

# 2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

|      |                          |
|------|--------------------------|
| 作品編號 | 090020                   |
| 參展科別 | 醫學與健康科學                  |
| 作品名稱 | 吡啶類化合物抑制神經膠質母細胞瘤及癌幹細胞之潛力 |

|      |              |
|------|--------------|
| 就讀學校 | 臺北市立第一女子高級中學 |
| 指導教師 | 賴韻如<br>吳雅嵐   |
| 作者姓名 | 張維珊          |

|     |                             |
|-----|-----------------------------|
| 關鍵詞 | <u>神經膠質母細胞瘤、癌幹細胞、吡啶類化合物</u> |
|-----|-----------------------------|

## 作者簡介



我叫張維珊，目前就讀北一女中科學班高三。受母親影響，我自小對科學充滿興趣。高中進入科學班後，我有機會進入師大生科系的實驗室，學到了設計實驗、分析數據等寶貴技巧，也培養了解決問題與面對挑戰的能力。這段經歷讓我更加堅定未來投入科學研究的決心，希望能探索生命科學並回饋社會。

# 2025 年台灣國際科學展覽會 研究報告

區 別：北區

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：吲哚類化合物抑制神經膠質母細胞瘤及癌幹細胞之潛力

關 鍵 詞：神經膠質母細胞瘤、癌幹細胞、吲哚類化合物

編 號：

# 目錄

|                |     |
|----------------|-----|
| 摘要.....        | p1  |
| 前言.....        | p3  |
| 壹、文獻探討.....    | p4  |
| 貳、研究設備及器材..... | p9  |
| 參、研究方法.....    | p12 |
| 肆、研究分析與結果..... | p15 |
| 伍、討論與結論.....   | p27 |
| 陸、未來展望.....    | p32 |
| 柒、參考文獻資料.....  | p32 |

## 摘要

癌症幹細胞被認為是癌症會復發的主因，本研究著眼於探討新合成吡啶類化合物對癌細胞及癌幹細胞的效應與可能的作用機制。透過體外細胞實驗，我們使用不同神經膠質母細胞瘤細胞株，評估化合物對細胞增殖、存活和凋亡的作用。接著以類癌幹細胞球篩檢評估化合物對癌症幹細胞的影響。研究結果顯示，該化合物對神經膠質母細胞瘤及其癌幹細胞皆有一定程度的抑制效果。

同時，透過分子生物學技術，研究化合物的分子作用機制，結果顯示化合物能對細胞生長和凋亡的路徑產生影響。研究結果有望提供對候選抗癌藥物在細胞水平的效能、選擇性以及對癌幹細胞的特異性反應的深入理解。

期望本研究成果可為癌症治療藥物的開發提供重要參考，並促使對癌症治療新方法的探索。這將有助於確定更具潛力的藥物候選者，為癌症治療領域帶來更具前瞻性的解決方案。

## Abstract

Cancer stem cells are considered to be the main cause of cancer recurrence. This study focuses on exploring the effects and possible mechanisms of newly synthesized indole compounds on cancer cells and cancer stem cells. Through *in vitro* experiments, we used different glioblastoma cell lines to evaluate the effects of compounds on cell proliferation, survival, and apoptosis. Tumosphere screens were then used to assess the compound's effects on cancer stem cells. Research results show that the compound has a certain inhibitory effect on glioblastoma and its cancer stem cells.

At the same time, molecular biology techniques were used to study the molecular mechanism of action of the compounds, and the results showed that the compounds could affect cell growth and apoptosis pathways. The findings are expected to provide in-depth understanding of the potency, selectivity, and specific response of candidate anticancer drugs at the cellular level to cancer stem cells.

It is expected that the results of this study can provide important reference for the development of cancer treatment drugs and promote the exploration of new methods of cancer therapy. This will help identify more potential drug candidates and bring more forward-looking solutions to the field of cancer treatment.

# 前言

## 一、研究動機

癌症在台灣十大死因中長年位居第一(衛生福利部統計處，2023)而常見的治療方式例如：化學治療、手術治療、免疫治療等。但在療程結束並清除了腫瘤後，仍有不少的病患復發，復發的時間長短不等，有病患在治療結束後十幾年突然復發，且復發後的癌細胞甚至可以對抗化學藥物及放射線治療，也使得復發的癌症更難治療。

在經過多項研究後癌症幹細胞被認為是癌症多年後復發的主因。因此本研究將著眼於抗癌吲哚類化合物的細胞篩檢，探討這些吲哚類化合物對癌細胞及癌幹細胞的效應。透過體外實驗，使用不同癌細胞株，包含多形性神經膠質母細胞瘤( Glioblastoma Multiforme, GBM ) 的 U251-MG 及 U373-MG 細胞株，評估吲哚類化合物對細胞增殖、存活和凋亡的作用。本研究將使用由師大化學系姚清發教授實驗室所提供的吲哚類化合物，進行實驗測試具影響一般腦癌細胞生長能力的化合物，並挑選影響程度大之化合物分析其影響細胞的可能路徑和方式。

在確認化合物對癌細胞的作用後，將會進一步關注癌幹細胞的反應，以類癌幹細胞篩檢評估吲哚類化合物對癌症幹細胞的影響，以期深化對治療潛力的認識。我們也希望能透過分子生物學技術，深入研究化合物的作用機制，包括對基因表達和細胞訊號通路的調控。研究結果有望提供對候選抗癌藥物在細胞水平的效能與選擇性，並能深入理解藥物對癌幹細胞的特異性反應。

## 二、研究目的

- (一) 研究化學合成吲哚類化合物對腦癌細胞生長情形的影響
- (二) 研究化學合成吲哚類化合物對腦癌細胞生長造成影響的作用機制
- (三) 研究化學合成吲哚類化合物對腦癌幹細胞生長情形的影響

## 壹、文獻探討

### 一、多形性神經膠質母細胞瘤 ( Glioblastoma Multiforme, GBM )

多形性神經膠質母細胞瘤 ( Glioblastoma Multiforme, GBM )是成人中最常見的原發性腦瘤。目前 GBM 仍是相當難治癒的疾病，不做任何治療確診後病人的存活中位數為三個月，一般經過治療後可以延長到一到兩年。現今主要治療 GBM 的方式為手術切除並以放射線治療及化學治療輔助。但基本上是無法避免復發的，最主要的關鍵原因為手術治療並未能徹底切除 GBM 細胞，周圍細胞仍被 GBM 細胞浸潤，成為復發的源頭。也因為其侵襲性及不良預後，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 將 GBM 歸類為第四型星狀細胞瘤(grade IV astrocytoma)。



圖一、腦瘤在核磁造影下的外型(資料來源：張勝凱，2022)

### 二、神經膠質母細胞瘤的治療

由於多種原因膠質母細胞瘤的治療非常困難：

- (一) 癌細胞對經典療法抵抗力非常強
- (二) 經典療法可能導致腦傷
- (三) 腦修補恢復自己的能力有限
- (四) 許多藥物無法通過血腦障壁來對腫瘤起作用

對它的治療主要在於減輕病狀以及姑息性的治療。

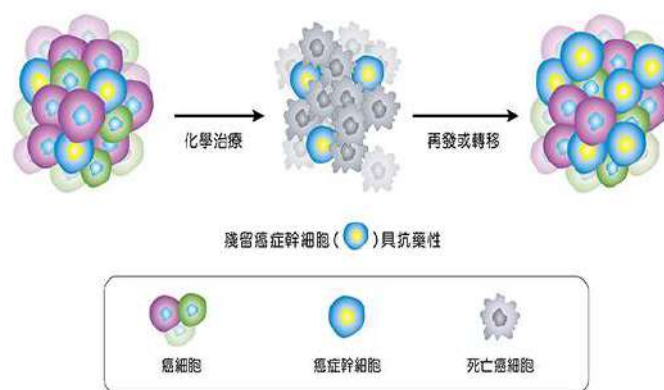
### 三、癌幹細胞的發現過程

2003 年時美國密西根大學克拉克（Michael F. Clarke）教授的研究團隊從乳癌腫瘤組織分離出一種只需要較少個數便可在實驗鼠身上形成腫瘤的癌症細胞(Al-Hajj et al.,2003)，而在 2009 年《自然醫學雜誌》報告經過 33 個癌症病患的研究後，將這些具有許多和幹細胞一樣特性的癌細胞稱為「癌幹細胞」，並且科學家發現在不同種類的癌幹細胞上也有不同的蛋白標記物，而癌幹細胞也在多項研究發表後被認為是癌症會在多年後復發的重要原因。

### 四、癌幹細胞假說

幹細胞(stem cells)是一群尚未完全分化的細胞，具有增殖及自我更新的能力。自我更新是一種不對稱的細胞分裂(asymmetric cell division)，在每次細胞分裂後產生的兩個子細胞中，一個是與本身完全相同的幹細胞，另一個則分化成為具有特定功能的體細胞。這些能力讓幹細胞能長期進行增殖，並且每次細胞分裂中，藉由保留一個跟自己完全相同的細胞，成為組織中存在最久的細胞。

癌症幹細胞(cancer stem cells)指的是特定腫瘤細胞具有與正常幹細胞一樣的能力，能不斷地增殖並產出許多子細胞。研究人員首先於 1997 年發現人類血癌細胞中一群 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的細胞可以在免疫不全的小鼠體內形成人類血癌。這個實驗證明有一群癌症細胞可能具有幹細胞的特性，具有增殖及自我更新的能力，藉以形成腫瘤。在這之後越來越多的科學家在各式惡性腫瘤中發現癌幹細胞的存在，癌幹細胞也成為近年的重要研究主題。癌幹細胞被認為是癌症無法根除的原因，因此科學家著手研究並討論以癌幹細胞作為治療癌症的機制。

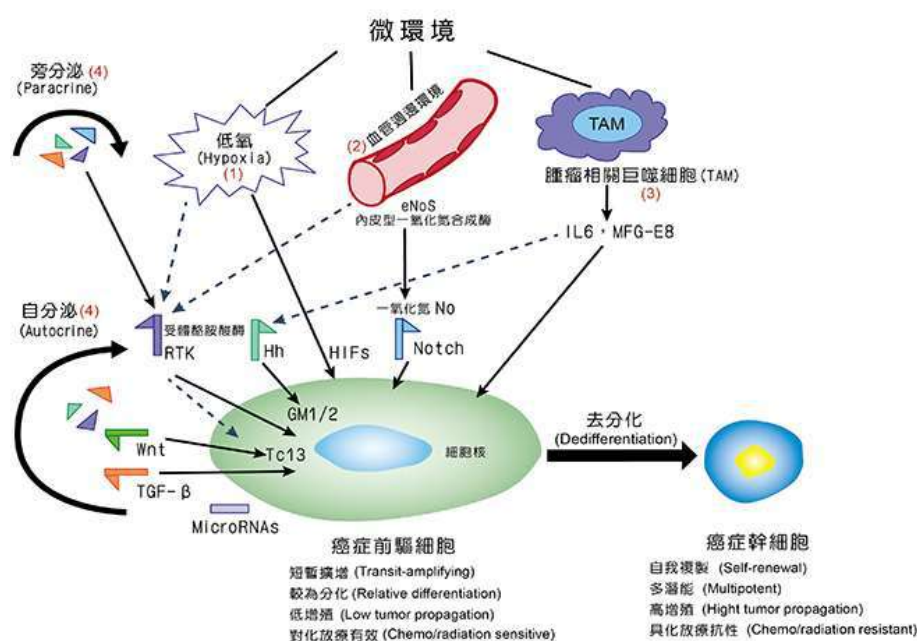


圖二、癌幹細胞在癌症復發中的機制(資料來源：張金堅，2022)

## 五、癌幹細胞的形成原因

癌幹細胞的來源目前有許多種理論：

- (一) 由普通癌細胞去分化形成
- (二) 成體幹細胞在更新過程中累積突變形成
- (三) 正常幹細胞受外界刺激突變形成
- (四) 癌細胞和幹細胞兩者細胞融合形成



圖三、癌幹細胞形成方式 (資料來源：張金堅，2022)

## 六、癌幹細胞的治療困難

(一)較強的 DNA 修補能力

1.長期處於 G0 期

癌症幹細胞長期處於休眠、不分裂的狀態，因此有更多時間進行 DNA 修復。由於化療大多是針對快速分裂的活躍細胞，這些休眠癌症幹細胞被清除的機率因此較低。同時，休眠中的癌症幹細胞新陳代謝慢，因此積累的代謝物較少，更能抵抗放射線治療的攻擊。

## 2.更嚴謹的細胞週期檢查點

癌症幹細胞會生產更多具有活性的蛋白（如 ATH-Chk2 等）提升 DNA 修復能力抵抗治療，並利用更嚴謹的細胞週期檢查點，一經發現損傷，就能快速地進行 DNA 修復。

### (二) 治療後具抗藥性

研究發現惡性腦瘤中多形性膠質母細胞瘤（glioblastoma multiforme），在接受腦部放射線治療之後，CD133 陽性的細胞比率反而上升，顯示腦瘤的幹細胞比率增加。此外，在乳癌、大腸直腸癌等癌症的研究皆發現癌症幹細胞有較多的抗凋亡分子、較高表現的藥物外排機能，顯示這些可能是癌幹細胞共同的特性。

## 七、分離出癌幹細胞的幾種方法與原理

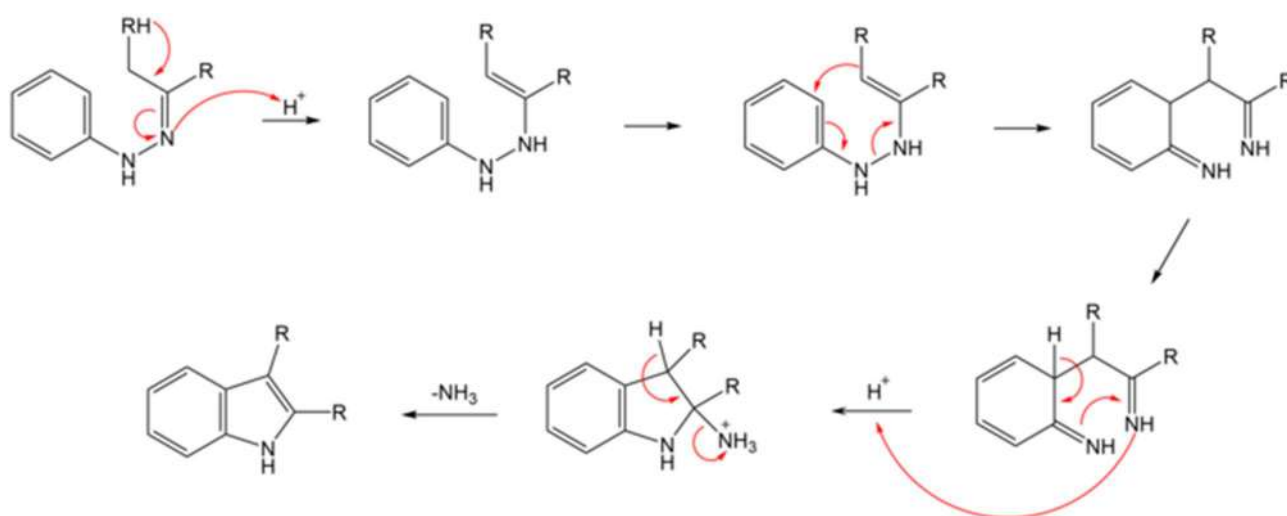
- (一) 利用流式細胞儀：將細胞經 rhodamine 123 或 Hoechst 33342 等螢光染料處理後，因幹細胞內之 MDR1、ABCG2 等 ABC 運輸蛋白的表現量遠高於一般細胞，容易將攝入的疏水性螢光染劑排出，因此成為缺乏或微弱螢光訊號的「邊緣族群（side-population）」的幹細胞。
- (二) 將固態腫瘤細胞培養在不含血清，但含有如 EGF 和 bFGF 等生長因子的培養基，再從形成的球狀細胞群落中挑選出能以單一細胞增殖成球狀群落的癌幹細胞。
- (三) 利用存在於幹細胞表面的特殊標記，例如 CD133，這個標記存在於由腦瘤、非小細胞肺癌及大腸直腸癌分離出之癌症幹細胞的細胞膜上，利用專一性抗體與這些分子結合後，再以流式細胞儀或是免疫磁珠來進行純化。

本研究所採用為第(二)種方式。

## 八、吲哚類化合物

吲哚（英語：Indole），又名靛基質，是芳香雜環有機化合物，為雙環結構，有苯環和五元含氮吡咯環。氮的孤對電子參與形成芳香環，吲哚不是鹼，性質也不同簡單的胺。吲哚在室溫是固體。吲哚廣泛分布於自然環境中，尤其是人類和畜禽糞便中，有強

烈糞臭味；但很低濃度的吡啶有像花的香味，是橘子花等許多花香的成分，煤焦油也會有吡啶。吡啶也用來製造香水。很多有機化合物都有吡啶結構，比如色胺酸及含色胺酸的蛋白質，生物鹼及色素也有吡啶結構。吡啶能親電取代，多取代於 3 位。取代吡啶是許多色胺鹼的基礎結構，比如神經傳遞素複合胺，褪黑素，迷幻藥，二甲基色胺，5-甲氧基-二甲基色胺和 LSD。其他的吡啶化合物包括植物生長素（吡啶-3-乙酸），抗炎藥物消炎痛（茚甲新）和血管舒張藥物心得樂。吡啶首次由混合靛藍和發煙硫酸製得，英名 indole 由 indigo（靛藍）和 oleum（發煙硫酸）組成。



圖四、Fischer 吡啶合成反應機構(資料來源：Fischer Indole Synthesis,2023)

## 貳、研究設備及器材

### 一、設備及器材

|                     |                       |             |
|---------------------|-----------------------|-------------|
| 顯微鏡                 | 無菌細胞操作台               | 細胞培養箱       |
| 細胞計數板               | pipette               | 微量吸管尖       |
| 電動移液管控制器            | 血清移液管                 | 培養盤         |
| 離心管                 | eppendorf             | 離心機         |
| 乾浴機                 | 制膠台                   | 跑膠台         |
| 多用途試管振盪器            | 冷光螢光影像擷取分析系統 LAS-4000 | Highcontnet |
| Multiskan FC 微量盤分析儀 | 超音波細胞破碎機              |             |

### 二、藥品與培養基

#### (一)培養液

| 名稱              | 功能        | 來源/配方       |
|-----------------|-----------|-------------|
| DMEM            | 標準的細胞培養液  | gibco，由粉末沖泡 |
| P/S 抗生素         | 避免細胞污染    | gibco       |
| FBS             | 天然培養基     | SIGMA       |
| B-27 Supplement | 無血清培養基    | Thermo      |
| F12             | 細胞培養液     |             |
| FGF             | 成纖維細胞生長因子 |             |
| EGF             | 表皮生長因子    |             |

癌細胞培養使用之 Medium 配置比例：10%DMEM：FBS：P/S 抗生素 =9：1：0.1

癌幹細胞養使用之 Medium 配置使用：DMEM/F12、B-27、FGF、EGF

#### (二)其他

| 名稱                             | 功能      | 來源/配方                                                                      |
|--------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| Trypsin（胰蛋白酶）                  | 使細胞脫離盤面 | gibco                                                                      |
| PBS（Phosphate buffered saline） | 清洗培養皿   | Nacl、KCl、Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| Pippement（微量分注器）               | 吸取液體    | 型號：2μl, 20μl, 200μl, 1000μl                                                |
| DMSO                           | 溶解藥品    | ALPHA                                                                      |

|              |  |                                              |
|--------------|--|----------------------------------------------|
| 多種化學合成吡啶類化合物 |  | 師大化學系博士後研究生提供(為粉末狀，使用DMSO 溶解後保存於-20 度 C 冰箱內) |
|--------------|--|----------------------------------------------|

## 二、MTT 試驗

| 名稱                                                                            | 來源    |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| MTT assay ( 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-di- phenyltetrazolium bromide ) | SIGMA |

## 三、西方墨點法(Western blot)實驗用品

### (一) 鑄膠

| 名稱                 | 來源      | 下膠配置用量<br>(for 兩片) | 上膠配置用量<br>(for 兩片) |
|--------------------|---------|--------------------|--------------------|
| ddH <sub>2</sub> O | 實驗室提供   | 4.9 ml             | 3.3 ml             |
| Tris               | ALPHA   | 3.8 ml (pH 8.8)    | 1.5 ml (pH 6.8)    |
| Acrylamid          | BIO-RAD | 6 ml               | 1.0 ml             |
| 10%SDS             | ALPHA   | 150 µl             | 60µl               |
| 10%APS             | VWR     | 150 µl             | 60µl               |
| TEMED              | BIO-RAD | 6 µl               | 6µl                |

### (二) 蛋白質前處理/凝膠電泳

| 名稱                                | 功能     | 來源/配方                                                                           |
|-----------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------|
| PBS ( Phosphate buffered saline ) | 清洗培養皿  | NaCl 、 KCl 、 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| BSA/BCA-A/BCA-B                   | 測量蛋白濃度 | BCA Protein Assay Kit                                                           |
| Lysis buffer                      |        | SDS 、 Tris                                                                      |
| Running buffer                    |        | SDS 、 Tris                                                                      |

### (三) 轉印 (transfer)

| 名稱              | 功能 | 來源/配方                           |
|-----------------|----|---------------------------------|
| Transfer buffer |    | Tris 、 glycine 、 SDS 、 methanol |
| PVDF membrane   |    |                                 |

(四) 一級抗體

| 名稱                | 類型     | 來源                                 |
|-------------------|--------|------------------------------------|
| Caspase 8         | Rabbit | GeneTex                            |
| Caspase 9         | Rabbit | GeneTex                            |
| ERK1/ERK2 Phospho | Rabbit | GeneTex                            |
| ERK1/ERK2         | Rabbit | GeneTex                            |
| AKT1              | Rabbit | GeneTex                            |
| AKT1 Phospho      | Rabbit | GeneTex                            |
| GAPDH             | mouse  |                                    |
| TTBS              |        | Tris、NaCl、HCL、<br>Tween、thimerosal |

(五) 冷光發片

1.ECL-I

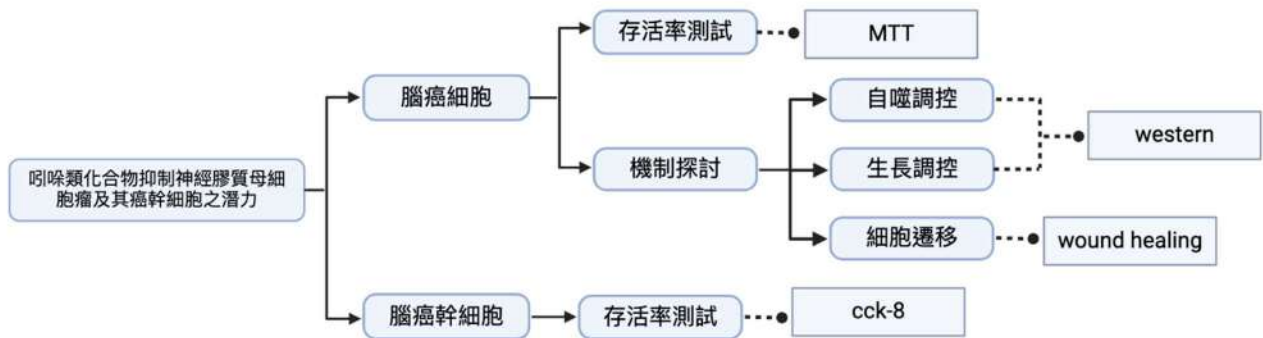
| 名稱                 | 比例/用量       | 來源    |
|--------------------|-------------|-------|
| 0.1M Tris (pH 9.0) | 1ml         | ALPHA |
| 0.8mM P-coumaric   | 20 $\mu$ l  |       |
| 100mg/ml Luminol   | 7.5 $\mu$ l | FERAK |

2.ECL-II

| 名稱                                | 比例/用量       | 來源/配方 |
|-----------------------------------|-------------|-------|
| 0.1M Tris (pH 9.0)                | 1ml         | ALPHA |
| 35% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 3.4 $\mu$ l |       |

## 參、研究方法

### 一、研究架構

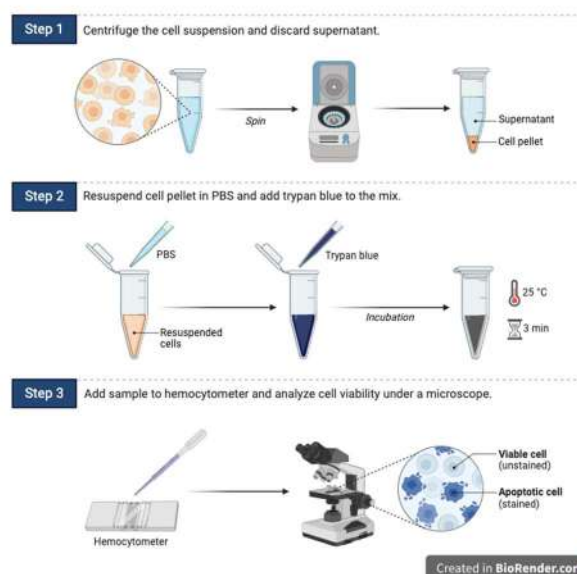


圖五、研究架構圖 (資料來源：作者自繪)

### 二、實驗方法

#### (一) 細胞繼代/實驗準備

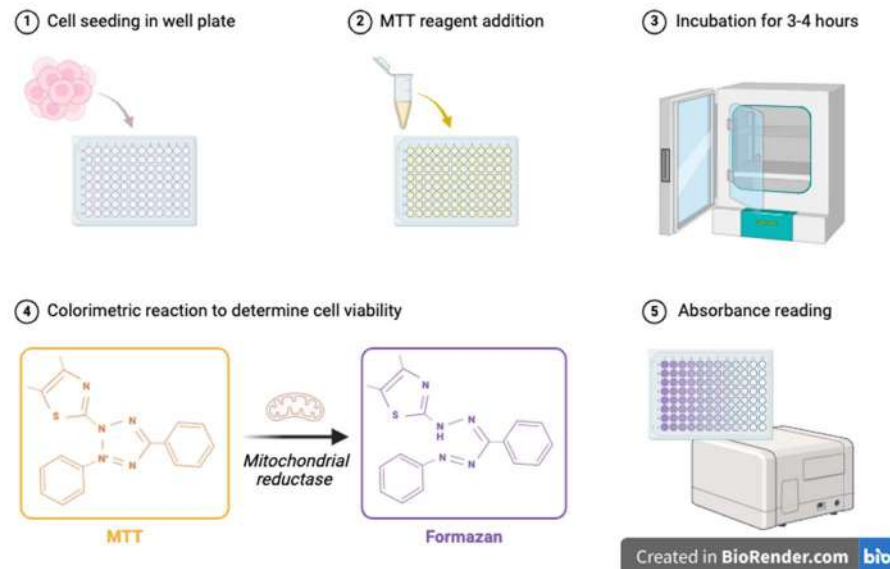
吸除原有盤中的 Medium 並在每一盤中加入 2ml PBS 清洗兩次，吸去液體後再加入 500  $\mu$ l Trypsin 並放入培養箱(37 $^{\circ}$ C) 2 分鐘。加入 3ml medium 將細胞打下後收集至 eppendorf 以 1.3\*1000 rpm 離心 5 分鐘後吸除上清液，加入 Medium 回溶細胞。取 20 $\mu$ l 細胞液加入 140 $\mu$ l Trypan Blue 並將其滴至數細胞用的玻片，計算出每毫升中的細胞數，並依此計算所需的細胞液量。將多餘的細胞加回 10 公分盤，或使用凍管將其凍至液態氮。



圖六、細胞培養示意圖。(資料來源: Created with BioRender.com)

## (二) MTT 試驗

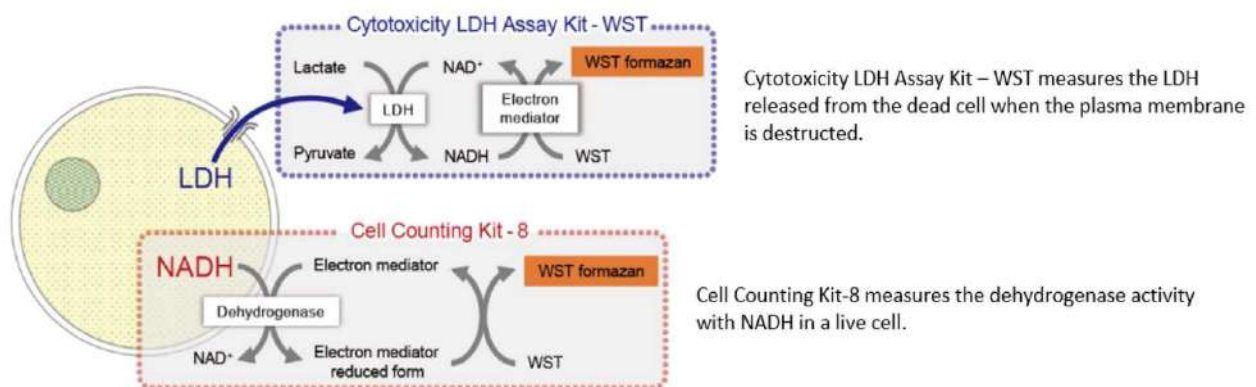
將 MTT 和 Medium 以 1:9 配置所需溶液量，吸除原有培養液後加入，等待 4 小時後，吸出加入的測試液，並加入 DMSO 溶解紫色晶體。將 96 孔盤避光至分光光度儀以 570nm 波長測量吸光度，並記錄結果。



圖七、MTT 試驗示意圖。(資料來源: Created with BioRender.com)

## (三) CCK-8 試驗

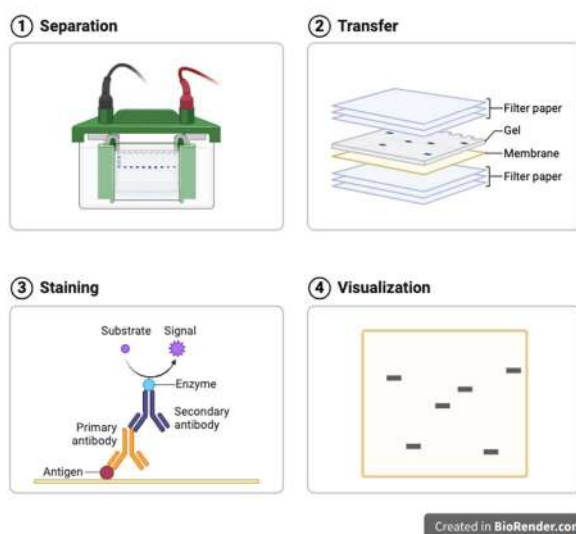
加入原有培養液體積 1/10 之 CCK-8 檢測液，等待 1-2 小時後，將 96 孔盤避光至分光光度儀以 450nm 波長測量吸光度，並記錄結果。



圖八、CCK-8 作用原理。(資料來源: 如何使用 CCK-8 檢測細胞增生與毒性，2019)

#### (四) 西方墨點法

將 U251 及 U373 細胞從培養皿打下後，以  $4 \times 10^5$  顆細胞種進 6 公分盤之中，等待一日讓細胞貼盤後，隔天加入待測化合物作用三日後，使用 lysis buffer (1% SDS, 60 mM Tris-HCl pH 6.8) 將細胞打破，將細胞液收集進 1.7 ml Eppendorf，並以 95°C 加熱 3 分鐘，並且用超音波震盪 10 秒三次，用來破壞核膜跟細胞膜，萃取出蛋白質。使用 BCA protein assay kit (#23225, Thermo Scientific Pierce) 依據廠商步驟測定蛋白質濃度後，取 50  $\mu\text{g}$  與 4x loading buffer (400 mM  $\beta$  Mercaptoethanol, 240 mM Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 0.002% bromophenol blue, 40% glycerol) 以 3:1 體積混和後，用 95°C 加熱 3 分鐘，用 12% SDS-PAGE 電泳膠跑電泳，固定電壓為 140V，跑膠 70 分鐘。把膠取下後，用半乾轉漬之轉漬方式，使用 15V、60 分鐘的條件將蛋白質轉至聚偏氟乙烯膜(PVDF membrane)。接著使用 5% 脫脂牛奶 blocking 1 小時之後，使用 1xTTBS 清洗三次，再加入含有一級抗體之 1% 脫脂奶粉置於 4°C 中搖晃 16-20 小時(overnight)。隔天回收一級抗體，以 1xTTBS 清洗三次，再加入含有 HRP-conjugated 之二級抗體的 1% 脫脂牛奶在室溫以 30 rpm 搖晃作用 2 小時，移除二級抗體，以 1xTTBS 清洗三次。最後使用 ECL substrate (ECLI: 0.136 mM  $p$ -Coumaric Acid, 75  $\mu\text{g}$  /mL luminal, 0.1 M Tris-HCl pH9.0; ECL II: 2.4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1M Tris-HCl pH9.0)，讓二級抗體發出冷光訊號，利用冷光影像分析系統 (Luminescent Image Analyzer, LAS4000, GE Healthcare) 拍攝結果。



圖九、西方墨點實驗概念圖。(資料來源: Created with BioRender.com)

## 肆、研究分析與結果

### 一、研究化學合成吡啶類化合物對腦癌細胞生長情形的影響

由於腦癌幹細胞的培養花費及難度較高，我們先測試 9 種化合物對兩種常見腦癌細胞的抑制效果，從中選取效果明顯的 1-2 兩組化合物及細胞組合，再進行腦癌幹細胞的測試。

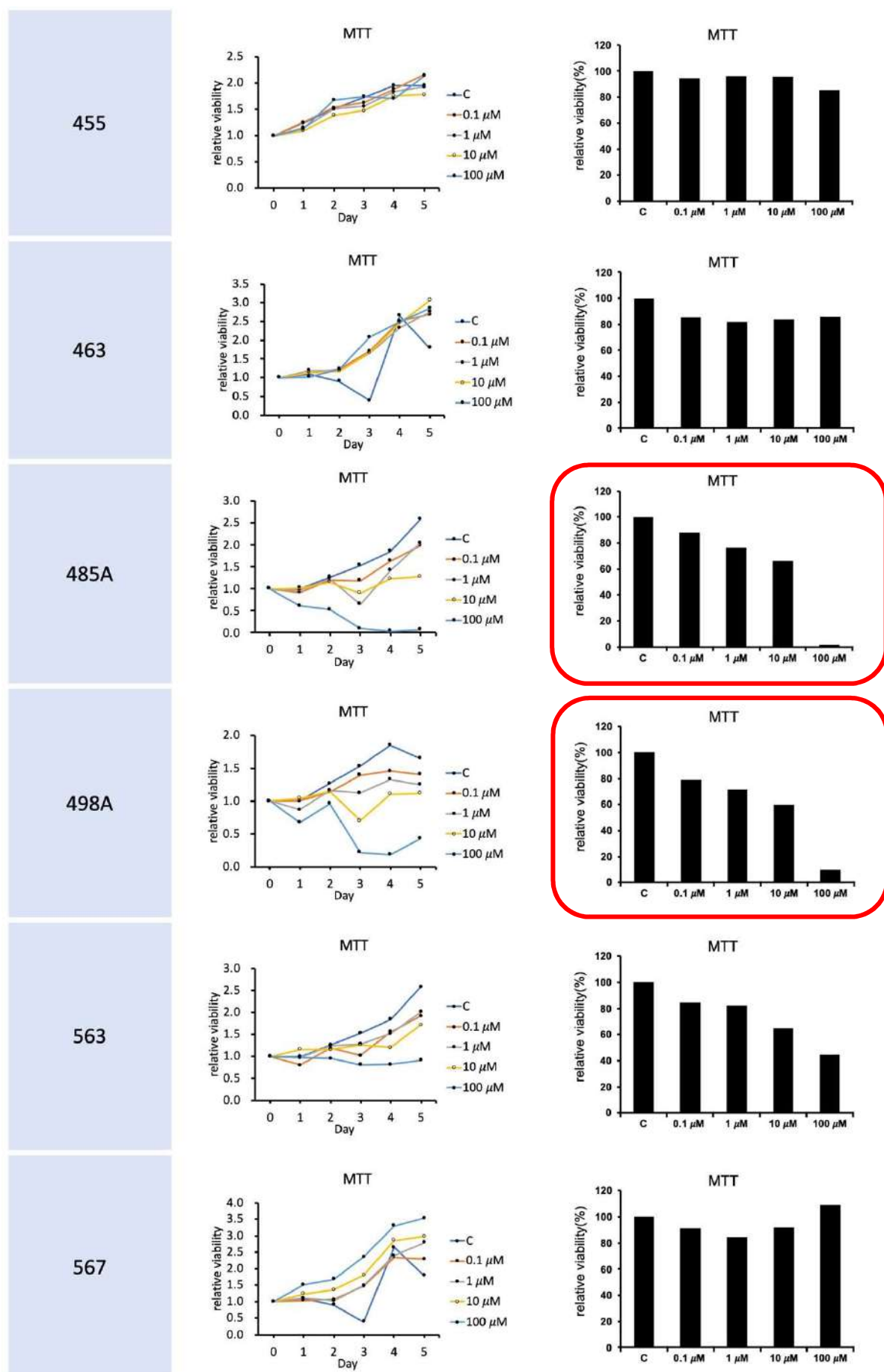
#### (一) 研究不同吡啶類化合物對 U373 細胞的生長影響

##### 1. 整體篩選結果

化合物使用 DMSO 溶解後加入 Medium 稀釋。實驗分為五組，分別為四種濃度(0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ )的化合物及控制組(DMSO 100 $\mu\text{M}$ )，以 MTT 試驗測量吸光度，來計算細胞存活率。

表一、不同吡啶類化合物對 U373 細胞的生長影響(資料來源：作者自繪)

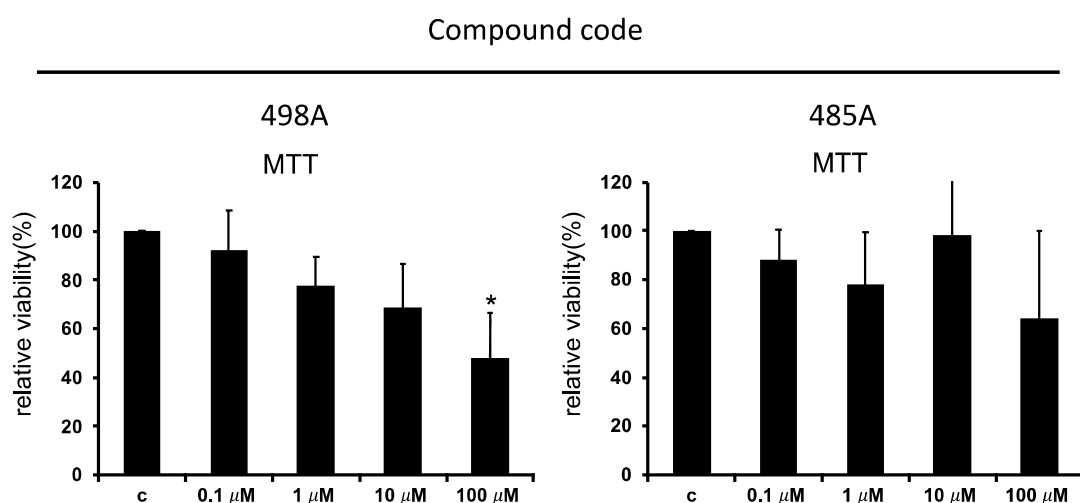
| Compound code | Relative viability | day4       |
|---------------|--------------------|------------|
| 411           | <p>MTT</p>         | <p>MTT</p> |
| 435           | <p>MTT</p>         | <p>MTT</p> |
| 436           | <p>MTT</p>         | <p>MTT</p> |



從表一可以觀察到，化合物 498A 及 485A 的抑制效果明顯較其他化合物顯

著，在濃度為 100  $\mu\text{M}$  時存活率接近乎於 0，而化合物 563 雖無以上兩藥物明顯但也有顯現出抑制效果，在濃度 100  $\mu\text{M}$  時存活率低於 50。表中右欄 MTT 結果圖是取用第四天，但在實驗結果中三天就已見到效果，故後續實驗皆改為測試三日，並使用第三天的結果繪製長條圖。而最終我們決定使用效果最好的化合物 498A 及化合物 485A 進行進一步的測試。

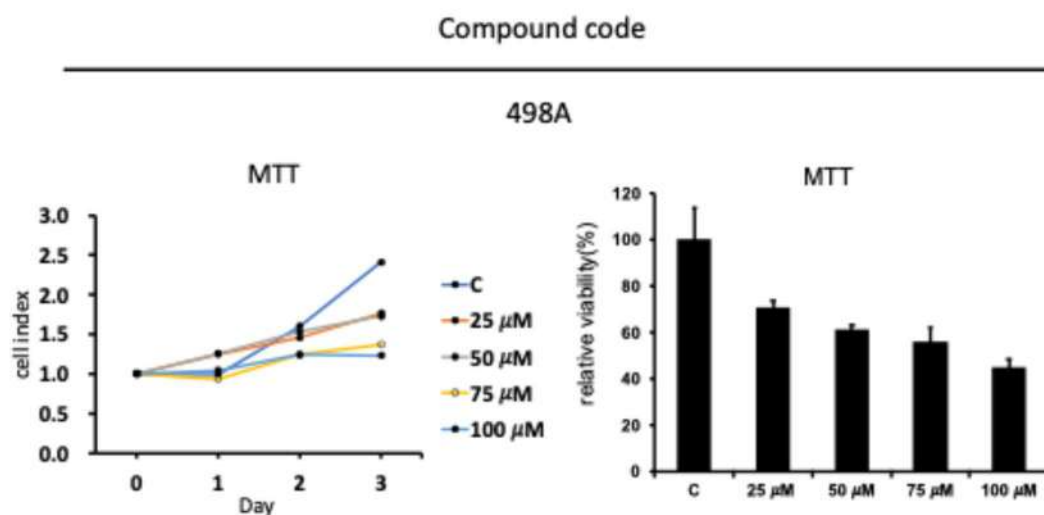
## 2. 化合物 498A 及 485A 對 U373 細胞的抑制效果



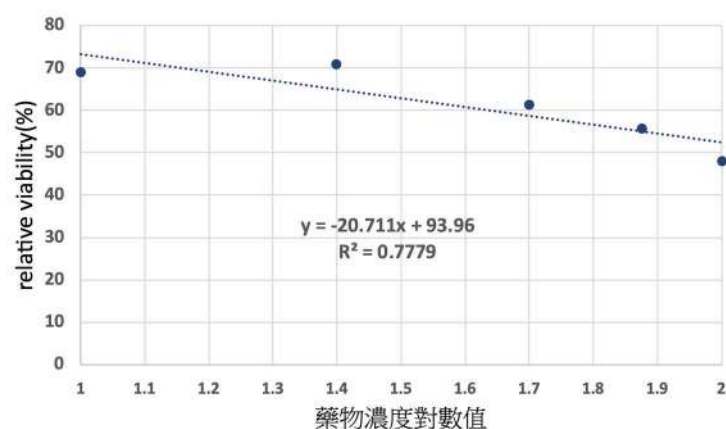
圖十、化合物 498A 及藥物 485A 對 U373 的進一步測試(資料來源：作者自繪)

由圖十可觀察到，在後續多次測試後，化合物 485A 的效果相較於初次測試減弱許多，濃度 100  $\mu\text{M}$  時存活率仍高於 50，推測可能是由於 485A 保存一段時間後可能發生結構改變或產生分解，造成效果減弱。由於 485A 對細胞 U373 的抑制效果不佳，後續實驗將不使用此組合測試。而 498A 效果雖也減弱，但在濃度 100  $\mu\text{M}$  時存活率有低於 50，故我們改變濃度為 25、50、75、100  $\mu\text{M}$  繼續測試，取得更多的數據點以計算  $\text{IC}_{50}$ 。

### 3. 較高濃度化合物 498A 對 U373 細胞的抑制效果



圖十一、較高濃度化合物 498A 對 U373 的抑制效果(資料來源：作者自繪)



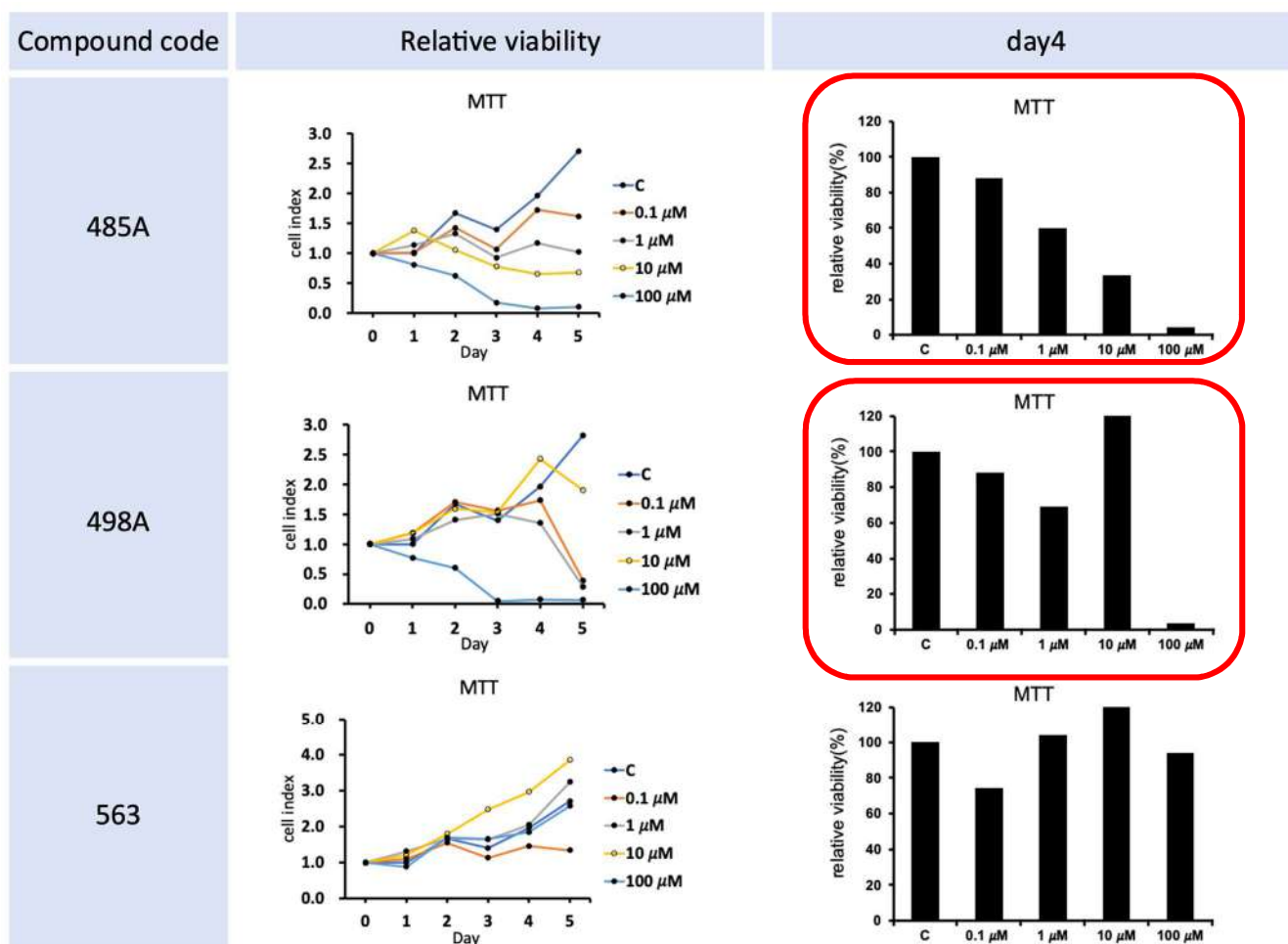
圖十二、U373 細胞存活率對化合物 498A 濃度的近似直線 (資料來源：作者自繪)

將上述所有試驗結果平均後選取 10、25、50、75、100  $\mu\text{M}$  之數據點以最小平方方法求得近似曲線，計算後發現  $\text{IC}_{50}$  為 132.6  $\mu\text{M}$ ，大於 100  $\mu\text{M}$ ，表示 498A 對細胞 U373 的效果不佳，後續實驗將不使用此組合測試。

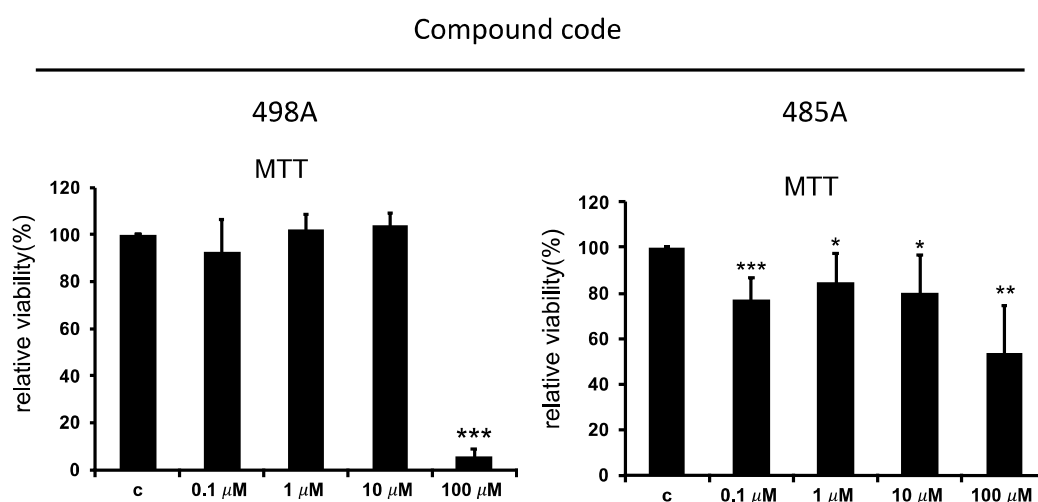
## (二) 研究不同吡喹酮類化合物對 U251 細胞的生長影響

化合物同樣使用 DMSO 溶解後加入 Medium 稀釋。實驗分為五組，分別為四種濃度 (0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ ) 及控制組(DMSO 100 $\mu\text{M}$ )，以 MTT 試驗測量吸光度，來計算細胞存活率。由於前述 U373 的初步篩選實驗已發現 498A、485A 及 563 有較顯著效果，故此實驗將只使用此三藥物進行測試。

表二、不同吡喹酮類化合物對 U251 細胞的生長影響(資料來源：作者自繪)

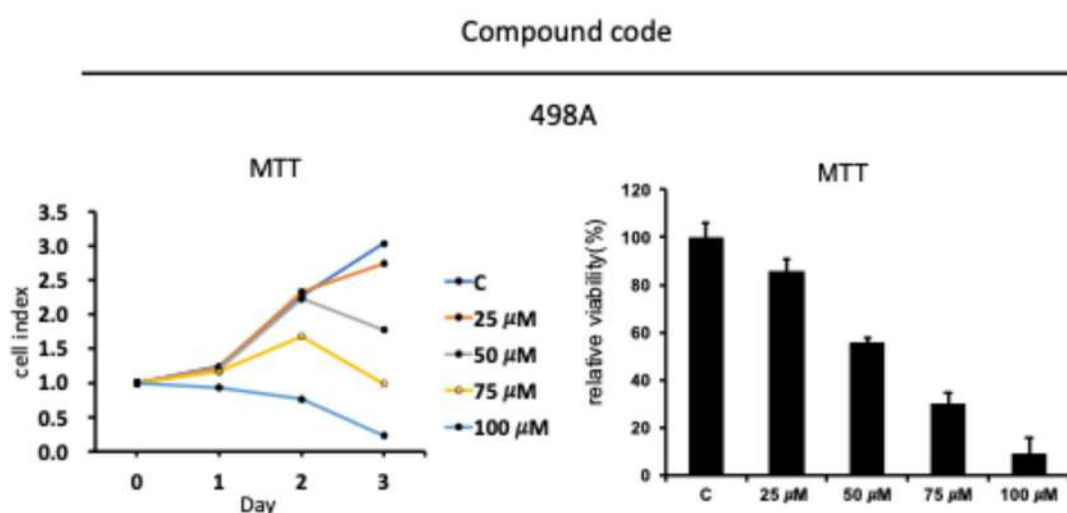


從表二中可以觀察到，498A 及 485A 的抑制效果明顯較 563 顯著，在濃度 100  $\mu\text{M}$  時存活率接近於 0，而 563 在 100  $\mu\text{M}$  時存活率仍大於 50，可知其效果不佳，將不繼續進行測試。和細胞 U373 相同，表中右欄 MTT 結果圖是取用第四天，但在實驗第三天就已見到效果，故後續實驗亦皆改為測試三日，並使用第三天的結果繪製長條圖。最終我們決定使用效果最好的 498A 及 485A 進行進一步的測試。

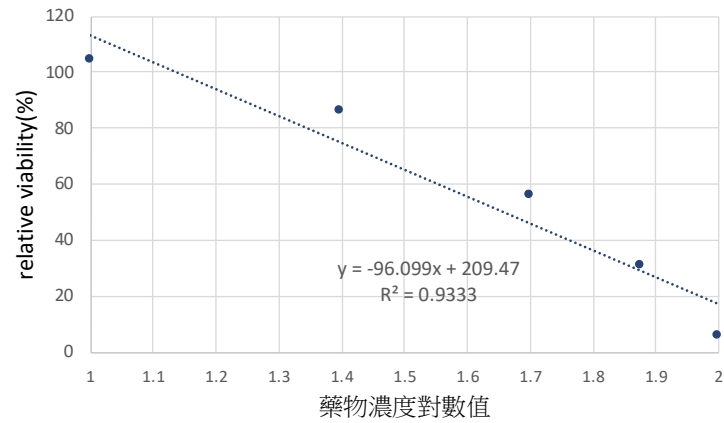


圖十三、化合物 498A 及藥物 485A 對 U251 的進一步測試(資料來源：作者自繪)

和細胞 U373 之測試相同，在後續多次測試後 485A 的效果相較於初次測試減弱許多，濃度 100  $\mu$ M 時存活率仍高於 50，推測可能是由於藥物保存一段時間後結構改變或產生分解，造成效果減弱。由於 485A 對細胞 U373 的抑制效果不佳，後續實驗將不使用此組合測試。而 498A 效果則未減弱，在濃度 100  $\mu$ M 時存活率仍接近於 0，故我們改變濃度為 25、50、75、100  $\mu$ M 繼續測試，取得更多的數據點以計算 IC50。



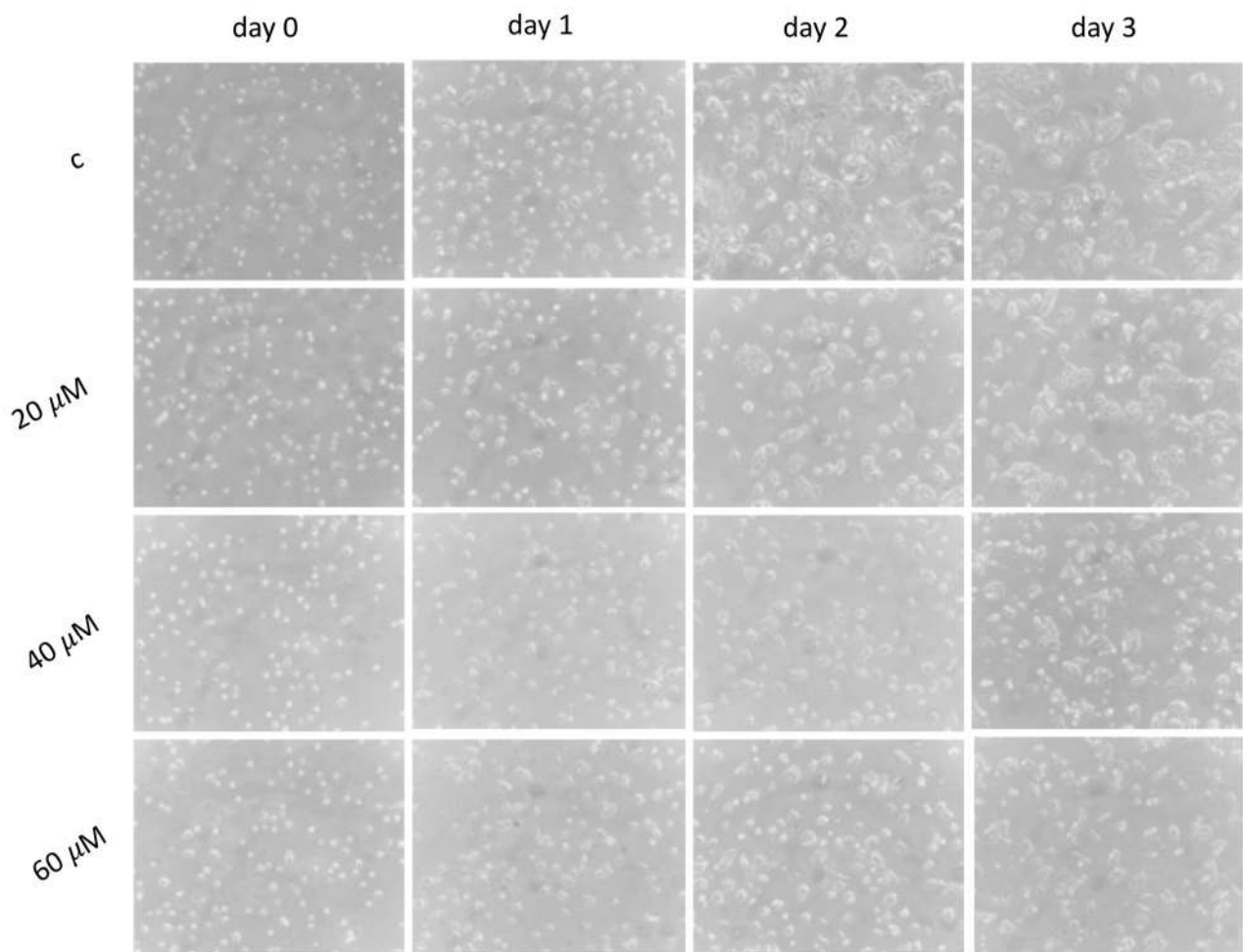
圖十四、化合物 498A 對 U251 改變濃度後的測試(資料來源：作者自繪)



圖十五、U251 細胞存活率對化合物 498A 濃度的近似直線 (資料來源：作者自繪)

將上述所有試驗結果平均後選取 10、25、50、75、100  $\mu\text{M}$  之數據點以最小平方方法求得近似直線，計算後發現  $\text{IC}_{50}$  為 45.6  $\mu\text{M}$ ，表示 498A 對細胞 U251 有抑制效果，且比對所有實驗組合後，發現其效果最顯著，故後續實驗皆使用此組合進行。

### (三) 不同濃度下吡啶類化合物 498A 對 U251 細胞生長及外觀影響



圖十六、不同濃度下吡啶類化合物 498A 對 U251 細胞生長及外觀影響

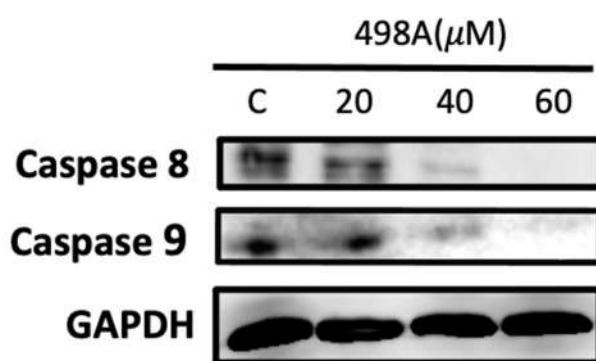
(資料來源：作者拍攝)

由圖十六可以觀察到加入化合物 2 日後細胞型態出現明顯不同，相較於控制組細胞，經藥物作用的細胞較接近圓球形而非與培養盤緊密貼合呈現常見型態的紡錘狀，且濃度 40  $\mu\text{M}$  以上組別的細胞數皆少於控制組組別的一半，濃度越高剩餘細胞數越少，證實 498A 確實對細胞 U251 具抑制效果，能使其活性降低而較難附著於盤面，接著死亡脫離盤面，漂浮於培養液中。

## 二、以西方墨點法分析化學合成吡啶類化合物對腦癌細胞生長造成影響的作用機制

化合物使用 DMSO 溶解後加入 Medium 稀釋。實驗分為四組，分別為三種濃度(20、40( IC<sub>50</sub>)、60  $\mu\text{M}$ )的化合物及控制組(DMSO 100 $\mu\text{M}$ )。

### (一)化合物 498A 對細胞 U251 凋亡的調控

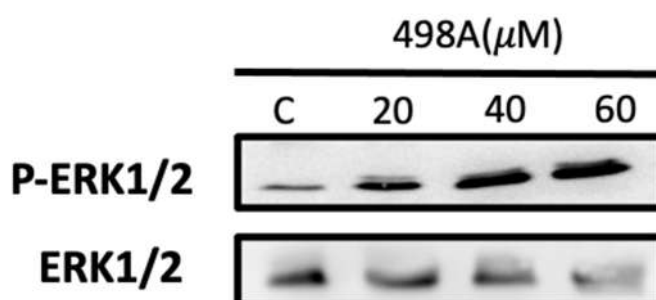


圖十七、不同濃度 498A 作用下 U251 細胞蛋白表現(Caspase 8 及 Caspase 9)

(資料來源：作者拍攝)

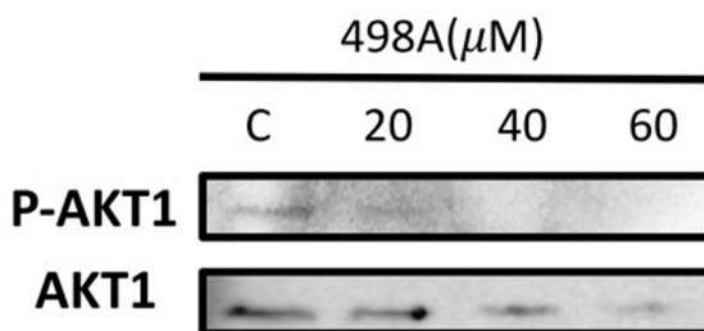
Caspase8 及 Caspase9 是兩種細胞凋亡路徑上傳訊的胱天蛋白酶，Caspase8 涉及細胞外源性細胞凋亡，而 Caspase9 涉及細胞內源性細胞凋亡，兩者皆透過剪切來活化進而將訊號傳至下游分子。由圖十七可以觀察到未剪切的 Caspase8 蛋白表現量隨著化合物濃度上升而漸少，表示其活化了較多的 caspase8，即增加細胞外源性細胞凋亡比率。同時，我們也可以觀察到未剪切的 Caspase9 蛋白表現量隨著化合物濃度上升而漸少，表示其活化了較多的 caspase9，即增加細胞內源性細胞凋亡比率。由上述結果我們發現化合物 498A 可以同時促進細胞 U251 的內源及外源性凋亡。

## (二)化合物 498A 對細胞 U251 生長的調控



圖十八、不同濃度 498A 作用下 U251 細胞蛋白表現(ERK)(資料來源：作者拍攝)

ERK(細胞外信號調節激酶)是一種細胞生長路徑上傳訊的蛋白激酶，其透過磷酸化來活化繼而將訊號傳至下游分子，在一般情況下其活化不僅能促進細胞生長，同時也能透過促進抗凋亡基因的表達來抑制凋亡。然而，我們發現有文獻 (Sugiura et al., 2021)指出，當細胞遭受過度的壓力，如氧化壓力、化療藥物等時，ERK 將會過度活化，而增加促凋亡分子的表達或與其他促凋亡路徑交互作用，進而增加凋亡比率。由圖十八可以觀察到磷酸化的 ERK 蛋白表現量隨著化合物濃度上升而增加，表示 ERK 的活化被增加了，由於實驗在藥物壓力下進行，因此我們可以推測 ERK 的過度活化將促進細胞的凋亡。

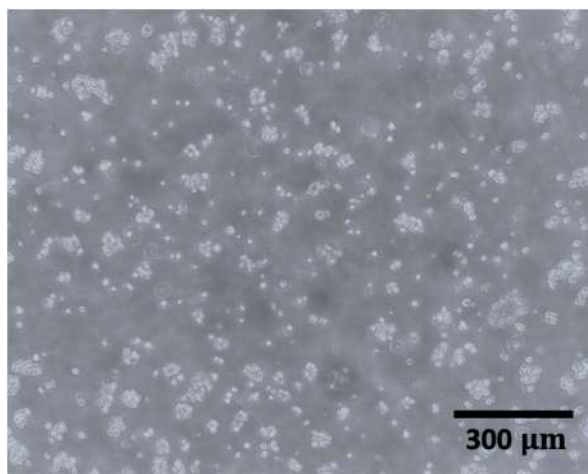


圖十九、不同濃度 498A 作用下 U251 細胞蛋白表現(AKT)(資料來源：作者拍攝)

與 ERK 相似，AKT 是一種細胞生長路徑上傳訊的蛋白激酶，其透過磷酸化來活化繼而將訊號傳至下游分子，其活化不僅能促進細胞生長，同時也能間接阻止細胞外源性及內源性的凋亡，許多癌細胞也因為 AKT 信號過度活躍而能夠逃避凋亡，持續增殖。由圖十九可以觀察到磷酸化的 AKT 蛋白表現量隨著化合物濃度上升而漸少，表示 AKT 的活化被抑制了，即化合物 498A 能減少細胞 U251 的抑制凋亡及使細胞生長的能力。

### 三、研究化學合成吡啶類化合物對腦癌幹細胞生長情形的影響

#### (一)癌幹細胞的培養

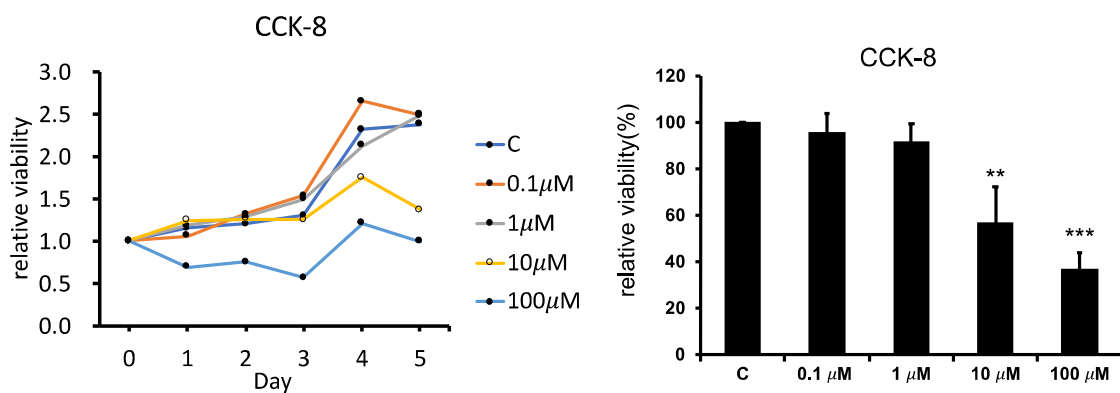


圖二十、癌幹細胞外型(資料來源：作者拍攝)

將 U251 細胞培養在不含血清，但含有如 EGF 和 bFGF 等生長因子的培養基，並以懸浮細胞培養盤進行培養，以得到實驗所需的癌幹細胞。由圖二十可觀察到其型態為懸浮，形成多顆細胞球狀生長。

#### (二) 化合物 498A 對 U251 癌幹細胞的生長影響

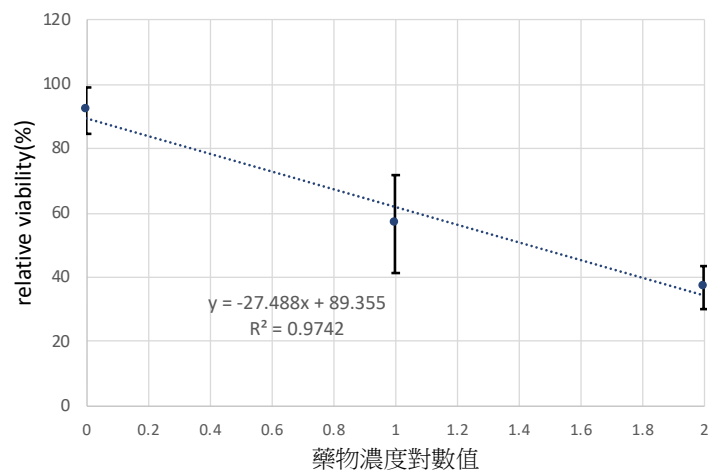
化合物使用 DMSO 溶解後加入 Medium 稀釋。實驗分為五組，分別為四種濃度 (0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$ ) 及控制組(DMSO 100 $\mu\text{M}$ )，以 CCK-8 試驗測量吸光度，來計算細胞存活率。



圖二十一、化合物 498A 對 U251 細胞的癌幹細胞的生長影響(資料來源：作者繪製)

從圖二十一可以觀察到，化合物 498A 對癌幹細胞有產生影響，在濃度 10  $\mu\text{M}$

時癌幹細胞存活率已有下降，在濃度 100  $\mu\text{M}$  時存活率下降低於 50。顯示此化合物確實能抑制癌幹細胞的生長。



圖二十二、癌幹細胞存活率對化合物 498A 濃度的近似直線 (資料來源：作者自繪)

我們選取 1、10、100  $\mu\text{M}$  之數據點以最小平方法求得近似直線，計算後發現  $\text{IC}_{50}$  為 27  $\mu\text{M}$ ，表示 498A 對癌幹細胞有抑制效果，且其對癌幹細胞的抑制效果相較於對一般 U251 細胞更好。

## 伍、討論與結論

### 一、討論

#### (一)化合物對癌細胞的抑制效果差異

本研究顯示吡啶類化合物對 U251 和 U373 膠質母細胞瘤細胞系的作用存在明顯差異。查詢文獻(Stepanenko & Kavsan, 2014)後我們發現，雖然 U251 和 U373 細胞株被認為具有相同的基因起源，但在對凋亡類藥物的敏感性上卻展現出差異的可能原因如下：

- 1.**核型差異:** U251 和 U373 細胞株雖然基因組高度相似，但在染色體數量、結構和複雜性上存在差異。這些差異可能導致基因表現和細胞功能的變化，進而影響對藥物的反應。
- 2.**FLIPS 蛋白質表現差異:** U251 細胞相較於 U373 細胞，對於腫瘤壞死因子相關凋亡誘導配體 (TRAIL) 的敏感性更高。這是因為 U251 細胞中核糖體蛋白質 S6 激酶 1 (S6K1) 活性不同，進而影響了 FLICE 樣抑制蛋白短 (FLIPS) mRNA 的轉譯。FLIPS 是 TRAIL 敏感性的關鍵調節因子，因此其表現差異可能導致 U251 細胞對 TRAIL 更敏感。
- 3.**Survivin 蛋白質表現差異:** 另一個研究發現，槲皮素與 TRAIL 的聯合使用可以顯著增強 U251 細胞的 TRAIL 介導的細胞凋亡，但 U373 細胞卻完全抵抗。這是因為槲皮素處理僅在 U251 細胞中抑制了 Survivin (一種凋亡抑制蛋白) 的蛋白質表現。因此，Survivin 表現的差異也可能導致 U251 細胞對凋亡誘導類藥物更敏感。

#### (二)癌幹細胞的現今研究及發展

目前癌幹細胞的相關治療方式仍在進行研究，我們查找文獻(Chu et al., 2024 ; Guo et al., 2024)後整理了以下幾個主要的方面：

1. **靶向癌幹細胞特異性標誌物：** 癌幹細胞表達一些特異性標誌物(表三)，如 CD44、CD133 和 ALDH1。通過開發針對這些標誌物的藥物或抗體，可以選

擇性地殺死癌幹細胞。例如，Bivatuzumab mertansine 是一種標靶 CD44v6 的抗體藥物偶聯物，已經在臨床試驗中顯示出對乳腺癌的治療效果。

表三、各類癌症幹細胞之表面生物標記

(資料來源：張金堅，2022))

| 癌別      | 癌症幹細胞<br>表面標記                                                                                                                                                                         | 癌別                                                               | 癌症幹細胞<br>表面標記                                                                                           |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 急性骨髓白血病 | CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup><br>CD90 <sup>+</sup> (高惡性度者)                                                                                                                     | 胃癌                                                               | CD44 <sup>+</sup>                                                                                       |
| 急性淋巴白血病 | CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> /CD19 <sup>+</sup>                                                                                                                               | 肝癌                                                               | CD133 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup><br>CD90 <sup>+</sup><br>EpCAM <sup>+</sup><br>CD133 <sup>+</sup>  |
| 骨肉瘤     | Stro-1 <sup>+</sup> /CD105 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup>                                                                                                                            | 轉移性黑色素瘤                                                          | CD20 <sup>+</sup>                                                                                       |
| 腦瘤      | CD133 <sup>+</sup>                                                                                                                                                                    | 卵巢癌                                                              | CD133 <sup>+</sup> /ALDH <sup>+</sup><br>CD44 <sup>+</sup> /CD117 <sup>+</sup>                          |
| 乳癌      | ESA <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /lin <sup>*</sup><br>CD90 <sup>low</sup> /CD44 <sup>+</sup><br>CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> /low/ALDH1 <sup>high</sup> | 胰臟癌                                                              | CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /ESA <sup>+</sup>                                                  |
| 大腸癌     | CD133 <sup>+</sup><br>ESA <sup>high</sup> /CD44 <sup>+</sup> /(CD166 <sup>+</sup> )<br>CD133 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup><br>CD133 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup>                 | 前列腺癌                                                             | CD44 <sup>+</sup> /α2β1hi/CD133 <sup>+</sup><br>CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup><br>SP <sup>+</sup> |
| 轉移性大腸癌  | CD133 <sup>+</sup> /CD44 <sup>low</sup> /CD24 <sup>+</sup><br>CD133 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>                                                                | 腎細胞癌                                                             | CD105 <sup>+</sup> /(CD133 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup> )                                            |
| 子宮內膜癌   | CD133 <sup>+</sup><br>SP <sup>+</sup>                                                                                                                                                 | 頭頸癌                                                              | CD44 <sup>+</sup>                                                                                       |
| 膽囊癌     | CD133 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup>                                                                                                                                                 | lin <sup>*</sup> = lineage 標記 CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 及 CD56 |                                                                                                         |

**2.抑制癌幹細胞相關信號通路：** 癌幹細胞的自我更新和分化受到多條信號通路的調控，包括 Wnt、Notch 和 Hedgehog。通過抑制這些信號通路，可以抑制癌幹細胞的增殖和轉移。例如，表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯（EGCG）可以通過抑制 Wnt/β-catenin 信號通路來抑制肺癌幹細胞的生長。

**3.破壞癌幹細胞微環境：** 癌幹細胞所處的微環境（niche）為其提供了生存和增殖的必要條件。通過破壞癌幹細胞微環境，可以抑制癌幹細胞的生長和轉移。

**4.增強免疫系統對癌幹細胞的識別和殺傷：** 癌幹細胞具有免疫逃逸的能力，可以躲避免疫系統的攻擊。通過增強免疫系統對癌幹細胞的識別和殺傷，可以提高癌症治療效果。例如：CAR-T 細胞療法是一種新興的免疫療法，可以通過改造 T 細胞使其特異性地識別和殺傷癌幹細胞。

**5.增強癌幹細胞對傳統治療方法的敏感性：**一些藥物可以通過抑制藥物外排泵或 DNA 修復機制來增強癌幹細胞對傳統治療方法的敏感性。例如，pH 敏感的核殼納米顆粒可以同時靶向膠質母細胞瘤幹細胞和分化細胞，顯著降低癌幹細胞的比例。

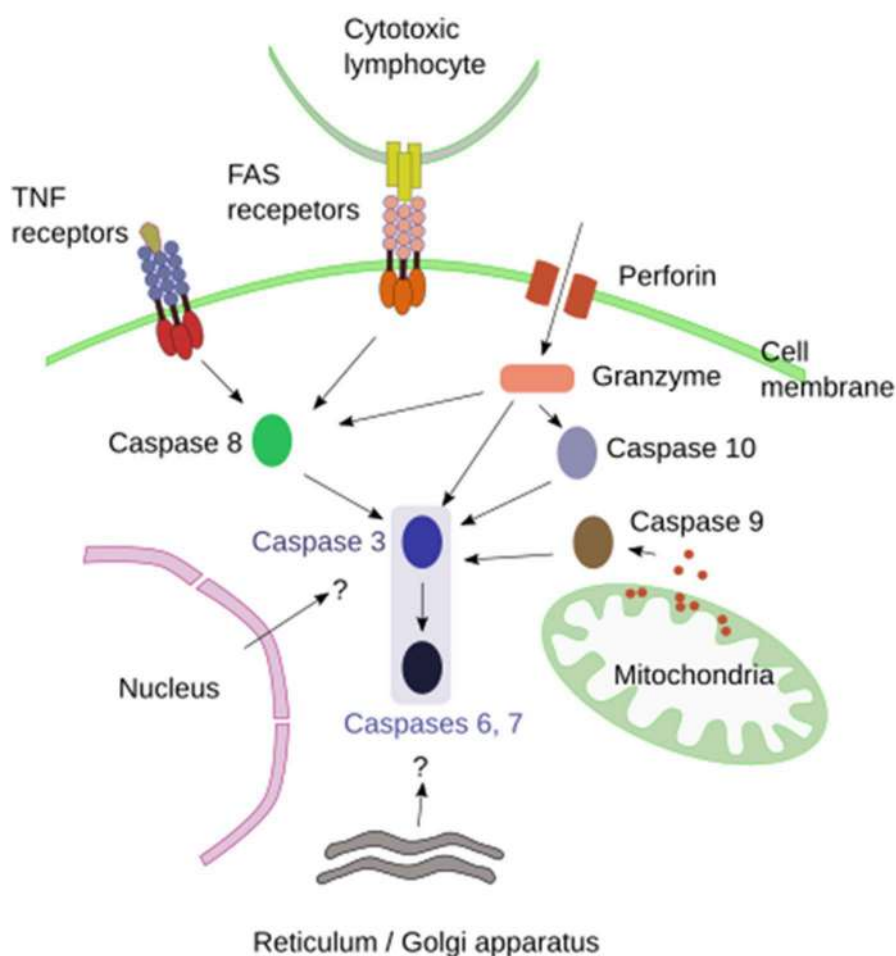
本研究的藥物同樣能同時對膠質母細胞瘤幹細胞和分化細胞產生抑制，提供了一種癌幹細胞治療的方式。

### (三) 吲哚類化合物對癌症的抑制效果

本研究使用了化學合成的吲哚類化合物，而吲哚類化合物在過去的癌症預防與治療中展現出顯著潛力，主要透過多重機制來抑制癌細胞增生、轉移與耐藥性。研究表明，這類化合物能透過阻斷細胞週期（如干擾 Cyclin D1 與 Cyclin B 的功能）和啟動內生性及外生性凋亡途徑，有效誘導癌細胞死亡。此外，它們還可調控 PI3K/Akt/mTOR、NF- $\kappa$ B 等訊號通路，抑制癌症進程和癌細胞的抗藥性。其中，吲哚-3-甲醇 (I3C) 和 3,3'-二吲哚甲烷 (DIM) 是來自十字花科蔬菜（如花椰菜和青花菜）的重要天然成分，不僅能抑制乳腺癌、前列腺癌和子宮頸癌的增生，還能調節荷爾蒙受體活動，如降低雌激素的影響，對荷爾蒙依賴型腫瘤有顯著效果。同時，I3C 和 DIM 在促進「Anoikis」現象（即因失去黏附而導致癌細胞死亡）方面也具有潛力，這有助於抑制腫瘤轉移。

基於吲哚結構的藥物也已被應用於臨床，例如 奧希替尼 (Osimertinib) 和 阿來替尼 (Alectinib)，這些藥物主要用於治療非小細胞肺癌，透過抑制表皮生長因子受體 (EGFR) 和其他激酶，抑制癌細胞的生長及增殖。然而，儘管吲哚類化合物在體外和動物試驗中表現良好，其低溶解度和生物可用性仍是臨床開發中的挑戰。為了解決這些問題，研究人員正積極探索半合成衍生物的開發和奈米技術載體的應用，以提升其穩定性和藥效。

#### (四)呋喃類化合物影響癌細胞增生的可能路徑

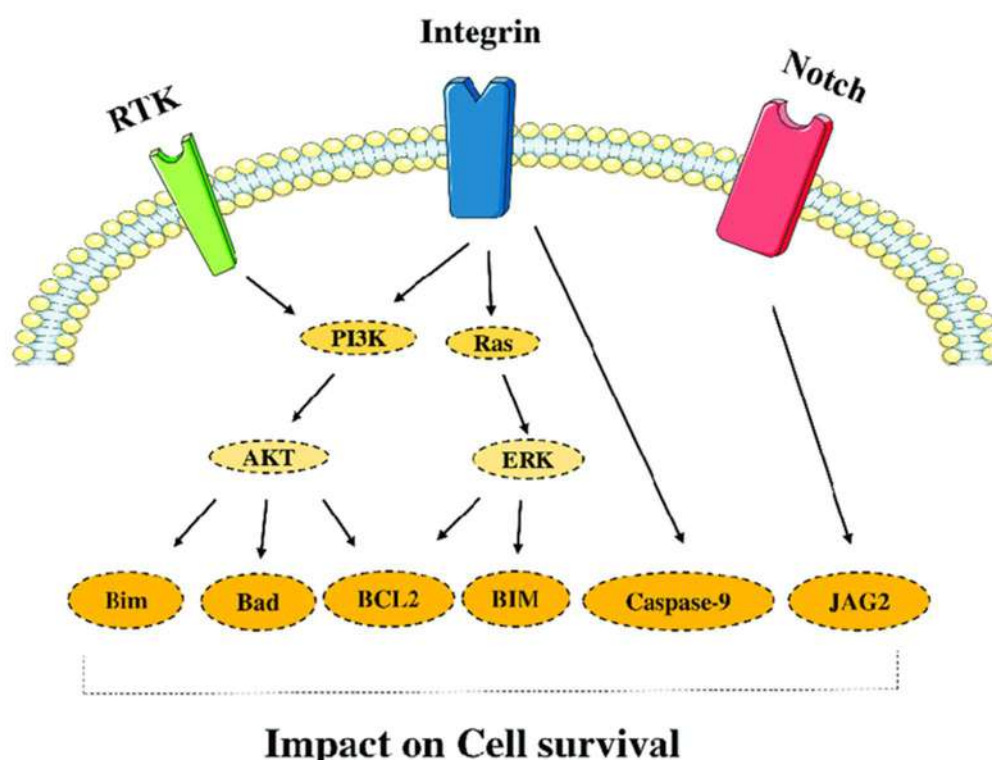


圖二十三、細胞凋亡路徑(資料來源：Fernández-Lázaro et al., 2023)

由實驗我們發現化合物 498A 可以增加 caspase8 的活化，而由圖二十三我們可知 caspase8 被活化後可進一步調控後續的凋亡反應，促進細胞 U251 的外源性凋亡。而我們也發現化合物 498A 可以增加 caspase9 的活化，而由圖二十三我們可知 caspase9 是經由粒線體訊號傳遞而被活化，並進一步調控後續的凋亡反應，促進細胞 U251 的內源性凋亡。

在查閱文獻(Kim et al.,2017)後，我們發現外源性凋亡過程中，caspase 8 會切割 BID 蛋白，產生 tBID，這種形式的 BID 會轉位至粒線體，促使釋放細胞色素 C 和其他促凋亡因子，進一步啟動內源性凋亡通路。因此我們推測呋喃類化合物透過促進 U251 細胞的外源性凋亡以及引起線粒體的功能損傷引起內源性凋亡，同時

也透過激活 caspase-8 促進 tBID 的生成，造成內源性凋亡途徑的交叉作用來加強凋亡信號的傳遞，進而使細胞凋亡。



圖二十四、細胞生長路徑(資料來源：Derakhshani et al., 2021)

由圖二十四可見 AKT 及 ERK 皆為生長路徑中的傳訊分子，查詢文獻(A. McDowell et al., 2011)後，我們推測吡啶類化合物可能透過抑制 U251 細胞中 PI3K 的活性，進一步減少 AKT 的磷酸化，從而減少細胞存活和增殖的信號。PI3K 透過催化細胞膜上 PIP2 磷酸化為 PIP3，使 AKT 轉移到細胞膜並被磷酸化，進而調控後續的生長訊號。而 ERK 通常透過磷酸化活化來促進細胞生長，同時也能透過促進抗凋亡基因的表達來抑制凋亡。然而，如結果中所說，我們發現有文獻 (Sugiura et al., 2021)指出，當細胞遭受過度的壓力，如氧化壓力、化療藥物等時，ERK 將會過度活化，而增加促凋亡分子的表達或與其他促凋亡路徑交互作用，進而增加凋亡比率。

綜合上述，我們推測吡啶類化合物能透過增加內源及外源性凋亡，以及抑制細胞生長通路的活化，來導致細胞數量減少。

## 二、結論

- (一) 吡啶類化合物 498A 對細胞 U251 的生長有明顯影響，且為抑制效果，其 IC50 約為 45.6  $\mu$ M。
- (二) 吡啶類化合物對 U251 細胞之作用皆大於 U373 細胞，推測是因兩細胞基因表現不同，造成對細胞凋亡相關的化合物耐受度不同。
- (三) 吡啶類化合物 498A 能增加 U251 細胞的內源性及外源性凋亡，並抑制其生長和降低抗凋亡基因的表現。
- (四) 藥物 498A 對神經膠質母細胞 U251 之癌幹細胞的生長有明顯抑制效果，且其抑制效果相較於對一般 U251 細胞更好。
- (五) 吡啶類化合物 485A 可能會隨時間分解或結構改變，因而對細胞 U251 及 U373 的抑制效果不穩定

## 陸、未來展望

- 一、以傷口癒合試驗探討化合物 498A 對細胞 U251 遷移能力之影響
- 二、研究藥物 498A 影響癌幹細胞生長的方式
- 三、確認合成吡啶類化合物對正常神經細胞的相對安全性
- 四、確認合成吡啶類化合物對人體幹細胞的相對安全性
- 五、探討以合成吡啶類化合物治療癌幹細胞和現有治療方式的協同效果

## 柒、參考文獻資料

張凱勝. (2022, June 25). 6 公分腦瘤壓迫 9 旬癱瘓半癱. 自由健康網.

<https://health.ltn.com.tw/article/paper/1524846>

張金堅. (2022, June 1). 張金堅：揭開癌症幹細胞真面目. <https://reurl.cc/WN93Lx>

數量少卻打不倒，癌症治療的大 BOSS：癌幹細胞. PanSci 泛科學. (n.d.).

<https://pansci.asia/archives/187614>

癌組織的種子－癌幹細胞. . (n.d.).

<https://scitechvista.nat.gov.tw/Article/C000003/detail?ID=7f81b5bb-a8ea-439a-807e-1d579797ebcc>

如何使用 CCK-8 檢測細胞增生與毒性. (2019, April 17).

[https://www.toolsbiotech.com/news\\_detail.php?id=241](https://www.toolsbiotech.com/news_detail.php?id=241)

Ahmad, A., Sakr, W. A., & Rahman, K. W. (2011). Mechanisms and Therapeutic Implications of Cell Death Induction by Indole Compounds. *Cancers*, 3(3), 2955 – 2974.

<https://doi.org/10.3390/cancers3032955>

Bielecka, Z. F., Maliszewska-Olejniczak, K., Safir, I. J., Szczylik, C., & Czarnecka, A. M. (2016). Three-dimensional cell culture model utilization in Cancer Stem Cell Research. *Biological Reviews*, 92(3), 1505 – 1520. <https://doi.org/10.1111/brv.12293>

Chu, X., Tian, W., Ning, J., Xiao, G., Zhou, Y., Wang, Z., Zhai, Z., Tanzhu, G., Yang, J., & Zhou, R. (2024). Cancer stem cells: Advances in knowledge and implications for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 170. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01851-y>

Derakhshani, A., Rostami, Z., Safarpour, H., Shadbad, M. A., Nourbakhsh, N. S., Argentiero, A., Taefehshokr, S., Tabrizi, N. J., Kooshkaki, O., Astamal, R. V., Singh, P. K., Taefehshokr, N., Alizadeh, N., Silvestris, N., & Baradaran, B. (2021). From Oncogenic Signaling Pathways to Single-Cell Sequencing of Immune Cells: Changing the Landscape of Cancer Immunotherapy. *Molecules*, 26(8), 2278. <https://doi.org/10.3390/molecules26082278>

Fernández-Lázaro, D., Sanz, B., & Seco-Calvo, J. (2023). *Mechanisms of Programmed Cell Death: Structural and Functional Proteomic-Pathways. A Narrative Review.*

<https://doi.org/10.20944/preprints202312.0364.v1>

*Fischer Indole Synthesis*. (n.d.). [https://en.wikipedia.org/wiki/Fischer\\_indole\\_synthesis](https://en.wikipedia.org/wiki/Fischer_indole_synthesis)

Guo, S., Zheng, S., Liu, M., & Wang, G. (2024). Novel Anti-Cancer Stem Cell Compounds: A Comprehensive Review. *Pharmaceutics*, *16*(8), 1024.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081024>

Jiang, M., Qi, L., Li, L., Wu, Y., Song, D., & Li, Y. (2021). Caspase-8: A key protein of cross-talk signal way in “panoptosis” in cancer. *International Journal of Cancer*, *149*(7), 1408 – 1420.

<https://doi.org/10.1002/ijc.33698>

Kaur, B., Venugopal, S., Verma, A., Sahu, S. K., Wadhwa, P., Kumar, D., & Sharma, A. (2023). Recent Developments in the Synthesis and Anticancer Activity of Indole and Its Derivatives. *Current organic synthesis*, *20*(4), 376 – 394. <https://doi.org/10.2174/1570179419666220509215722>

Kim, W. S., Lee, K. S., Kim, J. H., Kim, C. K., Lee, G., Choe, J., Won, M. H., Kim, T. H., Jeoung, D., Lee, H., Kim, J. Y., Ae Jeong, M., Ha, K. S., Kwon, Y. G., & Kim, Y. M. (2017). The caspase-8/Bid/cytochrome c axis links signals from death receptors to mitochondrial reactive oxygen species production. *Free radical biology & medicine*, *112*, 567 – 577.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.001>

Magee, J. A., Piskounova, E., & Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: Impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, *21*(3), 283 – 296. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.003>

McDowell, K. A., Riggins, G. J., & Gallia, G. L. (2011). Targeting the AKT pathway in glioblastoma. *Current pharmaceutical design*, *17*(23), 2411 – 2420.

<https://doi.org/10.2174/138161211797249224>

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D’ Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, *8*(4), 603 – 619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

- Saruengkhanphasit, R., Butkinaree, C., Ornnork, N., Lirdprapamongkol, K., Niwetmarin, W., Svasti, J., Ruchirawat, S., & Eurtivong, C. (2021). Identification of new 3-phenyl-1H-indole-2-carbohydrazide derivatives and their structure-activity relationships as potent tubulin inhibitors and anticancer agents: A combined in silico, in vitro and synthetic study. *Bioorganic chemistry*, 110, 104795. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104795>
- Stem cells may cause some forms of bone cancer. News. (2019, June 19). <https://www.news-medical.net/news/2005/12/07/14891.aspx>
- Shin, S., Buel, G. R., Wolgamott, L., Plas, D. R., Asara, J. M., Blenis, J., & Yoon, S.-O. (2015). ERK2 Mediates Metabolic Stress Response to Regulate Cell Fate. *Molecular Cell*, 59(3), 382 – 398. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.020>
- Stepanenko, A. A., & Kavsan, V. M. (2014). Karyotypically distinct U251, U373, and SNB19 glioma cell lines are of the same origin but have different drug treatment sensitivities. *Gene*, 540(2), 263 – 265. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.02.053>
- Sugiura, R., Satoh, R., & Takasaki, T. (2021). ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Cells*, 10(10), 2509. <https://doi.org/10.3390/cells10102509>
- UMDNJ – Graduate School of Biomedical Sciences. (n.d.). [https://njms.rutgers.edu/sgs/current\\_students/docs/new/PhDHandbookSept62012.pdf](https://njms.rutgers.edu/sgs/current_students/docs/new/PhDHandbookSept62012.pdf)
- Walcher, L., Kistenmacher, A.-K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blandszun, A.-R., Yevsa, T., Fricke, S., & Kossatz-Boehlert, U. (2020). Cancer stem cells—origins and biomarkers: Perspectives for targeted personalized therapies. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>

## 【評語】 090020

### 1. 創新性與重要性:

本研究探討新合成吡啶類化合物對神經膠質母細胞瘤細胞及其癌幹細胞的影響，具有重要的創新性和臨床意義。癌症幹細胞被認為是腫瘤復發的主要原因，而針對這一群細胞的治療策略一直是癌症研究的重點和難點。研究通過評估化合物對癌細胞增殖、存活和凋亡的影響，以及對癌幹細胞球形成的抑制作用，為開發新型抗癌藥物提供了創新的思路。特別是，研究同時關注了化合物對常規癌細胞和癌幹細胞的作用，這種全面的研究方法有助於開發更有效的癌症治療策略，potentially addressing the challenge of tumor recurrence。

### 2. 優點:

該研究採用了多角度的實驗方法，包括細胞增殖、存活和凋亡分析，以及癌幹細胞球形成實驗，評估化合物的抗癌效果。其次，研究探討了其分子作用機制，特別是對細胞生長和凋亡相關信號通路的影響，這為理解化合物的作用機制提供了重要線索。此外，研究使用了多種神經膠質母細胞瘤細胞株，增加了結果的可靠性。

和代表性。最後，研究結果顯示該化合物對神經膠質母細胞瘤及其癌幹細胞均有抑制作用，這一發現為開發針對癌症幹細胞的新型治療策略提供了重要依據。

### 3. 待改進的部分：

儘管研究取得了重要進展，但仍存在一些需要改進的方面。首先，雖然研究提到化合物影響了多條信號傳遞路徑（如 PI3K/Akt 和凋亡路徑），但對分子機制的具體作用解析仍然有限。建議進一步研究 PI3K/Akt 路徑中關鍵分子的變化（如 PIP3、PTEN 表現的影響），以及與其他信號傳遞的交互作用。其次，研究僅選用 U251 和 U373 兩種膠質母細胞瘤細胞株進行實驗，這可能不足以代表所有膠質母細胞瘤的多樣性。建議在未來研究中擴大細胞株的範圍，或者考慮使用原代腫瘤細胞，以更好地反映腫瘤的異質性。在實驗設計方面，圖 17 和圖 18 的實驗需要至少重複 3 次以確保結果的可靠性，同時應加入內部對照（如 GAPDH 或 actin）進行比較。這些改進將有助於增強研究結果的可靠性和普適性，為新型吡啶類化合物作為潛在抗癌藥物的開發提供更堅實的科學基礎。