

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

洛神花青素抑制動物致血癌之作用及其分子機轉(第2年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2313-B-040-005-MY2
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：張雲菁
共同主持人：王朝鐘

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 100 年 10 月 31 日

中文摘要：癌症預防已為一世界潮流，因此，尋找一化學預防物質（chemopreventive agent）為一重要工作。花青素（Anthocyanins）廣存於蔬菜、水果等植物中，已有許多報告證明花青素具抗氧化活性，降低血脂肪及防癌等作用，本研究室也發現分離自洛神花之花青素（Hibiscus anthocyanins，HAs）有抗氧化及保肝之功能。先前的工作利用細胞實驗，結果顯示洛神花之 HAs 具有抑制血癌之作用。因此，本計劃我們將深入研究 HAs 抑制血癌之作用。第一年的工作已完成之動物實驗進行鑑定，確認 N-Nitroso-N-Methylurea (NMU) 所誘導雄性大白鼠 (Sprague-Dawley rat) 血癌之動物模式，屬於 M3 期之急性前骨髓細胞性白血病 (APL, acute promyelocytic leukemia)。根據血液分析、生化分析、H&E 染色、骨髓性過氧化酶染色等實驗方法，結果發現，HAs (0.2%) 可以降低白血球侵入肝臟及脾臟，且進一步抑制大鼠罹患血癌。由以上的結果發現 HAs 可降低血癌 (33.3%) 的作用，且可能是經由 PI3K/Akt 的訊息傳遞路徑，因上游 RAR 及 RXR 表現量皆有上升的趨勢，而有效的刺激人類骨髓性白血病的細胞走向分化。第二年的工作為利用不同之動物模式即 inoculation 方式，以腹腔注射 WEHI-3 於 BALB/c 小鼠體內，28 天後成功地誘導小鼠產生血癌，處理 HAs 及全反式維生素 A 酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) (15 mg/kg/day)，亦探討其抑癌之可能機轉。同樣的，根據 H&E 染色，結果發現，HAs 可以降低白血球侵入肝臟及脾臟，且進一步抑制小鼠罹患血癌。由以上的結果發現 HAs 可降低血癌 (54.5%) 的作用，與第一年之結果相互印證。最後，利用西方點墨法分析蛋白表現，結果發現 HAs 活化 RAR 及 RXR 蛋白，初步結果推測 HAs 可能透過 RAR 路徑調控而抑制老鼠血癌之誘發。綜合以上，確認 NMU 所誘發之動物血癌為急性前骨髓細胞性白血病 (Acute promyeloid leukemia, APL)，並且利用本實驗室所分離之 HAs 與市售之 ATRA，比較兩者抑制血癌之作用，進而釐清其詳細相關分子機制，未來期許洛神花青素可在癌症治療上有所貢獻。

英文摘要：Cancer prevention has been a world trend. Because of this, searching for chemopreventive agents is a very important thing. Anthocyanins are abundant in vegetables and fruits. Many reports indicated its have function in anti-oxidation, reducing cholesterol, and preventing cancers. Our laboratory explores anthocyanins extracted from Hibiscus sabdariffa Linne, Hibiscus anthocyanins (HAs), have antioxidant activity and liver protection. Previously, we found that HAs have anti-carcinogenesis effect in vivo and in vitro. Therefore, we further work are study that the mechanism of HAs inhibits leukemia effect. First year, we utilize the same rat model for

the inhibition of leukemia induced by N-Nitroso-N-Methylurea (NMU). Furthermore, to determine NMU-induced Sprague-Dawley rat leukemia is classified to leukemia M3 (APL, acute promyelocytic leukemia). Based on the data of blood analysis, biochemical analysis, H&E stain and MPO stain, we further demonstrate that HAs inhibits rat leukemia induced by NMU and reduces invasion of liver and spleen. We suggested that HAs could reduce leukemia progression (33.3%). HAs increase RAR and RXR proteins expression, mediated through PI3K/Akt signal pathway. The phosphorylation of Akt is determinant for leukemia cells differentiation. Second year, we employ different animal model (inoculation) to further investigation. WEHI-3 cells inject to BALB/c mice (i.p.), and then leukemia was successfully induced after 28 days. We same add the two different drug (HAs and ATRA ; all-trans retinoic acid) in this research. We further demonstrate that HAs inhibits rat leukemia induced by NMU and reduces invasion of liver and spleen by H&E stain. We suggested that HAs could reduce leukemia progression (54.5%). In addition, we utilized western blotting to analyze protein expression. These data suggest that HAs also increases RAR and RXR activation and possibly plays beneficial roles in anti-leukemia. We expect it could application for developing a new chemopreventive agent.

前言

血癌又稱為白血病，簡單來說就是白血球的癌症，台灣地區血癌為癌症死因的第十三位，雖然只占死亡人數的 2.6%，但卻是在兒童中最常見的惡性疾病之一，由於血球新陳代謝極快，故白血病患者可以在數日內突然發病，尤其是急性白血病，倘若未給予適當治療，因血癌細胞會迅速浸潤及破壞骨髓，使得正常的造血功能受抑制而導致貧血、出血或是內臟出血。另外，因體內的血癌細胞過多時會造成血栓，這些症狀嚴重會足以致命，若是延誤診斷及治療，病患的存活期很少超過二至四個月，因此，找出正確且是當的治療血癌的方法是刻不容緩的事，而對於癌症的預防及抗癌藥物的開發、篩選更是需要去重視及探討的。

研究目的

隨著科技不斷進步的過程，使得人們的物質生活也逐漸改善，但是卻也伴隨著更多文明病的發生，如心臟血管方面的疾病、糖尿病等，其中值得我們關注的焦點是，癌症在最近數年來一直高居國人十大死因之首，由於我們隨時暴露在許多致癌因子（如空氣污染、輻射線影響）的環境中，所以了解癌症發生的機轉，進而找尋適合的預防及治療方法是首要的任務之一。白血病不同於一般固體形式的腫瘤，其無法利用手術或是雷射直接切除根治，且可能會隨著血液循環跑到全身各個部位去造成更大的傷害，在傳統上以毒性極大的化療藥物治療，常常無法完全的將白血病細胞清除乾淨，反而常因其帶來的嚴重副作用使得治療失敗，所以，找出新的治療機轉，對於癌症之治療將帶來一大契機。臨床上目前使用 ATRA 來治療人類前骨髓性白血病 (APL)，但全反式維生素 A 酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 使用時，只能維持短時間的緩解之後又會再復發，其最根本的原因可能是分化的不完全所致。而且 ATRA 使用一段時間之後，又會因為 ATRA 本身的毒性作用造成肺部損傷、腎衰竭等嚴重的副作用。基於預防重於治療的原則，發展預防癌症的方式將是未來癌症研究的重點之一。食品防癌的方式由於較易為人所接受，因此，本計畫主要的目的即想以洛神花之花青素 (*Hibiscus anthocyanins*, HAs) 研究抑制血癌的作用，並利用 ATRA 這是目前在臨床上普遍的癌症用藥，觀察這兩種物質在其已知的抑癌效果上以何者較優，及其可能的抑癌機轉是否相同，藉由觀察 HAs 對 HL-60 細胞型態變化、細胞的生長情形、細胞表面抗原之表現與細胞週期之影響，加上動物實驗之研究，探討其作用機轉，以做為日後深入研究的依據。研究洛神花萃取物之防癌及抗癌作用，並說明其作用機轉且分析其功能性成份作為抗癌物質，其成果將技術轉移產業發展為保健食品及抗癌新藥。而本計劃首先探討 NMU 誘發血癌之作用，在本年度更進一步以臨床上用藥 ATRA 比較其抑制血癌作用及機轉，期許未來能建立一保健食品之標準動物模式。

文獻探討

洛神花萃取物已被我們研究為抑制心血管病變之物質，花青素具抗氧化作用(1)，有保肝作用(2)，其成份原兒茶酸具抗癌作用(3, 4)，其它國外研究大部分在原兒茶酸抗癌及降血脂作用(5-14)，另國內外對於花青素及多酚酸亦甚多，但對於多酚酸及花青素之抗癌研究則少有報告（除原兒茶酸外）。急性前骨髓性白血病 (Acute promyelocytic leukemia, APL)，是急性骨髓性白血病第三型 (AML-M3)，細胞株為 HL-60。1998 年，Dirsch 等人提出大蒜有機硫化物 ajoene 治療人類前骨髓性白血病細胞株 (HL-60)，誘發癌細胞凋亡(15)；2003 年，Hou 等人提出花青素 (Anthocyanidins) 治療人類前骨髓

白血病細胞株 (HL-60) (16)，誘發癌細胞凋亡，而且沒有化療引起的副作用；2004 年 Li 等人提出中草藥 *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang Qin) 乾燥根的組成物 Baicalein (5,6,7-trihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) 經由 caspase 活性誘發人類前骨髓白血病細胞株 (HL-60) 產生細胞凋亡(17)；以上文獻為天然物治療血癌一線曙光，但都未進一步有動物血癌抑制作用之研究。

研究方法

第一年：NMU 誘發 Sprague-Dawley 大白鼠白血病之作用機轉

(A) 洛神花花青素 (HAs) 之製備

(1) HAs extracts 製備及定量

將乾燥的洛神花以酸化甲醇(1% HCl)浸泡隔夜後，所得的液體以濾紙過濾後真空乾燥，所得的物質即為洛神花花青素粗萃取物，隨後以pH區分法定量總花青素含量。200 µg/ml的洛神花花青素萃取物溶於pH1.0 及 4.5 下，在以分光光度儀測其 510 及 700 nm之吸光值，使用 $A=[(A_{510}-A_{700})_{pH1.0}-(A_{510}-A_{700})_{pH4.5}]$ 公式，與 delphindin標準曲線比照定量。

(2) HPLC 分析

為使HAs製備標準化，進一步以HPLC分析cyanidin-3-glucoside及delphindin-3-glucoside之含量是必要的，將洛神花花青素萃取物溶於水中，以高效能液像層析管柱(250x4.6 mm, 5 µm Hypersil ODS), mobile phase為 1.5% H₃PO₄、20% HPAC、MeCN in H₂O、流速為 0.5ml/min。

(B) NMU 誘發大白鼠血癌模式

(1) 化學藥劑

所需藥劑共有二種，第一種為N-Nitroso-N-Methylurea (NMU), stock concentration 0.5 g/100 ml saline, 使用NMU時，加入saline, 新鮮配製，避光，儲放4°C冰箱。每次i. v.給予35 mg/kg。第二種HAs, stock concentration 100 mg/ml, 避光，儲放於4°C冰箱。欲使用HAs時，加入distilled water, 新鮮配製成0.1%及0.2%。

(2) 動物分組及藥物處理

此動物模式是根據Huggins C.B.等人之研究方法(18)。將Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠 (七週大) 隨機分為七組，每三隻分為一籠，除控制組只有8隻之外，其餘一組12隻 (共80隻)。Group I 為Control組，不做任何處理；Group II 僅i.v.注射NMU (35 mg/kg)；Group III 單獨給予0.2% HAs, 加入飼料中每日食用；Group IV 除i.v.注射NMU (35 mg/kg)外，從第一次i.v.當天開始，配合給予0.1% HAs, 加入飼料中每日食用；Group V 除i.v.注射NMU (35 mg/kg)外，從第一次i.v.當天開始，配合給予0.2% HAs, 加入飼料中每日食用；Group VI 除i.v.注射NMU (35 mg/kg)外，從第一次i.v.當天開始，配合給予ATRA (15 mg/kg/day), 以胃管方式餵食，每週五天共四週；Group VII 除i.v.注射NMU (35 mg/kg)外，從第一次i.v.當天開始，配合給予ATRA, 加入飼料中或是利用胃管每日食用；以上i.v.注射NMU四組，每兩週一次，共六次。之後，觀察150天全部斷頭犧牲，取其血液、肝臟及脾臟。

註：ATRA were administered p.o to mice in ATRA group with a 20 gauge intragastric feeding tube daily, 5 days per week, in 0.1 ml of super-refined and sterilized sesame oil at a dose of 15 mg/kg/d for 4 weeks)

(C) 鑑定 NMU 誘發大白鼠血癌之作用

(1) 體重

體重的變化是最直接可觀察到大鼠的生長情形及生理狀態，故每兩週記錄其老鼠的體重變化，以統計分析之。

(2) 大體觀察

將老鼠犧牲後，迅速取下骨頭、肝臟、脾臟、腎臟、胃及腸；對其病變性狀（包括大小、形狀、重量、色澤、質地、邊界、表面和切面狀態）進行詳細地解剖、觀察、測量、取材和記錄。

(3) 血液

a. 在i.v.注射NMU六次完畢後，每30至40天抽血一次，收集含EDTA抗凝劑之血液，以血球自動分析儀分析，觀察其血液中各種血球的數值，項目包括白血球（WBC）、紅血球（RBC）、血紅素（Hb）、血小板（PLT）等。另外，亦進行生化、血清數值分析，項目包括GOT、GPT、Uric acid、LDH等數值之變化，最後以統計分析之。

b. 血液抹片檢查：老鼠斷頭犧牲後，取其血液收集於含EDTA抗凝劑之試管；先以紗布擦拭載玻片，拭淨之玻片不可手摸，以免弄污；接著製作成兩張血液抹片，分別使用劉氏染色法和柏氏染色法染色，再由顯微鏡觀察判讀，根據FAB（French-American British cooperative group）分類系統進行分析。

c. 血液染色體核型分析：老鼠斷頭犧牲後，取其血液進行染色體核型分析。

d. 血液流式細胞儀分析：老鼠斷頭犧牲後，取其血液進行CD11b及CD33（二個抗原分別是成熟與不成熟細胞之特徵）之分析表現。

(4) 免疫組織化學染色 (IHC)

血液抹片染色之詳細型態可能不容易辨認，鑑定某種特定群系酵素標誌能幫助鑑別診斷白血病。

區分骨髓性及淋巴性白血病: Myeloperoxidase (MPO) stain

急性B-淋巴細胞白血病(B-ALL)之細胞標記: CD20

急性T-淋巴細胞白血病(T-ALL)之細胞標記: CD3

淋巴樣贅瘤(Lymphoid neoplasm)之細胞標記: CD45

骨髓細胞之主要細胞標記: CD33

區別紅白血病(FAB-M6): PAS stain

定義骨髓單核細胞分化(FAB- M4、M5): CD15、非特定解酯酶

造血幹細胞的抗原標記(FAB- M1、M2): CD34、HLA-DR*

*HLA-DR: promyelocyte缺此標記，作為APL(FAB-M3) 之鑑別診斷

(5) Hematoxylin & Eosin stain (H&E stain)

將老鼠犧牲後，迅速取一小部分肝臟及脾臟（4 mm），置於10%福馬林中固定，然後染蘇木紫 & 伊紅（Hematoxylin & Eosin stain, HE stain），製成病理切片，進行組織染色，透過光學顯微鏡觀察、分析並綜合病變特徵，可作出疾病的病理診斷。切片染色製作過程如下：

① 固定 (fixation)：將組織保存於中性福馬林（10% neutral buffered formalin），固定24小時以上將組織切成0.5 cm²，製於包埋盒中，然後於連續的水流中沖洗兩小時，以去除福馬林，避免影響切片的製作。

② 脫水 (dehydration)：將以去除福馬林的組織取出，用吸水紙吸取多餘的水分，然後依序進行下列的脫水步驟，70%酒精 20分鐘→80%酒精 20分鐘→90%酒精 20分鐘→95%酒精 I 20分鐘→95%酒精 II 20分鐘→100%酒精 I 20分鐘→100%酒精 II 20分鐘。

③澄清 (clearing)：將以完全脫水的組織，浸置於二甲苯 (xylene) 中，直到組織浸至透明。因為酒精與石蠟 (paraffin) 不互溶，所以必須完全以二甲苯取代組織內的酒精成分，才不至於影響浸潤過程。步驟首先是二甲苯 I 6分鐘→二甲苯 II 6分鐘。

④浸潤 (infiltration)：由於石蠟與二甲苯可以互溶，故先以二甲苯澄清後，才能使浸潤過程得以完全，而浸潤的目的是為了使石蠟能完全進入組織內。步驟首先是二甲苯：石蠟 (1：1) 40°C 60分鐘→石蠟 I 55°C 30分鐘→石蠟 II 55°C 30分鐘→石蠟 III 55°C 30分鐘。

⑤包埋 (embedding)：將以浸潤完成的組織置於模子中央，然後於模子中加入溶化的石蠟以覆蓋組織，接著將包埋台置於模子上，再加入少許石蠟使組織固定於包埋台。然後置於-20°C 冰箱，使石蠟結晶較細，待石蠟凝固後，除去模子，即完成包埋。

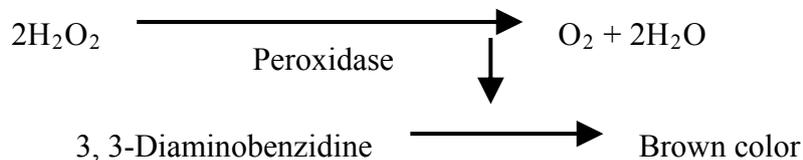
⑥連續切片 (serial section)：將包埋台固定於連續切片機上，調整刀片角度及距離，先以20 μM粗切至所要觀察的組織面，然後調整為5 μM切出連續切片，取下所切出的連續切片，置於38°C 的水中，使其完全伸展，再將切片置於沾附有蛋白與乾油比例為的玻片中央，然後置於38°C 的乾燥台上烘乾。

⑦染色 (stain)：H&E stain步驟，首先是二甲苯 I 6分鐘→二甲苯 II 6分鐘→100%酒精 I 6分鐘→100%酒精 II 3分鐘→95%酒精 6分鐘→80%酒精 6分鐘→沖水30分鐘→以紫蘇木溶液染色10分鐘→以酸性酒精辨色至核清楚為止→沖水30分鐘→以伊紅溶液染色5分鐘→70%酒精 30秒→80%酒精 30秒→90%酒精 30秒→100%酒精 I 6分鐘→100%酒精 II 3分鐘→二甲苯 I 6分鐘→二甲苯 II 6分鐘。

⑧封蓋 (mount)：將封片膠滴於已染色的組織切片上，以45度角慢慢蓋上蓋玻片避免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

(6) 骨髓性過氧化酶染色法 (myeloperoxidase stain)

實驗原理：血球內的過氧化酶能使過氧化氫氧化產生氧，氧在作用於雙胺聯苯胺，產生棕色生成物。



步驟如下：

1. 在低溫下，以冷卻過之福馬林-丙酮緩衝液固定抹片 30 秒。
2. 以冷水沖洗，風乾。
3. 將染色操作液覆蓋在抹片上，染色十五分鐘。
4. 以冷水沖洗，風乾。
5. 以蘇木素 (Hematoxylin) 續染 1--2 分鐘

結果與判讀：

在細胞質內，出現棕黃色顆粒為陽性，細胞核則染成灰藍色其型態依稀可辨。

骨髓性細胞系列 (Myeloid series) 為 (+) - (++)

單核球性細胞系列 (Monocytic series) 為弱陽性 [weak (+)]

淋巴球性細胞系列 (Lymphocytic series) 為 (-)

(7) 劉氏染色法 (Liu's stain)

實驗原理：利用血球之鹼性、中性或酸性內容物，可分別被嗜鹼性 或嗜酸性染劑染色之特性，將血球內之各結構加以染色。其檢體須為新鮮之微血管、靜脈血或添加抗凝劑之靜脈血。步驟如下：

1. 將風乾後之血液抹片置於染色架上，取 0.8--1.0 mL 之劉氏 A 染液覆蓋在抹片上，靜置約 15--30 秒。
2. 在抹片上再覆以約為劉氏 A 染液兩倍量之劉氏 B 染液 (1.6--1.8 mL)，且輕吹之，使兩者混何均勻 (此時在染劑表面會逐漸形成一層具金屬光澤之薄膜)。

3. 經 1.5--2 分鐘後，以自來水或蒸餾水輕輕地沖洗抹片，將多餘染液沖掉。
4. 風乾，置於顯微鏡下觀察。

(8) 柏氏染色 (Papanicolaous' stain)

此法優點在於 1. 核之染色良好。核之詳細結構必須很清楚，尤其是惡性細胞之鑑別更屬重要。2. 細胞質之染色鮮明。為瞭解原有之細胞構造，細胞質與核之構造必須看起來有差異。3. 細胞質透明。塗抹片中常常有細胞重疊發生，為求能看到壓在底下之細胞狀態，故細胞質之染色須透明。Papanicolaou 染色法步驟如下：

- ① 固定 (fixation)：將血液抹片固定 95% alcohol。
- ② 染色 (stain)：75% alcohol 30 秒→50% alcohol 30 秒→Washing 2 分鐘 →Hematoxylin 30 秒→Washing 1 分鐘→0.5% HCl (acid Alcohol) 10 秒→ Washing 2 分鐘→50% alcohol 30 秒→75%alcohol 30 秒→95% alcohol 30 秒→OG-6 30 秒--1 分鐘→95% alcohol 30 秒→95% alcohol 30 秒→1% Acetic acid ethanol 30 秒→1% phosphotungstic acid ethanol 30 秒→95% alcohol 30 秒→EA-65 30 秒--1 分鐘→95% alcohol 30 秒→95% alcohol 30 秒→100% absolute alcohol 2 分鐘→100% absolute alcohol 2 分鐘→ heat air dry→10 分鐘→ xylene 5 分鐘→ xylene 5 分鐘。
- ③ 封蓋 (mount)：將封片膠滴於已染色的組織切片上，以 45 度角慢慢 蓋上蓋玻片避免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

(9) 統計分析

數據以 means ± SD 表示。以 unpaired t-test 來評估統計差異。P < 0.05 或 P < 0.005 表示具有顯著性。

第二年：HAs 與 ATRA 抗癌作用之可能機轉 (inoculation 動物模式)

(1) 動物來源：

16-20週齡的BALB/c雄性小鼠，體重為20-30公克，購自財團法人國家實驗研究國家實驗動物中心，實驗前至少飼養於動物房一週，使其適應環境；在動物房中，以basal diet CE-2為飼料，蒸餾水無限制飲用，並維持室溫在25°C且日夜各12小時循環 (light-dark cycle) 中，本實驗經由中山醫學大學動物實驗管理小組審查通過。

(2) 化學藥劑：

HAs, stock concentration 100 mg/mL，避光，儲放於4°C 冰箱。欲使用HAs時，加入distilled water，新鮮配製成實驗所需濃度。

(3) 動物分組及藥物處理：

血癌動物模式建立方法依 1996 年Dr. Glass等報告所述(19) 及中國醫藥大學鍾景光老師實驗室之條件進行。將WEHI-3 細胞(1×10^6)，以靜脈注射 (*i.v.*) 方式注入BALB/c 小鼠體內，每週 (0-28 天期間) 根據血癌之臨床特徵檢測是否順利誘發血癌病變。實驗分為八組，隨機將每組分為兩籠，每組 11 隻 (共 88 隻)。Group I 為Control組，不做任何處理；Group II 僅靜脈注射WEHI-3 細胞；Group III除靜脈注射WEHI-3 細胞外，從第一次靜脈注射當天開始，配合給予 0.5% HAs，每日管灌餵食；Group IV除靜脈注射WEHI-3 細胞外，從第一次靜脈注射當天開始，配合給予 2% HAs，每日管灌餵食；Group V除靜脈注射WEHI-3 細胞外，從第一次靜脈注射當天開始，配合給予 3% HAs，每日管灌餵食；Group VI除靜脈注射WEHI-3 細胞外，從第一次靜脈注射當天開始，配合給予 ATRA (15 mg/kg/day)，以胃管方式餵食，每週五天共四週；Group VII單獨處理 ATRA，每日管灌餵食；Group VIII單獨處理 3% HAs，每日管灌餵食。其評估方式包括：觀察外觀之變化、動物活動力是否降低、體重是否改變等，並於每週犧牲實驗小鼠，觀察脾臟及肝臟等器官的外觀及重量變化，並將脾臟組織切片 (5 μm) 以H&E染色觀察紅漿區 (red pulps) 內癌細胞的浸潤情形。

(4) 動物實驗：

(a) 死亡率

每週記錄其老鼠的死亡情形，最後以統計分析之。

(b) 體重

體重的變化是最直接可觀察到大鼠的生長情形及生理狀態，故每兩週記錄其老鼠的體重變化，以統計分析之。

(c) 大體觀察

將老鼠犧牲後，迅速取下骨頭、肝臟、脾臟、腎臟、胃及腸；對其病變性狀（包括大小、形狀、重量、色澤、質地、邊界、表面和切面狀態）進行詳細地解剖、觀察、測量、取材和記錄。

(5) 免疫組織化學染色 (IHC)

同第一年實驗步驟。

(6) Hematoxylin & Eosin stain (H&E stain)

同第一年實驗步驟。

(7) 西方點墨法 (Western blot)

癌細胞或組織塊經處理後，其 lysate 經 western blotting 分析 RAR-related signal pathway RAR, RXR 等蛋白表現之影響。

(8) 統計分析

數據以 means \pm SD 表示。以 unpaired t-test 來評估統計差異。P < 0.05 或 P < 0.005 表示具有顯著性。

結果與討論（含結論與建議）

一、NMU 導致大鼠肝臟及脾臟癌化之組織型態

1. 肝臟：利用 H&E stain 的方法，觀察老鼠肝臟的變化。在 NMU 單獨處理的組別中，老鼠肝臟有嚴重的癌細胞浸潤，與正常組比較 (Fig. 1a)，其組織內空洞處較多（白色處）且大，空洞內佈滿許多癌細胞（較深色且為小圓狀）(Fig. 1b)，而在加入 0.1 及 0.2% 的洛神花花青素可發現其癌細胞較為減少且空洞處也較小，尤其以處理 0.2% 的 HAs 組較為明顯 (Fig. 1c、d)。另外，從 Table 1 可觀察到肝臟的重量正常組平均為 19.32 g，而 NMU 單獨處理的組別肝臟明顯腫大，重量高達 47.09 g，若處理 HAs 0.1% 及 0.2% 則重量降為 24.51 及 19.11 g，老鼠肝臟重與體重的相對重量比也有同樣的趨勢。從結果可得，HAs 對肝臟癌化情況具有延緩的作用。

2. 脾臟：同樣利用 H&E stain 的方法，觀察老鼠脾臟的變化。在正常組中，其脾臟組織內白髓（紫藍色處）與紅髓（橘色處）分佈清楚 (Fig. 2a)，而 NMU 單獨處理的組別，老鼠脾臟則同樣有嚴重的癌細胞浸潤，可以觀察到紅髓部分幾乎消失 (Fig. 2b)，在加入 0.1 及 0.2% 的洛神花花青素可發現其癌細胞較為減少，紅髓部份出現增多，特別是 0.2% 的 HAs 組 (Fig. 2c、d)。另外，從 Table 2 可觀察到脾臟的重量正常組平均為 1.25 g，而 NMU 單獨處理的組別脾臟亦明顯腫大，重量高達 9.65 g，若處理 HAs 0.1% 及 0.2% 則重量降為 3.27 及 1.25 g，老鼠脾臟重與體重的相對重量比也有同樣的趨勢。從結果可得，HAs 亦對脾臟癌化情況具有延緩的作用。

二、NMU 導致大鼠癌化之血液數值分析

此部分的實驗是利用生化及血球自動分析儀分析，觀察在全血中各種血球的數值。

在引發動物血癌過程中，一共偵測四次的血球數值，而當動物因處理NMU而發生血癌現象，血液內白血球的數目會大量增加，並且出現貧血、血液凝固時間長等現象。反之，紅血球、血紅素及血小板等數值卻是顯著降低。在NMU單獨處理的組別，數值與正常組的比較，白血球數（WBC）上升至 $13 \times 10^3/\mu\text{L}$ ，在處理0.2%的洛神花花青素後，降低至約 $8 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Fig. 3a)。紅血球數（RBC）在NMU單獨處理的組別，數值降低為 $7 \times 10^6/\mu\text{L}$ ，而處理0.2%的洛神花花青素後，數值回復至 $9 \times 10^6/\mu\text{L}$ 左右 (Fig. 3b)。另外，血小板數（PLT）在NMU單獨處理的組別，數值降低為 $600 \times 10^3/\mu\text{L}$ ，而處理0.2%的洛神花花青素後，數值回復至 $900 \times 10^3/\mu\text{L}$ 左右 (Fig. 3c)。最後，血紅素（Hb）同樣在NMU單獨處理的組別，數值下降為12 g/dL，而處理0.2%的洛神花花青素後，則發現其數值上升至16 g/dL左右 (Fig. 4d)。從以上四者數值得知NMU確實會引起鼠體內白血球增多現象，而添加HAs會降低這些數值都趨近正常值，且可以與圖四生化數值相互印證。

三、NMU 導致大鼠癌化其體重與致癌率之分析

1. 體重：

體重改變為評估動物健康徵兆的指標之一。在整個引發動物癌化過程中，一共記錄八次的體重數值，每三十天記錄一次。當動物因處理NMU後，食慾降低，雖然體重以平均而言仍是增加的，但與正常組比較，可明顯觀察到其增加的比率是比正常組低，而同時處理HAs 0.1%及0.2%，其體重增加的比率緩慢上升，尤其以處理0.2%的HAs組較為明顯 (Fig. 4)。

2. 致癌率及死亡率：

在本動物實驗模式中，結果證實NMU會誘發的血癌，因此，單獨處理NMU的組別中，發生癌症的大鼠有11隻，故其腫瘤發生率為91.6%。而處理HAs 0.1%組有7隻，腫瘤發生率為58.3%；HAs 0.2%組有4隻，腫瘤發生率為33.3%（但此組老鼠所發生腫瘤之程度均較輕微，圖一至圖二），控制組則為0%。另外，各組的大鼠死亡率如下，控制組為0%，單獨處理NMU組為41.6%，HAs 0.1%組為25%，HAs 0.2%組同樣為25% (Table 3)。

四、癌細胞之確立：區分骨髓性及淋巴性白血病

Myeloperoxidase stain (MPO stain) 可染出顆粒球或單核球中含有過氧化氫之顆粒，用以區分骨髓性及淋巴性白血病(1)；老鼠肝臟、脾臟、腎臟中所存在的癌細胞，利用MPO stain，可看到癌細胞的細胞質有很強的深黃棕色，即骨髓過氧化酶陽性的母細胞(myeloperoxidase-positive blast cells)，證實經由NMU導致大鼠誘發的癌細胞是為骨髓性白血病；對照H&E stain，MPO stain更能明白的表現出癌細胞的分佈情形與位置。此外，處理方法有所不同的動物分組，其肝臟或脾臟之MPO stain的染色結果，由NMU單獨處理的組別其MPO stain的陽性反應，隨著0.1及0.2%的洛神花花青素的加入，MPO stain陽性反應的遞減與消退，與H&E stain之組織型態的觀察結果可以互相印證 (Fig. 5, 6)，證實NMU導致大鼠誘發的癌細胞為骨髓性白血病，非屬淋巴性白血病。

由以上初步結果，在動物實驗的證據下，由肉眼觀察、劉氏染色、柏氏染色和H&E染色等實驗方法，結果發現NMU誘發血癌芽細胞浸潤大白鼠的肝臟、脾臟及腎臟，型態學上血癌芽細胞的減退以致成熟現象的產生清楚可見，可證實NMU的確可誘發Sprague-Dawley大白鼠血癌。因此，未來我們將進行HAs與ATRA比較其功能之實驗，及配合另一動物模式BALB/c mice (Inoculation test) 觀察，以期建立此模式是否能作為預防或延緩罹患血癌之評估方法，並以洛神花萃取物及臨床藥物ATRA證實其在降低血液異常發生率評估模式之可行性。

五、西方點墨法分析

首先，經 NMU 誘導 SD 老鼠的血癌模式，同時處理 ATRA (15 mg/kg/day) 或是 HAs (0.1 與 0.2%)，犧牲後取組織觀察下列數個蛋白之變化。結果 RAR 及 RXR 表現量皆有上升的趨勢 (Fig. 7)。進一步研究 phospho-Akt 蛋白，發現 ATRA 是經由 PI3K/Akt 的訊息傳遞路徑，有效的刺激人類骨髓性白血病的細胞走向分化，在處理 HAs 後，亦有類似的趨勢。另外，發現處理 ATRA 後，細胞會透過 caspase-3 相關路徑而誘發凋亡，但是，在 HAs 的刺激下，caspase-3 並無大量表達，暗示著 ATRA 與 HAs 可能是透過不同路徑而抑制血癌細胞生長。以上只是初步結果，詳細的路徑需繼續深入探討。

六、WEHI-3 細胞誘導小鼠癌化其肝臟及脾臟之組織型態

1. **肝臟：**利用 H&E stain 的方法，觀察老鼠肝臟的變化。在 WEHI-3 細胞誘導血癌的組別中，老鼠肝臟有嚴重的癌細胞浸潤，與正常組比較，其組織內空洞處較多（白色處）且大，空洞內佈滿許多癌細胞（較深色且為小圓狀），而在加入 2 及 3% 的洛神花花青素可發現其癌細胞較為減少且空洞處也較小，尤其以處理 3% 的 HAs 組較為明顯 (Fig. 8)。對照 WEHI-3 細胞誘導及合併處理 ATRA 組，則發現有些微抑制作用。另外，從圖 11 可觀察到肝臟的重量正常組平均為 1.58 g，而以 WEHI-3 細胞誘導的組別肝臟明顯腫大，重量高達 3.53 g，若處理 HAs 0.5、2 及 3% 則重量則降低。從結果可得，HAs 對肝臟癌化情況具有延緩的作用。

2. **脾臟：**同樣利用 H&E stain 的方法，觀察老鼠脾臟的變化。在正常組中，其脾臟組織內白髓（紫藍色處）與紅髓（橘色處）分佈清楚，在 WEHI-3 細胞誘導血癌的組別中，老鼠脾臟則同樣有嚴重的癌細胞浸潤，可以觀察到紅髓部分幾乎消失，在加入洛神花花青素組別可發現其癌細胞較為減少，紅髓部份出現增多，特別是 3% 的 HAs 組 (Fig. 9)。對照 WEHI-3 細胞誘導及合併處理 ATRA 組，則發現有些微抑制作用。另外，從圖 12 可觀察到脾臟的重量正常組平均為 0.16 g，而以 WEHI-3 細胞誘導的組別肝臟明顯腫大，重量高達 0.56g，若處理 HAs 0.5、2 及 3% 則重量則降低。從結果可得，HAs 亦對脾臟癌化情況具有延緩的作用。

七、WEHI-3 細胞誘導小鼠癌化其體重與致癌率之分析

1. 體重：

體重改變為評估動物健康徵兆的指標之一。在整個引發動物癌化過程中，當動物因靜脈注射 WEHI-3 細胞誘導血癌後，雖食慾降低，但體重以平均而言仍是與正常組相似 (Fig. 10)。

2. 致癌率及死亡率：

在本動物實驗模式中，結果證實靜脈注射 WEHI-3 細胞會誘導血癌，因此，單獨處理 WEHI-3 細胞的組別中，發生癌症的小鼠有 11 隻，故其腫瘤發生率為 100%。而處理 HAs 0.5% 組有 10 隻，腫瘤發生率為 90.9%；HAs 2% 組有 10 隻，腫瘤發生率為 90.9%（但此組老鼠所發生腫瘤之程度均較輕微，圖一至圖二），控制組（HAs 3% 組）則為 0%；WEHI-3 細胞誘導及合併處理 ATRA 組，有 9 隻，腫瘤發生率為 81.8%，對照組（單獨處理 ATRA 組）則為 0%。另外，各組的小鼠死亡率如下，控制組為 0%，單獨處理 WEHI-3 細胞組為 45.5%，HAs 0.5% 組為 81.8%，HAs 2% 組為 72.7%，HAs 3% 組為 54.5%；對照組 0%，WEHI-3 細胞誘導及合併處理 ATRA 組為 72.7% (Table 2)。

八、西方點墨法分析

我們進一步配合另一動物模式 BALB/c mice (Inoculation test) 觀察，本實驗中，以 MHC 同源的小鼠血癌細胞株 (WEHI-3)，利用尾靜脈方式注入 BALB/c 小鼠體內，將 BALB/c 小鼠誘導成血癌模式，而後以 HAs 做為治療藥物，連續以管餵方式給予至 28 天，可藉由本實驗結果評估 HAs 對於血癌模式小鼠 (WEHI-3/BALB/c) 的改善功效。BALB/c 將小鼠產生的 WEHI-3 (myelomonocytic leukemia of BALB/c origin) 血癌細胞株注入 BALB/c 小鼠中，便能成功地誘導 BALB/c 小鼠產生血癌。經 WEHI-3 細胞誘導老鼠的血癌模式，同時處理 ATRA (15 mg/kg/day) 或是 HAs (0.5、2 與 3%)，犧牲後取肝臟組織觀察下列數個蛋白之變化。結果在處理 HAs 下，RAR 及 RXR 表現量皆有上升的趨勢 (Fig. 13)。另外，發現處理 ATRA 後，兩個蛋白表現並無顯著差異，此部分結果與表 2 互相印證，因在以 WEHI-3 細胞誘導下合併處理 ATRA，其致癌率及致死率並未顯著下降，暗示著利用 WEHI-3 細胞誘發老鼠血癌模式，可能並未透過 RAR 及 RXR 所調控，以上只是初步結果，詳細的路徑需繼續深入探討。

結論與建議

1. 觀察 NMU 導致大鼠肝臟及脾臟癌化之組織型態。

NMU 會誘發老鼠肝臟及脾臟的癌化作用，而加入洛神花花青素後，其癌化現象減緩。證實 HAs 對肝臟癌化情況具有延緩的作用 (圖 1-2)。

2. 分析 NMU 致大鼠癌化之血液數值。

NMU 亦會使白血球、紅血球、血紅素及血小板四者數值異常，而添加 HAs 會降低這些數值都趨近正常值 (圖 3)。以上證實 HAs 會降低發炎及白血球增多現象。

3. 分析 NMU 致大鼠癌化之體重變化與致癌率。

(1) NMU 組老鼠其體重增加的比率比正常組低，而 HAs 組老鼠體重比率則增加 (圖 4)。

(2) NMU 組老鼠腫瘤發生率為 91.6%，而 HAs 0.1% 及 0.2% 組腫瘤發生率則分別降低為 58.3%、33.3% (表 1)。

(3) NMU 組老鼠死亡率為 41.6%，而 HAs 0.1% 及 0.2% 組死亡率則分別降低為 25%、25% (表 1)。

5. 分析 NMU 導致大鼠之血癌型態。

在 NMU 處理的老鼠血液中，出現大量未成熟的白血球，證實的確為 M3(APL) (圖 5,6)。

6. 分析 HAs 抑制 NMU 誘發血癌之機制。

初步結果推測，可能透過 RAR 路徑調控而抑制老鼠血癌之誘發 (圖 7)。

7. 觀察 WEHI-3 細胞誘導小鼠血液異常之組織型態。

WEHI-3 細胞會誘發老鼠的血癌作用，而加入 HAs 3% 後，可觀察到老鼠肝臟及脾臟的癌化現象減緩 (圖 8、圖 9)。利用 NMU 誘導模式並配合此動物模式 BALB/c mice (Inoculation test)，可以相互驗證此結果能作為預防或延緩罹患血癌之評估方法，並以 HAs 證實其在降低血液異常發生率評

估模式之可行性。

8. 分析 WEHI-3 細胞誘導小鼠血液異常之體重變化與致癌率。

(1) WEHI-3 細胞誘發組老鼠其體重增加的比率各組間並無顯著差異 (圖 10)。

(2) WEHI-3 細胞誘發組老鼠腫瘤發生率為 100%，而共同處理 HAs 3%組腫瘤發生率則降低為 72.7%；另外，共同處理 ATRA 組腫瘤發生率則降低為 81.8% (表 2)。

(3) WEHI-3 細胞誘發組老鼠死亡率為 45.5%，而共同處理 HAs 3%組死亡率則為 54.5%；另外，共同處理 ATRA 組死亡率為 72.7% (表 2)。

9. 分析 HAs 抑制 WEHI-3 細胞誘發血癌之機制。

初步結果推測，HAs 可能透過 RAR 路徑調控而抑制老鼠血癌之誘發 (圖 13)。

參考文獻：

1. Tseng, T. H., Wang, C. J., Kao, E. S., and Chu, H. Y. (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chemico-biological interactions* **101**, 137-148
2. Wang, C. J., Wang, J. M., Lin, W. L., Chu, C. Y., Chou, F. P., and Tseng, T. H. (2000) Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* **38**, 411-416
3. Tseng, T. H., Hsu, J. D., Lo, M. H., Chu, C. Y., Chou, F. P., Huang, C. L., and Wang, C. J. (1998) Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer letters* **126**, 199-207
4. Tseng, T. H., Kao, T. W., Chu, C. Y., Chou, F. P., Lin, W. L., and Wang, C. J. (2000) Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol* **60**, 307-315
5. el-Saadany, S. S., Sitohy, M. Z., Labib, S. M., and el-Massry, R. A. (1991) Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of Hibiscus sabdariffa (Karkade). *Nahrung-Food* **35**, 567-576
6. Esselene, W. B., and Sammy, G. M. (1973) Roselle natural red colorant for foods. *Food Product Development* **7**, 80-82
7. Leclerc, H. (1938) Sida sabdariffa (Hibiscus sabdariffa). *Presse Medicale* **46**, 1060
8. Rankin, S. M., de Whalley, C. V., Hoult, J. R., Jessup, W., Wilkins, G. M., Collard, J., and Leake, D. S. (1993) The modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and gossypetin. *Biochemical Pharmacology* **45**, 67-75
9. de Whalley, C. V., Rankin, S. M., Hoult, J. R., Jessup, W., and Leake, D. S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochemical Pharmacology* **39**, 1743-1750
10. Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N., and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Research* **53**, 2775-2779
11. Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Hirose, Y., Wang, A., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., and Ogawa, H. (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene. *Cancer Research* **54**, 4653-4659
12. Kawamori, T., Tanaka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M., and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Japanese Journal of Cancer Research* **85**, 686-691
13. Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer* **75**, 1433-1439
14. Hirose, Y., Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K., and Hara, A. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis* **16**, 2337-2342
15. Dirsch, V. M., Gerbes, A. L., and Vollmar, A. M. (1998) Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species

- and activation of nuclear factor kappaB. *Molecular pharmacology* **53**, 402-407
16. Hou, D. X., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terahara, N., Yoshimoto, M., and Fujii, M. (2003) Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *International journal of oncology* **23**, 705-712
 17. Li, Y. C., Tyan, Y. S., Kuo, H. M., Chang, W. C., Hsia, T. C., and Chung, J. G. (2004) Baicalein induced in vitro apoptosis undergo caspases activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol* **42**, 37-43
 18. Huggins, C. B., Grand, L., and Ueda, N. (1982) Specific induction of erythroleukemia and myelogenous leukemia in Sprague-Dawley rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 5411-5414
 19. Glass, B., Uharek, L., Zeis, M., Loeffler, H., Mueller-Ruchholtz, W., and Gassmann, W. (1996) Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *British journal of haematology* **93**, 412-420

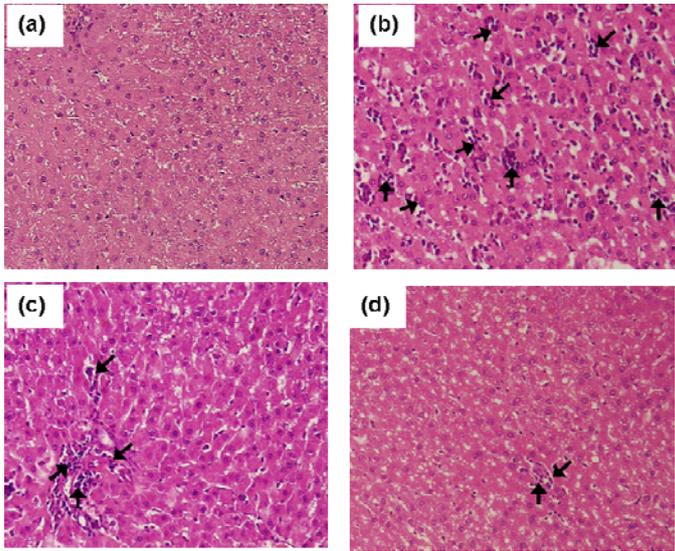


Figure 1. Pathological analysis of rat liver was using H&E stain. (a) normal control, (b) the animal were treated with NMU alone (35 mg/kg), (c) NMU and HAs (0.1%), (d) NMU and HAs (0.2%).The arrow indicated cancer cells invaded in liver tissue. 100X

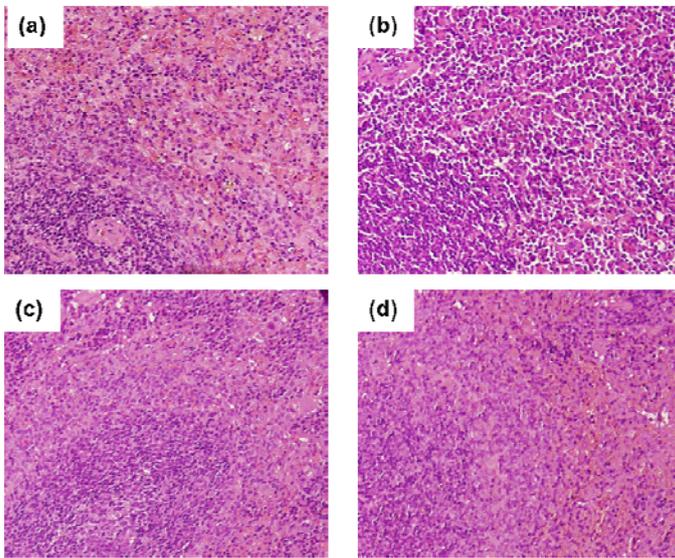


Figure 2. Pathological analysis of rat spleen was using H&E stain. (a) normal control, (b) the animal were treated with NMU alone (35 mg/kg), (c) NMU and HAs (0.1%), (d) NMU and HAs (0.2%). 100X

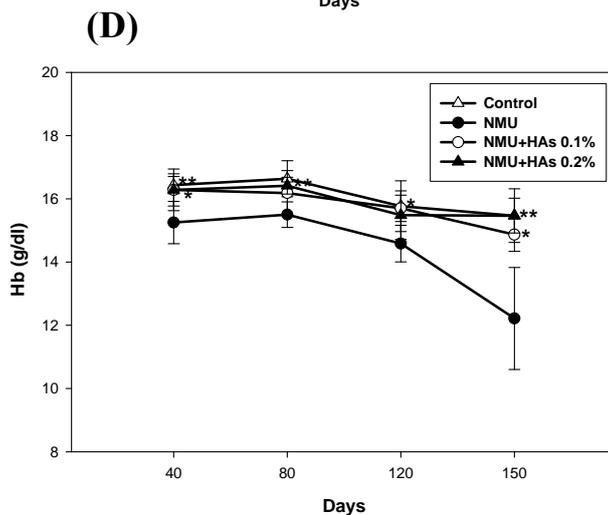
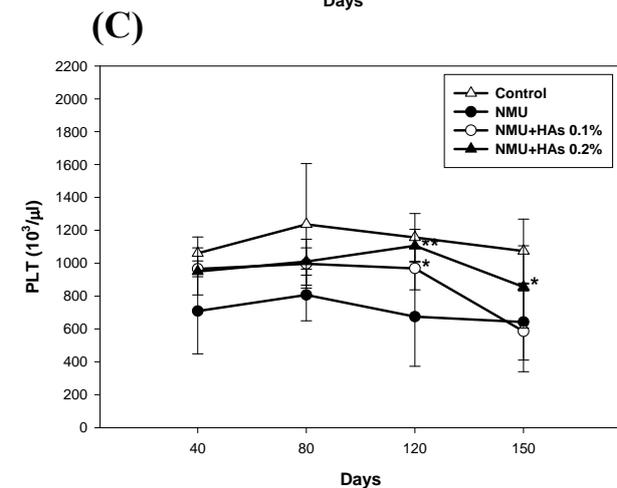
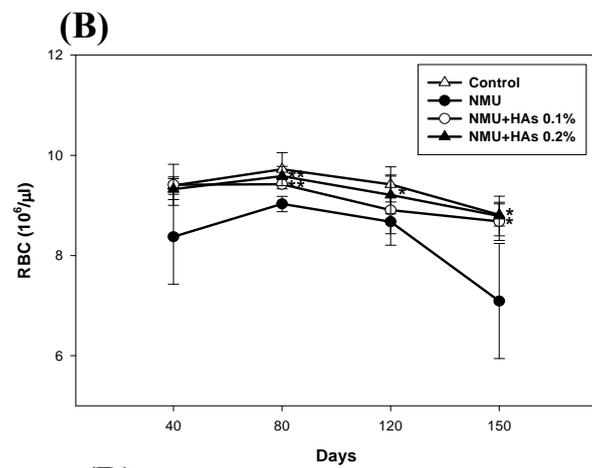
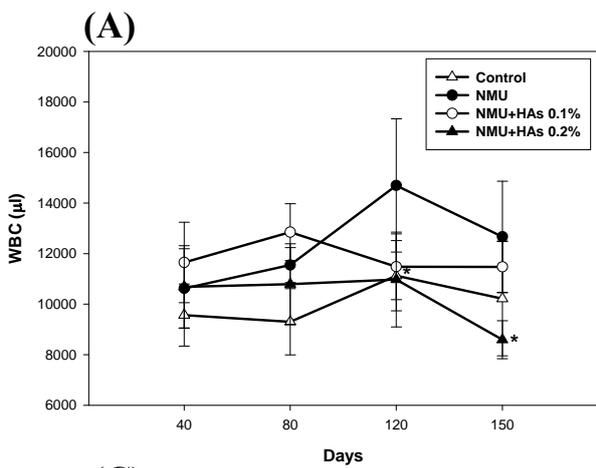


Figure 3. Effect of HAs on the count of white blood cell, red blood cell, platelet and hemoglobin in rats injected NMU by iv. HAs were given orally for at least 150 days and 35 mg/kg NMU (in saline) were injected 2 weekly for 7 times were as described in method. The indicated days are counted after iv. NMU and record one times about 30--40 days. The WBC values were expressed as mean \pm SD, n=12. *p < 0.05, compared with NMU-treated group.

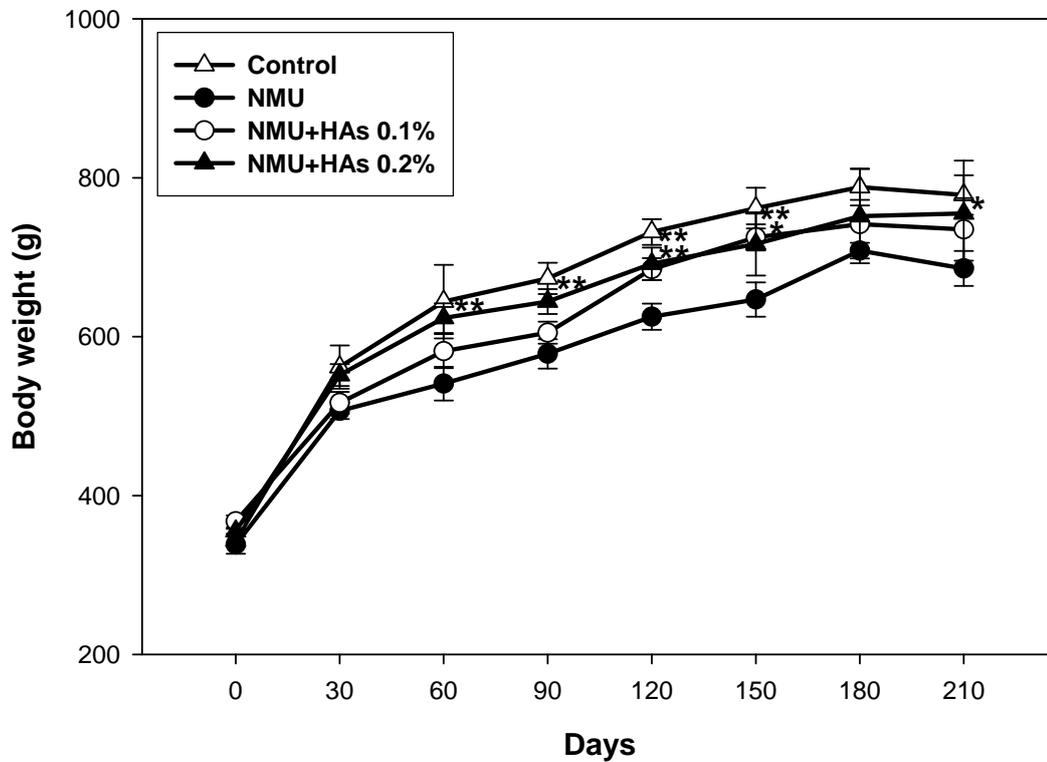


Figure 4. Effect of HAs on the body weight of rats injected NMU by iv. HAs were given orally for at least 150 days and 35 mg/kg NMU (in saline) were injected 2 weekly for 7 times were as described in method. Every 30 days record one times. The body weight values were expressed as mean \pm SD, n=12. *p < 0.05; *p < 0.005, compared with NMU-treated group.

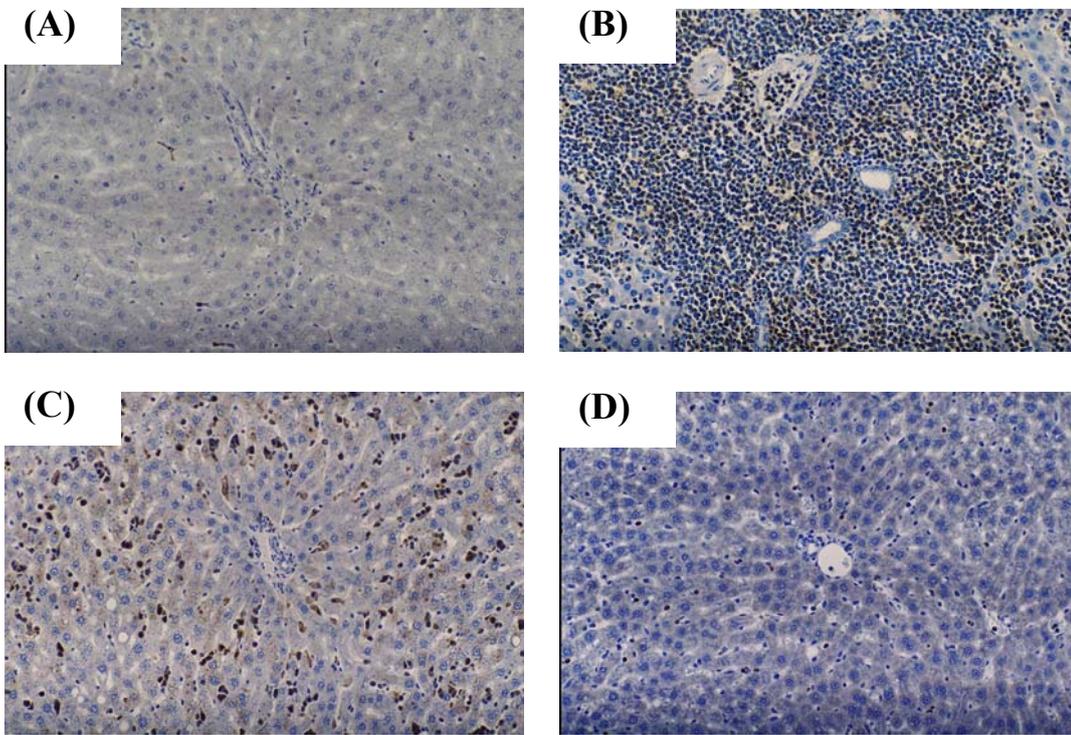


Figure 5. Pathological analysis of rat liver was using MPO stain. (A) normal control, (B) the animal were treated with NMU alone (35 mg/kg), shown prominent myeloperoxidase-positive cells, (C) NMU and HAS (0.1%), shown reduced myeloperoxidase-positive cells, (D) NMU and HAS (0.2%), original magnification 200 X.

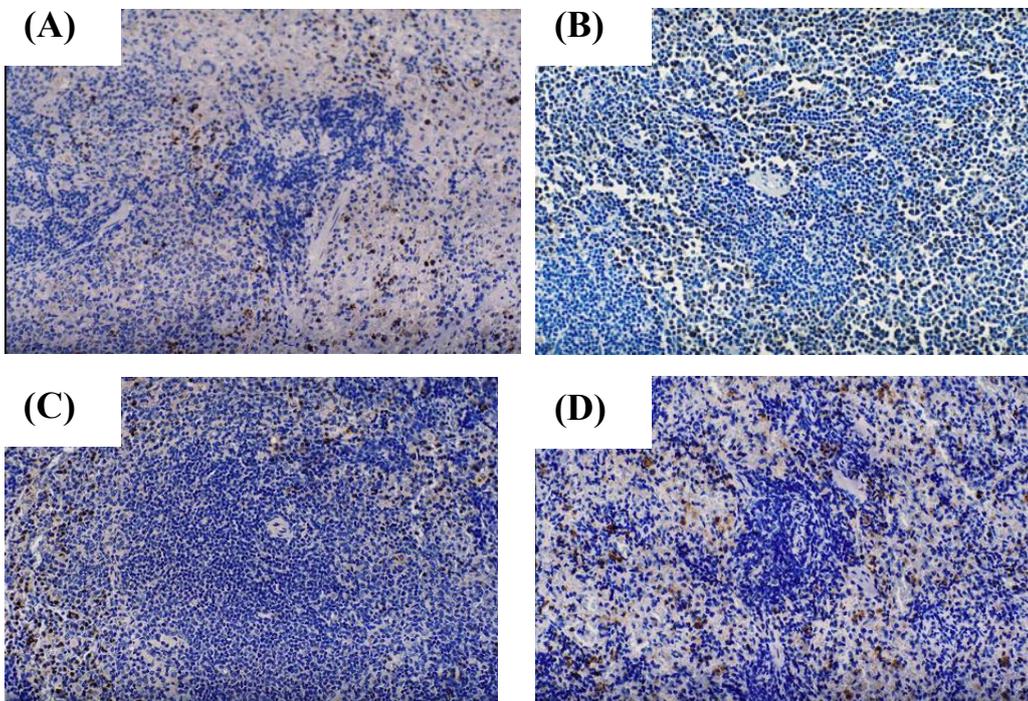


Figure 6. Pathological analysis of rat spleen was using MPO stain. (A) normal control, (B) the animal were treated with NMU alone (35 mg/kg), shown prominent myeloperoxidase-positive cells, (C) NMU and HAS (0.1%), shown reduced myeloperoxidase-positive cells. (D) NMU and HAS (0.2%), original magnification 200 X.

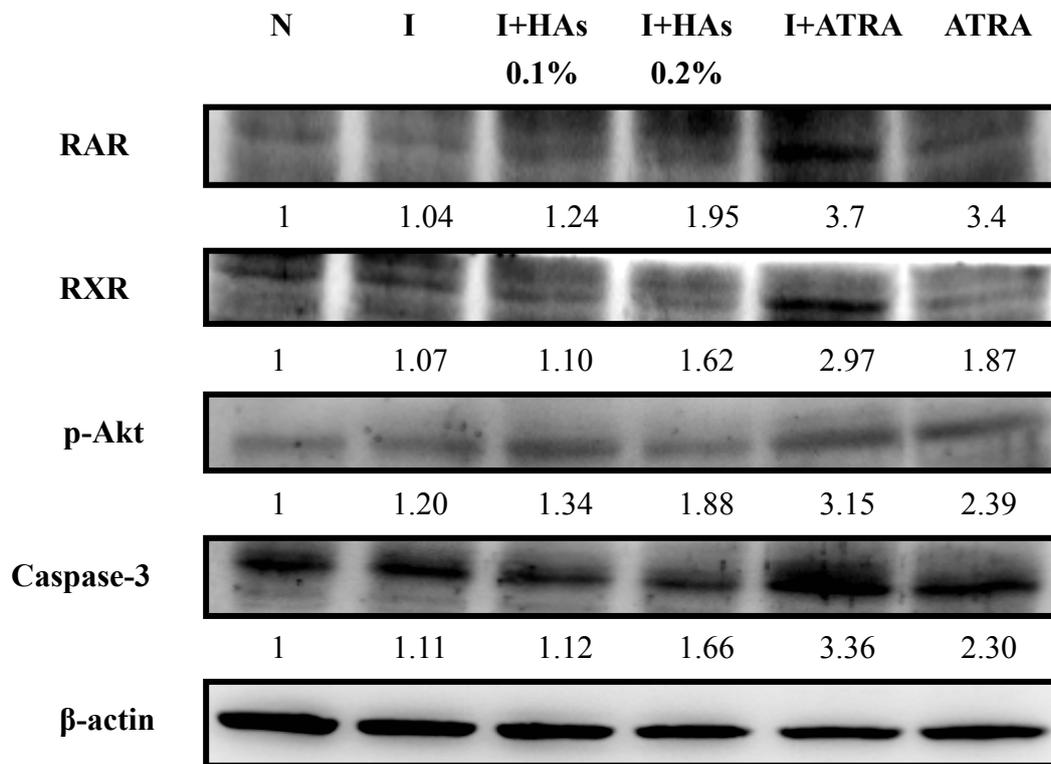
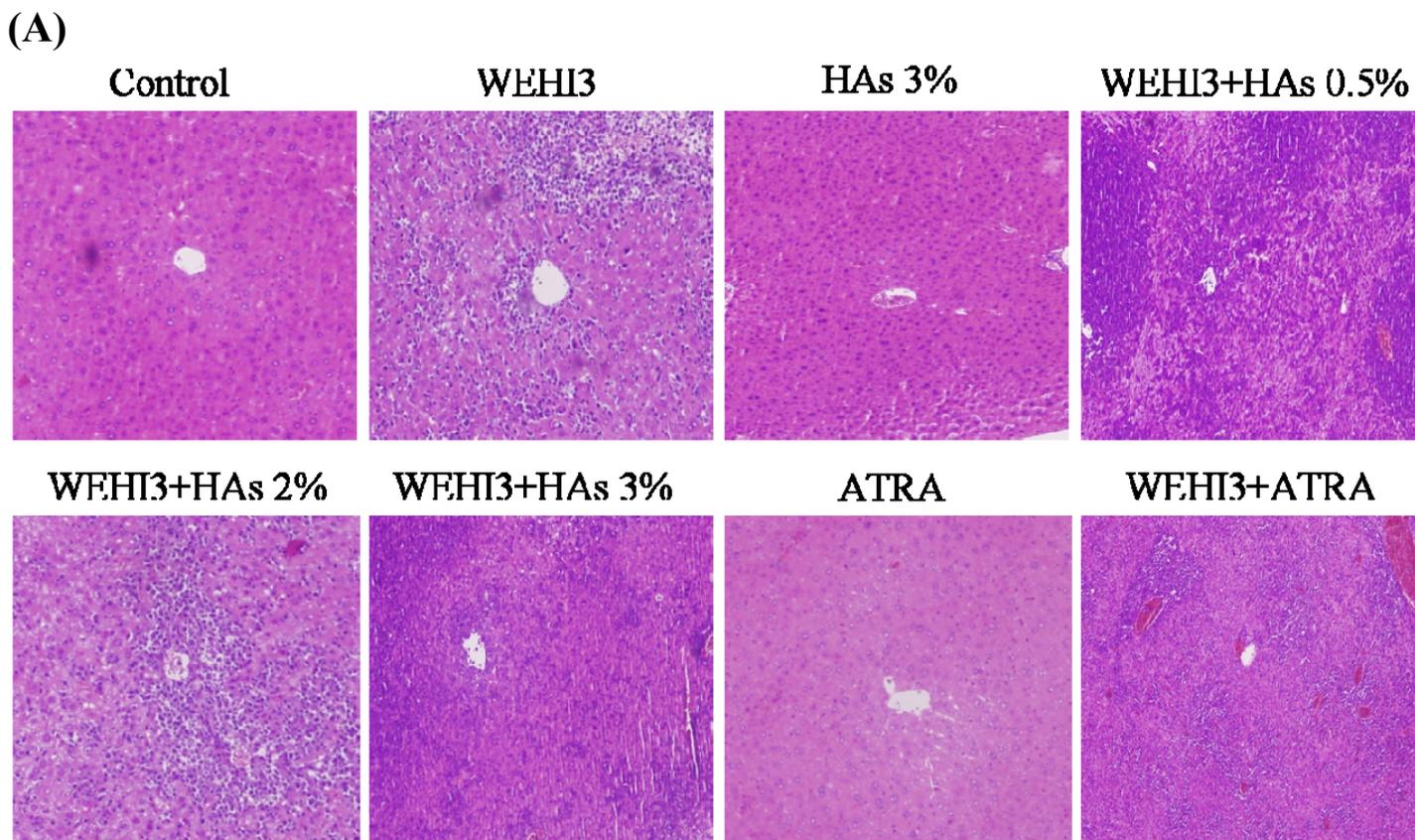


Figure 7. Effect of HAs-induced RAR and RXR activation. SD rats were treated with NMU (35 mg/ml) and then feed HAs or ATRA for 210 days and analyzed by immunoblotting with anti-RAR, RXR, phospho-Akt and caspase-3 antibody. Actin was the loading control. This figure is a representative of three independent experiments with similar results. N: Normal group; I: NMU-induced group; I+HAs0.1 or 0.2%: after NMU injection then treat HAs 0.1 or 0.2% group; I+ATRA: after NMU injection then treat ATRA (15 mg/kg) group; ATRA: treat ATRA alone group.



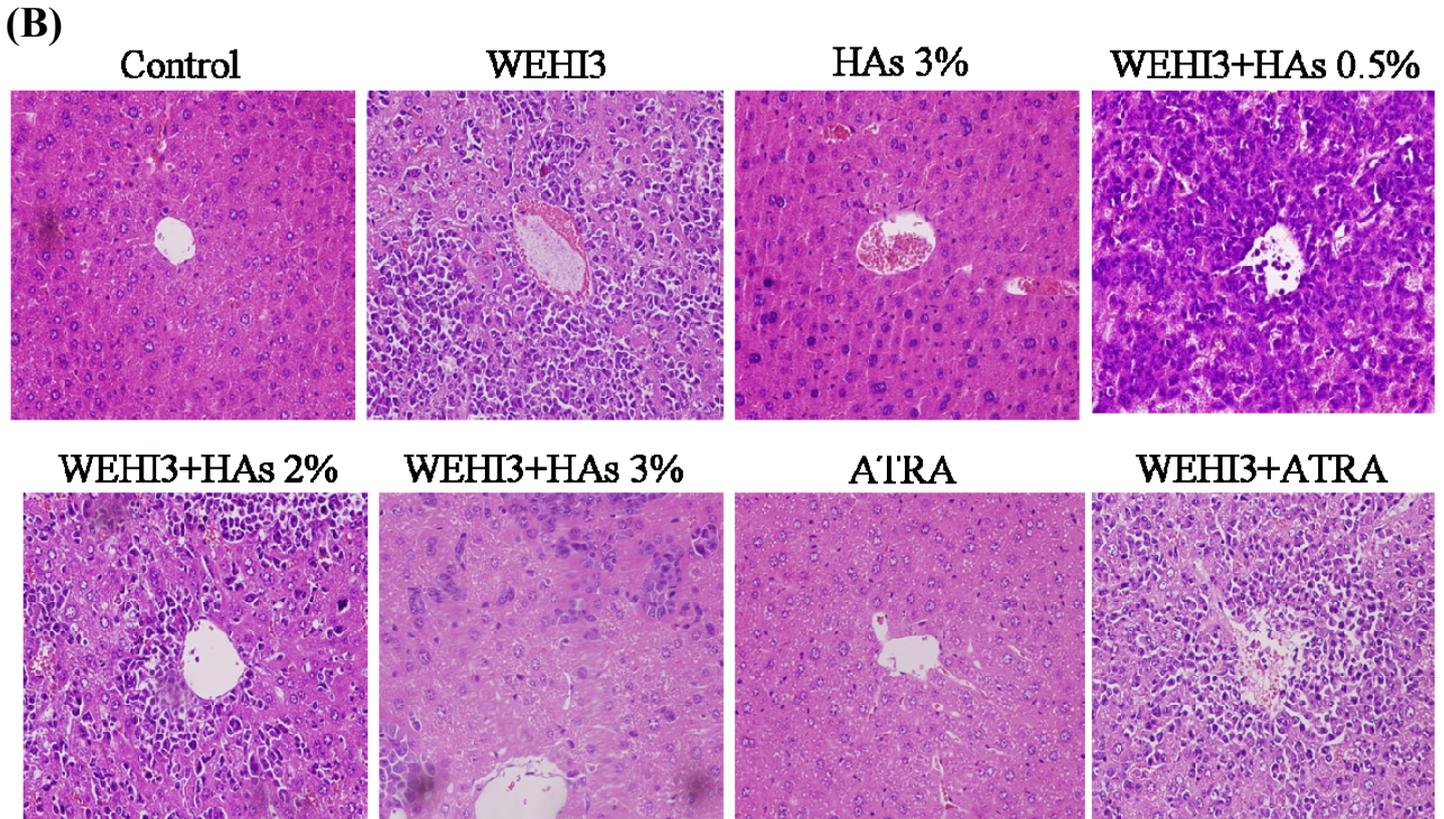
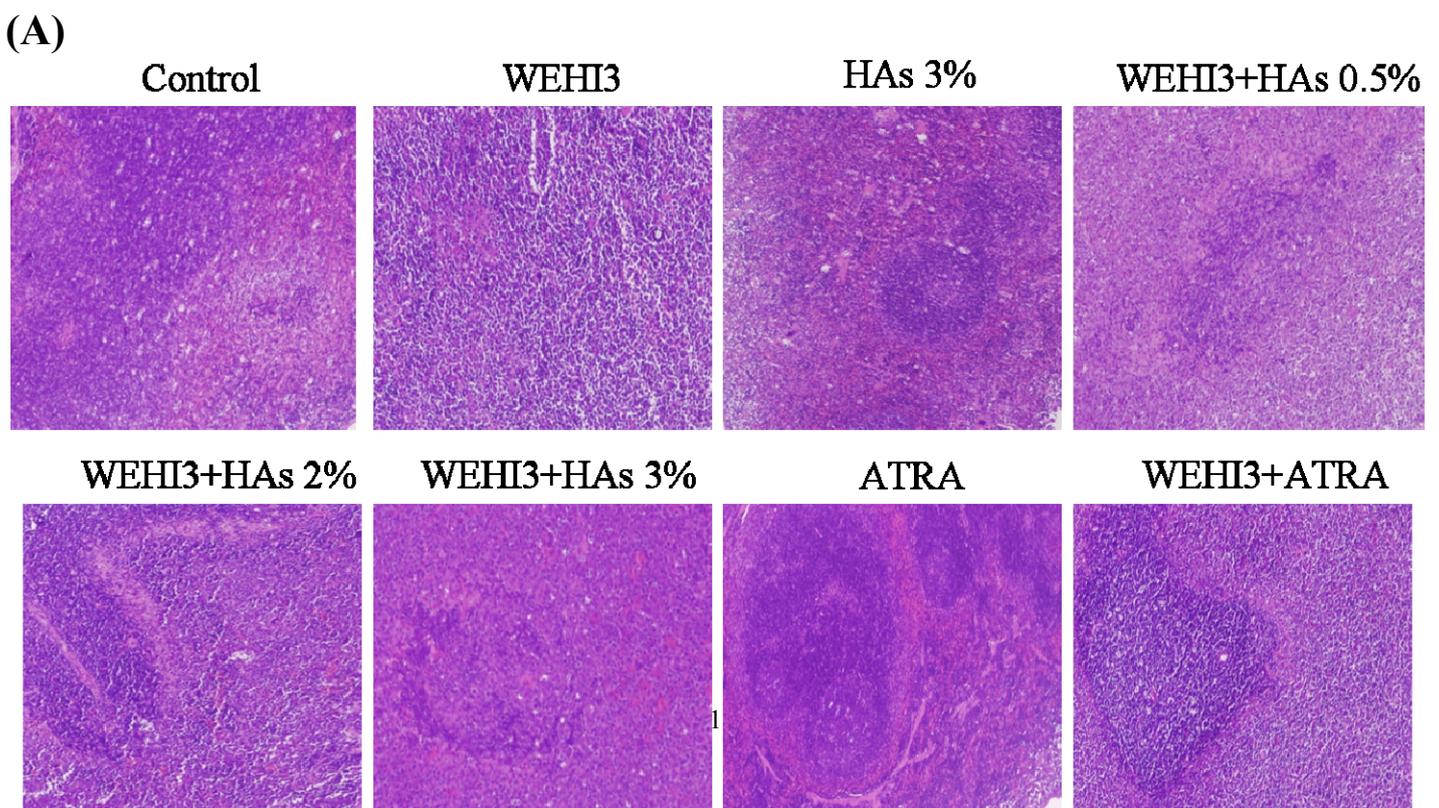


Figure 8. Histopathological examinations of BALB/c mice after injection with WEHI-3 cells and were treated with HAs over 3 weeks. Paraffin-embedded sections of representative liver tissues were by H&E staining. After animals were injected with WEHI-3 cells (1×10^6 cells/100 μ L) in RPMI 1640 medium and co-treated with HAs or ATRA, animals were sacrificed and collected liver organ. Control group; HAs 3%: mice were treated 3% HAs alone; WEHI3: WEHI-3 cells (1×10^6 cells/100 μ L)-induced leukemia group; WEHI3+HAs 0.5, 2 or 3%: after WEHI-3 cells one week injection then treat HAs 0.5, 2 or 3% group; WEHI3+ATRA: after WEHI-3 cells one week injection then treat ATRA group; ATRA: treat ATRA (15 mg/kg) alone group. Representative pictures were show in 40X (A) and 200X (B).



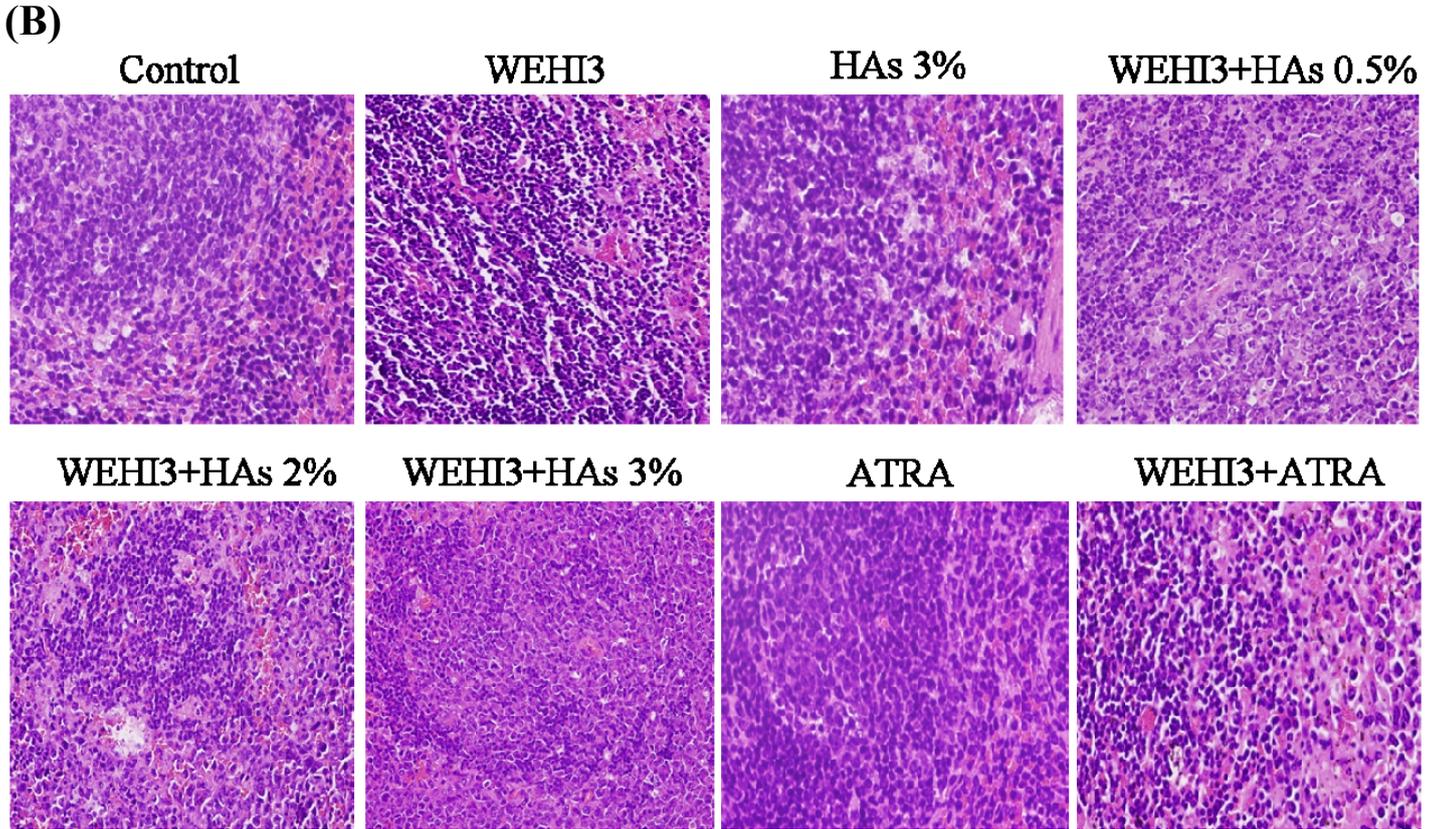


Figure 9. Histopathological examinations of BALB/c mice after injection with WEHI-3 cells and were treated with HAs over 3 weeks. Paraffin-embedded sections of representative spleen tissues were by H&E staining. After animals were injected with WEHI-3 cells (1×10^6 cells/100 μ L) in RPMI 1640 medium and co-treated with HAs or ATRA, animals were sacrificed and collected liver organ. Control group; HAs 3%: mice were treated 3% HAs alone; WEHI3: WEHI-3 cells (1×10^6 cells/100 μ L)-induced leukemia group; WEHI3+HAs 0.5, 2 or 3%: after WEHI-3 cells one week injection then treat HAs 0.5, 2 or 3% group; WEHI3+ATRA: after WEHI-3 cells one week injection then treat ATRA group; ATRA: treat ATRA (15 mg/kg) alone group. Representative pictures were show in 40X (A) and 200X (B).

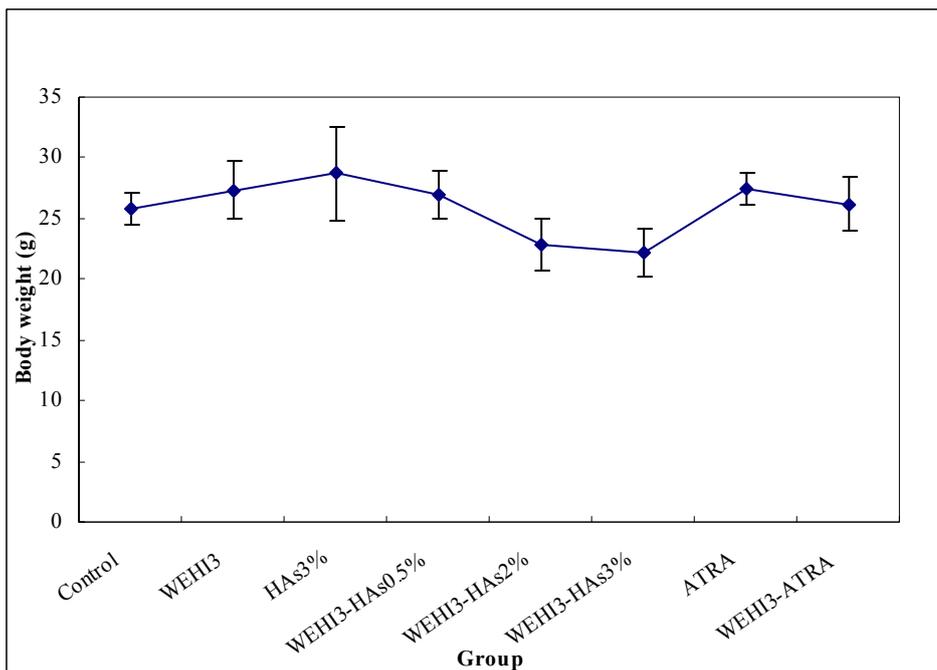


Figure 10. Body weight changes in WEHI-3-induced leukemia model and/or treated HAs were shown. Body weights of animals in four groups were recorded about 7-10 days one times. The body weight values were expressed as mean \pm SD, n=11.

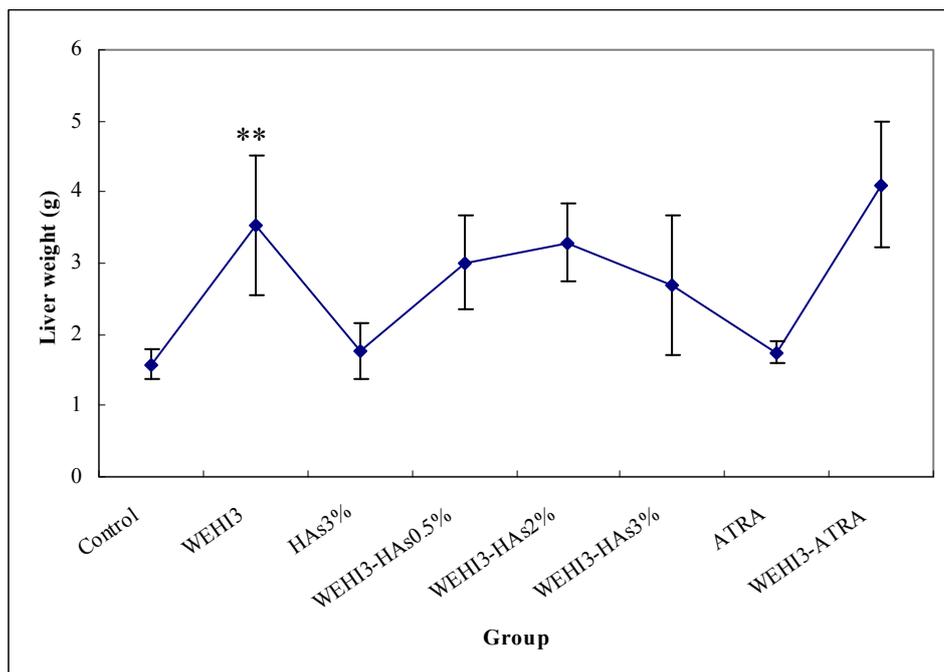


Figure 11. Liver weight changes in WEHI-3-induced leukemia model and/or treated HAs were shown. Liver weights of animals in four groups were recorded until sacrifice one times. The liver weight values were expressed as mean \pm SD, n=11.

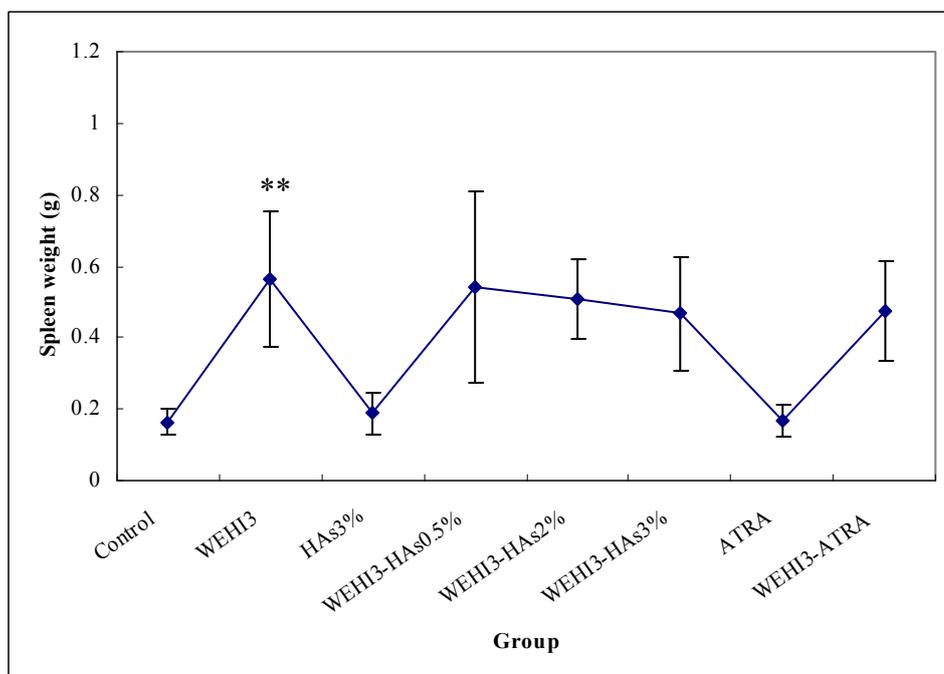


Figure 12. Spleen weight changes in WEHI-3-induced leukemia model and/or treated HAs were shown. Spleen weights of animals in four groups were recorded until sacrifice one times. The spleen weight values were expressed as mean \pm SD, n=11.

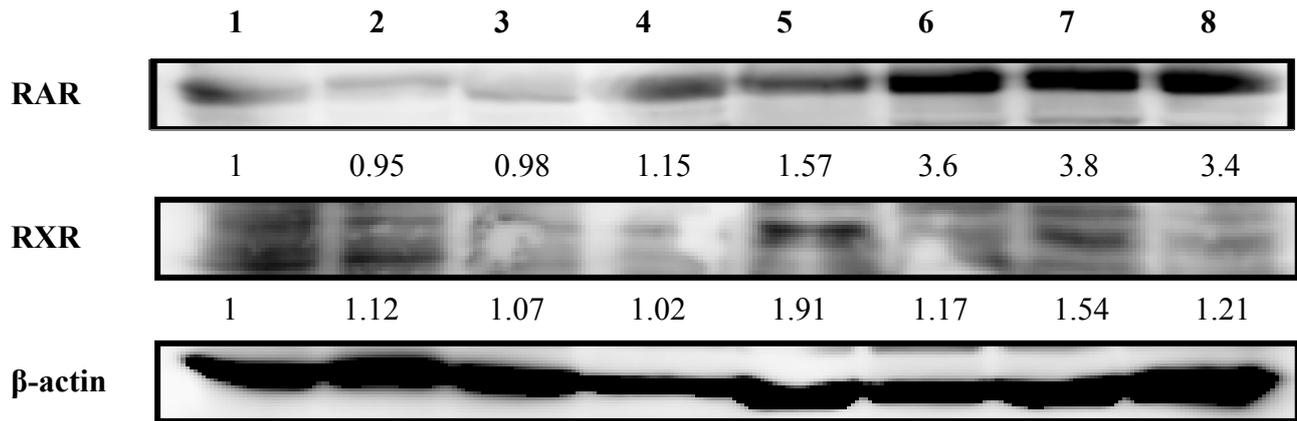


Figure 13. Effect of HAs-induced RAR and RXR activation. BALB/c mice were injected with WEHI-3 cells and then feed HAs or ATRA for over 3weeks and analyzed by immunoblotting with anti-RAR and RXR antibody. Actin was the loading control. This figure is a representative of three independent experiments with similar results. 1: Normal group; 2: WEHI-3 cells injection group; 3-5: after WEHI-3 cells injection then treat HAs 0.5, 2 or 3% group; 6: after WEHI-3 cells injection then treat ATRA (15 mg/kg) group; 7: treat HAs 3% alone group; 8: treat ATRA alone group.

Table 1
Inhibitory effects of HAs on NMU-induced rats tumorigenesis

| Treatment ^a | Leukemia | |
|------------------------|---------------------|---------------|
| | Tumor Incidence (%) | Rate of death |
| Control | 0/12 (0%) | 0/12 (0%) |
| NMU only | 11/12 (91.6%) | 5/12 (41.6%) |
| NMU+HAs 0.1% | 7/12 (58.3%) | 3/12 (25%) |
| NMU+HAs 0.2% | 4/12 (33.3%) | 3/12 (25%) |

a. First times i.v. NMU and treated various concentrations of HAs (0.1% and 0.2%) at same day.

Table 2
Inhibitory effects of HAs on WEHI-3-induced leukemia model in BALB/c mice

| Treatment ^a | Leukemia | |
|------------------------|---------------------|---------------|
| | Tumor Incidence (%) | Rate of death |
| Normal | 0/11 (0%) | 0/11 (0%) |

| | | |
|------------------------|----------------------|---------------------|
| WEHI-3 | 11/11 (100%) | 5/11 (45.5%) |
| HAs 3% | 0/11 (0%) | 0/11 (0%) |
| WEHI-3+HAs 0.5% | 10/11 (90.9%) | 9/11 (81.8%) |
| WEHI-3+HAs 2% | 10/11 (90.9%) | 8/11 (72.7%) |
| WEHI-3+HAs 3% | 8/11 (72.7%) | 6/11 (54.5%) |
| ATRA | 0/11 (0%) | 0/11 (0%) |
| WEHI-3+ATRA | 9/11 (81.8%) | 8/11 (72.7%) |

a The animals were injected with WEHI-3 cells after then treated without or with HAs 0.5-3% until 32 days.

附錄

部份成果已發表，如下。

Yun-Ching Chang, Jeng-Dong Hsu, Wea-Lung Lin, Yi-Ju Lee, Chau-Jong Wang. High incidence of acute promyelocytic leukemia a specifically induced by *N*-Nitroso-*N*-Methylurea (NMU) in Sprague-Dawley rats. *Archives of Toxicology*, 2011, In press.

Arch Toxicol
DOI 10.1007/s00204-011-0753-7

GENOTOXICITY AND CARCINOGENICITY

High incidence of acute promyelocytic leukemia specifically induced by *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) in Sprague–Dawley rats

**Yun-Ching Chang · Jeng-Dong Hsu ·
Wea-Lung Lin · Yi-Ju Lee · Chau-Jong Wang**

Received: 2 May 2011 / Accepted: 14 September 2011
© Springer-Verlag 2011

行政院國家科學委員會補助國內專家學者出席國際學術會議報告

99年 04月 30日

附件三

| | | | |
|----------------|---|--------------|------------------------------|
| 報告人姓名 | 張雲菁 | 服務機構 及職稱 | 中山醫學大學 生化暨生物科技研究所 助理教授 |
| 時間 會議地點 | 2010/4/17-2010/4/21 Washington, DC | 本會核定 補助文號 | NSC 98-2313-B-040 -005 -MY2 |
| 會議 名稱 | (中文) 2010 美國癌症醫學研究學會年會 (英文) 2010 Proceedings of the American Association for Cancer Research | | |
| 發表 論文 題目 | (中文) 荷葉水萃物在人類乳癌細胞的抑制作用 (英文) Inhibitory effects of the water extract of <i>Nelumbo Nucifera</i> leaf on human breast carcinoma MCF-7 cells in vitro and in vivo | | |

報告內容應包括下列各項：

一、參加會議經過

今年為美國癌症醫學研究學會第 101 屆，研討會日期為 2010 年 4 月 17 日至 21 日。本次會議搭乘長榮航空班機 BR016 由台灣桃園國際機場起飛，飛行時間約 11 個小時左右，在洛杉磯轉機，再搭乘美國航空至華盛頓，經過 5 小時當地時間上午 06 點 30 分抵達美國杜勒斯(Dulles)國際機場。本次研討會為 AACR 每年所召開之重要例行有關癌症之國際研討會，於美國華盛頓特區(Washington, DC)的 Walter E. Washington Convention Center 舉辦，為期一共 5 天的會期，參加人士囊括世界各大學教授、研究生、各研究中心人員及生技相關公司人員等。此次會議個人於會中發表壁報論文一篇，論文被安排在 04 月 19 日 PM2:00~5:00，發表的研究內容為荷葉萃取物抑制腫瘤生長之功效，並進一步探討其中抑制之機制，發表時段中，與參加會議的各國學者進行問題的討論，並交換研究心得。回程於 04 月 21 日下午 6 點 30 分搭乘美國航空班機 AA075 同樣由美國杜勒斯(Dulles)國際機場至洛杉磯轉機，由台灣桃園國際機場返抵國門，結束此次會議行程。

二、與會心得

這是本人第一次參加國際性的研討會，出國前懷抱著雀躍不已的心情，希望這次能有所獲得，最後回國後也的確如此，因為見識到國際性研討會的規模，參與國際會議不外乎瞭解目前最新的發展情況、具潛力的方向以及語言上的表達訓練，從中除了增加個人發表論文的經驗以外，更可以藉由聆聽許多的演講以及座談會增長各領域的知識水平，雖然每個作者的報告大約只有 20 分鐘，但已經可以讓我們對現今國際上相關研究的方法、進展、趨勢具有基本的認識，這對我們的研究是有所裨益。再者，各個展示廳同時段所發表的相關主題，更可以使相同領域的學者們分享彼此概念及作法，以激發自己的一些研究新想法，獲益匪淺，也希望將來能多參與大型的國際研討會。另外，展示廳中亦有許多知名的廠商參展，在參觀的過程中，可發現最新的或者是使用更加便利的儀器，這也是參加會議的另一收穫。

三、建議

希望國內將來也能舉辦許多大型的國際研討會。

四、攜回資料名稱及內容

- (1) 第101屆美國癌症醫學研究學會年會議程：研討會每日發表論文之場次、時間、發表人等。
- (2) 會議論文集【DVD】。
- (3) 研討會紀念手提袋一只。

五、其他

本人十分感謝國科會能提供適當的補助，並且希望國科會能夠持續支持學者參與相關的學術活動，提高國內的研究水平。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/31

| | |
|-----------|--|
| 國科會補助計畫 | 計畫名稱: 洛神花青素抑制動物致血癌之作用及其分子機轉 |
| | 計畫主持人: 張雲菁 |
| | 計畫編號: 98-2313-B-040-005-MY2 學門領域: 食品及農化 |
| 無研發成果推廣資料 | |

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

| 計畫主持人：張雲菁 | | 計畫編號：98-2313-B-040-005-MY2 | | | | 計畫名稱：洛神花青素抑制動物致血癌之作用及其分子機轉 | |
|-----------|-------------|----------------------------|-----------------|------------|------|-------------------------------------|--|
| 成果項目 | | 量化 | | | 單位 | 備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等） | |
| | | 實際已達成數（被接受或已發表） | 預期總達成數（含實際已達成數） | 本計畫實際貢獻百分比 | | | |
| 國內 | 論文著作 | 期刊論文 | 0 | 0 | 100% | 篇 | |
| | | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 研討會論文 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專書 | 0 | 0 | 100% | | |
| | 專利 | 申請中件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 已獲得件數 | 0 | 0 | 100% | | |
| | 技術移轉 | 件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 權利金 | 0 | 0 | 100% | 千元 | |
| | 參與計畫人力（本國籍） | 碩士生 | 3 | 2 | 100% | 人次 | |
| | | 博士生 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專任助理 | 0 | 0 | 100% | | |
| 國外 | 論文著作 | 期刊論文 | 1 | 1 | 100% | 篇 | |
| | | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 研討會論文 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專書 | 0 | 0 | 100% | 章/本 | |
| | 專利 | 申請中件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 已獲得件數 | 0 | 0 | 100% | | |
| | 技術移轉 | 件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 權利金 | 0 | 0 | 100% | 千元 | |
| | 參與計畫人力（外國籍） | 碩士生 | 0 | 0 | 100% | 人次 | |
| | | 博士生 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專任助理 | 0 | 0 | 100% | | |

| | |
|--|----|
| <p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p> | 無。 |
|--|----|

| | 成果項目 | 量化 | 名稱或內容性質簡述 |
|---|-----------------|----|-----------|
| 科 教 處 計 畫 加 填 項 目 | 測驗工具(含質性與量性) | 0 | |
| | 課程/模組 | 0 | |
| | 電腦及網路系統或工具 | 0 | |
| | 教材 | 0 | |
| | 舉辦之活動/競賽 | 0 | |
| | 研討會/工作坊 | 0 | |
| | 電子報、網站 | 0 | |
| | 計畫成果推廣之參與(閱聽)人數 | 0 | |

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

本計劃的一部分成果已發表，但尚有未發表的資料正在整理撰寫中。另外，洛神花萃取已取得台灣、大陸及美國專利。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

大部份的白血病發病原因不清楚，小部份可以找到原因的可歸類的例子，但畢竟只佔少數，對大多數的白血病而言，此疾病是難去預防。綜合以上研究結果，首次完成上述之動物試驗，並發現洛神花花青素具有顯著的抑制化學致癌物誘使大白鼠致血癌之作用，配合利用不同動物實驗模式，以老鼠 WEHI-3 細胞誘發血癌作用，可證實 HAs 對降低或延緩血癌確實有某個程度的作用，希望藉由我們的發現可以在癌症治療上能有所裨益，未來將上述成果於學術期刊上發表，目前本計劃的部分成果已發表，但尚有未發表的資料正在整理撰寫中，預期應有兩篇論文的發表。在社會影響方面，本計畫對民眾具教育宣導之成果預防勝於治療，花青素可預防血液異常之作用。而在應用價值上有兩點：(1) 建立評估血液異常（尤其是血癌）之評估方法。(2) 發現花青素可降低血液異常之作用。