

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫：荷葉黃酮萃取物抑制人類乳癌細胞 HER2/ER/FASN 訊息 *
* 名稱：路徑之研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 楊馨瑜
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-017-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 王朝鐘

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： 中山醫學大學生化暨生物科技研究所

中華民國 103年03月26日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 荷葉黃酮萃取物抑制人類乳癌細胞 HER2/ER/FASN *
* : 訊息路徑之研究 *
* 名稱 *
* ***** *

執行計劃學生： 楊警瑜
學生計畫編號： 102-2815-C-040-017-B
研究期間： 102年07月1日至103年02月28日
指導教授： 王朝鐘

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： 中山醫學大學生化暨生物科技研究所
中華民國： 103年3月29日

(一) 中文摘要

乳癌是世界上女性普遍常見的惡性腫瘤，癌症預防已為世界趨勢，因此尋找特殊化學預防物質為現今之重要工作。荷葉是睡蓮科多年生草本植物，其化學成分含有多種荷葉鹼(pronuciferine)、抗氧化物質類黃酮等，所以本研究擬以細胞與動物實驗模式探討台灣荷葉黃酮萃取物(Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves, NLFE)抑制腫瘤生長之功效，並進一步探討其中抑制之機制。首先我們以人類乳癌細胞株 BT-474 為實驗模式，將細胞注射於裸鼠，並使用不同劑量 NLFE 與 Tamoxifen 餵食裸鼠，結果證實 NLFE 確實可有效降低裸鼠之腫瘤生成，NLFE 2%組別抑制效果更優於 Tamoxifen 之組別。接著，我們利用免疫染色分析與西方墨點法分析腫瘤蛋白之表現，結果指出隨著 NLFE 劑量之提升，Fatty acid synthase (FASN) 及 phospho-ER α 的表現量隨著 NLFE 的劑量增加而逐漸減少，顯示 NLFE 確實會造成 Estrogen receptor alpha (ER α) 的磷酸化表現下降。所有 NLFE 組別，Tamoxifen 組跟對照組相比較下，結果顯示 HER2 蛋白並無顯著變化；然而，phospho-HER2，NLFE 2.0% 組別與對照組比較有下降，總結這些結果也正可以說明 NLFE 降低乳癌的發生是透過減少 ER α ，HER2 的活化及抑制 FASN 表現，進而降低腫瘤生長，因此本研究成果可應用於發展為降低與延緩癌症發生之健康食品。

(二) Abstract

Breast cancer is a common women malignancy tumor in many countries of the world. Over the past decade, advances in understanding carcinogenesis have made possible the identification of the candidates of chemopreventive agents that are being developed to hit the key molecular targets. The lotus leaf is the Nymphaeaceae perennial herb, and its chemical composition to contain a variety of pronuciferine and flavonoids. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves (NLFE) had been demonstrated previously to possess anti-oxidative In this study aimed to define the anti-carcinogenesis and the mechanism of NLFE reduced cancer in cell and animal model. First, we observed that murine xenograft model also confirmed that NLFE inhibited tumor growth. Immunohistochemical and Western blot analysis of FASN (fatty acid synthase) and phospho-ER α show dose dependent decreased protein level. Protein expression has no significant change in HER2; however, phospho-HER2 has been suppressed in NLFE 2.0% treated groups , The result revealed that NLFE reduce breast cancer growth is by reducing the expression of FASN and downregulation of ER α . and HER2.Taken together, our results suggest that NLFE possible as a new auxiliary therapeutic strategy for anti-cancer and used to develop a new chemopreventive medicament.

(三) 文獻回顧與探討

【1】乳癌

乳癌是全球婦女最常發生的癌症，流行病學相關研究指出，誘導乳癌發生的可能因子有：①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；②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；③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脂酮者)；脂肪細胞過多：酗酒及更年期後過度肥胖者；④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[1-4]。

【2】乳癌相關之蛋白

2-1 神經膠原致癌基因(HER2):Evolving novel anti-HER2 strategies

人類 HER2 基因位於第十七號染色體的長臂 q12-q21 區域[5]，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 [6] 及 erbB-4/HER4[7] 其間結構有高相似性。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]。

HER2 的訊息傳導約可大致分為三大方式：① 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、② 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、③ 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[10, 11]。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[12]。

2-2 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]。

(1) 雌激素受體- α (Estrogen Receptor α)

人類雌激素受體- α (ER- α) mRNA 最早是由 Walter, P.及 Green, S.等人在 MCF-7 人類乳癌細胞株中所發現、定序。其 cDNA 包含 1785 個核苷酸，可轉譯成 595 胺基酸的蛋白質，其相對分子量約 66 kDa [16-18]。在乳房增殖及腫瘤形成的過程中，曾發現 ER- α 的表現量會隨之上升。在轉錄的過程中因經歷各種不同選擇性接合作用(alternative splicing) 而產生的 mRNA 變異型，也陸續的被發現，這些基因產物被認為會影響腫瘤的形成有關，並反映著對雌激素的生理作用或對抗雌激素藥物的反應。

(2) 雌激素受體- β (Estrogen Receptor β)

西元 1996 年 Mosselman 在人類睪丸組織中分離出一個新的雌激素受體基因，因為與 ER- α 有部分相似性，而命名為雌激素受體- β (ER- β)。此類雌激素受體- β (ER- β) 其 cDNA 包含了 1593 個核苷酸，可轉譯出含 530 胺基酸的蛋白質，其相對分子量約為 59-kD [19]。雌激素的刺激可增加乳房組織中雌激素受體(ER)和黃體素受體(PR)的表現量，故雌激素受體的表現隨月經週期而有變異，在濾泡增生期(follicular phase)最高，而在排卵期(ovulation)最低[20]，在乳房組織中雌激素受體的表現量與乳癌的發生率成正比[21]。將近 70%的乳癌患者，其腫瘤組織中有雌激素受體的表現(ER⁺)，但這些病人約有 2/3 以 Tamoxifen 治療能達到顯著的效果；而未表現雌激素受體(ER⁻)的病人，約只有 5-10%對 Tamoxifen 治療有反應。ER陽性的乳癌病人，其腫瘤分化較好，生長速率較慢，預後較好，存活率較高，而 ER陰性的病人則反之。故臨床上以雌激素受體的表現做為預後及荷爾蒙治療的指標。

2-3 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，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。先前研究指出，FASN 發現在腫瘤細胞中有過度表現，而未表現在正常細胞。在腫瘤細胞生長與存活，FASN 的調控表達成分複雜，包含轉錄、轉譯後調控等。因此，癌細胞中需要合成大量的脂肪酸，若能夠抑制此酵素，便具有抗腫瘤之活性。故對癌症治療，FASN 之抑制作用藥物便顯得十分重要。

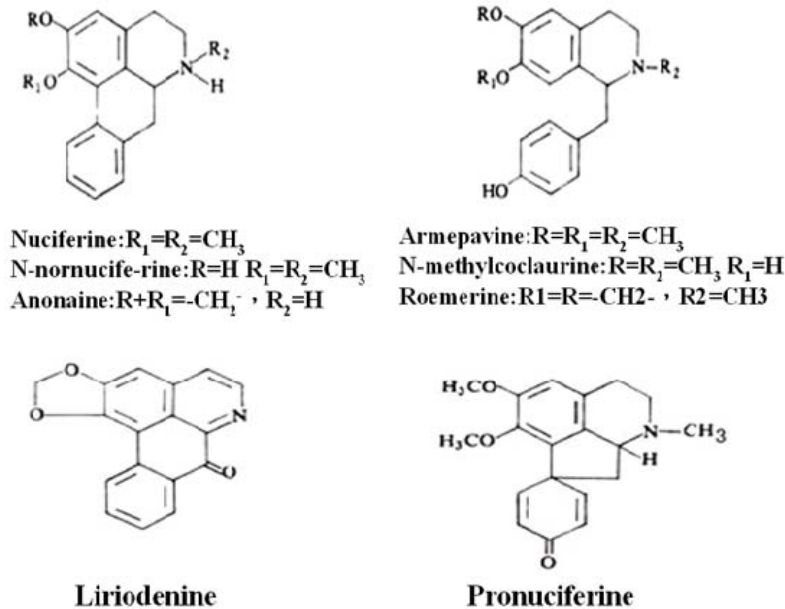
Nakamura 等人利用免疫組織染色觀察到在乳癌臨床病人的檢體中 FASN 有大量表現的情形，而在乳癌病患中若 FASN 的表現量低的話，其預後與存活率也比較高[22]。另外，Porter 等人利用 tissue microarrays 分析 FASN 在不同時期的乳癌組織中表現差異，結果發現，約有 38.8% 的 ductal carcinoma、51.0% 的 primary invasion tumors、50.0% 的 metastatic-distant 與 lymph node-breast carcinoma 有著 FASN 的過量表現 (FASN overexpression)。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[23, 24]。有文獻指出，在有表現 ER 的乳癌細胞當中，再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[25]。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[26]。

【3】荷葉之背景介紹

植物蓮學名 Gaertneria。英名 East Indian Lotus，俗稱 Lotus，中文亦稱「荷」、「蓮」，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：如荷葉鹼 (nuciferine)、N-去甲荷葉鹼 (N-nornuciferine)、o-去甲荷葉鹼 (o-nornuciferine)、牛心果鹼 (anonaine)、繞袂鹼 (roemerine)、亞美帕鹼 (armepavine)、N-甲基衡州烏藥鹼 (N-methylcochlorine)、原荷葉鹼 (pronuciferine)、鵝掌楸鹼 (liriodenine) 及去氧繞袂鹼 (dehydroroemerine) [27] 等等。荷葉也另含抗氧化物質類黃酮：荷葉苷 (nelumboside) [28]、oligomeric procyanidins 及其槲皮素、異槲皮甙 [29, 30]，以及維生素 C、酒石酸、枸橼酸、蘋果酸、草酸、琥珀酸、葡萄糖酸、鞣質。另外，還含抗有絲分裂作用的鹼性成分 [31]。荷

葉在研究中較具代表性及說服力的功效為抗氧化與降血脂兩大方面，根據前人對荷葉中的有效成分之分析，大多認為是荷葉中的類黃酮 (flavonoids) 及生物鹼 (alkaloids)。荷葉成分構造如圖一。



圖一、荷葉化學成分結構圖

(四) 研究動機與目的

台灣地區乳癌發生率位居女性好發癌症的第一位，據流行病學統計具有浸潤、轉移現象的乳癌約有 75% 皆為 ER+ 或 PR+[32]，這些證據顯示 ER 在乳房腫瘤的發展與惡化過程中，扮演舉足輕重的角色，利用阻斷或干擾 ER 對於乳房腫瘤的影響，對於治療乳癌的患者來說十分地關鍵。將近有 20% 的乳癌患者高度表現 HER2/neu 蛋白，而此類患者通常預後較差[33]，另外 50% 以上 HER2/neu 高度表現的乳癌患者同時也表現 ER+[34]。HER2/neu 過度表現也許與某些對內分泌治療產生抵抗性有關，而複雜的 ER 和 HER2 通路之間是否為治療產生抗性的原因，這內在的生物機制目前所知甚少，因此探討乳癌的形成原因，以及找出適當、副作用少且成本低廉的治療方式，對於乳癌的防制策略上，是相當重要的一環。有鑒於此，若我們能釐清 ER 與 HER2/neu 之間的關聯性，抑或是找出可影響 ER 與 HER2/neu 兩條路徑的軸樞蛋白，將有助於我們了解乳癌發展過程之機制，並進一步將荷葉黃酮萃取物開發成為具有抗癌潛力之天然物質。

本實驗室致力於探討與開發天然物中所含的特殊成份，期望可藉由攝取天然食品來達到預防腫瘤發生之目的，因此本計劃擬以台灣鄉間常見之大慈蓮萃取物為實驗題材，針對乳癌細胞以動物實驗進行分析並輔以細胞實驗探討作用機制，更進一步與現行臨床用藥相互比較。本研究

計劃若能順利達成預定目標，不僅可以利用天然萃取物及其有效成分抑制乳癌發生更可以深入地瞭解造成乳癌發展的可能原因、過程和機制，這些結果對於乳癌的預防和控制具有非常重要的意義。

(五) 研究方法及步驟

5-1 荷葉黃酮萃取物(NLFE)的製備

取乾燥荷葉黃酮粉末 20 克加 1000 毫升的二次水在 4°C 下浸放，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。實驗時，以乾燥粉末稱重，配取不同濃度荷葉黃酮水萃取物。使用於細胞實驗操作之荷葉黃酮水萃取物配製的各濃度溶液需先經 0.22 μm filter 過濾除菌。

5-2 乳癌細胞培養

人類乳癌細胞株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 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。

5-3 細胞毒性試驗 (Cytotoxicity assay)

將乳癌細胞BT-474 (5×10^4 cell/well) 培養於 24 well culture plate，加入不同濃度的NLFE (0.25、0.5、1、2 mg/ml) 處理 24 小時後，移除舊的培養基(含 NLFE)，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。

5-4 西方點墨法 (Western blotting)

將人類乳癌細胞株以 2×10^6 cell/100mm dish 中加入含有不同濃度的NLFE處理 24 小時後，以PBS沖洗細胞二次，收集細胞，加入RIPA buffer，及蛋白質水解酶抑制劑，在 4°C 下震盪 2 小時，4°C 高速離心 10,000 $\times g$ ，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在-70°C。取定量之whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入 5 倍追蹤染劑(loading dye)，混合均勻，以 100 °C 加熱 10 分鐘，再迅速置於冰上，隨後進行SDS-PAGE，完畢後將膠體取出，轉漬到硝化纖維紙，用TBS buffer漂洗，以 5% blocking buffer於室溫下 1 小時作用，換上一級抗體和二級抗體作用，最後加入ECL顯色，並以冷光儀偵測。

5-5、動物移植性腫瘤試驗 (tumorigenic assay)

由國家實驗動物中心購入 5~6 週之BALB/cAnN.Cg-Foxn1nu/CrINarl 雌性裸鼠，共 25 隻，隨機分組，每組 5 隻，分為A組，單獨移植腫瘤對照組；B組，低劑量試驗組 0.5% NLFE；C組，高劑量試驗組 1% NLFE；D組，藥物對照組 40 mg/kg Herceptin; E組，藥物對照組 1 mg tamoxifen。每 5 隻試驗裸鼠一籠，飲水以高溫高壓滅菌過後的一次水餵之，採無限制供應。選擇高度表現HER2/neu與ER蛋白的人類乳癌細胞株BT-474，計算細胞數成 10^7 cell/0.1

ml PBS，經皮下注射於裸鼠大腿外側之皮下脂肪層，腫瘤細胞注射後一週，依各組實驗規劃給予不同劑量之NLFE餵食，並連續觀察6週，每週觀察紀錄腫瘤生成之大小，停止給予NLFE之次日(或停止給予受試物後1-5天)犧牲動物，將腫瘤秤重並供未來分析之用。

5-6 組織病理切片及染色

老鼠犧牲後，迅速取部分腫瘤組織，置10%福馬林中固定，倒去福馬林後以TBA脫水，接著浸蠟、包埋，再將組織切片以fresh xylene 浸泡2分鐘，接著以100% EtOH 浸泡2分鐘1次，95% EtOH浸泡2分鐘1次，以PBS (0.01 M PBS, pH 7.4) 浸泡2分鐘1次，再用PBS配製3% H₂O₂ (內含10% MeOH) 於室溫下浸泡30分鐘後，以PBS清洗3次，配製blocking solution (BSA 20 mg/ml, 0.1% triton, 3%血清)室溫下作用30分鐘，以PBS清洗3次，以primary antibody 在室溫作用12~16小時後，以PBS清洗1分鐘共2次，再加入secondary antibody於室溫下作用30分鐘後以PBS清洗，再加入ABC buffer (avidin-biotin complex) 於室溫下反應30分鐘，以PBS清洗3次，再用DAB (DAB 5 mg, 12 μ l H₂O₂, 20 ml Tris) 於室溫下呈色3-10分鐘後以dd H₂O清洗1分鐘共2次，再用hematoxylin染10秒鐘後以dd H₂O 清洗，最後浸泡於100% EtOH 2分鐘共2次，再浸於xylene 2分鐘共2次，於xylene未完全揮發前，以permount 加上蓋玻片(24 x 40 mm) 保存。

5-7 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 one-way ANOVA 作為統計分析，凡 $p < 0.05$ 時表示為有意義的差異。

(六) 實驗結果

6-1 動物移植性腫瘤試驗

首先我們評估NLFE是否能夠有效抑制腫瘤的生長速度，於是我們選擇人類乳癌細胞株BT-474的注射在免疫缺乏的裸鼠體內強迫其產生腫瘤，待腫瘤生成後，在餵食不同劑量之NLFE與Tamoxifen，觀察NLFE對於腫瘤生長之影響。由結果得知，在對照組中，其腫瘤長得十分巨大，而在餵食0.5% NLFE的組別當中，腫瘤體積有變小的趨勢，而在2.0% NLFE的餵食下，更可以明顯地看出抑制腫瘤生長的能力。餵食Tamoxifen的組別雖然腫瘤體積明顯受到抑制，但仍沒有2.0% NLFE餵食的組別抑制效果佳，由此證明NLFE具有抑制腫瘤生長之能力(Fig. 1)。

接著我們利用免疫組織染色觀察裸鼠腫瘤的相關蛋白變化，結果發現，在有NLFE餵食的情況下，表現在細胞質的FASN量有減少的趨勢。ER α 的免疫染色結果中，除了NLFE 2.0%的組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組都無顯著變化；而在phospho-ER α ^{ser118}的表現方面，單獨注射BT-474細胞株的腫瘤，其細胞核中都有ER α ^{ser118}濃染的情形，餵食NLFE 0.5%的組別中，有濃染ER α ser118的細胞核數量明顯地減少，而在餵食NLFE 2.0%的

組別，濃染ER α ser118 的細胞已經幾乎不見，顯示NLFE 確實會造成ER α 的磷酸化表現下降(Fig. 2A)。HER2 表現於細胞膜上，其組織染色結果顯示，所有NLFE組別與Tamoxifen跟對照組相比較並無顯著變化；然而，phospho-HER2 的免疫染色結果中，除了NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較並無明顯改變(Fig.2B)。

進一步我們利用西方墨點法分析在 NLFE 處理下裸鼠腫瘤蛋白的變化。結果顯示出，隨著 NLFE 劑量之提升，FASN 的表現量隨著 NLFE 的劑量增加而逐漸減少。ER α 只在 NLFE 2.0% 的組別中有受到抑制，其餘的組別與對照組比較，其蛋白表現都無顯著變化；而 phospho-ER α 隨著 NLFE 劑量之增加，其表現量則隨之減少，顯示 NLFE 確實會造成 ER α 的磷酸化表現下降。所有 NLFE 組別，Tamoxifen 組跟對照組相比較下，結果顯示 HER2 蛋白並無顯著變化；然而，phospho-HER2，除了 NLFE 2.0% 組別有受到抑制之外，其他的組別與對照組比較都無明顯改變(Fig.3)。

6-2 NLFE 對乳癌細胞之毒性測試

我們將人類乳癌細胞株 BT-474 處理 0-5 mg/mL 之 NLFE，培養 24 小時後，利用 MTT 之細胞毒性測試法觀察 BT-474 細胞存活的情形。結果顯示，經過 24 小時後，NLFE 可以達到抑制細胞生長 50%的劑量為 4.25 mg/mL (Fig.4)。我們最終選定 NLFE 濃度 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 及 2.0 mg/mL 進行之後細胞試驗之分析。

6-3 西方墨點法

我們利用乳癌細胞 BT-474 再次確認動物移植性腫瘤試驗的結果。我們將細胞處理 NLFE 24 小時後，分析 BT-474 蛋白的變化。結果顯示出，隨著 NLFE 劑量之提升，FASN 的表現量隨著 NLFE 的劑量增加而逐漸減少。ER α 與 Her2 與對照組比較，其蛋白表現都無顯著變化；而 phospho-ER α 及 phospho-HER2 隨著 NLFE 劑量之增加，其表現量則隨之減少，顯示 NLFE 確實會造成 ER α 及 HER2 的磷酸化表現下降。總結這些結果也正可以說明 NLFE 降低乳癌的發生是透過減少 HER2 及 ER α 的活化及 FASN 的表現。

(七) 討論

台灣地區乳癌發生率躍居女性好發癌症的第一位，顯示乳癌對於女性健康影響日深，如何有效預防及延緩乳癌發生是當前研究的重要課題。荷葉是睡蓮科多年生草本植物，自古以來均記載荷葉具有清熱解毒、涼血、止血的作用，其化學成分含有多種荷葉鹼(pronuciferine)、抗氧化物質類黃酮等，許多研究證實荷葉中的物質具有抗氧化之能力[36, 37]。而先前我們實驗室研究也發現荷葉萃取物可有效改善在小鼠體內高脂肪飲食所誘導的脂肪堆積[35]，抑制血管平滑肌細胞增殖和遷移減少動脈粥狀硬化的發生[38]。此外，荷葉萃取物也具改善高脂飲食誘導之肝損傷和氧化壓力之功效[35]。

荷葉自古以來均記載著對於『活血化淤』具有強大的功效，據研究指出

荷葉含豐富抗氧化物質，所以具代表性及說服力的功效為抗氧化與降血脂兩大方面，但鮮少有人利用荷葉萃取物做對於抑制腫瘤生成之研究。在我們動物試驗的模式當中，我們以裸鼠移植乳癌腫瘤細胞的結果證實，NLFE 確實能夠抑制腫瘤的成長，而免疫化學染色及西方點法的結果也正可以說明 NLFE 降低乳癌的發生是透過減少 ER α 的活化。

先前的研究指出 NMU 大鼠模型誘導疾病相似於乳腺癌，大鼠產生之乳腺腫瘤特性為非侵入性導管癌、ER 陽性與分化的上皮細胞組成[39]，這結果與我們 IHC 的結果相似(Fig. 4)。有相關文獻指出臨床上目前發現在正常乳腺上皮細胞約有 15~25% 會表現 ER α ，反之在乳癌中有超過 70% 大量表現 ER α ，表示 ER α 對於促進乳癌的發展扮演一個重要的角色。FASN 通過促進激素依賴性乳腺癌和子宮內膜癌細胞的細胞凋亡，抑制細胞增殖和細胞存活率下降，其是透過一個複雜的機制牽涉到 MAPK/ER 的調控以及 E2 相關蛋白 Her-2/neu (erbB-2) oncogene 及 cyclin-dependent kinase inhibitors p21WAF1/CIP1 and p27Kip1[40]，先前本實驗室的研究結果發現 NLFE 是透過 PI3K/Akt 路徑，影響脂肪酸合成酶之表現進而抑制細胞生長作用。在本次的試驗當中，發現到 NLFE 對於 ER α 及 HER2 的磷酸化狀態有所影響，但對 HER2 蛋白表現卻無顯著差異。研究指出，HER2 活化增加了脂肪酸合成酶轉譯，而 FASN 過度表現也顯著增加了 HER2 訊息，進而促進了腫瘤的生長[41]。結果證實在 *in vivo* 及 *in vitro* 中，NLFE 確實能夠抑制腫瘤的成長，NLFE 降低乳癌的生長是透過減少 ER α 及 HER2 的活化及抑制 FASN 表現，因此 NLFE 可用為化學預防物質與抗乳癌之功效。

(八)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. 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.
6. 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.
7. 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.
 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. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2(2):127-137.
 11. Yu D, Hung MC: Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 2000, 19(53):6115.
 12. 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.
 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. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M: Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985, 82(23):7889-7893.
 17. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. 1986.
 18. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J: Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (New York, NY)* 1986, 231(4742):1150.
 19. Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Lubahn DB, O'Donnell TF, Korach KS, Mendelsohn ME: Estrogen inhibits the vascular

- injury response in estrogen receptor α -deficient mice. *Nature medicine* 1997, 3(5):545-548.
20. Porter JC: Hormonal regulation of breast development and activity. *Journal of Investigative Dermatology* 1974, 63(1):85-92.
 21. Anderson E: The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 2002, 4(5):197-201.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Fulda S, Debatin KM: Death receptor signaling in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 2003, 3(4):253-262.
 29. Mayer B, Oberbauer R: Mitochondrial regulation of apoptosis. *Physiology* 2003, 18(3):89-94.
 30. M Chinnaiyan A, Dixit VM: The cell-death machine. *Current Biology* 1996,

- 6(5):555-562.
31. Herr I, Debatin KM: Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001, 98(9):2603-2614.
 32. Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer. *Cell* 1991, 66(6):1071-1074.
 33. Halaban R: Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999, 18(3):333-343.
 34. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen YP, Furukawa H, Itoigawa M, Fujioka T, Mihashi K, Cosentino LM, Morris-Natschke SL: Anti-HIV benzyloisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure–activity correlations with related alkaloids. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2005, 13(2):443-448.
 35. Lin M-C, Kao S-H, Chung P-J, Chan K-C, Yang M-Y, Wang C-J: Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, 57(13):5925-5932.
 36. Huang B, He J, Ban X, Zeng H, Yao X, Wang Y: Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat science* 2011, 87(1):46-53.
 37. Lin H-Y, Kuo Y-H, Lin Y-L, Chiang W: Antioxidative effect and active components from leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, 57(15):6623-6629.
 38. Ho H-H, Hsu L-S, Chan K-C, Chen H-M, Wu C-H, Wang C-J: Extract from the leaf of *nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48(1):159-168.
 39. Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL: Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26(8):1343-1353.
 40. Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U: Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996, 77(3):474-482.
 41. Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, Hawke DH, Yeung SC, Lee MH, Hortobagyi GN: Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 2010, 12(6):R96.

(九) 實驗成果附圖

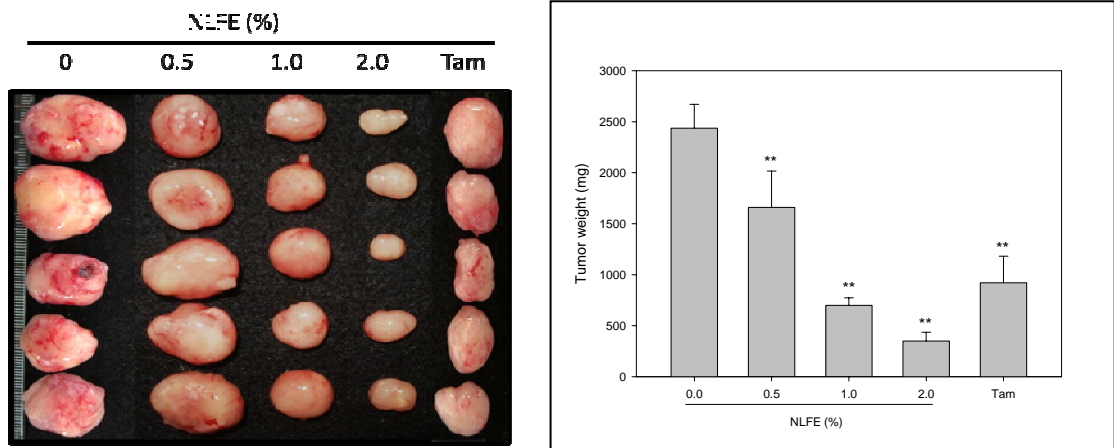
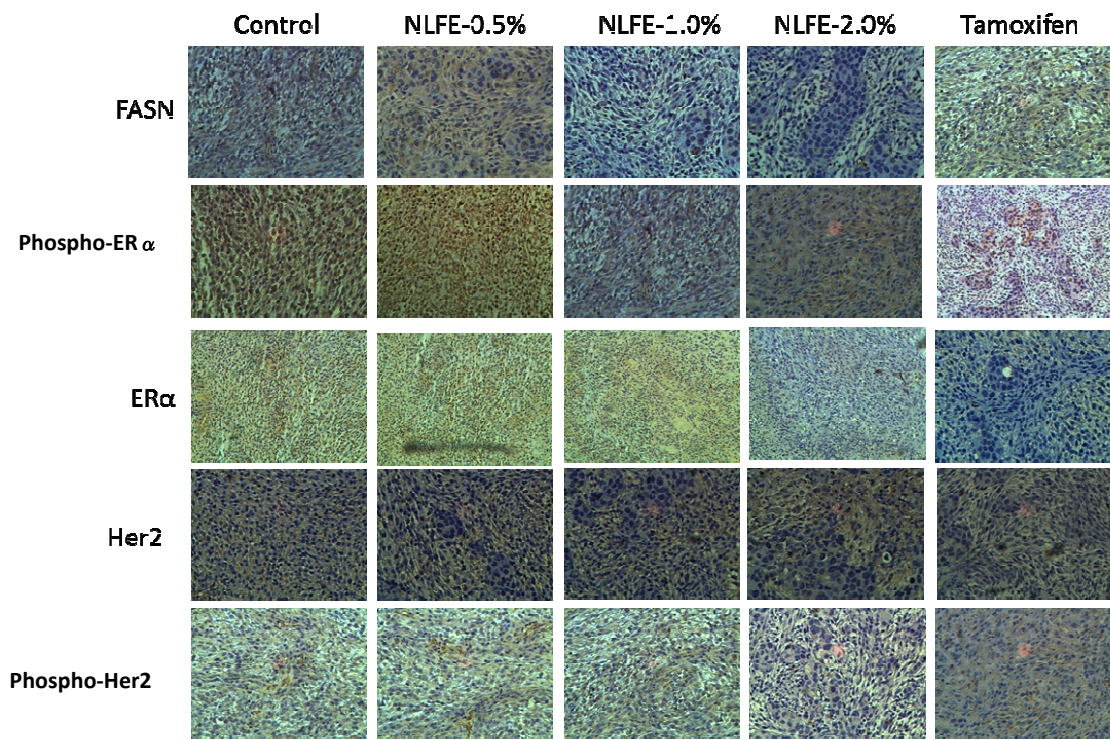


Figure 1. NLFE suppresses tumor growth in nude mice. BT-474 cells were injected subcutaneously into mice. At 28 days after injection, mice were killed by cervical dislocation and tumor were collected for analysis. (A) Representative tumors from each group dissected at day 28. Tam, Tamoxifen. (B) Densitometry analysis of tumor size for each group. Data are shown as the means \pm SD. **, $p < 0.05$.

(A)



(B)

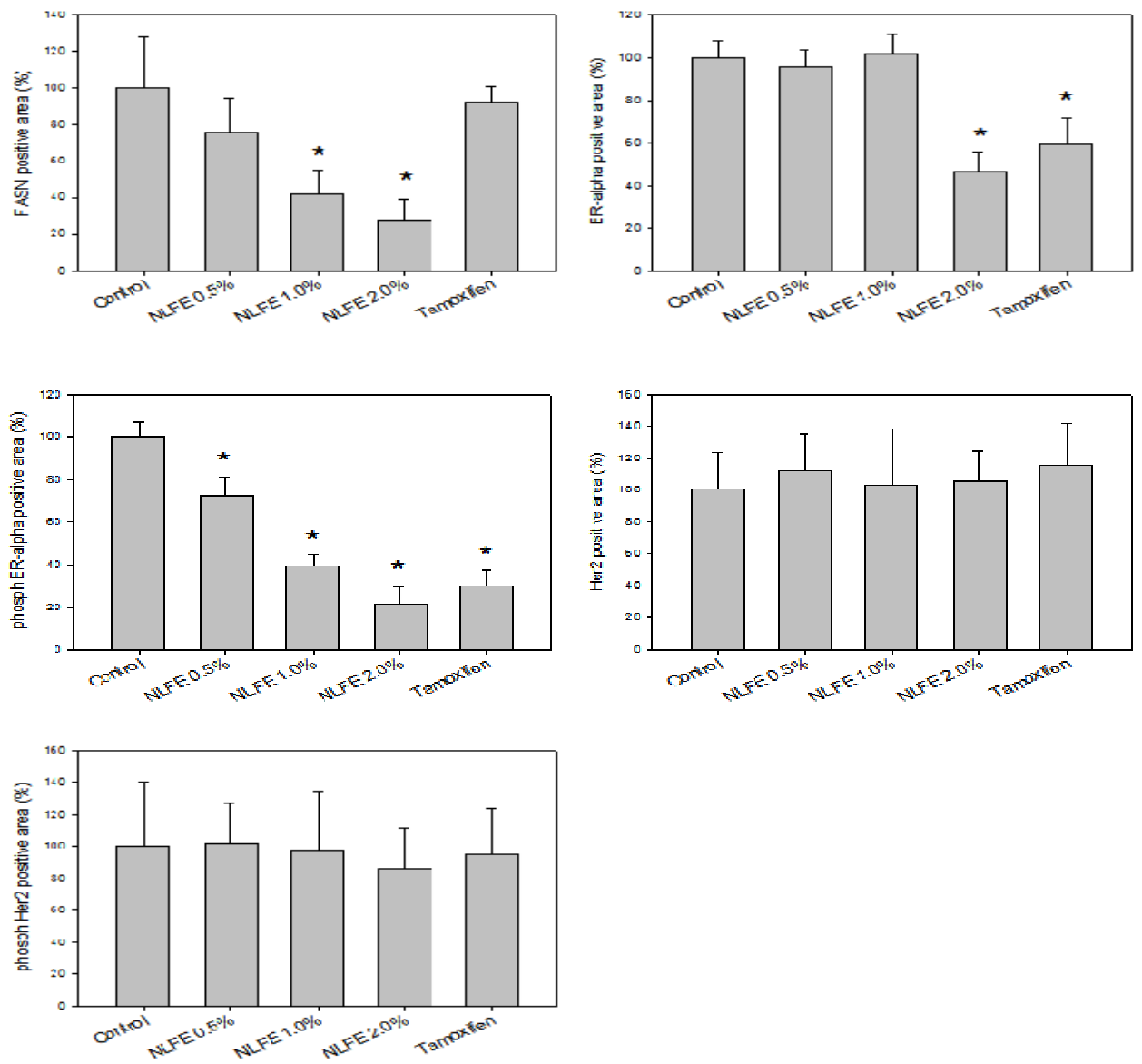
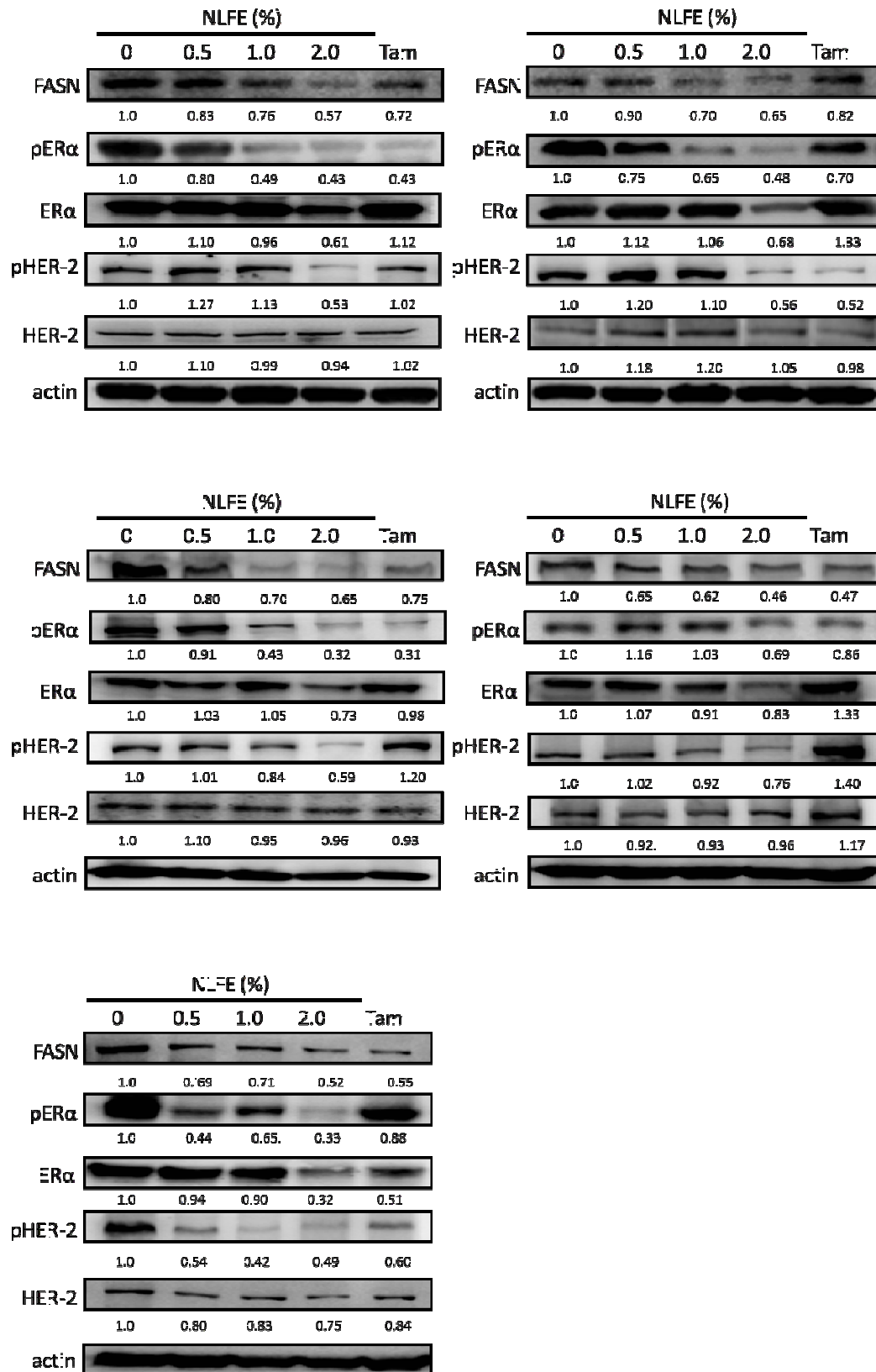


Figure 2. NLFE reduced FAS, ER- α and Her-2 expression in inoculated tumor with BT-474 mammary cancer cell in nude mice. (A) Characterization of BT-474 induced tumor cell lineage by H&E and immunohistochemistry stain. Excised tumors were fixed in formalin and embedded in paraffin prior to preparation for IHC by standard methods. Each target protein was detected with respective antibody. (200 \times) (B) Quantification of FAS, phospho-ER α / ER α and phospho-HER-2/HER-2. The graph represents mean values of three independent experiments, and error bars represent the means \pm SD of these experiments. *P<0.05 compared with the control. The three independent experiments were significantly different according to a one-way ANOVA.

(A)



(B)

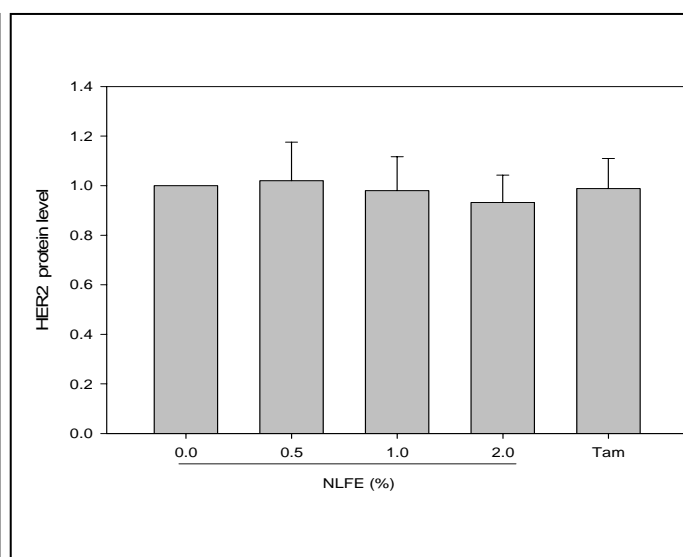
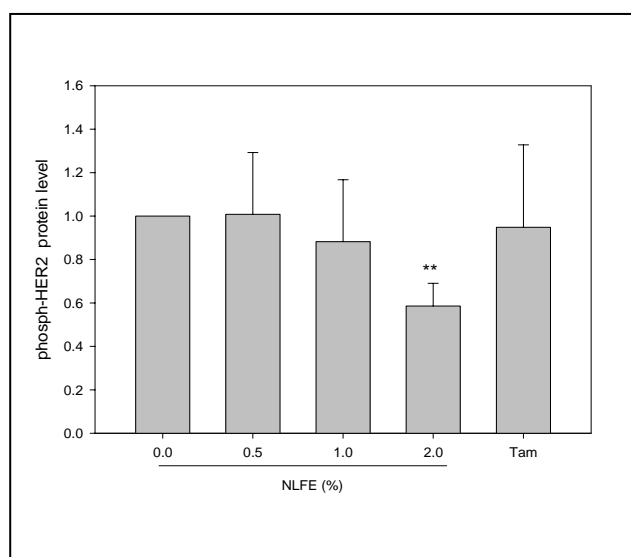
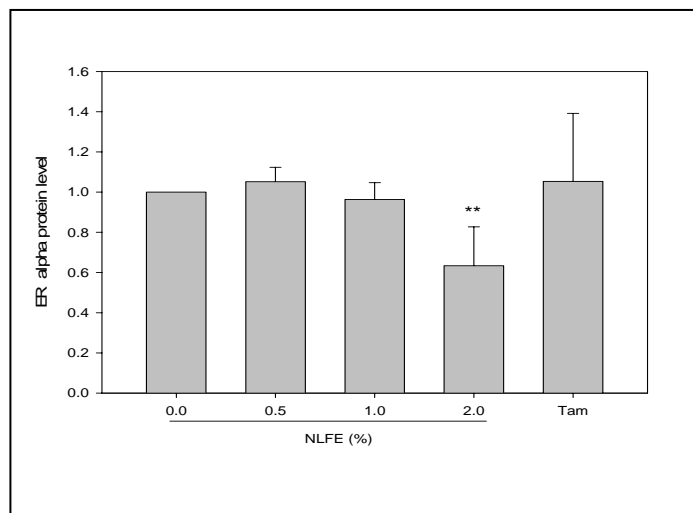
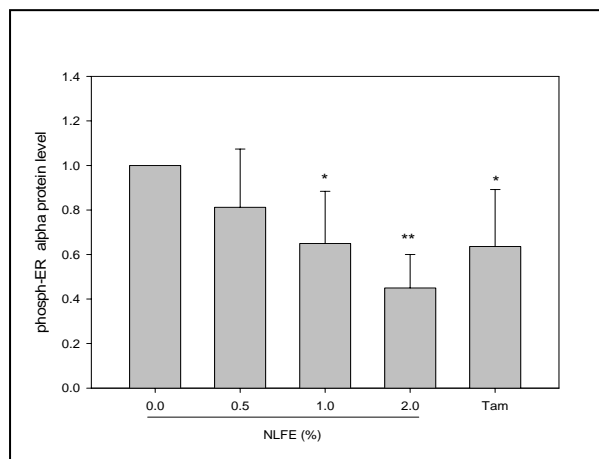
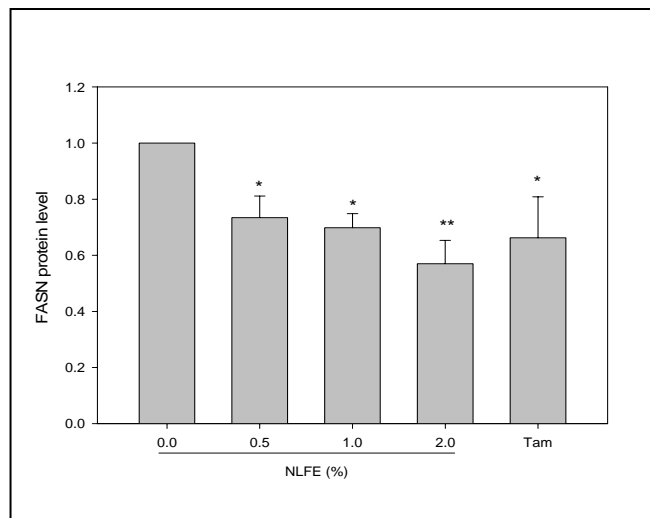


Figure 3. Effect of NLFE on the protein level of FASN, ER- α and Her-2 in BT-474 human breast cancer xenografts nude mice (A) Tumor whole cell extracts

(50 µg/lane) were separated on 8-10% SDS PAGE followed by Western blot analyses. Each target protein band was detected with respective antibody. β-actin was used as an internal control.(B) Quantification of FAS, phospho-ERα / ERα and phospho-HER-2/HER-2. The graph represents mean values of three independent experiments, and error bars represent the means ± SD of these experiments. *P<0.05 compared with the control. The three independent experiments were significantly different according to a one-way ANOVA. C, control; Tam, Tamoxifen.

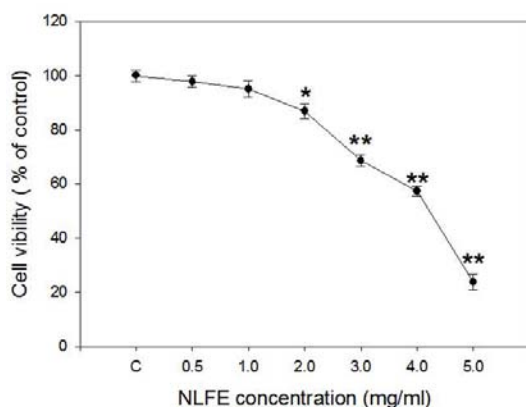


Figure 4. Cell viability of cells treated with NLE. 5×10^4 BT-474 cells were treated with NLE under different concentration (0,0.5-5 mg/ mL) for 24 h. Cell viability was analyzed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The result represents an average of four independent experiments ± SD.

* P < 0.001, versus corresponding control.

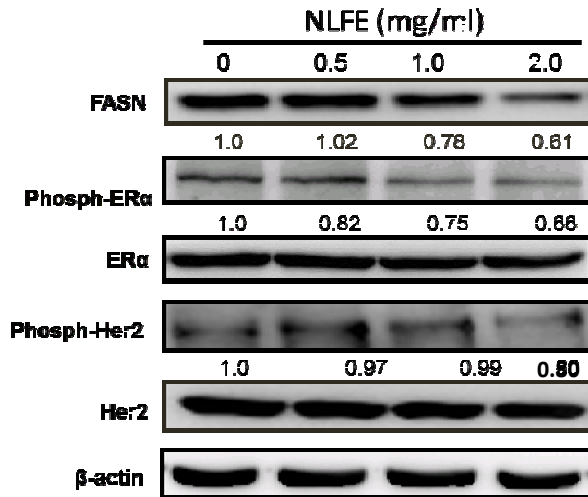


Figure 5. NLFE reduced the phosphorylation level of ER α and FASN in BT-474 cells. BT-474 cells were treated with various concentrations of NLE for 24 h. Whole cell extracts (50 μ g/lane) were separated on 10% SDS PAGE followed by immunoblot analyses. Each target protein band was detected with respective antibody. β -actin served as the internal control. Data are representative of three independent experiments