RRPG93080289 (36 .P)

計畫編號：DOH93-TD-F-113-049-(2)

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

省產石花菜萃取物對血管新生作用之影響

研 究 報 告

執行機構：台 北 醫 學 大 學

計畫主持人：陳 玉 華 ； 郭 明 良

研究人員：張筱珮、王美琳

執行期間： 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，依合約之規定：如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意＊

目　　錄

中文摘要 3

Abstract 4

一、前言 5

二、材料與方法 10

三、結果 14

四、討論 17

五、結論與建議 20

六、九十三年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議 21

七、參考文獻 23

八、圖表 27

中文摘要

血管新生作用的失調與一些老化疾病的發生有關，包括癌症以及動脈粥狀硬化、高血壓與糖尿病等。坊間傳言，國人夏季常食用的石花凍可降低心血管疾病與癌症的罹患率，但相關之科學文獻卻非常有限，因此本研究主要以血管內皮 EA hy 926 細胞株為實驗模式，探討不同之石花菜萃取物對血管新生作用及其相關因子之影響。細胞計數與細胞增殖結果顯示，除 7.5 mg/ml 之 phosphate-buffered saline (PBS)石花菜萃取物可抑制細胞生長與增殖外，其他濃度之 PBS 與 methanol 石花菜萃取物(2.5~7.5 mg/ml)皆不影響細胞的生長。類血管生成之結果指出，該劑量之石花菜 PBS 萃取物可抑制，而 methanol 萃取物則不影響 PMA (phorbol myristate acetate)所誘導之類血管生成。此外，ELISA 與 zymography 分析結果分別顯示，PBS 萃取物(2.5~7.5 mg/ml)可抑制 PMA 所誘導之 vascular endothelial growth factor (VEGF)分泌，但 PBS 與 methanol 萃取物皆不影響基質金屬蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)之分泌。此外，石花凍之 dimethyl sulfoxide (DMSO)萃取物，可能因 DMSO 於培養基濃度過高(2%)之故，無法取得一確定的結果。總言之，石花菜之 PBS 萃取物可抑制對於以 PMA 誘導之過度的血管新生的作用，暗示石花菜可能於一些與血管新生過多相關疾病的發生上，扮演一保護的角色。

關鍵字：石花菜、血管新生、類血管新生、基質金屬蛋白酶

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of extracts of *Gelidium amansii* (GA) on in vitro markers of angiogenesis in endothelial EA hy 926 cells. The results showed that 7.5mg/ml dried GA powder phosphate-buffered saline (PBS) extract inhibited cell growth and proliferation, but methanol extract and all other concentrations of PBS extracts showed no such effect. Parallel to the results obtained from cell growth and proliferation, 7.5 mg/ml PBS extract showed inhibitory effects on the phorbol myristate acetate (PMA)-induced tube formation. Additionally, PBS extracts (2.5~7.5 mg/ml) also inhibited PMA-stimulated vascular endothelial growth factor (VEGF) production in EA hy 926 cells. However, neither PBS nor methanol extracts affected matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity. On the other hand, because of high concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) in cultured medium, no conclusive results were obtained from GA gel DMSO extracts. In conclusion, GA PBS extract (7.5 mg/ml) showed inhibitory effects on cell growth and cell proliferation, and such inhibition is associated with suppressed PMA-stimulated tube formation and VEGF secretion in EA hy 926 cells. Although GA lipid-soluble methanol extracts did not show such effects, consumption of GA may play a role in prevention of angiogenesis-related diseases.

Keywords: *Gelidium amansii*, angiogenesis, tube formation, matrix metalloproteinase

一、前言

癌症與心血管相關疾病連續多年位居國人十大死因之列，其中癌症已連續 23 年高居國人十大死因之首位，而位居民國 93 年十大死因第二位之腦血管疾病、第三位之心臟疾病與第十位之高血壓性疾病均屬心血管相關之疾病[1]，因此，政府醫療單位每年花費在治療這些疾病上之經費，亦相對地提高，顯示尋求一可預防這些疾病的發生的途徑或方式，成為刻不容緩的課題。現今為一預防醫學之時代，預防重於治療，預防這些疾病的發生不僅可降低國人因這些疾病而造成之死亡率，同時亦可節省治療這些疾病所需消耗的龐大醫療成本。

這些老化的疾病相似性除了皆高居國人十大死因之列外，它們也皆與體內的血管新生作用有關[2,3]。血管新生作用為由一已存在的血管形成一新血管的過程，此作用於一些生理過程，如胚胎發育、傷口癒合與女性生殖系統等，扮演重要的角色[4,5]。然而，若血管新生作用失去平衡或是調控，則與一些老化疾病的發生有密切的關係。其中過度的血管新生與癌症及肥胖有關，而血管新生作用不足則可能造成動脈粥狀硬化、高血壓、糖尿病與阿茲罕默症等疾病的發生。早於 1971 年，Folkman[6] 便提出腫瘤生長有賴於血管的新生，即唯有足夠血流的供應，腫瘤的體積才會增大，這可能

與腫瘤細胞產生與釋放至組織中的促血管新生因子有關。其後研究亦陸續指出血管新生與轉移亦有密不可分的關係[7,8]。相反的，一些心血管疾病的發生反而與血管新生作用的不足有關；文獻指出高膽固醇血症可使血管內皮細胞功能受損，而促使動脈粥狀硬化等相關疾病的生成，而此過程與血管新生作用的受損有密切關係[9]，因此對於過度血管新生抑制之物質，已被建議可降低癌症的發生與轉移[10]，但於生理狀況可促進血管內皮細胞新生的物質，對於預防心血管疾病相關疾病與一些老化疾病的發生將有所助益[11]。

一般而言，一些促血管新生因子，如 vascular endothelial growth factor (VEGF)、VEGF receptor、tumor necrosis factor-α (TNF-α)、basic fibroblast growth factor (bFGF)與 interleukin-8 (IL-8)等，可促進血管新生之作用[4]。舉列而言，當腫瘤細胞開始釋放 VEGF 時，VEGF 會與位於腫瘤周邊組織血管之內皮細胞表面的 VEGF receptor 結合，使該細胞活化並開始血管新生作用，這些血管內皮細胞可產生一些蛋白質分解酵素，將基底膜與一些細胞外基質(extracellular matrix, ECM)分解，使血管內皮細胞可由血管內移至鄰近刺激原之組織內、於該處增生、進而形成管狀之結構並使血液於內流動，最後與血管平滑肌細胞共同形成一成熟的血管而完成血管新生作用[10]。因此一些與促血管新生相關的因子包括 VEGF、TNF-α 和 IL-8 等細胞激素、

以及 urokinase (uPA)與 matrix metalloproteinases (MMPs)等蛋白質分解酵素、一些轉錄因子和訊息傳導物質等皆與血管新生有密切關係。許多可抑制癌症發生的物質與飲食中活性物質，如綠茶中，已被證實亦具抑制血管新生的作用或是抑制 VEGF、VEGF receptor、uPA 與 MMP 之活性[12, 13]。而於臨床上給予促血管新生的因子 phVEGF，則可促進心肌梗塞病人之心肌血管新生作用，而達到治療心血管疾病的目的[14]。

癌症與心血管相關疾病的發生與飲食有密切的關係，所以若可藉由平時特定飲食的攝取，而降低這些老化疾病的發生，將可達到預防與保健的目的，因此由飲食中尋求具有此特性的天然食物為從事營養與預防醫學人員一重要的研究課題。海藻為台灣日常食用的食物之一，本草綱目記載以海藻治療各種疾病的紀錄。海藻富含豐富的營養價值、植物色素以及多醣類的食物纖維等，這些不同的成分已被指出具有預防或治療一些疾病的作用[15]。例如不同海藻具有抑制癌症發生[16,17]、延緩高血壓與腦血管疾病發生的作用[18]；Lim 等人亦指出，海藻類具有預防心血管疾病、降血脂以及清除自由基的功能[19]，其中包括國人常食用的石花菜。

石花菜（*Gelidium amansii*）為葉狀或線狀的細胞紅藻類，屬石花菜科，台灣東北角海岸為主要產區。因其可用為洋菜原料，因此也是東北角海域最具經濟價值的藻類之一[20]。石花菜採收後，須經”六曝六曬”

的加工手續，使之去色去腥味，才成為市場上所賣的淡黃色乾燥石花菜。將乾燥的石花菜放入水中烹煮、再經過濾除去雜質及冷卻後所得之石花凍製品，是廣為國人喜愛之夏季盛品。一般而言，坊間傳言它具有健康促進的作用，包括促進新陳代謝、治療高血壓、預防癌症及心血管疾病與降血糖及降血脂質等。Guven 等人(1997)發現，由紅藻或褐藻萃取之多醣體具有降血脂的作用[21]。石花菜之 methanol 萃取物被指出具有細胞毒性[22]，而先前我們研究室之結果顯示石花菜之不同萃取物具有抑制癌細胞生長的作用，且此作用可能與誘導細胞程式化凋亡有關[23]。由於石花菜與其他海藻類似，具有豐富的營養素及一些活性成分，同時細胞程式凋亡於抑制血管新生的作用過程中扮演重要的角色[24]，此外，關於省產石花菜的相關科學研究非常有限，因此本研究欲以體外之細胞培養模式，探討不同之石花菜萃取物，包括水溶性、脂溶性與日常所食用之石花凍萃取物對於血管新生的影響，以初步瞭解石花菜應用於保健食品與預防心血管及其他一些老化疾病發生或是抑制癌症之潛能。同時，本研究之結果將可提供石花菜於降低疾病發生之科學根據，提供國人預防老化疾病之飲食一新的方針，同時亦可提供未來較複雜之動物或人體實驗的參考。除此之外，本研究之結果亦可促進省產石花菜的推廣，因而提供賴採石花菜為生的漁民另一生機，並將此豐富的海洋資源充分加以利

用，應用在日常飲食中促進人類的健康，進而節省因治療這些疾病所需要之醫療成本。

二、材料與方法

（一）石花菜萃取物之製備

1. 石花菜水溶性與脂溶性物質之萃取

乾燥之石花菜購自市場，以磨碎機研磨成細的粉末後，取定量磨碎之石花菜粉末於 phosphate buffered saline (PBS)中振盪萃取 24 小時後，經離心、過濾後之上清液為石花菜 PBS 或水溶性萃取物。PBS 萃取後之石花菜沉澱物，再加入 methanol 振盪萃取 24 小時後，過濾後之上清液為石花菜 methanol 或脂溶性萃取物。實驗結果乃以每毫升培養基所含之乾燥石花菜粉末(mg/mL)表示之。

2. 石花凍冷凍乾燥粉末之製備

取 40 g 之乾燥石花菜加水 3 L 加熱煮沸 2 小時後，經過濾及冷卻後製成石花凍，而後經冷凍乾燥後取得石花凍之乾燥粗粉末，100 g 之乾燥石花菜原料約可得 4.78 g 之石花凍乾燥粉末。此冷凍乾燥粉末以 DMSO 萃取之。實驗結果乃以每毫升培養基所含之冷凍乾燥石花菜粉末(μg/mL)表示之。

由於之前研究指出，乾燥石花菜之 PBS 和 methanol 萃取物於 2.5~7.5 mg/ml 以及石花凍乾燥粉末之DMSO萃取物於250~500 μg/ml

濃度範圍具抑制培養之細胞生長的作用，因此本計畫乃採用此濃度範圍進行相關之分析。

（二）細胞培養

本研究使用血管內皮 EA hy 926 細胞株為實驗模式。此細胞株乃由人類肺癌細胞 A549 (human lung carcinoma cells)與人類初代臍靜脈血管內皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)融合而成，相較於常被使用之初代血管內皮細胞，其優點為它是一永久(permanent)之細胞株[25]，可持續繼代培養，同時不需額外添加昂貴之生長因子於培養基中，除此之外，此細胞株仍具有血管內皮細胞之各種特性[26]，因此是一研究血管新生作用好的實驗模式。此細胞株由 Dr. Cora-Jean Edgell (University of North Carolina, NC, USA)提供，培養於 10% FBS (fetal bovine serum)的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)及 37℃，5% CO2 的環境中，並定期繼代。

（三）細胞生長之分析

細胞於於加入不同濃度之各種石花菜萃取物於有/無 PMA 存在下培養 2, 4, 6 天後，將細胞收集，並加入等量 trypan blue 染色，再以血球計數器觀察細胞之存活狀況，並以 Coulter counter (Coulter

Elertronics, Hong Kong）計數細胞的數目。

（四）細胞增殖之分析

為瞭解石花菜萃取物對 EA hy 926 細胞生長抑制的影響是否因抑制細胞增殖之故，細胞培養於添加不同濃度之石花菜萃取物於有/無 PMA 之存在下培養 24 小時後，以 MTS 之 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Aaasy@ (Promega)分析試劑組於波長 492 nm 偵測吸光值。藉由吸光值不同，作為判別細胞增殖速率之差別。

（五）血管新生之分析

於體外，血管內皮細胞具有分化之能力，同時可形成管狀的結構，因此血管內皮細胞形成管柱狀(tube formation)之能力可用以評估血管新生之作用[25]。EA hy 926 細胞於 PMA 存在下，添加抑制細胞生長有效濃度之石花菜萃取物，於培養 24 小時後以 Matrigel 進行類血管形成之分析，並於顯微鏡下觀察與照相 tube formation 之狀況。

（六）血管新生相關因子的影響

1. 細胞 VEGF 之分泌情形

由於 VEGF 與血管新生有密不可分之關係，因此為了解不同之

石花菜萃取物對 VEGF 分泌之影響，細胞於不同石花菜萃取物與 PMA 共同培養 24 小時後，收集細胞培養基並利用市售 ELISA 試劑組分析並定量細胞所分泌之 VEGF。

2. 對 MMP 活性之影響

MMP 是一具有 gelatinase 活性可分解細胞外基質(ECM)的酵素[27]，血管新生之進行亦通常伴隨其活性的增加，因此這些石花菜萃取物對於 MMP 的活性的影響亦被探討。細胞與不同石花菜萃取物培養 24 小時後，取定量之細胞培養液蛋白質，以含 gelatin 之 SDS-PAGE 進行分析，以 Coomassie blue 染色後，再以影像分析系統定量並評估石花菜萃取物對於 MMP 之影響。

（七）統計分析

實驗結果以 SAS 軟體進行統計分析，數值均以平均值±標準偏差（Mean±SD）表示，以單因子變異數分析法（one-way ANOVA）分析所得之數據，並以 Fisher's test 比較組間差異。以 $p<0.05$ 表示有統計上的差異。

三、結果

（一）細胞生長

石花菜粉末之 PBS 和 methanol 萃取物質，於 2.5 ~ 7.5 mg/ml 之濃度範圍培養 2 至 6 天，皆不影響細胞生長【圖一(A), (B)】，但石花凍冷凍乾燥粉末之 DMSO 萃取物，於 0, 250 與 250 μg/ml 之濃度可能由於添加之 DMSO 含量高達 2%之故，因而幾乎完全抑制細胞的生長【圖一(C)】；於 PMA 刺激下，僅 7.5 mg/ml 之石花菜 PBS 萃取物與 500 μg/ml 石花凍 DMSO 萃取物可抑制細胞的生長，而 methanol 萃取物則無影響【圖二】。

（二）細胞增殖

與細胞生長之結果相似，MTS 分析結果顯示石花菜 PBS 和 methanol 萃取物於 2.5 ~ 7.5 mg/ml 濃度培養 1 天後，均不具細胞毒性，methanol 萃取物反而可促進細胞之增生；然而，在 PMA 之刺激下，石花菜 PBS 萃取物在 5 ~ 7.5 mg/ml 具細胞毒性【圖三(A), (B)】。然而，石花凍 DMSO 萃取物不論有無 PMA 之存在，0, 250 與 500 μg/ml 的濃度亦皆有較低的細胞增殖速率【圖三(C)】，此與細胞生長的結果類似。

（三）類血管生成之分析

血管內皮細胞具有分化之能力，同時可形成微血管狀的結構，因此利用血管內皮細胞形成管柱狀(tube formation)之能力，作為評估血管新生之作用。石花菜萃取物可影響血管內皮細胞之生長，因此亦觀察其是否可影響類血管新生作用。圖四指出石花菜 PBS 與 methanol 萃取物皆不影響類血管生成；然而，圖五(A)指出石花菜 PBS 萃取物於 7.5 mg/ml 於 EA hy 926 細胞之可抑制 PMA 所誘導之類血管生成，且此作用亦可於 HUVEC 細胞中呈現相似的結果（圖五(B)）。與細胞生長與增殖結果相似，石花凍 DMSO 萃取物，於較高 DMSO 濃度下(0 與 500 μg/ml)無明顯之類血管生成(圖六)；而石花菜 methanol 萃取物則不影響類血管的生成(圖七)。

（四）細胞 **VEGF** 之生成與分泌

VEGF是在缺氧的腫瘤細胞、巨噬細胞和免疫有關的細胞被大量製造，是目前已知最具效力促使血管新生的mitogen。結果顯示，石花菜PBS萃取物對EA hy 926細胞所分泌之VEGF無任何影響，但PBS萃取物(2.5～7.5 mg/ml)可降低PMA所誘導之VEGF分泌，而論有無PMA之存在，methanol萃取物反而可增加VEGF之生成(圖八)。

（五）MMP-2 活性

MMP 是一具有 gelatinase 活性可分解 ECM 的酵素[28]，血管新生之進行通常伴隨著其活性的增加。目前已知之 isoform 有二十多種，其中 MMP-9 及 MMP-2 於基底膜的破壞上扮演重要的角色，同時參與癌症的侵襲及轉移過程。由於石花菜 PBS 萃取物可抑制類血管生成，因此進一步探討石花菜萃取物是否可影響 MMP-2 之活性。圖九與圖十結果顯示，無論有無 PMA 之存在，石花菜 PBS 和 methanol 萃取物對 MMP-2 活性皆無影響，但隨著 PBS 萃取物劑量增加，一未知蛋白質(30~45 kDa)的表現有隨之增加的現象。而石花凍 DMSO 萃取物則與其他的結果相似，250 ~ 500 μg/ml 之濃度可能因含較高劑量之 DMSO，因而有較低之 PMA 導之 MMP-2 活性（圖十一）。

四、討論

本研究發現國人夏季常食用之石花菜，雖其水溶性 PBS 萃取物於 5 及 7.5 mg/ml 濃度可抑制、而脂溶性 methanol 萃取物於培養 24 小時後可促進細胞的增生，但此二種萃取物皆不影響血管內皮 EA hy 926 細胞的生長、類血管的形成以及血管新生相關因子，因而暗示石花菜的攝取不會影響血管新生的進行。然而，平日攝食形態石花凍之 DMSO 萃取物則未有一致性的結果，我們推測此乃因添加於培養基中之最終 DMSO 濃度太高(2%)之故我們分別曾試著以 PBS、methanol 與 DMSO 來萃取石花凍之冷凍乾燥粉末，但可能因其內含大量多醣體之故，PBS 與 methanol 之添加可使石花凍乾燥粉末膨脹，故造成萃取之困難，而當增加 PBS 與 methanol 體積得以取得萃取液時，該萃取液之濃度卻對各項分析均無顯著之影響。而 DMSO 雖可萃取出較高濃度之物質，但為避免添加至培養基內之 DMSO 濃度太高，因而我們以培養基進行連續稀釋，所以培養基內 DMSO 所含之濃度會隨著石花凍萃取物濃度增加而增加，因而我們的結果發現較高濃度之石花凍萃取物與控制組可能因含有較高濃度之 DMSO (2%)，故對細胞有較強的毒性。

在給予 PMA 誘導血管新生之模式下，石花菜 PBS 萃取物於 7.5 mg/ml 濃度下可能可藉由抑制細胞之生長，而抑制 EA hy 926 或 HUVEC 細胞類血

管之生成，且此作用伴隨著抑制 VEGF 生成和 MMP-2 活性，但是 methanol 石花菜萃取物則無明顯影響。

血管新生(angiogenesis)主要指由一已存在的血管形成新血管的過程，主要參與許多正常生理之調節，如傷口癒合以及女性生理週期等。此外，一些疾病的發生與血管新生不平衡一有密切的關係，如一些心血管疾病的發生被指出可能與血管新生作用的不足有關，然而一些疾病的發生與血管新生作用的過多表現有關，包括腫瘤的生長與風濕性關節炎和糖尿病之視網膜病變等[29, 30]。因此本研究之結果顯示，石花菜萃取物不影響生理狀態之血管新生作用，因而對於一些因血管新生作用缺乏而引起的心血管疾病可能無助益；然而，石花菜之 PBS 水溶性萃取物可抑制 PMA 所誘導之血管新生作用，因而可能於癌症發生的過程扮演一保護的角色。

研究指出，許多促血管新生因子（如 PMA、致癌物質、一氧化氮、細胞激素和缺氧情況）會促進 VEGF 之表現。VEGF 是目前被研究最多的促血管新生因子，由組織釋放之 VEGF 至鄰近的血管中，與血管內皮細胞上之接受體結合，進而活化內皮細胞產生一連串的訊息傳遞，引發內皮細胞進行增生(proliferation)、移行(migration)等血管新生相關反應[31, 32]。由此可見 VEGF 在血管新生之調節中扮演重要角色。由於石花菜 PBS 萃取物降低 VEGF 之分泌，因而推測其可藉由減少 EA hy 926 細胞 VEGF 之生成，而達

到抑制類血管之生成。

當血管內皮細胞受到一些促血管生成因子而活化時，除了受上游 VEGF 和其接受器結合影響訊息傳導調節過程外，亦可透過其他過程進行血管新生作用之發生，如促進細胞外基質之分解。一些參與基底膜分解之酵素(如: MMP-2, MMP-9)，即扮演著參與分解細胞外基質的角色，以進一步促進內皮細胞向外移行(migration)。研究指出，一般腫瘤細胞被證實含有大量 MMP-2 和 MMP-9[33]，因其參與細胞外基底膜分解，因此在腫瘤侵犯、轉移和血管新生過程皆扮演重要的角色。本實驗結果發現，石花菜 PBS 萃取物，雖不影響 PMA 所誘導 MMP-2 之分泌，但其隨劑量增加可增加一 30 ~ 45 kDa 蛋白質的表現。我們推測此蛋白質可能是 MMP-2 的分解蛋白質產物，其含量越高表示 MMP-2 分解情形增加，進而降低活性。

根據過去研究發現，天然食物中已知抑制血管新生作用之物質，均屬於多酚類物質，例如 EGCG、Genistein 和 resveratrol 等。本研究發現石花菜 PBS 水溶性萃取物，具有抑制血管細胞增生與體外 PMA 所誘導之血管新生作用，但其本身並不影響生理狀況之血管新生作用，因此推測，石花菜雖無法改善因血管新生缺乏所造成的心血管疾病，但其可提供飲食中所含之天然物質，同時可能於一些血管新生過多的疾病上扮演一保護的角色。然而有關其作用機制以及於動物及人體等體內的作用，需進一步實驗的證實。

五、結論與建議

本研究發現未給予 PMA 處理情況下，石花菜之 PBS 與 methanol 萃取物皆不影響血管內皮 EA hy 926 細胞的生長、類血管的形成以及血管新生相關因子，因而暗示石花菜的攝取不會影響正常生理狀態血管新生的進行。然而，於 PMA 誘導血管新生之模式下，石花菜 PBS 萃取物於 7.5 mg/ml 濃度下可能可藉由抑制細胞之生長，而抑制 EA hy 926 或 HUVEC 細胞類血管之生成，且此作用伴隨著抑制 VEGF 生成和 MMP-2 活性，但是 methanol 石花菜萃取物則無明顯影響。由於本研究乃以體外之細胞培養模式先初步了解石花菜對血管新生之影響，雖其 PBS 萃取物可抑制 PMA 所誘導之血管新生作用，於癌症的發生過程可能扮演一保護的角色，但仍須進一步的動物或人體實驗來證實此作用，且其作用機制仍須進一步探討。

六、九十三年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議

1.本計畫之新發現或新發明

本研究發現未給予 PMA 處理情況下，石花菜之 PBS 與 methanol 萃取物皆不影響血管內皮 EA hy 926 細胞的生長、類血管的形成以及血管新生相關因子，暗示石花菜的攝取不會影響正常生理狀態血管新生的進行。然而，於 PMA 誘導血管新生之模式下，石花菜 PBS 萃取物於 7.5 mg/ml 濃度下可能可藉由抑制細胞之生長，而抑制 EA hy 926 或 HUVEC 細胞類血管之生成，且此作用伴隨著抑制 VEGF 生成，但是 methanol 石花菜萃取物則無明顯影響。

2.本計畫對民眾具教育宣導之成果

根據過去研究發現，天然食物中已知抑制血管新生作用之物質，多均屬多酚類物質，例如：EGCG、Genistein 和 resveratrol 等。本次研究發現石花菜水溶性萃取物具有抑制血管內皮細胞增生與體外血管新生作用。可能其提供日常飲食中之天然物質之故。然而本研究乃以體外之細胞培養模式先初步了解石花菜對血管新生之影響，雖其 PBS 萃取物可抑制 PMA 所誘導之血管新生作用，於癌症的發生過程可能扮演一保護的角色，但仍須進一步的動物或人體實驗來證實此作用，且其作用機

制仍須進一步探討。

3.本計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於許多慢性老化疾病，如癌症和心血管疾病等，皆與血管新生作用有關。石花菜是台灣東北角之經濟產物，可預防癌症和心血管疾病之功效，但僅停留在坊間傳說，並未有科學證據支持。由本次實驗結果得知，石花菜萃取物（約 30~40 克石花菜乾燥原料），具有抑制血管內皮細胞之血管新生作用，因此可能有助於癌症以及心血管疾病之預防，提供國人預防老化疾病之飲食新指標。除此之外，可促進推廣民眾對石花菜之認識，應用在日常飲食中促進人類的健康，進而節省治療這些老化疾病所需要之醫療成本，另外亦可提供賴採石花菜為生之漁民另一生機，將此海洋資源充分加以利用。

七、參考文獻

1. 行政院衛生署台灣地區主要死亡原因網站: http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/93 年/表 1.xls

2. Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003; 9: 653-660
3. Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, Breibart RE, and Ginsburg GS: Atherosclerosis and cancer: common molecular pathways of disease development and progression. *Ann NY Acad Sci* 2001; 947: 271-292
4. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* 2000; 6: 389-395
5. Modlich U and Ricknell R: Angiogenesis. In: The Cancer Handbook (Alison MR ed.) Ch17, pp.235-245. Nature Publishing Group.
6. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186
7. Kumar R and Fidler IJ: Angiogenic molecules and cancer metastasis. *In Vivo* 1998; 12: 27- 34
8. Bohle AS and Kalthoff H: Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbecks Arch of Surg* 1999; 384: 133-140
9. Henry PD: Hypercholesterolemia and angiogenesis. *Am J Cardiol* 1993; 72: 61C - 64C
10. Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, Albini A: 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer preventive agents. *FASEB J* 2002; 16: 2-14

11. Timar J, Dome B, Fazekas K, Janovics A and Paku S: An update on angiogenesis t therapy. *Crit Rev Euk Gene Exp* 2001; 11: 1-21

12. Paper DH: Nature products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med* 1998; 64: 686- 695

13. Jung YD and Ellis LM: Inhibition of tumor invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int J Exp Path* 2001; 82: 309-316

14. Freedman SB: Clinical trials of gene therapy for atherosclerotic cardiovascular disease. *Current Opin Lipidol* 2002; 13: 653-661

15. 黃櫻、廖婉茹 海藻：來自海洋的保健草藥. *科技發展* 2003; 364: 30-37

16. Hiqashi-Okaj K. Otani S and Okai Y: Potent suppressive effect of a Japaneses edible seaweed, Enteromorpha prolifera (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Lett* 1999; 140：21-25

17. Yamamoto I. Maruyama H and Moriguchi M: The effect of dietary seaweeds on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett* 1987; 35：09-118

18. Yamori Y. Miura A and Taira K: Implications from and for food cultures for Cardiovascular diseases: Japanese food, particular Okinawan diets. 2001

19. Lim SN. Cheung PCK. Ool VEC and Ang PO: Elvaluation of antioxidantive activity of extracts from a brown seaweed, Sarassum siliquastrum. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3862-3866

20. 東北角資料庫：http://www.sinica.edu.tw/~dlproj/nec/dbase/154.html

21. Guven KC. GULER E. Aktin E. Koyuncuoglu H: Studies on Pterocladia capillacea (Gmel.) *Born Thur* 1979; PartII: 693-710

22. Harada H, Noro T and Kamei Y: Selectivity antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 541-546

23. Chen YH, Tu CJ and Wu HT: Growth inhibitory effects of the red alga Gelidium amansii on cultured cells. *Bio Pharm Bull* 2004; 27: 180-184

24. Dimmeler S, Zeiher AM: Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circulation Res* 2000; 87: 434- 439

25. Edgell CJ S, McDonald CC and Graham JB: Permanent cell line expressing human factor VII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3734- 3737

26. Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E and Juliano RL: In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J Cell Physiol* 1992; 153: 437- 449

27. Grove AD, Lapidos KA, Doong H and Kohn EC: Angiogenesis models. In: The Cancer Handbook (Alison MR ed.) Ch 62. pp971- 982. Nature Publishing Group.

28 McCawley LJ and Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opin Cell Biol* 2001; 13: 534-540

29. Blagosklonny MV: Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* 2004; **5**: 13-17.

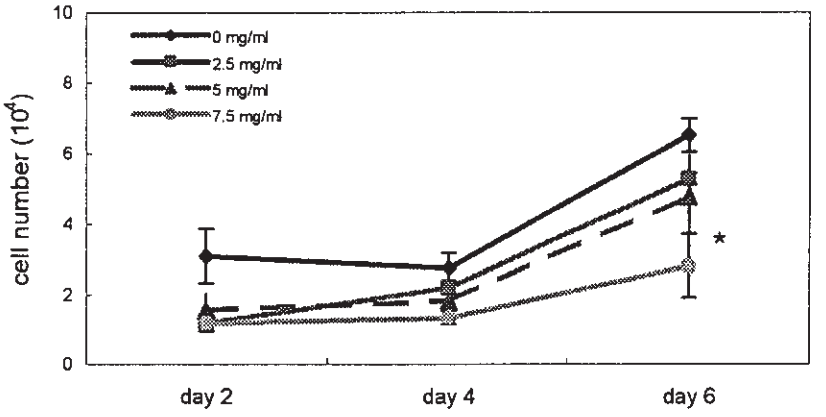
30. Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, Shirabe K, Shimada M, Wands JR and Sugimachi K: Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors. *J Gastroenterol* 2003; **38(Suppl 15)**: 93-97.

31. Gale NW and Yancopoulos G D: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999; **13**: 1055-1066.

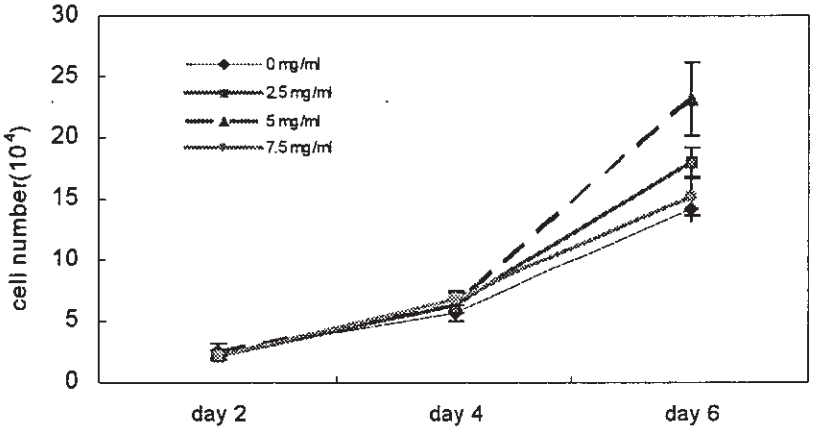
32. Gao N, Ding M, Zheng J Z, Zhang Z, Leonard S S, Liu K J, Shi X and Jiang B H: Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2002;**277**: 31963-31971.

33. John A and Tuszynski G: The role of matrix metalloproteinase in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 14-23

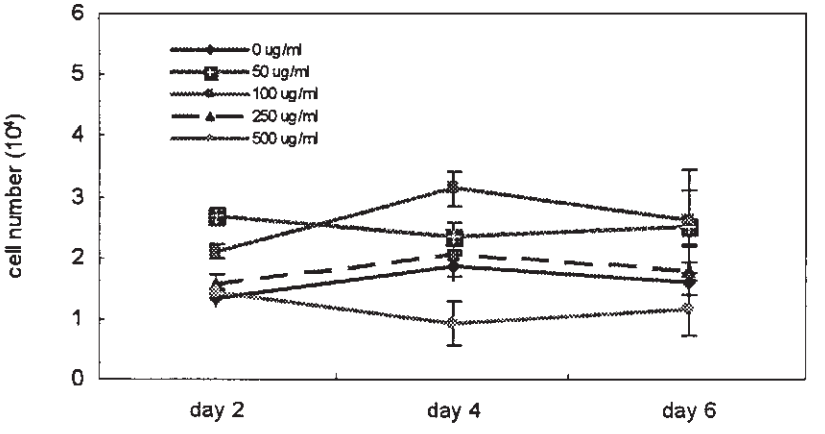
(A)



(B)

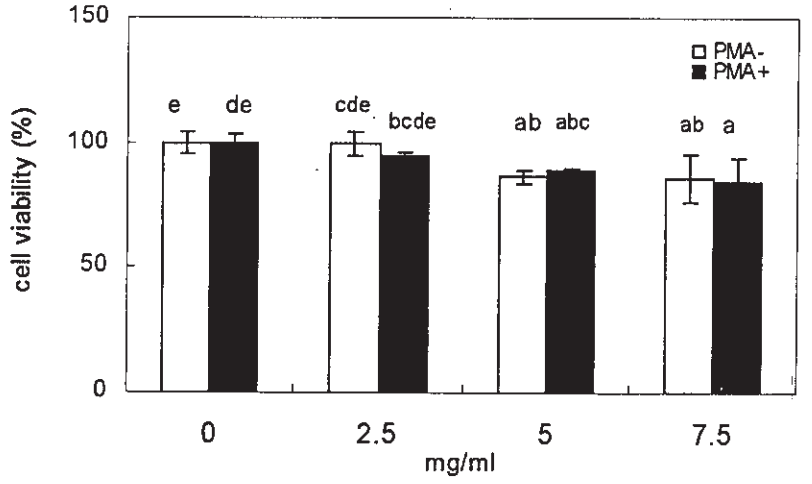


(C)

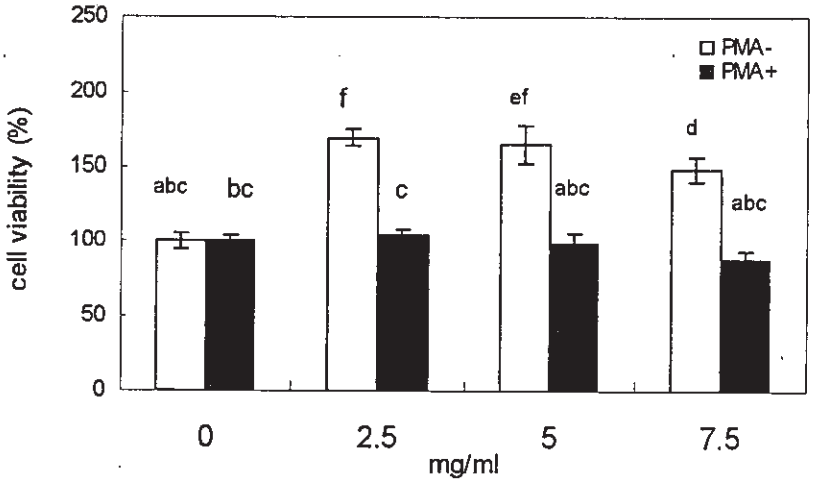


圖二 石花菜之 PBS 萃取物(A)與 Methanol 萃取物(B)以及石花凍 DMSO 之萃取物(C)對 PMA 誘導之 EA hy 926 細胞生長的影響

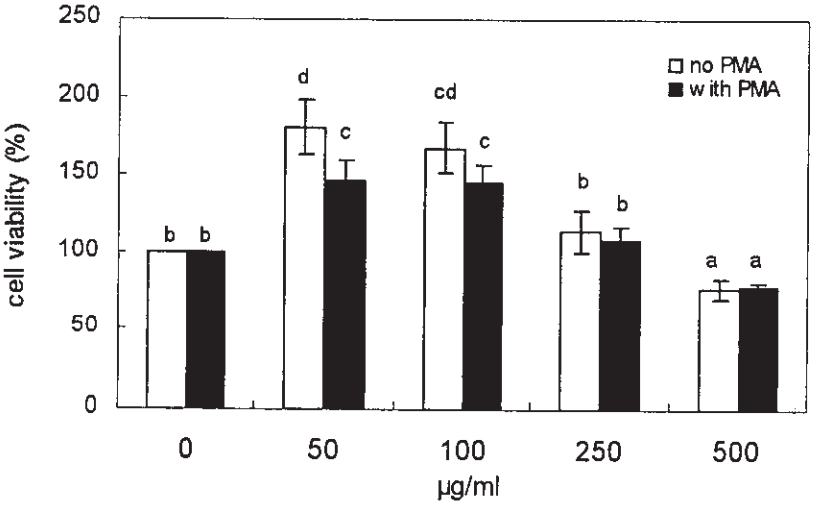
(A)



(B)

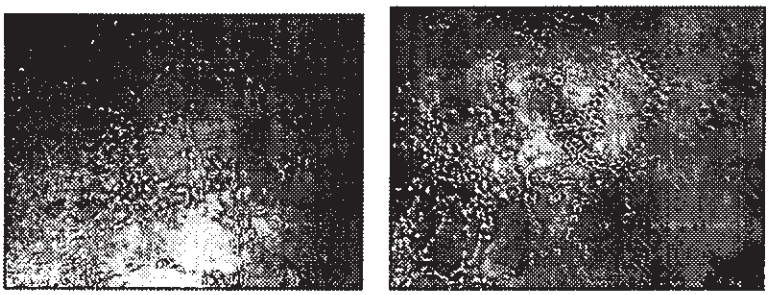


(C)

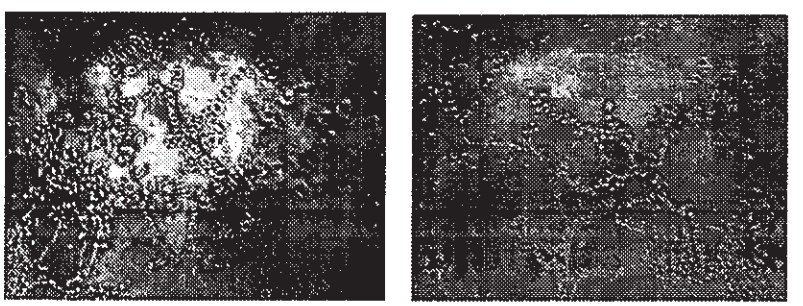


圖三 石花菜之 PBS 萃取物(A)與 Methanol 萃取物(B)以及石花凍 DMSO 之萃取物(C)對 EA hy.926 細胞增殖的影響

(A)

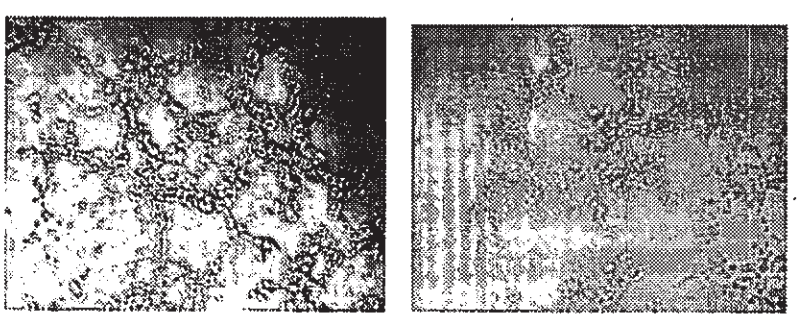


PBS　　P 2.5 mg/ml

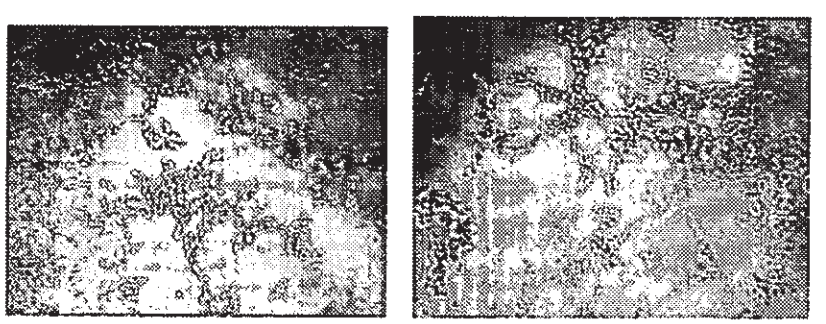


P 5 mg/ml　　P 7.5 mg/ml

(B)



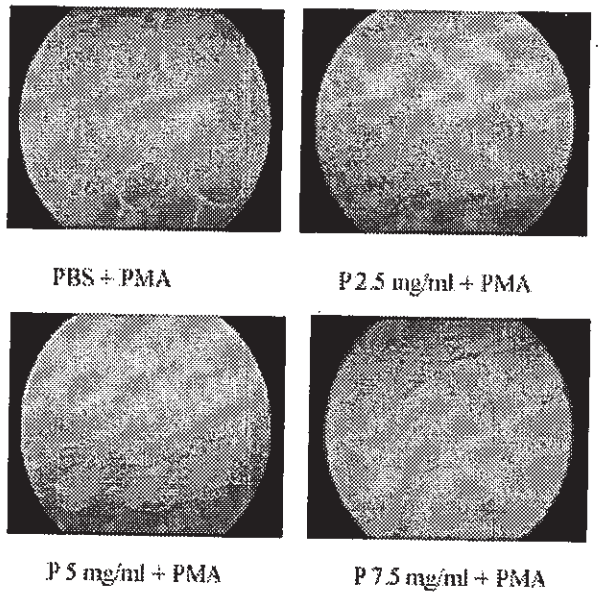
Methanol　　M 2.5 mg/ml



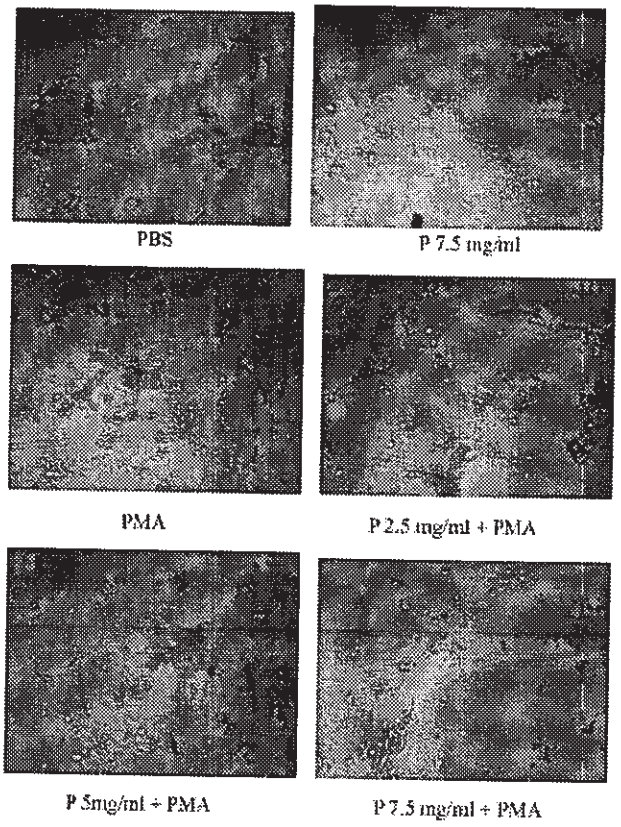
M 5 mg/ml　　M 7.5 mg/ml

圖四 石花菜 PBS 萃取物(A)與 methanol 萃取物(B)對類血管生成之影響

(A)

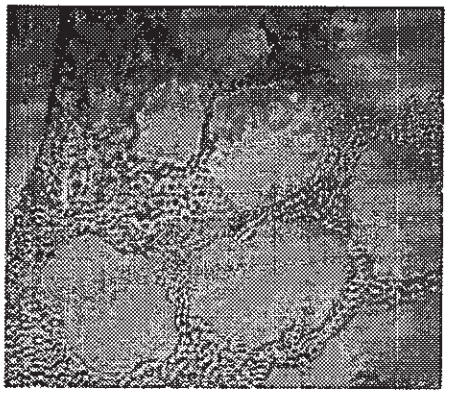


(B)

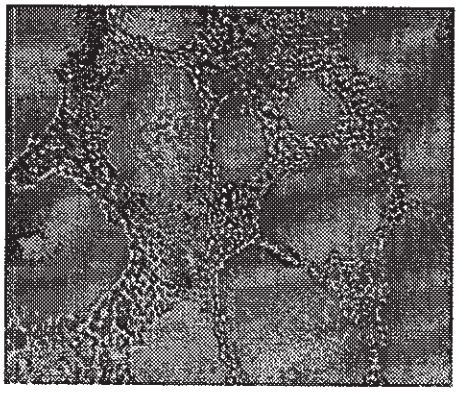


圖五 石花菜 PBS 萃取物對 PMA 誘導 EA hy 926 細胞(A)與 HUVEC 細胞(B)類血管生成之影響

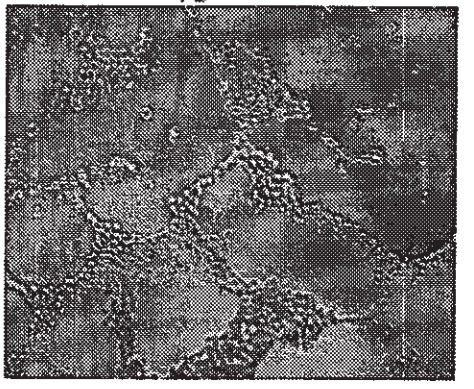
DMSO + PMA



D 50 μg/ml + PMA



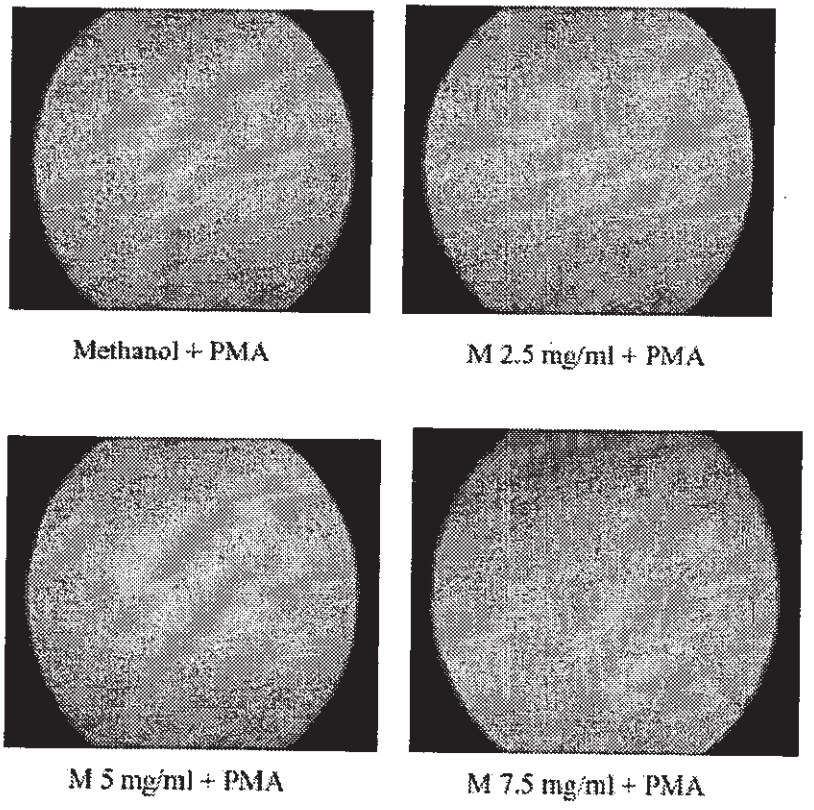
D 100 μg/ml + PMA



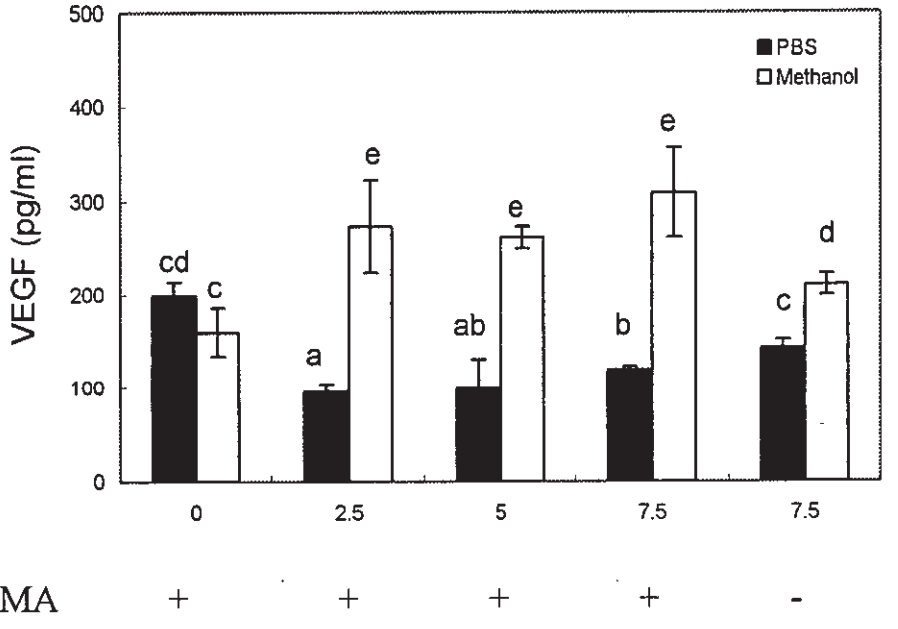
D 250 μg/ml + PMA

D 500 μg/ml + PMA

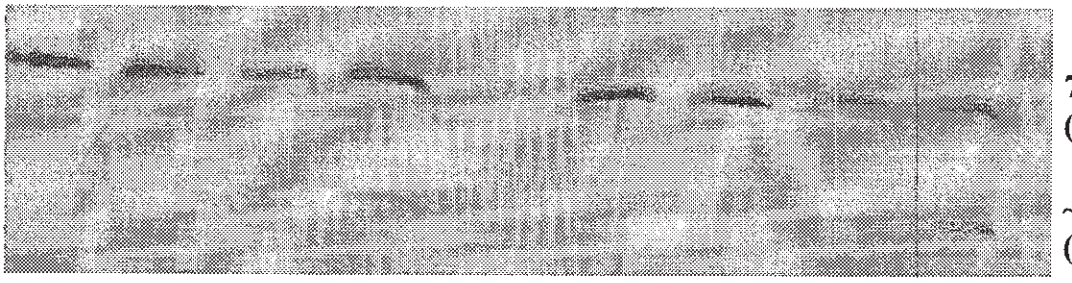
圖六 石花凍 DMSO 萃取物對 PMA 誘導 EA hy 926 細胞類血管生成之影響



圖七 石花菜 methanol 萃取物對 PMA 誘導 EA hy 926 細胞類血管生成之影響

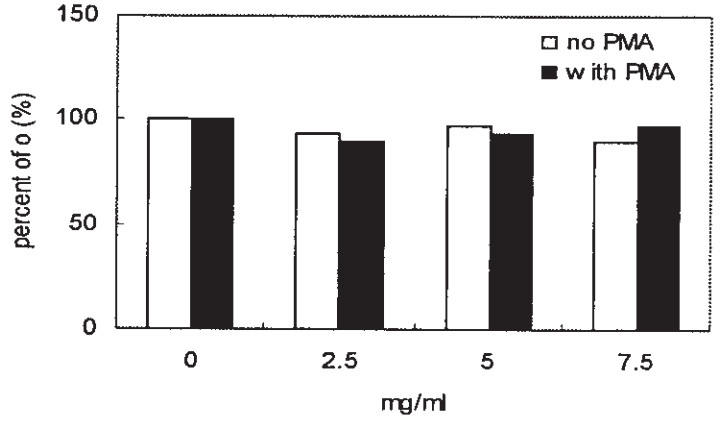


圖八 石花菜之 PBS 萃取物與 Methanol 萃取物對 EA hy 926 細胞之 VEGF 分泌的影響

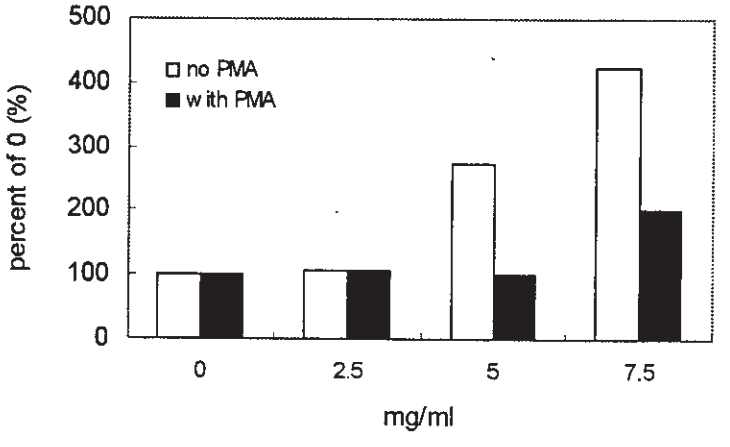


PMA	-	-	-	-	+	+	+	+
mg/ml	0	2.5	5	7.5	0	2.5	5	7.5

(B) MMP-2 之量化圖

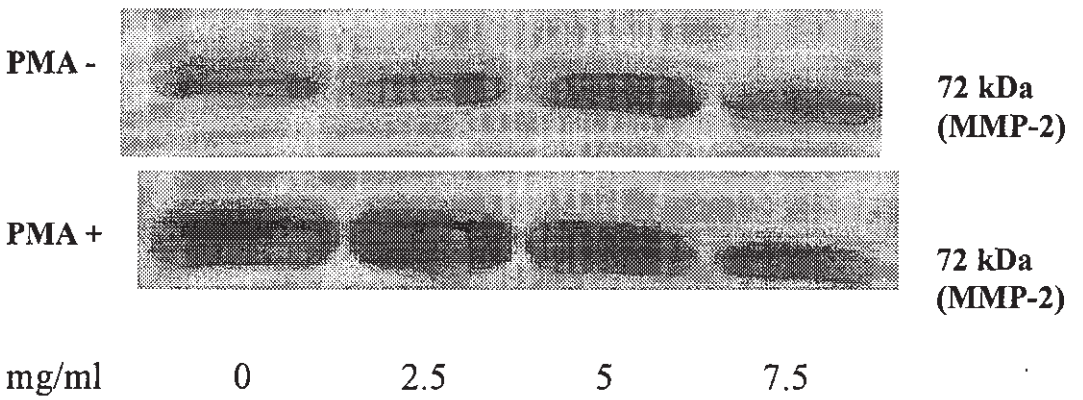


【45kDa 之量化圖】

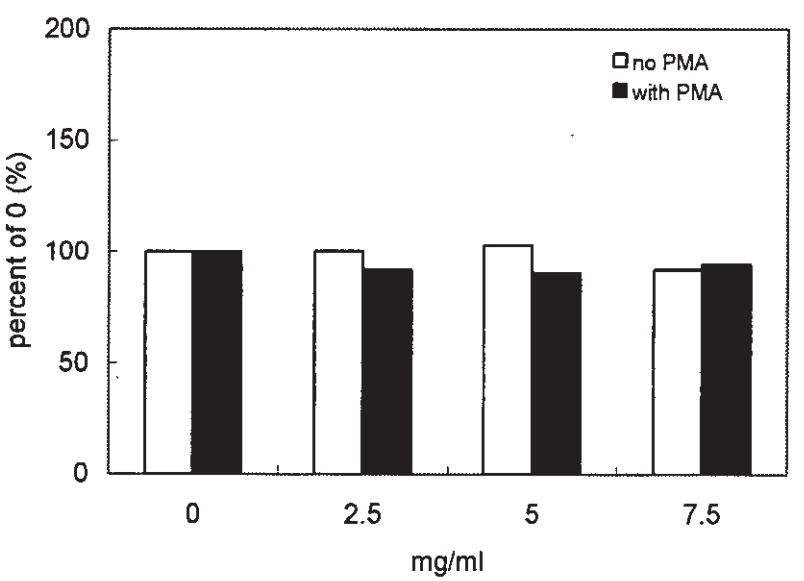


圖九 石花菜之 PBS 萃取物對 EA hy 926 MMP-2 之影響(A)及量化圖(B)

(A)

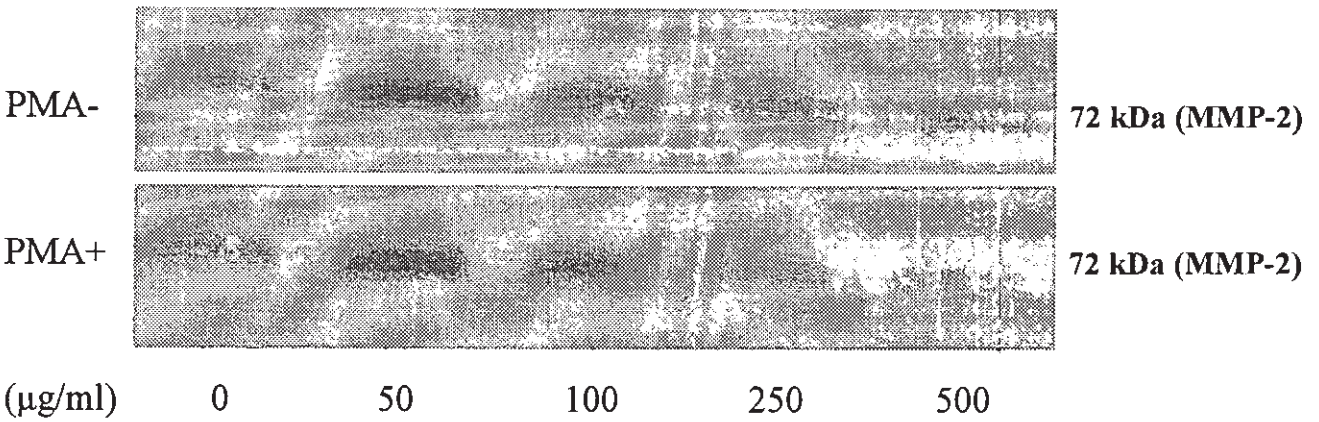


(B) MMP-2 之量化圖

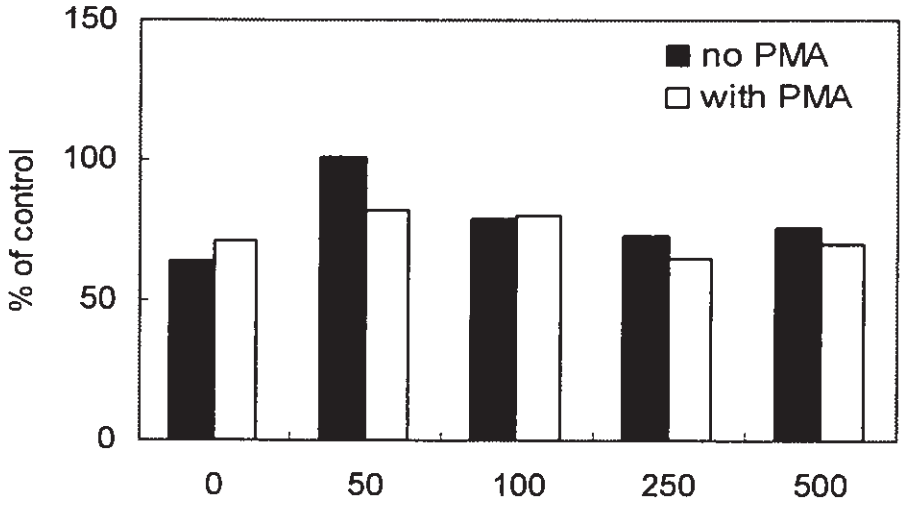


圖十石花菜之 methanol 萃取物對 EA hy.926 MMP-2 之影響(A)及量化圖(B)

(A)



(B) MMP-2 之量化圖



圖十一石花凍 DMSO 之萃取物對 EA hy.926 MMP-2 之影響(A)及量化圖(B)