

中華民國第 65 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

第三名

052018

豬蛔蟲成蟲體蛋白促使肺癌細胞凋亡之機轉初探

學校名稱：靜心學校財團法人臺北市私立靜心高級中等學校

作者： 高二 朱芷瑩 高二 陳宥晴 高二 曾子杰	指導老師： 黃碧瑩 王詩瑩
---	-----------------------------

關鍵詞： 肺癌、凋亡、豬蛔蟲成蟲體蛋白

摘要

癌症長期對人類健康構成重大威脅，尤其癌細胞對傳統化療產生抗藥性，尋找新治療方法成當務之急。近年許多研究發現寄生蟲的分泌-排泄蛋白具抑制癌細胞生長的潛力。如犬蛔蟲的分泌-排泄抗原已被證實能抑制纖維肉瘤、肝癌及大腸癌細胞增生，但其作用機制仍未明確。

本研究利用與犬蛔蟲相近的人畜共通線蟲——豬蛔蟲成蟲體蛋白進行肺癌細胞共培實驗。結果顯示 AsSP 可顯著抑制肺癌細胞增生與惡性特性。透過快速蛋白質液相層析系統對 AsSP 粗蛋白做分離純化，並經由 Q-TOF-MS 技術分析其成分，成功篩選出 10 種具有抗癌潛力的豬蛔蟲胜肽。未來研究將利用 *E. coli* BL21 表達系統，進一步開發與驗證這些抗癌胜肽的功效與應用潛力。

壹、前言

一、研究動機

近年來，癌症仍是我國十大死因之首，而肺癌更是其中最具致死性的癌症之一，尤其晚期患者的治療選擇有限，預後較差。因此，尋找新的治療策略成為當前癌症研究的重要課題。近年研究發現，某些寄生蟲蛋白具有免疫調節作用，甚至可能對癌細胞的生長產生抑制作用。然而，寄生蟲感染是一類常被忽視的疾病，其對人體健康的影響往往被低估。豬蛔蟲（*Ascaris suum*）作為一種人畜共通的寄生蟲，主要感染宿主為豬，並可能透過環境或食物污染影響人類健康。過去的研究發現，豬蛔蟲感染可能影響宿主免疫系統的調節。然而，關於豬蛔蟲感染或其蟲體蛋白與癌症之間的交互作用，目前仍然缺乏深入研究。

本研究的動機即在於探討豬蛔蟲成蟲體蛋白（*A. suum* Somatic Protein, AsSP）對肺癌細胞的影響機制，並分析其是否具備潛在的抗癌活性。本計畫將研究豬蛔蟲成蟲體蛋白是否可影響肺癌細胞的增殖、轉移及侵襲能力，並探討其可能涉及的訊息傳遞途徑（Signaling transduction pathway），例如是否透過調節免疫微環境、影響細胞凋亡機制或抑制腫瘤血管新生來達成抗癌效果。透過此研究初探寄生蟲蛋白與癌症的關聯性，本計畫進一步希望能夠揭示寄生蟲蛋白在癌症治療上的潛力，為未來開發新型肺癌治療策略提供新的方向，並提高社會對寄生蟲感染與癌症相互作用的認識，進一步維護國民健康。

二、文獻回顧

（一）肺癌之簡介：

世界衛生組織（WHO）數據顯示，肺癌是全球癌症死亡人數排名第一；而根據衛生福利部 110 年癌症登記報告中，我國肺癌發生率從 109 年第二名上升至第一名，共 16,880 新增個案，可見肺癌在全世界仍至於我國的重要性（Centers for Disease Control, R.O.C. (Taiwan)）。

肺癌有主要分成兩種類型：小細胞肺癌（Small cell lung cancer, SCLC）和非小細胞

肺癌（Non-small cell lung cancer, NSCLC），而非小細胞肺癌主要為肺腺癌（Adenocarcinoma）和肺鱗狀上皮癌（Squamous cell carcinoma），前者好發於非吸煙者、年輕人及女性，由正常之肺泡腺體上皮細胞（Alveoli glandular cell）癌化；後者常見於吸煙者之肺癌病變，通常由肺部中央之支氣管鱗狀上皮（Bronchi squamous cell）癌化（Miriam Sánchez-Ortega et al., 1879）。肺癌臨床表現如侵襲性和治療選擇取決於診斷的腫瘤類型。由於許多類型的肺癌生長迅速、擴散迅速，早期發現和及時治療至關重要[3]。而肺癌的成因與多種因素有關，最高的風險因子為吸煙，其次為環境空氣、職業工種之環境暴露、慢性肺病和生活方式等因素，都會增加罹患肺癌風險（Brett C Bade et al., 2020）。

（二）肺癌之治療與臨床困境：

目前肺癌主要的治療方式包括手術、放射治療、化學治療、標靶治療及免疫治療。臨床中常用的化療藥物如 Cisplatin 和 Paclitaxel；或以標靶治療（Targeted Therapy）針對不同的基因突變進行治療，如 EGFR 突變之 Osimertinib；而免疫治療（Immunotherapy）常合併化療使用的病人，如 Pembrolizumab（NCCN, 2024）。然而，病人很常會對化療藥物產生抗藥性，如 EGFR 突變病患使用一代 Tyrosine kinase inhibitor 後，在 9-12 個月內產生 T790M 突變，並產生抗藥性（Roy S Herbst, Et al., 2018）；或部分病對 PD-1/PD-L1 抑制劑初期有效，但後續產生腫瘤逃脫機制（Immune escape）（Martin Reck et al., 2016），對於肺癌病人的治療方式與成效一直都是一個棘手的問題。

（三）新型抗癌肽與臨床應用：

抗癌肽（Anti-cancer peptides, ACPs）是由 10-60 個胺基酸所組成的一系列短肽，可以抑制腫瘤細胞的增殖或遷移，或抑制腫瘤血管的形成，不易引起抗藥性。ACP 可用於治療癌症，對於多種標靶蛋白有效，並且對癌細胞具有高選擇性和特異性（Mingfeng Xie et al., 2020）。ACP 具有多元的抗癌作用與方式，如活化自然殺

手細胞 (Natural killer cell) 或其他免疫細胞，對癌細胞進行毒殺；抑制癌細胞的血管新生 (Angiogenesis)，降低癌細胞的惡性侵襲；ACPs 亦可以藉由本身帶有的正電荷直接裂解癌細胞的細胞膜、破壞癌細胞 DNA、引起凋亡 (Apoptosis) 和活化或抑制特定蛋白來影響癌細胞生長 (Raj Kumar Chinnadurai et al., 2023)。

目前越來越多研究團隊在開發 ACPs，在不同癌症中都有研究。在肺癌方面，ACP19M 能夠引起 A549 肺癌細胞凋亡及抑制血管新生能力 (Min Kyoung Shin et al., 2022)；Azurin 透過活化 p53 抑癌蛋白與抑制細胞週期 G2/M 期，有效的殺滅胃癌、胰臟癌與肝癌細胞 (Nawal E Al-Hazmi et al., 2021)。

(四) 豬蛔蟲 (*Ascaris suum*) 生活史：

豬蛔蟲與人蛔蟲 (*Ascaris lumbricoides*) 在形態及生活史上極為相似 (劉光庭等，2020)，豬蛔蟲在臨床上可能會交叉感染人類 (Mitsuaki Nishioka et al., 2024)。而豬蛔蟲之成蟲寄生於豬的小腸中，產卵後透過糞便排出環境。在溫暖潮濕的環境的條件下，卵在 2 至 4 週內發育成具有感染力的 L3 幼蟲。感染豬蛔蟲後，幼蟲會在組織遷移，穿透腸壁，進入肝門靜脈，並移行至肝臟；或透過血液循環進入肺部，在肺泡發育約 10-14 天後再經吞嚥回到腸道 (Centers for Disease Control, USA)。

(五) 豬蛔蟲之臨床症狀：

感染豬蛔蟲主要以肝臟和肺臟作為主要的臨床症狀。

1. 肝臟損傷 (Liver Lesions)：幼蟲經肝門靜脈移行時，會引起肝臟之發炎反應，造成嗜酸性球 (Eosinophil) 在肝臟浸潤，並形成典型的白色斑點 (Martha Betson et al., 2014)。
2. 肺部症狀 (Pulmonary Symptoms, Löeffler's Syndrome) 幼蟲進入肺部後，可引起出血性肺炎和嗜酸性球增多症 (Hypereosinophilia)，臨床症狀包括咳嗽、呼吸困難和肺部浸潤。如日本就有兩例關於豬蛔蟲幼蟲移行到肺部的臨床報導，都以嗜酸球性肺炎 (Eosinophilic pneumonia) 來表現，可見豬蛔蟲亦有感染人類

之風險，並會在組織中寄生（Koichi Izumikawa et al., 2011. S Katoh al., 2004）。

（六）寄生蟲與癌症之關係：

1. 促進癌症：寄生蟲於宿主內，會改變宿主免疫反應和訊號傳遞。目前有研究指出幾種寄生蟲感染後會增加罹患癌症的風險（Figen Çelik et al., 2022）。如埃及血吸蟲（*Schistosoma haematobium*）感染會造成膀胱發炎、抗原引起細胞氧化壓力，並增加膀胱癌的發生率（Hoang van Tong et al., 2017）；中華肝吸蟲（*Clonorchis sinensis*）盛行率高的國家如越南、中國，都有研究指出會誘發膽管發炎及過度增生，並與膽管癌有高度風險（Peter L Labib et al., 2019）；枯西氏錐蟲（*Trypanosoma cruzi*）會使 TP53 基因缺失，增加胃食道癌的惡性（Fernanda da Silva Manoel-Caetano et al., 2004）。
2. 抑制癌症：寄生蟲和癌症有一些共同的抗原，在細胞實驗、動物模式等許多科學證據表明，寄生蟲具有顯著的抗癌作用（Morteza Yousefi et al., 2023）。如有研究發現犬蛔蟲（*Toxocara canis*）幼蟲分泌的化合物具有抑制纖維肉瘤生長的作用（Hossein Yousofi Darani et al., 2009）；弓形蟲（*Toxoplasma gondii*）蟲體蛋白能降低黑色素瘤的 T cell 和 NK cell 生長（Yu-Meng Jiao et al., 2011）；*Hydatid cyst fluid* 能誘導乳癌細胞進行凋亡反應（Shima Daneshpour et al., 2019），可見不同寄生蟲具有抗癌的發展潛力。然後，目前尚未有關於豬蛔蟲與肺癌之間的研究。雖然有臨床報導豬蛔蟲侵犯於人類的肺部，但對於人類的影響仍有待被研究。

（七）Ras 蛋白促癌機制與癌細胞受抑制與凋亡訊號：

1. Ras 促癌路徑：

Ras 是一種小型 GTP 結合蛋白（small GTPase），在細胞信號傳導中扮演重要的角色，主要參與細胞增殖、分化、存活和遷移。因為能觸發可驅動 MAPK、PI3K/AKT、RalGEF 等通路（Philip East et al., 2022），使其成為重要的致癌驅

動因子 (oncogenic driver)；因此 Ras 在癌症相關研究中，可作為重要的癌症活性與生存的重要指標。

2. Caspase 凋亡蛋白訊號：

Caspase-3 的功能異常與多種癌症的發展相關。許多癌細胞會透過過度表達抗凋亡蛋白或抑制 Caspase-3 活性來逃避免疫系統監控，導致細胞不受控制地增殖。此外，一些腫瘤如肺癌、肝癌與乳癌中觀察到 Caspase-3 表現下降，顯示其可能為癌症抑制的重要標誌 (Vousden & Prives, 2009)。在癌症治療方面，促進 Caspase-3 活性已成為開發新型抗癌藥物的重要策略。例如，特定的小分子藥物或抗癌肽可直接活化 Caspase-3，誘導癌細胞凋亡，達到抗癌效果 (Levine et al., 1991)。

3. p53 腫瘤抑制訊號：

p53 是一種轉錄因子負責監控細胞內的 DNA 損傷、調控細胞週期並啟動細胞凋亡 (apoptosis)；因此，p53 被稱為「基因組守護者」(Guardian of the Genome)，可防止細胞發生癌變。而 p53 的抑癌方式主要為以下途徑：p53 誘導 p21 表達，進而抑制細胞週期蛋白 CDK2，使細胞週期停滯於 G1/S 期，防止受損 DNA 被複製 (Levine et al., 1991)；誘導 BAX、PUMA 表達，促進細胞凋亡，並抑制 BCL-2 抗凋亡蛋白，確保 DNA 受損的細胞被清除 (Vousden & Prives, 2009)，此機制防止受損 DNA 被複製，提供修復時間，若 DNA 損傷過於嚴重，則進一步誘導細胞凋亡。

貳、 研究設備與器材

一、細胞培養室 (Culture room)：

細胞培養室用於培養與維持各類哺乳動物細胞、細菌或其他微生物，為生物醫學研究提供基礎平台。細胞室需具備層流無塵設備，以維持無菌環境，並配備 CO₂ 培養箱 (CO₂ incubator)、倒置顯微鏡 (Inverted microscope) 及離心機等儀器，以確保細胞培養的穩定性。細胞培養室在癌症研究、藥物篩選、基因表達研究及生物技術開發等領域中扮演

關鍵角色，是生命科學研究的重要基礎設施（R. Ian Freshney et al., 2015）。

二、快速蛋白質液相層析系統（Fast Protein Liquid Chromatography，FPLC）：

FPLC 是一台專為分離與純化蛋白質、胜肽及其他生物大分子而設計的層析技術機器。與高效液相層析（HPLC）相比，FPLC 主要適用於水溶性蛋白質，並能在較溫和的條件下操作，以維持蛋白質的生物活性。FPLC 能夠依據蛋白質的分子量、電荷或親和特性進行分離。FPLC 廣泛應用於生物製藥、結構生物學及蛋白質功能研究中，能夠高效且精確地獲取高純度的目標蛋白，為生物醫學研究提供強大的技術支援（Robert K. Scopes et al., 1994）。

參、 研究過程與方法

一、細胞培養（Cell culture）：

本實驗所用細胞株為肺腺癌細胞 A549（BCRC 60074），購自新竹食品工業發展研究所菌種保存及開發中心；A549 培養於 RPMI 1640 培養基。培養基含有 10%胎牛血清、50 µg/mL 鏈黴素（Streptomycin, Sigma, St. Louis, MO, USA）、50 IU/mL 青黴素（Penicillin G, Sigma）。細胞培養於 37°C、5% CO₂、95%大氣培養箱。每兩天更換一次培養基，每四天一次繼代培養。

二、豬蛔蟲成蟲（*A. suum*）採集與蟲體蛋白萃取：

於臺北市吳興商圈豬肉販採購豬大腸，解剖腸道後觀察腔道內是否有豬蛔蟲（*A. suum*）。隨後收集豬蛔蟲成蟲，以 PBS（Phosphate buffered saline, 0.2M, pH7.4）清洗 3 次後，放置於 PBS 中於-80°C 中保存。

取得數條豬蛔蟲浸泡於液態氮後，使用研鉢把蟲體進行初步均質化，再加入適量的 PBS。把含有蟲體蛋白之 PBS 以超音波破碎機（Qsonica sonicator, Newtown, USA）均質化後，以 3500g, 4°C 離心 10 分鐘後，取其上清液並以針筒過濾器（0.22 µm）過濾。利用 BCA Protein Assay Reagent Kit 進行蛋白濃度測量後，完成豬蛔蟲蟲體蛋白（*Ascaris suum*

Somatic Protein, AsSP) 製備。

三、細胞增殖測試 (MTT Assay) :

MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]在活細胞中為粒線體之丁二酸鹽脫氫酶 (Succinate dehydrogenase) 所分解，生成藍紫色結晶產物。將此結晶溶於 DMSO 溶液之後，透過測量吸光值判讀細胞存活之狀況。把 5×10^3 顆細胞懸浮於 100 μ L 的培養液中，種至 96 孔細胞培養盤，其中需保留未種任何細胞但同時依步驟操作的背景值控制組。經過 24 小時培養後，移除培養液，並加入以無 FBS 之培養液稀釋之不同濃度 AsSP (125, 250, 500, 1000 μ g/mL) 或無濃度之培養液 (對照組) 進行培養。經 24、48 小時後以 100 μ L PBS 清洗 2 次，以將 AsSP 除去。再將 50 μ L 0.1 mg/mL MTT 加入 96 孔細胞培養盤中，於 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培養箱中靜置 3 小時。隨後以 PBS 清洗 2 次將 MTT 除去，加入 50 μ L DMSO 作用 3 分鐘將藍紫色結晶物溶解，然後以 ELISA 讀值機，設定 OD_{630 nm} 為參考波長進行偵測吸光值。每組實驗皆重複三次。

四、西方墨點法 (Western blot) :

A549 以 AsSP (125, 250, 500, 1000 μ g/mL) 加入培養 24 小時後，去除培養基並以 PBS 清洗。把細胞置於 RIPA 緩衝液中進行裂解 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, and 1% sodium deoxycholate)，並於 RIPA 緩衝液中加入 Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)。蛋白質之濃度以 BCA Protein Assay Kit (T-Pro biotechnology, Taipei, Taiwan) 測量。蛋白質透過 SDS-PAGE 分離後，轉移至 PVDF 膜上 (Millipore, Billerica, MA, USA)，並以 Block PRO blocking buffer (Visual Protein Biotechnology Corporation, Taipei, Taiwan) 進行阻斷。PVDF 膜加入一抗 (p53、Ras、Caspase 3、GAPDH, beta-tubulin, Cell Signal Technology, Danvers, MA, USA) 於 4 $^{\circ}$ C 靜置過夜後，加入 HRP 共軛之二抗 Anti-mouse IgG (Abcam, Cambridge, MA, USA) 並於室溫靜置 2 小時。蛋白質之含量利用圖像攝影分析機進行記錄。

五、惡性腫瘤細胞群集生長 (Colony formation assay) :

於直徑 6 公分的培養盤中種入 500 顆肺癌細胞，並加入不同濃度之 AsSP (125、250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$)、無濃度之培養液 (對照組) 進行培養。每三天更換三分之二的細胞培養液，持續此動作培養兩週後，以 PBS 緩緩清洗兩次。再用 95% 酒精固定 10 分鐘後，加入 3% Giemsa 染劑至少三十分鐘再用清水脫色。可將細胞群落染成明顯的藍紫色，有利於在顯微鏡下觀察計算，計算細胞群落時該群落的總細胞數需大於 50 顆才算一個細胞群落，比較各實驗組之促進癌細胞群集生長能力。

六、惡性腫瘤細胞移行測試 (Migration assay) :

A549 肺癌細胞以 6×10^4 種於 μ -Dish 35 mm (Cat. No. 80206, ibidi GmbH, Germany) 的 Culture-Insert 2 Well 中，每孔加入 70 μL 培養基。經過 24 小時培養後，移除 Culture-Insert 以建立間隙，並加入 1 mL 培養基以確保培養盤完全被培養基覆蓋。分別加入 0.5 和 1 mg/mL 之 AsSP 並繼續培養 36 小時。在 0、12、24、36 小時的時間點，使用倒置顯微鏡 (DMI4 000, Leica, Germany) 拍攝間隙區域。移行的面積由 Image J 軟體 (National Institute of Health, Bethesda, USA) 進行分析，細胞移行率 (%) 計算公式為：

$$(100 - \text{面積}_{t=t(12, 24, 36)} / \text{面積}_{t=0}) \times 100。$$

七、豬蛔蟲粗萃取之蛋白分離 (Protein fractionation) 與質譜分析 (Mass spectrometry) :

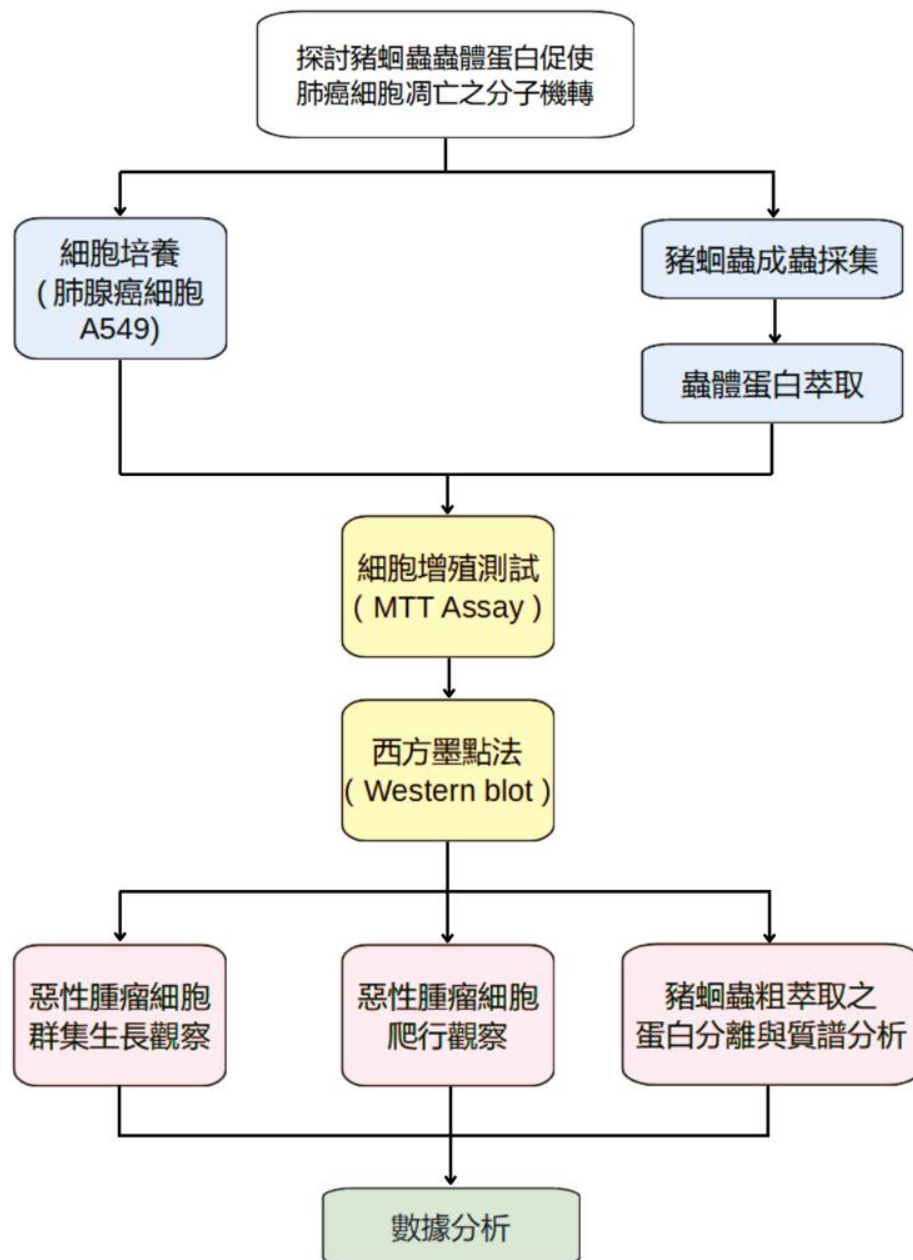
FPLC (Fast-Performance Liquid Chromatography) : 把 0.5 mL AsSP 注射至 SuperdexTM-75 (S-75 管柱) GL 管柱 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 後，使用 AKTA 色譜系統 (Chromatography system) 純化。隨後以 0.5 mL/min 之流速，共吸取 28 mL 20 mM pH7.5 Tris-HCl, 150 mM NaCl 之緩衝溶液至 S75 管柱，使 AsSP 蛋白以分子量大小進行分離。每一管收集 1 mL 之分離蛋白，共收集 28 管分離 (Fraction)。前述每一管 Fraction 以 15% SDS-PAGE 進行蛋白質定性分析，測出各管 Fraction 之蛋白質分子量大小及分佈。

Q-TOF (Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry): 上述分離管樣本 (Fractionated AsSP sample) 於 25 mM Ammonium Bicarbonate (ABC) 中加入 2mM Dithiothreitol (DTE) 8M urea 加熱至 37°C 50 分鐘後使其變成還原態 (Reduction), 再加入 20 mM Iodoacetamide (IAM) 於黑暗室溫中反應 50 分鐘, 使其烷基化 (Alkylated)。接著以 25 mM ABC 溶液以 6 倍稀釋並在 37°C 加入 trypsin/Lys-C mix 分解 16 小時 (Promega, Madison, USA)。使用 Millipore Zip Tip micro-C18 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 和對分解物進行脫鹽, 最後使用 Water SYNAPT G2 quadrupole Time-Of-Flight mass spectrometry Q-TOF prime 系統分析所有蛋白質序列。這些序列具有很高潛力發展成抗癌肽 (Anti-cancer peptides)。

八、數據分析 (Statistical analysis):

所有數據以 GraphPad Prism 8 軟件繪製, 數據取 Mean \pm Standard error of mean (SEM); 對於所有數據組別, 使用單因子變異數分析 (One-way Analysis of Variance (ANOVA)); Student's unpaired *t*-test 用於兩組間之比較。在 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 時視為具有統計學上之顯著性差異。

九、實驗流程架構圖



(圖一) 實驗架構圖 (資料來源：研究者自行繪製)

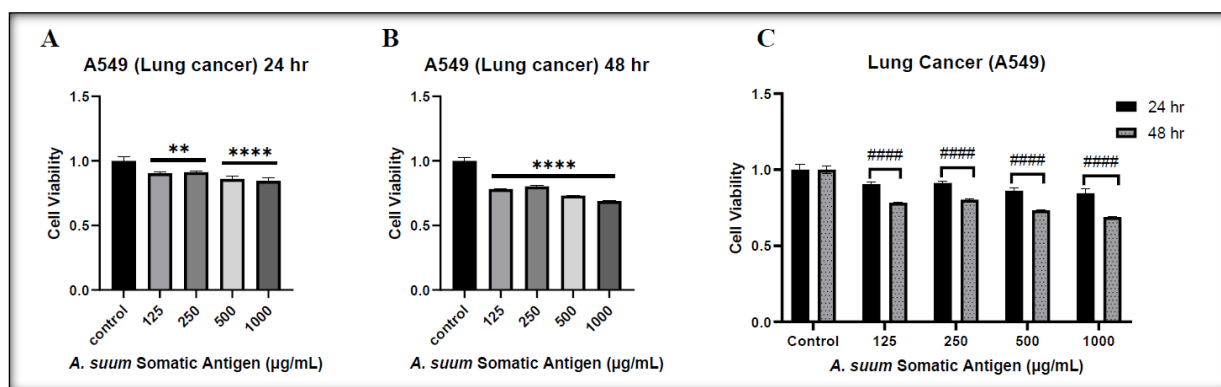
肆、 研究結果

一、豬蛔蟲成蟲體蛋白能有效抑制肺癌細胞活性：

肺癌細胞 A549 在 125-1000 $\mu\text{g/mL}$ 濃度之 AsSP 作用 24 小時後，隨著濃度的增加，癌細胞活性有明顯下降的趨勢 (圖 2-A)。與對照組 (0 $\mu\text{g/mL}$) 相比，在濃度為 125 $\mu\text{g/mL}$ 時癌細胞之存活率為 90.5%，並有統計學上的差異 ($p < 0.01$)；而當濃度提高至 500 及 1000

μg/mL 時，癌細胞之存活率分別為 86.1 及 84.5% ($p < 0.001$)。A549 在給予 AsSP 作用 48 小時後，有更顯著的抑制癌細胞活性的效果（圖 2-B）。在 AsSP 最高濃度 1000 μg/mL 時，癌細胞之存活率為 68.8%，與對照組相比，有統計學上的差異 ($p < 0.001$)。在 24 小時及 48 小時治療組別中，說明了 AsSP 有效的抑制肺癌細胞的活化，且呈現劑量依存性（Dose-dependent）效果。

接著比對相同濃度下，24 小時與 48 小時之細胞存活率可以發現，隨著時間的增加，AsSP 能顯著的抑制肺癌細胞的活性（圖 2-C）。無論在任何濃度（125-1000 μg/mL），作用 48 小時之肺癌細胞活性皆低於 24 小時，並在 AsSP 濃度為 1000 μg/mL 時達到最大之差異（84.5% 比 68.8%， $p < 0.001$ ），並呈現時間依存性（Time-dependent）效果。



（圖二）*Ascaris suum* 體蛋白（AsSP）對肺癌細胞株 A549 的影響。

A549 細胞培養於 RPMI-1640 培養基中，並分別接受 AsSP 處理 24 小時與 48 小時（圖 2A，2B）。數據為 4-6 次獨立實驗的平均值 \pm SEM，每次實驗包含 3 個重複組。統計分析採用單因子變異數分析（one-way ANOVA）及雙因子變異數分析（two-way ANOVA）進行多重比較。**, $p < 0.01$ ；****, $p < 0.0001$ ，相較於對照組（0 μg/mL）。####, $p < 0.0001$ ，48 小時與 24 小時相比（圖 2C）

A、以不同濃度治療肺癌細胞 24 小時

B、以不同濃度治療肺癌細胞 48 小時

C、以不同濃度治療肺癌細胞之 24 小時與 48 小時對照

（資料來源：研究者自行繪製）

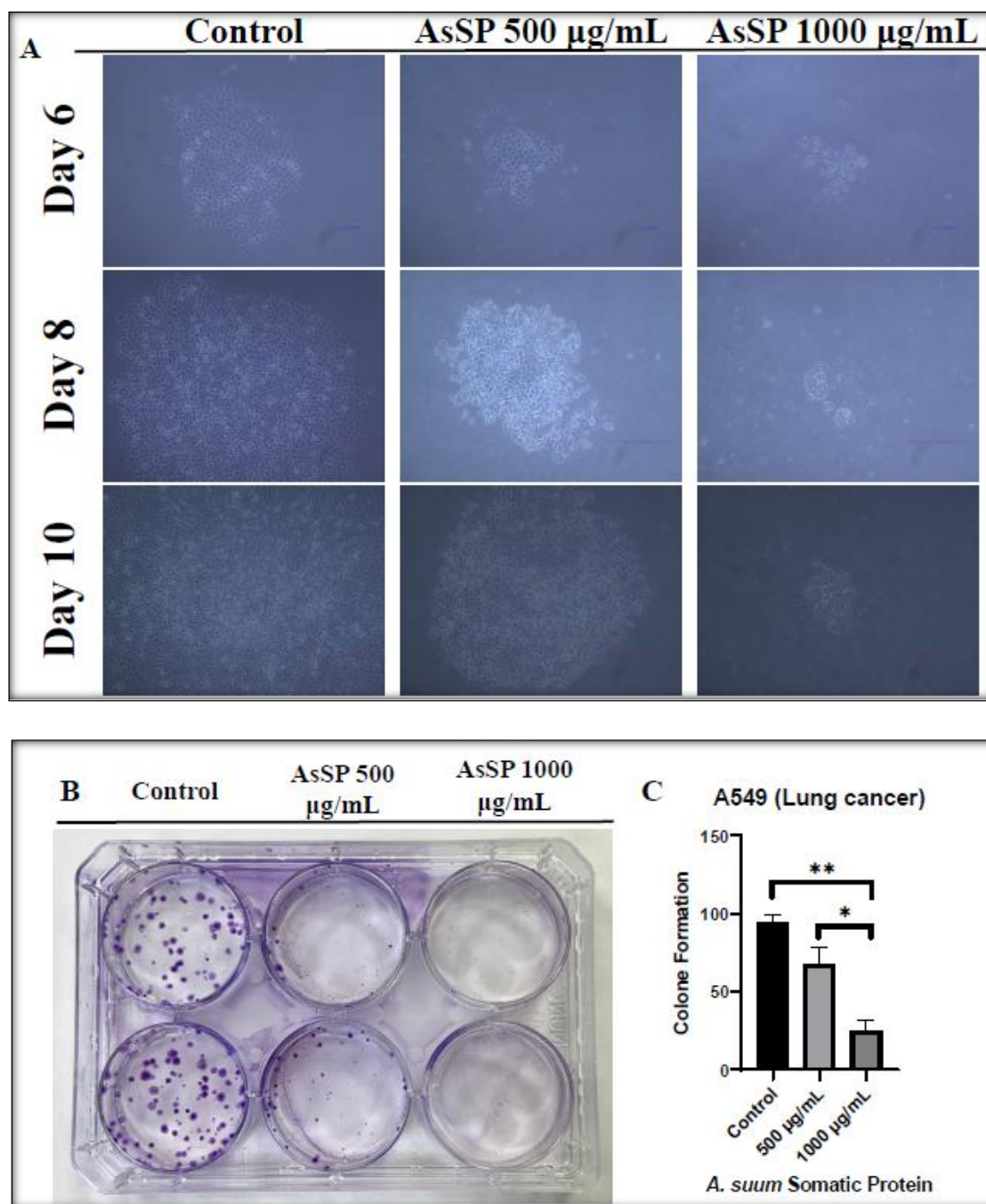
二、豬蛔蟲成蟲體蛋白降低肺癌細胞群集生長能力

經過 MTT 實驗後，雖最高濃度 1000 μg/mL（1 mg/mL）及第二高濃度 500 μg/mL（0.5 mg/mL）有顯著抑制肺癌細胞的活性，但並未達到半抑制濃度（Half maximal inhibitory

concentration, IC50)，因此接下來的實驗都以此兩個濃度進行。

癌細胞群集生長（Colony formation）廣泛用於評估腫瘤轉化與惡性程度，肺癌細胞在給予不同條件生長 10 天後，在細胞形態、群落大小、群落形態都有明顯的差異（圖 3-A）。在 40 倍顯微鏡視野下觀察，第 6 天培養的結果中，對照組之肺癌細胞及形態完整，有明顯的群聚現象；相較之下，在給予 500 $\mu\text{g/mL}$ 之 AsSP 作用後，肺癌細胞之群落大小有明顯的變小，但肺癌細胞之形態依然完整；當濃度提高至 1 mg/mL 時，肺癌細胞之形態（Morphology）有顯著改變，癌細胞萎縮、細胞膜不明顯、細胞核呈現混濁，且肺癌細胞無法形成緊密的群落，可見 AsSP 在第 6 天開始有效抑制肺癌細胞的群集生長。當實驗結果到第 10 天時，對照組之癌細胞群集生長明顯，且細胞有疊起生長的現象、群落範圍大。與對照組相比，500 $\mu\text{g/mL}$ 之 AsSP 作用組雖然能抑制肺癌細胞的群落生長，但癌細胞還是能夠順利的進行群聚生長。但當給予 1000 $\mu\text{g/mL}$ 之 AsSP 時，肺癌細胞無法有效形成群落、癌細胞之形態萎縮改變。

本實驗於第 10 天為終點（Endpoint）後，利用 Giemsa 對癌細胞群落進行染色，使群落數得以巨觀觀察與分析（圖 3-B）。巨觀下，對照組、500 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 培養 10 天後之肺癌細胞群落數分別為 94、67 和 25 顆（圖 3-C）。500 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 與對照組沒有統計學上的差異，但 1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 與 500 $\mu\text{g/mL}$ AsSP ($p<0.05$) 與對照組 ($p<0.01$) 在肺癌細胞群落數上皆有顯著的差異，可見 AsSP 能有效的抑制肺癌細胞的惡性群聚生長。



(圖三) *Ascaris suum* 體蛋白降低了肺癌細胞 A549 的集落形成能力。
 (A) 顯微鏡觀察 A549 細胞在 AsSP 處理第 6、8 和 10 天的形態變化。
 (B) 使用 A549 細胞進行集落形成實驗，並以姬姆薩 (Giemsa) 染色。
 (C) 統計分析採用單因子變異數分析 (one-way ANOVA)。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

A、肺癌細胞在給予不同條件生長圖片

B、癌細胞群落染色以巨觀觀察分析

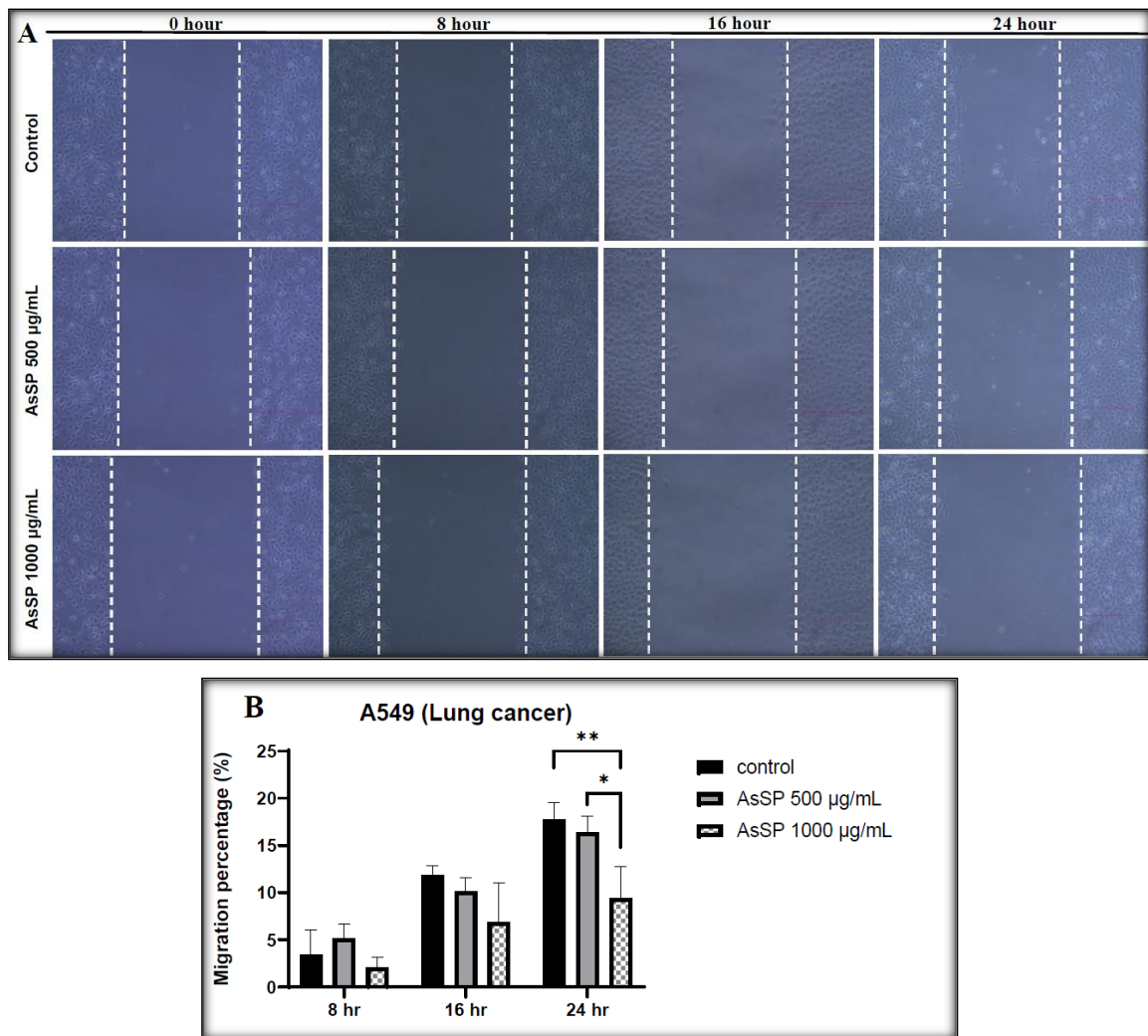
C、肺癌細胞在給予不同濃度 AsSP 生長對比

(資料來源：研究者自行繪製)

三、豬蛔蟲成蟲體蛋白抑制肺癌細胞移行能力：

癌細胞除了會進行群落生長外，亦會透過移行來侵犯其他正常的細胞組織。移行能力（Migration assay）可以測試受測物是否能有效抑制癌細胞移動的惡性侵襲。肺癌細胞在培養 24 小時後移除 Culture-Insert，癌細胞即進行移行。圖 4-A 分別在 40 倍顯微鏡視野下，於 8、16、24 小時記錄對照組、500 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 的移行情況，白色虛線為移除 Culture-Insert 之間隙，亦即不同組別之癌細胞移行前的標準線。

在移行實驗第 8 小時中，可以觀察到三組的癌細胞都有移行超過白色標準線，但只有少數幾顆癌細胞移行，並沒有明顯的差異；在第 16 小時之對照組中，癌細胞有較明顯的移行趨勢；相較之下，500 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 組仍然侷限在起始點，只有幾顆癌細胞有移行。當實驗進行到 24 小時終點時，可以觀察到對照組之癌細胞有明顯的移行，開始往間隙移動；而 500 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 治療組之癌細胞也有移行的趨勢，相較之下，1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 實驗組的大部分癌細胞仍然沒有移動。利用 ImageJ 影像工具，分析各組在不同時間點之移行面積，並進行統計學分析（圖 4-B）。在第 8 小時中，三組的癌細胞移行面積並沒有差異；在第 16 小時後，對照組、500 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 組之移行面積為 11.9、10.1、6.9%，有濃度梯度抑制移行效果；實驗終點 24 小時之結果中，1000 $\mu\text{g/mL}$ AsSP 能顯著的降低肺癌細胞之移行面積（9.4%，500 $\mu\text{g/mL}$ AsSP：16.4%、對照組：17.7%），可見 AsSP 能有效抑制惡性腫瘤細胞爬行能力。



(圖四) *Ascaris suum* 體蛋白抑制肺癌細胞 A549 的遷移能力。

A、40 倍鏡下 A549 細胞在不同 AsSP 濃度處理的 8、16、24 小時記錄對照。

B、使用 A549 細胞進行遷移實驗，並以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 進行統計分析。

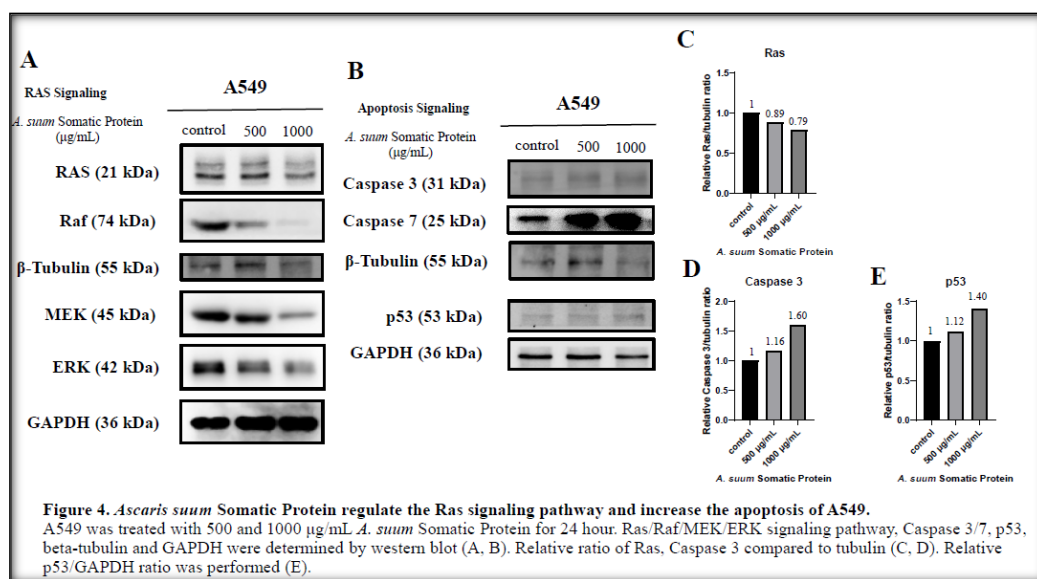
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

(資料來源：研究者自行繪製)

四、豬蛔蟲成蟲體蛋白抑制 Ras 促癌路徑，並增加肺癌細胞之凋亡訊號：

為了進一步研究 AsSP 之抑癌機制，利用西方墨點法 (Western blot) 分析促癌蛋白 Ras/Raf/MEK/ERK 路徑、細胞凋亡 Caspase 3/7 及腫瘤抑制蛋白 p53 在給予 AsSP 治療後之改變。肺癌細胞在經過 24 小時 500 和 1000 µg/mL AsSP 治療後，收成細胞並進行蛋白質萃取。圖五為西方黑點法之實驗結果，並以 ImageJ 進行量化。在給予 1000 µg/mL AsSP 作用後，與對照組相比，促癌蛋白 Ras 之表現量有明顯下降 (相對對照組表現量之 0.79 倍)；凋亡蛋白 Caspase 3 和腫瘤抑制蛋白 p53 的表現水準都有增加 (相對對照組表

現量之 1.60 和 1.40 倍)，三種蛋白都有呈現劑量依存性（Dose-dependent）效果，如圖五所示。



（圖五）*Ascaris suum* 體蛋白調節 Ras/Raf/MEK/ERK 訊號傳導途徑並增加 A549 細胞的凋亡。

A549 細胞以 500 和 1000 µg/mL 的 *A. suum* 體蛋白處理 24 小時，透過西方墨點法檢測 Ras/Raf/MEK/ERK、Caspase 3/7、p53、β-微管蛋白和 GAPDH 的表達量（A、B）。Ras 和 Caspase 3 相對於微管蛋白的比例（C、D）。p53/GAPDH 的相對比例分析（E）

A、肺癌細胞在不同 AsSP 濃度治療後各目標蛋白萃取

B、Ras/Raf/MEK/ERK 蛋白量在不同 AsSP 濃度治療後之對比

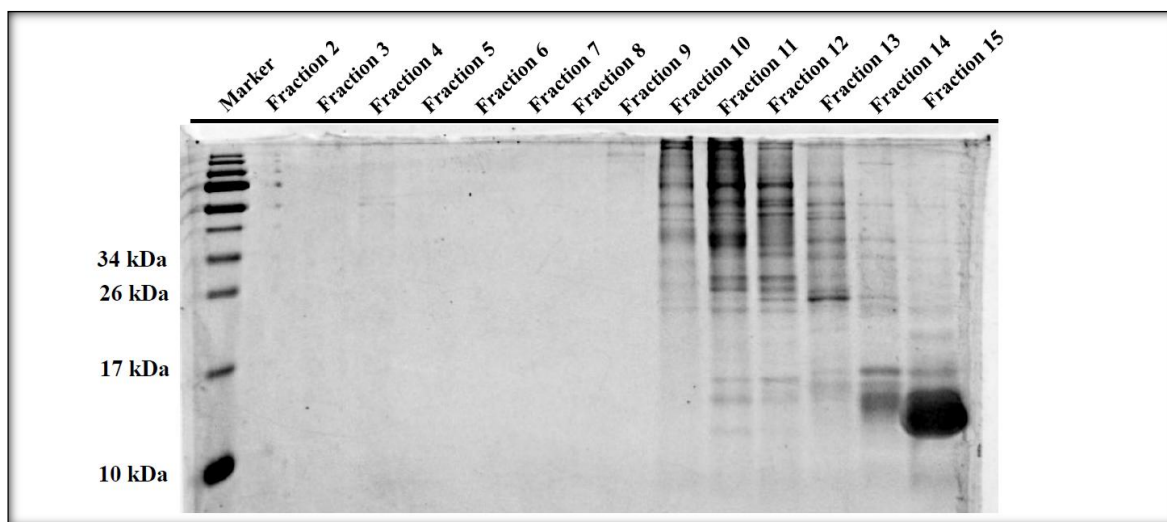
C、Caspase 3/7 蛋白量在不同 AsSP 濃度治療後之對比

D、p53 蛋白量在不同 AsSP 濃度治療後之對比

（資料來源：研究者自行繪製）

五、豬蛔蟲成蟲體粗萃取蛋白分離及具有潛力之抗癌胜肽：

為了進一步確認並開發精準的抗肺癌抗癌胜肽（Anti-cancer peptides），豬蛔蟲成蟲體粗萃取蛋白（AsSP）以快速蛋白質液相層析系統（Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC）進行初步分離。其原理為混合物中不同分子量大小物質有不同的流速，當流經 S-75 GL 管柱時，能把蛋白質進行分離。AsSP 分離後，利用 SDS-PAGE 進行定性實驗，確認各管（Fraction）之分子量大小，如圖六所示。ACPs 之特性為分子量約為 10 kDa、帶有+2 至 +9 電價之胜肽。因此，接著把 Fraction 14 和 15 進行 Q-TOF 蛋白質定序，並篩選出 10 種最具潛力之豬蛔蟲抗癌胜肽（*A. suum* Anti-cancer peptides, AsACP）（表 1）。



(圖六) *Ascaris suum* 體蛋白 FPLC 純化分餾的 SDS-PAGE 分析。

AsSP 透過 FPLC (快速蛋白液相層析) 分離，使用洗脫緩衝液 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5)，每個分餾樣本均載入 15% SDS-PAGE 進行進一步的蛋白質品質確認。

(資料來源：研究者自行繪製)

(表一) 10 種最具潛力之抗癌胜肽 (資料來源：研究者自行繪製)

No.	Protein name	Amino Acid	MW (Da)	Charge	Function
1	FMRFamide-like neuropeptide PF3	7	902	+2	Myoactive
2	Cytochrome b large subunit of complex II	17	2,001	+2.25	Unknown
3	Ribosomal protein 127a	18	2,022	+6.5	Unknown
4	Flavoprotein subunit of complex II	29	3,189	+5	ATP binding
5	ASABF-delta	31	3,289	+2	defense response
6	Cytochrome b small subunit of succinate-ubiquinone reductase	32	3,596	+7	Unknown
7	40S ribosomal protein S17	40	4,649	+3.25	Ribonucleoprotein
8	GTP cyclohydrolase 1	42	4,836	+4	Cofactor biosynthesis
9	DIHYDROLIPOYL dehydrogenase-binding protein/pyruvate dehydrogenase complex subunit	42	4,365	+3.25	acyltransferase activity
10	Flavoprotein subunit of succinate-ubiquinone reductase	48	5,068	+3.25	Ubiquinone

伍、 討論

近年來，越來越多細胞和動物實驗中，發現寄生蟲具有抗癌的效果，包括大腸直腸癌、肺癌、乳癌等，其抗癌效果有來自於寄生蟲的蟲體或排泌性抗原（Excretory-secretory antigens, ES-Ag），如單包條蟲（*Echinococcus granulosus*）產生的 protein KI-1 和弓形蟲（*Toxoplasma gondii*）分泌的 GRA15II 等，都已經有深入的研究（Maha M. Eissa et al., 2024）。具有抗肺癌效果的蠕蟲（Helminth）亦廣被研究，如 A549 肺癌細胞與旋毛蟲（*T. spiralis*）的排泌性抗原共同培養（Co-culture）後，旋毛蟲能夠抑制肺癌細胞生長，並引起粒腺體的凋亡反應（Apoptosis），其機制為降低抗凋亡基因 *bcl-2* 並增加促凋亡基因如 Caspase-9 和 Caspase-3 之水準（Zsolt Boros et al., 2019）。另有研究進一步分析與分離出旋毛蟲中的熱休克蛋白（Heat Shock Protein）sHSP-DQ 986457 能與肺癌細胞接合，此旋毛蟲的 sHSP-DQ 986457 蛋白有效抑制 C57BL 小鼠 LLC 肺癌生長、調節宿主的免疫功能（Taotao Yue et al. 2024）。抗肺癌的原蟲則有較多的研究，如克魯氏錐蟲（*T. cruzi*）、陰道滴蟲（*Trichomonas vaginalis*）與弓形蟲（*T. gondii*）等，都能抑制肺癌細胞的生長（Y Yang et al., 2017）。然而，直至 2024 年，沒有任何關於豬蛔蟲（*A. suum*）與人蛔蟲（*A. lumbricoides*）在癌症的研究，本實驗為首次發現豬蛔蟲成蟲蟲體含有抗肺癌的成分，並初探其抗癌機制。本實驗發現，當肺癌細胞 A549 給予豬蛔蟲成蟲體蛋白（AsSP）後，能促進肺癌細胞的凋亡、降低肺癌細胞之移行與群聚惡性能力，其機制為增加促凋亡蛋白 Caspase-3 及腫瘤抑制蛋白 p53 的表現，讓肺癌細胞進行凋亡，與旋毛蟲抗肺癌之機制相似（朱莹莹等，2022）。

寄生蟲感染後，其排泌性抗原或蟲體蛋白會引起宿主的訊息傳導路徑（Signal transduction pathway）。如人蛔蟲蛋白（*A. lumbricoides* cystatin, AI-CPI）上調膽固醇生物合成（Biosynthesis）及參與固醇調控序列結合蛋白（Sterol regulatory element-binding proteins, SREBPs）路徑；增加 TNF-alpha 和 TGF-beta 等免疫表現，參與多項人體的訊息傳導路徑（Nathalie Acevedo et al., 2024）。目前有關寄生蟲與癌症傳導路徑的研究，以針對寄生蟲誘導癌症為主。如隱孢子蟲（*Cryptosporidium parvum*）透過 Wnt 路徑誘發大腸癌（Sadia Benamrouz et al., 2014）；中華肝吸蟲（*C. sinensis*）granulin 蛋白以 RAS/MAPK/ERK 路徑促

進正常肝細胞進行癌化 (Caiqin Wang et al., 2021)。然而，目前寄生蟲抗癌的研究較少討論其訊息傳導路徑，主要研究其成份是否具有促進癌細胞凋亡反應。而 Ras 在癌症研究中非常重要，超過 20% 的癌症都有 RAS 基因突變。Ras-GTP 會促增癌細胞的增生，使癌症更具侵犯惡性；肺癌病人有高表現的 RAS 亦有較差的臨床化療治療效果，因此深入研究肺癌的 Ras 訊息傳導相當重要 (Philip East et al., 2022)。本實驗結果顯示，豬蛔蟲成蟲體蛋白 (AsSP) 能顯著的降低 Ras 蛋白的表現，在給予 1 mg/mL AsSP 能下調 21% Ras 蛋白表現水準。本研究未來將持續針對 Ras 的下游路徑如 PI3K/AKT/mTOR 或 MERK/ERK 作深入的研究，期望能夠開發具有精準對抗 RAS 傳導路徑的豬蛔蟲特異蛋白。

寄生蟲除了直接毒殺癌細胞外，在感染期亦會引起免疫反應，並透過調控宿主的免疫系統達到抗癌的效果。如弓形蟲感染後會活化巨噬細胞 (Macrophage)，並促增 CD8 T 細胞和 IL-12 表現，誘導免疫細胞殺滅癌細胞 (Zhi Zheng et al., 2024)；*E. granulosus* 感染後，六鉤幼蟲 (Oncosphere) 的 Mucin type O-glycan 蛋白會活化 NK 細胞和 Th1 細胞釋放細胞激素 (Cytokines) IFN-gamma，抑制癌細胞生長 (Wang Guan et al., 2019)。豬蛔蟲與人蛔蟲感染後，其幼蟲會從腸道中移行到肺部。蛔蟲在肺部會引起 Th2 細胞激素如 TGF-beta、IL-6、IL-13 等免疫反應 (Luisa Magalhães et al., 2021)，有研究指出 Th2 路徑能夠抑制肺癌的轉移和惡性 (Simon Schreiber et al., 2021)。然而，蛔蟲在肺癌的角色仍需要有深入的研究，未來將進行動物實驗來進一步釐清蛔蟲的蟲體蛋白除了能直接抑制癌細胞生長外，是否同時存在免疫調控的作用，而影響到肺癌的進程及癒後。

抗癌胜肽 (Anticancer peptides, ACPs) 的發現與來源豐富，大部分天然的 ACPs 來自不同有機體如海洋動物、植物、真菌、細菌等 (Raj Kumar Chinnadurai et al., 2023)。然而，目前並未有來自寄生蟲所開發的 ACPs。大部分寄生蟲之抗癌研究，都以寄生蟲的排泌性抗原或蛋白，直接研究其抗癌作用，未見有寄生蟲源性抗癌胜肽 (Parasite-derived anticancer peptides) (Maha M. Eissa et al., 2024)。不過，已經有越來越多寄生蟲源性胜肽 (Parasite-derived peptides) 在其他醫療領域上的研究，如來自牛羊肝吸蟲 (*Fasciola hepatica*) FhHDM-1 能活

化 PI3K/Akt 傳導路徑，抑制胰島細胞的凋亡（Inah Camaya et al., 2024）。本實驗之豬蛔蟲蟲體蛋白亦參與 RAS 傳導路徑，可能與 FhHDM-1 一樣，影響 RAS/PI3K/Ak 路徑；肥頭帶條蟲（*Taenia crassiceps*）源性胜肽 GK-1 為促發炎細胞激素，合併 PD-L1 免疫抑制劑能更有效殺滅黑色素瘤（Jesus Vera-Aguilera et al., 2017）。有不少針對 RAS 開發的抗 RAS 抗癌胜肽，如 LUNA18、SOS 994–1004 等（Matthew R Pincus et al., 2023）。本實驗利用 FPLC 和 Q-TOF-MS，把混合物 AsSP 進一步分析其有效的抗癌成份胜肽序列，再比對 Anticancer Peptides 資料庫，篩選出 10 個最有潛力的 ACPs。未來將透過 *E. coli* BL21 表達系統，純化出 10 個豬蛔蟲重組抗癌胜肽（recombinant *Ascaris suum* Anticancer Peptides, rAsACPs），期望此 10 個 rAsACPs 具有抗肺癌效果，並深入研究 rAsACPs 如何在 RAS 傳導路徑。

本實驗的研究限制為只有單一細胞體外實驗，缺乏寄生蟲、宿主免疫及癌細胞之間的互動關係，後續會建立肺癌的小鼠動物模式，進一步了解豬蛔蟲蟲體蛋白（AsSP）抗癌機制。最後，將繼續深入研究 AsSP 對肺癌細胞的訊息傳導路徑影響，以完善其抗癌的原理及分子機制。

陸、 結論

本實驗首次發現豬蛔蟲成蟲體蛋白具有抗肺癌的作用，其機制為促使肺癌細胞進行凋亡，並下調促癌蛋白 Ras 的表現量。利用分子生物學技術加以分析豬蛔蟲蟲體蛋白，並選出 10 個最有潛力開發成抗癌胜肽之豬蛔蟲重組抗癌胜肽 rAsACPs。未來將成為首個以寄生蟲蟲源性開發的抗癌胜肽，對肺癌和抗癌胜肽研究中或有重要的角色與地位。

除了直接抑制癌細胞外，豬蛔蟲蛋白可能還通過調控宿主的免疫系統達到間接抗癌效果。未來若能進一步證實其免疫調控功能，rAsACPs 或可發展為免疫治療的輔助劑，提供更全面且精準的癌症治療策略。此外，通過結構與功能關聯分析，可優化 rAsACPs 的設計，使其具更高的癌細胞專一性和藥效。

綜合以上結果，本研究為寄生蟲蟲源性抗癌胜肽的研發開創了新領域，也為抗 Ras 癌症療法

提供了全新策略。未來若能進行更深入的動物實驗及臨床前評估，rAsACPs 有望成為針對肺癌甚至其他 Ras 突變癌症的潛力藥物，並為癌症治療帶來突破性進展。

柒、 參考文獻資料

- [1]朱莹莹、王灝軒、郭文平、謝廣成、杜婁英（2022 年 12 月）。旋毛虫原肌球蛋白的特性分析及原核表达。中国病原生物学杂志 *Journal of Pathogen Biology*，第 17 卷第 12 期。1410-1414。 <http://cjpb.org/1234/attached/file/20230112/20230112104914211421.pdf>
- [2]劉光庭、李美貞、藍翌菱、黃玉輝、李淑玲、張俊梁（2020）。肺部性蛔蟲症之案例報告及文獻回顧。台灣醫檢雜誌，35(3)，28-33。
<https://www.airitilibrary.com/Article/Detail?DocID=P20190523001-202009-202010210013-202010210013-28-33>
- [3]Cancer registry annual report, 2021 Taiwan. Ministry of Health and Welfare, Taiwan.
- [4]Miriam Sánchez-Ortega, et al., *Cells* 2021, 10(8), 1879.
- [5] National Institutes of Health, USA.
- [6]Brett C Bade. (2020, March). *Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clinics in Chest Medicine.*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0272523119300802?via%3Dihub>
- [7]National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines – Non-Small Cell Lung Cancer, 2024.
- [8]Roy S Herbst. (2018, January 25). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. <https://www.nature.com/articles/nature25183>
- [9]Martin Reck. (2016, November 10). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*.
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1606774>
- [10]Mingfeng Xie. (2020, July 22). Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *The Royal Society*.

<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsob.200004>

- [11] Raj Kumar Chinnadurai. (2023, August). Current research status of anti-cancer peptides: Mechanism of action, production, and clinical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223007862?via%3Dihub>.
- [12] Min Kyoung Shin. (2022, December 9). De Novo Design of AC-P19M, a Novel Anticancer Peptide with Apoptotic Effects on Lung Cancer Cells and Anti-Angiogenic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/24/15594>
- [13] Nawal E Al-Hazmi. (2021, June 22). Microbial Azurin Immobilized on Nano-Chitosan as Anticancer and Antibacterial Agent Against Gastrointestinal Cancers and Related Bacteria. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12029-021-00654-6>
- [14] Mitsuaki Nishioka. (2024, September). A case of asymptomatic infection of *Ascaris suum* identified by PCR-restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889324002700?via%3Dihub>
- [15] Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health & Human Services
- [16] Martha Betson. (2014, September 15). Molecular Epidemiology of Ascariasis: A Global Perspective on the Transmission Dynamics of *Ascaris* in People and Pigs. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://academic.oup.com/jid/article/210/6/932/2908564>
- [17] Koichi Izumikawa. (2011). Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21937827/>
- [18] S Katoh. (2004, July 01). Elevated interleukin-18 levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia. *Allergy*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2004.00492.x>
- [19] Figen Çelik. (2022, June). Parasite and Cancer Relationship. *Türkiye Parazitol Derg.*

<https://turkiyeparazitolderg.org/articles/doi/tpd.galenos.2022.30974>

- [20]Hoang van Tong. (2017, February). Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *eBioMedicine*. [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(16\)30551-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(16)30551-5/fulltext)
- [21]Peter L Labib. (2019, February 28). Molecular Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *BMC Cancer*. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5391-0>
- [22] Fernanda da Silva Manoel-Caetano. (2004, February). Cytogenetic alterations in chagasic achalasia compared to esophageal carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15104278/>
- [23]Morteza Yousefi. (2023, March 22). Parasites as potential targets for cancer immunotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-023-04694-2>
- [24]Hossein Yousofi Darani. (2009, May 27). Effects of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model. *The Korean Journal of Parasitology*. <https://www.parahostdis.org/journal/view.php?doi=10.3347/kjp.2009.47.2.175>
- [25]Yu-Meng Jiao. (2011, June). Effects of excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* on CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells and NK cells of melanoma-bearing mice. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22164498/>
- [26]Shima Daneshpour. (2019, Arpil). Effect of Hydatid Cyst Fluid Antigens on Induction of Apoptosis on Breast Cancer Cells. *Advanced Biomedical Research*. https://journals.lww.com/adbm/fulltext/2019/08000/effect_of_hydatid_cyst_fluid_antigens_on_induction.27.aspx
- [27]R. Ian Freshney. (2015, December). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 7th Edition. *Wiley*. <https://www.wiley.com/en-us/Culture+of+Animal+Cells%3A+A+Manual+of+Basic+Technique+and+Specialized+Applications%2C+7th+Edition-p-9781118873649>

- [28]Robert K. Scopes. (1994). Protein Purification Principles and Practice. *Springer Nature Link*.
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4757-2333-5>
- [29]Maha M. Eissa. (2024, October 05). Parasites revive hope for cancer therapy. *European Journal of Medical Research*. <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40001-024-02057-2>
- [30]Zsolt Boros. (2019, August). The oncogenic and oncostatic action of *Trichinella* spp. in animals. *Scientia Parasitologica*. https://www.scientia.zooparaz.net/2019_20_01/05-11-SP-2019-Boros.pdf
- [31]Taotao Yue. (2024, May 16). The effects of anti-lung cancer in nude mice by a fully human single-chain antibody against associated antigen Ts7TMR between A549 cells and *Trichinella spiralis*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2024.2347377>
- [32]Y Yang. (2017, June 26). Exosomes from *Plasmodium*-infected hosts inhibit tumor angiogenesis in a murine Lewis lung cancer model. *Oncogenesis*.
<https://www.nature.com/articles/oncsis201752>
- [33] Nathalie Acevedo. (2024, February 28). Cystatin from the helminth *Ascaris lumbricoides* upregulates mevalonate and cholesterol biosynthesis pathways and immunomodulatory genes in human monocyte-derived dendritic cells. *Frontiers in Immunology*.
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1328401/full>
- [34]Sadia Benamrouz. (2014, June 01). *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Disease Models & Mechanisms*.
<https://journals.biologists.com/dmm/article/7/6/693/3574/Cryptosporidium-parvum-induced-ileo-caecal>
- [35]Caiqin Wang. (2021, November 10). *Clonorchis sinensis* Granulin Promotes Malignant Transformation of Hepatocyte Through EGFR-Mediated RAS/MAPK/ERK and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

<https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2021.734750/full>

- [36]Philip East. (2022, September 26). RAS oncogenic activity predicts response to chemotherapy and outcome in lung adenocarcinoma. *Nature Communications*.

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-33290-0>

- [37]Zhi Zheng. (2024, January 11). A novel enemy of cancer: recent investigations into protozoan anti-tumor properties. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

<https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1325144/full>

- [38]Wang Guan. (2019, September 25). Employing Parasite Against Cancer: A Lesson From the Canine Tapeworm *Echinococcus Granulosus*. *Frontiers in Pharmacology*.

<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2019.01137/full>

- [39]Luisa Magalhães. (2021, April 12). Immunological underpinnings of Ascaris infection, reinfection and co-infection and their associated co-morbidities. *Parasitology*.

<https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/immunological-underpinnings-of-ascaris-infection-reinfection-and-coinfection-and-their-associated-comorbidities/0466D1226B282FEBC2FB54A8AF538D48>

- [40]Simon Schreiber. (2021, May 31). Metabolic Interdependency of Th2 Cell-Mediated Type 2 Immunity and the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*.

<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.632581/full>

- [41]Inah Camaya. (2024, July 10). The Parasite-Derived Peptide, FhHDM-1, Selectively Modulates miRNA Expression in β -Cells to Prevent Apoptotic Pathways Induced by Proinflammatory Cytokines. *Journal of Diabetes Research*.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2024/8555211>

- [42]Jesus Vera-Aguilera. (2017, March 01). Novel Treatment of Melanoma: Combined Parasite-Derived Peptide GK-1 and Anti-Programmed Death Ligand 1 Therapy. *Cancer Biotherapy &*

Radiopharmaceuticals. <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cbr.2016.2123>

- [43]Matthew R Pincus. (2023, February 06). Peptides That Block RAS-p21 Protein-Induced Cell Transformation. *Biomedicines*. <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/2/471>
- [44]Porter, A.G., & Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6, 99-104.
- [45]Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>
- [46]Levine, B. D., & Stray-Gundersen, J. (1997). "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 83(1), 102–112. <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.1.102>
- [47]Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>

【評語】 052018

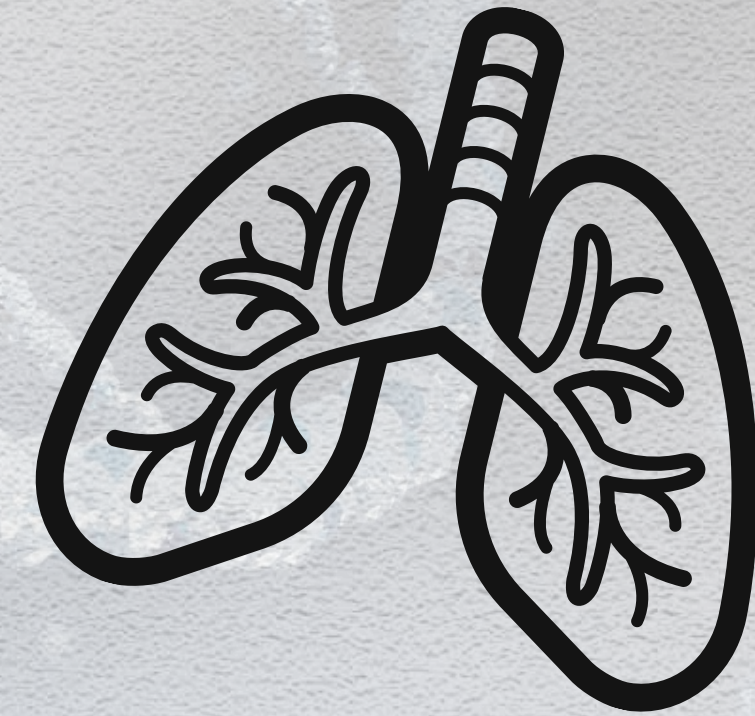
本研究聚焦於癌症治療，特別是肺癌細胞對傳統化療產生抗藥性的問題，並積極尋找新的治療方法。本研究目的在初步探討豬蛔蟲成蟲體蛋白 (AsSP) 如何抑制肺癌細胞增生並促使細胞凋亡，研究運用了多種現代細胞生物學技術，包括肺癌細胞共培養實驗、快速蛋白質液相層析系統、Q-TOF-MS 技術分析等，成功從 AsSP 粗蛋白中分離並篩選出 10 種具有抗癌潛力的豬蛔蟲胜肽。本研究主題新穎，連結臨床未來性，為未來進一步的藥物開發奠定了重要基礎；儘管如此，仍有部分意見與建議如下：

1. 本研究主要為體外 (in vitro) 實驗，未進行動物實驗（如小鼠異種移植肺癌模型）或免疫細胞共培養，缺乏生理層次的整體驗證。細胞層面的實驗發現能否在複雜的活體環境中有效重現並產生實際的治療效果，仍需大量的動物模型和最終的人體臨床試驗驗證。
2. 雖透過 FPLC 進行部分純化，但實驗中使用的蛋白仍為混合型萃取液，尚未確認特定單一胜肽的真實抗癌效果。
3. 由 FPLC 結果分離並篩選出 10 種具有抗癌潛力的豬蛔蟲胜肽，需進一步驗證其功效。

4. 由於提取自寄生蟲，未來若將這些蛋白或胜肽應用於人體治療時，可能會面臨潛在的免疫原性問題，即可能引發宿主的免疫反應。
5. 研究主要關注其抗癌效果，但未考慮 AsSP 或其篩選出的胜肽對正常細胞的潛在副作用或非特異性影響，這在評估其治療潛力時是不可或缺的考量。

作品海報

豬蛔蟲成蟲體蛋白



促使肺癌細胞凋亡之機轉初探

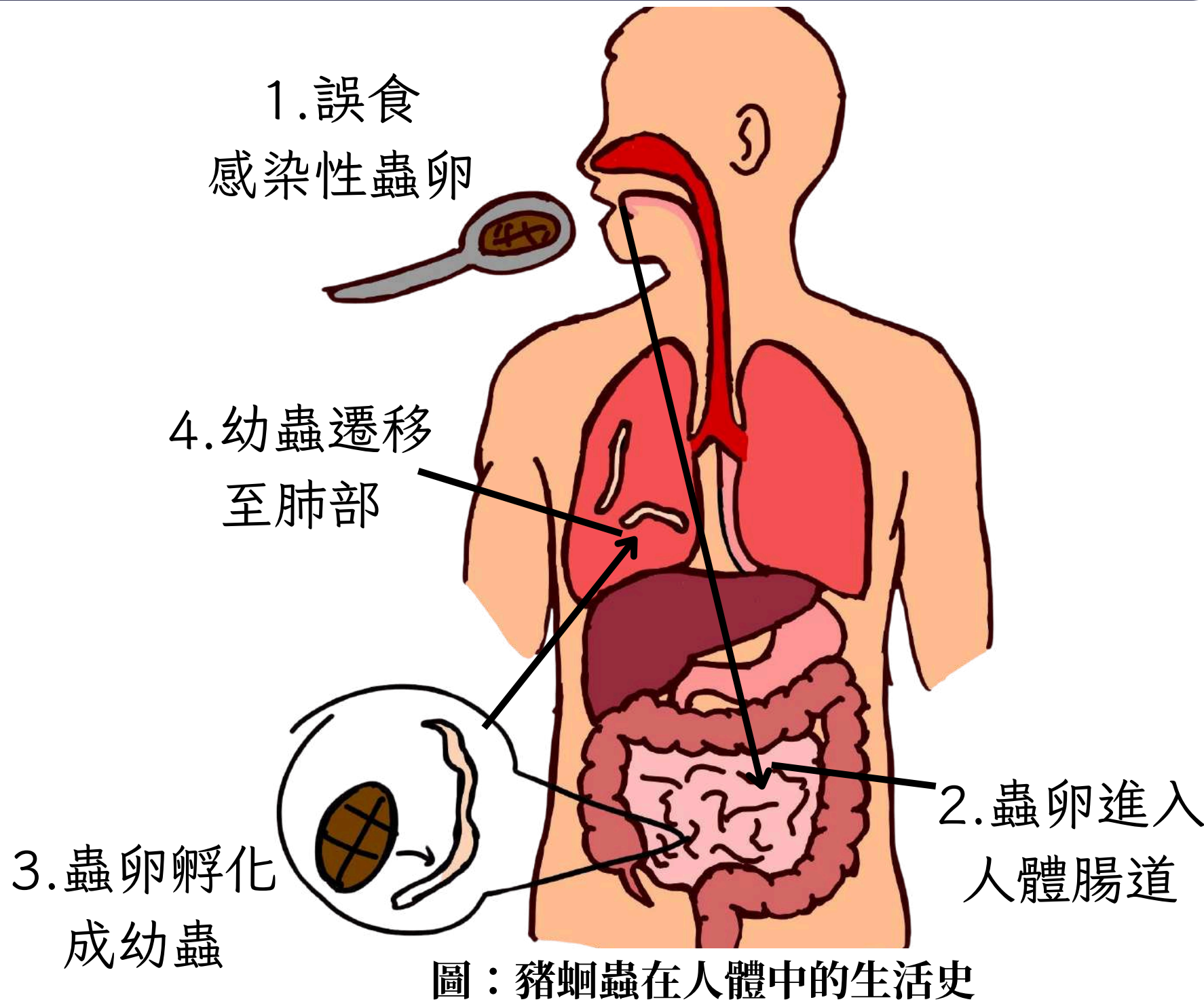
摘要

近年發現，寄生蟲的排泄-分泌性蛋白（排泌性蛋白）對癌細胞有抑制作用。犬蛔蟲的排泌性蛋白已證實能**抑制纖維肉瘤、肝癌和大腸癌細胞增生**，但其機制尚未明確。本研究利用與犬蛔蟲相近的人畜共通線蟲—**豬蛔蟲成蟲蛋白（*Ascaris suum* Somatic Protein, AsSP）**，與肺癌細胞 A549 共同培養實驗，發現 AsSP 能顯著抑制肺癌細胞的增生和腫瘤惡性特性。透過快速蛋白質液相層析系統分離 AsSP 後，篩選出 10 種具抗癌潛力的豬蛔蟲胜肽，未來將進一步驗證這些胜肽的抗癌效應。

壹.研究動機

近年來癌症仍是我國十大死因之首，肺癌更是其中最具致死性的癌症，尤其晚期患者的**治療選擇有限**。因此尋找新的治療策略成為當前癌症研究的重要課題。

豬蛔蟲為人畜共通寄生蟲，感染後其幼蟲會移行至肺部，並引起宿主的免疫反應。然而，關於豬蛔蟲感染或其蟲體蛋白與癌症之間的交互作用，目前仍然缺乏深入研究。本研究期望**揭示豬蛔蟲蟲體蛋白在肺癌治療上的潛力，為未來療法提供新方向**，並提升社會對寄生蟲與癌症相互作用的認識，促進國民健康。

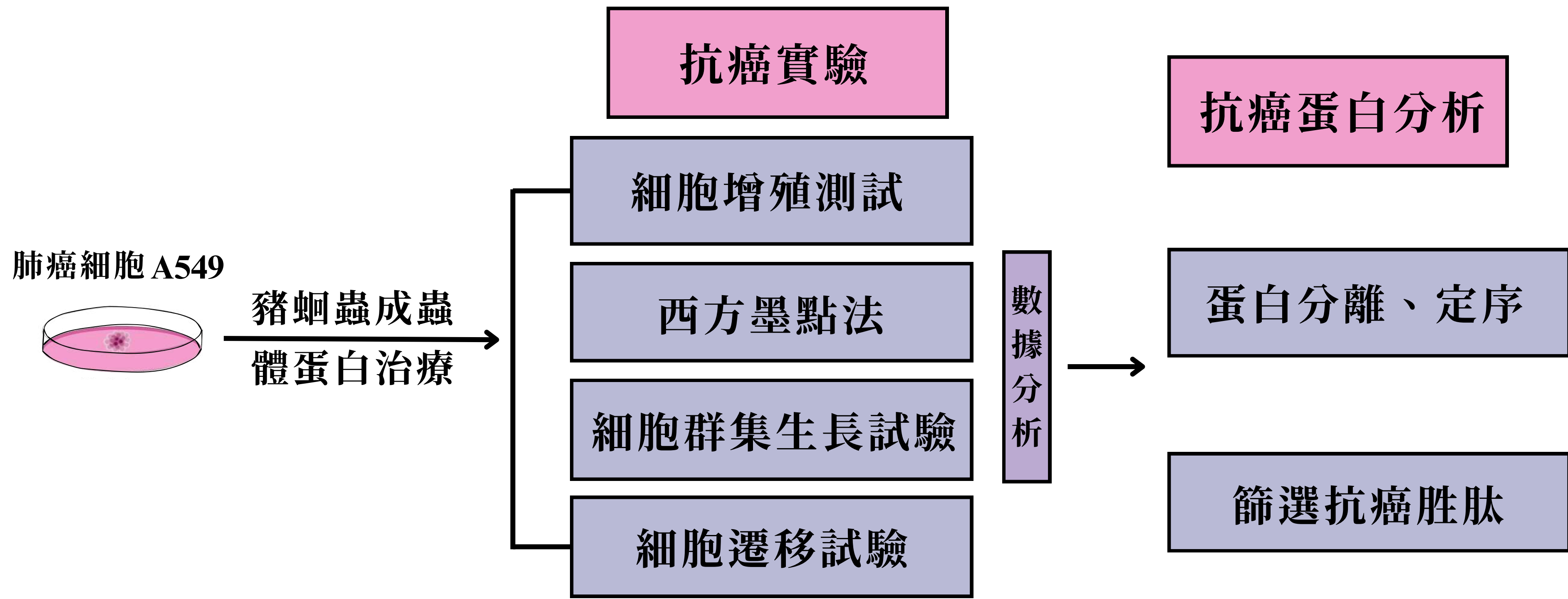


貳.研究目的

初探寄生蟲蛋白與癌症的關聯性：

- 探討豬蛔蟲成蟲體蛋白（AsSP）對肺癌細胞的影響機制，測試其在不同濃度與時間下抑制肺癌細胞活性的效果，並分析其是否具備潛在的抗癌活性
- 分析 AsSP 治療後，肺癌細胞之惡性腫瘤能力（如群集生長、移行能力等）
- 分析促癌蛋白 RAS 細胞凋亡蛋白 Caspase 3 及腫瘤抑制蛋白 p53 在治療後表現水準之改變
- 篩選出具抗癌潛力之豬蛔蟲抗癌胜肽（*Ascaris suum* Somatic Protein, AsSP）

參.研究方法與過程



一、細胞培養

使用人類肺癌細胞株 A549，培養於含10%胎牛血清與1% PSN 抗生素的 RPMI1640 培養基中，於 37°C、5% CO₂ 環境下進行細胞培養

二、豬蛔蟲成蟲採集與蟲體蛋白萃取

從市售豬腸取得豬蛔蟲，經清洗、液氮冷凍、超音波破碎與離心，成功萃取出豬蛔蟲成蟲體蛋白（*Ascaris suum* Somatic Protein, AsSP）

三、細胞增殖測試 (MTT assay)

以 MTT 分析不同濃度AsSP 治療 A549 後的存活率，透過吸光值判定細胞活性抑制程度

四、西方墨點法 (Western blot)

萃取經 AsSP 處理過後的 A549 蛋白質，進行電泳與轉膜，以特定抗體檢測細胞中目標蛋白表現

五、細胞群集生長 (Colony formation)

A549肺癌細胞加入 AsSP 培養兩週後以 Giemsa 染色觀察其群落形成能力，評估抑癌效果

六、細胞移行 (Migration assay)

在細胞單層形成間隙後，給予不同濃度 AsSP，觀察並分析細胞移行面積變化以判斷抑制能力

七、豬蛔蟲成蟲體蛋白分離與質譜分析

利用 FPLC 分離 AsSP 蛋白後，以 Q-TOF 質譜分析蛋白質序列，鑑定具有潛力的抗癌胜肽

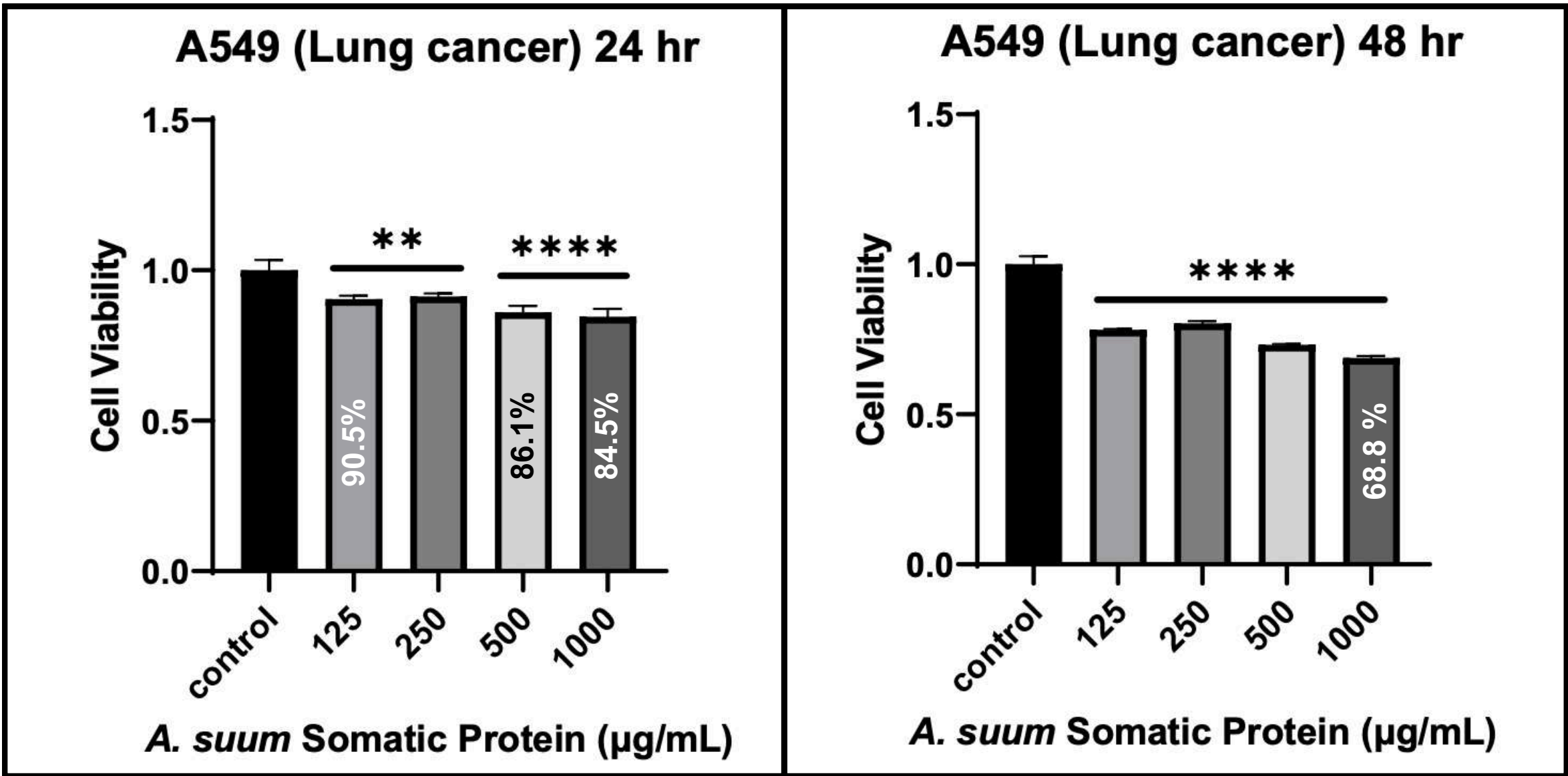
八、數據分析

數據以 GraphPad Prism 8 分析，使用單因子變異數與 *t* 檢定，並以 **p*<0.05 為顯著差異判準

肆.研究結果

一、豬蛔蟲成蟲體蛋白能有效抑制肺癌細胞活性

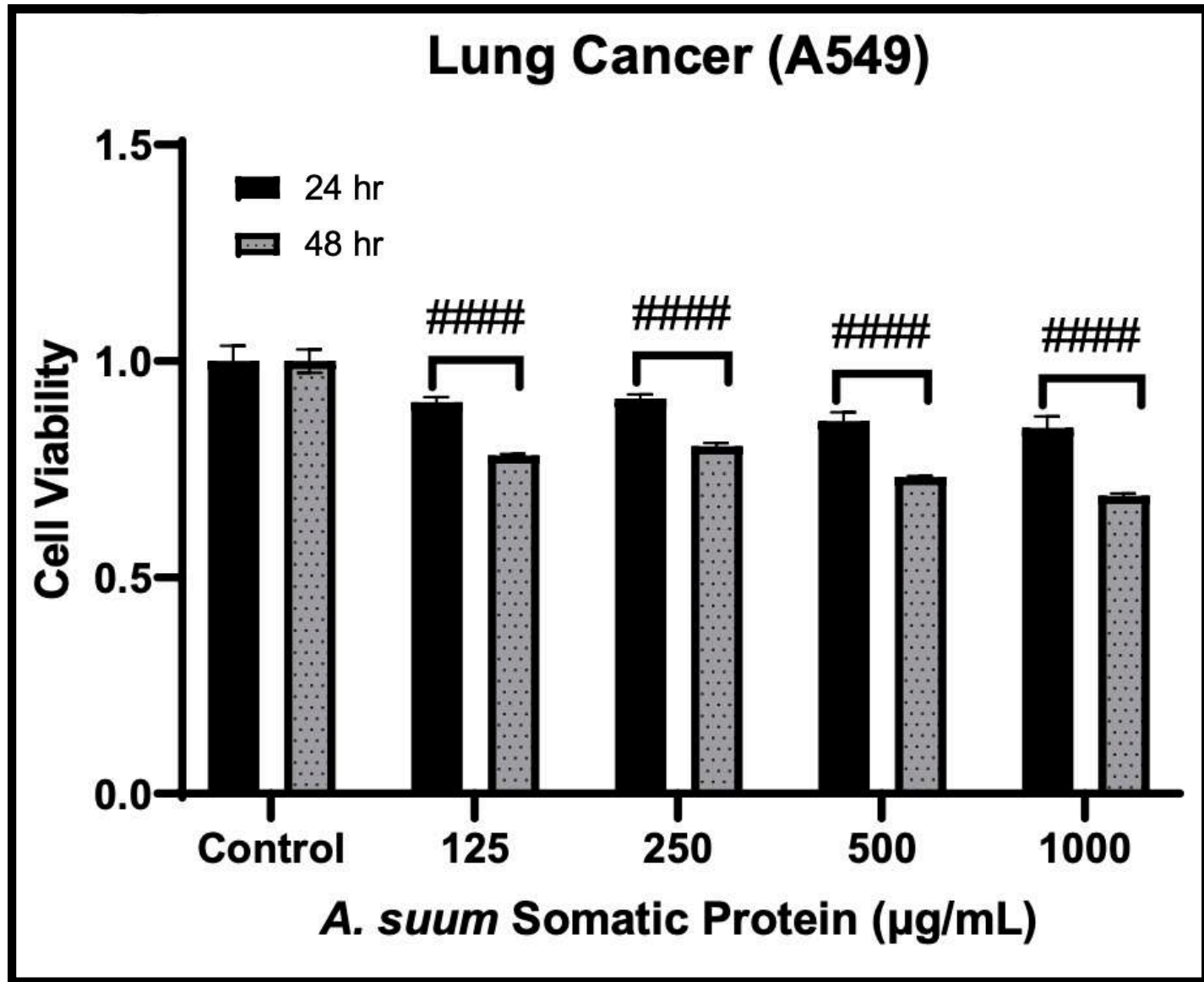
劑量依存性比較



(圖 1A) 24 小時處理結果

(圖 1B) 48 小時處理結果

時間依存性比較

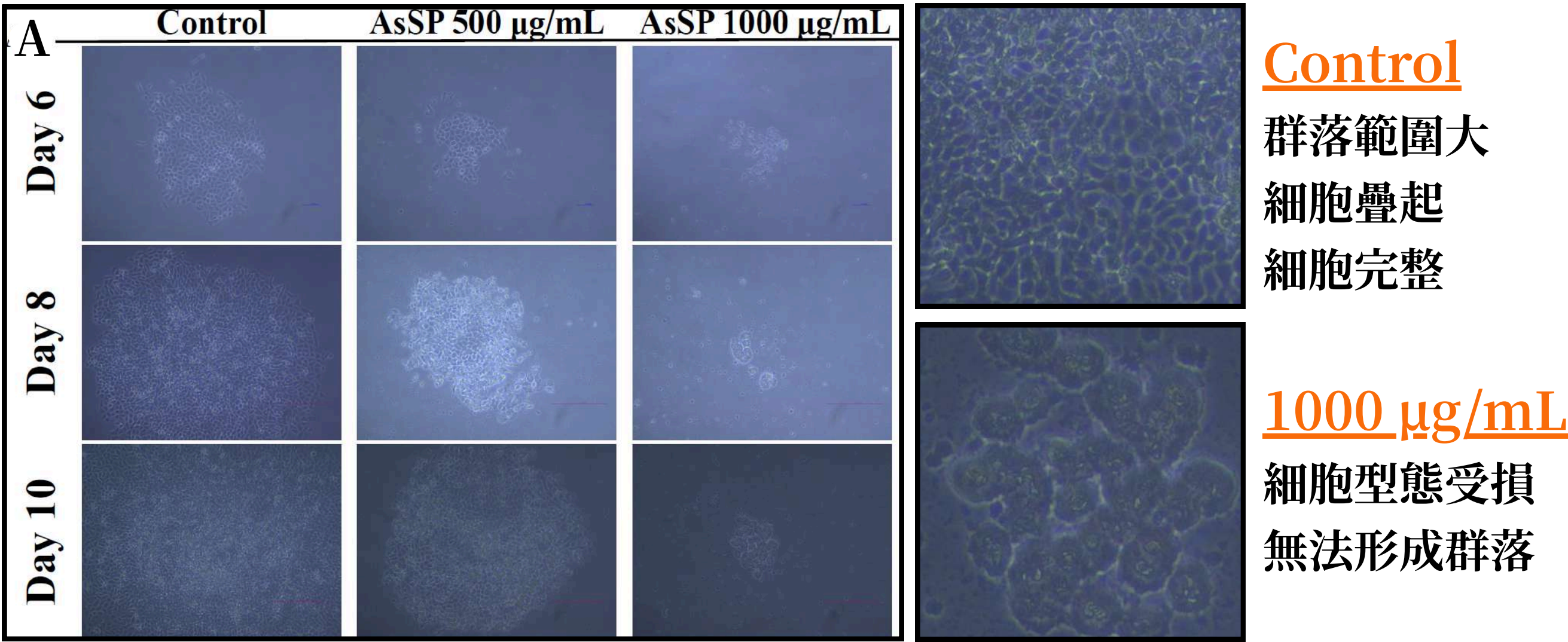


(圖 1C) 不同濃度處理之 24 小時與 48 小時對照

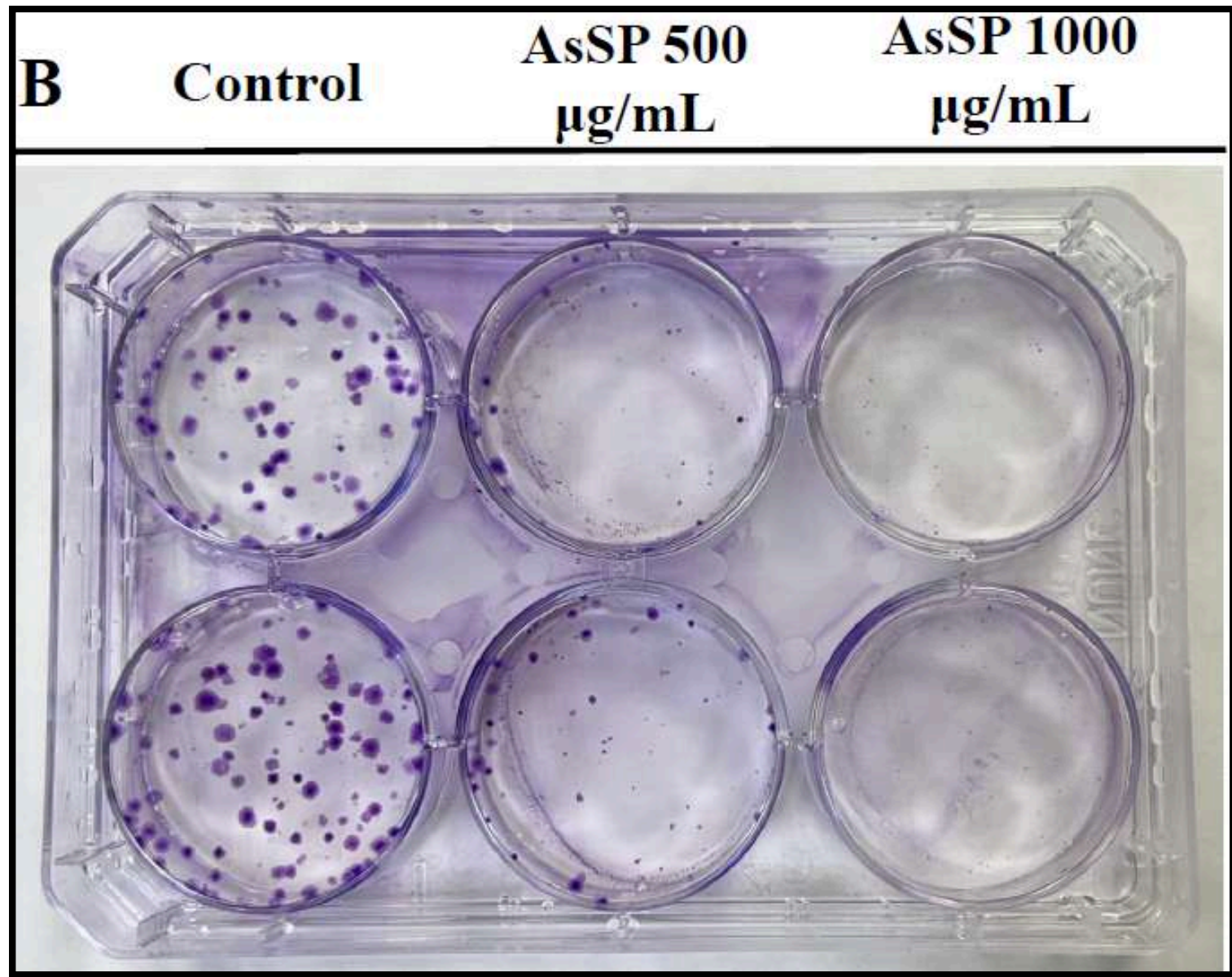
** : $p < 0.01$
**** : $p < 0.0001$
: $p < 0.0001$
統計分析採用單因子及雙因子變異數分析進行多重比較。

AsSP 對肺癌細胞 A549 具有明顯的劑量依存性與時間依存性抑制效果，濃度升高及延長作用時間能降低細胞活性

二、豬蛔蟲成蟲體蛋白降低肺癌細胞群集生長能力

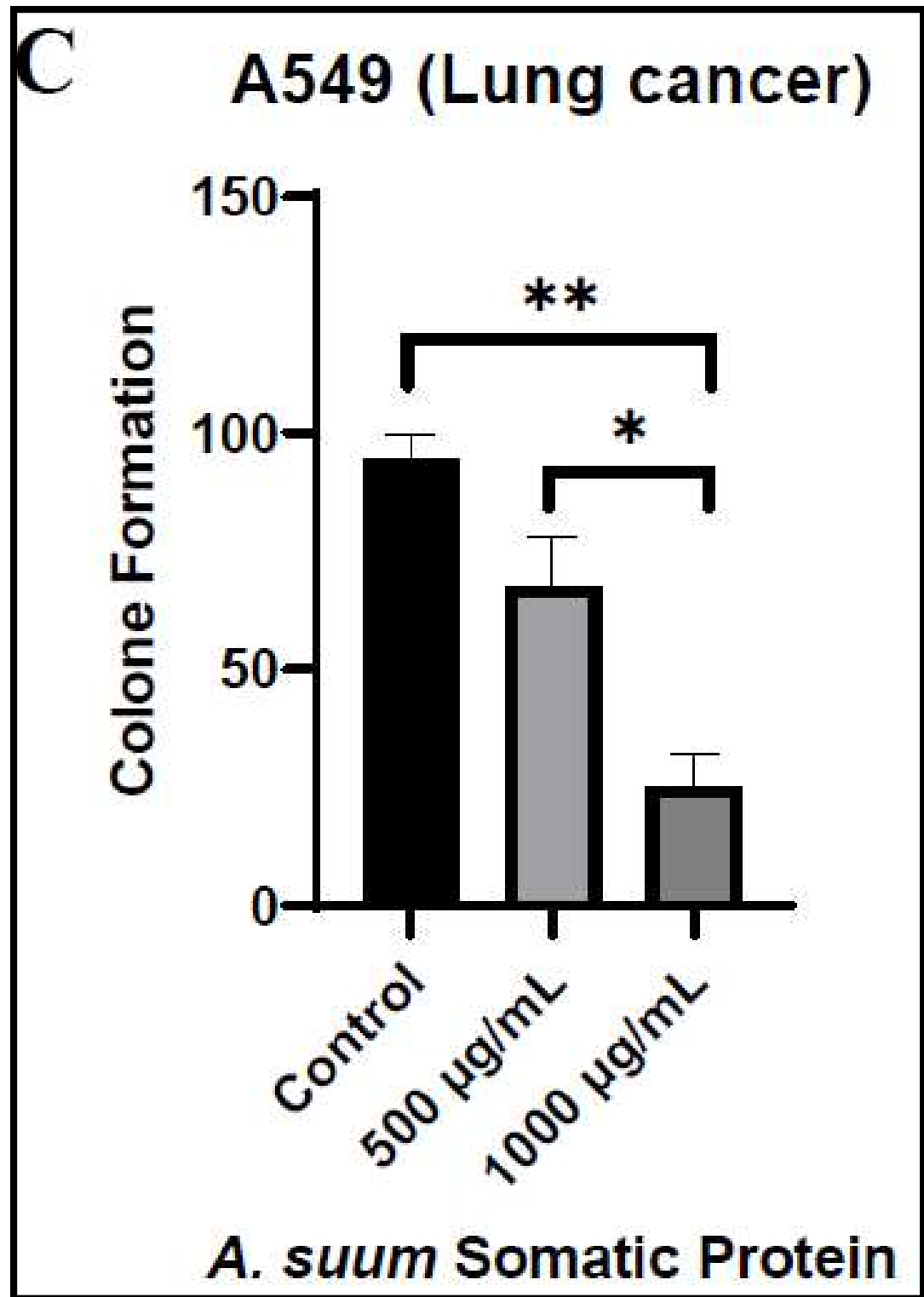


細胞形態學觀察 (圖 2A)

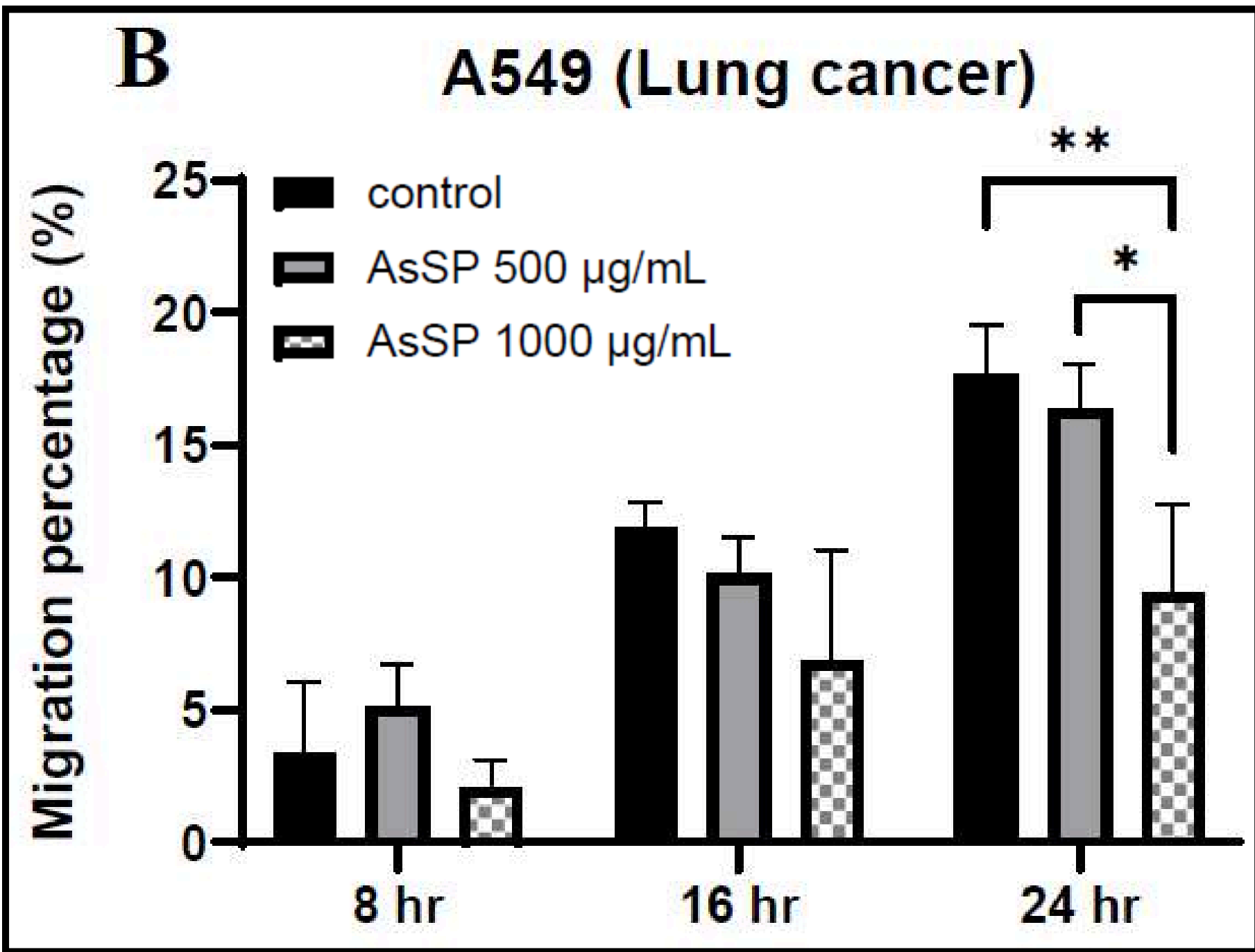
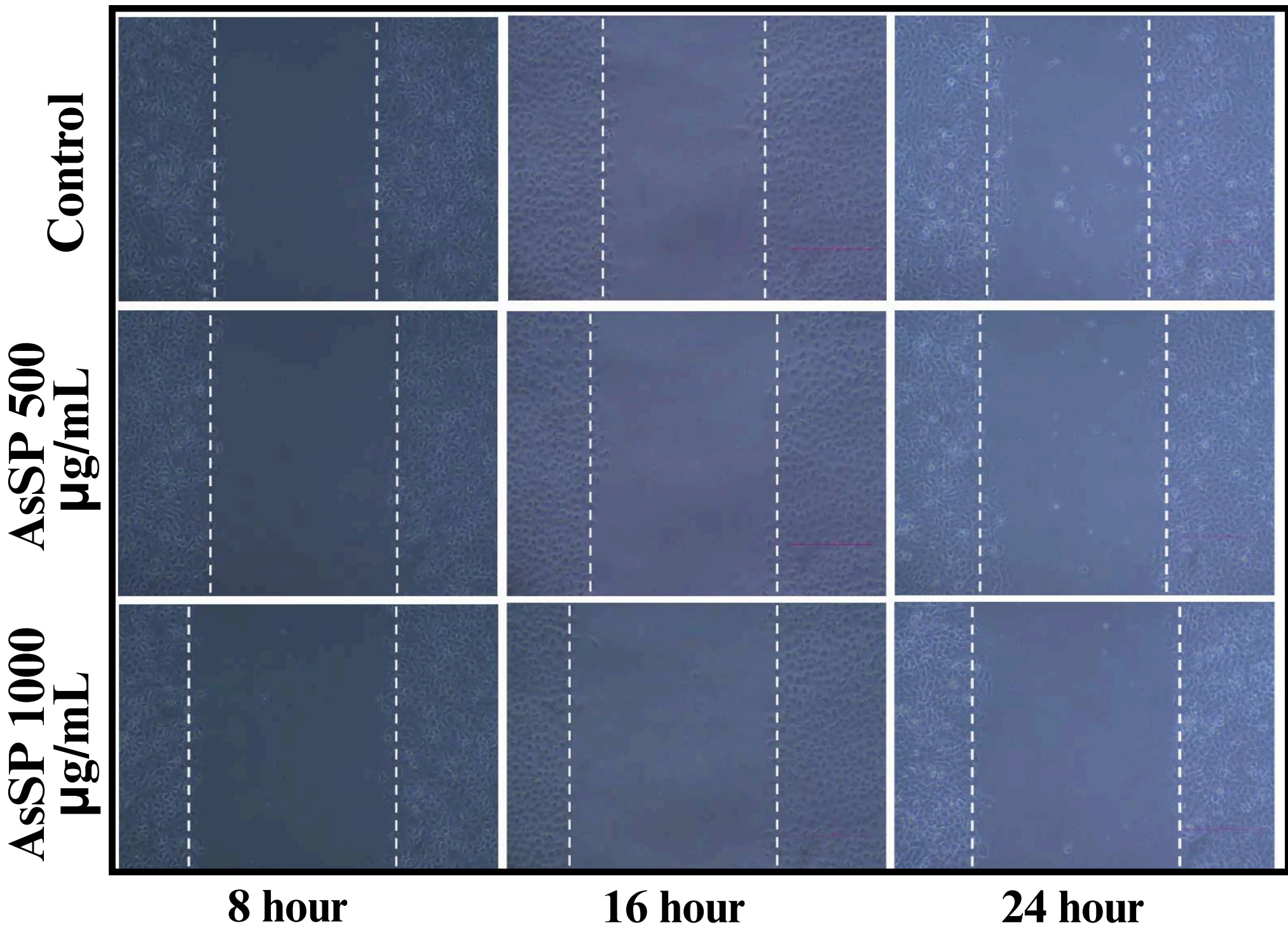


染色分析第10天癌細胞群落 (圖 2B、2C)

- Control : 94 顆 ($p < 0.01$)
- 500 µg/mL : 67 顆 ($p < 0.05$)
- 1000 µg/mL : 25 顆



三、豬蛔蟲成蟲體蛋白抑制肺癌細胞移行能力



8 小時：

各組無顯著差異

16 小時：

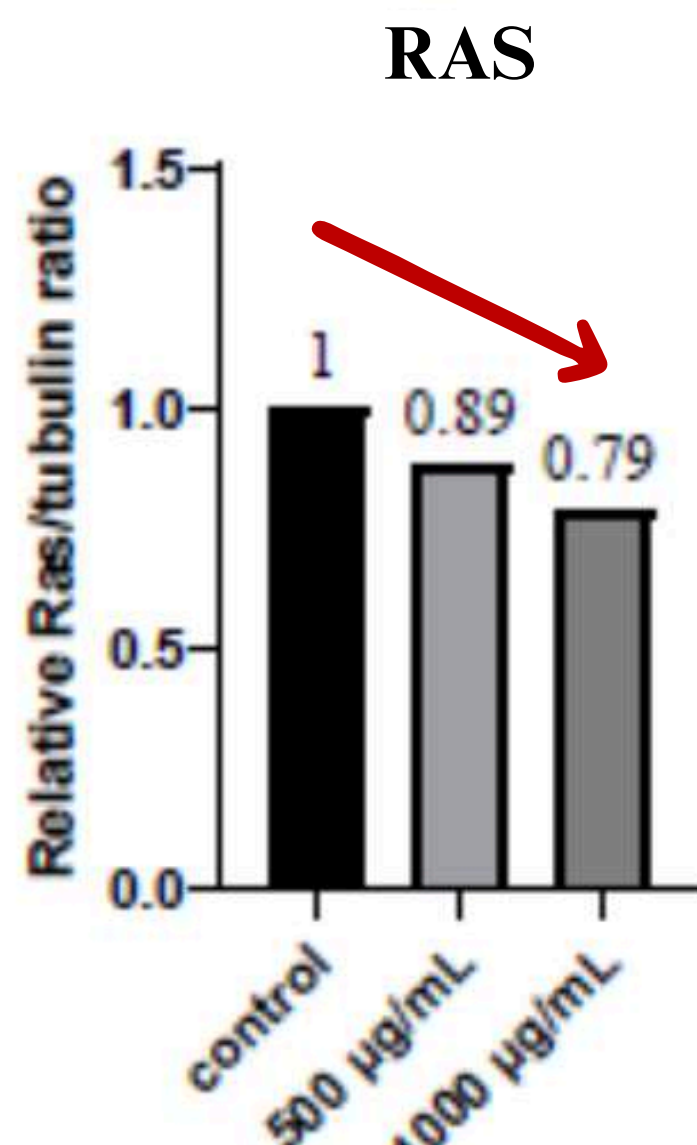
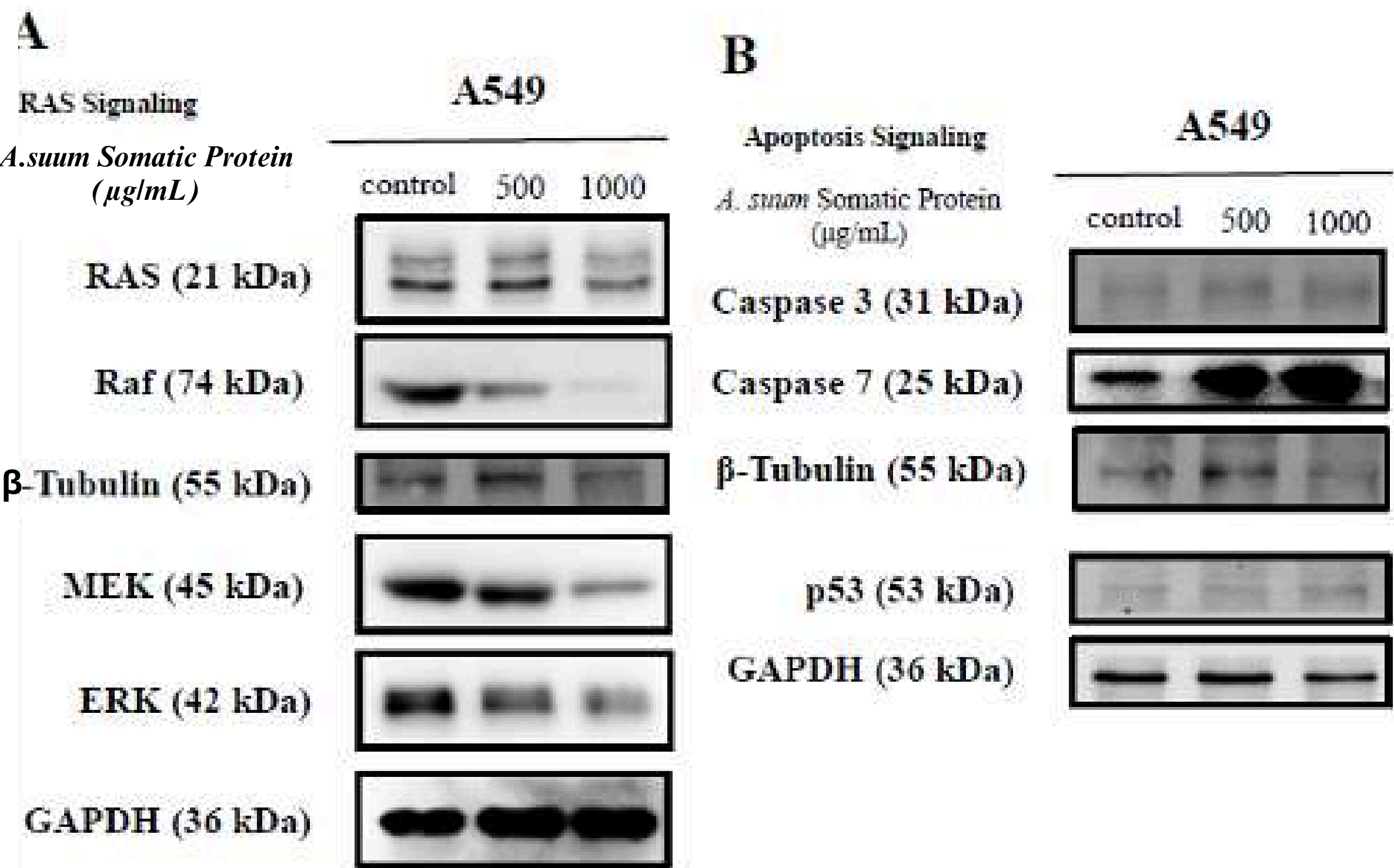
相較於對照組，多數癌細胞仍接近起始點，移行較少

24 小時：

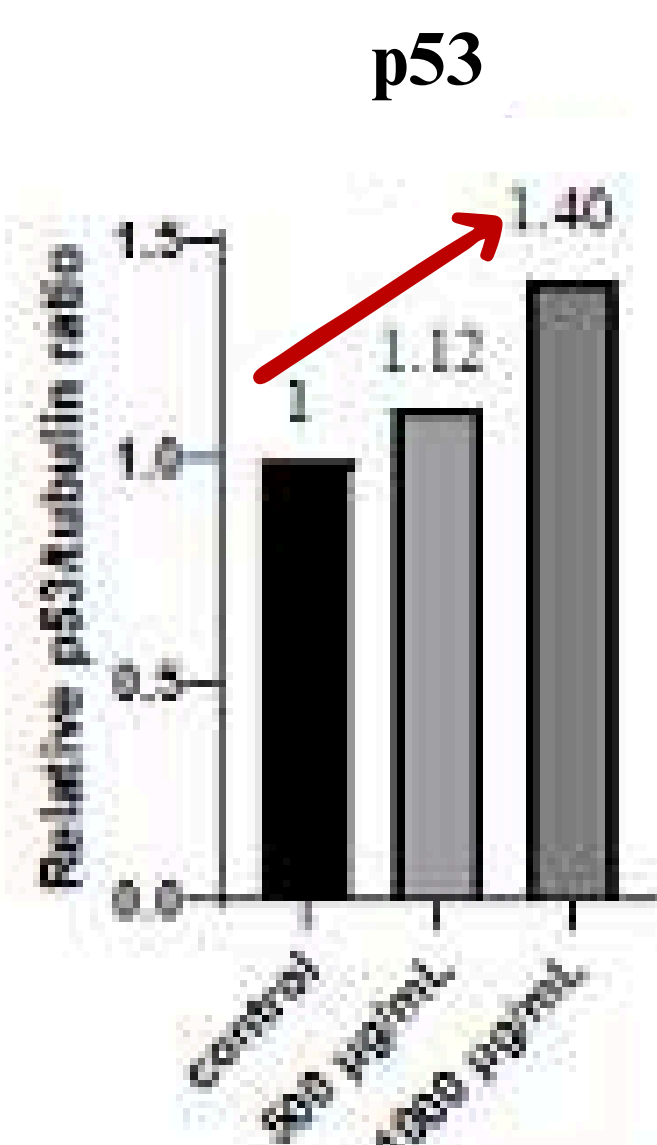
相較對照組，AsSP 能顯著抑制癌細胞移行

- 對照組：17.7%
- 500 µg/mL：16.4%
- 1000 µg/mL：9.4%

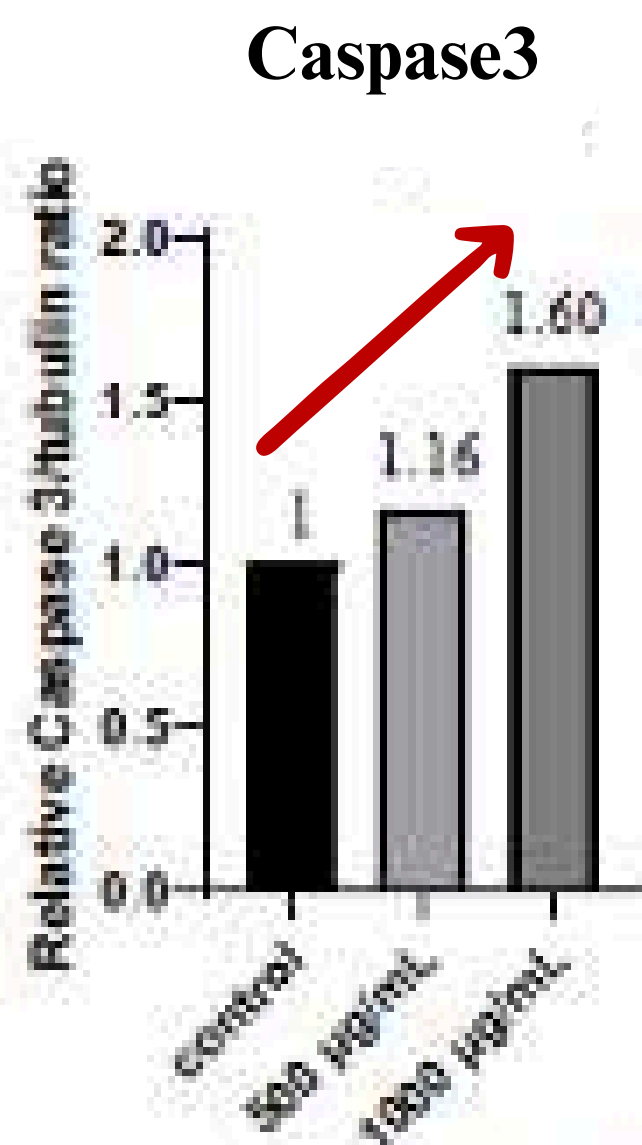
四、豬蛔蟲成蟲體蛋白抑制RAS促癌路徑，並增加肺癌細胞之凋亡訊號



A. suum Somatic Protein



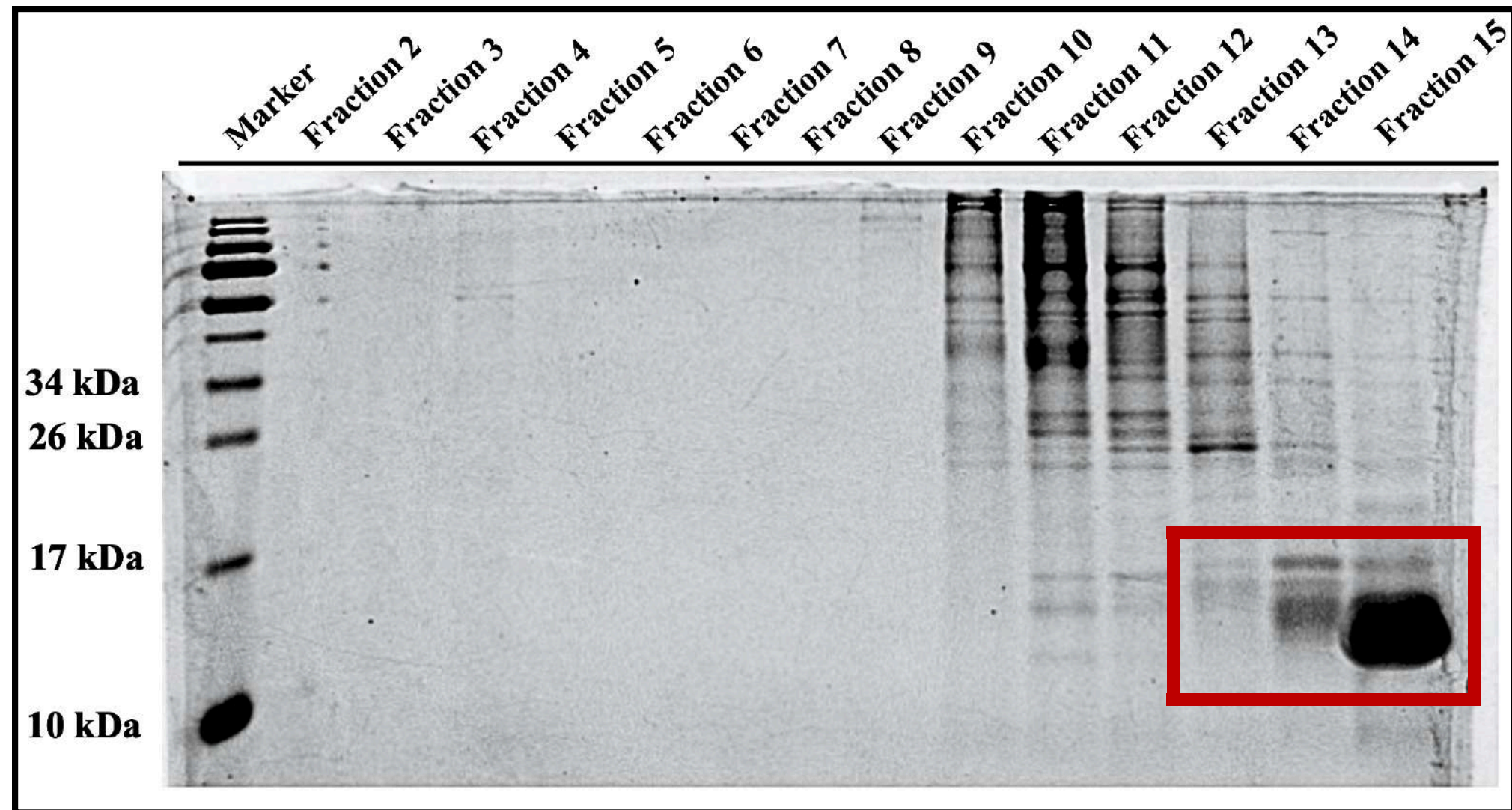
A. suum Somatic Protein



A. suum Somatic Protein

AsSP 可抑制促癌蛋白 RAS 表現，並提升凋亡蛋白 Caspase 3 與腫瘤抑制蛋白 p53 表現

五、豬蛔蟲成蟲體蛋白分離及具有潛力之抗癌胜肽



(圖五) FPLC 分離豬蛔蟲成蟲體蛋白後，以凝膠電泳進行蛋白定性實驗

Table 1.					
No.	Protein name	Amino Acid	MW(Da)	Charge	Function
1	FMRFamide-like neuropeptide PF3	7	902	+2	Myoactive
2	Cytochrome b large subunit of complex II	17	2,001	+2.25	Unknown
3	Ribosomal protein I27a	18	2,022	+6.5	Unknown
4	Flavoprotein subunit of complex II	29	3,189	+5	ATP binding
5	ASABF-delta	31	3,289	+2	defense response
6	Cytochrome b small subunit of succinate-ubiquinone reductase	32	3,596	+7	Unknown
7	40S ribosomal protein S17	40	4,649	+3.25	Ribonucleoprotein
8	GTP cyclohydrolase 1	42	4,836	+4	Cofactor biosynthesis
9	DIHYDROLIPOYL dehydrogenase-binding protein pyruvate dehydrogenase complex subunit	42	4,365	+3.25	acyltransferase activity
10	Flavoprotein subunit of succinate-ubiquinone reductase	48	5,068	+3.25	Ubiquinone

(表一) 10 種最具潛力之抗癌胜肽

開發具有抗癌潛力之豬蛔蟲胜肽：

- AsSP 經 FPLC 分離與凝膠電泳定性分析
- 選出Fraction 14與15送至Q-TOF進行蛋白定序
- 透過Anti-cancer Peptides 資料庫篩選出含有符合 ACPs 特性的蛋白，為後續開發的關鍵對象

伍. 討論

一、現況與寄生蟲對肺癌的影響

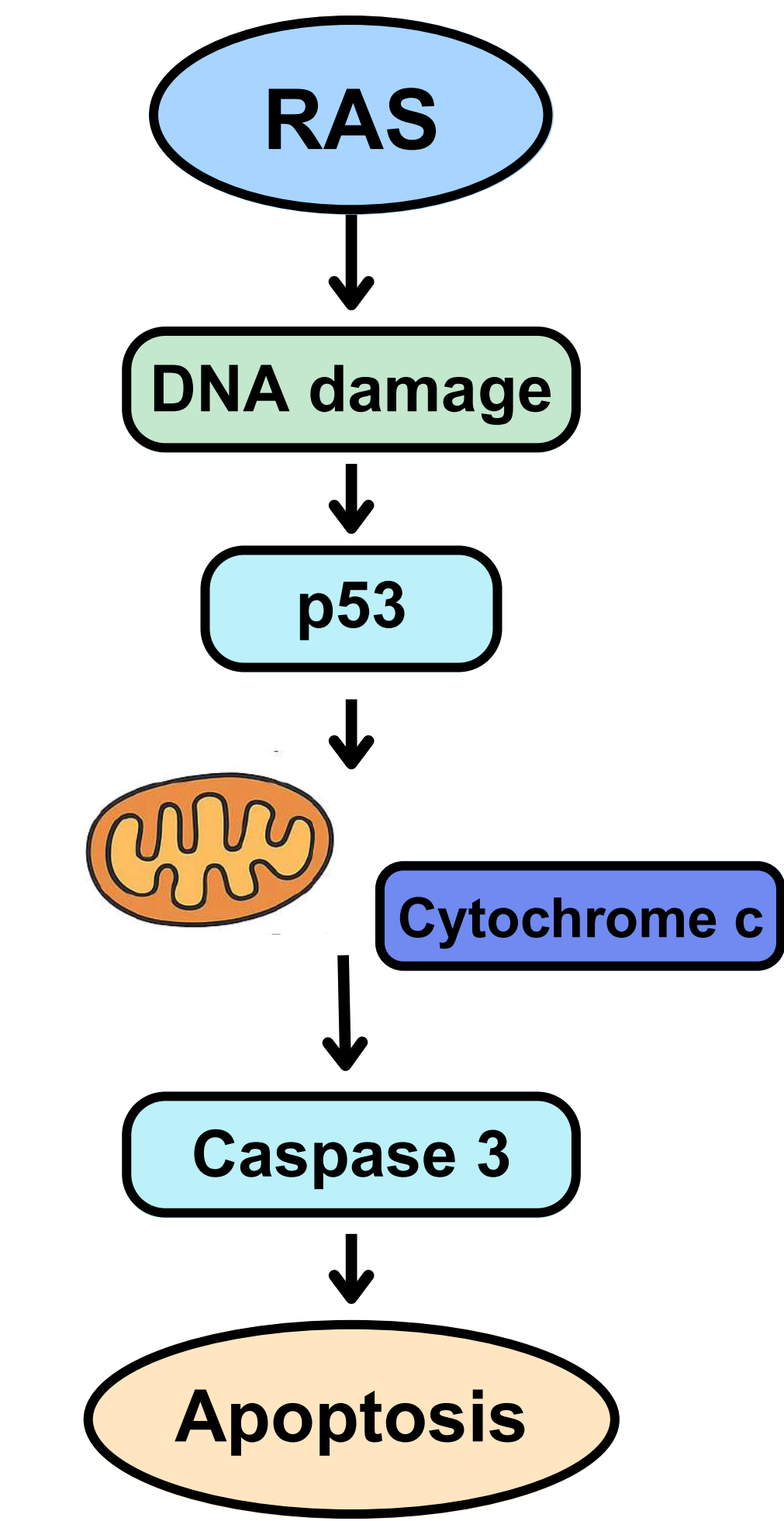
近年研究發現寄生蟲的蟲體或排泌性蛋白具抗癌效果，均可抑制肺癌細胞生長並誘導凋亡。

- 抗肺癌的原蟲（如克魯氏錐蟲、陰道滴蟲、弓形蟲）已廣受研究

豬蛔蟲與人蛔蟲的抗癌作用尚未被探討，本研究首次發現 AsSP 具抗肺癌效果。

- 可促進 A549 肺癌細胞凋亡、降低移行與群聚能力

- 機制涉及提升 Caspase-3 及 p53 表現，與旋毛蟲抗癌機制相似



(圖六) RAS 參與的常見細胞凋亡途徑

二、寄生蟲影響宿主訊息傳導路徑

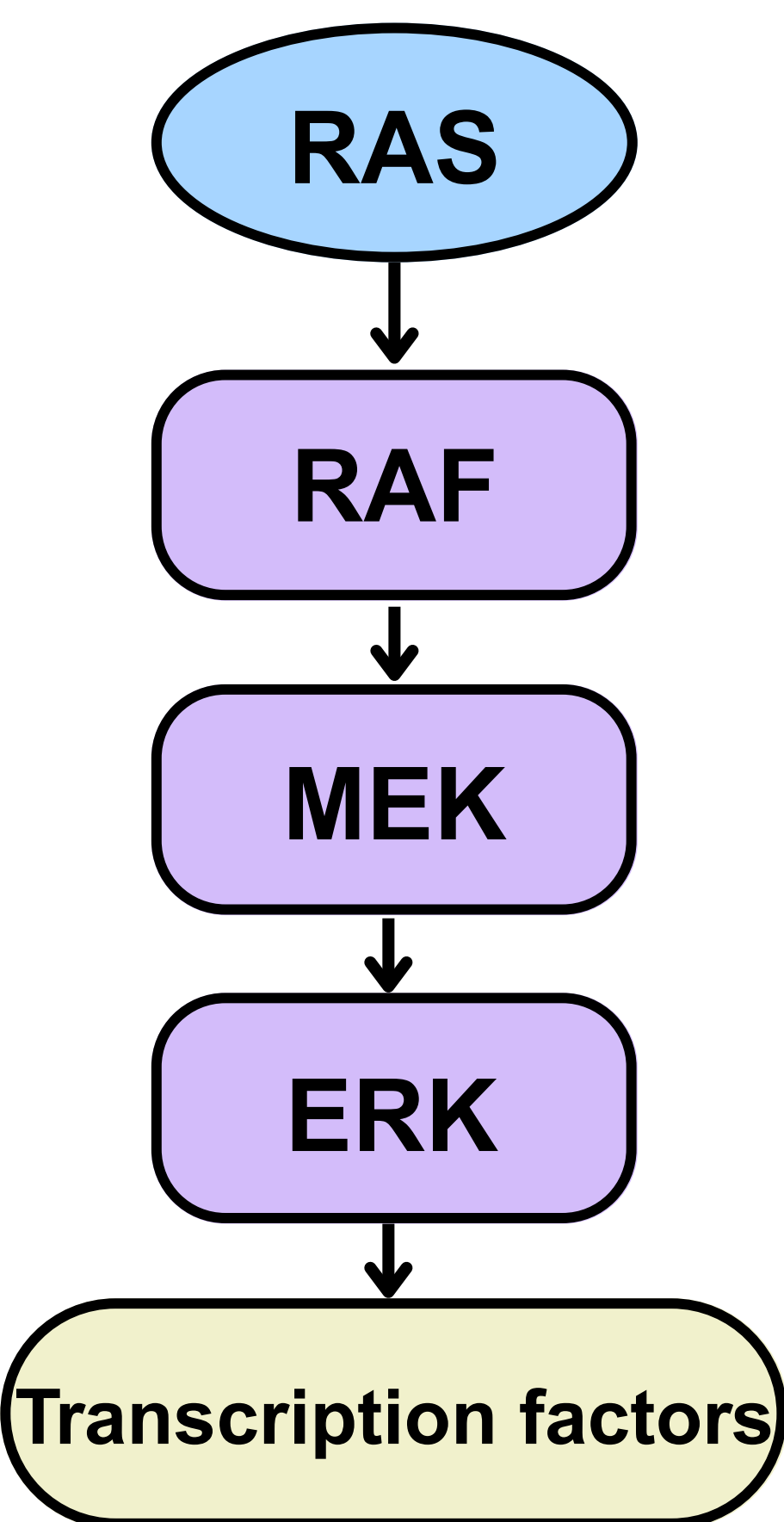
寄生蟲感染後，其排泌性蛋白或蟲體蛋白可影響宿主的訊息傳導路徑。

- 人蛔蟲蛋白可調控膽固醇合成及固醇調節序列結合蛋白路徑，影響免疫反應

目前寄生蟲與癌症的訊息傳導研究多集中於寄生蟲誘導癌症

- 中華肝吸蟲 Granulin 蛋白則透過 RAS/MAPK/ERK 路徑促進肝細胞癌化

本研究發現，**AsSP 能顯著降低肺癌細胞 RAS 蛋白表現**，1000 µg/mL AsSP 可下調 21% RAS 表現。



(圖七) MAPK/ERK 路徑

未來將深入探討 AsSP 是否影響 RAS 的下游路徑，如 PI3K/AKT/mTOR 或 MAPK/ERK，期望開發出**針對 RAS 傳導路徑的特異性抗癌蛋白**。

三、寄生蟲的免疫調節與抗癌潛力

寄生蟲感染會誘發免疫反應，並透過調控宿主免疫系統來影響癌症發展。

- 弓形蟲可活化巨噬細胞及促進 CD8 T 細胞與 IL-12 的表現，進而殺死癌細胞
- *E.granulosus* 感染可活化 NK 細胞及 Th 1 免疫反應，促進 IFN-γ 釋放來抑制癌細胞生長。

由於**豬蛔蟲幼蟲會移行至肺部**，其感染可誘發 Th 2 相關激素 (TGF-β、IL-6、IL-13) 表現，而 Th 2 反應**可能抑制肺癌轉移及惡性發展**。然而豬蛔蟲對肺癌的影響機制尚不明確，未來將進行動物實驗以探討其免疫調控是否有助於肺癌治療。

四、寄生蟲源性抗癌胜肽的潛力

抗癌胜肽 (ACPs) 主要來自海洋生物、植物、細菌等，目前**尚無寄生蟲源性抗癌胜肽的相關研究**。已有研究發現，某些寄生蟲源性胜肽可調控訊息傳導

- 牛羊肝吸蟲 FhHMD-1 能透過 PI3K/Akt 路徑抑制胰島細胞凋亡
- 肥頭帶條蟲源性胜肽 GK-1 可增強 PD-L1 免疫抑制劑的效果來殺滅黑色素瘤

本研究透過 FPLC 和 Q-TOF-MS 分析 AsSP，比對抗癌胜肽資料庫，篩選出 10 種可能具有抗癌效果的 ACPs。未來計畫透過 *E.coli* BL21 表達系統純化這些胜肽 (rAsACPs)，並深入研究其對 RAS 訊息傳導路徑的影響。

五、研究限制與未來方向

本研究僅為體外細胞實驗，缺乏宿主免疫與癌細胞的交互作用模型。未來將建立肺癌小鼠動物模式，進一步探討豬蛔蟲成蟲體蛋白如何透過免疫調控與訊息傳導路徑來發揮抗癌作用。透過深入分析 AsSP 的分子機制，期望為未來寄生蟲抗癌藥物開發提供新的方向與可能性。

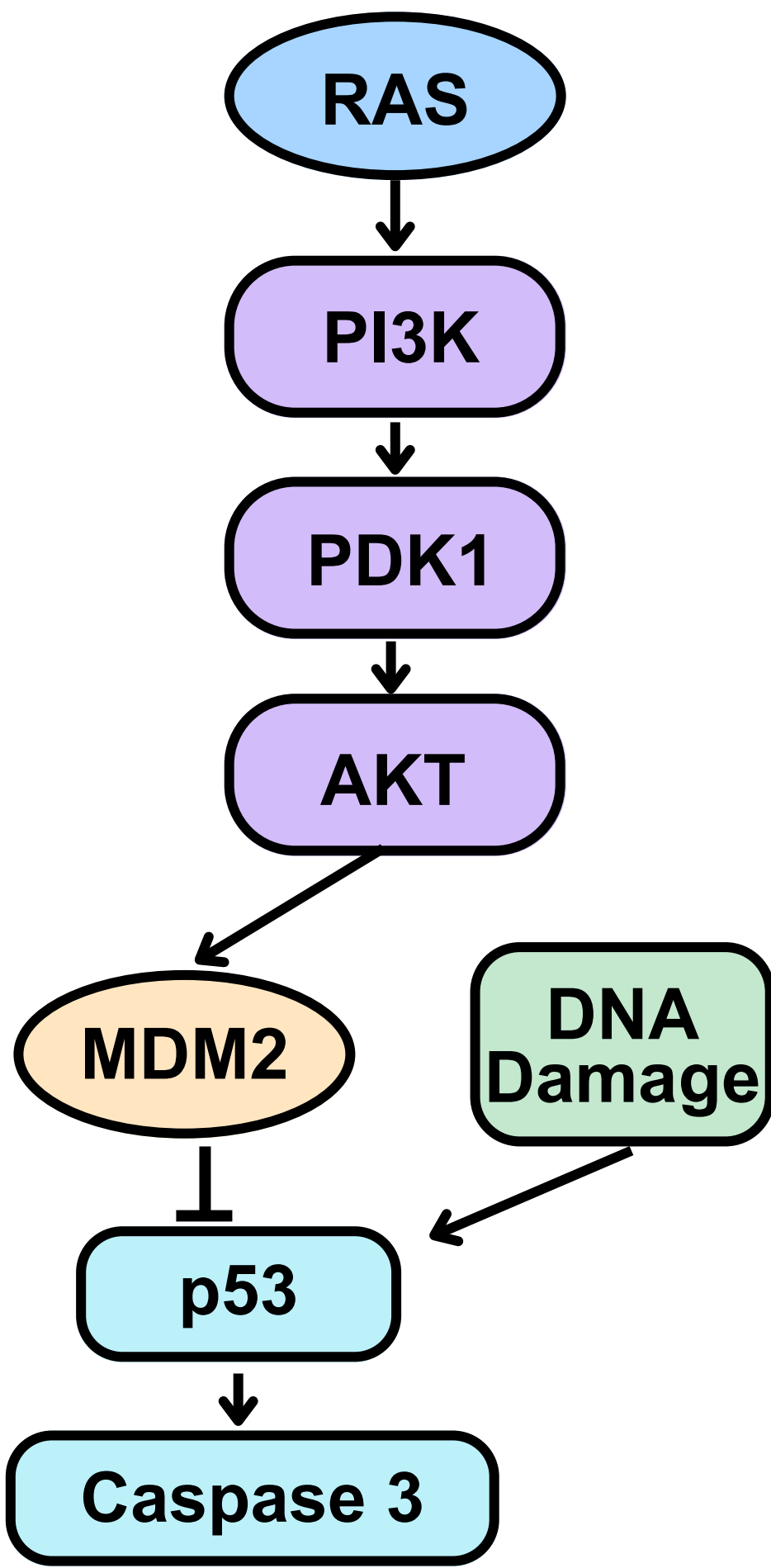
陸. 結論

一、**本研究首次發現，豬蛔蟲成蟲體蛋白具有抑制肺癌的潛力**，可透過誘導細胞凋亡及下調促癌蛋白 RAS 表現來發揮抗癌作用。經分子生物學分析，我們篩選出 10 個具潛力的抗癌序列，並預計開發為豬蛔蟲重組抗癌胜肽 (rAsACPs)，將成為首個源自寄生蟲的抗癌胜肽。

二、除直接殺傷癌細胞外，研究亦指出豬蛔蟲蛋白可能透過**調節宿主免疫反應**，發揮間接抗癌效果。若其免疫調節功能進一步獲得證實，rAsACPs 有望成為癌症免疫治療之輔助劑。

三、透過結構與功能關聯分析，未來可優化其專一性與藥效。綜合而言，rAsACPs 不僅開創寄生蟲蛋白抗癌應用的新方向，亦為針對**RAS 路徑**異常癌症（如肺癌）提供**潛力治療策略**，具發展為新型抗癌藥物之可能。

(圖八) 根據文獻探討與實驗結果推論 AsSP 可能抑癌細胞的相關路徑



柒. 主要參考資料

[1] Bahadory S, Sadraei J, Zibaei M, Pirestani M, Dalimi A. *In vitro* anti-gastrointestinal cancer activity of *Toxocara canis*-derived peptide: analyzing the expression level of factors related to cell proliferation and tumor growth. Front Pharmacol.2022; 13:878724.

[2] Cancer registry annual report, 2021 Taiwan. Ministry of Health and Welfare, Taiwan.

[3] Porter, A.G., & Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death and Differentiation, 6, 99-104.