

108 學年度

中山醫學大學生物醫學科學系

專題研究競賽

大會手冊

主辦單位：

中山醫學大學生物醫學科學系

中華民國一百零八年九月五日

目錄

口頭論文發表大會議程	3
1 甯治鈞：二氫嘧啶水解酶與抗癌藥物 5-氟尿嘧啶的分子複合結晶結構	4
2 溫建泓：比較 GATK4 和 GATK3 的 NGS 數據分析差異	5
3 李美寰：精胺酸甲基轉移酶調控誘發型一氧化氮生成之機轉研究	6
4 賴怡婷：探討光敏潛力材料對乳癌細胞毒殺的分子機制	7
5 張景翔：探討紫紅素對大鼠心肌缺血/再灌注傷害的治療效益	8
6 徐悅恬：橙花叔醇減少心肌缺血再灌注損傷的評估	9
7 鐘明耀：芬普尼單株抗體之製備並將其應用於酵素免疫連結吸附分析	10
8 章禮君：利用四環素調節的雙分子螢光互補方法驗證 Jhd2 和 Not4 蛋	10
9 林筱淳：X 藥物對胃潰瘍模式小鼠的保護效力	11

口頭論文發表大會議程

108 年 9 月 5 日(星期五) 正心 0323 教室

1:20 主任致辭			
時間		報告講題	學生/指導教授
1	1:30~1:50	二氫嘧啶水解酶與抗癌藥物 5-氟尿嘧啶的分子複合結晶結構 Crystal structure of dihydropyrimidinase in complex with anticancer drug 5-fluorouracil	甯治鈞/黃晟洋
2	1:50~2:10	比較GATK4和GATK3的NGS數據分析差異 Comparing the results of GATK4 and GATK3 NGS data analysis.	溫建泓/劉玉凡
3	2:10~2:30	精胺酸甲基轉移酶調控誘發型一氧化氮生成之機轉研究 Modulation of inducible nitric oxide synthesis by arginine methylation in MES-13 cells.	李美寰/林庭慧
4	2:30~2:50	探討光敏潛力材料對乳癌細胞毒殺的分子機制 To investigate the molecular mechanisms of photosensitive potential materials for the damages of breast cancer cells	賴怡婷/張文瑋
5	2:50~3:10	探討紫紅素對大鼠心肌缺血/再灌注傷害的治療效益 Purpurin attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury In Rats	張景翔/廖娟妙
3:10~3:20 休息			
6	3:20~3:40	橙花叔醇減少心肌缺血再灌注損傷的評估 Nerolidol alleviate myocardial ischemia reperfusion injury	徐悅恬/黃相碩
7	3:40~4:00	芬普尼單株抗體之製備並將其應用於酵素免疫連結吸附分析法及奈米金粒子免疫層析試紙之開發 Production of Antibodies and their Application to ELISA and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Fipronil	鐘明耀/余豐益
8	4:00~4:20	利用四環素調節的雙分子螢光互補方法驗證 Jhd2 和 Not4 蛋白質在白色念珠菌具交互作用 The use of a tetracycline-regulated bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay to verify the interaction between Jhd2 and Not4 in <i>Candida albicans</i>	章禮君/謝家慶
9	4:20~4:40	X 藥物對胃潰瘍模式小鼠的保護效力	林筱淳/王淑紅

二氫嘧啶水解酶與抗癌藥物 5-氟尿嘧啶的分子複合結晶結構

Crystal structure of dihydropyrimidinase in complex with anticancer drug 5-fluorouracil

學生：甯治鈞 指導教授：黃晟洋

摘要：

研究背景含動機：

二氫嘧啶水解酶 (Dihydropyrimidinase; DHPase) 在嘧啶代謝過程中扮演速率決定步驟的關鍵酵素，若能有效抑制此酵素則能影響 DNA 鹼基的生合成，進而達到抑制生物的生長。5-fluorouracil (5-FU) 是一種 FDA 核可使用的抗代謝用藥，目前廣泛用於治療人類的各癌症。若能將 DHPase 和 5-FU 結合並解出複合結晶結構，就能了解其分子層次的作用機制而有望達成抑制酵素的功用，對於將來應用理性藥物設計能提供非常重要的基礎。

所用方法：

大腸桿菌的 DHPase 質體轉型與 IPTG 誘導、大量培養與蛋白質表達，經過破菌、離心與管柱層析純化出 DHPase。經過多種條件測試得到濃縮和去鹽的合適條件以及懸滴法嘗試獲得 DHPase 和 5-FU 的複合晶體。晶體利用同步輻射光、HKL2000 計算、傅立葉轉換並解出目標結構。

結果：

DHPase 順利大量表達並已純化出，最適濃縮和去鹽條件也已找出。晶體成長並收集繞射數據、解出 DHPase 和抗癌藥物 5-FU 的複合結構，解析度為 1.76 Å 的高解析度。5-FU 其結合位置確實在 DHPase 的活性中心，與 His61、Tyr155、Asp316、

Cys318、Ser289、Asn337 有交互作用，其中 Tyr155 和 Cys318 明顯重要。目前我們已另外進行突變以及其他細胞訊息途徑研究。

研究結論與未來展望:

我們將結合其他研究，希望對抑制 DHPase 而達到抑制細胞生長的藥物設計產出貢獻。我們亦優化嘗試取代 5-FU 的 imide bond 以便更佳了解其結合機制、效果與實際應用。

2

比較GATK4和GATK3的NGS數據分析差異

Comparing the results of GATK4 and GATK3 NGS data analysis.

學生：溫建泓 指導教授：劉玉凡

摘要：

癌症的發生的原因有90%是因為體細胞的突變(Somatic mutations)，其可能為有害物質的暴露、不良的生活習慣等等所導致。

GATK(Genome Analysis Toolkit)，為一個由Broad Institute開發較具公信力的人類基因體分析工具，我們根據GATK網站上的建議步驟將33位口腔癌病人的全外顯子定序資料利用不同版本的GATK來做體細胞突變的分析，而GATK3和GATK4其主要差異為判定標準的改變及演算模型的更換。

結果上，使用GATK4時，所認為的變異平均上大約2200個，而使用GATK3時，大約有6000個，對於GATK3來說，分析出來的共同變異平均只佔了其所有變異的17%(兩版本相同變異/GATK3全部變異)，這似乎是有點低，於是我們利用PHIAL做了更進一步的比較。

PHIAL(precision heuristics for interpreting the alteration landscape)，是一個同樣由Board Institute開發的軟體，主要是將臨床藥物的關聯性給視覺化，比較的結果上GATK4所發現的變異不管是在臨床藥物的目標變異上、臨床藥物相關反應路徑上或者癌症相關反應路徑上都相較於GATK3好，選擇GATK4分析會是比较好的方法。

根據PHIAL和GATK4，我們發現在33位病人中有31位有臨床藥物使用，31位病人中平均一個人有3.7個可用藥物，而根據GATK3在33位病人只有29位有臨床藥物使用，29位病人中平均一個人有3.2個可用藥物，因此在未來來，NGS的資料分析上GATK4會是比较好的選擇，因為它能提供較為可信的變異點，為標靶藥物的投放、免疫療法的開發提供有力的支持。

3

精胺酸甲基轉移酶調控誘發型一氧化氮生成之機轉研究

Modulation of inducible nitric oxide synthesis by arginine methylation in MES-13 cells.

學生：陳美寰 指導教授：林庭慧

摘要：

Prolonged inflammation reactions lead to chronic diseases. Overproduction of nitric oxide (NO) by inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been implicated in inflammatory disorders. Methyltransferases (MTases) catalyze the transfer of methyl groups to their substrates in cellular methylation reactions. MTases are emerging as targets for drug discovery since MTases are implicated in normal physiology and human diseases. How iNOS-derived NO interacts with cellular methylation reactions within cells is an important question to be answered. Our results demonstrated iNOS-derived NO modulated the protein expression of enzymes central to the cellular methylation reactions and triggered global DNA and protein arginine/lysine methylation in MES-13 cells. Adenosine dialdehyde (*AdOx*), a broad-spectrum methyltransferase inhibitor, inhibited LPS/IFN γ -stimulated NO production and iNOS mRNA and protein expression in MES-13 cells. *AdOx* blocked NF κ B nuclear translocation but showed no effect on ERK, STAT 1 α signaling pathway in MES-13 cells. Among different MTases, protein lysine methyltransferase 7/9 (Set7/9), protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1), PRMT4,

PRMT5 and PRMT6, have been reported to modulate NF- κ B-dependent gene expression either through forming a complex with transcription factors or methylate NF- κ B directly. Gene silencing of SET7/9 with small interfering RNAs (siRNA) in MES-13 cells significantly inhibited iNOS protein expression. Ongoing experiments are performed to specific knockdown gene expression of PRMT1, 4, 5 and 6 using siRNA or shRNA-encoding lentiviruses. Our data suggest protein methylation may be implicated in inflammatory disorders though controlling the synthesis of NO. Exploring specific MTases involving in iNOS-derived NO may provide therapeutic applications in treatment of chronic inflammatory diseases.

4

探討光敏潛力材料對乳癌細胞毒殺的分子機制

To investigate the molecular mechanisms of photosensitive potential materials for the damages of breast cancer cells

學生：賴怡婷 指導教授：張文瑋

摘要：

根據衛生福利部國民健康署統計資料顯示，惡性腫瘤蟬聯國人十大死因首位已超過 30 年。癌症治療包含多種方式，其中光動力療法(Photodynamic therapy, PDT)，相較於其他治療方式，沒有手術傷口癒合的顧慮，也可有效的控制治療範圍及時間，光敏藥物的選擇也可降低副作用，在癌症治療上有相當多的安全性及優點。本研究中，我們預計探討可以同時吸收 350-410nm 之紫外光及 750-800nm 之近紅外光的類菌綠素(Bacteriochlorin-like)材料 LS-01'、LS-01''，是否具有光敏效果，進而促使 MCF7 乳癌細胞產生生長抑制。在初步結果中，類菌綠素材料 LS-01'、LS-01''的暗室毒性測試顯示，在沒有其他提高效能的複合材料下，分別在濃度 3.125 μ M、12.5 μ M 對於 MCF7 乳癌細胞僅有約 20%的細胞毒性效果，符合光敏劑之低暗室毒性條件。我們也將類菌綠素材料在加入細胞培養液的 30 分鐘後移除，並以波長為 405 nm 之雷射二極體作為激發光源照射後，顯示在光的輔助下有增強細胞毒殺效果，表示此類菌

綠素材料確實有進入細胞內且具光敏劑效果。此外，我們也初步發現，兩種類菌綠素材料在 405nm 光照的輔助下，可降低 MCF7 乳癌細胞內存活蛋白 Survivin 的表現。未來，我們將進一步利用近紅外光作為激發光源，探討 Survivin 之表現是否參與在類菌綠素材料 LS-01'、LS-01''導致癌細胞的光照毒殺之分子作用機轉中，並進一步設計適當的藥物載體，以提高兩種類菌綠素材料被生物利用的效率，同時讓此複合系統具有癌症標靶的功能，透過穿透深度較深的近紅外光來驅動光動力療法以達到好的臨床治療效果。

5

探討紫紅素對大鼠心肌缺血/再灌注傷害的治療效益

Purpurin attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury In Rats

學生：張景翔 指導教授：廖娟妙

摘要：

紫紅素，Purpurin(1,2,4-trihydroxyanthraquinone)，是一種萃取自茜草(Rubia tinctorum)與亞洲茜草(Rubia akane)根部的蒽醌衍生物，在先前的研究中發現其具有抗菌、抗氧化及抗發炎...等能力，經評估認為其抗氧化及抗發炎機制可能對心肌的缺血/再灌注(ischemia/reperfusion)傷害具有保護作用，在心肌梗塞治療上有作為藥物之潛力。

藉由結紮左上冠狀動脈來製造缺血的病理條件，實施結紮時間為一小時，隨後解開結紮三個小時以達到缺血再灌注的病理狀態，在結紮前 15 分鐘經靜脈注射給予

Purpurin 或其等濃度之載體，經觀察心電圖計算因缺血再灌注傷害而誘導的心律不整做為心肌傷害之評估。另秤重計量梗塞缺氧和正常細胞、缺氧和死亡細胞之比例，以預評估給藥組與控制組兩者差異是否達到顯著差異。在本研究計劃中，已有預試

驗結果指出 Purpurin 在減少心肌缺血再灌注傷害可能具有潛力。爾後，我們將血液離心後取血漿送檢，另取心臟勻漿進行膠體電泳，以分析各項抗體與蛋白表現量以探討 Purpurin 確切所作用之生理途徑，並評估其藥理特性與是否適合作為心肌缺血再灌注的藥物。

6

橙花叔醇減少心肌缺血再灌注損傷的評估
Nerolidol alleviate myocardial ischemia reperfusion injury

學生：徐悅恬 指導教授：黃相碩

摘要：

橙花叔醇 (Nerolidol) 是天然的倍半萜烯醇，存在於具花香氣味的各種植物中，其具有抗氧化和抗發炎的活性，認為可能有保護心臟減少心肌缺血再灌注損傷之潛力。

然而截至目前，尚

未有研究證實 Nerolidol 是否對大鼠心肌缺血再灌注損傷具有保護作用，因此本研究的目的是要透過大鼠心肌缺血再灌注損傷的模式來驗證 Nerolidol 的作用。我們將雄性 Sprague-Dawley 大鼠結紮左前降支冠狀動脈造成其缺血 60 分鐘，而後放開結紮處造成血液再灌注 3 小時，造成缺血再灌注損傷，並在缺血前 15 分經由靜脈注射投予 Nerolidol 或載體，透過檢測心肌缺血再灌注損傷誘導的心律不整、心肌梗塞區域和細胞損傷程度來驗證 Nerolidol 的心臟保護效果。在預試驗結果中，我們發現 Nerolidol 的大鼠降低心肌缺血再灌注損傷誘發的心室性心律不整和死亡率，且 Nerolidol 還可以減少心肌缺血再灌注損傷造成的心肌梗塞的體積，因此在本研究計劃中，我們將進一步評估 Nerolidol 對於大鼠心肌缺血再灌注損傷的心臟保

護作用，並深入的探討其分子作用機制。

7

芬普尼單株抗體之製備並將其應用於酵素免疫連結吸附分析法及奈米金粒子免疫層析試紙之開發 Production of Antibodies and their Application to ELISA and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Fipronil

學生：鐘明耀 指導教授：余豐益

摘要：

芬普尼 (Fipronil) 為一種苯基吡唑類殺蟲型農藥，常用於螞蟻、白蟻、甲蟲、蟑螂、扁蝨、蜜蜂等昆蟲的殺蟲劑。經國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 研究發現，Fipronil 具有致癌性。因此我國政府訂定 Fipronil 的限制含量，於包莖菜類、茄子為 30 ppb，蛋類為 10 ppb，紅豆為 2 ppb，玉米、米類、芒果、小黃瓜、茶葉為 1 ppb。我國衛生福利部食品藥物管理署報告中指出於 2008－2011 年間共有 54 件農作物含有過量的 Fipronil，更於 2019 年 2 月 17 日查出含有 Fipronil 的雞蛋流入市面。因此本研究欲利用抗原-抗體專一性結合的特性，開發一快速免疫檢測分析方法來檢測雞蛋、蛋製品及農產品中 Fipronil。本研究將 Fipronil 結合載體蛋白質做為免疫抗原，並注射入 BalB/c 小鼠內以製備對 Fipronil 專一性之抗體，再利用融合瘤技術製備 Fipronil 的單株抗體。並利用此 Fipronil 的專一性抗體來建立一套針對 Fipronil 的酵素連接免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)。本研究於免疫後第 9 週利用 ELISA 檢測小鼠血清，發現已成功製備出對 Fipronil 具有專一性之抗體，其一號小鼠及二號小鼠血清中抗體抑制 50% 抗原-酵素接合物與抗體接合所需的抗原濃度 (IC_{50}) 分別為 74.8 ng/mL 及 65.6 ng/mL。但其抗體的敏感度仍高於限制含量，所以本研究將持續加強免疫老鼠，期望小鼠對 Fipronil 專一性之抗體其專一性增強後，利用融合瘤技術製備 Fipronil 的單株抗體並進一步利用此單株抗體開發快速免疫層析試紙。

8

利用四環素調節的雙分子螢光互補方法驗證 Jhd2 和 Not4 蛋白質在白色念珠菌具交互作用

The use of a tetracycline-regulated bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay to verify the interaction between Jhd2 and Not4 in *Candida albicans*

學生：章禮君 指導教授：謝家慶

摘要：

Candida albicans is a member of commensal flora in healthy human body. However, it serves as opportunistic fungal pathogen in the immunocompromised patients, such as HIV infection and chemotherapy. Recently, *C. albicans* was reported as the 4th pathogen of healthcare-acquired infections in the ICU of Taiwan. If the care of infection was out of control, invasive candidiasis would severely lead to death. Morphological plasticity of *C. albicans* adapted to variety of environment contributed to its pathogenesis.

Gene expression depended on the methylation of histone H3 at Lys4 has been known in eukaryotes. In *Saccharomyces cerevisiae*, JmjC domain-containing H3K4 demethylase (Jhd2) solely antagonizes the trimethylation of H3K4 state, and is broken down through ubiquitination catalyzed by Not4, which is a ubiquitin ligase in the CCR4-NOT complex. However, the interaction between Jhd2 and Not4 associated with morphogenesis in *C. albicans* is unclear.

In this study, tetracycline-regulated bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) was utilized to validate the interaction between *CaNot4* and *CaJhd2* in vivo. Split-mCherry complex is used as the reporter. We constructed the Tet-on systems capable of expressing either RN (1-159 amino acid of mCherry) or RC (160-237 amino acid of mCherry) fused to *CaNot4* or *CaJhd2*. These two Tet-on systems carrying a hygromycin B selectable marker (*CaHygB*) and a nourseothricin selectable marker (*CaSAT1*), respectively, were transformed into the *C. albicans* strains RBY717 (a/a) and RBY722 (α/α) which possess mating competency after transformed into opaque state. By mating of opaque cells with Tet-on systems, the BiFC vectors will be efficiently implemented into a *C. albicans* cell. Red fluorescence observed under a fluorescent microscope is expected when the interactions occur.

At the same time, the timing of *CaNot4*-*CaJhd2* interaction will be addressed through a variety of morphological stimuli, including serum at 37°C, nutrient starvation, cell cycle arrest or acidic and basic pH. After verifying the interaction between *CaJhd2* and *CaNot4*, I will perform immunoprecipitation of *CaJhd2* followed by a western blotting to verify the presence of ubiquitinated Jhd2. In addition, the location of the interaction should be predicted in the nucleus and the intensity of red fluorescence will be quantified under different conditions.

In conclusion, the BiFC system allows effective visual assay for *CaNot4* and *CaJhd2* interactions in a *C. albicans* cell. Combined with chemical genetics and biochemical assay, it helps us understanding the relationship between *CaNot4* and *CaJhd2* in the morphogenesis of *C. albicans*.

9

X 藥物對胃潰瘍模式小鼠的保護效力

學生：林筱淳 指導教授：王淑紅

摘要：

消化性潰瘍是成年常見的疾病之一，根據西方國家的統計其盛行率為 10%。而在台灣，無症狀的胃潰瘍的盛行率就高達 4.7%。且一旦罹患消化性潰瘍沒有妥善處理，每年有 50%-80%的疾病復發率，嚴重的會引起胃癌、胃出血或胃穿孔，目前臨床上質子幫浦抑制劑(PPI)為常見的治療方式，但有引發神經病變、惡性貧血腎衰竭及失智症的副作用。故找尋其它低副作用且有效的天然藥用植物有其必要性。本實驗主題測試 X 藥物對胃潰瘍模式小鼠的保護效力。X 藥物是台灣特有種植物，目前僅少數研究指出在 *in vitro* RAW264.7 cells 中，葉部 X 萃取物具有抗發炎及中和自由基的效力，而自莖幹的 X 萃取物則具有殺死癌細胞的功用。實驗首先以 HCL/Ethanol 誘導胃潰瘍 2 小時，建立胃潰瘍模式小鼠，並觀察長期服用 X 藥物是否對胃潰瘍之模式小鼠具保護效力。實驗步驟採連續管餵高劑量(100mg/kg)、低劑量(50mg/kg)X 藥物 22 天後，以 HCL/Ethanol 誘導胃潰瘍 2 小時後犧牲，心臟採血、取下胃並沿胃大彎剪開胃部，觀察胃內部黏膜層損傷狀況，發現胃潰瘍組別的黏膜層有明顯焦黑灼傷的帶狀區塊，在陽性治療對照組(Carbenoxolone 100 mg/kg)中則明顯的灼傷區塊減少，而不管在低劑量 (50mg/kg)及高劑量(100mg/kg) X 藥物作用下，皆呈現出灼傷區域的下降現象，且具有劑量效應。根據潰瘍面積除以胃部總面積得出各組 Ulcer Index(UI)指數，ulcer 組,陽性治療組(Carbenoxolone)，低劑量 X 及高劑量 X 治療組,UI 指數分別為:20.37%,1.71%,9.95%,4.36%，計算出陽性治療組，高低 X 藥物治療組對於胃潰瘍的保護指數分別為 91, 78 及 51%。胃組織切片 HE 染色結果中，可發現胃潰瘍組有明顯的細胞壞死、排列混亂，皮下組織水腫和炎症細胞浸潤，在陽性治療組

及高低 X 治療組中都可看出組織水腫現象、炎症浸潤及壞死現象減少，且高劑量 X 治療效果明顯比低劑量 X 治療組好。綜合上述結果，X 藥物對於胃潰瘍具保護效力且呈現出劑量效應。未來將提高 X 藥物劑量並縮短給藥時間，分析 X 藥物對胃潰瘍的保護效力、最佳治療劑量及其分子機制，如：血清發炎指數，胃黏液含量，細胞凋亡蛋白及組織抗氧化力。另外也分析單獨給予 X 藥物是否造成肝腎毒性。進一步分析 X 藥物是否將來可以作為胃潰瘍的治療藥物之一。