

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 桑椹功能性成分抗癌作用之研究(二):抑制化學致癌物致動物胃癌血癌及轉移之作用(第2年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-023-MY2  
執行期間：96年08月01日至97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：王朝鐘

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 97年10月30日

# 國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式

## 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。

本格式說明僅為統一成果報告之格式，以供撰寫之參考，並非限制研究成果之呈現方式。精簡報告之篇幅（不含封面之頁數）以 4 至 10 頁為原則，完整報告之篇幅則不限制頁數。

成果報告繳交之期限及種類（精簡報告、完整報告或期中報告等），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、內容格式：依序為封面、中英文摘要、目錄（精簡報告得省略）、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>)下載製作(格式如附件一)。

(二)中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

(三)報告內容：請包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）…等。若該計畫已有論文發表者，可以 A4 紙影印，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，俾可供進一步查考。

(四)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。

(五)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。

(六)計畫成果自評部份，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、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。

(七)可供推廣之研發成果資料表：凡研究性質屬**應用研究及技術發展**之計畫，請依本會提供之表格（如附件二），每項研發成果填寫一份。

## 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，須依規定撰寫心得報告，以附件方式併同成果報告繳交，並請於成果報告封面註記。

## 四、打字編印注意事項

### 1. 用紙

使用 A4 紙，即長 29.7 公分，寬 21 公分。

### 2. 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。

### 3. 字體

報告之正文以中英文撰寫均可。在字體之使用方面，英文使用 Times New Roman Font，中文使用標楷體，字體大小請以 12 號為主。

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

(計畫名稱)

桑椹功能性成分抗癌作用之研究(二):抑制化學致癌  
物致動物胃癌血癌及轉移之作用

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2320-B-040-023-MY2

執行期間：2006年 8月 1日至 2008年 7月 31日

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

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

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

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

## 中文摘要

癌症預防已成為世界研究趨勢，因此尋找一化學預防物質(chemopreventive agent)為現今重要工作之一。花青素(anthocyanins)廣存於蔬菜、水果等植物中，且有許多報告證明花青素具抗氧化活性、抑制心血管病變及防癌等作用。台灣特有植物桑椹(Mulberry fruit)含有豐富之花青素(MACs)，而本實驗室利用 HPLC 分析，經定量並計算出乾燥後的桑椹含有約 5% MACs。我們進一步利用 MTT assay、Flow cytometry、TUNEL assay 及 Western blot 等方法，探討 MACs 之抗癌作用。結果發現 MACs 明顯造成 AGS 細胞 DNA 斷裂，導致細胞的凋謝死亡，其詳細機制透過三種抑制劑的使用，如 SB203580 (p38 inhibitor)、PD98059 (MEK inhibitor)、and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase; PI-3K inhibitor)，結果推測可能經由 p38 pathway 抑制癌細胞生長。細胞經由 MACs 的處理，活化 p38/JNK 造成 c-jun 的磷酸化，同時也造成 p53 磷酸化，而活化下游的 FasL/Fas 使得 Bid 變成 tBid，而 Bax 在粒腺體膜上聚集在一起而形成孔洞，結果 cytochrome c 釋放到細胞質活化 caspase-3 造成細胞的死亡。此外，在動物實驗中亦發現，當於裸鼠皮下注射 AGS 細胞，MACs 可以抑制其腫瘤形成及血管新生作用。

從以上結果我們可以提出 MACs 可以預防及治療癌症，並說明其抗癌機轉。由於桑椹易在國內種植，MACs 產率高也易分離，因此本研究結果可應用於發展為抗癌物質。

關鍵詞：桑椹花青素、胃癌細胞、凋謝死亡、細胞生長停滯

## 英文摘要

Over the past decade, advances in understanding carcinogenesis have made possible which identify the candidates of chemopreventive agents that are being developed to hit the key molecular targets. Plant anthocyanins are important part of diet because of their effects on modulating carcinogenesis and cardiovascular disease. Mulberry fruit has abundant anthocyanins (MACs), and our laboratory has been quantified and calculated that dried-Mulberry fruit contains 5% anthocyanins by HPLC experiment. Next, we used MTT assay, flow cytometry, TUNEL assay and Western blot to analyze the antitumor effect of MACs. Mulberry anthocyanins (MACs) were isolated from the dried fruit of Mulberry and the effect of MACs was to cause the cancer cell apoptosis. We further used SB203580 (p38 inhibitor), PD98059 (MEK inhibitor), and wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase; PI-3K inhibitor) to evaluate their effect on the MACs-induced AGS death. The data showed that only SB203580 had strong potential in inhibiting AGS cell apoptosis and also revealed increased phosphorylation in p38 and c-Jun, cytochrome c release, and expression of tBid, Fas and FasL in the MACs-treated AGS cells. Therefore, we suggested that MACs mediated AGS apoptosis via the p38-FasL and tBid pathway. Besides, when the nude mice were injected subcutaneously with AGS cells, MACs could decrease the weight of tumor and inhibit the angiogenesis.

The results of these studies may be used to (1) develop a new chemopreventive agent, (2) demonstrate the mechanisms of MACs in anticarcinogenesis.

Key word : Mulberry anthocyanins (MACs)、Human gastric carcinoma (AGS)、apoptosis、cell cycle arrest

## 前言

桑椹 (mulberry) 是一種天然植物桑科落葉喬木”桑”(Morus alba L.) 的果實，其科、屬、種名為 MORACEAE Morus spp.。桑椹味甘酸、性涼，具滋陰養血、生津止渴、潤腸通便等作用，自古即被用來防治頭暈、目眩、盜汗、消渴、腸燥、便秘等現象，許多古籍記載了桑椹的藥用價值，但是在科學研究上卻缺乏科學證據來證實。而由桑椹果實顏色為深度的紫紅顏色，顯示出桑椹具有豐富的色素成分，而許多的色素成分被證實是一種很好的抗氧化物質。由 Toscano 和 Lamonica(1) 鑑定出桑椹的色素成分為花色苷，而桑椹的花色苷為 cyanidin 3-glucoside 及 cyanidin 3-rutinoside，因此我們推測桑椹具有豐富的天然抗氧化成分。此外桑椹除含有豐富的黃酮素 (如 quercetin, gossypetin) 亦含有原兒茶酸，這些成份都以具有抗氧化、防癌、抑制心血管病變(2-11)。

花青素廣泛存在於許多食用的植物果實中，不同的花青素具有不同的顏色，其中包含了：藍色、紫色或紅色等。一些具有醣基的醣化 delphinidin 與 cyanidin 也發現存在許多的植物中。在營養食品中添加花青素萃取物，可以有效的使人們攝取到數個毫克的花青素。根據統計，在美國每人每天會攝取 180-250 毫克的花青素。現今，由天然植物果實中所萃取出具有高度花青素含量產物也廣泛的被接受。對於花青素的應用方面，被認為對於許多的疾病是具有有效的預防作用，如：糖尿病視網膜病變及的微血管循環疾病等，此外也具有抗發炎及化學預防作用的功效。已有許多報告指出花青素具有抗氧化活性 (12-16) 抗致突變性 (17-19)，抗癌作用 (20-22) 及降低脂質過氧化作用和 DNA 損傷 (23)。根據世界衛生組織 (WHO) 估計，胃癌是全世界排名第四個最普遍被診斷的癌症，而且是所有癌症死亡率排名第二，被視為國際間重要的健康危機(24, 25)。胃癌的高發生率的國家包括亞洲的日本、韓國、中國大陸，南美洲和東歐。在台灣地區，胃癌發生率尤其偏高，根據行政院衛生署 20 年來的統計，癌症已超過腦血管疾病，居十大死亡原因的第一位；其中胃癌僅次於肺癌、肝癌及結直腸癌居第四位，死亡率為 11.4%。

## 研究目的

由衛生署公佈之台灣十大死亡原因顯示癌症仍為十大死因之首，因此如何預防或延緩癌症的發生時為刻不容緩的事。癌症的形成是透過許多複雜且多重的過程，其中形成的原因雖然被了解，但治療的效果仍然有限。目前許多研究趨向以天然物成份或複方來達到抑制癌細胞的增生及惡化，例如 Tea polyphenolic extracts, curcuminoid extracts 及 broccoli extracts (sulforaphane) 已被廣泛的應用為 chemopreventive agents，因此本研究室也致力於開發可食用之天然物中之 chemopreventive agents，希望可以由攝取食品來達到預防或延緩癌症。本研究以台灣特有之桑椹萃取物，分離之花青素及多酚探討其對人類癌細胞之作用，及抗癌之分子機制。目前世界上許多研究單位發現，癌細胞與正常細胞差別之一為無法進行一般細胞之 apoptosis，因此生長無法控制，本研究先前已證實洛神花青素可以經由促進胃癌細胞週期停滯、凋亡，使胃癌細胞生長被抑制，因此，本實驗再次以台灣特有之桑椹萃取物分離之花青素，探討其對人類胃癌細胞之作用，及抗癌之分子機制，並進一步以動物模式觀察其抑癌作用，俾以發展為抗癌物質。

## 文獻探討

許多研究指出，飲食中的花青素，例如白藜蘆醇(resveratrol)、槲皮素(quercetin)及 EGCG (epigallocatechin gallate) 等，可以經由誘發凋謝死亡路徑而有效的抑制腫瘤增生(26)。以乳癌細胞為例，當處理 50 g/L 的小紅莓水萃取物，可以增加 25% MCF-7 細胞凋亡(27)；然而，以

250mg/L 小紅莓花青素處理 MCF-7 細胞後，高達 92%細胞凋亡，而 MCF-10A 正常細胞凋亡情形則未增加(26)。其他如葡萄汁花青素也可以經由誘發如癌細胞凋亡，進而抑制老鼠乳癌發生率(28)。除此之外，常見的 6 種花青素也被用來觀察對不同癌細胞的作用，如表 1 所示，各種花青素對不同的癌細胞都會促進其凋亡，來降低腫瘤發生率(29)。

對於桑椹在醫學上的報導，國外的研究甚少，只有桑椹的成分分析等，國內的研究從網路搜尋也只有花青素成份分離及鑑定等，至於其他相關植物花青素之研究則甚多，已描述於背景資料中，我們相關的研究則描述於近五年研究成果之(I)及(III)，其中有關洛神花花青素亦受美國 Heart Disease Weekly (Oct. 26, 2003, page 16)及 Cardiovascular Week (Oct. 20, 2003)所重視；最近也發現洛神花花青素經由 p38 活化 FasL 致 HL-6 凋亡(30)。

## 研究方法

### (A) 桑椹花青素(MAC)之製備

#### (1) MAC extracts 製備及定量

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

#### (2) HPLC 分析

為使 MAC 製備標準化，進一步以 HPLC 分析 cyanidin-3-glucoside 及 delphinidin-3-glucoside 之含量是必要的，將桑椹花青素萃取物溶於水中，以高效能液像層析管柱(250x4.6 mm, 5 µm Hypersil ODS)，mobile phase 為 1.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、20% HPAc、MeCN in H<sub>2</sub>O、流速為 0.5ml/min。

### (B) 細胞毒性試驗 (MTT assay)

#### (1) 細胞培養

人類胃癌細胞株 AGS human gastric carcinoma (from ATCC)，培養於含有 10% fetal bovine serum (FBS:Gibco)、1% nonessential amino acid (NEAA: Gibco)、1% glutamine、1% Penicillin Streptomycin (PS:Gibco)之 F-12 Nutrient mixture (F-12K : Gibco)，培養箱設定 5% CO<sub>2</sub>，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。

#### (2) MTT assay

調整 AGS 胃癌細胞濃度為  $1 \times 10^5$ /ml，加入 0、1、2、3 mg/ml MACs，分別培養 12、24、36 小時後，去除培養基，加入 2 ml 新鮮無血清之培養基與 200 µl MTT (5 mg/ml)繼續培養 4 hr，去除培養液後，加入 1.5 ml isopropanol，均勻分散細胞後離心，取 1 ml 上清液於波長 563 nm 測其吸光。

### (C) 細胞凋亡 (apoptosis) 相關試驗

#### (1) TUNEL assay

將細胞培養於 8-well chamber slide 中，密度為  $4 \times 10^5$ /ml，每一 well 加入 125µl，加入前述相同最終濃度的 MACs 處理後，以 PBS 清洗 2 次後，以新鮮配置之固定液 (2% paraformaldehyde in PBS, pH7.4) 於室溫下固定細胞 1 小時，再以 PBS 清洗後放入 permeabilisation solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) 置於冰上反應 2 分鐘，去除 permeabilisation solution 後再清洗二次，加入 TUNEL reaction mixture，將 chamber slide

放入可保濕的盒子中再置入 37°C 預熱過的 incubation oven 中避光反應 1 小時，最後再以 blocking buffer (0.1 % Triton X-100, 0.5 % bovine serum albumin in PBS) 清洗 3 次後，於螢光顯微鏡 (NIKON DIAPHOT 300) 下觀察。

## (2) Cell cycle 分析

經處理 24 hr 不同濃度之 MACs 後，以 FACScan 分析細胞週期之變化。首先，將細胞打下，離心，所得的 pallette 加入 1 ml 80% alcohol 固定，放置於 -20°C 冰箱中隔夜。進行流式細胞儀分析前，再以 PBS 沖洗，離心，加入 propidium iodide/RNase (PI 10 µg/ml、RNase 40 µg/ml) 1 ml，避光反應 15 分鐘，最後置於冰上，以流式細胞分析儀 (flow cytometer, FACS) 測定之。

## (3) Apoptosis-related proteins 分析

癌細胞經處理後，其 lysate 經 western blotting 分析 p38、c-Jun、p53、caspase family (包括 procaspase-8、caspase-8、procaspase-3 及 caspase-3)、Bax、t-Bid 與 cytochrome C 等蛋白表現之影響。

## (D) 抑制 Balb/c 裸鼠腫瘤生長試驗

取 5 週大 Balb/c 雌性裸鼠，分為 9 組，每組 4 隻，處理方式如下所示：

### (1) 正常組

(2) **AGS alone**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [2 × 10<sup>6</sup> AGS cells/0.1 ml medium]

(3) **0.2% inj-MACs**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel + 0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.2% MACs/0.1 ml medium]

(4) **AGS+0.1% inj-MACs**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [2 × 10<sup>6</sup> cells and 0.1% MACs/0.1 ml medium]

(5) **AGS+0.2% inj-MACs**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [2 × 10<sup>6</sup> cells and 0.2% MACs/0.1 ml medium]

(6) **0.2% oral-MACs**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，每日餵管 0.2% MACs (每日飲水量之 0.2%)

(7) **AGS+0.1% oral-MACs**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [2 × 10<sup>6</sup> AGS cells/0.1 ml medium]，每日餵管 0.1% MACs (每日飲水量之 0.1%)

(8) **AGS+0.2% oral-MACs**：於裸鼠左下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [0.1 ml medium]，右下腹注射 [0.1 ml matrigel] + [2 × 10<sup>6</sup> AGS cells/0.1 ml medium]，每日餵管 0.2% MACs (每日飲水量之 0.2%)

實驗過程為期 7 週，期間每星期秤量體重，並紀錄腫瘤體積大小。7 週後，將動物犧牲並進行解剖，秤取腫瘤部分，最後以 Western blotting 觀察腫瘤之 VEGF 表現量。

## 結果討論

### (A) 桑椹花青素(MACs)之分離與鑑定：

取乾燥桑椹果粒秤取乾重 20g，經萃取及真空冷凍乾燥機乾燥為粉末。所得的粉末約有 1g 左右。經換算桑椹果實內萃取的 MACs 產率有 5%。由 spectrophotometer 分析萃取出之桑椹花青素(MACs)，其吸光值在經公式換算，而換算出所萃取出之花青素純度大約有

85~95%。經 HPLC 分析，Cyanidin 的滯留時間(retention time; RT)在 25.6 min，而 delphinidin 在 24.1 分鐘，pelaryanidin 的 RT 在 27.1 min；malcadin 的 RT 在 27.4 min；peonidin 的 RT 在 27.6 min；萃取出來的桑椹花青素(MACs)酸水溶液 RT 分別為 24.1 及 25.6 min。從結果可得，桑椹花青素(MACs)主要含有 cyanidine 與 delphinidin (圖 1)。

### (B) 桑椹花青素(MACs)對胃癌細胞致死率之敏感度

以 MTT assay 觀察桑椹花青素對 AGS cell 的細胞毒性，在 0, 12, 24, 36 hrs 等不同時間點，處理 0, 1, 2, 3 mg/ml 的花青素，可以發現桑椹花青素在處理時間越久的情況之下對細胞死亡的作用越強，且呈現 time-dependent 的現象。在高濃度 MACs 處理下，細胞死亡情況更明顯 (圖 2)。經過計算的結果，3 mg/ml MACs 對 AGS cells 處理 24 hrs 之  $IC_{50}$  為 2.88 mg/ml，而 1、2 mg/ml MACs 處理胃癌細胞 24 小時後，細胞死亡率未達一半，因此接下來的實驗，MACs 處理的濃度採用 1, 2, 3 mg/ml，處理時間為 24 小時。

### (C) 處理桑椹花青素(MACs)所引起胃癌細胞凋亡的現象與生長停滯

由於大多數的細胞程序性死亡過程中，DNA 會被切斷成 200 kb 或 500 kb 的大分子量片段，因此，我們使用 TUNEL assay 觀察大片 DNA 斷裂的情形。以 TUNEL assay 進行 *in situ* 的測試後，我們可以觀察到在 3 mg/ml MACs 處理下，有明顯的紅色螢光產生，代表有 DNA 斷裂出現 (圖 3A)。

接著我們利用流式細胞儀來觀察細胞內 DNA 的含量比，當 AGS cell 加入不同濃度包括 0, 1, 2, 3 mg/ml 桑椹花青素後培養 24 小時之後，結果發現細胞 Sub-G1 期的 DNA 的含量由 2.62% 增加到 33.86%，增加了約 31.24% (圖 3B)；另外，為了進一步觀察引起胃癌細胞凋亡的可能機制，我們使用不同抑制劑處理：包括 5nM wortmannin (PI3K inhibitor)、25 $\mu$ M PD98059 (MEK1 inhibitor) and 20 $\mu$ M SB203580 (p38 inhibitor)，結果發現當抑制 p38 蛋白表現時(加入 SB203580)，細胞 Sub-G1 期的 DNA 的含量被抑制到 5.16%。因此可知，桑椹花青素可能會經由 p38 路徑而造成 AGS cell 細胞的凋亡死亡 (圖 3C)。

### (D) 桑椹花青素(MACs)引起胃癌細胞凋亡之機制

在初步確定 MACs 可能經由 p38 路徑來引起 AGS 凋亡，接下來我們利用西方點墨法 (western blotting) 來分析相關蛋白。首先，將 AGS 細胞加入桑椹花青素(3 mg/ml)，處理不同時間點(0, 30, 60, 120 min)後，發現 MAPK family 蛋白 phospho-p38, phospho-c-Jun 隨著時間的增加，表現量都高於未處理細胞的 3.5 倍左右 (圖 4A)，此外，p-p53 也增加為原來的 2 倍以上；同時在圖 4B 也觀察到 Fas 與 FasL 隨著 MACs 處理的濃度愈高，protein level 的表現量皆有上升的趨勢。因此，我們認為 MACs 可能透過外使性及內使性 2 種路徑，來促進癌細胞凋亡。

將不同濃度的桑椹花青素(0, 1, 2, 3 mg/ml)處理 AGS 細胞，24 小時之後，結果發現 procaspase-3 與 procaspase-8 的表現量，隨著 AGS 處理 MACs 濃度的增加而下降，相反的，cleaved-caspase-3 及 cleaved-caspase-8 皆有顯著的表現 (圖 5)，由此可知 MACs 可以藉由活化 caspase3/8，使 AGS 凋亡。

此外，我們也發現 Bax 及 Bid 活化形式的蛋白 tBid 的表現量則也上升，同時 Bcl-2 表現量減少。同樣的，在 MACs 的刺激下，Cytochrome c 表現量亦上升呈現 dose-dependent (圖 6)。

最後我們使用 p38 蛋白抑制劑 SB203580 來反證，結果發現 p-p38, p-c-Jun, p-p53 及 Fas 與 FasL，都被抑制 (圖 7)。

### (E) 桑椹花青素(MACs)抑制 Balb/c 裸鼠胃癌細胞生長

在 MACs 抑制裸鼠胃癌細胞生長的動物模式中，我們使用了 2 種不同方式處理，第一種是將 MACs 與 AGS 細胞混合並注射於裸鼠皮下，第二種是注射 AGS 細胞於裸鼠皮下後，



每日給予餵管，7 週後分別予以犧牲。由圖 8B 的結果得知，各組腫瘤都在第 4 週(滿 3 週)開始生長，MACs 抑制腫瘤生長能力在第 5 週(滿 4 週)開始出現，其中以餵食 0.2% MACs 在實驗結束後抑制腫瘤生長效果最好。

此外我們也觀察到，犧牲後之腫瘤有血管新生的現象(圖 8A)，不論是 MACs 與 AGS 細胞混合注射，或是每日餵管，都可以抑制血管新生的現象。所以我們分析腫瘤部分 VEGF 表現量，結果發現在 0.1% MACs 處理組別抑制血管新生的作用，混合注射的效果優於每日餵管；然而，在 0.2% MACs 處理組別抑制血管新生的作用，每日餵管的效果卻優於混合注射。最後，我們將 MACs 抑制腫瘤形成及縮小腫瘤重量整理於 Table 1.，由 Table 1. 可知，每日餵管 0.2% MACs 可以明顯的降低腫瘤形成與腫瘤重量，並具有統計上的意義( $p < 0.0001$ )。

## (F) 討論

### (1) 桑椹花青素(MACs)促進胃癌細胞機制

圖 9 為綜合以上之結果所做出的 MACs 促進 AGS 胃癌細胞凋謝死亡機制圖。由圖 9 可得知 MACs 可以活化 p53 及 p38 路徑，啟動內始性凋亡路徑，增加活化態 t-Bid 表現，以促進 Bax 表達，並同時抑制 Bcl-2。當促進凋亡蛋白 Bax 增加，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 減少，則會使 cytochrome c 由粒線體內釋放到細胞質中，因此活化 caspase cascade 機制，導致 AGS 胃癌細胞走向凋亡。另一方面，MACs 亦可以透過活化 FasL，啟動外始性凋亡路徑，接著 FasL 加上 Fas receptor，而活化 caspase 8，進而活化 caspase cascade 機制，導致 AGS 胃癌細胞走向凋亡。

### (2) 桑椹花青素(MACs)作為胃癌之化學預防物質之前景

各種食物中的花青素常用於抗癌的研究，Nichenametla 等人在 2006 年指出，在細胞實驗方面，飲食中的花青素確實可以抑制各種癌細胞生長，但在動物實驗方面，花青素對於乳癌、皮膚癌及腸癌的抑制效果較佳，但在胃癌方面效果較不顯著(31)。然而，在我們的動物模式中可看出，桑椹花青素確實可以有效的抑制胃癌發生。由於胃癌的發展速度很慢，早期變化很少有症狀，即使發現後，經手術合併化療與放療也常會引起全身性副作用。因此，由於人體對花青素的高耐受性，桑椹應該可以成為一種天然、安全無毒性並具有預防疾病效用的天然物。

## 結論

在國外許多花青素之單一成分的研究，對於其調控細胞凋亡、發炎、增生及腫瘤形成，都已了解的十分透徹，但有關小紅莓、葡萄籽及藍莓等花青素混合物的協同作用則較少了解(26)，此外，對於花青素抑制胃癌腫瘤形成的動物模式也較少研究發表。本研究提供了一個良好的動物模式，並探討 2 種不同處理方法，進而比較直接注射於腫瘤與口服花青素的不同影響，希望藉由本研究為基礎，提供一個研究各種癌症的動物 model。

## 參考文獻

1. Toscano, M. A. and Lamonica, G. (1975) Pigments from *Morus nigra* fruits. Chem. Abstr. 83, 55669.
2. Rankin, S.M., De Whalley, C.V., Houlst, R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, T. and Leake, D.S. (1993) The modification of low density lipoprotein by the flavonoids muricetin and gossypetin. Biochem. Pharmacol., 45, 67-75.

3. De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R., Essup, W. and Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1743-1750.
4. Thanka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N. and Mori, H. (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid, protocatechuic acid in rat. *Cancer Res.*, 53, 2775-2779.
5. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, M., Mori, H. and Hara, A. (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phase. *Cancer Res.*, 54, 1359-2365.
6. Kawamori, T., Thanka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M. and Mori, H. (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 54, 2359-2365.
7. Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M. and Mori, H. (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer (Suppl.)*, 75, 1433-1439.
8. Hirose, Y., Thanka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita H. and Satoh, K. (1995) Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rat. *Carcinogenesis*, 16, 2337-2342.
9. Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, C.Y. (1996) Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 101, 137-148.
10. Wang, C.J., Lee, M.J., Chang, M.C. and Lin, J.K. (1995) Inhibition of tumor promotion in benzo(a)pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis*, 16, 187-191.
11. Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. (2000) Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of RB phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.*, 60, 307-315.
12. Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Fd. Chem.*, 42, 248-251.
13. Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.*, 52, 1033-1039.
14. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1998) Dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33, 583-588.
15. Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J. and Osawa, T. (1999) Protective effects of dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 316-366.
16. Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T. (1999) Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS Lett*, 449, 179-182.
17. Edenharder, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S. and Seeger, K. (1994) In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-3,8-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Fd. Chem. Toxicol.*, 32, 443-459.
18. Edenharder, R., Lepold, C. and Kries, M. (1995) Modifying actions of solvent extracts from

fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella tryphimurium* TA98. *Mutat. Res.*, 341, 303-318.

19. Yishimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M. and Yamada, J. (1999) Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 537-541.
20. Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T. and Hasegawa, M. (1996) Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 11, 273-277.
21. Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K. (1997) Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 12, 277-280.
22. Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N. and Shirai, T. (2001) Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F334 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.*, 171, 17-25.
23. Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R. and Duthie, G.G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 1033-1037.
24. Parkin DM., Bray FI., Devesa SS. (2001) Cancer burden in the year 2000. *Eur. J Cancer*, 37, S4-S66.
25. Parkin DM. (2004) International variation. *Oncogene*, 23, 6329-6340.
26. Neto CC. (2007) Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. *J. Nutr.*, 137, 186S–193S.
27. Sun J., Liu RH. (2006) Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett.*, 241, 124–134.
28. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107–1112.
29. Darren C., William PS., Andreas JG., Tim M. (2005) Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Euro. J. Cancer*, 41, 1931-1940.
30. Chang, YC., Huang, HP., Hsu, JD., Yang, SF., and Wang, CJ. (2005) Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 205, 201– 212.
31. Nichenametla SN., Taruscio TG., Barney DL., Exon JH., (2006) A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46,161–183.

## 計畫成果自評

- (1) 提出桑椹花青素為新的 chemopreventive agents。
- (2) 說明桑椹花青素抑制胃癌的機轉。
- (3) 初步證實桑椹花青素抑制血管新生作用。
- (3) 提供食物成份在抗癌研究的模式。

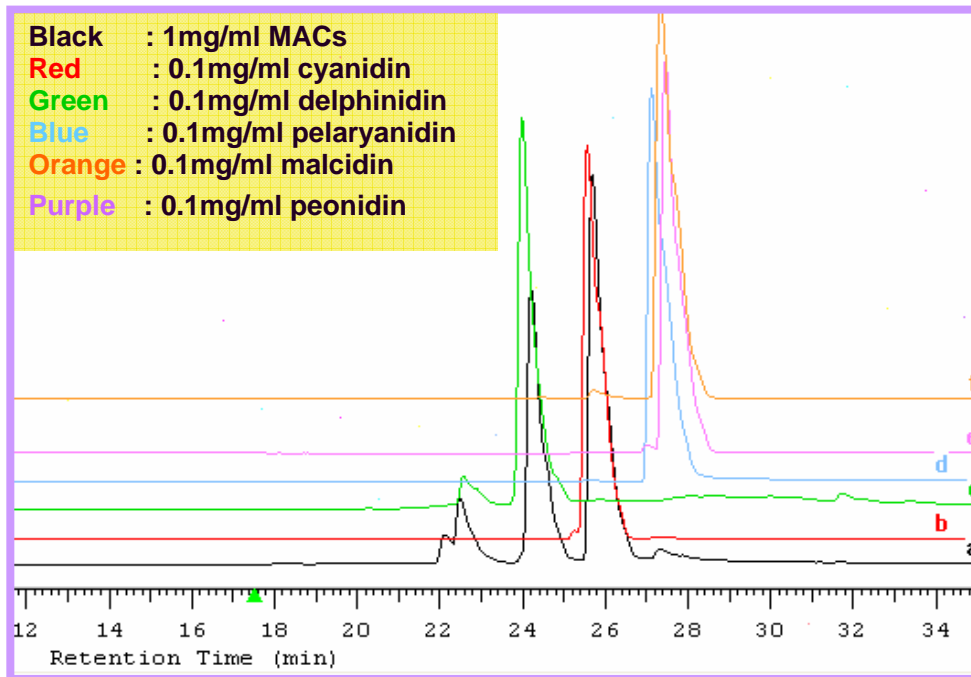
## 圖表

圖 1、桑椹花青素(MACs)之成分分析 (HPLC assay)

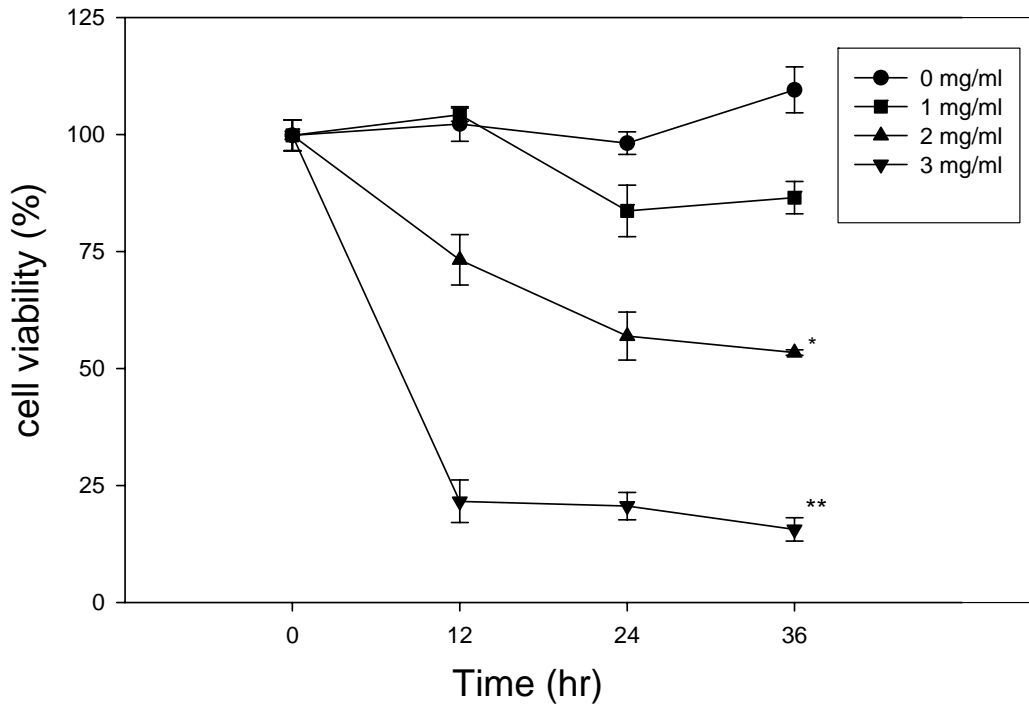
(A)

Dried <i>Mulberry</i>	MACs	Total anthocyanins	Yield (%)
20g	1g	0.85-0.95g	5%

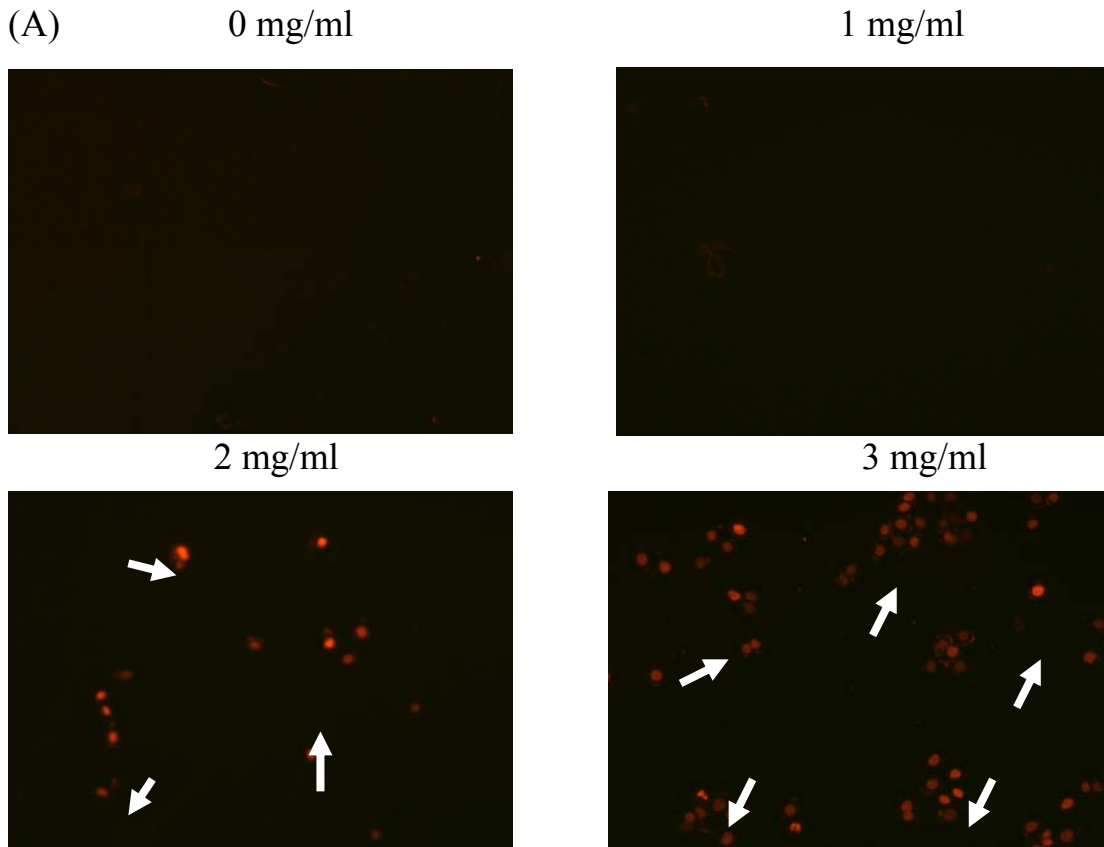
(B)



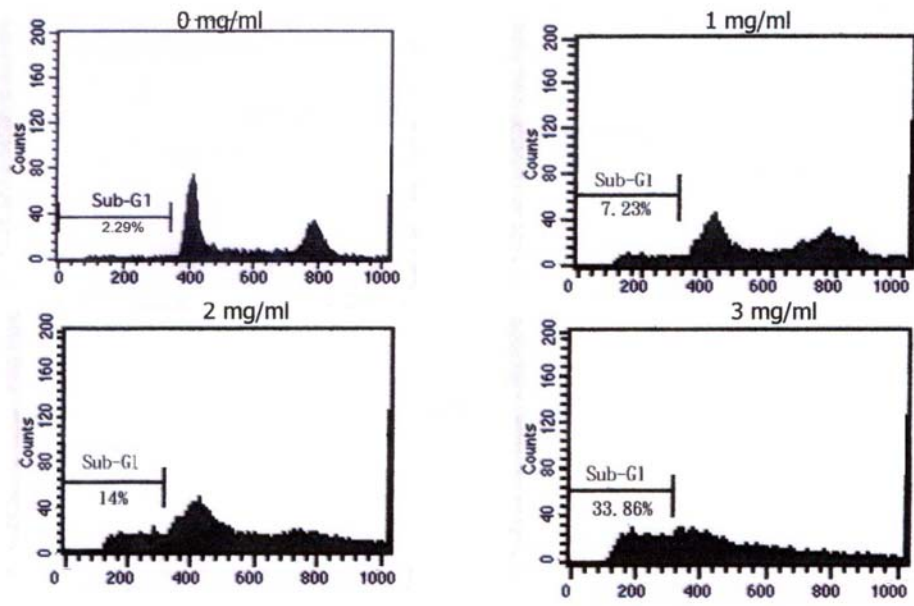
圖二、桑椹花青素(MACs)對胃癌細胞(AGS)之毒性試驗 (MTT assay)



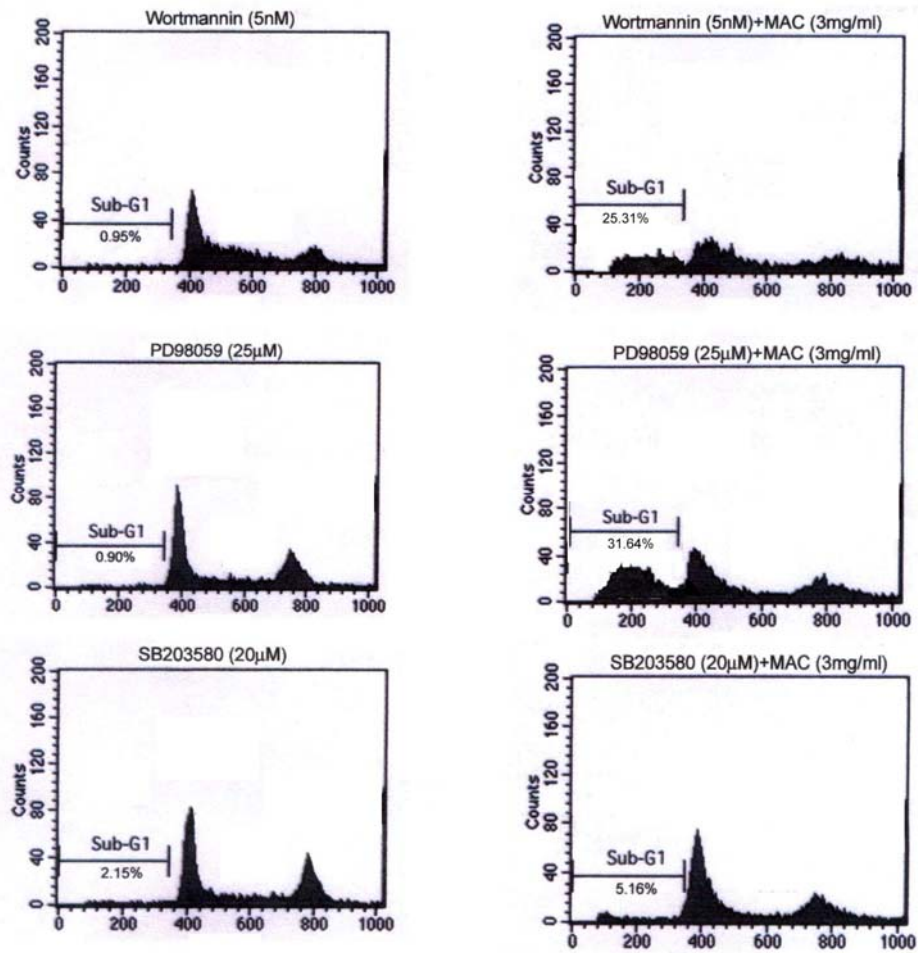
圖三、桑椹花青素(MACs)誘發胃癌細胞(AGS)凋謝死亡 (TUNEL assay, Flow cytometry)



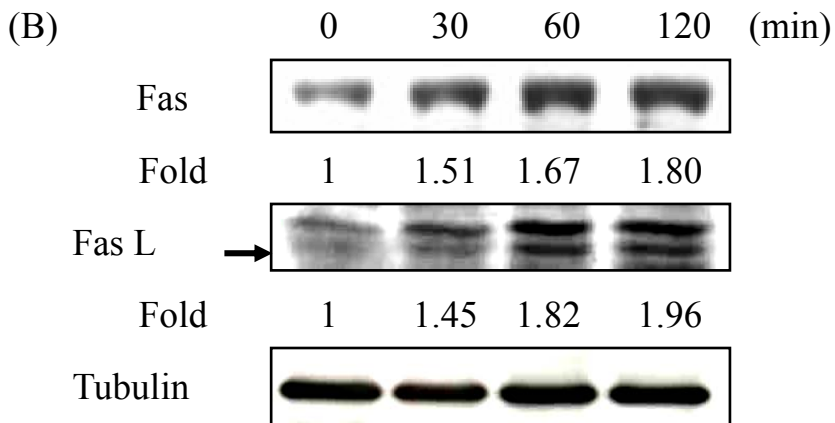
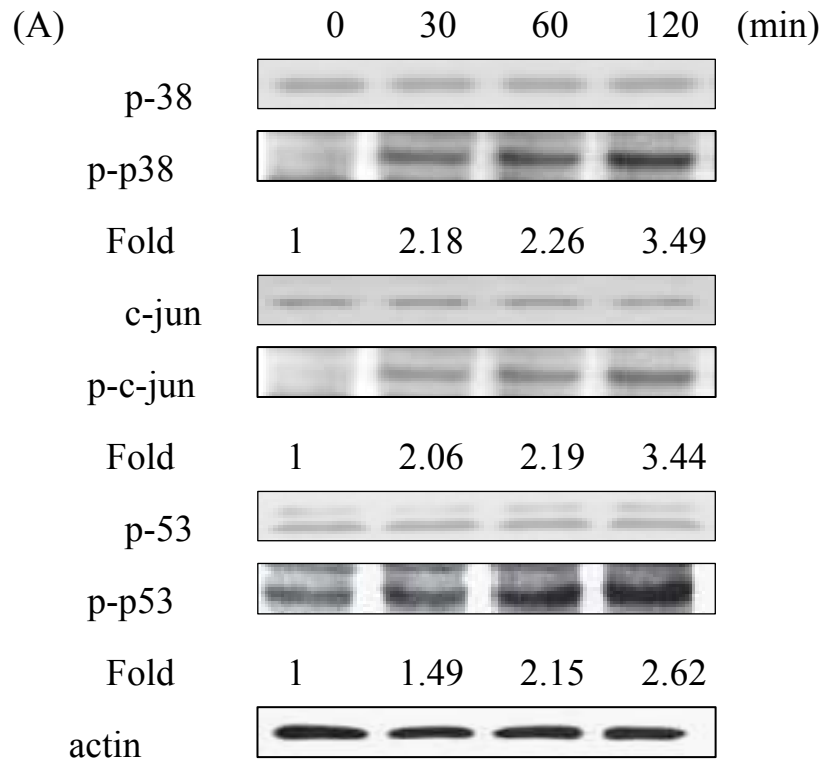
(B)



(C)

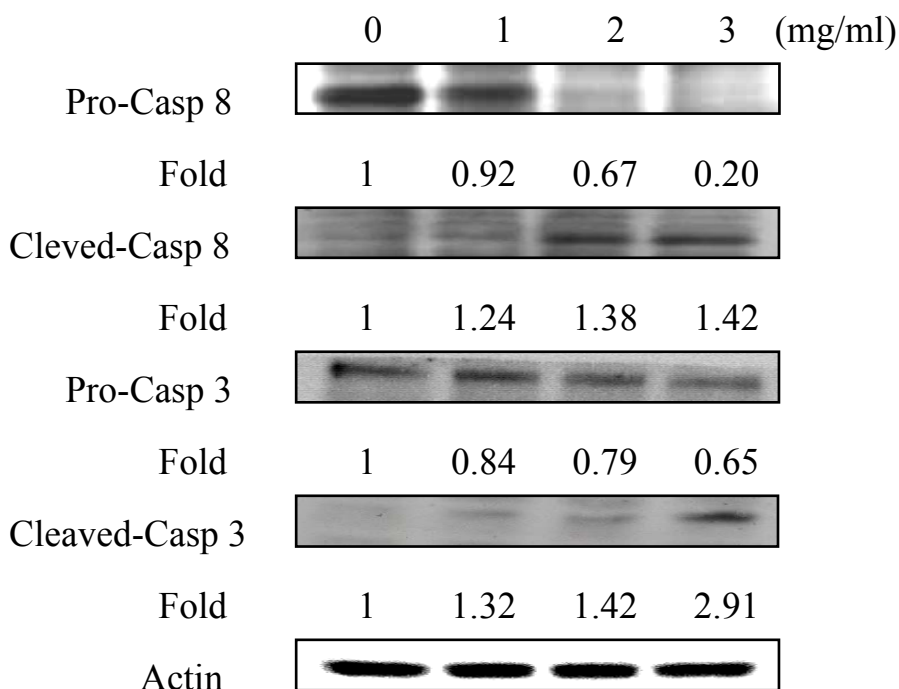


圖四、桑椹花青素(MACs)誘發胃癌細胞(AGS)凋謝死亡之機制-extrinsic pathway (Western blotting)



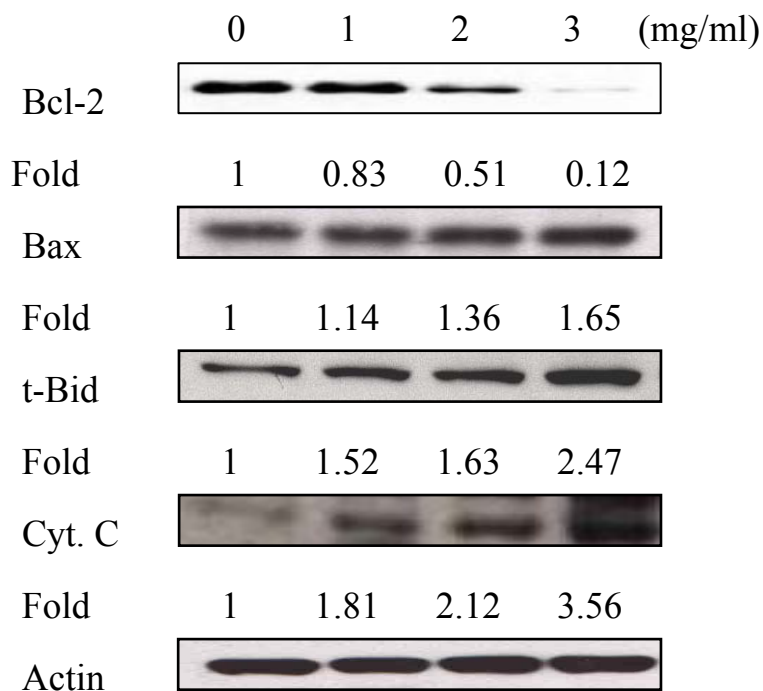
圖五、桑椹花青素(MACs)誘發胃癌細胞(AGS)凋謝死亡之機制-caspase cascade pathway

(Western blotting)



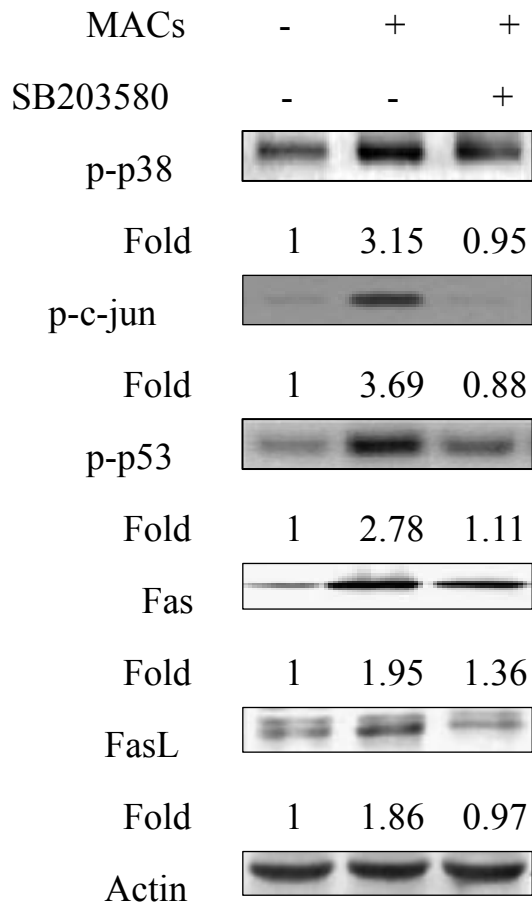
圖六、桑椹花青素(MACs)誘發胃癌細胞(AGS)凋謝死亡之機制-intrinsic pathway (Western

blotting)

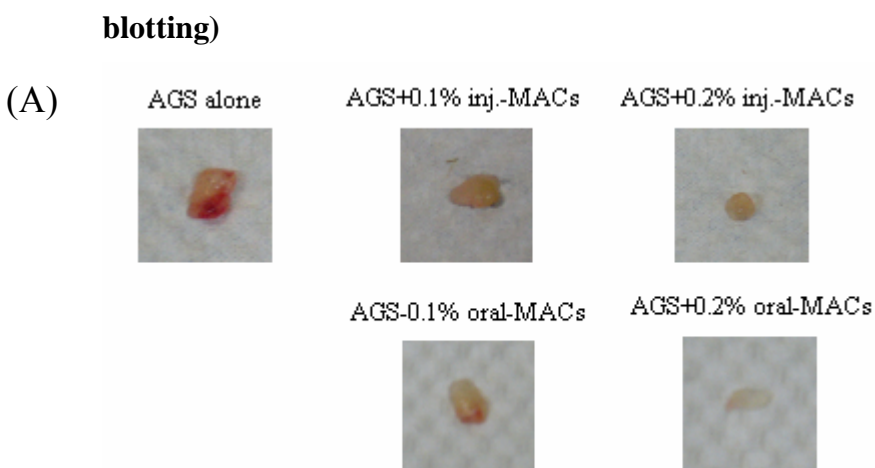




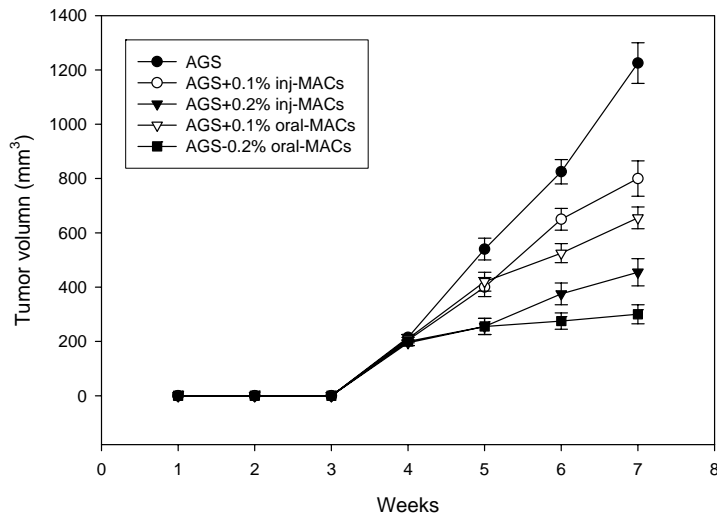
圖七、桑椹花青素(MACs)誘發胃癌細胞(AGS)凋謝死亡之機制-透過 p38 pathway (Western blotting)



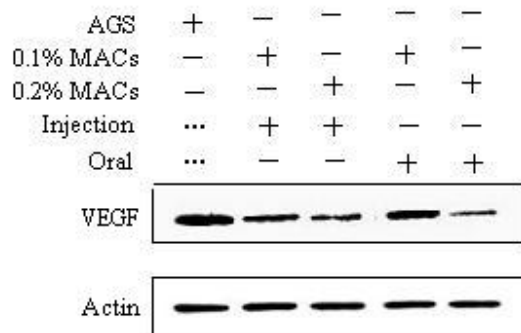
圖八、桑椹花青素(MACs)抑制小鼠腫瘤形成及血管新生作用 (xenograft model, Western blotting)



(B)



(C)



表一、桑椹花青素(MACs)降低腫瘤重量及發生率

Treatment	Body weight (g)	No. of mice with tumor	Tumor weight (g)
Normal	22.65±0.65	0/4	—
AGS	17.72±0.27	4/4	1.34±0.135
-----			
0.2% MACs	20.71±0.84	0/4	—
<i>Injection</i>			
0.1% MACs	22.55±0.72	4/4	0.84±0.076*
0.2% MACs	20.65±0.64	3/4	0.49±0.072**
-----			
<i>Oral</i>			
0.1% MACs	21.05±0.42	4/4	0.74±0.106*
0.2% MACs	20.10±0.95	2/4	0.32±0.044**

Data are presented as mean  $\pm$  SD from 4 mice. \*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.0001$  versus AGS group.

圖九、桑椹花青素(MACs)促進胃癌細胞(AGS)凋謝死亡並抑制腫瘤形成之機制圖

