



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I806806 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：111148279

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 15 日

(51)Int. Cl. : A61K35/614 (2015.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：國立中山大學(中華民國) NATIONAL SUN YAT-SEN UNIVERSITY (TW)

高雄市鼓山區蓮海路 70 號

高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：鄭源斌 CHENG, YUAN-BIN (TW)；張學偉 CHANG, HSUEH-WEI (TW)；許茵茵 HSU, YIN-YIN (TW)；莊雅婷 CHUANG, YA-TING (TW)；顏欽堉 YEN, CHING-YU (TW)；鄭明雅 CHENG, MING-YA (TW)；陳清雨 CHEN, CHING-YEU (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

期刊, YC SHEN, et al., "New dolabellanes from the Taiwanese soft coral *Clavularia inflata*", J. Chin. Chem. Soc., 50(3A), Wiley Online Library, 2003: 471~476.

審查人員：葉士緯

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：65 共 63 頁

(54)名稱

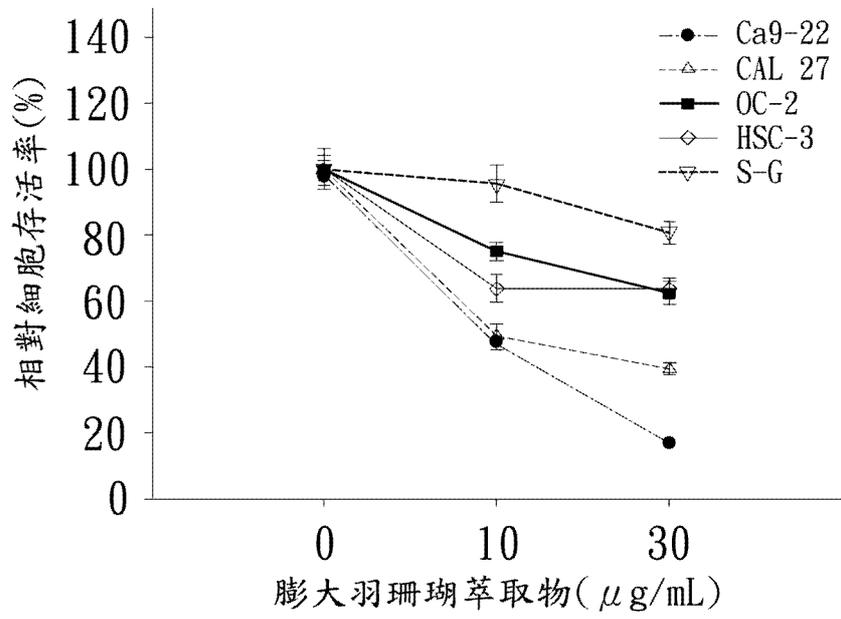
膨大羽珊瑚萃取物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

(57)摘要

一種膨大羽珊瑚萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，以解決習知抗癌藥物在抑制口腔癌細胞的增生或促進口腔癌細胞進入細胞凋亡的同時，也會造成口腔癌細胞周遭的正常細胞的損傷的問題。該膨大羽珊瑚萃取物係由包含以下步驟的方法製備獲得：以一乙醇水溶液萃取一膨大羽珊瑚樣品，以獲得一乙醇萃取物；以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該乙醇萃取物進行分配萃取，以獲得一乙酸乙酯萃取層；及以包含一甲醇水溶液與己烷的一第二混合液，對該乙酸乙酯萃取層進行分配萃取，以獲得一甲醇萃取層，該甲醇萃取層即為該膨大羽珊瑚萃取物。

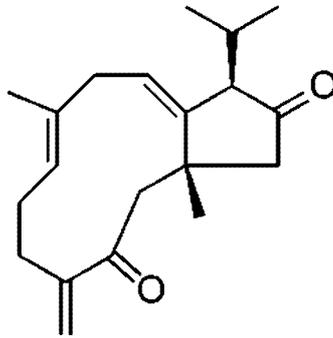
A use of an extract of *Clavularia inflata* is used for manufacturing a medicament for selective antiproliferation of oral cancer cells is used to solve the problem that when the conventional anti-cancer drug is applied to inhibit the proliferation or to induce apoptosis of the oral cancer cells, the conventional anti-cancer drug also damage the normal cells around the oral cancer cells. The extract of *Clavularia inflata* is manufactured by the method including the following steps: extracting a sample of *Clavularia inflata* using an aqueous ethanol solution to obtain an extract of ethanol, partitioning the extract of ethanol using a first mixture including ethyl acetate (EtOAc) and water to obtain an ethyl acetate layer, and partitioning the ethyl acetate layer using a second mixture including an aqueous methanol (MeOH) and hexane to obtain a methanol layer. The methanol layer is then served as the extract of *Clavularia inflata*.

指定代表圖：



【第 3 圖】

特徵化學式：





公告本

I806806

【發明摘要】

【中文發明名稱】 膨大羽珊瑚萃取物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

【英文發明名稱】 Use of Extract of *Clavularia inflata* of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cells

【中文】

一種膨大羽珊瑚萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，以解決習知抗癌藥物在抑制口腔癌細胞的增生或促進口腔癌細胞進入細胞凋亡的同時，也會造成口腔癌細胞周遭的正常細胞的損傷的問題。該膨大羽珊瑚萃取物係由包含以下步驟的方法製備獲得：以一乙醇水溶液萃取一膨大羽珊瑚樣品，以獲得一乙醇萃取物；以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該乙醇萃取物進行分配萃取，以獲得一乙酸乙酯萃取層；及以包含一甲醇水溶液與己烷的一第二混合液，對該乙酸乙酯萃取層進行分配萃取，以獲得一甲醇萃取層，該甲醇萃取層即為該膨大羽珊瑚萃取物。

【英文】

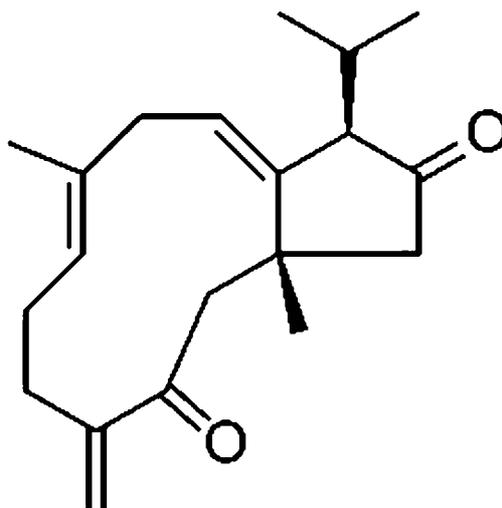
A use of an extract of *Clavularia inflata* is for manufacturing a medicament for selective antiproliferation of oral cancer cells is used to solve the problem that when the conventional anti-cancer drug is applied to inhibit the proliferation or to induce apoptosis of the oral cancer cells, the conventional anti-cancer drug also damage the normal cells around the oral cancer cells. The extract of *Clavularia inflata* is manufactured by the method including the following steps: extracting a sample of *Clavularia inflata* using an aqueous

ethanol solution to obtain an extract of ethanol, partitioning the extract of ethanol using a first mixture including ethyl acetate (EtOAc) and water to obtain an ethyl acetate layer, and partitioning the ethyl acetate layer using a second mixture including an aqueous methanol (MeOH) an hexane to obtain a methanol layer. The methanol layer is then served as the extract of *Clavularia inflata*.

【指定代表圖】 第 3 圖

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】



(1R*,12R*)-朵蕾烷-4(16),7,10-三烯-3,13-二酮

((1R*,12R*)-dolabella-4(16),7,10-triene-3,13-dione)

【發明說明書】

【中文發明名稱】 膨大羽珊瑚萃取物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

【英文發明名稱】 Use of Extract of *Clavularia inflata* of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cells

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種膨大羽珊瑚萃取物的用途，尤其是一種膨大羽珊瑚萃取物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞增生的藥物之用途。

【先前技術】

【0002】 口腔癌為發生在口腔部位（例如，唇、頰黏膜、牙齒、舌頭下方的口腔底部、前三分之二的舌頭、硬顎、牙齦以及臼齒後方等區域）之惡性腫瘤的總稱，90%屬於鱗狀細胞癌，常見的症狀包含口腔內部或周圍有腫脹、硬塊或口腔有長期不癒合的口腔黏膜潰瘍。

【0003】 臨床上的口腔癌治療方法除了手術和放射治療外，亦可以使用習知抗癌藥物來抑制口腔癌細胞的增生或促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，但通常在殺死口腔癌細胞的同時，也會對口腔癌細胞周遭的正常細胞產生細胞毒性，反而造成正常細胞的損傷，如口腔黏膜破損。

【0004】 有鑑於此，習知抗癌藥物確實仍有加以改善之必要。

【發明內容】

【0005】 為解決上述問題，本發明的目的是提供一種膨大羽珊瑚萃取物之用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物者。

【0006】 本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；該膨大羽珊瑚萃取物係由包含以下步驟的方法製備獲得：以一乙醇水溶液萃取一膨大羽珊瑚樣品，以獲得一乙醇萃取物；以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該乙醇萃取物進行一第一分配萃取，以獲得一乙酸乙酯萃取層；及以包含一甲醇水溶液與己烷的一第二混合液，對該乙酸乙酯萃取層進行一第二分配萃取，以獲得一甲醇萃取層，該甲醇萃取層即為該膨大羽珊瑚萃取物。

【0007】 據此，本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，係能夠藉由該膨大羽珊瑚萃取物所含有的活性成分，在將該膨大羽珊瑚萃取物投予一所需個體時，該些活性成分可以於該所需個體的體內發生效用，促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，並造成口腔癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制口腔癌細胞的存活；並且，相較於對口腔癌細胞而言，該膨大羽珊瑚萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該膨大羽珊瑚萃取物係可以用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，為本發明之功效。

【0008】 本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該乙醇水溶液的乙醇濃度為 95%。如此，藉由優先去除該膨大羽珊瑚樣品上的雜質，不僅可以避免該些雜質影響該第一分配萃取及該第二分配萃取的萃取效率，亦可以提升最終獲得的膨大羽珊瑚萃取物所含有的活性成分的比例。

【0009】 本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係以口服方式施予一所需個體。如此，使用者係能夠以簡便方式獲取該膨大羽珊瑚萃取物的活性成分，有助於提升使用者的服藥順從性。

【0010】 本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係以靜脈注射方式施予一所需個體。如此，該膨大羽珊瑚萃取物係可以經由該所需個體的靜脈流向患部，避免該膨大羽珊瑚的活性成分受到胃酸的破

壞而影響生物活性，因而具有較佳的抑制口腔癌細胞生長的能力。

【0011】 本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係以每天每公斤體重施予 5~20 克的劑量施予該所需個體。如此，藉由該膨大羽珊瑚萃取物的投予劑量，而具有較佳的抑制口腔癌細胞生長的功效。

【圖式簡單說明】

【0012】

〔第 1 圖〕 (1R*,12R*)-朶薈烷-4(16),7,10-三烯-3,13-二酮的化學結構式。

〔第 2 圖〕 試驗(A)中，第 A1、A2 組待測樣品的高效液相層析分析圖譜。

〔第 3 圖〕 試驗(B)中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞、CAL 27 細胞、OC-2 細胞、HSC-3 細胞及 S-G 細胞的相對細胞存活率變化折線圖。

〔第 4 圖〕 試驗(B)中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖(MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖(NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異($P < 0.05$)。

〔第 5 圖〕 試驗(B)中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖(MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖(NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異($P < 0.05$)。

〔第 6 圖〕 試驗(B)中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 OC-2 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖(MECI 組)，以及先以 N-乙醯半

胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 OC-2 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 7 圖〕 試驗 (B) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 HSC-3 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 HSC-3 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 8 圖〕 試驗 (B) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 9 圖〕 試驗 (C) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞的細胞週期變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞的細胞週期變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 10 圖〕 試驗 (C) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞的細胞週期變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞的細胞週期變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 11 圖〕 試驗 (C) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的

S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 12 圖〕 試驗 (D) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 13 圖〕 試驗 (D) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 14 圖〕 試驗 (D) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 15 圖〕 試驗 (D) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 16 圖〕 試驗 (D) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 (P

<0.05)。

〔第 17 圖〕 試驗(D)中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 18 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 19 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 20 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 21 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 22 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 23 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標

示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 24 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 25 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 26 圖〕 試驗 (E) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 27 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 28 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 29 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖

(MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 30 圖〕試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 31 圖〕試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 32 圖〕試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 33 圖〕試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀

圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 34 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 35 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 36 圖〕 試驗 (F) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 37 圖〕 試驗 (F) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 38 圖〕 試驗 (F) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文

字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 39 圖〕 試驗 (F) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 40 圖〕 試驗 (F) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 41 圖〕 試驗 (F) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 42 圖〕 試驗 (G) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 43 圖〕 試驗 (G) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示

不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 44 圖〕 試驗 (G) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 45 圖〕 試驗 (G) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 46 圖〕 試驗 (G) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 47 圖〕 試驗 (G) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 48 圖〕 試驗 (H) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同

英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 49 圖〕 試驗 (H) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 50 圖〕 試驗 (H) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 51 圖〕 試驗 (H) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 52 圖〕 試驗 (H) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 53 圖〕 試驗 (H) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P <$

0.05)。

〔第 54 圖〕 試驗 (I) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 55 圖〕 試驗 (I) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 56 圖〕 試驗 (I) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 57 圖〕 試驗 (I) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 58 圖〕 試驗 (I) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 59 圖〕 試驗 (I) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI

組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 60 圖〕試驗 (J) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 61 圖〕試驗 (J) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 62 圖〕試驗 (J) 中，經不同濃度之本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 63 圖〕試驗 (J) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 Ca9-22 細胞中，在不同時間點下，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 64 圖〕試驗 (J) 中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀

之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 65 圖〕 試驗(J)中，經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖 (MECI 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之膨大羽珊瑚萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀 (NAC/MECI 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

【實施方式】

【0013】 為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式作詳細說明如下：

【0014】 本發明所述的「膨大羽珊瑚 (*Clavularia inflata*)」係指羽珊瑚屬 (*Clavularia*) 的一類珊瑚蟲的群體，目前多分布在墾丁、綠島、蘭嶼等地，珊瑚體為黃灰色，具有薄的膜狀基底。

【0015】 本發明所述的「選擇性」係指對癌細胞較具有細胞毒性但對正常細胞較不具有細胞毒性，舉例而言，可以促進癌細胞進入細胞凋亡，並可以造成癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制癌細胞的存活，但對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害。

【0016】 本發明之一實施例的膨大羽珊瑚萃取物，係可以促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，並可以造成口腔癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制口腔癌細胞的存活，且相較於對口腔癌細胞而言，該膨大羽珊瑚萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該膨大羽珊瑚萃取物可以應用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物。該膨大羽珊瑚萃取物可以與醫藥學上可以接受的載劑或賦形劑組合，以共同形成該藥物，並可以供製備成如錠劑、粉劑、粒

劑或液劑等各種劑型，進而供一所需個體的使用。

【0017】 舉例而言，該膨大羽珊瑚萃取物係可以利用口服的方式投予該所需個體，以供使用者能夠以簡便方式獲取該膨大羽珊瑚萃取物的活性成分，有助於提升使用者的服藥順從性（drug compliance）。此時，該膨大羽珊瑚萃取物中的活性成分可以經由小腸吸收，並藉由血流循環至患部位置，以抑制口腔癌細胞生長，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係能夠以每天每公斤體重施予 5~20 克的劑量施予該所需個體。

【0018】 又，該膨大羽珊瑚萃取物亦可以利用靜脈注射的方式投予該所需個體，例如將該膨大羽珊瑚萃取物注射到所需個體的手背或前臂的靜脈中，以避免該膨大羽珊瑚的活性成分在通過消化道時會受到胃酸的破壞而影響生物活性。此時，該膨大羽珊瑚萃取物可以直接經由靜脈流向患部位置，以抑制口腔癌細胞生長，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係能夠以每天每公斤體重施予 5~20 克的劑量施予該所需個體。

【0019】 該膨大羽珊瑚萃取物係可以指萃取自一膨大羽珊瑚樣品所得的任意萃取物，於本實施例中，該膨大羽珊瑚萃取物係藉由如下所述的製備方法所製得，該製備方法可以包含：一乙醇萃取步驟、一第一分配萃取步驟及一第二分配萃取步驟。

【0020】 該乙醇萃取步驟中，工者能夠以一乙醇水溶液萃取該膨大羽珊瑚樣品，再去除該乙醇水溶液，即可以獲得一乙醇萃取物。又，該乙醇萃取步驟亦可以重覆執行數次，此為本發明所屬技術領域中具有通常知識者可以理解，於此不再贅述。工者係選用乙醇濃度為 95% 的乙醇水溶液，將 2 公升的乙醇水溶液加入 200 克的膨大羽珊瑚樣品中，於室溫下清洗 72 小時，再藉由蒸發來去除該乙醇水溶液，在前述清洗步驟重覆三次之後，可以獲得 124.6 克的乙醇萃取物。

【0021】於該第一分配萃取步驟中，工者可以將該乙醇萃取物加入包含乙酸乙酯與水的一第一混合液中，以對該乙醇萃取物進行第一分配萃取，在將該乙醇萃取物與該第一混合液均勻混合之後，會形成位於上層的一乙酸乙酯萃取層及位於下層的一水萃取層，該乙醇萃取物之活性成分係可以溶於該乙酸乙酯萃取層中。於本實施例中，工者係將 124.6 克的乙醇萃取物加入該第一混合液（包含 2 公升的乙酸乙酯與 2 公升的水）中，於室溫（25°C）下反應 12 小時，續收取該乙酸乙酯萃取層。

【0022】接著，於該第二分配萃取步驟中，工者則可以將該乙酸乙酯萃取層加入包含一甲醇水溶液與己烷的一第二混合液中，以對該乙酸乙酯萃取層進行第二分配萃取，在將該乙酸乙酯萃取層與該第二混合液均勻混合之後，該乙酸乙酯萃取層中的乙酸乙酯會與該第二混合液中的己烷相溶，並共同形成位於上層的一己烷萃取層，而該乙酸乙酯萃取層中的部分來自該膨大羽珊瑚樣品的活性成分則可以溶於該第二混合液中的甲醇水溶液中，以共同形成位於下層的一甲醇萃取層。於本實施例中，工者係將 34.8 克的乙酸乙酯萃取層加入該第二混合液（包含 1 公升的 75% 甲醇水溶液與 1 公升的己烷）中，於室溫下反應 12 小時，續收取該甲醇萃取層，最終即可以獲得 11.1 克的膨大羽珊瑚萃取物。

【0023】較佳地，為了避免降低該萃取步驟中所使用的乙醇水溶液的乙醇濃度，該膨大羽珊瑚萃取物的製備方法更可以包含一乾燥步驟，即在進行該乙醇萃取步驟之前，先乾燥該膨大羽珊瑚樣品，藉此維持該乙醇水溶液清除該膨大羽珊瑚樣品上的雜質的能力。舉例而言，工者係可以於-80°C 下進行冷凍乾燥，以獲得該經乾燥的膨大羽珊瑚樣品。

【0024】為確認依據前述製備方法所得的膨大羽珊瑚萃取物中的主要成分及含量佔比（%），遂進行以下試驗：

【0025】 (A) 膨大羽珊瑚萃取物的成分分析

【0026】 本試驗係將該膨大羽珊瑚萃取物用於矽膠上的快速色譜，以己烷－乙酸乙酯－甲醇梯度系統逐步洗脫，依序獲得 8 個分液 (fraction，依序命名為 CI-1～CI-9)，取得分液 CI-2 之後，再以己烷－丙酮 (40：1～0：1) 逐步洗脫，以依序獲得 9 個次分液 (subfraction，依序命名為 C-I2-2～CI-2-9)，接著再對次分液 CI-2-6 (共 373.7 mg) 以己烷－乙酸乙酯－甲醇 (100：10：1～0：0：1) 逐步洗脫，即可以分離出二萜類化合物，經比對得知該二萜類化合物為(1R*,12R*)-朵蕾烷-4(16),7,10-三烯-3,13-二酮 ((1R*,12R*)-dolabella-4(16),7,10-triene-3,13-dione，具有如第 1 圖所示的化學結構式)。

【0027】 將該膨大羽珊瑚萃取物及前述之二萜類化合物分別作為第 A1、A2 組的待測樣品，以液相層析儀 (high performance liquid chromatography) 進行分析，結果如第 2 圖所示，前述之二萜類化合物的滯留時間約為 32.046 分鐘 (第 A2 組)。

【0028】 另將該第 A1 組的待測樣品於第 32.046 分鐘的滯留時間下的波峰面積，代入校準曲線 (calibration curve) $y = 10^7x - 12062$ ($R^2 = 0.9999$) 中，最終可以換算得知該第 A1 組的待測樣品中，約有 3.17% 為第 A2 組的二萜類化合物 ((1R*,12R*)-朵蕾烷-4(16),7,10-三烯-3,13-二酮)，換言之，依據前述製備方法所得的膨大羽珊瑚萃取物除前述的二萜類化合物 ((1R*,12R*)-朵蕾烷-4(16),7,10-三烯-3,13-二酮) 之外，仍包含大量其他的活性成分。

【0029】 又，為證實本發明之該膨大羽珊瑚萃取物確實能夠抑制口腔癌細胞的生長，且相較於對口腔癌細胞而言，該膨大羽珊瑚萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，遂選用包含 Ca9-22 細胞 (牙齦鱗狀上皮細胞癌)、CAL 27 細胞 (舌頭鱗狀上皮細胞癌)、OC-2 細胞 (頰黏膜鱗狀上皮細胞癌) 及 HSC-3 細胞 (舌頭鱗狀上皮細胞癌) 等口腔癌細胞株，以及非惡性

口腔細胞株 S-G 細胞（即，正常細胞）作為模式細胞株，另將該膨大羽珊瑚萃取物溶於二甲基亞砷（DMSO）水溶液（含 0.1%的二甲基亞砷）中所得的溶液作為試驗組的待測樣品（分別含濃度為 10 或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物），及以不含有該膨大羽珊瑚萃取物的二甲基亞砷水溶液（含 0.1%的二甲基亞砷）作為控制組的待測樣品，進行以下試驗：

【0030】 （B）膨大羽珊瑚萃取物對相對細胞存活率的影響

【0031】 將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，加入 MTS 試劑，測量於波長為 490 nm 下的吸光值，並以未處理該膨大羽珊瑚萃取物的細胞的吸光值作為基準（100%），換算各種模式細胞株在經該膨大羽珊瑚萃取物的處理之後的相對細胞存活率的變化曲線。

【0032】 請參照第 3 圖所示，在以 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物處理 24 小時之後，口腔癌細胞株（Ca9-22 細胞、CAL 27 細胞、OC-2 細胞及 HSC-3 細胞）的相對細胞存活率均降低至 70%以下，而正常細胞（S-G 細胞）的相對細胞存活率仍可以達 80%以上。另經過換算，可以得知該膨大羽珊瑚萃取物對 Ca9-22 細胞、CAL 27 細胞、OC-2 細胞、HSC-3 細胞及 S-G 細胞的半抑制濃度（ IC_{50} 值）分別為 9.53 ± 0.18 、 8.36 ± 0.86 、 60.65 ± 3.08 、 50.25 ± 4.08 及 75.15 ± 0.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，顯示該膨大羽珊瑚萃取物的處理會導致各種口腔癌細胞株的相對細胞存活率下降，對正常細胞的影響則較不顯著。

【0033】 接著，為確認該膨大羽珊瑚萃取物是否係藉由提升對細胞的氧化壓力，進而導致相對細胞存活率的下降，遂於以該膨大羽珊瑚萃取物處理各種模式細胞株之前，先加入活性氧抑制劑（N-乙醯半胱氨酸，N-acetyl-L-cysteine，簡稱 NAC；濃度為 10 mM）進行預處理 1 小時，接著再進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（24 小時），最終如前述之換算各種模式細胞株在經

該膨大羽珊瑚萃取物的處理之後的相對細胞存活率。

【0034】請參照第 4 圖所示，於 Ca9-22 細胞中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會導致 Ca9-22 細胞的相對細胞存活率下降（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，該膨大羽珊瑚萃取物的處理則不再影響 Ca9-22 細胞的相對細胞存活率（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 5~7 圖所示之 CAL 27 細胞、OC-2 細胞及 HSC-3 細胞等口腔癌細胞株中觀察到。

【0035】再請參照第 8 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物抑制 S-G 細胞的相對細胞存活率的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，相對細胞存活率的回復亦不顯著。

【0036】值得注意的是，由於活性氧抑制劑的預處理在 Ca9-22 及 CAL 27 細胞的效果較為顯著，故後續試驗僅以 Ca9-22 及 CAL 27 細胞作為口腔癌細胞株的例示，與 S-G 細胞（正常細胞）進行比較。

【0037】由於異常的細胞週期亦會導致細胞存活率的下降，為了確認該膨大羽珊瑚萃取物所造成之細胞存活率的下降的作用機制，遂確認經該膨大羽珊瑚萃取物處理之各種模式細胞株的細胞週期的變化。

【0038】（C）膨大羽珊瑚萃取物對細胞週期變化的影響

【0039】本試驗係取如經不同濃度之膨大羽珊瑚萃取物處理 24 小時的模式細胞株（MECI 組），以及先以活性氧抑制劑（NAC）進行預處理 1 小時，再進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理 24 小時的模式細胞株（NAC/MECI 組），以 75%乙醇水溶液（乙醇濃度為 75%）固定細胞內 DNA（cellular DNA）之後，再以 7-氨基放線菌素 D（7-aminoactinomycin D，簡稱為 7AAD）進行染色，接著以流式細胞儀（Guava easyCyte flow cytometry）進行分析，再依據所測得的 DNA 含量確認細胞週期的變化；其中，以細胞內 DNA 含量未達 2N 者定義為處於 subG1 期的細胞、細胞內 DNA 含量為 2N 者定義為處於 G1

期的細胞、細胞內 DNA 含量介於 2N~4N 之間者定義為處於 S 期的細胞，且細胞內 DNA 含量為 4N 者定義為處於 G2/M 期的細胞。

【0040】請參照第 9 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升處於 subG1 期的細胞的佔比，亦會提升處於 G2/M 期細胞的佔比，並且會降低處於 G1 期細胞的佔比（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以減少處於 subG1 期的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 10 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0041】再請參照第 11 圖所示，與前述的口腔癌細胞株相比，S-G 細胞（正常細胞）的 subG1 期的細胞的佔比較低，顯示該膨大羽珊瑚萃取物的處理並不會顯著提升正常細胞中處於 subG1 期的細胞的佔比。

【0042】值得注意的是，由於處於 subG1 期的細胞的佔比的增加，係為細胞進入細胞凋亡〔apoptosis，又稱為計畫性細胞死亡（programmed cell death）〕的快篩指標之一，故後續即確認該膨大羽珊瑚的處理是否會造成口腔癌細胞進入細胞凋亡。

【0043】（D）膨大羽珊瑚萃取物對細胞凋亡的影響（一）

【0044】本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g/mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，混合膜聯蛋白 V (annexin V, 1:1,000) 及 7-氨基放線菌素 D (7AAD) 以進行染色，接著以流式細胞儀進行分析。其中，由於膜聯蛋白 V 會與進入細胞凋亡的細胞外翻的磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine, 簡稱為 PS) 特異性結合，因而所測得的經膜聯蛋白 V 染色的細胞〔膜聯蛋白 V (+) / 7AAD (+ 或 -)〕即為進入細胞凋亡的細胞。

【0045】請參照第 12 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該

膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升進入細胞凋亡的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 13 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0046】再請參照第 14 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理亦會提升進入細胞凋亡的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。

【0047】接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後，是否會影響進入細胞凋亡的細胞的佔比，遂以活性氧抑制劑（NAC）進行預處理 1 小時，接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 NAC/MECI 組細胞，以及未經活性氧抑制劑（NAC）的預處理，直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 MECI 組細胞，混合膜聯蛋白 V（annexin V，1：1,000）及 7-氨基放線菌素 D（7AAD）以進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，其中，經膜聯蛋白 V 染色的細胞〔膜聯蛋白 V（+）／7AAD（+ 或 -）〕即為進入細胞凋亡的細胞。

【0048】請參照第 15 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理仍可以顯著提升進入細胞凋亡的細胞的佔比（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低進入細胞凋亡的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 16 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0049】再請參照第 17 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞的進入細胞凋亡的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，進入細胞凋亡的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0050】由於凋亡蛋白酶（caspase）的活化在細胞凋亡的反應扮演重要的角色，經活化的凋亡蛋白酶會將死亡訊息傳遞至下游，最終使細胞進入細

胞凋亡，其中凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 為此一過程的關鍵蛋白質。位於上游的凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 為起始凋亡蛋白酶(initiator caspase)，當細胞外的死亡受體 (death receptor) 被活化，即會啟動與凋亡蛋白酶 8 有關的外源性凋亡途徑 (extrinsic apoptosis pathway)，活化凋亡蛋白酶 8；而當細胞遭遇嚴重的 DNA 損傷或氧化壓力 (oxidative stress) 時，則會啟動與凋亡蛋白酶 9 相關的內源性凋亡途徑 (intrinsic apoptosis pathway)，進而活化凋亡蛋白酶 9。當凋亡蛋白酶 8 或凋亡蛋白酶 9 被活化之後，均會再活化下游的效應凋亡蛋白酶 (effector caspase；即，凋亡蛋白酶 3)，而經活化的凋亡蛋白酶 3 則為實際上去執行細胞凋亡的蛋白質。基於上述，以下係確認該膨大羽珊瑚的處理是否會對細胞內的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 造成影響。

【0051】 (E) 膨大羽珊瑚萃取物對細胞凋亡的影響 (二)

【0052】 本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g/mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，以基於胜肽之偵測套組 (peptide-based detection, OncoImmulin kit) 使經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 專一性地切割對應的受質，進而產生螢光，並以流式細胞儀進行分析，其中，所測得的包含螢光的細胞即為包含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 的細胞。

【0053】 請參照第 18 圖所示，於 Ca9-22 細胞 (口腔癌細胞株) 中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比增加，顯示該膨大羽珊瑚萃取物的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 8 的活性；前述的試驗結果亦可以於第 19 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0054】再請參照第 20 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理亦會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。

【0055】再請參照第 21 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比增加，顯示該膨大羽珊瑚萃取物的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 9 的活性；前述的試驗結果亦可以於第 22 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0056】再請參照第 23 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理亦會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。

【0057】另請參照第 24 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比增加，顯示該膨大羽珊瑚萃取物的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 3 的活性；前述的試驗結果亦可以於第 25 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0058】再請參照第 26 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理亦會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。

【0059】依據前述試驗數據可以得知，該膨大羽珊瑚萃取物的處理，不僅會啟動該外源性凋亡途徑，亦會啟動該內源性凋亡途徑，造成凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 的活化，進而活化下游的凋亡蛋白酶 3；而此一現象在正常細胞中則較不明顯。

【0060】接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後，是否會影響包

含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比，遂以活性氧抑制劑（NAC）進行預處理 1 小時，接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 NAC/MECI 組細胞，以及未經活性氧抑制劑（NAC）的預處理，直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 MECI 組細胞，以基於胜肽之偵測套組（peptide-based detection，OncoImmunitin kit）使經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 專一性地切割對應的受質，進而產生螢光，並以流式細胞儀進行分析，其中，包含螢光的細胞即為包含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 的細胞。

【0061】 請參照第 27 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比增加（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 28 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0062】 再請參照第 29 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞中包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0063】 請參照第 30 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比增加（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 31 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0064】 再請參照第 32 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該

膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞中包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0065】請參照第 33 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比增加（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 34 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0066】再請參照第 35 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞中包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0067】如前所述，該膨大羽珊瑚萃取物的處理不僅可以抑制口腔癌細胞的存活，更可以促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，進而提升處於 subG1 期的細胞的佔比，而活性氧抑制劑的預處理則可以回復前述現象，因此後續另確認前述現象的發生是否與氧化壓力（oxidative stress）的產生有關。

【0068】（F）膨大羽珊瑚萃取物對氧化壓力的影響（一）

【0069】本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，以 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯（2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate，簡稱為 H₂DCFHDA）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析。由於 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯（H₂DCFHDA）可以通過細胞膜，並在進入細胞之後形成不帶螢光的 2',7'-二氯二氫螢光素（2',7'-dichlorodihydrofluorescein，簡稱為 H₂DCF），而在細胞內包含活性氧物質

(reactive oxygen species, 簡稱 ROS) 的情況下, 不帶螢光的 2',7'-二氯二氫螢光素 (H₂DCF) 會再被活性氧物質氧化形成螢光產物 (激發光波長為 495 nm, 發射光波長為 529 nm), 因此所測得的包含 529 nm 波長的螢光產物的細胞即為包含活性氧物質的細胞。

【0070】 請參照第 36 圖所示, 於 Ca9-22 細胞 (口腔癌細胞株) 中, 該膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升包含活性氧物質的細胞的佔比; 前述的試驗結果亦可以於第 37 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0071】 再請參照第 38 圖所示, 於 S-G 細胞 (正常細胞) 中, 該膨大羽珊瑚萃取物的處理亦會提升包含活性氧物質的細胞的佔比, 惟佔比的提升較不明顯 (在經濃度為 30 µg/mL 的膨大羽珊瑚萃取物處理 24 小時之後, 於 Ca9-22 細胞中, 包含活性氧物質的細胞的佔比達 84.2%, 於 CAL 27 細胞中, 包含活性氧物質的細胞的佔比達 90.7%, 而於 S-G 細胞中, 包含活性氧物質的細胞的佔比則僅有 38.6%)。

【0072】 接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後, 是否會影響包含活性氧物質的細胞的佔比, 遂以活性氧抑制劑 (NAC) 進行預處理 1 小時, 接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理 (0、12、24 小時) 所得的 NAC/MECI 組細胞, 以及未經活性氧抑制劑 (NAC) 的預處理, 直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理 (0、12、24 小時) 所得的 MECI 組細胞, 以 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯 (H₂DCFHDA) 作為探針, 接著以流式細胞儀進行分析, 其中, 包含 529 nm 波長的螢光產物的細胞即為包含活性氧物質的細胞。

【0073】 請參照第 39 圖所示, 於 Ca9-22 細胞 (口腔癌細胞株) 中, 該膨大羽珊瑚萃取物的處理仍可以顯著提升包含活性氧物質的細胞的佔比 (MECI 組), 但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後, 則可以降低包含活性氧物質的細胞的佔比 (NAC/MECI 組); 前述的試驗結果亦可以於第 40 圖所

示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0074】再請參照第 41 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞的包含活性氧物質的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，包含活性氧物質的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0075】除了存在於細胞質內的活性氧物質之外，粒線體超氧化物（mitochondrial superoxide）亦為產生氧化壓力的原因之一，因此後續係確認該膨大羽珊瑚萃取物的處理對包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的影響。

【0076】（G）膨大羽珊瑚萃取物對氧化壓力的影響（二）

【0077】本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，以粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析。由於該粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）可以通過細胞膜，在進入粒線體之後若是被粒線體超氧化物氧化，則會與粒線體 DNA 結合而形成螢光產物（激發光波長為 396 nm，發射光波長為 610 nm），因此所測得的包含 610 nm 波長的螢光產物的細胞即為包含粒線體超氧化物的細胞。

【0078】請參照第 36 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 37 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0079】再請參照第 38 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理亦會提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比，惟佔比的提升較不明顯。

【0080】 接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後，是否會影響包含粒線體超氧化物的細胞的佔比，遂以活性氧抑制劑（NAC）進行預處理 1 小時，接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 NAC/MECI 組細胞，以及未經活性氧抑制劑（NAC）的預處理，直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 MECI 組細胞，以粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析，其中，所測得的包含 610 nm 波長的螢光產物的細胞即為包含粒線體超氧化物的細胞。

【0081】 請參照第 39 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理仍可以顯著提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低包含粒線體超氧化物的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 40 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0082】 再請參照第 41 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞的包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0083】 已知穀胱甘肽（glutathione，簡稱為 GSH）為人體最重要的抗氧化劑，能夠用於降低體內的氧化壓力；換言之，若是細胞內缺乏穀胱甘肽的存在，則代表細胞內的氧化壓力無法降低，因此也一併確認細胞內不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0084】 （H）膨大羽珊瑚萃取物對氧化壓力的影響（三）

【0085】 本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小

時之後，以 5-氯甲基螢光素二乙酸酯（5-chloromethylfluorescein diacetate，簡稱為 CMF-DA）進行染色，接著以流式細胞儀進行分析。由於 5-氯甲基螢光素二乙酸酯（CMF-DA）能夠與細胞內游離的硫醇〔thiol，包含巰基（thiol group，-SH）的化合物〕進行反應而形成發出螢光的 5-氯甲基螢光素（5-chloromethylfluorescein）（激發光波長為 492 nm，發射光波長為 517 nm），因此所測得的包含 517 nm 波長的 5-氯甲基螢光素的細胞即為包含穀胱甘肽的細胞，並可以再進一步換算得知不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0086】 請參照第 48 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 49 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。再請參照第 50 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理並不會提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0087】 接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後，是否會影響不含有穀胱甘肽的細胞的佔比，遂以活性氧抑制劑（NAC）進行預處理 1 小時，接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 NAC/MECI 組細胞，以及未經活性氧抑制劑（NAC）的預處理，直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 MECI 組細胞，以 5-氯甲基螢光素二乙酸酯（CMF-DA）進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，其中，所測得的包含 517 nm 波長的 5-氯甲基螢光素的細胞即為包含穀胱甘肽的細胞，並再進一步換算得知不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0088】 請參照第 51 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理仍可以顯著提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低不含有穀胱甘肽的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 52 圖所

示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0089】再請參照第 53 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物並未提升 S-G 細胞的不含有穀胱甘肽的細胞的佔比，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，亦不會降低不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0090】無論是內源性產生的氧化壓力，亦或是來自外源性的氧化壓力，均會對細胞造成重大的威脅，導致對 DNA 的嚴重損傷（如，造成雙股 DNA 斷裂），而當 DNA 的損傷到達無法修復的嚴重狀況時，細胞即會進入細胞凋亡，因此後續另確認該膨大羽珊瑚萃取物的處理對 DNA 損傷造成的影響。

【0091】由於當雙股 DNA 斷裂（DNA double-strand break，簡稱為 DSB）發生時，隸屬於 PI3-家族的激酶（kinase，舉例如 ATM、ATR 及 DNA-PK 等）會磷酸化組蛋白 H2AX（H2A histone member X）的第 139 個位置的絲胺酸（serine），進而形成磷酸化組蛋白 γ H2AX，因此包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞即可以代表已發生雙股 DNA 斷裂的的細胞。

【0092】（I）膨大羽珊瑚萃取物的對 DNA 損傷的影響（一）

【0093】本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，以對磷酸化組蛋白 γ H2AX 具有特異性的抗體作為一級抗體，另再加入 Alexa Fluor[®]488—二級抗體，以及以 7-氨基放線菌素 D（7AAD）進行雙重染色，接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比。

【0094】請參照第 54 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 55 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細

胞中觀察到。

【0095】再請參照第 56 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理僅能夠些微提升包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比，且與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。

【0096】接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後，是否會影響包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比，遂以活性氧抑制劑（NAC）進行預處理 1 小時，接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 NAC/MECI 組細胞，以及未經活性氧抑制劑（NAC）的預處理，直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理（0、12、24 小時）所得的 MECI 組細胞，以對磷酸化組蛋白 γ H2AX 具有特異性的抗體作為一級抗體，另再加入 Alexa Fluor[®]488 一二級抗體，以及以 7-氨基放線菌素 D（7AAD）進行雙重染色，接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比。

【0097】請參照第 57 圖所示，於 Ca9-22 細胞（口腔癌細胞株）中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理仍可以顯著提升包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比（MECI 組），但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 58 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0098】再請參照第 59 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該膨大羽珊瑚萃取物提升 S-G 細胞的包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比的效果並不顯著，縱使以活性氧抑制劑進行預處理，包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比的下降亦不顯著。

【0099】8-羥基去氧鳥苷（8-hydroxy-2-deoxyguanosine）為去氧鳥苷（deoxyguanosine）的氧化衍生物，為細胞內 DNA 及粒線體 DNA 在受到活性氧物質攻擊後所形成的主要產物，被認為亦可以作為 DNA 損傷的生物標記

(biomarker)，因此後續另確認包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比是否也產生變化。

【0100】 (J) 膨大羽珊瑚萃取物的對 DNA 損傷的影響 (二)

【0101】 本試驗係同樣將該待測樣品加入各種模式細胞株中，使各種模式細胞株分別包含 0、10 或 30 $\mu\text{g/mL}$ 的膨大羽珊瑚萃取物，在共培養 24 小時之後，加入對 8-羥基去氧鳥苷具有特異性的抗體進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比。

【0102】 請參照第 60 圖所示，於 Ca9-22 細胞 (口腔癌細胞株) 中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理會顯著提升包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 61 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0103】 再請參照第 62 圖所示，於 S-G 細胞 (正常細胞) 中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理僅能夠些微提升包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比，且與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。

【0104】 接著另確認在進行活性氧抑制劑的預處理之後，是否會影響包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比，遂以活性氧抑制劑 (NAC) 進行預處理 1 小時，接著進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理 (0、12、24 小時) 所得的 NAC/MECI 組細胞，以及未經活性氧抑制劑 (NAC) 的預處理，直接進行該膨大羽珊瑚萃取物的處理 (0、12、24 小時) 所得的 MECI 組細胞，加入對 8-羥基去氧鳥苷具有特異性的抗體進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比。

【0105】 請參照第 63 圖所示，於 Ca9-22 細胞 (口腔癌細胞株) 中，該膨大羽珊瑚萃取物的處理仍可以顯著提升包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比 (MECI 組)，但是在以活性氧抑制劑進行預處理之後，則可以降低包含 8

— 羥基去氧鳥苷的細胞的佔比（NAC/MECI 組）；前述的試驗結果亦可以於第 64 圖所示之另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。

【0106】 再請參照第 65 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，活性氧抑制劑的預處理亦可以大幅降低包含 8—羥基去氧鳥苷的細胞的佔比。

【0107】 綜上所述，本發明的膨大羽珊瑚萃取物的用途，係能夠藉由該膨大羽珊瑚萃取物所含有的活性成分，在將該膨大羽珊瑚萃取物投予一所需個體時，該些活性成分可以於該所需個體的體內發生效用，促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，並造成口腔癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制口腔癌細胞的存活；並且，相較於對口腔癌細胞而言，該膨大羽珊瑚萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該膨大羽珊瑚萃取物係可以用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，為本發明之功效。

【0108】 雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當包含後附之申請專利範圍所記載的文義及均等範圍內之所有變更。

【符號說明】

【0109】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種膨大羽珊瑚萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；該膨大羽珊瑚萃取物係由包含以下步驟的方法製備獲得：

以一乙醇水溶液萃取一膨大羽珊瑚樣品，以獲得一乙醇萃取物；

以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該乙醇萃取物進行一第一分配萃取，以獲得一乙酸乙酯萃取層；及

以包含一甲醇水溶液與己烷的一第二混合液，對該乙酸乙酯萃取層進行一第二分配萃取，以獲得一甲醇萃取層，該甲醇萃取層即為該膨大羽珊瑚萃取物。

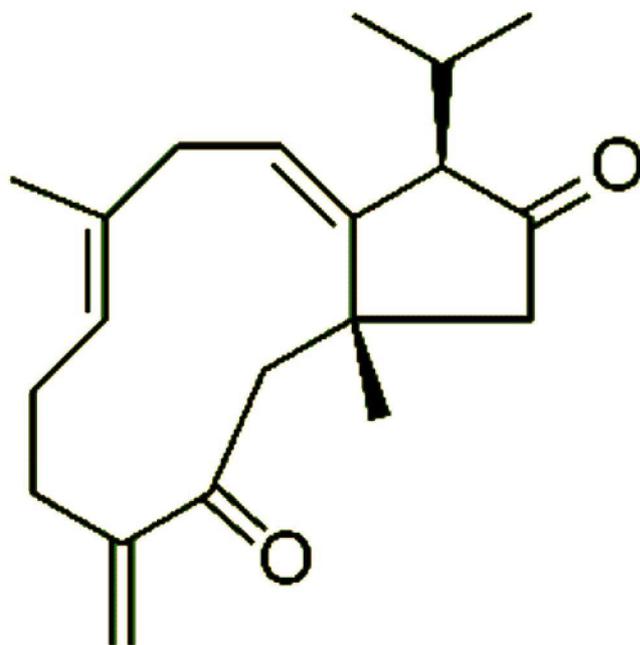
【請求項 2】 如請求項 1 之膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該乙醇水溶液的乙醇濃度為 95%。

【請求項 3】 如請求項 1 之膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係以口服方式施予一所需個體。

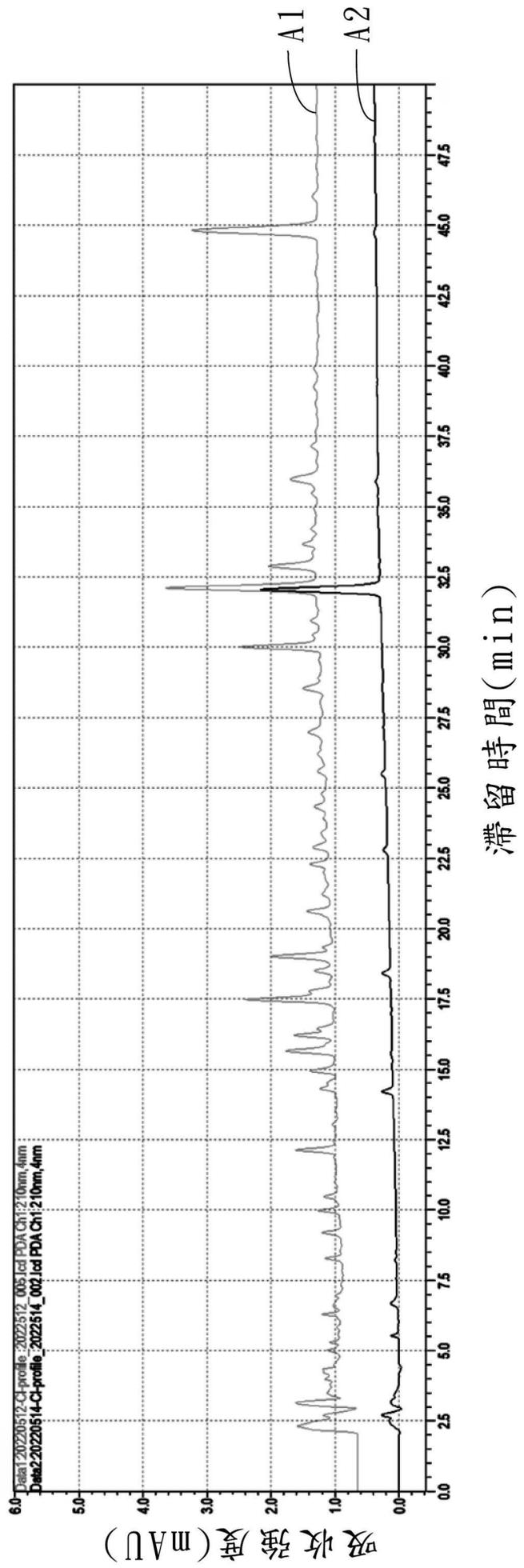
【請求項 4】 如請求項 1 之膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係以靜脈注射方式施予一所需個體。

【請求項 5】 如請求項 3 或 4 之膨大羽珊瑚萃取物的用途，其中，該膨大羽珊瑚萃取物係以每天每公斤體重施予 5~20 克的劑量施予該所需個體。

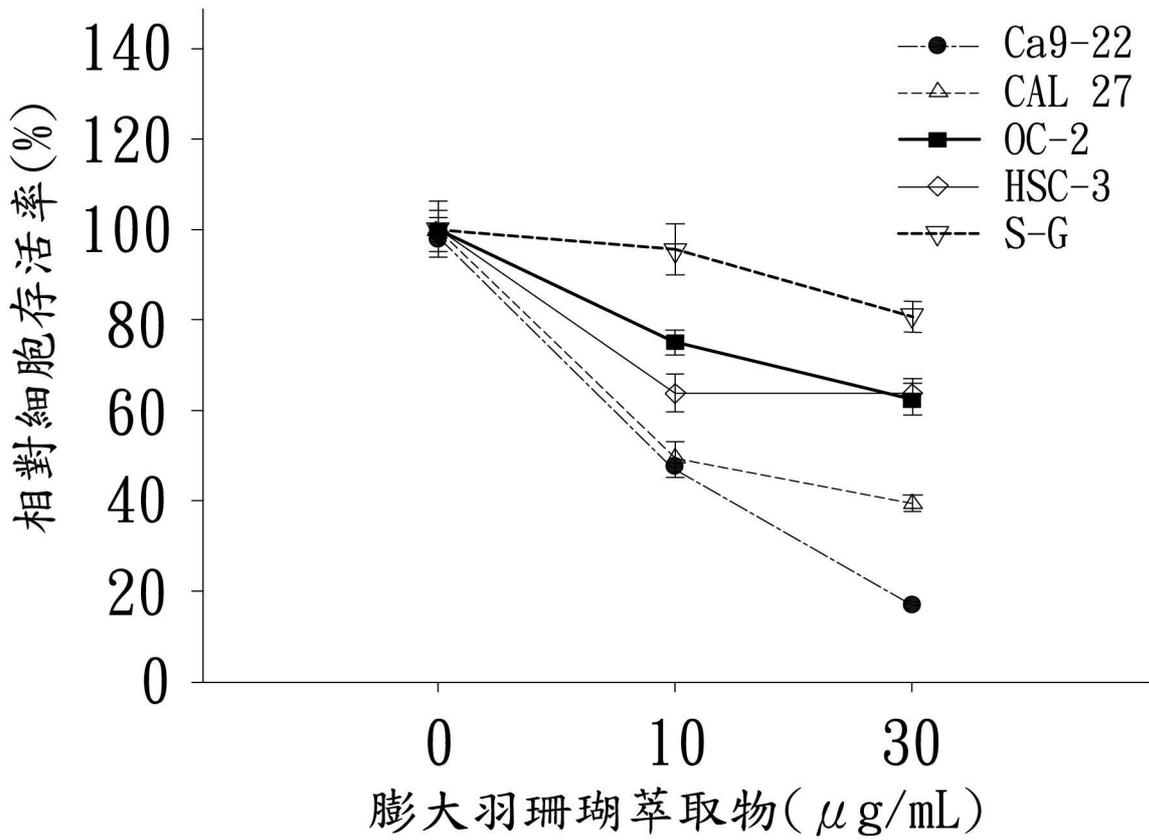
【發明圖式】



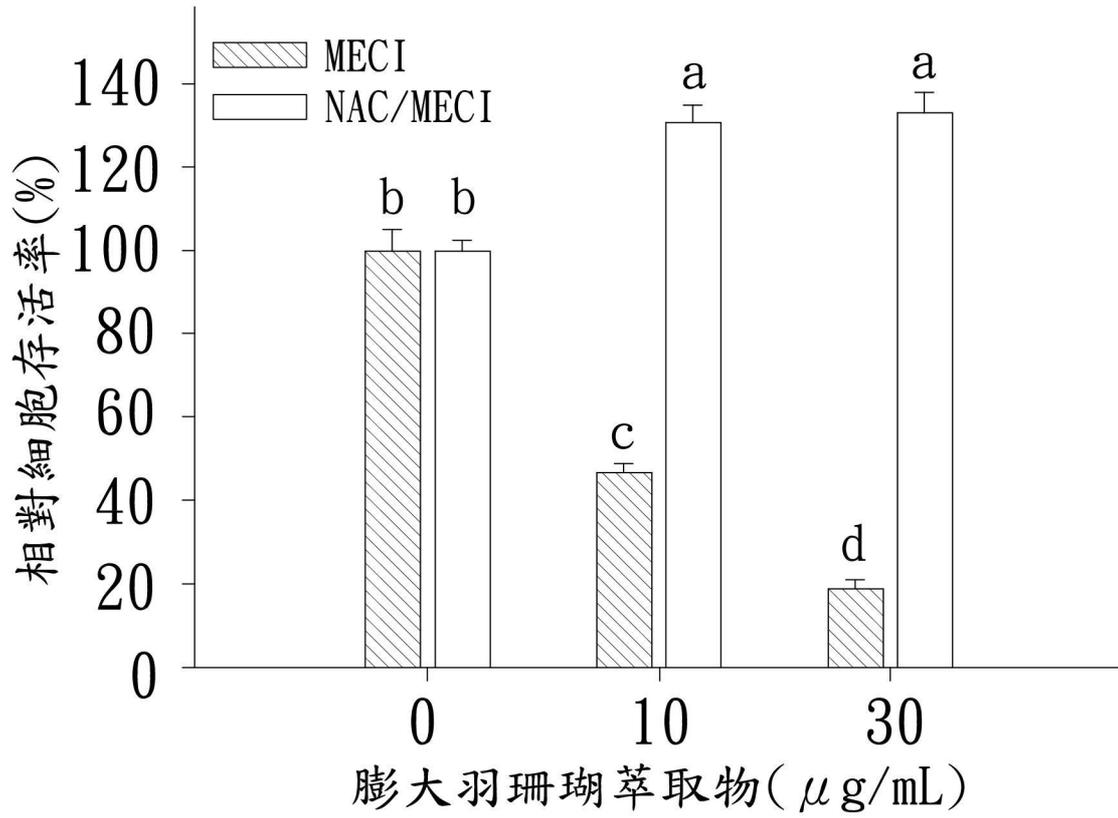
【第 1 圖】



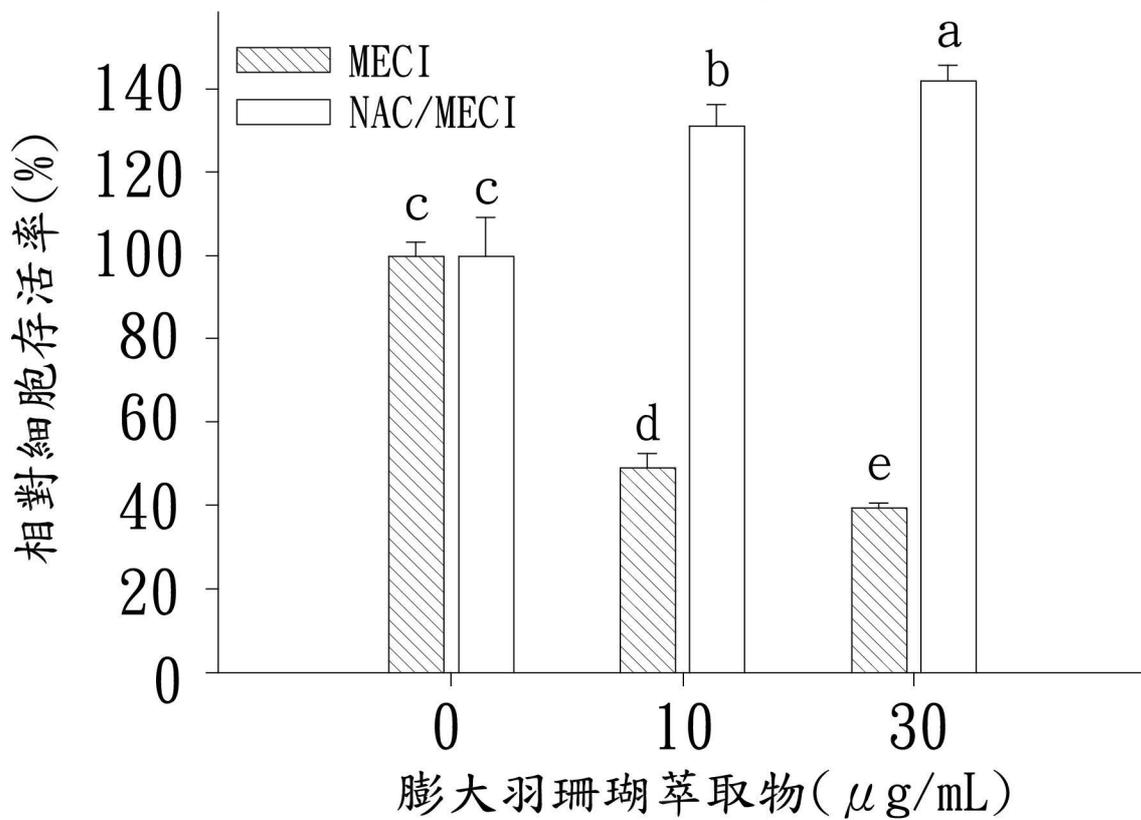
【第 2 圖】



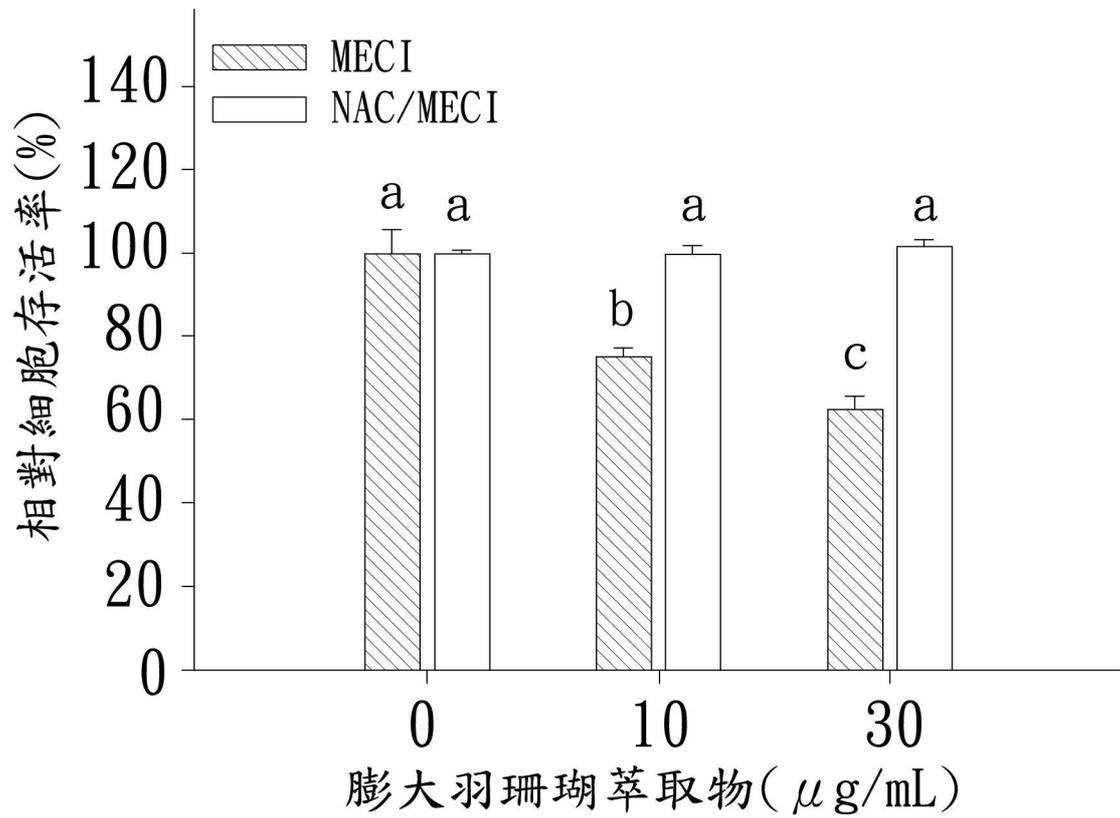
【第 3 圖】



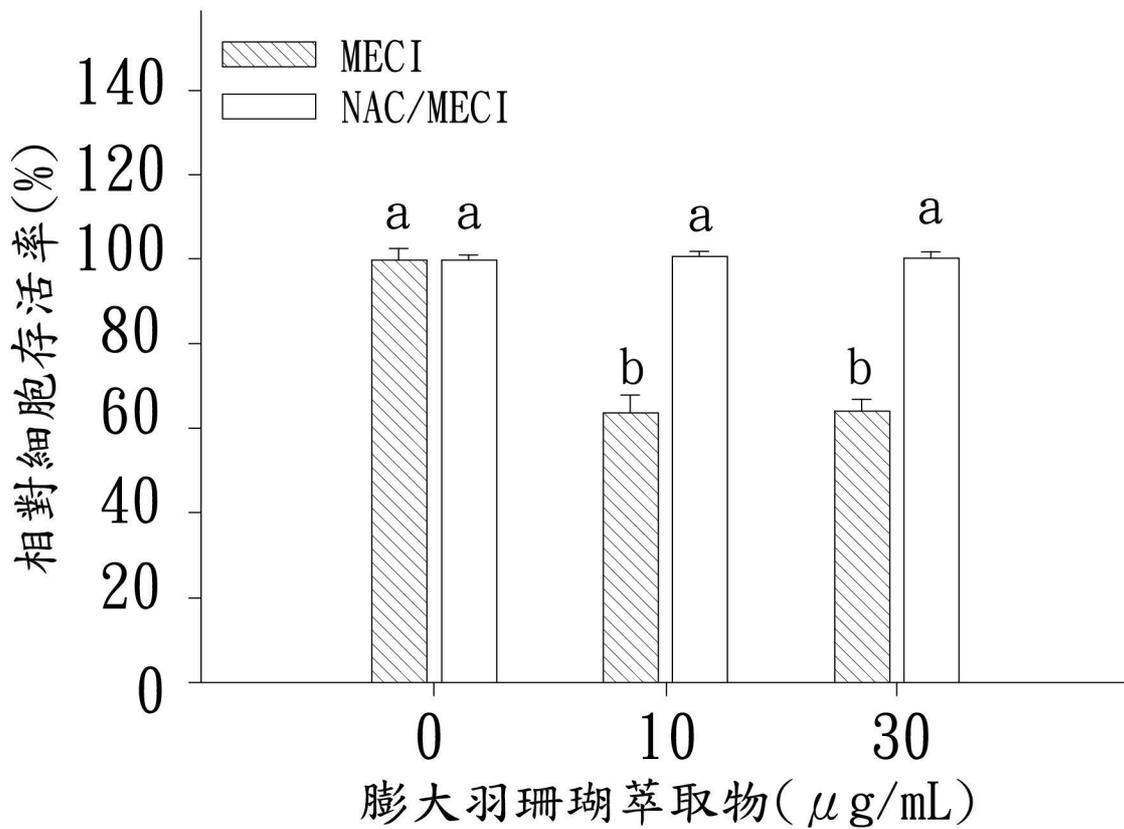
【第 4 圖】



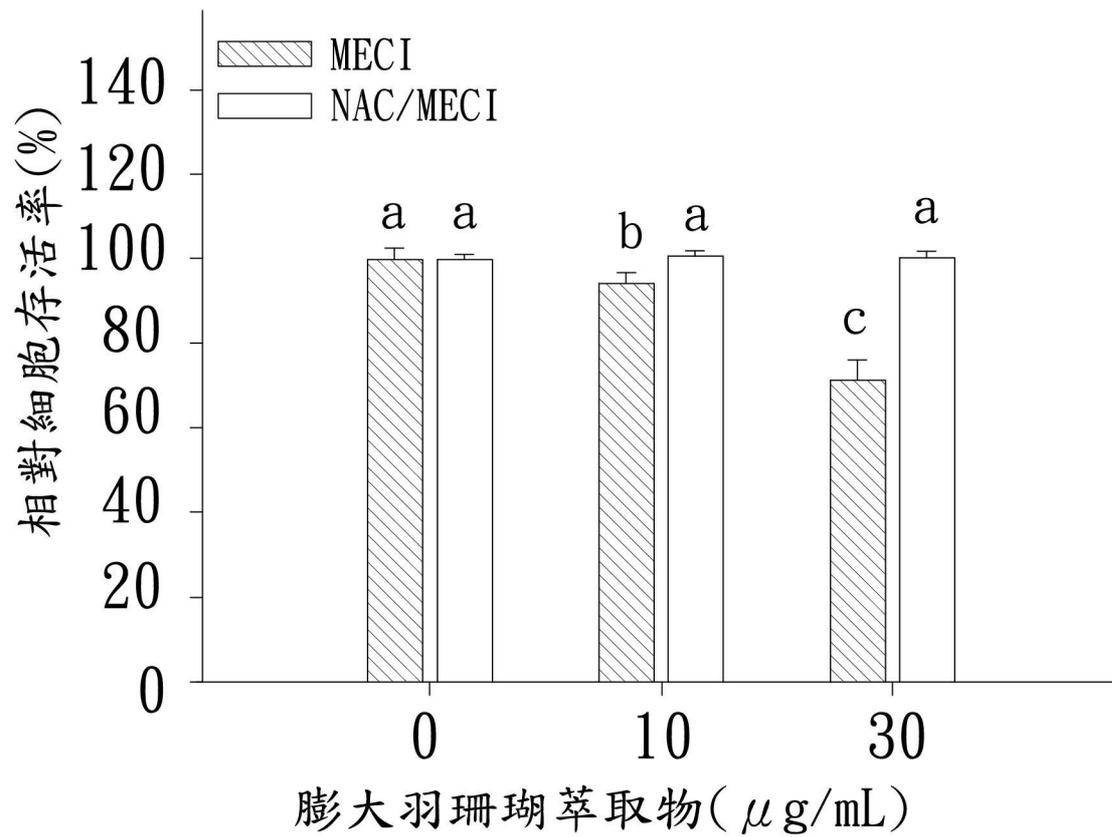
【第 5 圖】



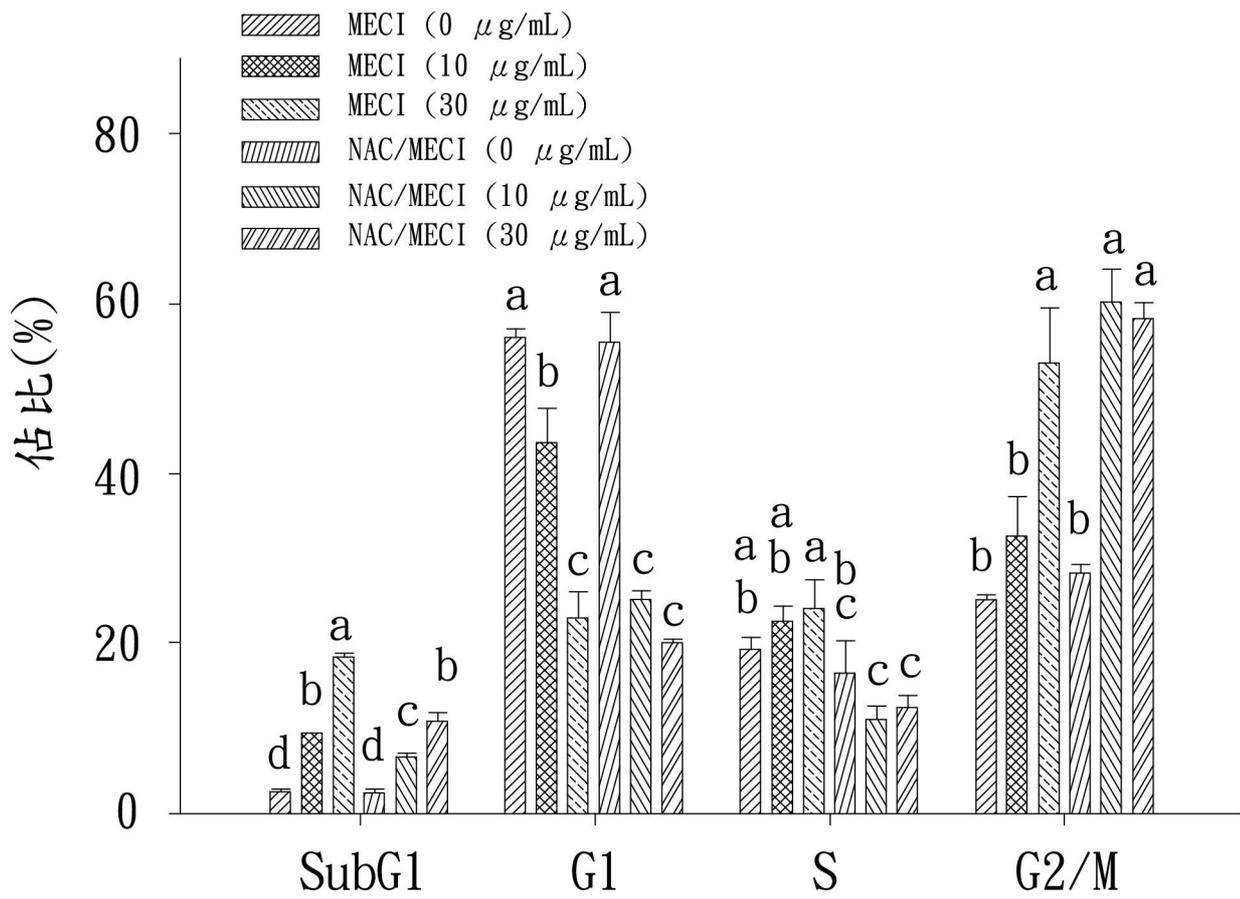
【第 6 圖】



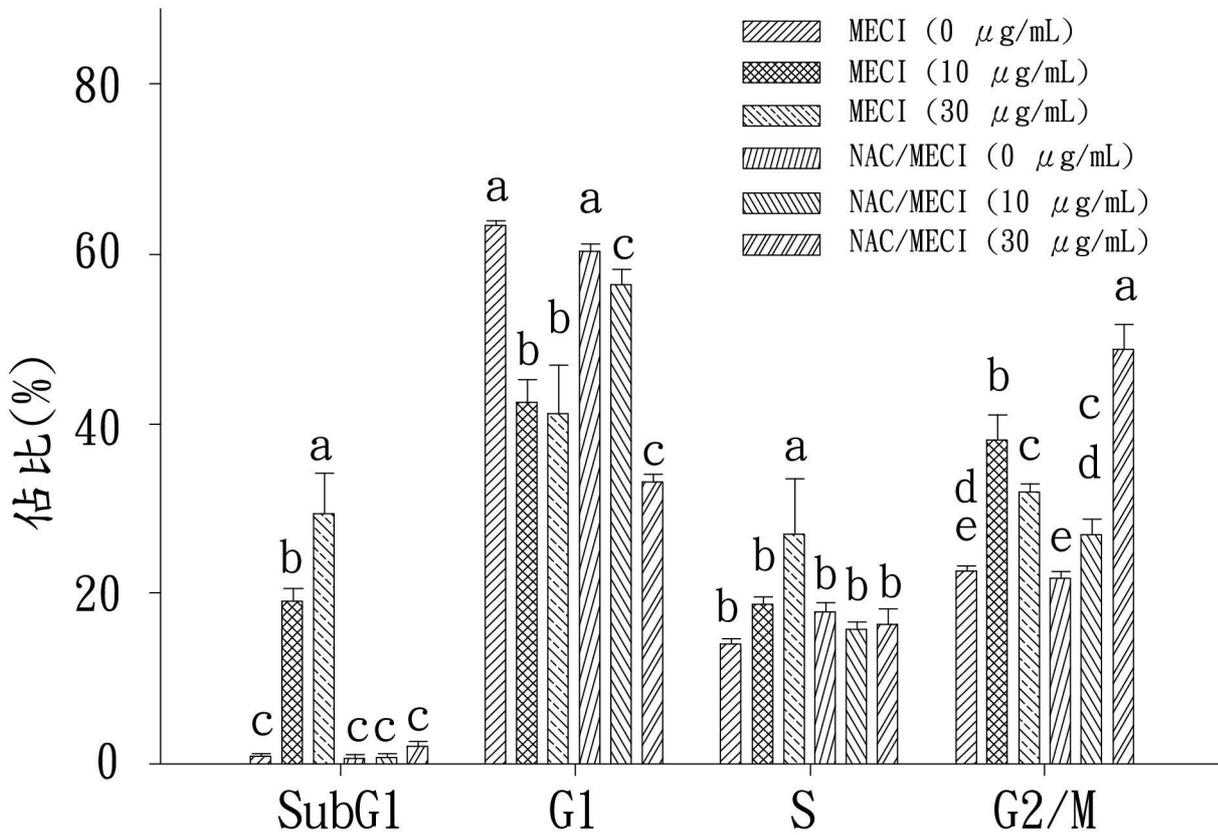
【第 7 圖】



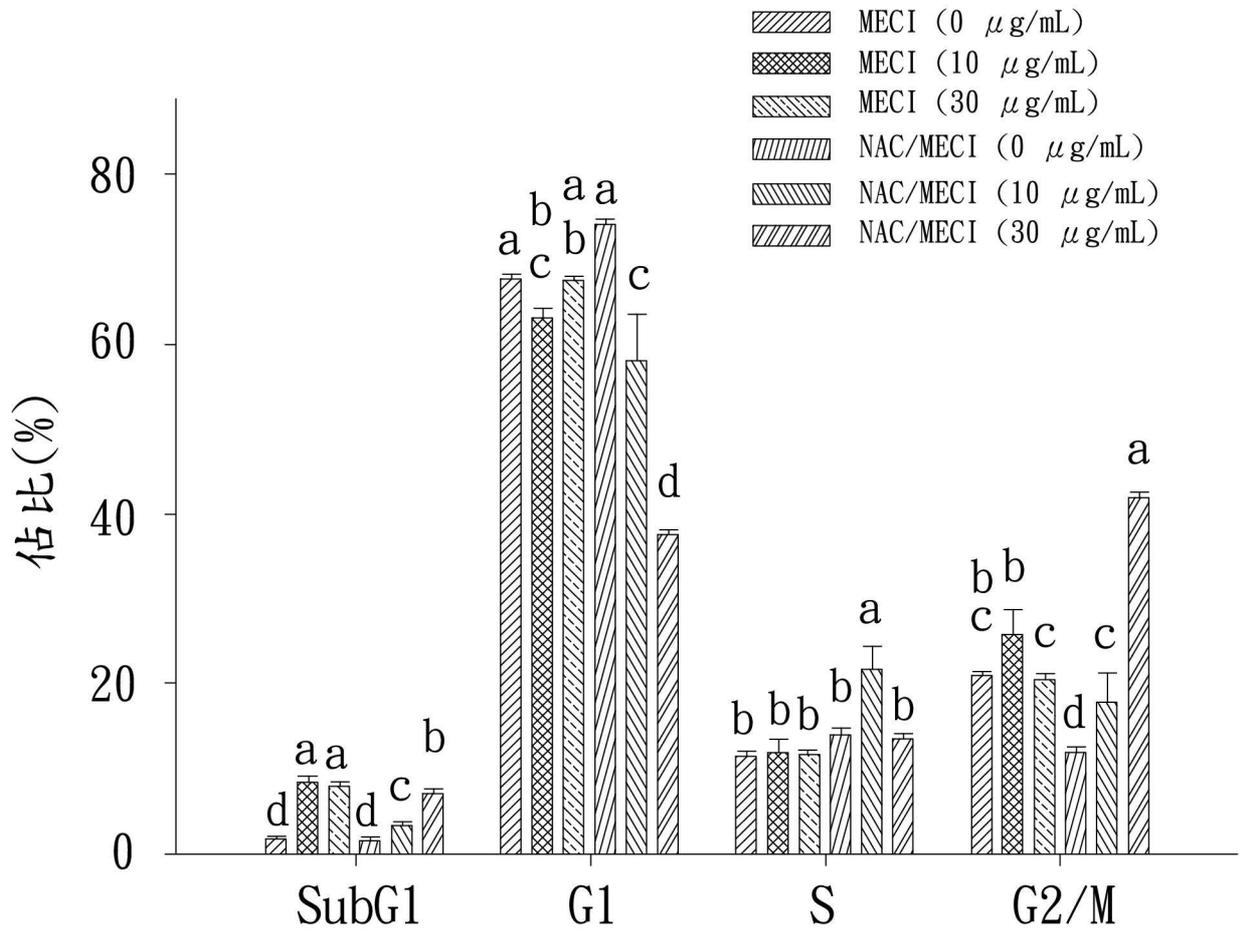
【第 8 圖】



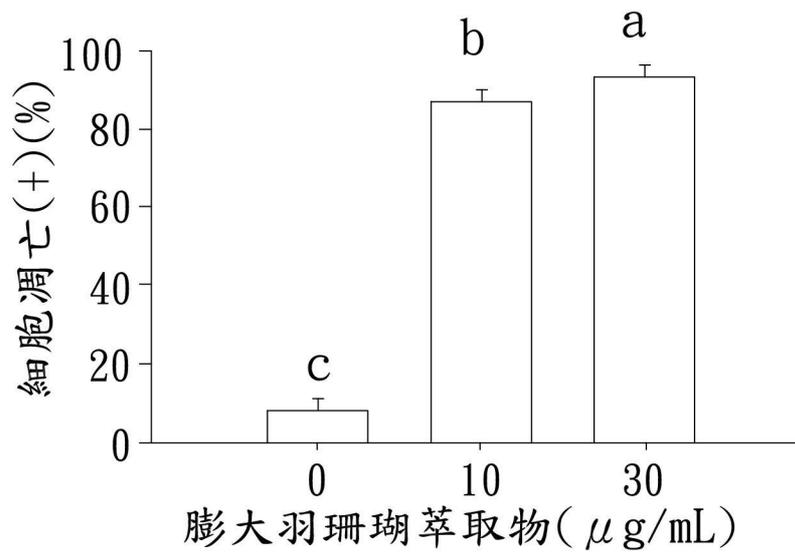
【第 9 圖】



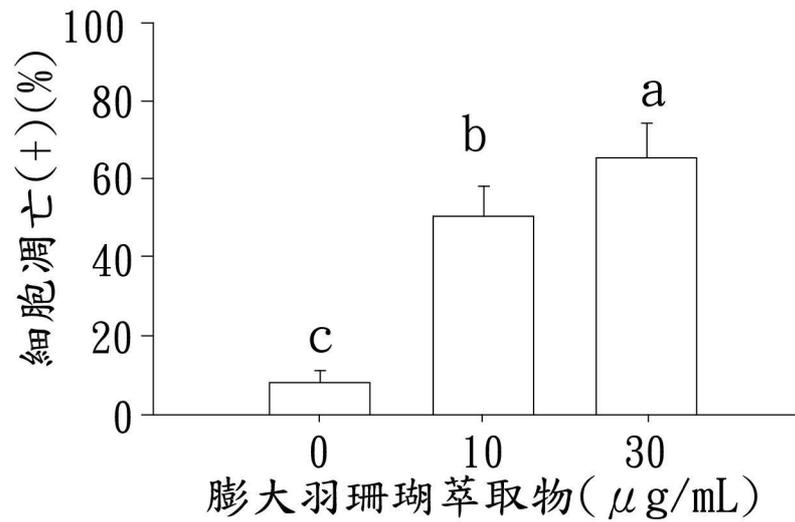
【第 10 圖】



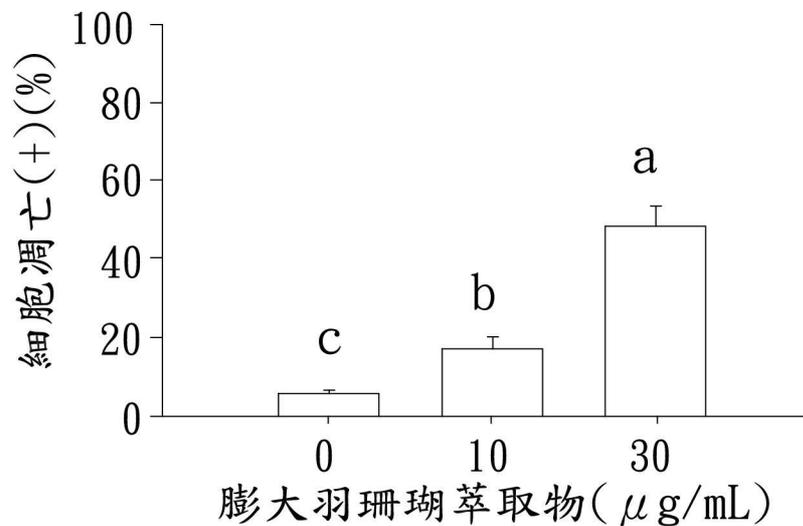
【第 11 圖】



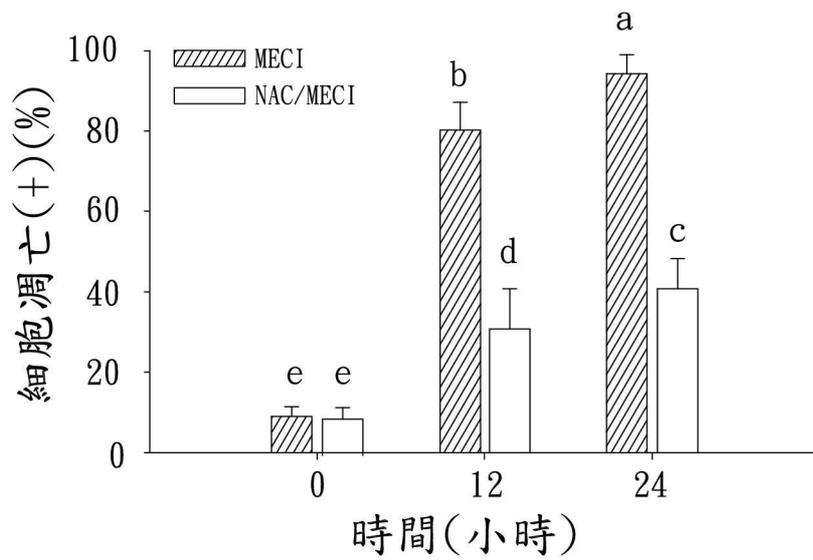
【第 12 圖】



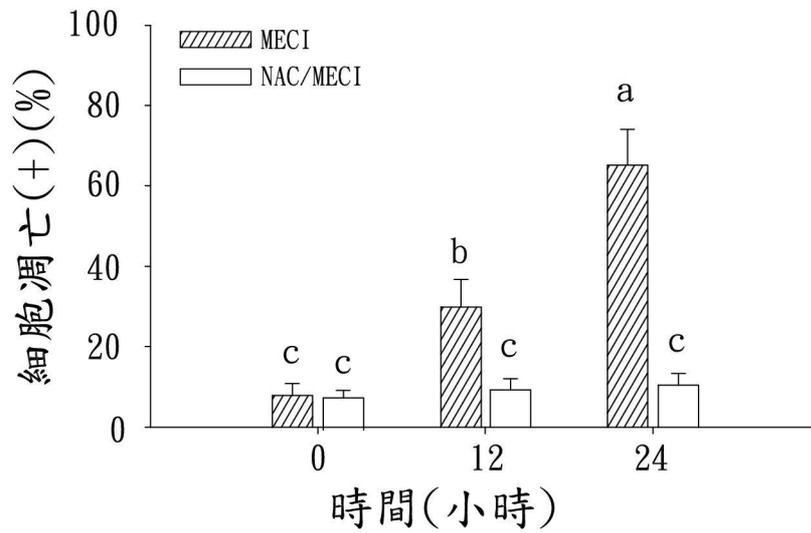
【第 13 圖】



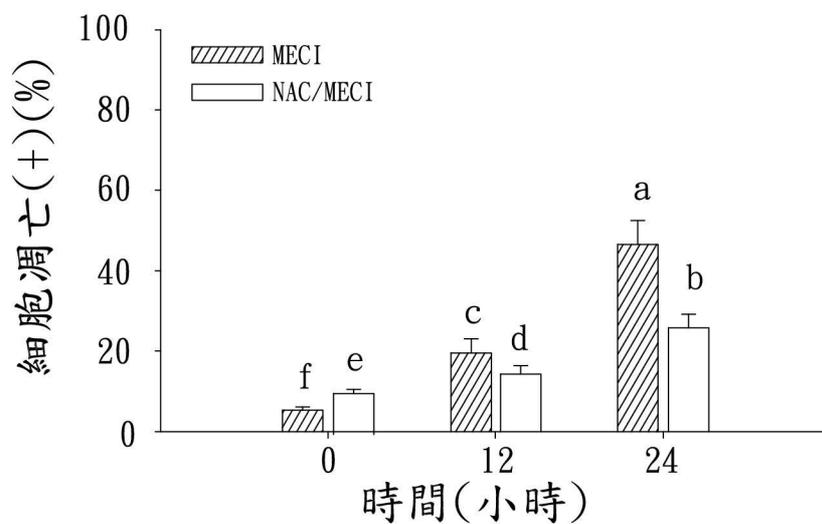
【第 14 圖】



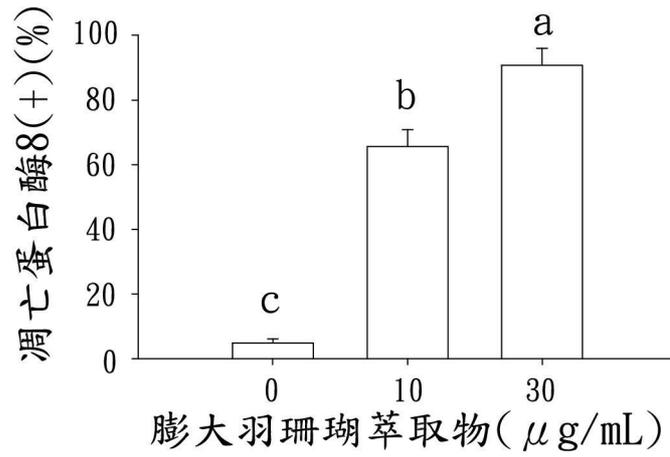
【第 15 圖】



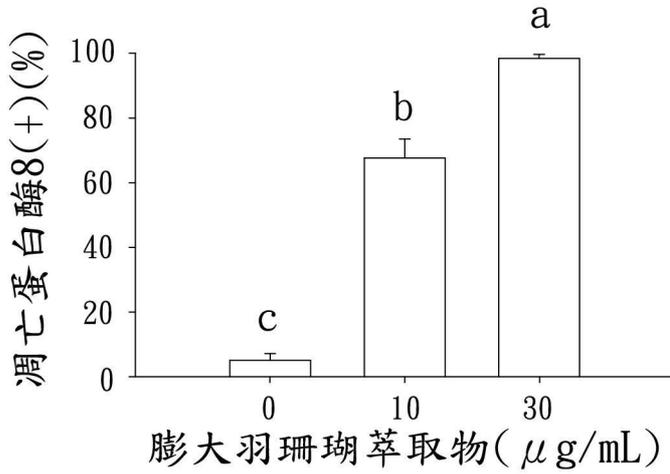
【第 16 圖】



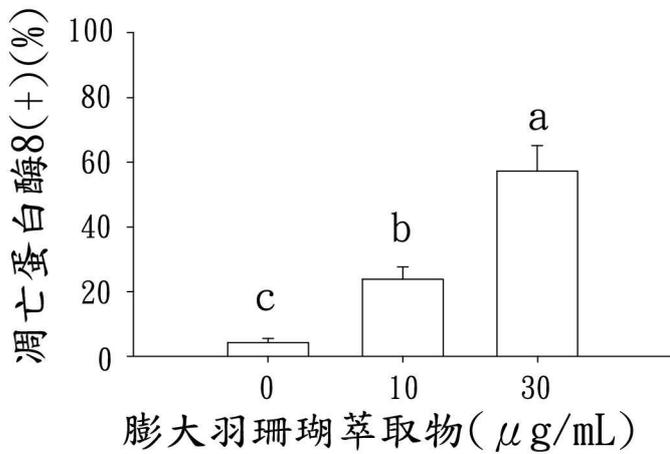
【第 17 圖】



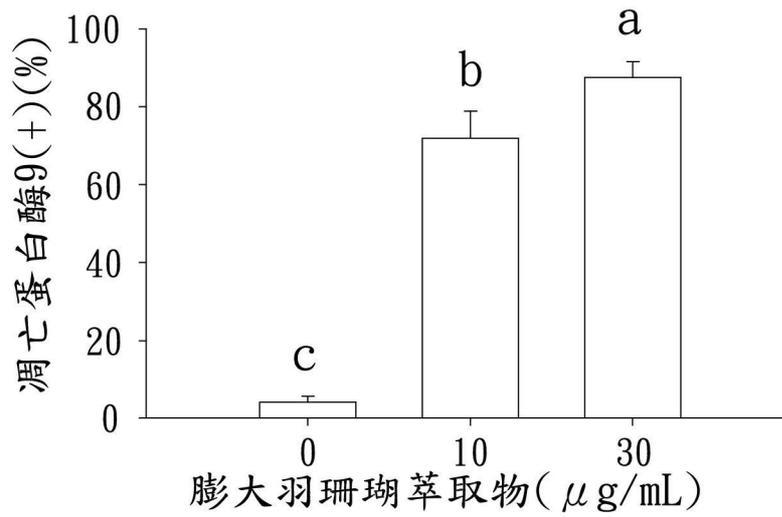
【第 18 圖】



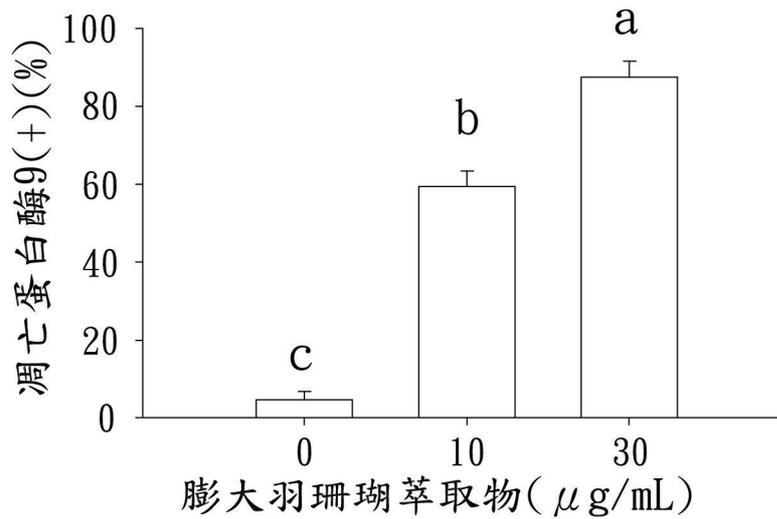
【第 19 圖】



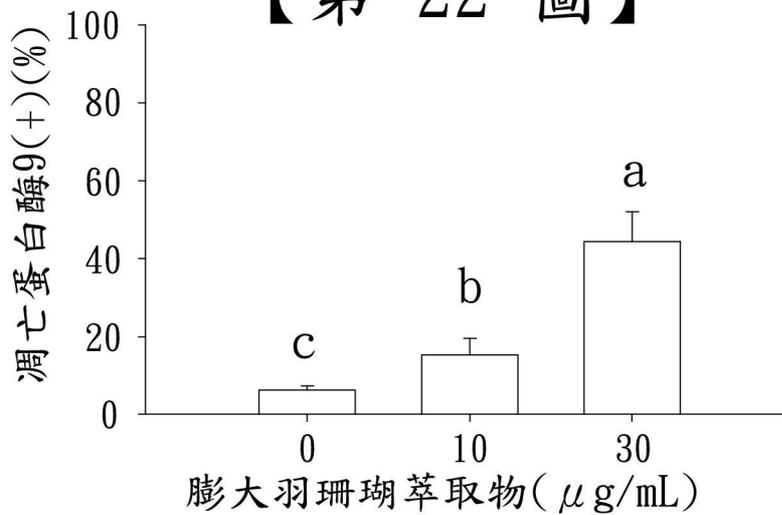
【第 20 圖】



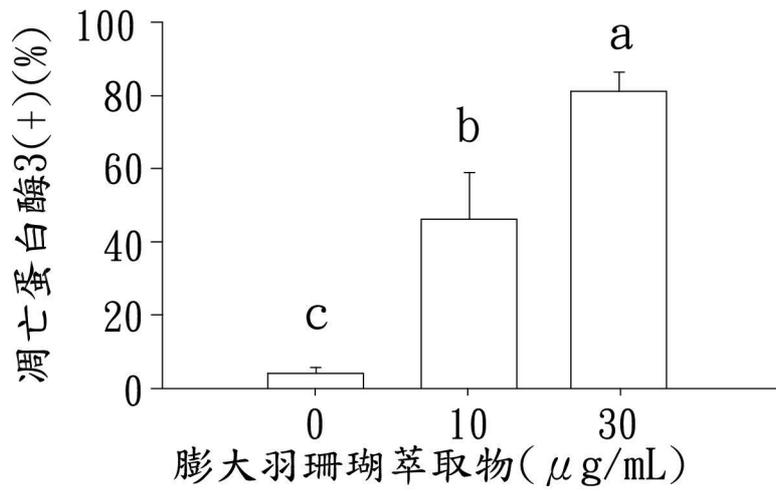
【第 21 圖】



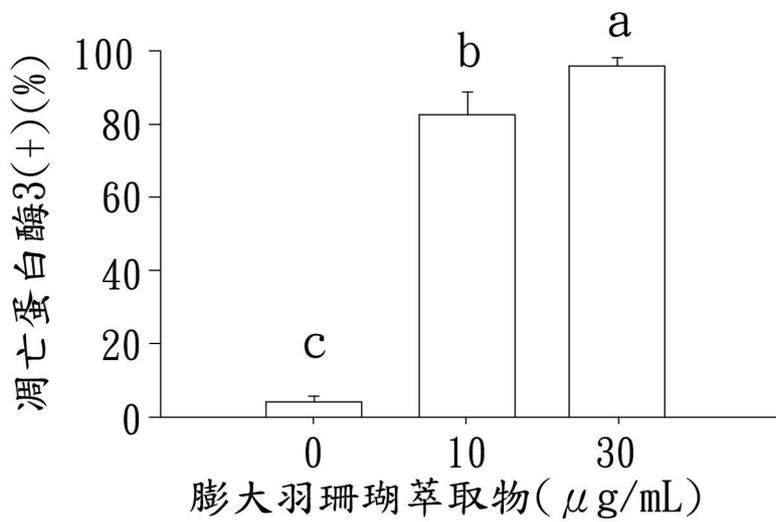
【第 22 圖】



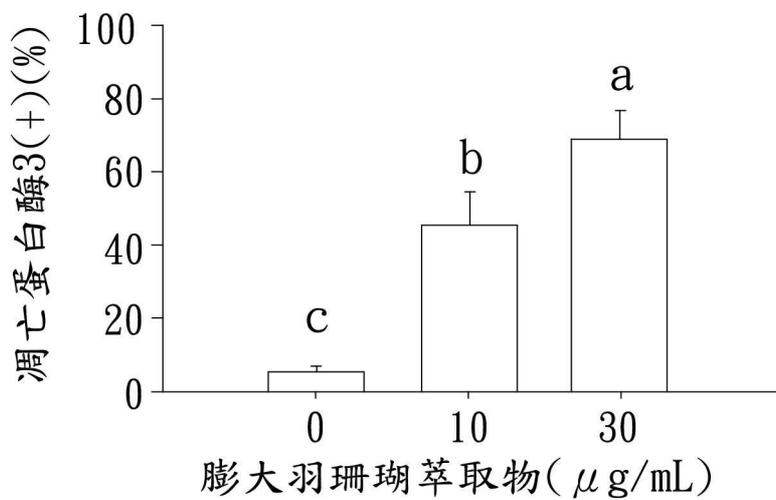
【第 23 圖】



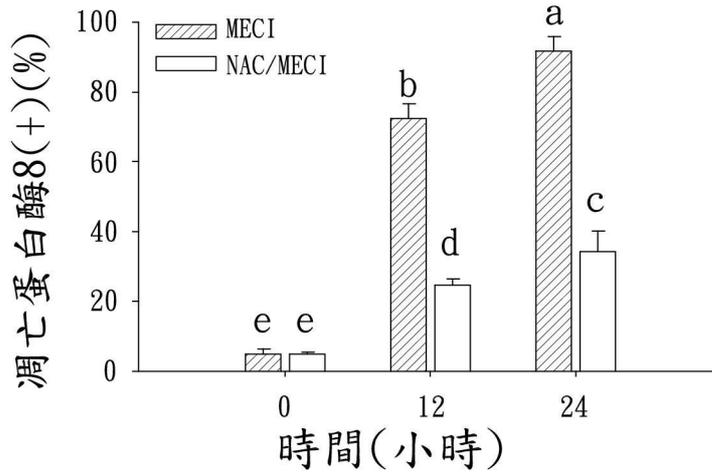
【第 24 圖】



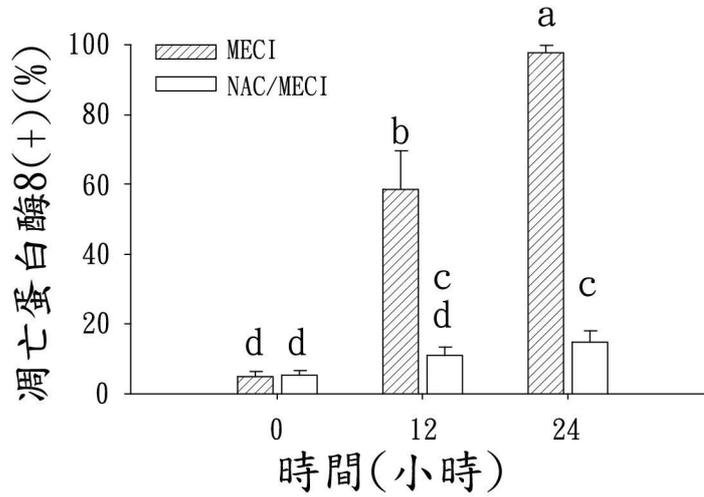
【第 25 圖】



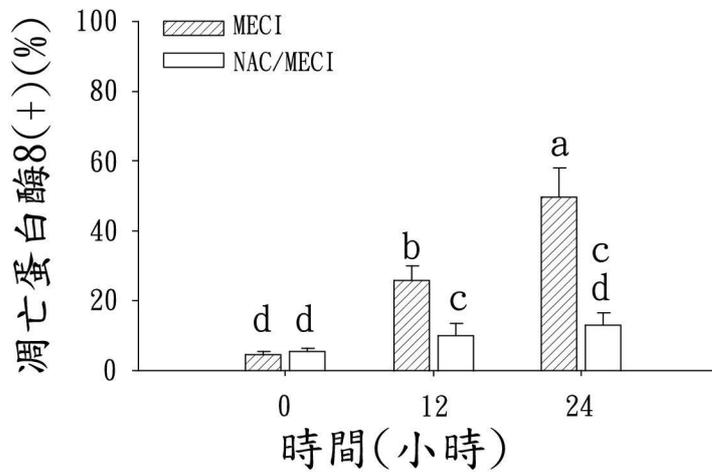
【第 26 圖】



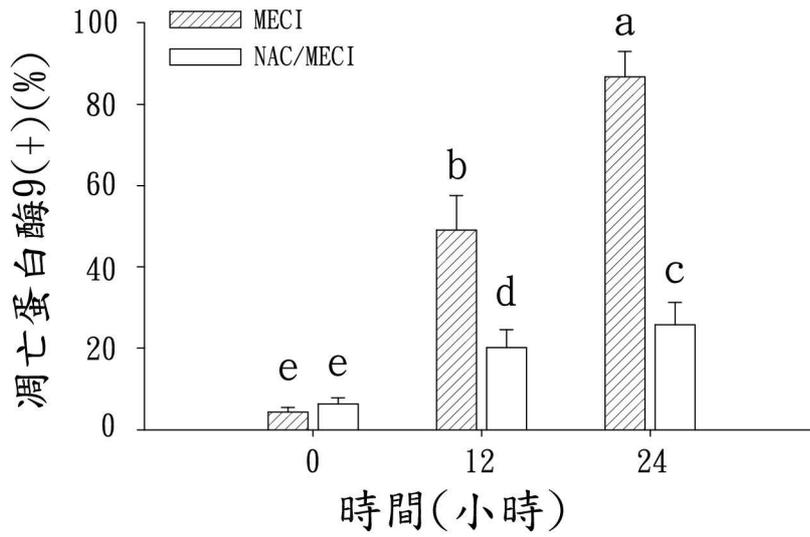
【第 27 圖】



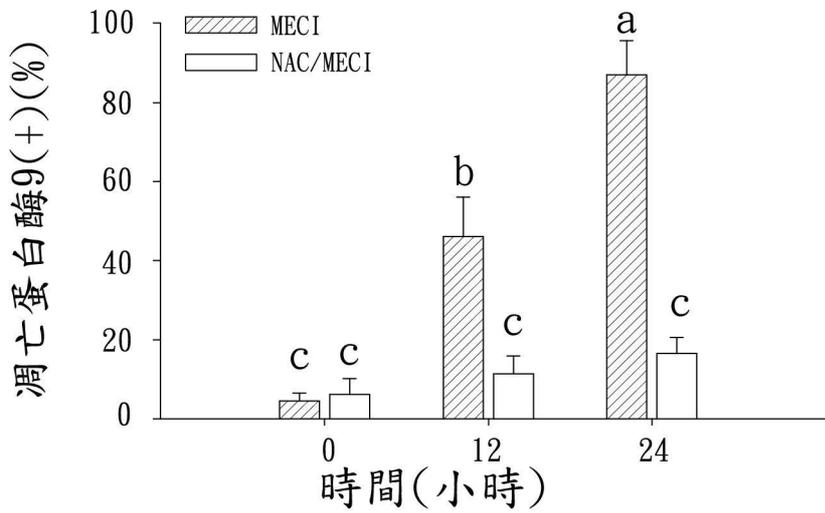
【第 28 圖】



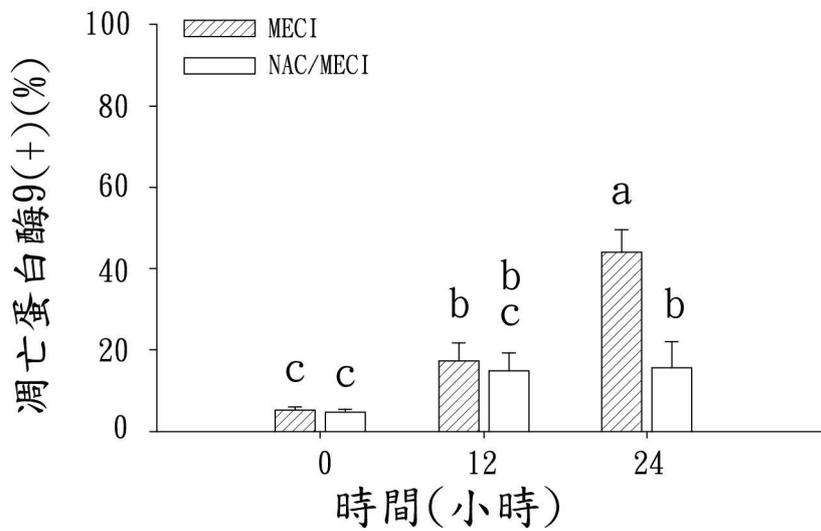
【第 29 圖】



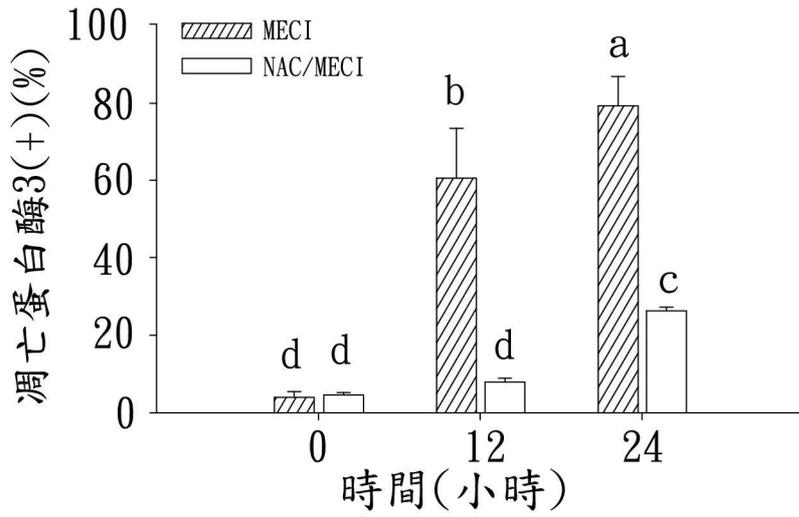
【第 30 圖】



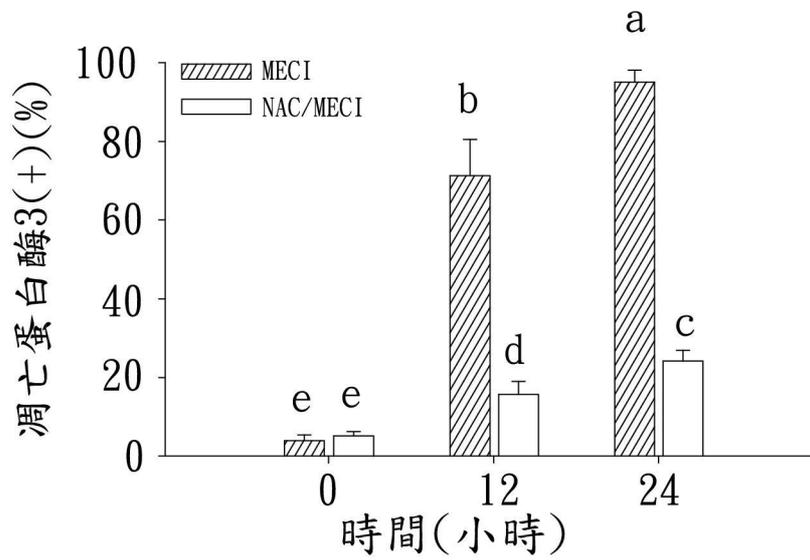
【第 31 圖】



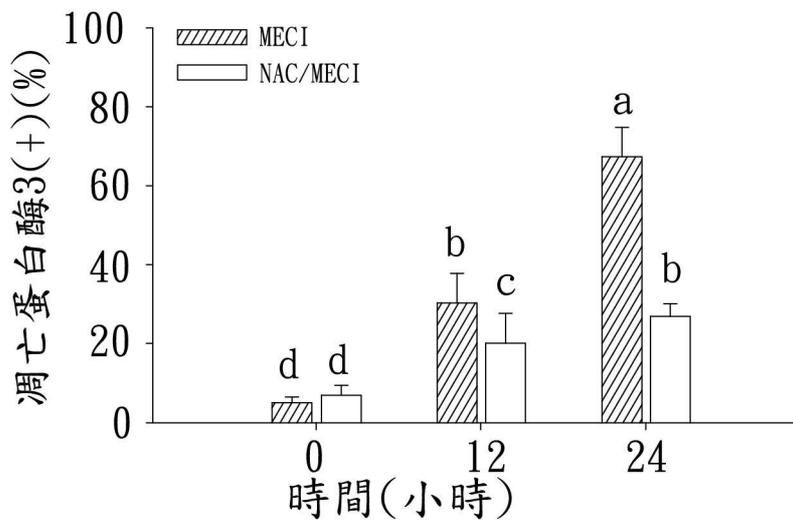
【第 32 圖】



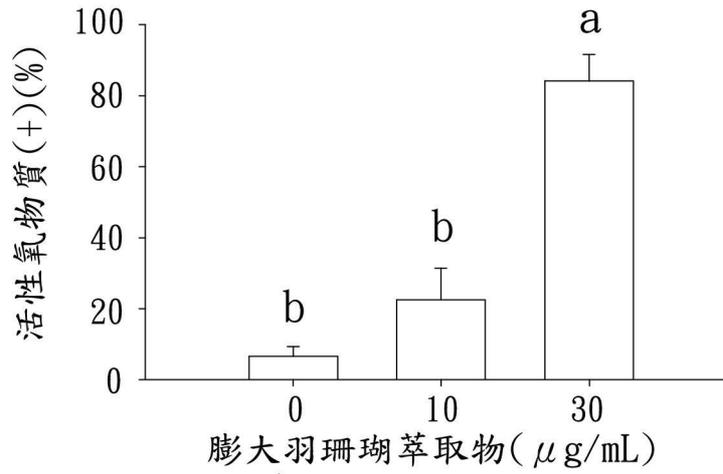
【第 33 圖】



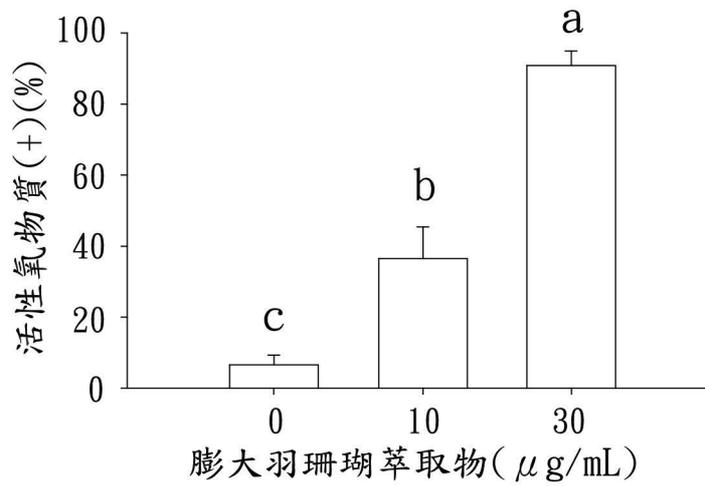
【第 34 圖】



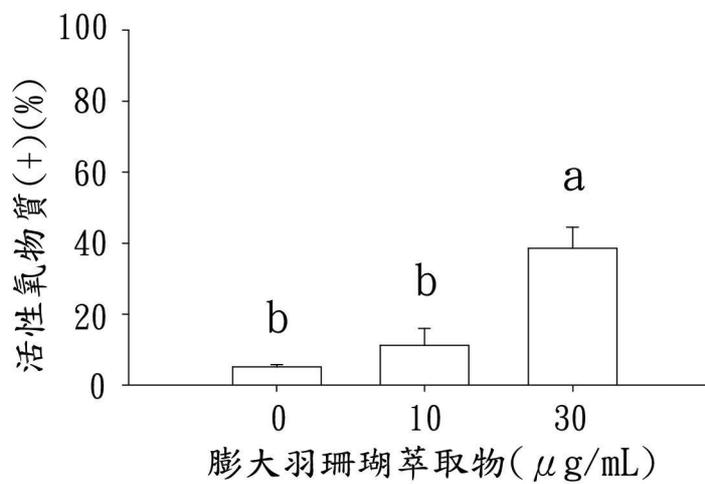
【第 35 圖】



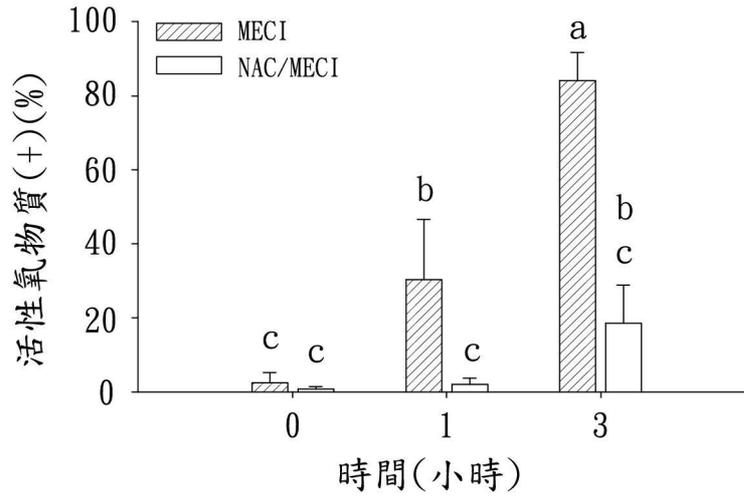
【第 36 圖】



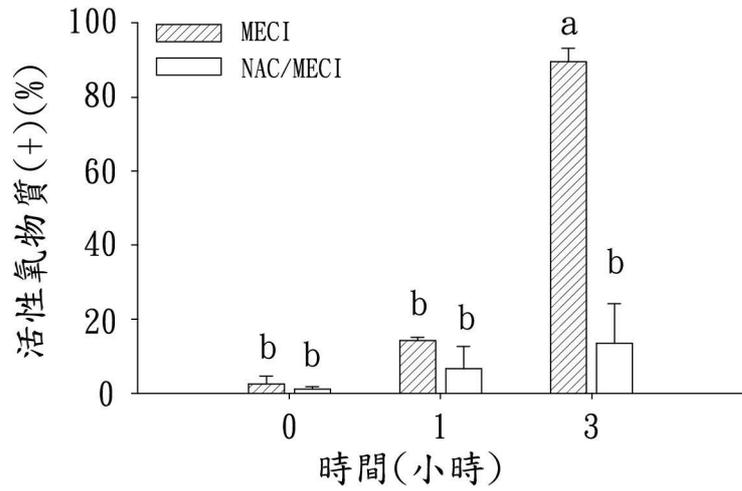
【第 37 圖】



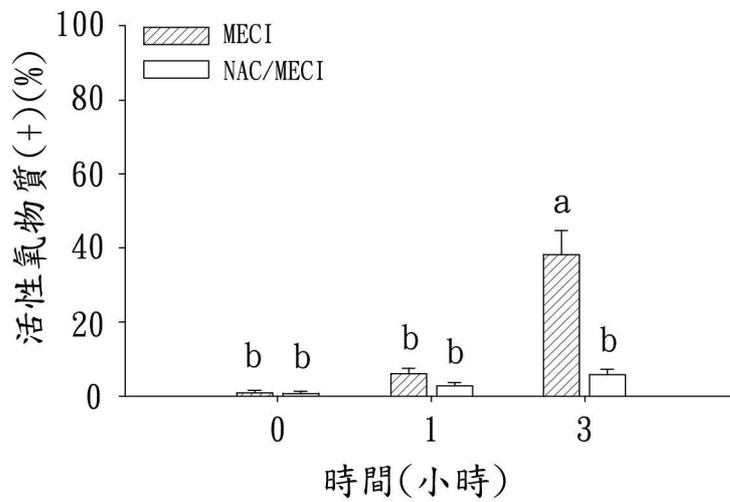
【第 38 圖】



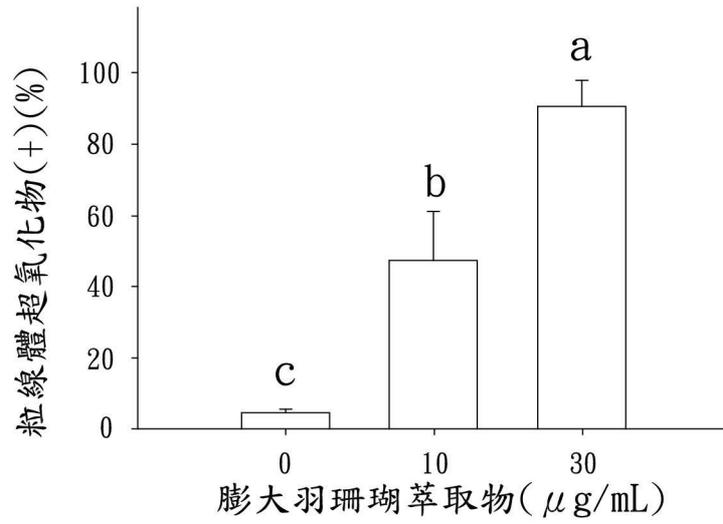
【第 39 圖】



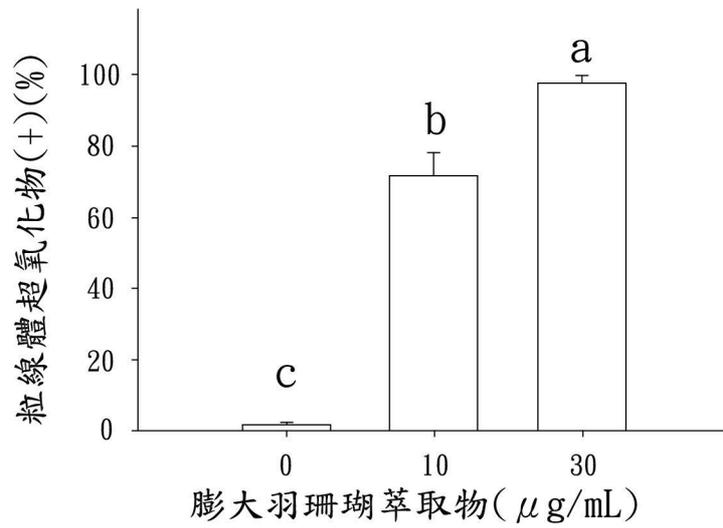
【第 40 圖】



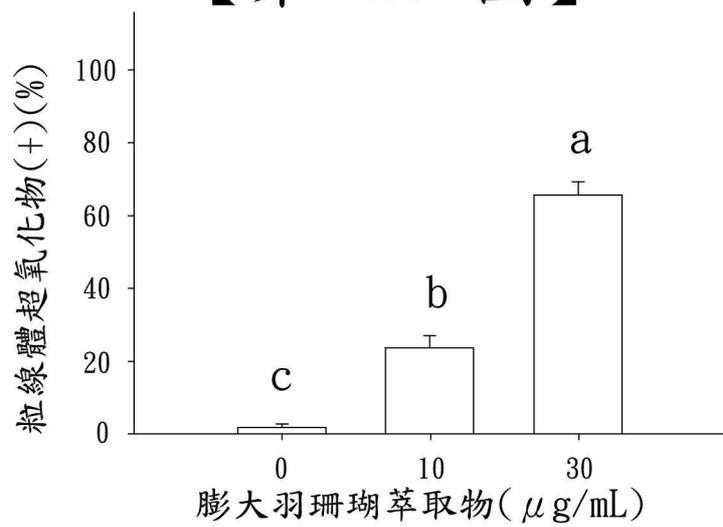
【第 41 圖】



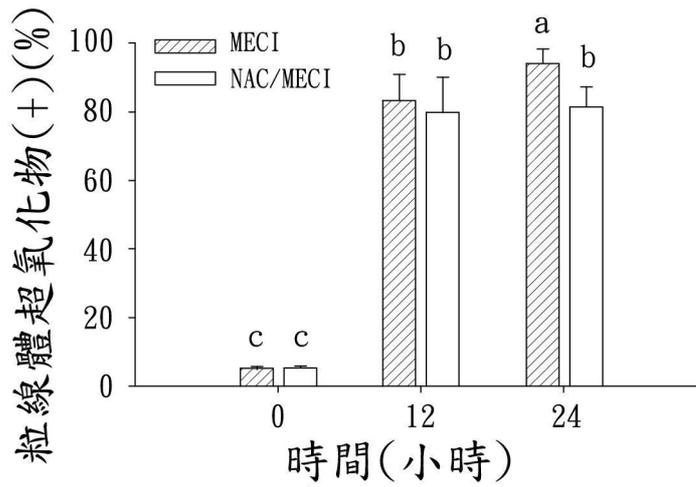
【第 42 圖】



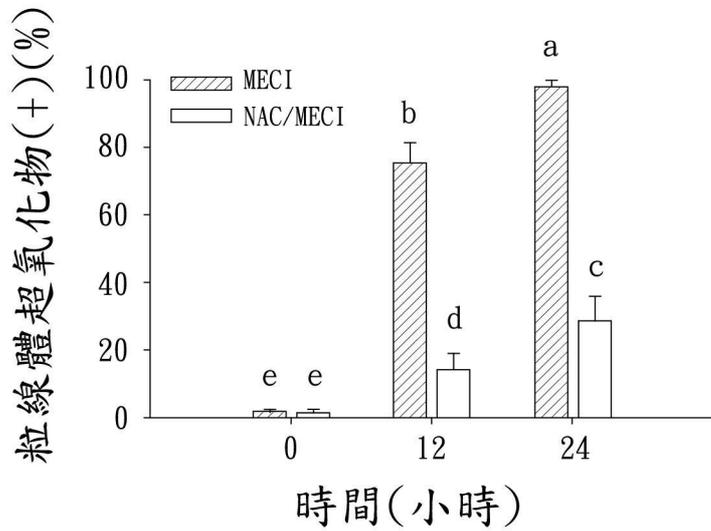
【第 43 圖】



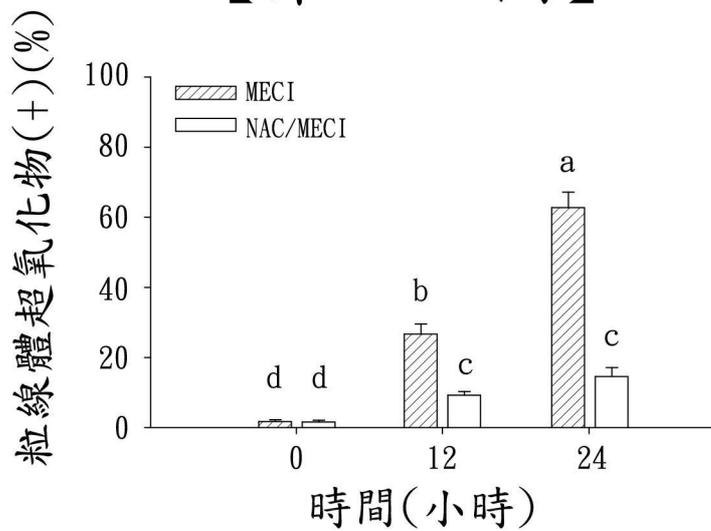
【第 44 圖】



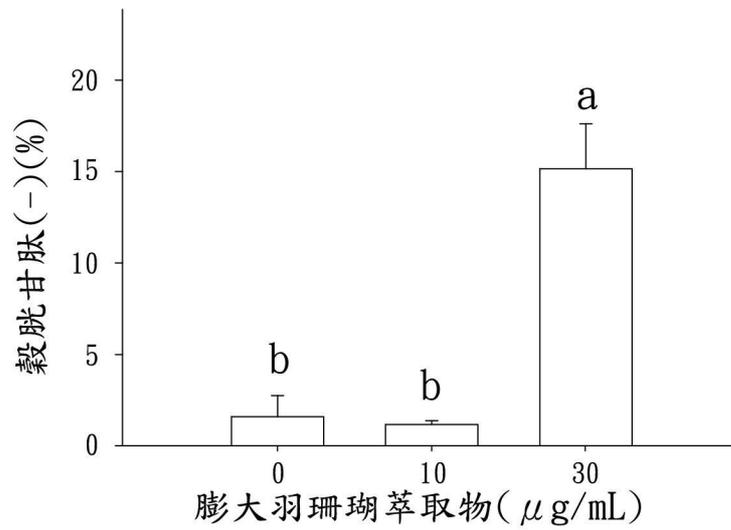
【第 45 圖】



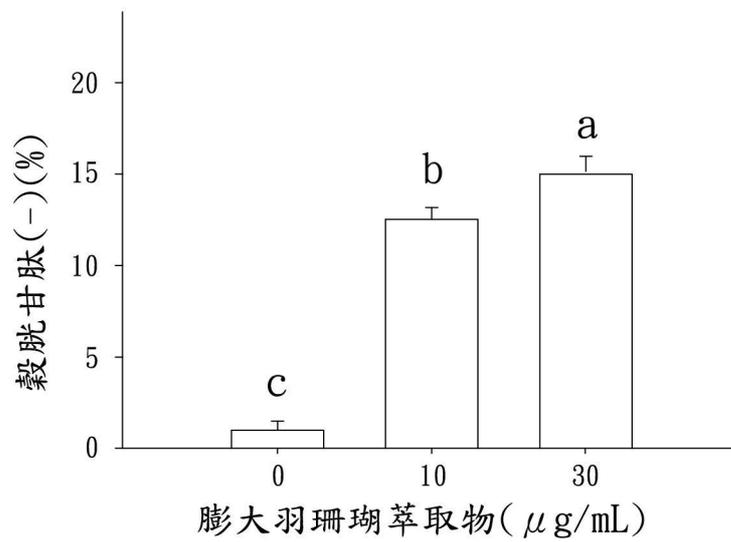
【第 46 圖】



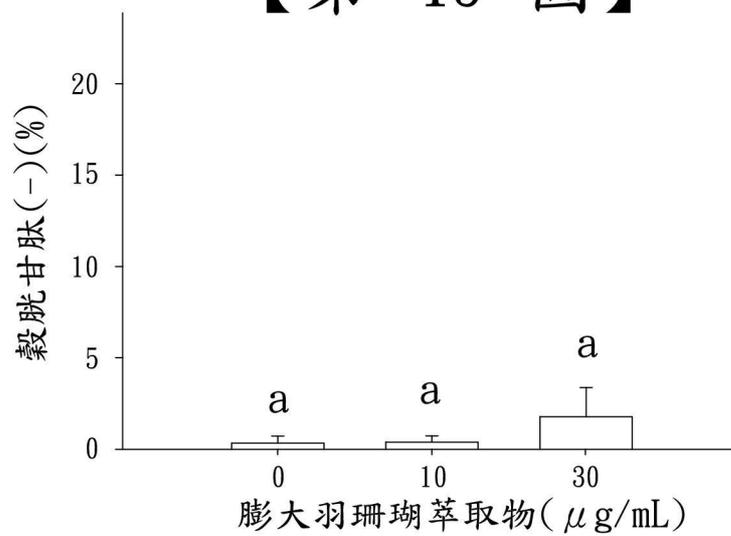
【第 47 圖】



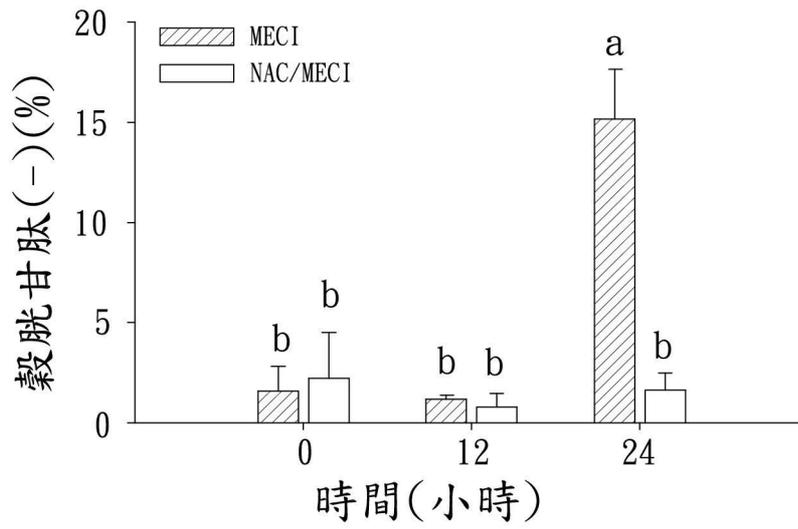
【第 48 圖】



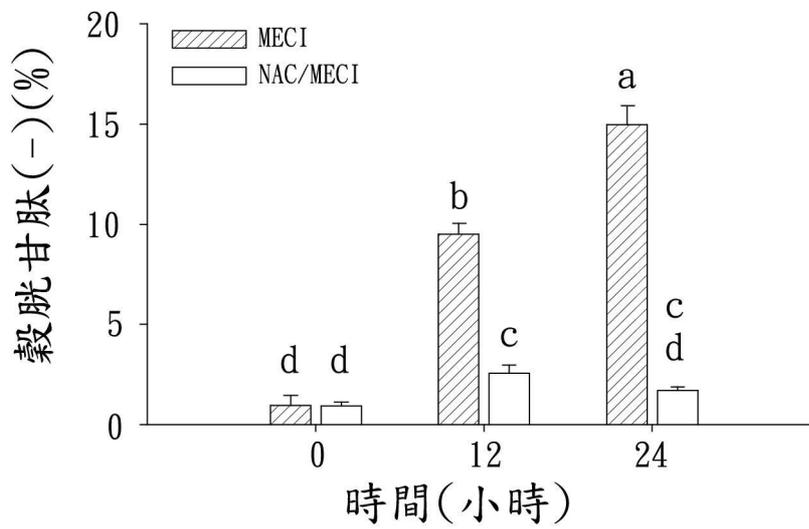
【第 49 圖】



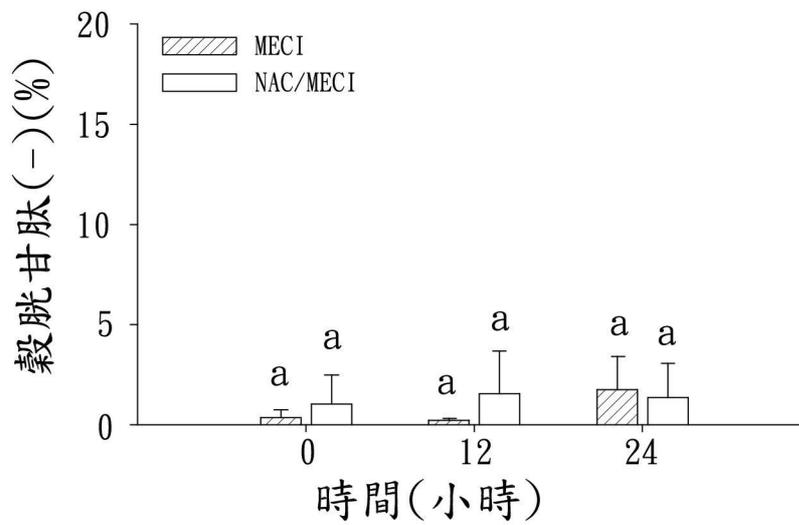
【第 50 圖】



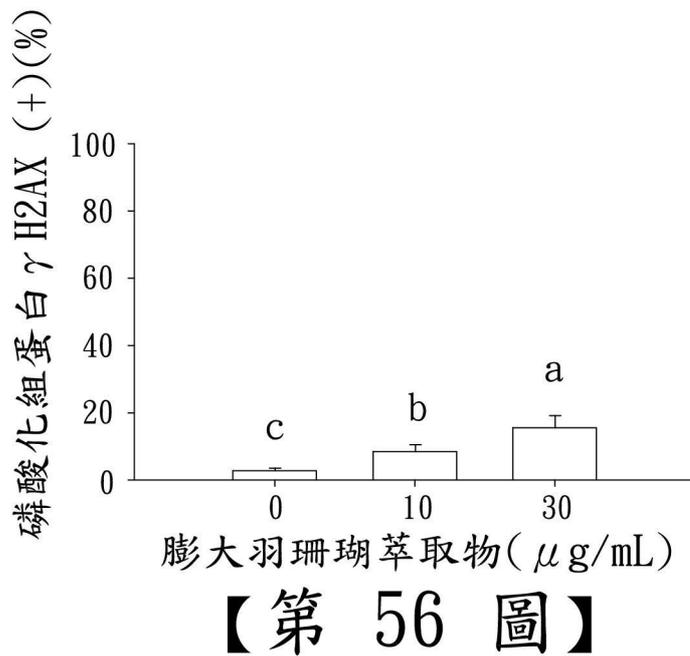
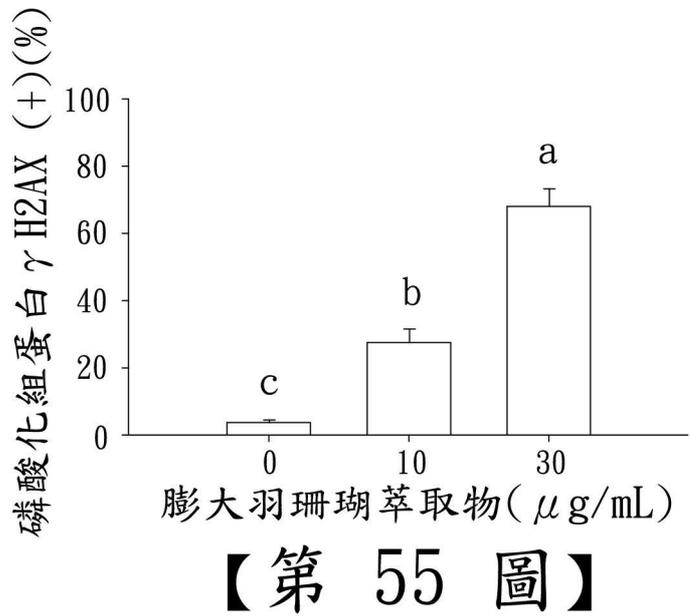
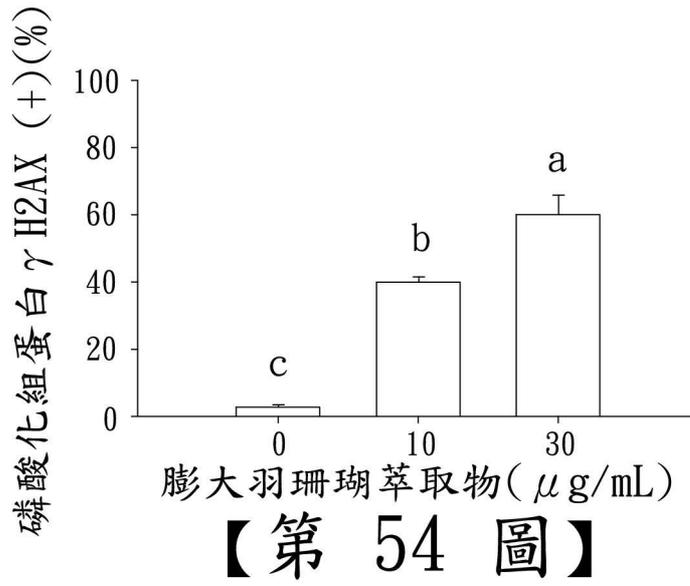
【第 51 圖】

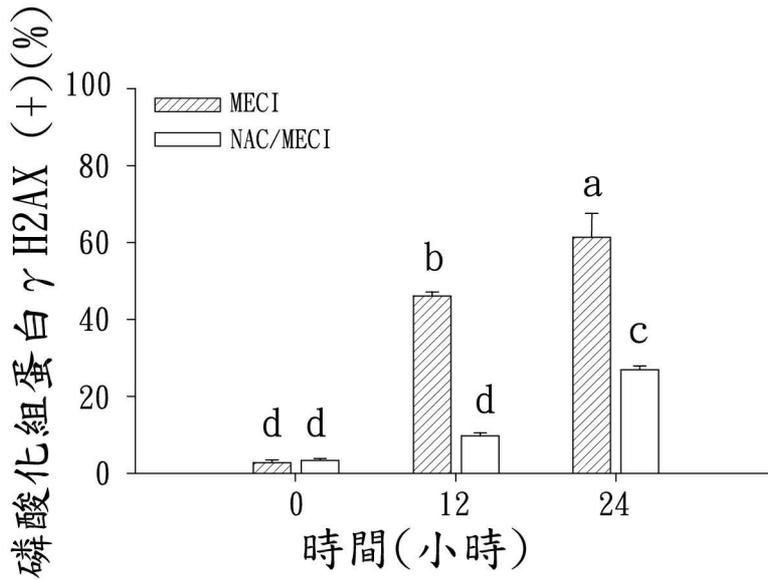


【第 52 圖】

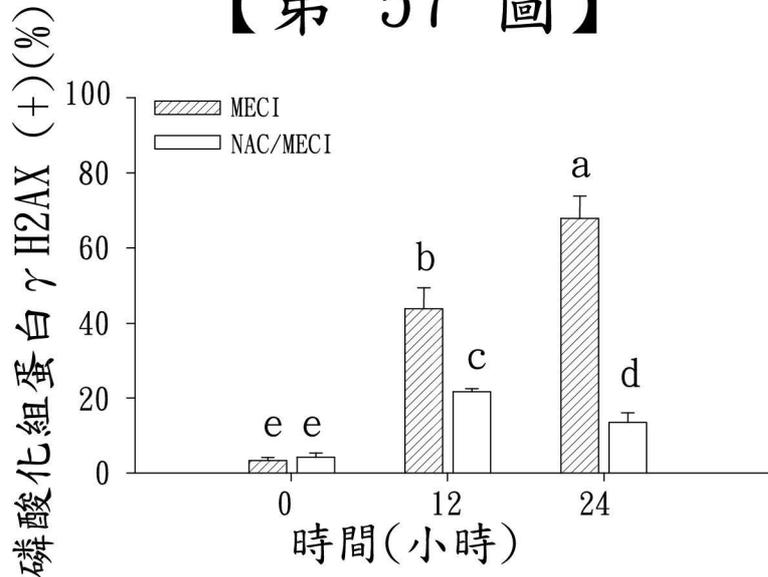


【第 53 圖】

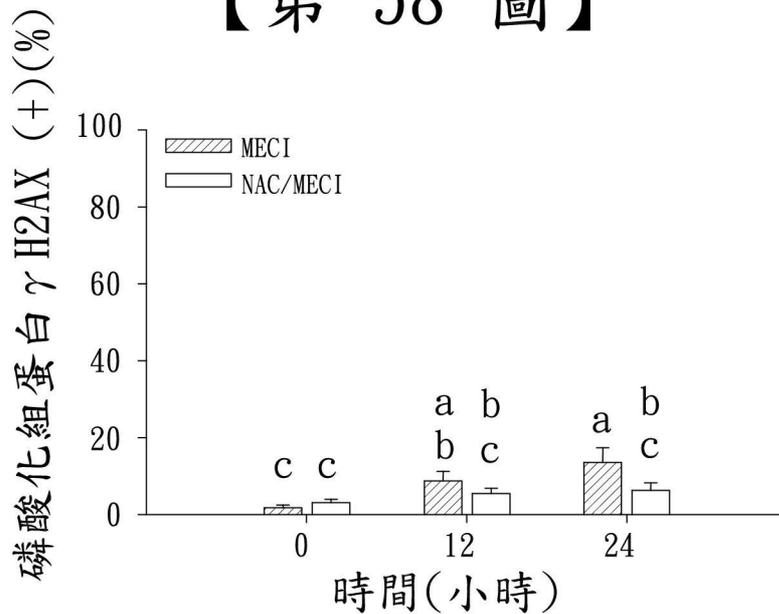




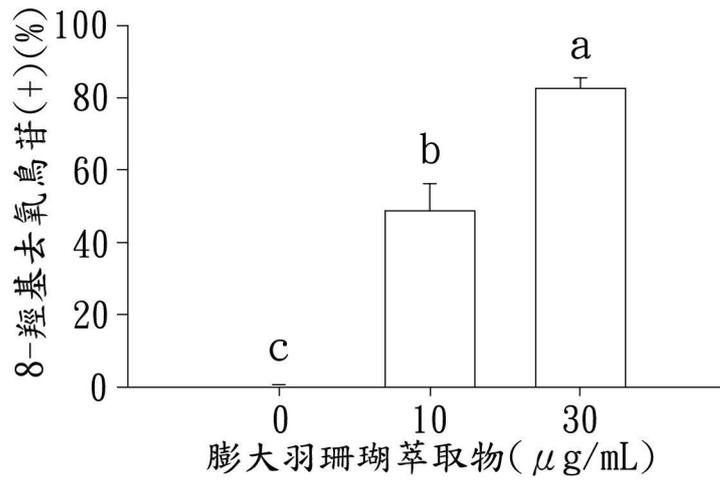
【第 57 圖】



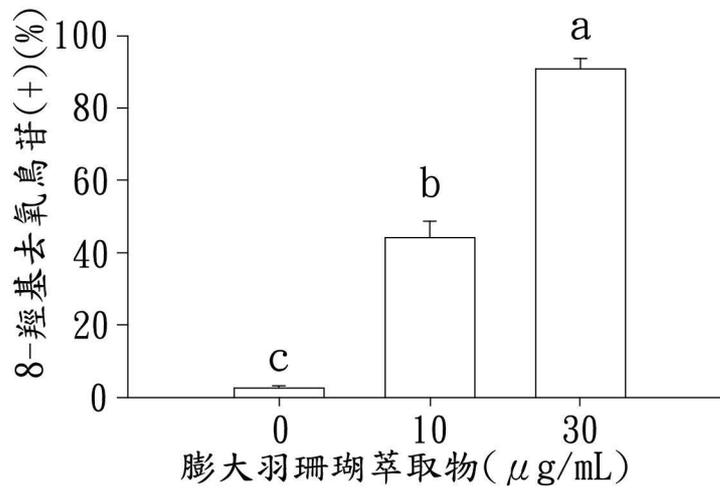
【第 58 圖】



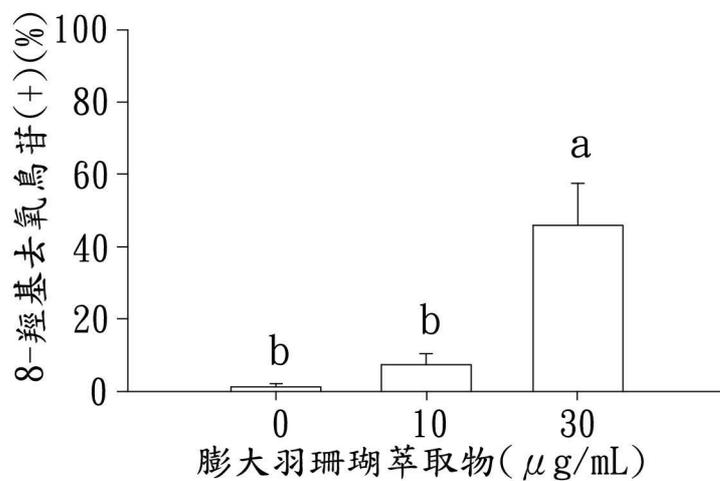
【第 59 圖】



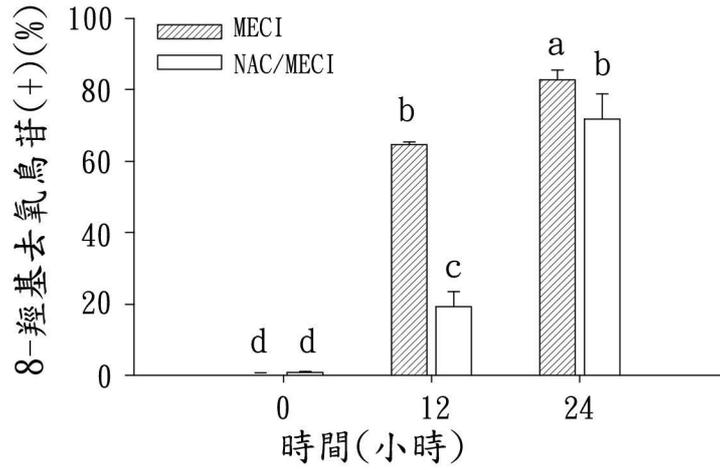
【第 60 圖】



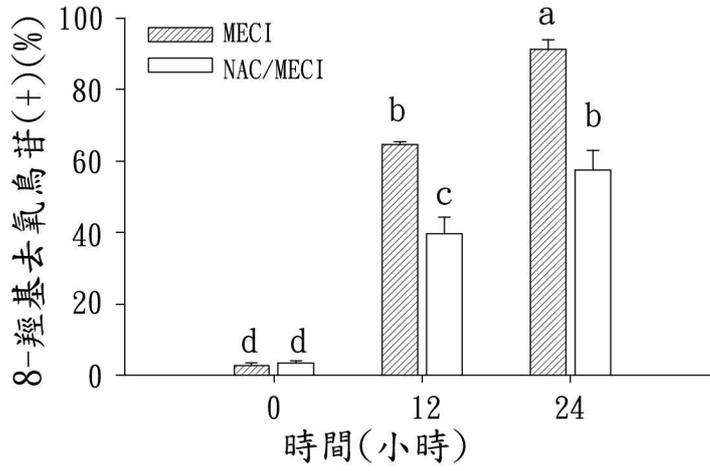
【第 61 圖】



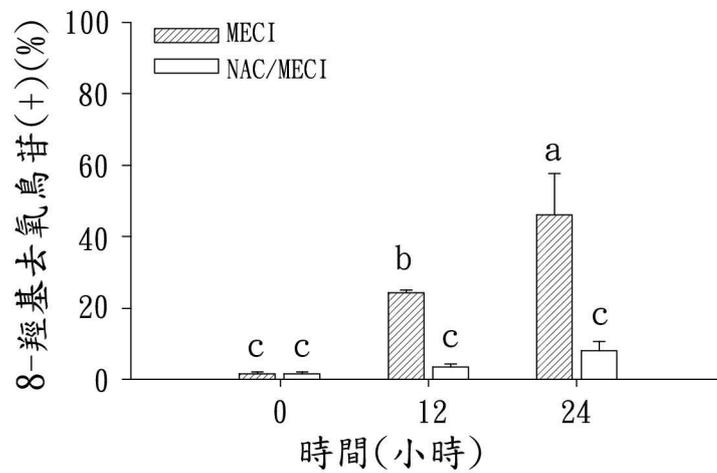
【第 62 圖】



【第 63 圖】



【第 64 圖】



【第 65 圖】