

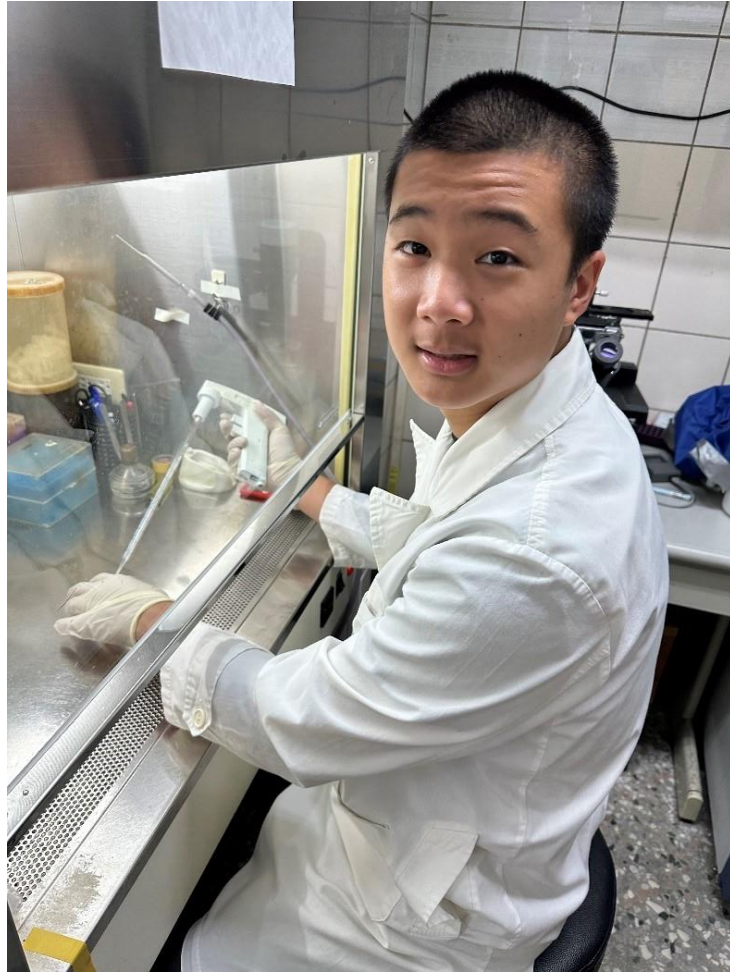
2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090014
參展科別 醫學與健康科學
作品名稱 原著蘆皂苷對腎臟癌細胞的影響
得獎獎項 體外生物學協會獎

就讀學校 嘉義縣私立協同高級中學
指導教師 蔡任弼、盧俊達
作者姓名 陳昱安

關鍵詞 原著蘆皂苷、細胞凋亡、腎臟癌細胞

作者簡介



教授們好，我叫陳昱安，目前就讀協同中學高中二年級，我從小對稀奇的東西感到好奇，往往會追根究柢的找出答案。我的父親是一名醫生，從小耳濡目染之下，我也對癌症研究產生好奇及探索的心。這次，在父親的同事幫助下，如期進行此次研究計畫，希望透過這次研究主題，能夠發現有效抑制腎臟癌之天然藥物。這次能夠順利進入複賽，由衷感謝我的兩位指導老師，讓我在研究知識及實驗技巧方面收穫良多。

摘要

癌症治療多半會傷害到人體的健康，所以國民大多較偏好以較養生的方法來治療癌症，例如中藥。本實驗以山藥萃取物原薯蕷皂苷抑制腎癌細胞 A498 及 786-O，期望能達抑制腎臟癌細胞增生之目的。

實驗方法包括以 MTT 試驗、細胞菌落試驗來觀測腎癌細胞受原薯蕷皂苷作用後的活性及存活量，再透過西方墨點法及流式細胞儀來了解腎臟癌細胞死亡途徑。實驗結果顯示將原薯蕷皂苷抑制人類腎癌細胞株 786-O 及 A498 的增生能力具有抑制的能力。再透過流式細胞儀的分析，顯示原薯蕷皂苷可誘發兩種腎臟癌細胞的凋亡作用，並且透過西方墨點法觀察出是抑制 Bcl-2 蛋白、增加 Bax 蛋白和 caspase-9/PARP 蛋白的表現，進而導致腎臟癌細胞株產生細胞凋亡。

本研究是在實驗室中進行，且只是利用細胞株來觀測此項研究結果。或許未來可以透動物實驗以及臨床實驗，確認原薯蕷皂苷抗癌之功效，並推廣至全球以造福全人類之健康。

Abstract

Because cancer treatment will mostly harm human health, most people currently prefer to use more health-preserving methods to treat cancer, such as traditional Chinese medicine. This experiment will use yam extract PD to inhibit renal cancer cells A498 and 786-O, hoping to achieve the purpose of inhibiting cell activity and growth.

In this experiment, MTT assay and colony formation will be used to observe the activity and survival of renal cancer cells after being acted by PD, and then we will use Western blotting and flow cytometry to understand the death pathway of renal cancer cells. The experimental results showed that when the human renal cancer cell lines 786-O and A498 were treated with PD, the medicament had the ability to inhibit the two cancer cell lines. Through flow cytometry analysis, it was shown that the PD can induce the apoptosis of two cancer cell lines, and the way of inducing apoptosis can be observed by Western blotting method to decreased the expression of Bcl-2 and increased the expression of Bax, cleaved-caspase-3/-PARP in RCC cells, This in turn leads to apoptosis in human renal cancer cell lines.

Because the experiment is carried out in the laboratory, and only the use of cell lines to observe the results. Perhaps in the future, the efficacy of PD can be confirmed through in vivo animal experiments and clinical experiments, and promoted to the world to benefit the health of all human beings.

壹、前言

一、研究動機

近年來，國內十大死因居首的往往是癌症，癌症有很多種，其中腎臟癌是全世界最普遍的惡性腫瘤之一，雖不屬前十大癌症之列，但因發病初期並沒有明顯的症狀，導致當發現腎臟癌時，已經屬於中、後期腎臟癌。腎臟癌的肇因並沒有定論，但根據研究指出吸煙、肥胖、化學及環境致癌物質、接受女性荷爾蒙治療者、放射線和病毒、藥物濫用等因子可能造成腎癌。目前對於癌細胞的主要治療方式為外科手術切除為主，因為單純的化療或放射線治療對人體具有相當大的副作用與傷害，且在殺死癌細胞的同時也會造成正常細胞的傷害。腎臟癌細胞對於人體多個器官皆具有傷害性，而腎臟作為人體重要的新陳代謝器官，遭受到癌細胞入侵，想必會使人體受到莫大的傷害。

由於科學中藥的興起，中藥中的許多成分，可以透過溫和的方式對人體進行治療。文獻中有描述到原屬蘘皂苷 (PD) 具有抑制其他癌細胞的潛力，例如其能誘導子宮頸癌細胞 HeLa 以及子宮頸癌細胞 C33A 產生細胞凋亡[1]，因此想了解透過原屬蘘皂苷的處理，對於腎臟癌細胞的影響。

二、研究目的

本研究期望透過原屬蘘皂苷處理腎癌細胞株(A498 及 786-O)，探討原屬蘘皂苷對腎癌細胞的影響。研究的目標主要為以下三點：

1. 觀察原屬蘘皂苷是否會影響細胞的存活率。
2. 探討原屬蘘皂苷是否會誘發腎癌細胞的細胞凋亡。
3. 利用西方墨點法確認細胞死亡途徑。

三、文獻探討

(一) 原屬蘘皂苷(PD)

原屬蘘皂苷(PD，化學式:C₅₁H₈₄O₂₂)是一種有毒的甾體皂甘，常見於中草藥穿龍薯蕷(Dioscorea nipponica Makino)的根部以及蒺藜(Tribulus terrestris)的根部以及果實之中。穿龍薯蕷的萃取物已被證實可以抑制人類口腔癌細胞 HSC-3 的轉移和侵襲的能力[2]；同時在肝癌細胞 Hep-G2 和慢性骨髓性白血病血癌 K562 細胞中，穿龍薯蕷的萃取物亦被證實可以抑制癌細胞的轉移和侵襲能力[3][4]，顯示出穿龍薯蕷的萃取物含有具有抗癌能力的天然化合物。而針對原屬蘘皂苷抗癌能力的相關研究中，則是發現 PTD 會誘導血癌細胞 HL-60 進行細胞凋亡，但對胃癌細胞 KATO III 卻不會有影響；同時也有研究指出 PTD 能夠誘導細胞進行凋亡，顯示出原屬蘘皂苷的抗癌活性具有細胞特異性。

(二) 腎臟癌細胞株(786-O 及 A498)

在實驗中常用的腎臟癌細胞株包括 786-O 和 A498 細胞。其中，786-O 來自一名 58 歲的人類，為腎臟的上皮細胞；A498 細胞株則是來自一名 52 歲的女性。兩者皆屬於原發性腎臟癌細胞。

(三) 細胞凋亡(apoptosis)

1972 年，Kerr、Wyllie 及 Currie 提出了細胞凋亡的概念，描述一種與細胞壞死不同的細胞死亡機制[5]。細胞在發生凋亡過程中細胞質濃縮，細胞骨架蛋白被蛋白酶破壞細胞凋亡發生在真核多細胞生物在發育過程之中，除了產生新的細胞之外，也需要伴隨一些細胞的死亡才能控制體內細胞的總數，而推動細胞死亡的步驟稱為-細胞凋亡。細胞凋亡常常發生在單一細胞或是一小群細胞群落，且細胞凋亡時要進行特定的步驟達成，此時在細胞外觀上開始出現：細胞外型皺縮且細胞膜產生氣泡、核染質開始濃縮、核內 DNA 之片段化發生、形成凋亡小體等，此時細胞內部執行細胞凋亡的蛋白質正大量表現，調控細胞凋亡之蛋白 Caspases 此類蛋白為 protease 的一種，是細胞凋亡的執行者。細胞凋亡的兩條主要路徑分別為透過 death receptor 活化的外源性凋亡途徑(extrinsic apoptosis pathway)以及透過粒線體的內源性凋亡途徑(intrinsic apoptosis pathway) [6]。

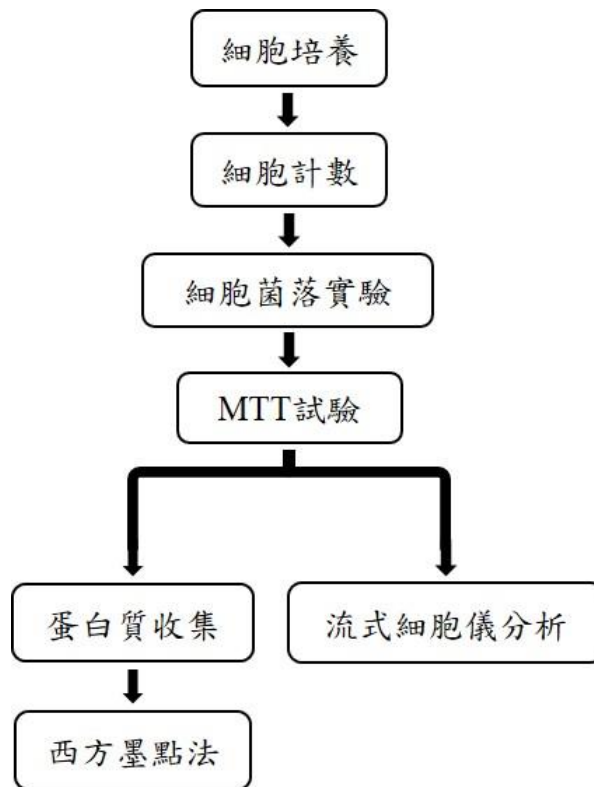
(四) 細胞自噬 (Autophagy)

細胞自噬在 1960 年代被法國科學家 Christian René de Duve 所發現，但過去被認為只是細胞維持體內平衡一個簡單機制，直到近幾年研究發現許多疾病與自體吞噬有密切關係。自體吞噬指細胞能夠藉由自己的溶酶體將自身的老化胞器或蛋白質進行分解，普遍被認為是調控細胞生長、分化、體內平衡之要機轉，目前已有多份研究表明自噬在許多細胞的分化進程中被不同程度地觸發[7]，例如參與血管生成[8]、成骨分化[9]、脂肪生成[10]、神經發生[11]等過程。

自體吞噬過程可以分成三個時期：1.起始期、2.延展期、3.成熟期。當誘導自體吞噬時，細胞質中會發展出隔離膜進而圍繞在欲清除物質周圍。在延展期時，隔離膜會發展新的膜結構，而完整包覆欲清除物質，即形成所謂的自噬體。而在成熟期時，自噬體會與溶酶體結合形成自噬溶酶體，最後藉由溶酶體內大量消化酵素，對包覆的物質進行降解或清除，可以與細胞凋亡一起調控細胞的生長與死亡。過去的研究認為細胞自噬是細胞用來抵抗不適當的環境尋求生存的反應；然而研究的結果顯示，細胞誘發過度的細胞自噬反而會促成細胞凋亡[12]。

貳、研究方法或過程

一、研究架構與流程



二、研究設備與材料

(一) 細胞株

人類腎細胞癌 786-O 細胞株、人類腎細胞癌 A498 細胞株。

(二) 藥品及試劑

Trypsin、培養液 (medium) RPMI + Glucose + 10%FBS + 1% P/S + 1 mM Sodium pyruvate、MTT 染料、methanol、Giemsa stain solution、PBS、protein lysate。

(三) 器材

微量吸管分注器、真空吸取器、無菌操作平台、細胞培養箱、恆溫水槽、吸量管 10 ml/1000 μ l/100 μ l、10 公分培養皿、6 公分培養皿、冰塊、高速低溫離心機、15mL 離心管、50mL 離心管、6 孔盤、12 孔盤、ELISA reader、protein lysate、流式細胞儀、Western Blot 電泳槽、Western Blot 轉移槽、多功能冷光影像分析儀。

三、研究方法

(一) 細胞存活率分析 (MTT assay)

MTT assay 是透過測量細胞的代謝活性，進而了解細胞存活率的一種檢測方式。MTT(全名為 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)是一種可接受氫離子的黃色染料，在活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶 (SDH) 和細胞色素 C 的作用下四氫唑環會開裂，生成紫色的甲臍(formazan, $C_{14}H_{14}N_4$)結晶，若是在死細胞則會因為琥珀酸脫氫酶的消失，導致 MTT 還原的反應不發生。之後利用二甲基亞砷 (DMSO) 將甲臍 ($C_{14}H_{14}N_4$) 溶解出來，再透過吸光度的測定去評估有多少細胞存活，而吸光度正代表了活細胞數目。因此可利用上述原理得知，透過不同藥量，其所對應的不同存活率。

(二) 細胞菌落試驗 (Colony Formation)

細胞培養技術是在體外模擬適當環境，進行細胞培養。在非整倍體無限細胞系和癌細胞株中，仍然存在不同細胞亞群，它們的功能和生長特點有些差異，其中有些亞群細胞對培養環境有較大的適應性和具有較強的獨立生存能力，細胞集落率高。純化細胞群來自一個共同的祖細胞，細胞遺傳性狀、生物學特性相似，利於實驗研究。原代培養細胞和二倍體有限細胞系，細胞集落率很低。細胞集落化培養之前，應先測定細胞集落形成率，以了解細胞在極低密度條件下的生長能力。細胞集落形成率單個細胞在體外增殖 6 代以上，其後代所組成的細胞群體，稱為集落。每個集落含有 50 個以上的細胞，大小在 0.3-1.0mm 之間。集落形成率表示細胞獨立生存能力。[17]

(三) 西方墨點法 (Western Blot)

西方墨點法是分子生物學、生物化學和免疫遺傳學中常用以檢測蛋白質表現量的實驗方法。其利用特定抗體能夠專一結合其抗原蛋白質的原理，對目標樣品進行著色，通過分析成像的位置和訊號深淺，獲得特定的目標蛋白質在擬分析的細胞或組織中表現情況之資訊，為分析檢測特定蛋白質之生物學檢測技術。傳統的西方墨點法，是利用底片來接收薄膜上的冷光、螢光或者放射線訊號，再利用顯影液、定影液將底片上的潛像黑化而形成灰階影像。但現今在臨床、生物醫學與生命科學研究領域中，傳統 X 光底片的使用已日漸式微，以數位光電感應器(CCD)進行影像擷取已經成為新的趨勢。因為以 CCD 取得影像的方式不但效率遠高於傳統 X 光片曝光沖洗，在檔案管理、存放、備份以及調閱上更是具有絕對的優勢，同時完全無任何額外的一般或是有毒廢棄物產生。在環保議題日漸受到重視的今日，這更是數位影像系統受到青睞的重要原因。目前發展的螢冷光影像擷取分析系統可取代傳統壓片，用於掃描 gel、membrane 等薄膜式的 sample。藉由優越的大光圈鏡頭以及專利的超低溫 Super CCD 偵測冷光釋出的光子，可增高靈敏度、降低熱干擾，獲得高畫數的影像品質。配合軟體可將影像數據化，實驗流程約 30 分鐘，大大縮短傳統呈色或壓片沖片顯影系統所耗費時間。數位式的影像系統可以大量減少底片、顯影液與定影液等耗材的消耗，不但更具經濟效益更環保，也可以避免曝光條件、藥水濃度與底片歸檔等繁複的手動程序。

(四) 流式細胞術(flow cytometer)

流式細胞術是一種生物學技術，用於對懸浮於流體中的微小顆粒進行計數分選。這種技術可以用來對流過光學或電子檢測器的一個個細胞進行連續的多種參數分析。流式細胞術是對懸液中的單細胞或其他生物粒子，通過檢測標記的螢光信號，實現高速、逐一的細胞定量分析和分選的技術。透過一束單色光照到流體力學聚焦的一股流體上，若干個檢測器瞄向流束和雷射相交的這個點，其中一個和雷射在同一直線上，其它幾個和雷射垂直。每個懸浮顆粒通過光束時會按某種方式把光散射，同時所帶有的螢光化合物被激發並發射出頻率低於激發光的螢光。這些散射光和螢光的組合資料被檢測器記錄，根據各檢測器亮度的波動就能夠推算出每個顆粒的物理和化學性質。前散射與細胞體積相關，而旁散射取決於顆粒的內部複雜程度，至於螢光則用來標記和檢測特定的細胞表面抗原或者 DNA。[18]

四、實驗步驟

(一) 細胞培養

將欲用藥瓶之瓶口及瓶蓋以酒精燈消毒，將培養皿自培養箱中取出，於操作台以幫浦及吸量管抽去所有溶液。用滴管吸取 1 ml PBS 溶液，加至培養皿中，以輕微搖晃潤洗細胞層，之後用同一隻滴管將 PBS 溶液回收。用另一滴管吸取 1 ml 胰蛋白酶溶液，加入至 dish 中，並放入培養箱一分鐘。取出後，拍打培養皿使細胞分散用滴管加入 8 ml 新鮮培養基於培養皿中，以終止胰蛋白酶作用。混合均勻後用同一滴管取出所有溶液，置於一乾淨離心管內。將離心管放入離心機中，以 1000 rpm 離心五分鐘。於操作櫃中，以幫浦及吸量管抽去上方殘存溶液。加入適量培養基，以滴管吸放的方式將沉澱的細胞重新懸浮起來，在平均分配至各個培養皿中。重新放入 37°C、5% 二氧化碳培養箱中繼續培養。

(二) 細胞計數

將培養皿自培養箱中取出，於操作台以幫浦及吸量管抽去所有溶液。用另一滴管吸取 1 ml 胰蛋白酶溶液，加入至培養皿中。放入培養箱一分鐘。取出後，拍打培養皿使細胞分散取出所有溶液，置於一個 15 ml 乾淨離心管內。將離心管放入離心機中，以 1000 rpm 離心五分鐘。吸除上清液，將細胞打散。取 4 ml medium 回溶細胞。取 10 ml 細胞溶液 + 10 L trypan blue 混合進行計數細胞。數兩次四大格細胞數加總/40 = $\times 10^5$ cell/ml。

(三) 細胞菌落實驗 (Colony Formation)

先於 6 well plate 的每個 well 加入 2 ml medium 再加入 5 μ l 的細胞懸浮液(含 1000 顆細胞)，搖勻後放入細胞培養箱培養。隔天加入 不同濃度 PD 於每個 well 中。大約放置一星期後，去除上清液，利用 methanol 固定細胞 30 分鐘。之後去除 methanol，並加入用水稀釋 20 倍的 Giemsa stain solution 染色一個晚上，隔天去除 Giemsa stain solution，並利用 PBS 將背景清洗乾淨。

(四) MTT 試驗

計算 5×10^4 個細胞培養於 24 well 中。分別於 24 小時後，移除上清液。更換含有 10% MTT 之培養液。放置於培養箱中作用四小時。去除上清液。加入 1 ml 之異丙醇 (isopropanol) 溶解紫色晶體。分別取出 200 μ l 至 96 ELISA 孔盤中。利用 ELISA reader 以波長 573 nm 進行讀取吸光值，便可得知相對細胞存活率。

(五) 蛋白質收集

先取 6 cm dish 中 1 ml medium 至 eppendorf 管子，其餘移至 15ml 管子。用 PBS 洗培養皿後再移至管子，0.5 ml trypsin 至培養皿反應至細胞切下，輕拍培養皿，再加入 eppendorf 管子的 medium 沖洗各位置後移入 eppendorf 管子。用 PBS 洗培養皿後再移至管子。將 15ml 管子和 eppendorf 管子，離心 1000rpm / 5mins，吸除上清液後拍散細胞，再加 1 ml PBS 至 15ml 管子將細胞混合均勻後併入 eppendorf 管子。將 eppendorf 管子再次離心 1000 rpm, 5mins 後吸除上清液，用離心機 spin down 並去除殘留的 PBS，加入 100ul NETN (依細胞 pellet 調整加入的量，加入後就必須放在冰上)，用 22% sonicate 2 次 (所有 sample 震完一輪之後再震一次, sample 每次震完要立刻放回冰上)，離心 13000rpm, 20 mins, 4°C，吸取上清液，取 2 μ l 測 OD (800ul ddH₂O+200ul protein assay dye+2 μ l protein lysate)，分裝固定濃度 (20 μ g/well) 一份：20 μ g 的 protein lysate 再補 NETN 至 10 μ l，再加 2.5 μ l sample buffer，100°C，10 mins (夾防爆夾)，保存於 -20°C。

(六) 流式細胞儀分析

將人類腎癌細胞培養於培養基中，待貼盤後，以不同濃度的藥物處理 24 小時後，使用 Annexin V/PI Detection kit，以 PBS 清洗細胞表面兩次後再加入 1x Trypsin-EDTA 作用 5 分鐘，加入 5 ml 新鮮培養液與 1x Trypsin-EDTA 中和，之後離心 1000 rpm 5 分鐘，移除上清液，接著以 1x PBS 清洗兩次，使用 75%酒精固定細胞，保存於-20°C 冰箱。隔天取出，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，以 1x PBS 清洗兩次，之後加入 Annexin V/PI 試劑，進行室溫避光作用 30 min，分析前過 filter，避免細胞顆粒過大阻塞儀器，再以 FACSCalibur 流式細胞儀做分析，實驗數據以 Cellquest 軟體來做分析。

(七) 西方墨點法

先上膠，分為上下兩膠，上膠一片 3ml 規格 (5%)(10-15 min 凝固)、下膠:一片 10ml 規格 (10%)(30 min 凝固)，最後加 APS (促凝劑)。接著以電壓 80 伏特進行電泳 120 分鐘。電泳完後，將實驗前準備的 10*Running Buffer 100 ml + Methanol 200 ml 溶液加至 1L (至 -20°C)，並將海綿、濾紙、電泳完成的凝膠、PVDF Membrane、濾紙、海綿依序夾在 Gel Holder Cassette 中，放入轉漬槽，並加入 Transfer Buffer，以電壓 100 伏特進行 Transfer 90 分鐘。接著使用 5% 脫脂奶粉進行 Blocking 10 分鐘。在裁切後加入事先配好濃度的一級抗體在 4°C 下反應過夜。在回收一級抗體後，使用 TBS-T 洗 Membrane 3 次，每次 10 分鐘。加入配好的二級抗體，在室溫下反應 120 分鐘後，亦使用 TBS-T 洗 3 次，每次 10 分鐘。最後利用 ECL 試劑組，使其與二抗反應，以多功能冷光影像分析儀呈色。

參、研究結果與討論

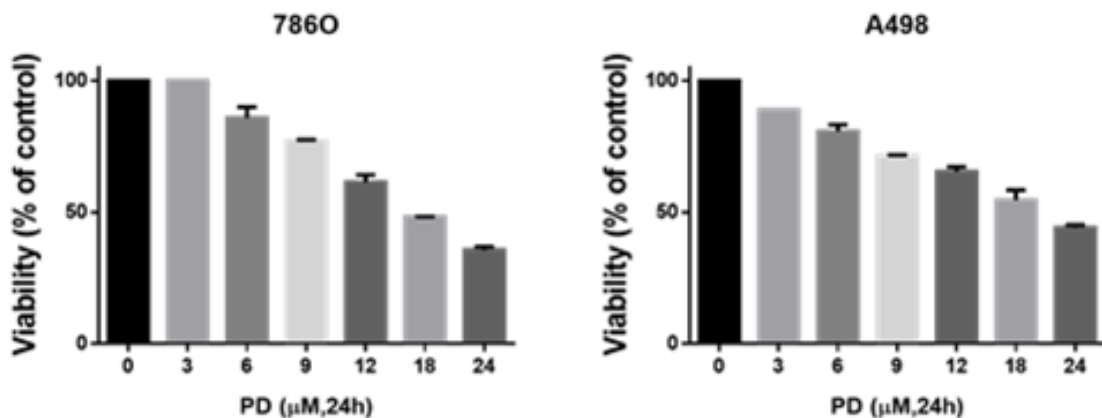
一、研究結果與分析

(一) PD 對於人類腎癌細胞株存活率的影響

1. 人類腎癌細胞株存活率

為了觀察 PD 是否會影響人類腎癌細胞的存活率，我們使用 786-O 及 A498 腎癌細胞株進行研究。首先將 4×10^4 /well 細胞培養在 24 well 的培養皿，待隔天細胞完全貼盤後，分別處理不同濃度 (0、3、6、9、12、18 和 24 μM) 的 PD，作用 24 小時後，以 MTT 方法測得細胞存活率。

實驗結果如圖一所示，人類腎癌細胞 786-O、A498 細胞分別以不同濃度的 PD (0、3、6、9、12、18 和 24 μM) 處理 24 小時後，在不同濃度處理下的細胞存活率具有差異，而且可發現，PD 的濃度越高，人類腎癌細胞 786-O、A498 細胞的存活率越低，因此可推論 PD 會抑制腎癌細胞的存活率。

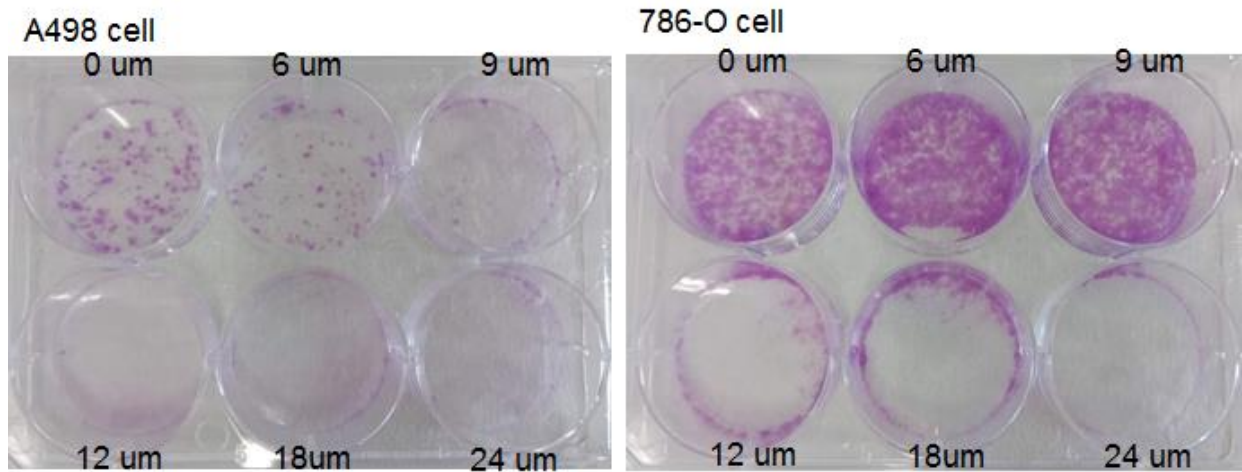


圖一、探討 PD 對於人類腎癌細胞存活率所造成的影響

2. 人類腎癌細胞株菌落形成的影響

為了觀察 PD 對人類腎癌細胞株菌落形成的影響，我們使用 786-O 及 A498 腎癌細胞來做研究。將人類腎癌細胞 786-O、A498 細胞分別以不同濃度的 PD (0、3、6、9、12、18 和 24 μM) 處理 24 小時，透過細胞菌落實驗來觀察細胞的增生能力。

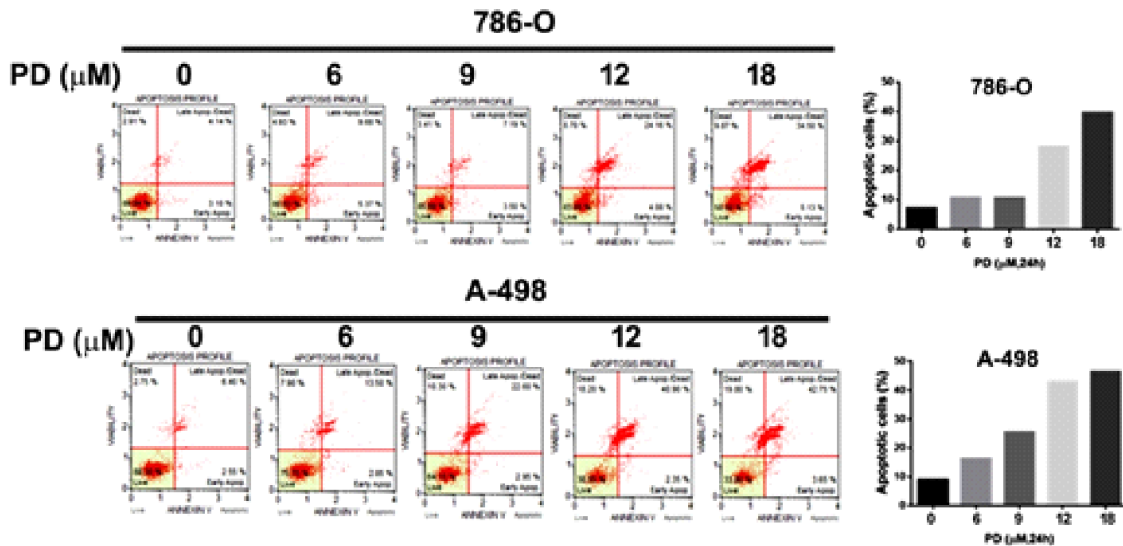
實驗結果如圖二所示，PD 於濃度 9 μM 開始對於腎癌細胞 786-O、A498 細胞菌落具有顯著抑制增生效果。



圖二、探討 PD 對於人類腎癌細胞增生所造成的影響

(二) PD 誘導人類腎癌 786-O 和 A498 細胞凋亡的現象

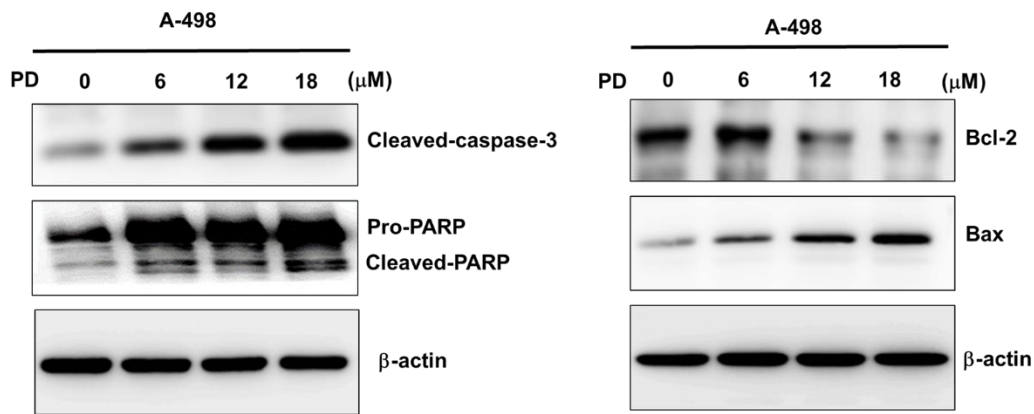
以不同濃度的 PD (0、6、9、12 和 18 μM)處理兩株不同的人類腎癌細胞(786-O 以及 A498) 24 小時後，以流式細胞儀分析細胞凋亡的情形，結果如圖三所示，可觀察到經 PD 處理後的人類腎臟癌細胞株 786-O 及 A498，確實會發生細胞凋亡的現象。



圖三、探討 PD 誘導人類腎癌細胞凋亡之影響

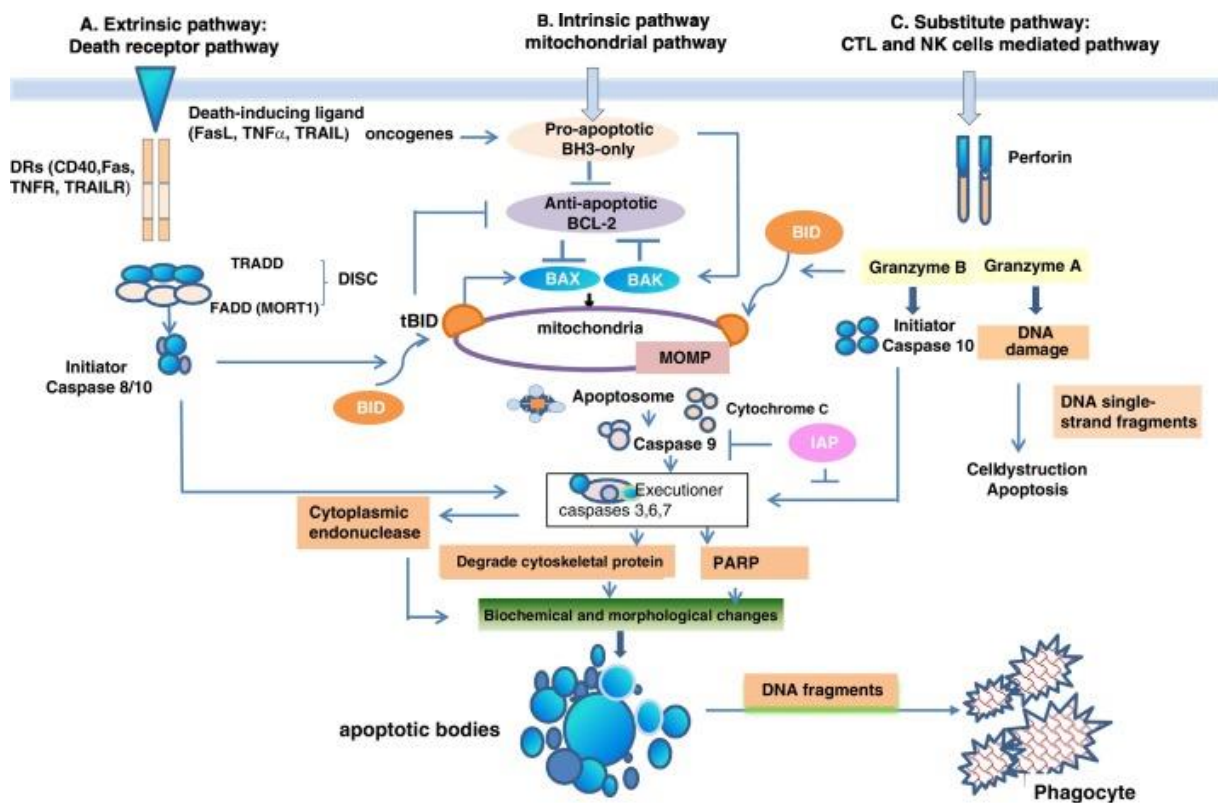
(三) PD 誘導人類腎癌 786-O 和 A498 細胞凋亡途徑的討論

以西方墨點法分析 A498 細胞株凋亡後的蛋白質表現，結果如圖四。可發現當 A498 細胞與 PD 作用後 會促進 cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白表現、Bcl-2 減少和增加 Bax 蛋白表現，因此可知 A498 細胞確實逐漸走向細胞凋亡。



圖四、A498 細胞與 PD 作用後的蛋白質表現

以細胞凋亡的途徑而言，當 cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 表現增加，Bcl-2 減少和增加 Bax 蛋白表現，進而引發細胞凋亡，固可測得 Bcl-2 減少和增加 Bax 蛋白表現，如圖五(Wu, H., Medeiros, L. J., & Young, K. H., 2018)。



圖五、細胞凋亡的路徑(Wu, H., Medeiros, L. J., & Young, K. H., 2018)

二、討論

根據結果可得知在 PD 作用下能夠有效克制腎癌細胞株 786-O 及 A498 的生長，且根據另一份研究表示，透過 PD 作用於子宮頸癌細胞時，發生 Bcl-2 減少，而 Cyt-c 與 caspase-9 增加，並逐漸走上細胞凋亡途徑[1]，與本實驗雷同。因此我推論當 PD 作用於腎癌細胞 786-

O 與 A498 時，是因為抗凋亡蛋白 Bcl-2 表現量減少和凋亡蛋白 Bax 表現增加，同時增加 cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 表現增加，進而走向細胞凋亡途徑。

由於 PD 細胞毒性較強，因此較多研究會用比原屬蘆皂苷多出一個甲基的 methyl PD (MPD)，來減緩它的毒性。有研究指出，methyl PD 是一種呋喃甾醇糖苷，具有抗腫瘤活性，當使用 methyl PD 處理慢性骨髓性白血病 K562 細胞時，研究結果顯示 methyl PD 能透過細胞凋亡來抑制 K562 細胞增殖[14]。而當 methyl PD 作用在人類肝癌 HepG2 細胞中，也有觀察到相似的分子機制[15]。另一篇文獻也發現，methyl PD 作用在人類肺腺癌細胞，最後也會走向細胞凋亡[16]。此篇研究與我們觀察到的結果，使用 PD 處理癌細胞，造成抗凋亡蛋白 Bcl-2 表現量減少是一樣的。

肆、結論與應用

一、結論

將不同濃度之 PD 對人類腎癌細胞株 786-O 及 A498 進行處理後，並以 MTT assay、細胞菌落實驗檢驗後，顯示原屬蘆皂苷對於兩種所選之癌細胞株確實有抑制的情況。經過流式細胞儀的分析，顯示原屬蘆皂苷可誘發人類腎癌細胞株 786-O 及 A498 的細胞凋亡，並且其誘發凋亡的途徑可能是抑制 Bcl-2 蛋白和凋亡蛋白 Bax 表現增加，進而導致人類腎癌細胞發生細胞凋亡。

二、未來展望與應用

根據衛生福利部統計資料顯示，國內十大死因居首的往往是癌症，而癌症的成因大多與我們的生活習慣與品質息息相關，諸如吸煙、酗酒、不健康的飲食等，都有可能罹癌。因此在癌症的肆虐之下，癌症的預防與治療已成為現今醫學界最重視的課題之一。在 2002 年，美國國家癌症研究院 (National Cancer Institute, NCI) 的抗癌藥物篩選中，PD 在針對 60 種不同類型的人類癌細胞株中，對於大多數的細胞具有極強的細胞毒性，表明其可能具有抗癌作用的潛在機制[13]。而直至目前尚未有研究探討原屬蘆皂苷對腎臟癌細胞是否具有抑制能力，根據本實驗結果可得知，在 PD 作用下，能夠抑制腎臟癌細胞 786-O 和 A498 的生長，進而誘發其細胞凋亡的發生，或許可以推論 PD 對於腎癌的治療應該具有相當不錯的潛力。

由於實驗僅於實驗室進行，且只是利用細胞株的進行。或許未來可以透過實際的動物實驗，確認 PD 在臨床上的功效，若可行，或許可以及抗腎臟癌的藥品與保健食品，推廣至全球並造福全人類之健康。

伍、參考文獻

1. 曾佳儀 (2017)。探討原薯蕷皂苷誘導人類子宮頸癌細胞凋亡之機制。中山醫學大學生化微生物免疫研究所碩士論文，台中市。取自 <https://hdl.handle.net/11296/ncd55w>
2. Hsieh, M. J., Lin, C. W., Chen, M. K., Chien, S. Y., Lo, Y. S., Chuang, Y. C., Hsi, Y. T., Lin, C. C., Chen, J. C., & Yang, S. F. (2017). Inhibition of cathepsin S confers sensitivity to methyl PD in oral cancer cells via activation of p38 MAPK/JNK signaling pathways. *Scientific reports*, 7, 45039. <https://doi.org/10.1038/srep45039>
3. Wang, G., Chen, H., Huang, M., Wang, N., Zhang, J., Zhang, Y., Bai, G., Fong, W. F., Yang, M., & Yao, X. (2006). Methyl PD induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 liver cancer cells. *Cancer letters*, 241(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.050>
4. Liu, M. J., Yue, P. Y., Wang, Z., & Wong, R. N. (2005). Methyl PD induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer letters*, 224(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.051>
5. Soria González, J. E., & Orea Solano, M. (2002). Apoptosis [Apoptosis]. *Revista alergía Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993)*, 49(4), 121–128.
6. Phang, C. W., Karsani, S. A., Sethi, G., & Abd Malek, S. N. (2016). Flavokawain C Inhibits Cell Cycle and Promotes Apoptosis, Associated with Endoplasmic Reticulum Stress and Regulation of MAPKs and Akt Signaling Pathways in HCT 116 Human Colon Carcinoma Cells. *PloS one*, 11(2), e0148775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148775>
7. Guan, J. L., Simon, A. K., Prescott, M., Menendez, J. A., Liu, F., Wang, F., Wang, C., Wolvetang, E., Vazquez-Martin, A., & Zhang, J. (2013). Autophagy in stem cells. *Autophagy*, 9(6), 830–849. <https://doi.org/10.4161/autophagy.24132>
8. Torisu, T., Torisu, K., Lee, I. H., Liu, J., Malide, D., Combs, C. A., Wu, X. S., Rovira, I. I., Fergusson, M. M., Weigert, R., Connelly, P. S., Daniels, M. P., Komatsu, M., Cao, L., & Finkel, T. (2013). Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nature medicine*, 19(10), 1281–1287. <https://doi.org/10.1038/nm.3288>
9. Pantovic, A., Krstic, A., Janjetovic, K., Kocic, J., Harhaji-Trajkovic, L., Bugarski, D., & Trajkovic, V. (2013). Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, 52(1), 524–531. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.10.024>
10. Nuschke, A., Rodrigues, M., Stolz, D. B., Chu, C. T., Griffith, L., & Wells, A. (2014). Human mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells consume accumulated autophagosomes early in differentiation. *Stem cell research & therapy*, 5(6), 140. <https://doi.org/10.1186/scrt530>
11. Vázquez, P., Arroba, A. I., Cecconi, F., de la Rosa, E. J., Boya, P., & de Pablo, F. (2012). Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells. *Autophagy*, 8(2), 187–199. <https://doi.org/10.4161/autophagy.8.2.18535>
12. Hseu, Y. C., Chiang, Y. C., Vudhya Gowrisankar, Y., Lin, K. Y., Huang, S. T., Shrestha, S., Chang, G. R., & Yang, H. L. (2020). The In Vitro and In Vivo Anticancer Properties of Chalcone Flavokawain B through Induction of ROS-Mediated Apoptotic and Autophagic Cell

Death in Human Melanoma Cells. *Cancers*, 12(10), 2936.

<https://doi.org/10.3390/cancers12102936>

13. Hu, K., & Yao, X. (2002). PD (NSC-698 796): its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. *Planta medica*, 68(4), 297–301.
<https://doi.org/10.1055/s-2002-26743>
14. Liu, M. J., Yue, P. Y., Wang, Z., & Wong, R. N. (2005). Methyl PD induces G2/M arrest and apoptosis in K562 cells with the hyperpolarization of mitochondria. *Cancer letters*, 224(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.051>
15. Wang, G., Chen, H., Huang, M., Wang, N., Zhang, J., Zhang, Y., Bai, G., Fong, W. F., Yang, M., & Yao, X. (2006). Methyl PD induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 liver cancer cells. *Cancer letters*, 241(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.050>
16. Bai, Y., Qu, X. Y., Yin, J. Q., Wu, L., Jiang, H., Long, H. W., & Jia, Q. (2014). Methyl PD induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells. *Pharmacognosy magazine*, 10(39), 318–324. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.137373>
17. Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315–2319.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
18. McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
19. Wu, H., Medeiros, L. J., & Young, K. H. (2018). Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. *Blood reviews*, 32(1), 8–28. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.08.004>

【評語】 090014

此作品檢測原屬蘓皂苷(Protodioscin)對腎臟細胞癌的毒殺效果，發現可能引發細胞凋亡。此成分於不同癌別的抗癌效果已有文獻報導，創新性較為不足。雖然可細胞凋亡相關蛋白之表現，其真正作用的分子機制尚未釐清。結果圖表的呈現與統計仍有進步空間，該成分是否對正常細胞亦產生毒性值得進一步探討。

1. 研究背景敘述較為薄弱，反而比較像是科普性質，建議可以更著重於研究相關的方向來撰寫，像是可以多加著墨於細胞凋亡的機制以及相關的基因調控，且在過去研究中也許許多文獻在探討 protodioscin 對於癌細胞生長抑制的研究，在這篇報告僅點出 protodioscin 對於不同種類的癌細胞有抑制的特異性，所以選擇目前尚未被研究的腎臟癌細胞來探討，然而比較可惜的是在這篇報告中也僅提出和其他研究類似的細胞凋亡機制以及相關的基因調控，較無創新性。
2. 在報告撰寫時，有些描述科學的方式較不嚴謹(e.g 化學式下標、科學記號上標等)

3. 在研究結果及探討部分，在結果圖下方建議在多加一些相關的描述，以及結果圖都偏模糊，有些也偏小，導致看不清楚，圖片排版也要多加注意。