

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : Fatty acid synthase, Estrogen receptors, HER2 在 *
* 名稱 : Miquelianin 抑制乳癌增生及位移的角色之研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳信融

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-043-B

研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月

指導教授： 王朝鐘

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 106年03月31日

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

Fatty acid synthase, Estrogen receptors, HER2 在 Miquelianin 抑制乳癌

增生及位移的角色之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 105-2815-C-040 -043 -B

執行期間： 105 年 7 月 1 日至 106 年 2 月 28 日

執行機構及系所：中山醫學大學生化暨微生物免疫研究所

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：陳信融

中 華 民 國 106 年 3 月

Fatty acid synthase, Estrogen receptors, HER2 在 Miquelianin 抑制乳癌增生及位移的角色之研究

(一) 摘要

1-1. 中文摘要

惡性腫瘤已經多年高居國人十大慢性疾病死因之首。癌症預防研究已為世界重要趨勢，因此尋找新興治療以及預防藥物為現今科學家之重要目標。本實驗室長期致力於發展使用天然物質治療或預防癌症，以降低傳統治療方法對人體所造成的嚴重副作用與傷害。在先前的研究指出荷葉多酚具有抑制乳癌腫瘤生長以及轉移的能力。在經過質譜分析後，發現當中的主要成分為 Miquelianin。在本研究利用 ECIS assay、Boyden chamber 以及 transwell assay 證實 Miquelianin 具有抑制乳癌細胞 MDA-MB-231 的 migration 現象。利用 ECIS assay 證實 Miquelianin 具有抑制乳癌細胞 MDA-MB-231 的 proliferation。Miquelianin 抑制乳癌的路徑是否透過 FASN、ER、HER2 的路徑目前仍努力進行中。根據本篇研究所看到的現象，Miquelianin 具有作為乳癌病人藥物的潛力。

1-2. 英文摘要

Malignant neoplasms have been the top ten causes of death in chronic diseases. Cancer prevention research has become an important trend for the world, so looking for emerging treatment as well as preventing drugs as an important goal for today's scientists. Our laboratory has long been committed to the development of the use of natural substances in the treatment or prevention of cancer, in order to reduce the traditional treatment of the human side caused by serious side effects and injuries. Previous studies have shown that lotus leaf polyphenols have the ability to inhibit tumor growth and metastasis in breast cancer. After mass spectrometry analysis, found that the main component of Miquelianin. In this study, Miquelianin was used to inhibit the migration of breast cancer cells MDA-MB-231 using ECIS assay, Boyden chamber and transwell assay. The use of ECIS assay confirmed that Miquelianin inhibited the proliferation of breast cancer cells MDA-MB-231. Miquelianin inhibits the pathways of breast cancer through whether the path through FASN, ER, HER2 is still ongoing. According to the phenomenon seen in this study, Miquelianin has the potential as a drug for breast cancer patients.

1-3. 關鍵詞

Miquelianin, Breast cancer, Migration, Proliferation

(二) 研究動機

根據 103 年衛生福利部統計處資料顯示，十大死因以慢性疾病為主，惡性腫瘤自 71 年以來穩居首位。其中女性乳房癌更是在女性的十大癌症死亡率穩坐第四名，標準死亡率更是在十年來增加了 13.6 個百分比。從十大癌症死亡年齡中位數來看，女性乳房癌死亡年齡中位數只有 58 歲，更是遠低於所有癌症的 69 歲。上述資料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。因此探

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。

本實驗室長久以來，致力於開發中藥草中所含的特殊成分，希望可以藉由簡單的攝入食品來達到預防、治療腫瘤發生。現今癌症的治療方式，大多以手術切除、放射治療或是投予化學治療藥物，皆會對人體造成巨大的傷害且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食品開發，替代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。在我們先前的研究之中發現，荷葉具有抑制乳癌細胞生長[1]與轉移的功用[2]。在我們在經過質譜分析之後發現，荷葉多酚當中以 Miquelianin 比例最高，因此我們想要探討荷葉多酚中的 Miquelianin 是否能夠減緩及抑制乳癌細胞的轉移。

(三)文獻回顧與探討

3-1.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以下四點

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。

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。

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。

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[3-6]。

3-2.與乳癌相關蛋白

3-2-1. HER2

訊息傳導可分成三種

➤ **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。

➤ **PLCγ** 路徑: HER2 可以活化 PLCγ 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[7-8]。

➤ **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。

HER2 和 ligand 親和力極低，被歸類為 ligandless receptor，但可以經由和其他 receptor 結合形成 heterodimer，再與 ligand 結合，雖然 HER3 本身無內生性酪胺酸激酶活性，但 HER2-HER3 是最常見也是活性最強的 heterodimer[9]。經由基因和蛋白表現量倍增，可促進下游蛋白磷酸化而活化，加速細胞增殖，導致細胞型態轉變，造成癌化[10]。HER2 的活化，產生的訊號傳遞會導致腫瘤形成。目前已知人類因為 HER2 基因過度表現所引起的癌症有乳癌、卵巢癌、膀胱癌、攝護腺癌、胃癌、直腸癌、肺癌等。其中乳癌有 30% 是經由 HER2 基因過度表現，復發率極高。因此 HER2 基因可作為乳癌病人復發率的指標[11]。人類 HER2 基因位於第十七號染色體的長臂 q12-q21 區域[12]，含有 3765 個核苷酸，可轉譯成 HER2 蛋白(p185HER2)，擁有自我磷酸化功能，分為膜外(N 端)、穿膜區域和膜內(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[13]及 erbB-4/HER4 其間結構有高相似性[14]。

3-2-2. Estrogen receptors (ER)

人類雌激素受體可分為 α 、 β 兩大類，雌激素受體- α (ER α) 基因位於第六對染色體長臂 [15]，雌激素受體- β (ER β) 基因位於第十四對染色體長臂上[16]。

雌性激素受體為 SSHR (sex steroid hormone receptor superfamily) 的成員之一。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[17]。

3-2-3. Progesterone receptor (PR)

Progesterone receptor 是一個受體蛋白，可以經由 progesterone 活化。人類的 progesterone receptor 是由坐落在染色體 11q22 的 PGR gene 所產生，分為兩個主要的形式 A 和 B，差別在於分子兩不同[18-19]。近年來發現 PR 比 ER 在預測治療的績效上更為顯著[20]。

3-2-4. Fatty acid synthase (FASN)

FAS 由兩個單體組成，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，若能夠抑制此酵素，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[21]。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)。另外，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[22-23]。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[24]。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[25]。

3-3. 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。

(四) 研究方法及步驟

4-1. 乳癌細胞培養

人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 來自新竹食品工業研究所生物資源保存及研究中心(BCRC)。培養於 L-15 中，並依照 BCRC 所提供之培養條件添加 2 mM L-glutamine、1% antimycotic solution(PSA)以及 10% fetal bovine serum (FBS)，培養箱設定無 CO₂，37°C 的恆溫環境，根據細胞生長速度定期更換培養液。

4-2. 細胞毒性試驗(cytotoxicity assay)

將乳癌細胞 MDA-MB-231 (5×10^4 cell/well)培養於 24 well culture plate，加入不同濃度的 Miquelianin 處理 24 小時後，移除舊的培養基，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。

4-3. 乳癌細胞移動性分析 (migration assay)

4-3-1. 人類乳癌細胞傷口癒合試驗 (wound healing assay)

藉由 200 μL tip 在培養皿中央劃出一道沒有細胞的區域(wound)，持續觀察細胞增生及遷移的能力，若此區域一直沒有細胞進入，即表示細胞的增生或遷移能力受到抑制。將乳癌細胞 MDA-MB-231 (1×10^6 cell/well) 培養於 6 well culture plate，當細胞密度約八分滿時，加入含有不同濃度的 Miquelianin 培養基，並培養於無 CO_2 、 37°C 的恆溫環境中，隔 24 小時以倒立顯微鏡觀察細胞型態，並利用 CCD 拍照。

4-3-2. 人類乳癌細胞移動性分析 (Boyden chamber assay)

將細胞給予不同濃度的 Miquelianin 分別處理 24 小時後，以 trypsin-EDTA 打下所有細胞並用 trypan blue 計算細胞數，利用 48 well Boyden chamber 的分析，然後在 upper chamber 注入固定量的細胞數(1×10^5 cell/ well)，另 lower chamber 為含有誘導物(inducer)的培養基；待細胞移動 12 小時以後，取下薄膜，以甲醇固定細胞 10 分鐘，風乾 5 分鐘之後，以 Giemsa stain (1: 20) 染色 1 小時，最後固定住薄膜，擦拭掉薄膜之上層細胞，在 200 倍顯微鏡下隨機選取 5 個視野，做移動細胞數之統計。

4-3-3. 人類乳癌細胞移動性分析 (Transwell assay)

拆下細胞後，以不含 FBS 的 medium 回溶，分裝不同濃度 Miquelianin 的組別(1×10^5 cell/200 μL)，先在 24 well 加入 900 μL 的 induced medium(含 10% FBS)，將 cell culture inserts 放入 well 後，加入不同濃度 Miquelianin 的細胞，待細胞移動 12 小時以後，取出 inserts 後，以甲醇固定細胞 60 分鐘，以 Giemsa stain (1: 15) 染色 overnight，以棉花棒擦拭，在 200 倍顯微鏡下隨機選取 5 個視野，做移動細胞數之統計。

4-4. ECIS assay

利用電流/電壓的方式，即時連續的測量細胞在電極表面所造成的阻抗值變化。利用電學參數的變化偵測敏感的細胞特質，包括細胞的黏附和伸展、成長曲線、活動力與屏障功能等。藉由微小電極的電流迴路，測量電極上阻抗、電阻與電容值。當細胞黏附並伸展於 ECIS 的電極上，細胞膜阻礙電流，而造成抗阻的增加，藉以觀察和分析多種細胞行為。在種植細胞前一天，先將培養盤的密封膠帶及包裝拆除，打開培養盤的蓋子，於每個 well 緩慢加入 200 μL 的 L-15 培養基，來活化電極板。隔天將每個 well 內的 200 μL 的 L-15 培養基給移除，控制組加入 400 μL (1×10^5 cell/well) 的細胞懸浮液，對照組加入 400 μL 20% FBS 為誘導對照組，並加入不同劑量的 Miquelianin，以維持一樣的滲透壓。上述動作完成後將培養盤鎖在陣列固定器上，以 ECIS 軟體進行紀錄，藉以觀察 Miquelianin 在是否具有抑制 MDA-MB-231 移動的能力。

4-5. 統計分析

細胞實驗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 $p < 0.05$ 標記為 "**"。 $p < 0.01$ 標記為 "***"。 $p < 0.001$ 為 "****"。)

(五)結果

5-1. Miquelianin 對 MDA-MB-231 的毒性試驗

加入不同濃度的 Miquelianin(control, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M)後，結果顯示，不同濃度之間並沒有明顯差異，甚至到了 200 μ M 的劑量都沒有造成 MDA-MB-231 這株細胞的明顯死亡。(Figure 1)

5-2. Miquelianin 對 MDA-MB-231 的傷口癒合實驗

再加入不同濃度的 Miquelianin(0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M)後，可以發現似乎隨著濃度的增加，傷口癒合的能力有下降的趨勢。(Figure 2)

5-3. 利用 ECIS assay 檢測 Miquelianin 對 MDA-MB-231 的 proliferation 影響

在 0 μ M 的組別中，隨著時間的延長有顯著性的增加(24 hr 增加 2.3% ; 48 hr 增加 5.5%)。在 10 μ M 的組別中，隨著時間的延長顯著性的降低(24 hr 下降 3.6% ; 48 hr 下降 4.7%)。20 μ M 的組別中，隨著時間的延長也有顯著性的降低(24 hr 下降 7.6% ; 48 hr 下降 13%)。到了 50 μ M 下降得更顯著(24 hr 下降 25% ; 48 hr 下降 35%)。(Figure 3)

5-4. 利用 ECIS assay 檢測 Miquelianin 對 MDA-MB-231 的 migration 影響

在處理不同濃度的藥物之後，MDA-MB-231 這株細胞 migration 的情形都顯著的下降(10 μ M 下降 45% ; 20 μ M 下降 47% ; 50 μ M 下降 45%)。(Figure 4)

5-5. 利用 Transwell assay 檢測 Miquelianin 對 MDA-MB-231 的 migration 影響

在 20 μ M Miquelianin 的組別有輕微的減緩 migration 的情形，當濃度增加到 50 μ M 和 100 μ M 後，migration 的情形降低得更顯著(20 μ M 下降 8% ; 50 μ M 下降 38%)。(Figure 5)

5-6. 利用 Boyden chamber assay 檢測 Miquelianin 對 MDA-MB-231 的 migration 影響

隨著 Miquelianin 濃度的增加，MDA-MB-231 這株細胞 migration 的情形，顯著性的降低，並隨著濃度增加有著下降的趨勢(10 μ M 下降 12% ; 20 μ M 下降 29% ; 50 μ M 下降 39% ; 100 μ M 下降 37%)。(Figure 6)

(六)討論

在實驗室先前的研究當中顯示，荷葉多酚具有抑制乳癌細胞生長與轉移的功效。其中荷葉多酚又以 Miquelianin 的物質為主要成分，因此本研究取用乳癌細胞 MDA-MB-231 為細胞實驗的模式，並給予不同濃度的 Miquelianin，觀察其 migration 和 proliferation 的情形。

根據 MTT assay 的結果顯示從濃度 0 μ M 到 200 μ M 皆不會明顯造成 MDA-MB-231 的死亡，代表說在之後的實驗，Miquelianin 會抑制 migration 和 proliferation 的現象，而不是因為藥物對細胞的毒性所造成的誤判。因此在之後的實驗都選用 0~200 μ M 之間的劑

量(Figure 1)。

在傷口癒合實驗(Figure 2)當中可以看到隨著劑量的上升，細胞的傷口癒合能力似乎減緩。由於傷口癒合實驗伴隨著 proliferation 以及 migration，所以接下來利用 ECIS assay 去分別觀察這兩個現象(Figure 3,4)。在 proliferation 的部分可以發現，有著 dose-dependent 的減緩趨勢。在 migration 的部分則是都會顯著性的減少。接著我們又再分別利用 Transwell assay 以及 Boyden chamber assay(Figure 5,6)去觀察 migration 的情形。可以看到藥物處理後的 transwell assay 當中，隨著藥物的增加有著減緩 migration 的趨勢。在 Boyden chamber 中則更為明顯。

在未來，仍需要進行詳細的生化機制探討，以釐清 Miquelianin 對於 migration 以及 proliferation 之間的調控機轉，像是 HER2、FASN、ER、PI3K、Akt、Fak、Erk、cdc42、RhoA、Rac1、Ras 等等。並以動物實驗模式去進一步驗證 Miquelianin 抑制乳癌細胞 migration 和 proliferation 的影響。

(七)參考文獻

1. Yang MY, Chang YC, Chan KC, Lee YR, Wang CJ. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves inhibits proliferation of breast cancer in vitro and in vivo. *European J. Integrative Med.* 2011, 3, e153–e163.
2. Yang MY, Chang YC, Wang CJ. Unpublished data.
3. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 1997, 71, 800-9.
4. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E: Epidemiology of breast cancer. *The lancet oncology* 2001, 2, 133-140.
5. McPherson K, Steel CM, Dixon J. ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Med. J.* 2000, 321, 624-8.
6. Baselga J, Norton L. Focus on breast cancer. *Cancer cell* 2002, 1, 319.
7. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 127-137.
8. Yu D, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 2000, 19, 6115-21.
9. 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. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 3884-3890.
10. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000, 19, 3159-67.
11. Nagai MA, Pacheco MM, Oshima CT, Brentani MM. c-erbB-2 DNA amplification and mRNA expression in human primary breast tumors and its relationship to other prognostic factors. *Cancer Biother.* 1993, 8, 29-35.
12. 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, 362-6.

13. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 9193-7.
14. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 1746-50.
15. 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* 1993, 17, 263-5.
16. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996, 392, 49-53.
17. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988, 240, 889-895.
18. Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 143, 740-8.
19. Gadkar-Sable S, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C. Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues. *Front Biosci* 2005, 10, 2118-30.
20. Li YF, Liu ZJ, Gi JW, Tunghai University, Taiwan: Purification of human progesterone receptor.
21. 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. *Int. J. Mol. Med.* 1999, 4, 381-7.
22. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Markss J, Richardson A, Cooper A, Strausberg R, Riggins GJ. Molecular Markers in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *Mol Cancer Res* 2003, 1, 362-75.
23. Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4, 1686-96.
24. Menendez JA, Rubinstein W, Lupu R. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) activity reverses tamoxifen resistance in Her-2/neu-overexpressing breast cancer cells. *AACR Meeting* 2005, 1198.
25. 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. *J. Cell Physiol.* 2013, 228, 1087-1097.
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, 935-943.
27. Fulda S, Debatin KM: Death receptor signaling in cancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2003, 3, 253-262.
28. Mayer B, Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol. Sci.* 2003, 18, 89-94.
29. Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr. Biol.* 1996, 6, 555-62.
30. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001, 98, 2603-2614.

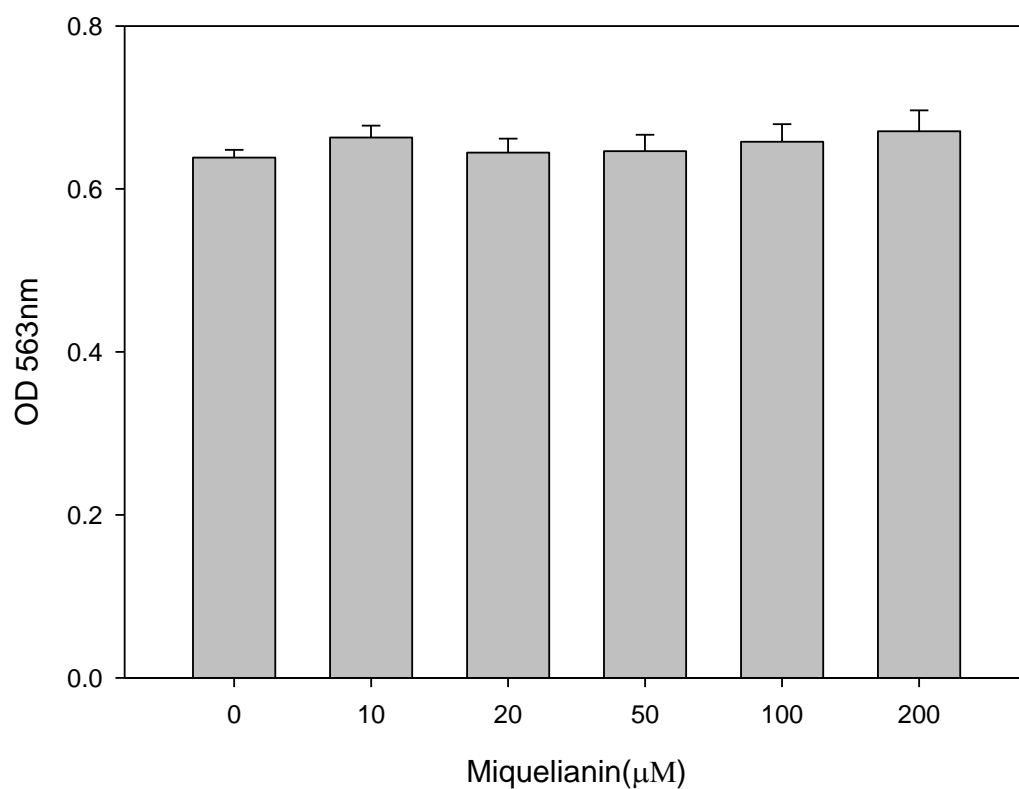


Figure1. Cytotoxicity of Miquelianin in MDA-MB-231. Seeds MDA-MB-231 (5×10^4 cell/well) in 24 well treated with different concentration of Miquelianin (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM), incubated 24 hrs. Detected with OD 563nm.

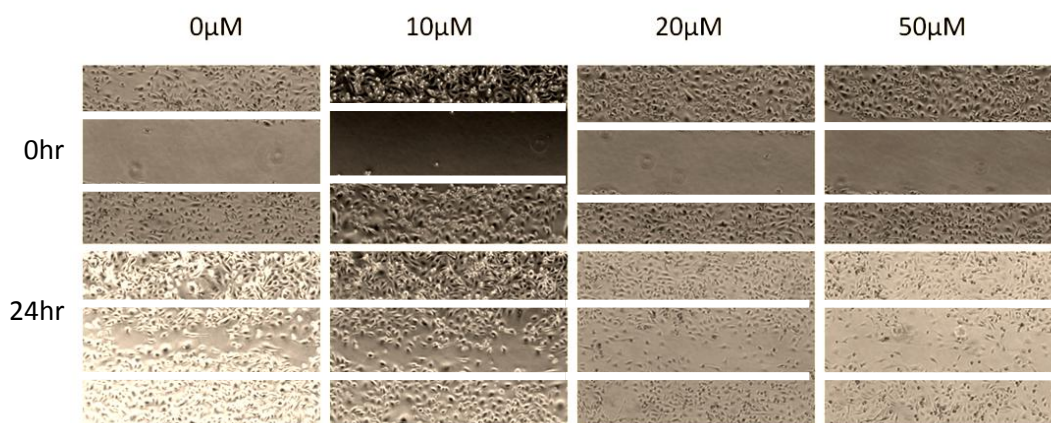


Figure2. Miquelianin slow down the wound healing. Draw a wound with 200 μL tip, treated with different concentration of Miquelianin (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM). Observed in 40X with Inverted Fluorescence Microscope.

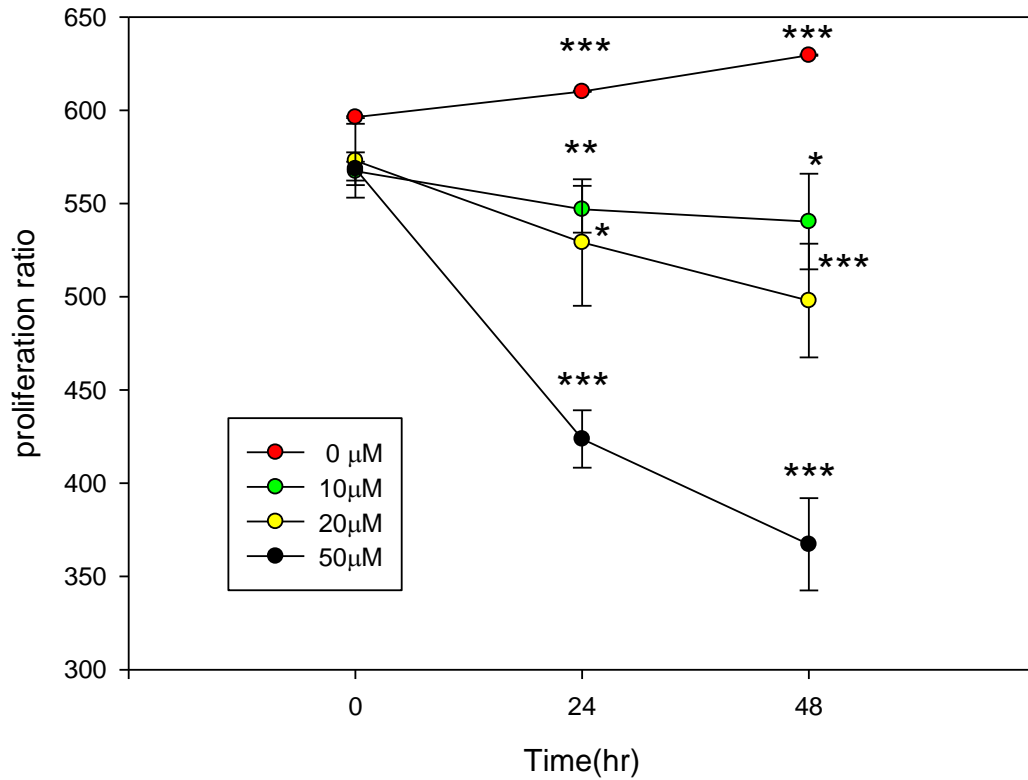


Figure3. Miquelianin inhibits proliferation with ECIS in MDA-MB-231 model. Treated with different concentration of Miquelianin (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM) in MDA-MB-231. Detected the proliferation with ECIS. (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 compared with 0hr.)

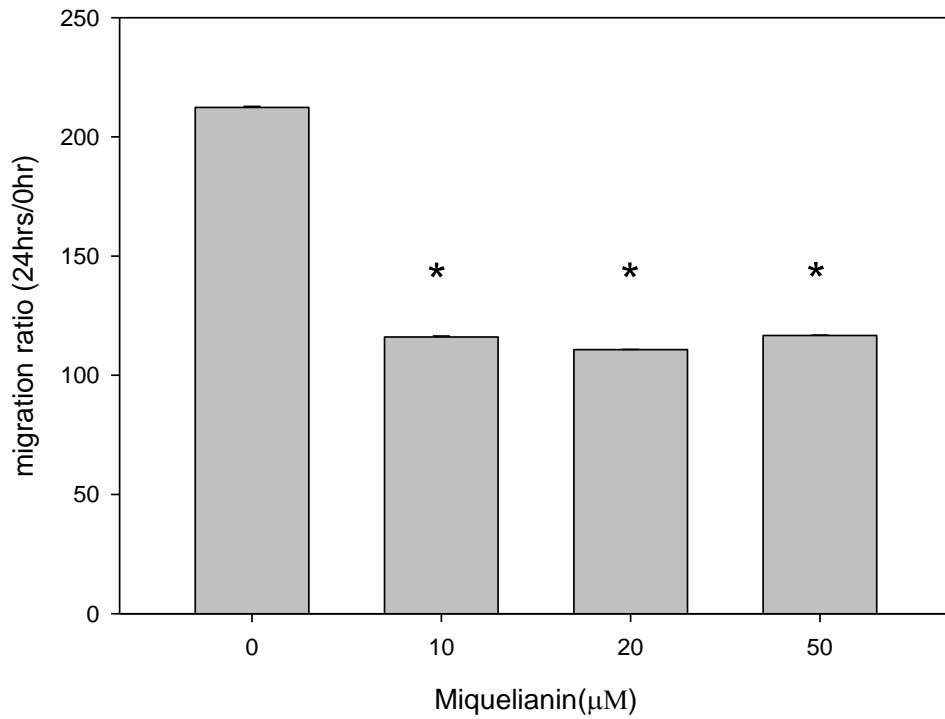


Figure4. Miquelianin inhibits migration with ECIS in MDA-MB-231 model. Treated with different concentration of Miquelianin (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM) in MDA-MB-231. Detected the migration with ECIS. (* p<0.05 compared with 0 μM.)

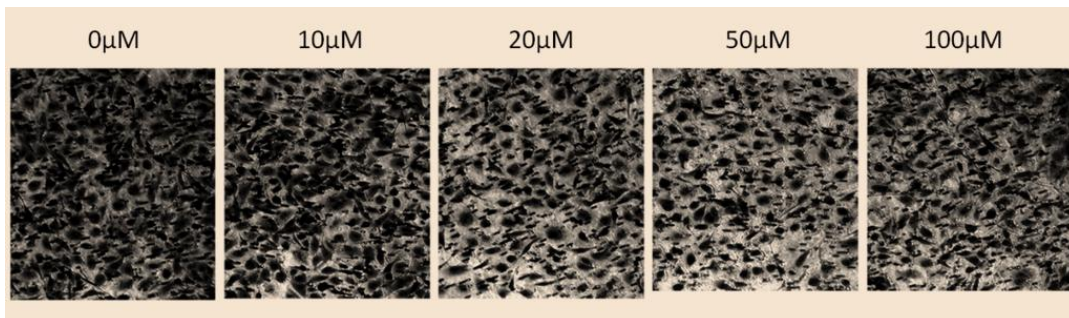
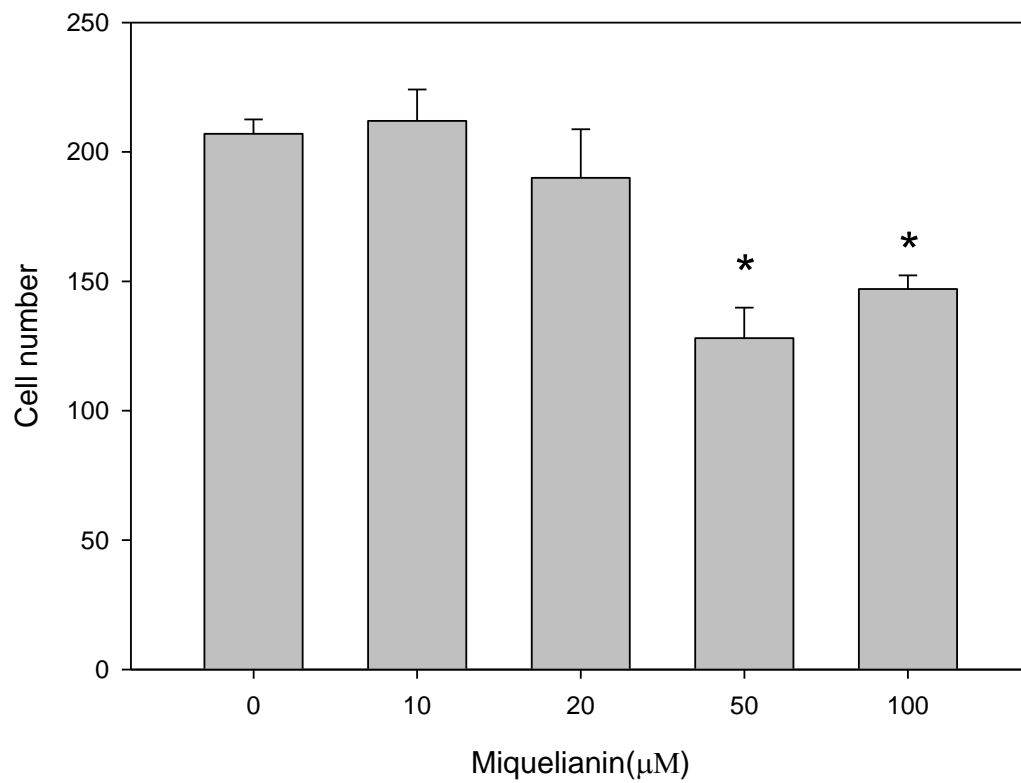


Figure5. Miquelianin inhibits migration with transwell in MDA-MB-231 model. Treated with different concentration of Miquelianin (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM, 100 μM) and incubate for 12 hrs (CO₂ –free, 37°C). Observed in 40X with Inverted Fluorescence Microscope. (* p<0.05 compared with 0 μM.)

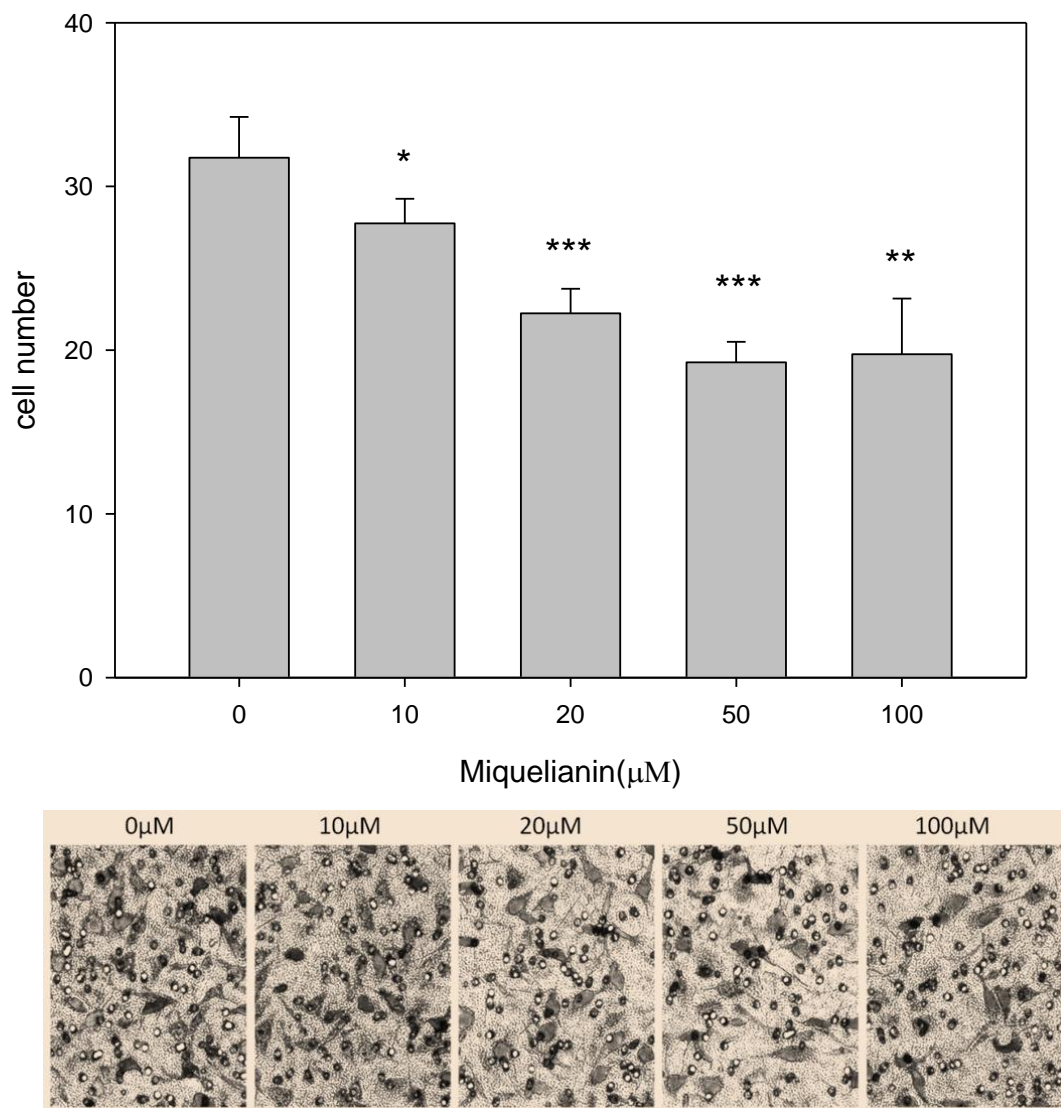


Figure6. Miquelianin inhibits migration with Boyden chamber in MDA-MB-231 model. Treated with different concentration of Miquelianin (0 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM, 100 μM) and incubate for 6 hrs(CO₂ -free, 37°C). Observed in 40X with Inverted Fluorescence Microscope. (* p<0.05 , ** p<0.01, *** p<0.001 compared with 0 μM.)

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

論文：已發表未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得申請中 無

技轉：已技轉洽談中

無

其他：（以 200 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以 500 字為限）。

Miquelianin 具有抑制乳癌細胞株 MDA-MB-231 proliferation 以及 migration 的能力。在未來以動物實驗印證之後，有做為乳癌新藥的潛力。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供農業經濟相關機關

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：Miquelianin 未來可應用在乳癌治療。