

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080005
參展科別 生物化學
作品名稱 小兵立大功-發現日常生活中可抑制腦癌細胞之植物萃取物
得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師 賴韻如、廖怡甄
作者姓名 戴寧昕、王筱淇

關鍵字 神經膠母細胞瘤、植物藥、藥物篩檢

作者簡介



第一作者—王筱淇：

國立台灣師範大學附屬高級中學高三生，就讀數理資優班。外表有些內向但其實內在熱情開朗。喜歡親自動手作實驗並偏好生物。未來希望可以考上醫學院，為社會大眾盡一份心。

第二作者—戴寧昕：

國立台灣師範大學附屬高級中學高三生，就讀數理資優班。個性溫和恬靜，但是一旦相熟就會變得十分熱情。喜歡生物，對於人體的運作很有興趣，以考上醫學系為目標。

摘要

本實驗藉由「篩檢抑制癌細胞增長的藥物」來尋找可以抑制癌細胞生長的植物萃取物。我們希望從日常生活中唾手可得的蔬果類植物中尋得抗癌藥物。曾經在生物課聽老師提過，紫衫中的紫衫醇可抑制乳癌；由此我們產生一個想法：是否從日常生活中的植物中也能找出有效抑制癌症的成份？因此便著手進行。先從尋找相關論文、蒐集植物，經由萃取、篩檢四種蔬果類的不同部位之水粗萃物或酒粗萃物，我們得到三種蔬果類可有效抑制腦癌細胞的增長。之後選出實驗效果較為顯著兩種水粗萃物進行西方墨點法，初步確認影響腦癌細胞生長的可能機轉：Akt 以及 Erk；實驗過後發現以上有兩種水粗萃物能透過這兩種訊息傳遞分子影響細胞生長。最後再進行高效液相層析法，期望能夠找出抑制腦癌細胞生長的物質。日後希望這部份的實驗能完整，以期最後的成果。

Abstract

Our experiment aims to find out the botanical extracts that can inhibit the growth of cancer cells by screening. We hope to derive anti-cancer drugs from common fruits and vegetables in our daily life. By screening the aqueous extracts or alcohol extracts taken from four different parts of vegetables and fruits, we discover that three vegetables and fruits can effectively inhibit the growth of U251.

In one of our freshman biology classes, our teacher mentioned that paclitaxel extracted from yews can effectively keep mastocarcinoma from growing and its application can be found in clinical treatments. Inspired by this instance, a good idea flashed into our mind: what if we look for some common plants in our daily life and perform extractions? Maybe we can find effective ingredients in them.

The plants we use in this experiment include those we love eating, those that are said to have the medicinal properties for inhibiting cancer, and those we came across in cookbooks. We collected various kinds of plants and put them into our screening tests. The extracts are applied to U251, the object of our study, and we hope that we can find effective botanical extracts.

After finding the plants that have the potential for being made into anti-cancer drugs, we will adjust this experiment to find out the most effective level of their concentration.

Then, we select the two most effective extracts and conduct western blotting to probe into the possible mechanism of inhibiting. We find that the two aqueous extracts can affect the growth of U251 through two signaling pathways – Akt and Erk.

After western blotting, we will conduct high performance liquid chromatography (HPLC) to find out which chemical compound is the main material can inhibit the growth of U251. And we wish we can finish it in the future, and our research can be used on medical treatment one day.

(一)、前言

本實驗藉由「篩檢抑制癌細胞增長的藥物」來尋找可以抑制癌細胞生長的植物萃取物。我們希望從日常生活中唾手可得的蔬果類植物中尋得抗癌藥物。經由篩檢四種蔬果類得不同部位之水粗萃物或酒粗萃物，我們得到三種蔬果類可有效抑制腦癌細胞的增長。

高一在一次上生物課的時候，老師提到紫杉裡面的紫杉醇可以有效抑制乳癌，目前已經有應用在醫學治療上。於是我們萌生一個想法：如果尋找日常生活中常見的植物，並進行萃取，或許能找到一些可以抑制癌症的成份。

我們尋找的素材中，有自己本來就喜歡食用的、也有因為耳聞據說有抑制癌症功效因而取材的，也有在食譜上偶然看見而有嘗試的興趣的，我們蒐集各種素材一起做篩選，並以腦癌細胞作為研究對象，找出有效抑癌的植物萃取物。

我們蒐集日常生活中常見、且有可能能夠作為有抗癌藥物的植物，並求出它們的有效濃度；並且探討植物萃取物可以有效抑制腦癌細胞生長的可能機轉。

(二)、研究方法或過程

1、萃取

(1)、前置工作

<1>、先蒐集各種有興趣、有耳聞過對抑癌有效的素材，並確認無論文已經先行發佈提出。

<2>、採集素材並先行置於 37 °C 養菌箱 24 小時烘乾處理。

<3>、將素材冷藏備用。

(2)、實驗流程（見圖一）



圖一、萃取實驗流程圖

<1>、取出素材，將素材放進研鉢，用研杵磨碎。

<2>、分水萃及酒萃分別加入二次水或純酒精；量視素材多寡而定。

<3>、再研磨。

<4>、將研鉢內混合物以微量吸管吸至 1.5 mL 小管或是 2 mL 小管。

- <5>、使用加熱器，以 95 °C 加熱 20 分鐘。
- <6>、以 14000 轉/秒 離心 5 分鐘。
- <7>、吸取上清液以針筒過濾器過濾至新的小管。
- <8>、放入-20 °C 冰箱冷凍貯備。

2、配藥（植物萃取液）

(1)、計算出原始萃取液的濃度，我們以手中得到的萃取液濃度為最高濃度，計算可以處理細胞的濃度。

計算方式見圖二：以最高濃度為貯備溶液，配製 200 μL。由於細胞最多只能加 5% v/v 的劑量，我們可知必須配製 20 倍最終濃度的濃度作為貯備濃度。

$$\text{最高濃度} * 20 = \frac{\text{原液濃度} * X}{200 (\mu\text{L})}$$

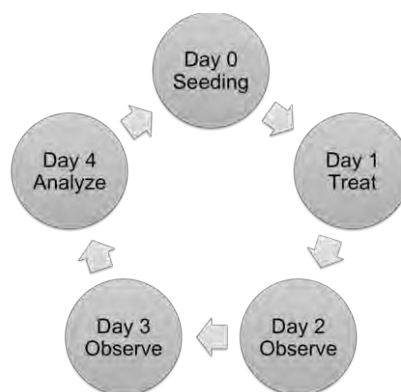
$X = \text{所需原液量} (\mu\text{L})$

圖二、濃度計算方式

(2)、餘下濃度以最高濃度依比例配製。

濃度比例：如 ½ 最高濃度、再 *½，依此類推。

3、篩藥/毒性測試（篩選有效抑制腦癌細胞的植物萃取物/對非癌細胞之細胞的影響）（流程見圖三）



圖三、篩藥流程示意圖

(1)、細胞培養（種類：U251，腦神經膠質癌細胞/NIH3T3，小鼠纖維母細胞）

(2)、種細胞

<1>、將培養皿中的培養液吸乾，並加入 3 mL 細胞等張溶液（PBS）。

<2>、加入 1 mL 胰蛋白酶（Trypsin），放入細胞培養箱中 1 分鐘。

<3>、加入 3 mL 細胞培養液，並將剩餘貼在培養皿底部的的細胞沖起。

<4>、將台盼藍（Trypan blue）與細胞培養液以 140：20 的體積比例混合，並置於倒立式顯微鏡下計算細胞數。

<5>、取 3000*100 的細胞數量。

<6>、取出所需細胞液，並補至 10 mL。

<7>、九十六孔盤中每格放入 100 uL 細胞液。隔天即可加藥。

(3)、加藥

<1>、將濃度配好的萃取液與培養液以 20：380 比例稀釋。

<2>、一種藥的濃度加入孔盤三格，每格加 100 uL。

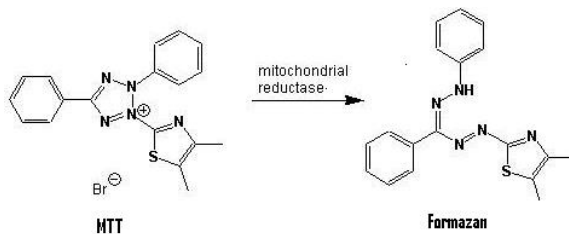
<3>、觀察 72 小時後，分析細胞的存活率。

4、細胞存活率分析

(1)、將九十六孔盤中的培養液全數吸掉。

(2)、將噻唑藍（MTT）1 mL 與培養液 8 mL 混合均勻，並以一格 90 uL 的量加入九十六孔盤中的格。等待 3 小時。

(3)、將格內溶液吸掉，加入二甲基亞砷（DMSO），溶出被還原的甲臞。見圖四。



圖四、噻唑藍（MTT）反應示意圖

(4)、用微量分光光度計分析存活率。

5、西方墨點法 (Western Blotting)

將腦癌細胞培養於 3 cm 之培養皿，於加藥後 48 小時收取並進行下列實驗。
實驗目的為分析某些特殊幹細胞以及細胞凋亡的機制。

(1)、濃度測定

<1>、將細胞培養液與細胞吸進小管，並加入細胞等張溶液至滿。

(盡量把細胞從培養皿上沖下來)

<2>、離心約 1~2.5 分鐘。

<3>、將上清液吸起，小心不要吸到底部細胞。重複 1~3 步驟三次。

<4>、加入裂解液 (SDS lysis buffer) 100 μ L，並以 95 °C 乾浴 3 分鐘。

<5>、使用超聲波振盪器振盪 10 秒。

<6>、以二喹啉酸 (BCA) 讀取吸光值。並以小牛血清蛋白 (BSA) 作為基準計算出所需蛋白質量。

(2)、電泳

<1>、取新小管加入 10 μ L 上樣緩衝液 (SDS loading buffer)，並取含 30 μ g 蛋白質量及含有細胞的細胞裂解液加入其中。

<2>、將電解液倒入電解槽，並將 1. 做好的樣品加入膠上的小格。

<3>、通以電壓 160 V、電流 400 mA 運行 60 分鐘。

(3)、轉漬

<1>、將濾紙浸入轉漬溶液，並置於半乾式轉漬槽上，共疊三張。

<2>、將膠取下，並將不要的部份切除，與硝酸纖維素膜一同浸泡在轉漬溶液中，再放上已經疊好的濾紙上。

<3>、再疊三張浸泡過轉漬溶液的濾紙，並接好轉漬槽的正負極，以 15 V、200~400 mA 運行 70 分鐘。

(4)、接抗體

<1>、取下轉漬過後的硝酸纖維素膜，並加入 5 % 牛奶放在蹺蹺板振盪器上搖 60 分鐘以去除雜訊。

<2>、用 TTBS 沖洗 10 分鐘。

<3>、加入一級抗體，並置於 4 °C 冰箱以蹺蹺板振盪器搖整夜。

<4>、隔天將一級抗體倒掉，以 TTBS 沖洗。10 分鐘換一次 TTBS，共三次。總共沖洗 30 分鐘。

<5>、加入 1 % 牛奶，以蹺蹺板振盪器搖 60 分鐘。

<6>、加入二級抗體，以蹺蹺板振盪器搖 120 分鐘。

(5)、發片

<1>、加入 1 mL ECL luminol 以及 ECL 氧化劑，作用於二抗使發冷光。

<2>、放入冷螢光影像機擷取機中讀取，存成圖片後分析。

6、高效液相層析法

(1)、分析

<1>、取 200 uL 的藥品，以孔徑 0.45 um 的過濾器過濾大顆粒的雜質，並裝入樣品瓶中。

<2>、裝上所使用的管柱 [分析級逆相層析管柱 (ODS)]

<3>、開啓 HPLC，設定收集條件：

流速：1 mL

溫度：30 °C

偵測器：光二極體陣列式偵測器 (L-2455)

偵測波長：208 nm

進樣體積：2 uL

移動相溶液：A=ddH₂O，B=CH₃CN

移動相流動方式：梯度

<4>、先以 ddH₂O:CH₃CN=9:1 的溶液沖洗管柱，再以 ddH₂O:CH₃CN=1:9 的溶液沖洗，目的是洗去管柱中的雜質以及確認管柱的穩定性。

<5>、開始進樣。

(2)、收取分離液

<1>、重複上述步驟，進樣體積改為 50 uL。並設定收集器以每五分鐘收一管，所以編號為 1 的是 0~5 分鐘、編號為 2 的是 6~10 分鐘，依此類推。

<2>、抽取初步分離液 1.5 mL 裝在 2 mL 的微量離心管內，濃縮一小時。

<3>、取出離心管，將溶液補至 1.5 mL，再次濃縮一小時。

<4>、重複 2 直到抽乾。

(5)、再分別加入 50 uL 的 ddH₂O。

(三)、研究結果與討論

1、篩藥結果—細胞存活率

經過實驗並分析整理，得下列結果。

(1)、薰衣草

<1>、水萃：（見圖五）

薰衣草之淨重為：65.5 mg；原始濃度為：43.7 mg/mL

經實驗發現細胞在薰衣草粗萃液作用之下的存活率：

在其濃度 0.1 mg/mL 之存活率：115.9 % ± 6.2

濃度 0.5 mg/mL 之存活率：105.2 % ± 6.7

濃度 1.0 mg/mL 之存活率：112.0 % ± 7.2

濃度 2.0 mg/mL 之存活率：78.6 % ± 10.4

由圖五可知，在濃度 2.0 mg/mL 時有 78.6 % 的抑制效果，其餘低濃度部份則顯示無效。

<2>、酒萃：（見圖六）

薰衣草之淨重為：64.7 mg；原始濃度為：43.1 mg/mL

經實驗發現細胞在薰衣草粗萃液作用之下的存活率：

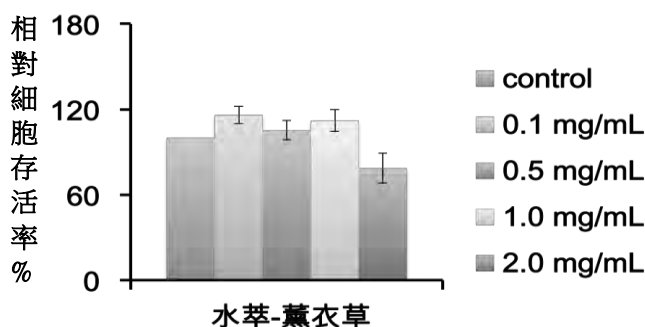
在其濃度 0.1 mg/mL 之存活率：118.5 % ± 5.7

濃度 0.5 mg/mL 之存活率：105.3 % ± 2.6

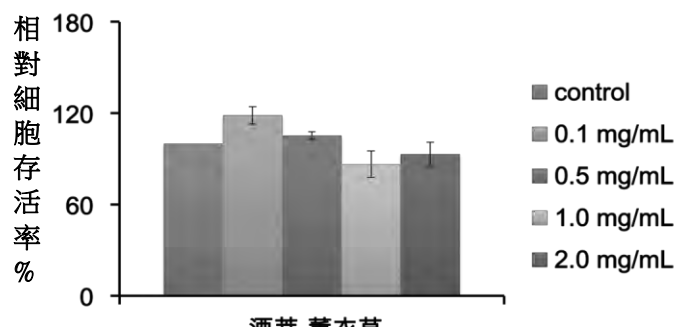
濃度 1.0 mg/mL 之存活率：86.3 % ± 8.6

濃度 2.0 mg/mL 之存活率：93.0 % ± 7.9

結果與水萃比較（見圖五、圖六），我們發現酒萃薰衣草基本上對於抑制腦癌細胞無顯著效果，而不比水萃的高濃度存活率略有下降。



圖五、水萃薰衣草



圖六、酒萃薰衣草

(2)、葡萄籽

<1>、水萃：（見圖七）

葡萄籽之淨重為：660 mg；原始濃度為：264 mg/mL

經實驗發現細胞在葡萄籽粗萃液作用之下的存活率：

在其濃度 0.25 mg/mL 之存活率：97.0 % ± 0

濃度 1.00 mg/mL 之存活率：41.3 % ± 8.7

濃度 5.00 mg/mL 之存活率：14.5 % ± 1.2

濃度 10.00 mg/mL 之存活率：20.6 % ± 0.9

由圖七可知，水萃葡萄籽在濃度 1.00 mg/mL 的時候開始有抑制效果，而在 10.00 mg/mL 上存活率有上升情形。

<2>、酒萃：（見圖八）

葡萄籽之淨重為：650 mg；原始濃度為：260 mg/mL

經實驗發現細胞在葡萄籽粗萃液作用之下的存活率：

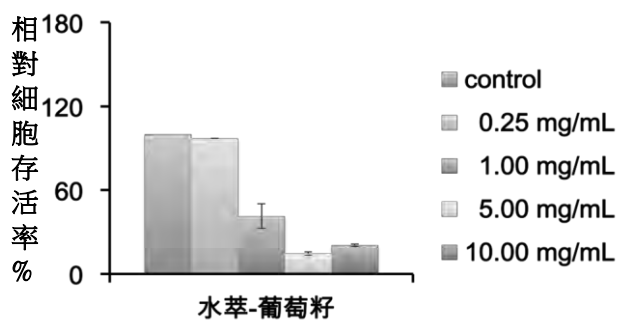
在濃度 0.5 mg/mL 之存活率：133.1 % ± 24.6

濃度 1.0 mg/mL 之存活率：105.9 % ± 12.8

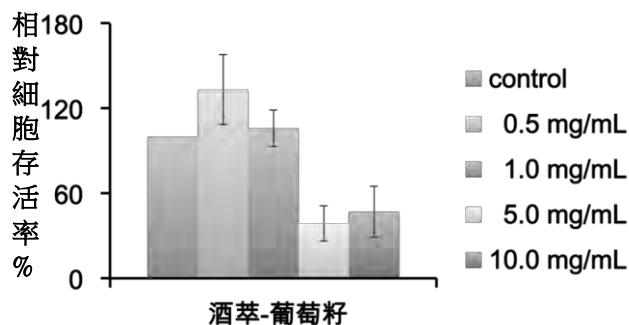
濃度 5.0 mg/mL 之存活率：38.7 % ± 12.4

濃度 10.0 mg/mL 之存活率：46.9 % ± 17.9

由圖八看出，酒萃葡萄籽低濃度不但沒有抑制腦癌細胞生長，反而使它增殖。5.0 mg/mL 的濃度的確有抑制作用，10 mg/mL 則和水萃同樣有反衝現象。



圖七、水萃葡萄籽



圖八、酒萃葡萄籽

(3)、青椒籽

<1>、水萃：（見圖九）

青椒籽之淨重為：709 mg；原始濃度為：236.33 mg/mL

經實驗發現細胞在青椒籽粗萃液作用之下的存活率：

在濃度 0.5 mg/mL 之存活率：90.0 % ± 8.7

濃度 1.0 mg/mL 之存活率：80.6 % ± 6.3

濃度 5.0 mg/mL 之存活率：68.0 % ± 8.7

濃度 7.5 mg/mL 之存活率：49.7 % ± 9.8

由圖九可知，隨濃度上升，細胞存活率隨之下降，可知水萃青椒籽能有效抑制腦癌細胞生長。

<2>、酒萃：（見圖十）

青椒籽之淨重為：1141.5 mg；原始濃度為：285.375 mg/mL

經實驗發現細胞在青椒籽粗萃液作用之下的存活率：

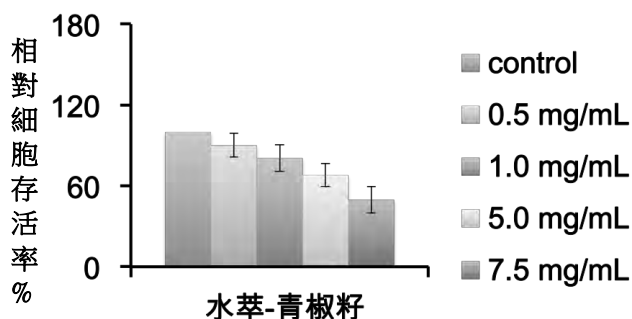
在濃度 0.5 mg/mL 之存活率：83.2 % ± 2.5

濃度 1.0 mg/mL 之存活率：82.6 % ± 20.0

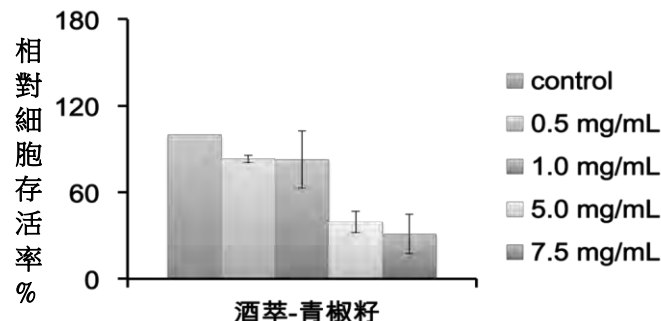
濃度 5.0 mg/mL 之存活率：39.4 % ± 7.4

濃度 7.5 mg/mL 之存活率：31.0 % ± 13.6

由圖十可知，0.5 mg/mL 以及 1.0 mg/mL 的濃度無法有效抑制腦癌細胞生長，但是高濃度細胞存活率則明顯下降。



圖九、水萃青椒籽



圖十、酒萃青椒籽

(4)、苦瓜籽

<1>、水萃：（見圖十一）

苦瓜籽之淨重為：2250.4 mg；原始濃度為：750.13 mg/mL

經實驗發現細胞在青椒籽粗萃液作用之下的存活率：

在濃度 0.5 mg/mL 之存活率：78.9 % ± 9.9

濃度 1.0 mg/mL 之存活率：60.9 % ± 6.2

濃度 5.0 mg/mL 之存活率：22.4 % ± 13.6

濃度 7.5 mg/mL 之存活率：15.0 % ± 9.5

由圖十一可知，水萃苦瓜籽隨濃度上升，細胞存活率呈現梯度下降。

<2>、酒萃：（見圖十二）

苦瓜籽之淨重為：2.2685 g；原始濃度為：756.16 mg/mL

經實驗發現細胞在青椒籽粗萃液作用之下的存活率：

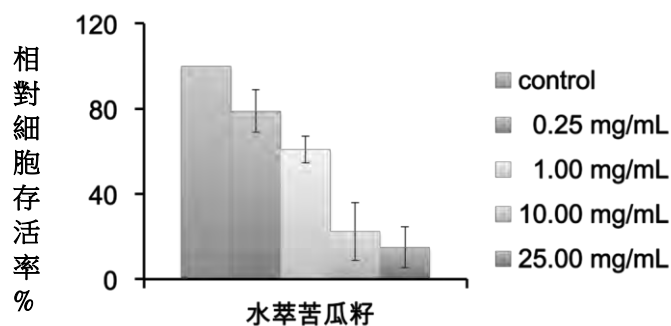
在濃度 1.0 mg/mL 之存活率：76.8 % ± 0.4

濃度 5.0 mg/mL 之存活率：55.1 % ± 6.8

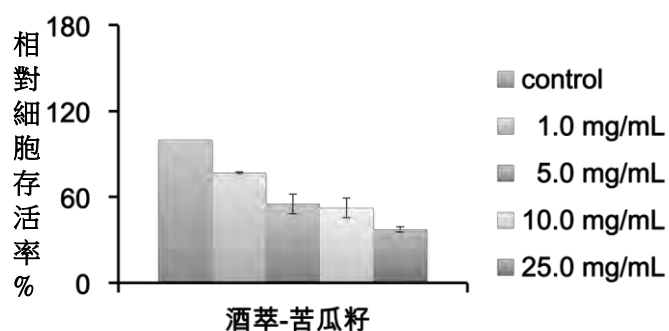
濃度 10.0 mg/mL 之存活率：52.4 % ± 6.7

濃度 25.0 mg/mL 之存活率：37.3 % ± 1.7

由圖十二可知，酒萃苦瓜籽同水萃苦瓜籽，隨濃度上升，細胞存活率呈現梯度下降的情形。



圖十一、水萃苦瓜籽



圖十二、酒萃苦瓜籽

2、西方墨點法結果—CD133、Sox 2、PAkt、PErk 分析

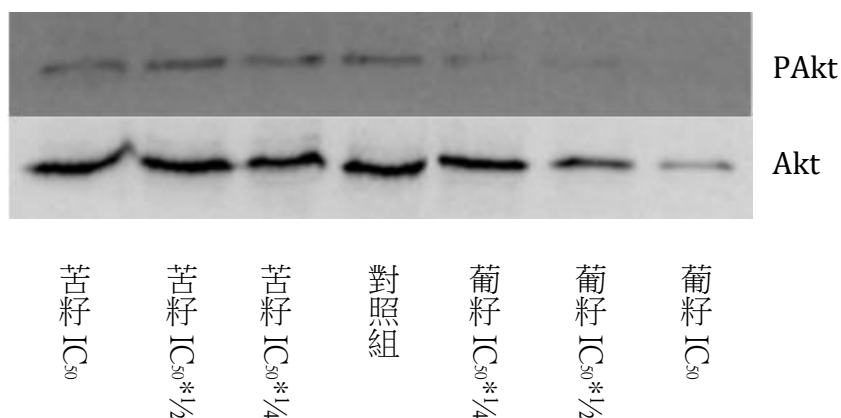
篩藥結果分析完畢後，為了研究影響細胞生長及存活的相關機轉—利用西方墨點法來分析相關的蛋白質。我們將篩藥結果的數值回歸直線後求 IC_{50} （細胞存活 50 % 之濃度），取 IC_{50} 、以及 $IC_{50} \times \frac{1}{2}$ 、 $\frac{1}{4}$ 作為西方墨點法濃度。

藥物篩檢結果，酒萃實驗期間我們發現酒萃對照組細胞生長並不好，幾次實驗下來細胞存活率相對於水萃大多只高不低，效果較差；而青椒籽相比較葡萄籽以及苦瓜籽效果較為不彰，因此西方墨點法目前只取水萃葡萄籽、水萃苦瓜籽進行實驗。

我們檢測四種蛋白質：CD133、Sox 2、PAkt、PErk。CD133 以及 Sox 2 均屬於神經膠母細胞的蛋白質標記，如果我們得到這兩種標記訊號隨藥物濃度上升而逐漸變弱，我們便可推測植物萃取液的確能夠抑制癌幹細胞生長。Akt、Erk 則是與腦癌細胞生長與存活相關蛋白質途徑，如果其活化（磷酸化）後則會成為 PAkt 以及 PERk，這兩種蛋白質訊號隨濃度上升而減弱，則可以推想植物萃取液有經由這兩種途徑作用，進而抑制細胞生長及存活。PARP 則是看細胞凋亡，上排為完整蛋白質，下排為被切碎的蛋白質，因此隨濃度上升，上排訊號應越來越弱，下排則反。而 GAPDH、Akt、Erk 為細胞本身就有的蛋白質，表現量恆定，因此作為蛋白質定量的對照。

實驗結果如下：

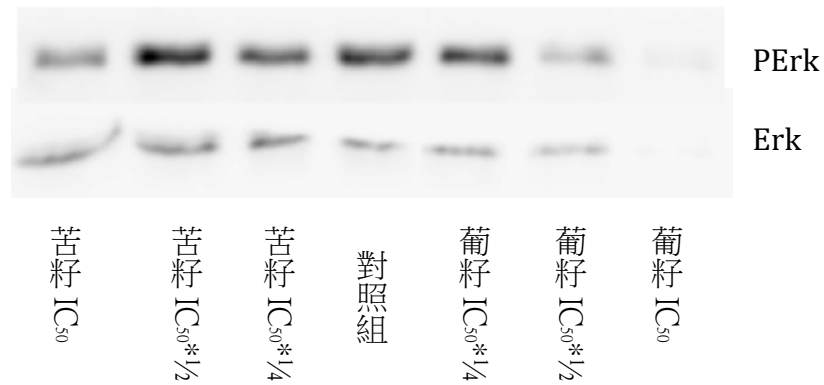
(1)、水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽 PAkt、Akt 之表現（圖十三）



圖十三、水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽 PAkt、Akt 之表現

圖十三可看出 PAkt 隨葡萄籽濃度上升而訊號減弱；苦瓜籽則 IC_{50} 訊號減弱較為明顯。

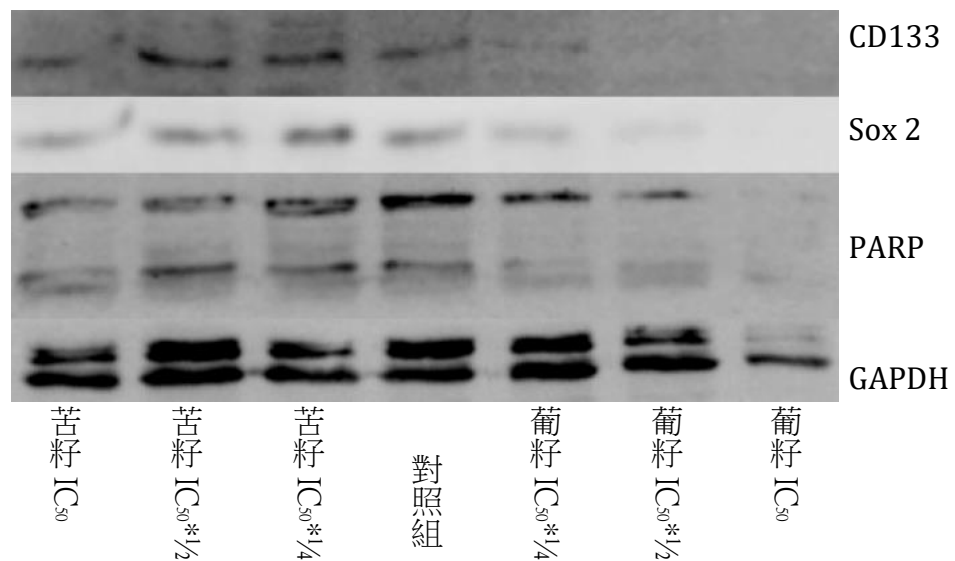
(2)、水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽 PERk、Erk 之表現 (圖十四)



圖十四、水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽 PERk、Erk 之表現

由圖十四可看出 PERk 在苦瓜籽有訊息隨濃度上升而減弱的趨勢，葡萄籽剩餘兩個濃度亦是。

(3)、水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽 CD133、Sox 2、PARP、GAPDH 之表現 (圖十五)



圖十五、水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽 CD133、Sox 2、PARP、GAPDH 之表現

由圖十五可看出，水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽隨濃度上升，CD133 及 Sox 2 訊號隨之減弱。

3、初步毒性測試結果

確認植物萃取物俱有標靶治療的效能，我們做了初步毒性測試，但腦神經膠質細胞成本過高，以神經纖維母細胞作為代替。如圖十六、圖十七、圖十八。

(1)、水萃葡萄籽之細胞存活率

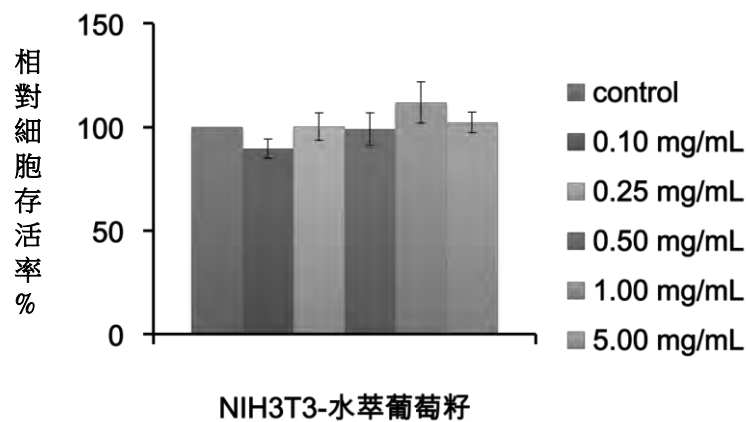
在濃度 5.00 mg/mL 之存活率：89.5 % ± 4.9

在濃度 1.00 mg/mL 之存活率：10.2 % ± 6.2

在濃度 0.50 mg/mL 之存活率：98.9 % ± 7.9

在濃度 0.25 mg/mL 之存活率：111.7 % ± 9.9

在濃度 0.10 mg/mL 之存活率：102.1 % ± 4.8



圖十六、NIH3T3 水萃葡萄籽

(2)、水萃青椒籽之細胞存活率

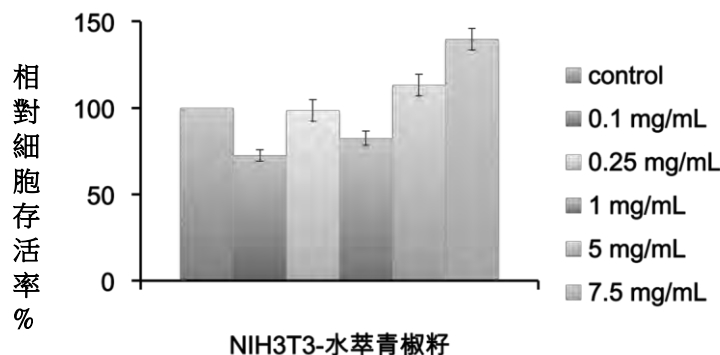
在濃度 7.5 mg/mL 之存活率：139.7 % ± 6.2

在濃度 5.0 mg/mL 之存活率：113.2 % ± 6.2

在濃度 1.0 mg/mL 之存活率：82.3 % ± 4.1

在濃度 0.25 mg/mL 之存活率：98.5 % ± 6.2

在濃度 0.1 mg/mL 之存活率：72.5 % ± 3.3



圖十七、NIH3T3 水萃青椒籽

(3)、水萃苦瓜籽之細胞存活率

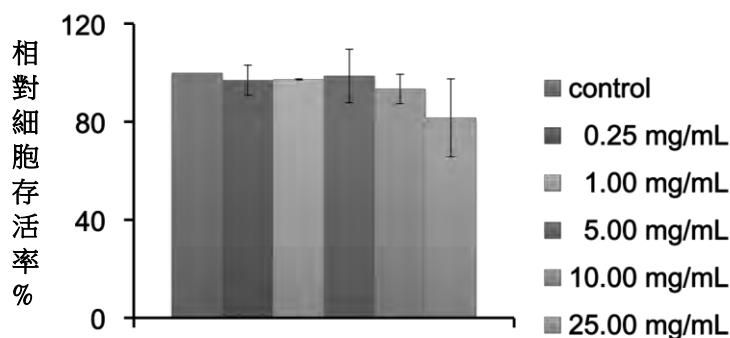
在濃度 25.00 mg/mL 之存活率：97.0 % ± 6.2

在濃度 10.00 mg/mL 之存活率：97.3 % ± 0.2

在濃度 5.00 mg/mL 之存活率：98.8 % ± 10.9

在濃度 1.00 mg/mL 之存活率：93.4 % ± 6.0

在濃度 0.25 mg/mL 之存活率：81.6 % ± 15.9



NIH3T3-水萃苦瓜籽

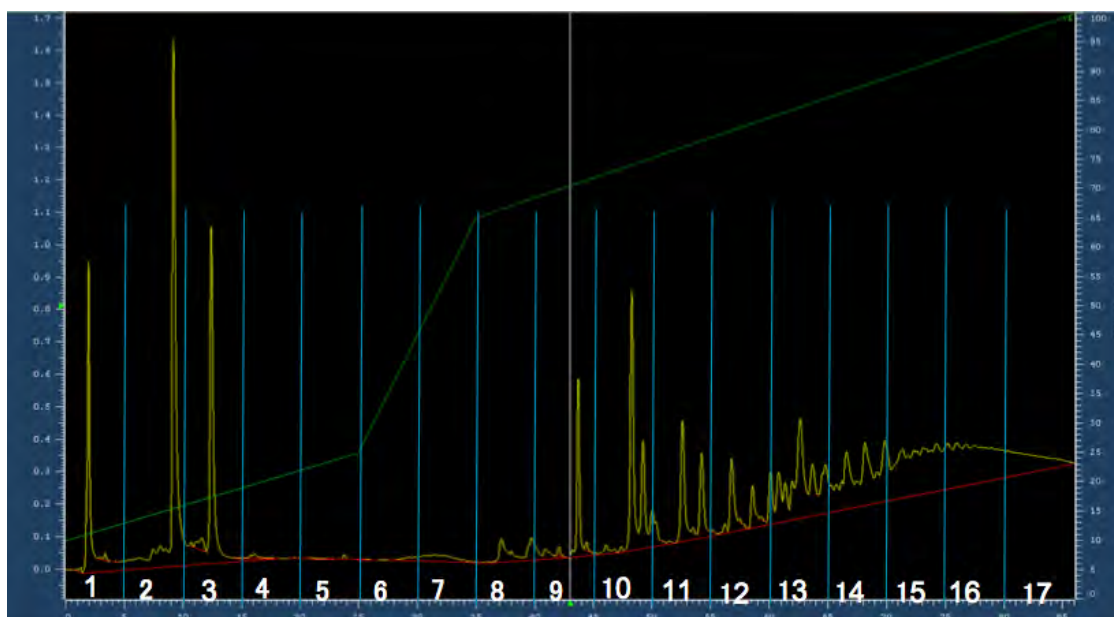
圖十八、NIH3T3 水萃苦瓜籽

由圖十六可看出，水萃葡萄籽對細胞無抑制生長的情形。圖十七表現出水萃青椒籽對細胞非但沒有抑制力，反而幫助細胞生長。圖十八可看出水萃苦瓜籽對細胞有抑制效果，但是相較於腦癌細胞的存活率仍為高。

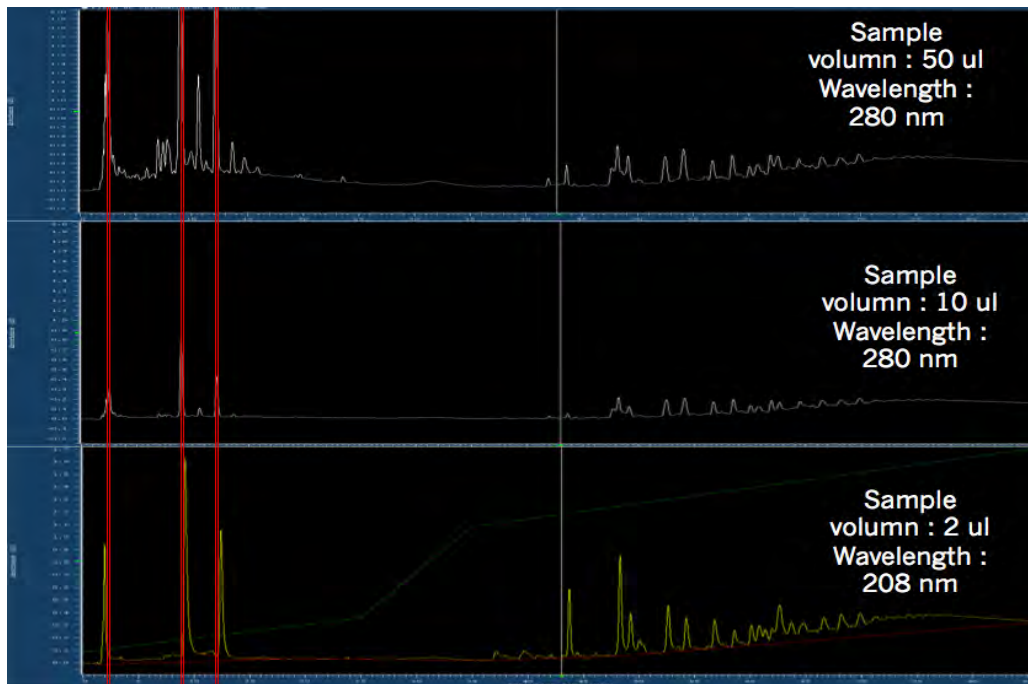
4、高效能液效層析法結果

(1)、跑圖結果分析

<1>、葡萄籽（如圖十九、圖二十）

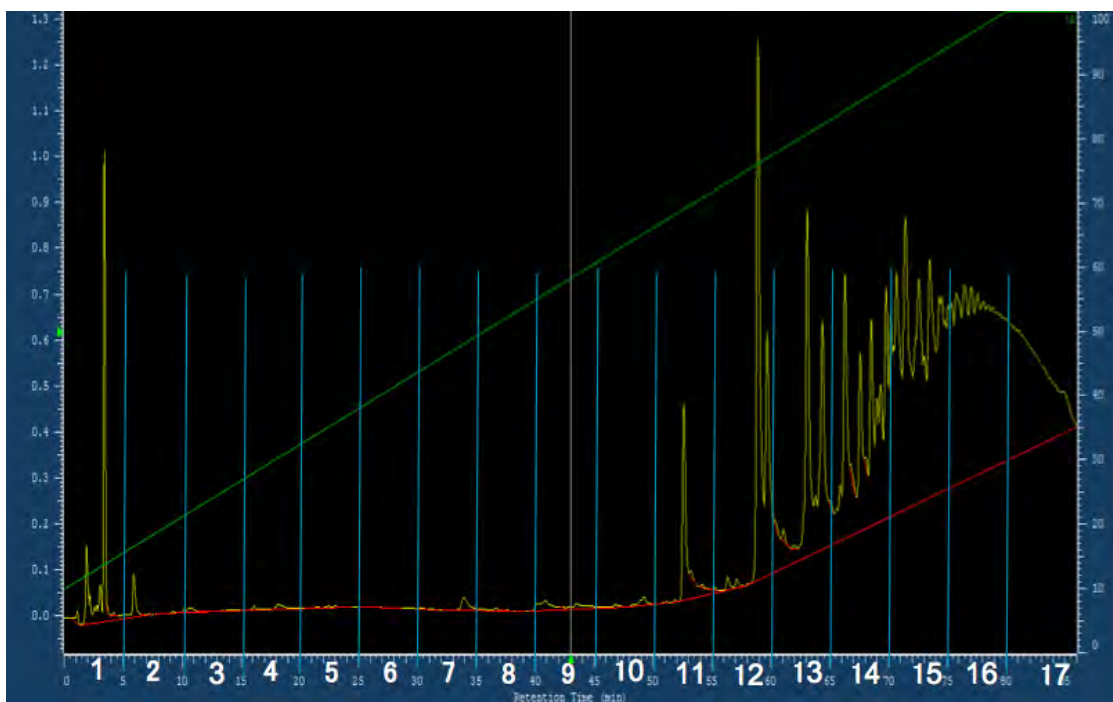


圖十九、葡萄籽 2 uL 分析



圖二十、葡萄籽 50 uL 收取之吸收峰對照

依據有吸收峰的分離液，將使用 1-3、8-14 管做初步細胞毒殺測試。



圖二十一、苦瓜籽 2 uL 之分析

<2>、苦瓜籽（見圖二十一）

根據有吸收峰的分離液，將使用 1-2、11-15 管做初步細胞毒殺測試。

(2)、分離液之細胞存活率分析

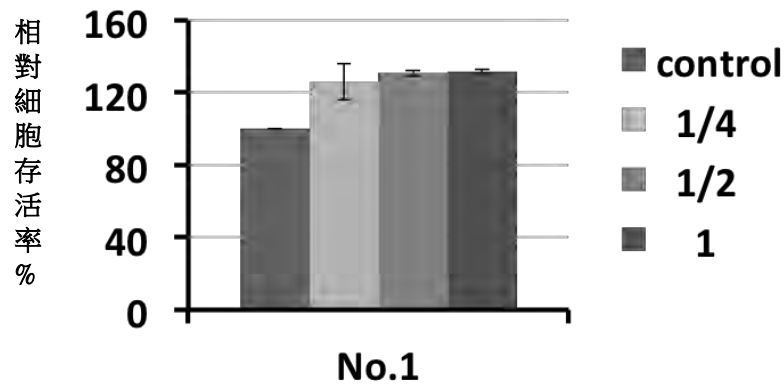
<1>、1 號藥之相對細胞存活率（見圖二十二）

經實驗發現細胞在一號藥作用之下的存活率：

在其濃度 1/4 之存活率：126.02 % ± 17.2

濃度 1/2 之存活率：130.71 % ± 1.5

濃度 1 之存活率：131.71 % ± 2.4



圖二十二、1 號藥之相對細胞存活率

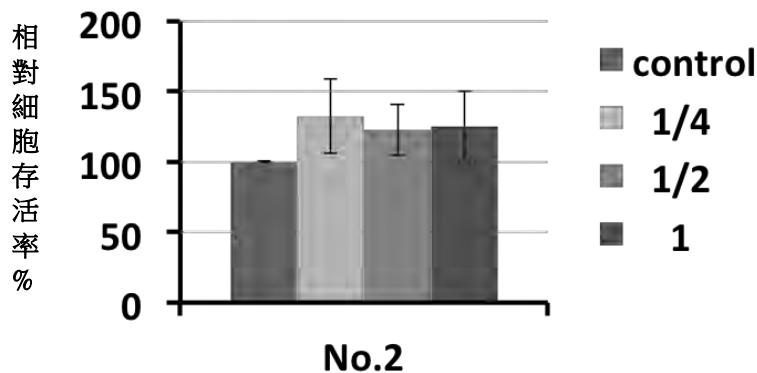
<2>、2 號藥之相對細胞存活率（見圖二十三）

經實驗發現細胞在二號藥作用之下的存活率：

在其濃度 1/4 之存活率：106.04 % ± 2.48

濃度 1/2 之存活率：105.62 % ± 13.90

濃度 1 之存活率：100.13 % ± 4.71



圖二十三、2 號藥之相對細胞存活率

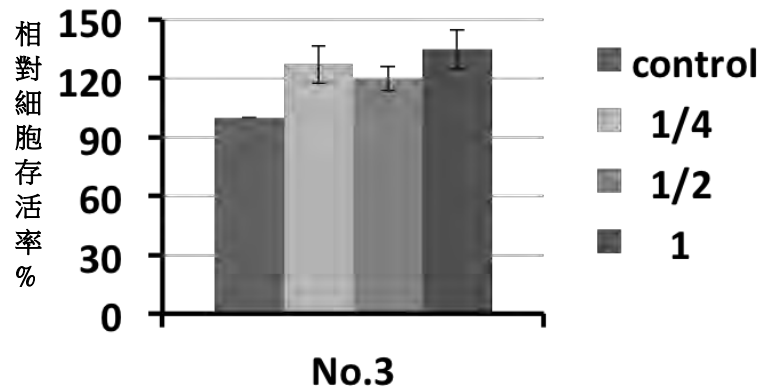
<3>、三號藥之細胞存活率（見圖二十四）

經實驗發現細胞在三號藥作用之下的存活率：

在其濃度 1/4 之存活率：127.03 % ± 16.5

濃度 1/2 之存活率：119.79 % ± 10.7

濃度 1 之存活率：134.78 % ± 17.4



圖二十三、3 號藥之相對細胞存活率

5、篩藥—腦癌細胞存活率之分析討論

(1)、薰衣草水萃部份的腦癌細胞存活率在高濃度方面有下降的情形，我們猜測更高濃度可能也有抑制腦癌細胞生長的效果，然而原始濃度太低，無法進行確證。

(2)、葡萄籽無論水萃或酒萃，最高濃度（10 mg/mL）存活率均有反衝的情形，我們目前推想是實驗誤差。而酒萃數值標準差過大情形還要再進一步實驗確認。葡萄籽酒萃低濃度存活率超越對照組存活率這方面，酒萃對照組存活情形並不如水萃好，再加上葡萄籽本身有抗氧化的功效，可能相比較之下，低濃度非但沒有抑制腦癌細胞生長，反而幫助細胞增殖。不過，大致上葡萄籽在水萃及酒萃的實驗後可發現，隨濃度上升有抑制腦癌細胞的效果。

(3)、青椒籽萃取液實驗結果呈現濃度上升、細胞存活率下降的情形，但是存活率仍偏高。由於已經無法再調配出更高濃度，因此這部份有待日後探討。

(4)、苦瓜籽萃取液實驗結果呈現濃度上升、細胞存活率下降的情形，並且在最高濃度作用下，細胞存活率也確實降低許多，目前推測苦瓜籽對抑制腦癌細胞確實有效。

6、西方墨點法分析討論

(1)、西方墨點法中，葡萄籽 IC₅₀ 這支藥結果來看定量有出錯，因此我們無法判定其訊息減弱是藥物有效或是本身蛋白質量就少的原因。出錯原因可能包括小牛血清蛋白讀值誤差、或是轉漬時沒有完全轉漬。因此西方墨點法我們還需要再進行實驗確認。

7、初步毒性測試討論

(1)、青椒籽呈現濃度越高、細胞存活率反而越好的情形，但是由於先前 U251 篩藥實驗青椒籽萃取液濃度無法再上升，腦癌細胞存活率無法壓得更低，因此這部份我們先略過不談。

8、高效液相層析法討論

(1)、我們先進行葡萄籽的實驗，由於是水萃，我們推想有效物質應在極性部份，先行嘗試 1-3 管，然而全數無效。我們推測可能在抽乾、去除 CH₃CN 時將有效物質一起抽走，或是有效物質確實為非極性。

(四)、結論與應用

1、在篩藥—腦癌細胞存活率之分析上，青椒籽、苦瓜籽的相對細胞存活率隨濃度上升呈梯度下降，而葡萄籽高濃度對抑制腦癌細胞有效果，但其酒萃低濃度效果不彰且有助長的情形；薰衣草對抑制腦癌細胞生長無顯著效果。

2、西方墨點法之分析上，水萃苦瓜籽及水萃葡萄籽對癌幹細胞有抑制效果，從 CD133、Sox 2 這兩種癌幹細胞標記的訊號變弱可得知；並且這兩種藥可針對 PAkt、PErk 這兩種蛋白質途徑使其細胞凋亡。日後我們將會再度進行實驗，並且將酒萃藥物進行西方墨點法分析，最後希望能夠進行藥物成分及細胞週期變化分析，尋找藥物能夠抑制細胞生長的成分，以及改變細胞週期變化的原因。

3、在初步毒性測試結果上，水萃葡萄籽、水萃苦瓜籽對細胞無顯著殺傷力。水萃青椒籽則隨濃度上升、存活率隨之上升。

4、高效液相層析法中，水萃葡萄籽編號 1-3 管對影響腦癌細胞生長無顯著效果。

5、未來若是能夠完成全部實驗，找出能夠有效抑制腦癌細胞生長的分離液並分析出內含的物質，則有望對治療腦癌能有一小步的貢獻。

(五)、參考文獻

1、口蹄疫病毒鞘蛋白 VP1 在細胞造成之訊息傳遞及其影響。

作者：曾思宜。(2007)

<http://activity.ntsec.gov.tw/activity/race-1/46/senior/0407/040714.pdf>

2、VP-16 調控 Akt-Ser473 去磷酸化效應誘導 *p53* 突變 非小細胞肺癌細胞的凋亡。

作者：林佳薇、林銘儀、吳忠信、黃慧滇、方剛•發表。(2008)

http://ir.lib.ntnu.edu.tw/retrieve/27208/ntnlib_ja_C0401_4301_017.pdf

3、The antitumor effects of *Angelica sinensis* on malignant brain tumors in vitro and in vivo.

作者：Tsai NM¹, Lin SZ, Lee CC, Chen SP, Su HC, Chang WL, Harn HJ.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867250>

4、The Methanol Extract of *Angelica sinensis* Induces Cell Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Malignant Brain Tumors.

作者：Lin YL¹, Lai WL, Harn HJ, Hung PH, Hsieh MC, Chang KF, Huang XF, Liao KW, Lee MS, Tsai NM.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=UThe+Methanol+Extract+of+Angelica+sinensis+Induces+Cell+Apoptosis+and+Suppresses+Tumor+Growth+in+Human+Malignant+Brain+Tumors.>

【評語】 080005

葡萄籽萃取物在抑制癌細胞的研究已經很多對於本研究與他人研究之間的相關性應要有所探討，Western blot 的結果應要重複三次並計算出相差的程度，用統計方法分析其差異重要性。如果把有效成分分離出並且鑑定出會更完整呈現研究成果。葡萄品種與苦瓜品種應說明。