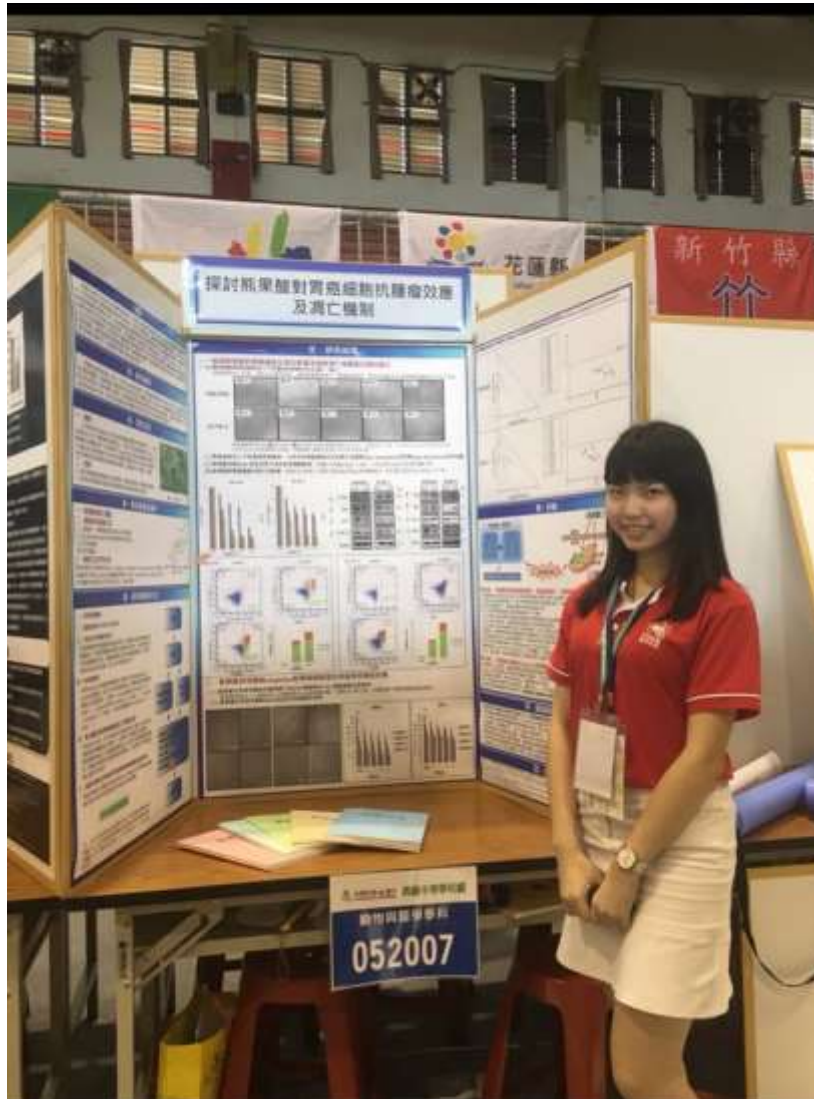


# 2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號** 090012
- 參展科別** 醫學與健康科學
- 作品名稱** 熊果酸抗胃癌細胞增生與順鉑的協同效應
- 得獎獎項** 大會獎：三等獎  
土耳其科學能源工程博覽會 OKSEF  
出國正選代表
- 就讀學校** 臺北市立南湖高級中學
- 指導教師** 董家莒
- 作者姓名** 林佳妮
- 關鍵詞** 胃癌細胞、熊果酸、順鉑

## 作者簡介



喜歡音樂、旅遊、也勇於探索，我是林佳妮。

在父母支持下，滿 15 歲就到德國參與一年期的交換學生計畫，也泳渡日月潭。高一生活我更積極參加各樣活動：合唱團，一年級班代代表、並代表校內參加教育部新世紀領導人才培育計畫。校內德文朗讀、新生辯論賽及英文演講也獲佳績。更在第 58 屆全國科展得到第一。

很榮幸將實驗成果與大家分享，感謝一路指導的師長們，這段旅程會是我珍貴的回憶。

## 摘要

胃癌的治療方式以手術及化學藥物治療為主。本研究目的是研究中草藥白花蛇舌草的主要成份熊果酸(Ursolic acid, UA)對於胃癌細胞增生的影響。研究使用兩種人類胃癌細胞株 MKN45 及 SCM-1。藉 UA 處理胃癌細胞之後，由鏡檢可見細胞數目減少，SRB 分析法也證明 UA 會降低細胞的存活率。利用流式細胞儀，證實 UA 會讓胃癌細胞凋亡。進一步由西方墨點法實驗顯示，UA 會誘導促細胞凋亡蛋白 Bax 及 Bak 的上升，並且降低抗細胞凋亡蛋白 Bcl-x1 及 Bcl-2 的表現。UA 也會抑制訊息傳遞途徑 *p*-Stat3/c-Myc/Cyclin D1。實驗也發現 UA 合併使用化療藥物順鉑(cisplatin)會使胃癌細胞存活率降低。經由周塔氏藥物合併指數及流式細胞儀分析均與協同順鉑能抑制胃癌細胞的增生,西方墨點法也發現 pro-caspase 9 被活化，皆與 UA 會促進順鉑引發凋亡效應有關，這些實驗證實 UA 是 cisplatin 治療胃癌的輔劑，這個結果對中草藥白花蛇舌草的抗癌效果提供了具體的實證。

## Abstract

The standard therapy for gastric cancer is chemotherapy and surgery. Because of the poor outcome during treatment, new regimen is always needed. The study is to uncover the potential anti-tumor effect of a major component Ursolic acid (UA) from the herbal medicine *Hedyotis diffusa* during gastric cancer treatment. Two human gastric cancer cell lines, MKN45 and SCM-1, were used. UA was demonstrated successful in suppressing cell viabilities and the effects were dose- and time-dependent as shown by Sulforhodamine B assay, while flow cytometry analysis proved that the reduced viable cells were induced by apoptosis. Western blot analysis showed that UA markedly induced pro-apoptotic markers, Bax and Bak, and suppressed anti-apoptotic markers, Bcl-x1 and Bcl-2. Other signaling pathway markers *p*-Stat3/c-Myc/Cyclin D1, were suppressed by UA. To supplement the effects of common chemotherapeutic agent cisplatin in treating gastric cancer, the combinative effect of UA were examined using Chou-Talalay method and flow cytometric analysis, thereby proving the synergistic effects. The results demonstrated that UA is effective against growth of gastric cancer cells and useful for clinical applications.

# 壹、前言

根據衛生福利部公佈的統計資料，國人十大死因之首是惡性腫瘤。其中胃癌居全國癌症死亡率排名第七，也是常見的消化道惡性腫瘤之一。目前胃癌的主要治療方式以手術合併化學藥物為主，如：順鉑 (cisplatin)等，但胃癌復發率高且易轉移，為降低胃癌病人存活率。近年來臨床上也發現，若能將中西藥搭配，更能有效抑制癌細胞生長，治療效果會更好，而且減少藥物的副作用與抗藥性。但傳統中草藥複方多以經驗傳承，對於純化分析其有效成分的瞭解不多，本研究使用中草藥成分中有效的成分，目標是提供癌細胞研究的成果，作為未來臨床研究的參考。

## 一、研究背景

中醫藥以其獨特的理論體系，在腫瘤臨床醫學上發揮更多的功能。但中醫文獻並無胃癌的病名，類似的記載多見有：胃反、伏梁、胃脘痛等。根據研究，中草藥白花蛇舌草具有清熱解毒、活血止痛及消腫毒的功效，為中醫治療胃疾的常用藥物之一 (董 2017)。其中有效成分之一是熊果酸 (Ursolic acid, UA) (Wei et al., 2015; Xiao et al., 2016; Chen et al., 2016)。

熊果酸 (圖 1)具有增強免疫力、抗發炎功能且能促進癌細胞凋亡之活性。近年來，許多國內外的文獻也報導熊果酸具有促進癌細胞凋亡的效果，它具有抗腫瘤作用，也是抗癌的研究目標之一。它對腎臟癌與乳癌 (Li et al., 2015)、多發性骨髓瘤 (Pathak et al., 2007)、子宮頸癌 (Wang et al., 20117)、肝癌 (Liu et al., 2017)等都有顯著的藥效。文獻顯示熊果酸的抗腫瘤效果，其藥效與細胞凋亡(apoptosis)及調控 Stat3 傳遞路徑有關 (Li et al., 2017; Pathak et al., 2007; Wang et al., 2017; Liu et al., 2017)；另一方面，也有文獻指出胃癌細胞中的 Stat3 表現量與癌細胞的存活有密切相關 (Kanda et al., 2004; Yakata et al, 2007)。根據中醫理論與文獻資料，本研究則是探討白花蛇舌草中的主要有效活性成分-熊果酸-對胃癌細胞的細胞增生之影響，進一步釐清熊果酸對胃癌細胞凋亡的相關機制，並且瞭解熊果酸是否可以有效協助現有臨床藥物治療的可能。

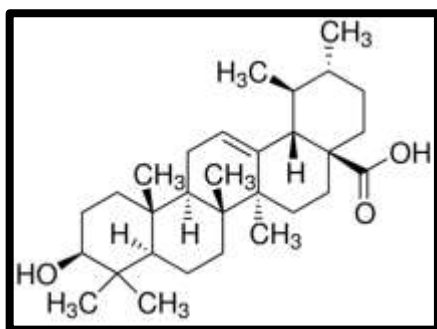
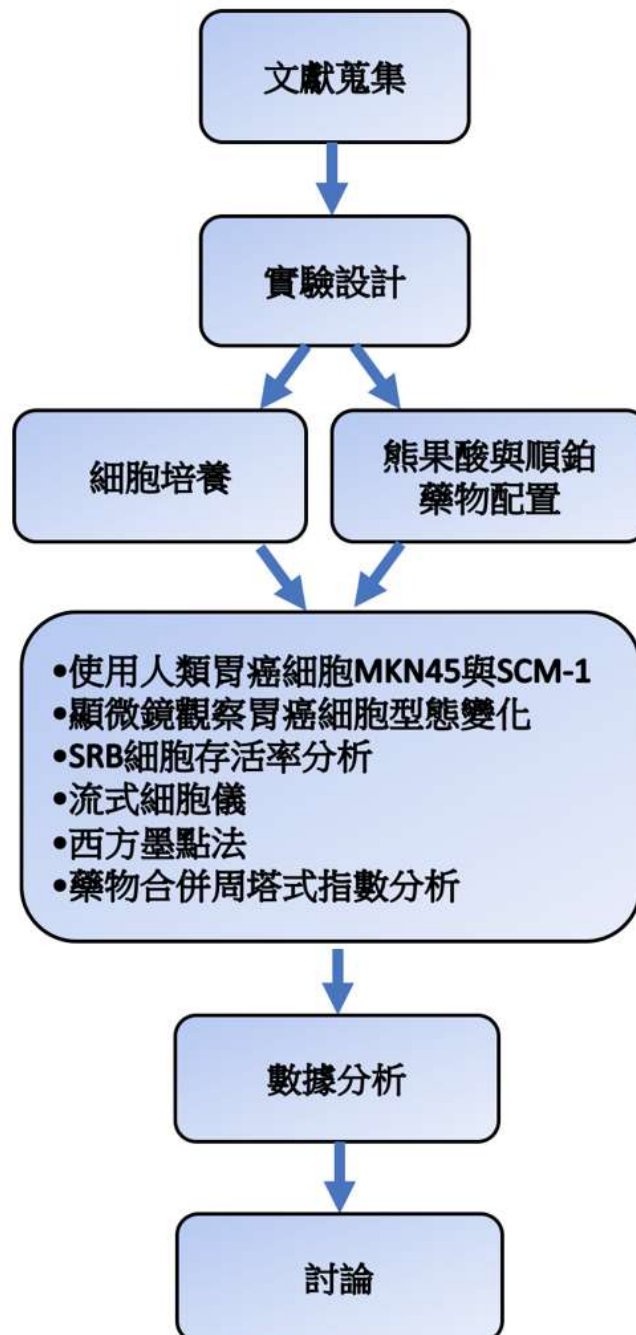


圖 1、熊果酸 (Ursolic Acid) 結構式(分子量:456.70)

## 二、研究目的

- (1) 探討熊果酸對胃癌細胞生長的影响，並檢測所誘導細胞凋亡相關機制的變化。
- (2) 檢視合併使用熊果酸及順鉑對胃癌細胞所造成的協同抑制效應。

## 貳、研究方法與過程



## 一、實驗試劑之準備：

- (1) 熊果酸 (3  $\beta$ -hydroxy-12-ursen-28-ic acid, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 分子量 456.70;U6753, CAS 77-52-1) 購自 Sigma-Aldrich。
- (2) 人類胃癌 MKN45 和 SCM-1 細胞株是購自於食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心；細胞株培養液 RPMI 1640 購自 CAISSON LABS；FBS (Fetal bovine serum)、PBS (phosphate-buffered saline、包括 sodium chloride、sodium phosphate dibasic 等)、antibiotic-antimycotic 購自於美國 Gibco-BRL 公司；胰蛋白酶 (trypsin-EDTA)、dimethyl sulfoxide (DMSO 細胞冷凍保存液)購自於 Sigma-Aldrich；trypan blue 染劑購自於 Thermo Fisher Scientific。
- (3) SRB 細胞存活率分析法：Sulforhodamine B (SRB)染劑、10% trichloroacetic acid (TCA)、1% acetic acid、PBS、ddH<sub>2</sub>O、Tris 緩衝液及順鉑 (購自 Sigma-Aldrich)。
- (4) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)與西方墨點法分析的研究試劑：Pierce™ BCA Protein Assay Kit、Pierce™ ECL Western Blotting Substrate 及 Enhanced chemiluminescence (ECL)皆購於 Thermo-Fisher Scientific。Tris、protein lysis buffer、10% SDS、acrylamide、10% ammonium persulphate (AP) solution、tetramethylethylenediamine (TEMED)、lane marker reducing sample buffer (sample dye)、methanol、PBS - 1% Tween 20 (PBS-T) buffer、BSA standard、primary antibodies (Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-xl、及  $\beta$ -actin、*p*-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D1、caspase 9)、secondary antibody (HRP-conjugated anti-rabbit IgG 及 HRP-conjugated anti-mouse IgG)、10× running buffer、10× transfer buffer。polyvinylidene fluoride 膜 (PVDF membrane)、skim milk 等皆購自於 Sigma-Aldrich。
- (5) 流式細胞儀的研究試劑: PE Annexin V 染劑、7-Aminoactinomycin D (7-AAD)核酸染劑、Annexin V binding buffer 皆購於 Becton-Dickinson。

## 二、西方墨點法研究所需配製

### (一)膠體配製：

1.集膠溶液 (5% acrylamide stacking gel)：ddH<sub>2</sub>O (6.8 ml)、30% acrylamide (1.7 ml)、1 M Tris (1.25 ml)、10% SDS (0.1 ml)、10% AP (0.1 ml)、TEMED (10  $\mu$ l)。

2.分離膠體液體 (10% acrylamide separating gel)：ddH<sub>2</sub>O (5.9 ml)、30% acrylamide (5.0 ml)、1.5 M Tris (3.8 ml)、10% SDS (0.15 ml)、10% APS (0.15 ml)、TEMED (6  $\mu$ l)。

(二)電泳緩衝液(running buffer)配製：取 Tris (3 g)、glycine (14.4 g)及 10% SDS (100 ml)，

用 ddH<sub>2</sub>O 將上述藥品溶解，並調整 pH 值至 7.0 後，再調整量至 1,000 ml。

(三)電泳轉印緩衝液 transfer buffer 配製：取 Tris (3 g)及 glycine (14.2 g)，用 ddH<sub>2</sub>O 將上述藥品溶解，並調整 pH 值至 8.3 後，加入 methanol (200 ml)，再調整量至 1,000 ml。

(四)電泳阻斷液 blocking buffer 配製：取 5 g skim milk 加入 100 ml PBS-2% tween (PBS-T)，均勻混合後即可使用。

(五)裂解緩衝液 lysis buffer 配製：150 mM NaCl、1 % NP-40、0.1 % SDS、50 mM Tris-HCl，pH 7.6、10 mM EDTA，pH 8.0、1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)、0.5% deoxycholate、1 mM sodium orthovanadate、10 mM sodium fluoride、10 mM  $\beta$ -glycerophosphate 及 10  $\mu$ g/ml protease inhibitor cocktail。

(六)西方墨點法分析使用的抗體 (表一)：

1.Primary antibody： $\beta$ -actin、*p*-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D1、Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-xl、caspase 9。

2.Secondary antibody：horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody 及 HRP-conjugated anti-mouse antibody。(購自於 Abcam)

表一、使用一級抗體的背景及來源

Antibody	抗原分子量 (kDa)	Source	產品編號	稀釋比例	廠牌
$\beta$ -actin	42	mouse	ab6276	1:10000	Abcam
<i>p</i> -Stat3	79,86	rabbit	9145P	1:500	Cell Signaling
Stat3	86	rabbit	4904P	1:500	Cell Signaling
c-Myc	55~60	mouse	Sc-40	1:500	Santa Cruz
Cyclin D1	38	mouse	Sc-8396	1:500	Santa Cruz
Bax	20	rabbit	5023	1:1000	Cell Signaling
Bak	25	rabbit	6947P	1:1000	Cell Signaling
Bcl-2	26	rabbit	2870	1:1000	Cell Signaling
Bcl-xl	36~47	rabbit	2764S	1:1000	Cell Signaling
caspase 9	35, 37, 47	Rabbit	#9502P	1:1000	Cell Signaling

### 三、實驗器材儀器清單

細胞培養箱、離心機 (KUBOTA2420)、電動吸管 (pipette aid，購自於 Thermo Fisher Scientific)、微量吸管分注器 (Thermo Fisher Scientific)、手動八爪分注器 (Thermo Fisher Scientific)、烘箱、SDS-PAGE 電泳和轉漬器材購自於 BIO-Rad、倒立式相位差顯微鏡、濕式轉印機、電源供應器、防爆夾、加熱板、凝膠成像儀 (Biospectrum 500 Image System UVP)、ELISA reader 及流式細胞儀 (Becton-Dickinson，Accuri C6)。

#### 四、分析方法之選用

利用 ANOVA 分析法，統計分析加入不同藥物之後的細胞存活率來進行比較，並計算  $p$  值。如果相關的  $p$  值低於 0.05，代表結果具有顯著意義。

用於分析順鉑搭配熊果酸對胃癌細胞作用所使用的程式為網路分享的 ComboSyn 電腦應用軟體 (ComboSyn Inc, Paramus, NJ, USA)，以周塔 (Chou-Talalay) 式藥物合併指數定理 Combination Index (CI) 評估 (Chou, 2011)。先根據  $IC_{50}$  濃度混合毒性試驗中之熊果酸及順鉑，分別使用不同比例加以組合，由實驗結果估算出細胞存活率，換算成死亡率之後，繪出 Isobologram 曲線。

#### 五、細胞培養過程

##### (一) 解凍胃癌細胞

MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞自液態氮中取出後，採快速解凍法將細胞冷凍管置於浮床上以 37°C 水浴槽回溫，快速種入 10 公分培養皿上，並加入含有 10% FBS 及含有 1% 抗生素的 RPMI 培養液培養。置於 5%  $CO_2$  培養箱於 37°C 培養。

##### (二) 繼代培養胃癌細胞

1. 去除培養皿內原有的細胞培養液，並取 PBS 潤洗，除去殘留的培養液。
2. 每個培養皿加入 1 ml 的 trypsin-EDTA 後，放回培養箱約 7 分鐘後，讓貼附於盤底的細胞懸浮。
3. 加入含有血清蛋白的培養液終止 trypsin-EDTA 作用，離心 1,200 rpm，5 分鐘。
4. 抽掉離心完後的上清液，加入 3 ml 的培養液回溶，並混合均勻。
5. 取 10  $\mu$ l 的 trypan blue 和 10  $\mu$ l 回溶後的細胞液，混合均勻後取 10  $\mu$ l 加至細胞計數格中，在顯微鏡觀察下計數細胞數目。
6. 取約  $1 \times 10^6$  顆細胞接種到新的 10 公分培養皿，低速水平搖晃培養皿，讓細胞均勻分佈，放回培養箱。
7. 剩餘的細胞，可使用細胞冷凍保存液和細胞液以 1:1 混合後，採階段性冷凍儲存，置於 -20°C 至少 20 分鐘，並放入 -80°C 約 16 小時後，移至液態氮桶中保存。



## 六、加入熊果酸作用於胃癌細胞，觀察不同時間下的形態變化，並分析細胞存活率

### (一) SRB 分析法原理：

SRB 分析法是利用染劑 SRB 中磺酸基的陰性離子，於弱酸環境下與細胞內蛋白質的鹼性胺基酸結合，接著使用弱鹼溶液萃取出細胞內的 SRB 之後，於 ELISA reader 測量在波長 565 nm 處的吸光值，依據細胞濃度-吸收度檢量線換算，即得知細胞內的 SRB 濃度，以決定細胞存活率。實驗以 DMSO 溶劑控制組的結果視作存活率 100%，推算其他組別之細胞存活率。

### (二)SRB 細胞存活率分析法操作如下：

#### 1. 前置操作

- (1) 分別取 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞，以每 100  $\mu\text{l}$  包括 FBS 培養基中含  $3 \times 10^3$  顆胃癌細胞的細胞密度，植入 96 孔培養盤培養。培養盤外圍只放入 100  $\mu\text{l}$  PBS，置入 37°C 且有 5%  $\text{CO}_2$  培養箱。
- (2) 約 24 小時之後，確認細胞貼盤後，細胞培養盤分別加入濃度 0、5、10、20 及 50  $\mu\text{M}$  熊果酸，而且讓每個指定濃度為六重複。
- (3) 將胃癌細胞於 12、24 及 48 小時熊果酸反應完後，以顯微鏡觀察並記錄細胞在不同濃度及不同作用時間下的細胞形態變化。並且使用 SRB assay 測定 12、24 及 48 小時吸光度，轉換成細胞存活率。
- (4) 以相同實驗條件重複操作兩次。

#### 2. SRB 細胞存活率分析操作步驟：

- (1) 清除 96 孔培養盤之培養液，加入 PBS 100  $\mu\text{l}$  潤洗兩次。
- (2) 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  的 10% TCA 置於 4°C 下 1 小時。
- (3) 倒掉孔內原液，以 ddH<sub>2</sub>O 100  $\mu\text{l}$  潤洗兩次後，每孔加入 200  $\mu\text{l}$  的 SRB 染劑，於室溫下靜置 1 小時。
- (4) 將每孔 SRB 染劑回收後，以 1% acetic acid 100  $\mu\text{l}$  潤洗兩次。
- (5) 將多餘液體拍乾後，於烘箱烘乾 20 分鐘。
- (6) 以 200  $\mu\text{l}$  的 20 mM Tris 溶解，靜置 30 分鐘後，於設定 565 nm 波長的 ELISA reader 測定吸光值。
- (7) 以上每個實驗濃度為六重複，同實驗條件重複操作兩次，結果取其平均值。

## 七、以流式細胞儀測試加入熊果酸對胃癌細胞造成的影響

### (一) 流式細胞儀分析法原理：

將細胞樣本以 7-AAD 及 PE Annexin V 螢光雙染法來進行檢測，利用 Annexin V 染劑檢測細胞凋亡時會出現磷脂醯絲胺酸 (PS) 外翻現象，並 7-AAD 為核酸染料。當樣本通過 flow 的毛細管，以 488 nm 為激發光譜，設定 578 nm 為顯示散發光譜。得到四個象限的圖表，依據訊號的有無來將細胞區分為四種狀況，分別為：左下象限顯示為活細胞分佈百分比 (Annexin V negative, 7-AAD negative)，右上象限為 apoptosis 晚期細胞分佈百分比 (Annexin V positive, 7-AAD positive)，右下象限為 apoptosis 前期細胞分佈百分比 (Annexin V positive, 7-AAD negative)，左上象限為 necrosis 細胞分佈百分比 (Annexin V negative, 7-AAD positive)。

### (二) 流式細胞儀細胞存活率分析法操作如下：

1. 將 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞分別種於培養皿中，培養 24 小時待細胞貼盤，設定三組別分為：DMSO 溶劑控制組及加入 2.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M 熊果酸的實驗組，再培養 24 小時後收取細胞，即完成待檢測之樣品。利用 ddH<sub>2</sub>O 將 10 $\times$  binding buffer 稀釋為一倍。
2. 吸掉 medium 以 PBS 離心兩次，使細胞沉澱。除去上清液後加入稀釋成一倍的 binding buffer。將細胞稀釋成 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 顆 per ml 胃癌細胞，均勻打散細胞。
3. 分裝在四個 eppendorf 內，每一個 100  $\mu$ l。分別加入 5  $\mu$ l 之 PE Annexin V 染劑、7-AAD 染劑、同時加入兩種染劑，及兩種染劑均不加入的對照組，以避光染色 15 分鐘。
4. 在每一管中加入 400  $\mu$ l 的 1 $\times$  binding buffer。
5. 在開機後先按 BACKFLUSH 鍵，並將裝入 1 ml 過濾過的 ddH<sub>2</sub>O 放置取樣區，並設定流動 5 分鐘，上樣速度設定為 FAST。結束後按 DELETE EVENTS 鍵，並移除試管，使用樣本開始實驗。

## 八、西方墨點法明確胃癌細胞凋亡之相關蛋白檢測

### (一) 西方墨點法原理：

西方墨點法是利用 SDS-PAGE 方式，將分析樣品中的蛋白質依分子量自大至小向下展開，再將蛋白質轉漬到 PVDF 膜上。以 skim milk 處理後，利用抗體的專一性，讓 primary antibody 結合目標蛋白，再與帶有 HRP 的 secondary antibody 結合，最後以受質顯色後，用冷光影像儀器照相鑑別。透過分析著色的位置和顏色深淺變化，比對樣本中目標蛋白質的消長。

(二)西方墨點法操作步驟如下：

1. 抽取蛋白質

- (1) 將 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞分別種在 6 孔培養盤。組別分為：DMSO 溶劑控制組及加入 5  $\mu$ M 熊果酸的實驗組。放入培養箱 6 及 24 小時後，吸除培養液，潤洗。離心後取上清液。
- (2) 以 lysis buffer 裂解細胞反應 30 分鐘，並於離心後取上清液，即為總蛋白質萃取物。

2. 蛋白質定量

- (1) 將 BSA standard 序列稀釋成 2.000, 1.000, 0.500, 0.250, 0.125, 0.0625 及 0.0313 mg/ml，並以 ddH<sub>2</sub>O 作為對照組，每個濃度二重複。
- (2) 依建議比例配 BCA kit 的 working reagent，取 190  $\mu$ l working reagent 至各樣本的 well 中。
- (3) 以 ELISA reader 在 562 nm 測定吸光值，並以 BSA standard 算出的回歸曲線，推算出樣本中的蛋白質濃度。

3. 樣本製備

分別取 10, 20 或 30  $\mu$ g 的樣本蛋白質，加入 sample dye。

4. 電泳

製膠後，將待測樣本和蛋白質分子量標準液加入對應 well 中，空格處補 sample dye。先將電源設定 70 V，當樣本移至下層分離凝膠介面時，再設定為 100 V。

5. 轉漬

將 PVDF 膜泡入 methanol 中予以活化。先放適量 transfer buffer 至轉漬槽。轉漬夾中由下往上依序將濾紙兩張、PVDF 膜、膠體、濾紙兩張放入轉漬夾中。將轉漬槽放入冰箱中，設定電流時間後，開始轉漬，設定電壓為 100 V，電流 60 mA。

6. 免疫抗體墨點法

- (1) 將蛋白質轉漬後的 PVDF 膜置入 blocking buffer 盒中搖晃反應後，用 PBS-T 搖晃潤洗三次，移除 PBS-T。
- (2) 將配置好的 primary antibody 加入放置 PVDF 膜的盒內，於冷房反應 18 小時後，用 PBS-T 搖晃潤洗 PVDF 膜。
- (3) 將配置好的 secondary antibody 倒入 PVDF 膜盒內，並在室溫搖晃 1 小時後，以 PBS-T 潤洗 3 次。

## 7. 照相

- (1) 將配好 ECL 顯色試劑加到 PVDF 膜上。
- (2) 置入 UVP 冷光分析儀照相，檢視細胞內各式目標蛋白質的消長變化。

## 九、利用周塔氏藥物合併指數定理分析熊果酸合併使用順鉑對細胞存活率的影響

### (一)周塔氏藥物合併指數定理原理：

周塔氏藥物合併指數定理是依照周塔氏法分析劑量反應曲線計算 CI 值。CI > 1.1 表示拮抗，CI = 0.9~1.1 表示加成作用，CI < 0.9 表示協同作用。

利用目前化療藥物順鉑搭配熊果酸使用，探討是否能達到增強化療藥物的敏感性，進而了解輔助藥物的治療效果。步驟是將兩株細胞分別種入 96 孔盤，待細胞固定之後，先將順鉑放入培養箱 4 小時後，再加入熊果酸培養 24 小時，最後以 SRB assay 結果，換算出每一實驗組別之細胞死亡率 (100% - 存活率)，再使用細胞死亡率以周塔氏藥物合併指數定理之 ComboSyn 程式 (<http://www.combosyn.com/>) 繪出反應曲線。

### (二)本實驗操作步驟如下：

1. 分別取 MKN45 與 SCM-1 胃癌細胞，以每 100  $\mu$ l 包括 FBS 培養基中含  $3 \times 10^3$  顆胃癌細胞的細胞密度，種入 96 孔培養盤培養。培養盤外圍一律不種，但是加入 100  $\mu$ l PBS，放入 37°C 且有 5% CO<sub>2</sub> 培養箱約 18 小時。
2. 確認細胞貼盤後，將細胞培養盤先分別加入 0、2.5、5、10 及 20  $\mu$ M 的順鉑。4 小時之後，再分別加入 0、2.5、5 及 10  $\mu$ M 熊果酸處理，每個濃度三重複，放回培養箱至 24 小時後觀察，利用 SRB assay 讀取其吸光度平均值，再決定細胞存活率，並換算成死亡率。每一實驗條件分別操作兩次。

## 參、研究結果

### 一、熊果酸對胃癌細胞的影響與細胞凋亡相關蛋白質的變化

#### (一)觀察不同濃度熊果酸對胃癌細胞的影響

以 5、10、20 及 50  $\mu\text{M}$  濃度的熊果酸分別加入 MKN45 和 SCM-1 細胞，並觀察於 12、24 及 48 小時後的反應。發現 48 小時後，相較於未加藥之 DMSO 溶劑控制組，顯微鏡視野下顯示細胞數量會顯著的降低，且藥物濃度劑量越高，更多的細胞出現不完整的形態，且伴隨著細胞膜皺縮及空泡化現象。這種情形至 48 小時之後，更為明顯。因此以這個時間點做為爾後實驗參考(圖 2 為 MKN45 的結果，圖 3 為 SCM-1 細胞的結果)。

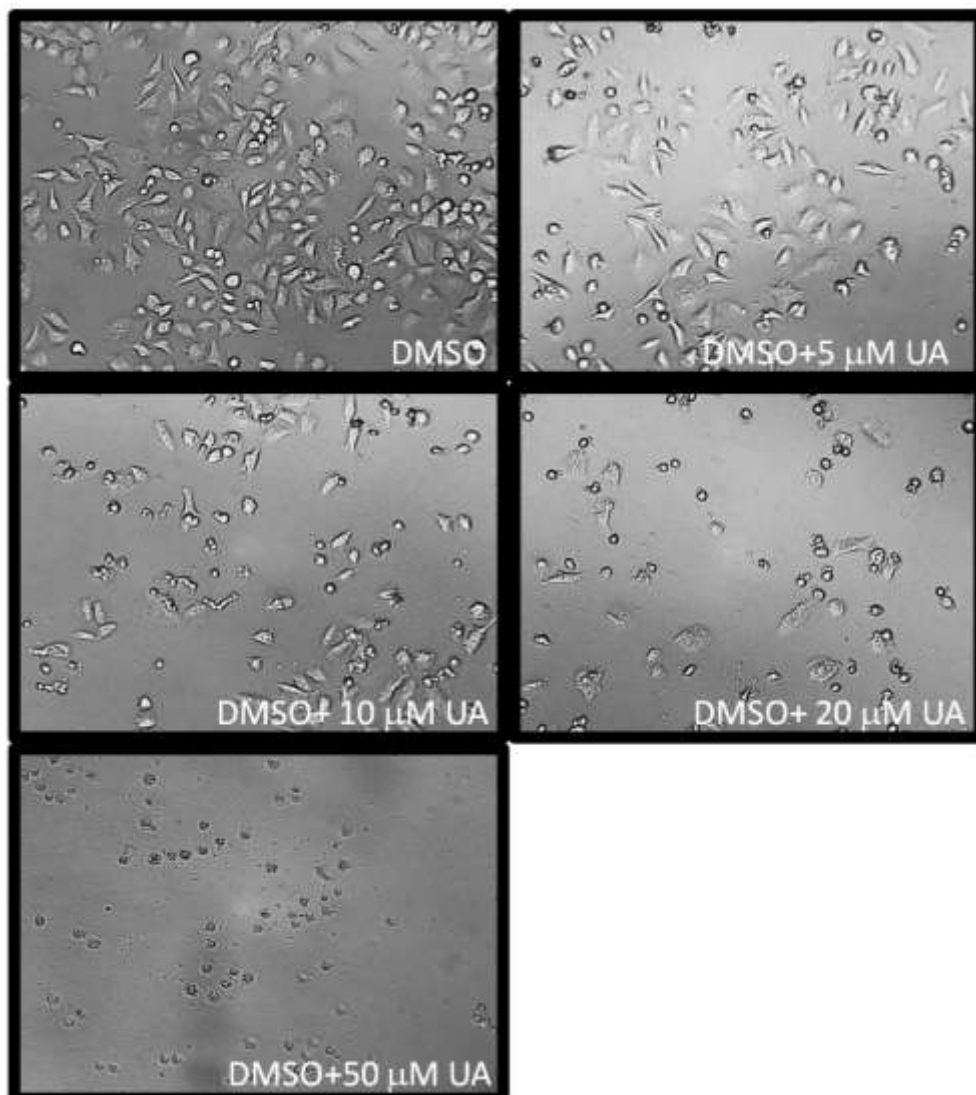


圖 2、MKN45 胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及不同濃度熊果酸實驗組 48 小時後顯微鏡下細胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

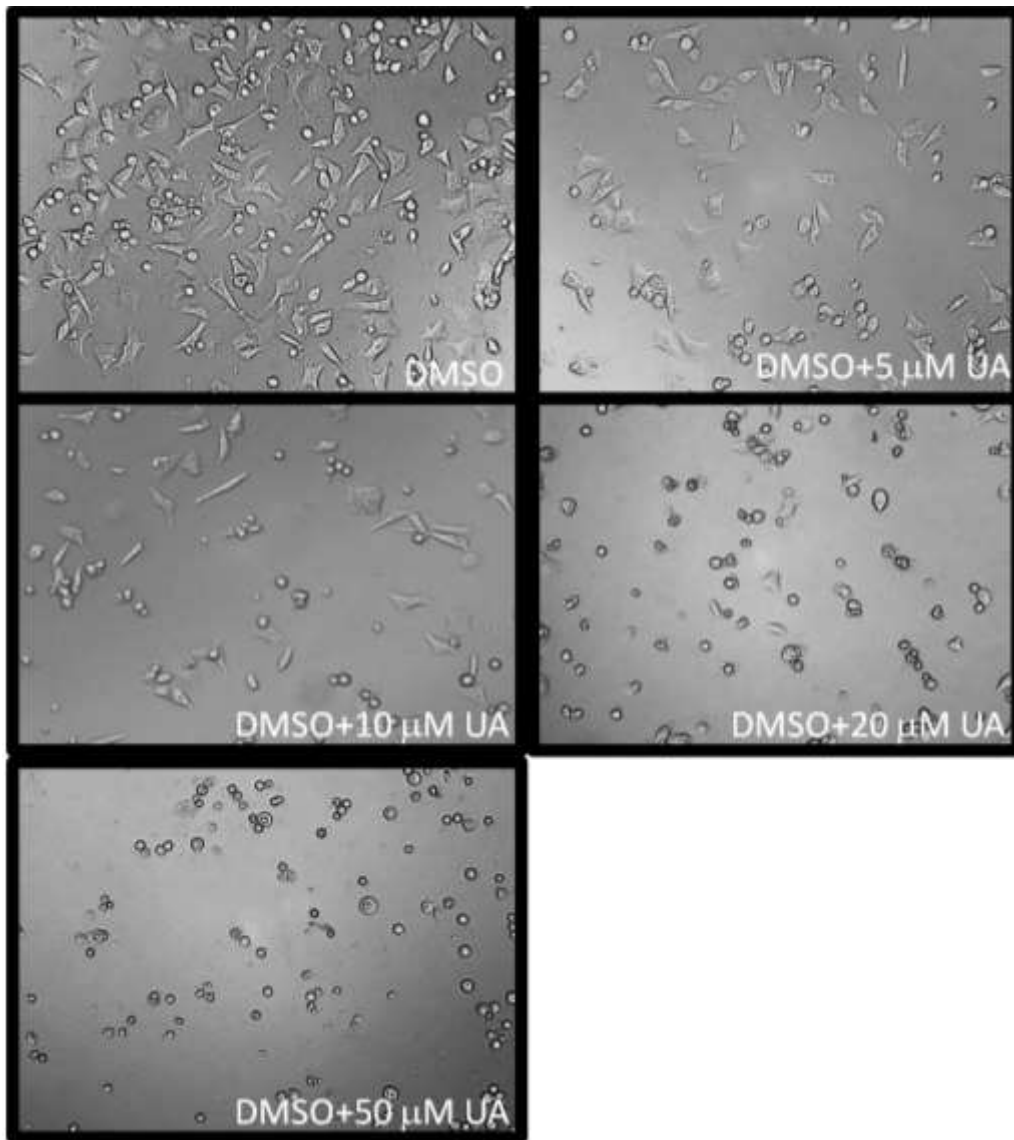


圖 3、SCM-1 胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及不同濃度熊果酸實驗組 48 小時後顯微鏡下細胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

## (二) 分析胃癌細胞於不同濃度熊果酸環境之下，於不同作用時間下的細胞存活率

當加入熊果酸 5  $\mu\text{M}$  至胃癌細胞，在不同時間後，隨著熊果酸作用的時間增加，細胞存活率有明顯下降的趨勢。同樣的效應也出現在於 10、20 及 50  $\mu\text{M}$  等不同實驗濃度組別中。此實驗證實熊果酸在胃癌細胞作用時間越長，其毒殺效果愈見明顯 ( $p < 0.01$ )。同樣熊果酸處理 MKN45 (圖 4A) 和 SCM-1 (圖 4B) 細胞 12 小時之後，熊果酸濃度越高，其細胞存活率有明顯的下降。同樣的趨勢也出現在於 24 及 48 小時等不同時間組別中。這項結果可以確認熊果酸濃度越高，反應時間愈長，對胃癌細胞毒殺效果越為明顯。

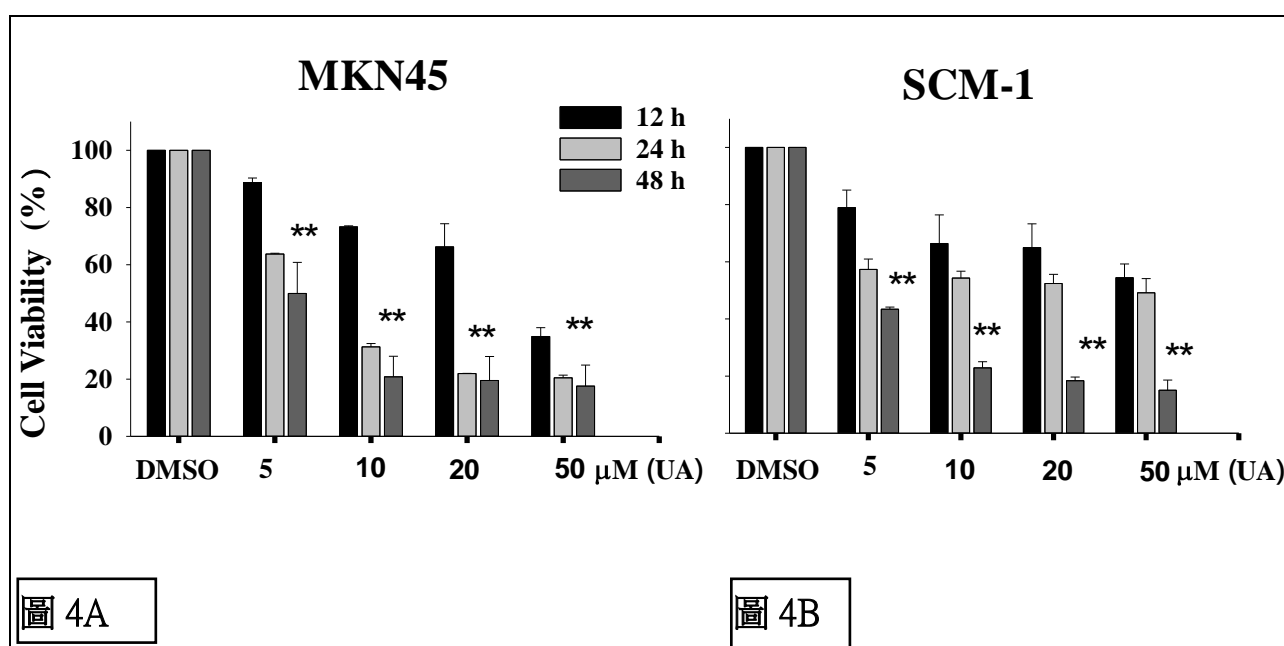


圖 4、胃癌細胞株 MKN45 及 SCM-1 分別加入 DMSO 與不同濃度熊果酸後，於 12、24 及 48 小時後，與 DMSO 溶劑控制組之細胞存活率的比較 (\*\*為  $p < 0.01$ ,  $n=3$ )

### (三) 分析胃癌細胞於不同濃度熊果酸下的細胞凋亡分佈比率

加入熊果酸 2.5  $\mu\text{M}$  以及 5  $\mu\text{M}$  至胃癌細胞 48 小時後，利用流式細胞儀進行分析可以得知：當加入高濃度的熊果酸時，前期以及晚期細胞凋亡比率都有上升的趨勢，但是壞死的細胞比率卻無明顯增加。證明熊果酸會促使細胞凋亡(圖 5A 為 MKN45 細胞的結果，圖 5B 為 SCM-1 細胞的結果)。

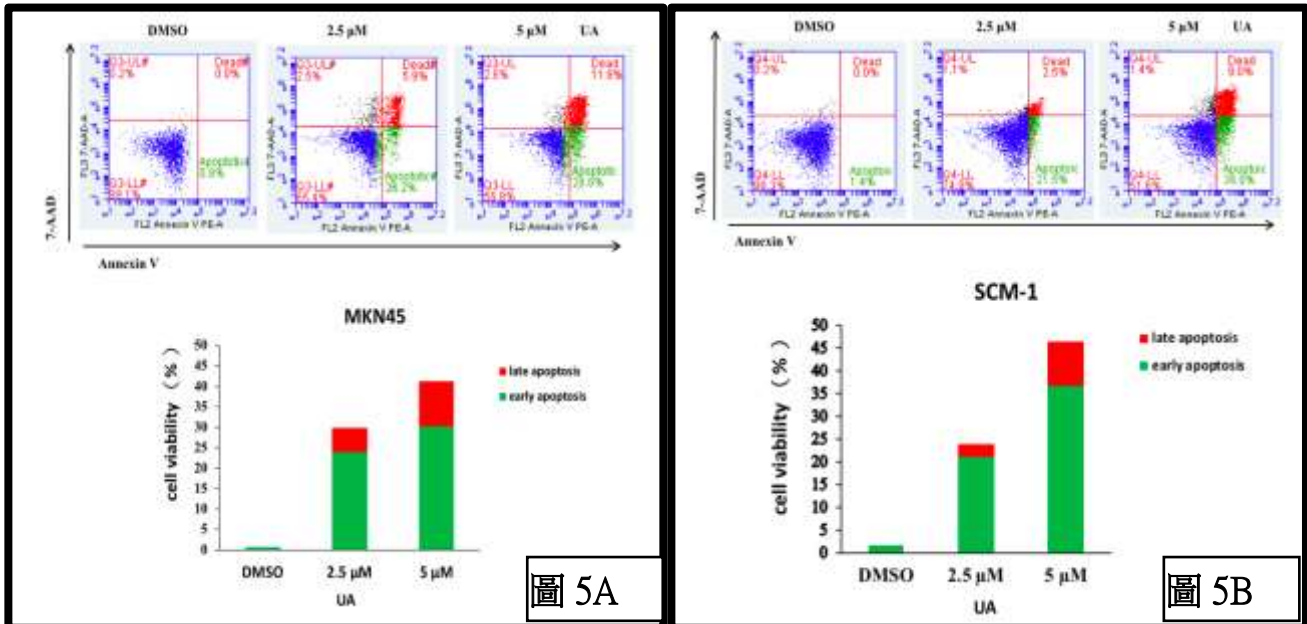


圖 5、MKN45 (A)及 SCM-1 (B)胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及不同濃度熊果酸處理 48 小時後，由雙參數流式細胞儀的分佈圖及前期(green)與晚期(red)凋亡比率分析圖表。



#### (四)熊果酸抑制 Stat3 活性及其下游的訊息傳遞路徑

此實驗利用兩株胃癌細胞，分別為加 5  $\mu$ M 熊果酸的實驗組，及 DMSO 溶劑控制組，培養 6 小時後，將萃取蛋白質以 western blot 分析。實驗顯示經 5  $\mu$ M 熊果酸處理後之胃癌細胞，其 Stat3 訊號傳遞路徑的相關蛋白質，包括 p-Stat3、Stat3、c-Myc 及 Cyclin D1 的表現量皆有顯著的下降(圖 6)。

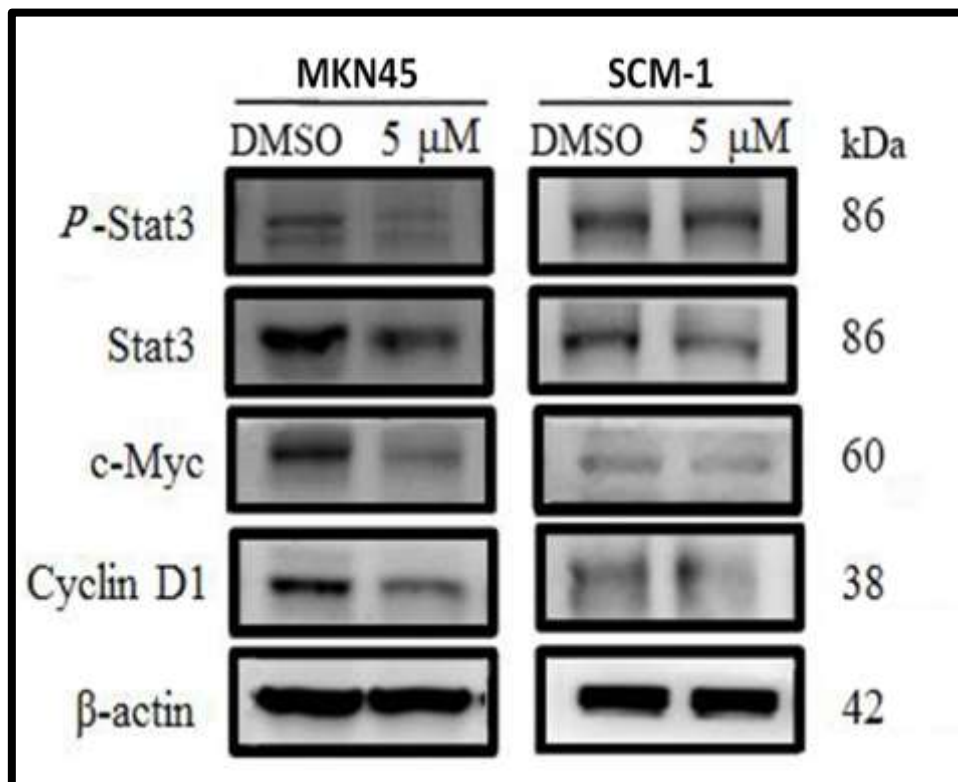


圖 6、以西方墨點法分析熊果酸反應 6 小時，對 MKN45 及 SCM-1 胃癌細胞之 Stat3 訊號傳遞路徑相關蛋白質表現之影響 (實驗包括 DMSO 溶劑控制組及加入 5  $\mu$ M 熊果酸組， $\beta$ -actin 是細胞內恆定蛋白質，用來作為對照基準)。

### (五)熊果酸對胃癌細胞內凋亡蛋白質表現的影響

利用兩株胃癌細胞，分別加入 5  $\mu$ M 熊果酸的實驗組，及 DMSO 溶劑控制組，培養 24 小時後，由 western blot 結果發現：經 5  $\mu$ M 熊果酸處理後之胃癌細胞，相較於未經熊果酸處理的對照組，與細胞凋亡相關蛋白質有明顯差異。由 western blot 結果顯示，促凋亡的蛋白質 Bax 及 Bak 表現量經處理後會有顯著上升，而抗凋亡的蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-xl 之表現量則出現下降的趨勢(圖 7)。

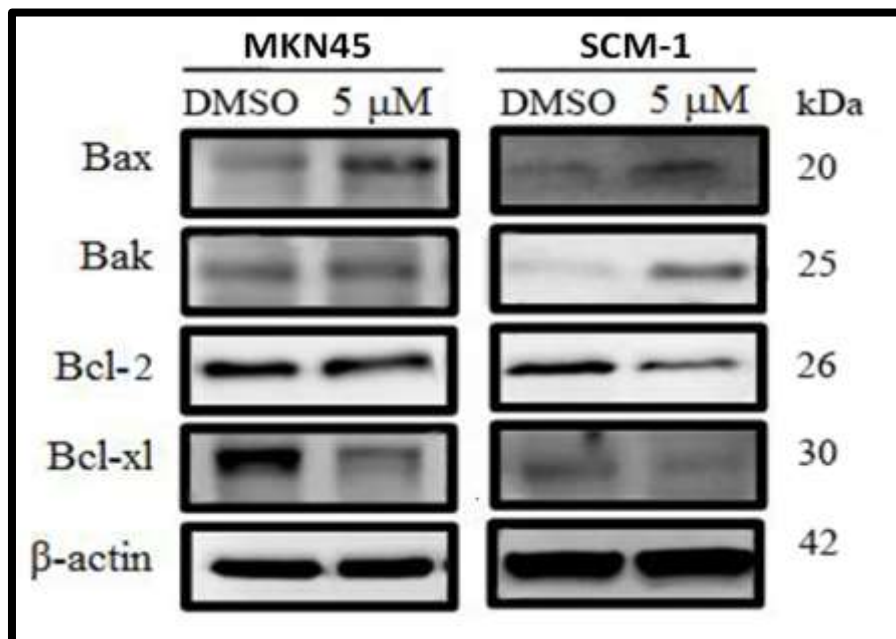


圖 7、以西方墨點法分析熊果酸作用 24 小時，對 MKN45 及 SCM-1 細胞凋亡相關蛋白質之影響 (實驗包括 DMSO 溶劑控制組及加入 5  $\mu$ M 熊果酸組， $\beta$ -actin 是細胞內恆定蛋白質，用來作為對照基準)。

綜合前述實驗結果顯示，熊果酸對毒殺及調控胃癌細胞的分子機制，可以看得出來熊果酸反應 6 小時之後會抑制胃癌細胞內 Stat3 訊號傳遞路徑之相關蛋白表現，包括 p-Stat3、Stat3、c-Myc 與 Cyclin D1 等，證實影響胃癌細胞之存活訊號受到抑制。再由反應 24 小時的結果顯示，抗凋亡的蛋白質 (例：Bcl-2 和 Bcl-xl) 表現量減少，而促凋亡的蛋白質 Bax 和 Bak 等表現量增加，證實熊果酸造成胃癌細胞凋亡是細胞死亡的主要原因。熊果酸是藉由抑制 Stat3 訊息傳遞路徑，達成抗調控凋亡的蛋白質如 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表現(圖 8)。

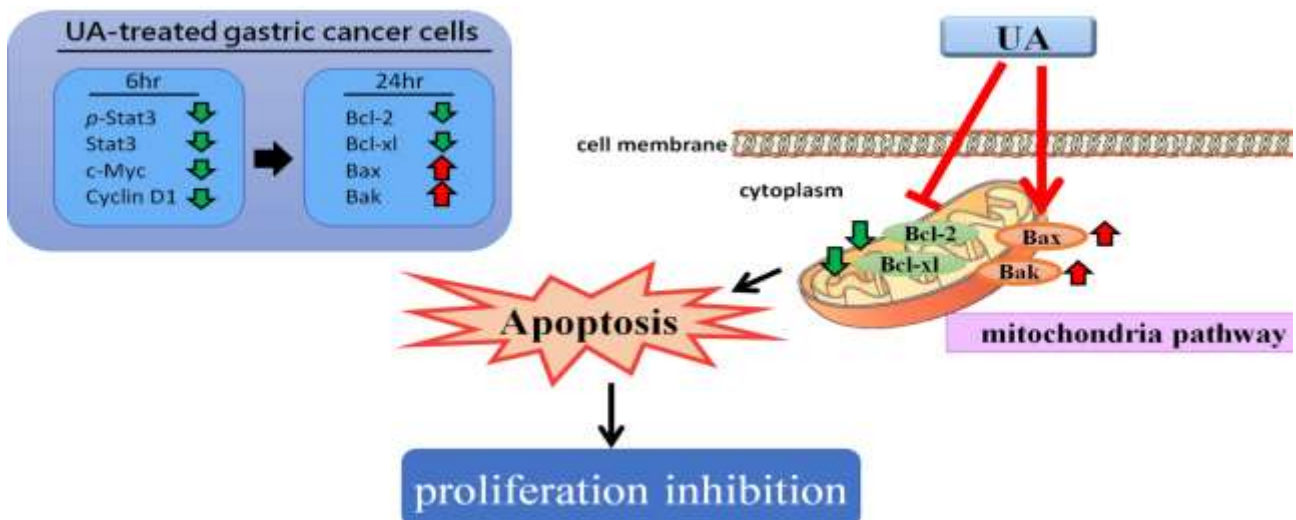


圖 8、熊果酸促進胃癌細胞凋亡的路徑

## 二、順鉑併用熊果酸對胃癌細胞的抑癌效應

### (一)順鉑併用熊果酸顯微鏡下觀察細胞形態變化

先加入順鉑 4 小時後，再加入熊果酸，反應 24 小時後，觀察胃癌細胞形態上的變化，發現合併使用 20  $\mu\text{M}$  順鉑及 10  $\mu\text{M}$  熊果酸共同處理胃癌細胞後，相較於只加入 DMSO 的對照組、20  $\mu\text{M}$  順鉑 28 小時或僅使用 10  $\mu\text{M}$  熊果酸 24 小時的實驗條件下，其細胞數目顯著減少。合併處理情形時，大量細胞會顯現不完整細胞形態、細胞膜皺縮及空泡化現象。圖 9A 與圖 9B 分別為 MKN45 及 SCM-1 細胞在顯微鏡下觀察的結果。

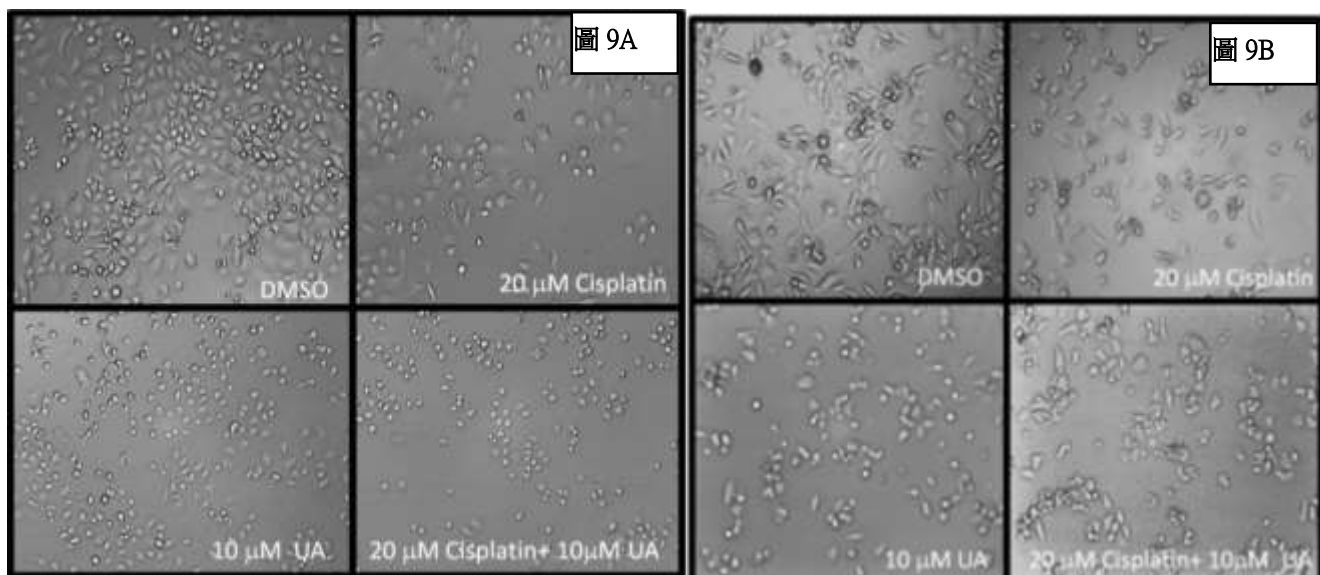


圖 9、分別使用 MKN45 (A)及 SCM-1 (B)細胞加入順鉑 (20  $\mu\text{M}$ ，28 小時)及熊果酸 (10  $\mu\text{M}$ ，24 小時)，以順鉑先處理 4 小時再加入熊果酸 24 小時之後，分別於顯微鏡下觀察細胞形態的變化 (放大倍率為 200 倍)

## (二)、熊果酸合併使用順鉑之後對細胞存活率的影響：

本實驗在含有胃癌細胞的 96 孔盤內先加入 0、2.5、5、10 及 20  $\mu\text{M}$  的順鉑 4 小時後，再加入 0、2.5、5 及 10  $\mu\text{M}$  的熊果酸，培養 24 小時後，使用 SRB assay 檢測的吸光值並計算細胞相對存活率。隨著順鉑濃度的上升，胃癌細胞 MKN45 (圖 10A) 和 SCM-1 (圖 10B) 細胞存活率有明顯下降的趨勢。但是也發現順鉑與熊果酸併用時，在同一濃度的順鉑作用下，若搭配的熊果酸濃度越高，胃癌細胞的存活率越低。推測順鉑搭配熊果酸對毒殺胃癌細胞有相輔相成的效果。

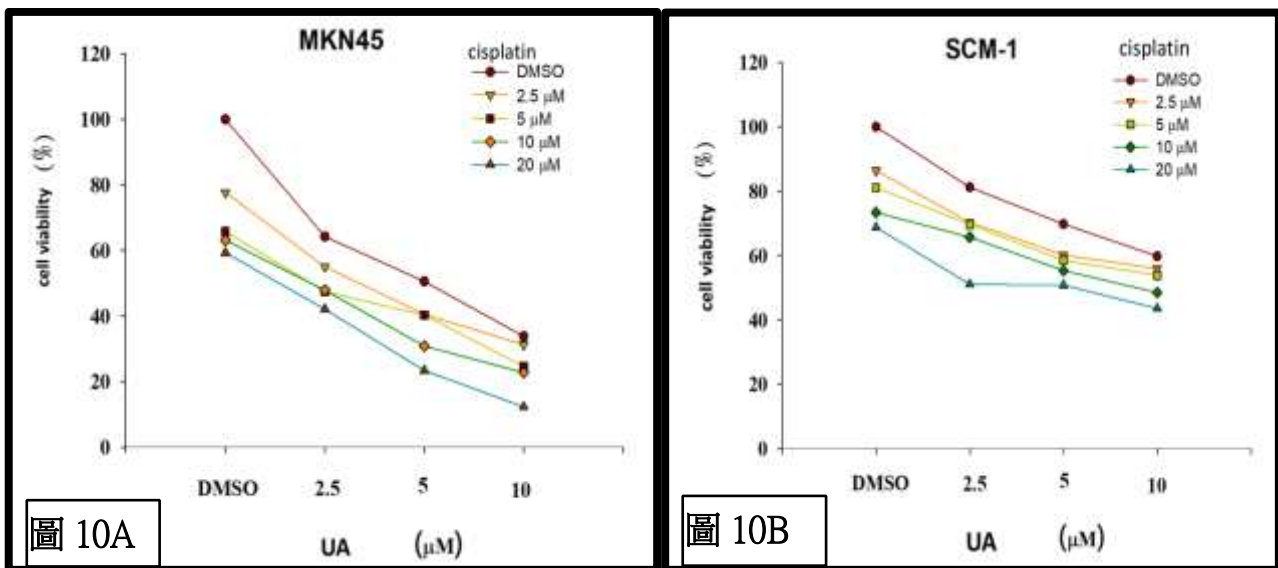


圖 10、MKN45 (A) 及 SCM-1 (B) 胃癌細胞株合併使用順鉑及熊果酸，當加入 0、2.5、5、10 及 20  $\mu\text{M}$  的順鉑 4 小時後，再加入 0、2.5、5 及 10  $\mu\text{M}$  的熊果酸，培養 24 小時後之細胞存活率

## (三) 周塔氏藥物合併指數分析順鉑合併熊果酸對胃癌細胞有協同作用

為了進一步瞭解這兩種藥物輔助的效果，實驗利用 SRB assay 結果，換算出每一實驗組別之細胞死亡率 ( $F_a$ ) 後，再以 ComboSyn 程式計算出熊果酸與順鉑的 CI 值 (表二)。由 Normalized Isobologram for Combination 的每一個點顯示，其比值皆落在三角範圍內，證實兩者藥物合併使用，會造成協同作用，而 MKN45 細胞 (圖 11A) 的比值較 SCM-1 細胞 (圖 11B) 為緊密。CI plot 顯示，當兩種藥物合併使用時，MKN45 細胞 (圖 12A) 的 CI 值較 SCM-1 細胞 (圖 12B) 較小。

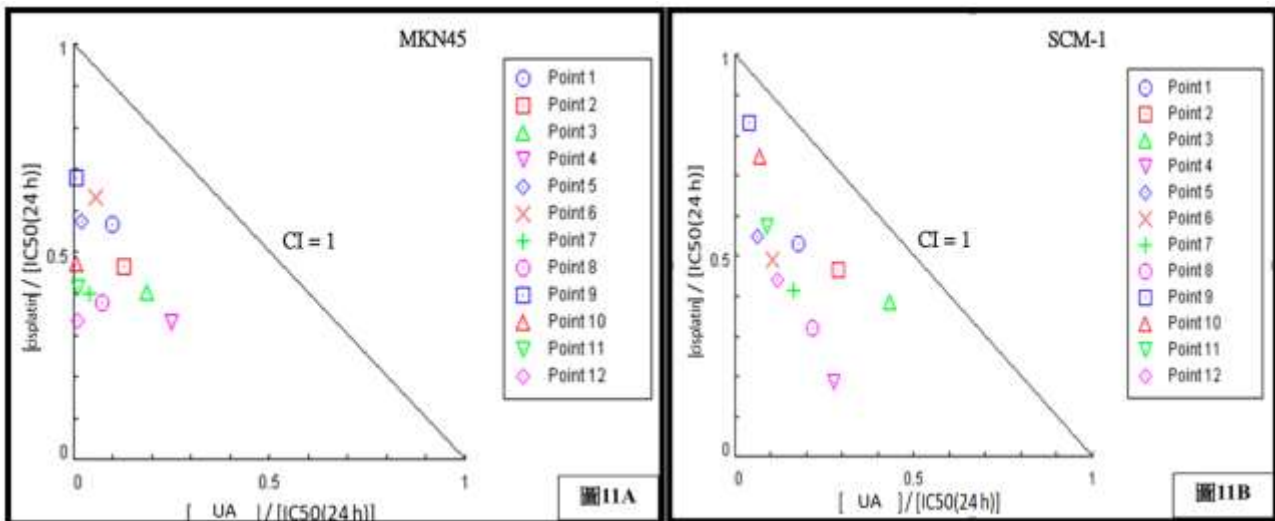


圖 11、根據圖 10，推算 MKN45 (A)及 SCM-1 (B)熊果酸及順鉑合併處理的藥物聯用效應圖 (Normalized Isobologram for Combination)

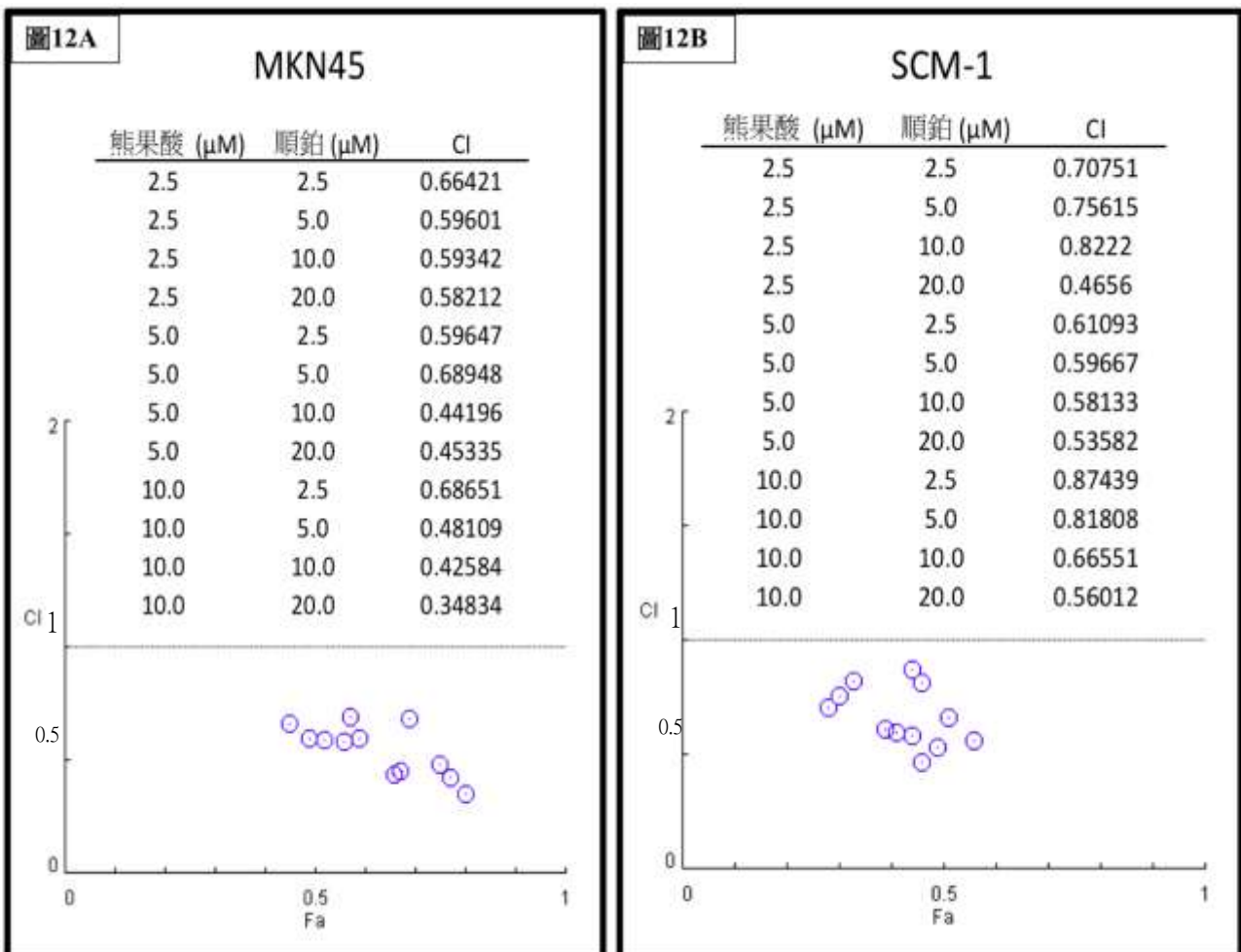


圖 12、根據圖 10，推算 MKN45 (A)及 SCM-1 (B)胃癌細胞株在加入不同濃度的熊果酸及順鉑後，所得到的細胞死亡率 (Fa)及以 ComboSyn 程式換算出的 CI。



#### (四) 分析不同濃度熊果酸合併使用不同濃度順鉑細胞凋亡比率的比較

當加入順鉑 4 小時後，再加入 2.5、5  $\mu\text{M}$  的熊果酸共同作用 24 小時後，重複條件實驗三次。以流式細胞儀進行分析可以得知：相較於單加順鉑或是單加熊果酸，無論 MKN45 (圖 13A)及 SCM-1 (圖 13B)細胞的細胞凋亡比率均有明顯提升，但是細胞壞死的細胞比例並無明顯增多。進一步分析，無論 MKN45 (圖 14A)及 SCM-1 (圖 14B) 的細胞凋亡前期以及細胞凋亡晚期的比例都較單用順鉑或是單用熊果酸處理增加許多。此實驗結果證實熊果酸與順鉑合併使用會促進細胞凋亡。

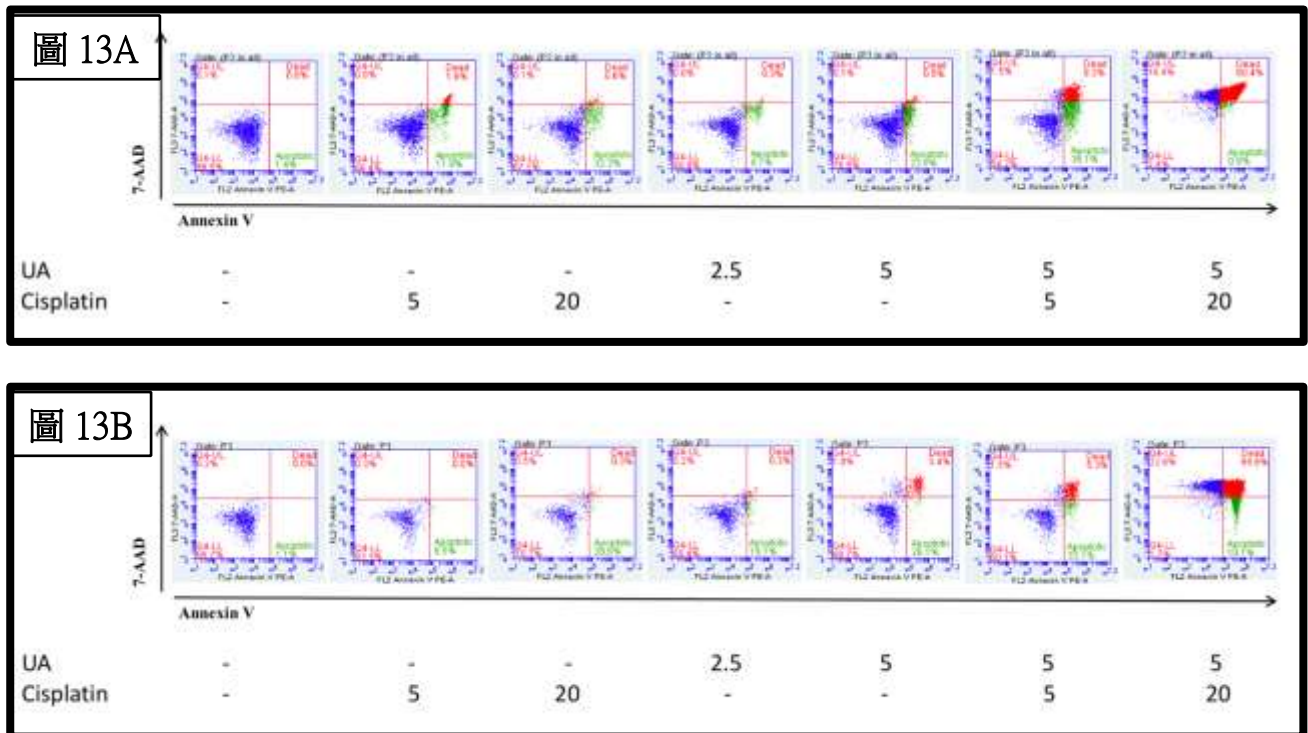


圖 13、MKN45 (A)及 SCM-1 (B)胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及分別加入 5、20  $\mu\text{M}$  順鉑 4 小時，再加入 2.5、5  $\mu\text{M}$  的熊果酸 24 小時後，由雙參數流式細胞儀的分佈圖

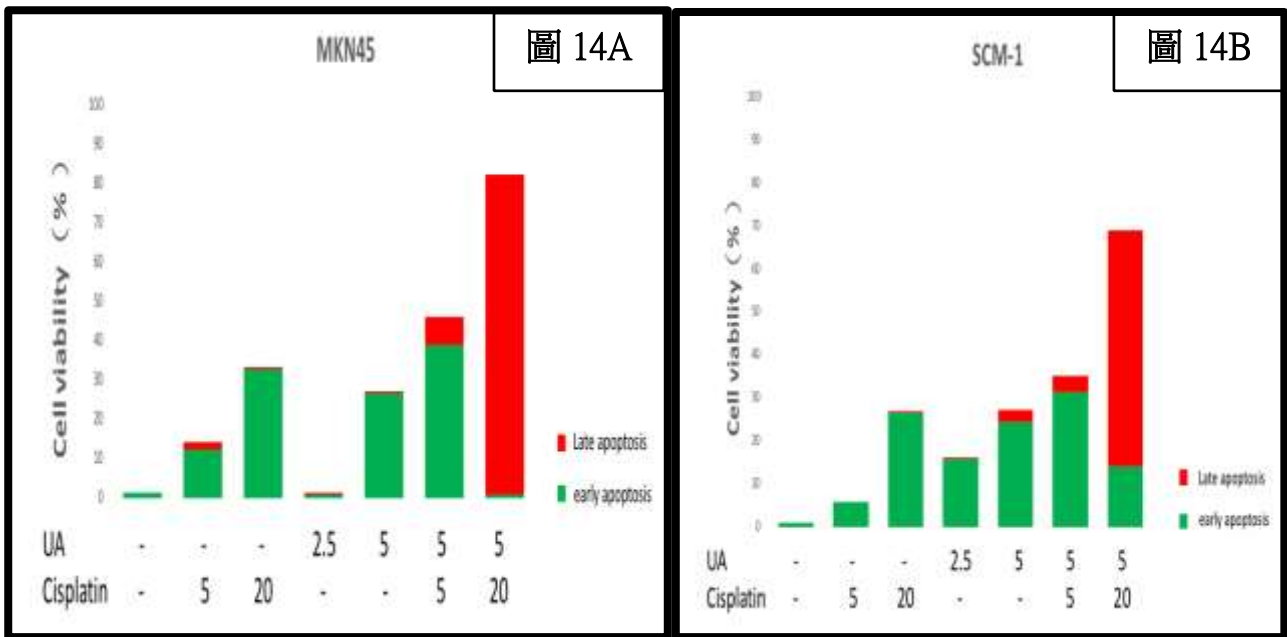


圖 14、MKN45 (A)及 SCM-1 (B)胃癌細胞於 DMSO 溶劑控制組及分別加入 5、20  $\mu$ M 順鉑 4 小時，再加入 2.5、5  $\mu$ M 的熊果酸共同作用 24 小時後，由雙參數流式細胞儀的分佈圖換算出前期(green)與晚期(red)凋亡比率分析圖表

### (五)以西方墨點法探討細胞凋亡相關蛋白質的變化

此實驗使用 MKN45 細胞，設計實驗分別為:DMSO 溶劑控制組、及單用順鉑(5  $\mu$ M)、單用熊果酸(5  $\mu$ M)，及合併相同濃度順鉑及熊果酸共同作用(將細胞加入順鉑 4 小時培養後，再加入熊果酸共同作用 24 小時) 四組。將萃取蛋白質以 western blot 分析。實驗顯示單用順鉑、單用熊果酸皆會使不活化態的 pro-caspase 9 轉變為活化態 caspase 9。尤其以合併順鉑及熊果酸合併使用實驗組最為明顯。大量的不活化態的 pro-caspase 9 轉變為活化態 caspase 9。

細胞凋亡的內在路徑過程中，會使不活化態 pro-caspase 9 轉變成被裁切為活化態 caspase 9 後，因而產生蛋白酶活性而使細胞走向一個不可逆的凋亡過程。

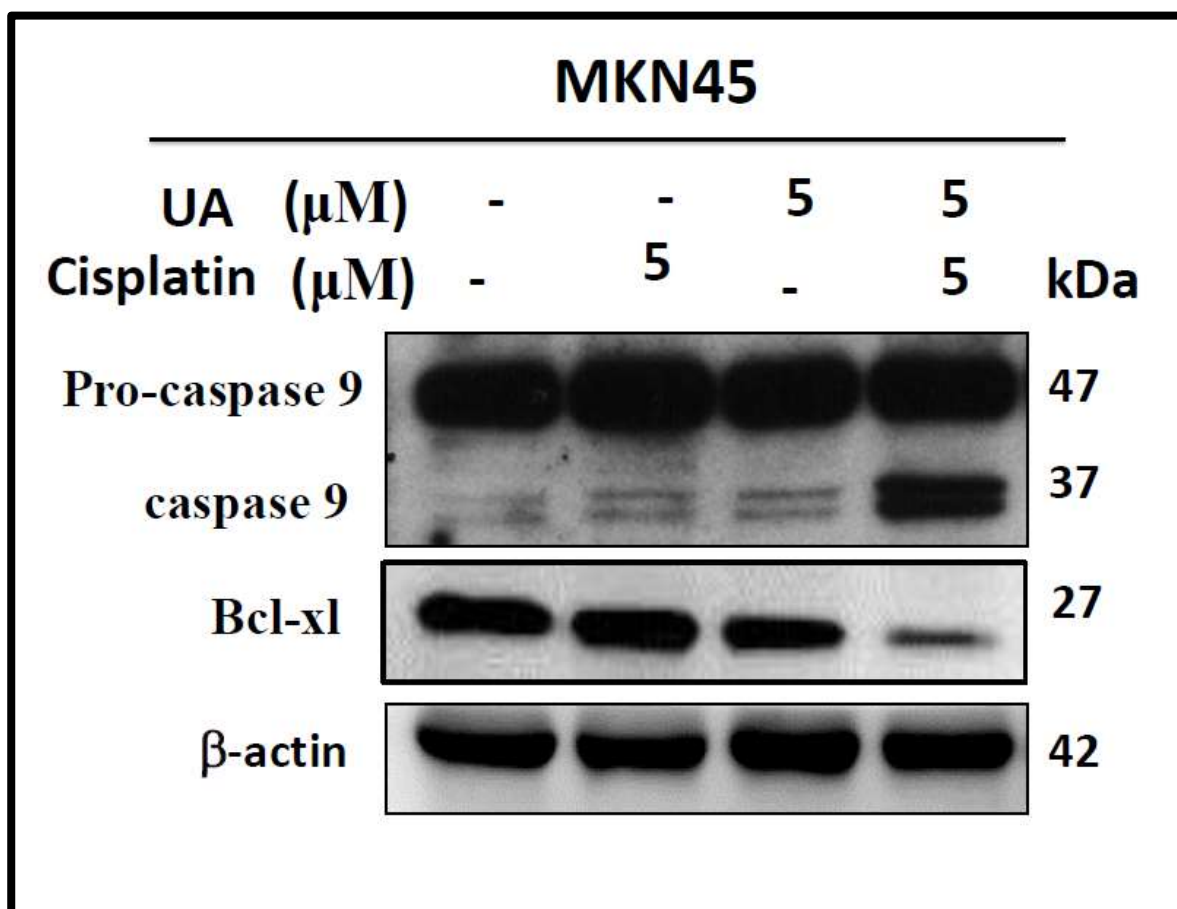


圖 15、以西方墨點法分析 MKN45 細胞加入熊果酸及合併順鉑使用對細胞凋亡內在路徑起始者 caspase 9 之變化。(實驗包括 DMSO 溶劑控制組、單用順鉑、單用熊果酸及相同濃度兩藥合併使用組，Bcl-x1 抗細胞凋亡蛋白質及  $\beta$ -actin，用來作為對照組)。



根據本研究結果及兩個研究目的，分別進行以下討論：

**研究目的一：探討熊果酸對胃癌細胞生長的影响，並檢測所誘導細胞凋亡相關機制的變化。**

熊果酸是白花蛇舌草萃取物的主要成份 (wei et al., 2015)。由顯微鏡觀察及 SRB assay 發現，熊果酸會造成 MKN45 與 SCM-1 兩株胃癌細胞存活率下降，使細胞形態產生皺縮及空泡化，並且存活細胞數及細胞形態均有明顯變化。由 SRB 細胞存活率分析以 0 至 50  $\mu\text{M}$  熊果酸處理人類 MKN45 及 SCM-1 胃癌細胞，觀察其毒殺效果。結果顯示當同一濃度熊果酸作用下，反應時間越長，細胞存活率越低，證實有時間依存效應 (time-dependent manner)。此外也發現同一作用時間，熊果酸濃度越高，細胞存活率越低，明顯的顯示濃度依存效應 (dose-dependent manner)。並從流式細胞儀的結果得知，加入越高濃度的熊果酸，會促使細胞凋亡的比例明顯增多。以上結果證實，熊果酸有明顯的抑制胃癌細胞增殖的效應，並且是以細胞凋亡的方式促使細胞死亡，以降低胃癌細胞的存活率。也有研究指出，白花蛇舌草可以用來治療胃疾 (董 2017)，這個實驗顯示證實了這個說法。

進一步探討胃癌細胞凋亡之相關蛋白質變化。以劑量 5  $\mu\text{M}$  之熊果酸處理的胃癌細胞，在 6 小時及 24 小時兩個時間點，收集蛋白質使用西方墨點法觀察熊果酸對胃癌細胞造成的相關機制。由反應 6 小時的 western blot 發現，熊果酸可顯著抑制胃癌細胞內 Stat3 訊息傳遞路徑之相關蛋白，包括 *p*-Stat3、Stat3、c-Myc、Cyclin D1 蛋白質，進而抑制癌細胞生長；而反應 24 小時的結果發現，抗凋亡的蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-x1 的表現量驟降的過程，而 Stat3 是細胞內重要的致癌基因，它可以調控胃癌細胞增殖 (Kanda et al., 2004)；人類胃癌細胞中的 *p*-Stat3 與腫瘤侵襲性及病人的存活預後有密切關係 (Yakada et al., 2007)，另一方面，熊果酸可抑制多發性骨髓瘤 (Pathak et al., 2007)、肝癌細胞 (Liu et al., 2017) 及腎細胞癌與乳癌 (Li et al., 2015) 的生長，並且造成細胞凋亡，其主要機制是抑制 Stat3 訊息傳遞路徑；甚至在動物實驗也證實熊果酸可以毒殺子宮頸癌細胞 (Wang et al., 2017)。本實驗證實，細胞凋亡是熊果酸造成胃癌細胞死亡的主要原因，其調控胃癌細胞之分子機制的確是藉由抑制 Stat3 訊息傳遞路徑，降低抗凋亡的蛋白質 Bcl-2 和 Bcl-x1，而且促進凋亡的蛋白質 Bax 及 Bak 的上升，這個結果與過去不同癌症的結果相近。

## 研究目的二：檢視合併使用熊果酸及順鉑對胃癌細胞所造成的協同抑制效應。

由本研究結果證實，熊果酸的確能提高胃癌細胞對藥物的敏感性，也就是增強化療藥物順鉑的治療效果，達到多種藥物共同治療的協同作用。過去也有類似方式結合植物萃取物協助順鉑在肝癌治療的藥效的報導(Júnior et al., 2012)。僅僅使用熊果酸需要 48 小時才可明顯看出細胞存活率及凋亡比例的變化，但在實驗結果中熊果酸併用順鉑只需 24 小時，就可以明顯看出細胞存活率降低及細胞凋亡前期與晚期比例明顯的增加。過去使用熊果酸來治療多發性骨髓瘤的文章中指出，熊果酸可以增加化學治療藥物的效應 (Pathak et al., 2007)，這個報導與本研究結果一致。本研究主要是發現熊果酸協助抗胃癌細胞效應及相關凋亡機制，實驗僅使用於細胞實驗。其結果是否能推廣至人體使用，後續仍需加入的動物實驗，以證實其有效性及安全性。儘管順鉑的化學療法對於胃癌患者的存活有幫助，但隨之而來的腎衰竭和嚴重的副作用，甚至因為高劑量對患者所伴隨的抗藥性，使得順鉑治療劑量必須調整，因此為適應病人的需要，使用聯合療法(Offerman et al., 1984)，若能降低劑量，並且持續化學療法的功效有其必要，本研究證實熊果酸是一個具有潛力的藥物。

## 肆、結論與應用

胃癌是國內常見的消化道惡性腫瘤，本研究發現中草藥白花蛇舌草的主要成分熊果酸能有效抑制胃癌細胞的增生，實驗證實它能對胃癌細胞 MKN45 及 SCM-1 有明顯毒殺的效果。實驗觀察細胞形態與數量的改變，並且以 SRB 分析細胞存活率，及流式細胞儀來分析皆證實熊果酸能透過促使胃癌細胞走向細胞凋亡的方式以抑制胃癌細胞生長。由西方墨點法發現，熊果酸能促使胃癌細胞中的 stat3 下降，促細胞凋亡的蛋白質表現上升，抗細胞凋亡的蛋白質表現下降，證實熊果酸能誘導細胞凋亡。由周塔氏藥物合併指數分析顯示，若能合併熊果酸與目前胃癌常用藥物順鉑，可以達到協同的效果，這項結論也證實白花蛇舌草的藥效與熊果酸相關。若能再做進一步開發研究，對這個中藥成分使用於胃癌的治療上，應該具有相當程度的潛力。

## 伍、參考文獻

1. 董筠。2017。基於數據挖掘探討周仲瑛治療胃癌術後轉移的用藥規律分析。江南中醫藥 49(6):62-65.
2. Chen, R., He, J., Tong X., Tang, L., Liu, M. 2016. The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics. *Molecules* 30;21(6):710.
3. Chou, T. C. 2011. The mass-action law-based algorithms for quantitative econo-green bio-research (Perspective article). *Integrative Biol* 3:548-559.
4. Júnior R, et al. 2012. Growth inhibitory effects of Phyllanthus niruri extracts in combination with cisplatin on cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 18(31):4162-4168
5. Kanda, N., Seno, H., Konda, Y., Marusawa, H., Kanai, M., Nakajima, T., Kawashima, T., Nanakin, A., Sawabu, T., Uenoyama, Y., Sekikawa, A., Kawada, M., Suzuki, K., Kayahara, T., Fukui, H., Sawada, M., Chiba, T. 2004. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with surviving expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 23(28):4921-4929
6. Li, W., Zhang, H., Nie, M., Tian, Y., Chen, X., Chen, C., Chen, H., Liu, R. 2017. Ursolic acids derivative FZU-03,010 inhibits STAT3 and induces cell cycle arrest and apoptosis in renal and breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 49(4):367-373.
7. Liu, T., Ma, H., Shi, W., Duan, J., Wang, Y., Zhang, C., Li, C., Lin, J., Li, S, Lv, J., Lin, L. 2017. Inhibition of STAT3 signaling pathway by Ursolic acid suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 51(2):555-562.
8. Offerman, J. J., Meijer, S., Sleijfer, D. T., Mulder, N. H., Donker, A. J., Koops, H. S., van der Hem GK.1984. Acute effects of cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) on renal function. *Cancer Chemother Pharmacol* 12: 36 - 38.
9. Pathak, A. K., Bhutani, M., Nair, A. S., Ahn, K. S., Chakraborty, A., Kadara, H., Guha, S., Sethi, G., Aggarwal, B. 2007. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res* 5(9):943-955.
10. Wang, S., Meng, X., Dong, Y. 2017. Ursolic acids nanoparticles inhibit cervical cancer growth in vitro and in vivo via apoptosis induction. *Int J Oncol* 50(4):1330-1340.
11. Wei, M-C., Yang, Y-C., and Hon, S-Jen. 2015. Determination of oleanolic and Ursolic acids in *Hedyotis diffusa* using hyphenated ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and

chromatography. *Evid Based Complement Alternat Med* 450547:1-10

12. Xiao, S., Xiao, S, Xi, X., Tang, Fe., Juan, Dai., Liu, J., Lei, J., Wang, L. 2016. Subcritical water extraction of Ursolic acid from *Hedyotis diffusa*. *Appl Sci* (7)187:1-13.
13. Yakata, Y., Nakayama, T., Yoshizaki, A., Kusaba, T., Inoue, K., Sekine, I. 2007. Expression of *p*-Stat3 in human gastric carcinoma: significant correlation in tumour invasion and prognosis. *Int J Oncol* 30(2):437-442.

## 【評語】 090012

本研究目的是研究中草藥白花蛇舌草的主要成份熊果酸 (Ursolic Acid, UA) 對於胃癌細胞增生的影響，也研究 UA 合併使用化療藥物順鉑(cisplatin)對胃癌細胞存活率的影響。證實 UA 協同順鉑能抑制胃癌細胞的增生，是因為促進細胞凋亡效應所造成。

1. 熊果酸處理後 SCM1 的 p-Stat3,c-Myc 並沒有降低(Fig 6)
2. Fig 5, 10, 14 缺乏統計分析
3. 類似的實驗已經有人研究過了，宜突顯本實驗新發發現的地方