

中華民國第 62 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

052014

「蝦!」你是我的囊中物

學校名稱：臺中市立臺中第二高級中等學校

作者： 高二 江宗任 高二 黃世均 高二 陳奕翔	指導老師： 吳如玉
---	------------------

關鍵詞：蝦紅素、奈米囊泡、黑色素癌

摘要

近年發現，以腫瘤本身或分泌物作為藥物載體時，具有高度生物相容性、增強藥物遞送至特定細胞趨向性等優點。本實驗旨在於研發腫瘤細胞膜分泌特性的奈米囊泡，以包覆目標物加強癌症治療效果。因前期研究發現：蝦紅素具有極高抗氧化及抗腫瘤性，故選擇蝦紅素作為抗癌藥物。蝦紅素奈米囊泡載體的製程方式是以黑色素癌及蝦紅素經適當比例混合，透過擠壓法，再去除癌細胞遺傳物質及發炎因子。在成果方面：蝦紅素奈米囊泡與黑色素癌細胞共同培養後證實，蝦紅素奈米囊泡抑制黑色素癌細胞生長及轉移的能力明顯優於等量蝦紅素，且對於人體正常細胞無顯著傷害性，顯示囊泡具有選擇性運送的傾向。我們的科展說明了蝦紅素奈米囊泡有成為抗癌藥物的潛力。

壹、前言

研究動機與文獻回顧

黑色素癌在早期檢測非常困難，因為黑色素癌的初期型態與一般皮膚上的斑或痣沒什麼差別，然而黑色素癌隨著時間經過，擴張速度極快。患者身上會迅速出現大量凹凸不平的小圓包，惡化程度快再加上現存治療藥物的效果不佳，且治療的費用極高，使患者極容易輕忽它並放棄接受治療，導致它的死亡率占全部皮膚癌之中最高。根據衛生福利部統計，以2015年來說，黑色素癌佔了整體皮膚癌死亡率的60%，是當今非常棘手的癌症。目前治療黑色素癌的方法有外科手術、化學療法、放射療法、免疫療法等，但這些治療方式往往都伴隨著強烈的副作用，且無法徹底根治黑色素癌，故我們又查找了將抗癌藥物有效送入目標細胞中的其他方法。在奈米運輸科技中，研究人員會將目標藥物或促進腫瘤細胞死亡的蛋白質包覆於奈米藥物載體中進行治療。相關文獻顯示將腫瘤本身的細胞膜製成奈米等級大小的囊泡具有作為藥物載體的潛力，因為奈米囊泡具有類似細胞膜的結構（如蛋白質、脂質等），能表現出更好的生物相容性，其組成的蛋白質大多來自於原細胞本身。於是我們想要以黑色素癌細胞製做奈米囊泡，希望所製成的奈米囊泡可貼附、融合於黑色素癌細胞，以增強抗癌藥物的作用性，將藥物有效且有目標性的送入癌細胞，並消滅癌細胞。隨著近年來蝦紅素被各大醫學、生技研究證實有極優的抗氧化、視力改善、增強免疫力甚至是極佳的抗腫瘤能力，相關的保健營養產品也逐漸大量上市，而普遍的消費者對於蝦紅素產品的接受度頗高，因此我們的團隊經過討論後，決定本篇研究的對象將以蝦紅素作為抑制黑色素癌的前趨藥物，以及利用黑色素癌細胞做為奈米運輸載體，希望可以達到有效治療黑色素癌的目的。

研究目的

- 一、 檢測蝦紅素是否能達到有效抑制、消滅黑色素瘤的效果。
- 二、 利用囊泡擠壓器製作以黑色素瘤細胞自身為外包膜的奈米囊泡，並確認其抑制、殺死黑色素瘤的效果。
- 三、 觀察黑色素瘤是否能專一性接收蝦紅素奈米囊泡。
- 四、 比較蝦紅素奈米囊泡與等量純蝦紅素對抗黑色素瘤的效果。

貳、 研究設備及器材

一、 研究器材

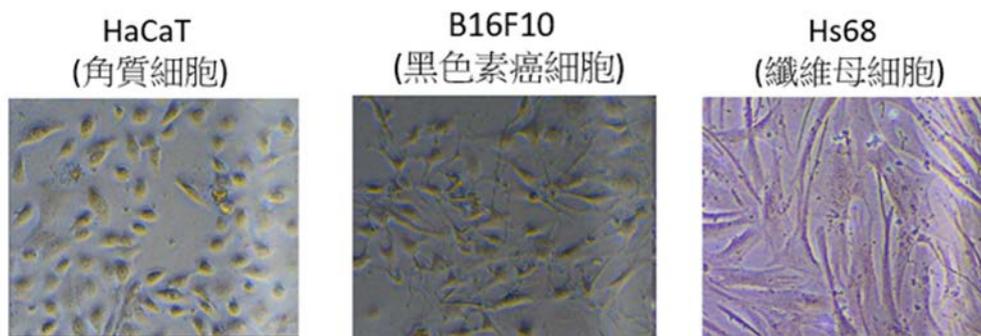
			
無菌操作台	細胞培養箱	高壓滅菌爐	液態氮桶
			
高精度電子秤	超音波震盪儀	顯微鏡	流式細胞儀
			
超高速離心機	桌上型離心機	低溫離心機	分光光度儀
			
UVB 光照射儀	水域槽	移液器(Pipette)	微量吸管尖(Tip)

	
<p>囊泡擠壓器（零件）</p>	<p>囊泡擠壓器（組裝後）</p>

二、研究試劑材料

			
<p>蝦紅素</p>	<p>磷酸鹽緩衝生理鹽水</p>	<p>細胞培養液</p>	<p>CCK8 試劑套組</p>
			
<p>Pierce™ BCA Protein Assay regent A（右）、standard （中）、regent B（左）</p>	<p>錐蟲藍 (trypan blue solution) （後）、計數器 （中）、血球計算板 （前）</p>	<p>PKH26（紅色螢光 探針）</p>	<p>密度梯度離心分離液 (Optiprep™)</p>

三、細胞



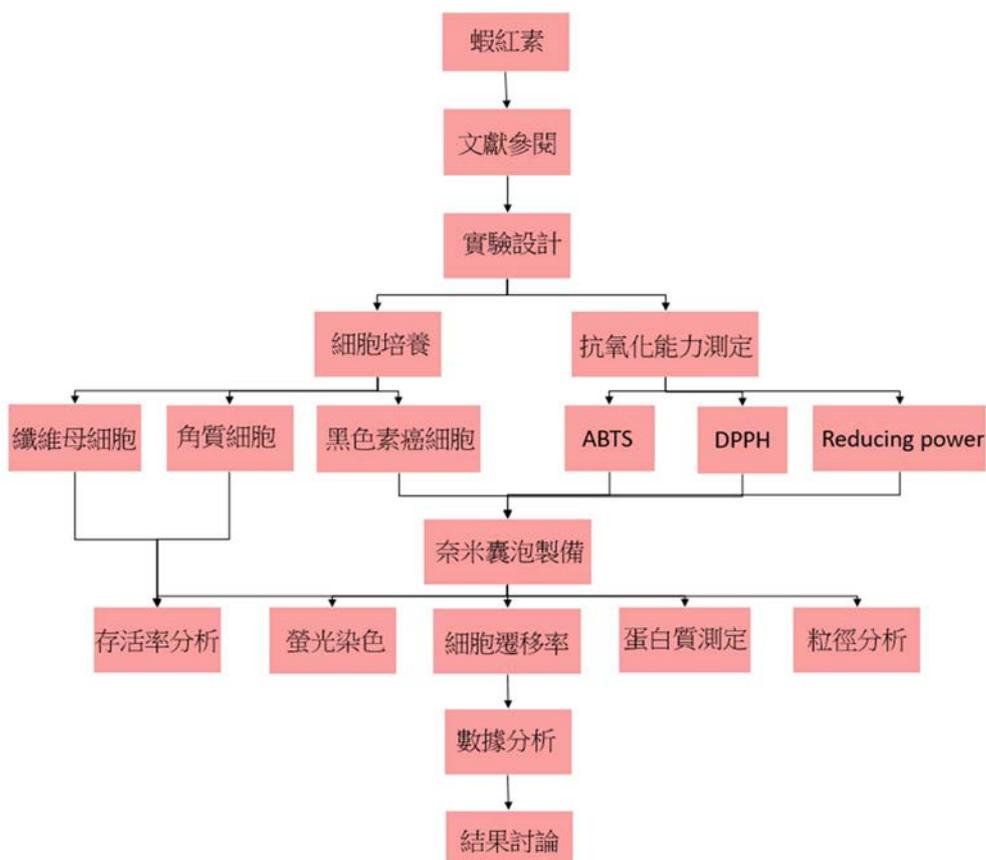
(一) 黑色素癌細胞(B16F10)：鼠源腫瘤細胞，是一種常用於研究黑色素皮膚癌的細胞。

(二) 皮膚角質細胞(HaCaT)：具備良好的增生能力，被利用於多項研究的人類角質細胞。

(三) 皮膚纖維母細胞(Hs68)：具有分泌多種基質及蛋白的功能，常用於傷口癒合等研究人類細胞。

註：三種細胞皆取自合作實驗室的液態氮桶。

參、研究過程與方法



一、抗氧化能力測定

(一) DPPH 自由基清除測定

1. 原理：DPPH 是一種穩定的自由基，而 DPPH 自由基溶液在波長 517 nm 下有最強吸收值，當自由基與抗氧化物質作用之後，抗氧化物質提供氫質子清除自由基，因而自由基就會失去本身藍紫色變為亮黃色而造成吸光值的下降，反應機制為 $\text{DPPH} \cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH} : \text{H} + \text{A} \cdot$ ，最後藉由測定 517 nm 的吸光值則可判斷樣品抗氧化能力之強弱。
2. 試劑配置：取蝦紅素 1.68 mM 以 DMSO 為溶劑，稀釋成 1、1/2、1/4、1/8、1/12、1/24 倍樣品。DPPH 溶劑則取 15 mg DPPH 粉末 + 15 mL 甲醇溶劑配置。
3. 實驗步驟：取 DPPH 溶液 392 μL 並與樣品 8 μL 配置於微量離心管混合均勻，接著取 100 μL 至 96 孔盤做 3 重複，避光 30 分鐘後以分光光度計並在 517 nm 下測量吸光值。當自由基被清除愈多時，其吸光值亦會隨之下降，利用相較於空白對照組的吸光值相比，可判斷各樣品清除自由基能力之強弱。

$$\text{清除率} = \frac{\text{控制組吸光值} - \text{樣品吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \times 100\%$$

(二) ABTS 自由基清除能力分析

1. 原理：ABTS 與過硫酸鉀混合產生氧化反應，形成穩定的深藍綠色 ABTS^+ 陽離子自由基，而 ABTS^+ 陽離子自由基溶液在波長 734 nm 下有強吸收值，當自由基與抗氧化物質反應之後，溶液顏色變淡綠色造成吸光值的下降，故當吸光值越低其抗氧化能力越強。
2. 試劑配置：取蝦紅素 1.68 mM 以 DMSO 為溶劑，稀釋成 1、1/2、1/4、1/8、1/12、1/24 倍樣品。ABTS 溶液取 180.11 mg ABTS 粉末 + 50 mL 二次水溶劑配置成 7 mM ABTS 溶液。過硫酸鉀溶液取 180.11 mg 過硫酸鉀粉末 + 10 mL 二次水溶劑配置成 140 mM 過硫酸鉀溶液。
3. 實驗步驟：取 ABTS 溶液 25 mL 並與過硫酸鉀溶液 440 μL 混合配置成 ABTS^+ 陽離子自由基溶液，避光反應 12 小時後，用乙醇稀釋 ABTS^+ 陽離子自由基溶

液至吸光值為 0.7 ± 0.002 ，接著取樣品 $20 \mu\text{L}$ 與 ABTS^+ 陽離子自由基溶液 $380 \mu\text{L}$ 配置於微量離心管混合均勻，接著取 $100 \mu\text{L}$ 至 96 孔盤做 3 重複，避光 30 分鐘後以分光光度計在 734 nm 下測量吸光值。當自由基被清除愈多時，其吸光值亦會隨之下降，利用相較於空白對照組的吸光值相比，可判斷各樣品清除自由基能力之強弱。

$$\text{清除率} = \frac{\text{控制組吸光值} - \text{樣品吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \times 100\%$$

(三) 還原力測定 (Reducing power assay)

1. 原理：利用樣品的抗氧化能力將赤血鹽 (Potassium ferricyanide) 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^-$ 還原成 $[\text{Fe}(\text{CN})]^{4-}$ ；三分子的 $[\text{Fe}(\text{CN})]^{4-}$ 和四分子的 FeCl_3 形成 $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_4]^{3-}$ ，在波長 700 nm 下有強吸收值，隨著 $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_4]^{3-}$ 增加，溶液的顏色越深造成吸光值增加還原力越好。
2. 試劑配置：取蝦紅素 1.68 mM 以 DMSO 為溶劑，稀釋成 1、1/2、1/4、1/8、1/12、1/24 倍樣品。
3. 實驗步驟：準備八個微量離心管，加入磷酸緩衝液 $340 \mu\text{L}$ 及赤血鹽 $7.5 \mu\text{L}$ 至每個微量離心管中，再將六個樣品取 $7.5 \mu\text{L}$ 至微量離心管中，另外兩個微量離心管分別加入 BHA (丁基羥基甲氧苯, butylated hydroxyl-anisole)及二次水 $10 \mu\text{L}$ 分別作為正控制及控制組，將八個微量離心管進行水浴 (water bath) 50°C 、20 分鐘，接著放入冰塊降溫 2 分鐘後，加入 TCA (三氯乙酸, Trichloroacetic acid) $160 \mu\text{L}$ 到微量離心管中並放進離心機中轉 10 分鐘 (離心機設定為 3000 轉)，離心結束後取上清液 $75 \mu\text{L}$ 至 96 孔盤當中做 3 重複，再加入 $25 \mu\text{L}$ 的 FeCl_3 至 96 孔盤，最後以分光光度計並在 700 nm 下測量其吸光值。

二、細胞繼代

(一) 細胞凍存與解凍

1. 凍存：冷凍細胞前，應先配置細胞冷凍保存液，將 DMSO 加入新鮮培養基中，使其最終濃度為 5~10%，混合均勻，置於室溫下等待使用。依細胞繼代

培養之操作，收集細胞，並取少量細胞懸浮液計數細胞濃度及凍前存活率。將收集之細胞離心 1000 rpm、5 分鐘後，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，混合均勻後，使細胞濃度為 $1\sim5 \times 10^6$ cells/mL，分裝至冷凍保存管中，每管分裝 1 mL。採階段性冷凍儲存，置於 -20°C 至少 20 分鐘，並放入 -80°C 約 16 小時後，移至液態氮桶中保存。

2. 解凍：先預備好空的培養皿分別加入 10 mL 的培養基（因為細胞凍存液中含有 DMSO，所以須以 1：10 去稀釋），從液態氮桶中取出待解凍之凍管，將細胞凍管置於浮床上以 37°C 水浴槽回溫，接著將細胞液取出，加入至 dish 後，放入培養箱，數小時後觀察細胞是否貼盤。

(二) 繼代培養：黑色素癌細胞 (B16F10) / 纖維母細胞 (Hs68) / 角質細胞 (HaCaT)

去除培養皿內原有的細胞培養液，並取 PBS 潤洗，除去殘留的培養液。每個培養皿加入 1 mL 的 trypsin-EDTA 後，放回培養箱約 7 分鐘後，讓貼附於盤底的細胞懸浮。加入含有血清蛋白的培養液終止 trypsin-EDTA 作用，離心 1200 rpm，5 分鐘。抽掉離心完後的上清液，加入 2 mL 的培養液回溶，並混合均勻。抽取 1 mL 的細胞液至 dish 搖晃均勻後，放回培養箱。過一段時間再次檢查細胞是否已貼盤。剩餘的細胞，可使用細胞冷凍保存液和細胞液以 1：1 混合後，採階段性冷凍儲存，置於 -20°C 至少 20 分鐘，並放入 -80°C 約 16 小時後，移至液態氮桶中保存。

三、細胞存活率分析 (CCK8 Assay)

- (一) 原理：透過將淡黃色之 WST8 (Water Soluble Tetrazolium 8) 水溶液與活細胞內的脫氫酶反應後，WST8 會被還原成橙色的甲臍 (formazan) 水溶性產物。因此活細胞的數目和橘色深淺成正比，最後在波長 450 nm 下藉由分光光度計測量吸光值，進一步求得其存活比率。

$$\text{細胞存活率} = \frac{\text{樣品存活率} - \text{空白組存活率}}{\text{控制組吸光值} - \text{空白組吸光值}} \times 100\%$$

- (二) 試劑配置：取蝦紅素 1.68 mM 並以 DMEM 為溶劑，稀釋成 1、1/2、1/4、1/8、1/12、1/24 倍樣品；而蝦紅素奈米囊泡則配置成 100 μM 、125 μM 、150 μM 、175 μM 及 200 μM 。CCK8 試劑則是取 10 μL 之 WST8 並以 DMEM 稀釋 10 倍。
- (三) 實驗步驟：將細胞在 96 孔盤中培養 24 小時。之後與不同濃度的蝦紅素溶液與

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)一起孵育，然後將細胞在 5% 二氧化碳的環境下於 37 °C 孵育 24 小時。最後將 WST8 溶液添加到每個孔中，並在 37 °C 下孵育培養 2 至 4 小時。使用分光光度計在 450 nm 下測量細胞懸浮液的吸光度。該實驗進行三重複，並且進行統計分析以獲得最終值。

四、奈米囊泡製備

- (一) 細胞刮除：將長滿並已貼附於培養皿(cell culture-dish)壁上的黑色素癌細胞，使用無菌細胞刮勺(cell scrapers)並加入 1 mL PBS (磷酸鹽緩衝生理鹽水) 刮除，並加入到微量離心管中(eppendorf)。
- (二) 離心：將微量離心管放入離心機中進行 1200 rpm，10 分鐘，讓黑色素癌細胞沉澱於離心管的底部。
- (三) 細胞計數：將部分黑色素癌細胞混合 PBS 並滴入錐蟲藍(trypsin blue solution)來區分出活細胞與死細胞，將所計算出的數量來推測取得全部的細胞數。
- (四) 超音波震盪：將蝦紅素與細胞進行 30 分鐘的超音波震盪，因超音波有頻率高、波長短、穿透力強的特性，能使萃取蝦紅素與細胞達到充分混合接觸，在 30 分鐘後每 10 分鐘混合(pipette)一次，一共進行 90 分鐘。
- (五) UVB 照射：先將蝦紅素與黑色素癌細胞的混合液從離心管移到培養基中，放入照射 UVB 照射的儀器，進行 2 分鐘的 UVB 光照射破壞黑色素癌細胞的 DNA。
- (六) 擠壓：先將孔徑大小為 10 μm 聚碳酸酯(PC)膜放入奈米擠壓器當中，再將蝦紅素與黑色素癌細胞的混合液進行來回擠壓 5 次，接著換為孔徑大小為 5 μm 聚碳酸酯(PC)膜，重複上述步驟進行擠壓，擠壓結束後，讓癌細胞的細胞膜擠壓成奈米囊泡，來包覆蝦紅素，對抗黑色素癌細胞。
- (七) 超高速離心：將密度梯度分離液(60%)加入離心管中，接著將奈米囊泡緩緩地沿著管壁加入，最後再配置 10% 的密度梯度分離液，使囊泡位於離心管正中間。將配置完成的離心管牢固的鎖在超高速離心機中，將超高速離心機設定成 25,000 rpm、4 °C、2 小時。離心完後，將位於正中間的囊泡抽起並加入 15 mL 之離心管(附件二)。

五、細胞遷移率分析 (Migration 傷口癒合分析)

將黑色素癌細胞以每孔 3×10^5 cell/mL 加 70 mL 至傷口癒合插件(Culture-Insert 2 Well)中培養 24 小時。之後先將插件內的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)抽起並使用 PBS 潤洗兩次，再與不同濃度的囊泡和 DMEM 在 5% CO₂ 的環境下於 37 °C 一起培養 16 小時，並利用光學顯微鏡(Leica microsystems)在 4 倍視野下拍攝縫隙上細

胞遷移的程度，並計算面積得出細胞遷移率。

六、DLS 粒徑分析

(一) 原理：利用動態光散射原理與光子光譜，根據待測物在液體中布朗運動的速度測量待測物的大小。因大小粒子運動速率不同，所以經雷射照射後不同的顆粒造成散射光產生不同角度的散射，所得的結果再與光子光譜做比對得到待測物的大小。

(二) 實驗步驟：取製備完成的囊泡 1 mL 加入光吸管(Cuvette)中，並放入粒徑分析儀(Litesizer)的四方格孔洞中，按下黃色亮起的燈，並蓋上蓋子之後按 Start 開始進行測量。

七、細胞螢光染色

(一) PKH 染劑原理：PKH26 染劑適用於細胞的標記，也常用於體內細胞追蹤的研究，光譜處於黃~橙色區域，在光學顯微鏡下，可看見紅橙色的激發光。

(二) 實驗步驟：去除培養皿內原有的細胞培養液，並取 PBS 潤洗，除去殘留的培養液。每個培養皿加入 1 mL 的 trypsin-EDTA 後，放回培養箱約 7 分鐘後，讓貼附於盤底的細胞懸浮。加入含有血清蛋白的培養液終止 trypsin-EDTA 作用，離心 1200 rpm，5 分鐘。抽掉離心完後的上清液，加入 2 mL 的培養液回溶，並混合均勻。加入 1 mL 稀釋液 C (Diluent C)，與細胞液充分的混和；同時，取 4 mL 的 PKH26 與 1 mL 的稀釋液 C (Diluent C)，混和於另一離心管，再將兩管混合在一起，放入培養箱，培養 2~5 分鐘，輕輕搖晃，使其均勻，接著加入等量血清後，離心 400 g，10 分鐘。接著將上清液抽乾，加入 1 mL 的 PBS 回溶並離心，重複三次。

肆、研究結果

一、抗氧化能力測定

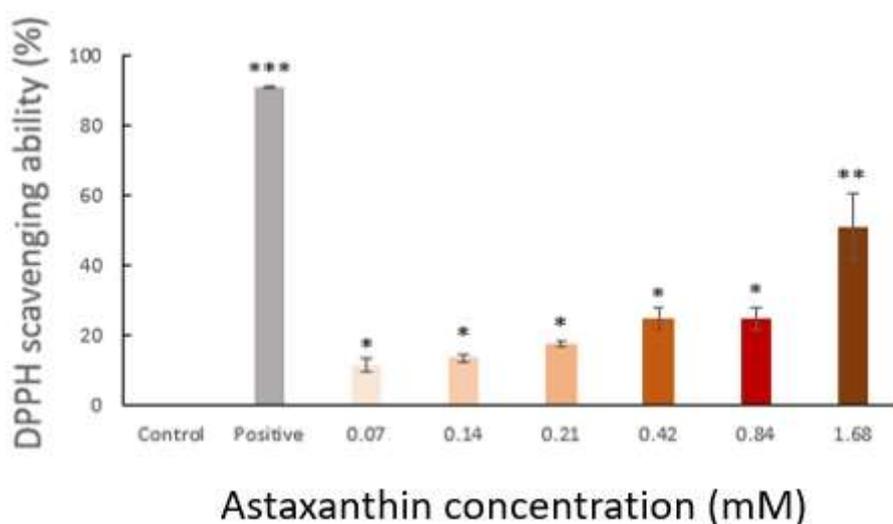
在本次的實驗中，分別利用 DPPH 自由基清除測定、ABTS 自由基清除能力及還原力測定(Reducing power assay)等三種不同方法測試蝦紅素的抗氧化能力。在 DPPH 自由基清除測定實驗中(圖一)，橫軸從左至右分別為控制組(Control)、正控制組(Positive)及不同濃度的蝦紅素樣品，控制組為二次水而正控制組為 100 μ M 維他命 C；縱軸為 DPPH 自由基的清除能力。蝦紅素具有 DPPH 自由基清除能力，在 0.07 mM 蝦紅素中，僅具有約 15%的 DPPH 自由基清除率，而在 1.68 mM 高濃度蝦紅素的 DPPH 清除能力大約

在 50%左右，在 0.42 mM、0.84 mM 時，抗氧化能力均為 20%左右。

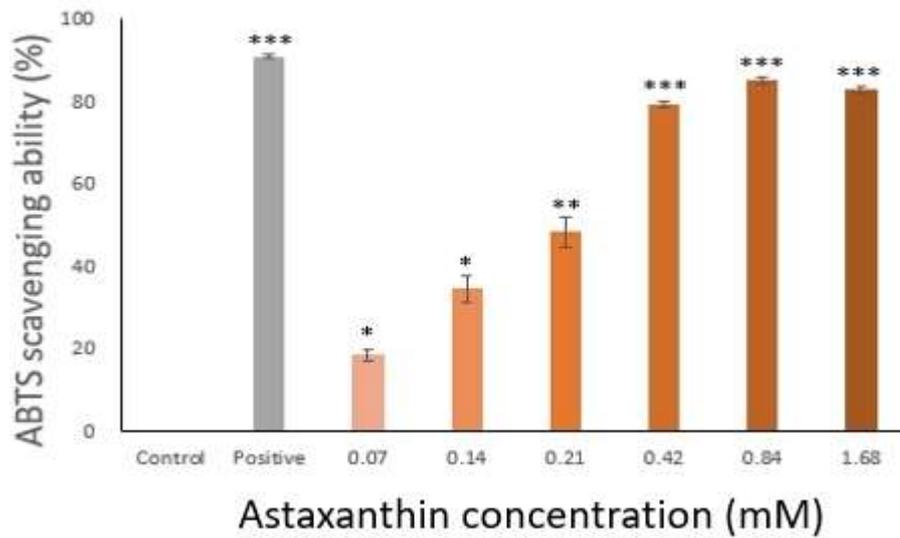
蝦紅素具有顯著的 ABTS 自由基清除能力(圖二)，控制組(Control)為二次水而正控制組(Positive)為 EDTA。在蝦紅素低濃度 0.07 mM 時，具有 20%左右的自由基清除能力，當蝦紅素濃度越高時，ABTS 自由基的清除能力也隨之提高，具有明顯的濃度趨勢；蝦紅素在較高濃度 0.42 mM、0.84 mM、1.68 mM 時，ABTS 自由基的清除能力與正控制組皆不具有顯著差異，ABTS 自由基的清除能力皆在 85% 以上，具有極強的抗氧化能力。

在還原力測定(圖三)的實驗中，控制組(Control)所選的試劑為二次水，正控制組(Positive)所選用的試劑為丁基羥基甲氧苯(BHA)，縱軸為抗氧化能力。圖三顯示，蝦紅素幾乎不具有清除自由基的還原力，各濃度蝦紅素的還原力，與控制組皆無顯著差異。

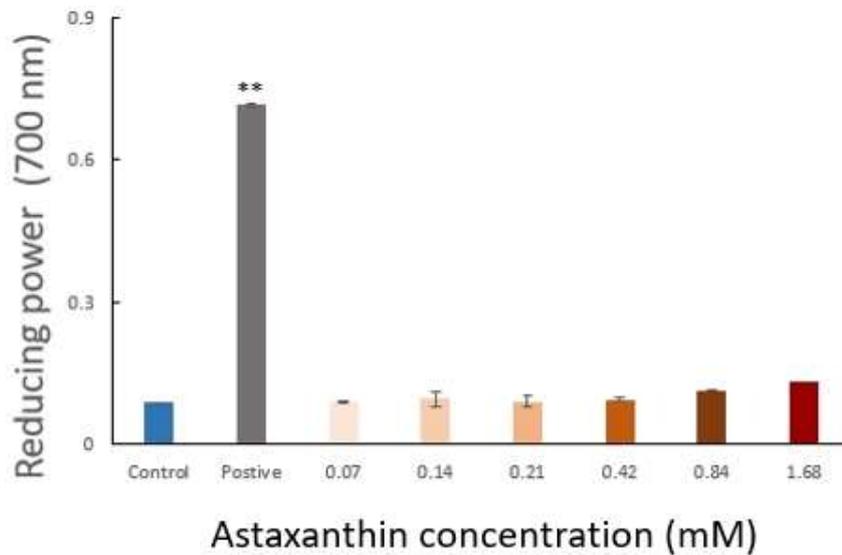
若利用 IC₅₀ (半抑制濃度，是一種定量度量，表示需要多少帶測物的濃度或劑量來抑制特定生物化學功能，且抑制的效果達 50%，一般 IC₅₀ 的值越小代表代測物抑制效果越佳)測定蝦紅素之 DPPH 及 ABTS 自由基消除能力(圖四)，蝦紅素清除 ABTS 的 IC₅₀ 為 0.231 mM(圖四 A)，代表蝦紅素在濃度 0.231 mM 時抗氧化能力即達 50%；而 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 約為 1.61 mM(圖四 B)。綜合以上結果，可以證明蝦紅素確實有極高效的抗氧化能力，且在 DPPH 及 ABTS 自由基清除時有較佳的表現。因蝦紅素在濃度 0.42 mM、0.84 mM、1.68 mM 時，即展現出極佳的 ABTS 抗氧化能力，與正控制組無顯著差異。因此，我們選定 0.42 mM 及 0.84 mM 的蝦紅素進行後續實驗。



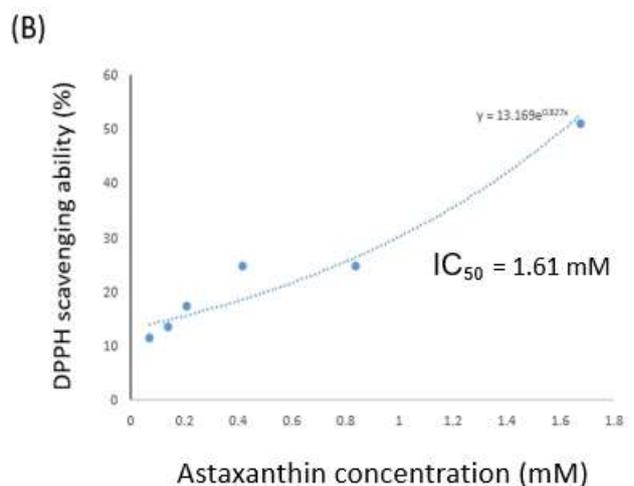
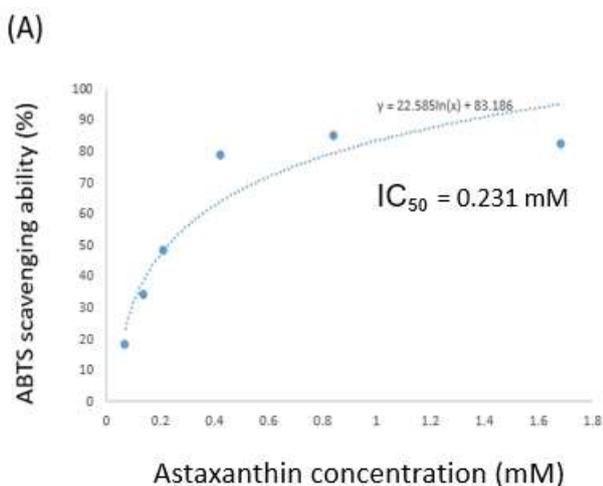
圖一：DPPH 清除率測試。控制組(control)為二次水；正控制組(positive)為 100 μM 維生素 C。樣品與 control 相比：* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.005



圖二：ABTS 清除率測試。控制組(control)為二次水；正控制組(positive)為 EDTA。樣品與 control 相比：* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.005



圖三：還原力測試(Reducing power)。控制組(control)為二次水；正控制組(positive)為 BHA。樣品與 control 相比：* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.005

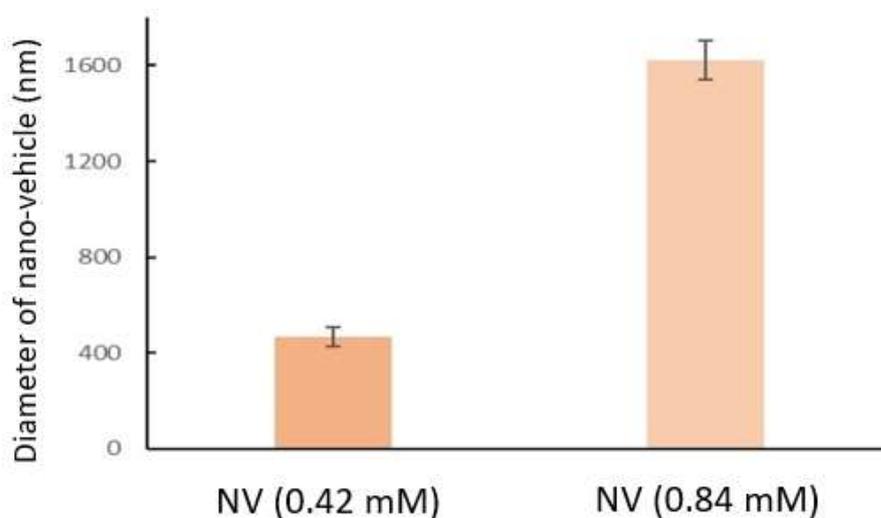


圖四：自由基清除率的 IC50。(A)ABTS 的自由基清除率。(B)DPPH 的自由基清除率。

二、奈米囊泡粒徑分析與蛋白質定量

(一) DLS 粒徑分析

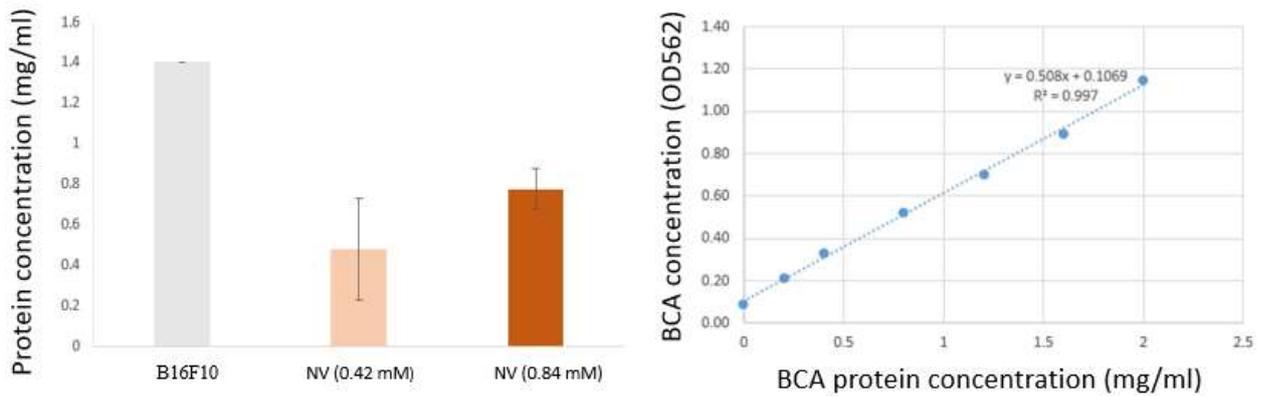
由實驗一：蝦紅素的抗氧化能力測定得知，0.42 mM 及 0.84 mM 蝦紅素的抗氧化能力較佳。因此，將 0.84 mM 及 0.42 mM 兩種不同濃度的蝦紅素與黑色素癌細胞混合，製作出兩種不同的蝦紅素奈米囊泡(NV)：一種為包覆 0.84 mM 蝦紅素奈米囊泡 NV (0.84 mM)，另一種為包覆 0.42 mM 的蝦紅素奈米囊泡 NV (0.42 mM)。(圖五)的橫軸為 0.84 mM 及 0.42 mM 兩種不同濃度製成的蝦紅素囊泡 NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM)；縱軸為粒徑大小(nm)。NV (0.84 mM)直徑大小約為 1620 nm 而 NV (0.42 mM)直徑大小約為 470 nm。在(圖五)中顯示，將濃度越高的蝦紅素與黑色素癌細胞混合，並製成奈米囊泡，此囊泡的粒徑會越大。



圖五：奈米囊泡粒徑分析。

(二) 蛋白質含量測定(BCA)

將 BCA 蛋白做出標準曲線後，利用分光光度計測量，再檢測黑色素癌細胞的吸光值。再將得到的數據帶入標準曲線，求得黑色素癌細胞蛋白質濃度為 1.4 mg/mL。並使用相同方法測量 NV (0.84 mM) 與 NV (0.42 mM) 的吸光值，將分光光度計測得的數值再帶入標準曲線計算，得知 NV (0.84 mM) 與 NV (0.42 mM) 的蛋白質含量分別約為 0.77 及 0.48 mg/mL。此實驗顯示了，粒徑越大的奈米囊泡，其所含的蛋白質濃度越高。



圖六：BCA 蛋白質測定。

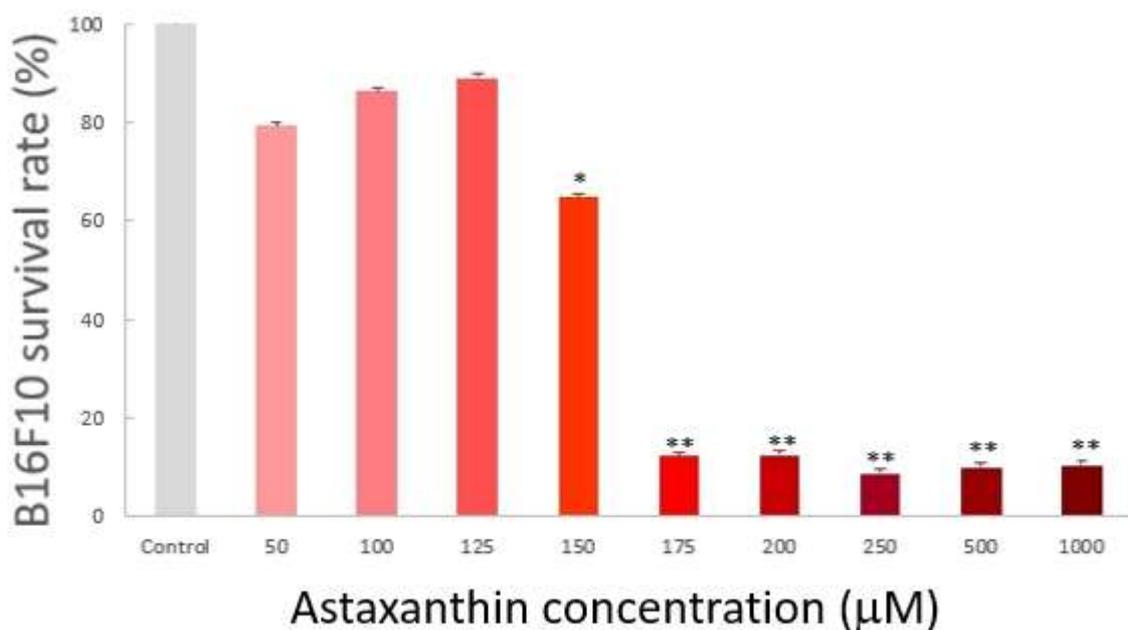
三、細胞存活率分析

此實驗分為三部分，目的是為了檢測未包覆囊泡的蝦紅素、NV (0.84 mM) 與 NV (0.42 mM) 是否具有對抗黑色素癌細胞的能力及奈米囊泡是否有選擇性運輸的傾向。第一部分的實驗，使用未包覆奈米囊泡的蝦紅素進行 B16F10 細胞存活率分析測試，為了找出進行後續實驗的蝦紅素濃度(圖七)。由(圖五)顯示，未包覆奈米囊泡的蝦紅素濃度在 150 μ M ~ 175 μ M，有很大的落差，黑色素癌細胞的存活率由 150 μ M 的 70% 存活率，急速降至 175 μ M 的 20% 以下。顯示了未包覆奈米囊泡的蝦紅素在 150 μ M ~ 175 μ M 之間，具有半數致死的效果。也證實了，蝦紅素具有抗黑色素癌的功能，具有作為抗癌藥物的潛力。因此，在接下來的實驗中，為了測定蝦紅素包覆在奈米囊泡內的抗癌特性，我們選定了 100 μ M、125 μ M、150 μ M、175 μ M、200 μ M 的蝦紅素進行後續實驗。

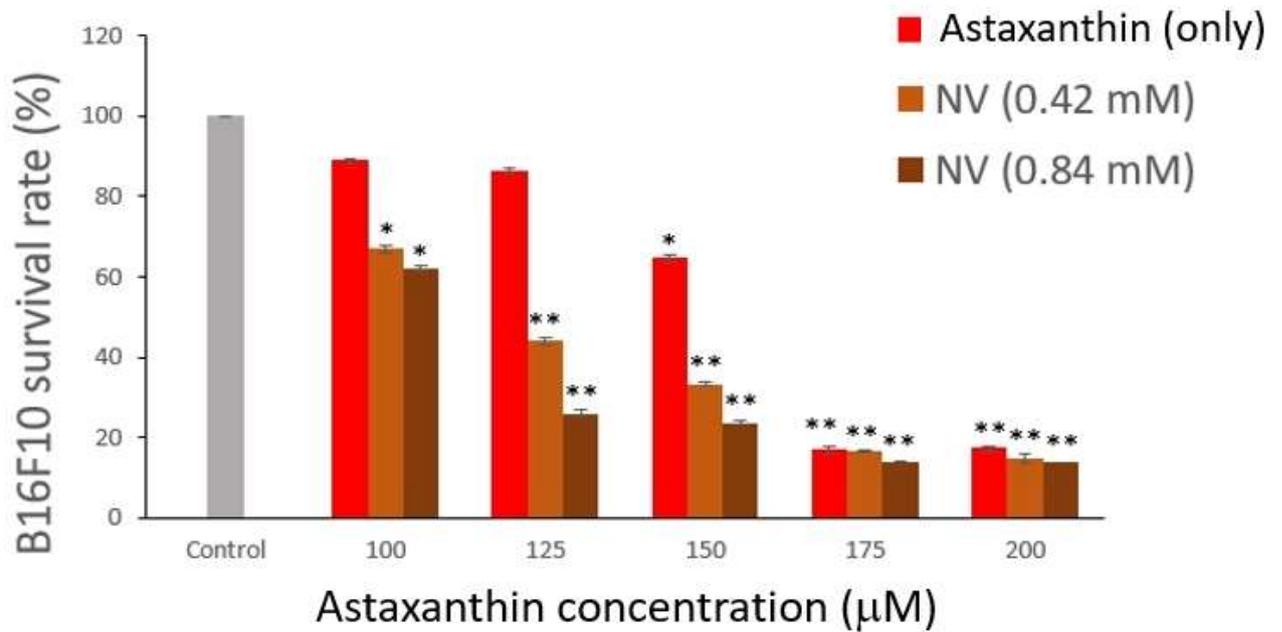
第二部分實驗，將比較未包覆奈米囊泡的蝦紅素，及 NV (0.84 mM) 與 NV (0.42 mM) 對 B16F10 存活率的影響，為了證明奈米囊泡具有加強蝦紅素抗癌效果的能力(圖八)。因蝦紅素包裹於奈米囊泡後，其蝦紅素包裹於奈米囊泡後，蝦紅素的有效濃度會改變，因此我們使用了蝦紅素濃度的檢量線(附件一)算出 NV (0.84 mM) 與 NV (0.42 mM) 的檢量濃度，為了使囊泡內的蝦紅素與未包覆囊泡的蝦紅素濃度可以比較。將 NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM) 算出檢量濃度 100 μ M、125 μ M、150 μ M、175 μ M、200 μ M，與未包覆囊泡的蝦紅素一起進行細胞存活率實驗的比較(圖八)。未包覆囊泡的蝦紅素組別中，B16F10 的死亡率與圖八數值相符，150 μ M 蝦紅素具有 70% 存活率，175 μ M 及 200 μ M 蝦紅素的存活率皆為 20% 以下。在 100 ~ 150 μ M 時，包覆蝦紅素的奈米囊泡皆具有較強的 B16F10 細胞殺傷力，例如在 125 μ M 濃度時，未包覆奈米囊泡的蝦紅素的 B16F10 存活率高於 80%，與控制組無顯著差異；但是，NV (0.42 mM)

的 B16F10 存活率顯著下降，約為 40%；NV (0.84 mM) 的細胞存活率更僅存 20%。雖然在 175 μ M 及 200 μ M 較高濃度的蝦紅素處理組別中，未包覆奈米囊泡的蝦紅素、NV (0.42 mM) 與 NV (0.84 mM) 的細胞存活率未達到顯著差異，但是仍然具有細胞存活率在未包覆奈米囊泡的蝦紅素組別大於 NV (0.42 mM) 大於 NV (0.84 mM) 的傾向。此實驗結果顯示，蝦紅素在包覆奈米囊泡的情形下具有較佳抑制癌細胞的能力，且所包覆的原始蝦紅素濃度越高，抑制細胞存活的能力越大。

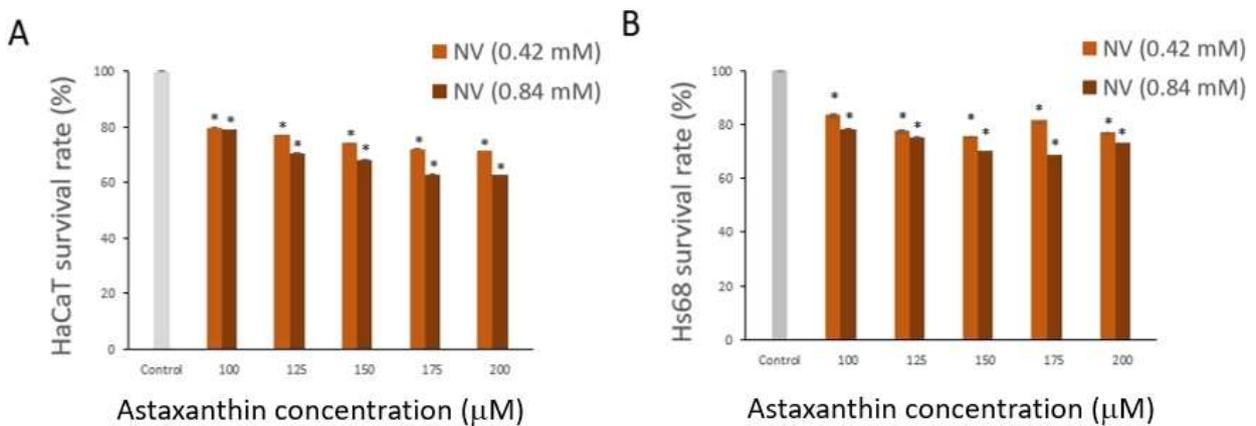
實驗的第三部分，將測試此奈米囊泡是否對其他非黑色素癌的細胞具有抑制能力，也就是此奈米囊泡是否將藥物遞送至特定細胞的趨向性(圖九)。實驗使用角質細胞 (HaCaT)及纖維母細胞(Hs68)在蝦紅素奈米囊泡 NV (0.42 mM) 及蝦紅素奈米囊泡 NV (0.84 mM) 處理下的細胞存活率。在實驗中，HaCaT 的存活率在 100 ~ 200 μ M NV (0.42 mM) 及 NV (0.84 mM) 皆無顯著差異，存活率皆為 70%以上，雖然 NV (0.84 mM) 的抑癌效率較 NV (0.42 mM) 稍微好，但是仍無達到顯著差異(圖九 A)。而 Hs68(圖九 B)亦有此傾向，在各蝦紅素濃度的 NV (0.84 mM) 和 NV (0.42 mM) 中的細胞存活率亦達到 70%以上，且皆無顯著差異。此實驗證明我們的奈米囊泡的確具有將藥物運送至特定細胞的趨向性。



圖七：未包覆囊泡之不同濃度蝦紅素的存活率測試。樣品與控制組相比：* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.005



圖八：B16F10 在未包覆囊泡的蝦紅素(Astaxanthin)、蝦紅素奈米囊泡 NV (0.42 mM) 及蝦紅素奈米囊泡 NV (0.84 mM) 在濃度 100 µM、125 µM、150 µM、175 µM 及 200 µM 下的細胞存活率。樣品與控制組相比：* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.005

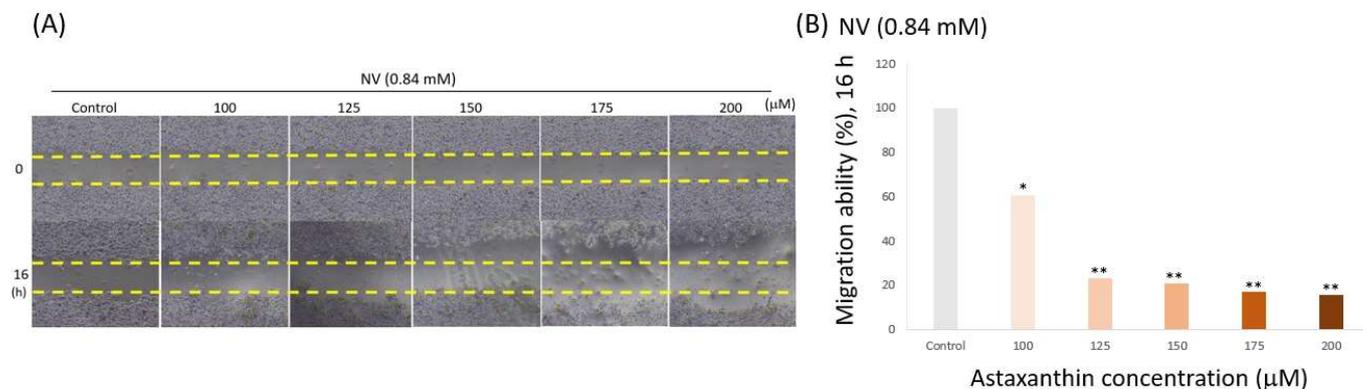


圖九：非黑色素癌細胞之蝦紅素奈米囊泡細胞存活率測試。(A)角質細胞(HaCaT)之蝦紅素奈米囊泡細胞存活率測試 (B)纖維母細胞(Hs68)之蝦紅素奈米囊泡細胞存活率測試。樣品與控制組相比：* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.005

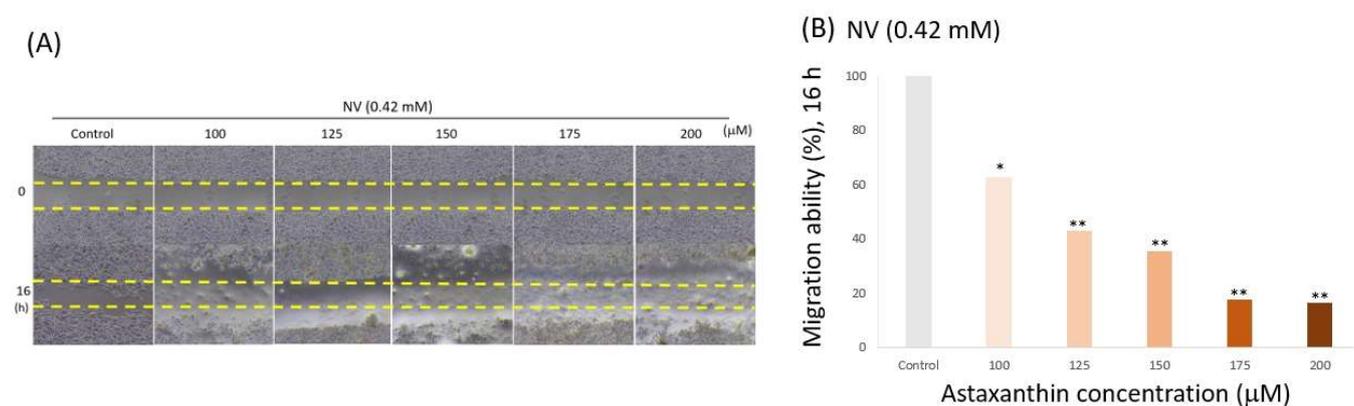
四、遷移率分析

此實驗是觀察蝦紅素奈米囊泡，是否真正有效抑制黑色素癌細胞的遷移。實驗組為 0.84 mM (圖十)及 0.42 mM (圖十一)的蝦紅素奈米囊泡，而又將其稀釋成 200、175、150、125、100 µM；對照組為細胞的正常培養，在經過 16 小時後，與對照組相比之下，明顯的發現 0.84 mM 在濃度 200、150 µM 下，能有效抑制癌細胞的擴散及生長，

而在 0.42 mM 中，濃度 200、175、125 μM 抑制表現極佳，其中又以濃度 125 μM ，觀察到有少部分的細胞死亡。然而在下藥後 20 小時後，細胞突然大量地死亡，可能為蝦紅素奈米囊泡在針對癌細胞上面，有極強的毒殺率。綜上所述，驗證出蝦紅素奈米囊泡能有效抑制癌細胞的轉移及遷移。



圖十：黑色素癌細胞遷移測試。(A)黑色素癌細胞與 NV (0.84 mM)培養 16 小時的細胞型態 (B)黑色素癌細胞遷移率。樣品與控制組相比：* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.005$

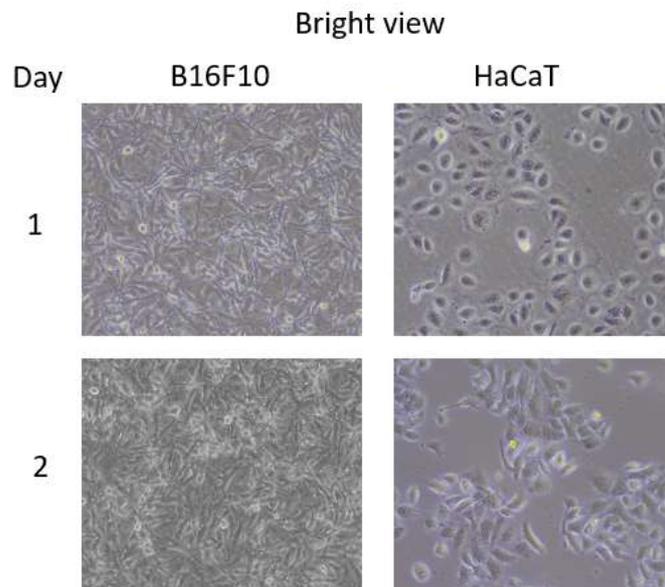


圖十一：黑色素癌細胞遷移測試。(A)黑色素癌細胞與 NV (0.42 mM)培養 16 小時的細胞型態 (B)黑色素癌細胞遷移率。樣品與控制組相比：* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.005$

五、細胞螢光染色

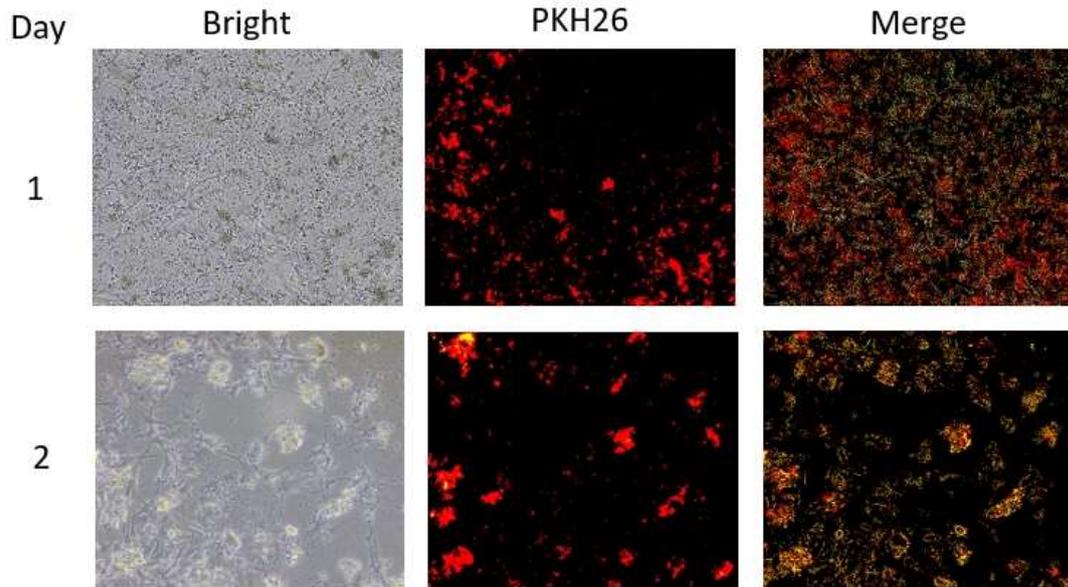
在這項實驗中，我們先用 PKH26 螢光染劑將奈米囊泡的外膜染色，再將此染色的奈米囊泡與細胞共同培養一天，並使用顯微鏡觀察，藉以判斷細胞是否將蝦紅素奈米囊泡攝入細胞內，以確認蝦紅素奈米囊泡是否具有將藥物運送至特定細胞的趨向性。實驗比較了黑色素癌細胞(B16F10)及角質細胞(HaCaT)。藥物採用蝦紅素奈米囊泡 NV (0.42 mM) 及蝦紅素奈

米囊泡 NV (0.84 mM)。圖(十二)為 B16F10 及 HaCaT 正常培養時的細胞型態，作為控制組。實驗組為預染的蝦紅素奈米囊泡 NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM)，各自加入 B16F10 圖(十三、十四)及 HaCaT 圖(十五、十六)兩種細胞當中。在圖(十三)及圖(十四)中可以發現蝦紅素奈米囊泡 NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM)在 B16F10 中，皆細胞內發出紅色的螢光，且在第二天的實驗照片中發現許多細胞殘骸。此證明了，蝦紅素奈米囊泡的確會進入細胞中，並且能有效抑制 B16F10 的生長。相對的，在圖(十五)及圖(十六)的實驗中，HaCaT 細胞內並無螢光，且藥物懸浮於 HaCaT 角質細胞上方，並沒有進入到細胞體內，在培養皿上也未發現大量的細胞殘骸。因此，可以證明蝦紅素奈米囊泡不會進入非黑色素癌的細胞當中。綜合以上結果，可以證實蝦紅素奈米囊泡，能進入黑色素癌細胞(B16F10)去抑制細胞的生長使其死亡，且具有一定程度的細胞趨性。



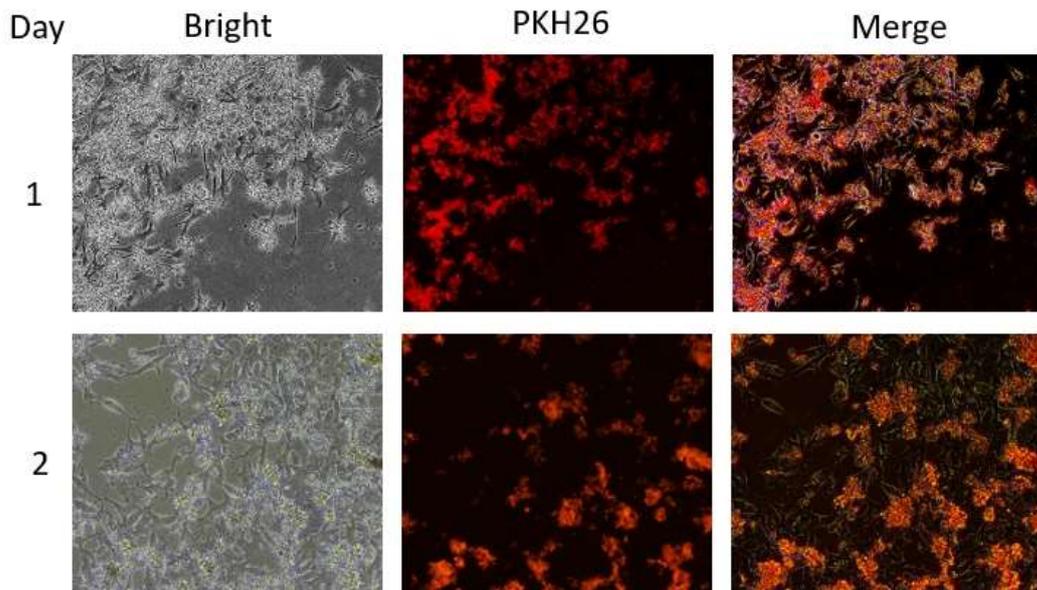
圖十二：此為 B16F10 與 HaCaT 細胞的正常培養圖。作為螢光染色實驗的控制組。

B16F10 PKH26 NV (0.84 mM)

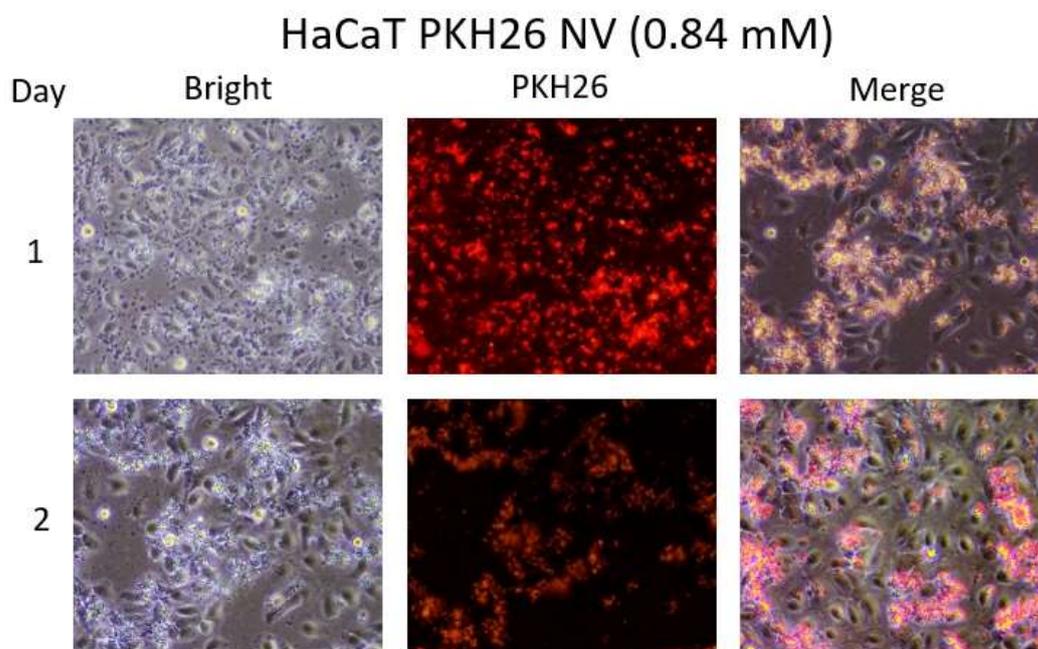


圖十三：B16F10 與 NV (0.84 mM) 共同培養 24 小時後的螢光染色細胞照片。Bright：細胞照片。PKH26：螢光染色之細胞照片。Merge：將 Bright 與 PKH26 疊圖之細胞照片

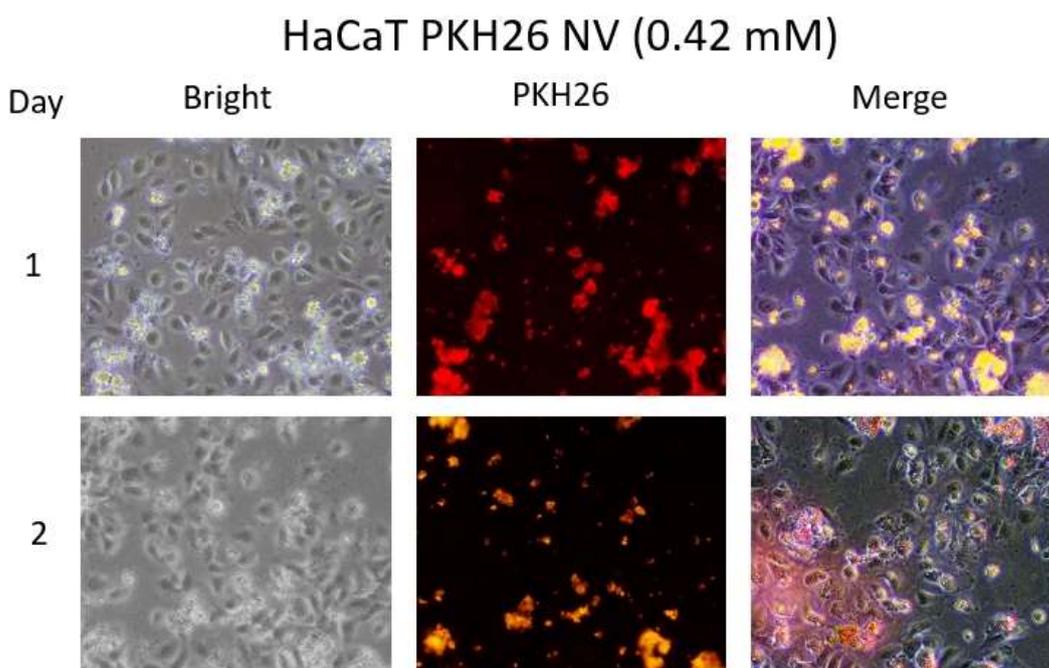
B16F10 PKH26 NV (0.42 mM)



圖十四：B16F10 與 NV (0.42 mM) 共同培養 24 小時後的螢光染色細胞照片。Bright：細胞照片。PKH26：螢光染色之細胞照片。Merge：將 Bright 與 PKH26 疊圖之細胞照片



圖十五：HaCaT 與 NV (0.84 mM) 共同培養 24 小時後的螢光染色細胞照片。Bright：細胞照片。PKH26：螢光染色之細胞照片。Merge：將 Bright 與 PKH26 疊圖之細胞照片



圖十六：HaCaT 與 NV (0.42 mM) 共同培養 24 小時後的螢光染色細胞照片。Bright：細胞照片。PKH26：螢光染色之細胞照片。Merge：將 Bright 與 PKH26 疊圖之細胞照片

伍、討論

首先，在抗氧化能力實驗，我們做了三項實驗來證明蝦紅素具有優良的抗氧化能力，分別為 DPPH、ABTS、Reducing power，由 DPPH、ABTS 的實驗數據顯示出，當蝦紅素濃

度越高時，其清除自由基的能力也越好，證明了蝦紅素具有強抗氧化能力，與我們所查閱文獻的實驗結果相符。在細胞遷移實驗中再將蝦紅素與黑色素癌細胞共同培養，證明蝦紅素可以有效抑制黑色素癌遷移與擴散，實驗發現濃度越高的蝦紅素與黑色素癌細胞混合培養後，黑色素癌細胞生長受到越強烈的抑制。查找文獻後發現蝦紅素能使細胞內自由基與抗氧化物失去平衡，進一步給癌細胞更多的氧化壓力來抑制其生長。

在製造奈米囊泡的過程中，為了確認奈米囊泡的性質，以 BCA 蛋白質測定及 DLS 粒徑分析作為實驗依據。在 BCA 蛋白質測定實驗中，我們肯定奈米囊泡上具有某些蛋白質是來自於原先黑色素癌細胞本身的，再經過測量後與原始的蛋白質含量(1.4 mg/mL)相比，NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM) 分別為 60% 及 35%。在 DLS 粒徑分析實驗中證實自製的奈米囊泡確實屬於奈米等級的載體，大小約介於 400~1600 nm 之間，而造成 NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM) 大小差異這麼大的原因，推測應為蛋白質的相近物質產生群聚與黏附效應，導致 NV (0.84 mM) 大小為 NV (0.42 mM) 三倍左右。一般外泌體的大小介於 50 ~ 200 nm 之間，雖然製成的囊泡比外泌體體積大了約兩倍左右，但依舊為奈米等級大小，此一特點提供了更大的藥物與細胞接觸的表面積，使細胞對於囊泡內藥物的吸收度大幅提升。

為了測試包覆蝦紅素的奈米囊泡是否會抑制黑色素癌細胞的生長。我們將不同濃度蝦紅素溶液及蝦紅素奈米囊泡與黑色素癌細胞共同培養後進行細胞存活率測試。結果顯示，在有被奈米囊泡包覆的情況下，黑色素癌的死亡率較高。此實驗證明了，使用奈米囊泡作為藥物載體，可能具有加強藥物效果的潛力。此外，我們想知道囊泡包覆的蝦紅素對非黑色素癌細胞是否也具有抑制的特性，我們也對角質細胞(HaCaT)與纖維母細胞(Hs68)也進行存活率測試，在數據中證實 HaCaT 和 Hs68 對蝦紅素的接受度較小，細胞存活率幾乎都在 70% 以上。這項結果代表著蝦紅素奈米囊泡不會使其他細胞的存活率顯著下降殺死正常細胞，但對於黑色素癌細胞卻有極高的致死率，此項結果代表蝦紅素奈米囊泡具有一定程度的細胞專一性。再者，透過細胞遷移實驗，可以觀察到蝦紅素奈米囊泡，能在 16 到 18 小時內，抑制癌細胞的生長，並在 24 小時以後造成細胞的凋亡，證實了蝦紅素奈米囊泡能有效抑制癌細胞的轉移及遷移；而透過螢光染色可以觀察到螢光染劑進入到黑色素癌細胞，但是並未進入 HaCaT 細胞，代表著我們利用黑色素癌細胞本身所製成奈米囊泡是可以與一般的黑色素癌細胞互相融合，把囊泡內所包覆的蝦紅素藥物直接送進黑色素癌細胞中，而從螢光染色的圖中也可以觀察到經螢光染色後的奈米囊泡完整的包覆於黑色素癌細胞周圍更證實了奈米藥物有著更佳的吸收度。而其他細胞並未發生此種狀況。一些研究表明，細胞膜（奈米囊泡膜）上有某些細胞標誌（CD 蛋白）及整合素(integrin)是只有黑色素癌細胞特有。因此本實驗顯示出奈米囊泡藥物的運送具有專一性與此有關。

陸、結論

一、蝦紅素的抗氧化能力

(一) 實驗證明蝦紅素具有優秀的抗氧化能力，尤其是在 ABTS 及 DPPH 自由基清除率的表現上。

二、奈米囊泡特性之確認

(一) 由 BCA 蛋白測定顯示，奈米囊泡的成分不僅僅只有細胞膜的磷脂質成分，也具有蛋白質。

(二) 由 DLS 確認，自製的奈米囊泡粒徑大小介於 400~1600 nm 之間。

三、蝦紅素奈米囊泡抑制黑色素癌細胞的效果

(一) 蝦紅素經由奈米囊泡包覆後，具有較佳抑制黑色素癌生長的效果，可加強癌症藥物的效果。

(二) 蝦紅素奈米囊泡不影響角質細胞及纖維母細胞的細胞存活率。在螢光染色實驗中，蝦紅素囊泡僅進入黑色素癌細胞，並未進入角質細胞。證實蝦紅素奈米囊泡具有運送藥物至特定細胞的傾向。

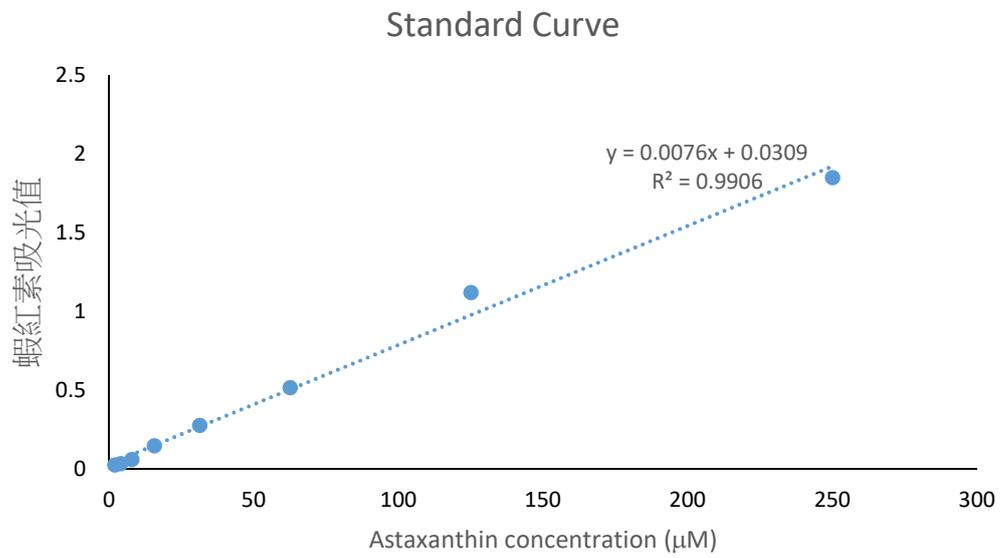
(三) 蝦紅素奈米囊泡在細胞遷移實驗中，有效抑制癌細胞的遷移能力，具有抑制癌細胞擴散的效果。

柒、參考資料

- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi C. R., Alaibac M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28(6), 1005-11.
- Mishra, H., Mishra, P. K., Ekielski, A., Jaggi, M., Iqbal, Z., Talegaonkar, S. (2018). Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144(12), 2283-2302, doi: 10.1007/s00432-018-2726-1.
- Middleton, R. J., Grob, J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Muller, M. (2000) Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 18(1), 158-66. doi: 10.1200/JCO.2000.18.1.158
- Chen, Y. T., Kao, C. J., Huang, H. Y., Huang, S. Y., Chen, C. Y., Lin, Y. S., ... & Wang, H. M. D. (2017). Astaxanthin reduces MMP expressions, suppresses cancer cell migrations, and triggers apoptotic caspases of in vitro and in vivo models in melanoma.
- Lu, M., Zhao, X., Xing, H., Xun, Z., Zhu, S., Lang, L., . . . Ding, P. (2018). Comparison of exosome-mimicking liposomes with conventional liposomes for intracellular delivery of siRNA. *International journal of pharmaceutics*, 550(1-2), 100-113.
- Chen, Mu-Hoe Yang, Hsueh-Wei Chang, Jo-Shu Chang* Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry* 45, 1865-1872, 2010
- Jian-Liang Pan, Hui-Min Wang, Chun-Yen Chen, Jo-Shu Chang* Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by supercritical carbon dioxide fluid with ethanol modifier. *Engineering in Life Sciences*, 12 (6), 638-647, 2012
- Lunavat, T. R., Jang, S. C., Nilsson, L., Park, H. T., Repiska, G., Lässer, C., . . . Lötvall, J. RNAi delivery by exosome-mimetic nanovesicles—Implications for targeting c-Myc in cancer.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*, Nov-Dec 2007;4(6):807-18. doi: 10.1021/mp700113r. Epub 2007 Nov 14
- Wang, H. M. D., Li, X. C., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2017). Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource Technology*, 244, 1407-1415, 2017 (Invited Review)
- 沈馨仙、郭旻奇、張思平、鍾佳玲、楊榮季(2010)抗氧化劑及常見之抗氧化活性評估。臺北長庚紀念醫院、林口長庚紀念醫院。
- 汪徽五(2012)抗癌藥品的奈米給藥傳輸
- 周鑫佑、吳聖馨、王惠民(2020)蝦紅素回顧：合成、萃取以及在皮膚醫藥上之應用。化工；67卷1期，P54-63。

捌、附件

一、蝦紅素濃度減量線



二、囊泡製備完成圖



【評語】 052014

1. 本研究的主旨在於研發黑色素癌細胞膜分泌特性的奈米囊泡，以包覆蝦紅素當抗癌藥物加強癌症治療效果。研究結果顯示此蝦紅素奈米囊泡可抑制黑色素癌細胞生長及轉移，且對於正常的角質與纖維母細胞無顯著傷害性。
2. 研究作品的題目名稱相當有趣，容易吸引讀者目光。研究過程有系統地收集數據及分析。
3. 蝦紅素的來源未說明。作品說明書的實驗方法陳述「取蝦紅素 1.68 mM 以 DMSO 為溶劑，稀釋成 1、1/2、1/4、1/8、1/12、1/24 倍樣品」，此濃度與附件的吸光值圖中濃度並不一致。既然蝦紅素以 DMSO 為溶劑，在測量抗氧化能力實驗時，不宜以二次水當控制組。
4. 建議定義奈米囊泡(例如是外泌體或是微泡?)。蝦紅素濃度在 150 uM ~ 175 uM 時，黑色素癌細胞的存活率有很大的落差，建議宜在此區間再做更細的分割。
5. 可再進一步探討蝦紅素奈米囊泡如何抑制癌細胞的轉移及遷移的機制。

作品簡報



蝦!你是我的囊中物

科別: 動物與醫學科

組別: 高中職組

前言

- 黑色素癌占整體皮膚癌死亡率的**60%**
- 目前治療黑色素癌細胞的方式有化療藥、免疫藥、標靶藥，但都伴隨強大的副作用，例如:化療藥會使病人噁心嘔吐，疲倦無力且影響造血系統功能
- 特洛伊效應
- 類似的細胞膜結構，表現出更好的生物相容性

研究架構圖



囊泡製成



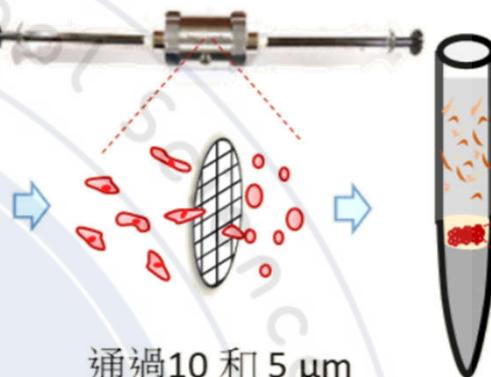
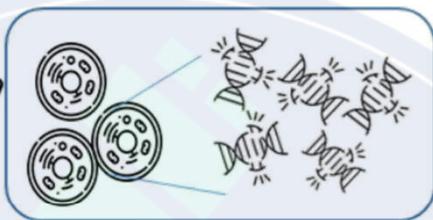
B16F10
細胞刮除



超音波處理
30分鐘

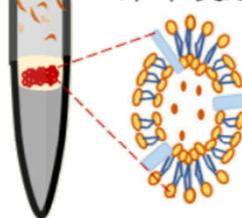


UVB照射(去除細胞內遺傳物質)



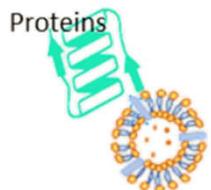
通過10 和 5 μm
過濾膜

奈米囊泡



囊泡特性

囊泡成分



蛋白質濃度



減量線濃度

粒徑大小

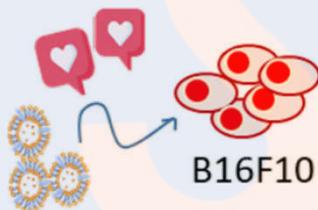


大小約介於
400 ~ 1600 nm
之間

適合搭載藥物的載體



囊泡趨向性



B16F10



Not
Interested



HaCaT, Hs68

囊泡效果

抑制作用

遷移率下降 ↓



存活率下降 ↓



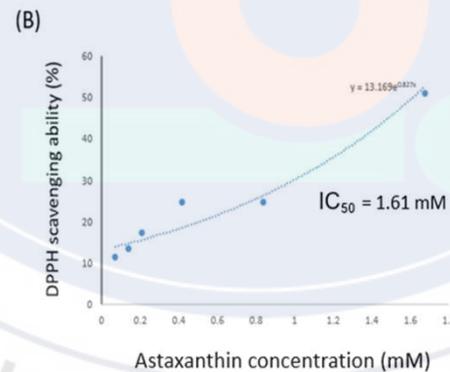
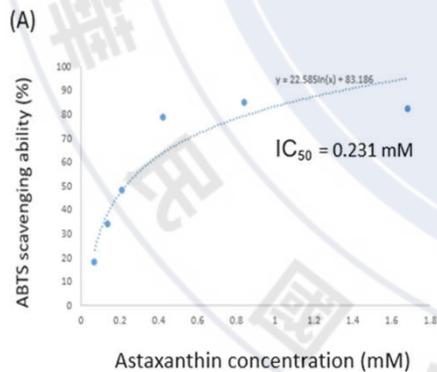
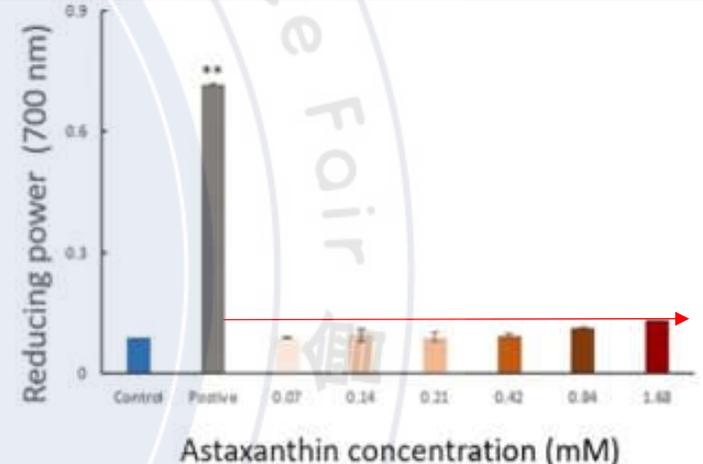
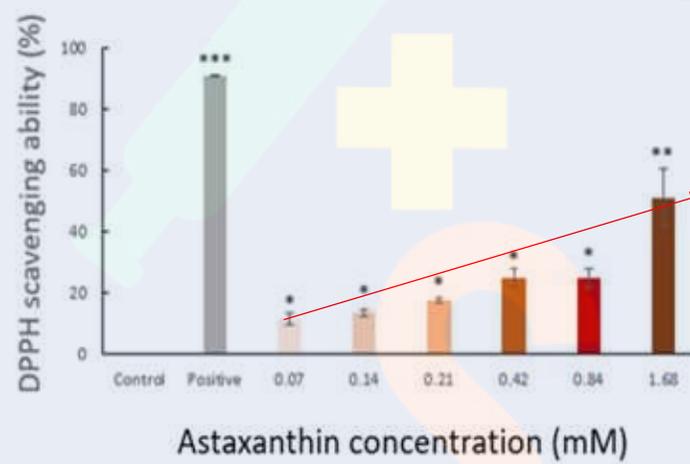
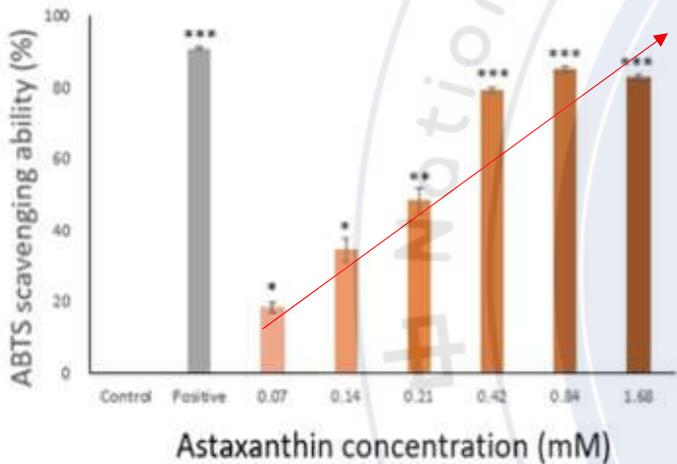
優於未經包覆之
蝦紅素



研究成果-抗氧化能力測定

可以顯現出蝦紅素具有抗氧化能力

無法顯現出蝦紅素具有抗氧化能力



- ABTS、DPPH:當蝦紅素濃度越高時，清除自由基的能力越好，表示蝦紅素具有抗氧化能力
- Reducing power:無法看出蝦紅素有抗氧化能力
- 在ABTS 稀式兩倍及四倍有最好的抗氧化能力經過代入檢量線，得到濃度為 0.84及0.42mM，也用此濃度來做後續實驗

自由基清除率的IC50

製備奈米囊泡



奈米囊泡



將載體震碎

破壞黑色素癌細胞的DNA

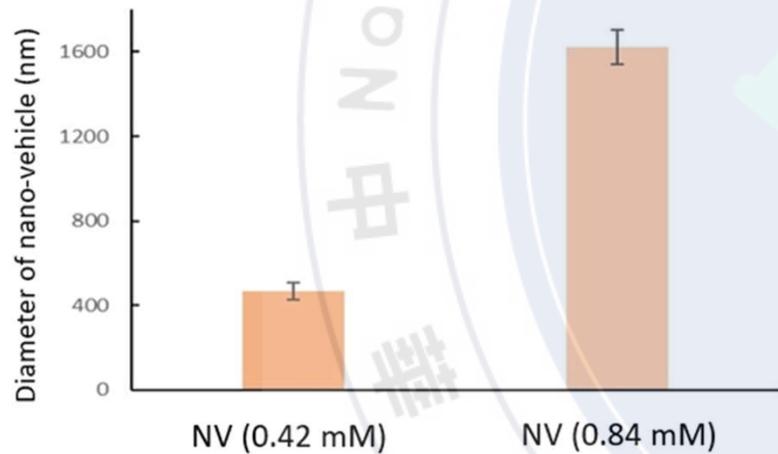
利用密度梯度分離液將藥物與遺傳物質分層

擠壓器



研究成果

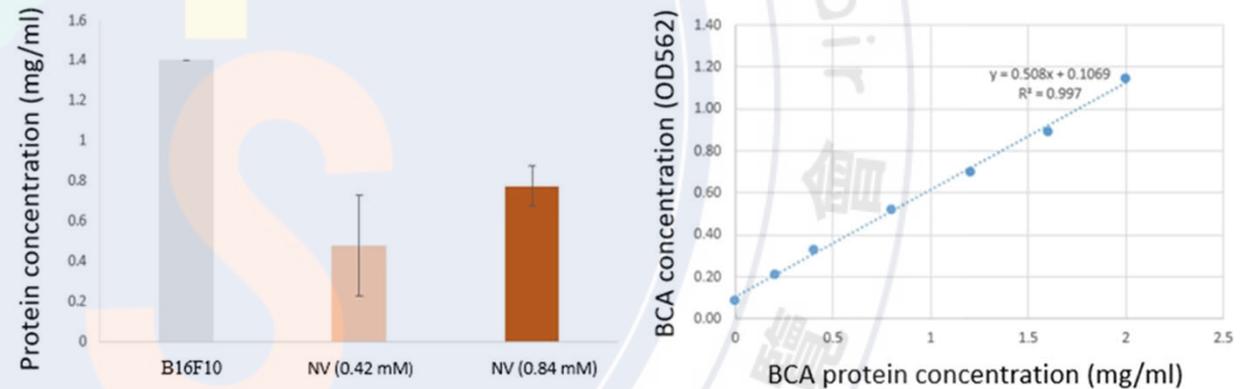
DLS粒徑分析



NV(0.84 mM)直徑大小約為1620 nm

NV(0.42 mM)直徑大小約為470 nm

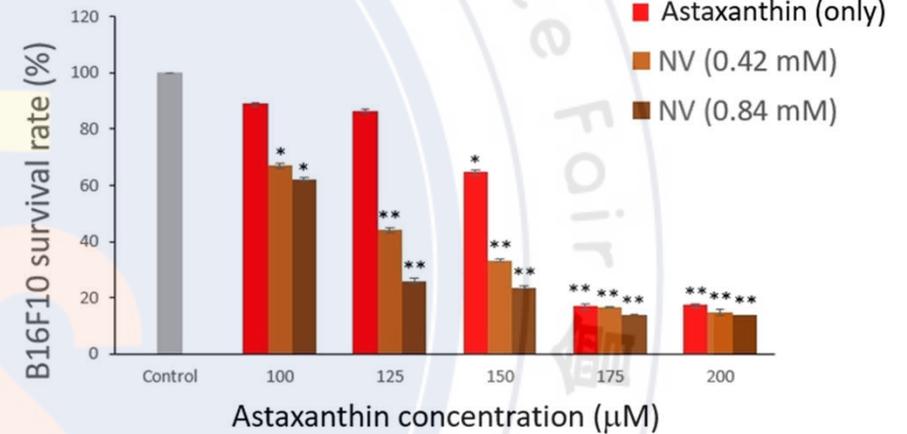
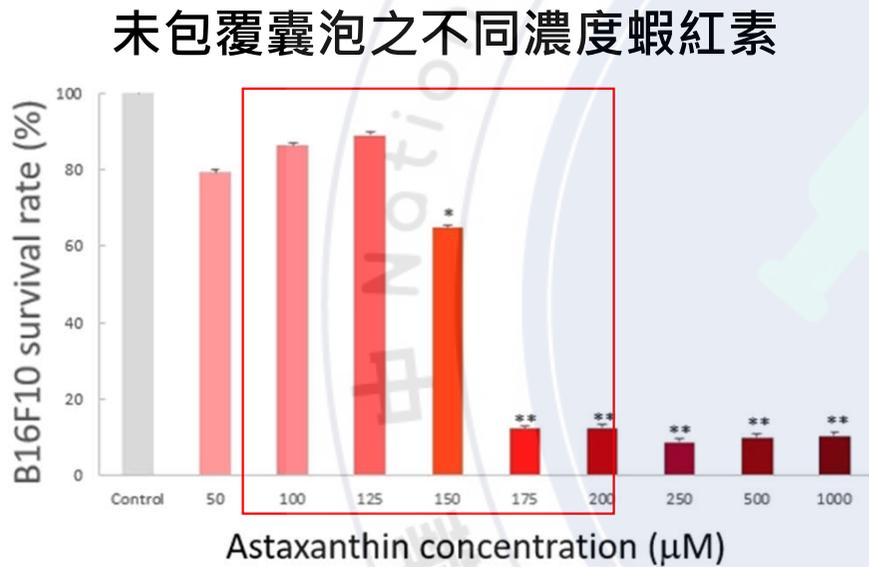
蛋白質含量測定



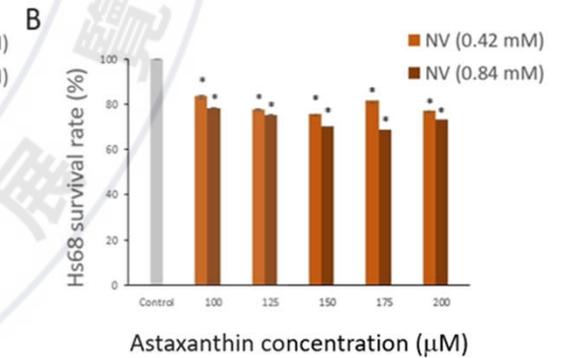
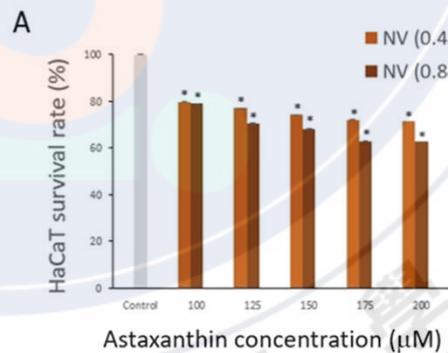
粒徑越大的奈米囊泡，所含的蛋白質濃度越高

研究成果-細胞存活率分析

黑色素癌細胞



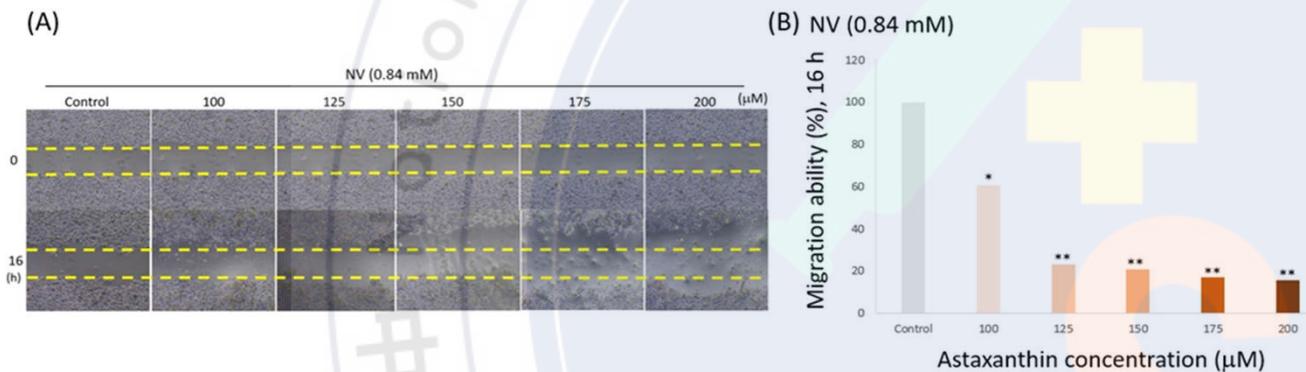
角質細胞和纖維母細胞



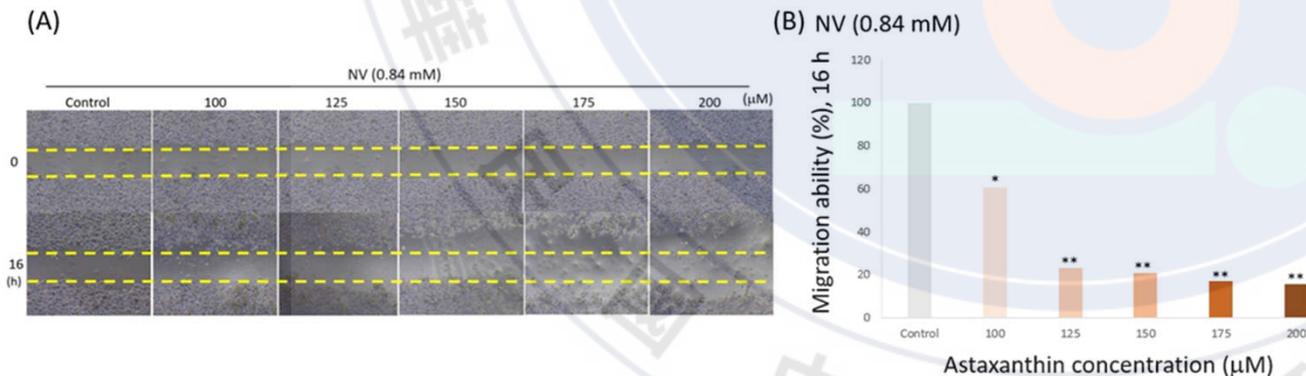
- 在濃度為100到200時存活率急劇下降，在接下來的實驗，以此區間的濃度，進行實驗
- 其囊泡包覆的蝦紅素抑制黑色素癌細胞的能力優於未經囊泡包覆的蝦紅素。
- 囊泡具有趨向性，會殺死黑色素癌細胞，而角質細胞及纖維母細胞則否。

研究成果- 細胞遷移率分析

黑色素癌細胞與0.84 mM的奈米囊泡共培養



黑色素癌細胞與0.42mM的奈米囊泡共培養

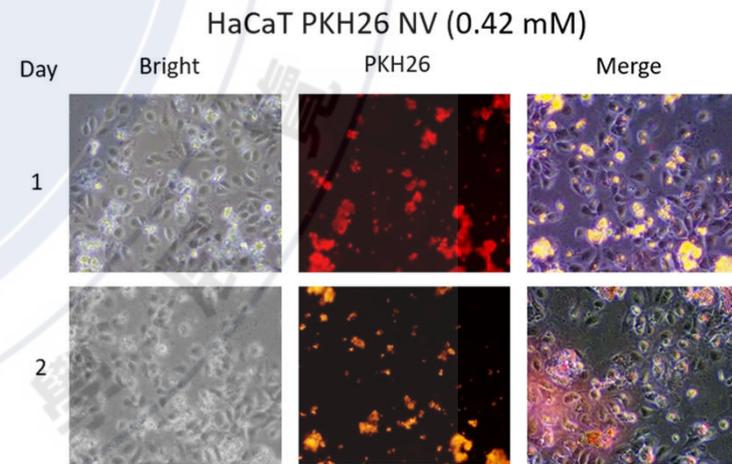
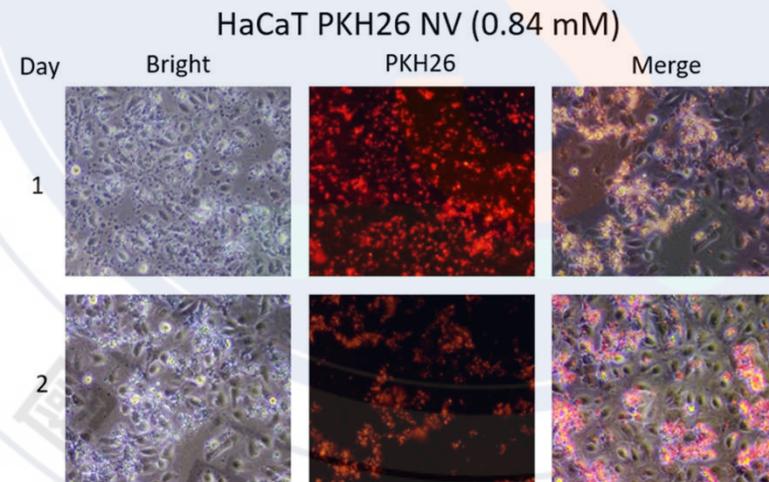
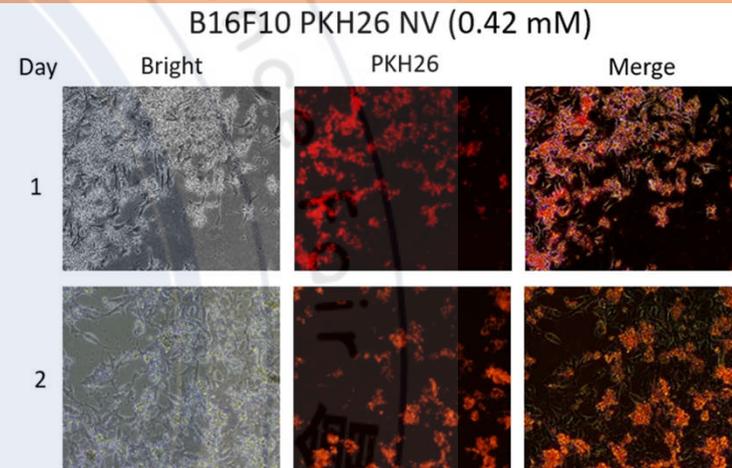
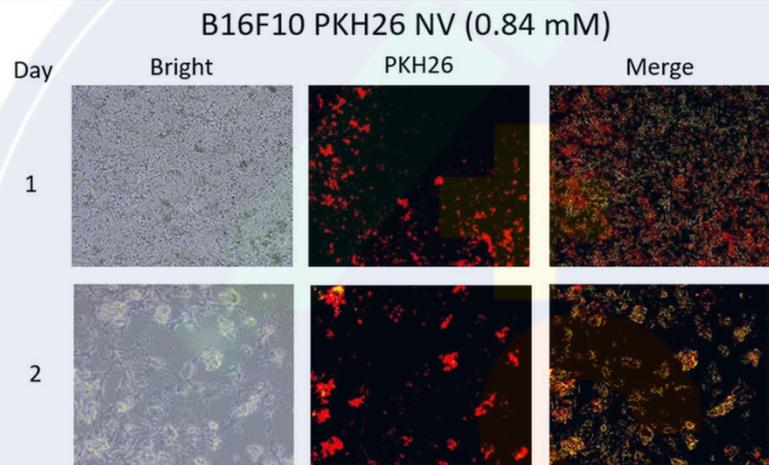
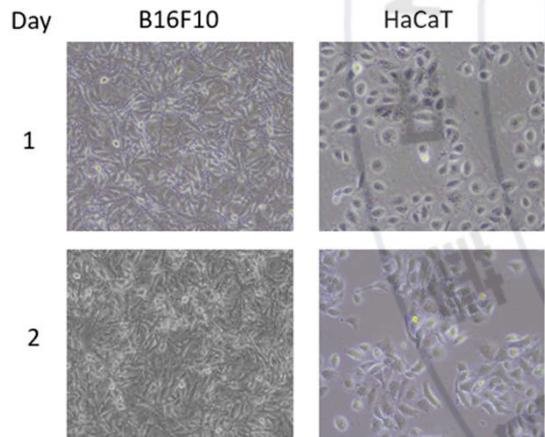


- 左圖可以看到隨著濃度的上升，細胞離中間的標準線越來越遠且有少部分的凋亡
- NV(0.84 mM) 在濃度100 ~ 200 mM下，能有效抑制癌細胞的擴散及生長。
- NV(0.42 mM) 在濃度125 ~ 200 mM抑制表現極佳，在濃度100 mM下，有少部分的細胞死亡。然而在後20小時後，細胞突然大量地死亡，可能為蝦紅素奈米囊泡在針對癌細胞上面，有極強的毒殺率；因此實驗時間訂為16小時。

研究成果-細胞螢光染色

對照組

Bright view



研究成果-細胞螢光染色

染劑(PKH26)



- 用PKH26螢光染劑將奈米囊泡的外膜染色
- PKH26染劑用於細胞的標記，也常用於體內細胞追蹤的研究，在光學顯微鏡下，可看見紅橙色的激發光。
- 由第三張合成圖中可以看到奈米囊泡會貼附在黑色素癌細胞上，而不會貼附在角質細胞上

未來展望

- 利用qrt PCR來檢測遺傳物質是否清除乾淨
- 將奈米囊泡進行純化，並製作成針劑，應用在人體的癌症治療。
- 奈米囊泡中包覆不同藥物，例如：化療藥，光敏劑，血管增生抑制劑...等，增強治療的效果。
- 利用不同細胞製成奈米囊泡，如：紅血球細胞或巨噬細胞，讓奈米囊泡具有不同的特性及趨向性

參考資料

- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi C. R., Alaibac M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28(6), 1005-11.
- Middleton, R. J., Grob, J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Muller, M. (2000) Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 18(1), 158-66. doi: 10.1200/JCO.2000.18.1.158
- Chen, Mu-Hoe Yang, Hsueh-WeiChang, Jo-Shu Chang* Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry* 45, 1865-1872, 2010