

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

第二名

052013

腸腸搞轟趴—塑化劑對大腸癌細胞的影響

學校名稱：國立彰化高級中學

作者： 高二 吳宗諺 高二 楊芷菱 高二 詹舜凱	指導老師： 林家帆
---	------------------

關鍵詞：大腸癌細胞、DEHP、MEHP

摘要

本研究利用大腸癌細胞培養於添加塑化劑 DEHP 及其代謝產物 MEHP 環境中，觀察與探討塑化劑對癌細胞的生長、轉移能力的影響，進而了解塑化劑對大眾健康的影響。WST-1 試驗結果顯示僅高濃度 MEHP 對細胞的增生有顯著抑制作用。傷口癒合試驗結果顯示低濃度 DEHP 和 MEHP 皆顯著促進癌細胞移行的能力。細胞侵襲試驗結果顯示低濃度 DEHP 和 MEHP 皆可增加癌細胞侵襲的能力。最後使用西方墨點法分析特定蛋白質含量以探討塑化劑對癌細胞影響的機制，初步結果顯示塑化劑對細胞增生相關 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 蛋白或是腫瘤相關 SIRT1 (sirtuin 1) 或 tNOX (tumor associated NADH oxidase) 蛋白的表現量無統計差異。綜合以上，低濃度塑化劑 DEHP 和 MEHP 會促進大腸癌細胞之移行與侵襲之能力，促進腫瘤進展 (tumor progression)。

壹、 研究動機

近年來塑化劑的問題越來越被大眾們關注，而塑化劑出現在食品中的新聞也層出不窮。塑化劑可能影響生物體免疫、神經與內分泌系統正常運作，進而改變生殖或發育現象，而且也有致癌的風險，與我們的生活息息相關。大腸癌則是台灣人好發的癌症，在 2017 的癌症排名中，男性大腸癌發病率排名第一，女性則居第二。而在之前的塑化劑事件中，新聞也曾報導過懷疑塑化劑與大腸癌有關係，因此我們想要深入探討塑化劑與大腸癌的關聯，所以在這次研究中，我們使用大腸癌細胞且加入不同濃度的塑化劑，進而觀察有什麼樣的交互影響。

貳、 研究目的

- 一、觀察 DEHP、MEHP 影響大腸癌細胞的生長情況
- 二、探討 DEHP、MEHP 影響大腸癌細胞的爬行能力
- 三、分析影響大腸癌細胞增生能力之蛋白

參、 研究設備及器材

一、 實驗細胞株：

細胞株名稱
大腸癌細胞 (HCT116)

二、 實驗藥品、設備、及器材:

(一). 細胞培養所需實驗藥品

藥品名稱	藥品名稱
胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)	McCoy's 5A 培養液
抗生素	磷酸鹽緩衝液 (PBS)
胰蛋白酶 (Trypsin)	亞甲基藍染劑 (trypan blue)

(二). 塑化劑

藥品名稱	藥品名稱
鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP)	鄰苯二甲酸-單-乙基己基酯 (MEHP)

(三). 細胞增生試驗所需實驗藥品

藥品名稱	WST-1
------	-------

(四). 西方墨點法所需實驗藥品

藥品名稱	藥品名稱
30% acrylamide 混和液	1.5M Tris buffer, pH8.8
0.5M Tris buffer, pH6.8	SDS (Sodium dodecyl sulfate)
APS (Ammonium persulfate)	TEMED
甲醇 (Methanol)	Ponceau S
Transfer buffer	Running buffer
SIRT1 Mouse Monoclonal antibody	ENOX2 Rabbit Polyclonal antibody
PCNA Mouse Monoclonal antibody	Actin Mouse Monoclonal antibody
Goat anti-mouse IgG antibody-HRP conjugate	Goat anti-rabbit IgG antibody-HRP conjugate
3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate	5%牛奶
Cell lysis buffer	BIO Dye Reagent
4X Sample buffer	

(五). 細胞侵襲試驗所需實驗藥品

藥品名稱	藥品名稱
Hematoxylin (蘇木素)	Ethanol(乙醇)

(六). 實驗設備

設備名稱	設備名稱
蛋白質電泳槽	離心機
震盪混合器	電源供應器
全溼式轉置槽	分光光度計
冰箱	無菌操作台
倒立顯微鏡	水浴槽
細胞培養箱	

(七). 實驗器材

器材名稱	器材名稱
微量分注器	齒梳
棉花棒	96 孔盤
冷凍小管	PIPETTE AID
離心管	細胞培養瓶
微量離心管	Transwell (Corning®)
Culture insert 2 well (ibidi®)	

(八). 軟體

軟體名稱	軟體名稱
GraphPad Prism software	Excel
Image J	

肆、 研究過程及方法

一、 實驗流程圖

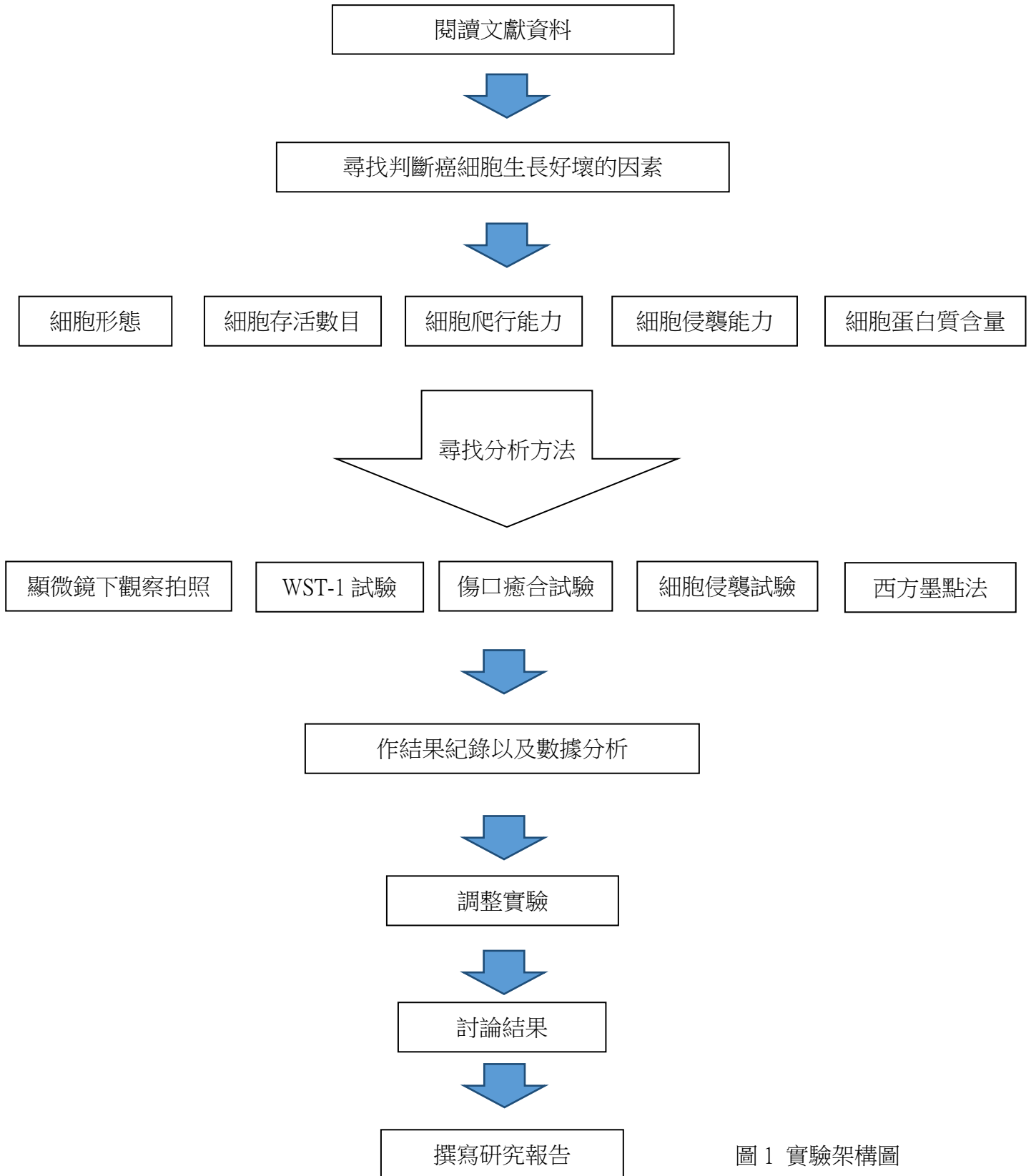


圖 1 實驗架構圖

二、 DEHP 及 MEHP 介紹

DEHP 是一種鄰苯二甲酸酯類 (Phthalates esters, PAEs) 化合物，其化學式 $C_6H_4(C_8H_{17}COO)_2$ ，分子量為 390.56，常溫常壓下是一種無色、無味而不溶於水，可塑性強的脂溶性黏稠液體。DEHP 為塑膠製品添加物的一種，可增加塑膠產品的柔軟度及可塑性，尤其普遍添加於聚氯乙烯(Polyvinyl chloride, PVC)產品中，為環境荷爾蒙之一種，對生物體的健康影響可能是一種緩慢的長期效應。MEHP 化學式 $C_{16}H_{22}O_4$ ，分子量為 278.34，是 DEHP 代謝的產物。

三、 細胞培養

實驗所需使用的細胞株，大腸癌細胞(HCT116)，保存於液態氮中，須先進行細胞解凍，且由於剛解凍的細胞不穩定，所以將細胞先經過繼代培養數代後，才開始進行實驗。

(一).解凍細胞

自液態氮桶中將實驗所需之大腸癌細胞(HCT116)冷凍管取出，放入 37°C 水浴槽兩分鐘做回溫處理，待冷凍小管中的冰塊溶化，於無菌操作台內將細胞亦取出加入含有 10 ml 培養液之離心管內，進行離心 (1000 rpm, 5 分鐘)，倒除上清液，以 5 ml 培養液懸浮細胞團塊後，全數加入 25T 細胞培養瓶，再放入細胞培養箱，完成細胞解凍。

(二).繼代細胞

當細胞生長在 flask 中，達到高密度的生長情況，則需收集細胞，分殖至其他培養瓶中。

取出 flask，於無菌操作台內，先倒除舊培養液，接著使用無菌 1X PBS 潤洗兩次後，加入胰蛋白酶，分離附著於底部的細胞，拍打瓶身並加入 medium，將細胞液全部取出至離心管內，進行離心 (1000 rpm, 5 分鐘)，倒除上清液，以 1~2 ml 培養液懸浮細胞團塊後，取出約 1/3 的細胞液加入 10 ml 的 medium，放回 flask 中，再將 flask 放回細胞培養箱，完成細胞繼代。

四、 配置藥劑

將 DEHP、MEHP 藥劑配置成 200 mM，再依下表配置所需濃度藥劑，之後再加入每孔含有 50 μ L 的培養液(2 倍的抗生素和 20%FBS)中使塑化劑最終濃度符合預期。

塑化劑最終濃度(μ M)	200 mM 塑化劑(μ L)	McCoy' s 5A (μ L)
0	0	50
2.5	0.00125	49.99875
5	0.0025	49.9975
10	0.005	49.995
100	0.05	49.95
1000	0.5	49.5
10000	5	45

表 1 塑化劑濃度配置

五、 觀察細胞形態

(一). 實驗目的

藉由顯微鏡觀察細胞在不同濃度的塑化劑中的生長型態是否與在正常情況生長的細胞有差異。

(二). 檢測方法

(1). 將細胞培養在下表的濃度中，培養 24 或 48 小時後，放在顯微鏡下觀察、拍照。

組別	塑化劑濃度 (μ M)
NC	0
1	2.5
2	5
3	10
4	10^2
5	10^3
6	10^4

表 2 細胞觀察試驗分組

六、 觀察細胞生長情況

(一). 實驗目的

此實驗之目的為探討 DEHP 及 MEHP 是否會影響大腸癌細胞的生長，我們採用 WST-1 試驗，用以了解塑化劑對大腸癌細胞的毒性。

(二). 實驗原理

WST-1 試劑是利用粒線體中的脫氫酶還原成橙色產物，導致顏色改變，當死亡細胞數越多，則顏色越淺，我們藉由顏色的改變來分析塑化劑對大腸癌細胞的毒性。

(三). 實驗方法

- (1). 取出培養的細胞，進行繼代與細胞計數。
- (2). 於 96 孔細胞培養盤內每孔加入 100 μL 含有 1×10^4 個細胞，再放回細胞培養箱培養隔夜。
- (3). 取出培養盤，按照下表格式的實驗設計進行塑化劑處理，每種處理為五重複，加完後放回培養箱繼續培養 24 和 48 小時。

表 3 細胞毒性測試分組

組別	塑化劑濃度 (μM)
Blank	無細胞、無塑化劑
NC	0
1	2.5
2	5
3	10
4	10^2
5	10^3
6	10^4

- (4). 分別於 24 或 48 小時，將培養盤取出，將培養液去除，每孔加入 100 μL 的 medium 和 10 μL 的 WST-1 試劑，放回培養箱反應 5 小時。
- (5). 將培養盤置入分光光度計，利用波長 450 nm 及 655 nm 測定濃度，並將兩個數據相減，比較結果。

七、 測定細胞移行能力

(一). 實驗目的

此實驗之目的為探討 DEHP 及 MEHP 對大腸癌細胞的移行能力的影響，我們使用傷口癒合試驗(wound healing assays)測試細胞移行的能力。

(二). 實驗原理

在培養細胞時，於培養盤中製造一條無細胞的間隙，再利用不同塑化劑處理之培養液培養於一段時間後，放置於顯微鏡下觀察細胞移行的距離，將此距離與無塑化劑之對照組比較，就可判別移行能力是否受影響。

(三). 實驗步驟

- (1). 取出培養的細胞進行繼代與細胞計數，取出適量的細胞數。
- (2). 於 24 孔細胞培養盤中，每孔先置入 Culture insert 2 well (ibidi®)。
- (3). 於兩側腔室分別加入 70 μ L 含有 1×10^4 個細胞，再放入細胞培養箱培養隔夜。
- (4). 取出 24 孔盤，拔起 Culture-Insert，用 PBS 潤洗兩次，再加入含不同濃度 (0、2.5、5、10 μ M) 塑化劑的培養液(500 μ L media/well)
- (5). 放回細胞培養箱，放置 24 和 48 小時後，取出放置於顯微鏡下觀察、照相，並比較結果。

八、 測定細胞侵襲能力

(一). 實驗目的

此實驗之目的為探討 DEHP 及 MEHP 對大腸癌細胞的侵襲能力之影響，我們使用細胞侵襲試驗(transwell assays) 測試細胞侵襲轉移的能力。

(二). 實驗原理

先將細胞培養在缺乏養分的環境，再將細胞注入 upper 孔中，因為下方孔中有較高濃度的營養物質，會驅使癌細胞侵襲穿過區隔兩室的膜，觀察細胞通過膜的多少，可判斷侵襲的能力是否受到藥物處理影響與對照組不同。

(三). 實驗步驟

- (1). 將培養密度約 5~6 成的細胞換液成不含 FBS 的培養液，培養一天。

- (2). 將細胞取出進行繼代與細胞計數，此時使用不含 FBS 的培養液將細胞團塊進行懸浮。
- (3). 於 upper 孔中注入 100 μ L 含有 1×10^5 個細胞與不同濃度 (0、2.5、5、10 μ M) 塑化劑之懸浮液，而下方孔則是加入 650 μ L 的培養液 (含有 10% FBS)。
- (4). 放回細胞培養箱，培養 48 小時。
- (5). 將 upper chamber 膜的上方細胞用棉花棒刮除，再浸泡於 100% 的乙醇中 5 分鐘。
- (6). 再浸泡於蘇木素染劑 5 分鐘，再放入水中退染。
- (7). 觀察結果並計數膜上細胞數量。

九、 測定細胞蛋白的含量

(一). 實驗目的

此實驗之目的為探討 DEHP 及 MEHP 對大腸癌細胞增生能力的影響機制，我們使用西方墨點法來測定某些對癌細胞生長有影響的相關蛋白質表現量。

(二). 實驗原理

將培養好的細胞取出萃取其細胞內蛋白，進行蛋白質電泳，將蛋白依不同的分子量分離，再進行西方墨點法，將特定抗體附著在特定的蛋白上，再顯色，當蛋白含量越多時，顏色會越深，可以和對照組比較蛋白質含量是否有影響。

(三). 實驗步驟

● 細胞蛋白萃取液製備

- (1). 將培養的細胞取出進行繼代與計數，將 8×10^5 個細胞懸浮於 5 mL 含不同濃度 (0、2.5、5、10 μ M) 塑化劑的 medium，放入 25T flask 中，培養 48 小時。
- (2). 將細胞進行繼代，取 100 μ l Cell lysis buffer 懸浮細胞團塊。
- (3). 於 4°C 冰箱內進行低速震盪 30 分鐘。
- (4). 接著進行離心 (12000 rpm，4°C) 20 分鐘。
- (5). 收取上清液即為細胞蛋白萃取液。

- (6). 進行蛋白質定量。
- (7). 製作樣本溶液。
- (8). 每個 well 加入 BIO Dye Reagent，進行反應。
- (9). 使用分光光度計(波長 595)測定吸光值，繪製標準曲線圖。
- (10). 測定欲測量的蛋白之吸光值，再依據曲線圖測出濃度。
- (11). 將蛋白質萃取液與 4X Sample Buffer 進行混合配置成濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 後， 95°C 處理 10 分鐘，靜置冰上冷卻待電泳分析。

● 蛋白質電泳

- (1). 裝置好製膠用玻璃板。
- (2). 於 50 mL 離心管內依序加入下列試劑，配置 10% 分離膠體。

表 4 分離膠體配置試劑表

試劑	體積 (mL)
ddH ₂ O	4.84
30% acrylamide 混和液	2.5
1.5 M Tris buffer, pH8.8	2.5
10% SDS	0.1
10% APS	0.05
TEMED	0.005

- (3). 將試劑加入玻璃板中至 3/4 的高度，再加上一層水，放置半小時。
- (4). 於 50 mL 離心管內依序加入下列試劑，配置 4% 聚集膠體。

表 5 聚集膠體配置試劑表

試劑	體積 (mL)
ddH ₂ O	3.12
30% acrylamide 混和液	0.5
0.5 M Tris buffer, pH6.8	1.25
10% SDS	0.05
10% APS	0.07
TEMED	0.007

- (5). 插上齒梳，注入上膠溶液，約十分鐘後，膠體凝固，即完成膠體配置。
- (6). 將製好膠體的玻璃板架入電泳槽芯，放入電泳槽，於內槽注入電泳緩衝液 (Running buffer)。

- (7). 外槽注入電泳緩衝液 (Running buffer)。
- (8). 拔除齒梳，注入蛋白質樣本。
- (9). 接上電極，以 120V 的電壓進行電泳，放置 1.5 小時。

● 西方墨點法

- (1). 電泳結束後將膠片取出，將短玻璃板分開再切除上膠，取下膠浸泡於 Transfer buffer。
- (2). 拿取一片 PVDF membrane 浸泡於甲醇溶液中，使用水平震盪器搖晃進行活化 5 分鐘。
- (3). 活化完後，回收甲醇溶液，並將 PVDF membrane 浸泡於 Transfer buffer 保持濕潤。
- (4). 拿取濾紙 2 張，浸泡於 Transfer buffer 備用。
- (5). 利用轉漬設備，於卡夾中放一層 fiber pad 和一層濾紙，然後放上膠體，接著疊上轉漬膜，再放上一層濾紙，之後趕出氣泡，放上 fiber pad，將卡夾合起。
- (6). 以電壓 110V 進行轉漬 100 分鐘。
- (7). 將卡夾取出，再將 PVDF membrane 取出，浸泡於 Ponceau S 溶液中 3~5 分鐘，再浸泡於 PBS 中稍退染。
- (8). 剪裁欲偵測特定蛋白質之分子量範圍。
- (9). 浸泡於 5% 的牛奶中，使用水平震盪器在室溫進行 Blocking 反應 1 小時。
- (10). 倒除牛奶，以 PBS 進行 wash，取出 PVDF membrane，加入一級抗體，使用水平震盪器置於 4°C 冰箱反應隔夜。

表 6 一級抗體稀釋倍數

一級抗體	稀釋倍數
SIPT1 Mouse Monoclonal antibody	1:1000
ENOX2 Rabbit Polyclonal antibody	1:1000
PCNA Mouse Monoclonal antibody	1:10000
Actin Mouse Monoclonal antibody	1:5000

倒除一級抗體，以含有 0.05% Tween-20 之 PBS (PBST) 進行 wash，每次 5 分鐘，共 6 次。

(11). 加入二級抗體，使用水平震盪器在室溫反應一小時。

表 7 二級抗體稀釋倍數

二級抗體	稀釋倍數
Goat anti-mouse IgG antibody-HRP conjugate	1:4000
Goat anti-rabbit IgG antibody-HRP conjugate	1:1000

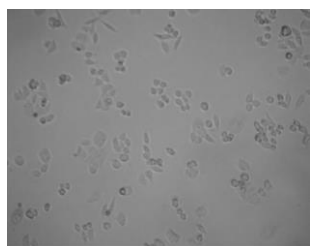
(12). 倒除二級抗體，以含有 0.05% Tween-20 之 PBS (PBST) 進行 wash，每次 5 分鐘，共 6 次。加入 DAB 進行呈色，並判讀結果。

伍、 研究結果

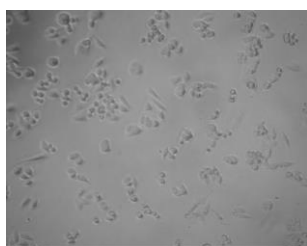
一、 細胞型態

1. 細胞於 DEHP 中 (不含 DMSO) 培養 24 小時

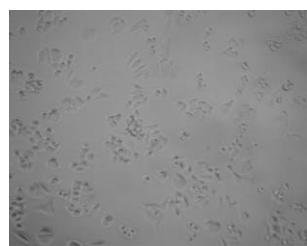
(a) 0 μ M



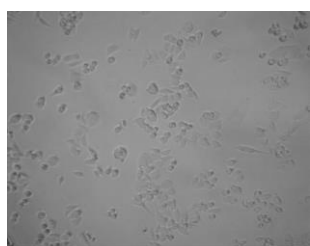
(b) 2.5 μ M



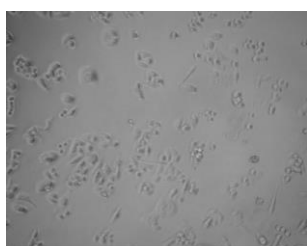
(c) 5 μ M



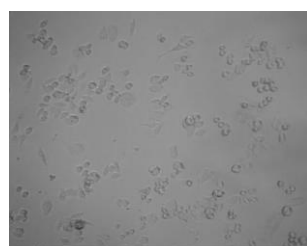
(d) 10 μ M



(e) 100 μ M



(f) 1000 μ M



(g) 10000 μ M

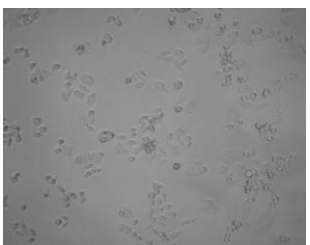
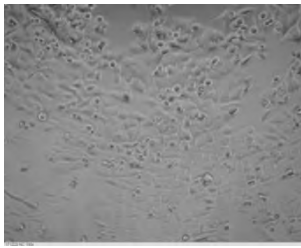


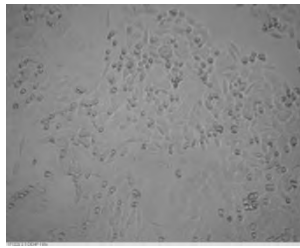
圖 2(a)~(g)為各個濃度之 DEHP 下培養 24 小時後，皆無觀察到細胞型態有明顯變化。(各圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

2. 細胞於 DEHP 中 (不含 DMSO) 培養 48 小時

(a) 0 μM



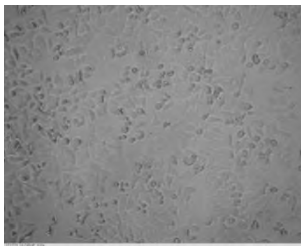
(b) 2.5 μM



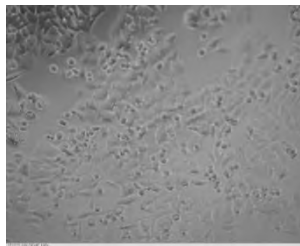
(c) 5 μM



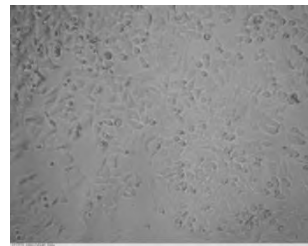
(d) 10 μM



(e) 100 μM



(f) 1000 μM



(g) 10000 μM

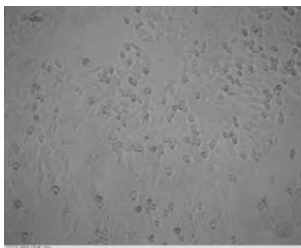
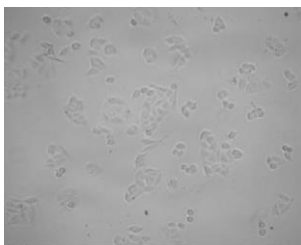


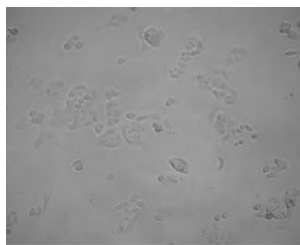
圖 3(a)~(g)在各個濃度之 DEHP 下培養 48 小時後，皆無觀察到細胞型態有明顯變化。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

3. 細胞於 MEHP 中 (不含 DMSO) 培養 24 小時

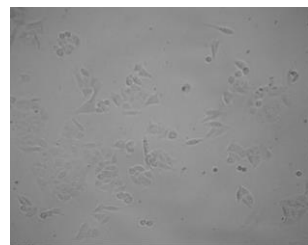
(a) 0 μM



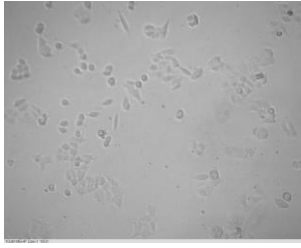
(b) 2.5 μM



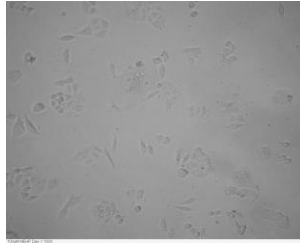
(c) 5 μM



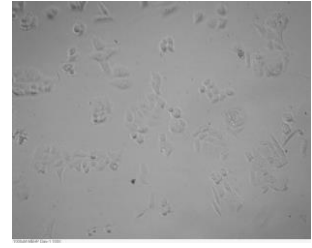
(d) 10 μM



(e) 100 μM



(f) 1000 μM



(g) 10000 μM

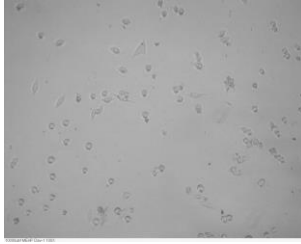
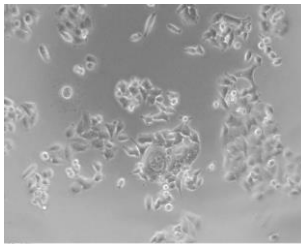


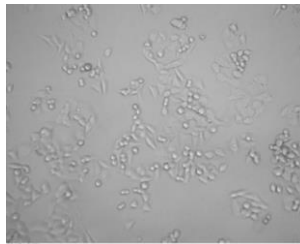
圖 4(a)~(g)在各個濃度之 MEHP 下培養 24 小時後，在低濃度 ($0\sim 10^3 \mu\text{M}$) 皆無觀察到細胞型態有明顯變化，然而在 $10^4 \mu\text{M}$ 時可見細胞型態呈現圓形，且大量懸浮，代表死亡。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

4. 細胞於 MEHP 中 (不含 DMSO) 培養 48 小時

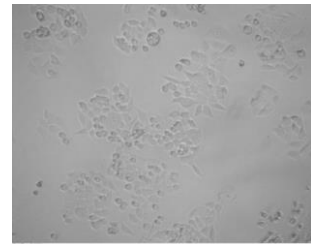
(a) 0 μM



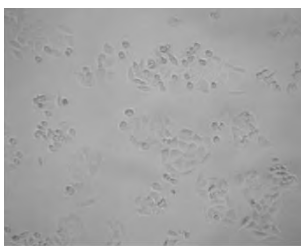
(b) 2.5 μM



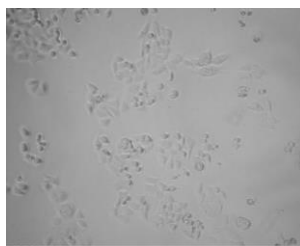
(c) 5 μM



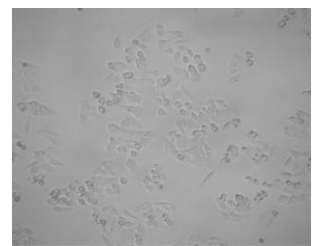
(d) 10 μM



(e) 100 μM



(f) 1000 μM



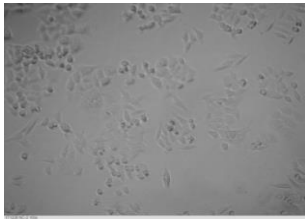
(g) 10000 μM



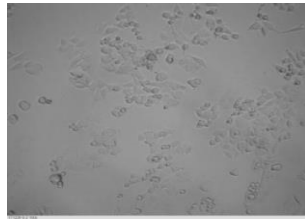
圖 5(a)~(g)在各個濃度之 MEHP 下培養 48 小時後，在低濃度 ($0\sim 10^3 \mu\text{M}$) 皆無觀察到細胞型態有明顯變化，然而在 $10^4 \mu\text{M}$ 時可見細胞型態呈現圓形，且大量懸浮，代表死亡。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

5. 細胞於 DEHP 中 (含 DMSO) 培養 24 小時

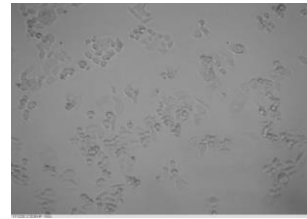
(a) NC (不含 DMSO)



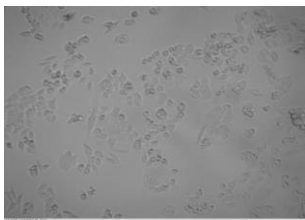
(b) 0 μM



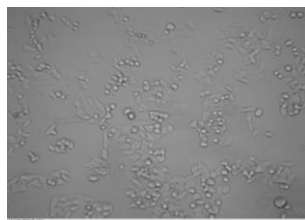
(c) 2.5 μM



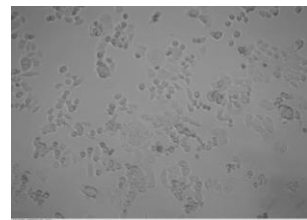
(d) 5 μM



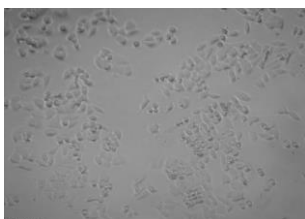
(e) 10 μM



(f) 100 μM



(g) 1000 μM



(h) 10000 μM

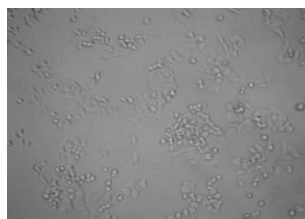
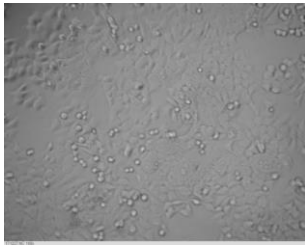


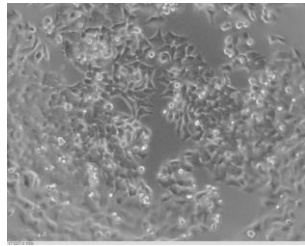
圖 6(a)~(h)在各個濃度之 DEHP 下培養 24 小時後，皆無觀察到細胞型態有明顯變化。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

6. 細胞於 DEHP 中 (含 DMSO) 培養 48 小時

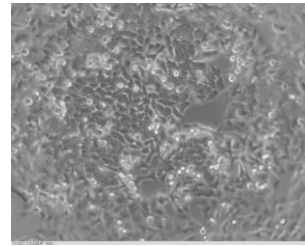
(a)NC(不含 DMSO)



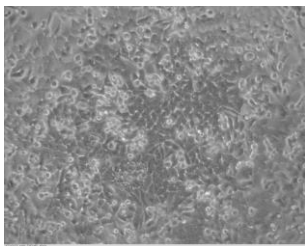
(b)0 μ M



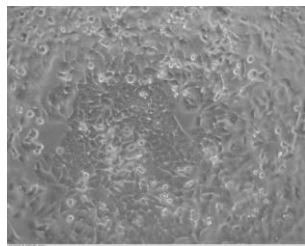
(c)2.5 μ M



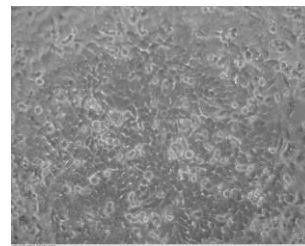
(d)5 μ M



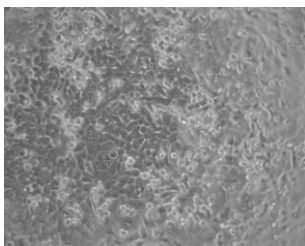
(e)10 μ M



(f)100 μ M



(g)1000 μ M



(h)10000 μ M

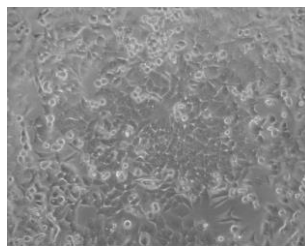
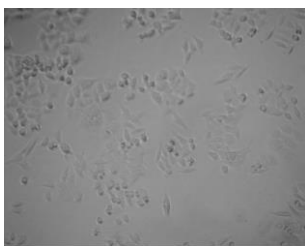


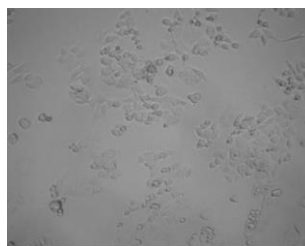
圖 7(a)~(h)在各個濃度之 DEHP 下培養 48 小時後，皆無觀察到細胞型態有明顯變化。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

7. 細胞於 MEHP 中 (含 DMSO) 培養 24 小時

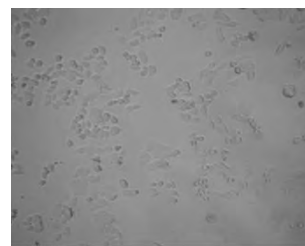
(a)NC(不含 DMSO)



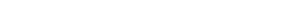
(b)0 μ M



(c)2.5 μ M



(d)5 μ M

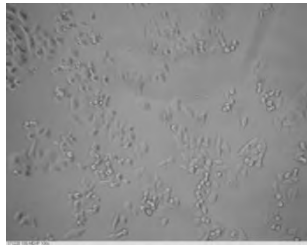


(e)10 μ M

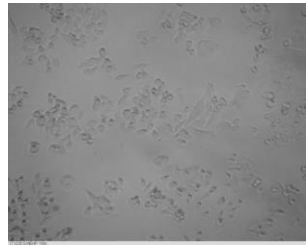


(f)100 μ M





(g)1000 μ M



(h)10000 μ M

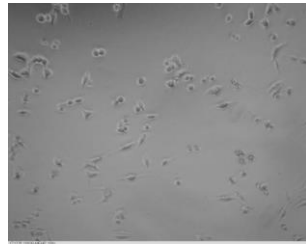
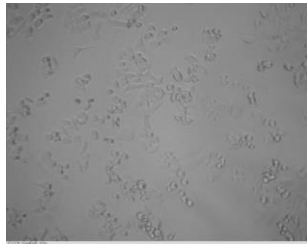
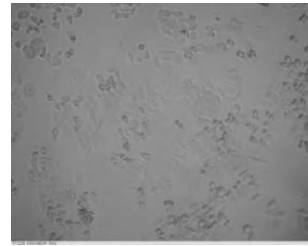
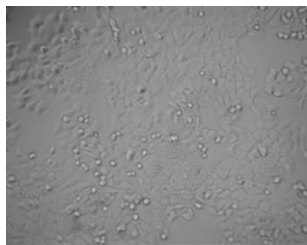


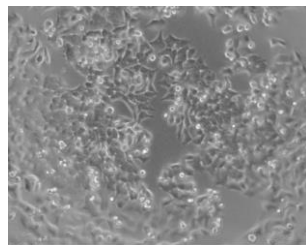
圖 8(a)~(h)在各個濃度之 MEHP 下培養 24 小時後，在低濃度 ($0\sim 10^3 \mu$ M) 皆無觀察到細胞型態有明顯變化，然而在 $10^4 \mu$ M 時可見細胞型態呈現圓形，且大量懸浮，代表死亡。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

8. 細胞於 MEHP 中 (含 DMSO) 培養 48 小時

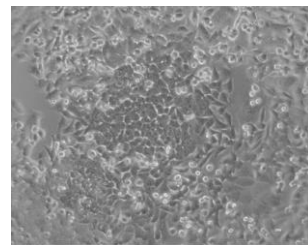
(a)NC(不含 DMSO)



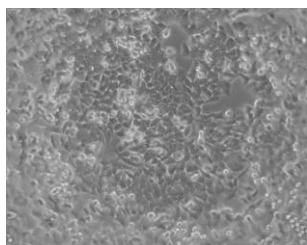
(b)0 μ M



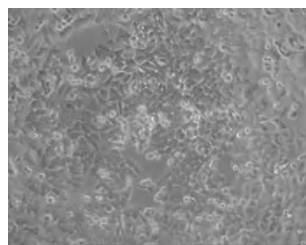
(c)2.5 μ M



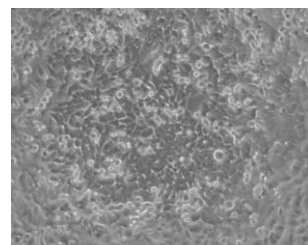
(d)5 μ M



(e)10 μ M



(f)100 μ M



(g)1000 μ M

(h)10000 μ M

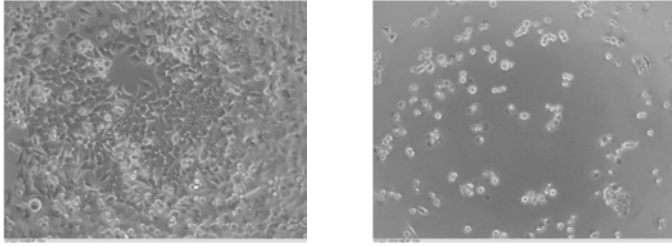


圖 9(a)~(h)在各個濃度之 MEHP 下培養 48 小時後，在低濃度 ($0\sim 10^3 \mu\text{M}$) 皆無觀察到細胞型態有明顯變化，然而在 $10^4 \mu\text{M}$ 時可見細胞型態呈現圓形，且大量懸浮，代表死亡。(圖為顯微鏡放大倍率為 100X 可見光視野)

二、 細胞存活數目

分析 WST-1 試驗結果

1. 細胞於 DEHP 中 (不含 DMSO) 培養 24 小時

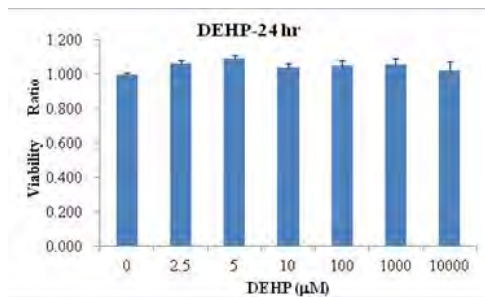


圖 10 細胞於不同濃度 DEHP 下存活比率 (不含 DMSO/24hr)

HCT116 培養在六種不同濃度 DEHP 中 24 小時後，細胞生長情形皆無明顯變化。

2. 細胞於 DEHP 中 (不含 DMSO) 培養 48 小時

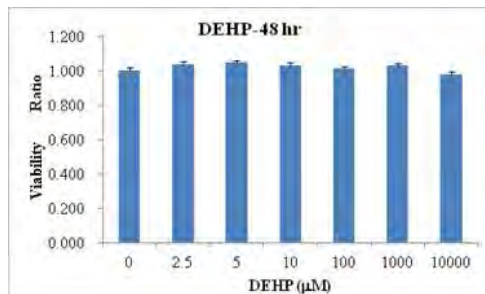


圖 11 細胞於不同濃度 DEHP 下存活比率 (不含 DMSO/48hr)

HCT116 培養在六種不同濃度 DEHP 中 48 小時後，細胞生長情形皆無明顯變化。

3. 細胞於 DEHP 中 (含 DMSO) 培養 24 小時

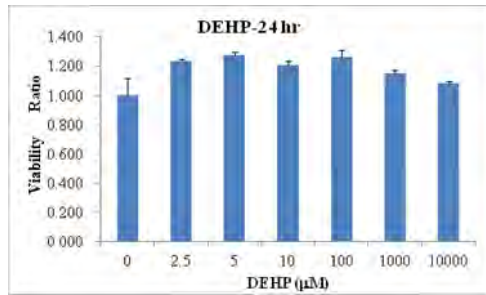


圖 12 細胞於不同濃度 DEHP 下存活比率 (含 DMSO/24hr)

HCT116 培養在六種不同濃度 DEHP 中 24 小時後，細胞生長情形有略微增加。

4. 細胞於 DEHP 中 (含 DMSO) 培養 48 小時

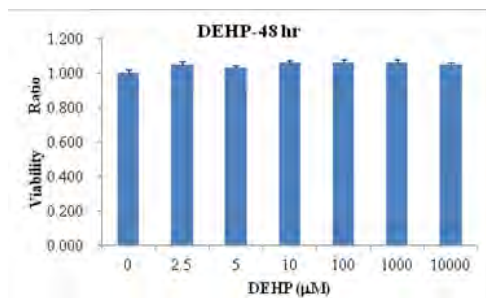


圖 13 細胞於不同濃度 DEHP 下存活比率 (含 DMSO/48hr)

HCT116 培養在六種不同濃度 DEHP 中 48 小時後，細胞生長情形皆無明顯變化。

5. 細胞於 MEHP 中 (不含 DMSO) 培養 24 小時

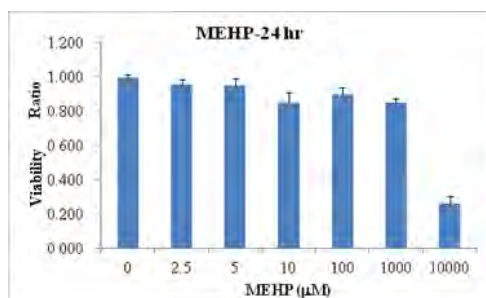


圖 14 細胞於不同濃度 MEHP 下存活比率 (不含 DMSO/24hr)

HCT116 培養在六種不同濃度 MEHP 中 24 小時後，較高濃度下細胞生長略受抑制，且於 10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制。

6. 細胞於 MEHP 中（不含 DMSO）培養 48 小時

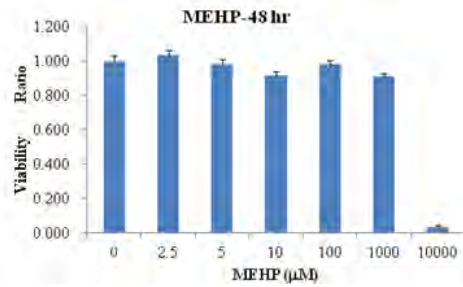


圖 15 細胞於不同濃度 MEHP 下存活比率（不含 DMSO/48hr）

HCT116 培養在六種不同濃度 MEHP 中 48 小時後，於 10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制。

7. 細胞於 MEHP 中（含 DMSO）培養 24 小時

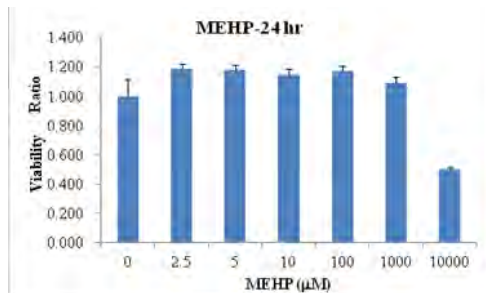


圖 16 細胞於不同濃度 MEHP 下存活比率（含 DMSO/24hr）

HCT116 培養在六種不同濃度 MEHP 中 24 小時後，較高濃度下細胞生長略增加，但是於 10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制。

8. 細胞於 MEHP 中（含 DMSO）培養 48 小時

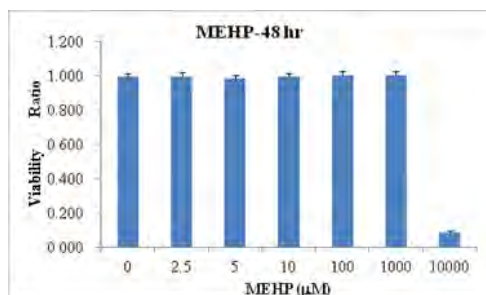


圖 17 細胞於不同濃度 MEHP 下存活比率（含 DMSO/48hr）

HCT116 培養在六種不同濃度 MEHP 中 48 小時後，於 10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制。

三、 細胞移行能力

1. 細胞於低濃度 DEHP 中培養 48 小時後，利用顯微鏡觀察之結果。

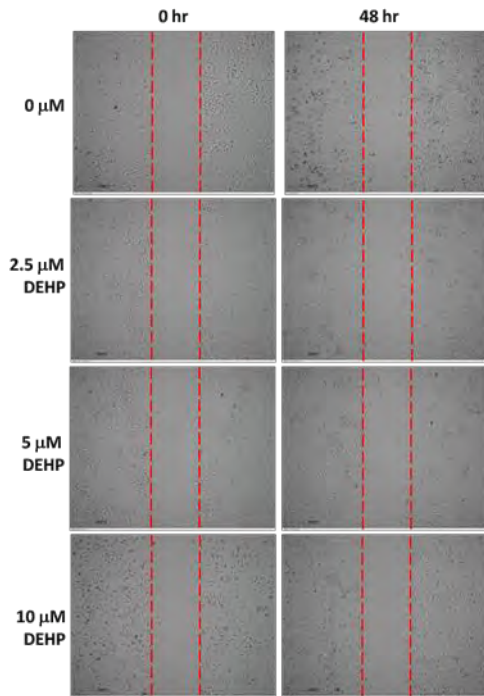


圖 18 傷口癒合試驗結果圖(DEHP/48hr)

於顯微鏡下觀察可以發現使用低濃度 (2.5 或 5 μM) DEHP 處理 48 小時後，HCT116 細胞的移行能力較未處理組明顯，而 10 μM 處理則是出現抑制情況。

2. 細胞於低濃度 MEHP 中培養 48 小時後，利用顯微鏡觀察之結果。

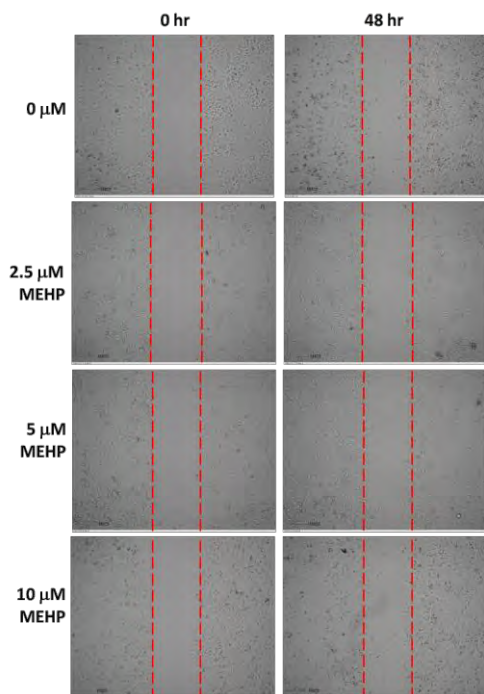


圖 19 傷口癒合試驗結果圖(MEHP/48hr)

於顯微鏡下觀察可以發現使用低濃度 MEHP 處理 48 小時後，HCT116 細胞的移行能力皆較未處理組明顯。

3. 將各濃度處理之細胞移行距離進行統計如下圖，從結果可以發現使用低濃度（2.5 μM ）DEHP 和 MEHP 處理 48 小時後，傷口的平均距離皆有顯著減少（ $p<0.05$ ），顯示低濃度（2.5 μM ）DEHP 和 MEHP 具有促進 HCT116 細胞爬行能力之作用。且也發現若是使用 10 μM DEHP 處理，則是顯著抑制 HCT116 細胞移行能力（ $p<0.05$ ）。

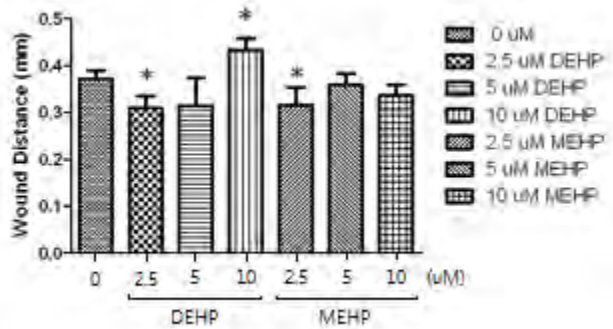


圖 20 Wound distance 長度長條圖(DEHP&MEHP/48hr)

四、細胞侵襲能力

利用 Transwell 試驗觀察不同濃度 DEHP 和 MEHP 處理之細胞，觀察 48 小時後細胞轉移數量統計結果如下圖，從結果可以知道，無論是 DEHP 或 MEHP，在低濃度處理下皆具有較多之轉移細胞數，顯示低濃度 DEHP 和 MEHP 具有促進 HCT116 細胞侵襲遷移能力之作用。

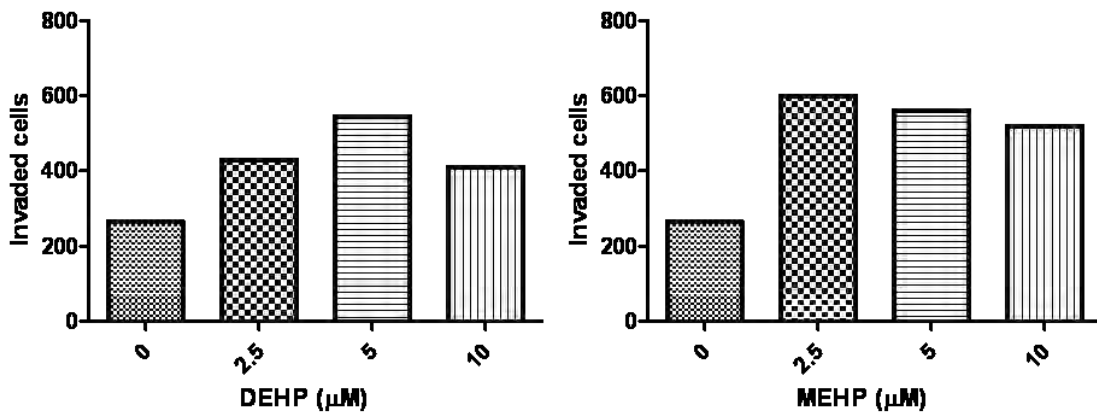


圖 21 細胞在不同濃度的 DEHP&MEHP 下 invaded cells 數量長條圖

五、細胞蛋白的含量

1. 利用西方墨點法檢測不同濃度 DEHP 和 MEHP 處理 48 小時後之細胞內蛋白

質表現情形。結果顯示皆可以偵測到細胞內預期目標蛋白質。

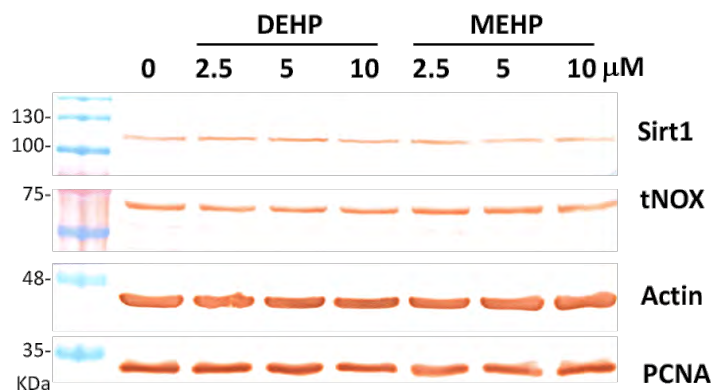


圖 22 西方墨點法之結果

2. 將西方墨點法偵測到的目標蛋白質進行表現量的比較如下圖，結果顯示細胞增生相關的PCNA 蛋白質(圖 a)、腫瘤相關抗原 Sirt1(圖 b)或 tNOX 蛋白(圖 c)，三者相對表現量並無統計上之差異。

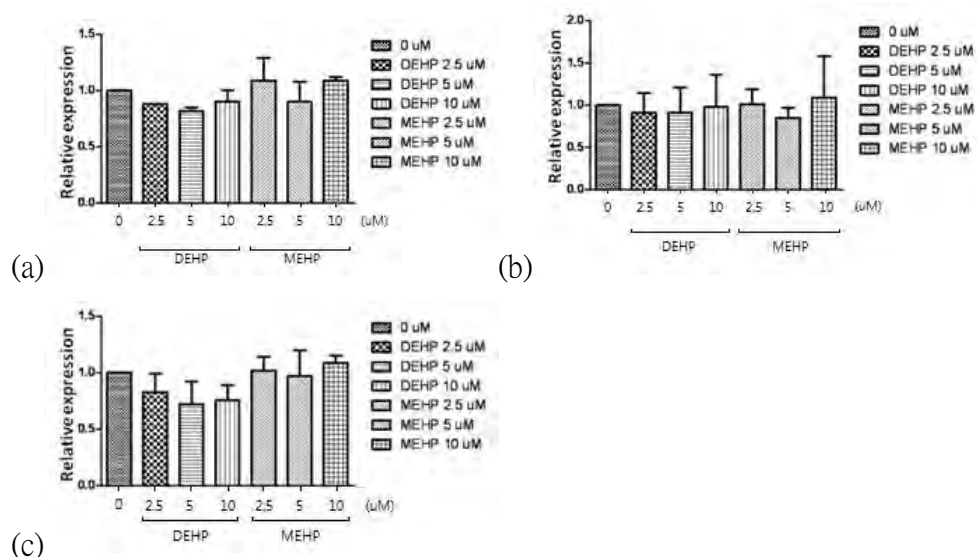


圖 23(a)~(c)分別為 PCNA、SIRT1 及 tNOX 在不同的 DEHP 和 MEHP 濃度下蛋白的表現量。

陸、 討論

一、 比較實驗所用與法規規定的塑化劑濃度差異

根據文獻，塑化劑每人每日耐受量為 0.05(mg/kg bw/day)，又根據食品容器器具包裝衛生標準，溶出試驗(正庚烷，25°C，1 小時)DEHP 溶出量不得超過 1.5ppm，而企業監測塑化劑指標值如下表：

表 8 企業監測塑化劑指標值表

食品類別		DEHP (ppm)
飲料		1
嬰幼兒食品	嬰兒奶粉	0.5
	嬰兒輔助食品	0.5
	益生菌粉末	1
	維生素	1
膠囊、錠狀食品		5
油脂類		3
主食類	米麵製品	1
甜點及其他加工食品		3

而我們實驗濃度換算如下表：

表 9 實驗濃度換算

表

DEHP(μM)	2.5	5	10	100	1000	10000
DEHP(ppm)	0.99	1.98	3.96	39.6	396	3960

因此認為我們試驗的濃度是一般情況下可能暴露之量，因此可以模擬目前大眾長期接觸後受到塑化劑之影響。由我們實驗可知，就算是攝取符合上述法規的劑量，還是有可能使得大腸癌細胞移行、侵襲能力增加。換言之，若是一名大腸癌症患者食用含有微量塑化劑的食品，我們推測可能會使癌細胞加速擴散，因此導致病情惡化。

二、 探討配置溶液加入 DMSO 的差異

在我們的實驗中，因為塑化劑本身水溶性不佳，於試驗時需添加有機溶劑如 DMSO，但正常情況下大眾接觸的容器中並不常存在有機溶劑，因此試驗時我們也需比較塑化劑溶於有機溶劑（DMSO）和水溶液中對細胞毒力之影響。

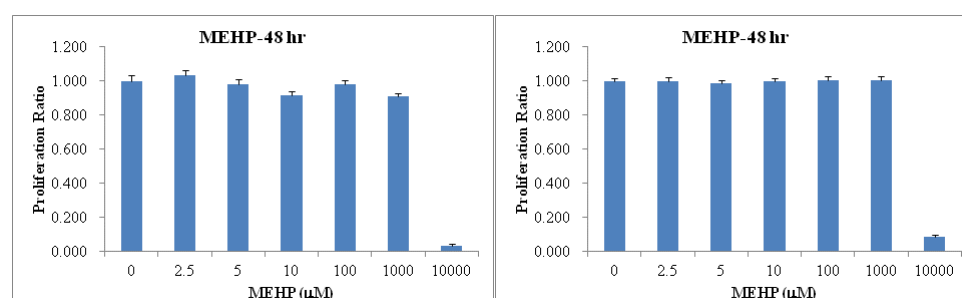


圖 24 WST 試驗-細胞於不同濃度 MEHP 下存活比率（48hr）。左圖為不含

DMSO，右圖為含 DMSO。

根據實驗結果得知在有含 DMSO 時趨勢與不含 DMSO 並無差別。

三、 細胞型態

由於 HCT116 細胞為貼附型細胞，會貼附在表面並延展開來，如左圖紅色方塊圈起的細胞所示；而當 HCT116 細胞死亡時，會變成圓球狀並懸浮於培養液中，如右圖紅色方塊圈起的細胞所示。



圖 25 左圖為未經處理過的 HCT116 細胞，右圖為 HCT116 細胞培養於 10000Mm 的 MEHP 48hr(不含 DMSO)

四、 細胞存活數目

1. 經過多次實驗，我們發現 DEHP 對 HCT116 細胞存活數目並沒有明顯影響 (圖)，但根據文獻 18，當 DEHP 濃度超過 $100 \mu\text{M}$ 時，非小細胞肺癌細胞存活率逐漸下降。所以我們推測，此差異應該來自細胞種類的不同。

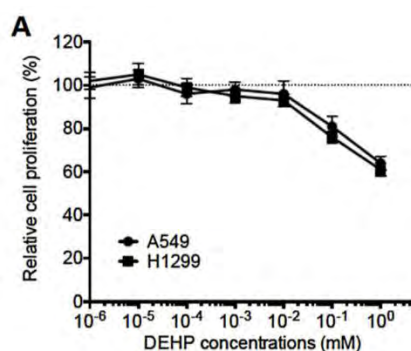


圖 26 不同濃度 DEHP 對肺癌細胞(A549&H1299)存活率的影響(48hr)，*Yingyi Wang etc.*，2017(摘自文獻 8)

2. 無論是 24 或是 48 小時，我們發現 DEHP 對 HCT116 細胞存活數目並沒有

明顯影響；而 HCT116 則是在 10000 μ M 的 MEHP，存活數目顯著降低。而根據文獻 19，發現細胞在 DEHP 及 MEHP 的不同濃度下，趨勢有部分相近，但細胞在 DEHP 處理 48hr 小時，則會在較高濃度造成細胞存活數目明顯下降，這是在我們試驗中未觀察到的現象，推論也是細胞種類不同所致。

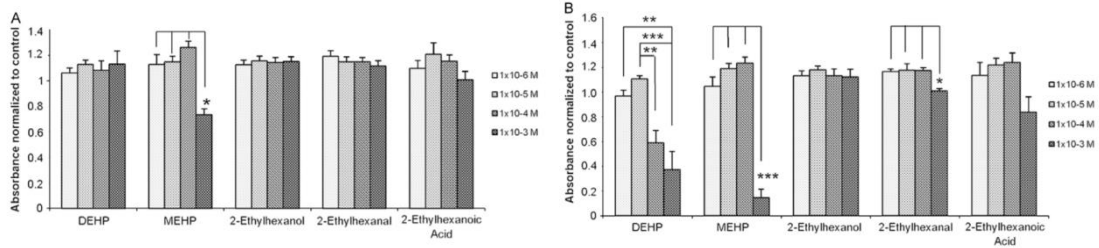


圖 27 不同濃度塑化劑對 MA-10 細胞存活數目的影響(24&48hr)，*Carlie D.Piché etc.*，2012(摘自文獻 9)

五、 細胞移行能力

在多次實驗後，我們發現在 2.5 及 5 μ M 的 DEHP 與 MEHP 對細胞移行能力有促進的影響，但在 10 μ M 的 DEHP 下卻有抑制效果，我們推測可能是濃度太高所致，而我們也找到相關文獻如下圖，當非小細胞肺癌細胞培養在較低濃度的 DEHP 下，也會促進細胞移行能力，大致符合我們實驗結果。

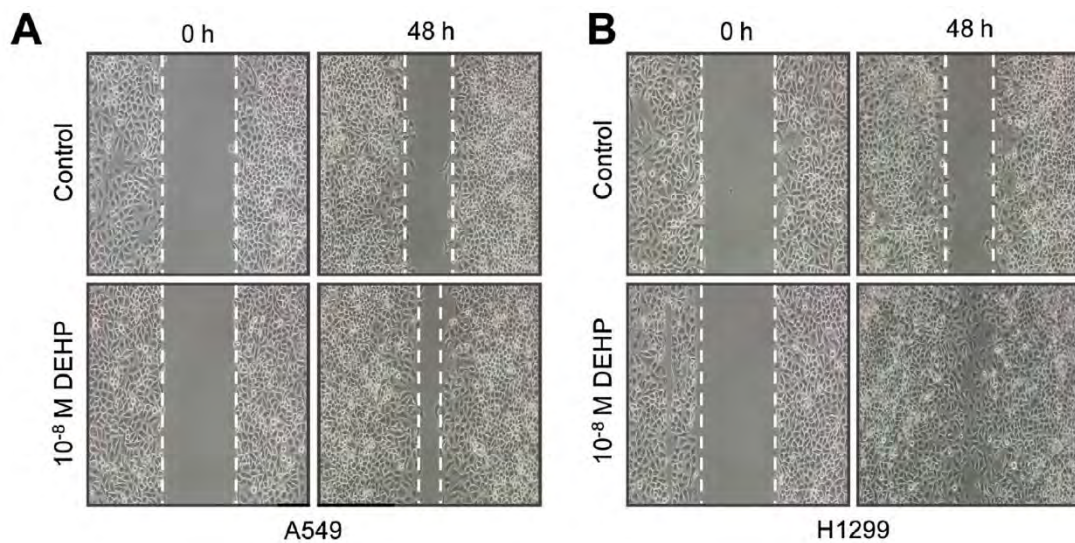


圖 28 10⁻² μ M DEHP 對肺癌細胞(A549&H1299)移行能力的影響(0&48hr)，*Yingyi Wang etc.*，2017(摘自文獻 8)

六、 細胞侵襲能力

在我們實驗結果中，顯示培養在較低濃度 DEHP 或 MEHP 的 HCT116 細胞，侵襲能力明顯增加。而在下圖我們所摘錄的文獻中，也發現在加入 DEHP 後，能促進細胞侵襲能力，故與我們實驗結果相似。

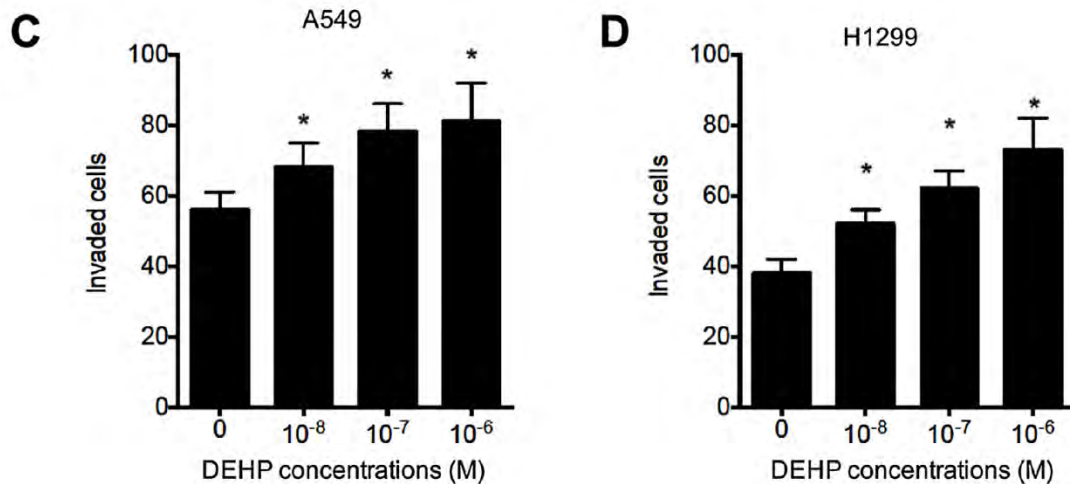


圖 29 不同濃度 DEHP 對肺癌細胞(A549&H1299)遷移能力的影響(48hr)，*Yingyi Wang etc.*，2017(摘自文獻 8)

七、 細胞蛋白的含量

在西方墨點法實驗中，我們發現蛋白質表現量並沒有較大差異，但在我們所參考的文獻如下圖，發現此實驗培養在 500ppm(約 1262.63 μ M)的 DEHP 下，大腸癌細胞在 PCNA 的表現量上卻有增加，但此實驗為在活體中實驗且實驗時間長達 15 週，推測可能為時間長短所致。

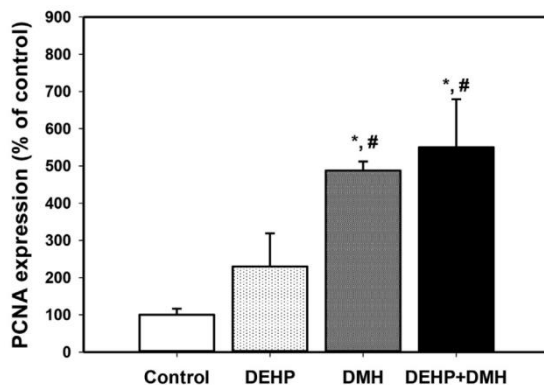


圖 30 DEHP 及 DMP 對大腸癌細胞 PCNA 蛋白質表現量的影響(15wk)，*Chen HPI etc.*，2016(摘自文獻 10)

柒、 結論

- 一、HCT116 細胞在 DEHP 實驗所設計的濃度範圍內，存活數目並無太大變化；而在 10000 μ M 的 MEHP 下，存活數目有顯著的降低。
- 二、HCT116 細胞在較低濃度的 DEHP 及 MEHP 下有促進細胞移行能力的作用，但在 10 μ M 的 DEHP 下卻有抑制其能力。
- 三、HCT116 細胞在較低濃度的 DEHP 及 MEHP 下有促進細胞侵襲能力的作用。
- 四、PCNA、SIRT1 及 tNOX 蛋白質，在有無處理 DEHP 或 MEHP 的 HCT116 細胞，其蛋白質相對表現量並無統計學上差異。

捌、 未來展望

- 一、希望能夠找到 DEHP 及 MEHP 影響 HCT116 細胞的機制。
- 二、能測試更多種類的塑化劑。
- 三、能夠測試塑化劑對正常細胞的影響。
- 四、檢查法規規定的數值是否恰當。

玖、 參考資料

1. <http://library.ndmctsgh.edu.tw/ttsweb/piggy/ttsweb/Document/000001641/327014e/21.pdf> / 大腸癌細胞培養
2. Shih-cheng Li, Ming-Yi Chung, Mei-Lien Chen. Evaluation on Estrogenic Effects of Diisononyl Adipate (DiNA) on MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines.
3. <http://www.cch.org.tw/nephro/knowledge/detail.aspx?oid=172> / 塑化劑在人體的代謝途徑
4. http://tcpa.taiwan-pharma.org.tw/sites/default/files/doc/0729-1-1_0.pdf / 食品安全(起雲劑含塑化劑)跨部會專案會議(第十六次)
5. Chen FP1, Chien MH. Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. Climacteric. 2014 Aug;17(4):377-84. doi: 10.3109/13697137.2013.865720.

6. <http://www.aaci.org.tw/news/1020415-102066.pdf> 器具容器包裝衛生標準
7. <https://www.fda.gov.tw/upload/133/%E9%99%8D%E4%BD%8E%E9%A3%9F%E5%93%81%E4%B8%AD%E5%A1%91%E5%8C%96%E5%8A%91%E5%90%AB%E9%87%8F%E4%B9%8B%E4%BC%81%E6%A5%AD%E6%8C%87%E5%BC%95-pdf%E6%AA%94.pdf> 降低食品中塑化劑含量之企業指引 - 衛生福利部食品藥物管理署
8. Wang Y,Zhao M,Liu J,Ni J,Jiao Y,Bai C. Up regulation of IL-6 is involved in di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induced migration and invasion of non small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Biomed Pharmacother.* 2017 May;89:1037-1044. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.107.
9. Piché CD,Sauvageau D, Vanlian M,Erythropel HC,Robaire B,Leask RL. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites on steroidogenesis in MA-10 cells. *Ecotoxicol Environ Saf.*2012 May;79:108-15. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.12.008.
10. Chen HP, Pan MH, Chou YY, Sung C, Lee KH, Leung CM, Hsu PC. Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate exposure on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor promotion in rats. *Food Chem Toxicol.*2017 May;103:157-167. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.014. Epub 2017 Mar 8.

【評語】 052013

在之前塑化劑事件中，新聞也曾報導過懷疑塑化劑與大腸癌有關係，因此學生想要深入探討塑化劑與大腸癌的關聯，所以在這次研究中，他們使用大腸癌細胞且加入不同濃度的塑化劑，進而觀察有什麼樣的交互影響

1. 實驗的內容可以再深入一些。既然做化劑對細胞的爬行有影響跟細胞爬行相關的蛋白質(slug、snail、vimentin...)，可以利用西方墨點來探討。
2. 促進細胞爬行的機制是何？可以深入探討增加實驗的深度。
3. 類似的實驗已有相關的報導產出，宜參考之前的文獻找出不同的方向(*Toxicol Lett.* 2018 Sep 15;294:135-144., *Chem Biol Interact.* 2017 May 25;270:1-8.)
4. 實驗組數僅做一次可能略顯不足，無法確認誤差，若今後有更多時間資源足夠應增加組數。
5. 欠缺文獻回顧與整理，對於研究的假設背後邏輯的陳述也較欠缺。討論部分對於與之前文獻不一致之處宜再深入剖析，與過去文獻相異之創新處也不亦從現有論文中看出。高濃度之 MEHP 對細胞增生之抑制作用如何解釋。

摘要

本研究利用大腸癌細胞培養於添加塑化劑DEHP及其代謝產物MEHP環境中，觀察與探討塑化劑對癌細胞的生長、轉移能力的影響，進而了解塑化劑對大眾健康的影響。WST-1試驗結果顯示僅高濃度MEHP對細胞的增生有顯著抑制作用。傷口癒合試驗結果顯示低濃度DEHP和MEHP皆顯著促進癌細胞移行的能力。細胞侵襲試驗結果顯示低濃度DEHP和MEHP皆可增加癌細胞侵襲的能力。最後使用西方墨點法分析特定蛋白質含量以探討塑化劑對癌細胞影響的機制，初步結果顯示塑化劑對細胞增生相關PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 蛋白或是腫瘤相關SIRT1 (sirtuin 1) 或tNOX (tumor associated NADH oxidase) 蛋白的表現量無統計差異。綜合以上，低濃度塑化劑DEHP和MEHP會促進大腸癌細胞之移行與侵襲之能力，促進腫瘤進展 (tumor progression)。

研究動機

近年來塑化劑的問題越來越被大眾們關注，而塑化劑出現在食品中的新聞也層出不窮。塑化劑可能影響生物體免疫、神經與內分泌系統正常運作，進而改變生殖或發育現象，而且也有致癌的風險，與我們的生活息息相關。大腸癌則是台灣人好發的癌症，在2017年的癌症排名中，男性大腸癌發病率排名第一，女性則居第二。而在之前的塑化劑事件中，新聞也曾報導過懷疑塑化劑與大腸癌有關係，因此我們想要深入探討塑化劑與大腸癌的關聯，所以在這次研究中，我們使用大腸癌細胞且加入不同濃度的塑化劑，進而觀察有什麼樣的交互影響。

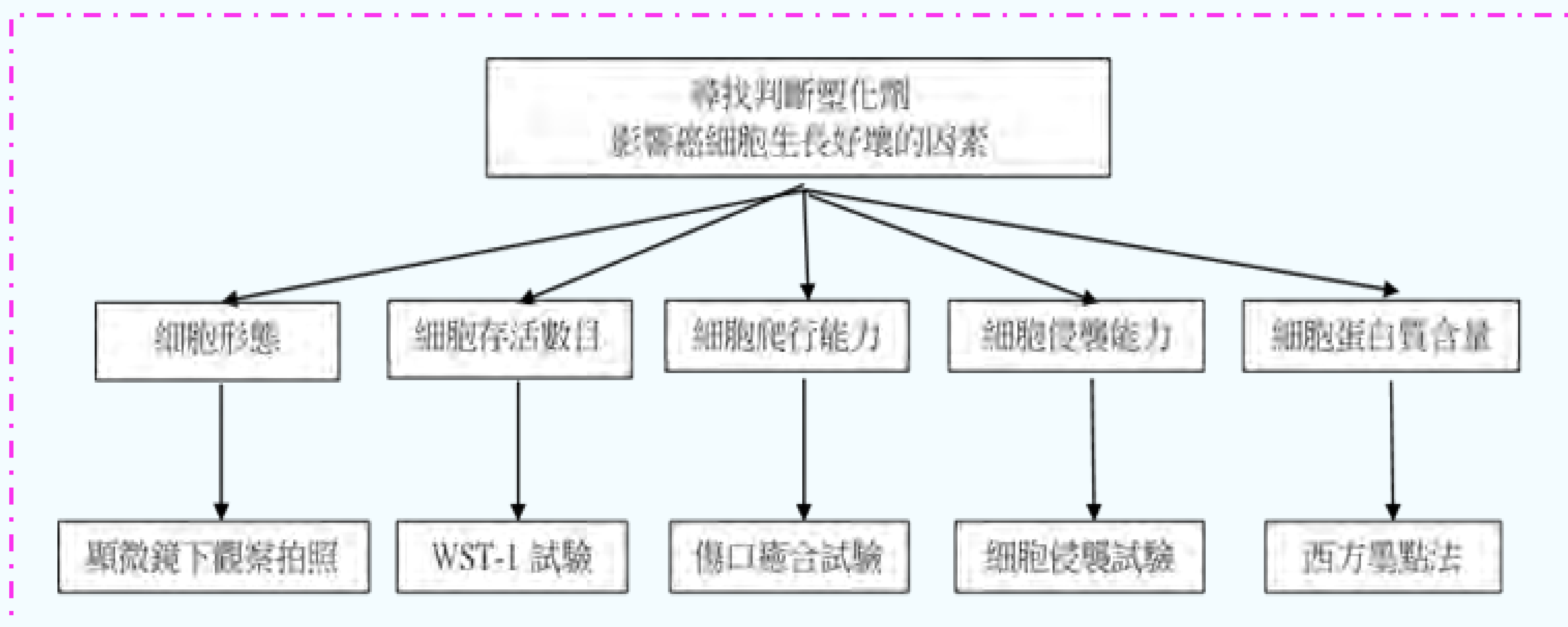
研究目的

- 一、觀察DEHP、MEHP影響大腸癌細胞的生長情況
- 二、探討DEHP、MEHP影響大腸癌細胞的爬行能力
- 三、分析影響大腸癌細胞生長情況之目標蛋白

研究設備與器材

大腸癌細胞(HCT116)、DEHP、MEHP、WST-1試驗、西方墨點法、細胞侵襲試驗、傷口癒合試驗等的相關設備。

實驗流程



一、觀察細胞形態：藉由顯微鏡觀察細胞在不同濃度的塑化劑中的生長型態是否與在正常情況生長的細胞有差異。

二、細胞存活數目：採用WST-1試驗，用以了解塑化劑對大腸癌細胞的毒性。

三、細胞移行能力：使用傷口癒合試驗測試細胞移行的能力。

四、細胞侵襲能力：使用細胞侵襲試驗測試細胞侵襲轉移的能力。

五、細胞蛋白質含量：使用西方墨點法來測定某些對癌細胞生長、爬行、轉移有影響的相關蛋白質表現量。

研究結果

一、細胞型態

由於HCT116細胞為貼附型細胞，會貼附在表面並延展開來，如左圖紅色方塊圈起的細胞所示；而當HCT116細胞死亡時，會變成圓球狀並懸浮於培養液中，如右圖紅色方塊圈起的細胞所示。

圖1左圖為未經處理過的HCT116細胞

右圖為HCT116細胞培養於10000 μM 的MEHP 48 hr (不含DMSO)

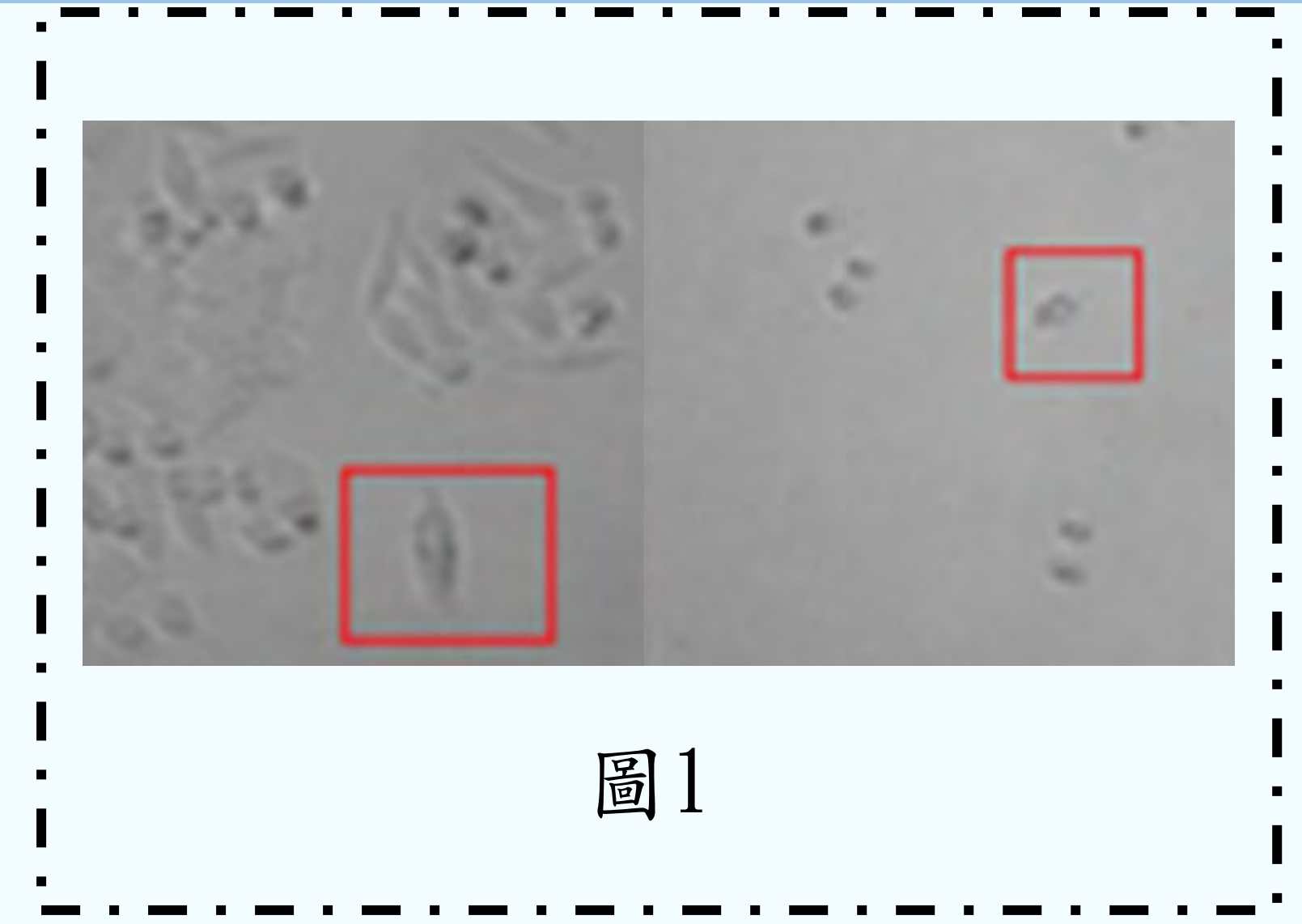
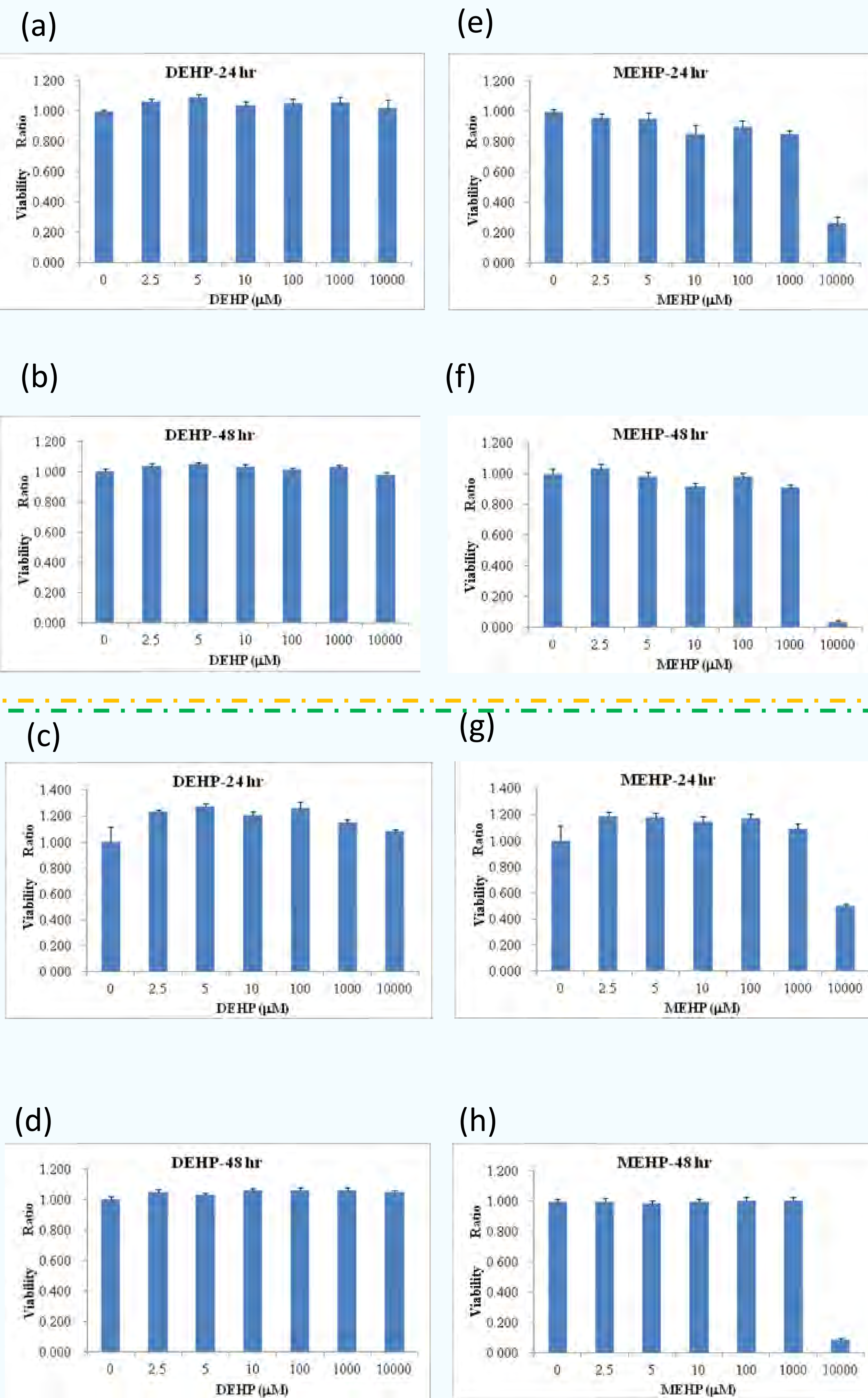


圖1

二、細胞存活數目分析WST-1試驗結果



圖a、b、為大腸癌細胞培養於DEHP(不含DMSO)24、48小時。
圖c、d為大腸癌細胞培養於DEHP(含DMSO)24、48小時。
圖e、f為大腸癌細胞培養於MEHP(不含DMSO)24、48小時。
圖g、h為大腸癌細胞培養於MEHP(含DMSO)24、48小時。
圖a、b、d其細胞生長情形皆無明顯變化，圖c其細胞生長情形些微增加，圖e在較高濃度下細胞生長略受抑制，且於10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制，圖f、h於10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制，圖g較高濃度下細胞生長略增加，但是於10000 μM 時，細胞生長受到顯著性抑制。

三、細胞移行能力

(圖3)是細胞於低濃度DEHP中培養48小時後，利用顯微鏡觀察之結果。

使用低濃度(2.5或5 μM) DEHP處理48小時後，HCT116細胞的移行能力較未處理組明顯，而10 μM 處理則是出現抑制情況。

(圖4)是細胞於低濃度MEHP中培養48小時後，利用顯微鏡觀察之結果。

使用低濃度MEHP處理48小時後，HCT116細胞的移行能力皆較未處理組明顯。

(圖5)是將各濃度處理之細胞移行距離進行統計如下圖，從結果可以發現使用低濃度(2.5 μM) DEHP和MEHP處理48小時後，傷口的平均距離皆有顯著減少 ($p < 0.05$)，顯示低濃度(2.5 μM) DEHP和MEHP具有促進HCT116細胞爬行能力之作用。且也發現若是使用10 μM DEHP處理，則是顯著抑制HCT116細胞移行能力 ($p < 0.05$)。

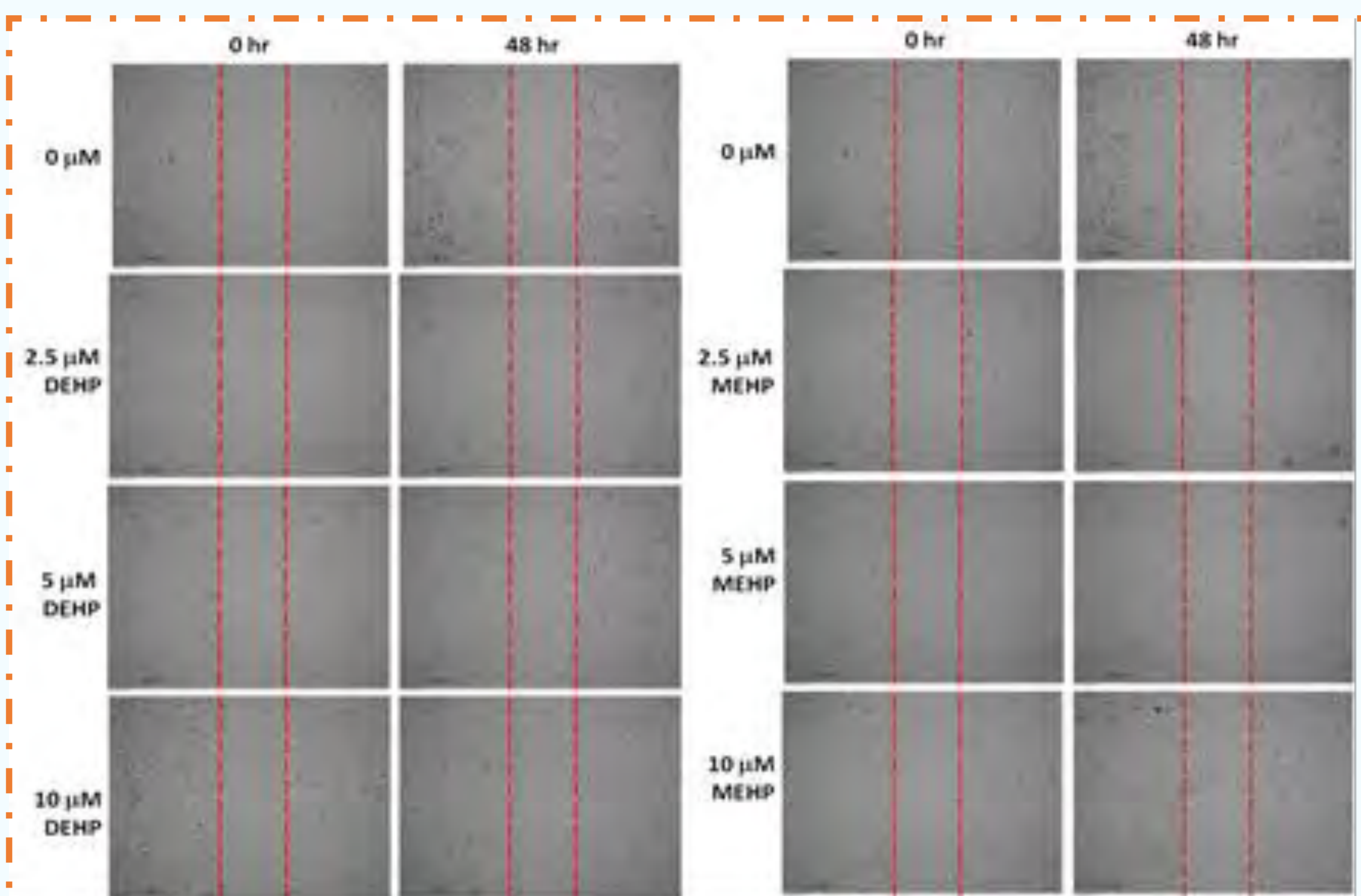


圖3 傷口癒合試驗結果

圖4 傷口癒合試驗結果

圖(DEHP/48hr)

圖(MEHP/48hr)

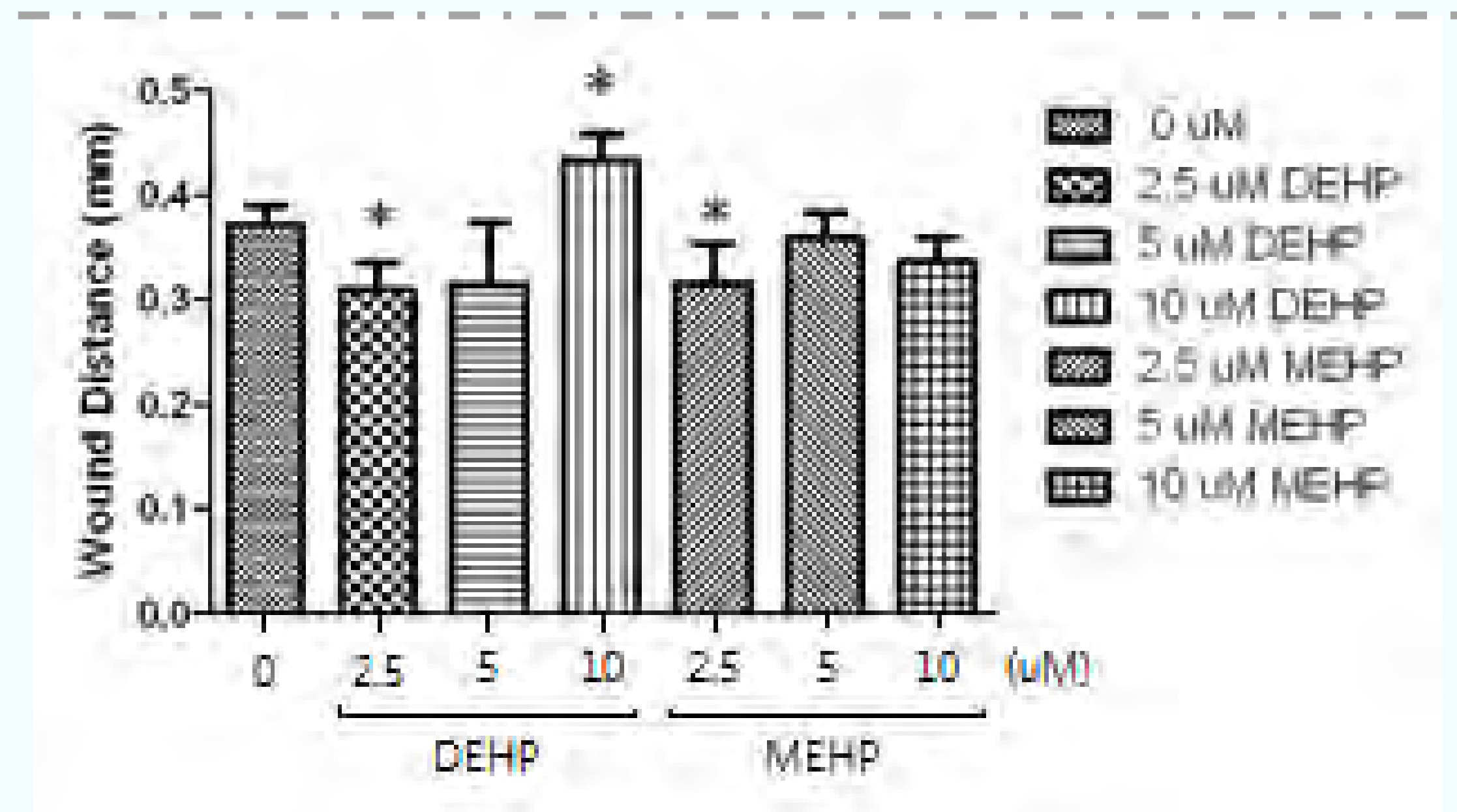


圖5 Wound distance長度長條圖 (DEHP&MEHP/48hr)

四、細胞侵襲能力

利用Transwell試驗觀察不同濃度DEHP和MEHP處理之細胞，觀察48小時後細胞轉移數量統計結果如下圖，從結果可以知道，無論是DEHP或MEHP，在低濃度處理下皆具有較多之轉移細胞數，顯示低濃度DEHP和MEHP具有促進HCT116細胞侵襲遷移能力之作用。

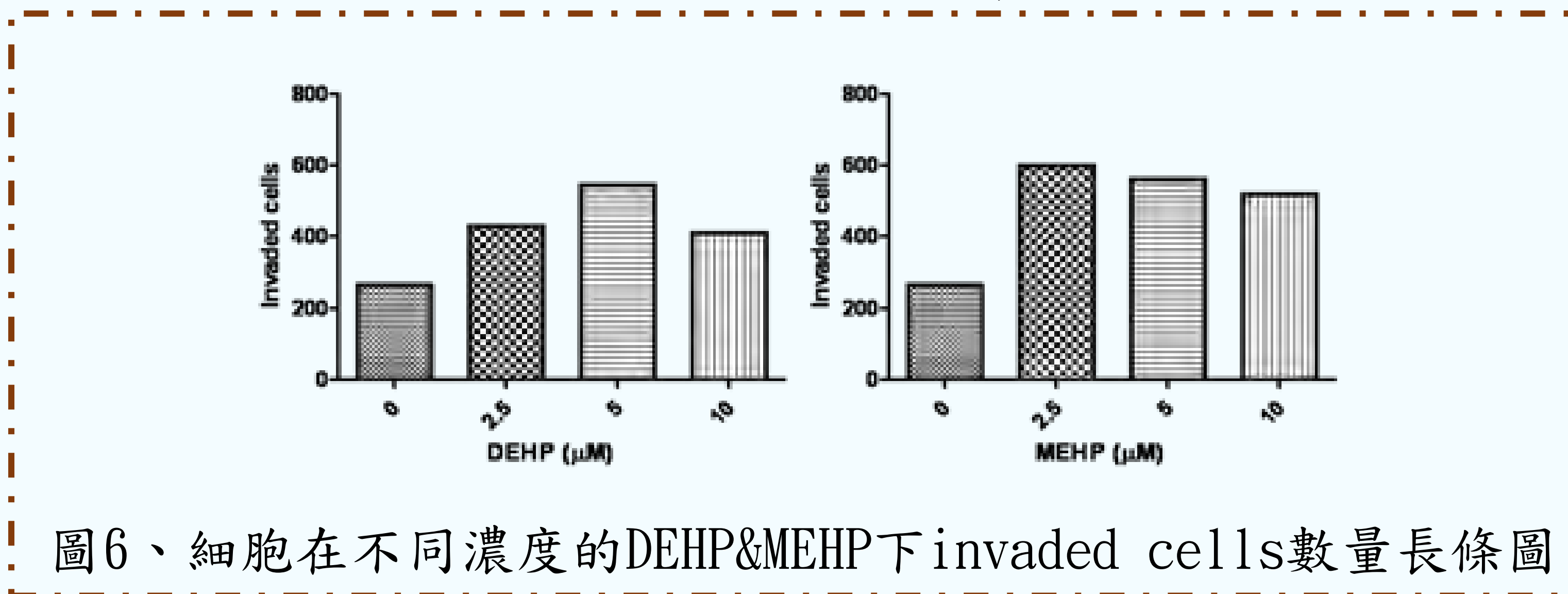


圖6、細胞在不同濃度的DEHP&MEHP下invaded cells數量長條圖

五、細胞蛋白的含量

1. 利用西方墨點法檢測不同濃度DEHP和MEHP處理48小時後之細胞內蛋白質表現情形。結果顯示皆可以偵測到細胞內預期目標蛋白質。

2. 將西方墨點法偵測到的目標蛋白質進行表現量的比較如下圖，結果顯示細胞增生相關的PCNA蛋白質(圖8、a)、腫瘤相關抗原Sirt1(圖8、b)或tNOX蛋白(圖8、c)，三者相對表現量並無統計上之差異。

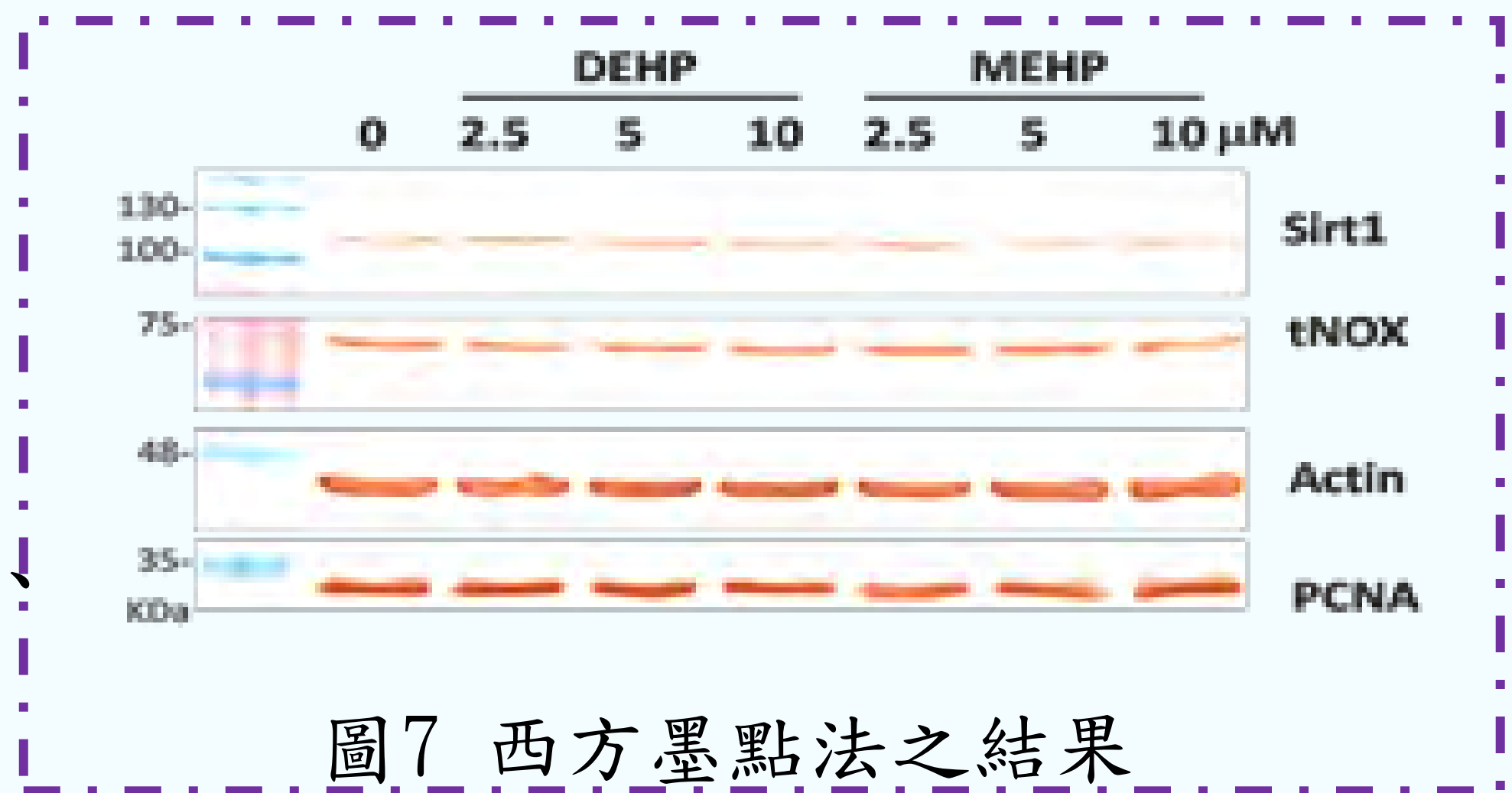


圖7 西方墨點法之結果

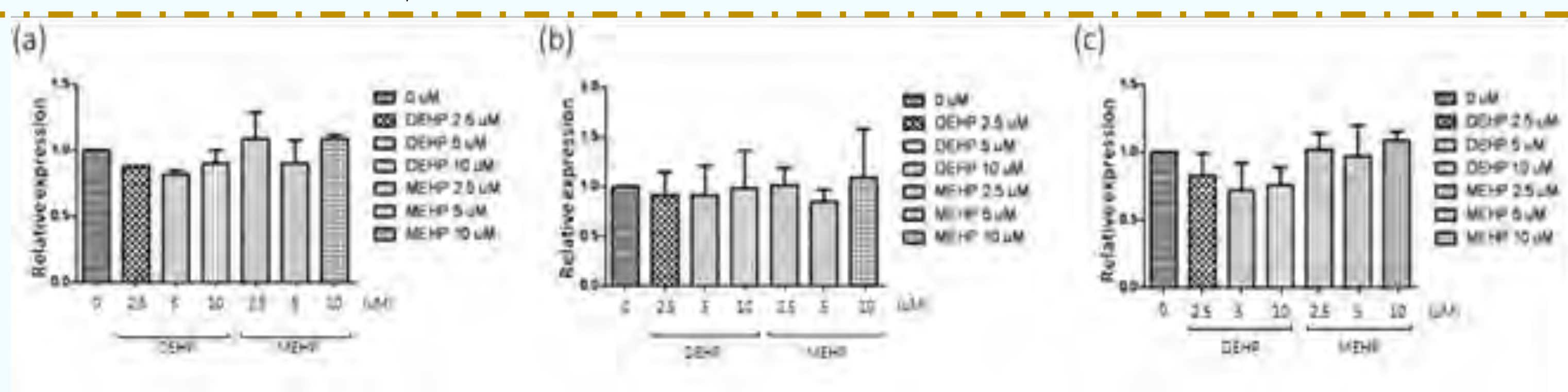


圖8、圖a：PCNA蛋白質含量比較、圖b：Sirt1含量比較、圖c：tNOX蛋白含量比較

討論

一、比較實驗所用與法規規定的塑化劑濃度差異

根據文獻，塑化劑每人每日耐受量為0.05(mg/kg bw/day)，又根據食品容器器具包裝衛生標準，溶出試驗(正庚烷，25°C，1小時)DEHP溶出量不得超過1.5ppm。

因此認為我們試驗的濃度是一般情況下可能暴露之量，因此可以模擬目前大眾長期接觸後受到塑化劑之影響。

由我們實驗可知，就算是攝取符合上述法規的劑量，還是有可能使得大腸癌細胞移行、侵襲能力增加。換言之，若是一名大腸癌症患者食用含有微量塑化劑的食品，我們推測可能會使癌細胞加速擴散，因此導致病情惡化。

DEHP(μM)	2.5	5	10	100	1000	10000
DEHP(ppm)	0.99	1.98	3.96	39.6	396	3960

表1、實驗濃度換算表

二、探討配置溶液加入DMSO的差異

在我們的實驗中，因為塑化劑本身水溶性不佳，於試驗時需添加有機溶劑如DMSO，但正常情況下大眾接觸的容器中並不常存在有機溶劑，因此試驗時我們也需比較塑化劑溶於有機溶劑(DMSO)和水溶液中對細胞毒力之影響。

根據實驗結果得知在有含DMSO時趨勢與不含DMSO並無差別。

結論

一、HCT116細胞在DEHP實驗所設計的濃度範圍內，存活數目並無太大變化；而在10000 μM的MEHP下，存活數目有顯著的降低。

二、HCT116細胞在較低濃度的DEHP及MEHP下有促進細胞移行能力的作用，但在10 μM的DEHP下卻有抑制其能力。

三、HCT116細胞在較低濃度的DEHP及MEHP下有促進細胞侵襲能力的作用。

四、PCNA、SIRT1及 tNOX蛋白質，在有無處理DEHP或MEHP的HCT116細胞，其蛋白質相對表現量並無統計學上差異。

未來展望

一、希望能夠找到DEHP及MEHP影響HCT116細胞的機制。

二、能測試更多種類的塑化劑。

三、能夠測試塑化劑對正常細胞的影響。

四、檢查法規規定的數值是否恰當。