

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫：洛神花花青素抑制脂肪合成?—促進腸癌 LOVO 細胞凋 *
* 名稱： 亡 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 蔡依凝
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-031-B
研究期間： 101年07月01日至102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，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化暨生物科技研究所

中華民國 102年03月29日

(一) 中文摘要

癌症預防已成為每一個人關心的議題，了解癌症的形成；預防癌症的發生，都成為現在人必備的知識。根據癌症登記年度統計顯示，大腸癌發生人數紀錄於95年（2006）時，首次超越肝癌，成為發生人數為最多的癌症，同年度已增至10,248人。其死亡人數自84年2,469人急升到96年的4,470人，「標準化死亡率」上升17%¹。癌症雖然無法完全根治，但可藉預防等方法來減少癌症發病率亦延緩癌症的發病時間。因此，尋找安全有效之化學預防及治療的方法日益蓬勃發展。

本實驗室致力於抗癌研究,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 (anthocyanins)具有抗氧化活性；能夠降低血脂肪；預防動脈粥狀硬化及防癌等療效。故此研究計畫擬探討 HAs 對於人類腸癌 LoVo 細胞之抗癌作用與其作用之分子機制。

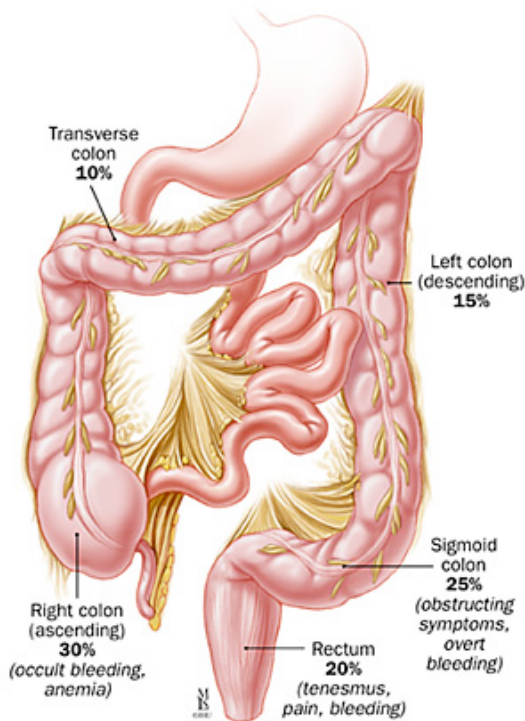
本研究已進行細胞毒性試驗並利用 DAPI 染色、FACS、粒腺體膜變電位染色等方法。初步結果顯示洛神花花青素確實會透過iNOS/AMPK訊號路徑及Ras/PI3K訊號路誘發人類腸癌細胞凋亡以及促進腸癌LoVo細胞凋亡與延緩腸癌發展速度。實驗結果顯示神花花青素具有抗腫瘤的療效，盼未來應用在化學預防上，並發展成治療癌症之用藥。

(二) Abstract

Colorectal cancer is the third most common malignant cancer in both men and women, and the second leading cause of cancer-related death in western developed countries. Anthocyanins exist widely in many vegetables and fruits. As shown in previous studies that anthocyanins extracted from *Hibiscus sabdariffa* Linne (hibiscus anthocyanins; 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). Analysis of the molecular mechanisms of HAs inducing cytotoxicity in LoVo cell showed 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. Meanwhile, in intrinsic pathway Bid enroutes to mitochondrial death pathway and the release of cytochrome c. Besides the release 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)



大腸為人體的消化系統之一。主要的生理功能為吸收水分、糞便儲藏及食物經過口腔 (oralcavity)、食道 (esophagus)、胃 (stomach) 及小腸 (smallintestine) 等消化吸收後便會移至大腸，大腸會將其中的水份及有用的電解質再吸收，而其剩下的物質變形成糞便(feces)。

目前，大腸直腸癌的發病原因仍有許多致癌機制尚未明瞭，許多的研究報告及統計資料認為與飲食及遺傳兩大方面較為相關。飲食方面：若肉類、蛋白質、脂肪的攝取量增加，罹患腸癌的機率則有顯著增加之趨勢。另一方面，從遺

傳理論之角度：有家族癌症之家族病史者，則罹患腸癌的比例也較高。腸癌之形成是由許多因素及多種機制所演變而成的¹⁰。

大腸的任何部位都可能發生癌症，但以直腸癌的機會最高，其他依次是乙狀結腸、升結腸、降結腸、橫結腸。結腸直腸癌中 95% 為腺癌、1% 為鱗狀細胞癌¹¹。

根據腺瘤形成理論 (adenoma carcinoma secquecen) 正常的大腸黏膜上皮細胞會因 APC (adenomatous polyposis coli) 基因的缺失過度增生，漸漸形成早期腺瘤，因 k-Ras 基因活化及 DCC (deleted in colon cancer) 基因缺失而形成惡性腫瘤並轉移至身體其他部位。

2. 洛神花(hibiscus sabdariffa Linnaeus)與花青素(anthocyanins)

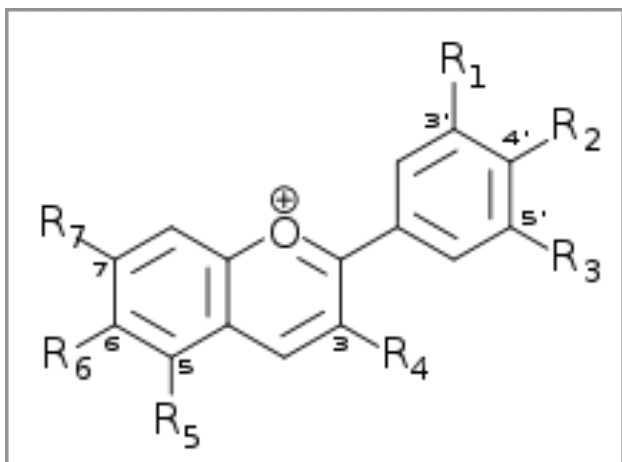
• 洛神花(hibiscus sabdariffa Linnaeus)



洛神花,學名為 Hibiscus Sabdariffa Linnaeus, 又稱「洛神花」、「洛濟葵」、「山茄」、「紅葵」,為錦葵科(malvaceae)木槿屬的一年生灌木,相傳原產地為印度,分布在熱帶及亞熱帶地區。台灣於 1910 年由日本人藤根吉春氏自新加坡引入

栽種,1911~1914 年陸續再由夏威夷、菲律賓引入栽培。洛神花其成份包含有機酸(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。先前,研究報告中顯示,在體外試驗顯示其萃取物中有 anti-spasmodic,有降膽固醇、降血壓及抗菌作用。其成份 flavonoids 具有抗氧化及抑制心血管疾病;原兒茶酸(protocatechuic acid; PCA)可抑制化學致癌物誘導之癌化,本研究室也顯示洛神花中之 PCA 及花青素有強的抗氧化作用^{1,2,12}。

• 花青素(anthocyanins)



花青素(anthocyanins)是屬於類黃酮族群之天然色素,屬於水溶性的色素,廣泛存在於許多食用的植物果實中,也是一種天然的抗氧化劑。不同的花青素的顏色隨著PH值改變,顏色包含藍色、紫色或紅

色等。在植物的果實中通常含有許多不同種類的花青素，如：草莓(strawberry)、葡萄 (grape fruit)及櫻桃(cherry)等，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。現今，許多研究皆以證實花青素為一種能抵抗和清除體內過多自由基之天然成分，並有增強血管彈性、增加循環、預防心血管疾病等臨床功效，而花青素也被認為對於某些疾病是具有有效的預防作用，如：糖尿病之視網膜病變及微血管循環疾病等。此外，花青素也具有抗發炎及化學預防作用的功效^{4,5,6}。

3. 細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡為生物演化史中之保存機制，主要導致細胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)的調節機制，為利他性的自我犧牲。而細胞凋亡為一種型態學之概念，描述細胞在一定的生理條件下，猶如枝天的樹葉或花瓣般凋謝、巧然死去的淒涼情景，而藉由希臘語“Apoptosis”有墮落、死亡之意來表示。

細胞凋亡的特徵包含細胞型態萎縮(cell shrinkage)、DNA階梯狀斷裂(DNA fragmentation)、染色質濃縮(chromatin condensation)、細胞膜構造改變 PS (phosphatidylserine)外翻、細胞凋亡小體(apoptosis bodies)產生，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。

細胞凋亡受到一連串蛋白的嚴密調控，一連串的家族大致分為促進及抑制細胞凋亡作用之蛋白質。在訊號傳遞當中，這些分子交互作用形成十分複雜、嚴謹的機制。一般而言，細胞凋亡的機制可概分為兩大類：一類為外在傳導路徑(death receptor pathway)；另一類為內在傳導路徑(mitochondria associated pathway)，而這兩條主要的細胞凋亡路徑彼此間亦相互影響。外在傳導路徑一般由死亡受體(death receptor)所傳導的凋亡路徑。

一般常見的死亡受體如：CD95、TNF- α 、DR5 等會導致死亡誘導訊息，在各種不同因子諸如化學物質或藥物的刺激下，使得 Fas ligand(FasL)與細胞膜表面蛋白質 Fas 結合後，其下游受體蛋白的部位 FADD(fas associated death domain)和 pro-caspase-8 的複合體形成 DISC (death-inducing signaling complex)進而活化 procaspase-8，活化態的 caspase-8 接著活化其下游的 caspase-3、6、7 去開啟一連串的生化死亡反應，最後使細胞走上凋亡路徑^{7,8}。

另一方面，內在傳導路徑則泛指透過粒線體所傳導之細胞凋亡路徑，當粒腺體遭受到破壞的時候，粒腺體所釋放出的細胞凋亡誘導因子 cytochrome c 等蛋白質。當 apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1)、cytochrome c、dATP/ATP 及 procaspase-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、7 及6使細胞走向凋亡。

4. 脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase (FAS))

FAS由兩個單體所組成，每個單體中含有七個酵素，主要參與脂肪酸的新生作用。脂肪酸在生物體內作為細胞中儲存能量與細胞內訊息的傳遞的物質；同時，也是建構細胞膜時不可或缺的重要材料。FAS 亦為腫瘤脂質生成的關鍵酶之一，在催化脂肪酸合成時最後步驟之關鍵材料。

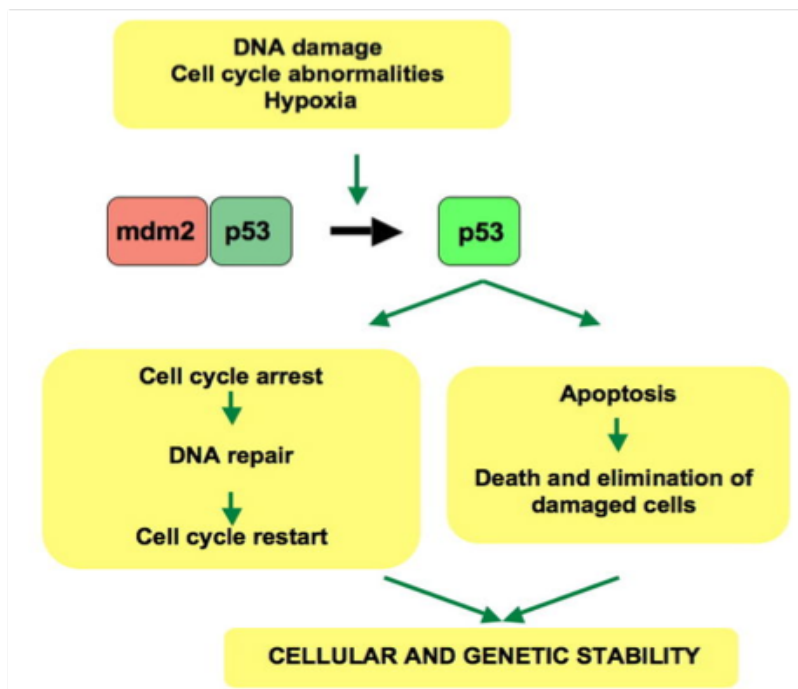
先前研究指出，FAS發現在腫瘤細胞中有表現而未表現在相應之正常細胞。在腫瘤細胞生長與存活，FAS 的調控表達為分複雜，包含轉錄、轉譯後調控等。因此，癌細胞中需要合成大量的脂肪酸，若能夠抑制此酵素，便具有抗腫瘤之活性。故對癌症治療，FAS之抑制作用藥物便顯得十分重要⁹。

5. 抑癌基因—p53

p53蛋白能調節細胞週期和避免細胞癌變發生。因此，p53蛋白被稱為基因組守護者。其角色為保持基因組的穩定

性，避免突變發生。p53 基因位於第十七對染色體上，其功能為轉錄因子 (transcription factor)，可調控具有 p53 結合序列之基因表現，例如：DNA 修補 (DNA repair)、抑制細胞週期進行 (cell cycle arrest)、或細胞程序性死亡 (programmed cell death, apoptosis) 等。p53 的結構分為四部分：transactivation、DNA binding domain、tetramerization 與 nuclear localization domain。使 p53 活化的途徑分為兩部分 transcription level 與 protein level。

p53 基因可以受到一些轉錄因子活化，例如 NF- κ B 或 HOXA5。但 p53 活性的調控最主要還是在於 protein level，包括調控 p53 的穩定性 (stability)、p53 在細胞中的位置 (subcellular localization)、p53 的修飾 (posttranslational modification) 或結構的改變 (conformation change)^{3,10}。



6. AMPK

AMPK 為絲氨酸/蘇氨酸激酶 (serine/ threonine kinase)。亦為異三元體 (heterotrimer)，包含催化性的 α (63KDa) 和調節性的 β (30KDa)、 γ (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

的感測者。AMPK 在體內作為一個能量平衡的偵測器，AMPK活化之路徑包括：(1)當細胞內AMP/ATP 比例升高時，例如：缺氧、局部缺血、飢餓、運動、葡萄糖缺乏等情況下，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，而活化了 α 次單位的活性，提升細胞內的能量，同時關閉消耗ATP的代謝路徑，比如抑制脂肪和膽固醇的合成。相反地，細胞內能量充足時 (AMP/ATP 比例降低) 則AMPK 失去活性，耗能的合成代謝路徑被打開。因此AMPK 是細胞內非常重要的能量調控因子，協調體內代謝和能量需要。

AMPK 可以調控許多不同功能，而在脂質合成代謝方面，AMPK可經由磷酸化多種酵素如：FAS (fatty acid synthase)，ACC (acetyl-CoA carboxylase)，HMGCoR (HMG-CoA reductase) 及GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) 而使得脂肪酸、膽固醇及三酸甘油酯合成受到抑制^{11,12}。

7. iNOS

一氧化氮合成酶家族(NOS family)目前共發現了三種形式的蛋白質，分別稱為 endothelial NOS(eNOS)、neuronal NOS(nNOS)以及 inducible NOS(iNOS)。iNOS 最先是在巨噬細胞(macrophages) 中所發現，之後陸續又在血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells)、神經膠細胞(glial cells)都有iNOS。由於巨噬細胞在具有免疫反應(如 LPS 刺激)的狀況下才有 iNOS 的表現,故稱為此一形式的 NOS 為 inducible NOS。iNOS分子量為 130 kDa，屬於 calcium-independent NOS。iNOS 平常並不會表現，但在經過刺激後會產生高濃度的 NO，此酵素反應可以維持數小時至數天。iNOS 所製造的 NO 可殺死病原菌，但因為 iNOS 不需要鈣和調鈣蛋白(Calmodulin)，所以有時會產生過量的NO，反而會造成組織損害及器官衰竭等現象^{13,14}。

(四) 研究動機與目的

隨著高齡化、生活行蓋改變，及肥胖人口增加，致使國人癌症發生人數持續上升。依衛生署國名健康局最今癌症登記資料顯示，97年國人共有79818人發生癌症，其中男性為45171人、女性為34647人，平均每10萬人有347人診斷為癌症。換言之，每1000人有3.5人罹癌。以癌症發生人數而言，97年發生人數最高依序為大腸癌（11004人）、肝癌（10565人）、肺癌（9516人）、乳癌（8136人）與口腔癌（5781人），此五種癌症佔所有癌症數的56%，大腸癌為目前國人罹患癌症的第一名⁸。因此，此研究便想以腸癌細胞來探討。

腸癌形成由許多因素及多種步驟演變而成。一般而言，百分之98至99的大腸癌並無家族病史；也不具有遺傳性。腸癌並非突發式發生而是漸進式形成。腸癌細胞可藉由血液循環轉移到身體的其它部位，如肝、肺、腦等部位；也可以藉由淋巴循環而轉移至鄰近的淋巴結或淋巴腺。其中，大腸癌致病機轉中最重要之原因包含抑癌基因(tumor suppressor gene)及致癌基因(oncogene)發生缺陷或突變。抑癌基因包含APC基因、DCC基因、P53基因；而致癌基因包含有 k-Ras 基因等⁹。

許多研究致力於探討天然草藥中所含有的成分是否具有預防及治療疾病的功能。本實驗室致力於化學預防的研究顯示洛神花萃提取物 HAs 及 hibiscus polyphenol (HPE)會誘導胃癌、肝癌、血癌、乳癌等細胞凋亡。另外，許多報告中證實洛神花花青素具有抗氧化活性；有效降低血脂肪；預防動脈粥狀硬化及防癌的效果。

目前對於洛神花花青素試驗中發現利用細胞毒性試驗、細胞染色、流氏細胞儀以及粒腺體膜電位等方法觀察。初步的結果顯示洛神花花青素確實會誘發人類惡性腸癌細胞程序性凋亡之作用。盼此研究之初步結果，對於爾後保健食品、抗癌製藥開發及應用能有所貢獻。

(五) 研究方法及步驟

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四小時，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，因為當粒線體膜電位小於 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 μ 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^o C、400V 轉漬蛋白 3 小時，接著浸入含 5% nonfatmilkpowder 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，我們利用HPLC來偵測洛神花花青素 (HAs) 中的有效成分。Fig.1結果顯示，HAs中的peak與cyanidin及delphinidin最為接近，且在HAs中cyanidin的含量為69%，而delphinidin的含量為27%。

2. 細胞毒性試驗

我們要探討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MTT試驗進行分析。以不同濃度 (0,1,2,3 mg/ml) 在不同時間點 (0,12,24,48 h) 中進行分析。從Fig.2得知，加藥處理24小時，最高濃度 (3 mg/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. 洛神花花青素 (HAs) 引起LoVo細胞型態之改變並呈現 dose-dependent

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，發現其細胞存活率的降低以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HAs的濃度處理增加，細胞開始出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。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，在不同劑量 (0,1,2,3 mg/ml) 處理LoVo細胞24小時，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之產生，且具有dose-dependent之線性關係。

4. 洛神花花青素 (HAs) 引起LoVo細胞型態之改變並呈現 time-dependent

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0,12,24,48 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，隨著加藥處理時間之增加，發現其細胞存活率的降低以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，隨著加藥處理之時間增加，細胞開始出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，以不同時間點0, 12, 24, 48 小時後，培養48小時，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，特別是在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顯示，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，紅色螢光漸減而綠色螢光有漸增之趨向。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指出，分析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89.75%。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

進一步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接受器之活化，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。亦在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。而在Fig.6C中發現，抑制拮抗細胞凋亡Bcl-2蛋白族群如：Bcl-2、Bcl-xl有明顯的下降。

(七) 討論

本實驗室長期的研究發現洛神花花青素 (HAs) 為一抗氧化物質，並對於預防動脈粥狀硬化、抑制自由基及增加抗氧化能力具有功效。本實驗發現，HAs確實有效抑制大腸癌細胞的生長，再利用細胞毒性試驗及細胞型態的改變，證實HAs會提高腸癌細胞對其用藥之敏感度。並利用western blot證實HAs會透過影響AMPK訊號路徑及調控Ras/PI3K訊號路徑促使LoVo腸癌細胞凋亡作用。

而在過去的文獻中指出，花青素具有提升細胞內抗氧化作用的能力。在活體系統當中，花青素具有良好清除自由基的作用，進而降低蛋白質磷酸化的機率。更有文獻指出藍莓、黑莓、桑椹、荷葉中的花青素是提供有效抗氧化能力的主要成份³。在水果中的花青素或花青素衍生物，可以有效的抑制腫瘤壞死因子誘發發炎物質IL-8、MCP-1、ICAM-1的表現。而在治療組織硬化症 (systemic sclerosis) 方面，花青素可以有效抑制可溶性吸附因子之能力，進而降低白血球吸附於內皮細胞，以調節發炎反應的發生⁴。另外，在葡萄籽花青素萃取物中，可藉由抑制proapoptotic factors (JNK-1及c-Jun) 的表現而阻礙細胞死亡訊息的傳遞，以達到保護心臟免於缺血壞死的效果¹⁸。在覆盆子之甲醇萃取物在動物模式上具有舒張動脈血管的功能。而在蔓越莓甲醇萃取物中發現可以抑制K562血癌細胞株之增生¹⁹。過去的研究也同時指出花青素可以經由阻斷細胞週期的進行而抑制動脈內皮癌細胞的增生。而在動物方面，也發現花青素確實可以抑制各種腫瘤的生長²⁰。

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casepase-8及其下游蛋白，進而使細胞進行一連串的反應，最終使細胞走向凋亡。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，而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，會透過一連串訊息傳遞將訊號由細胞外傳入細胞核中，進而調節細胞內種種反應。

iNOS 在正常情況下並不表現，但若細胞經由細胞內毒素如：Lipopolysaccharide(LPS)或是由細胞激素如：tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interferon- γ (IFN- γ)的刺激下則會大量表現並釋放出大量的 NO。iNOS 的活化過程中不需要鈣離子，但其活化仍是需要 Calmodulin 的參與³。在先前的研究報告顯示，iNOS並未出現在正常的前列腺組織中，但卻在前列腺癌中大量表現¹⁵。而iNOS會透過產生NO進而活化AMPK磷酸化。而AMPK的活化受細胞內AMP/ATP比例調節，一旦激活即可磷酸化下游信號分子，關閉消耗ATP的合成代謝通路，開啟產生ATP的分解代謝通路。AMPK的活化可以抑制多種腫瘤細胞增殖，因AMPK信號整合了許多腫瘤抑制因子基因如LKB1、p53、TSC1和TSC2，最後使腫瘤走向死亡¹⁶。本實驗發現，在LoVo腸癌細胞中加入HAs後，iNOS的表現量增加；AMPK磷酸化之表現量也增加（Fig.8），由此推斷HAs可以透過iNOS活化AMPK磷酸化，進而促使細胞死亡。

另一方面，有文獻指出慢性血管病變中Fas及FasL透過抑制Akt磷酸化之表現，進而增加 c-Jun N-terminal kinase，而Akt之表現量下降促使caspase 3裂解並使細胞凋亡¹⁷。本實驗發現，在LoVo腸癌細胞中加入HAs後，Fas/FasL之表現量上升，而Akt-P/Ras表現量下降，因此推斷加入HAs後，細胞可能經由Fas/FasL這條路徑促使細胞凋亡，也可能是經由iNOS/AMPK-P/Ras/Akt-P此路徑來促使細胞凋亡的發生，但這兩條路徑當中，Fas/FasL有可能同時會來調控Akt-P之表現。但其詳細的上下游關係，還有待透過NO抑制劑L-NAME驗證。待釐清相關分子機制後，再利用動物模式分析洛神花花青素或

其中富含之有效成分處理之下，是否同樣具有預防癌症發生及抑制腫瘤生長之保健功效，並藉以評估可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. Lin HH, Huang HP, Huang CC, Chen JH, Wang CJ. (2005) Hibiscus polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway. *Mol Carcinog.* 43(2), 86-99.
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 aes 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. Xu M, Li S, Zheng X, Hu L. (2004) The apoptosis and its relationship with the expression of inducible nitric oxide synthase and Bcl-2 proteins in prostate carcinoma. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2004 Jan;10(1):39-41.
 16. Chen L, Han F, Qu H, Yan H, Ren L, Yang S. (2013) Combination therapy with 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside and arsenic trioxide in acute myeloid leukemia cells

- involving AMPK/TSC2/mTOR pathway. *Pharmazie*. 2013 Feb; 68(2):117-23.
- 17.Suhara T, Kim HS, Kirshenbaum LA, Walsh K. (2002) Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol*. 2002 Jan;22(2): 680-91.
- 18.Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. (2001) Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radic Biol Med*. 2001 Sep 15;31(6):729-37.
- 19.Mullen W, McGinn J, Lean ME, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A. (2002) Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J Agric Food Chem*. 2002 Aug 28;50(18):5191-6.
- 20.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*. 2005 Jun 15;205(3):201-12. Epub 2004 Dec 7.

(九) 實驗結果 附圖

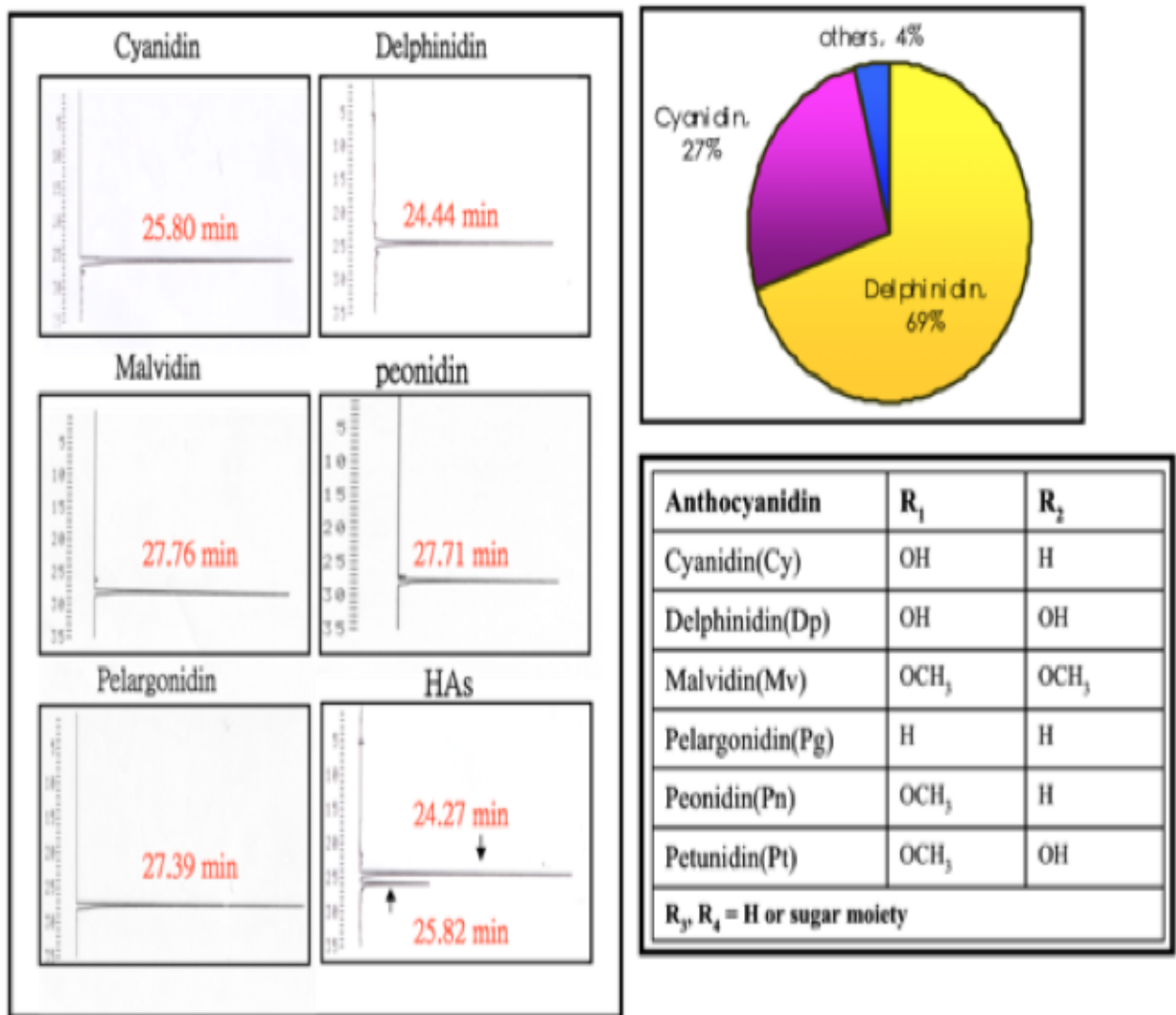


Figure 1. The HPLC chromatogram of Hibiscus Anthocyanins (HAs). The peak of HAs are similar to the peaks of Cyanidin and Delphinidin. Therefore, this determines the main two elements of HAs are Cyanidin and Delphinidin, and each compose 69% and 27% respectively.

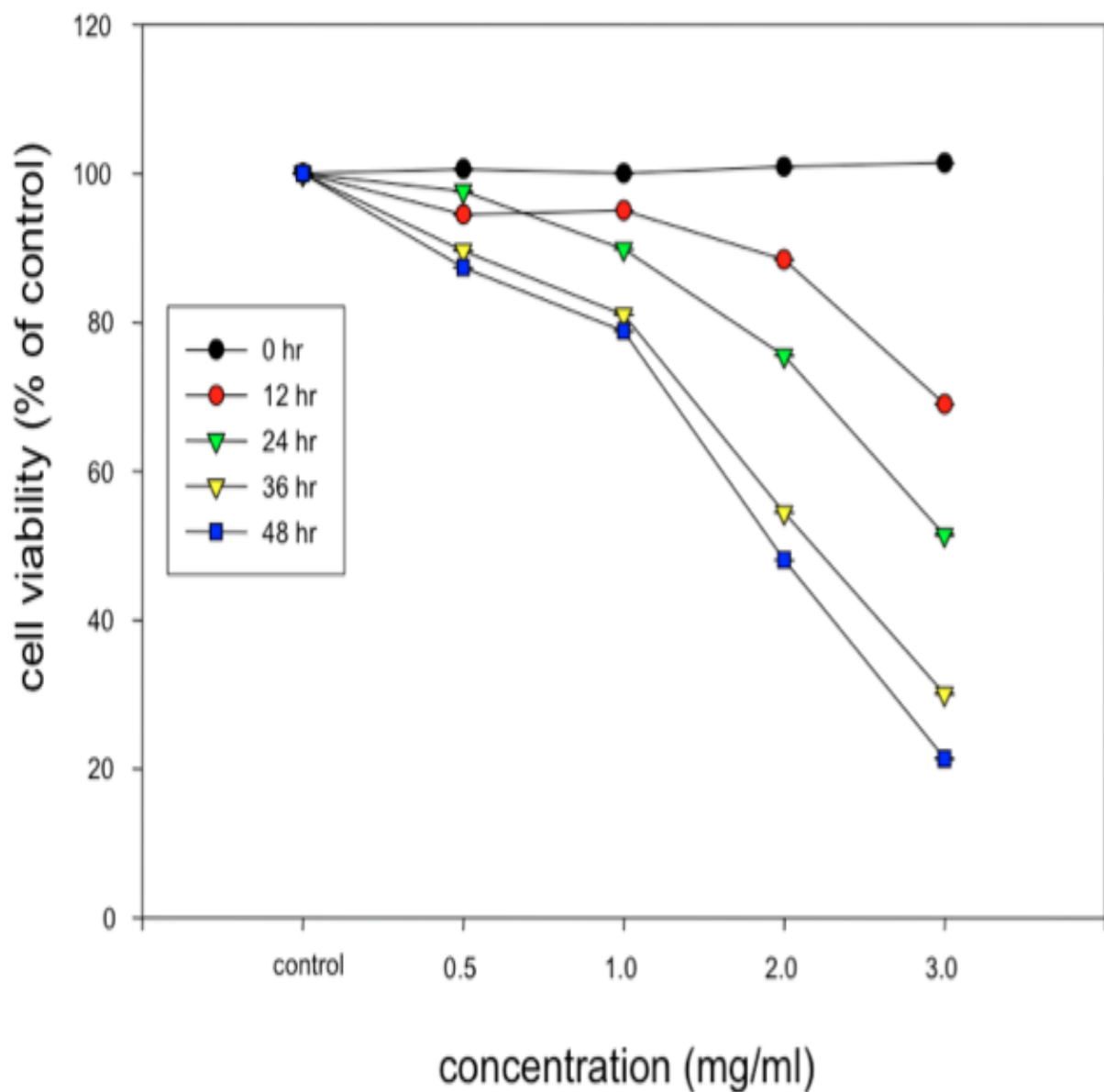


Figure 2. Effects of HAs on human colon cancer cell line.

LoVo cell was incubated with different concentration HAs(0,1,2,3mg/ mL) in 37°C for different time (0,12,24,48h).

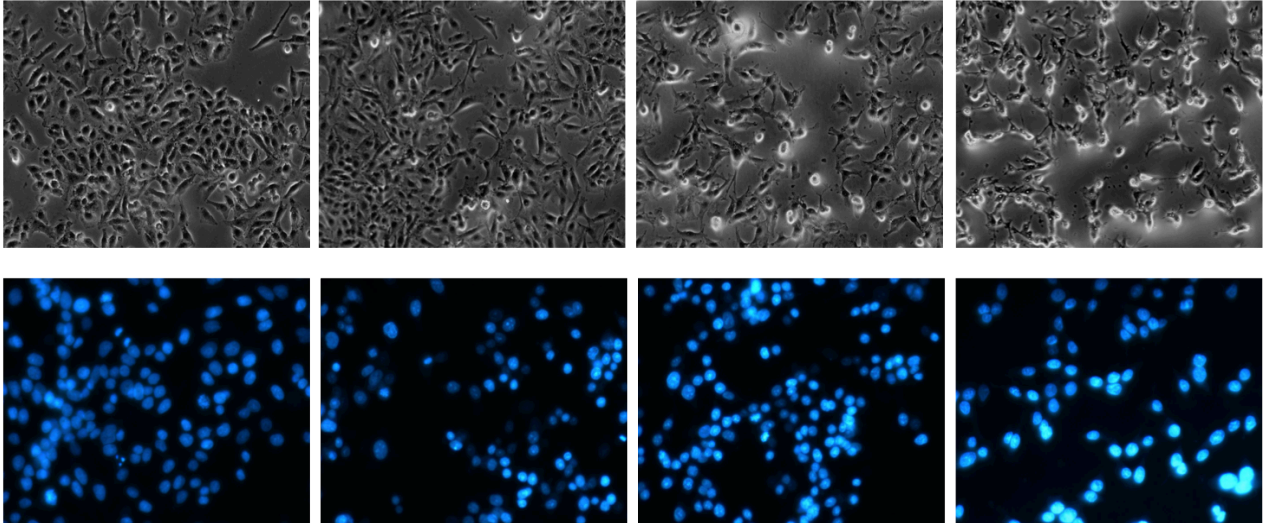
(A)

Control

1 mg/ml

2 mg/ml

3 mg/ml



(B)

Control

1 mg/ml

2 mg/ml

3 mg/ml

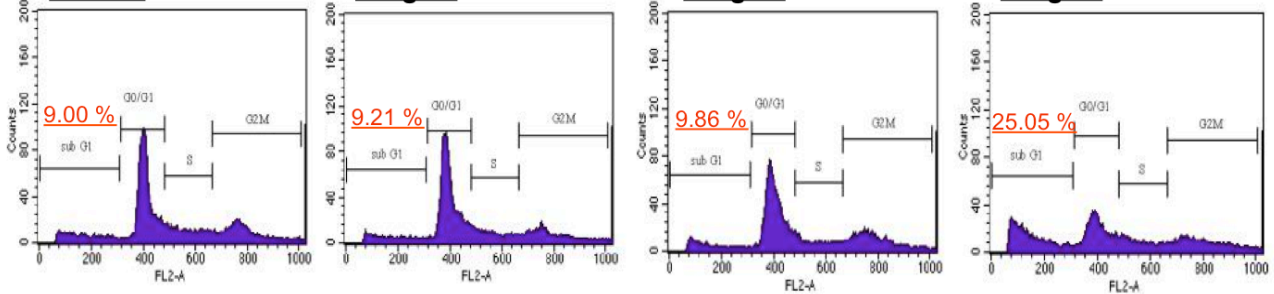


Figure 3. Induction of apoptosis and cell progress in HAs treated LoVo cells in a dose-dependent manner.

(A) LoVo cell were treated with HAs under different concentration (0,1,2 and 3mg/ml) for 24 h, and the apoptosis cells were assayed by DAPI stain.

(B) LoVo cell were treated with HAs under different concentration (0,1,2 and 3mg/ml) for 24 h. After treatment the apoptosis cells were analyzed by flow cytometry.

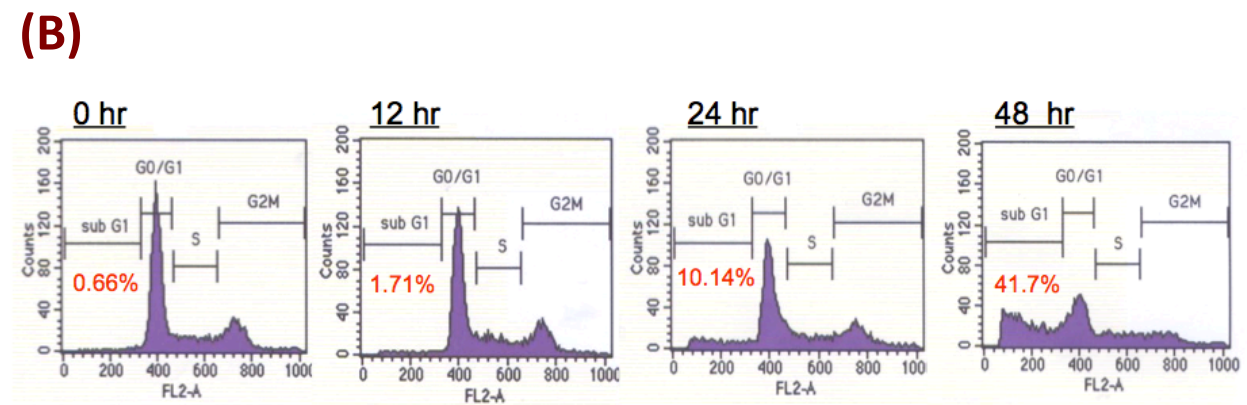
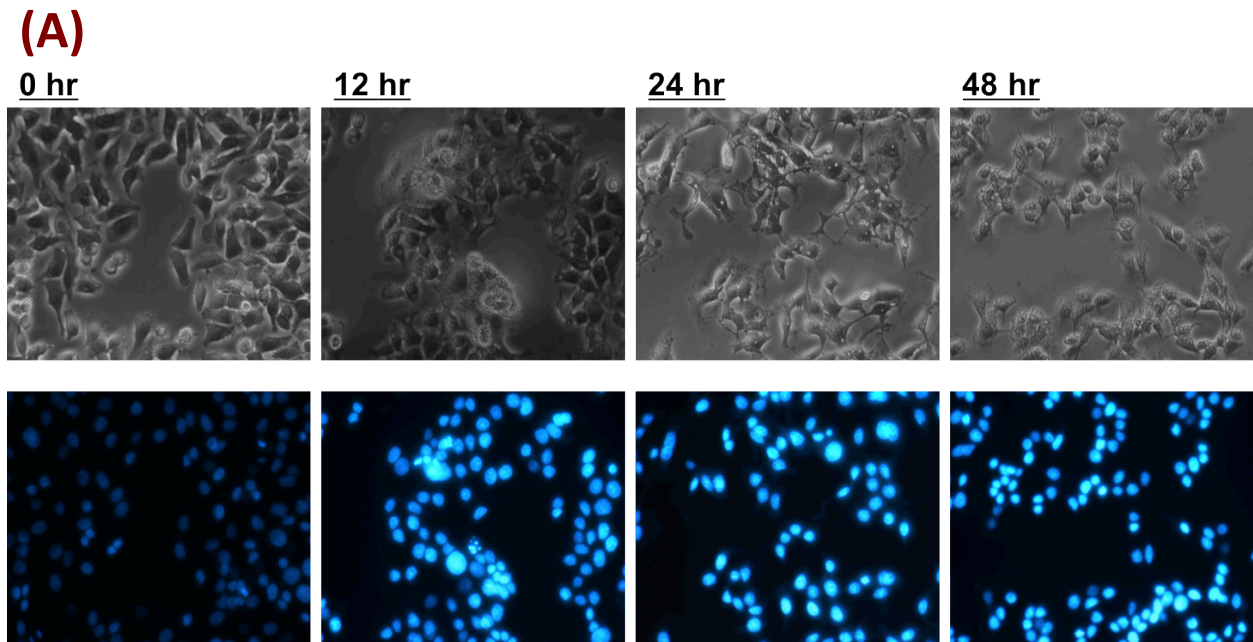
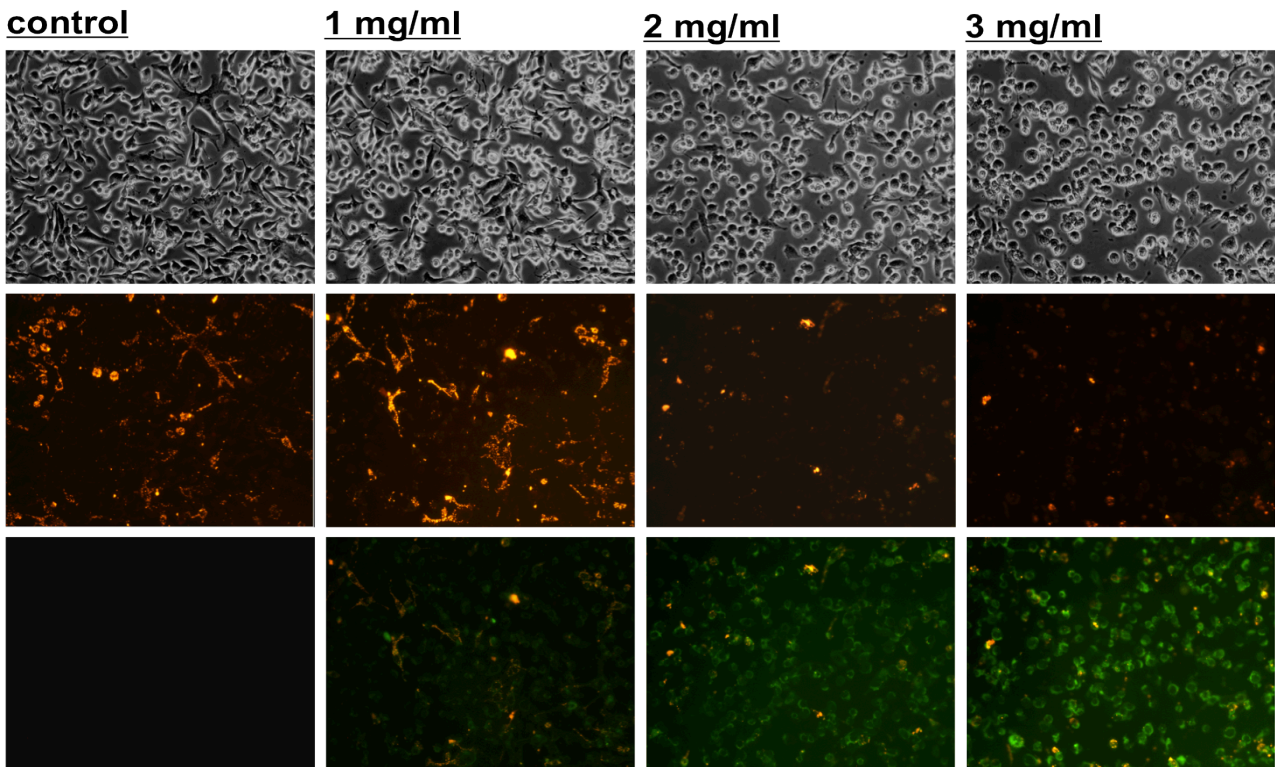


Figure 4. Induction of apoptosis and cell progress in HAs treated LoVo cells in a time-dependent manner.

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

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

(A)



(B)

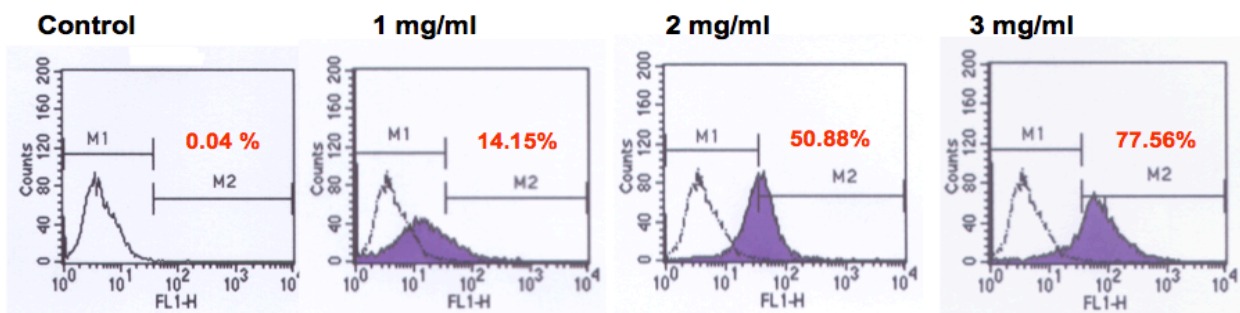


Figure 5. Mitochondria membrane potential $\Delta\Psi_m$ assessment of LoVo cells.

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

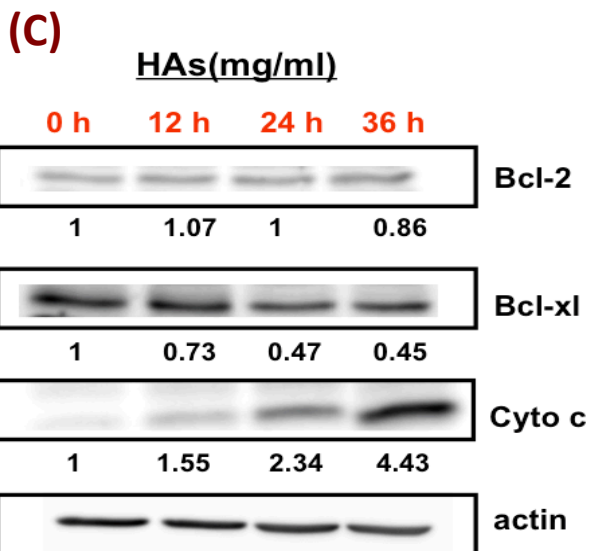
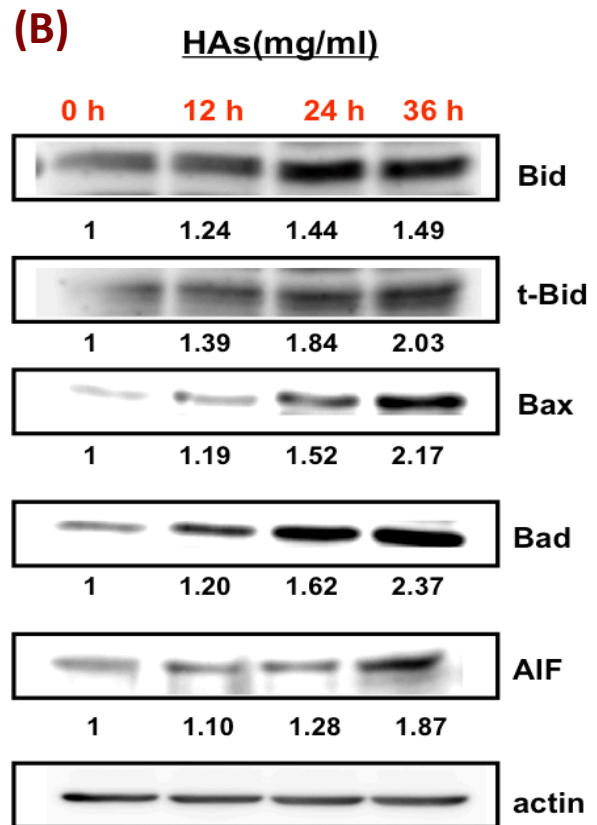
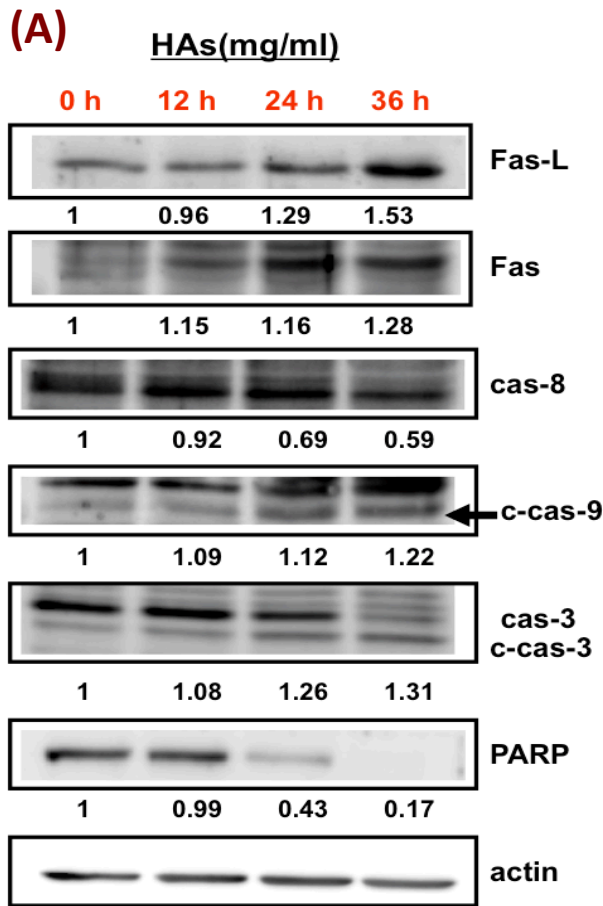


Figure 6. Effects of HAs on the protein levels of apoptosis pathway in LoVo cells.

(A) Immunoblot analysis of the expression of caspase family(cas-3,8,9) and PARP(poly ADP-ribose polymerases) in LoVo cells treated with HAs.

(B) Immunoblot analysis of the expression of pro-apoptotic protein(Bid, tBid, Bad, Bax and AIF) 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.

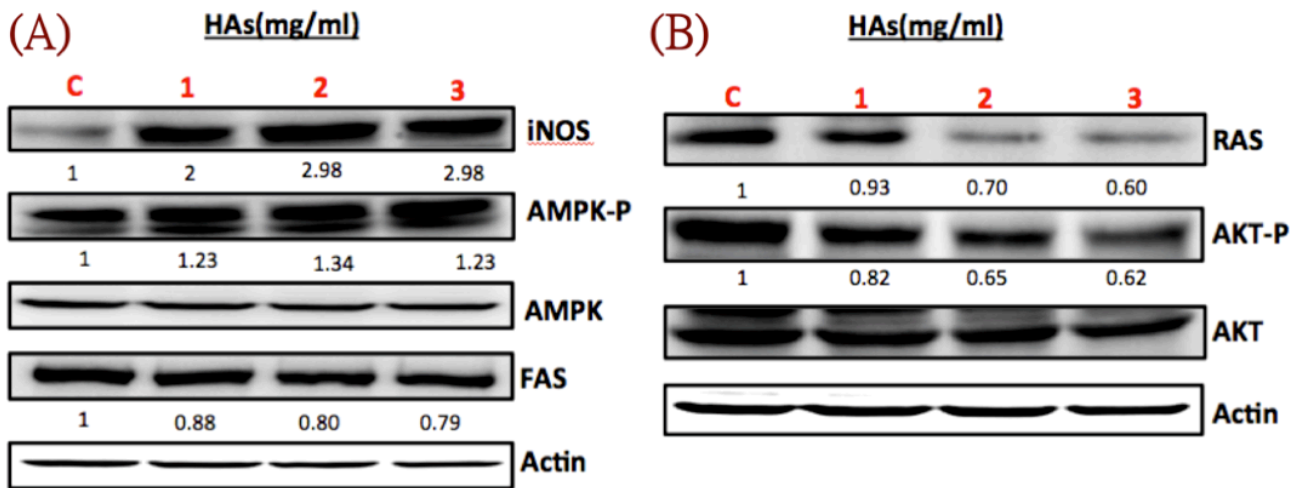


Figure 7. Effects of HAs on AMPK Signals protein (A) and Ras/PI3K Signals (B)

(A) Immunoblot analysis of the expression iNOS, AMPK-P and FAS in LOVO cells treated with HAs under different concentration (0,1,2 and 3mg/ml) for 24 h.

(B) Immunoblot analysis of the expression of RAS and AKT-P in LOVO cells treated with HAs under different concentration (0,1,2 and 3mg/ml) for 24 h.

Figure 8.

