

# 2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090017

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 白花蛇舌草免疫抗癌新機轉及活性物質分析

得獎獎項

就讀學校 臺中市私立曉明女子高級中學

指導教師 劉郁伶、楊新玲

作者姓名 侯芸筑

關鍵詞 免疫抗癌、基因標靶、中藥

## 作者簡介



我是就讀於台中市曉明女中的侯芸筑，因為對生物醫學很感興趣，也常常聽到研究過程的酸甜苦辣，讓我對研究感到好奇，因此在直升高中後，就利用寒暑假及課餘時間到中國醫藥大學參與實驗。很感謝老師們及學長姐們很有耐心的指導我，讓我拓展了視野，也從中學習到很多寶貴的知識及經驗，這些經驗將會是驅動我在未來持續探研究生醫知識的動力。

## 摘要

白花蛇舌草是中醫常使用的抗癌中藥，本研究主要探究白花蛇舌草治療大腸癌的可能效應、機轉及活性物質。本研究利用大腸癌動物實驗搭配次世代基因定序，期望發現白花蛇舌草的新穎免疫抗癌標靶，並利用氣相層析質譜儀搭配新穎免疫抗癌標靶分子對接，分析主要的活性物質。結果顯示，白花蛇舌草可以減少小鼠結直腸增生組織的數量及大小，將被影響的基因進行生物資訊程式分析，發現白花蛇舌草會干擾與免疫細胞趨化有關的基因群組以及與上皮細胞增生有關的白細胞介質 IL-17 訊息路徑，而且存在於白花蛇舌草的阿魏酸可以阻斷 IL-17 與 IL-17 受體的結合，減緩小鼠的大腸直腸癌。本研究將古老知識透過現代科學證實有用，呈現與發炎或與上皮細胞增生有關的細胞激素可以作為免疫抗癌標靶，也發現白花蛇舌草的免疫抗癌新機制，並由免疫抗癌新機轉成功求證白花蛇舌草的主要活性物質。

## Abstract

*Hedyotis diffusa* (HD) is a medicinal herb commonly used in traditional Chinese medicine for the treatment of cancers. The aims of this study are to analyze the therapeutic effects, targets, and active components of HD against colorectal cancer (CRC). The animal model of CRC was applied to confirm the therapeutic efficacy of HD. Next generation sequencing coupled with bioinformatics analysis was used to find out the therapeutic targets of HD. Gas chromatography mass spectrometry and docking analysis were performed to identify the active compounds of HD. Data showed that oral administration of HD reduced the number and the size of tumor mass in colons of mice. Gene ontology and pathway analysis of affected genes showed that HD interfered with the genes related to chemotaxis and the interleukin-17 (IL-17) signaling pathway related to epithelial cell proliferation. Gas chromatography mass spectrometry identified 30 chemical components from HD. Docking analysis showed that ferulic acid in HD interacted with Pro-59 and Arg-101 residues of IL-17, resulting in the abolishment of IL-17/IL-17 receptor interaction. In addition, oral administration of ferulic acid reduced the number of tumor mass and the content of IL-17 protein in colons of mice. In conclusion, this study applied modern experiments to elucidate effects of the ancient anti-CRC herb. Our findings suggested that IL-17 might be the therapeutic target of HD and ferulic acid was the active component responsible for the anti-CRC effect of HD.

# 壹、前言

## 一、研究動機

白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa*) 是傳統醫學常用來治療大腸直腸癌 (colorectal cancer) 的抗癌中草藥，科學文獻顯示，白花蛇舌草具有毒殺細胞的特性，會抑制細胞的增生，也會促進細胞的凋亡，但白花蛇舌草是可以做為飲料的原料，理論上不可能有極大的細胞毒性，所以白花蛇舌草是否會透過其他機制而產生抗癌效應呢？本研究試圖利用動物實驗搭配次世代基因定序 (next generation sequencing)，並利用氣相層析質譜儀 (gas chromatography mass spectrometry) 搭配分子對接 (docking analysis)，確認白花蛇舌草的治療效果、影響的基因群組及組成份，期望可以發現白花蛇舌草的新穎免疫抗癌標靶以及主要活性物質。

## 二、研究目的

- (一) 利用動物實驗確認白花蛇舌草具有抗大腸直腸癌的功效。
- (二) 利用次世代基因定序分析白花蛇舌草會影響的基因群組及基因類別。
- (三) 利用酵素連結免疫吸附分析法確認白花蛇舌草會影響基因標靶的表現。
- (四) 分析白花蛇舌草質譜儀所鑑定的所有成分，尋找可能主導白花蛇舌草免疫抗癌新機轉之活性物質。
- (五) 利用動物實驗確認白花蛇舌草的活性物質—阿魏酸具有抗大腸直腸癌的功效。

## 三、文獻回顧

### (一) 白花蛇舌草的抗癌機轉

白花蛇舌草為茜草科的植物，傳統醫學已有數千年的使用經驗。白花蛇舌草主要用在清熱解毒，也是前五種最常使用的抗癌草藥之一 (Meng et al., 2013)。科學文獻顯示，白花蛇舌草具有抗癌、抗發炎、免疫調節、抗氧化等功效，透過 PI3K/AKT、RAS/ERK、IL-6/STAT3、nuclear factor- $\kappa$ B、Wnt/ $\beta$ -catenin、細胞週期停滯等多種途徑及標靶，可以抑制腫瘤細胞的增生和轉移，也可以緩解化療藥物的副作用 (例如化療藥物造成的毒性及骨髓抑制)，進而改善癌症病人的生活品質及存活率，所以已被廣泛應用於治療大腸直腸癌、乳癌、前列腺癌等

癌症 (Wu et al., 2022)。

## (二) 大腸直腸癌的現況及治療方式

大腸直腸癌是一種發生於結腸或直腸的惡性腫瘤，世界衛生組織於 2020 的調查顯示，大腸直腸癌的發生率是所有癌症的第二名，死亡率為所有癌症的第三名 (Sung et al., 2021)。治療大腸直腸癌的方法包括手術、化學療法、放射線療法、及標靶療法，醫生會依照癌症的分期及腫瘤的位置，選擇適合的治療策略。以標靶療法為例，通常會使用在無法切除且已轉移的病程，標靶藥物的種類有抗表皮生長因子受體的抗體 (cetuximab、panitumumab 等)、抗血管新生的抗體 (bevacizumab、ramucirumab 等)，分別用來抑制上皮細胞的增生及血管的生成，使得腫瘤細胞無法分裂，也會讓腫瘤組織內的細胞因為沒有血管供應養份而衰竭 (Yin et al., 2022)。

## (三) 發炎與大腸直腸癌的關連

造成大腸直腸癌的原因有很多，例如加工肉類及紅肉的飲食習慣，或是腸道有慢性發炎疾病，都會增加罹患大腸直腸癌的風險。發炎細胞及細胞激素被認為與大腸直腸癌的發生有關，腸道免疫細胞產生的細胞激素，例如白細胞介質-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ )、IL-6 等會與腸道的其他細胞，如腸細胞、杯狀細胞、巨噬細胞等產生交互作用，而趨動慢性發炎反應的發生；白細胞介質-17 (interleukin-17) 可以促進腫瘤誘發的發炎反應，造成結直腸的癌化，也會促進上皮細胞的增生 (Bhat et al., 2022)。因為慢性發炎與大腸直腸癌的發生息息相關，因此有文獻建議含有大量酚類化合物的飲食 (橄欖油、魚油、植物性食品等) 因為具有很好的抗發炎功效，所以對大腸直腸癌的發生，有潛在的預防效果 (Mahmod et al., 2022)。

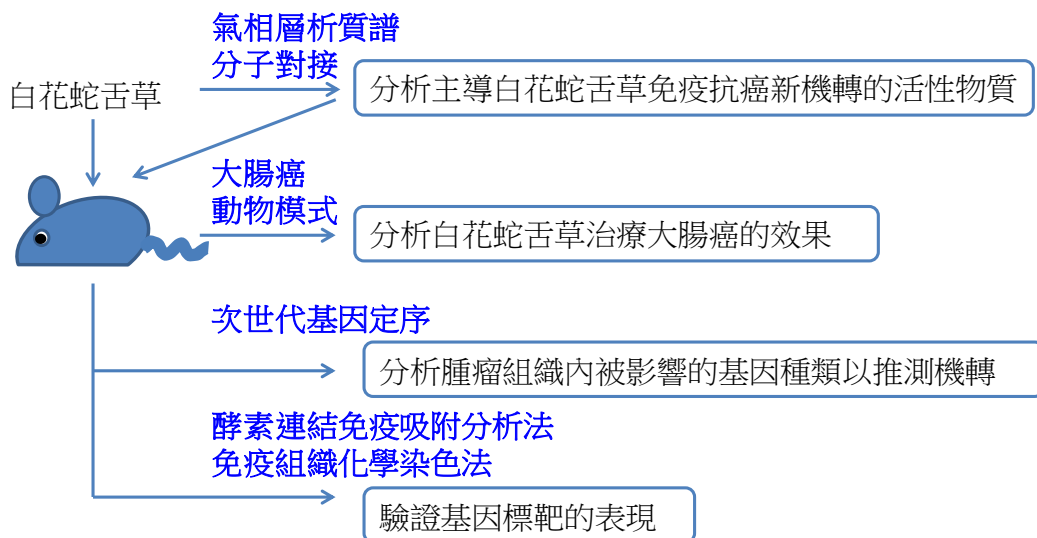
## 貳、研究方法

### 一、實驗架構及流程

本實驗所使用的白花蛇舌草藥材如圖一所示，白花蛇舌草購自台中某合格中藥商，產地為台灣，批號為#108070865。實驗架構如圖二所示。



圖一、白花蛇舌草藥材相片。左圖為白花蛇舌草的外觀，右圖為白花蛇舌草放大後的型態。



圖二、實驗架構及流程。

### 二、大腸直腸癌的動物模式

動物實驗有經過實驗動物照護及使用委員會審議，並在有經驗的研究人員的監督下操作。

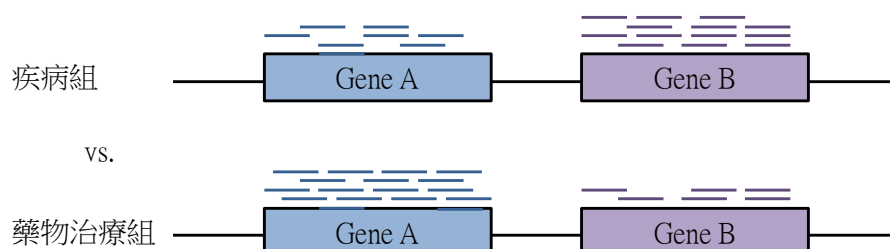
大腸直腸癌的誘導方法參考 Neufert 等（2007）的方法，誘導劑為 azoxymethane（AOM）及 dextran sulfate sodium（DSS），AOM 會使細胞染色體發生突變，DSS 會刺激胃腸道的發炎。

這種小鼠模式的病理特徵與人類大腸直腸癌的特徵相似，因此已被應用於研究機轉及開發藥物 (Neufert et al., 2007)。實驗共有四組，每組 6 隻小鼠，空白組為健康小鼠，疾病組為大腸直腸癌小鼠，白花蛇舌草組為白花蛇舌草治療的大腸直腸癌小鼠，阿魏酸組為阿魏酸治療的大腸直腸癌小鼠。施作方法為：腹腔注射 AOM (10 mg/kg)，一週後以飲水中含有 2% DSS 的方式讓小鼠自由飲用，一週後更換為正常飲水，兩周後再進行 DSS 飲水的循環，經過 3 次循環後，會在直腸部位產生明顯的腫瘤組織。

將白花蛇舌草加水加熱後，收集上清液，烘乾測定乾重，以 200 mg/kg 的劑量每天餵食一次、連續 10 周餵給小鼠。阿魏酸購自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)，以 100 mg/kg 的劑量每天餵食一次、連續 10 周餵給小鼠。實驗結束後，犧牲小鼠，並取適當的組織及樣品進行後續的實驗。

### 三、次世代基因定序 (Next Generation Sequencing)

次世代基因定序是要分析組織中基因的表現量，原理是將組織的所有 RNA 反轉成 cDNA，再構築到質體中，利用定序儀進行 cDNA 核苷酸序列的定序，再與小鼠約 3 萬個基因的序列進行比對，確認基因的種類。若被定序出來的 cDNA 片段 (圖三的直線片段) 數量越多，代表該基因的表現量越高，以圖三為例，疾病組 Gene B 的表現量多於 Gene A，若是將藥物治療組與疾病組的 cDNA 片段數相比，就可以計算藥物治療組該基因表現增加或減少的倍率 (fold change) (以圖三為例，藥物治療組 Gene A 的表現量較疾病組增加 2.5 倍)。接著，挑出表現量相差 1.5 倍的基因，利用 DAVID Bioinformatics Resources 網站 (<https://david.ncifcrf.gov>)，將這些基因依照功能進行分類 (Gene Ontology)，並分析這些基因位在哪些生物訊息傳導途徑上 (Pathway) (Sherman et al., 2022)。



圖三、利用次世代基因定序比較組別之間基因表現變化的概念圖。



#### 四、酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)

酵素連結免疫吸附分析法是用來測定樣品中基因產物（蛋白質）濃度的方法，原理是將可以與目標蛋白質結合的抗體先吸附在塑膠平盤的底部，再加上樣品，若是樣品中有目標蛋白質，這時目標蛋白質會被抗體抓住。接著加入帶有酵素且可以與目標蛋白質結合的抗體，再加上受質，受質會因為酵素切割成產物而呈現顏色，最後就利用分光比色儀，以波長 450 nm 的可見光測定產物的吸光值。吸光值越高，代表樣品中目標蛋白質的濃度越高。

#### 五、氣相層析質譜 (Gas Chromatography Mass Spectrometry)

氣相層析質譜主要是用於混合物中各個組成份的身份鑑定及含量測定，本項實驗結合氣相色譜和質譜等兩部份，將混合物注入毛細管柱，組成份會因為化學性質的差異，而在不同極性的溶劑流經管柱時被沖出。接著質譜儀會將每個組成份斷裂成離子化碎片，每個碎片會形成不同荷質比的帶正電荷離子，質量分析器中，會利用電場使不同荷質比的離子在時間上分離，最後可以藉由計算質量-電荷比 ( $m/z$ ) 的數值，再比對目前已知化合物的質量-電荷比，推測組成份的種類，也可以藉由計算層析圖上各個波峰的面積，計算組成份的含量比例。

#### 六、IL-17/IL-17R ELISA

IL-17/IL-17R ELISA 是用來分析化合物阻斷 IL-17 與 IL-17 受體 (IL-17R) 結合的試驗。實驗設計為將 IL-17 連接在盤面上，再加入化合物，接著加入帶有 Fc 片段的 IL-17R (Fc-IL-17R) 及帶有酵素 horseradish peroxidase 的二次抗體 Anti-Human IgG，最後加入受質 3,3',5,5'-tetra-methylbenzidine。若是化合物無法阻止 IL-17 與 IL-17R 的結合，則 Fc-IL-17R 會與 IL-17 結合，二次抗體會與 Fc-IL-17R 結合，受質會被酵素切割，利用波長 450 nm 測定後，吸光值就越高。若是化合物可以阻止 IL-17 與 IL-17R 結合，則吸光值就下降。

#### 七、分子對接 (Docking)

分子對接是利用生物程式進行虛擬的受體和受質的接合分析方法，先由 Protein Databank (<https://www.rcsb.org/>) 獲得 IL-17/IL-17R 的晶體結構 (PDB ID: 4HSA)，並使用 Reaxys

(<https://www.reaxys.com/#/search/quick>) 搜尋化合物的結構，接著將這些結構利用 AutoDock (<https://autodock.scripps.edu/>) 分析，AutoDock 會計算接合過程中分子之間的空間和能量等參數，預測結合的位向及穩定度。

## 八、免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry)

在實驗的終點時間，麻醉並犧牲小鼠，結直腸組織樣品以福馬林固定，然後取結直腸的樣品進行石蠟包埋以及切片。免疫組織化學染色法是藉由組織上的蛋白質與抗體進行非共價鍵結合後，偵測組織或細胞內目標蛋白質的表現量及位置。本項實驗使用可以分別與 IL-1 $\beta$ 、IL-17、CD11b 結合的三種抗體進行染色。

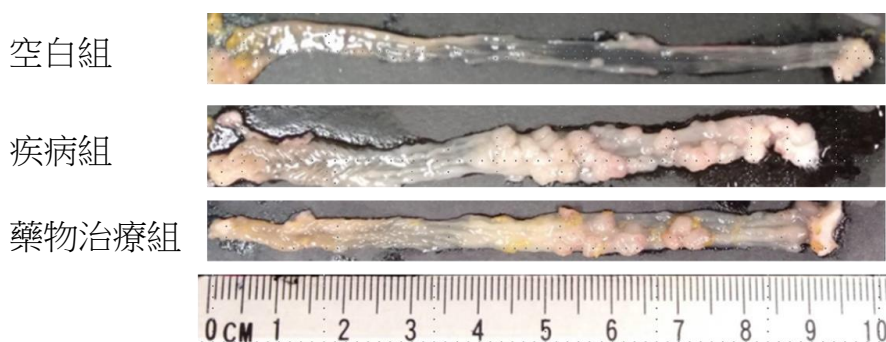
## 參、研究結果與討論

### 一、白花蛇舌草可以緩解小鼠的大腸直腸癌

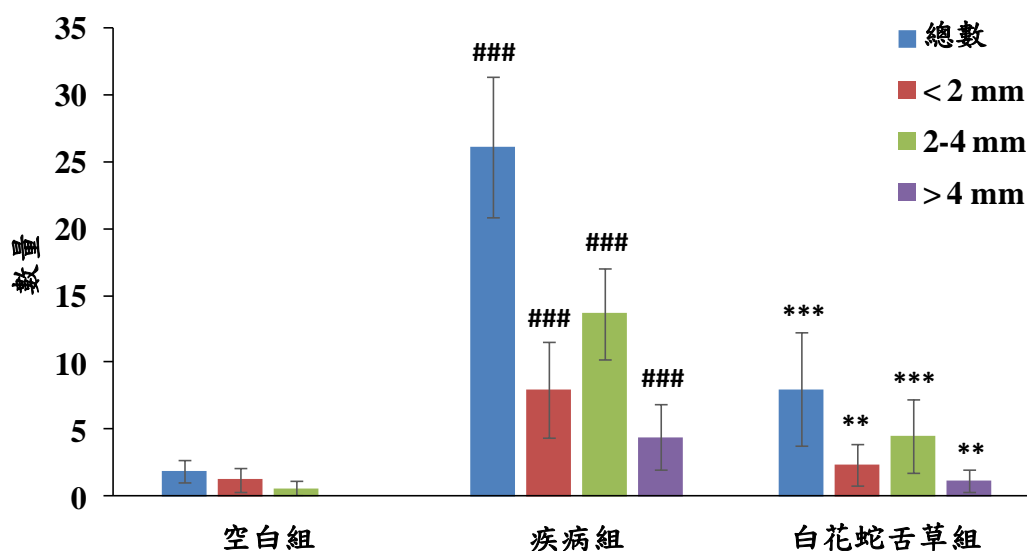
大腸直腸癌的小鼠實驗進行 10 周，因為脫肛及直腸出血是大腸直腸癌常見的症狀，因此特別針對這兩項症狀進行觀察與紀錄。將各組實驗小鼠肛門出血及脫肛的隻數、天數等參數進行運算後發現，空白組小鼠並無任何出血或脫肛現象發生；疾病組小鼠的平均出血（總天數/隻數）為 6 天、平均脫肛（總天數/隻數）為 0.1 天；白花蛇舌草組小鼠平均出血為 2.25 天、平均脫肛為 0 天。這些結果顯示，白花蛇舌草具有降低大腸直腸癌小鼠脫肛及直腸出血症狀的效果。

實驗終點時將小鼠人道犧牲取出結直腸段，先觀察外觀的差異。圖四顯示，空白組的結直腸段外觀平整，疾病組出現許多大大小小突出物（增生組織），白花蛇舌草組也有突出物，但數量較少。接著，紀錄增生組織的數量及體積。首先將增生組織依照直徑區分為 < 2 mm、2-4 mm、> 4 mm 三群，再計算結直腸固定長度內這三群增生組織的數量，最後以 Student's *t* test 進行統計分析。圖五顯示，空白組仍有非常少量的增生組織，這些組織有可能是腸管內的淋巴結；疾病組增生組織的數量明顯多於空白組，而且是以直徑 2-4 mm 的數量最多；白花蛇舌草組增生組織的數量雖然比空白組多，但明顯地比疾病組少。因為增生組織的型態類似圓形，所以接著計算各組增生組織的體積，結果顯示，空白組增生組織的平均體積為  $0.006 \pm 0.006 \text{ cm}^3$ ，

疾病組為  $0.209 \pm 0.146 \text{ cm}^3$ ，白花蛇舌草組為  $0.062 \pm 0.047 \text{ cm}^3$ ，疾病組明顯多於空白組 ( $p < 0.01$ )，白花蛇舌草組明顯少於疾病組 ( $p < 0.05$ )。綜合上述，白花蛇舌草可以緩解小鼠大腸直腸癌的症狀及增生組織的形成。



圖四、大腸直腸癌小鼠實驗結直腸段的外觀。利用 AOM 及 DSS 誘導小鼠發生大腸直腸癌，過程中持續以每天一次的頻率餵食 200 mg/kg 白花蛇舌草，10 周後將小鼠人道犧牲，取結直腸段進行拍照觀察。



圖五、大腸直腸癌小鼠實驗結直腸段增生組織的數量。利用 AOM 及 DSS 誘導小鼠發生大腸直腸癌，過程中持續以每天一次的頻率餵食 200 mg/kg 白花蛇舌草，10 周後將小鼠人道犧牲，取結直腸段分別計算直徑 < 2 mm、2-4 mm、> 4 mm 的增生組織的數量及總數。數值為平均值  $\pm$  標準差 ( $n=6$ )。###代表與空白組相比， $p$  值小於 0.001。\*\*及\*\*\*代表與疾病組相比， $p$  值分別小於 0.01 及 0.001。

## 二、利用基因表現的變化，探討白花蛇舌草的作用機轉

基因表現的變化是使用次世代基因定序來進行分析，共檢測到 24,444 個基因，其中疾病組共有 8,938 個基因的表現量與空白組相比相差 1.5 倍，而白花蛇舌草組共有 10,478 個基因的表現量與疾病組相比相差 1.5 倍。接著選擇這些表現量相差 1.5 倍的基因依照功能進行分類 (Gene Ontology; GO)，表一為經過分類後排名前 10 名的結果，結果顯示白花蛇舌草會影響與白血球趨化現象 (leukocyte chemotaxis 及 neutrophil chemotaxis) 或移動 (leukocyte migration 及 neutrophil chemotaxis) 有關的基因，也會干擾與趨化因子 (chemokine) 和細胞激素 (cytokine) 有關的訊息傳遞路徑。接著，分析這些基因會影響哪些生物訊息傳導途徑 (Pathway)，表二為經過 Pathway 分析後排名前 10 名的結果，其中 8 種生物訊息傳導途徑與免疫反應有關，在這 8 種生物訊息傳導途徑中，有 2 個途徑 (Th17 cell differentiation 及 IL-17 signaling pathway) 與 IL-17 有關，IL-17 是一種細胞激素，與上皮細胞的增生有關 (Bhat et al., 2022)，所以這些結果顯示，白花蛇舌草可能可以經由干擾免疫反應以及上皮細胞的增生，而緩解小鼠大腸直腸癌的形成。

表一、白花蛇舌草影響的生物功能。

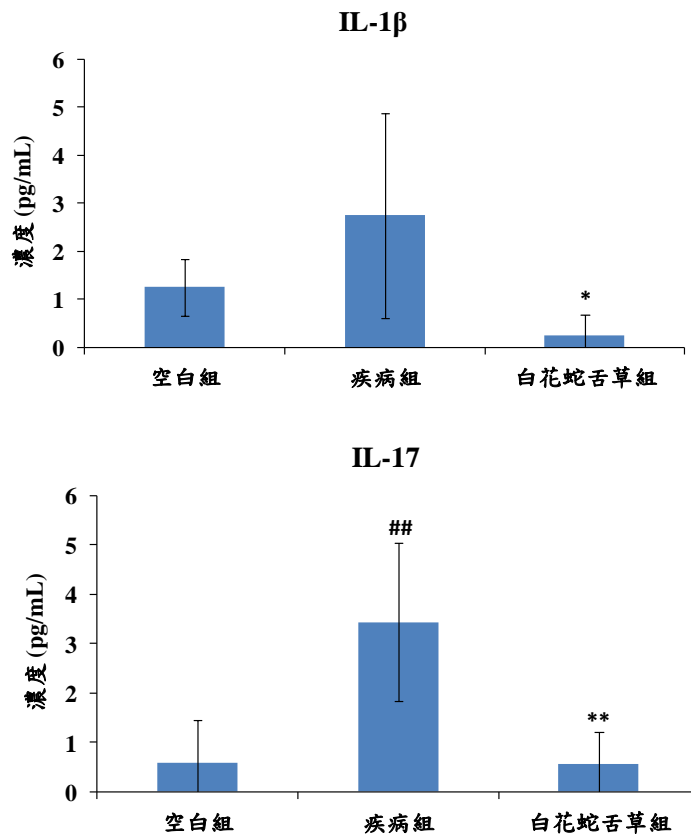
GO 編號	基因功能分類	影響的基因數量	<i>p</i> 值
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	64	1.53E-18
GO:0050900	leukocyte migration	61	2.47E-18
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	70	3.17E-18
GO:0030098	lymphocyte differentiation	68	2.61E-17
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	44	5E-16
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	64	6.97E-15
GO:0060326	cell chemotaxis	49	4.1E-14
GO:0002685	regulation of leukocyte migration	37	2.3E-12
GO:1990266	neutrophil migration	27	4.87E-12
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	25	7.82E-12

表二、白花蛇舌草影響的生物訊息傳導途徑。

生物訊息傳導途徑	影響的基因數量	<i>p</i> 值
TNF signaling pathway	61	1.59E-34
Th17 cell differentiation	58	1.10E-33
Toll-like receptor signaling pathway	57	1.59E-33
T cell receptor signaling pathway	55	1.17E-30
Pathways in cancer	131	1.17E-26
NF-kappa B signaling pathway	53	2.11E-26
Chemokine signaling pathway	72	1.93E-25
B cell receptor signaling pathway	40	4.99E-23
Proteoglycans in cancer	67	3.60E-21
IL-17 signaling pathway	42	4.70E-20

### 三、白花蛇舌草會影響重要致病基因標靶的表現

免疫細胞的趨化現象如同細菌會向有較高食物分子濃度的地方移動一樣，如果在腫瘤附近有較多的趨化因子及細胞激素，就會吸引免疫細胞移動到腫瘤組織附近，這些免疫細胞又會分泌趨化因子及細胞激素吸引更多的免疫細胞過來，最後造成嚴重的發炎現象。由上面的結果顯示，白花蛇舌草可能會干擾免疫細胞的趨化現象及上皮細胞的增生，而 IL-1 $\beta$  及 IL-17 分別與免疫細胞的趨化現象及上皮細胞的增生有關，所以用 ELISA 確認這兩種蛋白質的濃度（圖六）。在 IL-1 $\beta$  的部份，疾病組 IL-1 $\beta$  的濃度較空白組多，但是白花蛇舌草組 IL-1 $\beta$  的濃度較疾病組低，而且達顯著差異，這個結果顯示大腸直腸癌的誘導劑 AOM 及 DSS 會造成大腸發炎，而白花蛇舌草可以有效地抑制大腸發炎的現象。在 IL-17 的部份，疾病組 IL-17 的濃度較空白組多且達顯著差異，但是白花蛇舌草組 IL-17 的濃度較疾病組低且達顯著差異，這個結果說明 IL-17 在大腸癌的生成過程中確實是一個重要的指標，而白花蛇舌草可有效地抑制 IL-17，減少上皮細胞的增生，進而抑制大腸腫瘤的生成。



圖六、白花蛇舌草對基因標靶表現量的影響。收集小鼠血清後，利用 ELISA 測定血清中 IL-1 $\beta$ （上圖）及 IL-17（下圖）的濃度。數值為平均值 $\pm$ 標準差（ $n=6$ ）。##代表與空白組相比， $p$ 值小於 0.01。\*及\*\*代表與疾病組相比， $p$ 值分別小於 0.05 及 0.01。

#### 四、分析白花蛇舌草的組成份並推測可能的活性物質

為了找到白花蛇舌草的活性成份，先利用氣相層析質譜儀鑑定白花蛇舌草的所有成分，再利用 IL-17/IL-17R ELISA 及分子對接技術（docking）尋找可能主導白花蛇舌草免疫抗癌新機轉之活性物質。

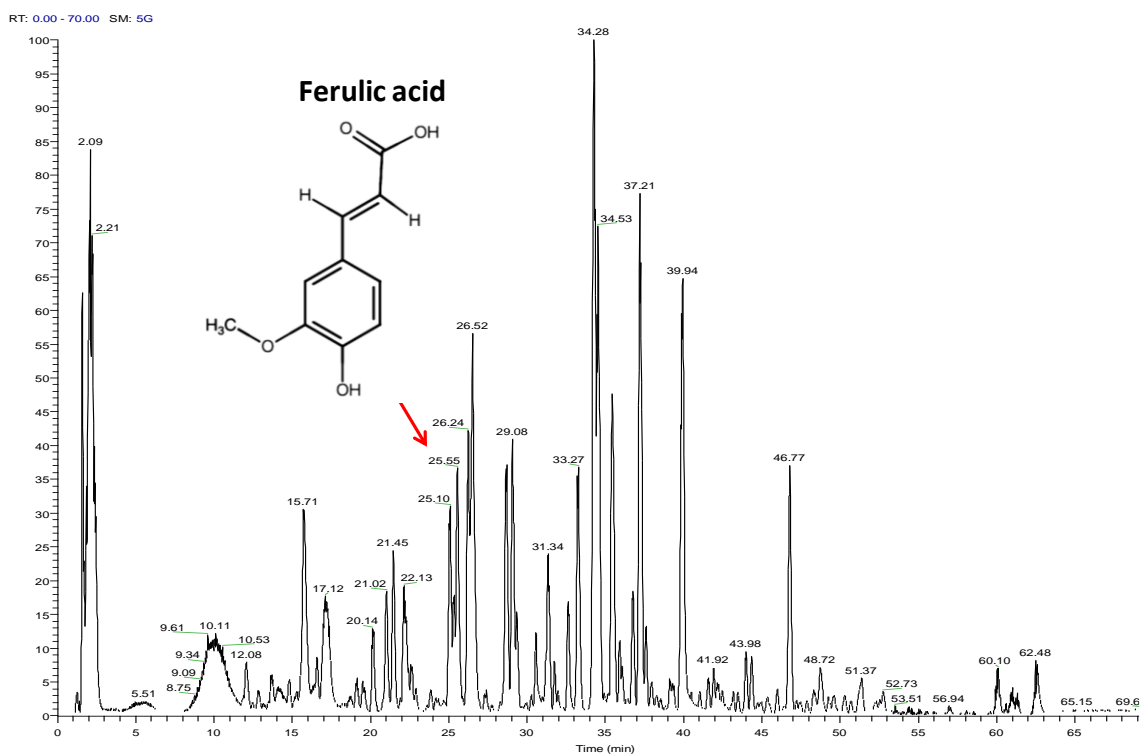
經氣相層析質譜儀分析後，可以藉由計算質量-電荷比（ $m/z$ ）的數值，再比對目前已知化合物的質量-電荷比，推測組成份的種類，也可以藉由計算層析圖上各個波峰的面積，計算組成份的含量比例。結果顯示，共有 30 種白花蛇舌草的組成份可以藉由上述分析方法被鑑定出來（表三及圖七）。進一步使用 Reaxys (<https://www.reaxys.com/#/search/quick>) 搜尋這些化合物的結構並直接下載，若是 Reaxys 沒有的結構，則利用 PubChem

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋出結構後，再使用 Reaxys 繪製 (圖八)。有 3 種化合物 (2E,2'E)-N,N'-1,4-Butanediylbis[3-(4-hydroxyphenyl)acrylamide]、(3R,5R)-1,3,5-Trihydroxy-4-[[ (2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl]oxy]cyclohexanecarboxylic acid、{(3R,5R,6S,8S)-3-[(6-O-Benzoyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-6-hydroxy-8-methyl-9,10-dioxatetracyclo[4.3.1.02,5.03,8]dec-2-yl)methyl benzoate)無法從 PubChem 被查詢到。由結構上判讀，大約有一半的組成分都屬於酚醛類化合物 (phenolic compound)。

表三、利用氣相層析質譜儀分析白花蛇舌草中所有可能的組成份。

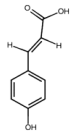
No.	Name	RT [min]	Detection (m/z)	Formula	Content (%)
1	Adenosine	2.052	267.09623	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	0.522
2	L-Phenylalanine	2.245	165.07881	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>2</sub>	0.177
3	D-(+)-Tryptophan	4.71	204.08962	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.042
4	Kynurenic acid	12.06	189.04234	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>3</sub>	0.059
5	2,3,4,9-Tetrahydro-1H-β-carboline-3-carboxylic acid	12.063	216.08962	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.445
6	Norharman	13.301	168.06859	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	0.006
7	Tryptoline	15.877	172.09993	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	0.007
8	Esculetin	16.002	178.02629	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.214
9	Vanillin	19.109	152.04718	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.283
10	Tolycaine	19.604	278.16268	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.142
11	3-Fluoro-N'-hydroxy-4-methylbenzenecarboximidamide	19.673	168.06859	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> F N <sub>2</sub> O	0.036
12	4-Coumaric acid	22.115	164.04715	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.736
13	(3R,5R)-1,3,5-Trihydroxy-4-[[ (2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl]oxy]cyclohexanecarboxylic acid	23.604	368.10979	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0.040
14	Cyclo(phenylalanyl-prolyl)	25.115	244.12081	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.030
15	N-Acetyl-DL-tryptophan	25.534	246.09991	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.029
16	Ferulic acid	25.544	194.0577	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	2.212
17	Quercetin	26.525	302.0421	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	3.094
18	Sinapinic acid	35.442	206.05762	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	2.955
19	4-Methoxycinnamic acid	35.856	178.06278	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	0.211
20	Kaempferol	37.223	286.0475	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	2.334
21	(2E)-3-(4-Hydroxyphenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	38.381	283.12029	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>3</sub>	0.007

22	(2E,2'E)-N,N'-1,4-Butanediylbis[3-(4-hydroxyphenyl)acrylamide]	42.225	380.17284	C22 H24 N2 O4	0.025
23	{(3R,5R,6S,8S)-3-[(6-O-Benzoyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-6-hydroxy-8-methyl-9,10-dioxatetracyclo[4.3.1.02,5.03,8]dec-2-yl}methyl benzoate	48.575	584.18944	C30 H32 O12	0.006
24	9S,13R-12-Oxophytodienoic acid	48.749	292.20326	C18 H28 O3	0.267
25	Daidzein	52.069	254.05747	C15 H10 O4	0.085
26	Pinolenic acid	52.855	278.22402	C18 H30 O2	0.005
27	Formononetin	52.914	268.07311	C16 H12 O4	0.016
28	Oleanolic acid	58.03	438.34929	C30 H48 O3	0.003
29	6-Hydroxyflavone	60.892	238.06256	C15 H10 O3	0.033
30	Psoralidin	61.407	336.09905	C20 H16 O5	0.001

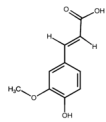


圖七、白花蛇舌草的氣相層析色譜圖。紅色箭頭指出阿魏酸的波峰。

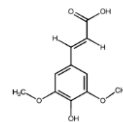




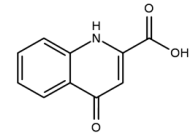
4-Coumaric acid



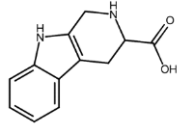
Ferulic acid



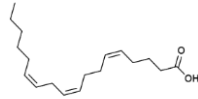
Sinapinic acid



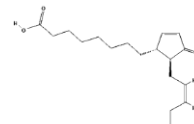
Kynurenic acid



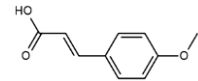
2,3,4,9-Tetrahydro-1H- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid



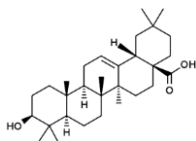
Pinolenic acid



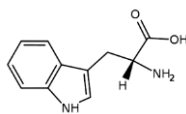
9S,13R-12-Oxophytodi-  
enoic acid



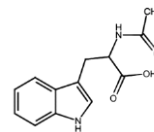
4-Methoxycinnamic  
acid



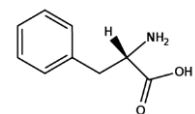
Oleanolic acid



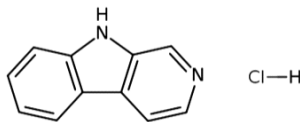
D-Tryptophan



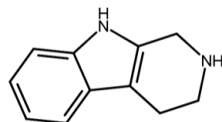
N-Acetyl-DL-tryptoph



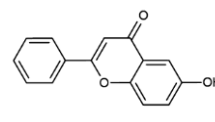
L-Phenylalanine



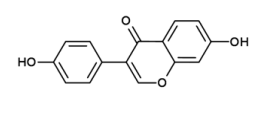
Norharman



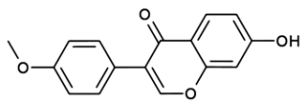
Tryptoline



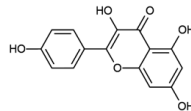
6-Hydroxyflavone



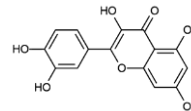
Daidzein



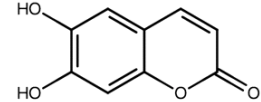
Formononetin



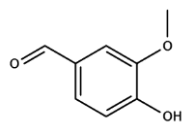
Kaempferol



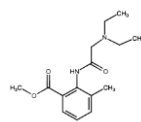
Quercetin



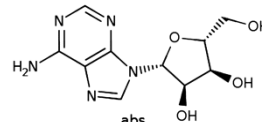
Esculetin



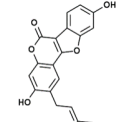
Vanillin



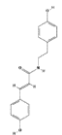
Tolycaine



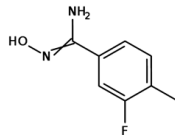
Adenosine



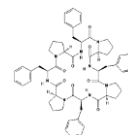
Psoralidin



(2E)-3-(4-Hydroxyphenyl)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide



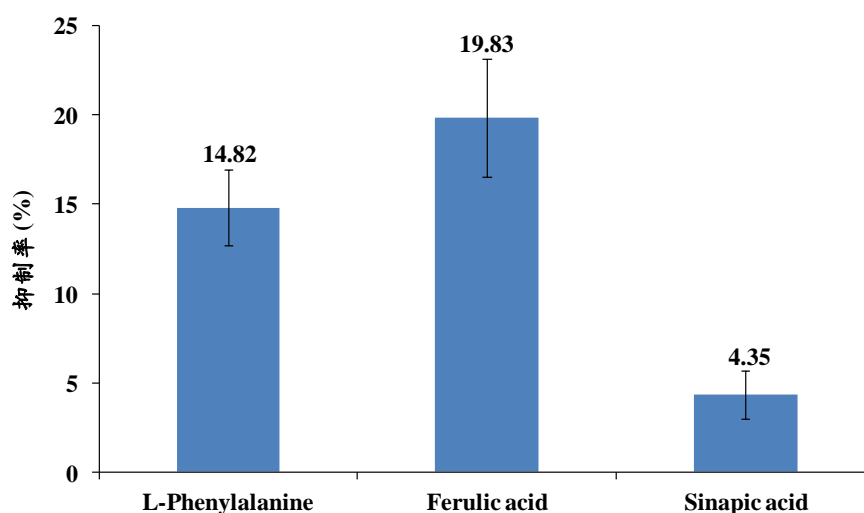
3-Fluoro-N'-hydroxy-4-methylbenzenecarboximidamide



Cyclo(phenylalanyl-prolyl)

圖八、白花蛇舌草中所有可能組成份的結構圖。

IL-17 可能是白花蛇舌草的免疫抗癌標靶，IL-17 會與其受體 IL-17R 結合而傳遞訊息，因此將上述表三的化合物與 IL-17/IL-17R 進行分子接合分析，發現酚醛類化合物具有可以阻止 IL-17 與 IL-17R 結合的潛能。進一步利用 IL-17/IL-17R ELISA 分析其中 3 種白花蛇舌草酚醛類化合物阻止 IL-17 與 IL-17R 結合的效應，發現阿魏酸 (ferulic acid) 抑制 IL-17/IL-17R 接合的能力最好 (圖九)。

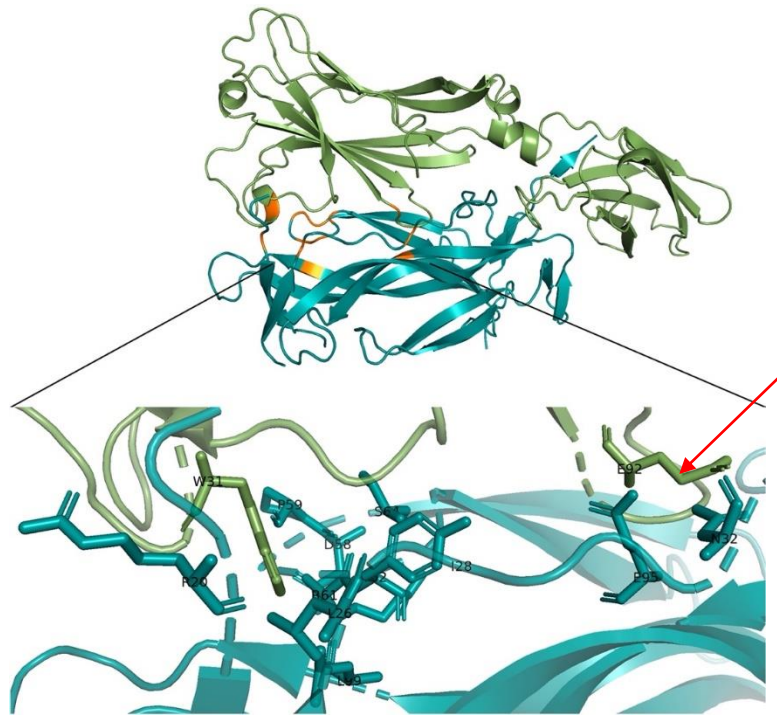


圖九、白花蛇舌草酚醛類化合物對 IL-17/IL-17R 結合的效應。將 100  $\mu$ M 的 phenolic compounds 利用 IL-17/IL-17R ELISA 進行分析，再將吸光值轉換成抑制率。數值為平均值 $\pm$ 標準差 (n=3)。

## 五、推測白花蛇舌草的組成份—阿魏酸阻止 IL-17/IL-17R 結合的行為

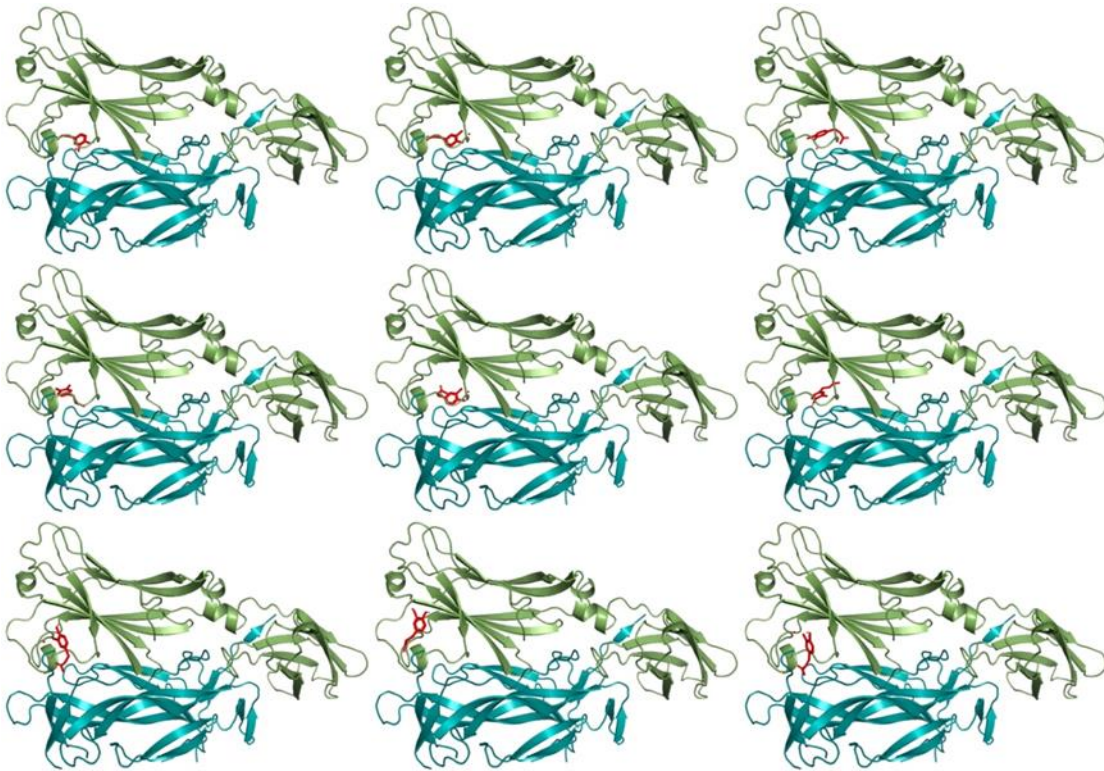
為了釐清阿魏酸如何抑制 IL-17/IL-17R 的接合行為，進一步利用生物資訊模擬及分子對接分析這幾種分子之間的交互作用，解釋阿魏酸可能的作用機轉。

首先，先建立 IL-17/IL-17R 結合界面的背景資訊，從 Protein Databank (<https://www.rcsb.org/>) 獲得 IL-17/IL-17R 的晶體結構 (PDB ID: 4HSA)，再由 Liu 等 (2013; 2019) 的文獻中得知 IL-17 會透過三個區域和 IL-17R 結合，其中在第一個區域的 IL-17R 之 Glu-92 與 IL-17 之 Asn-32 為參與 IL-17/IL-17R 結合的關鍵胺基酸 (圖十)。



圖十、IL-17 與 IL-17R 的結合結構。IL-17（藍色）有三個區域會和 IL-17R（綠色）結合，使用 PyMoL (<https://pymol.org/2/>) 標示出第一個區域（橘色）後，再放大第一個區域的關鍵結合位。紅色箭頭指出 IL-17R 之 Glu-92 (E92) 與 IL-17 之 Asn-32 (N32) 的相對位置。

接著利用 AutoDock 將阿魏酸和 IL-17/IL-17R 進行分子對接，並整理前九名的結果。如圖十一所示，阿魏酸可鍵結於 IL-17/IL-17R 界面之間，而且前九名的結果都顯示阿魏酸可以結合在第一區域，與 IL-17R 之 Glu-92 及 IL-17 之 Asn-32 的位置相近（表四）。

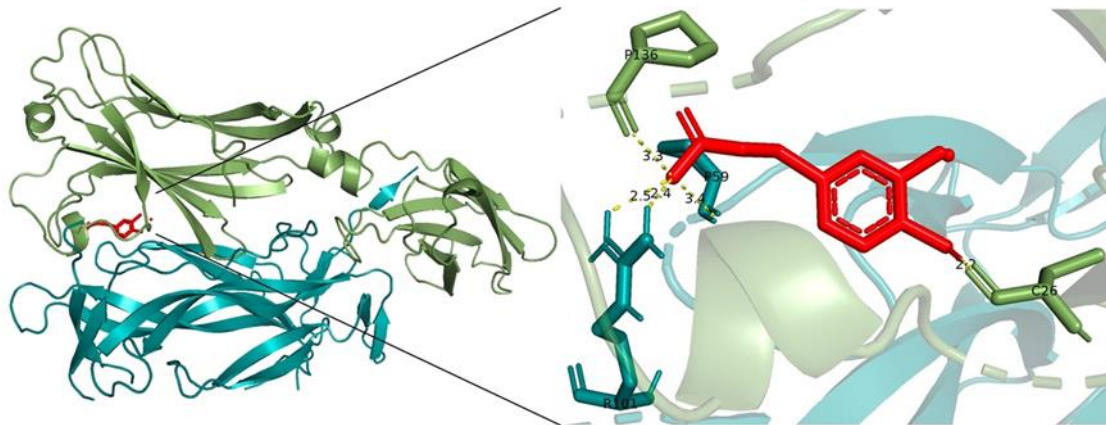


圖十一、阿魏酸與 IL-17/IL-17R 前 9 名可能的結合結構。利用 AutoDock (<https://autodock.scripps.edu/>) 將阿魏酸 (紅色) 和 IL-17 (藍色) /IL-17R (綠色) 進行分子對接後，列出排名前九名的結構圖 (由左到右)。

表四、阿魏酸與 IL-17/IL-17R 產生交互作用的胺基酸，關鍵胺基酸以紅色字體表示。

前九名結合結構	IL-17 A chain	IL-17 B chain	IL-17RA
1		R101	
2		P59 R101	C26 P136
3		S64 V65	R93 K135
4		S64	H144
5		E57 S64	H144
6		R55	C26 E127 T129 S146
7	N17 R20		E99
8			D29 R35
9	R20		R97

進一步分析其詳細的結合位，其中第二名的結合結構呈現阿魏酸可鍵結於 IL-17/IL-17R 界面之間，阿魏酸和 IL-17 chain B 的 Pro-59 和 Arg-101 產生交互作用，阿魏酸的羧基會和 IL-17 chain B 的 Pro-59 產生氫鍵，距離 3.4 Å，也會和 Arg-101 產生兩個氫鍵，距離為 2.4 和 2.5 Å（圖十二）。由於第一個區域為 IL-17 的 N 端和 IL-17R 的結合位置，其中 IL-17 chain B 的 Arg-101 和 IL-17R 的 Trp-31 在其他 IL-17 細胞因子中為高度保留的胺基酸，可知為重要的交互作用區域，因此推測當阿魏酸鍵結於 Pro-59 和 Arg-101 時，可以影響 IL-17 Arg-101 和 IL-17R Trp-31 的結合，進一步抑制 IL-17 結合到 IL-17R。

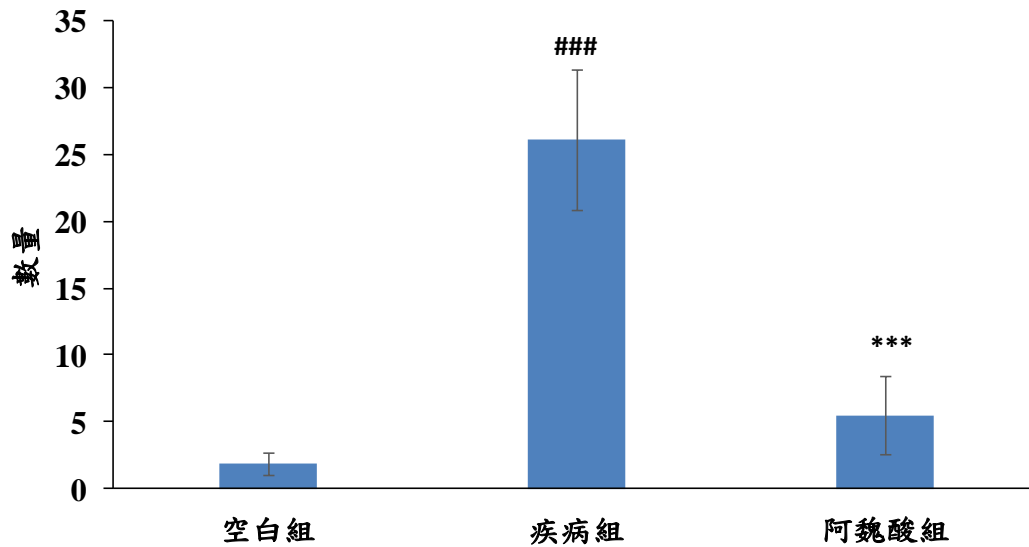


圖十二、阿魏酸和 IL-17/IL-17R 的結合結構。阿魏酸（紅色）的羧基會和 IL-17 的 Pro-59 和 Arg-101 產生氫鍵（黃色虛線）

## 六、阿魏酸可以藉由抑制基因標靶的表現而緩解小鼠的大腸直腸癌

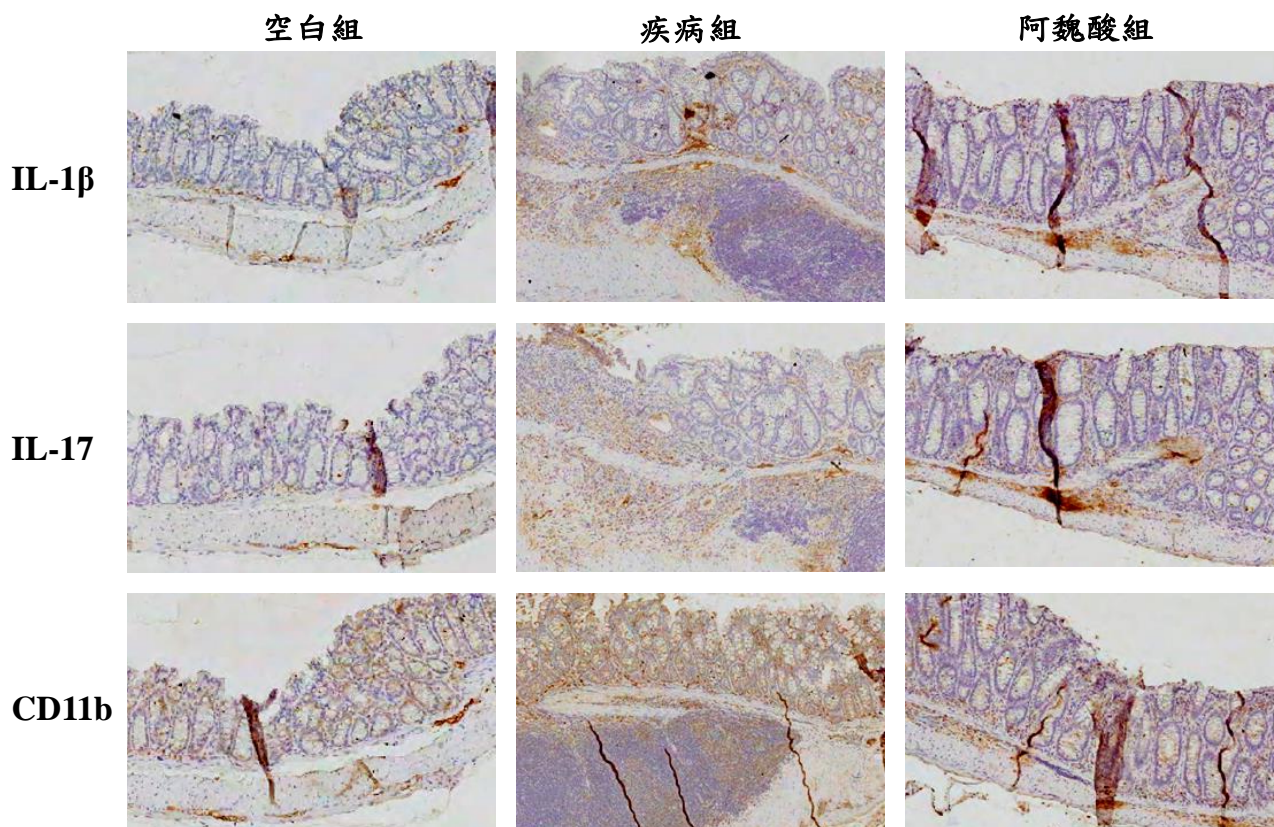
由以上實驗，藉由 IL-17 關鍵靶點去分析白花蛇舌草質譜儀所鑑定的所有成分中，阿魏酸可能擁有抑制 IL-17 作用之效應，代表阿魏酸可能是主導白花蛇舌草免疫抗癌的活性物質，但是體內的效應是如何呢？

將阿魏酸投與以 AOM/DSS 誘導的大腸癌動物模式，確認阿魏酸是否同樣可以抑制大腸癌增生組織的數量。結果如圖十三所示，疾病組增生組織的數量明顯多於空白組；阿魏酸組增生組織的數量明顯地比疾病組少。



圖十三、阿魏酸抑制大腸直腸癌小鼠實驗結直腸段增生組織的數量。利用 AOM 及 DSS 誘導小鼠發生大腸直腸癌，過程中持續以每天一次的頻率餵食 100 mg/kg 阿魏酸，10 周後將小鼠人道犧牲，取結直腸段分別計算增生組織的總數。數值為平均值±標準差 (n=6)。###代表與空白組相比，*p* 值小於 0.001。\*\*\*代表與疾病組相比，*p* 值小於 0.001。

IL-1 $\beta$  是一種促發炎細胞激素，在與受體結合後，會促進 MyD88 訊息傳遞路徑，活化轉錄因子 NF- $\kappa$ B，產生促發炎訊號 (pro-inflammatory signal)，因此 IL-1 $\beta$  被視為和先天免疫反應較為相關的細胞激素。IL-17 是一種重要的炎症因子，與上皮細胞的增生有關，CD11b 和單核細胞、巨噬細胞等發炎細胞的黏附作用有關，因此接著利用可以分別與 IL-1 $\beta$ 、IL-17、CD11b 結合的三種抗體進行直腸組織切片的免疫組織化學染色，確認這三種蛋白質在組織中的含量。結果呈現，疾病組和空白對照組相比，這三種蛋白質的表現量都有增加(棕色區域)，而阿魏酸組和疾病組相比，這三種蛋白質的表現量都有減少(圖十四)。



圖十四、阿魏酸對基因標靶表現量的影響。利用 IL-1 $\beta$ 、IL-17、CD11b 抗體進行免疫組織化學染色後，擷取圖片。

## 肆、結論與應用

### 一、研究結論

#### (一) IL-17 為白花蛇舌草的新穎免疫抗癌標靶

本研究利用動物實驗搭配次世代基因定序，確認白花蛇舌草的治療效果、影響的基因群組及組成份，並發現白花蛇舌草的新穎免疫抗癌標靶。研究結果顯示，白花蛇舌草可以減少小鼠結直腸增生組織的數量及大小，將被影響的基因進行 Gene Ontology 分析，發現白花蛇舌草會干擾與免疫細胞趨化有關的 IL-1 $\beta$  基因群組，進行 Pathway 分析，發現白花蛇舌草會干擾與上皮細胞增生有關的 IL-17 訊息路徑，最後利用 ELISA，也確認白花蛇舌草會抑制 IL-1 $\beta$  及 IL-17 的濃度。綜上所結，與發炎及誘發上皮細胞增生的細胞激素 IL-1 $\beta$  及 IL-17 可能可以作為免疫抗癌標靶，而本研究利用現代科學方法，也證實傳統醫學使用的白花蛇舌草可以透

過降低 IL-1 $\beta$  及 IL-17 基因標靶的濃度，減少發炎及上皮細胞增生的現象，進而緩解小鼠的大腸直腸癌。

本研究發現白花蛇舌草可以透過降低 IL-17 基因標靶的濃度，進而緩解小鼠的大腸直腸癌。無獨有偶的，科學文獻報告也顯示人類大腸直腸癌組織中有高濃度的 IL-17，而且高濃度的 IL-17 與患者的預後呈負相關 (Li et al., 2022)，這個結論佐證本研究認為與誘發上皮細胞增生的細胞激素 IL-17 可能可以作為免疫抗癌標靶的想法，也證實白花蛇舌草透過降低 IL-17 基因標靶的濃度而緩解小鼠大腸直腸癌的合理性。

## (二) 阿魏酸 (Ferulic acid) 是白花蛇舌草的可能致效活性物質

本研究進一步利用氣相層析質譜儀搭配分子對接，尋找白花蛇舌草的主要活性物質。結果顯示，共有 30 種化合物被鑑定出來，多數的化合物屬於酚醛類化合物。將化合物與 IL-17/IL-17R 進行分子對接分析，發現阿魏酸會與 IL-17 的 Pro-59 和 Arg-101 產生交互作用，利用 IL-17/IL-17R ELISA 發現阿魏酸會抑制 IL-17 與 IL-17R 的結合，因此本研究推測阿魏酸鍵結於 Pro-59 和 Arg-101 時，可以影響 IL-17 Arg-101 和 IL-17R Trp-31 的結合，進一步抑制 IL-17 結合到 IL-17R。將阿魏酸餵給大腸直腸癌的小鼠，發現阿魏酸可以減少小鼠結直腸增生組織的數量，也會降低結直腸組織中基因標靶的濃度，代表阿魏酸是白花蛇舌草的可能致效活性物質，可以透過 IL-17，減緩小鼠的大腸直腸癌。

## 二、研究應用及討論

白花蛇舌草為茜草科的植物，傳統醫學會以帶根的全草作為藥材，但是植物的成份會隨著土壤的環境、生長的季節等變因而有所變化，不同地區或是不同時節採收的植物所含的成分可能略有差異，因此，以白花蛇舌草指標成份的含量作為品質管控的標準，可以使研究的結果更為穩定。

本研究發現阿魏酸會阻斷 IL-17 與 IL-17R 的結合，可能是白花蛇舌草緩解小鼠大腸直腸癌的致效成份，經過動物實驗也呈現阿魏酸的抑制效果。因為阿魏酸是一種毒性很低的化合物 (Li et al., 2021)，所以阿魏酸可能可以應用在治療大腸直腸癌的新藥開發。

綜上所結，白花蛇舌草是中醫抗癌常使用的中草藥，本研究利用現代科學證實傳統醫學的知



識，確認白花蛇舌草可以藉由 IL-17 這個新的免疫抗癌機制，緩解小鼠大腸直腸癌的發生。此外，本研究由免疫抗癌新機轉成功求證白花蛇舌草的主要活性物質，未來可以作為新藥開發衍生化合物的基礎，達成抗大腸癌新機轉，有效藥物開發的遠大夢想。

## 伍、參考文獻

- Bhat, A. A., Nisar, S., Singh, M., Ashraf, B., Masoodi, T., Prasad, C. P., Sharma, A., Maacha, S., Karedath, T., Hashem, S., Yasin, S. B., Bagga, P., Reddy, R., Frennaux, M. P., Uddin, S., Dhawan, P., Haris, M., & Macha, M. A. (2022). Cytokine- and chemokine-induced inflammatory colorectal tumor microenvironment: Emerging avenue for targeted therapy. *Cancer Communications*, 42, 689-715.
- Li, D, Rui, Y. X., Guo, S. D., Luan, F., Liu, R., & Zeng, N. (2021). Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Science*, 284, 119921.
- Li, S., Na, R., Li, X., Zhang, Y., & Zheng, T. (2022). Targeting interleukin-17 enhances tumor response to immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1877, 188758.
- Liu, S. (2019). Structural insights into the interleukin-17 family cytokines and their receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1172, 97-117.
- Liu, S., Song, X., Chrnyk, B. A., Shanker, S., Hoth, L. R., Marr, E. S., & Griffor, M. C. (2013). Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nature Communication*, 4, 1888.
- Mahmod, A. I., Haif, S. K., Kamal, A., Al-Ataby, I. A., & Talib, W. H. (2022). Chemoprevention effect of the Mediterranean diet on colorectal cancer: Current studies and future prospects. *Frontiers in Nutrition*, 9, 924192.
- Meng, Q. X., Roubin R. H., & Hanrahan J. R. (2013). Ethnopharmacological and bioactivity guided investigation of five TCM anticancer herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 229-238.
- Neufert, C., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for

the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature Protocols*, 2, 1998-2004.

Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50 (W1), W216-W221.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249.

Wu, Z., Yin, B., & You, F. (2022). Molecular mechanism of anti-colorectal cancer effect of *Hedyotis diffusa* Willd and its extracts. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 820474.

Yin, L., Li, H., Shi, L., Chen, K., Pan, H., & Han, W. (2022). Research advances in nanomedicine applied to the systemic treatment of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, doi: 10.1002/ijc.34256.

## 【評語】 090017

此作品探討白花蛇舌草抑制大腸癌生長的治療效果，發現阿魏酸為其中有效成分，可藉由阻斷 IL17/IL17R 之間的結合而達到抗癌效果。本作品有效利用 RNA seq、氣相層析、電腦分子對接等體外研究模式證明阿魏酸可發展成為具有潛力的 IL17R 抑制劑，若能進一步證明其具有改善大腸癌細胞對臨床標準用藥產生抗藥性的問題，可提高其藥物發展的價值。整篇研究架構邏輯清楚，雖使用已知的抗癌草藥及機轉，但找出新的活性物質-阿魏酸，並推測出阿魏酸與 IL-17 和 IL-17R 可能的結合位置進而阻止 IL-17 和 IL-17R 結合，抑制上皮組織增生的現象，達到抗癌效果，其作用機轉可望作為藥物開發基礎，具有應用價值。