

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 洛神花花青素活化 iNOS/AMPK 促進 LOVO 腸癌細胞凋亡 \*  
\* 名稱 : 作用 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 林宜頡  
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-027-B  
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月  
指導教授： 王朝鐘

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 105年03月31日

## (一)中文摘要

近年來癌症死亡率逐年攀升，衛福部公布103年國人十大死因統計，每11分24秒就有1人死於癌症，較102年度的11分44秒又撥快20秒，代表現代人更應該去重視癌症的預防及形成的可能。癌症雖然成因複雜且目前還無法完全根治，透過化療等方式則可以延長患者的壽命並有效殺死癌細胞。但這些治療方式雖然有效但也有一定的副作用，對於大多數罹癌的老年人尤其是如此。所以目前尋找天然有效的化學物質來預防或治療的方法日益蓬勃發展。

本實驗室致力於研究如何利用中草藥達到抗癌的效果，之前的研究顯示洛神花等此類 HAs 及 Hibiscus polyphenol (HPE)會促進胃癌、肝癌、血癌、乳癌等細胞凋亡 (apoptosis)。其他文獻報導證實了洛神花花青素 (anthocyanin)具有抗氧化之活性，能夠降低血脂肪、預防動脈粥狀硬化甚至是防癌等療效。故此研究計畫主要探討 HAs 對於人類腸癌 LoVo 細胞之抗癌作用與其分子機制。

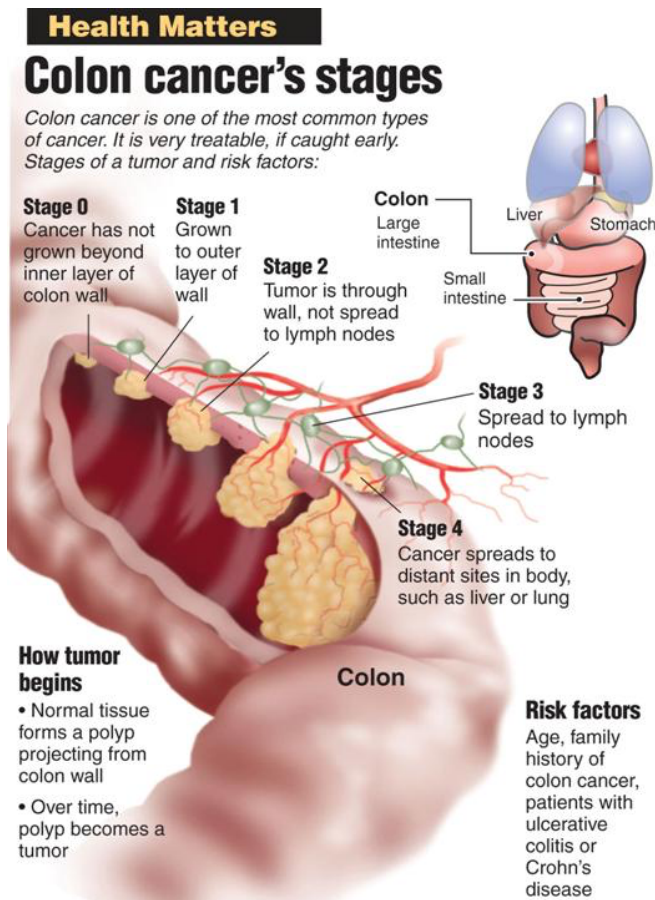
本研究透過細胞毒性試驗並利用 DAPI 染色、FACS、粒腺體膜變電位染色等方法。初步結果顯示洛神花花青素確實會透過AMPK/iNOS、RAS/PI3K訊號路徑引發人類腸癌LoVo細胞凋亡與延緩腸癌發展速度。實驗結果顯示洛神花花青素具有抑制腫瘤細胞增生的療效，盼未來應用在癌症預防上，並發展成治療上之用藥。

## **(二)Abstract**

**Colorectal cancer(CRC) is the third most common malignant cancer in Taiwanese. Anthocyanin exists widely in vegetables and fruit like as strawberry 、cherry and so on. As shown in previous studies that anthocyanin extracted from Hibiscus sabdariffa Linne (Hibiscus anthocyanin; HAs) was found to possess antioxidant and anti-carcinogenesis functions. The aim of our study is to explore the anti-cancer effect and the particular mechanism of HAs on LoVo cell line (human colon cancer cell). Detection of the molecular mechanisms of HAs' cytotoxicity in LoVo cell show that induced expressions of Fas, FasL activates Caspase-8. It simultaneously promotes extrinsic and intrinsic pathways. In extrinsic pathway, it activates Caspase-3,6,7 to induce apoptosis. On the side, in intrinsic pathway that Bid promotes mitochondrial death pathway and releasing of Cytochrome C. Besides the releasing of Cytochrome C from the intramembrane space, the intramembrane concent contains apoptosis inducing factor (AIF) to facilitate DNA fragmentation. Our results suggest that HAs possibly can be a new therapeutic strategy in human colorectal cancer.**

### (三)文獻回顧與探討

#### 1. 大腸癌 Colorectal cancer(CRC)



大腸是人體消化系統的器官之一。大腸的功能主要是吸收食物殘渣剩餘的水分和電解質，並形成糞便（feces），直到大腸蠕動才會排出體外。

大腸主要可以分為盲腸、升結直腸、橫結直腸、降結直腸、乙狀結腸以及直腸，而最常發生癌症的部分是直腸和乙狀結腸，所以又可以稱作為結直腸癌。

然而，先前的研究顯示大腸癌的成因目前主要分為三大類：(1)大約65~85%屬於非遺傳性偶發大腸癌，例如高脂肪、低纖維食物以及菸酒都會造成腸壁組

織發炎產生瘻肉（polyp）。一開始可能是良性腺瘤性瘻肉

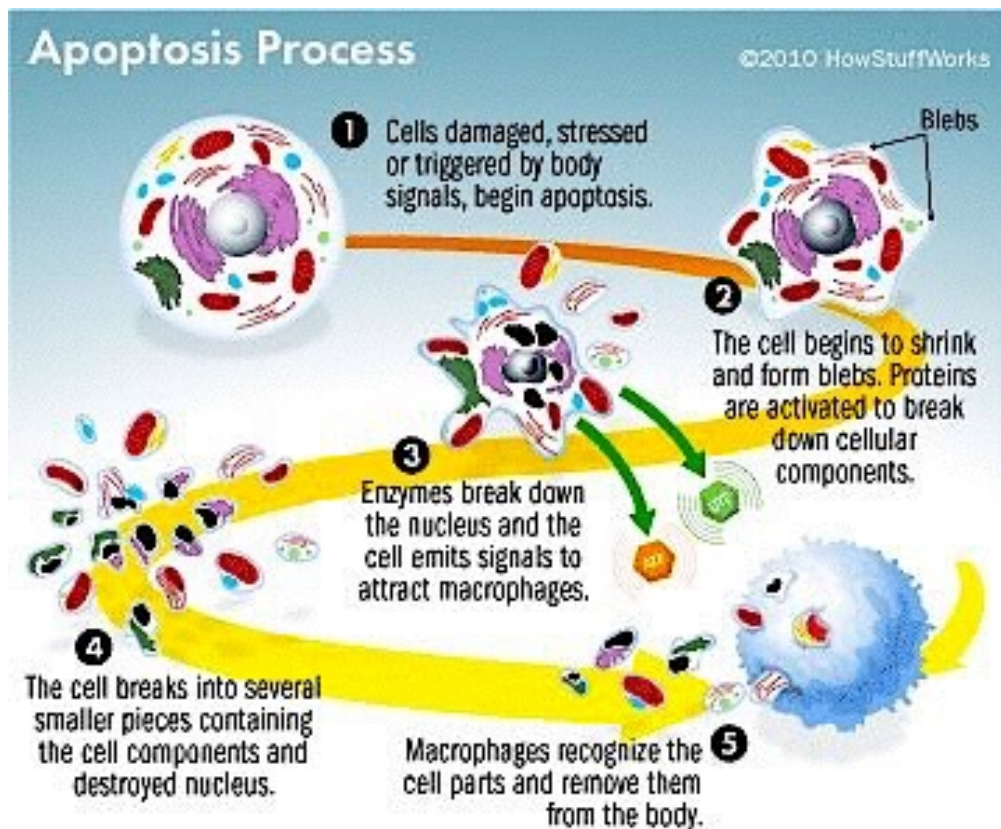
（Adenomatous polyp），而隨著時間瘻肉越大就愈有機會就形成腫瘤（tumor）。(2)約有10~30%是家族史，腸癌患者的一等親家屬，會比沒有這樣家族史的人高出2~4倍的罹病率。所以，有家族病史者應更加定期篩檢。(3)另外有2~3%是家族性腺瘤性瘻肉症（FAP, Familial Adenomatous polyposis），這個是顯性遺傳疾病，通常在青春期後，大腸就會出現數量眾多個大大小小的瘻肉，大部分患者都會有APC基因的突變，而這些瘻肉會增生，細胞也會分化不良，最後變成腺癌。所以病人除了需要密切追蹤外，必要時要接受預防性大腸切除術。除此之外還有可能因為發炎性腸道疾病或其他不明原因導致大腸癌<sup>10</sup>。

而近年我國國人的十大癌症中，大腸癌是名列前茅，並且有文獻指出後期大腸癌的存活率大約10%左右，且預後不佳。本篇主要是想利用中草藥去觀察其對大腸癌增生的影響<sup>3</sup>。

## 2.細胞凋亡：

細胞凋亡（Apoptosis）是細胞內部主動進行的計畫性死（programmed death），細胞因應環境的刺激，接受特定的訊號後（FasL/Fas）所自行決定的死亡。

細胞凋亡是成熟生命體中正常且必須之現象，無論是動植物、組織（tissue）或器官（organ）的生長（growth）、分化（differentiation）或新陳代謝（metabolism）之過程中需要透過細胞凋亡來完成發育或維持正常生長。細胞凋亡還有另一項特殊使命，就是消滅對組織系統運作具有威脅性的細胞，例如DNA受損的細胞。而細胞凋亡的程序包含細胞型態萎縮（cell shrinkage）、細胞膜小泡（blebs）、染色質濃縮（chromatin condensation）、DNA斷裂（DNA fragmentation）、粒線體膜電位去極化（depolarization）、細胞膜構造改變PS（phosphatidylserine）外翻(eversive)、細胞凋亡小體（apoptosis bodies）產生等等，並吸引鄰近細胞來吞噬。然而細胞進程序性凋亡整個過程當中，細胞膜均保有其完整性，因此不會有細胞壞死般的發炎情形發生。



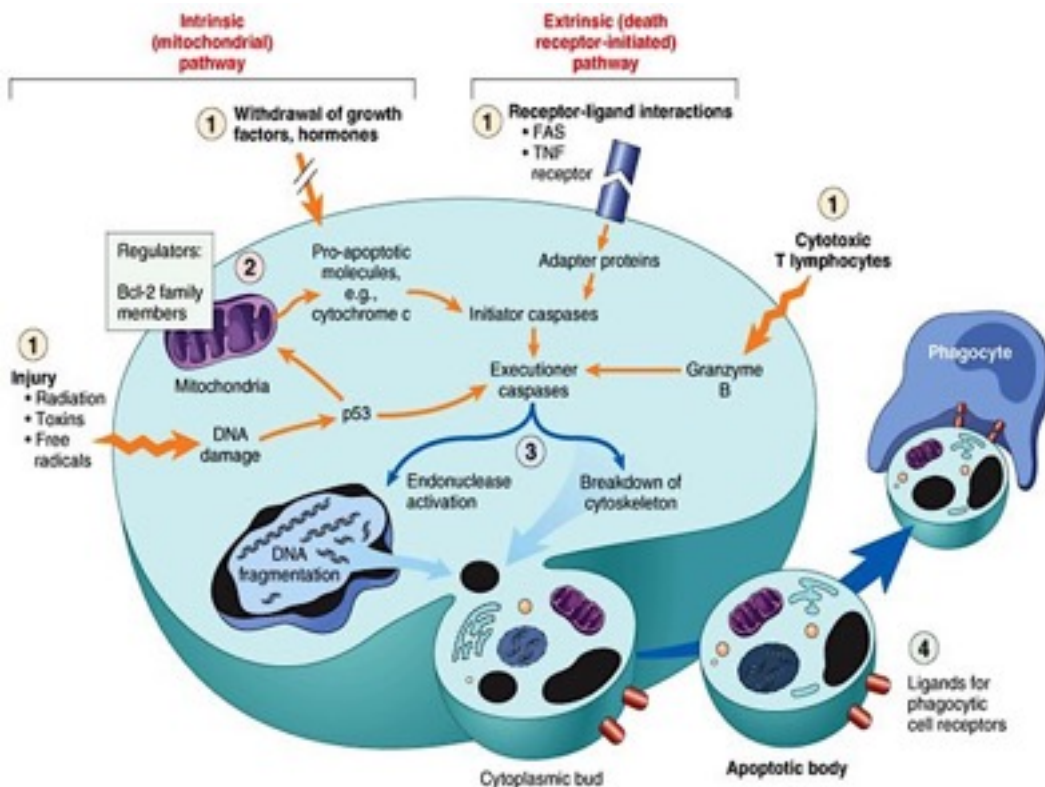
細胞凋亡的過程主要涉及兩大訊息傳遞途徑 (apoptotic signals transduction pathway)。

(1)外源性傳導路徑(death receptor pathway)：

主要是死亡受器(death receptor) 的啟動或誘導細胞信號所形成的複合物直接刺激半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase)一即凋亡蛋白酶(caspase)的活化。

(2)內在傳導路徑(mitochondria associated pathway)：

即指透過粒線體所傳導之細胞凋亡路徑或壓力誘導途徑(stress-mediated pathway)，當粒腺體遭受到外界刺激破裂時，粒腺體會釋放細胞凋亡誘導因子 cytochrome c 等蛋白質。之後 apa f-1 (apoptotic protease-activating factor-1)、cytochrome c、dATP/ ATP 及 pro-caspase-9 結合形成凋亡複合體 (apoptosome) 後，形成活化態的 caspase-9，進而活化下游的 caspase-3,6,7 促進細胞凋亡。



而這兩條主要的細胞凋亡路徑彼此間相互影響。

而近年來都有相關研究顯示藉由天然中草藥誘導癌細胞apoptosis，作為可能的治療方向<sup>7,8,15</sup>。

### 3.洛神花(*Hibiscus sabdariffa* Linnaeus)與花青素(Anthocyanins)：

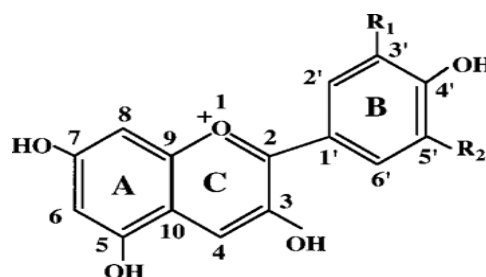
#### I. 洛神花(*Hibiscus sabdariffa* Linnaeus)



洛神花，學名為 *Hibiscus Sabdariffa* Linnaeus，又稱「洛神葵」、「洛濟葵」、「山茄」、「紅葵」，為錦葵科(Malvaceae)木槿屬的一年生灌木。在中國醫藥典籍上有記載著洛神花其相關功效，《新華本草綱要》：根、種子有利尿、強壯功能。花含棉花色素、槲皮素、木槿苷、檸檬酸、蘋果酸及生物鹼。洛神花主要分布在熱帶及亞熱帶地區，是植物界的「紅寶石」，每年的10~11月期間盛開，果期於秋冬間。洛神花的主要成份包含有機酸(例如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)；醣份主要為半乳糖、葡萄糖及果糖；Pectin 及類黃酮素，黃酮素包括有 hibiscetin、gossypetin、quercetin等。之前就有研究顯示，藉由體外實驗發現其萃取物有利尿、降膽固醇、降血壓及抗菌等作用。其成份類黃酮(Flavonoids)也具有抗氧化及抑制心血管疾病等效果；而原兒茶酸(Protocatechuic acid；PCA)可以增加穀胱甘肽(Glutathione；GSH)並抑制化學致癌物誘導之癌化作用。本實驗室也發現到洛神花中之 PCA 及花青素具有強效性抗氧化效果<sup>1,2,12</sup>。

#### II. 花青素(Anthocyanin)

花青素(anthocyanin)屬於生物類黃酮族(Bioflavonols)之天然色素，含類黃酮基本結構為黃酮醇的烷化物，是水溶性的植物色素，存在於植物之葉、花、果實及根莖，大多為具有鮮艷的顏色，也是一種天然的抗氧化劑。而花青素的顏色會隨著不同酸鹼性環境而改變，通常鹼性呈藍色、中性成紫色、酸性呈紅色，所以使葉子、花瓣能夠表現出各種不同的顏色。在草莓、葡萄及藍莓等植物果實內都含有豐富的花青素，故在這些植物中可以發現一些具有醣基的醣化 delphinidin 與 cyanidin 的存在。而近年有許多研究都證明花青素能抵抗和清除體內過多自由基，並會增強血管彈性、增加免疫系統、預防心血管疾病等。此外花青素也具有抗發炎及化學預防作用的功效。現



Name	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH3	OH
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH3	H
Malvidin	OCH3	OCH3

在更有學者發現花青素對於癌症有良好的治療作用，例如：誘導人類大腸癌細胞(HCT116 cells)凋亡等<sup>4,5,6</sup>。

#### 4. AMPK 絲氨酸/蘇氨酸激酶 (serine/ threonine kinase)：

為異三元體(heterotrimer)，包含催化性的  $\alpha$  (63KDa)和調節性的  $\beta$  (30KDa)、 $\gamma$  (37-63KDa) 三種次單位(subunit)。AMP- activated protein kinase(AMPK)之主要功能為細胞能量狀態的偵測器。AMPK活化之路徑包括：(1) 當細胞內能量缺失時 (AMP/ATP 比例上升、缺氧、局部缺血、飢餓、運動、葡萄糖缺乏等狀況)，AMP會與AMPK 結合，AMPK上游激酶 (AMPK kinase, LKB1)將AMPK threonine residue (Thr-172) 的位置磷酸化，進而活化了  $\alpha$  次單位，提升細胞內的能量，並抑制消耗 ATP的代謝路徑，例如脂肪和膽固醇的合成。(2) 細胞內能量充足時 (AMP/ATP 比例下降)，AMPK會失去活性，促進耗能的合成代謝路徑運作。因此AMPK 是細胞內重要的能量調控因子。

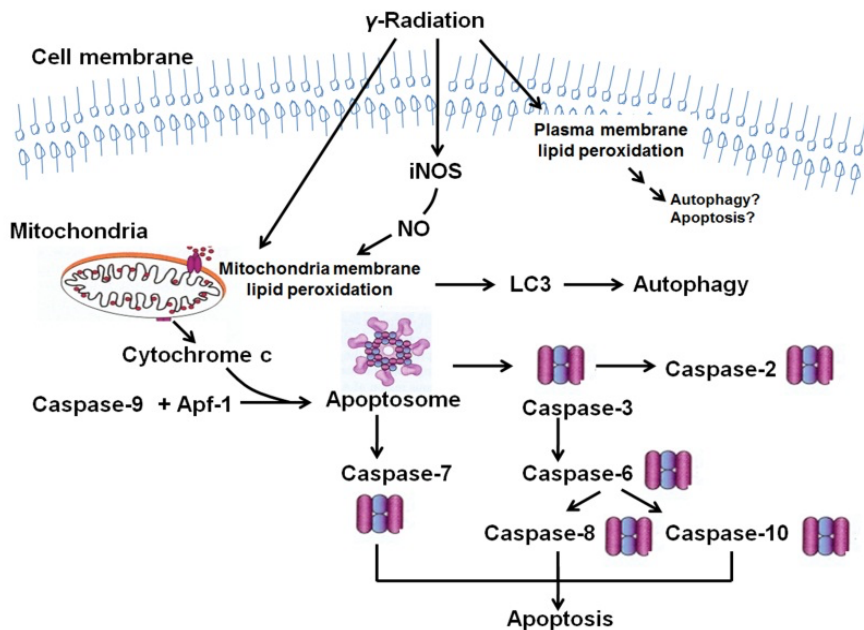
AMPK 另外可以調控許多不同功能，在脂質合成代謝方面，AMPK可經由磷酸化 FAS (fatty acid synthase)等酵素進而抑制脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成<sup>11 12</sup>。

最近有很多文獻指出調控AMPK和其下游蛋白Akt 等路徑會去抑制腸癌細胞增生<sup>17</sup>。

#### 5. iNOS：

iNOS分子量為 130 kDa，屬於 Calcium-independent NOS。iNOS 通常幾乎不表現，一旦有外在刺激就會產生高濃度的一氧化氮 (NO)，此反應可以維持數小時至數天。iNOS 所製造的NO可殺死致病源，但因為iNOS不需要鈣離子和調鈣蛋白(Calmodulin)即能活化，所以可能會產生過量的NO，反而導致組織損害及器官衰竭等現象。

而先前的研究則發現iNOS可以去促進apoptosis<sup>16</sup>。





#### (四)研究動機與目的

這幾十年來癌症一直蟬聯我國國人十大死因之首，而且發生人數持續上升，根據2015年衛福部統計，死於癌症的國人達4萬6094人，占死亡人數的28.3%；而十大癌症中，肺癌、肝癌、腸癌居前3位。另外在美國等西方國家中，腸癌亦是美國癌症死亡的第三大原因。因此，此研究便想以腸癌細胞來探討。

大腸癌的成因極為複雜，多半和飲食習慣、生活作息等密切有關。一般而言，多數的大腸癌患者並無家族病史，也不具有遺傳性。腸癌並非一朝一夕所產生，而是長時間、漸進式的慢慢形成。腸癌細胞大多藉由體內血液循環轉移到身體的其它部位，如肝、肺、腦等；也可以透過淋巴循環系統而轉移至附近的淋巴結(lymph node)。而腸癌前期的治癒率相當高，但大多不易察覺，因為大部分腸癌的症狀與其他良性的腸道疾病症狀很相似，所以有時很難去辨別，在台灣有許多病例都是因為末期的大腸癌所引起的腸阻塞或血便時才被發現，因為結直腸的內徑大，一般剛開始有腫瘤發生的時候症狀並不明顯。

然而許多相關研究都在探討天然草藥中的成分是否具有預防及治療疾病的功能。本實驗室所著重的化學預防研究顯示出洛神花萃取物 HAs 及 Hibiscus polyphenol (HPE)會誘導胃癌、肝癌、血癌、乳癌等細胞凋亡。另外，許多報告皆證實洛神花花青素具有抗氧化，降低體脂肪、預防動脈硬化化的效果。

現階段對於洛神花花青素的檢測主要是利用細胞毒性實驗、細胞染色、流式細胞儀以及粒腺體膜電位等方法觀察。目前的結果顯示洛神花花青素確實會去誘導人類結直腸癌細胞凋亡。盼此研究之初步結果對於日後保健食品、抗癌製藥開發及應用能有所貢獻。

## (五)研究方法與步驟

### 1. 洛神花花青素製備

先將乾燥的洛神花乙酸化甲醇(1% HCl)浸泡過夜，並利用萃取濃縮儀器所取得的濃縮液體，以浸泡在特殊分子篩 HP-20，接著用酸化甲醇洗滌，取上清液。取得的濃縮液再經由真空乾燥，所得的物質即為洛神花花青素萃取物。

### 2. 細胞毒性分析(Tetrazolium assay)

利用 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 黃色水溶性固體可被細胞內粒腺體(mitochondria)中的去氫酵素(dehydrogenase)代謝，將 tetrazolium ring 切斷還原呈紫色不溶性沈澱物 formazan (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl-formazan)堆積在細胞中，再以有機溶液溶解，並以 563 nm 測其吸光值(O.D.)。

因只有活細胞具有粒線體酵素，因此所測得的吸光值與細胞數量呈正比，便可判斷細胞的存活率。先以適當的細胞數將細胞分盤並待細胞貼壁，接著更換培養基加藥處理，製備 MTT (5 mg/ml)。移除加藥的培養基並置入含有 MTT(Methyl thiazolyl tetrazolium)的培養基等待細胞反應時間約兩小時，在移除含有 MTT 的培養基後，以有機溶液溶解紫色結晶，最後以 563 nm 測吸光值後得知細胞的存活率，並統計分析。

### 3. DAPI染色

DAPI 為一種可以穿透細胞膜的藍色螢光染劑，利用DAPI 螢光染色來觀察腸癌細胞發生細胞凋亡時其 chromatin 的變化。人類腸癌 LoVo 細胞(106 cells/mL)培養於含 3 mg/ml 洛神花花青素的培養基中，分別在 0、12、24、48小時或處理 24、48 小時不同濃度 1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml 後，以 PBS 沖洗細胞表層一至兩次後，以 4 % paraformaldehyde 室溫固定細胞 15~30 分鐘後再加入 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)染劑避光處理 30 分鐘，利用螢光顯微鏡觀察腸癌細胞是否出現 chromatin condensation、fragmentation的程度，藉以判定是否發生細胞凋亡現象。

### 4. 流式細胞儀分析 (flow cytometer, FACS)

利用壓力將待測細胞在鞘液的包圍下成單行排列，讓細胞依次通過雷射區，在雷射光 488 nm 的波長下會發出橘紅色的螢光。再依照細胞的不同特性而產生不同的螢光強度與光散射，在雷射光束垂直的 90°

位置收集紅色螢光訊號 ( 617 nm )，可偵測細胞中染上 PI 的 DNA 含量。目的是為了瞭解細胞凋亡與細胞週期之間的關係，利用 PI(propidium iodide)會與核酸(包含 DNA 及 RNA) 結合來確定細胞是否進行程序性凋亡。將 LoVo 細胞(106 cells/mL)培養 24 小時於不同濃度中，分別為 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml 收集。進行流式細胞儀分析前，再以 PBS 沖洗、離心，加入 propidium iodide 避光15 分鐘，上機前混合均勻樣品過 filter 以避免細胞顆粒過大阻塞儀器。最後置於冰上，以流式細胞分析儀(flow cytometer, FACS)測定並統計分析之。

#### 5. 粒腺體膜電位定量與定性

細胞在信息呼吸氧化過程中，所產生的能量以電化學位能儲存於粒線體膜內，稱為 mitochondrial membrane potential，並以此位能進行電子傳遞鏈，最終產生 ATP 以供細胞使用。許多親脂性的陽離子化合物會結合到粒線體內膜，在雷射激發光下放出螢光，利用此特性可以方便使用螢光顯微鏡來觀察粒線體的型態變化。JC-1 是一個很好的 potential-dependent 染劑，因為當粒腺體膜電位小於 100 mV 時會以 monomer 的形式存在於粒線體內膜，以 488 nm 激發光下會放出 525 nm (FL-1H in flow cytometry)的綠色螢光。膜電位弱勢逐漸高，JC-1 會聚集在粒線體內膜形成橘色的 J-aggregates (~590 nm, FL-2H)；而當膜電位逐漸下降時，JC-1 又會形成綠色螢光的 monomer 形式 (FL-1H)。利用顏色的變化來偵測粒線體的膜電位，可以更容易的對粒腺體膜電位做定性與定量的分析在流式細胞儀(flow cytometry)或螢光顯微鏡。將人類的腸癌細胞 LoVo (106 cells/mL) 培養於 48 小時不同濃度 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml，並以 PBS 沖洗細胞表層一至兩次，加入 JC-1 染劑後放入培養箱一小時，以螢光顯微鏡觀察粒腺體膜電位的變化。另外再將定量分析的測量在培養箱處理一小時後，以 1X Trypsin- EDTA 將細胞打下，再以 PBS 清洗後於冰上，以流式細胞分析儀(flow cytometer, FACS)測定並統計分析。

#### 6. western blot assay

先取 100  $\mu$ g 蛋白量的均質液，再加入等體積的 protein loading buffer 混合均勻，loading 至 10% SDS-PAGE，電泳完成後先將膠體取出並截去多餘部分，再以 4°C、400V 轉漬蛋白 3 小時，接著浸入含 5% nonfat milk powder 之 TBS-T buffer ( Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0.1% ) 於室溫下搖動 2 小時，加入一級抗體(iNOS/AMPK-P/RAS/FAS/ p53/AKT-P/Cyto C/Caspase family)反應 over night，再以 TBS-T 清洗

三次後，再二級抗體(anti-mouse/anti-rabbit)反應 1 小時，並以 TBS-T 清洗，再以 ECL 呈色系統處理後以 X-ray film 感光。

## 7. 統計分析

無論是試管外或是細胞實驗過程，每組試驗皆為獨立操作並重複三次以上，student's t-test 作統計分析，凡  $p < 0.05$  以下時表示為有意義的差異。

## (六)實驗結果

### 1. 成分分析：

首先，利用HPLC來偵測洛神花花青素(HAs)中的有效成分。Fig.1結果顯示出HAs的peak與Cyanidin和Delphinidin最為接近，而且在HAs中Cyanidin的含量為27%，而 Delphinidin的含量為69%，證明這兩者是洛神花花青素裡的主要成分。

### 2. 細胞毒性試驗（MTT assay）：

接著探討HAs是否會對腸癌細胞產生毒殺性作用。我們選用人類腸癌細胞LoVo作為實驗模式，以不同濃度(0,1,2,3 mg/ml)在不同時間點 (0,12,24,48h)中進行分析。從Fig.2得知，加藥處理24小時，最高濃度(3mg/ml)會達到半致死劑量(IC50)，因此我們決定加藥時間設定為24小時，並進行以下實驗。

### 3. 利用dose-dependent去觀察洛神花花青素(HAs)引起LoVo細胞型態之改變：

將LoVo細胞培養在37°C，不同濃度(0,1,2,3 mg/ml)之Has，作用24小時後，利用光學顯微鏡觀察期細胞型態及其存活狀態並利用DAPI staining染色觀察。Fig.3A顯示，隨著 HAs的濃度處理增加，發現其細胞存活率降低並呈現細胞型態萎縮(cell shrinkage)及類似凋亡小體的產生，而透過DAPI staining也發現細胞核濃染等凋亡現象。為了更進一步確認HAs在腸癌細胞LoVo中的凋亡現象，利用流式細胞儀觀察細胞內的 pro-apoptotic body之含量。將LoVo細胞在37°C，不同濃度 (0,1,2,3 mg/ml)之HAs作用24小時後，Fig3B發現其Sub-G1期的DNA含量由9.0%增加到25.05%，結果顯示有明顯的pro-apoptotic body產生，且具有dose-dependent之線性關係。

### 4. 利用time-dependent去觀察洛神花花青素(HAs)引起LoVo細胞型態之改變：

在最高濃度的HAs(3 mg/ml)加藥處理後並將LoVo細胞 培養在37°C，作用0,12,24,48小時後，利用光學顯微鏡觀察期細胞型態及其存活狀態並利用DAPI staining 染色觀察。Fig.4A顯示隨著加藥

處理時間增長，其細胞存活率跟著降低，並呈現細胞型態萎縮 (cell shrinkage) 及類似凋亡小體的產生，再透過DAPI staining中也發現，隨著加藥處理時間增加，細胞開始出現細胞核濃染等凋亡現象。同樣為了進一步確認HAs在腸癌細胞LoVo中之凋亡現象，故利用流式細胞儀觀察細胞內的pro-apoptotic body之含量。同樣以最高濃度(3 mg/ml)之加藥處理，將LoVo細胞培養在37°C，作用0, 12, 24, 48 小時後，Fig4B指出在作用不同時間點0, 12, 24, 48 小時後，培養48小時的細胞亦有大量的pro-apoptotic body的產生，細胞Sub-G1期的DNA含量由0.66%增加到41.7%，大約上升40%，並呈現 time-dependent之現象。

#### 5. 洛神花花青素(HAs)對腸癌細胞粒線體膜電位之影響：

粒線體在細胞凋亡中扮演極重要之角色，特別是膜蛋白或訊息傳遞物質的釋出，而粒線體上膜電位的改變及膜上傳遞通道的形成，被視為不可逆之細胞凋亡步驟。JC-1是一種具有穿透膜性的親脂性陽離子染劑，同時也是很好的potential-dependent染劑，可用來偵測粒線體之膜電位。我們將LoVo細胞培養在37°C，不同濃度(0,1,2,3 mg/ml)之HAs作用24小時後，Fig5A利用JC-1 staining，發現在LoVo細胞未經過HAs加藥處理時呈現紅色螢光，隨著加藥濃度的增加，紅色螢光逐漸轉變成綠色螢光。另外，再利用流式細胞儀分析JC-1的染劑強度做為粒線體膜電位之定量分析。Fig5B 顯示JC-1染劑的綠色吸收強度與未經加藥處理之對照組比較，綠色螢光強度由0.04%增加到77.56%。腸癌細胞LoVo在HAs的加藥處理下，造成粒線體的受損瓦解，並隨著dose-dependent之影響，去極化的情況更加明顯。此結果初步顯示，腸癌細胞可能是透過粒線體的細胞凋亡傳遞路徑來執行細胞的程序性死亡。

#### 6. 洛神花花青素對腸癌細胞之凋亡相關蛋白的表現：

利用西方點墨法探討HAs對於腸癌細胞之詳細凋亡機制。首先，以最高濃度的HAs(3 mg/ml)加藥處理，並將LoVo細胞培養在37°C作用0,12,24,36小時，觀察其蛋白表現量。Fig6A結果顯示，HAs會經由外在路徑刺激Fas/FasL受體之活化，並啟動一連串caspase family的反應，以及修補DNA功能的poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)有被切割活化之反應，進而促使細胞凋亡。而在Fig.6B觀察到在刺激Fas/ FasL接受器活化，也透過Bid切割活化成tBid,開啟一連串的粒線體死亡路徑並觀察到其下游蛋白AIF之表現量增

加，進而造成細胞凋亡。在Fig.6C中發現，抑制細胞凋亡的Bcl-2蛋白族群如:Bcl-2、Bcl-x1有明顯的下降。最後在Fig.6D發現到隨著HAs的濃度增加，其明顯會促進iNOS/P-AMPK的表現，相對會抑制Ras/P-AKT，所以推測HAs可能藉由調控這些蛋白所組成的pathway來促使細胞凋亡的發生。

#### 7. 洛神花花青素調控腸癌細胞內凋亡相關蛋白的路徑關係：

利用西方點墨法觀察蛋白量的改變，進而推測這些蛋白質的上下游關係。除了洛神花花青素之外，還加入了AMPK的抑制劑Compound C，它會抑制活化AMPK的上游蛋白。以最高濃度的HAs(3 mg/ml)加藥處理，並將LoVo細胞培養在37°C作用24小時，而在加藥的前一小時先加入Compound C(10  $\mu$  M)作用，藉由抑制P-AMPK去確認其他蛋白的相對關係。從Fig.7A可以發現，同時加入Compound C和HAs的P-AMPK表現量明顯比只加HAs的量還要來得低，而單純只加Compound C的P-AMPK表現量顯著的下降，證明其確實有達到抑制P-AMPK的效果，而iNOS的表現也隨之下降，證明抑制P-AMPK之後也會抑制iNOS，代表P-AMPK應該是在iNOS的上游。而Fig.7B則顯示抑制P-AMPK之後Ras/P-AKT和Foxo 3a的表現量相對上升，證明P-AMPK應該在Ras/P-AKT的上游。最後在Fig.7C也同樣發現加入Compound C之後會影響Fas-L、下游蛋白Caspase以及PARP、AIF的表現量，可以藉此推測HAs可能透過P-AMPK/iNOS/Ras/P-AKT這條路徑去調控外源性以及內生性細胞凋亡路徑(Apoptosis)，進而降低腸癌細胞LoVo cell生長。

## (七)討論

本實驗室長期研究發現洛神花的水萃物(HSE)中所含有的含有豐富的酚酸、類黃酮等物質可以預防心血管疾病、達到保肝等作用。而本實驗主要是利用HPLC去分析洛神花中可能的抗氧化物質，發現到花青素的濃度很高(Fig.1)。而在過去文獻中指出洛神花花青素(HAs)為天然強效之抗氧化物質，能有效清除體內自由基、增加免疫力。在活體系統當中，花青素透過其良好的抗氧化能力去降低蛋白質硝酸化的機率。在其他研究報導則指出藍莓、黑莓、桑椹、荷葉中的花青素也是提供有效抗氧化能力的主要成份<sup>3</sup>。在水果中的花青素或花青素衍生物，可以抑制腫瘤壞死因子(TNF)誘發發炎物質IL-8、MCP-1、ICAM-1的表現。另外在治療組織硬化症(systemic sclerosis)方面，花青素可以降低可溶性吸付因子之能力，進而抑制白血球吸付於內皮細胞，並調節發炎反應的發生<sup>4</sup>。在覆盆子之甲醇萃取物的動物實驗上發現其具有舒張動脈血管的功能。而在蔓越莓甲醇萃取物中發現其可以抑制K562血癌細胞株之增生。過去的研究也同時指出花青素可以經由阻斷細胞週期(cell cycle)的運作進而抑制動脈內皮癌細胞的增生。而在動物實驗(in vivo)上，也發現花青素確實可以抑制各種腫瘤的生長。本實驗則利用細胞毒性試驗(Fig.2)及細胞型態的改變(Fig.3~5)，證實了HAs會增加腸癌細胞對於藥物之敏感度。並透過western blot驗證HAs會透過AMPK、Akt/Ras訊號路徑促進LoVo腸癌細胞凋亡。實驗結果顯示，HAs會使細胞膜上死亡受體Fas/Fas-ligand的蛋白量增加(Fig.6)，而Fas與Fas ligand結合後會吸引FADD (Fas-associated protein with death domain) 並與Fas相互鍵結形成DISC，藉此促使procaspase-8與其結合，進而活化caspase-8及其下游蛋白，最後促使細胞進行一連串細胞凋亡的反應。另外HAs除了會誘導細胞走向凋亡途徑之外，從流式細胞儀的分析數據中發現，HAs會抑制細胞週期的進行，促使細胞週期停滯在G2/M時期(Fig.3B、4B)。根據先前研究指出，細胞中會造成G2/M phase停滯的機轉不只一種，但最後都是藉由抑制Cdc2的活性來達到G2/M phase的停滯作用。另外許多文獻報導當細胞接收到外來訊息(生長因子、賀爾蒙、藥物、神經傳導物質或是UV傷害)時，會透過一連串反應將訊號從細胞外傳遞到細胞核中，進而調節細胞內各種生理反應。而目前發現到HAs可能也經由P-AMPK/iNOS/Ras/P-AKT此路徑來促使細胞凋亡的發生，而其上下游關係則是利用western blot來驗證，藉由AMPK抑制劑Compound C進行實驗發現到一旦AMPK表現量下降，iNOS的表現也隨之降低；而Ras、P-Akt則相對上升，藉由表現量的改變推估此蛋白路徑的相對關係(Fig.8)。之後本實驗則希望透過動物模



式分析洛神花花青素或其中富含之有效成分進行實驗，觀察是否同樣具有預防癌症發生、抑制腫瘤生長之保健功效，並藉以評估是否進一步進行中草藥臨床試驗，進而提出在臨床用藥之參考數據，同時建立其相關參考資料。

## (八)參考文獻

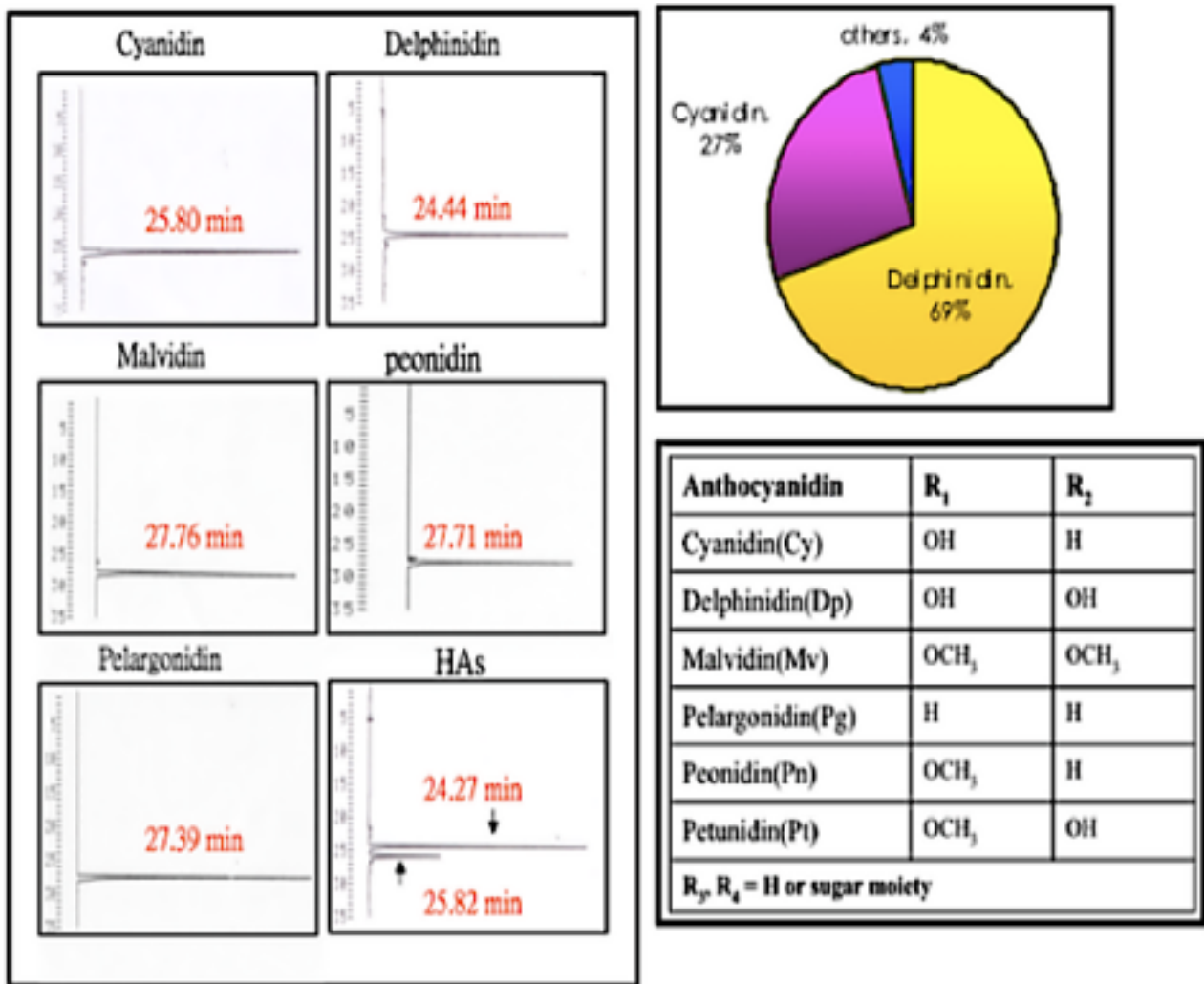
1. Lin HH, Chen JH, Kuo WH, Wang CJ. (2007) Chemopreventive properties of hibiscus sabdariffa L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chem Biol Interact.* 165(1), 59-75.
2. Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. (2005) Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 205(3), 201-212.
3. Hanna K. Sanoff, Daniel J. Sargent, Megan E. Campbell.(2008)Five-Year Data and Prognostic Factor Analysis of Oxaliplatin and Irinotecan Combinations for Advanced Colorectal Cancer: N9741.J *Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5721-7.
4. Messaoud C, Boussaid M. (2011) Myrtus communis berry color morphs: A comparative analysis of essential oils, fatty acids, phenolic compounds, and antioxidant activities. *Chem Biodivers*,8(2), 300-310
5. Chen CF, Li YD, Xu Z. (2010) Chemical principles and bioactivities of blueberry *Yao Xue Xue Bao.* 45(4), 422-449.
6. Hu QP, Xu JG. (2011) Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. *J Agric Food Chem.* 9, 59(5), 2026-2033
7. Wu CH, Yang MY, Chan KC, Chung PJ, Ou TT, Wang CJ. (2010) Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a nelumbo nucifera leaf flavonoid-rich extract in mice. *J Agric Food Chem* 58(11), 7075-7081.
8. Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, Hashida H, Takabayashi A, Sasaki M, Robine S, Itoh K, Yoshioka K,

Kakizaki F, Kitamura T, Oshima M, Taketo MM. (2011) Suppression of colon cancer metastasis by aesculetin through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell*. *Cancer Cell*, 19(1), 125-37.

9. Kao ES, Tseng TH, Lee HJ, Chan KC, Wang CJ. (2009) Anthocyanin extracted from *Hibiscus attenuate* oxidized LDL- mediated foam cell formation involving regulation of CD36 gene. *Chem Biol Interact*. 179(2-3), 212-218.
10. McCune LM, Kubota C, Stendell-Hollis NR, Thomson CA. (2011) Cherries and health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 51(1), 1-12.
11. Tabas I, Ron D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 13(3), 184-190.
12. Xie SQ, Li Q, Ma HX, Zhang YH, Wang JH, Zhao J, Wang CJ. (2010) Apoptotic mechanism of WJH-6, a novel polyamine conjugate, on K562 and HL-60 cells *Yao Xue Xue Bao*. 45(4), 451-455.
13. Yang Y, Liu H, Li Z, Zhao Z, Yip-Schneider M, Fan Q, Schmidt CM, Chiorean EG, Xie J, Cheng L, Chen JH, Zhang JT. (2011) Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers. *Int J Biochem Mol Biol*, 2(1), 89-98.
14. Chan KC, Ho HH, Peng CH, Lan KP, Lin MC, Chen HM, Wang CJ. (2010) Polyphenol-rich extract from mulberry leaf inhibits vascular smooth muscle cell proliferation involving upregulation of p53 and inhibition of cyclin-dependent kinase. *J Agric Food Chem*. 58(4), 2536-2542.
15. Bao-Xin-Zi Liu<sup>†</sup>, Jin-Yong Zhou<sup>†</sup>, Yu Li, Xi Zou, Jian Wu, Jun-Fei Gu, Jia-Rui Yuan, Bing-Jie Zhao, Liang Feng. (2014) Hederagenin from the leaves of ivy (*Hedera helix* L.) induces apoptosis in human LoVo colon cells through the mitochondrial pathway. *BMC Complement Altern Med*.

16. Juliann G. Kiang, Risaku Fukumoto and Nikolai V. Gorbunov. (2012) Lipid Peroxidation After Ionizing Irradiation Leads to Apoptosis and Autophagy. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*
17. Chiang EP, Tsai SY, Kuo YH, Pai MH, Chiu HL, Rodriguez RL. (2014) Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99631.

(九)實驗結果 附圖

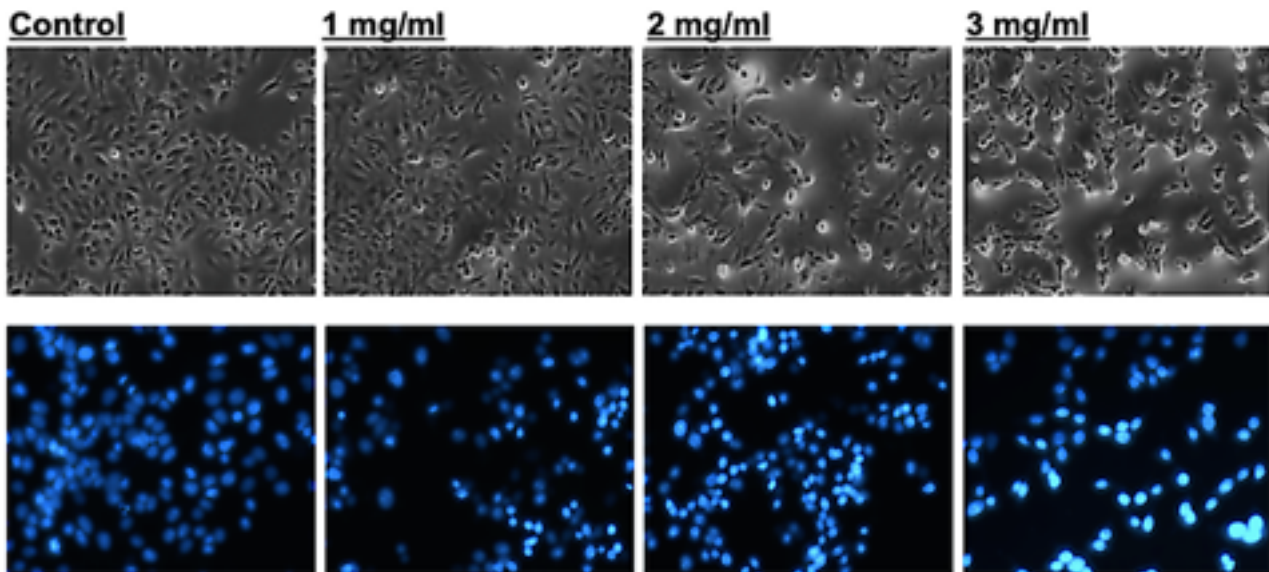


**Figure 1. The HPLC chromatogram of Hibiscus anthocyanin (HAs).**

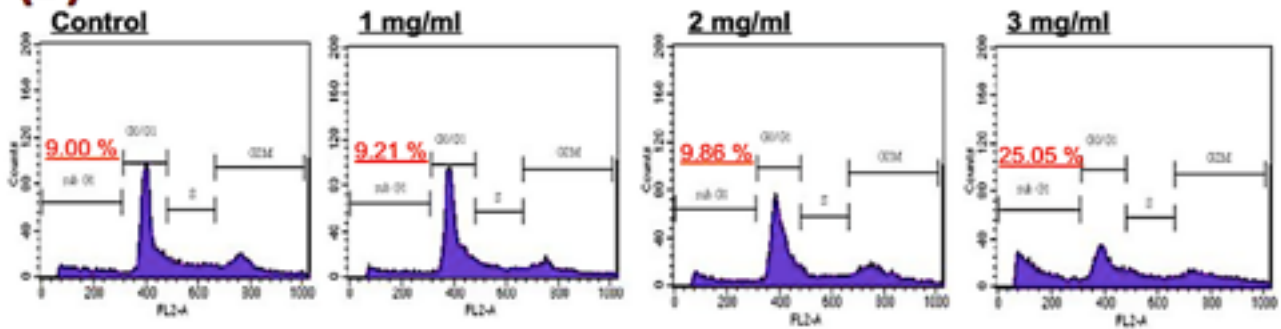
The peak of HAs are similar to the peak of Cyanidin and Delphinidin.

Therefore, this determines the main two elements of HAs are Cyanidin and Delphinidin, and each compose 27% and 65% respectively.

**(A)**



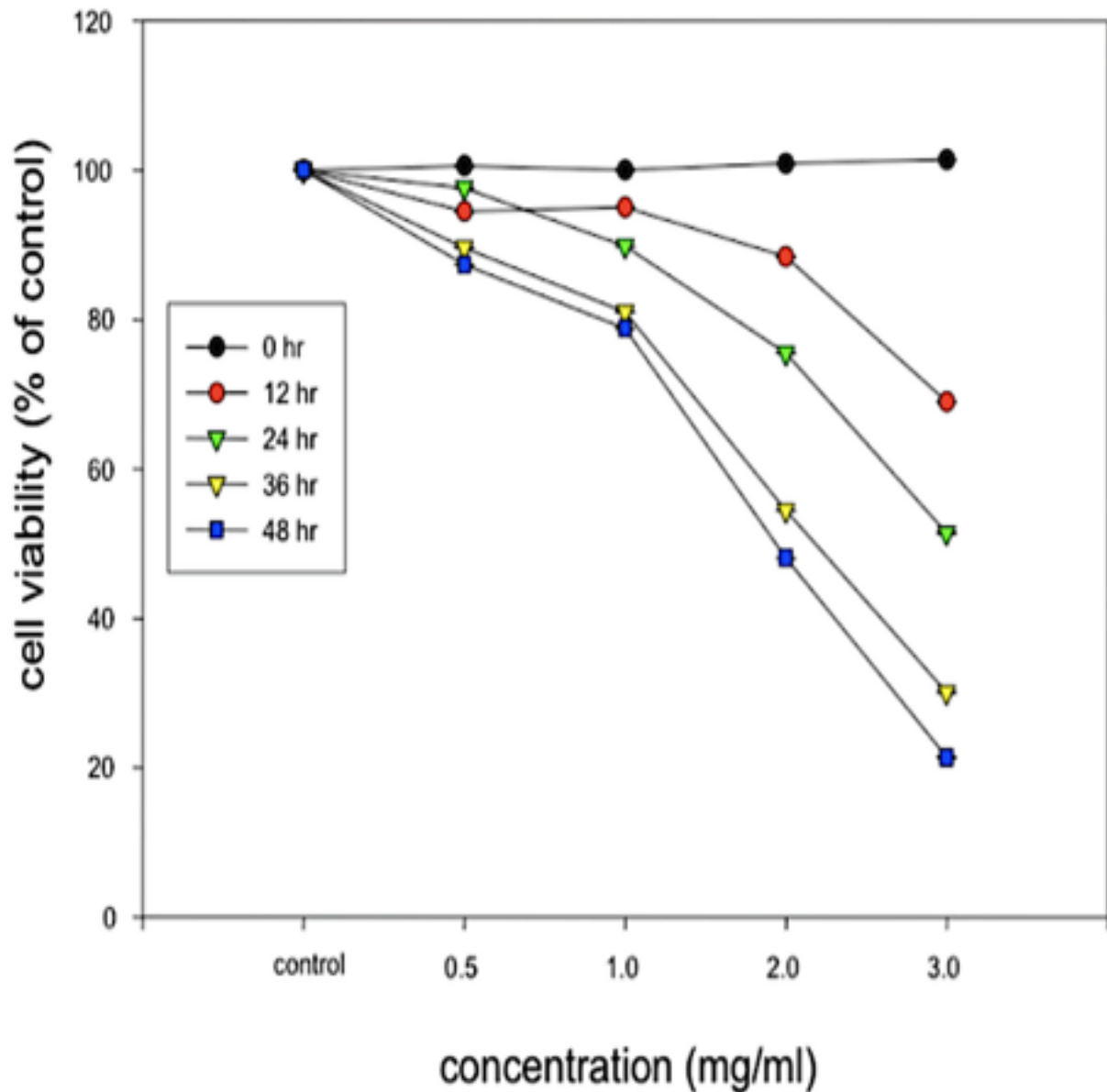
**(B)**



**Figure 2. Effect of HAs on human colon cancer cell line.**

LoVo cells incubated with different concentration HAs (0,1,2,3 mg/mL) in 37°C in different time (0.12.24.48h).

**Figure 3. Induction of apoptosis and cell progress in HAs treated LoVo cells in a dose-dependent manner.**



(A) LoVo cells were treated with HAs under different concentrations (0, 1, 2, and 3 mg/mL) for 24 h, and the apoptotic cells were assayed by DAPI staining.

(B) LoVo cells were treated with HAs under different concentrations (0, 1, 2, and 3 mg/mL) for 24 h. And the treatment of the apoptotic cells was analyzed by flow cytometry.

**Figure 4. Induction of apoptosis and cell progress in HAs treated LoVo cells in a time-dependent manner.**

(A) LoVo cells were treated with HAs with 3mg/mL for 0,12,24,48 h, and the apoptosis cells were assayed by DAPI staining.

(B) LoVo cells were treated with HAs with 3mg/mL for 0,12,24,48 h. And the treatment the apoptosis cells were analyzed by flow cytometry.

**Figure 5. Mitochondria membrane potential  $\Delta\Psi_m$  assessment of LoVo cells.**

(A) After 24 h HAs treatment by JC-1 staining. Changes in mitochondria membrane potential  $\Delta\Psi_m$  are indicated by changes in the red to green fluorescence ratio.

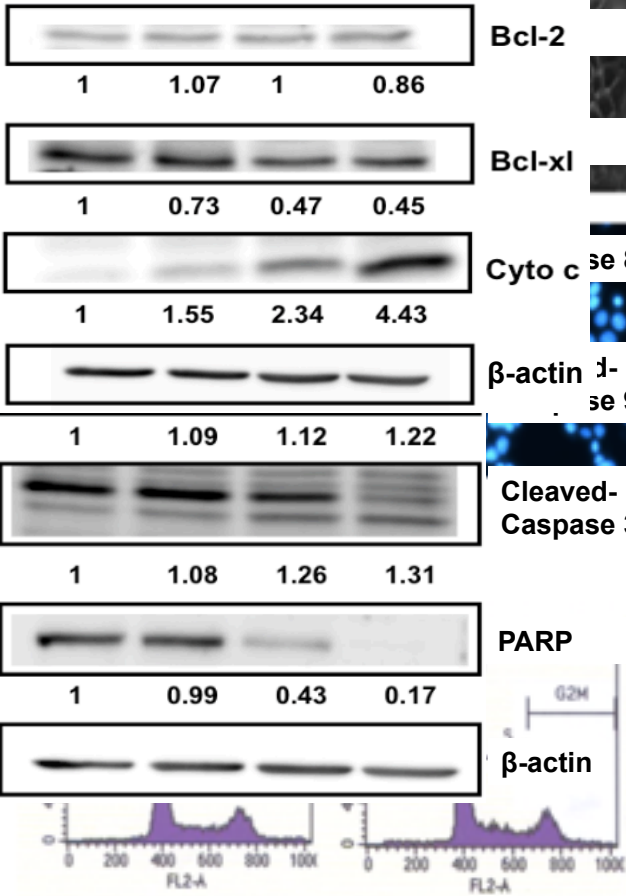
(B) Quantitative assessment of the percentage of LoVo cells in mitochondria membrane potential, as indicated by flow cytometry.



(A)  
(C)

HAs(3 mg/mL)

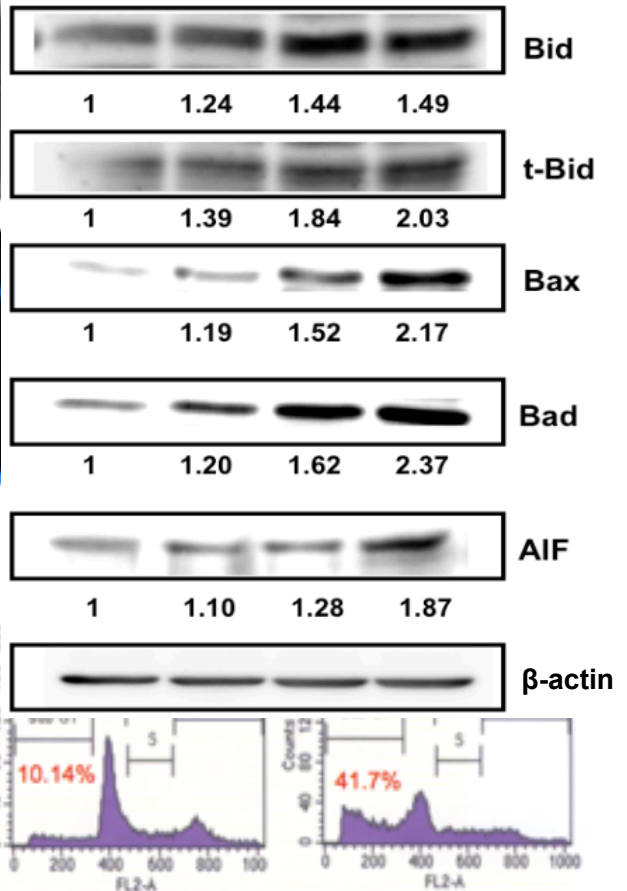
0 h 12 h 24 h 36 h



(B)

HAs(3 mg/mL)

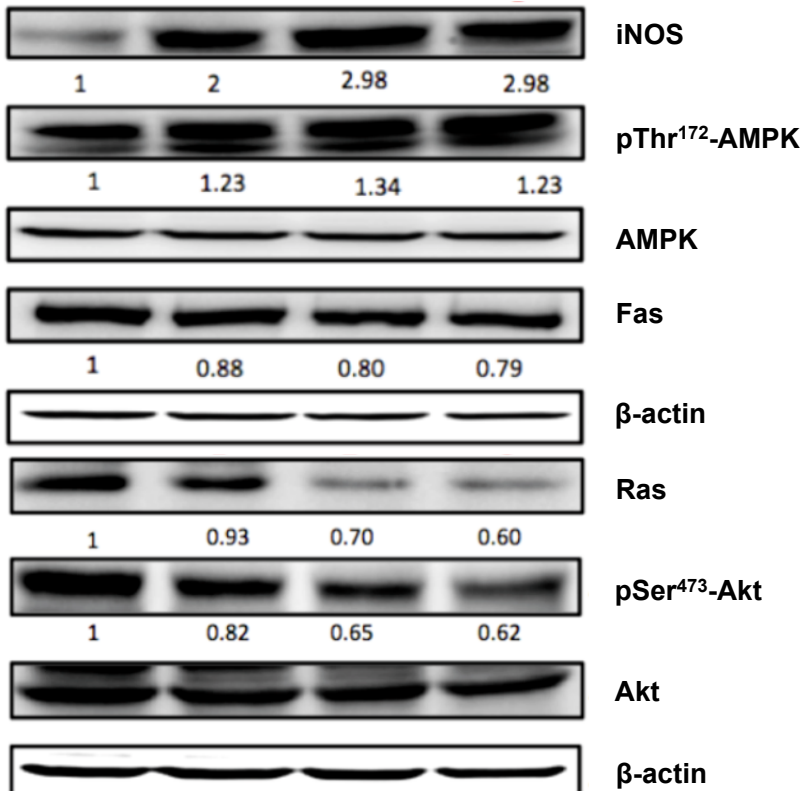
0 h 12 h 24 h 36 h

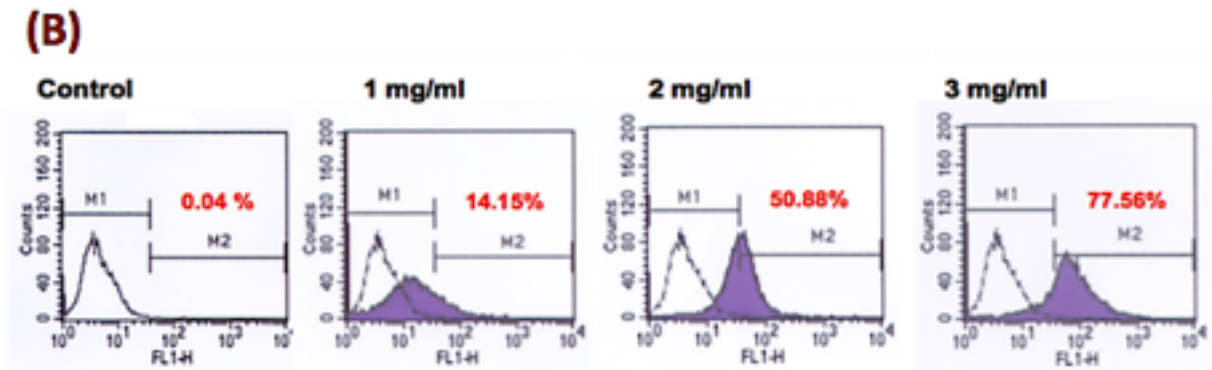
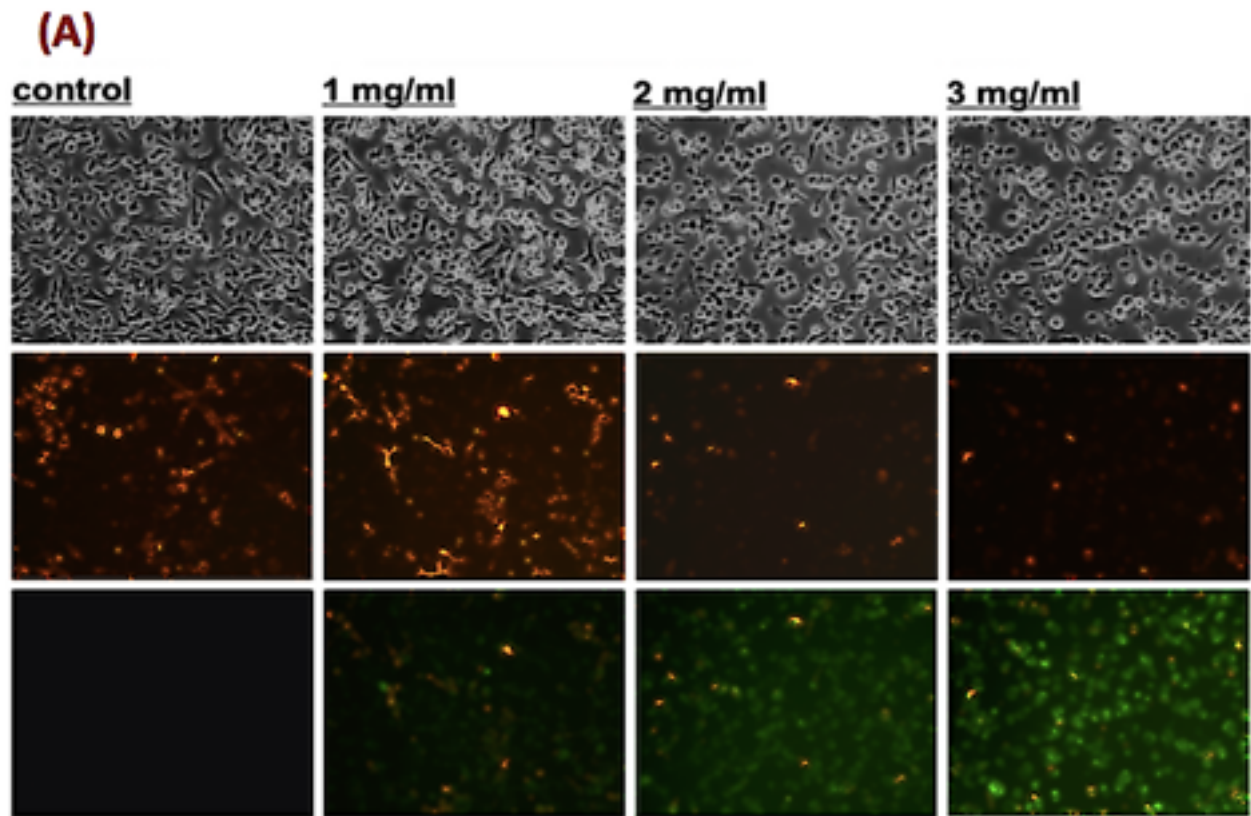


(D)

Control  
HAs  
(mg/mL)

+      -      -      -  
-      1      2      3



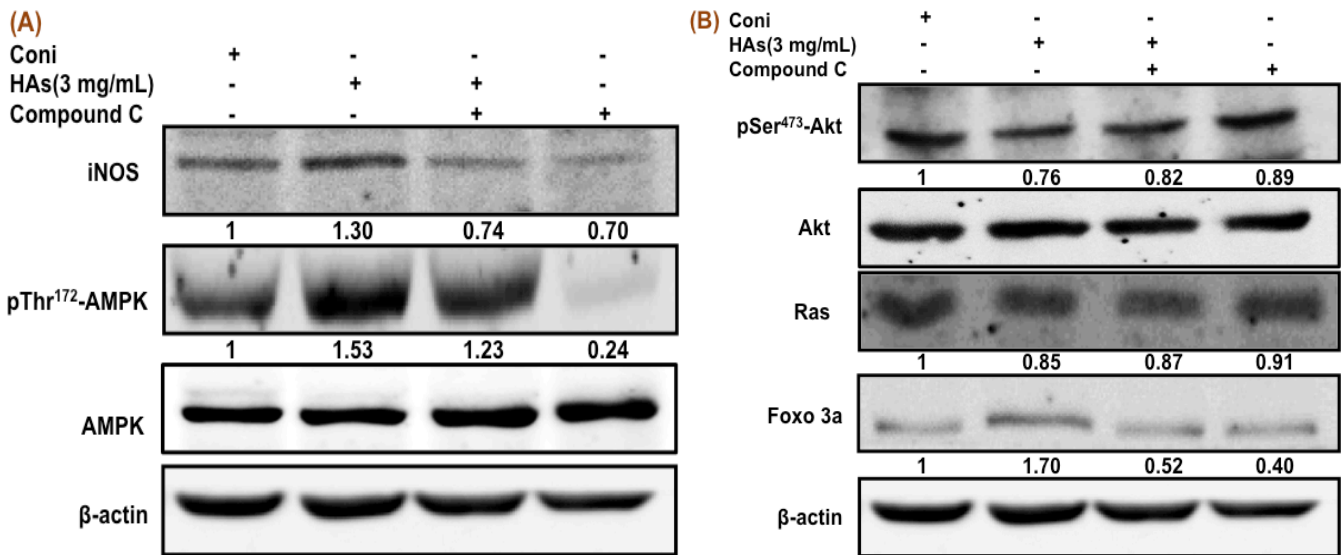


**Figure 6. Effects of HAs on the protein levels of apoptosis pathway in LoVo cells.**

(A) Immunoblot analysis of the expression of caspase family, and PARA in LoVo cells treated with HAs.

(B) Immunoblot analysis of the expression of pro-apoptotic protein in LoVo cells treated with HAs.

(C) Immunoblot analysis of the expression of Bcl-2, Bcl-xl, Cyto C in LoVo cells treated with HAs. Cultured cell were treated with HAs 3 mg/mL for 12 24 36 48 h.



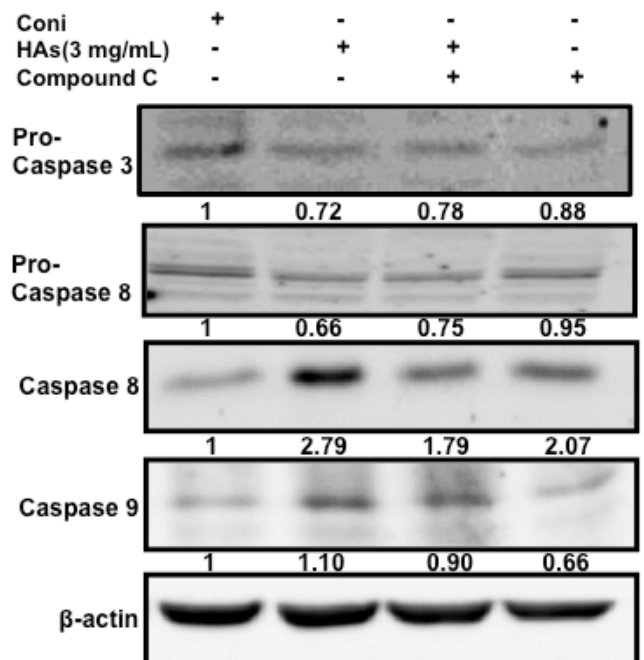
(D) Immunoblot analysis of the expression iNOS, P-AMPK, FAS and Ras/P-Akt in LoVo cells treated with HAs for 24 h.

**Figure 7. The downstream relations of apoptosis-associated protein expression in HAs treated LoVo cells.**

(A) Immunoblot analysis of the expression iNOS, P-AMPK in LoVo cells treated with HAs and Compound C.

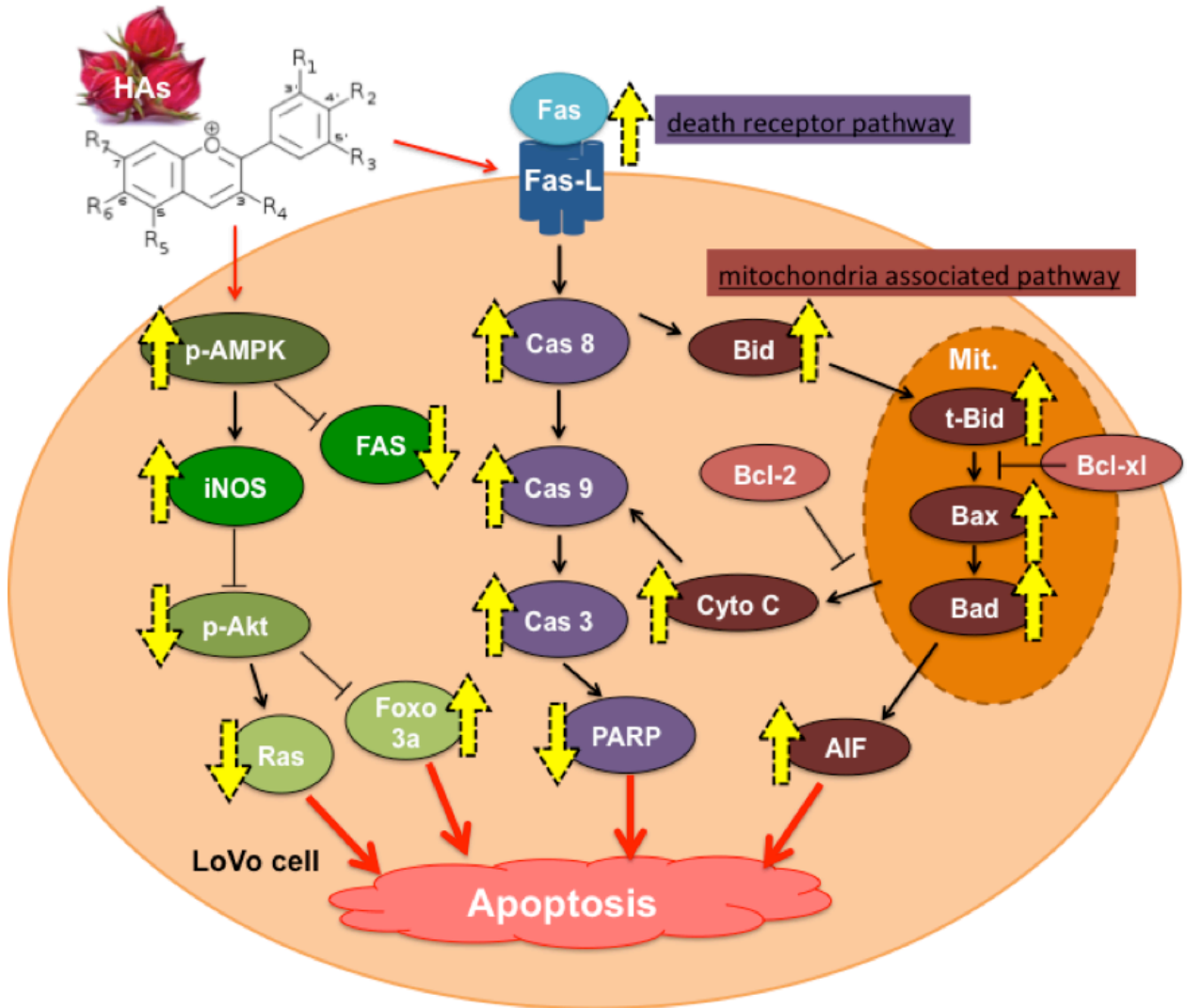
(B) Immunoblot analysis of the expression Ras, P-Akt and Foxo 3a in LoVo cells treated with HAs and Compound C.

(C) Immunoblot analysis of the expression Fas-L, PARP, AIF and caspase family in LoVo cells treated with



# HAs and Compound C.

Figure 8.



**(C)**

Coni	+	-	-	-
HAs(3 mg/mL)	-	+	+	-
Compound C	-	-	+	+

