

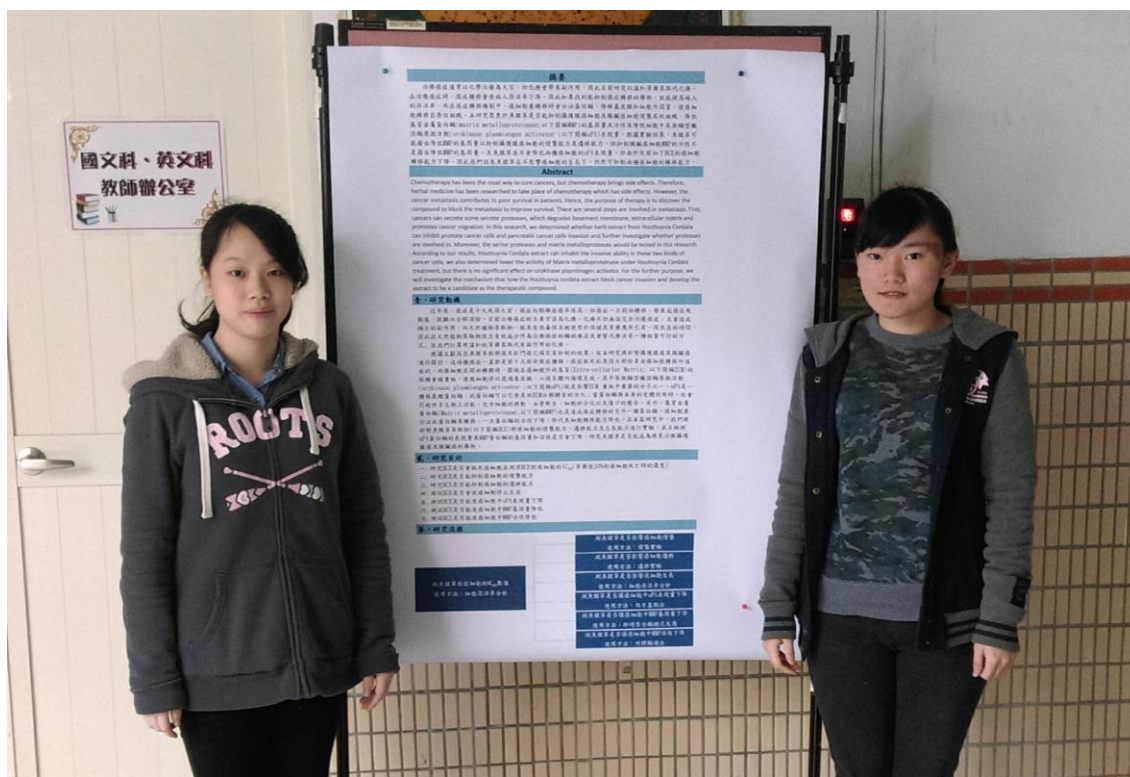
2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090012
參展科別 醫學與健康科學
作品名稱 魚腥草對攝護腺癌及胰臟癌之影響
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立中山女子高級中學
指導教師 陳晏如、李明學
作者姓名 黃鈺雯、黃品瑄

關鍵字 魚腥草、癌症、蛋白酶

作者簡介



我是黃品瑄(左)，就讀中山女高高三數理資優班。從小就喜歡科學，上了高中後第一次接觸有關生物的實驗，從此熱愛生物。透過高中後滿滿的專題及實驗課，不僅學習許多實驗，更開闊了眼界，更能從無數的公假單中得到樂趣。希望來能夠真正把研究內容發揚光大，解救許多人!!!耶!

我是黃鈺雯(右)，就讀中山女高高三數理資優班。從小就喜歡做科學實驗，特別與生物相關的，因此在高中選擇進行與生物相關的專題研究，也因為專題有了進研究所實驗室的經驗，更學習到高中課本所沒教的經驗技巧，在三年中，即使有過失敗及挫折，但憑藉著對生物的熱情，我們從不放棄在科學中揮灑青春的機會。

摘要

治療癌症通常以化學治療為大宗，但化療會帶來副作用，因此目前研究以溫和草藥來取代化療。在治療癌症時，癌症轉移會使病人存活率下降，因此如果找到能抑制癌症轉移的藥物，就能提高病人的存活率，而在癌症轉移機制中，癌細胞要轉移時會分泌蛋白酶，降解基底膜和細胞外間質，使癌細胞轉移出原位組織。本研究聚焦於魚腥草是否能抑制攝護腺癌細胞及胰臟癌細胞侵襲其他組織、降低基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase;以下簡稱 MMP)的基因量及活性及降低細胞中尿激酶型纖維溶酶原激活劑(urokinase plasminogen activator ;以下簡稱 uPA)表現量。根據實驗結果，魚腥草可能藉由降低 MMP 的基因量以抑制攝護腺癌細胞的侵襲能力及遷移能力，但抑制胰臟癌細胞 MMP 的活性不是藉由降低 MMP 的基因量，且魚腥草並不會降低兩種癌細胞的 uPA 表現量，但由於先前加了 HCE 的癌細胞轉移能力下降，因此我們認為魚腥草在不影響癌細胞的生長下，仍然可抑制兩種癌細胞的轉移能力。

Abstract

Chemotherapy has been the most way to cure cancers, but chemotherapy brings side effects. Therefore, herbal medicine has been researched to take place of chemotherapy which has side effects. However, the cancer metastasis contributes to poor survival in patients. Hence, the purpose of therapy is to discover the compound to block the metastasis to improve survival. There are several steps are involved in metastasis. First, cancers can secrete some secrete proteases, which degrades basement membrane, extracellular matrix and promotes cancer migration. In this research, we determined whether herb extract from *Houttuynia Cordata* can inhibit prostate cancer cells and pancreatic cancer cells invasion and further investigate whether proteases are involved in. Moreover, the serine proteases and matrix metalloproteases would be tested in this research. According to our results, *Houttuynia Cordata* extract can inhabit the invasive ability in these two kinds of cancer cells, we also determined lower the activity of Matrix metalloproteinase under *Houttuynia Cordata* treatment, but there is no significant effect on urokinase plasminogen activator. For the further purpose, we will investigate the mechanism that how the *Houttuynia cordata* extract block cancer invasion and develop the extract to be a candidate as the therapeutic compound.

壹、 前言

一、研究動機

近年來，癌症是十大死因之首，癌症初期雖痊癒率很高，但癌症一旦開始轉移，發展成癌症晚期後，就難以全部消除，目前治療癌症的主要方法為化療，化療不但無法完全治癒癌症，且會造成極大的副作用，而天然植物萃取物一般具有低毒性且被使用於保健及草藥應用已有一段很長的時間，因此從天然植物萃取物找出有效成分作為治療癌症的輔助療法或者替代療法是一種相當可行的方式[註一、註二、註三、註十八、註十九]，故我們打算用溫和的草藥來取代有副作用的化療。

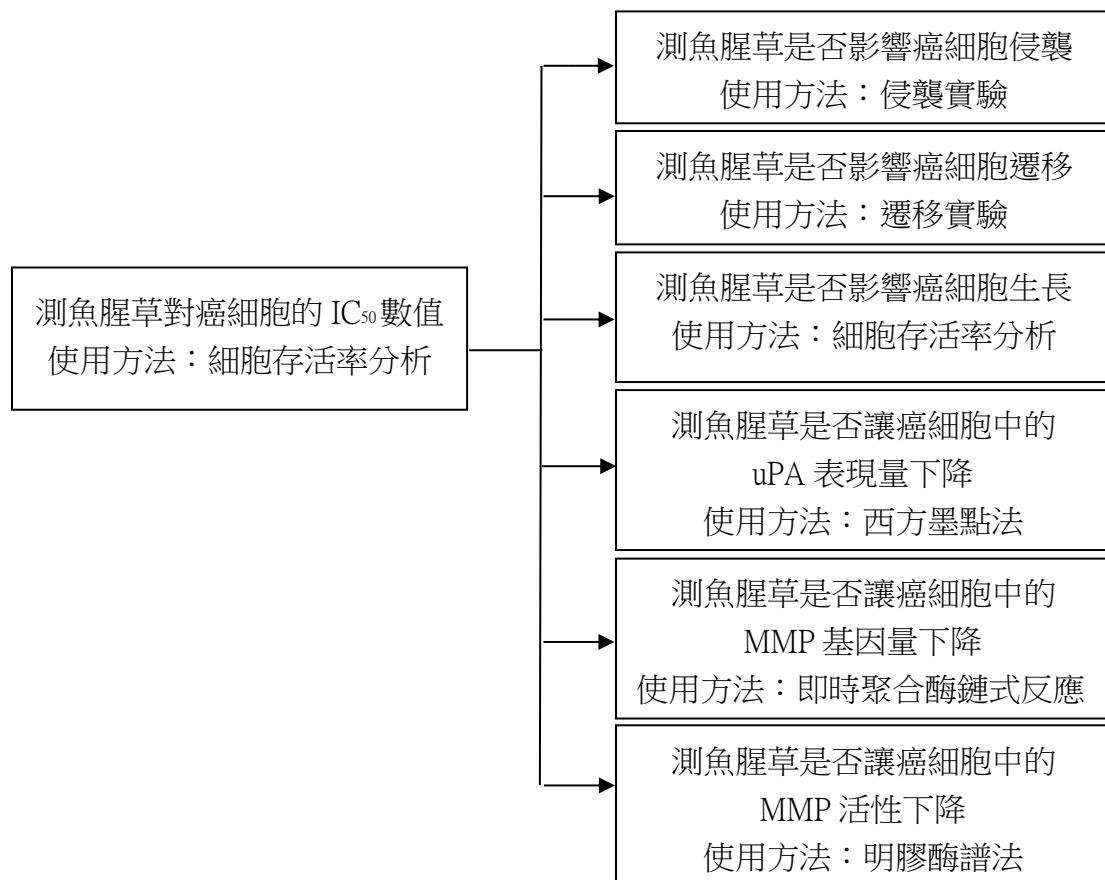
根據文獻指出魚腥草對肺癌及肛門癌已確定有抑制的效果[註三]，故本研究將針對攝護腺癌及胰臟癌進行探討，這兩種癌症一直都是前十大致命癌症種類。癌症致死的原因大部份是由癌細胞轉移所造成的，而癌細胞在開始轉移時，圍繞在癌細胞外的基質(Extra-cellular Matrix; 以下簡稱 ECM)的結構會被重組，使癌細胞得以透過基底膜，入侵至體內循環系統。其中尿激酶型纖維溶酶原激活劑(urokinase plasminogen activator ;以下簡稱 uPA)就是影響 ECM 重組中重要的分子之一，uPA 是一種絲氨酸蛋白酶，此蛋白酶可以引發其他 ECM 分解酵素的活化；當與本身的受體作用時，也會引起許多生物上功能，包含細胞的移動、血管新生、細胞的分化以及傷口的癒合[註八]。另外，基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinase;以下簡稱 MMP)也是造成癌症轉移的另外一種蛋白酶，癌細胞要分泌此蛋白酶來轉移，一旦蛋白酶的活性下降，即代表細胞轉移能力降低[註八]。在本篇研究中，我們將針對魚腥草萃取物(以下簡稱 HCE)對癌細胞的侵襲能力、遷移能力及生長能力進行實驗，並且檢測 uPA 蛋白酶的表現量及 MMP 蛋白酶的基因量和活性是否會下降，研究魚腥草是否能成為將來治療攝護腺癌及胰臟癌的藥物。

二、 研究目的

- (一)研究 HCE 是否會殺死癌細胞並測得 HCE 對癌細胞的 IC_{50} (草藥使 50%的癌細胞死亡時的濃度)
- (二)研究 HCE 是否能抑制癌細胞的侵襲能力
- (三)研究 HCE 是否能抑制癌細胞的遷移能力
- (四)測試 HCE 是否會使癌細胞停止生長
- (五)測試 HCE 是否能使癌細胞中的 uPA 表現量下降
- (六)測試 HCE 是否能使癌細胞中 MMP 基因量降低
- (七)測試 HCE 是否能使癌細胞中 MMP 活性降低

貳、 研究過程及方法

一、研究過程



二、研究設備

(一)、硬體設備

編號	名稱	型號及規格
1	離心機	Sigma 2K15
2	分光光度計	Thermo NanoDrop2000
3	二氧化碳培養箱	Sanyo MCO-18AIC
4	細胞計數器	Luna
5	搖擺震盪器	TKS OS701
6	顯微鏡	Nikon

(二)、軟體設備

1. Graph Pad Prism5
2. Gene5

三、研究器材

(一)癌細胞

1. 攝護腺癌細胞：PC-3
2. 胰臟癌細胞：PANC-1

(二)魚腥草萃取物

魚腥草經真空濃縮,弄碎至大約一公分,每一公斤的魚腥草碎片用 20 公升的酒精浸泡一星期,混和物用濾紙過濾後,用蒸發濃縮機設定為在四十度下濃縮,經過濃縮後大約有八十克的魚腥草萃取物殘留下。

(三)實驗用品

編號	名稱	型號及規格
1	細胞培養盤	6 孔、96-孔
2	離心管	15mL
3	微量吸管	P2、P20、P200、P1000
4	微量吸管尖	2 ug、20 ug、200 ug、1000 ug
5	微量離心管(Eppendorf)	1.5mL

(四)實驗藥品

編號	名稱	用途
1	二甲基亞砷(DMSO)	極性非質子溶劑
2	胰蛋白酶(Trypsin)	分解細胞與瓶壁之附著蛋白
3	培養基(Medium)	提供細胞生長所需營養成分的培養基
4	Serum Free medium(簡稱：SF- medium)	缺乏細胞生長所需營養成分的培養基
5	DEPC-ddH ₂ O	滅菌
6	MTT	黃色染劑
7	磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)	緩衝液
8	結晶紫	細胞存活率分析的染劑
9	TBST	西方墨點法的緩衝液
10	牛血清白蛋白(BSA)	西方墨點法所用的基準
11	裂解緩衝液(RIPA buffer)	萃取蛋白質的試劑
12	脫脂奶粉	防止一級抗體結合到膜上
13	β -巰基乙醇(β -mercaptoethanol)	可降低氧對細胞產生的氧化損傷的還原劑
14	苯甲基磺醯氟(PMSF)	用於製備細胞裂解液
15	曲拉通 X-100(Triton X-100)	表面活性劑

四、研究方法

(一)細胞存活率分析

1.目的：在不同 HCE 濃度環境下，偵測細胞的存活率

2.原理：

利用活細胞的呼吸作用，生成紫色的甲臞(formazan)，並利用測吸光度得知細胞還原 MTT 的能力(甲臞的形成量)，此吸光度代表了粒線體的活性，即活細胞數目，並找出 IC₅₀。

3.方法：

首先每個細胞培養皿種入 10000 個細胞，放置一天後分別加入 0%,0.1%,1%,10%,20%,50%,75%,100%濃度的 HCE，最後加入 MTT，放置三十分鐘後測吸光值。

(二)侵襲實驗

1.目的：研究 HCE 是否能抑制癌細胞的侵襲能力

2.原理：

由侵襲實驗了解 HCE 濃度是否能改變癌細胞爬行數量。將先在上層 chamber 加入基底膜基質作為一種類似細胞間質層，仿效癌細胞在人體中爬行經歷的間隔。

3.方法：

於上層細胞室加入基底膜基質，放置一天，再分別加入 0%, 1%, 10%, 20%, 30% 濃度的 HCE 及細胞，再放置一天，用結晶紫染色，並拍照。

(三)遷移實驗

1.目的：研究 HCE 是否能抑制癌細胞的遷移能力

2.原理：

在培養盤上盤加入細胞及缺乏細胞生長所需營養成分的培養液，而在下盤加入有營養成分的培養液，使細胞為了取得營養成分，往下盤遷移，最終看下盤細胞數量即可知道細胞的遷移能力。

3.方法：

於各細胞培養盤中種下細胞，接著分別加入 0%, 1%, 10%, 20%, 30%濃度的 HCE，放置一天後，再用結晶紫染色，並拍照。

(四)生長實驗

1.目的：

我們推測 HCE 不會造成癌細胞過度繁殖或降低繁殖效率而影響到他的移轉情形，

預計將長期使用細胞存活率分析看 HCE 對癌細胞的生長影響。

2.原理：

利用活細胞的呼吸作用，生成紫色的甲臍(formazan)，並利用測吸光度得知細胞還原 MTT 的能力(甲臍的形成量)，此吸光度代表了粒線體的活性，亦代表活細胞數目。

3.方法：

於每個培養皿中種 10000 個細胞，接著分別加入 1%, 5%, 10%濃度的 HCE，之後每兩天換一次藥，並於該天那盤加入 MTT，測吸光值。

(五)西方墨點法

1.目的：

我們推測 HCE 可以降低癌細胞中 uPA 蛋白酶的表現量，以降低細胞轉移至其他組織的能力。

2.原理：

透過西方墨點法利用特定抗體的專一結合其抗原蛋白來對 uPA 進行著色，在透過分析著色位置和著色深度得到 uPA 在癌細胞中的表現情況。

3.方法：

先在普通培養基內種細胞〔4種濃度 x3 盤 x 4×10^5 cells/1500 μ L= 4.8×10^6 cells/18000 μ L= 5.33×10^6 cells/20mL(50mL 離心管)〕，放置一天後細胞盤中加入 HCE 及 SF medium〔藥的濃度：0,10,20,30(mg/mL)〕，再放置一天收 Condition Media，取下細胞盤內細胞及培養液，離心 3 分鐘後取上清液，接著 10 倍濃縮。再來是收 Cell Lysate，首先用 PBS 清洗細胞加入 100 λ RIPA 打破細胞，離心後取上清液，並做標準曲線〔6種濃度 500%,375%,250%,125%,62.5%,0%(BSA+H₂O)〕，並把樣品和對照組(RIPA buffer)都稀釋 20 倍，加入 200 μ L 於 96 孔細胞培養盤後測吸光值後分析數據，以調整 sample 和 condition media 的比例。接著製備膠體〔成分：10%separating gel,30%acrylamid(sigma,A3574-100ml)ddH₂O,1.5M

Tris-HCl, Ph8.8(AMERESCO, J831), 10% SDS, 10% APS(Research Organics, 8530A-1), TEMED(AMRESCO, 0761), 5% stacking gel(30% acrylamide, ddH₂O, 0.5M Tris-HCl, ph6.8(AMRESCO, J832))], 製備完成後跑膠, 跑完膠進行轉漬 [轉漬的條件: 30v 14~16hr ; 300v 3hr(電極須先以 ddH₂O 潤洗)], 後加入 Ponceau S 染劑, 看 band 是否轉印到 membrane 上(染上馬上用 TBST 洗掉)。接著開始阻攔(Blocking) [配 5% 脫脂牛奶 (50mL+2.5g 奶粉), 加入可淹過 membrane 的量(約 25mL)搖晃約 1 小時]。加入 1 抗(uPA:milk=1:200), 先倒掉脫脂牛奶, 用 PBST 清洗, 並將 membrane 先裁切需要部份, 再加入約 2000 λ milk+10 λ uPA, 室溫搖晃約 1 小時。加入 2 抗, 先將 membrane 取出, TBST 沖洗一次後搖晃 10 分鐘, 再以 TBST 沖洗三次, 配 40 mL TBST+ 2g 脫脂奶粉倒入盒子內, 2 抗 1:1w(4 λ 抗體直接加到盒內), 搖晃一小時, 再沖洗三次後照相。在進行 Stripping(壓 β -actin): 50mL 離心管加 50mL 一抗二抗去除液, 放入 55 度水浴槽, 待溫度達到 55 度, 加入 400 λ β -ME, 再放回水浴槽約 5 分鐘, 拿出後一抗二抗去除液+ β -巰基乙醇加入盒內, 蓋上蓋子, 放 55 度浸泡搖 10 分鐘 3 次, 以 TBST 沖洗 5 次 10 分鐘以上, 並 Blocking 1 小時。接著壓 β -actin, 首先用 TBST 潤洗 [β -actin:milk=1:20000(1.25 λ A8+25mL)], 搖晃一小時再 β -actin 的 2 抗, 稀釋 2:10000(2 λ +10mL milk), 再搖晃一小時後清洗三次, 最後進行拍照。

(六) 即時聚合酶鏈式反應

1.目的: 利用 PCR 來大量複製製造 MMP 的 mRNA 片段

2.原理:

藉由 PCR 擴增原理將 DNA 放大的同時並達到定量之結果, 並做成反應曲線圖

3.方法:

將細胞取下, 使用 DEPC-PBS 清洗後, 加入 1mL 的 TRIZOL 後, 再加入 200 λ chbroform, 混成雲霧狀後拿去離心。取離心後上清液 300 λ , 並加入等量 isopropanol, 混勻放置冰上 10 分鐘後, 再去離心。離心完會看到沉澱物, 接著吸乾上清液, 加入 DEPC EtOH 1ml 確保沉澱物被沖起。再去離心 5 分鐘後, 吸乾 DEPC, 並等沉澱物

風乾變透明。風乾後，加入 DEPC-H₂O 回溶，放置冰上 10 分鐘後取 2 λ 的 RNA 樣本測濃度。再來即轉 cDNA，我們將所需樣本濃度計算好後，取 10 λ ，加入停止液 1 λ ，放入 PCR 機器 70°C 10 分鐘。接著混和 Reaction Mix 4 λ 、Maxima Enzyme 2 λ 、Template RNA 11 λ 、ddH₂O 3 λ ，共 20 λ 。再拿去 PCR 機放大後，稀釋樣本，並混和樣本 5 λ 、Master Mix 10 λ 、forward primer 0.5 λ 、reverse primer 0.5 λ ，ddH₂O 4 λ ，共 15 λ 後加入 eppendorf，放入 qPCR 儀。待跑完後，使用螢光標示即可拍照。

(七)明膠酶譜法

1.目的：測 MMP 之活性

2.原理：

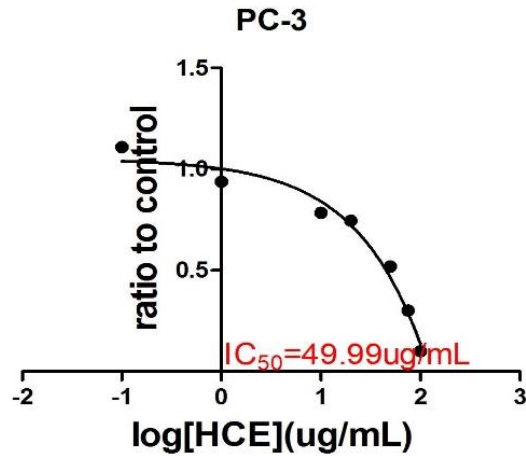
在電泳過程中，SDS 與樣品中的 MMPs 結合而破壞其氫鍵、疏水鍵而使 MMPs 不能發揮其分解明膠的作用。不過當將膠置 Triton 中洗脫時，由 SDS 與 Triton 結合而去除，從而使 MMPs 恢復了活性。

3.方法：

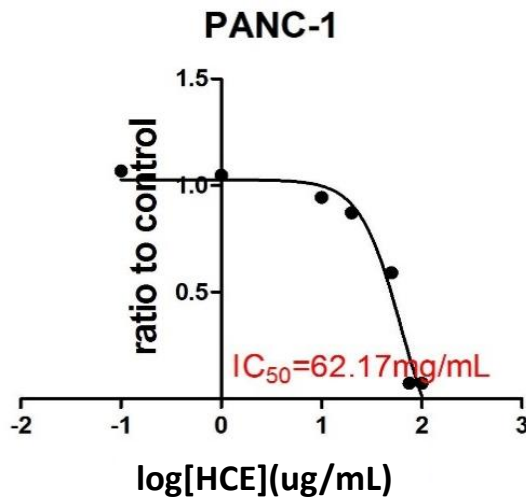
先收細胞液先離掉細胞(600~1000g,10 分鐘)可用常溫的離心機 0.5x g 10 分鐘，取上清液至新離心管，加入沒有 β -ME 的 sample medium 混勻後放入膠中，配膠(用薄的底板和樣本梳後壓克力板→3 片薄膠)先將明膠拿出,加熱使溶解，而後放常溫。膠體製備〔內含 0.1%明膠(Sigma,G3144-100G)的 10% separating gel〕。接著進行電泳：取 5mL 蛋白質加入樣品緩衝液〔4xsample buffer, 1 Tris-HCL pH6.8, 40%SDS, 0.5%Bromophenol blue, 20%Glycerol〕放五分鐘活化，再放 4 度跑膠，15mA/片,三小時。接著複性(Renaturation)，首先回溫至 37 度，加入 2.5%Triton X-100 搖 10 分鐘三次，再加入 100 μ L 反應緩衝液(0.05M Tris-HCL,Ph8.8,5mM CaCl₂,0.02%NaCl)。恆溫 16 小時後進行呈色，以 ddH₂O 清洗 1~2 次，並將柯瑪西亮藍淹過膠,搖晃 15 分鐘，致看不到 marker, ddH₂O destain buffer 淹過膠，染色 3 小時，再以退染劑退染，再用水清洗並浸泡，以可見光顯影。

參、 研究結果與討論

一、 毒性測試結果



《圖一》攝護腺癌之毒性測試曲線
(x 軸為藥物濃度,y 軸為各濃度吸光值與濃度為 0 的數值比值)

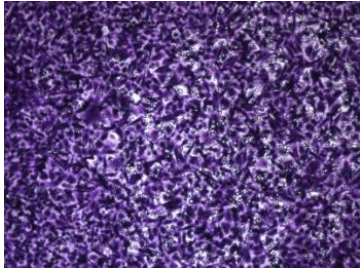
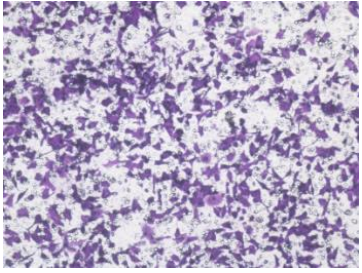
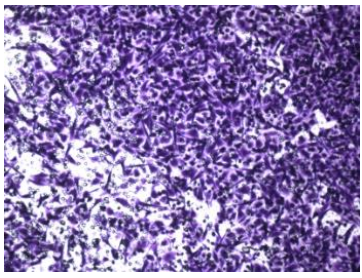
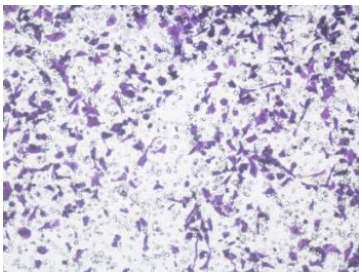
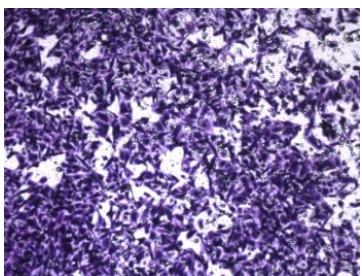
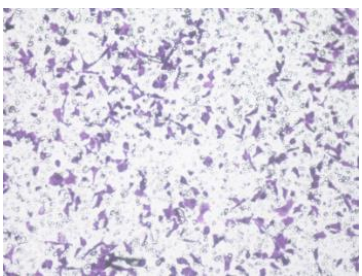
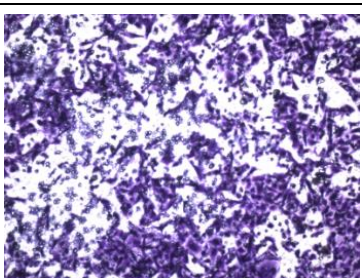
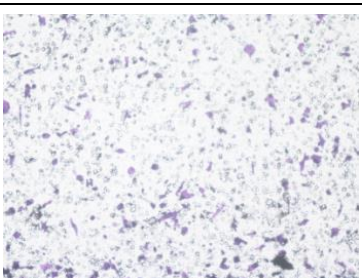


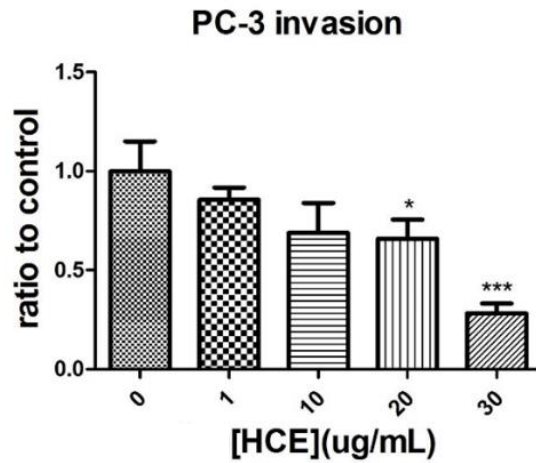
《圖二》胰臟癌之毒性測試曲線
(x 軸為藥物濃度,y 軸為各濃度吸光值與濃度為 0 的數值比值)
(註： IC_{50} 單位應為 $\mu\text{g/mL}$ ，圖中為誤記)

我們先測 HCE 對兩種癌細胞的 IC_{50} 數值，目的是測試 HCE 在何種濃度下，不會使過多細胞死亡，要讓細胞在加入 HCE 後，細胞存活數量至少可以有當初種下細胞數量的一半以上，才不會沒有細胞進行實驗，根據《圖一》及《圖二》的結果顯示在 HCE 濃度分別為 $49.99\mu\text{g/mL}$ 及 $62.17\mu\text{g/mL}$ 時，會使培養盤中一半數量的細胞死亡，因此未來實驗將分別以濃度 $49.99\mu\text{g/mL}$ 及 $62.17\mu\text{g/mL}$ 為基準，選擇小於此兩個數值的 HCE 濃度進行研究。

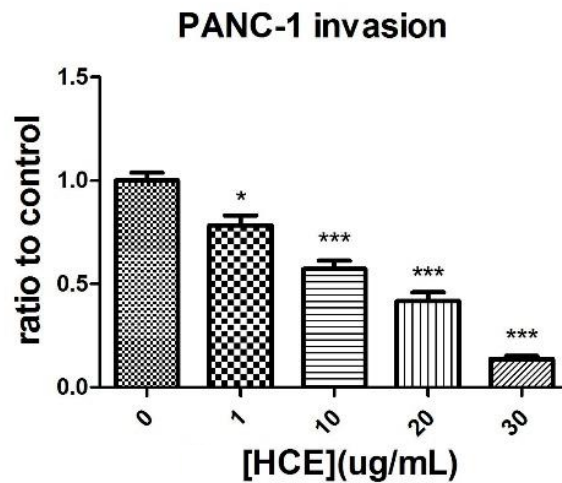
二、侵襲實驗結果

《表一》各種藥物濃度對癌細胞的侵襲實驗結果圖

種類 濃度	攝護腺癌	胰臟癌
0%		
10%		
20%		
30%		



《圖三》攝護腺癌之侵襲實驗長條圖表
(x 軸為藥物濃度,y 軸為各濃度染色面積與濃度為 0 的數值比值)

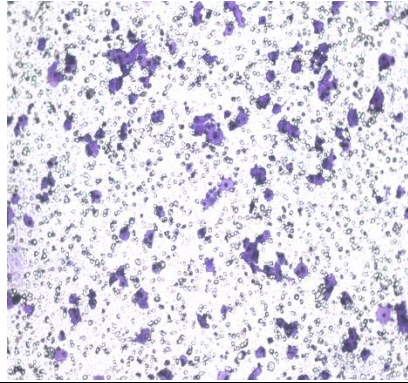
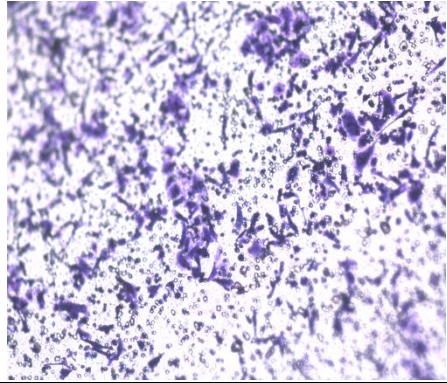
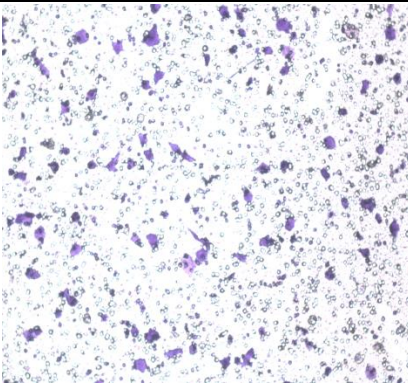
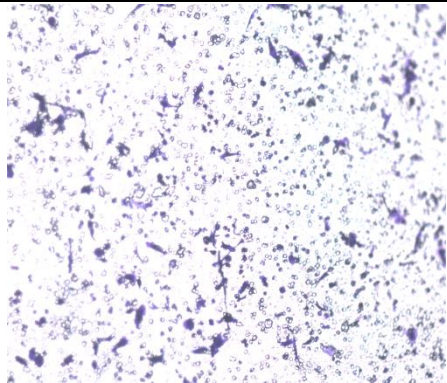
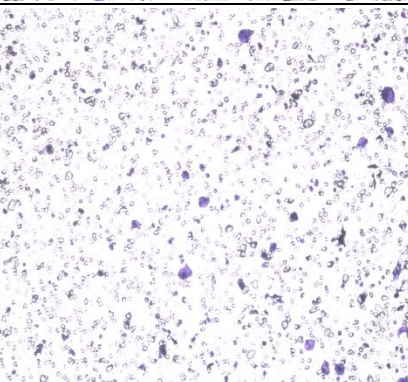
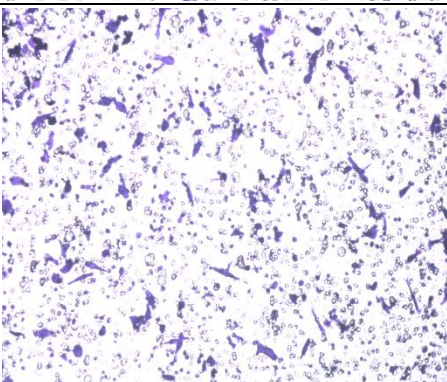
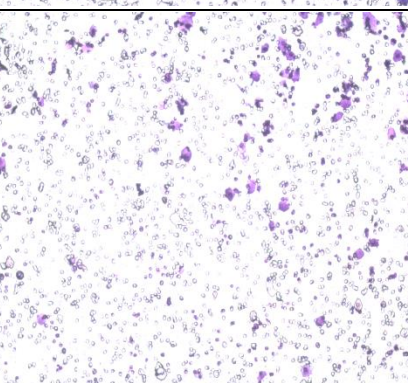
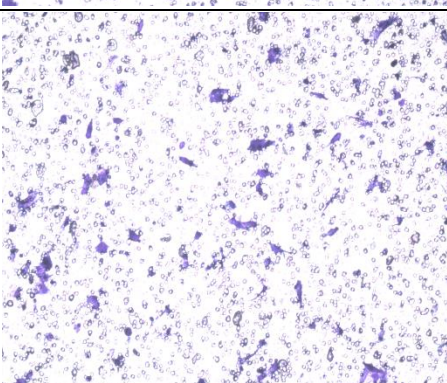


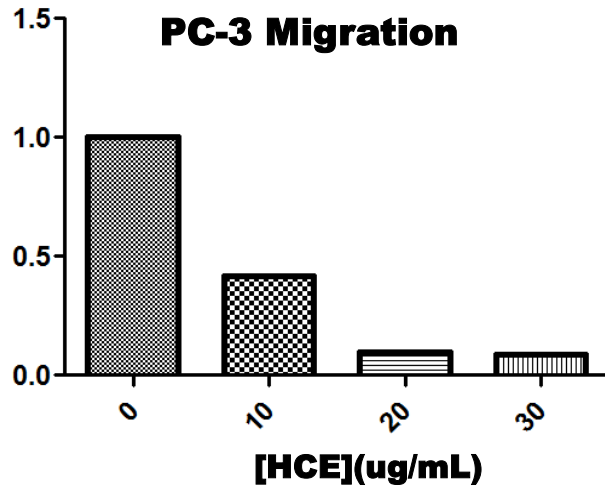
《圖四》胰臟癌之侵襲實驗長條圖表
(x 軸為藥物濃度,y 軸為各濃度染色面積與濃度為 0 的數值比值)

從《表一》中各張透過顯微鏡拍照的細胞染色圖，可發現隨著加入 HCE 濃度越高，穿過模擬間質至下層細胞盤被染色的細胞數量逐漸減少。透過 Graph Pad Prism5 軟體，將各濃度的拍攝圖與濃度為 0 的圖片進行染色面積比較而製成長條圖表，分別為《圖三》及《圖四》。由《圖三》可以明顯看出攝護腺癌細胞的細胞面積比值隨著 HCE 濃度加大而降低；而《圖四》也顯示出相同結果，因此我們認為魚腥草確實可以抑制癌細胞的侵襲能力。

三、遷移實驗結果

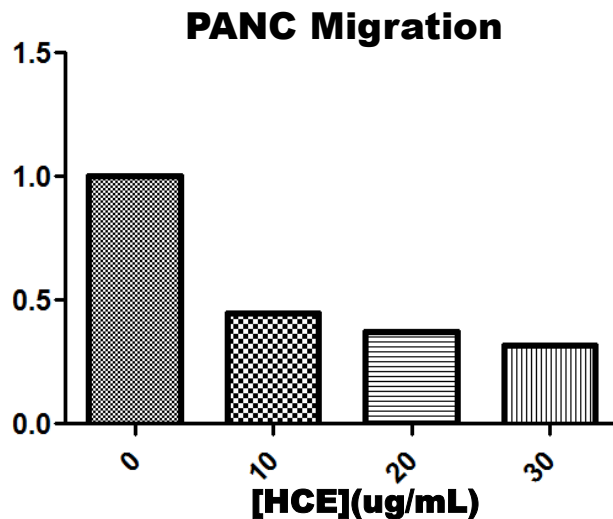
《表二》各種藥物濃度對癌細胞的遷移實驗結果圖

種類 濃度	攝護腺癌	胰臟癌
0%		
10%		
20%		
30%		



《圖五》攝護腺癌之遷移結果長條圖

(x 軸為藥物濃度,y 軸為各濃度爬行面積與濃度為 0 的數值比值)

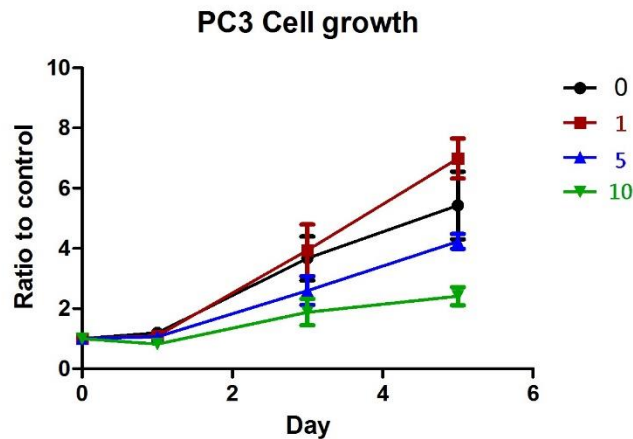


《圖六》胰臟癌之遷移結果長條圖

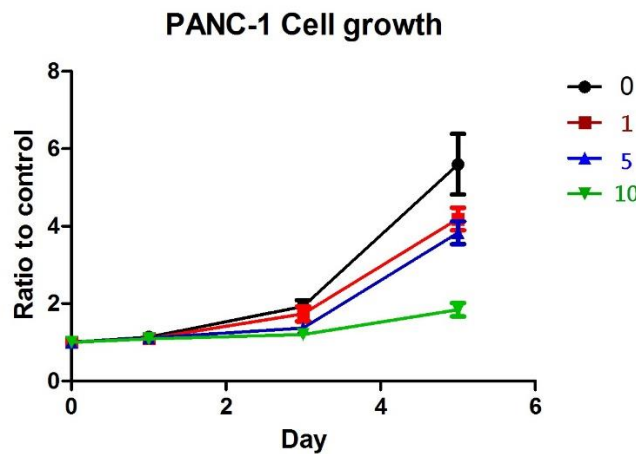
(x 軸為藥物濃度,y 軸為各濃度爬行面積與濃度為 0 的數值比值)

從《表二》中各張透過顯微鏡拍照的細胞染色圖，可發現隨著加入 HCE 濃度越高，穿過至下層細胞盤被染色的細胞數量逐漸減少。透過 Graph Pad Prism5 軟體，將各濃度的拍攝圖與濃度為 0 的圖片進行染色面積比較而製成長條圖表，分別為《圖五》及《圖六》。從《圖五》及《圖六》可以明顯看出攝護腺癌細胞及胰臟癌細胞在加入 HCE 後的下盤細胞培養盤中細胞面積比值隨著 HCE 濃度加大而降低，因此我們認為魚腥草確實可以抑制癌細胞的遷移能力。

四、生長實驗結果



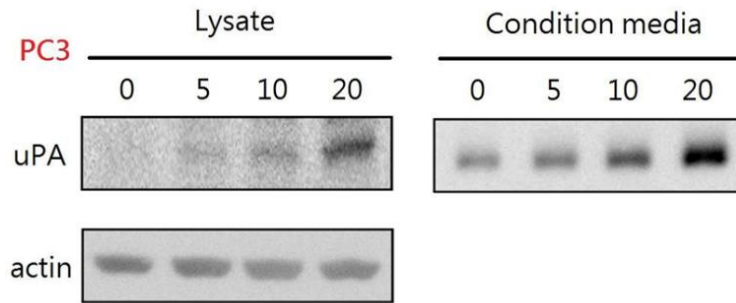
《圖七》攝護腺癌之生長實驗曲線
(x 軸為天數,y 軸為各濃度吸光值與濃度為 0 的數值比值)



《圖八》胰臟癌之生長實驗曲線
(x 軸為天數,y 軸為各濃度吸光值與濃度為 0 的數值比值)

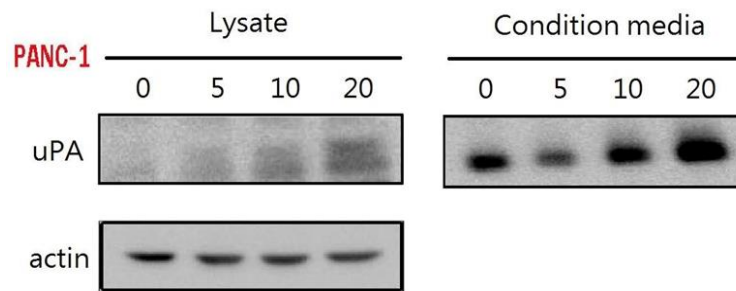
在《圖七》中，加入 HCE 濃度為 $0 \mu\text{g/mL}$ 的癌細胞應該要與其餘加入 1 、 5 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 濃度 HCE 的癌細胞存活比率相差不多或是較高，但到第三天時，加入 $0 \mu\text{g/mL}$ HCE 的攝護腺癌細胞存活量卻比 $1 \mu\text{g/mL}$ 濃度少，第五天亦為如此，經過檢討，我們推測應該是在種那兩天細胞盤時，沒有加入相同數目的細胞，導致數據上有如此差異。另外，我們發現在加入 HCE 濃度 0 至 $5 \mu\text{g/mL}$ 的癌細胞存活比率無相差太多，直到加入 $10 \mu\text{g/mL}$ HCE 以上才有顯著差異，所以我們推測加入濃度大於 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 HCE 效果更好。根據《圖八》我們得知胰臟癌細胞在加入各種濃度的 HCE 後，各盤細胞皆不會因為加入 HCE 而停止生長，因此我們認為兩種癌細胞的侵襲能力及遷移能力會隨著藥物濃度增加而減少不是直接使細胞死亡，而是真的能使侵襲能力及遷移能力下降。

五、uPA 蛋白酶表現量結果



《圖九》攝護腺癌中 uPA 蛋白酶表現量拍攝影像

(註：lysate 為細胞中的蛋白酶表現量，Condition media 為細胞於培養基中釋出的蛋白酶量，actin 為細胞中經常表現的蛋白質作為對照，數值單位為 $\mu\text{g/mL}$)

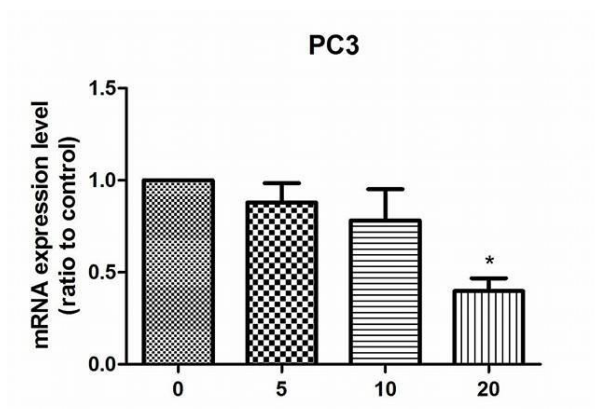


《圖十》胰臟腺癌中 uPA 蛋白酶表現量拍攝影像

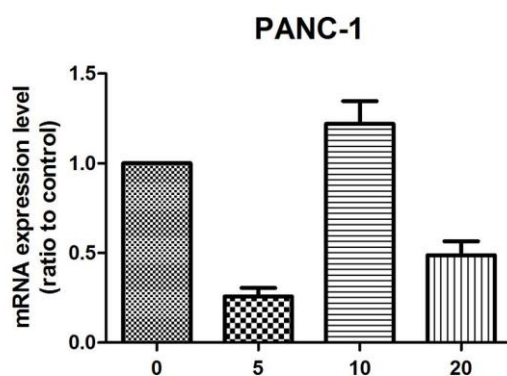
(註：lysate 為細胞中的蛋白酶表現量，Condition media 為細胞於培養基中釋出的蛋白酶量，actin 為細胞中經常表現的蛋白質作為對照，數值單位為 $\mu\text{g/mL}$)

根據《圖九》和《圖十》顯示加入 HCE 的濃度越高，uPA 的蛋白量表現不是如預期的下降，反而是上升，表示 HCE 並不是藉由抑制 uPA 來抑制癌細胞的侵襲能力。不論是細胞中的蛋白酶量或是細胞釋出於培養基的蛋白酶量都有這樣的結果，也就是說 HCE 可能抑制的是其他蛋白酶。另外，當細胞中的蛋白酶量上升但是細胞釋出於培養基的蛋白酶量下降，表示釋放出的量是變少的，這種情形在藥物對癌細胞的影響是比較好的，但是我們的結果是兩者都上升，表示 HCE 並沒有抑制 uPA 的生成和釋放，反之，uPA 表現量有隨著 HCE 濃度上升而上升的趨勢。

六、MMP 基因量表現結果



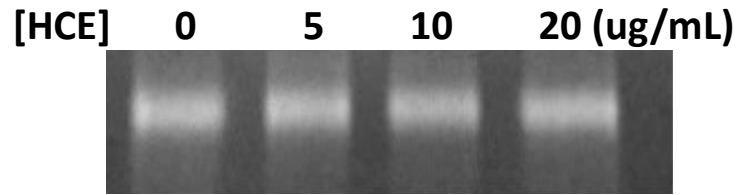
《圖十一》攝護腺癌 MMP 的 RNA 表現量圖
(數值單位為 $\mu\text{g/mL}$)



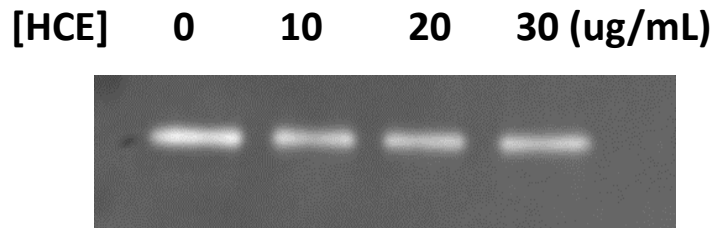
《圖十二》胰臟癌 MMP 的 RNA 表現量圖
(數值單位為 $\mu\text{g/mL}$)

從《圖十一》和《圖十二》中，可以看出 HCE 可降低攝護腺癌 MMP 的 mRNA 表現量，但不能逐步降低胰臟癌 MMP 的 mRNA 表現量，反而在 10 $\mu\text{g/mL}$ 時上升，推測為 HCE 無法降低胰臟癌 MMP 的 RNA 表現量。

七、MMP 蛋白酶活性表現結果



《圖十三》攝護腺癌中 MMP 活性拍攝影像



《圖十四》胰臟癌中 MMP 活性拍攝影像

從《圖十三》和《圖十四》中，可以看出在胰臟癌細胞中的 MMP 活性，隨著加入的 HCE 濃度上升而跟著顏色轉淡，但卻不會降低攝護腺癌的 MMP 活性。這說明當 HCE 濃度增加，能使胰臟癌細胞中的 MMP 活性下降，而 MMP 活性下降代表細胞降解 ECM 而轉移至其他組織的能力降低，並能有效抑制胰臟癌細胞，因此我們推論 HCE 抑制胰臟癌細胞轉移的途徑可能是藉由降低 MMP 活性，而抑制攝護腺癌細胞轉移的途徑可能不是藉由降低 MMP 活性。

肆、 結論

一、HCE 對攝護腺癌細胞及胰臟癌細胞的 IC₅₀ 數值分別為 49.99 μ g/mL 及 62.17 μ g/mL

二、HCE 會有效的抑制攝護腺癌細胞及胰臟癌細胞的侵襲能力

三、HCE 會有效的抑制攝護腺癌細胞及胰臟癌細胞的遷移能力

四、攝護腺癌細胞及胰臟癌細胞的生長情形隨著 HCE 濃度的增加，生長速度也越來越慢，但加入 HCE 並不會導致癌細胞不生長

五、HCE 降低兩種細胞轉移能力不是透過抑制 uPA

六、HCE 降低攝護腺癌轉移能力可能是可以降低 MMP 基因量，卻不能降低 MMP 活性

七、HCE 降低胰臟癌轉移能力不是透過降低 MMP 基因量而抑制 MMP 活性

經由上述結論可知魚腥草能透過降低基質金屬蛋白酶的基因量，進而抑制攝護腺癌細胞的侵襲能力、遷移能力、生長速度，卻不能抑制蛋白酶活性；魚腥草不會影響胰臟癌中的基質金屬蛋白酶基因量及尿激酶型纖維溶酶原激活劑表現量，但依然能抑制胰臟癌細胞 MMP 活性、侵襲能力、遷移能力、生長速度。故魚腥草具有發展為治療攝護腺癌及胰臟癌的潛力。

伍、 參考資料及其他

一、書籍資料

註一：王海龍、吳佳貞、洪志宏(2014/6)。相思樹胰蛋白酶抑制劑抑制大腸直腸癌細胞侵入轉移能力。**健康管理學刊**，12(1)，49-60。

註二：吳聲華 (2012/1)。桑黃 -- 古老的治癌新藥。**科學人**，118，118。

註三：臺灣中草藥研究中心(2014)。**驚人的魚腥草妙用療效**。新北市：和平國際。

註四：尚潤澤、戴斌、王德盛(2014/3)。uPA/uPAR 系統在腫瘤中作用的研究進展。**世界華人消化雜誌**，22(9)，1235-1240

註五：葉華谷主編 (2016/1)。**中國藥用植物七十**。北京市：化學工業出版社。

註六：周德生、王洪海(2015/10)。**中醫膏方臨床應用指南**。山西省：山西科學技術出版社。

二、網路資料

- 註七：Yuh-Fung Chen et al.(2013, March 19) Houlttuynia cordata Thunb extract modulates G0/G1 arrest and Fas/CD95-mediated death receptor apoptotic cell death in human lung cancer A549 cells [Electronic version]。 *Journal of Biomedical Science*。 取自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610241/>
- 註八：林素如(2007/07)。 **相思仔胰蛋白抑制劑抑制肺癌細胞侵襲和轉移之研究**。 中山醫學大學生化暨生物科技研究所：碩士論文。 取自 <http://handle.ncl.edu.tw/11296/ndltid/04224352992421382454>
- 註九：行政院農業委員會保健植物館。 取自 <https://kmweb.coa.gov.tw/subject/ct.asp?xItem=104648&ctNode=2861&mp=169&kpi=0&hashid=>
- 註十：詹雅筑(2007)。 **中草藥抑制乳癌細胞侵入能力及誘導細胞凋亡之機制探討** 中山醫學大學生化暨生物科技研究所：碩士論文。 取自 <http://handle.ncl.edu.tw/11296/ndltid/15180124491778436037>
- 註十一：余佳純(2009)。 **天然物-台灣大戟抗光老化活性成分之研究** 臺北醫學大學生藥學研究所：碩士論文。 取自 <http://handle.ncl.edu.tw/11296/ndltid/40351640951840901943>
- 註十二：蕭培文(2012)。 **抗癌草藥研究：關鍵就是如何更有效解決問題**。 中央研究院週報，第 1384 期。 2012/8/16， 取自 <http://newsletter.sinica.edu.tw/file/file/72/7248.pdf>
- 註十三：攝護腺癌治療準則。 取自 <http://homepage.vghtpe.gov.tw/~hemaonco/patientguide/prostate.htm>
- 註十四：男性老年人的隱形殺手~談攝護腺癌。 2013。 取自 <http://www.kmuh.org.tw/www/kmcj/data/9208/13.htm>
- 註十五：認識胰臟癌。 取自 <http://www.kmuh.org.tw/www/kmcj/data/9901/14.htm>
- 註十六：楊鴻旗(2014)。 **紫柳花素在癌症轉移中的抑制效果**。 慈濟大學藥理暨毒理學

所：碩士論文。取自

<http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/g32/gswweb.cgi?o=dnclcdr&s=id=%22102TCU00229006%22.&searchmode=basic&extralimit=asc=%22%E6%85%88%E6%BF%9F%E5%A4%A7%E5%AD%B8%22&extralimitunit=%E6%85%88%E6%BF%9F%E5%A4%A7%E5%AD%B8>

註十七：趙 蕤(2011)。Inotilone 在體內和體外抗癌症細胞轉移的效果及機制探討。

中國醫藥大學中國藥學暨中藥資源學系所：碩士論文。取自

<http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/g32/gswweb.cgi/login?o=dnclcdr&s=id=%22099CMCH5049004%22.&searchmode=basic>

註十八：維基百科。中藥。取自 <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E4%B8%AD%E8%8D%AF>

註十九：亞太中醫藥網。中藥。取自

<http://www.apbcm.com/apbcm/medinfo.nsf/ByUNID/614833D0698DB19D48256B650027ACA1?opendocument>

註二十：維基百科。癌症。取自

<https://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%99%8C%E7%97%87>

註二十一：亞東紀念醫院癌症防治中心。化療。取自

http://depart.femh.org.tw/indge/l2_14.aspx

註二十二：維基百科。MMP-2。取自

<https://en.wikipedia.org/wiki/MMP2>

【評語】 090012

本研究探討魚腥草對於攝護腺癌與胰臟癌細胞的影響。作者培養兩種癌細胞，觀察魚腥草萃取液對於細胞生長與爬行的影響，並探測是否這對影響 uPA 與 MMP 蛋白的表現。他們發現 uPA 不受影響，而 MMP 可能受影響。他們用了不同技術，西方墨點與活性檢測。成果相當好。後續也有許多事情需要繼續確定與探討。