

# 中華民國第 58 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

第一名

052007

探討熊果酸對胃癌細胞抗腫瘤效應及凋亡機制

學校名稱：臺北市立南湖高級中學

作者： 高一 林佳妮	指導老師： 黃祐慈 簡嘉慧
---------------	---------------------

關鍵詞：胃癌、熊果酸、細胞凋亡

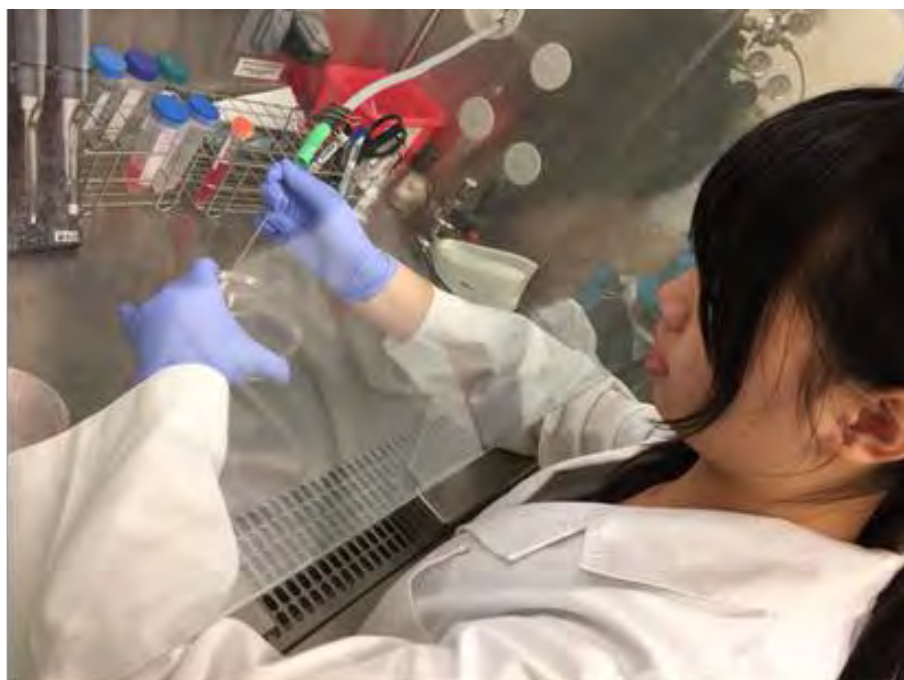
## 得獎感言

### 永遠不會結束的旅程

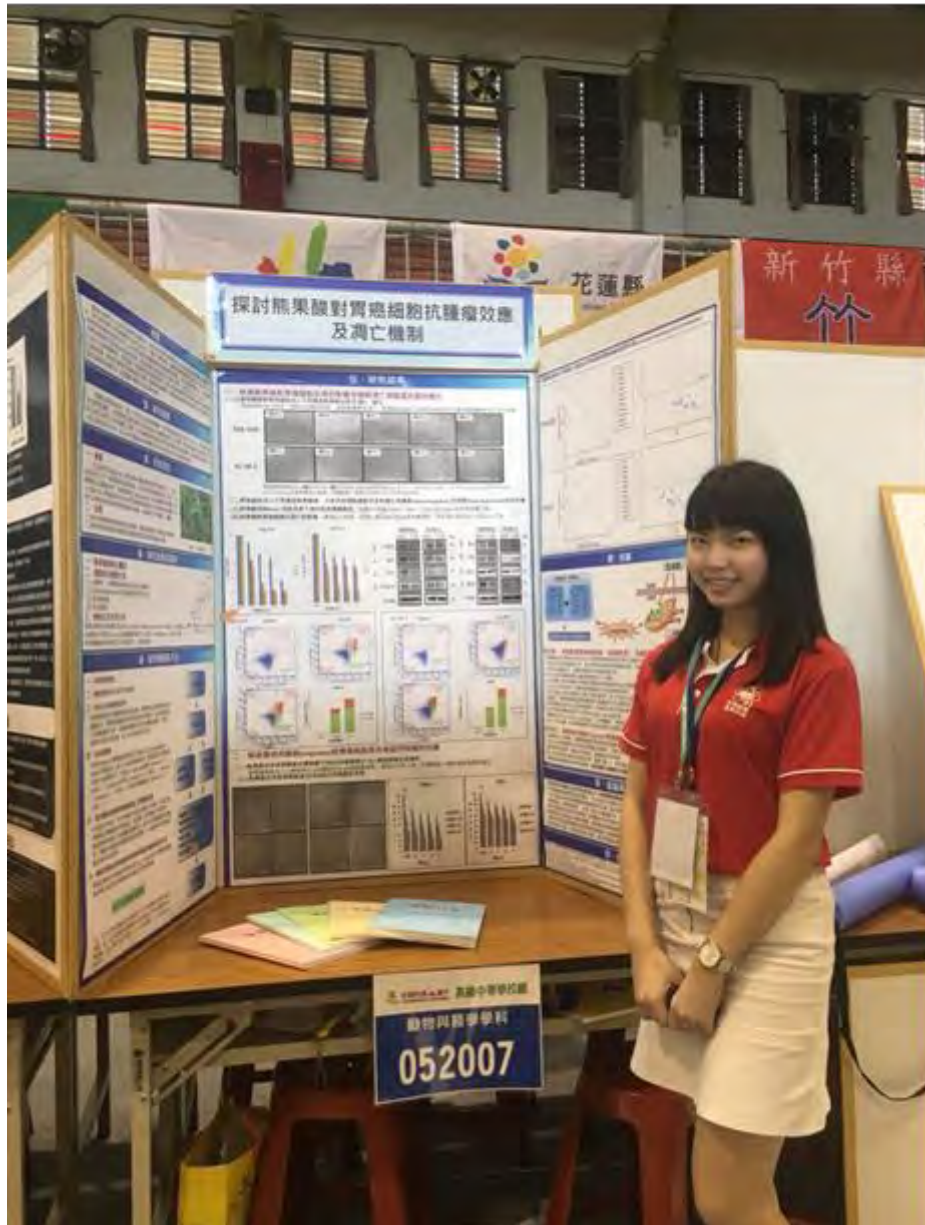
參展的過程，就像是在與朋友分享自己的成果一樣，很開心、很興奮；不過最讓我享受的還是在參賽期間，選手間互相交流學習，可以認識很多優秀的人才，欣賞頂尖的作品，並增長自己的見聞。對我而言，科展比起所謂的比賽，我認為它更像是一場精采的科學交流會。

回首科展的過程中，我磨練了耐心與細心及毅力。雖然遇到了重重的挫折，但在師長、父母的鼓勵下，我才能堅持下去並且盡全力去完成每一個小細節，魔鬼藏在細節裡，很可能一個小步驟只要一出錯，就導致整個實驗功虧一簣。尤其在無菌操作的實驗時，我也必須格外留意小心，避免汙染。這樣的訓練過程，也使我做事更加謹慎小心。另外，我認為大量搜尋並閱讀相關文獻也是一大收穫，學習如何搜尋正確的關鍵字、閱讀文獻並整理與實驗相關的題材歸納其重點，是一大重要課題。透過前人的經驗，我才能有明確的後續實驗方向，彷彿站在巨人的肩膀上，讓我有機會看的又高又遠。

我認為能夠得獎，不是因為自己有多麼優秀或是特別的突出，而是因為我很幸運的可以接受許多師長的指導與幫助。眾人的點滴指導，積沙成塔，我才能享這豐碩的成果。我由衷地感謝我的學校-南湖高中，以及老師們輔導我、給予我這個機會站上這個舞台，也非常感謝我的父母，陪伴我面對一路上所有的困境，並且在我需要時，無悔陪伴並支持著。也感謝台北市政府教育局給予的優質指導團隊及資源，所有給予我建議及鼓勵的人，正是因為您的幫助，才能成就這樣的作品，謝謝您們！



繼代細胞無菌操作台



全國賽與自己的海報合影



很榮幸作品得到評審的青睞，有機會獲獎。

# 摘要

胃癌的治療方式為手術及化學藥物治療為主。本研究目的是探討熊果酸(Ursolic acid)對於胃癌細胞的抗腫瘤作用。研究使用兩株人類胃癌細胞 MKN45 及 SCM-1。當加入熊果酸後，顯微鏡下觀察細胞數目會減少。由 SRB 證明熊果酸會降低細胞存活率，由西方墨點法實驗發現：熊果酸誘導促細胞凋亡蛋白質 Bax 及 Bak 的表現，降低抗細胞凋亡蛋白質 Bcl-x1 及 Bcl-2，也會抑制 *p*-Stat3/c-Myc/Cyclin D1 訊息傳遞途徑，從而阻斷促進細胞存活的基因表現，讓癌細胞凋亡。另外也研究熊果酸併用化療藥物順鉑對胃癌細胞存活率的影響，由周塔氏藥物合併指數定理證明熊果酸作為輔劑，對胃癌細胞抑制具有協同效應，故熊果酸具潛力成為新的治療方式，更證實中草藥白花蛇舌草的藥效。

## 壹、研究動機

根據衛生福利部的統計，國人十大死因之首是惡性腫瘤。其中胃癌居癌症死亡率排名第七位，是我國常見的消化道惡性腫瘤。目前胃癌的主要治療方式以手術合併化學藥物為主，如：順鉑 (cisplatin)等，但此類療法復發率高且易轉移，影響胃癌病人的存活率。近年來臨床上也發現，若能將中西藥搭配，會更有效而且降低藥物的副作用，更能抑制癌細胞生長。但傳統中草藥複方多為經驗傳承，較少純化分析其有效成分，因此本研究嘗試藉由中草藥成分中其中有效的成分，以為未來臨床之參考。

## 貳、研究目的

### 一、研究背景

中醫藥以其獨特的理論體系在我國腫瘤治療上發揮不可替代的作用，但中醫文獻並無胃癌的病名，類似的記載多見有：胃反、伏梁、胃脘痛等。根據研究，中草藥白花蛇舌草具有清熱解毒、活血止痛及消腫毒的功效，為中醫治療胃疾的常用藥物之一[1]。其中有效成分之一是熊果酸 (Ursolic acid)[2-4]。

熊果酸(圖 1)具有增強免疫力、抗發炎及促進癌細胞凋亡之活性。近年來，許多國內外的文獻也報導熊果酸具有促進癌細胞凋亡之活性，它是具有抗腫瘤作用的主要活性成分之一。對腎臟癌與乳癌[5]、多發性骨髓瘤[6]、子宮頸癌[7]、肝癌[8]等均具有顯著的抗癌效果，文獻顯示熊果酸的抗腫瘤效果，與細胞凋亡(apoptosis)的 Stat3 傳遞路徑有關[5-8]；另一方面，也有文獻指出胃癌細胞中的 Stat3 表現量與癌細胞的存活有密切相關[9,10]。因此根據中醫理論與文獻資料，本研究計畫探討白花蛇舌草中的有效活性成分之一「熊果酸」對胃癌細胞的

細胞生長影響，並釐清 Stat3 與胃癌細胞凋亡是否相關及熊果酸是否可以協助現有臨床藥物治療的可能。

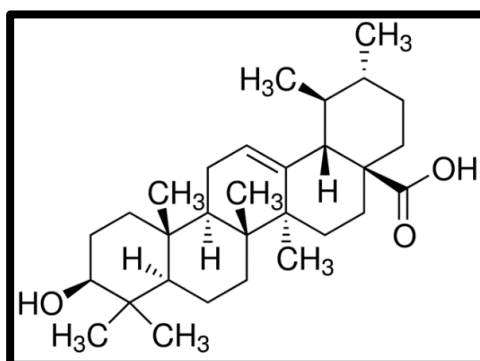


圖 1、熊果酸 (Ursolic acid)結構式

## 二、研究目標

- (一) 探討熊果酸對胃癌細胞生長的影響，並檢測細胞凋亡相關蛋白質的變化。
- (二) 檢視併用熊果酸及順鉑對胃癌細胞是否具有協同抑制癌細胞的效應。

## 參、 研究設備及器材

### 一、實驗試劑：

- (一)熊果酸 (3 $\beta$ -hydroxy-12-ursen-28-ic acid，化學式: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>，分子量 456.70)。購自於 Sigma-Aldrich (catalogue number : U6753，CAS number 77-52-1)。
- (二)人類胃癌 MKN45 和 SCM-1 細胞株購自於食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心；細胞株培養液 RPMI 1640 購自美國 CAISSON LABS；FBS (Fetal bovine serum)、PBS (phosphate-buffered saline、sodium chloride、sodium phosphate dibasic 等)、antibiotic-antimycotic 購自於美國 Gibco-BRL 公司；胰蛋白酶 (trypsin-EDTA)、dimethyl sulfoxide (DMSO 細胞冷凍保存液)購自於 Sigma-Aldrich；trypan blue 染劑購自於 Thermo Fisher Scientific。
- (三)SRB 細胞存活率分析法：Sulforhodamine B (SRB)染劑、10% trichloroacetic acid (TCA)、1% acetic acid、PBS、ddH<sub>2</sub>O、Tris 緩衝液、順鉑。
- (四)sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)與西方墨點法分析的研究試劑包括 Pierce™ BCA Protein Assay Kit、Pierce™ ECL Western Blotting Substrate 及 Enhanced chemiluminescence (ECL)皆購於 Thermo Fisher Scientific。20 mM Tris、

protein lysis buffer、10% SDS、acrylamide、10% ammonium persulphate (AP) solution、tetramethylethylenediamine (TEMED)、1.0 M Tris、1.5 M Tris、lane marker reducing sample buffer (sample dye)、methanol、PBS- 1% Tween 20 (PBS-T) Buffer、BSA standard、primary antibody (Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-x1、及  $\beta$ -actin、*p*-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D1)、secondary antibody (HRP-conjugated anti-rabbit IgG 及 HRP-conjugated anti-mouse IgG)、10X running buffer、10X transfer buffer、PVDF 膜 (polyvinylidene fluoride) 購自於 Sigma-Aldrich。skim milk 購自於 Anchor。

## 二、西方墨點法研究所需配置

### (一)膠體配置：

1.集膠溶液 (5% stacking gel): ddH<sub>2</sub>O (6.8 ml)、30% acrylamide (1.7 ml)、1 M Tris (1.25 ml)、10% SDS (0.1 ml)、10% AP (0.1 ml)、TEMED (0.01 ml)。

2.分離膠體液體 (10% separating gel): ddH<sub>2</sub>O (5.9 ml)、30% acrylamide (5.0 ml)、1.5 M Tris (3.8 ml)、10% SDS (0.15 ml)、10% APS (0.15 ml)、TEMED (6  $\mu$ l)。

(二)電泳緩衝液 running buffer 配置：取 Tris (3 g)、glycine (14.4 g)及 10% SDS (100 ml)，用 ddH<sub>2</sub>O 將上述藥品溶解，並調整 pH 值至 7.0 後，再調整量至 1000 ml。

(三)電泳轉印緩衝液 transfer buffer 配置：取 Tris (3 g)及 glycine (14.2 g)，用 ddH<sub>2</sub>O 將上述藥品溶解，並調整 pH 值至 8.3 後，加入 methanol (200 ml)，再調整量至 1000 ml。

(四)電泳阻斷液 blocking buffer 配置：取 5 g skim milk 加入 100 ml PBS-T，均勻混合後即可使用。

(五)裂解緩衝液 lysis buffer 配置：150 mM NaCl、1 % NP-40、0.1 % SDS、50 mM Tris-HCl、pH 7.6、10 mM EDTA，pH 8.0、1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)、0.5% deoxycholate、1 mM Sodium orthovanadate、10 mM sodium fluoride、10 mM  $\beta$ -glycerophosphate 及 10  $\mu$ g/ml protease inhibitor cocktail。

(六)西方墨點法分析使用的抗體 (下述抗體購置來源如表一)：

1.Primary antibody： $\beta$ -actin、*p*-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D1、Bax、Bak、Bcl-2 及 Bcl-x1。

2.Secondary antibody：horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody 及 HRP-conjugated anti-mouse antibody。

表一、使用之抗體資料及來源

Antibody	分子量 (kDa)	Source	產品編號	稀釋比例	廠牌
$\beta$ -actin	42	mouse	ab6276	1:10000	Abcam
p-Stat3	79,86	rabbit	9145P	1:500	Cell Signaling
Stat3	86	rabbit	4904P	1:500	Cell Signaling
c-Myc	55~60	mouse	Sc-40	1:500	Santa Cruz
Cyclin D1	38	mouse	Sc-8396	1:500	Santa Cruz
Bax	20	rabbit	5023	1:1000	Cell Signaling
Bak	25	rabbit	6947P	1:1000	Cell Signaling
Bcl-2	26	rabbit	2870	1:1000	Cell Signaling
Bcl-xl	36~47	rabbit	2764S	1:1000	Cell Signaling
HRP-conjugated anti-rabbit antibody	-	goat	ab6721	1:5000	Abcam
HRP-conjugated anti-mouse antibody	-	rabbit	ab97046	1:10000	Abcam

### 三、實驗器材儀器清單

細胞培養箱、離心機 (KUBOTA2420)、電動吸管 (pipette aid, 購自於 Thermo Fisher Scientific)、微量吸管分注器 (購自於 Thermo Fisher Scientific)、手動八爪分注器 (購自於 Thermo Fisher Scientific)、烘箱、SDS-PAGE 電泳和轉漬器材購自於 BIO-Rad、倒立式相位差顯微鏡、濕式轉印機、電源供應器 (Major Scitenc MP-250N)、防爆夾、加熱板、凝膠成像儀 (Biospectrum 500 Image System UVP)及 ELISA reader。

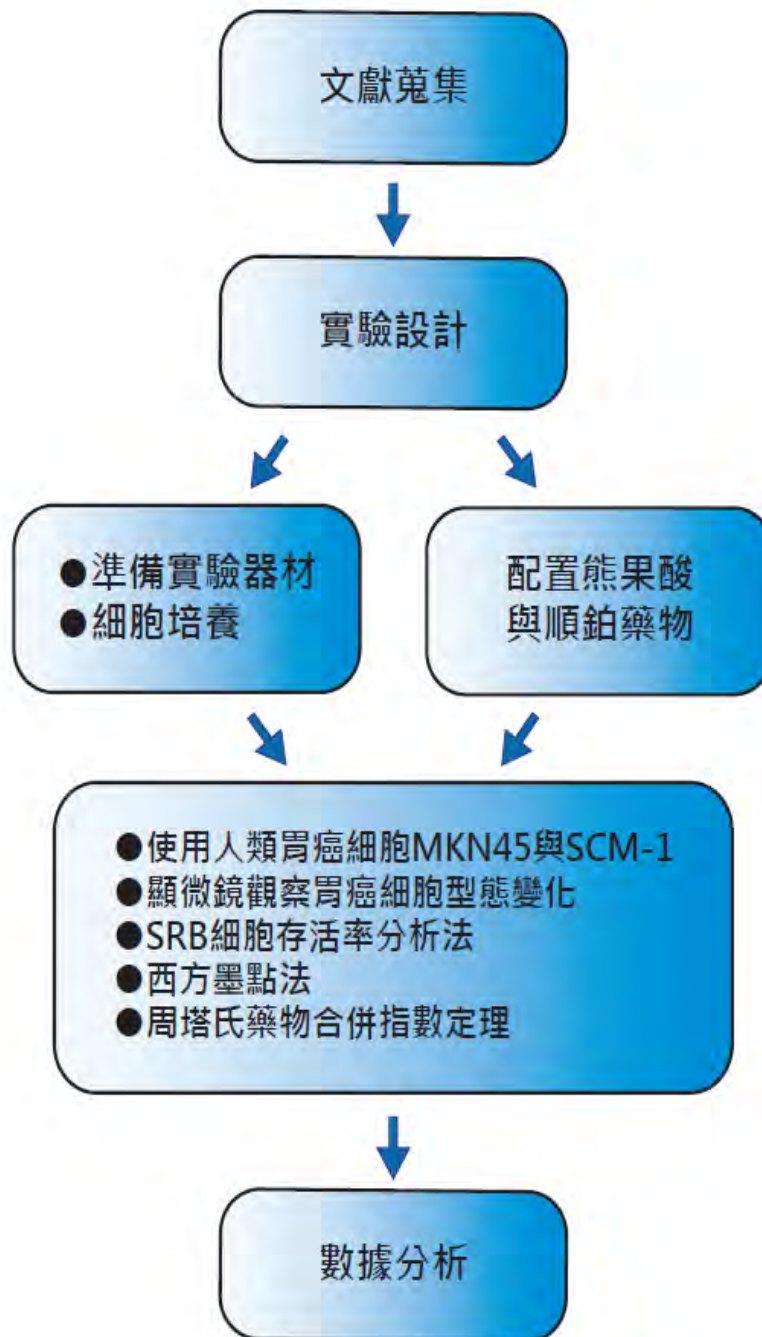
### 四、分析方法

利用 ANOVA 分析法，統計分析加入不同藥物之後的存活率來進行比較，並計算  $p$  值。如果相關的  $p$  值低於 0.05，代表結果具有顯著意義。

用於分析順鉑搭配熊果酸對胃癌細胞作用所使用的程式為網路分享的 ComboSyn 電腦應用軟體 (ComboSyn Inc, Paramus, NJ, USA)[11]，以周塔 (Chou-Talalay)式藥物合併指數定理 Combination Index (CI) [12] 評估。先混合毒性試驗中之熊果酸及順鉑，分別使用不同低於  $IC_{50}$  濃度比例加以混合，由實驗結果估算出細胞存活率，換算出死亡率之後，繪出 Isobologram 曲線。

## 肆、 研究過程或方法

### 一、研究架構圖





## 二、細胞培養

### (一)解凍胃癌細胞

MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞自液態氮中取出後，採快速解凍法將細胞冷凍管置於浮床上以 37°C 水浴槽回溫，快速種入 10 公分培養皿上，並加入含有 10% FBS 及 1% 抗生素的 RPMI 培養液培養。置於 5% CO<sub>2</sub> 培養箱於 37°C 培養。

### (二)繼代培養胃癌細胞

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 抽掉離心完後的上清液，加入 3 ml 的培養液回溶，並混合均勻。
5. 取 10 μl 的 trypan blue 和 10 μl 回溶後的細胞液，混合均勻後取 10 μl 加至細胞計數格中，在顯微鏡觀察下計數細胞數目。
6. 取約 100 萬顆細胞接種到新的 10 公分培養皿，水平搖晃培養皿，讓細胞均勻分佈。放回培養箱。
7. 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、加入不同濃度熊果酸作用於胃癌細胞觀察 12、24 及 48 小時下的形態變化，並以 SRB 分析細胞存活率

### (一) SRB 分析法原理：

SRB 分析法是利用染劑 SRB 中磺酸基的陰性蛋白質，於弱酸環境下與細胞內蛋白質的鹼性胺基酸結合，接著使用弱鹼溶液萃取出細胞內的 SRB 之後，於 ELISA reader 測量在波長 565 nm 處的吸光值，依據細胞濃度-吸收度檢量線換算，即得知細胞內的 SRB 濃度，以決定細胞存活率。實驗以 DMSO 溶劑控制組的結果視作存活率 100%，推算其他組別之細胞存活率。

### (二)SRB 細胞存活率分析法操作如下：

1. 前置操作

- (1) 分別取 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞，以每 100  $\mu$ l 包括 FBS 培養基中含  $3 \times 10^3$  顆胃癌細胞的細胞密度，種入 96 孔培養盤培養。培養盤外圍一律不種，但是加入 100  $\mu$ l PBS，放入 37°C 且有 5% CO<sub>2</sub> 培養箱。
- (2) 約 24 小時之後，確認細胞貼盤後，細胞培養盤分別加入濃度 0、5、10、20 及 50  $\mu$ M 熊果酸，而且讓每個指定濃度為六重複。
- (3) 將胃癌細胞於 12、24 及 48 小時熊果酸反應完後，以顯微鏡觀察後並記錄細胞在不同濃度及不同作用時間下的細胞形態變化。並且使用 SRB assay 在 12、24 及 48 小時計算細胞存活率。
- (4) 以同實驗條件重複操作兩次。

## 2. SRB 細胞存活率分析操作步驟：

- (1) 去除待測的 96 孔培養盤之培養液，加入 PBS 100  $\mu$ l 浸潤兩次。
- (2) 每孔加入 200  $\mu$ l 的 10% TCA 置於 4°C 下 1 小時。
- (3) 倒掉孔內原液，以 ddH<sub>2</sub>O 100  $\mu$ l 浸潤兩次後，每孔加入 200  $\mu$ l 的 SRB 染劑，於室溫下靜置 1 小時。
- (4) 將每孔 SRB 染劑回收後，以 1% acetic acid 100  $\mu$ l 浸潤兩次。
- (5) 將多餘液體拍乾後，於烘箱烘乾 20 分鐘。
- (6) 以 200  $\mu$ l 的 20 mM Tris 溶解，靜置 30 分鐘後，於設定 565 nm 波長的 ELISA reader 測定吸光值。
- (7) 以上每個實驗濃度為六重複，同實驗條件重複操作兩次，結果取其平均值。

## 四、西方墨點法明確胃癌細胞凋亡之相關蛋白檢測

### (一) 西方墨點法原理：

西方墨點法是利用 SDS-PAGE 方式，將分析樣品中的蛋白質依分子量大小展開，再將蛋白質轉漬到 PVDF 膜上。以 skim milk 處理後，利用抗體的專一性，讓 primary antibody 結合目標蛋白，再與帶有 HRP 的 secondary antibody 結合，再以受質顯色後，用冷光影像儀器照相鑑別。透過分析著色的位置和顏色深淺變化，比對樣本中目標蛋白質的消長。

(二)西方墨點法操作步驟如下：

1. 抽取蛋白質

(1) 將 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞分別種在 6 孔培養盤。組別分為：DMSO 溶劑控制組及加入 5  $\mu$ M 熊果酸的實驗組。放入培養箱 6 及 24 小時後，吸除培養液，潤洗。離心後取上清液。

(2) 以 lysis buffer 裂解細胞反應 30 分鐘，並於離心後取上清液，即為總蛋白質萃取物。

2. 蛋白質定量

(1) 將 BSA standard 序列稀釋成 2，1，0.5，0.25，0.125，0.0625 及 0.03125 mg/ml，並以 ddH<sub>2</sub>O 作為對照組，每個濃度二重複。

(2) 依建議比例配 BCA kit 的 working reagent，取 190  $\mu$ l working reagent 至各樣本的 well 中。

(3) 以 ELISA reader 在 562 nm 測定吸光值，並以 BSA standard 算出的回歸曲線，推算出樣本中的蛋白質濃度。

3. 樣本製備

分別取 50  $\mu$ g 蛋白質的樣本，加入 sample dye。

4. 電泳

製膠後，將待測樣本和蛋白質分子量標準液加入對應 well 中，空格處補 sample dye。上層膠，將電源設定 70 V，當樣本移至下層膠介面時，再設定為 100 V。

5. 轉漬

將 PVDF 膜泡入 methanol 中予以活化。先放適量 transfer buffer 至轉漬槽。轉漬夾中由下往上依序將濾紙兩張、PVDF 膜、膠體、濾紙兩張放入轉漬夾中。將轉漬槽放入冰箱中，設定電流時間後，開始轉漬，設定電壓為 100V，電流 60 mA。

6. 免疫抗體墨點法

(1) 將蛋白質轉漬後的 PVDF 膜置入 blocking buffer 盒中搖晃反應後，用 PBS-T 搖晃清洗三次，移除 PBS-T。

(2) 將配置好的 primary antibody 加入放置 PVDF 膜的盒內，於冷房反應 18 小時後，用 PBS-T 搖晃潤洗 PVDF 膜。

- (3) 將配置好的 secondary antibody 倒入 PVDF 膜盒內，並在室溫搖晃 1 小時後，以 PBS-T 潤洗 3 次。

## 7. 照相

- (1) 將配好 ECL 顯色試劑加到 PVDF 膜上。
- (2) 置入 UVP 冷光分析儀照相，檢視細胞內各式目標蛋白質的消長變化。

## 五、利用周塔氏藥物合併指數定理分析熊果酸合併使用順鉑對細胞存活率的影響

### (一)周塔氏藥物合併指數定理原理：

周塔氏藥物合併指數定理是依照周塔氏法分析劑量反應曲線計算 CI 值。CI > 1 表示拮抗，CI = 1 表示加成作用，CI < 1 表示協同作用。

利用目前化療藥物順鉑搭配熊果酸使用，探討是否能達到增強化療藥物的敏感性，進而了解輔助藥物的治療效果。步驟是先加入順鉑在 96 孔培養盤放入培養箱 4 小時後，再加入熊果酸培養 24 小時後，再以 SRB assay 結果，換算出每一實驗組別之細胞死亡率 (100% - 存活率)，再使用細胞死亡率使用周塔氏藥物合併指數定理之 ComboSyn 程式繪出反應曲線。

### (二)本實驗操作步驟如下：

1. 分別取 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞，以每 100  $\mu$ l 包括 FBS 培養基中含  $3 \times 10^3$  顆胃癌細胞的細胞密度，種入 96 孔培養盤培養。培養盤外圍一律不種，但是加入 100  $\mu$ l PBS，放入 37°C 且有 5% CO<sub>2</sub> 培養箱約 18 小時。
2. 確認細胞貼盤後，將細胞培養盤先分別加入 0、2.5、5、10 及 20  $\mu$ M 的順鉑。4 小時之後，再分別加入 0、2.5、5 及 10  $\mu$ M 熊果酸處理，每個濃度三重複，放回培養箱至預定時間後觀察，利用 SRB assay 讀取其吸光度平均值，再決定細胞存活率，並換算成死亡率。每一實驗條件分別操作兩次。

## 伍、 研究結果

### 一、探討熊果酸對胃癌細胞的影響，並檢測細胞凋亡相關蛋白質的變化

#### (一)以顯微鏡觀察胃癌細胞加入不同濃度熊果酸的狀況

以不同濃度 5、10、20 及 50  $\mu\text{M}$  的熊果酸分別與 MKN45 和 SCM-1 細胞反應，並於 12、24 及 48 小時後觀察。發現 48 小時後，相較於未加藥之 DMSO 溶劑控制組，視野中顯示細胞數量有顯著的降低，且藥物濃度劑量越高，更多的細胞會出現不完整的形態，而且伴隨細胞膜皺縮及空泡化現象。這種現象至 48 小時之後，愈為明顯，因此以這個時間點做為爾後實驗參考(圖 2 及圖 3 分別為 MKN45 與 SCM-1 細胞的結果)。

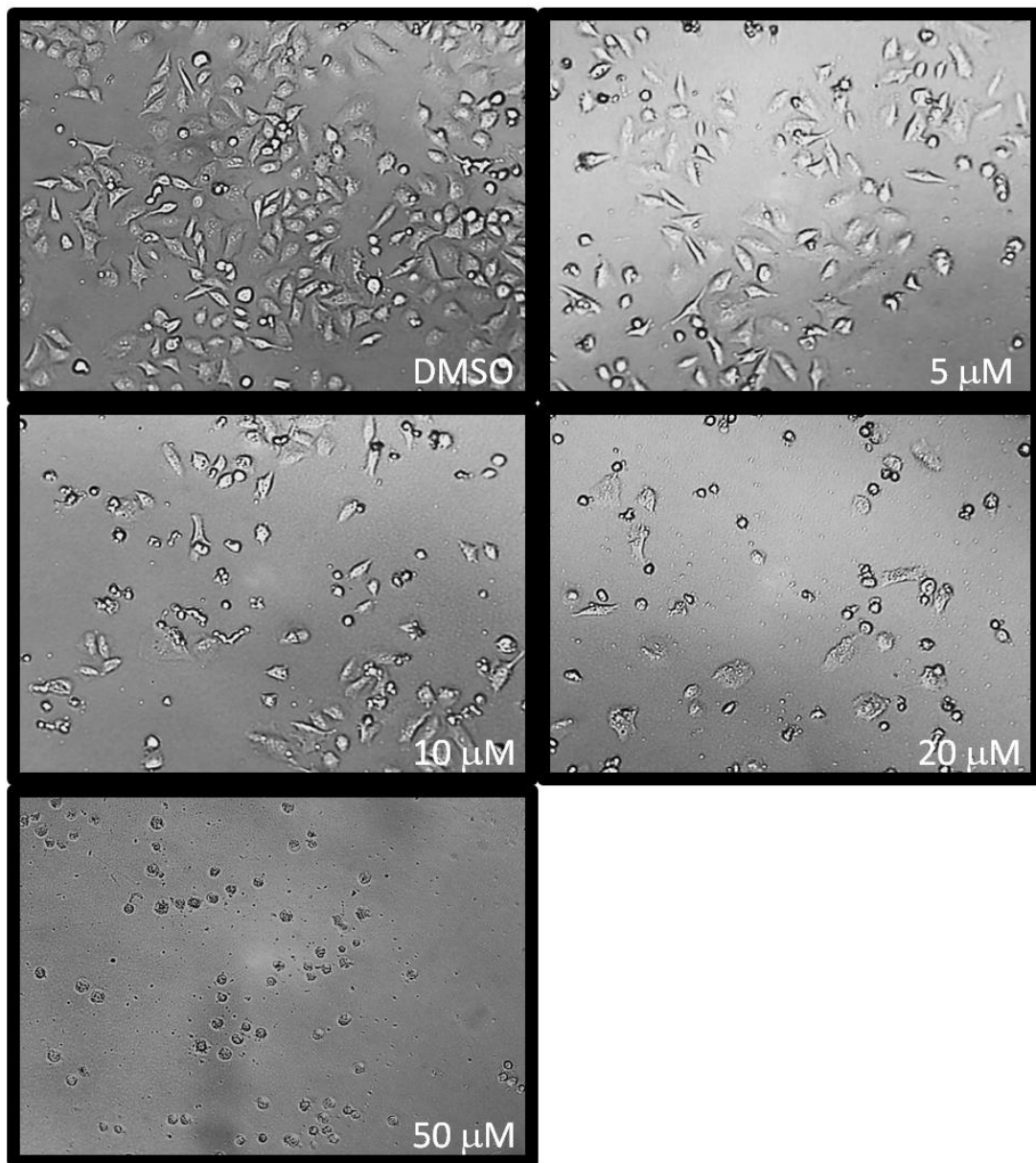


圖 2、MKN45 胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及不同濃度熊果酸實驗組 48 小時後顯微鏡下細

胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

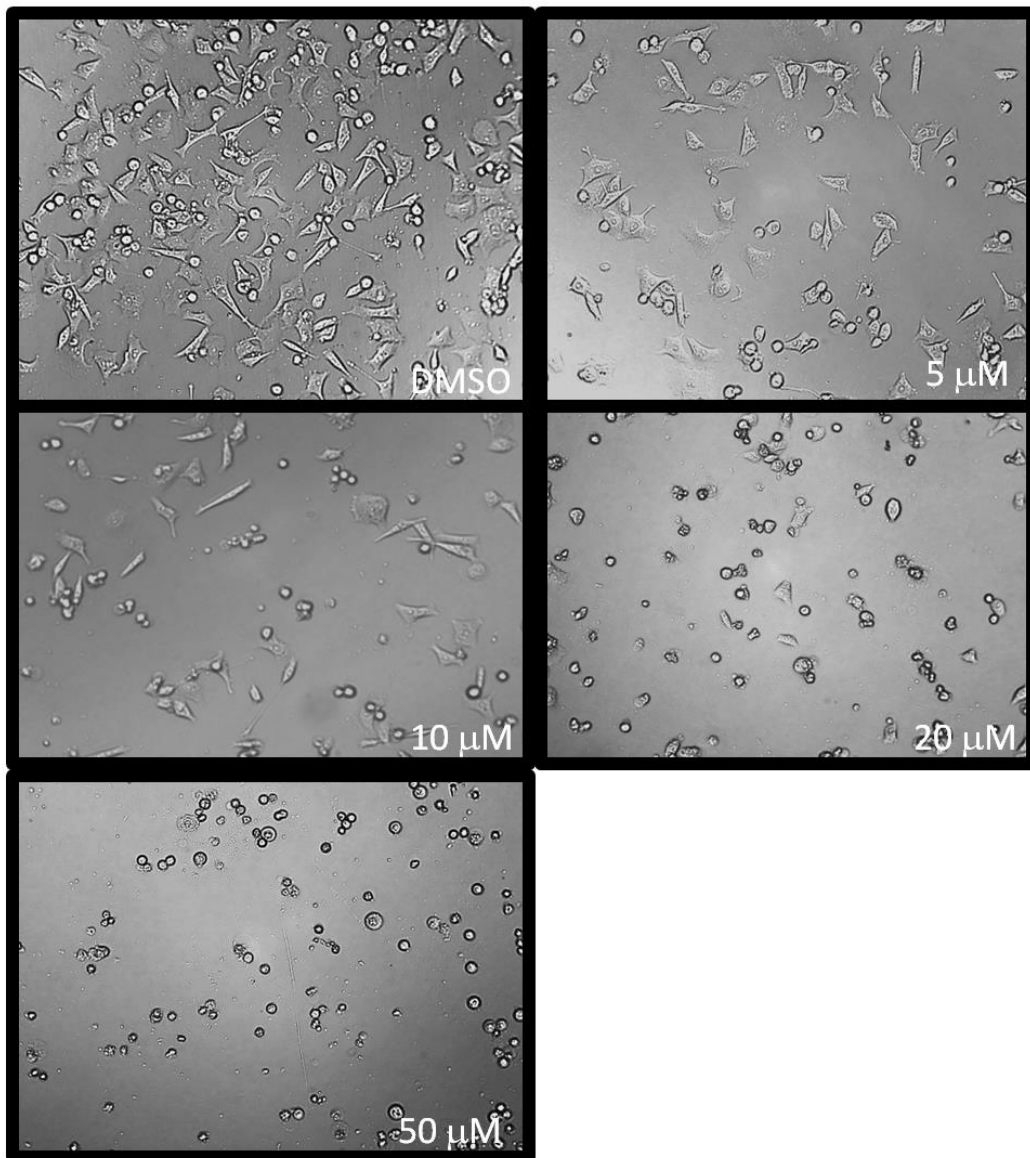


圖 3、SCM-1 胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及不同濃度熊果酸實驗組 48 小時後顯微鏡下細胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

## (二) 分析胃癌細胞於不同濃度熊果酸環境之下，於不同時間的細胞存活率

觀察加入熊果酸 5  $\mu\text{M}$  至胃癌細胞，在不同時間後，隨著熊果酸作用的時間增加，細胞存活率有明顯下降趨勢。同樣的效應也出現在於 10、20 及 50  $\mu\text{M}$  等不同實驗濃度組別中。此實驗證實熊果酸在胃癌細胞時間作用越長，其毒殺效果越強 ( $p < 0.001$ )。同樣熊果酸處理 MKN45 (圖 4A)和 SCM-1 (圖 4B) 細胞 12 小時之後，熊果酸濃度越高，其細胞存活率有明顯的下降。同樣的趨勢也出現在於 24 及 48 小時等不同時間狀況下。因此可以確認熊果酸作用

濃度越高，時間愈長，對胃癌細胞毒殺效果越為明顯。

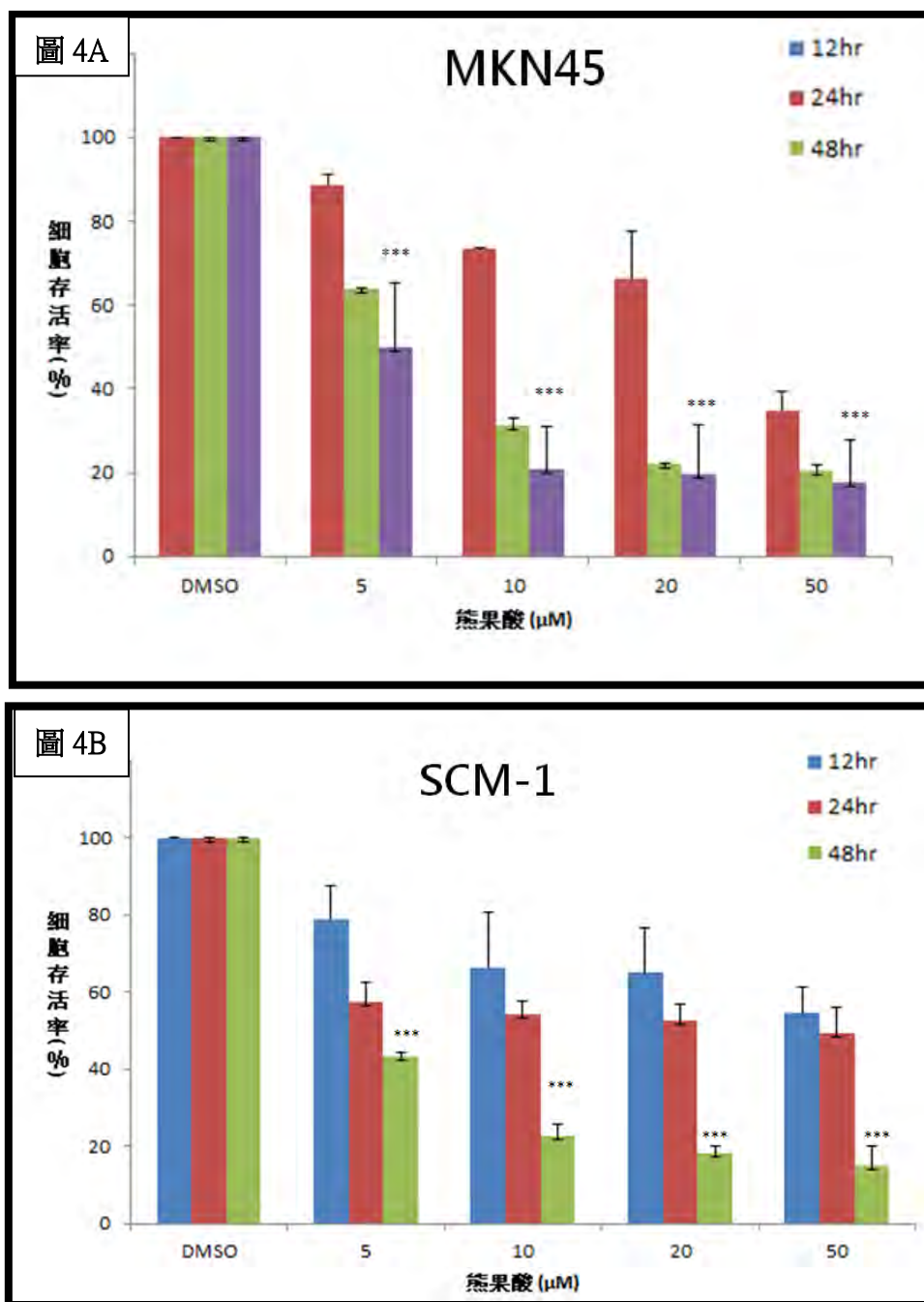


圖 4、MKN45 (A)及 SCM-1 (B)胃癌細胞株於加入不同濃度熊果酸後，在 12、24 及 48 小時的細胞存活率 (\*\*\*)為  $p < 0.001$ )

### (三)熊果酸抑制 Stat3 活性及其下游的訊息傳遞路徑

此實驗利用兩株胃癌細胞，分別為加 5 μM 熊果酸的實驗組，及 DMSO 溶劑控制組，培養 6 小時後電泳圖 (圖 5)。實驗顯示經 5 μM 熊果酸處理後之胃癌細胞，其 Stat3 訊號傳遞路徑的相關蛋白質，包括 p-Stat3、Stat3、c-Myc 及 Cyclin D1 的表現量均明顯下降。

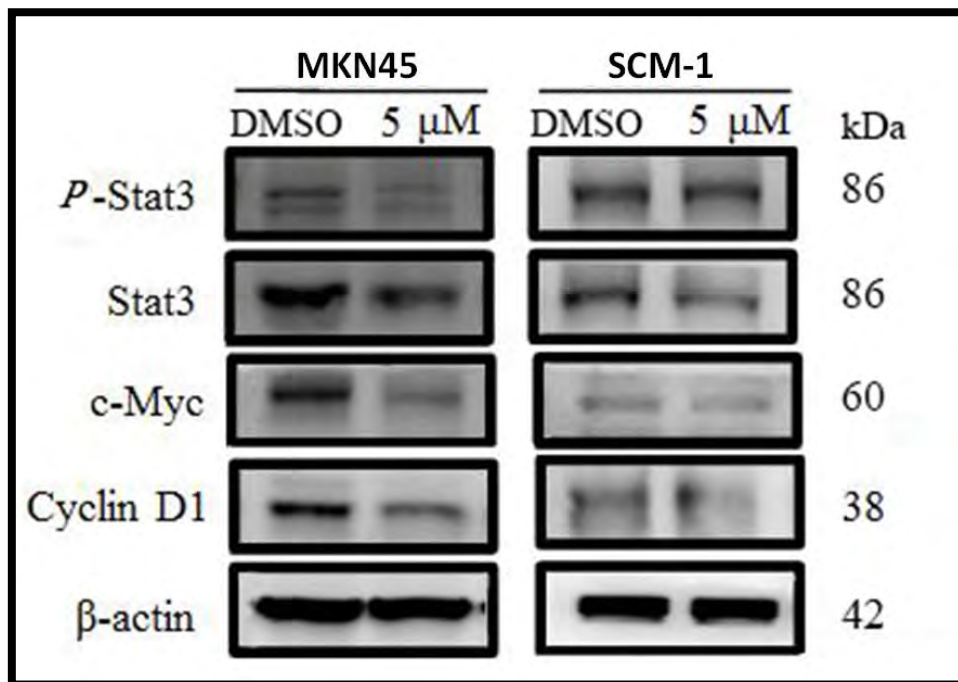


圖 5、以西方墨點法分析熊果酸作用 6 小時，對 MKN45 及 SCM-1 胃癌細胞之 Stat3 訊號傳遞路徑相關蛋白質表現之影響 (DMSO 溶劑控制組及加入 5  $\mu$ M 熊果酸組； $\beta$ -actin 是細胞內恆定蛋白質，在此作為對照基準來比較)。

#### (四)熊果酸對胃癌細胞內凋亡蛋白質表現的影響

此實驗利用兩株胃癌細胞，分別為加 5  $\mu$ M 熊果酸的實驗組，及 DMSO 溶劑控制組，培養 24 小時後電泳圖發現：經 5  $\mu$ M 熊果酸處理後之胃癌細胞，相較於未經熊果酸處理的對照組，其細胞凋亡相關蛋白質有明顯差異。由圖 6 的電泳圖可發現，促凋亡的蛋白質 Bax 及 Bak 表現量經處理後會有顯著上升，而抗凋亡的蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-x1 之表現量則有下降的趨勢。



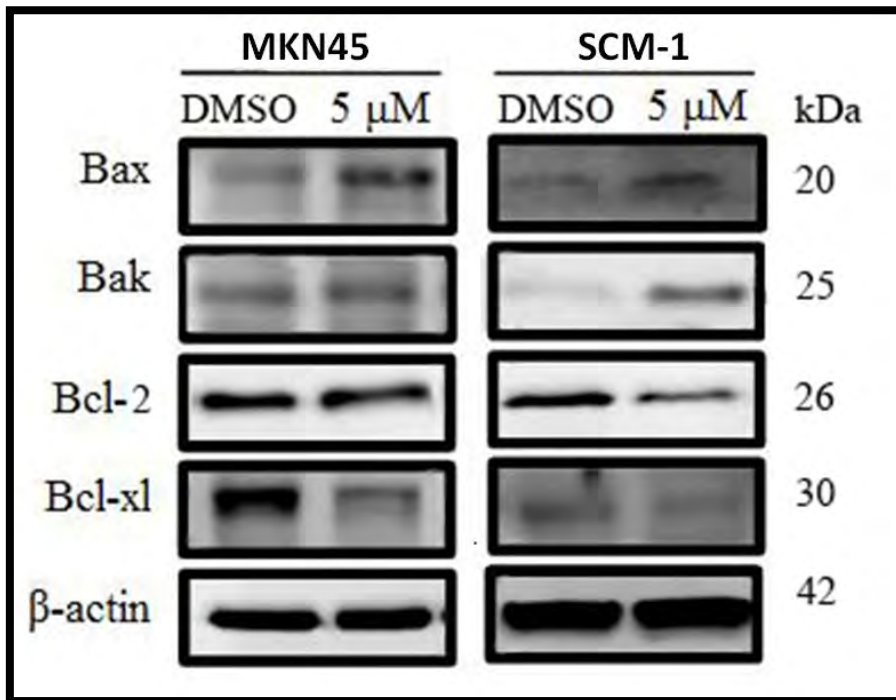


圖 6、以西方墨點法分析熊果酸作用 24 小時，對 MKN45 及 SCM-1 細胞凋亡相關蛋白質之影響 (DMSO 溶劑控制組及加入 5  $\mu$ M 熊果酸組； $\beta$ -actin 是細胞內恆定蛋白質，在此作為對照基準)。

## 二、順鉑併用熊果酸對胃癌細胞有抑癌的作用

### (一) 順鉑併用熊果酸顯微鏡下觀察細胞形態變化

加入順鉑 4 小時後，再加入熊果酸，反應 24 小時後，觀察胃癌細胞形態上的變化，發現合併使用 20  $\mu$ M 順鉑及 10  $\mu$ M 熊果酸共同處理胃癌細胞後，相較於只加入 DMSO 的對照組、20  $\mu$ M 順鉑 28 小時或僅使用 10  $\mu$ M 熊果酸 24 小時的實驗狀況下，其細胞數目顯著減少。合併處理情形時，大量細胞會顯現不完整細胞形態、細胞膜皺縮及空泡化現象。圖 7 與圖 8 分別為 MKN45 及 SCM-1 細胞的結果。

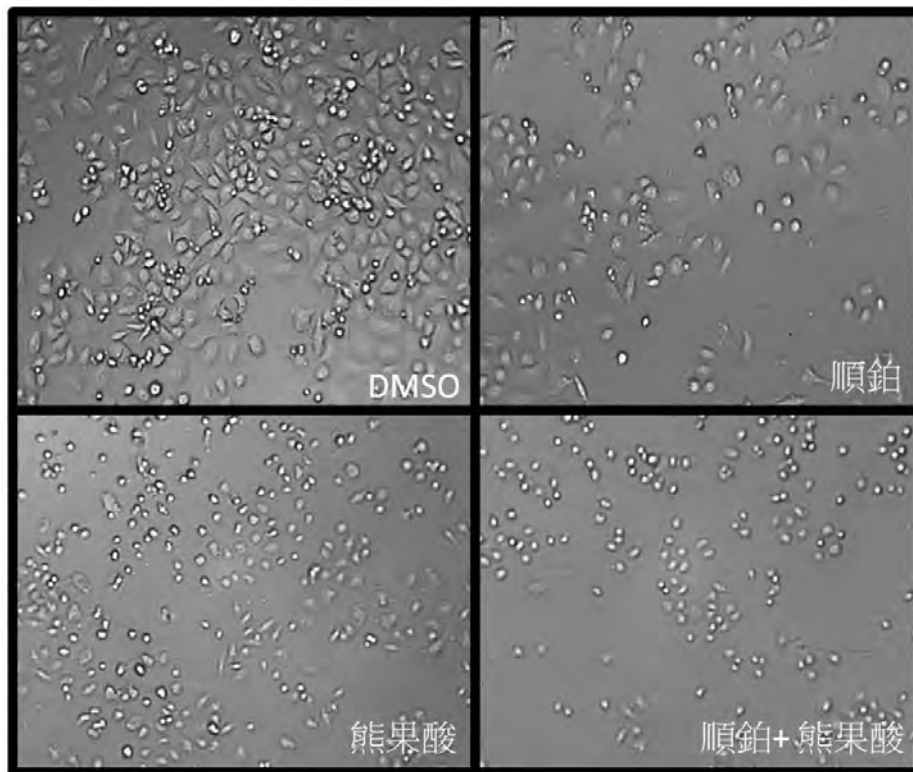


圖 7、MKN45 細胞使用順鉑 (20  $\mu\text{M}$ , 28 小時)及熊果酸 (10  $\mu\text{M}$ , 24 小時)及以順鉑先處理 4 小時再加入熊果酸 24 小時之後，分別於顯微鏡下觀察細胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

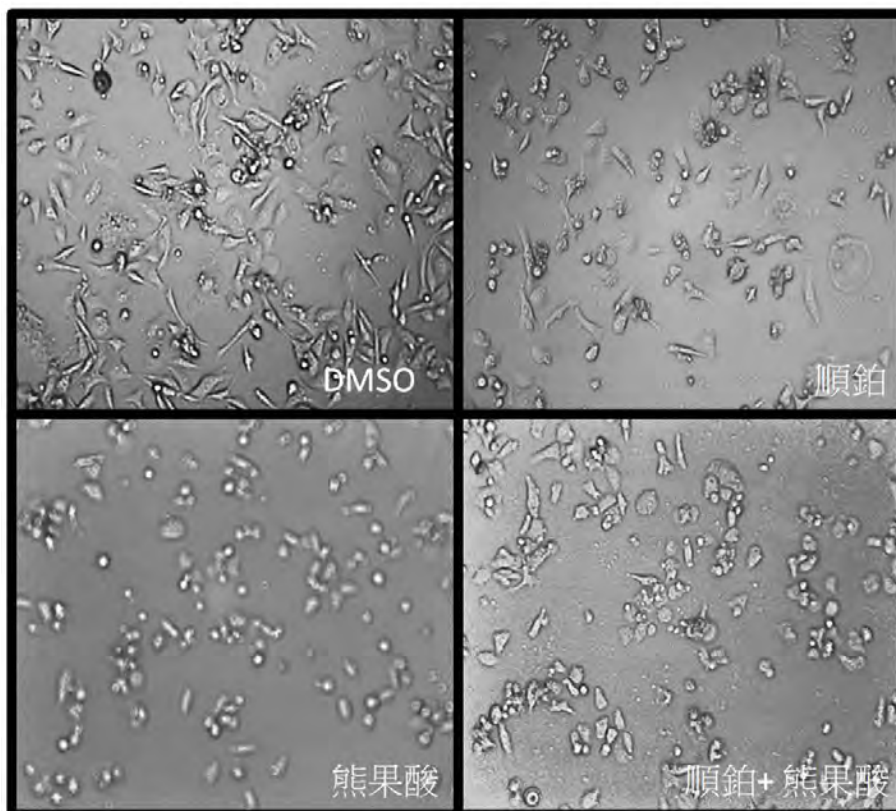


圖 8、SCM-1 細胞使用順鉑 (20  $\mu\text{M}$ , 28 小時)及熊果酸 (10  $\mu\text{M}$ , 24 小時)及以順鉑先處理 4 小時再加入熊果酸 24 小時之後，分別於顯微鏡下觀察細胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

(二)、熊果酸合併使用順鉑之後對細胞存活率的影響：

本實驗在含有胃癌細胞的 96 孔盤內先加入 0、2.5、5、10 及 20  $\mu\text{M}$  的順鉑 4 小時後，再加入 0、2.5、5 及 10  $\mu\text{M}$  的熊果酸，培養 24 小時後，使用 SRB assay 檢測的吸光值並計算細胞相對存活率。隨著順鉑濃度的上升，胃癌細胞 MKN45 (圖 9A)和 SCM-1 (圖 9B)細胞存活率有明顯下降的趨勢 ( $p < 0.001$ )。但是也發現順鉑與熊果酸併用時，在同一濃度的順鉑作用下，若搭配的熊果酸濃度越高，胃癌細胞的存活率越低。推測順鉑搭配熊果酸對毒殺胃癌細胞有相輔相成的效果。

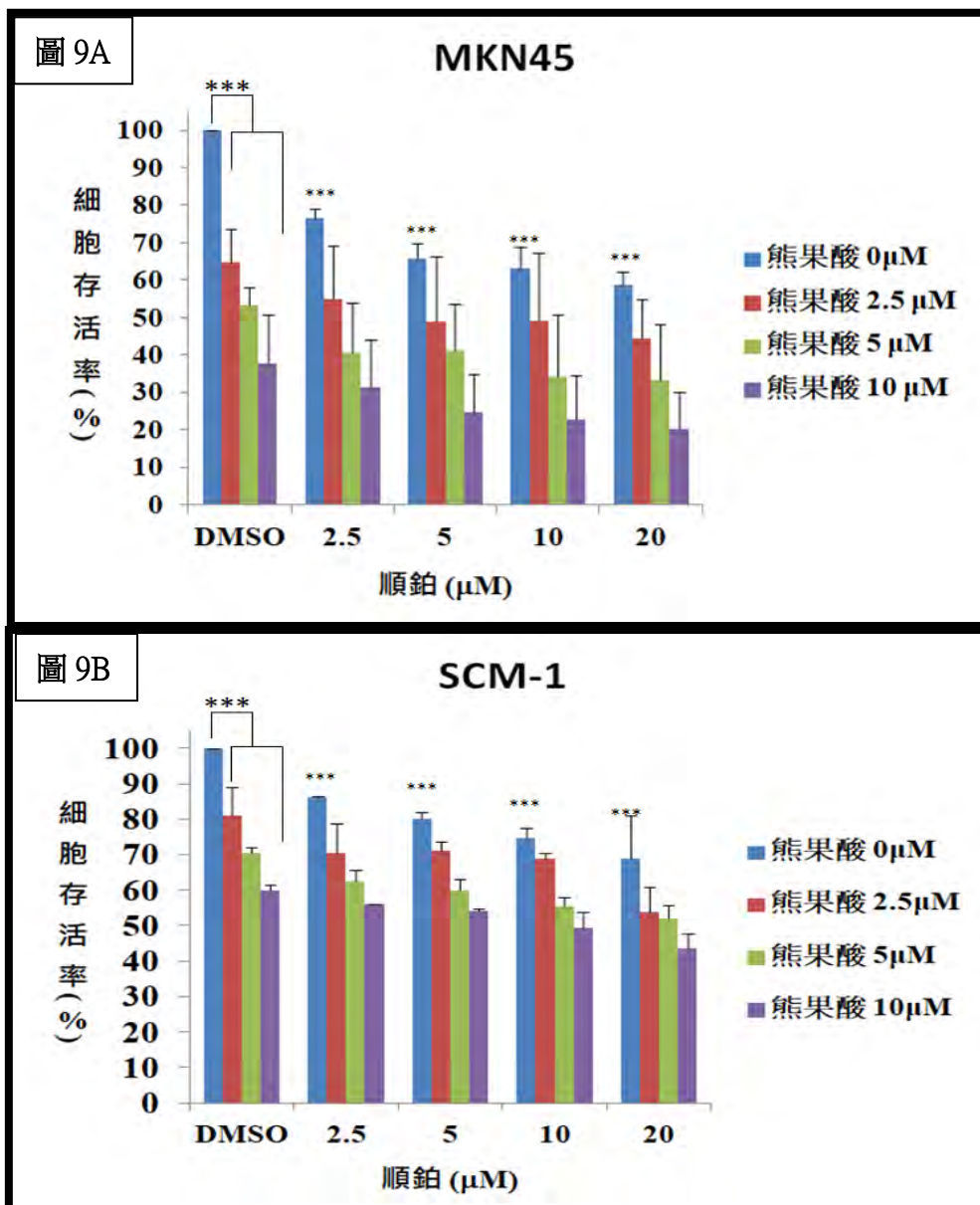


圖 9、MKN45 (A)及 SCM-1 (B)胃癌細胞株合併使用順鉑及熊果酸，在不同濃度下的細胞存活率 (\*\*\*) $p < 0.001$ )

### (三)周塔氏藥物合併指數分析順鉑合併熊果酸對胃癌細胞有協同作用

為了進一步瞭解這兩種藥物輔助的效果，實驗利用 SRB assay 結果，換算出每一實驗組別之細胞死亡率 (Fa)後，再以 ComboSyn 程式計算出熊果酸與順鉑的 CI 值 (表二)。由 CI plot 結果顯示，當兩種藥物聯合應用時，MKN45 細胞 (圖 10A)的 CI 值較 SCM-1 細胞 (圖 10B)為低；再由 Normalized Isobologram for Combination 的每一個點顯示，其比值皆落在三角範圍內，證實兩者藥物合併使用，會造成協同作用，而 MKN45 細胞 (圖 11A)的比值較 SCM-1 細胞 (圖 11B)為廣。

表二、MKN45 及 SCM-1 胃癌細胞株在加入不同濃度的熊果酸及順鉑後，所得到的細胞死亡率 (Fa)，以 ComboSyn 程式計算出的 CI。

MKN45	熊果酸 ( $\mu\text{M}$ )	順鉑 ( $\mu\text{M}$ )	Effect (Fa)	CI	SCM-1	熊果酸 ( $\mu\text{M}$ )	順鉑 ( $\mu\text{M}$ )	Effect (Fa)	CI
Point1	2.5	2.5	0.45	0.66421	Point1	2.5	2.5	0.28	0.70751
Point2	2.5	5.0	0.49	0.59601	Point2	2.5	5.0	0.30	0.75615
Point3	2.5	10.0	0.52	0.59342	Point3	2.5	10.0	0.33	0.82220
Point4	2.5	20.0	0.56	0.58212	Point4	2.5	20.0	0.46	0.46560
Point5	5.0	2.5	0.59	0.59647	Point5	5.0	2.5	0.39	0.61093
Point6	5.0	5.0	0.57	0.68948	Point6	5.0	5.0	0.41	0.59667
Point7	5.0	10.0	0.66	0.44196	Point7	5.0	10.0	0.44	0.58133
Point8	5.0	20.0	0.67	0.45335	Point8	5.0	20.0	0.49	0.53582
Point9	10.0	2.5	0.69	0.68651	Point9	10.0	2.5	0.44	0.87439
Point10	10.0	5.0	0.75	0.48109	Point10	10.0	5.0	0.46	0.81808
Point11	10.0	10.0	0.77	0.42584	Point11	10.0	10.0	0.51	0.66551
Point12	10.0	20.0	0.80	0.34834	Point12	10.0	20.0	0.56	0.56012

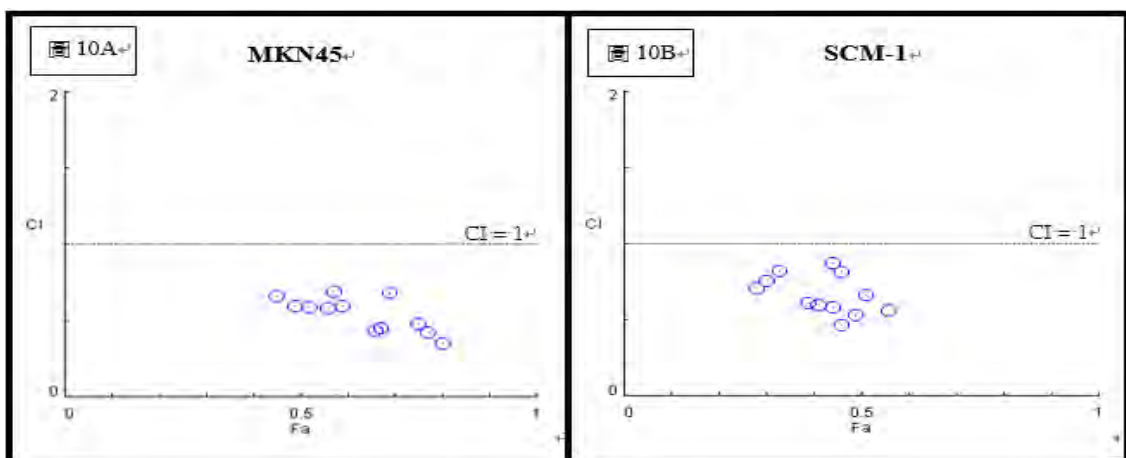


圖 10、MKN45 (A)及 SCM-1 (B)經熊果酸及順鉑合併處理之周塔氏藥物合併指數劑量反應曲線圖 (CI Plot)

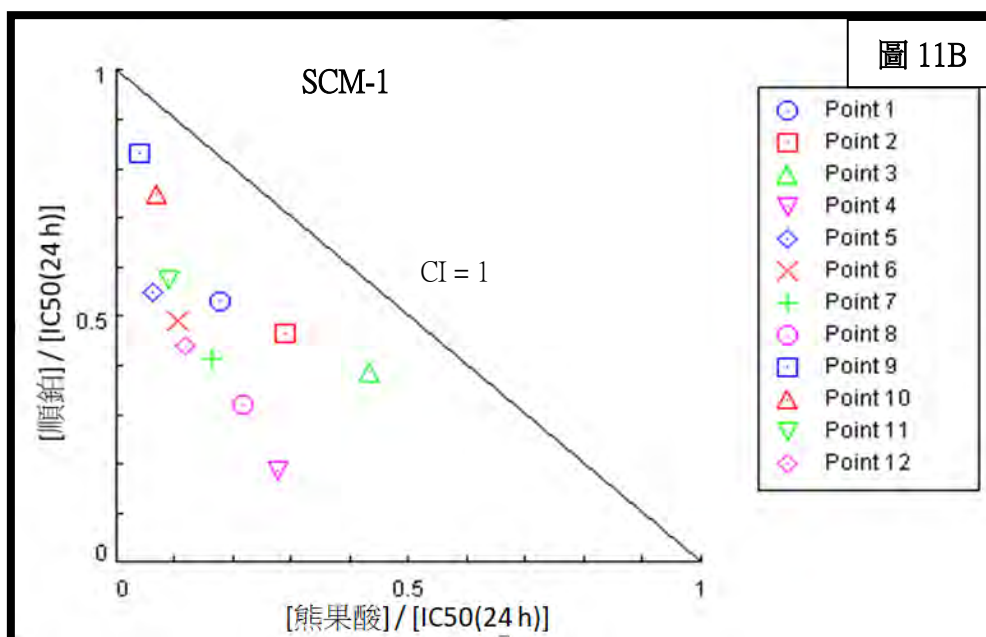
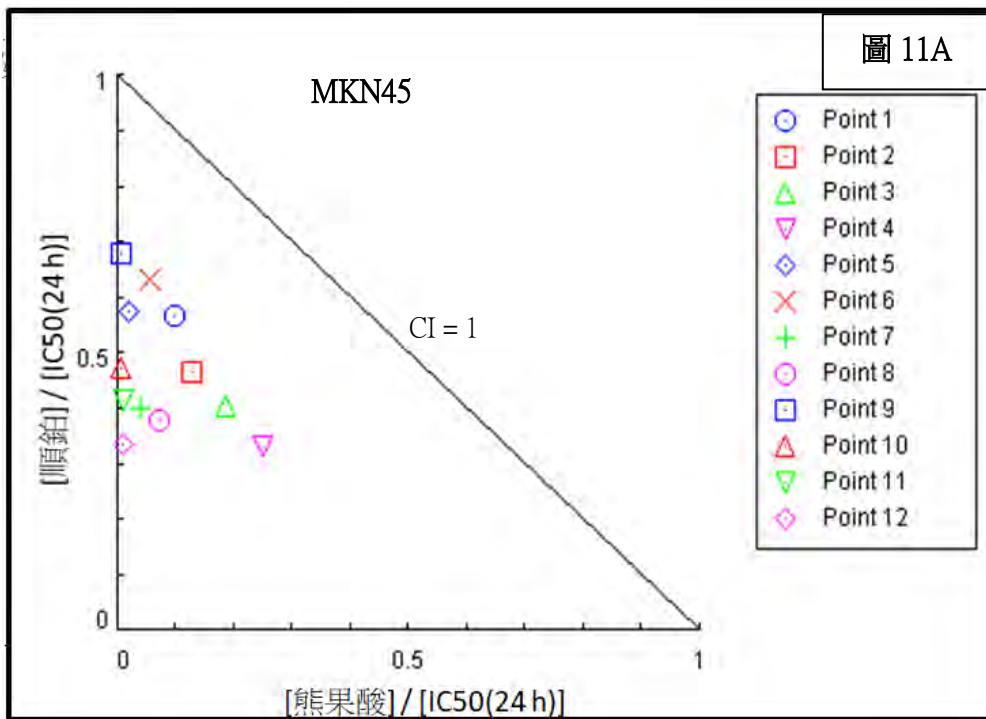


圖 11、MKN45(A)及 SCM-1(B)熊果酸及順鉑合併處理的藥物聯用效應圖 (Normalized Isobologram for Combination)

## 陸、 討論

根據本研究目的所設定的兩個研究目標，分別進行討論：

**研究目標一：熊果酸對胃癌細胞生長的影響，並檢測細胞凋亡相關蛋白質的變化。**

由顯微鏡觀察發現，熊果酸會造成 MKN45 與 SCM-1 兩株胃癌細胞存活率下降，使細胞形態產生皺縮及空泡化，而且在存活細胞數及細胞形態均有明顯變化。由 SRB 細胞存活率分析以 0 至 50  $\mu\text{M}$  熊果酸處理人類 MKN45 及 SCM-1 胃癌細胞，觀察其毒殺效果。結果顯示當同一濃度熊果酸作用下，反應時間越長，細胞存活率越低，證實有時間依存效應 (time-dependent manner)。此外也發現同一作用時間，熊果酸濃度越高，細胞存活率越低，明顯的顯示濃度依存效應 (dose-dependent manner)。以上結果證實：熊果酸有明顯的抑制胃癌細胞增殖的效應，並且促成細胞凋亡。且有研究指出，白花蛇舌草可以用來治療胃疾[1]，這個結果顯示證實了這個說法。

進一步探討胃癌細胞凋亡之相關蛋白質變化。以劑量 5  $\mu\text{M}$  之熊果酸處理的胃癌細胞，在 6 小時及 24 小時兩個時間點，收集蛋白質使用西方墨點法觀察熊果酸對胃癌細胞造成的相關機制。在反應 6 小時的電泳圖發現，熊果酸可顯著抑制胃癌細胞內 Stat3 訊號傳遞路徑之相關蛋白，包括 *p*-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D1 蛋白質，進而抑制癌細胞生長 (圖 5)；而反應 24 小時的結果發現，抗凋亡的蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-x1 的表現量降低，而促凋亡的蛋白質 Bax 及 Bak 的表現量增加 (圖 6)。胃癌細胞的癌化轉型是屬於多步驟的過程，而 Stat3 是細胞內重要的致癌基因，它可以調控胃癌細胞增殖[9]；人類胃癌細胞中的 *p*-Stat3 與腫瘤侵襲性及病人的存活預後有密切關係[10]，另一方面，熊果酸可抑制多發性骨髓瘤[6]、肝癌細胞[8]及腎細胞癌與乳癌[5]的生長，並且造成細胞凋亡，其主要機制是抑制 Stat3 訊息傳遞路徑；甚至在動物實驗也證實熊果酸可以毒殺子宮頸癌細胞[7]。實驗證實，細胞凋亡是熊果酸造成胃癌細胞死亡的主要原因，其調控胃癌細胞之分子機制的確是藉由抑制 Stat3 訊息傳遞路徑，降低抗凋亡的蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-x1，而且促進凋亡的蛋白質 Bax 及 Bak 的上升 (圖 12)。

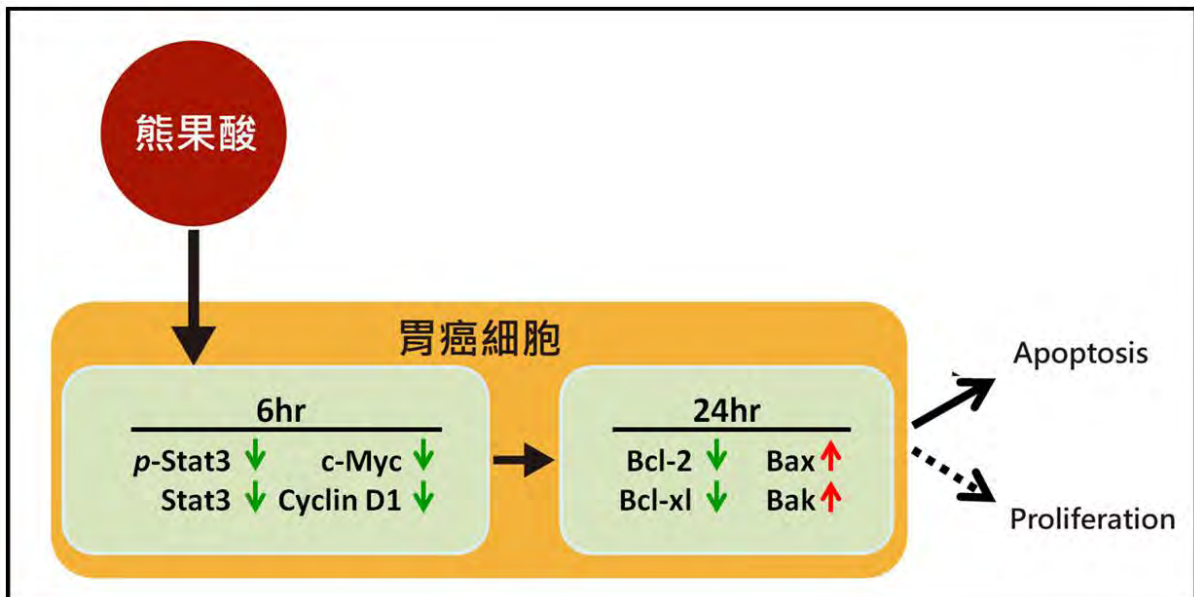


圖 12、熊果酸促進胃癌細胞凋亡的路徑。熊果酸藉由抑制胃癌細胞中 *p*-Stat3、Stat3、c-Myc 及 Cyclin D1 路徑，進而降低抗凋亡蛋白質 Bcl-2 及 Bcl-xl，增加促凋亡蛋白質 Bax 與 Bak，而達到促進胃癌細胞凋亡及抑制增殖的效應。

研究目標二：熊果酸併用順鉑對胃癌細胞是否有協同抑癌的作用。

由本研究結果證實，熊果酸的確能增強胃癌細胞對藥物的敏感性，也就是增強化療藥物順鉑的治療效果，達到多種藥物共同治療的協同作用。

對於使用熊果酸來增強抗癌化學治療藥物效果的研究，過去使用熊果酸來治療多發性骨髓瘤的文章中指出，熊果酸可增強化學治療藥物的效果 (chemosensitization)[6]，與本研究結果一致。

本研究主要是探討熊果酸對胃癌細胞之抗腫瘤效應及凋亡機制，實驗僅使用於細胞實驗。其結果是否能推廣至人體使用，仍需加入後續的動物實驗及臨床試驗，以證實其有效性及安全性。

## 柒、 結論

胃癌是國內常見的消化道惡性腫瘤，本研究發現熊果酸能有效抑制胃癌細胞的增長，證實它能對胃癌細胞 MKN45 及 SCM-1 有明顯毒殺的效果。實驗觀察細胞形態與數量的改變，並且以 SRB 分析細胞存活率，皆證實熊果酸能抑制胃癌細胞生長。由西方墨點法發現，熊果酸能促使胃癌細胞中的 stat3 下降，促細胞凋亡的蛋白質表現上升，抗細胞凋亡的蛋白質表現下降，證實熊果酸能誘導細胞凋亡。由周塔氏藥物合併指數分析顯示，若合併熊果酸與目前

胃癌常用藥物順鉑，可以達到協同的效果，這項結論也證實白花蛇舌草的藥效與熊果酸相關。若能再做進一步開發研究，對這個成分於胃癌的治療上，應該有相當程度的潛力。

## 參考資料及其他

1. 董筠。2017。基於數據挖掘探討周仲瑛治療胃癌術後轉移的用藥規律分析。江南中醫藥 49(6):62-65.
2. Wei MC, *et al.* 2015. Determination of oleanolic and ursolic acids in *Hedyotis diffusa* using hyphenated ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and chromatography. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Article ID 450547:1-10.
3. Xiao S, *et al.* 2016. Subcritical water extraction of ursolic acid from *Hedyotis diffusa*. *Appl. Sci* (7)187:1-13.
4. Chen R, *et al.* 2016. The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics. *Molecules* 30;21(6):710.
5. Li W, *et al.* 2017. Ursolic acids derivative FZU-03,010 inhibits STAT3 and induces cell cycle arrest and apoptosis in renal and breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 49(4):367-373.
6. Pathak AK, *et al.* 2007. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res* 5(9):943-955.
7. Wang S, *et al.* 2017. Ursolic acids nanoparticles inhibit cervical cancer growth in vitro and in vivo via apoptosis induction. *Int J Oncol* 50(4):1330-1340.
8. Liu T, *et al.* 2017. Inhibition of STAT3 signaling pathway by ursolic acid suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 51(2):555-562
9. Kanda N, *et al.* 2004. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 17;23(28):4921-4929.
10. Yakata Y, *et al.* 2007. Expression of p-Stat3 in human gastric carcinoma: significant correlation in tumour invasion and prognosis. *Int J Oncol* 30(2):437-442.
11. Chou TC, *et al.* 2011. The mass-action law-based algorithms for quantitative econo-green bio-research (Perspective article). *Integrative Biol* 3:548-559.



## 【評語】 052007

本研究分析百花蛇草中主要熊果酸成分是否具有抗癌作用，其作用機轉可抑制人類胃癌細胞 MKN45 及 CCM-1 之生長，其作用機轉經分析能促進細胞凋亡，熊果酸處理後的癌細胞 P-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D 等基因的表現量皆會下降，且抗細胞凋亡的蛋白質 Bcl-2 及 Bcl-X-1 表現量也有下降的趨勢。此外，分析中藥與西藥合併使用之分析亦得到具體研究結果。本計畫成果佳，但類似的實驗已經有多篇文獻被報導，若參考下列這些文獻找出新的研究方向能有較佳開創性(*Oncotarget*. 2017 Oct 6;8(54):92770-92777., *Oncol Res*. 2014;22(5-6):267-73., *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0133169., *Oncol Lett*. 2015 Feb;9(2):897-902.)。

# 摘要

胃癌的治療方式為手術及化學藥物治療為主。本研究目的是探討熊果酸(Ursolic acid)對於胃癌細胞的抗腫瘤作用。研究使用兩株人類胃癌細胞MKN45及SCM-1。當加入熊果酸後，顯微鏡下觀察細胞數目會減少。由SRB方法證明熊果酸會降低細胞存活率，由流式細胞儀可證實熊果酸可促使細胞走向凋亡。西方墨點法實驗發現：熊果酸會誘導促細胞凋亡蛋白質Bax及Bak的表現，使抗細胞凋亡蛋白質Bcl-xl及Bcl-2降低，也會抑制p-Stat3/ c-Myc/ Cyclin D1訊息傳遞途徑，從而阻斷了促進細胞存活的基因表現。另外也研究熊果酸併用化療藥物順鉑對胃癌細胞存活率的影響，由周塔氏藥物合併指數定理可證明，熊果酸作為輔劑，對胃癌細胞抑制具有協同效應，故熊果酸具有潛力成為新的治療方式，也更證實中草藥白花蛇舌草的藥效。

## 壹、研究動機

根據衛生福利部的統計，國人十大死因之首為惡性腫瘤，其中胃癌為癌症死亡率排名之第七位，是我國常見的消化道惡性腫瘤。目前胃癌的主要治療方式為手術合併化學藥物治療，如：順鉑。但胃癌復發率高且易轉移，致使病人的存活率低。近年來臨床上發現，中西藥搭配使用能有效降低副作用甚至抑制癌細胞，但傳統中草藥複方，較少純化其有效成分分析，因此本研究嘗試由中草藥尋找其中有效的成分作為可能的臨床運用。

## 貳、研究目的

### 一、背景

白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa*)為中醫治療胃疾的常用藥物之一；其中的有效成分之一熊果酸具有增強免疫、抗發炎及促進癌細胞凋亡活性，且熊果酸的抗腫瘤效果，它與細胞凋亡(apoptosis)及Stat3傳遞路徑有關；另外文獻也指出胃癌細胞中的Stat3表現量與癌細胞的存活有密切的相關。本研究目標是探討熊果酸對胃癌細胞的影響，並釐清其分子機制。(圖1)

### 二、目標

- (一)探討熊果酸對胃癌細胞生長的影響，並檢測細胞凋亡相關蛋白質變化。
- (二)檢視併用熊果酸及順鉑對胃癌細胞是否具有協同抑癌的效應。



圖1、白花蛇舌草

## 參、研究設備及器材

### 一、熊果酸結構式(圖2)

### 二、細胞株及檢驗方法

- (一)細胞株：人類胃癌MKN45和SCM-1細胞株
- (二) Sulforhodamine B (SRB)細胞存活率分析法
- (三) 流式細胞儀
- (四) 西方墨點法

### 三、藥物交互作用分析

周塔氏藥物合併指數定理(Chou-Talalay combination index method)，使用Chou於網路所分享的ComboSyn電腦應用軟體，計算CI (combination index) 指數，分析多種藥物對疾病的交互作用是拮抗、加成或協同。

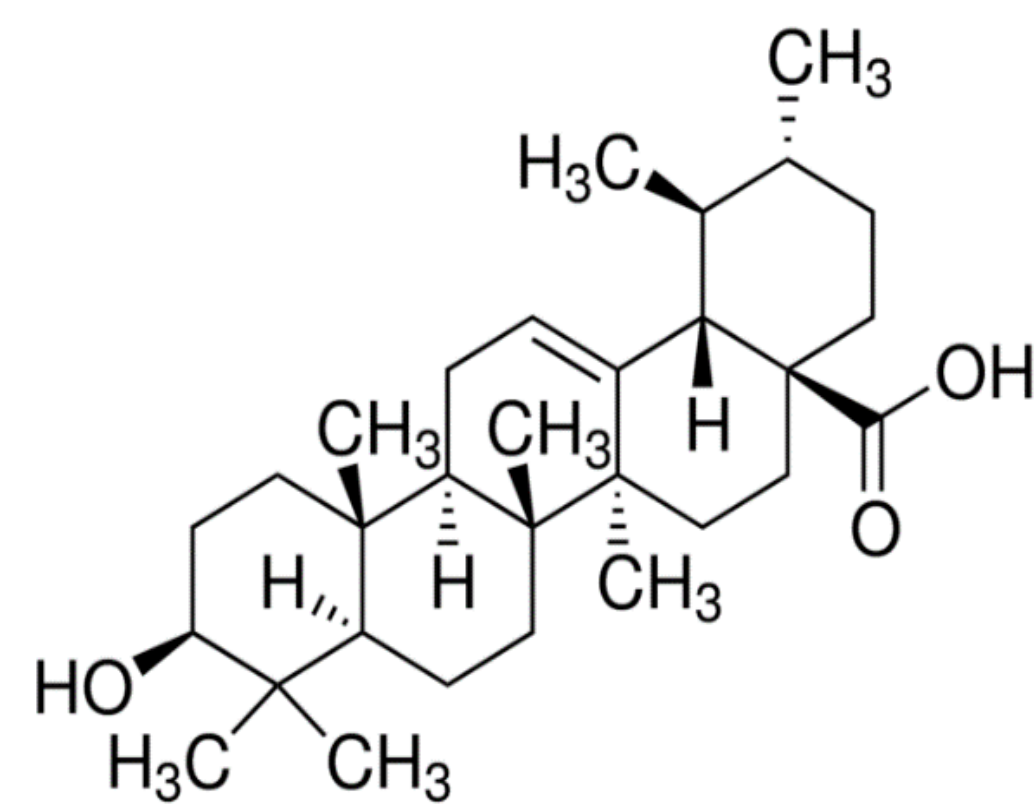


圖2、熊果酸(Ursolic acid)結構式  
分子量：456.70

## 肆、研究過程與方法

### 一、研究架構(圖3)

### 二、細胞培養:解凍及繼代胃癌細胞

### 三、SRB法分析細胞存活率

利用染劑SRB中磺酸基的陰性蛋白質，與細胞內蛋白質的鹼性胺基酸結合，再使用弱鹼溶液萃取出細胞內的SRB，並以酵素免疫分析儀測量吸光值，依據細胞濃度-吸收度檢量線換算，即得知細胞內的蛋白質含量，並以此代表細胞存活率。

### 四、流式細胞儀

利用Annexin V染劑檢測細胞凋亡時會出現之phosphatidyl serine外翻程度，並以7-AAD為核酸染料。依據訊號的多寡將細胞區分為四種狀況，分別為：apoptosis晚期 ( Annexin V + ,7-AAD + )，apoptosis早期 ( Annexin V + ,7-AAD - )，necrosis ( Annexin V - ,7-AAD + ) 與未受影響細胞 ( Annexin V - ,7-AAD - )。

### 五、西方墨點法檢測胃癌細胞凋亡之相關蛋白質

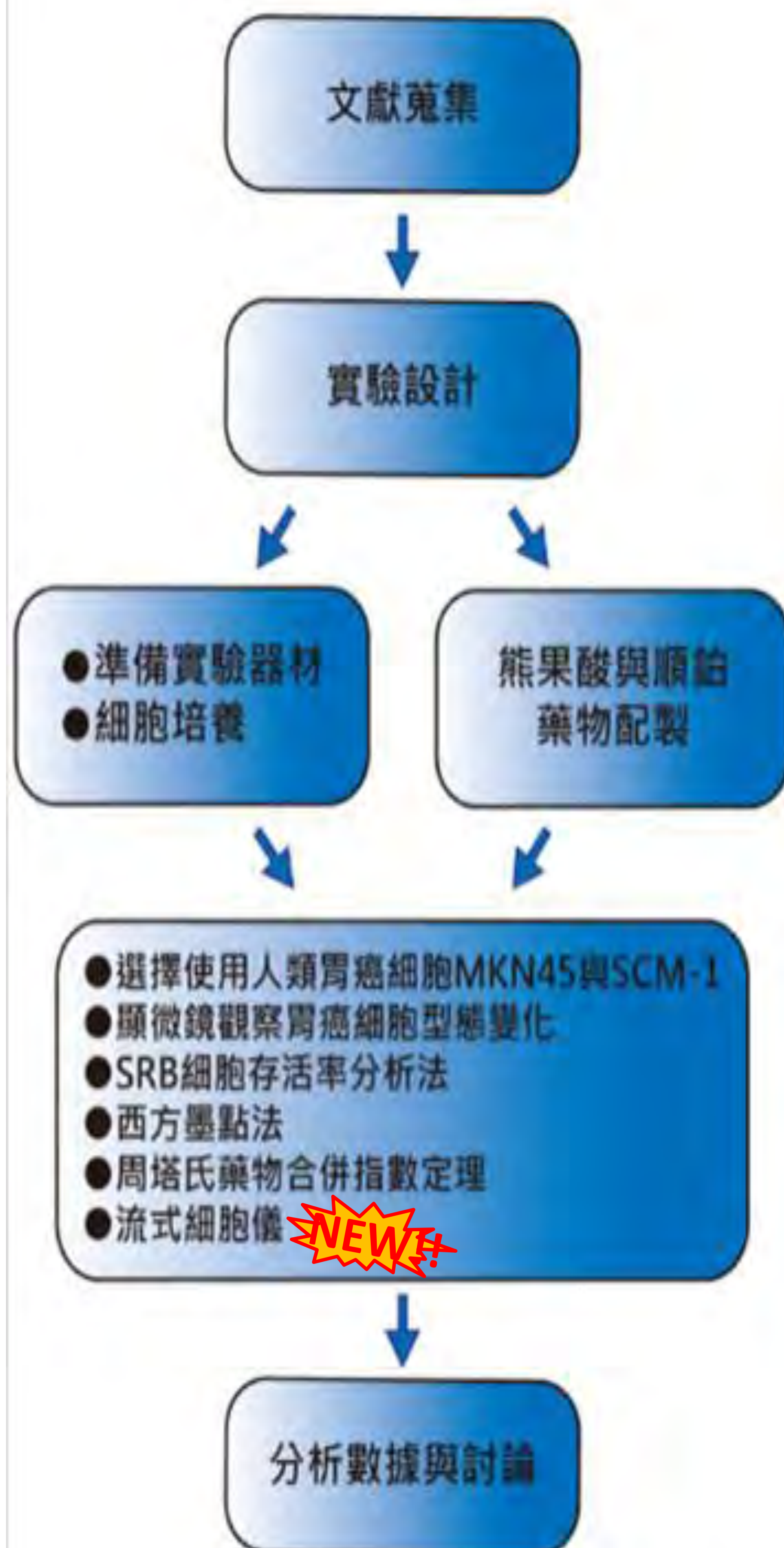
利用SDS-PAGE，將分析樣品中的蛋白質依分子量大小分離之後，再將蛋白質轉漬到PVDF膜上。使用專一性抗體結合目標蛋白，再與帶有HRP的二次抗體結合顯色後，並用冷光影像儀器照相鑑別。透過分析著色的位置和顏色深淺變化，比對樣本中目標蛋白質在樣本中的消長。

### 六、周塔氏藥物合併指數定理檢測熊果酸與順鉑的協同作用

周塔氏藥物合併指數定理是依照Chou-Talalay法分析劑量反應曲線計算CI值來評估兩藥物對於細胞存活率的影響：

$$CI = d1/D1 + d2/D2$$

D1、D2代表單用藥物1和2時產生的死亡率效應時所需的藥物劑量，d1、d2代表聯合應用藥物1和2時產生同等效應時的藥物劑量。CI > 1表示拮抗作用，CI = 1表示加成，CI < 1表示協同作用。

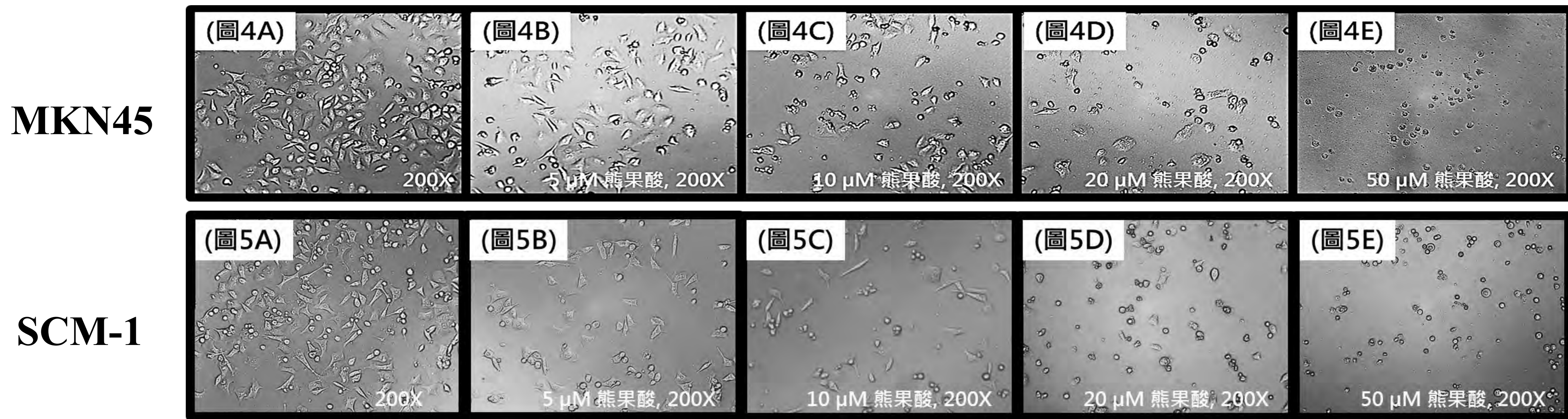


# 伍、研究結果

## 一、檢測熊果酸對胃癌細胞生長的影响及細胞凋亡相關蛋白質的變化

(一)以顯微鏡觀察胃癌細胞加入不同濃度熊果酸的狀況(圖4、圖5)

胃癌細胞48小時後，相較未加藥對照組，細胞數量顯著減少，當濃度越高時，更多的細胞有不完整細胞膜皺縮及空泡化現象。

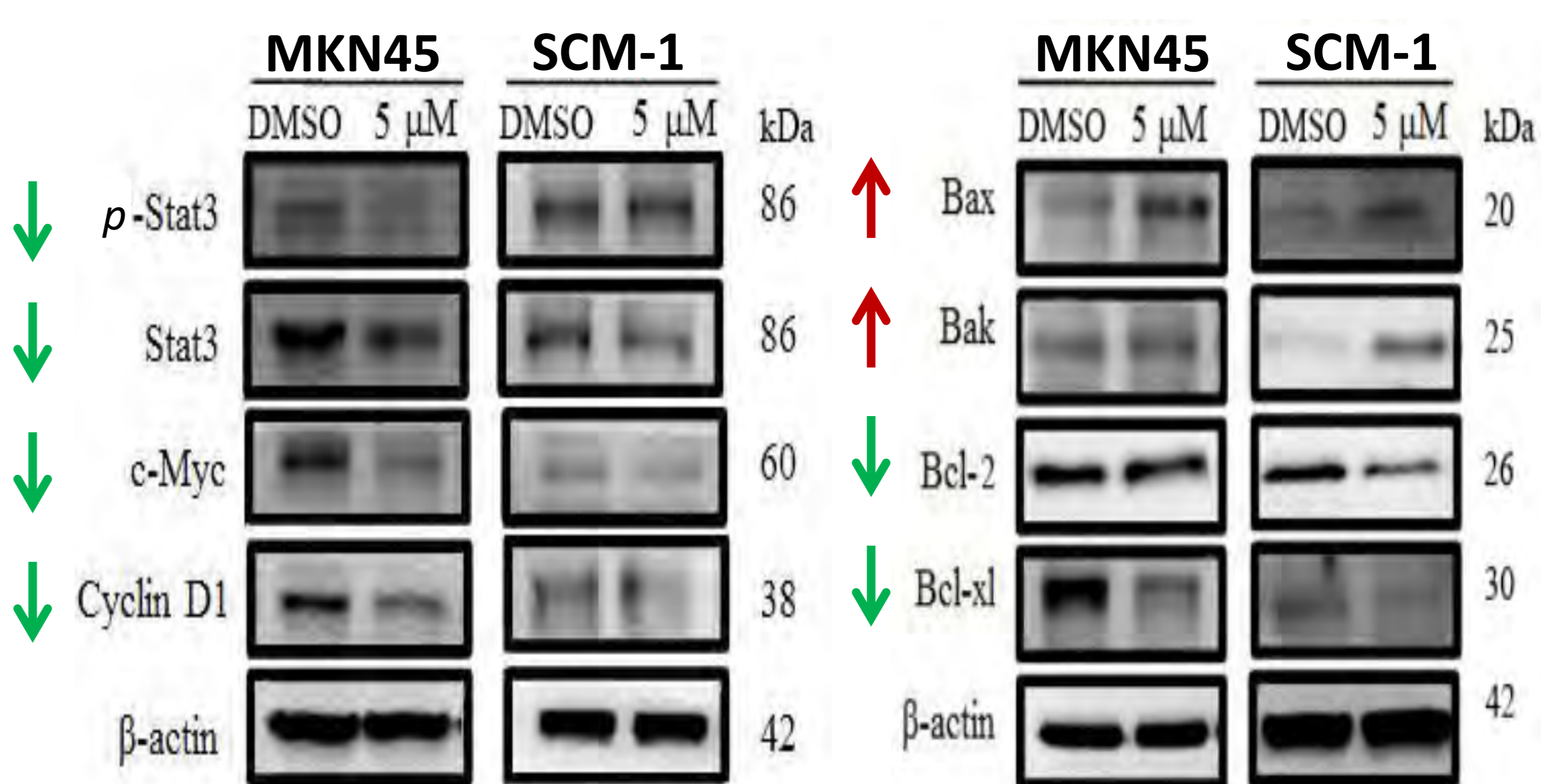
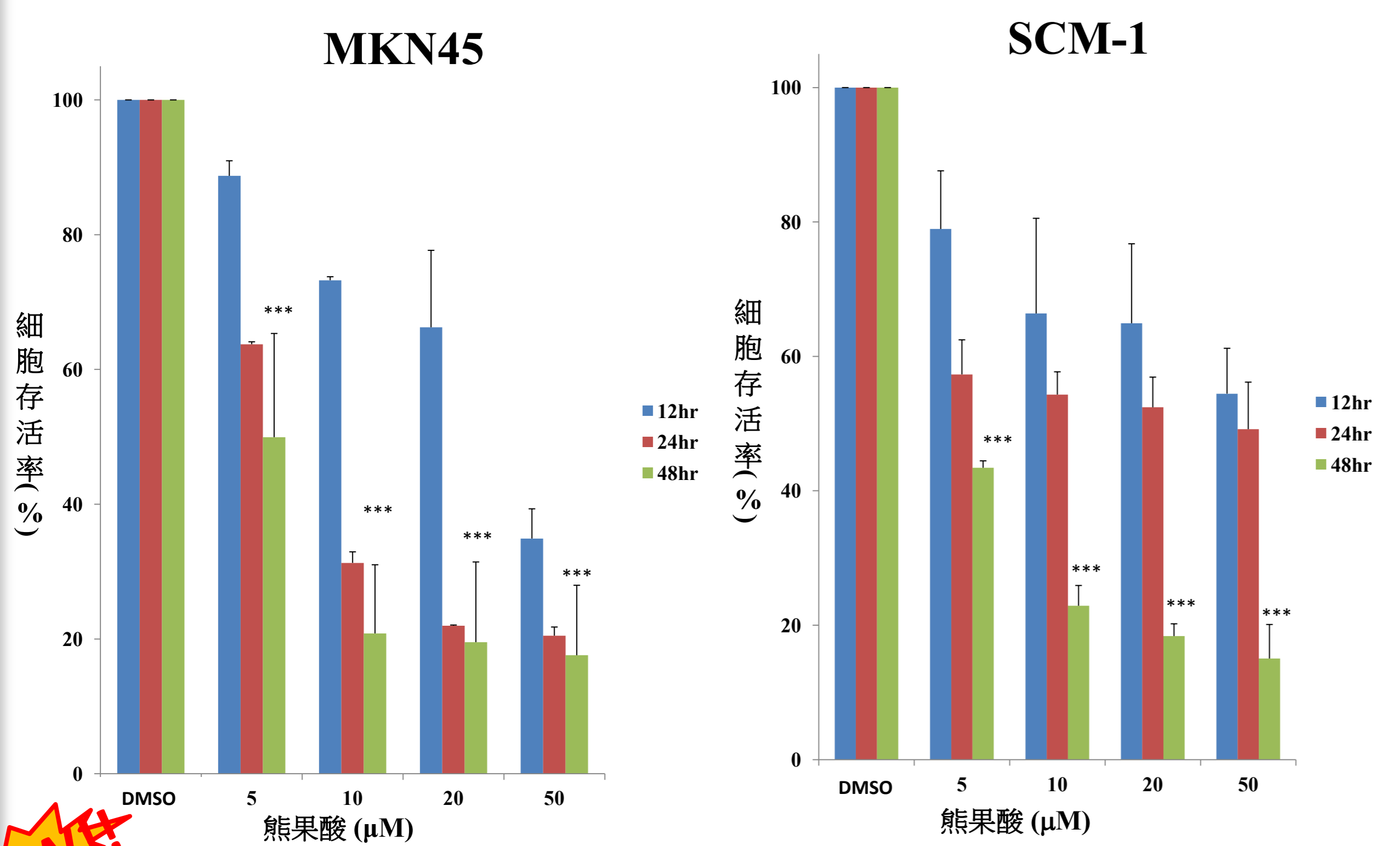


胃癌細胞株MKN45(圖4)及SCM-1(圖5)分別為 DMSO溶劑控制組(4A及5A)，(4B及5B) 5 μM，(4C及5C)10 μM (4D及5D)20 μM (4E及5E)50 μM 熊果酸48小時後，於顯微鏡下細胞生長情形(放大倍率為200倍)。

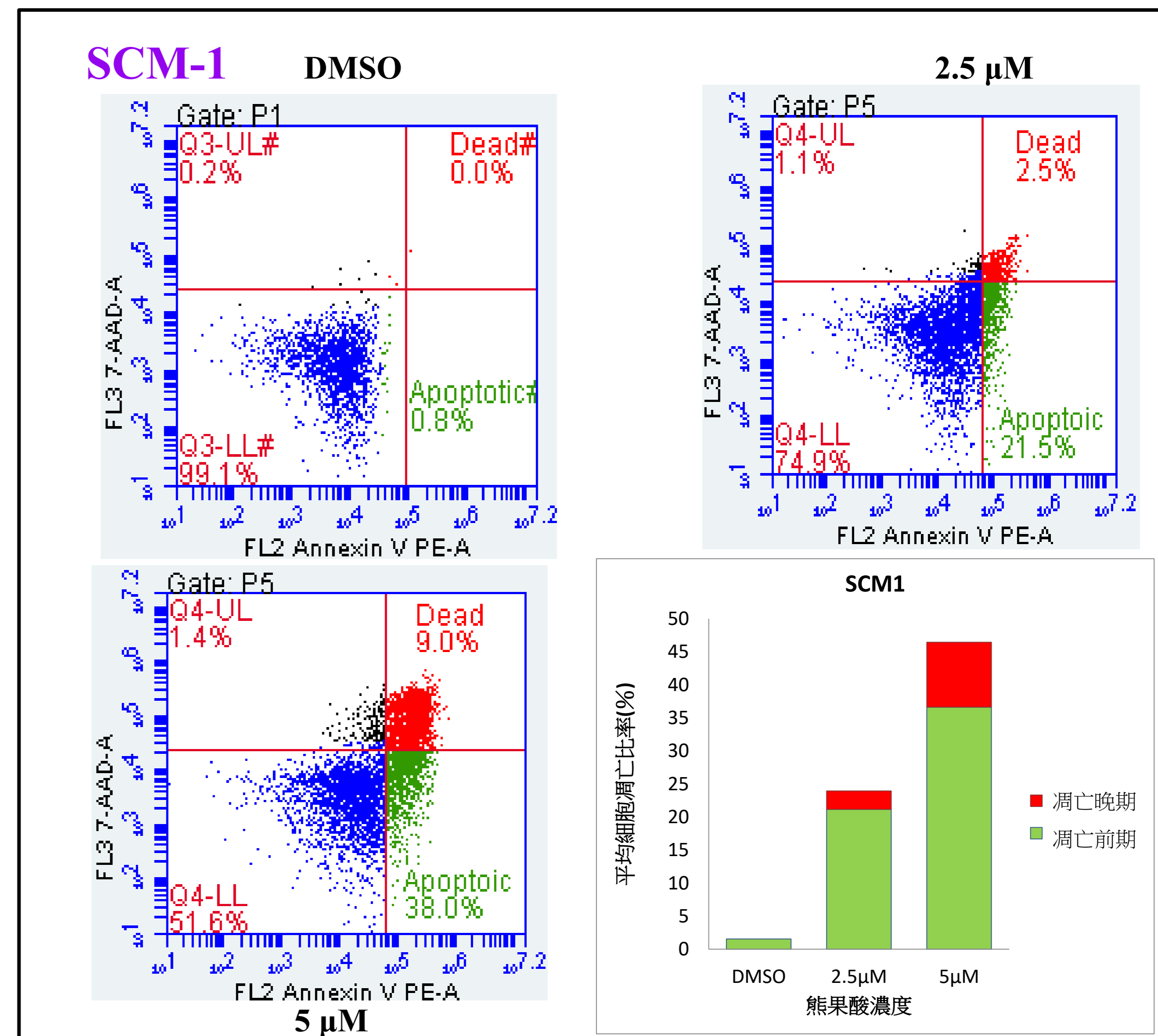
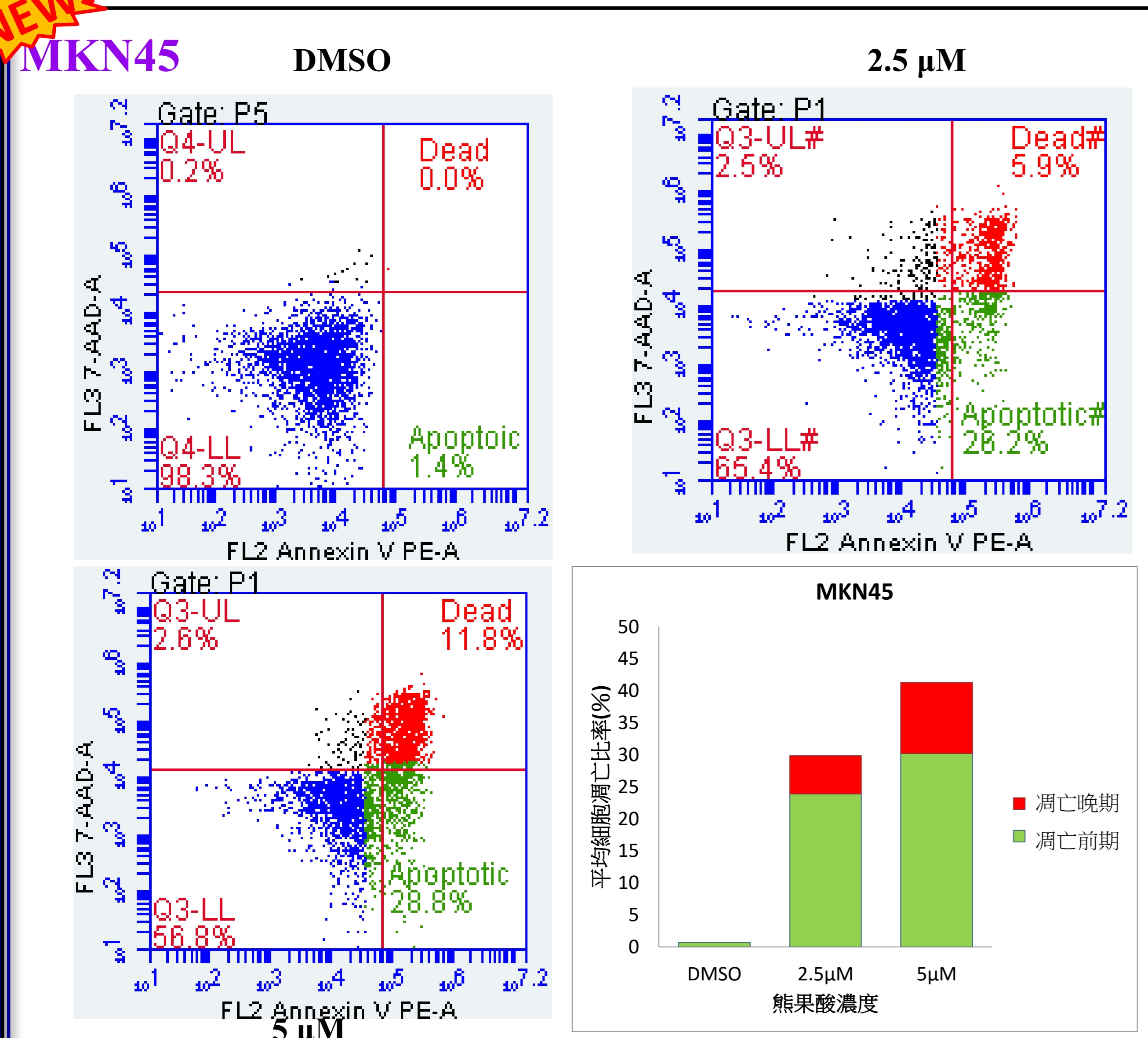
(二)胃癌細胞加入不同濃度熊果酸後，分析各時間點細胞存活率變化有濃度(dose-dependent)及時間(time-dependent)依存效應

(三)熊果酸抑制Stat3 活性及其下游的訊息傳遞路徑：培養6小時後p-Stat3、Stat3、c-Myc及Cyclin D1的表現量下降。

(四)熊果酸對胃癌細胞內凋亡的影响：處理24小時後，促凋亡蛋白Bax及Bak表現量增加，而抗凋亡蛋白Bcl-2及Bcl-xl下降。



NEW!

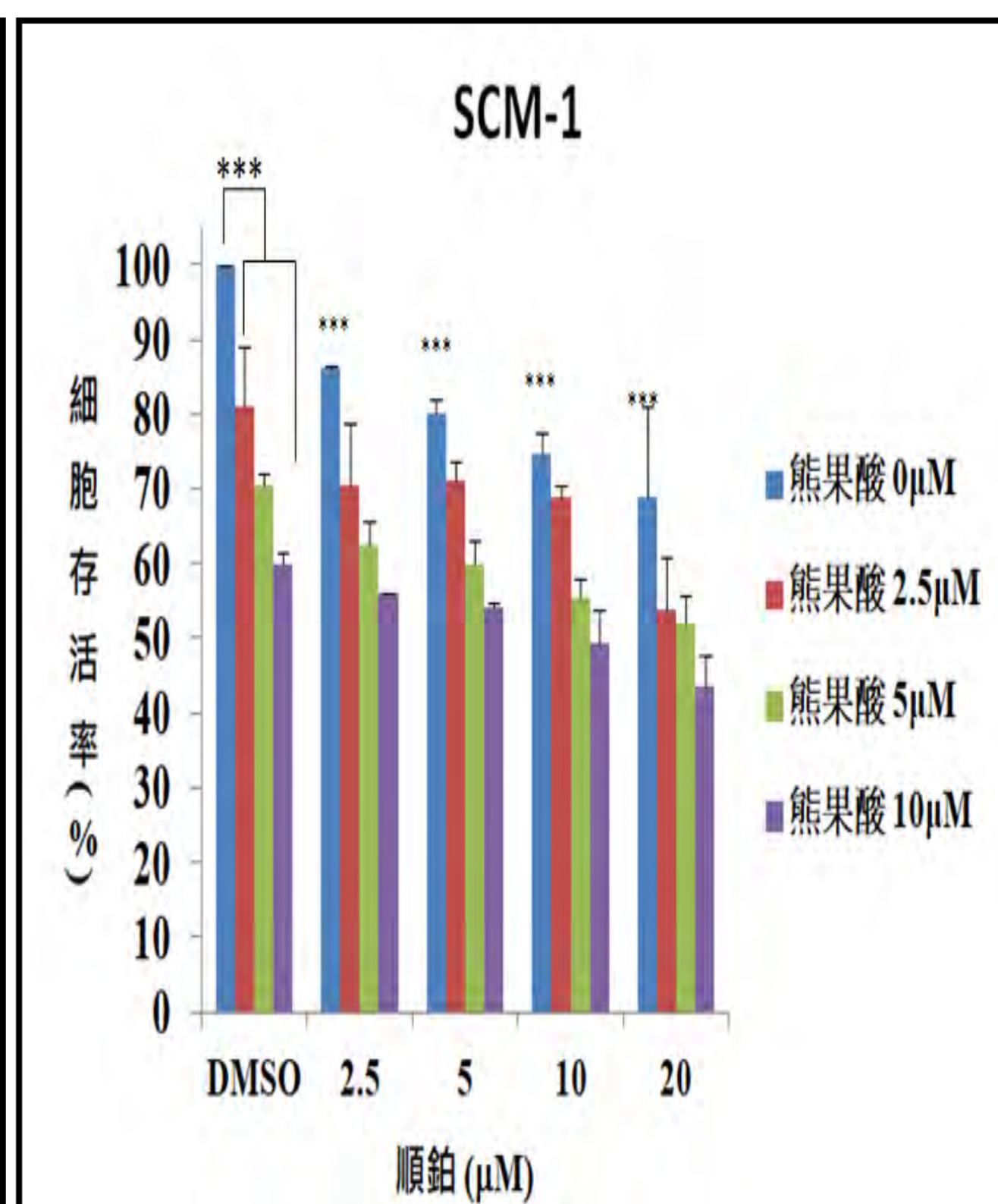
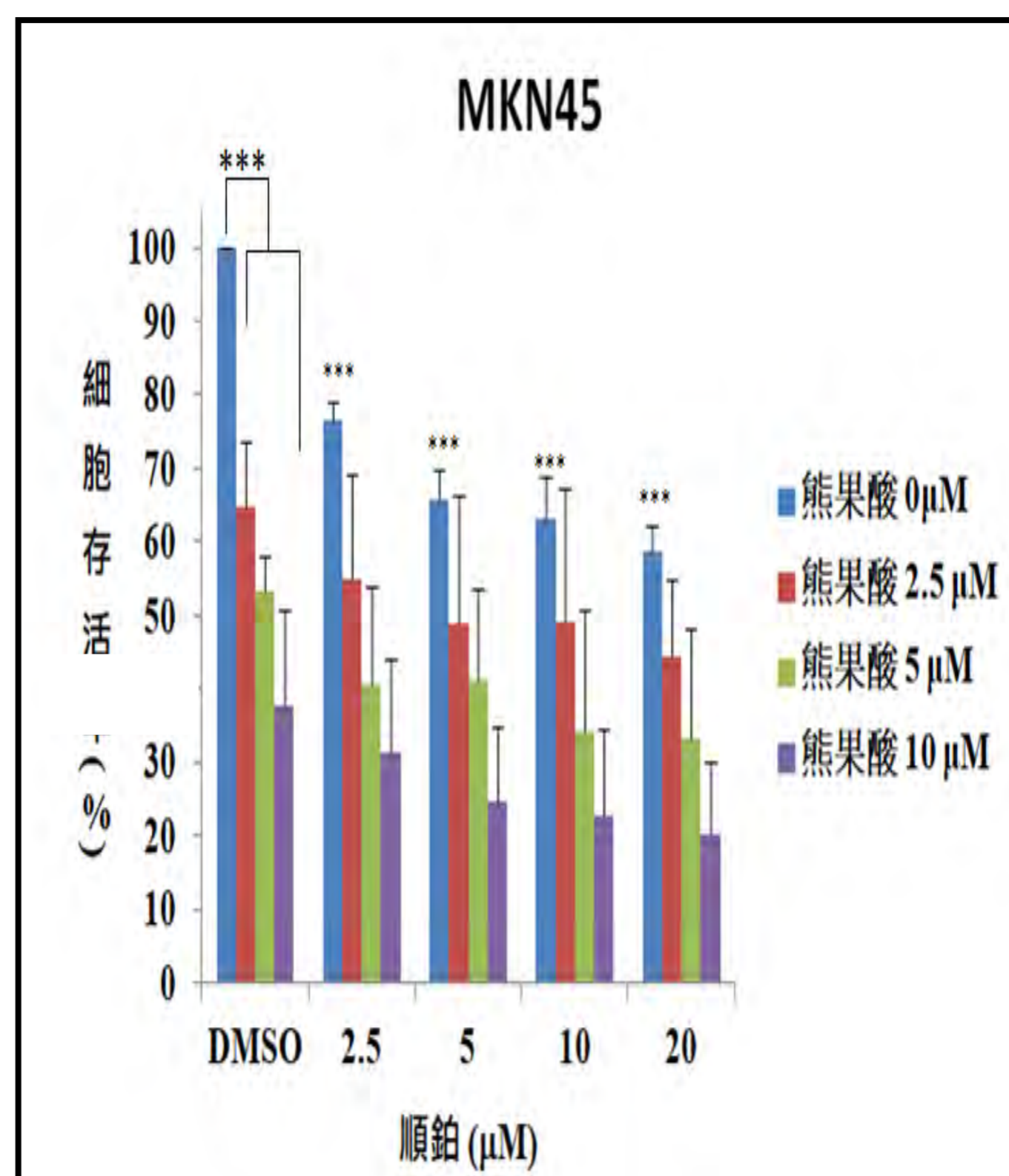
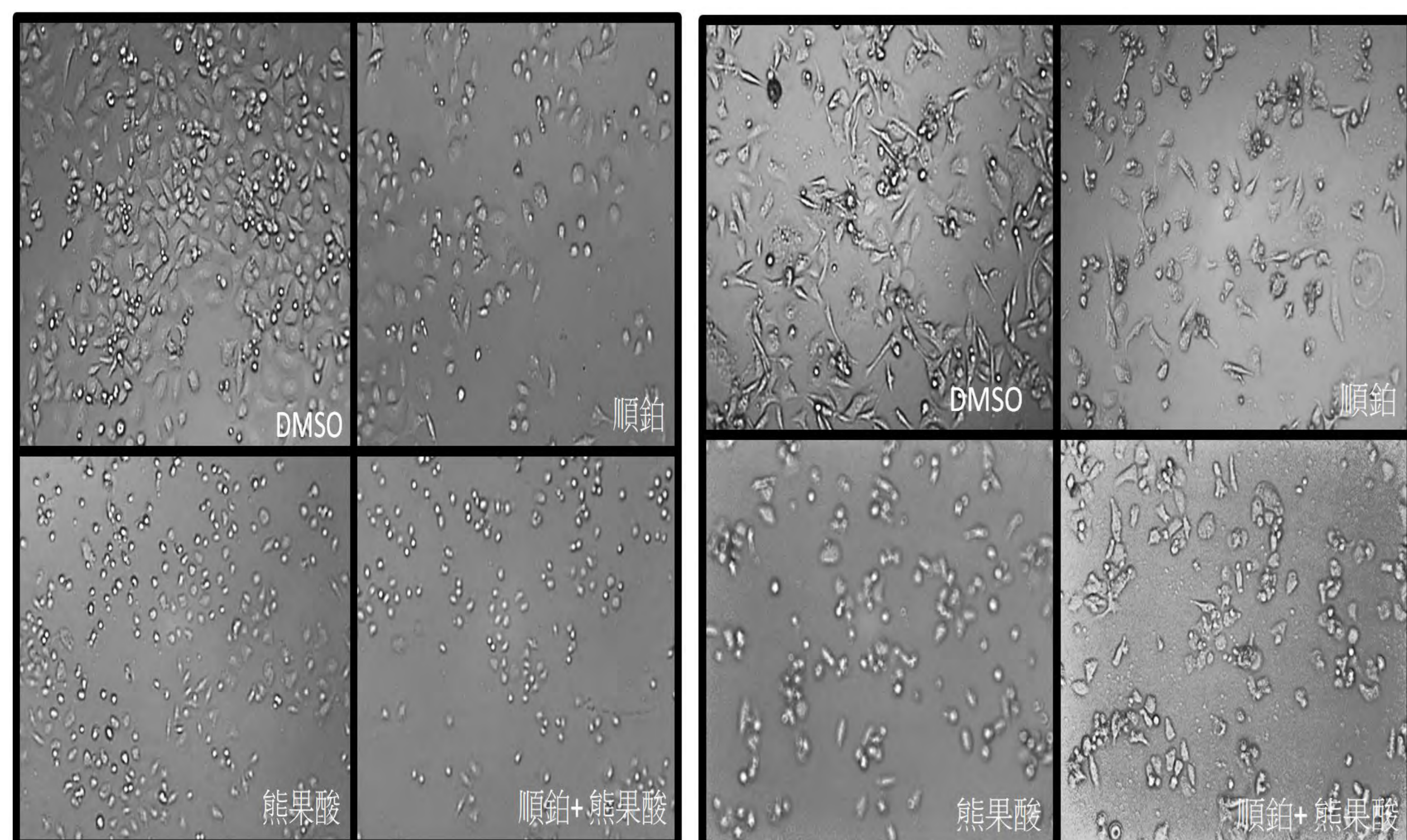


## 二、熊果酸併用順鉑(cisplatin)對胃癌細胞是否有協同抑癌的效率

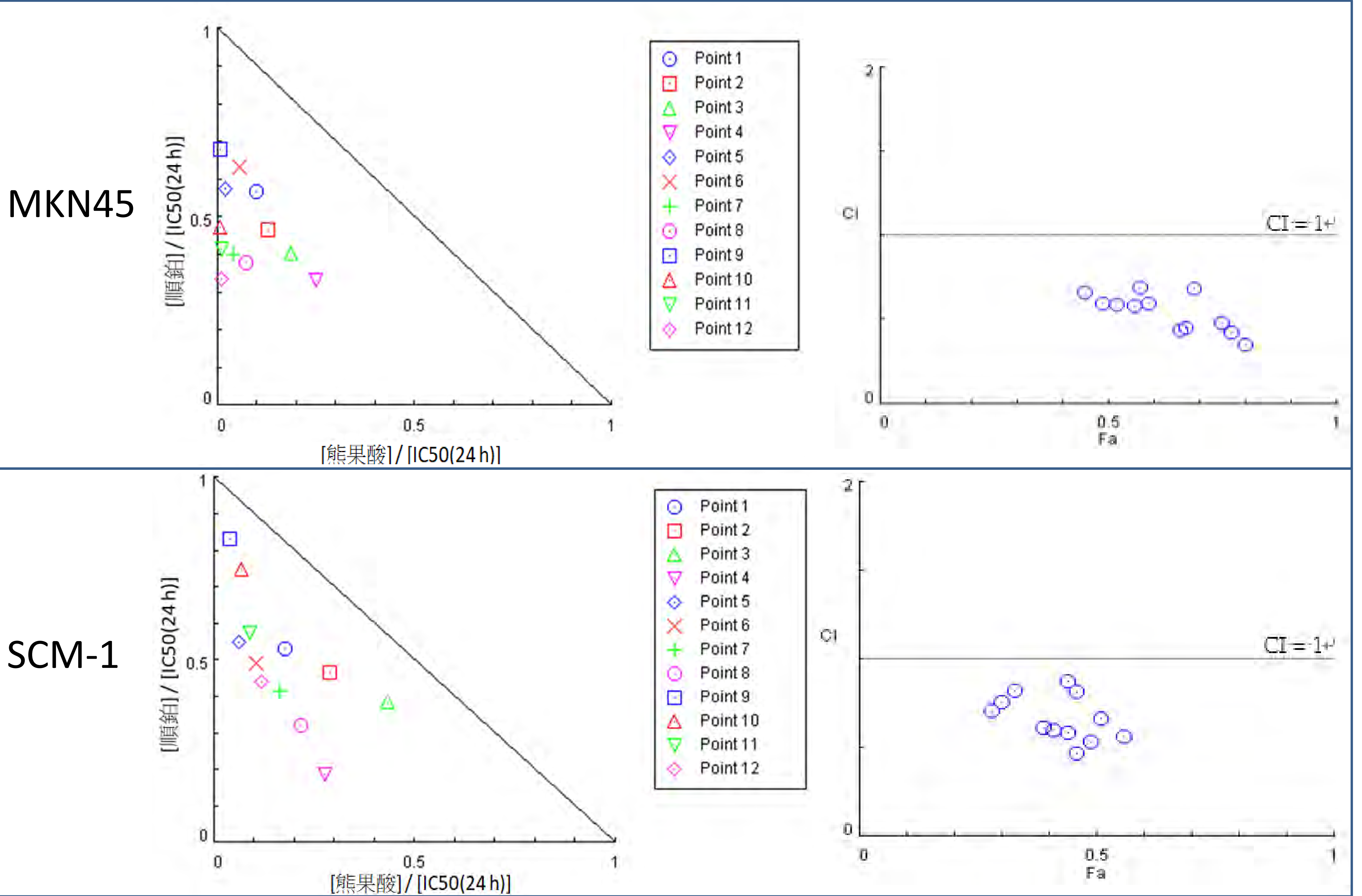
(一)熊果酸併用順鉑在顯微鏡下MKN45細胞與SCM-1細胞細胞生長情形

將胃癌細胞加入化療藥物20 μM順鉑與10 μM熊果酸搭配，處理24小時之後，於顯微鏡下觀察細胞型態的變化

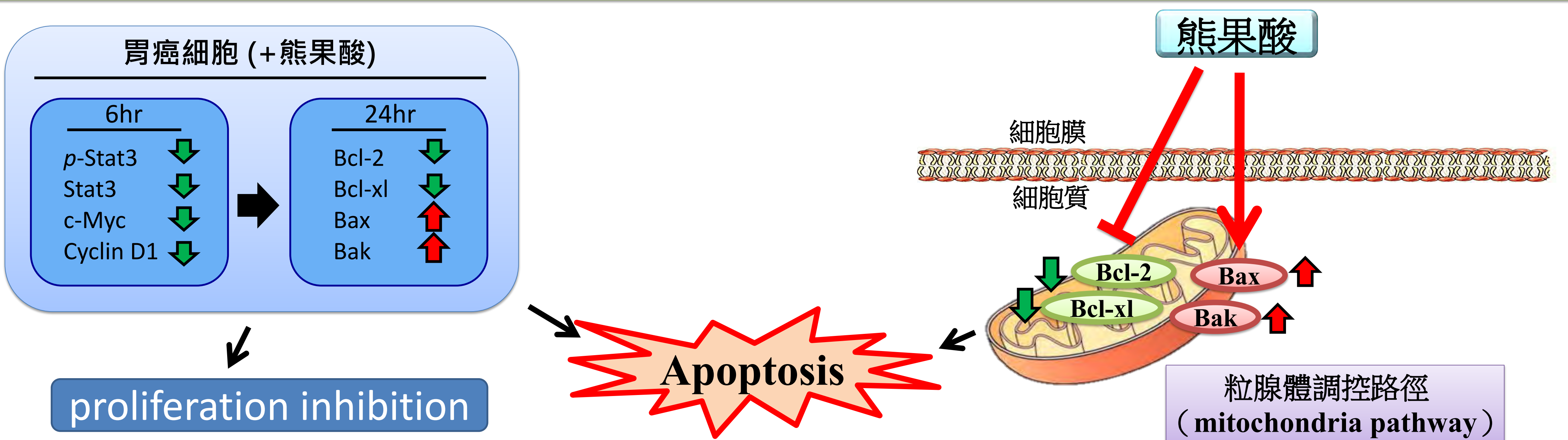
(二)熊果酸併用順鉑並以SRB法分析細胞存活率



(三)周塔氏藥物合併指數分析順鉑合併熊果酸對胃癌細胞有協同作用(Normalized Isobologram for Combination)



陸、討論



研究目標一：熊果酸抑制胃癌細胞增殖，促進細胞凋亡、及調控胃癌細胞之分子機制

1. 熊果酸會造成人類MKN45和SCM-1兩株胃癌細胞型態發生變化及細胞存活率下降。
2. 以SRB分析法對胃癌細胞分析，顯示熊果酸有顯著的細胞毒殺效果，有濃度及時間依存效應。
3. 利用流式細胞儀分析，證實熊果酸會使胃癌細胞產生凋亡。
4. 進一步探討熊果酸對毒殺及調控胃癌細胞的分子機制：
  - (1) 由反應6小時的結果顯示熊果酸可顯著抑制胃癌細胞內Stat3訊號傳遞路徑之相關蛋白p-Stat3、Stat3、c-Myc與Cyclin D1蛋白質表現，證實胃癌細胞重要之存活訊號受到抑制。
  - (2) 由反應24小時的結果顯示抗凋亡的蛋白質(例：Bcl-2 和Bcl-xl)表現量減少，而促凋亡的蛋白質(例：Bax和 Bak)表現量增加，證實熊果酸造成胃癌細胞凋亡是細胞死亡的主要原因之一。
  - (3) 熊果酸藉由抑制Stat3訊息傳遞路徑，來達成抗凋亡的蛋白質(例：Bcl-2 和Bcl-xl)表現量的減少。
5. 目前研究較為透徹的細胞死亡路徑(program cell death)有二：分別為死亡受體路徑 (death receptor pathway)及粒腺體調控路徑 (mitochondria pathway)。在本實驗中，發現熊果酸可增加胃癌細胞中Bax與Bak表現，同時抑制Bcl-2與Bcl-xl。因此推斷，造成胃癌細胞死亡是因為促凋亡的蛋白發生變化，讓癌細胞膜外翻，存活率降低。

研究目標二：熊果酸併用順鉑(Cisplatin)對胃癌細胞是否有協同抑癌的作用

1. 使用順鉑加入熊果酸，由顯微鏡觀察的胃癌細胞型態變化及細胞數量降低，發現熊果酸與順鉑有協同效應。
2. 以SRB 分析檢測細胞存活率確定熊果酸併用順鉑，可強化胃癌細胞的抑制作用；以固定順鉑濃度作用在胃癌細胞，併用越高濃度的熊果酸，細胞存活率越低，證實濃度依存效應。
3. 進一步套用周塔氏藥物合併指數定理，證實CI值 < 1，表示兩者合併使用產生藥物協同作用，進而證明熊果酸能有效增強順鉑對兩株胃癌細胞株的抑制效果。故熊果酸作為輔助合併順鉑使用，對於胃癌細胞惡性程度上，應有相當不錯的潛力

柒、結論與未來展望

本研究發現中草藥白花蛇舌草主要成分之一的熊果酸對胃癌細胞(MKN45和SCM-1)有明顯的毒殺效應：

1. 利用顯微鏡檢觀察細胞型態及數目、加上SRB分析細胞存活率，均證實熊果酸能抑制胃癌細胞的生長。
2. 由西方墨點法發現經熊果酸能使胃癌細胞的促凋亡蛋白表現量上升，抗凋亡蛋白表現下降，證實熊果酸藉由抑制Stat3訊息傳導路徑，誘導細胞凋亡，並由二維流式細胞儀分析，證實凋亡的發生。
3. 經周塔氏藥物合併指數定理證實，熊果酸合併目前胃癌常用藥物順鉑，可達協同作用，強化胃癌第一線藥物的效果。
4. 胃癌是國內常見的消化道惡性腫瘤，熊果酸能使胃癌細胞凋亡，若讓中草藥主要成分輔助藥物，應有相當程度的潛力。
5. 本研究利用流式細胞儀探討熊果酸對胃癌細胞之抗腫瘤影響及調控細胞凋亡的分子機制，因實驗受限於僅使用細胞實驗，是否能用於人體，未來仍需更深入研究，輔以更嚴謹的動物實驗以及後續的臨床試驗來證實其安全性與有效性。

捌、參考文獻

1. 董筠. 2017. 基於數據挖掘探討周仲瑛治療胃癌術後轉移的用藥規律分析. 江南中醫藥 49(6):62-65.
2. Wei MC, et al. 2015. Determination of oleanolic and ursolic acids in Hedyotis diffusa using hyphenated ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and chromatography. Evid. Based Complement. Alternat. Med. Article ID 450547:1-10.
3. Chen R, et al. 2016. The Hedyotis diffusa Willd. (Rubiaceae): A review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics. Molecules 30:21(6):710.
4. Pathak AK, et al. 2007. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. Mol Cancer Res 5(9):943-955.
5. Wang S, et al. 2017. Ursolic acids nanoparticles inhibit cervical cancer growth in vitro and in vivo via apoptosis induction. Int J Oncol 50(4):1330-1340.
6. Liu T, et al. 2017. Inhibition of STAT3 signaling pathway by ursolic acid suppresses growth of hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 51(2):555-562.
7. Kanda N, et al. 2004. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. Oncogene 17:23(28):4921-4929.
8. Yakata Y, et al. 2007. Expression of P-Stat3 in human gastric carcinoma: significant correlation in tumour invasion and prognosis. Int J Oncol 30(2):437-442.