

2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090015
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	味噌萃取物 Soyasaponin I 抑制肺癌細胞 轉移並且減少細胞激素分泌及抑制惡體質 進展
得獎獎項	大會獎：四等獎

就讀學校 國立臺南女子高級中學

指導教師 謝嘉興

作者姓名 謝宜岑、林冠含

關鍵詞 Soyasaponin I、肺癌、細胞自噬

作者簡介



我是來自台南女子高級中學的謝宜岑（左），高中因緣際會下與我的小夥伴共同完成了此實驗，一路上有許多挫折及摩擦，但我們總是相互鼓勵、互相幫助，而我也從中學到許多課本外的知識，更探索了很多未知的領域。

我是來自台南女子高級中學的林冠含（右），高中意外有機會接觸到不同於以往認知的生物領域，儘管過程中有許多困難，但我們總會彼此扶持、一起努力，最後終於完成了我們的實驗，而我也在這之中成長了許多。

摘要

研究指出 Soyasaponin I 是味噌中的一種成分，其效果可以抗發炎，因此，本實驗想使用 Soyasaponin I 探討其是否能應用於**肺癌治療**，及其對**肺癌**的轉移及癌症引起惡體質影響。

方式:使用肺癌細胞 A549 和 H1299 及正常的肺細胞 HEL299 進行 WST-8 試驗，測試 Soyasaponin I 對三種細胞的存活率影響，用螢光試驗及免疫染色確認死亡方式，用 Western blot 及免疫螢光染色測試 Soyasaponin I 對 p-NF- κ B 入核的效果，進行 boyden chamber 模型測試 Soyasaponin I 對於 A549 和 H1299 的侵犯速度的作用，並使用 ELISA 測出癌症引起惡體質的細胞分泌的 IL-6 細胞激素濃度。為了研究 Soyasaponin I 對於 cachexia (惡體質)的影響，我們以人類脂肪組織利用原始培養出脂肪細胞，加入 Soyasaponin I 於脂肪細胞，以免疫染色研究。

成果:在細胞存活實驗發現高濃度 Soyasaponin I 的濃度以細胞自噬引發癌細胞死亡，且不傷害正常肺部細胞，另外低濃度的 Soyasaponin I 則使兩種肺癌細胞的突觸皆縮短及細胞變圓形;用 Western blotting 證明 Soyasaponin I 治療後 mesenchymal 的標記 (N-cadherin)明顯減少，而 epithelial 的標記 (E-cadherin)明顯增加，接著在 boyden chamber 模型發現 Soyasaponin I 會引發肺癌細胞發生間質-上皮細胞轉型，轉換成爬行較慢的上皮細胞型細胞; Soyasaponin I 減少肺癌細胞 IL-6 的分泌，抑制發炎。用免疫組織染色證明 Soyasaponin I 治療後，原始培養脂肪細胞的惡體質標記 (UCP-1)明顯減少，減少棕色脂肪細胞形成，減少能量消耗及惡體質發生。

Abstract

Topic: Soyasaponin I decreases NF- κ B signaling to inhibit metastasis and cancer cachexia in the lung tumor model

Study aim: According to the studies, soyasaponin I is one of the components in miso, which is a protein-rich food, to promote antioxidative activity, cholesterol-lowering properties, reduction of blood glucose levels, anti-kidney disease progression and anti-inflammatory properties. Herein, we examined the cytotoxicity and anti-invasion activity of soyasaponin I in lung cancer cells. In addition, its molecular pathways of migration inhibition and autophagy in lung cancer cells were assayed. As anti-inflammation activity, we studied whether soyasaponin I suppressed cachexia in lung cancer models

Materials and Methods: WST-8 assay was used to determine cell cytotoxicity between normal and cancer cells. The cancer cell invasion after soyasaponin I exposure was tested via modified Boyden chambers. Immunofluorescent staining was performed for the studies of cancer cell autophagy and NF- κ B activity. Western blotting was used for the p-NF- κ B expression and change of epithelial-mesenchymal transition (EMT). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for IL-6 secretion of lung cancer cells after soyasaponin I treatment. Immunohistochemical staining for UCP-1 was used for cachexia study in human fatty cells after soyasaponin I treatment.

Results: Lung cancer cell death induced by soyasaponin I was dose-dependent. Autophagy was occurred in lung cancer cells with soyasaponin I therapy. In addition, soyasaponin I induced epithelial change of morphology and cell invasion inhibition *in vitro*. Furthermore, soyasaponin I inhibited NF- κ B phosphorylation and nuclear translocation in human lung cancer cells. In EMT assay, soyasaponin I induced E-cadherin upregulation and N-cadherin downregulation. In ELISA study, soyasaponin I suppressed IL-6 secretion, a downstream of NF- κ B signaling in human lung cancer cells. In cancer cachexia study, soyasaponin I inhibited UCP-1 expression in human fatty cells with IL-6 exposure.

Discussion: NF- κ B was a key role in cancer metastasis and cell survival. Soyasaponin I inhibited NF- κ B activity to suppress IL-6 secretion, a major cytokine for cachexia, and to induce autophagy cell death and mesenchymal-epithelial transition, which suppressed cancer cell invasion. Our study uncovered that soyasaponin I demonstrated the therapeutic potential for modulating IL-6 activity between cancer and fatty cells in tumor microenvironment. Thus, soyasaponin I inhibits tumor metastasis in early stage of cancers. In end stage of cancers, miso, protein-rich materials including soyasaponin I, may delay cancer cachexia and provide adequate nutrition.

壹、研究動機

之前在書中有讀到有關味噌的資料，就得知攝食味噌具有抗癌效果便深感好奇，因此想藉這次的機緣下研究味噌對癌症的影響。為了得知更多資訊，我上網查詢了味噌中的成分，發現大家較為熟悉的大豆異黃酮已有許多研究，於是我們選擇研究皂角苷(Soyasaponin I)。

至於對癌症細胞的選擇動機則是因為肺癌為台灣死亡率的第一名，且隨著環境汙染日益嚴重，肺癌對於人類的威脅便可能加大。總結上述的兩種因素後，我決定要探討 **Soyasaponin I** 是否能應用於肺癌治療，及其對肺癌的轉移及癌症引起惡體質影響。。

貳、研究目的

- 一、觀察加入不同劑量 Soyasaponin I 對於肺癌 H1299 和 A549 細胞及正常肺部細胞 HEL299 的存活率影響。
- 二、觀察在 Soyasaponin I 治療下，帶有自噬基因 LC3-EGFP 的 A549 細胞和帶有另一種自噬基因表現 Red-LC3-EGFP 的 H1299 細胞的螢光變化，得知細胞的死亡途徑。
- 三、透過比對是否加入 Soyasaponin I 的 A549 細胞、H1299 細胞觀察 p-NF-κB 入核狀態。
- 四、以 boyden chamber 實驗觀察比對是否加入 Soyasaponin I 對於 A549 細胞和 H1299 細胞的侵犯和爬行速度的影響。
- 五、測試 A549 細胞在加入 Soyasaponin I 後的癌症引起惡體質的發炎性細胞激素(IL-6)濃度的變化。
- 六、因為癌症引起惡體質時，發炎性細胞激素(IL-6)濃度會上升，測試人類脂肪細胞在加入 Soyasaponin I 後，對於癌症引起惡體質的變化。

參、研究設備與器材

1. 主要研究對象：

1. 皂角苷 (Soyasaponin I)
2. A549 cell (前期肺癌細胞)
3. H1299 cell (後期肺癌細胞)
4. HEL299 cell (正常肺部細胞)
5. Primary human fatty cells (正常人類脂肪細胞)

A549 cell	Organism	<i>Homo sapiens, human</i>
	Tissue	lung
	Cell Type	epithelial
	Disease	Carcinoma
	Culture Properties	adherent

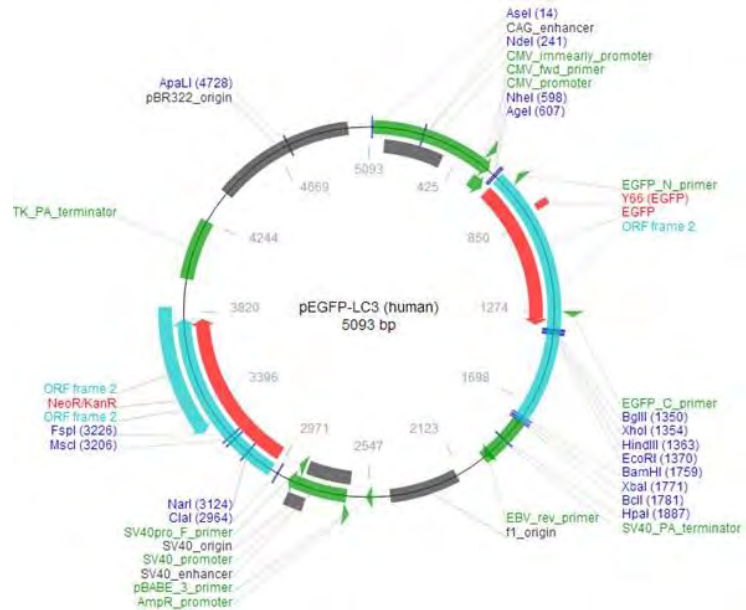
H1299	Organism	<i>Homo sapiens, human</i>
	Tissue	Lung ; derived from metastatic site: lymph node
	Morphology	epithelial

	Disease	Carcinoma; non-small cell lung cancer
	Culture Properties	adherent

2. 材料：

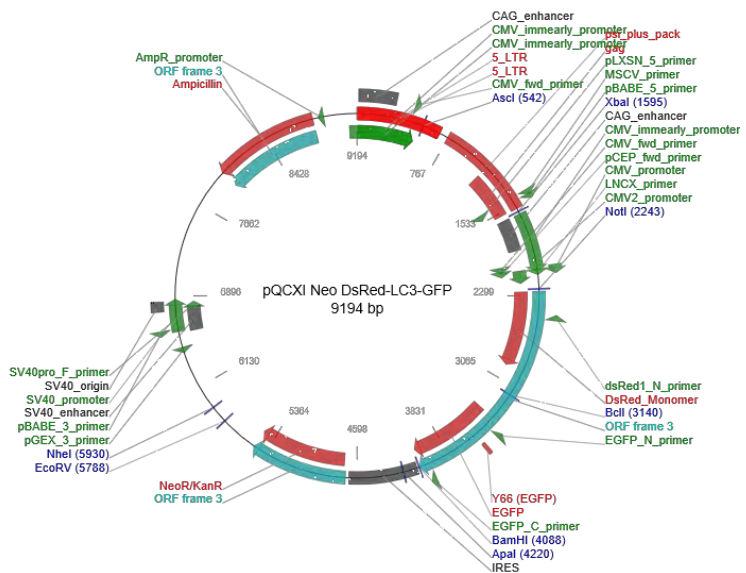
1. RPMI-1640 medium(L-glutamine(左旋麩醯胺酸)、HEPES (4-羥乙基哌嗪乙磺酸)、sodium pyruvate (丙酮酸鈉)、glucose (葡萄糖)、sodium bicarbonate (碳酸氫鈉)
2. F-12K medium (原液稀釋而得 (Low Glucose、L-Glutamine、No HEPES))
3. 不同濃度的 Soyasaponin I (0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M)
4. CCK-8 試劑 (WST-8)
5. 細胞溶解液 (protein lysis buffer) (0.8mM EDTA, 5% glycerol, 25mM CHAPS, 20mM Trizma-base, 0.05mM Digitonin, 1M KCl, 0mM Dithiothreitol, 1mM Glutathione)
6. BSA 蛋白
7. BCA reagent kit
8. protein loading dye
9. ddH₂O
10. running buffer
11. transfer buffer (25mM Tris-HCl, 192mM Glycine, 20% Methanol)
12. SDS-PAGE (ddH₂O、30%acrylamide/bis solution(29:1)、1.5M Tris(PH8.8)、10%SDS、APS、TEMED)
13. stacking gel(ddH₂O、30%acrylamide/bis solution(29:1)、1.5M Tris(PH6.8)、10%SDS、APS、TEMED)
14. blocking buffer
15. sample buffer
16. protein marker
17. methanol
18. TBST
19. 硝化纖維細胞膜 (PVDF membrane)
20. 抗體 (p-NF-kB、NF-kB, β -actin-HRP、goat anti-rabbit IgG)
21. peroxide solution
22. luminol enhancer
23. 磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS)
24. 細胞冷凍保存液 (cell culture freezing medium, DMSO)
25. trypsin-EDTA
26. EMDM
27. 酒精
28. 去離子純水
29. PBST
30. alama blue
31. trypan blue

32. RPMI-1640 medium
 33. 甲醛 (formaldehyde)
 34. Giemsa
 35. 凝聚胺
 36. Lipofectamine
 37. PBST (0.05%Tween20 的 PBS (pH7.2-7.4))
 38. Reagent diluent (含 10X 稀釋 BSA 的 PBS (pH7.2-7.4))
3. 載體：
1. EGFP - LC3 質體 (製成慢病毒)

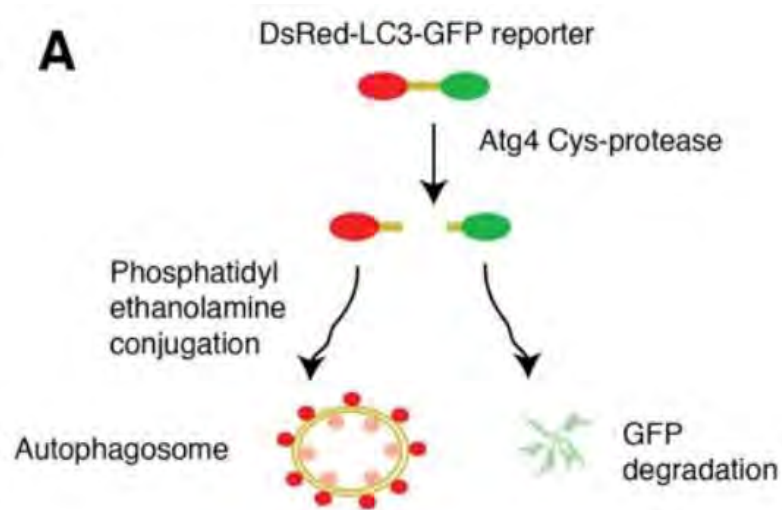


圖一、EGFP - LC3 質體

2. pQCXI Neo DsRed-LC3-GFP 質體



圖二、p-QCXI Neo DsRed-LC3-GFP 質體



圖三、pQCXI Neo DsRed-LC3-GFP Reporter 受 ATg4 Cys-protease 切斷而造成的效果

4. 實驗儀器：

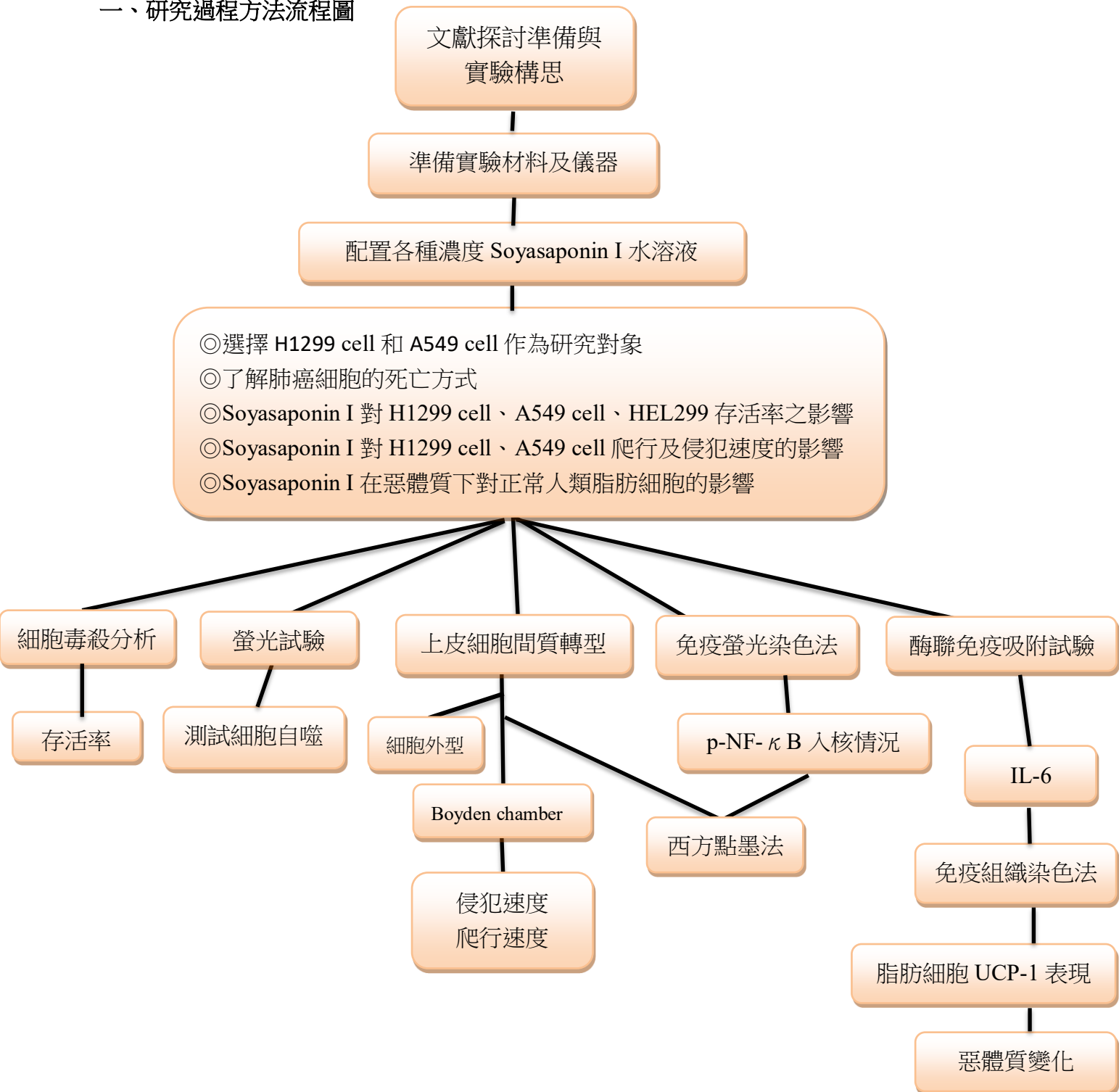
1. 恆溫水浴槽
2. 顯微鏡
3. 高速離心機
4. 培養箱無菌操作臺
5. 電泳槽
6. 桌上型微量離心機
7. 水平式旋轉器
8. 冷光螢光儀
9. 微量吸管
10. 試管震盪器
11. ELISA Reader
12. 螢光顯微鏡
13. OD Reader

5. 實驗器材：

1. 微量吸管分注器 (pipette)
2. 玻璃微量吸管分注器 (glass pipette)
3. 稱量紙
4. 刮杓
5. 細胞培養皿
6. 無菌離心管
7. 96 格孔盤
8. 6 格孔盤
9. 10 公分培養皿
10. filter
11. 96 孔 ELISA 專用盤

肆、研究過程與方法

一、研究過程方法流程圖



二、人類肺癌細胞培養

- (一) 取用人類肺臟上皮癌細胞 A549 及 H1299 作為研究，
- (二) 細胞株來源:成大生化所
- (三) H1299 培養基 (RPMI-1640 Medium)
- (四) A549 培養基 (F12-K Medium)
- (五) 將 H1299 及 A549 培養於各自培養液，然後將肺癌細胞置於 5%CO₂ 培養箱中培養 (37°C)，每 2-3 天換一次培養液，並再進行實驗。

三、細胞毒殺分析 (Cytotoxicity analysis) 及半致死量 (LD₅₀)

將細胞鋪至 96 格孔盤中一晚，吸出培養液後加入 100 μ L 含不同濃度的 Soyasaponin I (0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M) 的新鮮培養液後，另要有一組無藥物組作為基準。4 天後以稀釋十倍的 WST-8 (100 λ) 與細胞作用 1 小時，並以 OD Reader (吸光值 450nm) 偵測結果。以無藥物組為存活率 100%，計算出其餘組別的細胞存活率。用 SigmaPlot 軟體分析，利用 Pharmacology 選項中的 Standard Curve 程式進行 LD₅₀ 之分析。

四、西方墨點分析法 (Western blot analysis)

在 6-cm 的培養皿中培養細胞，次日再以 PBS 洗滌細胞，用刮勺從培養皿刮下細胞，加入 150 μ l 的細胞溶液放在冰上作用 30 分鐘後，將溶液以 13000 rpm 離心 15 分鐘，取出上清液，用 BCA assay 定量蛋白質濃度。取 35 μ g 蛋白混 4X protein loading dye 在加熱器上以 100 °C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性。將 10%SDS-PAGE 加入電泳玻片，待凝膠完全後加入 stacking gel，並在電泳槽內倒入 running buffer，將電泳玻片浸泡其中，將定量後蛋白質濃度將蛋白質樣品及 protein marker 注入各個電泳膠片槽溝中，兩邊多餘槽溝用 sample buffer 填滿。先以 250V，15mA/片，跑 60 分鐘 (圖五)，再以 250V，30mA/片電泳，並依所需抗體的 kDa (72) 決定需要的範圍，再停止電泳。用 Methanol 浸泡 30 秒，再用 TBST 清洗 2 次，以活化硝化纖維細胞膜。電泳完後取出膠。用黑色塑膠夾板固定 (負極朝內) 並加入 transfer buffer 以 63V、200mA 轉印 60 分鐘。將轉漬完的硝化纖維細胞膜泡入 blocking buffer 搖晃 2 個小時，用 TBST 搖晃清洗硝化纖維細胞膜三次 (10 分鐘/次)，再加入用 TBST 稀釋的一級抗體後，放入 4°C ice room 一晚 (置在水平式旋轉器上搖晃 3 rpm)。用 TBST 清洗 3 次，以一級抗體 (NF-kB 1:20000、p-NF-kB 1:1000)，抓住所需的蛋白，一晚後加入二級抗體做呈色反應。隔天將二抗搖晃 1 個小時 (8 rpm)，再用 TBST 清洗 3 次。將 luminol enhancer 和 peroxide solution 配成 40 λ ，將硝化纖維細胞膜塑膠夾夾至塑膠墊上，放入冷光螢光儀，並依不同抗體決定曝光時間 (90 張/10 分鐘)，檢視蛋白量。

六、免疫螢光染色法

第一天鋪 5x10⁴ 細胞於 24-well 細胞盤上，第二天加入 Soyasaponin I 或 medium，第三天吸掉 medium，以 PBS 清洗一次，吸掉 PBS，加入以 PBS 稀釋為 4% 的甲醛進行細胞固定，於室溫中放置 15-30 分鐘。吸掉甲醛，再加入 PBS，放置 5 分鐘，重複以 PBS 清洗三次。吸掉 PBS，加入 blocking buffer (1% bovine serum albumin)，於室溫放置 60 分鐘。吸掉 blocking buffer，加入適當濃度的第一抗體 (p-NF-kB 1:1000)，放置於 4°C 冰箱一晚。加入 PBS，放置 5 分鐘，重複以 PBS 清洗三次。加入適當濃度的連接螢光呈色的第二抗體，放置於避光的組織盒內，靜置 2 小時。重複以 PBS 清洗三次。放置於螢光顯微鏡下觀察。

七、Boyden chamber assay

在 6 格孔盤 (9.6 cm) 下層加入 500 μ l, 100% ccs DMEM, 並在不同 6 格孔盤 (9.6cm) 加入 100 μ l serum free DMEM, 且 serum free DMEM 分為未加藥及加入 Soyasaponin I (2 μ l) 的。第一天加入 2% ccs DMEM 在下層 (放隔夜), 使細胞 serum starvation。在第二天, 在上層 filter planting $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個細胞 (serum free medium), 在下層換 500 μ l、10% ccs DMEM, 使細胞爬行 6 個小時後, 取出 filter, 在上層加入 1ml PBS wash。以甲醇固定下層細胞 (5~10 分鐘) 後晾乾。下層置於 1ml Giemsa (用 10 倍原液用水稀釋之後過濾) 染色 30 分鐘後晾乾, 並利用 ddH₂O 清洗兩次, 並將上層用沾水的棉花擦掉、風乾。

八、酶聯免疫吸附試驗 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

第一天晚上先將 capture antibody 依照說明書著名之濃度已 PBS 稀釋, 披覆在 96 孔 ELISA 專用盤 (每孔 100 μ l), 至於室溫放隔夜。隔天利用 PBST 清洗 3 次後再在每孔加入 300 μ l 的 Reagent diluent 放置室溫兩個小時 blocking, 並以 PBST 清洗 3 次, 再加入樣本以及 Standard 100 μ l 放置於 4°C 搖晃隔夜。第三天, 清洗後每孔加入 100 μ l 的 Detection antibody (goat anti-rabbit) 室溫下搖晃 2 個小時並清洗, 再加入以 100 μ l streptavidin-HRP 在室溫下反應 20 分鐘 (避光), 接著以 PBST wash 3 次, 再加入 substrate (R&D) 100 μ l/well 避光作用 5 分鐘, 並停止反應。最後加入 50 μ l 2N H₂SO₄ 用 ELISA reader 讀取 450/540 nm 吸光值數值。

九、細胞自噬作用螢光試驗

1. A549 細胞: 在 8 μ g/ml 聚凝胺中加入表現 LC3-EGFP 的重組病毒, 一起放在 37°C、5% 的培養箱中培養 48 小時。
2. H1299: 使用 lipofectamine 3000A 將 pQCXI Neo DsRed-LC3-GFP 轉染到 H1299 細胞中。
3. 處理流程
 - (1) 將 mock medium 及 Soyasaponin I 加入兩種處理過的肺癌細胞中。
 - (2) 將兩種經上述處理過的細胞放置螢光顯微鏡下觀察及拍照。

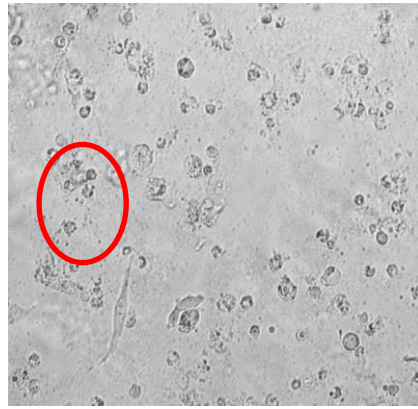
伍、研究結果

一、於加入 Soyasaponin I (20 μ M) 後的 H1299 和 A549 細胞的細胞毒殺結果

(一) H1299 細胞



未加入 Soyasaponin I (圖一-1)

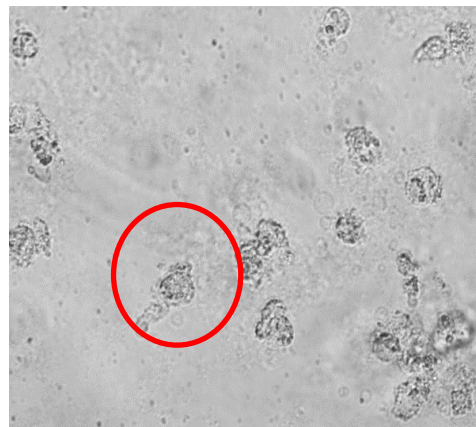


加入 Soyasaponin I (20 μ M) (圖一-2)

(二) A549 細胞



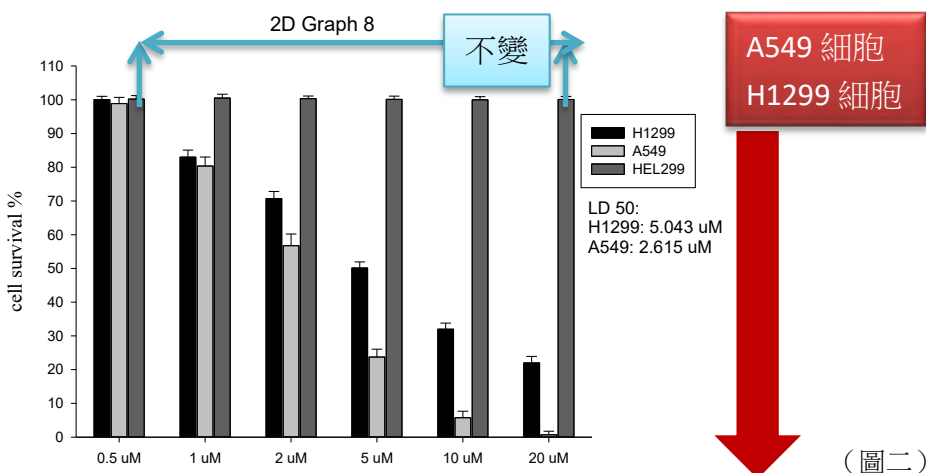
未加入 Soyasaponin I (圖一-3)



加入 Soyasaponin I (20 μ M) (圖一-4)

(三) 由(圖一-1/3)可知在未加入 Soyasaponin I 的細胞呈現紡錘型且有突觸伸出可爬行，而加入 Soyasaponin I (20 μ M) 後的 H1299 和 A549 細胞形狀多數變圓，數量變少且死亡(圖一-2/4)。

二、肺癌細胞 (H1299 和 A549) 及正常肺部細胞 (HEL299) WST-8 測定存活率 (波長: 450)

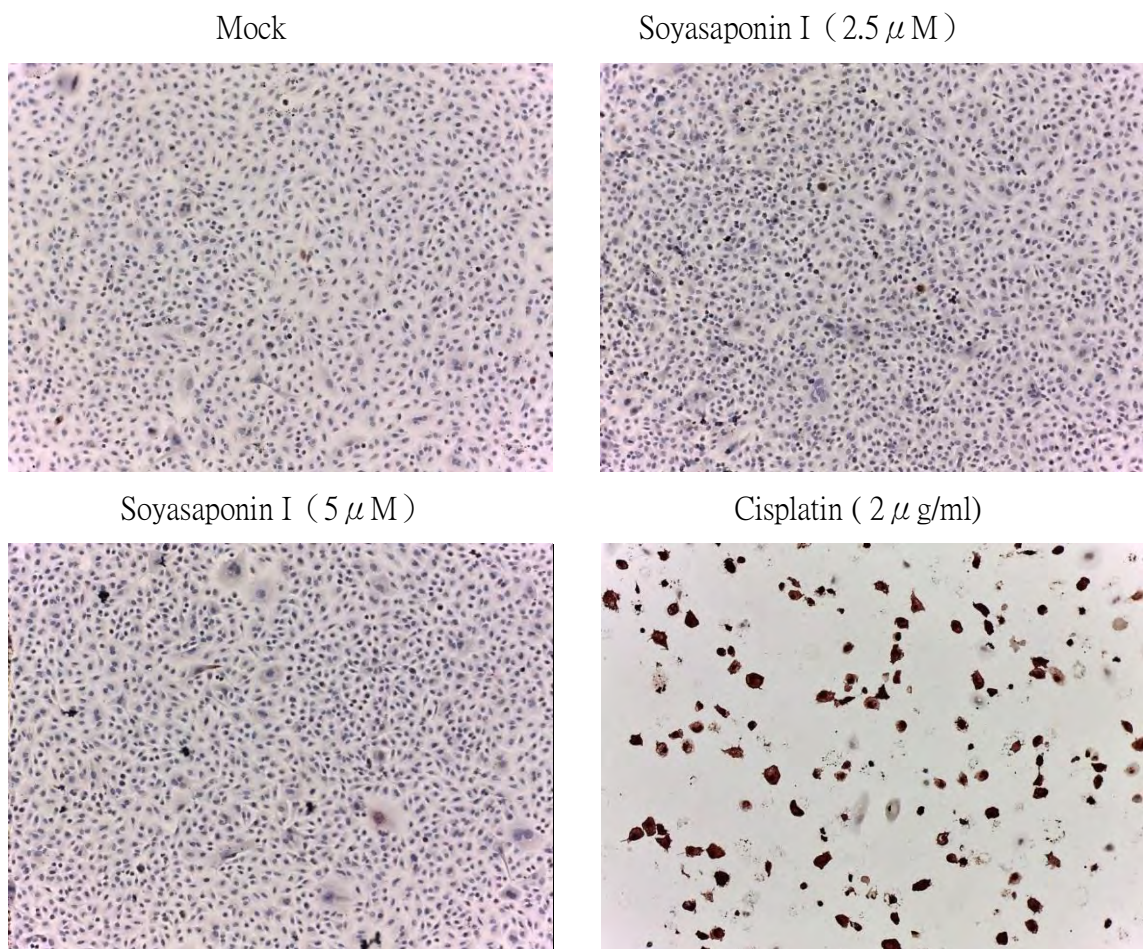


由（圖二）可知隨著 Soyasaponin I 劑量的增加，兩種肺癌細胞的存活率皆呈下降趨勢，而正常細胞並不受 Soyasaponin I 的影響，因此以 Soyasaponin I 治療肺癌有大範圍的治療安全濃度差別。且可由圖判斷當細胞存活率剩 50%時兩種癌細胞所加入 Soyasaponin I 劑量，分別為 A549：2.615 μM H1299：5.043 μM 。選擇存活率 50%是因為在 50%時的數據較有參考性，可以避免一些外在因素對於實驗的影響。另外可由（圖二）判斷 Soyasaponin I 對 A549 肺癌細胞毒殺效果影響較大，可由圖中明顯看出。

三、Immunohistochemical stain 免疫組織試驗進行細胞凋亡（Apoptosis）

（一）在正常肺細胞和癌細胞之間有 Soyasaponin I 的治療安全濃度差別。許多抗癌藥物誘導細胞凋亡，因此我們嘗試測試 Soyasaponin I 是否誘導 A549 細胞因細胞凋亡而死亡。

（二）A549 cells (100X)



（圖三）

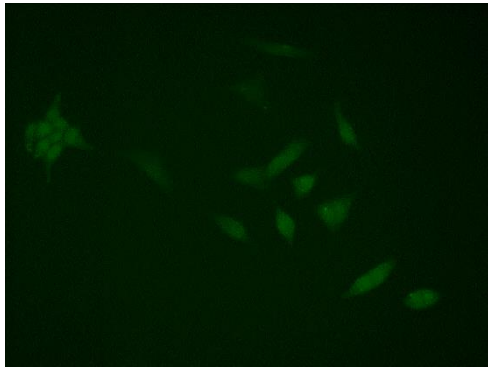
由（圖二）呈現 Soyasaponin I 對肺癌細胞有毒殺的治療效果，因此利用 A549 細胞以不同濃度的 soyasaponin I 治療 24 小時後，進行免疫組織試驗分析細胞凋亡的現象，凋亡的細胞會呈現紅色表現，結果無論加入 2.5 或 5 μM 的 soyasaponin I 治療後，只呈現少量的紅色細胞，而且數量上與 mock 控制組相當，cisplatin 組為 positive control，因此圖二的 soyasaponin I 對細胞毒殺效應並非以細胞凋亡方式造成細胞死亡。

四、螢光試驗 (Autophagy)

(一) 在正常肺細胞和癌細胞之間有 Soyasaponin I 的治療安全濃度差別。許多抗癌藥物誘導細胞凋亡，而一些化療劑在某些癌細胞中誘導細胞自噬，此外，我們嘗試測試 Soyasaponin I 是否誘導 A549 和 H1299 細胞因細胞自噬而死亡。為了看見活的癌細胞中的自噬空泡，我們使用表現 LC3-EGFP 的慢病毒載體來製造穩定表現的細胞。

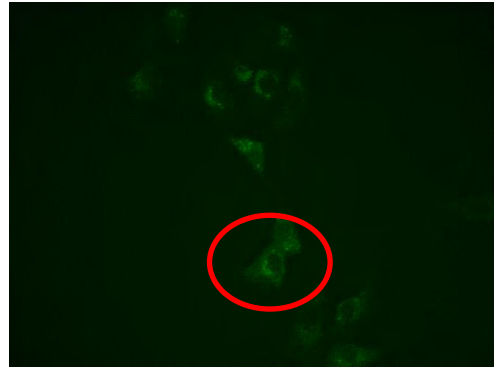
(二) A549-LC3-EGFP (300X)

MOCK



(圖三-1)

Soyasaponin I (2 μ M)

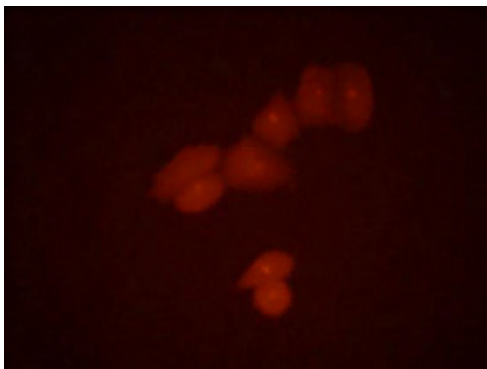


(圖三-2)

EGFP 基因轉譯成蛋白呈現綠光，並從螢光顯微鏡下看到加入 Soyasaponin I 之細胞的細胞質表現出斑點狀自噬空泡蛋白的螢光，而細胞核處則無 LC3-EGFP 蛋白的表現 (圖三-2)。

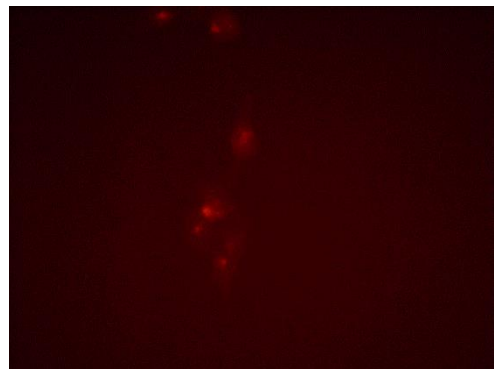
(三) H1299-Red-LC3-EGFP (400X)

Mock

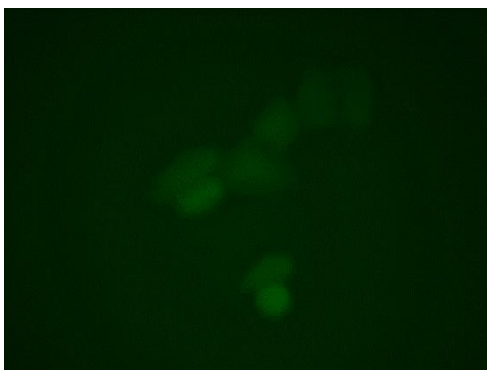


(圖三-3)

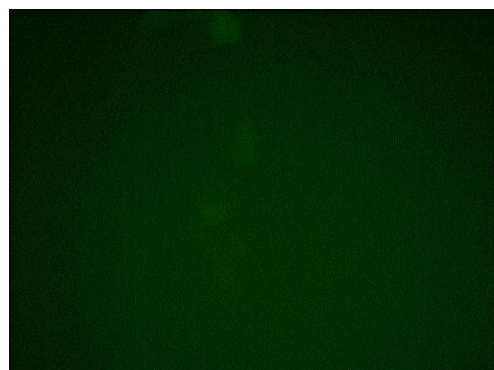
Soyasaponin I (2.5 μ M)



(圖三-4)



(圖三-5)



(圖三-6)

Red 是帶紅光的基因，EGFP 是帶綠光基因，同時表現時表示不受傷害的細胞，而當紅光表現而綠光不表現時，表示細胞呈現細胞自噬。由（圖三-6）可知加入 Soyasaponin I 的 H1299 細胞紅光量減少，代表細胞活性降低，細胞步入死亡；綠光的消失則因為酵素作用將 LC3-I 轉乘 LC3-II，使得 LC3 連結的 EGFP 蛋白無法表現，而 LC3 的轉變代表著 H1299 細胞產生細胞自噬效果。

四、Epithelial-mesenchymal transition

● 由本實驗做三個層面的探討：

1. 細胞外型的改變
2. Boyden chamber
3. Western blotting

（一）探討加低劑量的 Soyasaponin I 造成 H1299 細胞 A549 細胞的外型變化

H1299 細胞

Mock



（圖四-1）

Soyasaponin I (2.5μM)



（圖四-2）

A549 細胞

Mock



（圖四-3）

Soyasaponin I (2.5μM)



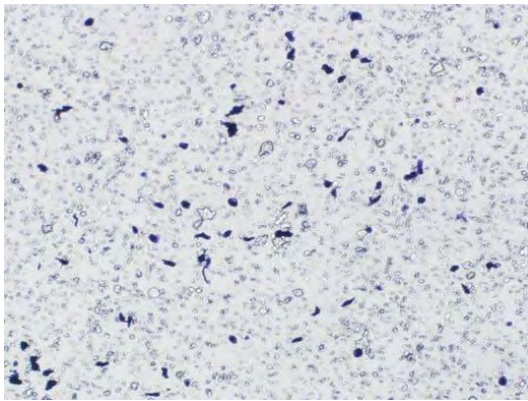
（圖四-4）

由上圖可知在加入 Soyasaponin I 的細胞從紡錘狀變成較為圓形或者較不紡錘狀的細胞，而 A549 細胞變圓的趨勢較為顯著，這也可由 WST-8 的實驗得到驗證，A549 細胞對於 Soyasaponin I 較為敏感。此實驗和前面（圖一-2/4）最大的差別是在於劑量，前面的實驗 Soyasaponin I 劑量為 20μM，因為是要觀察細胞的死亡；此實驗加入低劑量（2.5μM）的 Soyasaponin I，是為了繼續後續的實驗。此實驗 Epithelial-mesenchymal transition，細胞是從爬行較快的間質細胞（mesenchymal）的狀態變成爬行較慢的上皮細胞（Epithelial）。

(二) Boyden chamber

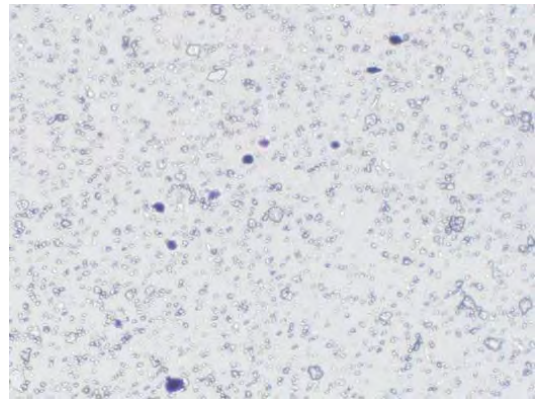
H1299 細胞 (4 Hours, 100X)

Mock



未加入 Soyasaponin I (圖四-5)

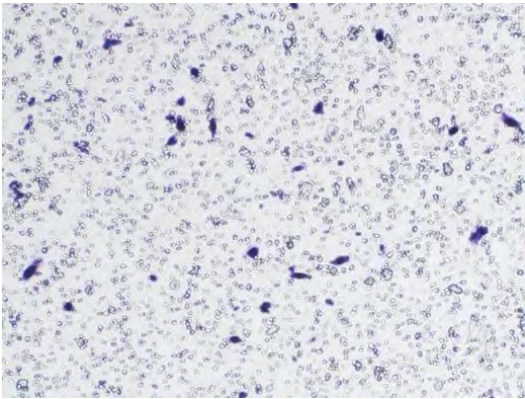
Soyasaponin I



加入 Soyasaponin I (2.5μM) (圖四-6)

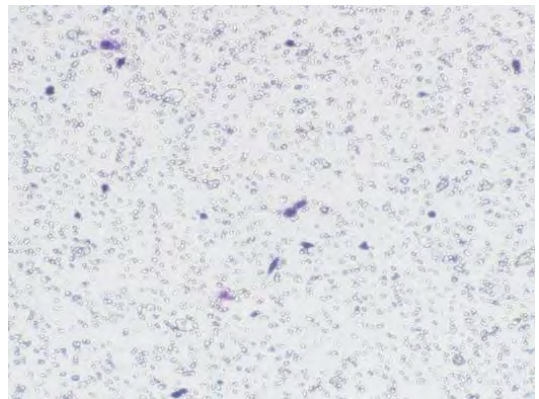
A549 細胞 (4 Hours, 100X)

Mock



未加入 Soyasaponin I (圖四-7)

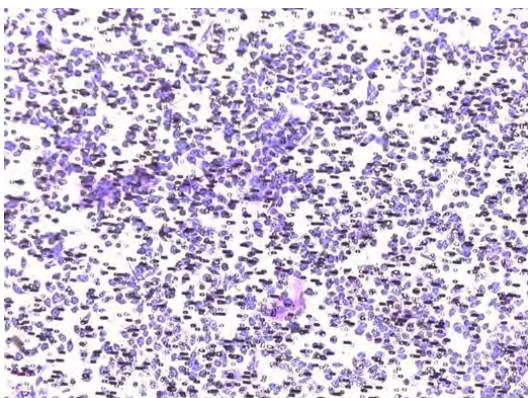
Soyasaponin I



加入 Soyasaponin I (2.5μM) (圖四-8)

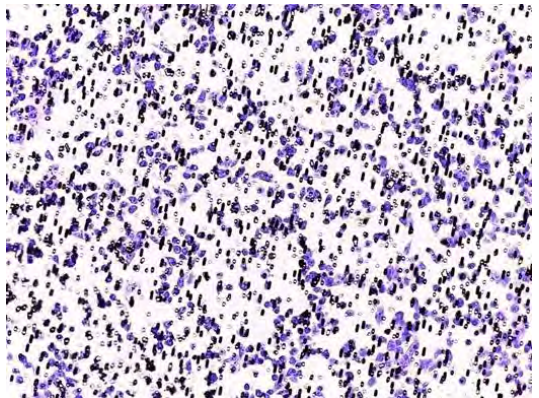
A549 細胞 (8 Hours, 100X)

Mock



未加入 Soyasaponin I (圖四-9)

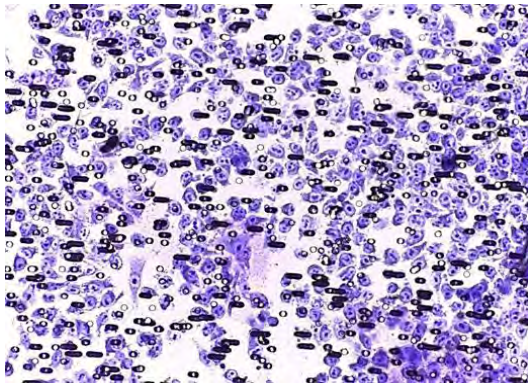
Soyasaponin I



加入 Soyasaponin I (2.5μM) (圖四-10)

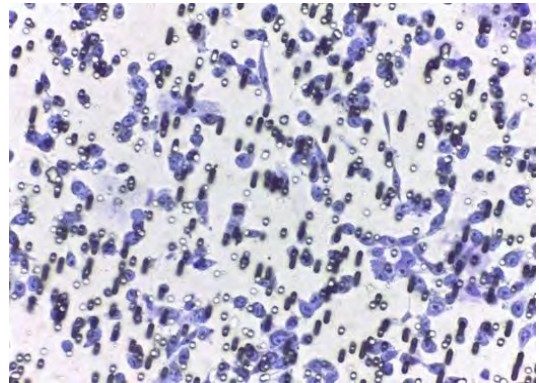
A549 細胞 (8 Hours, 200X)

Mock

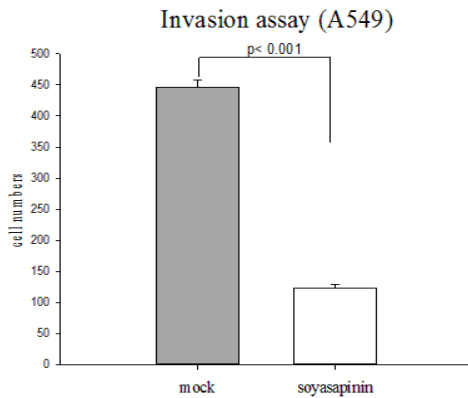


未加入 Soyasaponin I (圖四-11)

Soyasaponin I



加入 Soyasaponin I (2.5μM) (圖四-12)

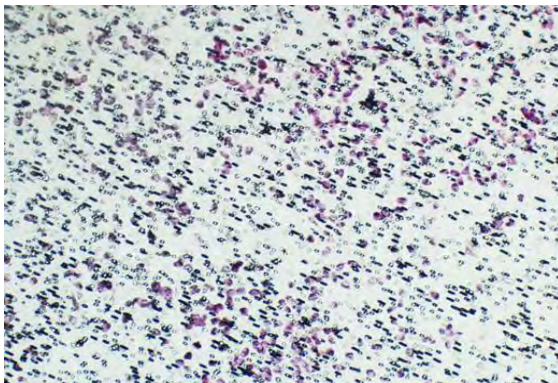


在顯微鏡觀察未加藥的 A549 侵犯的細胞數量中數 (medium) 為 445，而加藥後的細胞中數則為 123，且 **p 值 < 0.001**，一般情況在 **p 值 < 0.05** 有統計的意義，因此得知此具有統計上意義的數據。

(圖四-13)

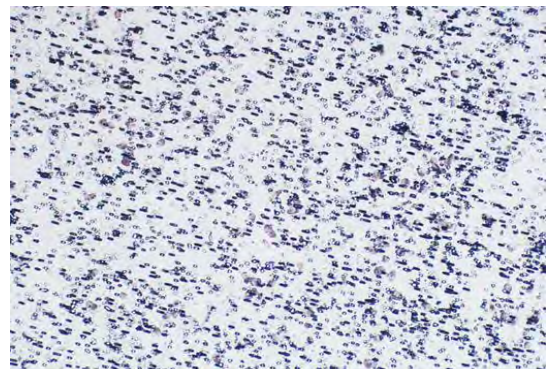
H1299 細胞 (8 Hours, 100X)

Mock

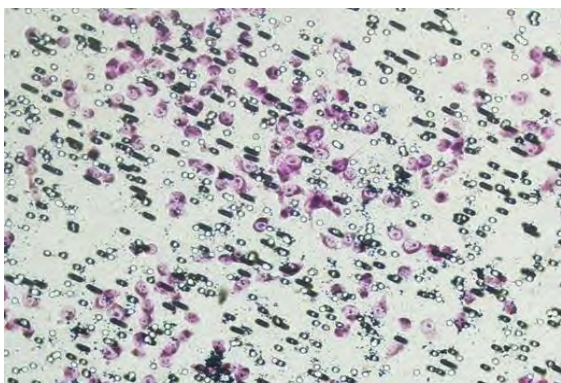


未加入 Soyasaponin I (圖四-14)

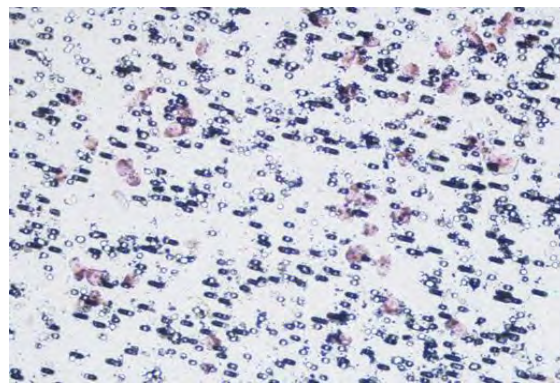
Soyasaponin I



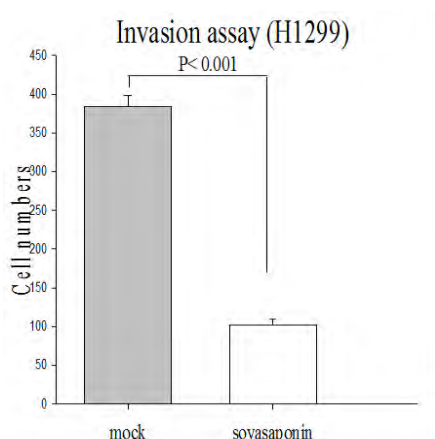
加入 Soyasaponin I (2.5μM) (圖四-15)



未加入 Soyasaponin I (圖四-16)



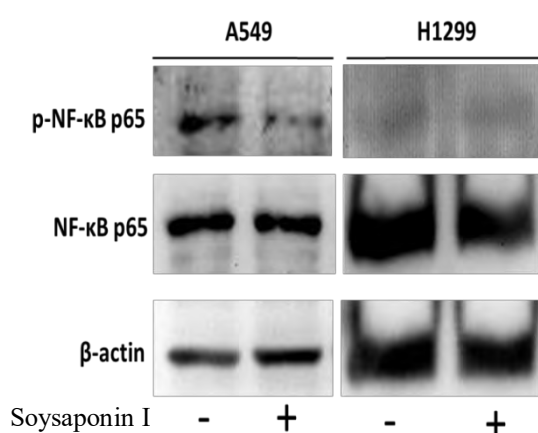
加入 Soyasaponin I (2.5μM) (圖四-17)



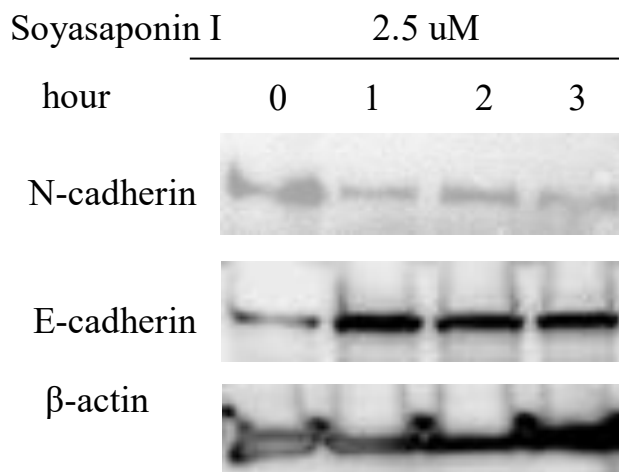
(圖四-18)

基質膠覆蓋的 boyden chamber 測定中，與對照細胞相比，在 Soyasaponin I 處理的 H1299 和 A549 細胞在爬行 4 及 8 小時後顯示**減少細胞侵犯能力**。A549 細胞是由 trypan blue 當染劑；H1299 細胞是由 Giemsa 當作染劑。因此 A549 和 H1299 細胞染色後有顏色差異(紫藍色；淡粉色)。在 mock 的 membrane 上可明顯看出有較多的細胞 invasion 和 migration 過 membrane，以 H1299 細胞和 A549 細胞(4 hours 100x)(圖四-6/8)呈現重紫色為爬過 membrane 的細胞，而較為透明的點為 membrane 上的孔洞；以 A549 細胞中(8 hours 200x)(圖四-10/12)，爬過 membrane 的細胞為重紫色，而 membrane 上的黑點為 trypan blue 的卡色殘留，不是爬過的 cell；而 H1299 細胞中，(8 hours 200x)(圖四-14/16)爬過 membrane 的細胞為淡粉色，且 membrane 也有 Giemsa 的卡色殘留。之所以選擇 2.5 μM 為 Soyasaponin I 的劑量，是因為由 WST-8 的實驗可知 A549 的 LD50 : 2.615 μM，因此選擇 Soyasaponin I 實驗濃度時，以較 H1299 細胞毒殺能力低的 A549 細胞的 LD 當作我們加入的 Soyasaponin I 的治療劑量。

(三) Soyasaponin I 抑制人類肺癌細胞 p-NF-κB (Western Blot)



(圖四-19)



(圖四-20)

其中 A549 細胞的 Soyasaponin I 的抑制效果較為明顯，而加入 Soyasaponin I 之 p-NF- κ B 及 NF- κ B 的暗帶較淺、較細，但因為 H1299 細胞的 p-NF- κ B 我們只能隱約感覺暗帶有較淺變細的趨勢，不像 NF- κ B 的暗帶有較明顯變淺變細的趨勢，故我們再測 β -actin 的蛋白量來輔助 p-NF- κ B 其實還是有意義的蛋白量數據，由(圖四-19)可知 β -actin 的蛋白量並沒有明顯減少，故可比較出 p-NF- κ B 和 β -actin 的差距。因此我們可推測 **Soyasaponin I 具有效抑制肺癌中的 NF- κ B 磷酸化**，p-NF- κ B 入核視為有功能性引發基因表現，能引細胞的發炎反應，而可藉此得知 Soyasaponin I 能**減緩發炎**之情形。接著實驗 p-NF- κ B 入核進行轉錄作用與 epithelial - mesenchymal transition 的相關性，由(圖四-20)顯示 A549 細胞以 Soyasaponin I 治療後 mesenchymal 的標記 (N-cadherin)明顯減少，而 epithelial 的標記 (E-cadherin)明顯增加，因此 Soyasaponin I 治療後使肺癌細胞是從 mesenchymal 的狀態變成轉移較慢的上皮細胞

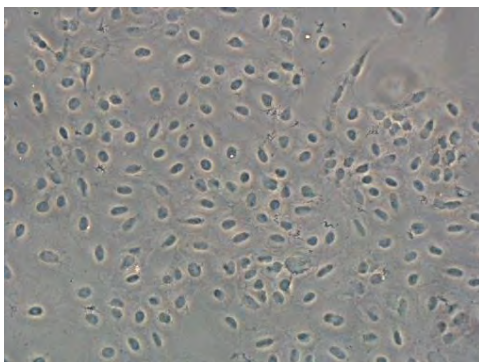
五、免疫螢光染色法 (fluorescence immunoassay)

(一) 免疫螢光染色法又稱螢光抗體法，在與第一抗體作用的第二抗體上標上螢光，而免疫螢光染色法的敏感度約在 0.05pg/ml。因為 **p-NF- κ B** 後會入核，呈現螢光反應，且會改變細胞的基因表現，**改變蛋白質**產物，產生促炎因子，使癌症持續惡化。未加入 Soyasaponin I 的細胞有較明顯的 p-NF- κ B 後入核情況，而且整體的螢光表現較強烈；而加入 Soyasaponin I 的細胞則減少的 p-NF- κ B 入核反應，而且整體的螢光表現較不強烈，因此 **Soyasaponin I 能抑制 p-NF- κ B 表現及入核**。

(二) A549 細胞:

Mock

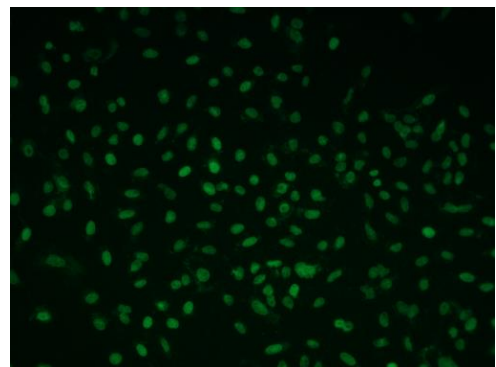
(白光)



(圖五-1)

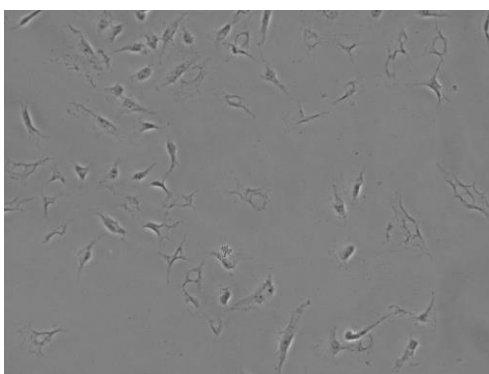
(螢光)

(200X)

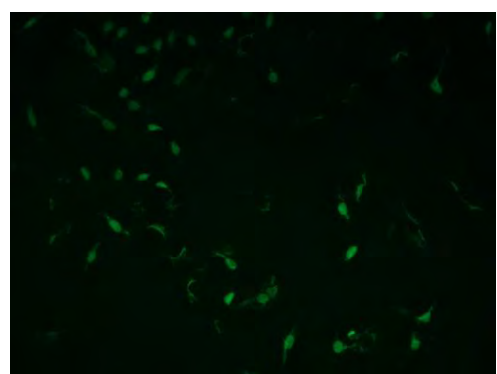


(圖五-2)

Soyasaponin I (2.5 μ M)



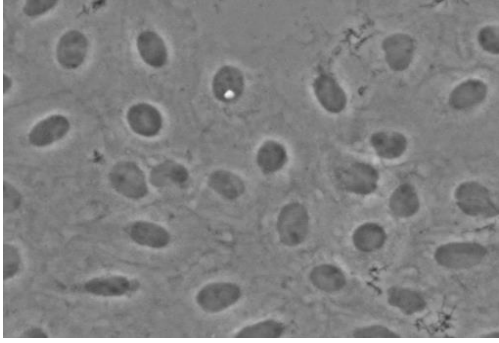
(圖五-3)



(圖五-4)

Mock

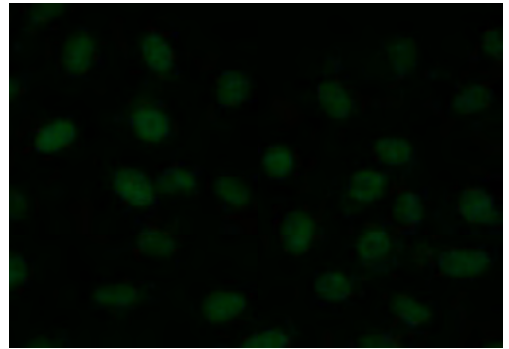
(白光)



(圖五-5)

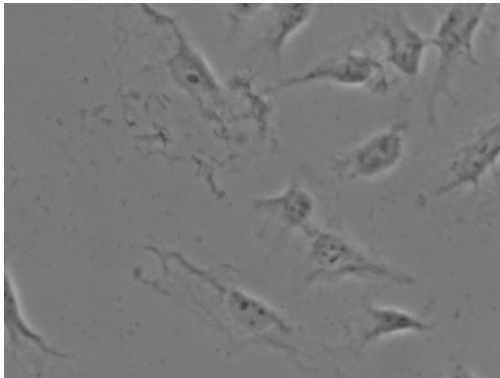
(螢光)

(600X)

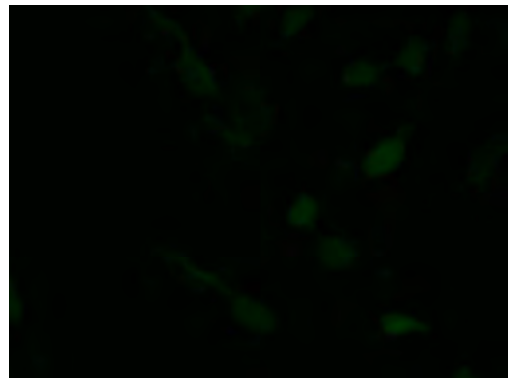


(圖五-6)

Soyasaponin I (2.5 μ M)



(圖五-7)

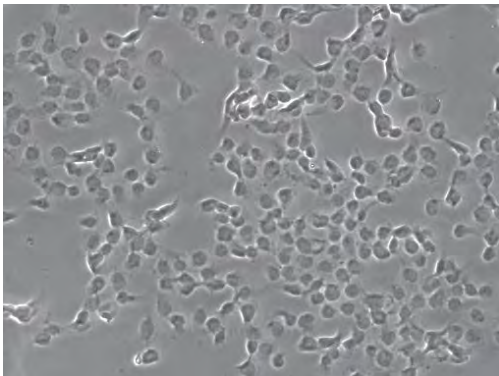


(圖五-8)

(三) H1299 細胞:

Mock

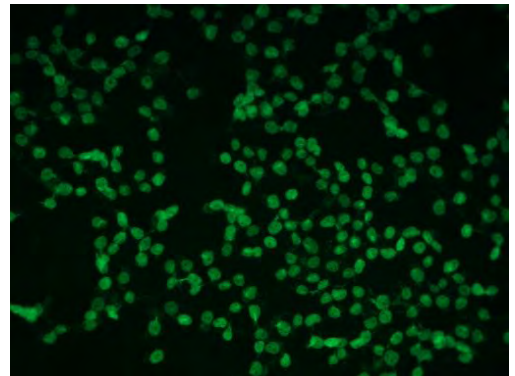
(白光)



(圖五-9)

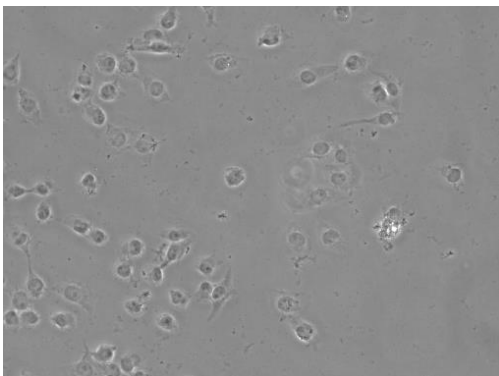
(螢光)

(200X)

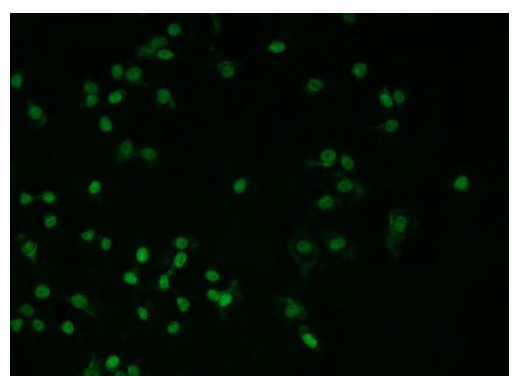


(圖五-10)

Soyasaponin I (2.5 uM)



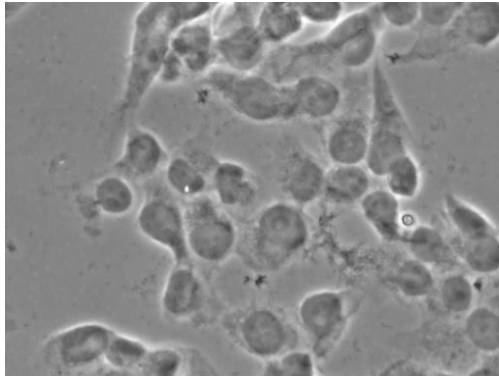
(圖五-11)



(圖五-12)

Mock

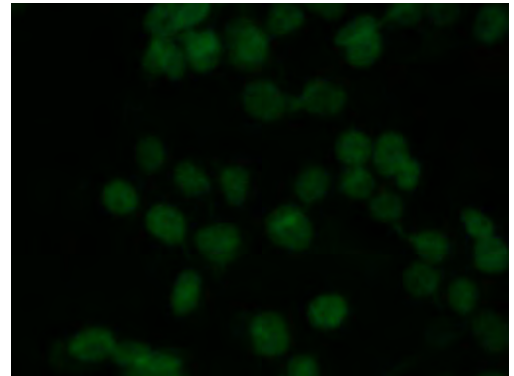
(白光)



(圖五-13)

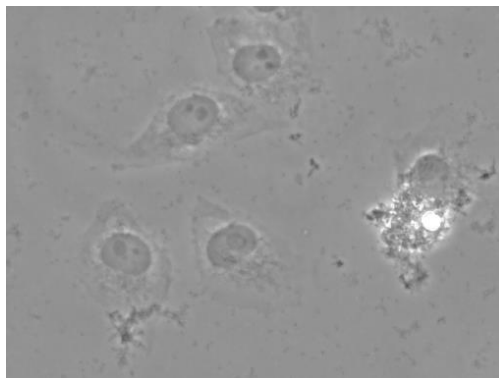
(螢光)

(600X)

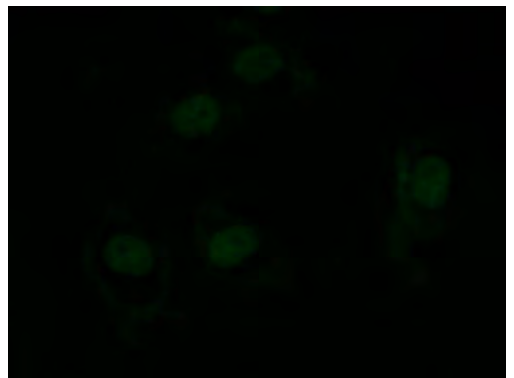


(圖五-14)

Soyasaponin I (2.5 uM)



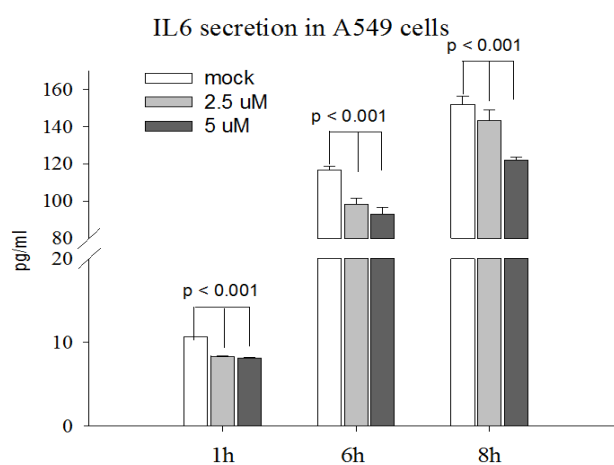
(圖五-15)



(圖五-16)

- (四) 在免疫螢光實驗中，mock 組的肺癌細胞的 **p-NF-κB** 於細胞核產生螢光反應，表示 p-NF-κB 能有效地轉入細胞核內，且 p-NF-κB 入核會改變細胞內基因表現，導致 IL-6 蛋白質增加，使癌症持續惡化。
- (五) 由圖中可見加入 Soyasaponin I (2.5 uM) 之 A549 細胞及 H1299 細胞的核內的螢光表現較微弱，從此推測 Soyasaponin I 可抑制 p-NF-κB 入核的情況；因 Soyasaponin I 減少細胞核內 p-NF-κB 的量，使 p-NF-κB 不會進入細胞核內改變細胞內基因表現，而此實驗最重要的目的地是呈現 p-NF-κB 入核量的減少。並可由(圖五-27/28)在 400X 的放大倍率下，清楚看到在 H1299 細胞的 p-NF-κB 入核量的減少(紅色箭頭標示處)。

六、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 酵素連結免疫吸附分析法



(圖六-1)

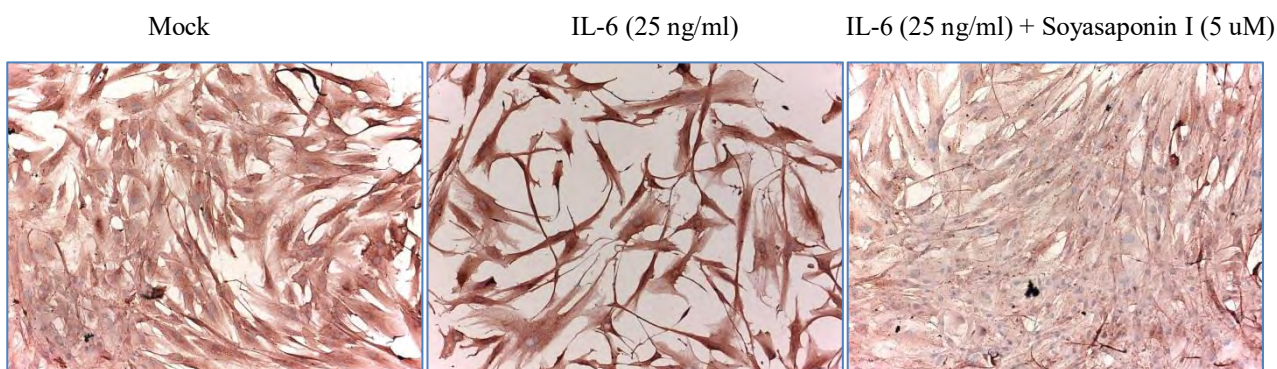


(一)利用 ELISA 來測試 A549 細胞分泌 IL-6 蛋白的表現量，並從(圖六-1)可發現 **Soyasaponin I** 的濃度越高，降低越多 A549 細胞之 IL-6 蛋白的量。癌症細胞的 IL-6 分泌量與癌症惡體質的體重減輕、體脂肪減少及肌肉萎縮，呈現正相關性，因此 **Soyasaponin I** 能有效地減少 IL-6 分泌，將能有效減少癌症惡體質的發生。

(二) p 值小於 0.05 的數據才有意義，而本實驗中 p 值小於 0.001，因此可得知此圖表據統計上的意義。

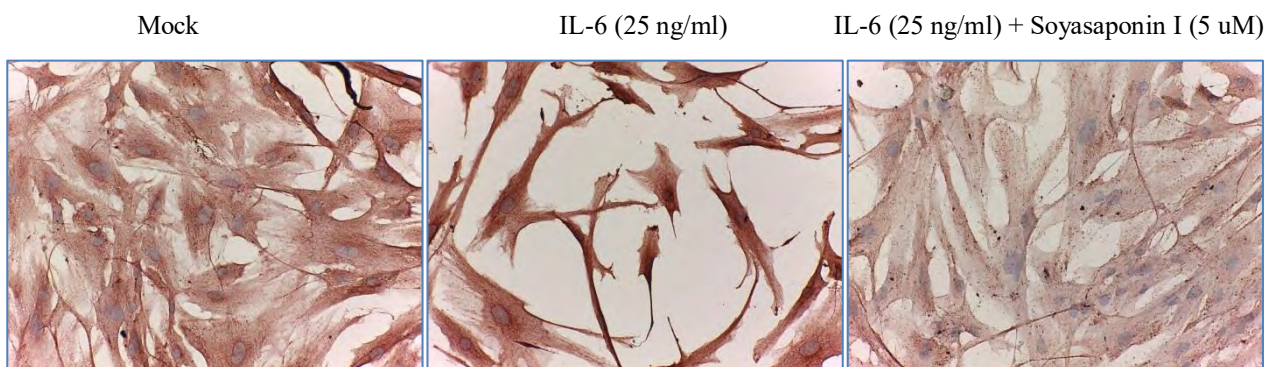
七、免疫組織試驗(Immunohistochemical stain)進行惡體質(cachexia)分析

Human fatty cell 脂肪細胞 (100X)



(圖七-1)

Human fatty cell 脂肪細胞 (200X)



(圖七-2)

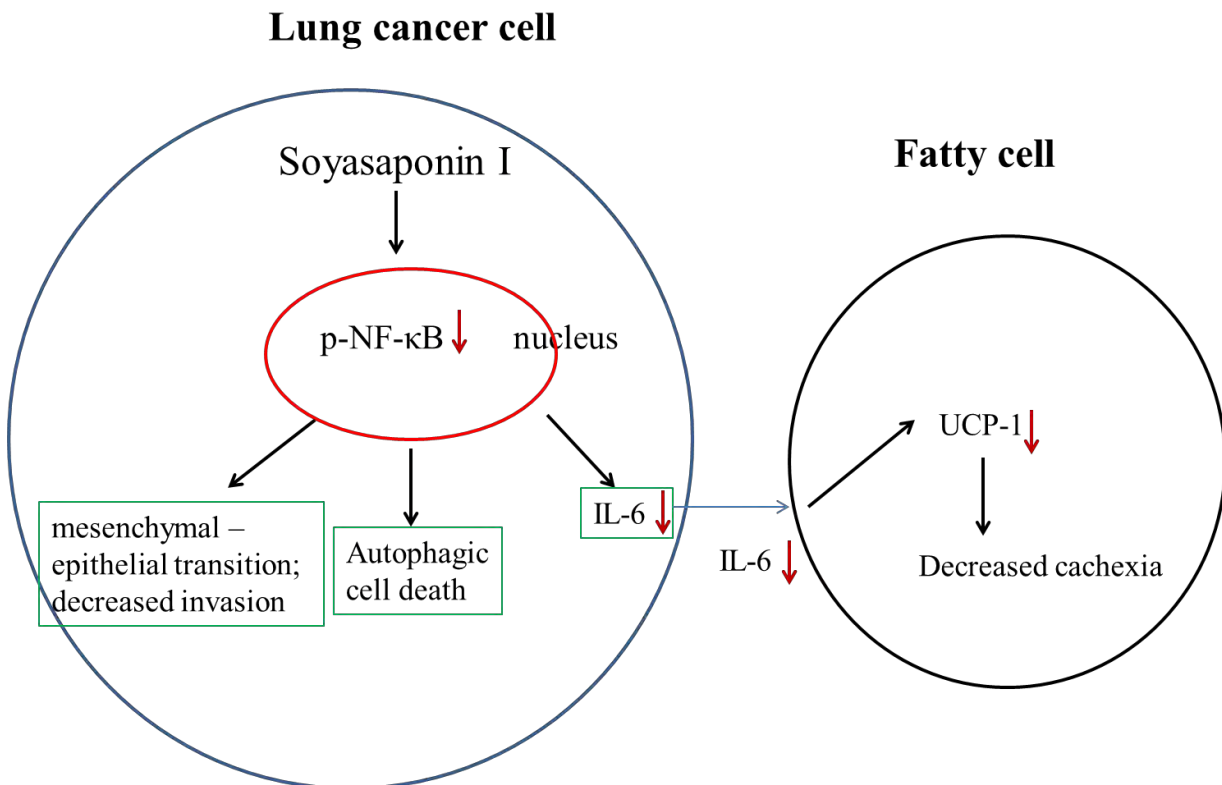
癌症細胞的 IL-6 分泌量與癌症惡體質的體重減輕、體脂肪減少及肌肉萎縮，呈現正相關性，於圖六的結果顯示 **Soyasaponin I** 能有效地減少 IL-6 分泌，我們繼續研究是否 **Soyasaponin I** 將能有效減少癌症惡體質的發生 (體脂肪減少)。我們以 UCP-1 染色強弱代表棕色脂肪細胞的消耗熱能狀態，UCP-1 染色越強代表體脂肪減少。於圖七顯示加入 IL-6 後, UCP-1 表現比 mock 組為高，結果表示此 IL-6 與人類脂肪細胞共同培養的模式能類比癌症細胞分泌 IL-6 促進體脂肪減少與癌症惡體質的體重減輕。當脂肪細胞同時加入 IL-6 及 **Soyasaponin I**(5 uM)，於圖七顯示此組的 UCP-1 表現最低，代表脂肪細胞的消耗熱能狀態最少，體脂肪減少最少，因此 **Soyasaponin I** 確實能減少癌症惡體質的發生。

陸、結論

本研究為討論大豆萃取物之皂角苷對於肺癌的治療成效，於實驗中我們便透過觀察細胞型態、數量、存活率等數據發現兩個不同階段的肺癌細胞加入 Soyasaponin I 後皆出現死亡之現象，但正常細胞加入藥劑後並不受影響，因此我們推論 **Soyasaponin I** 對肺癌細胞生長有抑制之效果，且不會傷害正常細胞。此外，本實驗亦使用 **Western blotting**、免疫螢光染色法發現 **Soyasaponin I** 減少的 **NF- κ B** 表現量及 **p-NF- κ B** 入核的情形，在 **boyden chamber** 實驗發現 **Soyasaponin I** 可以降低肺癌細胞爬行及侵犯的現象，即減緩癌症轉移的速度，用免疫組織試驗及螢光試驗得知 **Soyasaponin I** 造成的死亡路徑為細胞自噬而非細胞凋亡；用 **ELISA** 數據得知 **Soyasaponin I** 可減少肺癌細胞的發炎蛋白 **IL-6** 分泌。用免疫組織試驗數據得知 **Soyasaponin I** 可減少人類脂肪細胞的耗能蛋白 **UCP-1** 表現，減少癌症惡體質的發生。

柒、未來展望

- (一) 進行**生物實體實驗**加以印證其效果，便可推測 **Soyasaponin I** 對人體的抗癌效果，並藉由飲食中降低罹癌的機率改善癌症的惡化，抑或是規劃配合療程的餐點。
- (二) 味噌是日常食物中常加入的調味料，它含有豐富的蛋白質。對於癌症末期患者約有 5 到 6 成因惡體質而死亡，在本研究的味噌內含物 **Soyasaponin I** 能有效減少惡體質發生，並且味噌能補充大量的蛋白質，提供末期癌症患者所需的營養，因此補充味噌應該能有效減少因惡體質而死亡的比率，期望將來能在末期癌症患者的飲食中發現類似的結果。



捌、參考資料及其他

1. 阮馨怡 (2009)·藉由慢病毒在體傳遞界白素食九基因以治療膠原蛋白誘導隻小鼠關節炎·臺南：國立成功大學微生物及免疫學研究所。
2. 陳奐勻 (2010)·探討 Oct4 在肺癌中調控 VCC-1 的角色與機制·臺南：國立成功大學微生物及免疫學研究所。
3. 許翠珊 (2014)·Oct4 透過調控巨噬細胞聚落刺激因子促進 M2 巨噬細胞的極化造成肺癌轉移·臺南：國立成功大學微生物及免疫學研究所。
4. 蔡明憲 (2012)·Oct4 在肺癌中調控腫瘤相關巨噬細胞的角色·臺南：國立成功大學微生物及免疫學研究所。
5. 蔡明憲 (2011)·研究畫癌藥物 cisplatin 篩選出之新穎肺癌細胞群·臺南：國立成功大學微生物及免疫學研究所。

【評語】 090015

研究目的：想使用 Soyasaponin I 探討其是否能應用於肺癌治療，及其對肺癌的轉移及癌症引起惡體質影響。

1. 細胞自噬的實驗, 應該測量相關蛋白 (LC-I/LC-II, p62) 的表現
2. 細胞轉移的實驗應該定量
3. 加入 Soyasaponin I 對 EMT 相關蛋白質變化應該測量
4. UCP-1 的表現應該用西方墨點定量