

2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090007

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 小花蔓澤蘭活性成分 Dihydromilanolide 誘
導胃癌細胞凋亡與自噬性死亡

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 臺中市立西苑高級中學

指導教師 宋武修、魏宗德

作者姓名 許芷珂

關鍵詞 Dihydromilanolide、細胞凋亡、細胞自噬

作者簡介



由於父母開明建構式的教育，使我在學習過程中能夠自由發揮與親近大自然。我喜歡動手做實驗，親身證明某些理論。因從小就有接觸生物醫學的環境，自然就對科學試驗產生興趣。外來種小花蔓澤蘭是大量的繁殖覆蓋在林木上，使它成為農政單位的心頭之恨。我思考著要如何把把植物殺手轉化成人類幫手，讓小花蔓澤蘭變成有利於世界的抗癌藥草。

一、中英文摘要

中文摘要

外來入侵種小花蔓澤蘭繁殖速度太快，使台灣本土生環境及多樣性受到破壞。我們研究發現，小花蔓澤蘭葉萃取物會誘導人類胃癌(AGS)細胞毒性；以 HPLC 分析及分離出小花蔓澤蘭葉萃取物的活性成分 Dihydromilanolide (DHK)，發現 DHK 會毒殺胞胃癌、卵巢癌、乳癌與血癌細胞，其中以胃癌(AGS)細胞毒殺性最強。此外，抗氧化劑 *N*-acetylcysteine 可減緩小花蔓澤蘭葉萃取物及 DHK 對胃癌細胞毒殺性，推測是透過活性氧化物(ROS)來毒殺胃癌細胞。我們亦發現，DHK 可與抗癌藥物(Doxorubicin、Cisplatin 或 Paclitaxel)對胃癌細胞產生協同作用。DHK 作用胃癌細胞會誘導 Caspase-3 增加、PARP 蛋白裂解、促凋亡 Bax 增加及抑凋亡 Bcl-2 減少；產生酸性囊泡(AVOs)、促自噬 LC3-II 及 Beclin-1 蛋白增加，且加入自噬抑制劑 3-MA 可保護 DHK 誘導胃癌細胞死亡。推論 DHK 可誘發胃癌細胞凋亡(Apoptosis)及自噬性死亡(Autophagy)。總結，小花蔓澤蘭與活性成分 Dihydromilanolide (DHK) 具抗癌功效且與抗癌藥物產生協同作用，可開發成抗癌的藥品或保健食品。

英文摘要(Abstract)

Mikania micrantha (*M. micrantha*) is a perennial exotic noxious weed climber that grows vigorously and damages the Taiwan's ecosystem. However, the anticancer activities of *M. micrantha* are poorly known. Therefore, the objective of this study was to study the effect of anti-tumor properties exhibited by *M. micrantha* leaf extracts (MML) and active component Dihydromilanolide (DHK) on human gastric cancer (AGS) cells and the underlying molecular mechanisms. The ethanol extracts of MML (0–300 µg/mL) significantly downregulated the AGS cell viability. The spectral data obtained from the MML's active component was compared with previous reports and was this component was characterized as Dihydromilanolide (DHK). Our MTT data also showed that DHK (0-15 µM) possess anti-cell proliferation activity in AGS cells. Interestingly, the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) significantly attenuated the MML- or DHK-mediated cell death which signifies that MML or DHK induced cytotoxicity via ROS pathway in AGS cells. Moreover, compared to the individual treatments, the combined synergistic effects of DHK and anti-cancer agents (Doxorubicin, Cisplatin, or Paclitaxel) substantially repressed the AGS cell growth. Notably, DHK treatment induced apoptosis, which was accompanied by a sequence of events including caspase-3 activation, PARP cleavage, apoptotic Bax increase, and anti-apoptotic Bcl-2 decrease. Furthermore, we confirmed that DHK-induced autophagy was evidenced by increased LC3-II accumulation, Beclin-1/Bcl-2 dysregulation, and AVO (acidic organelle vesicles) formation in AGS cells. Our findings suggest that *Mikania micrantha* and Dihydromilanolide (DHK) may exert anti-tumor activity against human gastric cancers.

二、前言

(一)、研究背景

台灣癌症死亡率已經躍居總死亡人數的第 1 位。今日科學昌明，可是人類對於可怕的疾病—癌症還是力不從心，不能加以克服。目前癌症治療中西醫學不盡相同，西醫治療主要以外科手術、放射療法、化學療法與免疫療法等；中醫則以傳統中草藥作為治療。然而，中藥草成分複雜必須經由分離純化才能獲得有效成分。流行病學及動物實驗證實，食物攝取與癌症發生率有重要的正相關性。目前醫界正積極研究治療過程中，給予適當的營養或藥品添加，來減緩病人的不適，也藉以提高治癒的機會。科學家相信減少癌症發生主要有兩方面，一方面尋找最好的治療策略，另一方面則是由天然飲食成分的攝取來達到預防癌症發生的目的。

衛生署統計癌症連續多年蟬聯國人十大死因榜首，胃癌位居國人癌症死亡原因排名的第 7 位。臺灣為胃癌高罹患率地區，亞洲人因為飲食習慣等因素，是好發胃癌的高風險群。胃癌的成因很複雜，早期胃癌幾乎沒有症狀或症狀不明顯，所以等到嚴重腹痛等症狀就醫時，多半已是晚期。流行病學研究發現，飲食習慣與胃癌發生有相當關係，據統計喜吃醃烤食物、肉類、醬菜、鹹魚等鹽漬物者，胃癌發生率較高。抽菸、喝酒也較易促進胃癌發生。吃新鮮蔬果、食用牛奶和維他命 C 則相對較少發生胃癌。胃癌的治療包括：(1)手術：是治療胃癌最有效的方法，無法達到根治目的之病人，亦常需開刀治療以預防合併症之發生。(2)化學治療及放射治療：這兩種方法僅達到癌症局部的控制。除了手術外，現在醫藥科技的發達包括化療藥物，也能讓晚期患者延長存活期。國一自然與生物科技課本中，提及小花蔓澤蘭屬於外來種具侵略性本土植物，引起我們思考小花蔓澤蘭是否含有抗癌植物化合物？是否具有良好的抗癌功效？

目前最被熟知的促進腫瘤細胞的死亡模式有 2 型：(1)細胞凋亡(apoptosis)：第 1 型細胞計畫性死亡其特徵為造成細胞縮小、細胞膜外翻、染色體收縮與片段性的細胞核等結果。(2)細胞自噬(autophagy)：第 2 型的細胞計畫性死亡；在細胞誘發過度的細胞自噬反而會促成細胞的死亡。誘導細胞自噬性死亡與細胞凋亡作為癌症的治療策略具合理可行性(Chang et al., 2017)。細胞凋亡(Apoptosis)為學者研究和治療癌症的熱門方向，利用凋亡因子的特性應用於癌症治療，使癌細胞自行凋亡而不破壞其他正常的細胞。細胞凋亡是獨特的細胞死亡形式，主要變化包括細胞膜泡狀囊(Blebbing)的形成，核染色質聚集(Chromatin condensation)，DNA 斷裂(DNA fragmentation)及細胞凋亡小體(Apoptotic body)形成等特徵。細胞自噬 (autophagy) 是能夠藉由自己溶酶體(Lysosome)將自身胞器或物質進行分解，可調控細胞生長或死亡，是體內衡定的重要機轉。細胞自噬是演化上保留下來的自我吞食的機制，在細胞飢餓、缺氧和代謝壓力的時候，內質網會製造出雙層的膜(主要為自噬蛋白 LC3-I 轉變為 LC3-II)，將細胞

內的一些胞器或物質包圍起形成自噬體(Autophagosome)，再和溶酶體結合形成自溶體(Autolyosome)，將一些胞器或物質分解產生。

(二)、研究動機

小花蔓澤蘭原先是台灣政府為了水土保持而引入境內，然而，小花蔓澤蘭的迅速蔓延影響台灣山林生態，如今農政單位極力想消滅它(廖天賜, 2003)。高中的生物課中我學習到生物多樣性的概念，並想起國中課本介紹的小花蔓澤蘭是“入侵外來種”是破壞生物多樣性的元凶。小花蔓澤蘭物種適應力強、繁殖快速，所以其數目在台灣山林急劇上升。也由於小花蔓澤蘭對我們的生活沒有實用性，我們不能夠藉由大量利用使其數量減少。我們希望能發現小花蔓澤蘭(並分離出抗癌活性成分)的優點，針對其抑制癌細胞生長及誘發死亡藥用性的發現，將其應用於預防及治療罹癌者。由於小花蔓澤蘭取得容易、成本低廉，藉此研究我們希望鼓勵國人多利用小花蔓澤蘭，恢復台灣原有生態環境及生物多樣性。

(三)、研究目的

中藥典籍記載著到台灣本土的蔓澤蘭(*Mikania cordata*)擁有清熱、解毒及消腫止痛的功效。清熱、解毒及消腫止痛可能與抗癌相關。於是，我們思考外來種小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha*)，藉著藥理功效-抗癌的新發現，把小花蔓澤蘭化為有用的東西，希望能大量摘取並應用，恢復台灣原有的生態環境平衡。我們思考小花蔓澤蘭及其分離出來的活性成分 Dihydromilanolide (DHK) 是否具有有良好的抗胃癌功效?

主要研究目標:

1. 小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物對胃癌(AGS)細胞的抗癌活性
2. 小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物與抗癌藥物 Doxorubicin 對胃癌細胞具協同作用
3. HPLC 分析及分離小花蔓澤蘭葉的活性成分 Dihydromilanolide (DHK)
4. DHK 對各種癌細胞(胃癌最強/卵巢癌/乳癌/血癌等)的抗癌活性
5. DHK 與抗癌藥物 Doxorubicin 對胃癌細胞具協同作用
6. DHK 與抗癌藥物 Cisplatin 對胃癌細胞具協同作用
7. DHK 與抗癌藥物 Paclitaxel 對胃癌細胞具協同作用
8. DHK 與抗癌藥物 5-Fluorouracil 對胃癌細胞不具協同作用
9. DHK 誘導胃癌細胞凋亡及相關蛋白質分析(Caspase-3/PARP/Bax/Bcl-2)
10. DHK 誘導胃癌細胞自噬及相關蛋白質分析(AVO assay/LC-3/II/Beclin-1)

三、研究方法或過程

(一)、研究設備與材料

1.小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha*)

學名: *Mikania micrantha* H. B. K.

原產地: 中南美洲。



(<http://wssroc.agron.ntu.edu.tw/Mikania/mikania.htm>)

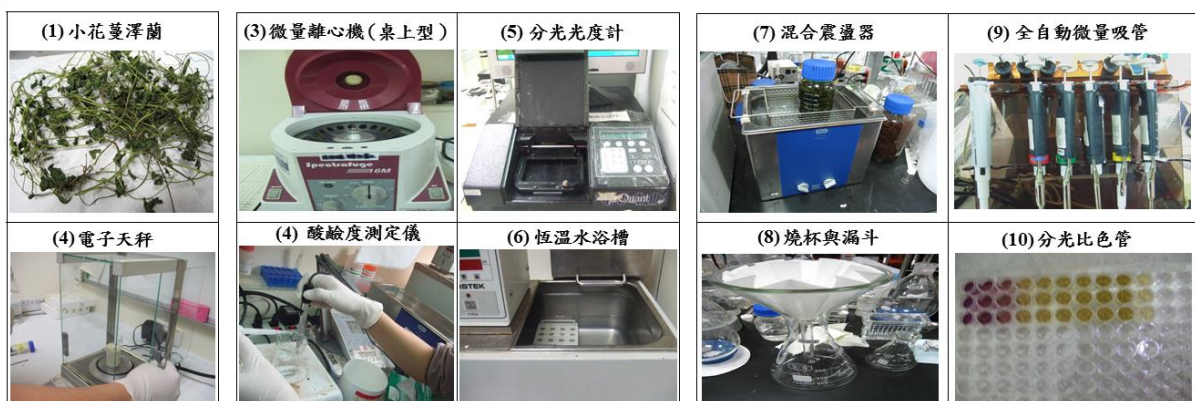
2.研究場地：

3.實驗儀器：電子天秤、酸鹼度測定儀、恆溫水浴槽、混合震盪器、桌上型離心機、分光光度計、數位相機、液態氮桶、培養箱、倒立式相位差顯微鏡、高速離心機、電泳、濕式轉印機、冷光影像儀器。

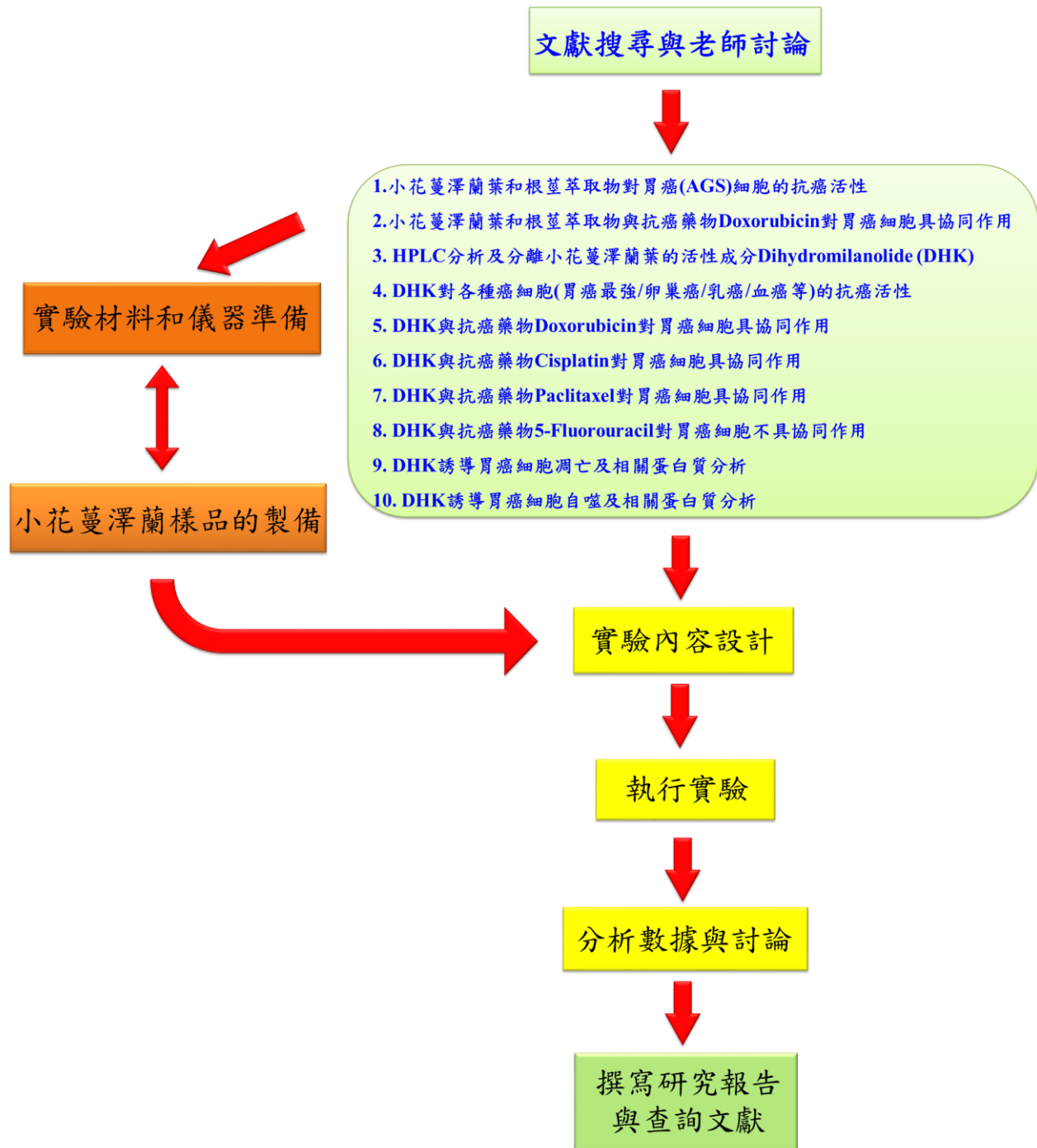
4.實驗材料：抗癌藥物 (Doxorubicin, Cisplatin, Paclitaxel, 5-Fluorouracil)、*N*-acetylcysteine (NAC)、FRPMI-1640 細胞培養液、胎牛血清 (FBS, Fetal bovine serum)、抗生素 (penicillin-streptomycin)、磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS; Sodium chloride, NaCl; Sodium phosphate dibasic, Na₂HPO₄ 等PH=7.4)、去離子純水、碳酸氫鈉、細胞冷凍保存液 (Cell culture freezing medium, DMSO)、Trypan blue 染劑。(來自Sigma公司)

5.實驗器材：微量吸管分注器 (Pipette)、試管、燒杯、量筒、玻璃瓶、細胞培養皿、分光比色管、稱量紙、無菌過濾膜、酒精燈、顯微鏡。

圖實驗儀器與器材



(二)、研究過程或方法流程圖



(三)、小花蔓澤蘭葉及根莖樣品的準備

1. 臺中市太平區聖愛山莊採集小花蔓澤蘭。
2. 初步處理: 清水洗乾淨, 放在室溫下陰乾(3 天)。
3. 將小花蔓澤蘭分成葉組和根莖組並切成小段。
4. 品種鑑定。

(四)、小花蔓澤蘭葉及根莖萃取物的製備

1. 將小花蔓澤蘭浸泡在 95% 酒精(1 天), 溶解出萃取物成分汁液。
2. 過濾留下溶在酒精的小花蔓澤蘭萃取物(去除不溶雜質)。
3. 將小花蔓澤蘭酒精萃取物放入減壓濃縮器內, 利用冷凝法使酒精蒸發。
4. 進行真空冷凍乾燥, 取得小花蔓澤蘭葉組(MML)和根莖組(MMS)綠色粉狀。
4. 將粉末狀小花蔓澤蘭萃取物保存於-20°C。
5. 將粉末狀小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物溶解於甲醇, 調配成實驗所需濃度。
6. 小花蔓澤蘭葉萃取物(MML, *Mikania micrantha* leaf); 。
7. 小花蔓澤蘭根莖萃取物(MMS, *Mikania micrantha* stem/root)。

(五)、高效液相層析法(HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

1.原理: HPLC 分析是利用動相通過靜相時, 混合物中的各成份在靜相和動相之間的親和力不同, 使其在管柱中的滯留時間不相同而分離的方法。在逆相層析法中, 通常以高極性作為流動相, 靜相為非極性, 極性大的樣品成分會先被沖提出來, 極性小的較慢沖提出來, 達到分離效果。樣品進行分離時也可以改變流動相(Acetonitrile)來進行梯度沖提。(感謝中國醫藥大學黃慧琪教授實驗室協助)

2.實驗儀器 HPLC: 採用了高壓泵/高效固定相和高靈敏度檢測器, 具備速度快、效率高、靈敏度高、操作自動化的特點。

(1)管柱(Column): COSMOSIL5 C18-ARII (4.6 x 250 mm, 5 μm)。沖提溶劑系統(Solvent system): 0-60 min 10-30% Acetonitrile。壓力(Press): 100 kgf。注入量(Injection volume): 20 μL。

(2)紫外線/可見光檢測器(UV/VIS detector): 優點是靈敏度高, 溫度效應低, 易於梯度沖提而且使用方便, 可分析大部分的有機物質。

3.實驗步驟: 小花蔓澤蘭葉萃取物(MML)經 HPLC 分離及分析, 紫外線/可見光檢測器分析, 取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜:(1) UV254 nm。(2) UV230 nm。(感謝中國醫藥大學黃慧琪教授實驗室協助)

(六)、人類癌細胞培養(Cell culture)

1. 試劑：取RPMI-1640 (9.5g)、DMEM (9.5g)、DMEM/F12 (9.8g)或IMEM (9.5g)粉狀培養基溶於去離子純水(900 uL)，加入2g NaHCO₃混合均勻，溶解後PH值調至7.4，最後將體積定量至1升。利用通過孔徑0.22 μm的無菌過濾膜過濾，再加入1%抗生素(penicillin-streptomycin)，混合後保存於4°C。取0.04克 Trypan blue 溶於10毫升磷酸緩衝液(PBS)，通過孔徑0.45 μm的濾膜濾除雜質，室溫保存。

2. 培養條件：將人類癌細胞株培養於含胎牛血清10% (Fetal bovine serum) 的培養液(1% penicillin-streptomycin)，然後將癌細胞置於5% CO₂培養箱中培養(37 °C)。胃癌(AGS)細胞細胞培養於RPMI-1640 培養液；卵巢癌(SKOV-3)細胞培養於DMEM/F12 培養液；乳癌(MDA-MB-231/MCF-7)細胞培養於DMEM培養液；血癌(K562)細胞培養於IMDM培養液。

3. 解凍細胞：將癌細胞自液態氮桶取出，立即移至於37 °C 水浴槽，30秒內急速解凍，再將細胞冷凍保存液(DMSO)吸到已加好培養液無菌離心管內稀釋，經離心(1000 rpm x 5 min)去除上清液，再加入培養液(10% FBS)將細胞均勻打散(pipetman)後，移到培養瓶，於含5% CO₂的37 °C 培養箱生長。視細胞貼壁情況決定是否更換新的細胞培養液。

4. 繼代培養：移除舊細胞培養液後以PBS(1X) 緩衝液清洗兩次。加入適量的 Trypsin 並置於培養箱中反應3分鐘。加入細胞培養液終止 Trypsin 反應，並將細胞液移至離心管中離心去除上清液。加入適量細胞培養液將細胞均勻打散。取的細胞懸浮液(100 μL)與等量的0.4% Trypan blue 均勻混和後，取出10 μL至細胞計數器(hemocytometer)計算細胞數。依據實驗所需的細胞密度，將細胞懸浮液均勻的種至不同的培養盤。

(七)、人類癌細胞的毒殺試驗(Trypan blue assay)

1. 原理：正常健康的細胞，由於細胞膜完整可排除 Trypan blue 染劑進入，所以不會被染色。然而，死細胞或損傷嚴重的細胞，其細胞膜通透完整性已被破壞，Trypan blue 染劑可進入細胞內而對細胞加以染色。經 Trypan blue 染劑染色為藍色者為死細胞，亮者為活細胞。

2. 繼代培養：將癌細胞密度維持在 $2\sim 5 \times 10^5$ cells/mL。繼代培養時，將含癌細胞之培養液收集至離心管中離心(1200 rpm)5分鐘。吸掉上清液，再將癌細胞打散加入新鮮培養液培養。

3. 癌細胞存活率測定：將癌細胞培養於12 well 細胞培養皿中(約 2×10^5 cells/mL 共1 mL)，再加入小花蔓澤蘭葉萃取物(MML, 0~300 μg/mL)及根莖萃取物(MMS, 0~300 μg/mL)放置於37 °C 培養箱反應24小時。反應時間結束時，於細胞培養皿中取出100 μL 癌細胞，再加入100 μL 的0.4% Trypan blue 染劑溶液混合均勻後，以血球計數器計數細胞數目，並以倒立式相位差顯微鏡觀察細胞形態及拍照。

(八)、人類癌細胞的細胞型態(Morphology)

1. 原理：利用倒立式顯微鏡觀察細胞型態改變。

2. 實驗方法：將人類胃癌(AGS)細胞(2.5×10^4 cell/24-well)置於培養箱中培養 24 小時。待隔日細胞貼壁後，依據實驗條件加入 MML or MMS (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，並置於培養箱中培養 24 小時。以倒立式顯微鏡觀察細胞型態並拍照。

(九)胃癌(AGS)、卵巢癌(SKOV-3)、乳癌(MDA-MD-231/MCF-7)及血癌(K562)細胞存活率(MTT)試驗

1. 原理：MTT(3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl-3,5-diphenyltetrazolium bromide)為水溶性黃色粉末。MTT 溶液(可接受氫離子)經由活細胞內粒線體的去氫酶還原後，在細胞色素 c 的作用下 MTT 的環狀結構(tetrazolium ring)會被切斷，而轉換成不溶水的藍紫色 formazan 結晶。再利用 DMSO 將細胞膜與藍紫色結晶物溶解，於波長 570 nm 測得吸光值。此反應需要在活細胞中進行，因此當藍紫色愈多表示，細胞數存活愈多，吸光值也越高(Huang et al., 2012)。

2. 存活率(MTT)測定：

(1) 胃癌細胞(AGS, 2.5×10^4 細胞)、卵巢癌(SKOV-3, 2.5×10^4 細胞)、乳癌細胞(MDA-MB-231/MCF-7, 2.5×10^4 細胞)及血癌(K562, 1×10^5 /mL 細胞)，分種於 24 孔盤中。

(2) 隔天細胞貼壁後，加入不同濃度的小花蔓澤蘭葉萃取物(MML, 0~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、根莖萃取物(MMS, 0~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或 Dihydromilanolide (DHK, 1.25-5 μM)，於培養箱培養 24 小時。

(3) 移除原有培養液以 PB 緩衝液清洗 1 次，每個孔洞加入 MTT 試劑(500 $\mu\text{L}/\text{well}$, 0.5 mg/mL)，並置於培養箱中反應 2 小時。

(4) 抽走原有的 MTT 溶液，可看到底部藍紫色結晶。加入 DMSO (400 μL)溶解結晶。

(5) 最後每個孔洞抽出 200 μL 上清液於 96-well 盤，並以 ELISA reader 在 570 nm 測吸光值。

(十)、DHK 和化療藥物合併實驗及計算協同作用(CI, Combination Index)

天然成份對生物活性的效應，與化療藥物彼此間可能具有協同性(Synergism)或拮抗性(Antagonism)或加成效應(additive effect) (謝明學、周瑞玲. 2002)。實驗以 DHK 和各種化療藥物的單獨劑量使用及不同劑量相互配對合併使用，測試其對 AGS 細胞的存活率效應間的關係。根據 Chou TC 等人(1984)及 Liang Zhao 等(2004)，提出之兩種藥物的聯用指數(combination index, CI)來分析評估兩種藥物間之交互作用。評估的計算公式為：CI =

$CA_x/IC_{x,A} + CB_x/IC_{x,B}$ ，其中 CA_x 和 CB_x 是指同時合併使用 A、B 兩種藥物達到 x% 有效時的各別部分藥物濃度， $IC_{x,A}$ 和 $IC_{x,B}$ 是指單獨用一種藥物達到 x% 有效時的藥物濃度。計算出 CI 值後，如果 $CI < 1$ 認為兩藥物聯用為協同作用；如果 $CI = 1$ ，認為兩藥物聯用為加成作用；如果 $CI > 1$ ，則認為兩藥物聯用為拮抗作用。

(十一)、西方墨點(western blotting)分析法

1. 原理：採用聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)去分析樣品中的特定蛋白質含量。利用介面活性劑SDS將蛋白變性並使分子表面均勻佈上負電荷，通電源後使帶負電的蛋白質分子向正極移動，分子量大者泳動率小;相反地，分子量小者泳動率大。將不同分子量蛋白分離後，將分離的蛋白轉漬於PVDF膜上固定，並加入能和特定蛋白質結合的專一性抗體(Primary antibody)充分反應後，再加入二級抗體(Secondary antibody)與一級抗體專一性結合，再經由受質(顯影劑)顯色顯影，最後冷光影像儀器來檢測電泳分離蛋白表現量的增加或減少。

2. 試劑與藥品：

- (1) 二級抗體: HRP-conjugated anti-rabbit IgG 及 HRP-conjugated anti-mouse IgG。
- (2) 一級抗體: Caspase-3、PARP、Bax、Bcl-2、PARP、LC3B、Beclin-1及 β -actin。
- (3) Ammonium persulfate (APS): 0.1g $(NH_4)_2S_2O_8$ 溶於1 mL二次水。
- (4) 30% Acrylamide/Bis solution (29:1)。
- (5) 10% SDS: 取10g SDS用二次水定量到100 mL。
- (6) SDS-PAGE 製備

	8% Running gel	10% Running gel	15% Running gel	5% Stacking gel
d.d. H ₂ O	4.6mL	4mL	2.3mL	2.8mL
1.5M Tris (pH=8.8)	2.5mL	2.5mL	2.5mL	2.5mL
1.5M Tris (pH=6.8)	-	-	-	500 μ L
30% Acrylamide	2.7mL	3.3mL	5mL	660 μ L

- (7) Lysis Buffer: Tris HCl (10 mM, pH=8)、Sucrose (0.32 M)、EDTA (5 mM)、PMSF (1mM)、DTT (2 mM)及Triton X-100 (1%)。
- (8) 1.5 M Tris (pH=8.8): 取Tris base (91g)溶在300 mL二次水，以6N HCl調至pH=8.8，用二次水定量至500 mL。
- (9) 1 M Tris (pH=6.8): 取Tris base (12.1g) 溶在40 mL二次水，以1N HCl調至 pH=6.8，用二次水定量到100 mL。
- (10) 5% Stacking gel: H₂O (3.5 mL)、1.5 M Tris (0.625 mL, pH=6.8)、30% Acrylamide Mix (0.825 mL)、10% SDS (0.05 mL)、10% APS (0.05 mL)及 TEMED (0.05 mL)。

- (11) Protein loading dye (6 倍): Tris-HCl (350 mM, pH=6.8)、SDS (10%)、Glycerol (35%)、Bromophenol blue (0.02%)及 β -mercaptoethanol (30%)。
- (12) Transfer buffer: 取 Tris base (18.2g)、Glycine (86.5g) 及 Methanol (1200 mL), 用二次水定量至 3000 mL。
- (13) Electrode buffer (pH=8.4): 取 Tris base (54.5g)、Boric acid (24.8g)、EDTA2Na (4.7g)及 SDS (5g), 用二次水定量至 1000 mL。
- (14) PBS 緩衝液: 取 800 mL 二次水, 加入 NaCl (8 g)、KCl (0.2 g)、KH₂PO₄ (0.2 g)、Na₂HPO₄·12H₂O (2.9 g), 調至 pH 7.4 並定量至 1000 mL。
- (15) Blocking buffer: 取 25g 脫脂奶粉溶於 500 mL 之 PBST。
- (16) Washing buffer (PBST): 取 499.5 mL PBS 再加入 500 μ L Tween-20。
- (17) 顯影劑: 將 WesternBright™ ECL 和 WesternBright™ Peroxide 以等比例混和, 依照 PVDF 膜的大小調整。

3. 小花蔓澤蘭萃取物(MML/MMS)及 Dihydromilanolide 處理的胃癌細胞樣品: 將胃癌 (AGS)細胞培養於培養皿中(約 2×10^6 cells 共 10 mL), 再加入小花蔓澤蘭葉/根莖萃取物 (MML/MMS, 0~300 μ g/mL) 及 DHK (0~15 μ M), 放置於 37 °C 培養箱反應 24 小時後, 收集培養液於離心管中離心(1200 rpm) 5 分鐘後去除上清液。再用 PBS 緩衝液清洗 2 次(離心 1200 rpm 5 分鐘及 4°C 下離心 3000 rpm 10 分鐘)去除上清液, 即得 MML/MMS 及 DHK 處理的胃癌細胞樣品。

4. 細胞蛋白質萃取: 使用刮刀將細胞刮下後, 利用高滲透壓溶液(Lysis buffer)使細胞內蛋白質溶解出來, 並加入避免蛋白質中蛋白酶失去活性(PMSF)及可使蛋白質變性的物質(DTT), 再利用超音波震盪將細胞徹底打破, 以高速離心機離心收取其上清液, 即為總蛋白質萃取物。

5. 蛋白質定量分析: 配製不同濃度胎牛血清白蛋白(BSA, Bovine serum albumin)標準品, 並將欲測定之蛋白質溶液稀釋成適當的濃度。取 800 μ L 之二次水加入不同濃度 BSA 標準品 (0~10 μ g/mL)及蛋白質溶液, 加入 200 μ L Protein assay dye 充分混合後靜置 5 分鐘後, 測波長 595 nm 之吸光值。並利用 BSA 標準品所求出的標準曲線, 計算出欲測定之蛋白質溶液濃度。已定量蛋白保存在-80°C 冰箱備用。

6. 聚丙烯醯胺膠體(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE):

將 SDS-PAGE 注入電泳玻片, 待凝膠完全後加入 5% stacking gel 並插入電泳梳。室溫下聚合反應 30 分鐘, 完全聚合後去除電泳梳, 裝置在電泳槽上並浸泡於 running buffer (1X)。取 50~80 μ g 蛋白質, 加入 6 倍 Protein loading buffer, 以 PBS 緩衝液調整使每一個樣品(體積相同), 並以 97°C 加熱 6 分鐘使蛋白質變性, 立即放回冰上冷卻。再將蛋白質樣品及 marker 注入各

個電泳膠片槽溝中進行電泳分析。先以 80V 電壓跑 30 分鐘後，再改變電壓為 100V，待 marker 完全展開後即停止電泳，再進行蛋白質的轉印。

7. 蛋白質轉印至 PVDF: 取適當之以甲醇浸潤 PVDF (Polyvinylidene difluoride memberane)，連同二張 3M 紙放入蛋白質轉印緩衝液(Transfer buffer)中浸潤。操作重疊順序由下而上依序為海綿、3M 紙、膠體、PVDF、3M 紙、海棉，並使用玻棒去除氣泡，放置於濕式轉印機。以 105 V 的電流轉印 1.5 小時，將蛋白質轉印到 PVDF 上。轉印後將膠體取出觀察轉印效果，PVDF 則進行免疫抗體墨點。

8. 免疫抗體點墨 (Immunoblotting): 將轉印蛋白質 PVDF 用 Blocking solution 振盪 30 分鐘，以 5% BSA 作為溶劑，分別將欲測之一級抗體稀釋至適當濃度，加入並使其均勻覆蓋 PVDF，再置於水平式旋轉器上室溫以 50 rpm 反應 0.5-1 小時後，接著置入 4°C 冰箱之水平式旋轉器上繼續以 50 rpm 反應至隔天。取出 PVDF 後用 Washing buffer 清洗 3 次(每次 3-5 分鐘轉速為 100 rpm)。依不同的一級抗體，加入特異作用的二級抗體，稀釋倍數為 5000 倍，置於水平式旋轉器上於室溫振盪 2 小時，再用 Washing buffer 清洗三次，清洗未接合二級抗體。使用冷光影像儀器，將 PVDF 膜以塑膠夾子置入黑色金屬盤上，蛋白面朝上，將配置好的 Chemiluminescent Detection Reagent 滴在 PVDF 膜上，利用 LAS-4000 mini FUJIFILM 冷光影像系統分析蛋白質的表現量。

(十二)、細胞自噬試驗 (AO-acridine orange staining)

1. 原理: 細胞自噬時會產生酸性囊狀胞器(acidic organelle vesicles, AVO)。Acridine orange (AO) 螢光色素染劑，可以滲入自噬溶酶體中，具有分析細胞內酸性囊狀胞器的能力。此染劑能在低 pH 值酸性環境下產生紅色螢光，藉由螢光顯微鏡來評估細胞自噬形成。

2. AO 染劑配製: 取 Acridine orange (1 mg) 粉末溶於 1 mL PBS 緩衝液中(配置成 1 mg/mL)，再以 filter (0.22 μM) 過濾，儲存於 -20°C 冰箱，使用前以細胞培養液稀釋(1:1000)。

3. 實驗步驟:

- (1) 將胃癌 AGS 細胞(2.5×10^4 cell/well) 種於 24 孔盤。
- (2) 隔日細胞貼壁後，給予不同濃度的 DHK (0-5 μM) 作用 24 小時。
- (3) 移除細胞培養液，加入 1 mL PBS 緩衝液清洗兩次並移除。
- (4) 加入含 AO 染劑(1 μg/mL) 的細胞培養液 (800 μL/well)，避光並放置於 37°C 細胞培養箱中 1 小時。
- (5) 移除細胞液再加入 1 mL PBS 緩衝液清洗兩次並移除，第三次加入 500 μL PBS 緩衝液。
- (6) 將 Well 孔盤移至螢光顯微鏡以紅色螢光觀察並拍照紀錄。

四、研究結果與討論

(一)、研究結果

1. 小花蔓澤蘭葉(MML)和根莖(MMS)萃取物對胃癌(AGS)細胞的抗癌活性

加入不同濃度(0-300 $\mu\text{g/mL}$)的小花蔓澤蘭葉(MML)及根莖(MMS)萃取物，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後，觀察胃癌細胞生長情形。相對於控制組，加入小花蔓澤蘭葉(MML)及根莖(MMS)萃取物後，發現胃癌細胞數目明顯下降 (Fig 1A 及 1B)，細胞存活率隨著劑量增加有明顯下降趨勢；且小花蔓澤蘭葉萃取物(MML)的抗胃癌活性大於小花蔓澤蘭根莖(MMS)萃取物。利用倒立式相位差顯微鏡(phase microscope)觀察細胞形態，發現胃癌細胞形態不完整與細胞膜皺縮的現象(Fig 1C)。此外，我們發現加入抗氧化劑 NAC (*N*-acetylcysteine)可保護小花蔓澤蘭葉萃取物(MML)對胃癌細胞的毒殺；然而，抗氧化劑 NAC 似乎無法保護小花蔓澤蘭根莖萃取物(MMS)對胃癌細胞的毒殺。推測，小花蔓澤蘭葉(MML)萃取物可能經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 1A)。

2. 小花蔓澤蘭葉(MML)和根莖(MMS)萃取物與抗癌藥物 Doxorubicin 對胃癌細胞具協同作用

加入不同濃度(25, 50, 或 100 $\mu\text{g/mL}$)的小花蔓澤蘭葉(MML)或根莖(MMS)萃取物，同時加入抗癌藥物 Doxorubicin (0.25, 0.5, 或 1.0 μM)，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後，發現小花蔓澤蘭葉(MML)或根莖(MMS)萃取物與 Doxorubicin 具協同作用(CI<1) (Table 1)。

3. HPLC 分析及分離小花蔓澤蘭葉(MML)的活性成分 Dihydromilanolide (DHK)

小花蔓澤蘭葉萃取物以 HPLC 分離，經紫外線/可見光檢測器分析，取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜: (1) UV254 nm。 (2) UV230 nm。 (Fig 2A-B) (Cuenca et al., 1998)。我們取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜，進一步分離鑑定出小花蔓澤蘭抗癌的活性成分-Dihydromikanolide (DHK)(感謝中國醫藥大學中藥資源系黃慧琪教授協助)。我們發現，加入不同濃度(0-15 μM)的 Dihydromikanolide (DHK)，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後具很強的毒殺(Fig 2C)。

4. DHK 對各種癌細胞(胃癌/卵巢癌/乳癌/血癌等)的抗癌活性

加入不同濃度的 DHK 作用癌細胞處理 24 小時後，以 MTT 試驗測定細胞存活率，發現胃癌(AGS)、卵巢癌(SKOV-3)、乳癌(MDA-MB-231)、乳癌(MCF-7)、血癌(K562)細胞的 IC₅₀ (抑制 50% 細胞存活率濃度)為 9.2, 17.4, 21.5, 31.7, 及 35.6 μM (Table 2)。總結，比較小花蔓澤

蘭葉活性成分 DHK (Dihydromilanolide)的抗癌活性，發現抗胃癌>卵巢癌>乳癌>血癌。

5. DHK 與抗癌藥物 Doxorubicin 對胃癌細胞具協同作用

同時加入 DHK (5 μ M)與抗癌藥物 Doxorubicin (0, 0.25, 0.5 或 1.0 μ M)，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後，發現 DHK 與 Doxorubicin 具協同作用(CI<1) (Fig 3A 及 Table 3)。此外，我們發現加入抗氧化劑 NAC 可保護 DHK 與 Doxorubicin 對胃癌細胞的毒殺，推測 DHK 與 Doxorubicin 可能經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 3A)。

6. DHK 與抗癌藥物 Cisplatin 對胃癌細胞具協同作用

同時加入 DHK (5 μ M)與抗癌藥物 Cisplatin (0, 25, 50 或 75 μ M)，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後，發現 DHK 與 Cisplatin 具協同作用(CI<1) (Fig 3B 及 Table 4)。此外，我們發現加入抗氧化劑 NAC 可保護 DHK 與 Cisplatin 對胃癌細胞的毒殺，推測 DHK 與 Cisplatin 可能經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 3B)。

7. DHK 與抗癌藥物 Paclitaxel 對胃癌細胞具協同作用

同時加入 DHK (5 μ M)與抗癌藥物 Paclitaxel (0, 100 或 200 μ M)，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後，發現 DHK 與 Paclitaxel 具協同作用(CI<1) (Fig 3C 及 Table 5)。此外，我們發現加入抗氧化劑 NAC 可保護 DHK 與 Paclitaxel 對胃癌細胞的毒殺，推測 DHK 與 Paclitaxel 可能經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 3C)。

8. DHK 與抗癌藥物 5-Fluorouracil 對胃癌細胞不具協同作用

同時加入 DHK (5 μ M)與抗癌藥物 5-Fluorouracil (0, 200 或 400 μ M)，作用人類胃癌(AGS)細胞於 24 小時後，相反地我們發現 DHK 與 5-Fluorouracil 不具協同作用(CI>1) (Fig 3D 及 Table 6)。此外，我們亦發現加入抗氧化劑 NAC 似乎無法保護 DHK 與 5-Fluorouracil 對胃癌細胞的毒殺，推測 DHK 與 Doxorubicin 可能不是經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 3D)。

9. DHK 誘導胃癌細胞凋亡及相關蛋白質分析(Caspase-3/PARP/Bax/Bcl-2)

本實驗利用西方墨點法來偵測胃癌細胞凋亡。加入不同濃度的 DHK (0, 0.125, 0.25, 或 0.5 μ M)，作用胃癌(AGS)細胞 24 小時，發現 ProCaspase-3 與 PARP 表現量減少而 Cleaved PARP 表現量增加(Fig 4A)；此外，我們亦發現促細胞凋亡 Bax 表現量增加，而抗細胞凋亡 Bcl-2 表現量減少(Fig 4A)。加入細胞凋亡抑制劑 Z-VAD 可保護 DHK 誘導胃癌細胞死亡(Fig 4B)，

本實驗證實，小花蔓澤蘭葉成分 DHK 具有誘導胃癌細胞進行細胞凋亡的能力。

10. DHK 誘導胃癌細胞自噬及相關蛋白質分析(AVO assay/LC-3I/II/Beclin-1)

細胞自噬會讓細胞產生的酸性囊泡(AVO, acidic Organelle vesicles)，本實驗利用 AO (Acridine orange)染色法來偵測胃癌細胞自噬。由於 AO (Acridine orange)可與細胞自噬溶酶體 lysosome 分解(呈酸性)胞器物質結合呈紅色螢光，可藉由螢光顯微鏡觀察。結果顯示，胃癌(AGS)細胞加入 DHK (0, 0.125, 0.25,或 0.5 μM)培養 24 小時後，可偵測到胃癌細胞有產生紅色螢光 AVO 與自噬的現象(Fig 5A)。加入不同濃度的 DHK (0, 0.125, 0.25,或 0.5 μM)，作用胃癌(AGS)細胞 24 小時，並利用西方墨點法偵測細胞自噬的蛋白質。發現 LC3-I/II 表現量增加(Fig 5B)；此外，我們亦發現促細胞自噬 Beclin-1 表現量增加(Fig 5B)。在細胞自噬中可利用自噬抑制劑 3-MA (3-methyladenine)，證明細胞在無法驅動自噬時是否減緩細胞的死亡。加入自噬抑制劑 3-MA 可保護 DHK 誘導胃癌細胞死亡(Fig 5C)，推論小花蔓澤蘭葉成分 DHK (Dihydromilanolide)具有誘導胃癌細胞自噬性死亡的能力。

Fig 1. 小花蔓澤蘭葉(MML)和根莖(MMS)萃取物對胃癌(AGS)細胞的抗癌活性

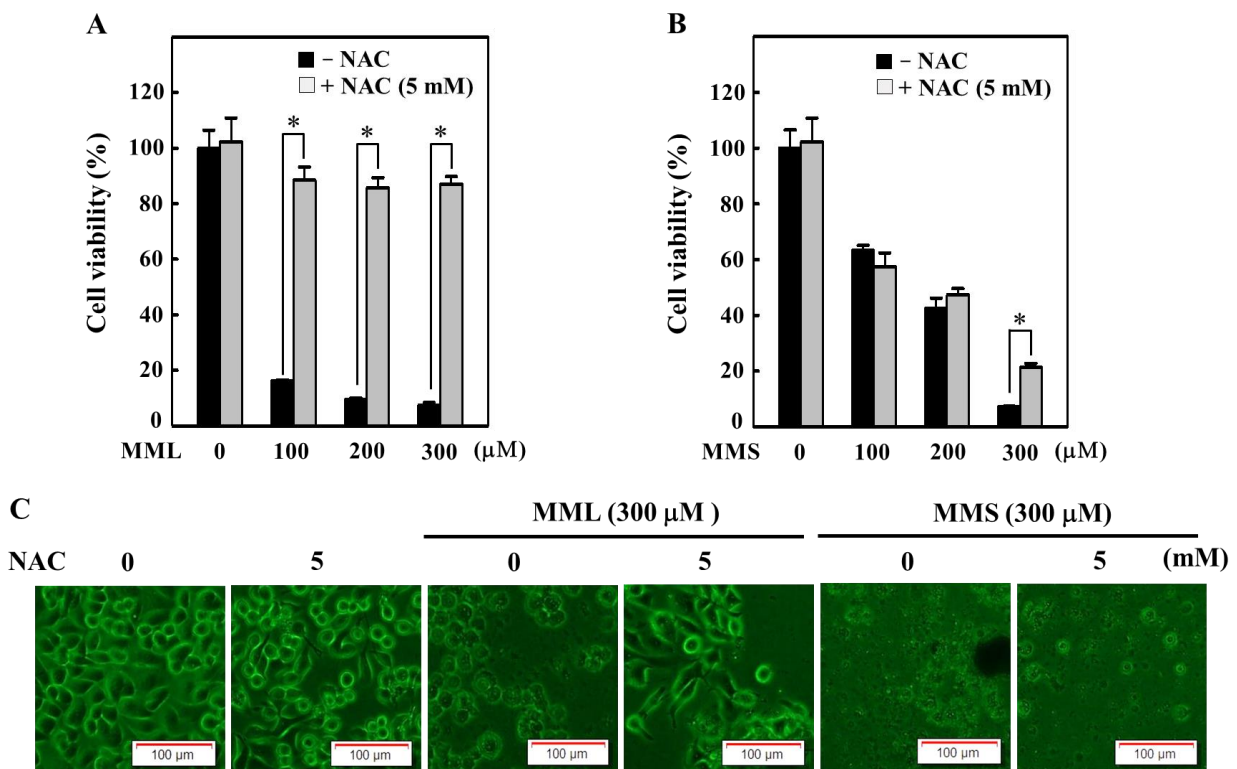


Table 1. 小花蔓澤蘭葉(MML)和根莖(MMS)萃取物與抗癌藥物 Doxorubicin 對胃癌細胞具協同作用

Table 1. The synergism effects of MML/MMS and Doxorubicin on AGS cells

Treatment	($\mu\text{g/mL}$) (μM)	Cell number (%)	Predicted value*	Combination index (CI)**
MML	25	99.0 \pm 1.5	—	—
	50	72.0 \pm 1.4	—	—
	100	63.3 \pm 1.8	—	—
MMS	25	89.8 \pm 0.4	—	—
	50	22.4 \pm 0.4	—	—
	100	16.1 \pm 0.5	—	—
Doxorubicin	0.25	88.1 \pm 4.6	—	—
	0.5	82.6 \pm 7.2	—	—
	1.0	73.1 \pm 9.3	—	—
MML+ Doxorubicin	25 + 0.5	78.6 \pm 1.4	81.8	1.152
	50 + 0.5	54.7 \pm 1.3	59.5	0.612
MMS+ Doxorubicin	25 + 0.5	57.7 \pm 0.7	74.2	0.849
	50 + 0.5	12.9 \pm 0.2	18.5	0.644

*Predicted value : (%A \times %B)/100.

**Combination index according to Chou and Talalay [1], Values < 1 indicates synergism. All SD were within 5%.

Fig 2. HPLC 分析及分離小花蔓澤蘭葉(MML)的活性成分 Dihydromilanolide (DHK)

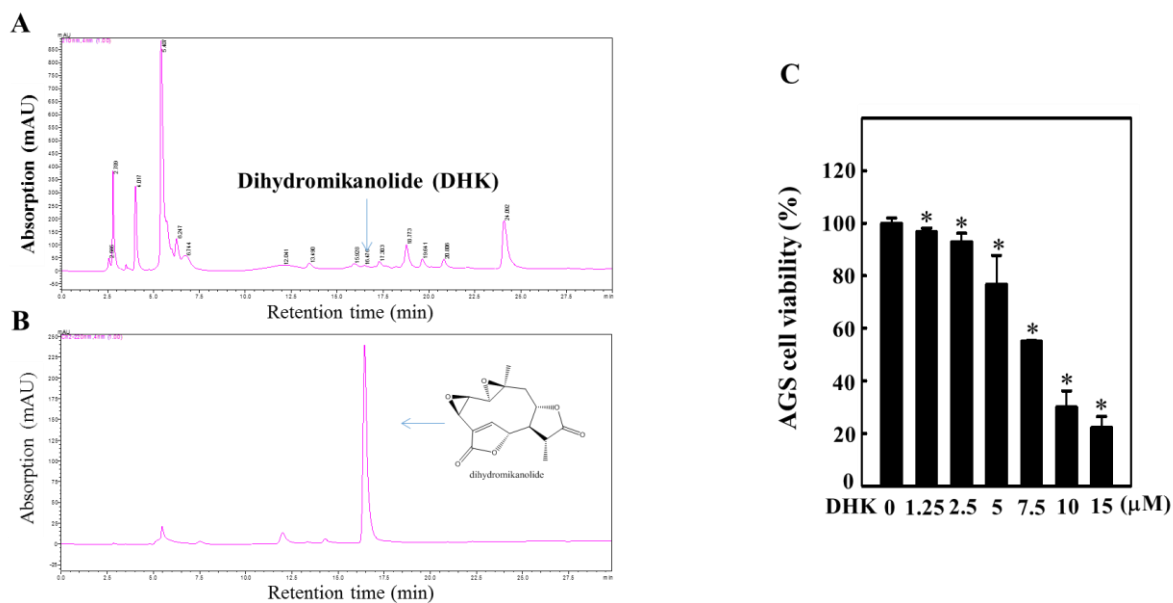


Fig 2. HPLC profiling of MML. The HPLC profile of MML. **(A)** The chemical profile of MML was performed using a RP-18 column and detected at UV 220 nm. **(B)** HPLC chromatograms of the active compound (dihydromilanolide, $t_R=16.435$ min). **(C)** The cytotoxicity of dihydromilanolide (DHK) on AGS cells by MTT assay.

Table 2. DHK 對各種癌細胞(胃癌/卵巢癌/乳癌/血癌等)的抗癌活性

Table 2. DHK inhibits cell viability of cancer cells

Cell lines	Type	IC ₅₀ (μM)
AGS	Gastric cancer cells	9.2
SKOV-3	Ovarian carcinoma cells	17.4
MDA-MB-231	Breast cancer cells	21.5
MCF-7	Breast cancer cells	31.7
K562	Leukemia cells	35.6

IC₅₀ values was analyzed by the MTT assay for 24 h.

Fig 3. DHK 與抗癌藥物毒殺胃癌細胞毒殺具協同作用:經由活性氧化物 ROS 毒殺癌細胞

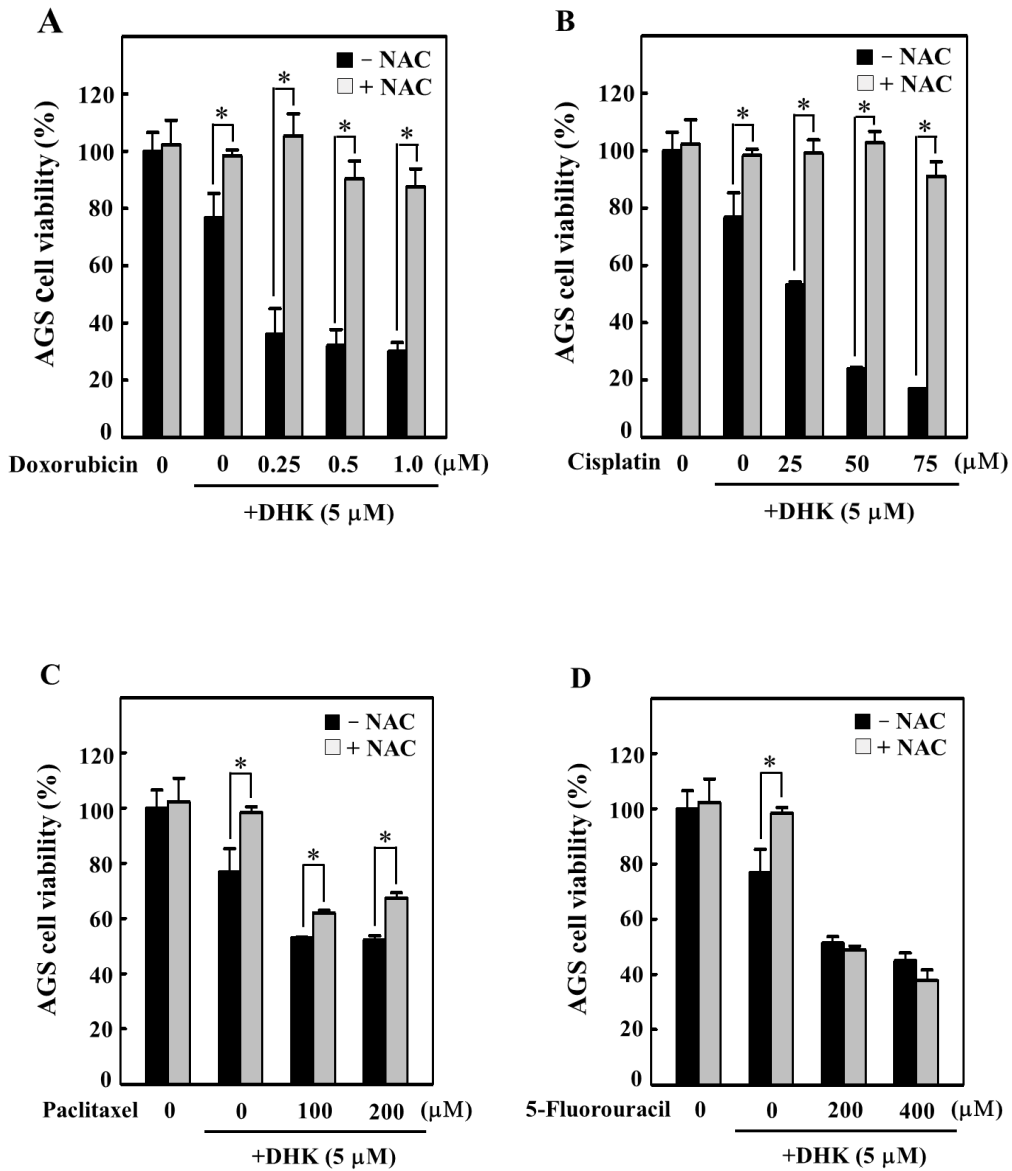


Table 3. DHK 與抗癌藥物 Doxorubicin 對胃癌細胞具協同作用

Table 3. The synergism effects of DHK and Doxorubicin on AGS cells

Treatment	(μ M)	Cell number (%)	Predicted value*	Combination index (CI)**
DHK	1.25	96.7 \pm 1.5	—	—
	2.5	93.0 \pm 3.1	—	—
	5	76.8 \pm 8.4	—	—
Doxorubicin	0.25	88.1 \pm 4.6	—	—
	0.5	82.6 \pm 7.2	—	—
	1.0	73.1 \pm 9.3	—	—
DHK+ Doxorubicin	1.25 + 0.25	89.8 \pm 2.4	85.2	1.626
	1.25 + 0.5	80.5 \pm 4.4	79.9	1.252
	1.25 + 1.0	69.8 \pm 6.5	70.6	1.134
DHK+ Doxorubicin	2.5 + 0.25	72.5 \pm 3.8	82.0	0.745
	2.5 + 0.5	64.4 \pm 11.1	76.9	0.704
	2.5 + 1.0	61.7 \pm 3.8	68.0	0.952
DHK+ Doxorubicin	5 + 0.25	36.0 \pm 9.0	67.7	0.439
	5 + 0.5	32.1 \pm 5.6	63.5	0.427
	5 + 1.0	30.1 \pm 3.1	56.1	0.461

*Predicted value : (%A \times %B)/100.

**Combination index according to Chou and Talalay [1], Values < 1 indicates synergism. All SD were within 5%.

Table 4. DHK 與抗癌藥物 Cisplatin 對胃癌細胞具協同作用

Table 4. The synergism effects of DHK and Cisplatin on AGS cells

Treatment	(μ M)	Cell number (%)	Predicted value*	Combination index (CI)**
DHK	1.25	96.7 \pm 1.5	—	—
	2.5	93.0 \pm 3.1	—	—
	5	76.8 \pm 8.4	—	—
Cisplatin	25	88.8 \pm 0.8	—	—
	50	75.3 \pm 1.5	—	—
	75	59.1 \pm 0.2	—	—
DHK+ Cisplatin	1.25 + 25	97.0 \pm 1.5	85.9	2.874
	1.25 + 50	73.2 \pm 0.6	72.8	1.291
	1.25 + 75	58.9 \pm 0.2	57.1	1.292
DHK+ Cisplatin	2.5 + 25	82.3 \pm 0.7	82.6	1.334
	2.5 + 50	53.9 \pm 0.4	70.0	0.971
	2.5 + 75	39.4 \pm 2.0	55.0	0.957
DHK+ Cisplatin	5 + 25	53.1 \pm 1.1	68.2	0.916
	5 + 50	23.9 \pm 0.5	57.8	0.626
	5 + 75	16.9 \pm 0.1	45.4	0.629

*Predicted value : (%A \times %B)/100.

**Combination index according to Chou and Talalay [1], Values < 1 indicates synergism. All SD were within 5%.

Table 5. DHK 與抗癌藥物 Paclitaxel 對胃癌細胞具協同作用

Table 5. The synergism effects of DHK and Paclitaxel on AGS cells

Treatment	(μ M)/ (nM)	Cell number (%)	Predicted value*	Combination index (CI)**
DHK	1.25	96.7 \pm 1.5	—	—
	2.5	93.0 \pm 3.1	—	—
	5	76.8 \pm 8.4	—	—
Paclitaxel	100	75.1 \pm 0.8	—	—
	200	71.9 \pm 0.6	—	—
	400	68.9 \pm 2.3	—	—
DHK+ Paclitaxel	1.25 + 100	75.1 \pm 0.4	72.6	1.230
	1.25 + 200	78.0 \pm 0.6	69.5	4.351
DHK+ Paclitaxel	2.5 + 100	67.9 \pm 0.8	69.8	0.629
	2.5 + 200	63.1 \pm 1.5	66.9	0.530
DHK+ Paclitaxel	5 + 100	53.0 \pm 0.2	57.7	0.596
	5 + 200	52.3 \pm 1.4	55.2	0.593

*Predicted value : (%A \times %B)/100.

**Combination index according to Chou and Talalay [1], Values < 1 indicates synergism. All SD were within 5%.

Table 6. DHK 與抗癌藥物 5-Fluorouracil 對胃癌細胞不具協同作用

Table 6. The synergism effects of DHK and 5-Fluorouracil on AGS cells

Treatment	(μ M)	Cell number (%)	Predicted value*	Combination index (CI)**
DHK	1.25	96.7 \pm 1.5	—	—
	2.5	93.0 \pm 3.1	—	—
	5	76.8 \pm 8.4	—	—
5-Fluorouracil	200	59.1 \pm 0.1	—	—
	400	46.7 \pm 1.0	—	—
	600	42.6 \pm 0.8	—	—
DHK+ 5-Fluorouracil	1.25 + 200	59.1 \pm 1.0	57.2	1.153
	1.25 + 400	50.4 \pm 0.8	45.2	1.327
DHK+ 5-Fluorouracil	2.5 + 200	59.3 \pm 0.3	55.0	1.333
	2.5 + 400	48.5 \pm 0.8	43.4	2.244
DHK+ 5-Fluorouracil	5 + 200	51.3 \pm 2.4	45.4	1.188
	5 + 400	45.0 \pm 2.7	35.9	1.360

*Predicted value : (%A \times %B)/100.

**Combination index according to Chou and Talalay [1], Values < 1 indicates synergism. All SD were within 5%.

Fig 4. DHK 誘導胃癌細胞凋亡及相關蛋白質分析(Caspase-3/PARP/Bax/Bcl-2)

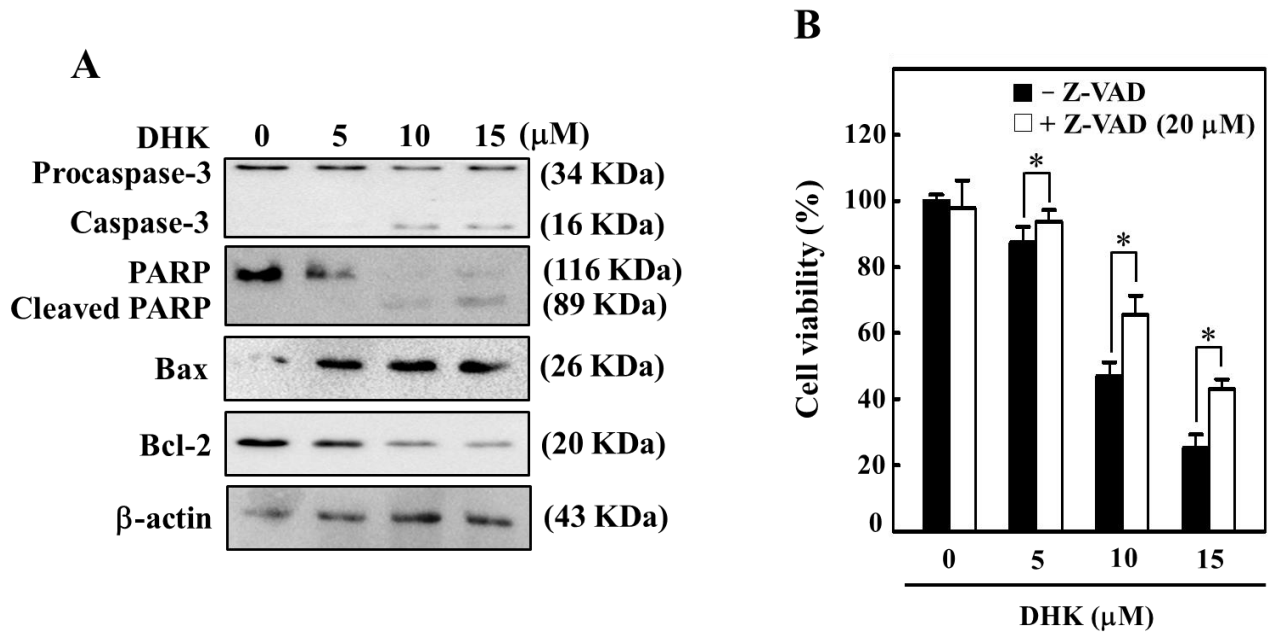
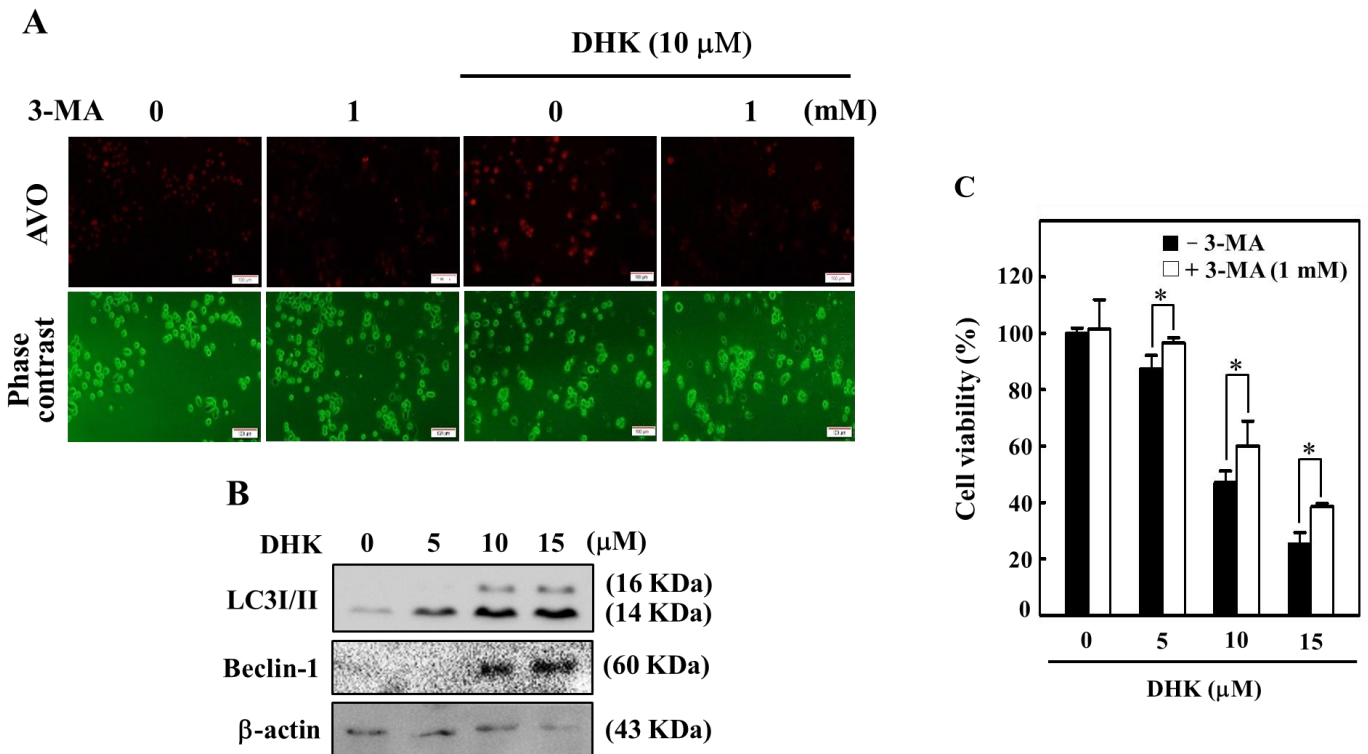


Fig 5. DHK 誘導胃癌細胞自噬及相關蛋白質分析(AVO assay/LC-3I/II/Beclin-1)



(二)、討論

癌症連續多年蟬聯國人十大死因榜首，是現代人健康的最大威脅。許多專家學者紛紛於天然植物中尋找具有潛力的抗癌物質。我們研究發現，加入不同濃度(0-300 $\mu\text{g/mL}$)加入小花蔓澤蘭葉(MML)及根莖(MMS)萃取物後，發現胃癌細胞數目明顯下降 (Fig 1A及1B)，且細胞存活率隨著劑量增加有明顯下降趨勢；利用倒立式相位差顯微鏡(phase microscope)觀察細胞形態，發現胃癌細胞形態不完整與細胞膜皺縮的現象(Fig 1C)；且小花蔓澤蘭葉萃取物(MML)的抗胃癌活性大於小花蔓澤蘭根莖(MMS)萃取物。於是，我們利用HPLC分析及分離小花蔓澤蘭葉萃取物(MML)，鑑定出抗癌的活性成分-Dihydromikanolide (DHK) (Fig 2A-B) (Cuenca et al., 1998)。此外，加入不同濃度的DHK (0-5 μM)作用胃癌(AGS)、卵巢癌(SKOV-3)、乳癌(MDA-MB-231)、乳癌(MCF-7)及血癌(K562)細胞，發現DHK的抗癌活性依序為抗胃癌>卵巢癌>乳癌>血癌(Table 2)。我們亦發現加入抗氧化劑NAC (*N*-acetylcysteine)可保護小花蔓澤蘭葉萃取物(MML)及活性成分DHK對胃癌細胞的毒殺，推測小花蔓澤蘭葉(MML)萃取物及活性成分DHK可能經由活性氧化物ROS來毒殺胃癌細胞。

化療藥物 Doxorubicin 由中草藥等天然物純化而來，作用機轉毒殺破壞癌細胞(凋亡)。常見或嚴重副作用引發次發性急性骨髓性白血病；因此，治療上希望能減少 Doxorubicin 劑量因而減少副作用產生。**化療藥物 Cisplatin** 是一種含鉑的抗癌藥物，屬於細胞周期非特異性藥物。副作用包括：腎臟毒性、噁心嘔吐、神經毒性、耳毒性、禿頭症、電解質紊亂。**化療藥物 Paclitaxel** (紫杉醇或稱太平洋紫杉醇)，其作用機轉為干擾細胞分裂時微管的正常功能，是一種用來治療多種癌症的化療藥物。副作用包含落髮、骨髓功能抑制、過敏反應、肌肉疼痛、腹瀉。嚴重的副作用包含心臟問題和肺炎。**化療藥物 5-Fluorouracil (5-FU)**目前衛生署核准使用治療胃癌主要的第一線化學藥物，副作用為腹瀉、噁心、嘔吐、食慾不振及骨髓抑制等作用。我們研究發現，同時加入 DHK (5 μM)與抗癌藥物 Doxorubicin (0, 0.25, 0.5 或 1.0 μM)、Cisplatin (0, 25, 50 或 75 μM)或 Paclitaxel (0, 100 或 200 μM)作用人類胃癌(AGS)細胞，發現 DHK 與 Doxorubicin、Cisplatin 或 Paclitaxel 具協同作用($\text{CI}<1$) (Fig 3A-C 及 Table 3-5)。此外，加入抗氧化劑 NAC 可保護 DHK 與三種抗癌藥物對胃癌細胞的毒殺，推測 DHK 與 Doxorubicin、Cisplatin 或 Paclitaxel 可能經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 3A-C)。我們亦發現同時加入 DHK (5 μM)與抗癌藥物 5-Fluorouracil (0, 200 或 400 μM)作用人類胃癌(AGS)細胞，DHK 與 5-Fluorouracil 不具協同作用($\text{CI}>1$) (Fig 3D 及 Table 6)。我們發現加入抗氧化劑 NAC 不可保護 DHK 與 5-Fluorouracil 對胃癌細胞的毒殺，推測 DHK 與 5-Fluorouracil 不是經由活性氧化物 ROS 來毒殺胃癌細胞(Fig 3D)。

利用細胞凋亡(Apoptosis)的特性可應用於癌症治療，使癌細胞自行凋亡而不破壞其他正常

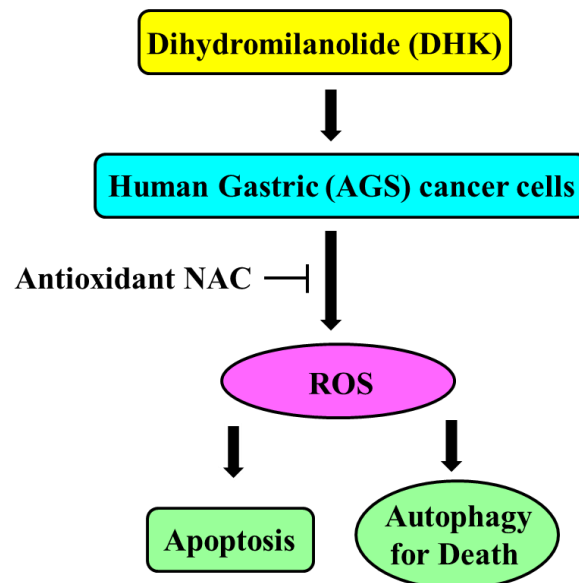
細胞。細胞凋亡為一種獨特的細胞死亡形式，其主要變化包括 DNA 斷裂(DNA fragmentation) 等特徵(陳義凱, 2017)。PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)是 DNA 修補酵素，其表現是藉由 DNA 斷裂而啟動；當細胞凋亡發生時，PARP(113 KDa)會被凋亡蛋白 Caspase-3 水解分裂成 89 KDa 蛋白質而失去原本的功能，是研究細胞凋亡最好的標的(Chang et al., 2017)。研究指出，若抗凋亡 Bcl-2 蛋白大量表現，則促使細胞存活；反之，若促凋亡 Bax 蛋白大量表現，則促使細胞走向凋亡。西方墨點法實驗發現，DHK 可使胃癌細胞凋亡 Caspase-3 蛋白表現量增加、PARP 蛋白裂解、促凋亡 Bax 蛋白增加及抑凋亡 Bcl-2 蛋白減少(Fig 4A)。加入細胞凋亡抑制劑 Z-VAD 可顯著保護 DHK 誘導胃癌細胞死亡(Fig 4B)，推論 DHK 可誘發胃癌細胞凋亡(Apoptosis)。

細胞自噬 (autophagy)可調控細胞生長或死亡，是體內衡定的重要機轉(王慈音, 2017)。細胞自噬內質網會製造出雙層的膜(主要為自噬蛋白LC3-I轉變為LC3-II)，將細胞內的胞器或物質包圍起形成自噬體(Autophagosome)，再和溶酶體結合形成自溶體(Autolysosome)，將胞器或物質分解產生。AO (Acridine orange)螢光染劑，可以滲入自溶體(Autolysosome)中產生紅色螢光，進而標記活細胞自噬體的形成(Chang et al., 2017)。抗凋亡Bcl-2除了會抑制細胞凋亡外，在細胞自噬中也扮演著抑制者的角色。促自噬蛋白Beclin-1和Bcl-2之間的結合作用，會透過干擾Beclin-1引起細胞自噬。AO染色法發現，DHK作用胃癌細胞，會產生酸性酸性囊泡(AVO, Acidic organelle vesicles) (Fig 5A);西方墨點法發現，自噬蛋白LC3-II增加、促自噬蛋白Beclin-1增加及抑自噬蛋白Bcl-2減少(Fig 5B)。推論 DHK可誘發胃癌細胞自噬。加入細胞自噬抑制劑 3-MA可顯著保護DHK誘導胃癌細胞死亡(Fig 5C)，推論DHK (Dihydromilanolide)會誘導胃癌細胞進行自噬性死亡。

五、結論與應用

外來種小花蔓澤蘭由於繁殖速度太快，使本土生態系受到嚴重破壞。我們研究發現，小花蔓澤蘭葉及其活性成分 Dihydromilanolide 會誘導人類胃癌(AGS)細胞毒性，且與抗癌藥物(Doxorubicin、Cisplatin 或 Paclitaxel)對胃癌細胞具協同作用。此外，我們亦發現 Dihydromilanolide (DHK)可誘發胃癌細胞凋亡(Apoptosis)及細胞自噬(Autophagy)死亡。然而，小花蔓澤蘭活性成分 Dihydromilanolide 抗胃癌功效，未來幾個月進行更多細胞凋亡與細胞自噬機制之探討，可能也須要動物/人體實驗及毒理試驗來加以佐證。總結，小花蔓澤蘭及活性成分 Dihydromilanolide (DHK)具有良好的抗胃癌功效且與抗癌藥物產生協同作用，可開發成預防及抗胃癌的藥品與保健食品。希望藉著小花蔓澤蘭摘取，恢復台灣原有生態環境的平衡。

機制圖：



六、參考文獻

- 一、廖天賜. 2003. 小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha*)在世界各地蔓延及危害. 小花蔓澤蘭危害與管理研討會專刊 147 - 153 頁.
- 二、Cuenca MR, Bardon A, Catalan CAN. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha*. *J Nat Prod*, 1988, 51, 625–626.
- 三、謝明學、周瑞玲. 2002. 中藥黃芩及其活性成分之抗發炎作用研究. *元培學報*. 19 期, 147 - 153 頁.
- 四、Chang et al., 2017. Inhibition of ROS production, autophagy or apoptosis signaling reversed anticancer properties of *Antrodia salmonea* in triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cells. *Food and Chemical Toxicology*. 103, p1-17.
- 五、陳義凱, 2017. 子寶草甲醇萃取物誘導人類血癌 HL-60 細胞進行細胞凋亡和細胞自噬. 中國醫藥大學碩士論文.
- 六、王慈音, 2017. 藥物 AN30 透過 ROS 引發口腔癌之細胞凋亡與細胞自噬機制之研究. 國立中山大學碩士論文.

【評語】 090007

本研究以 HPLC 分析及分離出小花蔓澤蘭葉萃取物的活性成分 Dihydromilanolide(DHK), 發現 DHK 會毒殺胞胃癌、卵巢癌、乳癌與血癌細胞, 其中以胃癌(AGS)細胞毒殺性最強。此外, 抗氧化劑 N-acetylcysteine 可減緩小花蔓澤蘭葉萃取物及 DHK 對胃癌細胞毒殺性, 推測是透過活性氧化物(ROS)來毒殺胃癌細胞。亦發現, DHK 可與抗癌藥物(Doxorubicin、Cisplatin 或 Paclitaxel)對胃癌細胞產生協同作用。DHK 作用胃癌細胞會誘導 Caspase-3 增加、PARP 蛋白裂解、促凋亡 Bax 增加及抑凋亡 Bcl-2 減少; 產生酸性囊泡(AVOs)、促自噬 LC3-II 及 Beclin-1 蛋白增加, 且加入自噬抑制劑 3-MA 可保護 DHK 誘導胃癌細胞死亡。推論 DHK 可誘發胃癌細胞凋亡(Apoptosis)及自噬性死亡(Autophagy)。總結, 小花蔓澤蘭與活性成分 Dihydromilanolide(DHK)具抗胃癌功效且與抗癌藥物產生協同作用。

以下建議：

1. 可試討論應該使用兩株的胃癌細胞來做實驗比較合適？
2. 促自噬 LC3-II 及 Beclin-1 蛋白增加, 加入自噬抑制劑 3-MA 兩種蛋白質的變化也是必須要測定。
3. DHK 可誘發胃癌細胞凋亡(Apoptosis)及自噬性死亡(Autophagy)的相關蛋白的變化可以再加強。