



(21)申請案號：112123908

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 27 日

(51)Int. Cl. : *A61K35/655 (2015.01)*

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)；鄭源斌 CHENG, YUAN-BIN (TW)；蕭君平 SHIAU, JUN-PING (TW)；莊雅婷 CHUANG, YA-TING (TW)；湯人仰 TANG, JEN-YANG (TW)；陳姝蓉 CHEN, SHU-RONG (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 Guo JK, et.al., 4-Methylenesterols from a sponge Theonella swinhoei, Mar Drugs., 10(7):1536-1544, 2012/07/19.

審查人員：陳琬瑜

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：44 共 85 頁

(54)名稱

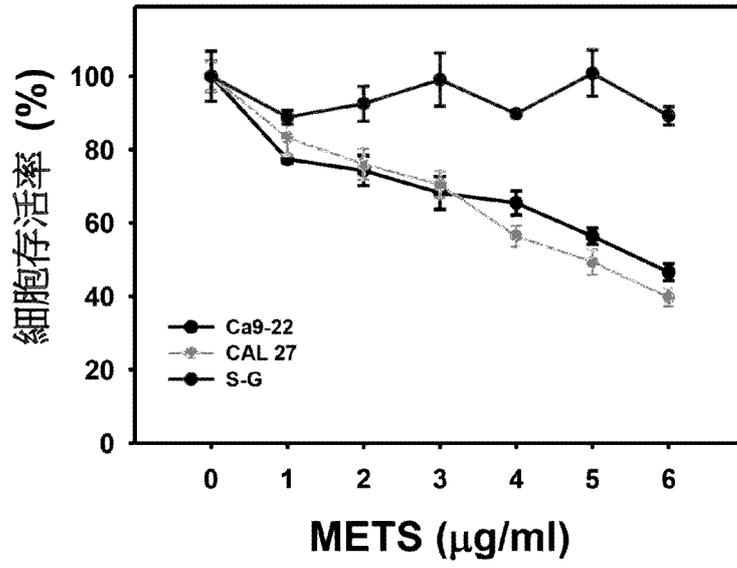
斯文豪蒂殼海綿萃取物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

(57)摘要

本發明係關於一種斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，該斯文豪蒂殼海綿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斯文豪蒂殼海綿樣品，以獲得該斯文豪蒂殼海綿樣品的一乙醇萃取物；以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物進行一第一分配萃取，以收集一乙酸乙酯萃取層；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，收集一甲醇水溶液萃取層以獲得該斯文豪蒂殼海綿萃取物。

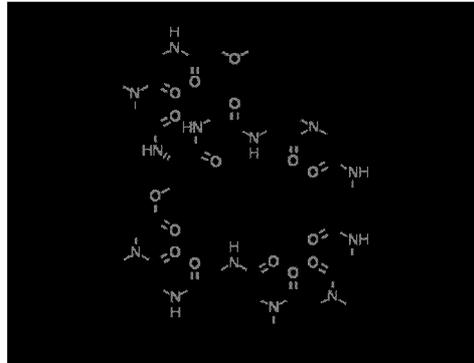
The present invention is related to a use of extract of Theonella swinhoei of manufacturing medicament for selective antiproliferation of oral cancer cell. The extract of Theonella swinhoei is manufactured by a method including the following steps: extracting a sample of Theonella swinhoei using an aqueous ethanol solution to obtain an extract of ethanol; partitioning the extract of ethanol using a first mixture including ethyl acetate and water, and collecting an ethyl acetate layer to obtain an extract of ethyl acetate; and partitioning the extract of ethyl acetate using a second mixture including an aqueous methanol solution and hexane, and collecting a methanol layer to obtain the extract of Theonella swinhoei.

指定代表圖：



【第 3 圖】

特徵化學式：





I841431

【發明摘要】

【中文發明名稱】 斯文豪蒂殼海綿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 *Theonella swinhoei* of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cell

【中文】

本發明係關於一種斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，該斯文豪蒂殼海綿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斯文豪蒂殼海綿樣品，以獲得該斯文豪蒂殼海綿樣品的一乙醇萃取物；以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物進行一第一分配萃取，以收集一乙酸乙酯萃取層；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，收集一甲醇水溶液萃取層以獲得該斯文豪蒂殼海綿萃取物。

【英文】

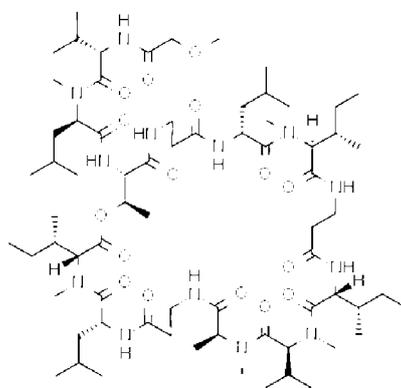
The present invention is related to a use of extract of *Theonella swinhoei* of manufacturing medicament for selective antiproliferation of oral cancer cell. The extract of *Theonella swinhoei* is manufactured by a method including the following steps: extracting a sample of *Theonella swinhoei* using an aqueous ethanol solution to obtain an extract of ethanol; partitioning the extract of ethanol using a first mixture including ethyl acetate and water, and collecting an ethyl acetate layer to obtain an extract of ethyl acetate; and partitioning the

extract of ethyl acetate using a second mixture including an aqueous methanol solution and hexane, and collecting a methanol layer to obtain the extract of *Theonella swinhoei*.

【指定代表圖】 第 3 圖

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】



Theonellapeptolide Id ($C_{70}H_{125}N_{13}O_{16}$)

【發明說明書】

【中文發明名稱】 斯文豪蒂殼海綿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 *Theonella swinhoei* of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cell

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種斯文豪蒂殼海綿萃取物(methanol extract of *Theonella swinhoei* , METS)，尤其是一種斯文豪蒂殼海綿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。

【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斯文豪蒂殼

海綿萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物者，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】 本發明的斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，該斯文豪蒂殼海綿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斯文豪蒂殼海綿樣品，以獲得該斯文豪蒂殼海綿樣品的一乙醇萃取物；以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物進行一第一分配萃取，以收集一乙酸乙酯萃取層；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，收集一甲醇水溶液萃取層以獲得該斯文豪蒂殼海綿萃取物。

【0008】 據此，本發明的斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，係能夠藉由斯文豪蒂殼海綿萃取物所含有的活性成分，在將斯文豪蒂殼海綿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，斯文豪蒂殼海綿萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而斯文豪蒂殼海綿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。

【0009】 本發明的斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，其中，斯文豪蒂殼海綿萃取物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斯文豪蒂殼海綿萃取物的活性成分，有助於提升使用者的服藥順從性。

【0010】 本發明的斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，其中，斯文豪蒂殼海綿萃取物係以靜脈注射投予一所需個體。如此，斯文豪蒂殼海綿萃取物係可以經由該所需個體的靜脈流向患部，避免斯文豪蒂殼海綿萃取物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】 本發明的斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，其中，斯文豪蒂殼海綿萃取物係以每天每公斤體重施予 2~10 毫克的劑量施予該所需個體。如此，藉由斯文豪蒂殼海綿萃取物的投予劑量，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〕 Theonellapeptolide Id ($C_{70}H_{125}N_{13}O_{16}$) 的化學結構式。

〔第 2 圖〕 試驗 (A) 中，第 A0、A1 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斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞、CAL 27 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經斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (NAC/METS 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 5 圖〕 試驗 (B) 中，經不同濃度之本發明之經斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細

胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（NAC/METS 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 6 圖〕 試驗（C）中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞的細胞週期變化柱狀圖，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，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細胞的細胞週期變化柱狀圖，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 8 圖〕 試驗（C）中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 S-G 細胞的細胞週期變化柱狀圖，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 9 圖〕 試驗（C）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下的細胞週期變化柱狀圖（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下的細胞週期變化柱狀圖（NAC/METS 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 10 圖〕 試驗（C）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下的細胞週期變化柱狀圖（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下的細胞週期變化柱狀圖（NAC/METS 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 11 圖〕 試驗（C）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下的細胞週期變化柱狀圖（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 S-G

細胞中，在不同時間點下的細胞週期變化柱狀圖（NAC/METS 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 12 圖〕 試驗（D）中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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數據之間具有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

〔第 13 圖〕 試驗（D）中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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數據之間具有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

〔第 14 圖〕 試驗（D）中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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數據之間具有顯著差異（ $P < 0.05$ ）。

〔第 15 圖〕 試驗（D）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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/METS 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 16 圖〕 試驗（D）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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/METS 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 17 圖〕 試驗（D）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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/METS 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 18 圖〕 試驗（E）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 19 圖〕 試驗（E）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 20 圖〕 試驗（E）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 21 圖〕 試驗（E）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 22 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 23 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 24 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 25 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 26 圖〕 試驗 (E) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 27 圖〕 試驗 (F) 中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性(倍)變化柱狀圖(METS 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斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CA9-22 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性(倍)變化柱狀圖 (NAC/METS 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 28 圖〕 試驗 (F) 中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性(倍)變化柱狀圖(METS 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斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 CAL 27 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性(倍)變化柱狀圖 (NAC/METS 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 29 圖〕 試驗 (F) 中，經不同濃度之本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物

處理的 S-G 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（METS 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斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 S-G 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（NAC/METS 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 30 圖〕 試驗（G）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 31 圖〕 試驗（G）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 32 圖〕 試驗（G）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 33 圖〕 試驗（H）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 34 圖〕 試驗（H）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 35 圖〕 試驗（H）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 36 圖〕 試驗（I）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 37 圖〕 試驗（I）中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 38 圖〕 試驗(I)中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 39 圖〕 試驗(J)中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 40 圖〕 試驗(J)中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（METS 組），以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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（NAC/METS 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 41 圖〕 試驗(J)中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 42 圖〕 試驗 (K) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 43 圖〕 試驗 (K) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 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 44 圖〕 試驗 (K) 中，經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (METS 組)，以及先以 N-乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之斯文豪蒂殼海綿萃取物處理的 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 (NAC/METS 組)，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異 ($P < 0.05$)。

【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。

【0014】 本發明所述之「斯文豪蒂殼海綿萃取物」係指蒂殼海綿屬 (*Theonella*) 的一類海洋海綿 (marine sponge)，目前多分佈在台灣東部海域等地。

【0015】 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。

【0016】 本發明之一實施例的斯文豪蒂殼海綿萃取物，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，該斯文豪蒂殼海綿萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該斯文豪蒂殼海綿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。該斯文豪蒂殼海綿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，該斯文豪蒂殼海綿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斯文豪蒂殼海綿萃取物的活性成分，有助於提升使用者的服藥順從性 (drug compliance)。此時，該斯文豪蒂殼海綿萃取物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，該斯文豪蒂殼海綿萃取物係能夠以每天每公斤體重施予 2~10 毫克的劑量施予該所需個體。

【0018】 又，該斯文豪蒂殼海綿萃取物亦可以利用靜脈注射的方式投予

該所需個體，例如將該斯文豪蒂殼海綿萃取物注射到所需個體的手背或前臂的靜脈中，以避免該斯文豪蒂殼海綿萃取物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，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的活性成分係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，該斯文豪蒂殼海綿萃取物係能夠以每天每公斤體重施予 2~10 毫克的劑量施予該所需個體。

【0019】 該斯文豪蒂殼海綿萃取物係可以指萃取自一斯文豪蒂殼海綿樣品所得的任意萃取物，於本實施例中，該斯文豪蒂殼海綿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】 在該乙醇萃取步驟中，工者係可以利用一乙醇水溶液萃取該斯文豪蒂殼海綿樣品，再去除該乙醇水溶液，即可以獲得該斯文豪蒂殼海綿樣品的一乙醇萃取物。又，在另一實施例中，該乙醇萃取步驟亦可以重複執行數次（例如，三次）。在本實施例中，工者係選用濃度為 95% 的乙醇水溶液，將 9 公斤的斯文豪蒂殼海綿樣品，以及該斯文豪蒂殼海綿樣品 2 倍體積的乙醇水溶液混合，於 25°C 下萃取 72 小時，再藉由蒸發或減壓濃縮等手段去除該乙醇水溶液。將前述萃取步驟重複進行三次後，即可以獲得約 469 公克的該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物。

【0021】 在該第一分配萃取步驟中，工者可以將該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物加入包含乙酸乙酯與水的一第一混合液中，以對該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物進行第一分配萃取。在將該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物與該第一混合液均勻混合且經靜置後，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，其中該斯文豪蒂殼海綿樣品的活性成分係可以溶解在該乙酸乙酯萃取層中。在本實施例中，工者係將約 469 公克的

該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物加入該第一混合液（包含 6 公升的乙酸乙酯與 5 公升的水，其中乙酸乙酯與水的體積比率為 1.2 : 1）中，於 25°C 下萃取 12 小時後，收集該乙酸乙酯萃取層。在一實施例中，可以再藉由蒸發或減壓濃縮等手段去除該乙酸乙酯萃取層中的溶劑（即，乙酸乙酯），以獲得約 187.3 公克的該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙酸乙酯萃取物。

【0022】 接著，在該第二分配萃取步驟中，工者可以將該乙酸乙酯萃取層加入包含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且經靜置後，會形成位於上層的一己烷萃取層及位於下層的一甲醇水溶液萃取層，其中該斯文豪蒂殼海綿樣品的活性成分可以溶解在該甲醇水溶液萃取層中。在另一實施例中，可以將該乙酸乙酯萃取層中的溶劑去除後的該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙酸乙酯萃取物，與該第二混合液混合以進行上述第二分配萃取。在本實施例中，工者係將約 187 公克的該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙酸乙酯萃取物加入該第二混合液（包含體積比為 1 : 3 : 4 的水、甲醇及己烷）中，於 25°C 下萃取 12 小時，收集該甲醇水溶液萃取層，該甲醇水溶液萃取層包含該斯文豪蒂殼海綿樣品的活性成分。另可以再藉由蒸發或減壓濃縮等手段去除該甲醇水溶液萃取層中的溶劑（即，甲醇與水），以獲得約 43.9 公克的該斯文豪蒂殼海綿萃取物。

【0023】 為確認依據前述製備方法所得到的斯文豪蒂殼海綿萃取物中的主要成分及其含量佔比（%），遂進行以下試驗：

【0024】 （A）斯文豪蒂殼海綿萃取物的成分分析

【0025】 本試驗係將該斯文豪蒂殼海綿萃取物快速柱色譜（flash column chromatography）方式進行沖提（用己烷、乙酸乙酯與甲醇為沖提液，當乙酸乙酯與甲醇體積比為 8:1 時），即可以分離出一化合物。經比對得知，

該化合物為 Theonellapeptolide Id ($C_{70}H_{125}N_{13}O_{16}$)，其具有如第 1 圖所示的化學結構式。

【0026】 將該斯文豪蒂殼海綿萃取物及 Theonellapeptolide Id 分別作為第 A0、A1 組的待測樣品，以液相層析儀 (HPLC) 進行分析，其分析條件如下：層析管柱為 Phenomenex Luna C18 (2) (顆粒大小為 $5\ \mu\text{m}$ ，孔隙大小為 $100\ \text{\AA}$ ，尺寸為 $250\times 4.6\ \text{mm}$)、檢測波長為 $254\ \text{nm}$ 、分析時間共 30 分鐘、流速為 0.1 毫升/分鐘、移動相為溶液 A (體積百分濃度為 0.1% 的三氟乙酸水溶液) 及溶液 B (甲醇)，進行梯度沖提 (gradient elution)，其中移動相的比例在第 0 分鐘時為 85% 溶液 B (其餘為溶液 A，以下不重複贅述)，第 0 至 10 分鐘之間為 85% 至 95% 溶液 B，第 10 至 20 分鐘之間為 95% 溶液 B，而第 20 至 30 分鐘之間為 95% 至 100% 溶液 B，其分析結果如第 2 圖所示，Theonellapeptolide Id 的滯留時間約為 14.205 分鐘 (第 A1 組)。

【0027】 另將第 A0 組的待測樣品於第 14.205 分鐘的滯留時間下的波峰面積，帶入校準曲線 (calibration curve) $y = 10^7x - 79228$ ($R^2 = 0.9995$) 中，最終可以換算得知該第 A0 組的待測樣品，約有 21.0% 為 Theonellapeptolide Id。

【0028】 為證實本發明之該斯文豪蒂殼海綿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，該斯文豪蒂殼海綿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) 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：

【0029】 (B) 斯文豪蒂殼海綿萃取物對於相對細胞存活率的影響

【0030】 本試驗係分別使上述各模式細胞株分別包含不同濃度 (0、1、2、3、4、5 及 $6\ \mu\text{g/mL}$) 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 (共培養) 24 小時

之後，加入 MTS 試劑且反應 1 小時後，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，因此以未經該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理（即，濃度為 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的組別）的細胞的吸光值作為基準（100%），計算經該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理之後的各種模式細胞株在波長為 490 nm 下的吸光值，加以換算即可得知各種模式細胞株的相對細胞存活率。

【0031】請參照第 3 圖所示，在以各種濃度（0、1、2、3、4、5 及 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時之後，各種口腔癌細胞株（Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞）的相對細胞存活率均明顯降低，且降低的幅度大致隨著斯文豪蒂殼海綿萃取物的濃度增加而提高；而正常細胞（S-G 細胞）的相對細胞存活率雖然有些許波動，但大致介於 90%~100%之間，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理會導致各種口腔癌細胞株的細胞存活率顯著下降，對正常細胞的影響則較不顯著。

【0032】接著，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物是否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，遂於以不同濃度（0、1、2、3、4、5 及 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理各組模式細胞株之前，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）進行預處理 1 小時，接著再進行該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理（24 小時），後續如前述般加入 MTS 試劑且反應 1 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斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之後的相對細胞存活率。

【0033】請參照第 4 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理（METS 組）會導致 CA9-22 細胞的相對細胞存活率下降，但是在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該斯文豪蒂殼海綿萃

取物的處理（NAC/METS 組）則不再影響 CA9-22 細胞的相對細胞存活率，顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理所造成 CA9-22 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。另，請參照第 5 圖所示，於另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中，由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理所造成 CAL 27 細胞的相對細胞存活率的下降效果亦被活性氧物質抑制劑（NAC）回復。前述結果證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物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。

【0034】 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，為了確認斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理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。

【0035】 （C）斯文豪蒂殼海綿萃取物對於細胞週期變化的影響

【0036】 本試驗係取經不同濃度（0、2 及 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時之後的模式細胞株，以 75%的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 之後，再以濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 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 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。

【0037】 請參照第 6 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理濃度的提升，CA9-22 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 7 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理會使口腔

癌細胞的細胞週期進入 subG1 期，妨礙口腔細胞的生長而使細胞存活率的下降，與試驗（B）中所得到的試驗結果相符。

【0038】 接著，請參照第 8 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），雖然 S-G 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比也會隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理濃度的提升而些微增加，惟增加的幅度與口腔癌細胞相比並不明顯，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0039】 接著，為了確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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，接著再以 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物分別處理 0、12 及 24 小時，後續如前述般以 75% 的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 之後，再以濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 7-氨基放線菌素 D（7AAD）進行染色 30 分鐘，接著以流式細胞儀進行分析。

【0040】 請參照第 9 圖及第 10 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）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未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比，顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0041】 請再參照第 11 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，S-G 細胞處於 subG1 期的細胞的佔

比也低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比，惟 S-G 細胞處於 subG1 期的細胞的佔比的增加幅度與口腔癌細胞相比原本即不明顯，故活性氧物質抑制劑（NAC）的回復效果亦有限。

【0042】 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，為確認斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理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。

【0043】 （D）斯文豪蒂殼海綿萃取物對於細胞凋亡的影響（一）

【0044】 本試驗係取經不同濃度（0、2 及 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時之後的模式細胞株，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 1 小時，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（+）〕。

【0045】 請參照第 12 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理濃度的提升，CA9-22 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 13 圖所示的另一口腔癌細胞株—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，雖然 S-G 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比也會隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理濃度的提升而些微增加，惟增加的幅度與口腔癌細胞相比並不明顯。第 12 圖

至第 14 圖的結果顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於正常細胞進入細胞凋亡的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0047】 接著，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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，接著再以 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 0、12 及 24 小時，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。

【0048】 請繼續參照第 15 圖及第 16 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）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未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比，顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理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。

【0049】 接著，請參照第 17 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據與未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的組別的各組數據之間的差異並不大，顯示活性氧物質抑制劑（NAC）對於 S-G 細胞進入細胞凋亡的細胞佔比的回復效果相較於口腔癌細胞而言較不明顯。

【0050】 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，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理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。

【0051】 (E) 斯文豪蒂殼海綿萃取物對於細胞凋亡的影響（二）

【0052】 本試驗係以 6 µg/mL 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物對各種模式細胞株分別進行處理 0、12 及 24 小時後，以基於於胜肽之偵測套組（peptide-based detection，OncoImmunit 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。

【0053】 另外，為了確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處

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，接著再以 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物分別處理 0、12 及 24 小時，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。

【0054】 請參照第 18 圖所示，針對 CA9-22 細胞（口腔癌細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 19 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 3 的活性。

【0055】 請繼續參照第 18 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CA9-22 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時後，已顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比；另，請參照第 19 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 12 或 24 小時後，均顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0056】 接著，請參照第 20 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，雖然該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理亦會使 S-G 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比些微提升，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，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）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並無規律關係，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0057】 請參照第 21 圖所示，針對 CA9-22 細胞（口腔癌細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 22 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 8 的活性。

【0058】 請繼續參照第 21 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CA9-22 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時後，已顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比；另，請參照第 22 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 12 或 24 小時後，均低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0059】 接著，請參照第 23 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）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，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）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。

【0060】 請參照第 24 圖所示，針對 CA9-22 細胞（口腔癌細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 25 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 9 的活性。

【0061】 請繼續參照第 24 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CA9-22 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 12 或 24 小時後，均顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比；另，請參照第 25 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CAL 27 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時後，已低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比。

前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0062】 接著，請參照第 26 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理 (METS 組) 的各組數據中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於 S-G 細胞包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比的影響無規律關係；且在利用活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行處理 (NAC/METS 組) 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同樣無規律關係，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0063】 第 18 圖至第 26 圖的結果顯示，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理確實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，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物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。

【0064】 除了測量包含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 或凋亡蛋白酶 3 的細胞佔比變化之外，凋亡蛋白酶 3/7 的活性也是用來判斷細胞進入凋亡程序的常用指標之一。因此，進行以下試驗，以確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理是否會對凋亡蛋白酶 3/7 的活性造成影響。

【0065】 (F) 該斯文豪蒂殼海綿萃取物對於細胞凋亡的影響 (三)

【0066】 本試驗係以活性氧物質抑制劑 (NAC, 10 mM) 進行預處理 1 小時之後，取經不同濃度 (0、2 及 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處

理 24 小時之後的模式細胞株 (NAC/METS 組)，以及未經活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行預處理，即直接以該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時之後的模式細胞株 (METS 組)，以 Caspase-Glo[®] 3/7 試劑使經活化的凋亡蛋白酶 3/7 專一性地切割對應的受質，進而產生螢光，並以光度計進行分析，在計算出產生螢光的細胞及未產生螢光的細胞後，加以換算之後即可以得到細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性 (倍)；其中，以濃度為 0 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時之後的模式細胞株所測得的凋亡蛋白酶 3/7 活性係被訂定為 1 (倍)。

【0067】請參照第 27 圖所示，於 CA9-22 細胞 (口腔癌細胞) 中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的濃度提升，CA9-22 細胞的凋亡蛋白酶 3/7 活性顯著提升；然而，在以活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行預處理之後，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於凋亡蛋白酶 3/7 活性的影響則被抵銷，且於斯文豪蒂殼海綿萃取物的濃度為 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的組別最為顯著，說明活性氧物質抑制劑會回復該斯文豪蒂殼海綿萃取物對於凋亡蛋白酶 3/7 活性的影響；前述的試驗結果亦可以於第 28 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。前述結果顯示斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理在凋亡蛋白酶 3/7 活性的層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響係與細胞內的氧化壓力有關。

【0068】再請參照第 29 圖所示，於 S-G 細胞 (正常細胞) 中，雖然 S-G 細胞的凋亡蛋白酶 3/7 活性也會隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理濃度的提升而些微增加，惟增加的幅度與口腔癌細胞相比並不明顯。另外，在經過活性氧物質抑制劑 (NAC) 處理後，S-G 細胞的凋亡蛋白酶 3/7 活性已不受該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理影響。第 27 圖至第 29 圖的結果顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於正常細胞的凋亡蛋白酶 3/7 活性的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0069】 從前述試驗所得到的結果可得知，該斯文豪蒂殼海綿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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理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。

【0070】 （G）斯文豪蒂殼海綿萃取物對氧化壓力的影響（一）

【0071】 本試驗係以 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物對各種模式細胞株分別進行處理 0、12 及 24 小時後，以濃度為 10 μM 的 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯（2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H_2DCFDA ）作為探針，在黑暗環境下於 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。

【0072】 另外，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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，在黑暗環境下於 37°C 反應 30 分鐘，接著以流式細胞儀進行分析。

【0073】請參照第 30 圖所示，針對 CA9-22 細胞（口腔癌細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 31 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著提升口腔癌細胞包含活性氧物質的細胞的佔比。

【0074】請繼續參照第 30 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CA9-22 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理後，已顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）的組別的對應佔比；前述的試驗結果亦可以於第 31 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0075】接著，請參照第 32 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於 S-G 細胞包含活性氧物質的細胞的佔比的影響無規律關係；且在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（METS 組）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同樣無規律關係，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於正常細胞包含活性氧物質的細胞的佔比的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0076】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

確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的影響。

【0077】 (H) 斯文豪蒂殼海綿萃取物對氧化壓力的影響 (二)

【0078】 本試驗係以 6 µg/mL 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物對各種模式細胞株進行處理 0、12 及 24 小時後，以濃度為 50 nM 的粒線體自由基螢光染劑 (MitoSOX™ Red) 作為探針，在黑暗環境下於 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。

【0079】 另外，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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，在黑暗環境下於 37°C 反應 30 分鐘，接著以流式細胞儀進行分析。

【0080】 請參照第 33 圖所示，針對 CA9-22 細胞 (口腔癌細胞)，在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理 (METS 組) 的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 34 圖所示的另一口腔癌細胞株 - CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著提升口腔癌細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比。

【0081】 請繼續參照第 33 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑 (NAC)

進行處理 (NAC/METS 組) 的各組數據中, CA9-22 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理後, 已顯著低於未利用活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行處理 (NAC/METS 組) 的組別的對應佔比; 前述的試驗結果亦可以於第 34 圖所示的另一口腔癌細胞株 – CAL 27 細胞中觀察到。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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, 證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0082】 再請參照第 35 圖所示, 於 S-G 細胞 (正常細胞) 中, 雖然 S-G 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比也會隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長而些微增加, 惟增加的幅度與口腔癌細胞相比並不明顯。另外, 在經過活性氧物質抑制劑 (NAC) 處理後, S-G 細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的增加效果也被回復。第 33 圖至第 35 圖的結果顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於正常細胞包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的影響較小, 與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【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, 則代表細胞內的氧化壓力較不易降低。因此, 為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於包含穀胱甘肽的細胞的佔比的影響, 遂進行以下試驗。

【0084】 (I) 斯文豪蒂殼海綿萃取物對氧化壓力的影響 (三)

【0085】 本試驗係以 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物對各種模式細胞株進行處理 0、12 及 24 小時後, 以濃度為 5 μM 的 5-氯甲基螢光素二乙酸酯 (5-chloromethylfluorescein diacetate, 簡稱為 CMF-DA) 進行染色,

在黑暗環境下於 37°C 反應 20 分鐘，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，-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。

【0086】另外，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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，在黑暗環境下於 37°C 反應 20 分鐘，接著以流式細胞儀進行分析。

【0087】請參照第 36 圖所示，針對 CA9-22 細胞（口腔癌細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 37 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著提升口腔癌細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0088】請繼續參照第 36 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CA9-22 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時後，已顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的組別的對應佔比；另，請參照第 37 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理

(NAC/METS 組) 的各組數據中，CAL 27 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 12 或 24 小時後，均低於未利用活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行處理 (NAC/METS 組) 的組別的對應佔比。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0089】 接著，請參照第 38 圖所示，針對 S-G 細胞 (正常細胞)，在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理 (METS 組) 的各組數據中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於 S-G 細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的影響無規律關係，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於正常細胞不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【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，因此後續另確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對 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】 (J) 斯文豪蒂殼海綿萃取物對 DNA 損傷的影響 (一)

【0093】 本試驗係以 6 μ g/mL 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物對各種模

式細胞株進行處理 0、12 及 24 小時後，以濃度為 75%的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 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，另再加入二級抗體及 7-氨基放線菌素 D (7AAD, 5 μ g/mL)，反應 30 分鐘，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〔磷酸化組蛋白 γ H2AX (+)〕的佔比。

【0094】另外，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於各組模式細胞株包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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%的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 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 γ H2AX 的細胞〔磷酸化組蛋白 γ H2AX (+)〕的佔比。

【0095】請參照第 39 圖所示，針對 CA9-22 細胞 (口腔癌細胞)，在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理 (METS 組) 的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 40 圖所示的另一口腔癌細胞株—CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著口腔癌細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比。

【0096】請繼續參照第 39 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行處理 (NAC/METS 組) 的各組數據中，CA9-22 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 12 或 24 小時後，均顯著低於未利用活性氧物質抑制劑 (NAC) 進行處理 (NAC/METS 組) 的

組別的對應佔比；另，請參照第 40 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CAL 27 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時後，已低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的組別的對應佔比。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0097】 接著，請參照第 41 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），雖然 S-G 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比也會隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理時間增長而些微增加，惟增加的幅度與口腔癌細胞相比並不明顯。另外，活性氧物質抑制劑（NAC）對於 S-G 細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比的回復效果不顯著。第 39 圖至第 41 圖的結果顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理對於正常細胞包含磷酸化組蛋白 γ H2AX 的細胞的佔比的影響較小，與口腔癌細胞相比具有選擇性。

【0098】 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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理是否會對包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比造成影響。

【0099】 （K）斯文豪蒂殼海綿萃取物對 DNA 損傷的影響（二）

【0100】 本試驗係以 6 μ g/mL 的該斯文豪蒂殼海綿萃取物對各種模式細胞株進行處理 0、12 及 24 小時後，以濃度為 75% 的乙醇溶液固定細胞內的

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。

【0101】 另外，為確認該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理之前，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% 的乙醇溶液固定細胞內的 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。

【0102】 請參照第 42 圖所示，針對 CA9-22 細胞（口腔癌細胞），在僅使用該斯文豪蒂殼海綿萃取物進行處理（METS 組）的各組數據中，隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理的時間增長，CA9-22 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比也顯著提升；前述的試驗結果亦可以於第 43 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到，顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理可以顯著口腔癌細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比。

【0103】 請繼續參照第 42 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CA9-22 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 24 小時後，已顯著低於未利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的組別的對應佔比；另，請參照第 43 圖所示，在利用活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的各組數據中，CAL 27 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比在經過該斯文豪蒂殼海綿萃取物處理 12 或 24 小時後，均低於未利用

活性氧物質抑制劑（NAC）進行處理（NAC/METS 組）的組別的對應佔比。前述試驗結果顯示由該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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，證實該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0104】 接著，請參照第 44 圖所示，針對 S-G 細胞（正常細胞），雖然 S-G 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比也會隨著該斯文豪蒂殼海綿萃取物的處理時間增長而些微增加，惟增加的幅度與口腔癌細胞相比並不明顯。另外，活性氧物質抑制劑（NAC）對於 S-G 細胞包含 8-羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的回復效果不顯著。第 42 圖至第 44 圖的結果顯示該斯文豪蒂殼海綿萃取物的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。

【0105】 綜上所述，本發明的斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，係能夠藉由斯文豪蒂殼海綿萃取物所含有的活性成分，在將斯文豪蒂殼海綿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，斯文豪蒂殼海綿萃取物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而斯文豪蒂殼海綿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。

【0106】 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】

【0107】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，該斯文豪蒂殼海綿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斯文豪蒂殼海綿樣品，以獲得該斯文豪蒂殼海綿樣品的一乙醇萃取物；

以包含乙酸乙酯與水的一第一混合液，對該斯文豪蒂殼海綿樣品的乙醇萃取物進行一第一分配萃取，以收集一乙酸乙酯萃取層；及

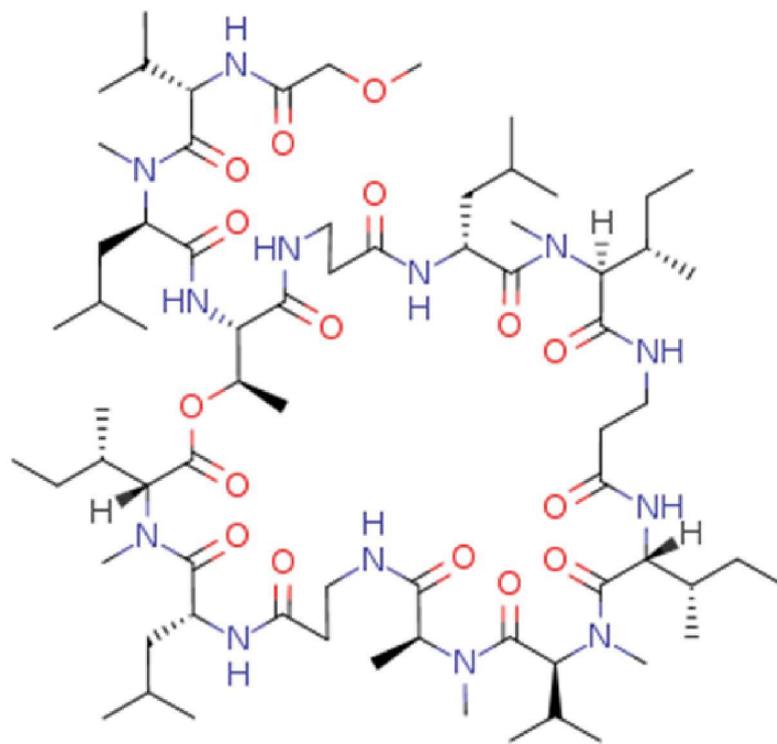
以包含一甲醇水溶液與己烷的一第二混合液，對該乙酸乙酯萃取層進行一第二分配萃取，收集一甲醇水溶液萃取層以獲得該斯文豪蒂殼海綿萃取物。

【請求項 2】 如請求項 1 之斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，其中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物係以口服方式投予一所需個體。

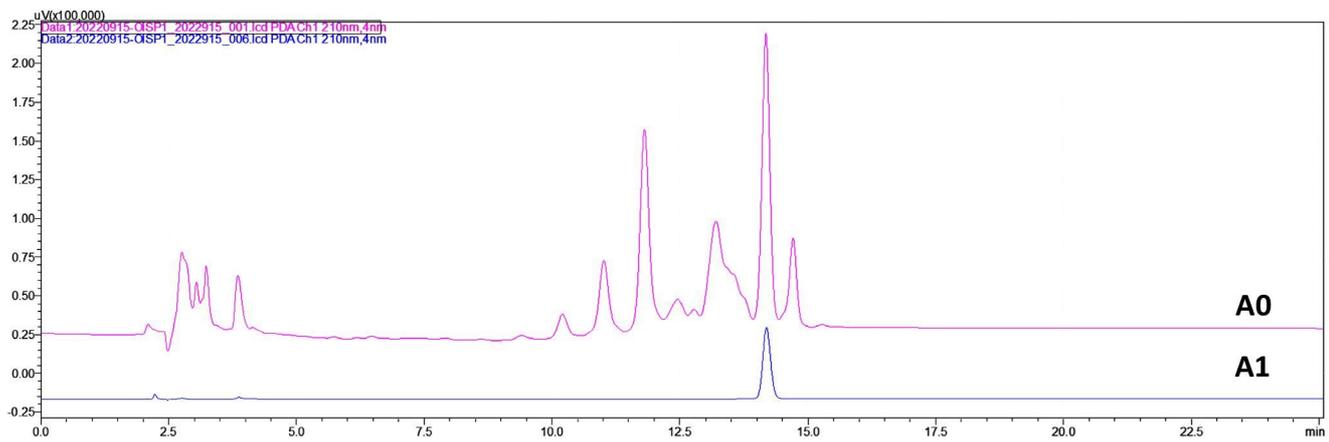
【請求項 3】 如請求項 1 之斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，其中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物係以靜脈注射投予一所需個體。

【請求項 4】 如請求項 2 或 3 之斯文豪蒂殼海綿萃取物的用途，其中，該斯文豪蒂殼海綿萃取物係以每天每公斤體重施予 2~20 毫克的劑量施予該所需個體。

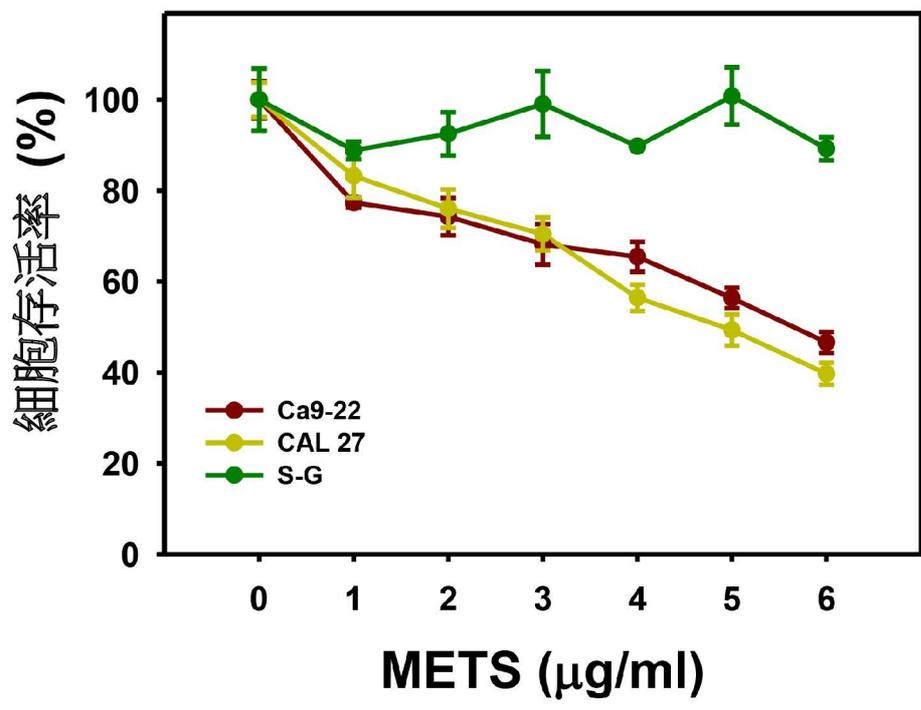
【發明圖式】



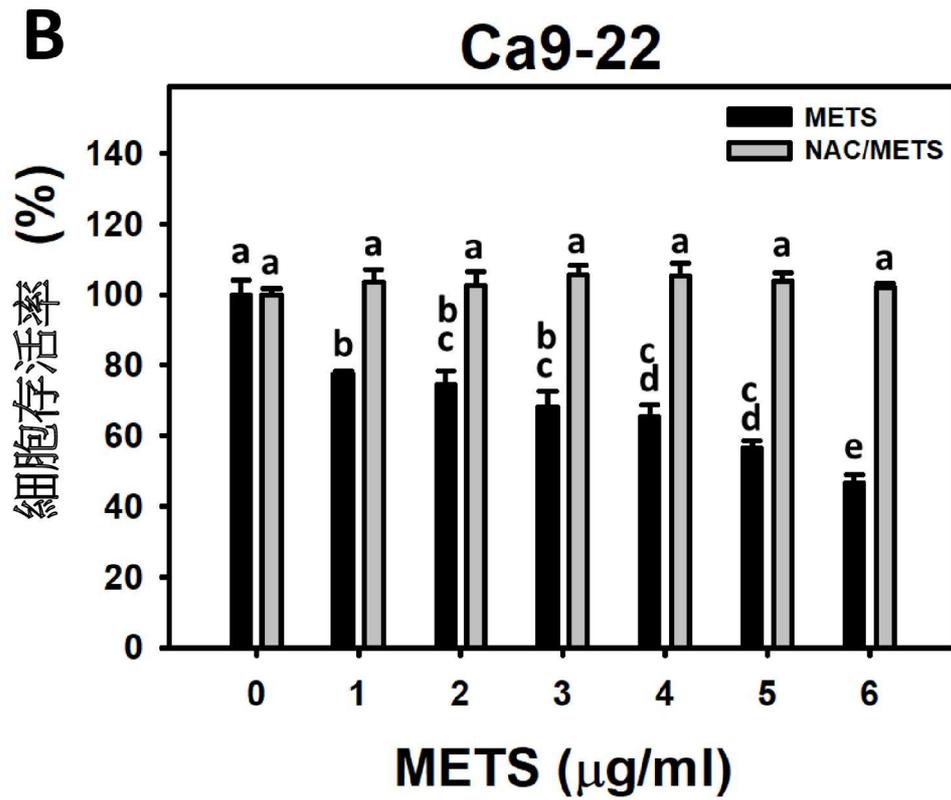
【第 1 圖】



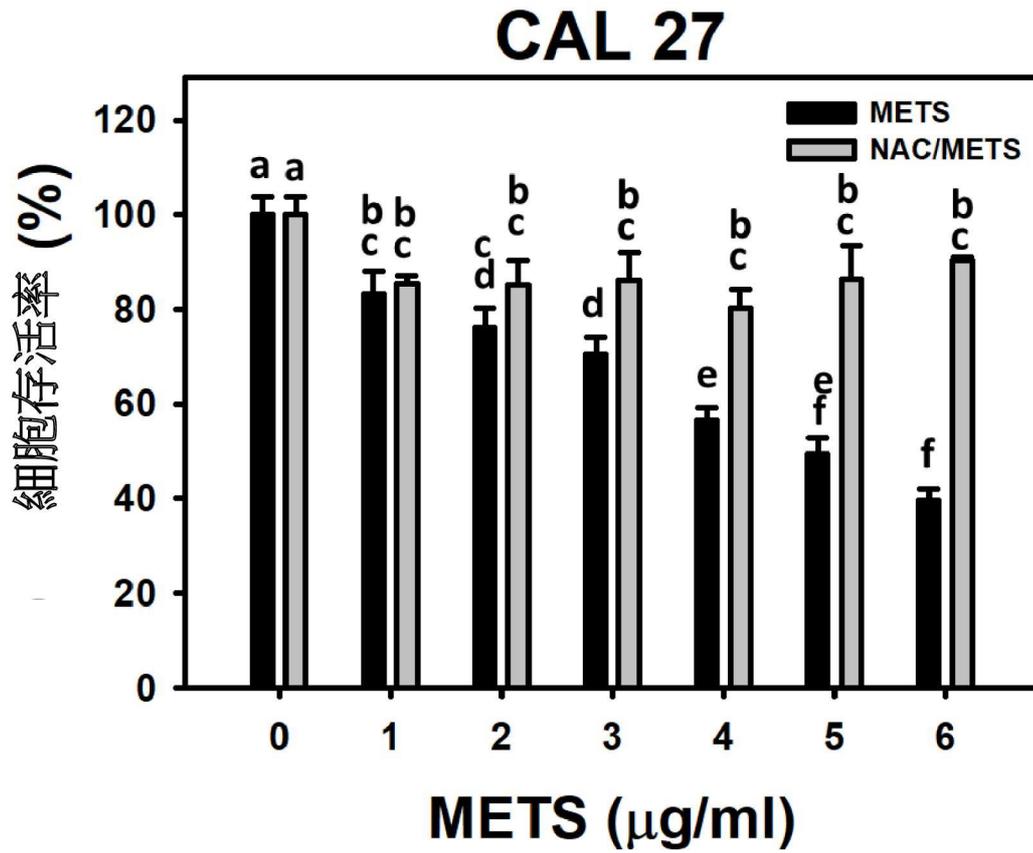
【第 2 圖】



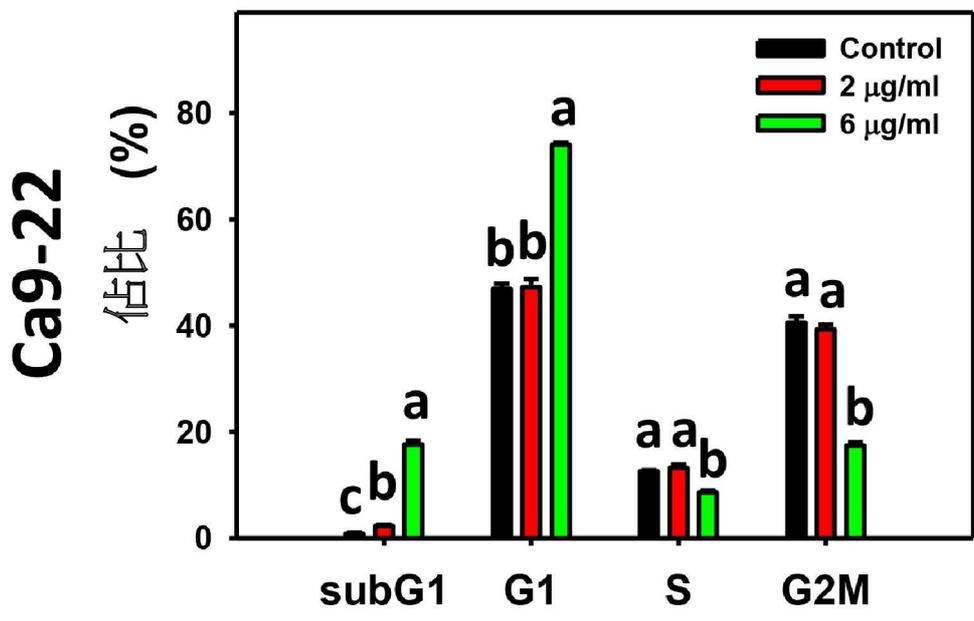
【第 3 圖】



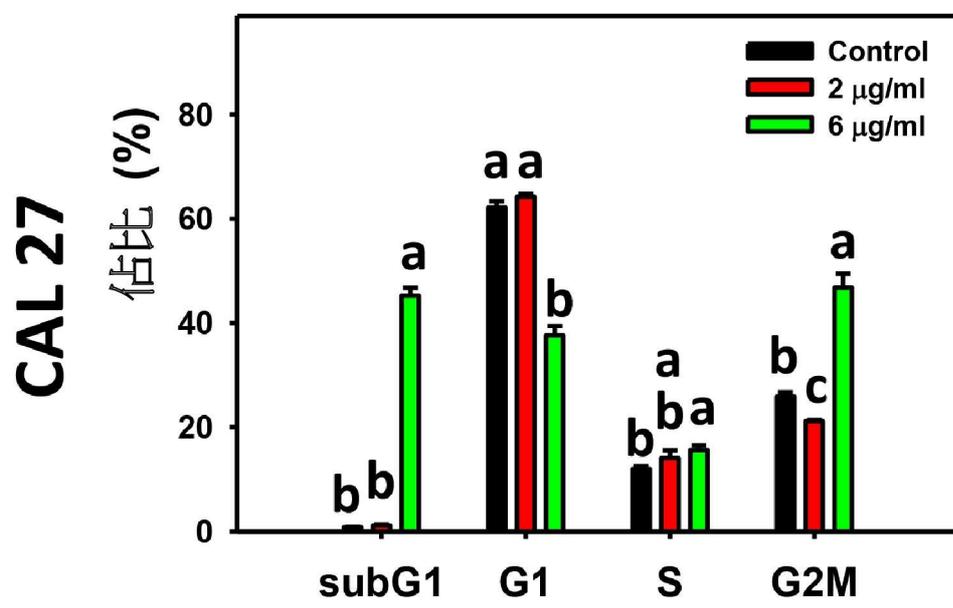
【第 4 圖】



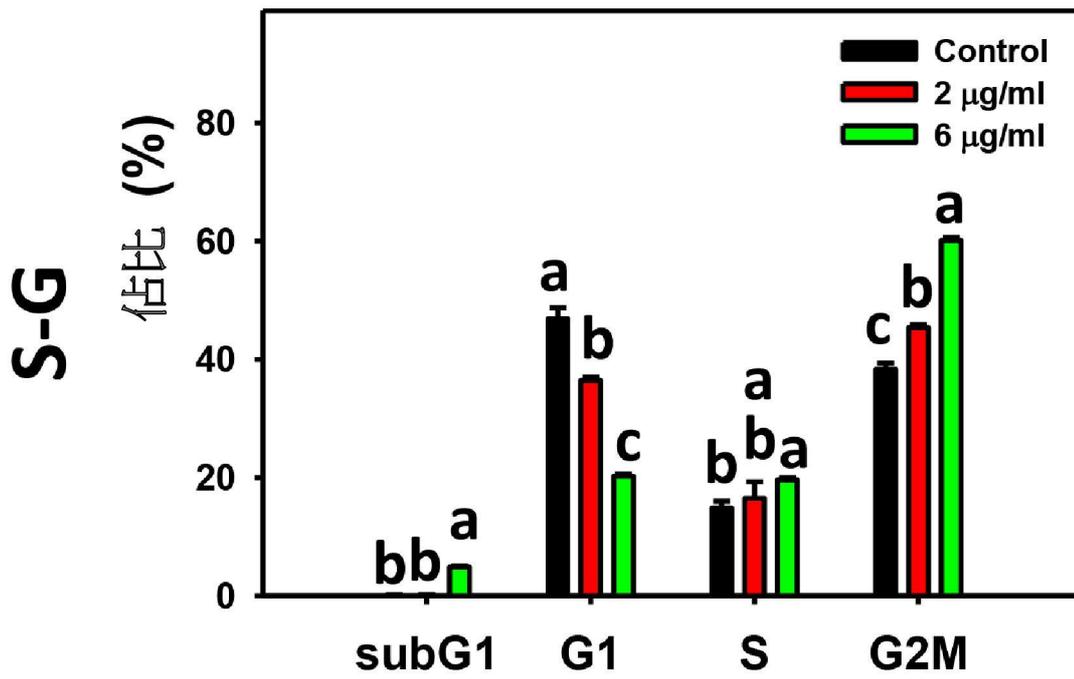
【第 5 圖】



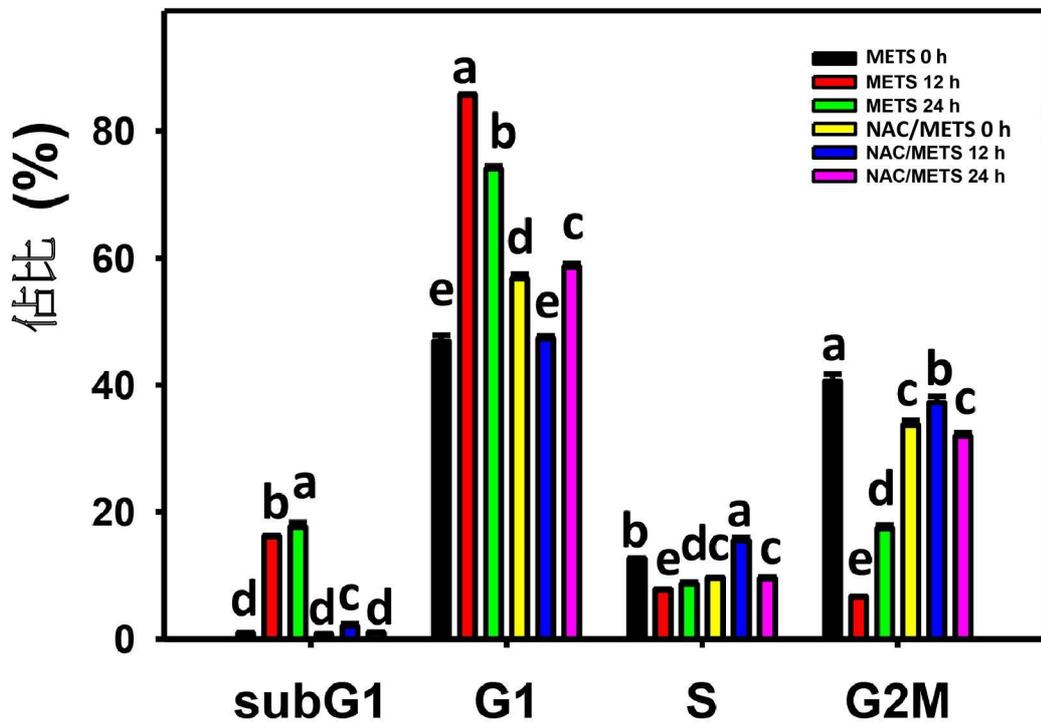
【第 6 圖】



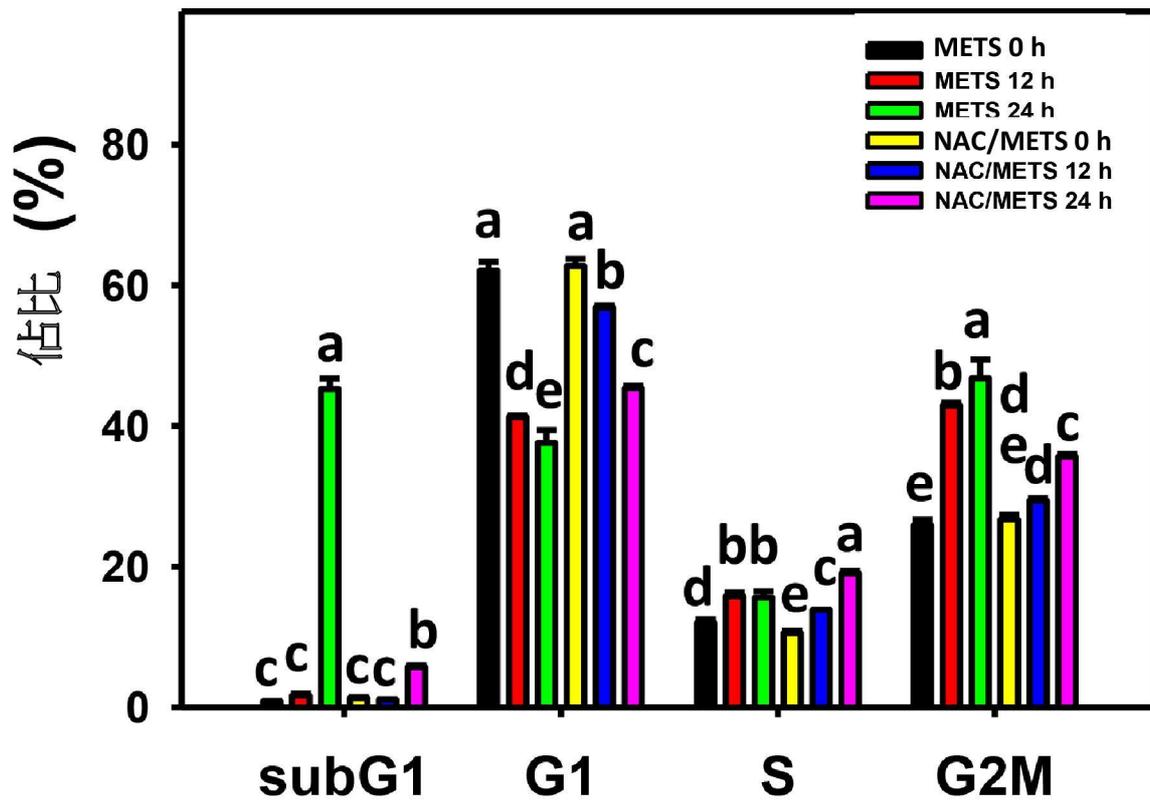
【第 7 圖】



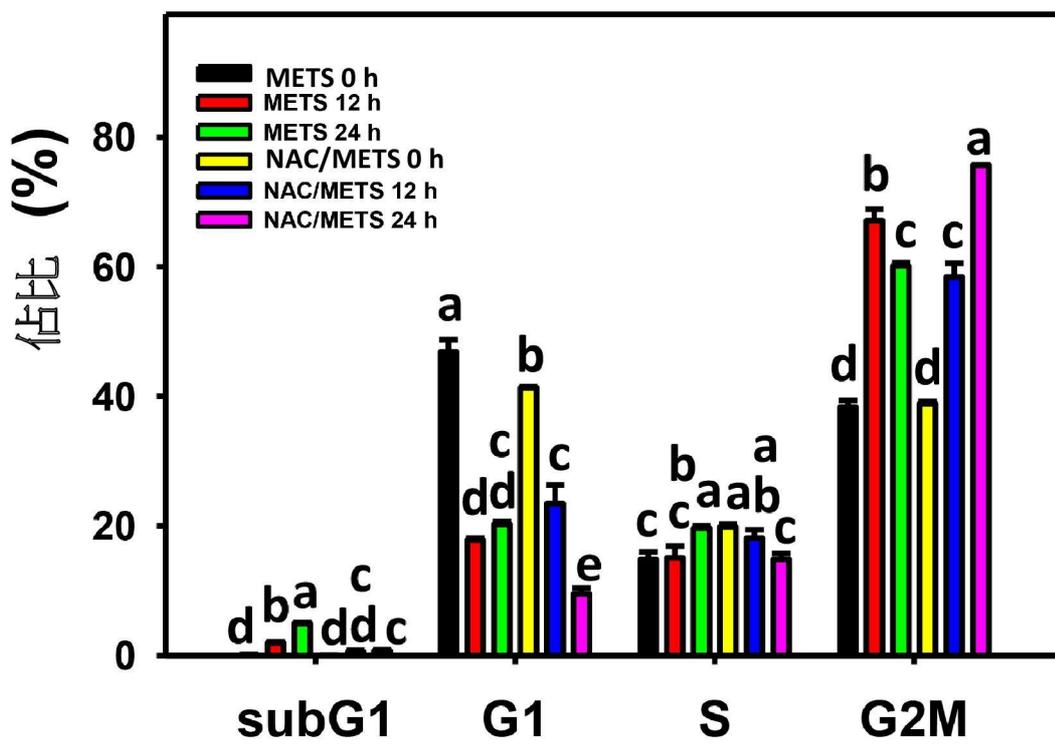
【第 8 圖】



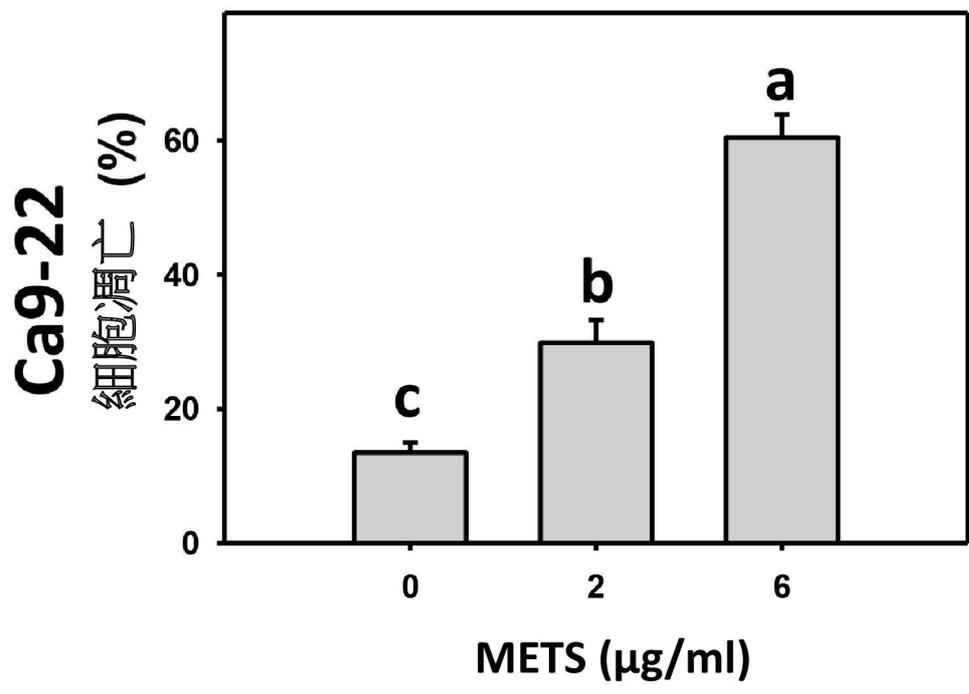
【第 9 圖】



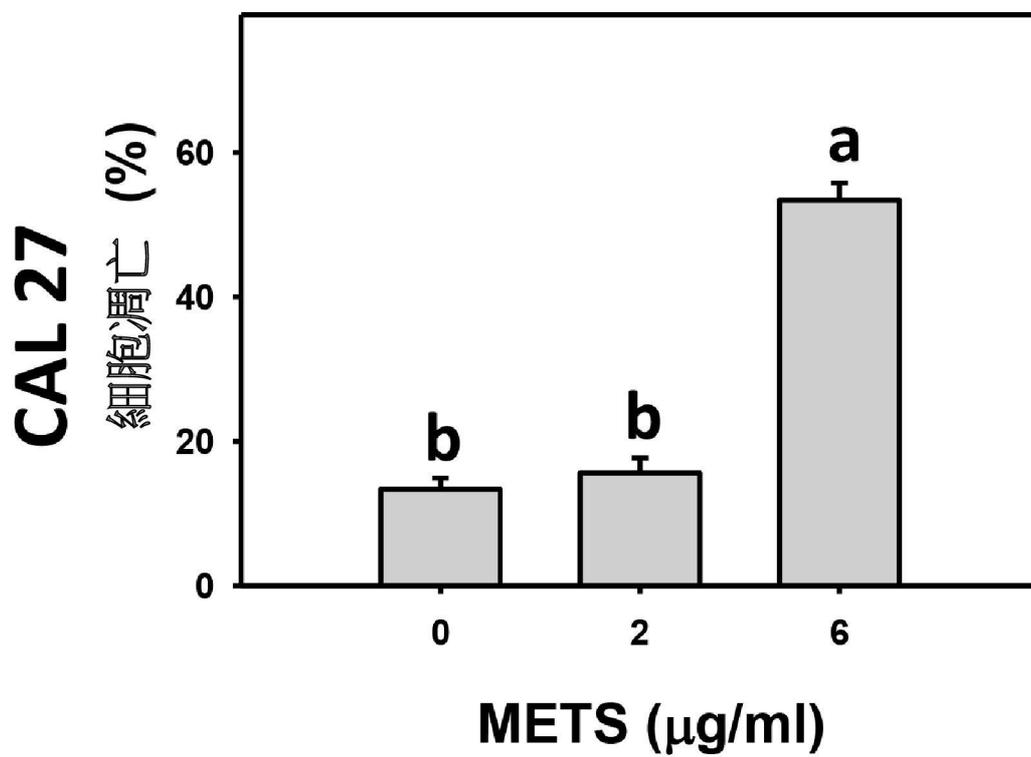
【第 10 圖】



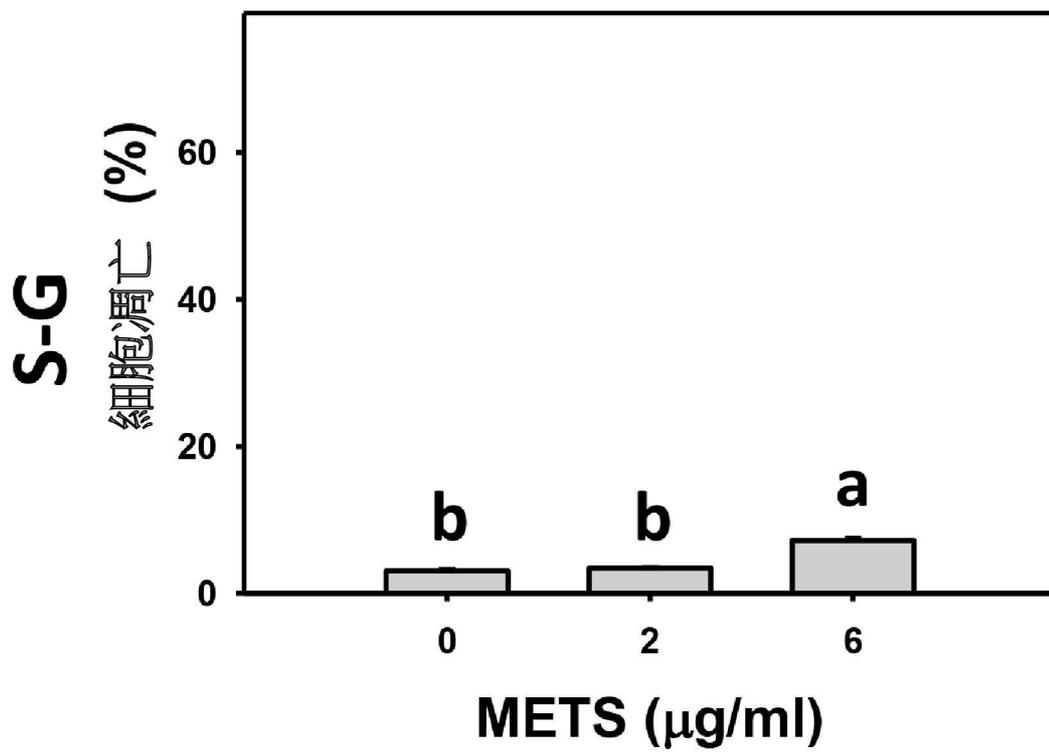
【第 11 圖】



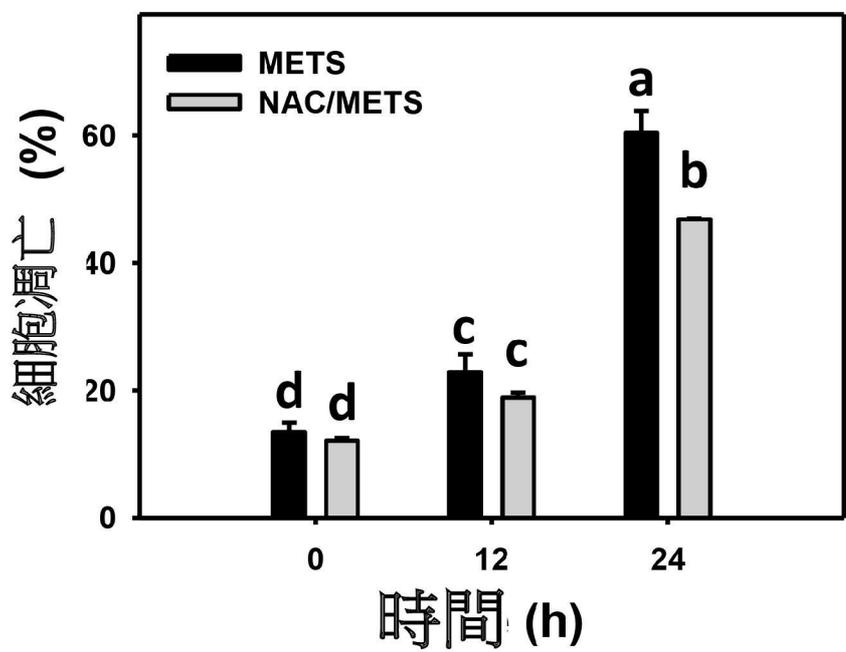
【第 12 圖】



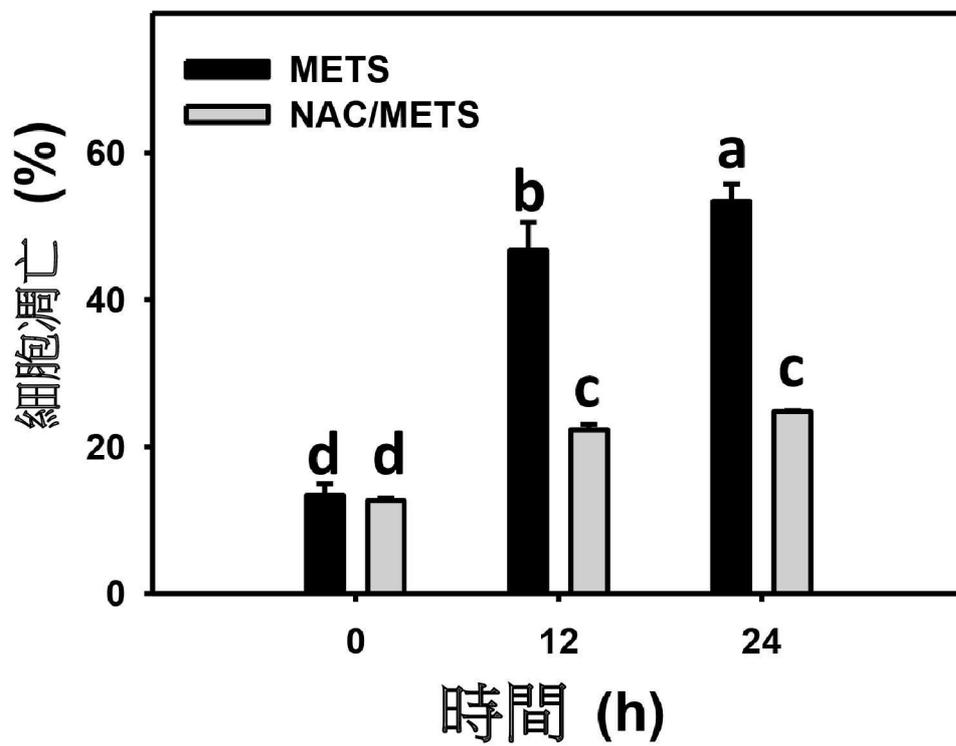
【第 13 圖】



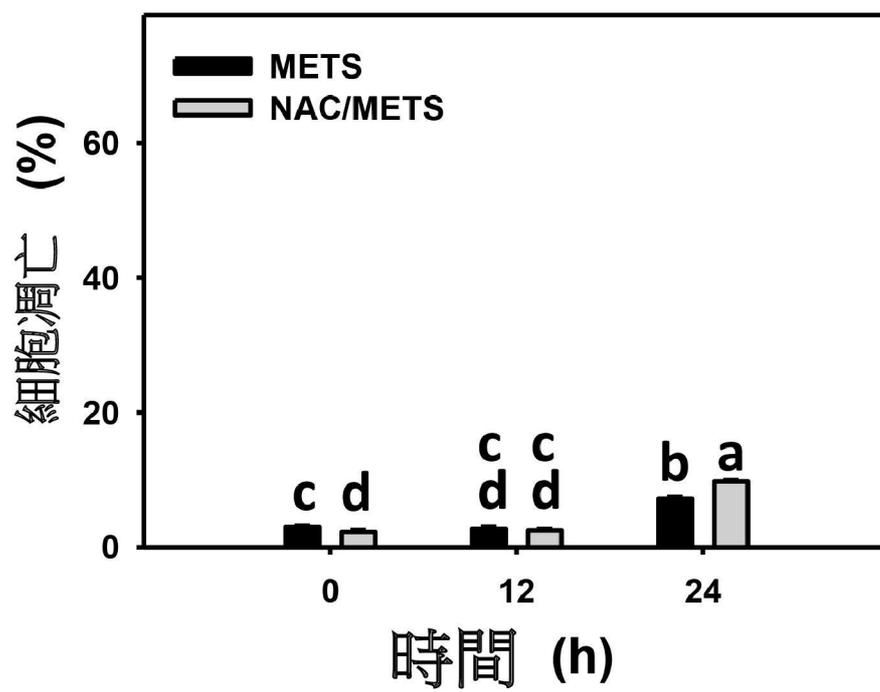
【第 14 圖】



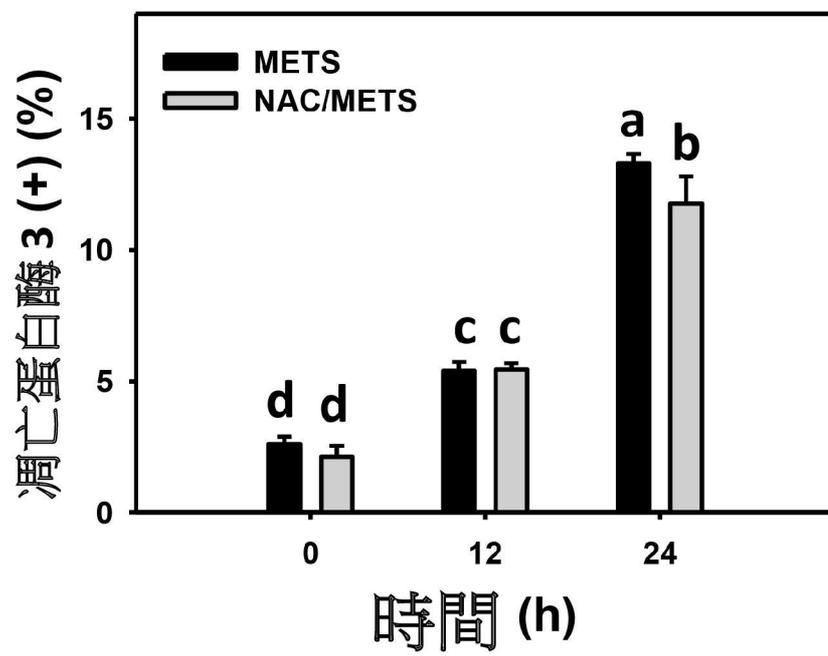
【第 15 圖】



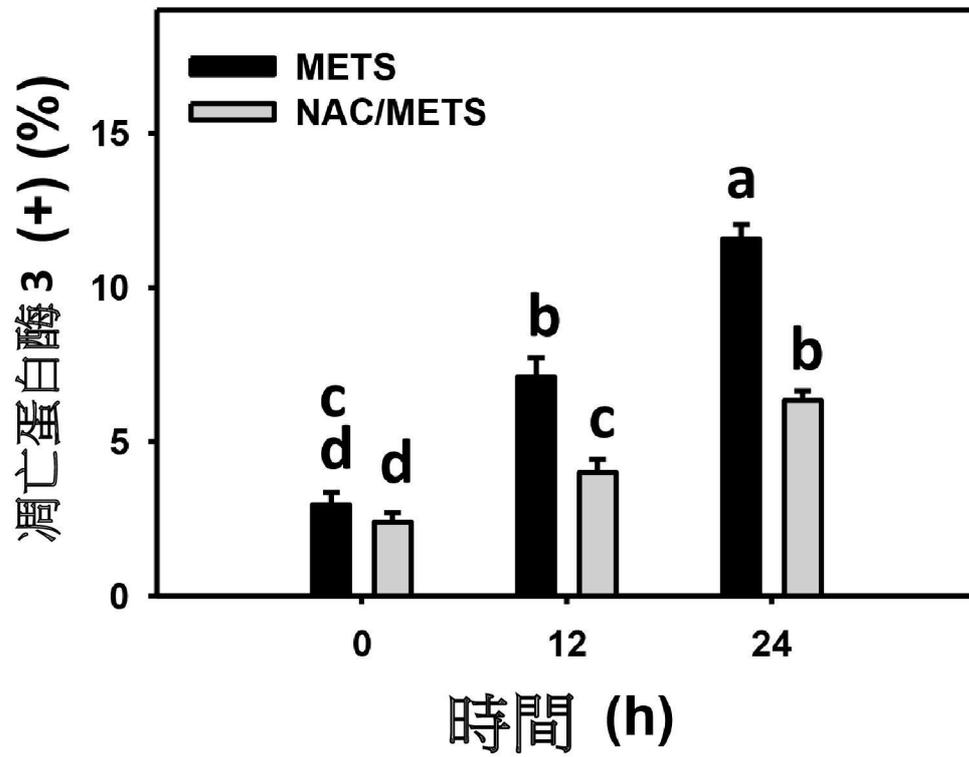
【第 16 圖】



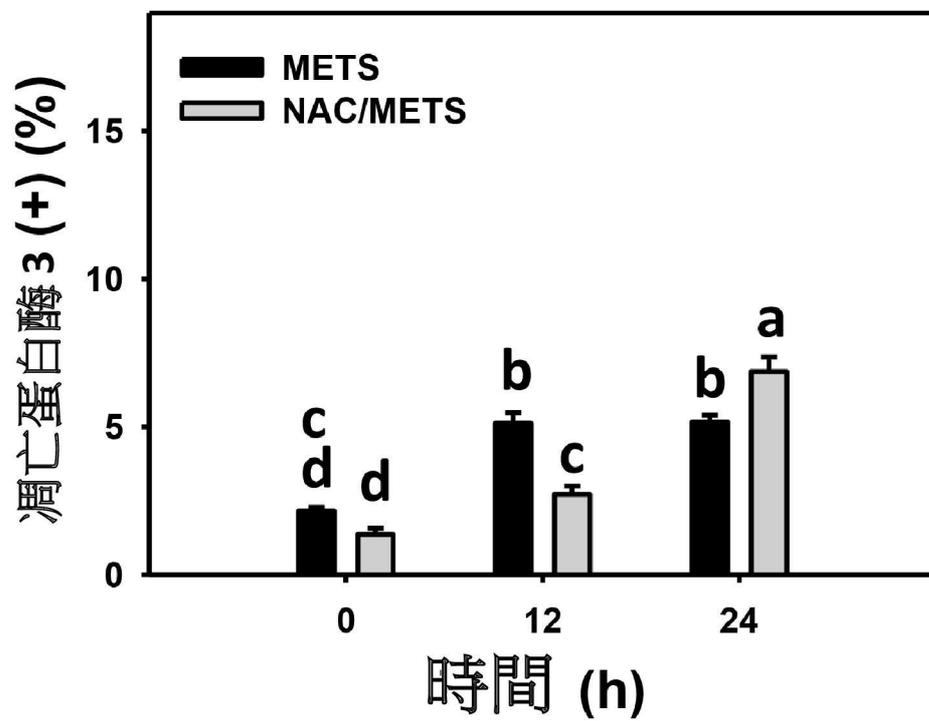
【第 17 圖】



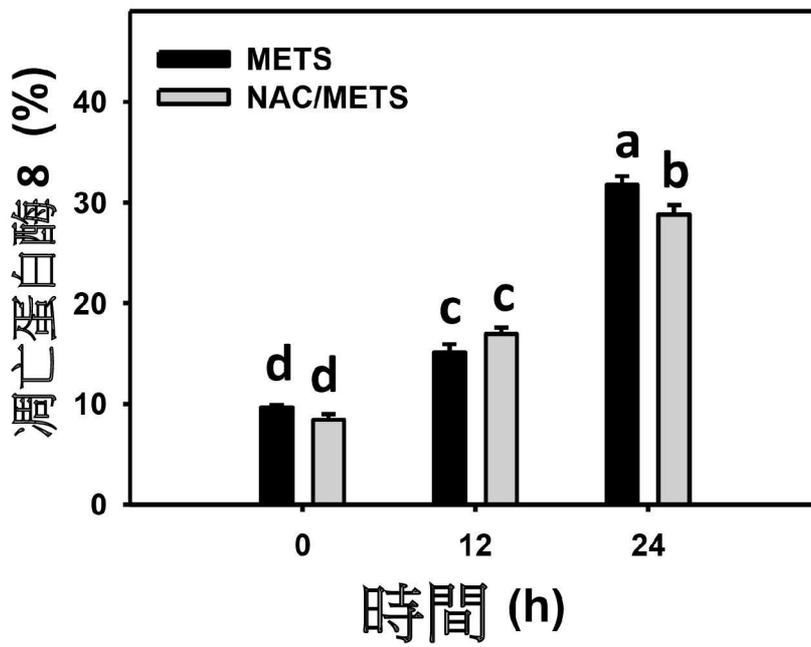
【第 18 圖】



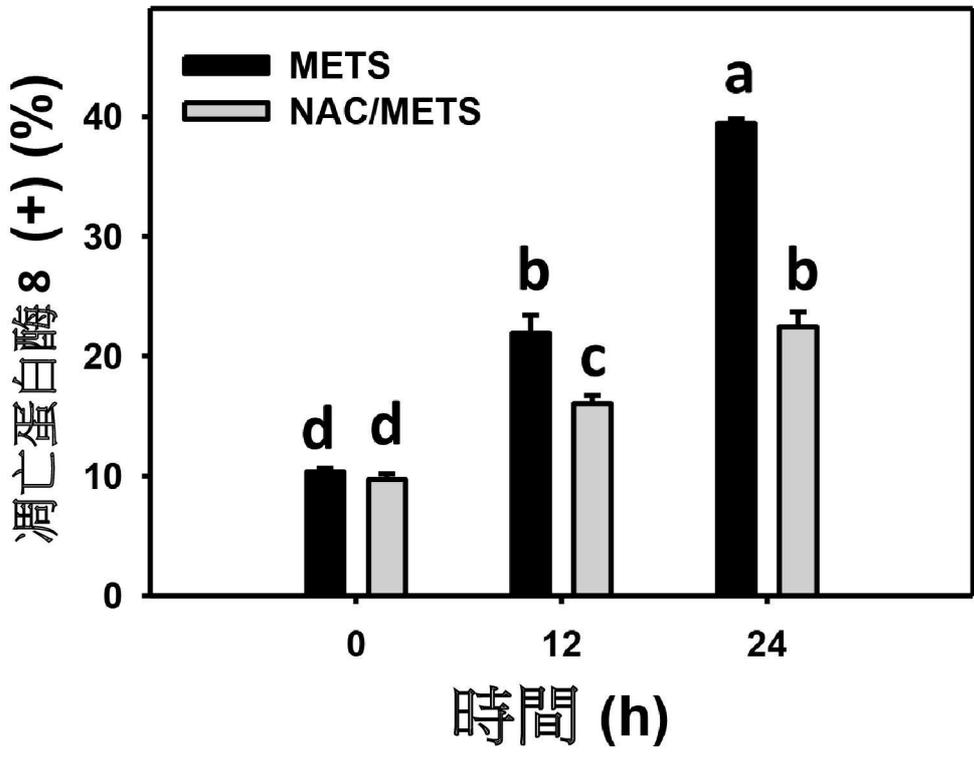
【第 19 圖】



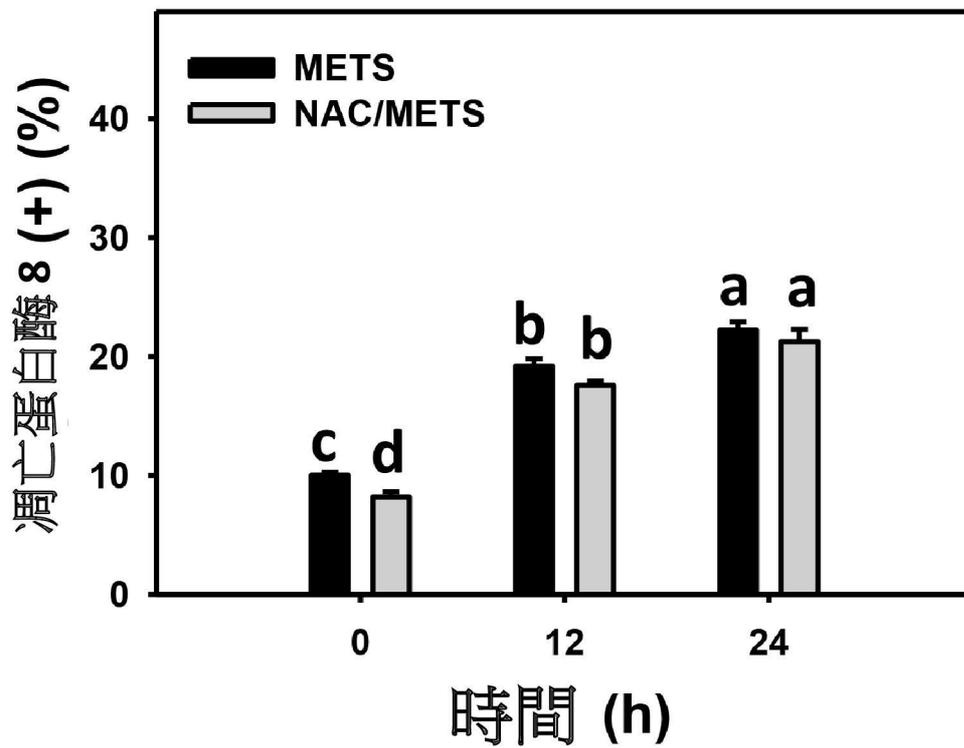
【第 20 圖】



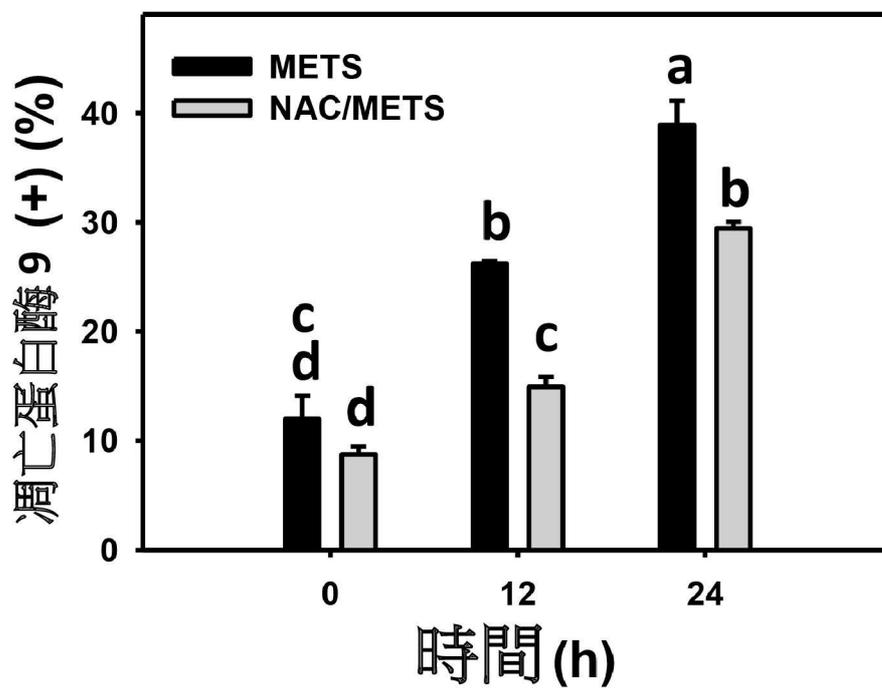
【第 21 圖】



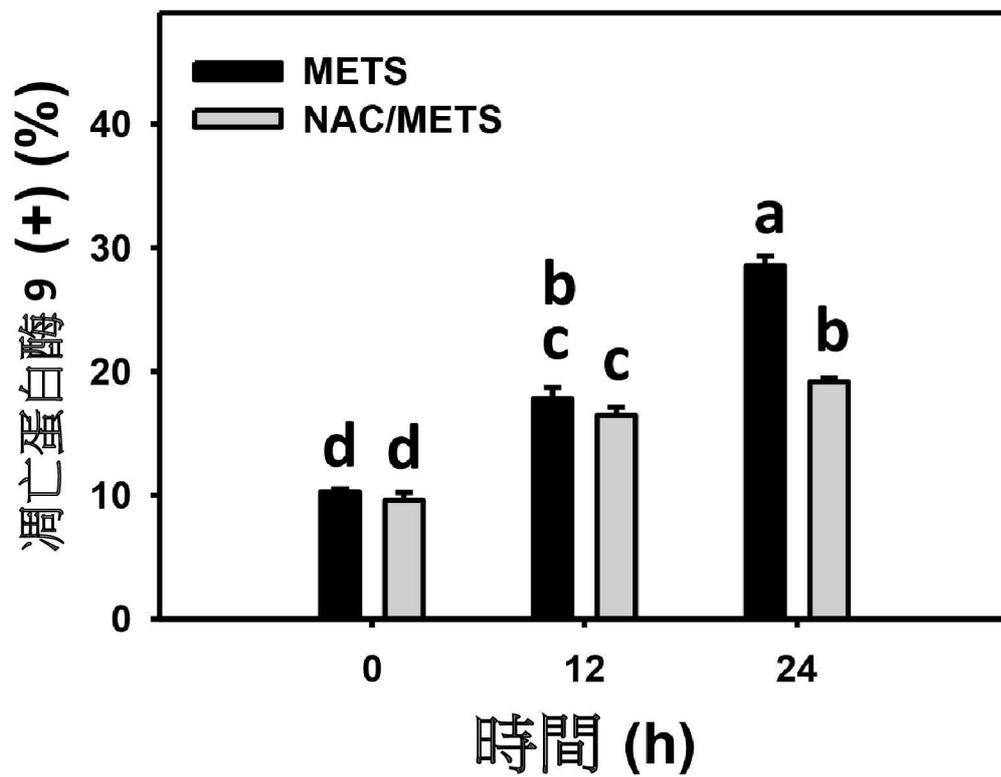
【第 22 圖】



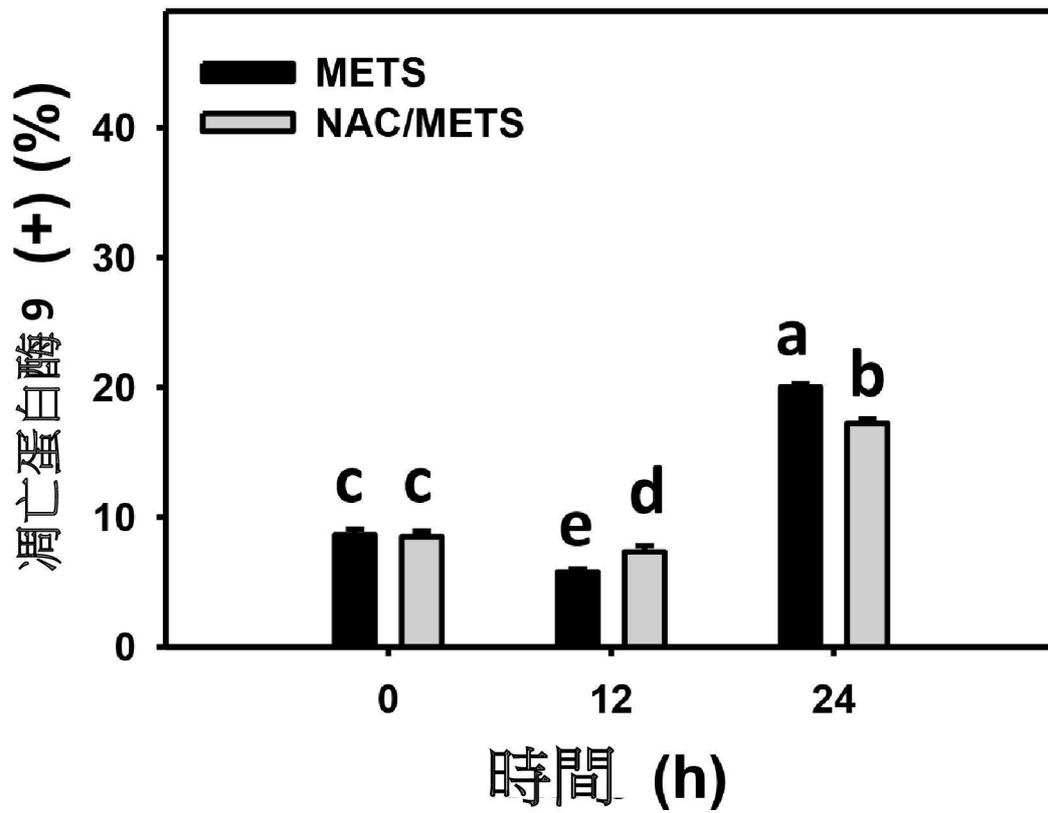
【第 23 圖】



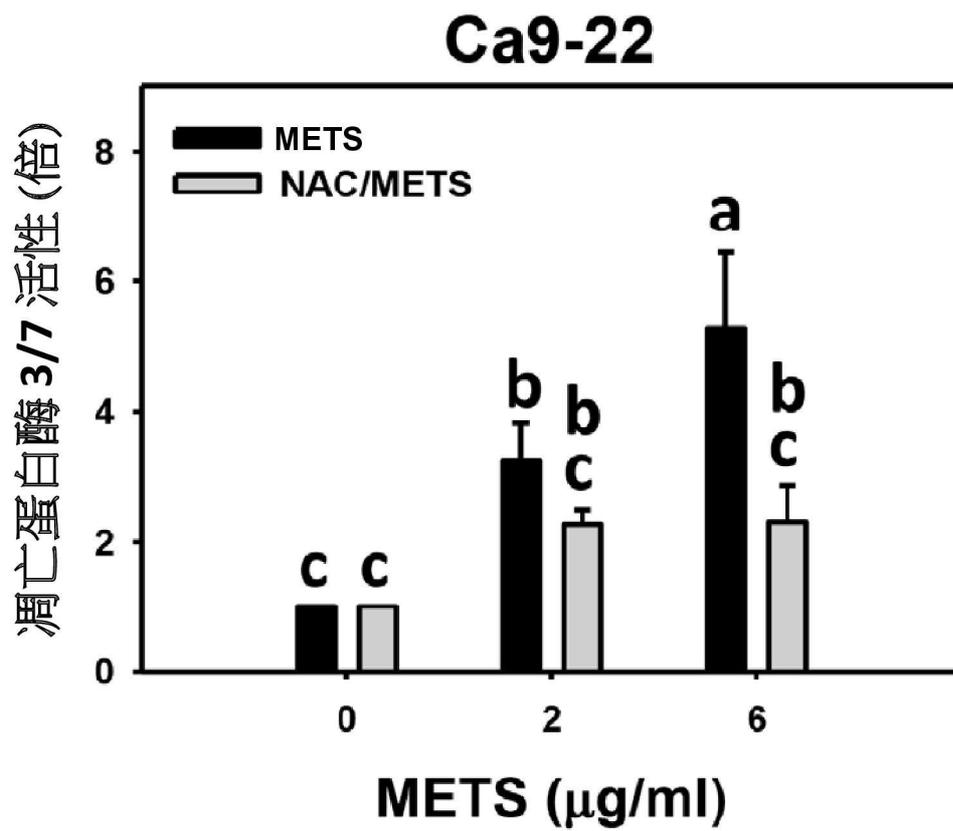
【第 24 圖】



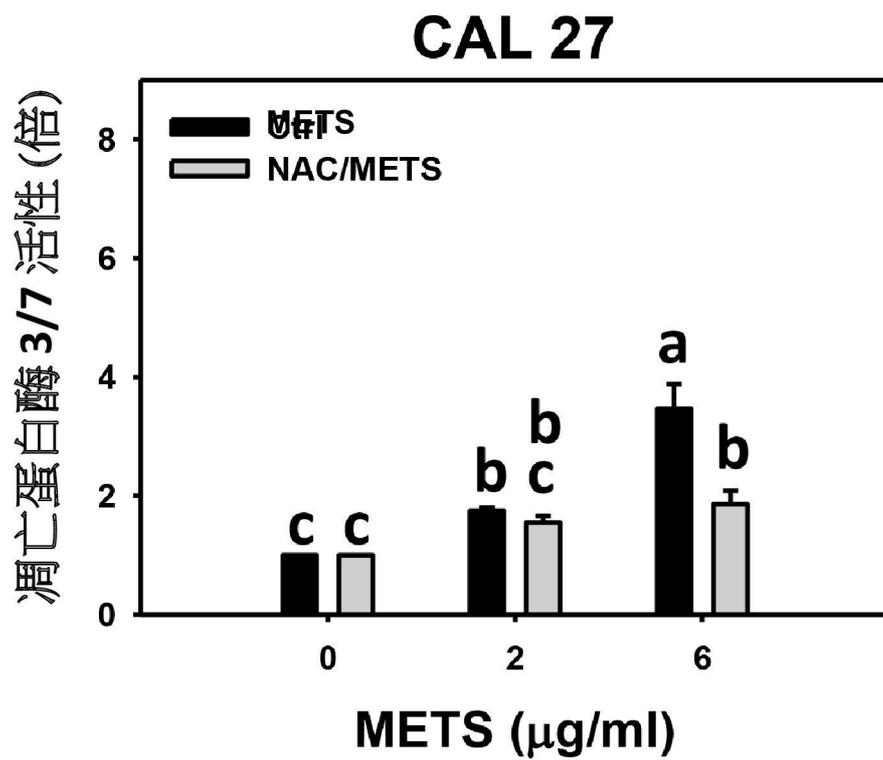
【第 25 圖】



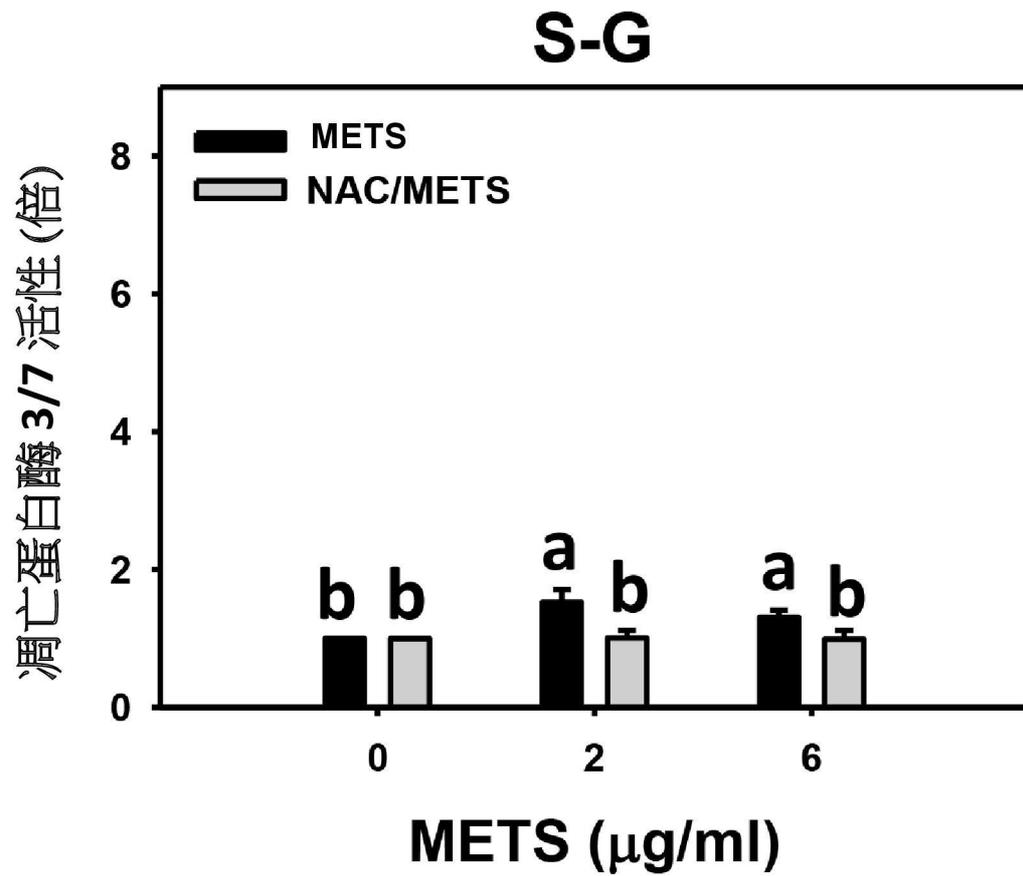
【第 26 圖】



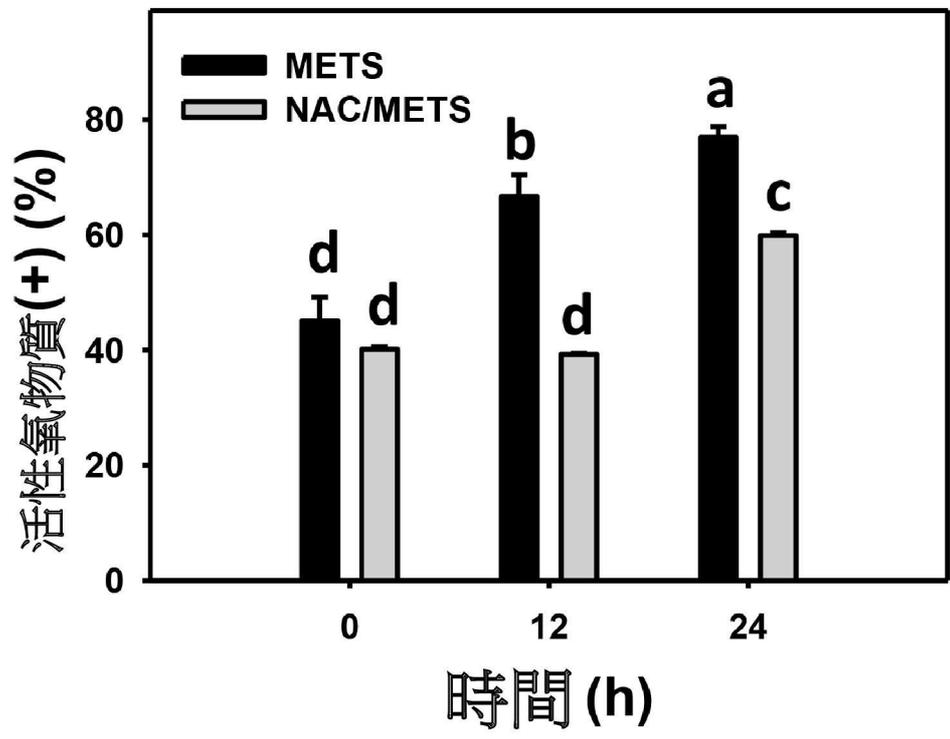
【第 27 圖】



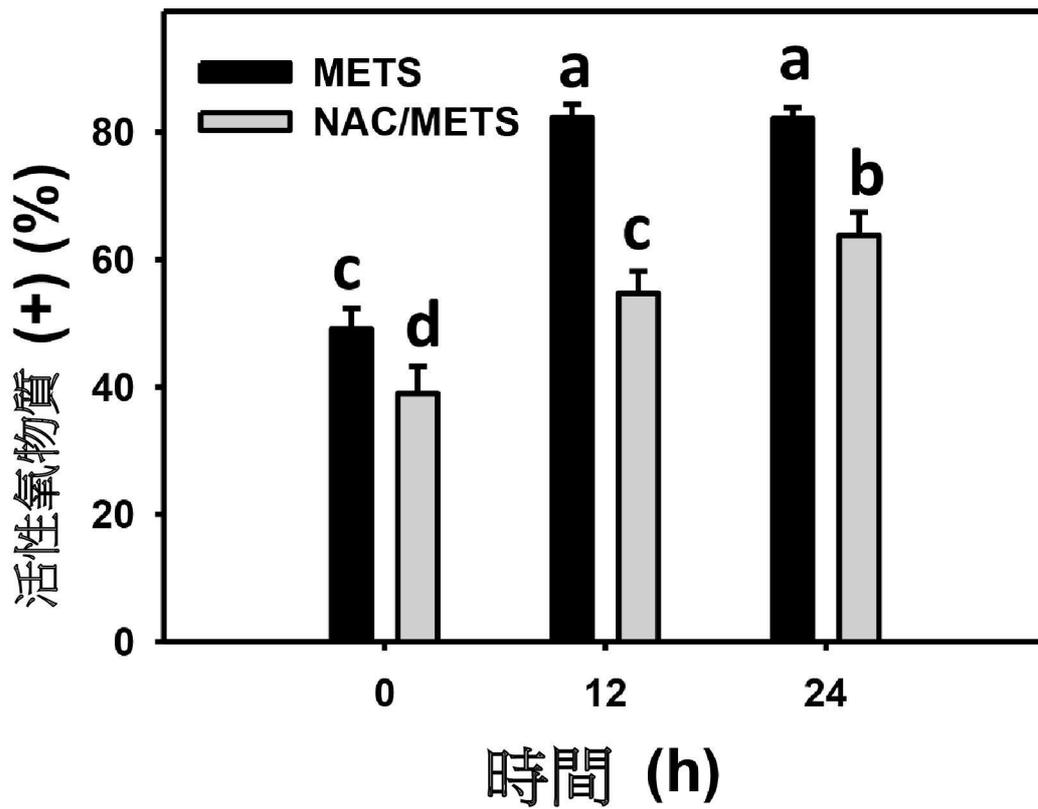
【第 28 圖】



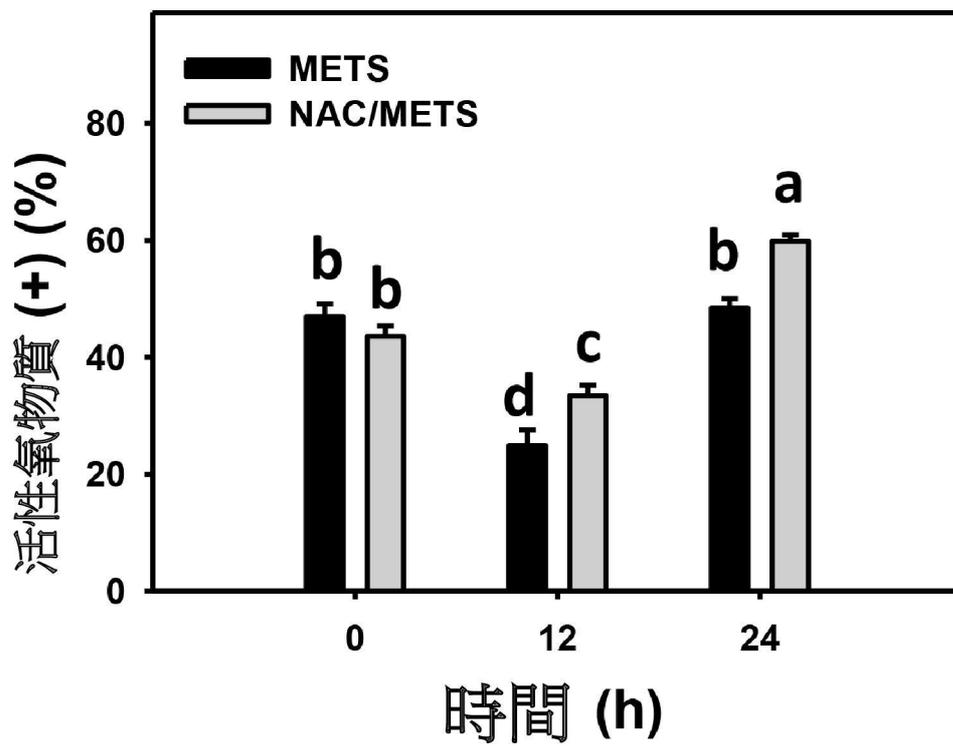
【第 29 圖】



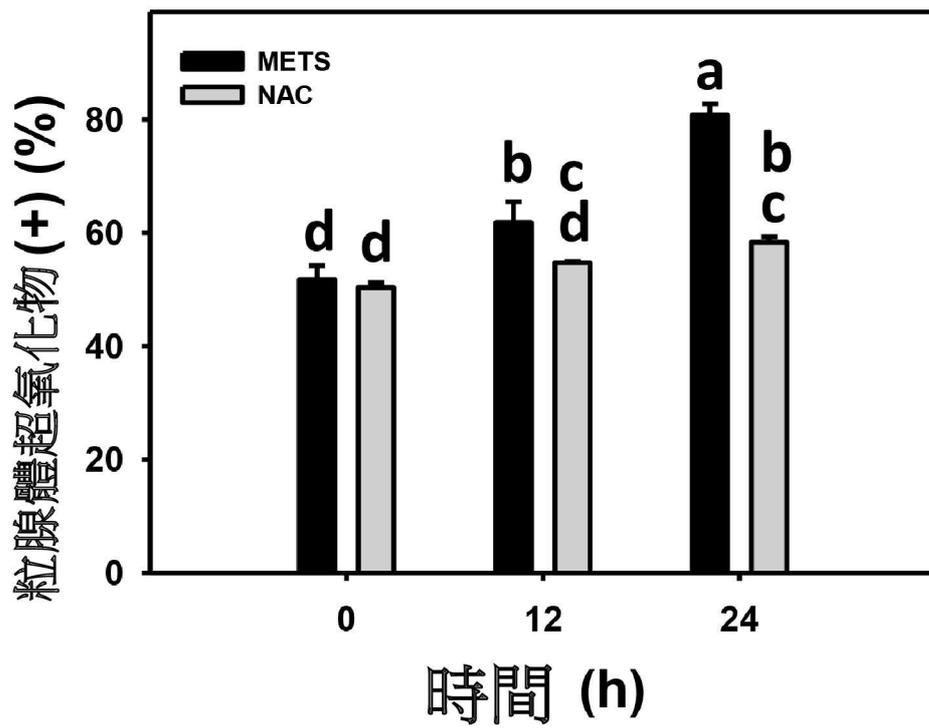
【第 30 圖】



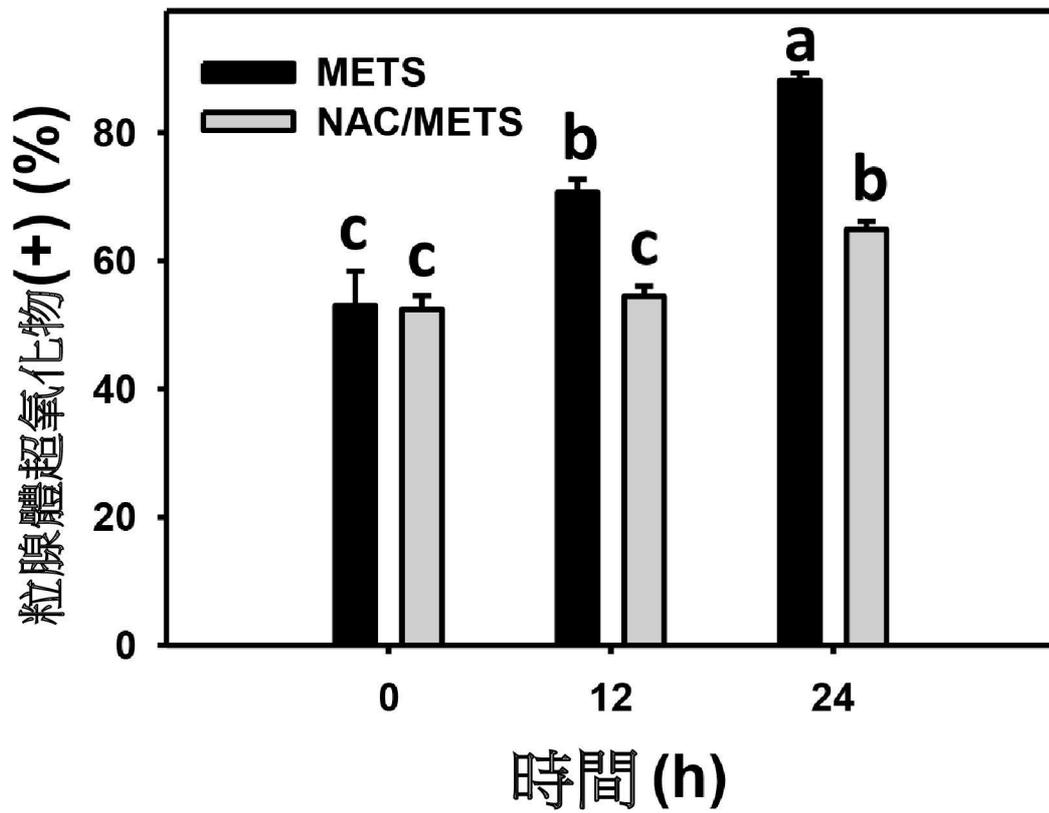
【第 31 圖】



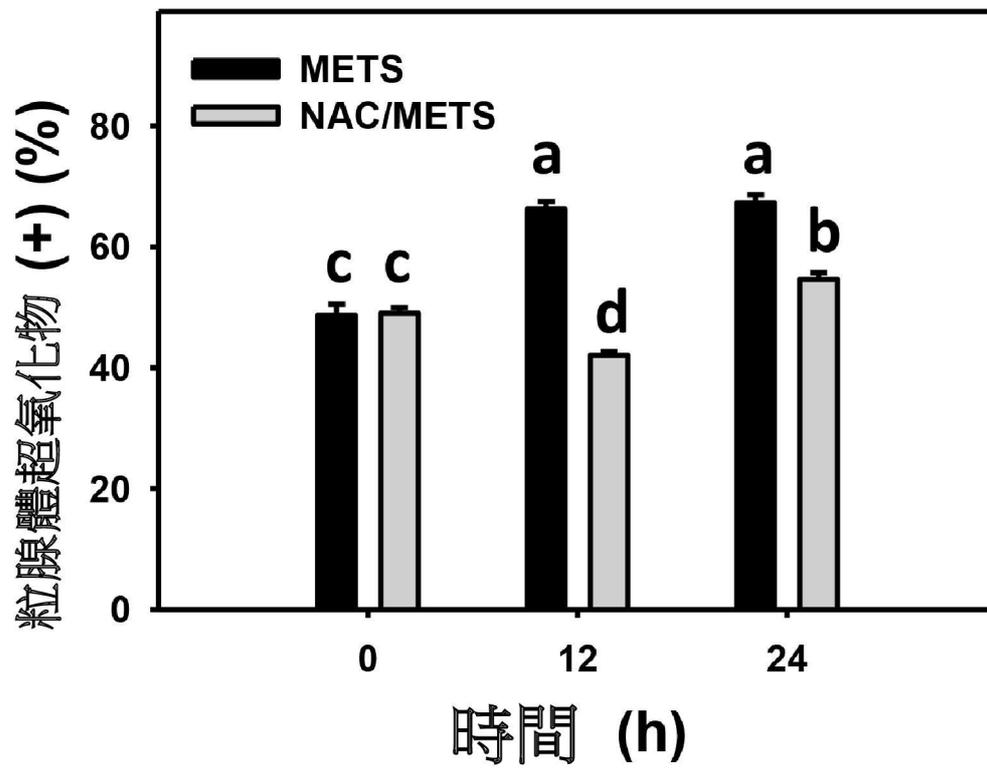
【第 32 圖】



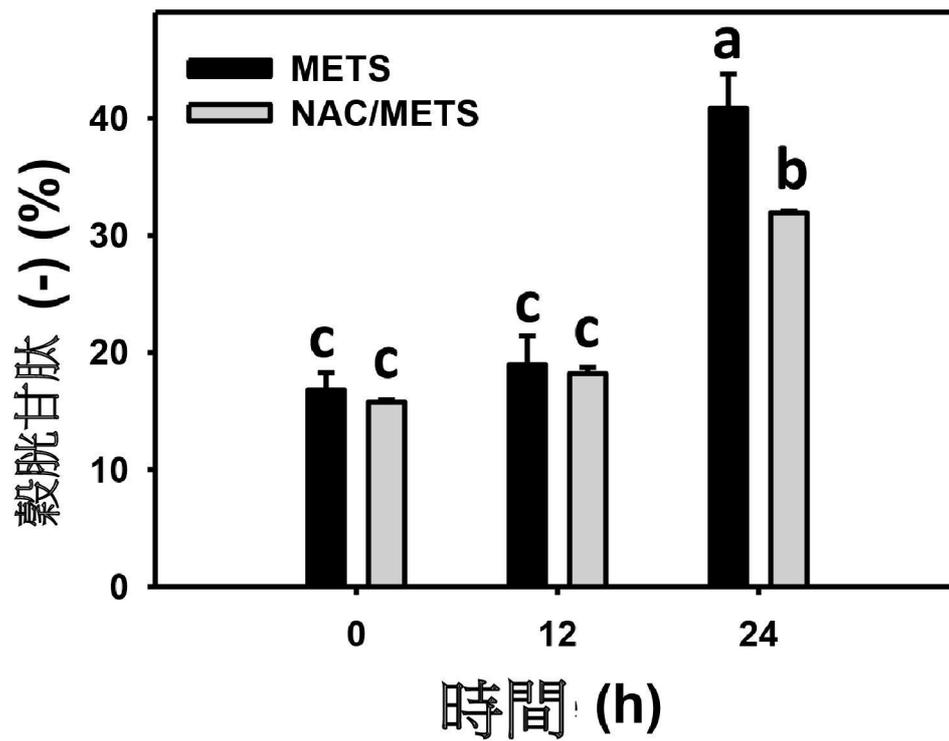
【第 33 圖】



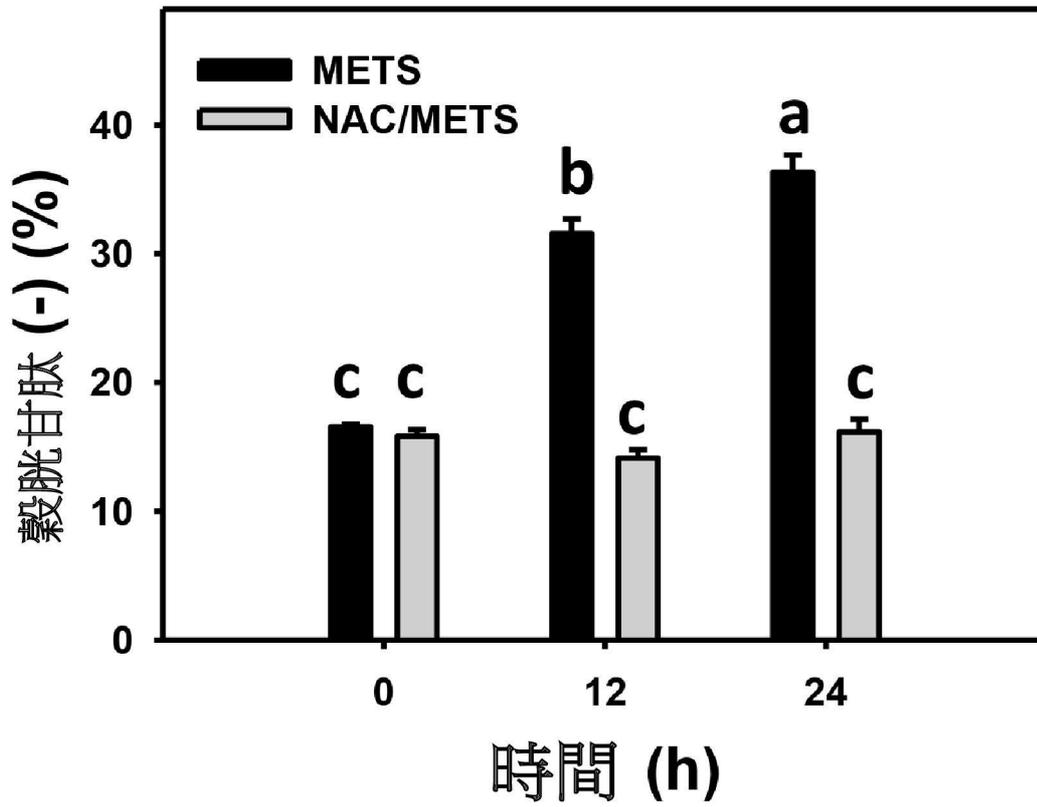
【第 34 圖】



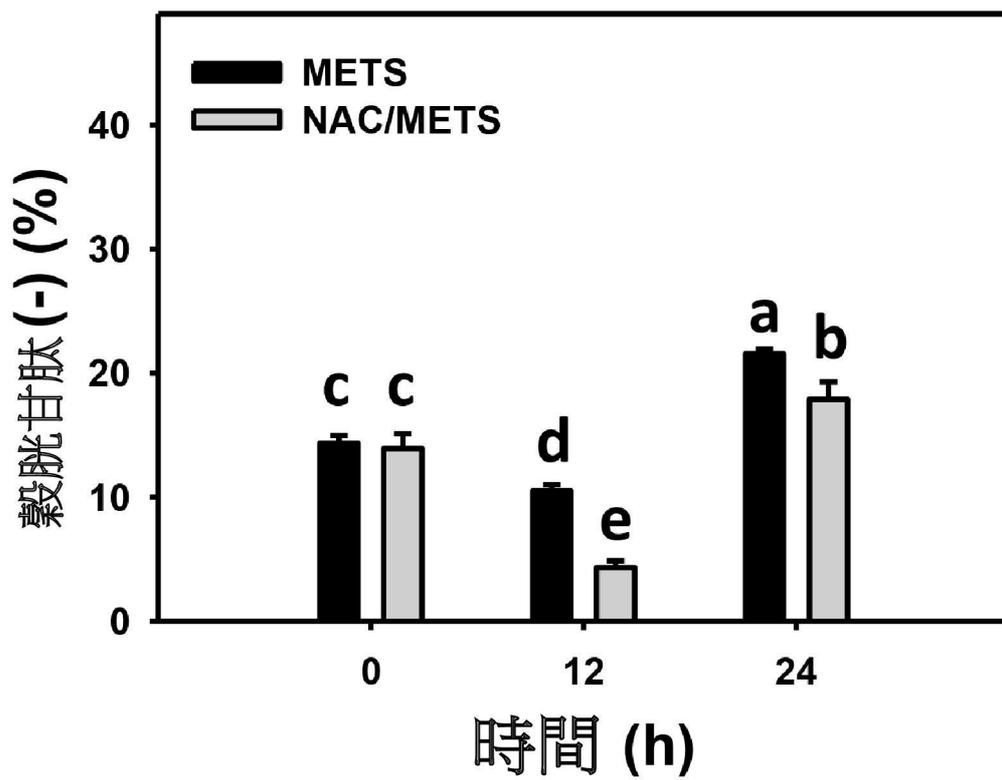
【第 35 圖】



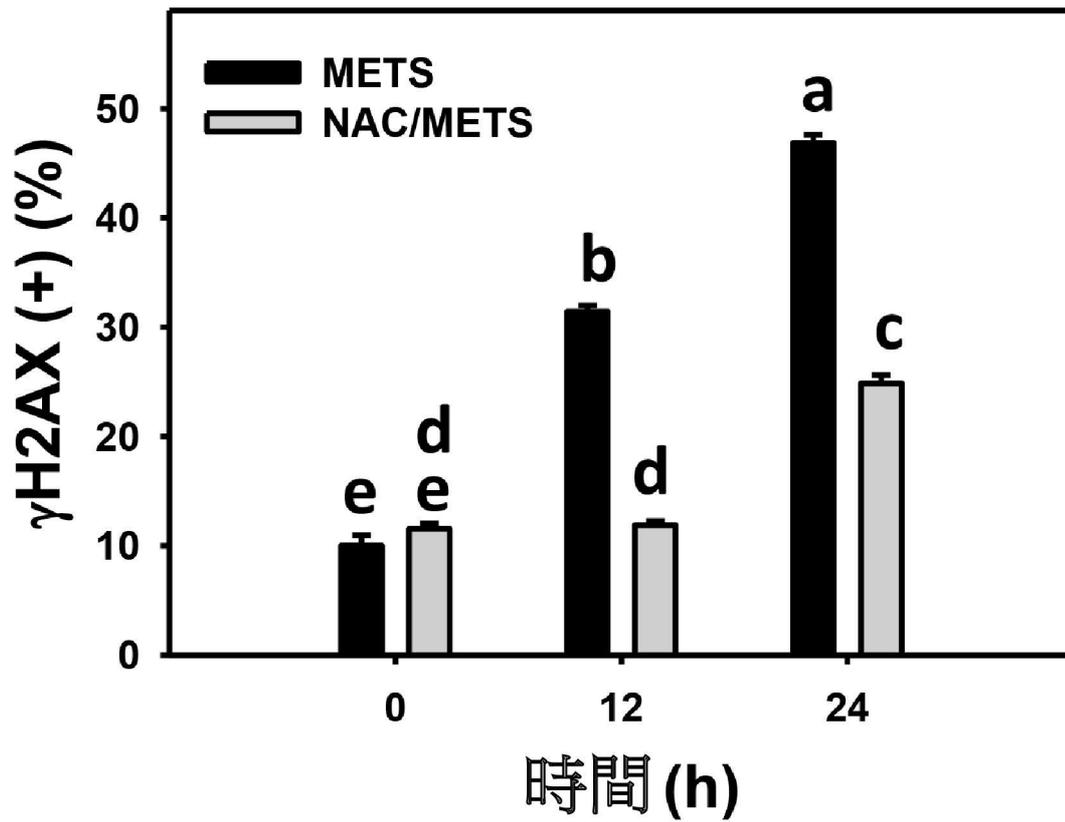
【第 36 圖】



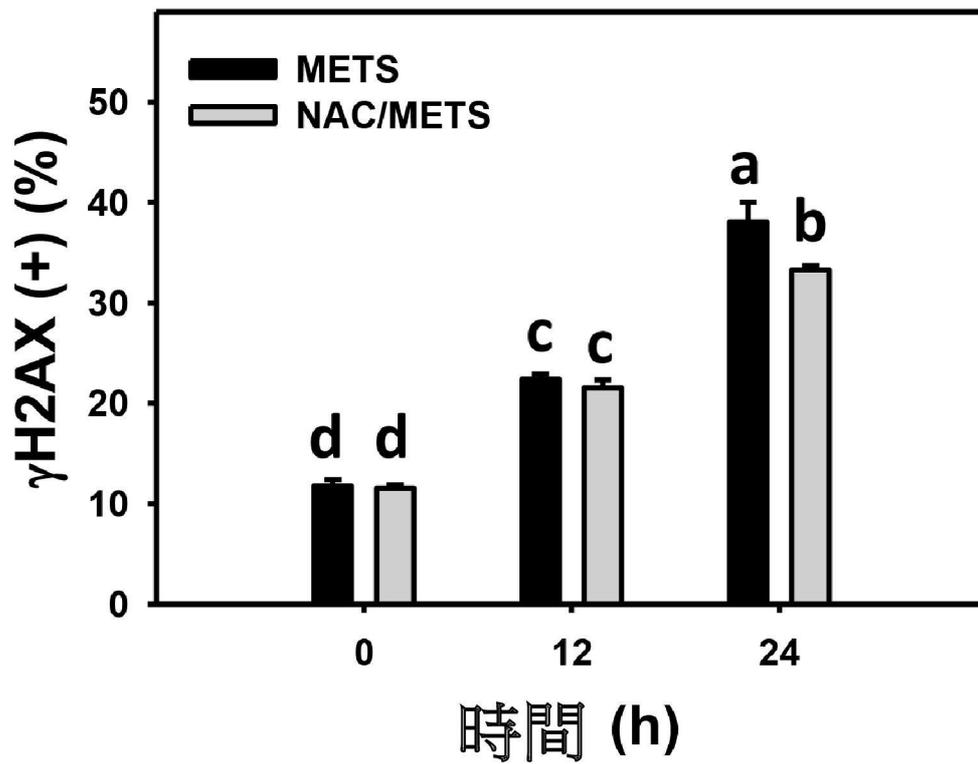
【第 37 圖】



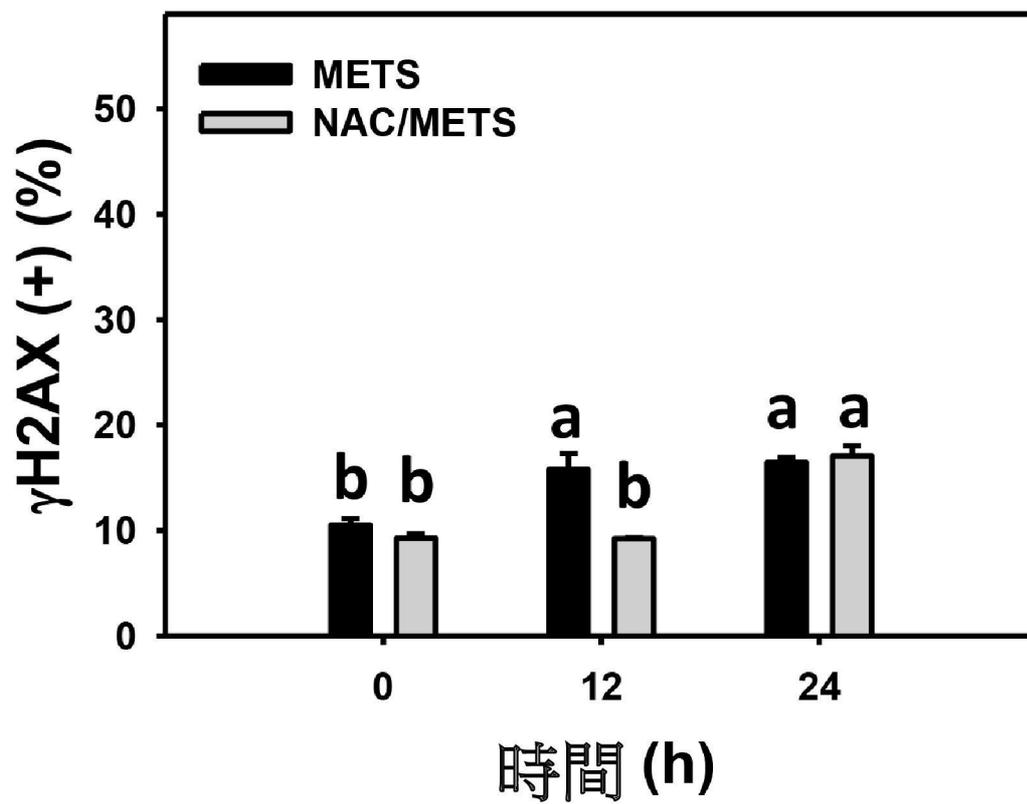
【第 38 圖】



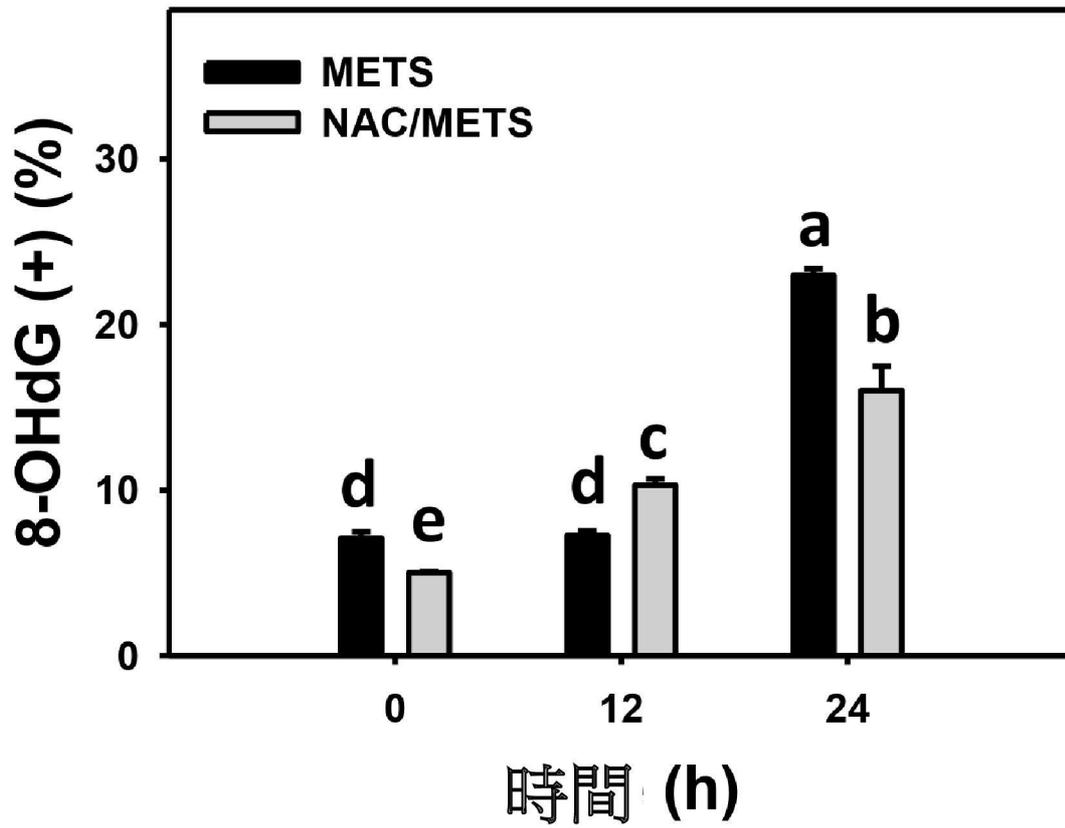
【第 39 圖】



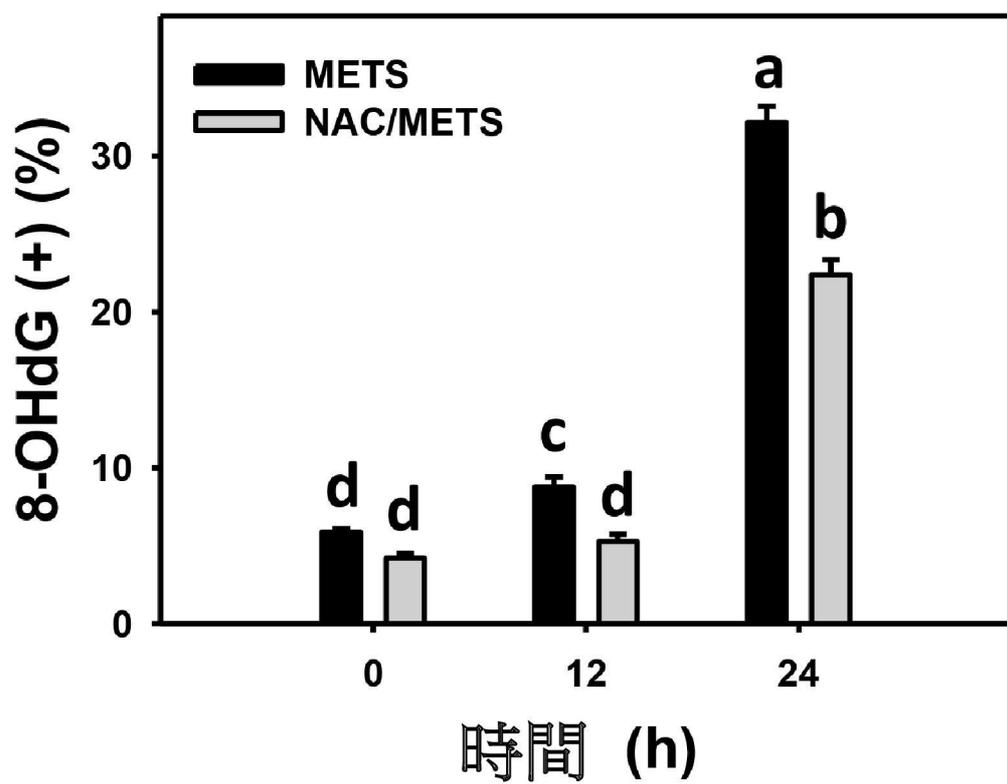
【第 40 圖】



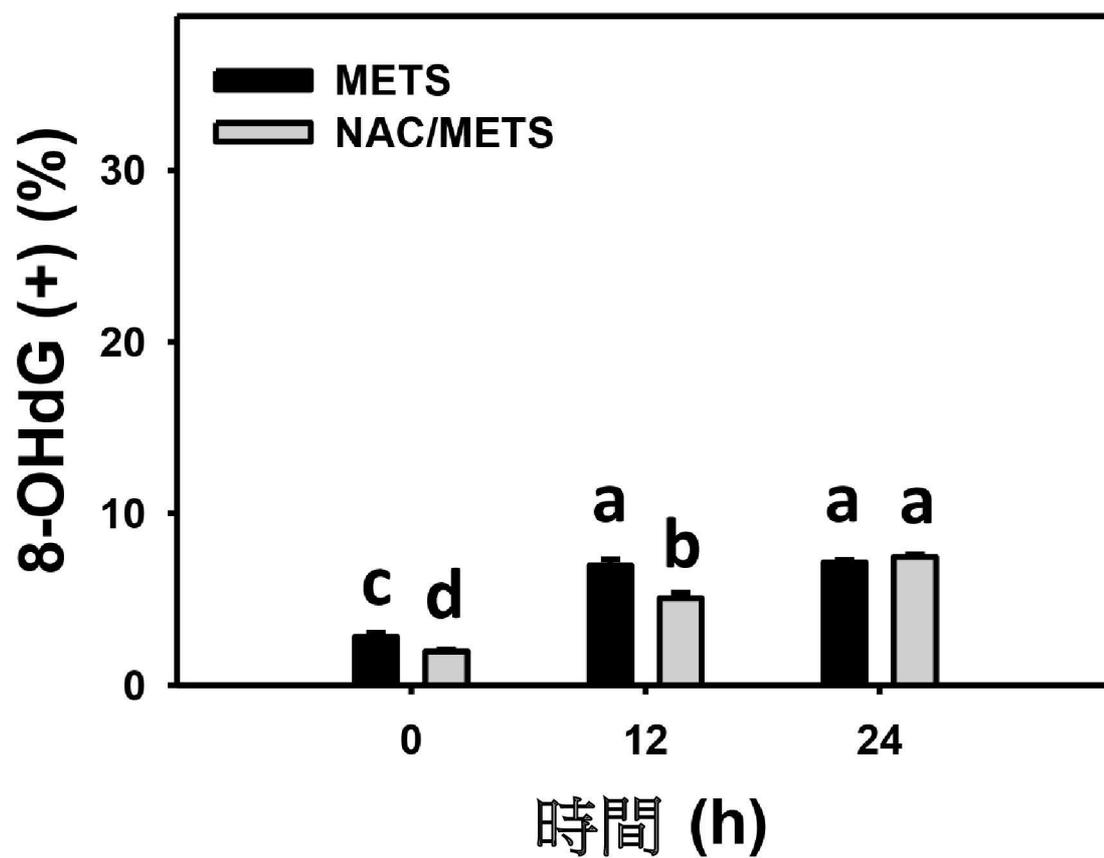
【第 41 圖】



【第 42 圖】



【第 43 圖】



【第 44 圖】