



(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 I458486 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：102106844

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 27 日

(51)Int. Cl. : A61K36/04 (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)；張芳榮 CHANG, FANG RONG (TW)；葉紀禎 YEH, CHI CHEN (TW)；李景欽 LEE, JIN CHING (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

徐年軍等，山東沿海海藻抗腫瘤活性的篩選，海洋與湖沼，2001年，第32卷第4期，第408~413頁。

Meenakshi Sundaram et al.; "Antitumor activity of ethanol extract of Gracilaria edulis (Gmelin) Silva on Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice"; Journal of Chinese Integrative Medicine, 2012, vol. 10, no. 4, pages 430~435.

S. Sasidharan et al.; "In vitro and in situ antiyeast activity of Gracilaria changii methanol extract against Candida albicans"; Eur Rev Med Pharmacol Sci., 2011, vol. 15, no. 9, pages 1020~1026.

審查人員：蔡明秀

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：24 共 0 頁

(54)名稱

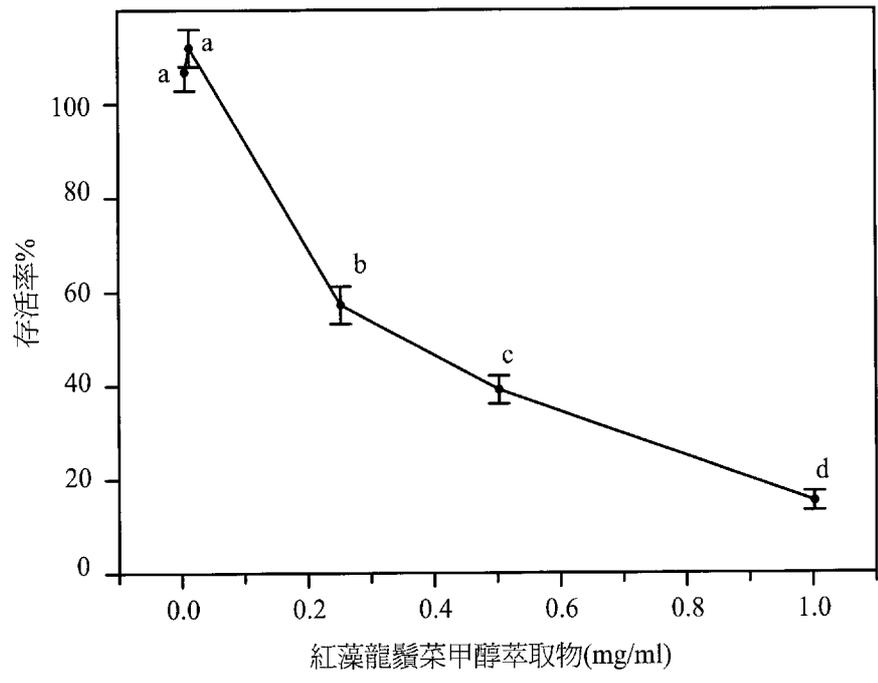
用於抑制癌細胞生長、誘導癌細胞細胞凋亡及／或造成DNA傷害之藥學組成物，以及紅藻龍鬚菜醇類萃取物的用途

CANCER CELL GROWTH INHIBITING, CANCER CELL APOPTOSIS INDUCING AND CANCER CELL DNA DAMAGE CAUSING PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND USES OF GRACILARIA SPP. ALCOHOL EXTRACT

(57)摘要

本發明提供一種抑制癌細胞生長之藥學組成物，其具有抑制癌細胞生長的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜(Gracilaria spp.)之醇類萃取物為活性成分。

The invention provides a cancer cell growth inhibiting pharmaceutical composition, being capable of inhibiting cancer cell growth and comprising an effective amount of Gracilaria spp. alcohol extract as an active ingredient.



第 1A 圖

## 發明摘要

公告本

※ 申請案號： 102106844

※ 申請日：

※IPC 分類： A61K36/04 (2006.01)  
A61P35/00 (2006.01)

【發明名稱】 102. 2. 27

用於抑制癌細胞生長、誘導癌細胞細胞凋亡及/或造成DNA傷害之藥學組成物，以及紅藻龍鬚菜醇類萃取物的用途

Cancer cell growth inhibiting, cancer cell apoptosis inducing and cancer cell DNA damage causing pharmaceutical composition, and uses of *Gracilaria spp.* alcohol extract

## 【中文】

本發明提供一種抑制癌細胞生長之藥學組成物，其具有抑制癌細胞生長的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜 (*Gracilaria spp.*)之醇類萃取物為活性成分。

## 【英文】

The invention provides a cancer cell growth inhibiting pharmaceutical composition, being capable of inhibiting cancer cell growth and comprising an effective amount of *Gracilaria spp.* alcohol extract as an active ingredient.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第( 1A )圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無。

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

用於抑制癌細胞生長、誘導癌細胞細胞凋亡及/或造成DNA傷害之藥學組成物以及紅藻龍鬚菜醇類萃取的用途

Cancer cell growth inhibiting, cancer cell apoptosis inducing and cancer cell DNA damage causing pharmaceutical composition, and uses of *Gracilaria spp.* alcohol extract

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種海藻萃取物，且特別關於一種紅藻龍鬚菜(*Gracilaria spp.*)醇類萃取物，其具有抑制癌細胞生長、誘導癌細胞細胞凋亡以及對癌細胞造成DNA傷害的功效。

## 【先前技術】

【0002】 天然產品 (BMC Cancer 2006, 6:119 ; BMC Cancer 2010, 10:210; BMC Cancer 2008, 8:310; BMC Cancer 2011, 11:360 ; BMC Cancer 2010, 10:46)提供許多可發展出治療多種癌症的藥物的途徑，尤其海洋來源 (Clinical advances in hematology & oncology: H&O 2009,7(6):383-385 ; Nat Rev Drug Discov 2009,8(1):69-85 ; Biochem Pharmacol 2009,78(5):440-448 ; Trends Pharmacol Sci 2010,31(5):225-265)更如是。藻類含有許多具有生物活性的初級或次級代謝物 (Nat Prod Rep 2002,19(1):1-48 ; Mar

Drugs 2011,9(7):1273-1292)且在海洋生藥合成物中佔有約9%(Mar Drugs 2004,2:123-146)。其中，紅藻龍鬚菜屬之生藥合成物已彙整(J Appl Phycol 1995,7:231-243；Int J Mol Sci 2011, 12(7):4550-4573)並以萃取方法分成：水萃(Food Chem 2010,123:395-399；Plant Foods Hum Nutr 2009,64(3):218-223；Fish Shellfish Immunol 2010,28(5-6):887-894)以及甲/乙醇萃(Bioresour Technol 2008,99(8):2717-2723；J Med Food 2010,13(6):1494-1499；J Agric Food Chem 2011,59(10):5589-5594)。這些研究大部分皆聚焦於其促進健康的效果，如抗發炎、抗高血膽固醇(anti-hypercholesterolemic)、抗氧化以及抗菌性質之上。

【0003】而先前研究亦顯示海藻(seaweed)衍生物具有可抑制一些人類癌症細胞株生長的抗癌潛力，包括抑制前髓細胞性白血病細胞株(promyelocytic leukemia cell line) HL-60 (Queiroz, K.C.; Assis, C.F.; Medeiros, V.P.; Rocha, H.A.; Aoyama, H.; Ferreira, C.V.; Leite, E.L. Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells)、紅血球骨髓胚細胞白血病細胞株(erythromyeloblastoid leukemia cell line) K562 (Int J Mol Med, 2004, 14, 925-929)、結腸腺癌細胞株(colon adenocarcinoma cell line) HT-29 (J Med Food, 2007, 10, 587-593)與乳腺癌(breast adenocarcinoma cell line) MCF7 (J Agric Food Chem, 2009, 57, 8677-8682)。海藻萃取物也已顯示具有對抗高膽固醇血症(hypercholesterolemia)與自由基壓力的保護作用(Phytother

Res, 2005, 19, 506-510)並且可促進益生菌(probiotics)的生長(Pak J Pharm Sci, 1991, 4, 49-54)。

【0004】 於臺灣周圍區域所發現的主要海藻種類包括細基龍鬚菜(*Gracilaria tenuistipitata*)、菊花心龍鬚菜(*Gracilaria coforvoides*)、大莖龍鬚菜(*Gracilaria gigas*)、野生長種龍鬚菜(*Gracilaria chorda*)與烏苧龍鬚菜(*Gracilaria compressa*)。來自這些種類之一些的海藻萃取物已被報導具有抗老化活性(*Journal of Plant Diseases and Protection*, 2009, 116, 263-270)且含有胺基酸、脂肪酸、維他命、礦物質、多酚性化合物(poly phenolic compound)與碳水化合物的豐富來源(*Food Control*, 2007, 18, 639-645)。細基龍鬚菜為可食用的且可做為食品與化妝品的成分。其為目前於臺灣所栽培之主要的龍鬚菜種類(林志遠, 國立高雄海洋科技大學水產食品科學研究所碩士學位論文, 2009)。先前報導已顯示細基龍鬚菜具有對高壓蒸氣滅菌(autoclaving)敏感之自由基清除活性(*Plant Foods Hum Nutr*, 2009, 64, 218-223)。

#### 【發明內容】

【0005】 本發明提供一種抑制癌細胞生長之藥學組成物，其具有抑制癌細胞生長的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜(*Gracilaria spp.*)之醇類萃取物為活性成分。

【0006】 本發明亦提供一種紅藻龍鬚菜萃取物用於製備抑制癌細胞生長之藥學組成物的用途。

【0007】 本發明另提供一種誘導癌細胞細胞凋亡及/或

對癌細胞造成DNA傷害之藥學組成物，其具有誘導癌細胞細胞凋亡(apoptosis) 並對癌細胞造成DNA傷害的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜(*Gracilaria spp.*)之醇類萃取物為活性成分。

**【0008】** 本發明更提供一種紅藻龍鬚菜萃取物用於製備誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成DNA傷害之藥學組成物的用途。

### **【圖式簡單說明】**

#### **【0009】**

第1A圖顯示不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物抑制Ca9-22細胞生長並經培養24小時後的情形，其以WST-1試劑組測得之細胞存活率資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間含有相同字母者，其差異不顯著。

第1B圖顯示不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)之紅藻龍鬚菜乙醇萃取物抑制Ca9-22細胞生長的情形，其以MTS試劑組測得之細胞存活率資料以平均值±標準差(n = 6)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著(p<0.05到0.0001)。

第1C圖顯示不同濃度(0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3.5 mg/ml)之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物抑制H1299細胞生長第24小時的情形，其以WST-1試劑組測得之細胞存

活率之資料以平均值±標準差(n = 6)來呈現。

第2圖顯示不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物對於Ca9-22細胞之細胞週期分布變化的影響(第24小時)，其流式細胞分析資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第3A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物處理後第24小時之annexin-V-FITC螢光標記含量的流式細胞分析圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第3B圖顯示annexin-V螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第4A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)乙醇萃取物處理後第24小時之annexin-V-FITC螢光標記含量的流式細胞分析圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第4B圖顯示annexin-V螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第5A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物處理後第24小時之 $\gamma$ -H2AX螢光標記含量的流式細胞分析圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第5B圖顯示  $\gamma$ -H2AX 螢光強度的量化分析，資料以平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第6A圖顯示 Ca9-22 細胞經不同濃度 (0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml) 甲醇萃取物以及  $H_2O_2$  (100  $\mu$  M 作為正控制組) 處理後第24小時之 CMF-DA 螢光標記含量圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第6B圖顯示 CMF-DA 螢光強度的量化分析，資料以平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第6C圖顯示 Ca9-22 細胞經不同濃度 (0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml) 甲醇萃取物以及  $H_2O_2$  (100  $\mu$  M 作為正控制組) 處理後第24小時之 H2DCF-DA 螢光標記含量圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第6D圖顯示 H2DCF-DA 螢光強度的量化分析，資料以平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第7A圖顯示 Ca9-22 細胞經不同濃度 (0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml) 乙醇萃取物以及  $H_2O_2$  (100  $\mu$  M 作為正控制組) 處理後第24小時之 CMF-DA 螢光標記含量圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第7B圖顯示 CMF-DA 螢光強度的量化分析，資料以平

均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第7C圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)乙醇萃取物以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 μ M作為正控制組)處理後第24小時之H<sub>2</sub>DCF-DA螢光標記含量圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第7D圖顯示H<sub>2</sub>DCF-DA螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第8A圖顯示以不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)之紅藻龍鬚菜乙醇萃取物以及1 μ l之500X的TF2-VAD-FMK處理，觀察其Ca9-22細胞之Pan-Caspase活化程度的影響(第24小時)，「陽性%」標於所有圖表中。

第8B圖顯示TF2-VAD-FMK螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

第9A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物處理後第24小時之DiOC<sub>2</sub>(3)螢光標記含量圖，「陽性%」標於所有圖表中。

第9B圖顯示DiOC<sub>2</sub>(3)螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同

字母者，其差異不顯著。

第 10A 圖顯示 Ca9-22 細胞經不同濃度 (0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml) 乙醇萃取物處理後第 24 小時之 DiOC<sub>2</sub>(3) 螢光標記含量圖，「陽性%」以水平線標於所有圖表中。

第 10B 圖顯示 DiOC<sub>2</sub>(3) 螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差 (n = 3) 來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。

### 【實施方式】

【0010】 在本發明一態樣中，本發明提供一種紅藻龍鬚菜 (*Gracilaria spp.*) 醇類萃取物，其具有抑制癌細胞生長的能力。

【0011】 上述之紅藻龍鬚菜可包括細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*)、菊花心龍鬚菜 (*Gracilaria coforvoides*)、大莖龍鬚菜 (*Gracilaria gigas*)、野生長種龍鬚菜 (*Gracilaria chorda*)、東港紗仔龍鬚菜 (*Gracilaria lichenoides*) 或烏苧龍鬚菜 (*Gracilaria compressa*)。上述癌細胞可包括口腔癌細胞、肺癌細胞、乳癌細胞、肝癌細胞、結腸直腸癌細胞、腎癌細胞或胃癌細胞等，但不限於此。

【0012】 獲得本發明紅藻龍鬚菜醇類萃取物的步驟可包括對紅藻龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物為紅藻龍鬚菜萃取物。第一萃取步驟可包括以一醇類來萃取紅藻龍鬚菜。

【0013】 萃取紅藻龍鬚菜所使用之醇類可包括，但不限於甲醇、乙醇、丙醇或其組合。在一實施例中，於第一萃取步驟中所使用之紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜，而所使用之醇類為甲醇。在另一實施例中，於第一萃取步驟中所使用之紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜，而所使用之醇類為乙醇。

【0014】 在一實施例中，於第一萃取步驟中，紅藻龍鬚菜與醇類之比例為約10：1000 (w (g)/v (ml))至50：1000 (w (g)/v (ml))，較佳為約50：1000 (w (g)/v (ml))。

【0015】 在一實施例中，第一萃取步驟的溫度為約15-35℃，較佳為約於室溫下或約24-26℃。又在一實施例中，第一萃取步驟的時間為約15-30小時，較佳為約24小時。

【0016】 在另一實施例中，獲得紅藻龍鬚菜萃取物的步驟可更包括，在獲得上述第一萃取物後，將第一萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中濾液為一第二萃取物並作為本發明之紅藻龍鬚菜萃取物使用。

【0017】 此外，在另一實施例中，獲得紅藻龍鬚菜萃取物的步驟可更包括下述步驟。首先在將上述第一萃取物進行過濾以獲得上述濾液與濾渣之後，對濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中第二萃取步驟包括以一醇類來萃取濾渣。接著，將濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第二濾液。最後將第二濾液與上述第二萃取物混合以獲得一第三萃取物，並將第三萃取物作為本發明之紅藻龍鬚菜醇類萃取物使用。

【0018】 於第二萃取步驟中所使用之醇類可包括，但不

限於甲醇、乙醇、丙醇或其組合。第一萃取步驟與第二萃取步驟中所使用之醇類可為相同或不同。在一實施例中，於第二萃取步驟中所使用之醇類為甲醇。在另一實施例中，於第二萃取步驟中所使用之醇類為乙醇。又在一實施例中，第二萃取步驟的溫度為約 $15^{\circ}\text{C}$  -  $35^{\circ}\text{C}$ ，較佳為約於室溫下或約 $24^{\circ}\text{C}$  -  $26^{\circ}\text{C}$ 。另外，在一實施例中，第二萃取步驟的時間為約15-30小時，較佳為約24小時。

**【0019】** 在又另一實施例中，可進一步將上述所獲得之紅藻龍鬚菜醇類萃取物進行蒸乾處理、減壓濃縮及/或冷凍乾燥。在一實施例中，係對上述所獲得之紅藻龍鬚菜醇類萃取物進行 $35^{\circ}\text{C}$  -  $45^{\circ}\text{C}$ 之蒸乾處理。在另一實施例中，前述溫度較佳約為 $40^{\circ}\text{C}$ 左右。

**【0020】** 在本發明之一態樣中，本發明可提供一種用於抑制癌細胞生長的藥學組成物，其具有抑制癌細胞生長的能力，且此藥學組成物可包括一有效量之上述紅藻龍鬚菜醇類萃取物為活性成分。此外，本發明還可提供一種將上述紅藻龍鬚菜醇類萃取物用於製備抑制癌細胞生長的藥學組成物的用途。

**【0021】** 在一實施例中，上述之抑制癌細胞生長的藥學組成物可更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。藥學上可接受之載體或鹽類可佔上述藥學組成物之0.01 wt%-99.99 wt%，較佳為0.1 wt%-99.9 wt%。

**【0022】** 在一實施例中，紅藻龍鬚菜醇類萃取物還具有誘導癌細胞細胞凋亡的功效及/或對癌細胞造成DNA傷害

的功效。DNA傷害可包括細胞內的DNA傷害。在一實施例中，細胞內的DNA傷害可包括細胞核中之DNA的傷害，例如基因體DNA的傷害，或者於細胞內之其他DNA的傷害，但不限於此。

【0023】 又，在本發明另一態樣中，本發明可提供一種用於誘導癌細胞細胞凋亡的功效及/或對癌細胞造成DNA傷害的藥學組成物，其具有誘導癌細胞細胞凋亡的功效及/或對癌細胞造成DNA傷害的能力，且此藥物可包括一有效量之上述紅藻龍鬚菜醇類萃取物為活性成分。此外，本發明還可提供一種將上述紅藻龍鬚菜醇類萃取物用於製備誘導癌細胞細胞凋亡的功效及/或對癌細胞造成DNA傷害的藥學組成物的用途。

【0024】 在一實施例中，上述之用於誘導癌細胞細胞凋亡的功效及/或對癌細胞造成DNA傷害的藥學組成物可更包括一藥學上可接受之載體或鹽類。藥學上可接受之載體或鹽類可佔上述藥物或保健食品之0.01 wt%-99.99 wt%，較佳為0.1 wt%-99.9 wt%。

【0025】 而上述藥學上可接受之載體可包括，但不限於溶劑、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌與抗真菌試劑與一等滲透壓與吸收延遲(absorption delaying)試劑等與藥學投予相容者。對於不同的給藥方式，可利用一般方法將藥學組合物配置成劑型(dosage form)。

【0026】 前述藥學上可接受之鹽類可包括，但不限於鹽類包括無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，

鹼土金族鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或銳鹽。此外，也可是為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡萄糖胺，胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、組織胺酸、麩胺酸醯胺。

【0027】 前述試劑或藥物之給藥可以口服、非口服、經由吸入噴霧(inhalation spray)或藉由植入貯存器(implanted reservoir)的方式。非口服可包括(subcutaneous)、皮內(intracutaneous)靜脈內(intravenous)、肌肉內(intramuscular)、關節內(intraarticular)動脈(intraarterial)、滑囊(腔)內(intrasynovial)、胸骨內(intrasternal) 蜘蛛膜下腔(intrathecal)、疾病部位內(intraleaional)注射以及灌注技術。

【0028】 藥物口服成分或保健食品的形式可包括，但不限定於，藥錠、膠囊、乳劑(emulsions)、水性懸浮液(aqueous suspensions)、分散液(dispersions)與溶液。

### 【實施例】

#### 材料與方法

##### 1. 未經處理之材料

【0029】 細基龍鬚菜(*Gracilaria tenuistipitata*)為於2009年春季收集自位於臺灣雲林縣口湖鄉海邊的養殖場，並以0℃運送至實驗室。在實驗室中，將海藻以自來水清洗以移除附生植物及鹽分、與雜質與沙。接著將海藻浸泡於蒸餾水中兩次，然後將其冷凍乾燥。將經乾燥的樣本進行研磨

並通過60網目(mesh)篩網。將經冷凍乾燥之樣本磨成細粉並儲存於-40℃。

## 2. 萃取與分離

【0030】 甲醇萃取物：於室溫下，將於前述步驟中所獲得之冷凍乾燥之粉末(50 g)以250ml之甲醇浸濕三次，並以1000 ml之99.9%甲醇於機械震盪器中進行萃取24小時。將萃取物以Whatman No.1 濾紙進行過濾。將濾液置於迴轉蒸發濃縮機 (rotary evaporator) (Buchi Laboratoriums-Technik, Switzerland)中在 $40\pm 2^\circ\text{C}$ 下蒸發至乾燥，且之後將其進行冷凍乾燥。將冷凍乾燥之紅藻龍鬚菜萃取物儲存於一密封之容器於-20℃直到使用。

【0031】 乙醇萃取物：於室溫下，將於前述步驟中所獲得之冷凍乾燥之粉末(50 g)以250ml之乙醇浸濕三次，並以1000 ml之99.9%乙醇於機械震盪器中進行萃取24小時。將萃取物以Whatman No.1 濾紙進行過濾。將濾液置於迴轉蒸發濃縮機 (rotary evaporator) (Buchi Laboratoriums-Technik, Switzerland)中在 $40\pm 2^\circ\text{C}$ 下蒸發至乾燥，且之後將其進行冷凍乾燥。將冷凍乾燥之紅藻龍鬚菜萃取物儲存於一密封之容器於-20℃直到使用。

## 3. 細胞培養

【0032】 將人類口腔癌細胞株 (oral squamous cell carcinoma, OSCC)，Ca9-22細胞培養於添加10%胎牛血清、100 U/ml盤尼西林、100  $\mu\text{g/ml}$ 鏈黴素、0.03%麩胺酸以及1mM丙酮酸鈉的完全DMEM培養基(Gibco, Greenland, NY,

USA)中。將細胞維持於37 °C下含5% CO<sub>2</sub>的潮濕大氣中。

【0033】 將人類肺腺癌細胞株，H1299細胞培養於添加10%胎牛血清、100 U/ml盤尼西林、100 μg/ml鏈黴素以及0.03%麩胺酸的完全RPMI-1640培養基中。將細胞維持於37 °C下含5% CO<sub>2</sub>的潮濕大氣中。

#### 4. 細胞生存能力分析

【0034】 甲醇萃取物處理Ca9-22細胞：將紅藻龍鬚菜甲醇萃取物溶於二甲基亞砷(DMSO)並加入培養基中，並使DMSO之最後濃度少於1%。以WST-1試劑組(Roche)檢測其細胞增殖的情形。將Ca9-22細胞以約為 $1 \times 10^5$ 個/盤之密度塗在96孔盤上，並以將其分別以濃度0 mg/ml、0.01mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物進行處理24小時。在24小時處理並培養後，以每一孔(well)10 μl的量天加WST-1增殖試劑(Roche)並持續在37°C下培養1-2小時。96孔盤將以裸眼觀察顏色差異以區分細胞是否經過紅藻龍鬚菜甲醇萃取物處理。

【0035】 甲醇萃取物處理H1299細胞：將紅藻龍鬚菜甲醇萃取物溶於二甲基亞砷(DMSO)並加入培養基中，並使DMSO之最後濃度少於1%。以前述者進行3-MTS分析(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium)(CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega, Madison, WI, USA)。簡而言之，將H1299細胞以約為 $1 \times 10^5$ 個/盤之密度塗在96孔盤上，並以將其分別以濃度0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3.5

mg/ml之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物進行處理24小時。在處理並培養24小時後，以每孔(well)10  $\mu$  l的方式添加MTS溶液並在37°C下持續培養1-2小時。最後使用96孔盤讀取器(Dynex MRX Model 96, MTX Lab Systems, Inc.)於波長595 nm下測量其吸光值。

【0036】 乙醇萃取物處理Ca9-22細胞：將紅藻龍鬚菜乙醇萃取物溶於二甲基亞砷(DMSO)並加入培養基中，並使DMSO之最後濃度少於1%。以前述者進行3-MTS分析(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium)(CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega, Madison, WI, USA)。簡而言之，將Ca9-22細胞以約為 $1 \times 10^5$ 個/盤之密度塗在96孔盤上，並以將其分別以濃度0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物進行處理24小時。在處理並培養24小時後，以每孔(well)10  $\mu$  l的方式添加MTS溶液並在37°C下持續培養1-2小時。最後使用96孔盤讀取器(Dynex MRX Model 96, MTX Lab Systems, Inc.)於波長595 nm下測量其吸光值。

## 5. 細胞凋亡分析

【0037】 如於*Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 612-616中所述，以annexin-V試劑組(Pharmingen, San Diego, Ca, USA)測試細胞凋亡。簡而言之，以載體或增加之濃度的紅藻龍鬚菜醇類萃取物(甲醇萃取物：0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml；乙醇萃取物：0 mg/ml、

0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml) 處理細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞/petri-dish)，並培養24小時。接著再添加 10  $\mu$ g/ml 之 annexin V-fluorescein isothiocyanate(FITC) 後，使用 FACSCalibur 流式細胞儀分析。annexin-V 之螢光標記含量係代表細胞膜外翻的程度，亦即細胞凋亡。

#### 6. 細胞週期頻度分佈分析 (cell cycle distribution)

**【0038】** 以 0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 之上述紅藻龍鬚菜甲醇萃取物處理之細胞培養基培養24小時。在經胰蛋白酶處理後，收集細胞，並以 PBS 緩衝溶液清洗兩次，且隔夜浸泡於 70% 乙醇中以將其進行固定。之後將內含細胞之 70% 乙醇離心以獲得細胞沈澱。再將細胞懸浮於含有碘化丙啶 (10  $\mu$ g/ml) (Sigma, St Louis, MO) 與 RNase A (10  $\mu$ g/ml) 之 PBS 緩衝溶液中以進行染色。在於黑暗中室溫下培養 15 分鐘後，以 FACSCalibur 流式細胞儀 (Becton-Dickinson, Mansfield, MA) 及 Win-MDI 軟體 2.9 版 (<http://facs.scripps.edu/wm29w98.exe>) 來分析細胞。

#### 7. 配合 $\gamma$ -H2AX 抗體標記之流式細胞分析

**【0039】** 分別將 0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 紅藻龍鬚菜醇類萃取物處理之細胞培養基固定於 70% 乙醇中並以 BSA-PBST 溶液 (牛血清白蛋白 1%、溶於 PBS 中之聚乙二醇辛基苯基醚 0.2%；Sigma) 清洗兩次，並在含有 2  $\mu$ g 的 p-Histone H2A.X 單株抗體 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 之 BSA-PBST 溶液於 4°C 下隔夜培養後，再以 BSA-PBST 溶液清洗兩次後，懸浮在稀釋 100 倍

之 Alexa Fluor 488-tagged 二次抗體 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) 中 1 小時後，再以 BSA-PBST 溶液清洗兩次後，重新懸浮於 PBS 中，並使用 FACSCalibur 流式細胞儀分析。 $\gamma$ -H2AX 標記可視為 DNA 雙股斷裂的指標。

#### 8. 以流式細胞分析法檢測胞內活性氧物質 (ROS)

【0040】 利用專一性標記 2',7'-二氯二氫螢光素乙醯乙酸 (2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate, H2DCF-DA) 標定活性氧物質後進行流式細胞分析。簡而言之，分別將 0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 紅藻龍鬚菜甲醇萃取物處理之細胞，以及 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml 紅藻龍鬚菜乙醇萃取物處理之細胞，以 PBS 清洗兩次後加入含有 10  $\mu$  M 之 H2DCF-DA 的 PBS，於 CO<sub>2</sub> 之 37°C 環境下培養 30 分鐘並收集細胞，以 PBS 清洗之兩次後離心，再懸浮於 PBS 中並立即以 FACSCalibur 分析，將激發光波長設定為 480nm、發散光波長設定為 525nm。

#### 9. 以流式細胞分析法檢測胞內穀胱甘肽 (GSH)

【0041】 利用專一性標記 5-氯甲基螢光素二醋酸酯 (5-chloromethylfluorescein diacetate, CMF-DA) 測量胞內穀胱甘肽後進行流式細胞分析。簡而言之，分別將 0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 紅藻龍鬚菜甲醇萃取物，以及 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml 紅藻龍鬚菜乙醇萃取物處理之細胞以 5  $\mu$  M 之 CMF-DA 於 CO<sub>2</sub> 之 37°C 環境下培養 20 分鐘並收集細

胞，以PBS清洗後離心收集細胞，再以FACSCalibur分析。

#### 10. Pan-Caspase活性檢測

【0042】 透過泛胱天蛋白酶類 (Pan-Caspase) 活性試劑組 (Abcam, Cambridge, UK) 測量泛胱天蛋白酶類 (Caspase 1、3、4、5、6、7、8、9) 的活化情形與紅藻龍鬚菜乙醇萃取物之關聯性。大部分的胱天蛋白酶皆對 Val-Ala-Asp (VAD) 肽序列有受質選擇性 (substrate selectivity)。因此可使用能通過細胞並對活化之 caspase 產生不可逆結合的 TF2-VAD-FMK 作為報導序列，其無毒且具有螢光。簡而言之，將 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml 紅藻龍鬚菜乙醇萃取物處理之細胞懸浮於 37°C、0.5 ml 之培養基中，使細胞密度約  $1 \times 10^6$  細胞/ml 並再加入 500X 之 TF2-VAD-FMK 共  $1 \mu\text{l}$ ，在  $\text{CO}_2$  之 37°C 環境下培養 1 小時，以 PBS 清洗 2 次再立刻懸浮於試劑組之緩衝溶液中進行激發光波長 480 nm、發散光波長 525 nm 之流式細胞分析。

#### 11. 粒線體膜電位分析

【0043】 利用 MitoProbe<sup>TM</sup> DiOC<sub>2</sub>(3) 試劑組 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) 分析粒線體膜電位。簡而言之，分別將 0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml 紅藻龍鬚菜甲醇萃取物，以及 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml、2.5 mg/ml 紅藻龍鬚菜乙醇萃取物處理之細胞懸浮於 37°C、1 ml 之培養基中，使細胞密度約  $1 \times 10^6$  細胞/ml 並再加入 10  $\mu\text{M}$  DiOC<sub>2</sub> 共  $5 \mu\text{l}$ ，在  $\text{CO}_2$  之 37°C 環境下培養 20-30 分鐘後收集細胞並以 PBS 清洗，再重懸浮

於PBS中進行激發光波長480nm、發散光波長525nm之流式細胞分析。

## 12. 統計分析

【0044】 所有資料以平均值±標準差來呈現。使用 one-way ANOVA與Tukey's HSD Post Hoc Test(軟體為JMP® 9)來測試於群組間的平均值差異。各群組間字母不同者代表顯著差異( $p < 0.05$ )，若具有至少一個字母相同者，則不具有顯著差異。

## 結果

1. 海龍鬚菜醇類萃取物濃度的增加使癌細胞生存能力降低

【0045】 如第1A、1B與第1C圖所示，試驗結果顯示出醇類萃取物有效降低癌細胞存活率，並且具有濃度依賴效應。第1A圖顯示以濃度為0 mg/ml、0.01 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml之甲醇萃取物處理之Ca9-22細胞，24小時後其細胞存活率分別為 $100 \pm 2.1\%$ 、 $106.1 \pm 4.3\%$ 、 $55.5 \pm 4.1\%$ 、 $37.4 \pm 2.5\%$ 、 $14.2 \pm 1.1\%$  ( $n=5$ ; mean  $\pm$  SD)，隨甲醇萃取物濃度上升而顯著地減少，其具有濃度效應( $p < 0.05$ )，第24小時之 $IC_{50}$ 值為0.326 mg/ml。第1B圖顯示以濃度為0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml、2 mg/ml的乙醇萃取物處理之Ca9-22細胞，24小時後其細胞存活率分別為 $100.0 \pm 2.8\%$ 、 $106.7 \pm 2.2\%$ 、 $85.5 \pm 1.2\%$ 、 $57.5 \pm 0.4\%$ 、 $16.8 \pm 1.1\%$  ( $n=6$ )，隨乙醇萃取物濃度上升而顯著地減少，

其具有濃度效應 ( $p < 0.0001$ )，第 24 小時之  $IC_{50}$  值為 1.632 mg/ml。第 1C 圖顯示以濃度為 0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3.5 mg/ml 的甲醇萃取物處理之 H1299 細胞，24 小時後其細胞存活率為  $80.5 \pm 4.1\%$ 、 $66.8 \pm 2.2\%$ 、 $53.6 \pm 4.9\%$ 、 $37.1 \pm 5.2\%$  ( $n=6$ )，第 24 小時之  $IC_{50}$  值為 2.346 mg/ml。結果顯示，隨著海龍鬚菜甲醇萃取物濃度提高，癌細胞存活率越低。

2. 海龍鬚菜醇類萃取物濃度的增加使 Sub-G1 細胞的含量增加

【0046】 細胞週期中，G1 時期下細胞主要進行生長，到 S 時期，DNA 開始準備合成，G2 則準備分裂，其中 G1 時期另分有一時期稱作 Sub-G1，若細胞週期停留在 Sub-G1 時期，即是處於將要凋亡的狀態。所以當 Sub-G1 在流式細胞分析中有所增加，即指，測定物之部分細胞族群已趨向細胞凋亡。藉由流式細胞技術分析在 0-1 mg/ml 之紅藻龍鬚菜甲醇萃取物 (0 mg/ml、0.01 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml) 處理下第 24 小時之 Ca9-22 細胞的細胞週期分佈。如第 2 圖所示，在 0-0.25 mg/ml 處理下之細胞，其 G1 比例顯著增加並導致 G1 期阻滯 (G1 arrest)，而在濃度大於 0.5 mg/ml 之處理下，G1 之細胞顯著減少 ( $p < 0.0005$ )。此外在 0.25 mg/ml 處理下之 Sub-G1 稍減少，在 0.5 mg/ml 處理下之 Sub-G1 適中地增加，而在 1 mg/ml 處理下之 Sub-G1 則顯著增加。隨著海龍鬚菜甲醇萃取物濃度的遞增使細胞週期 Sub-G1 的含量亦遞增，並同時其餘細胞時期的含量皆遞減，其具有濃度依賴效應 ( $p < 0.0005$ )。此結果指出紅藻龍鬚

菜醇類萃取物具有抑制癌細胞週期進行的能力。

### 3. 海龍鬚菜醇類萃取物誘發細胞凋亡

【0047】 Annexin-V為一種磷脂結合蛋白，故若以之作爲標記可知測定細胞族群之細胞膜外翻程度，而細胞膜外翻則爲細胞凋亡的一種指標。第3A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物處理後第24小時之annexin-V-FITC螢光標記含量的流式細胞分析圖，陽性%標於所有圖表中。第3B圖顯示annexin-V螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差( $n = 3$ )來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。第4A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)乙醇萃取物處理後第24小時之annexin-V-FITC螢光標記含量的流式細胞分析圖，陽性%標於所有圖表中。第4B圖顯示annexin-V螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差( $n = 3$ )來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。又，在經上述24小時各濃度的甲醇與乙醇萃取物處理後，發現annexin-V之螢光含量具有顯著的濃度效應(甲醇： $p < 0.001$ ；乙醇： $p < 0.05$ 至 $0.0001$ )。顯示海龍鬚菜醇類萃取物具有誘發細胞凋亡的能力。

### 4. 海龍鬚菜醇類萃取物誘發癌細胞之雙股螺旋斷裂 (DNA double strand break)

【0048】 以 $\gamma$ -H2AX抗體作爲標記測定雙股螺旋斷裂，其螢光含量越高代表雙股螺旋斷裂越多。第5A圖顯

示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物處理後第24小時之 $\gamma$ -H2AX抗體螢光標記含量的流式細胞分析圖，陽性%標於所有圖表中。第5B圖顯示 $\gamma$ -H2AX螢光強度的量化分析，資料以平均值 $\pm$ 標準差(n=3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著(p<0.05)，所示為Ca9-22細胞經載劑控制組與不同濃度甲醇萃取物處理後第24小時之統計結果。 $\gamma$ -H2AX螢光標記含量隨萃取物濃度(0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml, n=3)遞增，也具有濃度依賴效應(p<0.05)。此結果顯示海龍鬚菜醇類萃取物具有對癌細胞造成DNA傷害的能力。

#### 5. 海龍鬚菜醇類萃取物影響癌細胞內ROS與GSH之消長

【0049】 活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)係由細胞代謝或環境之自由基壓力引起，且被認為是引發細胞老化之一貢獻因子；而穀胱甘肽(GSH)是人體最主要的抗氧化物；故當ROS增加而GSH減少時將促使細胞老化而凋亡；當ROS減少而GSH增加則代表細胞的老化速度趨緩而存活。利用專一螢光標記ROS、GSH配合流式細胞分析儀檢測，結果如第6A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100  $\mu$  M作為正控制組)處理後第24小時之CMF-DA螢光標記含量圖，陽性%標於所有圖表中。第6B圖顯示CMF-DA螢光強度的量化分析，資料以平均值 $\pm$ 標準差(n=3)

來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。第6C圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml)甲醇萃取物以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 μ M作為正控制組)處理後第24小時之H<sub>2</sub>DCF-DA螢光標記含量圖，陽性%標於所有圖表中。第6D圖顯示H<sub>2</sub>DCF-DA螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。第7A圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)乙醇萃取物以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 μ M作為正控制組)處理後第24小時之CMF-DA螢光標記含量圖，陽性%標於所有圖表中。第7B圖顯示CMF-DA螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。第7C圖顯示Ca9-22細胞經不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)乙醇萃取物以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 μ M作為正控制組)處理後第24小時之H<sub>2</sub>DCF-DA螢光標記含量圖，陽性%標於所有圖表中。第7D圖顯示H<sub>2</sub>DCF-DA螢光強度的量化分析，資料以平均值±標準差(n = 3)來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。由結果發現加入海龍鬚菜甲醇萃取物不同劑量(0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL) 24小時之後，Ca9-22細胞之ROS的含量明顯增加(p<0.0001)，而GSH含量明顯下降(p<0.05)，而加入海龍鬚菜乙醇萃取物不同劑量(0 mg/ml、0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL、2

mg/mL、2.5 mg/ml) 24小時之後，亦如是，Ca9-22細胞之ROS的含量明顯增加( $p < 0.0001$ )，而GSH含量明顯下降( $p < 0.01$ )。此結果顯示海龍鬚菜醇類萃取物具有促使癌細胞趨於老化的能力。

#### 6. 海龍鬚菜醇類萃取物誘發泛胱天蛋白酶類的活化

**【0050】** 泛胱天蛋白酶類(Pan-Caspase)與細胞凋亡高度相關，其在活化狀態下主導一系列細胞凋亡所需之程序。此處利用一種泛用的胱天蛋白酶抑制劑作為標記進行流式細胞分析，來檢驗海龍鬚菜醇類萃取物與泛胱天蛋白酶類之間的關係。結果如第8A圖顯示以不同濃度(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml 0-2.5 mg/ml)之紅藻龍鬚菜乙醇萃取物以及 $1 \mu\text{l}$ 之500X的TF2-VAD-FMK處理，觀察對於其Ca9-22細胞之Pan-Caspase活化程度的影響(第24小時)，陽性%標於所有圖表中。第8B圖顯示TF2-VAD-FMK螢光強度的量化分析，資料以平均值 $\pm$ 標準差( $n = 3$ )來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著，在0-2 mg/ml之紅藻龍鬚菜乙醇萃取物(0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)處理下第24小時之Ca9-22細胞中的泛胱天蛋白酶類活化情形與萃取物濃度具有顯著的濃度依賴效應( $p < 0.0001$ )，呈正向成長。此結果顯示海龍鬚菜醇類萃取物具有誘導癌細胞細胞凋亡發生的能力。

#### 7. 海龍鬚菜醇類萃取物致癌細胞粒線體膜電位下降

**【0051】** 粒線體內の間質具有多種物質如cytochrome c

和 apoptosis-inducing factor (AIF)，能夠活化 caspase 而引起一連串細胞凋亡的現象發生。當粒線體表面之 mitochondrial permeability transition pore (PT pore) 這種巨大通道打開後會造成粒線體內膜兩側之  $H^+$  濃度梯度消失、粒線體膜電位下降、間質滲透壓增高，而粒線體漲大，外膜漲破之後，cytochrome c 和 AIF 則釋放到細胞基質中造成細胞凋亡。因此，粒線體膜電位下降是細胞凋亡的重要指標。此處利用一種親脂性的螢光染料  $DiOC_2(3)$  作為標記進行流式細胞分析，來檢驗海龍鬚菜醇類萃取物與粒線體膜電位之間的關係。結果如第 9A 圖顯示 Ca9-22 細胞經不同濃度 (0mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1 mg/ml) 甲醇萃取物處理後第 24 小時之  $DiOC_2(3)$  螢光標記含量圖，陽性 % 標於所有圖表中。第 9B 圖顯示  $DiOC_2(3)$  螢光強度的量化分析，資料以平均值  $\pm$  標準差 ( $n = 3$ ) 來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著。第 10A 圖顯示 Ca9-22 細胞經不同濃度 (0mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml) 乙醇萃取物處理後第 24 小時之  $DiOC_2(3)$  螢光標記含量圖，陽性 % 以水平線標於所有圖表中。第 10B 圖顯示  $DiOC_2(3)$  螢光強度的量化分析，資料以平均值  $\pm$  標準差 ( $n = 3$ ) 來呈現，群組間各條狀柱含有相同字母者，其差異不顯著，當萃取物濃度越高的狀況下， $DiOC_2(3)$  含量越低，即粒線體膜電位下降幅度越大，具有濃度效應 (甲醇： $p < 0.05$ ；乙醇： $p < 0.005$ )。此結果顯示海龍鬚菜醇類萃取物具有促使癌細胞細胞凋亡的能力。

## 討論

【0052】 於本發明中研究紅藻龍鬚菜醇類萃取物抑制癌細胞生長的能力，更包括紅藻龍鬚菜醇類萃取物誘導癌細胞細胞凋亡並造成癌細胞DNA傷害的能力。另外本發明中亦研究出紅藻龍鬚菜醇類萃取物與抑制癌細胞生長或造成細胞凋亡及DNA傷害的程度具有濃度效應。

【0053】 本發明中，以細胞存活率觀察紅藻龍鬚菜醇類萃取物抑制癌細胞生長的能力；藉由細胞週期分布及annexin-V評估此類萃取物誘導癌細胞細胞凋亡的能力；藉由 $\gamma$ -H2AX抗體調查其造成DNA傷害的效果；以ROS及GSH的含量估測其造成自由基壓力的情況；利用DiOC<sub>2</sub>(3)染劑探尋此種萃取物與粒線體膜電位去極化之間的關係。並以前述實施例的結果可知，紅藻龍鬚菜醇類萃取物係透過誘發癌細胞之細胞凋亡、DNA傷害以及自由基壓力的途徑達到抑制癌症的效果。

【0054】 大致上，目前實施例之中的紅藻龍鬚菜醇類萃取物所使用的濃度近似於其他癌症治療研究中所使用之天然萃取物的濃度範圍。另外，紅藻龍鬚菜醇類萃取物對於Ca9-22細胞之IC<sub>50</sub>值(50%抑制濃度)範圍，如紅藻龍鬚菜甲醇萃取物為326  $\mu$ g/ml(24小時)，亦近似於一般癌症治療所使用之天然產品，如*Cassia tora*葉之甲醇萃取物對HeLa細胞之IC<sub>50</sub>為191  $\mu$ g/ml(48小時)(*Toxicol In Vitro* 2009, 23(6):1034-1038)。因此，由上述結果可知，紅藻龍鬚菜醇類萃取物在於癌症治療上，有成為化療用天然藥物的潛力。

【0055】 考慮到海藻之快速的生長速度及海藻萃取物於食品與化妝品工業的廣泛使用，因此本發明之紅藻龍鬚茶醇類萃取物在這些應用中表現出吸引人之多功能選擇。

【0056】 雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，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內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

#### 【符號說明】

【0057】

無。

103年6月25日修(更)正本

## 申請專利範圍

1. 一種用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其具有抑制癌細胞生長的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜 (*Gracilaria spp.*)之甲醇或乙醇萃取物為活性成分，其中該紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*)，該癌細胞為口腔癌細胞或肺部癌細胞，其中該甲醇或乙醇萃取物之濃度為0.5~3.5 mg/ml。
2. 如申請專利範圍第1項所述之用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其中獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟包括對該紅藻龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物，而該第一萃取步驟包括以一甲醇或乙醇來萃取該紅藻龍鬚菜。
3. 如申請專利範圍第2項所述之用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其中該第一萃取步驟於室溫下進行。
4. 如申請專利範圍第1項所述之用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其中該萃取步驟的時間為約15-30小時。
5. 如申請專利範圍第2項所述之用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其中該獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟更包括：  
將該第一萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第二萃取物。
6. 如申請專利範圍第2項所述之用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其中該獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟更包括：

對該濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中該第二萃取步驟包括以一甲醇或乙醇於室溫來萃取該濾渣；

將該濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第二濾液；以及將該第二濾液與該第二萃取物混合以獲得一第三萃取物。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之用於抑制癌細胞生長之藥學組成物，其中該獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟更包括進行一第三萃取步驟：

將該第二萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第三萃取物；以及

乾燥該第三萃取物，其係於 35°C -45°C 下蒸乾處理。

8. 一種紅藻龍鬚菜之甲醇或乙醇萃取物用於製備抑制癌細胞生長之藥學組成物的用途，其中該紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*)，該癌細胞為口腔癌細胞或肺部癌細胞。

9. 一種用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其具有誘導癌細胞細胞凋亡 (apoptosis) 並對癌細胞造成 DNA 傷害的能力且包括一有效量之紅藻龍鬚菜 (*Gracilarias spp.*) 之甲醇或乙醇萃取物為活性成分，其中該紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*)，該癌細胞為口腔癌細胞或肺部癌細胞，其中該甲醇或乙醇萃取物之濃度為 0.5~3.5 mg/ml。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其中獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟包括對該紅藻龍鬚菜進行一第一萃取步驟以獲得一第一萃取物，而該第一萃取步驟包括以一甲醇或乙醇來萃取該紅藻龍鬚菜。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其中該第一萃取步驟於室溫下進行。
12. 如申請專利範圍第 9 項所述之用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其中該萃取步驟的時間為約 15-30 小時。
13. 如申請專利範圍第 10 項所述之用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其中該獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟更包括：  
將該第一萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第二萃取物。
14. 如申請專利範圍第 10 項所述之用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其中該獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟更包括：  
對該濾渣進行一第二萃取步驟以獲得一濾渣之萃取物，其中該第二萃取步驟包括以一甲醇或乙醇於室溫來萃取該濾渣；  
將該濾渣之萃取物進行過濾以獲得一第二濾液；以及  
將該第二濾液與該第二萃取物混合以獲得一第三萃取

物。

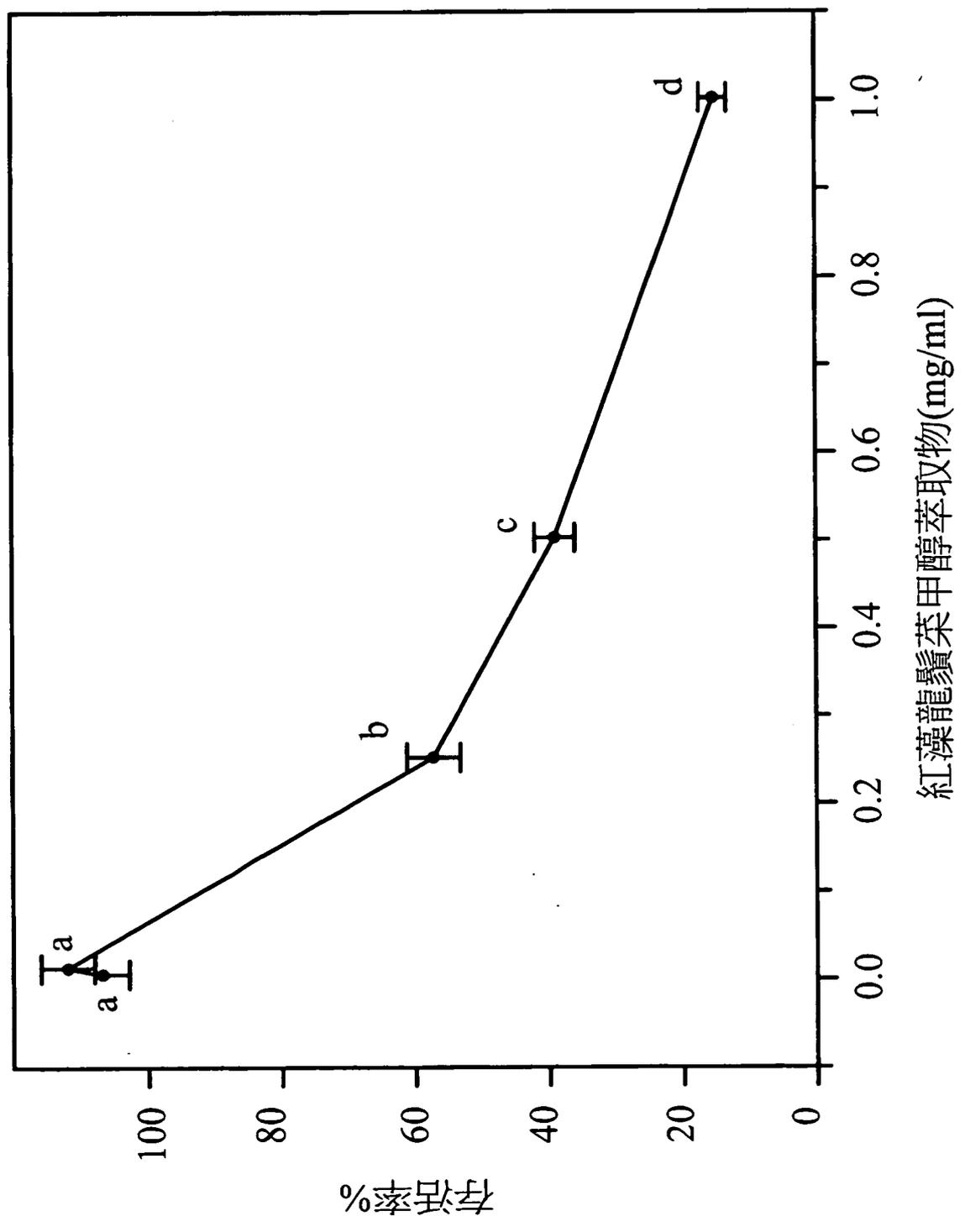
15. 如申請專利範圍第 14 項所述之用於誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物，其中該獲得該紅藻龍鬚菜萃取物的步驟更包括進行一第三萃取步驟：

將該第二萃取物進行過濾以獲得一濾液與一濾渣，其中該濾液為一第三萃取物；以及

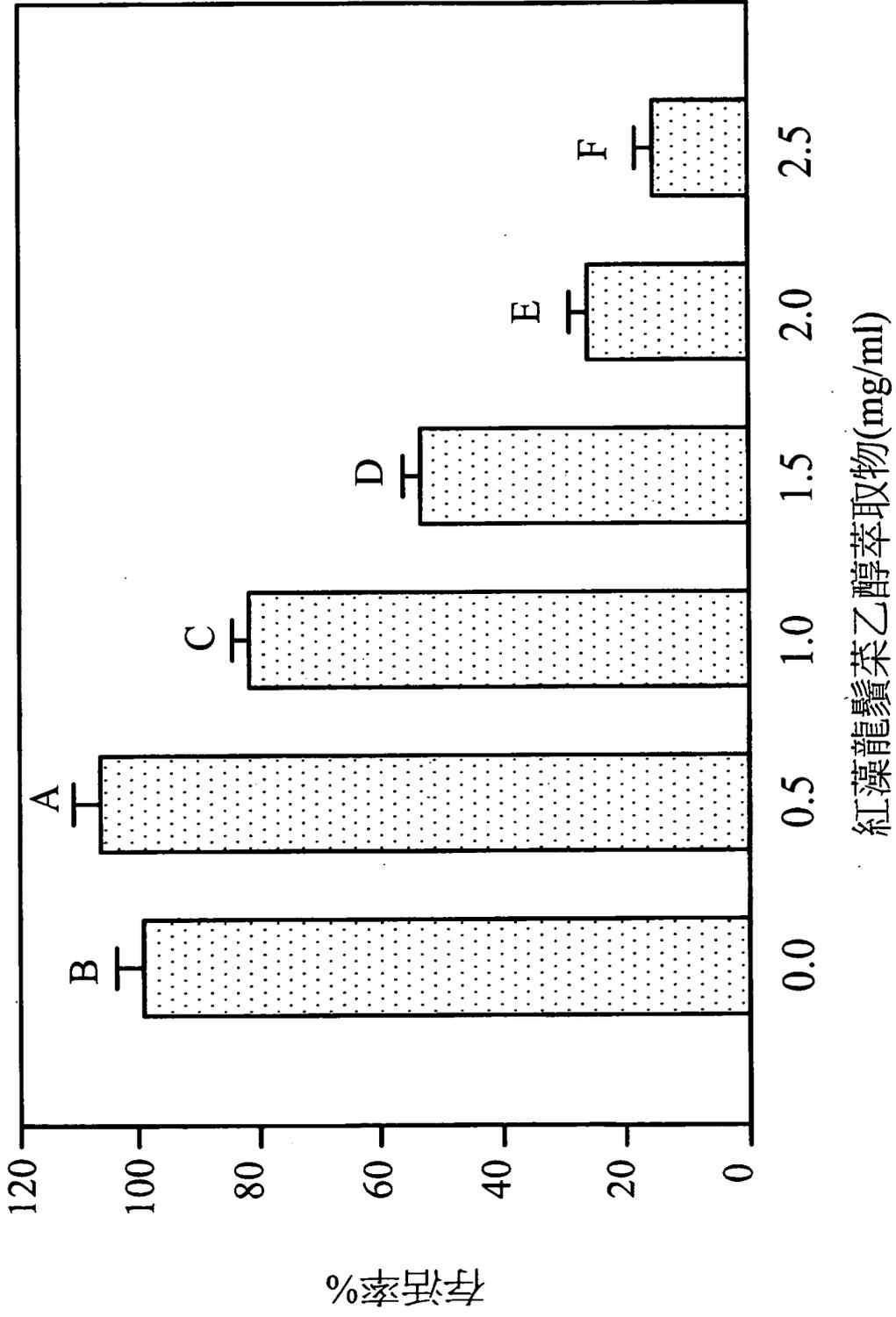
乾燥該第三萃取物，其係於 35°C -45°C 下蒸乾處理。

16. 一種紅藻龍鬚菜之甲醇或乙醇萃取物用於製備誘導癌細胞細胞凋亡及/或對癌細胞造成 DNA 傷害之藥學組成物的用途，其中該紅藻龍鬚菜為細基龍鬚菜 (*Gracilaria tenuistipitata*)，該癌細胞為口腔癌細胞或肺部癌細胞。

圖式

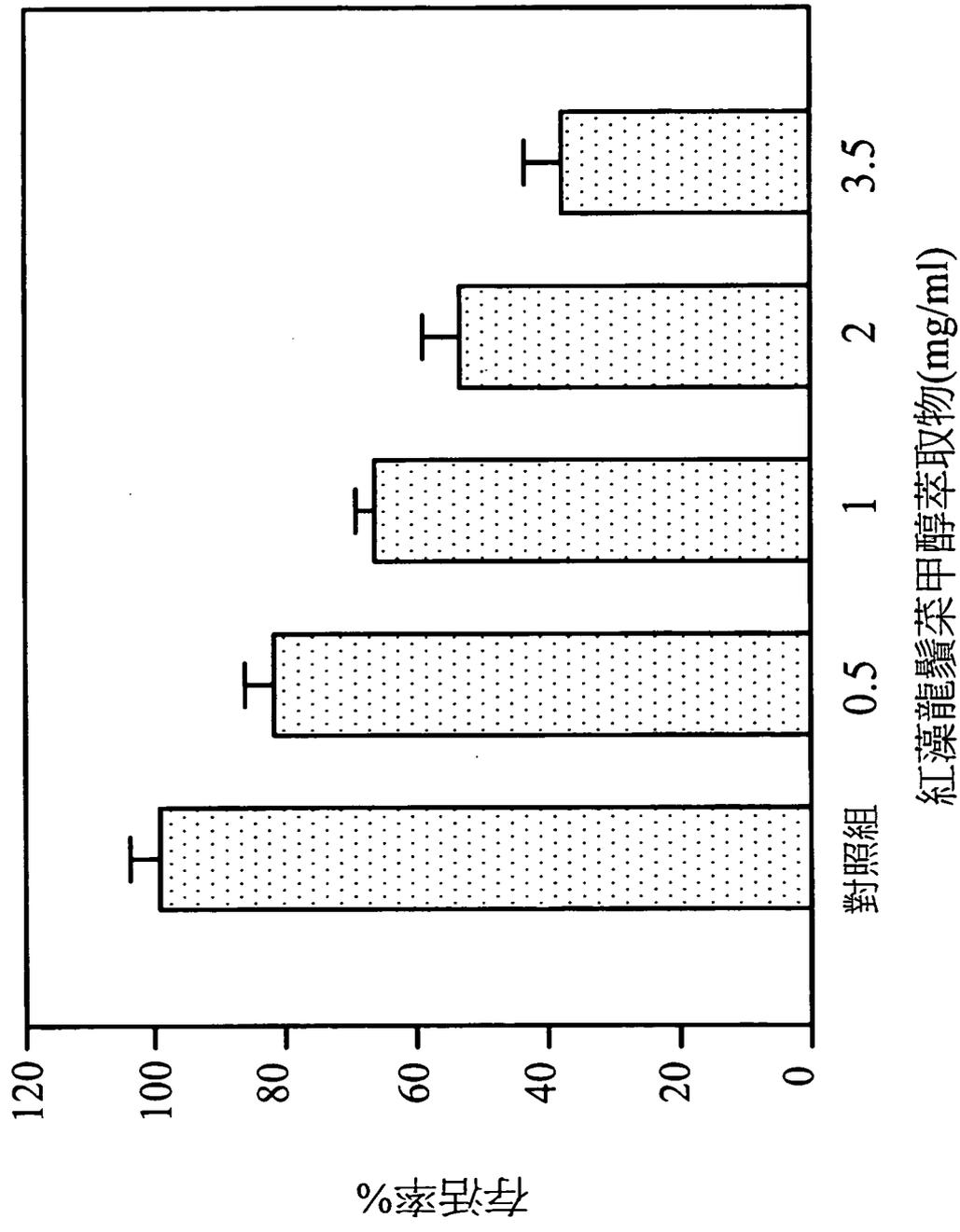


第 1A 圖

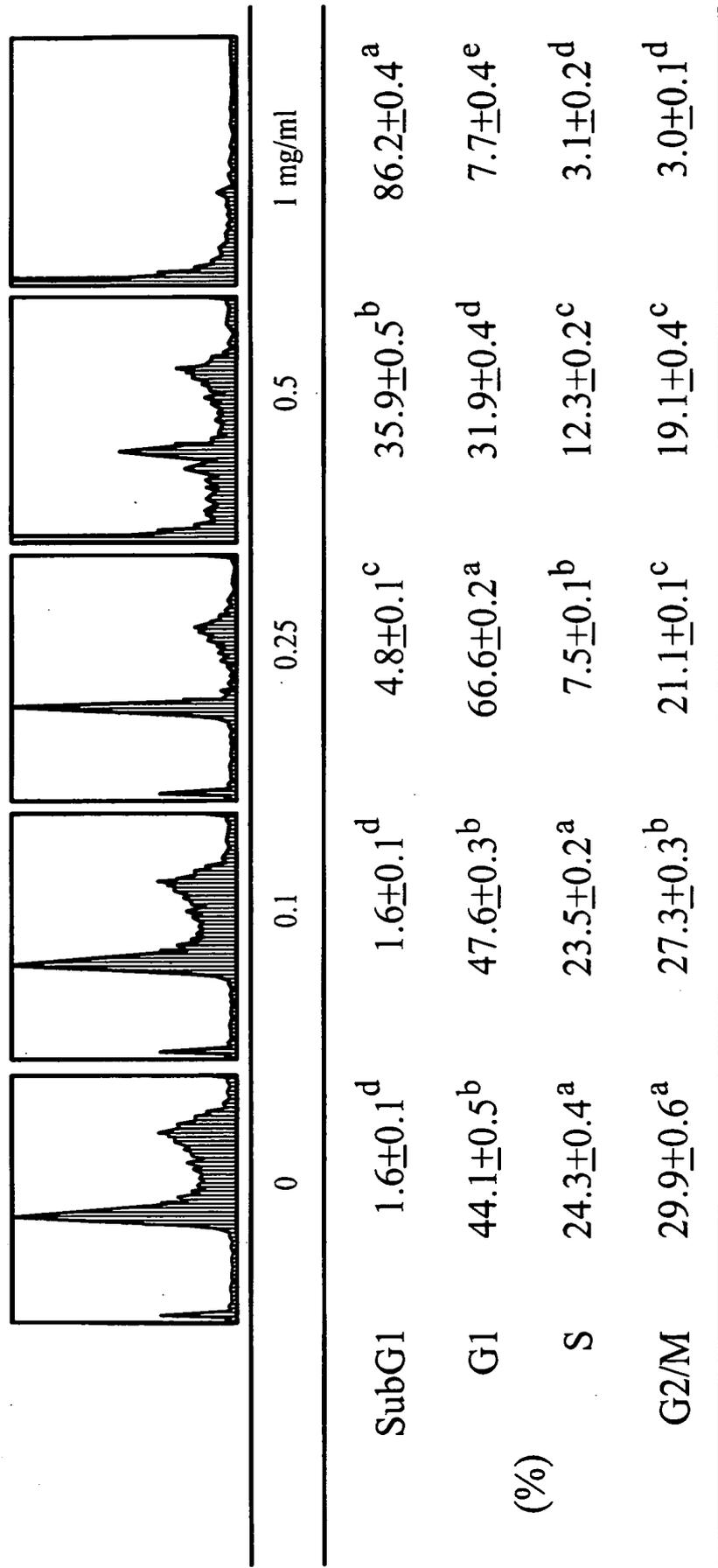


第 1B 圖

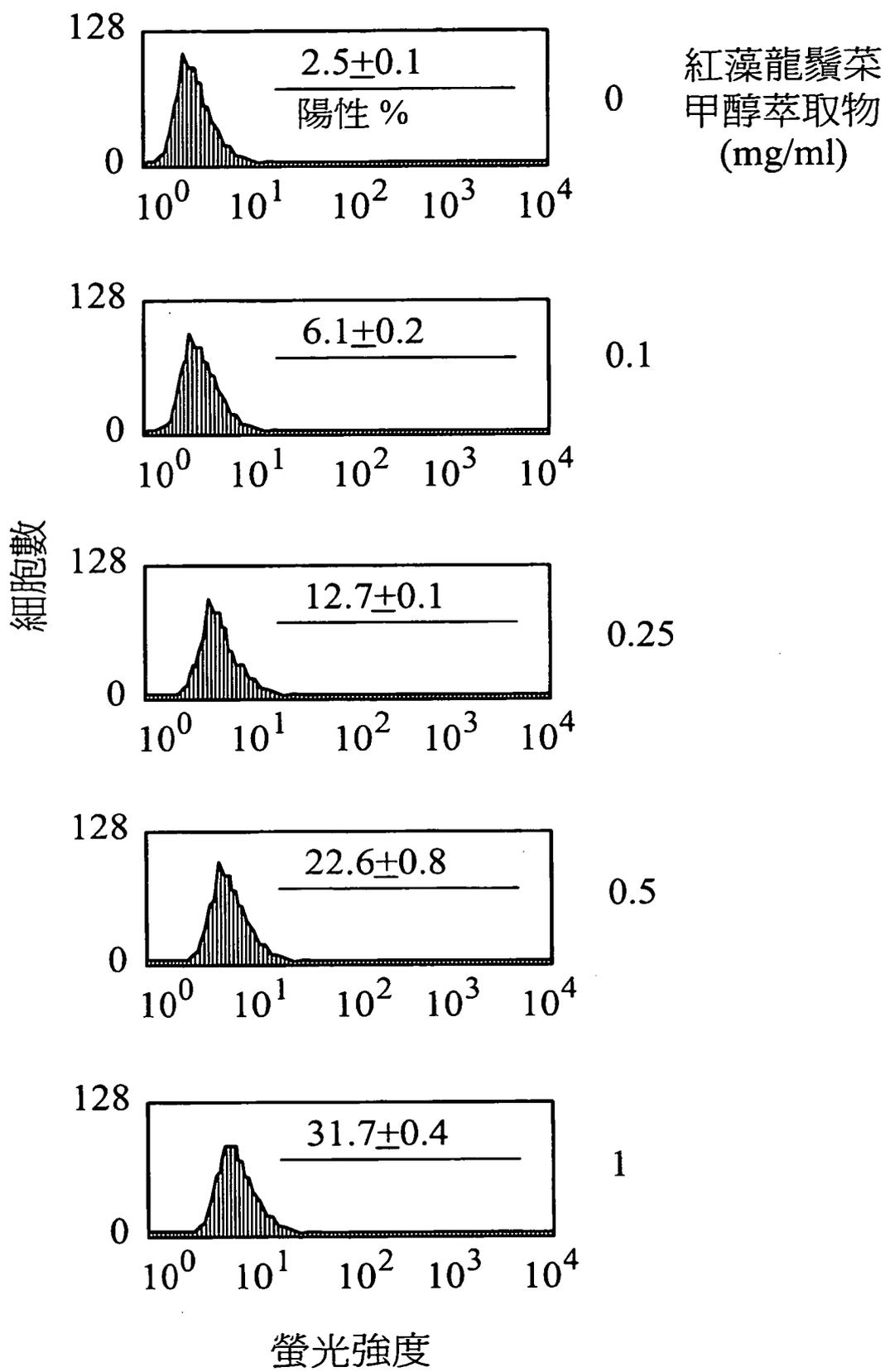
紅藻龍鬚菜乙醇萃取物(mg/ml)



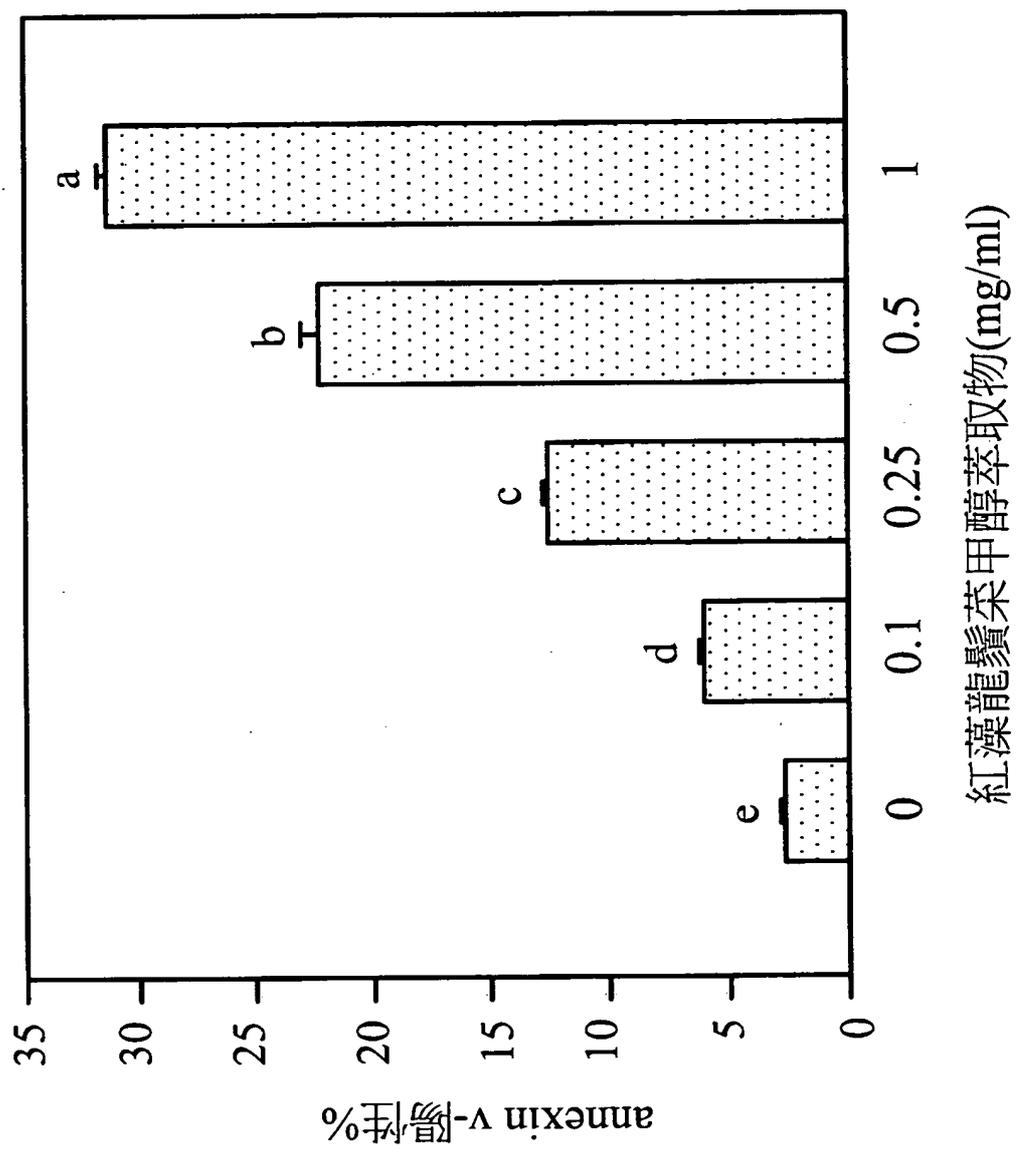
第1C圖



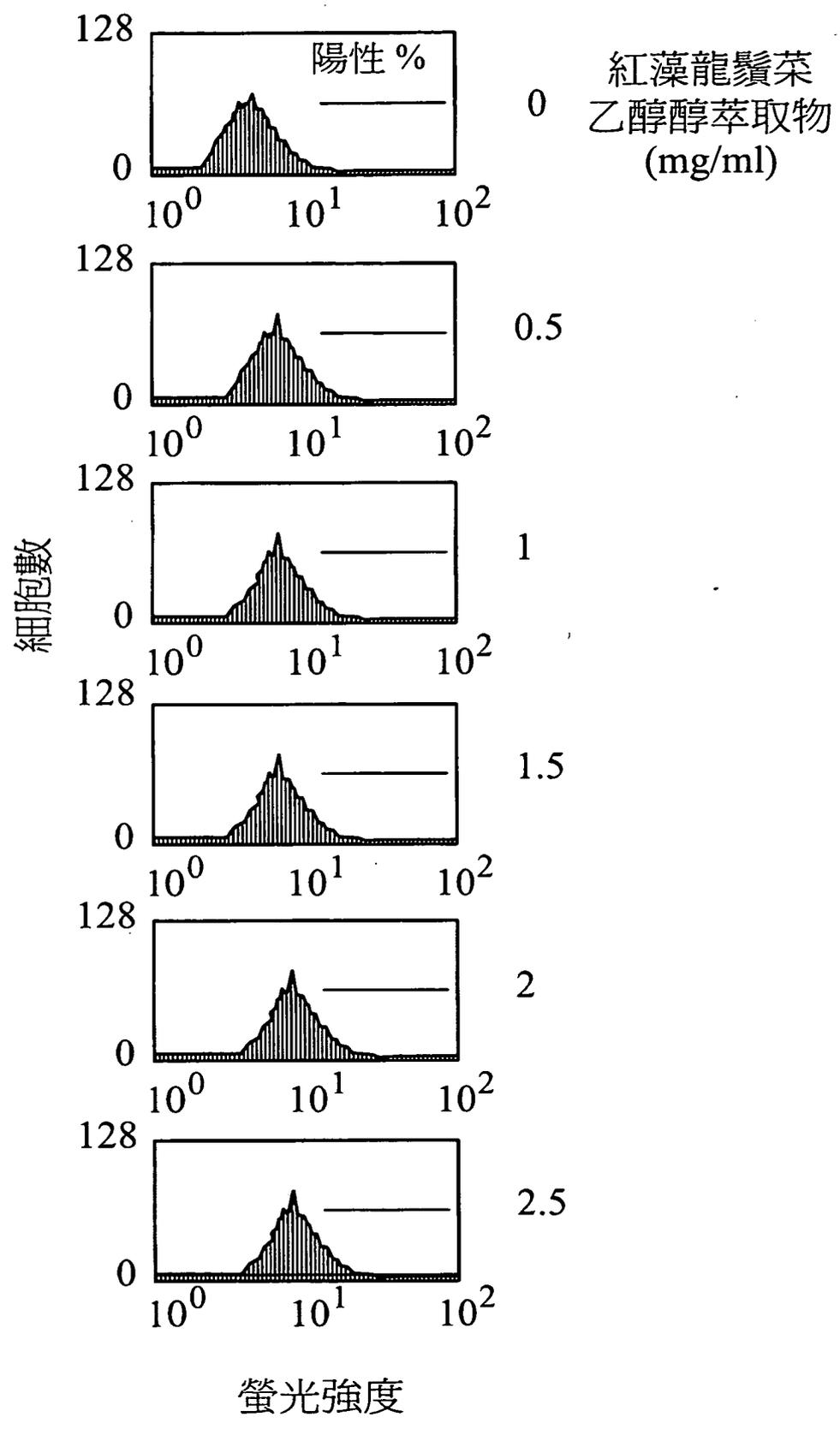
第 2 圖



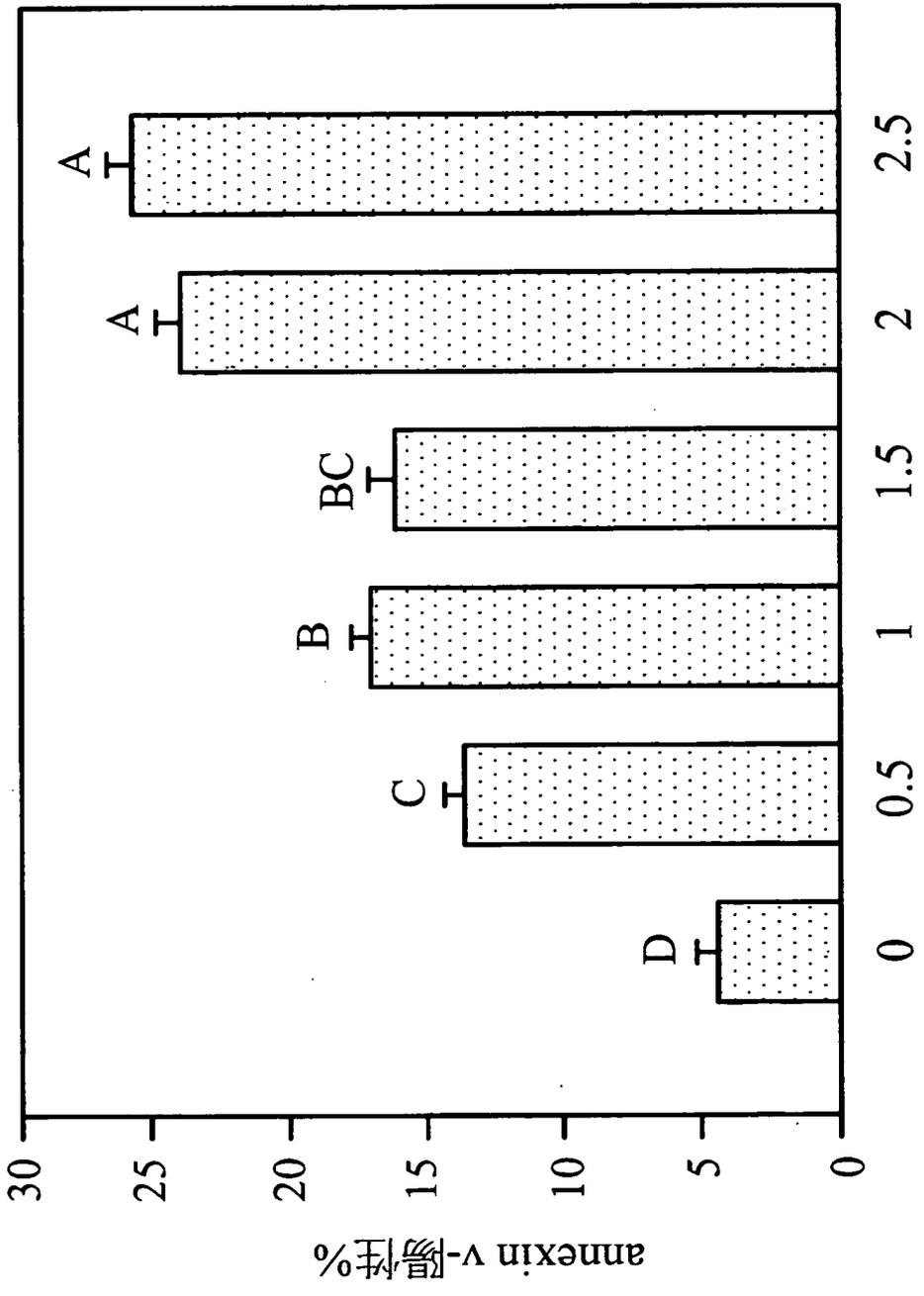
第 3A 圖



第3B圖

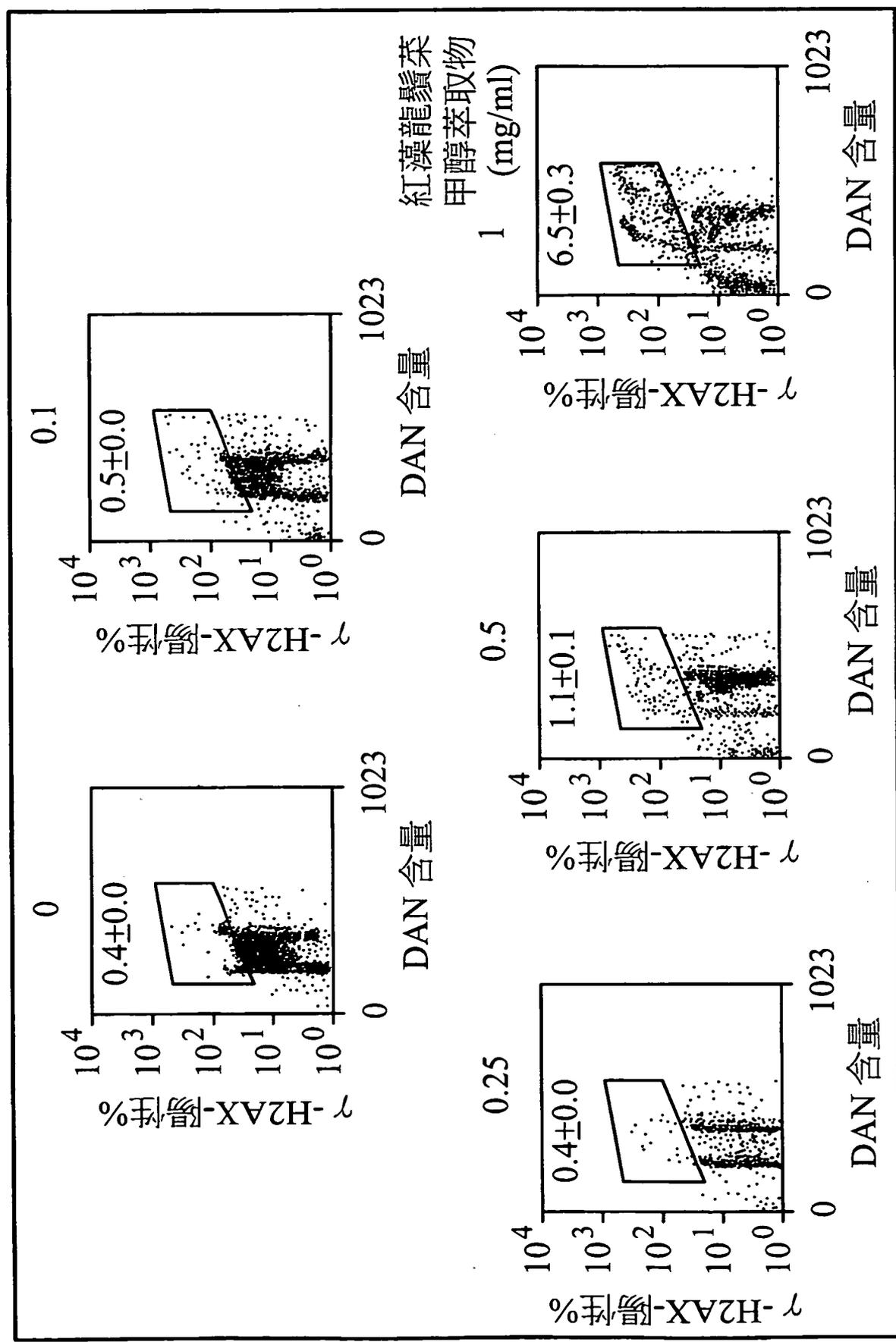


第 4A 圖

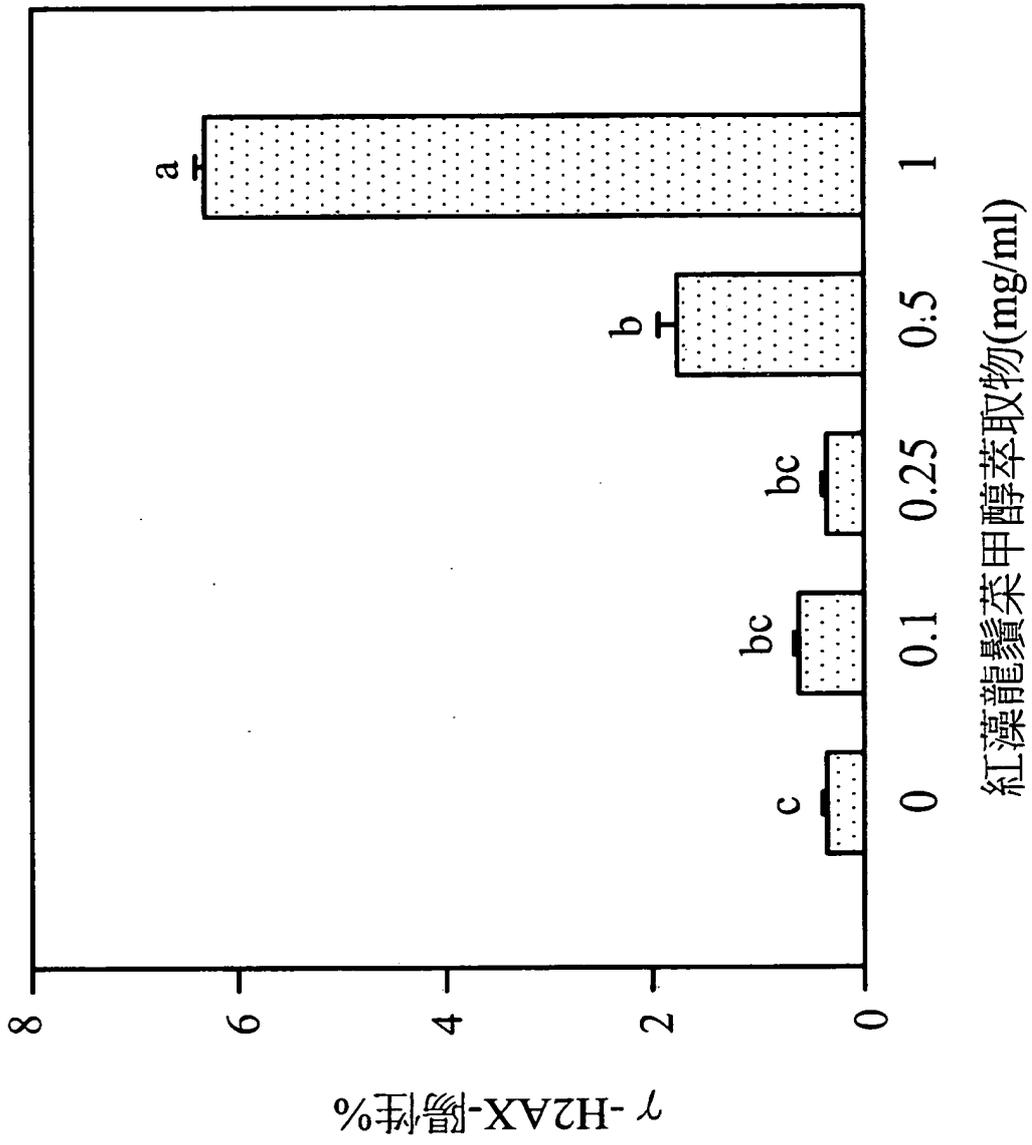


紅藻龍鬚菜乙醇醇萃取物(mg/ml)

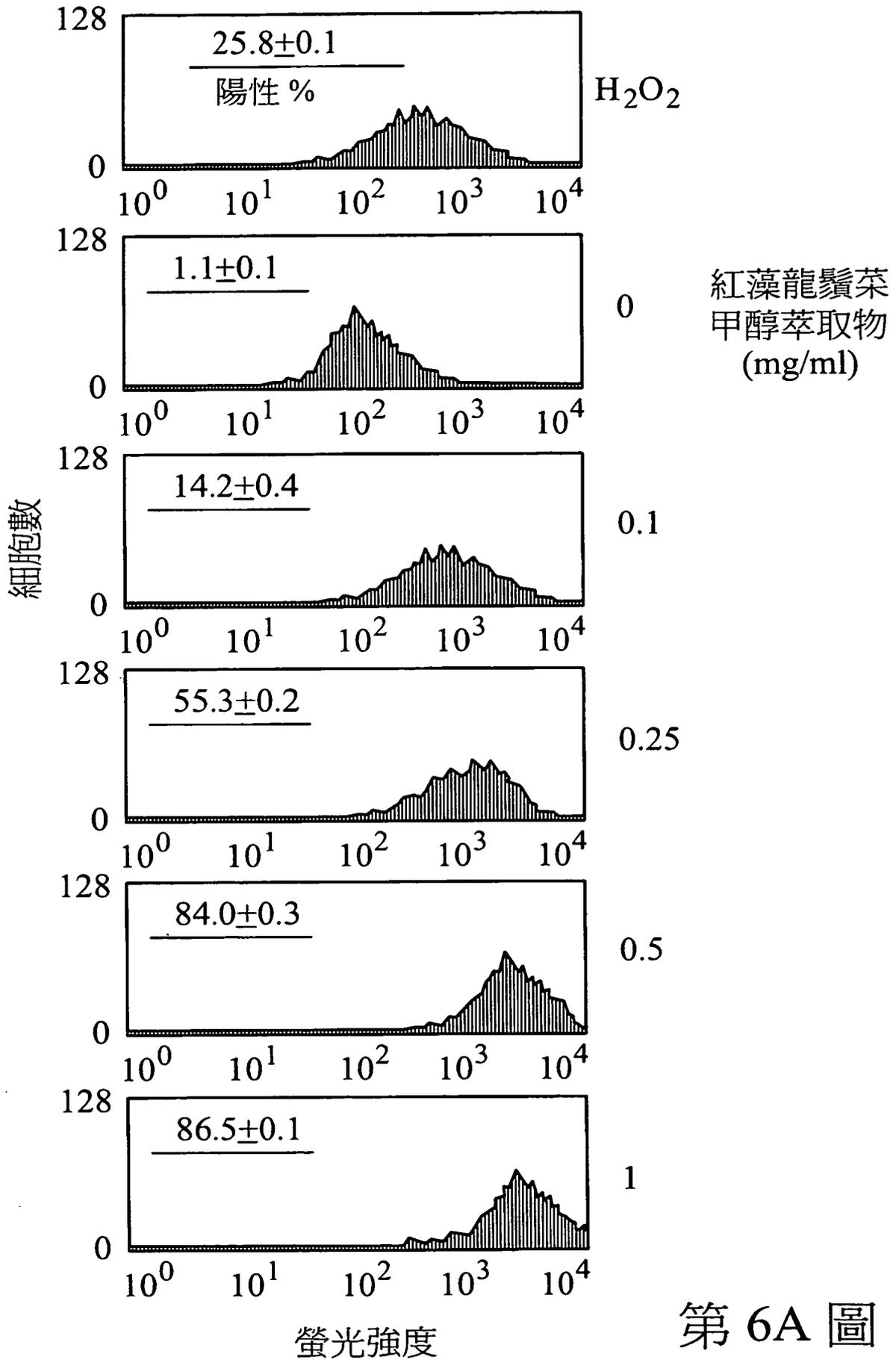
第4B圖



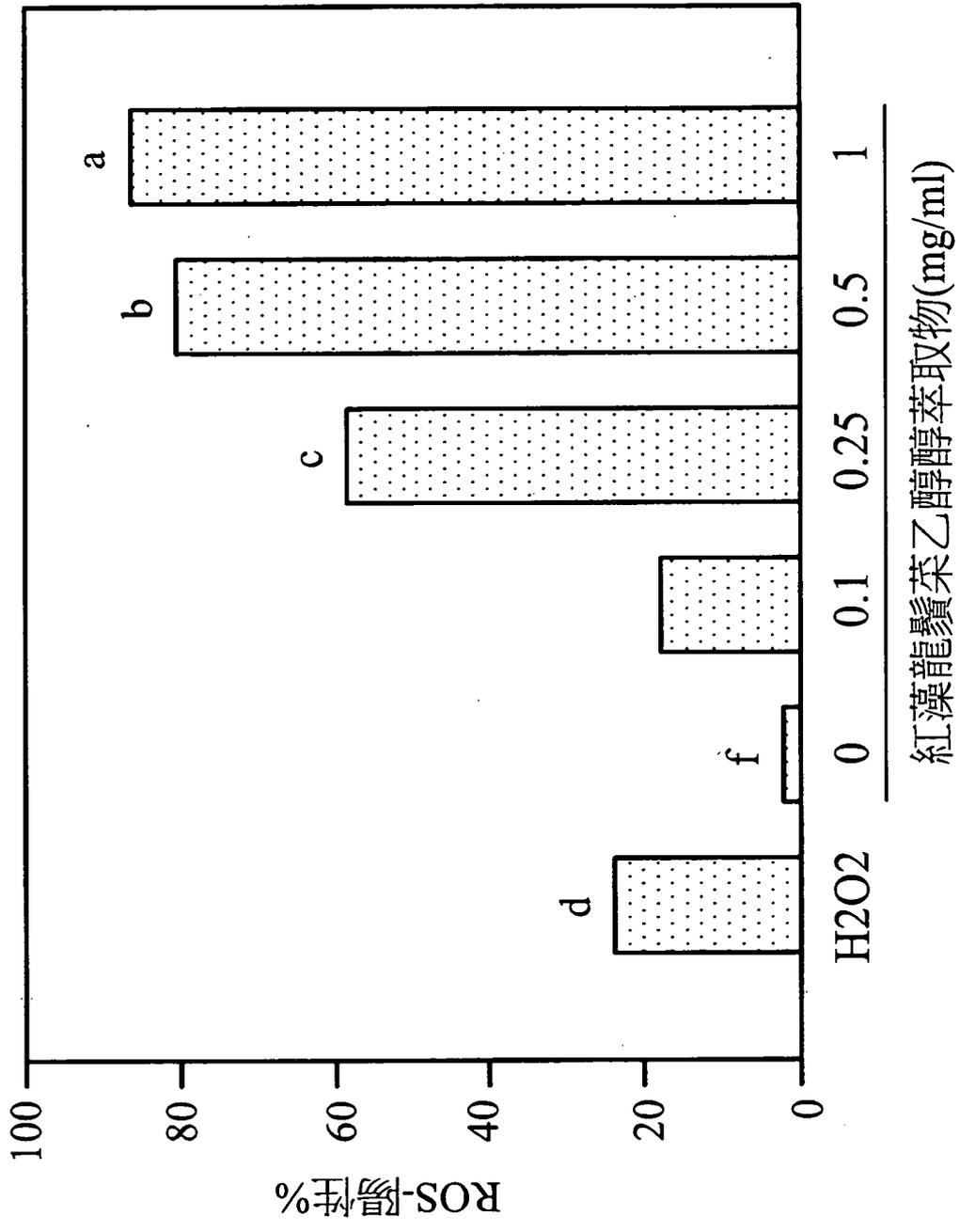
第 5A 圖



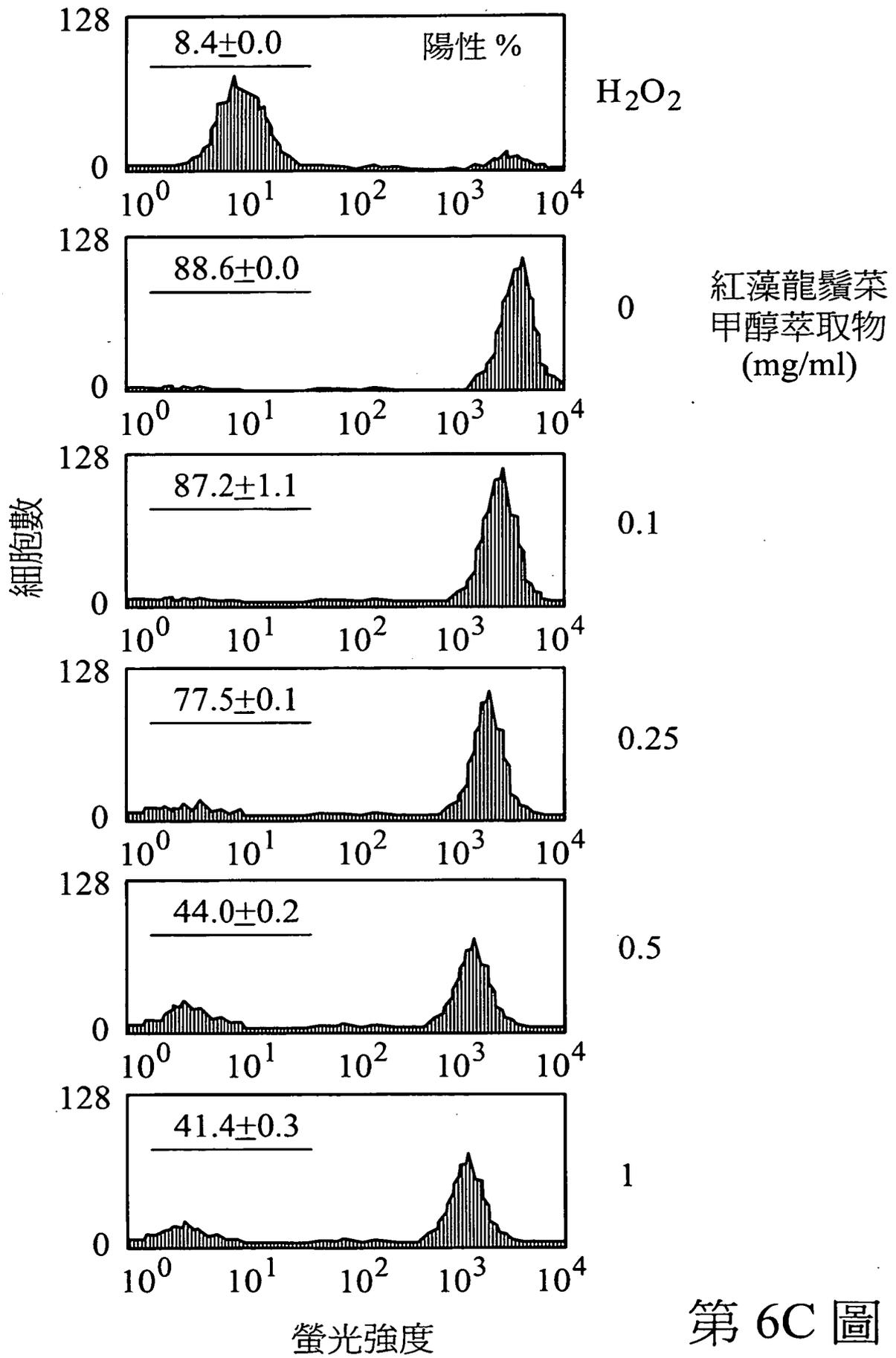
第 5B 圖



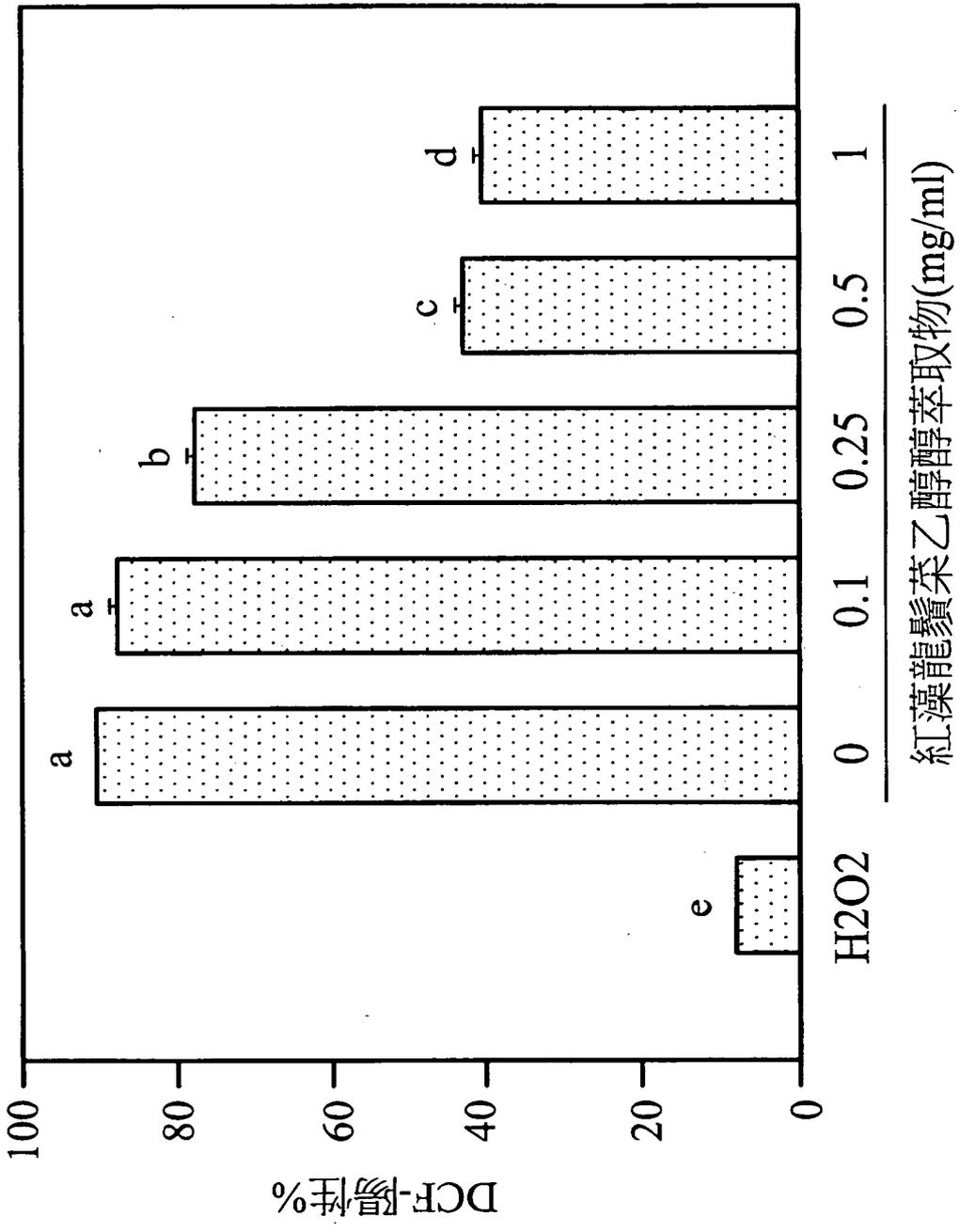
第 6A 圖



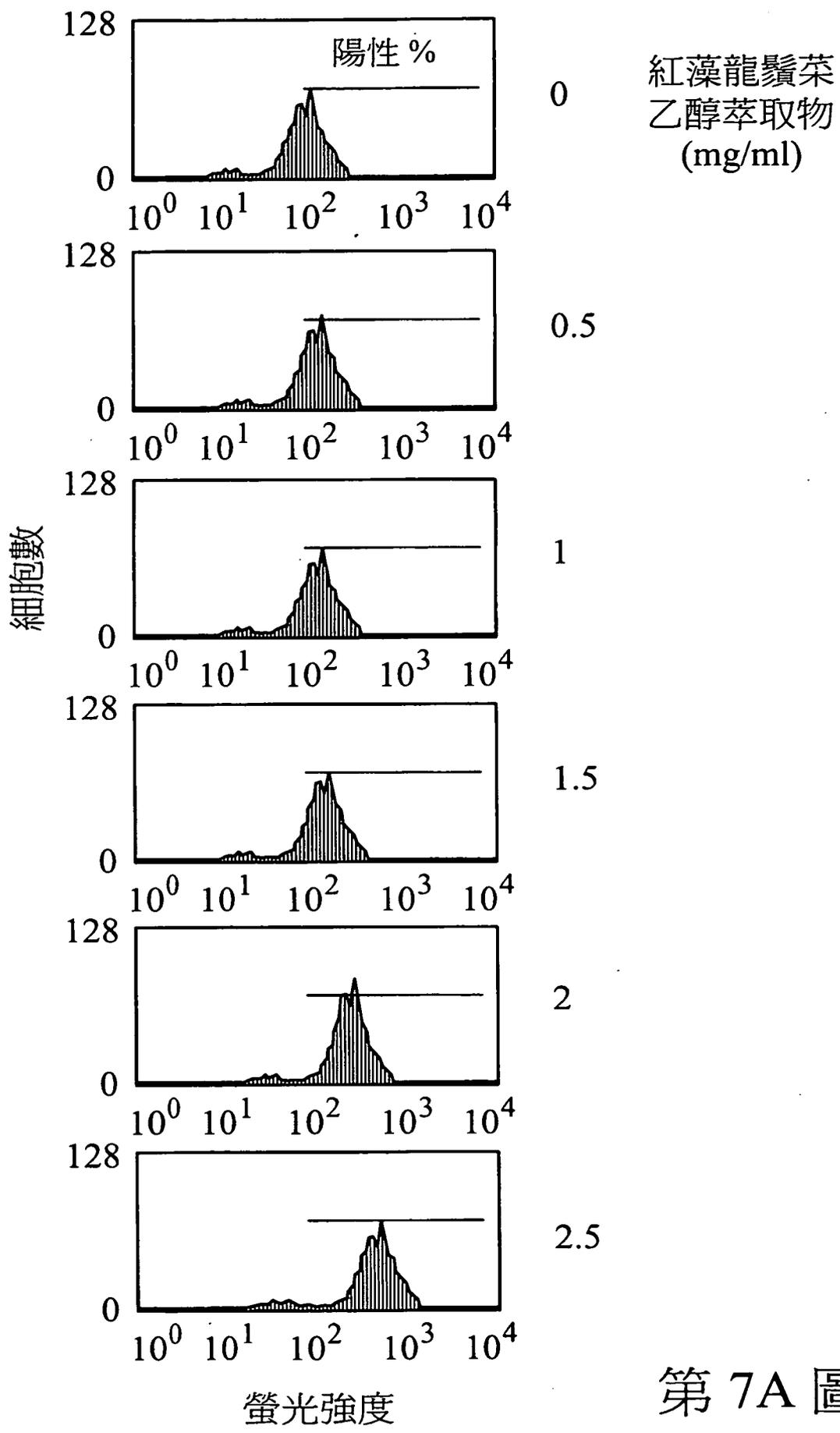
第 6B 圖



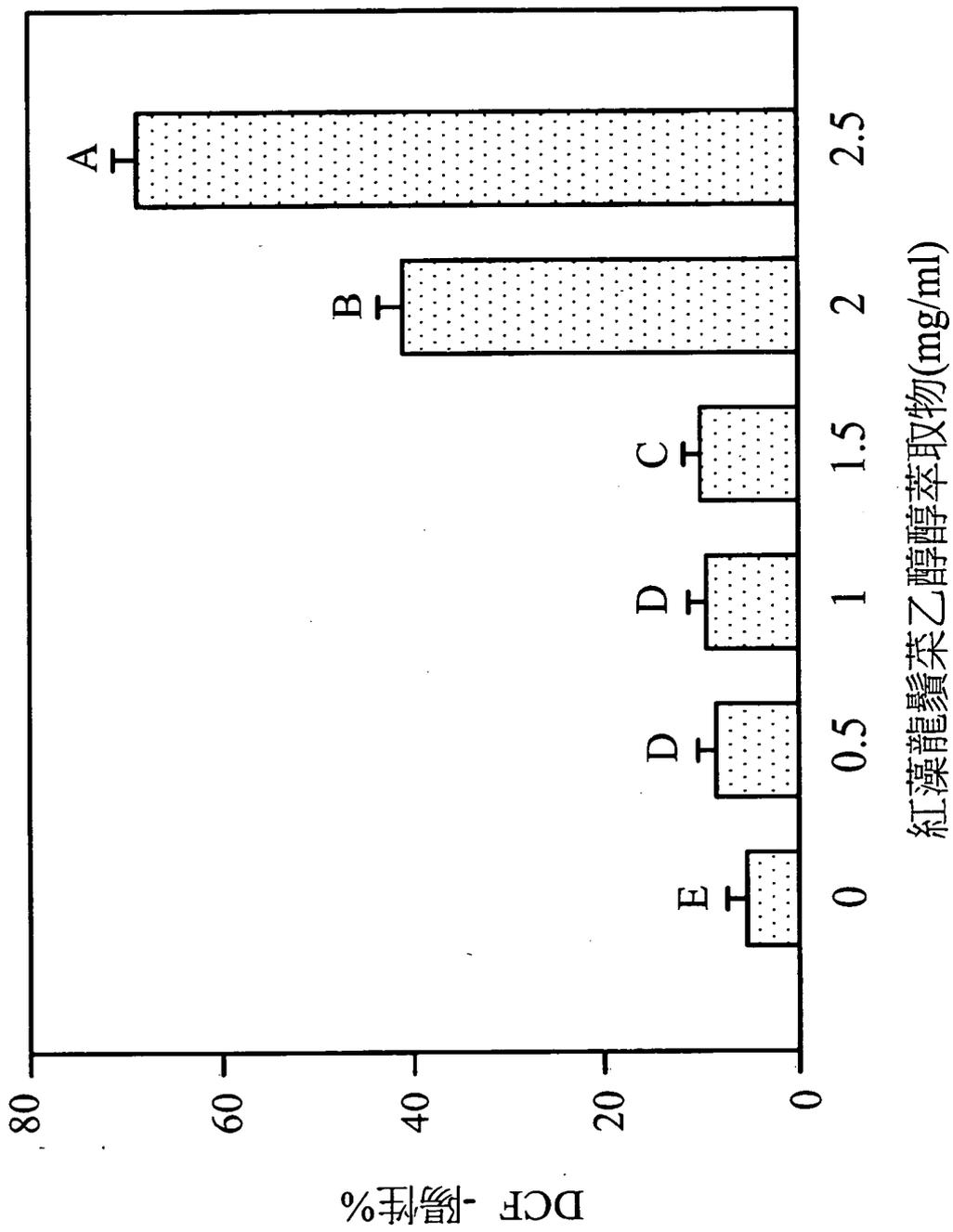
第 6C 圖



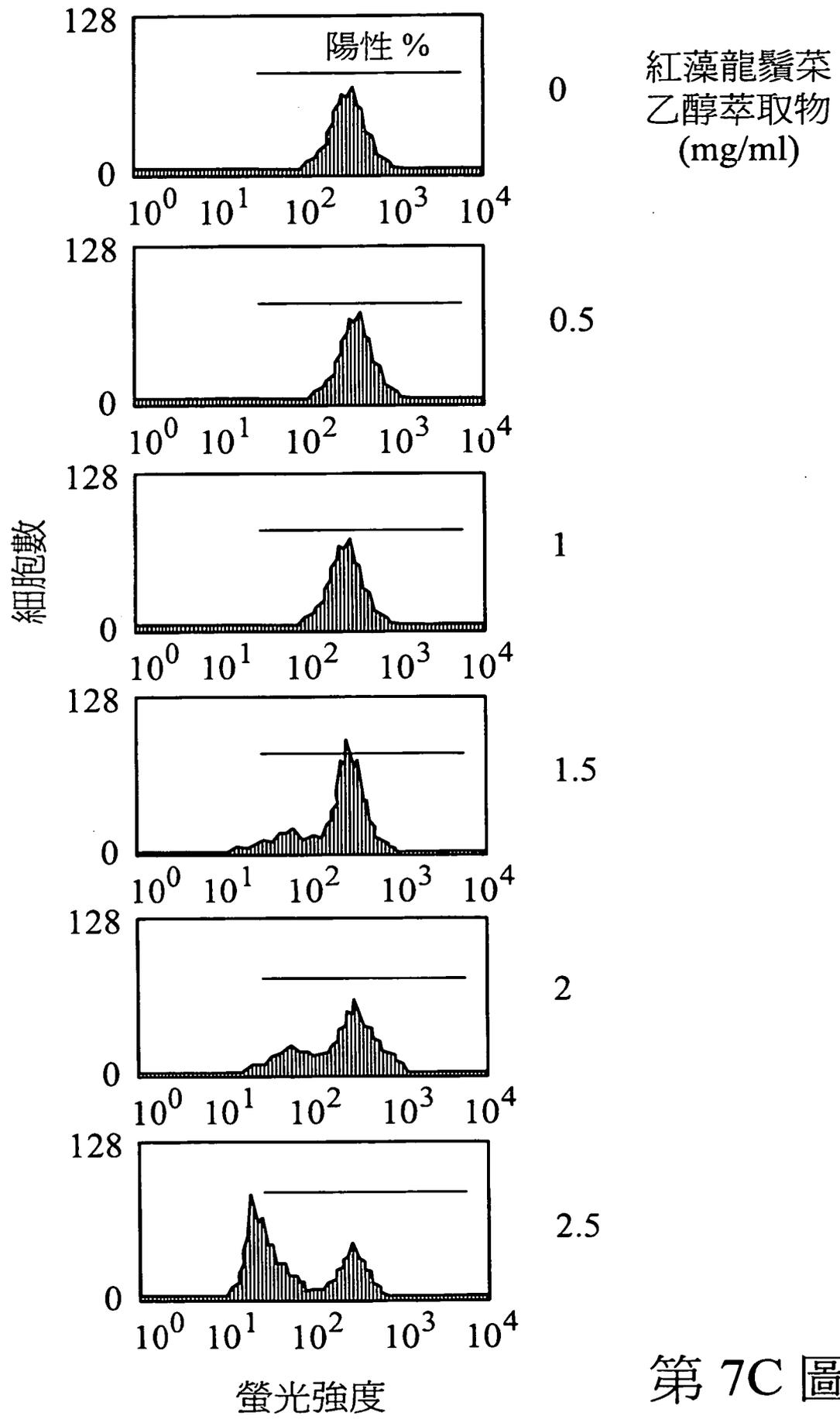
第 6D 圖

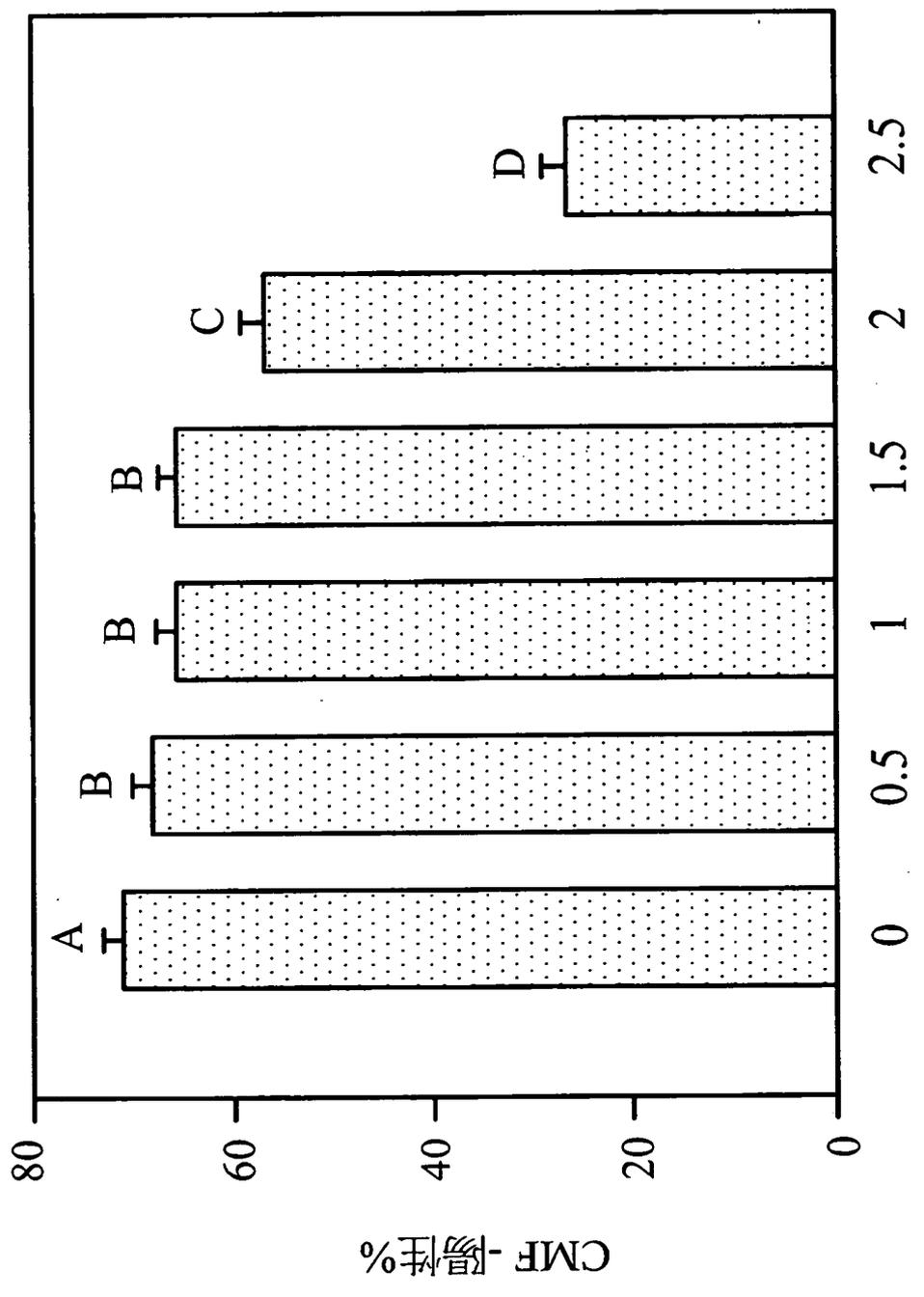


第 7A 圖



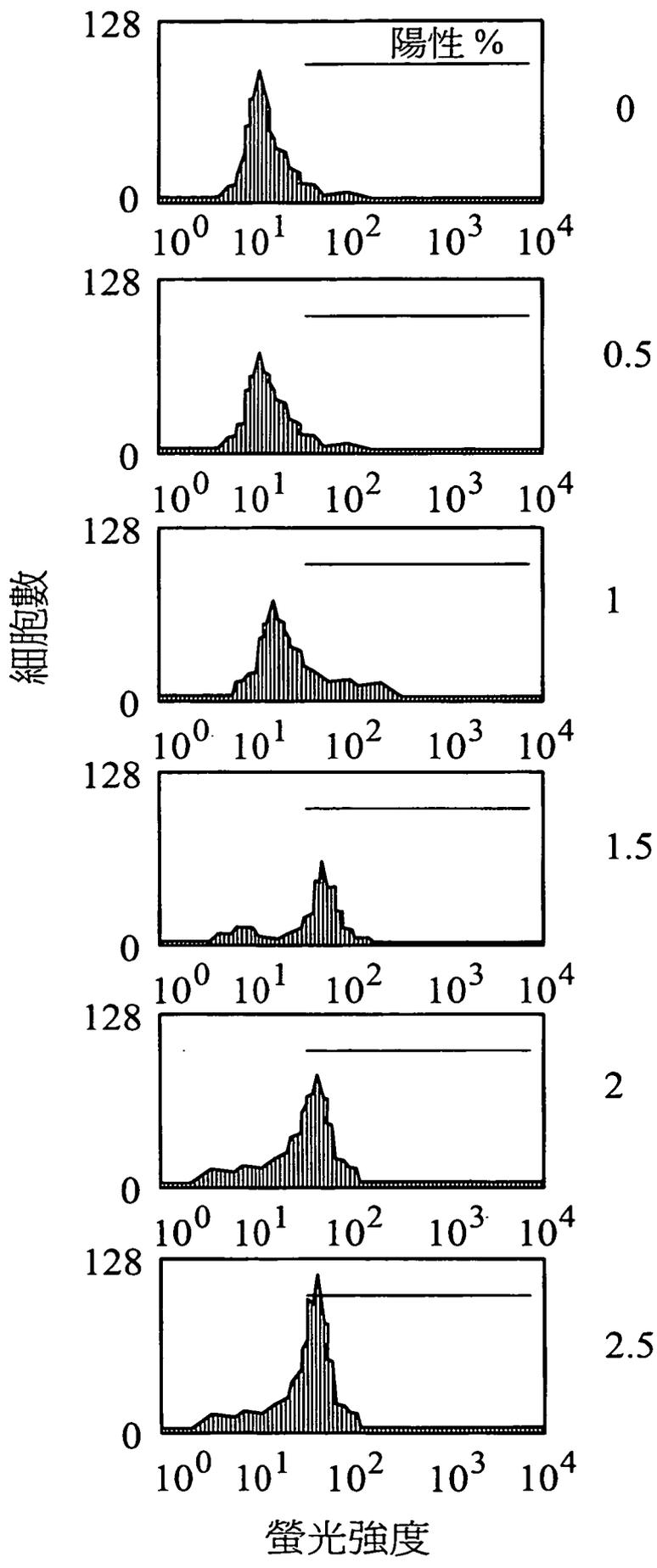
第7B圖



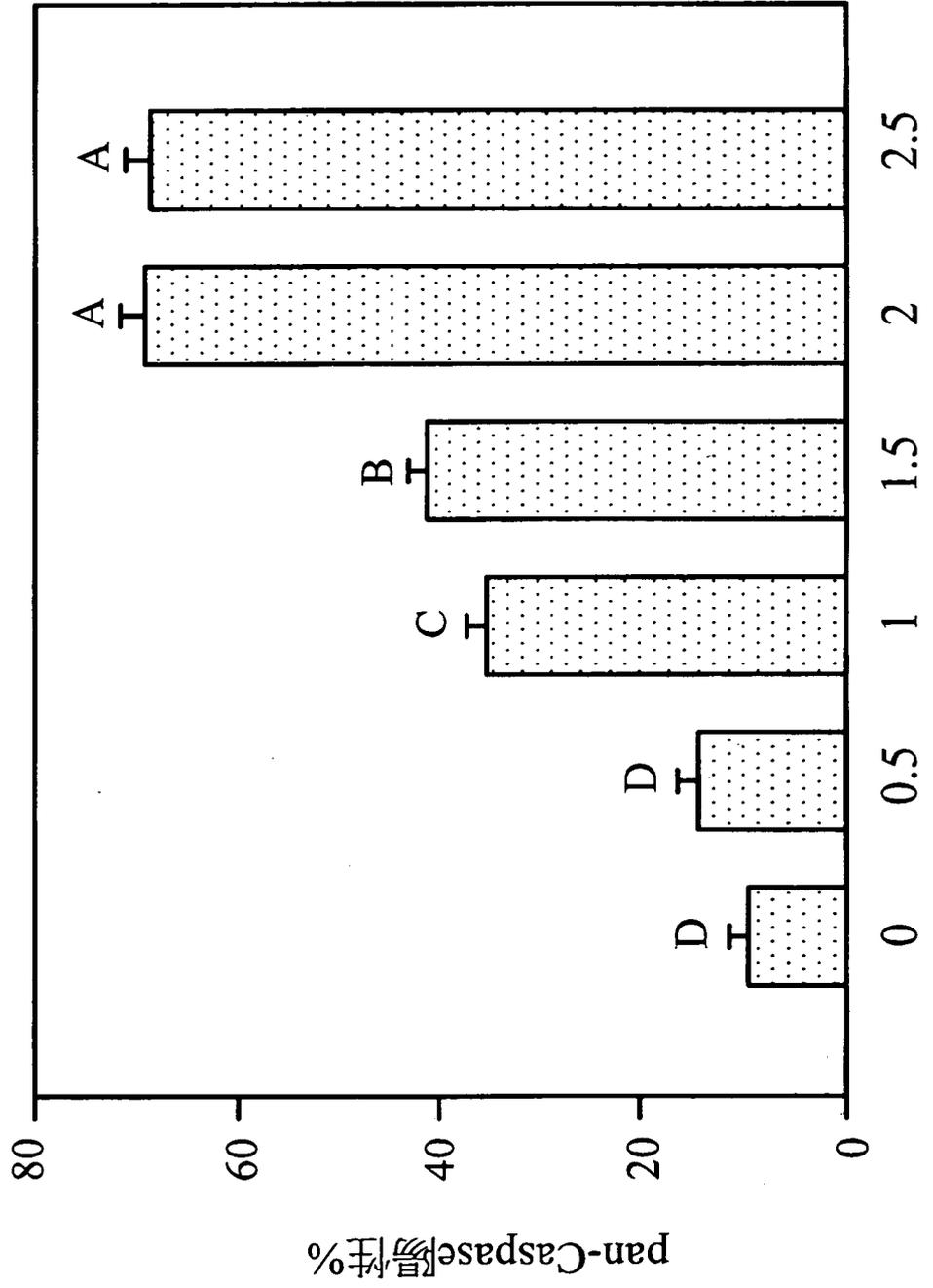


紅藻龍鬚菜乙醇萃取物(mg/ml)

第7D圖

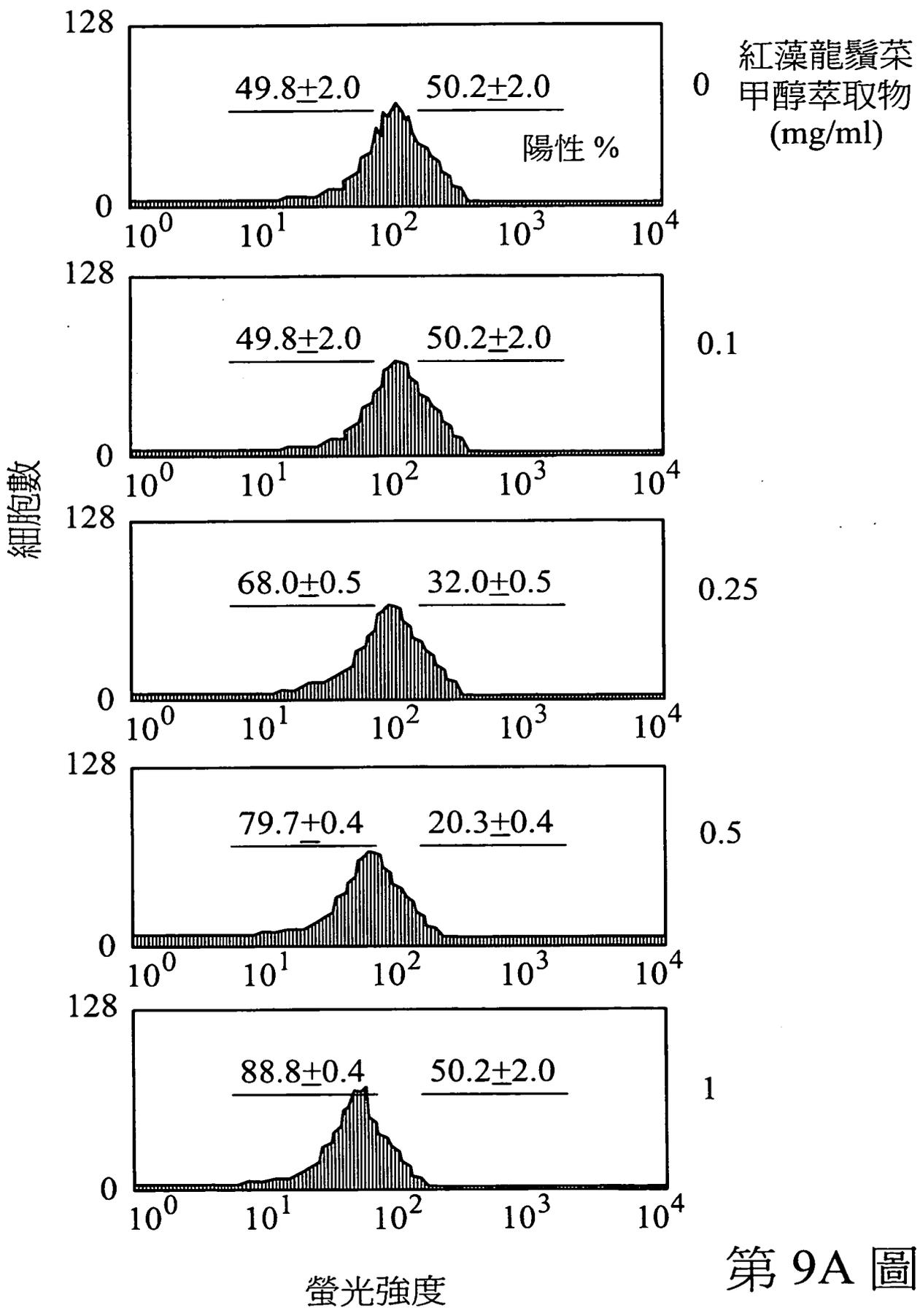


第 8A 圖

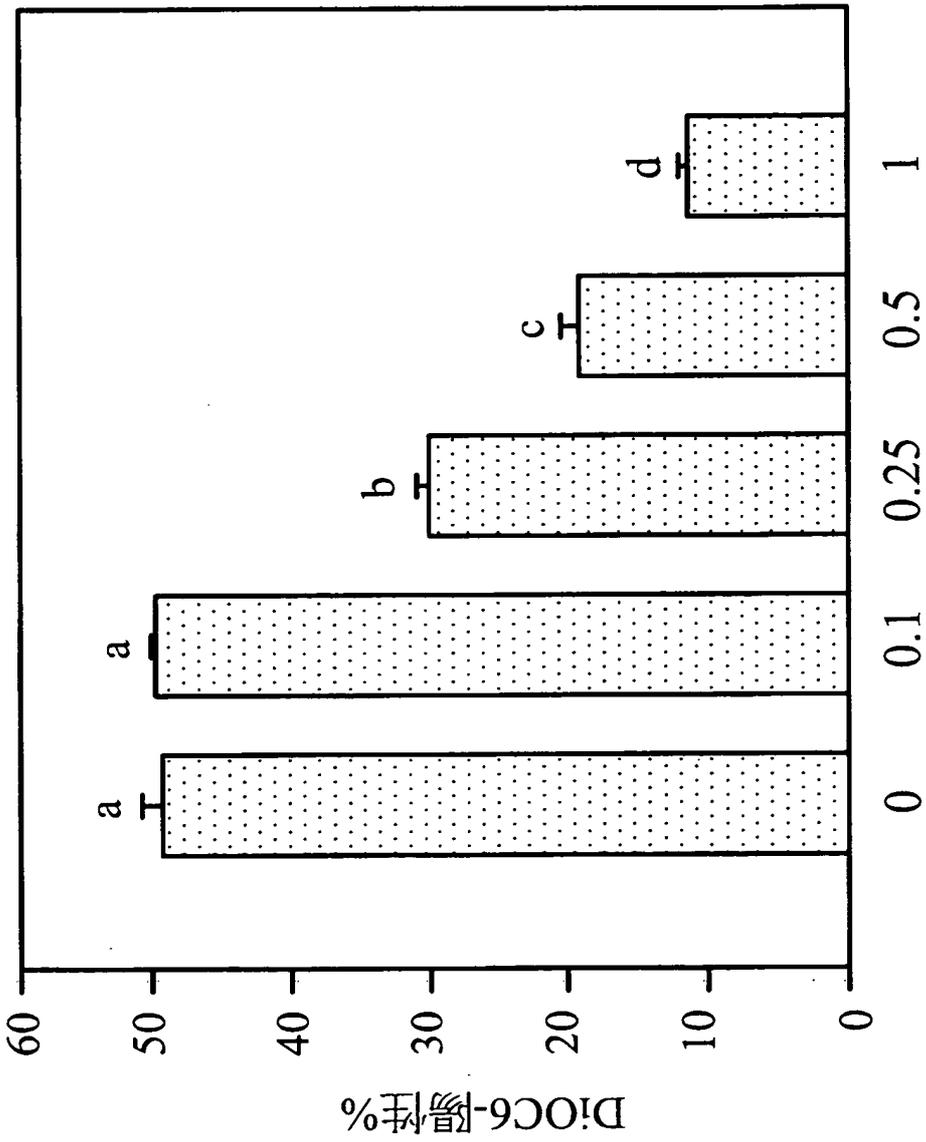


紅藻龍鬚菜乙醇醇萃取物(mg/ml)

第8B圖

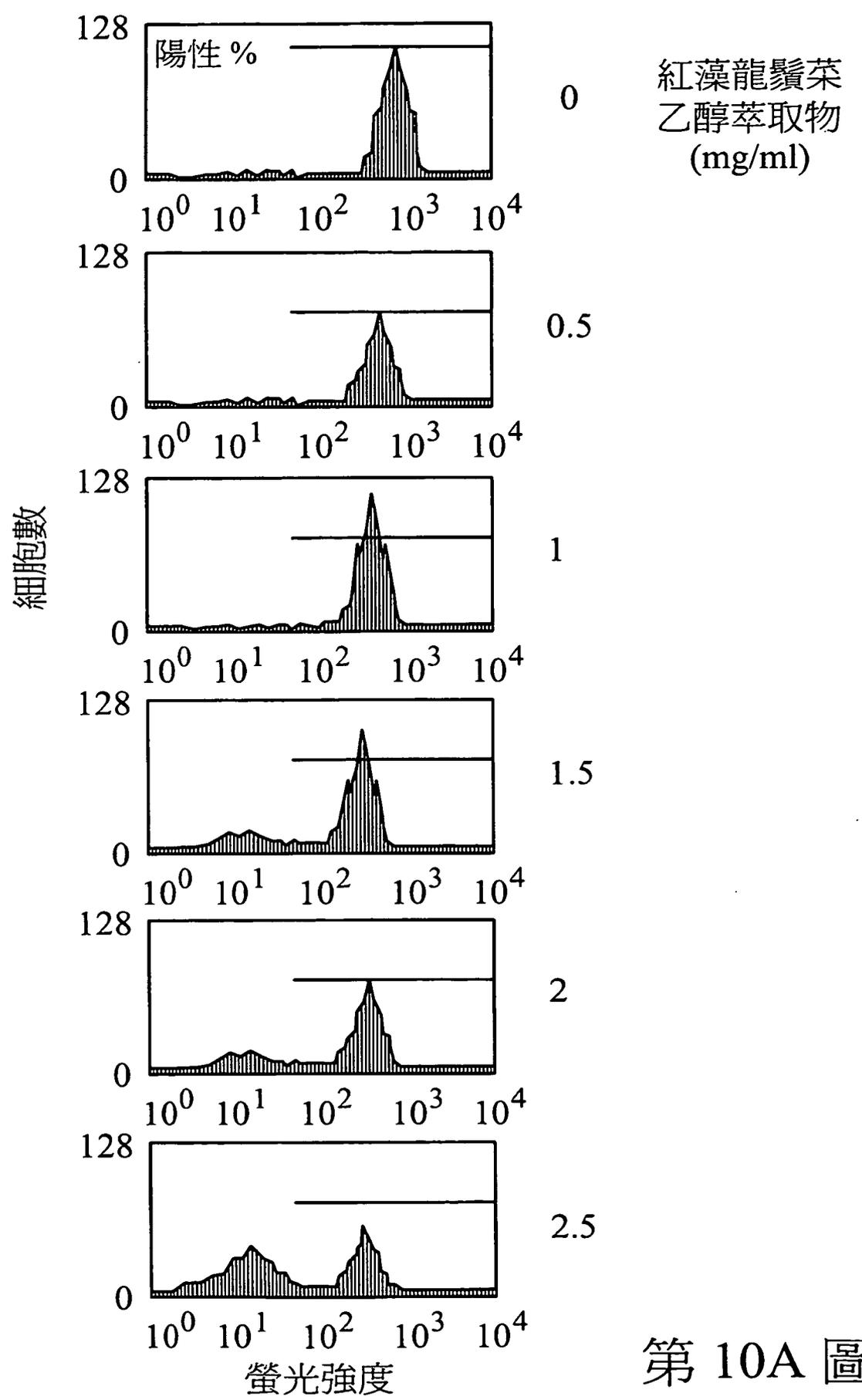


第 9A 圖

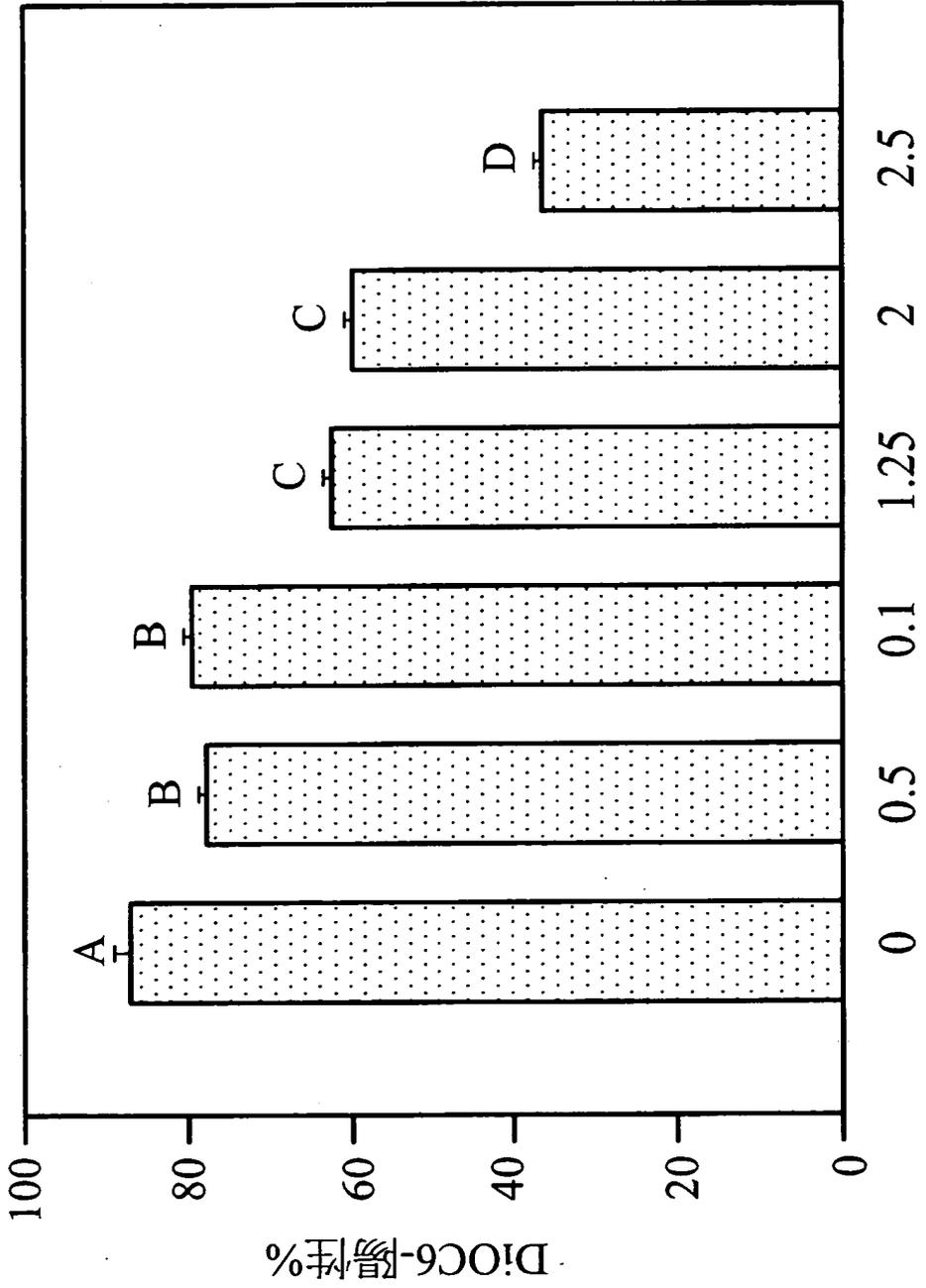


紅藻龍鬚菜甲醇萃取物(mg/ml)

第9B圖



第 10A 圖



紅藻龍鬚菜乙醇萃取物(mg/ml)

第10B圖