

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 西番蓮與豬籠草中可能的抗菌抗癌化合物：找尋、驗證 與藥物優化
------------	-------------------------------------

執行計畫學生：陳榮鴻

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-033-B

研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月

指導教授：黃晟洋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 109年03月28日

目錄

目錄.....	1
研究計畫摘要.....	2
研究背景與動機.....	3
材料方法.....	4
結果.....	8
結論.....	17
文獻參考.....	18
附錄.....	20

1. 研究計畫摘要

豬籠草與西番蓮植物產於熱帶地區。豬籠草具有一捕蟲籠子，可引誘並捕食昆蟲獲得額外養分；而西番蓮果實已知有美白與抗黑色素沉澱之藥用功效。此兩種熱帶植物是否有其他潛力如抗氧化、抗菌與抗癌活性的功效仍未知。細菌抗藥性的問題日漸嚴重，而癌症亦為國人重要死因。在此研究，我們將豬籠草的葉、莖、籠與西番蓮果殼萃取液經由不同溶劑萃取，研究其生物功效，並利用高壓液相層析與質譜法來探索具有潛力的化合物以對抗細菌與癌細胞。我們發現西番蓮果殼甲醇、丙酮及豬籠草莖的丙酮萃取物富含高量的總酚、總黃酮以及高抗氧化活性。豬籠草莖的丙酮萃取物亦發現有相當高且廣的抑菌活性。初步利用 trypan blue 染色觀察細胞死亡和傷口癒合試驗(wound healing assay)發現豬籠草莖丙酮萃取物可殺死並抑制小鼠黑色素瘤細胞(B16F10)的生長與遷移(抑制率99%)，其中經由層析質譜結果推測出豬籠草內含的 plumbagin, droserone, 5-O-methyldroserone 以及類黃酮 quercetin, kaempferol 與其他化合物等可能相關。另外，在西番蓮果殼丙酮萃取液也發現抑制革蘭氏陽性和陰性菌生長的能力，並在高濃度的情況下(50 mg/mL)亦能殺死細菌。透過抑癌實驗發現西番蓮果殼萃取液對於癌細胞的毒殺能力並不顯著，不過可以抑制癌細胞的增生以及遷移能力，並透過氣相層析質譜找出其中含有的化合物，以待日後實驗加以驗證其藥性和作用機制，並尋找是否有與其他化合物有協同作用，甚是藥物優化的可能性。

2. 研究背景與動機

熱帶地區多雨、太陽輻射強、蒸發旺盛，容易滋生細菌與黴菌。為了對抗自然環境如輻射以及其他微生物或蟲咬等，熱帶植物通常都有一定的防禦機制對抗蟲害及威脅。豬籠草是一種生長於熱帶氣候的食蟲植物[1]，熱帶地區高溫 and 大量雨水沖刷，導致土壤貧瘠且氮素含量低，而此種植物能通過引誘、捕食、消化昆蟲獲取額外氮素，獲取蛋白質生成的來源。目前有許多捕蟲籠的相關研究，其籠內液呈酸性，具有多種不同消化昆蟲的酵素，如：幾丁質分解酶、脂肪酶等[2][3]。豬籠草的莖、葉和捕蟲籠以及何種溶劑萃取物可達最好萃取效果與藥用價值仍尚不清楚。西番蓮果原產於南美洲巴西，廣泛分布於熱帶地區。因具有多種水果的香味，而又被譽為「果汁之王」，西番蓮具有重要的營養價值與藥用價值[4]，內含酚類化合物、有機酸以及生物鹼[5]，亦被證實服用能抗憂鬱和抗焦慮，保健以及藥用價值不容小覷，而保護這些營養物質的果殼，是存在什麼樣的物質可以抵禦外來的蟲害或是細菌的侵襲，這使人很感興趣，找尋了目前台灣市面上比較普及並較常選購的三種西番蓮，分別是台農一號西番蓮、滿天星西番蓮以及黃金西番蓮進行實驗分析並加以探討其萃取物活性及潛在藥用的可能性。細菌抗藥性的問題日漸嚴重[6]，愈來愈多具抗藥性細菌疾病在動物及人類間傳染使得抗生素研發的重要性提高，而癌症的發生率也愈來愈高，抗癌藥物也需不斷的尋找與研發。植物為了捕獲昆蟲(如豬籠草)或吸引昆蟲授粉，常需接觸昆蟲而無法避免的與昆蟲身上的細菌交互作用，是否在這些植物上具有壓制細菌生長甚或癌細胞仍是許多研究的重點目標。目前有許多研究發現天然物作為替代療法[7][8]，並且根據萃取物找到可用的藥物。為了對抗自然環境，豬籠草及西番蓮似乎有一定的防禦機制、抗氧化活性可對抗細菌與癌細胞的效果。使用天然萃取物對抗癌細胞的優點是它們含有多種化合物，有機會以協同作用的方式多靶點的對抗癌細胞或細菌，成為多重用藥。天然化合物中許多有抗癌效果的物質屬於酚類化合物，這類化合物藉由細胞週期來抑制癌細胞的生長、複製和遷移。植物化學成分中有很高比例屬於多酚類化合物。藉由測試天然萃取物清除自由基能力、提供氫原子或電子或螯合金屬陽離子的能力和多酚的抗氧化活性可以判斷其如何對抗細胞中的氧化壓力，以探尋其藥用可行性。

3. 材料方法

3.1 品種：使用的豬籠草是 *Nepenthes miranda*(Nm)及西番蓮品種為台農一號(*Passiflora edulis* cv. Tainung No.1)(以 PT 代稱)：

台灣農試所鳳山熱帶園藝試驗分所以紫色種(*Passiflora edulis* Sims)為母本，黃色種(*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener)為父本的雜交後代選育出，具有自交親和性，故極易由蟲媒授粉即可結果，果實成熟時，果皮呈紅紫色，略為光滑，果實最大達 120 公克，平均果重 62.8 公克，果汁率高，果肉呈濃黃色，香味濃烈，酸度稍低，為目前台灣西番蓮主要栽培品種。

滿天星(以 PS 代稱)：

美國雜交優良品種，抗性很強，不擇土壤，生長速度很快，但是耐寒性差。滿天星西番蓮單果重量 150 克左右，比普通品種大幾倍，也叫蜜糖西番蓮，果甜而不酸、果香濃郁，果的外觀漂亮，是鮮賣加工兩用品種。

黃金(以 PG 代稱)：

果形為圓形，黃色或者金黃色，有臘質光澤，八成熟時甜度能達到 16 度，充分成熟後在 20 度以上，有濃香的芭樂味，但此種品種栽種較挑氣候，太冷的地方和太旱的地方，不太好種植。

(下圖由左至右分別為台農一號，滿天星以及黃金西番蓮)



3.2 化學藥品和細胞株

B16F10 鼠黑色素瘤細胞系獲自台灣新竹食品工業研究所。所有化學品均購自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)並且均為分析等級。

3.3 製備西番蓮果與豬籠草萃取液

新鮮西番蓮果殼切小塊，清水洗淨後冷凍乾燥，分別打碎後加入各溶劑萃取並過濾離心，取上清液凍至-20°C，待實驗時取出使用。豬籠草的葉、莖與籠分別切小塊，萃取方法亦同。

3.4 測定總酚 (TPC)

使用改良的 Folin-Ciocalteu 方法對 TPC 進行定量[9]。Folin-Ciocalteu 法中的福林酚試劑內含鉬酸鈉的黃色溶液，遇到酚類時會被還原成藍綠色，利用此顏色變化測定其總酚含量。取 80 μ L 萃取物與 720 μ L 去離子水混和，加入 80 μ L Folin-Ciocalteu 試劑及 800 μ L 7% Na_2CO_3 溶液，用去離子水稀釋至 2 mL，並混和均勻，30°C 反應 90 分鐘。以分光光度計測定波長 750 nm 之吸光值。以沒食子酸 (Gallic acid) 當標準品做標準曲線測定。

3.5 測定總類黃酮(TFC)

利用氯化鋁比色法對 TFC 進行定量[10]。因黃酮化合物於鹼性條件下可與硝酸鋁形成穩定的紅色錯合物，利用此性質可以透過顏色變化測定其類黃酮含量。取 0.25 mL 萃取物與 1.125 mL 去離子水混和，加入 0.075 mL 5% NaNO_2 反應 6 分鐘，之後加入 0.15 mL 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，靜置 5 分鐘，最終加入 0.5 mL 的 1 M NaOH ，混和均勻。以分光光度計測定波長 510 nm 之吸光值。以槲皮素 (Quercetin) 當標準品做標準曲線測定。

3.6 測定抗氧化活性

使用 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 測定[11]。DPPH 自由基可溶於甲醇或乙醇溶液中，為一穩定的自由基，在波長 515 nm 下，呈現藍紫色強的吸光值。當一個抗氧化劑還原 DPPH 時，會形成 DPPH_2 ，此時顏色會變為黃色，而透過其變化可以瞭解其萃取物的抗氧化能力。取 200 μ L 10X DPPH + 1750 μ L 乙醇混和均勻，加入 50 μ L 萃取物，於室溫下混和均勻並避光，30 分鐘後，以分光光度計測定位於波長 517 nm 之吸光值。

3.7 測定抑菌活性

(1)孔洞擴散法：抑菌圈抑菌活性使用革蘭氏陽性與陰性菌各一(大腸桿菌以及金黃色葡萄球菌)。每個孔的直徑為 6 mm，每個孔加入萃取物，放入培養箱中 37 °C 培養 10 小時後觀察抑菌情形。

(2)最小抑菌濃度(MIC)及最小殺菌濃度(MBC)測定:

細菌在 LB broth 中培養至指數期後將菌液稀釋至 10^8 CFU / mL，接種於含有萃取物之 LB broth 中，再置於 37 °C、160 rpm 培養

24 小時，以能抑制 90%細菌生長的濃度定義為最小抑菌濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。從 MIC 試驗結果的實驗組中分別取出 10 μ L 滴至 LB agar 上以 37 $^{\circ}$ C 培養 24 小時，並將沒有產生菌落的濃度定義為最小殺菌濃度 (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)。

3.8 台盼藍(Trypan blue)細胞毒性試驗

萃取物抗癌潛力透過台盼藍細胞毒性試驗評估[12]。B16F10 細胞 (1×10^4) 加入不同萃取液經過 24 小時，利用 trypan blue cytotoxicity assay 染色並觀察細胞外型改變，若產生藍色不透光則為細胞死亡。

3.9 傷口癒合試驗(wound healing assay)

將 B16F10 細胞在減少血清的培養基中培養 6 小時，用 200 μ L 的 pipette tip 畫出一條線作為傷口，並加入不同萃取物處理 24 小時，而後觀察其遷移能力[13]。

3.10 克隆形成試驗(Clonogenic formation assay)

克隆形成試驗用於評估 B16F10 細胞的生長[14]。將 B16F10 細胞以 10^3 個細胞/孔的密度接種到 6 well 中，並孵育 12 小時使其附著。經過不同萃取物處理後，培養 5-7 天，使克隆形成生長。用 PBS 洗滌後，用甲醇固定菌落並用 0.5% 結晶紫染色 20 分鐘，並在光學顯微鏡下計數菌落。抗增殖活性表示為抑制細胞生長 50% 的濃度 (IC 50)。

3.11 染色質凝聚試驗

用 Hoechst 33342 染色法檢測 B16F10 細胞的凋亡[15]。將 B16F10 細胞以 5×10^5 個細胞/孔的密度接種在 6 well 中，體積為 100 mL。使細胞貼附 16 小時。經過不同萃取物處理後，將細胞培養 24 小時。用 PBS 洗滌後，將細胞用 Hoechst 染料 (1 μ g/mL) 在黑暗中染色 10 分鐘，並用倒置熒光顯微鏡進行成像，激發波長為 360 nm，發射波長為 460 nm。凋亡指數的計算如下：凋亡指數 = 凋亡細胞數 / (凋亡細胞數 + 非凋亡細胞數)。

3.12 HPLC 分析

利用 HPLC 加以分析並改良其條件[16]。將萃取液稀釋後取 20 μ L 注射進 HPLC 機器中，設定流速 0.8 mL / min，流動相(A)1%甲酸(B)乙腈，一開始用 10% B 並使用梯度在 20 分鐘時獲得 25% B，在 25 分鐘時獲得 50% B，在 280,330 和 530 nm 處記錄色譜圖，並在 35 分鐘時將梯度拉回 10% B。

3.13 GC-MS 分析

進行 GC-MS 分析以確定樣品的分子組成。使用 Thermo Scientific TRACE 1300 氣相色譜儀和 Thermo Scientific ISQ 單四極桿質譜儀系

統分析過濾後的樣品。使用的色譜柱為 Rxi-5ms (30 m×0.25 mm 內徑×0.25µm 膜)。氮氣以 1 mL / min 的恆定流速用作載氣。oven 初始溫度為 40°C，並在此溫度下保持 3 分鐘；溫度以 10°C / min 的速度逐漸升至 300°C，並保持 1 分鐘。進樣口的溫度為 300°C，氮氣的流速為 1 mL / min。通過四極桿質量檢測器檢測從色譜柱中排出的化合物。離子通過電子電離方法產生。MS 四極桿和源極的溫度分別為 150 和 300°C，電子能量為 70 eV，檢測器溫度為 300°C，發射電流倍增器電壓為 1624 V，界面溫度為 300°C，並且質量範圍為 29 至 650 amu。通過峰面積歸一化方法確定每種化學成分的相對質量分數。通過將生成的光譜與 NIST 2011 和 Wiley 第 10 版質譜庫進行匹配來鑑定化合物。

4. 結果

4.1 豬籠草萃取物 TPC、TFC 和 DPPH 自由基清除測定分析

對豬籠草之萃取物進行了分析，TPC 和 TFC 的值顯示在表一中，TPC 的範圍從 Nm-pw 的 3.2 mg GAE/g 到 Nm-sa 的 17.0 mg GAE/g。TFC 的範圍從 Nm-pw 的 3.1 mg QUE / g 到 Nm-1a 的 66.5 mg QUE / g，並顯示由丙酮能萃取出最多含量的酚類及黃酮類。表二使用 DPPH 自由基清除法評估了不同 Nm 提取物的抗氧化活性，其結果顯示莖提取物 Nm-sa 具有最高的抗氧化能力，IC₅₀ 值為 56.2±1.8 µg/ mL。

Solvent	Leaves		Stems		Pitchers	
	TPC ^a	TFC ^b	TPC	TFC	TPC	TFC
Water	5.0	6.9	5.6	23.5	3.2	3.1
Methanol	10.9	29.7	14.0	64.9	11.3	28.0
Ethanol	10.8	42.9	12.7	66.0	7.8	32.0
Acetone	11.3	66.5	17.0	66.3	12.4	44.4

表一：豬籠草不同部位之萃取物的總酚(TPC)和總黃酮(TFC)含量

^a TPC (mg GAE/g). (即每克乾重等同於 mg GAE 的量)

^b TFC (mg QUE/g). (即每克乾重等同於 mg QUE 的量)

Solvent	IC ₅₀ (µg/mL)		
	Leaves	Stems	Pitchers
Methanol	93.4	62.8	140.8
Ethanol	117.3	85.0	193.6
Acetone	106.2	56.2	165.6

表二：利用 DPPH assay 豬籠草萃取物的抗氧化活性。豬籠草莖的丙酮萃取物有最高之抗氧化活性。

4.2 豬籠草萃取物抑菌活性

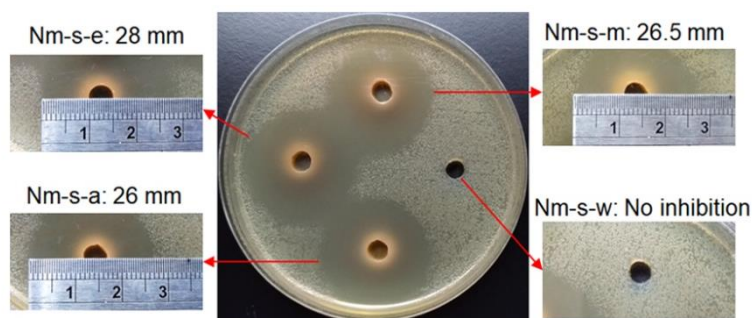
表三使用孔洞擴散法研究不同豬籠草之提取物的抑菌活性分析。使用甲醇、乙醇和丙酮之豬籠草萃取物表現出不同的抑菌活性，其抑制範圍為7.5-28 mm，並顯示豬籠草萃取物對於大腸桿菌的抑制效果優於金黃色葡萄球菌，又以莖的效果最佳。相較水的萃取物是沒有觀察到抑菌效果的。

Solvent	Zone of inhibition (mm)					
	Leaves		Stems		Pitchers	
	Ec ^a	Sa ^b	Ec	Sa	Ec	Sa
Water	No inhibition					
Methanol	19	9	26.5	13	14	7.5
Ethanol	19.5	9	28	14	14	8
Acetone	21	10	26	13	20	10

表三：豬籠草萃取物抑菌圈分析。豬籠草莖萃取物有良好的抑菌能力。

^a Ec, *E. coli*.

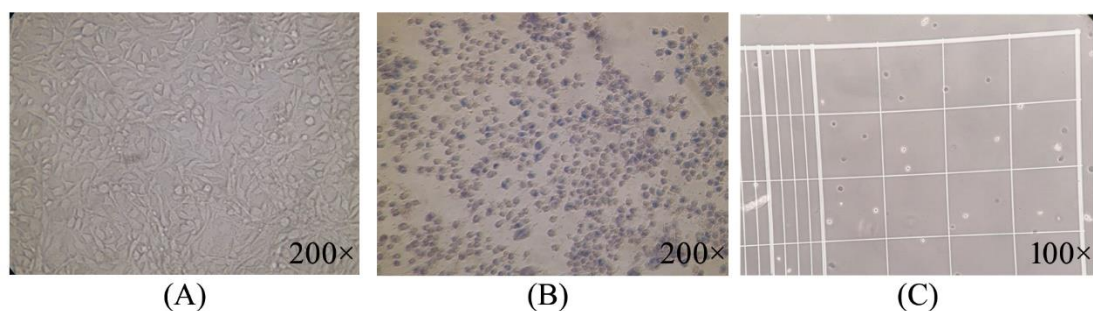
^b Sa, *S. aureus*.



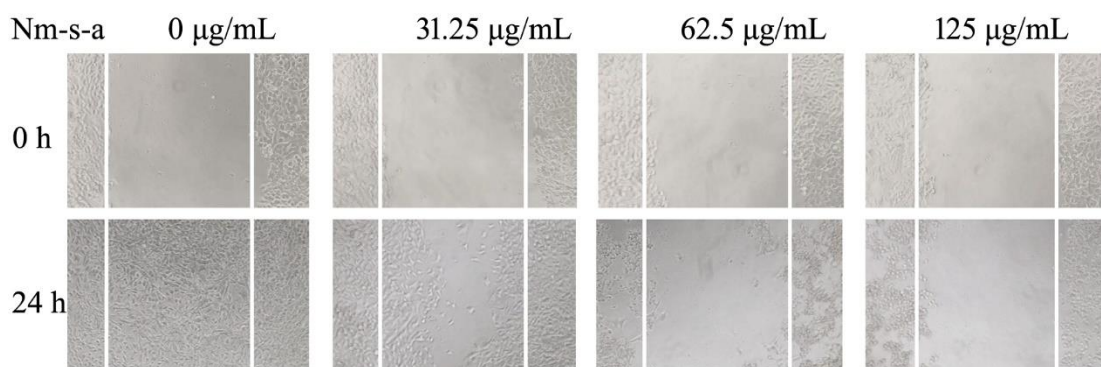
圖一：豬籠草莖萃取物抑菌圈。豬籠草莖(Nm-s)在甲醇(m)、乙醇(e)與丙酮(a)萃取物 2 mg 皆發現明顯抑制。水萃(w)則完全不抑制。

4.3 豬籠草萃取物抑癌能力

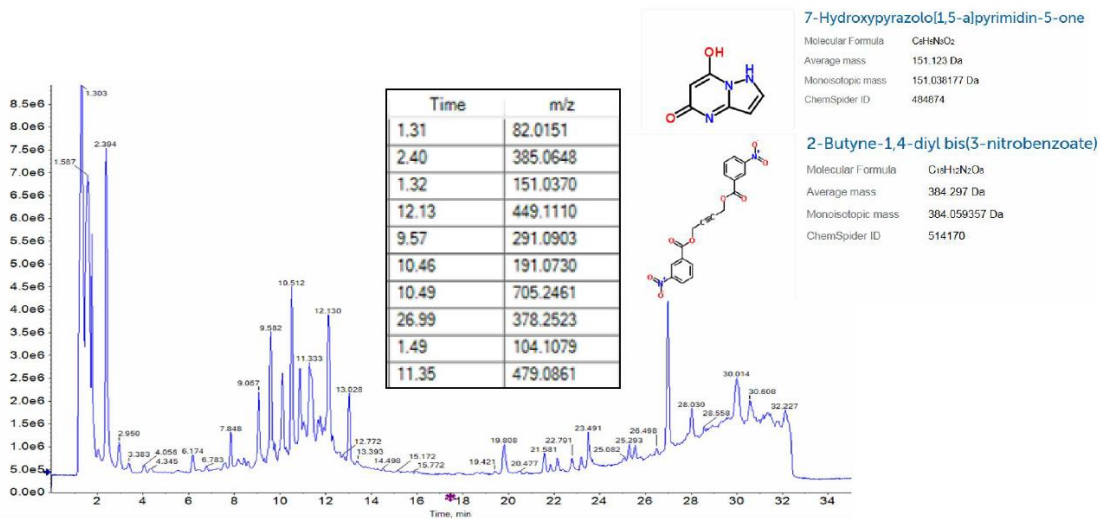
豬籠草萃取物對於抑癌作用尚不清楚，因此研究了存活率測試(圖二) 以及傷口癒合試驗(圖三)。圖二可以觀察到豬籠草莖丙酮萃取物(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 B16F10 細胞反應 24 小時發現細胞存活率低於 50%。圖三細胞加入豬籠草莖丙酮萃取物處理 24 小時後能明顯抑制黑色素瘤細胞的生長和遷移。對照組(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在 24 小時後細胞刮痕逐漸癒合，豬籠草莖丙酮萃取物(125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理後細胞遷移侵襲能力被抑制 99%。而經 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 豬籠草莖丙酮萃取物處理的細胞抑制亦有 96%。顯示豬籠草萃取物是具有抑制 B16F10 之效用。



圖二：台盼藍(trypan blue)染色細胞存活率測試。(A) 0 小時和 (B) 24 小時發現細胞存活率低於 50%。(C) 死細胞核會被染成深色。



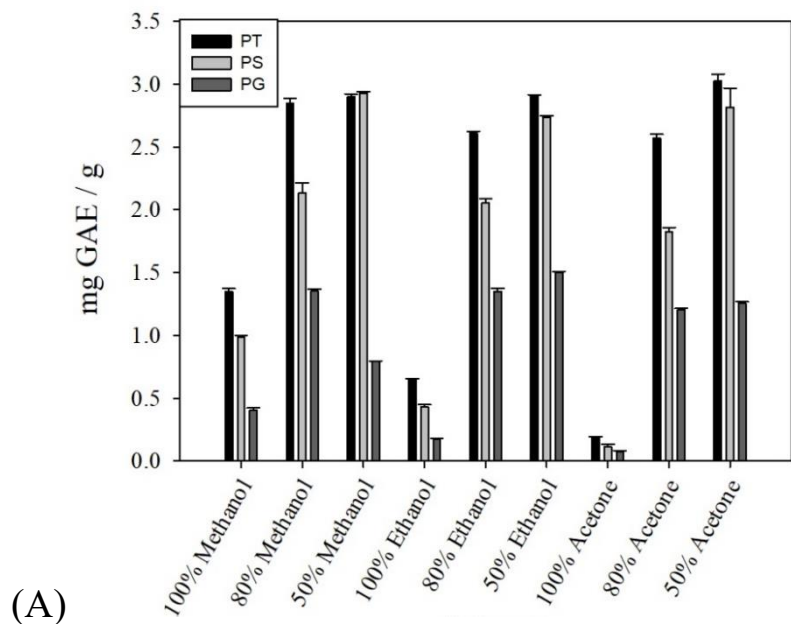
圖三：B16F10 細胞傷口癒合試驗實驗。



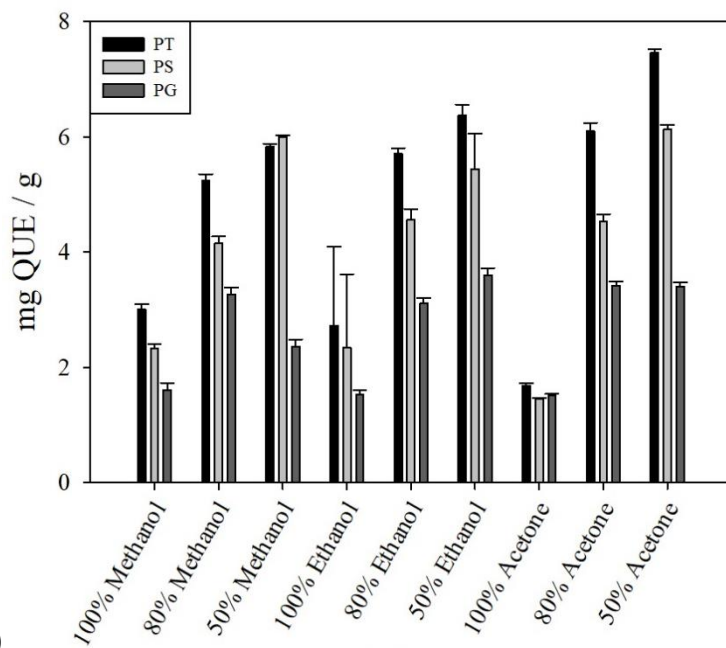
圖四：豬籠草萃取物的高壓液相層析/質譜分析。我們經由付費中興大學貴儀中心，得到相關可能的萃取內容物，並鎖定數個化合物進行抗菌抗癌細胞的實驗。另外我們亦已鎖定幾個原本就已知在植物萃取液中而豬籠草也有的化合物如 plumbagin, droserone, 5-O-methyl droserone, quercetin, kaempferol 進行加成協同試驗。

4.4 西番蓮萃取物 TPC、TFC 和 DPPH 自由基清除測定分析

由圖五顯示出不同有機溶劑萃取的情形。以品種而言台農一號的總酚及總黃酮含量最多，其次是滿天星，再來是黃金；以萃取效率而言其實三種有機溶劑的效果相仿，不過由先前初步實驗已知丙酮萃取物是含有抑菌功能的，所以選擇丙酮做為主要探討，而 50% 的有機溶劑萃取效率是最佳的，不過由於 50% 萃取會含有大量果膠，不利於日後實驗，因此使用 80% 丙酮萃取物，探討其抗氧化活性(表四)及抑菌能力(表五、六)。表四使用 DPPH 自由基清除法評估了西番蓮萃取物的抗氧化活性，並顯示台農一號以及滿天星皆有良好的抗氧化能力，其 IC_{50} 分別為 550.7 $\mu\text{g/mL}$ 和 647.3 $\mu\text{g/mL}$ 。



(A)



(B)

圖五:不同種西番蓮以不同有機溶劑萃取並測定其總酚含量(圖 A)和總黃酮含量(圖 B)

IC ₅₀ (μg/mL)			
Solvent	PT	PS	PG
80%Acetone	550.7	647.3	ND

表四:利用 DPPH assay 西番蓮萃取物的抗氧化活性。豬籠草莖的丙酮萃取物有最高之抗氧化活性。(ND = No Detected)

4.5 西番蓮萃取物抑菌活性

表五和表六顯示西番蓮萃取物有抑菌的能力，從抑菌圈(表五)中雖看不出對於哪種菌株有著較強的抑制效果，但從(表六)就可以發現西番蓮萃取物對於金黃色葡萄球菌的抑制效果較大腸桿菌好，而其中又以台農一號的萃取物效果最好(MIC 為 9.6 mg/mL)，而西番蓮萃取物的殺菌效果並不顯著，需要到達高濃度(50 mg/mL)的萃取物才顯示出殺菌效果。

Solvent	Zone of inhibition (mm)					
	PT		PS		PG	
	Ec	Sa	Ec	Sa	Ec	Sa
80%Acetone	11.5	11	9.5	10	8.5	8.5

表五：西番蓮萃取物抑菌圈分析

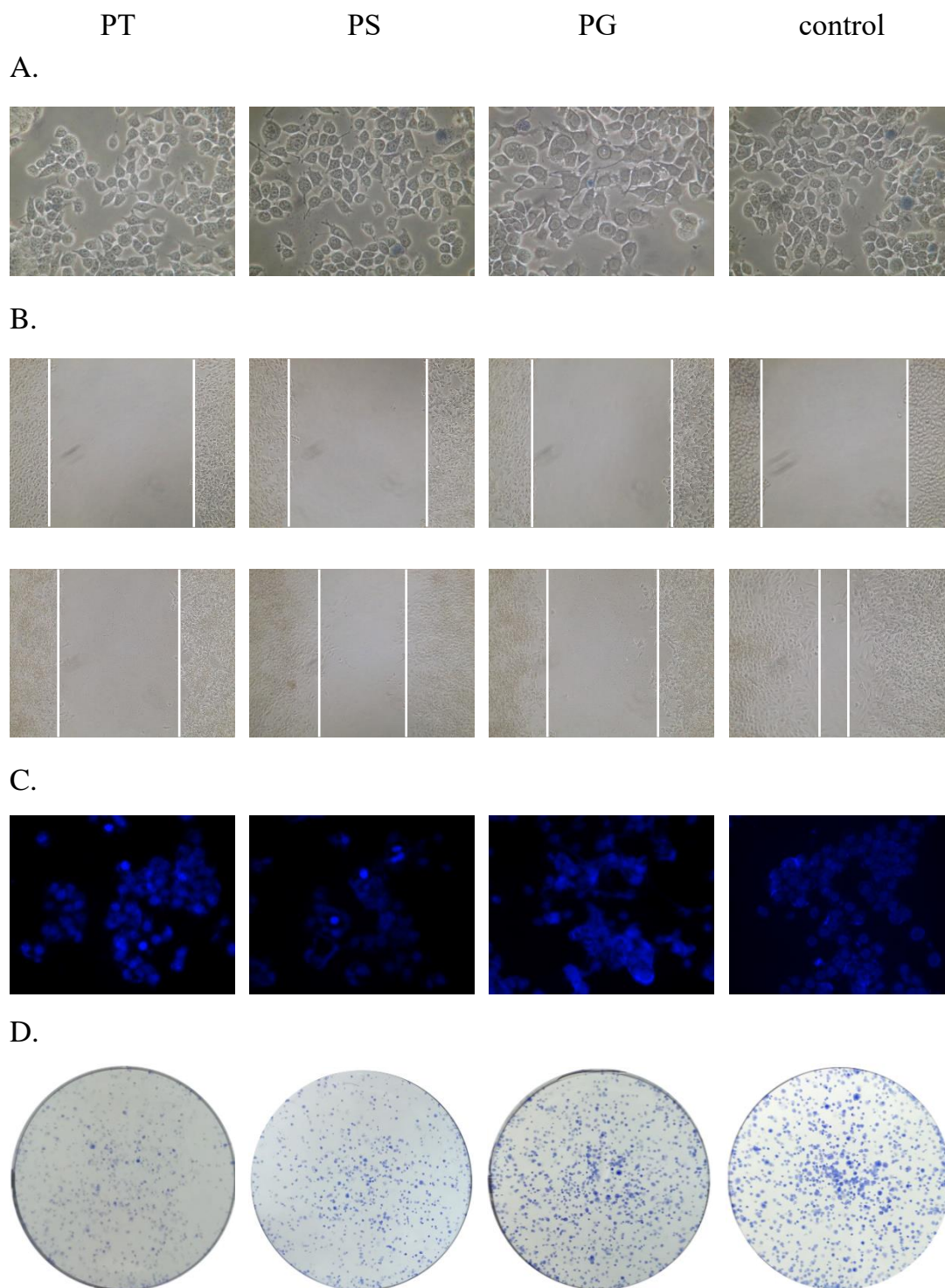
	mg/mL					
	PT		PS		PG	
	Ec	Sa	Ec	Sa	Ec	Sa
MIC	12.7	9.6	21.8	21.6	24.0	20.2
MBC	50	50	50	50	50	50

表六：西番蓮萃取物之 MIC、MBC

4.6 西番蓮萃取物抑癌能力試驗

由以上實驗顯示西番蓮萃取物具有一定的抗氧化活性以及抑菌能力，但對於其抑癌能力尚未知曉，因此我們研究了西番蓮萃取物對於黑色素瘤細胞的存活、遷移和增殖的毒性作用(圖六)。與 3 mg / mL 的萃取物一同培養的 B16F10 細胞顯示其萃取物對於細胞並沒有太大的毒殺能力 (<3%)(圖六 A)。另外，檢查了對核凝聚(區分凋亡細胞的過程)試驗(圖六 C)，沒有看到顯著的效果(凋亡率<12%)，而細胞增殖試驗(圖六 D)顯示西番蓮萃取物能夠些微的抑制細胞的增生，並由台農一號的效果最佳 (52.3%)，其餘的增生率分別為(PS : 73.7%, PG : 76.5%)。在相同濃度的萃取物作用之下，對於抑制細胞遷移能力有較顯著的效果(圖六 B)，其中又以台農一號最佳(抑制率為 83.6%)，而滿天星和黃金西番蓮也顯示有良好

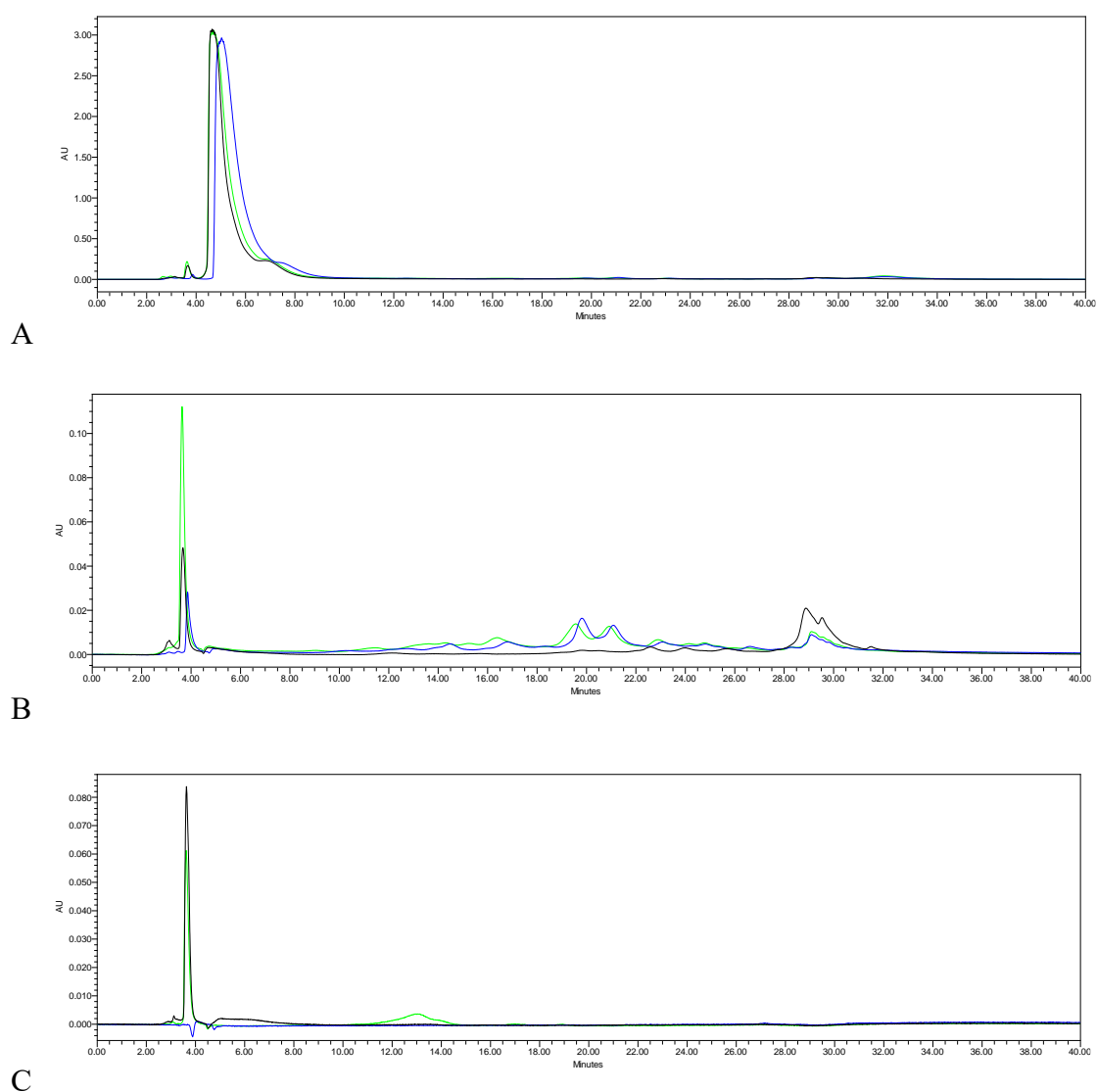
的抑制效果，其抑制率分別為 62.4%和 78.8%。由以上實驗顯示，西番蓮萃取物可能無法有效的毒殺癌細胞或誘導細胞凋亡，不過能抑制生殖以及遷移能力。



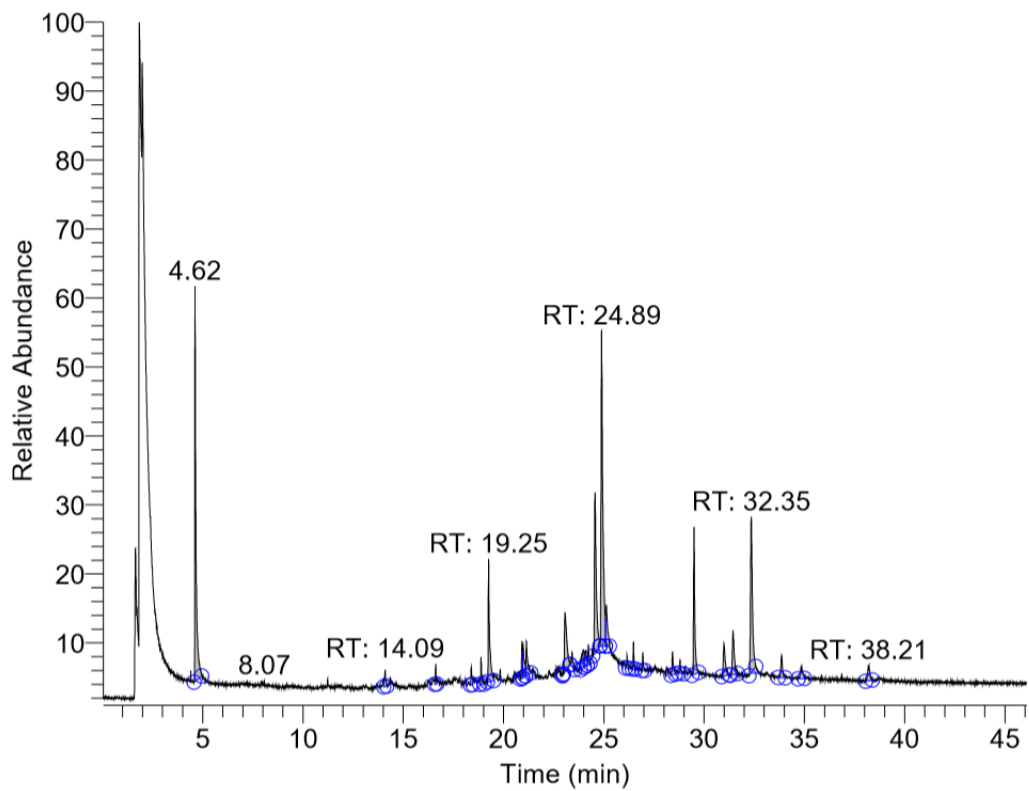
圖六:西番蓮抑癌活性。(A) 台盼藍(Trypan blue)細胞毒性試驗。(B)傷口癒合試驗(Wound healing)。(C)染色質凝聚試驗。(D)克隆形成試驗(Clonogenic formation assay)

4.7 西番蓮萃取物成分分析

上述實驗顯示西番蓮有著抗氧化、抑菌、抑癌的能力，我們想更進一步的找尋並探討其作用機制，因此先利用 HPLC 嘗試找尋一些可能的化合物(圖七)，並也發現在不同吸光下顯示出數個不同的波峰，確定存在著多種化合物的可能性，而後再利用 GC-MS 去確定其萃取物含有的成分(圖八)，其中發現萃取物含有 Diisobutyl phthalate, n-Hexadecanoic acid, Squalene, Vitamin E 等化合物，這或許就能解釋西番蓮萃取物為何含有抗氧化活性以及抑菌、抑癌等功效。



圖七: HPLC 圖譜(black : PT / green : PS / blue : PG)
(A 為 280 nm, B 為 330 nm, C 為 530 nm)



圖八:利用 80%丙酮萃取的西番蓮萃取物 GC-MS 質譜圖

5. 結論

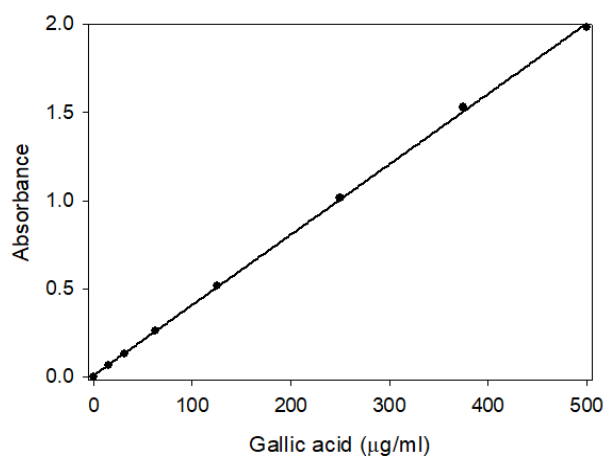
由天然物中取得數種化合物已達到同時擁有多個靶點攻擊抗藥性細菌亦或是癌細胞以產生療效，是目前盛行的研究方向，而本實驗也是透過此種概念去尋找並分析潛在藥效之天然萃取物。由表一至表三以及圖一至圖四的基本性質分析顯示豬籠草與各種萃取物富含多酚化合物，且具有良好的抗氧化能力，而抑菌能力及抑癌能力也極其顯著，尤其是從豬籠草莖萃取之物。已得到質譜數據找出可能有效之化合物加以驗證，並從中推敲分子機制。其餘的數據也顯示從西番蓮果殼萃取出具有抗氧化以及可以同時抑制革蘭氏陽性和陰性菌的物質，並透過抑癌活性測試可以得知其萃取物具有不殺死癌細胞，但可抑制其生殖和遷移能力，其中的作用機轉值得更深入的探討並加以分析其抑制途徑，亦可以透過分離和純化再將有效成分從萃取物中提煉，觀察是否有更好的藥效，或是可與其他化合物有協同作用以及藥物優化的可能性。

6. 文獻參考

1. Miguel, S., A. Hehn, and F. Bourgaud, *Nepenthes*: State of the art of an inspiring plant for biotechnologists. *J Biotechnol*, 2018. **265**: p. 109-115.
2. Higashi, S., et al., Analysis of feeding mechanism in a pitcher of *Nepenthes hybrida*. *Journal of Plant Research*, 1993. **106**(1): p. 47-54.
3. Rottloff, S., et al., Proteome analysis of digestive fluids in *Nepenthes* pitchers. *Ann Bot*, 2016. **117**(3): p. 479-95.
4. Miroddi, M., et al., *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *J Ethnopharmacol*, 2013. **150**(3): p. 791-804.
5. Song, Y., et al., Nutritional Composition and Antioxidant Properties of the Fruits of a Chinese Wild *Passiflora foetida*. *Molecules*, 2018. **23**(2).
6. Tommasi, R., et al., ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(8): p. 529-42.
7. Sunderam, V., et al., In-vitro antimicrobial and anticancer properties of green synthesized gold nanoparticles using *Anacardium occidentale* leaves extract. *Saudi J Biol Sci*, 2019. **26**(3): p. 455-459.
8. Herranz-Lopez, M., M. Losada-Echeberria, and E. Barrajon-Catalan, The Multitarget Activity of Natural Extracts on Cancer: Synergy and Xenohormesis. *Medicines (Basel)*, 2018. **6**(1).
9. Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in *Methods in Enzymology*. 1999, Academic Press. p. 152-178.
10. Chang, C.-C., et al., Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 2002. **10**(3).
11. Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 1995. **28**(1): p. 25-30.
12. Strober, W., Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
13. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2007. **2**(2): p. 329-33.
14. Chen, M.H., et al., Gene expression-based chemical genomics identifies potential therapeutic drugs in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2011.

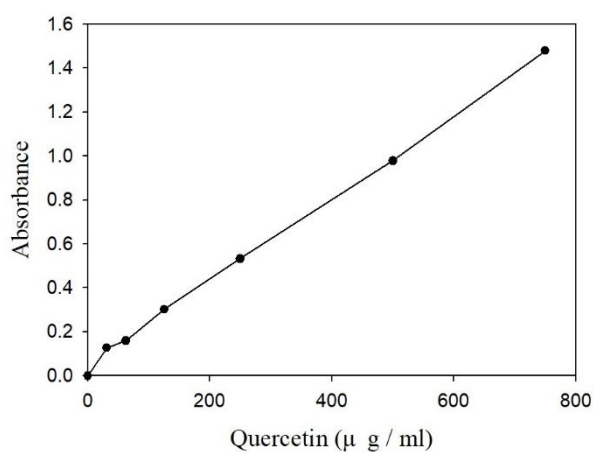
- 6(11): p. e27186.
15. Larsson, R. and P. Nygren, A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. *Anticancer Res*, 1989. **9**(4): p. 1111-9.
 16. Medina, S., et al., Quantification of phytoprostanes - bioactive oxylipins - and phenolic compounds of *Passiflora edulis* Sims shell using UHPLC-QqQ-MS/MS and LC-IT-DAD-MS/MS. *Food Chem*, 2017. **229**: p. 1-8.

7. 附錄



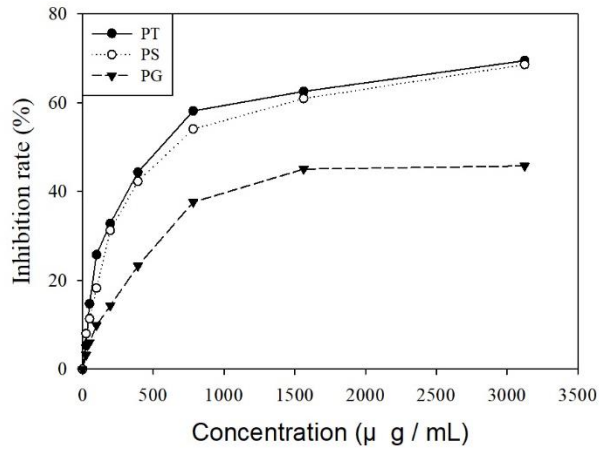
沒食子酸 (µg/mL)	500	375	250	125	62.5	31.25	15.625	0
吸光值	1.983	1.529	1.015	0.518	0.26	0.128	0.064	0

表一：總酚標準曲線



槲皮素濃 度(µg/mL)	750	500	250	125	62.5	31.25	0
吸光值	1.479	0.979	0.533	0.302	0.159	0.127	0

表二：總黃酮標準曲線



圖一:西番蓮萃取物 DPPH 自由基清除測定分析圖



圖二:西番蓮萃取物抑菌圈。左邊為萃取物添加示意圖，中間為大腸桿菌抑菌圈，右邊為金黃色葡萄球菌抑菌圈。

	PT	PS	PG
Ec			
Sa			

表三:西番蓮萃取物 MBC。數字 1 的格子所代表濃度 50 mg / mL 的萃取物並序列稀釋至數字 7 的格子(50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 15.625, 7.8125 mg / mL)，數字 8 的格子為 negative control (30%DMSO)，數字 9 的格子為 positive control (1 mM ampicillin)。