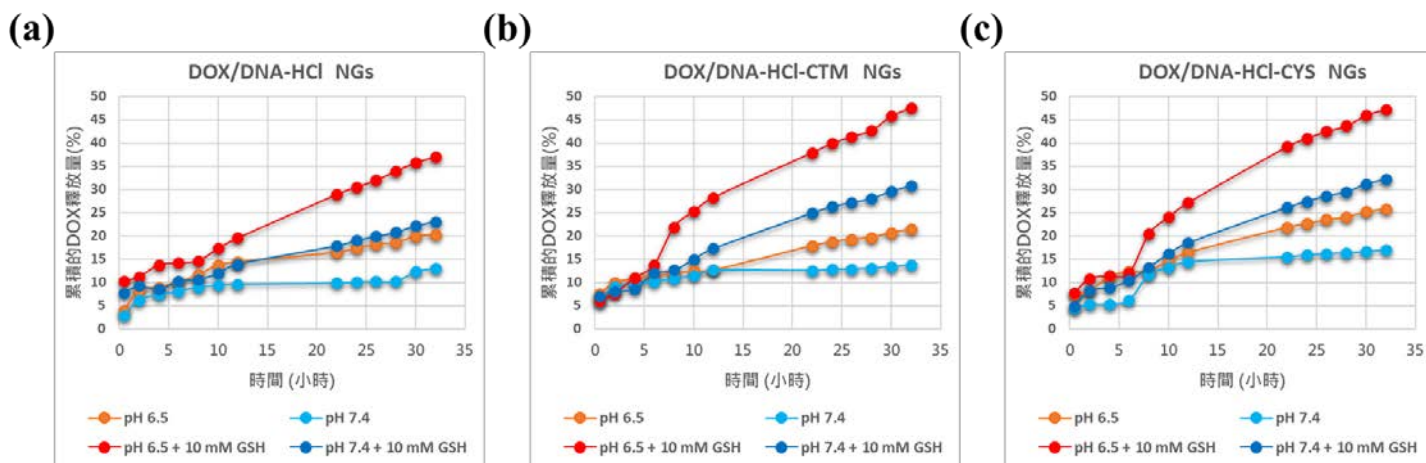
(三)、 結果：由圖六結果得知，同樣條件下(有或無 GSH)，pH 值 6.5 比 7.4 更能促使藥物載體釋放 DOX。同樣 pH 值(6.5 或 7.4)下，有含 GSH 的溶液，讓藥物載體更能釋放 DOX。因此各組的 pH 值 6.5 含 10 mM GSH 的環境下，是最能促使藥物載體釋放 DOX 的。而且 (b)DNA-HCl-CTM 和 (c)DNA-HCl-CYS 因為含有二硫化物的修飾，讓藥物的釋放比 (a)DNA-HCl 更明顯。

1. 標準曲線，如下圖五。



圖五、DOX 濃度與吸光值的標準曲線

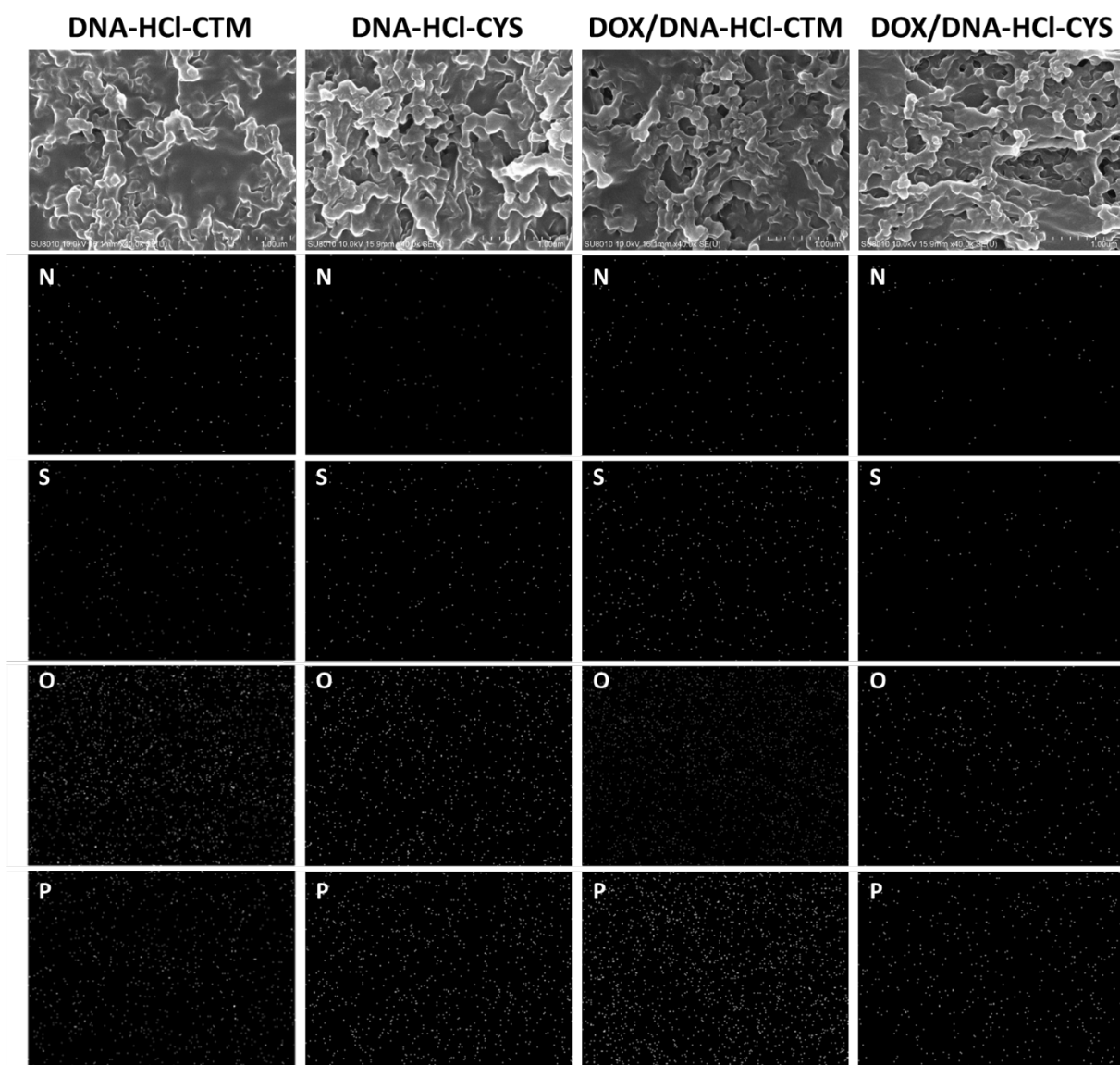
2. 藥物釋放曲線，如下圖六。



圖六、藥物載體在不同環境與時間點下，所釋放的 DOX 濃度

## 伍、 討論

- 一、由實驗二得知，這五種藥物載體是帶負電的球型結構，而數據皆顯示在包覆化療藥物後(6-10 組)的粒徑會比沒包覆(1-5 組)的大，且界面電位也更負，顯示包覆 DOX 會影響表面帶電度。界面電位較負的狀態下，與細胞膜較不容易有極性相異而產生正負靜電力相吸的效果，在包覆藥物後使載體粒徑增大的同時也需注意不能過大而使人體不會難以吸收。
- 二、由實驗三得知，藥物載體會因外界環境(pH 值和 GSH)改變，而在粒徑上和帶電度有所變化。相同藥物載體(1 和 6；2 和 7；3 和 8)有包覆 DOX 的粒徑較無包覆的大，而隨著 pH 值增加，粒徑有變小的趨勢，在界面電位的方面，包覆 DOX 比沒包的帶電度更負，隨著 pH 值增大，界面電位有更負的趨勢。
- 三、由實驗四得知，在空的藥物載體濃度 2 mg/mL 以下，因其對一般人體細胞毒性較低，存活率可達 95%以上，而在細胞外觀上較沒有明顯差異。因此，將來是可以應用在生物體上的藥物包覆材料。。
- 四、實驗五得知，在是否有穀胱甘肽 (GSH)的條件下，pH 值 6.5 比 7.4 均更能促進藥物載體釋放 DOX。同樣 pH 值(6.5 或 7.4)下，含有 GSH 的溶液，也讓藥物載體更加容易釋放化療藥。且我們發現 pH 值 6.5 含 10 mM GSH 的環境下，藥物載體釋放 DOX 的效率是最佳的。
- 五、與過去發表的藥物載體相比，我們使用二硫化物取代交聯劑，達到生物材料被交聯的效果[5]。傳統交聯劑，戊二醛(Glutaraldehyde)有毒性太高的問題；京尼平(Genipin)有價格稍高的問題；檸檬酸(Citric acid)有需要超過 70°C 高溫才能反應的問題，會影響包覆物的活性。四種二硫化物中，其中胱胺(Cystamine)或胱胺酸(Cystine)沒有上述的三類問題。
- 六、在包覆完成後，為確認兩種二硫化物是否有在藥物載體上，我們利用掃描式電子顯微鏡的元素分析功能，來確認硫(S)元素的存在，下圖為元素分析結果，由圖可知，兩種二硫化物皆有交聯在核酸材料上。



## 陸、 結論

在本實驗中，我們抽取火龍果核酸並利用鹽酸進行改造，使其露出醛基，來做為天然藥物載體的材料，簡寫為 DNA-HCl。根據希夫反應的原理，利用二硫化物胱胺(Cystamine)、胱胺酸(Cystine)、甲脒二硫化物(Formamidine disulfide)或 4,4'-二硫代二苯胺(4,4'-Dithiodianiline)上的一級胺，和核酸醛基進行交聯反應，並搭配正己烷包水(Water-in-Hexane)的乳化反應，得到五種藥物載體：對照組 DNA-HCl、二硫化物組 DNA-HCl-CTM、DNA-HCl-CYS、DNA-HCl-FAD 和 DNA-HCl-DTD，它們皆帶負電，是粒徑 55.89~115.7 nm 的球狀構造。隨著 pH 值 3 往 10 變化，載體粒徑有變小和帶電度變負的趨勢。五種載體與兩種正常細胞株共同培養後，在濃度高達 2

mg/mL 時，還保留大於 95% 的細胞存活率。在藥物釋放的結果中，模擬癌症微酸環境(pH6.5, 10 mM GSH)的溶液中，因為二硫化物組 DNA-HCl-CTM 和 DNA-HCl-CYS 具有雙硫鍵，可以被 GSH 催化而斷鍵，與 DNA-HCl 組相比，釋放更多的化療藥物(DOX)。因此，本研究可提供化療藥物載體一個新的天然無毒材料參考。

## 柒、 參考資料

- [1] L.G.W. Jr, Organic Chemistry, 8th ed., Pearson 2012.
- [2] R.G. Kallen, The mechanism of reactions involving Schiff base intermediates. Thiazolidine formation from L-cysteine and formaldehyde, J Am Chem Soc 93(23) (1971) 6236-48.
- [3] Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba, Acidic extracellular microenvironment and cancer, Cancer Cell Int 13(1) (2013) 89.
- [4] Y.F. Chen, C.H. Chang, C.Y. Lin, L.F. Lin, M.L. Yeh, J.S. Jan, Disulfide-cross-linked PEG-block-polypeptide nanoparticles with high drug loading content as glutathione-triggered anticancer drug nanocarriers, Colloids Surf B Biointerfaces 165 (2018) 172-181.
- [5] Y.F. Chen, M.W. Hsu, Y.C. Su, H.M. Chang, C.H. Chang, J.S. Jan, Naturally derived DNA nanogels as pH- and glutathione-triggered anticancer drug carriers, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 114 (2020) 111025.

## 【評語】 050205

本研究抽取火龍果核酸並利用鹽酸進行改造，使其露出醛基，來做為天然藥物載體的材料。利用 cystamine、cystine、formamidine disulfide 或 4,4'-dithiodianiline 上的一級胺，和核酸醛基進行交聯反應，並搭配 water-in-hexane 的乳化反應，得到五種藥物載體。因為二硫化物組具有雙硫鍵，可以被 GSH 催化而斷鍵，釋放更多的化療藥物(DOX)。有實際應用價值，可利用癌症細胞內的穀胱甘肽量高於正常細胞，而釋放較多包覆的化療藥，針對癌細胞毒殺。雖然在藥物釋放的結果中，模擬癌症微酸環境(pH6.5, 10 mM GSH)的溶液中，因為二硫化物組 DNA-HCl-CTM 和 DNA-HCl-CYS 具有雙硫鍵，可以被 GSH 催化而斷鍵，與 DNA-HCl 組相比，釋放更多的化療藥物(DOX)，但應該拿癌細胞做測試，看是否相對於正常細胞較會被毒殺。

## 作品海報



A microscopic image showing a large, prominent cell with a reddish-pink nucleus and a textured surface, surrounded by several smaller, spherical cells with blue, granular interiors. The background is a soft, out-of-focus blue.

# 二硫化合物交聯核酸 在癌症藥物的應用

# 壹、研究動機

癌症患者因使用化療藥物，常承受嚴重副作用的痛苦。

找到具有選擇性的藥物治療方式以此減少對正常細胞造成的影響。

化學課中有提到材料在奈米尺度下的特性與應用。

抽取植物中的核酸做為藥物載體的主要成分來進行化療藥物包裹，使具有選擇性。

模擬癌症的微環境來測試改造後的藥物載體，分析未來使用性。

## 貳、研究目的

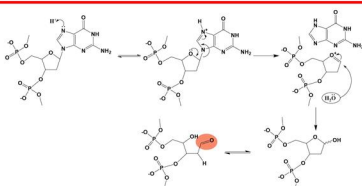
1. 萃取火龍果的核酸並加以改造，將其製作為無毒的藥物載體。
2. 利用二硫化物與改造後核酸進行希夫反應，並搭配乳化製程，將化療藥物進行包裹。
3. 探討及分析核酸藥物載體的物理化學特性。
4. 利用正常細胞進行藥物載體的毒性測試。
5. 分析不同酸鹼值的溶液(微酸環境)下，藥物載體所能釋出的化療藥物濃度。



## 參、研究設備與器材

超音波破細胞膜粉碎機	粒徑、界面電位分析儀	超音波震盪儀	內校式電子天秤
離心機	加熱攪拌器	烘箱	冷凍乾燥機
純水系統	振盪器	恆溫水浴槽	微量分注器
穿透式電子顯微鏡	透析袋(3.5 kDa)	透析夾	Tip (1 mL, 200 µL)
果汁機	細胞培養箱	拭鏡紙	酸鹼計
1.5 mL 指管	濾紙	50 mL離心管	15 mL離心管
細胞無菌培養操作台	玻璃樣品瓶	酵素免疫分析儀	盤勢離心機
界面活性劑 Tween-80	界面活性劑 Span-80	正己烷 Hexane	化療藥(DOX)
二硫化物(胱胺、胱胺酸)	CCK-8細胞呈色劑	細胞培養液	穀胱甘肽
HCl	NaOH	95%酒精	96-孔盤

### 本研究重要的化學反應示意圖



1N鹽酸處理DNA核酸的化學反應流程，得到去氧核醣開環後，露出醛基的結構。

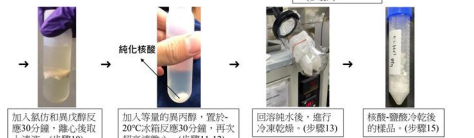
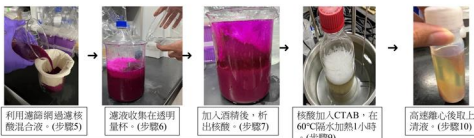


希夫反應(Schiff reaction)，醛基(-CHO)和一級胺(NH<sub>2</sub>)形成亞胺鍵(-C=N-)。

## 肆、研究過程及方法

### 實驗一、萃取火龍果核酸(載體)

- (1)破壞果肉細胞 (2)破壞細胞間質 (3)使細胞萎縮 (4)分解組織蛋白質 (5)收集核酸濾液 (6)取濾液倒入透明量杯 (7)加入冰酒精析出核酸 (8)收集核酸並透析 (9)將冷乾後的核酸加入溴化十六烷基三甲銨(CTAB)，隔水加熱(10)純化核酸 (11)加入氯仿和異戊醇待反應離心後取上清液 (12)加入等量的異丙醇反應離心後取析出核酸 (13)酒精洗核酸兩次 (14)回溶純水後冷乾得純度較高核酸 (15)核酸以純水回溶加入鹽酸室溫攪拌3小時 (16)純水透析核酸-鹽酸(DNA-HCl)溶液數次 (17)將鹽酸除去後酸鹼計測試酸鹼值達7進行冷乾。

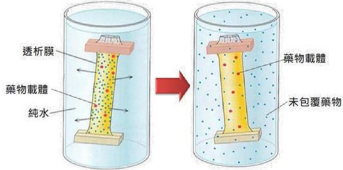


### 實驗二、進行乳化包裹

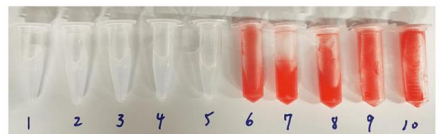
- (1)先將下表內含物進行油包水(Water-in-Hexane)的乳化反應

組別	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DNA-HCl	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45
Cytosine	0	21.08	0	0	0	0	21.08	0	0	0
Cytine	0	0	33.26	0	0	0	0	33.26	0	0
Formamide disulfide	0	0	0	30.88	0	0	0	0	30.88	0
4,4'-Dithiodiphenylsulfone	0	0	0	0	34.37	0	0	0	0	34.37
DOX	0	0	0	0	0	20	20	20	20	20

- (2)將上述內容物放入20 mL樣品瓶，加入1.5 mL純水到1-5組，加入3 mL純水到6-10組，並利用震盪器充分混合均勻 (3)分別取界面活性劑Tween-80和Span-80加到正己烷 (4)用磁石攪拌 (5)利用超音波粉碎機，在冰上進行乳化作用 (6)放在攪拌機上低溫(4°C)攪拌隔夜 (7)進行離心(7000 rpm，1 min) (8)移去離心管中上方液體，加入正己烷，充分混合洗去界面活性劑 (9)離心(7000 rpm，1 min)，洗去界面活性劑 (10)洗完後，指管底部有水膠沉澱，加入無菌純水，進行振盪 (11)將水膠懸浮液裝入透析袋，並用夾子固定 (12)在2 L純水中，進行5次透析，將未反應物移除，裝置如下圖：



- (13)將透析袋內藥物載體進行少量分裝如下圖：



- (14)進行粒徑大小、表面帶電度和穿透式電子顯微鏡的觀察。

### 實驗三、不同pH值下粒徑和帶電度的變化

- (1)先使用pH值標準液(4.01, 7.0, 10.0)進行酸鹼計的校正 (2)再使用0.1 M HCl或0.1 M NaOH進行pH值調整 (3)由pH值3往10的順序進行，在量測準確的pH值後，使用超音波震盪，進行粒徑分析後，再進行界面電位分析。

## 實驗四、測試空載體(沒有包化療藥)對正常細胞的毒性

(1)小鼠纖維母細胞(NIH3T3)和人類支氣管上皮細胞(BEAS-2B)。做為藥物載體細胞毒性的測試細胞 (2)將細胞鋪在96孔盤上( $8 \times 10^3$ 細胞/孔)，加入10%胎牛血清的細胞培養液、37°C、5% CO<sub>2</sub>隔夜培養 (3)以細胞培養液(含10%胎牛血清)配置各種濃度的藥物載體溶液。(4)將對照組奈米水膠進行濃度序列稀釋(2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL)，如下表：

藥物載體濃度 (mg/mL)	0.125	0.25	0.5	1	2
細胞和細胞培養液	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
藥物載體溶在細胞培養液	0.25 mg/mL 加入100 $\mu$ L	0.5 mg/mL 加入100 $\mu$ L	1 mg/mL 加入100 $\mu$ L	2 mg/mL 加入100 $\mu$ L	4 mg/mL 加入100 $\mu$ L

(5)加入細胞內，以細胞培養箱進行37°C、5% CO<sub>2</sub>，培養48小時 (6)用CCK-8將原液稀釋，溶在沒有胎牛血清的細胞培養液中 (7)移去細胞培養液混合液，加入CCK-8反應 (8)盤子離心(1500 rpm, 3分鐘)後，上清液取到新的96孔盤(9)利用酵素免疫分析儀進行波長450的吸光值偵測。

## 實驗五、藥物釋放曲線

(1)配置磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS) 1公升(pH7.4)：

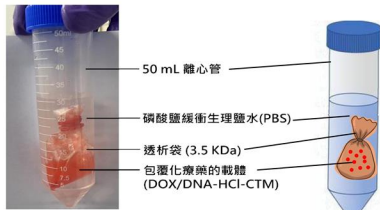
藥品	含量
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.27 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.42 g
NaCl	8 g
KCl	0.2 g

將左表藥品，先加800 mL的純水，利用0.1 N HCl將pH值調整為7.4，補水到1000 mL，並進行高溫滅菌後才使用。

(2)利用離心管，分別配置以下溶液，各三組，總共12組：

組別	pH6.5	pH7.4	pH6.5 (10 mM GSH)	pH7.4 (10 mM GSH)
添加物				
PBS	25 mL	25 mL	23.75 mL	23.75 mL
0.1 M HCl 校正	✓	x	✓	x
200 mM GSH	0	0	1.25 mL	1.25 mL
總體積	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL

(3)取三組載體置入透析袋內 (4)將上述透析袋置入離心管內，放到37°C水浴槽內反應，每隔2小時取透析袋外的液體，進行化療藥物(DOX)吸光值485 nm偵測，測完再放回離心管裡面，裝置如下圖：



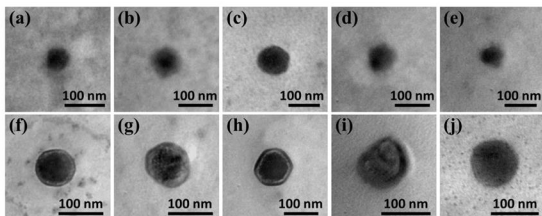
(5)製作標準曲線，可以利用吸光值來回推DOX的釋放濃度 (6)將每個時間點的DOX濃度經由吸光值換算後，做成累積的DOX釋放量與時間點的對照圖。

## 伍、研究結果

結果一、由表一和圖一結果得知，6種藥物載體是為球型兩個數據皆顯示有包覆化療藥物(4-6組)的粒徑會比沒包覆(1-3組)的較大，而且界面電位更負電，顯示包覆DOX會影響表面帶電度。

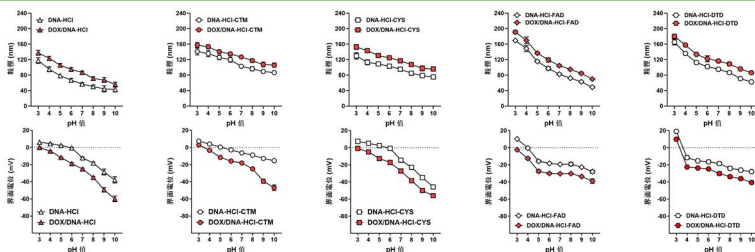
表一、藥物載體在粒徑大小與表面帶電度的分析

組別	平均粒徑 (nm)	界面電位 (mV)
1. DNA-HCl	55.89 ± 1.48	-15.2 ± 0.64
2. DNA-HCl-CTM	102.8 ± 2.36	-6.17 ± 0.67
3. DNA-HCl-CYS	97.89 ± 1.21	-14.1 ± 0.72
4. DNA-HCl-FAD	84.8 ± 3.21	-18.23 ± 0.54
5. DNA-HCl-DTD	95.8 ± 2.34	-18.1 ± 0.17
6. DOX/DNA-HCl	85.75 ± 0.87	-29.7 ± 3.42
7. DOX/DNA-HCl-CTM	108.0 ± 0.92	-18.0 ± 1.14
8. DOX/DNA-HCl-CYS	111.8 ± 0.71	-27.2 ± 2.39
9. DOX/DNA-HCl-FAD	105.1 ± 2.53	-30.4 ± 1.24
10. DOX/DNA-HCl-DTD	115.7 ± 3.17	-29.1 ± 2.47



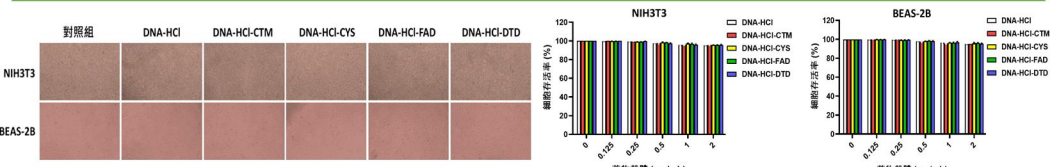
圖一、穿透式電子顯微鏡觀察藥物載體：(a) DNA-HCl, (b) DNA-HCl-CTM, (c) DNA-HCl-CYS, (d) DNA-HCl-FAD, (e) DNA-HCl-DTD (f) DOX/DNA-HCl, (g) DOX/DNA-HCl-CTM, (h) DOX/DNA-HCl-CYS, (i) DOX/DNA-HCl-FAD (j) DOX/DNA-HCl-DTD.

結果二、有包DOX會比沒包的粒徑較大，而且隨著pH值變大，粒徑有變小的趨勢。在界面電位的分析，有包DOX會比沒包的帶電度更負，隨著pH值變大，界面電位有更負電的趨勢。



圖二、藥物載體在pH值3到10的粒徑和界面電位變化

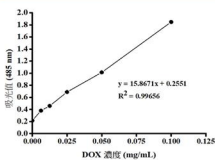
結果三：五種藥物載體本身皆沒有造成兩株正常細胞株死亡，存活率可達95%以上，而且與不做任何處理的組別相比，細胞外觀沒有明顯差異。



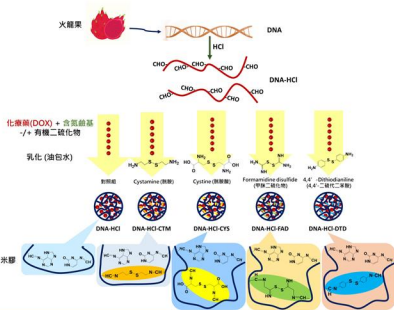
圖三、空的藥物載體(2 mg/mL)對兩種正常細胞的型態影響

圖四、空藥物載體對正常細胞的毒性分析

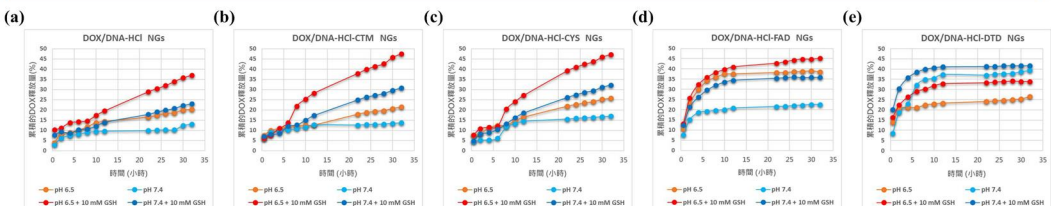
## 結果四: 特定的DOX濃度有特定的吸光值, 利用吸光值來回推DOX的釋放濃度並製作標準曲線。



圖五、DOX濃度與吸光值的標準曲線圖



## 結果五: 將每個時間點釋放的DOX濃度經由吸光值換算後, 做成累積的DOX釋放量與時間點的相對圖, 含有雙硫鍵的藥物載體, 在相同時間點, 可以釋放較多的DOX。



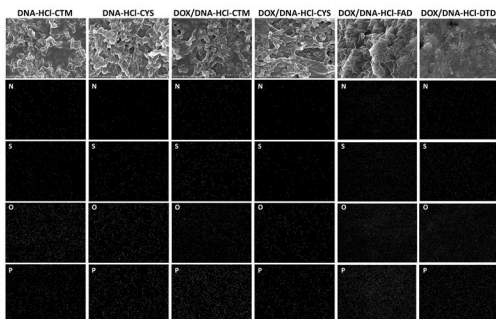
圖六、藥物載體在不同pH值環境與時間點所釋放的累積DOX濃度

## 陸、討論

- 由實驗二得知, 而數據皆顯示在包覆化療藥物後(6-10 組)的粒徑會比沒包覆(1-5 組)的大, 且界面電位也更負, 顯示包覆DOX 會影響表面帶電度。
- 由實驗三得知, 相同藥物載體有包覆 DOX 的粒徑較無包覆的大, 而隨著 pH 值增加, 粒徑有變小的趨勢, 在界面電位的方面, 包覆DOX比沒包的帶電度更負, 隨著 pH值增大, 界面電位有更負的趨勢。
- 由實驗四得知, 在空的藥物載體濃度 2 mg/mL 以下, 因其對一般人體細胞毒性較低, 存活率可達 95%以上, 而在細胞外觀上較沒有明顯差異。
- 由實驗五得知, 在6-9組藥物載體, 有穀胱甘肽 (GSH)的條件下, pH 值 6.5 比 7.4 均更能促進藥物載體釋放 DOX。同樣pH值(6.5 或 7.4)下, 含有 GSH 的的溶液, 也讓藥物載體更加容易釋放化療藥。且我們發現pH 值 6.5 含 10 mM GSH 的環境下, 藥物載體釋放 DOX 的效率是最佳的。而在第10組藥物載體, 此現象則是相反, pH 值7.4比6.5更易釋放藥物, 推測與交聯劑(4,4'-Dithiodianiline)上的苯環作用具相關性, 而有含GSH仍是促進藥物釋放。
- 與過去發表的藥物載體相比, 我們使用二硫化物取代交聯劑, 達到生物材料被交聯的效果。傳統交聯劑, 戊二醛

(Glutaraldehyde)有毒性太高的問題; 京尼平(Genipin)有價格稍高的問題; 檸檬酸(Citric acid)有需要超過70°C高溫才能反應的問題, 會影響到包覆物的活性。四種二硫化物沒有上述的三類問題。

6. 在包覆完成後, 為確認兩種二硫化物是否有在藥物載體上, 我們利用掃描式電子顯微鏡的元素分析功能, 來確認硫(S)元素的存在, 下圖為元素分析結果, 由圖可知, 四種二硫化物皆有交聯在核酸材料上。



圖七、掃描式電子顯微鏡的元素(氮、硫、氧、磷)分析

## 柒、結論

在本實驗中, 我們抽取火龍果核酸並利用鹽酸進行改造, 使其露出醛基, 來做為天然藥物載體的材料, 簡寫為DNA-HCl。根據希夫反應的原理, 利用二硫化物胱胺(Cystamine)、胱氨酸(Cystine)、甲脒二硫化物(Formamidine disulfide)或4,4'-二硫代二苯胺(4,4'-Dithiodianiline)上的一級胺, 和核酸醛基進行交聯反應, 並搭配油包水(Hexane)的乳化反應, 得到五種藥物載體: 對照組DNA-HCl、二硫化物組DNA-HCl-CTM、DNA-HCl-CYS、DNA-HCl-FAD和DNA-HCl-DTD, 它們皆帶負電, 是粒徑55.89~115.7 nm的球狀構造。隨著pH值3往10變化, 載體粒徑有變小和帶電度變負的趨勢。五種載體與兩種正常細胞株共同培養後, 在濃度高達2 mg/mL時, 還保留大於95%的細胞存活率。在藥物釋放的結果中, 模擬癌症微環境(pH6.5, 10 mM GSH)的溶液中, 因為二硫化物組DNA-HCl-CTM和DNA-HCl-CYS具有雙硫鍵, 可以被GSH催化而斷鍵, 與DNA-HCl組相比, 釋放更多的化療藥物(DOX)。因此, 本研究可提供化療藥物載體一個新的天然無毒材料參考。

## 捌、參考資料

- [1] L.G.W. Jr, Organic Chemistry, 8th ed., Pearson2012.
- [2] R.G. Kallen, The mechanism of reactions involving Schiff base intermediates. Thiazolidine formation from L-cysteine and formaldehyde, J Am Chem Soc 93(23) (1971) 6236-48.
- [3] Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba, Acidic extracellular microenvironment and cancer, Cancer Cell Int 13(1) (2013) 89.
- [4] Y.F. Chen, C.H. Chang, C.Y. Lin, L.F. Lin, M.L. Yeh, J.S. Jan, Disulfide-cross-linked PEG-block-polypeptide nanoparticles with high drug loading content as glutathione-triggered anticancer drug nanocarriers, Colloids Surf B Biointerfaces 165 (2018) 172-181.
- [5] Y.F. Chen, M.W. Hsu, Y.C. Su, H.M. Chang, C.H. Chang, J.S. Jan, Naturally derived DNA nanogels as pH- and glutathione-triggered anticancer drug carriers, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 114 (2020) 111025.