

2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090002

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 "癌"究—小花蔓澤蘭

得獎獎項 大會獎：一等獎

美國 ISEF 正選代表：美國第 66 屆國際科
技展覽會

推薦參加英語測驗之指導教師

就讀學校 臺中市私立曉明女子高級中學

指導教師 謝麗惠

作者姓名 許芷瑄

關鍵字 小花蔓澤蘭、抗氧化、抗癌

作者簡介



我來自一個幸福和諧的家庭。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，喜歡計算數學，常看科幻懸疑小說，培養多元的思考。因從小就有接觸生物醫學的環境，自然就對邏輯推理及科學試驗產生興趣。外來種「小花蔓澤蘭」是大量的繁殖覆蓋在林木樹冠上的蔓莖類，使它成為農政單位的心頭之恨。從國中開始我思考著要如何把危機轉化成動力，把植物殺手轉化成人類幫手，讓大量摘取的小花蔓澤蘭變成有利於世界的藥草。

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嚴重破壞。我們研究發現，小花蔓澤蘭葉和根莖具有保護自由基誘發劑 AAPH 誘導紅血球溶血及清除 DPPH 自由基的能力。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(HL-60)細胞毒性(24 小時 IC₅₀ 為 129 及 203 $\mu\text{g/mL}$)。顯微鏡觀察下，血癌細胞有減少和皺縮現象；TUNEL 試驗法發現，血癌細胞 DNA 斷裂；西方墨點法發現，Caspase-3 蛋白增加、Bcl-2 蛋白減少、Bax 蛋白增加及 PARP 蛋白裂解；推論小花蔓澤蘭可能誘發血癌細胞凋亡。裸鼠移植腫瘤模式證實，小花蔓澤蘭確實具有抑制活體血癌腫瘤及誘導血癌細胞凋亡之功效。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癌的保健食品。

Abstract

Mikania micrantha (*M. micrantha*) is one of the 100 worst invasive alien species in the world. The exotic noxious weed *M. micrantha* is a perennial creeping climber grows vigorously, which heavily damages Taiwan's ecosystem. Until now, the pharmacological activities of *M. micrantha* are poorly investigated. The present study examined the antioxidant and anti-tumor activities of ethanol (95%) extracts of *M. micrantha* leaf (MML) and stem/root (MMS), and revealed its underlying molecular mechanism behind the actions. We found that AAPH [2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride]-induced oxidative hemolysis in erythrocytes was prevented by *M. micrantha* (15–45 µg/mL) in a time- and concentration-dependent manner. Furthermore, *M. micrantha* possess potential antioxidant activity against *in vitro* oxidative systems as evidenced by DPPH (α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) radical scavenging activity. The leaf and stem/root extracts of *M. micrantha* contains 51.6 and 20.9 mg/g of total polyphenols, which might be the main active components responsible for its antioxidant activity. Besides, treatment of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells with *M. micrantha* (50–200 µg/mL) significantly reduced the cell viability. Notably, *M. micrantha* treatment induced apoptosis, which was accompanied by internucleosomal DNA fragmentation, followed by a sequence of events including caspase-3 activation and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. This increased apoptosis was associated with decreased protein levels of anti-apoptotic Bcl-2 and increased levels of apoptotic Bax. Furthermore, we confirmed that *M. micrantha* treatment was effective in inhibiting tumor growth and inducing apoptosis in HL-60 xenografted nude mice. Our findings conclude that *M. micrantha* ethanol extracts may exert antioxidant properties from free radical-related diseases and offer anti-tumor activity against human leukemia.

一、前言

(一)、研究背景

1、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; Song et al., 2002)。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)?

2、抗血癌功效

衛生署統計癌症連續多年蟬聯國人十大死因榜首。血癌(俗稱白血病)占台灣癌症的第 8 位，小兒血癌更為小兒癌病之第一位，發病的人數有逐年增加之勢。血癌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 premyelocytic 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、PARP、Bcl-2 及 Bax)的表現量? 此外，我們也利用裸鼠皮下移植腫瘤模式，測定小花蔓澤蘭對抗活體血癌腫瘤之功效(Huang et al., 2012)?

(二)、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，希望將其應用於預防自由基疾病及延長罹癌者的生命。我們藉此研究結果，希望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。

(三)、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。

主要研究目標:

- 1.小花蔓澤蘭葉和根莖抗自由基 AAPH 誘發紅血球溶血的能力測試
- 2.小花蔓澤蘭葉和根莖清除 DPPH 自由基試驗
- 3.小花蔓澤蘭葉和根莖的總多酚類含量測定
- 4.小花蔓澤蘭葉和根莖對血癌細胞形態及存活率之影響
- 5.小花蔓澤蘭葉和根莖誘導血癌細胞凋亡及相關蛋白質測定(Caspase-3/ PARP/ Bcl-2/Bax)
- 6.小花蔓澤蘭葉對活體裸鼠移植腫瘤模式之影響
7. HPLC 分析小花蔓澤蘭葉活性成分

二、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. (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

2.研究場地：中國醫藥大學共同實驗室。

3.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, Na₂HPO₄ 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-amindinopropane) dihydrochloride]、磷酸 (phosphoric acid, H₃PO₄)、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。

4.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。

5.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。

(二)、研究過程或方法流程圖



(三)、小花蔓澤蘭葉及根莖樣品的前置作業

1. 採集小花蔓澤蘭
2. 種源鑑定(品種由中興大學森林系教授鑑定)
3. 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)。

(四)、小花蔓澤蘭葉及根莖樣品的製備

1. 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。
2. 過濾後去除不溶雜質, 留下溶在酒精的小花蔓澤蘭萃取物。
3. 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)。
4. 得粉末狀小花蔓澤蘭萃取物(保存於 0°C 以下)。
5. 利用甲醇將小花蔓澤蘭葉(MML)和根莖(MMS)萃取物粉末溶解調配成所需實驗濃度。



&小花蔓澤蘭葉萃取物(MML): *Mikania micrantha* leaf

&小花蔓澤蘭根莖萃取物(MMS): *Mikania micrantha* stem/root

(五)、抗氧化活性分析(Antioxidant activity)

1. 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-amindinopropane) 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：(a)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)。(b)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。(c)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：

(a)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。

(b)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。

(c)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，於 37°C 溫度下預培養 30 分鐘。接著加入 25 mM AAPH 溶液。

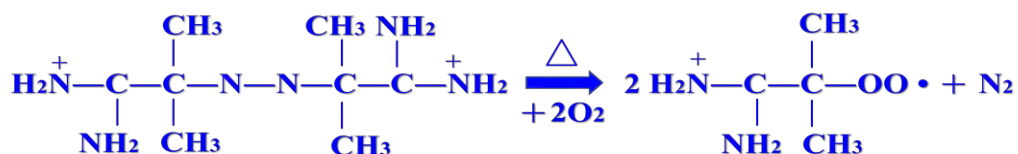
(d)實驗組三：將紅血球溶液分別與 10-30 μL 小花蔓澤蘭莖部萃取物(30~90 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，於 37°C 溫度下預培養 30 分鐘。接著加入 25 mM AAPH 溶液。

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

(f)溶血百分比：每小時取 200 μL 取混合液取離心(3000 g x 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,pH=7.4)，使呈現 100%溶血狀態作為測定參考值(100%)。

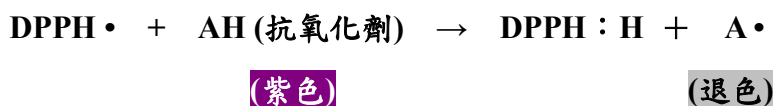
溶血百分比計算：(上清液的吸光值/測定參考值) x 100

(g) 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。



2. 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：



(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 $\mu\text{g/mL}$)。

(六)、小花蔓澤蘭葉和根莖總多酚類含量的測定 (Total polyphenols)

1. **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)。

2. 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, 0~0.5 mg/mL) 溶於 1 mL 之甲醇/水 (60:40 比例加入 0.3% 氯化氫)，再依前述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) 總多酚類含量。

(七)、人類癌細胞培養 (Cell culture)

1. **試劑**：取 RPMI-1640 (9.5g)、DMEM (9.5g) 或 DMEM/F12 (9.8g) 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。

2. 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。

3. 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)，然後將血癌細胞置於5%CO₂培養箱中培養(37 °C)。[血癌(HL-60)細胞和胃癌(AGS)細胞培養於RPMI-1640 培養液; 乳癌(MDA-MB-231)細胞培養於DMEM培養液; 肺癌(A549)細胞培養於DMEM/F12培養液]。

(八)、人類急性骨髓血癌(HL-60)細胞的毒殺試驗(Cell viability)

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 (Huang et al., 2012)。

2. 繼代培養：將血癌細胞密度維持在 $2\sim 5\times 10^5$ 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。

3. 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(0~200 µg/mL)及根莖萃取物(0~400 µg/mL)放置於37 °C培養箱反應24-72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。

(九)、胃癌、乳癌及肺癌細胞存活率(MTT)試驗

1. 原理：MTT 為水溶性的 tetrazolium salt，為黃色粉末。MTT 溶液在經由活細胞內粒線體的酵素去氫酶代謝還原後，同時在細胞色素 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，再利用異丙醇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 & Hseu et al., 2004)。

2. 存活率(MTT)測定：

- (1)將胃癌細胞(AGS, 8×10^4 細胞)、乳癌細胞(MDA-MB-231, 2×10^4 細胞)及肺癌細胞(A549, 4×10^4 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(0~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及根莖萃取物(0~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，於培養箱培養 24 小時。
- (3)抽掉原有的培養液，以 PBS 清洗一次，每個孔洞加入 400 μL 的 MTT 試劑(0.5mg/mL)反應 2 小時。
- (4)抽走原有的 MTT 溶液，此時底部應有結晶。再加入 400 μL 的 DMSO 以溶解結晶。
- (5)最後每個孔洞抽出 200 μL 的上清液於 96 孔微量盤中，以 570 nm 波長測吸光值。

(九)、西方墨點(western blotting)分析法

1. 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，分子量大的泳動率小；相反地，分子量小的泳動率大。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。

2. 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 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 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)、KH₂PO₄ (0.2 g)、Na₂HPO₄·12H₂O (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。

3. 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 μg/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。

4. 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。

5. 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 μg /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。

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 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。

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 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。

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% 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。

(十)、細胞凋亡試驗(TUNEL assay)

1.原理:為去氧核糖核苷酸末端-轉移酶的缺口末端標記分析(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling; TUNEL)。由於細胞凋亡會使染色體 DNA 斷裂，而在 DNA 斷裂口(Nick)產生大量的 3'-OH 末端，能被去氧核糖核苷酸末端轉移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT)作用，而接上帶有螢光的三磷酸去氧尿嘧啶(dUTP-FITC)，即可辨識細胞凋亡的現象。本實驗呈現的綠光為 FITC (fluorescein isothiocyanate)，藍光為細胞核染劑 DAPI (Hseu et al., 2004)。

2. 試劑配製:

(1) In Situ Cell Death Detection Kit 購自 Roche (Cat.1286400)。

Vial	試劑	內容物
1. Blue cap	Enzyme Solution	Terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus (EC 2.7.7.31), recombinant in E. coli.
2. Violet cap	Label Solution	Nucleotide mixture in reaction buffer

(2) 4% paraformaldehyde (Fixation solution): 取 4 克 paraformaldehyde 溶於 100 mL PBS 中，並調 PH=7.4，保存於 4°C 備用。

(3) Permeabilisation solution: 配製 0.1% Triton-100 in 0.1% sodium citrate 等比例混合均勻，保存於 4°C 備用。

(4) DAPI 染劑: 配製 1mg/mL DAPI 用時以 PBS (1:1000 比例)稀釋。

3. 實驗步驟:

(1) 將血癌細胞調整至 2×10^5 /mL (10 mL, 2×10^6 /dish)。

(2) 加入不同濃度的小花蔓澤蘭葉萃取物(200 μ g/mL)及根莖萃取物(400 μ g/mL)，於培養箱培養 24 小時。

(3) 抽掉原有的培養液以 PBS 清洗兩次(300 g x10 min)，各加入 200 μ L/well 的 4% paraformaldehyde 於培養箱中固定 1 小時。

(4) 移除 4% paraformaldehyde 以 PBS 清洗兩次(300 g x10 min)，加入 Permeabilisation solution (200 μ L/well)於冰上反應 2 分鐘，增加細胞膜的通透性方便染劑進入。

(5) 移除 Permeabilisation solution 以 PBS 清洗兩次(300 g x10 min)。

(6) 避光配製 Tunel mixture Solution (50 μ L/well)比例為 vial 1:vial 2 = 1:9，並置於培養箱反應 90 分鐘。

(7) 移除Tunel mixture solution以PBS清洗兩次(300 g x10 min)。

(8) 使用DAPI染劑(1:1000) 50 μ L/well，於培養箱反應5分鐘。

(9) 移除DAPI染劑後以PBS清洗兩次(300 g x10 min)，即可在螢光顯微鏡下觀察並拍照 (200x)。

(十)、腫瘤裸鼠異種移植(HL-60 xanografted nude mice)

1. 實驗動物：本實驗將用裸鼠(BALB/c-nu nude mice, 6~8 週)購自國家實驗動物中心，飼養於無塵之環境; 以自動定時器控制光照週期, 08 至 20 時屬於光照期(light period)及 20 至隔日 08 時屬於黑暗期(dark period)。裸鼠飼養於乾淨鼠籠並以乾淨的鼠糧與水加以餵食，實驗進

行前動物須先經 7 天的適應期並於第 8 天施打腫瘤(Huang et al., 2012)。

2.裸鼠皮下腫瘤移植動物模式：將血癌細胞($5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 細胞液及 $100 \mu\text{L}$ Matrigel)以皮下注射將其植入裸鼠背部右下側。將處理過的裸鼠飼養於上述環境下，至皮下細胞液被完全吸收(約施打後三天)。裸鼠隨機分組(每組裸鼠有5隻共四組)並開始腹腔注射小花蔓澤蘭葉萃取物;剔除個體差異較大之裸鼠，取4隻裸鼠做為正式數據。實驗期間每週測量腫瘤體積大小(長徑 \times 短徑 $^2/2$)及體重變化並紀錄其變化。

3.給藥途徑：採用腹腔注射方式給予小花蔓澤蘭葉萃取物，每週注射 3 次。實驗期間為期 21 天，共注射 9 次。試驗組別為：(1)控制組(21 天)；(2)小花蔓澤蘭組(50 mg/kg; 21 天)；(3)小花蔓澤蘭組(100 mg/kg; 21 天)。並在第 21 天給藥期結束後，以給予二氧化碳方式犧牲動物，解剖並取出腫瘤，測量其重量與體積後以 10%福馬林固定。(4)小花蔓澤蘭預防組(100 mg/kg; 35 天):先給予裸鼠腹腔注射小花蔓澤蘭葉萃取物 1 週(注射 3 次);血癌細胞皮下注射裸鼠背部右下側，給藥至第 21 天;停止給藥後觀察至第 35 天(觀察腫瘤再成長情形)。裸鼠犧牲方法同上。

4. 腫瘤組織包埋與切片：將腫瘤組織經過固定、脫水及浸蠟後，更換石蠟浸潤用以滲透組織。將石蠟完全浸潤的組織置於包埋框中，加入溶化的石蠟靜待冷卻後除去模子，以 $5 \mu\text{m}$ 的厚度連續切片，置於 38°C 水中使其完全伸展後置於玻片上烘乾。(腫瘤組織送至中興大學廖俊旺教授實驗室/感謝協助)。

(十一)、組織病理分析(H&E staining)

1.原理：為蘇木紫與伊紅染色(Hematoxylin and Eosin stain)，簡稱 H&E 染色。是目前最常用的一種染色法，主要作為細胞核和細胞質的辨別。蘇木紫為一種鹼性染劑，可經氧化作用將細胞核和其他酸性結構染成藍色；而伊紅為一種酸性染劑，則可將細胞質染成紅色(Huang et al., 2012)。

2.試劑：(1)二甲苯(xylene)。(2)序列酒精：酒精配製成 100%、95%及 70%。(2) Hematoxylin solution 配製: 50 g 銨或鉀礬(Ammonium or potassium aluminum sulfate); 1 g hematoxylin crystals; 0.2 g 碘酸鈉(sodium iodate); 1 g 檸檬酸(citric acid); 50 g 水化氯醛(chloral hydrate); 1000 mL 蒸餾水。(3) Eosin solution 配製: 1 g Eosin Y; 300 mL 95%酒精; 1000 mL 蒸餾水。

3.方法：

(1)**脫臘：**切片需用xylene脫臘。將玻片取出放置於第一缸xylene中，再將此缸放置於 70°C 烘箱2分鐘。為使脫臘完全，將玻片置於第二缸xylene中反應2分鐘。

(2)**回水：**將玻片置於酒精順序為 100%、95%及 70%，每缸序列酒精反應的時間為 10 秒。

(3)二次水清洗20秒，再用Hematoxylin solution染30至50秒。

(4)以0.1%醋酸水中反應20秒，並用二次水沖洗7分鐘。

(5)再用Eosin solution染1分40秒，而後進行脫水的流程(依序置放80%酒精30秒、95%酒精30秒、95%酒精20秒、100%酒精20秒、100%酒精30秒)，最後再用xylene共澄清3次(前2次每次20秒/後1次1分鐘)，並以mounting gel封片。

(十一)、組織細胞凋亡分析(Tissue TUNEL assay)

1.試劑:(1) 10 mM Citrate Buffer (pH=6.0):9 mL (0.1M) citric acid、41 mL (0.1M) Sodium citrate 再以二次水定量至 500 mL，儲存於 4°C 冰箱備用。

(1)脫臘：同上。

(2)回水：同上。

(3)復性：本實驗使用加熱法來達到復性效果，藉由熱誘導和酵素方法暴露出抗原。將玻片置於抗原修復液(Antigen retrieval solution, Citrate buffer)中，因高溫會蒸發水分，液面需蓋過玻片以防乾煮；微波 15-20 分鐘至溶液達到沸點左右。

(4)將玻片夾出，放入二次水中待其稍微冷卻；再用 DaKo Pen (一種臘圈筆可以阻止液體流出的筆)將組織周圍圈住(目的為節省染劑或抗體使用量)。

(5)加入 0.1M Tris-HCl 反應 30 分鐘；以 PBS 沖洗兩次，第二次沖洗時留置 2 分鐘周圍擦乾。

(6)加入 TUNEL reaction mixture (1:12)。避光放置於培養箱中 60 分鐘。

(7)以 PBS 沖洗兩次，留置 2 分鐘周圍擦乾。使用 mounting gel 封片。

(8)光學顯微鏡下(200 X)觀察並拍照。

(9)每張照片隨機取 5-6 個區域並計算其陽性表現。以 positive 組為基準值，將各組換算成百分比製圖(每組 n=3)。

(十二)、組織蛋白質萃取 (Tissue protein extraction)

1.原理: 利用高張蛋白裂解液和均質機，將腫瘤組織磨碎而使細胞破碎，使蛋白質溶解變性並抑制蛋白酶活性使蛋白質穩定，再利用高速離心收集上清液提取蛋白質，進行組織西方墨點法實驗(Huang et al., 2012)。

2. 試劑配製：RIPA buffer

試劑	儲藏溫度	需要量	最終濃度
1M Tris-HCl	RT	5 mL	50 mM
0.5M EDTA (pH=8)	RT	200 μ L	1 mM
4M NaCl	RT	200 μ L	150 mM
NP-40	RT	1 mL	1%
10% Na-deoxycholate	-20°C	2.5 mL	0.25%
10% SDS	RT	1 mL	0.1%
Protease inhibitor cocktail	-20°C		0.1%
Phosphatase inhibitor cocktail II	4°C		1%
Phosphatase inhibitor cocktail III	4°C		1%

以二次水定量到 100 mL 儲藏在室溫，使用前依 RIPA buffer 使用量加入 1% 抑制劑。

3. 實驗步驟:

- (1) 將欲均質組織和 500 μ L RIPA buffer 加入均質專用玻璃管。
- (2) 再以 Glas-Col Homogenizer 均質，將臟器均勻磨碎後收集到微量離心管。
- (3) 4°C 下 10000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液至新的微量離心管並測蛋白質濃度，進行西方墨點法實驗。

(十三)、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分佈係數不相同（即親和力不同），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，因而達到分離效果。樣品進行分離時也可以改變流動相(Acetonitrile)來進行梯度沖提。Column 選用較小顆粒的 Packing size 及較長鏈的填充物或者管柱半徑較小者以增加其分離效果。(感謝中國醫藥大學黃慧琪教授實驗室協助)

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

(1) 沖提溶劑系統(Solvent system): 0-60 min 10-30% Acetonitrile。自動收集器(Auto sampler): SIL-20A。幫浦(Pump): LC-20AT。偵測器(Detector): SPD-M20A。恆溫箱(Oven): CTO-20A。管柱(Column): COSMOSIL5 C18-AR II (4.6 x 250 mm, 5 μ m)。壓力(Press): 100 kgf。注入量(Injection volume): 20 μ L。

(2) 紫外線/可見光檢測器(UV/VIS detector): 靈敏度可達 10^{-8} g/mL，優點是溫度效應低，易於

梯度沖提，而且便宜使用方便，可分析大部分的有機物質。

(3)光電二極管矩陣偵測器(PDA, Photodiode Array Detector):光電二極管矩陣偵測器不僅能提供吸收度的訊息，同時還能提供各波峰光譜，所得到的是三度空間的資訊，即滯留時間軸、吸收度軸與波長軸，由光譜的訊號即可判斷波峰的純度和強度。

3.實驗步驟: 小花蔓澤蘭葉萃取物(注入量 20 μL)經 HPLC 分離及分析，紫外線/可見光檢測器及光電二極管矩陣偵測器分析，取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜: (1) UV254 nm。 (2) UV230 nm。 (3) 3D 全波長掃描(200-400 nm)。 (4) 2D 全波長掃描(200-400 nm)。

三、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 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，幾乎皆可以完全抑制(100%) AAPH 誘發的紅血球溶血作用 (Fig 1A)。加入小花蔓澤蘭根莖萃取物(30、60 和 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，則根莖萃取物 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度才可以達到完全抑制(100%)紅血球溶血作用 (Fig 1B)。本實驗亦使用維生素 E (1、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作為正向的控制組，只有維生素 E (偏水溶性 Trolox) 達到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度，才可以接近完全抑制(約 100%)紅血球溶血作用 (Fig 1C)。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 (Fig 1A-C 結果以 Mean \pm SD 表示, $n=3$; $p < 0.05$)。

2. 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig 2)與根莖萃取物(300~1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作為正向的控制組 (Fig 2)。結果顯示，240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小花蔓澤蘭葉萃取物、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的根莖萃取物以及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗氧化維生素 E，具有相同清除 DPPH 自由基的能力(大約 80%) (Fig 2 結果以 Mean \pm SD 表示, $n=3$; $p < 0.05$)。

3. 小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物的總多酚類含量

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 (Fig 3 結果以 Mean \pm 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。

4. 小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物對人類急性骨髓血癌細胞(HL-60, Human premyelocytic leukemia cells)細胞形態及細胞存活率(Cell Viability)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(0~200 $\mu\text{g/mL}$)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(Fig 4A)。相同地，血癌(HL-60)細胞加入根莖萃取物(0~400 $\mu\text{g/mL}$) 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(Fig 4B)。

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 至 72 小時於顯微鏡下計數細胞數目。加入小花蔓澤蘭葉萃取物(0~200 $\mu\text{g/mL}$)處理 24, 48 及 72 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 129, 126 及 81 $\mu\text{g/mL}$ (Fig 4A)。在高濃度小花蔓澤蘭葉萃取物(200 $\mu\text{g/mL}$)作用下，血癌細胞存活率皆小於 20%。相同地，血癌細胞加入根莖萃取物(0~400 $\mu\text{g/mL}$) 處理 24, 48 及 72 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 203, 226 及 180 $\mu\text{g/mL}$ (Fig 4B)。在高濃度小花蔓澤蘭根莖萃取物(400 $\mu\text{g/mL}$)作用下，血癌細胞存活率皆小於 15%。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(Fig 4A-B 結果以 Mean \pm SD 表示, $n=3$; $p < 0.05$)。

5. 小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物對癌(乳胃肺)細胞存活率測定

加入不同濃度的小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物作用癌細胞，以 MTT 試驗測定細胞存活率。加入小花蔓澤蘭葉萃取物(0~400 $\mu\text{g/mL}$)處理 24 小時後，發現乳癌、胃癌、肺癌細胞的 IC_{50} (抑制 50%細胞存活率濃度)為 208, 252 及 >400 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1)。加入小花蔓澤蘭根莖萃取物(0~400 $\mu\text{g/mL}$)處理 24 小時後，發現乳癌、胃癌、肺癌細胞的 IC_{50} (抑制 50%細胞存活率濃度)為 396, >400 及 >400 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1)。總結，比較小花蔓澤蘭(葉和根莖)萃取物抗癌活性，發現抗血癌>乳癌>胃癌>肺癌。

6. 測定小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物誘導血癌細胞凋亡

細胞凋亡(Apoptosis)早期會出現細胞皺縮 (Cell shrinkage)、染色質濃縮 (chromatin condensation)及 DNA 斷裂(DNA fragmentation)等現象；晚期則細胞核開始裂解並形成凋亡小體(apoptotic bodies)而受到鄰近吞噬細胞的吞噬，在此過程不會引起發炎反應而危害周圍組織。一般認為藥物誘發癌細胞進行凋亡是一種好的抗癌機制，可藉此減少藥物引起的副作用。

用。本實驗利用 TUNEL assay 來偵測血癌細胞凋亡，由於細胞凋亡在 DNA 斷裂口，可被 terminal transferase 作用加上具螢光的 dUTP-FITC，在螢光顯微鏡下 DNA 斷裂處就會出現綠色螢光的現象。結果顯示，血癌細胞加入小花蔓澤蘭葉萃取物(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及根莖萃取物(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培養 24 小時後，可偵測到血癌細胞有產生綠色螢光的現象(Fig 5 結果以 Mean \pm SD 表示, n=3; $p < 0.05$)。本實驗證實，小花蔓澤蘭葉及根莖萃取物具有誘導血癌細胞進行細胞凋亡的能力。

7. 測定小花蔓澤蘭葉和根莖萃取物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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 (Fig 6)。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(Fig 6)。加入小花蔓澤蘭根莖萃取物(0~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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(Fig 6)。我們亦發現 Bcl-2 表現量減少而 Bax 表現量增加(Fig 6)。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。

8. 小花蔓澤蘭葉萃取物對活體裸鼠移植腫瘤模式之影響

體外細胞試驗發現，小花蔓澤蘭可抑制血癌腫瘤增生及誘發細胞凋亡。利用裸鼠異位移植腫瘤(Nude mice xenografted tumor)模式，進行活體血癌細胞(HL-60)腫瘤之生長抑制。利用裸鼠腹腔注射給予小花蔓澤蘭(葉萃取物)作為實驗組(50 或 100 mg/kg；0.1% DMSO)，而腹腔注射投予 PBS (0.1% DMSO)作為控制組。實驗為期三星期(21 天)後觀察裸鼠體重變化，結果發現控制組與實驗組，實驗前後並沒有太大變化(Fig 7)；結果顯示，小花蔓澤蘭對於活體生物，並不影響其正常生理狀況。活體裸鼠腫瘤體積變化發現，小花蔓澤蘭組對腫瘤有明顯抑制增生效果($p < 0.05$) (Fig 7)。其中，我們將小花蔓澤蘭預防組(100 mg/kg；preconditioned)於腹腔注射 21 天後停止用藥，發現裸鼠腫瘤會再回復生長(觀察至 35 天) (Fig 7)。

9. 小花蔓澤蘭對裸鼠皮下植入血癌細胞之腫瘤生長抑制作用

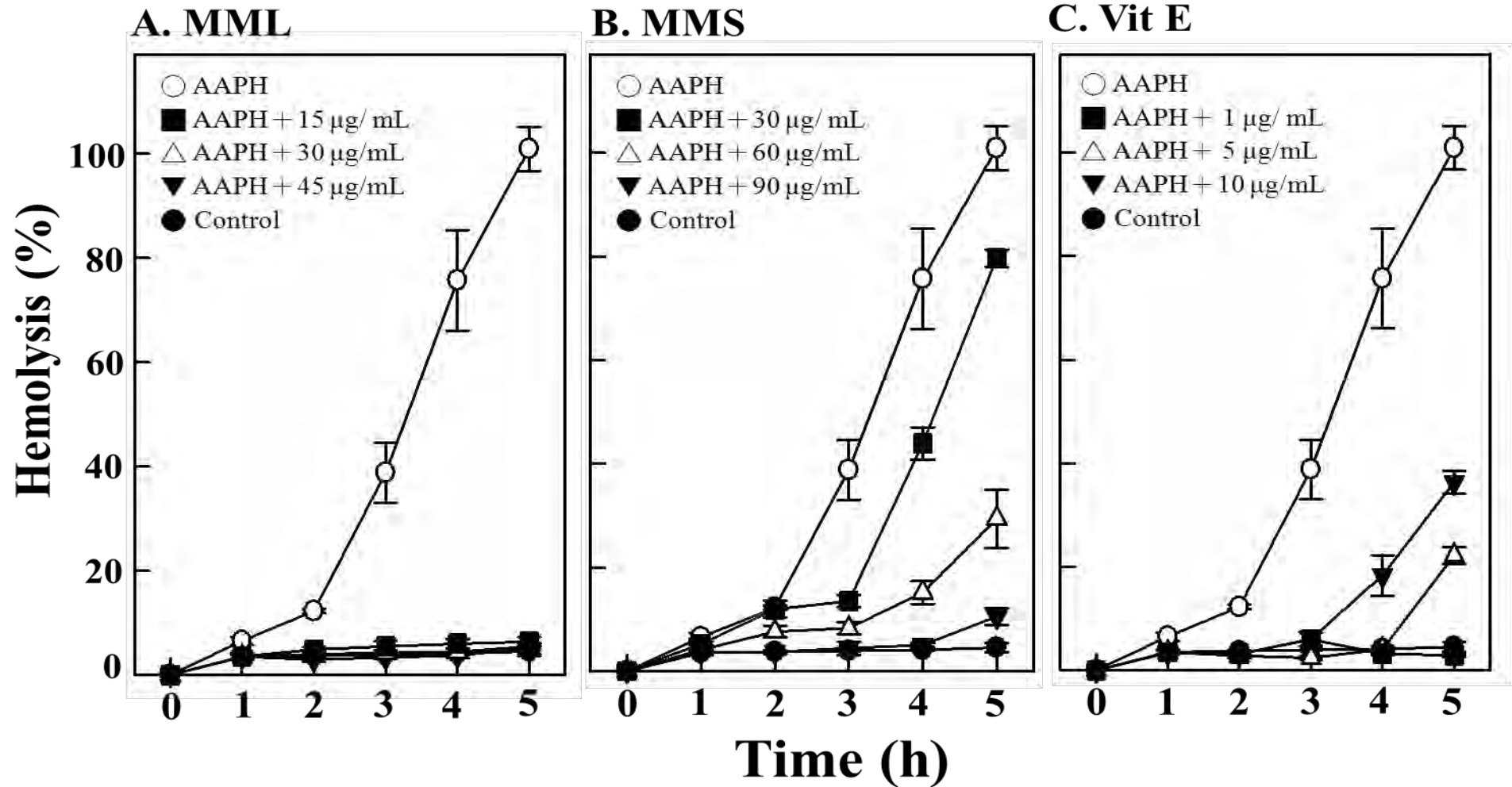
接著將裸鼠犧牲切除腫瘤組織，測定腫瘤重量發現，小花蔓澤蘭組(50 或 100 mg/kg)對腫瘤重量有明顯抑制($p < 0.05$) (Fig 8A)；小花蔓澤蘭預防組(100 mg/kg；preconditioned) 21 天後停止用藥，發現裸鼠腫瘤重量會再增加回復(Fig 8B)。將裸鼠腫瘤進行包埋，腫瘤組織病理

切片進行 H&E 染色。結果發現，控制組的裸鼠腫瘤具高度的有絲分裂；小花蔓澤蘭實驗組 (50 或 100 mg/kg) 則呈現低度有絲分裂及細胞凋亡的情形 (Fig 9A)。利用 TUNEL 測試法分析發現，經過小花蔓澤蘭給予的裸鼠腫瘤細胞表現出細胞凋亡的現象 (綠色螢光強度較強)；控制組裸鼠腫瘤細胞呈現無細胞凋亡現象 (螢光強度較弱並且無明顯標的細胞) (Fig 9B)。取裸鼠腫瘤組織均質後定量蛋白質，利用西方墨點法分析細胞相關凋亡蛋白，實驗發現小花蔓澤蘭實驗組 (50 或 100 mg/kg) 可使腫瘤細胞 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，小花蔓澤蘭在活體具誘發血癌細胞凋亡能力 (Fig 9C)。

10. 小花蔓澤蘭葉萃取物的 HPLC 分析指紋圖譜

小花蔓澤蘭葉萃取物以 HPLC 分離，經紫外線/可見光檢測器及光電二極管矩陣偵測器分析，取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜 (Fig 10): (1) UV254 nm。 (2) UV230 nm。 (3) 3D 全波長掃描 (200-400 nm)。 (4) 2D 全波長掃描 (200-400 nm)。我們已取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜，未來將進一步分析鑑定小花蔓澤蘭抗氧化及抗血癌的活性成分。

Fig 1. Effects of MML and MMS on AAPH-induced hemolysis in RBCs



MML: *Mikania micrantha* leaf (小花蔓澤蘭葉萃取物)

MMS: *Mikania micrantha* stem/root (小花蔓澤蘭根莖萃取物)

Fig 2. DPPH radical scavenging activity of MML and MMS

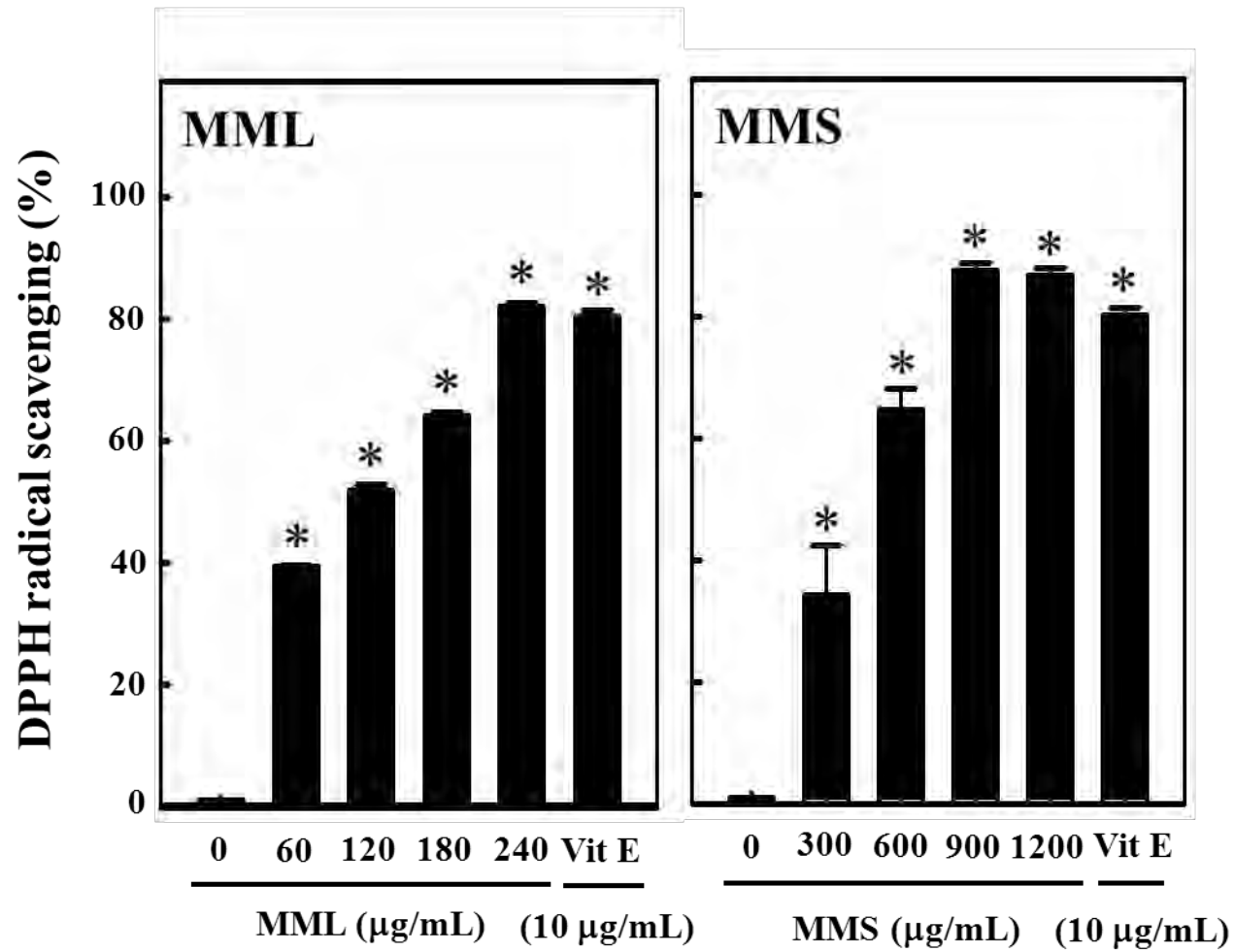


Fig 3. Total polyphenol contents of MML and MMS

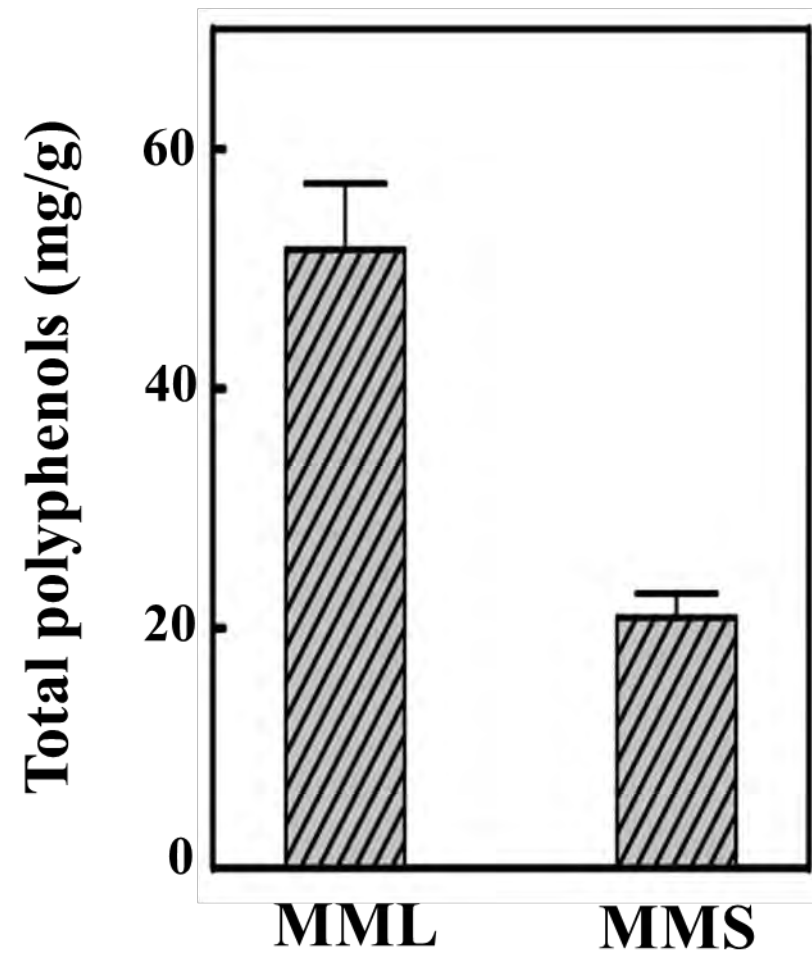
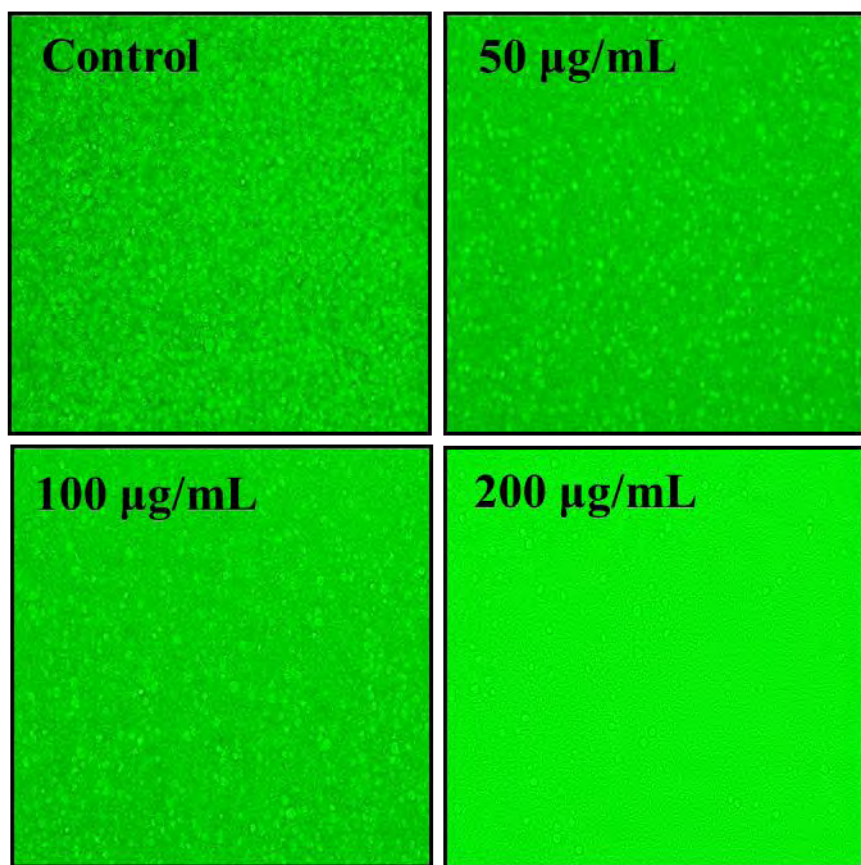
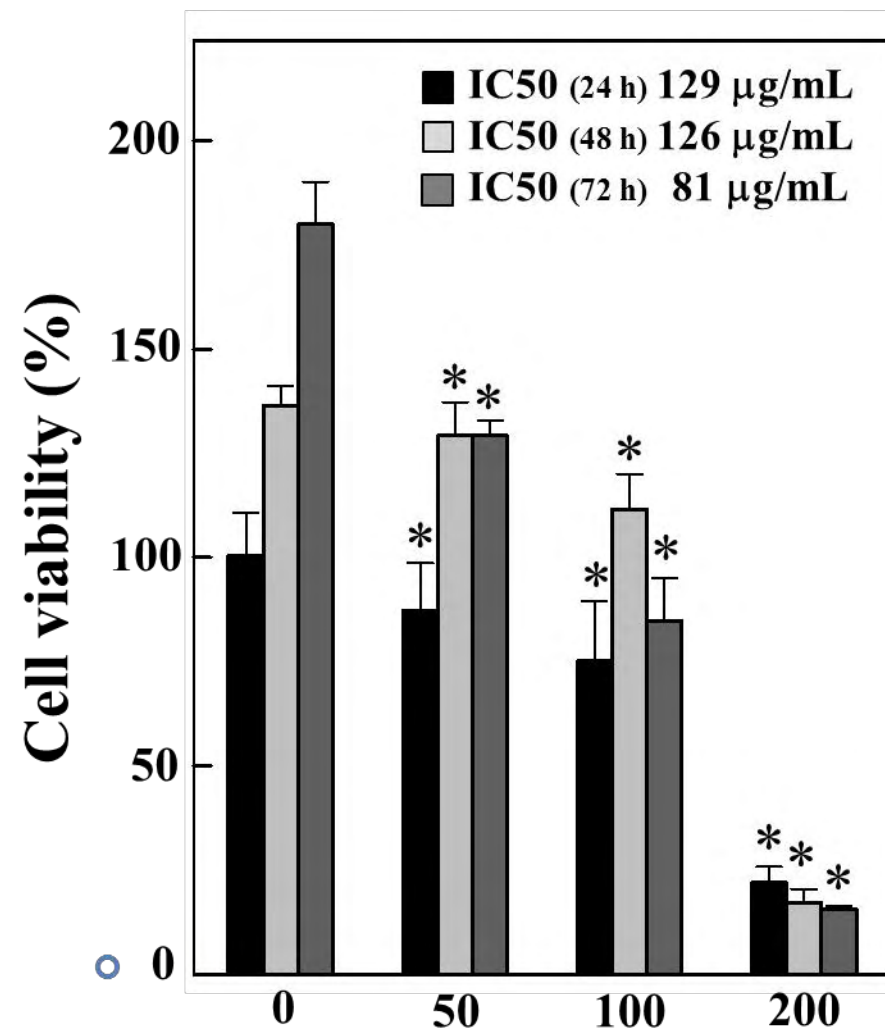


Fig 4. MML (A) and MMS (B) inhibited the proliferation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells

A



(24 h)



B

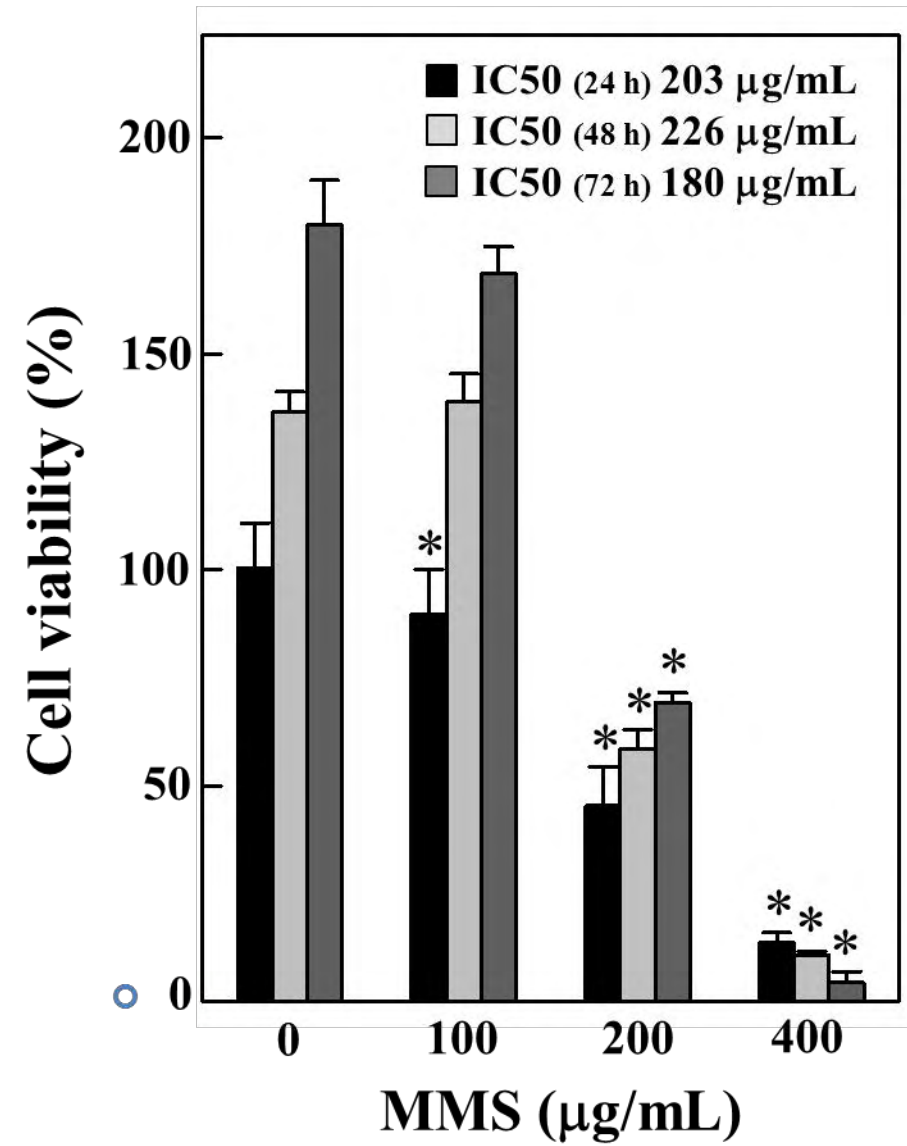
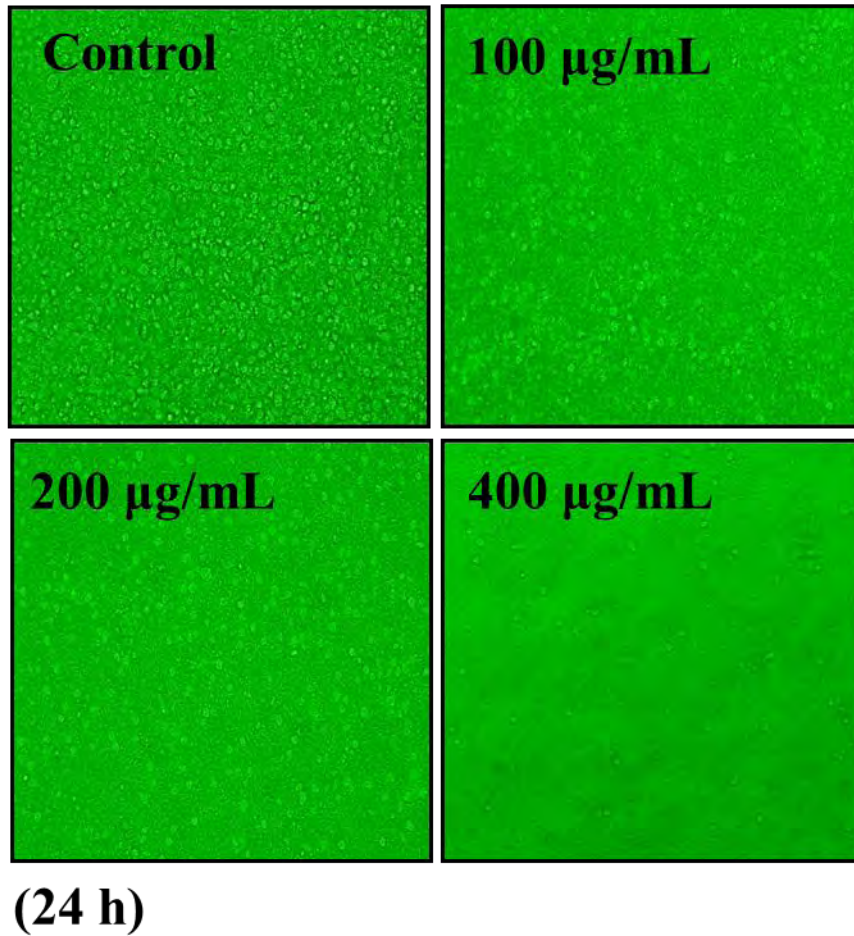


Table 1. Effect of MML and MMS on the proliferation of human cancer cells

Tumor cell lines	IC ₅₀ (µg/mL)	
	MML	MMS
HL-60	129	203
MDA-MB-231	208	396
AGS	252	> 400
A549	> 400	> 400

IC₅₀: Concentrations required to inhibit 50 % of cell growth. Cancer cells (2~8 × 10⁴ cells/well) were treated with different concentrations of MML and MMS (0–400 µg/mL) from *Mikania micrantha* for 24 h.

Fig 5. MML and MMS induced apoptotic DNA fragmentation in HL-60 cells

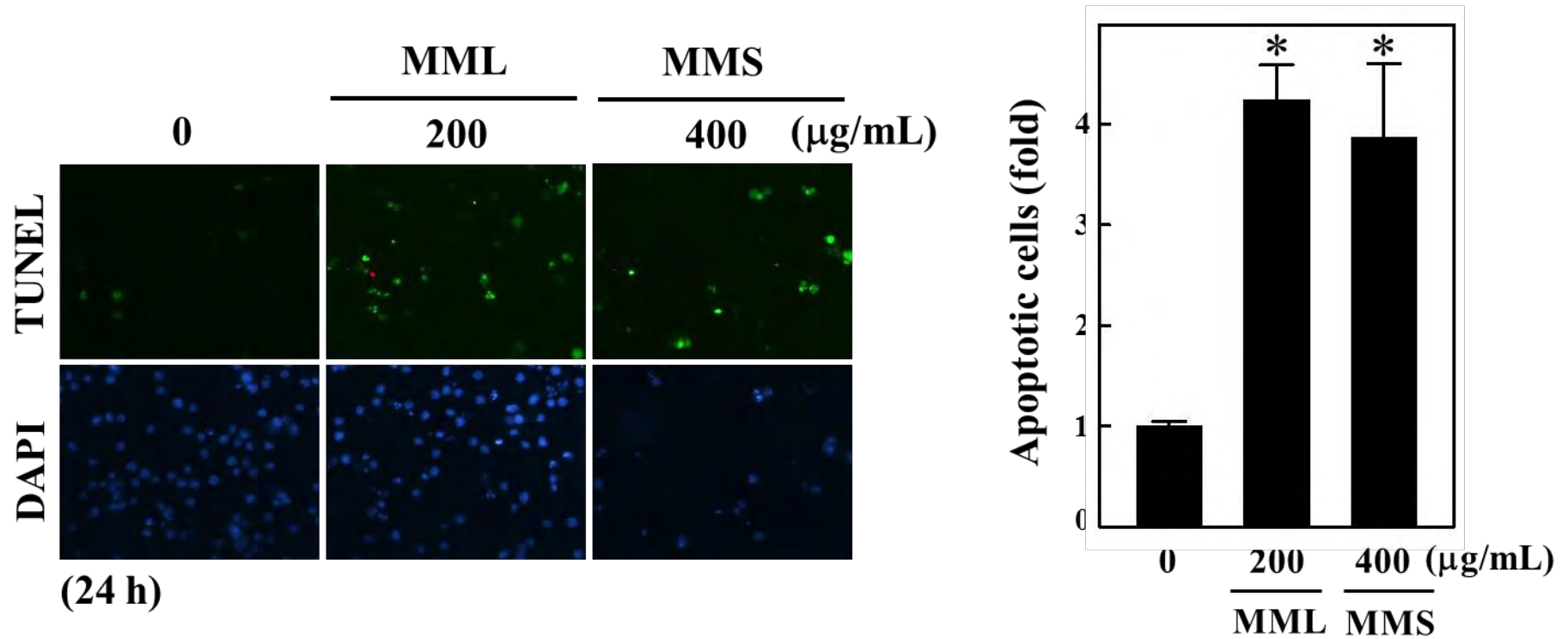


Fig 6. MML and MMS mediated apoptosis-regulatory proteins in HL-60 cells

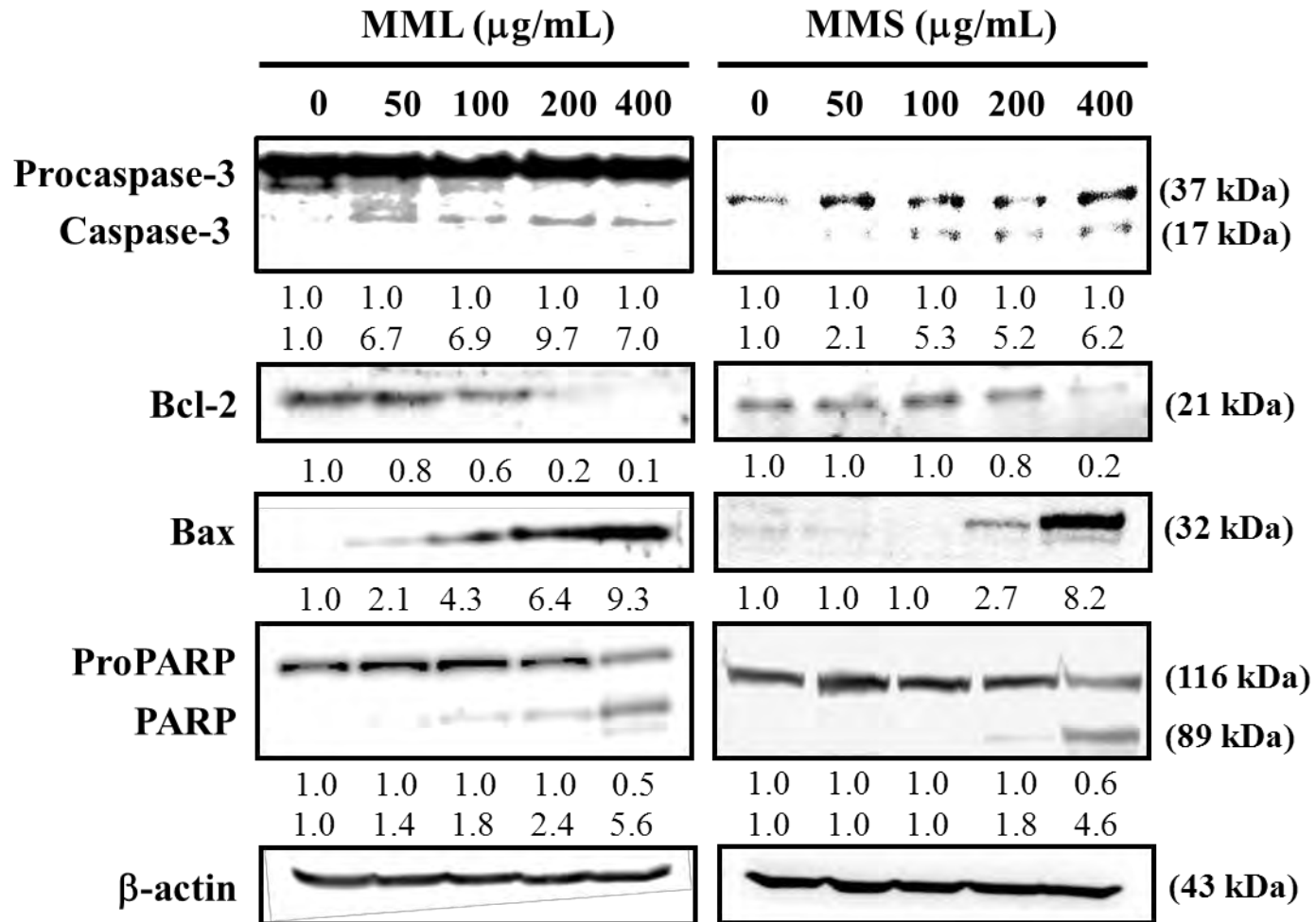


Fig 7. The body weight and tumor size in HL-60 xenografted nude mice after *Mikania micrantha* treatment

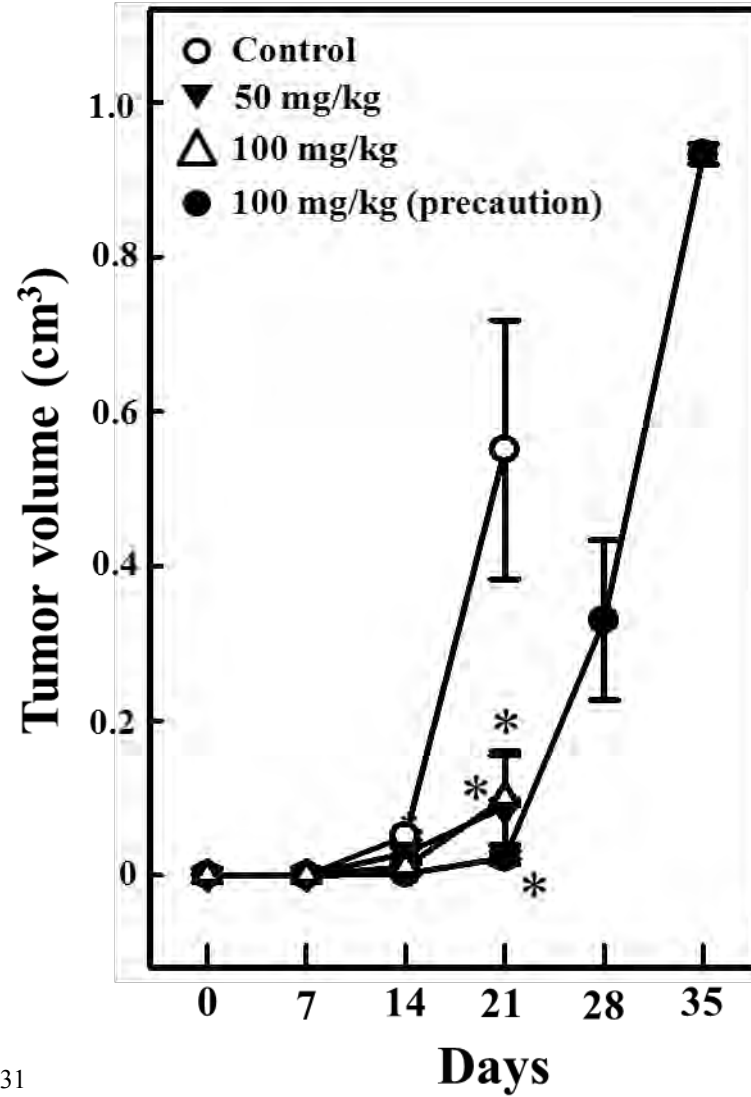
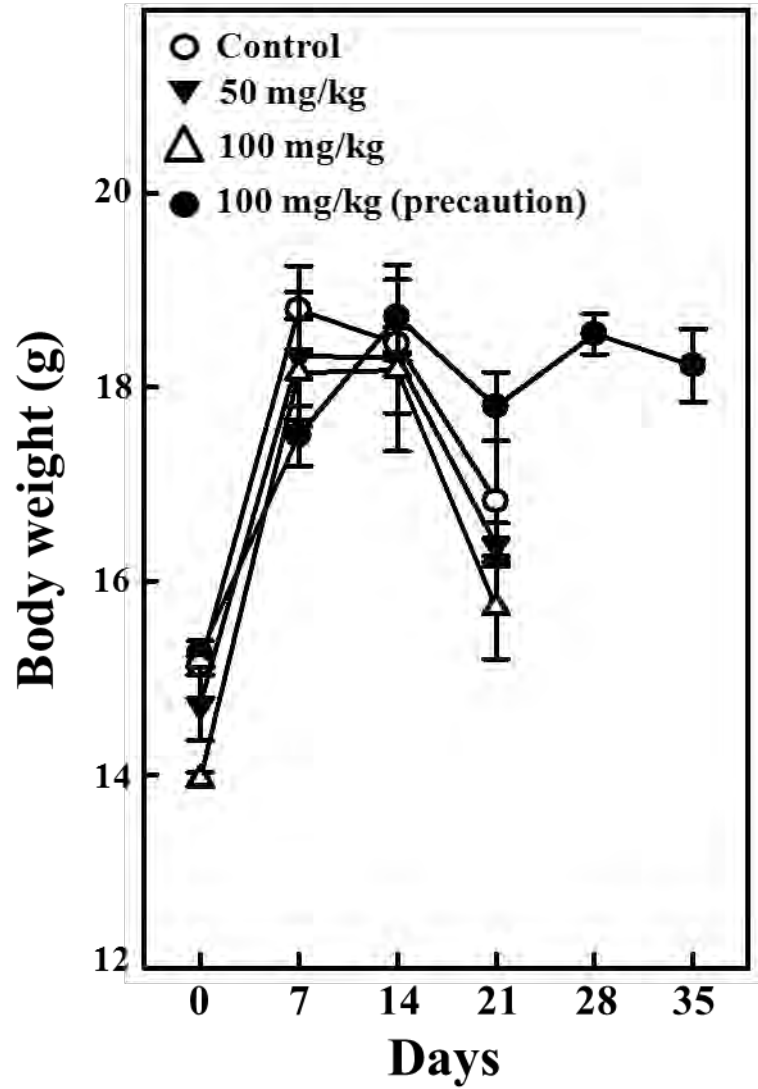
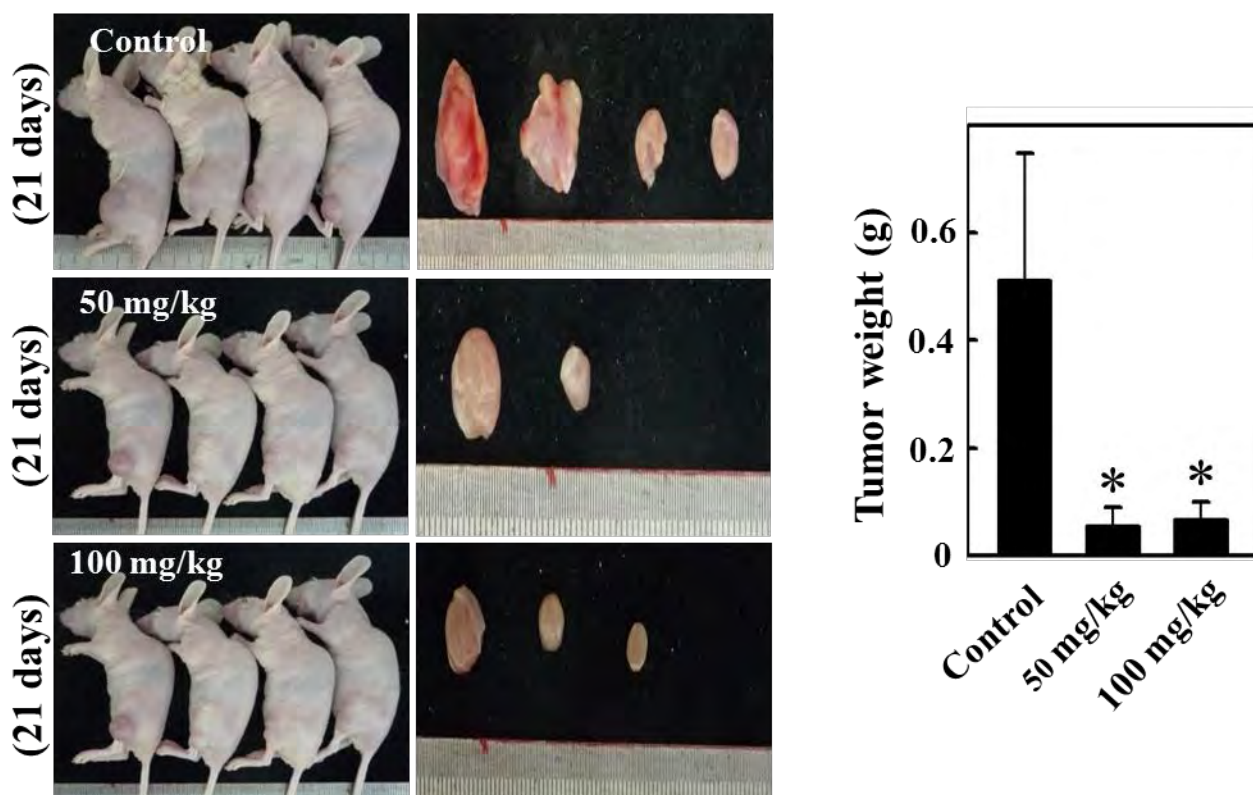


Fig 8. *Mikania micrantha* inhibited tumor growth in HL-60 xenografted nude mice

A



B

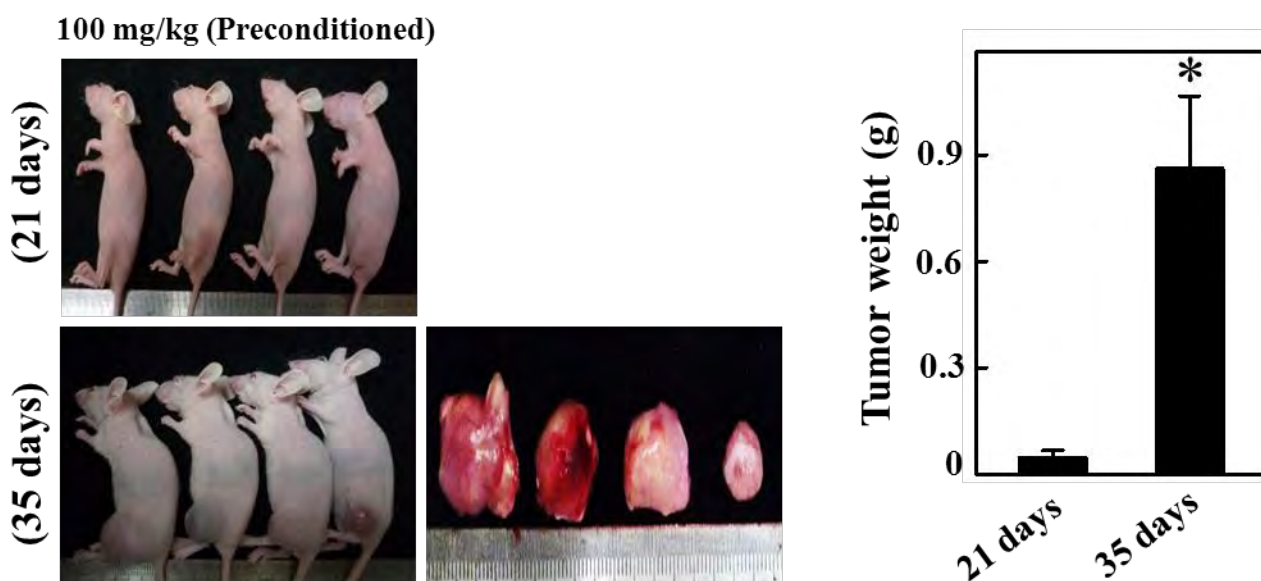


Fig 9. MML induced apoptosis in HL-60 xenografted tumors
As shown by HE staining, TUNEL assay, and western blotting

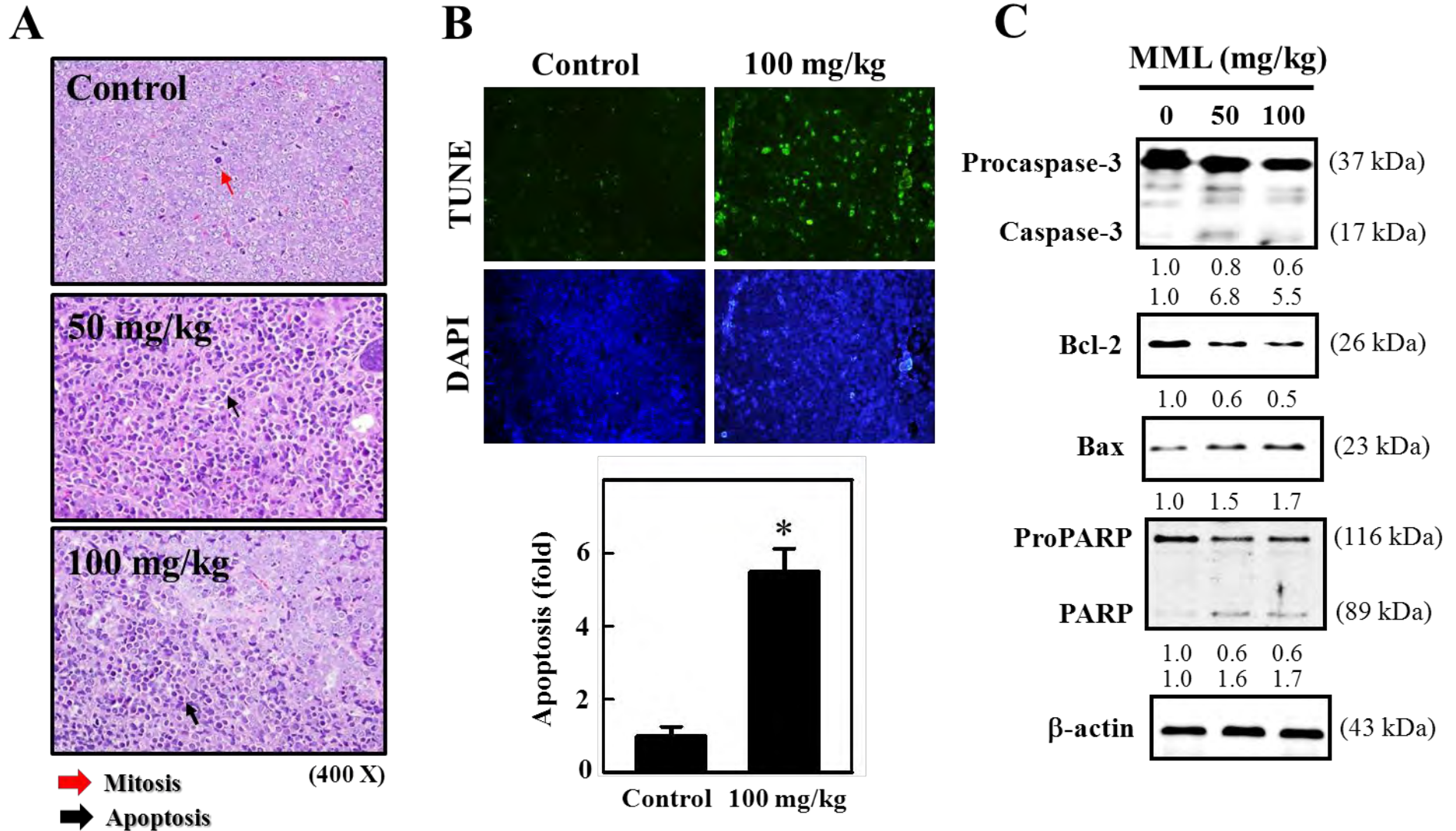
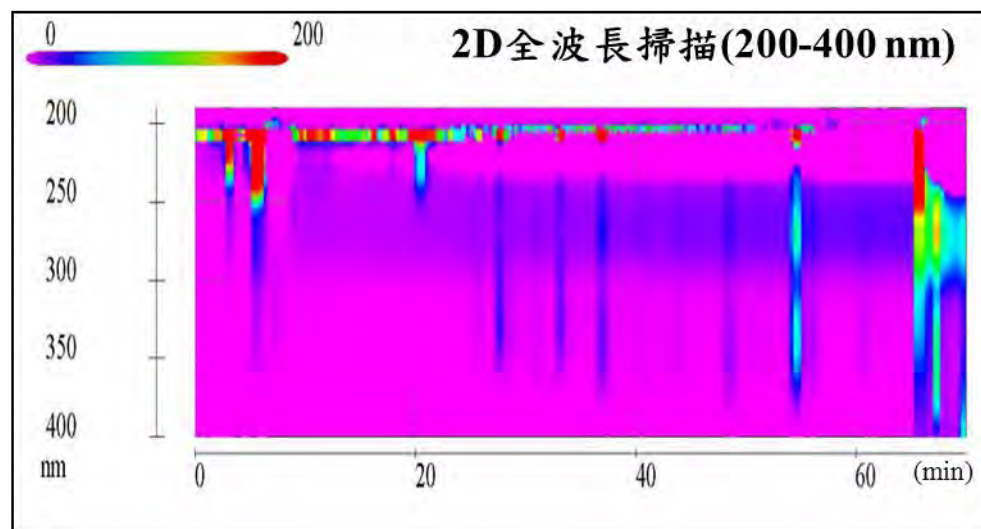
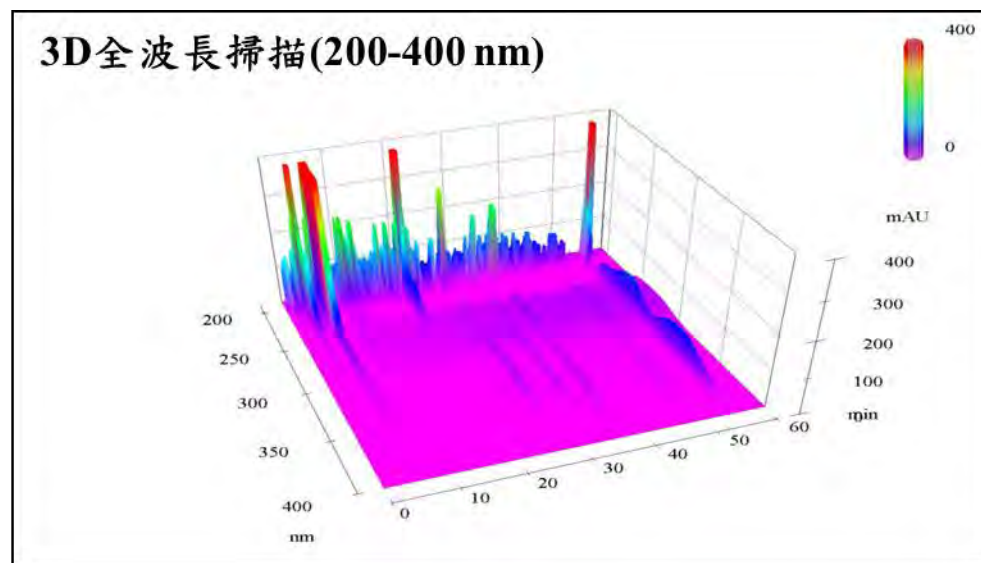
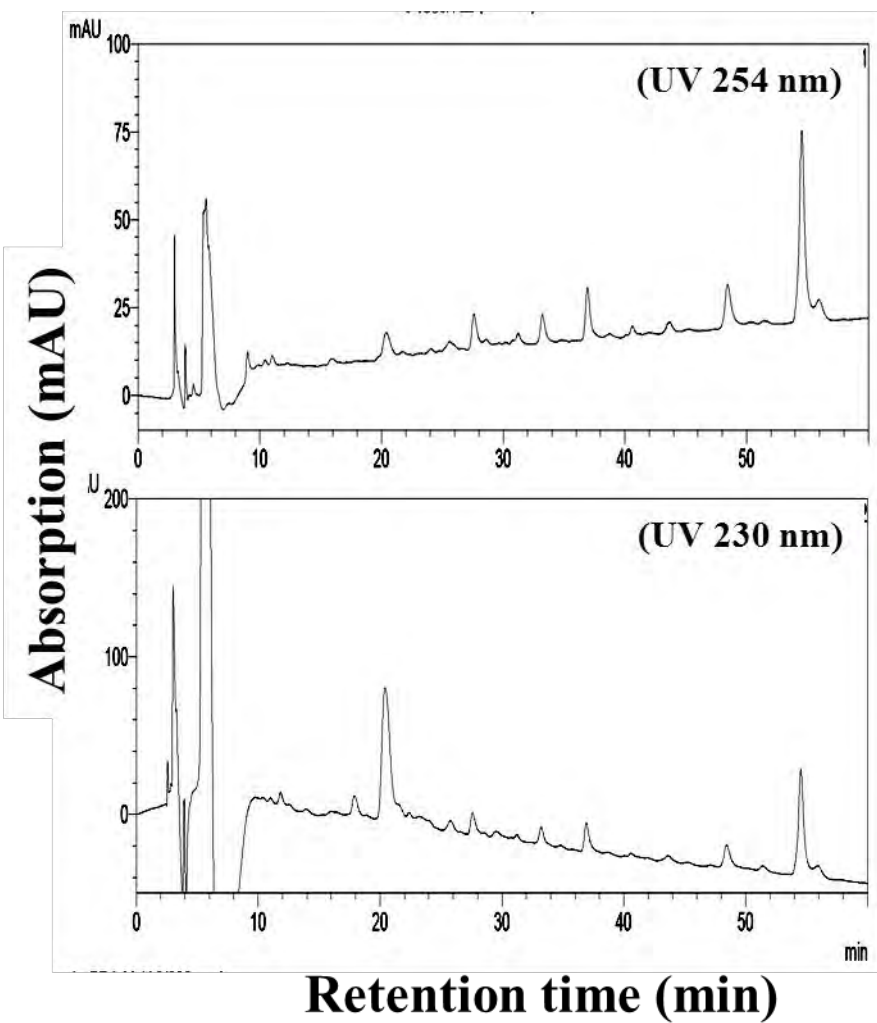


Fig 10. HPLC profiling of MML



(二)、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。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度才可以達到完全抑制(100%)；維生素 E 衍生物 Trolox 則約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小花蔓澤蘭葉萃取物、1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的根莖萃取物與 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。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保護紅血球溶血及清除 DPPH 自由基能力的原因。

血液中急性骨髓血癌細胞(Human premyelocytic leukemia 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。小花蔓澤蘭葉萃取物處理血癌細胞 24, 48 及 72 小時的 IC_{50} (抑制

50%細胞存活率濃度)為 129, 126 及 81 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 小花蔓澤蘭根莖萃取物處理血癌細胞 24, 48 及 72 小時的 IC_{50} 為 203, 226 及 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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。此外，我們比較小花蔓澤蘭(葉和根莖)萃取物抗癌活性，發現抗血癌>乳癌>胃癌>肺癌。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 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。

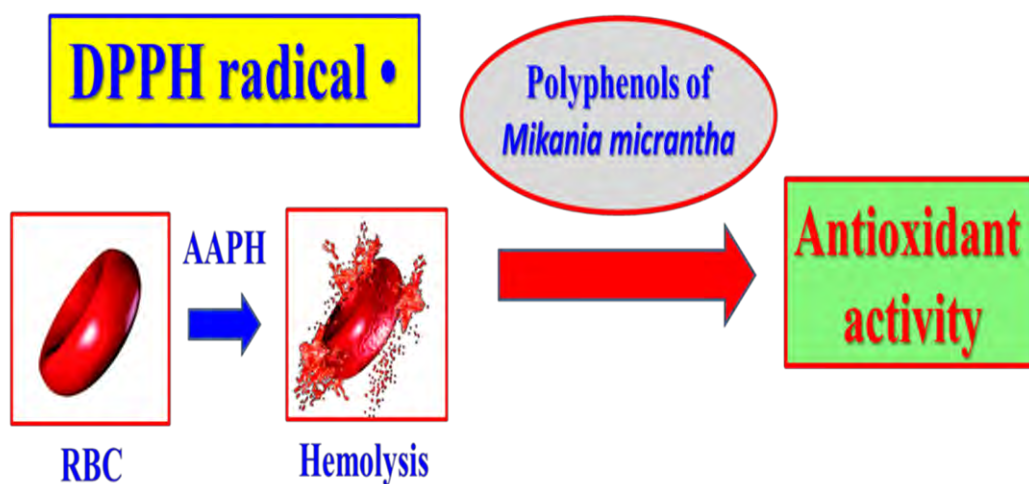
細胞實驗中得到結果也未必能應用於活體動物及人體。須考慮細胞培養中所發現的藥物作用，並不是絕對與活體動物所見到的效果一致，因為牽涉到藥物在活體動物體內的吸收、運送、代謝及排除等效應；同時藥物在活體動物體內的累積量及毒性，必須以實驗動物真正的進行研究。此外，實驗使用的抗癌藥物濃度，是否能為活體動物或人體所承受，是臨床應用重要的課題。因此，我們進行了小花蔓澤蘭對血癌細胞移植裸鼠的活體試驗，裸鼠移植實驗模式在腫瘤研究被廣為應用，原因來自其對於外來移植物(血癌細胞)不會產生排斥(無胸腺)。我們利用活體裸鼠皮下移植腫瘤模式證實，小花蔓澤蘭顯著抑制裸鼠植入血癌細胞腫瘤大小、重量與體積及誘導血癌細胞凋亡，故小花蔓澤蘭確實具有抗血癌腫瘤之功效。

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，

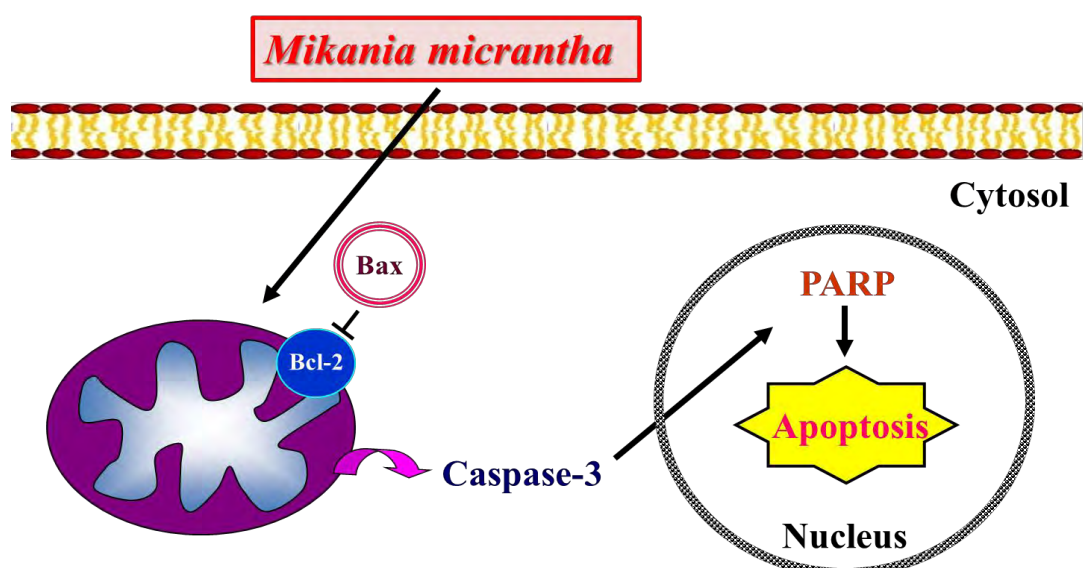
可能還須要更多的實驗來加以佐證，尤其是相關的動物/人體實驗及毒性試驗來證實。我們已取得小花蔓澤蘭葉 HPLC 化學指紋圖譜，未來將進一步分析鑑定小花蔓澤蘭抗氧化及抗腫瘤的活性成分。由於抗氧化/抗腫瘤功效的新發現，我們希望把小花蔓澤蘭化為有用的東西。藉著小花蔓澤蘭大量被摘取，使之慢慢地減少，漸漸地恢復台灣原有生態環境的平衡。

四、結論與應用

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)。活體裸鼠移植腫瘤模式證實，小花蔓澤蘭確實具有抗血癌腫瘤之功效。



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。

五、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 premyelocytic 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 premyelocytic leukemia HL-60 cells. Nutrition and Cancer. 48(2), 189-197.

ABSTRACT

Mikania micrantha is one of the worst invasive alien species in the world. This exotic noxious weed is a perennial creeping climber grows vigorously in East Asia and US (especially Florida), and heavily damages Taiwan's ecosystem. This study examined the *in vitro* or *in vivo* anti-tumor, apoptosis, anti-angiogenesis, anti-metastasis, and antioxidant activities of ethanol extracts of *Mikania micrantha* leaf (MML), and revealed the underlying molecular mechanism. *In vivo* data showed that MML effectively inhibited the tumor growth in triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) and leukemia (HL-60) cell xenografted nude mice. Bioluminescence imaging further confirmed MML inhibited lung metastasis in living MDA-MB-231-luc-injected nude mice. *In vitro* data showed that MML significantly inhibited the proliferation of breast cancer and leukemia cells. Furthermore, MML induced apoptosis, which was associated with DNA fragmentation, followed by a sequence of events, including ROS generation, cytochrome *c* release, caspase-3 activation, PARP cleavage, and Bax/Bcl-2 dysregulation in cancer cells. Notably, non-cytotoxic concentrations of MML inhibited VEGF-induced migration, invasion, tube formation, and MMP-9 expression in endothelial EA.hy 926 cells. Anti-metastatic effect of MML was further confirmed by inhibition of migration, invasion, and MMP-9/VEGF expressions in highly metastatic MDA-MB-231 cells. Antioxidant activity of MML was evidenced by DPPH radical scavenging activity, which could be due the presence of total polyphenols (52 mg/g). Furthermore, HPLC chemical fingerprint and active constituent (dihydromikanolide) in MML extracts were characterized. In conclusion, *Mikania micrantha* possesses antioxidant and anti-cancer effects that could be used in cancer chemotherapy.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in American and northwestern European women. Approximately one-third of all women with breast cancer develops metastases and ultimately expires due to the effects of the disease. Despite the fact that many tumors initially respond to chemotherapy, breast cancer cells can subsequently survive and gain resistance to the treatment. Leukemia is one of the most life-threatening and deadly diseases. In recent decades, considerable attention has been devoted to the sequence of events referred to as apoptotic cell death and the role that this process plays in mediating the lethal effects of the diverse antineoplastic agents that are used to treat leukemia (Kaufmann and Gores, 2000).

Several novel approaches are being considering in the treatment and/or prevention of the cancer progression. In this scenario, chemical or biological agents that induce apoptosis have been reported to be promising interventions in the management of malignant cancer. The key events in apoptosis are, including cellular morphological changes, chromatin condensation, internucleosomal DNA cleavage and the activation of caspases, a family of cysteine-aspartic acid proteases. On the other hand, tumor cell growth is depends on the angiogenesis to provide nutrients for a newly proliferated tumor cells. Angiogenesis, is an essential process in a variety of physiological and pathological conditions, including cancer and metastasis (Hillen and Griffioen, 2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF), plays a key role in regulating the normal and pathologic angiogenesis. VEGF contributes to the angiogenic process by stimulating the proliferation, migration/invasion and formation of new blood vessels by endothelial cells.

Cancer metastasis, the spreading of tumor cells from the primary neoplasm to distant sites and their growth there, is the most common cause of death in cancer patients. Degradation of extracellular matrix and components of the basement membrane, mediated by the concerted action of proteinases, such as matrix metalloproteinases (MMPs) are critical in tumor invasion and metastasis (Westermarck and Kahari, 1999). Therefore, the inhibition of MMP-mediated migration or invasion could be a potential strategy in treatment for the prevention or inhibiting of cancer metastasis. In addition to these, suppression of excessive reactive oxygen species (ROS) and improvement of cellular antioxidant status could attenuate the cancer-associated adverse effects.

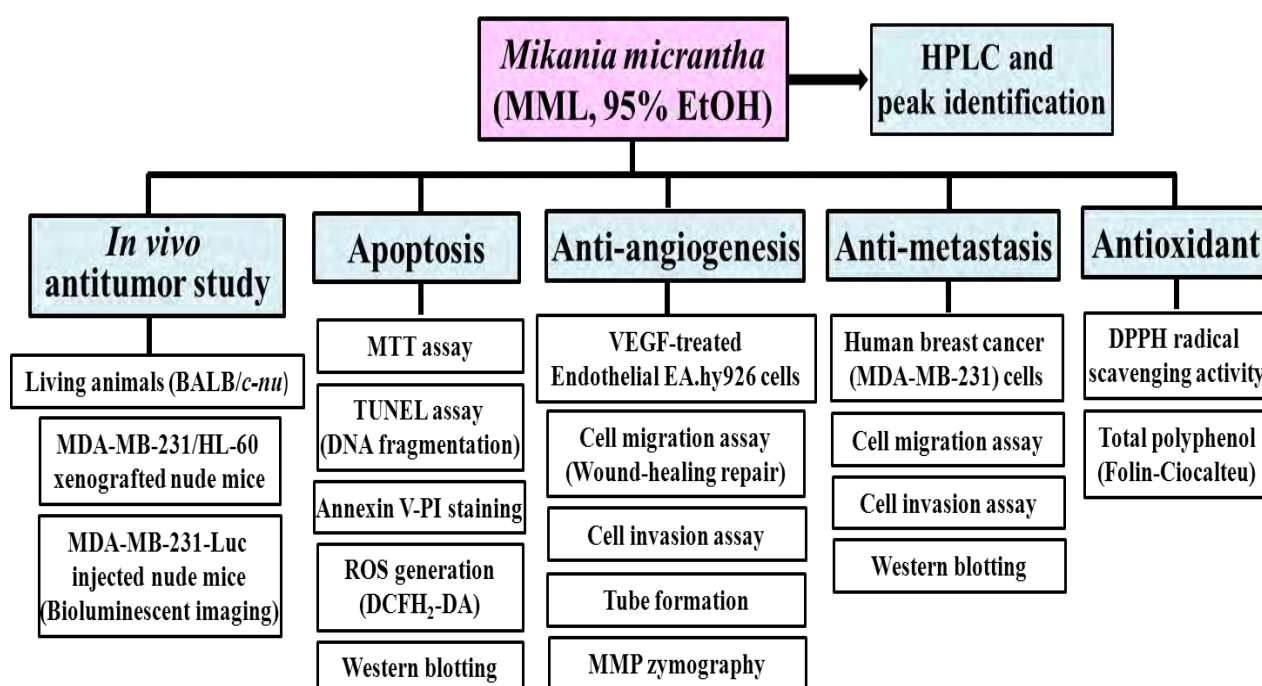
Background and Significance of the Study

Mikania micrantha is one of the worst invasive alien species in the world. This exotic noxious weed is a perennial creeping climber grows vigorously in East Asia and US (especially Florida), and heavily damages Taiwan's ecosystem (Biology text book, Taiwan high school). *Mikania* species has been used in Taiwanese folk medicine for treatments of food detoxicant and pain relief. However, the pharmacological activities of *Mikania micrantha* are remained to be studied.

Main Goals of the Study

This study aimed to investigate the *in vitro* or *in vivo* anti-tumor, apoptosis, anti-angiogenesis, anti-metastasis, and antioxidant activities of 95% ethanol extracts of *Mikania micrantha* leaf (MML), and revealed the underlying molecular mechanism. The chemical fingerprint and active compound(s) in MML extracts are characterized.

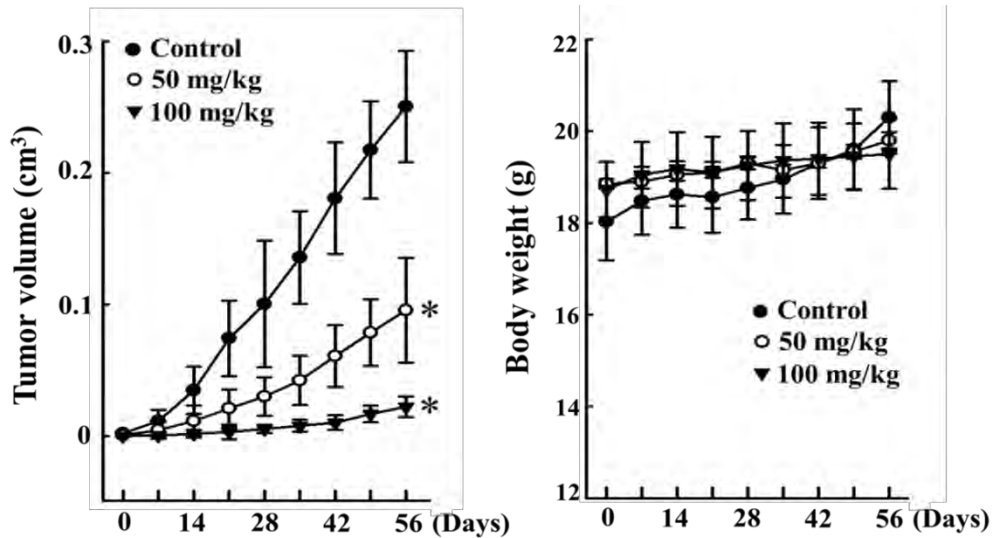
Experimental Design and Methods



Key Findings of the Study (Results)

Result 1: *In vivo* inhibition of MDA-MB-231/HL-60 xenografted nude mice by MML. MML inhibited tumor growth in living MDA-MB-231 (A) and HL-60 (B) xenografted nude mice.

(A)



(B)

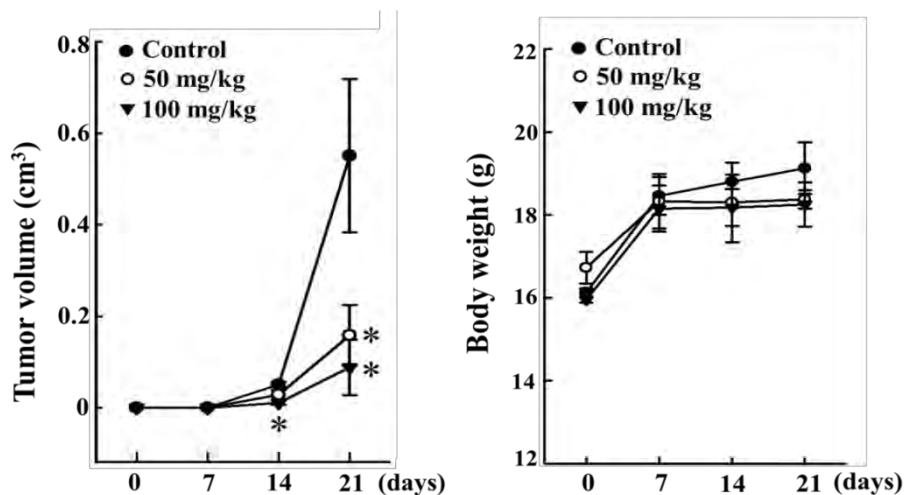
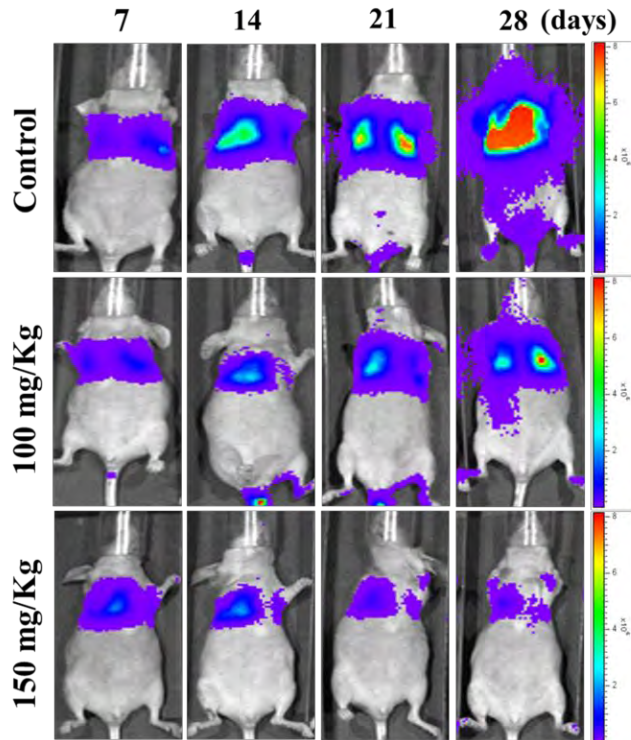


Fig. 1. Effect of MML on treatment on body weight and tumor size in living MDA-MB-231(A) and HL-60 (B) xenografted nude mice. Cells (1×10^6 cells, 200 μ L matrix gel) were injected subcutaneously. The body weight and tumor volume was measured 3 times/week for 21 days. Nude mice were treated with the 0.1% DMSO (control), 50 mg/kg of MML, or 100 mg/kg of MML for 21 days, as described in the Materials and Methods. Tumor volume was measured for every 3 days using: length \times width² \times 1/2. Values are expressed as the mean \pm SD of three mice. * $p < 0.05$, comparing the mock treatment group with the MML treatment group.

Result 2: Anti-metastatic effects of MML treatment in living MDA-MB-231-luciferase-injected nude mice by bioluminescence imaging. MML inhibited lung metastasis in living mice by bioluminescence imaging.

(A)



(B)

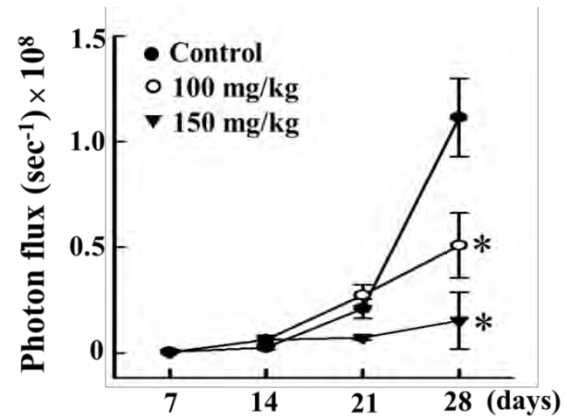


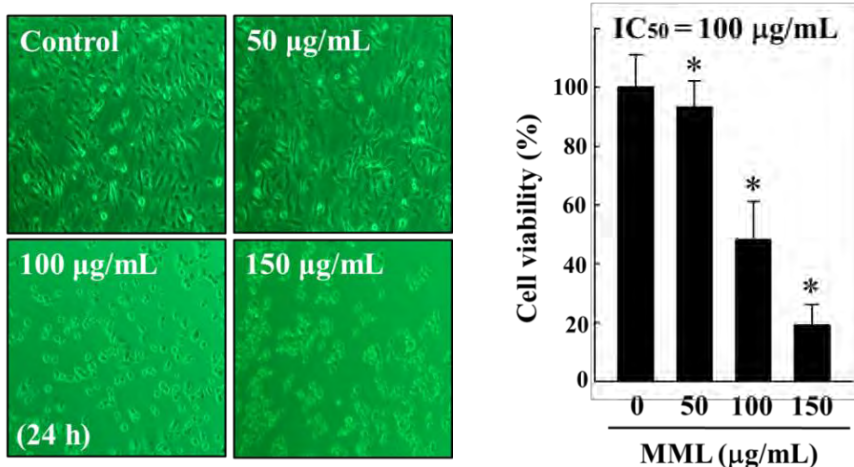
Fig. 2. Mice treated with MML (100 or 150 mg/kg), and then injected the MDA-MB-231-luciferase cells (1×10^6 cells/well) intravenously. The mice were anaesthetized and intraperitoneally injected luciferin. The mice were imaged using the IVIS 200 system, and the photons from the whole animal were quantified. **(A)** Diagrams showing the bioluminescent signal emitted from the whole body. The color overlay on the image represents the luminescence (photons/sec) emitted from the animal, as indicated by the color scales. Photos are representative images ($n=4$). **(B)** Quantification of the photon emission from the whole body. Values are expressed as the mean \pm SD of three mice. * $p < 0.05$, comparing the mock treatment group with the MML treatment group.

Result 3: MML inhibited the proliferation of human triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) (A) and promyelocytic leukemia (HL-60) cells (B). The IC₅₀ value in different cell lines was shown in Table 1.

Table 1

Tumor cell lines	IC ₅₀ (μg/mL at 24 h)
	MML
MDA-MB-231	100
HL-60	33
MCF-7	140
AGS	252

(A)



(B)

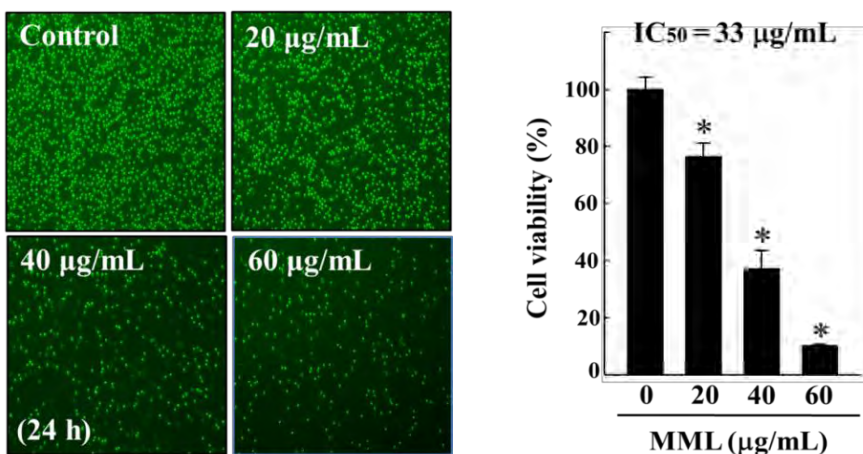


Fig. 3. Morphological changes were examined by phase-contrast microscope (200×). Cell viability was determined by MTT. IC₅₀: concentrations required to inhibit 50 % of cell growth. Cell viability (%) was calculated as; $(A_{570} \text{ of treated cells} / A_{570} \text{ of untreated cells}) \times 100$. Each value is expressed as the mean \pm SD (n=3). *Significant difference compared to the control group ($p < 0.05$).

Result 4: MML induced DNA fragmentation (A), apoptotic cell death (B), intracellular ROS generation (C), and apoptotic-related proteins (D) in MDA-MB-231 and HL-60 cells. MML induced apoptosis, which was assayed by DNA fragmentation kit and Annexin V-PI staining in breast cancer and leukemia cells. This was associated ROS generation, cytochrome *c* release, caspase-3 activation, PARP cleavage, and Bax/Bcl-2 dysregulation.

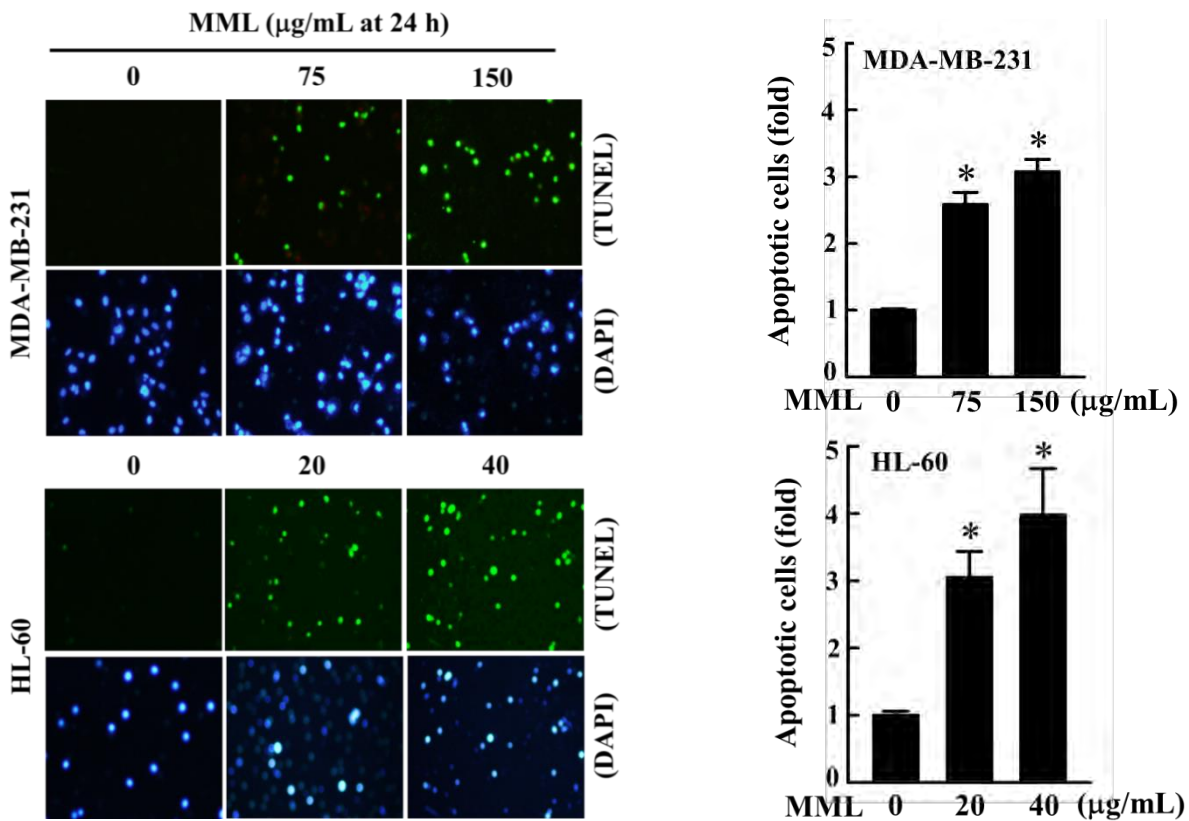


Fig. 4A. TUNEL was assayed by DNA fragmentation detection kit. The cells were treated with MML (75-150 µg/mL or 20-40 µg/mL for 24 h). The green fluorescence indicates number of TUNEL-positive cells (400×). The percentage of apoptotic cells were calculated by measuring the fluorescence intensity using commercially available software. Each value is expressed as the mean ± SD (n=3). *Significant difference compared to the control group ($p < 0.05$).

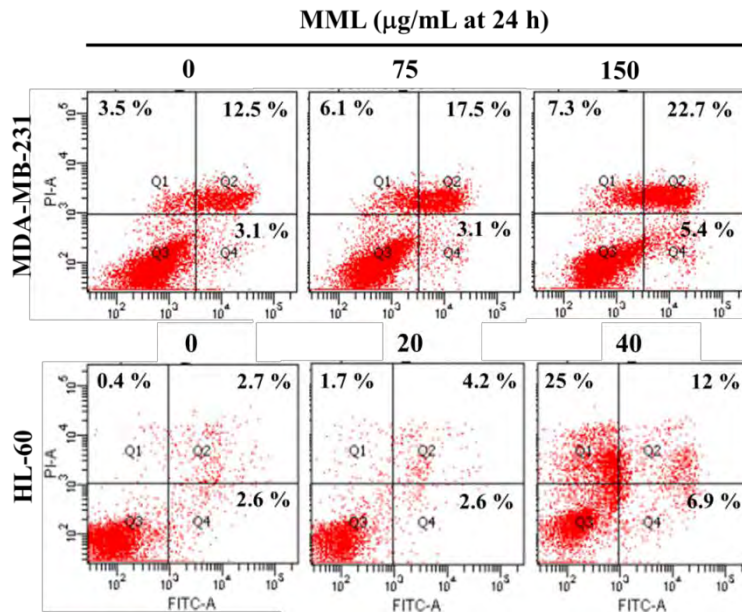


Fig. 4B. AnnexinV/PI staining was performed to determine early/late apoptosis or necrosis. Cells were grown in the absence (control) or presence of MML (75-150 $\mu\text{g/mL}$ or 20-40 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, stained with Annexin/PI, and analyzed using flow cytometry, as described in the Materials and Methods. The flow cytometry patterns shown here are from one representative experiment that was repeated three times with similar results. The percentage of necrosis/apoptosis after MML treatment is shown in histogram.

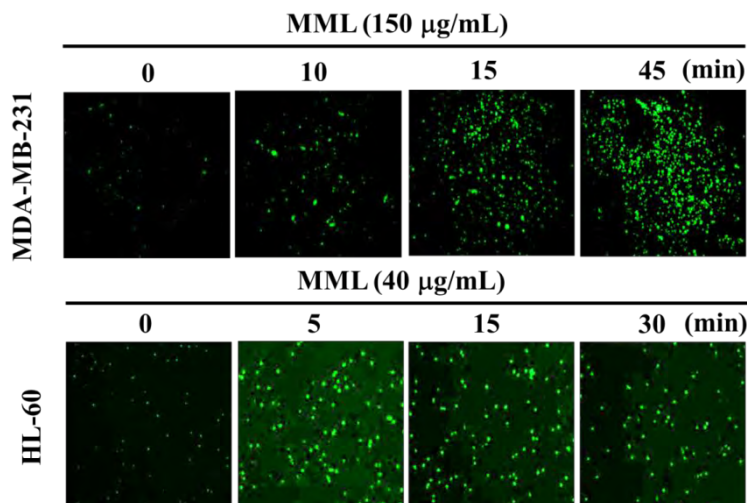


Fig. 4C. MML induced intracellular ROS generation. The cells were treated with MML (150 $\mu\text{g/mL}$ for 10-45 min or 40 $\mu\text{g/mL}$ for 5-30 min). The non-fluorescent cell membrane-permeable probe, DCFH₂-DA (10 μM), was added to the culture medium 30 min prior to the end of each experiment. When DCFH₂-DA permeates the cell membrane, it reacts with cellular ROS and is metabolized into fluorescent DCF, acting as an indicator of ROS production that can be measured using fluorescence microscopy (200 \times). The ROS level in control cells were assigned as 1 fold.

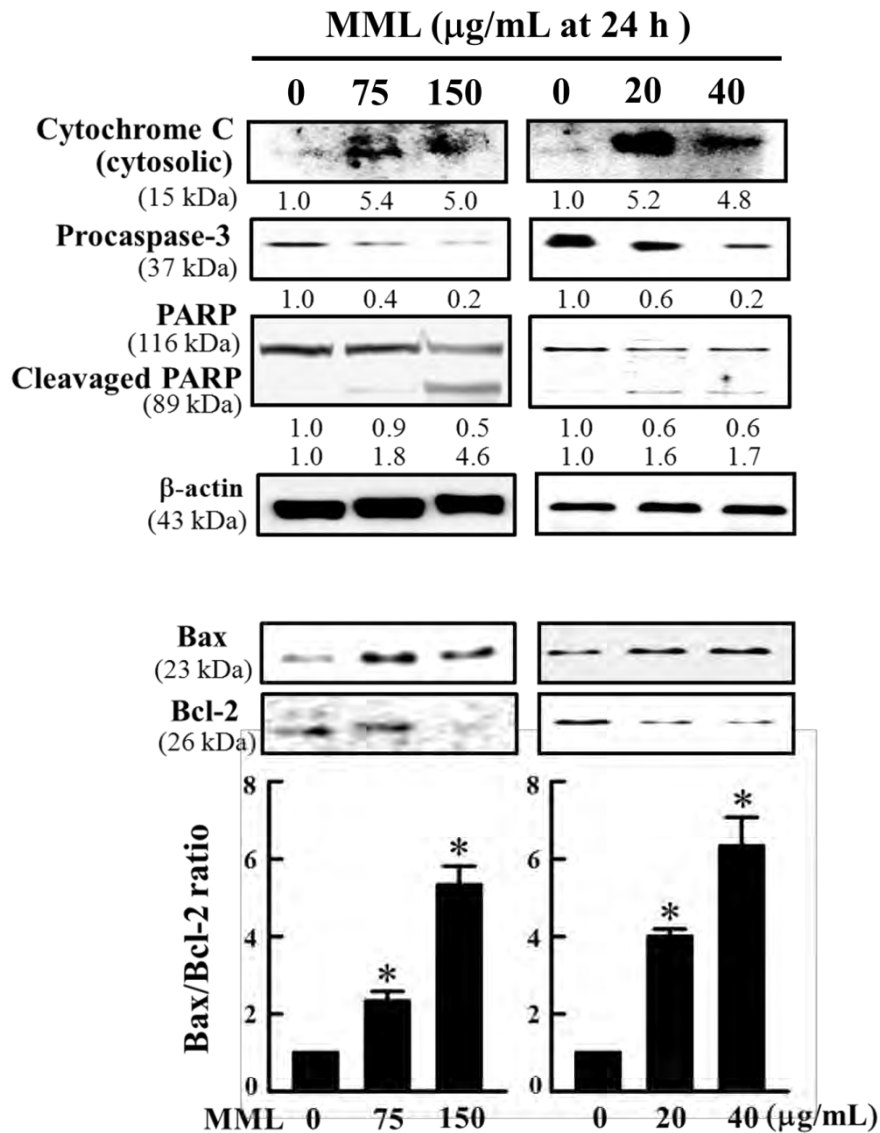
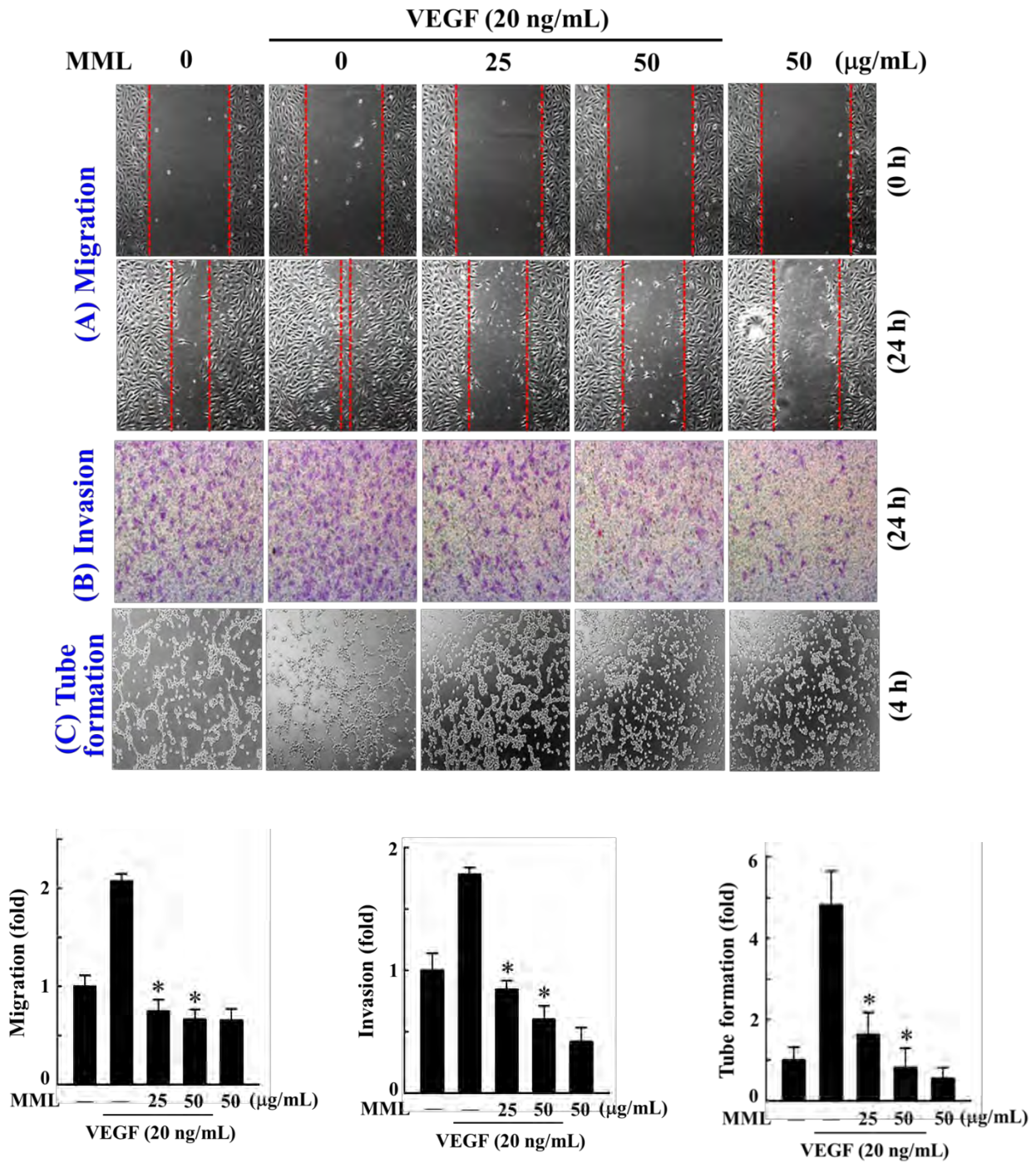


Fig. 4D. Effects of MML treatment on apoptotic-related proteins expression. Cells were exposed to MML (75-150 or 20-40 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The protein levels of cytosolic and nuclear cytochrome *c*, procaspase-3, -8, and -9, PARP, Bax, and Bcl-2 were monitored using Western blot analyses. Relative changes in the Bax and Bcl-2 protein bands were measured by commercially available quantitative software (AlphaEase, Genetic Technology Inc. Miami, FL, USA), with the control representing 1.0 fold.

Result 5: Anti-angiogenesis activity of MML in endothelial EA.hy 926 cells. Tumor cell growth depends on angiogenesis to provide nutrients for newly proliferated tumor cells. In this study, we used VEGF to stimulate angiogenesis in MML pretreated- endothelial cells. We found that non-cytotoxic concentrations of MML inhibited VEGF-induced migration (A), invasion (B), tube formation (C) in endothelial EA.hy 926 cells. (D) The MML inhibited VEGF-induced MMP-9 activity and expression.



(D)

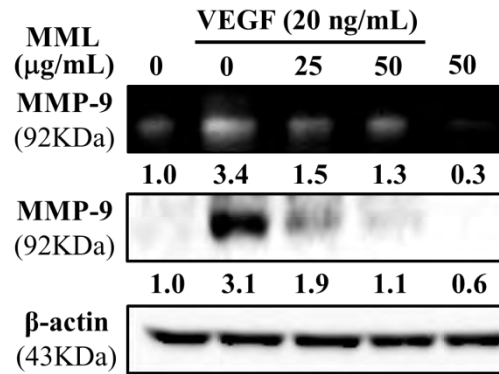
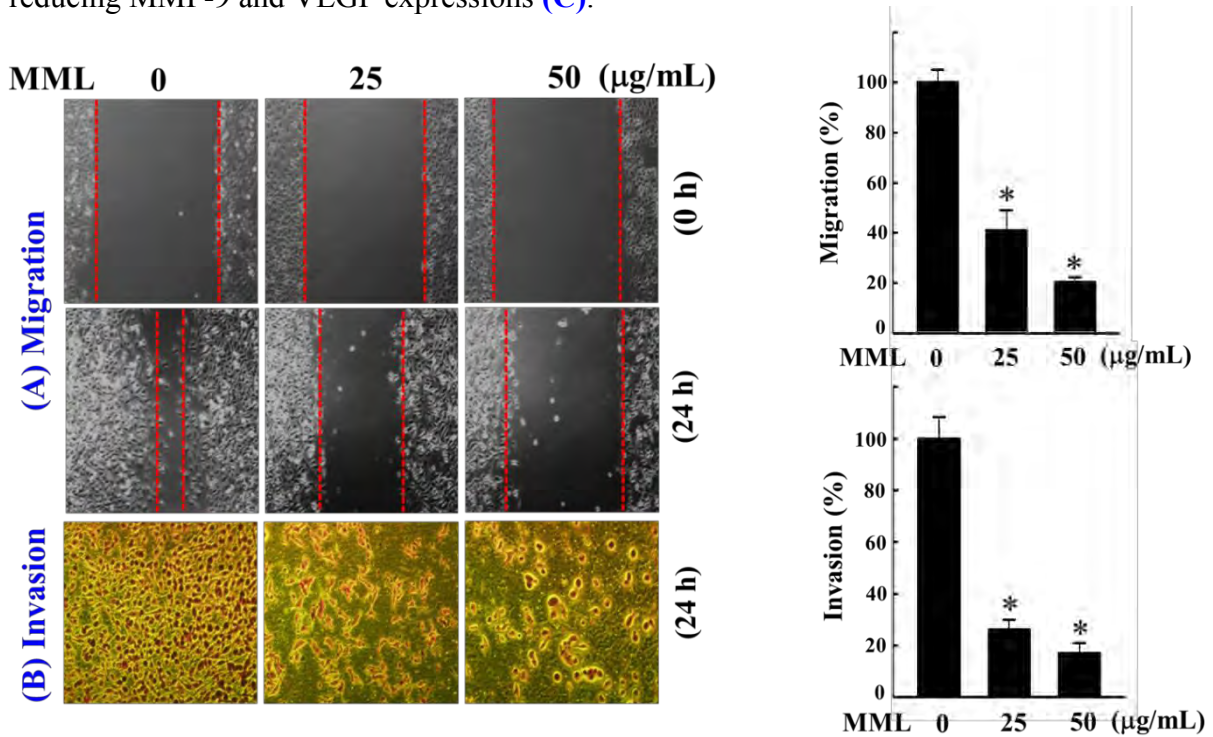


Fig. 5. Cells were pretreated with MML (25 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h, and stimulated with or without VEGF (20 ng/mL). **(A)** Invasiveness was determined by BD Matrigel invasion chambers. Subsequently, cells were scratched and then stimulated with or without VEGF for 24 h. Migration was observed using an optic microscope, at a 200 \times magnification, and migrating cells were quantified by manual counting. **(B)** The capillary networks were photographed using a phase-contrast microscope (200 \times). Photomicrographs of cells invading under the membrane for 24 h. The Inhibitory percentage of invading cells was quantified and expressed with untreated cells (control) representing 100%. Invasiveness was determined by counting cells in three microscopic fields per sample. **(C)** Cells were pretreated with MML, and then collected and replaced on Matrigel-coated plates at a density of 1×10^5 cells/well and incubated in the absence or presence of VEGF. After 4 h, the tube formation was determined using a phase-contrast microscope at 200 \times magnification. The capillary networks were photographed, and the number of tubes was quantified from three random fields. **(D)** MML suppresses MMP-9 activity and expression in VEGF-induced EA.hy 926 cells. An equal amount (50 μg) of conditioned culture media from each sample was subjected to gelatin zymography. An equal amount (50 μg) of total lysate from each sample was resolved by 8-15% SDS-PAGE with β -actin as a control. The relative changes in the protein bands were measured by commercially available quantitative software.

Result 6: Anti-metastasis of MML in MDA-MB-231 cells. Cancer metastasis, the continuous spreading of tumor cells from origin to distant sites. It is the most common cause of death in cancer patients. The results show that non-cytotoxic concentrations of MML inhibited cell migration (A) and invasion (B) of breast cancer cells, which was confirmed by reducing MMP-9 and VEGF expressions (C).

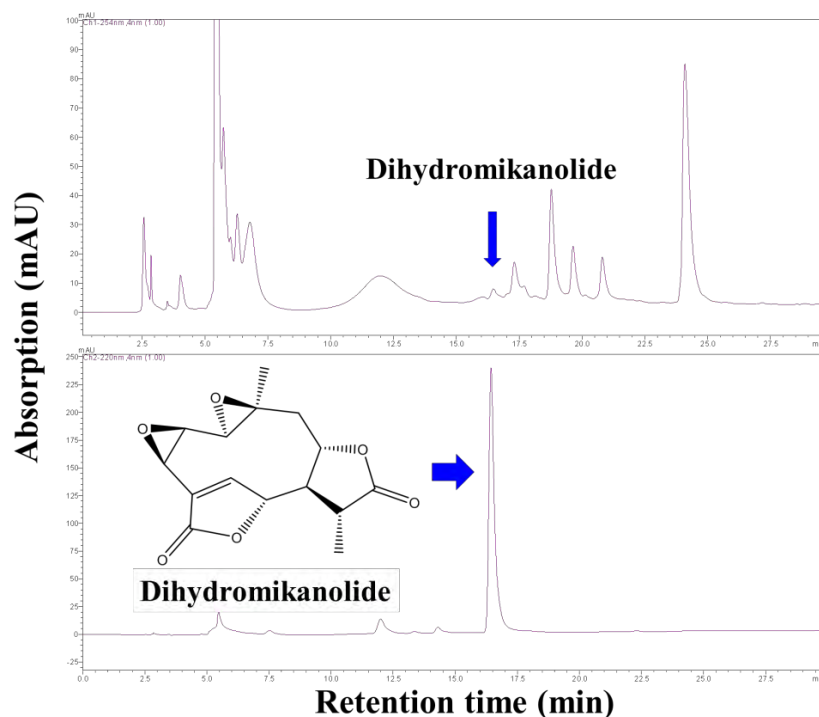


(C)

Fig. 6. (A) Migration and (B) invasion were quantified in three microscopic fields per sample (200×). (C) MMP-9 and VEGF were determined by western blot.

Result 7: The chemical fingerprint and active constituents in the MML extracts were characterized. (A) The HPLC chemical profile of MML extracts was performed using RP-18 column and detected at UV 254 nm and active constituent (dihydromikanolide, tR=16.4 min) were characterized. The anti-proliferative activity of dihydromikanolide of human breast cancer cells and leukemia cells, with IC₅₀ values of 4.2 and 2.1 µg/mL at 24 h **(B)**.

(A)



(B)

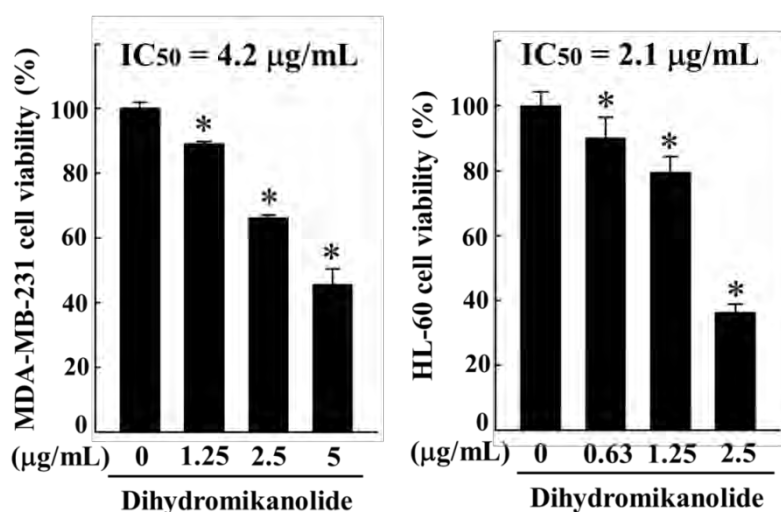


Fig. 7. (A) Chemical profile was determined using an RP-18 column and detected at UV 254 nm. **(B)** The cell viability of dihydromikanolide was assayed by MTT at 24 h.

Result 8: Antioxidant activity of MML. Most plant-derived compounds exhibit both antioxidant and anticancer activities. Therefore, we assume that *Mikania micrantha* might have antioxidant activity. (A) Hydrogen-donating activity of MML was increased in a dose-dependent manner. Vitamin E was used as positive controls. (B) We found that MML possess 52 mg/g of total polyphenols, which might be responsible for the antioxidant activity.

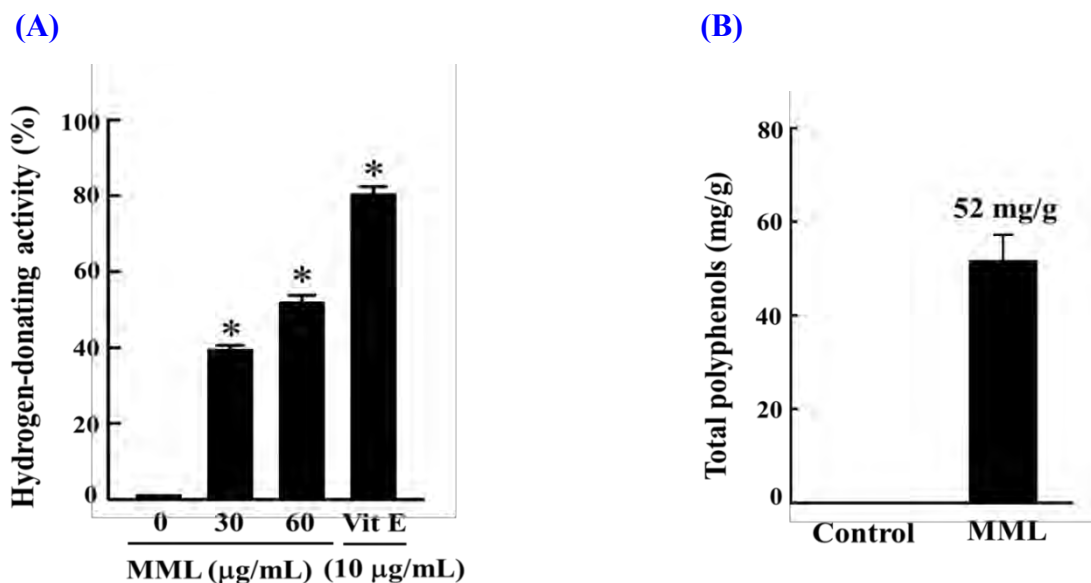
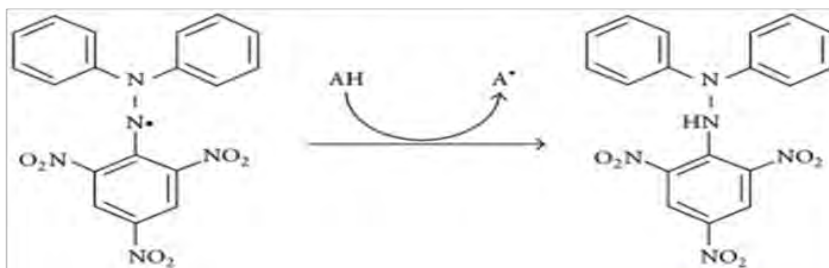


Fig. 8. (A) The effects of MML (30-60 µg/mL) on DPPH radical scavenging activity. Vitamin E (10 µg/mL) was used as positive controls. **(B)** Total polyphenol contents of MML were determined using Folin-Ciocalteu assay. Total polyphenol were estimated using a regression equation from a calibration curve and expressed in gallic acid equivalents. The values shown represent the mean ± SD of three experiments. * indicates a significant difference from the control group ($p < 0.05$).



Discussion

Cancer chemotherapeutic agents may reduce the growth/proliferation and induce apoptosis in cancerous cells. Recent studies have emphasized that the use of natural bioactive compounds is an alternative approach to control and treatment of cancer (Surh, 2003). The findings from our study revealed that leaf extracts of *Mikania micrantha* exhibited anti-proliferative activity and inhibited the growth of cultured human cancer (MDA-MB-231 and HL-60) cell lines. *In vivo* study documented the anti-tumor activity of *Mikania micrantha* leaf (MML) extracts in human breast cancer and leukemic cell xenografts in nude mice. Bioluminescence imaging further confirmed that MML inhibited lung metastasis in living MDA-MB-231-luc-injected nude mice. The inhibition of cell proliferation and the induction of apoptosis in breast cancer and leukemia cells by MML provided a new insight for its chemo-preventive effects.

We further showed the apoptotic property of MML as we found increased cell death, DNA fragmentation and dysregulated apoptotic proteins in human breast cancer and promyelocytic leukemia cells, when exposed to MML. Induction of apoptosis has become a novel therapeutic approach in cancer research, and our results suggest that MML could be used as a potential chemotherapeutic agent. For the first time here we screened the chemical finger print of MML extracts by HPLC, and characterized the compound known as 'dihydromikanolide'. This dihydromikanolide compound has been tested for its effects on cancer cell survival. Interesting results showed that dihydromikanolide treatment significantly decreased the cell viability of both human breast cancer cells and leukemia cells. We assume that this anti-proliferative property of dihydromikanolide may attributing for the induction of apoptosis and contribute to decrease the tumor volume in living nude mice.

The anti-angiogenic properties of MML further supports that MML could be valid candidate for the developing of herbal-based anticancer drugs. The results of this study clearly indicate that MML possess potential antioxidant activity. The tested antioxidant property of MML was confirmed by a increased DPPH radical scavenging ability in a dose-dependent manner. Another important finding of this is that MML contains 52 mg/g of total polyphenols, which is relatively higher than other well known antioxidant-rich herbs. Our findings emphasized that high amount of total polyphenols in MML extracts may contribute for its strong antioxidant activity.

Conclusions

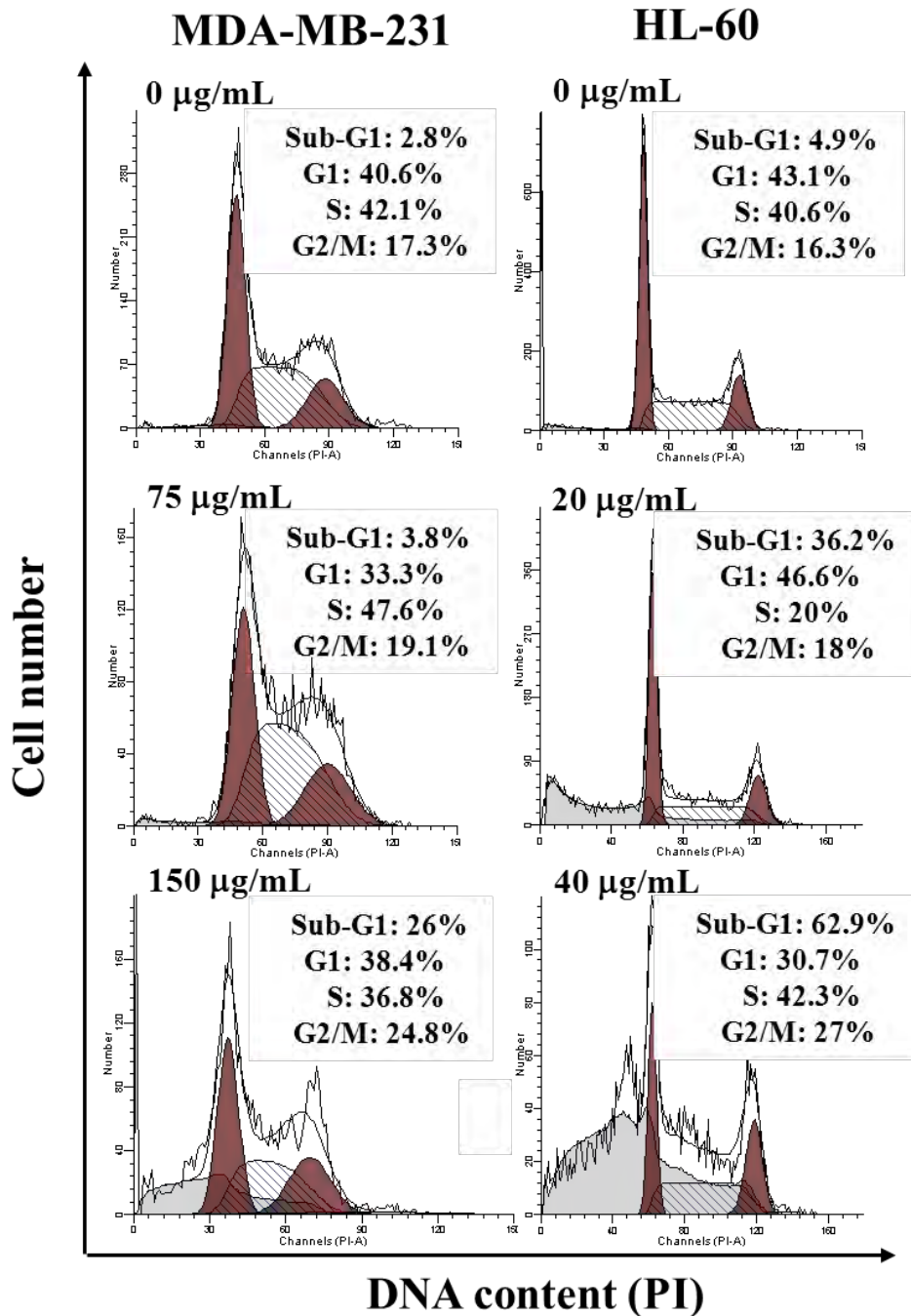
- (1) *Mikania micrantha* showed anti-tumor, anti-angiogenesis, anti-metastasis, and antioxidant activities *in vitro* and/or *in vivo*.
- (2) *Mikania micrantha* possesses anticancer effects that can be used in cancer chemotherapy.
- (3) This fruitful outcome may encourage people to collect and make more use of whole plant and restore the original ecosystem in the world.

References

- (1) SH Kaufmann, GJ Gores. 2000. Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays*. 22, 1007-1017.
- (2) F Hillen, AW Griffioen. 2007. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Reviews*. 26, 489-502.
- (3) J Westermarck, VM Kahari. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal*. 13, 781-792.
- (4) TY Song, GC Yen, 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3322-27.
- (5) 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 premyelocytic leukemia. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 3489-3497.
- (6) YC Hseu, Yang HL, Lai YC, Lin JG, Chen GW and Chang YH. 2004. Induction of apoptosis by *Antrodia Camphorata* in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. *Nutrition and Cancer*. 48(2), 189-197.
- (7) DE Jenkins, YS Hornig, YO, J Dusich, T Purchio. 2005. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Research*. 7, R444-R454.
- (8) HL Yang, YH Kuo, CT Tsai, YT Huang, SC Chen, HW Chang, E Lin, WH Lin, YC Hseu. 2011. Anti-metastatic activities of *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 290-298.
- (9) Y Cao, CY Slaney, BN Bidwell, BS Parker, CN Johnstone, J Rautela J, BL Eckhardt, RL Anderson. 2014. BMP4 Inhibits Breast Cancer Metastasis by Blocking Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity. *Cancer Research*. 74, 5091-102.
- (10) HL Yang, HC Chang, SW Lin, KJS Kumar, CH Liao, HM Wang, KY Lin, and YC Hseu. 2014. *Antrodia salmonea* inhibits TNF- α -induced angiogenesis and atherogenesis in human endothelial cells through the down-regulation of NF- κ B and up-regulation of Nrf2 signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 394-406.

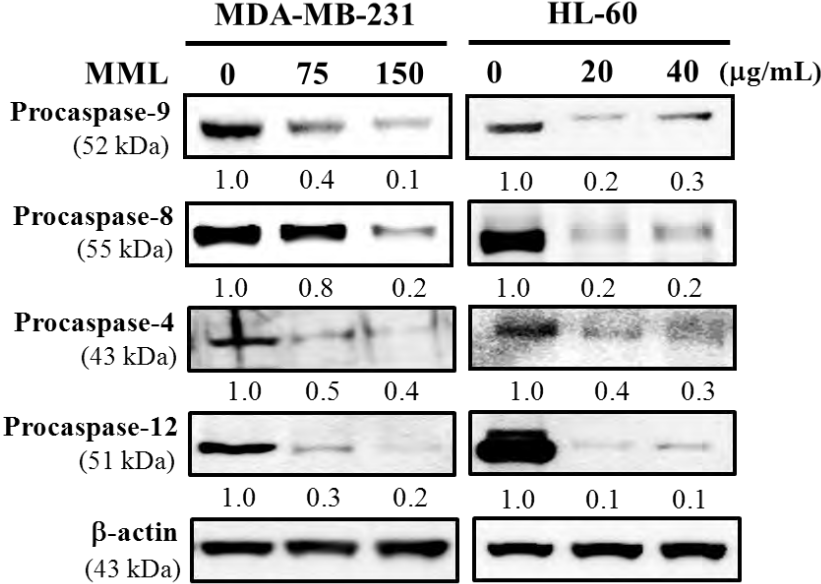
Supplementary Data

S1: MML induces G2/M arrest in MDA-M-231 and HL-60 cells.



S1. Cells were treated with 75-150 or 20-40 µg/mL of MML for 24 h, stained with PI and analyzed for cell-cycle phase using flow cytometry. The cellular distributions (percentage) in different phases of the cell-cycle (sub-G1, G1, S, and G2/M) were determined after treatment with MML. The flow cytometry graph shown here are from one representative experiment that was repeated three times with similar results.

S2: MML mediated apoptosis-regulatory proteins in MDA-MB-231 and HL-60 cells



【評語】 090002

探討小花蔓澤蘭的抗氧化，抗癌之功效初步的結果顯示葉子的萃取物具有較佳之效果。

1. 具有較強之清除 DPPH 自由之能力。
2. 但對 HL-60 細胞形態形式之影響不明顯。
3. 可再用其他 CANCER CELL 作比較。