

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090007

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 香杉芝誘導黑色素癌細胞凋亡與自噬性死亡

就讀學校 臺中市立臺中第一高級中學

指導教師 張建鴻、許游章

作者姓名 詹立安

關鍵詞 香杉芝、細胞凋亡、細胞自噬

## 作者簡介



我是詹立安，就讀於台中一中數理資優班二年 24 班，從小對科學探究充滿興趣，從高一開始至中國醫藥大學開始研究天然物質抑制癌細胞的效果，目標是探究台灣本土藥用真菌抑制黑色素癌細胞的能力，透過在實驗室的學習來充實自身的視野及素養，希望自己的研究結果能夠對受癌症所苦的患者有些許的貢獻。

## 摘要

香杉芝(*Antrodia salmonea*)是台灣特有的食藥用菇，具抗血癌、抗發炎及抗動脈硬化的功能。我們研究發現，香杉芝發酵液會誘導人類黑色素癌(A2058/A375)細胞毒性；比較香杉芝抗癌活性發現毒殺 A2058 強於 A375 細胞。我們亦發現，香杉芝作用黑色素癌(A2058)細胞，會誘導晚期凋亡(Annexin V-PI 雙染法)、Caspase-3 增加及 PARP 裂解;產生自噬酸性囊泡(AVO)、促自噬蛋白 LC3-II 增加。加入細胞凋亡抑制劑 Z-VAD-FMK 及自噬抑制劑 3-MA/CQ 可保護香杉芝誘導癌細胞死亡。此外，香杉芝會誘導黑色素癌細胞 Bax/Bcl-2 及 Beclin-1/Bcl-2 比例增加。推論，香杉芝可同時誘發黑色素癌細胞凋亡(Apoptosis)及自噬性死亡(Autophagy)。香杉芝會誘導黑色素癌細胞活性氧化物(ROS)生成；抗氧化劑 *N*-acetylcysteine 可減緩香杉芝對黑色素癌細胞毒殺。推測，香杉芝是透過 ROS 來殺死黑色素癌細胞。我們亦發現，香杉芝可與抗癌藥物 Paclitaxel 對黑色素癌細胞產生協同作用(CI<1)。總結，香杉芝發酵液具抗黑色素癌功效，可開發成抗癌的藥品/保健食品。

## Abstract

We investigated the anticancer properties of *Antrodia salmonea* (AS), a well-known edible/medicinal mushroom, on human melanoma cells, and revealed the underlying molecular mechanism. Our MTT data showed that treatment of melanoma (A2058) cells with fermented culture broth of AS (0-300  $\mu$ g/mL) inhibited cell viability and growth. Increased TUNEL-positive cells and Annexin-V/PI stained cells indicated AS-induced necrosis and late apoptosis. Notably, AS treatment induced apoptosis, which was accompanied by a sequence of events including caspase-3 activation, PARP cleavage, and Bax/Bcl-2 dysregulation. Furthermore, we confirmed that AS-induced autophagy was evidenced by increased AVO (acidic organelle vesicles) formation, LC3-II accumulation, and Beclin-1/Bcl-2 dysregulation in A2058 cells. Notably, AS enhances ROS generation and the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) significantly attenuated the AS-mediated cell death and AVO formation which signifies that AS induced apoptosis and autophagy via ROS pathway in A2058 cells. Moreover, compared to the individual treatments, the synergistic effects of AS and anti-cancer agent Paclitaxel substantially repressed the A2058 and A375 cell growth (CI<1). Our findings suggest that *Antrodia salmonea* may exert anti-tumor activity against human melanoma cells.

## 一、前言

### (一)、研究背景

香杉芝(*Antrodia salmonea*, AS)是寄生於香杉木(屬於台灣特有高山貴重針葉樹)上的台灣特有真菌。香杉芝於2004年被鑑定出為薄孔菌屬之新種，與台灣珍貴的藥用真菌—樟芝同屬，兩者的外型十分相似，容易混淆。唯一的差異在於香杉芝的子實體是淡黃色，而非樟芝的紅褐色。生長時緊貼在香杉木上，孢子為圓柱形，在潮濕的狀況下偏黃。和已知具有多種生物活性而具有高價值的牛樟芝相比，目前有關香杉芝之活性功能評估並不多，而香杉芝的價格又只有樟芝的1/3到1/4，但皆是台灣市場中昂貴的民俗藥材。目前已有研究將香杉芝菌株利用現代生物栽培技術，生產液態深層發酵培養之香杉芝菌絲體及發酵液(Submerged culture)，此方法是最經濟、最符合環保的人工培育法。液態深層發酵培養，一般是指使用固定組成之液態培養基，控制適當的 pH 值、溫度以及通氣和攪拌/振盪的條件下，進行微生物的發酵培養，以製造生質量(Biomass)或代謝物(Metabolites)。利用深層培養的方式生產香杉芝菌絲體發酵液，可避免森林生態破壞、具有降低成本及大量生產的優點。已有研究分析香杉芝菌絲體發現許多新的生物活性成分，包括 lanosta-8,24-diene-3 $\beta$ ,15  $\alpha$ ,21-triol, 24-methylenelanost-8-ene-3 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,21-triol, 2,3-dimethoxy-5-(2',5'-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyphenyl)-7-methyl-[1,4]-naphthoquinone, 2,3-dimethoxy-6-(2',5'-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyphenyl)-7-methyl-[1,4]-naphthoquinone, 2-methoxy-6-methyl-p-benzoquinone, 2,3-dimethoxy-5-methyl-p-benzoquinone, 2-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-p-benzoquinone 等[2]。

台灣癌症死亡率已經躍居總死亡人數的第1位。目前癌症治療中西醫學不盡相同，西醫治療主要以外科手術、放射療法、化學療法與免疫療法等；中醫則以傳統中草藥作為治療。惡性黑色素癌的基本療法為早期診斷和手術切除，必要時包括放射治療、化學療法和免疫療法等。科學家相信減少癌症發生主要有兩方面，一方面尋找最好的治療策略，另一方面則是由天然飲食成分的攝取來達到預防癌症發生的目的。目前世人最熟悉促進癌細胞死亡方法主要有2種：(1)細胞凋亡(apoptosis):第1型的細胞計畫性死亡。(2)細胞自噬(autophagy):第2型的細胞計畫性死亡；在細胞誘發過度的細胞自噬反而會促成細胞的死亡。因此將誘導細胞自噬性死亡與細胞凋亡作為癌症的治療策具有合理可行性[6]。細胞凋亡(Apoptosis)為近年來學者研究和治療癌症的熱門方向，將凋亡因子的特性充分應用於癌症的治療，讓癌細胞自行凋亡而不破壞非目標的細胞。細胞凋亡是獨特的細胞死亡方式，主要差異在於細胞膜泡狀囊(Blebbing)的形成，核染色質聚集(Chromatin condensation)，DNA 斷裂(DNA fragmentation)及細胞凋亡小體(Apoptotic body)形成等特徵。細胞自噬 (autophagy)藉著自己的溶酶體(Lysosome)將體內的

胞器或物質進行分解，調控細胞生長或死亡，是細胞內衡定的重要機轉。細胞自噬是生物演化上保留下來的自我吞食機制，當細胞飢餓、缺氧或有代謝壓力的時候，內質網會製造出雙層的膜(主要從自噬蛋白 LC3-I 轉變為 LC3-II)，將細胞內的一些胞器或物質包圍起形成自噬體 (Autophagosome)，再和溶酶體結合形成自溶體 (Autolysosome)，因而使一些胞器或物質分解。

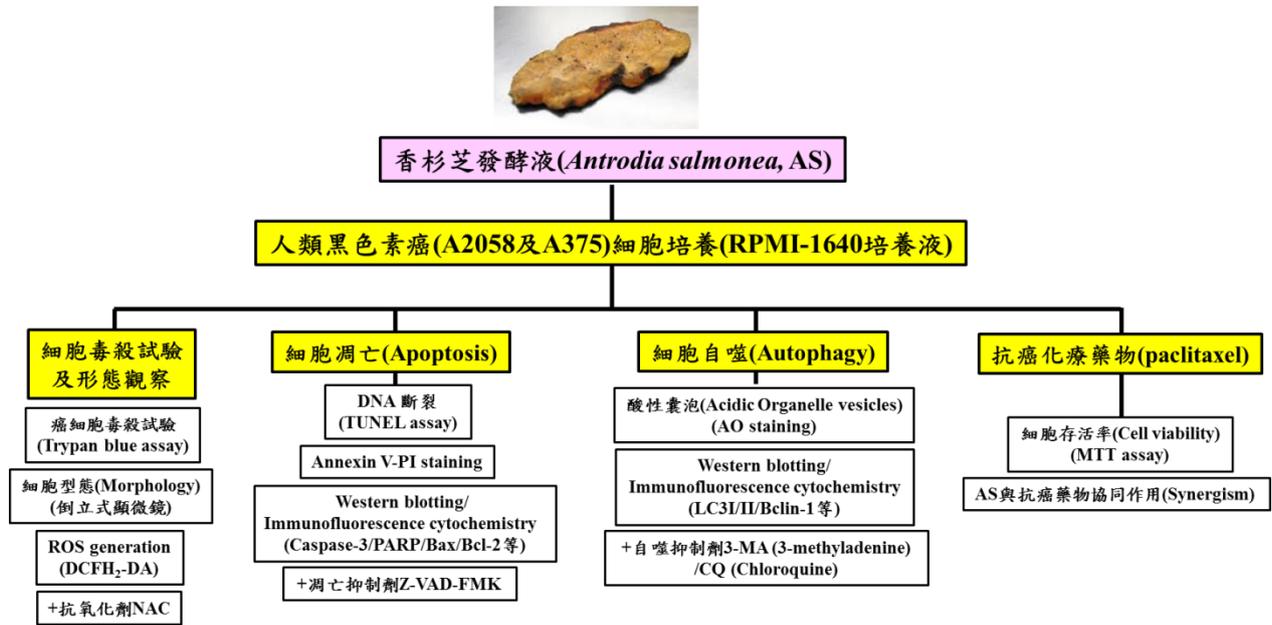
## (二)、研究動機

癌症化學預防 (Cancer chemoprevention) 的概念是希望藉天然物或藥物的使用而抑制具有侵犯性的癌症之發展，因此功能性食品開發是目前全球趨勢。樟芝是台灣國寶級食品，具國際知名度且樟芝價格愈來愈昂貴。過去研究發現，香杉芝發酵液確實具有抗血癌、抗發炎、抗氧化及抗動脈硬化等功能[1-4]，且活性濃度與樟芝濃度相當[5]。香杉芝抗皮膚癌功能是值得被研究及被開發。本研究希望香杉芝能成為繼樟芝之後，台灣特有的健康食品，推廣全球及造福人類之健康。

## (三)、研究目的

- (1) 香杉芝發酵液對黑色素癌細胞的抗癌活性
- (2) 香杉芝發酵液誘導黑色素癌細胞凋亡及相關蛋白質分析 (TUNEL assay/Annexin V-PI staining/Caspase-3/PARP/Bax/Bcl-2)
- (3) 香杉芝發酵液誘導黑色素癌細胞自噬及相關蛋白質分析 (AVO assay/LC-3I/II/Beclin-1)
- (4) 香杉芝發酵液與抗癌藥物 Paclitaxel 對黑色素癌 (A2058 及 A375) 細胞具協同作用

## 二、研究方法或過程



& Statistical analyses : Mean  $\pm$  SD, Significant at  $*p < 0.05$  (ANOVA)

### (一)、研究設備與材料

#### 1. 實驗材料：

(1) 香杉芝(*Antrodia salmonea*)發酵液：香杉芝來自南投縣，並由台灣南投特有物種研究所 Shy-Yuan Hwang 博士鑑定。香杉芝標本(編號 AS001)已存放在台中中國醫藥大學。從香杉芝子實體中分離出香杉芝的菌絲體，並依實驗室論文方法製備香杉芝發酵液 [1-4]。香杉芝發酵培養液(1g)乾燥後的產量約為0.375g。將香杉芝發酵培養液粉末樣品(stock solution)在25 °C 下用10 mM 磷酸鈉緩衝液(pH 7.4)溶解並溶液儲存在-20 °C 下。

(2).人類黑色素瘤(A375及 A2058)細胞：購買自新竹食品工業發展研所生物資源保存中心

2. 實驗場地：中國醫藥大學共同實驗室

3. 實驗儀器：電子天秤、恆溫水浴槽、混合震盪器、桌上型離心機、分光光度計、數位相機、液態氮桶、培養箱、倒立式相位差顯微鏡、高速離心機、電泳槽、濕式轉印機、冷光影像儀器、流式細胞儀，超音波震盪器、無菌細胞操作台。

4. 實驗試劑：細胞培養液、胎牛血清(FBS)、磷酸緩衝液(PBS)、running buffer、transfer buffer、lysis buffer、麗春紅、蛋白質一級抗體(Caspase-3、LC3B、PARP、Beclin-1、Bax、 $\beta$ -actin、Bcl-2)、蛋白質二級抗體(M、R)、trypsin、6X dye、DMSO、Trypan blue。

5. 實驗器具：微量吸管分注器 (Pipette)、試管、燒杯、玻璃瓶、細胞培養皿、96 孔盤、無菌過濾膜、顯微鏡。

## (二)、人類黑色素(A2058/A375)癌細胞培養(Cell culture)

**1. 試劑：**取 RPMI-1640 (10.39g)、DMEM (9.5g)或 DMEM/F12 (9.8g)粉狀培養基溶於去離子純水(900 uL)，加入2g NaHCO<sub>3</sub>混合均勻，溶解後 PH 值調至7.4，最後將體積定量至1升。再通過孔徑0.22 μm 的無菌過濾膜過濾，再加入1%抗生素(penicillin-streptomycin)，混合後保存於4°C。取0.4克 Trypan blue 溶於100毫升磷酸緩衝液，通過孔徑0.45 μm 的濾膜濾除雜質，室溫保存。

**2. 解凍細胞：**自液態氮桶將黑色素瘤(A2058、A375)細胞取出後，立即移置於37°C水浴槽中，30秒內急速解凍，再將細胞冷凍保存液(DMSO)吸到已加好培養液的無菌離心管內稀釋，經離心去除上清液，再加入培養液將細胞均勻打散後，移到培養瓶，於含5% CO<sub>2</sub>的37 °C培養箱中生長，並且需每天更換培養液。

**3. 培養條件：**將人類黑色素瘤細胞株培養於加入了10%胎牛血清 (Fetal bovine serum) 的培養液(1% penicillin-streptomycin)，然後將黑色素瘤細胞置於5%CO<sub>2</sub>培養箱中培養(37°C)。

**4. 繼代培養：**移除原細胞培養液後以 PBS (1X)緩衝液5c.c 清洗兩次。並加入 Trypsin(1X)1c.c 放回培養箱中反應3分鐘。加入5c.c 細胞培養液終止 Trypsin 反應，並將細胞液移至15c.c 離心管中離心去除上清液。加入適量細胞培養液將細胞團塊均勻打散。取的細胞懸浮液(100μL)與等量的0.4% Trypan blue 均勻混和後，取出10μL 至細胞計數器(hemocytometer)計算細胞數。計算細胞的數量後，依據實驗所需的細胞密度，將細胞懸浮液均勻的種至不同的培養盤。

## (三)、人類癌細胞的毒殺試驗(Trypan blue assay)

**1. 原理：**正常健康的細胞，由於細胞膜完整可排除 Trypan blue 染劑進入，所以不會被染色。然而，死細胞或損傷嚴重的細胞，其細胞膜通透完整性已被破壞，Trypan blue 染劑可進入細胞內而對細胞加以染色。經 Trypan blue 染劑染色為藍色者為死細胞，亮者為活細胞。

**2. 癌細胞存活率測定：**將癌細胞培養於12孔細胞培養盤中(約 $2 \times 10^5$  cells/mL 共1 mL)，再加入香杉芝發酵液(0~300 μg/mL)放置於37°C 培養箱反應24小時。反應時間結束時，於細胞培養皿中取出100 μL 癌細胞，再加入100 μL 的0.4% Trypan blue 染劑溶液混合均勻後，以血球計數器計數細胞數目，並以倒立式相位差顯微鏡觀察細胞形態及拍照。

## (四)、人類癌細胞的細胞型態(Morphology)

**1. 原理：**利用倒立式顯微鏡觀察細胞型態改變。

**2. 實驗方法：**將黑色素瘤細胞( $2.5 \times 10^4$ /格)種在24孔盤中，至於培養箱24小時。待隔日細胞貼壁後，依據實驗條件加入香杉芝發酵液(0-300 μg/mL)，並放回培養箱中培養24小時。待隔日

以倒立式顯微鏡觀察細胞型態並拍照。

### (五)、細胞存活率(MTT)試驗

**1. 原理：**MTT 為水溶性的 tetrazolium salt，為黃色粉末。MTT 溶液在經由活細胞內粒線體的酵素去氫酶代謝 還原後，同時在細胞色素 C 的作用下，MTT 的環狀結構 tetrazolium ring 會被切斷而轉換成不溶水的藍紫色 formazan 結晶，再利用異丙醇將細胞膜與藍紫色結晶物溶解，於波長570 nm 測得吸光值。因為此反應需要在活細胞中進行，故當藍紫色愈多表示細胞數存活愈多，吸光值也越高

**2. 存活率(MTT)測定：**

- (1) 將黑色素瘤細胞( $2.5 \times 10^4$ )分種於24孔盤中。
- (2) 隔天細胞貼壁後，加入不同濃度的香杉芝發酵液(0~300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，於培養箱24小時。
- (3) 於避光環境下加入10X MTT 溶液，置於培養箱中反應2小時。
- (4) 移除 MTT 溶液，此時底部應有結晶。以400 $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶解結晶。
- (5) 最後每個孔洞抽出200 $\mu\text{L}$  的上清液於 96 孔盤中，以570nm 波長測得溶液之吸光值。

### (六)、細胞凋亡試驗(TUNEL assay)

**1. 原理：**利用去氧核糖核苷酸末端-轉移酶的缺口末端標記分析(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling; TUNEL)。由於細胞凋亡會使 DNA 斷裂，而在 DNA 斷裂口(Nick)存在大量的3'-OH 末端，能被去氧核糖核苷酸末端轉移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT) 作用，因而接上發螢光的三磷酸去氧尿嘧啶 (dUTP-FITC)，即可辨識及觀察細胞凋亡的現象。本實驗呈現的綠色螢光為 FITC (fluorescein isothiocyanate)，藍光為細胞核染劑 DAPI (Hseu et al., 2004)。

#### 2. 試劑配製：

- (1) In Situ Cell Death Detection Kit 購自 Roche (Cat.1286400)。
- (2) 4% paraformaldehyde (Fixation solution)：取4克 paraformaldehyde 溶於100 mL 1X PBS 中，並調 PH=7.4，保存於4°C 備用。
- (3) 0.1% Triton X-100: 將10  $\mu\text{L}$  之 Triton X-100溶於10 mL 的1 $\times$  PBS 中，以0.22  $\mu\text{m}$  filter 過濾後儲存於4°C。
- (4) DAPI 染劑: 配製1mg/mL DAPI 用時以 PBS (1:1000比例)稀釋。

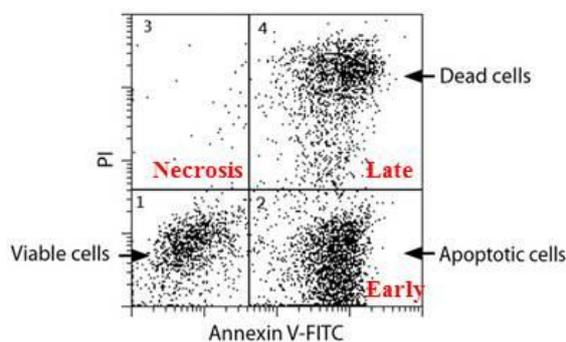
#### 3. 實驗步驟：

- (1) 將黑色素瘤細胞調整至3  $\times 10^4$  /mL (0.5 mL, 8-chamber)。
- (2) 加入不同濃度的香杉芝發酵液 (0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，於培養箱培養24小時。

- (3) 抽掉原有的培養液以1X PBS 清洗兩次，各加入200  $\mu\text{L}/\text{well}$  的4% paraformaldehyde 於培養箱中固定1小時。
- (4) 移除4% paraformaldehyde 以1X PBS 清洗兩次，加入0.1% Triton X-100 (200  $\mu\text{L}/\text{well}$ )於室溫反應10分鐘，增加細胞膜的通透性方便染劑進入。
- (5) 移除0.1% Triton X-100以1X PBS 清洗兩次。
- (6) 避光配製 TUNEL mixture Solution (50  $\mu\text{L}/\text{well}$ )比例為 vial 1:vial 2 = 1:9，並置於培養箱反應90分鐘。
- (7) 移除TUNEL mixture solution以1X PBS清洗兩次。
- (8) 使用DAPI染劑(1:1000) 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，於培養箱反應5分鐘。
- (9) 移除DAPI染劑後以1X PBS清洗兩次，即可在螢光顯微鏡下觀察並拍照(200x)。

### (七)、Annexin V-PI 雙染色法 (Annexin V-PI staining)

**1.原理：** 磷脂醯絲氨酸 (PS, Phosphatidyl-serine)正常情況下位於細胞膜的裏側。在初期細胞凋亡發生時，PS 會從細胞膜裏側移動至外側而暴露在細胞外。Annexin V 是一種對 PS 具有高度親和力的  $\text{Ca}^{2+}$  依賴性磷脂結合蛋白，將 Annexin V 與螢光素綠色 FITC 標記作為螢光探針，PI (Propidine iodide) 則可做為 DNA 核酸的染料，能穿過壞死的細胞膜將細胞核染成紅色，接著利用流式細胞儀檢測。分別將四個象限分成：1.正常細胞(Annexin V-FITC 與 PI 皆無)。2.早期細胞凋亡 (只使用 Annexin V-FITC)。3.細胞壞死(只使用 PI 染劑)。4.晚期細胞凋亡(同時使用 Annexin V-FITC 與 PI)。



Annexin V / PI 雙染原理

### 2.試劑配置

- (1) FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit
- (2) PI Annexin V Apoptosis Detection Kit

### (3) 1X Annexin V Binding Buffer

取10X Annexin V Binding Buffer 1mL，加入9 mL 1 X PBS 即可。

## 3.實驗步驟

- (1) 將黑色素瘤(A375、A2058)細胞，種於 10-cm dish 中( $1 \times 10^6$ )。待隔日細胞貼壁後，分別給予不同濃度的香杉芝發酵液(0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )處理 24 小時。
- (2) 將細胞培養液倒入 50c.c 的離心管中，以 5 mL 的磷酸緩衝液(1X)清洗 dish。
- (3) 加入 Trypsin(1X)反應 3 分鐘。
- (4) 待完全反應後，於培養箱中取出 10-cm dish，輕敲 dish 使細胞分離，並於顯微鏡下觀察確認後，加入新鮮細胞培養液來終止 Trypsin 反應，待混合均勻之後，將細胞懸浮液收集至 50 c.c 離心管中，以 1000 rpm 離心 5 分鐘。
- (5) 待細胞離心完後，將上清液移除，加入 1 mL 1X PBS，抽取至微量離心管，再以 5000 rpm 離心 10 分鐘。
- (6) 重複步驟(5)，移除上清液後，將細胞沉澱物的 Pellet 刮散，加入 100  $\mu\text{L}$  Annexin V Binding Buffer(1X)，與細胞 pellet 均勻混合。
- (7) 將在避光環境下先行配置完成的 FITC 與 PI 染劑，每管各加入 2  $\mu\text{L}$  FITC 與 2  $\mu\text{L}$  PI 染劑反應 15 分鐘。(Control 組共有四管：1、不加染劑；2、單染 PI；3、單染 FITC；4、雙染 PI 加 FITC。)
- (8) 在使用流式細胞儀 Flow cytometry 之前，將微量離心管中的細胞液加至 FASC 專用小管，並加入 400  $\mu\text{L}$  的 Annexin V Binding Buffer(1X)混合均勻即可上機。

## (八)、西方墨點(western blotting) 分析法

**1. 原理：**西方墨點分析法是使用聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)去分析樣品中的特定蛋白質含量。利用SDS-PAGE將不同分子量的蛋白質進行分離，再利用一級抗體(Primary antibody)作為探針，二級抗體(Secondary antibody)為顯色用標記。使用介面活性劑SDS將蛋白變性並使其分子表面均勻步上負電荷，通電後帶負電的蛋白質分子將會向正極移動，分子量者泳動率小；相反地，分子量小者泳動率大。將不同分子量的蛋白於膠片中分離後，將膠片上的蛋白轉漬於PVDF膜上固定。加入和目標蛋白質結合的專一性抗體充分反應，再加入二級抗體與一級抗體專一性結合，最後用冷光影像儀器來測定經電泳分離後的蛋白在表現量上的增減。

**2.細胞樣品置備：**將用香杉芝發酵液處理過的黑色素瘤細胞樣品：將黑色素瘤(A375&A2058)細胞培養於培養皿中(約 $2 \times 10^6$  cells共10 mL)，再加入香杉芝發酵液(0~300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，放置於37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱反應24小時後，收集培養液與細胞於離心管中離心(1500 rpm)5分鐘後去除上清液。

再用PBS緩衝液清洗1次(離心3000 rpm 5分鐘)後去除上清液，即得香杉芝發酵液處理24小時後的黑色素瘤細胞樣品。

**3. 細胞蛋白質萃取:** 將樣品以Lysis buffer使細胞內蛋白質溶解出來，並加入避免蛋白質中蛋白酶失去活性(PMSF)及可使蛋白質變性的物質(DTT)，再利用超音波震盪儀將細胞徹底打破，以高速離心機(12000 rpm，40分鐘)後收取其上清液，即為細胞的總蛋白質萃取物。

**4. 蛋白質定量分析:** 配製不同濃度之胎牛血清白蛋白(BSA)標準品，並將欲測定之蛋白質溶液稀釋成適當的濃度。取二次水加入不同濃度牛血清白蛋白標準品(0~10 µg /mL)及蛋白質溶液後，加入200 µL Protein assay dye，充分混合後，靜置5分鐘，以595nm波長測吸光值，並將回歸直線作為測定濃度的標準曲線。測定蛋白質樣品(稀釋800倍)在波長595nm下的吸光值，利用回歸直線算得蛋白質萃取液濃度。並配置濃度一樣的蛋白質液來進行電泳。

**5. 聚丙烯醯胺膠體(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)電泳:** 將SDS-PAGE注入電泳玻片，待凝膠完全後加入5% stacking gel並插入電泳梳。室溫下聚合反應30分鐘，完全聚合後去除電泳梳，裝置在電泳槽上並浸泡於1X running buffer。取50µg蛋白質，加入6倍 Protein loading buffer，以PBS緩衝液調整使每一個樣品(體積相同)，並以97°C加熱5分鐘使蛋白質變性，立即放回冰上冷卻。再將蛋白質樣品及marker注入各個電泳膠片槽溝中進行電泳分析。先以60V電壓跑30分鐘後，再改變電壓為90V，待marker完全展開後即停止電泳，再進行蛋白質的轉印。

**6. 轉印蛋白質:** 取適當之PVDF膜 (Polyvinylidene difluoride memberane)先以甲醇活化後，連同二張3M紙放入蛋白質轉印緩衝液(Transfer buffer)中浸潤。操作重疊順序由下而上依序為海綿、3M 紙、膠體、PVDF、3M紙、海棉，並使用滾輪去除氣泡後，於濕式轉印機內以25V的電壓轉印12小時，將蛋白質轉印到PVDF膜上。轉印後取出膠體，將膜加入麗春紅以觀察轉印效果，照著由marker所標示出的蛋白分子量，將膜切割成不同部分並進行免疫抗體點墨。

**7. 免疫抗體點墨(Immunoblotting):** 將轉印完的PVDF膜以Blocking solution振盪30分鐘，以5%的BSA作為溶劑，將欲測得之一級抗體稀釋至適當濃度，加入並使其均勻覆蓋PVDF，接著置入4°C冰箱中的水平式旋轉器上繼續以55 rpm反應至隔天。取出PVDF後，用PBST buffer清洗三次(每次5分鐘，95 rpm)。依不同的一級抗體，加入特定的二級抗體，稀釋5000倍，置於水平式旋轉器上於室溫振盪1小時(55 rpm)，再用PBST buffer清洗三次，將未接合二級抗體的部分清洗掉。使用冷光影像儀器，將PVDF膜置於黑色金屬盤上，以有蛋白那面朝上進行拍攝。

## **(九)、免疫螢光染色法(Immunofluorescence cytochemistry)**

**1. 原理:** 指在抗體上結合螢光或可呈色的化學物質，利用免疫學原理中抗原和抗體之間的專一

性結合，以檢測細胞中是否有目標抗原的存在。將細胞分別以 paraformaldehyde 和 Triton X-100 固定和增加細胞通透性，再利用一級抗體與特定抗原結合，檢測某種蛋白質在細胞內或細胞膜上的存在和分布，再運用螢光二級抗體接合一級抗體，使用螢光來定位蛋白質位置，最後利用 DAPI 染上細胞核，使細胞在特定波長的激發光照射下發出螢光，並使用螢光顯微鏡觀察並拍照。

## 2. 試劑配製:

- (1) 4% paraformaldehyde: 將 4g paraformaldehyde 粉末溶於 100 mL 之 1×PBS 中隔水加熱至 75 °C 下溶解，以 0.22 μm filter 過濾後儲存於 4°C。
- (2) 0.1% Triton X-100: 將 10 μL 之 Triton X-100 溶於 10 mL 的 1×PBS 中，以 0.22 μm filter 過濾後儲存於 4°C。
- (3) 6% BSA: 將 0.6 g BSA 溶於 10 mL 的 1×PBS 中，儲存於 4°C。
- (4) 1 mg/mL DAPI: 將 1 mg DAPI 粉末溶於 1 mL 1×PBS 中，儲存於 4°C。使用前需以 1×PBS 稀釋(1 : 1000)。

## 3. 實驗步驟:

- (1) 首先將 A2058 細胞種於 8-chamber 中( $3 \times 10^4$  cell/well)。
- (2) 待隔日細胞貼壁後，依據實驗條件在培養液中加入不同濃度的香杉芝發酵液反應 24 小時。
- (3) 反應時間到達後，移除培養液，並以 1×PBS 清洗並移除，將 4% paraformaldehyde 加入至 chamber 內(200 μL/well)，於室溫下固定細胞 30 分鐘。
- (4) 接著移除 4% paraformaldehyde，以 1×PBS 清洗三次，將 0.1% Triton X-100 加入至 chamber 內(200 μL/well)，於室溫反應 10 分鐘，增加細胞膜的通透性。
- (5) 反應結束後移除 0.1% Triton X-100，以 1×PBS 清洗三次，將 6%BSA 加入至 chamber 內(200μL/well)，於 37°C 細胞培養箱內反應 30 分鐘。
- (6) 之後移除 6%BSA，接著避光將第一種一級抗體(抗體：依各廠牌所建議的濃度配置於 6%BSA 及 0.1% Triton X-100 1:1 比例的混和溶液中)加入至 chamber 內(50 μL/well)，於 37 °C 細胞培養箱內反應至隔天。
- (7) 隔天，將一級抗體回收，接著避光將第二種一級抗體(抗體：依各廠牌所建議的濃度配置於 6%BSA 及 0.1% Triton X-100 1:1 比例的混和溶液中)加入至 chamber 內(50 μL/well)，於 37°C 細胞培養箱內反應至隔天。

- (8) 清除第二種一級抗體，在避光環境下將螢光二級抗體(抗體：1：200 配置於 6%BSA 及 0.1% Triton X-100 1:1 比例的混和溶液中)加入至 chamber 內(50  $\mu$ L/well)，於 37°C 細胞培養箱內反應至隔天。
- (9) 反應時間到達後，移除二級抗體，以 1×PBS 清洗三次，避光將 DAPI 染劑(DAPI：1×PBS = 1：1000)加入至 chamber 內(50  $\mu$ L/well)，於室溫避光反應 5 分鐘。
- (10) 最後移除 DAPI 染劑，以 1×PBS 清洗三次，將 chamber 置於螢光顯微鏡下觀察並拍照。

### (十)、細胞自噬試驗 (AO-acridine orange staining)

**1. 原理：**當細胞進行自噬時會產生酸性囊狀胞器(acidic organelle vesicles, AVO)。Acridine orange (AO)螢光色素染劑可以滲入自噬溶酶體中，具有分析細胞內酸性囊狀胞器的效果。此染劑會在低 pH 值酸性環境下產生紅色螢光，可藉由螢光顯微鏡來觀察細胞自噬形成。

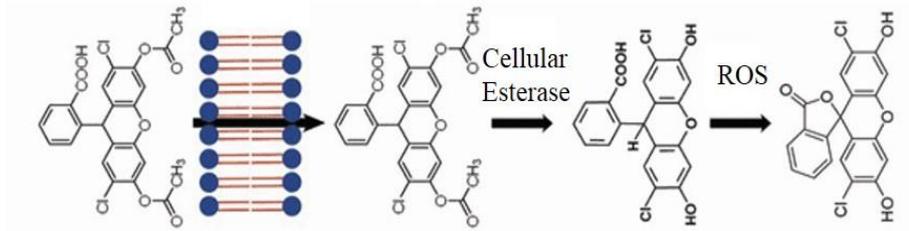
**2. AO 染劑配製：**將 Acridine orange (1 mg)粉末溶於1 mL 的 PBS 緩衝液中(配置成1 mg/mL)，再以 filter (0.22  $\mu$ M)進行過濾，儲存於-20°C 冰箱，在使用之前以細胞培養液稀釋(1:1000)。

#### 3. 實驗步驟：

- (1) 將黑色素瘤細胞( $2.5 \times 10^4$  cell/well)種於 24 孔盤。
- (2) 待隔日細胞貼壁後，加入不同濃度的香杉芝發酵液(0~300  $\mu$ g/mL)作用 24 小時。
- (3) 移除原細胞培養液，加入 PBS 緩衝液(1 mL)清洗兩次並移除。
- (4) 於避光環境下加入含 AO 染劑(1  $\mu$ g/mL)的細胞培養液 (800  $\mu$ L/well)，並放置於 37°C 細胞培養箱中 1 小時。
- (5) 移除細胞液，加入 PBS 緩衝液(1 mL)清洗兩次並移除，第三次加入 500  $\mu$ L PBS 緩衝液。
- (6) 將 24 孔盤移至螢光顯微鏡下以紅色螢光觀察並拍照紀錄。

### (十一)、活性氧化物(ROS)生成試驗

**1. 原理：**2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA)為一種脂溶性染劑，有通透細胞膜和發出螢光的能力，進入細胞後會和細胞內的乙醯脂酶 (esterases) 結合而進行去乙醯化作用，形成非螢光性的 DCFH 後，再被活性氧化物(ROS)氧化成可發螢光的 DCF。DCF 在受到波長485 nm 的光激發後，會生成530nm 波長的螢光，可利用螢光光譜儀(fluorescence spectrophotometer) 進行偵測，以分析 ROS 活性氧化物的生成量。



DCFH<sub>2</sub>-DA 作用原理(Cosmo Bio Co., LTD 官方網站)

## 2. 試劑配置:

- (1) 10 mM DCFH<sub>2</sub>-DA 染劑：取 4.873 mg 之 DCFH<sub>2</sub>-DA，加入經無處理後 PBS 緩衝液。實驗前再用滅菌的 PBS 稀釋 1000 倍，變成 10 μM 的作用濃度。
- (2) 0.25% Triton-100：取 250 μL 的 Triton-100 加入 100 mL 的 PBS 緩衝液。

## 3. 方法：

- (1) 將黑色素瘤細胞以細胞數( $2.5 \times 10^4$ )種於 24 孔盤。
- (2) 待隔日細胞貼壁後，加入不同濃度的香杉芝發酵液(0~300 μg/mL)，分別於培養箱培養 0-120 分鐘。
- (3) 待移除細胞培養液後，使用 PBS 緩衝液(400 μL/次)清洗兩次後移除。
- (4) 加入濃度 10 μM 的 DCFH<sub>2</sub>-DA 染劑 (1 mL/well)，並將鋁箔紙蓋於盤上避光後，放入培養箱反應 30 分鐘。
- (5) 將上清液移除後，用 PBS (400 μL/次)清洗三次。
- (6) 移至螢光顯微鏡下觀察並照相記錄其 ROS 生成量。
- (7) 在螢光顯微鏡下觀察並拍照(200X)。

## (十二)、香杉芝和化療藥物 paclitaxel(紫杉醇)合併實驗及計算協同作用(CI, Combination Index)

天然成份對生物活性的效應，與化療藥物彼此間可能具有協同性(Synergism)或拮抗性(Antagonism)或加成效應(additive effect) (謝明學、周瑞玲, 2002)。實驗以香杉芝和化療藥物 paclitaxel(紫杉醇)單獨施用及以不同劑量相互配對合併使用，測試其對 A2058 細胞的存活率效應間的關係。根據 Chou TC 等人(1984)及 Liang Zhao 等(2004)所提出的兩種藥物的聯用指數 (combination index, CI) 來分析評估兩種藥物之間的交互作用。評估的計算公式為： $CI = CA,x/ICx,A + CB,x/ICx,B$ ，其中  $CA,x$  和  $CB,x$  是指同時合併使用 A、B 兩種藥物達到 x% 有效時的各別部分藥物濃度， $ICx,A$  和  $ICx,B$  是指單獨使用一種藥物達到 x% 有效時的藥物濃

度。計算出 CI 值後，如果  $CI < 1$  則兩藥物聯用為協同作用；如果  $CI = 1$ ，則兩藥聯用為加成作用；如果  $CI > 1$ ，則兩藥聯用為拮抗作用。

### 三、研究結果與討論

#### (一)、研究結果

##### 1. 香杉芝(*Antrodia salmonea*, AS)對黑色素瘤(A2058 及 A375)細胞的抗癌活性

加入不同濃度香杉芝發酵液(*Antrodia salmonea*, AS)作用人類黑色素瘤(A2058 及 A375)細胞於 24 小時後，以 MTT 試驗黑色素瘤測定細胞存活率，觀察癌細胞生長情形。相對於控制組，加入 AS (0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )後，發現黑色素瘤 A2058 及 A375 細胞數目明顯下降，且細胞存活率隨著劑量增加有明顯下降趨勢(Fig 1A&B)；黑色素瘤 A2058 及 A375 細胞的  $IC_{50}$ (抑制 50%細胞存活率濃度)分別為 187 及 297  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig 1A&B)。總結，比較 AS 的抗癌活性，發現抗黑色素瘤 A2058 細胞強於 A375 細胞。此外，利用倒立式相位差顯微鏡(phase microscope)觀察 A2058 細胞形態，發現黑色素瘤細胞形態不完整與細胞膜皺縮的現象(Fig 1C)。

##### 2. AS 誘導黑色素瘤細胞凋亡

細胞凋亡的一個特徵是 DNA 的斷裂，本研究以 TUNEL assay 偵測黑色素瘤細胞在不同香杉芝濃度下的 DNA 斷裂現象。結果顯示，給予香杉芝作用於黑色素瘤細胞 24 小時後，隨著香杉芝的濃度上昇會增加細胞 DNA 斷裂(Fig 2 A&B)。本研究利用 Annexin V-PI 雙染法發現，AS (0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用黑色素瘤 A2058 細胞會誘導細胞壞死(Necrosis, Q2 由  $0.1\pm 0.1\%$ 增加至  $35.3\pm 1.7\%$ )與晚期細胞凋亡(Late apoptosis, Q4 由  $0.1\pm 0.1\%$ 增加至  $62.8\pm 1.7\%$ ) (Fig 2C)。本實驗證實 AS 具有誘導黑色素瘤細胞進行細胞壞死與晚期凋亡的能力。

##### 3. AS 誘導黑色素瘤細胞凋亡相關蛋白質分析(Caspase-3/ PARP/Bax/Bcl-2)

本實驗利用西方墨點法來偵測黑色素瘤 A2058 癌細胞凋亡。加入不同濃度的 AS (0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 5, 10 或 15  $\mu\text{M}$ )，作用 A2058 細胞 24 小時，發現 Procaspase-3 與 PARP 表現量減少而 Caspase-3 及 Cleaved PARP 表現量增加(Fig 3 A-E)。加入細胞凋亡抑制劑 Z-VAD-FMK 可保護 AS 誘導黑色素瘤細胞死亡(Fig 4)。本實驗證實 AS 具有誘導黑色素瘤細胞進行細胞凋亡。

##### 4. AS 誘導黑色素瘤細胞自噬作用

細胞自噬會讓細胞產生的酸性囊泡(AVO, acidic Organelle vesicles)，本實驗利用 AO (Acridine

orange)染色法來偵測黑色素瘤 A2058 細胞自噬。由於 AO (Acridine orange)可與細胞自噬溶酶體(lysosome)分解(呈酸性)胞器物質結合呈紅色螢光，可藉由螢光顯微鏡觀察。結果顯示，黑色素瘤 A2058 細胞加入 AS (0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )培養 24 小時後，可偵測到黑色素瘤細胞有產生紅色螢光 AVO 與自噬的現象(Fig 5A&B)。

## 5. AS 誘導黑色素瘤細胞自噬相關蛋白質分析(LC-3I/II)

加入不同濃度的 AS (0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用黑色素瘤 A2058 細胞 24 小時，並利用西方墨點法偵測細胞自噬的蛋白質，發現 LC3-I/II 表現量增加(Fig 6A-C)。在細胞自噬中可利用自噬抑制劑 3-MA (3-methyladenine)及 CQ (Chloroquine)，證明細胞在無法驅動自噬時是否減緩細胞的死亡。加入自噬抑制劑 3-MA/CQ 可保護 AS 誘導黑色素瘤細胞死亡(Fig 7A&B)，推論 AS 具有誘導黑色素瘤細胞自噬性死亡的能力。在細胞自噬中可利用自噬抑制劑 3-MA (3-methyladenine)及 CQ (Chloroquine)，證明細胞在無法驅動自噬時是否減緩細胞的死亡。加入自噬抑制劑 3-MA/CQ 可保護 AS 誘導黑色素瘤細胞死亡(Fig 7A&B)，推論 AS 具有誘導黑色素瘤細胞自噬性死亡的能力。

## 6. AS 誘導黑色素瘤細胞 Bax/Bcl-2 及 Beclin-1/Bcl-2 比例增加

此外，我們發現 AS 可誘導黑色素瘤促細胞凋亡 Bax 表現量增加，而抗細胞凋亡 Bcl-2 表現量減少(Fig 6B&D; Fig 8A)；我們亦發現促細胞自噬 Beclin-1 表現量增加(Fig 8A)。經由 Bax/Bcl-2 及 Beclin-1/Bcl-2 比例增加(Fig 8B&C)，可再次驗證 AS 可同時誘導黑色素瘤細胞凋亡及自噬性死亡。

## 7. AS 誘導黑色素瘤細胞活性氧化物 ROS 增加

活性氧化物ROS會誘發癌細胞凋亡/自噬作用[6]。利用DCFH<sub>2</sub>-DA螢光染劑發現，AS會誘導黑色素瘤A2058細胞ROS生成量增加(Fig 9A&B)。

## 8. AS 經由 ROS 增加而誘導黑色素瘤細胞凋亡與自噬作用

我們亦發現加入抗氧化劑NAC (*N*-acetylcysteine)可保護AS對黑色素瘤A2058細胞的毒殺，推測AS可能經由活性氧化物ROS來毒殺黑色素瘤細胞(Fig 10)。此外，加入抗氧化劑NAC可保護AS誘導酸性囊泡AVO形成(Fig 11A&B)，推論AS可能經由活性氧化物ROS有誘導黑色素瘤細胞自噬性死亡。

## 9. DHK 與抗癌藥物 Paclitaxel 對黑色素瘤細胞具協同作用

同時加入 AS (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )與抗癌藥物 Paclitaxel (0, 100, 200或300 nM)，作用人類黑色素瘤 (A2058 及 A375)細胞於24小時後，發現 AS 與 Paclitaxel 具協同作用( $\text{CI}<1$ ) (Table 1 & Table 2)。

Fig 1. 香杉芝(*Antrodia salmonea*, AS)對黑色素瘤(A2058 及 A375)細胞的抗癌活性

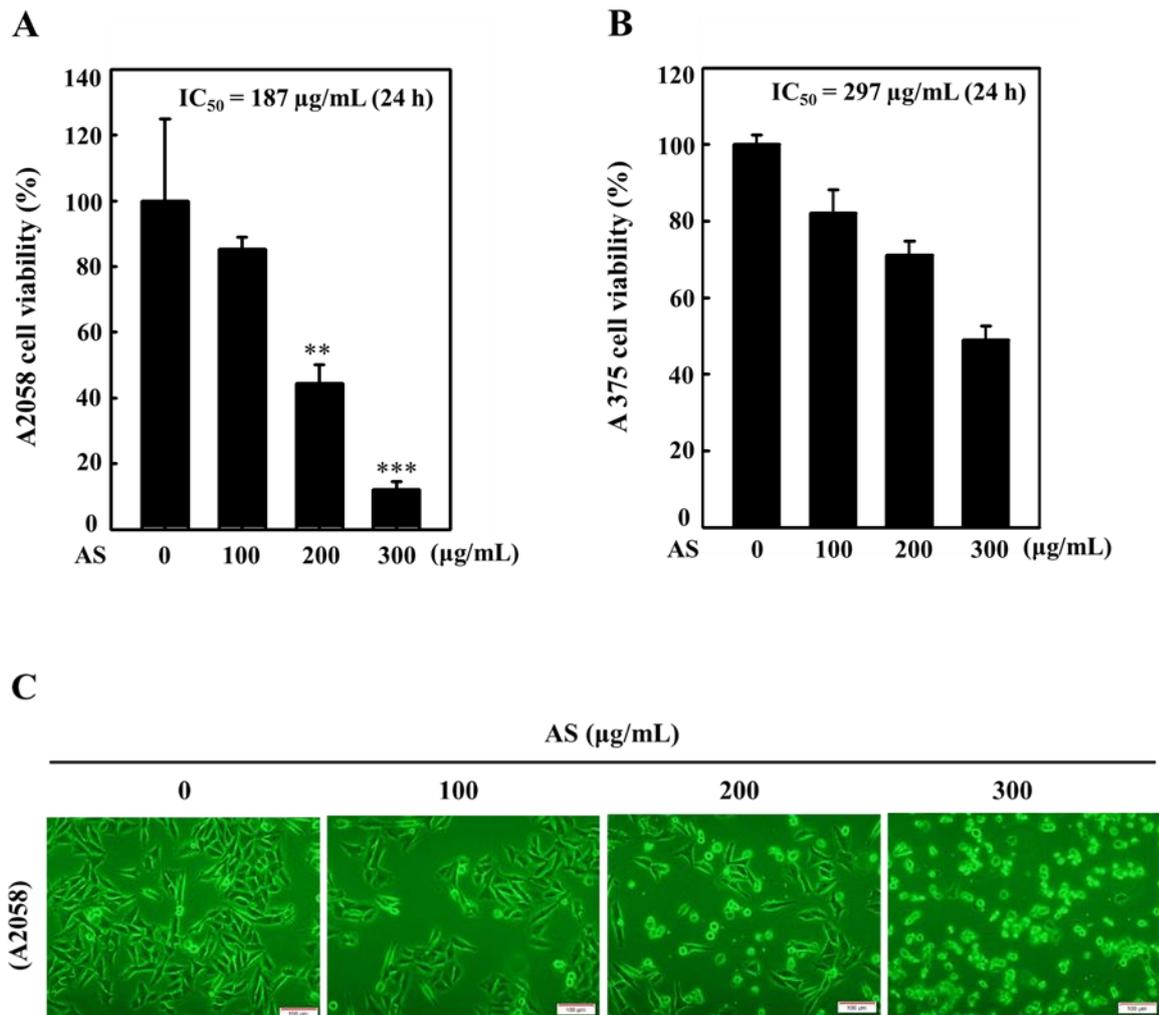
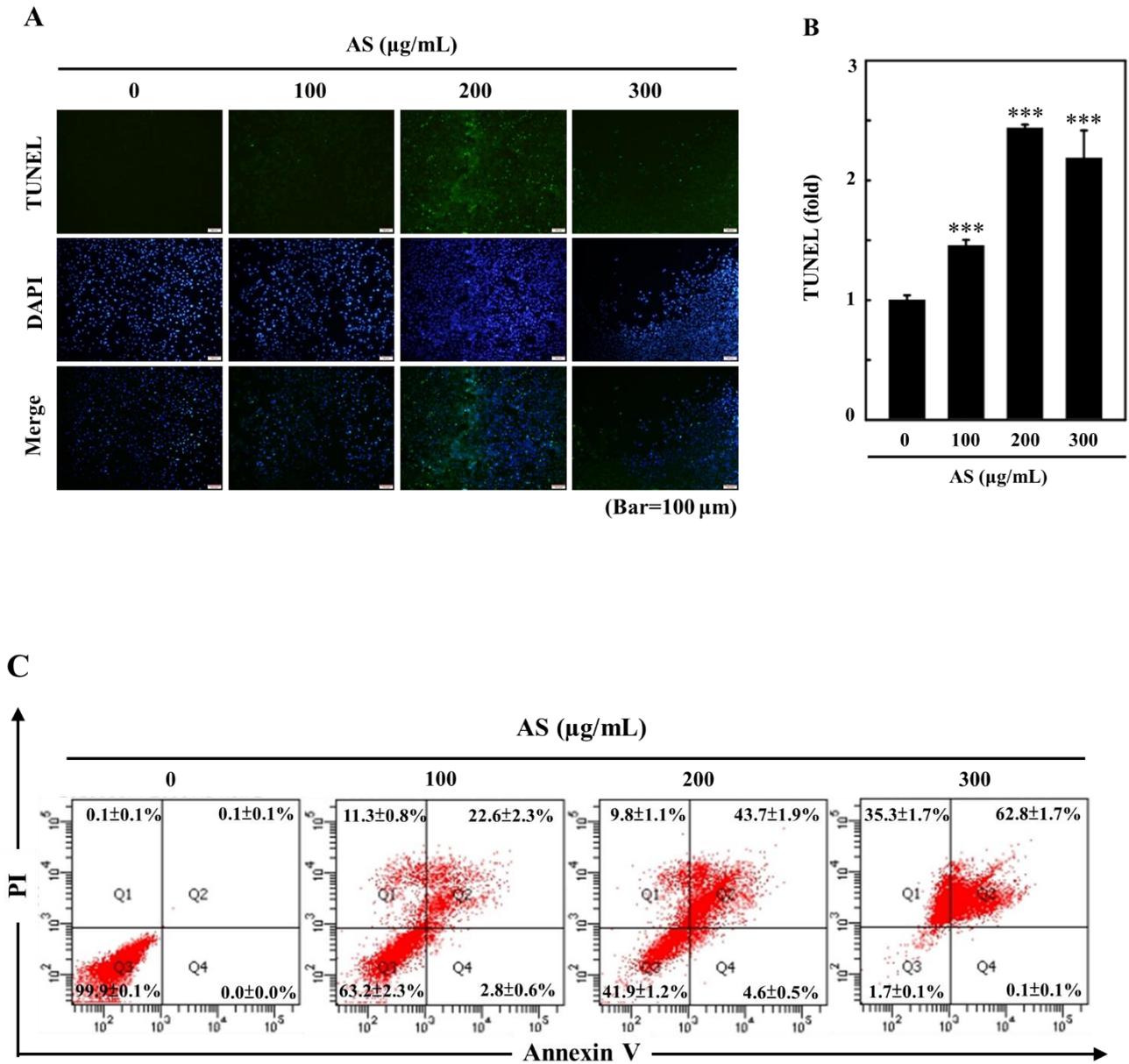


Fig 2. AS 誘導黑色素瘤 A2058 細胞晚期凋亡



**Fig 3. AS 誘導黑色素瘤細胞凋亡相關蛋白質分析(Caspase-3/ PARP)**

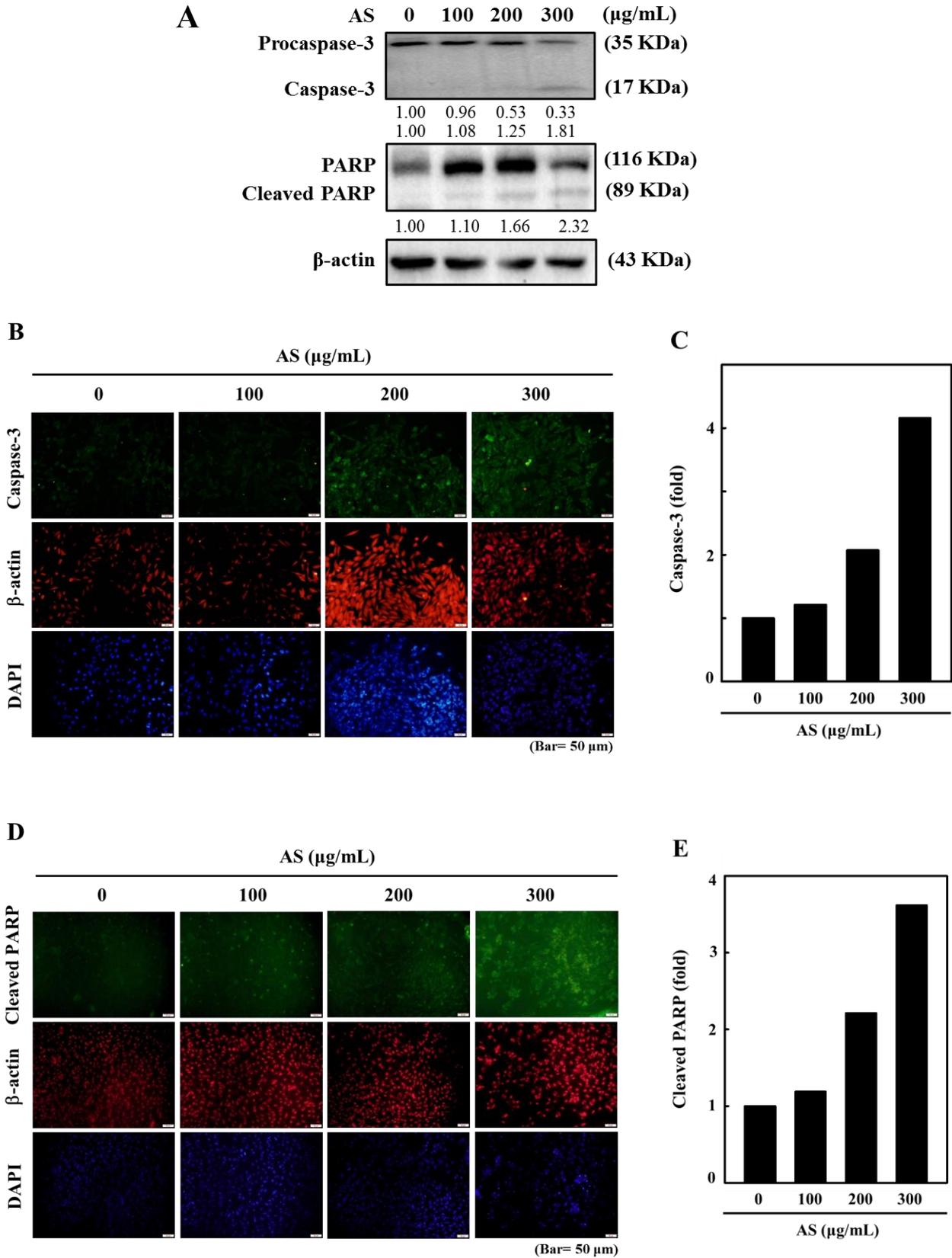


Fig 4. 細胞凋亡抑制劑 Z-VAD-FMK 可保護 AS 誘導黑色素瘤細胞死亡

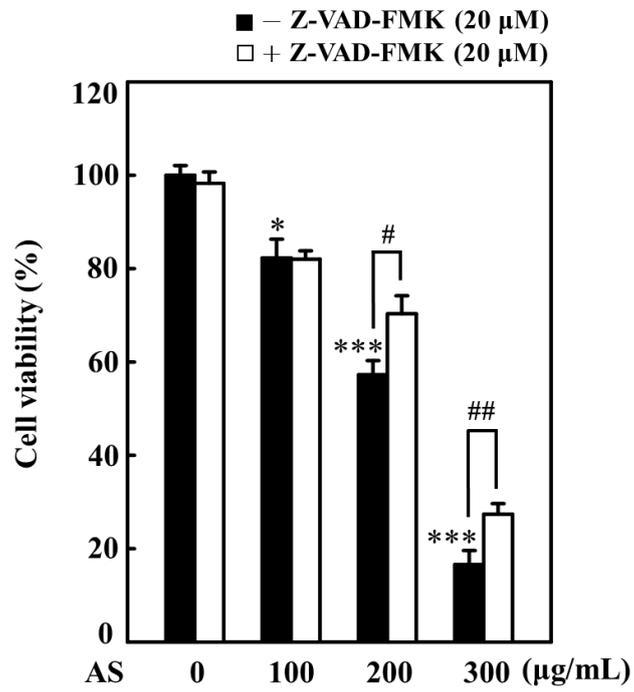


Fig 5. AS 誘導黑色素瘤細胞自噬作用

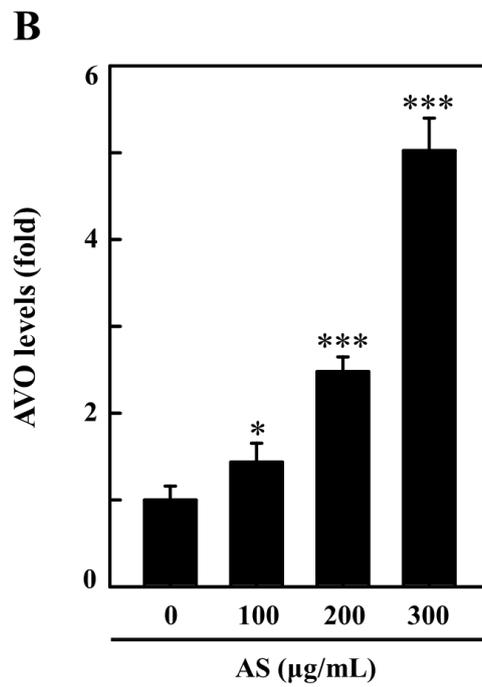
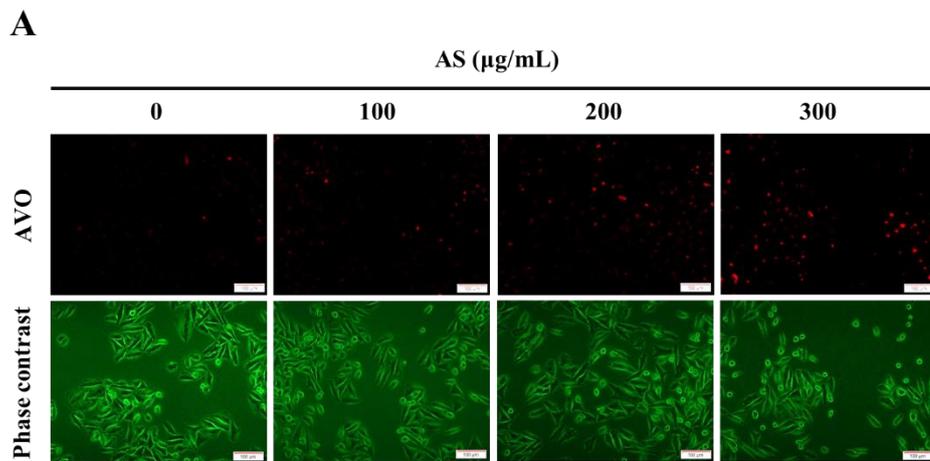


Fig 6. AS 誘導黑色素瘤細胞自噬相關蛋白質分析(LC3-I/II)

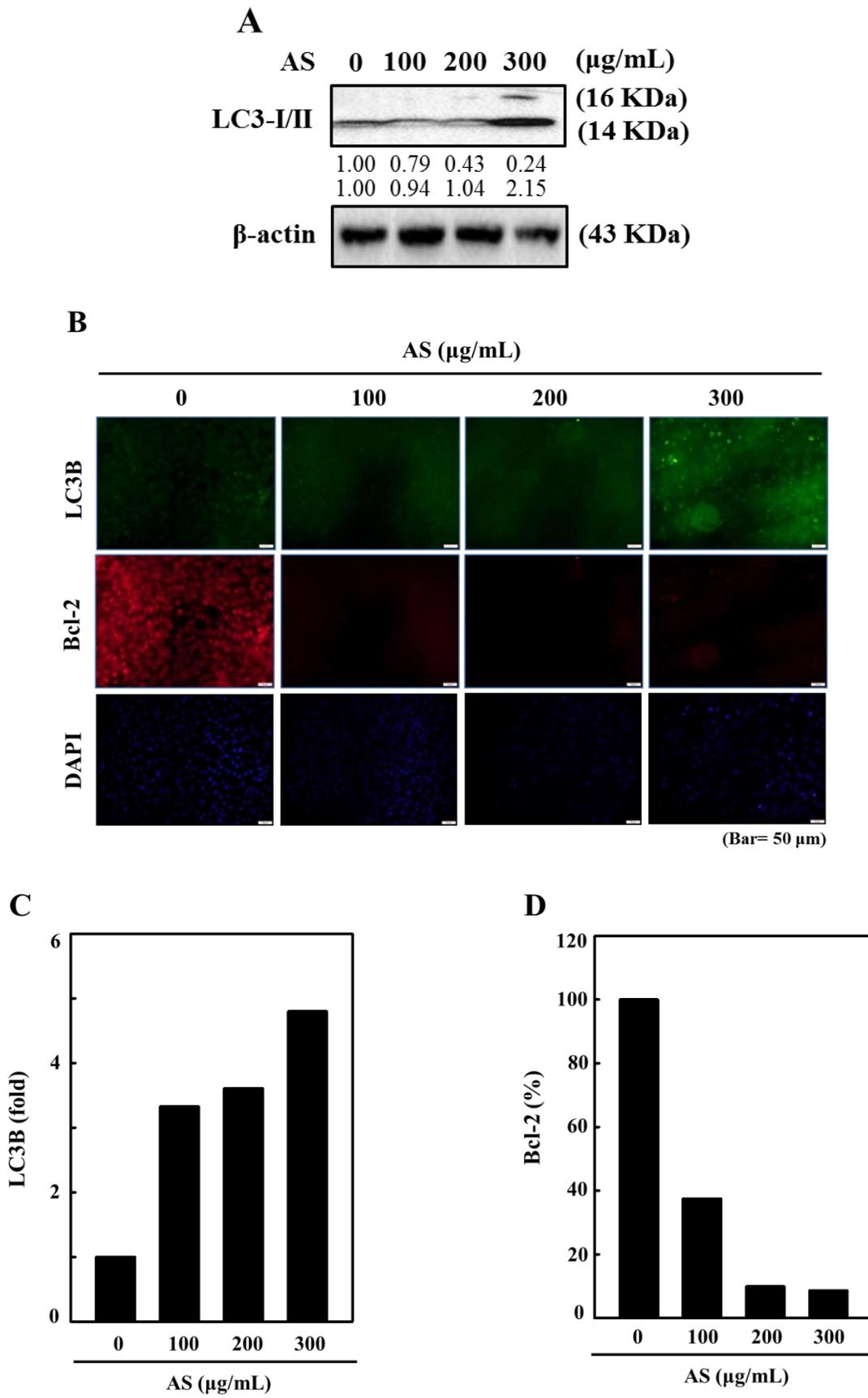


Fig 7. 自噬抑制劑 3-MA/CQ 可保護 AS 誘導黑色素瘤細胞死亡

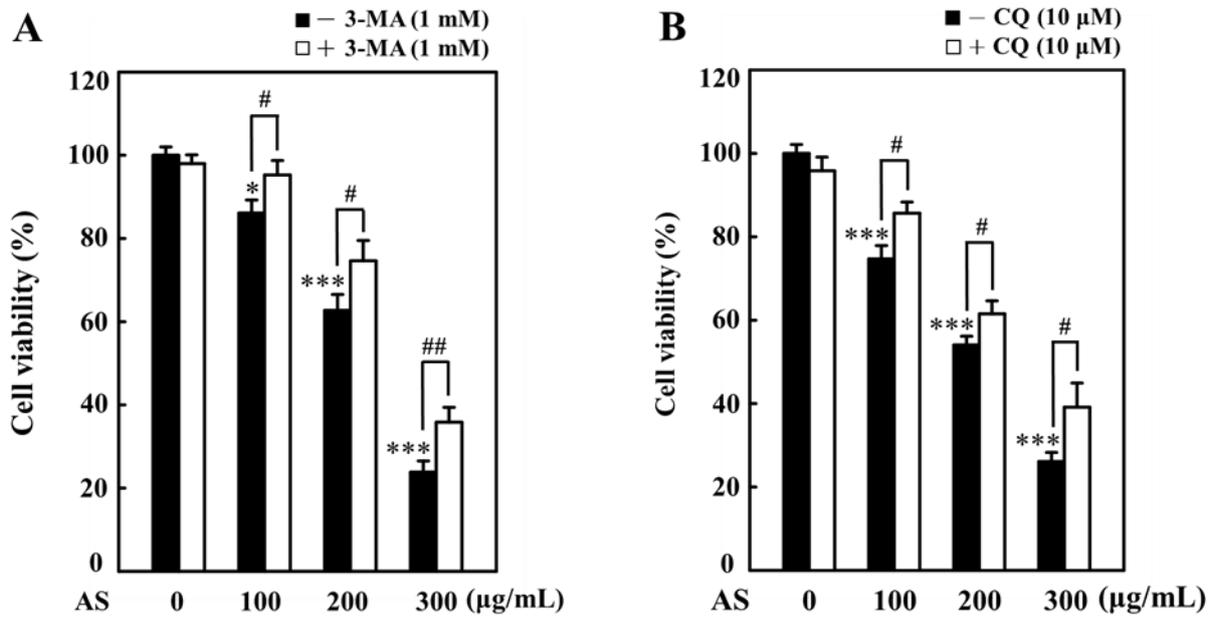


Fig 8. AS 誘導黑色素瘤細胞 Bax/Bcl-2 及 Beclin-1/Bcl-2 比例增加

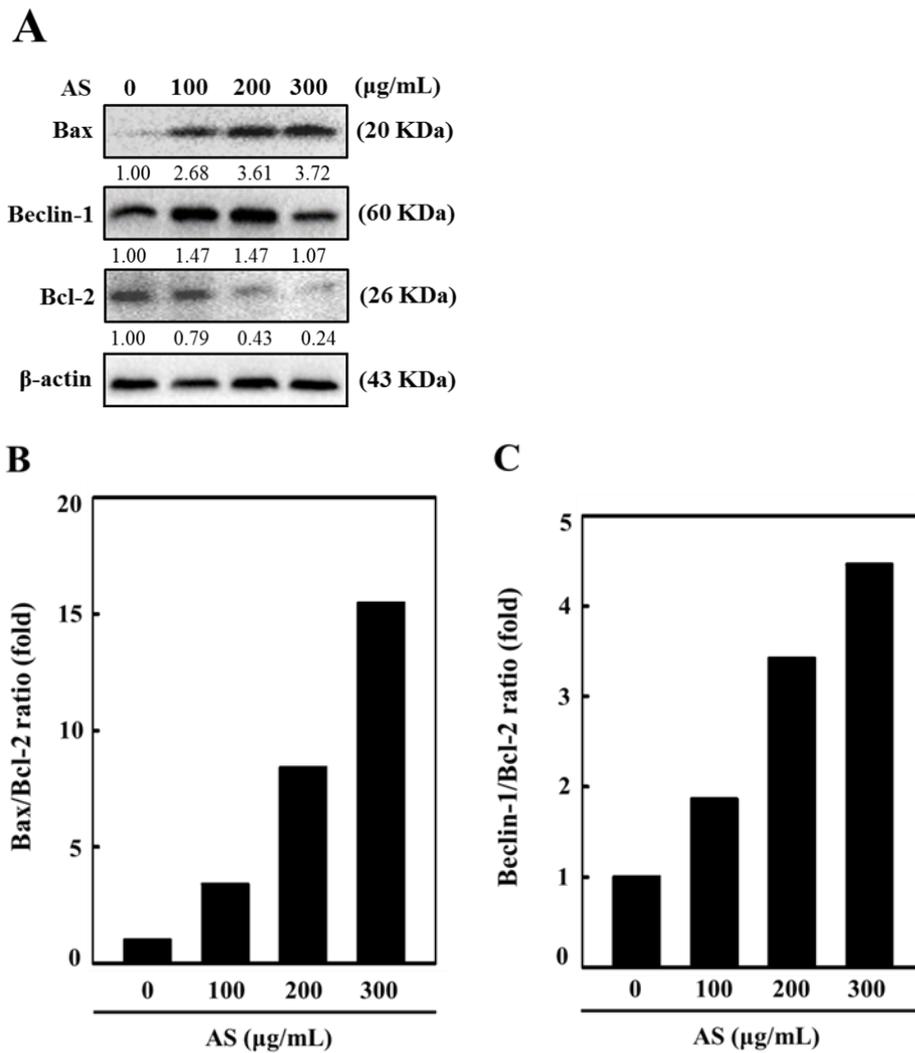


Fig 9. AS 誘導黑色素瘤細胞活性氧化物 ROS 增加

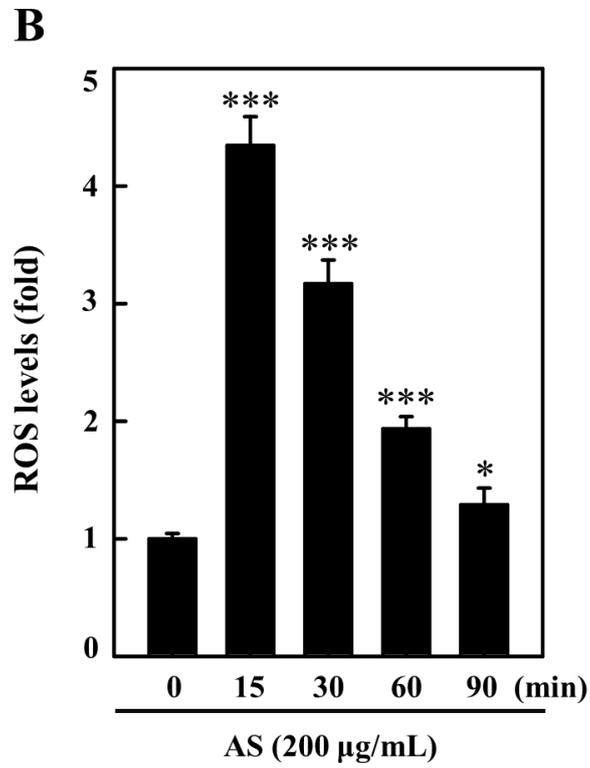
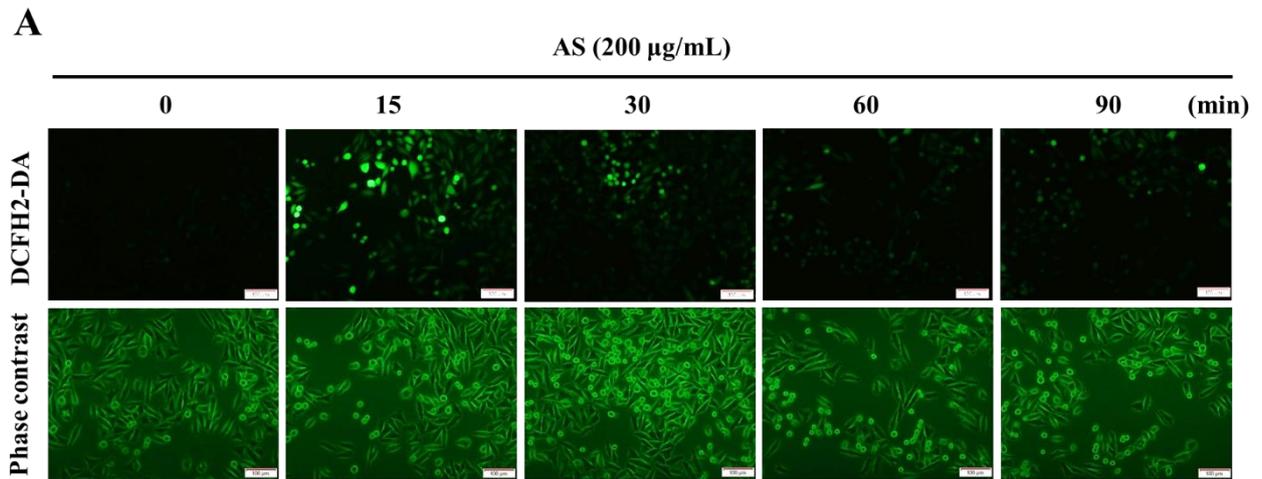


Fig 10. AS 經由 ROS 增加而誘導黑色素癌細胞死亡

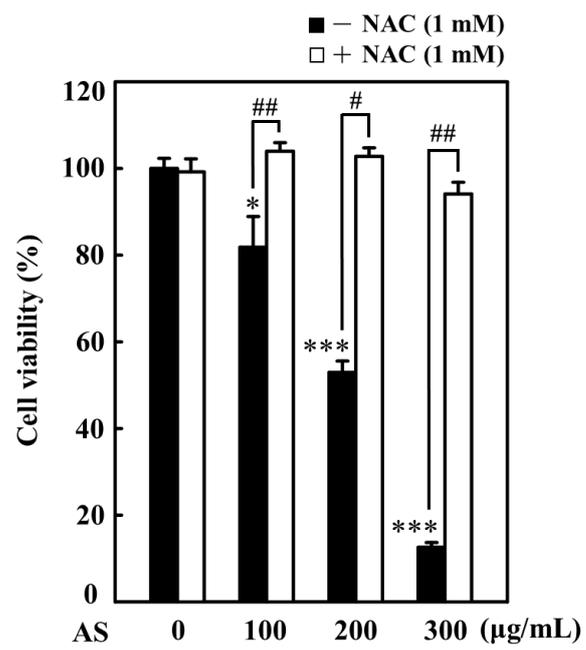
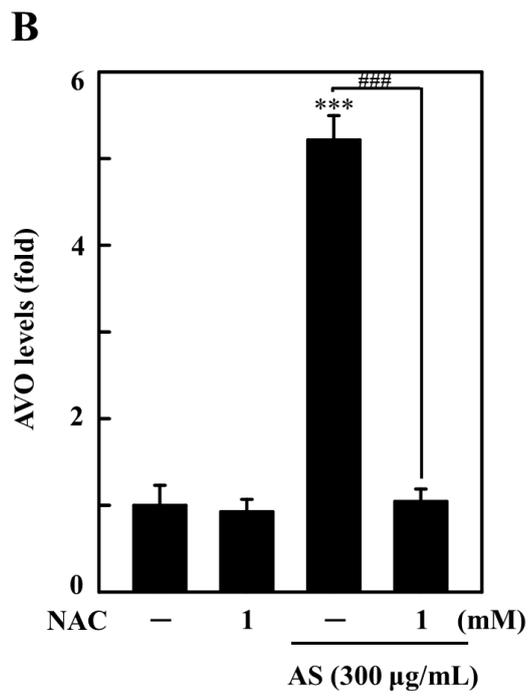
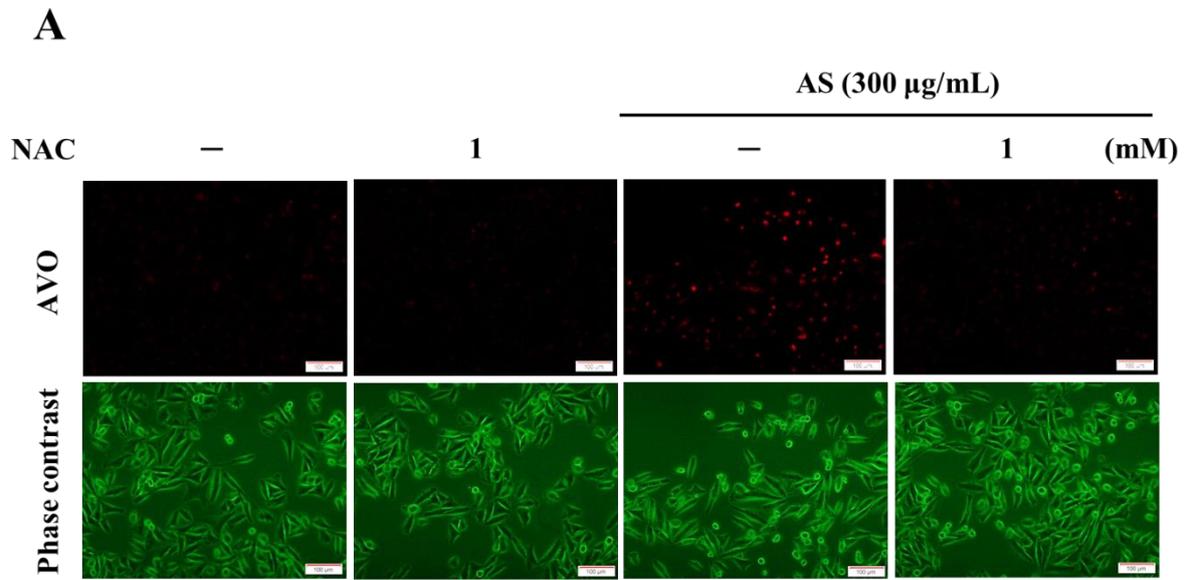


Fig 11. AS 經由 ROS 增加而誘導黑色素癌細胞自噬作用



**Table 1.** The synergism effects of AS and Paclitaxel on A2058 cells

| Treatment         | ( $\mu\text{g/mL}$ )/<br>(nM) | Cell number (%) | Predicted value* | Combination index (CI)** |
|-------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| AS                | 100                           | 81.6 $\pm$ 0.6  | —                | —                        |
| Paclitaxel        | 100                           | 73.6 $\pm$ 1.1  | —                | —                        |
|                   | 200                           | 69.4 $\pm$ 1.9  | —                | —                        |
|                   | 300                           | 63.7 $\pm$ 1.2  | —                | —                        |
| AS+<br>Paclitaxel | 100 + 100                     | 58.0 $\pm$ 5.5  | 61.3             | 0.798                    |
|                   | 100 + 200                     | 51.2 $\pm$ 3.5  | 58.7             | 0.736                    |
|                   | 100 + 300                     | 41.4 $\pm$ 3.1  | 53.4             | 0.578                    |

\*Predicted value :  $(\%A \times \%B)/100$ .

\*\*Combination index according to Chou and Talalay [1], Values  $< 1$  indicates synergism.

**Table 2.** The synergism effects of AS and Paclitaxel on A375 cells

| Treatment         | ( $\mu\text{g/mL}$ )/<br>(nM) | Cell number (%) | Predicted value* | Combination index (CI)** |
|-------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| AS                | 100                           | 81.4 $\pm$ 1.8  | —                | —                        |
|                   | 200                           | 63.2 $\pm$ 1.0  | —                | —                        |
| Paclitaxel        | 100                           | 80.3 $\pm$ 1.6  | —                | —                        |
|                   | 200                           | 76.1 $\pm$ 1.9  | —                | —                        |
|                   | 300                           | 68.0 $\pm$ 3.8  | —                | —                        |
| AS+<br>Paclitaxel | 100 + 100                     | 68.1 $\pm$ 3.7  | 65.4             | 0.886                    |
|                   | 100 + 200                     | 61.4 $\pm$ 5.3  | 62.0             | 0.770                    |
|                   | 100 + 300                     | 52.8 $\pm$ 2.5  | 55.4             | 0.806                    |
| AS+<br>Paclitaxel | 200 + 100                     | 50.8 $\pm$ 5.1  | 55.2             | 0.704                    |
|                   | 200 + 200                     | 46.1 $\pm$ 2.6  | 50.0             | 0.645                    |
|                   | 200 + 300                     | 35.1 $\pm$ 2.8  | 43.0             | 0.492                    |

\*Predicted value :  $(\%A \times \%B)/100$ .

\*\*Combination index according to Chou and Talalay [1], Values  $< 1$  indicates synergism.

## (二)、討論

癌症連續多年蟬聯國人十大死因榜首，是現代人健康的最大威脅。許多專家學者紛紛於天然植物中尋找具有潛力的抗癌物質。我們研究發現，加入不同濃度香杉芝發酵液(AS, 0-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )後，發現黑色素瘤A2058及A375細胞數目明顯下降 (Fig 1A&B)，且細胞存活率隨著劑量增加有明顯下降趨勢。此外，我們發現AS的抗癌活性為抗黑色素A2058癌細胞( $\text{IC}_{50}$  為187  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )強於A375癌細胞( $\text{IC}_{50}$ 為297  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。利用倒立式相位差顯微鏡(phase microscope)觀察細胞形態，發現黑色素瘤細胞形態不完整與細胞膜皺縮的現象(Fig 1C)。

利用細胞凋亡(Apoptosis)的特性可應用於癌症治療，使癌細胞自行凋亡而不破壞其他正常細胞。細胞凋亡為一種獨特的細胞死亡形式，其主要變化包括 DNA 斷裂(DNA fragmentation)等特徵[6]。在 TUNEL assay 中發現，香杉芝會誘導黑色素瘤細胞凋亡式 DNA 斷裂(Fig 2A&B)。Annexin V-PI 雙染法發現，AS 會誘導黑色素瘤細胞晚期細胞凋亡(Fig 2C)。PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)是 DNA 修補酵素，其表現是藉由 DNA 斷裂而啟動；當細胞凋亡發生時，PARP (116 KDa)會被凋亡蛋白 Caspase-3 水解分裂成 89 KDa 蛋白質而失去原本的功能，是研究細胞凋亡最好的標的[6]。研究指出，若抗凋亡 Bcl-2 蛋白大量表現，則促使細胞存活；反之，若促凋亡 Bax 蛋白大量表現，則促使細胞走向凋亡。西方墨點法實驗發現，AS 可使黑色素瘤細胞凋亡 Caspase-3 蛋白表現量增加、PARP 蛋白裂解、促凋亡 Bax 蛋白增加及抑凋亡 Bcl-2 蛋白減少(Fig 3A-E; Fig 8A&B)。加入細胞凋亡抑制劑 Z-VAD-FMK 可顯著保護 AS 誘導黑色素瘤細胞死亡(Fig 4)，推論 AS 可誘發黑色素瘤細胞凋亡(Apoptosis)。

細胞自噬 (autophagy)可調控細胞生長或死亡，是體內衡定的重要機轉[6]。細胞自噬內質網會製造出雙層的膜(主要為自噬蛋白LC3-I轉變為LC3-II)，將細胞內的胞器或物質包圍起形成自噬體(Autophagosome)，再和溶酶體結合形成自溶體(Autolysosome)，將胞器或物質分解產生。AO (Acridine orange)螢光染劑，可以滲入自溶體(Autolysosome)中產生紅色螢光，進而標記活細胞自噬體的形成[6]。AO染色法發現，AS作用黑色素瘤細胞會產生酸性囊泡(AVO, Acidic organelle vesicles) (Fig 5A&B)。西方墨點法發現，自噬蛋白LC3-II增加、促自噬蛋白Beclin-1增加及抑自噬蛋白Bcl-2減少(Fig 6A-D; Fig 8A&C)。抗凋亡Bcl-2除了會抑制細胞凋亡外，在細胞自噬中也扮演著抑制者的角色。促自噬蛋白Beclin-1和Bcl-2之間的結合作用，會透過干擾Beclin-1引起細胞自噬。加入細胞自噬抑制劑 3-MA/CQ可顯著保護AS誘導黑色素瘤細胞酸性囊泡及細胞死亡(Fig 7A&B)，推論AS會誘導黑色素瘤細胞進行自噬性死亡。

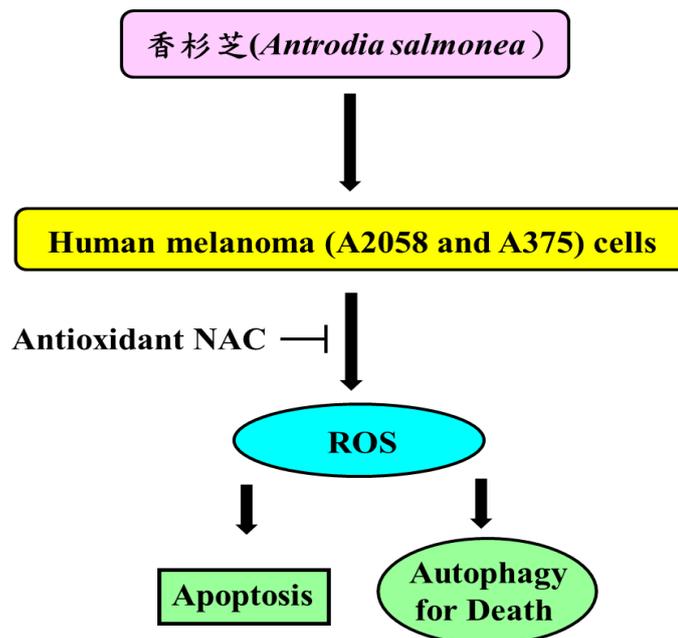
ROS會誘發癌細胞凋亡與自噬作用[6]。利用DCFH<sub>2</sub>-DA螢光染劑發現，AS會誘導黑色素瘤細胞ROS生成量增加(Fig 9A&B)。我們亦發現加入抗氧化劑NAC (N-acetylcysteine)可保護AS對黑色素瘤細胞的毒殺(Fig 10)及抑制AVO形成(Fig 11A&B)。推測AS可能經由活性氧化物

ROS來毒殺黑色素癌細胞及誘導黑色素癌細胞凋亡與自噬作用。我們亦研究發現，同時加入AS (100 µg/mL)與抗癌藥物Paclitaxel (0, 100, 200或300 nM)，作用人類黑色素癌(A2058 及 A375)細胞於24小時後，發現AS與Paclitaxel具協同作用(CI<1) (Table 1 & Table 2)。

#### 四、結論與應用

癌症化學預防(Cancer chemoprevention)的概念是希望藉天然物或藥物的使用，抑制具有侵犯性的癌症之發展，來預防減緩或終止癌形成過程，因此功能性食品開發是目前全球趨勢[1-5]。我們研究發現，香杉芝(*Antrodia salmonea*, AS)會誘導人類黑色素癌細胞毒性。此外，我們亦發現香杉芝可誘發黑色素癌細胞凋亡(Apoptosis)及細胞自噬(Autophagy)死亡。然而，香杉芝抗黑色素癌功效，未來幾個月將進行更多細胞凋亡與自噬機制之探討。總結，香杉芝具有良好的抗黑色素癌功效，可開發成預防及抗黑色素癌的藥品與保健食品。本研究希望香杉芝能成為台灣特有的健康食品，推廣全球及造福人類之健康。

#### 機制圖：



#### 五、參考文獻

- 1.You-Cheng Hseu, et al., 2014. *Antrodia salmonea* in submerged culture exhibits antioxidant activities in vitro and protects human erythrocytes and low-density lipoproteins from oxidative modification. *Food Chem Toxicol.* p150-157
- 2.Hsin-Ling Yang, et al., 2014. *Antrodia salmonea* inhibits TNF- $\alpha$ -induced angiogenesis and atherogenesis in human endothelial cells through the down-regulation of NF- $\kappa$ B and up-regulation

of Nrf2 signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*. p394-406

3. Hsin-Ling Yang, et al., 2015. Induction of Nrf2-mediated genes by *Antrodia salmonea* inhibits ROS generation and inflammatory effects in lipopolysaccharide- stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Function*. p229-240.

4. Hsin-Ling Yang, et al., 2014. The anti-tumor activity of *Antrodia salmonea* in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells is mediated via the induction of G<sub>1</sub> cell-cycle arrest and apoptosis *in vitro* or *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. p499-510

5. K J Senthil Kumar, et al., 2020. A mechanistic and empirical review of antcins, a new class of phytosterols of *formosan fungi*. *Journal of and Drug Analysis*. p38-59.

6. You-Cheng Hseu, et al., 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):E2936. doi: 10.3390/cancers12102936.

## 【評語】 090007

在本專題中，作者發現香山芝發酵液會造成黑色素癌細胞 ROS 增加並造成凋亡與自噬作用。本篇研究做了非常扎實的實驗以推導出結果，期待未來進行更多關於香山芝發酵液細胞凋亡與自噬分子機制之探討。另外，如果有香山芝發酵液對於非黑色素癌細胞的影響作為對照會更好。對於實驗定量的原理和解釋可以再進步的空間。