



(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 I846521 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：112123477

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 21 日

(51)Int. Cl. : A61K31/737 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：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：張學偉 CHANG, HSUEH-WEI (TW)；湯人仰 TANG, JEN-YANG (TW)；莊雅婷 CHUANG, YA-TING (TW)；蕭君平 SHIAU, JUN-PING (TW)；顏欽堉 YEN, CHING-YU (TW)；侯明鋒 HOU, MING-FENG (TW)；鄭景暉 JENG, JIANG-HUEI (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

期刊 Shiau JP, Chuang YT, Yang KH, Chang FR, Sheu JH, Hou MF, Jeng JH, Tang JY, Chang HW. Brown Algae-Derived Fucoidan Exerts Oxidative Stress-Dependent Antiproliferation on Oral Cancer Cells. Antioxidants (Basel). 2022/04/26

期刊 Peng SY, Wang YY, Lan TH, Lin LC, Yuan SF, Tang JY, Chang HW. Low Dose Combined Treatment with Ultraviolet-C and Withaferin a Enhances Selective Killing of Oral Cancer Cells. Antioxidants (Basel). 2020/11/13

審查人員：藍羿軒

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：33 共 65 頁

(54)名稱

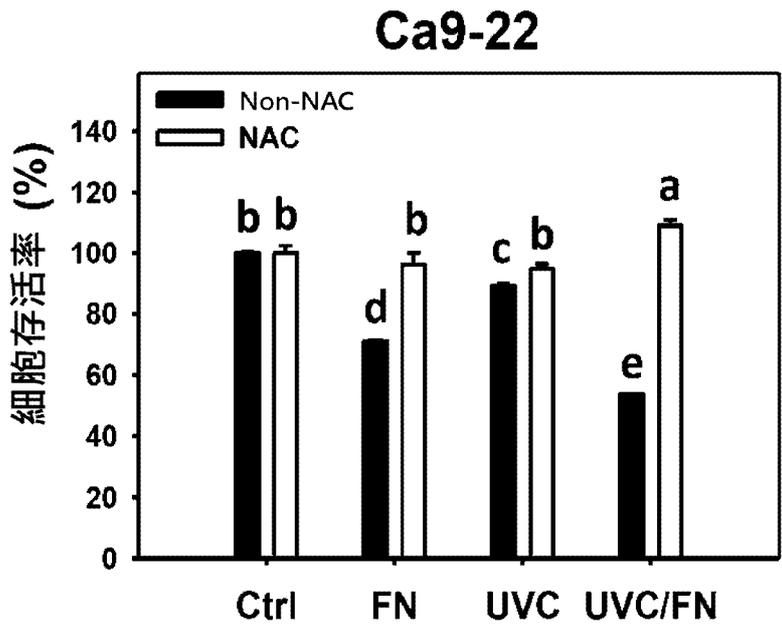
褐藻醣膠用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

(57)摘要

本發明係關於一種褐藻醣膠的用途，用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，褐藻醣膠係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長。

The present invention is related to a use of Fucoidan of manufacturing medicament for selective antiproliferation of oral cancer cell. The Fucoidan is administered to a subject in need thereof to induce apoptosis in oral cancer cells, leading to selective antiproliferation of the oral cancer cells.

指定代表圖：



【第 1 圖】



I846521

【發明摘要】

【中文發明名稱】 褐藻醣膠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 Fucoidan of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cell

【中文】

本發明係關於一種褐藻醣膠的用途，用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，褐藻醣膠係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長。

【英文】

The present invention is related to a use of Fucoidan of manufacturing medicament for selective antiproliferation of oral cancer cell. The Fucoidan is administered to a subject in need thereof to induce apoptosis in oral cancer cells, leading to selective antiproliferation of the oral cancer cells.

【指定代表圖】 第 1 圖

【代表圖之符號簡單說明】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 褐藻醣膠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 Fucoidan of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cell

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種褐藻醣膠，尤其是一種褐藻醣膠用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途。

【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，本發明的主要目的在於提供一種褐藻醣膠的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，但較不傷害正常口

腔細胞者。

【0006】 本發明全文所記載的元件及構件使用「一」或「一個」之量詞，僅是為了方便使用且提供本發明範圍的通常意義；於本發明中應被解讀為包括一個或至少一個，且單一的概念也包括複數的情況，除非其明顯意指其他意思。

【0007】 本發明的褐藻醣膠的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，褐藻醣膠係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長，且在將褐藻醣膠係投予該所需個體之前，以一紫外光照射該所需個體的患部，該紫外光的波長係介於 200 nm~280 nm 之間。

【0008】 據此，本發明的褐藻醣膠的用途，係能夠藉由褐藻醣膠作為活性成分，在將褐藻醣膠投予一所需個體時，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，褐藻醣膠對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而褐藻醣膠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。又，藉由將褐藻醣膠與具有特定波長範圍的紫外光 C 組合使用，可以強化抑制口腔癌細胞生長的功效。

【0009】 本發明的褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠係以口服方式投予一所需個體。如此，使用者係能夠以簡便方式獲取褐藻醣膠的活性成分，有助於提升使用者的服藥順從性。

【0010】 本發明的褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠係以靜脈注射的方式投予一所需個體。如此，褐藻醣膠係可以經由該所需個體的靜脈流向患部，避免褐藻醣膠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】 本發明的褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠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，藉由褐藻醣膠的投予劑量，而具有較佳的抑制口腔癌細胞生長的功效。

【0012】 本發明的褐藻醣膠的用途，其中，該紫外光的輻射能量係介於 $10 \text{ J/m}^2 \sim 15 \text{ J/m}^2$ 之間。如此，藉由將紫外光的輻射能量控制在上述範圍，可以得到較佳的抑制口腔癌細胞生長的功效。

【圖式簡單說明】

【0013】

〔第 1 圖〕 試驗 (A) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 Ca9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (Non-NAC 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 Ca9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 2 圖〕 試驗 (A) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (Non-NAC 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 3 圖〕 試驗 (A) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (Non-NAC 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具

有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 4 圖〕 試驗 (B) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 Ca9-22 細胞的細胞週期中的 subG1 期變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 5 圖〕 試驗 (B) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 CAL 27 細胞的細胞週期中的 subG1 期變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 6 圖〕 試驗 (B) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 S-G 細胞的細胞週期中的 subG1 期變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 7 圖〕 試驗 (C) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 8 圖〕 試驗 (C) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 9 圖〕 試驗 (C) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 10 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 11 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 12 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 13 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 14 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 15 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 16 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 17 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 18 圖〕 試驗 (D) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 19 圖〕 試驗 (E) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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

母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 20 圖〕 試驗 (E) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 21 圖〕 試驗 (E) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 22 圖〕 試驗 (F) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 23 圖〕 試驗 (F) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 24 圖〕 試驗 (F) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 25 圖〕 試驗 (G) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 26 圖〕 試驗 (G) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 27 圖〕 試驗 (G) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 S-G 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，標示不同英文字母的柱狀

數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 28 圖〕 試驗 (H) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 29 圖〕 試驗 (H) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 30 圖〕 試驗 (H) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 31 圖〕 試驗 (I) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 32 圖〕 試驗 (I) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

〔第 33 圖〕 試驗 (I) 中，經褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合處理的 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，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

【實施方式】

【0014】 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。

【0015】 本發明所述之「褐藻醣膠」係指從褐藻（或少數海藻）萃取而

113年3月13日修正替換頁

得的硫化多醣，其平均分子量係介於約 20,000~30,000 之間，且其組成係以岩藻糖為主，包含葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖、葡萄糖醛酸。

【0016】 本發明所述之「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。

【0017】 本發明之一實施例的褐藻醣膠，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，該褐藻醣膠對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該褐藻醣膠可以應用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物。該褐藻醣膠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。

【0018】 舉例而言，該褐藻醣膠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褐藻醣膠，有助於提升使用者的服藥順從性 (drug compliance)。此時，該褐藻醣膠可以經由小腸吸收，並藉由血流循環至患部位置，以抑制口腔癌細胞生長，其中，該褐藻醣膠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】 又，該褐藻醣膠亦可以利用靜脈注射的方式投予該所需個體，例如將該褐藻醣膠注射到所需個體的手背或前臂的靜脈中，以避免該褐藻醣膠在通過消化道時會受到胃酸的破壞而影響生物活性。此時，該褐藻醣膠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，該褐藻醣膠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。

【0020】 在本發明的實施例中，該褐藻醣膠係可以與一紫外光共同使

113年3月13日修正替換頁

用，以強化抑制口腔癌細胞的存活/生長的效果。舉例而言，可以在將該褐藻醣膠施予該所需個體之前，先以該紫外光照射該所需個體的患部。在本實施例中，該紫外光可以為紫外光 C，其波長介於約 200 nm~280 nm 之間（例如，254 nm）。另外，該紫外光的輻射能量可以介於 10 J/m²~15 J/m² 之間，而照射時間可以介於 10 秒~15 秒之間。

【0021】 為證實本發明之該褐藻醣膠，以及該褐藻醣膠與紫外光的組合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，該褐藻醣膠（及該褐藻醣膠與紫外光的組合）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）及 CAL 27 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，進行以下試驗：

【0022】 (A) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對於相對細胞存活率的影響

【0023】 本試驗係分別使上述各模式細胞株分別進行以下處理：（1）以濃度為 300 µg/mL 的褐藻醣膠〔配置於 1X 磷酸鹽緩衝生理鹽水（1X PBS）的水溶液中；另外，以下試驗均係將褐藻醣膠配置於 1X PBS 水溶液中，故不再贅述〕處理（即，共培養）24 小時（FN 組）；（2）以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射（UVC 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m²，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m²；以及（3）先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理（共培養）24 小時（UVC/FN 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m² 的紫外光 C + 300 µg/mL 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m² 的紫外光 C + 300 µg/mL 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組（Ctrl 組）。在各模

113年3月13日修正替換頁

式細胞株分別進行上述各組處理後，加入 MTS 試劑且反應 24 小時，接著測量於波長為 490 nm 下的吸光值；其中，由於活細胞內的粒腺體所含有的物質可以使 MTS 試劑轉化為最大吸光值為 490 nm 的甲臍（formazan）化合物，因此以未經任何處理的細胞的吸光值作為基準（100%），計算經上述各組處理之後的各組模式細胞株在波長為 490 nm 下的吸光值，加以換算後，即可以得知各組模式細胞株的相對細胞存活率。

【0024】另外，為了確認上述各組處理對於各組模式細胞株的相對細胞存活率的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行各組處理之前，先加入活性氧物質抑制劑（N-乙醯半胱氨酸，N-acetylcysteine，簡稱 NAC；濃度為 10 mM，配置於 1X PBS 水溶液中）進行預處理 1 小時，接著再進行上述個別處理，後續如前述般加入 MTS 試劑且反應 24 小時後，測量於波長為 490 nm 下的吸光值，最終如前述之換算各種模式細胞株在經過該褐藻醣膠的處理之後的相對細胞存活率。

【0025】另外，本試驗亦一併檢驗褐藻醣膠及紫外光 C 的組合的協作性（synergy，以 α 表示），而協作性（ α ）的定義為：

$$\text{協作性} (\alpha) = \frac{\text{相對細胞存活率 (UVC)} - \text{相對細胞存活率 (FN)}}{\text{相對細胞存活率 (UVC/FN)}}$$

其中， $\alpha=1$ 、 $\alpha>1$ 及 $\alpha<1$ 分別表示加成性（additive）抗增生、協作性（synergistic）抗增生及對抗性（antagonistic）抗增生。

【0026】請參照第 1 圖及第 2 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC（即，未經活性氧物質抑制劑進行預處理的試驗組別）的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞的相對細胞存活率顯著下降，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞

及 CAL 27 細胞的相對細胞存活率進一步下降。

【0027】另外，從上述針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞的試驗結果可以計算出褐藻醣膠及紫外光 C 的組合的協作性 (α) 分別為 1.20 及 1.33，顯示本發明的褐藻醣膠與紫外光 C 具有良好的協作性，相較於單獨使用褐藻醣膠或紫外光 C，將褐藻醣膠與紫外光 C 組合使用可以得到較佳的口腔癌細胞的抗增生效果。

【0028】請繼續參照第 1 圖及第 2 圖所示，在標示 NAC（即，經活性氧物質抑制劑進行預處理的試驗組別）的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞的相對細胞存活率皆顯著高於 Non-NAC 的組別的相對細胞存活率，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞的相對細胞存活率的下降效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞的相對細胞存活率的下降。

【0029】接著，請參照第 3 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，各組處理不會使 S-G 細胞的相對細胞存活率下降，反而有些微上升的趨勢（各組的實際相對細胞存活率分別為 106.0%、107.6%及 108.5%）。另外，在標示 NAC 的各組數據中，雖然 S-G 細胞的相對細胞存活率係具有不規律的浮動，但浮動的幅度並不大（即，相對細胞存活率均接近 100%），顯示前述各組處理對於正常細胞的氧化壓力的影響相對較小，進而導致對於正常細胞的相對細胞存活率的影響相對較不明顯。

【0030】異常的細胞週期會導致細胞存活率的下降，其中，處於 subG1 期的細胞的佔比增加是驅使細胞進入細胞凋亡〔apoptosis，又稱為計畫性細胞死亡（programmed cell death）〕的其中一種可能原因。因此，為了確認上述各組處理（即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組）所造成之細胞存活率的下降的作用機制是否係與口腔癌細胞處於 subG1 期的細胞的佔比增加有關，遂

進行以下試驗。

【0031】 (B) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對於細胞週期變化的影響

【0032】 本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：(1) 以濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠處理 (即, 共培養) 24 小時 (FN 組)；(2) 以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射 (UVC 組), 其中, 針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 , 而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ; 以及 (3) 先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後, 再以褐藻醣膠處理 (共培養) 24 小時 (UVC/FN 組), 其中, 針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠, 而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠。另外, 本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組 (Ctrl 組)。接著, 以 75% 乙醇水溶液固定細胞內的 DNA 之後, 再以 7-氨基放線菌素 D (7-aminoactinomycin D, 簡稱為 7AAD) 對各模式細胞株進行染色, 於 37°C 培養 30 分鐘, 接著以流式細胞儀 (Guava easyCyte flow cytometer) 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, 細胞內 DNA 含量未達 2N 者係定義為處於 subG1 期的細胞。

【0033】 另外, 為了確認上述各組處理對於細胞週期變化的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關, 遂於各種模式細胞株進行各組處理之前, 先加入活性氧物質抑制劑 (NAC, 濃度為 10 mM) 進行預處理 1 小時, 接著再進行各組處理, 後續如前述般以 75% 乙醇水溶液固定細胞內的 DNA 之後, 再以 7-氨基放線菌素 D (7AAD) 進行染色, 於 37°C 培養 30 分鐘, 接著以流式細胞儀進行分析。

【0034】 請參照第 4 圖及第 5 圖所示, 針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞 (口腔癌細胞), 在標示 Non-NAC 的各組數據中, 該褐藻醣膠的處理 (FN

組)及紫外光 C 的處理 (UVC 組)皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比顯著提升,而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理 (UVC/FN 組)則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比進一步提升。

【0035】請繼續參照第 4 圖及第 5 圖所示,在標示 NAC 的各組數據中, Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比,顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞處於 subG1 期的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑 (NAC) 回復,證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力,進而導致口腔癌細胞處於 subG1 期的細胞的佔比顯著提升。

【0036】接著,請參照第 6 圖所示,針對 S-G 細胞 (正常細胞),在標示 Non-NAC 的各組數據中,上述各組處理對於 S-G 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比影響並不明顯,而此結果也能在標示 NAC 的各組數據中觀察到,顯示各組處理對於正常細胞的細胞週期的影響較小,與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0037】承上所述,由於處於 subG1 期的細胞的佔比增加是驅使細胞進入細胞凋亡的其中一種可能原因,而在細胞凋亡的早期會發生細胞膜組成移位 (translocation) 的現象,使原先位於細胞膜內側的磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine, 簡稱為 PS) 外翻至細胞膜外側。因此,為確認上述個別處理 (即, UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組) 是否確實會造成口腔癌細胞進入細胞凋亡,遂進行以下試驗。

【0038】(C) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對於細胞凋亡的影響 (一)

【0039】本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理: (1) 以濃度為 300 µg/mL 的褐藻醣膠處理 (即, 共培養) 24 小時 (FN 組); (2) 以

113年3月13日修正替換頁

波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射 (UVC 組)，其中，針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 ，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ；以及 (3) 先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理 (共培養) 24 小時 (UVC/FN 組)，其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組 (Ctrl 組)。接著，以膜聯蛋白 V (Annexin V) 及 7-氨基放線菌素 D (7AAD) 對各模式細胞株進行染色，續以流式細胞儀 (Guava easyCyte flow cytometer) 進行分析；其中，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 (PS) 特異性結合，故流式細胞儀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 [細胞凋亡(+)]。

【0040】另外，為確認上述各組處理對於各組模式細胞株進入細胞凋亡的細胞的佔比影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行上述個別處理之前，先加入活性氧物質抑制劑 (NAC，濃度為 10 mM) 進行預處理 1 小時，接著再進行上述個別處理，後續如前述般以膜聯蛋白 V (Annexin V) 及 7-氨基放線菌素 D (7AAD) 進行染色，接著以流式細胞儀進行分析。

【0041】請參照第 7 圖及第 8 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞 (口腔癌細胞)，在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理 (FN 組) 及紫外光 C 的處理 (UVC 組) 皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理 (UVC/FN 組) 則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比進一步提升。

【0042】請繼續參照第 7 圖及第 8 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實上述各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比顯著提升。

【0043】接著，請參照第 9 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，上述各組處理對於 S-G 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比影響並不明顯，而此結果也能在標示 NAC 的各組數據中觀察到，顯示各組處理對於正常細胞的細胞凋亡的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0044】除了細胞膜組成移位的現象之外，凋亡蛋白酶（caspase）的活化亦在細胞凋亡的反應中扮演重要的角色；其中，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。凋亡蛋白酶 3、凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 為此一過程的關鍵蛋白質，其中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）被活化時，即會啟動與凋亡蛋白酶 8 有關的外源性凋亡途徑（extrinsic apoptosis pathway），進而使凋亡蛋白酶 8 活化；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），進而使凋亡蛋白酶 9 活化。在凋亡蛋白酶 8 或凋亡蛋白酶 9 被活化之後，會接著活化下游的效應凋亡蛋白酶（effector caspase；例如，凋亡蛋白酶 3），經活化的效應凋亡蛋白酶則進一步誘導細胞蛋白的分解，從而啟動細胞凋亡的程序。因此，為確認上述各組處理（即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組）是否會對凋亡蛋白酶

3、凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 造成影響，進而導致口腔癌細胞進入細胞凋亡，遂進行以下試驗。

【0045】 (D) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對於細胞凋亡的影響(二)

【0046】 本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：(1) 以濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠處理(即，共培養) 24 小時(FN 組)；(2) 以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射(UVC 組)，其中，針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 ，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ；以及(3) 先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理(共培養) 24 小時(UVC/FN 組)，其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組(Ctrl 組)。接著，以基於於胜肽之偵測套組(peptide-based detection, OncoImmunin kit)使經活化的凋亡蛋白酶 3、凋亡蛋白酶 8 或凋亡蛋白酶 9 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 3〔凋亡蛋白酶 3 (+)〕、凋亡蛋白酶 8〔凋亡蛋白酶 8 (+)〕或凋亡蛋白酶 9〔凋亡蛋白酶 9 (+)〕的細胞。

【0047】 另外，為了確認上述各組處理對於各組模式細胞株包含經活化的各種凋亡蛋白酶的細胞的佔比的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行各組處理之前，先加入活性氧物質抑制劑(NAC, 濃度為 10 mM)進行預處理 1 小時，接著再進行各組處理，後續如前述般以基於於胜肽之偵測套組使經活化的凋亡蛋白酶 3、凋亡蛋白酶 8 或凋亡蛋白酶 9 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。

【0048】請參照第 10 圖及第 11 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比進一步提升，顯示上述各組處理均可以顯著提升凋亡蛋白酶 3 的活性。

【0049】請繼續參照第 10 圖及第 11 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比顯著提升。

【0050】接著，請參照第 12 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，雖然上述各組處理亦會使 S-G 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比提升，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於各組處理的回復效果亦不顯著，顯示各組處理對於正常細胞的凋亡蛋白酶 3 的活性的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0051】請參照第 13 圖及第 14 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活

113年3月13日修正替換頁

化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比進一步提升，顯示上述各組處理均可以顯著提升凋亡蛋白酶 8 的活性。

【0052】請繼續參照第 13 圖及第 14 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比顯著提升。

【0053】接著，請參照第 15 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，雖然上述各組處理亦會使 S-G 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比提升，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於各組處理的回復效果亦不顯著，顯示各組處理對於正常細胞的凋亡蛋白酶 8 的活性的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0054】請參照第 16 圖及第 17 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比進一步提升，顯示上述個別處理均可以顯著提升凋亡蛋白酶 9 的活性。

【0055】請繼續參照第 16 圖及第 17 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌

細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑 (NAC) 回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比顯著提升。

【0056】 接著，請參照第 18 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，雖然上述各組處理亦會使 S-G 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比提升，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於各組處理的回復效果亦不顯著，顯示各組處理對於正常細胞的凋亡蛋白酶 9 的活性的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0057】 第 10 圖至第 18 圖的結果顯示，上述各組處理（即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組）係可以顯著提升凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 的活性，進而提升凋亡蛋白酶 3 的活性，顯示該褐藻醣膠及褐藻醣膠與紫外光 C 的組合不僅可以促進該外源性凋亡途徑的進行，亦可以促進內源性凋亡途徑的進行；雖然此一現象亦可以在正常細胞中觀察到，惟影響較不明顯。

【0058】 從前述試驗所得到的結果可得知，該褐藻醣膠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的程序。在前述試驗中，係利用活性氧物質抑制劑 (NAC) 的預處理來間接確認上述各組處理（即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組）對於各試驗的結果是否與細胞內的氧化壓力有關，為進一步直接確認各組處理對於細胞內的氧化壓力的影響，遂進行以下試驗。

【0059】 (E) 褐藻醣膠對氧化壓力的影響 (一)

【0060】 本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：(1) 以濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠處理（即，共培養）24 小時 (FN 組)；(2) 以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射 (UVC 組)，其中，針對 Ca9-22

細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 ，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ；以及 (3) 先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理 (共培養) 24 小時 (UVC/FN 組)，其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組 (Ctrl 組)。接著，以濃度為 100 nM 的 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H_2DCFDA) 作為探針，於 37°C 反應 30 分鐘，接著以流式細胞儀 (Guava easyCyte flow cytometer) 進行分析。由於 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯 (H_2DCFDA) 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, H_2DCF)，而在細胞內包含活性氧物質的情況下，不帶螢光的 2',7'-二氯二氫螢光素 (H_2DCF) 會再被活性氧物質氧化形成具有強螢光的 2',7'-二氯螢光素 (DCF, 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 2',7'-二氯螢光素 (DCF) 的細胞即為包含活性氧物質的細胞。

【0061】另外，為確認上述各組處理對於各組模式細胞株包含活性氧物質的細胞的佔比的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行各組處理之前，先加入活性氧物質抑制劑 (NAC, 濃度為 10 mM) 進行預處理 1 小時，接著再進行各組處理，後續如前述般以 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯 (H_2DCFDA) 作為探針，於 37°C 反應 30 分鐘，接著以流式細胞儀進行分析。

【0062】請參照第 19 圖及第 20 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞 (口腔癌細胞)，在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理

113年3月13日修正替換頁

(FN 組) 及紫外光 C 的處理 (UVC 組) 皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理 (UVC/FN 組) 則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比進一步提升。

【0063】請繼續參照第 19 圖及第 20 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞包含活性氧物質的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑 (NAC) 回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含活性氧物質的細胞的佔比顯著提升。

【0064】接著，請參照第 21 圖所示，針對 S-G 細胞 (正常細胞)，在標示 Non-NAC 的各組數據中，褐藻醣膠的處理 (即，FN 組) 不會使 S-G 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 的處理及紫外光 C 與褐藻醣膠的組合 (即，UVC 組及 UVC/FN 組) 則會使 S-G 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比些微提升。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於各組處理的回復效果亦不顯著，顯示各組處理對於正常細胞包含活性氧物質的細胞的佔比影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0065】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，因此以下試驗係確認上述各組處理 (即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組) 對於包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的影響。

【0066】(F) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對氧化壓力的影響 (二)

【0067】本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：(1) 以濃度為 300 µg/mL 的褐藻醣膠處理 (即，共培養) 24 小時 (FN 組)；(2) 以

113年3月13日修正替換頁

波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射（UVC 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 ，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ；以及（3）先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理（共培養）24 小時（UVC/FN 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組（Ctrl 組）。接著，以濃度為 50 nM 的粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）作為探針，於 37°C 反應 30 分鐘，接著以流式細胞儀（Guava easyCyte flow cytometer）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。

【0068】 另外，為確認上述各組處理對於各組模式細胞株包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行各組處理之前，先加入活性氧物質抑制劑（NAC，濃度為 10 mM）進行預處理 1 小時，接著再進行各組處理，後續如前述般以粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）作為探針，於 37°C 反應 30 分鐘，接著以流式細胞儀進行分析。

【0069】 請參照第 22 圖及第 23 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠

113年3月13日修正替換頁

的處理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比進一步提升。

【0070】請繼續參照第 22 圖及第 23 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比顯著提升。

【0071】接著，請參照第 24 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，紫外光 C 的處理（即，UVC 組）不會使 S-G 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比顯著提升，而褐藻醣膠的處理及紫外光 C 與褐藻醣膠的組合（即，FN 組及 UVC/FN 組）則會使 S-G 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比些微提升。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於各組處理的回復效果亦不顯著，顯示各組處理對於正常細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0072】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，則代表細胞內的氧化壓力較不易降低。因此，為確認上述各組處理（即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組）對於包含穀胱甘肽的細胞的佔比的影響，遂進行以下試驗。

【0073】（G）褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對氧化壓力的影響（三）

【0074】本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：（1）以濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠處理（即，共培養）24 小時（FN 組）；（2）以

113年3月13日修正替換頁

波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射（UVC 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 ，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ；以及（3）先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理（共培養）24 小時（UVC/FN 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + $300 \mu\text{g/mL}$ 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組（Ctrl 組）。接著，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（Guava easyCyte flow cytometer）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（thiolgroup， $-\text{SH}$ ）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為包含穀胱甘肽的細胞，並可以再進一步換算即可以得知不含有穀胱甘肽的細胞〔穀胱甘肽（-）〕的佔比。

【0075】另外，為確認上述各組處理對於各組模式細胞株不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行各組處理之前，先加入活性氧物質抑制劑（NAC，濃度為 10 mM）進行預處理 1 小時，接著再進行各組處理，後續如前述般以 5-氯甲基螢光素二乙酸酯進行染色，接著以流式細胞儀進行分析。

【0076】請參照第 25 圖及第 26 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處

理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比進一步提升。

【0077】請繼續參照第 25 圖及第 26 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比顯著提升。

【0078】接著，請參照第 27 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，雖然上述各組處理亦會使 S-G 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比提升，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於各組處理具有回復效果。此結果顯示各組處理對於正常細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0079】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，因此後續另確認上述各組處理（即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組）對 DNA 損傷造成的影響。

【0080】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。

113年3月13日修正替換頁

【0081】 (H) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對 DNA 損傷的影響 (一)

【0082】 本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：(1) 以濃度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠處理 (即, 共培養) 24 小時 (FN 組)；(2) 以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射 (UVC 組), 其中, 針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 , 而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ; 以及 (3) 先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後, 再以褐藻醣膠處理 (共培養) 24 小時 (UVC/FN 組), 其中, 針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠, 而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠。另外, 本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組 (Ctrl 組)。接著, 以濃度為 75% 乙醇水溶液固定細胞內的 DNA 之後, 以對磷酸化組蛋白 γH2AX 具有特異性的抗體作為一級抗體, 另再加入二級抗體及 7-氨基放線菌素 D (7AAD), 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 γH2AX 的細胞 [磷酸化組蛋白 γH2AX (+)] 的佔比。

【0083】 另外, 為確認上述各組處理對於各組模式細胞株包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關, 遂於各種模式細胞株進行各組處理之前, 先加入活性氧物質抑制劑 (NAC, 濃度為 10 mM) 進行預處理 1 小時, 接著再進行各組處理, 後續如前述般以濃度為 75% 乙醇水溶液固定細胞內的 DNA 之後, 以對磷酸化組蛋白 γH2AX 具有特異性的抗體作為一級抗體, 另再加入二級抗體及 7-氨基放線菌素 D (7AAD), 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 γH2AX 的細胞 [磷酸化組蛋白 γH2AX (+)] 的佔比。

【0084】 請參照第 28 圖及第 29 圖所示, 針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞 (口腔癌細胞), 在標示 Non-NAC 的各組數據中, 該褐藻醣膠的處理

113年3月13日修正替換頁

(FN 組) 及紫外光 C 的處理 (UVC 組) 皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL27 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理 (UVC/FN 組) 則可以使 Ca9-22 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比進一步提升，但對於 CAL 27 細胞的影響則較不顯著。

【0085】請繼續參照第 28 圖及第 29 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比皆顯著低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑 (NAC) 回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比顯著提升。

【0086】接著，請參照第 30 圖所示，針對 S-G 細胞 (正常細胞)，在標示 Non-NAC 的各組數據中，雖然上述各組處理亦會使 S-G 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比提升，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。另外，在標示 NAC 的各組數據中，活性氧物質抑制劑對於 FN 組及 UVC/FN 組具有回復效果，但對於 UVC 組則無回復效果。此結果顯示各組處理對於正常細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0087】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)，因此下列試驗另確認上述各組處理 (即，UVC 組、FN 組及 UVC/FN 組) 是否會對包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比造成影響。

【0088】(I) 褐藻醣膠、紫外光 C 及其組合對 DNA 損傷的影響 (二)

【0089】本試驗係分別使各模式細胞株分別進行以下處理：(1) 以濃

113年3月13日修正替換頁

度為 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠處理（即，共培養）24 小時（FN 組）；（2）以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射（UVC 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 10 J/m^2 ，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的紫外光 C 的輻射能量為 15 J/m^2 ；以及（3）先以波長為 254 nm 的滅菌紫外光 C 燈進行照射後，再以褐藻醣膠處理（共培養）24 小時（UVC/FN 組），其中，針對 Ca9-22 細胞的處理條件為 10 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠，而針對 CAL 27 細胞及 S-G 細胞的處理條件為 15 J/m^2 的紫外光 C + 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的褐藻醣膠。另外，本試驗係以未經任何處理的模式細胞株做為控制組（Ctrl 組）。接著，以濃度為 75%乙醇水溶液固定細胞內的 DNA 之後，加入對 8-羥基去氧鳥苷具有特異性的一級抗體進行染色，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〔8-羥基去氧鳥苷（+）〕的佔比。

【0090】另外，為確認上述各組處理對於各組模式細胞株包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的影響是否係與口腔癌細胞的氧化壓力有關，遂於各種模式細胞株進行各組處理之前，先加入活性氧物質抑制劑（NAC，濃度為 10 mM）進行預處理 1 小時，接著再進行各組處理，後續如前述般以濃度為 75%乙醇水溶液固定細胞內的 DNA 之後，加入對 8-羥基去氧鳥苷具有特異性的一級抗體進行染色，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〔8-羥基去氧鳥苷（+）〕的佔比。

【0091】請參照第 31 圖及第 32 圖所示，針對 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞（口腔癌細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，該褐藻醣膠的處理（FN 組）及紫外光 C 的處理（UVC 組）皆可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比顯著提升，而紫外光 C 搭配該褐藻醣膠的處理（UVC/FN 組）則可以使 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比進一步提升。

113年3月13日修正替換頁

【0092】請繼續參照第 31 圖及第 32 圖所示，在標示 NAC 的各組數據中，Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比大致上皆低於 Non-NAC 的組別的對應佔比，顯示由上述各組處理所造成口腔癌細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的提升效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實各組處理確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比顯著提升。

【0093】接著，請參照第 33 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在標示 Non-NAC 的各組數據中，上述各組處理對於 S-G 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比影響並不明顯，而此結果也能在標示 NAC 的各組數據中觀察到，顯示各組處理對於正常細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0094】綜上所述，本發明的褐藻醣膠的用途，係能夠藉由該褐藻醣膠作為活性成分，在將該褐藻醣膠投予一所需個體時，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，該褐藻醣膠對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該褐藻醣膠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。又，藉由將褐藻醣膠與具有特定波長範圍的紫外光 C 組合使用，可以強化抑制口腔癌細胞生長的功效。

【0095】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】

【0096】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種褐藻醣膠的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，褐藻醣膠係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長，且在將褐藻醣膠係投予該所需個體之前，以一紫外光照射該所需個體的患部，該紫外光的波長係介於 200 nm~280 nm 之間。

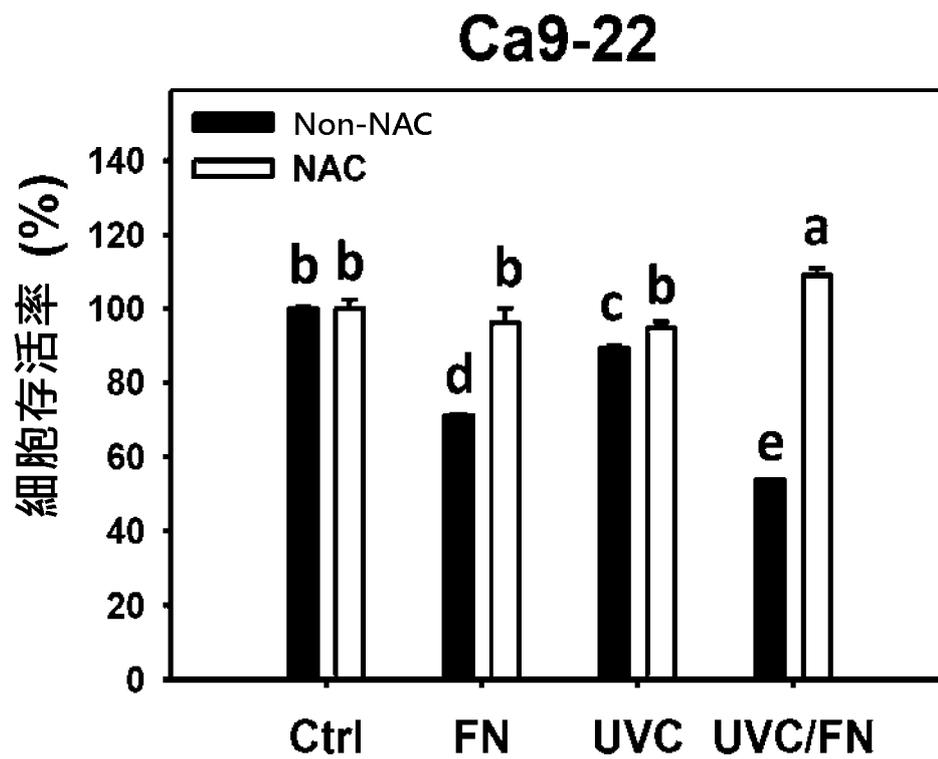
【請求項 2】 如請求項 1 之褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠係以口服方式投予一所需個體。

【請求項 3】 如請求項 2 之褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠係以每天每公斤體重施予 5~20 克的劑量施予該所需個體。

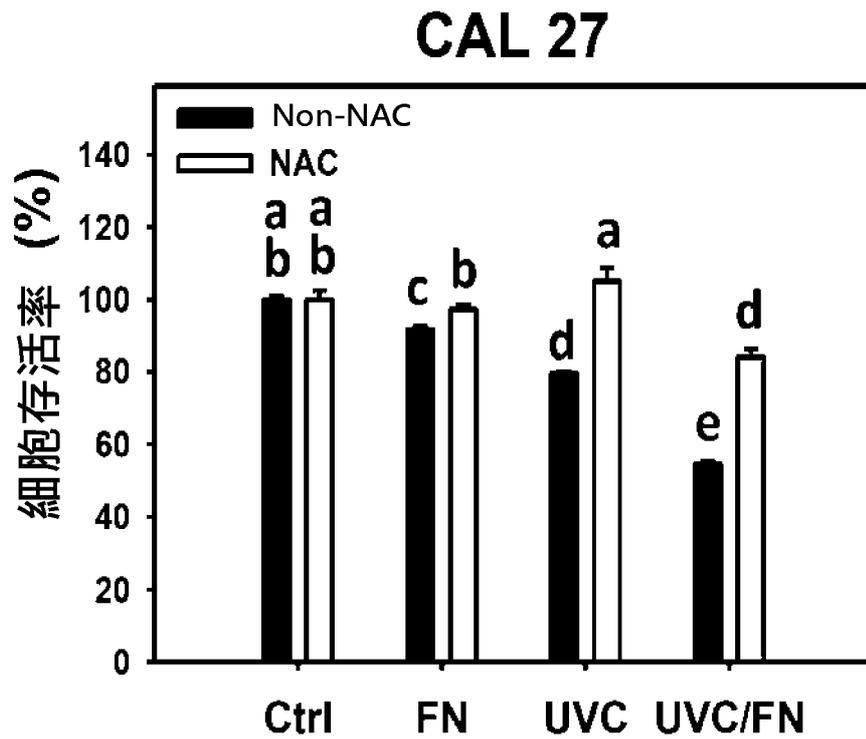
【請求項 4】 如請求項 1 之褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠係以靜脈注射的方式投予一所需個體。

【請求項 5】 如請求項 4 之褐藻醣膠的用途，其中，褐藻醣膠係以每天每公斤體重施予 5~20 克的劑量施予該所需個體。

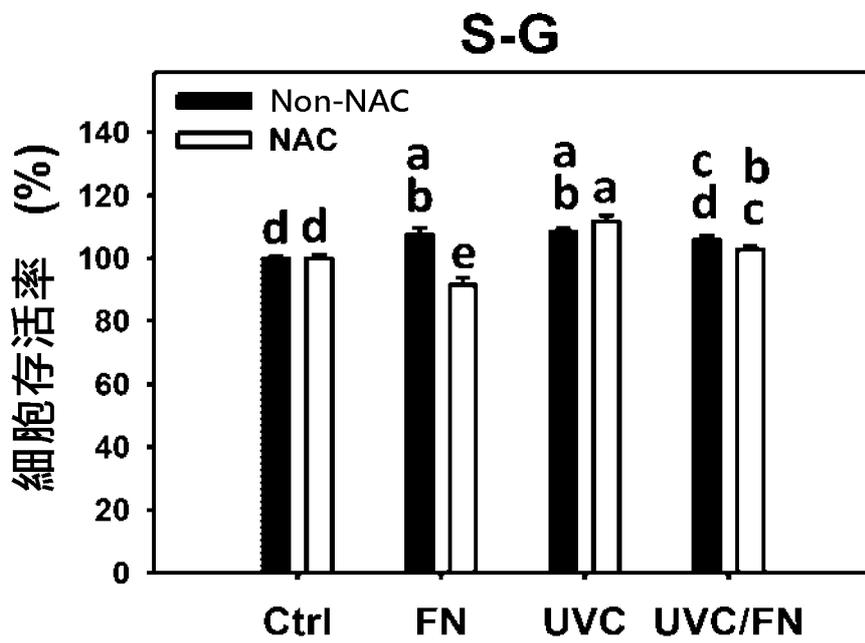
【請求項 6】 如請求項 1 之褐藻醣膠的用途，其中，該紫外光的輻射能量係介於 10 J/m²~15 J/m² 之間。



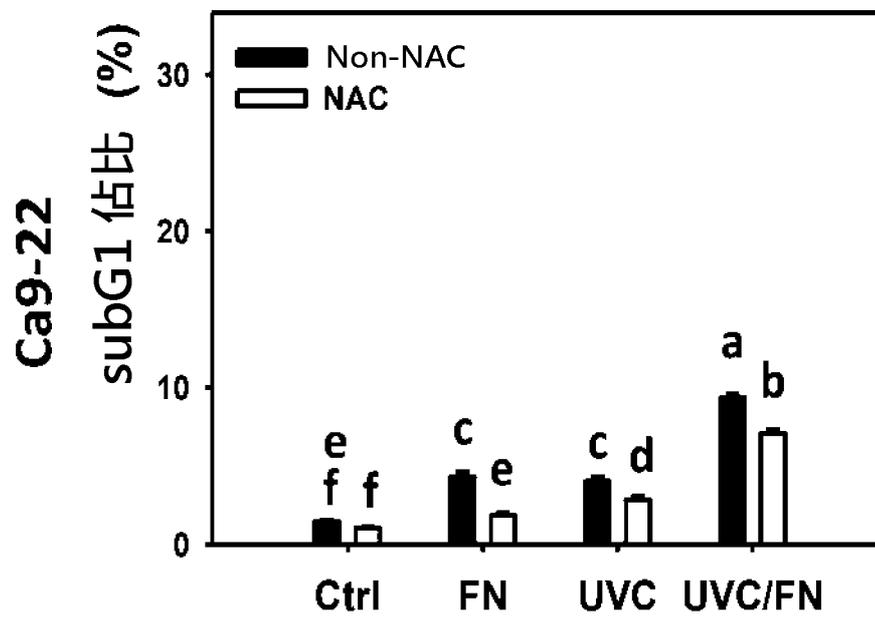
【第 1 圖】



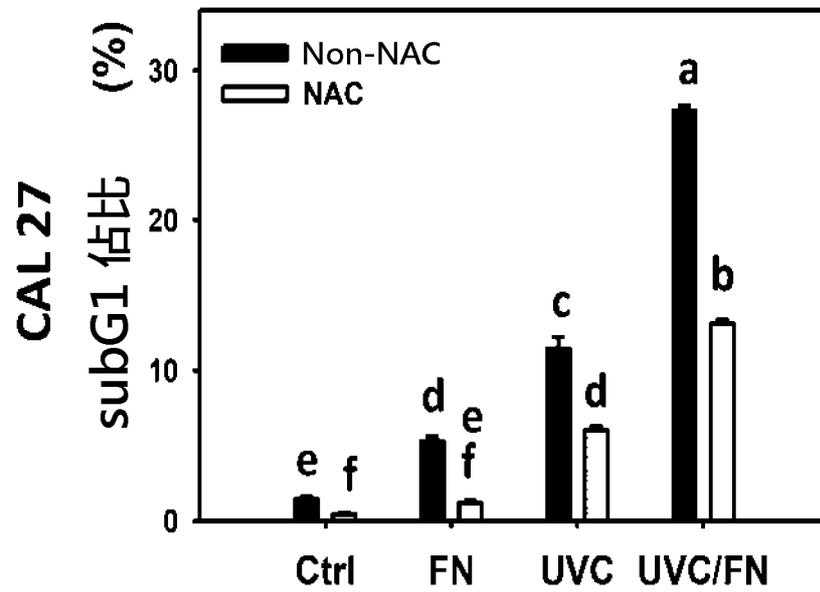
【第 2 圖】



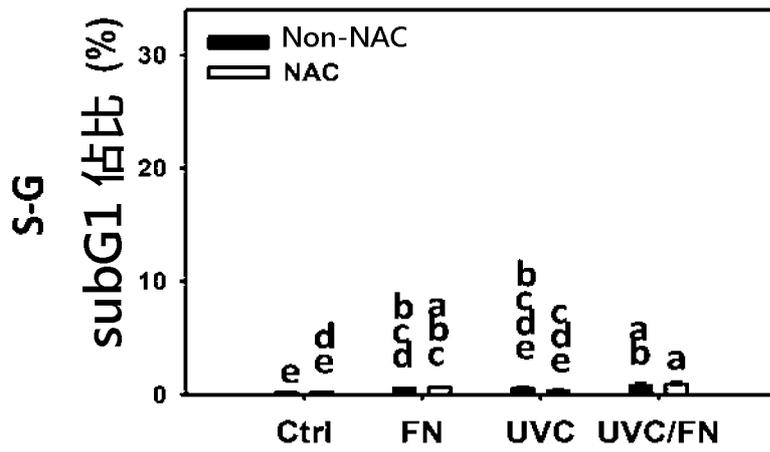
【第 3 圖】



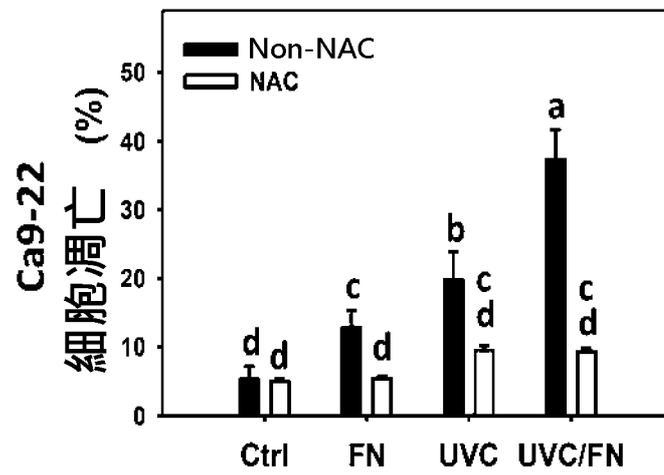
【第 4 圖】



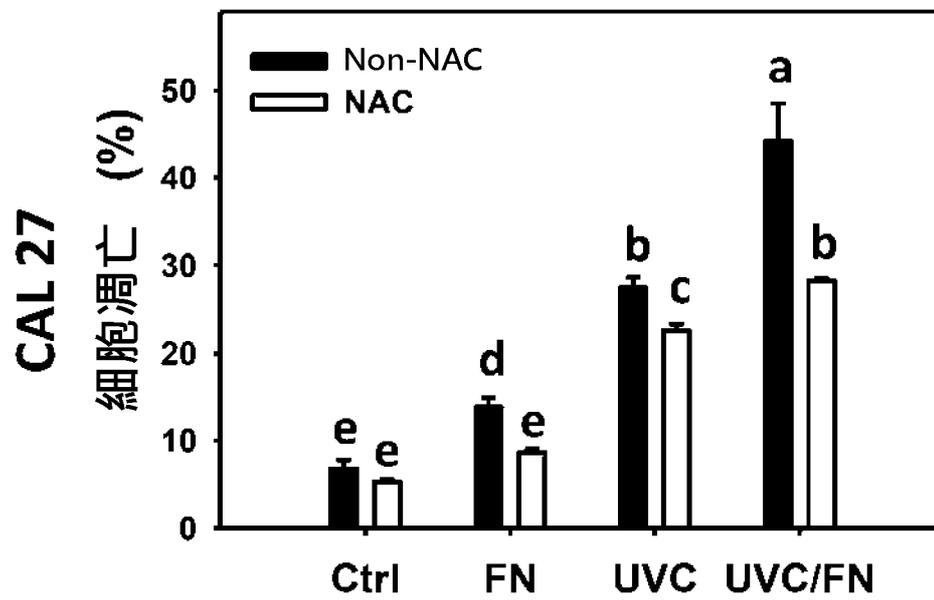
【第 5 圖】



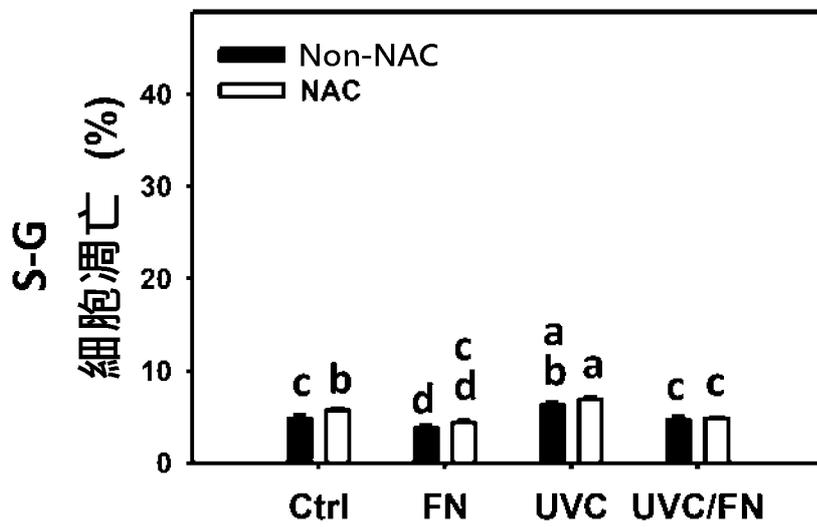
【第 6 圖】



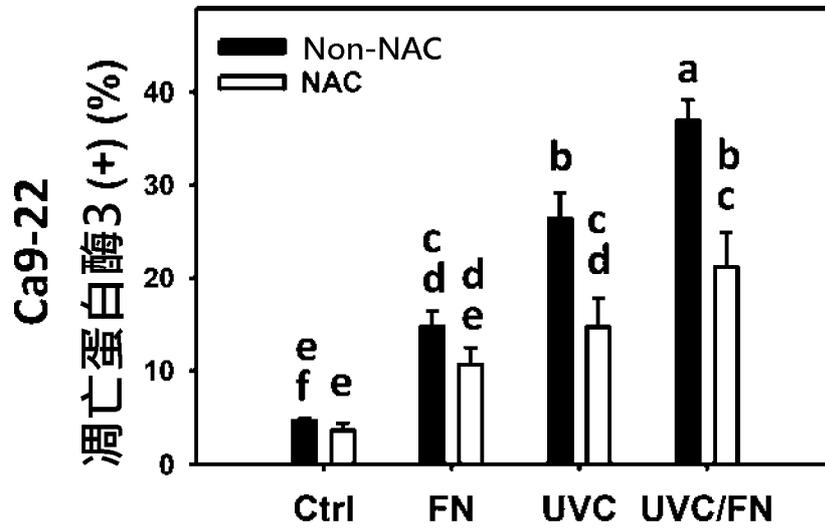
【第 7 圖】



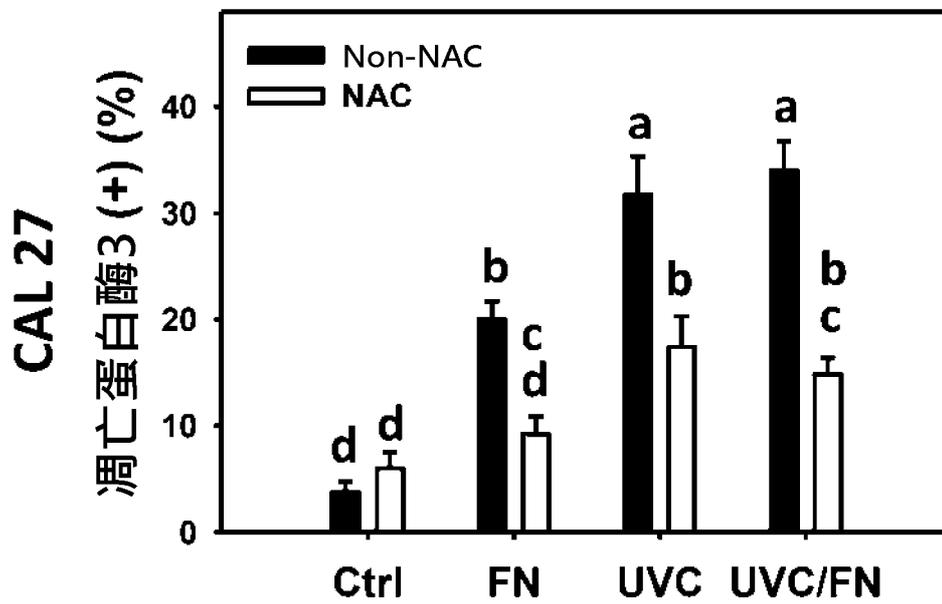
【第 8 圖】



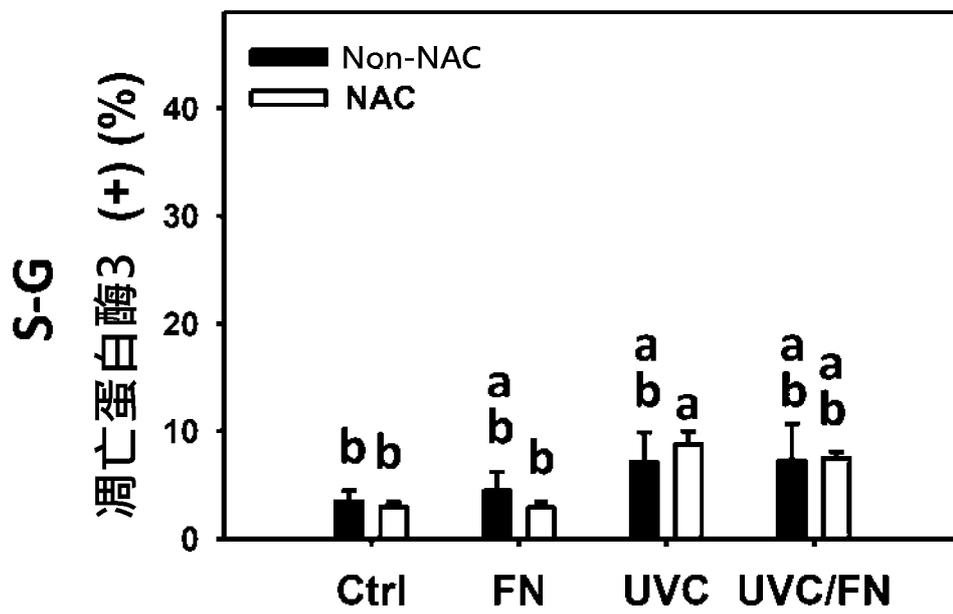
【第 9 圖】



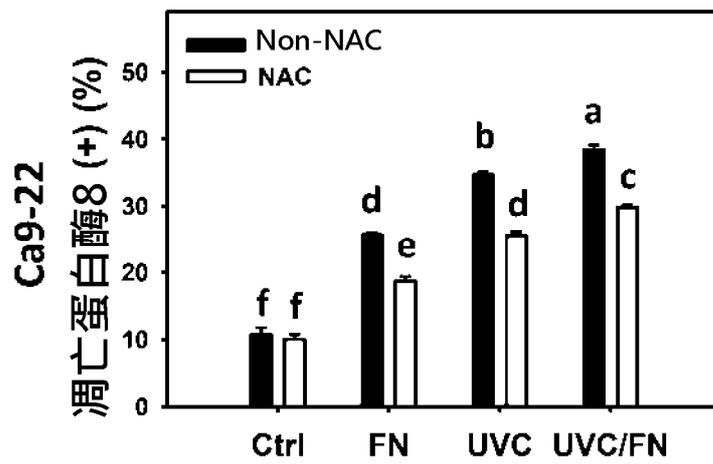
【第 10 圖】



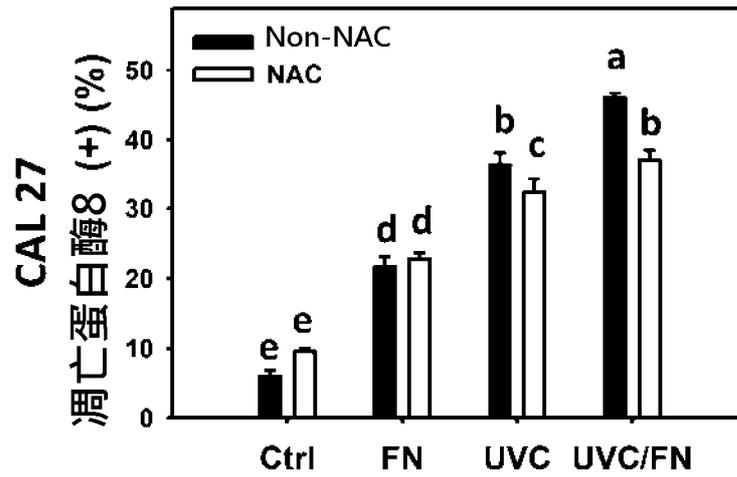
【第 11 圖】



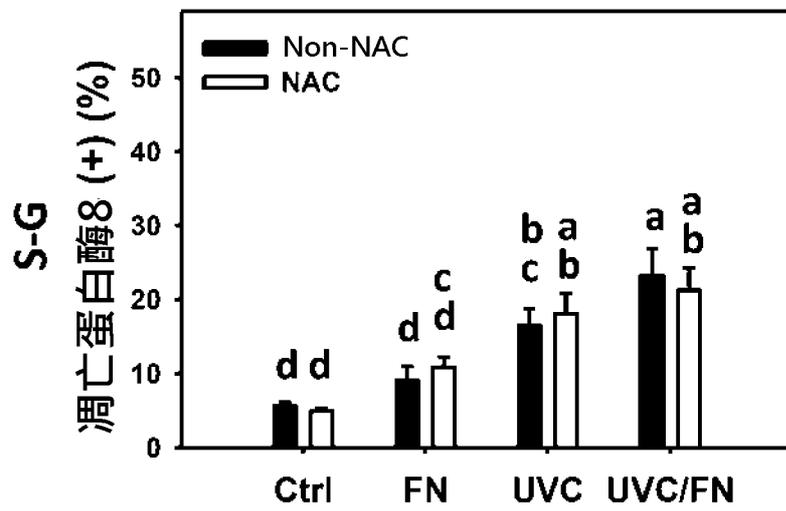
【第 12 圖】



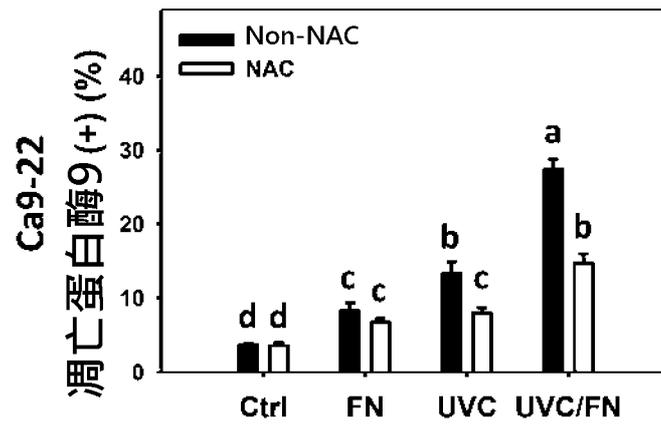
【第 13 圖】



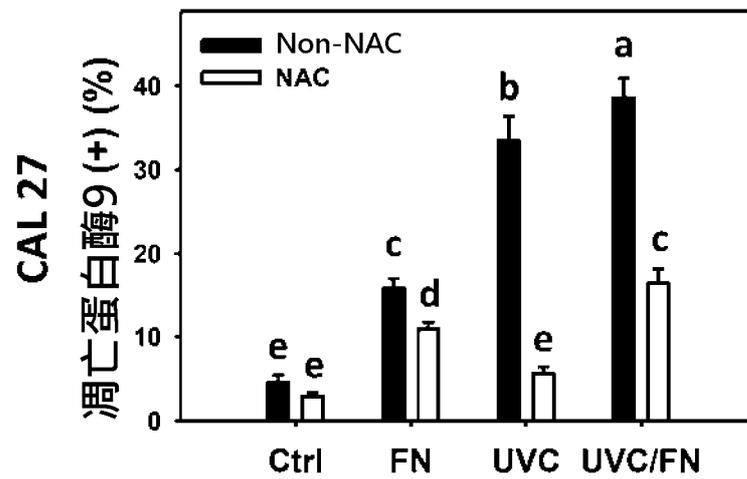
【第 14 圖】



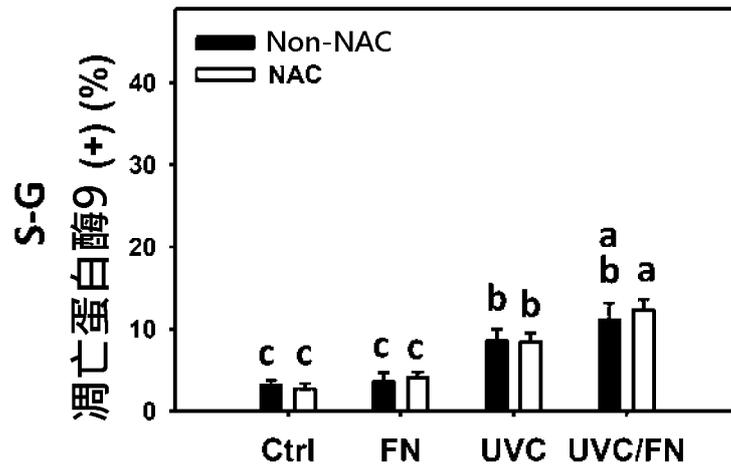
【第 15 圖】



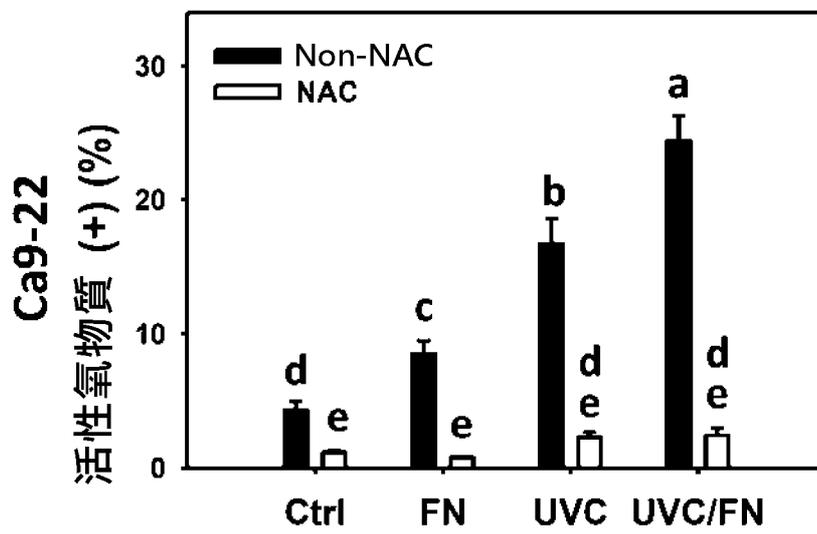
【第 16 圖】



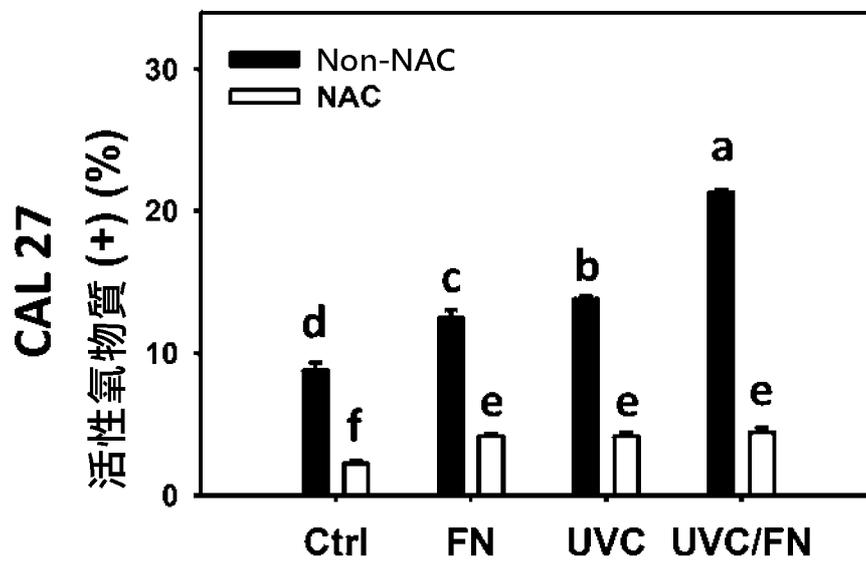
【第 17 圖】



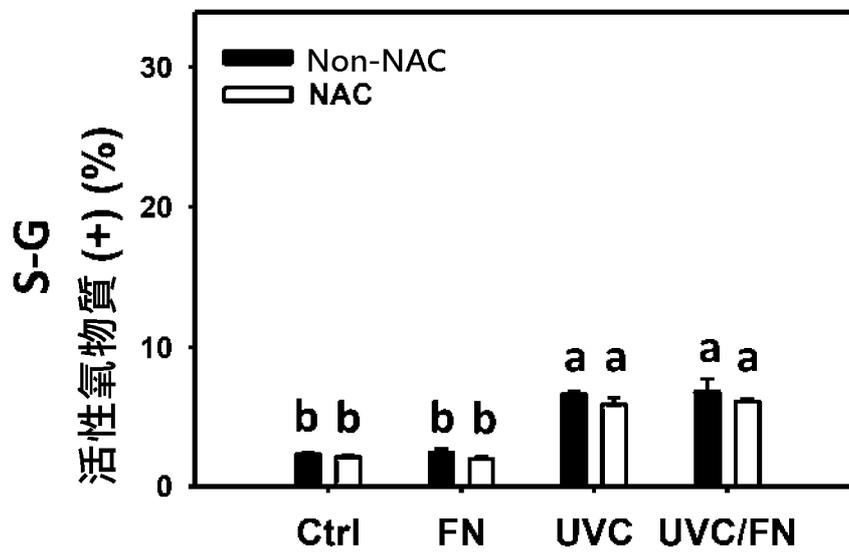
【第 18 圖】

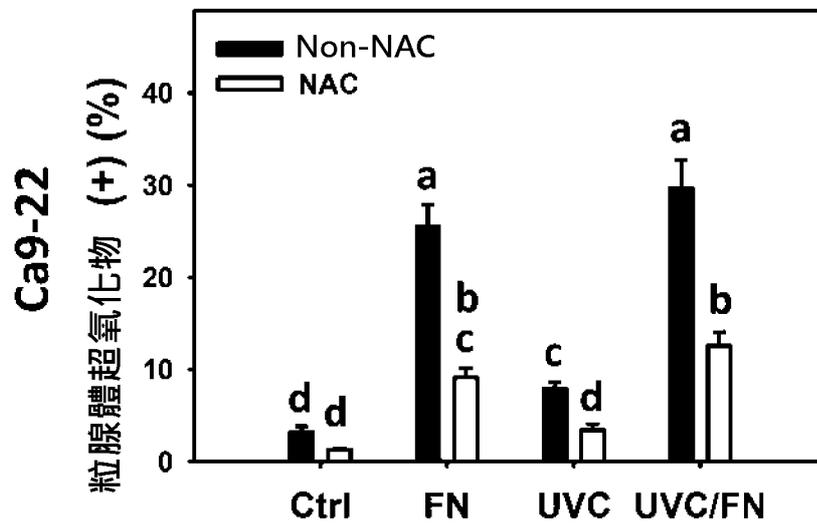


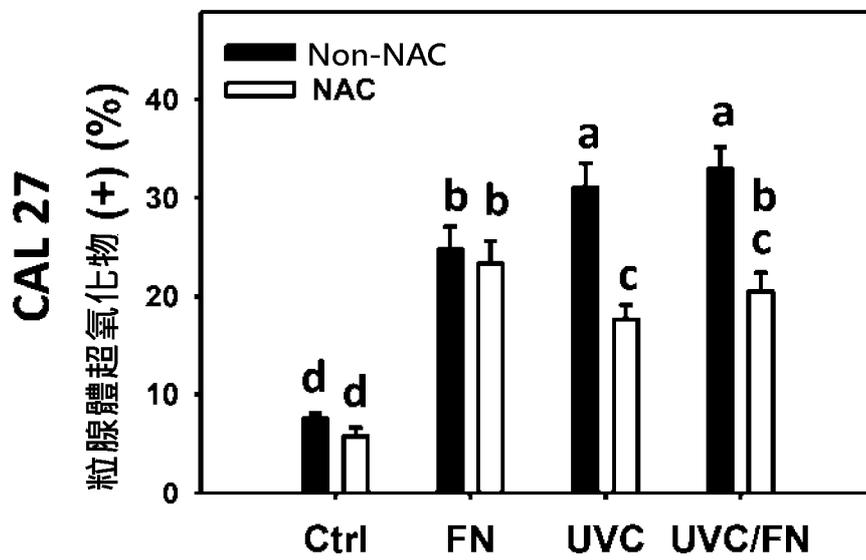
【第 19 圖】



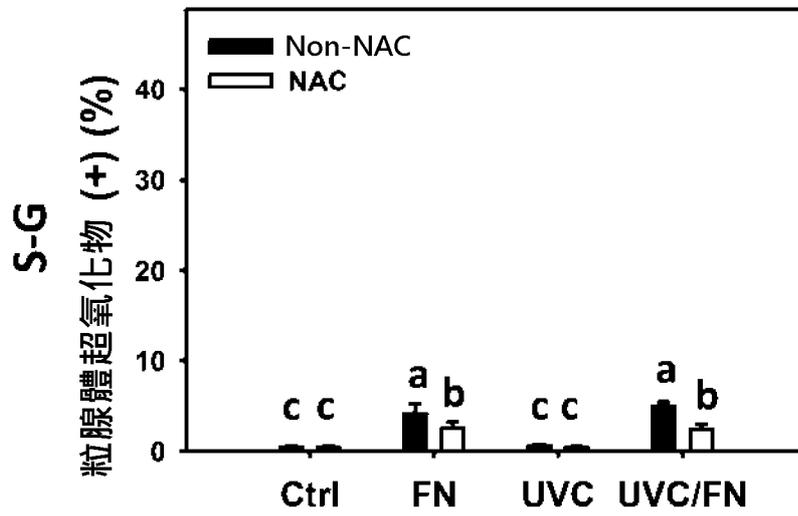
【第 20 圖】

**【第 21 圖】**

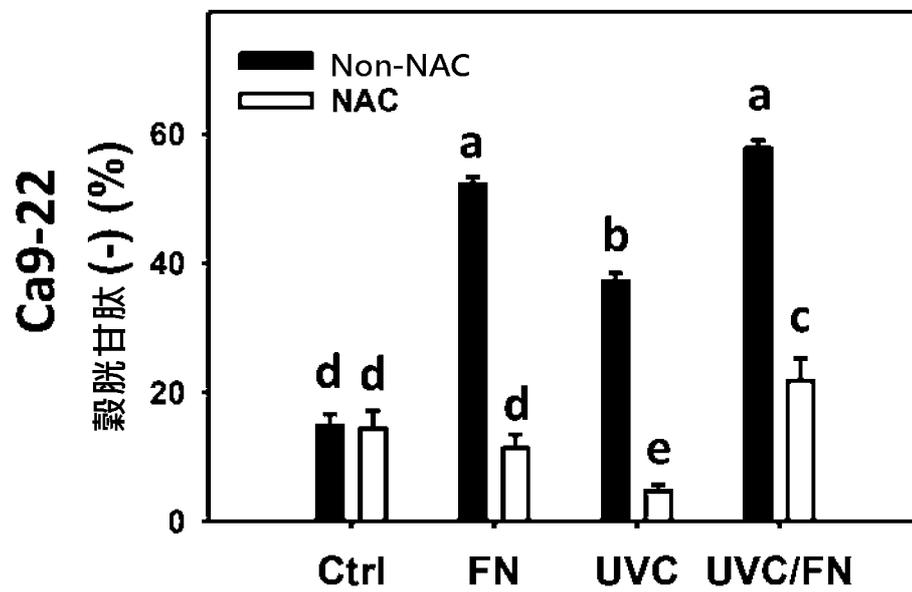
**【第 22 圖】**



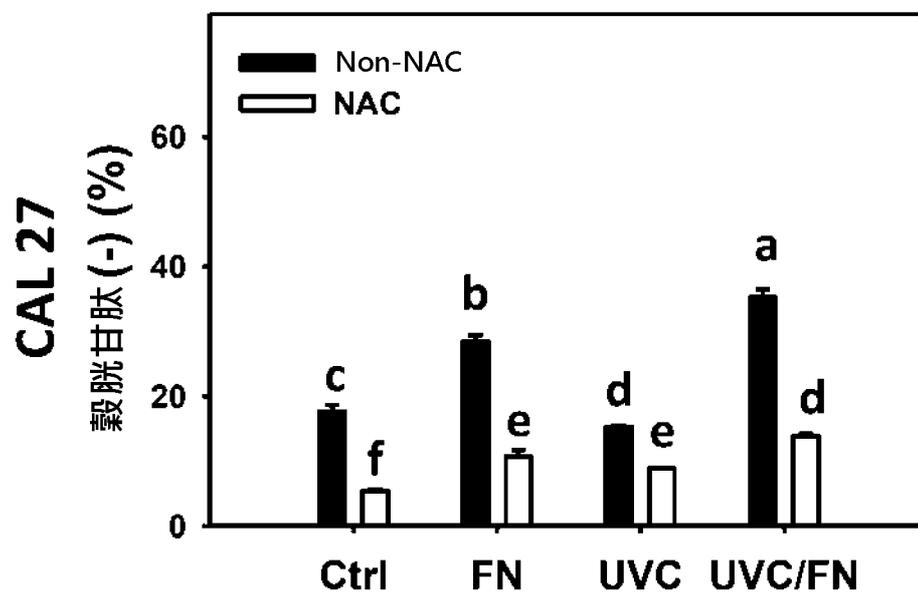
【第 23 圖】



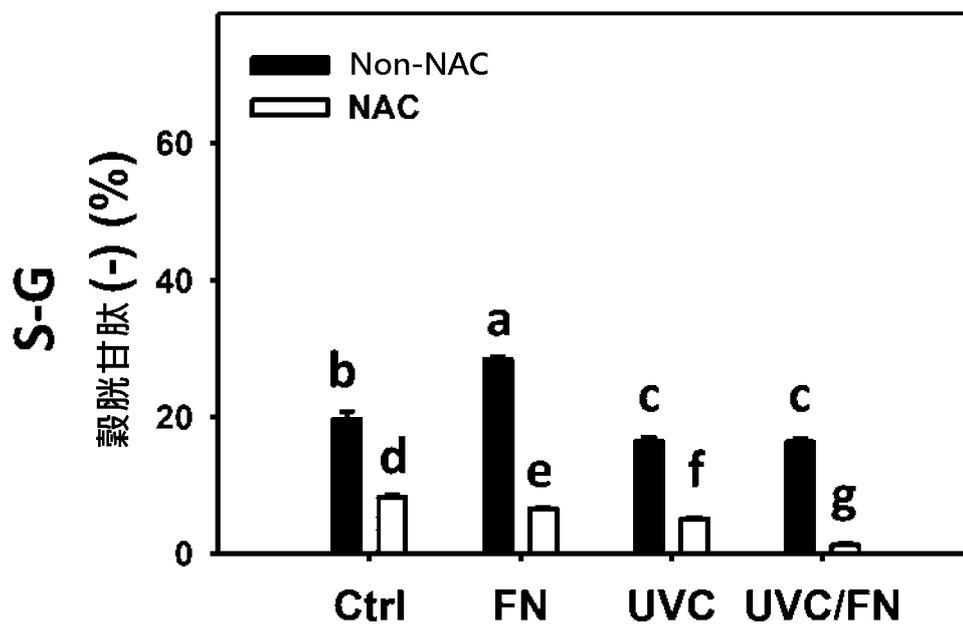
【第 24 圖】



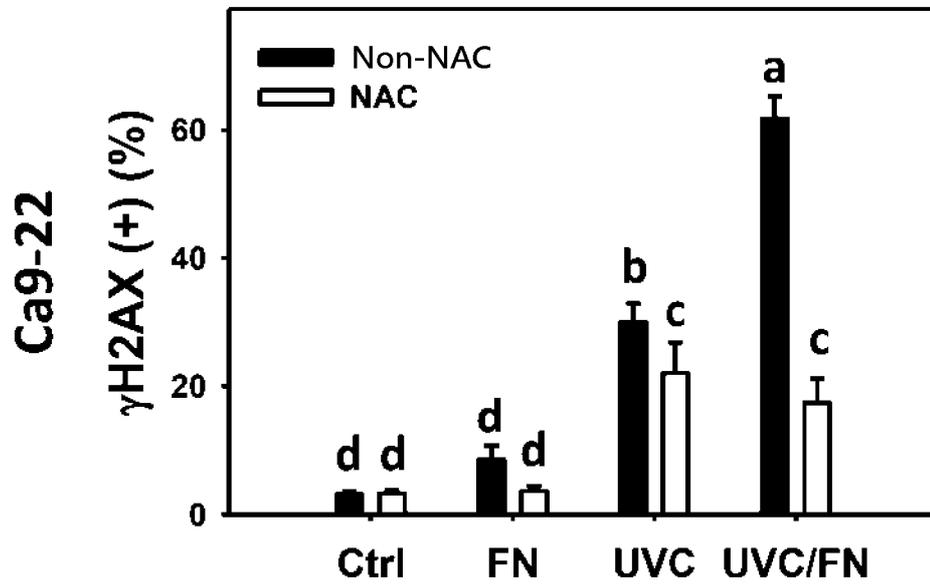
【第 25 圖】



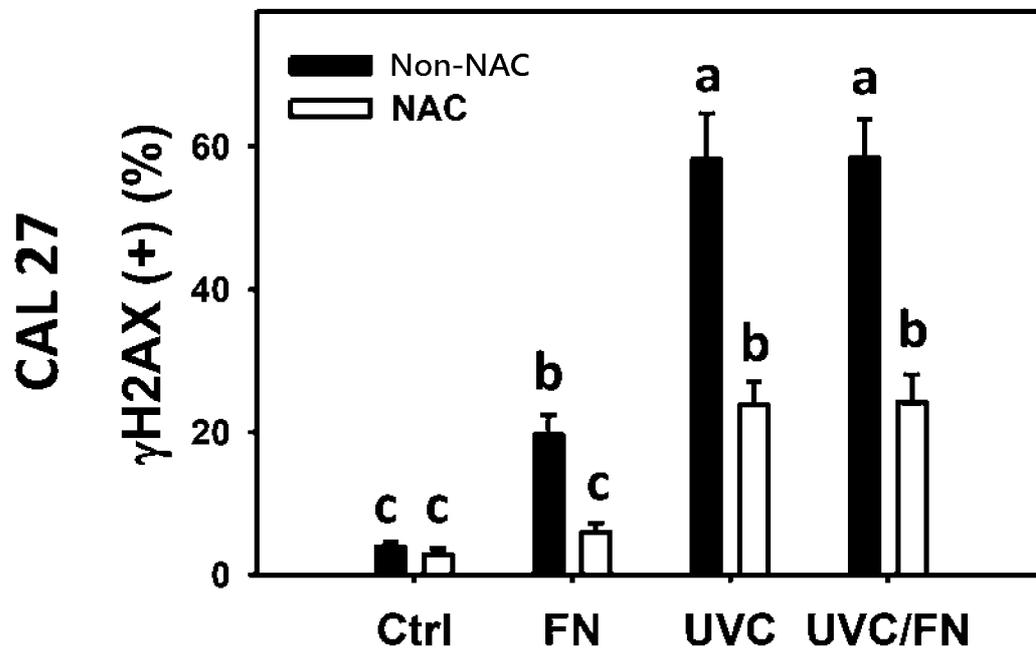
【第 26 圖】



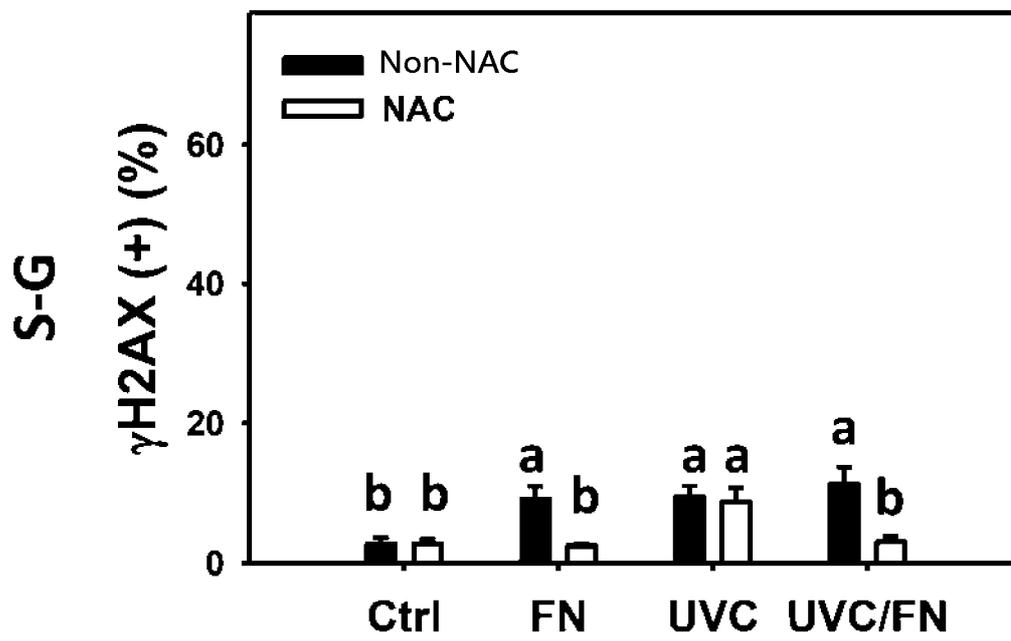
【第 27 圖】



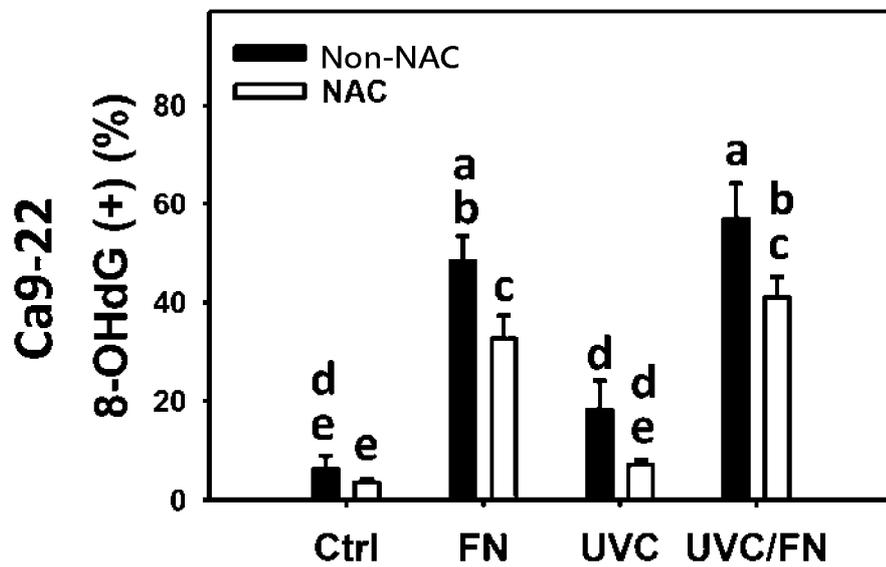
【第 28 圖】

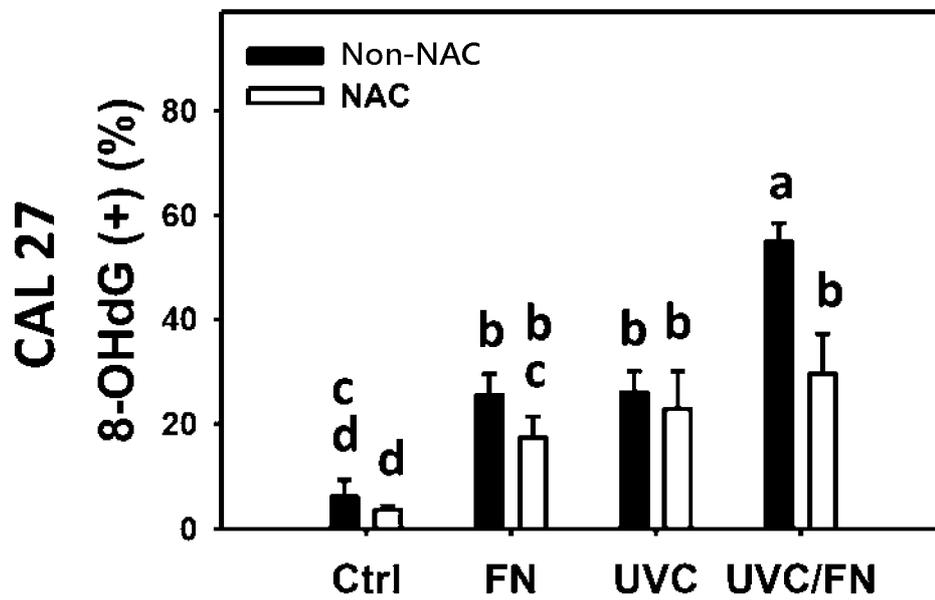


【第 29 圖】

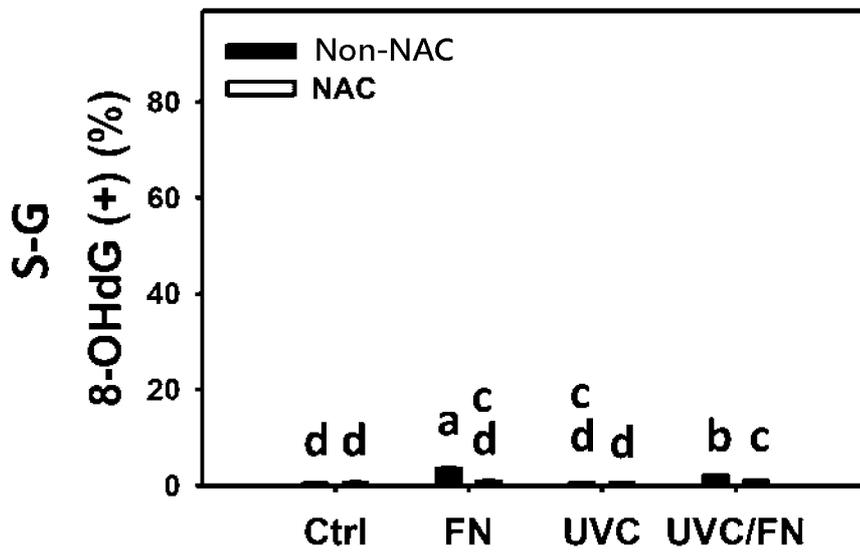


【第 30 圖】

**【第 31 圖】**



【第 32 圖】



【第 33 圖】