

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

金針花萃取物之抗氧化及抗癌功能研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2313-B-040-003-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：呂鋒洲

計畫參與人員：許又文，蔡佳芳，莊孟憲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

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

金針花萃取物之抗氧化及抗癌功能研究

Studies on Antioxidant and Anticancer Functionality of
Hemerocallis fulva Linn. extracts

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2313-B-040-003

執行期間：九十四年八月一日至九十五年七月三十一日

計畫主持人：呂鋒洲 教授

共同主持人：

計畫參與人員：許又文、蔡佳芳、莊孟憲

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

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：中山醫學大學應用化學系

中 華 民 國 九 十 五 年 十 月 三 十 一 日

中文摘要

類胡蘿蔔素(Carotenoid)是一種存在於自然界中的植物色素，其功能廣泛。其中，葉黃素(Lutein)和玉米黃素(Zeaxanthin)是構成人類視網膜黃斑區的黃斑色素，具有相當強的抗氧化能力。過去的文獻中提到長期攝取葉黃素可以預防許多慢性疾病，例如粥狀動脈硬化、老年性黃斑退化症(AMD)、提昇免疫功能及癌症的預防等。我們將在本研究中，利用超臨界二氧化碳萃取天然物中的葉黃素與玉米黃素，並利用高效能液相層析儀(HPLC)進行定性與定量。在一系列的萃取分析綠豆，金盞花，花椰菜，碗豆，青椒與金針花，發現到深綠色蔬菜葉黃素的含量都相當高，但是玉米黃素的含量極少。其中最令人感興趣的，金針花(*Hemerocallis disticha*)不只有在葉黃素的含量很高，玉米黃素的含量也相當的可觀，所以我們大膽預測金針花萃取物可能有抗氧化及抑制癌細胞增生的能力。接下來將在本研究中探討金針花萃取物對人類乳癌細胞株(MCF-7、MDA-MB-231)之細胞毒性與可能機制，結果發現金針花萃取物處理過的MDA-MB-231細胞的存活率有隨著濃度而下降，這現象在MCF-7細胞中則影響較不顯著。在轉移的部分，經過金針花萃取物處理過的MCF-7細胞與MDA-MB-231細胞，其MMP-2與MMP-9的表現量不會隨著金針花萃取物濃度上升而有所改變。接著我們利用流式細胞儀來觀察細胞週期，結果發現MDA-MB-231細胞的細胞週期很明顯的被停滯在G2/M時期，但MCF-7則無此現象。從螢光顯微鏡下，也可以觀察到MDA-MB-231的細胞在加藥處理後，二倍體的細胞很明顯比不處理的細胞多。綜合本研究所提供的結果來看，金針花萃取物可以藉由細胞週期G2/M的停滯來抑制人類乳癌細胞株MDA-MB-231細胞的增生，這或許值得再進一步研究與發展成為天然的抗癌藥物。

關鍵字：金針花萃取物、抗氧化、人類乳癌細胞株、細胞週期

Abstract

Lutein and zeaxanthin are antioxidant carotenoids that occur naturally in the diet. High dietary intake of lutein and zeaxanthin has been associated with risk reduction of many chronic diseases, including age-related macular degeneration (AMD), cancer, and cardiovascular diseases. In this study, we used supercritical carbon dioxide to extract many naturally plants and analysis the concentration of lutein and zeaxanthin by HPLC. Marvelously, Daylily (*Hemerocallis disticha*) contains a lot of lutein and zeaxanthin. First we investigated the effect of cell viability of breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231). After 24 hours of treatment with Daylily extracted, both of dose- and time dependent decrease in viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells were observed. The cytotoxic effect of Dalylily extracted on MCF-7 cells was less significant than that on MDA-MB-231 cells after 24 hours of treatment In order to confirm the effect of Dalylily extracted on MDA-MB-231 cells, we examined the Daylily extracted for its effect on proliferation in human breast cancer cell lines, estrogen-dependent MCF-7 cells and estrogen-independent MDA-MB-231 cells by flow cytometry. The results showed that Daylily extracted can inhibit the proliferation of the MDA-MB-231 cells by blocking cell cycle progression in the G2/M phase, but MCF-7 cells showed low effect in this study. And this study provides evidences that Dalylily extracted may be a potential anti-cancer for the treatment of breast cancer.

Introduction

生藥是我國傳統國粹，國人用來治病已有數千年歷史，而目前有許多文獻顯示自由基和許多疾病有關，本實驗室一向致力於自由基的研究，而自由基又與許多疾病有關，因此大部分著重於生藥抗自由基的研究，尤其是超氧陰離子及脂質過氧化作用。在超氧陰離子實驗中，先以非酵素性產生的超氧離子系統(NADH-PMS-NBT 系統)來產生超氧陰離子，並加入不同生藥於反應系統看生藥清除超氧陰離子的情形。結果發現所測試的生藥皆可減弱該反應所產生的自由基。

由於自由基所引起的細胞毒性反應很多，而其中重要也容易測得的是脂質過氧化，我們做了生藥抑制鼠肝微粒體脂質過氧化的初步實驗。在由微粒體酵素系統引起脂質過氧化的實驗中，發現脂質過氧化的過程含有多種自由基參與，倘若生藥可以直接去除超氧陰離子，則可以阻斷 $\text{O}_2\text{H}\cdot$ 的生成，以致於 $\text{HO}\cdot$ 也不能產生而抑制脂質過氧化的起始反應，因為無法使 $\text{--}_2\text{CH--}$ 形成自由基阻斷了脂質過氧化作用。除了生藥抗自由基的研究外，近年來更致力於抗癌物的研發，有別於傳統研究上對於治療癌症藥物只著重於對細胞壞死與細胞毒性之研究，而在殺死癌細胞的同時亦造成了許多正常的死亡，導致病患在治療過程中造成個體極大的傷害。因而利用計畫性細胞凋亡的機轉作為治療癌症藥物的發展方向，並著重於天然物對抗癌細胞脂生長甚至殺死癌細胞。由石鹼樹皮的實驗中，我們發現石鹼樹皮中的皂素能抑制前列腺癌細胞的生長，並希望進一步研究石鹼樹皮的皂素透過哪一種途徑抑制癌細胞的生長。

由上面的結果可知生藥能減少自由基引起的反應，藉由生藥抗自由基的分析有助於了解生藥如何去除自由基及脂質過氧化的作用。天然植物中的萃取物含有抗癌的作用，藉由計畫性凋亡來抑制甚至殺死癌細胞。並期能找到優良的抗癌藥物應用於臨床上。

從 1982 年起，癌症之死亡率已經躍升台灣地區十大死因之首，近年來，台灣女性乳癌發病率和死亡率有明顯的上升，並且已經超越子宮頸癌，在 2003 年行政院衛生署統計資料顯示，女性乳癌(breast cancer)位列台灣婦癌(乳癌、子宮頸癌及卵巢癌)發病率的第一位。在 2003 年行政院衛生署統計資料顯示，台灣地區女性癌症死因前五名為肺癌、肝癌、結腸直腸癌、女性乳癌及子宮頸癌，就台灣地區而言，女性乳癌逐年升高的發生率與死亡率對台灣女性造成的生命威脅是不容忽視的。

乳癌的病因上不能完全明瞭，已證實的某些因素亦仍存在著不少的爭議。停經前和停經後雌激素是刺激發生乳腺癌的明顯因素。此外，遺傳因素、飲食因素、外界理化因素以及某些乳房良性疾病與乳癌的發生有一定相關。乳癌除了和遺傳有很大的關係外，和肥胖也有很大的關係。如果攝取過多的熱量，會導致較高的乳癌罹患率。這是因為攝取了過多的熱量使體內代謝旺盛、荷爾蒙異常，異化細胞的分化也比較快。而攝取過多脂肪會使腸中細菌從膽汁鹽類製造較多的動情激素，也較容易得乳癌。

在乳癌的第一線治療目前主要是以乳房全部切除，較新的治療技術乳房保留手術也漸漸的發展成熟，再輔以第二線的化療或放射性治療將可延長其存活率，但在 1997 年 Newbold

et al.研究顯示原本用於治療乳癌患者的藥物 Tamoxifen 可能會造成女性子宮頸癌發生率上升；西藥的治療上有些報告指出會有導致其他癌症或副作用之發生，所以研究者漸漸的朝中草藥有效成分來發展，如紫杉醇用於轉移性乳癌的第二線化學治療或曾接受第二線化學治療後六個月復發之乳癌患者仍有不錯之治療效果。所以開發中草藥用於治療癌症的新藥為目前刻不容緩的目標，以往的癌症用藥以造成細胞壞死的途徑來殺死癌細胞，結果亦使正常的細胞大量死亡，導致病患在治療的過程中身體極大的不適。近年來計畫性細胞凋亡機轉是研究治療癌症藥物的發展方向，若能由天然植物中純化出有效抗癌化合物，研究其是否可經由計畫性細胞死亡之途徑來抑制細胞之生長甚至殺死癌細胞，則將有別於傳統研究治療癌症之藥物只有著重於對細胞壞死與細胞毒性的研究。

自然界中發現的類胡蘿蔔素有超過 600 種，在人體的血液及組織器官中鑑定出的類胡蘿蔔素約只有 20 種。流行病學研究發現，類胡蘿蔔素可降低數種疾病的發生，如癌症、心血管疾病、老年性黃斑退化症(AMD)[1]等疾病。多攝食富含類胡蘿蔔素的蔬菜水果也可降低肺癌、胃癌，以及前列腺癌的發生。類胡蘿蔔素結構上具有長鏈的共軛雙鍵構造，此一結構可吸收自由基而形成共振，降低自由基的活性。類胡蘿蔔素可直接與激發態的葉綠素作用或清除單重氧，而防止其他破壞性反應產生。類胡蘿蔔素可終止自由基的連鎖反應，並與單重氧自由基作用而形成較安定的類胡蘿蔔素自由基，以防止蛋白質及 DNA 等受到氧化傷害。Mortensen 及 Skibsted(1997)的研究報告中指出類胡蘿蔔素和單重氧自由基的反應速率隨著類胡蘿蔔素上的共軛雙鍵數目增加而增加。在人類血液中發現有相當高濃度之 α -carotene、 β -carotene、 γ -carotene、lycopene、lutein 及 Zeaxanthin 等對人體有益之類胡蘿蔔素。而在動物實驗及細胞培養實驗都顯示類胡蘿蔔素可作為一抗癌 agents，如 β -carotene 在正常乳腺上皮細胞可以促進細胞進行分化，以及調控其增生作用，因此對於乳癌癌化具有保護作用。 β -carotene 也可以抑制乳癌細胞生長，其可能的作用機制是抑制 RAR 表現及抑制 activator protein-1 (AP-1)所媒介的基因活化作用。另外 β -carotene 也可促進 HL-60 血癌細胞分化。Michaud 等人研究 α -carotene 和 lycopene 可降低非吸煙者肺癌的發生率，而且攝入較多的 carotenoids 比少量攝入 carotenoids 的人其肺癌發生率也較低。在動物實驗的模式中，Lycopene 可以抑制人類乳癌細胞的增生，在乳癌自發性模式下(spontaneous mammary tumor model)，可抑制乳癌的發展。Toledo 等人以 RH 模式(resistant hepatocyte model)進行研究，發現 lutein 和 lycopene 可抑制大鼠肝炎癌化的發生，並推斷 lutein 和 lycopene 是經由保護 DNA 的穩定性，進而達到抗癌的作用機制。因此類胡蘿蔔素中， β -carotene、lycopene、lutein 和 retinoid 等均具有抗癌的潛力。這些類胡蘿蔔素成分若能由平常飲食中直接攝取對生物體無毒性傷害，且可降低細胞內活性氧物質，減緩細胞脂質過氧化的發生，並預防 DNA 損傷的抗氧化食品成分，減少疾病的發生進而達到疾病預防的保健能力。

對於腫瘤學家來說，腫瘤細胞的侵犯及轉移是現今最難解決的問題之一。不幸的是，臨床上對於有效預防腫瘤細胞發生侵犯並沒有重大的突破。侵犯在癌細胞轉移中是關鍵性的一個環節，且藉著癌細胞與周圍環境交互作用的生物活性而發生。整個轉移的過程可以分成三個次要步驟：(a)腫瘤細胞附著於周圍環境的細胞外基質 (b)降解基質的酵素產生(c)腫瘤細胞穿過被破壞的基質而遷移出去。癌細胞開始啟動及成功的完成上述三個步驟，為

的就是經由進入循環及淋巴系統而達到遠距的轉移。為了研究上述三個步驟的機制，一些細胞實驗已經發展了“侵犯”的實驗模組，可用來篩選各種癌細胞的侵犯活性。蛋白質水解酶（proteases）在許多疾病中扮演重要的角色，細胞外蛋白質水解酶是腫瘤細胞穿過組織細胞所須的物質，水解細胞外基質蛋白對侵掠性腫瘤的轉移是必須的；此外，支援腫瘤生長的血管增生也藉此水解細胞外基質蛋白。有四種內肽酶（endopeptidases）：絲胺酸（serine）蛋白酶、胱胺酸（cystine）蛋白酶、天門冬胺酸（aspartyl）蛋白酶及基質金屬蛋白酶（Matrix metalloproteinases, MMPs），四種都和腫瘤發生、轉移過程有關。而MMPs是腫瘤發生過程中四種蛋白質水解酶最重要的一種，在原位的增殖性腫瘤到侵襲轉移癌的演進過程，都扮演極重要的角色。

MMPs主要包括膠原酶(Collagenases)、明膠酶(Gelatinases)和基質溶素(Stromelysins)和膜型MMPs (MT-MMPs) 及其他酶類等。膠原酶又分為膠原酶1、膠原酶2和膠原酶3，分別由纖維母細胞、嗜中性細胞和腺瘤細胞分泌，可分解纖維膠原，在基質重構中起重要作用。基質溶素能將其它基質金屬蛋白酶由酶原形式轉化成活性基質金屬蛋白酶，並降解構成基質的另外兩種主要成分彈性蛋白及蛋白多糖中的蛋白質。明膠酶分為明膠酶A (MMP-2) 和明膠酶B (MMP-9)，作用受質為明膠、膠原I、IV、V型以及彈性蛋白。MMPs多數以無生物活性之酶原型式分泌，其活化需要進行蛋白質水解，故基活過程往往伴隨蛋白質分子量的減少。正常人體內MMPs的活性必須受到嚴密的控制。身體可以釋放tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)來抑制MMPs的活性。多數MMPs基因轉錄受內源性生長因子及細胞激素（如：IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- α 及IFN γ 等因子）的調節。在超過26種MMPs中，明膠酶被認為與腫瘤轉移及血管新生成特別相關；研究指出：潛伏的明膠酶A會明顯地在惡性乳癌中增加，且有活性酵素比例隨腫瘤等級增加，證明有活性的明膠酶A大量存在侵略性乳癌中[2]。明膠酶A的表達和胃癌、結腸癌和乳癌發展有關。明膠酶A在侵略性卵巢腫瘤、肺癌病人的血清比起良性卵巢囊腺瘤（cystadenomas）及正常人或無轉移情形的病人的血清有較多的表現。此外，在非小細胞肺癌和相對應的肺組織中，明膠酶A表達層次和腫瘤擴散的組織病理學有高度相關性。明膠酶B之基因主要受生長因子、細胞激素、紫外線及TPA刺激而被轉錄；此外，在一些惡性程度較高的腫瘤細胞，亦發現明膠酶B有大量表現。明膠酶能夠促進內皮細胞形成微管網狀結構、助長微血管生成和分解組織，因而可幫助癌細胞向外擴散。故明膠酶抑制劑被認為是很有潛力的抗癌藥物之一。

本次研究之目標主要是針對 lutein 進行相關之研究。在許多 lutein 的研究中常有另一類胡蘿蔔素 zeaxanthin 也同時會一併研究，因為 Lutein 及 zeaxanthin 的結構相當相似，有些研究在進行定性及定量分析時無法將此兩種類胡蘿蔔素分離，是故常一起探討其功能。Lutein 及 zeaxanthin 原本是存在於天然蔬菜與水果中的一種天然類胡蘿蔔素，人體無法自行合成，必須要從食物中才可以獲得。有研究指出 lutein 及 Zeaxanthin 可以在黃色植物中發現，如玉米；同時也可以發現綠色蔬菜中含有高量的 lutein 及 Zeaxanthin，如菠菜、芥藍菜等；偶而 lutein 及 Zeaxanthin 也可以在動物性產物中發現，如蛋黃中即含有很高量之 lutein 及 zeaxanthin，因為該動物平日攝取富含 lutein 及 Zeaxanthin 之飼料。

近年來許多流行病學報告中均指出，lutein 對於人體正常身體功能具調節及保護作用。

於 2000 年的報告證實 lutein 具清除體內由自由基產生之過氧亞硝基物 (peroxynitrite) 之能力，因此和大多數的類胡蘿蔔素一樣亦扮演著抗氧化物的角色。Martin et al. (2000) 等學者有研究指出，lutein 可減少人類動脈內皮細胞上黏著分子的聚積，進而降低粥狀動脈硬化的發生。Dwyer et al. (2001) 於體外模式下證實 lutein 可抑制動脈血管上單核球的聚積，並可減小 apo-E 缺乏的小鼠 (apo-E-null mice) 體內之粥狀動脈硬化病變區域之範圍。血清中及飲食中 lutein 的量與冠狀心臟疾病與中風成反比。1997 年及 2001 年的流行病學研究顯示，以飲食介入的模式，投與受試者 lutein 及 zeaxanthin 或攝取大量深綠色食物，可顯著降低冠狀心臟疾病之發生率。更有研究指出攝取含有 lutein 及 zeaxanthin 的食物或補充富含類胡蘿蔔素的食物會增加視網膜上黃斑色素的密度，以達到保護眼睛之功能在細胞培養的實驗中，lutein 比 β -carotene 更可以有效的抑制細胞脂質的過氧化，以及保護細胞免於 DNA 氧化損傷，在人體血漿中高濃度的 lutein，使乳癌細胞有較好的 estrogen receptors 表現，並比荷爾蒙治療有較高的存活率。以老鼠餵食 lutein 的方式，也可降低乳癌的生長，並加強淋巴球的增生作用。在以 BALB/c mice 的動物實驗模式中，餵食低劑量金盞花草提取物 (marigold extract) 中的 lutein，可以有效的減少乳癌的發生，並抑制乳癌的生長及脂質過氧化。

由上述許多研究顯示 lutein 確實具有保護人體之作用，其具有研究發展之潛力；但目前國外研究從天然物中萃取 lutein 大部份是從金盞花 (marigold) 來萃取 [3]，國內目前栽種金盞花之區域並不多，且生長條件並非相當符合金盞花，所以國內金盞花的來源主要仍是仰賴國外進口。本實驗室在研究從天然物中萃取定性及定量分析 lutein 的初步研究中，意外發現台灣地區所栽種之金針含有相當高量之 lutein，且金針在國內有農民大量栽種，若能發展從本土化之植物中萃取 lutein 將會對國內農產品有所幫助，不但能幫助推廣國內之農產品，同時對於研究物料之來源亦能降低成本及穩定供應，因此本實驗針對金針花草提取物中之 lutein 作為本次研究之主角。金針之簡介如下：

金針，又稱萱草、宜男草、黃花菜，為百合科之多年生作物。金針原產我國大陸、西伯利亞、日本、東南亞，其花可供觀賞之外，花蕾收穫後乾燥之成品即為金針菜乾，其味甘鮮，深受國人喜好。長久以來即為一般家庭常用蔬菜。金針鮮蕾可供直接作菜，亦可加工成乾燥產品，提昇其價值。金針菜是多年生宿根草本植物，屬百合科，屬名 *Hemerocallis*，英文俗稱 DayLily，原產我國大陸、西伯利亞、日本、東南亞等地，是我國特有栽培作為食花用之蔬菜，臺灣目前金針菜經濟栽培的品種為 *H. fulva* L，是明朝末年從華南引入臺灣種植，主要產區分佈於台東縣太麻里、長濱、知本、花蓮縣玉里、富里、嘉義縣梅山及南投縣等地區海拔 800~1,000 公尺之山坡地。金針之功能在本草綱目有記載，萱草有利尿、止血、消腫等作用，但對其他之功能則少有記載。一般民間只將金針當一般蔬菜食用，素食者更常食用金針花當食材所作之料理，如金針湯，金針菜等，但功效仍不明確，有待本研究加以開發。

本實驗室選擇利用超臨界二氧化碳進行天然植物中萃取 lutein 之研究 [4,5]，因為傳統萃取 lutein 的方法為利用索氏萃取法 (Extraction of Soxhlet)，將樣品放在萃取的玻璃容器中，再加入有機溶劑如 Acetone 或 Hexane 將 lutein 溶解萃取出來，但全程萃取所需耗費之時間及過程相當攏長而複雜，且萃取後會有大量有機溶劑廢液產生，對於應用於萃取蔬菜及水

果中的類胡蘿蔔素而言，萃取後之產物會有有機溶劑的殘留等毒性問題產生，故在天然植物中萃取類胡蘿蔔素較不適合使用。另有研究發展出超臨界二氧化碳萃取方法，其優點為萃取所需時間短，萃取後無有機溶劑廢液之環保問題，最重要的為應用於天然食物中類胡蘿蔔素的萃取時，不會有有機溶劑殘留等毒性問題。一般最常被採用之超臨界流體為二氧化碳(CO₂)，主要原因有：臨界點適中，臨界溫度僅 31.1°C，適合分離易受熱分解的天然物；臨界壓力適中 (72.8 atm)，又不可燃，無毒性、化學性質穩定且安全性高；但因二氧化碳極性小無法分離高極性之化合物為其主要之缺點，因此 N₂O 及 NH₃ 曾被用來作高極性之物質分離，但這些物質化學性質較活潑，且對人體有一定程度之不良影響，所以使用率不高。因此本實驗室選擇超臨界二氧化碳作為天然植物中萃取 lutein 的主要方式。同時本研究亦成功利用 HPLC 分離 lutein 和 zeaxanthin。

本研究計畫預計將金針花萃取物應用兩大方向：首先是利用 ultra-weak chemiluminescence analyzer 進行金針花萃取物抗自由基之實驗，由於金針花在初步之研究結果顯示其含有高量的 lutein，而 lutein 的結構含有許多共扼雙鍵，此一結構可吸收自由基而形成共振，降低自由基的活性，故針對此一特性，將進行抗自由基之研究。自由基的產生對細胞或 DNA 會造成氧化性損傷，而在慢性病或癌症的發生扮演一相當重要之角色。因此若金針花萃取物能掃除自由基，將可進一步進行細胞培養實驗。在抗自由基的研究選擇所欲清除的自由基主要有 superoxide anion (O₂^{•-})、hydrogen peroxide (H₂O₂)和 hydroxyl radical (•OH)等三種，此三種自由基為最常在人體體內產生，並造成氧化性損傷(Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C., 1991)。因此本研究第一項應用之方向為抗自由基功能之評估及試驗。

其次本研究欲將金針花萃取物應用於人類乳癌細胞(MCF-7、MDA-MB-231)抗癌實驗中，目前乳癌的研究大多是以動物實驗為主，且在動物實驗的模式中顯示 lutein 具有降低乳癌細胞生長之功效，如 Chew et al.的研究顯示以老鼠餵食 lutein 的方式，也可降低乳癌的生長，並加強淋巴球的增生作用(Chew et al., 1996)。另外，在 Park et al.的研究顯示在以 BALB/c mice 的動物實驗模式中，餵食低劑量金盞花萃取物(marigold extract)中的 lutein，可以有有效的減少乳癌的發生，並抑制乳癌的生長及脂質過氧化。而在細胞培養的實驗上尚未有明確之作用機轉，其是否也具有抑制腫瘤細胞生長，甚至誘發癌細胞凋亡的潛力，以及其作用之機轉為何？透過本研究萃取金針花主成分之抗癌的努力，找出對抗人類乳癌的有效方法。

Material and method

1. 金針花之 lutein 萃取

本研究選擇天然植物金針花作為萃取 lutein 的來源，係因為天然植物為傳統中草藥，且在國內有大量栽種，來源取得容易，且先前初步之研究已顯示金針花中含有高量之 lutein。先將金針花洗淨後晾乾，秤其未乾燥前之濕重重量紀錄，然後放入冷凍乾燥機中進行冷凍乾燥步驟，待樣品完全乾燥後秤其乾重重量紀錄之。將乾燥後之樣品使用研磨機將其研磨製成粉抹狀，以利進行下一步驟之超臨界二氧化碳萃取。本研究欲將先前在本實驗室研究所發展之超臨界二氧化碳萃取方法在加以改良，以提高其產量。超臨界二氧化碳萃取的優點較傳統萃取方式為萃取所需時間短，萃取後無有機溶劑廢液之環保問題，最重要的為應用於天然藥草的萃取時，不會有有機溶劑殘留等毒性問題，故本研究依然選擇使用超臨界二氧化碳萃取方法進行金針花 lutein 的萃取。

使用超臨界二氧化碳萃取 lutein，將前一步驟製備好之樣品粉末放入萃取槽，萃取槽容量為 50 ml。測試並設定萃取時最佳之壓力、溫度及二氧化碳流速等條件，以提高從蔬果中萃取出 lutein 的萃取量，同時也可避免萃取出其他物質，以增加萃取後產物之純度。再將萃取出來之產物進行 HPLC 之定性及定量分析，以鑑定本研究所萃取之物質為 lutein，並檢驗回收率。

本研究先前已成功從天然植物中使用超臨界二氧化碳萃取出 lutein，並將萃取物中之主要成份鑑定出為 lutein，初步之實驗結果已相當有效，為實驗之條件較為複雜，期能在本次計畫內再加以改良，除改良超臨界二氧化碳萃取 lutein 之方法外，對於 HPLC 定性及定量之條件亦加以簡化，在顧及能完全分離所欲分析之目標物之下，達到簡化分析條件之目的。

2. 高效能液相層析儀操作

使用 JASCO 系列之高效能液相層析儀，包含一部 photodiode array detector (MD-2015) 及兩部 HPLC 用高壓 pump (PU2080 Plus)，可利用 photodiode array detector 以同時獲得多個不同 UV 波長之層析圖。

3. 以超微量化學發光儀測定抗超氧陰離子(superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$)之能力

抗超氧陰離子能力之測定是參考 Greenwald et al. (1985)及 Mathys et al. (1997)等學者所述之方法，再加以修飾。分別將 0.25U 之 xanthine oxidase (XOD)、磷酸鹽緩衝溶液及 lucigenin 加入樣品槽內，並放入超微量化學發光儀內開始測量，於適當時間後加入 xanthine，並連續紀錄適當之時間內之總發光值，測定後計算其抑制超氧陰離子之能力。

4. 以超微量化學發光儀測定抗過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)之能力

測定抗過氧化氫之能力的方法主要是參考日本學者 Okubo et al.(1999)所發展出來的理論，並加以修飾以符合本研究之需求。在樣品槽內分別加入適當濃度之過氧化氫及待測之樣品，並放入超微量化學發光儀內開始測量，於適當時間後加入乙醛，並連續紀錄適當之時間內之總發光值，測定後計算其抗過氧化氫之能力。

5. 以超微量化學發光儀測定抗羥自由基(hydroxyl radical, $\cdot OH$)之能力

掃除羥自由基能力的測定方法主要是參考 Gülüzar et al. (1998)及 Kahraman et al. (1997)等學者所述之方法，並依實驗需求加以修飾以符合本研究。反應溶液含有 200 μM 的硫酸亞鐵溶液、待測之樣品及磷酸鹽緩衝溶液，將上述之溶液分別加入樣品槽內，並放入超微量化學發光儀內開始測量，於適當時間後加入 luminol，並連續紀錄適當之時間內之總發光值，測定後計算其掃除羥自由基之能力。

6. 細胞培養

將人類腫瘤細胞如 MCF-7 等以 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液培養於 5%CO₂ 的 37°C 的細胞培養箱中，保持濕度 90%。細胞長滿後，將培養液抽乾，以 PBS 溶液清洗細胞，加入 3ml 0.05% trypsin-EDTA，至於 37°C 2 分鐘後，加入新鮮的培養液將細胞收集，離心 1000rpm 5 分鐘後吸掉培養液，在加入新鮮培養液，將細胞均勻沖散，依實驗目的的不同，將細胞均勻分配到各種大小的培養皿中。

7. 藥物處理細胞的方法

每次實驗，細胞都經重新換代培養，經過 24 小時的培養後，先吸除原來舊的培養液，再將與培養液充分混合之藥物加入細胞培養皿，依各種實驗情況在培養箱中放置不同的培養時間。若因藥物作用而懸浮於培養液之細胞仍和固定於培養皿的細胞一起收集分析。

8. Trypan blue exclusion assay[Freshney, 1994]

細胞以 PBS 洗滌二次後，再以 trypsin-EDTA 處理 2 分鐘，加入培養液，將細胞收集以 1000rpm 離心 10 分鐘，去除培養液，再加入新鮮的培養液，抽吸細胞使細胞均勻分布在培養液中，取出 20ml 的細胞液與 20ml 的 0.2% trypan blue 混合均勻，取出適量的體積置於 hemacytometer 在顯微鏡下觀察，照相並計算呈黑色的死細胞與成明亮的活細胞的數目。

9. MTT 反應分析[Mosmann,] 1983

細胞培養於 24 well 的培養皿上，每個 well 含 5×10^4 個細胞，培養液含各種不同濃度金針花萃取物的 lutein 成分，經各種時間的培養後，將含藥物的培養液吸除，以一倍濃度的 PBS 緩衝液洗滌細胞，加入以 PBS 緩衝液配置的 MTT 溶液濃度為 0.5mg/ml，每個 well 體積 0.35ml，於 37°C 培養 5 小時，若細胞粒線體的呼吸作用仍在進行，則粒線體內的 dehydrogenase 酵素會將 MTT 轉化成紫色的 formazan 化合物結晶，細胞越健康，粒線體呼吸作用越旺盛，其 dehydrogenase 活性越高，則所形成的紫色結晶越多，再於培養皿中加入 10% SDS，於 37°C 培養 12 小時，將結晶溶解，於 570-630nm 的 microtitre plate reader 測定吸光值，互相做比較以決定各種濃度的金針花萃取物處理後細胞的活性。

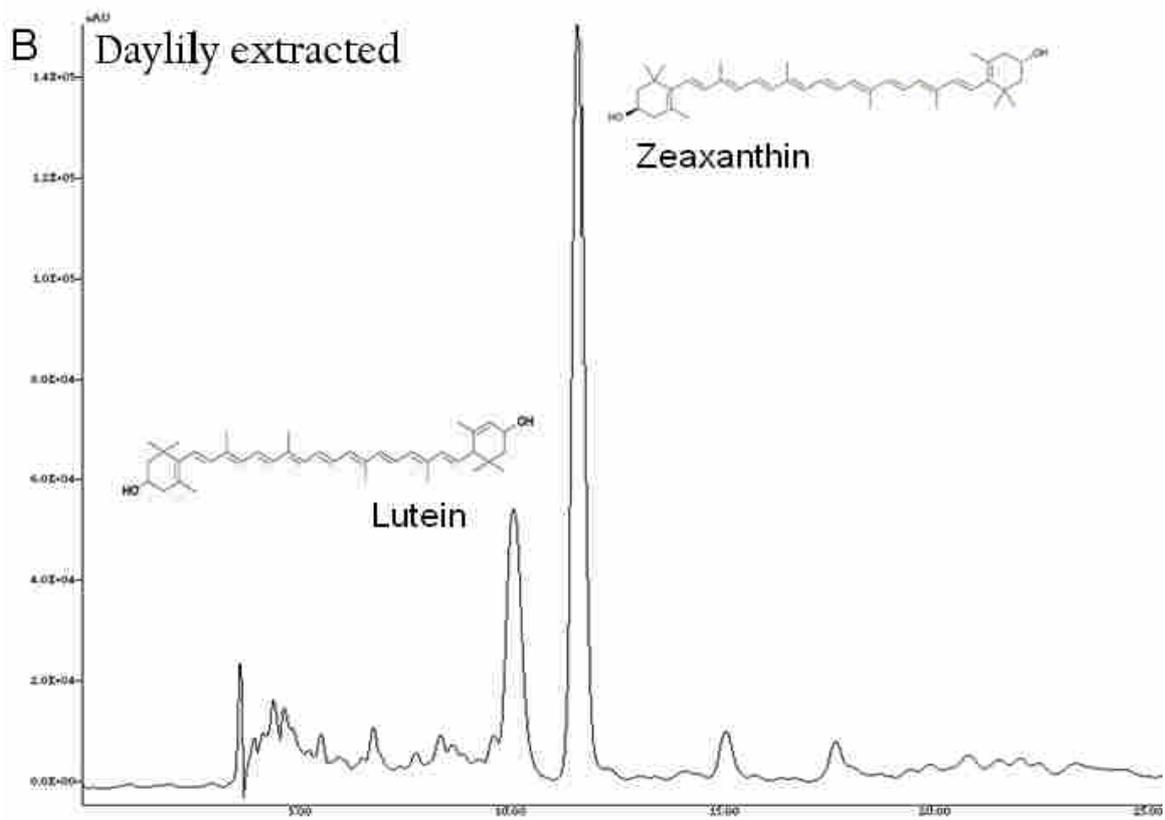
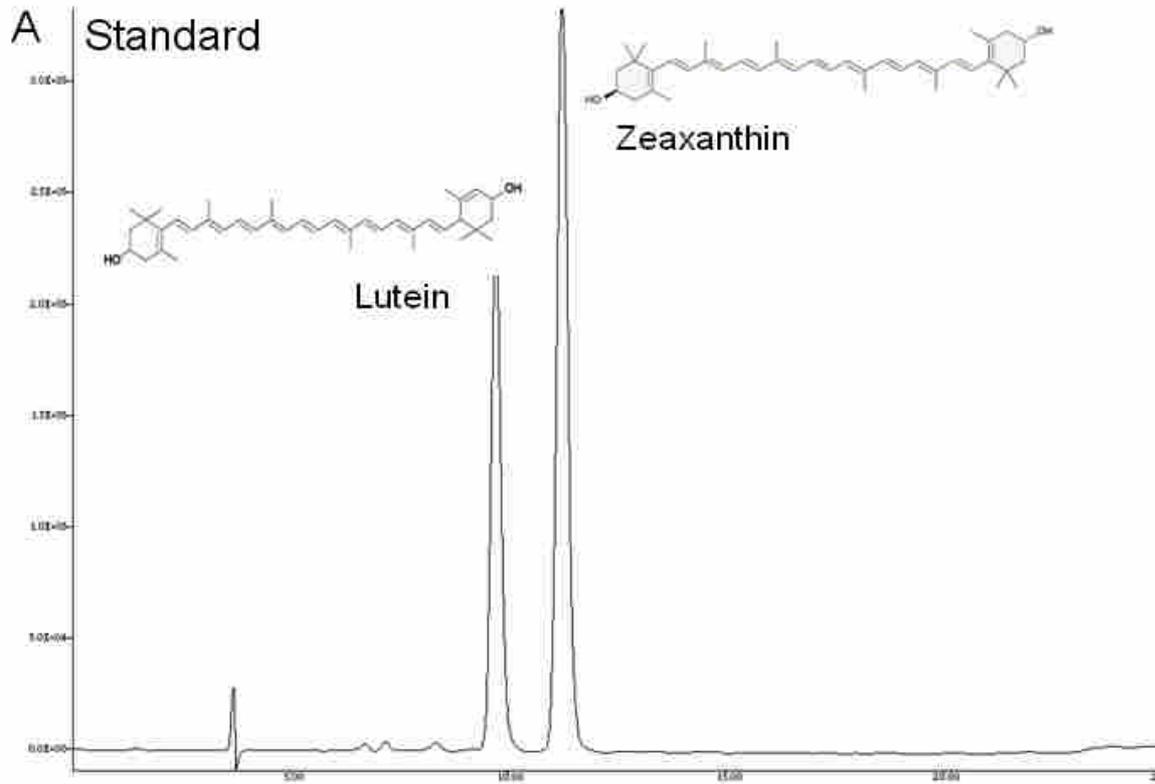
10. 金針花萃取物對過氧化氫誘發細胞產生氧化損傷分析

將細胞種於 24well 後，加入不同濃度之金針花萃取物，並於不同時間點加入過氧化氫，反應四小時後以 MTT 測細胞存活率。

11. Flow cytometry 細胞週期分析[Coligan et al., 1992]

細胞以4°C的PBS洗二次以後，加入3ml 0.1% trypsin-EDTA置於37°C，5分鐘後，輕拍培養皿底部，加入7ml新鮮的培養液以中和掉trypsin的作用，以pipet小心吸放使細胞皆成為單一顆粒，以PBS清洗並離心1000rpm二次，使細胞懸浮於1ml的PBS，取適量的細胞以hemacytometer計算細胞數目，以PBS調整細胞濃度為一百萬個/ml，取出1ml的細胞置於離心管，1000rpm離心5分鐘，直接倒掉上清液，輕彈離心管以打散細胞沉澱塊，以2ml的70%酒精一滴一滴加入離心管使細胞均勻懸浮於酒精中置於4°C至少30分鐘以固定細胞。將細胞以1000rpm離心10分鐘，將酒精倒掉，輕震離心管使細胞沉澱成為單一細胞懸浮，加入0.5ml的 propidium iodide(PI; 50mg/ml)染色液，再加入0.5ml以回溫的Rnase-Dnase free溶液(最終濃度100units/ml)，小心震動離心管使細胞均勻懸浮，將離心管置於室溫，保持避光狀態40分鐘後，以35 μ m nylon mesh過濾樣品，以FACStar flow cytometer 分析每個細胞樣品的細胞週期。

Result



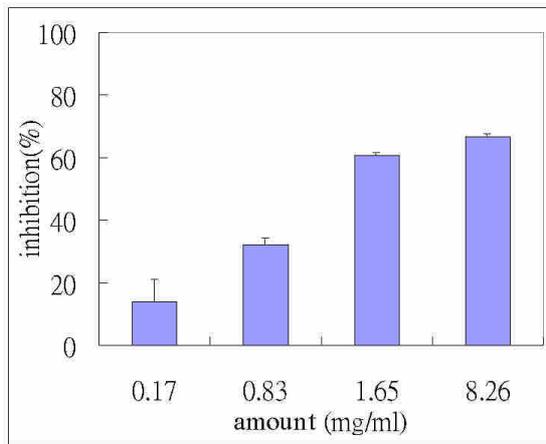
圖一. HPLC的定性分析。(A) standard (B) Daylily extracted。

表一. 利用超臨界二氧化碳萃取天然物中的葉黃素與玉米黃素並使用HPLC定量。從上到下依序是綠豆、金盞花、花椰菜、青椒、豌豆和金針花。

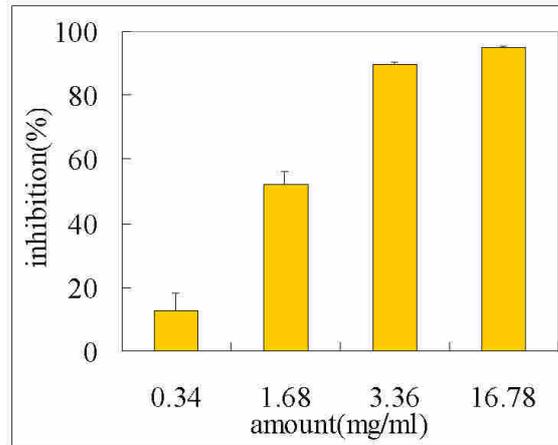
Sample	Pre-extracted(mg/g)	Lutein(μ g/g)	Zeaxanthin(μ g/g)
Mung Beans(<i>Vigna radiata</i>)	368.27 \pm 142.01	3.68 \pm 0.93	2.21 \pm 0.39
Marigold(<i>Tagetes erecta</i> L.)	994.57 \pm 113.69	2.62 \pm 0.18	ND*
Broccoli(<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck)	263.23 \pm 42.07	17.22 \pm 1.17	ND
Capsicum (<i>Green Pepper in A.E</i>)	426.43 \pm 57.11	13.85 \pm 2.24	ND
Garden peas (<i>Pisum sativum</i> L.)	204.23 \pm 55.04	16.58 \pm 2.38	ND
Daylily (<i>Hemerocallis disticha</i>)	401.57 \pm 40.51	24.37 \pm 4.26	19.64 \pm 6.79

*No detect

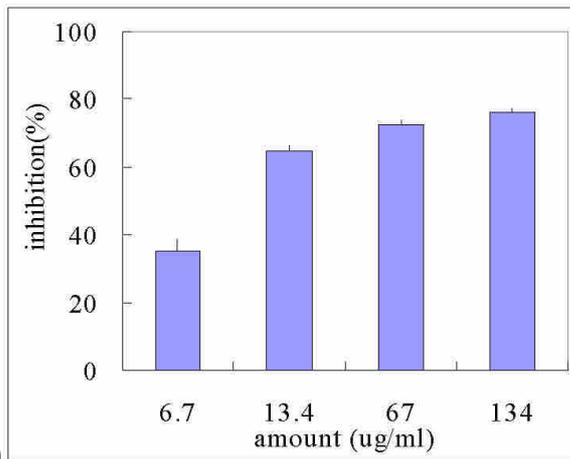
(A)



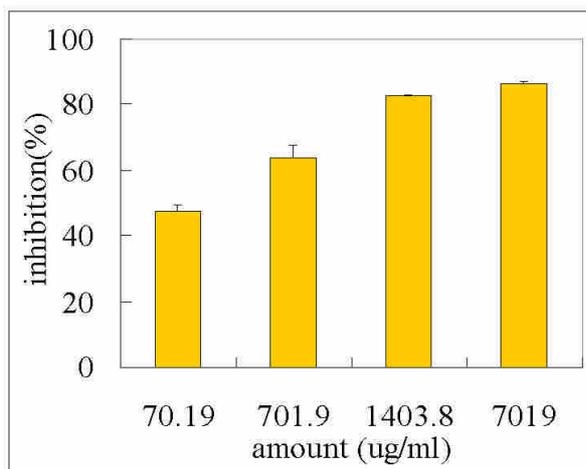
(B)



圖二、H₂O₂ scavenging ability of (A) daylily extract (B) marigold extract..(A)

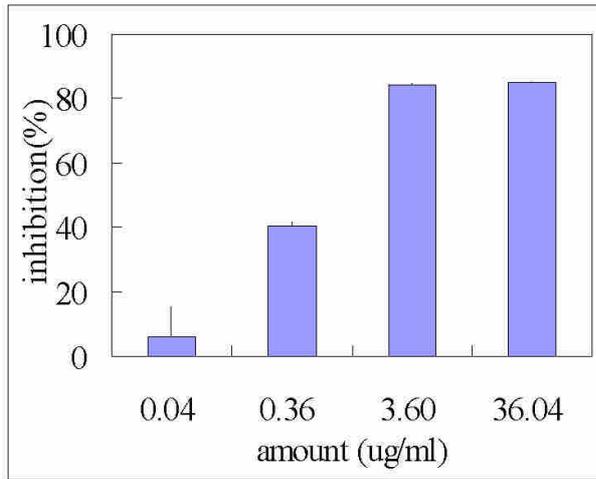


(B)

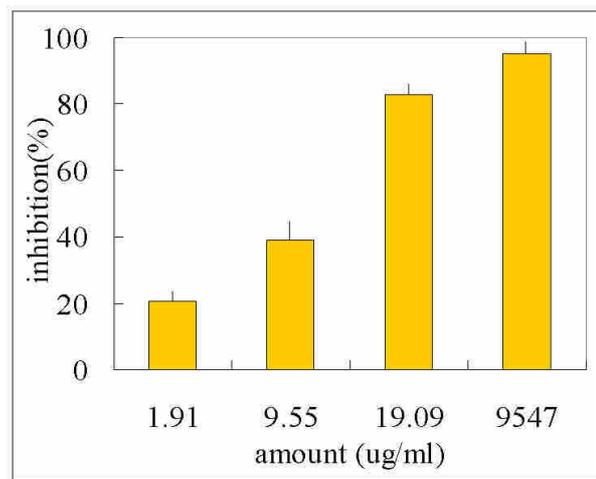


圖三、Hydroxyl radical scavenging ability of (A) daylily extract (B) marigold extract.

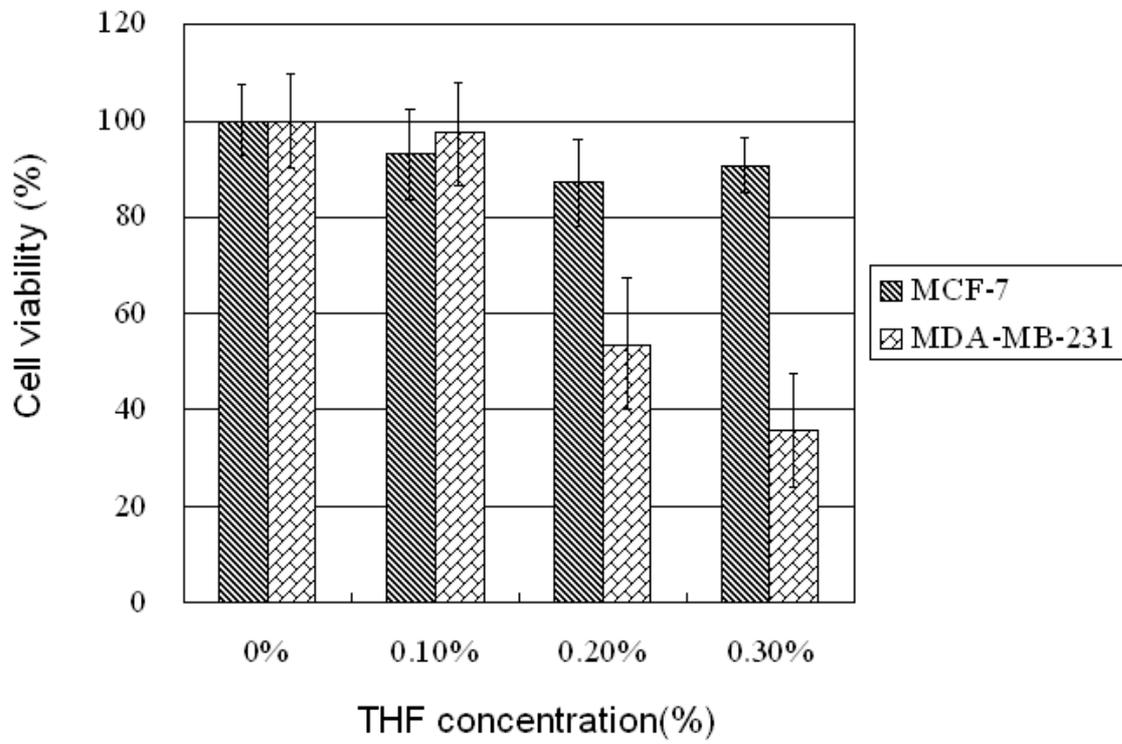
(A)



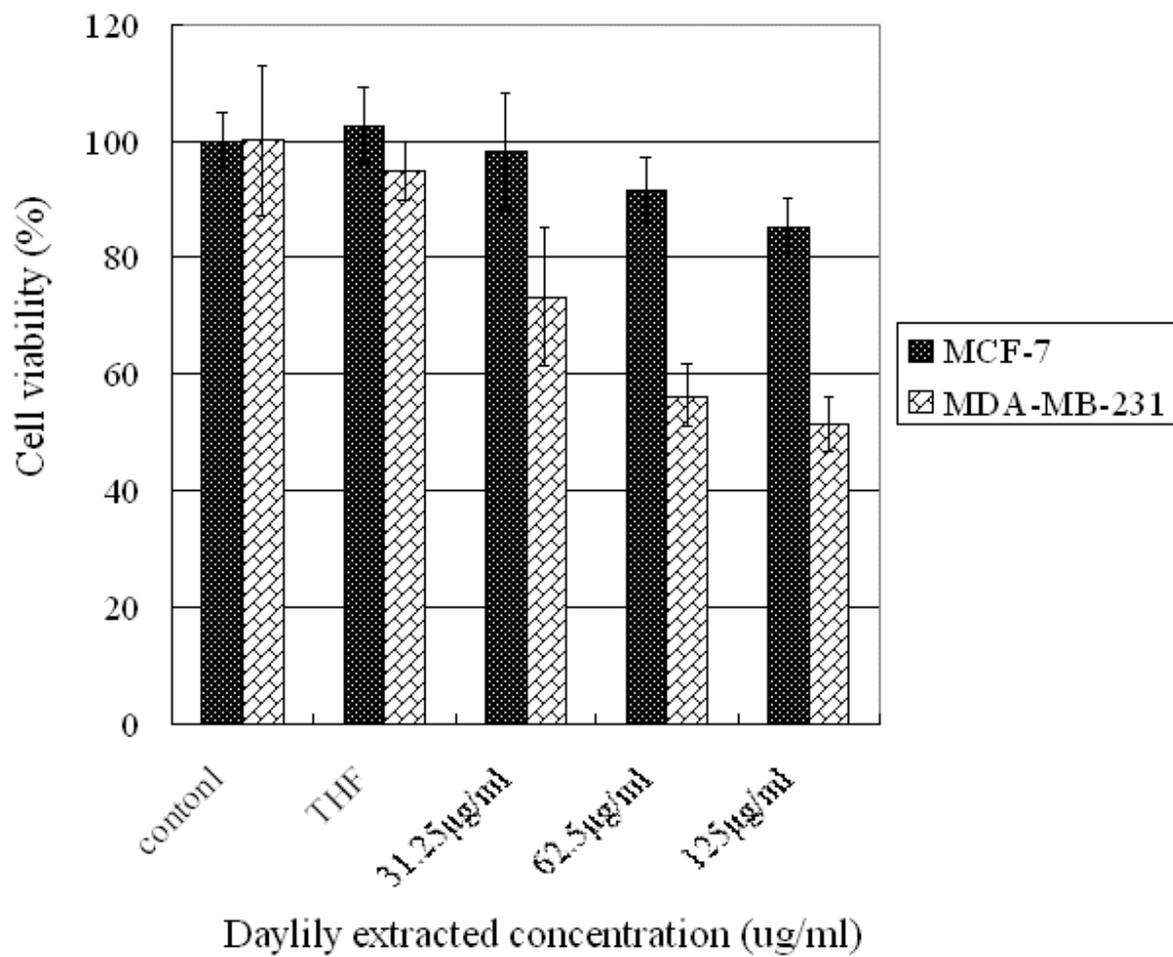
(B)



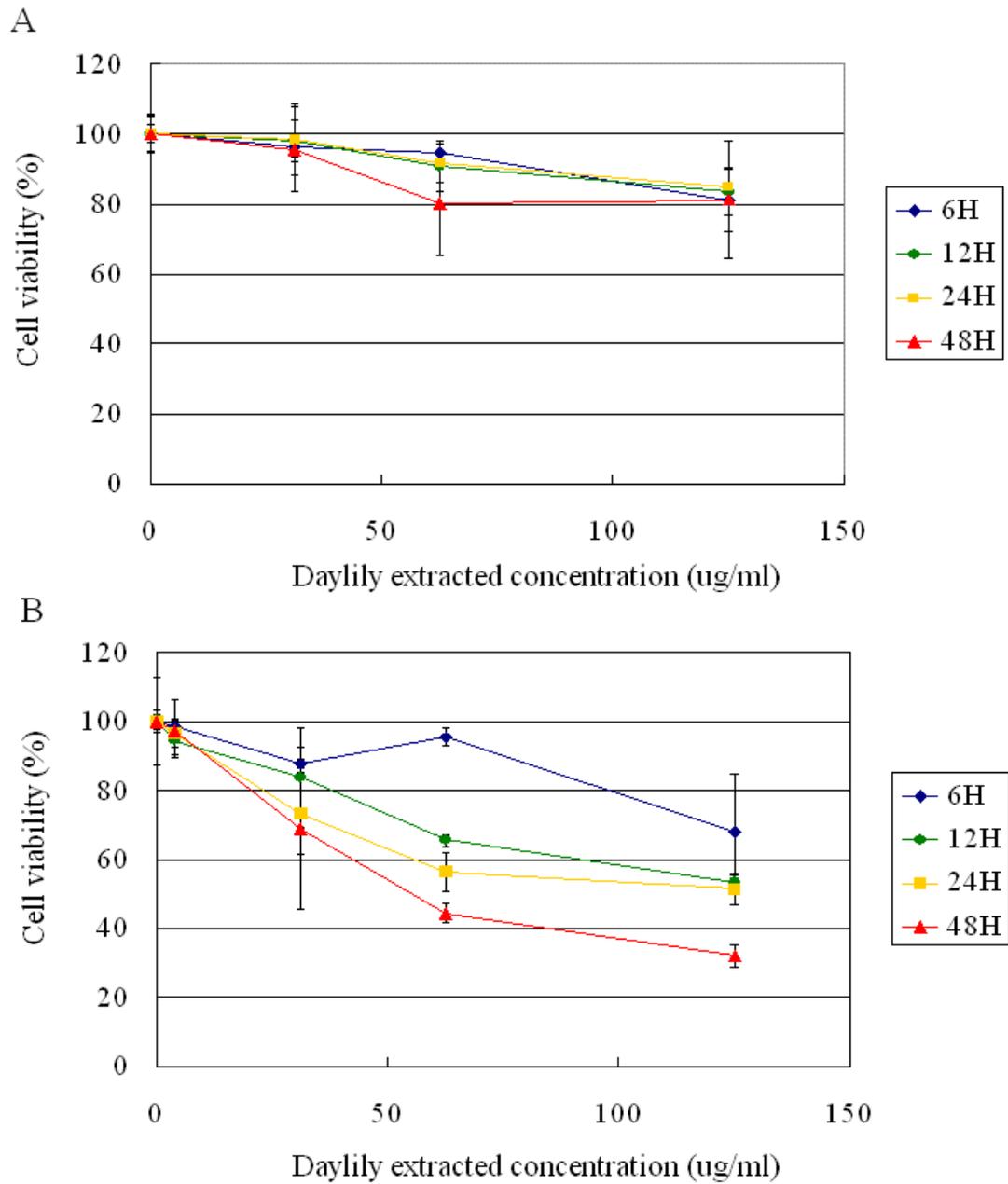
圖四、Superoxide anion scavenging ability of (A) daylily extract (B) marigold extract.



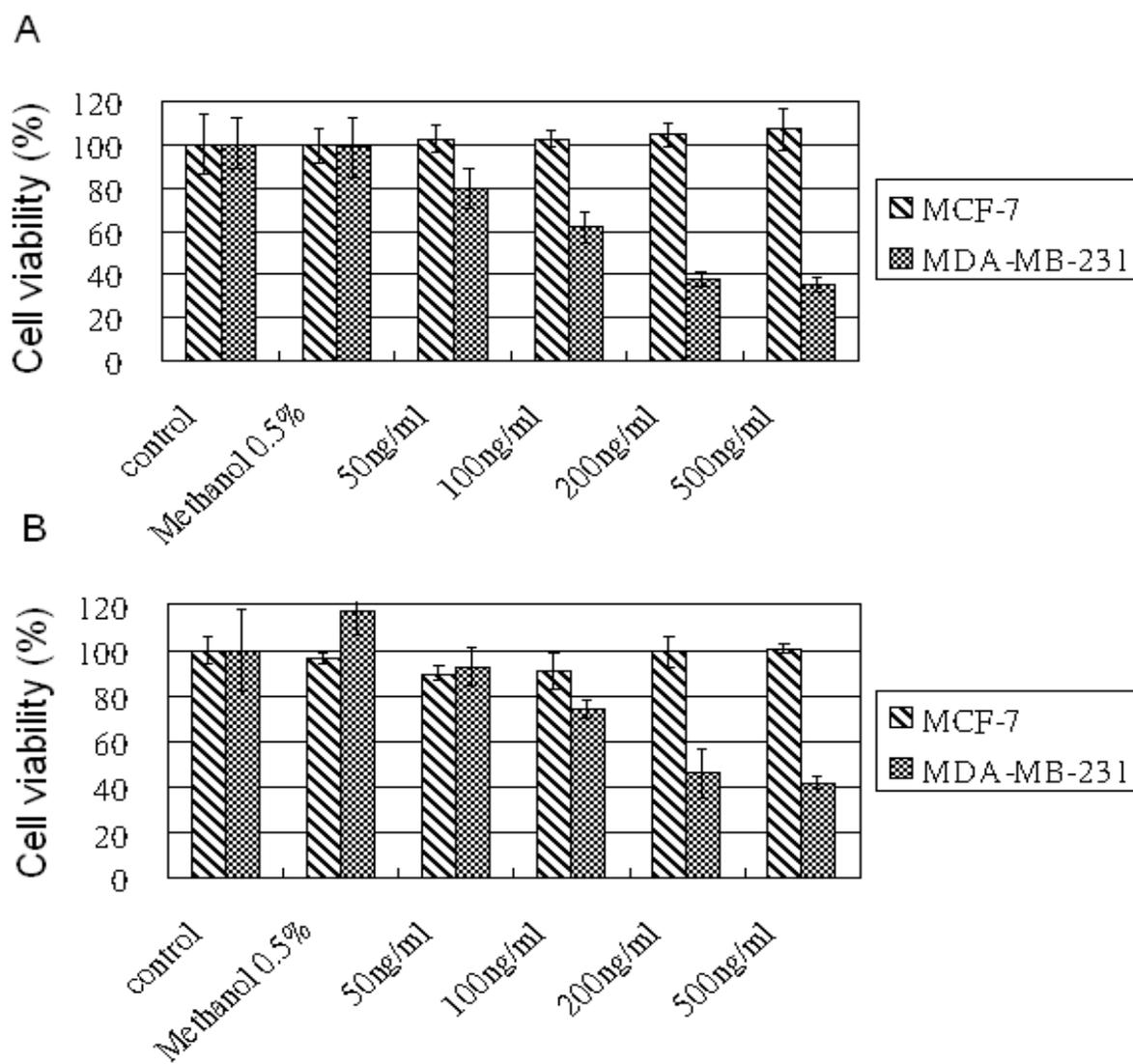
圖五. THF的濃度變化對人類乳癌細胞(MCF-7、MDA-MB-231)作用24小時後產生的毒性影響，細胞密度 10^5 cells/well。



圖六. 金針花萃取物作用在人類乳癌細胞(MCF-7、MDA-MB-231) 24小時所造成的的影響，金針花萃取物溶於THF，細胞密度 10^5 cells/well。

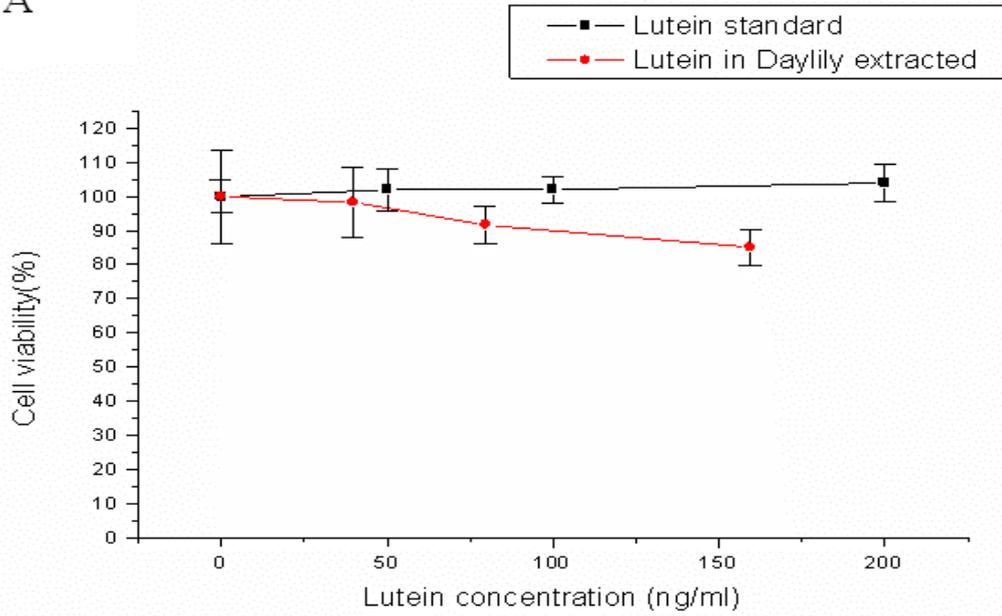


圖七. 金針花萃取物在不同時間點對人類乳癌細胞的存活率所造成的影響。(A) MCF-7 (B) MDA-MB-231，金針花萃取物溶於THF，細胞密度 10^5 cells/well。

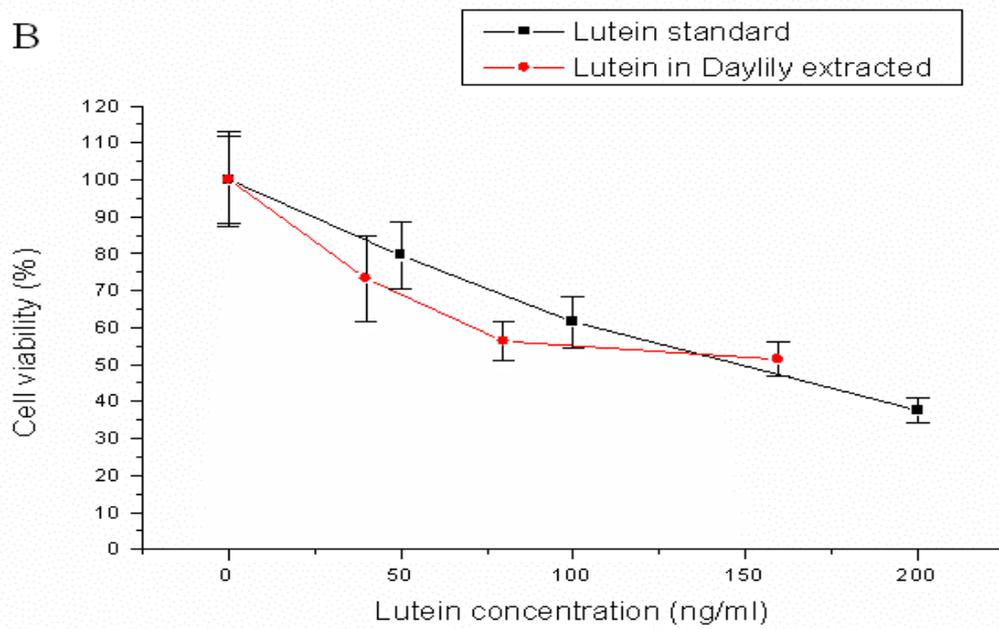


圖八. 葉黃素(Lutein)與玉米黃素(Zeaxanthin)對人類乳癌細胞作用24小時後的影響。(A) Lutein (B) Zeaxanthin 標準品溶於甲醇，細胞密度 10^5 cells/well。

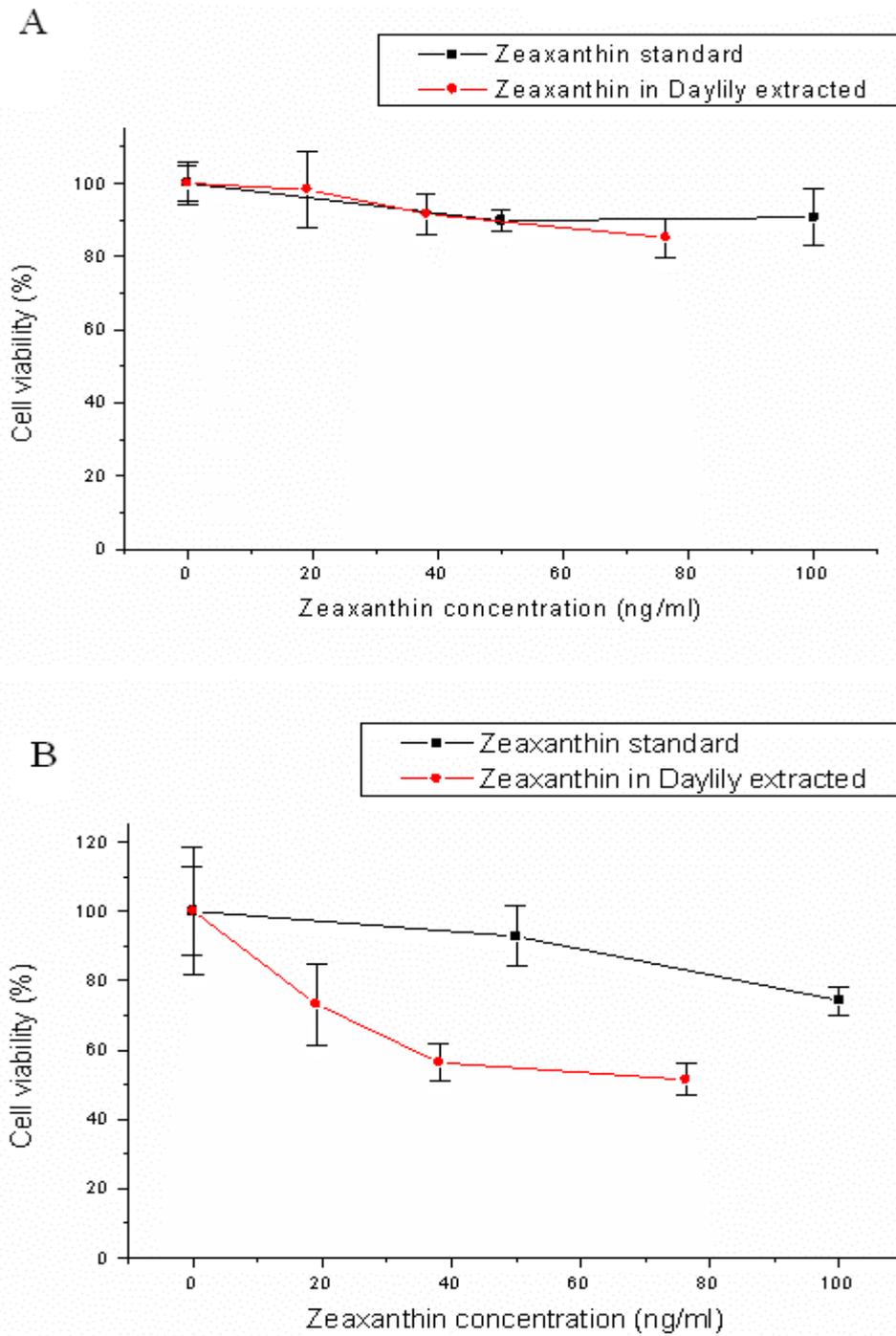
A



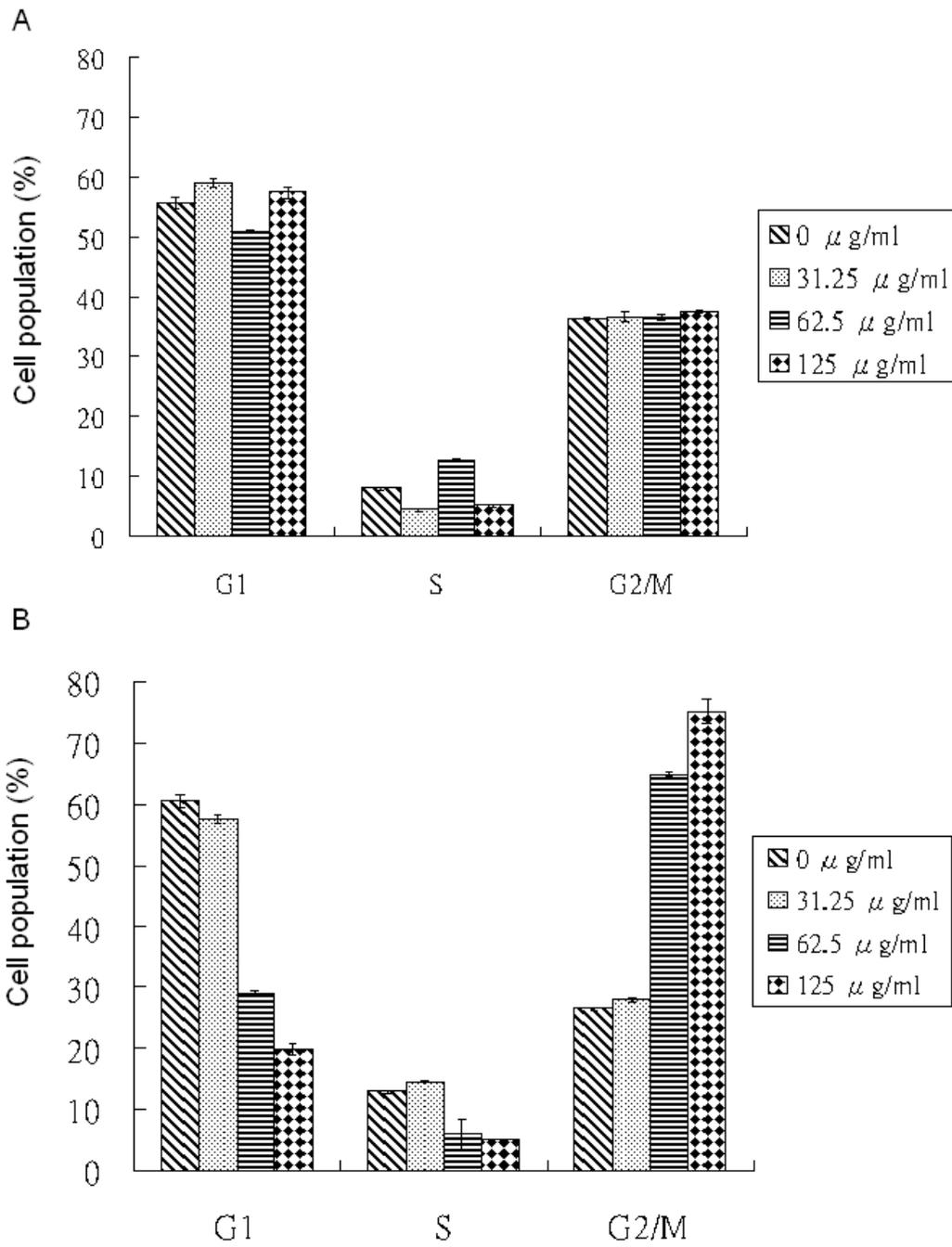
B



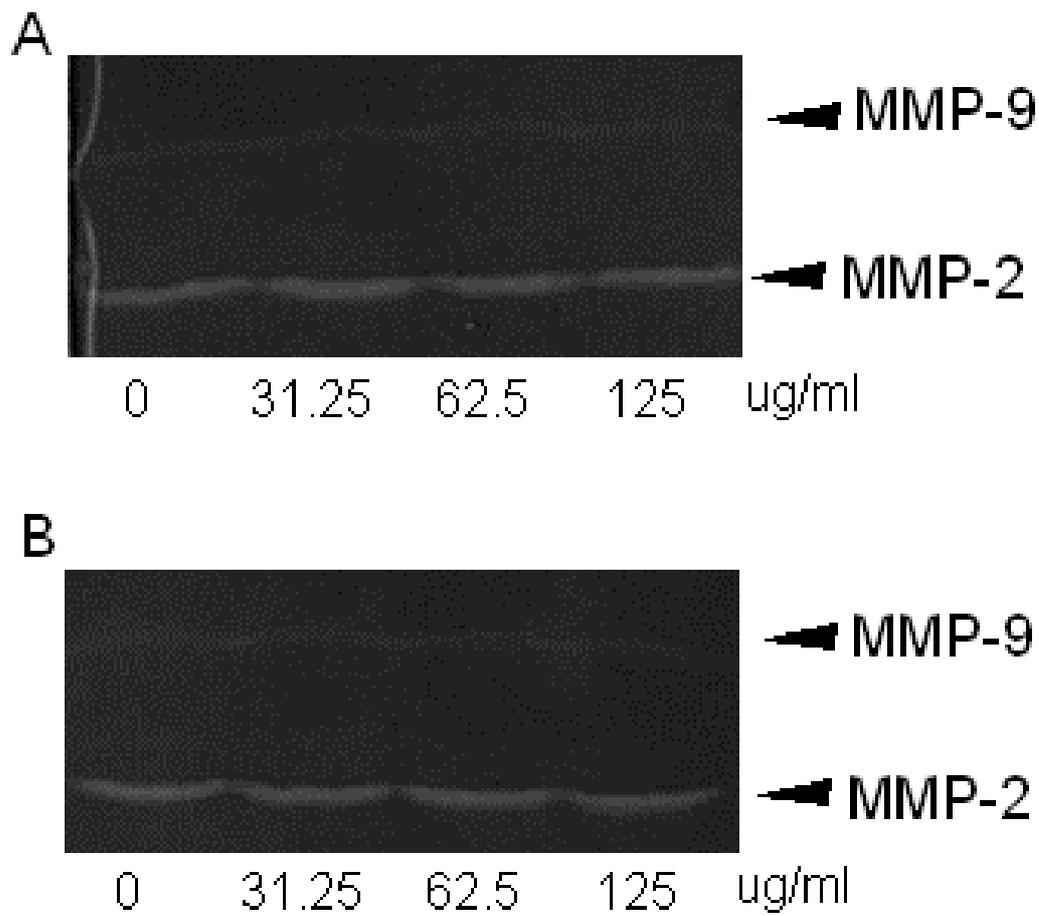
圖九. 葉黃素(Lutein)與金針花萃取物中葉黃素的含量對人類乳癌細胞作用24小時後的影響。(A) MCF-7 (B) MDA-MB-231，細胞密度 10^5 cells/well。



圖十. 玉米黃素(Zeaxanthin)與金針花萃取物中玉米黃素的含量對人類乳癌細胞作用24小時後的影響。(A) MCF-7 (B) MDA-MB-231，細胞密度 10^5 cells/well。

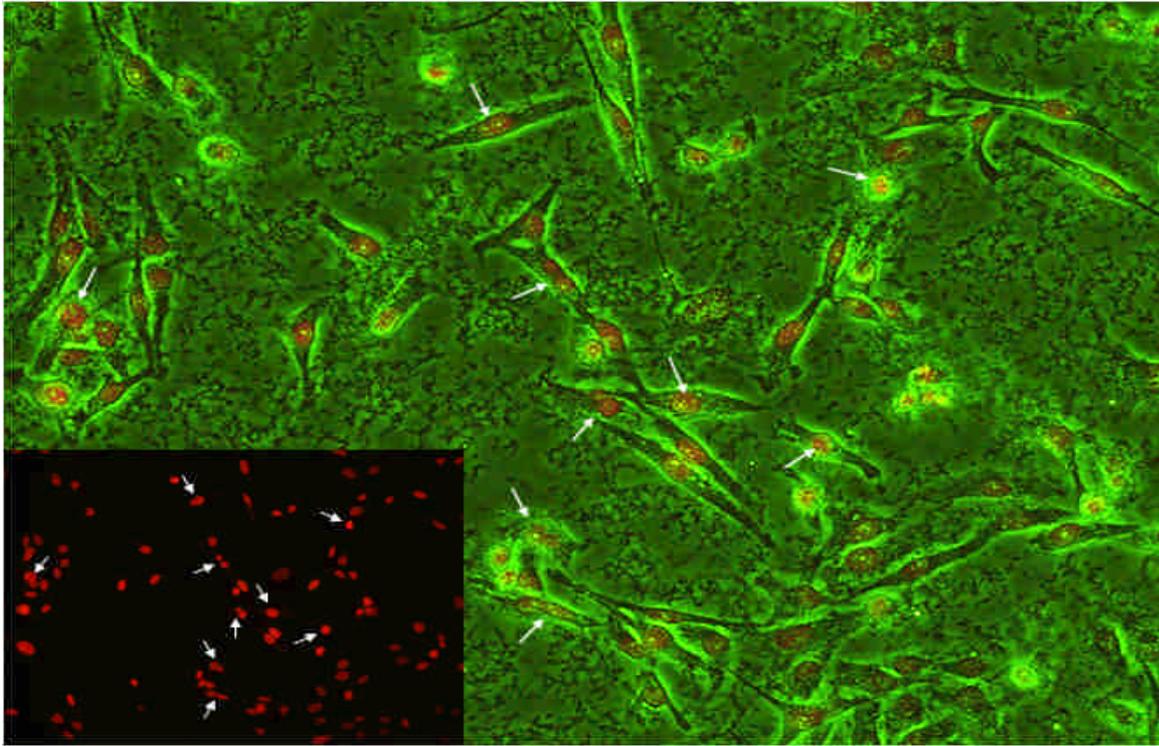


圖十一. 金針花萃取物對人類乳癌細胞作用24小時後，細胞週期的變化。(A) MCF-7 (B) MDA-MB-231。金針花萃取物溶於THF，細胞密度 2×10^6 cells/10cm dish。

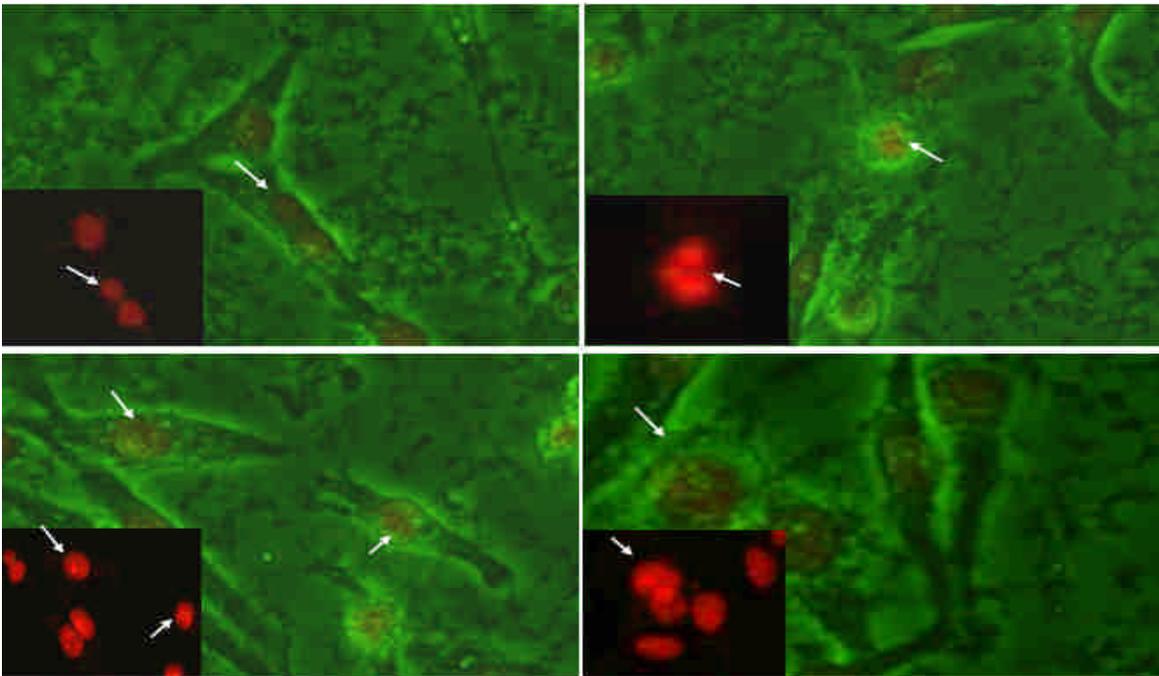


圖十二. 金針花萃取物對人類乳癌細胞作用24小時後，MMPs的變化。(A) MCF-7 (B) MDA-MB-231。金針花粗萃取物溶於THF，細胞密度 2×10^6 cells/10cm dish。

A



B



圖十三. 金針花粗萃取物對人類乳癌細胞作用24小時後，利用螢光顯微鏡，觀察二倍體細胞。(A) 400X (B) 部份放大。

Discussion

過去有許多的文獻都說明多攝取天然植物對身體有益。天然植物中存在著一些植物特有的化學物質，如類胡蘿蔔素與類黃酮等物質，人類無法自我合成這類物質，只能靠攝取自然界中的植物來獲得。目前抗癌藥物的發展，通常都具有相當強的副作用存在，所以尋找自然界中的天然抗癌藥物便顯得十分重要。自然界中有六百多種類胡蘿蔔素，約有 20 種可以經由攝食進入人體的血液中。其中，葉黃素的抗氧化能力比其他類胡蘿蔔素強，且到目前為止的研究都指出，葉黃素比起 β -胡蘿蔔素來的安全，在人體內濃度為 $0.67 \mu\text{g/mL}$ 是沒有致突變性的。金針花是我們在本實驗中，葉黃素與玉米黃素含量最高的植物，我們藉由超臨界二氧化碳萃取並分析出每克的金針花含有 $24.37 \mu\text{g}$ 的葉黃素與 $19.64 \mu\text{g}$ 的玉米黃素，超過了我們分析的金盞花的含量，這讓我們產生了興趣，便進一步由金針花萃取其葉黃素與玉米黃素來進行抗癌的研究。

MCF-7 細胞與 MDA-MB-231 細胞都是乳腺癌的細胞株，其分別是第一期與第三期乳腺癌的細胞株，MDA-MB-231 細胞的染色體突變相當的嚴重，數量接近三倍體，N8 與 N15 染色體缺失，屬於雌激素不依賴型的乳癌細胞，而 MCF-7 細胞屬於良性的乳癌細胞，且是雌激素依賴型。就乳癌的發生而言，基因缺損斷裂造成的基因體不穩定是乳癌進展的原動力，但這種不穩定又是造成每個乳癌都有其特有基因變異型態的主要原因。荷爾蒙致突變性以氧化性傷害為主，這其中便包含基因的斷裂與缺損，這也許是能部份解釋基因斷裂造成基因體缺損對乳癌發生格外的重要。所以我們認為，從金針花萃取出來的葉黃素與玉米黃素，具有很強的抗氧化能力，因該可以抑制乳癌細胞的增生，

從研究結果可以得知，金針花萃取物濃度為 $125 \mu\text{g/ml}$ 時，在抑制乳癌細胞增生的部分，對 MDA-MB-231 細胞的效果可達 48.6%，並且會隨著時間而增加抑制效果，但是對 MCF-7 細胞的抑制效果卻只有 14.9%。接著我們使用葉黃素與玉米黃素的標準品來進行實驗，MDA-MB-231 細胞的存活率隨著葉黃素與玉米黃素濃度的增高而降低，但 MCF-7 細胞卻沒有任何的抑制效果。

金針花萃取物對 MCF-7 細胞有些微的抑制增生的功能，而葉黃素與玉米黃素的標準品在 500ng/ml 的濃度時，沒有抑制增生的現象。過去的文獻中，MCF-7 細胞在葉黃素濃度高達 $7 \mu\text{g/ml}$ 時，會進行細胞凋亡，這個濃度與本實驗金針花萃取物所含的葉黃素濃度相差 43 倍。而金針花萃取物卻以抑制 MCF-7 細胞的存活率達 14.9%，這顯示著金針花萃取物中因該含有某些可以抑制 MCF-7 細胞增生的物質。

過去，曾經有學者分析過金針花中所含的物質，有多達 20 種類胡蘿蔔素被分離出來，其中葉黃素的異構物有 13-cis-lutein 5,6-epoxide、lutein 5,6-epoxide、13-cis-lutein、9-cis-lutein 和 all-trans-lutein[6]，而本實驗中所使用的葉黃素為 all-trans-lutein，雖在 MDA-MB-231 細胞上，抑制增生效果相當明顯，但其濃度仍不足以對 MCF-7 細胞造成作用。Robert H. Cichewicz 從金針花中九種 anthraquinone 的異構物[7]，來測試各種人類的癌細胞的抑制現象，其中 MCF-7 細胞也會受到這類物質的影響而抑制生長，但大部分抑制效果也都不顯著。

我們所使用的金針花萃取物，有大部分是油脂，葉黃素與玉米黃素只佔了初萃取物的0.13%與0.06%，純度不高，因此比較同樣濃度的葉黃素與玉米黃素下，標準品與金針花萃取物的比較就很重要。經過換算做圖來比較，MCF-7細胞的抑制與葉黃素和玉米黃素較無關，而MDA-MB-231細胞抑制的情形則與葉黃素關係較大，與玉米黃素關係較小。超臨界二氧化碳的萃取對物質的專一性差，取決其優點是在於快速、無污染、不會熱降解、新鮮與無溶劑殘留等，所以金針花萃取物中其他物質分離及探討是將來努力的部份。

癌細胞的侵犯及轉移是現今最難解決的問題，臨床上對於有效預防腫瘤細胞發生侵犯並沒有重大的突破，而MMPs是腫瘤發生過程中四種蛋白質水解酶最重要的一種，在原位的增殖性腫瘤到侵襲轉移癌的演進過程扮演極重要的角色，研究更指出，潛伏的MMP-2會明顯地在惡性乳癌中增加，且有活性酵素比例隨腫瘤等級增加，證明有活性的MMP-2大量存在侵略性乳癌中，如果金針花萃取物可以抑制MMP-2的表現量，在乳癌的抑制上，也會是重要的突破。很遺憾的，實驗結果較無顯著的差異，也許是萃取物濃度不夠所致。

細胞週期的調控對癌細胞相當重要。完成一個細胞週期有三個檢查點(checkpoint)可以檢查細胞是否出現問題，第一個檢查點在G1時期，負責檢查遺傳訊息是否正確，第二個檢查點在G2時期，檢查染色體複製是否異常，第三個檢查點在M期，主要檢查染色體是否均勻分布在紡錘絲上，這些調控都是經由週期蛋白(Cyclin)家族的調控。由流式細胞儀我們觀察到，MCF-7細胞在金針花處理之下，細胞週期沒有明顯變化，而MDA-MB-231細胞則很明顯抑制在G2/M時期，這具有很大的意義。乳癌的成因通常是荷爾蒙造成的氧化性傷害為主，其中包含基因的斷裂與缺損，且會隨著氧化性傷害的增加而增加乳癌的發展與嚴重性，我們猜測抑制MDA-MB-231細胞在G2/M時期可能的原因是金針花萃取物中的抗氧化物質，在抑制氧化壓力後，使MDA-MB-231細胞G2/M的檢查點發揮它的作用，再加上MDA-MB-231細胞的染色體比MCF-7細胞突變程度高，且容易複製錯誤，所以G2/M的檢查點較容易在MDA-MB-231細胞中發揮它的功效。

金針花萃取物在抑制人類乳癌細胞的增生上，確實有其功用，MCF-7細胞的抑制現象比MDA-MB-231細胞差，並不是藉由使細胞停滯在G2時期來達到抑制效果，也不是葉黃素與玉米黃素的影響造成細胞增生的抑制，有可能是金針花萃取物中其他的類胡蘿蔔素異構物或是類黃酮類的物質所導致，我們曾經使用各種方式去提高金針花萃取物的濃度，但都無法增加對MCF-7細胞增生的抑制，其中葉黃素與文獻中所提到的43倍有明顯的落差外，金針花萃取物中油脂的含量要是能夠減少，便可以提高在溶劑中其他物質的含量，這是未來將繼續努力的部份。而實驗證明MDA-MB-231細胞可以明顯被抑制在G2/M時期，因該是主要的抑制增生現象主要因素，我們曾抽DNA作觀察，是否如細胞凋亡時所產生的片斷化，結果沒有產生DNA的片斷化，在加藥後也沒觀察到明顯的凋亡小體，但在抑制增生方面，金針花確實發揮作用。往後我們將利用西方點末法來觀察細胞週期調控的蛋白質，更進一步找出其機制。綜合本實驗所提供的證據，金針花萃取物確實可抑制人類乳癌細胞的增生，並且具有其潛力發展成天然抗癌藥物。

Reference

- Bailey CA, Chen BH. Chromatographic analyses of xanthophylls in egg yolks from laying hens fed turf Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) meal. *J. Food Sci.* 54: 584-586,592. 1989
- Berendschot TJM, Goldbohm AR, Klopping WA, Van de Kraats J, Van Norel J, Van Norren D. Influence of lutein supplementation on macular pigment, assessed with two objective techniques. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 3322-3326. 2000
- Burri, B. J., Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutr. Res.* 17: 547–580. 1997.
- Burton GW, Ingold KU. β -carotene: an unusual type of liquid antioxidant. *Science.* 224:569-573. 1984
- Chew, B. P., Wong, M. W. & Wong, T. S., Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res.* 16: 3689–3694. 1996.
- Dwyer JH, Navab M, Dwyer KM, Hassan K, Sun P, Shircore A, Hama-Levy S, Hough G, Wang X, Drake T, Merz CN, Fogeiman AM. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*; 103(24):2922-2927. 2001
- Flagg, E. W., Coates, R. J. & Greenberg, R. S., Epidemiological studies of antioxidants and cancer in humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 14: 419–427. 1995.
- Greenwald RA. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, CRC Press, 1985.
- Gülüzar Yıldız and A. Tuncay Demiryürek. Ferrous Iron-induced Luminol Chemiluminescence: A Method for Hydroxyl Radical Study. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 39, 179-184; 1998.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine, oxford: Clarendon, 1991.
- Hammond BR, Johnson EJ, Russell EJ, Krinsky NI, Yeum KJ, Edwards RB, Snodderly DM. Dietary modification of human macular pigment density. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 1795-1801. 1997
- Iribarren C, Folsom AR, Jacobs DR, Gross MD, Belcher JD, Eckfeldt JH, for the ARIC Study Investigators. Associations of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation, and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1171-1177. 1997.
- Johnson I., Fluorescence probes for living cells. *Histochem. J.* 30: 123-140, 1998.

- Joshiyura KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Hennekens CH, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *J. Am. Med. Assoc.* 1999; 282:1233-1239.
- Kahraman S; Demiryürek A. T. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth. Analg.* 84: 1127-1129; 1997.
- Landrum JT, Bone RA, Joa H, Kilburn MD, Moore LL, Sprague KE. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp. Eye Res.* 64: 57-62. 1997.
- Levy, J. Bosin, E, Feldman, B, Giat, Y, Miinster, A, et al; Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α -carotene or β -carotene. *Nutr. Cancer* 24: 257-266, 1995.
- Ling X., Bernacki R. J., Brattain M. G., Li F., Induction of surviving expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *Biol. Chem.* 279: 15196-15203, 2004.
- Luciana P. T., Thomas P. O., Ana L.G. P., Alceu J. J., Helio V., and Fernando S. M., Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-Positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 47: 62-69, 2003.
- Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J. Am. Diet. Assoc.* 93: 284-296, 1993.
- Martin, K. R., Eailla, M. L. & Smith, J. C., β -Carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. *J. Nutr.* 126: 2098–2106. 1996.
- Martin KR, Wu D, Meydani M. The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 150: 265-274. 2000.
- Mathys M. J. Oosthuizen, Maureen E. Engelbrecht, Hugo Lambrechts, Deirdre Greyling and Richard D. Levy, (1997). The Effect of pH on Chemiluminescence if Different Probes Exposed to Superoxide and Singlet Oxygen Generators. *J. Biolumin. Chemilumin.* 12: 277-284; 1997.
- Michaud D. S., Feskanich D., Rimm E. B., Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 990-997, 2000.
- Mortensen A. Skibsted LH. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Letters.* 17: 417(3):261-6. 1997. Nov.

- Nagasawa, H., Mitamura, T., Sakamoto, S., and Yamamoto, K., Effects of lycopene on spontaneous mammary tumor development in SHN virgin mice. *Anticancer Res.* 15: 1173-1178. 1995.
- Newbold R. R., Jefferson W. N., Padilla-Burgos E., Bullock B. C., Uterine carcinoma in mice neonatally with Tamoxifen. *Carcinogenesis*, 18: 2293-2298. 1997.
- Panasenko OM, Sharov VS, Briviba K, Sies H. Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:302-305. 2000.
- Park J. S., Chew B. P., Wong T. S., Dietary Lutein from Marigold Extract Inhibits Mammary Tumor Development in BALB/c Mice. *J. Nutr.* 128: 1650–1656, 1998.
- Parker RS. Carotenoids in human blood and tissues. *J. Nutr.* 119:101-104. 1989.
- Rock, C. L., Kusluski, R. A., Galvez, M. M., Ethier S. P., Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. *Nutr. Cancer* 23: 319-333, 1995.
- Rock, C. L., Saxe, G. A., Ruffin, M. T., August, D. A. & Schottenfels, D., Carotenoids, vitamin A, and estrogen receptor status in breast cancer. *Nutr. Cancer.* 25: 281–296. 1996.
- Poppel, G. & Goldbohm, A., Epidemiologic evidence for b-carotene and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1393S–1402S. 1995
- Snodderly, D. M., Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 62(suppl): 1448S–1461S. 1995.
- Sommerburg O, Keunen JE, Bird AC, van Kuijk FJ. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *Br. J. Ophthalmology*, 82(8): 907-910. 1998.
- Suzuki, T., Matsui, M., Murayama, A., Biological activity of (all-E)- β -apo-12'-carotenoic acid and the geometrical isomers on human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J. Nutr. Sci. vitaminol.* 41: 575-585, 1995.
- Yumiko Yoshiki, Takao Yamanaka, Kumi Satake and Kazuyoshi Okubo. Chemiluminescence properties of soybean protein fraction in the hydroperoxide and hydrogen donor system. *Luminescence*, 14:315–319; 1999.
- Zhang, L.-X., Cooney, R. V., & Bertram, J. S., Carotenoids enhanced gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T/2 cells: relationship to their cancer chemopreventative action. *Carcinogenesis* 12: 109–114. 1991.
- Ziegler, R. G., A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.* 119: 116–122. 1989.