

2025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

治癌良「芝」— 探討樟芝萃取物對口腔癌幹細胞的影響

就讀學校

臺中市私立明道高級中學

指導教師

余承佳

王姍珮

作者姓名

林承韻

林侑勳

林弘侑

關鍵詞

牛樟芝菌絲萃取物、口腔癌、癌幹細胞

作者簡介



大家好，我是林佑勳，目前專注於化學領域的學習，對自然科學充滿熱忱。參與科學比賽的經歷磨練了我的邏輯思維，也培養了創新應對挑戰的能力。對我而言，科學是理解自然與生活的關鍵，也是實現價值的途徑。性格上，我細心且耐心，做事謹慎又認真，同時樂觀幽默，擅長用正向態度面對挑戰。我也喜歡與人分享知識，這讓我在團隊合作中更能發揮優勢。課餘時間，我熱衷於氣球手作，創造造型或挑戰複雜設計，既發揮創意，也紓解壓力。

大家好，我是林弘侑。我對生物學有十分興趣。在課餘時間，我常自行研讀相關資料，如普通生物學，其中許多的知識都令我對自然科學的奧秘感到十分好奇。我也在相關競賽中與各好手切磋，一方面發現自己的不足，一方面激發我對生物的熱忱。此外，我也樂於助人。在假期間，我常參與志工服務。曾經參與過醫學志工、偏鄉小學教育等。我在這些服務經驗中培養為人著想的能力，並珍惜自己所有。

大家好，我叫林承諱，是一名高中生，對生物學有著濃厚的興趣。我喜歡深

入鑽研生物相關的學習和研究，未來的目標是成為一名醫生，雖然目前還沒有決定要專攻哪個科別。在課業之外，我有許多興趣愛好讓我的生活更加充實。我喜歡打籃球和游泳，這不僅讓我保持體力，也能幫助我專注。此外，我對英文學習充滿熱情，也常常聆聽R&B音樂，它既能啟發我，也讓我放鬆身心。除了對科學的熱愛，我也有創作的興趣。我喜歡寫散文，藉由文字表達自己的想法和感受。同時，我也是一個喜歡與人互動、熱愛交朋友的人，因為我相信與他人的交流能讓生活更加豐富，也能開闊自己的視野。

2025年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區 別：台灣，中華民國

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：治癌良「芝」—探討樟芝萃取物對口腔癌幹細胞的影響

關 鍵 詞：牛樟芝菌絲萃取物、口腔癌、癌幹細胞

編號：

摘要

研究旨在檢測牛樟芝菌絲萃取物 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞的影響。過去研究發現細胞膜蛋白 CD44 的表現與癌幹性有密切關係，因此本實驗著重於追蹤 CD44 的表現情況。透過 3D 懸浮培養獲得腫瘤球來擴增癌幹細胞群並用流式細胞儀分析。隨著兩種牛樟芝萃取物的濃度增加，CD44 表現量下降，顯示此二化合物可能可以抑制其表現。實驗顯示牛樟芝萃取物不僅抑制癌幹細胞的存活率，且在低濃度下顯著抑制成球效率，還能促進癌幹細胞的凋亡。研究結果說明牛樟芝萃取物對癌幹細胞有影響，而這個發現可能可以提供潛在的治療靶點，有益未來口腔癌治療發展。

Abstract

The study aimed to investigate the effects of 4-Acetylanthroquinonol B and Antrodin C extracted from *Antrodia camphorata* on oral cancer stem cells. Previous research has found that the expression of the cell membrane protein CD44 is closely related to cancer stemness; therefore, this experiment focused on tracking the expression levels of CD44. Tumor spheres were obtained through 3D suspension culture to amplify the population of cancer stem cells, which were then analyzed using flow cytometry. As the concentration of the two *Antrodia* extracts increased, the expression of CD44 decreased, indicating that these compounds may inhibit its expression. The experiments demonstrated that the *Antrodia* extracts not only reduced the viability of cancer stem cells but also significantly inhibited sphere formation efficiency at low concentrations and promoted the apoptosis of cancer stem cells. The results indicate that *Antrodia* extracts have an impact on cancer stem cells, which could provide potential therapeutic targets beneficial for the future development of oral cancer treatments.

壹、前言

一、研究動機

在台灣，根據 111 年衛福部指出，口腔癌造成的死亡人數佔所有癌症的第六名，此外，口腔癌在男性前十大癌症高居第三位，相比 105 年有上升的趨勢。隨著全國癌症人數不斷上升，當家中出現了一位癌症患者，往往會拖垮一個家庭並帶給家庭龐大的經濟負擔。然而，口腔癌並非在最近才開始盛行，目前口腔癌治療方式包括：手術移除、化學治療、放射線療法等，然而，上述療法仍對於根除口腔癌效果有限，並且有著高度復發和轉移風險。另外，隨著化學治療療程的進行，許多副作用也隨之而來，最常見為嘔吐、禿髮、倦態等。對此我們想找出日常生活中可能含有相關抗癌性成分的物质（衛生福利部, 2023）。

近年來癌幹性細胞 (Cancer Stem Cells, CSCs) 的研究引起了廣泛的關注，這些細胞是一個特殊的亞種，具有自我更新的能力並能夠生成各種癌細胞類型，包括那些對常規治療方法具有抗藥性的細胞，對於整體癌症發展及疾病預後都有很大的影響。因此，癌幹性細胞被視為癌症復發和轉移的主要原因之一，故抑制癌幹性細胞的生存和增殖，可能是改進癌症治療成效的一個關鍵策略 (Najafi, et al., 2019)。

對此，經我們上網查找資料與翻閱文獻後，發現一種台灣特有的菌類—牛樟芝，其有森林紅寶石的美譽。它屬於多孔菌科、薄孔菌屬，原住民常將其用以肝臟治療及食物中毒，對人體有許多益處，如、降高血脂、抗發炎、抗高血壓、抗氧化和免疫調節活性。由於其具有對抗癌症幹細胞的能力，同時不傷及正常細胞，另外有許多文獻指出，牛樟芝菌絲萃取物中的某些化合物具有抑制癌幹細胞的生長、分化甚至是侵襲能力，使我們對於這些化合物感到好奇，因此在這次的研究計畫中我們決定探討牛樟芝菌絲萃取物中的天然活性成分 (4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C) 對口腔癌幹細胞 (SAS-CSCs) 的抗癌作用 (Yue, 2012)。

二、研究目的

- (一) 探討 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞存活的影响
- (二) 研究 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞自我更新能力的影響
- (三) 探討 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞之癌幹性標誌表達的

影響

(四) 探討 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞之細胞凋亡的影響

(五) 綜合評估 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞的抑制效果

三、文獻回顧

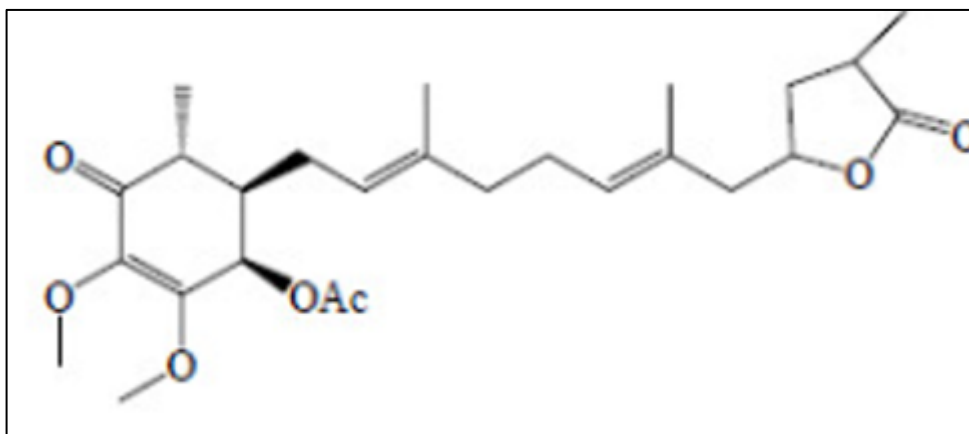
(一) 牛樟芝 (*Antrodia camphorate*)

牛樟芝是一種中草藥，也被稱為靈芝或靈芝菇，被傳統中醫用來治療各種疾病包括癌症。雖然樟芝的抗癌效果尚未被充分證實，但已有一些研究表明它可能對某些類型的癌症具有潛在的療效。樟芝具有以下特性：

1. 具有抗氧化特性：樟芝富含多酚和其他抗氧化物質，這些物質可以幫助中和自由基，提高抗氧化酶活性減少氧化損害，進而減少患癌風險。(陳靜婷, 2013)
2. 具有抗發炎作用：樟芝具有抗發炎特性，某些癌症的發展與慢性炎症有關。透過減少體內的慢性發炎，樟芝可能降低罹患癌症的風險。(王喬嬋, 2009)
3. 具有抗癌活性：研究報告顯示靈芝多醣 (GLP) 已被證明具有良好的抗癌作用，此外，樟芝萃取物中的某些成分可能對特定類型的癌症細胞具有直接的抗癌作用，這些作用包括抑制癌細胞的增殖、誘導細胞凋亡，減少腫瘤體積等。(林鈺棋, 2016)

(二) 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C

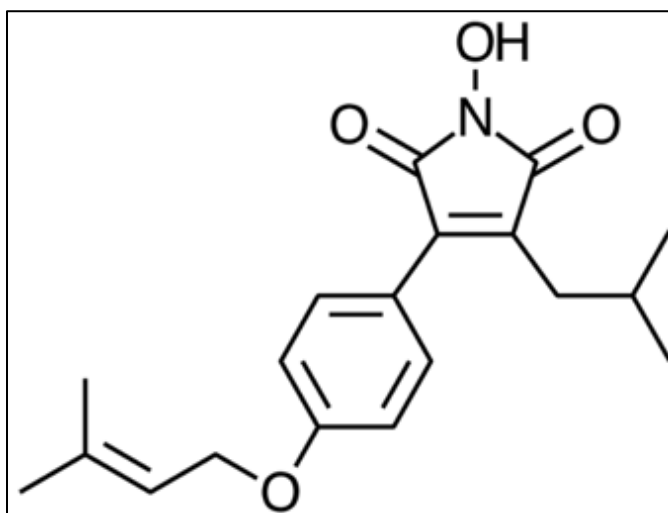
1. 4-Acetylanthroquinonol B 為牛樟芝菌絲體中分離出的一種化合物。牛樟芝是台灣特有的真菌，是一種潛在的抗癌藥物，文獻指出 4-Acetylanthroquinonol B 可以抑制肝癌幹細胞相關表現並活化樹突狀細胞的抗腫瘤能力，並抑制癌幹細胞的致瘤性與減少免疫逃脫相關細胞因子的分泌。此外，4-Acetylanthroquinonol B 還可以刺激免疫細胞增殖，促進未成熟樹突細胞的吞噬作用。顯示其可能具有抗肝癌的能力。(Li, 2018)



圖一、 4-Acetylanthroquinonol B 之結構

圖片來源：作者共同繪製

2. Antrodin C 是一種從牛樟芝菌絲體萃取物中分離出的化合物，從文獻中我們能看出 Antrodin C 能引發人類大腸直腸癌細胞的細胞凋亡，也能將細胞週期阻滯在 G1 期來減少細胞增殖和生長。(謝永宇, 2023)



圖二、 Antrodin C 之結構

圖片來源：作者共同繪製

(三) 口腔癌症幹細胞 (oral cancer stem cell, OCSC)

在過去的研究中發現，口腔癌幹細胞膜蛋白 CD24 、 CD44 與 CD133以及位於細胞核中的轉錄因子 Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4) 、 SOX2 (sex determining region Y-related Homo box gene2) 與 Nanog 可以作為口腔癌症幹細胞的標記。研究表明這些蛋白標誌分別調控不同癌症特徵，如： CD44 參與細胞分化、細胞生長、維持癌幹性及腫瘤轉移等。因此本研究須找出能有效下調癌症幹細胞標記表達的藥物，進而消除癌症

幹細胞。(Chiou, 2008) (Wang, et al., 2017)

(四) 人類舌頭鱗狀上皮癌細胞株 (human squamous cell carcinoma of the tongue, SAS)

SAS 細胞是一種來自口腔癌患者舌部腫瘤組織的特殊細胞，被廣泛應用於口腔癌研究相關的實驗。這些細胞顯示典型的癌細胞特徵，包括不受控制侵襲能力、細胞增殖、分化與轉移，使其成為研究口腔癌的理想細胞工具。由於這些細胞的不易貼附生長特性，它們在培養基中以懸浮的方式生長，這可以使一些研究，如對癌幹細胞和腫瘤球體形成等特殊實驗更加方便。(Altogen Lab, 2024)

(五) 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡，又稱細胞程序性死亡 (programmed cell death)。為了移除生長過程中不必要的細胞，細胞會主動進行此反應，其常見的特徵有：染色質固縮 (pyknosis)、核碎裂 (Nuclear fragmentation)。目前研究發現胱天蛋白酶 (Cysteine Aspartic Protease, Caspase) 所調控的細胞凋亡可以分為外始途徑 (Extrinsic pathway) 與內始途徑 (Intrinsic pathway) 兩種。(Chen, 2016)

在外始途徑中，死亡配體 (Death ligand) 如：Fas、TRAIL 或 TNF 等跨膜蛋白與 FasR 或 DcR3 結合後形成死亡誘導信號複合物 (Death-inducing signaling complex, DISC)，此一複合物能促使下游原先未活化的 Caspase-8 取得活性，並調控下游蛋白質如 Caspase-3，再進一步完成細胞凋亡。在內始途徑中，當細胞受到如病毒感染、DNA 損傷等外在刺激時，將釋出 BH3 訊息分子，使 BAK、BAX 等 BH2 蛋白質家族移動至粒線體內，並促使粒線體釋放細胞色素 C (cytochrome complex)。細胞色素 C 接著會與 APAF-1 結合使 Caspase-9 活化，並活化下游蛋白質 Caspase-3、Caspase-7，完成凋亡程序 (李敏, et al., 2014)。當細胞癌化時，將導致細胞凋亡無法正常執行，而 BAX 蛋白可使癌症細胞執行凋亡程序，對癌症治療有莫大助益。

貳、研究設備及器材

一、細胞株

人類牙齦正常上皮細胞株 (SG) 以及人類舌頭鱗狀細胞上皮癌細胞株 (SAS) 。

二、實驗藥品

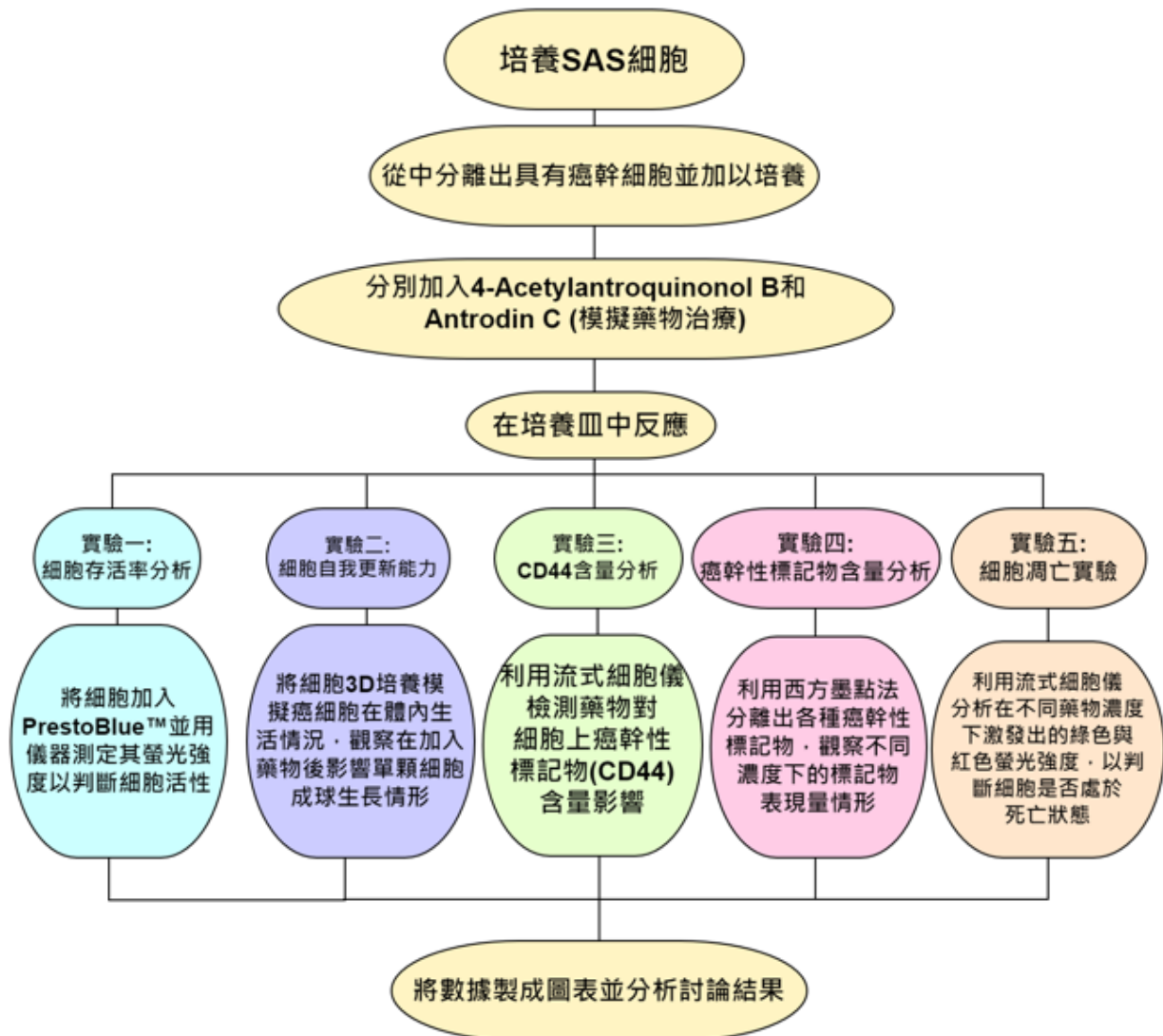
二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 、10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 、N-2 添加劑 (N2-supplement) 、磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) 、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (Trypsin-Ethylene diamine tetraacetic acid, Trypsin-EDTA) 、Running Buffer (SDS 、Glycine 、Tris) 、Blocking Buffer 、DMEM/F12 、Medium (RPMI-1640 + FBS + 10% 抗生素 + 麩醯胺酸) 、1% 三合一抗生素 (Cericilin Srepronycin Anyprhorericin B, PSA) 、丙烯醯胺 (Acrylamide) 、過硫酸胺溶液 (Ammonium Persulfate, APS) 、四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine, TEMED) 、Transfer Buffer (甲醇 、Glycine 、Tris) 、EGF

三、實驗器材

離心機、培養盤、細胞計數盤、流式細胞儀、細胞培養箱、培養皿、載玻片、塑膠吸管 (5 和 10 c.c.) 、無菌操作 、96-well plate 、試鏡紙、光學顯微鏡、加熱槽、計數器、電泳槽、4°C 冰箱、鋁箔紙、pipette (電動式與手動式) 、離心管、封口膜 (Parafilm) 、6-well plate

參、研究過程與方法

一、實驗架構圖



圖三、研究架構圖

圖片來源：作者共同繪製

二、研究流程與分析方法

(一) 藥物製備

本研究所使用之牛樟芝活性成分 4-Acetyltantroquinonol B 與 Antrodin C 由葡萄王公司提供。4-Acetyltantroquinonol B 與 Antrodin C 保存原液濃度分別為 2100 ppm

與 2500 ppm (w/v，溶劑為 DMSO)。每次實驗都將保存原液加入至細胞培養液並稀釋至最終目標濃度。實驗同時於控制組 (control group) 培養液中加入溶劑 DMSO (等同於最高濃度藥物對照組之 DMSO 比例)。



圖四、配藥過程

圖片來源：第一作者拍攝

(二) 細胞培養液 (cell culture medium)

人類正常口腔上皮細胞株 S-G 培養在含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 與 1% 三合一抗生素 (Pencillin/Srepronycin/Anyprhorericin B, PSA) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養液培養。人類舌癌細胞株 SAS 培養在含有 10% FBS 與 1% PSA 的 DMEM/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) 培養液。腫瘤球 (tumor sphere) 與口腔癌幹細胞 SAS-CSCs 培養在含有 10ng/ml 人類重組上皮生長因子 (human recombinant epidermal growth factor, EGF)、10ng/ml 人類重組鹼性成纖維細胞生長因子 (human recombinant basic fibroblast growth factor, bFGF)、1% N2 補充劑 (N2-supplement) 與 1% PSA 幹細胞無血清 DMEM / F12 培養液。

(三) 解凍細胞 (Thawing)

將細胞冷凍小管從液態氮桶中取出，並立即置於 37°C 水浴槽，解凍兩分鐘。講

冷凍小管中解凍後的細胞取出，並緩慢加入培養液的 15ml 離心管。將離心管於 1,200rpm 離心五分鐘以沈澱細胞。去除上清液並加入新鮮培養液使細胞重新懸浮，最後將細胞加入 10cm 培養皿，並置於 37°C/CO₂ 細胞培養箱中培養。

（四）培養液配製

1. 為培養初解凍細胞，需取得新鮮培養液。先將容器以去離子水清洗，並置入 800ml 去離子水，將容器置於加熱攪拌器上並加入含酚紅培養粉、2.438g 碳酸氫鈉 (Na₂CO₃)，混合完全後，以保鮮膜覆蓋並盡速使用以避免二氧化碳影響。
2. pH 值校正：先以去離子水清洗電極點，用拭鏡紙擦拭乾後，再用標準液 (pH = 4,7,10) 校正儀器。接著，使用三點矯正法測定培養液。過程中需以鹽酸溶液 (1N) 調整 pH 值以保持約 7.2 左右。
3. 取出冷凍細胞：由液態氮中取出冷凍管，並置於 37°C 恆溫水浴槽中，以確保迅速解凍，避免冷凍損傷。解凍後，將冷凍管離心處理，並抽出上清液。
4. 過濾培養液：將剛製備完成的新鮮培養液以過濾膜過濾後，將解凍的細胞轉移到準備好的培養液中。
5. 適當培養條件下培養：將細胞置於適當的培養條件下，包括正確的培養基、溫度和二氧化碳濃度。



圖五、培養液酸鹼值校正

圖片來源：第一作者拍攝

(五) 細胞繼代 (Cell Subculture)

當細胞高密度達到 80% 後，需要進行細胞繼代分盤以利細胞持續生長並擴增細胞數目。移除培養盤中舊的培養液後，加入磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) 清洗細胞兩次，接著在培養皿中加入 2ml 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin)-EDTA 並置於 37°C/CO₂ 細胞培養箱中反應 5-10 分鐘使細胞懸浮，接著加入 4ml 含有 10%FBS 培養液以中和 trypsin-EDTA 的活性。將細胞收集至 15ml 離心管，並以 1,200rpm 離心五分鐘。離心結束後移除上清液並加入適當體積的培養液重新懸浮細胞。將細胞分種入 10cm 培養皿並置於 37°C/CO₂ 細胞培養箱中培養。3-8 繼代繼代次數內的細胞將用於實驗實測。

(六) 冷凍細胞

依照細胞繼代的方式收集細胞。於 15ml 離心管中加入含有 7% DMSO 之新鮮培養液使細胞重新懸浮，並分裝至冷凍小管 (2 x 10⁶ cell/ml/tube)。冷凍小管依照梯度降溫法首先置於 4°C / 10 分鐘，接著移至 -20°C / 30 分鐘，之後移至 -80°C / 隔夜，最後移至液態氮槽中長期儲存。

(七) 腫瘤成球懸浮培養 (Tumor Sphere Formation)

腫瘤球中的幹細胞能夠促進自我更新並表現出強烈的侵入和遷移能力，能夠幫助癌細胞的存活、增殖、轉移和復發。我們透過成球實驗來評估癌細胞之幹性，方法包括評估成球的大小和比率。此外，在 3D 的環境中懸浮培養能模擬細胞在體內的生長狀態，因此本實驗使用低貼附性培養皿 (ultra-low attachment 6-well culture plate) 來培養腫瘤，擴增親代癌細胞中的癌幹細胞群，並計算成球效率以評估癌細胞在體內環境的自我更新能力。

依照細胞繼代的方法收集 2D 培養的親代 SAS 細胞，將其以單細胞懸浮於含有 0.5% 甲基細胞纖維素 (methylcellulose) 的無血清培養液中。接著依照 1 x 10⁴ /well 的細胞密度將細胞加入低貼附 6-well 培養盤。細胞盤置於 37°C/CO₂ 細胞培養箱中培養 14 天，並每 2-3 天更換新鮮培養液。14 天後將初級腫瘤球 (primary tumor sphere) 收集至 15 mL 離心管，並使用 2 ml PBS 清洗 2 次。隨後加入 2 mL

0.25% 胰蛋白酶 (trypsin)-EDTA 並置於 37°C/CO₂ 細胞培養箱中反應 5-10 分鐘使細胞從腫瘤球分離。加入 13 mL PBS 以稀釋 trypsin-EDTA，並以 1200 rpm 離心 5 分鐘。離心結束後移除上清液，並加入適當體積的培養液重新懸浮細胞，將細胞分種入培養盤中進行 2D 培養以持續擴增 SAS 癌幹細胞 (SAS-CSCs)。為了形成次級腫瘤球 (secondary tumor sphere) 以評估自我更新能力變化，依照上述步驟收集 2D 培養的 SAS-CSCs，並懸浮培養 14 天以獲得次級腫瘤球。為了測試藥物對於腫瘤球形成能力的影響，藥物將於懸浮培養的第 1 天加入培養液中，並持續培養 14 天。於顯微鏡底下計數直徑大於 50 μm 的腫瘤球以計算腫瘤球形成效率 (腫瘤球數目/初始細胞數目/控制組，%)

(八) 細胞存活率分析 (Cell Viability)

PrestoBlue™ Cell Viability 為螢光細胞存活分析試劑，其內涵有阿爾瑪藍 resazurin (alamar blue)可檢測細胞代謝能力。此法不需要事先進行細胞裂解，因此可作為細胞活性 (相對存活率) 的快速檢驗方法。由於細胞代謝中 NADH/NAD⁺ 被認為是新陳代謝的控制因子。NAD⁺ 與 NADH 間可互相轉換，取決於 H⁺ 的得失。當使用深藍色、低螢光性的 resazurin 受活細胞還原後可呈現紫紅色、具有高螢光性的 resazurin 產物，因而反映活細胞的代謝能力；死細胞由於喪失了代謝能力，故 resazurin 無法產生螢光。(蔡惠燕, 2013)

(九) 流式細胞儀 (Flow Cytometry)

流式細胞儀包括光學系統、液流系統、分選系統等。將細胞樣本通過流式細胞儀中雷射照射區域，細胞將被激發而產生信號，經放大後以圖表形式呈現。流式細胞儀產生的信號可分為兩種：光散射信號與螢光信號。前者的強弱可反映細胞型態、大小等，後者則可依螢光訊號強弱呈現不同顏色。利用流式細胞儀可比較出癌症幹細胞隻數量或標記蛋白活性高低。(林新田, 2024) 儀器使用雷射光激發標細胞表面抗體的螢光物質，透過評估螢光訊號來分析癌幹細胞群體中 CD44 表達程度變化。首先使用 trypsin-EDTA 溶液將癌幹細胞從細胞培養容器表面分離，使其呈單細胞懸浮狀，再將待測細胞透過離心機分離出來並使用 anti-CD44-PE 抗體標記細胞膜表面的

CD44 蛋白。標記完成後，在緩衝液內清洗細胞，以確保去除多餘的抗體。完成後將細胞單獨的通過流式細胞儀毛細管，即可透過細胞表面特殊標誌（如 CD44）辨認出較具癌幹性的細胞。（張育瑄, 2020）

（十）細胞凋亡分析 (Cell Apoptosis Analysis)

細胞先用 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C (0, 2.5, 5, 10 μ M) 處理後 24 小時後，使用 trypsin-EDTA 重新懸浮細胞並用 PBS 清洗兩次後以 1,200 rpm/4°C 離心五分鐘。完成後去除上清液並將 1×10^5 細胞懸浮於 binding buffer，並依據製造商的說明書使用細胞凋亡試劑組 (Annexin V-FITC apoptosis kit) 將細胞在避光環境下進行染色 5 分鐘，然後使細胞通過 40 μ m pore 濾膜後收集，再利用流式細胞儀進行分析。（郝若妍, 2023）

（十一）西方墨點法 (Western Blot)

為分析幹細胞相關基因蛋白質，使用西方墨點法測定蛋白質表現。首先使用 1ml 10 / 12.5 / 15 % acrylamide, 5 μ l TEMED, 10 μ l APS, 1ml H₂O 製作電泳上膠，使具有一定體積的蛋白質樣本溶液壓縮到極小的體積，pH 值 6.8 不帶電，蛋白質在此間移動緩慢，可以使開始位置固定。下膠使用 8ml 10 / 12.5 / 15 % acrylamide, 10 μ l TEMED, 80 μ l APS 製成，pH 值 8.8 蛋白質能在此區快速移動，不同大小的蛋白質會因為孔洞限制而逐漸分離開來，孔洞大小由 acrylamide 濃度決定，小蛋白質移動地較快，大蛋白質則較慢。配好膠體後至於電泳槽中並加入電泳緩衝液，在電泳片中加入樣品和 running buffer (含 SDS)，以 50V 進行電泳使蛋白質聚集在上下膠交界處（約 30min），再以用 110V 進行電泳分離（約 90min）。完成後取出膠體並夾到卡夾上（依泡棉、濾紙、印膜、膠體、濾紙、泡棉此順序）全程浸泡在 transfer buffet（含 20% 甲醇）。在冰盒裡以 100V 進行轉漬 90 分鐘使蛋白質轉印到 PVDF 膜上染色轉印膜上，完成後將染色轉印膜浸泡在 blocking buffer 中搖動 1 小時。之後加入一級抗體並於 4°C 下反應 16 小時。一級抗體包含 anti-Nanog、anti-Oct4、anti-SOX4 與 anti-GAPDH。之後再加入對應之二級抗體於室溫反應 1 小時。以上處理步驟間皆以 TBSB washing buffer (0.1% Tween-20 in TBST) 清洗三次，每次五分鐘。最後加

入 ECL substance 並以化學冷光偵測儀器偵測結果。(王棟源, 2018)



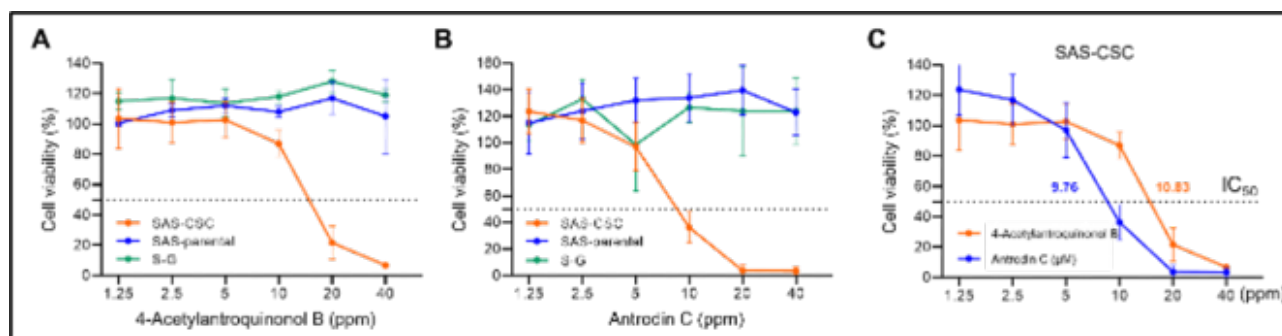
圖六、配置西式墨點法膠體

圖片來源：第一作者拍攝

肆、研究結果

一、4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 抑制口腔癌幹細胞的存活率

為了比較牛樟芝菌絲萃取物中的兩種生物活性分子 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對於口腔正常上皮細胞 (normal epithelial cell line, SG)、口腔鱗狀細胞上皮癌細胞 (oral squamous cell carcinoma cell line, SAS) 以及來自於親代 SAS (SAS-parental) 的癌幹細胞 (SAS-derived cancer stem cells, SAS-CSCs) 之細胞毒性，本研究首先測試不同濃度 (0、1.25、2.5、5、10、20 和 40 ppm) 的 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 處理三種細胞後的細胞存活率變化 (圖七)。實驗結果顯示 0-40 ppm 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對於 S-G 和 SAS-parental 細胞存活沒有影響。但當 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 濃度分別提高到 10 和 20 ppm 時，顯著降低 SAS-CSCs 的細胞存活率 (圖七A & 圖七B)。說明 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 可能是一種在不影響正常細胞存活率的條件下，能夠專門抑制癌幹細胞的抗癌天然化合物。另外為了進一步比較 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對於 SAS-CSC 細胞存活率差異，實驗將圖七 A 和圖七 B 中 SAS-CSC 細胞存活率曲線疊合 (圖七C)，並計算半數抑制濃度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。結果顯示 4-Acetylanthroquinonol B 與 Antrodin C 對於 SAS-CSC 細胞存活的 IC₅₀ 分別為 10.83 ppm 和 9.76ppm (圖七C)。因此我們認為 Antrodin C 相較於 4-Acetylanthroquinonol B 對於 SAS-CSC 細胞存活的抑制效果更好。

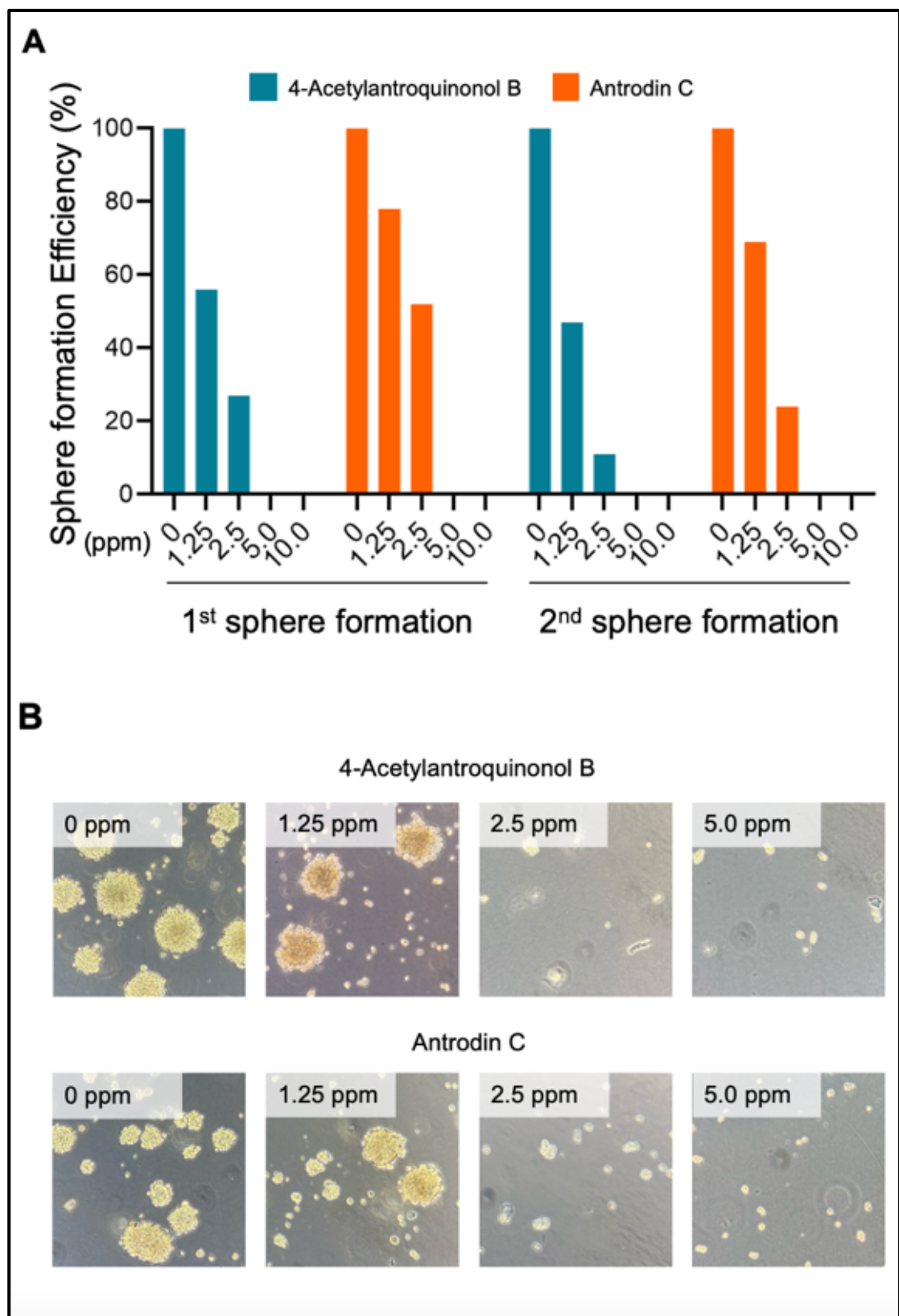


圖七、4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 抑制口腔癌幹細胞的存活率

圖片來源：作者共同繪製

二、4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 抑制 SAS 及 SAS-CSCs 的自我更新能力

過去研究認為癌幹細胞所具備得高度自我更新 (self-renewal) 和增生 (proliferation) 能力，是造成腫瘤發生 (initiation)、復發 (recurrence) 或轉移 (metastasis) 的原因 (Chen, Wei-An, 2016)。腫瘤球成型試驗 (sphere formation assay) 已被許多研究用來評估癌幹細胞的自我更新能力 (Shih-Hwa Chiou, 2008)。因此本研究將分析 SAS-parental 和 SAS-CSC 細胞經過 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 處理後腫瘤球成型能力的變化。實驗首先將 SAS-parental 細胞以單細胞懸浮培養方式培養在含有不同濃度 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C (1.25, 2.5, 5 和 10 ppm) 的環境中。結果顯示隨著 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 濃度的增加，腫瘤球成型效率降低，並且當濃度提高到 5 和 10 ppm 時，完全抑制 SAS-parental 的腫瘤球成型能力 (圖八 A, 1st sphere formation)。為了進一步評估 SAS-CSC 細胞的腫瘤球成型能力，實驗將未經處理的 SAS-parental 腫瘤球分離成單細胞以獲得 SAS-CSC，並再次以單細胞懸浮方式培養在含有 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 的環境。與 1st primary sphere formation 的結果相同，4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 在濃度提高至 5 和 10 ppm 時能完全抑制 SAS-CSC 形成腫瘤球 (圖八 A, 2nd sphere formation)。另外在複式顯微鏡下我們也發現 SAS-CSCs 經過 1.25ppm 的 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 處理後，形成的腫瘤球周圍之細胞相較沒有添加 Antrodin C 和 4-Acetyltroquinonol B 的組別，其形成的細胞球明顯較小且不完整，且腫瘤球邊緣存在許多受損的細胞雖然細胞有成球狀，而細胞經過 2.5ppm 以上的 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 處理後，則幾乎不能成球 (圖八 B)。這些結果表明 4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 可以抑制 SAS-CSC 自我更新能力。

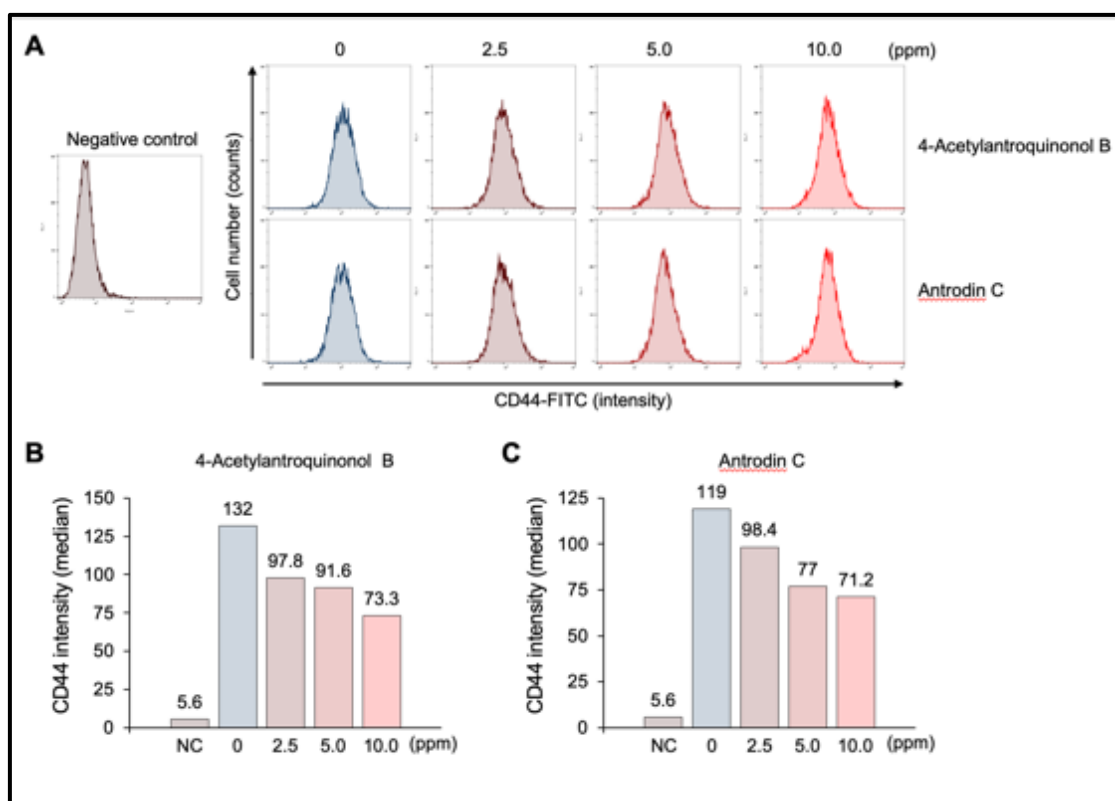


圖八、4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 抑制 SAS 及 SAS-CSCs 的自我更新能力

圖片來源：作者共同拍攝繪製

三、4-Acetylanthroquinonol B 與 Antrodin C 對 SAS-CSCs 膜上蛋白 CD44 表現量影響

這個研究的目標是探討 4-Acetylanthroquinonol B 與 Antrodin C 對口腔癌幹細胞 (SAS-CSCs) 的影響，我們特別關注了癌幹性標記物 CD44 的表現（圖九）。透過使用流式細胞儀進行分析，我們在 10^5 個細胞樣本中測量了 CD44 的表現量，並觀察了其在不同藥物濃度下的變化。根據統計結果，我們首先計算 CD44 表現量的中位數，以確定整體的表現水平。Negative control (NC) 是用表面不具有 CD44 的細胞，加入相同濃度的抗體所測得的結果。結果顯示，在 NC 組中，CD44 的測量值極低，可作為校正結果的背景誤差。而實驗組隨著 4-Acetylanthroquinonol B 與 Antrodin C 的濃度增加，細胞膜上的 CD44 表現量中位數呈現下降趨勢（圖九 B、C），代表此兩種化合物可以減少細胞群中 CD44 的表現量，推論這兩種化合物可能具有抑制 SAS-CSCs 癌幹性的能力。



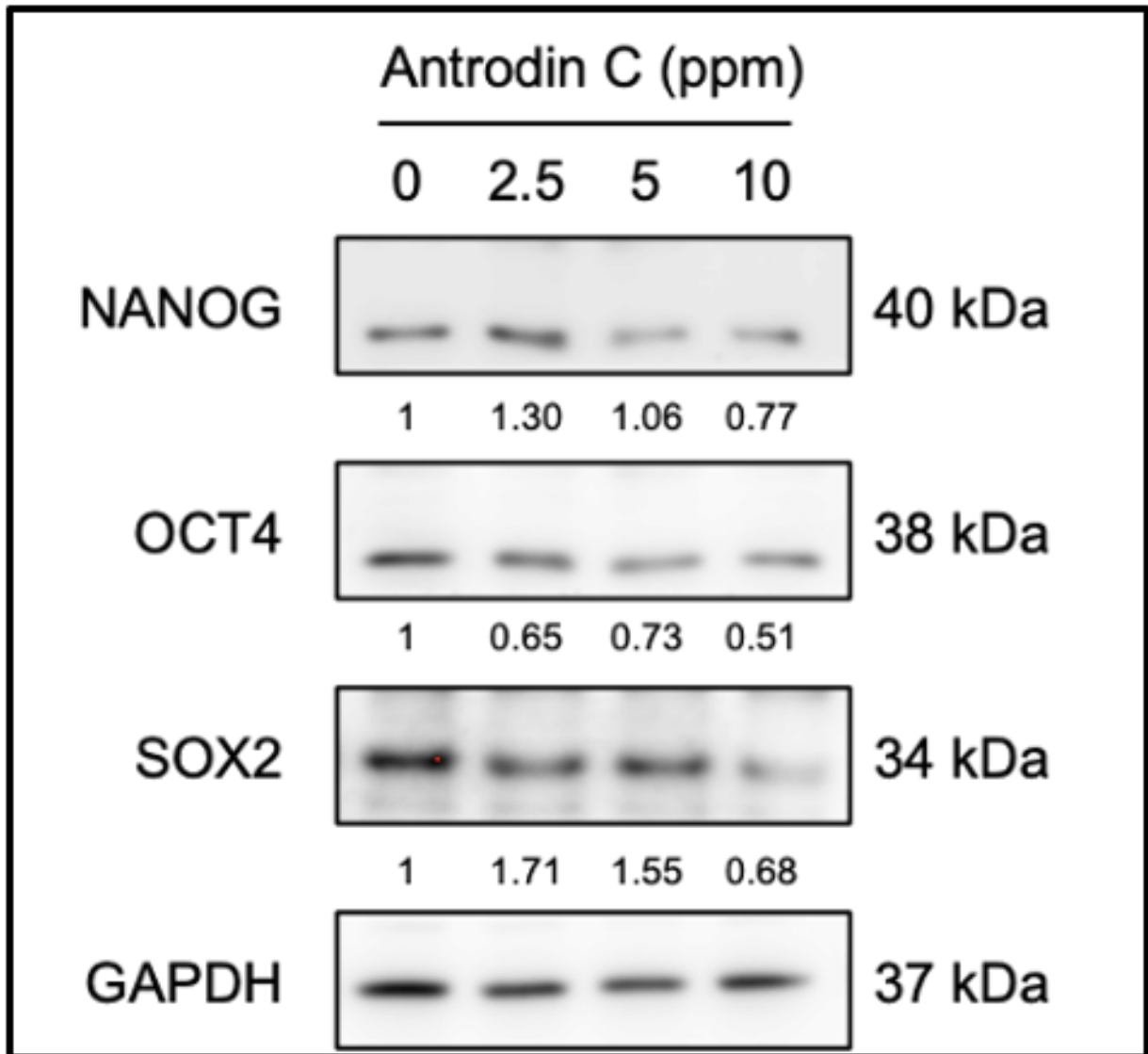
圖九、4-Acetylanthroquinonol B 與 Antrodin C 對 SAS-CSCs 膜上蛋白 CD44 表現影響

圖片來源：作者共同繪製

四、Antrodin C 對癌幹細胞標誌蛋白表達的影響

過去研究發現 Oct4、SOX2、Nanog 為幹細胞細胞核內重要的轉錄調節因子，能夠維持細胞幹性 (郝若妍, 2023) (Chiou, 2008)，因此為了得知 Antrodin C 對癌幹性影響，我們

運用西方墨點法來測定 Oct4、SOX2、Nanog 在細胞中的含量並以 GAPDH 表達量作為實驗的 loading control，因為其分子量穩定，可做為西方墨點實驗中的數量基礎 (Seidler, 2012)。透過實驗結果我們發現在用 10ppm 之 Antrodin C 處理細胞後，Oct4、SOX2、Nanog 的表現量皆有顯著下降（圖十），因此我們推論 Antrodin C 能有效抑制癌幹性。



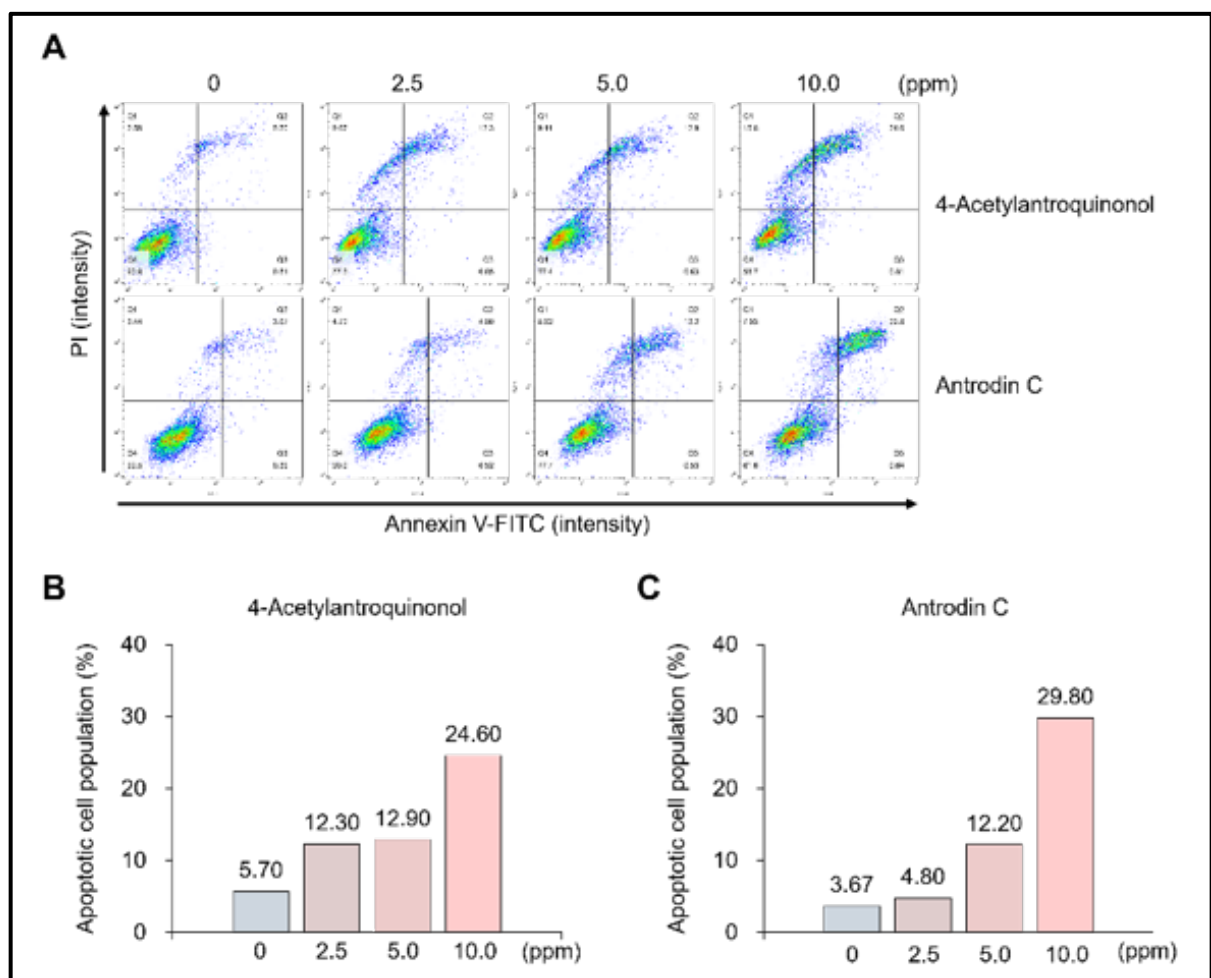
圖十、Antrodin C 對細胞幹性與上皮間質轉化標記物之影響

圖片來源：作者共同拍攝繪製

五、4-Acetyltroquinonol B 和 Antrodin C 促進細胞凋亡能力

細胞凋亡對生物發育、促進生理平衡有極大貢獻。在細胞凋亡實驗中，當細胞發生凋亡時，磷脂酰絲氨酸 (phosphatidylserine, PS) 會從細胞膜的內側翻轉到細胞膜的表面。此時，帶有綠色螢光素 (fluorescein, FITC) 的 Annexin V 可以與 PS 結合。同時，碘化丙

啖（propidium iodide, PI）是一種紅色的核酸染料，它能插入 DNA 的鹼基之間結合，但由於其不具有膜滲透性，因此通常用來標記細胞群中的死細胞。透過流式細胞儀，我們可以測量細胞綠色和紅色螢光的強度，以判斷細胞是否處於死亡狀態。本實驗藉由流式細胞儀測量 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對於 SAS-CSC 細胞產生細胞凋亡的能力。我們給予不同濃度的 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C（0, 2.5, 5, 10ppm）處理細胞。我們可以發現隨著4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 濃度的增加，細胞凋亡數量有顯著增加（圖十一B & 圖十一C）。以4-Acetylanthroquinonol B 而言，2.5ppm便可促使 SAS-CSC 凋亡，Antrodin C 則需至 5ppm。



圖十一、4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 促進細胞凋亡能力

圖片來源：作者共同繪製

伍、討論

本研究旨在探討牛樟芝菌絲體萃取物中的 4-Acetylanthroquinonol B 與 Antrodin C 對於標靶抑制口腔癌幹細胞 (SAS-CSCs) 的潛在治療效果，包括評估癌幹細胞特性與細胞凋亡，並比較兩種化合物的抑制能力差異。

一、透過細胞存活率實驗，我們發現4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 在高濃度下都能有效抑制 SAS-CSCs 的活性而口腔正常上皮細胞與口腔鱗狀上皮細胞皆能保有一定的活性，代表這兩種化合物對癌幹性細胞有標靶的抑制效果，其中Antrodin C 在相對較低的濃度下即展現對 SAS-CSCs 的抑制效果，相比於 4-Acetylanthroquinonol，Antrodin C 在抑制細胞活性更具潛力，意味其在未來作為藥物治療的應用具有更大的優勢。

二、透過腫瘤球成型實驗 (Sphere formation Efficiency)，我們發現隨著 Antrodin C 和 4-Acetylanthroquinonol B 濃度的增加，口腔癌幹細胞的腫瘤球形成能力受到了限制，我們發現在低濃度下 SAS-CSCs 形成的腫瘤球周圍的細胞相較沒有添加 Antrodin C 和 4-Acetylanthroquinonol B 的對照組，其形成的細胞球明顯較小且不完整，存在許多受損的細胞，而濃度高的 Antrodin C 和 4-Acetylanthroquinonol B 環境下 SAS-CSCs 幾乎無法形成腫瘤球，表示這兩種物質能調節口腔癌幹細胞的自我更新能力，對抗腫瘤球的發展。

三、利用流式細胞儀，我們發現這兩種化合物能夠有效抑制 SAS-CSCs 中 CD44 的表達量，我們將其視為一種有潛力的抑制癌幹性的作用，尤其在高濃度處理下呈現明顯的下降趨勢，兩種化合物皆表現相近的抑制 CD44 表達量的能力，接著透過西方墨點法的分析，我們得到了與利用流式細胞儀類似的結果，隨著 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 添加濃度升高，CD44 的表達量也呈現下降的趨勢。

四、利用流式細胞儀的測試，我們測量細胞中綠色和紅色螢光的強度，以判斷細胞是否處於死亡狀態。並將結果圖分成四個象限，我們從圖表觀察到隨著濃度的升高，細胞凋亡的數量

呈現明顯的上升趨勢，這表明這兩種物質可能透過誘導細胞凋亡途徑，有效地降低癌幹細胞的存活率。對於 4-Acetylanthroquinonol B 而言，僅在較低濃度（2.5ppm）即可觀察到 SAS-CSC 細胞進行明顯的細胞凋亡。相比之下，Antrodin C 則需要較高濃度（5ppm）才能產生相似的效果。

五、但這些實驗僅透過 3D 懸浮培養來模擬癌細胞在體內的生長環境，而培養液的成分與體內複雜的生長環境相比，存在一定的出入，這可能對 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對癌幹性細胞的抑制能力及其生長狀況產生影響。在未來的研究中，應該更加貼近體內實際情況，以提高實驗結果的可靠性。此外，雖然實驗數據顯示 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 可能具有抑制癌幹性細胞的能力，但這兩種化合物的作用機制仍然模糊不清。例如，我們尚不清楚這兩種天然化合物促進細胞產生程序性死亡的機制。未來的研究中，我們需要深入探討這些分子的作用機制，以更加全面地理解它們對癌幹細胞的影響。儘管我們的研究初步揭示了 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 在抑制癌幹性細胞方面的潛在效應，仍有待進一步的深入研究。

4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 在過去的許多研究中顯示，其皆能有效的抑制癌細胞的活性、細胞上癌幹性標誌物含量，並使其進入細胞凋亡，抑制癌細胞的生長。透過以上的實驗，我們發現 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 在抑制口腔癌幹細胞的表現上也如同對於對其他類型的癌幹細胞，一樣具有抑制效果，對於治療癌口腔癌帶來了正面的效果。這項研究只是我們在探索天然抗癌藥物領域中的一小步，我們未來將繼續致力於發現更多具有治療潛力的天然藥物，為癌症治療開辟新的前景。

陸、結論

本研究探討 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞的影響及其作用關係，並以細胞培養等體外實驗等方法進行研究。首先，根據細胞存活率分析，可推論 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 與 SAS-CSCs、S-G 與 SAS 活性關係。4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 皆能抑制 SAS-CSCs 細胞活性，其中 Antrodin C 相較於 4-Acetylanthroquinonol B 對於抑制 SAS-CSCs 細胞生存的效果更好。值得注意的是，儘管這兩種化合物對親代 SAS 細胞生存影響不顯著，表明對癌幹細胞具有特異性的抑制效果，並同時對正常細胞 (SG) 沒有顯著毒性。

第二，透過 3D 培養技術，我們能模擬 SAS-CSCs 在體內的懸浮生長環境，隨著培養基中 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 的濃度升高，我們發現到單顆細胞形成球體的數量下降，因此我們推論 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 皆可以抑制 SAS-CSCs 自我更新能力。

第三，透過西方墨點法實驗，可以得知 Antrodin C 對癌幹細胞標誌轉錄因子蛋白有抑制效果。經過 Antrodin C 處理後的 SAS-CSCs 隨著化合物添加濃度升高，Oct4、SOX2 與 Nanog 蛋白表達量也呈現下降趨勢。

第四，根據流式細胞儀實驗，能觀察到 SAS-CSC 細胞在經過 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 處理後其表面癌幹性標誌 CD44 膜蛋白表達量下降，且同時觀察到細胞凋亡數量增加，顯示 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 可能具有促使癌幹細胞凋亡的能力。

在未來，我們期望透過繼續探究以更深入了解樟芝菌絲萃取物 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 等抑制細胞遷徙能力與體外分化能力的表現、在生物體內的細胞是否能如實驗室中的癌細胞一樣具有抑制能力、在分子層面如何與癌細胞交互作用等。我們希望能將本實驗推廣到牛樟芝菌絲體的其他萃取物，檢驗其是否具有抑制癌幹性的能力，藉此提供未來開發癌症治療藥物的線索。

柒、參考文獻

- 陳靜婷 (2013). 樟芝菌絲體提升抗氧化及調節血壓之功效. 台灣碩博士論文加值系統.
- 王喬嬋 (2009). 樟芝菌絲與濾液多醣體之免疫調控與抗發炎作用. 台灣碩博士論文加值系統.
- 潘耀謙, 高豐, 成軍 (2000). 細胞凋亡與細胞壞死比較的研究進展. 動物醫學進展, 5-8.
- 蔡惠燕 (2013). 磁性奈米顆粒之細胞毒性評估.
- Hsieh YY, Lee KC, Cheng KC, Lee KF, Yang YL, Chu HT, Lin TW, Chen CC, Hsieh MC, Huang CY, Kuo HC, Teng CC. (2023). Antrodin C Isolated from Antrodia Cinnamomea Induced Apoptosis through ROS/AKT/ERK/P38 Signaling Pathway and Epigenetic Histone Acetylation of TNF α in Colorectal Cancer Cells. *Antioxidants (Basel)*, 12(3), 764.
- 林新田 (2024). Flowcytometry 流式細胞儀. 高雄榮民總醫院.
- 衛生福利部. 111 年國人死因統計結果(2023).
- SAS Xenograft Model. (2024). Altogen Lab.
- Shih-Hwa Chiou , Cheng-Chia Yu, Chi-Yang Huang, Shu-Chun Lin, Chung-Ji Liu, Tung-Hu Tsai, Shiu-Huey Chou, Chian-Shiu Chien, Hung-Hai Ku, Jeng-Fan Lo (2008). Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-Like. *Human Cancer Biology*, 14(13), 4085-4095.
- Li TY, Chiang BH. (2019). 4-Acetylanthroquinonol B from antrodia cinnamomea enhances immune function of dendritic cells against liver cancer stem cells. *Biomed Pharmacother*, 109, 2262-2269.
- Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol*, 234(6), 8381-8395.
- Seidler NW. (2013). Basic biology of GAPDH. *Adv Exp Med Biol*, 985,1-36.
- Wang L, Zuo X, Xie K, Wei D. (2018). The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 1692, 31-42.
- Yue PY, Wong YY, Chan TY, Law CK, Tsoi YK, Leung KS. (2012). Review of biological and pharmacological activities of the endemic Taiwanese bitter medicinal mushroom, *Antrodia camphorata* (M. Zang et C. H. Su) Sh. H. Wu et al. (higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 14(3), 241-56.

Chen, Wei-An (2016). Identification of Spindle Regulators in Cancer and Cancer Stem Cells Division. NTU Institutional Repository.

李敏, 林俊 (2014). The Apoptotic Pathways and Their Mechanisms. *Journal of International Obstetrics and Gynecology*, 2, 103-107.

林鈺棋 (2016). Antioxidant properties and free radical scavenging ability of *Antrodia camphorata* extracts. 國立屏東科技大學.

郝若妍 (2023). The inhibitory effect of phenylethyl isothiocyanate (PEITC) on the stemness and oncogenicity of oral cancer stem cells. Institute of Oral Science, Chung Shan Medical School.

張育瑄 (2020). Elucidation of the effects and molecular mechanisms of thymoquinone on inhibiting cancer stemness and oncogenicity in oral cancer. Institute of Oral Science, Chung Shan Medical University.

王棟源 (2018). Elucidation of the effects and molecular mechanisms of immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* (GMI) on targeting oral cancer stemness. Institute of Oral Science, Chung Shan Medical University.

【評語】 090014

1. 創新性與重要性：

本研究探討了牛樟芝菌絲萃取物 4-Acetylantroquinonol B 和 Antrodin C 對口腔癌幹細胞的影響，具有重要的創新性和臨床意義。癌症幹細胞被認為是腫瘤復發和轉移的主要原因，而口腔癌是常見的惡性腫瘤之一。研究聚焦於 CD44 這一與癌幹性密切相關的細胞膜蛋白，通過 3D 懸浮培養和流式細胞儀分析等先進技術，系統地評估了這兩種天然化合物對口腔癌幹細胞的影響。這種針對癌幹細胞的研究方法為開發新的口腔癌治療策略提供了重要的科學依據，有望為難治性口腔癌患者帶來新的治療希望。

2. 優點：

該研究採用了多角度的實驗方法來評估牛樟芝萃取物的抗癌效果。首先，通過 3D 懸浮培養獲得腫瘤球來擴增癌幹細胞群，這種方法更接近體內腫瘤微環境，增加了研究結果的可靠性。其次，研究不僅觀察了萃取物對癌幹細胞存活率的影響，還評估了其對成球效率的抑制作用，這為全面了解化合物的抗癌機制提供了重要信息。此外，研究發

現這兩種化合物能夠促進癌幹細胞的凋亡，這一發現為理解其抗癌機制提供了新的視角。最後，研究結果表明，即使在低濃度下，這些萃取物也能顯著抑制癌幹細胞的生長，這一發現為開發低毒性、高效率的口腔癌治療方法提供了可能性。

3. 待改進的部分：

該研究未能充分闡明 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 的具體分子機制和靶點，這可能影響研究結果的可解釋性和應用推廣。建議使用分子生物學技術（如 RNA 干擾或 CRISPR 基因編輯）深入研究這兩種化合物的作用靶點及信號傳導途徑。其次，研究僅使用了 SAS-CSCs 作為口腔癌幹細胞模型，可能不足以驗證結果的普遍性，建議考慮多種細胞株來驗證結果。此外，研究主要集中於體外實驗，缺乏動物模型實驗或臨床樣本驗證，這限制了研究結果在真實環境中的應用價值。最後，在實驗設計方面，建議使用體積莫耳濃度代替 ppm 作為濃度單位，並通過 HPLC 檢驗 4-Acetylanthroquinonol B 和 Antrodin C 的純度，以提高實驗的精確性和可重複性。同時，部分實驗（如圖八到圖十一）需要進行三次重複，以增加數據的可靠性。