

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

洛神葉功能性成分抗前列腺癌作用之研究(第3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-040-003-MY3
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：林慧萱
共同主持人：王朝鐘、陳璟賢
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：尹慧敏
碩士班研究生-兼任助理人員：林佳良

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 101 年 10 月 31 日

中文摘要：近年來，許多研究趨向以天然物質來抑制或延遲癌症的發生，可食的植物被認為是抗癌藥物的來源之一。洛神葉在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物，過去的研究顯示洛神葉具有降血糖及抑制雄激素之功效，以及其富含類黃酮 (flavonoids) 等多酚成分，顯示洛神葉可以扮演一個化學預防的角色。於是本計畫針對洛神葉萃取物之抗前列腺癌活性進行分析，探討洛神葉水萃取物(H. sabdariffa leaf extract, HLE)以及多酚萃取物(H. sabdariffa leaf polyphenol-rich extract, HLP)對前列腺癌細胞生長的影响及其可能抗癌的機轉。

第一年的工作進行 HLE 及 HLP 之成份分析，確認兩者為富含多酚之萃取物，HLE 成份中以鞣花酸 (ellagic acid, EA) 的比例最高；HLP 則以兒茶素類 ECG 和 catechin 等類黃酮含量最多。首先 in vitro 試驗中，探討 HLE 及 HLP 對人類前列腺癌細胞的影响及其可能造成癌細胞死亡的機轉。以 HLE/HLP 進行篩選三株細胞 (LNCaP、PC3 和 DU145) 的存活測試。MTT 結果顯示：HLE/HLP 會抑制雄激素依賴性前列腺癌細胞 LNCaP 之生長，相較於其他兩株非雄激素依賴性前列腺癌細胞 PC3 及 DU145 則抑制力較小。2.5 mg/mL HLE/ 250 µg/mL HLP 可達抑制 LNCaP 細胞生長約 50%，而且呈現濃度依賴性。後續以 LNCaP 細胞為實驗模式，各別處理 HLE/HLP 及其功能性成份 EA 或 ECG 在不同劑量下，並比較植物固醇 β -sitosterol 抗前列腺癌之作用，觀察細胞凋亡

(apoptosis) 及細胞自噬死亡 (autophagy) 的特徵。結果發現隨著處理 HLE 濃度增加造成 LNCaP 細胞凋亡的現象也愈顯著。流式細胞儀分析中，LNCaP 細胞處理 HLE 培養 24 小時後，其細胞週期 subG1 期出現明顯的 apoptotic peak，以 TUNEL 染色作為確認細胞凋亡試驗；而在 HLP 組別則在 48 小時觀察到部分細胞凋亡以及細胞週期 G0/G1 停滯的趨勢，並透過 AVO 染色發現 HLP 能夠引發細胞自噬作用。進一步藉由西方點墨法及抑制劑分析證實 HLE 誘導 LNCaP 細胞凋亡主要是透過粒線體內在路徑 (Bax/cytochrome c-mediated caspase-9) 所調控，部分藉由死亡接收器外在路徑 (FasL-mediated caspase-8) 所影響。HLP 則調控多重死亡機制：主要影響 FasL 凋亡路徑、LC3 誘導自噬小體

(autophagosome) 形成路徑及 p53 調控細胞週期停滯作用。

第二年利用裸鼠移植性腫瘤試驗模式，分析在 in vivo 狀態下 HLE 及 HLP 之抑癌作用及其機轉，並與洛神植株特有類黃酮--棉花皮素 (gossypetin) 作比較。動物實驗結果中發現：

HLE、HLP 和 gossypetin 對於 LNCaP 細胞移植誘導之裸鼠腫

瘤發生、腫瘤生長以及死亡確實有某個程度的抑制作用。進一步藉由 TUNEL 實驗得知，HLE、HLP 和 gossypetin 使腫瘤組織內細胞凋亡；再以西方點墨法及免疫組織染色法進行腫瘤組織蛋白分析，提出 HLE 和 HLP 可能藉由調控 Bax 及 FasL 機轉路徑以促使腫瘤細胞邁向凋亡，進而抑制腫瘤之形成及生長。並證實 HLE、HLP 和 gossypetin 抑制腫瘤組織增生及減少惡化之情形；其調控路徑可能透過 p53、p21、p27 相關調控蛋白使細胞週期停滯及 LXR α /ABCA1/Flotillin 路徑抑制前列腺癌細胞的惡化表現。HLE、HLP 和 gossypetin 也能夠有效降低 tPSA、血紅素含量以及腫瘤組織中 VEGF 的表現，此結果顯示出 HLE、HLP 和 gossypetin 三者可能具有抑制轉移 (metastasis) 及血管新生 (angiogenesis) 之能力。

第三年的工作釐清 HLP 之抑制癌細胞轉移侵襲作用及分子機制。首先，利用傷口癒合和 Boyden chamber 分析 HLP 對 LNCaP 細胞株移動和侵襲能力的影響，呈現濃度及時間的效應關係。利用 zymography 的方法分析細胞移動侵襲相關蛋白酶表現，結果發現 HLP 對 MMP-9 的活性、mRNA 及蛋白表現亦呈現明顯的抑制作用。進一步分析其中參與之分子機轉，觀察到轉錄因子 AP-1 表現及其與 DNA 結合能力、以及 PI3K/Akt 蛋白表現減少；並以基因轉殖 Akt1 證實 HLP 抑制 LNCaP 細胞移動侵襲是透過阻斷 Akt/AP-1 訊息路徑，抑制 MMP-9 之表現與活化。上述的結果也可以在 HLE 處理 LNCaP 細胞中得到類似的抑制作用。最後以人類臍帶內皮細胞血管生成實驗來探討血管新生的情形，HLE 及 HLP 確實具有抑制的表現。

從以上的結果，我們提出 HLE 和 HLP 具有預防及治療前列腺癌的潛力，HLE 及 HLP 可能具有 LXR agonist 的活性，並說明其作用機轉。由於洛神葉在國內容易栽培，但過去一直被視為無經濟價值的植物部位，而 HLE 和 HLP 也容易分離，因此，本研究結果除了可應用於發展新的保健食品，也能推廣洛神花之葉子為可食用之資源。

中文關鍵詞： 前列腺癌、洛神葉、多酚、化學預防、細胞凋亡、細胞自噬、細胞週期、惡化轉移、血管新生。

英文摘要：

英文關鍵詞：

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

洛神葉功能性成分抗前列腺癌作用之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2313-B-040-003-MY3

執行期間： 98 年 08 月 01 日至 101 年 07 月 31 日

計畫主持人：林慧萱

共同主持人：王朝鐘、陳璟賢

計畫參與人員：尹慧敏、林佳良

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中 華 民 國 101 年 10 月 31 日

§ 中文摘要

近年來，許多研究趨向以天然物質來抑制或延遲癌症的發生，可食的植物被認為是抗癌藥物的來源之一。洛神葉在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物，過去的研究顯示洛神葉具有降血糖及抑制雄激素之功效，以及其富含類黃酮 (flavonoids) 等多酚成分，顯示洛神葉可以扮演一個化學預防的角色。於是本計畫針對洛神葉萃取物之抗前列腺癌活性進行分析，探討洛神葉水萃取物 (*H. sabdariffa* leaf extract, HLE) 以及多酚萃取物 (*H. sabdariffa* leaf polyphenol-rich extract, HLP) 對前列腺癌細胞生長的可能抗癌的機轉。

第一年的工作進行 HLE 及 HLP 之成份分析，確認兩者為富含多酚之萃取物，HLE 成份中以鞣花酸 (ellagic acid, EA) 的比例最高；HLP 則以兒茶素類 ECG 和 catechin 等類黃酮含量最多。首先 *in vitro* 試驗中，探討 HLE 及 HLP 對人類前列腺癌細胞的影響及其可能造成癌細胞死亡的機轉。以 HLE/HLP 進行篩選三株細胞 (LNCaP、PC3 和 DU145) 的存活測試。MTT 結果顯示：HLE/HLP 會抑制雄激素依賴性前列腺癌細胞 LNCaP 之生長，相較於其他兩株非雄激素依賴性前列腺癌細胞 PC3 及 DU145 則抑制力較小。2.5 mg/mL HLE/250 µg/mL HLP 可達抑制 LNCaP 細胞生長約 50%，而且呈現濃度依賴性。後續以 LNCaP 細胞為實驗模式，各別處理 HLE/HLP 及其功能性成份 EA 或 ECG 在不同劑量下，並比較植物固醇 β -sitosterol 抗前列腺癌之作用，觀察細胞凋亡 (apoptosis) 及細胞自噬死亡 (autophagy) 的特徵。結果發現隨著處理 HLE 濃度增加造成 LNCaP 細胞凋亡的現象也愈顯著。流式細胞儀分析中，LNCaP 細胞處理 HLE 培養 24 小時後，其細胞週期 subG1 期出現明顯的 apoptotic peak，以 TUNEL 染色作為確認細胞凋亡試驗；而在 HLP 組別則在 48 小時觀察到部分細胞凋亡以及細胞週期 G0/G1 停滯的趨勢，並透過 AVO 染色發現 HLP 能夠引發細胞自噬作用。進一步藉由西方點墨法及抑制劑分析證實 HLE 誘導 LNCaP 細胞凋亡主要是透過粒線體內在路徑 (Bax/cytochrome c-mediated caspase-9) 所調控，部分藉由死亡接收器外在路徑 (FasL-mediated caspase-8) 所影響。HLP 則調控多重死亡機制：主要影響 FasL 凋亡路徑、LC-3 誘導自噬小體 (autophagosome) 形成路徑及 p53 調控細胞週期停滯作用。

第二年利用裸鼠移植性腫瘤試驗模式，分析在 *in vivo* 狀態下 HLE 及 HLP 之抑癌作用及其機轉，並與洛神植株特有類黃酮--棉花皮素 (gossypetin) 作比較。動物實驗結果中發現：HLE、HLP 和 gossypetin 對於 LNCaP 細胞移植誘導之裸鼠腫瘤發生、腫瘤生長以及死亡確實有某個程度的抑制作用。進一步藉由 TUNEL 實驗得知，HLE、HLP 和 gossypetin 使腫瘤組織內細胞凋亡；再以西方點墨法及免疫組織染色法進行腫瘤組織蛋白分析，提出 HLE 和 HLP 可能藉由調控 Bax 及 FasL 機轉路徑以促使腫瘤細胞邁向凋亡，進而抑制腫瘤之形成及生長。並證實 HLE、HLP 和 gossypetin 抑制腫瘤組織增生及減少惡化之情形；其調控路徑可能透過 p53、p21、p27 相關調控蛋白使細胞週期停滯及 LXR α /ABCA1/Flotillin 路徑抑制前列腺癌細胞的惡化表現。HLE、HLP 和 gossypetin 也能夠有效降低 tPSA、血紅素含量以及腫瘤組織中 VEGF 的表現，此結果顯示出 HLE、HLP 和 gossypetin 三者可能具有抑制轉移 (metastasis) 及血管新生 (angiogenesis) 之能力。

第三年的工作釐清 HLP 之抑制癌細胞轉移侵襲作用及分子機制。首先，利用傷口癒合和 Boyden chamber 分析 HLP 對 LNCaP 細胞株移動和侵襲能力的影響，呈現濃度及時間的效應關係。利用 zymography 的方法分析細胞移動侵襲相關蛋白酶表現，結果發現 HLP 對 MMP-9 的活性、mRNA 及蛋白表現亦呈現明顯的抑制作用。進一步分析其中參與之分子機轉，觀察到轉錄因子 AP-1 表現及其與 DNA 結合能力、以及 PI3K/Akt 蛋白表現減少；並以基因轉殖 *Akt1* 證實 HLP 抑制 LNCaP 細胞移動侵襲是透過阻斷 Akt/AP-1 訊息路徑，抑制 MMP-9 之表現與活化。上述的結果也可以在 HLE 處理 LNCaP 細胞中得到類似的抑制作用。最後以人類臍帶內皮細胞血管生成實驗來探討血管新生的情形，HLE 及 HLP 確實具有

抑制的表現。

從以上的結果，我們提出 HLE 和 HLP 具有預防及治療前列腺癌的潛力，HLE 及 HLP 可能具有 LXR agonist 的活性，並說明其作用機轉。由於洛神葉在國內容易栽培，但過去一直被視為無經濟價值的植物部位，而 HLE 和 HLP 也容易分離，因此，本研究結果除了可應用於發展新的保健食品，也能推廣洛神花之葉子為可食用之資源。

關鍵詞：前列腺癌、洛神葉、多酚、雄激素、化學預防、細胞凋亡、細胞自噬、細胞週期、惡化轉移、血管新生。

§ 英文摘要

Prostate cancer (CaP) has become the most frequently diagnosed, noncutaneous neoplasm and second leading cause of cancer-related deaths among men in the world. Thus, developing novel treatment options for CaP has become an important medical need. The use of phytonutrient as anticancer agents has gained considerable importance in recent years. *Hibiscus sabdariffa* Linne leaf had been demonstrated to possess hypoglycemic activity and estrogenic effects previously. In this study investigations were conducted to examine the mechanism of the anticancer activity of *H. sabdariffa* L. leaf extract (HLE) and polyphenol-rich extract (HLP). In first year, MTT data was shown that among three kinds of human CaP cells, LNCaP cells, an androgen-responsive human CaP cell line, were the most susceptible to HLE/HLP (2.5 mg/mL HLE/ 250 µg/mL HLP inhibited its growth by 50%), while not in PC3 and DU145. Thus, this research will be investigated that the anticancer activity of HLE/HLP on LNCaP cells and their molecular mechanisms. Our results revealed the cells presented TUNEL-positive morphology, and had an increase in the distribution of hypodiploid phase after a 24-h treatment with HLE/HLP. This effect of HLE/HLP in LNCaP cells might be mediated via the mitochondria (Bax/cytochrome c-mediated caspase-9) and/or partially death receptor (FasL-mediated caspase-8) pathways. In addition, HLP could induce cellular autophagy via LC-3 signaling, and p53-mediated cell cycle arrest. In second year, investigations were conducted to examine the anticancer activity of HLE/HLP in xenograft tumor studies. When the nude mice were injected subcutaneously with LNCaP cells, HLE/HLP resulted in inhibition of tumor incidence as well as serum total prostate specific antigen (tPSA) and hemoglobin level. Notably, the HLE/HLP-fed mice showed decreased tumor weight and tumor volume. HLE/HLP reduced the expression of VEGF in a dose-dependent manner by immunohistochemistry. The data imply the potential effects of HLE/HLP, which may be developed as an anti-angiogenesis agent. Moreover, the cellular levels of Bax and FasL, and caspases-3 cleavage were induced by HLP more than HLE. This study shows that HLP is a potent agent for CaP treatment through targeting apoptosis induction, achieving tumor cell growth inhibition. In third year, the results of wound-healing assay and *in vitro* transwell assay revealed that HLP inhibited dose-dependently the migration and invasion of LNCaP cells under non-cytotoxic concentrations. Molecular data showed the effect of HLP in the cells might be mediated via sustained inactivation of Akt signal involved in the up-regulation of MMP-9. Our results showed that HLP exerted an inhibitory effect on the activity and the mRNA and protein levels of MMP-9, but not MMP-2. The HLP-inhibited MMP-9 expression or activity appeared to occur via AP-1 because of its DNA binding activity was suppressed by HLP. Additionally, the transfection of Akt overexpression vector (*Akt1* cDNA) to LNCaP cells could result in an increase expression of MMP-9 concomitantly with a marked induction on cell invasion. These findings suggested that the inhibition on MMP-9 expression by HLP may be through suppression on Akt/AP-1 signaling pathway, which in turn led to the reduced invasiveness of the cancer cells. Thus, our data present the first evidence of HLE and HLP as apoptosis inducers in LNCaP cells and these findings may open interesting perspectives to the strategy in human CaP treatment.

Keywords: prostate cancer, *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus leaf, polyphenol, anticancer activity, androgen, chemopreventive agents, apoptosis, autophagy, cell cycle, metastasis, angiogenesis.

(一) 前言

一、前列腺癌(prostate cancer)

前列腺癌(prostate cancer)佔居全球男性最常罹患的癌症第二位(1, 2)。雄性素促進前列腺癌的生長進展，因此減少患者體內的雄性素，或阻斷雄性素活化其受體、等內分泌療法，在臨床上產生顯著的治療效果。然而，在消除大部分雄性素依存的癌細胞一段時間後，對內分泌療法具抗性的癌細胞產生。治療這樣惡化的前列腺癌，化療可能沿延長患者生命，但沒有一定有效的方式。新藥的研發以能區分癌細胞與正常細胞的標靶治療為主，干擾癌細胞的生長、蔓延、及強化免疫系統對癌細胞的辨識、攻擊。多年來癌症研究針對調節癌細胞生長所提出的干擾方式頗多，然而沒有一個能非常有效的停止癌細胞生長。但是有一些標靶治療加上其他有效的藥物，治療效果優於單一治療，顯示不同的標靶治療間是否具有協同作用為治療前列腺癌的重要課題。2004年，美國FDA核准血管增生抑制劑 bevacizumab (Avastin)用於治療結腸直腸癌，該藥對女性乳癌顯示有效，對前列腺癌與其他癌症仍在研究中(3, 4)。

文獻指出，即使前列腺癌進入雄性素抗性期，癌細胞仍多表現雄性素受體，癌轉移期後前列腺癌對內分泌療法有反應的高達八成。因此，雄性素受體功能仍然是可行的治療標靶，如何利用抗雄性素以外的信息途徑抑制末期前列腺癌細胞內雄性素受體的功能可謂關鍵。因此，本實驗室採對表現雄性素受體的前列腺癌細胞為基礎，建立成篩選藥物的細胞模式，進而建立成原位移殖的腫瘤動物模式。篩選、鑑定草藥抑制雄性素受體功能的化學成分、抗末期前列腺癌細胞的功效(3, 5)。

二、洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* Linne leaf)

洛神花(*H. sabdariffa* Linnaeus)為錦葵科(Malvaceae)植物，原產熱帶地區，分部於印度，馬來西亞及東南亞，台灣東部及南部也盛產。其花成份包含有機酸(如檸檬酸、壞血酸、原兒茶酸等)(6, 7); 醣分主要為半乳糖，葡萄糖及果糖(8, 9); Pectin 及類黃酮(flavonoids)(10)，黃酮素包括有 hibiscetin, gossypetin, quercetin。國外之研究，在體外試驗顯示其水萃取物有抗痙攣(11)，降膽固醇(112)，降血壓(13)及抗菌作用(14)。其成份類黃酮具有抗氧化及抑制心血管疾病(15, 16); 原兒茶酸(protocatechuic acid, PCA)可抑制化學致癌物誘導之癌化(17-21)，本研究顯示洛神花中之PCA和花青素有強的抗氧化作用(22, 23)，並引起血癌 HL-60 細胞凋亡以及生長週期停滯(24, 25)。我們也發現洛神花水萃取物、多酚萃取物及 PCA 具有促進人類胃癌 AGS 細胞凋亡之作用(26-28)，證實洛神花具有抗癌之活性。洛神葉則為洛神花植株之葉子。在東南亞一帶為普遍烹煮的蔬菜類食物。過去的研究顯示洛神葉萃取物(*H. sabdariffa* L. leaf extract, HLE)具有降血糖之功效(29, 30)以及雌激素(oestrogen)之活性，其成分富含類黃酮等多酚成份(31)。顯示洛神葉可以扮演一個化學預防的角色。

(二) 研究目的

近二十年來，癌症位居國人死亡原因首位；儘管癌症的檢驗和治療現今已經有了長足的進步，但它仍然是威脅人類生命的頭號殺手。因此，尋求預防與治療癌症的藥物乃是當代醫學重要的課題。化學預防是近年來在癌症的臨床或基礎研究中重要且快速進展的科研領域。我們研究室近年來致力於由台灣常見藥草中鑑定具化學預防活性潛能的天然植物萃取物與天然物。其主要的目的是希望發展出一套系統性之體外(細胞培養系統)及體內(動物模式)之研究平台與提供重要之科學性數據，來評估、驗證並有效應用目標藥用植物於將來做為人類抗(防)癌之健康食品或另類藥品之可能性。

洛神花茶是台灣區域性常用飲料，過去民間用於解熱、抗高血壓及治療肝病。近年來，

國內外之研究針對洛神花化萼各個成份（包含原兒茶酸、花青素、類黃酮素以及異黃酮素等等）的生化功效均有多方科學驗證與斬獲。但大部分的洛神花研究都集中在花萼的活性分析，卻甚少植株葉子的科學探討。過去研究僅有針對洛神葉作成分分析，有部分文獻指出洛神葉水萃取物能夠降血糖，以及其類似雌激素之活性，能夠抑制雄激素之作用。顯示洛神葉具有作為前列腺癌的化學預防物質之潛力。因此，本研究將針對台灣生產之洛神葉進行初步之多酚定性、定量分析，以及抗癌活性分析。目的在釐清於多重癌化的過程中，洛神葉萃取物所參與影響的範疇及抗癌之分子機制。天然物抗癌分子機制的研究無論對於多酚萃取物醫藥化評估，亦或針對癌症治療之分子標的，都是重要的參考指標。研究期望能提供國人食用洛神葉時，有一參考依據；為符合新時代講究自然與健康飲食的觀念，提供一無毒性的天然抗氧化劑與保健食品，並且提高洛神花農業作物的經濟效益。

(三) 文獻探討

對於洛神葉在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有洛神葉成分分析及降動物血糖試驗等(29-31)，國內也幾乎無相關之研究。至於洛神花之抗氧化、抗癌、抗心血管疾病等研究則甚多，我們相關的研究描述於近五年研究成果。從安全及經濟價值考量，由食物萃取出有機物質作為防癌或治療癌症之物質已為各國所重視，例如 Tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為 chemopreventive agents (32)，希望可以攝取食物中之有效萃取物達到預防或延緩癌症之最終目的。根據我們初步的實驗結果顯示：洛神葉萃取物具有成為化學預防物質之潛力，況且 HLE 是洛神葉直接經由水煮萃取而來，保留天然植物本身最原始之生物活性，一來不會有殘存有機溶劑之虞；二來它不會如人工合成化學物質 (pure chemical) 對人體衍生氧化性傷害之作用。期盼本計畫所獲得之初步結果，對於日後保健食品及農業之開發與應用上能有所貢獻。

(四) 研究方法

第一年：HLE及HLP促進前列腺癌細胞凋亡以及生長週期停滯之研究

一、洛神葉水萃取物 (HLE) 及多酚 (HLP) 之製備及定量

(1) HLE 水萃取物之製備

秤取乾燥洛神葉 100 g，加入 6 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷後過濾，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為洛神葉粗萃取物。HLE 之產率約為 50%。

(2) HLP 多酚萃取物之製備

秤取 100 克乾燥洛神葉，攪拌至粉末狀。以 300 ml 甲醇在 50°C (水浴) 中萃取 3 小時過濾，連續三次，收集濾液，於減壓濃縮乾燥後溶解於 50°C 500 ml 二次水 (deionized distilled water)。然後以 200 ml 己烷移除色素，分層之水層以 180 ml 乙酸乙酯萃取三次，再於減壓濃縮乾燥後溶解於 300 ml 二次水，最後進行冷凍乾燥為粉末。HLP 之產率約為 2.5%。

(3) 總多酚含量測定 (Total phenolic content assay)

測定酚的含量，以 gallic acid (GA) (mg/kg) 為標準品 (standard)，甲醇溶解後分別取不同的量，以甲醇稀釋補足 1 ml 後，各加 0.5 ml 之 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 後搖勻，再加 3 ml Na₂CO₃ (200 g/L) 搖勻，並於室溫靜置 15 分鐘後，加 5 或 10 ml 去離子水後搖勻，以 1250×g 離心 5 分鐘，在波長 725 nm 下測吸光值 (甲醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線，並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算酚的含量。

(4) 總黃酮含量測定 (Total flavonoid content assay)

測定黃酮的含量，以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30%

乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各加 0.3 ml 之 1M NaNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值（乙醇歸零），吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

(5) 總花青素含量測定 (Total anthocyanin content assay)

花青素通常微弱酸性，在酸性環境下可以形成穩定的 flavylum 陽離子構造。本次實驗採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量待測樣品，得體積 V，並從中吸取 2 ml 試樣，經適當稀釋以濃鹽酸或氫氧化鈉溶液調 pH，使一份 pH 為 1.0，另一份 pH4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A₁ (pH 1.0 者) 與 A₂ (pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克水果中所含總花青素毫克數。

總花青素含量(mg 花青素/100 mg 萃取物):

$$\frac{(A_1 - A_2) \times F \times MW \times V \times 100}{\epsilon \times \omega}$$

MW: 花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

V: 總抽出液體積(mL)

F: 稀釋倍數

ϵ : 花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient)，以 delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1% 鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ϵ 值 301.6 計算。

ω : 水果總重(g)

(6) 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析

為使 HLE 及 HLP 製備固定標準化，實驗利用 HPLC (high performance liquid chromatography) 鑑定其多酚成份。使用 12 個多酚標準品: 1. ellagic acid、2. PCA、3. catechin、4. epicatechin、5. caffeic acid、6. EGCG、7. ECG、8. p-coumaric acid、9. naringenin、10. ferulic acid、11. EGC、12. quercetin。分析條件為用 C-18 reverse-phase column (5 μ m, Hypersil ODS, 200 mm X 2.1 mm)，將 HLE 及 HLP 過濾 (0.45 μ m) 後，取 20 μ l 注入 HPLC，mobile phase 為 A: acetonitrile; B: 0.5% glacial acetic acid in water; C: isopropanol; 0-5 min 為 100% B; 5-15 min 為 5% A、95% B; 15-22 min 為 1% A、96% B、3% C; 22-24 min 為 5% A、90% B、5% C; 24-30 min 為 100% A，monitored at 290 nm。

二、細胞毒性測試 (Cytotoxicity assay, MTT assay)

調整細胞 (LNCaP、PC-3、和 DU 145 細胞) 濃度約為 10⁵ cell/ml，以 1 ml 之細胞沖至 24 well microtiter plate 培養，加入不同濃度的 HLE 或 HLP，反應 24 小時，移除 medium (含藥)，加入新的 medium (不含藥) 和 MTT (0.5 mg/ml) 37°C、5% CO₂ 反應 4 小時，移除 medium (含 MTT) 以 PBS washing，加入 isopropanol 將結晶溶出，在 OD_{563 nm} 下測定溶液吸光。

三、TUNEL 細胞螢光染色

TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase (TdT) -mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling) 是一種 in situ 的偵測 DNA 斷裂片的方法。當出現 DNA 斷裂片時，可能會出現雙股及單股的 DNA 片段，這兩種形式的片段皆可用修飾過的核苷酸 (modified nucleotides, 如 biotin-dUTP, DIG-dUTP 或 fluorescein-dUTP) 結合在 DNA 斷裂片的游離 3'-OH 端以得到偵測 DNA 裂片的目的，而這種修飾過的核苷酸結合到 DNA 斷裂片的過程必須在 terminal deoxynucleotide transferase 的催化下方可進行。首先將細胞培養於 6-well chamber slide 中，

密度為 4×10^5 /ml，細胞處理 HLE 或 HLP 後，以 PBS 清洗 2 次後加入新鮮配置之固定液(2% paraformaldehyde in PBS, pH7.4)於室溫下反應 1 小時，之後再以 PBS 清洗一次後放入 permeabilisation solution(0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate)置於冰上反應 2 分鐘，去除 permeabilisation solution 後再以 PBS 清洗二次後再置入 TUNEL reaction mixture(terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus (EC 2.7.7.31) in storage buffer, nucleotide mixture)，將 chamber slide 放入可保濕的盒子中再置入 37°C 預熱過的 incubation oven 中避光反應 1 小時，其後再以 blocking buffer (0.1% Triton X-100, 0.5% bovine serum albumin in PBS)清洗 3 次後在螢光顯微鏡下觀察。

四、西方點墨法 (Western blotting)

首先製備細胞萃取蛋白 (cell lysate)。收集細胞，加入 RIPA buffer 與蛋白酵素抑制劑 (sodium orthovanadate、leupeptin 及 PMSF)，在 0°C 下震盪 30 分鐘，之後於 4°C 高速離心 (10000 ×g) 10 分鐘，所得上清液即為 cell lysate，可儲存於 -70°C 備用。接下來為所得蛋白定量，將 30 μl cell lysate 加入 1 ml coomassie brilliant blue G-250，在室溫下反應 1 分鐘，利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 有一較大之吸光值，以 Spectrophotometer (HITACHI U-3210) 之可見光紫外光比色儀測定，並以 BSA 為蛋白質標準溶液，來換算細胞萃取液之蛋白質濃度。取 50 μg 蛋白與 5X loading dye 以 4:1 比例混合，以 95°C 加熱 10 分鐘，再置於冰上冷卻，即可作為電泳樣本。

至於 SDS-聚丙醯胺電泳 (SDS-PAGE) 膠片的配鑄，於鑄膠模型架設完成後，下層膠 (separating gel) 依照分子量所需而配製成 6-15%，上層膠 (stacking gel) 則為 4%。將配好之整組電泳玻璃膠體裝置移入電泳槽，把 running buffer 加入內槽需至玻璃上緣，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 color protein markers，然後把 running buffer 加入外槽也需蓋過電導線，連接電泳槽與電源供應器，先以 70 V 壓縮電泳樣本至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 90 V，當 loading dye 跑到底線時才停止電泳。之後進行蛋白轉漬。將膠片截去上層膠之部份後置於兩張濾紙上，膠片上面放上與膠片大小相同之硝化纖維紙 (Nitrocellulose transfer membrane, NC paper)，再置兩張濾紙於其上，其中所有濾紙、NC paper 都必須以 transfer buffer 浸濕過。用玻璃棒趕走氣泡，再以夾板 (內含海綿襯墊) 夾緊，放入轉漬槽中，於冰上以固定電壓 100V 轉漬約 2 個小時。轉漬完成後，取出 NC paper，加入 5% milk blocking buffer，在室溫下搖晃 1 小時。以 washing buffer (TBS + 0.1% Tween 20) 清洗三次，每次 10 分鐘，之後加入一級抗體 (分析 bcl-2 family、caspase-3,-8,-9、cytochrome c 等蛋白)，在 4°C 下反應，隔天早上以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。接著再加入二級抗體，置於室溫作用 1 小時後，以 washing buffer 清洗三次，每次 10 分鐘。最後將 NC paper 放入盤子 (Tray) 上，用面紙擦去多餘的 washing buffer，再以 Western Lightning (Enhanced chemiluminol Reagent: Oxidizing Reagent= 1:1；即 ECL substrate) 覆蓋整個 NC paper，在室溫下約反應一分鐘後，擦去多餘的 ECL substrate，將盤子放入 FUJIFILM LAS-3000 之冷光螢光影像分析系統中，以 ImageReader LAS-3000 Life 儀器控制軟體，在 Chemiluminescence 條件下拍得影像，並以 FUJIFILM-Multi Gauge V2.2 軟體定量蛋白密度。

五、粒線體膜電位分析 (mitochondrial membrane potential assay)

將 1×10^6 顆 LNCaP 細胞，培養在 6mm 培養皿 12~16 小時，再加入不同濃度的 HLE，24 小時後收取細胞，以 70% 酒精固定，置於 -20°C 待測。染色前將細胞離心去除上清液，加入 0.5 μM DiOC6 染劑，於 37°C 下避光反應 30 分鐘，以流式細胞儀分析螢光強度變化。

六、細胞增生試驗 (BrdU assay)

BrdU (bromodeoxyuridine) 是 DNA 鹼基 thymidine 的一個 analogue；當細胞進行 DNA 合

成時會取代 thymidine incorporate 到 DNA 中，再利用 BrdU monoclonal antibody 去偵測細胞表現 thymidine incorporation 的情形；因此只有在 DNA 合成旺盛的細胞中會呈現 BrdU 陽性表現結果，可以用來分析細胞週期的動力學。將 LNCaP 細胞 (5×10^3 cell/well) 培養於 96 well culture plate 中，培養 24 小時後，將 media 置換成 serum starvation 狀態，持續 24 小時。分別加入不同劑量的 HLP 混合著 $10 \mu\text{M}$ BrdU 試劑一起反應，並以鋁箔包覆 plate 避光反應。再繼續培養 24 小時後，將細胞培養液去除，在每個孔洞中加入 $200 \mu\text{L}$ Fixative Denaturing Buffer 室溫靜置 30 分鐘。將 Fixative Denaturing Buffer 去除後，在每個孔洞中加入 $100 \mu\text{L}$ 稀釋後之 Anti-BrdU Antibody Buffer 室溫靜置 1 小時。之後，將 Anti-BrdU Antibody Buffer 去除，再以 $1 \times$ Wash Buffer 潤洗三次。去除 Wash Buffer 後，加入 $100 \mu\text{L}$ Reconstituted Conjugate Buffer 靜置且避光 15 分鐘。將 Reconstituted Conjugate Buffer 去除，再以 $1 \times$ Wash Buffer 潤洗三次。去除 Wash Buffer 後，再以 ddH_2O 潤洗並去除。之後，每個孔洞中加入 $100 \mu\text{L}$ Substrate Solution，室溫靜置且避光 15 分鐘。15 分鐘後，每個孔洞中加入 $100 \mu\text{L}$ Stop Solution，室溫靜置且避光 15 分鐘。接著在 450 及 540 nm 波長下以 ELISA reader 讀取吸光值，並將波長 450 nm 之吸光值減去 540 nm 之吸光值則為實際數據。

七、細胞週期分析 (Cell cycle analysis)

(1) Cell cycle distribution (Flow cytometric analysis)

細胞處理 HLE 或 HLP 分別於 0-48 小時後收集，先以 PBS 沖洗，再用 trypsin-EDTA 將細胞打下 (不可用刮的)，離心去除上清液，重複沖洗、離心一次，最後取 pallet。隨即將 pallet 打散後加入 1 ml 70 % ethanol 以固定細胞，保存於 -20°C (勿超過三個月)。分析前將檢體離心去除 ethanol，再以 PBS 沖洗，離心後取 pallet。將 pallet 輕彈打散，加入 1 ml PI ($20 \mu\text{g/ml}$ propidium iodide、 $20 \mu\text{g/ml}$ RNase、0.1% Triton-X100) 染色室溫下 15 min (要避光)，以 Flow cytometer (FACS) 分析。

(2) 細胞週期相關蛋白分析 (Western blotting)

將經 HLE 或 HLP 處理之癌細胞分別於 0-48 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 p53 蛋白表現及磷酸化表現。

八、自體吞噬分析

(1) Acidic vesicular organelles stain (AVO stain)

自體吞噬是一種細胞內利用膜的構造將多餘或要代謝及有問題的蛋白質及胞器加以包裹，最後與溶酶體 (lysosome) 結合形成 autolysosome，予以分解並再加利用的機制，而形成這類的構造也被稱為 AVO。在活體狀態下，AVO 可以吞噬 acridine orange 進行活體染色，因此觀察 HLE 或 HLP 處理之後，細胞 AVOs 的形成。首先細胞經過不同濃度的 HLE 或 HL 處理之後，以 PBS 清洗三次，置換新的培養液，加入 acridine orange 染劑 ($1 \mu\text{g/ml}$)，於室溫下避光並染色 15 分鐘，移除培養液並以 PBS 清洗三次後加入新的培養液，於螢光顯微鏡下觀察細胞螢光之變化，並拍照記錄。

(2) 自體吞噬相關蛋白分析 (Western blotting)

將經 HLP 處理之癌細胞分別於 48 小時後收取其 lysate，以 Western blotting 分析 ATG 蛋白表現。

九、統計分析 (Statistical Analysis)

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

第二年：HLE 及 HLP 抑制裸鼠腫瘤生長之動物模式探討

一、裸鼠移植性腫瘤試驗 (Xenograft tumor studies)

(1) 動物處理

取 5 週大免疫不全之雄性鼠，分為 7 組，每組??隻。實驗過程為期 42 天，期間每十天秤量體重，並紀錄腫瘤體積大小。42 天後，將動物犧牲並進行解剖，秤取腫瘤部分，最後以免疫組織染色觀察血管新生指標 VEGF，以及 Western blotting 觀察腫瘤之 Bax、FaL 和 caspase-3 等相關凋亡蛋白之表現量。分組處理方式如下：

(I) 正常組

(II) LNCaP alone：於小鼠左下腹注射[0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，

右下腹注射[0.1 ml matrigel] + [2×10^6 LNCaP cells/0.1 ml medium]。

(III) LNCaP + 1% HLE：於小鼠左下腹注射[0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，

右下腹注射[0.1 ml matrigel] + [2×10^6 cells/0.1 ml medium]，

每日飼料添加 1% HLE。

(IV) LNCaP + 2% HLE：於小鼠左下腹注射[0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，

右下腹注射[0.1 ml matrigel] + [2×10^6 cells/0.1 ml medium]，

每日飼料添加 2% HLE。

(V) LNCaP + 0.1% HLP：於小鼠左下腹注射[0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，

右下腹注射[0.1 ml matrigel] + [2×10^6 cells/0.1 ml medium]，

每日飼料添加 0.1% HLP。

(VI) LNCaP + 0.2% HLP：於小鼠左下腹注射[0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，

右下腹注射[0.1 ml matrigel] + [2×10^6 cells/0.1 ml medium]，

每日飼料添加 0.2% HLP。

(VII) LNCaP + 100 mg Gossypetin：於小鼠左下腹注射[0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，

右下腹注射[0.1 ml matrigel] + [2×10^6 cells/0.1 ml medium]，

每日飼料添加 100 mg gossypetin。

(2) 體重及飲食

體重及飲食量的變化是最直接可觀察到實驗動物的生長情形及生理狀態，故每隔十天記錄老鼠體重及飲食量的變化，以統計分析之。

(3) 組織病理切片及組織染色 (Hematoxylin & Eosin, H&E stain)

首先，將老鼠犧牲後，迅速取一小部分腫瘤，置於 10% 福馬林中固定，製成病理切片。其切片製作過程固定→脫水→澄清→浸潤→包埋→連續切片→染色→封蓋，然後利用 H&E stain 方法，進行組織染色，觀察癌細胞浸潤 (infiltration) 之情形。

(4) TUNEL 細胞螢光染色

同第一年第三項目。

(5) 西方點墨法 (Western blotting)

取部分動物腫瘤檢體，加入 RIPA buffer 與蛋白酵素抑制劑 (sodium orthovanadate、leupeptin 及 PMSF)，在 0 °C 下震盪 30 分鐘，之後於 4 °C 高速離心 ($10000 \times g$) 10 分鐘，所得上清液即為 tissue cell lysate，可儲存於 -70 °C 備用。後續步驟同第一年第四項目。

(6) 組織免疫染色 (Immunohistochemical staining)

取動物腫瘤檢體浸入 10% 中性福馬林固定 (neutral buffered formalin)，以石蠟包埋檢體，再予以切至適當厚度置於載玻片上，以免疫組織化學染色法觀察病灶，利用對蛋白質具有特異性的抗體及免疫染色技術來達到偵測組織中的蛋白表現量與分布位置。從冰箱中拿出冷凍 slide，讓其回溫至室溫，用 SecurelineR pen 標示所有 slide，並置於 PBS 中，再利用 2-3x PBS 潤溼 slide，去除冰凍 mounting media (SecurelineR pen 在脫水及清洗 slide 不會掉色)，拭去在樣本周圍過多的 buffer，加 100 μ l 已經稀釋好濃度的一次抗體至 slide 上，在室溫下培養一小時 (抗體的量依組織的大小而定)，利用 PBS 潤溼 slide 三次，每

次二分鐘，擦拭 slide，接著加入 100 μ l 已稀釋濃度的生物素結合二次抗體(必須能與 speice 或一次抗體 isotype 相互 match)。在室溫下反應三十分鐘，利用 PBS 溼潤 slide 三次，每次二分鐘。擦拭 slide，接著加入 100 μ l Streptavidin/HRP 到每個 slide，在室溫下培養卅分鐘，利用 PBS 溼潤 slide 三次，每次二分鐘。置備 DAB (DAB 是種 carcinogen，操作時須小心，最好戴手套)，小心的滴掉 slide 液體並將 slide 置於平面，如果使用 SeguenzaR rack，去除 coverplates，將 slide 置於平面(不要讓 slide 乾掉)，每個 slide 加入大約 400 μ l DAB 溶液，確定所有組織都覆蓋溶液，在 humid chamber 反應五分鐘左右。小心的拿起每片 slide，在紙巾上滴掉多餘 DAB，置於染色架上放入大水盤中。用清水潤濕 slide 三次。以此染色法觀察 VEGF 等蛋白之表現。

(7) 血液生化值分析

為分析 HLE 之毒性，針對血液生化值包括 AST、ALT、BUN、creatinine 進行分析，做為肝功能、腎功能是否受 HLE 之影響。另外，分析總前列腺特異性抗原(total prostate specific antigen, tPSA)檢測作為骨轉移瘤的輔助檢查項目。

(8) 組織血紅素 (hemoglobin, Hb) 濃度分析

Hb 濃度的測量依照 ICSH (International Committee for Standardization in Hematology) 的標準方法。Hb 與 Drabkin's reagent 反應生成 cyanomethemoglobin，而 cyanomethemoglobin 在以 UV 540 nm 處有吸收。以購自 Sigma 的血紅素標準品稀釋成不同濃度後，分別與 Drabkin's reagent 反應，然後以吸光值 540 nm 測得相對應的吸收值，將此量得之吸光值對濃度做一條標準曲線。裸鼠犧牲後，將腫瘤組織放入 PBS 中取其溶液後，與 Drabkin's reagent 反應後，所測得的吸收值與此標準曲線比對即可得濃度值。

二、統計分析 (Statistical Analysis)

同第一年第九項目。

第三年：HLE及HLP抑制腫瘤惡化與轉移之作用研究

一、傷口癒合試驗分析 (Wound-healing assay)

將細胞種於 6 well plate 中(1×10^6 cell/well)待八分滿後，以 yellow tip 在每個 well 中劃出 2 條傷口，以 PBS 洗滌 2 次，在每個 well 加入不同濃度之 HLE 或 HLP，觀察 0、12、24 和 48 小時之傷口癒合情形。

二、細胞移動性和侵襲性分析 (Boyden chamber assay)

測試細胞移動性 (cell migration assay) 利用 48-well Boyden chamber 的分析方法，lower chamber 為含有 0.1% gelatin 的 conditioned medium (含正常 10% FBS 之培養液)。待細胞處理 HLE 或 HLP 培養 24 小時後，先以 PBS 沖洗，再用 trypsin-EDTA 將細胞打下並計算細胞數，然後以不含 FBS 之培養液回溶固定量的細胞 (2.5×10^5 cell/well) 並且注入於 upper chamber，待細胞移動 6 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa (1:20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在顯微鏡底下隨機選取視野，作移動細胞之計數。細胞侵襲性分析 (cell invasion assay) 和細胞移動性分析相異之處為在細胞注入 Boyden chamber 之前，先以 10 μ l/well matrigel basement membrane matrix (200 μ g/ml) 塗層於 upper chamber，待 2 小時於無菌操作台 (勿開 UV) 進行風乾，另外待細胞移動延長至 8 小時後觀察，其他步驟則相同。

三、Gelatin-zymography

將 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE 電泳膠片置於含有電泳緩衝液的電泳槽中，將培養基與 5 \times 染劑均勻混和後，注入膠片中，分別以 100V 與 140V 的電壓進行電泳分離。結束電泳分離後，以 washing buffer 在室溫下搖晃 30 分鐘 2 次，然後加入 reaction buffer 在 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中反應 12~16 小時，最後反應完的膠片以 coomassie blue 染色液染色 30 分鐘，再以退色液

退染，觀看結果。

四、Real Time-Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR)

將純化出之 total RNA，利用 DEPC H₂O 進行不同程度之稀釋，稀釋後之 RNA 樣本以分光光譜儀讀取核酸定量，計算出各個樣本 1 μg 之 total RNA 的體積，進行反轉錄 (reverse transcriptase)。當反轉錄反應完成所得之 cDNA 可以進行儲存或直接進行定量 PCR 反應之用。進行定量 PCR 實驗步驟：首先需將所要分析基因之 primer (包含：reverse 與 forward) 與 TaqMan 螢光 Probe 準備完畢。再配製 iQ Supermix (Cat#170-8860, BioRad)，用於進行 PCR 反應之用，Supermix 含有 PCR 反應所需的 dNTPs、buffer、鎂離子等，當 Supermix 與 cDNA template 混合後 (請勿 vortex，內有 DNA polymerase)，即可放入 Real-timePCR 機器進行分析。將 Supermix 與 primers、probe 混合好後，小心地將 20 μl 的 Supermix 混和液加入 96 well plate 或 8 連排的 PCR 專用試管當中，最後加入 5 μl 的 cDNA template，上機 (Bio-Rad iCycler Real-Time PCR) 分析 MMP-9 mRNA 表現結果。

五、癌細胞惡化轉移相關因子之蛋白分析 (Western blotting)

同第一年第四項目。分析 MMP-9、MMP-2、NF-κB、c-Jun、c-Fos、PI3K、Akt 以及 ERK 等蛋白或磷酸化表現。

六、凝膠遷移或電泳遷移率分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

EMSA 是一種檢測蛋白質和 DNA 序列相互結合的技術。先將細胞全部的 nuclear extract protein 準備好，使用 10 μg Nuclear protein extracts 和 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 2 μg poly (dI:dC) 的溶液以及 biotin 標記的 AP-1 or NF-κB oligonucleotide probe (購自 Promega) 在室溫下一起作用 20 分鐘之後，再將 Sample 放到 6% acrylamide gel 使用 0.5X TBE buffer 用 25 mA 跑 1 小時 30 分，之後轉漬到帶正電 nylon membranes，進行 UV cross-linked，最後反應 streptavidin-horseradish peroxidase，以冷光儀呈色。

七、Akt 基因轉殖 (Transient transfection)

於 6 well 之培養皿中接種 $1\sim 3\times 10^5$ cell/ml 之細胞，以完整之生長培養液培養細胞，當細胞生長至 6~8 分滿時，進行質體轉殖實驗。準備兩管已滅菌之微量離心管，每一管各加入 100 μl 不含抗生素及血清之培養液，其中一管加入 1 μl 之 pcDNA-Akt DNA (1 μg/μl) 和 1 μl plus reagent。另一管加入 2.5 μl 之 LIPOFECTAMINE reagent，再將兩管混合在一起，並利用 Tip 充份混合 60 次，室溫下於無菌操作檯靜置 45 分鐘，讓 DNA 與 liposome 形成聚合體。此時利用 2 ml 不含抗生素及血清之培養液浸潤細胞，並置入 37°C 培養箱中培養。當 DNA 與 liposome 作用時間到時，於混合液中加入 0.8 ml 不含抗生素及血清之培養液。並吸走培養皿中不含抗生素及血清之培養液，利用剪去尖端之 1 ml tip 吸起 DNA 與 liposome 之混和液，加入培養皿中與細胞作用，進行轉殖作用，並將細胞置入 37 °C 培養箱中培養。基因轉殖 12 小時後，加入 1ml 含 20 % 血清之細胞培養液 (不含抗生素)，24 小時後，換成完整的生長培養液。在基因轉殖 12 小時後，即可觀察結果，依細胞特性之不同，而有不同之轉質效率。

八、類血管生成作用試驗 (Tubule formation assay)

利用斷面觀察血管內皮細胞在活體外細胞外基質形成類血管結構，用於篩選血管新生抑制物。先將 matrigel 與不含血清培養液稀釋成 5 mg/mL，取 300 μL 於 24well 培養皿在 37°C、使聚合一小時，將人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVECs) 以密度 2×10^5 細胞數種入，加入含 1 % 血清 M199 溶液，並以不同濃度之 HLE 或 HLP 處理 HUVECs 細胞，放置回 37°C 細胞培養箱六小時後，加入 3 % 甲醛 (formaldehyde) 於是溫下固定十五分鐘後，於光學顯微鏡下觀察並照相。

九、統計分析 (Statistical Analysis)

同第一年第九項目。

(五) 結果與討論 (含結論與建議)

第一年：HLE及HLP抑制前列腺癌細胞生長以及促進死亡之研究

5.1 洛神葉水萃取物 (HLE) 及多酚 (HLP) 之成份分析

一、定性分析

為使 HLE 及 HLP 製備固定標準化首先以 HPLC 分析 10 個多酚標準品：1. GA、2. protocatechuic acid (PCA)、3. catechin、4. (-)-epicatechin gallate (ECG)、5. ellagic acid、6. rutin、7. ρ -coumaric acid、8. ferulic acid、9. quercetin、10. naringenin，其滯留時間 (retention time; RT) 依序出現在 4.55, 7.48, 9.40, 11.20, 13.27, 13.99, 14.41, 15.32, 21.64 和 24.47 分鐘；另外，將洛神葉所萃取出之 HLE 或 HLP 與標準品 (HLE + standard 或 HLP + standard) 兩兩混合，其 RT 分別在幾個時間點相吻合，從 Table 1 可得分析結果。總結 Table 1 顯示：HLE 包含兩個成份 catechin 和 ellagic acid 各別含量大約有 4.25% 和 28.20%；而 HLP 包含六個成份 catechin (7.4%)、ECG (16.53%)、ellagic acid (10.3%)、ferulic acid (0.7%)、以及 quercetin (0.83%)。

二、定量分析

利用 Folin-Ciocalteu 方法測定 HLE 以及 HLP 各約莫得到 5.22% 和 35.36% 的總多酚含量 (Table 1)。比較 HLE 經 HPLC 分析結果之多酚加總則為 32.45%，兩種試驗的多酚含量出現明顯的落差。以 HPLC 來論，它屬於定性分析，為使 HLE 製備固定標準化的一種評估方法；測定總多酚含量的 Folin-Ciocalteu 方法(33)卻會受制於標準品而有不同的分析結果。另根據 Table 1 之結果顯示：類黃酮 (catechin + ECG > 20%) 這類多酚占 HLP 成分比例最高，續利用 Jia 方法分析萃取物之總黃酮含量。Table 2 結果顯示：HLE 以及 HLP 各約莫得到 20.98% 和 74.96% 的黃酮測定值。上述成份鑑定試驗證實 HLP 功能性成份之含量遠高於 HLE，HLP 確為富含多酚之萃取物，其中以類黃酮的比例最高。然而在總花青素含量測定分析方面，兩種萃取物的含量都極低 (< 2%)。

5.2 洛神葉水萃取物成份 (HLE/EA) 對前列腺癌細胞株之毒性測試

三種人類前列腺癌細胞株 (LNCaP、PC3、DU145) 加入不同濃度 0.1-10 mg/ml HLE 於培養 24 小時後之存活情形。MTT 的結果顯示：HLE 皆可抑制這三種細胞的生長，並且隨著處理 HLE 的濃度增加，抑制生長的能力越趨於明顯 (Fig. 2A)。尤其對於雄激素依賴性 (androgen-dependent) 前列腺癌細胞 LNCaP 的影響為甚，處理 2.5 mg/mL HLE 可達抑制 LNCaP 細胞生長 50%，而且呈現濃度正相關；相反地，對於其他兩株非雄激素依賴性 (androgen-independent) 前列腺癌細胞 PC3 及 DU145 則抑制力較小。以 HLE 主成份 EA (占 28.20%) 純物質與之比較，證明濃度 25~100 μ M EA 也具有抑制 LNCaP 細胞生長的作用，100 μ M EA 抑制效力高於 1.0 mg/ml HLE (Fig. 2B)。

5.3 洛神葉水萃取物成份 (HLE/EA) 引起 LNCaP 細胞之凋亡現象

一、TUNEL assay：

後續以 LNCaP 細胞為實驗模式，各別處理 HLE/EA 在不同劑量下 (HLE：0.5、1.0 和 2.5 mg/mL；EA：100 μ M)，經過 24 小時以後，以 TUNEL 螢光染色法觀察凋亡細胞核之表現。由 Fig. 2C 結果顯示：當細胞處理 1.0 mg/ml HLE 即開始出現核濃染等細胞凋亡現象。將處理濃度提高到 2.5 mg/ml，細胞凋亡的數目愈多約 37%。處理高劑量 100 μ M EA 則可誘導約 25% 細胞凋亡之作用。

二、Flow cytometric analysis：

為了進一步確認 HLE/EA 會造成 LNCaP 細胞凋亡，利用流式細胞儀觀察細胞處於

subG1 期（或稱為 hypodiploid 期，代表細胞凋亡）的數目，量化為 apoptotic peak。同樣地，LNCaP 細胞加入不同濃度 HLE：0.5、1.0 和 2.5 mg/mL 或 EA：100 μ M 之後，培養 24 小時，發現在 subG1 期的細胞數量增加到 10-25%，有明顯的 apoptotic peak 的出現，與 HLE 濃度呈現正比 (Fig. 2D)。另外，在 EA 組別觀察到細胞停滯在 G2/M 期的趨勢 (Fig. D)。因此，初步推論 HLE/EA 的確會造成 LNCaP 細胞的凋亡，且 EA 會誘導細胞週期 G2/M 停滯作用。

5.4 洛神葉水萃取物成份 (HLE/EA) 對細胞凋亡路徑之影響

一、Caspase family：

為研究 HLE/EA 造成 LNCaP 細胞凋亡究竟是透過何種訊息傳遞路徑，首先，利用西方點墨法探討在凋亡路徑中扮演下游調節者的 caspase family 蛋白（如：caspase-3、caspase-8、caspase-9）之表現(34)。當 LNCaP 細胞處理不同濃度 HLE：0.5、1.0 和 2.5 mg/mL 或 EA：25、50 和 100 μ M，培養 24 小時後分析細胞內 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 的表現方面，都有被 HLE 或 EA 活化的現象 (Fig. 2E)。它們活化的表現是透過 procaspase 裂解為活化型 (cleaved caspase-3)，以 caspase-3 為例，當細胞受到 HLE 作用下，procaspase-3 (p32) 會隨著 HLE 濃度增加而表現逐漸減少為 0.65 倍；相對的，cleaved caspase-3 (p20 和 17) 的表現則逐漸增加，說明了 caspase-3 活化的現象與趨勢。而 procaspase-8 (p55) 和 procaspase-9 (p46) 的表現也受到 HLE 刺激而被裂解為 p23 的小片段，其 cleaved caspases (p23) 表現分別增加至 2.58 和 1.88 倍 (Fig. 2E, left panel)。Fig. 2E (right panel) 則觀察到 EA 主要調控 caspase-3 和 caspase-9 之活化，對於 caspase-8 之影響則較不顯著。

二、Bcl-2 family、cytochrome c 和 p53：

上述已證實 HLE/EA 會活化 caspases 所傳導的凋亡路徑，接著探討粒線體所傳導的內在凋亡路徑 Bcl-2 family 和 cytochrome c 之蛋白表現。Bcl-2 family 成員分為① 抑制細胞凋亡 anti-apoptotic 蛋白（如：Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1）以及② 促進細胞凋亡 pro-apoptotic 蛋白（如：Bid、Bax）兩類(35)。由 Fig. 3A 結果顯示：LNCaP 細胞隨著處理 HLE/EA 濃度增加，細胞內抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-X_L、Mcl-1 的表現受到抑制，特別是 Bcl-2 蛋白表現量最明顯減少約 82% (0.18 倍)；而凋亡蛋白 Bid、Bax 表現量則有增加的表現。Bid 活化形式的蛋白 t-Bid (p15) 在處理 2.5 mg/mL HLE/ 100 μ M EA 之下，其表現量增加 2.35/1.75 倍。接著探討 Bcl-2 family 下游蛋白 cytochrome c 的表現(36)。作同樣的細胞處理，觀察到 cytosolic cytochrome c 的表現增加，代表 cytochrome c 的活化而由粒線體釋放到細胞質 (Fig. 3B)。另外以粒線體膜電位改變來驗證 HLE/EA 會調控內在凋亡路徑 (Fig. 3C)。

三、Fas-FasL：

Fig. 4 研究由死亡接收器 Fas-FasL 所傳導的外在路徑。結果發現以 HLE 處理的高濃度點來看，細胞內 FasL 和 Fas 的蛋白表現可以分別增加至 2.18 和 1.43 倍 (Fig. 4A)；EA 也顯示增加 FasL 和 Fas 蛋白表現，並誘導兩者結合表現增加 (Fig. 4B)。進一步探討 FasL 和 Bax 抑制劑對 HLE 造成訊息傳遞蛋白表現之影響及細胞凋亡之影響。預先處理 FasL 和 Bax 專一性抑制劑：Nok-1 和 V5 後，再加入 2.5 mg/ml HLE 培養細胞，利用西方點墨法分析兩條路徑相關蛋白表現。結果發現：細胞預先處理抑制劑再加入 HLE 的組別與單獨處理 HLE 的組別兩相比較，除了各別抑制 FasL 和 Bax 之表現，也顯著地抑制原本 HLE 誘導 t-Bid、cytosolic cytochrome c、和 caspase-8、-3 蛋白之表現 (Fig. 5A)。為確認 HLE 是否調控 FasL 和 Bax 造成 LNCaP 細胞凋亡，同樣以抑制劑預先處理細胞後，使用 Flow cytometry 分析 sub G1 期細胞分佈情形。兩種抑制劑能有效抑制 HLE 所誘導細胞凋亡的現象，約莫從 26% 降低至 12% 和 8%，回復率大約有 50% (Fig. 5B)。這些結果推測 HLE 誘導 LNCaP 細胞凋亡主要是透過粒線體內在路徑 (Bax/cytochrome c-mediated caspase-9) 所調控，部分藉由死亡接收器外在路徑 (FasL-mediated caspase-8) 所影響 (Fig. 5C)。另外，EA 除誘導凋亡

內在及外在路徑之外，也具有細胞週期停滯作用。

5.5 洛神葉多酚萃取物成份 (HLP/ECG) 抑制 LNCaP 細胞增生之作用

先前研究顯示 HLP 對於雄激素依賴性前列腺癌 LNCaP 細胞的抑制作用最強，250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLP 可達抑制細胞生長 50%，而且呈現濃度正相關 (data not shown)。接續研究擬探討並比較 HLP (100 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、HLP 主成份 ECG (40 和 100 μM)、以及植物固醇 β -sitosterol (8 和 16 μM) 三者之抗前列腺癌細胞生長之作用。首先進行 MTT (Fig. 6A) 以及 BrdU assay (Fig. 6B) 分析，結果表明 HLP 相較於 ECG 具有較強的細胞生長抑制活性，並且呈現濃度和時間的依賴性。 β -sitosterol 對於 LNCaP 細胞生長也發揮抑制效果，尤其在 48 小時最為顯著 (Fig. 6)。

5.6 洛神葉多酚萃取物成份 (HLP/ECG) 引起 LNCaP 細胞之死亡現象

一、細胞凋亡

利用 Flow cytometry 以及 TUNEL assay 分析，觀察 HLP、ECG、以及 β -sitosterol 影響細胞存活的因素是否與細胞凋亡有關？在 Fig. 7A 顯示流式細胞儀分析的結果：隨著 LNCaP 細胞處理 HLP 的劑量提高，處於 sub G1 期以及 G0/G1 期的細胞越多； β -sitosterol 處理的細胞則呈現 G2/M 停滯表現，但是這個部份的結果並不明顯。另外，LNCaP 細胞加入 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLP 培養 48 小時後，分析 TUNEL-positive 細胞表現達 63.77%。此試驗分析的結果發現：HLP 確實會引起 LNCaP 細胞凋亡的發生。同樣處理情況下，ECG 引起細胞凋亡表現並不明顯； β -sitosterol 能夠誘導部分細胞凋亡 (Fig. 7B)。

二、自體吞噬

Fig. 8A 利用 AVO stain 分析及量化細胞自噬作用，結果觀察到處理 HLP 反應 48 小時後染上 acridine orange 的細胞有隨著濃度的提高而增加， β -sitosterol 也有類似的趨勢，但不如 HLP 組別來得明顯 (Fig. 8B)。

5.7 洛神葉多酚萃取物成份 (HLP/ECG) 對細胞死亡路徑之影響

延續 Fig. 7 之結果，利用西方點墨法探討 HLP、ECG、以及 β -sitosterol 是否影響 caspase family 蛋白之表現。caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 明顯在濃度 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLP 處理之下受到活化，出現活化型 cleaved form (p23 和 p17)。對於 caspase-8、-9 之表現 ECG 有些微地活化作用；處理 β -sitosterol 的細胞其蛋白表現不明顯 (Fig. 9A)。接著觀察經過 HLP 處理的細胞內 Fas 和 FasL 的表現。隨著 HLP 處理的濃度增加，兩者的表現量皆有上升的趨勢 (Fig. 9B)。Fig. 9C 研究 Bcl-2、Bax 和 p53，發現抗凋亡蛋白 Bcl-2 會受到 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HLP 刺激下而減少 60%；反之，Bax 表現量增加到 1.32 倍。此外，抑癌基因 p53 會利用 Bax 來調控細胞的死亡途徑(37)。於是，觀察在 HLP 刺激下之 p53 蛋白及磷酸化表現。細胞在 HLP 的處理下，無論是 phospho-p53 或是 p53 的表現量都是增加的 (Fig. 9D)，且 p53 活化的趨勢與 Bax 呈現一致性，可以得知 HLP 調控 p53/Bax 路徑是成立的； β -sitosterol 也可能藉由 p53 影響細胞週期停滯表現，然而這部分的研究仍需進一步證實。

同時並利用西方點墨法分析細胞自噬相關蛋白：Beclin、LC3、ATG5 以及 ATG9A。實驗結果顯示：在高濃度 HLP 處理下，形成 autophagosome 時必要的蛋白 LC3-II 表現也明顯地上升，其他蛋白並無顯著差異；隨著 β -sitosterol 濃度的提高，則可觀察到 LC3-II、ATG5 以及 ATG9A 表現皆隨之增加 (Fig. 10)。

5.8 第一年總結

洛神葉萃取物成份 HLE 以及 HLP 兩者誘導 LNCaP 細胞凋亡作用有許多相似之處，可能源於 HLE 和 HLP 同為洛神葉之萃取物。以萃取物兩相比較，可以提出 HLP 之抑制前列腺癌細胞生長的效力遠高於 HLE (約 10 倍左右)，以及說明水萃取物在較高劑量下所發揮促進細胞凋亡的影響，可能正因為多酚這個功能性成份所作用，並進而驗證多酚可能參與

的路徑。此外，HLE 以及 HLP 各別主成份之 EA 和 ECG 同時進行處理 LNCaP 細胞測試，也顯見兩者抑制癌細胞生長之作用。EA 可發揮相當或甚至大於 HLE 誘導細胞凋亡的活性，證明 EA 在 HLE 成份中扮演重要調控細胞凋亡的角色；然而在濃度 40 和 100 μM ECG 不足以引發 LNCaP 細胞死亡，則暗示是否有其他類黃酮成份作用於 HLP，仍有待進一步單離 HLP 成份進行分析，但目前研究確實顯示 HLP 具有部分植物固醇的活性，可同時誘導細胞凋亡以及細胞自噬作用。從以上的結果，我們可能提出 HLE 和 HLP 具有預防及治療前列腺癌的潛力，HLE 及 HLP 發揮其抑制細胞增生及誘導細胞死亡的活性，並說明其作用機轉。

第二年：HLE 及 HLP 抑制裸鼠腫瘤生長之動物模式探討

5.9 洛神葉萃取物 (HLE/HLP) 對動物移植性腫瘤試驗之評估

為評估 HLE 及 HLP 是否能夠有效抑制腫瘤的生長速度，於是實驗選用在免疫缺乏的裸鼠 (nude mice) 體內注射人類前列腺癌 LNCaP 細胞的方式，強迫其產生腫瘤待腫瘤生成之後，再餵食不同劑量之 HLE 及 HLP，以探討兩者對於腫瘤生長之影響；實驗組別另外加入洛神植株特有類黃酮--棉花皮素(gossypetin)作比較。實驗連續觀察 42 天後犧牲，期間每十天記錄每組每隻試驗動物飲食、體重及腫瘤發生情形，動物實驗模式如 Fig. 11 所示。由 Table 2 可以得知 LNCaP 細胞成功在活體內生長並誘導裸鼠產生腫瘤，經統計結果：本模式所誘導的腫瘤發生率為 75%，而在裸鼠餵食 HLE、HLP 或 gossypetin (100 mg/mice) 的試驗組中，腫瘤發生率明顯減低，且萃取物組別呈現濃度依賴性，說明 HLE 及 HLP 具有抑制腫瘤發生之作用。在陽性對照組 (LNCaP alone) 中，其誘發腫瘤平均大小為 855 mm^3 (重量約為 1390 mg)，而在餵食低劑量的 HLE 組別 (LNCaP + 1.0% HLE) 當中，腫瘤生長有變小的趨勢。在高劑量 HLE 餵食 (LNCaP + 2.0% HLE) 之下，可以完全抑制腫瘤的生成；HLP 組別也呈現類似的抑制作用，高劑量 HLP (LNCaP + 0.2% HLP) 可以明顯地看出抑制腫瘤生長的能力 (Fig. 12A)；gossypetin 組也有極佳的抑癌活性。並隨實驗天數測量活體腫瘤大小，觀察 HLE、HLP 及 gossypetin 抑制腫瘤生長更為顯著 (Fig. 12B)。

5.10 洛神葉萃取物 (HLE/HLP) 對動物移植性腫瘤之動物飲食、體重與存活率之分析

飲食量及體重改變為評估動物健康徵兆的指標之一。將平時紀錄及老鼠犧牲後之生理特徵進行統計分析。結果顯示：所有組別統計飲食 (Fig. 13A) 及體重 (Fig. 13B) 之趨勢無異。Fig. 13C 則分析實驗模式之存活率，統計此動物實驗模式各組的死亡率如下所述：正常組、LNCaP 誘導組、HLE 試驗組以及 gossypetin 組全部存活至 42 天之後，而在 30 天後 0.2% HLP 高劑量組的老鼠則僅有一隻死亡。由上述存活率可推測：HLE、HLP 及 gossypetin 具有抑制 LNCaP 細胞惡化生長而並不影響裸鼠的存活。

5.11 洛神葉萃取物 (HLE/HLP) 對動物移植性腫瘤組織中細胞型態及細胞凋亡之影響

實驗利用 H&E 組織染色觀察 LNCaP 細胞所誘導出腫瘤型態及特徵，並觀察 HLE、HLP 及 gossypetin 試驗組中，其裸鼠施打 LNCaP 之上皮細胞部位回復與正常組相當 (Fig. 14)。為了進一步探討 HLE、HLP 及 gossypetin 抑制腫瘤生長是透過促進 LNCaP 細胞凋亡的方式，以 TUNEL 實驗方法檢測細胞凋亡。在餵食萃取物組別之腫瘤組織及上皮組織中發現，HLE 及 HLP 皆可使腫瘤組織內的細胞走向凋亡，gossypetin 組別亦顯是明顯 TUNEL-positive 表現 (Fig. 15A)。在凋亡蛋白 caspase-3 表現部分，0.1% HLP 及 gossypetin 組結果顯示，細胞進行細胞凋亡 caspase-3 有被活化情形發生 (Fig. 15B)。後續利用西方點墨法探討在凋亡路徑中調控粒線體凋亡的 Bax 及 Bcl-2 蛋白 (Fig. 16A)、調控死亡接收器的 FasL 及 Fas 蛋白 (Fig. 16B)、以及細胞週期調控蛋白 cdk inhibitor (CKI)：p53、p21、p27 和 16 (Fig. 17)。實驗證實：與 LNCaP 誘導組相比，HLP 試驗組中兩種蛋白 Bax 及 FasL 之表現增加最為顯著，HLP 也抑制 Bcl-2 蛋白表現；HLE 則對於細胞週期蛋白 p53 和 p16 有明顯促進增加表現之情形；上述結果 gossypetin 都有部分調控作用。初步結果與細胞實驗相印證。

5.12 洛神葉萃取物 (HLE/HLP) 對動物移植性腫瘤組織中細胞增生及惡化轉移之影響

近期研究發現，整個前列腺惡化過程，一些重要的 LXR 訊息基因，例如 LXR alpha、ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) 和 CYP27 (sterol 27-hydroxylase) 基因的表現都降低。由於先前研究發現男性荷爾蒙會抑制 ABCA1 的基因表現，而且過量表現 ABCA1 基因會抑制前列腺癌細胞的生長，在前列腺癌細胞從需要男性荷爾蒙惡化成不需要男性荷爾蒙的過程中，調降 LXR 訊息(LXR signaling)可能是必要過程(3, 5)。因此 Fig. 18 分析前列腺惡化相關蛋白：LXR、其受體 RXR、以及下游分子 ABCA1 和 flotillin。由結果顯示，在 1% HLE 及 0.2% HLP 處理下 LXRα (Fig. 18A)、ABCA1 及 flotillin (Fig. 18B) 三者蛋白有明顯的表現增加，gossypetin 組不見影響。進一步利用免疫組織化學染色法觀察蛋白變化，首先以 Ki67 標示，該蛋白用來判斷細胞的增生活性，是確定良、惡性組織生長狀態的標記。在控制組中無表現 Ki67，在誘導組腫瘤中專一性結合表現明顯，1% HLE 試驗組中其表現減少許多，HLP 及 gossypetin 則幾乎看不到 Ki67 的表現 (Fig. 19A)。另外，上述有關凋亡及增生蛋白 (p53、p27、LXRα 及 ABCA1) 也透過免疫組織化學染色法確認 HLE、HLP 及 gossypetin 調控作用 (Fig. 19B-E)。

5.13 洛神葉萃取物 (HLE/HLP) 對動物移植性腫瘤血管新生指標 VEGF 表現之影響

接著利用 VEGF 免疫組織染色觀察裸鼠腫瘤血管內皮細胞指標之表現。結果發現：在單獨注射 LNCaP 細胞的組別，其腫瘤細胞中都有 VEGF 濃染的情形；餵食 HLE、HLP 及 gossypetin 的組別中，有濃染 VEGF 的細胞數量明顯地減少 (Fig. 19F)，此結果顯示三者確實會造成 VEGF 的表現下降，進一步推論 HLE、HLP 及 gossypetin 對於腫瘤血管新生確實有某個程度的抑制作用。

5.14 洛神葉萃取物 (HLE/HLP) 對動物移植性腫瘤轉移指標 tPSA 表現之影響

前列腺癌發生骨轉移的機會最多，發生率在 50%~80%。通常以總前列腺特异性抗原 (total prostate specific antigen, tPSA) 檢測是“骨轉移瘤”的一個輔助檢查，所以在本次血清值分析進行 tPSA 項目檢測。Fig. 20A 結果顯示：LNCaP 誘導組確實提升 tPSA 含量，HLE、HLP 及 gossypetin 試驗組別之裸鼠血清中 tPSA 表現明顯減低。另外，腫瘤的增生可能伴隨做血管新生，我們從腫瘤的血紅素診斷作為腫瘤的生長及惡化情形之評估，結果顯示 HLE、HLP 及 gossypetin 可使血紅素濃度下降且具有濃度效應性。顯示三者可能有抑制血管新生之作用 (Fig. 20B)。

5.15 第二年總結

利用裸鼠移植性腫瘤試驗模式用來觀察 *in vivo* 癌細胞惡化生長，是建立已久的前列腺癌動物模式(3, 38, 39)。結果發現，給予 HLE、HLP 及 gossypetin 作為治療可以有效抑制 LNCaP 細胞的生長 (Table 2)。此動物實驗模式中，當試驗組裸鼠餵食 HLE、HLP 及 gossypetin 後，其飲食量、體重及以及血液生化值 (包括 AST、ALT、BUN、creatinine) (data not shown) 並無改變，說明三者對動物無毒性之虞。HLE、HLP 及 gossypetin 對於 LNCaP 細胞移植誘導之裸鼠腫瘤發生、腫瘤生長以及死亡確實有某個程度的抑制作用。三者也能夠有效降低血清中 tPSA 含量以及腫瘤組織中 Hb 含量以及 VEGF 的表現，顯示其具有抑制轉移及血管新生之能力。並確認細胞實驗證實之結果：HLP 調控 Bax 及 FasL 路徑以誘導 LNCaP 細胞凋亡，HLE 則與細胞週期停滯調控有關，進而抑制腫瘤之生長。兩者也都可活化 LXR/ABCA1/flotillin signaling，具有發展成為 LXR agonist 之潛力。

第三年：HLE及HLP抑制腫瘤惡化與轉移之作用研究

5.16 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 對 LNCaP 細胞移動及侵襲之抑制作用

一、HLP 影響傷口癒合能力

利用傷口癒合實驗(Wound-healing assay)測試 HLP 影響 LNCaP 細胞之移動能力情形。結

果發現，LNCaP 細胞暴露在濃度 25、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 之 HLP 在 time-course (0、24、48 和 72 小時) 觀察下，與 control 組對照可發現，HLP 抑制 LNCaP 細胞之傷口癒合能力具有時間效應，且細胞在 100 $\mu\text{g/ml}$ HLP 處理下其細胞移動情形最為減弱，並呈現濃度依賴性 (Fig. 21A)。

二、HLP 影響細胞移動和侵襲能力

利用 Boyden chamber 實驗測試 HLP 影響 LNCaP 細胞之移動能力情形。結果發現，LNCaP 細胞暴露在濃度 25、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 之 HLP 在 24 小時後，與 control 組對照可發現，細胞在 100 $\mu\text{g/ml}$ HLP 處理下可發現細胞穿透 Boyden chamber 的薄膜有最明顯的抑制作用，並呈現濃度依賴性 (Fig. 21B)。這樣的結果也在 Boyden chamber 以 collagen-coated transwell 之細胞侵襲性試驗中得到證實 (data not show)。

5.17 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 對 LNCaP 細胞中 MMPs 表現之抑制作用

HLP 抑制 LNCaP 細胞移動和侵襲是透過何種機制？接下來利用 gelatin-zymography 方法分析與細胞侵襲及 ECM degradation 相關基因—MMP-2, -9 (40) 的活性表現。結果發現，HLP 對於 LNCaP 細胞所分泌的 MMP-9 有顯著的抑制作用，而且隨著處理 HLP 劑量增加愈趨於明顯 (Fig. 22A)。進一步為確認 HLP 對於 MMP-9 之影響，分析 MMP-9 mRNA 和蛋白層次是否會受到 HLP 的調控。Fig. 22B 顯示 RT-PCR 之結果，當細胞處理 HLP 在 24 小時之後便顯著的抑制 MMP-9 mRNA 的表現。利用西方點墨法偵測到 HLP 作用之細胞內不論是 pro-MMP-2 或 active MMP-2 表現皆不受到影響；而 active MMP-9 蛋白層次的部分在則 HLP 100 $\mu\text{g/ml}$ 劑量觀察到 0.58 倍的減少，和 mRNA 之表現一致 (Fig. 22C)。初步證實：HLP 除了影響 MMP-2 活性之外，也影響 mRNA 和蛋白質的表現。

5.17 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 對 LNCaP 細胞中 AP-1 與 DNA 結合能力之抑制作用

在一些癌細胞中，轉錄因子 AP-1 (c-Fos/c-Jun complex) 和 NF- κ B 會調控 MMP-9 基因的轉活化，進而影響到 MMP-9 的表現(41)。首先分析轉錄因子 c-Fos、c-Jun 和 NF- κ B 在核內表現情形。Fig. 23A 結果顯示：LNCaP 細胞隨著處理 HLP 濃度增加，轉錄因子 c-Jun 在細胞核內的表現明顯減少；而 NF- κ B 的表現則是有些許的影響。後續利用 EMSA 試驗分析在細胞核中 HLP 是否影響 AP-1 或 NF- κ B 與 DNA 結合能力。結果發現 LNCaP 細胞受到 100 $\mu\text{g/ml}$ HLP 處理 24 小時之下，AP-1 與 DNA 結合能力有下降趨勢；而 NF- κ B 之影響則較不明顯 (Fig. 23B)。因此推論 HLP 處理 LNCaP 細胞抑制 MMP-9 的產生可能是經由阻斷 AP-1 路徑，進而影響細胞移動和侵襲能力。

5.18 洛神葉多酚萃取物 (HLP) 抑制 LNCaP 細胞中惡化轉移因子之蛋白表現

研究報告指出，蛋白激酶 PI3K、Akt 和 ERK 參與在癌化、侵入與轉移的過程，三者也扮演調控 AP-1 的上游因子(42, 43)。因此為釐清 HLP 調控 LNCaP 細胞移動侵襲是否經由 PI3K/Akt 或 ERK 路徑，利用西方點墨法分析細胞內 PI3K、Akt 和 ERK 之蛋白及磷酸化表現，由結果發現：HLP 能夠抑制 Akt 磷酸化表現，並且具有濃度效應 (Fig. 24A)；而 ERK 的影響則較小 (Fig. 24B)。上述推論 HLP 可能經由抑制 Akt 路徑而調控 AP-1 之表現。HLP 再以基因轉殖 *Akt1* 方法驗證細胞移動侵襲能力以及 MMP-9 表現之影響。LNCaP 細胞短暫轉殖 *Akt1* 目的為造成細胞內之 Akt 大量表達之下，觀察 HLP 之作用。必須先以西法點墨法確認 *Akt1* cDNA 確實有轉殖入 LNCaP 細胞中，有轉殖 *Akt1* cDNA 的細胞其 Akt 的蛋白及磷酸化表現為轉殖空載體的 1.54 及 1.75 倍 (Fig. 25A)。接下來探討 MMP-9 的表現。大量表達的 Akt 顯著的增加 active MMP-9 之蛋白表現 (2.35 倍)，HLP 在 LNCaP/*Akt1* cDNA 組別能抑制 Akt 誘導其活性之 89.6% (Fig. 25A)。在細胞侵襲性試驗分析中，LNCaP/*Akt1* cDNA 組別會增強細胞移動及侵襲能力 (與 LNCaP/vector 組別相比)，處理 HLP 之後顯見其抑制效果 (Fig. 25B)。Fig. 25C 總論：HLP 抑制 LNCaP 細胞移動侵襲可能是透過阻斷 PI3K/Akt 訊息路徑，進而抑制 AP-1 轉錄活化

MMP-9。另外，HLE抗腫瘤惡化轉移作用之研究結果類似於HLP之作用（[data not show](#)）。

5.18 洛神葉萃取物（HLE及HLP）抑制血管新生作用

根據先前動物實驗指出 HLE 及 HLP 可使腫瘤組織中 VEGF 表現 (Fig. 19F) 及血紅素濃度下降 (Fig. 20B)，顯示兩者可能具有抑制血管新生之潛力。進一步以人類臍帶內皮細胞(HUVECs)血管生成(tube formation)實驗來探討 HLE 及 HLP 抑制血管新生的情形，由 Fig. 26 結果顯示 HLE 及 HLP 確實具有抑制的作用，後續這個部分詳細的分子機轉仍需進一步被釐清。初步結果與動物實驗相印證。

5.15 第三年總結

綜合上述結果，HLP 干擾前列腺癌細胞轉移侵襲之試驗模式可以作為佐證洛神葉抗癌之作用。計劃中動物模式也證實洛神葉促癌細胞凋亡、抗轉移及抗血管新生之活性，期許未來可推衍於人體，而本研究成果將可應用於發展新的保健食品。希望藉由我們的發現可以在癌症治療或預防上能有所裨益。由於洛神葉在國內容易栽培，但過去一直被視為無經濟價值的植物部位，而 HL 及 HLP 也容易分離，因此，本研究成果除了可應用於發展新的保健食品，也能推廣洛神花之葉子為可食用之資源。

§ 參考文獻

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57, 43-66, 2007.
2. Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, Mukhtar H. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene*. 27, 2055-63, 2008.
3. Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, Liao S. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res*. 66, 6482-6, 2006.
4. Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, Yu-Lee LY, Zhang S, Yeh ET, Hu MC, Logothetis CJ, Lin SH. Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res*. 6, 1259-67, 2008.
5. Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci*. 14, 543-53, 2007.
6. Reaubourg G, Monceause RH. The chemical botanical and pharmacological characteristics of the Karkade (rosella) *Hibiscus sabdariffa* (grossyfolius). *J Pharm Chem*. 1, 4292-305, 1940.
7. Kerharo J. Senegal bisap (*Hibiscus sabdariffa* or Guinea sorrel or red sorrel) *Plant Med Phytoher*. 5, 277-81, 1971.
8. El-Afry MMF, Khafaga ER, El-Sayed R, Koch H, Prinz D. Stage of maturity and quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *Sabdariffa*) III. Mucilage, pectin and carbohydrates. *Angrew Bot*. 54, 301-09, 1980.
9. El-Hamidi A, Saleh M, Ahmed SS. *Hibiscus sabdariffa*. *J Chem U.S.A.* 90, 127-30, 1966.
10. Koepfli JB. Chemical investigations of *Rauwolfia caffra*. *J Amer Chem Soc*. 54, 2412-8, 1932.
11. Ali MB, Satih WM, Mohamed AH, Homeida AM. Investigation of antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *J Ethnopharmacol*. 31, 249-57, 1991.
12. El-Saadany SS, Sitohy MZ, Labib SM, El-Marsy RA. Biochemical dynamics and

- hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa*. *Nahrung*. 35, 567-76, 1991.
13. Esselene WB, Sammy GM. Roselle natural red colorant for foods. *Food Prod Develop*. 7, 80-2, 1973.
 14. Leclere H. *Sida sabdariffa* (*Hibiscus sabdariffa*). *Presse Med*. 46, 1060, 1938.
 15. Rankin SM, De Whalley CV, Hoult RS, Jessup W, Wilkins GM, Collard T, Leake DS. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. *Biochem Pharmacol*. 45, 67-75, 1993.
 16. De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol*. 39, 1743-50, 1990.
 17. Thanka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, Mori H. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res*. 53, 2775-9, 1993.
 18. Thanka T, Kawamori T, Ohnishi M, Okamoto M, Mori H, Hara A. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res*. 54, 1359-65, 1994.
 19. Kawamori T, Thanka T, Kojima T, Suzui M, Ohnishi M, Mori H. Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn J Cancer Res*. 54, 2359-65, 1994.
 20. Thanka T, Kawamori T, Ohnishi M, Mori H. Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer* 75, 1433-9, 1995.
 21. Hirose Y, Thanka T, Kawamori T, Ohnishi M, Makita H, Satoh K. Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis* 16, 2337-42, 1995.
 22. Tseng TH., Wang CJ, Kao ES, Chu CY. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 101, 137-48, 1996.
 23. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Fd Chem Toxicol*. 38, 411-6, 2000.
 24. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol*. 60, 307-315, 2000.
 25. Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. *Hibiscus* anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 205, 201-12, 2004.
 26. Lin HH, Chen JH, Kuo WH, Wang CJ. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chem Biol Interact*. 165, 59-75, 2007.
 27. Lin HH, Huang HP, Huang CC, Chen JH, Wang CJ. *Hibiscus* polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway. *Mol Carcinog*. 43, 86-99, 2005.
 28. Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on

- human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *Int J Cancer* 120, 2306-16, 2007.
29. Sachdewa A, Nigam R, Khemani LD. Hypoglycemic effect of *Hibiscus rosa sinensis* L. leaf extract in glucose and streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Indian J Exp Biol.* 39, 284-6, 2001.
 30. Sachdewa A, Raina D, Srivastava AK, Khemani LD. Effect of *Aegle marmelos* and *Hibiscus rosa sinensis* leaf extract on glucose tolerance in glucose induced hyperglycemic rats (Charles foster). *J Environ Biol.* 22, 53-7, 2001.
 31. Ali BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytother Res.* 19, 369-75, 2005.
 32. Kelloff GJ, Sigman CC, Greenwald P. Cancer prevention: progress and promise. *Eur J Cancer* 35, 2031-8, 1999.
 33. Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem.* 48, 2848-52, 2000.
 34. Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Janicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R, Marti A. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 60, 4386-90, 2000.
 35. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoint for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 39, 615-47, 2003.
 36. Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr Biol.* 6, 555-62, 1996.
 37. Chang YC, Chou FP, Huang HP, Hsu JD, Wang CJ. Inhibition of cell cycle progression by penta-acetyl geniposide in rat C6 glioma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198, 11-20, 2004.
 38. Kim J, Choi YL, Vallentin A, Hunrichs BS, Hellerstein MK, Peehl DM, Mochly-Rosen D. Centrosomal PKC β II and pericentrin are critical for human prostate cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 68, 6831-9, 2008.
 39. Wu GJ, Wu MW, Wang C, Liu Y. Enforced expression of METCAM/MUC18 increases tumorigenesis of human prostate cancer LNCaP cells in nude mice. *J Urol.* 185, 1504-12, 2011.
 40. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.* 56, 190-6, 1996.
 41. Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Hofmeyer D, Tripathy D, Dandona P. Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 5988-91, 2001.
 42. Kandel E, Hay N. The Regulation and Activation of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 253, 210-29, 1999.
 43. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 477, 258-62, 2000.

§ 預期成果自評

1. 完成之工作項目

第一年：HLE及HLP促進前列腺癌細胞凋亡以及生長週期停滯之研究

1. 完成洛神葉萃取物 (HLE 及 HLP) 之分離及成分鑑定。
2. 確認 HLE 及 HLP 對前列腺癌細胞具有抑制生長的效用
3. 確認 HLE 及 HLP 產生癌細胞凋亡之作用及機轉。
4. 確認 HLE 及 HLP 對癌細胞週期停滯之作用及機轉。
5. 了解 HLE 及 HLP 對癌細胞凋亡及自體吞噬訊息傳遞路徑之調控作用。

第二年：HLE 及 HLP 抑制裸鼠腫瘤生長之動物模式探討

1. 建立前列腺癌動物模式。
2. 確認 HLE 及 HLP 之動物抑癌作用。
3. 了解 HLE 及 HLP 促癌細胞凋亡、抗轉移及抗血管新生之活性。
4. 提出 HLE 及 HLP 具有 LXR agonist 之活性

第三年：HLE及HLP抑制腫瘤惡化與轉移之作用研究

1. 確認 HLE 及 HLP 影響 metalloproteinase (MMP-9)，以及抑制前列腺癌細胞移動、侵襲及轉移。
2. 確認 HLE 及 HLP 抑制癌細胞轉移之作用及分子機轉。
3. 提出 HLE 及 HLP 為癌症化學預防試劑。

2. 對於學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻

- (1) 配合國家防癌目標，降低國人癌症發生率及死亡率，本研究物質洛神葉來自於台灣本土，且易栽培，產率高，可食用，為低毒或無毒之天然成份，將可大量生產，提供國人食用。
- (2) 研究之方法模式可為未來發展天然物抗癌作用研究之參考。
- (3) 研究之成果可提供產業界生產洛神葉水萃取物 HLE 及其多酚成份 HLP 為保健食品，進一步進入中草藥試驗。
- (4) 研究之成果可推廣洛神葉為可食用之資源，提升洛神花農業作物的經濟效益，並符合現今節能減碳之概念。

3. 對於參與之工作人員，預期可獲之訓練

- (1) 學習前列腺癌化之相關知識。
- (2) 學習更多致癌之機轉及研究模式。
- (3) 學習細胞週期、細胞凋亡、細胞自噬等與癌症之相關性。
- (4) 學習如何從天然植物萃取出各純化成份與細胞培養、電泳點墨、切片染色、酵素活性、血清檢測、動物實驗等實驗方法。
- (5) 學習如何統整實驗數據。

4. 已完成之研究成果及績效

4.1. 期刊論文(SCI)

1. **Hui-Hsuan Lin**, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Food Chemistry. 132, 880-891, 2012. [SCI] [Impact factor: 3.655 ; Ranking: 3/71] (NSC 98-2313-B-040-003-MY3)

2. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, **Hui-Hsuan Lin***. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic

extract induces apoptosis, autophagy, and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Under review, 2012.

4.2. 研討會論文

1. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Shu-Wen Hsuan, **Hui-Hsuan Lin***, 2011. Chemopreventive Effects of Hibiscus sabdariffa Linne leaf extract on prostate cancer cells through apoptosis induction. The 26th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
2. **Hui-Hsuan Lin**, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang* Jing-Hsien Chen*, 2011. Apoptotic effect of Hibiscus sabdariffa leaf on human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways. International Conference on Food Factors, Taipei, R.O.C., 2011.
3. Jing-Hsien Chen, Jenn-Yuan Sheu, Pin-Quan Hou, Soi-Tong Ho, and **Hui-Hsuan Lin***, 2012, Hibiscus sabdariffa leaf inhibits the growth of human prostate cancer LNCaP cells in vivo. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R.O.C.
4. Jing-Hsien Chen, Jenn-Yuan Sheu, Chia-Liang Lin, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang and **Hui-Hsuan Lin***, 2012. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Asia-Pacific Medical Laboratory Science Forum 2012, Taichung, R.O.C.

4.3. 專書及專書論文

Yin HM, 2012, 碩士論文：洛神葉萃取物在活體中抗前列腺癌之研究

The study of inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* leaf extracts on prostate cancer *in vivo*.

§ 附表及附圖

Fig. 1

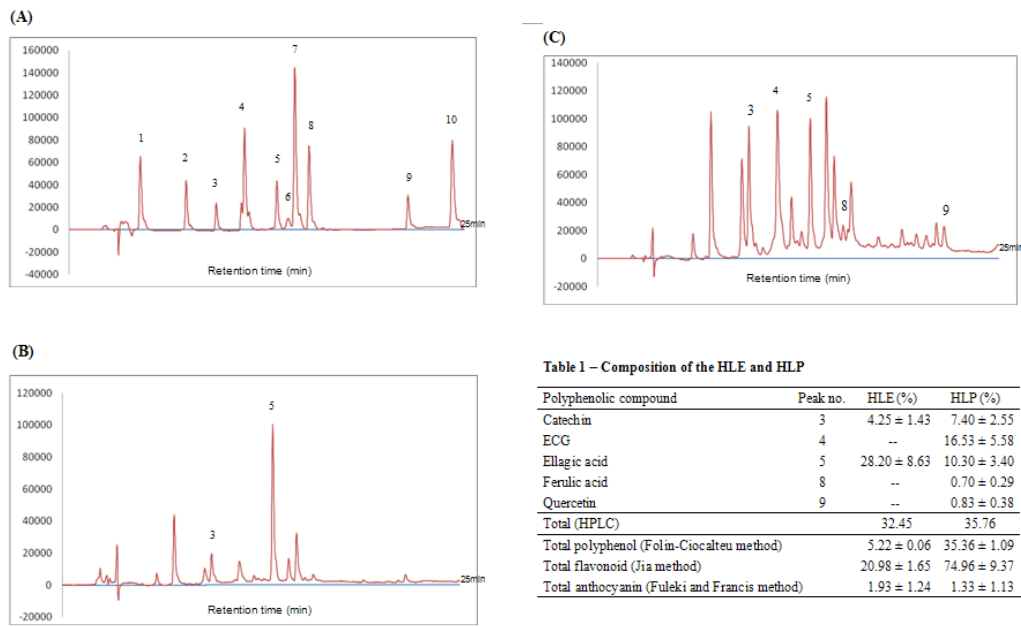


Fig. 1. (A) HPLC chromatogram of 10 kinds of standard polyphenols (10 mg/mL; 10 μ l). Peaks: 1, GA; 2, PCA; 3, catechin; 4, ECG; 5, EA; 6, rutin; 7, ρ -coumaric acid; 8, ferulic acid; 9, quercetin; and 10, naringenin. (B) HPLC chromatograms of free polyphenols from HLE (5 mg/mL; 10 μ l). Phenolic compounds correspond to peaks 3 and 5 as in (A). Detector was set at 285 and 345 nm. (C) Summary of composition of the HLE.

Fig. 2

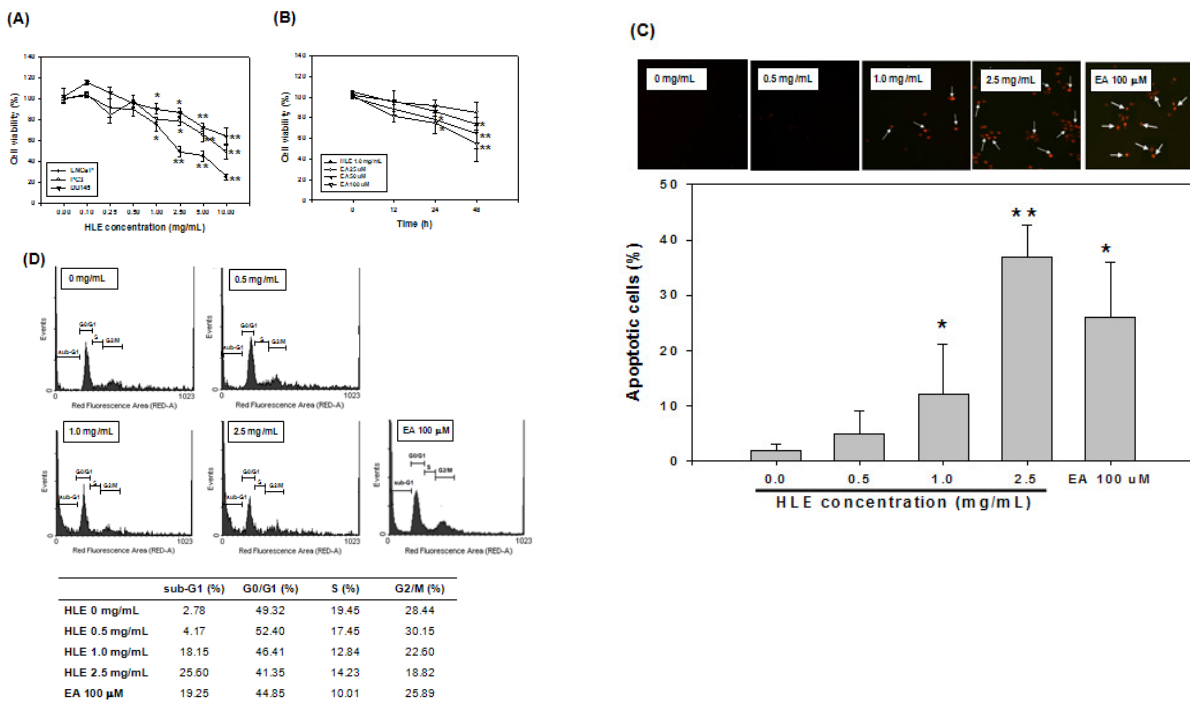


Fig. 2. Inhibition of CaP cells viability by HLE and EA. (A) Inhibition of 3 kinds of CaP cells viability by HLE. Cultured cells were treated with or without HLE under different concentrations (0-10.0 mg/mL) for 24 h. (B) LNCaP cells were treated with 1.0 mg/mL of HLE and 25-100 μ M of EA for indicated times (0, 12, 24 and 48 h). Cell viability was analyzed by MTT assay. The result represents the average of three independent experiments \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the control. (C) Induction of apoptosis by HLE and EA. LNCaP cells were treated with various concentrations (0, 0.5, 1.0 and 2.5 mg/mL) of HLE and 100 μ M of EA for 24 h, and the apoptotic cells were assayed by TUNEL stain. The arrow indicated apoptotic cells. Apoptotic values were calculated as the percentage of apoptotic cells relative to the total number of cells in each random field (>100 cells) and represent the average of three independent experiments \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the control. (D) Under the same

treatment condition, the DNA content was analyzed using fluorescence flow cytometry. The position of the sub-G1 peak (hypodiploidy), integrated by apoptotic cells, and the G0/G1, S and G2/M peaks are indicated. Quantitative assessment of the cell number percentage in each phase of the cell cycle was calculated and expressed, and represents the average of three independent experiments. (E) Immunoblot analysis of the expressions of caspase members (caspase 3, 8 and 9) in LNCaP cells treated with HLE and EA. β -actin served as an internal control. Results are representative of at least three independent experiments. The quantitative data were presented as means \pm SD of three repeats from one independent study. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 3

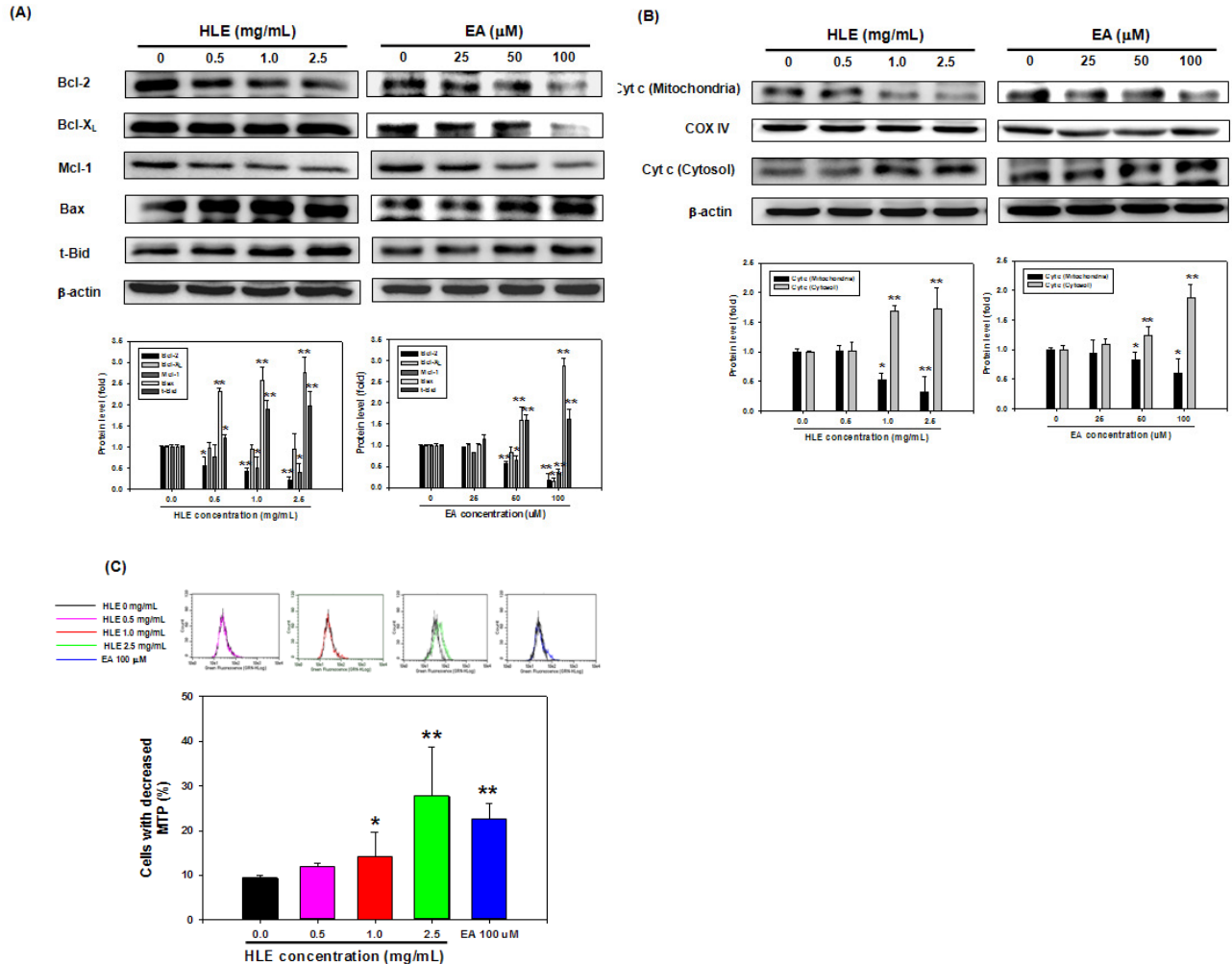


Fig. 3. Effect of HLE and EA on the intrinsic apoptotic pathway in LNCaP cells. (A) Effect of HLE and EA on the translocation of Bcl-2 family proteins. Mitochondrial fractions of LNCaP cells treated with various concentrations of HLE (0, 0.5, 1.0 and 2.5 mg/mL) and EA (0, 25, 50 and 100 μ M) for 24 h were analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antibodies against Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, t-Bid and β -actin that served as an internal control. (B) Effect of HLE on the release of cytochrome c. The expressions of cytochrome c (Cyt c) in cytosol and mitochondria were analyzed by Western blotting. To check the selectivity of proteins from subcellular fractionation, β -actin and COX-IV were used as marker proteins representing the cytosolic and mitochondrial fractions, respectively. (C) Under the same treatment condition, the cells then were harvested and the disruption of mitochondrial transmembrane potential (MTP) was measured using fluorochrome dye JC-1 by a mini-flow cytometry method. The quantitative data were presented as means \pm SD of three repeats from one independent study. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 4

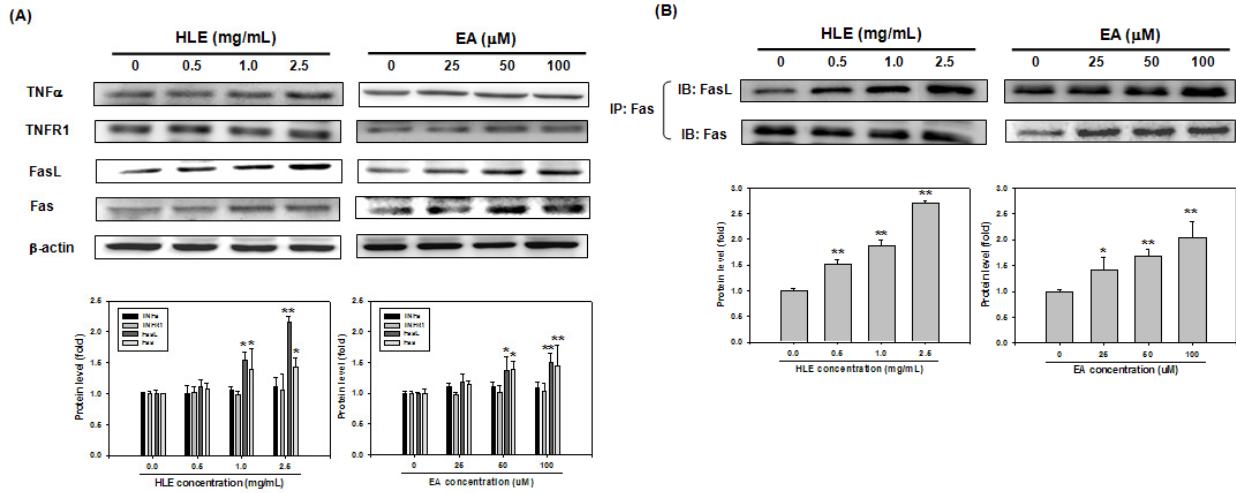


Fig. 4. Effects of HLE and EA on the extrinsic apoptotic pathway in LNCaP cells. (A) Total cell lysates (50 μg) of LNCaP cells treated with various concentrations of HLE (0, 0.5, 1.0 and 2.5 mg/mL) and EA (0, 25, 50 and 100 μM) for 24 h were analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against TNFα, TNFR1, FasL, Fas and β-actin that served as an internal control. (B) Cell extracts prepared from the same treatment condition were immunoprecipitated (IP) with Fas. The precipitated complexes were examined for immunoblotting (IB) using FasL antibody. The quantitative data were presented as means ± SD of three repeats from one independent study. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 5

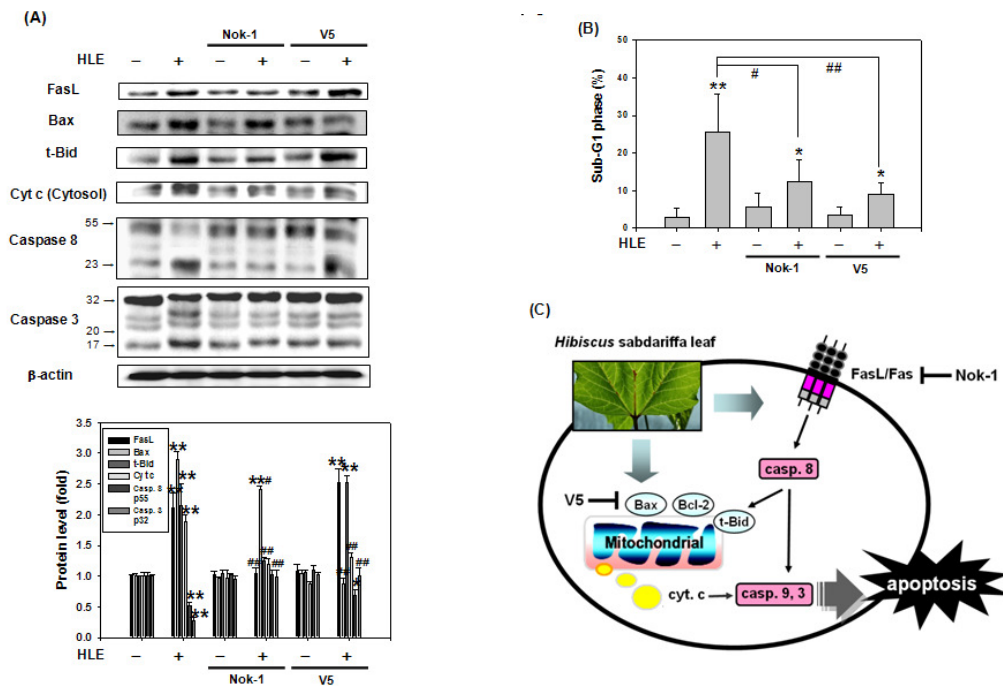


Fig. 5. (A, B) Effects of a FasL blocking antibody (Nok-1) and a Bax inhibitor peptide (V5) on HLE-induced signaling cascades and apoptosis. (A) LNCaP cells were pretreated with Nok-1 or V5 for 30 min, and then treated with 2.5 mg/mL of HLE for 24 h. The expressions of FasL, Bax, t-Bid, Cyt c (cytosol), caspase 8 and caspase 3 were analyzed by Western blotting. β-actin was served as an internal control. The quantitative data were presented as means ± SD of three repeats from one independent study. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control (lane 1). #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the HLE-treated group (lane 2). (B) Under the same treatment condition, apoptosis was analyzed by flow cytometry. Quantitative assessment of the percentage of LNCaP cells in the sub-G1 phase, as indicated by PI, and represents the average of three independent experiments ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the HLE-treated group. (C) Overview of pathways for HLE-induced apoptosis in human CaP cells. HLE were shown to be capable of inducing LNCaP cell apoptosis via both the intrinsic (mitochondrial) and extrinsic (Fas death receptor) pathways.

Fig. 6

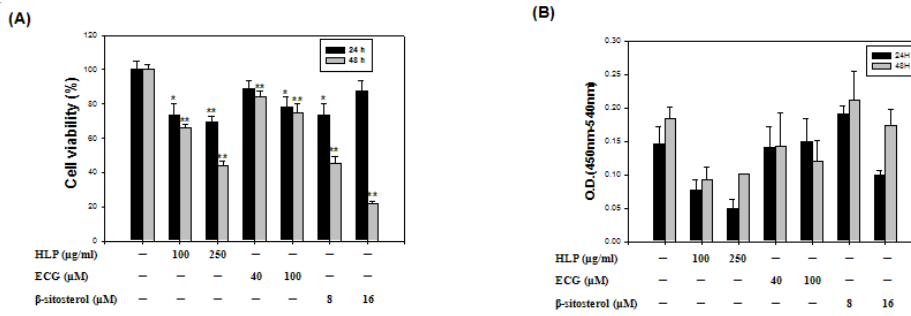


Fig. 6. Inhibition of LNCaP cell viability by HLP, ECG and β-sitosterol. (A) Trypan blue assay. (B) Brd U assay. Cultured cells were treated with or without HLP or ECG or β-sitosterol under different concentrations for 24 or 48 h. The result represents the average of three independent experiments ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 7

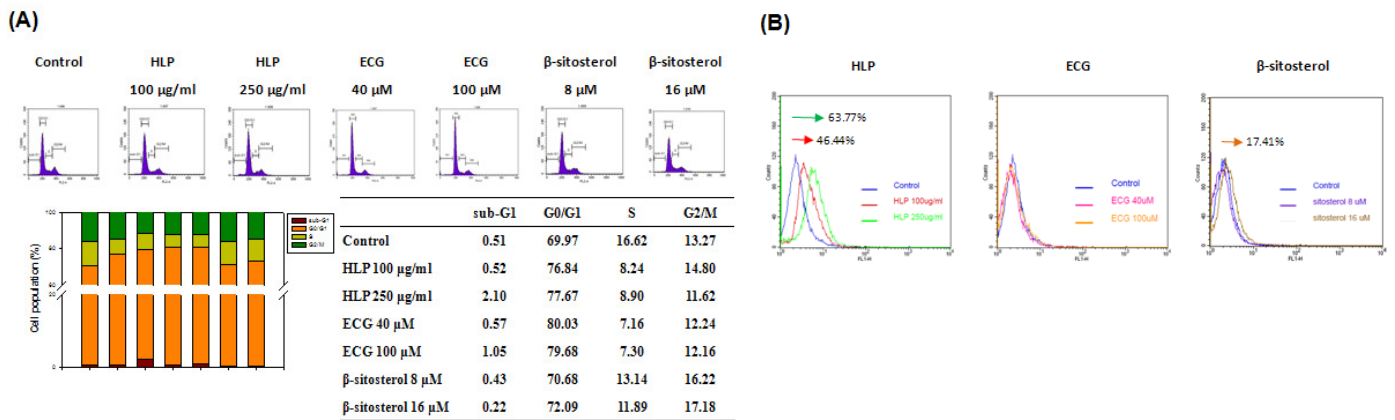
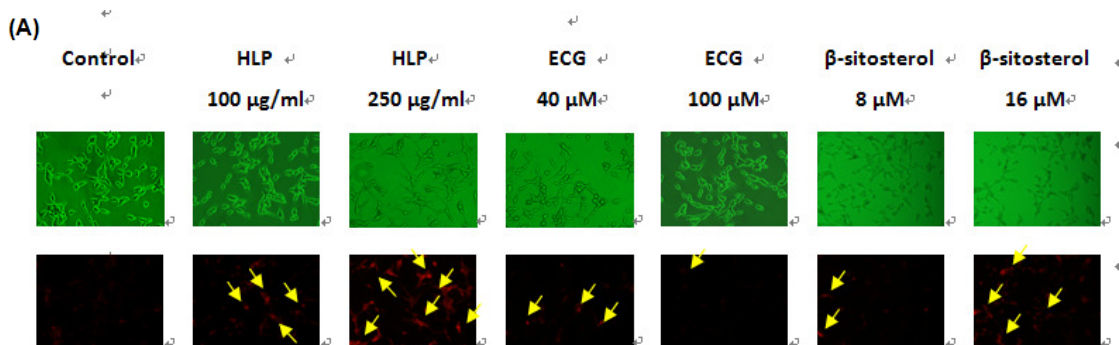


Fig. 7. Fig. 2 Effects of HLP, ECG and β-sitosterol on cell cycle distribution and apoptosis. (A) LNCaP cells were treated with various concentrations of HLP (100 and 250 µg/mL), ECG (40 and 100 µM) and β-sitosterol (8 and 16 µM) for 48 h. The DNA content was analyzed using fluorescence flow cytometry. The position of the sub-G1 peak (hypodiploidy), integrated by apoptotic cells, and the G0/G1, S and G2/M peaks are indicated. Quantitative assessment of the cell number percentage in each phase of the cell cycle was calculated and expressed, and represents the average of three independent experiments. (B) Under the same treatment condition, the determination of early apoptotic (TUNEL-positive) cells was analyzed by flow cytometry. The abscissa of each histogram indicates cell counts, and the ordinate indicates fluorescence of FITC-labeled DNA. The number at each histogram is the percentage of cells with FITC fluorescence above the line (TUNEL-positive). The results represent the average of three independent experiments.

Fig. 8



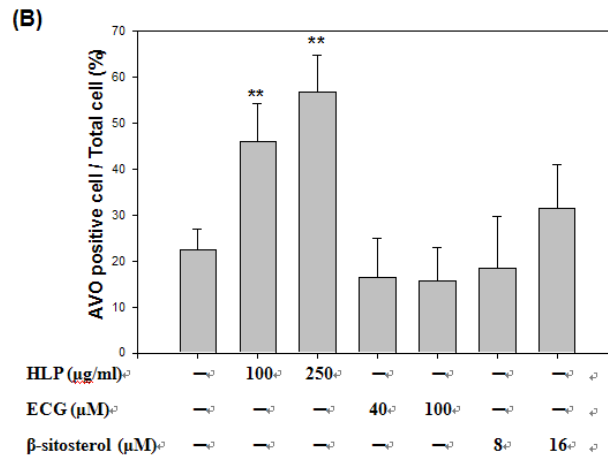


Fig. 8. Effects of HLP, ECG and β -sitosterol on autophagy in LNCaP cells. (A) LNCaP cells were treated with or without HLP, ECG or β -sitosterol under different concentrations for 48 h. The autophagy was analyzed using The DNA content was analyzed using AVO stain. The arrow indicated autophagy. (B) AVO-positive cell values were calculated as the percentage of autophagy cells relative to the total number of cells in each random field (>100 cells) and represent the average of three independent experiments \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the control.

Fig. 9

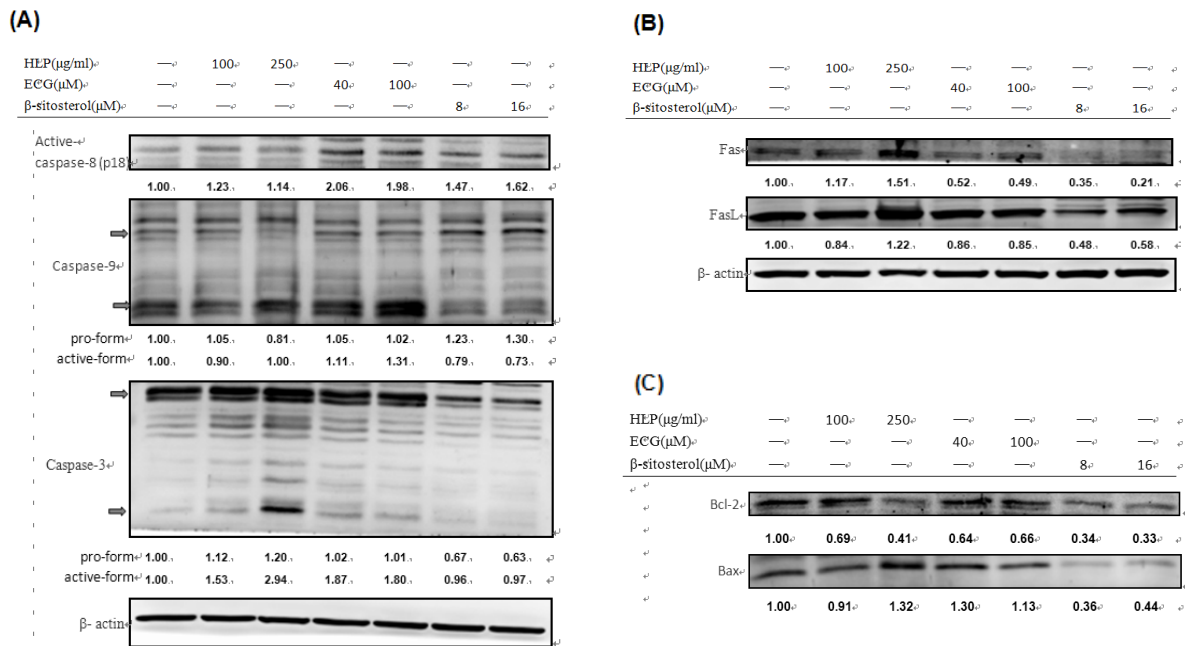


Fig. 9. Effects of HLP, ECG and β -sitosterol on the apoptosis-related proteins in LNCaP cells. Total cell lysates (50 μ g) of LNCaP cells treated with various concentrations of HLP (100 and 250 μ g/mL), ECG (40 and 100 μ M) and β -sitosterol (8 and 16 μ M) for 48 h were analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against caspase-8, -9, -3 (A), FasL, Fas (B), Bcl-2, Bax (C) and β -actin that served as an internal control. The quantitative data were presented as means \pm SD of three repeats from one independent study.

Fig. 10

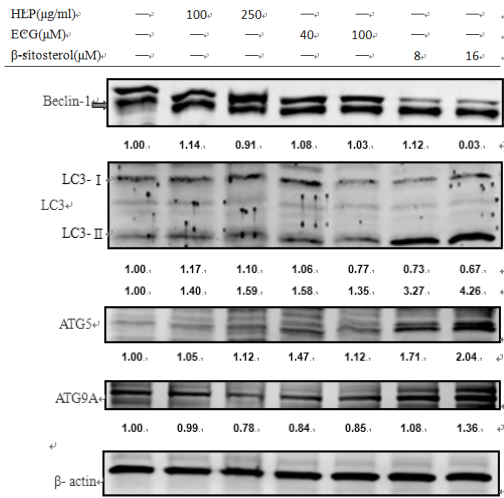


Fig. 10. Effects of HLP, ECG and β-sitosterol on the autophagy-related proteins in LNCaP cells. Total cell lysates (50 μg) of LNCaP cells treated with various concentrations of HLP (100 and 250 μg/mL), ECG (40 and 100 μM) and β-sitosterol (8 and 16 μM) for 48 h were analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against Beclin, LC-3, ATG5, ATG9A and β-actin that served as an internal control. The quantitative data were presented as means ± SD of three repeats from one independent study.

Fig. 11

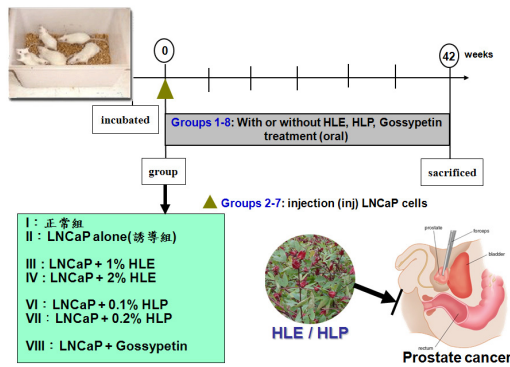


Table 2. Effects of HLE, HLP and gossypetin on LNCaP tumour growth.

Groups	No. of mice	Tumor incidence (%)	Tumor volume (mm ³)	Tumor weight (mg)
1. Control	6	0	ND	ND
2. LNCaP	6	75	855 ± 269	1390 ± 490
3. LNCaP + 1.0% HLE	6	33	363 ± 185	805 ± 95
4. LNCaP + 2.0% HLE	6	0	ND	ND
5. LNCaP + 0.1% HLP	6	25	913 ± 407	1040 ± 530
6. LNCaP + 0.2% HLP	6	16	255	890
7. LNCaP + 2mg Gossypetin	6	33	150 ± 149	270 ± 140

The mice were euthanised 42 days after cell injection, and the tumour incidence, volume and weight were measured. ND = non-detected.

Fig. 11. Determining tumorigenesis in nude mice (xenograft tumor studies) and animal trials in HLE and HLP.

Fig. 12

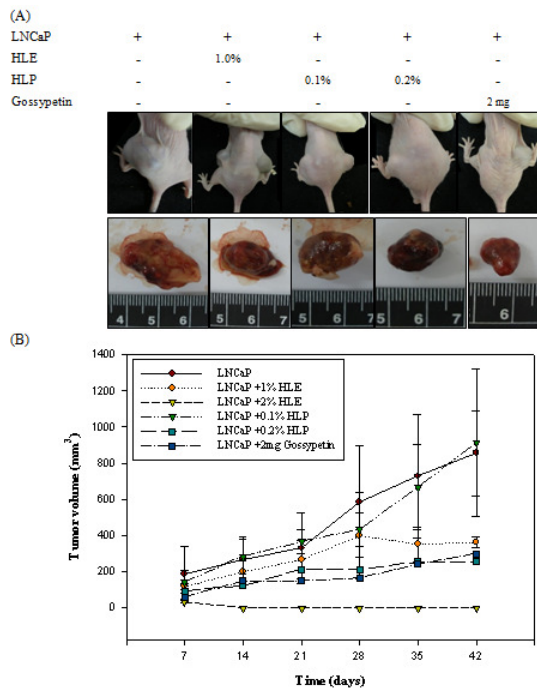


Fig. 12. HLE, HLP and Gossypetin inhibit LNCaP tumor xenograft growth in nude mice. The mice implanted with LNCaP xenografts were fed with HLE, HLP or gossypetin for 42 days. (A) Tumor formation was visualized by photography (B) Tumor volumn of athymic nude mice at indicative day after tumor innoculation.

Fig. 13

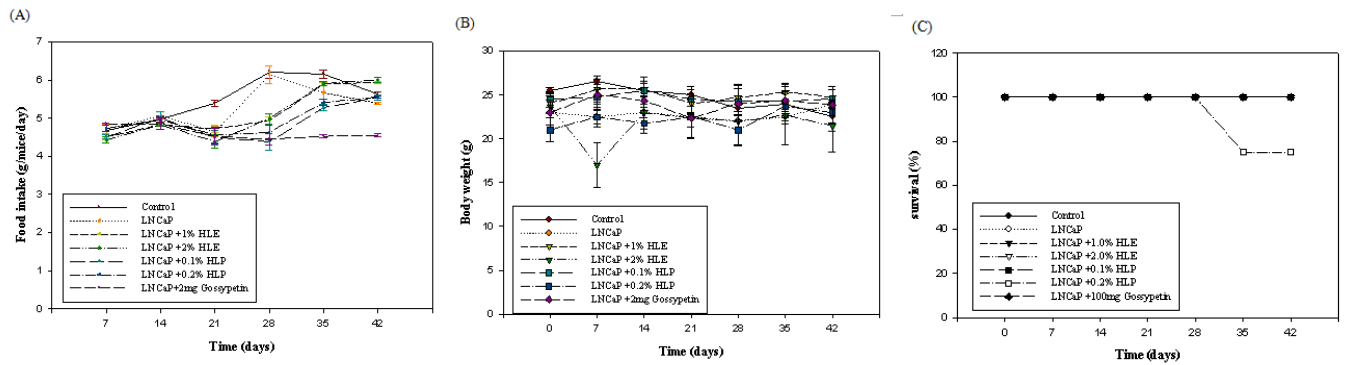


Fig. 13. HLE, HLP and gossypetin inhibit LNCaP tumor xenograft growth in nude mice. The mice implanted with LNCaP xenografts were fed with HLE, HLP or gossypetin for 42 days. (A) Food intake, (B) body weight, and (C) survival curve of each mouse was recorded weekly throughout the experiment. of each mouse was recorded weekly throughout the experiment.

Fig. 14

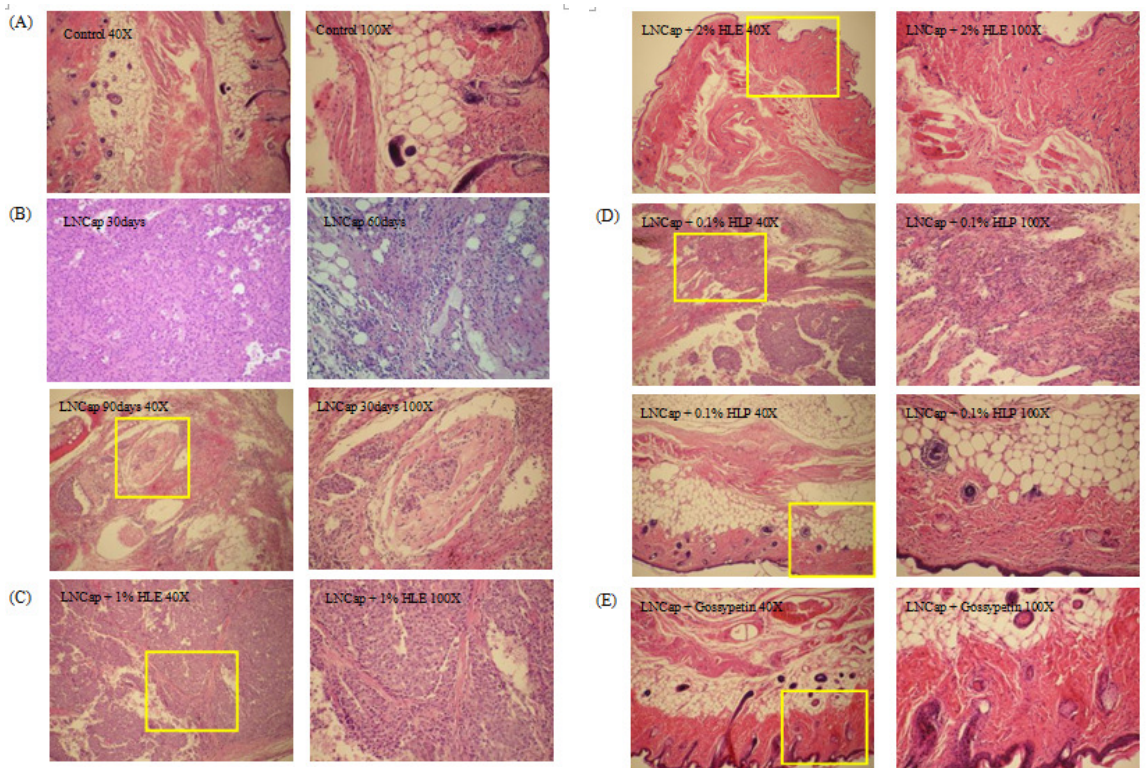


Fig. 14. Histological photomicrographs of tumor xenograft in nude mice with HLE, HLP and gossypetin. LNCaP cells were injected subcutaneously into nude mice (A, control; B, LNCaP cells injection). At the same time, six of the groups were orally treated with HLE (C), HLP (D) or gossypetin (E). The mice were sacrificed after 42 days, and tumors were collected for analysis. Histology of tissue from nude mouse injected with LNCaP cells.

Fig. 15

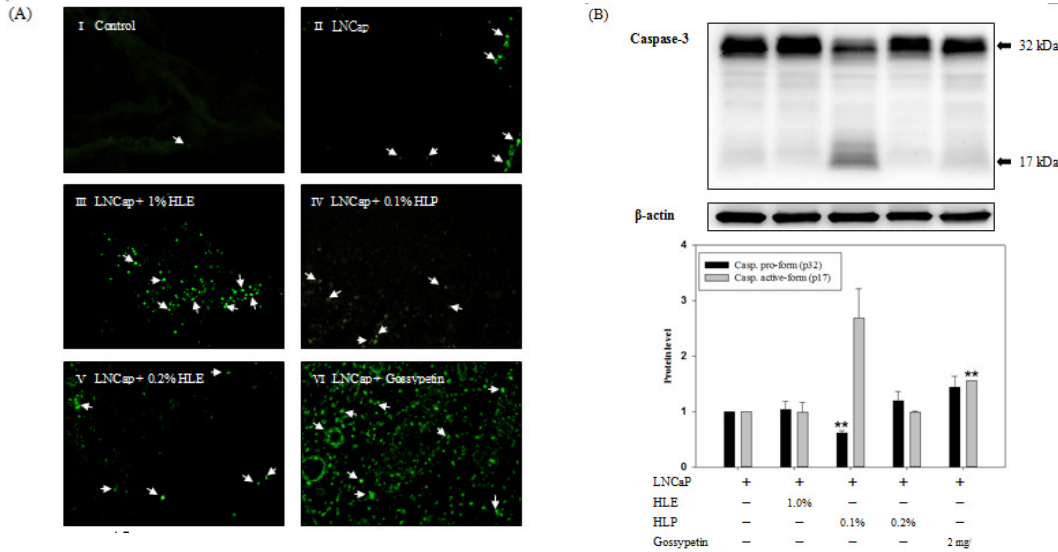


Fig. 15. HLE, HLP and gossypetin induce apoptotic cells of LNCaP tumor xenograft growth in nude mice. The mice implanted with LNCaP xenografts were fed with HLE, HLP or gossypetin for 42 days, and tumors were collected for analysis. The apoptotic cells were assayed by TUNEL stain. The arrow indicated apoptotic cells. (B) Immunoblot analysis of the expression of caspase 3 in tumor xenograft of nude mice with HLE, HLP and Gossypetin. The data are expressed as mean±SD from three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the LNCaP alone group

Fig. 16

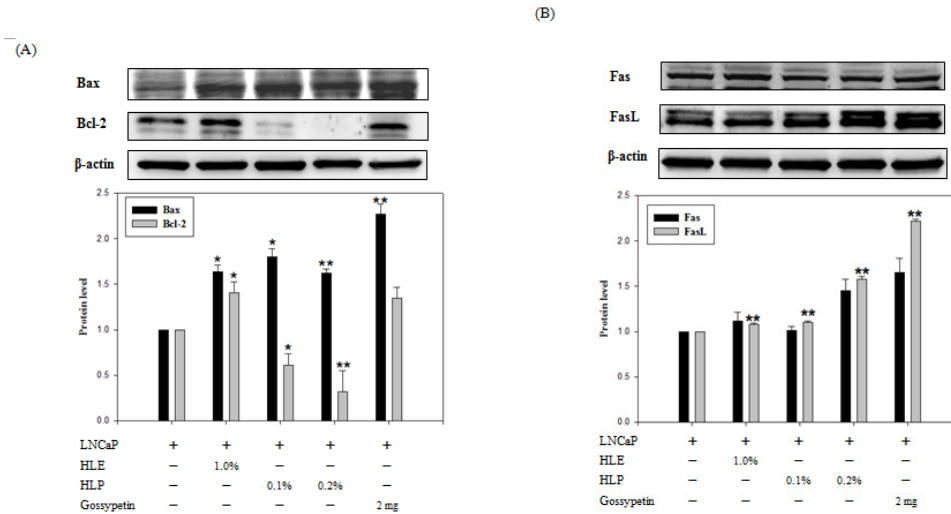


Fig. 16. Immunoblot analysis of the expression of (A) Bcl-2 family (Bax, Bcl-2 and Mcl-1) and (B) Fas, FasL tumor xenograft in nude mice with HLE, HLP and gossypetin. After treatment, whole tissue extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western blotting was performed with antibodies against Bax, Bcl-2, Fas and FasL. β -actin was used as an internal control. The data are expressed as mean±SD from three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 17

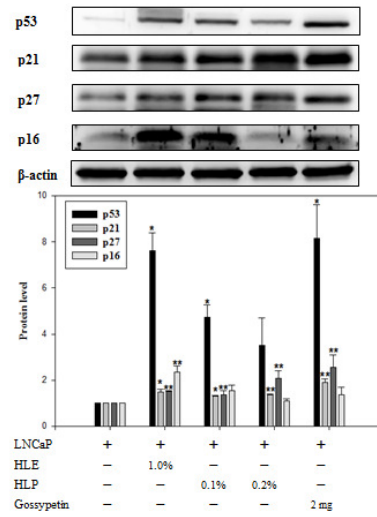


Fig. 17. Immunoblot analysis of the expression of p53, p21, p27 and p16. tumor xenograft in nude mice with HLE, HLP and gossypetin. After treatment, whole tissue extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western blotting was performed with antibodies against p-p53 and p53, p21, p27, and p16. β -actin was used as an internal control. The data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 18

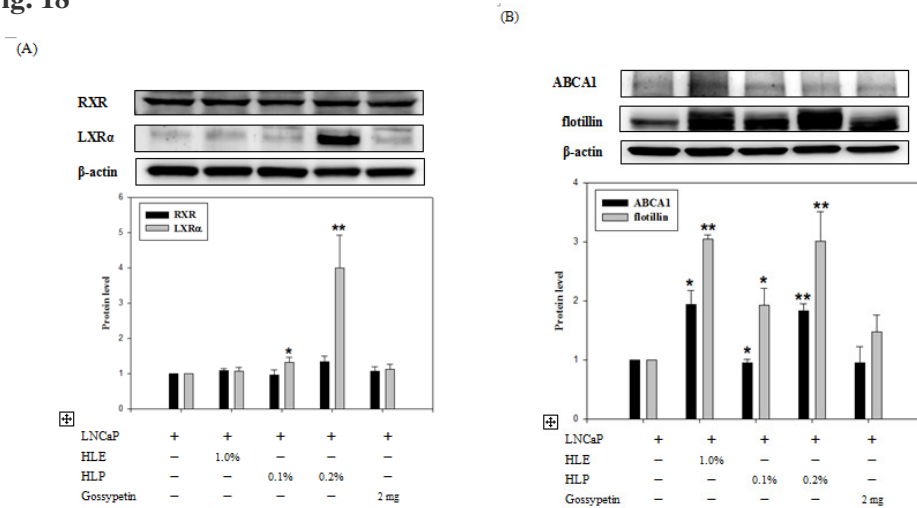


Fig. 18. Immunoblot analysis of the expression of (A) RXR and LXR α (B) ABCA1 and flotillin tumor xenograft in nude mice with HLE, HLP and gossypetin. After treatment, whole tissue extracts were prepared as described in material and method. Equal amount of total proteins were loaded in each lane of SDS-polyacrylamide gel. Western blotting was performed with antibodies against RXR, LXR α , ABCA1 and flotillin. β -actin was used as an internal control. The data are expressed as mean \pm SD from three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 19

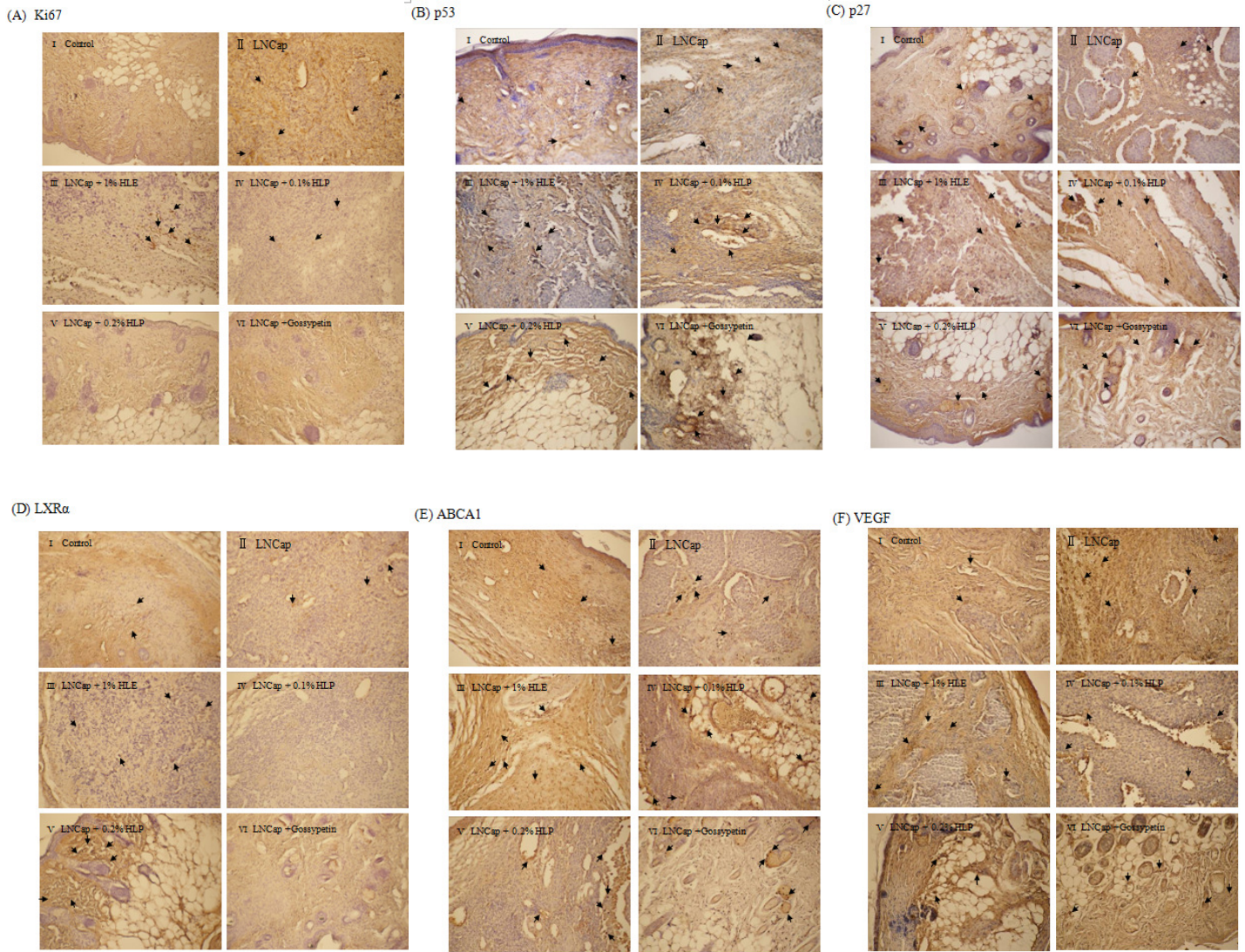


Fig. 19. Histological photomicrographs of tumor xenograft in nude mice with HLE, HLP and gossypetin. (A) Immunohistochemical staining for Ki-67 was done as detailed in materials and methods. (B) Immunohistochemical staining for p53. (C) Immunohistochemical staining for p27 (magnification X100). (D) Immunohistochemical staining for LXR α was done as detailed in materials and methods. (E) Immunohistochemical staining for ABCA1 (F) Immunohistochemical staining for VEGF (magnification X100)

Fig. 20

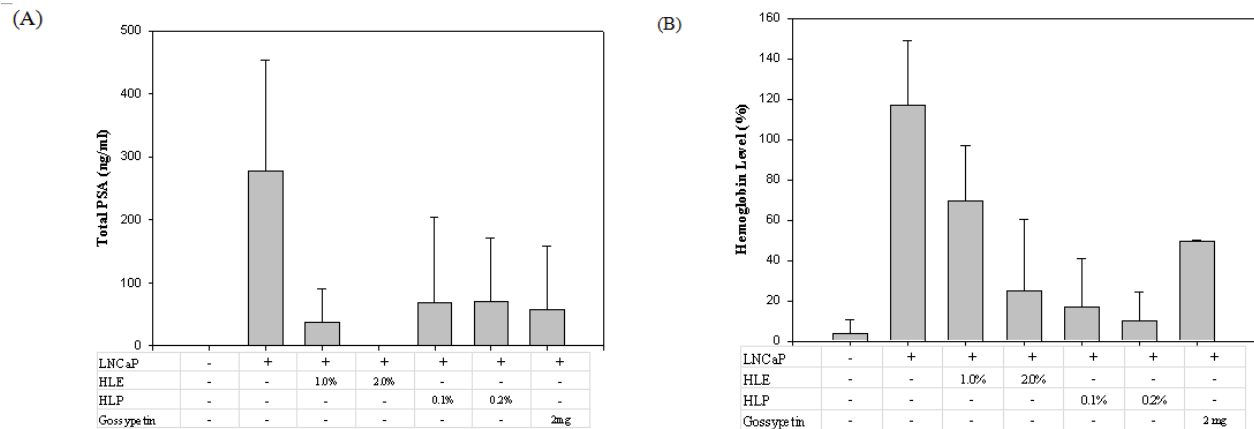


Fig. 20. Effect of HLE, HLP and gossypetin on the expression of tPSA and hemoglobin in serum from nude mouse injected with LNCaP cells. At the same time, two of the groups were orally treated with HLE, HLP or gossypetin. The mice were sacrificed after 42 days, and serum was collected for analysis of tPSA and hemoglobin level.

Fig. 21

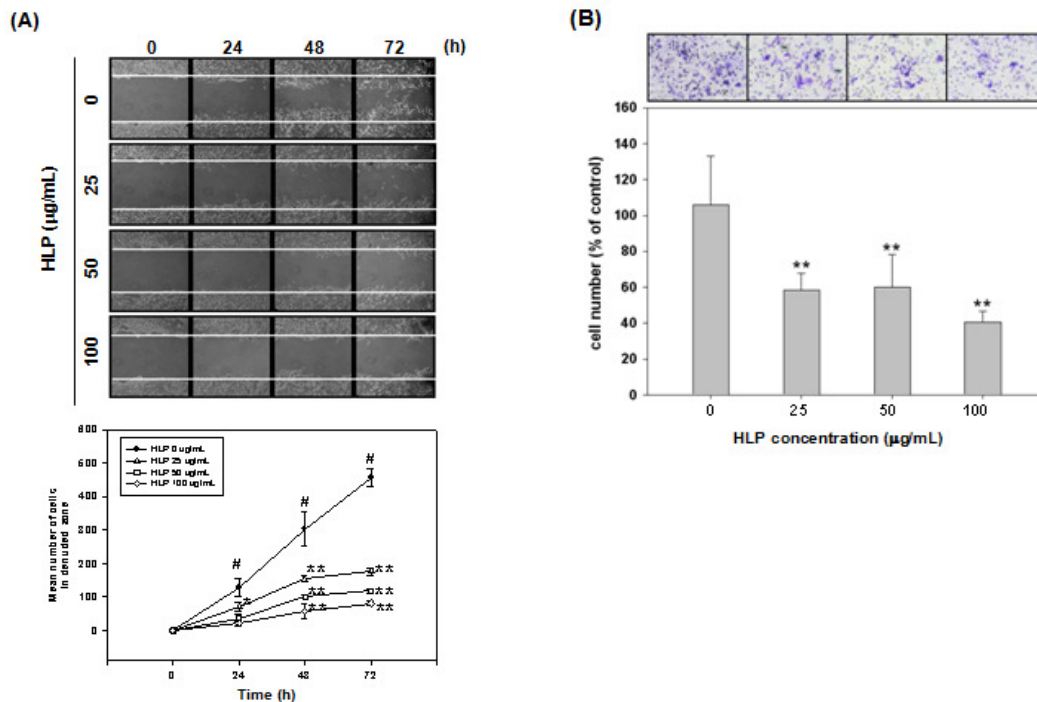


Fig. 21. Effects of HLP on wound healing ability and invasion of LNCaP cells. Monolayers of growth-arrested (A) LNCaP cells treated with HLP (25, 50 and 100 µg/ml) or without were scraped and the number of cells in the denuded zone (i.e., wound) was quantitated after 24, 48, and 72 h under a light microscopy. Quantitative assessment of the mean number of cells in the denuded zone and represents the average of three independent experiments \pm SD. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with the 0 h-treated time. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control. (B) LNCaP cells were pre-treated with HLP (25, 50 and 100 µg/ml) or without for 24 h. Treated cells were then subjected to analyses for invasion as described in Materials and Methods. Representative photomicrographs of the membrane-associated cells were assayed by Giemsa stain. The arrow indicated the membrane-associated cells. (c-d) "% of control" represent denotes the mean number of cells in the membrane expressed as a proportion of that control group and the average of three independent experiments \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

Fig. 22

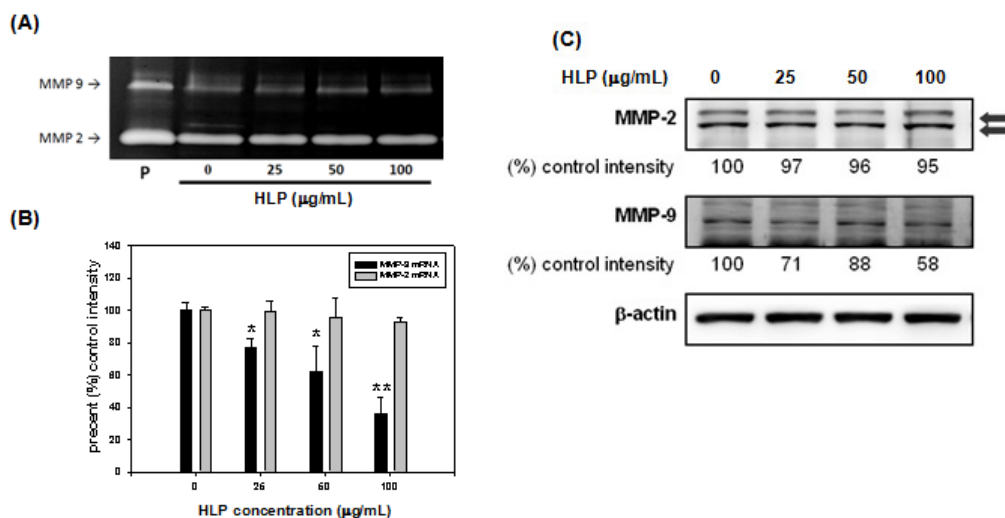


Fig. 22 Effects of HLP on the MMPs activities and expressions. (A) LNCaP cells in serum-free medium were treated with various concentrations (25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of HLP for 24 h. The culture medium of cells after treatment was subjected to gelatin-zymography to analyze the activity of MMPs. (B) Real-time quantitative RT-PCR and (C) Western blot analysis of mRNA and protein levels of MMP-2 and MMP-9 in cells treated with various concentrations of HLP and harvested at 24 h. β -actin was served as an internal control of protein level. The quantitative data were presented as means \pm S.D. of three repeats from one independent study. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared with the control.

Fig. 23

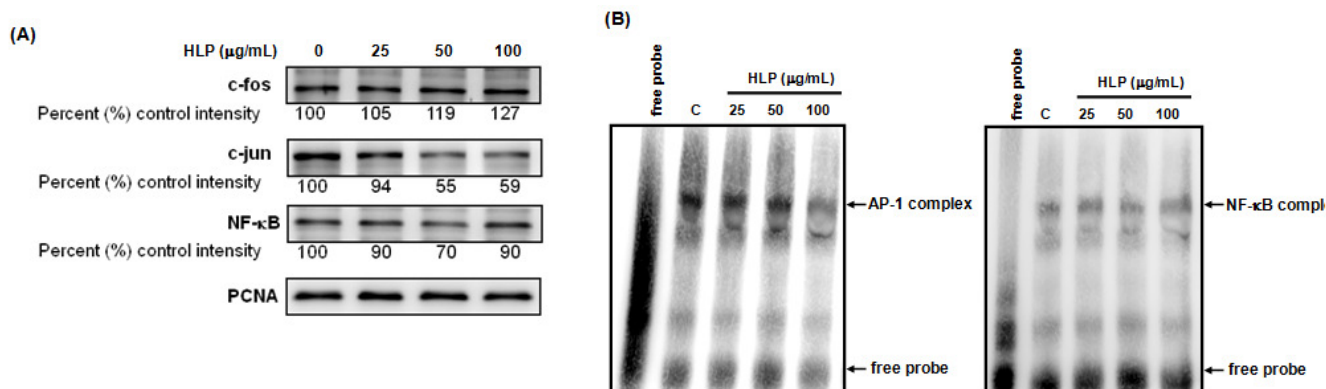


Fig. 23. Effects of HLP on the AP-1 nuclear translocation level. (A) LNCaP cells in serum-free medium were treated with various concentrations (25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of HLP for 24 h, after which cells were harvested and the nuclear fraction analyzed for the expression of c-Jun, c-Fos, and NF- κ B. The nuclear protein levels were determined by Western blotting. (B) The nuclear extracts were analyzed for AP-1 and NF- κ B DNA binding activity using biotin-labeled AP-1 and NF- κ B specific oligonucleotide by EMSA. Lane 1 represented nuclear extracts incubated with unlabeled oligonucleotide (free probe) to confirm the specificity of binding. PCNA was served as a nuclear internal control. The quantitative data were presented as means \pm SD of three repeats from one independent study.

Fig. 24

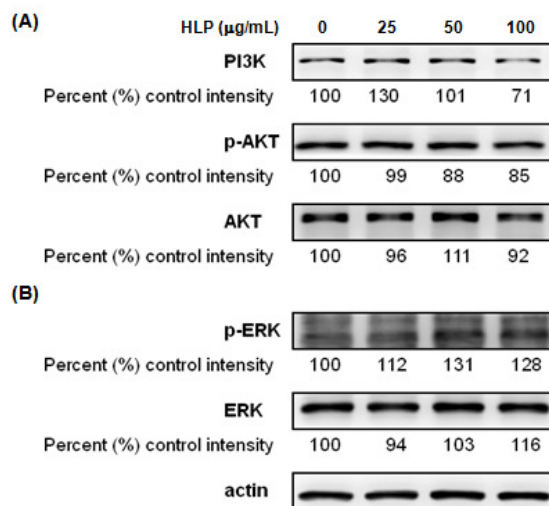


Fig. 24. Effects of HLP on the expressions of PI3K/Akt and ERK. LNCaP cells in serum-free medium were treated with various concentrations (25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of HLP for 24 h, after which cells were harvested and analyzed for the levels of (A) PI3K, p-Akt, Akt, (B) p-ERK and ERK. Equal amounts of cell lysates (50 μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with specific PI3K, p-Akt, Akt, p-ERK and ERK antibodies. β -actin was served as an internal control of protein level. The quantitative data were presented as means \pm SD of three repeats from one independent study.

Fig. 25

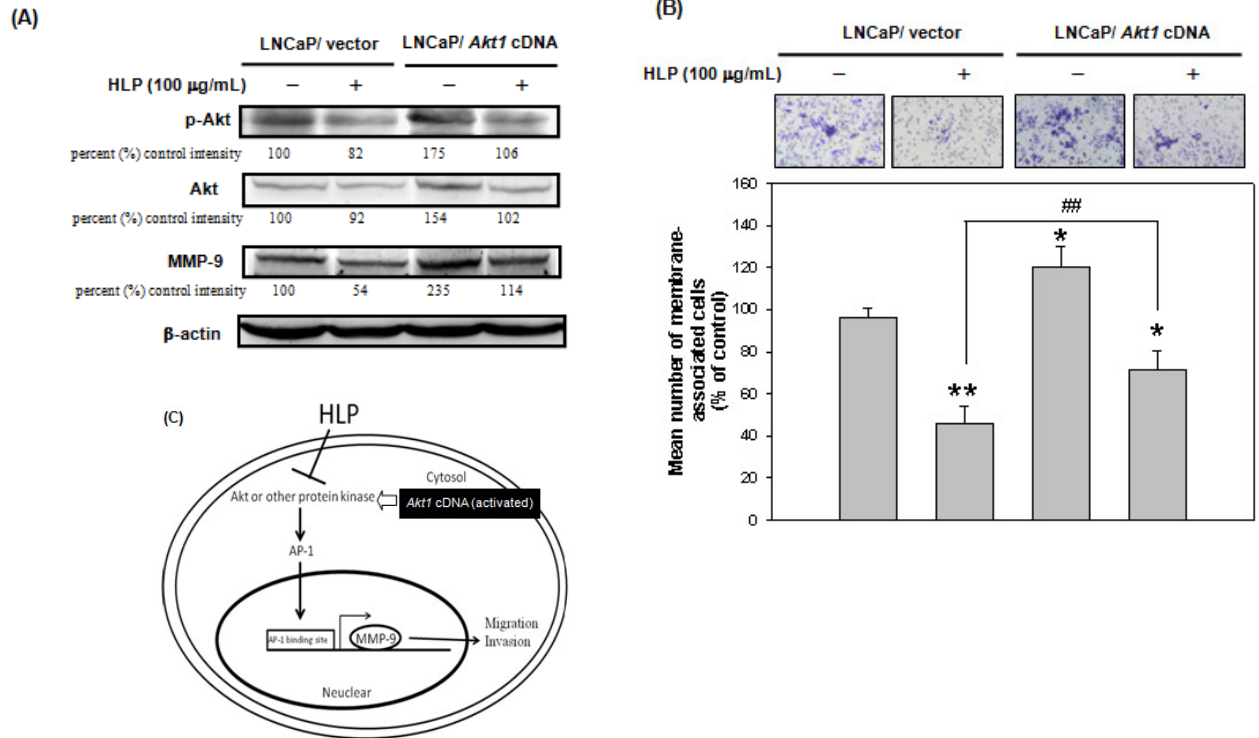


Fig. 25. Effects of mutant Akt expression vector on HLP-mediated cellular events. LNCaP cells were transfected with empty vector or *Akt1* cDNA (activated) and treated with or without 100 µg/ml of HLP for 24 h. (A) The cellular levels of p-Akt, Akt and MMP-9 were analyzed by Western blot. β-actin was served as an internal control. Determined expression of the protein was subsequently quantified by densitometric analysis with that of control being 100% as shown just below the gel data. (B) Cell invasion was analyzed by Boyden chamber assay. The quantitative data were presented as means ± S.D. of three repeats from one independent study. **p* < 0.05, ***p* < 0.005 compared with the respective untreated group. (LNCaP/vector or LNCaP /*Akt1* cDNA). ###*p* < 0.005 compared with the mean number of membrane-associated cells in HLP-treated LNCaP/vector group compared with HLP-treated LNCaP/*Akt1* cDNA group. (C) A proposed model for the HLP-mediated inhibition of LNCaP cell migration and invasion.

Fig. 26

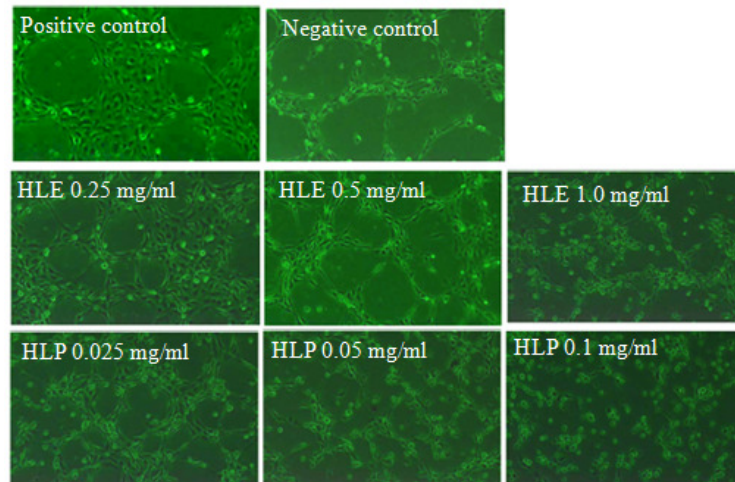


Fig. 26. Effects of HLE and HLP on on capillary tube formation in cultured endothelial cells. Representative photographs of Matrigel-coated cultured HUVEC cells after incubation with various concentrations of HLE (0.25, 0.5 and 1.0 mg/ml) or HLP (0.025, 0.05 and 0.1 mg/ml) or without.

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 洛神葉功能性成分抗前列腺癌作用之研究
	計畫主持人: 林慧萱
	計畫編號: 98-2313-B-040-003-MY3 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：林慧萱		計畫編號：98-2313-B-040-003-MY3					
計畫名稱：洛神葉功能性成分抗前列腺癌作用之研究							
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	<p>專題計畫研究成果精簡報告兩份以及成果報告一份</p> <p>1. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Shu-Wen Hsuan, Hui-Hsuan Lin*, 2011. Chemopreventive Effects of Hibiscus sabdariffa Linne leaf extract on prostate cancer cells through apoptosis induction. The 26th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R. O. C.</p> <p>2. Hui-Hsuan Lin, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*, 2011. Apoptotic effect of Hibiscus sabdariffa leaf on human prostate cancer cells through both intrinsic and</p>
		研究報告/技術報告	3	3	100%		
		研討會論文	4	4	100%		

						Conference of Biomedical Science, Taipei, R. O. C. 4. Jing-Hsien Chen, Jenn-Yuan Sheu, Chia-Liang Lin, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang and Hui-Hsuan Lin*, 2012. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Asia-Pacific Medical Laboratory Science Forum 2012, Taichung, R. O. C.
		專書	1	2	100%	Yin HM, 2012, 碩士論文：洛神葉萃取物在活體中抗前列腺癌之研究 The study of inhibitory effects of Hibiscus sabdaiffa leaf extracts on prostate cancer in vivo
	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%	
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	2	2	100%	人次
		博士生	0	0	100%	
		博士後研究員	0	0	100%	
		專任助理	2	2	100%	
國外	論文著作	期刊論文	1	4	100%	篇 Hui-Hsuan Lin, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Food

						(NSC 98-2313-B-040-003-MY3)
	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%		
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>詳列已完成之研究成果：</p> <p>1. 期刊論文(SCI)</p> <p>1.1. Hui-Hsuan Lin, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Food Chemistry. 132, 880-891, 2012. [SCI] [Impact factor: 3.655 ; Ranking: 3/71] (NSC 98-2313-B-040-003-MY3)</p> <p>1.2. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Hui-Hsuan Lin*. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract induces apoptosis, autophagy, and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Under review, 2012.</p> <p>2. 研討會論文</p> <p>2.1. Jing-Hsien Chen, Chau-Jong Wang, Shu-Wen Hsuan, Hui-Hsuan Lin*, 2011. Chemopreventive Effects of Hibiscus sabdariffa Linne leaf extract on prostate cancer cells through apoptosis induction. The 26th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R. O. C.</p> <p>2.2. Hui-Hsuan Lin, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang*, Jing-Hsien Chen*, 2011. Apoptotic effect of Hibiscus sabdariffa leaf on human prostate cancer cells through both intrinsic and extrinsic pathways. International Conference on Food Factors, Taipei, R. O. C., 2011.</p> <p>2.3. Jing-Hsien Chen, Jenn-Yuan Sheu, Pin-Quan Hou, Soi-Tong Ho, and Hui-Hsuan Lin*, 2012, Hibiscus sabdariffa leaf inhibits the growth of human prostate cancer LNCaP cells in vivo. The 27th Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taipei, R. O. C.</p> <p>2.4. Jing-Hsien Chen, Jenn-Yuan Sheu, Chia-Liang Lin, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang and Hui-Hsuan Lin*, 2012. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Asia-Pacific Medical Laboratory Science Forum 2012, Taichung, R. O. C.</p> <p>3. 專書及專書論文</p> <p>Yin HM, 2012, 碩士論文：洛神葉萃取物在活體中抗前列腺癌之研究 The study of inhibitory effects of Hibiscus sabdaiffa leaf extracts on</p>					

	prostate cancer in vivo.
--	--------------------------

	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）

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）

(1) 配合國家防癌目標，降低國人癌症發生率及死亡率，本研究物質洛神葉來自於台灣本土，且易栽培，產率高，可食用，為低毒或無毒之天然成份，將可大量生產，提供國人食用。

(2) 研究之方法模式可為未來發展天然物抗癌作用研究之參考。

(3) 研究之成果可提供產業界生產洛神葉水萃取物 HLE 及其多酚成份 HLP 為保健食品，進一步進入中草藥試驗。

(4) 研究之成果可推廣洛神葉為可食用之資源，提升洛神花農業作物的經濟效益，並符合現今節能減碳之概念。