

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：荷葉多酚經由調節 Her2 及 ER alpha 增加化療藥物 Tamoxifen 與 Trastuzumab 的抗乳癌作用 *
* ***** *

執行計畫學生： 林信頤
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-029-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 許立松

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 105年03月31日

(一) 中文摘要

癌症已連續 32 年高居國人死因之首位，因此尋找新的特殊化學物質用於治療或預防癌症為現今科學界之重要研究趨勢。本實驗室長期致力於發展使用天然物質治療或預防癌症，以降低由傳統治療方法對人體所造成的嚴重副作用與傷害。過去已有許多報告證實荷葉具抗氧化活性、降血脂等作用，卻對於荷葉特有化學物質對癌症治療的效果未多加著墨。

本研究以全方位的方法多管其下，研究台灣鄉間常見之荷葉，其荷葉多酚萃取物 (Polyphenols extract of *Nelumbo Nucifera* Leaf, NLPE) 與癌症預防治療的相關性及可行性。首先探討 NLPE 是否具有抑制乳癌細胞生長之能力，進而研究 NLPE 與 Tamoxifen、Herceptin 共同使用是否能產生協同作用，提升化療藥物之療效。同時研究 NLPE 造成乳癌細胞凋亡之路徑與蛋白質作用標的。

本研究已進行細胞毒性試驗及動物移植性腫瘤試驗。結果均顯示 NLPE 確實會抑制乳癌腫瘤的生長並且在細胞毒性試驗中可見 NLPE 與四種抗癌藥物 Tamoxifen、Herceptin、Doxorubicin 與 Paclitaxel 共用皆可產生協同作用，增加抗癌藥物的效果。在動物移植性腫瘤試驗中更可見 NLPE 與 Tamoxifen 及 Herceptin 共用，對實驗動物身上的腫瘤產生顯著的協同作用，抑制癌細胞的生長。

由於荷葉在國內容易種植，因此本研究成果可望應用於發展具有預防癌症與抵抗癌潛力的食品，提升荷葉農業價值。期望有朝一日甚至能開發成為價格合理的抗癌藥劑，取代價格高昂的乳癌標靶藥物。

(二) Abstract

Cancer has been ranked first in Taiwan's cause of death for 32 consecutive years, thus finding new chemical compounds to treat or prevent cancer is the most important trend of research now days. Our laboratory is committed to develop new method that treat or prevent cancer with natural substances, in order to reduce the damage of human body from severe side effects and drug toxicities associated with traditional treatments. Many past studies have confirmed that *Nelumbo Nucifera* leaf has antioxidant activity, blood-lipid lowering effects, but the effectiveness of unique chemicals in the *Nelumbo Nucifera* leaf in cancer treatment has yet to be determined.

Nelumbo Nucifera leaf is fairly common in the countryside of Taiwan. Our study utilized a full range of different approaches to exam the NLPE (Polyphenols extract of *Nelumbo Nucifera* Leaf) substance and its relevance and feasibility of cancer prevention and treatment. First, we will investigate whether NLPE has the ability to inhibit the growth of breast cancer cell lines. Further studies include: Whether NLPE can produce a synergistic effect with Tamoxifen and Herceptin that enhance the efficacy of chemotherapy. Determine which signal pathway and target protein that NLPE affected cause the apoptosis

of breast cancer cells.

Preliminary results have shown NLPE does suppress the growth of breast cancer tumors. The results of this study are expected to be applied to the development of new health food with cancer prevention and cancer curing potential. Since it is simple to grow *Nelumbo Nucifera* leaf in our country, the agricultural value of *Nelumbo Nucifera* will be significantly improved. Hopefully someday it will be developed into affordable anti-cancer agents, replacing the expensive breast cancer targeted therapy.

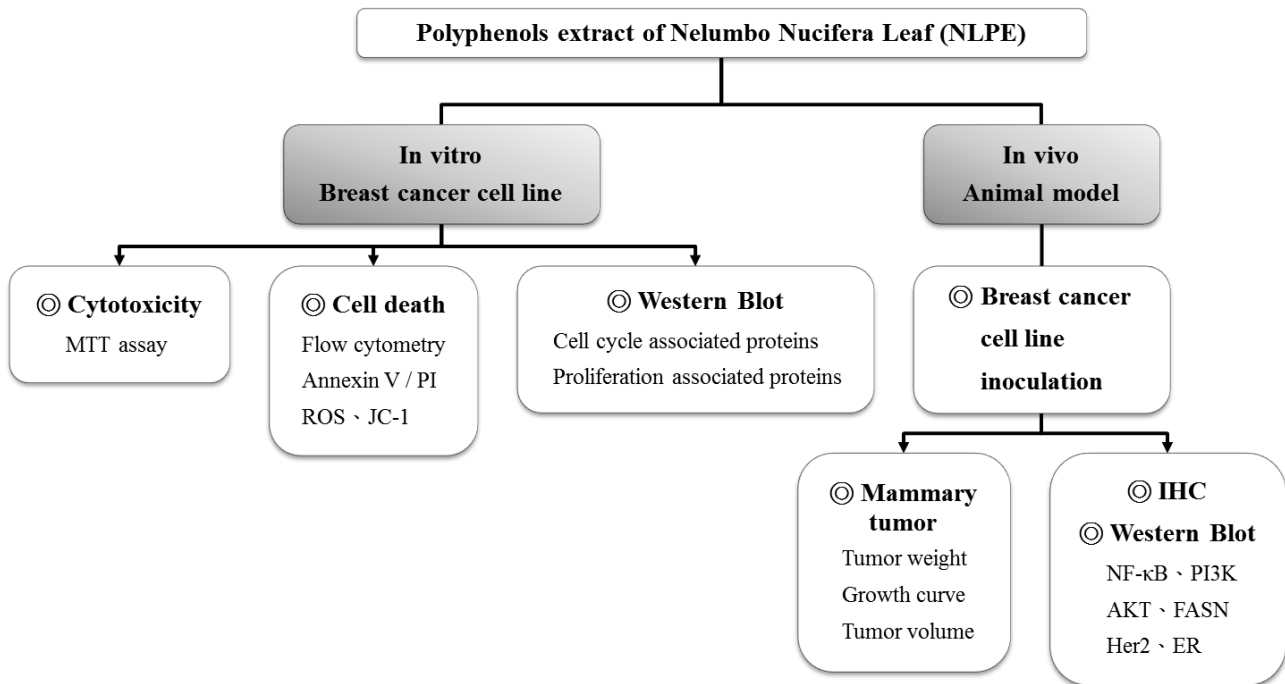
(三) 研究動機與研究問題

根據衛生福利部的資料顯示，惡性腫瘤標準化死亡率從民國 76 年逐年上升，自民國 71 年起已連續 32 年高居國人死因之首位。死亡人數逐年增加，其占率從 70 年之 16.0% 逐年上升至 101 年達 28.4%，占率增加 12.4 個百分點。從各癌症之平均生命年數損失來看，女性乳癌高達 16.2 年，是女性特有癌症之首。101 年國人惡性腫瘤死亡年齡中位數為 70.0 歲。而女性乳癌死亡年齡中位數更低於 60 歲，達到所有女性癌症中最低的 58.0 歲。顯示乳癌對於女性健康影響日漸深遠，所以女性乳癌在國內公共衛生的防治上顯得格外重要。探討乳癌的形成原因以及找出適當、副作用少的治療方式，對於乳癌防治策略的貢獻實著重要。

長久以來本實驗室致力於開發天然物中所含的特殊成分，希望可以藉由簡單的攝入食品來達到預防、治療腫瘤發生之目的。現今癌症的治療方式，大多採用手術摘除、放射治療或是投予化學藥物，皆會對人體造成較大的傷害並伴隨著相當程度的副作用。因此近年來許多研究趨向以天然藥物來達到治療疾病的目的，而如何藉由中藥草之特性與發展，提升對於腫瘤的治療與預防是一個值得我們深入探究的議題。

本研究計畫主要探討之議題為：

1. 荷葉多酚萃取物是否能有效抑制乳癌細胞之增生，其主要的的作用機制為何？
2. 將荷葉多酚萃取物與臨床藥物 Tamoxifen、Herceptin、Doxorubicin 與 Paclitaxel 共同使用，探討 NLPE 是否能夠具有提升或輔助臨床用藥的效果？
3. 利用流式細胞儀檢測 Annexin V / PI-ROS、JC-1 等分析乳癌細胞凋亡的機制為何？
4. 利用西方墨點法檢測 NF- κ B、PI3K、AKT、FASN、Her2 及 ER，探討導致乳癌細胞凋亡所影響的蛋白為何？
5. 利用動物移植性腫瘤試驗，藉由餵食添加荷葉多酚萃取物與臨床藥物 Tamoxifen、Herceptin 的飼料，驗證其是否具有治療及預防乳癌生長之療效，而兩種藥物共同餵食時是否會有加成作用？



(四) 文獻回顧與探討

I. 乳癌

乳癌是全球婦女最常發生的癌症。目前台灣乳癌也是女性好發癌症的第一位，死亡率為第四位。國內婦女隨著生活型態及飲食習慣西化的改變，台灣女性乳癌發生率從 1995 年的 28.46，增加為 2009 年的 59.91，大幅成長 110%。從流行病學相關研究指出，誘導乳癌發生的可能因子有：

- A. 基因突變：brca1，brca2，p53，pten 與 stk11/lkb1 等基因的突變已被證實與家族遺傳性乳癌有關。
- B. 年齡：在西方國家，乳癌發生率隨年齡增加而逐漸增高，每增加 10 歲發生率約增加 2 倍，直到約 45-55 歲，亦即平均停經年齡，增加數目才趨近於平緩。
- C. 賀爾蒙暴露時間過長：初經過早 (early menarche)、停經過晚 (late menopause)、三十歲以後生育第一胎、長期口服避孕藥或第一次服用避孕藥年齡小於 20 歲、接受賀爾蒙支持性療法者 (尤其合併使用雌激素與黃體素者)；脂肪細胞過多：酗酒及更年期後過度肥胖者。
- D. 家族史：約 10% 的乳癌病人具有乳癌家族病史，家族中有一等親 (母親、姊妹、女兒) 罹患乳癌者，其乳癌發生率也高於不具家族史者。[1-4]

II. 與乳癌相關之蛋白

A. 神經膠原致癌基因 (HER2)

HER2 的訊息傳導約可大致分為三大方式：

1. PI3K 路徑：HER2 可以直接活化 PI3K-Akt 路徑，當 Akt 被活化後，可以將 Bad 和 MDM2 磷酸化達到抑制細胞凋亡的發生。
2. PLC γ 路徑：HER2 可以活化 PLC γ 進而活化 PKC，調控細胞內鈣離子的濃度，有抑制細胞凋亡的作用[5,6]。
3. MAPK 路徑：HER2 可與 Grb2 和 Shc 的 SH2 區域結合，接著會與 SOS 蛋白結合，進而活化 Ras-MAPK 的路徑。

當 HER2 活化時，可經由訊息傳遞而導致腫瘤的發生。在目前人類癌症中，經由 HER2 過度表現所引起的相關癌症，已知有乳癌、卵巢癌、膀胱癌、攝護腺癌、胃癌、直腸癌、肺癌等。其中約有 30% 乳癌經由 HER-2 基因倍增及其蛋白過度表現引起，復發率極高，因此 HER-2 可當做乳癌病人復發率的指標[7]。

HER2 本身與配體 (ligand) 親和力極低，甚至被歸類為無配體上皮細胞生長因子受體 (ligandless receptor)，但其活化方式可經由和其它受體形成之異質雙體

(heterodimers) 在與專一配體結合可誘導其活化，雖然 HER3 本身無內生性酪胺酸激酶活性，但 HER2-HER3 卻是最常見也是活性最強的異質雙體[8]。經過基因倍增 (gene amplification) 與蛋白過度表現 (protein over-expression) 兩種方式，可促進訊息傳導而使下游蛋白磷酸化及活化，因而加速細胞增殖，誘發產生細胞轉形作用 (cell transformation) 使細胞癌化[9]。人類 HER2 基因位於第十七號染色體的長臂 q12-q21 區域[10]，包含 3765 個核苷酸，可轉譯成 1255 胺基酸之 HER2 蛋白 (p185HER2/neu，簡稱 p185HER2)，擁有自我磷酸化功能，分為胞膜外 (N 端) 區域、穿膜區域和胞膜內 (C 端) 三區域，屬於上皮細胞生長因子受體家族 (EGFR family) 成員，目前屬於上皮細胞生長因子受體家族成員的有 erbB-1/HER1/EGFR、erbB-2/HER2/neu、erbB-3/HER3[11] 及 erbB-4/HER4[12] 其間結構有高相似性。

B. 雌激素受體 (Estrogen Receptors)

雌激素受體 (Estrogen receptors/ER) 為固醇類性荷爾蒙受體家族 (SSHR/sex steroid hormone receptor superfamily) 的成員之一，廣泛分佈於脊索動物和哺乳動物體內。雌激素受體為一受到親脂性配體 (lipophilic ligand) 化的轉錄因子 (ligand-inducible transcriptional factors)，可與雌激素結合，調控男性及女性的生殖發育、脂質代謝、骨骼生長、調節心血管及神經系統等各種生理機能，雌激素亦會刺激子宮內膜、乳房的增生，因此，雌激素受體與子宮內膜及乳房的癌化具有相關性[13]。

人類雌激素受體可分為 α 、 β 兩大類，他們分別由不同的基因所轉錄、轉譯而成，雌激素受體- α (ER α) 基因位於第六對染色體長臂[14]，而雌激素受體- β (ER β) 基因位於第十四對染色體長臂上[15]。

C. 脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN)

FAS 由兩個單體所組成，每個單體中含有七個酵素，主要參與脂肪酸的新生作用，

FAS 在哺乳動物中，其分子量高達 272 kDa。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN) 可將乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 和丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA) 轉換為為棕櫚酸 (palmitate)，是能量代謝過程中一個重要的酵素複合體，在肝臟和脂肪組織的脂質合成扮演著重要的角色。

其表現量異常與肥胖、心血管疾病和癌症有密切關聯。早先的研究指出 FASN 在腫瘤細胞中有過度表現，而在正常細胞則未表現。FASN 參與腫瘤細胞生長和存活，其調控表達成分複雜，包含轉錄、轉譯後調控等。而癌細胞中需要合成大量的脂肪酸，若能抑制此酵素，便具有抗腫瘤之活性。故癌症治療藥物中 FASN 之抑制作用便顯得十分重要。

之後的研究中 Nakamura 等人利用免疫組織染色觀察到在乳癌臨床病人的檢體中 FASN 有大量表現的情形。而在乳癌病患中，FASN 的表現量低的患者其預後與存活率也比較高[16]。另外，Porter 等人利用 tissue microarray 分析 FASN 在不同時期的乳癌組織中表現差異。結果發現約有 38.8% 的 ductal carcinoma、51.0% 的 primary invasion tumors、50.0% 的 metastatic-distant 與 lymph node-breast carcinoma 有著 FASN 的過量表現 (FASN over expression)。有趣的是，在有表現 ER 或 HER2/neu 的腫瘤組織當中，FASN 的過量表現更為顯著[17, 18]。有文獻指出，在有表現 ER 的乳癌細胞當中，利用基因轉殖方式送入 HER2 大量表現 (MCF-7/HER2) 或是本身即有 ER 與 HER2 大量表現的乳癌細胞 (BT-474) 中可以發現到有 FASN 的高度表現，而在上述的細胞中利用 siRNA 降低 FASN 的表現則可增加抗癌藥物的作用[19]。2012 年的研究指出大葉茜草素 (Mollugin) 抑制 HER2 基因過度表達之癌症細胞增殖和誘導腫瘤細胞凋亡是透過調控 HER2/Akt/SREBP-1c 路徑，進而阻斷 FAS 基因的表現 [20]。

D. NF- κ B

核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, 簡稱為 NF- κ B) 是一種控制 DNA 轉錄的蛋白複合體。NF- κ B 幾乎存在於所有類型的動物細胞中，並參與細胞對諸多刺激的反應。這些刺激包括紫外線照射、細胞因子、自由基、氧化 LDL 及細菌或病毒抗原[21-25]。在針對感染的免疫反應中，NF- κ B 起到了重要的調節作用(κ 輕鏈是免疫球蛋白的重要組成部分)。而 NF- κ B 的調控失常與癌症、發炎和自身免疫病、感染性休克、病毒感染以及免疫發育異常有關。

III. 荷葉之背景介紹

植物蓮學名 *Nelumbo Nucifera* Gaertner。英名 East Indian Lotus，俗稱 Lotus，中文亦稱「蓮」、「荷」，是宿根性多年生水生植物。蓮在印度、中國及日本菲律賓等國皆有產，但主產地在印度。近百年內才由日本傳入臺灣，並開始大量種植，主要分佈在白河鎮及嘉義、台南市郊一帶，蓮的經濟作物以生產蓮子、蓮藕及藕粉等加工品為

主。

目前知道荷葉含多種生物鹼：如原荷葉鹼 (pronuciferine)、牛心果鹼 (anonaine)、繞袂鹼 (roemerine)、N-去甲荷葉鹼 (N-nornuciferine)、o-去甲荷葉鹼 (o-nornuciferine)、亞美帕鹼 (armepavine)、荷葉鹼 (nuciferine)、N-甲基衡州烏藥鹼 (N-methylcoclaurine)、鵝掌楸鹼 (liriodenine) 及去氧繞袂鹼 (dehydroroemerine) [26] 等等。荷葉也另含抗氧化物質類黃酮：荷葉苷 (nelumboside) [27]、oligomeric procyanidins 及其槲皮素、異槲皮甙 [28,29]，以及維生素 C、蘋果酸、草酸、琥珀酸、酒石酸、枸橼酸、葡萄糖酸、鞣質。另外，還含抗有絲分裂作用的鹼性成分 [30]。根據前人對荷葉中的有效成分之分析，荷葉中的類黃酮 (flavonoids) 及生物鹼 (alkaloids) 的代表性的功效為抗氧化與降血脂兩大方面。

(五) 研究方法及步驟

I. 荷葉多酚萃取物 (NLPE) 的製備

取乾燥荷葉粉末 20 g 加入 1000 mL 的二次水在 4°C 下浸放，先經濾紙過濾粗渣，而後於 -80°C 冷凍，再以真空冷凍乾燥使其形成粉末即為荷葉水萃取物 (NLE)。取 10g 荷葉水萃取物 (NLE) 加入 100 mL 甲醇在 50°C 下浸煮 3 小時，連續處理 3 次，經濾紙過濾粗渣，而後在 50°C 下減壓濃縮乾燥，以適量的二次水溶解，再加入適量的己烷，取水層，再加入適量的乙酸乙酯萃取，連續處理 3 次，取乙酸乙酯層，而後在 50°C 下減壓濃縮乾燥，以適量的二次水溶解，再以真空冷凍乾燥使其形成粉末即為荷葉多醇萃取物 (NLPE)。實驗時，以乾燥粉末稱重配製成不同濃度 NLPE。使用於細胞實驗操作時，NLPE 配製的各濃度溶液需先經 0.22 μm filter 過濾除菌。

II. 乳癌細胞培養

A. 人類腺導管瘤細胞株 BT-474

人類腺導管瘤細胞株 BT-474 來自新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC)。BT-474 培養於 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (DMEM/F12) 中，並依照 BCRC 所提供之培養條件添加 10% fetal bovine serum (FBS)，培養箱設定 5% CO₂，37°C 的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。

B. 人類乳癌細胞株 MCF-7

人類乳癌細胞株 MCF-7 來自新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC)。MCF-7 培養於 Minimum essential medium Eagle (MEM) 中，並依照 BCRC 所提供之培養條件添加 2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、以及 10% fetal bovine serum (FBS)，培養箱設定 5% CO₂，37°C 的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。

III. 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity assay)

將乳癌細胞 BT-474 (5×10^4 cell/well) 或 MCF-7 (5×10^4 cell/well) 培養於 24 well culture plate，加入不同濃度的 NLPE 與 Tamoxifen (5.0-10.0 μ M)、Herceptin (50.0-100.0 μ g/mL)、Doxorubicin (1.0-10.0 μ M)、Paclitaxel (20.0-120.0 nM) 處理 24 小時後，移除舊的培養基 (含 NLPE 與化療藥物)，換入新的培養基和 MTT (0.5 mg/mL) 反應 4 小時，移除培養基，加入異丙醇將結晶溶出，在波長 563 nm 下測定吸光值的變化。

IV. 動物移植性腫瘤試驗 (Tumorigenic assay)

實驗動物為鼠齡 6 週之 nude mice 母鼠，購自國家實驗動物中心，動物室溫度維持 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，濕度 $65 \pm 5\%$ ，光照及黑暗各 12 小時，每週記錄一次飼料攝取量及體重變化。將人類乳癌細胞株打至 nude mice 腹部乳房皮下脂肪組織，一週後隨機分成 8 組 (n=6): Group I: 餵食正常飲食; Group II: 單獨餵食抗癌藥物 Tamoxifen 組; Group III: 單獨餵食 0.5% NLPE 組; Group IV: 餵食抗癌藥物 Tamoxifen 配合 0.25% NLPE 組; Group V: 餵食抗癌藥物 Tamoxifen 配合 0.5% NLPE 組; Group VI: 單獨餵食抗癌藥物 Herceptin 組; Group VII: 餵食抗癌藥物 Herceptin 配合 0.25% NLPE 組; Group VIII: 餵食抗癌藥物 Herceptin 配合 0.5% NLPE 組，四週後將 nude mice 犧牲，分析腫瘤的大小與重量，實驗期間每天記錄腫瘤大小變化。

V. 統計分析

所有 *in vivo* 或 *in vitro* 之實驗分析，皆為獨立操作並重複三次以上，並以 student's t-test 作為統計分析，凡 $p < 0.05$ 時表示為有意義的差異。

(六) 結果與討論

I. BT-474 人類腺導管癌細胞

首先，我們要探討 NLPE 是否會對人類乳癌細胞產生毒殺性作用。我們選用人類腺導管癌細胞 BT-474 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以在不同濃度 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/ml) 進行分析並量化製成折線圖。從 Fig.1 得知，加藥處理 24 小時後，半致死劑量 (IC_{50}) 大約等於 2.13 mg/mL NLPE，因此我們決定加藥時間設定為 24 小時，並進行以下實驗。

A. Herceptin (Trastuzumab)

以 MTT assay 分析 BT-474 細胞處理不同劑量的 Herceptin，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成折線圖，觀察 BT-474 對 Herceptin 的反應。由 Fig.2 得知，以不同劑量的 Herceptin (0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) 處理 24 小時後皆無法造成一半以上細胞死亡。

接著探討 Herceptin 與 NLPE 共用是否會對 BT-474 細胞凋亡產生協同作用。我們選用人類腺導管癌細胞 BT-474 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以不同濃度的 Herceptin (0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) 與不同濃度的 NLPE (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml) 進行分析。從 Fig.2 中得知，加藥處理 24 小時後，只有最高濃度的 NLPE (3 mg/ml) 會達到半致死劑量 (IC_{50})。在 NLPE 濃度 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml 分組中可見 NLPE 與 Herceptin 產生協同作用，加強了 Herceptin 抑制腫瘤細胞生長的效果。

B. Tamoxifen (Nolvadex)

以 MTT assay 分析 BT-474 細胞處理不同劑量的 Tamoxifen，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成折線圖，觀察 BT-474 對 Tamoxifen 的反應。由 Fig.3 得知，以不同濃度的 Tamoxifen (0, 5.0, 7.5, 10.0 μM) 處理 24 小時後皆無法造成一半以上細胞死亡。

接著探討 Tamoxifen 與 NLPE 共用是否會對 BT-474 細胞凋亡產生協同作用。我們選用人類腺導管癌細胞 BT-474 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以不同濃度的 Tamoxifen (0, 5.0, 7.5, 10.0 μM) 與不同濃度的 NLPE (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml) 進行分析。從 Fig.3 中得知，加藥處理 24 小時後，只有最高濃度的 NLPE (3 mg/ml) 會達到半致死劑量 (IC_{50})。在 NLPE 濃度 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml 分組中可見 NLPE 與 Tamoxifen 產生協同作用，加強了 Tamoxifen 抑制腫瘤細胞生長的效果。

C. Doxorubicin (Adriablastin)

以 MTT assay 分析 BT-474 細胞處理不同劑量的 Doxorubicin，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成折線圖，觀察 BT-474 對 Doxorubicin 的反應。由 Fig.4 得知，以不同濃度的 Doxorubicin (0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 μM) 處理 24 小時後皆無法造成一半以上細胞死亡。

接著探討 Doxorubicin 與 NLPE 共用是否會對 BT-474 細胞凋亡產生協同作用。我們選用人類腺導管癌細胞 BT-474 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以不同濃度的 Doxorubicin (5.0, 10.0 μM) 與不同濃度的 NLPE (0, 2.0, 3.0 mg/ml) 進行分析。從 Fig.4 中得知，加藥處理 24 小時後，只有最高濃度的 NLPE (3 mg/ml) 會達到半致死劑量 (IC_{50})。在 NLPE 濃度 2.0, 3.0 mg/ml 分組中可見 NLPE 與 Doxorubicin 產生協同作用，加強了 Doxorubicin 抑制腫瘤細胞生長的效果。

D. Paclitaxel (Taxol)

以 MTT assay 分析 BT-474 細胞處理不同劑量的 Paclitaxel，其 24 小時細胞存活率分析，並量化製成折線圖，觀察 BT-474 對 Paclitaxel 的反應。由 Fig.5 得知，以不同濃度的 Paclitaxel (0, 20.0, 40.0, 80.0, 100.0, 120.0 nM) 處理 24 小時後皆無法造成一半以上細胞死亡。

接著探討 Paclitaxel 與 NLPE 共用是否會對 BT-474 細胞凋亡產生協同作用。我們選用人類腺導管癌細胞 BT-474 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以不同濃度的 Paclitaxel (50.0, 100.0 nM) 與不同濃度的 NLPE (0, 2.0, 3.0 mg/ml) 進行分析。從 Fig.5 中得知，加藥處理 24 小時後，只有最高濃度的 NLPE (3 mg/ml) 會達到半致死劑量 (IC_{50})。在 NLPE 濃度 2.0, 3.0 mg/ml 分組中可見 NLPE 與 Paclitaxel 產生協同作用，加強了 Paclitaxel 抑制腫瘤細胞生長的效果。

II. MCF-7 人類乳癌細胞

我們進一步使用人類乳癌細胞 MCF-7 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以在不同濃度 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/ml) 進行分析並量化製成折線圖。從 Fig.6 得知，加藥處理 24 小時後，半致死劑量 (IC_{50}) 大約等於 1.63 mg/mL NLPE，因此我們決定加藥時間設定為 24 小時，並進行以下實驗。

A. Herceptin (Trastuzumab)

以 MTT assay 分析 MCF-7 細胞處理不同劑量的 Herceptin，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成折線圖，觀察 MCF-7 對 Herceptin 的反應。由 Fig.7 得知，以不同劑量的 Herceptin (0, 50, 100 μ g/ml) 處理 24 小時後皆無法造成一半以上細胞死亡。

接著探討 Herceptin 與 NLPE 共用是否會對 MCF-7 細胞凋亡產生協同作用。我們選用人類乳癌細胞 MCF-7 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以不同濃度的 Herceptin (0, 50, 100 μ g/ml) 與不同濃度的 NLPE (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) 進行分析。從 Fig.7 中得知，加藥處理 24 小時後，最高濃度的 NLPE (2 mg/ml) 會達到半致死劑量 (IC_{50})。在 NLPE 濃度 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml 分組中可見 NLPE 與 Herceptin 產生協同作用，加強了 Herceptin 抑制腫瘤細胞生長的效果。

B. Tamoxifen (Nolvadex)

以 MTT assay 分析 MCF-7 細胞處理不同劑量的 Tamoxifen，其 24hr 細胞存活率分析，並量化製成折線圖，觀察 MCF-7 對 Tamoxifen 的反應。由 Fig.8 得知，以不同濃度的 Tamoxifen (0, 5.0, 7.5, 10.0 μ M) 處理 24 小時後皆無法造成一半以上細胞死亡。

接著探討 Tamoxifen 與 NLPE 共用是否會對 MCF-7 細胞凋亡產生協同作用。我們選用人類乳癌細胞 MCF-7 作為實驗模式，以 MTT 試驗進行分析。以不同濃度的 Tamoxifen (0, 5.0, 7.5, 10.0 μ M) 與不同濃度的 NLPE (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) 進行分析。從 Fig.8 中得知，加藥處理 24 小時後，最高濃度的 NLPE (2 mg/ml) 會達到半致死劑量 (IC_{50})。在 NLPE 濃度 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml 分組中可見 NLPE 與 Tamoxifen 產生協同作用，加強了 Tamoxifen 抑制腫瘤細胞生長的效果。

III. 動物移植性腫瘤試驗 (Tumorigenic assay)

A. Herceptin (Trastuzumab)

以 Tumorigenic assay 分析植入裸鼠皮下的 BT-474 細胞，將裸鼠分組後分別 iv 注射 Herceptin 以及餵食不同濃度 NLPE (0.25, 0.5 %) 的飼料。經過 28 天後由 Fig.9 得知在同時有 Herceptin 或 NLPE 治療的腫瘤在外觀上較小。將結果量化成折線圖及柱狀圖後可見 NLPE 與 Herceptin 產生協同作用，增加 Herceptin 的療效使腫瘤細胞縮小。

B. Tamoxifen (Nolvadex)

以 Tumorigenic assay 分析植入裸鼠皮下的 BT-474 細胞，將裸鼠分組後分別餵食參有 Tamoxifen 以及不同濃度 NLPE (0.25, 0.5 %) 的飼料。經過 28 天後由 Fig.10 得知參有 Tamoxifen 或 NLPE 的腫瘤在外觀上較小。將結果量化成折線圖及柱狀圖後可見 NLPE 與 Tamoxifen 產生協同作用，增加 Tamoxifen 的療效使腫瘤細胞縮小。

IV. 討論

本實驗發現，NLPE 確實能有效抑制人類乳癌細胞的生長。並且在細胞毒性試驗中可見 NLPE 與四種抗癌藥物 Tamoxifen、Herceptin、Doxorubicin 與 Paclitaxel 共用皆可產生協同作用，增加抗癌藥物的效果。在動物移植性腫瘤試驗中 NLPE 在單獨使用上可以抑制腫瘤細胞生長。更可見 NLPE 不管是與 Tamoxifen 還是 Herceptin 共同作用之下，對實驗動物身上的腫瘤皆有顯著的協同作用，大量抑制了癌細胞的生長。

然而 NLPE 的抑制作用與 HER2 訊息傳導的三大方式：PI3K 路徑、PLC γ 路徑、MAPK 路徑之關係，抑或與核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (NF- κ B) 蛋白複合體之關係，或是與 FASN 蛋白及 ER 受體的關係以及利用流式細胞儀檢測 Annexin V / PI、ROS、JC-1 等分析乳癌細胞凋亡的機制為何？則還需要進一步的研究。

未來希望能釐清相關分子機制後，利用動物模式分析在其中的有效成分處理之下，是否同樣具有預防癌症發生及抑制腫瘤生長之保健功效。藉此評估是否能進一步進行中草藥之臨床試驗，提出在臨床用藥的參考數據，建立其相關參考資料。希望藉由研究原本經濟價值較低的荷葉，萃取具有預防與抗癌潛力的物質，除了提升其農業價值之外，期望有朝一日能開發成為價格合理的抗癌藥劑，取代價格高昂的乳癌標靶藥物，成為新一代世界通用的抗癌藥物。衷心期盼這些發現能對癌症臨床治療或是癌症化學預防有著些許的貢獻。

(七) 參考文獻

1. McPherson K, Steel CM, Dixon J: ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ: British Medical Journal* 2000, 321(7261):624.
2. Pharoah PDP, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BAJ: Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* 1998, 71(5):800-809.
3. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E: Epidemiology of breast cancer. *The lancet oncology* 2001, 2(3):133-140.
4. Baselga J, Norton L: Focus on breast cancer. *Cancer cell* 2002, 1(4):319.
5. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2(2):127-137.
6. Yu D, Hung MC: Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 2000, 19(53):6115.
7. Nagai M, Pacheco M, Oshima C, Brentani M: c-erbB-2 DNA amplification and mRNA expression in human primary breast tumors and its relationship to other prognostic factors. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 1993, 8(1):29-35.
8. Zhang K, Sun J, Liu N, Wen D, Chang D, Thomason A, Yoshinaga SK: Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(7):3884-3890.
9. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: NEW EMBO MEMBERS'REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Science Signalling* 2000, 19(13):3159.
10. Popescu NC, King CR, Kraus MH: Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989, 4(3):362-366.
11. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA: Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, 86(23):9193-9197.
12. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M: Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, 90(5):1746-1750.
13. Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988, 240(4854):889-895.
14. Menasce LP, White GRM, Harrison CJ, Boyle JM: Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25. 1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics;(United States)* 1993, 17(1).

15. Mosselman S, Polman J, Dijkema R: ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* 1996, 392(1):49-53.
16. Nakamura I, Kimijima I, Zhang G, Onogi H, Endo Y, Suzuki S, Tuchiya A, Takenoshita S, Kusakabe T, Suzuki T: Fatty acid synthase expression in Japanese breast carcinoma patients. *International journal of molecular medicine* 1999, 4(4):381.
17. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, Richardson A, Cooper A, Strausberg R, Riggins GJ: Molecular Markers in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast 1 National Cancer Institute Cancer Genome Anatomy Project and Specialized Program in Research Excellence in Breast Cancer at Dana-Farber/Harvard Cancer Center (CA89393) and Johns Hopkins University (CA88843); Department of Defense Breast Cancer Center of Excellence Grants. *Molecular Cancer Research* 2003, 1(5):362-375.
18. Zhang DH, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ESC: Proteomic Study Reveals That Proteins Involved in Metabolic and Detoxification Pathways Are Highly Expressed in HER-2/neu-positive Breast Cancer*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005, 4(11):1686-1696.
19. Menendez JA, Rubinstein W, Lupu R: Inhibition of fatty acid synthase (FAS) activity reverses tamoxifen resistance in Her-2/neu-overexpressing breast cancer cells. In: *AACR Meeting Abstracts: 2005; 2005: 1198.*
20. Do MT, Hwang YP, Kim HG, Na MK, Jeong HG: Mollugin inhibits proliferation and induces apoptosis by suppressing fatty acid synthase in HER2-overexpressing cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 2013, 228(5):1087-1097.
21. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006, 25 (51): 6680–4. doi:10.1038/sj.onc.1209954. PMID 17072321.
22. Brasier AR. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* 2006, 6 (2): 111–30. doi:10.1385/CT:6:2:111. PMID 17303919.
23. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. January, 8 (1): 49–62. doi:10.1038/nrm2083. PMID 17183360.
24. Gilmore TD. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999, 18 (49): 6842–4. doi:10.1038/sj.onc.1203237. PMID 10602459.
25. Tian B, Brasier AR. Identification of a nuclear factor κ B-dependent gene network. *Recent Prog. Horm. Res.* 2003, 58: 95–130. doi:10.1210/rp.58.1.95. PMID 12795416.
26. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC, Leibson PJ, Kaufmann SH: Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997, 90(3):935-943.
27. Fulda S, Debatin KM: Death receptor signaling in cancer therapy. *Current Medicinal*

Chemistry-Anti-Cancer Agents 2003, 3(4):253-262.

28. Mayer B, Oberbauer R: Mitochondrial regulation of apoptosis. *Physiology* 2003, 18(3):89-94.
29. M Chinnaiyan A, Dixit VM: The cell-death machine. *Current Biology* 1996, 6(5):555-562.
30. Herr I, Debatin KM: Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001, 98(9):2603-2614.

(八) 實驗結果 附圖

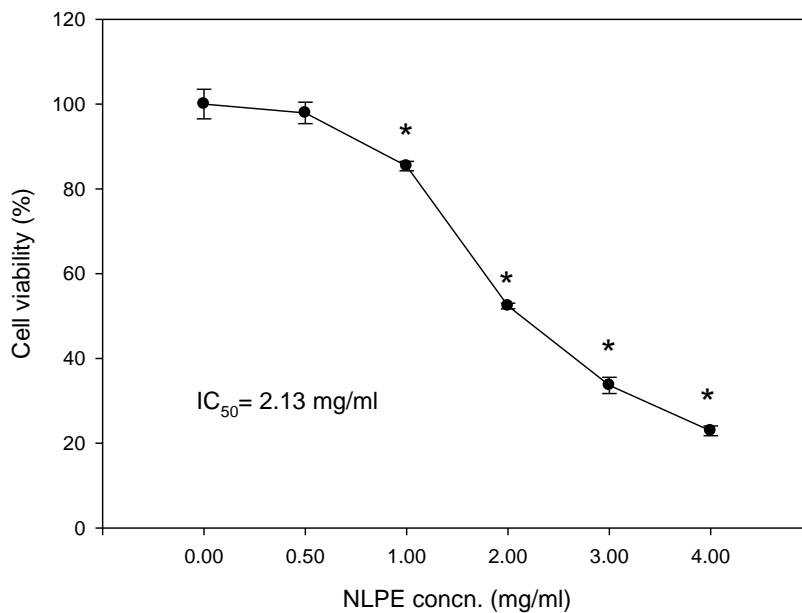
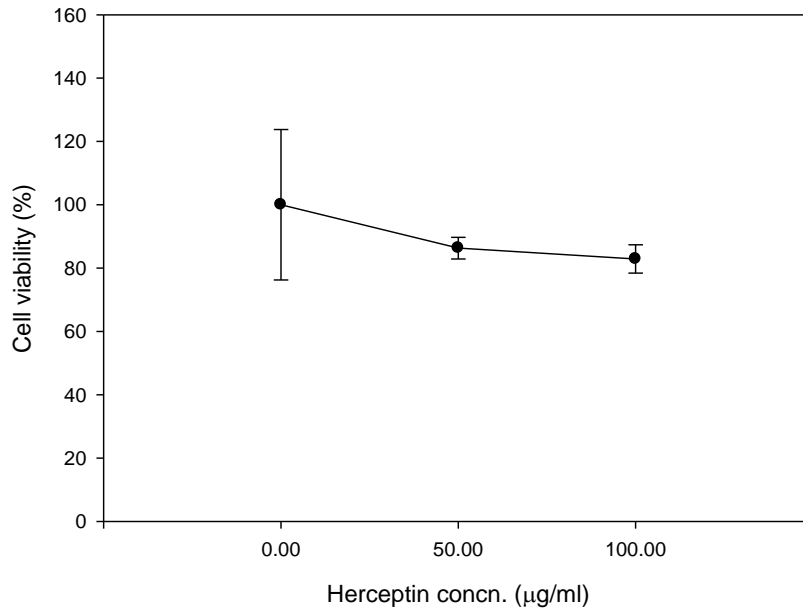


Figure 1. Cytotoxicity of NLPE on BT-474 human breast cancer cells.

BT-474 cells were incubated with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 4.0 mg/mL) at 37 °C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $IC_{50} = 2.13$ mg/mL NLPE. *, $p < 0.05$.

(A)



(B)

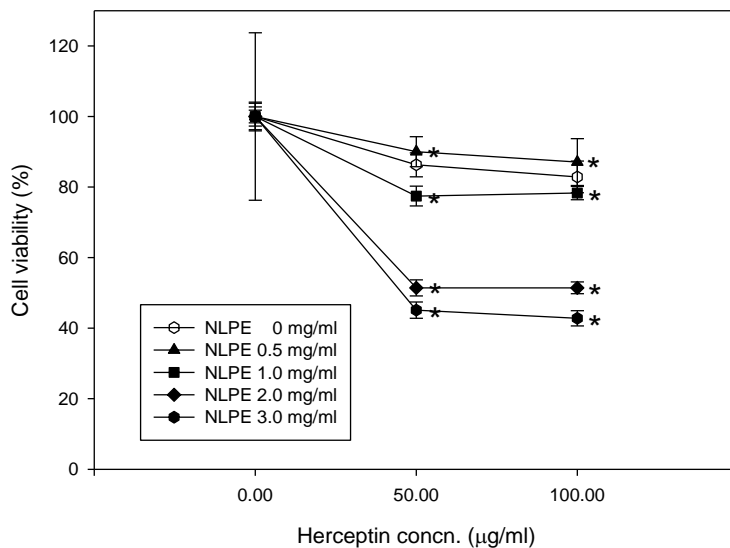
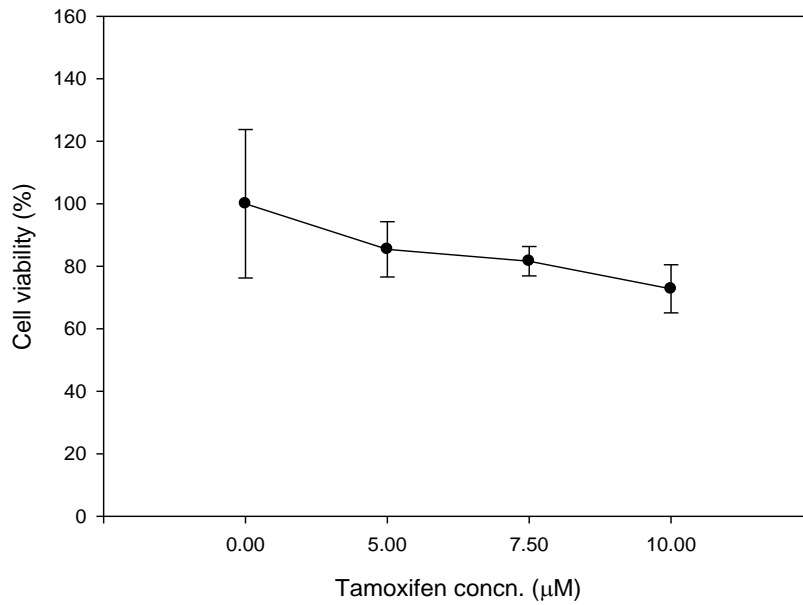


Figure 2. Cytotoxicity of Herceptin on BT-474 human breast cancer cells (A) with NLPE (B).

(A) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Herceptin (0.0 ~ 100.0 µg/ml) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $IC_{50} > 100$ µg/ml Herceptin.

(B) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Herceptin (0.0 ~ 100.0 µg/ml) combined with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 3.0 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. *, $p < 0.05$.

(A)



(B)

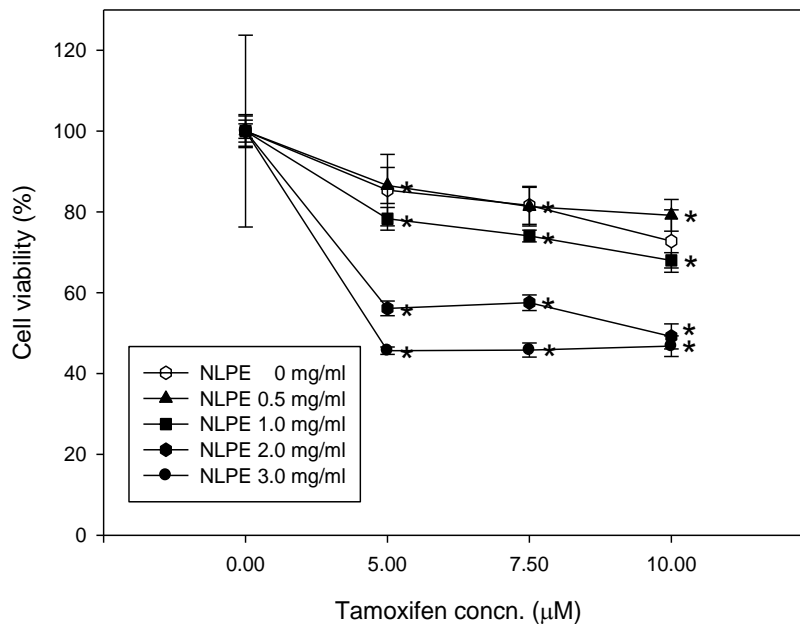
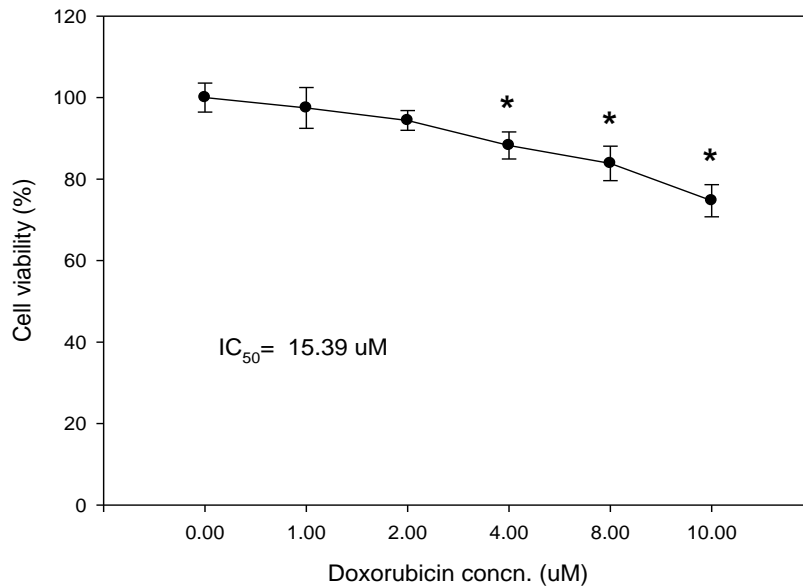


Figure 3. Cytotoxicity of Tamoxifen on BT-474 human breast cancer cells (A) with NLPE (B).

(A) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Tamoxifen (0.0 ~ 10.0 μM) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ Tamoxifen.

(B) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Tamoxifen (0.0 ~ 10.0 μM) combined with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 3.0 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. *, $p < 0.05$.

(A)



(B)

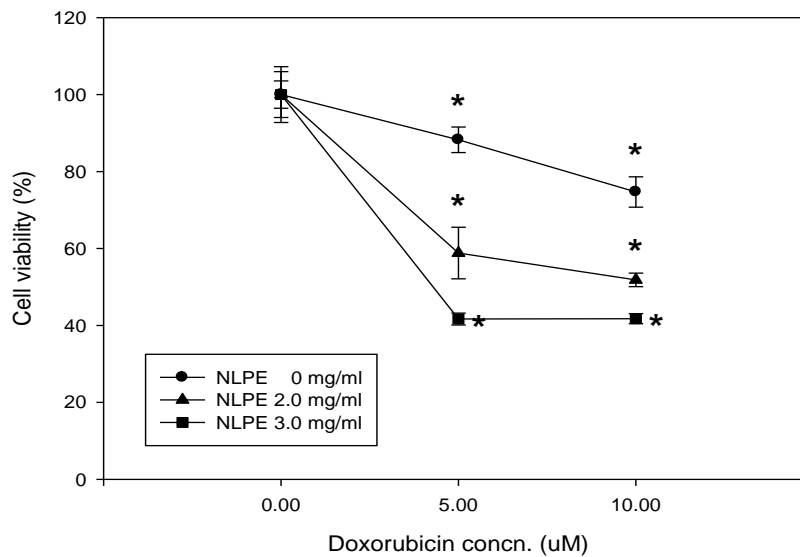
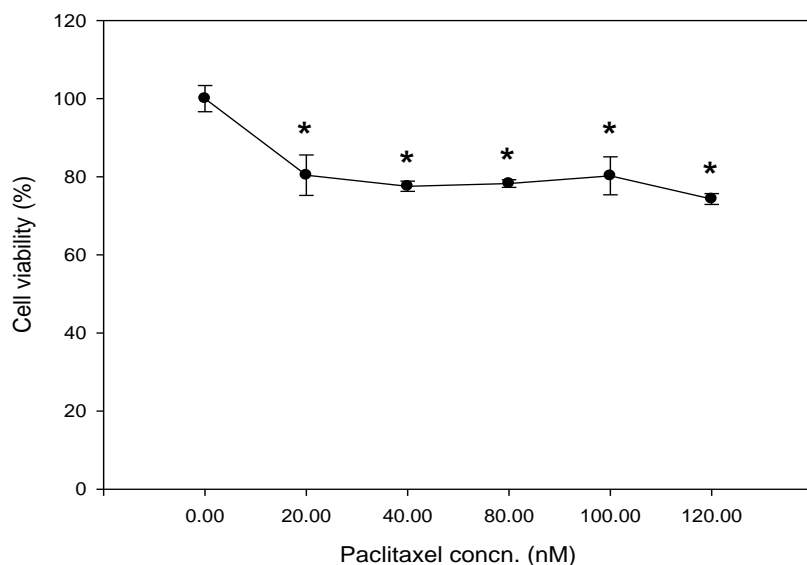


Figure 4. Cytotoxicity of Doxorubicin on BT-474 human breast cancer cells (A) with NLPE (B).

(A) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Doxorubicin (0.0 ~ 10.0 uM) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $IC_{50} > 10$ uM Doxorubicin.

(B) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Doxorubicin (0.0 ~ 10.0 uM) combined with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 3.0 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. *, $p < 0.05$.

(A)



(B)

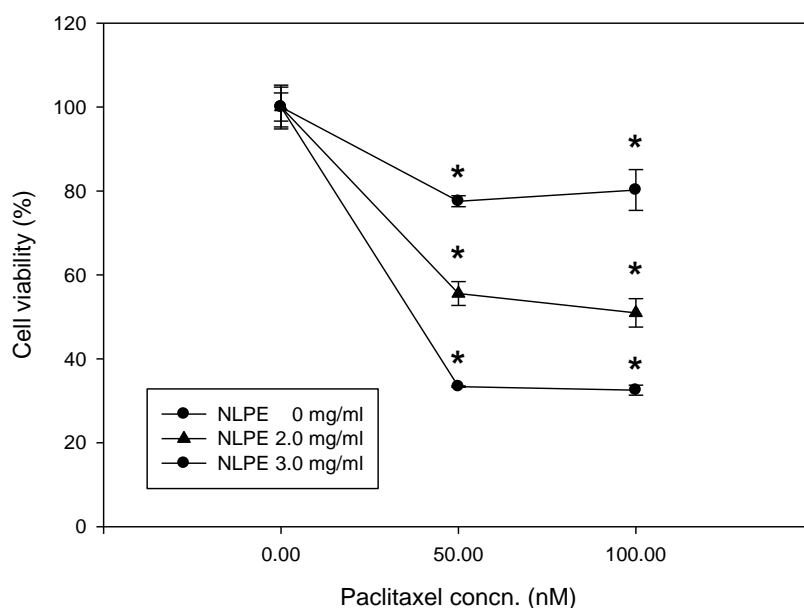


Figure 5. Cytotoxicity of Paclitaxel on BT-474 human breast cancer cells (A) with NLPE (B).

(A) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Paclitaxel (0.0 ~ 120.0 nM) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $IC_{50} > 120$ nM Paclitaxel.

(B) BT-474 cells were incubated with various concentrations of Paclitaxel (0.0 ~ 100.0 nM) combined with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 3.0 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. *, $p < 0.05$.

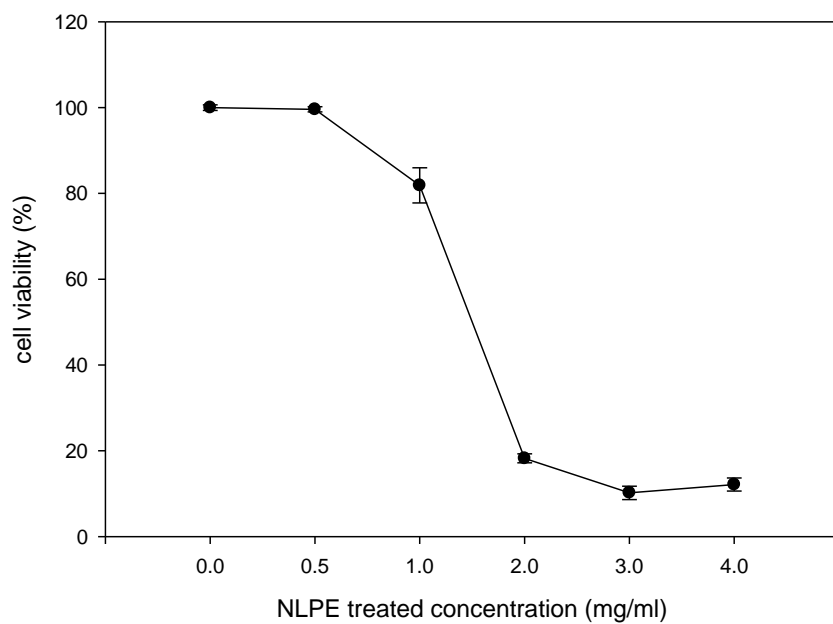
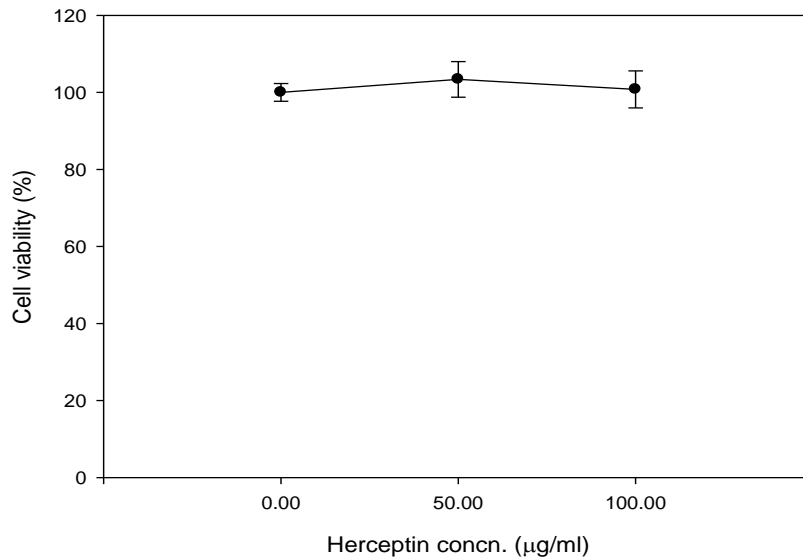


Figure 6. Cytotoxicity of NLPE on MCF-7 human breast cancer cells.

MCF-7 cells were incubated with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 4.0 mg/mL) at 37 °C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $IC_{50} = 1.63$ mg/mL NLPE.

(A)



(B)

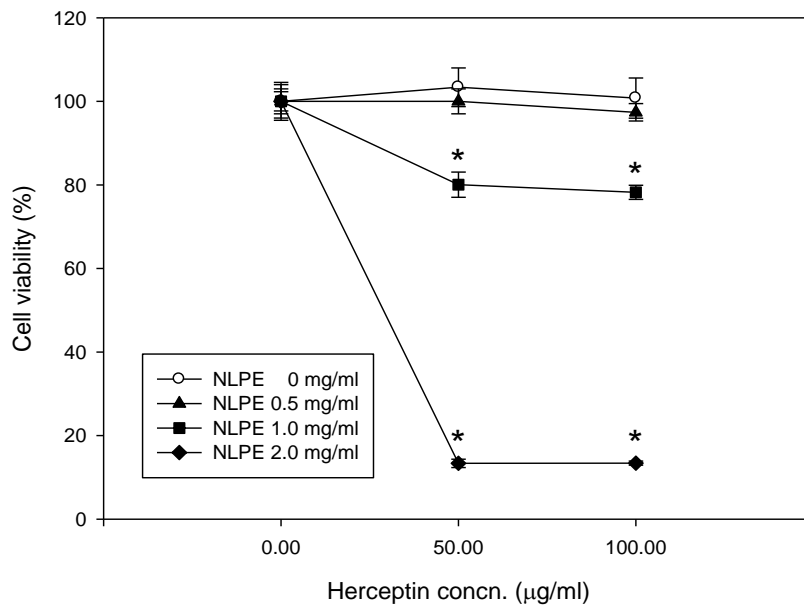
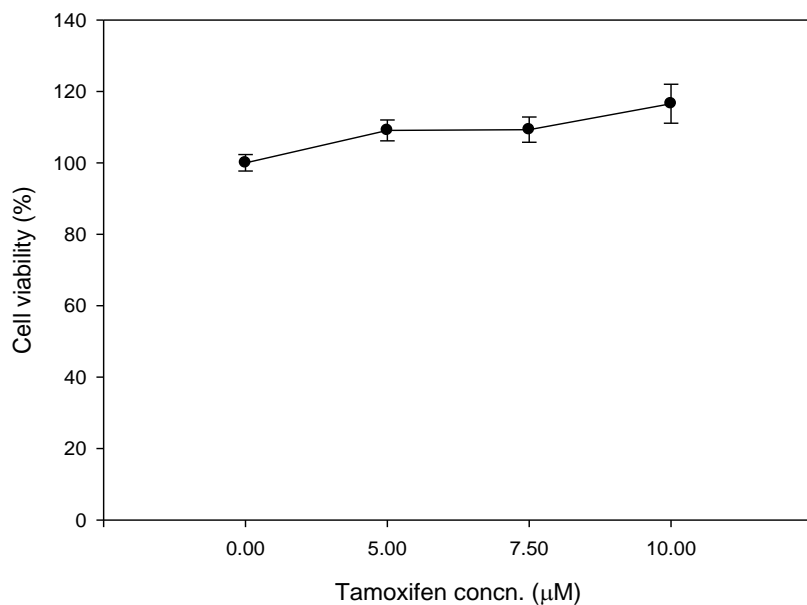


Figure 7. Cytotoxicity of Herceptin on MCF-7 human breast cancer cells (A) with NLPE (B).

(A) MCF-7 cells were incubated with various concentrations of Herceptin (0.0 ~ 100.0 µg/ml) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means ± SD from three replicates per treatment. $IC_{50} > 100$ µg/ml Herceptin.

(B) MCF-7 cells were incubated with various concentrations of Herceptin (0.0 ~ 100.0 µg/ml) combined with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 2.0 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means ± SD from three replicates per treatment. *, $p < 0.05$.

(A)



(B)

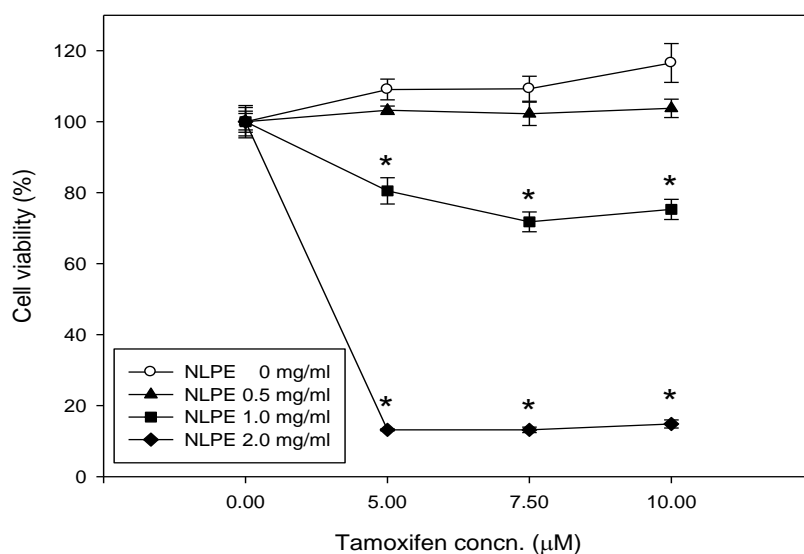


Figure 8. Cytotoxicity of Tamoxifen on MCF-7 human breast cancer cells (A) with NLPE (B).

(A) MCF-7 cells were incubated with various concentrations of Tamoxifen (0.0 ~ 10.0 μM) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ Tamoxifen.

(B) MCF-7 cells were incubated with various concentrations of Tamoxifen (0.0 ~ 10.0 μM) combined with various concentrations of NLPE (0.0 ~ 2.0 mg/mL) at 37°C for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. The data were shown as means \pm SD from three replicates per treatment. *, $p < 0.05$.

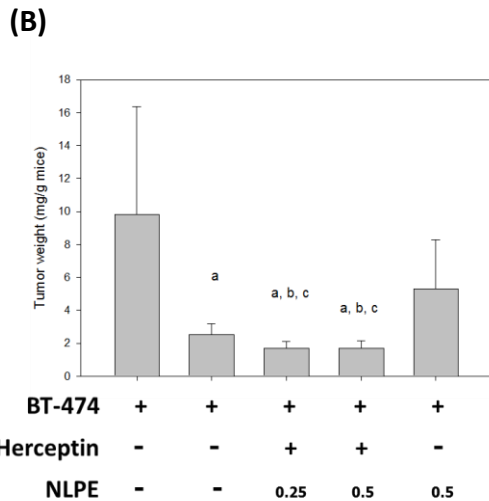
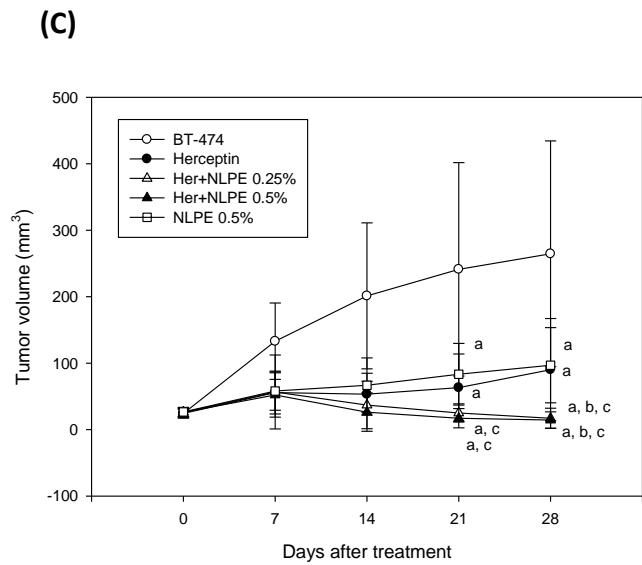
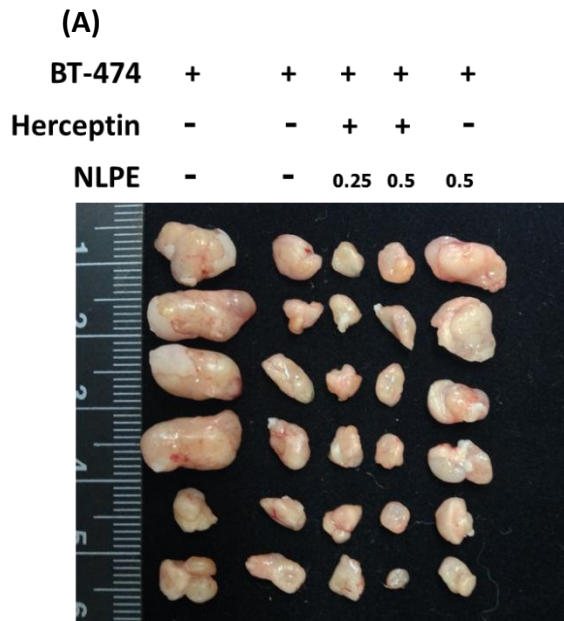


Figure 9. NLPE and Herceptin inhibiting the growth of breast cancer tumor with a synergistic effect in nude mice.

BT-474 cells were injected subcutaneously into mice. At 28 days after injection, mice were sacrificed by cervical dislocation and tumors were collected for analysis. A, Photographs of individual mice inoculated with BT-474 cells. Cells were injected into both flanks of each mouse (tumors = 6 per group). B, Representative tumors weight from each group dissected at day 28. C, Tumor volume was monitored over time. a, $p < 0.05$ compared with BT-474 only group; b, $p < 0.05$ compared with Herceptin only group; c, $p < 0.05$ compared with NLPE only group.

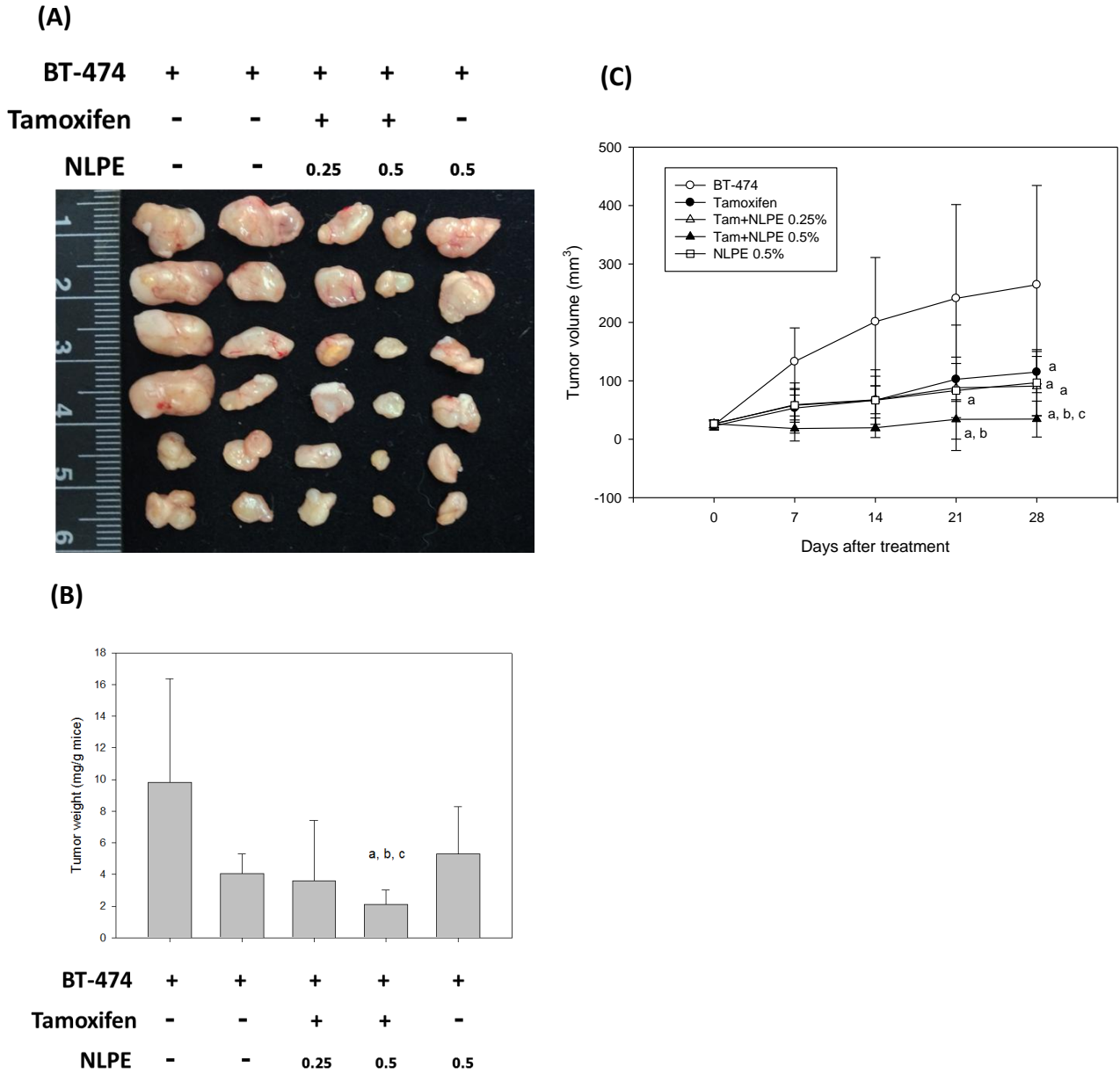


Figure 10. NLPE and Tamoxifen inhibiting the growth of breast cancer tumor with a synergistic effect in nude mice.

BT-474 cells were injected subcutaneously into mice. At 28 days after injection, mice were sacrificed by cervical dislocation and tumors were collected for analysis. A, Photographs of individual mice inoculated with BT-474 cells. Cells were injected into both flanks of each mouse (tumors = 6 per group). B, Representative tumors weight from each group dissected at day 28. C, Tumor volume was monitored over time. a, $p < 0.05$ compared with BT-474 only group; b, $p < 0.05$ compared with Tamoxifen only group; c, $p < 0.05$ compared with NLPE only group;