

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

第二名

040705

“癌”究—小花蔓澤蘭

學校名稱：臺中市私立曉明女子高級中學

作者：	指導老師：
高一 許芷瑄	謝麗惠
高一 謝佳融	鄭文杰

關鍵詞：小花蔓澤蘭、抗氧化、抗癌

摘 要

外來入侵種小花蔓澤蘭繁殖速度太快，使台灣本土生態系受到破壞。我們實驗發現，小花蔓澤蘭(葉和根莖)具有清除 DPPH 自由基能力及保護自由基誘發劑 AAPH 誘導紅血球溶血。小花蔓澤蘭葉和根莖總多酚含量可達 51.6 及 20.9 mg/g，推測其所含多酚化合物可能是抗氧化活性的來源。抗癌研究發現，小花蔓澤蘭葉和根莖會誘導人類急性骨髓血癌細胞(HL-60)細胞毒性，其 IC₅₀ (抑制 50%細胞存活率濃度)分別為 150 及 350 µg/mL；顯微鏡觀察下，血癌細胞有減少和皺縮現象。西方墨點法發現，小花蔓澤蘭葉和根莖可使血癌細胞 Caspase-3 蛋白增加、Bcl-2 蛋白減少、Bax 蛋白增加及 PARP 蛋白裂解，可能具誘發血癌細胞凋亡(Apoptosis)的能力。總結，小花蔓澤蘭具抗氧化及抗血癌功效，可開發成為預防自由基疾病及抗血癌的保健食品。

壹、研究動機

從高中的生物課本中我們學習到關於生物多樣性的概念，並聯想起國中的課本中所介紹的“入侵外來種”即是破壞生物多樣性的一大元凶。現今影響台灣山林生態的小花蔓澤蘭就是其一，此種植物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卻造成生態浩劫，如今的農政單位極力想減少其數量與限制其生長範圍。

小花蔓澤蘭的數目之所以能急劇上升，除了物種適應力強，繁殖快速，也因為其存在對我們的生活沒有密切實用性，換言之，我們不能夠藉由大量使用使其數量銳減。但是，若我們能從小花蔓澤蘭的優點出發，也就是取得容易、成本低廉，並針對其所具備的抗氧化、抑制癌細胞生長及誘發癌細胞死亡的能力及藥用性，希望能應用於預防自由基疾病及延長罹癌者的生命。我們希望藉此研究結果，鼓勵國人多利用小花蔓澤蘭並全株摘取，恢復台灣原有生態環境。

貳、研究目的

外來種小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha*)是我們政府刻意引進來的，原本要做水土保持之用，可是後來繁殖速度太快侵略本土植物，使得生態系遭受極大的破壞(廖天賜. 2003)，如今農政單位極力想要消滅它。偶然機會下，我們在中藥典籍上看到台灣本土的蔓澤蘭(*Mikania cordata*)擁有清熱、解毒及消腫止痛之作用。於是，我們思考著如何把外來種小花蔓澤蘭化為有用的東西，藉著抗氧化、抗癌功效及藥理療效的新發現，希望能大量摘取使用，慢慢恢復台灣原有生態環境的平衡。

一、研究背景

(一)、抗氧化功效

各種天然植物中(包括蔬菜、水果、藥草、茶甚至葉、根、莖、花、種子、樹皮等)或多或少存在抗氧化多酚化合物，這些植物多酚化合物具有清除自由基的生物活性。自由基會傷害人體細胞、組織及器官，導致許多疾病的發生(例如癌症、老化、動脈粥狀硬化、糖尿病、風濕性關節炎、中風及高血壓等)，可以說是萬病的根源 (陳惠英. 1998 & 詹皓等. 1990)。所以，植物多酚化合物的抗氧化能力是人類對抗疾病及保持健康的重要成分 (Hseu et al., 2008)。國一自然與生物科技課本中，提及小花蔓澤蘭屬於外來種會侵略本土植物，引起我們思考小花蔓澤蘭是否含有植物多酚化合物?是否具有良好的抗氧化功效(清除 DPPH 自由基及對抗自由基 AAPH 誘發紅血球溶血的能力)?

(二)、抗血癌功效

血癌(俗稱白血病)是一種骨髓惡性疾病，導致骨髓無法製造正常功能的血球；這些血球一直失控的生長，但不會變成分化成熟具功能的血球，所以血癌常表現出白血球過高的現象。成熟白血球劇減而易受感染、紅血球減少而貧血、血小板量不足而造成嚴重出血；患者常常會缺乏白血球、紅血球及血小板的功能而表現出易感染、敗血症、貧血、凝血不良等臨床症狀，更甚者使患者死亡 (Huang et al., 2012 & Hseu et al., 2004)。我們思考小花蔓澤蘭是否具有良好的抗血癌功效？我們將觀察小花蔓澤蘭對人類急性骨髓血癌細胞(HL-60, Human promyelocytic leukemia cells)形態變化及細胞存活率的影響？細胞凋亡(Apoptosis)為一種獨特的細胞死亡形式，為學者研究和治療應用熱門方向，利用凋亡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。當細胞凋亡時，凋亡訊息將直接傳入細胞內活化下

游之Procaspase-3活化成Caspase-3及Pro-PARP斷裂成PARP，使細胞走向凋亡。Bcl-2家族分子(含Bcl-2及Bax)為分子量26 KDa的蛋白質家族，細胞內抗細胞凋亡Bcl-2與促細胞凋亡Bax的相對量的多寡，為決定細胞凋亡的重要因子(Huang et al., 2012 & Hseu et al., 2004)。所以，我們將深入分析細胞凋亡蛋白質(Caspase-3、Bcl-2、Bax及 PARP)的表現量？

二、研究目標

- (一)、探討小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物能否清除 DPPH 自由基
- (二)、探討小花蔓澤蘭葉和根莖是否具有抗自由基 AAPH 誘發紅血球溶血的能力
- (三)、測定小花蔓澤蘭葉和根莖的總多酚類含量
- (四)、研究小花澤蘭葉和根莖對血癌細胞形態之影響
- (五)、測定小花蔓澤蘭葉和根莖對血癌細胞存活率
- (六)、測定小花蔓澤蘭葉和根莖誘導血癌細胞凋亡的相關蛋白質(Caspase-3、Bcl-2、Bax 及 PARP)

參、研究設備與材料

一、小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha*)



學名：*Mikania micrantha* H. B. K. (品種由中興大學森林系教授鑑定)

科名：菊科(*Asteraceae*) 蔓澤蘭屬、假澤蘭屬(*Mikania*)

原產地：中南美洲

來源：臺中市太平區聖愛山莊

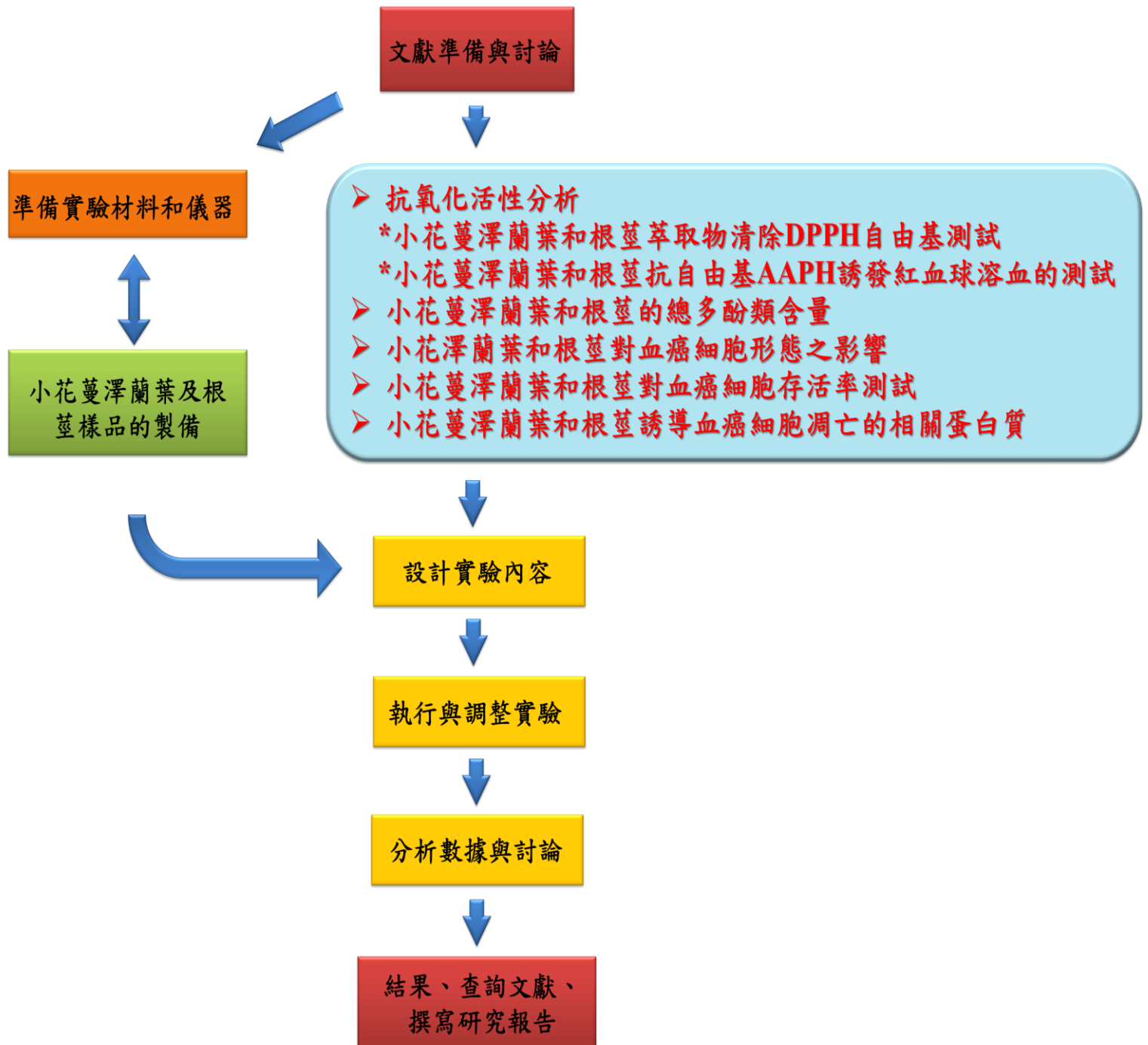
二、研究場地：中國醫藥大學立夫教學大樓 16 樓共同實驗室。

三、化學材料：(見附錄一)

四、實驗儀器：(見附錄一)

五、實驗器材：(見附錄一)

肆、研究過程或方法

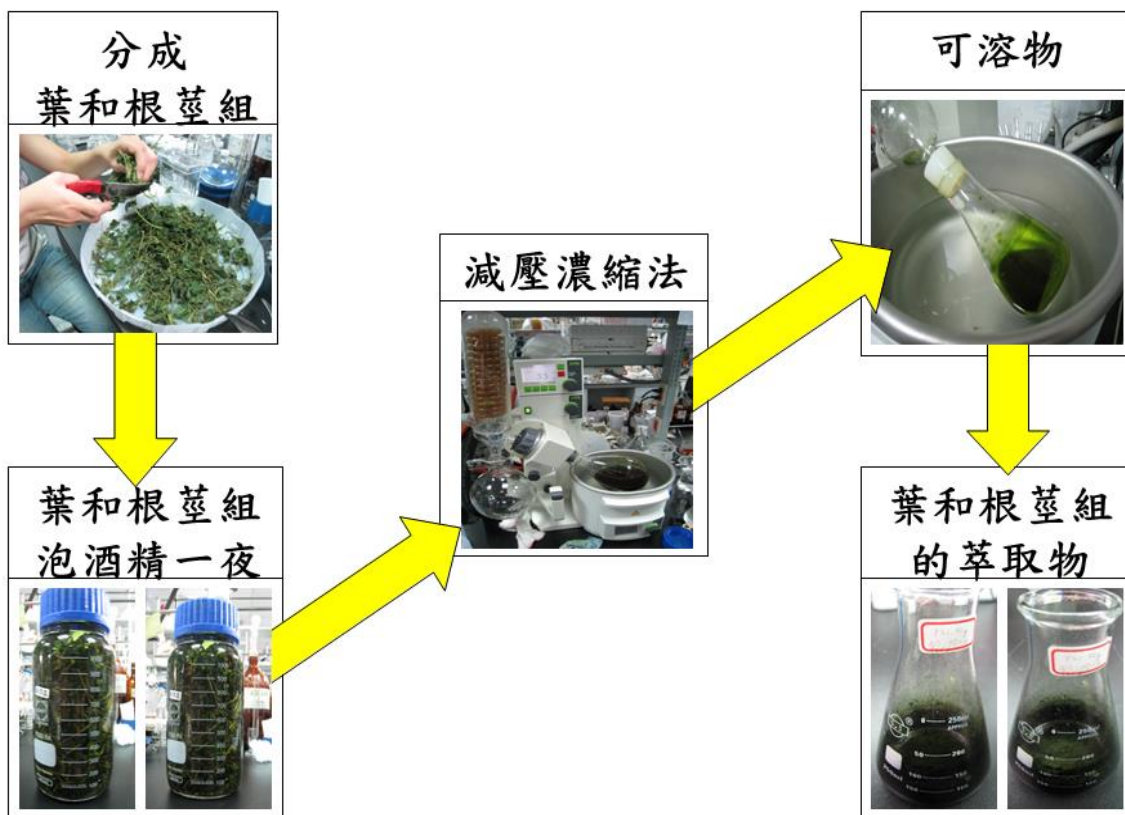


一、小花蔓澤蘭葉及根莖樣品的前置作業

- (一)、採集小花蔓澤蘭
- (二)、種源鑑定
- (三)、初步處理: 自來水清洗乾淨，放在室溫下 2~3 天陰乾。將小花蔓澤蘭分成葉組和根莖組(切小段)。

二、小花蔓澤蘭葉及根莖樣品的製備

- (一)、再將小花蔓澤蘭浸泡在酒精(95%)一夜，目的是溶解出成分汁液。
- (二)、過濾後去除不溶雜質，留下溶在酒精的小花蔓澤蘭萃取物。
- (三)、將酒精萃取物放入減壓濃縮器內(冷凝法)使酒精蒸發，而後進行真空冷凍乾燥留下小花蔓澤蘭乾燥綠色粉狀萃取物(葉組和根莖組)。
- (四)、得粉末狀小花蔓澤蘭萃取物(保存於 0°C 以下)。
- (五)、利用甲醇將小花蔓澤蘭萃取物粉末溶解調配成所需濃度，等待實驗進行。



三、抗氧化活性分析

(一)、清除 DPPH 自由基之功效實驗

(1)實驗原理：DPPH (α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)是一個很穩定的自由基，通常用來測定抗氧化物提供氫的能力。DPPH甲醇溶液在波長517 nm下會有強烈的吸收光，當DPPH被抗氧化物還原時，吸收的光會消失或降低。藉由517 nm吸光值可判定小花蔓澤蘭萃取物是否具有清除自由基的能力，吸光值愈低表示抗氧化物樣品的供氫能力愈強，清除DPPH自由基的能力愈強(Hseu et al., 2008)。反應如下：



(紫色)

(退色)

(2)實驗步驟及測定：取小花蔓澤蘭葉萃取物(60~240 $\mu\text{g/mL}$)及小花蔓澤蘭根莖萃取物(300~1200 $\mu\text{g/mL}$)，分別加入1 mL新鮮配製0.08 mM DPPH之甲醇溶液，均勻混合靜置30分鐘後，以分光光度計檢測517 nm的吸光值。正對照組是取10 μL 維生素 E (最終濃度10 $\mu\text{g/mL}$)。

(二)、紅血球抗氧化溶血之功效實驗

(1)實驗原理：我們選用人類紅血球作為探討小花蔓澤蘭萃取物的抗氧化作用。人類紅血球量多易取得，紅血球沒有細胞核及胞器干擾，是被研究及了解最多的生物細胞。而且，紅血球容易受到自由基(AAPH, [2,2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride])的攻擊造成溶血，故非常適合作為抗氧化研究的材料(Hseu et al., 2008)。

(2)紅血球製備：(1)血液是從健康的受試者取得，經同意後使用針筒作靜脈採血(加入抗凝血劑，檸檬酸鹽)。(2)將取得血液離心(3000g x 10分鐘)將紅血球沈澱，吸去上清液留下紅血球。(3)再加入磷酸緩衝液重複步驟(2)4次，接著加入相同緩衝液並分製成實驗所使用的紅血球濃度(10%)。

(3)實驗步驟：

(1)對照組：1紅血球溶於等張溶液(磷酸緩衝液)，使呈現0%不溶血狀態。

(2)實驗組一：將紅血球溶液加入自由基誘發劑 AAPH 溶液 (25 mM 溶於磷酸緩衝液)，培養期間要輕緩的均勻搖晃反應混合液。

(3)實驗組二：將紅血球溶液分別與 5-15 μL 小花蔓澤蘭葉部萃取物(15~45 $\mu\text{g/mL}$)，於 37°C 溫度下預培養 30 分鐘。接著加入 25 mM AAPH 溶液。

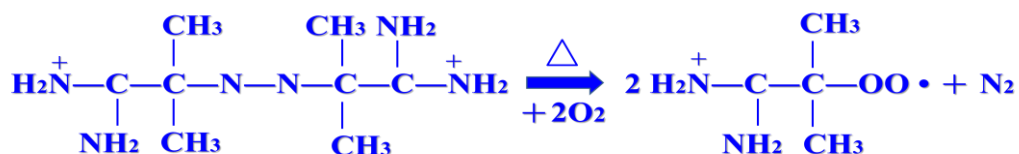
(4)實驗組三：將紅血球溶液分別與 10-30 μL 小花蔓澤蘭莖部萃取物(30~90 $\mu\text{g/mL}$)，於 37°C 溫度下預培養 30 分鐘。接著加入 25 mM AAPH 溶液。

(5)正向實驗組：將紅血球溶液分別與 1-10 μL 維生素 E ($1\sim 10\ \mu\text{g/mL}$)，於 37°C 溫度下預培養 30 分鐘。接著加入 25 mM AAPH 溶液。

(6)溶血百分比：每小時取 200 μL 取混合液取離心($3000\ \text{g} \times 2$ 分鐘)，得上清液測波長 540 nm 吸光值(測量紅血球溶血所釋放的血紅素)。將等量紅血(10%)溶於低張溶液(5 mM 磷酸緩衝液, $\text{pH}=7.4$)，使呈現 100%溶血狀態作為測定參考值(100%)。

溶血百分比計算：(上清液的吸光值/測定參考值) $\times 100$

(7) AAPH：為一種水溶性的含氮化合物，在生理溫度下極易自動分解而產生自由基，常被用來當作攻擊紅血球的自由基誘發劑。



四、小花蔓澤蘭葉和根莖總多酚類含量的測定

(一)、實驗原理：利用抗氧化物將phosphomolybdic-phosphotungstate 還原原理，使溶液變為藍色在750 nm波長而具有吸光值(Folin-Ciocalteu比色原理) (Hseu et al., 2008)。

(二)、實驗步驟：

(1)取10 mg小花蔓澤蘭萃取物葉組和根莖組，以1毫升之甲醇/水(60:40比例加入0.3%氯化氫)加以溶解。

(2)再從溶液中取50 μL 小花蔓澤蘭萃取物(葉組或根莖組)，加入1 mL之2%碳酸氫鈉(NaHCO_3)，2分鐘後加入50 μL Folin-Ciocalteu比色法試劑(50%)，混合均勻後反應30分鐘並於750 nm下測吸光值。

(3)以沒食子酸(Gallic acid, $0\sim 0.5\ \text{mg/mL}$)溶於1mL之甲醇/水(60:40比例加入0.3%氯化氫)，再依前述測定方法做出沒食子酸標準曲線，換算小花蔓澤蘭萃取物(葉或根莖組)之總多酚類含量。

五、人類急性骨髓血癌 (Human premyelocytic leukemia HL-60 cells)細胞培養

(一)、試劑：取RPMI-1640 (9.5g)粉狀培養基溶於去離子純水(900 μL)，加入2g NaHCO_3 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，通過孔徑0.45 μm 的濾膜濾除雜質，室溫保存。

(二)、解凍細胞：自液態氮桶將血癌(HL-60)細胞取出後，立即移置於 37°C 水浴槽中，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，經離心去除上清液，再加入培養液將細胞均勻打散後，移到培養瓶(T75)，於含5% CO₂的37 °C培養箱中生長，並且需定期更換培養液。

(三)、培養條件：將人類血癌細胞株(HL-60)培養於含胎牛血清10% (Fetal bovine serum) 的 RPMI-1640 培養液(1% penicillin-streptomycin)，然後將血癌細胞置於5%CO₂培養箱中培養(37 °C)。

(四)、繼代培養：將血癌細胞密度維持在 $2\sim5\times10^5$ cells/mL。繼代培養時，將含血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，再將血癌細胞打散加入新鮮培養液培養。

六、血癌(HL-60)細胞的毒殺試驗

(一)、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 (Huang et al., 2012)。

(二)、血癌細胞存活率測定：將血癌(HL-60)細胞培養於12 well細胞培養皿中(約 2×10^5 cells/mL 共1mL)，再加入小花蔓澤蘭葉萃取物(0~400 µg/mL)及根莖萃取物(0~400 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血癌細胞，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。

七、西方墨點(western blotting)分析法

(一)、原理：西方墨點分析法是採用的是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SDS-PAGE將不同分子量的蛋白質分開，再利用一級抗體(Primary antibody)當作探針，二級抗體(Secondary antibody)為顯色用標記。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充分反應後，再加入二級抗體與一級抗體專一性結合，最後冷光影像儀器來檢測電泳分離的蛋白表現量的增加或減少。

(二)、試劑與藥品：(見附錄二)

(三)、小花蔓澤蘭葉及根莖萃取物處理的血癌細胞樣品：將血癌(HL-60)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萃取物及根莖萃取物(0~400 $\mu\text{g/mL}$)，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，即得小花蔓澤蘭葉萃取物處理 24 小時後的血癌細胞樣品。

(四)、細胞蛋白質萃取：樣品以 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。

(五)、蛋白質定量分析：配製不同濃度之胎牛血清白蛋白(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 μL 之二次水加入不同濃度牛血清白蛋白標準品 (0~10 $\mu\text{g/mL}$)及蛋白質溶液，加入 200 μL Protein assay dye，充分混合後，靜置 5 分鐘後測波長 595 nm 之吸光值，並利用牛血清白蛋白標準品所求出的標準曲線計算出欲測定之蛋白質溶液之濃度。已定量蛋白濃度保存在-80°C 冰箱備用。

(六)、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 1X running buffer。取 50 ~80 μg 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。

(七)、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 20 V 的電流轉印 15 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。

(八)、免疫抗體點墨 (Immunoblotting): 將轉印蛋白質 PVDF 用 Blocking solution 振盪 30 分鐘，以 5% 胎牛血清白蛋白作為溶劑，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 2 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 清洗兩次(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 SuperSignal Substrate I 及 II 已 1:1 混合加入 PVDF，再依不同抗體的螢光強弱決定曝光時間。利用此法檢視細胞內各個蛋白的變化。

伍、研究結果

一、小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物清除DPPH自由基之能力

本實驗使用 DPPH 自由基來評估小花蔓澤蘭葉與根莖，提供氫的能力及測定清除 DPPH 自由基之功效。實驗發現，小花蔓澤蘭葉萃取物(60~240 µg/mL) (圖 1)與根莖萃取物(300~1200 µg/mL) (圖 2)都具有清除 DPPH 自由基的能力，結果顯示小花蔓澤蘭抗氧化能力可能與其提供氫原子的能力有關。小花蔓澤蘭葉比根莖具有較高的清除 DPPH 自由基的能力。本實驗使用抗氧化維生素 E (偏水溶性 Trolox, 10 µg/mL)作為正向的控制組(圖 1 及 2)。結果顯示，240 µg/mL 的小花蔓澤蘭葉萃取物、1200 µg/mL 的根莖萃取物以及 10 µg/mL 抗氧化維生素 E，具有相同清除 DPPH 自由基的能力(大約 80%) (圖 1 及 2 結果以 Mean ± SD 表示, n=3; $p < 0.05$)。

二、小花蔓澤蘭葉和根莖對 AAPH 誘發紅血球溶血反應之保護作用

本實驗使用人類紅血球評估小花蔓澤蘭葉與根莖，保護自由基誘發劑 AAPH 誘導紅血球溶血的功效。我們實驗發現，加入小花蔓澤蘭葉萃取物(15、30 和 45 µg/mL)，幾乎皆可以完全抑制(100%) AAPH 誘發的紅血球溶血作用 (圖 3)。加入小花蔓澤蘭根莖萃取物(30、60 和 90 µg/mL)，則根莖萃取物 90 µg/mL 濃度才可以達到完全抑制(100%)紅血球溶血作用(圖 4)。本實驗亦使用維生素 E (1、5 和 10 µg/mL)作為正向的控制組，只有維生素 E (偏水溶性 Trolox) 達到 10 µg/mL 濃度，才可以接近完全抑制(約 100%)紅血球溶血作用(圖 5)。比較保護紅血球溶血的抗氧化活性發現，維生素 E > 小花蔓澤蘭葉萃取物>小花蔓澤蘭根莖萃取物。結果推測，小花蔓澤蘭葉萃取物對 AAPH 誘導紅血球溶血，具有非常強的抑制作用及抗氧化的功效，與維生素 E 接近(圖 3-5 結果以 Mean ± SD 表示, n=3; $p < 0.05$)。

三、小花蔓澤蘭葉和根莖的總多酚類含量

多酚化合物具有清除自由基的能力，能有效的抑制過氧化作用。因此我們測量小花蔓澤蘭的葉和根莖中總多酚類的含量。結果可知，小花蔓澤蘭的葉和根莖的總多酚類含量可達 51.6 及 20.9 毫克/克的量(指每克乾燥粉末)；而且，小花蔓澤蘭葉的總多酚含量比根莖總多酚類含量高(圖 6 結果以 Mean ± SD 表示, n=3; $p < 0.05$)。我們推測小花蔓澤蘭葉萃取物具有較高清除 DPPH 自由基的能力及保護紅血球溶血的作用，可能與其含有高量的抗氧化總多酚類的緣故。

四、小花蔓澤蘭葉和根莖對人類急性骨髓血癌細胞(HL-60, Human premyelocytic leukemia cells)細胞形態之影響

加入不同濃度的小花蔓澤蘭葉萃取物及根莖萃取物，作用人類急性骨髓血癌(HL-60)細胞(2×10^5 cells/mL)於 24 小時時間點觀察血癌細胞生長情形，利用倒立式相位差顯微鏡(phase microscope)觀察細胞形態。相對於未經小花蔓澤蘭萃取物處理之控制組，加入小花蔓澤蘭葉萃取物(0~400 μ g/mL)處理 24 小時後，發現細胞數目明顯下降，且有細胞形態不完整、細胞膜皺縮與空泡化的現象(圖 7)。相同地，血癌(HL-60)細胞加入根莖萃取物(0~400 μ g/mL) 處理 24 小時後，發現細胞數目明顯下降，且有細胞形態不完整、細胞膜皺縮與空泡化的現象(圖 8)。

五、小花蔓澤蘭葉和根莖對血癌細胞存活率(Cell Viability)測定

加入不同濃度的小花蔓澤蘭葉萃取物及根莖萃取物，作用血癌(HL-60)細胞(2×10^5 cells/mL) 24 小時於顯微鏡下計數細胞數目。加入小花蔓澤蘭葉萃取物(0~400 μ g/mL)處理 24 小時後，發現細胞存活率隨著劑量增加有明顯下降的趨勢，而且血癌細胞的 IC_{50} (抑制 50%細胞存活率濃度) 為 150 μ g/mL (圖 9)。在高濃度小花蔓澤蘭葉萃取物(300 及 400 μ g/mL)作用下，血癌細胞存活率只剩下 20%。相同地，血癌細胞加入根莖萃取物(0~400 μ g/mL) 處理 24 小時後，發現細胞存活率隨著劑量增加有明顯下降的趨勢，而且血癌細胞的 IC_{50} (抑制 50%細胞存活率濃度)為 350 μ g/mL (圖 10)。比較抗血癌功效發現，小花蔓澤蘭葉萃取物>小花蔓澤蘭根莖萃取物(圖 9 及 10 結果以 Mean $\pm$ SD 表示, n=3; $p < 0.05$)。

六、測定小花蔓澤蘭葉和根莖誘導血癌細胞凋亡的相關蛋白質(Caspase-3, Bax, Bcl-2, PARP)

加入不同濃度的小花蔓澤蘭葉萃取物及根莖萃取物，作用血癌(HL-60)細胞(2×10^6 cells/10 mL)，並利用西方墨點法偵測細胞凋亡的蛋白質。加入小花蔓澤蘭葉萃取物(0~400 μ g/mL)處理 24 小時後，發現 Procaspase-3/ProPARP 表現量減少而 Caspase-3/PARP 表現量增加(圖 11)。此外，我們亦發現抗細胞凋亡 Bcl-2 表現量減少而促細胞凋亡 Bax 表現量增加(圖 11)。加入小花蔓澤蘭根莖萃取物(0~400 μ g/mL)處理 24 小時後，發現 Procaspase-3/ProPARP 表現量減少而 Caspase-3/PARP 表現量增加(圖 12)。我們亦發現 Bcl-2 表現量減少而 Bax 表現量增加(圖 12)。總結，小花蔓澤蘭葉萃及根莖萃取物確實具有誘發血癌細胞凋亡能力。比較誘發血癌細胞凋亡功效發現，小花蔓澤蘭葉萃取物>小花蔓澤蘭根莖萃取物。

圖1小花蔓澤蘭葉萃取物清除DPPH自由基之能力

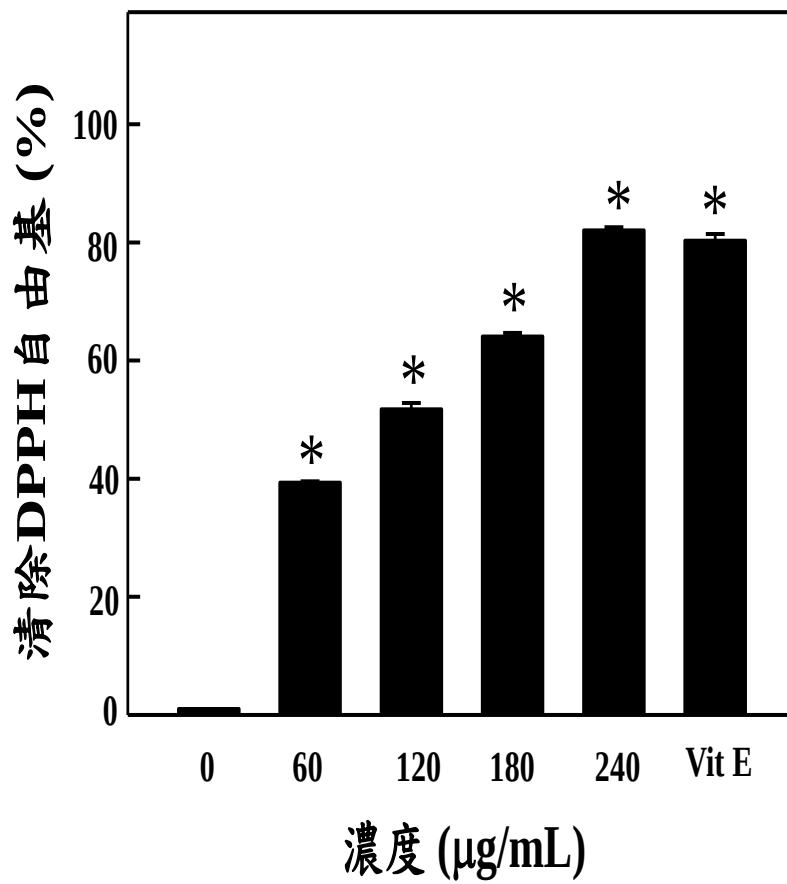


圖2小花蔓澤蘭根莖萃取物清除DPPH自由基之能力

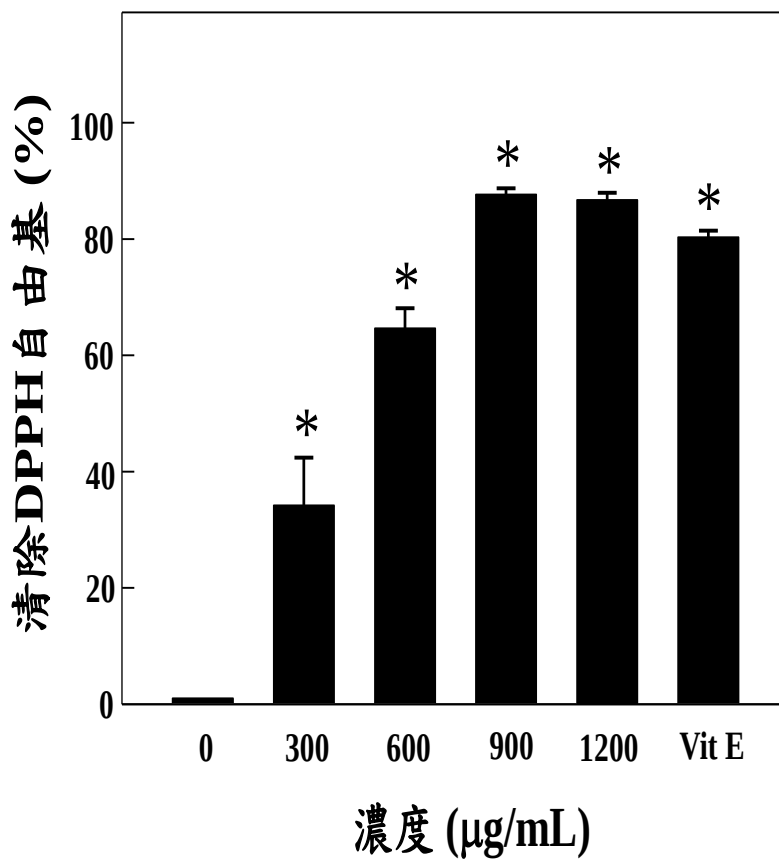


圖3小花蔓澤蘭葉萃取物保護紅血球溶血作用

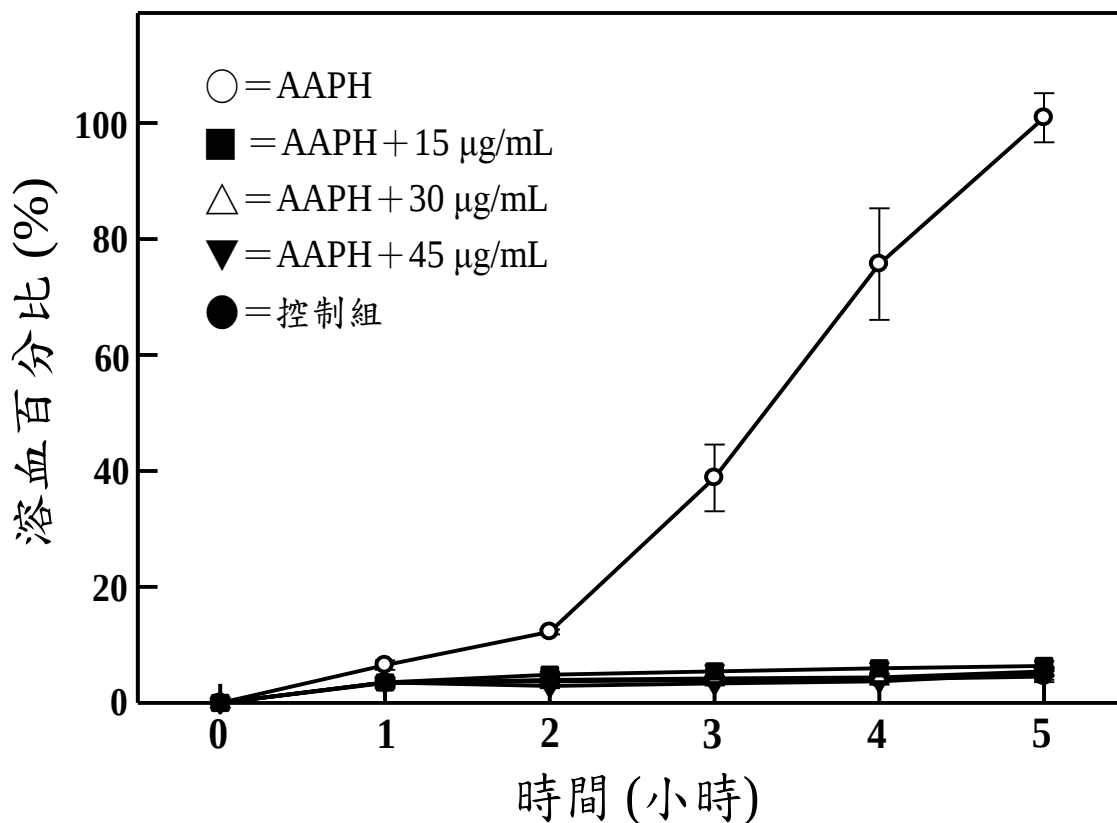


圖4小花蔓澤蘭根莖萃取物保護紅血球溶血作用

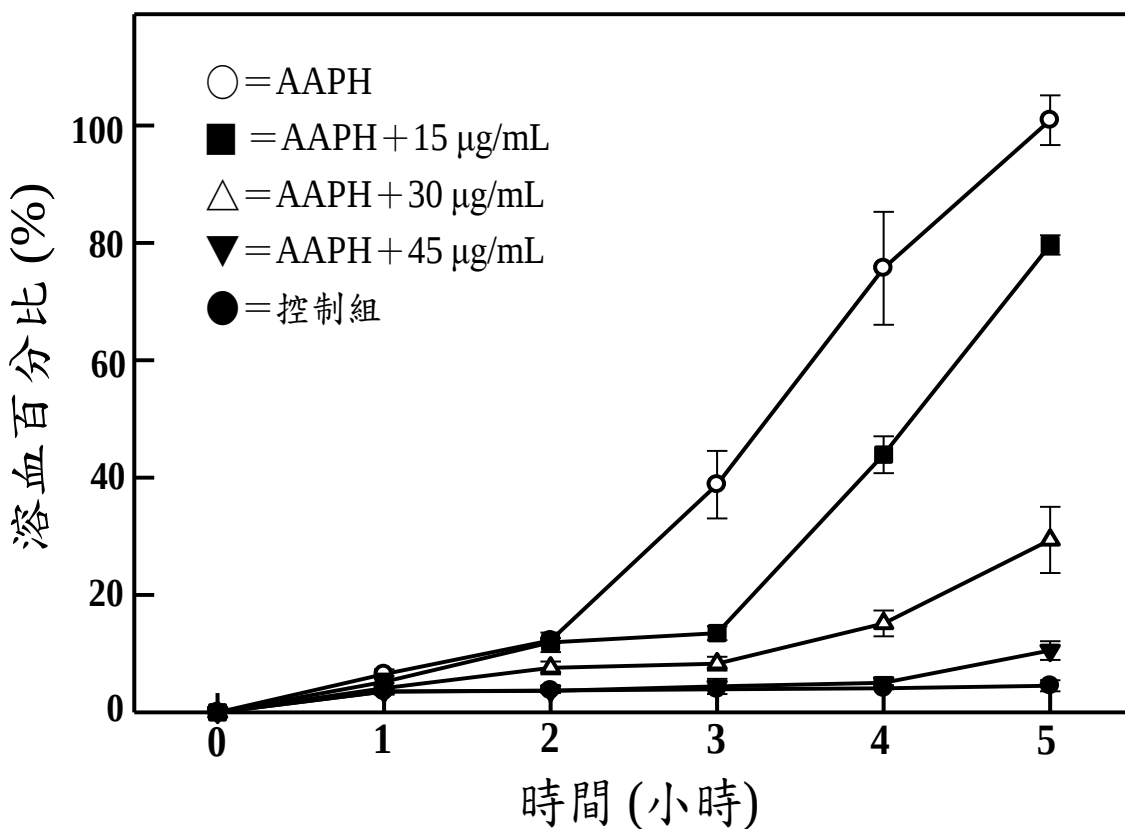


圖 5 維生素 E 保護紅血球溶血作用

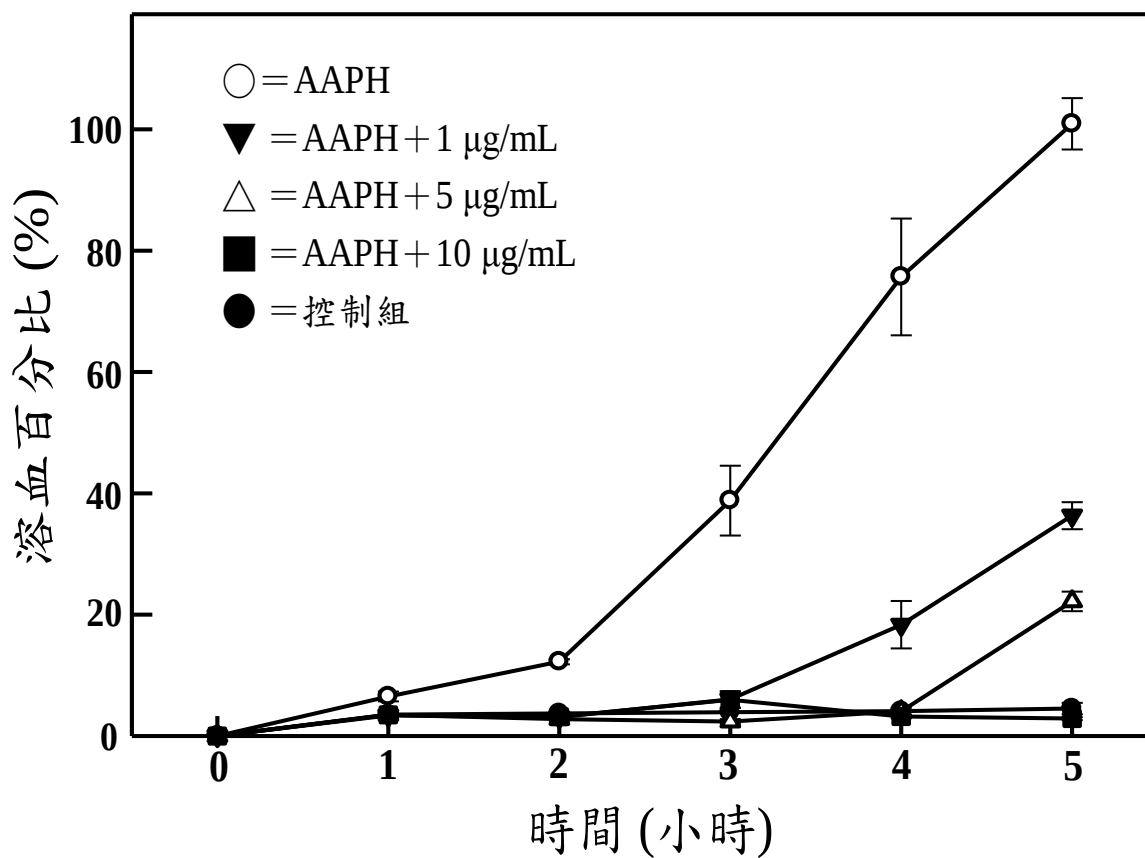


圖 6 小花蔓澤蘭葉與根莖萃取物總多酚類含量

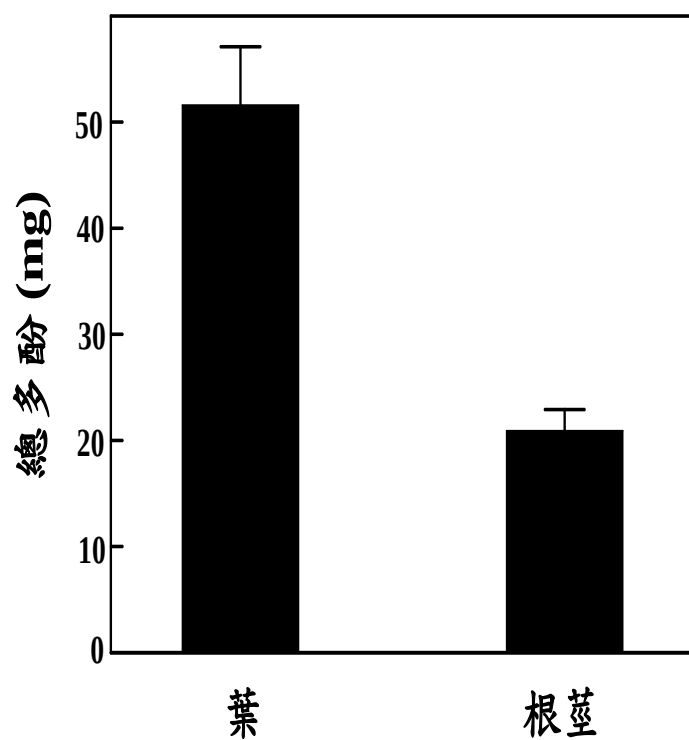
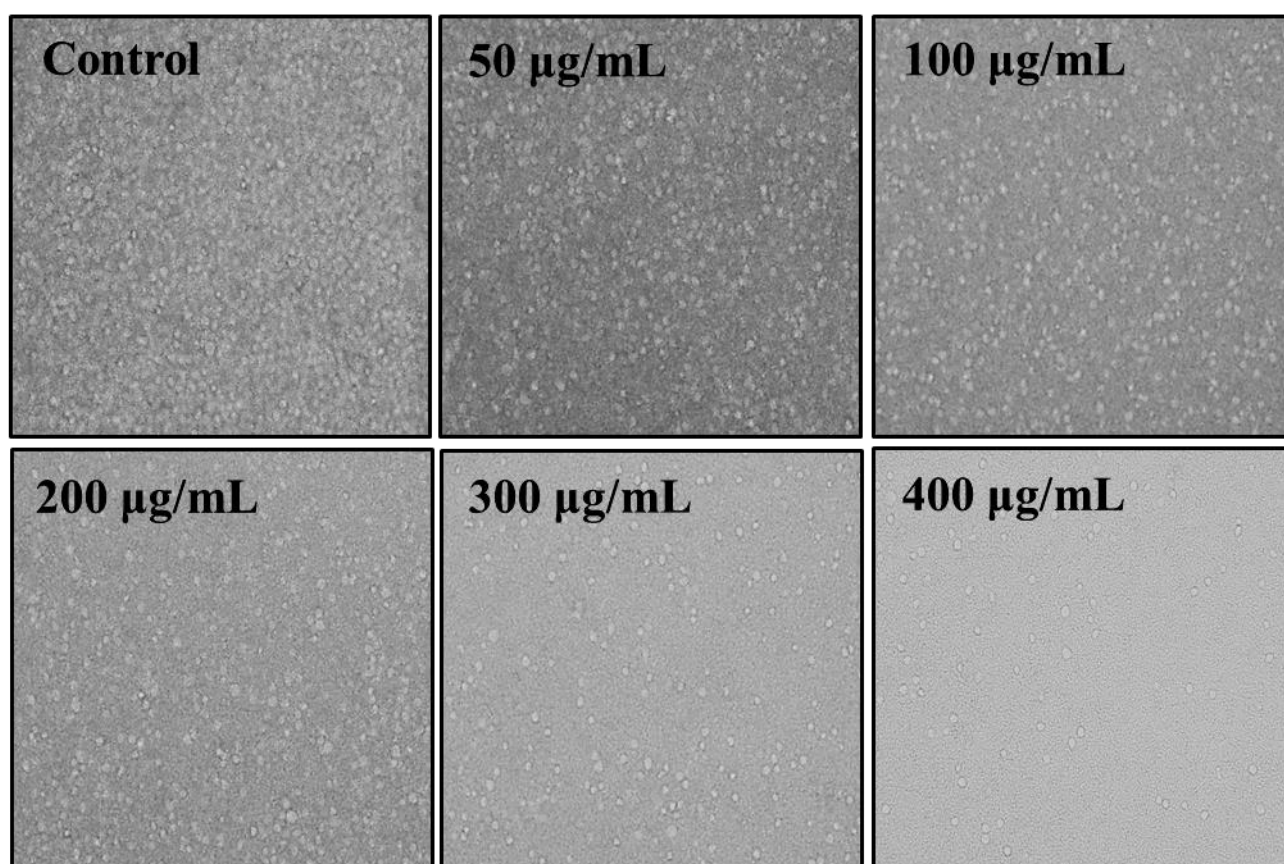
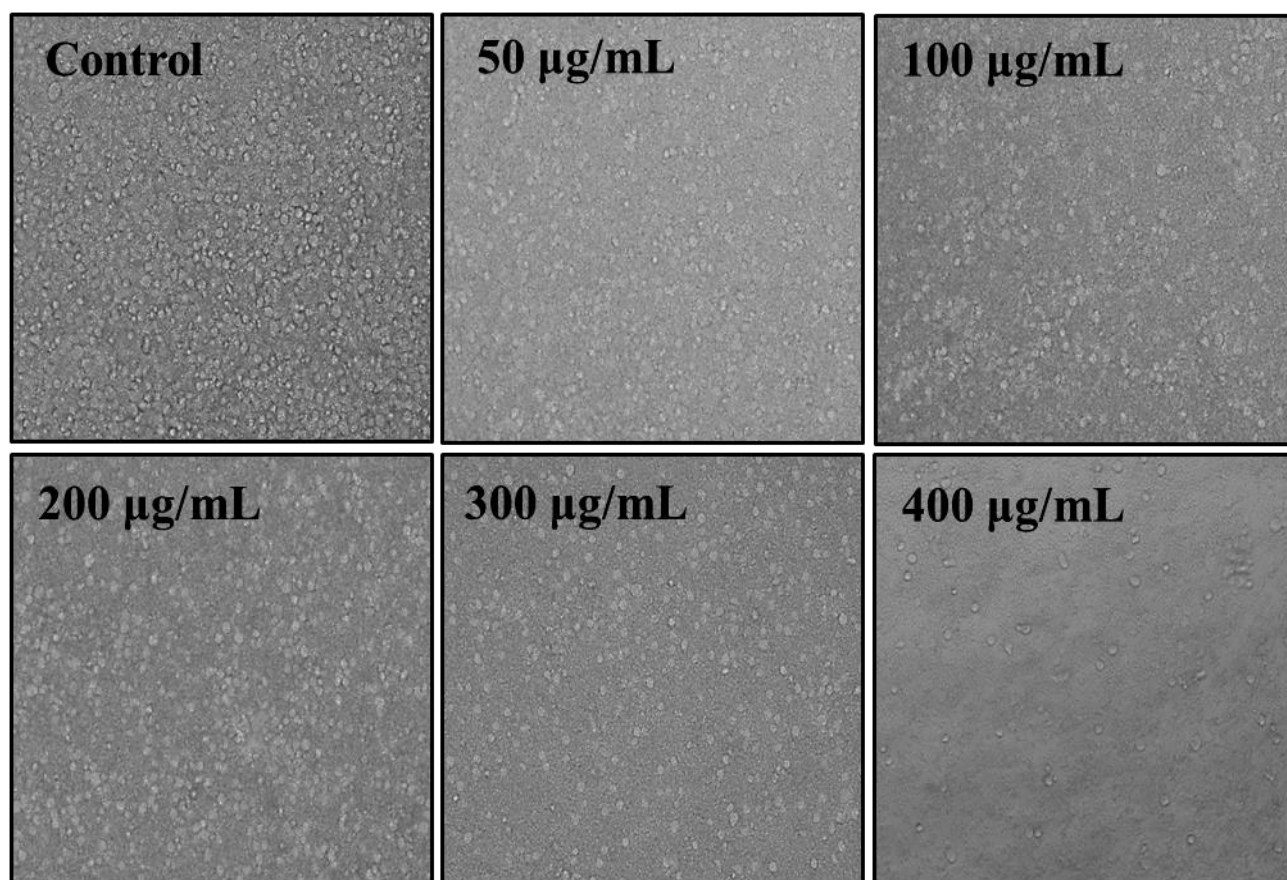


圖 7 小花蔓澤蘭葉作用血癌細胞 24 小時後
對細胞形態之影響



(放大倍率 200X)

圖 8 小花蔓澤蘭根莖作用血癌細胞 24 小時後
對細胞形態之影響



(放大倍率 200X)

圖 9 小花蔓澤蘭葉作用血癌細胞 24 小時後
對細胞存活率之影響

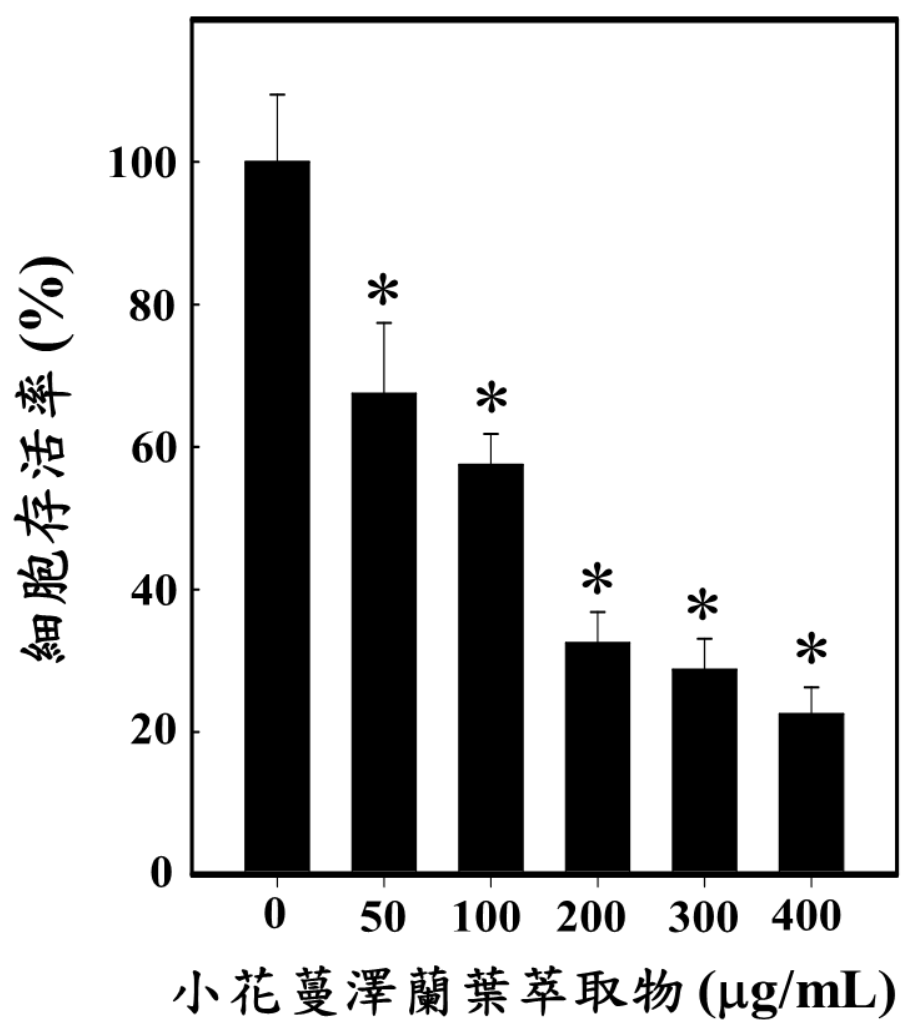


圖 10 小花蔓澤蘭根莖作用血癌細胞 24 小時後
對細胞存活率之影響

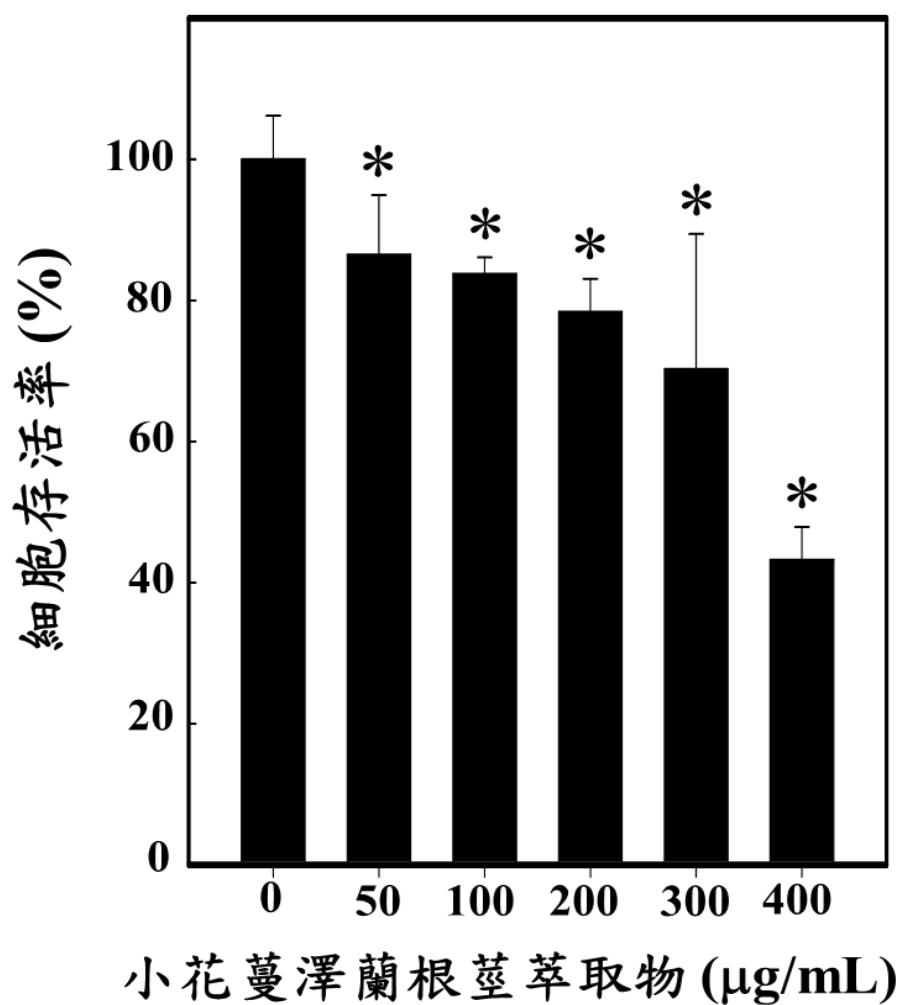


圖 11 小花蔓澤蘭葉對血癌細胞 caspase-3、Bax、
Bcl-2 及 PARP 蛋白表現量之影響

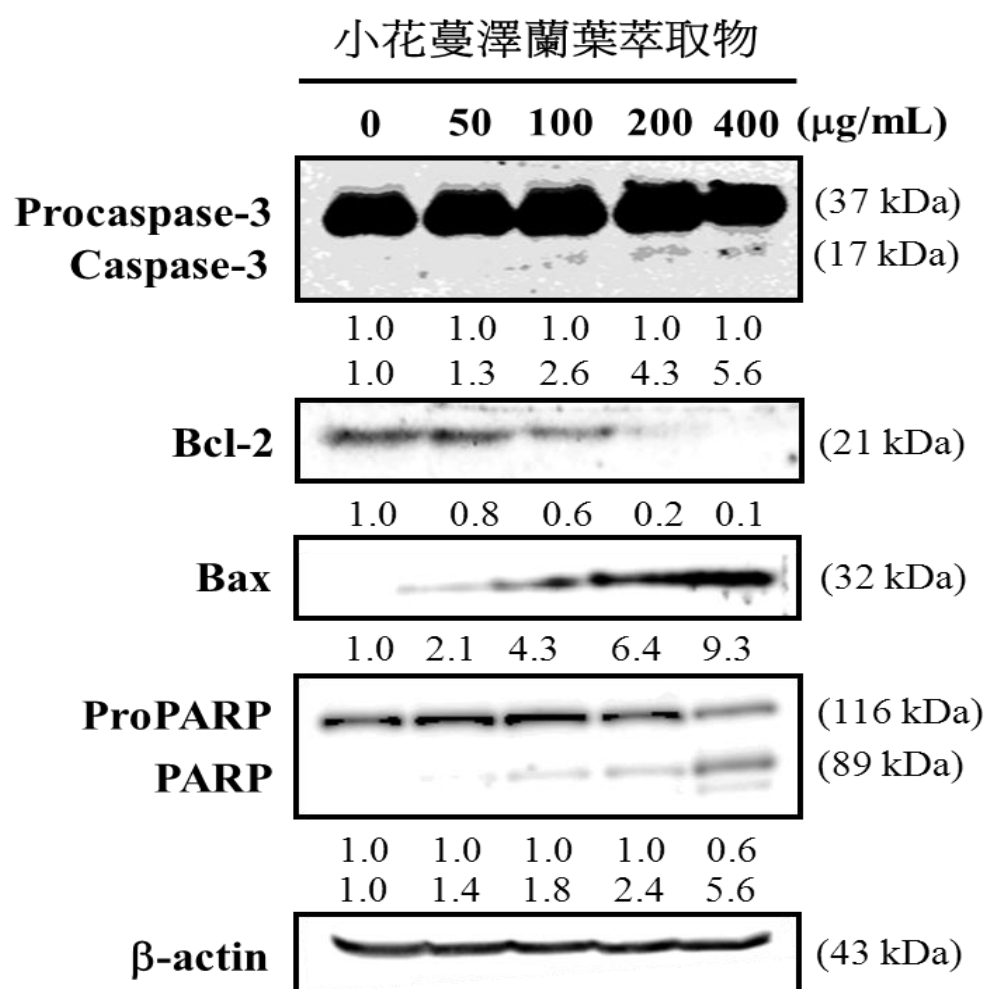
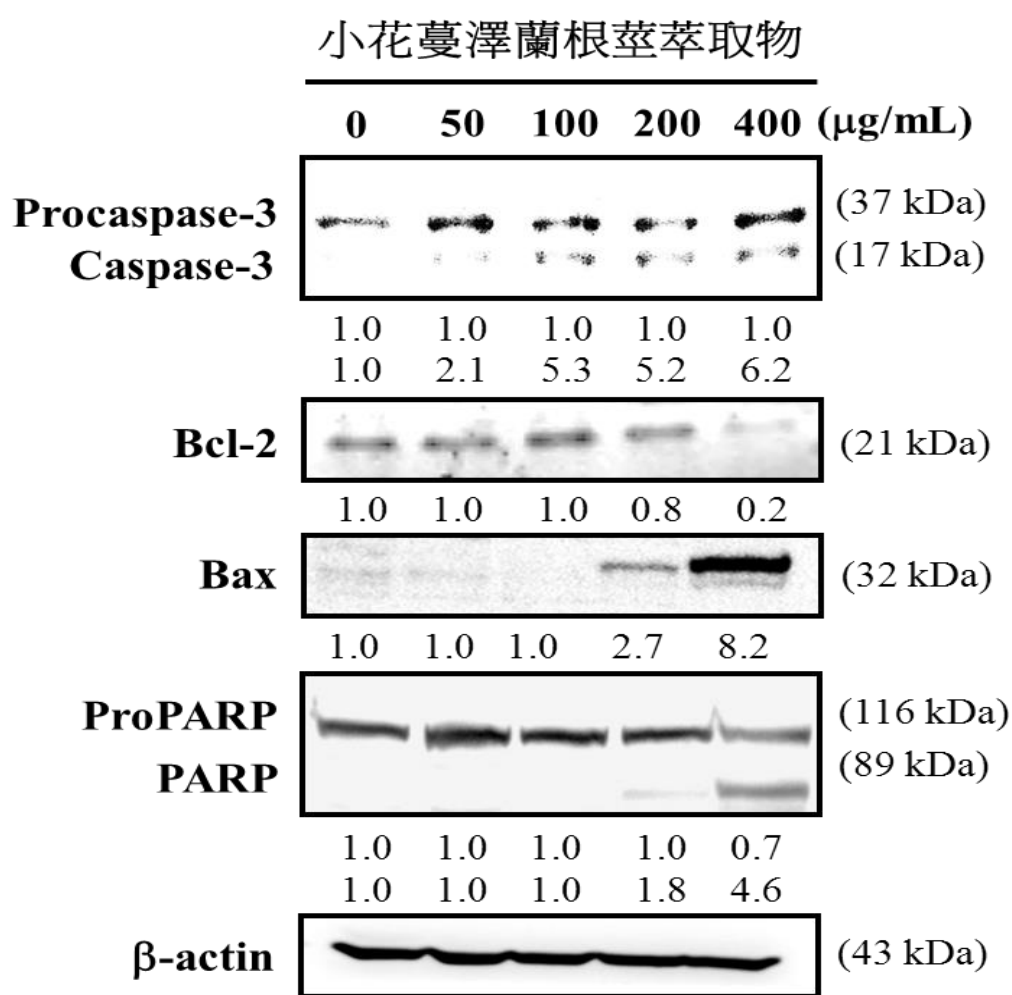


圖 12 小花蔓澤蘭根莖對血癌細胞 caspase-3、Bax、
Bcl-2 及 PARP 蛋白表現量之影響



陸、討論

許多疾病的發生和自由基所引起的氧化傷害有密切關係，這使得抗氧化作用在預防疾病發展所扮演的角色越來越受重視。癌症連續多年蟬聯國人十大死因榜首，也是現代人健康的最大威脅。近年來，許多專家學者紛紛於天然植物中尋找具有潛力的抗氧化及抗癌物質，希望直接由飲食中攝取降低人類的疾病及癌症的發生。

DPPH是一個很穩定的自由基，通常用來測定抗氧化物提供氫的能力。我們將DPPH用來測定小花蔓澤蘭葉和根莖抗氧化能力，其供氫能力愈強，清除DPPH自由基的能力愈強。實驗發現，小花蔓澤蘭葉與根莖萃取物都具有清除DPPH自由基的能力。本實驗使用維生素E衍生物Trolox作為正向的控制組，因為維生素E是脂溶性的抗氧化劑可以清除自由基，保護細胞膜的完整及防止細胞受氧化傷害。偏水溶性維生素E衍生物Trolox，比脂溶性維生素E容易溶於水使實驗容易進行。結果顯示，使用240 $\mu\text{g/mL}$ 的小花蔓澤蘭葉萃取物、1200 $\mu\text{g/mL}$ 的根莖萃取物與10 $\mu\text{g/mL}$ 抗氧化維生素E功效相同。而且，小花蔓澤蘭葉全株都有功效，但是，葉比根莖具有較高的清除DPPH自由基的能力。

人體血液含量最多的紅血球很容易受到自由基(AAPH)的攻擊，最後會造成溶血現象。所以，我們使用人類紅血球，來評估小花蔓澤蘭保護自由基誘發劑 AAPH，誘導紅血球溶血的功效，這個細胞模式很常被使用在保健食品或藥品的抗氧化能力評估。我們實驗發現，加入小花蔓澤蘭葉萃取物(15 至 45 $\mu\text{g/mL}$)，幾乎皆可以完全抑制(100%) AAPH 誘發的紅血球溶血作用；小花蔓澤蘭根莖萃取物則約 90 $\mu\text{g/mL}$ 濃度才可以達到完全抑制(100%); 維生素 E 衍生物 Trolox 則約 10 $\mu\text{g/mL}$ 濃度，才接近完全抑制(約 100%)紅血球溶血。比較保護紅血球溶血的抗氧化活性發現，維生素 E =小花蔓澤蘭葉萃取物>小花蔓澤蘭根莖萃取物。小花蔓澤蘭葉萃取物與維生素 E 接近，具有非常強的抑制紅血球溶血(防止貧血)及抗氧化的功效。多酚化合物廣泛的存在植物蔬菜水果中，長久以來被認為具有抗氧化功能。多酚化合物具有清除自由基的能力，能有效的抑制過氧化作用。結果發現，小花蔓澤蘭的葉和根莖的總多酚類含量可達 51.6 及 20.9 毫克/克的量(葉的總多酚含量比根莖總多酚類含量高)。我們推測小花蔓澤蘭葉的總多酚含量高，可能是小花蔓澤蘭葉具有較高清除 DPPH 自由基能力及保護紅血球溶血的原因。

血液中急性骨髓血癌細胞(Human premyelocytic Leulemia Cells)的出現會導致血癌發生，血癌就是俗稱的白血病。目前血癌的治療方式，包括化學治療、骨髓幹細胞移植、放射線治療與免疫治療等。我們實驗利用人類急性骨髓血癌(HL-60)細胞株加入小花蔓澤蘭葉及根莖萃取物後，以倒立式相位差顯微鏡觀察細胞形態，發現細胞數目明顯下降且有細胞形態不完整、細胞膜皺縮的現象。顯微鏡下計數血癌細胞數目，發現細胞存活率隨著小花蔓澤蘭劑量增加

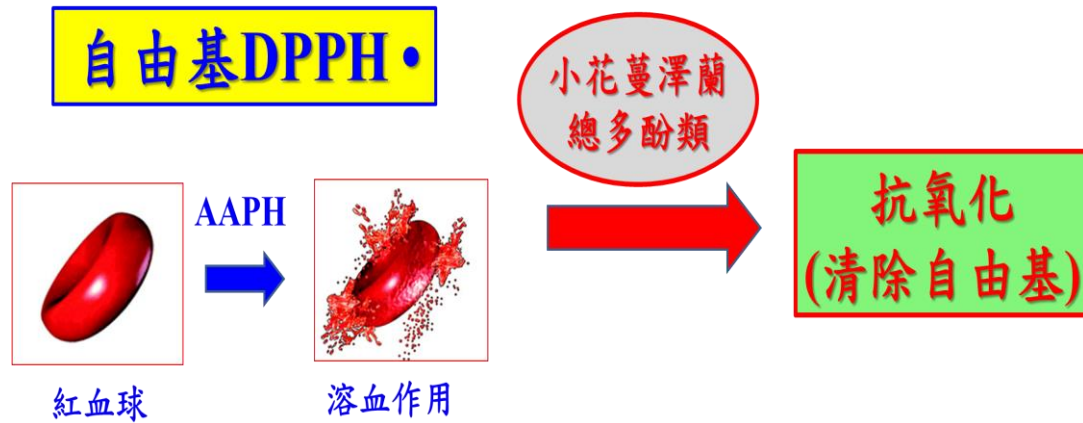
有明顯下降的趨勢。葉及根莖萃取物對血癌細胞的 IC₅₀ (抑制 50%細胞存活率濃度)分別為 150 及 350 µg/mL; 比較抗血癌功效發現, 小花蔓澤蘭葉萃取物>小花蔓澤蘭根莖萃取物。血癌患者會缺乏紅血球、白血球及血小板的功能, 而表現出易感染、貧血、敗血症、凝血不良等臨床症狀。我們的發現指出, 小花蔓澤蘭除了抗血癌功效, 更具有強的抗氧化及抑制紅血球溶血能力, 可進一步強化防止血癌所造成的貧血症狀。

細胞凋亡(Apoptosis)為一種獨特的細胞死亡形式, 其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)以及細胞凋亡小體(Apoptotic body)形成等特徵, 利用凋亡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的細胞(Hseu et al., 2004)。西方墨點法實驗發現, 小花蔓澤蘭葉和根莖可使血癌細胞 Caspase-3 蛋白表現量增加、Bcl-2 蛋白表現量減少、Bax 蛋白表現量增加及 PARP 蛋白裂解, 可能具誘發血癌細胞凋亡的能力。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)會由蛋白質水解酵素(Caspase-3)分裂成 89 kDa 和 24 kDa 蛋白質而失去原本的功能, 是研究細胞凋亡最好的標的之一 (Huang et al., 2012)。我們實驗發現, 小花蔓澤蘭葉和根莖可使血癌細胞 Caspase-3 蛋白表現量增加及 PARP 蛋白裂解, 促使細胞走向凋亡。研究指出, 若抗細胞凋亡 Bcl-2 蛋白大量表現, 則促使細胞存活; 反之, 若促細胞凋亡 Bax 蛋白大量表現, 則促使細胞走向凋亡(Hseu et al., 2004)。我們實驗發現, 小花蔓澤蘭葉和根莖可使抗細胞凋亡 Bcl-2 蛋白表現量減少及促細胞凋亡 Bax 蛋白表現量增加, 由以上推論小花蔓澤蘭可能具誘發血癌細胞凋亡的能力。

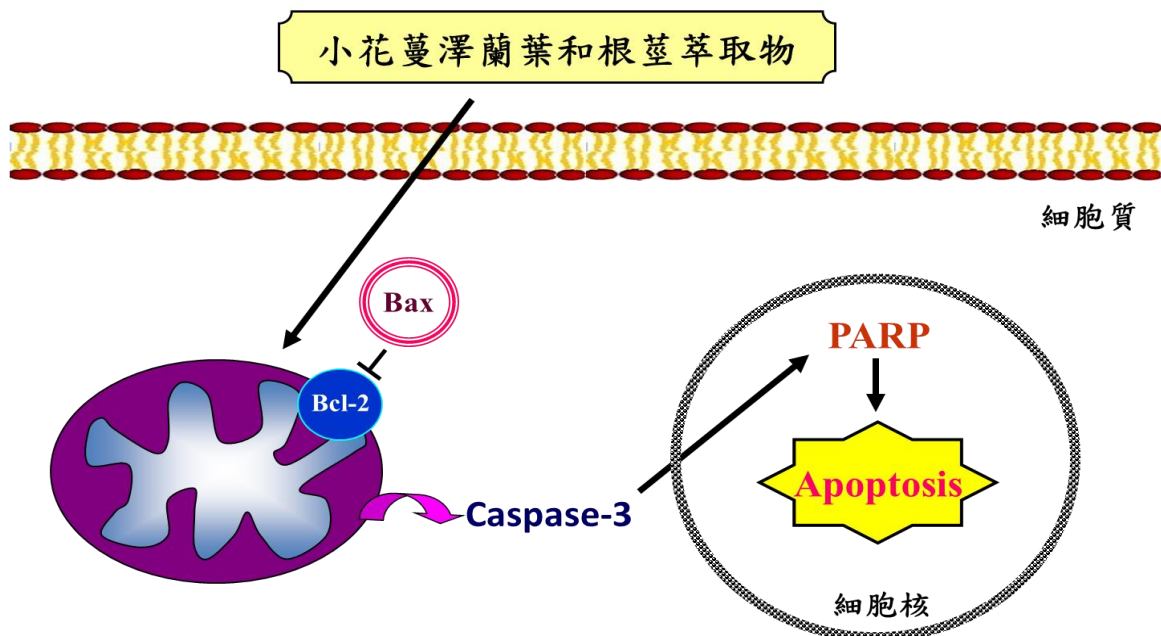
我們研究發現, 小花蔓澤蘭具有良好的抗氧化及抗血癌功效, 可能具開發成保健食品/藥品的潛力。我們認為小花蔓澤蘭全株都具有功效, 必須小花蔓澤蘭全株(葉及根莖)一起摘取, 只摘取葉子並沒有達到清除小花蔓澤蘭的目的。然而, 小花蔓澤蘭抗氧化/抗癌功效, 可能還須要更多的實驗來加以佐證, 尤其是相關的動物實驗、人體實驗及毒性試驗來證實。由於抗氧化/抗癌功效的新發現, 我們希望把小花蔓澤蘭化為有用的東西。藉著小花蔓澤蘭大量被摘取, 使之慢慢地減少, 漸漸地恢復台灣原有生態環境的平衡。

柒、結論

外來種小花蔓澤蘭(*Mikania micrantha*)由於繁殖速度太快，使台灣本土生態系受到嚴重破壞。我們實驗發現，小花蔓澤蘭(葉和根莖萃取物)具有清除自由基能力及保護自由基誘發劑誘導紅血球溶血反應，我們推測小花蔓澤蘭所含多酚化合物可能是其抗氧化活性的來源(下圖)。



抗癌研究發現，小花蔓澤蘭會誘導人類急性骨髓血癌細胞之細胞毒性，使血癌細胞減少及皺縮。此外，小花蔓澤蘭葉和根莖可能具誘發血癌細胞凋亡的能力(下圖)。



總結，我們的研究提出小花蔓澤蘭具有良好的抗氧化及抗血癌功效，可能開發成預防自由基疾病的應用產品及抗血癌保健食品/藥品的潛力。我們希望藉著小花蔓澤蘭全株摘取，恢復台灣原有生態環境的平衡。

捌、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、陳惠英. 1998. 自由基-抗氧化防禦與人體健康. 臺灣營養學會雜誌 23 卷 1 期 105 頁.
- 三、詹皓、沈竟民、姜桂榮. 1990. 中藥抗氧化作用的研究概況. 中國中藥雜誌 10 期 28 頁.
- 四、YC Hseu, Chang WH, Chen CS, Huang CJ, Lu FJ, Chia YC, Hsu HK, Wu JJ, Yang HL. 2008. Antioxidant Activities of *Toona sinensis* Extracts Using Different Antioxidant Models. Food and Chemical Toxicology. 46, 106-114.
- 五、TY Song, GC Yen, 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 3322-3327.
- 六、PJ Huang, YC Hseu, MS Lee, K.J.S. Kumar, CR Wu, LS Hsu, JW Liao, IS Cheng, YT Kuo, SY Huang, HL Yang. 2012. *In vitro* and *in vivo* activity of gallic acid and *Toona sinensis* leaf extracts against HL-60 human promyelocytic leukemia. Food and Chemical Toxicology. 50, 3489-3497.
- 七、YC Hseu, Yang HL, Lai YC, Lin JG, Chen GW and Chang YH. 2004. Induction of apoptosis by *Antrodia Camphorata* in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Nutrition and Cancer. 48(2), 189-197.

附錄一

三、化學材料：檸檬酸鹽抗凝血劑(sodium citrate)、硫巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid)、磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS; Sodium chloride, NaCl; Sodium phosphate dibasic, Na_2HPO_4 等PH=7.4)、DPPH (α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)、Folin-Ciocalteu比色法、沒食子酸(gallic acid)、AAPH [2,2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride]、磷酸 (phosphoric acid, H_3PO_4)、三氯以酸 (Trichloroacetic acid)、維生素E衍生物(Trolox)、RPMI-1640細胞培養液、去離子純水、碳酸氫鈉、抗生素 (penicillin-streptomycin)、細胞冷凍保存液 (Cell culture freezing medium, DMSO)、胎牛血清 (Fetal bovine serum)、L-glutamine、Trypan blue染劑。

四、實驗儀器：電子天秤、桌上型微量離心機、分光光度計、酸鹼度測定儀、恆溫水浴槽、混合震盪器、數位相機、液態氮桶、培養箱、培養瓶 (T75)、倒立式相位差顯微鏡、超音波、高速離心機、電泳、濕式轉印機、冷光影像儀器。

五、實驗器材：微量吸管分注器 (Pipette)、分光比色管、量筒、稱量紙、刮杓、試管、燒杯、玻璃瓶、細胞培養皿、血球計數器、無菌離心管、無菌過濾膜、顯微鏡、酒精燈。

附錄二

(二)、試劑與藥品：

- (1) 一級抗體: Caspase-3、Bax、Bcl-2、PARP及 β -actin。
- (2) 二級抗體: HRP-conjugated anti-rabbit IgG 及 HRP-conjugated anti-mouse IgG。
- (3) 30% Acrylamide/Bis solution (29:1)。
- (4) 10% SDS: 取10g SDS用二次水定量到100 mL。
- (5) Ammonium persulfate (APS) : 0.1g (NH₄)S₂O₈ 溶於1 mL二次水。

(6) SDS-PAGE 製備:

SDS-PAGE	8%	10%
d.d.H ₂ O (mL)	4.6	8
1.5M Tris (pH=8.8) (mL)	2.5	5
30% Acrylamide Mix (mL)	2.7	6.6
10% SDS (mL)	0.1	0.2
10% APS (mL)	0.1	0.2
TEMED (mL)	0.005	0.01
Total (mL)	10	10

- (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500mL。
- (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100mL。
- (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) 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。
- (13) Transfer buffer: 取 Tris base (18.2g)、Glycine (86.5g) 及 Methanol (1200 mL)，用二次水定量至 3000 mL。

- (14) PBS: 取 800 mL 二次水，加入 NaCl (8 g)、KCl (0.2 g)、 KH_2PO_4 (0.2 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2.9 g)，調至 pH 7.4 並定量至 1000 mL。
- (15) Washing buffer (PBST): 取 499.5 mL PBS 再加入 500 μL Tween-20。
- (16) Blocking buffer: 取 25g 脫脂奶粉溶於 500 mL 之 PBST。
- (17) SuperSignal substrate solution: 將 SuperSignal I : SuperSignal II (1 : 1)混合，加入的量依 PVDF 大小調整。

【評語】 040705

1. 本研究由小花蔓澤蘭之葉根莖各部位之酒精抽取液，具抗氧化及溶血作用，以 AAPH 分析，並對血癌細胞 HL-60 分析有毒殺作用。
2. 以 Western blot 分析小花蔓澤蘭抽取液可對 HL-60 細胞：Caspase 3、Bax、Bcl 2、PARP 有作用，但利用溶液 400 μ g/mL 才有作用
3. 建議使用 IC₅₀：較低劑量如 1/10 或 1/20 測試其對 HL-60：Caspase 3、Bax、Bcl 2 或 PARP 是否有抑制作用。並用動物試驗證明。