

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090006

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 探討橙皮苷(Hesperidin)及綠原酸(Chlorogenic acid)混合處理對結腸癌細胞(HCT116)存活率的影響

得獎獎項

就讀學校 臺北市立麗山高級中學

指導教師 謝淑貞、蕭國偉

作者姓名 陳廷睿

關鍵詞 橙皮苷(Hesperidin)、綠原酸(Chlorogenic acid)、  
結腸癌細胞(HCT116)

## 作者簡介



我是就讀北市麗山高中的陳廷睿，從小就常閱讀生物相關書籍並從中產生濃厚興趣，而現在進一步涉獵生命科學與醫學相關的科普文章和影片，除了可知曉特殊的生物種類及行為適應方式外，細胞生物學領域內研究分子間交互作用機制更是深深吸引著我，而希望能透過專題研究的機會來探索細胞間的奧妙，藉此拓展生命科學的研究視野。

## 摘要

癌症常年在我國十大死因中位居第一，而其中結腸、直腸和肛門癌的死亡率排第三，並有逐年增加趨勢。中草藥萃取的藥物分子已被證實可抑制癌症，研究發現橙皮苷 (Hesperidin) 及綠原酸 (Chlorogenic acid) 可協同抑制具有雌激素受體 ER $\alpha$  及 ER $\beta$  的乳癌細胞 (MCF-7)，並推測藥物是作用在雌激素受體/粒線體路徑，然而哪類雌激素受體會受影響則缺乏資料。故本研究以 MTT assay 探討橙皮苷、綠原酸對缺乏 ER $\alpha$  表現之結腸癌細胞 (HCT116) 的影響。結果顯示藥物單獨及混合作用下，當綠原酸濃度 600  $\mu$ M 以上時能顯著抑制 HCT116 並具有劑量效應，然而橙皮苷及綠原酸對 HCT116 協同效應較不顯著，推測 ER $\alpha$  在雌激素受體/粒線體路徑中扮演重要角色且參與在橙皮苷及綠原酸對 MCF-7 毒殺的協同效應中；因此推測上述藥物在不同細胞中可能作用於不同的抑制路徑，將來會以三陰性乳癌細胞為對象，進一步確認 ER $\alpha$  扮演的角色，期望可在橙皮苷混合綠原酸抑制乳癌的路徑上提供更多證據。

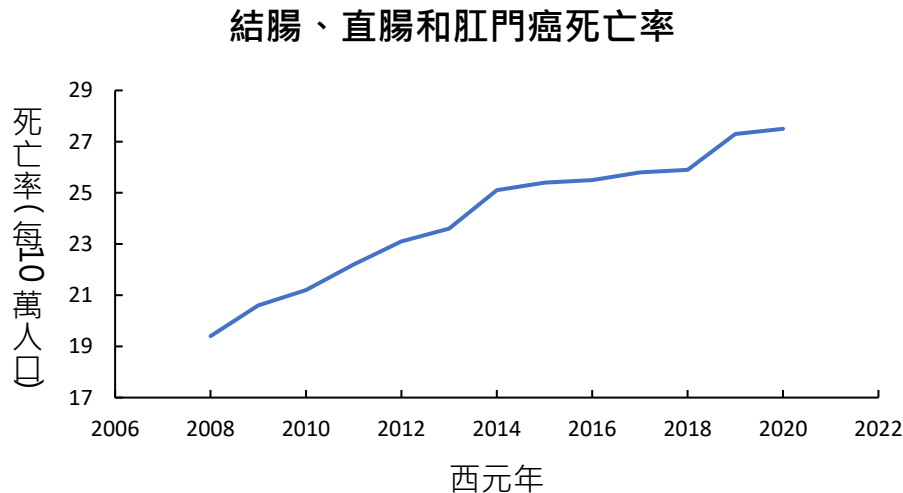
## Abstract

Cancer has ranked first among the top ten causes of death in Taiwan for many years. Among them, the mortality of colon, rectum and anal cancer ranks third, and there is a trend of increasing year by year. Previous studies have found that hesperidin and chlorogenic acid have a synergistic effect on breast cancer cells (MCF-7), presumably via the estrogen receptor/mitochondrial pathway. Estrogen receptors (ERs) can be divided into ER $\alpha$  and ER $\beta$ , and both exist in MCF-7, a human breast cancer cell line. However, little is known about the mechanism of the interaction between hesperidin and chlorogenic acid. Therefore, this study aims to investigate the inhibitory effect of hesperidin and chlorogenic acid on colon cancer cells (HCT116) without ER $\alpha$  by MTT assay. The results show that chlorogenic acid can significantly inhibit HCT116 at a concentration of more than 600  $\mu$ M in a dose-dependent manner. However, no synergistic effect was observed on the killing of HCT116 with co-treatment of hesperidin and chlorogenic acid, suggesting that ER $\alpha$  might contribute to the synergistic effect of these two drugs. It is speculated that ER $\alpha$  plays a vital role in the estrogen receptor/mitochondrial pathway, which is involved in the hesperidin and chlorogenic acid mediated synergistic effect on suppressing MCF-7. This study indicates that hesperidin and chlorogenic acid have different inhibitory pathways in cancer cells. In the future, we will adopt triple-negative breast cancer cells to explore the inhibitory mechanism of hesperidin and chlorogenic acid in breast cancers.

# 壹、前言

## 一、研究動機及文獻回顧

癌症 (cancer) 是指細胞發生不正常增生以及對人體產生傷害的病症 (Albanes et al., 1988)，並且可透過血液或淋巴循環系統擴散及侵犯到身體其他部位 (Lodish et al., 2007)。根據衛生福利部 2021 年 6 月公告的 2020 年國人死因統計結果，癌症已連續 39 年在國人十大死因中位居第一，佔總死亡人數的 29.0%，而結腸、直腸和肛門癌就排在十大癌症死亡率的第三名，每 10 萬人中的死亡率從 2008 年到 2020 年有逐年增加的趨勢 (圖一) (衛生福利部 [衛福部]，2021)。

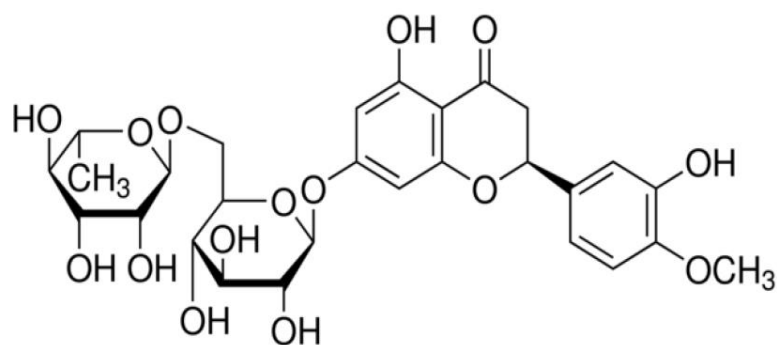


圖一、國人結腸、直腸和肛門癌每 10 萬人口的死亡率趨勢 (衛生福利部 [衛福部]，2021)。根據衛生福利部 2021 年 6 月公告的 2020 年國人死因統計結果繪製此圖，可發現國人結腸、直腸和肛門癌每 10 萬人口的死亡率從 2008 年的 19.4%到 2020 年的 27.5%，顯示這類癌症的每 10 萬人口死亡率有逐年增加的趨勢。

目前有多種癌症療法，像是化學療法 (Frei, 1985)、免疫療法 (Waldmann, 2003)、標靶治療 (Sawyers, 2004) 等方式。而探討中草藥與癌症間關係的多項研究中，發現中草藥能顯著減少化療引起的副作用，並改善手術後的症狀 (Qi et al., 2015)，而且從中草藥萃取到的中草藥分子已被證實可抑制或預防癌症發生 (Nie et al., 2015)，例如從苦參 (*Sophora flavescens*) 中萃取的氧化苦參鹼 (Oxymatrine) 能誘導胰臟癌細胞和胃癌細胞凋亡，還能預防胃癌 (Ling et

al., 2011 ; Guo et al., 2015) ; 白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa*) 萃取物能透過改變細胞的形態來抑制結腸癌細胞 (HT-29) 的生長 (Lin et al., 2010) , 還能抑制肺癌、乳癌、前列腺癌、子宮頸癌等癌細胞 (Gupta et al., 2004) ; 土貝母 (*Bolbostemma paniculatum*) 萃取物對於三陰性乳癌有抑制的潛力 (Dou et al., 2019) 。而在 2021 年的研究中發現橙皮苷 (Hesperidin) (圖二) 及綠原酸 (Chlorogenic acid) (圖三) 的混合物對於乳癌細胞 (MCF-7) 有顯著的抑制效果，而且這兩種藥物具有協同效應 (Hsu et al., 2021) 。

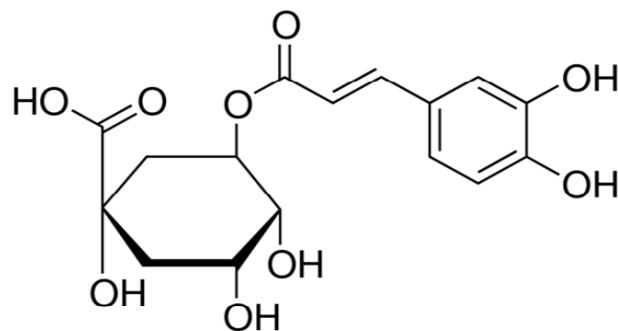
橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 是一種類黃酮物質，存在於柑橘屬 (*Citrus*) 植物體內，可萃取自檸檬 (*C. limon*)、甜橙 (*C. sinensis*) 等果皮中 (Peterson et al., 2006) 。橙皮苷具有多種藥理性質，包含降血糖、降血脂 (Akiyama et al., 2009)、降血壓並改善血管功能 (Morand et al., 2011)、抗氧化及抗發炎 (Yang et al., 2012) 。此外，橙皮苷還能抑制各種癌症 (Aggarwal et al., 2020) ，包括乳癌 (Lee et al., 2010)、結腸癌 (Ismail et al., 2012)、卵巢癌 (Zhao et al., 2017) 和肺癌 (Xia et al., 2018) ; 而前人研究發現結腸癌細胞 (WiDr) 各別處理 200  $\mu$ M 橙皮苷或 1500  $\mu$ M 5-氟尿嘧啶 (Fluorouracil) 時，並未造成細胞凋亡，然而當橙皮苷及 5-氟尿嘧啶混和處理時就可造成結腸癌細胞 (WiDr) 凋亡 (Gilang et al., 2012) ; 橙皮苷也能夠造成 p53 表達的 HCT116 結腸癌細胞 (HCT116 p53<sup>+/+</sup>) 的細胞週期 G1 期停滯 (G1 phase arrest)、誘發 ROS 以及促使細胞凋亡，藉此抑制癌細胞數量 (Ismail et al., 2012) 。此外橙皮苷和薑黃素 (Curcumin) 能夠有效改善使用 5-氟尿嘧啶化療藥物患者的副作用，例如腎損傷等腎毒性併發症 (Gelen et al., 2021) 。



圖二、橙皮苷 (Hesperidin) 結構式 (Hsu et al., 2021) 。

橙皮苷為一種類黃酮物質，可從柑橘屬 (*Citrus*) 植物體內萃取 (Peterson et al., 2006) ，近年研究顯示可抑制乳癌、結腸癌、卵巢癌、肺癌等多種癌症 (Aggarwal et al., 2020 ; Ismail et al., 2012 ; Lee et al., 2010 ; Xia et al., 2018 ; Zhao et al., 2017) 。

綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 是一種酯類化合物，常見於許多植物中，例如：毛竹 (*Phyllostachys edulis*) (Kweon, Hwang, & Sung, 2001)、金銀花 (*Lonicera japonica*) (Ding et al., 2017)、茄子 (*Solanum melongena*) (Luthria & Mukhopadhyay, 2006)、桃子 (*Prunus persica*) (Cheng & Crisosto, 1995)、梅子 (*Prunus mume*) (Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001) 和咖啡豆 (*Coffea arabica*、*C. canephora*) (Macheiner et al., 2019) 等，具有抗氧化 (Kweon et al., 2001)、抗發炎 (Hwang et al., 2014)、改善肥胖、調節脂質代謝 (Cho et al., 2010) 等功能，研究顯示在治療流感病毒感染方面有潛在的實用性 (Ding et al., 2017)。此外，綠原酸可透過誘導活性氧 (ROS) 產生而造成細胞週期 S 期停滯 (S phase arrest) 藉此抑制結腸癌細胞 (HCT116、HT-29) 數量 (Hou et al., 2017)，也可透過抑制 PI3K/Akt 路徑的活化，降低 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表現並誘導 Bax 蛋白表達，藉此抑制結腸癌細胞 (HCT116) 增殖並促使細胞凋亡 (Xiong et al., 2020)；綠原酸也可抑制 NF- $\kappa$ B 路徑，藉此減緩腫瘤細胞的增殖，並降低腫瘤重量 (Zeng et al., 2021)；此外綠原酸也能作為一種化學保護劑，可以改善使用 TAM (Tamoxifen) 化療藥物後的副作用 (E Owumi et al., 2021)。



圖三、綠原酸 (Chlorogenic acid) 結構式 (Hsu et al., 2021)。

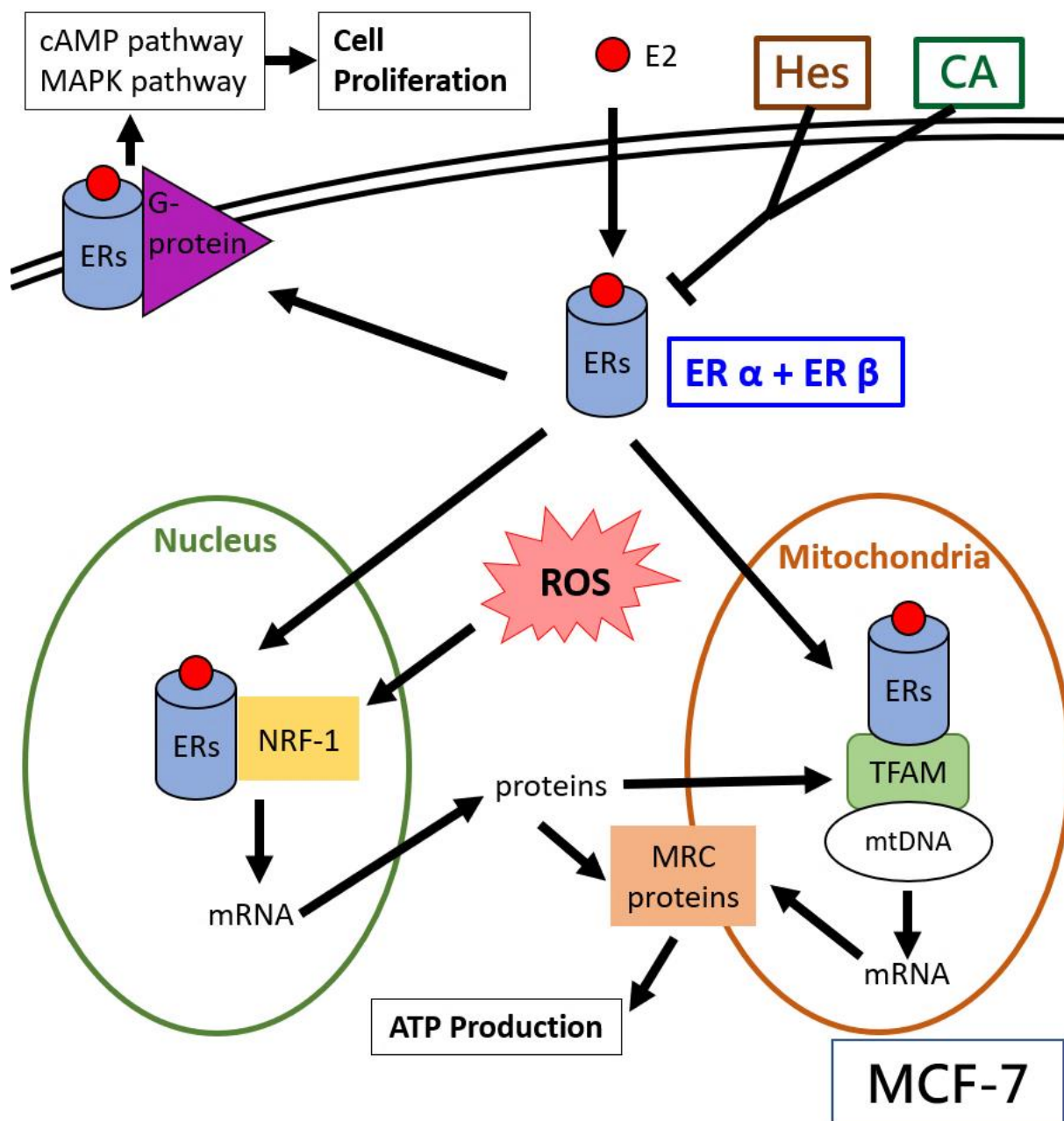
綠原酸為一種酯類化合物，可從多種植物體內萃取 (Cheng & Crisosto, 1995 ; Ding et al., 2017 ; Kweon, et al., 2001 ; Luthria & Mukhopadhyay, 2006 ; Macheiner et al., 2019 ; Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001)。研究顯示可透過誘導活性氧 (ROS) 產生或影響 PI3K/Akt 及 NF- $\kappa$ B 路徑來抑制癌細胞 (Hou et al., 2017 ; Xiong et al., 2020 ; Zeng et al., 2021)。

協同效應 (Synergistic effect) 為藥物合併指數 (CI) 的其中一種結果。藥物合併指數的計算公式為  $CI = \frac{C_{A,x}}{IC_{x,A}} + \frac{C_{B,x}}{IC_{x,B}}$ 。IC<sub>x,A</sub> 及 IC<sub>x,B</sub> 為藥物 A 和藥物 B 單獨發揮 X % 作用的濃度，C<sub>A,x</sub> 及 C<sub>B,x</sub> 為藥物 A 和藥物 B 混和在一起時產生 X % 作用時個別的濃度。計算結果可分為以下三種，CI > 1 代表藥物之間的作用為拮抗作用，CI = 1 代表藥物之間的作用為加成作用，CI < 1 則代表藥物之間的作用為協同作用 (Zhao et al., 2010)。

前人已研究橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 對於乳癌細胞 (MCF-7) 的影響，結果發現兩種藥物混合處理後在抑制乳癌細胞上有協同效應，會透過調控雌激素受體/粒線體路徑 (圖四) 來協同抑制乳癌細胞 (MCF-7) 的存活率 (Hsu et al., 2021)；雌激素受體 (ERs) 可分為 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  兩類，而 MCF-7 同時具有上述兩類受體 (Sommer et al., 2001)，然而是哪類雌激素受體會受到橙皮苷及綠原酸的協同抑制，目前則是缺乏研究資料。

結腸、直腸和肛門癌排在國人十大癌症死亡率的第三名，造成每 10 萬人口的死亡率從 2008 年至 2020 年有逐年增加趨勢，2020 年這類癌症每 10 萬人口的死亡率甚至達到 27.5% (圖一)(衛生福利部 [衛福部]，2021)。而過去在治療結腸癌方面，已證明橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 有抑制癌細胞 (HCT116) 分裂 (Ismail et al., 2012) 或促進癌細胞 (WiDr) 凋亡 (Gilang et al., 2012) 的效果；而在綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 處理下可抑制結腸癌細胞 (HCT116、HT-29) 的活性 (Hou et al., 2017)，或是透過 PI3K/AKT 路徑抑制結腸癌細胞 (HCT116) 增殖並促使癌細胞凋亡 (Xiong et al., 2020)。

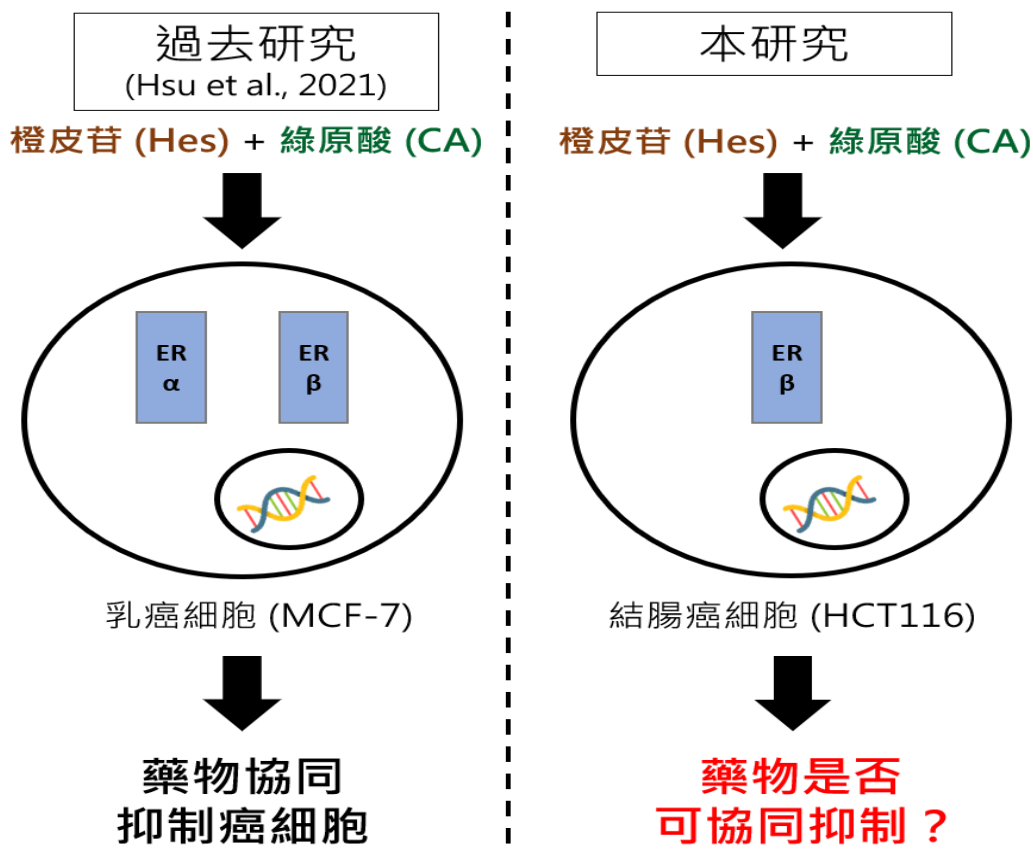
雖然橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 在單獨處理下都能抑制結腸癌細胞，然而這兩種藥物混合處理後是否能協同抑制結腸癌細胞則尚未有文獻探討，故本研究以結腸癌細胞 (HCT116) 為對象，探討橙皮苷混合綠原酸對於結腸癌細胞的影響。結腸癌細胞 (HCT116) 與乳癌細胞 (MCF-7) 相較下缺少了 ER $\alpha$  而只有 ER $\beta$  (Fiorelli et al., 1999)，也可藉此探討 ER $\alpha$  在橙皮苷混合綠原酸透過雌激素受體/粒線體協同抑制癌細胞路徑下所扮演的角色，若橙皮苷混合綠原酸協同抑制結腸癌細胞 (HCT116) 的效果降低或無法產生協同效應，則說明 ER $\alpha$  可能在此協同抑制路徑 (雌激素受體/粒線體路徑) 中扮演關鍵角色 (圖五)。



圖四、橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 透過調控雌激素受體/粒線體路徑協同抑制乳癌細胞 (MCF-7) (Hsu et al., 2021 圖重新繪製)。

當雌激素 (E2) 進入乳癌細胞 (MCF-7) 後會與雌激素受體 (ERs) 結合，雌激素受體複合物可轉移到細胞膜上與 G-protein 結合並啟動下游 cAMP-dependent 和 MAPK 路徑而促使癌細胞增殖 (Levin, 2001)；雌激素受體複合物也可進入細胞核及粒線體內，誘導參與粒線體電子傳遞鏈上的相關蛋白質 (MRC proteins) 表現，影響癌細胞粒線體的 ATP 產生。研究顯示橙皮苷混合綠原酸可協同抑制雌激素受體作用，並藉此影響乳癌細胞增殖及 ATP 產生，造成乳癌細胞存活率下降 (Hsu et al., 2021)；然而是哪類雌激素受體 (ER $\alpha$  或 ER $\beta$ ) 會受到上述兩種藥物協同抑制，目前則是缺乏研究資料。





圖五、本研究之架構及研究問題。

過去研究已發現同時具有雌激素受體  $ER\alpha$  及  $ER\beta$  的乳癌細胞 (MCF-7) 會被橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 協同抑制 (Hsu et al., 2021)，而本研究對象結腸癌細胞 (HCT116) 則缺少  $ER\alpha$ ，故本研究將探討橙皮苷混合綠原酸是否也可協同抑制結腸癌細胞，並進一步討論  $ER\alpha$  在此藥物協同抑制路徑 (雌激素受體/粒線體路徑) 中所扮演的角色。

## 二、研究目的

本研究探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 對於結腸癌細胞 (HCT116) 的影響，並藉此探討  $ER\alpha$  在此藥物協同抑制路徑 (雌激素受體/粒線體路徑) 中所扮演的角色。研究目的為以下兩項：

- (一) 探討橙皮苷及綠原酸單獨作用時，對結腸癌細胞存活率的抑制效果，藉此確認這兩種藥物混合處理的濃度。
- (二) 探討橙皮苷混合綠原酸時，對結腸癌細胞存活率的抑制效果，並討論當癌細胞缺乏  $ER\alpha$  時混合藥物是否仍具有協同抑制效應。

## 貳、 研究設備及方法

### 一、實驗藥物及設備

如表一所示，條列整理本研究中使用的藥物及功能；實驗設備及器材如表二所示。

表一、本研究中使用的藥物種類及其功能，並描述其功能。

藥物名稱	功能
Dulbecco's Modified Eagle Medium , DMEM (內含 10% 胎牛血清、penicillin (100 unit/mL)、 streptomycin (100 µg/mL)	細胞培養液
PBS	清洗細胞的磷酸鹽緩衝鹽水
Trypsin	蛋白酶，可使細胞脫離培養皿
DMSO，二甲基亞砷	溶劑，用以溶解橙皮苷 (Hes) 及綠原酸 (CA)，以及溶解 MTT 試驗產生的結晶
Hesperidin (Hes)，橙皮苷	待測藥物，檢測是否可抑制癌細胞生長
Chlorogenic acid (CA)，綠原酸	待測藥物，檢測是否可抑制癌細胞生長
MTT 試劑	測試細胞存活率
Trypan Blue	細胞染劑，用以估算細胞數量

表二、本研究中使用的實驗設備及器材，並描述其功能。

設備及器材名稱	功能
倒立式顯微鏡	觀察細胞生長狀況
血球計數盤	計算細胞數量
分光光度計	細胞存活率測試時分析溶液的吸光值
針筒	吸取藥物，配合無菌針筒過濾器使用
無菌針筒過濾器 (小飛碟)	過濾配好的橙皮苷及綠原酸溶液
恆溫細胞培養箱	培養細胞

## 二、實驗細胞株

HCT116：人類結腸癌細胞，使用 DMEM (內含 10% 胎牛血清、penicillin (100 unit/mL)、streptomycin (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 培養，細胞繼代及細胞種盤方法請見三、研究過程或方法說明。

## 三、研究過程或方法

本研究過程如圖六所示，依據研究目的進行實驗一、實驗二設計，分別為實驗一：檢測橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用的細胞 (HCT116) 存活率、實驗二：檢測兩種藥物混合作用的細胞存活率；研究過程依序為藥物配置、前測：測試藥物結晶析出狀況、細胞繼代培養、細胞種盤、細胞加藥處理 (實驗一、實驗二)、細胞存活率測試 (MTT assay)、數據統計及分析，其中實驗一重複三次、實驗二重複二次，每次實驗內的每種藥物處理都再獨立進行 5 次重覆。

### (一) 藥物配置

分別將橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 溶於 DMSO 中配置成 0.1 M 溶液，並在無菌操作台中使用無菌針筒過濾器過濾，並分別分裝成每管 10  $\mu\text{L}$  與 20  $\mu\text{L}$ ，置於  $-30^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存，且每管藥物不重複解凍超過 3 次。

### (二) 前測：測試藥物結晶析出狀況

前人研究發現橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 後溶液會有結晶析出 (陳薇瑄, 2021)，而藥物結晶多寡可能會造成後續實驗處理上的藥物濃度誤差，故先檢視不同濃度的橙皮苷、綠原酸以及兩種藥物混合後的結晶析出狀況。分別將配好的橙皮苷溶液以細胞培養液 (DMEM) 稀釋成濃度 50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$  (1  $\mu\text{M}$  = 1  $\mu\text{mol/L}$ )；綠原酸溶液以 DMEM 稀釋成濃度 600  $\mu\text{M}$ 、800  $\mu\text{M}$ 、1000  $\mu\text{M}$ 。上述兩種藥物再分別以不同濃度 (表三) 加到 12 孔盤中，並放置於顯微鏡下觀察不同濃度藥物的結晶析出狀況。

表三、測試藥物結晶析出所使用的各種藥物濃度。

藥物	濃度 (1 $\mu\text{M}$ = 1 $\mu\text{mol/L}$ )		
	橙皮苷 (Hes)	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
綠原酸 (CA)	600 $\mu\text{M}$	800 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
橙皮苷 (Hes) +	100 $\mu\text{M}$ + 600 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ + 800 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ + 1000 $\mu\text{M}$
綠原酸 (CA)	150 $\mu\text{M}$ + 600 $\mu\text{M}$	150 $\mu\text{M}$ + 800 $\mu\text{M}$	150 $\mu\text{M}$ + 1000 $\mu\text{M}$

### (三) 細胞繼代培養

於無菌操作台上操作，使用含有 10%胎牛血清及抗生素的細胞培養液 (DMEM) 培養人類結腸癌細胞 (HCT116)。細胞繼代時，先將舊的培養液吸除，再加入約 7 mL PBS 潤洗細胞，接著吸掉 PBS 並加入 2 mL Trypsin，搖晃均勻後吸除 Trypsin，並靜置 2 至 3 分鐘後，加入 8 mL DMEM 促使細胞脫離培養皿，形成 8 mL 細胞液，之後取 7 mL DMEM 於新培養皿中，加入 1 mL 細胞液，以八字形方式搖晃培養皿，使細胞均勻分散，接著置於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養，大約 3 天後細胞會佈滿培養皿。

### (四) 細胞種盤

於無菌操作台上操作，先將培養好的細胞吸除舊的培養液，再加入約 7 mL PBS 潤洗細胞，接著吸掉 PBS 並加入 2 mL Trypsin，搖晃均勻後吸除 Trypsin，靜置 2 至 3 分鐘後，加入 10 mL DMEM 促使細胞脫離培養皿，形成 10 mL 細胞液，取 10  $\mu\text{L}$  細胞液與 10  $\mu\text{L}$  Trypan Blue 混和均勻，接著取 10  $\mu\text{L}$  混和液置於血球計數器，放到顯微鏡下估算細胞的數量，並將細胞液加入細胞培養液 (DMEM) 稀釋，以  $1 \times 10^4$  cells / well 種於 96 孔盤，放置於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱中培養約 18~24 小時，等待細胞貼附。

### (五) 細胞加藥處理

**實驗一：檢測藥物單獨作用的細胞存活率。**

**實驗二：檢測兩種藥物混合作用的細胞存活率。**

將配好的橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 溶液以細胞培養液 (DMEM) 稀釋成濃度 50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$ ，綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 溶液以 DMEM 稀釋成濃度 400  $\mu\text{M}$ 、600  $\mu\text{M}$ 、800  $\mu\text{M}$ ，並將 96 孔盤中的舊培養液吸除，取不同濃度藥物 (表四：實驗一；表五：

實驗二) 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔盤內與細胞作用，再將 96 孔盤放置於 37°C，5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱培養 24 小時。在操作實驗時，需加快整體操作速度，並且盡量保持藥物及細胞培養液的溫度維持在 37°C，避免因操作時間過久而導致溫度降低，使藥物結晶析出而造成處理誤差。另外因橙皮苷及綠原酸皆使用 DMSO 為溶劑，故加藥處理時以細胞添加 DMSO 為對照組。(實驗二會依據前測結果，選擇較不容易產生結晶的藥物混合濃度)

表四、實驗一：檢測藥物單獨作用的細胞存活率，實驗使用的藥物種類及濃度。

藥物	濃度 (1 $\mu\text{M}$ = 1 $\mu\text{mol/L}$ )		
橙皮苷 (Hes)	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	150 $\mu\text{M}$
綠原酸 (CA)	400 $\mu\text{M}$	600 $\mu\text{M}$	800 $\mu\text{M}$

表五、實驗二：檢測兩種藥物混合作用的細胞存活率，實驗使用的藥物種類及濃度。

藥物	濃度 (1 $\mu\text{M}$ = 1 $\mu\text{mol/L}$ )	
橙皮苷 (Hes)	100 $\mu\text{M}$	
綠原酸 (CA)	400 $\mu\text{M}$	600 $\mu\text{M}$
橙皮苷 (Hes) + 綠原酸 (CA)	100 $\mu\text{M}$ + 400 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ + 600 $\mu\text{M}$

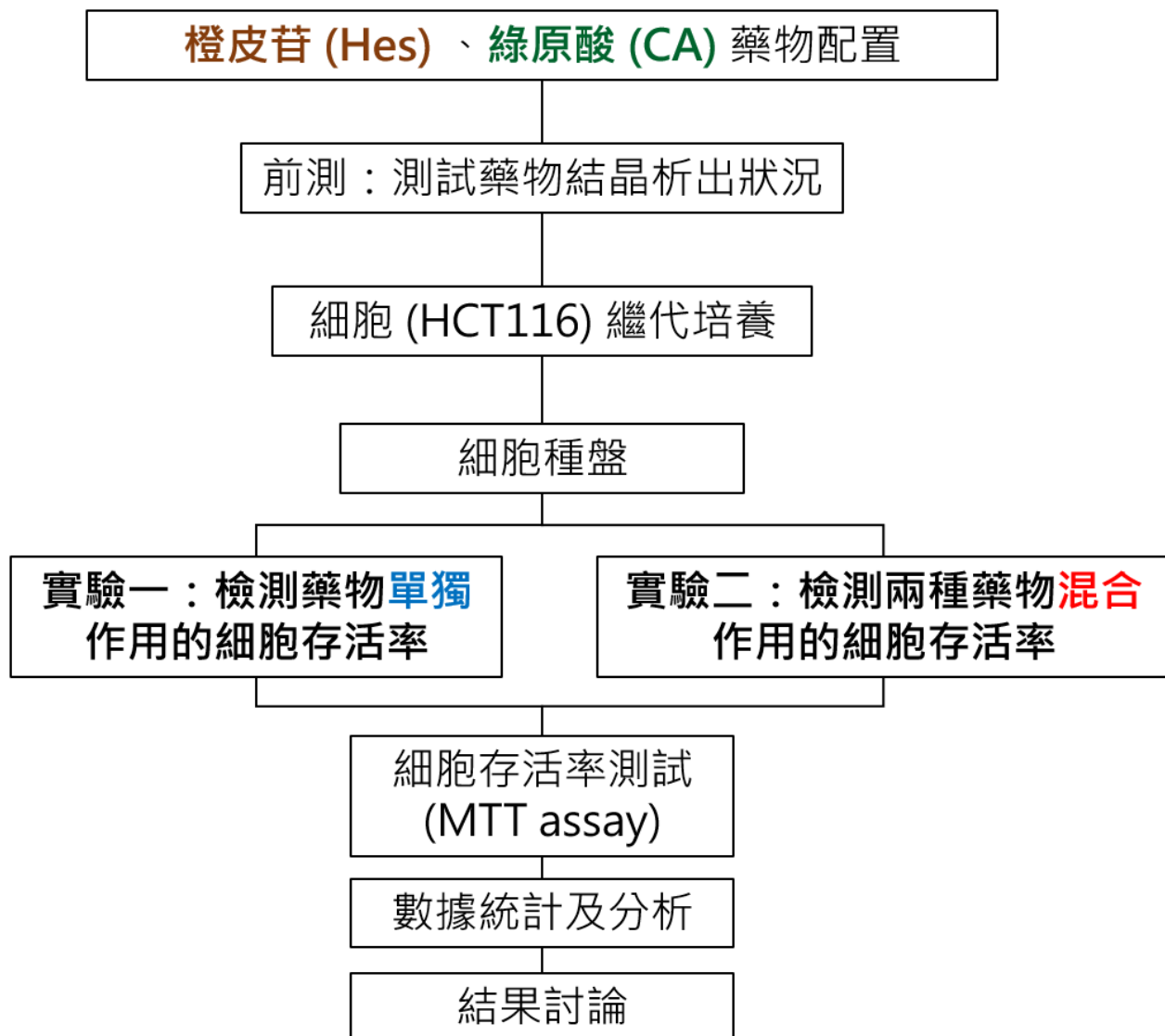
#### (六) 細胞存活率測試 (MTT assay)

人類結腸癌細胞 (HCT116) 加藥處理後 24 小時進行細胞活性測試，先將 MTT 試劑以細胞培養液 (DMEM) 10 倍稀釋調配成 MTT working solution，使用廢液抽吸系統去除 96 孔盤中舊的細胞培養液後，每個孔再加入 100 $\mu\text{L}$  MTT working solution 並置於細胞培養箱，等待 1 小時後將孔內的 MTT working solution 吸除，並於每個孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO 回溶產生的結晶，接者將 96 孔盤放入分光光度計測量  $\text{OD}_{570}$  (主要讀值) 及  $\text{OD}_{690}$  (背景值)，最後將  $\text{OD}_{570}$  減去  $\text{OD}_{690}$  數值帶入公式，就可計算各藥物處理下相對的細胞存活率。細胞

$$\text{細胞存活率 (cell viability \%)} : \frac{O.D_{\text{sample}}}{O.D_{\text{control}}} \times 100 \%$$

#### (七) 數據統計及分析

使用 GraphPad Prism 9 統計軟體進行數據分析，以 one-way ANOVA 比較各藥物處理的細胞存活率，並以 Tukey test 進行事後檢定，比較各處理間的差異。



圖六、研究流程圖。

依據研究目的進行實驗一、實驗二設計，分別探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用 (實驗一) 或兩種藥物混合作用 (實驗二)，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的影響，實驗簡易流程如下：(1) 培養人類結腸癌細胞 (HCT116)、(2) 單獨或混合加入不同濃度的橙皮苷及綠原酸溶液於培養細胞的 96 孔盤內後，將 96 孔盤放置於細胞培養箱個別作用 24 小時、(3) 以 MTT assay 測量各處理下的吸光值，並轉換成相對的細胞存活率、(4) 數據統計及分析。

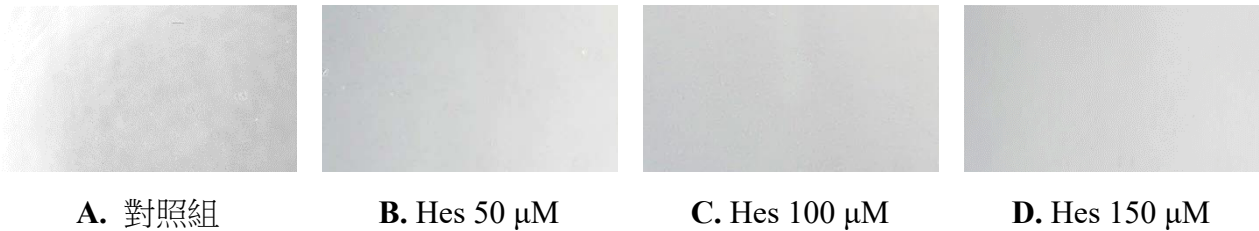
## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一) 前測：測試藥物結晶析出狀況

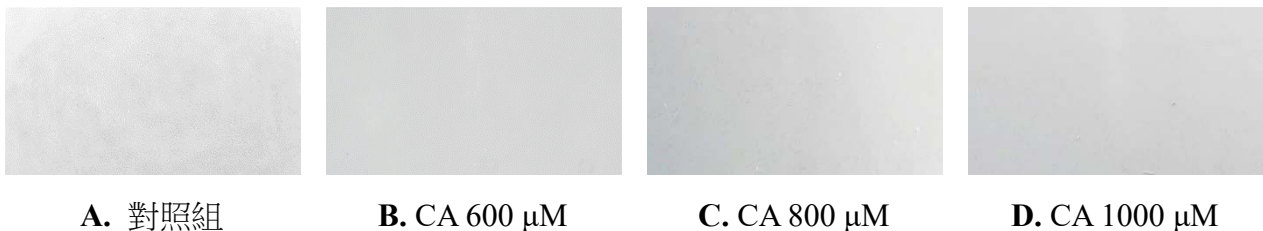
實驗進行前將橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 依據表三濃度配置並以細胞培養液 (DMEM) 稀釋後，再將溶液放於顯微鏡下觀察結晶析出狀況，可發現橙皮苷 (圖六) 及綠原酸 (圖七) 溶液在不同濃度下並無結晶析出；然而在兩種藥物混和溶液中，就可發現結晶析出 (圖八 B~G，黑色指針所示處為藥物結晶)，而且結晶析出量會隨混合藥物濃度提高 (濃度高於 Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M 以上) 而增加。

為避免藥物結晶多寡可能會造成實驗處理上的藥物濃度誤差，故後續實驗處理會選擇較不容易產生結晶的藥物混合濃度 (Hes 100  $\mu$ M + CA 400  $\mu$ M；Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M)。因橙皮苷及綠原酸皆以 DMSO 為溶劑，所以前測的對照組為細胞培養液加上 DMSO。



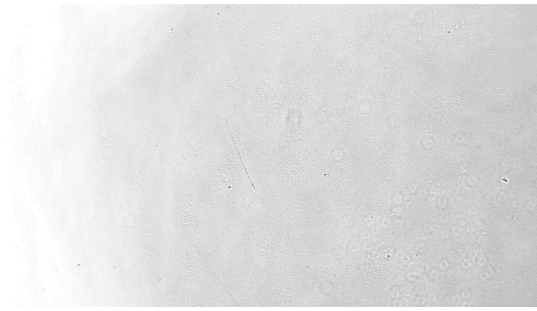
圖六、不同濃度的橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 結晶析出狀況。

結果顯示不同濃度 (A~D) 的橙皮苷皆無結晶析出。A 為對照組：細胞培養液 (DMEM) + DMSO。

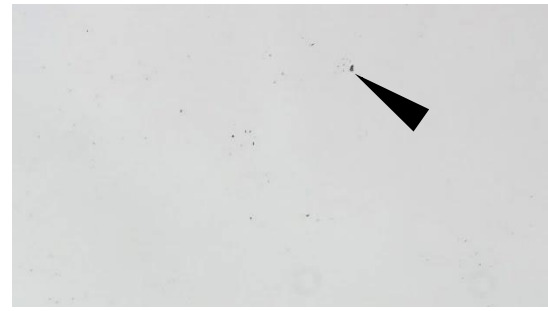


圖七、不同濃度的綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 結晶析出狀況。

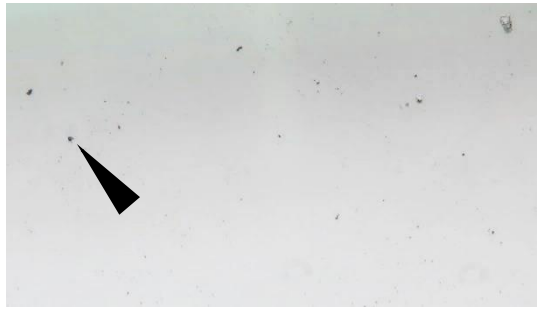
結果顯示不同濃度 (A~D) 的綠原酸皆無結晶析出。A 為對照組：細胞培養液 (DMEM) + DMSO。



A. 對照組 (DMEM + DMSO)



B. Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 600  $\mu\text{M}$



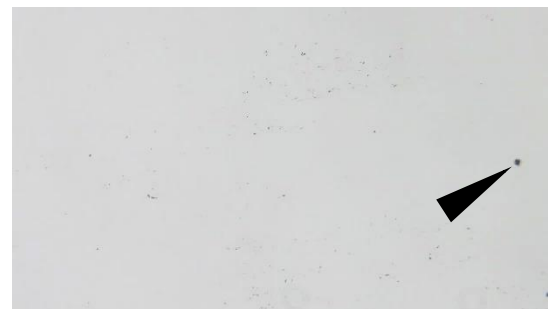
C. Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 800  $\mu\text{M}$



D. Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 1000  $\mu\text{M}$



E. Hes 150  $\mu\text{M}$  + CA 600  $\mu\text{M}$



F. Hes 150  $\mu\text{M}$  + CA 800  $\mu\text{M}$



G. Hes 150  $\mu\text{M}$  + CA 1000  $\mu\text{M}$

圖八、不同濃度的橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 混合溶液結晶析出狀況。

結果顯示不同濃度組合 (A~G) 的藥物混合溶液結晶析出狀況 (黑色指針所示處)，可發現隨著混合藥物的濃度提高，結晶析出量也會增加。A 為對照組：細胞培養液 (DMEM) + DMSO。



(二) 目的一：探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的抑制效果，藉此確認這兩種藥物混合處理的濃度。

本實驗將 HCT116 各別處理不同濃度的橙皮苷 (50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、150  $\mu$ M) 及不同濃度的綠原酸 (400  $\mu$ M、600  $\mu$ M、800  $\mu$ M)；因橙皮苷及綠原酸皆溶於 DMSO 中，故以細胞添加 DMSO 作為本實驗的對照組。

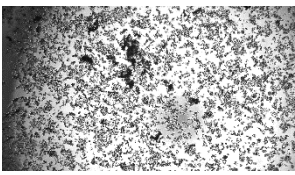
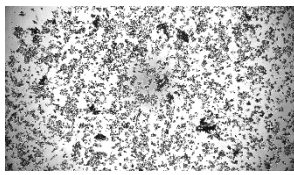
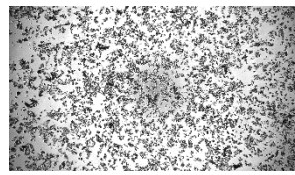
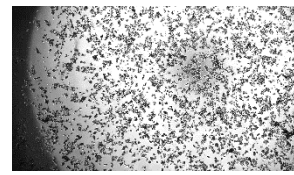
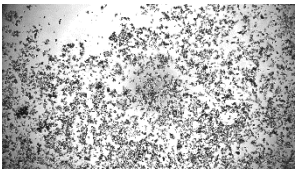
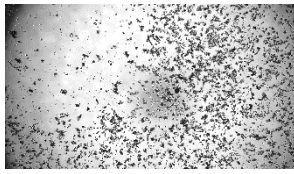
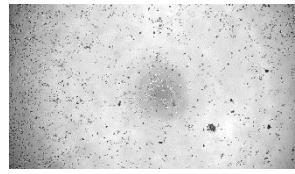
HCT116 加藥處理 24 小時後，以 MTT assay 測量細胞的存活率，因 MTT 試劑會和活細胞作用而產生紫色的 formazan 結晶，故 formazan 結晶的生成量會和活細胞的數量呈正比，再使用 DMSO 將結晶溶解後測量吸光值 (OD<sub>570</sub> 及 OD<sub>690</sub>)，其中 OD<sub>570</sub> 為主要讀值，OD<sub>690</sub> 為背景值，最後將 OD<sub>570</sub> 減去 OD<sub>690</sub>，相減後的數值越高代表存活的細胞數越多，反之數值越低則代表存活的細胞數較少，之後再將相減後的數值帶入公式就可轉換為相對的細胞存活率。

$$\text{細胞存活率 (cell viability \%)} : \frac{O.D_{\text{sample}}}{O.D_{\text{control}}} \times 100 \%$$

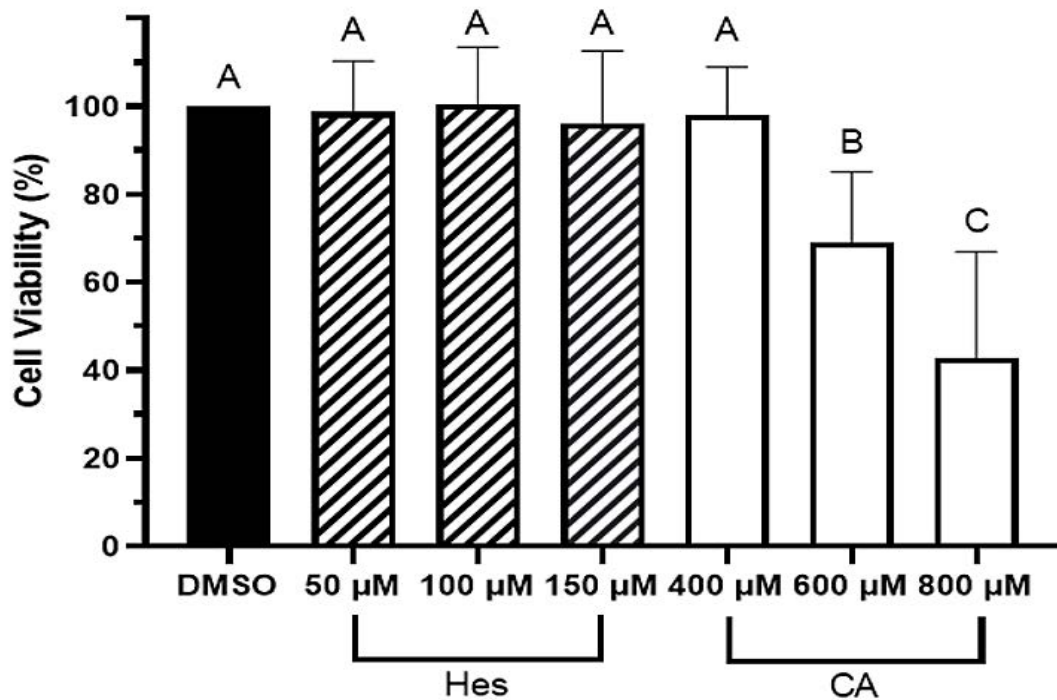
由圖九、(A) 可得知各處理的細胞存活率 (平均值  $\pm$  標準差)%，再以 one-way ANOVA 比較各藥物處理的細胞存活率，並以 Tukey test 進一步比較各處理間的差異 (圖九、(B))，統計結果顯示處理綠原酸 (CA) 在濃度 600  $\mu$ M 及 800  $\mu$ M 的細胞存活率 (CA 600  $\mu$ M : 69.1  $\pm$  16.02%、CA 800  $\mu$ M : 42.8  $\pm$  24.2%) 顯著低於對照組 (DMSO) 的細胞存活率 (100  $\pm$  0%)，然而 CA 400  $\mu$ M 的細胞存活率 (98.1  $\pm$  10.8%) 與對照組相比無顯著差異，說明隨著綠原酸濃度越高 (濃度大於 600  $\mu$ M)，抑制 HCT116 癌細胞的效果就越好，

橙皮苷 (Hes) 在本實驗的濃度 (50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、150  $\mu$ M) 對 HCT116 皆無顯著的抑制效果 (細胞存活率依序為：98.7  $\pm$  11.6%、100.5  $\pm$  13.0%、96.2  $\pm$  16.4%)；綜合以上結果可得知綠原酸濃度在 600  $\mu$ M 以上時可抑制 HCT116，然而橙皮苷濃度在 150  $\mu$ M 以下時抑制 HCT116 的效果則不顯著。

(A)

			
<b>DMSO (control)</b> (100 ± 0)%	<b>Hes 50 μM</b> (98.7 ± 11.6)%	<b>Hes 100 μM</b> (100.5 ± 13.0)%	<b>Hes 150 μM</b> (96.2 ± 16.4)%
			
<b>CA 400 μM</b> (98.1 ± 10.8)%	<b>CA 600 μM</b> (69.1 ± 16.02)%	<b>CA 800 μM</b> (42.8 ± 24.2)%	

(B)



圖九、橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的影響。

(A) 以 MTT assay 測量不同處理下的活細胞多寡，圖為細胞經 MTT 試劑作用後產生的結晶，再換算吸光值得到相對細胞存活率 (平均值 ± 標準差)%，DMSO 為對照組，n=15。(B) 比較不同處理間的細胞存活率差異，將 (A) 的實驗數據以 GraphPad Prism 9 進行 one-way ANOVA 分析，並以 Tukey test 進行事後檢定；長條圖上的英文字母若有差異，則代表兩處理間有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，再按照數據平均值高低排列字母順序，A 代表平均值最高。

(三) 目的二：探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的抑制效果，並討論當癌細胞缺乏  $ER\alpha$  時混合藥物是否仍具有協同抑制效應。

本實驗的處理組別為橙皮苷 (Hes) 100  $\mu$ M、綠原酸 (CA) 400  $\mu$ M 與 600  $\mu$ M、橙皮苷混合綠原酸 (100  $\mu$ M + 400  $\mu$ M 及 100  $\mu$ M + 600  $\mu$ M)；因兩種藥物皆溶於 DMSO 中，故以細胞添加 DMSO 作為本實驗的對照組。

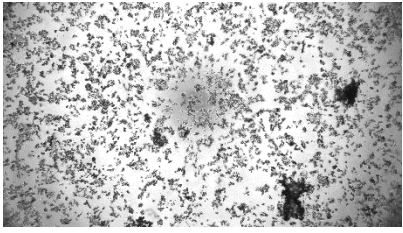
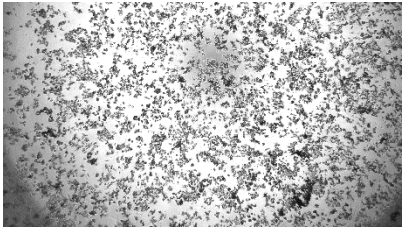
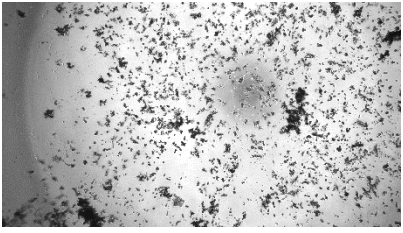
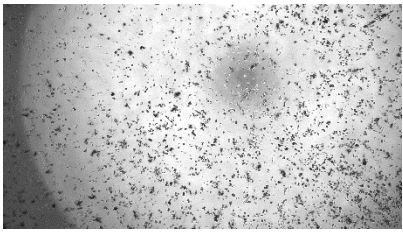
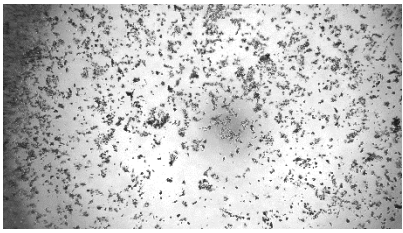
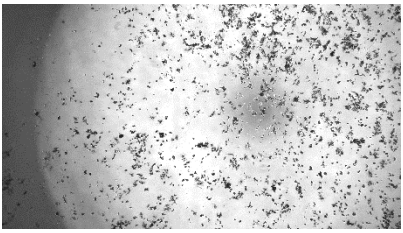
依據前人研究 (陳薇瑄, 2021) 及前測結果，Hes 若濃度高於 100  $\mu$ M 再加入 CA 混合則容易增加結晶析出機率 (圖八、E~G)，而在 Hes 濃度 100  $\mu$ M 時 (圖八、B~D)，結晶析出量會隨著 CA 濃度提高 (高於 600  $\mu$ M 以上) 而增加，故本實驗選擇 Hes 100  $\mu$ M 混合 CA 400  $\mu$ M 或 600  $\mu$ M，以避免結晶大量析出而產生誤差。以上藥物組合依據實驗一單獨作用的結果，Hes 100  $\mu$ M 及 CA 400  $\mu$ M 皆無法顯著抑制 HCT116 (圖九、B)，然而若這兩種藥物混合後能顯著抑制 HCT116，或原本可單獨抑制細胞的 CA 600  $\mu$ M 若加入 Hes 100  $\mu$ M 後能顯著提升抑制細胞效果，則可推論 Hes 混合 CA 可協同抑制 HCT116，反之則無協同效果。

以 MTT assay 測量各實驗處理的相對細胞存活率後 (平均值  $\pm$  標準差)% (圖十、(A))，再以 one-way ANOVA 及 Tukey test 分析不同藥物處理間的細胞存活率差異 (圖十、(B))，統計結果顯示處理綠原酸在濃度 600  $\mu$ M 以及橙皮苷混合綠原酸 (Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M) 的細胞存活率 ( $61.6 \pm 22.5\%$  及  $76.8 \pm 27.4\%$ ) 都顯著低於對照組的細胞存活率 ( $100 \pm 0\%$ ) (圖十、(B))，顯示 CA 600  $\mu$ M 及 Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M 處理都能有效抑制 HCT116 癌細胞，然而這兩種處理之間無顯著差異。

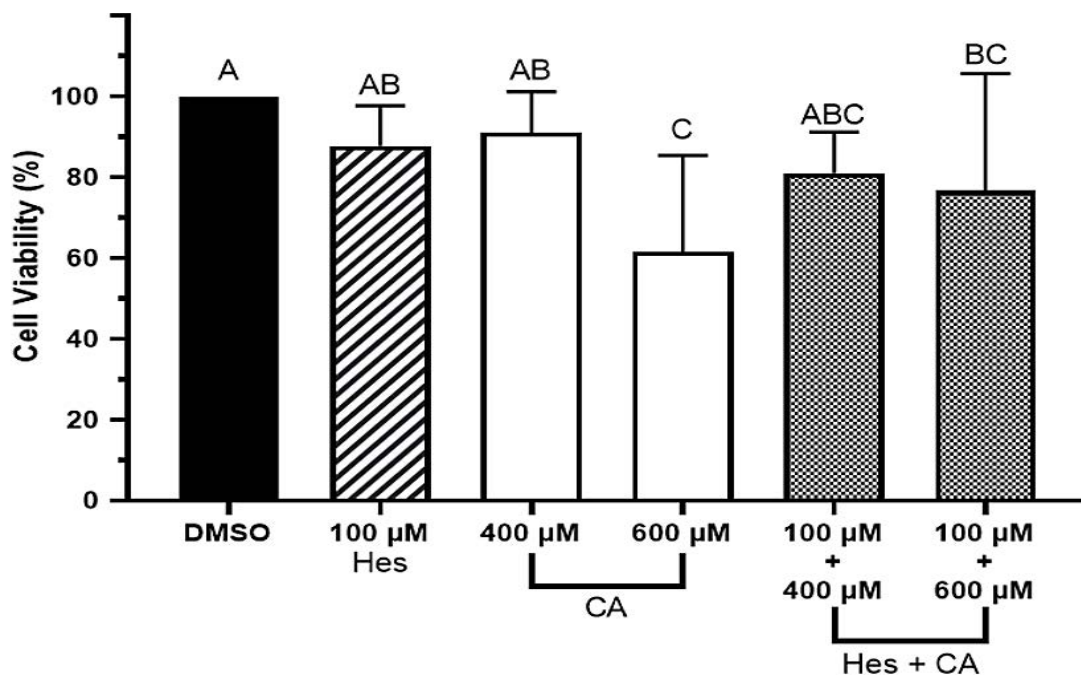
在綠原酸處理方面，CA 600  $\mu$ M 抑制 HCT116 癌細胞的效果 (細胞存活率  $61.6 \pm 22.5\%$ ) 顯著高於 CA 400  $\mu$ M (細胞存活率  $91.1 \pm 9.6\%$ )。

而在藥物混合處理方面，Hes 100  $\mu$ M + CA 400  $\mu$ M 及 Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M 處理之間的細胞存活率 ( $81.0 \pm 9.6\%$  及  $76.8 \pm 27.4\%$ ) 無顯著差異，但是 Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M 能有效抑制 HCT116 癌細胞；雖然 Hes 100  $\mu$ M、CA 400  $\mu$ M 及 Hes 100  $\mu$ M + CA 400  $\mu$ M 三種處理的細胞存活率 (依序為： $87.7 \pm 9.5\%$ 、 $91.1 \pm 9.6\%$ 、 $81.0 \pm 9.6\%$ ) 與對照組相比皆無顯著差異，然而當 Hes 100  $\mu$ M 混合 CA 400  $\mu$ M 後的細胞存活率卻有下降趨勢，顯示這兩種藥物混合 (Hes 100  $\mu$ M + CA 400  $\mu$ M) 可能會增強抑制 HCT116 的效果。

(A)

		
<b>DMSO (control)</b> (100 ± 0)%	<b>Hes 100 μM</b> (87.7 ± 9.5) %	<b>CA 400 μM</b> (91.1 ± 9.6) %
		
<b>CA 600 μM</b> (61.6 ± 22.5)%	<b>Hes 100 μM + CA 400 μM</b> (81.0 ± 9.6)%	<b>Hes 100 μM + CA 600 μM</b> (76.8 ± 27.4)%

(B)



圖十、橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 混合作用時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的影響。

(A) 以 MTT assay 測量不同處理下的活細胞多寡，圖為細胞經 MTT 試劑作用後產生的結晶，再換算吸光值得到相對細胞存活率 (平均值 ± 標準差)%，DMSO 為對照組，n=10。(B) 比較不同處理間的細胞存活率差異，將 (A) 的實驗數據進行 one-way ANOVA 及 Tukey test 分析；長條圖上的英文字母若有差異，則代表兩處理間有顯著差異 ( $p < 0.05$ )，再按照數據平均值高低排列字母順序，A 代表平均值最高。

## 二、討論

本研究先測量橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 不同濃度及兩者藥物混和後的結晶析出狀況，再依據前測結果選擇適合後續實驗操作的藥物濃度，再以 MTT assay 測量經藥物單獨作用或混合作用處理的結腸癌細胞 (HCT116) 存活率，依據實驗結果討論如下：

### (一) 前測：測試藥物結晶析出狀況

前測後發現橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用時的溶液並無結晶產生 (圖六、圖七)，然而當兩種藥物混合在一起後，依據前人研究 (陳薇瑄, 2021) 及前測結果，Hes 若濃度高於 100  $\mu\text{M}$  再加入 CA 混合則容易增加結晶析出機率 (圖八、E~G)，而在 Hes 濃度 100  $\mu\text{M}$  時 (圖八、B~D)，結晶析出量會隨著 CA 濃度提高 (高於 600  $\mu\text{M}$  以上) 而有增加趨勢，推測原因可能是橙皮苷及綠原酸這兩種藥物皆有多個環狀結構 (圖二、圖三)，導致當兩種藥物混合後分子間較易產生推疊而形成結晶 (陳薇瑄, 2021)。

此外在前測中也發現到當藥物溶液低於 37°C 時，結晶析出狀況也會越明顯，因此在後續進行橙皮苷混合綠原酸對結腸癌細胞 (HCT116) 的影響實驗時，為避免藥物結晶多寡造成後續實驗處理上的藥物濃度誤差，所以依據前測結果選擇較不容易產生結晶的藥物混合濃度 (Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 400  $\mu\text{M}$  ; Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 600  $\mu\text{M}$ ) 當做實驗處理，而且在加入藥物後，也會加快整體操作速度，同時也會盡量保持藥物及細胞培養液的溫度處於 37°C，以避免藥物結晶析出而造成實驗誤差。

### (二) 目的之一：探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的抑制效果，藉此確認這兩種化合物混合處理的濃度。

由圖九、(B) 說明當綠原酸單獨作用時，對於 HCT116 有抑制效果，而且隨著綠原酸濃度越高 (濃度大於 600  $\mu\text{M}$ )，抑制癌細胞的效果就越顯著，甚至綠原酸在濃度 800  $\mu\text{M}$  時會造成癌細胞存活率降至  $42.8 \pm 24.2\%$ ；然而橙皮苷在濃度 150  $\mu\text{M}$  以下時則無法有效抑制 HCT116 癌細胞。

比較過去探討綠原酸抑制 HCT116 的文獻，Hou 等人在 2017 年的研究指出綠原酸濃度在

125  $\mu\text{M}$  以上就能顯著抑制 HCT116，而本研究則是在 600 $\mu\text{M}$  以上才能顯著抑制 HCT116，然而若比較綠原酸最高劑量處理的抑制效果，本研究在 800 $\mu\text{M}$  時的細胞存活率是  $42.8 \pm 24.2\%$ ，而前人研究則是 1000  $\mu\text{M}$  時的細胞存活率約為 50.1% (Hou et al., 2017)，推測以上結果差異可能是前人的細胞加藥處理時間 (72 hr) 為本研究 (24 hr) 的 3 倍，藥物作用時間較長故只需低濃度的藥物就可產生顯著差異，而且在對照組設定及後續細胞存活率測試 (MTT assay) 上的實驗方法也有不同 (表六)，故可能導致兩份研究在結果上的差異。

由圖九、(B) 顯示當橙皮苷單獨作用時，在本實驗的濃度 (50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$ ) 對 HCT116 皆無顯著的抑制效果 (細胞存活率依序為： $98.7 \pm 11.6\%$ 、 $100.5 \pm 13.0\%$ 、 $96.2 \pm 16.4\%$ )，然而前人研究顯示 p53 表達的 HCT116 結腸癌細胞 (HCT116 p53<sup>+/+</sup>) 在 50  $\mu\text{M}$  時就可顯著抑制細胞並讓細胞存活率下降到約 50% (Ismail et al., 2012)，推論可能是藥物配置方式或實驗前培養細胞的方法不同，導致兩份研究在藥物處理時的細胞濃度出現差異，細胞濃度若較低則容易被藥物抑制而降低細胞存活率。

表六、比較前人研究 (Hou et al., 2017) 與本研究的異同。

兩份研究在加藥處理、對照組設定、MTT assay 讀取吸光值上有不同實驗方法，可能導致研究結果上的差異。細胞存活率右側的「\*」代表與對照組相比有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

研究	加藥處理時間	對照組	MTT assay 讀取吸光值	研究結果	
				綠原酸 ( $\mu\text{M}$ )	細胞存活率 (%)
Hou et al., 2017	72 hr	蒸餾水	OD <sub>450</sub> 、OD <sub>490</sub>	0 (蒸餾水)	約 100
				125	約 78 *
				250	約 64 *
				500	約 59 *
				1000	約 50.1 *
本研究	24 hr	DMSO	OD <sub>570</sub> 、OD <sub>690</sub>	0 (DMSO)	100 $\pm$ 0
				400	98.1 $\pm$ 10.8
				600	69.1 $\pm$ 16.02 *
				800	42.8 $\pm$ 24.2 *

(三) 目的二：探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的抑制效果，及討論當癌細胞缺乏 ER $\alpha$  時混合藥物是否仍具有協同抑制效應。

由圖十、(B) 顯示綠原酸濃度 (CA) 600  $\mu$ M 以及橙皮苷混合綠原酸 (Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M) 能有效抑制 HCT116 癌細胞 (細胞存活率  $61.6 \pm 22.5\%$  及  $76.8 \pm 27.4\%$ )，然而這兩種處理之間無顯著差異；藥物混合時，雖然 Hes 100  $\mu$ M + CA 400  $\mu$ M 無法顯著抑制癌細胞 ( $81.0 \pm 9.6\%$ )，然而隨著混合藥物中的綠原酸濃度增加，抑制癌細胞的效果有上升趨勢。而比較圖九、(B) 及圖十、(B)，橙皮苷濃度在 100  $\mu$ M 及綠原酸濃度在 400  $\mu$ M、600  $\mu$ M 的結果有再現性，代表實驗結果應為可信。

在藥物合併指數上，因橙皮苷在高濃度 (500  $\mu$ M) 時即有析出 (陳薇瑄, 2021)，且此時的濃度 (Hes 500 $\mu$ M) 對細胞的存活率並無顯著影響，故難以求得藥物合併指數上「藥物單獨發揮 X%作用的濃度」；而本實驗檢測橙皮苷混合綠原酸的濃度為 Hes 100  $\mu$ M + CA 400  $\mu$ M 及 Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M，選擇此藥物濃度組合的原因可依據實驗一單獨作用的結果，結果顯示 Hes 100  $\mu$ M 及 CA 400  $\mu$ M 單獨作用下皆無法顯著抑制 HCT116 (圖九、B)，然而若這兩種藥物混合後能顯著抑制 HCT116，或原本可單獨抑制細胞的 CA 600  $\mu$ M 若再加入 Hes 100  $\mu$ M 後能顯著提升抑制細胞效果，則可推論橙皮苷 (Hes )混合綠原酸 (CA) 可能有協同抑制 HCT116 的效應。

而在藥物混合處理方面，原本可單獨抑制細胞的 CA 600  $\mu$ M (細胞存活率  $61.6 \pm 22.5\%$ ) 在加入 Hes 100  $\mu$ M 後雖然也可抑制癌細胞 ( $76.8 \pm 27.4\%$ )，然而 Hes 100  $\mu$ M + CA 600  $\mu$ M 的抑制效果並無顯著提升；此外混合單獨作用下無法顯著抑制 HCT116 的 Hes 100  $\mu$ M ( $87.7 \pm 9.5\%$ ) 及 CA 400 ( $91.1 \pm 9.6\%$ )，混合後的結果雖然無法顯著抑制癌細胞 ( $81.0 \pm 9.6\%$ )，然而其細胞存活率與兩種藥物單獨作用相比卻有下降趨勢 (圖十、(B))。以上結果說明橙皮苷 (Hes) 混合綠原酸 (CA) 在協同抑制 HCT116 上的效果不明顯，而可能是藥物的加乘效應。

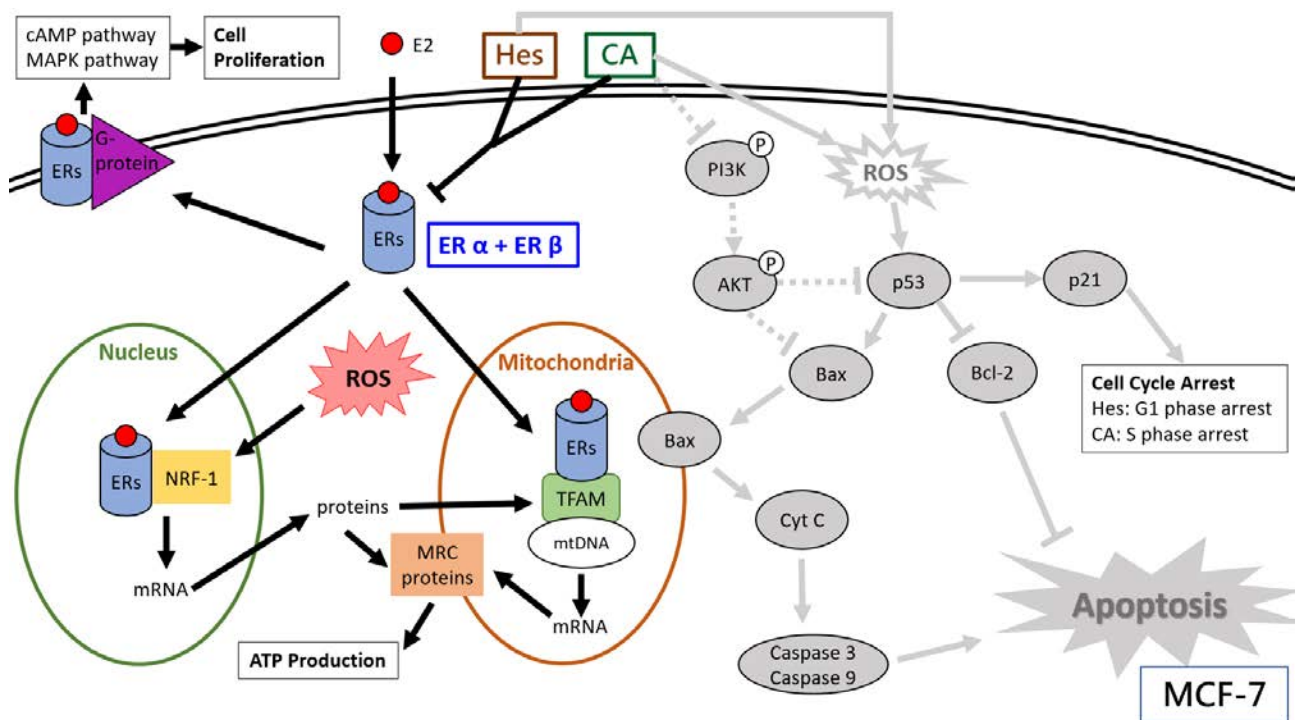
在探討橙皮苷混合綠原酸協同抑制癌細胞的研究上，前人使用的是同時具有雌激素受體 ER $\alpha$  及 ER $\beta$  的乳癌細胞 (MCF-7)，橙皮苷及綠原酸主要透過雌激素受體/粒線體路徑來協同抑制乳癌細胞數量 (圖十一) (陳薇瑄, 2021 ; Hsu et al., 2021)；雖然由過去研究推測，綠原酸單獨作用在 MCF-7 時可能藉由 PI3K/AKT 路徑引起細胞凋亡而抑制癌細胞存活率 (Changizi

et al., 2020 ; Funakoshi-Tago et al., 2020 ; Sharifi et al., 2015) , 然而當橙皮苷混合綠原酸處理 MCF-7 時 , PI3K/AKT 並無出現在主要調控途徑的分析中 (圖十一) (陳薇瑄, 2021 ; Hsu et al., 2021) , 其詳細作用路徑還有待後續研究釐清。

本研究使用的是僅有 ER $\beta$  的結腸癌細胞 (HCT116) , 過去研究顯示橙皮苷可誘發 HCT116 產生 ROS 並促進 p53 的表達 , 藉此讓細胞週期停滯在 G1 期及引發細胞凋亡 (Ismail et al., 2012) , 而綠原酸也可誘發 HCT116 產生 ROS 、促進 p53 表達而使細胞週期停滯在 S 期 (Hou et al., 2017) , 或是可能經由抑制 PI3K/Akt 路徑活化而誘發細胞凋亡 (Xiong et al., 2020) (圖十二) ; 本研究探討橙皮苷混合綠原酸協同抑制 HCT116 癌細胞的效果 , 結果顯示混合藥物對 HCT116 的協同抑制效果並不明顯 , 與前人研究 (陳薇瑄, 2021 ; Hsu et al., 2021) 比較下可能是 HCT116 缺乏 ER $\alpha$  , 才導致橙皮苷及綠原酸無法透過雌激素受體/粒線體路徑來協同抑制癌細胞數量 , 推論 ER $\alpha$  可能在此路徑中扮演重要角色 ; 而本研究的混合藥物處理能抑制 HCT116 , 推測可能是經由誘發 ROS 、p53 或是透過 PI3K/Akt 路徑來達到抑制效果 , 而確切的藥物抑制路徑及是否還能透過其他訊息傳遞路徑則需要進一步研究探討。

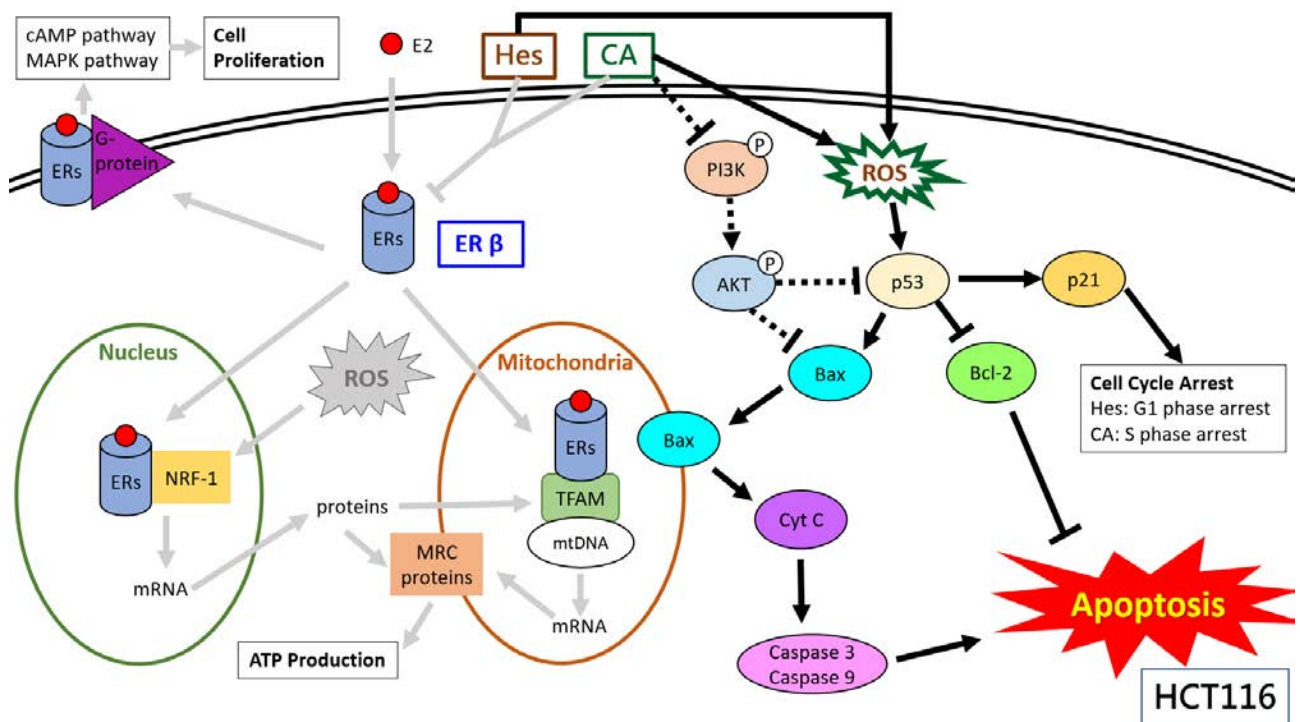
本研究使用混合藥物中的橙皮苷濃度低於前人在 MCF-7 所使用的橙皮苷濃度 (陳薇瑄, 2021 ; Hsu et al., 2021) , 可能是橙皮苷濃度不足才導致藥物協同抑制 HCT116 的效果不明顯 , 建議後續研究在避免結晶析出的條件下 , 適當提高橙皮苷濃度並可增加不同橙皮苷及綠原酸濃度組合的實驗處理。雌激素受體在橙皮苷及綠原酸協同抑制癌細胞的路徑 (雌激素受體/粒線體路徑) 中扮演關鍵角色 (Hsu et al., 2021) , 然而三陰性乳癌細胞不具有任何雌激素受體 (Foulkes et al., 2010) , 目前只有研究說明綠原酸單獨作用在三陰性乳癌細胞 (4T1) 中可透過 Bax/Bcl-2 路徑抑制癌細胞生長 (Changizi et al., 2020) , 尚未有橙皮苷混合綠原酸處理三陰性乳癌細胞的研究 , 未來將以三陰性乳癌細胞為對象探討橙皮苷混合綠原酸的抑制作用 , 可更進一步確認 ER $\alpha$  在這兩種藥物協同抑制作用中所扮演的角色 , 以及對於橙皮苷混合綠原酸抑制癌細胞的生理作用路徑提供更多證據 (圖十三)。





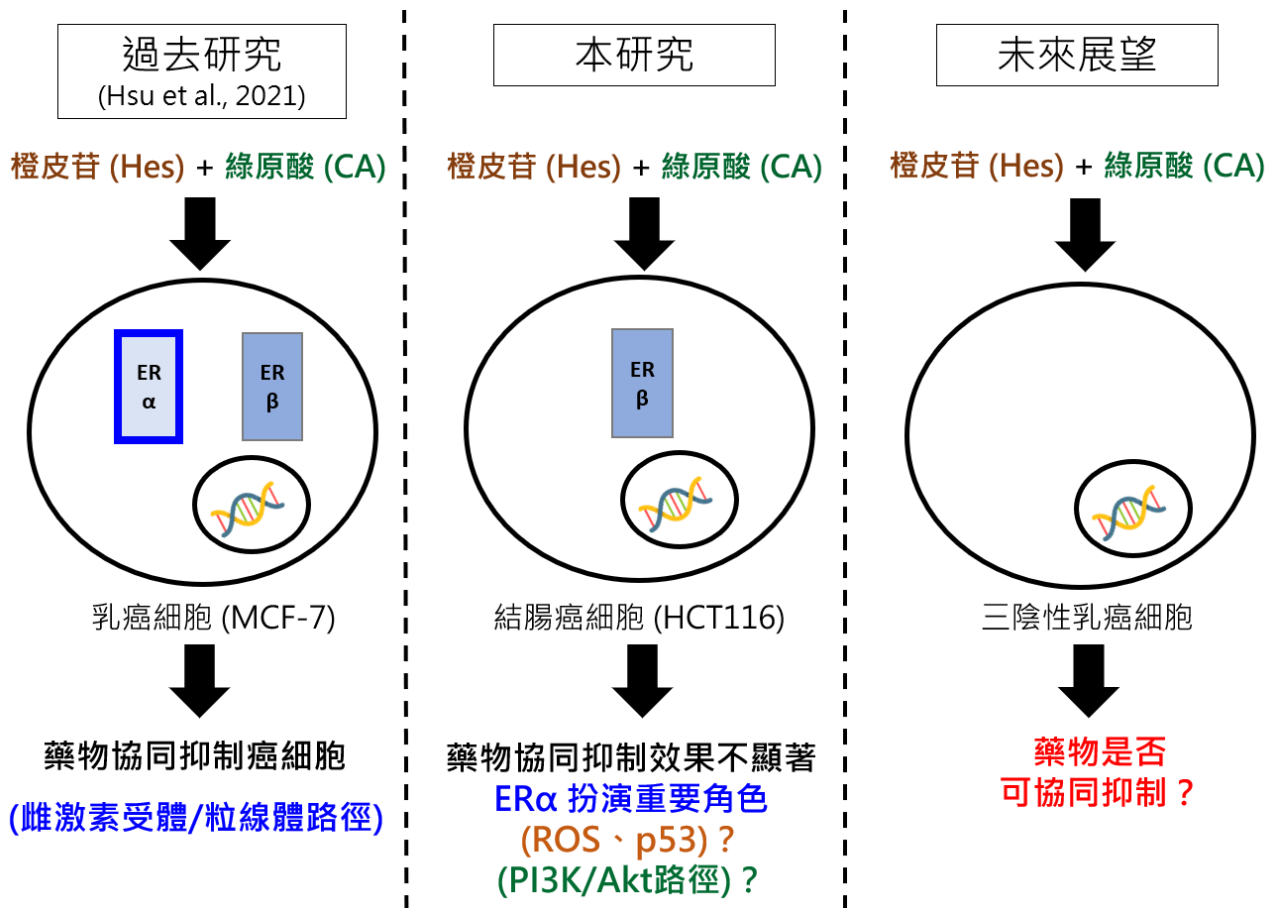
圖十一、橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 透過雌激素受體/粒線體路徑協同抑制乳癌細胞 (MCF-7) 的可能調控路徑 (Changizi et al., 2020 ; Funakoshi-Tago et al., 2020 ; Hsu et al., 2021 圖重新繪製 ; Sharifi et al., 2015) 。

橙皮苷及綠原酸主要透過雌激素受體/粒線體路徑來影響細胞 ATP 生成及細胞增生，藉此協同抑制 MCF-7 數量 (Hsu et al., 2021)。雖然由過去研究推測，綠原酸單獨作用在 MCF-7 時可能藉由 PI3K/AKT 路徑引起細胞凋亡而抑制癌細胞存活率 (Changizi et al., 2020 ; Funakoshi-Tago et al., 2020 ; Sharifi et al., 2015)，然而當橙皮苷混合綠原酸處理 MCF-7 時，PI3K/AKT 並無出現在主要調控途徑的分析中 (陳薇瑄, 2021 ; Hsu et al., 2021)，其詳細作用路徑還有待後續研究釐清。



圖十二、橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 混合綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 調控結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的可能生理路徑 (Hou et al., 2017 ; Hsu et al., 2021 圖重新繪製 ; Ismail et al., 2012 ; Xiong et al., 2020)。

過去研究說明橙皮苷單獨作用下可誘發 HCT116 產生 ROS 並促使細胞週期停滯及細胞凋亡 (Ismail et al., 2012) ; 綠原酸單獨作用下也可誘發 HCT116 產生 ROS、p53 而使細胞週期停滯 (Hou et al., 2017) , 或透過抑制 PI3K/Akt 路徑活化而誘發細胞凋亡 (Xiong et al., 2020) 。而本研究顯示在橙皮苷混合綠原酸處理 HCT116 時, 協同抑制效果並不明顯, 與前人研究 (陳薇瑄, 2021 ; Hsu et al., 2021) 比較下可能是 HCT116 缺乏 ER $\alpha$ , 才導致橙皮苷及綠原酸無法透過雌激素受體/粒線體路徑來協同抑制癌細胞數量, 推論 ER $\alpha$  可能在此路徑中扮演重要角色。而本研究的混合藥物處理能抑制 HCT116, 推測可能是經由誘發 ROS、p53 或是透過 PI3K/Akt 路徑來達到抑制效果, 而是否能透過其他訊息傳遞路徑則需要進一步研究探討。



圖十三、未來展望。

比較本研究及過去研究 (Hsu et al., 2021) 發現 ERα 在橙皮苷及綠原酸協同抑制癌細胞的路徑 (雌激素受體/粒線體路徑) 中扮演關鍵角色，而混合藥物抑制 HCT116 的生理路徑則需進一步探討確認。三陰性乳癌無任何雌激素受體，未來將以三陰性乳癌細胞為對象探討橙皮苷混合綠原酸的抑制作用，可更進一步確認 ERα 在這兩種藥物協同抑制作用中所扮演的角色，以及對於橙皮苷混合綠原酸抑制癌細胞的生理作用路徑提供更多證據。

## 肆、 結論與應用

### 一、探討橙皮苷 (Hesperidin, Hes) 及綠原酸 (Chlorogenic acid, CA) 單獨作用時，對結腸癌細胞 (HCT116) 存活率的抑制效果，藉此確認這兩種藥物混合處理的濃度：

綠原酸單獨作用下對 HCT116 有抑制效果，而且隨著綠原酸濃度越高（濃度大於 600  $\mu\text{M}$ ）則抑制效果越好，然而橙皮苷濃度在 150  $\mu\text{M}$  以下時抑制 HCT116 的效果較不顯著；而在避免藥物結晶析出的條件下，依據上述實驗結果設計橙皮苷混合綠原酸的濃度為 Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 400  $\mu\text{M}$  及 Hes 100  $\mu\text{M}$  + CA 600  $\mu\text{M}$ ，藉此檢測混合藥物是否可協同抑制 HCT116。

### 二、探討橙皮苷及綠原酸混合作用時，對結腸癌細胞存活率的抑制效果，並討論當癌細胞缺乏 ER $\alpha$ 時混合藥物是否仍具有協同抑制效應：

本研究首次發現當橙皮苷混合綠原酸時能顯著抑制 HCT116，並會隨著其中綠原酸濃度增加而顯著增強對 HCT116 的抑制效果，然而橙皮苷及綠原酸對 HCT116 協同效應較不顯著，比較前人研究而進一步推測雌激素受體  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 在雌激素受體/粒線體路徑中扮演重要角色；本研究的混合藥物可能是誘發 ROS、p53 或是透過 PI3K/Akt 路徑來抑制 HCT116，而確切的藥物抑制路徑則需進一步研究探討。

### 三、創新及應用

(一) 本研究首次發現橙皮苷及綠原酸的混合藥物能顯著抑制人類結腸癌細胞 (HCT116)，

然而這兩種藥物的協同效應較不顯著，與前人研究比較下可推測 ER $\alpha$  在雌激素受體/粒線體路徑中扮演重要角色。

(二) 進一步證實橙皮苷混合綠原酸能對癌細胞造成抑制效果，並且對抑制癌細胞的生理路徑研究提供更多證據。

## 伍、參考文獻

- 陳薇瑄 (2021) 橙皮苷與綠原酸透過雌激素受體/粒線體路徑協同抑制乳癌細胞之生長 (未出版碩士論文)。國立臺灣海洋大學，基隆市。
- 衛生福利部統計處。109 年國人死因統計結果。2021 年 6 月 18 日。取自 <https://www.mohw.gov.tw/cp-5017-61533-1.html>
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Thakral, F., Singhal, P., Aggarwal, D., Srivastava, S., ... & Sethi, G. (2020). Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 486-497.
- Akiyama, S., Katsumata, S. I., Suzuki, K., Ishimi, Y., Wu, J., & Uehara, M. (2009). Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 46(1), 87-92.
- Albanes, D., & Winick, M. (1988). Are cell number and cell proliferation risk factors for cancer?. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 80(10), 772-775.
- Changizi, Z., Moslehi, A., Rohani, A. H., & Eidi, A. (2020). Chlorogenic acid inhibits growth of 4T1 breast cancer cells through involvement in Bax/Bcl2 pathway. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 16(6), 1435.
- Cheng, G. W., & Crisosto, C. H. (1995). Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(5), 835-838.
- Cho, A. S., Jeon, S. M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S., & Lee, M. K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 937-943.
- Ding, Y., Cao, Z., Cao, L., Ding, G., Wang, Z., & Xiao, W. (2017). Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Dou, J. W., Shang, R. G., Lei, X. Q., Li, K. L., Guo, Z. Z., Ye, K., ... & Huang, Q. (2019). Total

saponins of *Bolbostemma paniculatum* (maxim.) Franquet exert antitumor activity against MDA-MB-231 human breast cancer cells via inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1-9.

E Owumi, S., K Olusola, J., O Arunsi, U., & K Oyelere, A. (2021). Chlorogenic acid abates oxidoinflammatory and apoptotic responses in the liver and kidney of Tamoxifen-treated rats. *Toxicology Research*, 10(2), 345-353.

Fiorelli, G., Picariello, L., Martineti, V., Tonelli, F., & Brandi, M. L. (1999). Functional estrogen receptor  $\beta$  in colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 261(2), 521-527.

Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, 363(20), 1938-1948.

Frei, E. (1985). Curative cancer chemotherapy. *Cancer research*, 45(12 Part 1), 6523-6537.

Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Li, C., Hokimoto, S., & Tamura, H. (2020). Coffee decoction enhances tamoxifen proapoptotic activity on MCF-7 cells. *Scientific reports*, 10(1), 1-36.

Gelen, V., Şengül, E., Yıldırım, S., Senturk, E., Tekin, S., & Kükürt, A. (2021). The protective effects of hesperidin and curcumin on 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.

Gilang, Y., Hermawan, A., Fitriyani, A., & Jenie, R. I. (2012). Hesperidin increases cytotoxic effect of 5-fluorouracil on WiDr cells. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 3(2), 404-409.

Guo, B., Zhang, T., Su, J., Wang, K., & Li, X. (2015). Oxymatrine targets EGFR p-Tyr845 and inhibits EGFR-related signaling pathways to suppress the proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 75(2), 353-363.

Gupta, S., Zhang, D., Yi, J., & Shao, J. (2004). Anticancer activities of *Oldenlandia diffusa*. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4(1), 21-33.

Hou, N., Liu, N., Han, J., Yan, Y., & Li, J. (2017). Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 28(1), 59-

65.

- Hsu, P. H., Chen, W. H., Lu, C. J., Hsieh, S. C., Lin, S. C., Mai, R. T. & Chen, S. Y. (2021). Hesperidin and Chlorogenic Acid Synergistically Inhibit the Growth of Breast Cancer Cells via Estrogen Receptor/Mitochondrial Pathway. *Life*, 11(9), 950.
- Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., & Kim, K. W. (2014). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, 63(1), 81-90.
- Ismail, I. A., Gabry, M. S., Abdalla, S. K., & Ibrahim, M. A. (2012). P53 SENSITIZES HUMAN COLON CANCER CELLS TO HESPERIDIN THROUGH UPREGULATION OF BAX AND P21. *Egyptian Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 30(2).
- Lee, C. J., Wilson, L., Jordan, M. A., Nguyen, V., Tang, J., & Smiyun, G. (2010). Hesperidin suppressed proliferations of both Human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytotherapy research*, 24(S1), S15-S19.
- Levin, E. R. (2001). Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of Applied Physiology*, 91(4), 1860-1867.
- Lin, J., Chen, Y., Wei, L., Chen, X., Xu, W., Hong, Z., ... & Peng, J. (2010). Hedyotis Diffusa Willd extract induces apoptosis via activation of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells. *International journal of oncology*, 37(5), 1331-1338.
- Ling, Q., Xu, X., Wei, X., Wang, W., Zhou, B., Wang, B., & Zheng, S. (2011). Oxymatrine induces human pancreatic cancer PANC-1 cells apoptosis via regulating expression of Bcl-2 and IAP families, and releasing of cytochrome c. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 66.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M. P., ... & Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Luthria, D. L., & Mukhopadhyay, S. (2006). Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 41-47.
- Kweon, M. H., Hwang, H. J., & Sung, H. C. (2001). Identification and antioxidant activity of novel

- chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4646-4655.
- Macheiner, L., Schmidt, A., Schreiner, M., & Mayer, H. K. (2019). Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84, 103307.
- Morand, C., Dubray, C., Milenkovic, D., Lioger, D., Martin, J. F., Scalbert, A., & Mazur, A. (2011). Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 93(1), 73-80.
- Nie, J., Zhao, C., Deng, L. I., Chen, J., Yu, B., Wu, X., ... & Chen, X. (2016). Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer. *Biomedical reports*, 4(1), 3-14.
- Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of food composition and analysis*, 19, S74-S80.
- Qi, F., Zhao, L., Zhou, A., Zhang, B., Li, A., Wang, Z., & Han, J. (2015). The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. *Bioscience trends*, 9(1), 16-34.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294-297.
- Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., & Samadi, N. (2015). Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 351.
- Sommer, S., & Fuqua, S. A. (2001, October). Estrogen receptor and breast cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 11, No. 5, pp. 339-352). Academic Press.
- Stacewicz-Sapuntzakis M., Bowen, P. E., Hussain, E. A., Damayanti-Wood, B. I., & Farnsworth, N. R. (2001). Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41(4), 251-286.
- Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nature medicine*, 9(3), 269-277.
- Xia, R., Xu, G., Huang, Y., Sheng, X., Xu, X., & Lu, H. (2018). Hesperidin suppresses the



migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by inhibiting the SDF-1/CXCR-4 pathway. *Life sciences*, 201, 111-120.

Xiong Gang, Zou Hua, Hu Chenglian, Wu Dan & Deng Guiliu. (2020) Effects of Chlorogenic Acid on the Proliferation and Apoptosis of Colon Cancer Cells Mediated by P13k/Akt Signaling Pathway[J]. *Western Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 33(05): 71-74. [doi:10.12174/j.issn.1004-6852.2020.05.20]

Yang, H. L., Chen, S. C., Senthil Kumar, K. J., Yu, K. N., Lee Chao, P. D., Tsai, S. Y., ... & Hseu, Y. C. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 522-532.

Zeng, A., Liang, X., Zhu, S., Liu, C., Wang, S., Zhang, Q., ... & Song, L. (2021). Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oncology Reports*, 45(2), 717-727.

Zhao, L., Au, J. L. S., & Wientjes, M. G. (2010). Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 2, 241.

Zhao, J., Li, Y., Gao, J., & De, Y. (2017). Hesperidin inhibits ovarian cancer cell viability through endoplasmic reticulum stress signaling pathways. *Oncology letters*, 14(5), 5569-5574.

## 附錄

表七、實驗數據：探討橙皮苷及綠原酸單獨作用時，對結腸癌細胞存活率的抑制效果，藉此確認這兩種藥物混合處理的濃度。

Hes、CA 單獨處理	對照組	Hes			CA		
	DMSO	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	150 $\mu$ M	400 $\mu$ M	600 $\mu$ M	800 $\mu$ M
細胞存活率% 以 DMSO 對照組為 100% (單位為%)	100	114.25	115.4	91.55	104.38	62.57	30.46
	100	98.79	104.97	100.79	91.17	59.73	16.81
	100	115.77	81.75	93.41	115.03	91.49	17.27
	100	88.89	114.14	86.16	90.21	104.46	20.99
	100	102.3	125.35	119.44	86.3	59.36	15.27
	100	110.38	102.89	101.06	107.32	67.61	79.58
	100	93.18	101.5	118.05	93.58	85.07	79.73
	100	80.89	80.84	89.97	97.56	78.64	85.52
	100	86.85	98.14	106.8	101.83	76.33	60.93
	100	90.88	90.59	62.36	80.63	68.55	49.55
	100	84.27	81.24	69.94	79.85	49.36	25.98
	100	109.32	96.43	117.65	101.97	72.36	45.85
	100	90.62	101.84	102.92	109.26	54.25	48.12
	100	104.25	108.78	94.91	102.16	59.36	38.23
100	110.36	103.78	88.17	110.65	46.75	27.83	
平均值	100	98.7333	100.509	96.212	98.1267	69.0593	42.808
樣本標準差	0	11.5915	12.9911	16.3657	10.8463	16.02	24.1934

表八、實驗數據：探討橙皮苷混合綠原酸時，對結腸癌細胞存活率的抑制效果，並討論當癌細胞缺乏 ER $\alpha$  時混合藥物是否仍具有協同抑制效應。

Hes、CA	對照組	Hes	CA		Hes+CA	
混和處理	DMSO	100 $\mu$ M	400 $\mu$ M	600 $\mu$ M	100 $\mu$ M + 400 $\mu$ M	100 $\mu$ M + 600 $\mu$ M
細胞存活率% 以 DMSO 對 照組為 100% (單位為%)	100	95.77	98.49	73.74	92.34	101.29
	100	73.63	91.13	93.74	83.28	111.49
	100	96.52	105.77	88.03	95.71	120.91
	100	69.45	102.8	83.86	71	87.27
	100	83.21	84.76	77.59	79.58	83.99
	100	94.74	80.26	33.12	75.23	47.93
	100	93.64	97.22	38.94	70.57	55.36
	100	81.71	83.03	46.12	73.58	40.25
	100	94.18	92.05	40.75	95.66	73.26
	100	94.18	75.39	40.32	72.95	45.85
平均值	100	87.703	91.09	61.621	80.99	76.76
樣本標準差	0	9.4806	9.563984525	22.543	9.638702195	27.40371581

## 【評語】 090006

1. 已經有相關的論文發表如下：
  - (a)綠原酸 (Chlorogenic acid) anticancer doi :  
10.7150/thno.34674
  - (b)Molecular mechanisms of action of hesperidin in  
cancer : Recent trends and advancements
  - (c)實驗的結果僅提供初步的證據，詳細的機制並沒有探討。深度可以再加強！
2. 參賽者根據前人的實驗，進行了改版加強，測試一樣的藥物在不同細胞有沒有一樣的表現。這對以後癌症病患者也許有一些程度上的幫助。橙皮苷及綠原酸對 HCT116 無協同效應的發現，建議也可以去探討該藥物的 active site，以便找出更多相似結構的藥物對抗不同種類的癌症。
3. Hesperidin，Chlorogenic acid 對結腸癌細胞 的影響已經有多個實驗室報導，應該找不同的毒殺機制比較合適。
4. 可以再加入另外一個細胞株做為研究比較適合。