

中華民國第 61 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

第二名

052014

**LincRNA-p21 參與線香成分 Auramine 影響化
療抗性之探討**

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 黃璿聿	指導老師： 陳玉珊
---------------	--------------

關鍵詞：LincRNA-p21、Auramine、化療抗藥性

摘要

先前文獻發現，線香煙霧中的金黃胺（auramine）雖會促進肺癌惡化與轉移，卻也增加肺癌細胞對標靶藥物的敏感度，但卻未觸及 auramine 對傳統化療藥物療效的影響。本研究探討在 p53 突變型或正常型的細胞株中，同時給予 auramine 和化療藥物能否增加 lincRNA-p21 的表現量，導致癌細胞進行細胞凋亡，以降低癌細胞對化療的抗藥性。首先，利用 RT-qPCR，得知在 p53 突變型細胞株中 auramine 濃度和 lincRNA-p21 表現量呈正相關，且合併化療藥物可再提升 lincRNA-p21 表現量。接著，藉由細胞存活率分析與西方墨點法，得知 auramine 合併化療藥物可提升細胞毒殺效果，並增強細胞凋亡訊號。最後，以 p53 正常型細胞株作為對照組重複上述實驗，結果卻未觀察到同樣的化療加成效果。期許本研究能對改善肺癌細胞對化療藥物產生抗藥性做出貢獻。

壹、研究動機

近十年來，肺癌已躍升為全球最常見的癌症，也位居所有癌症死亡率之首[4]。肺癌主要分為非小細胞型肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小細胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 兩種，以非小細胞型肺癌居多，約佔 80-85 %，而非小細胞肺癌中，肺腺癌 (Adenocarcinoma) 約佔四成[2]。吸菸是最常見引發肺癌的環境曝露因子，其他罹癌相關的危險因子還包括，曾接受游離輻射的治療、二手菸與環境毒物 (氫，重金屬，多環芳香烴碳氫化合物) 的接觸、肺纖維化與人類免疫缺乏病毒感染病史，以及飲酒過度[2]。研究顯示，肺腺癌的主要驅動基因突變包括表皮生長因子受體 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 和間變性淋巴瘤激酶 (Anaplastic lymphoma kinase, ALK) 基因，EGFR 基因突變在東亞裔病患約佔 50~60 %，而 ALK 基因突變則佔約 5 %。除此之外，肺癌細胞的致癌基因突變或轉位，還包括 ROS-1、k-Ras、B-Raf、HER-2、MET、與 RET...等[2]。

肺癌的治療根據診斷時的癌症的分期而有所不同，第一、二期的早期肺癌治療方法是手術切除，第二期以上須輔助性化學治療。第三期局部嚴重期則必須接受放射治療、化學治療等整合治療，而第四期的晚期肺癌治療方式則包括化學治療、標靶治療、及免疫治療[2]。超過半數的患者在診斷罹癌時，病情已進展至肺癌的中後期，且因治療效果不佳，患者五年存活率平均遠低於 50 % [2, 14]。目前治療肺癌的新穎抗癌藥物中，以酪胺酸激酶抑制劑 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) 與免疫治療為兩大主流[14]。藉由找出癌細胞的關鍵突變基因後給予特定的標靶藥物治療，是目前藥物治療的原則。然而，化療仍然廣泛使用在多數的病患，亦常與標靶藥物及免疫製劑合併治療。但是，抗藥性的發生一直是治療癌症時的一大挑

戰。因為抗藥性的出現，會導致癌症復發、癌細胞轉移擴散、甚至患者死亡。常見的腫瘤抗藥性的機轉包括以下幾種：癌細胞將藥物排出細胞外、癌細胞使藥物失去活性、藥物攻擊的目標蛋白出現變異、癌細胞自殺的能力受到抑制、腫瘤內癌細胞的異質性、以及腫瘤內基質細胞與癌細胞的交互作用所產生的微環境改變[15]。

許多研究發現，環境因素不僅影響癌症的發生也造成腫瘤對各種抗癌藥物反應的差異。非吸菸者罹患的 NSCLC 在危險因子與致癌機轉上，都與吸菸者罹患的 NSCLC 有所不同 [8]。東亞地區肺癌患者中，大約有 1/3 是非吸菸者且以女性居多，以肺腺癌的比例最高，且大部分的患者都有表皮生長因子受體（Epidermal growth factor receptor, EGFR）基因的突變，而且這群肺癌患者對 TKI 治療的效果，也顯著較居住在其他地區的患者來的高[16]。研究人員進一步證實，這些現象或許因為東亞地區宗教信仰須經常暴露在焚香的環境有關，因為線香燃燒殘存的主要成分金黃胺（Auramine: bis [4-(dimethylamino)phenyl]methaniminium chloride）常用於線香製造時的黃色染料，因為耐熱性高，燃點高達攝氏 267 度，所以形成線香燃燒後持續存在的空氣污染物質。雖然金黃胺並不會致癌但是卻能促進肺癌的惡性分化 [10]，也因為同時透過增強表皮生長因子受體 (Epidermal growth factor receptor) 的信息傳遞，提升了患者對 EGFR-TKI 治療的效果[9]。另一方面，線香燃燒後所產生的金黃胺已知可以選擇性地結合至 DNA 上 G-quadruplex(GQ) 結構，並穩定此結構[13]。然而，Auramine 這樣的特性是否影響到肺癌細胞抗癌藥物的敏感性則尚未有文獻報導。

腫瘤抑制蛋白 p53 是細胞中重要的轉錄因子，負責許多細胞凋亡相關基因的表現，當腫瘤細胞接受化療藥物刺激導致 DNA 損傷時，p53 蛋白就會被活化，如果損傷很嚴重 p53 就會啟動細胞凋亡的程序。而腫瘤細胞常因 TP53 基因的錯義突變（missense mutation），所以產生突變型的 p53 蛋白 (mutant p53 protein)，導致其無法啟動傳統的下游分子機制，因此失去抑制腫瘤的作用，甚至導致癌細胞的侵犯和轉移，以及抗藥性的產生[6]。有趣的是，突變型 p53 蛋白雖然失去了與特定 DNA 序列接合的能力，但是某種程度上卻還能誘導或抑制下游相關基因的表現，是因為突變型 p53 蛋白可以透過與非 B 型去氧核糖核酸結構 (Non-B DNA structures) 專一性且高親和性的接合，進而調控基因表現，只要吻合非 B 型 DNA 的立體結構即能進行接合而與 DNA 的本身的序列排列無關[3]，而前文所提及的 G-quadruplex(GQ) 結構即為其中一種非 B 型 DNA 結構。如何使突變型 p53 蛋白重新活化，啟動原本 p53 所調控的細胞凋亡機制，將是解決當前化療藥物抗藥性的關鍵，也是現今許多進行中臨床試驗的主題[7]。

人類基因組測序計劃顯示僅有 2 %左右的基因編碼蛋白，有超過 90 %的基因轉錄為 RNA，但未編碼為蛋白質。長鏈中介非編碼核糖核酸 (Long-intervening non-coding RNA,

lincRNA) 是指至少包含 200 個核苷酸的功能性 RNA，參與了表觀遺傳、轉錄及轉錄後調控等多種途徑的基因調控。在與 NSCLC 相關的研究顯示，lincRNAs 有幾種不同的類別，分別與不同的致癌機轉有關，有些與肺癌的誘發有關，有些與腫瘤細胞的增生與細胞凋亡有關，有些則與肺癌的的侵犯與轉移有關，還有些與抗藥性形成的機轉有關。明瞭這些 lincRNAs 在影響癌症發生與惡化的機制與角色，將有助於癌症的預測、診斷、與預後，而且也有助於治療藥物的研發[12]。其中，lincRNA-p21 被發現在 NSCLC 的組織與細胞中的表現量明顯減少，腫瘤中 lincRNA-p21 表現量較高的肺癌患者其預後較佳，也因此 lincRNA-p21 被認為有腫瘤抑制的效用[5]。重要的是 lincRNA-p21 的表現受到 p53 所調控，在 DNA 受損時，p53 蛋白被啟動後，lincRNA-p21 的表現量會增加，進一步以 cis-調控的型式增加鄰近的 p21 基因的表現，來協調細胞週期以及 DNA 的複製與修復；而 lincRNA-p21 亦會以 trans-的調控形式影響其他參與細胞凋亡的蛋白表現[1]。

綜合上述提及之文獻研究，本研究將探討 auramine 是否能重新活化突變型 p53 蛋白，藉由調控 lincRNA-p21 的表現啟動細胞凋亡的機制，影響肺癌細胞存活率與化療藥物治療效果。最後，進一步研究 auramine 對化療藥物的加成效果，是否發生在 p53 正常型細胞株中。

貳、研究目的

- 一、利用 RT-qPCR 實驗，偵測 auramine 濃度與 lincRNA-p21 表現量之相關性
- 二、利用 RT-qPCR 實驗，偵測 auramine 結合化療藥物後的 lincRNA-p21 表現量
- 三、利用 Colony Formation assay 與 MTT assay 實驗，觀察 auramine 結合化療藥物對細胞之毒殺效果
- 四、利用西方墨點法實驗，分析 auramine 結合化療藥物造成之細胞凋亡指標表現量
- 五、探討 auramine 對化療藥物的增敏作用是否發生在 p53 正常型細胞株中
- 六、綜合以上研究統整分析 auramine 影響化療抗藥性的機制並繪製模式圖

參、研究設備及器材

一、細胞株與化療藥物

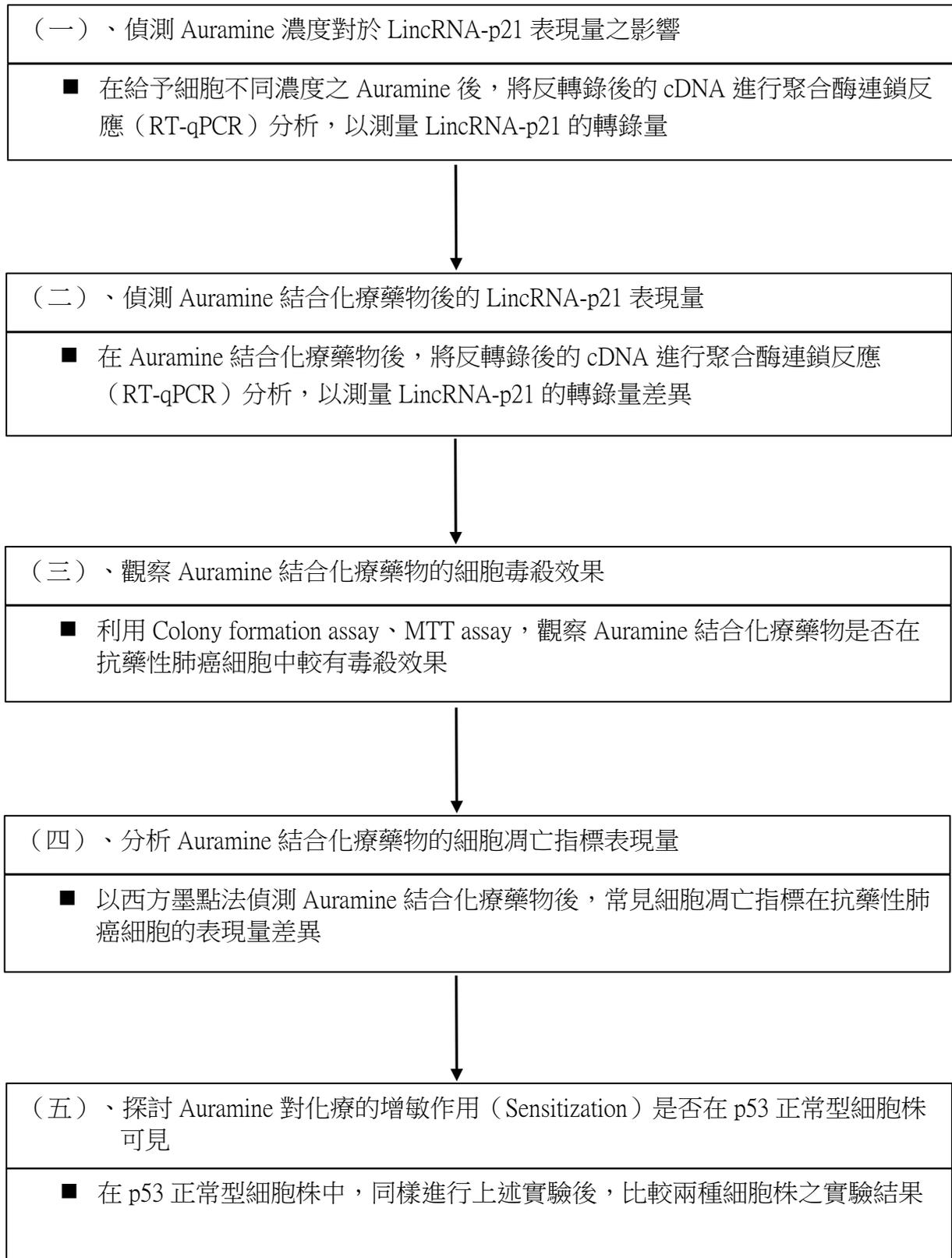
本實驗所研究之肺癌細胞株分別為：CL1-0 與 A549，其中 CL1-0 為 p53 突變型肺癌細胞株；A549 為 p53 正常型肺癌細胞株。所使用之化療藥物有兩種，分別為 carboplatin (Cayman) 與 cisplatin (Sigma)。

二、研究設備及器材

- (一)、細胞培養：顯微鏡 (Nikon TS100)、細胞培養箱 (Thermo)、無菌細胞操作台 (川富)、離心機 (Eppendorf)
- (二)、RNA 表現量測試：RT-qPCR 儀器 (QuantStudio™ 5 RT-PCR)
- (三)、細胞存活測試：ELISA reader (BioTek)
- (四)、蛋白表現量分析：超音波震盪儀 (SONIC Vibra-Cell)、西方墨點法系統 (Bio-Rad)、數位光電感應器影像擷取系統 (Bio-Rad)、乾浴槽 (Kaltis)
- (五)、抗體：PARP (Cell Signaling)、Tubulin (Sigma)
- (六)、試劑：Acrylamide Mix (Bio-Rad)、Tris (VWR)、SDS (FUJIFILM Wako Chemical)、Ammonium persulfate (J. T. Baker)、TEMED (Alfa Aesar)、PVDF (GE)、N. C. (GE)

肆、研究過程或方法

一、研究架構



二、研究方法及步驟

(一) RNA 萃取與反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)

經過相關處理後，細胞用磷酸鹽緩衝液 (PBS) 沖洗 3 次後，加入 Trizol™ 試劑 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 使其裂解。以每 1 mL Trizol™ 試劑加入 0.2 mL 氯仿 (chloroform) 的比例，分離出所有的 RNA，再以 12000 g 離心分離 15 分鐘，區分出水相層、中間層、與有機層。接著取出水相層，加入 0.25 - 0.5 mL 的異丙醇 (isopropanol)，再以 12000 g 離心分離 15 分鐘，使 RNA 沉澱。去除上清液後，膠狀的沉澱物再以 1 mL 的 75 % 乙醇沖洗兩次，風乾，使其溶解在用 DEPC (diethylpyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯) 處理過的純水中。然後取 1 μ g 的總 RNA，加入 M-MLV 反轉錄酶 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)、Random Hexamer 引子、DNA 聚合酶 (dNTP)、5X M-MLV 緩衝液、與二硫蘇糖醇 (Dithiothreitol, DTT)，進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應。

(二) 定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析 (Quantitative Real-Time PCR, RT-qPCR)

本研究使用 KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) 進行定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析，來偵測目標基因 LincRNA-p21 的表現量：

Forward - 5' -GAAACAGGCTGGGCCAGCTGAGAGT- 3'

Reverse - 5' -TGGCCTTGCCCGGGCTTGTC- 3' ;

接著使用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 來分析閾值循環 (Ct value)，而 $\Delta\Delta$ Ct 相對定量，則利用實驗組中目標基因 (lincRNA-p21) 相對於對照組中內源性 RNA (18S rRNA) 標準化後表達的差異倍數求得。

(三) 細胞群落形成能力實驗 (Colony Formation Assay)

將細胞 5000 cells/well 置於 96 well plate，經過一天後去除培養液，加入實驗設計之藥品，放置在培養箱培養 7~10 天，三天後以 colony formation assay 染劑 (含 5 % Crystal violet 之 50 % ethanol) 染色 20 分鐘，置於乾燥處，於風乾後觀察細胞群落的形成情形。

(四) 細胞存活率分析 (MTT assay)

將細胞以 5000 cells/well 種於 96 well plate，培養在恆溫培養箱 (incubator) 一天後，吸除培養液，並且以 MTT 染色，放置一段時間後，用冰醋酸溶解結晶體，最後使用 ELISA reader 判讀吸光值 (OD₅₇₀) 的數據。

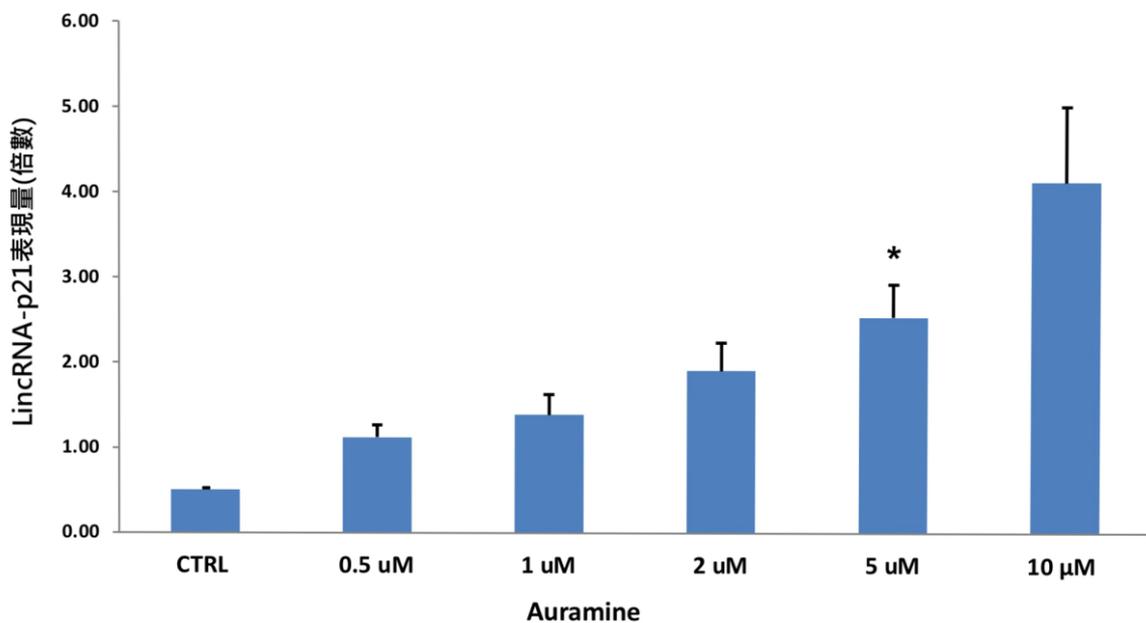
(五) 西方墨點法分析 (Western Blot Analysis)

本實驗使用 Bradford protein assay dye (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 來測量總蛋白質的濃度。取 30-50 μ g 的蛋白質，加入樣本緩衝液，於 95°C 加熱 5 分鐘。然後將這些變性蛋白加入電泳緩衝液 (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, and 0.1 % SDS)，利用 SDS-PAGE 凝膠電泳將之分離，再加入轉印緩衝液 (700 mL of ddH₂O, 200 mL of Methanol, and 100 mL of 10X running buffer (0.25 M Tris-base and 1.92 M Glycine))，使凝膠上的蛋白質轉印到 PVDF 膜 (0.45 μ M, Millipore[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 或 NC 膜 (0.22 μ M, Amersh[™], GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA, USA)。接著使用含有 5 % 脫脂奶粉或 BSA 之 TBS-T (Tris-buffered saline-Tween) (10 mL of 2 μ M Tris-HCl pH 7.4, 100 mL of 5 M NaCl, 0.5 mL of 100 % Tween-20, and 890 mL of ddH₂O) 緩衝液覆蓋 PVDF 膜。之後加入一級抗體 (Primary antibodies) 於此 PVDF 膜，運用免疫沉澱法之原理，於 4°C 冷房中反應過夜，接著再加入 Horseradish peroxidase (HRP) 所接合的二級抗體反應。最後加入化學發光底物 (ECL) 催化化學發光訊號，利用 ChemiDoc[™] Touch Imaging System (Bio-Rad) 影像系統偵測目標蛋白的表現。

伍、研究結果

一、 利用 RT-qPCR 實驗，偵測 auramine 濃度與 lincRNA-p21 表現量之影響

LincRNA-p21 表現量上升意味著 p53 蛋白有啟動下游細胞凋亡的機制。本研究先探討 auramine 是否可以增加 p53 突變型 CL1-0 細胞株中的 lincRNA-p21 表現量。首先，以不同濃度的 auramine 處理 CL1-0 細胞株，再經由 RT-qPCR 的結果得知，lincRNA-p21 的表現量隨著 auramine 的濃度上升而增加，而當 auramine 濃度為 10 μ M 時的上升幅度最顯著（圖一）。因此後續實驗皆使用 10 μ M auramine 濃度。

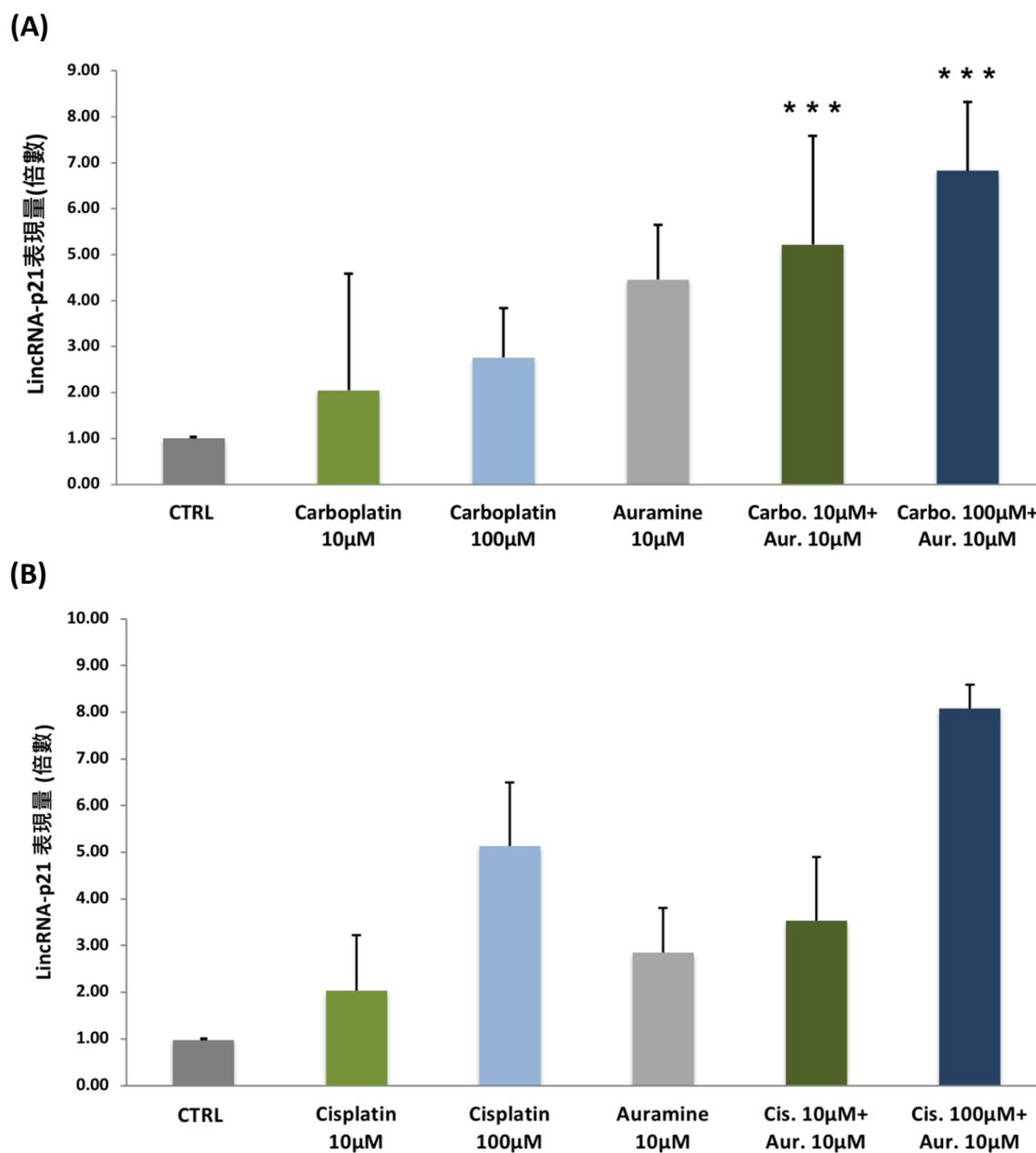


圖一、不同濃度 auramine 處理的 CL1-0 細胞株之 lincRNA-p21 表現量

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

二、 利用 RT-qPCR 實驗，偵測 auramine 結合化療藥物後的 lincRNA-p21 表現量

接著，探討合併給予 auramine 和化療藥物（carboplatin、cisplatin）是否可以增加 p53 突變型的 CL1-0 細胞株的 lincRNA-p21 表現量。根據 RT-qPCR 的實驗結果，得知在 CL1-0 細胞株中，合併給予 auramine 和兩種不同化療藥物（carboplatin、cisplatin）時的 lincRNA-p21 表現量，相較於單獨給予化療藥物其上升幅度有顯著增加（圖二 A、B）。



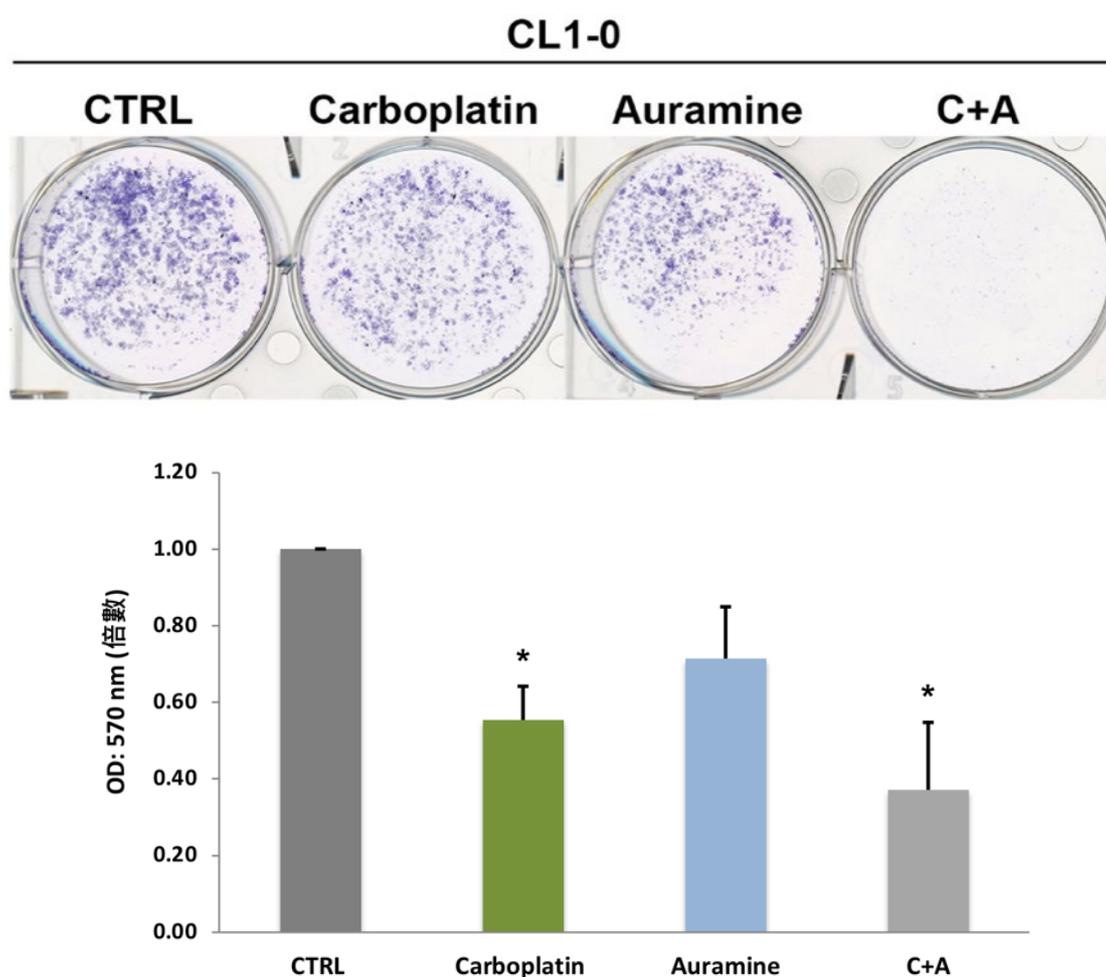
圖二、 (A) Carboplatin 合併 Auramine 處理的 CL1-0 細胞株之 LincRNA-p21 表現量

(B) Cisplatin 合併 Auramine 處理的 CL1-0 細胞株之 LincRNA-p21 表現量

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

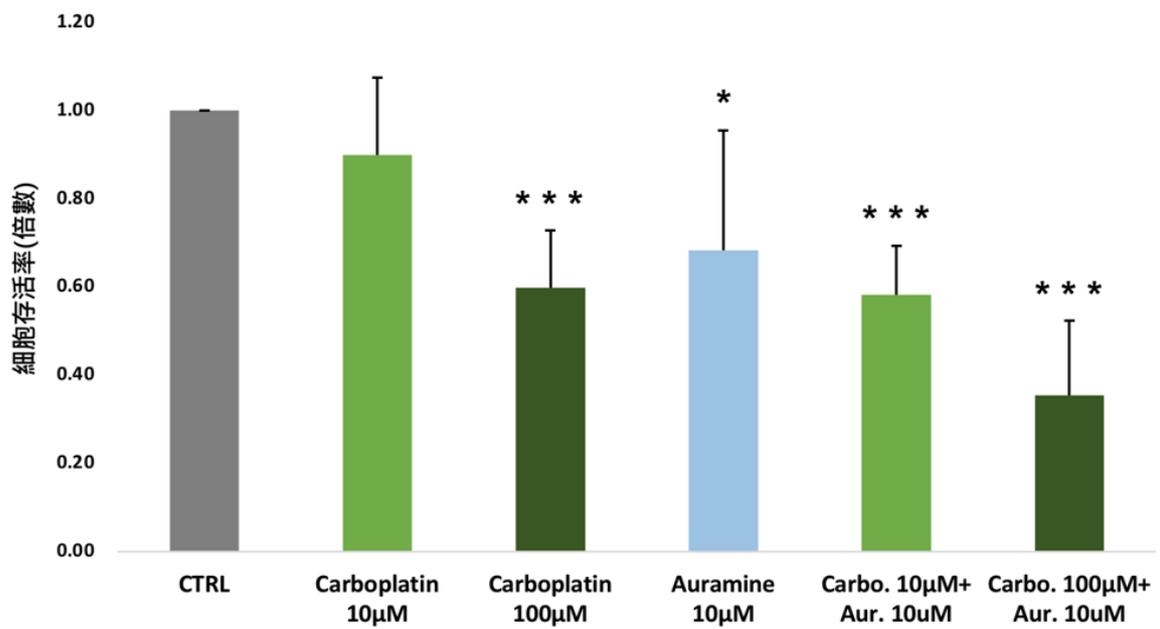
三、 利用 Colony Formation assay 與 MTT assay 實驗，觀察 auramine 結合化療藥物對細胞之毒殺效果

針對細胞毒殺效果探討，使用兩種實驗方法：細胞群落形成能力分析（Colony formation assay）與細胞存活率分析（MTT assay），探討合併給予 auramine 與化療藥物 carboplatin 或 cisplatin 對 p53 突變型的 CL1-0 細胞株之細胞毒殺效果是否會具有加成作用。根據細胞群落形成能力分析的結果，發現當合併給予 auramine 與 carboplatin 時，CL1-0 細胞株的群落形成能力，相較於單獨給予 carboplatin 時下降許多，也就是合併給予 auramine 與 carboplatin 更能有效使細胞存活率降低（圖三）。而從細胞存活率分析的結果，可以發現合併給予 auramine 和化療藥物 carboplatin 或 cisplatin 時，細胞毒殺效果都較單獨給予 carboplatin 或 cisplatin 時更有效（圖四 A、B）。因此得知：在 CL1-0 細胞株中，合併給予 auramine 和化療藥物，都可以達到更好的抑制細胞增生效果。換言之，auramine 產生了細胞毒殺效果的加成作用。

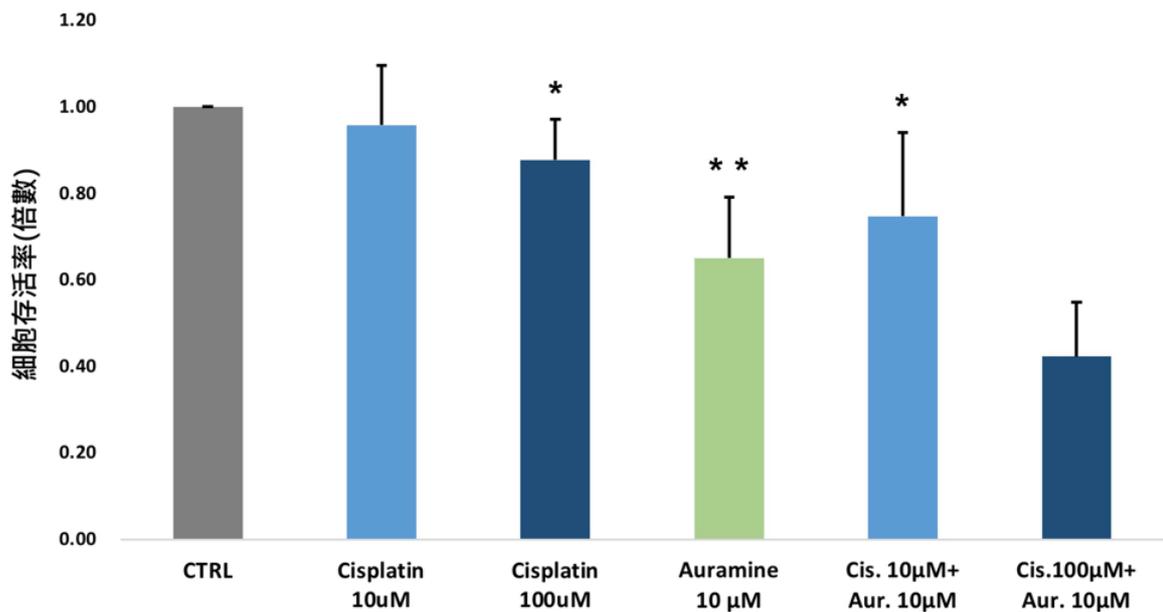


圖三、Carboplatin 合併 Auramine 處理的 CL1-0 細胞株之細胞群落形成能力分析
(下表為上圖之量化值，*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

(A)



(B)



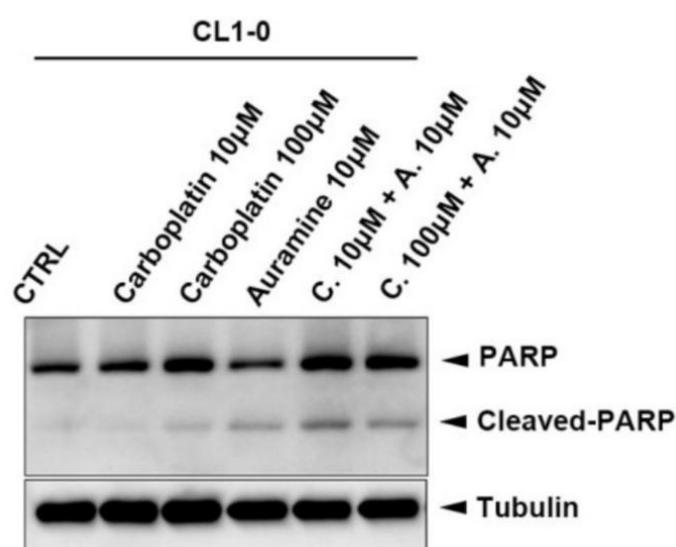
圖四、(A) Carboplatin 合併 Auramine 處理的 CL1-0 細胞株之細胞存活率

(B) Cisplatin 合併 Auramine 處理的 CL1-0 細胞株之細胞存活率

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

四、 利用西方墨點法，分析 auramine 結合化療藥物造成之細胞凋亡指標表現量

接著，本實驗欲接續探討上述實驗中，因為合併給予 auramine 和化療藥物所增強的細胞毒殺效果而死亡的細胞，是否是因細胞凋亡所致。已知在細胞凋亡的過程中，PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) 會被 Caspase-3 裂解，因此 PARP 裂解片段常被用來當作細胞凋亡的重要指標。本實驗利用西方墨點法 (Western Blot) 偵測 p53 突變型的 CL1-0 細胞株是否進行細胞凋亡。根據實驗結果發現，在 CL1-0 細胞株中，若合併給予 auramine 和 carboplatin，相較於單獨給予 carboplatin 時，更能偵測到較強的 PARP 裂解片段 (Cleaved-PARP) 的訊號，顯示細胞凋亡確實在 CL1-0 細胞株上引發 (圖五)。

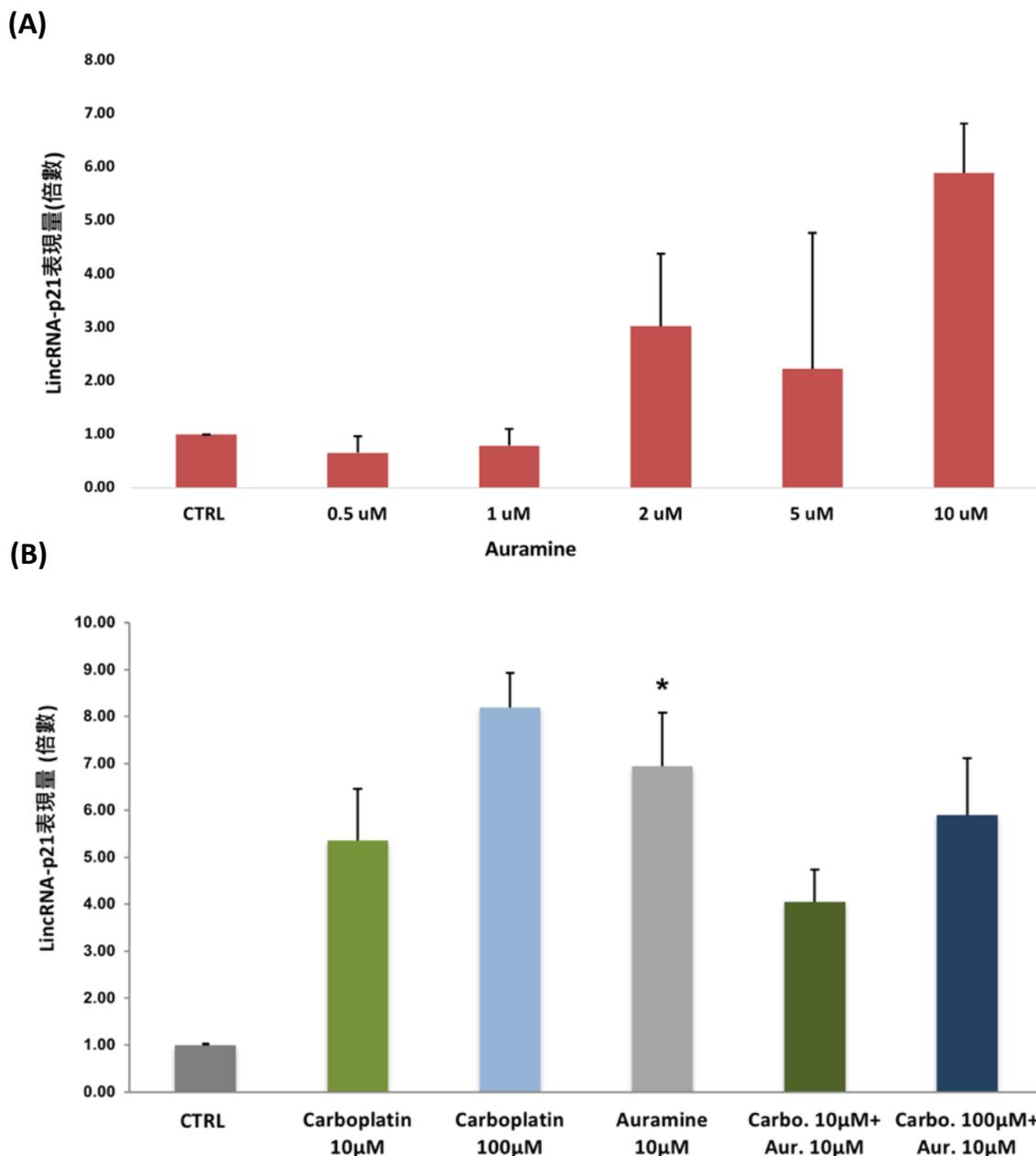


圖五、Carboplatin 合併 Auramine 處理的 CL1-0 細胞株之細胞凋亡指標訊號

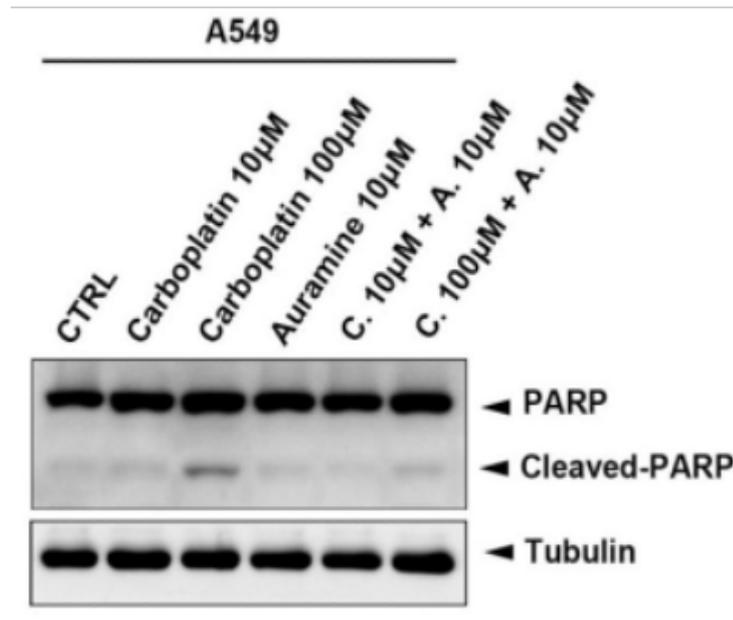
五、 探討 auramine 對化療藥物的增敏作用是否發生在 p53 正常型細胞株中

增敏作用 (Sensitization) 是指當合併多種化療藥物治療癌症時，可促進癌細胞進行細胞凋亡的現象。由於 CL1-0 為 p53 突變型細胞株，本實驗以 p53 正常型的 A549 細胞株作為對照組，進行相同實驗處理。RT-qPCR 結果顯示，在 A549 細胞株中，lincRNA-p21 表現量會隨著給予的 auramine 濃度增加而上升 (圖六 A)。但若合併給予 auramine 與化療藥物 carboplatin，則 lincRNA-p21 之表現量，並沒有比單獨給予 carboplatin 時高 (圖六 B)。因此推測，在 p53 正常型細胞株中，auramine 強化化療藥物提升 lincRNA-p21 的效果有限。

此外，利用西方墨點法進行 p53 正常型的 A549 細胞株的細胞凋亡分析。根據實驗結果發現，在 A549 細胞株合併給予 auramine 和 carboplatin 無法增加 PARP 裂解片段 (Cleaved-PARP)。因為實驗結果顯示，單獨給予 A549 細胞株化療藥物 carboplatin 細胞凋亡訊號就已相當明顯；而合併給予 auramine 後，並沒有產生更強 PARP 裂解片段的訊號 (圖七)。以上結果顯示，在 p53 正常型細胞株中，auramine 強化化療藥物的作用使細胞走向細胞凋亡的效果有限。



圖六、(A) 不同濃度 Auramine 處理的 A549 細胞株之 LincRNA-p21 表現量
 (B) Carboplatin 合併 Auramine 處理的 A549 細胞株之 LincRNA-p21 表現
 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)



圖七、Carboplatin 合併 Auramine 處理的 A549 細胞株之細胞凋亡指標訊號

陸、討論

在人類癌症細胞中，約有 50 – 60 % 的癌細胞，其腫瘤抑制蛋白 TP53 基因會發生同型合子的突變 (homozygous mutations)。在這些突變中約有 90 % 是因 TP53 基因發生錯義突變 (missense mutation)，錯義突變的區域主要是發生於 p53 蛋白和基因啟動子 (promoter) 上的 DNA 結合區域 (DNA binding domain)，此區域稱為 p53 response elements 序列。因錯義突變產生的突變型 p53 蛋白 (mutant p53 protein) 無法與 p53 response elements 結合，故無法啟動下游腫瘤抑制相關基因表現，而失去抑制腫瘤的作用。已知在 p53 response elements 序列中包含兩次的 5' -RRRCWWGYYY- 3' 重複序列。在 Václav Brázda et al. (2019) 文獻中提及，即使基因的啟動子中缺乏 p53 response elements，p53 蛋白仍可以結構辨識的方式高親和力的結合在 DNA 上多種非 B 型去氧核糖核酸的結構 (Non-B DNA structures)，例如：Holliday junctions, cruciform structures, quadruplex DNA (G-quadruplex 結構), triplex DNA, DNA loops, bulged DNA, and hemicatenane DNA. [11]。

根據文獻資料[13]，線香燃燒後所產生的金黃胺 (auramine) 可以選擇性地結合至 DNA 上的 G-quadruplex (GQ) 結構，並穩定此結構。因此本研究發現，auramine 能提升肺癌細胞對化療藥物的增敏作用 (Sensitization) 可能機轉為：突變型的 p53 蛋白可接合在因 auramine

而穩定的 G-quadruplex (GQ) 結構上，使其重新啟動 p53 腫瘤抑制相關基因表現，啟動細胞凋亡路徑。

本研究結果也發現 auramine 對 lincRNA-p21 表現量的調控、與合併化療藥物所產生的增敏作用，只在 p53 突變型的細胞株中有效果，而不會出現在 p53 正常型的 A549 細胞株中。推測可能原因為，正常型 p53 蛋白可辨識並結合在 lincRNA-p21 啟動子上的 p53 response elements 序列，以活化 lincRNA-p21 轉錄；突變的 p53 蛋白則是以結構辨識方式結合在 DNA 上。因此在 p53 正常型細胞株中加入 auramine 有可能因前者路徑受到干擾，導致化療增敏作用不如在 p53 突變型細胞株一般顯著。

此外，本研究所觀察到的 lincRNA-p21 表現量增加，是否為 auramine 穩定此特定結構後，讓突變型 p53 蛋白重新藉由結構性辨認接合至此結構，啟動下游分子機制所導致，則有待未來更進一步的實驗證明。

柒、結論

一、Auramine 可以增強化療藥物對 p53 突變型 CL1-0 細胞株的細胞凋亡作用

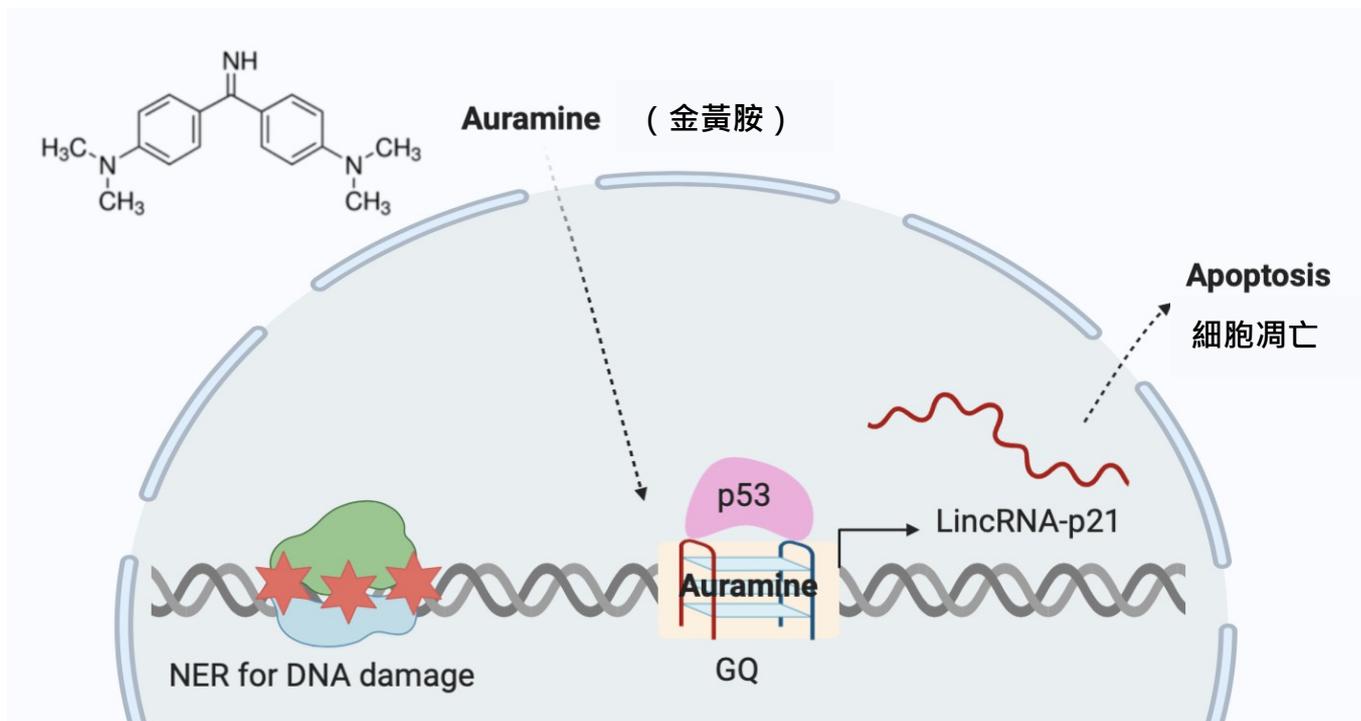
- (一) 在 CL1-0 細胞中，lincRNA-p21 的轉錄量會隨 auramine 濃度增加而隨之上升
- (二) 比較單獨給予藥物 (carboplatin 或 cisplatin) 與合併 auramine 處理的 CL1-0 細胞，觀察得知合併給予 auramine 可以有效增加 lincRNA-p21 表現量
- (三) 驗證 auramine 對於化療藥物對 CL1-0 細胞毒殺效果產生加成影響，合併 auramine 與化療藥物 (carboplatin 或 cisplatin) 可以使細胞存活率有效降低
- (四) 驗證合併給予 auramine 和化療藥物 (carboplatin)，可以有效增強 CL1-0 細胞株之細胞凋亡訊號

二、以 p53 正常型細胞株 A549 作為對照，發現 auramine 對化療藥物的增敏作用僅在 p53 突變型細胞株可見

- (一) 在 A549 細胞中，lincRNA-p21 的轉錄量會隨 auramine 濃度增加而隨之上升
- (二) 驗證在 p53 正常型細胞株，auramine 調控增加 lincRNA-p21 表現量的效果有限
- (三) 驗證在 p53 正常型細胞株中，合併給予 auramine 和化療藥物並沒有更增強細胞凋亡的訊號

三、綜合以上研究統整分析 auramine 影響化療抗藥性的機制並繪製模式圖

Auramine 合併化療藥物 carboplatin 或 cisplatin，在 p53 突變型的 CL1-0 細胞株中，相較於 p53 正常型的 A549 細胞株，較能藉由提升 lincRNA-p21 的轉錄量，引發細胞凋亡機制的啟動。因此證實本研究之假設，auramine 可以重新活化突變型 p53 蛋白，增加其下游分子 lincRNA-p21 的轉錄量，並達到加強細胞凋亡效果，進而改善肺癌化療抗藥性。



圖八、金黃胺調控 LincRNA-p21 表現而增強化療誘導細胞凋亡的可能機制。

Auramine 可藉由穩定 lincRNA-p21 promoter 上的特定 DNA 結構（GQ structure）使突變型 p53 與之結合，進而促進 p53 蛋白下游的 lincRNA-p21 的表現量。而增加的 lincRNA-p21 可以調控細胞凋亡機制，藉此提高癌細胞對化療的敏感度。

（圖片由研究者繪製）

四、本研究結果之未來應用可朝下列方向發展：

- （一）尋找並合成與 auramine 類似化學結構的分子，發展可重新活化突變型 p53 的藥物，改善癌症細胞對化療藥物的抗藥性。
- （二）了解 lincRNA-p21 在癌症形成與細胞凋亡上的調控機轉，並形成預測患者治療效果與存活率的生物指標。

捌、參考資料

1. Chaudhary R, & Lal A. Long noncoding RNAs in the p53 network. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2017, 8(3):1410-1433.
2. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2019, 94(8):1623-1640.
3. Göhler T, Jäger S, Warnecke G, Yasuda H, Kim E, Deppert W. Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acids Res* 2005, 33(3): 1087-1100.
4. Jones GS, & Baldwin DR. Recent advances in the management of lung cancer. *Clin Med* 2018, 18(2): s41-s46.
5. Li Y, Chen X, Tang Y, Tang Y, Yi B, Yang J, Li D, Zhou J. Relationship between lincRNA-p21 expression and human cancer prognosis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2018,11(11):1141511423.
6. Mantovani F, Collavin L, Sal GD. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* 2019, 26(2):199-212.
7. Parrales A, & Iwakuma T. Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy. *Front Oncol* 2017, 5:288-300.
8. Smolle E, & Pichler M. Non-smoking-associated lung cancer: a distinct entity in terms of tumor biology, patient characteristics and impact of hereditary cancer predisposition. *Cancers* 2019, 11(2): 204-216.
9. Tu C-Y, Wang B-W, Cheng F-J, Chen C-H, Hsia T-C, Wei Y-L, Chen C-Y, Hsieh I-S, Yeh Y-L, Wang L-Y, Chen C-M, Chang W-C, Huang W-C. Incense burning smoke sensitizes lung cancer cells to EGFR TKI by inducing AREG expression. *Am J Cancer Res* 2018, 8(12):2575-2589.
10. Tung J-C, Huang W-C, Yang J-C, Chen G-Y, Fan C-C, Chien Y-C, Lin P-S, Lung S-CC, Chang W-C. Auramine O, an incense smoke ingredient, promotes lung cancer malignancy. *Environ Toxicol* 2017, 32(11):2379-2391.
11. Václav Brázda and Miroslav Fojta. The Rich World of p53 DNA Binding Targets: The Role of DNA Structure. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20:5605-5622.
12. Wang M, Sun X, Wang H, Xin Y, Jiao W. Long non-coding RNAs in non-small cell lung cancer: functions and distinctions from other malignancy. *Transl Cancer Res* 2019, 8(7):2636-2653.
13. Xu H, Geng F, Wang Y, Xu M, Lai X, Qu P, Zhang Y, Liu B. A label-free fluorescent molecular

switch for a DNA hybridization assay utilizing a G-quadruplex-selective auramine O. *Chem. Commun* 2015, 51:8622-8625.

14. Zhang C, Leighl NB, Wu Y-L, Zhong W-Z. Emerging therapies for non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2019, 12(1):45-68.
15. Zheng H-C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 2017, 8(35): 59950-59964.
16. Zhou F, & Zhou C. Lung cancer in never smokers - the East Asian experience. *Transl Lung Cancer Res* 2018, 7(4):450-463.

【評語】 052014

1. 研究目的：

- 一、偵測 auramine 濃度與 lincRNA-p21 表現量之相關性
- 二、偵測 auramine 結合化療藥物後的 lincRNA-p21 表現量
- 三、利用 Colony Formation assay 與 MTT assay 實驗，觀察 auramine 結合化療藥物對細胞之毒殺效果
- 四、利用西方墨點法實驗，分析 auramine 結合化療藥物造成之細胞凋亡指標表現量
- 五、探討 auramine 對化療藥物的增敏作用是否發生在 p53 正常型細胞株中

此作品的研究目的明確且聚焦，問題或方法有創意，實驗設計合邏輯且考慮周詳具體可行，有初步結果顯示可行性。其他影響細胞凋亡細胞傳遞的因子也可以測試他們的表現。

- ### 2. Auramine 藉由 LincRNA-p21 而影響化療效果，尚未見相關的報告發表，然 LincRNA-p21 對化療/放療的影響，是有些文獻的蛛絲馬跡可循，整體而言還是有些新穎性。但因 Auramine 會促進癌轉移且在 NSCLC 預後的角色仍有爭議，令人有些擔心其結果對相關研究領域是否具貢獻。

3. 此研究所使用的方法大致合理可行，多數資料的數據分析有使用統計方法及顯著性檢定，以確定不同組別之間是否具有顯著性差異。建議應增加 Auramine 合併化療藥物處理後，對細胞移動及侵襲能力的影響，及合併處理後對肺癌細胞生長的抑制是否具有協同作用或加成作用。此外，此研究使用的化療藥物濃度高達 100 μM ，與文獻報導不符合。在此作品中，並無證據顯示 Auramine 可重新激活突變型的 p53。
4. 簡報資料編排合理，但整體內容的字數稍嫌過多，圖的 X 及 Y 軸字體可以再大一些。

作品簡報

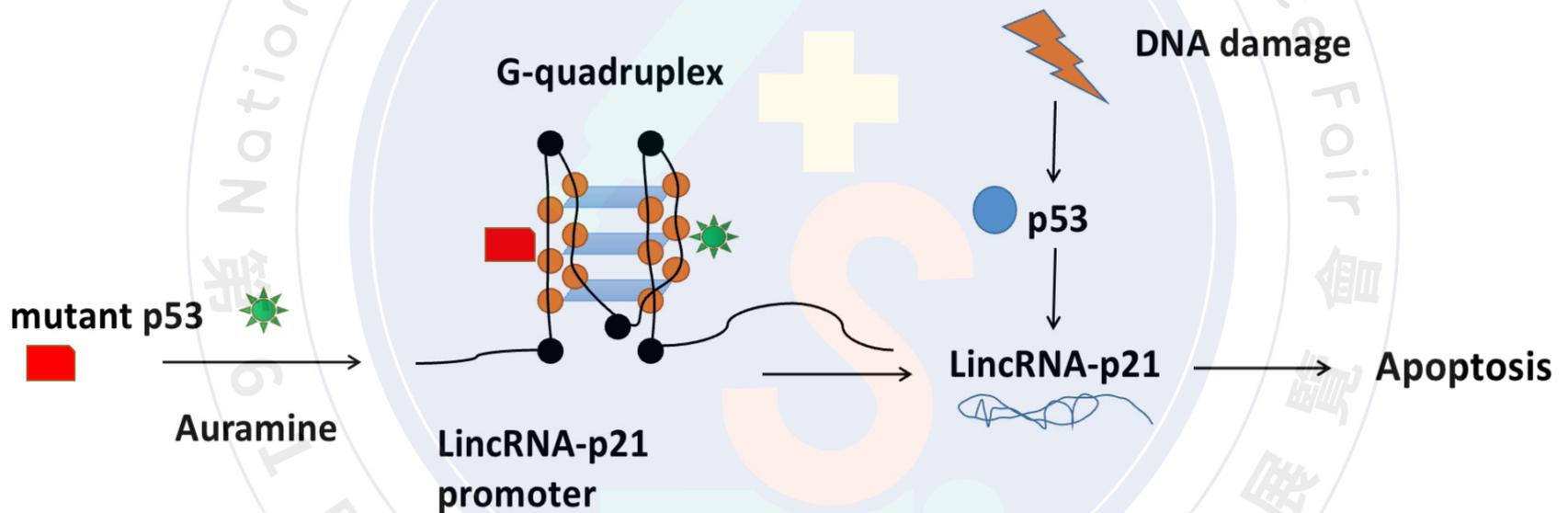
LincRNA-p21參與線香成分 Auramine影響化療抗性之探討

科 別：動物與醫學學科

組 別：高中職組

研究問題及目的

當腫瘤細胞接受化療藥物刺激導致 DNA 損傷時，腫瘤抑制蛋白 p53 會被活化並啟動下游細胞凋亡機制。但腫瘤細胞常因 TP53 基因的錯義突變，產生突變型 p53 蛋白，失去抑制腫瘤的作用導致化療抗藥性的產生。**如何重新活化突變型 p53 蛋白，啟動原先調控的細胞凋亡機制，將是解決當前化療藥物抗藥性的關鍵。**



研究目的：探討線香成分Auramine是否藉由調控LincRNA-p21的轉錄量，達到重新活化突變型p53蛋白的效果，以重新啟動細胞凋亡，解決p53蛋白突變所導致的化療抗藥性問題

研究架構及方法

(一)、偵測Auramine濃度對於LincRNA-p21表現量之影響

- 在給予p53突變型細胞不同濃度之Auramine後，將反轉錄後的cDNA進行聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR) 分析，以測量LincRNA-p21的轉錄量

(二)、偵測Auramine結合化療藥物後的LincRNA-p21表現量

- 在 Auramine結合化療藥物後，將反轉錄後的cDNA進行聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR) 分析，以測量LincRNA-p21的轉錄量差異

(三)、觀察Auramine結合化療藥物的細胞毒殺效果

- 利用Colony formation assay、MTT assay，觀察Auramine結合化療藥物是否在p53突變型肺癌細胞中較有毒殺效果

(四)、分析Auramine結合化療藥物的細胞凋亡指標表現量

- 以西方墨點法偵測Auramine結合化療藥物後，常見細胞凋亡指標在p53突變型肺癌細胞的表現量差異

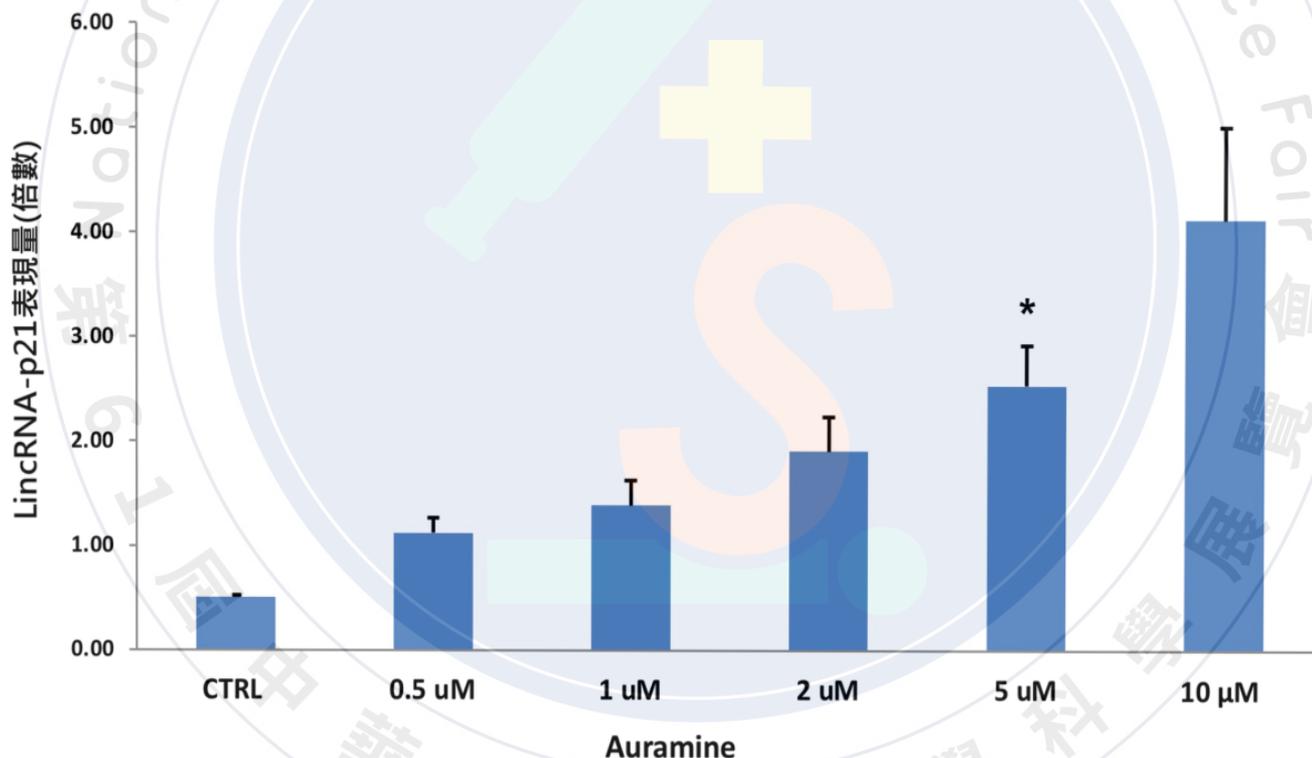
(五)、探討Auramine對化療的增敏作用是否在p53正常型細胞株可見

- 在p53正常型細胞株中，同樣進行上述 (一) (二) (四) 實驗，比較兩種細胞株之實驗結果

研究結果

一、偵測在p53突變型細胞株中Auramine濃度對於LincRNA-p21表現量之影響

以不同濃度的auramine處理CL1-0細胞株，再經由qRT-PCR的結果得知，在CL1-0細胞株中，lincRNA-p21的表現量隨著auramine的濃度上升而增加。其中auramine濃度為10 μM 時，lincRNA-p21的表現量上升幅度最顯著。



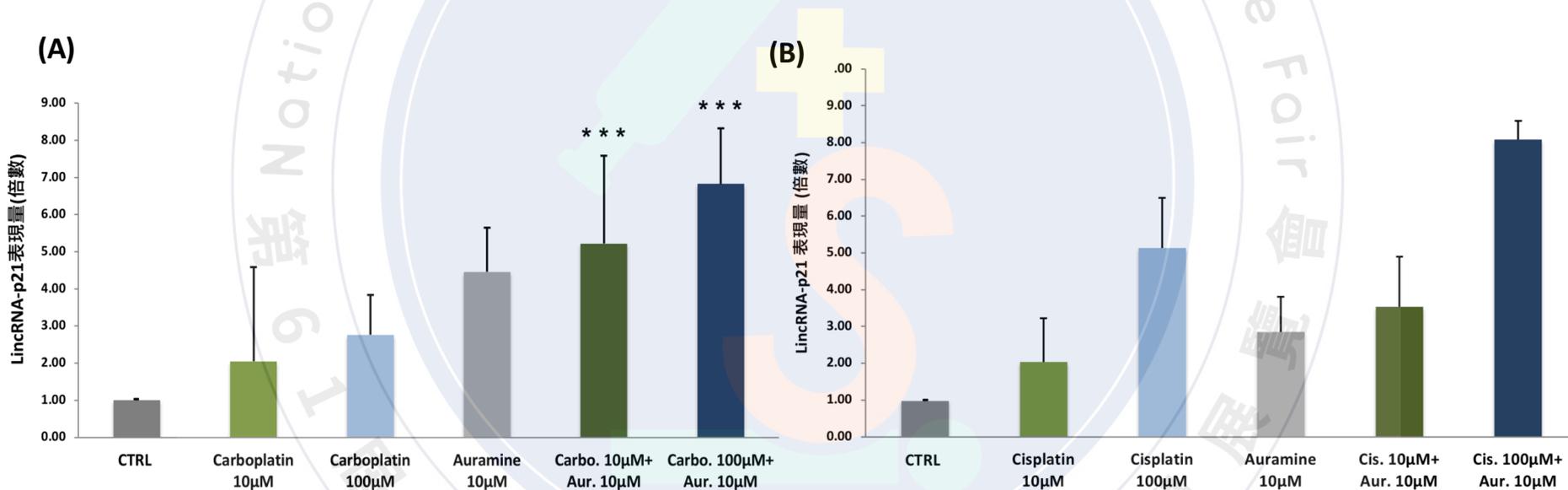
圖一、不同濃度auramine處理的CL1-0細胞株之lincRNA-p21表現量

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

研究結果

二、偵測在p53突變型細胞株中Auramine結合化療藥物的LincRNA-p21表現量

從qRT-PCR的實驗結果可以得知，在CL1-0細胞株中，合併給予auramine和兩種不同化療藥物 (carboplatin、cisplatin) 時的lincRNA-p21表現量，相較於單獨給予化療藥物，其上升幅度有明顯增加。此結果證明，**在CL1-0細胞株中，auramine搭配化療藥物可提高lincRNA-p21轉錄量。**



圖二、(A) Carboplatin合併Auramine處理的CL1-0細胞株之LincRNA-p21表現量

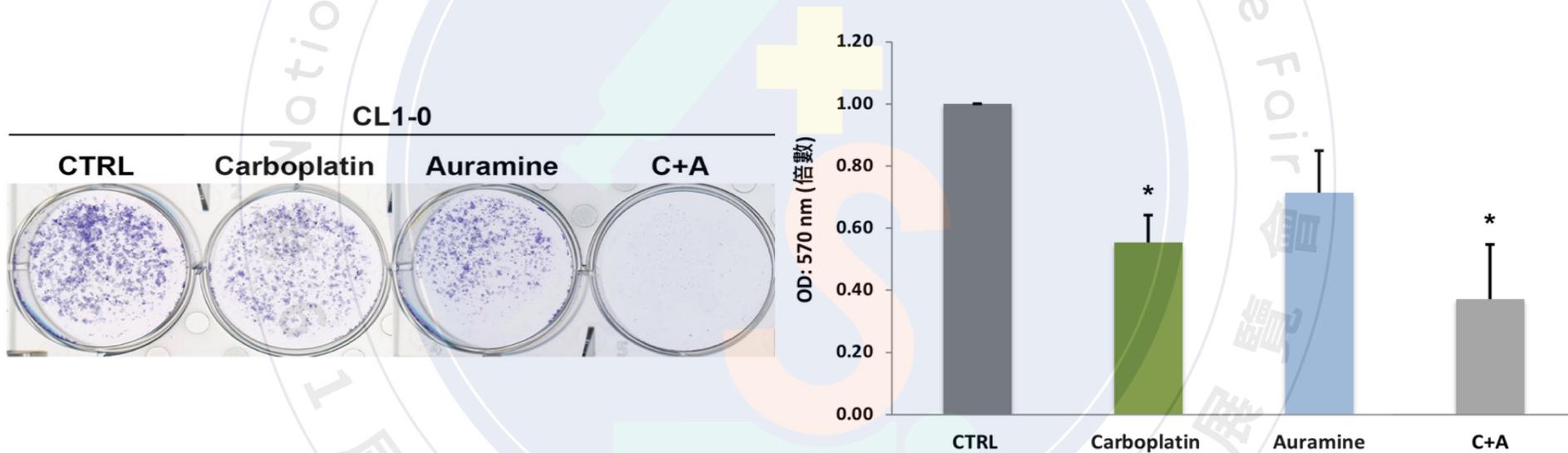
(B) Cisplatin合併Auramine處理的CL1-0細胞株之LincRNA-p21表現量

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

研究結果

三、觀察在p53突變型細胞株中Auramine結合化療藥物之細胞毒殺效果

根據細胞群落形成能力分析的結果，發現當合併給予auramine與化療藥物 (carboplatin) 時，CL1-0細胞株的群落形成能力，相較於單獨給予化療藥物時下降許多，也就是**合併給予auramine能有效使細胞存活率降低**。

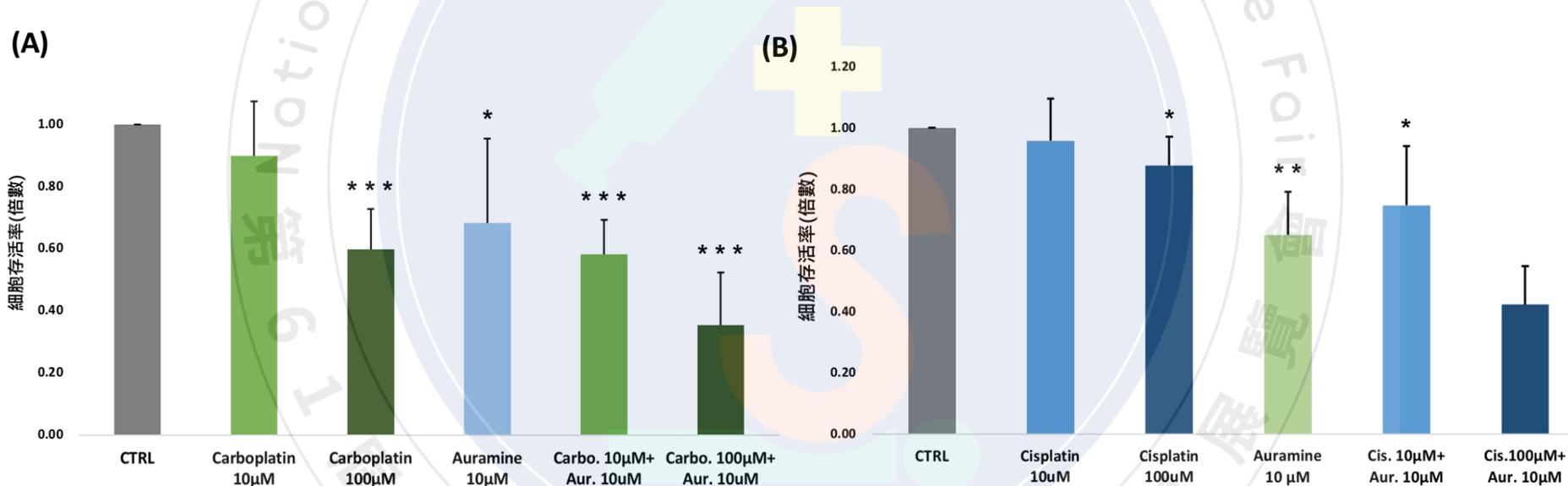


圖三、 Carboplatin合併Auramine處理的CL1-0細胞株之細胞群落形成能力分析
(右表為左圖之量化值，*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

研究結果

三、觀察在p53突變型細胞株中Auramine結合化療藥物之細胞毒殺效果

從細胞存活率分析的結果，可以發現合併給予auramine和兩種化療藥物時，細胞毒殺效果都較單獨給予化療藥物時更有效。因此得知**合併給予auramine和carboplatin或cisplatin**，在CL1-0細胞株中都可以達到更好的細胞毒殺效果。



圖四、(A) Carboplatin合併Auramine處理的CL1-0細胞株之細胞存活率

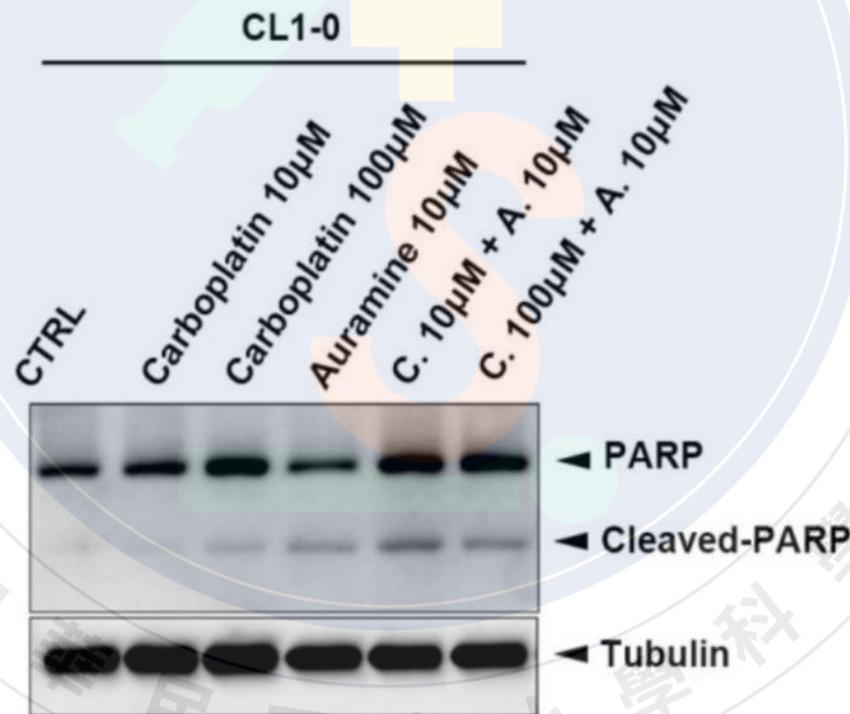
(B) Cisplatin合併Auramine處理的CL1-0細胞株之細胞存活率

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

研究結果

四、分析在p53突變型細胞株中Auramine結合化療藥物的細胞凋亡指標表現量

利用西方墨點分析 (Western Blot) 偵測p53突變型的CL1-0細胞株是否進行細胞凋亡。根據結果發現，合併給予細胞auramine和carboplatin，相較於單獨給予化療藥物時，能偵測到較強的PARP裂解片段的訊號 (Cleaved-PARP)，也是細胞凋亡的生物指標之一，這個結果顯示**auramine確實能在CL1-0細胞株重新啟動細胞凋亡機制**。

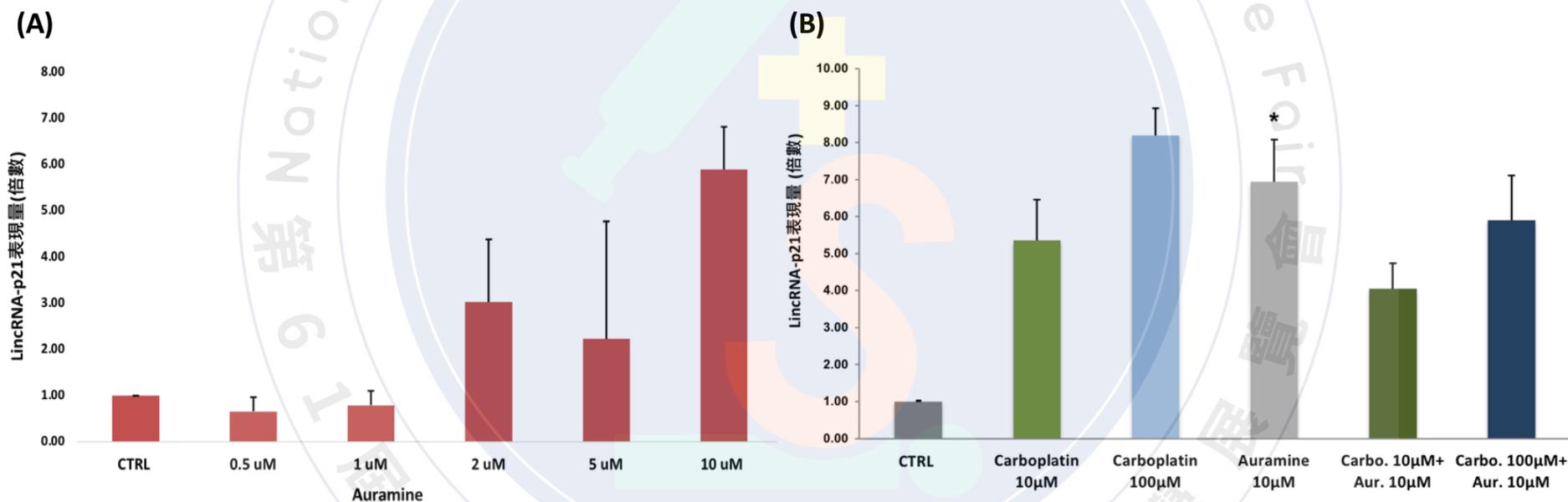


圖五、Carboplatin合併Auramine處理的CL1-0細胞株之細胞凋亡指標訊號

研究結果

五、探討Auramine對化療的增敏作用是否在p53正常型細胞株可見

qRT-PCR的結果顯示，在A549細胞株中lincRNA-p21的表現量會隨著auramine的濃度增加而上升，但在合併給予auramine與化療藥物時，lincRNA-p21之表現量並沒有比單獨給予化療藥物時高。

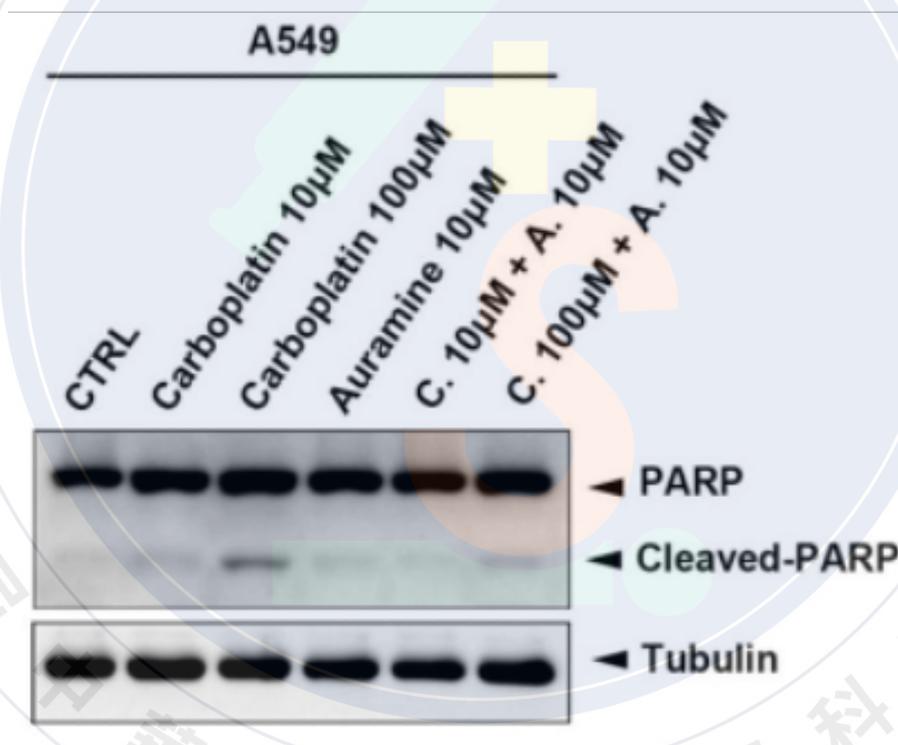


圖六、(A) 不同濃度Auramine處理的A549細胞株之LincRNA-p21表現量
(B) Carboplatin合併Auramine處理的A549細胞株之LincRNA-p21表現量
(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

研究結果

五、探討Auramine對化療的增敏作用是否在p53正常型細胞株可見

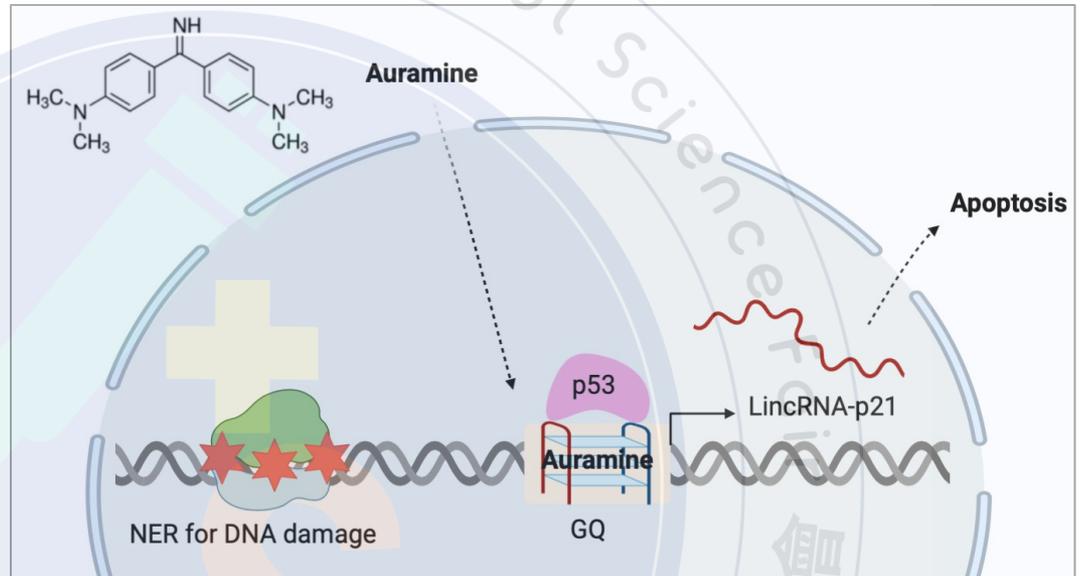
根據西方墨點法實驗結果，在A549細胞中合併給予auramine和carboplatin無法增強細胞凋亡訊號（Cleaved-PARP），僅給予化療藥物的細胞凋亡訊號便已經顯著，而合併給予auramine沒有產生更強訊號。



圖七、Carboplatin合併Auramine處理的A549細胞株之細胞凋亡指標訊號

結論

- 一、Auramine可以增強化療藥物對p53突變型CL1-0細胞株的細胞凋亡作用。
- 二、以p53正常型細胞株A549作為對照組，發現auramine對化療藥物的增敏作用，僅在p53突變型細胞株可見。
- 三、綜合以上研究統整分析auramine影響化療抗藥性的機制，繪製(圖八)的模式圖。



圖八、金黃胺調控LincRNA-p21表現而增強化療誘導細胞凋亡的可能機制

Auramine可藉由穩定lincRNA-p21啟動子上的特定DNA結構（GQ structure），使突變型p53可仍可以結構辨識的方式高親和力的結合在啟動子上，進而促進p53蛋白下游的lincRNA-p21基因的表現。而增加的lincRNA-p21可以調控細胞凋亡機制，藉此提高癌細胞對化療的敏感度。

未來展望

- 一、尋找並合成與auramine化學結構相似的分子，發展出可以重新活化突變型p53的藥物，並探討p53蛋白與GQ結構結合的機制，以改善癌症細胞對化療藥物的抗藥性。
- 二、了解lincRNA-p21在非小細胞肺癌的致病機轉與細胞凋亡上的調控機制，並發展成預測癌症患者接受化療藥物治療效果與預後存活率的生物指標。

參考資料

1. Xu H, Geng F, Wang Y, Xu M, Lai X, Qu P, Zhang Y, Liu B. A label-free fluorescent molecular switch for a DNA hybridization assay utilizing a G-quadruplex- selective auramine O. *Chem. Commun* 2015, 51:8622-8625.
2. Göhler T, Jäger S, Warnecke G, Yasuda H, Kim E, Deppert W. Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acids Res* 2005, 33(3): 1087-1100.
3. Chaudhary R, & Lal A. Long noncoding RNAs in the p53 network. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2017, 8(3):1410-1433.
4. Gilson P, Drouot G, Witz A, Merlin J-L, Becuwe P, Harlé. Emerging roles of DDB2 in cancer. *Int J Mol Sci* 2019, 20(20): 5168-5177.