

產業園區產學合作計畫結案摘要

計畫名稱	萬寶祿特級本草活性酵素抑制人類乳癌細胞生長、發炎、侵襲及腫瘤生成的效果			
合作廠商	萬寶祿生技股份有限公司		計畫主持人/ 學校/職稱	許仁宏/美和科技大學/教授
參與計畫 學生數	博士後研究		碩士生	1
	博士生		大學生	6
計畫執行 概述	執行期程	99年1月25日至 99年12月31日	執行經費 教育部/學校/ 廠商	395,000/96,000/300,000
	產學合作解 決之問題或 開發之技術	協助萬寶祿生技股份有限公司了解特級本草活性酵素的抑 制人類乳癌細胞生長、發炎、侵襲及腫瘤生成作用。		
計畫執行 成效	學生參與計畫情形： 如考取相關證照(數)、完成 相關專題製作(數)、完成相 關技術報告/論文(數)等		廠商滿意度 (請合作廠商說明)	
	完成兩個專題題目 國際研討會發表兩篇海報		非常滿意 滿意 大致滿意 不滿意 非常不滿意 相關說明；_____	
	相關專利申 請說明	相關技術移 轉說明(含技 轉金額)	無	
	已獲得 專利類型/名 稱： 申請中 未申請			

計畫摘要：

在飲食西化、生活模式改變與外在刺激因子增多的影響下，乳癌已是台灣女性癌症發生排行榜上的第一位，所以預防乳癌的發生是一個重要的研究課題。近年來有機農業及保健生技觀念抬頭使得台灣食品業界及中、西醫藥界投入對保健產品的開發及研究。本研究利用人類乳癌細胞株探討萬寶祿特級酵素之功效。結果證實該產品具有抑制乳癌細胞爬行及發炎中介基因(inflammation mediator gene) *COX-2* 的表現，並由動物實驗發現萬寶祿特級酵素具有抑制腫瘤生成之成效。

計畫執行團隊：

計畫主持人：許仁宏 教授

共同主持人：王凱弘 博士

計畫參與人員：美和科技大學 生物科技系

研究生：王敏傑

大四學生：林信叡、謝承洧

大三學生：蘇江文、徐一熏、曹家瑋、陳慧

計畫執行內容：

本研究使用「萬寶祿特級本草活性酵素」針對乳癌細胞進行抑制癌細胞生長、發炎、侵襲 (*in vitro*) 及腫瘤生成 (*in vivo*) 之研究。

主要目的包括下列四大方向：

- (1) 評估「萬寶祿特級本草活性酵素」抑制乳癌細胞生長的能力。
- (2) 評估「萬寶祿特級本草活性酵素」抑制乳癌細胞發炎能力。
- (3) 評估「萬寶祿特級本草活性酵素」抑制乳癌細胞侵襲能力。
- (4) 評估「萬寶祿特級本草活性酵素」抑制乳癌細胞形成腫瘤能力。

計畫成果報告：

本計畫完成萬寶祿特級本草活性酵素對 MCF-7 及 MDAMB231 兩株細胞株的測定，

試驗結果如下

1、百分之五十致死劑量(LC₅₀)：本試驗測定濃度均以三重複處理。

對MCF-7細胞株，萬寶祿特級本草活性酵素1號（OP1）的百分之五十致死劑量約為原液稀釋35倍，萬寶祿特級本草活性酵素2號（OP2）的百分之五十致死劑量約為原液稀釋20倍(Table 1, 2)。

Table 1 OP1 對MCF7有效致死劑量

OP1 稀釋倍數	Mean ± SD
未稀釋	1.00 ± 0.00
1000000	0.97 ± 0.37
100000	0.95 ± 0.29
10000	0.92 ± 0.51
1000	0.78 ± 0.54
500	0.69 ± 0.50
200	0.63 ± 0.30
100	0.74 ± 0.38
50	0.64 ± 0.34
20	0.38 ± 0.20
10	0.00 ± 0.00
6.6	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00

Table 2 OP2 對MCF7有效致死劑量

OP2 稀釋倍數	Mean ± SD
未稀釋	1.00 ± 0.00
1000000	0.95 ± 0.29
100000	0.81 ± 0.55
10000	0.84 ± 0.40
1000	0.75 ± 0.47
500	0.84 ± 0.61
200	0.71 ± 0.36
100	0.83 ± 0.86
50	0.59 ± 0.50
20	0.52 ± 0.52
10	0.00 ± 0.00
6.6	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00

對MDAMB231細胞株，OP1的百分之五十致死劑量約為50倍稀釋液，OP2的百分之五十致死劑量約為50倍稀釋液 (Table 3, 4)。

Table 3 OP1 對MDAMB231有效致死劑量		Table 4 OP2 對MDAMB231有效致死劑量	
OP1 稀釋倍數	Mean ± SD	OP2 稀釋倍數	Mean ± SD
未稀釋	1.00 ± 0.00	未稀釋	1.00 ± 0.00
1000000	0.92 ± 0.10	1000000	0.94 ± 0.11
100000	0.87 ± 0.12	100000	0.85 ± 0.12
10000	0.81 ± 0.16	10000	0.81 ± 0.18
1000	0.78 ± 0.16	1000	0.80 ± 0.26
500	0.72 ± 0.23	500	0.82 ± 0.19
200	0.53 ± 0.05	200	0.68 ± 0.13
100	0.59 ± 0.27	100	0.63 ± 0.19
50	0.53 ± 0.46	50	0.52 ± 0.27
20	0.26 ± 0.06	20	0.29 ± 0.06
10	0.16 ± 0.06	10	0.18 ± 0.08
6	0.04 ± 0.09	6	0.04 ± 0.08
5	0.03 ± 0.06	5	0.05 ± 0.06
2	0.00 ± 0.00	2	0.00 ± 0.00

2、傷痕癒合分析(Wound-healing assay)

對MCF-7細胞株，OP1及OP2在稀釋10,000倍下無顯著細胞毒性(Table 1, 2)，故本研究利用該濃度進行傷痕癒合分析，由結果顯示，OP1及OP2均有抑制細胞爬行的成效 (Figure 1)。

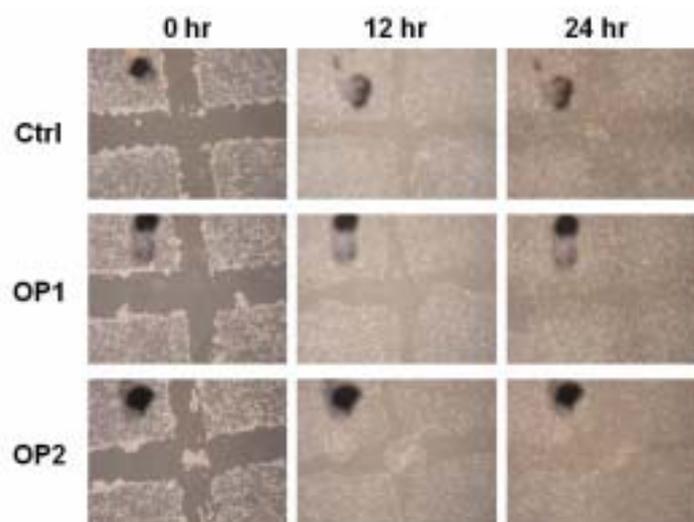


Figure 1. 萬寶祿對 MCF-7 的傷痕癒合分析之影響

對MDAMB231細胞株，OP1及OP2在稀釋1000000倍下無顯著細胞毒性(Table 3, 4)，故本研究利用該濃度進行傷痕癒合分析，由結果顯示，OP2具有抑制細胞爬行的成效(Figure 2)。

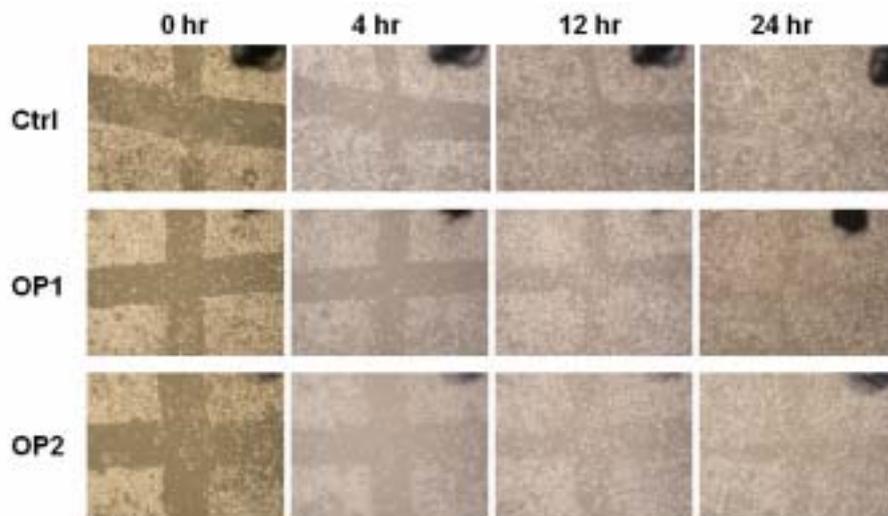


Figure 2. 萬寶祿對 MDAMB231 的傷痕癒合分析的影響

3、基因表現 (Gene expression)

對 MCF-7 細胞株，OP1 及 OP2 在不同稀釋濃度下，觀察 *COX-2* 基因的表現，結果顯示，OP2 具有較明顯抑制 *COX-2* 表現的能力(Figure 3)。

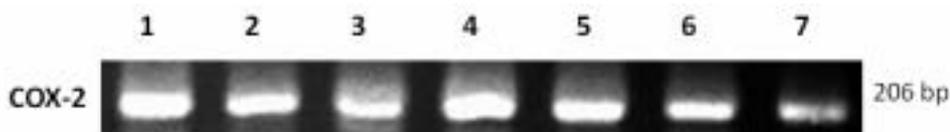


Figure 3. 萬寶祿 OP1 及 OP2 對 MCF-7 細胞株的 *COX-2* 基因表現的影響。Lane 1: Control、Lane 2: OP1 稀釋 10000 倍、Lane 3: OP1 稀釋 2000 倍、Lane 4: OP1 稀釋 500 倍、Lane 5: OP2 稀釋 10000 倍、Lane 6: OP2 稀釋 2000 倍、Lane 7: OP2 稀釋 500 倍。

對 MDAMB231 細胞株，OP1 及 OP2 在不同稀釋濃度下，觀察 *COX-2* 基因的表現，結果顯示，OP2 具輕微抑制 *COX-2* 表現的能力(Figure 4)。

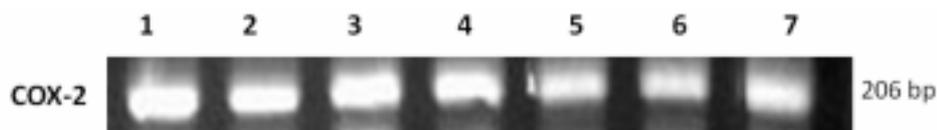


Figure 4. 萬寶祿 OP1 及 OP2 對 MDAMB231 細胞株的 *COX-2* 基因表現的影響。Lane 1: Control、Lane 2: OP1 稀釋 10000 倍、Lane 3: OP1 稀釋 2000 倍、Lane 4: OP1 稀釋 500 倍、Lane 5: OP2 稀釋 10000 倍、Lane 6: OP2 稀釋 2000 倍、Lane 7: OP2 稀釋 500 倍。

4、抑制乳癌細胞形成腫瘤能力

由動物實驗發現，OP1 和 OP2 都具有抑制腫瘤生成能力，但 OP2 具有較明顯抑制腫瘤生成能力(Figure 5)。



Figure 5. 萬寶祿 OP1 及 OP2 對腫瘤形成的影響

本研究已初步得到萬寶祿產品OP1及OP2對乳癌細胞影響的結果，可得知萬寶祿產品對抑制乳癌細胞生長的百分之五十致死劑量，以此濃度為基礎進一步探討該產品對乳癌細胞的爬行抑制能力、探討抑制發炎的效果，並以此基礎深入了解在動物實驗模式下該產品的抑制腫瘤功效。

本研究具備了解乳癌成因的基礎研究，希望結合產業界的研發能量，發展可能的預防疾病策略，以達到企業及學校雙贏的策略，並創造學生研究之能力，降低學校所培育之學生與產企業所需人才之差距，已期達到技職學生「學中做」、「做中學」的目標，研究成果對台灣女性預防乳癌更有其意義，達到多贏的局面。

成果發表：

1. I-Hsun Hsu, Chia-Wei Tsao, Hui Chen, Chiang-Wen Su, Hsin-Jui Lin, Cheng-Wei Hsieh, Kai-Hung Wang, An-Pei Kao and Zen-Hong Shü . Inhibition of mobility ability in breast cancer cells by One Power fermented product. *2010 Green Biotechnology International Symposium- International cooperation for promoting the development of green biotech industry.*
2. Chia-Wei Tsao, I-Hsun Hsu, Chiang-Wen Su, Hui Chen, Hsin-Jui Lin, Cheng-Wei Hsieh, Kai-Hung Wang, An-Pei Kao and Zen-Hong Shü . Inhibition of mobility ability and down-regulation of *Cyclooxygenase-2* expression in breast cancer cells by One Power fermented product. *2010 Green Biotechnology International Symposium- International cooperation for promoting the development of green biotech industry.*

計畫結案後對合作企業之成效：

本研究證萬寶祿特級本草活性酵素具有抑制人類乳癌細胞生長、發炎、侵襲及腫瘤生成的效果。產業界可利用此研究成果，結合本身的研發能量，發展可能的預防疾病策略，以達到企業及學校雙贏的策略，並創造學生研究之能力，降低學校所培育之學生與產企業所需人才之差距，已期達到技職學生「學中做」、「做中學」的目標，研究成果對台灣女性預防乳癌更有其意義，達到多贏的局面。

計畫實際成果產出：

1. 開發技術名稱：
2. 技術應用範圍：
技術成熟度： 概念 實驗室階段 雛形 試量產 量產 其他
3. 涉及專利或其他智慧財產權， 1年 2年後可公開查詢

2010 Green Biotechnology International Symposium- International cooperation for promoting the development of green biotech industry

(poster)



2010 Green Biotechnology International Symposium

萬寶祿特級本草活性酵素抑制人類乳癌細胞的細胞爬行能力

Inhibition of Mobility Ability in Breast Cancer Cells by One Power Active Enzymes Original Liquid

這一璽¹、曹家璋¹、陳慧¹、蘇江文¹、林信毅¹、謝承甫¹、王萬弘^{1,2}、萬安佩¹、許仁宏^{1,2}

1. 美利科技大學生物科技學系 2. 高雄醫學大學醫學研究所

研究背景

由於飲食西化、生活模式改變、外在刺激因子影響下，乳癌已是台灣女性癌症發生第一，所以預防乳癌的發生是一個重要的研究課題。近年來有德商及保健生技廠之出類拔萃台灣食品業界及中、西醫藥界並入於保健產品的開發及研究。

研究目的

本研究利用人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231 cell line) 探討萬寶祿特級酵素 (OP1、OP2) 抑制癌細胞爬行之能力。

研究成果

實驗結果顯示，OP1、OP2 之百分之五十成孔劑量均與此種細胞，利用類傷口癒合劑的遷移試驗 (wound healing assay) 發現原細胞株 MDA-MB-231 的細胞爬行；利用反轉錄聚合酶鏈式反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 顯示經用 OP1、OP2 處理之 MDA-MB-231 細胞其環氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 基因表達量有明顯的下降。且實驗初步結果證實 OP1、OP2 具有抑制乳癌細胞爬行及發炎基因表現的效果。



圖1 萬寶祿特級本草活性酵素

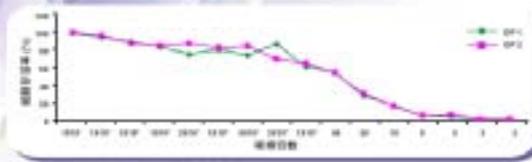


圖1: OP1、OP2 對 MDA-MB-231 細胞的半數死滅量 (IC₅₀)

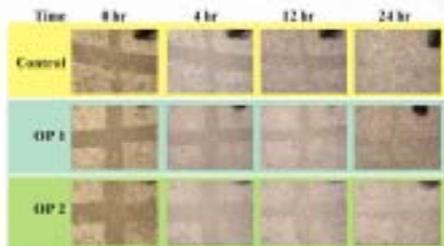


圖2 萬寶祿特級酵素對 MDA-MB-231 細胞的半數死滅量 (IC₅₀)。在 0、4、12、24 小時，觀察細胞的爬行能力。結果顯示 OP1、OP2 均能顯著抑制 MDA-MB-231 細胞的爬行能力。OP1 的 IC₅₀ 為 1.13 μg/ml，OP2 的 IC₅₀ 為 1.13 μg/ml。

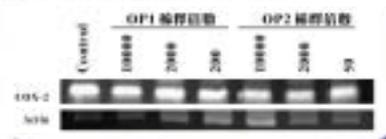


圖3 結果顯示，經 OP1、OP2 處理的 MDA-MB-231 細胞其 COX-2 (cyclooxygenase-2, Cox-2) 基因表達量有明顯的下降。且實驗初步結果證實 OP1、OP2 具有抑制乳癌細胞爬行及發炎基因表現的效果。

未來展望

萬寶祿特級酵素之原料是由多種水果、蔬菜及草本植物，經由發酵萃取而得的營養品。實驗結果只作證實極方效顯著之成效。應證實是那一種化合物所造成之效果。未來希望可進一步研究此後方萃取物真正抑制細胞的發炎及爬行之成份。

2010 Green Biotechnology International Symposium- International cooperation for promoting the development of green biotech industry

(poster)



2010 Green Biotechnology International Symposium

萬寶綠特級本草活性酵素對人類乳癌上皮細胞爬行作用及環氧化酶-2之影響

Inhibition of Mobility Ability and Down-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer Cells by One Power Active Enzymes Original Liquid

豐家遠¹、徐一傑¹、蘇江文¹、陳慧¹、林信敏¹、謝承清¹、王凱弘²、高安佩²、許仁宏²

¹ 美和科技大學生物科技學系 ² 高雄醫學大學醫學研究所

研究背景

乳癌是台灣女性癌症排行的第一位，預防乳癌的發生是一個重要的研究項目。近年來各種營養及保健產品紛紛使得保健食品的開發及研究開始被重視。

研究目的

本研究利用乳癌細胞株 (MCF-7 cell line) 探討萬寶綠特級酵素產品對乳癌細胞爬行與環氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 基因表現的效果。

研究成果

萬寶綠特級本草活性酵素2號 (OP2) 的百分之五十致死劑量為原液稀釋20倍；由類傷口癒合細胞遷移試驗 (wound healing assay) 發現 OP2 可增加細胞爬行作用。並利用反轉錄聚合酶鏈式反應 (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) 證實 OP2 會抑制 COX-2 基因表現。



圖1. 萬寶綠特級本草活性酵素

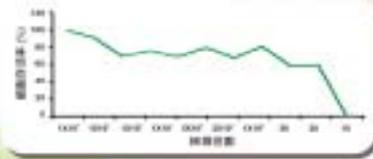


圖2. OP2對MCF-7細胞的50%致死劑量 (LC₅₀)

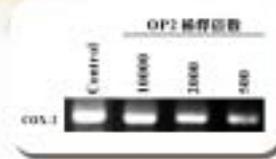


圖3. 結果顯示，隨著 OP2 濃度增加，MCF-7 細胞中環氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, Cox-2) 基因表現。



圖4. 此項試驗結果顯示 OP2 可增加 MCF-7 細胞的爬行作用。此項試驗結果顯示 OP2 可增加 MCF-7 細胞的爬行作用。此項試驗結果顯示 OP2 可增加 MCF-7 細胞的爬行作用。

未來展望

本實驗能現象是細胞組織於體外培養時所產生的一些現象，進而針對細胞體內基因層面的發炎因子所表現的結果，並參考使用天然草本酵素是否可以有效阻遏人體上的一些生理作用，在日後的實驗目標會朝向天然性草本複合物與腫瘤細胞之間所作用的相關途徑去探討。