

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	080014
參展科別	生物化學
作品名稱	探討藉由隧道奈米管(TNTs)傳遞Chromogranin-A對神經母細胞瘤細胞的影響及其相關機制
得獎獎項	二等獎

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	阮雪芬 賴廷倫
作者姓名	林琬苹

關鍵詞 隧道奈米管(TNTs)、Chromogranin-A、神經母細胞瘤

作者簡介



大家好，我是林琬葦，就讀於北一女中數理資優班二年級。在這次的研究中，我獲得了許多人的幫助，才能完成研究並站上國際科展舞台。首先要感謝阮雪芬教授提供實驗室學習機會並指導解惑。接下來要感謝學長教導實驗技巧並在我遇到困難時提供幫助。最後要感謝我的專研老師協助修正報告並提醒注意事項。

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：北區

科別：生物化學科

作品名稱：探討藉由隧道奈米管(TNTs)傳遞 Chromogranin-A 對神經母細胞瘤細胞的影響及其相關機制

關鍵詞：隧道奈米管(TNTs)、Chromogranin-A、神經母細胞瘤

編號：

(編號由國立臺灣科學教育館統一填列)

中文摘要

先前實驗室的研究觀察到在缺氧和正常氧神經母細胞瘤細胞之間隧道奈米管(Tunneling nanotubes, 簡稱 TNTs)的形成增加，並挽救缺氧癌細胞的存活，同時發現 Chromogranin-A(CHGA)這個蛋白質可能幫助了缺氧細胞生存，因此本研究比較五種神經母細胞瘤的細胞株中 CHGA 的表達量及是否存在 TNTs 中的差異，發現 CHGA 的表達量及傳遞現象在 SH-SY5Y 細胞株最明顯，其次為 SK-N-BE(2)C，而其餘三種表現量低。之後將繼續探討 CHGA 對細胞存活的影響及其分子機制。

Abstract

Previous research observed increased TNTs formation between hypoxic and normoxic neuroblastoma cells, aiding hypoxic cell survival. CHGA was identified as a potential factor in this process. This study compared CHGA expression and whether CHGA exists in TNTs in five cell lines, with SH-SY5Y showing the highest levels, followed by SK-N-BE(2)C, while the other three showed lower expression. Future studies will focus on the impact of CHGA on cell survival and its mechanisms.

壹、研究動機

多細胞生物的生存需要細胞之間的有效溝通（細胞通訊），動物細胞已演化出各種方式，以掌控訊息分子的傳遞，包括利用分泌物質和受體結合來進行信號傳遞、透過間隙連接來運輸小分子，還有釋放細胞外囊泡等膜結構來傳輸訊息。除此之外，近年研究發現一種細胞與細胞之間的微小管道，稱為隧道奈米管（Tunneling nanotubes，簡稱TNTs），這些微小管道能夠轉移包括小分子（例如離子）和大分子（DNA、RNA、蛋白質等）甚至整個細胞器（囊泡、粒線體等）都能在連接的細胞之間傳遞。這種發現引發了科學界對TNTs在生物體內的功能和應用的廣泛興趣（Hans-Hermann Gerdes, *et. al.*, 2008; Chiara Zurzolo, 2021）。

神經母細胞瘤是一種影響兒童的惡性腫瘤，其特點是快速增殖，導致細胞進入缺氧狀態。缺氧通常會導致細胞死亡，但有時缺氧環境下的部分細胞可以進一步變異成更惡性的腫瘤（Sven Pålman, *et. al.*, 2018）。因此，了解在缺氧條件下細胞間通訊的機制對於研究和治療神經母細胞瘤至關重要。實驗室的研究發現，TNTs在缺氧環境下的重要作用，一種名為Chromogranin-A（CHGA）的蛋白質藉由TNTs的傳遞，在癌細胞存活中扮演著重要角色。CHGA是神經內分泌細胞內的主要蛋白，可作神經內分泌腫瘤血清標誌物（Neuroendocrine tumor serum biomarker），如神經母細胞瘤（Neuroblastoma），在神經系統中具有多種功能（Fanny Laguerre *et. al.*, 2020）。這一發現引發了我們對CHGA在神經母細胞瘤中的進一步研究興趣。因此本研究動機為了解CHGA藉由TNTs傳遞後，對於

接受的細胞所產生的影響，以及其影響機制。

本研究將更深入地了解五種神經母細胞瘤細胞株中CHGA的表達量及傳遞現象的差異、CHGA對細胞存活的影響，以及CHGA對細胞存活影響的分子機制。希望徹底了解它在神經母細胞瘤中扮演的角色，有望為治療神經母細胞瘤提供新的思路和策略，幫助未來更有效地對抗惡性腫瘤細胞快速增值的挑戰。

貳、研究目的

- 一、比較不同細胞株中CHGA的表現量
- 二、確認CHGA在多種神經母細胞瘤細胞株的傳遞現象
- 三、探討CHGA對缺氧情況下細胞存活率的影響
- 四、探討CHGA對細胞存活影響的分子機制

參、研究設備及器材

一、實驗室一般耗材與器材

微量移液器	微量移液管	試管	烘箱
滅菌箱	搖晃器	震盪器	

二、細胞培養相關器材

細胞培養操作台	培養皿	培養瓶	細胞培養基 (DMEM) 與胎牛血清
常氧培養箱	CoCl ₂ (模擬缺氧狀態)		

三、TNTs 觀察相關器材

複式顯微鏡	螢光顯微鏡	CHGA 抗體	免疫螢光染色試劑
4% 甲醛			

四、西方墨點法相關器材

SDS-PAGE (SDS、TRIS、APS 與 TEMED)	電泳槽及相關設備	電源供應器	PVDF 膜
轉印槽冷光讀取儀	CHGA 抗體	標定蛋白質的二次抗體	

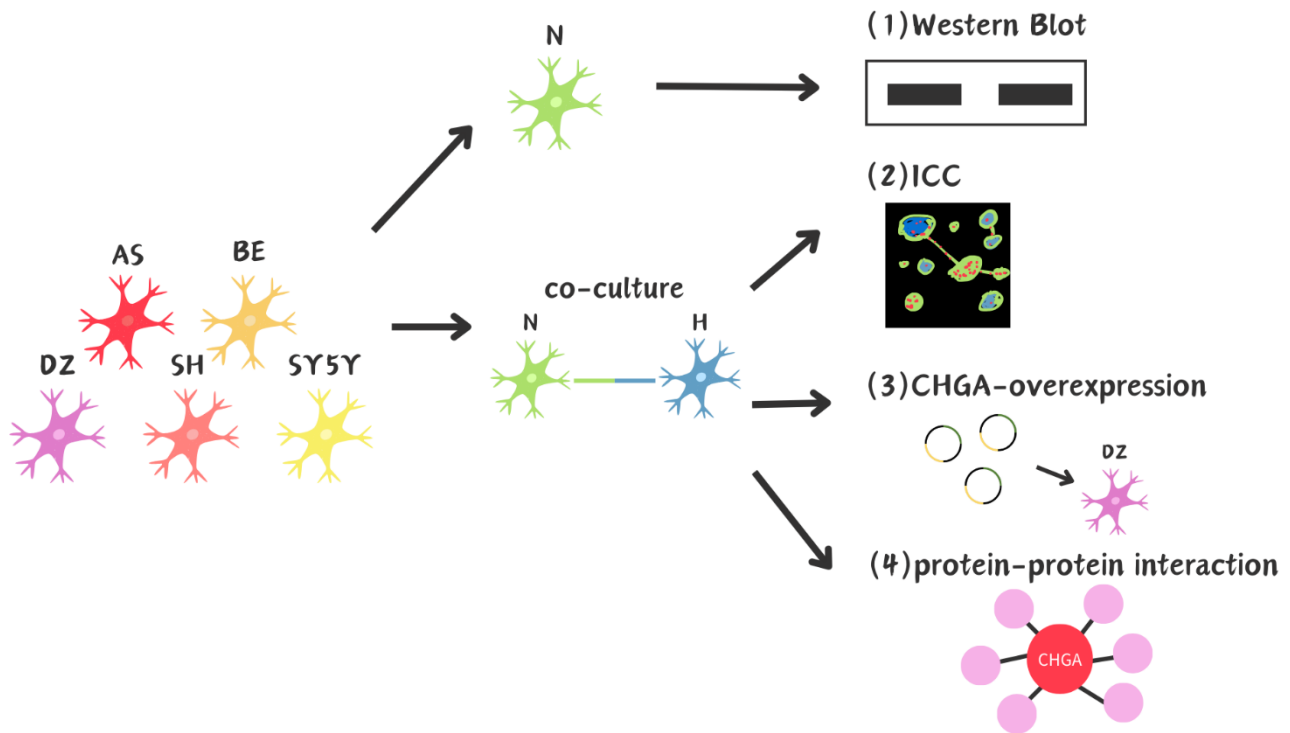
五、細胞存活率檢測相關器材

CHGA 過度表達質體 (Homo sapiens chromogranin A 轉錄變異體 1 mRNA，載體為 PcDNA3.1-C-(k)DYK，GenBank 登錄號為 NM_001275.4，)	Lipofectamine® 3000 試劑盒 (Thermo Scientific，Waltham，MA，USA)	含有抗生素 G418 的培養基 (G418 硫酸鹽，貨號：GEN418，BIOMAN SCIENTIFIC CO., LTD.)	流式細胞儀 (BD FACSara III，Biosciences，San Jose，CA，USA)
MTS 檢測試劑盒 (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)	聯免疫吸附分析儀 (ELISA，SpectraMax® ABS，MOLECULAR DEVICES)		

肆、研究過程或方法及進行步驟

流程圖

本圖由第一作者繪製



一、比較不同細胞株中CHGA的表現量

為了了解在五種神經母細胞瘤細胞株（SK-N-BE(2)C、SK-N-AS、SK-N-DZ、SK-N-SH、SH-SY5Y）中CHGA蛋白的表現量差異，將利用西方墨點法來詳細研究。首先收集這五株細胞的蛋白質樣本。接下來，透過電泳技術，在膠體中將這些蛋白質進行分離，根據其大小和電荷使其在膠體中移動。在這個過程中，蛋白質會根據其質量分布形成一個帶狀，透過轉印將這些蛋白質轉移到PVDF膜上，接下來會使用CHGA特定的抗體進行標定，這些抗體能夠與CHGA蛋白結合，準確標記出CHGA的位置。然後將利用特殊螢光標記的二次抗體來檢測這些CHGA蛋白的位置，使其呈現可見的條帶。最後，透過影像學的分析

來測量每個細胞株中CHGA蛋白的表達水平，進行定量比較。這種的分析方法有助於揭示不同的神經母細胞瘤細胞株之間CHGA蛋白表達量的差異，並可能可以提供進一步研究的方向，以深入探討這些差異對神經母細胞瘤的治療和發展可能產生的影響。

針對此實驗西方墨點法詳細步驟: 細胞樣本以 Triton X-100 (Sigma) 的0.1 M PBS中，然後使用超聲處理以進行溶解。隨後，將每個樣品中的20 µg載入10% SDS-PAGE凝膠中，並電泳轉移至0.45 µm聚偏氟乙烯膜 (PVDF)。為了阻止非特異性結合，將PVDF膜在含有3%非脂乳粉的PBST中作用1小時。對CHGA或GAPDH的一次抗體被稀釋在3%乳粉/ PBST中，然後在4°C與膜作用16小時。隨後，將膜用抗兔IgG (1:5000) 二次抗體進行1小時，這些二次抗體與HRP結合。接著使用發光影像分析儀 (ProteinSimple) 檢測抗體-蛋白質複合物。使用ImageJ定量分析其訊號強度，並相對於GAPDH的水平進行校正。

二、確認CHGA在多種神經母細胞瘤細胞株的傳遞現象

實驗室先前的研究觀察到在SK-N-BE(2)C細胞株中的CHGA透過TNTs傳遞的現象，本研究希望進一步確認該現象是否為普遍存在於神經母細胞瘤細胞之間的交互作用機制。因此本實驗會利用免疫螢光染色技術來確認CHGA在多種神經母細胞瘤細胞株的傳遞現象。

首先，培養五種不同的神經母細胞瘤細胞株，分別為SK-N-BE(2)C、SK-N-AS、SK-N-DZ、SK-N-SH以及SH-SY5Y。為了探索環境條件對CHGA在

TNTs中傳遞的影響，會將每種細胞株分為兩組進行培養：一組在常氧條件下培養，而另一組則在缺氧條件下(加入 CoCl_2 模擬缺氧狀態)培養（Vinay Kumar Tripathi *et. al.*, 2019），兩組均培養24小時。接下來，會將每個細胞株的常氧組與缺氧組細胞混合放置在同一培養皿中，並共同培養24小時。此步驟模擬細胞間的自然交互環境，並觀察在這種條件下CHGA是否能夠透過TNTs在不同細胞間傳遞。之後會利用免疫螢光染色技術，共培養後的細胞用4%的甲醛固定，然後使用針對CHGA的抗體進行染色。通過螢光顯微鏡的觀察，可以清晰地檢測到CHGA的螢光信號，並確認CHGA是否存在於連接不同細胞株細胞的TNTs中。

此實驗免疫螢光染色的詳細步驟：首先，在細胞培養的初步階段需要準備細胞生長的基底。具體操作是將蓋玻片浸泡在75%的酒精中消毒後，再利用酒精燈進行烘烤，以確保其表面的無菌狀態。之後，將處理好的蓋玻片放置於12孔的培養板中，準備接受細胞的種植，接著向每個含有蓋玻片的孔中加入1毫升的DMEM培養基以準備環境，隨後吸除。然後，加入1毫升含有 1×10^4 細胞的DMEM培養基到每個孔中，以進行細胞播種。播種後，將培養板放回培養箱中，讓細胞在 37°C 下培養24小時。培養24小時後，移除每個孔中的上清液，並用磷酸鹽緩衝液（PBS）輕柔沖洗細胞，去除未附著的細胞和培養基中的殘留物。隨後，加入含有3.7%甲醛的PBS溶液固定細胞，室溫下反應15分鐘。固定過後，再次用PBS沖洗，以去除多餘的固定劑。固定完成後，需要進行細胞膜的滲透處理，以便後續的抗體能夠進入細胞內部。這一步驟通過加入0.1%的Triton X-100於PBS中。之後，用PBS進行三次沖洗，以清除表面的滲透劑。接著，為了

防止非特異性結合，將10%的牛血清白蛋白（BSA）溶於PBS中加入至每個孔中，室溫作用1小時。封閉後，將抗CHGA一次抗體與BSA按照1:1000的比例混合，並加到每個孔中，於4℃下作用16小時，讓抗體充分與目標蛋白結合。隔天，用PBS洗滌，將二次抗體與BSA按1:5000比例混合，此抗體含有螢光染料Alexa Fluor™ 488，可激發出488 nm的螢光，室溫下加入每個孔中作用1小時。最後，將帶有細胞的蓋玻片倒扣在上面，用指甲油封固四周，防止樣品乾涸。準備好的樣品即可在螢光顯微鏡下進行觀察。

三、探討CHGA對缺氧情況下細胞存活率的影響

為了探索腫瘤細胞在缺氧條件下的恢復能力，並了解CHGA在此過程中的作用，本研究將從前兩項的研究結果中選出CHGA表現量較低的細胞株(SK-N-DZ)，並將其進行CHGA-overexpression，來比較不同CHGA表現量的細胞這可能可以揭示CHGA對於腫瘤細胞抵抗缺氧環境和後續恢復的潛在影響。首先使用了CHGA過度表達質體來誘導CHGA在SK-N-DZ細胞中的過度表達。接下來會使用Lipofectamine® 3000試劑盒將質體轉染至SK-N-BE(2)C細胞中。首先將Lipofectamine 3000試劑和P3000試劑與質體混合後，與細胞共同培養6小時。之後會更換培養基，並將細胞培養24小時。隨後，將培養基更換為含有抗生素G418的培養基，以篩選出成功轉染的細胞。當所有對照組細胞（未轉染質體的細胞）在G418培養基中全部死亡時，這表明存活下來的轉染組細胞為成功轉染質體的SK-N-DZ細胞。接下來，會通過使用西方墨點法來確認過度表達CHGA

的SK-N-DZ細胞中CHGA的表達水準，以確保CHGA在過度表達CHGA的SK-N-DZ細胞中豐富表達。在這同時，為了在SK-N-DZ細胞中追蹤CHGA，會將一段設計好對應於CHGA的序列將其克隆到含有GFP的pcDNA3.1載體中。這使得CHGA可以與GFP融合（Chromogranin A轉錄變異體1，pcDNA3.1+N-eGFP載體，基因合成，Genomics BioSci. & Tech. Co., Ltd.）。接下來一樣會使用Lipofectamine® 3000試劑盒將質體轉染至SK-N-BE(2)C細胞中。首先將Lipofectamine 3000試劑和P3000試劑與質體混合後，與細胞共同培養6小時。之後會更換培養基，並將細胞培養24小時。隨後，將培養基更換為含有抗生素G418的培養基，以篩選出成功轉染的細胞。當所有對照組細胞（未轉染質體的細胞）在G418培養基中全部死亡時，這確認了轉染組存活細胞中含有質體。為了進一步擴大培養具有較高轉染效率的SK-N-DZ細胞，將會使用流式細胞儀收集表現較高GFP信號的細胞，並對這些細胞進行培養。最後將進行細胞存活率的檢測。首先，將 2×10^6 個CHGA過度表達的SK-N-DZC細胞與只轉染質體的SK-N-DZ細胞分別種於兩個100毫米的培養皿中，並在37°C下培養24小時。隨後，將CHGA過度表達的細胞與只轉染質體的SK-N-DZ細胞在缺氧條件下用CoCl₂培養基處理，37°C培養24小時。接著，將5000個CHGA過度表達及只轉染質體的缺氧與常氧SK-N-DZ細胞分別重新接種於96孔培養板中。細胞存活率將會透過MTS檢測試劑盒進行評估。MTS/PMS緩衝液按20:1的比例混合後，向每個孔中加入20 μ L混合液。在37°C下培養1.5小時後，使用酶聯免疫吸附分析儀在490 nm波長測量吸光值。數據在0至4天的五個時間點進行測量。

四、探討CHGA對細胞存活影響的分子機制

本研究將會通過文獻探勘和生物資訊學分析，尋找可能與 CHGA 相關的關鍵基因群。這些基因群可能參與調控細胞凋亡、增殖、代謝和信號傳遞等重要的生物學過程。藉由深入的文獻檢閱和生物資訊學工具的應用，將可以鑑定可能與 CHGA 相關的基因，並更全面地理解 CHGA 在細胞存活中的作用機制。在確定潛在基因群後，將利用實驗驗證它們對於細胞存活的影響。首先，根據第一項研究，兩組細胞都接受相同的缺氧刺激，以模擬腫瘤微環境中的缺氧條件並預先螢光標記這些細胞。隨後，這兩組細胞將與對應的常氧細胞共同培養 24 小時，再使用流式細胞儀技術篩選出帶有螢光標記的細胞，接著，透過蛋白質分離和轉印技術，將這些細胞樣本的蛋白質分離並轉移到 PVDF 膜上，隨後，使用特定抗體標定這些相關的基因群的蛋白質。最後，透過螢光或酵素標記的二次抗體，檢測這些蛋白質的表達水平，並進行 CHGA 表達水平不同細胞之間的比較分析。

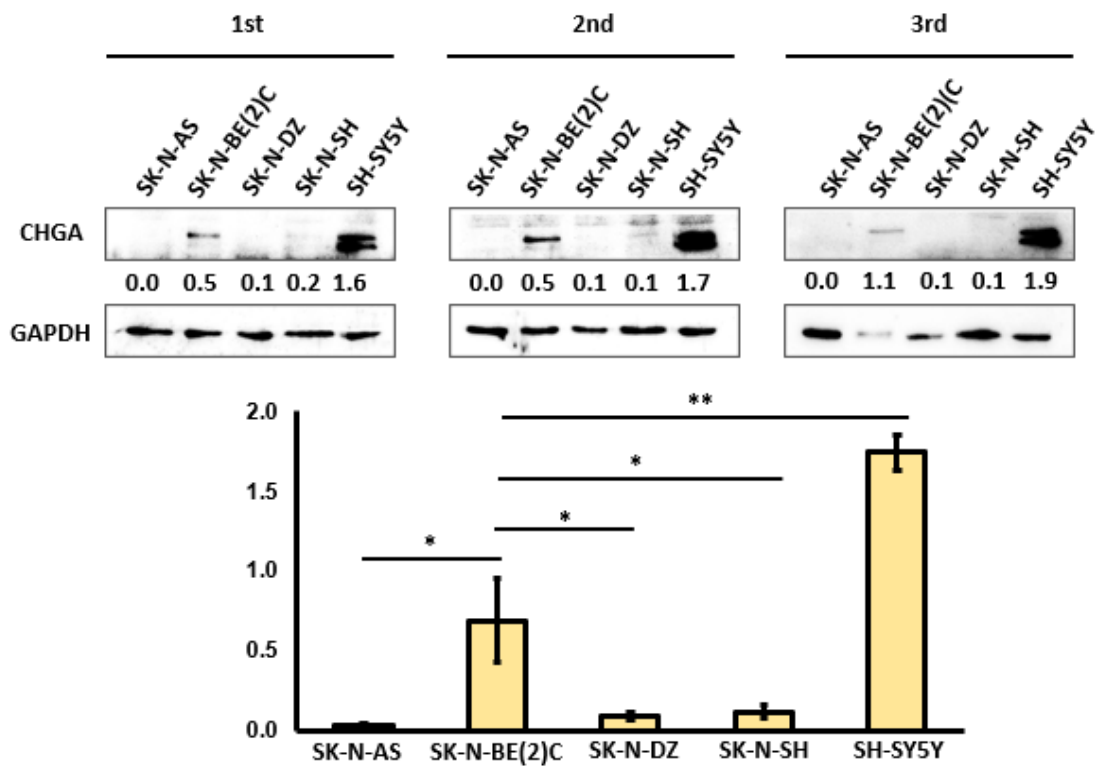
伍、實驗結果與討論

一、比較不同細胞株中CHGA的表現量

使用西方墨點法進行五種神經細胞株CHGA表現量的分析，以GAPDH的表現量當作對照組，將CHGA的表現量與GAPDH比對後發現，五種細胞株的表現量有明顯差異，實驗結果如圖一、表一，SH-SY5Y的CHGA表達量最高(1.7 ± 0.15)，SK-N-BE(2)C次之(0.7 ± 0.35)，而SK-N-AS、SK-N-DZ和SK-N-SH的表達量都較低。進行Student's t-test統計分析後發現，SH-SY5Y與SK-N-BE(2)C表現量明顯高於其他組，且彼此之間有顯著差異，其餘三組表現量很低，彼此之間無明顯差異。

表一：五種細胞株CHGA表現量比較

CHGA/GAPDH 表現量	第一次	第二次	第三次	平均值±標準差
SK-N-AS	0.0	0.0	0.0	0.0 ± 0
SK-N-BE(2)C	0.5	0.5	1.1	0.7 ± 0.35
SK-N-DZ	0.1	0.1	0.1	0.1 ± 0
SK-N-SH	0.2	0.1	0.1	0.1 ± 0.06
SH-SY5Y	1.6	1.7	1.9	1.7 ± 0.15

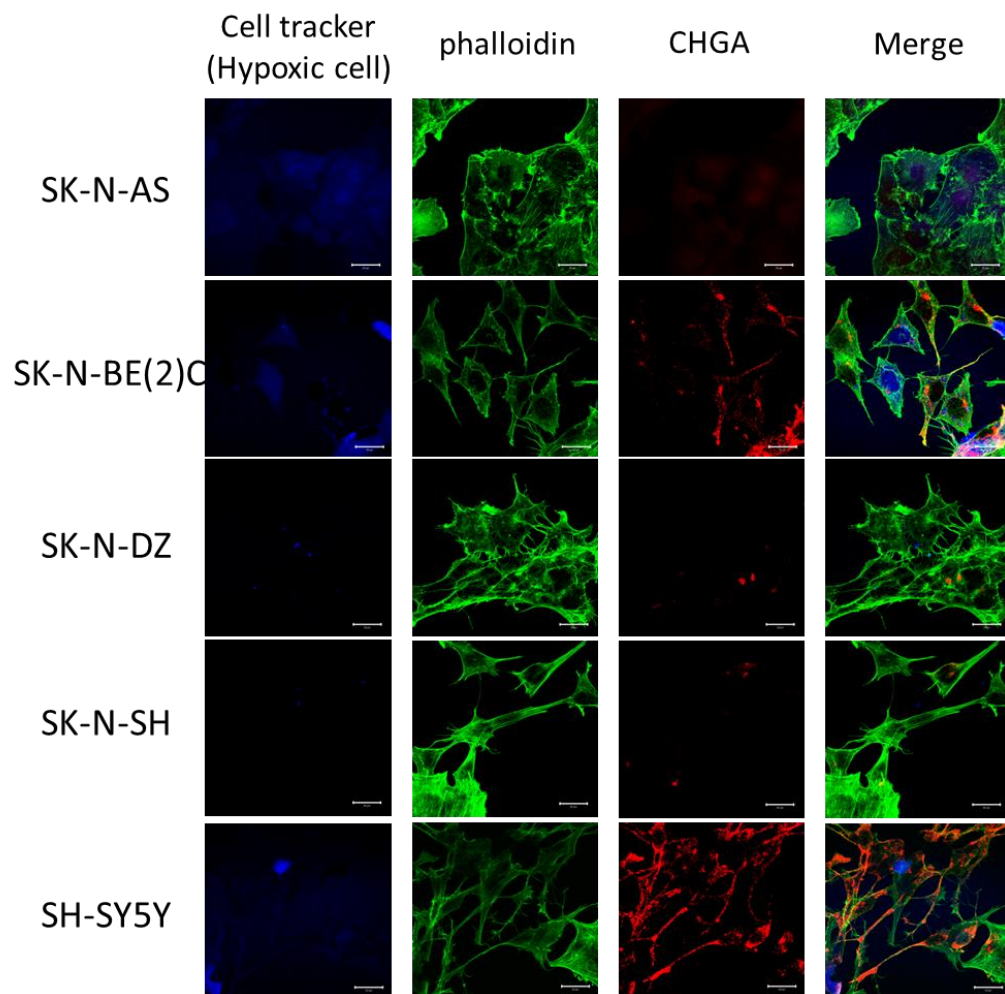


本圖由第一作者繪製

圖一、五種神經母細胞瘤細胞株 CHGA 表達量的實驗結果

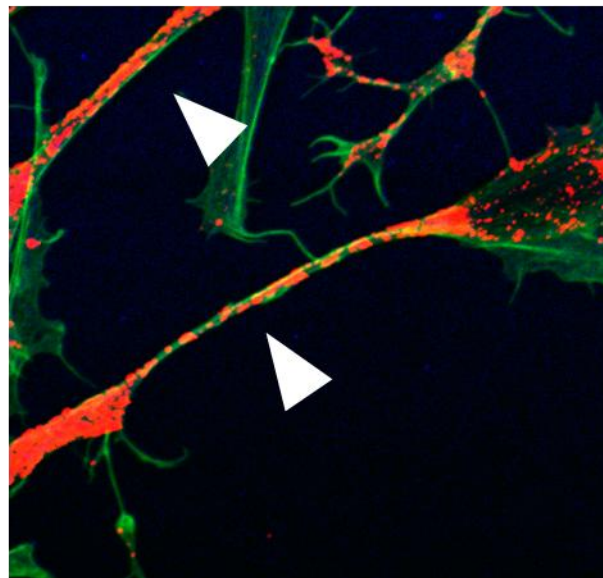
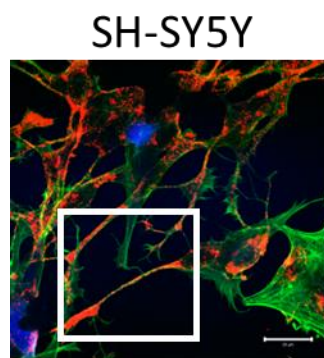
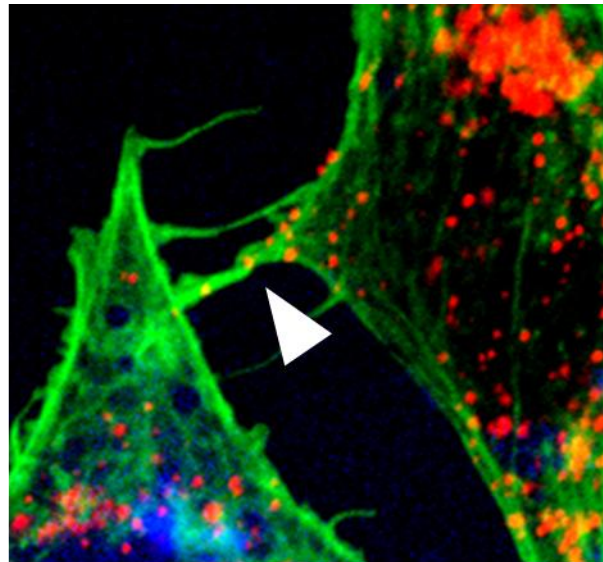
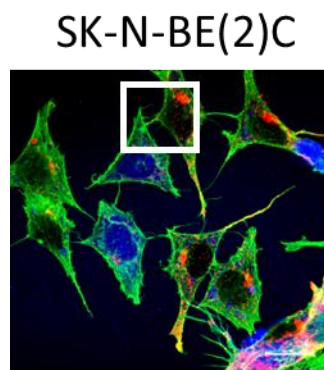
二、確認CHGA在多種神經母細胞瘤細胞株的傳遞現象

利用Cell tracker標記缺氧細胞，運用phalloidin標示actin所在位置，標示細胞所在位置(含TNTs)，利用抗體標示CHGA表現位置，之後進行疊圖分析(Merge)，實驗結果如圖二。圖三、四為圖二的merge圖及其圖中經過放大的TNTs。由圖二、三可以發現，SH-SY5Y的CHGA表達量最多，傳遞現象也最顯著，SK-N-BE(2)C的CHGA表達量及傳遞現象也都僅次於SH-SY5Y。而由圖二、四可發現其餘三組細胞SK-N-AS、SK-N-DZ和SK-N-SH雖然仍有TNTs，但CHGA表達量及傳遞現象都較不明顯。



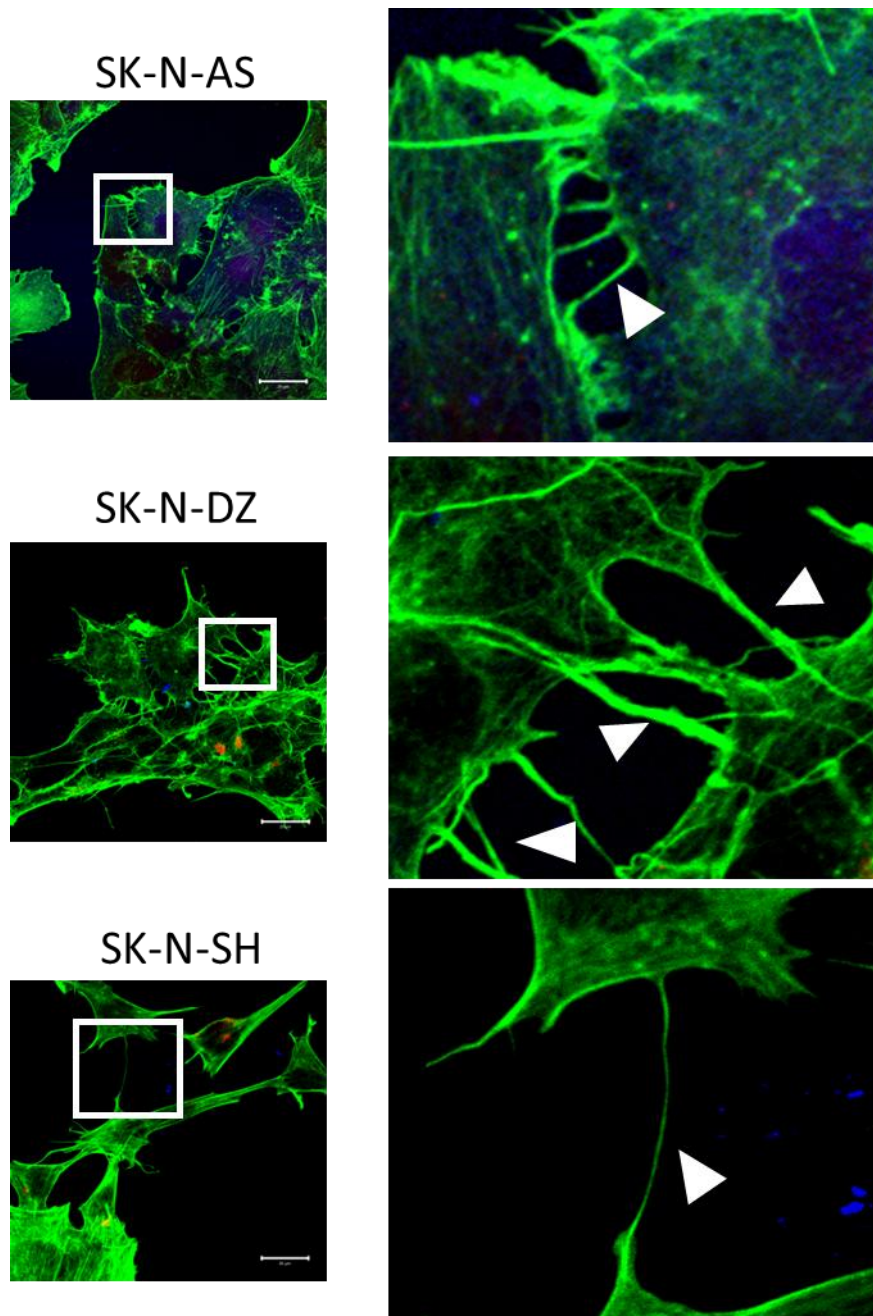
本圖由第一作者繪製

圖二、細胞在螢光顯微鏡下的實驗結果



本圖由第一作者繪製

圖三、SK-N-BE(2)C 和 SH-SY5Y 在螢光顯微鏡下的 TNTs

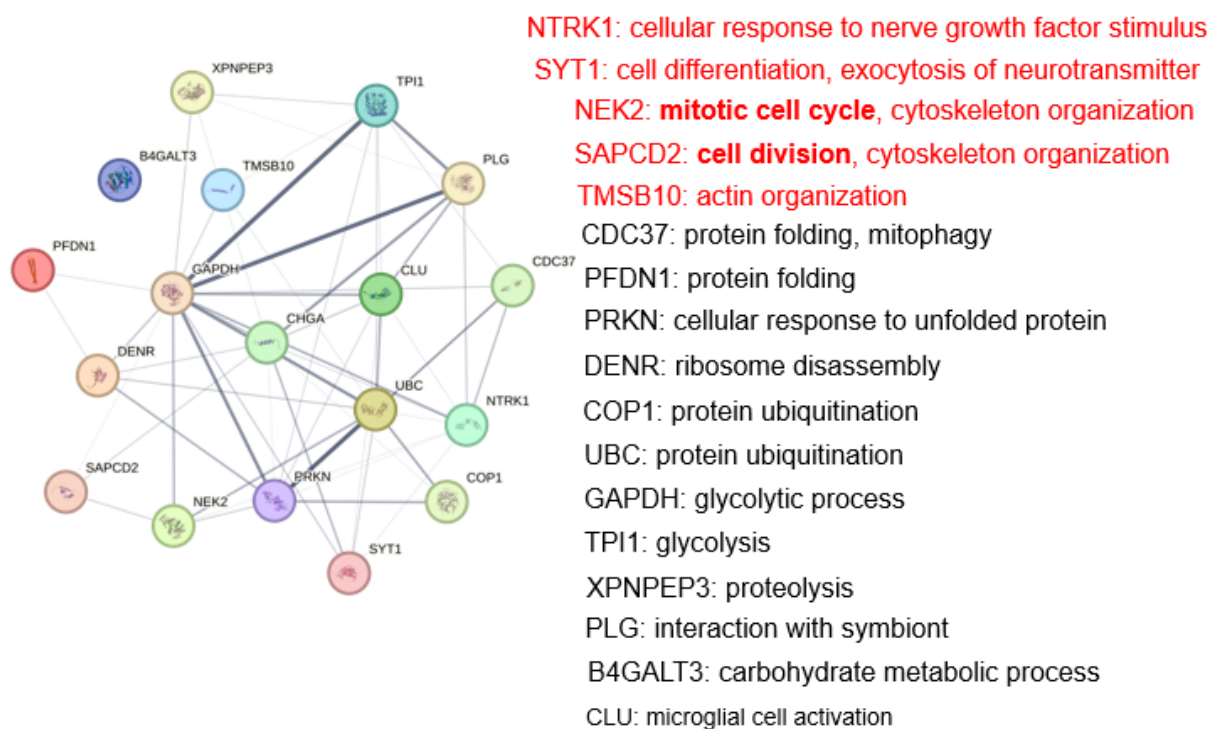


本圖由第一作者繪製

圖四、SK-N-AS、SK-N-DZ 和 SK-N-SH 在螢光顯微鏡下的 TNTs

四、探討 CHGA 對細胞存活影響的分子機制

圖五為利用 BioGrid 網站所查詢到可能與 CHGA 有蛋白質交互作用的各種蛋白質及其功能，藉由 string 網頁所繪製出蛋白質可能交互作用關聯圖。線條越粗代表證據越充足；目前 NTRK1 為與神經生長因子的反應有關；SYT1 與細胞分化有關；NEK2 與 SAPCD2 與細胞週期和分裂有關；TMSB10 與 actin 有關，之後會利用西方墨點法去確認一些候選蛋白質和 CHGA 的 expression level 是否有關聯。



本圖由第一作者繪製

圖五、預測可能跟 CHGA 產生蛋白質交互作用的蛋白質及其功能

陸、結論

一、由研究(一)、(二)的結果發現 SH-SY5Y 的 CHGA 表現量及傳遞現象最顯著，SK-N-BE(2)C 次之，而 SK-N-AS、SK-N-DZ、SK-N-SH 的表現量及傳遞現象都不明顯。

二、CHGA 表現量較高的細胞株，傳遞現象也最顯著，也即「CHGA 表現量」和「TNTs 傳遞現象」存在關聯性。

三、研究(一)、(二)挑選出 CHGA 表現量較少的細胞株之後，便可進行做 CHGA-over expression 來觀察存活率變化，也即研究目的(三)。

四、從交互蛋白質作用來看，CHGA 可能藉調控細胞週期、細胞分化或生長因子來影響細胞生存。

柒、參考資料(文獻) 及其他

- Hans-Hermann Gerdes, Negrão Carvalho (2008). Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 470-475.
- Chiara Zurzolo (2021). Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity. *Current Opinion in Cell Biology*, 71, 139-147.
- Sven Pålman, Sofie Mohlin (2018). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in neuroblastoma. *Cell Tissue Research*, 372, 269–275.
- Fanny Laguerre, Youssef Anouar, Maité Montero-Hadjadje (2020). Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway. *IUBMB Life*, 72, 524–532.
- Vinay Kumar Tripathi, Sivakumar Allur Subramaniyan, and Inho Hwang (2019). Molecular and Cellular Response of Co-cultured Cells toward Cobalt Chloride (CoCl₂)-Induced Hypoxia. *ACS Omega*, 4(25), 20882–20893.
- Chiara Corrado, Simona Fontana (2020). Hypoxia and HIF Signaling: One Axis with Divergent Effects. *Int. J. Mol. Sci*, 21(16), 5611.

【評語】 080014

本研究比較五種神經母細胞瘤的細胞株中 CHGA 的表達量及是否存在隧道奈米管(TNTs)中的差異，發現 Chromogranin-A(CHGA)這個蛋白質的表達量及傳遞現象在 SH-SY5Y 細胞株最明顯，其次為 SK-N-BE(2)C，而其餘三種表現量低。

優點：

1. Chromogranin-A(CHGA)這個蛋白質可能幫助了缺氧細胞生存，本研究探討 CHGA 對細胞存活的影响及其分子機制。
2. 本研究比較五種神經母細胞瘤的細胞株中 CHGA 的表達量及是否存在 TNTs 中的差異。結果發現 CHGA 的表達量及傳遞現象在 SH-SY5Y 細胞株最明顯，其次為 SKN-BE(2)C。

建議：

1. 觀察到不同神經母細胞瘤的細胞株中 CHGA 的表達量是否存在隧道奈米管(TNTs)中的差異，是否有對應到這些癌細胞的性狀及嚴重程度或治療方法？
2. 為何 SK-N-AS 沒表現 CHGA，細胞仍惡性？到底 CHGA 重要性何在？應在 SK-N-AS 強制表達 CHGA，比較和原來 SK-N-AS 細胞的差異性。

3. 也可做將 CHGA 表達量最高的 SH-SY5Y 敲掉或敲低其表達量看有何影響。
4. 影響除了看神經母細胞瘤的生長外，也可看轉移及抗藥性。
5. 圖五利用 BioGrid 網站查詢到可能與 CHGA 有蛋白質交互作用的各種蛋白質及其功能，可做西方點墨看是法相關蛋白表達量是否也隨 CHGA 表達量增加而增加。
6. 後續規劃如何探討 CHGA 對細胞存活的影响及其分子機制？