

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

荖葉水萃物回復肝功能保健功效之探討(第3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2320-B-040-030-MY3
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：周芬碧

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：張瑋烈
博士班研究生-兼任助理人員：吳佩芳
博士班研究生-兼任助理人員：軒叔汶

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 100 年 10 月 28 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 100 年度期末研究報告完整版

荖葉水萃取物回復肝功能保健功效之探討

Study of the prevention function of piper betel leaf extract toward liver diseases

計畫類別：一般型研究計畫(個別型)

計畫標號：NSC97-2320-B-040-030-MY3

執行期間：97 年 08 月 01 日至 100 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學

計畫主持人：周芬碧

計畫參與人員：吳佩芳 軒叔汶 張瑋烈

連絡電話：04-24730022 ext. 11672

電子郵件：fpchou@csmu.edu.tw

中華民國 100 年 10 月 10 日

目 錄

一、中英文摘要.....	3-4
二、前言.....	5-9
三、研究目的.....	10
四、文獻探討.....	10-11
五、研究方法.....	11-17
5.1 荖葉水萃取物(extract of piper betel leaf, PBL)的製備.....	11
5.2 荖葉水萃取物之成份分析.....	11-12
5.3 荖葉水萃取物之抗氧化能力分析.....	12-13
5.4 抗 LDL 氧化能力分析.....	12-13
5.5 老鼠 macrophage 之細胞培養與 foam cell formation assay.....	12-13
5.6 肝臟細胞株與肝癌細胞株之培養.....	13-14
5.7 細胞毒性測試.....	14
5.8 細胞螢光染色之分析.....	14-15
5.9 細胞週期分析.....	15
5.10 西方點墨法之分析.....	15-16
5.11 急性肝損傷之動物模式.....	16
5.12 化學誘導肝癌之動物模式.....	16
5.13 活體肝癌細胞異種移植之腫瘤生長分析.....	16-17
5.14 血液分析與組織切片.....	17
5.15 肝臟 phase I 及 phase II 解毒酵素活性分析.....	17
5.16 實驗數據統計與繪圖.....	17
六、結果.....	18-24
七、討論.....	24-30
八、參考文獻.....	31-35
九、計畫成果自評.....	36
十、表及附圖.....	37-61

中文摘要

惡性腫瘤蟬年十大死亡原因之首數年，而在台灣無論男女肝癌皆為癌症死亡主因之一，因此對於肝癌的研究防治與治療仍是相當重要的議題。過去在本實驗室對於荖葉水萃取物(extracts of piper betel leaf, PBLs)已發現具有良好抵抗四氯化碳所誘發肝損傷的能力，此外在合併抗癌藥物下可以加強癌細胞對藥物的敏感性。因此首先對於荖葉水萃取物進行基礎成份分析發現，其富含多醣類，及少許的蛋白質、脂質、多酚類和類黃酮。進一步利用全抗氧化能力分析儀(Total peroxy radical-trapping antioxidant parameter assay, TRAP)偵測荖葉水萃取物發現其相當於抗氧化劑 Trolox 的 0.542 倍。在脂質抗氧化方面發現，荖葉水萃取物經由脂蛋白相對性電泳分析(relative electrophoretic mobility assay)、脂質衍蛋白 B(apoprotein B)斷裂實驗，以及過氧化物 malondialdehyde (MDA)生成等實驗發現，可以有效保護低密度脂蛋白避免被促氧化劑硫酸銅氧化。利用老鼠巨噬細胞 J774A.1 進行活體試驗發現可以降低脂質於巨噬細胞內的累積，並能有效的抑制泡沫細胞形成。對於保肝功效的研究，使用乙醯胺酚(acetaminophen, APAP)誘導大鼠急性肝炎，以及化學致癌物 2-乙酰氨基氟(2-acetamidofluorene, 2-AAF)誘導大鼠肝癌模式下，發現荖葉水萃取物會誘導肝臟解毒酵素-細胞色素 P450 1A2 活化，進而促使 2-乙酰氨基氟產生肝毒性。在細胞實驗方面，荖葉水萃取物會造成人類肝小細胞癌(Hep3B2.1-7)產生與濃度變化相關性的細胞週期停滯現象，然而相同的處理對於人類胎兒肝臟上皮細胞株 WRL-68 並不會造成太大的影響。高劑量的處理荖葉水萃取物會增強 p21 蛋白的表現，並使得下游蛋白 cyclin A 和 E2F1 的表現量下降。另一方面在長時間的處理荖葉水萃取物，經由顯微鏡觀察細胞型態，以及螢光染劑 AVO、MDC 呈色發現，會促使細胞走向自體吞噬凋亡現象 (autophagy)，其相關性蛋白 LC3-I、LC3-II 和 Beclin-1 的表現皆有明顯上升。此外在腫瘤異種移植(tumor xenograft)的模式下，給予荖葉水萃取物具有抑制腫瘤生長的趨勢。此活體實驗證實荖葉水萃取物於肝癌治療上的應用價值。綜合以上實驗結果得知，荖葉是具有發展為肝癌照護的功能性食品。由於，荖葉水萃取物亦會影響肝臟解毒酵素系統，因此小心評估藥物治療的策略是很重要的。

關鍵字：荖葉、肝炎、低密度脂蛋白、肝癌、肝臟解毒酵素、
細胞自體吞噬死亡

英文摘要

Hepatocellular carcinoma is the leading cause of cancer mortality in male and female of Taiwan. The extracts of piper betel leaf (PBLs) have been demonstrated to be chemopreventive against CCl₄-induced liver damage, and to enhance the cytotoxicity of anticancer drug in our previous studies. In this study we analyzed the constitution of PBLs. The data showed that PBLs contains high level of polysaccharides and some protein, lipids, polyphenol and flavonoids. We used Total peroxy radical-trapping antioxidant parameter assay to determine the antioxidative activity of PBLs to be the equivalent of 0.542 of Trolox (a hydrophilic analog of alpha-tocopherol). PBLs also had protective effect on LDL oxidation which was evaluated by the relative electrophoretic mobility of oxLDL, fragmentation of ApoB and malondialdehyde production via the Cu²⁺- mediated oxidation of LDL. In the in vivo test, PBLs also inhibited lipid accumulation in murine macrophage J774A.1, and decreased foam cell formation. In the animal studies of the acetaminophen-induced acute hepatitis and 2-acetamidofluorene-induced hepatocarcinogenesis, PBLs enhanced the toxic effect of these two chemicals in some conditions that was resulted from the PBL-induced activity of detoxification enzyme, cytochrome P450 CYP1A2, which promoted the hepatotoxicity of AAF. In the cell culture models, PBLs induced cell cycle arrest dose-dependently in human hepatocellular carcinoma Hep3B2.1-7 cells, but much less in WRL-68 cells (normal control). High doses of PBLs increased the expression of p21, and down-regulated cyclin A and E2F1. On the other hand, a long-term treatment of PBLs caused morphological and ultrastructure changes of autophagic death as revealed by AVO and MDC stains, and by the increased expression of autophagic proteins, LC3-I, LC3-II and Beclin-1. Furthermore, the results of tumor xenograft demonstrated that PBLs suppressed tumor growth. The in vivo study further confirmed the application of PBLs in liver cancer therapy. The results of present project supported the development of PBLs as a functional food for hepatoma caring. However, since PBLs could influence the detoxification system of liver, it is important to evaluate carefully the drug metabolism of a treatment strategy.

Key words: piper betel leaf, hepatitis, low-density lipoprotein, hepatoma, detoxication enzyme, autophagy

前言

一、 荖葉資料與研究背景

荖葉(圖一)是白灰檳榔中不可或缺的佐料，最早在唐代就有記載食用的方法；其原產於馬來半島，現在以普遍植於熱帶地區；在台灣東部台東的卑南鄉、太麻里鄉以及南投草屯鎮雙冬及屏東、彰化諸地皆有大量種植。台灣所產的荖藤，不論葉、花或莖居有強烈的香味，其中以荖花的香味最為濃郁。而一般民眾所使用的包葉檳榔，即是檳榔果實外面包一片裹有石灰之荖葉，其藥理作用有 1. 抗菌作用：葉水萃取物及酒精浸水萃取物對於金黃色葡萄球菌、白色葡萄球菌、大腸桿菌、變形桿菌及一些真菌有明顯的抑菌作用。2. 抗寄生蟲作用：揮發油對原蟲有殺滅作用，跟殺死蚯蚓的土荊芥油作用相當。在中藥的應用上，其功效有味辛、微甘、性溫，且有驅風散寒、引氣化痰、消腫止癢的功能，用於治療風寒咳嗽、風濕骨痛與胃寒痛等。

二、 肝臟功能以及國人肝病之介紹

肝臟位於橫膈膜下方，幾乎占滿右上腹的空間，從形狀上來看似成直角型，其顏色因富含大量的血液故呈暗紅色，乃人體最大、機能最複雜的重要代謝器官，其重量成人約 1200~1400 公克，以 20~30 歲左右成人的肝臟最重，以後逐漸減輕。用顯微鏡觀察，肝臟是由許多肝小葉為單位而集中形成的，一個肝小葉大約為 $0.7\sim 2\text{mm}^3$ 的極小六角柱體，裡面大約有五十萬個肝細胞所構成。在肝小葉裡流動著來自於兩個不同性質的血液，其一為肝動脈所帶來的富含氧氣的血液，另一為肝門靜脈帶來自消化道與脾臟富含養分的血液。因此肝臟在醣類、蛋白質、脂質、維生素、激素及膽汁等物質代謝中，均扮演著重要的角色，同時肝臟還有分泌、排泄和生物轉化等方面的功能。肝細胞含有豐富的酵素，並合成許多酵素和某些凝血因子，儲存和釋放造血因子，參與血液凝固和造血過程。肝臟也是人體重要屏障器官，其解毒和吞噬功能對生物體而言具有重要保護作用。當肝功能損傷時會引發代謝障礙，並影響其它臟器功能，嚴重就會危及生命。肝臟具有肝動脈和門靜脈的雙重血液供應，並擁有大量血竇，肝細胞膜能直接與血液接觸，同時肝細胞膜的通透性又較大，因此肝細胞與血液間進行活躍的物質交換。所以許多有毒物質也易引起肝細胞損傷，肝具有強大再生和代償能力，對輕度或局限性損傷往往不致造成肝功能障礙。

肝臟對各種致病因子的反應方式，主要是肝實質細胞 (liver cells) 和星狀細胞 (stellate cells) 增生與肝實質細胞的變性和壞死，以及肝間質 (space of disse) 的滲出和增生。當肝細胞壞死，而剩餘肝細胞再生的情況下，則發生纖維增生導致肝硬化。在肝硬化時使靜脈血流受阻，導致肝靜脈與門靜脈壓上升，促進肝內動靜脈吻合支的形成，致使肝細胞供血減少，進而發生變性或壞死、纖維增生，肝硬化更加嚴重，形成惡性循環。當肝嚴重損傷，且代償能力顯著減弱時，則出現嚴重肝功能障礙稱肝功能不全，進一步發展則肝功能衰竭，引起中樞神經系統功能障礙，出現肝昏迷。

三、 肝臟解毒酵素系統

肝臟是人體最主要進行解毒功能的器官，無論毒素、藥物或營養素等皆會經過肝臟的解毒酵素系統來進行活化或代謝，將毒性物質變成較溶於水，且易於排出，來減低物質的毒性，相對的許多藥物也會經由肝臟的代謝活化，來增強藥物的活性而達到功效。因此肝臟常為毒物作用的標的器官。大多數的毒物經胃腸道吸收，而後經過肝門靜脈進入肝臟。在肝臟中有兩個解毒酵素系統，又可稱為生物轉化途徑，此系統分為 phase I 和 phase II。Phase I detoxification 是利用 cytochrome P450 酵素系統經由氧化作用(oxidation)、還原作用(reduction)、水解作用(hydrolysis)等作用來改變物質的極性，此過程可增加物質的溶解度，但有些物質反應後確會形成反應性中間產物(reactive intermediates)或產生自由基而導致毒性。經由 phase I 代謝後的物質，有部分會再經由 phase II 的結合反應作用，在此階段可以直接對某些分子或毒素加入一些親水性的分子，如此親脂性物質可轉變為水溶性物質排出或吸收。而主要在 phase II 作用的酵素就是麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase, GST)。

【Phase I Detoxication enzyme-細胞色素 P450 (Cytochrome p450)】

細胞色素為一個包含有血紅素的酵素(heme-containing enzyme)，在原核與真核生物中均存在，由於其在還原態下會與 CO 形成複合物並於波長 450nm 產生最大吸收波峰，故稱之細胞色素 P450。在哺乳類動物中此細胞色素幾乎存在於各個組織當中，但大部分還是分布於肝臟，而在細胞內則是主要存在於內質網及粒線體上⁽¹⁾此酵素系統有許多 isoform，而根據酵素胺基酸序列的相似度再做區分為不同族，若胺基酸序列相似度超過 40%則會歸類為同一族，並以阿拉伯數字來做分類。例如：CYP1、CYP2，而其胺基酸序列相似度大於 55%，則在阿拉伯數字之後，再以大寫英文字母描述，例如：CYP1A 與 CYP1B，最後若胺基酸序列相似度高於 65%，則在之後再加入阿拉伯數字表示之，例如：CYP1A1 及 CYP1A2。目前就人類而言共有 33 種的 CYP450，分別歸類在 14 個族內，其中 CYP1 到 CYP4 的酵素族系，最主要是負責代謝一些化學物與天然化合物，而再臨床上的一些重要藥物常經由 CYP3A 及 CYP2C 代謝，例如：癲癇用藥 Felopine、降血脂藥物 Lovastain 及心血管用藥、Diltiazem、Nicardipine 等，其中 CYP1A2、2E1 及 3A4 等則是代謝或活化一些環境因子。另外也有許多族系的細胞色素 P450 會代謝或生合成內生性的生理重要物質，例如：tromboxane、膽固醇、前列腺素、膽酸或參與合成固醇類荷爾蒙等。

【Phase II Detoxication enzyme-麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase)】

麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione-S-transferase, GST), (EC 2.5.1.18)是生物轉換酵素系統 Phase II 中重要的酵素之一⁽²⁾⁽³⁾，屬於複合酵素家族(multienzyme family)，存在於大部分的器官，例如肝臟、肺、小腸、腎臟、紅血球、表皮等等，尤其以肝臟最多⁽⁴⁾ GST 是一種具多功能的蛋白質，在解毒過程中它會催化 glutathione 和多種的化學物質（包括各種外來化學物質及一些毒性致癌物或是 Phase I 酵素的代謝產物）的活化型結合，這些化合物可能是內生性也可能來自外在，進而進

入 mercapturic acid 路徑加以代謝⁽⁵⁾，最後代謝成硫醚尿酸 (mercapturic acid)，可經由腎臟排出體外；除腎臟途徑外，GSH-Xenobiotics 也可直接經由膽汁系統注入十二指腸中排出體外⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾，以減少對組織和細胞的傷害。生物體藉由不同族的 GST 有效的代謝外源性或內生性的毒性化合物，以防禦這些毒性物質之侵害，促使自身安然的存活下來。

四、 急性肝臟損傷

常見急性的肝臟損傷有三種類型包括肝細胞毒性 (cytotoxic) 損傷，膽汁鬱滯 (cholestasis) 及混合型，而脂肪變性 (steatosis) 類型則不常見⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾。在停掉造成的藥物通常會完全的回復，但然而肝細胞的損傷常會形成惡化，並以黃疸方式表現。肝細胞毒性類型：肝細胞毒性的損傷與病毒性肝炎類似，包括壞死，脂肪變性，細胞退化。肝細胞毒性的損傷定義為 ALT 超過正常值上限的 2 倍或 ALT/alkaline phosphatase 比值大於或等於 5⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。膽汁鬱滯的程度與劑量有關，與此類型相關的化合物包括 chlorpromazine, nafcillin, rifampin, erythromycin, estolate, captopril, estradiol trimethoprim-sulfamethoxazole。⁽¹³⁾患者很少會有生病的感覺，最常見的症狀是搔癢和黃疸，而血清中的轉胺酶 aminotransferases 僅會些許的增加 (通常少於 8 倍)。此種類型的肝損傷癒後情形較肝細胞毒性損傷來的好。混合型：混合型的肝損傷相當常見，定義為 ALT/alkaline phosphatase 的比值超過 2，但小於 5。此種類型常見於 phenytoin 所引起的肝臟毒性。

五、 肝癌的形成及預防的重要性

行政院衛生署統計的全球國人九十八年及九十九年的十大死因中，惡性腫瘤續居十大死因之首，且有不斷持續升高的趨勢，其中再以癌症種類劃分中無論男女，肝癌皆屬主要癌症死因的前兩位，因此肝病乃有國病之稱。肝癌的造成其中百分之七十是由 B 型肝炎引起的，其餘約百分之十~二十是 C 型肝炎所引起的。感染 B 型或 C 型肝炎之後，有一部分人會變成慢性肝炎，再經由慢性肝炎演變為肝硬化，最後再形成肝癌，這就是所謂的肝病三部曲：肝炎、肝硬化、肝癌。另外各種化學或天然致癌物也與肝癌的產生有極大的相關性。例如：目前已證實了黃麴毒素會增加 B 型肝炎患者罹患肝癌的機會。而酗酒導致的酒精肝炎、藥物濫用造成的急性肝炎，皆會進而造成肝硬化，也間接增加了致癌的危險性。而目前對於治癒原位肝癌的治療方法，就是以手術的方式切除原位癌的部位，但只有少數的患者可以經由此方式治癒。對於無法手術完全切除的腫瘤，其治療方法包括了：局部酒精或醋酸注射療法、動脈化學栓塞法、無線電頻燒灼術、標靶治療、放射線療法與化學療法等，甚至合併上述的等多種療法治療等。雖然有以上諸種治療肝癌的方法，但仍很少數病患會被完全治癒，尤其是在發現時已是晚期肝癌患者，治療的目的就是著重在於提高生活品質及存活期限，才是評量施行治療的重點。因此對於肝癌的研究，無論是預防保健、癌症藥物開發，與中草藥合併治療等方法，皆是近年來著重的研究趨勢與方向。

六、 細胞程式性死亡機制

細胞的程式死亡 (programmed cell death: PCD) 最早於 1965 年 Lockshin 與 Williams⁽¹⁴⁾ 等人的提出，於 1972 年 Kerr 等人描述了細胞凋亡的特徵⁽¹⁵⁾。在正常的生理當中，PCD 扮演了非常重要的角色，它可以維持正常組織細胞數的恆定

以及胚胎正常發展，但也相對的當 PCD 有所缺陷後，就會造成疾病甚至細胞癌化的產生。目前科學家研究統整後將 PCD 主要分為兩種型式：Type I programmed cell death 為眾所皆知的細胞凋亡(apoptosis)，而 Type II programmed cell death 則為近年來較受到矚目的自體吞噬死亡(autophagic cell death)。過去對於調控細胞凋亡的機制研究較為透徹；其主要分為透過 Death receptor ligation (Fas Ligand/FADD)調控的胞外訊息傳遞(extrinsic pathway)以及透過 mitochondria 所調控的胞內訊息傳遞(intrinsic pathway)的兩種機制。

【PCD TypeI:細胞凋亡(apoptosis)】

細胞凋亡現象以型態學來觀察可以發現，其細胞型態不規則、表面皺縮、體積變小，粒線體通透性改變，膜電位消失，細胞核濃縮(nuclear condensation)，核膜、核仁破裂，DNA 降解成 180~200 個鹼基對的片段(DNA fragmentation)、細胞內膜上的磷酸絲胺酸(phosphatidylserine；PS)外翻至細胞膜外 (PS externalization)，最後凋亡細胞的遺骸會形成凋亡小體(apoptotic bodies)，接著會被鄰近細胞或巨噬細胞(macrophage)所吞噬。細胞凋亡的最主要的訊息調控分為外部與內部路徑(extrinsic and intrinsic pathway)。外部的路徑是經由 Fas、TNFR 以及 TRAIL 等的死亡接收體，接收到死亡的訊息(death ligands)後活化 caspase 8，引發 caspase cascade 進而使得細胞走向凋亡。而內部的調控機制則是透過粒線體(mitochondria)，當粒線體受損之後會造成膜電位與通透性的改變，使得細胞色素 c (cytochrome C)被釋放出來，與 Apaf1 結合後活化 caspase 9，接著同樣的引發 caspase cascade，最後走向細胞凋亡。另外 Bcl-2 family 也扮演了調控細胞凋亡的重要角色，這個家族某些成員可以抑制凋亡的發生，例如：Bcl-2, Bcl-xL 等，而某些則是促進凋亡的進行，例如：Bax, Bak, Bad 等。

【PCD TypeII: 細胞自體吞噬死亡 (autophagic cell death)】

細胞自體吞噬(Autophagy)是調控細胞生理的一種機制，一旦細胞遭受的養分不足、或有老舊胞器產生等訊息時，細胞內就會產生膜的結構，將蛋白質及老舊的胞器等加以包裹、分解並回收再利用，此過程是屬於一種動力的調控機制(dynamic process)。此種調控機制從演化史上來看，自酵母菌(yeast)、細菌(bacterial)等到哺乳動物裡，autophagy 都被高度的保留下來。然而一旦細胞內過度的表現自體吞噬的現象，最終還是會導致細胞死亡，因此學者將此死亡方式編屬於 Type II programmed cell death(PCDII)。有別於細胞凋亡，其主要的表現特徵與形成過程，就是在細胞質內出現許多雙層或多層的空泡(double-or multi-membrane-bound vacuoles)，此稱為自噬小體(autophagosomes)或 acidic vesicle organelle(AVO)，自噬小體最後會與溶小體(lysosome)相融而形成 autolysosome，經由溶小體內的酵素(lysosome enzyme)分解所包裹的胞器及蛋白質並再回收利用，以幫助細胞渡過惡劣的環境。因此 autophagy 的形成過程中除了 AVO 的生成外，mammalian microtubulin light chain 3(LC3-II)的表現增加，在電子顯微鏡下更可以觀察到空泡狀自噬小體型成⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾。相較於細胞凋亡(apoptosis)分為 extrinsic and intrinsic pathway 兩條調控路徑，細胞自噬(autophagy)則是受到 class I 及 class III

phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)的訊息傳遞路徑所調控⁽²²⁾⁽²³⁾。Class I PI3K 會受到生長因子接受器(growth factor receptor)及生長因子受體基底蛋白(growth factor receptor substrate protein)的活化，進而促使細胞膜脂質的磷酸化，活化細胞自噬作用的下游調蛋白(downstream negative regulator) Akt/PKB，而活化的 Akt 可經由活化 mTOR 抑制細胞自噬作用的進行⁽²³⁾⁽²⁴⁾，而形成一個負調控的機制。相較於 class I PI3K，class III PI3K 則是屬於促進細胞自噬的作用⁽²²⁾，實驗發現自噬小體前驅物(pre-autophagosome) 會受到 class III PI3K signaling 及 Beclin 1(ATG6)的促進而形成 autophagosome。此外 autophagy-related protein(ATG)的家族蛋白，例如:Atg3, Atg4, Atg5, Atg8 等基因在高等生物當中皆被高度的保留，並參與調控促進自噬小體的形成，與胞器的分解作用⁽²⁵⁾。

七、細胞週期之調控

細胞週期是指一循環連續的事件，包含 cell contents 的複製及隨後的 cell division。就真核細胞而言，細胞週期被定義為持續進行完整有絲分裂(mitosis)的間期，細胞會分裂再形成子細胞(daughter cells)。而真核細胞的過程分為幾個階段：1. Gap phase 1 (G1；DNA 合成前期) 2. DNA synthesis (S；DNA 合成期) 3. Gap phase 2 (G2；DNA 合成後期) 4. mitosis (M；有絲分裂期)，構成一次完整的細胞週期⁽¹⁶⁾。細胞週期藉由調控許多 check points 的活性來監控細胞的分裂情形⁽¹⁷⁾，包含：cyclin (週期素)、 cyclin-dependent kinase (CDK；週期素依賴性激酶)、以及 cyclin-dependent kinase complexes (CDKs；週期素依賴性激酶複合物)。cyclin 藉著與 CDK 結合形成 cyclin-CDK complexes (CDKs)，其具有催化活性，可使受質磷酸化而調控增加下游的轉錄因子(transcription factors)表現，啟動細胞轉換進入下一時期，控制細胞週期進行正常。例如：生長因子(growth factors)刺激 cyclin D1 的製造，並活化相關 CDK4 或 CDK6，使 retinoblastoma protein (Rb protein)磷酸化增加而調控增加下游 E2F 轉錄因子之表現，使細胞週期由 G1 進入 S phase⁽¹⁸⁾。當細胞遭逢環境不佳、DNA 突變或受到損傷時，會誘發 CDK inhibitors (CDKI) family，包含：cip1/p21、kip1/p27 及 kip2/p57 等，藉著抑制 CDKs 之活性，導致細胞週期停滯於 G1/S 或 G2/M，以提供時間使細胞 DNA 修復⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾，或藉由啟動 tumor suppressor gene 之轉錄因子 p53，使細胞進行 apoptosis (程式性凋亡)而減少癌細胞生成可能性⁽²⁸⁾。也因此一旦逃避此調控系統，就會演化成無法控制且無限增生的癌細胞，而這也就是癌細胞與正常細胞的最大差別。因此如果可以利用藥物去控制癌細胞的週期，使得癌細胞停止增生，並進行程式性的死亡，乃是針對抗癌研究的一項熱門的話題。

研究目的

近幾年來癌症的死亡率仍是有不斷攀升的趨勢，衛生署統計九十八與九十九年國人十大癌症死亡分析，無論男女肝癌與肺癌續居前兩位，因此對於肝癌的研究，無論是預防保健，癌症藥物開發，與中草藥合併治療，仍是近年來的研究趨勢與方向。本實驗室對於荖葉水萃取物過去的研究發現，且過去也對於抗四氯化碳所誘導的肝纖維化動物模式中發現，荖葉可以透過TIMP2、Ras、Raf、Erk 訊息傳遞路徑使體內 matrix metalloproteinase-2 (MMP2) 蛋白活化去降解 alpha-smooth muscle actin (α -sma) 沉積造成的肝臟纖維化現象，並且活化體內 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT) 等酵素活性，因此保肝的效果相當卓越⁽²⁹⁾。而對於與化療藥物 cisplatin 合併處理之下，發現具有抑制肝癌細胞 HepG2 解毒酵素 GST 的酵素活性，且抑制藥物傳輸蛋白 multidrug resistance protein 2 (MRP2) 的表現量，進而增強肝癌細胞 HepG2 的感受性，並加強細胞凋亡的現象⁽³⁰⁾。因此第一年度計畫首先探討荖葉的基礎成分以及抗氧化能力分析，再利用乙醯酚胺 (acetaminophen) 的動物模式，誘發急性肝損傷進一步探討荖葉是否具有預防急性肝損傷的功效。第二年度計畫擬定，先以乙醯酚胺 (acetaminophen) 誘發急性肝損傷後再給予荖葉水萃取物觀察是否具有治療性的功效，並利用過去文獻記載以 2-acetamidofluorene 誘發肝癌的動物模式⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾，探討是否具有化學預防肝癌產生的效果。第三年計畫針對人類惡性肝小細胞癌 (human hepatocellular carcinoma) Hep3B2.1-7，處理荖葉水萃取物後，觀察其對於此惡性癌細胞株的影響能力；並利用裸鼠進行異種移植 (Xenograft model)，觀察在荖葉給予之下在活體中的表現為何。

文獻探討

目前文獻記載最早自 1989 年開始，陸續有研究指出荖葉具有化學預防、抗癌、抗氧化的作用⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾。在 2003 年則發現荖葉甲醇粹取液能保護由 NSAID 所引起的 experimental ulcer⁽³⁸⁾，以及能保護老鼠腦中一些毒物所引起的傷害⁽³⁹⁾；而 Santu Bandyopadhyay 等人於分別於 2002 至 2010 年發表專利 US7674487 B2 指出 piper betel leaf 中富含含有 3-o-p-coumaryl quinic acid (PCQ) (圖二)。研究指出 PCQ 會辨認細胞膜表面帶有 CD33⁺ 的急性或慢性白血病的癌細胞，造成細胞死亡，且對於正常的細胞並不會有影響。Sengupta 等人利用老鼠餵食荖葉，進行毒性測式的評估發現，會降低總白血球數 (Total white blood cell W.B.C. count)，但對於整體的血液常規、生化指數與酵素分析而言，是不具有毒性的⁽⁴⁰⁾。Santu Bandyopadhyay 等人於 2002 年發表專利 US6413553 B1 指出將 PIPER BETEL 與 MURRYA KOENIGII 的萃取物合併具有抑制 5-Lipoxygenase 脂氧合酶的活性，而抑制此酶的活性可以有效阻止白三烯素 (Leukotriene, LTs) 的生成，進而可以達到抗發炎的功效。而在過去本實驗室的研究也發現對於四氯化碳所造成的肝損傷的動物模式下，有非常良好的保肝功效⁽²⁹⁾；另一方面荖葉水萃取物對於人類肝臟細胞瘤 (human hepatoblastoma) HepG2 合併抗癌藥物 cisplatin 處理之下，發現

具有增強肝癌細胞感受性，進而造成細胞毒性(cytotoxic)產生⁽³⁰⁾。當細胞毒性的產生，往往後續伴隨著許多種值得探討的作用機制，例如細胞程式性死亡機制(Programmed cell death; PCD)、細胞生長週期調控機制(Regulation of cell cycle)等。

研究方法

A. 荖葉水萃取物

將新鮮荖葉洗淨並去除梗後加以稱重，然後再與3倍量的水放入果汁機攪拌，等到攪拌成碎泥狀後再以紗布過濾，過濾後的溶液再經由離心機4000rpm 10分鐘，取上清液放入4°C冰箱靜置overnight，隔天取出後放入鐵盒中置入-80°C冷凍，接著利用冷凍乾燥機將水分完全的抽乾，然後刮下放於-20°C中保存。

B. 成分分析

1. 總酚含量測定 (Total phenolic content assay)

測定酚的含量，以 gallic acid (GA) 為標準品，甲醇溶解後分別取不同的量，以甲醇稀釋補足 1ml 後，各加 0.5ml 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent⁽⁴¹⁾ 後搖勻，再加 3ml 20% Na₂CO₃ 混合均勻，於室溫靜置 15 分鐘後，加 5 或 10ml 去離子水後搖勻以 1250g 離心 5 分鐘，以 725 nm 測吸光值並用甲醇歸零繪出標準曲線，將樣品配製好取 0.1ml 加入 0.9ml 的甲醇依標準曲線計算出酚的含量。

2. 類黃酮含量測定 (Total flavonoids content assay)

以 rutin 為標準品，甲醇溶解後分別取不同體積，以二次水稀釋並補足體積至 1.5ml 搖勻，接著加 5% 0.09ml 的硝酸鈉(NaNO₃)搖勻靜置 6 分鐘，再加 0.9ml 10% 氯化鋁(AlCl₃·6H₂O)搖勻靜置 6 分鐘，最後加入 4% 氫氧化鈉 0.6ml 混合均勻 10 分鐘，以吸光 425nm 繪出標準曲線。

3. 總醣含量之測定 (酚-硫酸 Phenol-Sulfuric Acid Method)

酚硫酸法由 Dubois 等於 1956 年開始應用，是一種簡單、快速、靈敏且又專一性高的方法，廣泛的被應用在碳水化合物之定量，可測定單醣、寡醣及多醣混合之總醣量，以 glucose 為標準品，配置不同的濃度，利用硫酸和醣反應之後會產生 furfural 等的化合物，再與液態酚作用而生成橘黃色的聚合物，此呈色反應可以在 490nm 偵測到其吸收波長，如此即可做樣品的總醣含量之測定。首先配置 10、30、50、70 以及 90 標準糖溶液，再各取 0.5ml 加入 0.5ml 的 5% 液態酚以及 2.5ml 的濃硫酸使其反應產生橘黃色的化合物，由於反應會放熱，因此必須在室溫下靜置冷卻後，以吸光 490nm 來繪製出標準曲線來訂量萃取物內的總醣分之含量。

4. 蛋白質含量之測定 (Broadford protein assay)

蛋白質的定量採用 broadford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白質含量越高。取 100 μl sample，加入 700 μl 二次水，200 μl Broadford protein dye，混合均勻後，靜置室溫五分鐘，在波長 595nm 下測定吸光質。0, 2.5, 5, 10, 12.5, 25 μg/100 μl BSA 為標準品。

5. 脂肪含量之測定 (Acid Hydrolysis Method)

精秤樣品後放入容器中，加入濃鹽酸。將容器放入 70~80°C 恆溫水槽中加熱，每間隔 5~10 分鐘搖動容器一次，直到水解完成，大約五十分鐘。將容器取出冷卻後加入乙醇，並將樣品移至分液漏斗後加入乙醚，充分搖晃均勻，靜置 20 分鐘之後，待上層有機溶液層變成透明澄清，將下層的水層移入其他容器中待用。

有機層倒入乾燥及秤重好的茄型瓶中，以冷凝裝置回收乙醚，並重複數次。最後放入 100~105°C 之烘箱乾燥 2 小時，冷卻後秤重。⁽⁴²⁾

6. 膳食纖維含量之測定

膳食纖維是食物當中最主要不可消化的多醣類，而依據溶解的特性又分為可溶性或不可溶兩種。依照 AOAC 法 991.43⁽⁴³⁾，可將待測樣品取 0.5g 用 pH7.5 的 PBS 配製，之後加入 0.1ml α -amylase 後加熱處理 100°C 15~30 分鐘，待降溫至 60°C 加入 proteinase 並維持溫度 30 分鐘，以上過程須充分作用，目的在將可消化的醣類、蛋白質充分分解，最後加入 pH 4.2 的 Amyloglucosidase 0.2ml 分解可消化的醣苷鍵結等。充分作用後以濾紙過濾，10ml 的二次水及 10ml 95% 的酒精各清洗 3 次，最後再以 10 ml Acetone 清洗兩次，殘留在濾紙上的即為不可溶纖維，烘乾後秤重即可。而上述的濾液及水洗液，利用 4 倍體積的 95% 酒精再次萃取，先進行水浴 60°C 反應 5 分鐘後，室溫沉澱一小時再次過濾，並用 20ml 78% 酒精、10ml 95% 及 10ml acetone 各清洗兩次，殘留於濾紙上的即是可溶性纖維。

C. 抗氧化能力分析

1. DPPH scavenging activities 自由基清除能力分析

在抗氧化的研究中通常以清除 DPPH 自由基的試驗模式來檢測抗氧化劑的提供氫的能力 DPPH· (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 是一種穩定的自由基，常作為電子順磁共振光譜(electron paramagnetic resonance, EPR)的測定之用，DPPH· 的甲醇溶液在 517nm 下有強吸收光譜，但被抗氧化劑(AH)或是自由基(R·)還原時，則吸收消失或降低其反應機制如下： $DPPH \cdot + AH \rightarrow DPPH:H + A \cdot$ 。配製 1mM 的溶於 methanol 的 DPPH 以及不同濃度的測試樣品，以 methanol 做為 background 歸零，將樣品與 DPPH 各取 0.5ml 反應後，測量在 517nm 下的吸光值。(自由基清除能力) Scavenging effect (%) = $(1 - \text{樣品吸光值} / \text{純 DPPH 吸光值}) \times 100\%$ 。⁽⁴⁴⁾

2. Total peroxy radical-trapping antioxidant parameter assay (TRAP)

利用化學冷光(chemiluminescence, CL)，加強劑 lucigenin 或 luminol 和化學冷光分析儀(chemiluminescence analyzing system)。此儀器可以直接偵測樣品中超氧陰離子與氫氧自由基形成的情形。其原理是利用 2,2-Azobis(ABAP)作為氧自由基供應者，氧自由基會將所含的電子轉移給化學冷光加強劑，始自由基本身由高能階轉換成低能階，並釋放出能量(此所散發之能量的型是在物理學上稱化學放光或冷光)，始化學冷光加強劑強迫發光，所以激發出冷光再經由光電倍增管(photo-multiple tube, PMT)接收後，轉換成電流經由檢測器取得電流強度，再轉換成計數值(counts)。因此加入樣品之後，觀測樣品是否可以清除超氧陰離子，若能清除其 counts 的數值就會下降。以 Trolox(a Vitamin E analogue)做為標準品進行比較。在不鏽鋼培養盤中注入將配置好的 Luminol (1mM, pH=10) 100 μ l，ABAP (400mM) 200 μ l 及作為 buffer 的 Glycine (0.125M) 800 μ l。並立即置於超微弱化學發光分析儀(CLA-2100)。以每 10 秒測一次 ABAP 產生的過氧化自由基的化學發光強度，並於分析後的第 320 秒注入已樣品，再繼續測定分析樣品降低過氧化自由基 ABAP 的能力，直到第 1080 秒而結束。所得數據以 CLA(TOHOBU ELECTRONIC INDUSTRIAL CO.,LTD) 軟體分析後。而 trolox 作為標準品並於每次加入 10 μ mol 後的平均間隔時間作為基準再計算 TRAP 數值。計算如下： $TRAP (\mu M Trolox) = d \times (\tau_{Sample} / \tau_{Trolox})$ τ = induction time, d = dilution factor τ_{Sample} = induction time of the sample, τ_{Trolox} = induction time by 10 μ mol of Trolox standard。

3. 脂質抗氧化能力分析

a.低密度脂蛋白的分離

取自正常人類的血漿 2ml，加入 0.7ml 的 0.15M NaCl 及 0.3mM EDTA (pH 7.4) 離心(BECKMAN Optima™ TL100)90,000 rpm, 10°C 10 分鐘，取下層液 2ml 後，重複上述步驟後再離心 3.5 小時，取上層液中淡黃色即為 LDL。製備好的 LDL 冰藏於 4°C，以不超過三天為限。⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾

b.氧化型低密度脂蛋白的製備

LDL 先過 PD-10 desalting column 後，再以 5 μ M CuSO₄ 於 37°C 水浴中反應 24 小時，定量稀釋到 1000 μ g/ml 後過 0.22 μ m filter 過濾除菌，以防實驗培養污染。製備好的氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)冰藏於 4°C 且不超過一星期為限。(H.Y. Hsu, 2000)

c. Relative Electrophoretic Mobility assay

利用 lipoprotein 氧化後其帶電荷會由正電性轉為陰電性的特性，加入 buffer 後，通電 100V，40 min 後，以固定液固定 5 分鐘後烘乾，再用染色液染色 5 分鐘，最後以脫色液脫色。依電泳結果以 band 移動的距離 (electrophoretic mobility; EM) 判定 LDL 氧化程度。⁽⁴⁷⁾

d.Electrophoresis of ApoB-100 Fragmentation

LDL 先加入不同濃度的 piper betel leaf，加入最終濃度 10 μ M CuSO₄，放入 37°C 水浴槽中 4 小時之後加入 EDTA 終止反應，檢體以 SDS-PAGE 用的 sample dye 配製，95°C 加熱 10 分鐘後，以 8% 的 acrylamide gel running，140V 進行電泳 6 小時，LDL apoB protein 在 CuSO₄ 的處理下，會分解成不同大小的蛋白片段，利用 0.1% coomassie blue 進行染色，以及 7% 甲醇 7% 醋酸的脫色液進行脫色，再以玻璃封存即可。⁽⁴⁴⁾

e.Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

LDL 氧化會形成過氧化物 malondialdehyde(MDA)，一分子的 MDA 與二分子的 thiobarbituric acid(TBA)，會生成具螢光性質的聚合物 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)，此物質於激發波長為 532nm，發射波長為 600nm 時可以被螢光光讀盤儀(Labsystem, CA)偵測到(48)。1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)為標準液做標準曲線而可定量 LDL 氧化程度，單位為 nM MDA/mg protein。⁽⁴⁷⁾

f.Foam cell formation assay

由於巨噬細胞會藉由表達清除者接受器(scavenger receptor)，將氧化型的低密度脂蛋白(oxLDL)吞噬至細胞中，以達到清除 oxLDL 而避免傷害到其他細胞，但若巨噬細胞吞噬過多的 oxLDL 而來不及代謝，就會形成泡沫細胞(foam cell)，這些 foam cell 聚集形成的脂肪斑(fatty streak)就是引起動脈粥狀硬化的起始點。吞噬過多的 oxLDL 可以利用油脂染劑 oil-red-o 染色並針測。巨噬細胞 J774A.1，經由 oxLDL 處理之後，以 PBS 清洗後用 2% 的 paraformaldehyde 室溫固定 30 分鐘，DAPI 染核以 PBS 清洗後，再以 0.5% 的油紅染劑染色(染劑以 isopropanol 配製過 0.45 μ m 的 filter，再以染劑 3:滅菌水 2 的比例稀釋並過 0.22 μ m 的 filter 即可染色使用)。以 oil-red-o 染色 40 分鐘後即可以 PBS 衝洗拍照。最後以 isopropanol 回溶染劑測吸光 510nm 的比值換算出 macrophage uptake oxLDL 的比值即可。⁽⁴⁹⁾

D.細胞實驗

1.細胞培養

a.Hep3B2.1-7 (Human Hepatocellular carcinoma cell line)

人類肝小細胞癌之細胞株 Hep3B2.1-7 購自於食品工業發展研究所生資中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 細胞株標號為 BCRC60434, 其組織來源為 Human hepatocellular carcinoma, 此細胞生長特性為 adherent, 組織屬於 epithelial cells。培養液為 90% Minimum essential medium, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids and 1.0 mM sodium pyruvate 和 10 % fetal bovine serum。培養箱設定 5% CO₂, 37°C 恆溫的環境, 細胞維持在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$, 每週更換培養基 2~3 次。

b.WRL68(Hepatic fetal human epithelial cell line)

人類胎兒肝臟上皮細胞株 (ATCC number: CL-48) (M.C. Gutierrez-ruiz et al, 1994), 其細胞生長特性為 adherent, 組織屬於 epithelial。培養液為 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (low glucose), 0.1 mM non-essential, 10% fetal bovine serum, 培養箱設定 5% CO₂, 37°C 恆溫環境, 細胞維持約在六七分滿, 每週更換培養基 2~3 次。

c.J774A.1(Mouse macrophage)

老鼠巨噬細胞株 J774A.1 購自於食品工業發展研究所生資中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC), 細胞株標號為 BCRC60140, 其組織來源為 mouse macrophage, 生長特性為 adherent, 繼代培養需用 scraping 方式刮取。培養液為 90% Dulbecco's modified Eagle's medium, 內需含 4 mM L-glutamine、4.5 g/L glucose 及 10% fetal bovine serum, 培養條件為 5% CO₂, 37°C 恆溫環境, 繼代稀釋比例為三到六, 每週約更換培養基 2~3 次。

2.細胞毒性是驗(MTT assay)

根據 Alley 等人之研究得知, 活細胞會將 tetrazolium 代謝成藍紫色之結晶, 且此結晶可溶於異丙醇, 故測其吸光可得知活細胞的數目⁽⁵⁰⁾。取 3×10^4 的細胞置於 24 well-plate, 讓細胞貼壁後, 吸乾培養液, 換取新鮮的培養液, 加入不同濃度的藥物, 培養不同時間點後, 吸乾培養液, 細胞以 PBS 清洗 2 次後, 換上新鮮的培養液 1 ml, 加入 20 μ l tetrazolium (25 mg/ml)。培養 4 hours, 移除培養液, 加入 1 ml isopropanol, 以 pipette 來回打散均勻, 直接吸 1 ml 以波長 563nm 測吸光。

3.細胞螢光染色

a.DAPI stain

DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)是一小段特別的 DNA 探針, 可以嵌入細胞雙股 DNA 的 minor groove 中 Adenine 及 Thymine rich 的位置, 且在 UV 照射之下, 可以發射出藍色的螢光, 於螢光顯微鏡下便可以觀察細胞核的形態, 若觀察到核濃染或斷裂的現象便可以判定細胞是走向凋亡的途徑⁽⁵¹⁾。細胞經由 PBLs 處理之後移除培養基, 並以 PBS 沖洗三次, 加入 4% paraformaldehyde, 在室溫下作用 30 分鐘固定後, 以 DAPI(1 μ g/ml)染色 15 分鐘, 再以 PBS 沖洗三次, 利用螢光顯微鏡在波長 340/380nm excitation 之下觀察細胞並拍照。

b.AVO stain

Autophagy 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 lysosome 結和形成 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 Acidic vesicular organelles(AVO)⁽⁵²⁾。在活體狀態下, AVO 可以吞噬 acridine orange 進行活體染色, 因此觀察在荖葉水萃取物(PBLs)處理之後, 細胞 AVOs 的形成。首先細胞經過不同濃度的 PBLs 處理之後, 以 PBS 清洗三次, 置換新的培養液, 加入 acridine orange 染劑(1 μ 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。

c.MDC stain

Autophagy 形成最後會與 Lysosome 結合形成 autophagosome，結合 lysosome 內的溶解酵素，再將所包裹的蛋白質與胞器加以分解再利用。而含有螢光的化合物 monodansylcadaverine(MDC)，可以與 autophagic vacuoles 結合並針測的到期螢光染色以方便加以分析⁽⁵³⁾。Noboru 於 2004 年的 review 中更指出 MDC 此螢光化合物與 autolysosome 中的 lysosome 結合，是一種用來偵測 autophagy 的方式之一⁽⁵⁴⁾。細胞加藥處理之後以 PBS 清洗乾淨，置換新的 PBS 加入 MDC 染劑 (sigma30432) 1 μ g/ml，染色 15 分鐘後再以 PBS 清洗，於螢光顯微鏡下觀察細胞螢光之變化。

4.細胞週期分析(Flow cytometry)

Hep3B2.1-7 細胞經由 PBLs 處理之後，以 PBS 清洗三次，再以 trppsin-EDTA 將細胞自培養皿分離下來，以轉速 900rpm 離心 5 分鐘去除上清液後，以 PBS 小心重覆沖洗離心取 pallette，再利用 70%的 ethanol 小心沖洗 pallette 後置於-20 $^{\circ}$ C 冰箱，隔夜取出細胞離心去除 ethanol，再利用 PBS 沖洗離心去除上清液，收集 pallette，以 PI 染劑(20 μ g/ml propidium iodide、20 μ g/mlRNase、0.1% Triton-X100)於室溫下避光染色約 15 分鐘，最後以 Flow cytometry(FACScan)分析細胞週期的分布。⁽⁵⁵⁾

5.蛋白表現分析(西方墨點法)

(a) 蛋白質定量 :利用 Coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595nm 有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。首先以 BSA (bovine serum albumin)為蛋白質標準溶液，以換算各樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。取 100ul sample 加入 200ul 蛋白質定量試劑組 (protein assay dye, Bio-Rad)，補二次水置 1 ml，於室溫下反應 5-10 分鐘，於波長 595nm 測吸光。

(b) 樣本處理 :將以定量之 whole cell lysate，取 160 ug 的蛋白質樣本，加入適量之 5X loading dye，再以 whole cell lyses buffer 將各 sample 之體積補成一致，以 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分鐘，煮完後再迅速置於冰上至少 5 分鐘。

(c) 鑄膠 :將電泳玻璃片洗淨，擦拭乾淨後，用厚度約 0.75mm 或 1.25mm 之 spacer 為間隔裝好電泳片，並架到電泳座上固定。separating gel。將配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5cm 處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配置上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離 stacking gel，待上層膠凝固後抽出齒梳用，二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將 sample 加入 well 中。

(d) 跑 SDS-PAGE :將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 protein standard marker，再取 SDS-running buffer 小心地將各 well 補滿，持續加入 SDS-running buffer 至內槽，直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽也以 SDS-running buffer 補至蓋過電導線為止。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70V 的電流跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 100V，當色帶跑至底限時才停止電泳

(e) 蛋白質樣本之轉漬 (Electrotransfer) :電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙上，膠體上面再放上與膠體大小相同之硝化纖維紙 (硝化纖維紙也需事先經 transfer buffer 浸濕)，再放上

兩張經transfer buffer 浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板 (內含海綿襯墊)夾緊，放入轉漬槽中，同時將轉漬槽放在冷房中，以固定電流0.1 安培轉漬16-18 個小時。

(f) 免疫墨點法 (Immunoblot)轉漬完後將硝化纖維紙取出，用PBS-T buffer 漂洗5 分鐘，再5% blocking buffer於室溫下溫和作用1小時。倒掉blocking buffer再以PBS-T 漂洗三次，時間分別為5、10、15 分鐘。換上一級抗體，於室溫下溫和作用一小時，再以PBS-T buffer 快速漂洗三次，時間也是5、10、15 分鐘。再換上二級抗體，於室溫下溫和作用1 小時，再以PBS-T buffer 快速漂洗三次，時間也是5、10、15 分鐘。最後將硝化纖維紙放入透明塑膠套中，以濾紙吸掉硝化纖維紙上殘留的PBS-T buffer，再將ECL substrate 覆蓋整個硝化纖維紙，再以冷光影像分析儀偵測蛋白量的變化。

E. 動物實驗

1. 動物模式誘導肝急性肝損傷雙動物模式(萹葉預防急性肝損傷)

經由國家實驗動物中心所訂購的 SD rat 先適應環境一週後隨機分組並給予標號，開始以管灌的方式餵食 25mg/kg 以及 50mg/kg 劑量的萹葉萃物，兩週後給予 1.5g/kg 高劑量的 acetaminophen 並在 16 小時後犧牲，取其血液及肝臟進行酵素分析測試。⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾

2. 急性肝損傷動物模式(萹葉治療急性肝損傷)

經由國家實驗動物中心所訂購的七周齡 SD rat 先適應環境一週後隨機分組並給予標號，開始以管灌的方式餵食給予高劑量的 acetaminophen 之後，於第四及第十小時間點給予 50mg/kg 劑量的萹葉萃物，最後於第十六小時犧牲，並取其血液及肝臟進行分析測試。⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾其組別分為 Normal 正常組、Induction 誘導組、A 組為給予誘導並於第四小時給予萹葉、B 組為給予誘導並於第四及十小時給予萹葉、C 組為第四及第十小時給予萹葉、D 組為第四小時給予萹葉。C、D 組為單純給予萹葉不給予誘導的對照組別。

3.2-AAF誘導大鼠肝癌實驗

本實驗參考過去文獻加以修改後所建立出來的 AAF (2-acetamidofluorene)誘導肝癌雙動物模式⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾，以五週大的 Wistar 公鼠飼養於室溫下，適應環境至六週大後再進行分組；共分為六組，第一組為正控常制組(normal group)、第二組為 AAF 誘導組(induced group)、第三、四組為 PBL 控制組(positive control group)分為低劑量與高劑量兩組、第五、六組為 PBL 試驗組為低劑量與高劑量兩組。第三~六組在老鼠適應環境一週後，及每天開始管灌 PBL，管灌餵食一週後，第二組以及五~六組每天拌食 0.025% 的 AAF 於飼料當中，每兩個禮拜監控體重變化並詳加記錄。預計實驗進行三個月後，將實驗動物犧牲並進行解剖犧牲，取其血液、肝臟及腎臟等組織，而組織部分則分為以 10% 的福馬林浸泡保存，以及放置 -80°C 冷凍儲藏，以便以後進行各項分析。

4. 活體中對於癌細胞轉移與腫瘤生長分析(measurement of metastasis and tumor growth in Hep3B2.1-7-bearing mice)Xenograft

四週齡的 BALB/cAnN.Cg-Foxn1nu/CrlNarl 購自國家實驗動物中心，入室後先適應環境一週，隨機將老鼠分組，一組五隻，並在左大腿外側打入 1×10^7 Hep3B2.1-7 細胞 (0.1ml/mouse)⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾，每 0.1ml 的細胞液混和 BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix 0.1ml 注射於皮下，待腫瘤開始成長後，即開始餵食萹葉水萃取物，並每七天測量老鼠的腫瘤大小，待犧牲後取下腫瘤拍照秤重並記錄。老鼠腫

瘤的計算方式為(寬度)²×長度×0.52。⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾

5. 血液樣本分析

血液樣品靜置室溫一小時後，以每分鐘3500 rpm 離心20 分鐘分離出血清。再以自動分析儀檢測麩氨酸草醋酸轉胺機酵素(AST,GOT)、麩氨酸焦葡萄糖轉胺基酵素(ALT,GPT)、丙麩氨轉肽酶(γ -GT, Gamma - Glutamyl Transpeptidase)、胎兒蛋白(AFP, α -fetoprotein)等，具有肝腎功能指標性的血液數值。

6. 病理切片染色

肝臟組織以10%中性福馬林固定，修整完成後置入石蠟包埋，切成4微米 (μ m) 厚度，切片經xylene 脫蠟及不同濃度之酒精脫水處理，以H&E染色及Masson's 特殊染色後，觀察肝臟變性及硬化或癌化的程度。

7. 細胞色素cytochrome p450酵素活性分析

萃取肝臟位於microsome上的cytochrome p450酵素，採取Schenkman JB與Pradnya S Walawalkar各於1978以及2006年所發表萃取microsome的方法。配製 Homogenized buffer(0.25M sucrose, 0.01M Tris-HCl,pH7.4)，Resuoernatant buffer(100mM Tris-HCl,10mM EDTA, 20% w/v glycerol,pH7.4)，0.5g sample比2 ml homogenized buffer研磨均勻後以13000rpm 4°C 離心取上清液，加入CaCl₂始最終濃度為10mM，於冷房震盪20分鐘後以25000rpm 4°C 離心取沉澱物，用 resuoernatant buffer回溶後分裝並存放於-80°C 冰箱保存。使用Promega V8771的 P450-Glo assay kit配合Luminometer(Tropix TR717)偵測酵素P450的活性表現量。

8. 肝臟中解毒酵素測定

經由GST activity 的測定我們可以較快速得知其對每個GST isofrom的影響，同時針對某個isofrom 作較詳細的探討。將各組老鼠肝組織取0.1g 用homogenization buffer 均質，均質完後以39000 rpm、4°C，超高速離心30 分，取上清液為樣本，並儲存於 -70°C。依其測定不同的isofrom加入不同的受質反應下，在其適當的波長下偵測GST的酵素活性。⁽⁶¹⁾

F. 實驗數據統計與繪圖

所有數據皆以電腦統計軟體SigmaStat與繪圖軟體SigmaPlot (Jandel Scientific Software,USA)進行student t-test或one-way analysis of variance等分析。

結果

【**荖葉水萃取物(water extracts of piper betel leaf, PBLs)基礎成分分析**】

荖葉經由攪碎離心後送請廠商進行冷凍乾燥，其粉末呈現深黃褐色產率為 $1.13 \pm 0.7495\%$ ，使用酚硫酸法測得含多醣 $66.66 \pm 13.61\%$ ，蛋白質含量為 $0.008 \pm 0.001\%$ ，脂質含量為 $5.5 \pm 0.003\%$ ，多酚含量為 $2.43 \pm 0.53\%$ ，類黃酮為 $0.513 \pm 0.09\%$ (Table-1)。再以膳食纖維的含量測定，其可溶性纖維含有 $26.255 \pm 6.4378\%$ ，不可溶纖維有 $16.9600 \pm 5.4420\%$ ，因此總纖維含量有 $43.2150 \pm 10.4469\%$ 。(Table-2)

【**PBLs 抗氧化能力分析**】

荖葉水萃取物(water extracts of piper betel leaf, PBLs)，經由DPPH的自由基清除能力分析，荖葉濃度在 0.5 mg/ml 的濃度之下可以達到百分之二十的清除率，在濃度 2.0 mg/ml 之下清除率達到將近百分之五十，在濃度 $5.0 \sim 20 \text{ mg/ml}$ 的濃度下清除率則可達到將近百分之七十(Figure-1)。利用化學冷光儀 (chemiluminescence, CL)，針測PBLs清除自由基的能力(Total radical trapping antioxidant parameter, TRAP)，利用維他命E 類似物Trolox來做比較換算，每 $100 \mu\text{g}$ 的PBLs相當於 $0.2164 \pm 0.1010 \mu\text{M}$ 的trolox。

【**PBLs 抗脂質氧化能力分析**】

利用人類血清抽取低密度脂蛋白，進行 in vitro 測是荖葉對抗脂質氧化的能力。低密度脂蛋白氧化後，會使蛋白序列中的 lysine、histidine 等帶正電胺基酸的 ϵ -amino group 與氧化產物的醛類：malondialdehyde(MDA)、hexanal 與 4-hydroxynoneal(4-HNE)交互作用生成 Schiff base，因而使低密度脂蛋白表面正電荷減少，負電荷增多，因此可以利用膠上帶狀電泳移動的距離來做判定，其低密度脂蛋白被氧化的程度，control group band (LDL)的位置定為 1。實驗結果可以看到(Figure-2A-2B)，氧化型 LDL 相較於沒有氧化的其移動距離有顯著性的較遠，加入 Vitamin E analogue: Trolox 之下，有效的抑制 LDL 的氧化，而實驗組再加入低濃度的 PBLs 之下(0.01 、 0.05 and 0.1 mg/ml)相較於 trolox 之下並沒有有效的抑制氧化，在高濃度 PBLs 之下(0.5 and 1.0 mg/ml)則具有抑制 LDL 的氧化效果($p < 0.001$)。低密度脂蛋白氧化時其蛋白部份會進行氧化修飾，衍蛋白(apoprotein)Apo B 會受到自由基或共軛雙烯的攻擊而斷裂，可以經由 SDS-PAGE 以及 comassive blue 染色觀察。實驗結果如 Figure-3，oxLDL 可以明顯的看出其 ApoB100 斷裂，Trolox 組別有效的保護 LDL 避免被氧化，而在低濃度 PBLs 之下(0.01 and 0.05 mg/ml)的組別，LDL 遭受氧化的攻擊，在濃度 0.1 、 0.5 and 1.0 mg/ml ，PBLs 與 Trolox 相當具有保護的 LDL 功能，apoprotein B 並未氧化斷裂。在 LDL 氧化之後會產生過氧化物 Malondialdehyde(MDA)，此過氧化物會與 thiobarbituric acid (TBA)產生螢光性物質並可測得。因此利用此法觀察 PBLs 是否有保護 LDL 避免被氧化的能力。實驗結果於 Figure-4，oxLDL 的組別相較於 LDL 組別產生了許多 MDA ($p < 0.001$)，Trolox 的組別其 MDA 的量與 oxLDL 組別相比明顯的下降許多($p < 0.001$)，PBLs 的組別在 0.01 mg/ml 的濃度下就有意義的抑制 MDA 的產生($p < 0.01$)， 0.05 mg/ml 的以上的濃度，除了 0.1 mg/ml 之外，皆有意義的抑制過氧化物 MDA 的產生($p < 0.001$)。利用 murine macrophage cell line, J

774A.1，進行 in vivo 的實驗，由於巨噬細胞在 oxLDL 的刺激下會大量表現清除者接受器(scavenger receptors)，例如 CD36 與 SR-A 等，將 oxLDL 吞噬至細胞內，而堆積於細胞中過多的膽固醇就會形成泡沫細胞(foam cell)可經由脂質染色(oil-red-o 油紅試劑)呈色。首先必須先觀察聚是細胞吞噬 oxLDL 的情形，並且找出最適當的吞噬濃度與條件，因此測試了 50、100 和 200 μ g/ml 的 oxLDL 處理下細胞吞噬的情形(Figure.5A-H)，由於實驗觀察發現 oxLDL 也具有毒殺細胞的能力，因此使用 MTT assay 測試 563nm 存活率，並將吞噬 oxLDL 染色後的細胞經由 isopropanol 回溶測 510nm 吸光值，以 510nm/563nm 推算出 oxLDL uptake 的比例(Figure.5I-5J)。最後採取 100 μ g/ml 的 oxLDL 濃度。將 PBLs 與 LDL 共同加入促氧化劑 CuSO₄ 處理之後，再將樣品處理細胞 24 小時染色觀察並測定吸光值(Figure.6A-6H)為細胞處理後進行染色並在顯微鏡下觀察，Figure.6I 利用 MTT assay 測試吸光值樣品處理之後對於細胞的毒殺程度，而 oil red o 染色利用吸光 510nm 測試其吞噬脂質的多寡，Figure.6H 利用吸光 510nm 除吸光 563nm 表示巨噬細胞吞噬 oxLDL 的比例。此外測試 PBLs 是否可以抑制 macrophage 吞噬 oxLDL 的能力，實驗設計將 PBLs 先處理 J774A.1 之後再加入 oxLDL，觀察是否可以具有抑制 macrophage 吞噬 oxLDL 的能力。實驗結果如 Figure.7，在顯微鏡的觀察之下(Figure.7A-H)，隨著 PBLs 的加入量化統計的結果顯示(Figure.7J)，能有效降低 macrophage 吞噬 oxLDL 的能力(p<0.05)。

【**茗葉預防急性肝損傷之作用**】

本實驗室先前的研究發現茗葉具有很好的抗四氯化碳肝損傷的能力⁽²⁹⁾。過去許多研究證實乙醯胺酚(acetaminophen)其為一般民眾日常所使用的止痛藥，由於過量的服用會有損害肝臟的疑慮，因此使用此藥物當作誘發大鼠急性肝損傷的模式，觀察茗葉是否具有預防肝臟受損的功效。實驗結果發現降低肝臟血液損傷的指標有限(Table-3)。更進一步分析其肝臟解毒酵素 GST 的活性，在誘導下合併茗葉的組別 total GST 的活性有上升的趨勢，在損傷組別高劑量茗葉的處理之下更有顯著性上升的意義(p<0.05)，而 GST alpha 的活性在損傷的組別給予茗葉合併之下有上升的趨勢，且在高劑量有顯著意義的上升(p<0.001)，而相較於 GST pi 的活性表現則是與發炎癌化有相關，實驗在有核並的茗葉的處理之下，有下降的趨勢但無意義的表現。由研究指出茗葉可以增強肝臟解毒酵素的活性，然而對於此乙醯胺酚誘導急性肝炎的動物模式下，並無預期的良好保肝的功效(Figure.8A-D)。

【**茗葉治療急性肝損傷之探討**】

利用第一年所建立的 Acetaminophen-induce acute hepatic damage model 誘導產生急性的肝損傷之後，於犧牲(十六小時)前給予茗葉萃取物觀察，茗葉是否具有治療及修復急性肝損傷的可能性。實驗結果血清生化值(Table-4)可以發現誘導組的肝功能指數有顯著性的升高(p < 0.01)，在誘導第四個小時後後給予第一次茗葉(A 組)，肝功能數值有些微下降但是並沒有顯著性的差異。而在誘導後的第四及十小時給予兩次茗葉萃取物(B 組)，發現其肝功能指數反而持續上升，且具有 p<0.001 的顯著性差異。對照組(C-D 組)單純只給茗葉萃取物的比較，其 Alk-p 有顯著的下降而腎功能有降低的趨勢。而利用肝重除以體重百分比顯示(Figure.9)，並沒有多大的意義。其組織切片於 Figure.10，正常飼食的組別為

Figure.10A，正常飼食添加荖葉的 25mg, 50mg 以及 100mg/kg 的組別其切片分別為 **Figure.10C-10E**，其組織切片與正常組並無差異變化，飼食 AAF 的誘導組切片則明顯出現損傷現象 **Figure.10B**，AAF 誘導並合併添加荖葉 25mg, 50mg 以及 100mg/kg 的組別其切片 **Figure.10F-10H**，損傷現象雖稍為減輕但仍與正常組別有所差異。

【PBLs 預防 2-AAF 誘導之肝癌功效評估: 毒性影響】

五週大的 Wistar 公鼠飼養於室溫下，適應環境至六週大後再進行分組；共分為八組，第一組為正控常制組(normal group)、第二組為 AAF 誘導組(induced group)、第三到五組為 PBL 控制組分為 25、50 與 100 mg/kg 三組、第六到八為 PBL 試驗組，飼食三種劑量的 PBLs 外，飲食中也添加了 AAF 誘發致癌，normal diet 與添加 PBLs 的組別老鼠隻數各為六隻，而 AAF 誘導組與 AAF 添加 PBLs 的組別老鼠隻數個為十隻。在整體適應環境一週後，即開始灌食 PBLs 一週，於第二週開始開始於飼料中添加 0.025% 的化學治癌藥物 AAF，觀察其死亡率與體重上的變化，實驗為期三個月共 12 週後，犧牲取血液生化值與相關臟器進行分析檢測。老鼠的存活率如 **Figure.11**，控制組(normal diet)與飼食 PBLs 組別存活率到皆為 100%(每組各六隻皆存活)，誘導組(0.025% AAF)的存活率也為 100%(誘導組十隻皆存活)，然而在荖葉水萃取物處理之下，其死亡率明顯提高，AAF + 25mg/kg 存活率只剩 60%(實驗組十隻，六隻存活)，AAF+50 mg/kg 存活率為 80%(實驗組十隻，一隻為 censor，八隻存活)，AAF + 100 mg/kg 存活率為 90%(實驗組十隻，九隻存活)。其各組體重變化如 **Figure.12A**，Normal 組與 PBLs 25、50 與 100 mg/kg 的組別，隨著週數皆有不斷上升的趨勢，而相較有 AAF 處理的組別，體重的變化明顯受到了抑制。犧牲後取肝臟稱重並與其個別體重相除後的比值於 **Figure.12B**，Normal 組與 PBLs 各組相比並無顯著性的差異，然而 AAF 誘導組的比值與 Normal 組相比有顯著性的上升 $p < 0.001$ ，AAF 添加 PBLs 的各組與 AAF 組相較之下，也無明顯的改變。老鼠犧牲後，觀察其肝臟的外觀變化(**Figure.13A-G**)，Normal diet 的組別與 PBLs 三個不同劑量飼食的組別，其肝臟的外觀並無明顯的差異，色澤紅潤，外表光滑且觸感柔軟 **Figure.13A, 13C-13E**，而 AAF 誘導組與 Normal 組肝臟相比，明顯的有腫脹，且表面粗糙可見明顯的結節突起 **Figure.13B**，在 AAF 誘導並投以不同劑量的荖葉水萃取物之下，與誘導組相比結節突起雖較少，但表面仍是不光滑且觸感略微堅硬 **Figure.13F-H**，組織切片染色於 **Figure.14**。分析犧牲後之血液生化值，肝功能以檢測 GOT、GPT、 γ GT 與 AFP 四項指標 **Figure.15A-D**，GOT 是存在於肝臟、心臟以及肌肉組織，且具有兩種 isoenzyme 一種在細胞質，而另一則是存於粒線體，當細胞受到破壞時就會釋出至血液當中，常用來檢測肝臟細胞壞死或發炎的指標，實驗處理之下正常組(normal)與 PBLs 的組別相較之下，有些許下降的趨勢但並無統計上的意義，誘導組(AAF)與正常組(normal)相比有上升的趨勢，但也並無意義，而 AAF 合併 PBLs 的組別與誘導組(AAF)相比，雖有下降的趨勢但仍無統計意義(**Figure.15A**)。GPT 則是主要由肝臟製造，在肝臟細胞早期的傷害其上升的幅度會超過於 GOT，因此也常用來評估肝臟細胞損壞的程度，在正常

組別(normal)與 PBLs 的組別相較之下,GPT 並無太大的差異性,然而誘導組(AAF)與正常組相比則有顯著性的升高 $*p<0.05$,在 AAF 合併不同 PBLs 處理之下,則並無顯著變化性(Figure.15B)。 γ GT 是膽所分泌的酵素,協助氨基酸及 peptides 運送通過細胞膜,存在肝、腎、胰、心臟、腦部等,其對肝的特異性比 alkaline phosphatase 來的高,可以用來評估肝臟疾病的進行,篩檢酒精中毒也可做為癌症肝轉移的監測。實驗處理之下,正常組與 PBLs 處理組並無明顯差異,而誘導組與正常組相比則有上升的趨勢,但無顯著性差異,AAF 合併荖葉水萃取物處理之下,則有些許下降趨勢,但仍無顯著性差異 (Figure.15C)。

alpha-fetoprotein(AFP) α 胎兒蛋白,肝細胞複製時所分泌的球蛋白,可應用在肝癌偵測,監控療效及復發的測定,正常組(normal)在 PBLs 處理之下,有些微下降的趨勢,其中 50mg/kg 的組別有 $p<0.05$ 的顯著差異,誘導組(AAF)與正常組(normal)相比並無太大的變化,然而 AAF 合併 PBLs 的組別,在 AAF+25mg/kg 與 AAF 組相比 $p=0.05$ 的下降趨勢,而 AAF+50 mg/kg 以及 AAF+100mg/kg 的組別分別與 AAF 相比,皆有 $p<0.05$ 顯著性的下降。檢測腎臟功能指標依據 BUN 與 Creatinine (Figure.16A-16B),BUN 血中尿素氮是反應過濾排泄尿素的能力,正常組在 PBLs 餵食之下 BUN 有明顯上升的趨勢,在 50mg/kg 餵食之下與正常組相比有 $p=0.05$ 上升趨勢,100mg/kg 與 normal 相比則有 $p<0.01$ 的顯著性上升的意義,誘導組(AAF)與正常組(Norma)的 BUN 有顯著性 $p<0.05$ 的上升,而在 AAF 合併 PBLs 處理之下,在 50mg/kg 與 100 mg/kg 的組別分別有 $p<0.05$ 及 $p<0.01$ 顯著性下降的意義(Figure.16A)。

此外偵測血清中的肌酸酐 (Creatinine,Cre),其主要是經由腎絲球所排出的,所以當腎絲球的過濾率下降時,血清中的 Cre 就會有上升的現象,因此也是腎功能特異的指標,在實驗處理之下,無論是正常組、誘導組以及有無 PBLs 處理的組別,其 Cre 的數值皆無太大的變化(Figure.21B)。

另外也對發炎反應的指標進行觀測,C 反應性蛋白(C-Reactive protein,CRP),在急性發炎期肝臟會產生異常的醣蛋白 CRP,當發炎舒解食指數就會下降,可以視為感染、組織傷害等的指標,實驗處理之下正常組(normal)與添加 PBLs 餵食的組別相比,並無太大的差異性,然而誘導組(AAF)與正常組(Normal)上升的趨勢但無顯著統計上的差異,在 AAF 合併不同濃度的 PBLs 之下與誘導處相比有下降的趨勢,但仍是無統計上的意義(Figure.16C)。

白血球(white blood cell)指數上升與感染、發炎、腫瘤等皆有相關,在實驗處理之下,正常組與 PBLs 組比較之下除了高濃度 100mg/kg 有些微上升但並無統計意義,而誘導組(AAF)與正常組(normal)相比有上升的趨勢但無統計意義,合併 AAF 與荖葉的各組別與誘導組相比,WBC 有下降的趨勢但仍無顯著統計上的意義。細胞色素 p450(cytochrome p450)為肝臟 phase I 解毒酵素系統,許多營養素、藥物以及毒物皆會透過此系統達到活化或解毒的功效。因此測定細胞色素 p450 1A2 的蛋白活性是否有受到 PBLs 的餵食而有所變化,實驗結果如 Figure.22,正常組(normal)與單獨餵食 PBLs 的組別相比,50mg/kg 與 100mg/kg 的組別其酵素活性明顯的上升 $p<0.01$ 的可性差異度,而誘導組(AAF)與正常組(normal)相比也有 $p<0.001$ 的顯著性上升,然而

AAF 與 PBLs 合併餵食與單獨 PBLs 組別相比, 25mg/kg 比 AAF+25 以及 100mg/kg 比 AAF+100 皆有 $p < 0.05$ 的顯著性上升的意義。

【PBLs 保肝功效研究】

細胞毒性測試

由於過去本實驗室對於 PBLs 的研究發現對於人類肝臟細胞瘤 (human hepatoblastoma) HepG2 合併抗癌藥物 cisplatin 處理之下, 發現具有增強肝癌細胞感受性, 進而造成細胞毒性 (cytotoxic) 產生⁽³⁰⁾。因此實驗設計以荖葉水萃取物 PBLs 處理 WRL68 (Hepatic fetal human epithelial cell line) 以及 Hep3B2.1-7 (Human Hepatocellular carcinoma cell line), 利用 MTT assay 觀察 24、48 以及 72 小時對於細胞所產生的影響為何, 實驗結果如 **Figure.18** 中顯示, WRL68 細胞處理 PBLs 在 0.5mg/ml 濃度以下對細胞並沒有毒殺性, 0.75mg/ml 以上在長時間處理之下才會造成細胞的傷害, 而相對的 Hep3B2.1-7 細胞從低濃度 0.1mg/ml 起就會影響細胞的生長。

細胞週期分析

因此針對 Hep3B2.1-7 進行了 PI 單染的細胞週期分析, 在 24 小時 PBLs 處理之下細胞週期沒有太大的變化, 48 小時處理之下 subG1 從原本的 0.6% 上升到了 5.7%, S 期也從原本的 10.9% 上升至 20.9%, 細胞週期大致停留在 S 期, 而到了 72 小時的處理之下, subG1 已從 1.4% 提高至 13.7%, G1 其明顯從 58.1% 下降至 26.6%, 且仍是有部分細胞滯留於 S 與 G2/M 期。接下來針對 48 小時處理 PBLs 的 S 期調控蛋白進行分析研究, 實驗如 **Figure.19**, CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) 主要為調控 G1 到 S 以及 S 到 G2 期的調控激酶, 在 PBLs 處理之下 CDK2 並沒有變化, 而調控 G1 進入 S 的 cyclinE 也是不受影響, 但調控 S 進入 G2/M 的 cyclin A 在處理 0.5mg/ml 的濃度以上明顯的受到抑制 (**Figure.20**), 相對的影響到下游的 transcription factor E2F1 的表現, 因此針對此週期的相關 inhibitor 進行分析, p27 在 PBLs 處理之下變化並不明顯, p21 則是隨著處理濃度提高也有變多的趨勢, 此外也針對 cdc25A (cell division cycle 25A), 此蛋白為調控細胞從 G1 進入 S 期。當細胞受到 DNA damage 的訊號時會啟動 ATM/ATR, 引發下游 Chk2 及 Chk1 的磷酸化, Chk2 的磷酸化會導致下游 cdc25A 蛋白的磷酸化, 當磷酸根接上 cdc25A 時就會被 ubiquitin 辨識上而分解, 使得整個細胞週期停在 G1 到 S 的這個階段, 延緩週期進入 S 期。因此實驗檢測 cdc25A 與其磷酸化的蛋白表現量: cdc25A 隨著濃度上升有變多的趨勢, 而相較於 p-cdc25A 隨著濃度上升蛋白表現量則是越來越少, 這樣的結果表示在處理 PBLs 48 小時之後, 細胞順利從 G1 進入 S 期。 (**Figure.20**)

Hep3B2.1-7 的細胞株是屬於 p53 native 的癌細胞株, 然而處理 PBLs 小時候偵測期細胞週期的調控蛋白發現其 CDK inhibitor: p21 是有受到影響, 調控 p21 分為 p53-dependent 和 p-53-independent, 由於此細胞缺乏 p53, 因此調控 p21 改變的主要是以 p53-independent 的分式, p21 的大量表現會去結合 cyclin A/Cdk2 complex 而抑制 apoptosis 的訊號使細胞進入 arrest 的階段⁽⁷⁰⁾。因此對於 PBLs 處

理 Hep3B2.1-7 cells 於 48 小時之後的細胞週期調控，可以針對 CDK2/Cyclin A, p21/CDk2-cyclinA 進行 co-immunoprecipitation 觀察 PBLs,以及調控轉錄因子 E2F1 上游的 Rb 進行探討是否有所變化。

細胞程式性死亡

PBLs 處理下產生的細胞毒性在 72 小時是最明顯的(**Figure.19**)，以流式細胞儀針測在 48 小時 subG1 明顯的從 0.6%上升到了 5.7%，因此探討細胞死亡的機制為何。首先利用螢光染色的方式偵測核是否有濃染的現象(apoptosis)，如 **Figure.21** 利用 DAPI 染色觀察是否有濃染現象，24 小時處理細胞，核並無濃染的變化，而 48 小時處理於 0.25mg/ml 以上亮點數有明顯的增加，然而占細胞的整體比例而言仍是少數。因此進行 AVO 的染色觀察是否屬 type II 的程式性死亡，如 **Figure.22** 可見 24 小時處理 1.0 mg/ml 以上的 AVO 的染色與 control 組比較些微明顯，在 48 小時處理 0.5mg/ml 以上 AVO 較 control 明顯，且在 1.0mg/ml 可明顯看亮點，高濃度 1.5 與 2.0mg/ml 則明顯染出整個細胞都呈現紅色螢光。因此利用 MDC 染劑針對 48 小時處理的細胞進行染色觀察是否為 type II 的死亡，如 **Figure.23** 可以觀察到 control 並無染上 MDC，而在濃度 0.25mg/ml 以上的濃度 MDC 的呈色皆較為明顯。72 小時低濃度 PBLs(1.0 mg/ml 以下)處理，偵測 AVO 以及 MDC 的結果如 **Figure.24**，AVO 在 0.25~0.75mg/ml，而 MDC 則在 0.1 及 0.25mg/ml 的呈色最為明顯。進行 programmed cell death 相關性的蛋白表現偵測如 **Figure.25**，細胞在處理 PBLs48 小時進行收取蛋白，Bcl-2 為 Bcl-2 family 為細胞粒線體所調控的蛋白之一，他的表現與 anti-apoptosis 有極度的相關，隨著 PBLs 的濃度提高 Bcl-2 蛋白並無太大的變化。Caspase 3 與 cleavage caspase 3 屬 apoptosis 下游表現蛋白之一，實驗結果可以發現 Caspase 3 的量並無太大變化，然而 cleavage caspase 3 在高濃度 1.0 和 1.5mg/ml 的 PBLs 處理之下有些許上升的跡象。針對 Type II cell death 偵測 LC3、ATG5 以及 Beclin-1。在 autophagy 中 Beclin-1 蛋白在接受來自 PI3K III 的刺激訊號後，開始扮演著 Vescicke nuleation 最初的起始角色，皆著促使 LC3I 去除 PE 後形成 LC3II 接合在剛形成的膜上慢慢進行延長膜的動作，而 ATG5 則是調控整個 vesicle elongation 過程的相關蛋白。如 **Figure.15** 在 PBLs 處理 48 小時觀察可以發現，Beclin-1、LC3 I 與 LC3 II 蛋白明顯的隨著濃度慢慢增加，ATG5 蛋白的表現量則並沒有太多的變化。因此可知在 PBLs 處理 48 小時之後，細胞明顯的產生 cell cycle arrest 並開啟 autophagy 的相關訊息傳遞。調控 autophagy 有兩條最主要的途徑分別為 PI3K/AKT pathway 以及 NF κ B pathway，因此未來依據此兩條 pathway 尋找 PBLs 對於 Hep3B 所產生的 autophagy cell death 是屬於哪條途徑所造成的。此外由於 PBLs 的處理亦會造成 cell cycle arrest，因此該如何做劃分的界線，又 PBLs 在 Hep3B2.1-7 的細胞所造成的 cell cycle arrest 與 autophagy 之間的 cross-talkd 仍尚待研究。

PBL 異種移植初期實驗測試(xenograft model)

細胞實驗實驗進行之下發現對於 Hep3B2.1-7 細胞株具有抑制生長並誘導走向 autophagy cell death 的能力，因此利用異種移植(xenograft model)的技術，將人類

肝癌細胞種植在免疫缺乏小鼠的大腿皮下進行 in vivo 的試驗，待腫瘤順利成長後即開始餵食 PBLs 觀察期是否有抑制腫瘤生長的能力。**Figure.26** 實驗取決以 1×10^7 種於老鼠大腿皮下待腫瘤生長後即開始分組處理，PBLs 的餵食濃度 10mg/mice，在實驗處理第 21 天腫瘤生長趨勢已經有 $p < 0.05$ 的差異性，在第 28 天 $p < 0.001$ 以及第 35 天 $p = 0.05$ ，因此可以看出 PBLs 的確可以有效的抑制 Hep3B2.1-7 在活體試驗中的生長。

合併以上的結果得知在細胞實驗上 PBLs 可以促使細胞生長停滯並走向 autophagy cell death，而在初步的動物實驗中也發現具有延緩腫瘤生長的趨勢，因此未來將利用現今已在使用 mTOR inhibitor 的抗癌藥物合併處理 PBLs 之下，觀察在細胞實驗上是否可以更促進細胞走向 autophagy cell death，且在動物實驗上由於合併抗癌藥物使用之下達到加成的療效。

討論

荖葉 piper betel leaf 過在中國與印度常被用來當作藥理，主治風寒咳嗽、引氣化痰等，而在過去文獻中也提到荖葉抗氧化的作用可拿來當作預防化學的研究，且也有許多印度學者提出專利指出其 piper betel leaf 中富含 3-o-p-coumary quinic acid(PCQ)，且對於急性或慢性白血病的治療有不錯的效果，而在過去本實驗室中也提出其在四氯化碳所誘導的肝纖維化的動物模型下，有良好的保肝功效，而對於肝癌細胞在荖葉與化療藥物合併處理之下，也有不錯的效果。因此對於荖葉其抗氧化、保肝及抗癌的作用仍是有許多待研究發展空間與利用價值。首先荖葉經由充分水洗，經由果汁機攪打過濾離心後，取上清液冷凍乾燥所得的粉狀樣品產率約為 $1.13 \pm 0.7495\%$ 。

荖葉水萃取物的基礎成分分析

經由基礎成份分析後發現所萃取出來的 PBLs 粉末，其多醣成分高達 $66.66 \pm 13.61\%$ ，因此進一步分析是否還有膳食纖維此多醣體，實驗結果可發現總膳食纖維含量為 $43.2150 \pm 10.4496\%$ ，而可溶與不可溶分別占 $16.9600 \pm 5.4420\%$ 與 $26.255 \pm 6.4378\%$ ，其餘的蛋白質含有 $0.008 \pm 0.001\%$ 、脂質含有 $5.5 \pm 0.003\%$ ，而多酚含有 $2.34 \pm 0.53\%$ 、類黃酮則含有 $0.513 \pm 0.09\%$ 。由 Santu Bandyopadhyay 等人分別於 2002 至 2010 年發表專利 US7674487 B2 指出 piper betel leaf 中富含 3-o-p-coumary quinic acid(PCQ) 此種奎寧酸物質，是最主要有效成份之一，因此 PBLs 樣品中是否含有此成分、所占比例多寡，又是否為最主要的作用成分仍待確認。

PBLs 抗氧化能力分析

實驗設計經由清除 DPPH 自由基的方式來檢測 PBLs 抗氧化的程度，結果在 0.5mg/ml 的濃度之下可以達到百分之二十的清除率，在濃度 2.0 mg/ml 之下清除率達到將近百分之五十，在濃度 5.0~20 mg/ml 的濃度下清除率則可達到將近百分之七十。此外也利用 TRAP 的方式偵測 PBLs 清除自由基的能力利用維他命 E 類似物 Trolox 來做比較換算，每 $100 \mu\text{g}$ 的 PBLs 相當於 $0.2164 \pm 0.1010 \mu\text{M}$ 的

trolox。Trolox 的分子量為 250.29 kDa，因此換算得知 1 克的 PBLs 粉末相當於 0.542 克的 Trolox，Trolox 的化學名為 6-hydroxyl -2,5,7,8 - tetramethylchroman -2-carboxylic acid，是一種抗氧化劑常應用在降低氧化壓力或傷害的研究上。在過去的文獻中指出將 Retinoic acid(RA)可以促使 neuronal-like cell 的 neurentogenesis 在 Trolox 共同處理下可以降低此過程所產生的 reactive oxygen species (ROS)以增加細胞的存活率⁽⁶⁸⁾。Arsenic trioxide (As₂O₃)是用來治療急性骨髓性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)，然而 As₂O₃ 的使用在高濃度處理之下會造成細胞 apoptosis 的現象，在動物實驗中更造成肝毒性的產生，利用 trolox 合併處理可以保護正常細胞並增加 As₂O₃ 對於癌細胞的調控進而走向 apoptosis，在動物實驗中合併處理可增加動物的存活率⁽⁶⁹⁾。PBLs 具有類似 trolox 的抗氧化能力，且在過去的專利中指出 PBLs 可以有效辨識 myeloid cancer cell 膜上的 CD33+，並殺死癌細胞不會對正常細胞造成傷害(US 7674487)。過去本實驗室研究指出 PBLs 具有保肝的功效。因此若能與 As₂O₃ 或 Trolox 合併相較探討之下對於白血病的治療或許有更好的對策。

PBLs 抗脂質氧化能力分析

低密度脂蛋白(LDL)為循環在血液中的複合粒子，主要是由膽固醇組成，其衍蛋白為 ApoB-100 纏繞與表層上，可被 LDL 接收器辨別而連結。LDL 結合血清中 60%的膽固醇，並將其運送到組織中成為細胞膜上的組成份，或是轉變為其他代謝產物，例如固醇類荷爾蒙，若人體內大量的 LDL 循環與血管中，就十分容易受到一些氧化因子攻擊而被氧化修飾(oxidative modification)。LDL 氧化修飾的過程是由自由基所引起的一連串的連鎖反應，包含了 LDL 蛋白質及脂質構型上的改變，衍蛋白 ApoB 受自由基或共軛雙烯攻擊造成蛋白序列中的 lysine、histidine 等帶正電荷的胺基酸 ϵ amino group 與氧化產物的醛類，例如 malondialdehyde(MDA)、hexanal 與 4-hydroxynoneal(4-HNE)等 cross-linking 並生成 schiff base，促使 LDL 表面正電荷減少負電荷增多，使得 LDL receptor 無法辨識，最後經由 macrophagy 的清除者接收器(scavenger receptor)專一辨識並吸收⁽⁷⁰⁾。

而由於 PBLs 具有抗氧化能力的功效，因此實驗研究設計觀察萜葉水萃取物是否也有不錯的抗 LDL 氧化之作用，在 in vitro 的實驗研究指出 PBLs 處理在 0.5 與 1.0 mg/ml 的濃度處理之下，可以有效的抑制 LDL 氧化後帶電荷改變以及氧化物質 MDA 產生的現象，此外在 PBLs 濃度 0.1, 0.5 以及 1.0mg/ml 能有效的抑制 LDL 上的衍蛋白 Apo B 的斷裂。利用 macrophagy uptake oxLDL 形成 foam cell 的現象進行 in vivo 的觀察 PBLs 抑制 oxLDL 的形成，進而抑制 foam cell 的產生。實驗先測始 macrophagy J774.1 吞噬 oxLDL 的能力，在濃度 200 μ g/ml oxLDL 的濃度 macrophagy 的吞噬能力是最好，也明顯的有 foam cell 的形成，但其對細胞的毒殺能力也相對的提高許多，因此最後選擇濃度 100 μ g/ml oxLDL 作為 macrophagy uptake 的基準(**Figure.5**)。LDL 加入 PBLs 0.05、0.1、0.5 和 1.0mg/ml 與促氧化劑 CuSO₄ 共同反應之下，與加入抗氧化劑 Trolox 組別比較，在 in vivo

實驗中可以發現在有 PBLs 處理與 oxLDL 組別相比 foam cell 形成的比例就有顯著性的下降(Figure.6)，因此 PBLs 的確是能有效的阻止 oxLDL 的形成。利用已經氧化的 LDL 與 PBLs 及 Trolox 共同加入細胞中，觀察 PBLs 是否可以抑制 macrophagy 吞噬已經形成的 oxLDL，實驗結果發現有處理 PBLs 的組別之下明顯有抑制 macrophagy 吞噬 oxLDL 的能力(Figure.7)。在專利 US 6413553 B1 提到 piper betel 合併 murrya koenigii 具有抑制 5-Lipoxygenase 脂氧合酶的活性，並有效阻止白三烯素(Leukotriene,LTs)的生成達到抗發炎的功效。LDL 氧化的形成，主要是由巨噬細胞(macrophages)、內皮細胞(endothelial cells)、血管平滑肌細胞(arterial smooth muscle cells)等所釋放出的活性氧物質(O₂·、OH·)經金屬離子催化氧化。另外酵素也會催化 LDL 脂質氧化，如 15-lipoxygenase(15-LO)、nitric oxide synthase 與 myeloperoxidase 等也會促使 LDL 脂質的氧化⁽⁷⁰⁾⁽⁷¹⁾。脂氧合酶家族中的 5-lipoxygenase (5-LO)在過去文獻中用 inhibitor 處理，可抑制 monocytes 活化所造成的 oxLDL 的形成。⁽⁷²⁾ 因此 PBLs 若能有效抑制 5-LO 亦能有效的抑制 oxLDL 的累積。實驗的設計是將 oxLDL 與 PBLs 共同處理細胞下發現具有抑制 macrophagy 吞噬的現象；而 macrophagy 會受到 oxLDL 的刺激下透過活話轉錄因子 AP1 以及 PPAR γ 來分別產生 scavenger receptors A (SR-A)與 CD36 此兩種清除者接受器來吞噬 oxLDL，若表達過多 receptor 就會使得細胞吞噬過多 oxLDL 使得膽固醇堆基於細胞中形成泡沫細胞(foam cell)，因此實驗中發現 PBLs 處理之下有效的抑制 oxLDL 的吞噬，進一步可以朝向是否抑制細胞上 scavenger receptor 的表現而產生的結果。

【荖葉預防急性肝損傷之作用】

本實驗室先前的研究發現荖葉具有很好的抗四氯化碳肝損傷的能力(29)。過去許多研究證實乙醯酚胺(acetaminophen)其為一般民眾日常所使用的止痛藥，由於過量的服用會有損害肝臟的疑慮，因此使用此藥物當作誘發大鼠急性肝損傷的模式，觀察荖葉是否具有預防肝臟受損的功效。然而實驗結果得知發現降低肝臟損傷的效果有限。進一步分析肝臟解毒酵素 GST 的活性指出荖葉是可以活化肝臟中解毒酵素的活性，但是對於藥物的保肝預防功效並不顯著。

【荖葉治療急性肝損傷之探討】

利用第一年所建立的 Acetaminophen-induce acute hepatic damage model 誘導產生急性的肝損傷之後，於犧牲(十六小時)前分為兩組別，於第四小時及第十小時給予一到兩次荖葉萃取物觀察，荖葉是否具有治療及修復急性肝損傷的可能性。實驗結果顯示誘導後，給予一次(第四小時)的萃取物肝指數有些微的下降，但並無顯著性差異，然而給予兩次(第四及第十小時)肝指數反而有意義的持續上升，實驗結果血清生化值(Table-4)可以發現誘導組的肝功能指數有顯著性的升高(p < 0.01)，在誘導第四個小時後後給予第一次荖葉(A 組)，肝功能數值有些微下降但是並沒有顯著性的差異。而在誘導後的第四及十小時給予兩次荖葉萃取物(B 組)，發現其肝功能指數反而持續上升，且具有 p < 0.001 的顯著性差異。這樣的結果指出，荖葉水萃取物對於急性肝損傷並無預期的治療效果，反而是有增加其毒性的

可能性。

【PBLs 預防 2-AAF 誘導之肝癌功效評估:毒性影響】

在過去本實驗室的研究也發現對於四氯化碳所造成的肝損傷的動物模式下，PBLs 有非常良好的保肝功效⁽²⁹⁾。因此實驗更進一步使用 2-acetamidofluorene 此化學治癌藥物，誘發肝臟癌變，觀察 PBLs 是否具有化學預防的功能。實驗各組的存活率結果如 Figure.11，control 控制組、PBLs 25、50 以及 100mg/kg 的組別皆有存活 100% (n=6)，induction 誘導組(AAF)的存活率也有達到 100%(n=10)，然而預期有化學預防保護能力的 PBL 組別，其存活率分別只有 25mg/kg(60%,n=10)、50 mg/kg(80%, censorx1,n=10)、100 mg/kg(90%, n=10)，明顯可見在餵食 PBLs 組別皆有毒性產生，且老鼠外觀也清楚可見相較於正常組異常瘦弱。由體重的變化曲線也可看出 AAF 以及 AAF 合併 PBLs 的組別體重皆較沒有 AAF 處理的組別輕 Figure.12A。由於肝病變產生的發炎、纖維化、硬化甚至癌化等現象，皆會造成肝腫脹，因此可以利用肝重相除體重的比值得知其肝病變的程度。實驗為期 12 週犧牲後取出主要目的器官肝臟，並以其個別體中相除後如 Figure.12B，單獨處理 PBLs 各組別與正常組並沒有差異，AAF 誘導組與正常組相比指數明顯上升 $p<0.01$ 的差異性，然而 AAF 合併 PBLs 的組別與 AAF 誘導組相比也毫無差異。觀察犧牲之後各組的肝臟外觀也可得知，正常組與 PBLs 的組別並無差別，AAF 組明顯外觀粗糙且結節嚴重，而 AAF 合併 PBLs 的組別其肝臟的外觀雖有好轉但仍是結節粗糙的表面。分析犧牲後的血液常規，以 GOT、GPT、 γ GT 及 AFP 代表肝功能指數 Figure.15，BUN 以及 CREA 表示腎功能指數 Figure.16，發炎指標以 CRP 及 WBC 為參考 Figure.16。GOT 以及 GPT 兩者皆是偵測肝臟細胞壞死或發炎的指標，實驗可看出 GOT 的指數在 PBLs 處理有下降的趨勢但無統計上意義，而 GPT 在 AAF 誘導組明顯有高於正常組 $p<0.05$ 的可性差異，而 PBLs 處理的組別並無降低的效果。 γ GT 可用來評估肝臟疾病的進行，而在有 PBLs 處理的組別並無有意義的下降。AFP 為用來偵測肝癌的指標，在餵食 PBLs 50mg/kg 的組別與正常組相比，有 $p<0.05$ 的顯著性下降，而合併 PBLs 與 AAF 的組別與誘導組 AAF 相比，在 AAF+25mg/kg 的組別有 $p=0.05$ ，AAF+50 mg/kg 以及 AAF+100mg/kg 有 $p<0.05$ 的下降趨勢。這表示在 PBLs 處理之下是可以明顯的降低 AFB 癌化的指標，但是否代表著抑制肝細胞的複製仍有待探討。腎功能指標的 BUN 正常組在 PBLs 餵食之下 BUN 有明顯上升的趨勢，在 50mg/kg 餵食之下與正常組相比有 $p=0.05$ 上升趨勢，100mg/kg 與 normal 相比則有 $p<0.01$ 的顯著性上升的意義，誘導組(AAF)與正常組(Norma)的 BUN 有顯著性 $p<0.05$ 的上升，而在 AAF 合併 PBLs 處理之下，在 50mg/kg 與 100 mg/kg 的組別分別有 $p<0.05$ 及 $p<0.01$ 顯著性下降的意義。BUN 尿素氮是人體白質代謝的產物，由肝臟合成並經由腎臟透過尿液而排出，因此血液中的 BUN 表示腎功能的排泄能力與肝臟合成的能力。CREA 亦是表示腎功能的指標之一，主要是偵測腎絲球的排泄率，由於各組皆無差異，因此 BUN 數值的改變趨向解釋為影響肝臟的合成，在單獨 PBLs 與單獨 AAF 處理肝臟的合成 BUN 比率上升，然而在合併之後高濃度的

PBLs 對於肝臟合成 BUN 的能力明顯下降。發炎指標偵測 CRP 與 WBC，實驗發現雖然有趨勢但是各組間皆無意義。

細胞色素 P450 是肝臟 phase I 的解毒酵素，許多營養素、藥物以及毒物皆會透過此關卡代謝，進而獲得活性或毒性。實驗採用誘導肝癌的化學致癌藥物 N-(2-fluorenyl)acetamide，其毒性主要是經由細胞色素 p450 家族中的 1A2 的 N-hydroxylated 後會與肝細胞中的 DNA 結合進而產生癌變的現象。由於上述結果看來 PBLs 並沒有先前預設的具有化學預防的功能，因此轉而討論是否 PBLs 是否具有活化細胞色素 P450 1A2 的活性，進而造成 AAF 的毒性加強。測試 CYP450 1A2 的活性如 Figure.22，正常組(Normal)與 PBLs 組表較，在 50、100mg/kg 的濃度 CYP1A2 的活性有顯著性的上升($p < 0.01$)，誘導組與正常組相比更有 $p < 0.001$ 的上升幅度，這結果表示 PBLs 與 AAF 皆會促使 CYP1A2 的活性上升，合併之下各組與誘導組之間無顯著性的差異，而合併的各組與其相對應單獨的 PBLs 組別相比則有 $p < 0.05$ 的上升，此結果顯示 AAF 加成了 PBLs 促使 CYP1A2 的活性提高。因此可得知 PBLs 的體內代謝方式是會透過肝臟的細胞色素 p450 1A2 的途徑，這對於以後若欲以荖葉作為輔助性治療的角色更多了一方層面上的思考。

【細胞活體模式】

細胞毒性測試

由於過去本實驗室對於 PBLs 的研究發現對於人類肝臟細胞瘤 (human hepatoblastoma) HepG2 合併抗癌藥物 cisplatin 處理之下，發現具有增強肝癌細胞感受性，進而造成細胞毒性 (cytotoxic) 產生⁽³⁰⁾。因此實驗設計以荖葉水萃取物 PBLs 處理 WRL68 (Hepatic fetal human epithelial cell line) 以及 Hep3B2.1-7 (Human Hepatocellular carcinoma cell line)，利用 MTT assay 觀察 24、48 以及 72 小時對於細胞所產生的影響為何，實驗結果如 Figure.18 中顯示，WRL68 細胞處理 PBLs 在 0.5mg/ml 濃度以下對細胞並沒有毒殺性，0.75mg/ml 以上在長時間處理之下才會造成細胞的傷害，而相對的 Hep3B2.1-7 細胞從低濃度 0.1mg/ml 起就會影響細胞的生長。

細胞週期分析

因此針對 Hep3B2.1-7 進行了 PI 單染的細胞週期分析，在 24 小時 PBLs 處理之下細胞週期沒有太大的變化，48 小時處理之下 subG1 從原本的 0.6% 上升到了 5.7%，S 期也從原本的 10.9% 上升至 20.9%，細胞週期大致停留在 S 期，而到了 72 小時的處理之下，subG1 已從 1.4% 提高至 13.7%，G1 其明顯從 58.1% 下降至 26.6%，且仍是有部分細胞滯留於 S 與 G2/M 期。接下來針對 48 小時處理 PBLs 的 S 期調控蛋白進行分析研究，實驗如 Figure.20，CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) 主要為調控 G1 到 S 以及 S 到 G2 期的調控激酶，在 PBLs 處理之下 CDK2 並沒有變化，而調控 G1 進入 S 的 cyclinE 也是不受影響，但調控 S 進入 G2/M 的 cyclin A 在處理 0.5mg/ml 的濃度以上明顯的受到抑制，相對的影響到下游的 transcription factor E2F1 的表現，因此針對此週期的相關 inhibitor 進行分析，p27

在 PBLs 處理之下變化並不明顯，相對的 p21 則是隨著處理濃度提高也有變多的趨勢，此外也針對 cdc25A (cell division cycle 25A)，此蛋白為調控細胞從 G1 進入 S 期。當細胞受到 DNA damage 的訊號時會啟動 ATM/ATR，引發下游 Chk2 及 Chk1 的磷酸化，Chk2 的磷酸化會導致下游 cdc25A 蛋白的磷酸化，當磷酸根接上 cdc25A 時就會被 ubiquitin 辨識上而分解，使得整個細胞週期停在 G1 到 S 的這個階段，延緩週期進入 S 期。因此實驗檢測 cdc25A 與其磷酸化的蛋白表現量：cdc25A 隨著濃度上升有變多的趨勢，而相較於 p-cdc25A 隨著濃度上升蛋白表現量則是越來越少，這樣的結果表示在處理 PBLs 48 小時之後，細胞順利從 G1 進入 S 期。

Hep3B2.1-7 的細胞株是屬於 p53 native 的癌細胞株，然而處理 PBLs 小時候偵測期細胞週期的調控蛋白發現其 CDK inhibitor：p21 是有受到影響，調控 p21 分為 p53-dependent 和 p-53-independent，由於此細胞缺乏 p53，因此調控 p21 改變的主要是以 p53-independent 的分式，p21 的大量表現會去結合 cyclin A/Cdk2 complex 而抑制 apoptosis 的訊號使細胞進入 arrest 的階段⁽⁶⁷⁾。因此對於 PBLs 處理 Hep3B2.1-7 cells 於 48 小時之後的細胞週期調控，可以針對 CDK2/Cyclin A, p21/CDk2-cyclinA 進行 co-immunoprecipitation 觀察 PBLs, 以及調控轉錄因子 E2F1 上游的 Rb 進行探討是否有所變化。

細胞程式性死亡

PBLs 處理下產生的細胞毒性在 72 小時是最明顯的 (Figure.18)，以流式細胞儀針測在 48 小時 subG1 明顯的從 0.6% 上升到了 5.7%，因此探討細胞死亡的機制為何。首先利用螢光染色的方式偵測核是否有濃染的現象 (apoptosis)，如 Figure.21 利用 DAPI 染色觀察是否有濃染現象，24 處理核並無太大的變化，而 48 小時處理於 0.25mg/ml 以上亮點數有明顯的增加，然而占細胞的整體比例而言仍是屬少數。因此進行 AVO 的染色觀察是否屬 type II 的程式性死亡，如 Figure.22 可見 24 小時處理 1.0 mg/ml 以上的 AVO 的染色與 control 組比較些微明顯，在 48 小時處理 0.5mg/ml 以上 AVO 較 control 明顯，且在 1.0mg/ml 可明顯看亮點，高濃度 1.5 與 2.0mg/ml 則明顯染出整個細胞都呈現紅色螢光。因此利用 MDC 染劑針對 48 小時處理的細胞進行染色觀察是否為 type II 的死亡，如 Figure.23 可以觀察到 control 並無染上 MDC，而在濃度 0.25mg/ml 以上的濃度 MDC 的呈色皆較為明顯。72 小時低濃度 PBLs (1.0 mg/ml 以下) 處理，偵測 AVO 以及 MDC 的結果如 Figure.24，AVO 在 0.25~0.75mg/ml，而 MDC 則在 0.1 及 0.25mg/ml 的呈色最為明顯。進行 programmed cell death 相關性的蛋白表現偵測如 Figure.25，細胞在處理 PBLs 48 小時候進行收取蛋白，Bcl-2 為 Bcl-2 family 為細胞粒線體所調控的蛋白之一，他的表現與 anti-apoptosis 有極度的相關，隨著 PBLs 的濃度提高 Bcl-2 蛋白並無太大的變化。Caspase 3 與 cleavage caspase 3 屬 apoptosis 下游表現蛋白之一，實驗結果可以發現 Caspase 3 的量並無太大變化，然而 cleavage caspase 3 在高濃度 1.0 和 1.5mg/ml 的 PBLs 處理之下有些許上升的跡象。針對 Type II cell death 偵測 LC3、ATG5 以及 Beclin-1。在 autophagy 中 Beclin-1 蛋白在接受來自

PI3K III 的刺激訊號後，開始扮演著 Vesicicle nucleation 最初的起始角色，皆著促使 LC3I 去除 PE 後形成 LC3II 接合在剛形成的膜上慢慢進行延長膜的動作，而 ATG5 則是調控整個 vesicle elongation 過程的相關蛋白。如 Figure.25 在 PBLs 處理 48 小時觀察可以發現，Beclin-1、LC3 I 與 LC3 II 蛋白明顯的隨著濃度慢慢增加，ATG5 蛋白的表現量則並沒有太多的變化。因此可知在 PBLs 處理 48 小時之後，細胞明顯的產生 cell cycle arrest 並開啟 autophagy 的相關訊息傳遞。調控 autophagy 有兩條最主要的途徑分別為 PI3K/AKT pathway 以及 NF κ B pathway，因此未來依據此兩條 pathway 尋找 PBLs 對於 Hep3B 所產生的 autophagy cell death 是屬於哪條途徑所造成的。此外由於 PBLs 的處理亦會造成 cell cycle arrest，因此該如何做劃分的界線，又 PBLs 在 Hep3B2.1-7 的細胞所造成的 cell cycle arrest 與 autophagy 之間的 crosstalk 仍尚待研究。

PBL 異種移植實驗測試(xenograft model)

細胞實驗實驗進行之下發現對於 Hep3B2.1-7 細胞株具有抑制生長並誘導走向 autophagy cell death 的能力，因此利用異種移植(xenograft model)的技術，將人類肝癌細胞種植在免疫缺乏小鼠的大腿皮下進行 in vivo 的試驗，待腫瘤順利成長後即開始餵食 PBLs 觀察期是否有抑制腫瘤生長的能力。實驗先進行初步的測試種入不同的細胞數於裸鼠大腿皮下，待腫瘤生長後隨機平均分配於 control 組與灌食 PBLs(餵食濃度 10mg/mice)，如 Figure.26，在實驗處理第 21 天腫瘤生長趨勢已經有 $p < 0.05$ 的差異性，在第 28 天 $p < 0.001$ 以及第 35 天 $p = 0.05$ ，因此可以看出 PBLs 的確可以有效的抑制 Hep3B2.1-7 在活體試驗中的生長。

合併以上的結果得知在細胞實驗上 PBLs 可以促使細胞生長停滯並走向 autophagy cell death，而在初步的動物實驗中也發現具有延緩腫瘤生長的趨勢，因此未來將利用現今已在使用 mTOR inhibitor 的抗癌藥物合併處理 PBLs 之下，觀察在細胞實驗上是否可以更促進細胞走向 autophagy cell death，且在動物實驗上由於合併抗癌藥物使用之下達到加成的療效。

參考文獻

1. Daniele W.R. et al. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*. 6 : reviews, 3003.1-3003.9 (2000)
2. Wormhoudt, L.W. et al. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathion- S-transferase, and epoxide hydrolase enzyme: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol* 29:59-124, (1999)
3. Blaauboer, B.M. et al. Bio- transformation: detoxication and bioactivation. In *Toxicology CRC press London* 41-45,(1996)
4. Cho, S.G. et al. Glutathione S-Transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase. *J. Biol. Chem.* 276:12749-12755,(2001)
5. Gliot, D. et al. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via Glutathione S-transferase regulation. *J. Biol. Chem.* 277: 49220-49229, (2002)
6. .Lu, S. C. et al. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *FASEB J.* 13: 1169-1183, (1999)
7. Josephy, P. D. et al. Evidence for multiple signalling pathways in the regulation of gene expression in human cell lines. *J. Nutri.* 130: 1555-1560, (2000)
8. Stine, K. E. et al. *Biotransfor principles of toxicology.* CRC Press. (1996)
9. Bissell, D.M. et al. Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. *Hepatology* 33:1009, (2001)
10. Batt, A.M. et al. Manifestations of chemically induced liver damage. *Clin Chem;* 41:1882.(1995)
11. Benichou, C. et al. Criteria of drug-induced liver disorders. *J Hepatology* . 11:272.(1990)
12. Kaplowitz, N. et al. Drug-induced liver injury. *Clin Infect Dis.* 38: S44.(2004)
13. Chang, C.C. et al. Severe intrahepatic cholestasis caused by amiodarone toxicity after withdrawal of the drug: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 123:251.(1999)
14. Lockshin, R.A. et al. Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.* 11:831-844 (1965)
15. Kerr, R.P. et al. Two mechanisms of erythrocyte destruction in penicillin-induced hemolytic anemia. *N Engl J Med.* 287:1322-1325.(1972)
16. Norbury, C. et al. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem.* 61:441-470.(1992)
17. Rao, P.N. et al. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis

- and mitosis. *Nature*.225:159-164.(1970)
18. Sherr, C.J. et al. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13:1501-1512.(1999)
 19. Klionsky, D.J. et al. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*.290:1717-1721.(2000)
 20. Broker, L.E. et al. Cell death independent of caspases : a review. *Clin Cancer Res*. 11:3155-3162.(2005)
 21. Klionsky, D.J. et al. Autophagy. *Curr Biol*. 15:282-283.(2005)
 22. Petiot A. et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinase in HT-29 cells. *J Biol Chem*. 275:992-998.(2000)
 23. Rusten, T.E. et al. Programmed autophagy in the Drosophia fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell*. 7:179-192.(2004)
 24. Takeuchi, H. et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res*. 65:3336-3346.(2005)
 25. Baehrecke, E.H. et al. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*.6:505-510.(2005)
 26. Lee, M.H. et al. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*.9:639-649.(1995)
 27. Matsuoka, S. et al. P57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 9:650-662. (1995)
 28. El-deiry, W.S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 54:1169-1174.(1994)
 29. Young, S.C. et al. Protection effect of piper betel leaf extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Arch Toxicol*:81:45-55.(2007)
 30. Young, S.C. et al. Increased sensitivity of HepG2 cells toward the cytotoxicity of cisplatin by the treatment of piper betel leaf extract. *Arch Toxicol*: 80: 319-327. (2006)
 31. Sarwar S. et al. *Emblica officinalis* and hepatocarcinogenesis: a chemopreventive study in wistar rats. *J.Ethnopharmacology*.118: 1-6.(2008)
 32. Tetyana V.B. et al. Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis*. 29: 638-646.(2008)
 33. Stewart S. et al. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Cell Dev Biol*. 13: 419-424.(2002)
 34. Hus J.D. et al. *Solanum nigrum* L. Extract Inhibits 2- Acetylaminofluorene - Induced Hepatocarcinogenesis through Overexpression of Glutathione S-Transferase and Antioxidant Enzymes. *Agric. Food Chem*. 57: 8628 - 8634 (2009)

35. Padma, P.R. et al. Anticarcinogenic effect of betel leaf extract against tobacco carcinogens. *Cancer Lett.* 45: 195-202.(1989)
36. Azuine, M.A. et al. Protective single/combined treatment with betel leaf and turmeric against methyl (acetoxymethyl) nitrosamine-induced hamster oral carcinogenesis. *Int. J. Cancer.* 51:412-415.(1992)
37. Jitesh, S.R. et al. Antioxidant activity of piper betel leaf extract and its constituents. *J. Agric. Food Chem.* 54,9046-9054.(2006)
38. Majumdar, B.R. et al. Effect of ethanol extract of Piper betle Linn leaf on healing of NSAID - induced experimental ulcer a novel role of free radical scavenging action. *Indian J Exp Biol.* 41:311-315.(2003)
39. Saravana, R. et al. Effect of Piper betel leaf extract on alcoholic toxicity in the rat brain. *J Med Food.* 6: 261-265.(2003)
40. Sengupta, A. et al. Pre-clinical toxicity evaluation of leaf-stalk extractive of Piper betle Linn. in rodents. *Indian J Exp Biol.* 38:338-42.(2000)
41. Ragazzi, E. et al. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation. *J Chromatogr.*77:369-75.(1973)
42. 食品分析與檢驗 陳明汝 張瑞郎 藍群傑 合著 2000年七月
43. Gaithersburg, M.D. et al. AOAC International, Official Methods of Analysis, 16th ed., 3rd revision (1997)
44. Xu, W. et al. Antioxidant activity of a water-souble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydr. Res.* 344:217-222.(2008)
45. Havel, R.J. et al. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 34:1345-1353.(1995)
46. Jeong T.S. et al. Low density lipoprotein (LDL)- antioxidant flavonoids from roots of *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 31:2097-2102.(2008)
47. Lee, J. H. et al. LDL-antioxidant from roots of *glycine max (L.) Merr.* *J Agric Food Chem.* 54:2057-2063.(2006)
48. Yagi, K. et al. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids.* 45:337-351.(1987)
49. Bente H. et al. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J lipid Res.* 46: 211-219.(2004)
50. Alley, M.C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48:589-601.(1988)
51. Peng, C.H. et al. Penta-acetyl geniposide induce apoptosis in C6 glioma cells by modulating the activation of neutral sphingomyelinase -induced p75 nerve growth factor receptor and protein kinase Cdelta pathway. *Mol Pharmacol.*70:997-1004. (2006)

52. Kanzawa, T. et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res*,63,2103-2108.(2003)
53. Biederbick, A. et al. Monodanylecadaverine(MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles.*Eur. J. Biochem.* 243:240-246.(1995)
54. Noboru M. et al. Methods for monitoring autophagy. *Int j Biochem Cell*, 36:2491-2502.(2004)
55. Jin, C.Y. et al. Genistein enhances TRAIL -induced apoptosis through inhibition of p38 MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Chemico-Biological Interactions*, 180:143-150.(2009)
56. Hartmut J. et al. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology*,144 :279-288.(2003)
57. Hanumantha, R.B.R. et al. Effect of sargassum polycystum (Phaeophyceae)-sulphated polysaccharide extract against acetaminophen-induced hyperlipidemia during toxic hepatitis in experimental rats. *Mol Cell Biochem.* 276:89-96,(2005)
58. Grypioti, A.D. et al. Platelet activating factor (PAF) involvement in acetaminophen-induced liver toxicity and regeneration. *Arch Toxicol*, 79:466-474. (2004)
59. Ahmed, O. et al. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology.* 234:124-134. (2007)
60. Hartmut, J. et al. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*.144:279-288.(2003)
61. Sarwat, S. et al. *Embllica officinalis* and hepatocarcinogenesis: a chemopreventive study in wistar rats. *J Ethnopharmacology.* 118:1-6.(2008)
62. Tetyana, V. B. et al. Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis*.29:638-646.(2008)
63. Stewart, S. et al. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Cell Dev Biol*, 13:419-424.(2002)
64. Lai J.P. et al. Additive effect of apicidin and doxorubicin in sulfatase 1 (SULF1)-expressing hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *J Hepatol*, 50:1112-1121.(2009)
65. Shi, J. et al. Therapeutic expression of an anti-death receptor 5 single-chain fixed-variable region prevents tumor growth in mice. *Cancer Res*.66:11947-11953. (2006)
66. Xue, F. et al. Tumor-targeted therapy with a conditionally replicating mutant of HSV-1 induces regression of xenografted human hepatomas. *Cancer Biol Ther.* 4:1234-1239.(2005)

67. Andrei, L.G. et al. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.*1:639-649.(2002)
68. Mario, L.C.F.J et al. In vitro optimization of retinoic acid – induced neuritogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Mol Cell Biochem.* DOI 10.1007/s11010-011-0983-2.(2011)
69. Diaz, Z. et al. Trolox enhances the anti-lymphoma effects of arsenic trioxide, while protecting against liver toxicity. *Leukemia.* 21:2117-2127.(2007)
70. Steinberg, D. et al. Lipoproteins, Lipoprotein Oxidation and Atherogenesis. K.R. Chien,ed. Philadelphia:W.B. Saunder Co.)(1999)
71. Heinecke, J.W. et al. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis.* 141:1-15.(1998)
72. Folcik, V.A. et al. Assessment of 5-lipoxygenase involvement in human monocyte - mediated LDL oxidation. *J Lipid Res.*34:69-79.(1993)

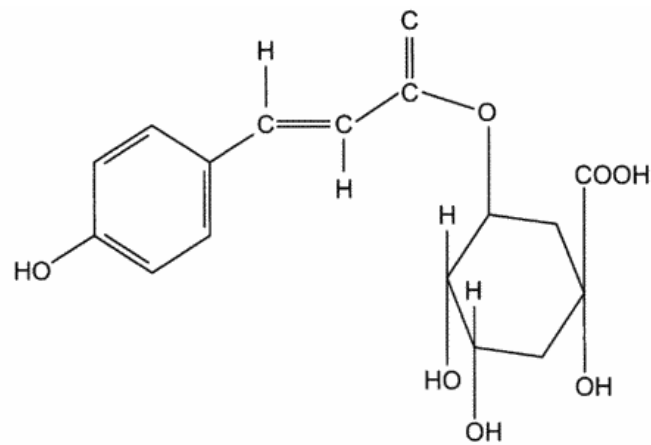
計畫成果自評

由於肝纖維化、肝臟損傷是早期肝癌的重要指標，如能預防或治療這段時間的損傷，對於肝癌的發生可以有效的遏止。先前荖葉的研究中發現，其有良好的預防四氯化碳所誘發之肝臟損傷。因此在此更進一步的分析萃取物裡面的成分，發現其有高含量的 polysaccharide 的成分，少量的酚類、脂類。預期即將在更進一步分析其多醣的成分，發現其含有膳食纖維的含量頗高，又過去的專利指出荖葉富含含有 3-O-p-courmaryl quinic acid(PCQ)此成分是否為其最主要功效成份，亦或含有其他具有功效成份仍待確認。而在試管實驗中發現荖葉據有良好的抗氧化功效，在對抗低密度脂蛋白氧化的功能卓越，在 *in vivo* 的細胞實驗中更顯示除了可以抑制低密度脂蛋白的氧化之外，還可以抑制巨噬細胞產生 foam cell 的能力。對於保肝功效的探討方面，首先參考過去文獻加以修正後建立的乙醯酚胺 (acetaminophen) 誘發急性肝損傷之動物模式下，觀察是否可以預防藥物性所帶來的肝損傷，實驗結果發現荖葉透過肝臟解毒酵素的活性來預防藥物所產生的肝損傷的毒性。第二年度計畫則是使用 acetaminophen(APAP) 誘導急性肝損傷後，再給予荖葉萃取物期許具有治療性的效果。然而實驗結果發現並沒有預期的良好治療效果，相對給予多次的荖葉組別，反而提升了肝臟發炎的現象，這是非常值得注意的關鍵的地方。利用了 2-Acetylaminofluorene (AAF) 誘導肝癌的動物模式探討，荖葉長期給予之下是否具有預防肝癌的形成與發生，然而實驗結果也不如預期的良好，誘導組合併荖葉的組別其數值並無良好的改變。由於 AAF 此藥物代謝主要是透過肝臟 phase I 的解毒酵素活化代謝而產生毒性，因此轉而探討是否荖葉的處理之下造成此解毒酵素活化，而使得誘導藥物合併之下加強毒性的產生。因此也由後續的實驗結果發現，荖葉單獨的餵食之下的確會有效的促進活化 AAF 的解毒酵素活性。因此往後可以針對荖葉活化肝臟解毒酵素的種類下加以分析，如此對於未來將荖葉輔以藥物合併治療下，即可找出最恰當的輔助有效的方法。細胞實驗部分利用人類肝小細胞癌 Hep3B2.1-7 細胞株，在 PBLs 處理之下造成 cell cycle arrest 的現象，經由 western blot 皆可以發現調控 S 期到 G2/M 期的蛋白以及 transcription factor 明顯的受到影響。而 Hep3B2.1-7 以 PBLs 長時間處理即造成細胞走向 autophagy cell death，此外進行異種移植(Xenograft model) 的 *in vivo* 實驗觀察下發現，PBLs 處理的組別能有效的抑制腫瘤生長的跡象，因此未來可考慮使用，同樣經由肝臟 phase I 解毒酵素活化的抗癌藥物 everolimus (a derivative of rapamycin)，此為 mTOR inhibitor 具有誘使細胞走向 autophagy cell death 的功效，期許荖葉配合此抗癌藥物的使用下可有效抑制腫瘤生長等的趨勢，已達到加成療效。

表及附圖



圖一、Piper betel leaf 荖葉



圖二、3-O-p-coumaryl quinic acid(PCQ)

Table-1 The polysaccharide,protein,lipid, polyphenol and flavonoids content of water extracts of piper betel leaf (PBLs).

<i>Piper betel leaf</i> (PBL)	%
Polysaccharide	60.66 ±13.61
Protein	0.008±0.001
Lipid	5.5±0.003
Polyphenol	2.34±0.53
flavonoids	0.513±0.09

Table-2 The dietary fiber of piper betel leaf

<i>Piper betel leaf</i> (PBL)	%
Insoluble dietary fiber	26.255 ±6.4378
Soluble dietary fiber	16.9600±5.4420
Total dietary fiber	43.2150±10.4496

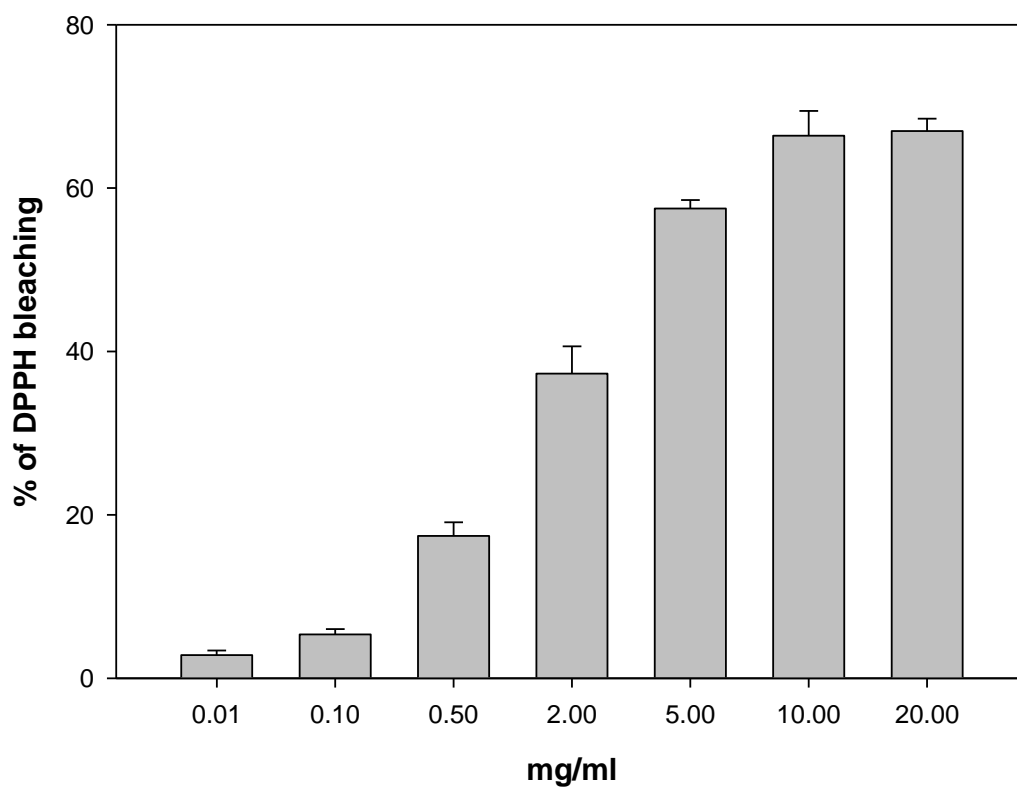
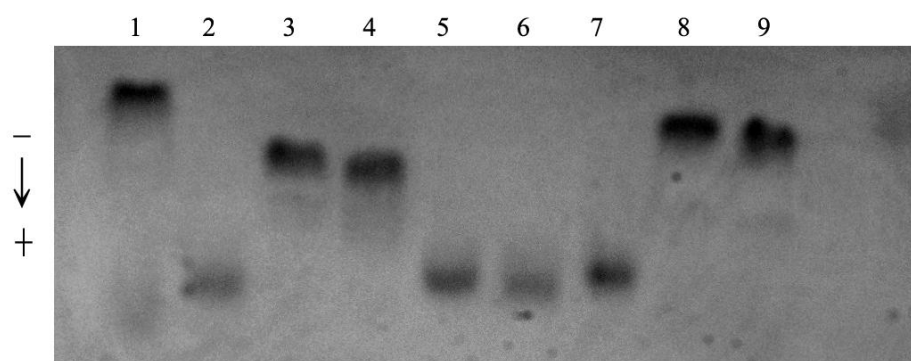


Figure.1 DPPH scavenging activity

The antioxidant activity analysis of piper betel leaf on DPPH scavenging activities.

(A)



(B)

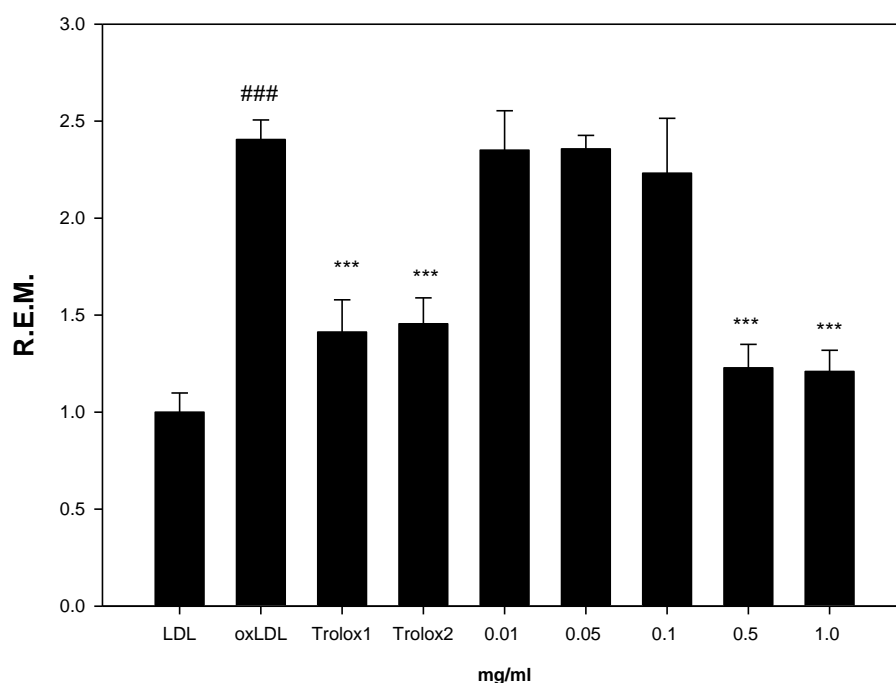


Figure.2 Relative Electrophoretic Mobility assay

(A)Effect of compound on CuSO₄ mediated oxidation and electrophoretic mobility of LDL. Lane 1 was control group (only LDL without CuSO₄). Lane 2 was native control ox-LDL(treat with CuSO₄). Lane 3-4 was positive control that treated with Trolox 0.5mM and 1 mM. Lane 5-9 treated with piper betel leaf 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg/ml. (B)The results from the agarose gel electrophoresis were quantified and expressed in the form of relative electrophoretic mobility (REM). The distance traveled in the agarose gel by the native LDL was assigned the arbitrary unit 1.

###P < 0.001 vs. native LDL ; ***P < 0.001 vs. oxLDL.

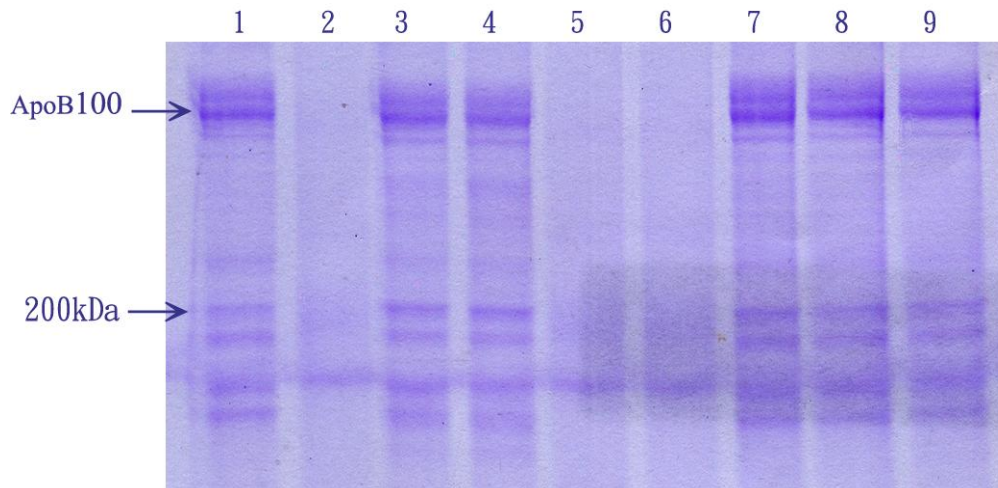


Figure.3 Electrophoresis of ApoB-100 Fragmentation

Effect of compound on the apoB-100 fragmentation.. Lane 1 was control group (only LDL without CuSO₄). Lane 2 was native control ox-LDL (treat with CuSO₄). Lane 3-4 was positive control that treated with Trolox 0.5mM and 1 mM. Lane 5-9 treated with piper betel leaf 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg/ml.

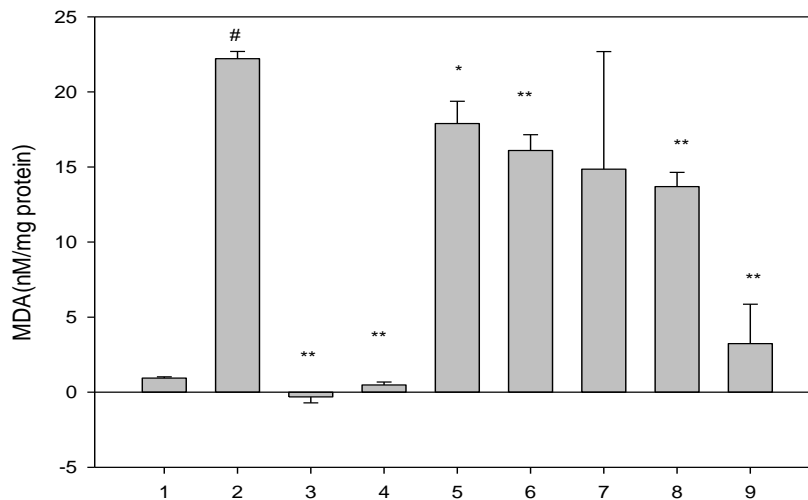


Figure.4 TBARS

Effects of piper betel leaf on copper-induced oxidation of LDL measured as a decrease in TBARS. Bar 1 was control group (only LDL without CuSO₄). Bar 2 was native control ox-LDL (treat with CuSO₄). Bar 3-4 was positive control that treated with Trolox 0.5mM and 1mM. Bar 5-9 treated with piper betel leaf 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg/ml.

#P < 0.001 vs. native LDL ; *P < 0.01, **P < 0.001 vs. oxLDL.

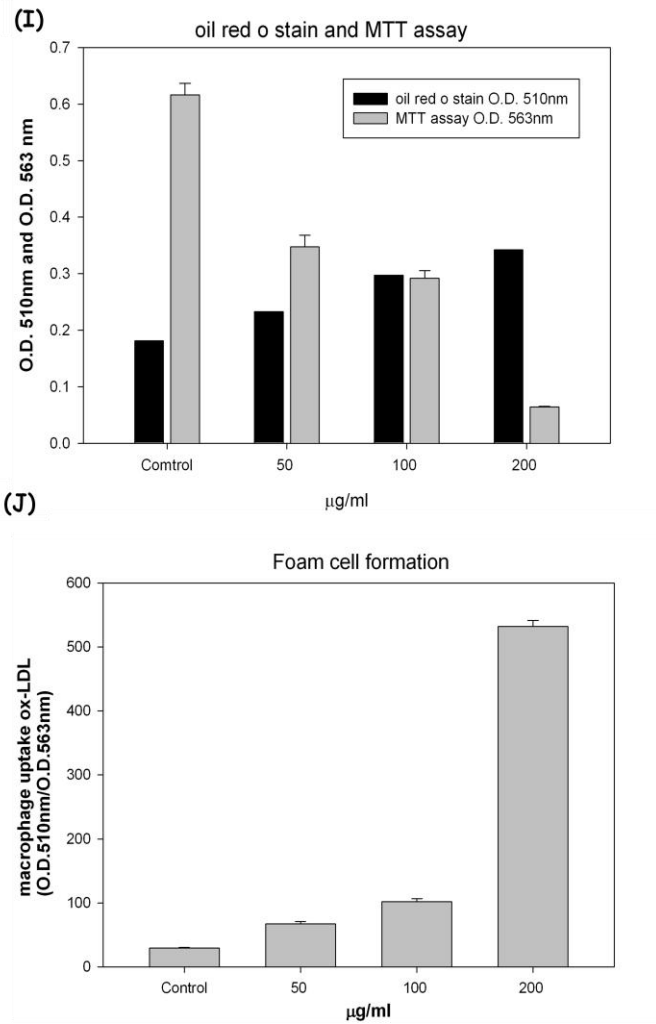
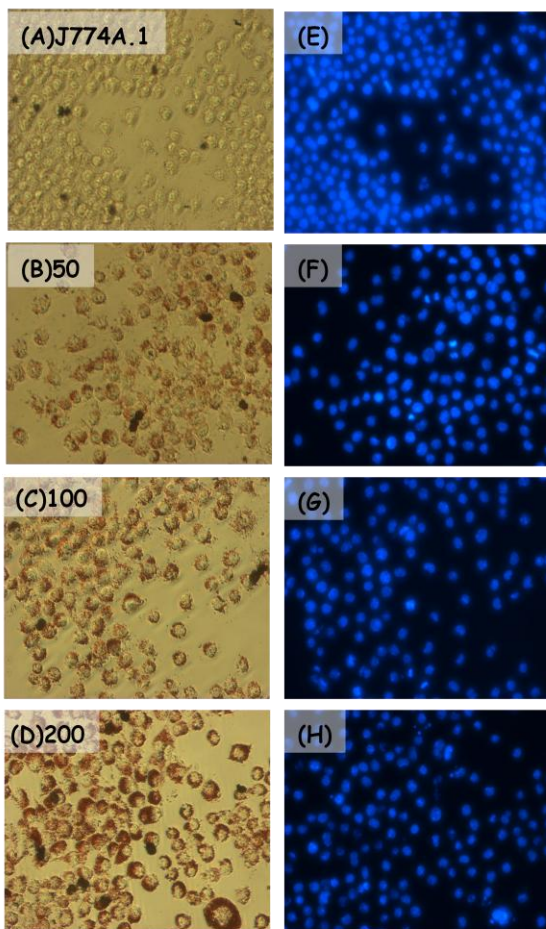


Figure.5 Macrophage uptake oxLDL in different concenterations.

J774A.1 cells was incubated with 50 、 100 and 200 μ g/ml oxLDL at 24 hours.(A) to (D) was stained foam cell by oil-red-o. (E) to (H) was stained cell nuclear by DAPI.(A) and (E) was control group (J774A.1 alone). (B) and (F) ,(C) and (G), (D) and (H) was treated with 50 、 100 and 200 μ g/ml oxLDL individually. (I) The oil-red-o-stained lipids and cytotoxicity were measured spectrophotometrically after isopropanol extraction. (J) macrophage uptake oxLDL ratio was 510nm value divided by 563 nm value.

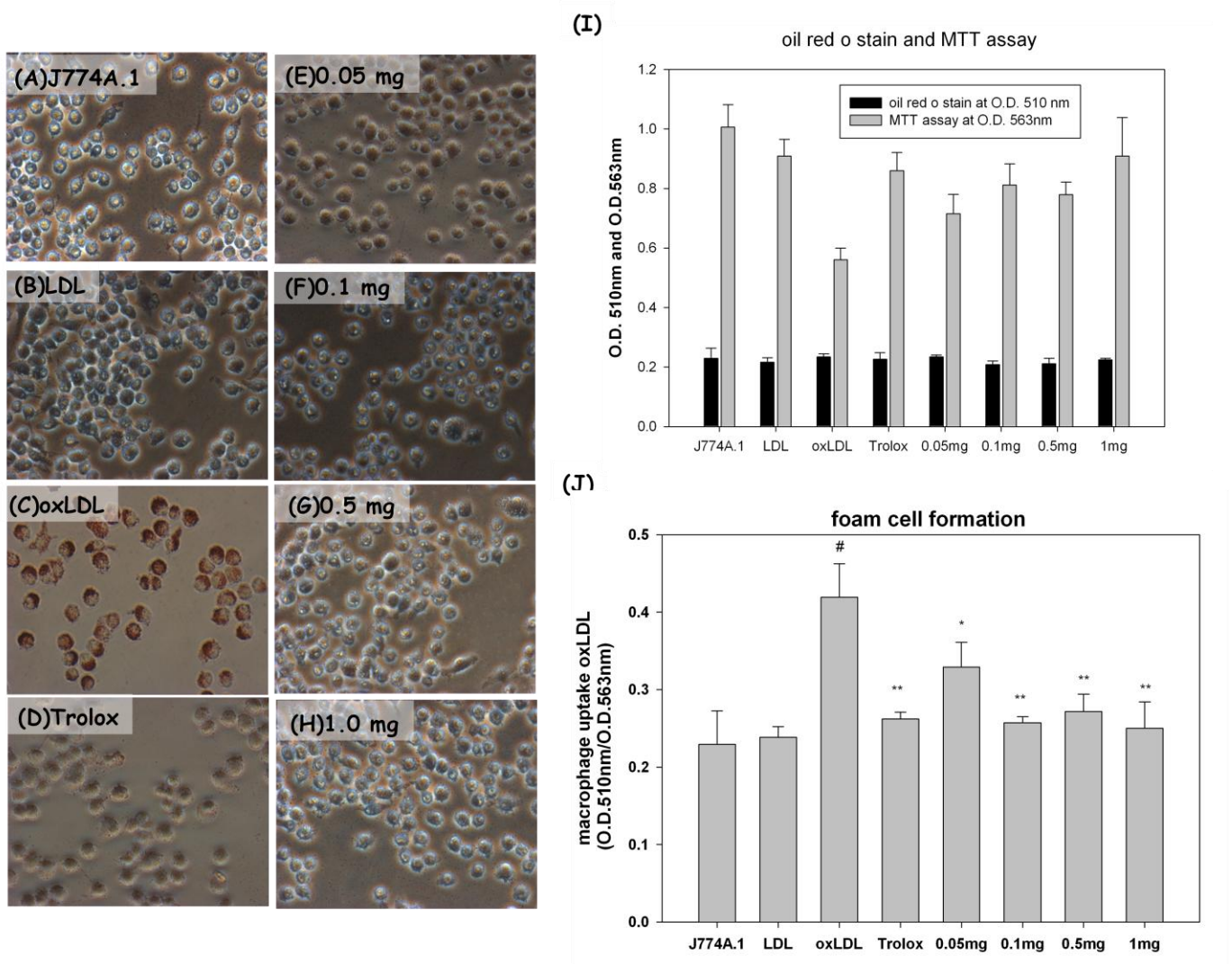


Figure.6 Inhibitory effects of piper betel leaf extracts(PBLs) on foam cell formation. J774A.1 cells were incubated in DMEM medium with samples for 24 hours. The samples were LDL treated with different concentration PBLs and CuSO₄. The cells were stained with oil red o and observed under the microscope. (A) Control: J774A.1 alone (B) native LDL : without CuSO₄ (C) oxLDL (D) positive : treated with Trolox (E) to (H) PBLs, 0.05~1.0 mg/ml. (I) The oil-red-o-stained lipids and cytotoxicity were measured spectrophotometrically after isopropanol extraction. (J) macrophage uptake oxLDL ratio was 510nm value divided by 563 nm value. #p<0.01 v.s. native LDL ; *p<0.05, **<0.01 v.s. oxLDL

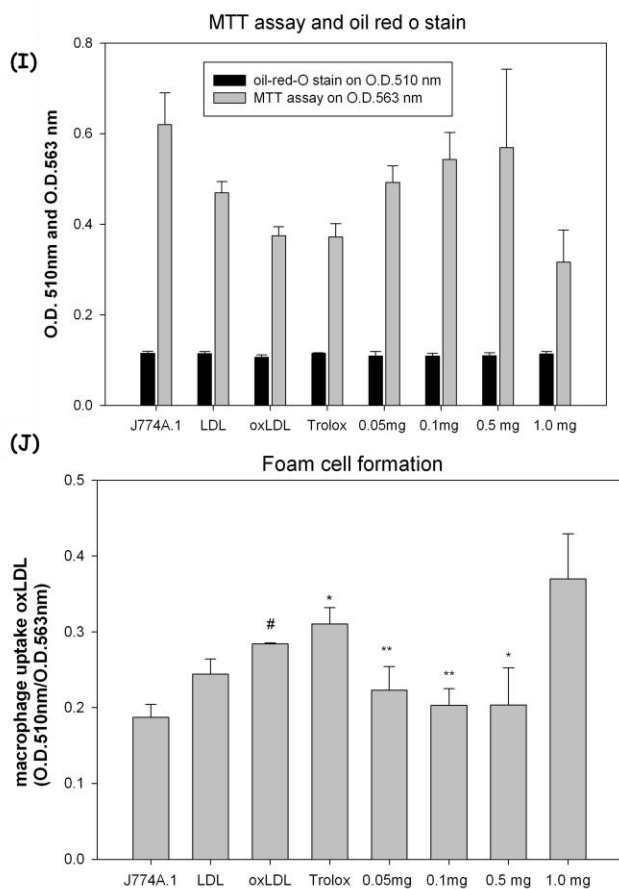
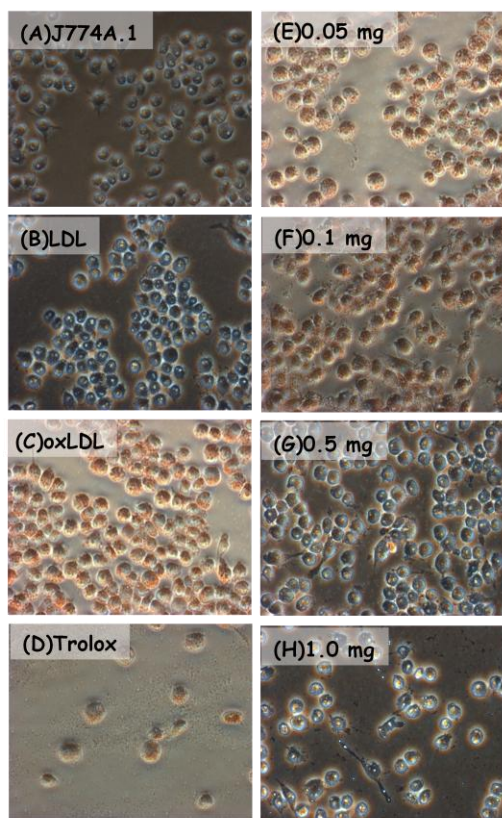


Figure.7 Inhibitory effects of piper betel leaf extracts(PBLs) on foam cell formation. J774A.1 cells were incubated in DMEM medium with Trolox(positive) and PBLs(0.05 mg~1.0 mg) and then added to 100 μ g/ml oxLDL at 37°C、5%CO₂ for 24 hours. (A-H) The cells were stained with oil red o and observed under microscope. (I)The oil-red-o stained lipid and cytotoxicity were measured spectrophotometrically after isopropanol extraction.(J) macrophage uptake oxLDL ratio was 510nm value divided by 563nm value.#p<0.05 v.s. native LDL, *p=0.05, **p<0.05 v.s. oxLDL.

	N	I	P25I	P50I	25	50
AST	162.8±19	210±27 ^{##}	177.3±16*	244±12.1	197±9.4 [#]	170.8±9.4
ALT	77±17.7	90±5.5	77.7±15.9	90.2±4.8	68±4.1	70.5±5.35
ALP	152.4±11	167.2±9.9	163.2±5.7	168.7±6.8	169.5±3.9 ^{##}	167.5±8.2 [#]
r-GT	5.2±2.2	5.8±2.6	7.5±2.7	6.5±1.6	4.5±2.1	6.7±1.86

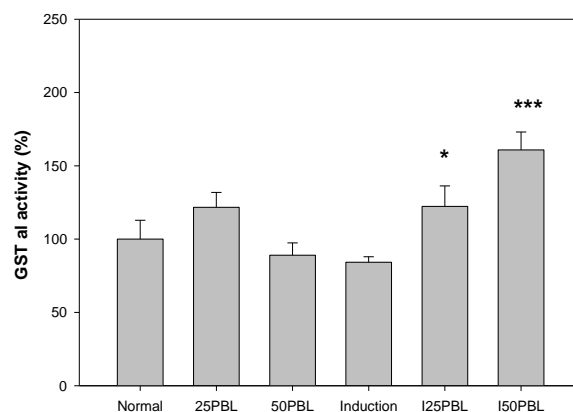
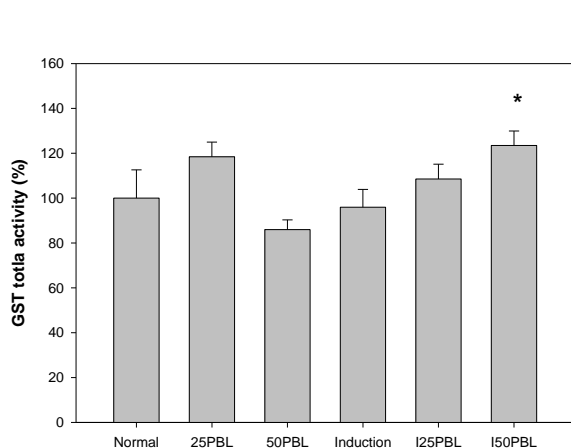
Table-3 Serum levels of GOT , GPT , ALP and r-GT of SD rats were on Acetaminophen-induce acute hepatic damage and supplement of PBL .

#P<0.05, ## P<0.01, the value was significantly different from that of normal group,

* P<0.05, ** P<0.01, the value was significantly different from that of induction group

(A)

(B)



(C)

(D)

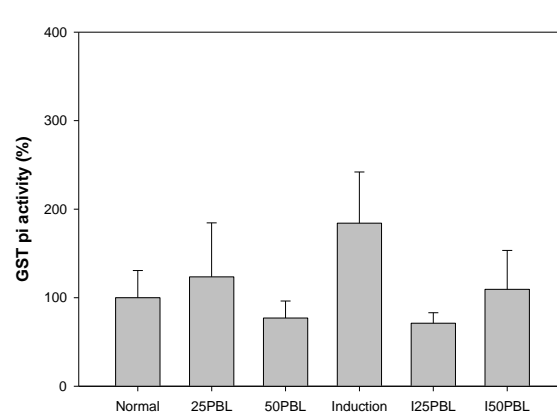
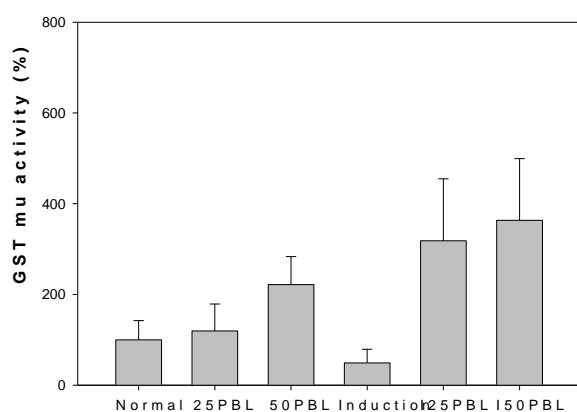


Figure.8 Effect of PBL extract on acute hepatic damage (A)total GST, (B)GST alpha, (C)GST mu and (D)GST pi activity after acetaminophen-induce. The data were presented as means ± SE, n=6. *P < 0.05 and *P<0.001 as compared with the induction group.**

	Control	Induction	A	B	C	D
GOT	131.875±10.3	157±15.6 ^{##}	144±23.4	312±19.98 ^{***}	126.75±5.15	134.75±6.63
GPT	55.88±7.66	65.5±5.83 ^{##}	50.38±6.48 ^{***}	111.5±5.98 ^{***}	53.63±3.06	48.75±3.69 [#]
r-GT	14±3.5	14.6±3.7	11.1±2.42 [*]	54.0±7.25 ^{***}	15.0±4.5	12.25±2.71
Alk-p	172.6±7.6	167.63±7.3	122.87±18.29 ^{***}	175.25±7.36 [*]	135.25±17.29 ^{###}	106.25±14.19 ^{###}
BUN	10.27±0.79	8.67±0.97 [#]	9.37±1.33	9.75±1.35	9.05±0.67 ^{###}	9.91±0.96
Cre	0.72±0.076	0.738±0.089	0.765±0.096	0.642±0.09 [*]	0.773±0.063	0.818±0.106 [#]

Table-4 .Serum levels of liver function in GOT , GPT , r-GT, Alk-p and kidney function in BUN and Cre. SD rats were on Acetaminophen -induce acute hepatic damage and supplement of PBL.

the value was significantly different from that of Normal group, # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001

* the value was significantly different from that of Induction group, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

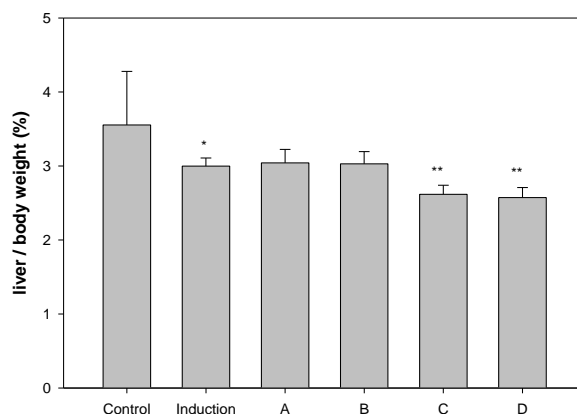


Figure-9 The rat body weight and liver weight in Acetaminophen- induce acute hepatic damage and supplement of PBL. A and B treat with APAP and PBL. (A) treat with PBL at 4 hour after APAP- induce. (B) treat with PBL at 4 and 10 hour after APAP- induce. (C) and (D) only treat with PBL. (C) at 4 and 10 hour. (D) at 4 hour. The value was means ± SD. *, p<0.05 compared with normal group; #, p<0.001 compared with AAF-treated group.

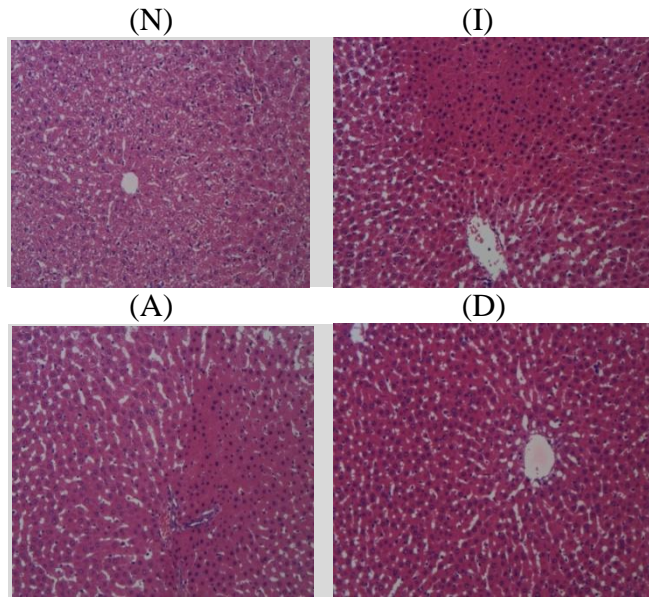


Figure-10 Effects of PBL on APAP-induced acute hepatic damage in the liver histological of rats. (N) Normal; (I) Induction(A) APAP-PBL 4 hr (D) PBL-4 hr.Liver sections were stained with hematoxylin and eosin. 400x.

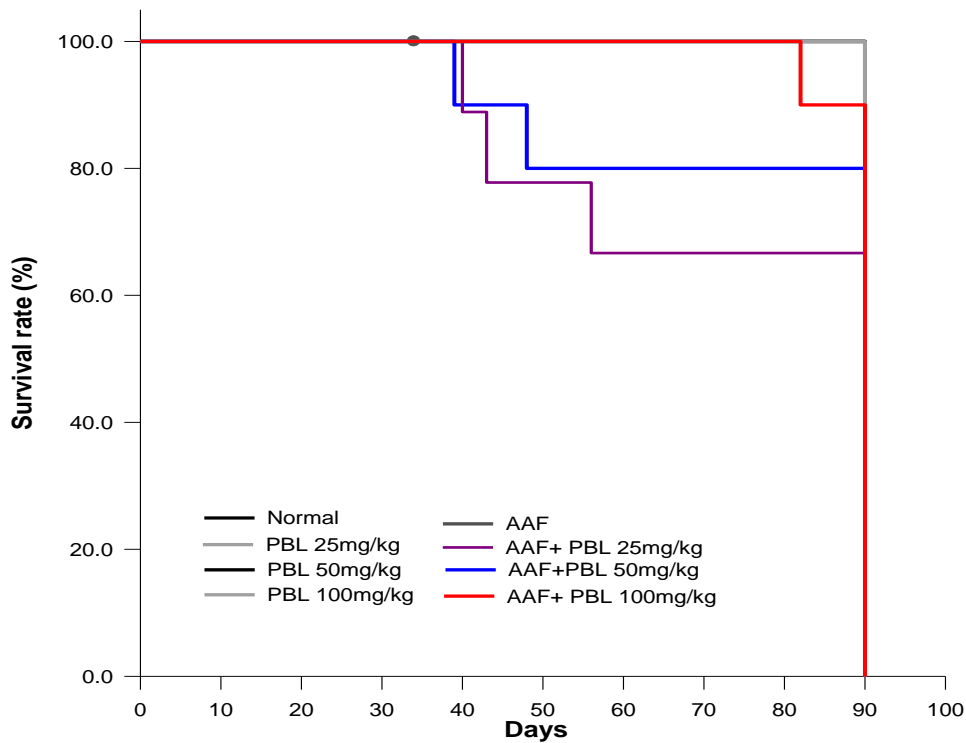


Figure.11 Cumulative survival curve showing that treatment with PBLs on AAF-induced rats

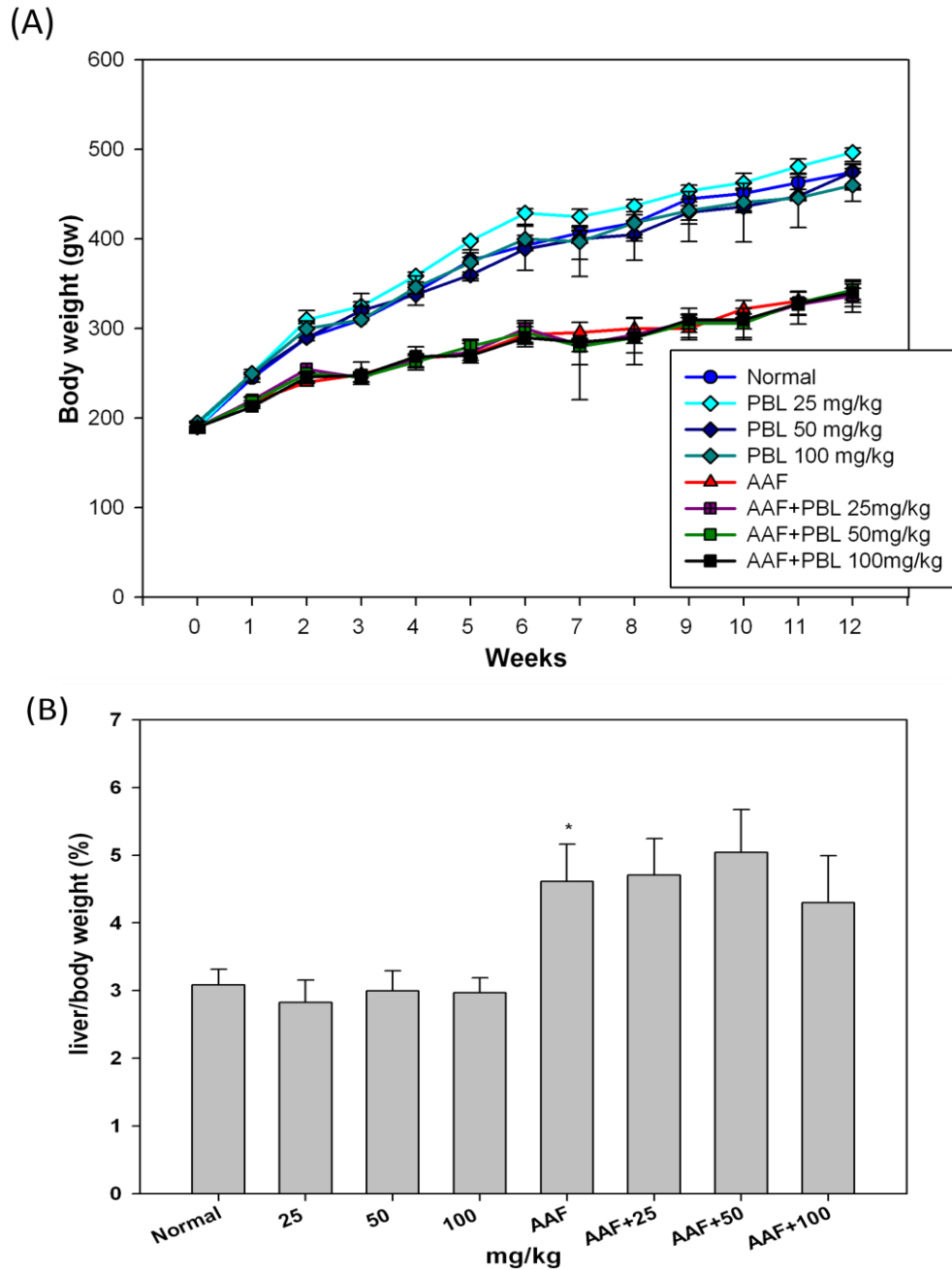
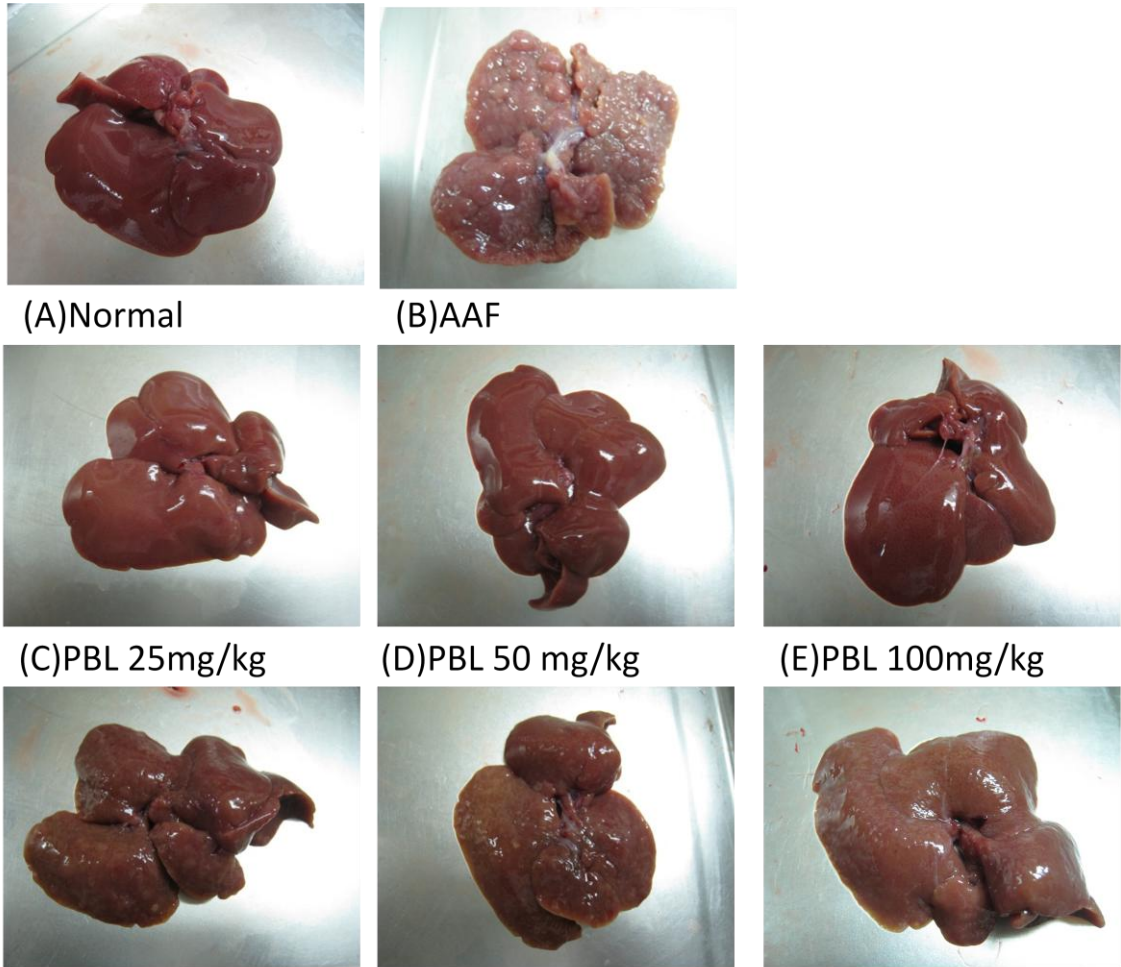


Figure.12 Changes of body weight and liver weight in Wistar rats fed on AAF and AAF supplemented with PBLs.(A) Changes of body weight in the rats fed normal diet(control), normal diet supplemented with PBLs 25,50 and 100 mg/kg , containing AAF(induction), induction diet supplemented with PBLs 25, 50 and 100 mg/kg. (B) Changes of liver weight in the rats fed with the eight diets. Data are shown as the mean \pm SEs, * $p < 0.001$ as compared with the control group.



(A)Normal (B)AAF (C)PBL 25mg/kg (D)PBL 50 mg/kg (E)PBL 100mg/kg (F)AAF + PBL 25mg/kg (G)AAF + PBL 50mg/kg (H)AAF + PBL 100mg/kg

Figure.13 Effect of PBLs on AAF-induced liver morphology of rats. (A) normal diet,(B)AAF(induction), (C) t o (E) normal diet supplemented with PBLs 25, 50 and 100 mg/kg, (F) to (G) AAF diet supplemented with PBLs 25, 50 and 100 mg/kg

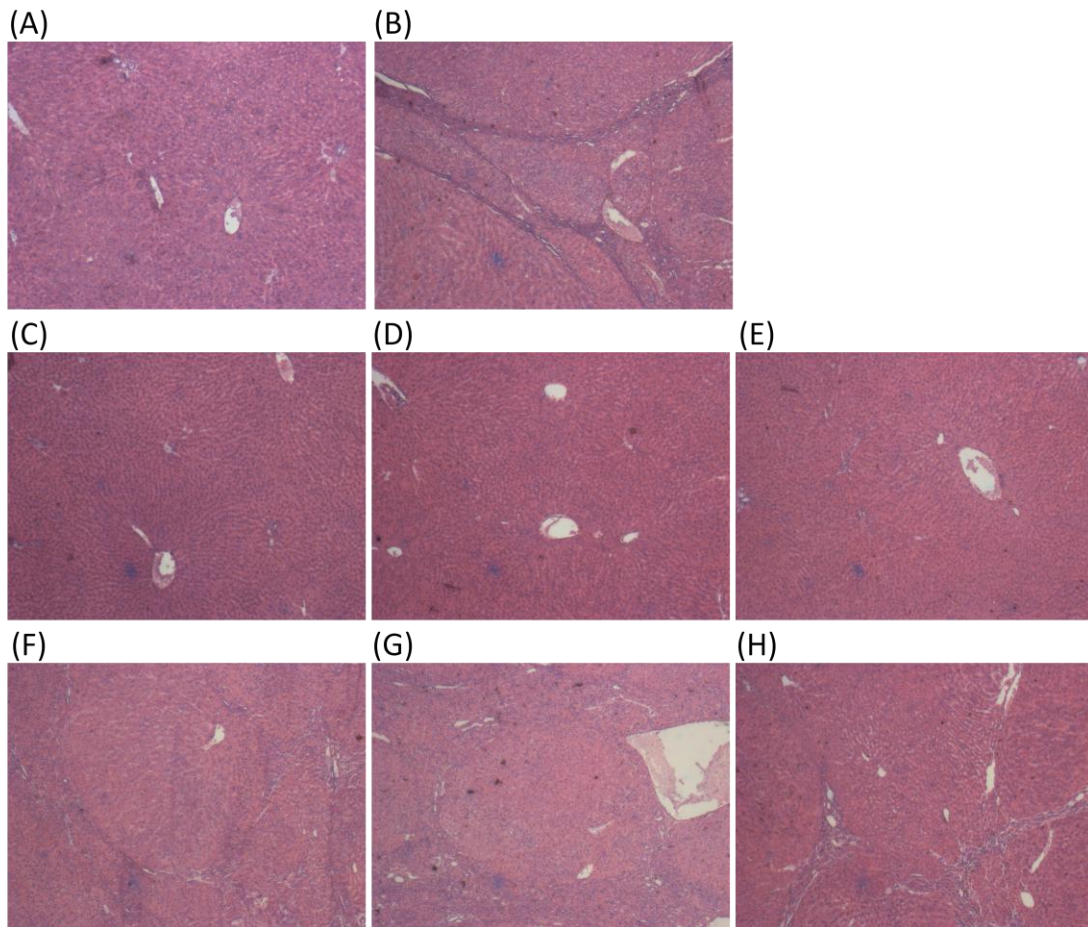


Figure.14 Effect of PBL on AAF-induced hepatocellular damage in the liver histological of rats.(A) Normal diet (B) AAF-induced (C) to (E) normal diet supplemented with PBLs 25, 50 and 100 mg/kg, (F) to (G) AAF diet supplemented with PBLs 25, 50 and 100 mg/kg. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin.

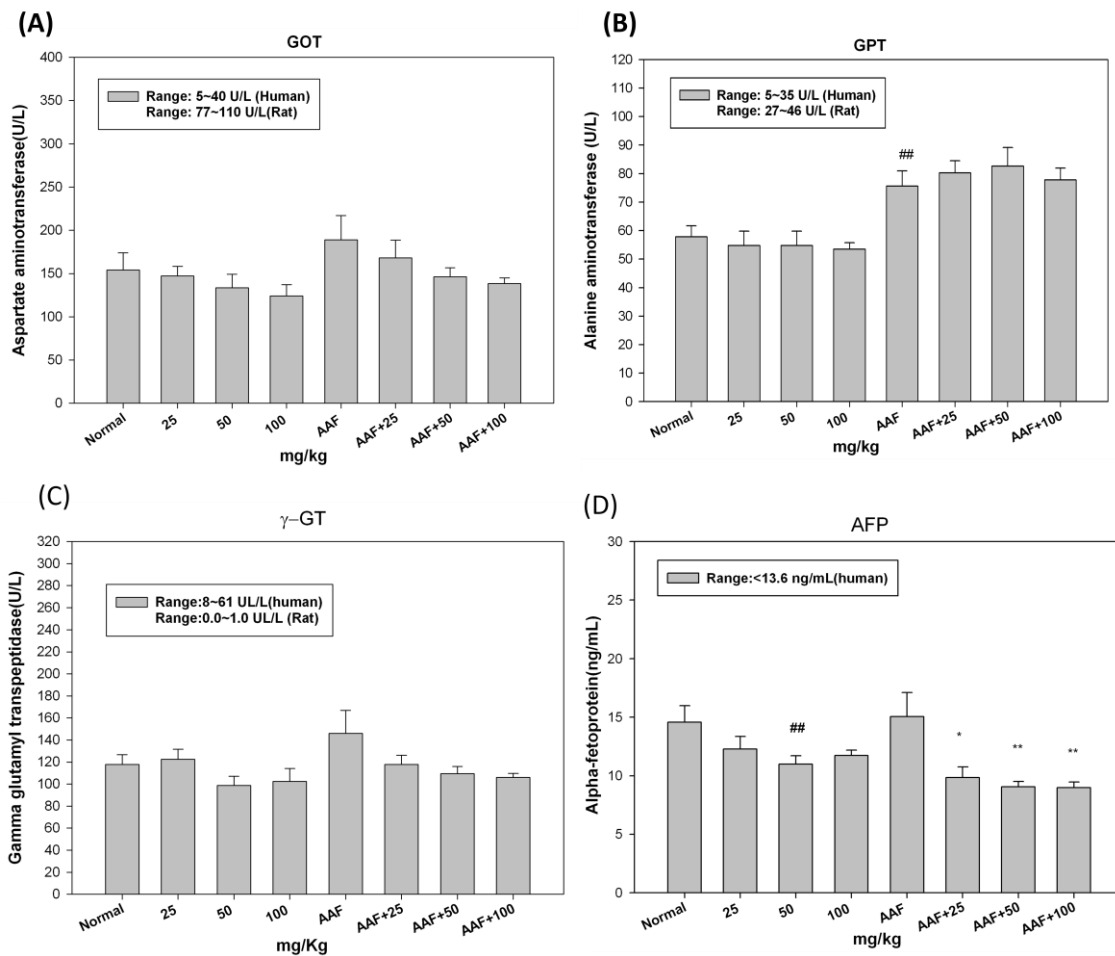


Figure.15 Effect of hepatic injury and hepatocarcinogenesis biomarkers on AAF-induced rats supplemented with PBLs or not. (A) GOT activity (B)GPT activity (C) γ GT level and (D) AFP level in plasma. Normal diet (control), group 25, 50 and 100mg/kg (without AAF), AAF(induction), AAF+25,50 and 100mg/kg (with AAF and supplemented with PBLs). Data are shown as the mean \pm SEs,##p<0.05 as compared with normal group,*p=0.05, **p<0.05 as compared with AAF group.

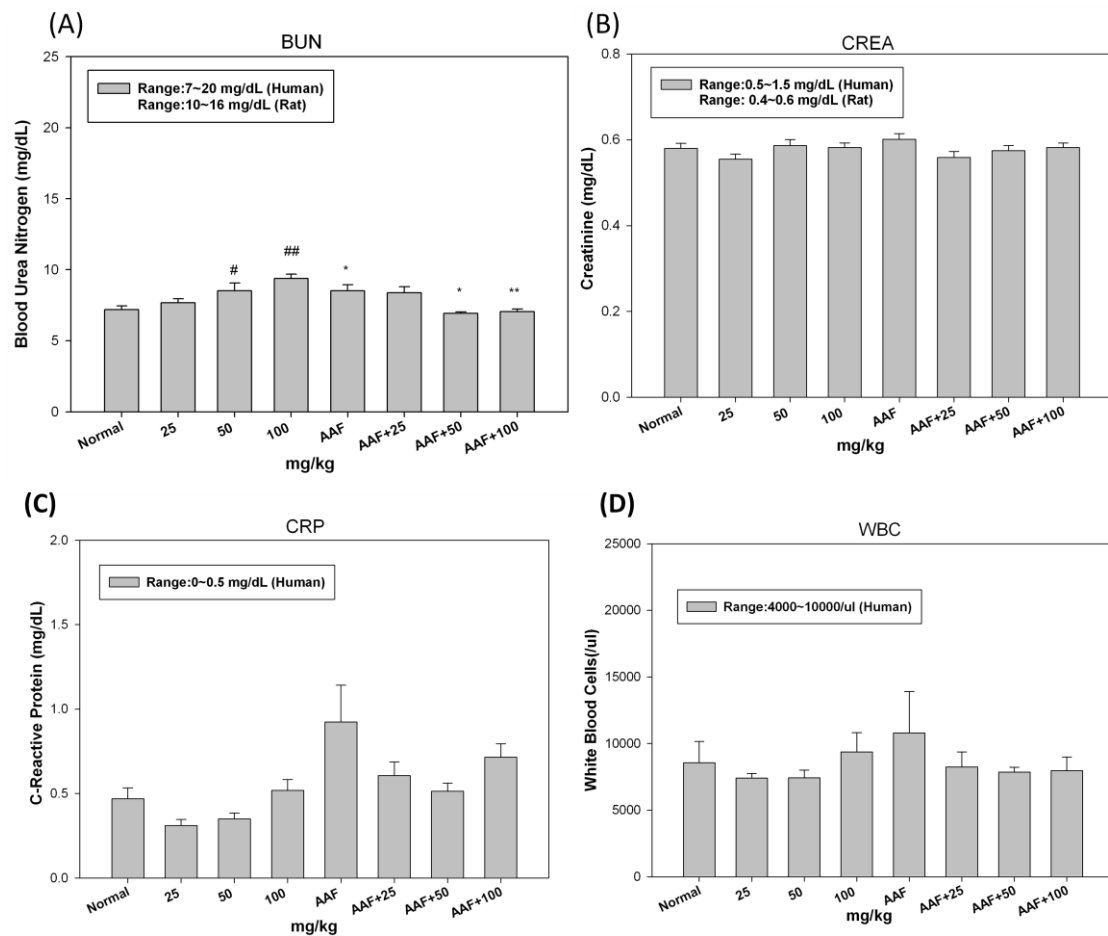


Figure.16 Effect of kidney function and inflammation biomarker on AAF-induced rats supplemented with PBLs or not. Kidney function biomarkers (A) BUN and (B) Cre (creatinine), Inflammation biomarker (C) CRP (c-reactive protein) (D) WBC (total white blood cells). Normal diet (control), group 25, 50 and 100mg/kg (without AAF), AAF(induction), AAF+25,50 and 100mg/kg (with AAF and supplemented with PBLs). Data are shown as the mean±SEs, #p=0.05,##p<0.001 as compared with normal group, *p<0.05,p<0.01 as compared with AAF group.**

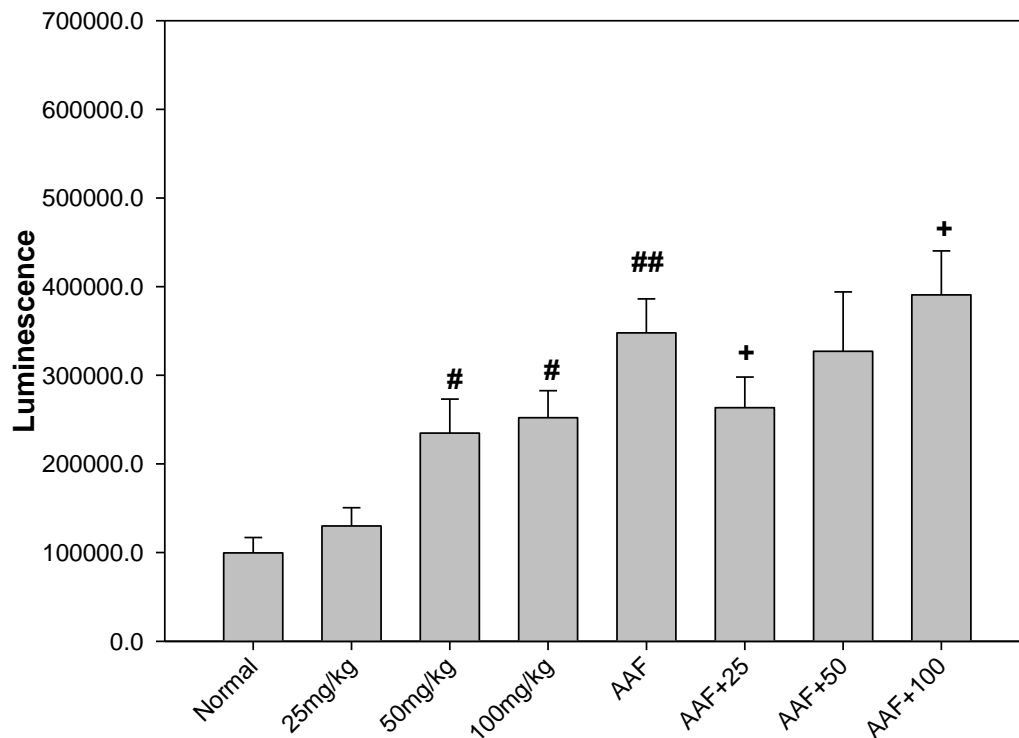


Figure.17 Cytochrome p450 1A2 activity.

Effect of cytochrome p450 1A2 activity on AAF-induces and PBLs supplement group . Normal is control group(Normal diet), AAF is induction group (normal diet contain 0.025% AAF), PBLs group (tube feeding 25,50 and 100 mg/kg), AAF combined with PBLs(25,50 and 100 mg/kg) groups.

Significantly ($p < 0.01$) different when compared to normal diet group.

##Significantly($p < 0.001$) different when compared to normal diet group.

+ Significantly($p < 0.05$)different when compared towith or without PBLs.

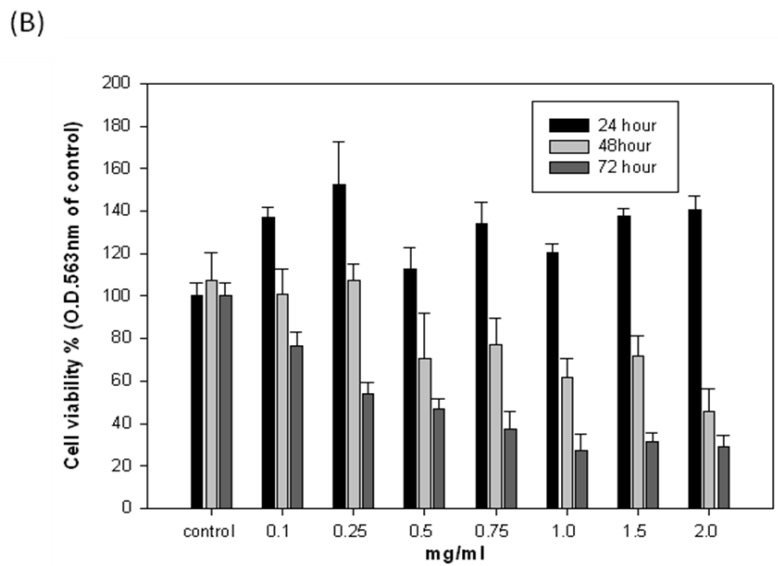
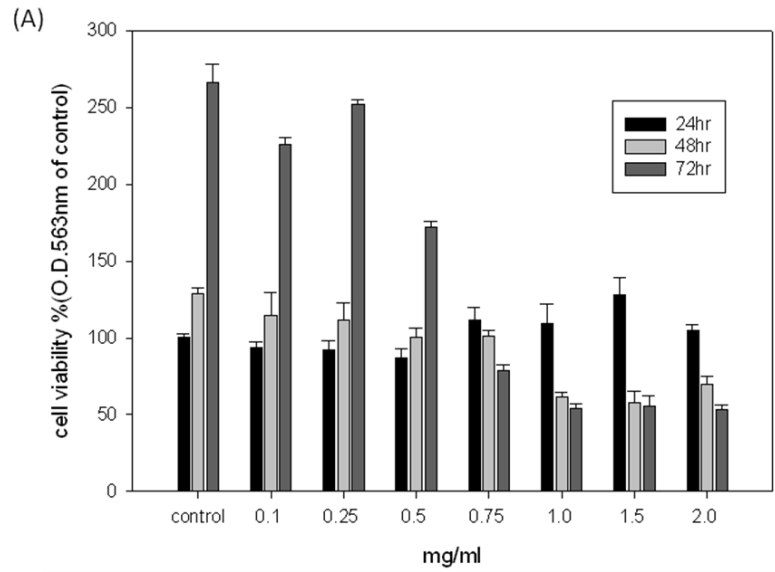


Figure.18 Effects of PBLs on the cell viability. (A) normal cells (WRL68). (B) hepatocellular carcinoma cells (Hep3B2.1-7). Cells were treated with 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 or 2 mg/ml of PBLs for 24, 48 and 72 hours. The data were expressed as a percentage of control (dose 0), and presented as mean \pm SD form three independent experiments.

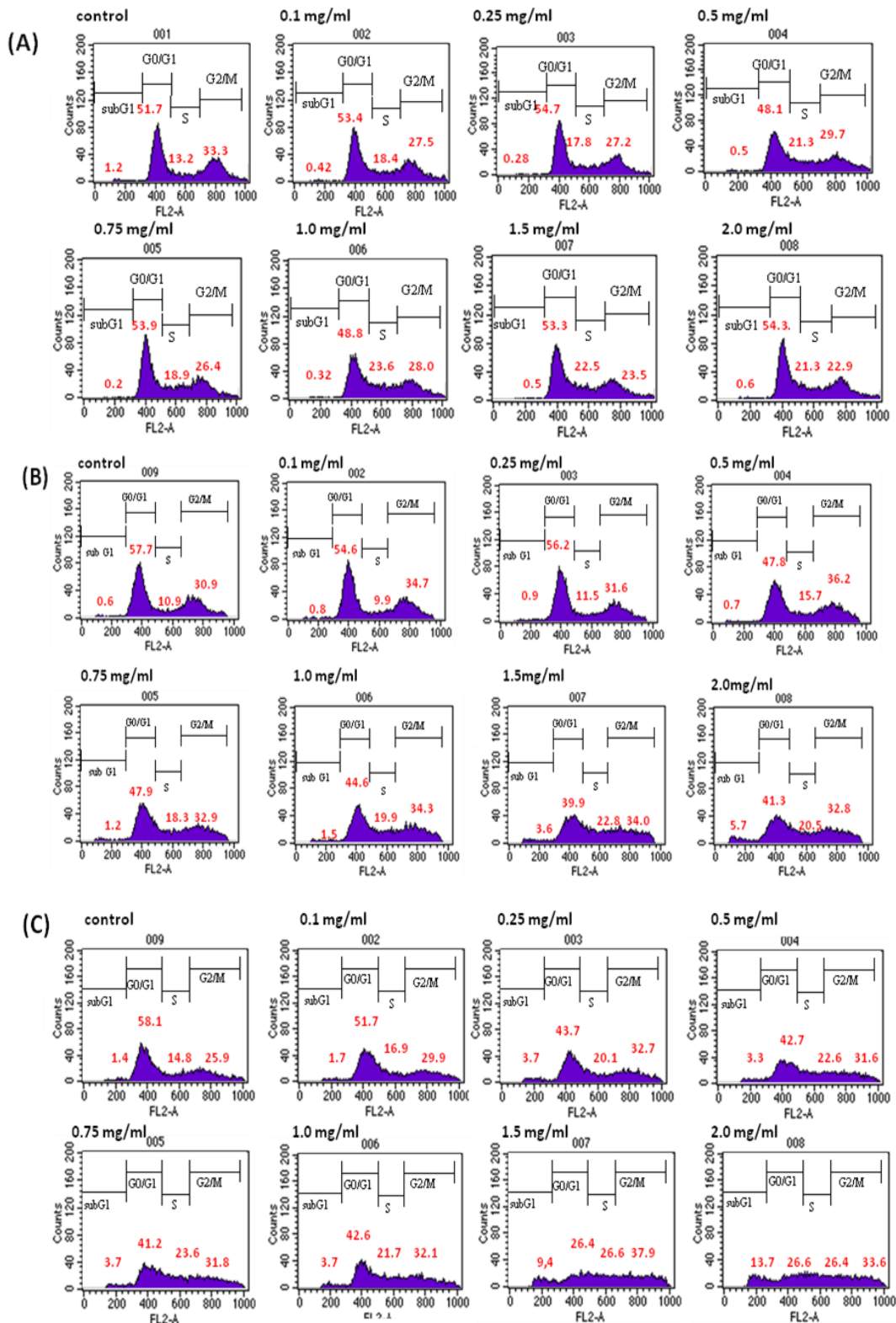


Figure.19 Effect of PBLs on cell cycle distribution of Hep3B2.1-7 cells. Cell were treated with PBLs (A) 24 hours, (B) 48 hours, (C) 72 hours and stained with propidium iodide for FACSscan analysis. Histograms of flow cytometry analysis for cell population with counts versus propidium iodide staining intensity were evaluated by Cell-Quest software.

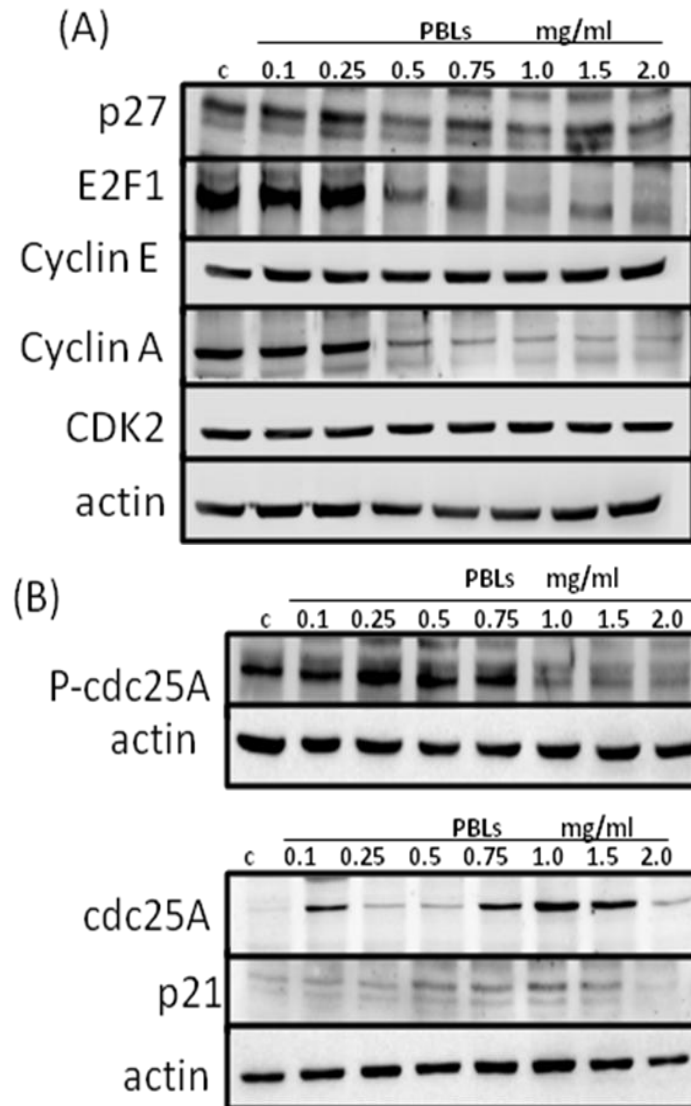


Figure.20 Effects of PBLs on the expression of cell cycle regulator protein. Hep3B2.1-7 cells were treated with PBLs at a concentration of 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 and 2 mg/ml for 48 hours, then subjected to Western blotting to analyze. (A) CDK2 , Cyclin A, Cyclin E, E2F1 and p27. (B) p-cdc25A, cdc25A, p21.

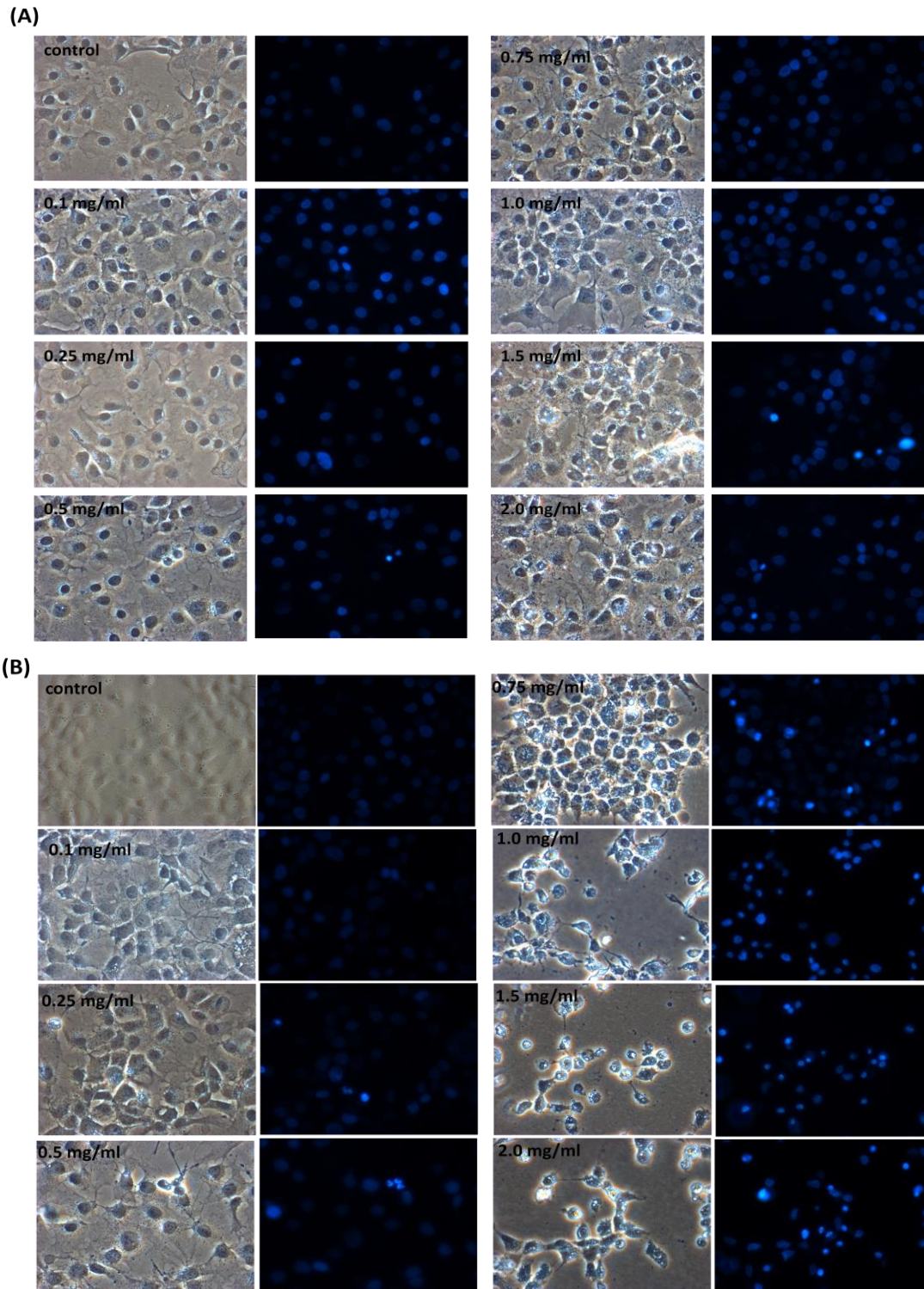


Figure 21.Effect of PBLs on DAPI stain cell morphology. Hep3B2.1-7 cells treated with 0~2.0 mg/ml PBLs at (A)24, (B) 48 hours.

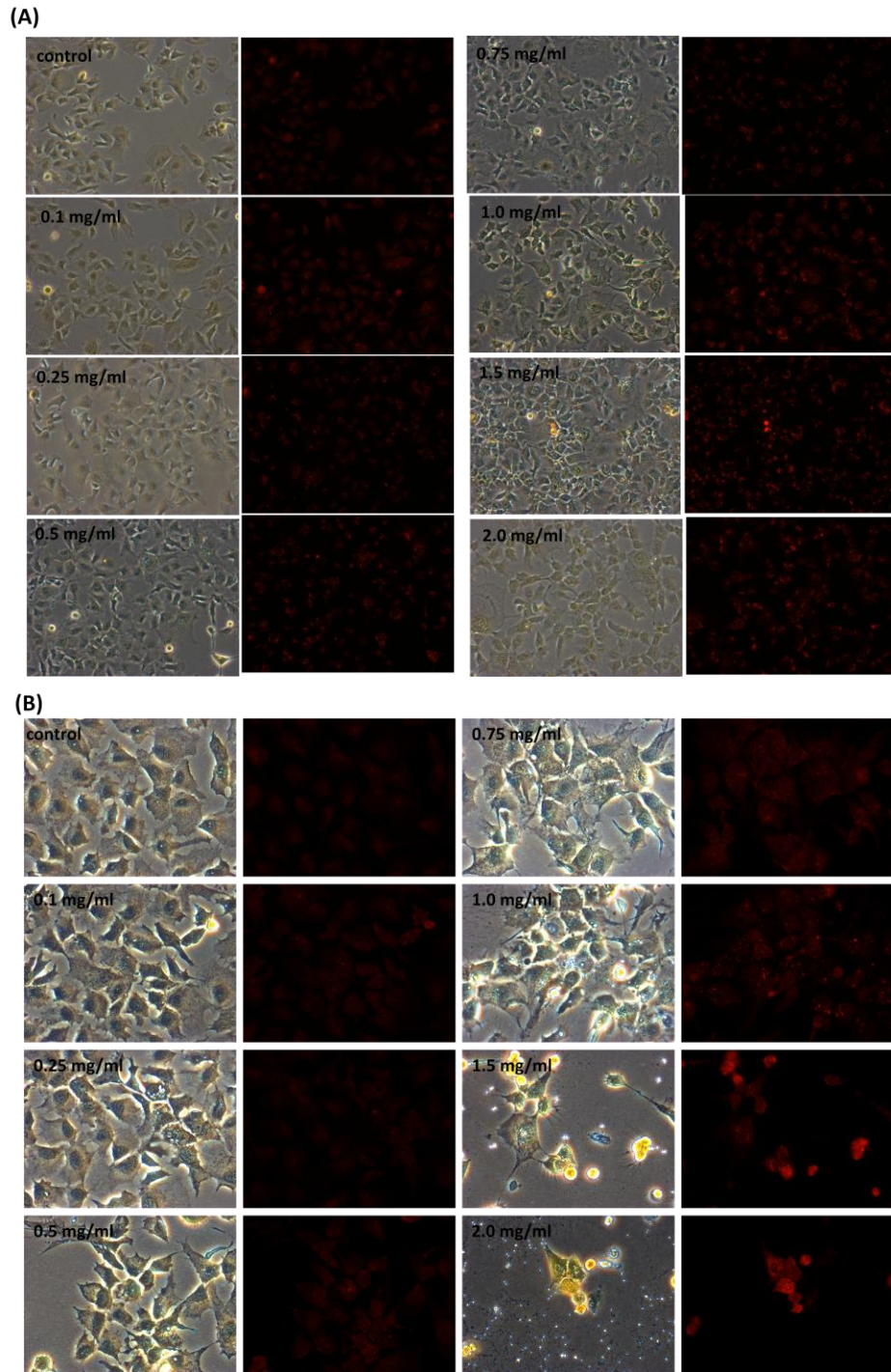


Figure 22.Effect of PBLs on AVO stain cell morphology. Hep3B2.1-7 cells treated with 0~2.0 mg/ml PBLs at (A)24, (B) 48 hours.

(A)

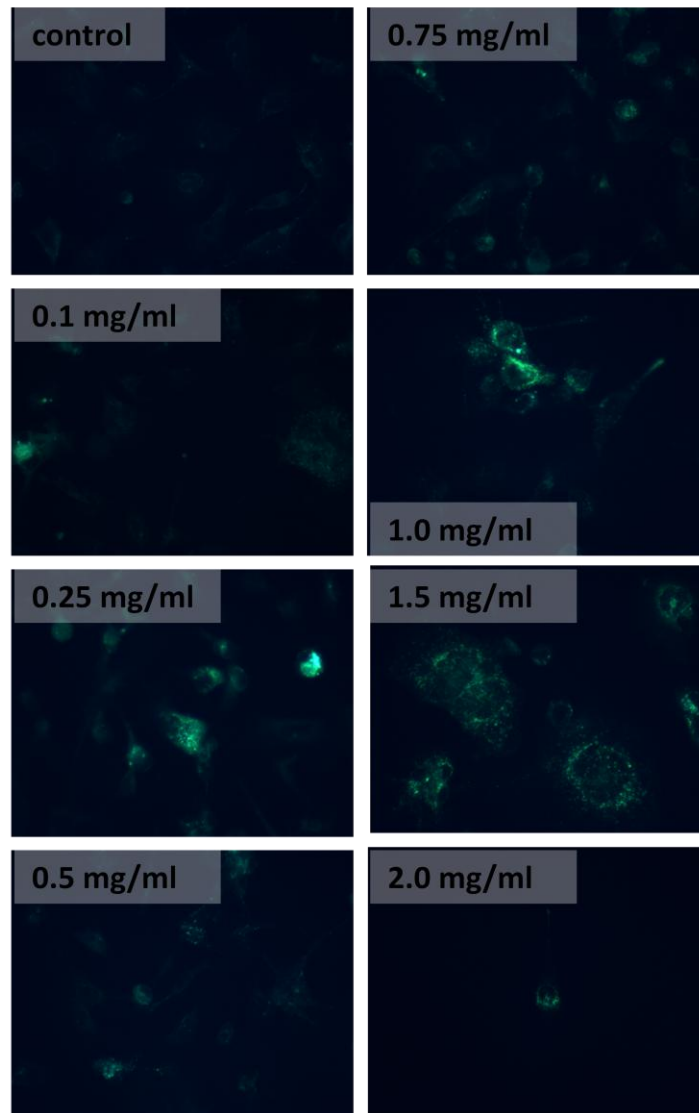


Figure 23.Effect of PBLs on MDC stain cell morphology. Hep3B2.1-7 cells treated with 0~2.0 mg/ml PBLs at 48 hours

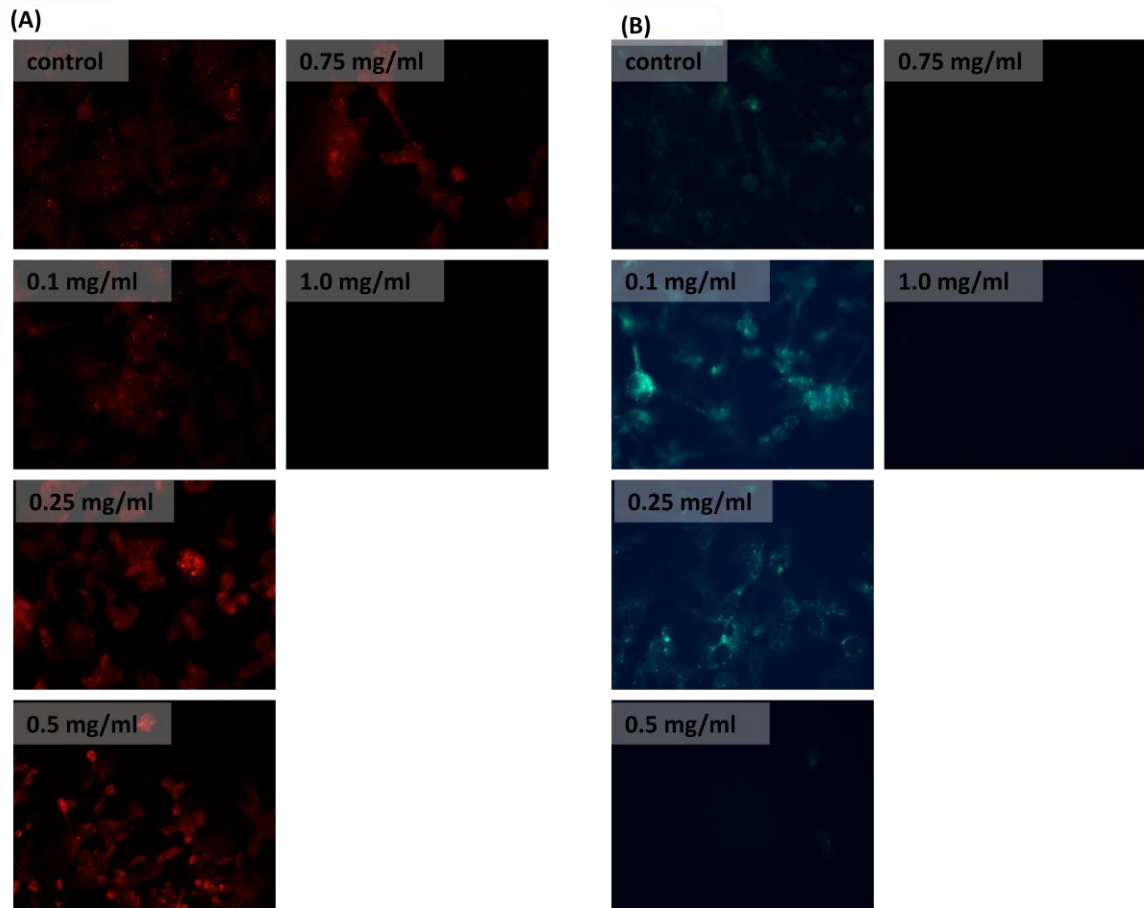


Figure 24. Effect of PBLs on AVO and MDC stain cell morphology. Hep3B2.1-7 cells treated with 0~2.0 mg/ml PBLs at 72 hours. (A) AVO stained (B) MDC stained

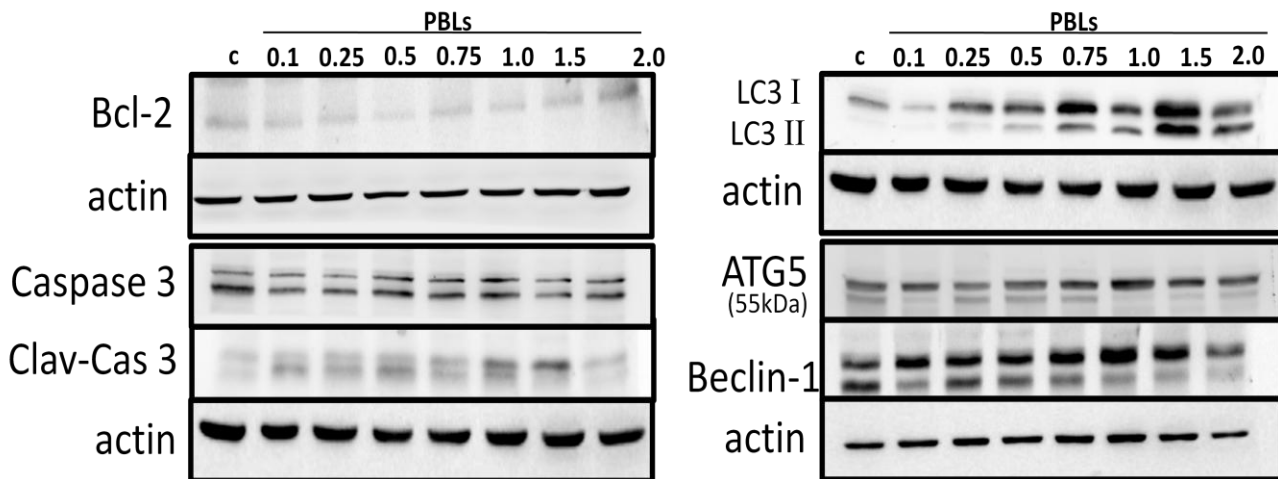


Figure 25. Effects of PBLs on the expression of programmed cell death protein. Bcl-2 is anti-apoptosis protein. Caspase-3 and cleavage-caspase-3 are downstream of apoptosis. LC3, ATG5 and Beclin-1 are autophagy-regulate protein.

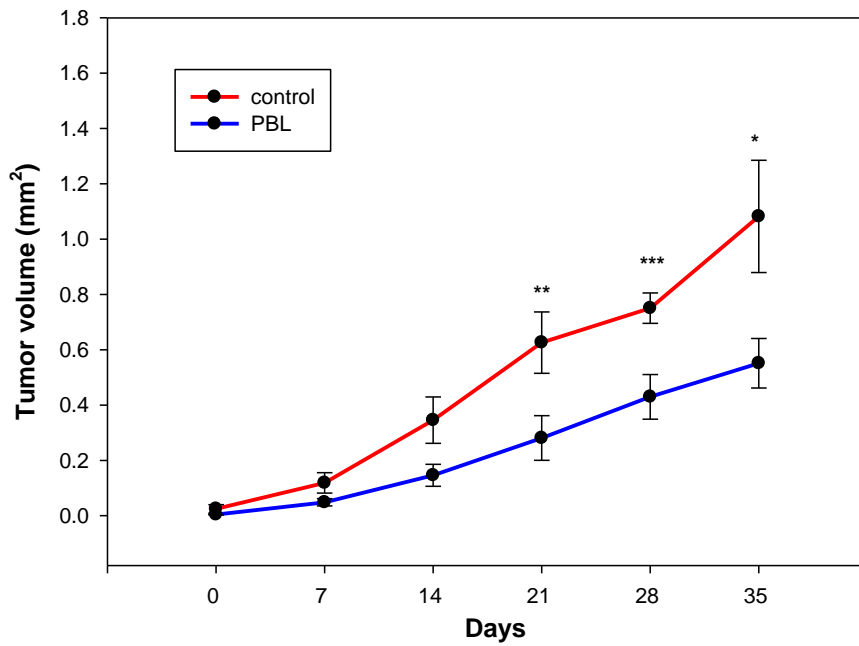


Figure.26 Effect of PBLs treatment on the growth of human xenograft tumor in nude mice. Nude mice bearing Hep3B2.1-7 were treated for 6 weeks with tube feeding PBLs (A) 1mg/days and (B) 10 mg/day, 5 d/wk. Weekly measurements of tumor size. Tumor volume formula: $V = L \times W^2 \times 0.52$. Significantly different from control group, $p^* = 0.05$, $p^{**} < 0.05$, $p^{***} = 0.01$

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式

99年5月5日本會第304次學術會報修正通過

一、說明

國科會基於學術公開之立場，鼓勵一般專題研究計畫主持人發表其研究成果，但主持人對於研究成果之內容應負完全責任。計畫內容及研究成果如涉及專利或其他智慧財產權、違異現行醫藥衛生規範、影響公序良俗或政治社會安定等顧慮者，應事先通知國科會不宜將所繳交之成果報告蒐錄於學門成果報告彙編或公開查詢，以免造成無謂之困擾。另外，各學門在製作成果報告彙編時，將直接使用主持人提供的成果報告，因此主持人在繳交報告之前，應對內容詳細校對，以確定其正確性。

本格式說明之目的為統一成果報告之格式，精簡報告內容之篇幅以4至10頁為原則，完整報告內容之篇幅不得少於10頁。

成果報告繳交之期限及種類(精簡報告、完整報告、期中精簡報告、期中完整報告等)，應依本會補助專題研究計畫作業要點及專題研究計畫經費核定清單之規定辦理。

二、報告格式：依序為封面、目錄(精簡報告得省略)、中英文摘要及關鍵詞、報告內容、參考文獻、計畫成果自評、可供推廣之研發成果資料表、附錄。

(一)報告封面：請至本會網站(<http://www.nsc.gov.tw>)線上製作(格式如附件一)。

(二)中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

(三)報告內容：包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論(含結論與建議)……等。

(四)計畫成果自評部分：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，並請至本會網站線上製作。(格式如附件二)

(五)頁碼編寫：請對摘要及目錄部分用羅馬字I、II、III……標在每頁下方中央；報告內容至附錄部分請以阿拉伯數字1.2.3……順序標在每頁下方中央。

(六)附表及附圖可列在文中或參考文獻之後，各表、圖請說明內容。

(七)可供推廣之研發成果資料表：

1.研究計畫所產生之研發成果，應至國科會科技研發成果資訊系統(STRIKE系統，<https://nscnt66.nsc.gov.tw/strike/>)填列研發成果資料表(如附件三)，循執行機構行政程序，由研發成果推廣單位(如技轉中心)線上繳交送出。

2.每項研發成果填寫一份。

(八)若該計畫已有論文發表者(須於論文致謝部分註明補助計畫編號)，得作為成果報告內容或附錄，並請註明發表刊物名稱、卷期及出版日期。若有與執行本計畫相關之著作、專利、技術報告、或學生畢業論文等，請在參考文獻內註明之。

三、計畫中獲補助國外或大陸地區差旅費、出席國際學術會議差旅費或國際合作研究計畫差旅費者，須依規定分別撰寫心得報告，並至本會網站線上繳交電子檔，心得報告格式如附件四、五、六。

四、報告編排注意事項

(一)版面設定：A4紙，即長29.7公分，寬21公分。

- (二)格式：中文打字規格為每行繕打（行間不另留間距），英文打字規格為 Single Space。
- (三)字體：以中英文撰寫均可。英文使用 Times New Roman Font，中文使用標楷體，字體大小以 12 號為主。

附件四

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：100 年 3 月 25 日

計畫編號	NSC97-2320-B-040-030-MY3		
計畫名稱	荖葉水萃取物回復肝功能保健功效之探討		
出國人員姓名	吳佩芳	服務機構及職稱	生化暨生物科技研究所博士生
會議時間	100 年 3 月 15 日至 100 年 3 月 18 日	會議地點	美國拉斯維加斯 內華達州立大學
會議名稱	(中文)功能性食品對於慢性疾病之科學研究與執行 (英文)Functional Foods and Chronic Diseases :Science and Practice		
發表論文題目	(中文)荖葉對於人類肝癌細胞 Hep3B2.1-7 經由誘導 S Phase arrest 造成細胞毒性 (英文) Cytotoxic activities of Piper betel leaves on human hepatocellular carcinoma Hep3B2.1-7 cells by induction of S phase arrest		

一、參加會議經過

本次第八屆的功能性食品研討會，舉辦於美國拉斯維加斯的內華達州立大學，主要是在探討功能性食品對於慢性疾病的研究與執行，其中在本次會議慢性疾病包括了糖尿病、肥胖、心血管疾病以及癌症，除此之外也討論了功能性食品對於人類健康補給以及療效等。主辦單位將主題區分為六大部分，分別是(一)Functional Foods for Diabetes (二)Functional Foods for Obesity (三)Functional Foods for Cardiovascular Diseases (四)Functional Foods for Cancer (五)Functional Food in Health and Diseases (六)Functional Food Products as Therapeutics.本次會議於三月十五、十六日整天以及十七日上午皆有安排演講者。三月十五日主要的講題為 Cancer 和 Obesity。十六日的講題是 Diabetes 以及 Functional Foods in Health and Disease。十七日則是 Development of Functional Food Products。本次會議安排了 31 為演講者以及 103 位參與海報論文的展出，參與學者有來自於美國、印度、澳洲、巴基斯坦、埃及、紐西蘭、波蘭、巴西、匈牙利以及台灣等多個國家。以下為大會安排的演講者與講題分別如下：

(1) March 15th

1. "Lipid Replacement Therapy: a Functional Food Approach for Reducing Cancer-Associated Fatigue and Adverse Effects of Cancer Therapy."

Professor Garth L Nicolson, Laguna Beach, California, USA

2. "The Cancer inhibition acts of phytochemicals from fruits and vegetables grown in Egypt."

Professor Ahmed M. Aboul-Enein, Cairo University, Egypt

3. "Ceramic Nanocarriers with Modified Lactoferrin for Cancer and Bio-Distribution through MRI."

Professor Jagat R. Kanwar, Deakin University, Australia

4. "Cytotoxic effects of Litsea cubeba extracts on human breast cancer cell line MCF7"

Professor Shyang-Chwen Sheu, Pingtung, Taiwan

5. "Attenuation of Dyslipidemia in Mice Chronically Fed on a Diet Containing Red Kidney Beans (Phaseolus Vulgaris L.)"

Professor Wen-Jun Shen, Stanford University, California, USA

6. "Diacylglycerol for Obesity-Serotonin Hypothesis"

Professor Hidekatsu Yanai, Kohnodai Hospital, Chiba, Japan

7. "Effectiveness of Weight Control Program on the Healthy Promoting school"

PhD student Hsiu-Mei Huang, Taipei, Taiwan

8. "Inverse correlation between leptin sensitivity and susceptibility to high-fat induces obesity in Sprague Dawley rats"

Professor Yi Zhang, Gainesville, Florida

9. "The effect of high calcium and vitamin D Fortified Milk on Anthropometric induces of Post Menopausal Women"

Professor Mario V. Capanzana, Taguig City, Philippines

10. "Resveratrol : Expanding Roles in Cardiovascular Disorders"

Professor Nilanjana Maulik, Farmington, Connecticut, USA

11. "Ready-to-Drink Fortified Juice Resulted in Improved Iron and Zinc Status of schoolchildren."

Professor Imelda Angeles-Agdeppa, Taguig City, Philippines

12. "Dietary cinnamon supplementation and changes in systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes."

Professor Mona Boaz, Wolfson Medical Center, Holon, Israel

(2) March 16th

1. "Ceylon cinnamon does not affect postprandial plasma glucose or insulin in subjects with impaired glucose tolerance."

Professor Jennie Wickenberg, Malmö, Sweden

2. "Hypoglycemic effect of an extract from date seeds on diabetic rats."

Professor Ahmed El Fouhil, King Saud University, Saudi Arabia

3. "Natural Herbal Plant Extracts as Antioxidant and Anticancer Agents in Egypt."

Professor Hany A. El-shemy, Cairo University, Cairo, Egypt

4. "Commonly consumed fruits in the Philippines: are they good and safe for diabetics?"

Professor Trinidad P. Trinidad, Taguig City, Philippines.

5. "Inhibitory potential of some traditionally consumed fruits and plant materials against fructose induced glycation of albumin."

Professor Snehal Gite, Pune, India

6. "Lipid profiles of the skin, muscle and liver of greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*): Dietary

Implications.”

Professor Emmanuel Ilesanmi Adeyeye, Ado Ekiti Nigeria

7. “Bacopa monnieri inhibits the activity of Capase-1 and 3, and the matrix metalloproteinase MMP3”

Professor Diana I. Lurie, Missoula, MT, USA

8. “Analysis of Vitmain C in fruit juices in different periods and types of storage”

Professor Daniela Maria Alves Chaud, Universidade Presbiteriana Mackenzie-São Paulo,Brazil

9. “Functional Food Availability, a Limitation to people’ s Health in Island”

Professor Rameshwar Sarma, Kraladjik Bonaire, Netherlands Antilles

10. “Medicinal and Nutraceutial Properties of Hot Pepper(Capsicum spp.) and Bitter Melon(Momordica charabtia L.)

Professor Mohammad Jalaluddin,AR,USA

11. “Body composition and its associated CHD risk factors in apparently middle ages men.”

Sujatha D, Andhra Pradesh, India

12. “Fighting Dysphagia with Orally Disintegrating Tablets.”

Professor Jason McConville ,Texas,USA

13. “Effects of irregular menstruation on transport of folate mediated by plasma membrane transporters in syncytiotrophoblast tissue”

Professor Xiaokun Cai, Washington Ashington, USA

14. “Morinda citrifolia L. improves the Quality of life in adults with Osteoaethritis”

Master Mian-Ying Wang, Rockford,IL, USA

(3) March 17th

1. “Development and commercialization of specific functional food products”

Professor Danik M. Martirosyan,Texas,USA

2. “Development of natural component-based unique functional foodstuffs with enhanced prebiotic effect.”

Professor Attila Kiss, Hungary

3. “Natural antioxidant activity of commonly consumed foods in India and effect of heat treatment of green leafy vegetables.”

Professor Dande Sreeramulu,Hyderabad,India

4. “Development of antioxidant rich barkery products by mailard reaction and newly described transformation products”

Professor Diana Virag, Hungary

5. “Characterization of defatted maize germ as a source of dietary fiber and protein to develop functional barkery products”

Professor Muhammad Nasir, Lahore, Pakistan

6. “Posters Presentation Session and Workshop”

二、與會心得

本次會議是我第一次出國參與國際性的會議。這次會議是舉辦在美國拉斯維加斯的內華州立大學(University of Nevada Las Vegas)，那裏是一個日夜溫差大的沙漠型氣候，大學裡充滿了各式各樣

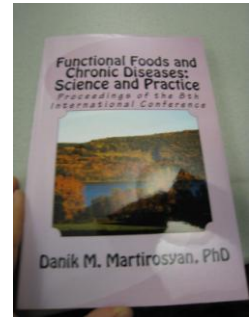
的沙漠植物。而我們的會場是在這所大學裡的 Student Union 裡。



(內華達州立大學拉斯維加斯分校)



(Student Union)



(會議手冊)

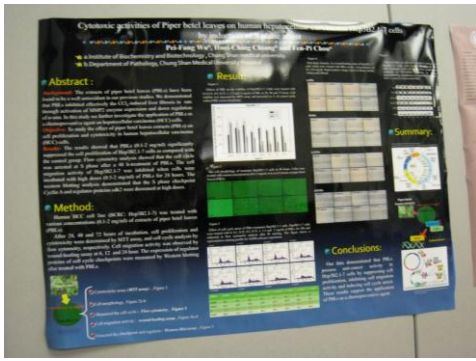
會議過程自報到完及主持人介紹完後就接續的開始，首先第一場演講者是來自於美國的 *Garth L Nicolson* 教授，他所演講的是一種 Functional Food: NTFactor[®]，應用於 cancer 以及 non-cancer 的患者上發現其具有有效減緩疲勞疲倦感，這項發現有助於改善，cancer 病患化放療後的副作用，另一方面也可應用於一般的民眾身上，且是無毒性的可以當作一般的營養補給品的使用。*Garth L Nicolson* 教授的這項發現，加深了我對於” Functional Food” 的應用價值及意義。



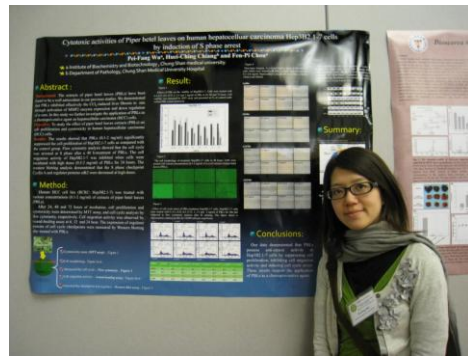
Garth L Nicolson 教授

皆著還有來自台灣屏科大的許祥純副教授的演講，他主要是針對 *Litsea cubeba* 萃取物，對於人類乳癌細胞株 MCF7 具有細胞毒性的影響，造成細胞生長停滯甚至細胞凋亡的現象，會議過程中也有學者提問，是否有測試過其他種類細胞株等問題。由於以上關於癌症方面與其他慢性病的研究對於我來說是比較耳熟能詳的，因此較我覺得新奇的是第三天的講題，是針對功能性食品的”產品”，來自匈牙利的 *Diana Virag* 教授的研究，他將抗氧化劑添加至蛋糕中，再去測定不同的溫度等條件之下對於抗氧化劑的效價是否有受影響，又哪一種條件是保存抗氧化劑的最佳條件，很簡單的訴求與目的，但是卻對於一般民眾而言是日常生活中可以應用的，讓大家吃得健康甚至美味，這對於不同領域的我而言，覺得既新奇又有趣。

由於我這次是以海報的方式呈現研究結果，海報展示的時間是三月十七日的十一點十分到十二點四十分，但是其實當天早上到了會場我們就開始展示海報，演講的休息途中以及參展的過程裡，陸陸續續也有人參觀詢問。



(展示海報)



(海報與我)

這次是第一次出國參加國際型的研討會，也有看到很多不同領域學者的研究，或許是因為這一次出國開會的主題是訴求功能性食品，實際去了現場發現大部分的研究並沒有到很深入，比方說有抑癌的作用，但只是初步的觀察到似乎有毒殺的效果而已。糖尿病以及心血管疾病的主题，有部分是使用人體試驗的結果，得到相當的有意義的統計結果，但是可惜的是深入的著墨仍太少。至於其他的功能性食品的主题，則比較多是試驗抗氧化的能力效果好壞而已。加上這次參加的國際會議，無論是海報論文或者是與會人士以及講者內容來說都屬於小型的會議。雖有與他國人事交流，也有獲得些許重要的實驗概念與方法，但是對於原本的期待仍有所差距，這是覺得很可惜的地方。

三、考察參觀活動(無是項活動者略): 無

四、建議

透過這次出國參加會議的經驗，讓我更了解我應該在多準備些文件資訊，比方說可以列印小份的海報資料，附上連絡訊息及信箱可以供以後與國外的學者再進行交流，以及篩選會議目的與內容，可以讓我更有效的獲得與本身研究有相關性領域的新知與概念。以上這些是我對於這次出國開會所學習與獲得的重要經驗。

五、攜回資料名稱及內容

本次會議所攜回的資料如下:

1. 會議手冊與論文摘要集
2. 會議行程安排表

六、其他



**8TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON FUNCTIONAL
FOODS FOR CHRONIC DISEASES.
MARCH 15-17, 2011, UNLV**

October 22, 2010

Pei-Fang Wu ,
Institute of biochemistry and biotechnology,
College of Medicine, Chung Shan Medical University,
No.110,Sec.1,Jiangou, N Rd, Taichung City, 402 Taiwan

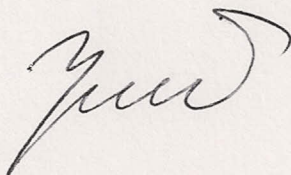
Dear Pei-Fang Wu ,

It is our distinct pleasure to inform you that your abstract (**Authors:** Pei-Fang Wu, Huei-Ching Chiang and Fen-Pi Chou) has been accepted for the poster presentation in our upcoming 8th International Conference on Functional Foods for Chronic Diseases. By this letter I am pleased to invite you to participate in the 8th International Conference entitled "Functional Foods for Chronic Diseases: Science and Practice", to be held in University of Nevada (UNLV) at Las Vegas, USA, on March 15-17, 2011. The main goal of the conference is to bring together experts in medicine, biology, and the food industry to discuss the contribution of functional foods in the prevention and management of chronic diseases, such as diabetes, obesity, cancer and cardiovascular disorders.

We extend this invitation on account of your significant contributions to the field. The title of your presentation, "**Cytotoxic activities of Piper betel leaves on human hepatocellular carcinoma Hep3B2.1-7 cells by induction of S phase arrest**" will be a very interesting discussion topic for our conference.

The meeting will attract many experts from food processing companies, universities, research centers, and related industries from around the world. It will be a good opportunity to introduce yourself to many international organizations. We look forward to seeing you at the meeting.

Sincerely,



Danik M. Martirosyan, PhD,
Chairman of 8th International Conference,
President of Functional Food Center Inc,
Associate Clinical Professor at Nutrition and
Food Science Department, TWU

901 Administration Dr. Rm # 108,
Denton, TX 76204, USA
In the Student Union at Texas
Woman's University

Phone: (866) 464-6955
Fax: (214) 646-0022
Email: ffc_usa@sbcglobal.net
www.functionalfoodscenter.net

Cytotoxic activities of Piper betel leaves on human hepatocellular carcinoma
Hep3B2.1-7 cells by induction of S phase arrest

Pei-Fang Wu, Huei-Ching Chiang and Fen-Pi Chou

Correspondence:

Prof. Fen-Pi Chou, Institute of biochemistry and biotechnology, College of Medicine,
Chung Shan Medical University, No.110,Sec.1,Jiangou, N Rd, Taichung City, 402
Taiwan

[Tel:\(+886\)-4-27320022#11676](tel:+886-4-27320022#11676). Fax:(+886)-4-23248195

Email: fpchou@csmu.edu.tw

Background: The extracts of piper betel leaves (PBLs) have been found to be a well antioxidant in our previous studies. We demonstrated that PBLs inhibited effectively the CCl₄-induced liver fibrosis in rats through activation of MMP2 enzyme expression and down regulation of α -sma. In this study we further investigate the application of PBLs as a chemopreventive agent on hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Objective: To study the effect of piper betel leaves extracts (PBLs) on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Methods: Human HCC cell line (BCRC: Hep3B2.1-7) was treated with various concentrations (0.1-2 mg/ml) of extracts of piper betel leaves (PBLs). After 24, 48 and 72 hours of incubation, cell proliferation and cytotoxicity were determined by MTT assay, and cell cycle analysis by flow cytometry, respectively. Cell migration activity was observed by wound-healing assay at 6, 12 and 24 hour. The expression of regulator proteins of cell cycle checkpoints were measured by Western blotting after treated with PBLs.

Results: The results showed that PBLs (0.1-2 mg/ml) significantly suppressed the cell proliferation of Hep3B2.1-7 cells as compared with the control group. Flow cytometry analysis showed that the cell cycle was arrested at S phase after a 48 h-treatment of PBLs. The cell migration activity of Hep3B2.1-7 was inhibited when

cells were incubated with high doses (0.5-2 mg/ml) of PBLs for 24 hours. The western blotting analysis demonstrated that the S phase checkpoint CyclinE and regulator proteins cdk2 were decreased at high doses.

Conclusions: Our data demonstrated that PBLs possess anti-cancer activity in Hep3B2.1-7 cells by suppressing cell proliferation, inhibiting cell migration activity and inducing cell cycle arrest. These results support the application of PBLs as a chemopreventive agent.

Key Words: Piper betel leaves, hepatocellular carcinoma cells, migration, S phase arrest

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/28

國科會補助計畫	計畫名稱: 荖葉水草物回復肝功能保健功效之探討
	計畫主持人: 周芬碧
	計畫編號: 97-2320-B-040-030-MY3 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：周芬碧		計畫編號：97-2320-B-040-030-MY3				計畫名稱：荖葉水萃物回復肝功能保健功效之探討	
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	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	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	1	1	100%	人次	
		博士生	2	2	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	0	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	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>	<p>無</p>
--	----------

	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）

本研究成果對於萹葉水萃取的研究發現，其具有良好抵抗低密度脂蛋白氧化的能力，且在活體細胞實驗中，可有效的抑制泡沫細胞形成，此原因是否是經由抑制活化轉錄因子 AP1 及 PPAR γ 的表現，進而造成細胞表面清除者接受器(scavenger receptor)的表現量下降，而達到抑制泡沫細胞形成的關鍵，仍是有待評估。此部分結果對於未來發展，可針對預防心血管疾病的研究課題上再更進一步的著墨。在對於肝病方面的研究指出，萹葉水萃取物可有效的活化動物體內 phase I 及 phase II 的肝臟解毒酵素系統的活性，且在肝癌細胞及腫瘤異種移植的活體實驗上，發現萹葉水萃取物的處理，可有效的抑制癌細胞的生長，並導向細胞走入自體吞噬性凋亡機制，因此對於其未來應用方面，可期許萹葉作為肝癌治療後的照護性功能食品外，另一方面的觀點更指出，若在使用藥物的治療下，仔細評估藥物的生理代謝機制後，再與萹葉合併輔助處理下，及能達到輔助藥物治療的加成性效果。