

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫： 抹草萃取物成分抑制乳癌細胞生長及調控細胞週期之 *
* 名稱： 研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 吳珮慈

學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-040-B

研究期間： 106年07月01日至107年02月28日止，計8個月

指導教授： 林慧萱

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： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國

107年03月20日

目錄

目錄.....	I
圖表目錄.....	V
摘要.....	1
第一章、 研究動機與研究問題.....	3
第二章、 文獻回顧與探討.....	4
2.1 抹草(<i>Desmodium caudatum</i>).....	4
2.1.1 植物簡介.....	4
2.1.2 已知功效.....	4
2.2 乳癌(Breast cancer).....	5
2.2.1 簡介.....	5
2.2.2 乳癌組織學以及細胞學分類.....	5
2.2.3 乳癌細胞株不同特性與臨床治療之差別.....	6
2.3 細胞週期(Cell cycle).....	7
2.3.1 簡介.....	7
2.3.2 分子機制.....	7
2.3.3 細胞週期在疾病中扮演之角色.....	8
2.4 細胞凋亡(Apoptosis).....	9
2.4.1 簡介.....	9

2.4.2 分子機制.....	9
2.4.3 細胞凋亡在疾病中扮演之角色.....	11
第三章、 實驗架構與流程.....	13
第四章、 研究方法與步驟.....	14
4.1 抹草萃取物(Desmodium caudatum extract, DCE)製備及成份分析.....	14
4.1.1 DCE 製備.....	14
4.1.2 總多酚含量測定(Folin-Ciocalteu method).....	14
4.1.3 總黃酮含量測定(Jia method).....	14
4.1.4 總花青素含量測定(Fuleki and Francis method).....	15
4.2 細胞培養(Cell culture).....	16
4.2.1 細胞株.....	16
4.2.2 細胞培養條件.....	16
4.2.3 細胞飢餓處理.....	16
4.2.4 細胞加藥處理.....	17
4.3 流式細胞儀分析(Flow cytometric analysis).....	18
4.3.1 細胞存活率分析(Cell viability assay).....	18
4.3.2 細胞週期分析(Cell cycle analysis).....	18
4.3.3 細胞凋亡分析(Annexin V -FIFC apoptosis assay).....	19

4.4 西方墨點法(Western blotting)	19
4.4.1 萃取蛋白	19
4.4.2 蛋白質之定量	21
4.4.3 蛋白樣品(Sample)之配置	21
4.4.4 鑄膠(Denatured-PAGE)	21
4.4.5 電泳法(Electrophoresis)	22
4.4.6 轉漬法(Transfer)	23
4.4.7 免疫墨點法(Immunoblot)	23
4.5 裸鼠移植性腫瘤試驗(Xenograft tumor studies)	23
4.5.1 動物分組與處理	23
4.5.2 體重及飲食	23
4.5.3 組織血紅素(Hemoglobin, Hb)濃度分析	24
4.6 統計分析	25
第五章、 結果與討論	26
5.1 抹草萃取物成分分析	26
5.2 探討抹草萃取物於不同濃度以及時間作用對人類乳癌細胞存活之影響	26
5.3 探討抹草萃取物於不同濃度以及時間作用對人類乳癌細胞生長週期之影響	27

5.4 探討抹草萃取物對於人類乳癌細胞生長週期分子機制之影響	27
5.5 探討抹草萃取物對於人類乳癌細胞凋亡之影響	28
5.6 探討抹草萃取物對於乳癌細胞異種移植誘導之裸鼠腫瘤生長之影響	29
5.7 總結與未來研究	30
第六章、 參考文獻	32
第七章、 圖表	34

圖表目錄

附圖 1.....	3
附表 1.....	8
附圖 2.....	11
附表 2.....	16
附表 3.....	21
附表 4.....	22
附表 5.....	22
Table 1. Composition of the <i>Desmodium caudatum</i> extract (DCE).....	34
Fig. 1. Effect of DCE on cell viability and growth curve of MCF-7 cells	35
Fig. 2. Dose-dependent effect of DCE on cell cycle progression of MCF-7 cells.....	37
Fig. 3. Time course effect of DCE on cell cycle distribution of MCF-7 cells.....	38
Fig. 4. Effects of DCE on the expressions of E2F and p-Rb in MCF-7 cells.....	40
Fig. 5. Effects of DCE on the expressions of cki in MCF-7 cells	42
Fig. 6. Effects of DCE on the expressions of cyclins in MCF-7 cells	44
Fig. 7. Effects of DCE on the expressions of cdks in MCF-7 cells	46
Fig. 8. Effect of DCE on apoptosis of MCF-7 cells.....	48
Fig. 9. Effects of DCE on xenograft tumor in Balb/c nude mice.....	49
Fig. 10. Overview of pathways for DCE-inhibited the proliferation of breast cancer <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	51

摘要

根據衛生福利部資料顯示，乳癌(breast cancer)發生率在台灣逐年上升中，2017 年位居台灣婦女好發癌症之首。近年來研究趨向以天然萃取物來抑制或延遲癌細胞的生長，抹草(Desmodium caudatum)在坊間為廣泛使用於驅邪去煞之草本植物，在中醫上應用在治療發熱性疾病。然而抹草成分功效之相關醫學研究尚未釐清，所以本篇目的為探討抹草萃取物(Desmodium caudatum extract, DCE)抑制乳癌細胞生長及調控細胞週期(cell cycle)之研究。首先，利用人類乳癌細胞株 MCF-7 進行探討，在不同 DCE 濃度下，以細胞存活率分析(cell viability assay)顯示 DCE 對於 MCF-7 細胞生長具有抑制作用，且呈現濃度及時間依賴性效應。再以流式細胞儀(flow cytometric analysis)分析經由 DCE 處理後之癌細胞在各個生長週期的分布，DCE 可促進 MCF-7 細胞週期 G0/G1 期停滯(G0/G1 arrest)作用，並誘發產生細胞凋亡(apoptosis)反應。進一步藉由西方墨點法(Western blotting)分析發現 DCE 會增加 p53 磷酸化表現，以及活化下游 cki (p21 和 p27)；DCE 並且抑制 E2F 的表現和 Rb 磷酸化，可能導致兩者的結合增加，最後促使細胞週期停滯。最後利用裸鼠移植性腫瘤試驗模式，DCE 對於 MCF-7 細胞移植誘導之裸鼠腫瘤生長確實有某個程度的抑制作用。綜合上述，DCE 能夠促進 MCF-7 細胞週期停滯以及調控細胞凋

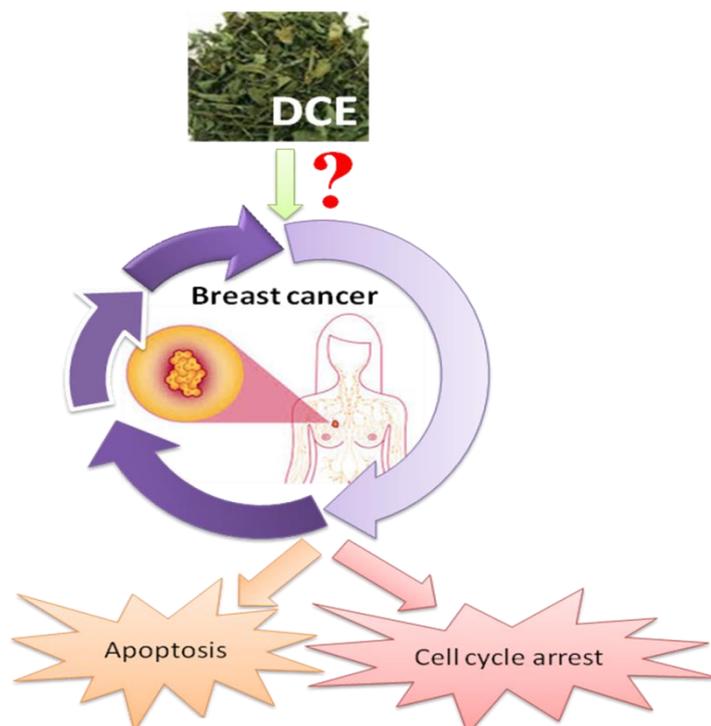
亡作用，進而抑制乳癌細胞的生長，藉以證實抹草具抗乳癌之潛力。

關鍵字: 乳癌(breast cancer)、抹草萃取物(*Desmodium caudatum*)、細胞週期(cell cycle)、細胞凋亡(apoptosis)

第一章、研究動機與研究問題

近年來癌症為十大死因之首，而女性癌症發生率之首為乳癌 (breast cancer)^[1]。現今手術切除乳癌組織仍是主要的方法，但乳癌易發生轉移，治療效果十分有限，且化學藥物對患者本身會產生嚴重之副作用。所以尋求其他治療方法或有效預防之天然物質為現今研究重點，而抹草(Desmodium caudatum)在目前廣泛應用於中醫清熱、利濕之用，而在其他生物醫學上的用途為何？因此，本計畫擬探討抹草萃取物(Desmodium caudatum extract, DCE)是否能夠有效抑制人類乳癌細胞的生長，並進一步分析細胞週期(cell cycle)分布，並探討 DCE 所造成乳癌細胞死亡是否透過細胞凋亡(apoptosis)的機制，最後利用裸鼠體內移植性腫瘤試驗，釐清 DCE 抑制乳癌細胞生長之效果(附圖 1)。

附圖 1：研究動機



第二章、文獻回顧與探討

2.1 抹草(*Desmodium caudatum*)

2.1.1 植物簡介

在台灣抹草有許多不同品種，因習俗不同與各地人文，所以不同的民族所稱之抹草各有差異，所慣用的抹草也不盡相同：客家人所習用的抹草為「魚針草」；原住民是用屬於菊科植物的「艾納香」；而閩南人使用的是「銳葉小槐花」，屬於豆科植物，也是本次研究計畫所採用的品種。抹草學名為 *Desmodium caudatum*，全日照多年生草本或亞灌木，高約 1-2 公尺，分布在台灣中、北部平地和低海拔山區，忌長期濕潤之土壤，以種子繁衍後代，常被使用為避邪植物，曬乾後較容易保存。

2.1.2 已知功效

過去研究顯示抹草乙醇提取物具有抗發炎、鎮痛解熱之功效^[2]；抹草根萃提取物中異黃酮黃酮 B (sophoraflavanone B, SPF-B)可開發用於低耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)之抗藥性菌株用藥^[3]，且抹草葉以及莖萃取出的酚類化合物已知具有抗發炎和抗氧化作用^[4]。由於目前關於抹草的生物醫學研究較為少數，本計畫擬進一步探討抹草萃提取物(*Desmodium caudatum* extract, DCE)抑制乳癌細胞生長及調控細胞週期之研究。

2.2 乳癌(Breast cancer)

2.2.1 簡介

乳癌患者以女性居多，通常發生在乳房腺上皮組織，當乳腺細胞發生病變並變成腫瘤時，即是乳癌。因乳房含豐富的血管、淋巴，所以乳癌容易擴散到其他器官，早期的發現是非常重要的，乳癌的特徵包括乳房腫塊或形狀改變、乳頭分泌物、皮膚凹陷、皮膚出現紅色鱗屑狀斑塊^[5]。家族史中有乳癌病史月經初潮年齡早、肥胖、脂肪飲食、生活壓力為乳癌的高風險群，發病危險率是普通人的 2-3 倍。現今乳癌治療主要是採手術切除，還有一些輔助醫療，主要的目的在於可以減少乳癌之復發率與死亡率，對於乳癌術後的病患，其心理建設更是一大工程，因此尋求其他有效抗癌活性之天然物質應具有其可行性。

2.2.2 乳癌組織學以及細胞學分類

乳癌在組織學上分類可分為的乳小葉癌(lobular carcinoma)以及乳腺管癌(ductal carcinoma)，好發率分別約為 10%以及 80%，好發率如此高的乳腺管癌又可分為乳腺管原位癌(ductal carcinoma in-situ)、浸潤性乳腺管癌(infiltrating ductal carcinoma)、髓質癌(medullary carcinoma)、管狀癌(tubular carcinoma)、黏液性癌(mucinous carcinoma)、乳突狀癌(papillary carcinoma)，而乳腺管癌中又以浸潤性乳腺管癌最為常見，約占 75~80%^[6]，也是本次研究計畫所採用的細胞株類型。

就細胞學來看，乳癌在細胞膜上具有三個重要受體：動情激素受體 (estrogen receptor, ER)、黃體素受體 (progesteron receptor, PR)、第二型類表皮生長因子受體 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)，所以會受到賀爾蒙刺激而加速生長^[7]，可依照此三者受體基因的不同，將乳癌大致分為：管狀 A 型 (ER⁺, PR⁺, HER2⁻)、管狀 B1 型 (ER⁺, PR⁺, HER2⁻, Ki67⁺)、管狀 B2 型 (ER⁺, PR⁺, HER2⁺)、HER2 過度表現型 (ER⁻, PR⁻, HER2⁺)、類基底細胞型 (ER⁻, PR⁻, HER2⁻)，本次研究計畫所採用的是屬於管狀 A 型的乳癌細胞株為研究材料。

2.2.3 乳癌細胞株不同特性與臨床治療之差別

現今乳癌治療主要是先採手術切除，再加上一些輔助療法，化療是最常見的方式之一，但不同類型乳癌細胞具有獨特的生物特性，所對應的化療藥物也不同，增加了乳癌治療的困難度，主要的目的在於可以減少乳癌之復發率與死亡率。一般女性的 ER 和 PR 應該都是陽性表現，可以使用賀爾蒙拮抗劑（如：tamoxifen）^[8]，但如果乳癌細胞過度分化，兩者受體表現轉變成陰性，即無法使用此類用藥；而專門針對 HER2 陽性的病人可以使用標靶藥物 herceptin，也能顯著改善預後^[9]。針對研究計畫所採用的管狀 A 型 (ER⁺, PR⁺, HER2⁻) 乳癌細胞株，臨床治療除了手術之外，以化療的內分泌治療為主，因此本文後續動物實驗中以 tamoxifen 作為臨床藥物對照組。

2.3 細胞週期(Cell cycle)

2.3.1 簡介

細胞週期是發生在細胞生長中的一系列事件，導致細胞分裂、染色體複製、產生兩個子細胞。在真核細胞中，細胞分為三期，分別是休止期(resting phase)、間期(interphase)、有絲分裂期(cell division)。在細胞分裂之前，細胞必須在間期獲得足夠養分，在間期則有三個階段，分別為 G1 細胞生長期(gap1, G1)、染色體複製期(synthesis, S)、G2 細胞生長期(gap2, G2)，為了確保細胞的適當分裂，存在 G1 及 G2 細胞週期檢查點(checkpoint)的控制機制^[10]。細胞週期的進行是由週期素(cyclin)以及細胞週期蛋白依賴性激酶(cyclin dependent kinase, cdk)之不同訊息蛋白所調控。上述調控細胞週期進行的機制都與腫瘤形成有極密切的關係，因此，了解抗癌藥物對細胞週期的調控作用有助於提高藥物之效率。

2.3.2 分子機制

細胞週期的進行是由 cyclin、cdk、細胞週期蛋白依賴性激酶抑制者 (inhibitor of cdk, cki)之不同訊息蛋白所交替循環調控。cdk 為控制細胞週期中最主要執行磷酸化的激酶，並受 cki 以及 cyclin 的調節，在不同期對應著不同週期蛋白(附表 1)，當 cdk 與相對應的 cyclin 結合，可促進細胞週期的進行；反之，當 cdk 與相對應的 cki 結合時，

則抑制細胞週期運行^[11]。

附表 1：參與細胞週期相關蛋白

Cell cycle	cdk	cyclin	cki
G0/G1	cdk4	cyclinD (early stage)	p15, p16, p18, p19
	cdk6		
	cdk2	cyclinE (late stage)	
S	cdk2	cyclinA	
G2	cdk1	cyclinA	
M	cdk1	cyclinB	

2.3.3 細胞週期在疾病中扮演之角色

當細胞週期不斷進行會促使細胞分裂增生而來不及分化，即可能成為癌症。視網膜母細胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)是一種腫瘤抑制性蛋白，它會與轉錄因子 E2F 結合，兩者結合時即 E2F 無法促進細胞週期的運作，促使細胞週期停止；磷酸化的 Rb (p-Rb)為去活化態，因 Rb 產生構型改變，失去與 E2F 結合的能力，被釋放出的 E2F 會結合到 DNA 調節區上，促進癌細胞目標基因的表現，轉錄出 Cyclin E 以及 Cyclin A，促進細胞週期從 G1 進入 S 期，DNA 開始複製合成，細胞即不斷增生。總結，導致癌症的原因可能為 Rb 突變而無法抑制 E2F 使細胞週期快速運作，或者病毒蛋白(如：多瘤病毒科病毒蛋白 E7)和 Rb 結合，造成 Rb 失去作用。目前有研究顯示三陰性乳癌可以使用針對活化 Rb 的標靶藥物來治療^[12]；且 Rb 家族的 E2F3 可透過上游調節微囊蛋白-1 (Caveolin-1, Cav1)表達和抑制轉錄訊息

傳遞及活化子蛋白-5 (signal transducer and activator of transcription -5, STAT5)信號傳導來抑制妊娠誘導的乳腺細胞增殖和分化^[13]。

2.4 細胞凋亡(Apoptosis)

2.4.1 簡介

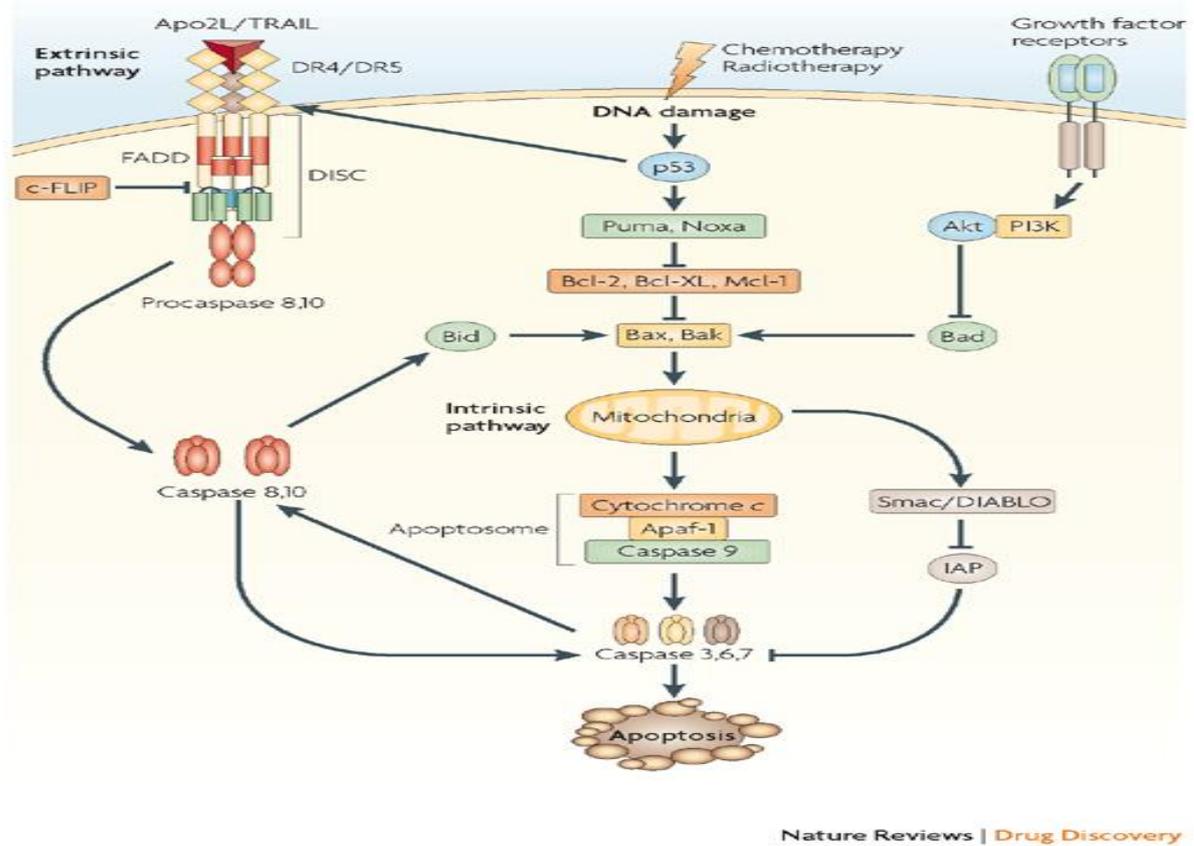
細胞死亡可以分為細胞凋亡(apoptosis)、細胞自噬(autophagy)、壞死(necrosis)，細胞自噬屬於可逆性的，而細胞凋亡與壞死皆是不可逆的傷害。壞死是因整塊組織的細胞先腫脹，然後在很短時間內所有蛋白一起變性而全部死光，會產生核濃縮(pyknosis)、核碎裂(karyorrhexis)、核溶解(karyolysis)，且組織會產生發炎反應。而細胞凋亡是單一細胞死亡，整體收縮胞器破壞形成凋亡小體，但不會引起發炎反應，細胞當受刺激，以細胞體及細胞核收縮為主的死亡，又稱細胞程序性死亡(cell programmed death)，是接受到訊號後所自行死亡的方式^[4]，過程大致為誘導訊息期(induction signaling)→促進期(effector)→分解期(degradation)→吞噬作用期(phagocytotic)，也是生命體之正常現象，無論動植物或組織器官的發育分化過程中，皆需要透過細胞凋亡來完成發育以維持正常生長，是維持正常生命現象不可或缺的因素。

2.4.2 分子機制

細胞凋亡反應的發生有三種調控路徑，分別為粒線體調控

(mitochondrial regulation)、死亡接受器 (death receptor signal transduction) 以及蛋白激酶調控路徑(附圖 2)。粒線體的調控路徑為 Bcl2 會和 Bax 或 Bad 結合而抑制細胞凋亡，但當細胞生長因子濃度下降，或出現腫瘤壞死因子時，細胞內會活化 p-Bad 或 t-Bid；而當 DNA 受損時，則會活化 p53 抑癌基因，進而增加下游分子 Bax 的蛋白質總量，由上述兩點，當 p-Bad、t-Bid 出現會結合上抗凋亡蛋白 Bcl-2，此時 Bax 會形成 dimer 或 oligomer，然後在粒線體的外膜打洞，此時粒線體外膜形成孔洞後，其會釋放 AIF (apoptosis inducing factor)、cytochrome c、Diablo (Smac) 或 EndoG (endonuclease G)，進而形成凋亡小體(apoptosome)，並且促進 procaspase 3 或 procaspase 7 活化成 caspase 3 或 caspase 7，促使細胞產生凋亡^[14]。死亡接受器的路徑是外界或免疫系統傳達訊號分子，其可分為 Fas-Fas ligand 誘導機制以及 TNF (tumour necrosis factor) 傳遞機制，其共通點為都具有與細胞膜上對應接受器結合後進一步形成死亡誘導訊號複合體(death-inducing signaling complex, DISC)，DISC 中之 procaspase 8 與 procaspase 3 會各自切割成有活性的 caspase 8 與 caspase 3，其作用為水解酵素，使大量的水進入細胞，造成滲透壓不平衡，進而使細胞凋亡。蛋白激酶的調控是透過細胞膜上的生長因子接受器，因生長因子下降進而使下游 PI3K 路徑被抑制，而活化 Bad，最後啟動細胞凋亡^[15]。

附圖 2：細胞凋亡分子機制^[15]

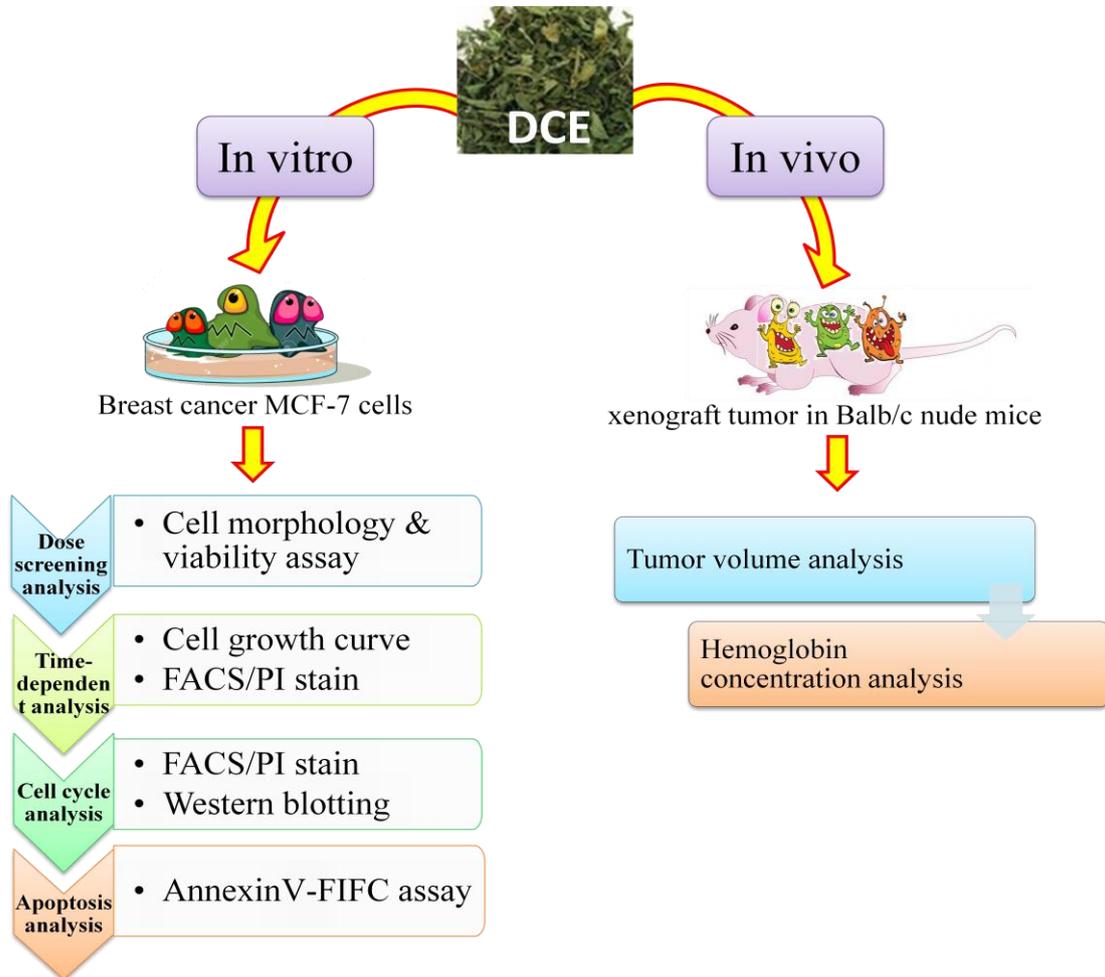


2.4.3 細胞凋亡在疾病中扮演之角色

細胞凋亡可分為生理性以及病理性所引起。就生理性來說，正常人類在胎兒發育時期結束後已經不需要的器官(如：蹼、胸腺)以及靠賀爾蒙生長和退化的器官(如：月經週期子宮內膜、停止哺乳的乳房)都是藉由細胞凋亡所清除，而當身體受到輕微刺激、放射線照射或有毒藥物時，皆會引起 DNA 傷害，而誘發細胞凋亡。就病理性來看，凋亡的細胞會呈現核染色質濃縮，並隨著胞漿及核質的凋亡小體脫離此細胞群，被周圍細胞吞噬(如:巨噬細胞)或進入淋巴管，最後隨著血液

清除代謝。已有研究顯示在乳癌中藉由組蛋白去乙酰化抑制劑可以促進乳癌幹細胞產生細胞凋亡^[16]；且胰高血糖素樣肽-1 類似物可以調節 microRNA-27a 的表現量，進而促使乳癌細胞凋亡^[17]。

第三章、實驗架構與流程



第四章、研究方法與步驟

4.1 抹草萃取物(Desmodium caudatum extract, DCE)製備及成份分析

4.1.1 DCE 製備

秤 300 g 的乾燥抹草，並用神奇磨碎機將其磨成粉裝入滷包中，加入 1.5L distilled water，以 100°C 煮 1 小時，將抹草水萃取物收集起來，再加入 1.5 L distilled water 重複熬煮第二次，重複以上動作三次，將濾液進行冷凍乾燥，得其粉末即為抹草萃取物。

4.1.2 總多酚含量測定(Folin-Ciocalteu method)

配製食子酸(gallic acid, GA)為標準品，先取 10 mg 溶於 25 ml 甲醇中，分別取 0.05 ml、0.1 ml、0.15 ml、0.2 ml、0.25 ml 到 15 ml 離心管中，再補甲醇到 1 ml；另配置 DCE 以二次水稀釋成 100 倍，取 0.1 ml，同樣補甲醇到 1 ml。之後每管都各加入 0.5 ml 2 N Folin-Ciocalteu's reagent 混勻後，再加入 3 ml 20% 的 Na_2CO_3 ，混勻之後靜置 15 分鐘，加入 5 ml 二次水，將之離心 1200 rpm、5 分鐘，取上清液 1 ml，測其在波長 725 nm 下吸光值為多少，並以甲醇歸零。最後並畫標準曲線，帶入 DCE 反應之吸光值，並進一步計算總多酚含量。

4.1.3 總黃酮含量測定(Jia method)

配製芸香素(rutin)為標準品，先取 8.8 mg 溶於 25 ml MeOH 中，分別取 0.5 ml、1.0 ml、1.5 ml、2.0 ml、2.5 ml、3.0 ml、3.5 ml 到 15 ml 離心管中，再補 30% 乙醇到 10 ml；另配置 DCE 以二次水稀釋成 100 倍，取 0.1 ml，加入甲醇 0.9 ml，同樣補 30% 乙醇到 10 ml。之後每管都各加入 0.3 ml 1 M 的 NaNO_3 混勻後靜置 6 分鐘，再加入 0.3 ml 1% 的 AlNO_3 ，混勻之後靜置 6 分鐘，加入 4 ml 4%NaOH，混勻後靜置 15 分鐘，取 1 ml，測其在波長 510 nm 下吸光值為多少，並以乙醇歸零。最後並畫標準曲線，帶入 DCE 反應之吸光值，並進一步算出總黃酮含量。

4.1.4 總花青素含量測定(Fuleki and Francis method)

將 DCE 以二次水稀釋成 100 倍，分別取 5 ml 至兩管離心管中，以酸鹼 Buffer 調 pH 值，使一管 pH 為 1.0，另一管為 pH 4.5，用分光光度計測其在 520 nm 下吸光值為多少，並以二次水歸零(blank)，再經由以下公式計算其總花青素含量。

$$\frac{|A1-A2| \times F \times MW}{\epsilon}$$

MW：花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

F：稀釋倍數

ϵ ：花青素之莫耳吸光係數 (Molecular extinction coefficient) 以 delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1% 鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ϵ 值

301.6 計算。

4.2 細胞培養(Cell culture)

4.2.1 細胞株

選用人類乳癌細胞株 MCF-7 (ATCC number: HTB-22)進行探討(附表 2)，細胞來源為財團法人食品工業發展研究所菌種中心／國家衛生研究院細胞庫(BCRC)。

附表 2：MCF-7 乳癌細胞株簡介

Name	MCF-7
Type	Human breast adenocarcinoma
Receptor expressed	ER+, PR+, HER2-
Species	Homo sapiens (human)
Strain ethnicity	Caucasian 69 years female

4.2.2 細胞培養條件

將乳癌細胞株 MCF-7 加入含有 2 mM L-glutamine、1% streptomycin、1% penicillin、0.1 mM non-essential amino acid 以及 10% fetal bovine serum (FBS)的 MEM 培養液來培養。MCF-7 為貼附型生長的細胞株，會將其培養在 75 cm² (T) 的 flask 中，放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長，每兩天更換一次培養基。

4.2.3 細胞飢餓處理

將長滿貼附於 75 cm² 的 flask 中 MCF-7 細胞，吸除培養基，用磷酸緩衝溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗細胞後，加入 1 ml 胰蛋

白酶(trypsin)，將 75 T flask 放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中反應 5 分鐘，使細胞懸浮飄起，加入 2 ml 培養基回溶以中止反應，將整個吸起置於 15ml 離心管，拿去離心 1200 rpm 約五分鐘，將上清液倒掉，用 10 ml 培養基回溶，並取 10 µl 加入 10 µl trypan blue 染色，進行細胞計數後，將細胞種植於 6 well 的培養皿中，並放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中等待細胞生長貼附後，吸除培養基並用 PBS 洗一次，每一 well 加入 3 ml starvation medium (原培養液中不含 10% FBS)，最後放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。

4.2.4 細胞加藥處理

將長滿貼附於 75 cm² 的 flask 中 MCF-7 細胞，吸除培養基，用磷酸緩衝溶液 PBS 清洗細胞後，加入 1 ml trypsin，將 75 T flask 放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中反應 5 分鐘，使細胞懸浮飄起，加入 2 ml 培養基回溶以中止反應，將整個吸起置於 15ml 離心管，拿去離心 1200 rpm 約五分鐘，將上清液倒掉，用 10 ml 培養基回溶，並取 10 µl 加入 10 µl trypan blue 染色，進行細胞計數後，將細胞種植於 6 well 的培養皿中，並放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中等待細胞生長貼附後，吸除培養基並用 PBS 洗一次，每一 well 加入 3 ml starvation medium (原培養液中不含 10% FBS)，最後放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。24 小時後，吸除 starvation medium，

並以 PBS 清洗細胞，再將每一 well 換上新的 3 ml 培養基，並加入不同劑量的 DCE 做處理，分別為 0、10、50、100、250、500 $\mu\text{g/ml}$ ，放置於含 5% CO_2 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。

4.3 流式細胞儀分析(Flow cytometric analysis)

4.3.1 細胞存活率分析(Cell viability assay)

將長滿貼附於 75 T flask 的 MCF-7 細胞，經細胞計數，每 well 種 10^5 個細胞，再經過 24 小時細胞飢餓以及細胞以 DCE 處理 24 小時後，吸除培養液，用 PBS 清洗細胞後，再加入 500 μl trypsin，放入恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞懸浮飄起，加入 500 μl PBS 把細胞收起至 1.5 ml 離心管並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清液，再加入 1 ml PBS 洗一次並離心 1200 rpm 離五分鐘，最後用 400 μl PBS 回溶，並加入 8 μl 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染劑(50 ml PBS 中含有 1 mg 的 PI)，避光染色 5 分鐘，再以流式細胞儀分析其細胞存活力。

4.3.2 細胞週期分析(Cell cycle analysis)

將長滿貼附於 75 T flask 的 MCF-7 細胞，經細胞計數，每 well 種 1.5×10^5 個細胞，再經過 24 小時細胞飢餓以及細胞以 DCE 處理 24 小時後，將培養液收置 15 ml 離心管，用 PBS 清洗細胞再加入 500 μl trypsin，放入恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞懸浮飄起，加入 500 μl PBS 把細胞收起置 15 ml 離心管中並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清

液，再加入 1 ml PBS 洗一次並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清液，用 70% 冰酒精 1 ml 固定 overnight，固定完成後，將細胞液以 1200 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，加入 1 ml 的 PBS 清洗細胞後離心，去除上清液，最後再加入 1 ml 的 PI/Triton X-100 (終濃度 PI=20 $\mu\text{g/ml}$, Triton-X 100=0.1%, RNase =0.2 mg/ml)，並將細胞均勻混合，避光染色 30 分鐘後，再以流式細胞儀分析其細胞週期的變化。

4.3.3 細胞凋亡分析(Annexin V -FIFC apoptosis assay)

將長滿貼附於 75 T flask 的 MCF-7 細胞，經細胞計數，每 well 種 8×10^4 個細胞，再經過 24 小時細胞飢餓以及細胞以 DCE 處理 24 小時後，將培養液收置 15 ml 離心管，用 PBS 清洗細胞再加入 500 μl trypsin，放入恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞懸浮飄起，加入 500 μl 培養液把細胞收起並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清液，再加入 1ml 培養液洗一次並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清液。接著在每一離心管中以 200 μl 培養液回溶細胞，並吸取出 100 μl 至 1.5 ml 離心管，再加入 100 μl annexin V -FIFC 染劑(Muse Annexin V Dead Cell Kit)，混合均勻後，室溫避光 20 分鐘，即可以流式細胞儀分析其細胞凋亡。

4.4 西方墨點法(Western blotting)

4.4.1 萃取蛋白

將長滿貼附於 75 T 的 flask 中 MCF-7 細胞，吸除培養基，用 PBS

清洗細胞後，加入 1 ml trypsin，將 75 T flask 放置於含 5% CO₂ 的 37 °C 無菌恆溫培養箱中反應 5 分鐘，使細胞懸浮飄起，加入 2 ml 培養基回溶以中止反應，將整個吸起置於 15 ml 離心管，進行離心 1200 rpm 約五分鐘，將上清液倒掉，用 10 ml 培養基回溶，並取 10 µl 加入 10 µl trypan blue 染色，進行細胞計數後，將細胞種植於直徑 10 公分的培養皿中，並放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中等待細胞生長貼附後，去除培養基並用 PBS 洗一次，加入 starvation medium，放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長，24 小時後去除 starvation medium，以 PBS 清洗細胞，每個 10 cm dish 皆換上新的培養基，並加入不同劑量的 DCE 進行處理，分別為 0、10、50、100、250、500 µg/ml，放置於含 5% CO₂ 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長，24 小時後以 15 ml 離心管收取上清液，用 PBS 清洗細胞再加入 trypsin，放入恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞懸浮飄起，加入 PBS 把細胞收入含上清液的離心管中並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清液，再加入 1 ml PBS 清洗細胞並離心 1200 rpm 離五分鐘，倒掉上清液，重複以上動作數次，加入 300 µl 的 RIPA buffer (RIPA buffer 含 150 mM NaCl、0.5% deoxycholic acid、1% NP-40、0.1% SDS、50 mM Trisbase，pH 7.5)，再加入 10 µl 蛋白酶抑制劑(1 mM sodium orthovanadate、100 µg PMSF、170 µg/ml leupeptin)，放到 vortex 上搖至少 2 小時以破壞細胞，

於 4°C、12000 rpm 下離心 10 分鐘，離心後保留上清液的部分，並加入 10 µl 蛋白酶抑制劑，置於- 20°C 冰箱存放，如要長時間保存，則需儲存於- 80°C 冰箱。

4.4.2 蛋白質之定量

藉由商業套組 Pierce™ BCA protein assay kit 進行實驗(內有試劑 A 與試劑 B，分別以 50:1 的比例配置)與蛋白在 37°C 下避光反應 30 分鐘，蛋白質在鹼性下會將二價銅離子(Cu^{2+})還原成一價銅離子(Cu^+)， Cu^+ 會與 BCA (bicinchoninic acid) 試劑結合形成藍色複合物後，以 562 nm 測其 OD 值，並換算出蛋白濃度。

4.4.3 蛋白樣品(Sample)之配置

取 8~10 µl 已經定量完的蛋白，以二次去離子水將蛋白補至相同體積(10 µl)，再加入 2.5 µl 5x loading dye (附表 3)均勻混合，於 100°C 乾浴槽加熱 10 分鐘使蛋白質變性後，為了避免蛋白質覆性，所以必須馬上置於冰上冷卻，然後離心備用。

附表 3：5x loading dye 配方(10 ml)

Tris-Base (pH = 6.8)	4 ml
SDS	1 g
DTT	0.77 g
Bromophenol blue	0.5 ml
Glycerol	5 ml

4.4.4 鑄膠(Denatured-PAGE)

將厚、薄玻璃片用拭淨紙擦乾淨後，放置於架膠台上，先在玻璃夾片中加入已配置好的 separating gel (附表 4)，並加入 30% 酒精將下膠緊密壓平，待凝固後將酒精去除，接著加入已配置好的 stacking gel (附表 5)，在玻璃夾層中插入 15 well 齒梳，等待膠完全凝固即可拔掉齒梳。

附表 4：separating gel 配方

10% separating gel (15 mL，兩片量)	
ddH ₂ O	5.9 mL
30% Acrylamide mix	5.0 mL
1.5M Tris-base (pH 8.8)	3.8 mL
10 % SDS	0.15 mL
10 % APS	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

附表 5：stacking gel 配方

3% stacking gel (4 mL，兩片量)	
ddH ₂ O	2.7 mL
30% Acrylamide mix	0.67 mL
1.5M Tris-base (pH 6.8)	0.5 mL
10 % SDS	0.04 mL
10 % APS	0.04 mL
TEMED	0.004 mL

4.4.5 電泳法(Electrophoresis)

將經過處理的 sample 加入至已配置完成的聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行 60 福特的電泳約三小時，使蛋白依分子量不同而分離。

4.4.6 轉漬法(Transfer)

接著以 100 V、75 分鐘使蛋白從凝膠上轉印(transfer)到硝化纖維膜(nitrocellulose membrane, NC membrane)。

4.4.7 免疫默點法(Immunoblot)

將已 transfer 完成的 NC membrane 以麗春紅(ponceau's solution)進行紅染，並裁剪出要觀察蛋白分子量的部分，再以 TBS 將紅染清洗乾淨，接著進行 blocking，將 NC membrane 浸泡在 5%的脫脂牛奶中放到 shaker 上搖一個小時、4°C，再以 TBS + 0.1% tween-20 buffur 清洗三次，每次十分鐘以洗去非專一性鍵結。加入一級抗體於 4°C 下反應 overnight 後，以 TBS + 0.1% tween-20 buffur 清洗三次，每次十分鐘，接著再加入所對應的二級抗體於 4°C 下反應一個小時，最後再以 TBS + 0.1% tween-20 buffur 清洗三次，每次十分鐘以洗去非特异性鍵結。最後將 ECL (以 1 : 1 等比例將 HRP substrate peroxide solution 與 HRP substrate luminol solution 均勻混合)加至處理好的 NC membrane 上並以冷光影像分析系統(GE ImageQuant™ LAS4000 mini)進行拍攝並分析蛋白質表現量。

4.5 裸鼠移植性腫瘤試驗(Xenograft tumor studies)

4.5.1 動物分組與處理

以 Balb/c 裸鼠進行實驗，共 20 隻。隨機分組，分為 3 組。分組

處理方式如下：(i)單獨移植腫瘤對照組、(ii)劑量試驗組 1% DCE、(iii) 4 mg/kg tamoxifen (臨床乳癌治療藥物對照組)。每 3~4 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。用生理食鹽水稀釋細胞數成 10^7 cell/0.1 ml，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 1% DCE 餵食，並連續觀察 4 週，每週觀察紀錄腫瘤生成之大小，停止給予萃取物之次日(或停止給予受試物後 1-5 天)動物行安樂死，先稱體重後解剖下皮腫瘤塊，稱重並量其腫瘤大小紀錄之。

4.5.2 體重及飲食

體重及飲食量的變化是最直接可觀察到實驗動物的生長情形及生理狀態，故每隔三天記錄老鼠體重及飲食量的變化，以統計分析之。

4.5.3 組織血紅素(Hemoglobin, Hb)濃度分析

Hb 濃度的測量依照 ICSH (International Committee for Standardization in Hematology)的標準方法。Hb 與 Drabkin's reagent 反應生成 cyanomethemoglobin，而 cyanomethemoglobin 在以 UV 540 nm 處有吸收。以購自 Sigma 的血紅素標準品稀釋成不同濃度後，分別與 Drabkin's reagent 反應，然後以 540 nm 測得相對應的吸收值，將此量得之吸光值對濃度做一條標準曲線。裸鼠犧牲後，將腫瘤組織放

入 PBS 中取其溶液後，與 Drabkin's reagent 反應後，所測得的吸收值與此標準曲線比對即可得濃度值。

4.6 統計分析

以 Sigma Plot 10.0 軟體統計分析，再利用 t-test 來評估統計差異。

$P < 0.05$ 即表示具有顯著意義，以 * 表示；當 $P < 0.01$ 則以 ** 表示。

第五章、結果與討論

5.1 抹草萃取物成分分析

從附圖 Table 1 結果可得知，以定量分析測得在抹草萃取物 (Desmodium caudatum extract, DCE) 成份分析中總多酚 (total polyphenol) 的含量約有 $11.2 \pm 4.3\%$ ；而總黃酮 (total flavonoid) 約有 $5.3 \pm 0.4\%$ ，目前也持續進行高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析。

5.2 探討抹草萃取物於不同濃度以及時間作用對人類乳癌細胞存活之影響

從 Fig. 1 可得知人類乳癌 MCF-7 細胞於不同劑量與作用時間的 DCE 中的存活率。首先，Fig. 1A 實驗利用 DCE 濃度分別為 0、10、50、100、250、500 $\mu\text{g/ml}$ 處理 24 小時後，利用顯微鏡進行觀察細胞型態，以及細胞存活分析 (cell viability assay) 結果可發現到相對於 control (0 $\mu\text{g/ml}$) 之組別而言，除了低劑量 (10 和 50 $\mu\text{g/ml}$) 組別中較無明顯的抑制作用，DCE 在其他劑量 (100~500 $\mu\text{g/ml}$) 對於 MCF-7 細胞之生長皆有明顯的抑制作用。而 Fig. 1B 是利用 DCE 濃度分別為 0、100、250、500 $\mu\text{g/ml}$ 分別處理 0、24 和 48 小時後，分析細胞生長曲線 (growth curve)，結果發現各別與同樣時間 control 相比，DCE 劑量 250 和 500 $\mu\text{g/ml}$ 對於 MCF-7 細胞之生長具有明顯的抑制作用；與在

不同時間點作觀察，結果顯示不論劑量 250 或 500 $\mu\text{g/ml}$ 在 24 以及 48 小時的細胞生長曲線則持平不再生長。

5.3 探討抹茶萃取物於不同濃度以及時間作用對人類乳癌細胞生長週期之影響

從 Fig. 2 可得知 MCF-7 細胞經由不同劑量的 DCE 處理 24 小時後，經流式細胞儀(flow cytometric analysis)所得各個細胞週期(cell cycle)分布情形(Fig. 2A)。Fig. 2B 量化結果可發現到細胞於 G_0/G_1 時期之數量相對於 control 之組別而言顯著上升，於 DCE 高劑量 250 $\mu\text{g/ml}$ 以及 500 $\mu\text{g/ml}$ 則有明顯的 G_0/G_1 停滯(arrest)的表現。另一方面，在 Fig. 3A 中以流式細胞儀分析在不同濃度且於不同時間點處理下，結果發現隨 DCE 濃度提升則細胞處於生長週期 G_0/G_1 期之細胞數量隨之明顯增加；另外，分析 DCE 高劑量 500 $\mu\text{g/ml}$ 於反應 24 或 48 小時後，量化確認皆有明顯的 G_0/G_1 停滯的情形(Fig. 2B)，此結果推論 DCE 可誘發濃度和時間依賴性細胞週期於 G_0/G_1 期停滯作用。

5.4 探討抹茶萃取物對於人類乳癌細胞生長週期分子機制之影響

進一步，利用西方墨點法(Western blotting)分析細胞週期相關蛋白之表現是否受到 DCE 所調控。從 Fig. 4 結果可觀察到 DCE 組別中細胞週期關鍵蛋白 E2F 表現量和 p-Rb/Rb 比值皆下降，可以推斷此腫瘤抑制蛋白 Rb 被去活化(p-Rb)的比率下降，表示大部分的 Rb 還是與

E2F 形成複合體，使游離的 E2F 處於低表現狀態，無法促進細胞週期進行；我們進一步探討細胞週期中週期素(cyclin)、細胞週期蛋白依賴性激酶(cyclin dependent kinase, cdk)、以及細胞週期蛋白依賴性激酶抑制者(inhibitor of cdk, cki)三者之調控情形。首先，Fig. 5 中分析 cki 及其上游調控蛋白，包含 p-p53/p53、p27 和 p21 隨著 DCE 濃度而有表現增加之趨勢；然對於 p16 蛋白表現並無顯著差異，可知主要路徑並非透過抑制 G0/G1 的前期；從 Fig. 6 中 cyclinD1 以及 cyclinE 蛋白表現皆明顯受到 DCE 處理而下降，而 cyclinA (S、G2 期調控蛋白)則並不具明顯統計意義，更加明確表示 DCE 所造成 MCF-7 細胞週期 G0/G1 後期停滯表現；由 Fig. 7 結果也明顯看出在 DCE 組別中 cdk2 以及 cdk4 蛋白表現量下降。總結上述，再次證實 DCE 可透過調節 p21 和 p27，進而抑制 cyclinD1、cyclinE、cdk2 和 cdk4 等，促使細胞週期 G0/G1 後期停滯。

5.5 探討抹茶萃取物對於人類乳癌細胞凋亡之影響

由上述實驗結果已知 DCE 可能藉由 G0/G1 後期停滯達到抑制乳癌細胞之生長，因此後續實驗欲探討 DCE 是否會誘發細胞凋亡(apoptosis)表現。由 Fig. 8 中可知將 MCF-7 細胞經 DCE 處理 24 小時後，藉由流式細胞儀以 annexin V - FIFC apoptosis assay 分析細胞凋亡 (Fig. 8A)，發現隨著 DCE 濃度上升 0、10、50、100、250、500 $\mu\text{g/ml}$

處理 24 小時下，MCF-7 細胞中呈現進入早期和晚期細胞凋亡階段皆有明顯增加情形(Fig. 8A)，經統計分析確實細胞凋亡的表現比率明顯增加具有統計意義(Fig. 8B)。

5.6 探討抹茶萃取物對於乳癌細胞異種移植誘導之裸鼠腫瘤生長之影響

為延續細胞實驗結果所證實 DCE 能夠有效抑制乳癌細胞生長及調控細胞週期，因此接續將透過動物實驗來驗證。Balb/c 裸鼠入室適應三天後，經皮下注射 MCF-7 細胞，待腫瘤體積生長一週，將裸鼠隨機分為三組(3~4 隻/組)：(i)腫瘤控制組(MCF-7 alone)、(ii) 1% DCE、(iii) 臨床乳癌治療藥物對照組 4 mg/kg tamoxifen (Tam)，裸鼠經餵食四週後，將其犧牲後取腫瘤(Fig. 9A)，並進行後續分析。從 Fig. 9B 可以觀察到裸鼠經 DCE 餵食 12 天後，腫瘤體積明顯已經小於腫瘤控制組以及臨床藥物對照組，續餵食至 30 天後可發現到 Tam 組別之腫瘤生長變動很大，但持續餵食 DCE 的裸鼠組別，腫瘤生長幅度呈現明顯平穩被抑制的狀態。動物犧牲後將腫瘤組織放入 PBS 中取其溶液，再與 Drabkin's reagent 反應後所測得的吸收值與此標準曲線比對，即可得組織血紅素(hemoglobin)濃度值(Fig. 9C)，結果明顯觀察到在 1% DCE 試驗組中組織血紅素明顯降低，可以推論 DCE 除了抑制乳癌細胞增生，也可能具有阻斷腫瘤血管新生(angiogenesis)的表現。

5.7 總結與未來研究

未來研究項目：

1. 本次研究結果發現DCE會增加p53磷酸化表現，以及活化下游cki；且抑制E2F的表現和Rb磷酸化，可能導致兩者的結合增加，促使細胞週期停滯，所以後續將進行免疫沉澱法(Immunoprecipitation, IP)分析蛋白質間交互作用，以確認細胞週期蛋白複合物E2F - Rb、cyclin - cdk之結合關係。
2. 由西方墨點法分析細胞凋亡相關分子機制：經DCE處理24小時後的MCF-7細胞內細胞凋亡相關蛋白的表現變化，例如：Bcl-2、Bax、Bad、Bid、caspases等分子。
3. 另一方面，將藉由AVO染色進行細胞自噬(autophagy)分析：當MCF-7細胞經DCE處理24小時後，分析細胞是否發生細胞自噬的現象，並釐清此細胞自噬與細胞凋亡或存活的關係性。
4. 後續在裸鼠移植性腫瘤生長試驗，將進行肝、肺、腫瘤的免疫組織化學染色分析：雖已證實原位癌腫瘤被DCE所抑制，持續於探討DCE是否也可抑制腫瘤之侵襲或轉移，並與臨床藥物進行比較，提出DCE具有作為癌症化學預防試劑之潛力。

乳癌一直以來都是女性癌症好發率之冠，乳癌種類複雜性非常高，但經統計國人大部分都是屬於乳腺管癌，也是本研究所使用的實驗材

料。抹草於國內坊間隨處可見，中醫將其用於清熱解火，但現今並未使用於西方醫療中，因此抹草為具備癌症化學預防發展潛力者。此次研究計畫初步證實 DCE 具有抑制乳癌細胞生長以及調控細胞週期進行之作用，同時也誘發細胞凋亡表現，在動物實驗中 DCE 也明顯抑制乳癌腫瘤的生長以及血管新生(Fig. 10)。總結，此結果提出 DCE 具有誘導人類乳癌 MCF-7 細胞週期停滯及細胞凋亡之體內外作用，所以未來可應用抹草作為一個有潛力展為治療乳癌的化學預防試劑或輔助用藥。

第六章、參考文獻

- [1] Liu SM, Ou SY, Huang HH. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017 Feb.;18(2):89-98.
- [2] Ma KJ, Zhu ZZ, Yu CH, Zhang H, Liu J, Qin LP. Analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activities of the ethanol extract from *Desmodium caudatum*. *Pharm Biol*. 2011 Apr;49(4):403-7.
- [3] Mun SH, Joung DK, Kim SB, Park SJ, Seo YS, Gong R, Choi JG, Shin DW, Rho JR, Kang OH, Kwon DY. The mechanism of antimicrobial activity of sophoraflavanone B against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog Dis*. 2014 Mar;11(3):234-9.
- [4] Li W, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Kim S, Chae D, Hyun JW, Kang HK, Koh YS, Kim YH. Anti-inflammatory and antioxidant activities of phenolic compounds from *Desmodium caudatum* leaves and stems. *Arch Pharm Res*. 2014 Jun;37(6):721-7.
- [5] Hamy AS, Abuellellah H, Hocini H, Coussy F, Gorins A, Serfaty D, Tournant B, Perret F, Bonfils S, Giacchetti S, Cuvier C, Espie M. Contraception after breast cancer: a retrospective review of the practice among French gynecologists in the 2000's. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2014;35(2):149-53.
- [6] Cho WK, Choi DH, Lee J, Park W, Kim YB, Suh CO, Shin KH, Jeon SH, Kim K, Park KR, Kim JH, Ahn SJ, Yoon WS, Yang DS, Kim J, Lee JH, Yea JW. Comparison of failure patterns between tubular breast carcinoma and invasive ductal carcinoma (KROG 14-25). *Breast*. 2018 Jan 30;38:165-170.
- [7] Anna Lewinska, Jagoda Adamczyk - Grochala, Ewa Kwasniewicz, Anna Deregowska, Maciej Wnuk. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. *Apoptosis*. 17 February 2017.
- [8] Szmyd M, Lloyd V, Hallman K, Aleck K, Mladenovik V, McKee C, Morse M, Bedgood T, Dinda S. The effects of black cohosh on the regulation of estrogen receptor (ER α) and progesterone receptor (PR) in breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2018 Jan 18;10:1-11.
- [9] You Y, Xu Z, Chen Y. Doxorubicin conjugated with a trastuzumab epitope and an MMP-2 sensitive peptide linker for the treatment of HER2-positive breast cancer. *Drug Deliv*. 2018 Nov;25(1):448-460.

- [10] Sablin MP, Ricci F, Loirat D, Jobard A, Basse C, Romano E, Le Tourneau C, Dieras V. Cell cycle inhibitors in endocrine receptor positive breast cancer. *Bull Cancer*. 2017 Jan 23. pii: S0007-4551(16)30378-2.
- [11] Fu, X. J., Li, H. X., Yang, K., Chen, D., & Tang, H. (2016). The important tumor suppressor role of PER1 in regulating the cyclin-CDK-CKI network in SCC15 human oral squamous cell carcinoma cells. *Onco Targets Ther*, 9, 2237-2245.
- [12] Witkiewicz, A. K., Chung, S., Brough, R., Vail, P., Franco, J., Lord, C. J., & Knudsen, E. S. (2018). Targeting the Vulnerability of RB Tumor Suppressor Loss in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep*, 22(5), 1185-1199.
- [13] Liao, Y., & Du, W. (2018). An Rb family-independent E2F3 transcription factor variant impairs STAT5 signaling and mammary gland remodeling during pregnancy in mice. *J Biol Chem*.
- [14] Green, Douglas. *Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011
- [15] Xie ZZ, Li MM, Deng PF, Wang S, Wang L, Lu XP, Hu LB, Chen Z, Jie HY, Wang YF, Liu XX, Liu Z. Paris saponin-induced autophagy promotes breast cancer cell apoptosis via the Akt/mTOR signaling pathway. *Chem Biol Interact*. 2017 Feb 25;264:1-9.
- [16] Aztopal, N., Erkisa, M., Erturk, E., Ulukaya, E., Tokullugil, A. H., & Ari, F. (2018). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chem Biol Interact*, 280, 51-58.
- [17] Zhao, W., Zhang, X., Zhou, Z., Sun, B., Gu, W., Liu, J., & Zhang, H. (2018). Liraglutide inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells through downregulation of microRNA-27a expression. *Mol Med Rep*.

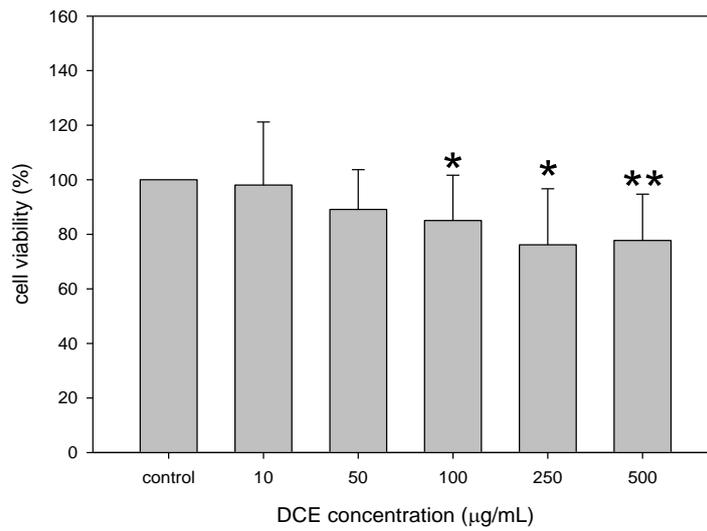
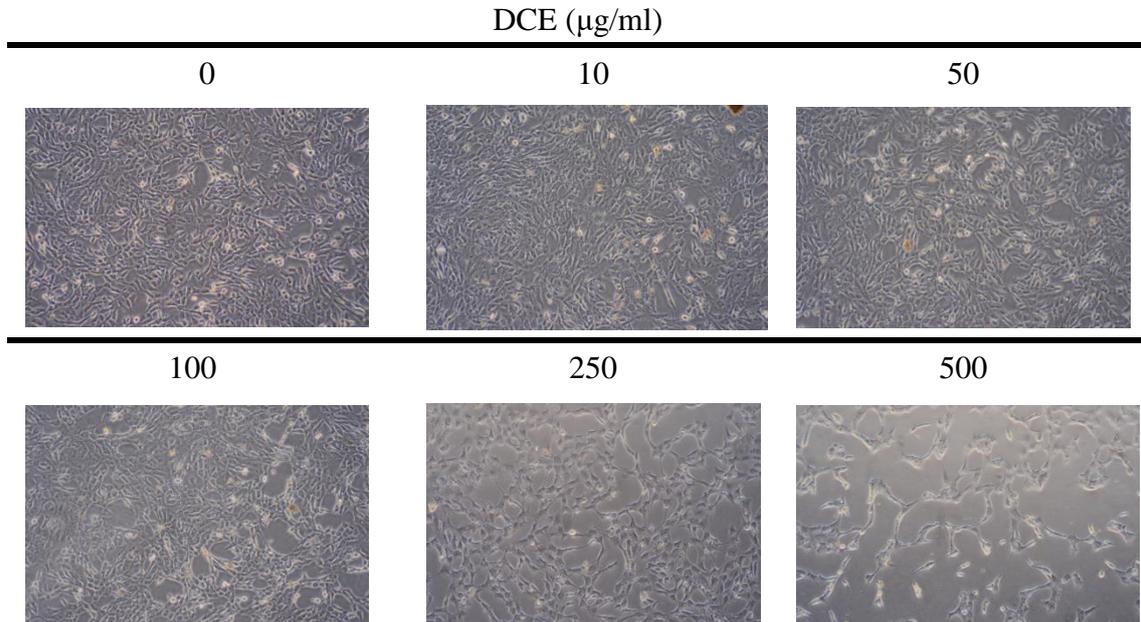
第七章、圖表

Table 1 – Composition of the *Desmodium caudatum* extract (DCE)

Composition	DCE
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	11.2 ± 4.3%
Total flavonoid (Jia method)	5.3 ± 0.4%

Fig. 1

(A)



(B)

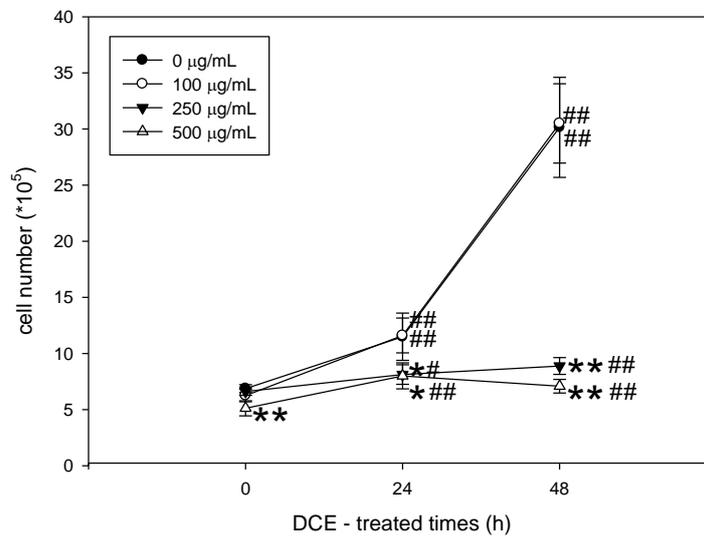
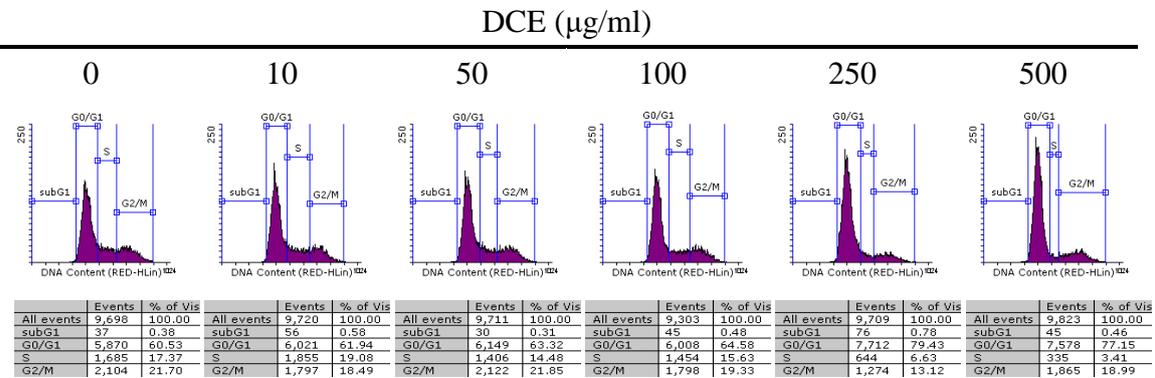


Fig. 1. Effect of DCE on cell viability and growth curve of MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 10, 50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 24 h. Microscopy picture showed the morphology of MCF-7 cells treated with or without the various concentrations of DCE. Cell viability was measured by flow cytometric analysis. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the receptive control. (B) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 0, 24 and 48 h. Cell growth curve was analyzed by flow cytometric analysis. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$) from three independent experiments.. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the receptive control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with 0-h of the receptive groups.

Fig. 2

(A)



(B)

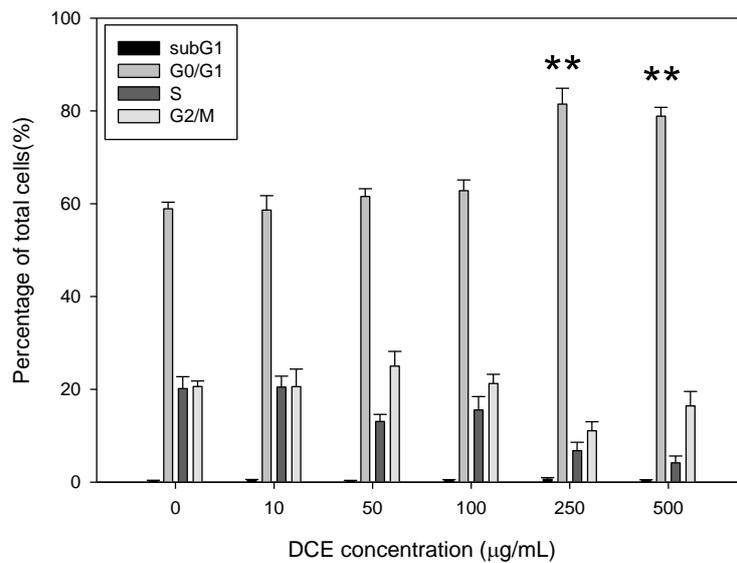


Fig. 2. Dose-dependent effect of DCE on cell cycle progression of MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 10, 50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 24 h. The DNA contents of both cells were measured by flow cytometry. The position of the subG1, G0/G1, S and G2/M peaks were indicated. (B) Quantitative assessment of cell number percentage presents as mean \pm SD ($n = 3$) of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

(B)

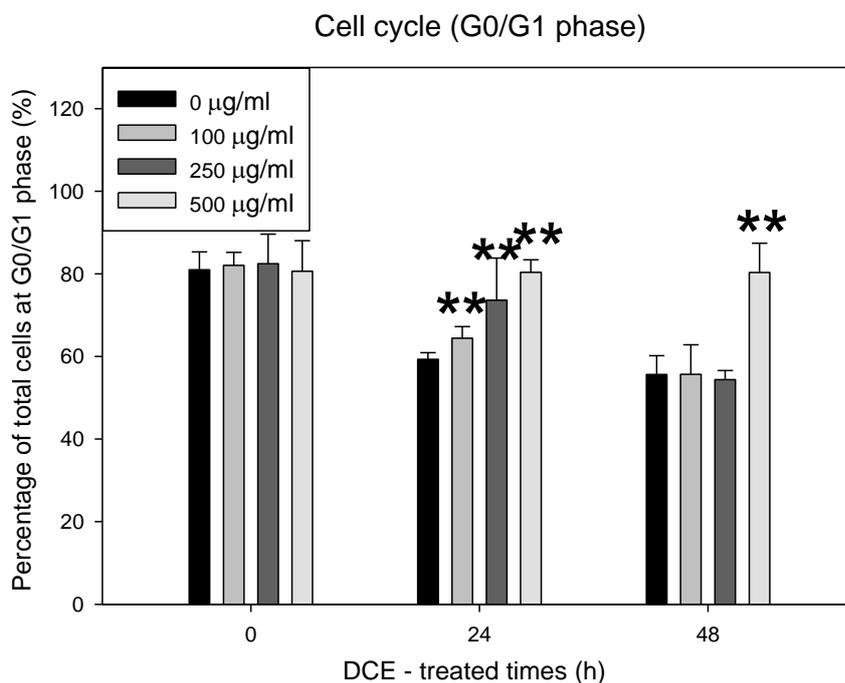
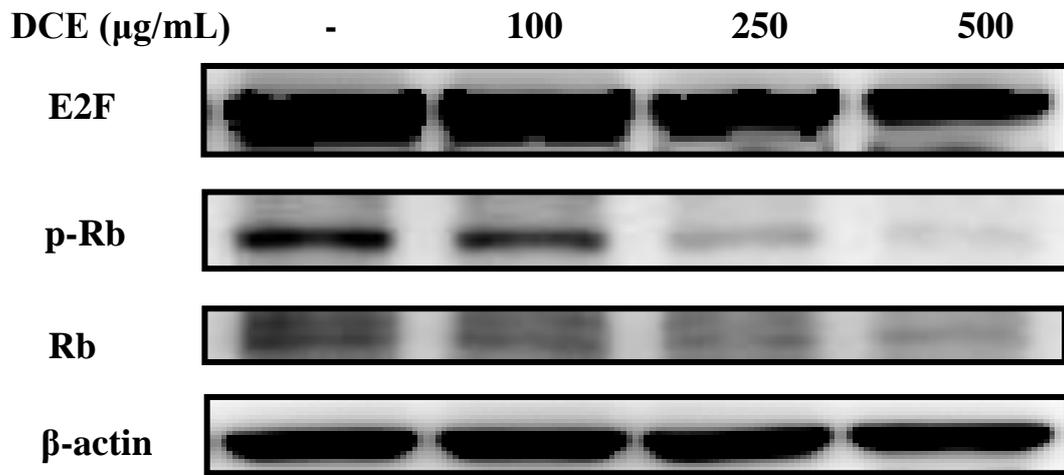


Fig. 3. Time course effect of DCE on cell cycle distribution of MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 100, 250 and 500 µg/ml of DCE for 24 and 48 h. The DNA contents of both cells were measured by flow cytometry. The position of the subG1, G0/G1, S and G2/M peaks were indicated. (B) Quantitative assessment of cell number percentage presents in the G0/G1 phase was indicated by PI, and represents as mean \pm SD (n = 3) of three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 4

(A)



(B)

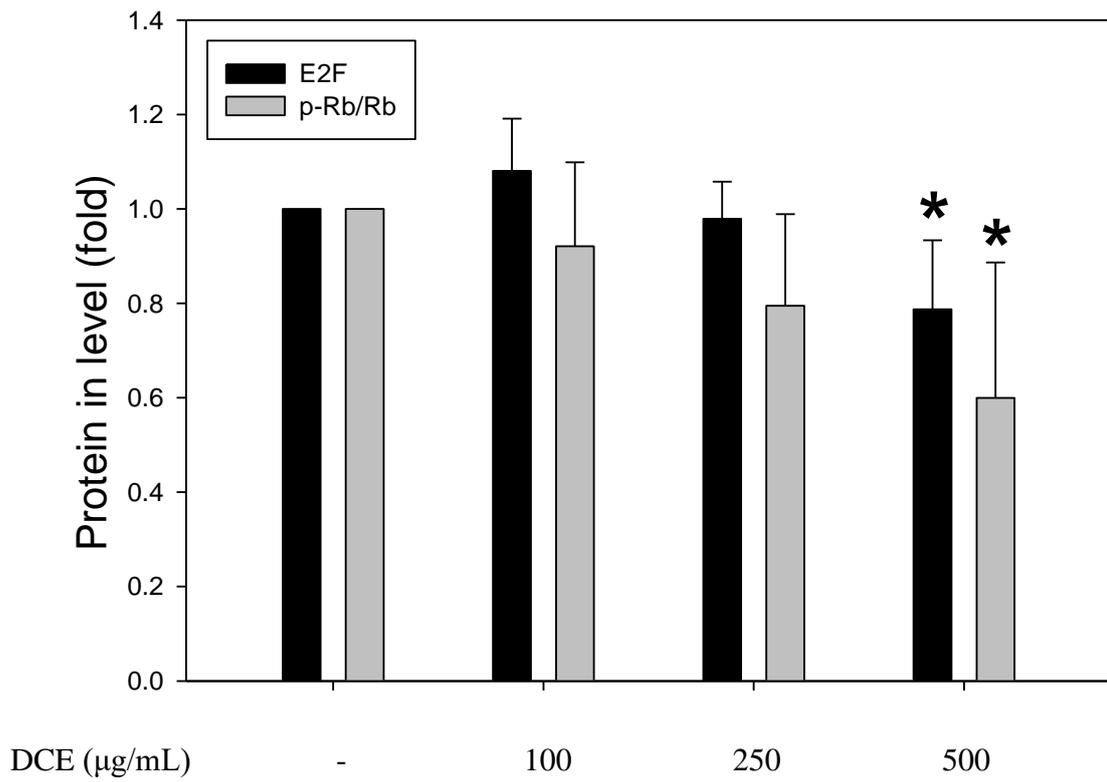
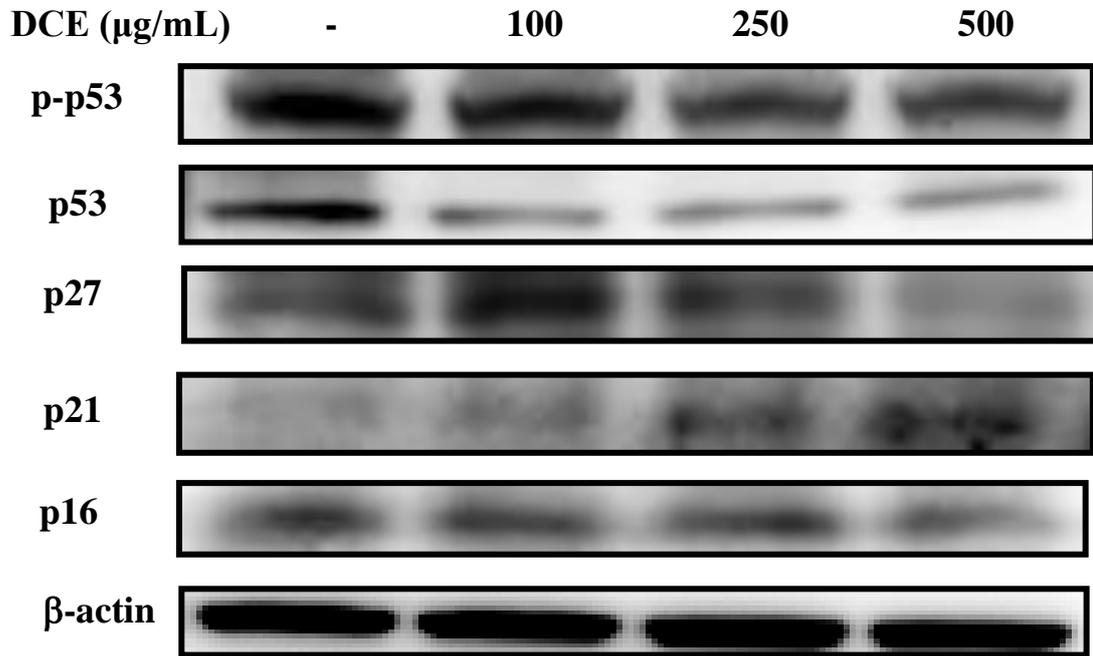


Fig. 4. Effects of DCE on the expressions of E2F and p-Rb in MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 24 h. Western blot analysis of E2F, p-Rb, and Rb protein expressions was carried out with the cell extracts from them. The protein levels above the figures represent relative density of the bands normalized to β -actin. (B) The quantitative data are presented as mean \pm SD (n = 3) from three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 5

(A)



(B)

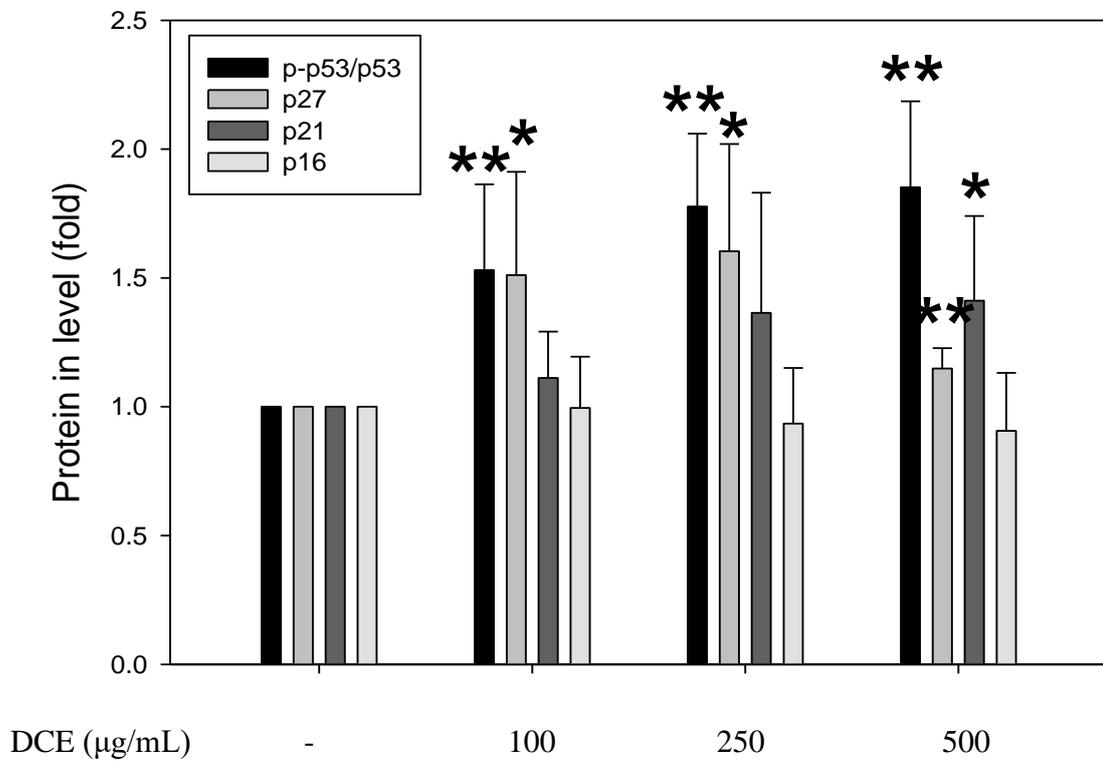
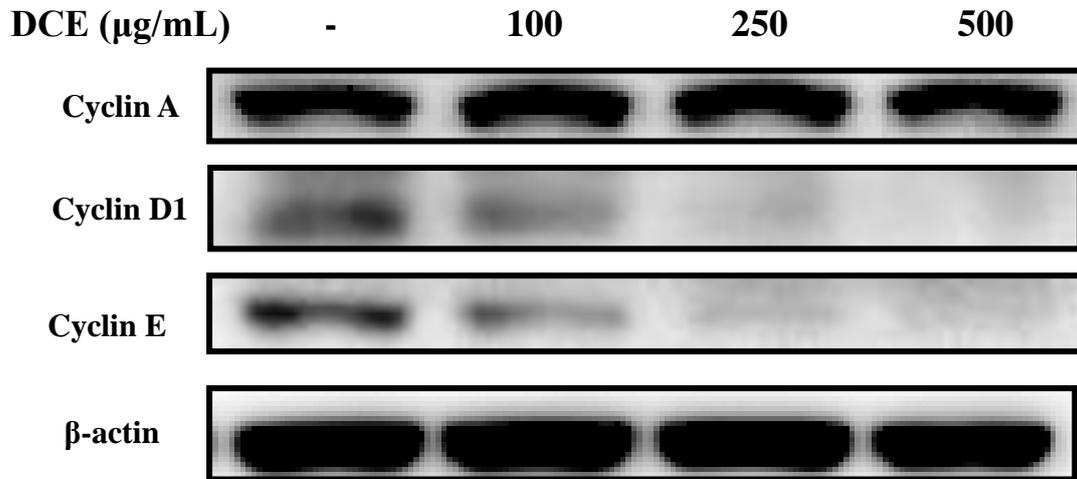


Fig. 5. Effects of DCE on the expressions of cki in MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 24 h. Western blot analysis of p-p53, p53, p27, p21 and p16 protein expressions was carried out with the cell extracts from them. The protein levels above the figures represent relative density of the bands normalized to β -actin. (B) The quantitative data are presented as mean \pm SD (n = 3) from three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 6

(A)



(B)

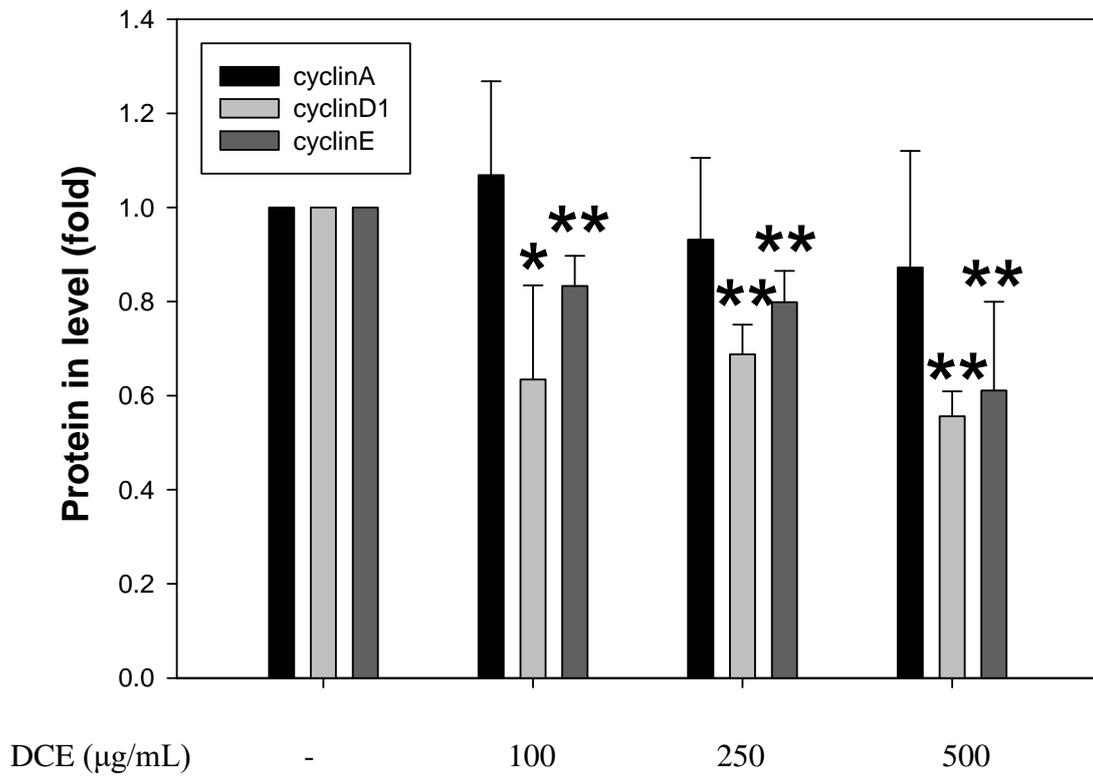
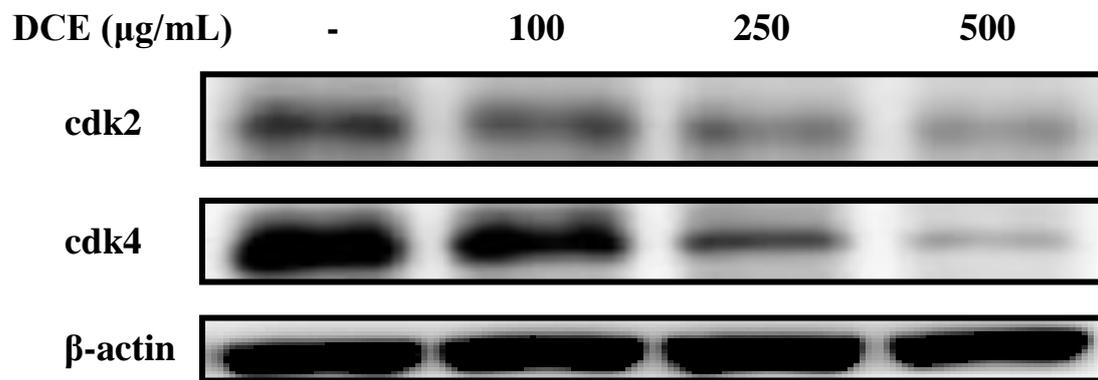


Fig. 6. Effects of DCE on the expressions of cyclins in MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 24 h. Western blot analysis of cyclinA, cyclinD1 and cyclinE protein expressions was carried out with the cell extracts from them. The protein levels above the figures represent relative density of the bands normalized to β -actin. (B) The quantitative data are presented as mean \pm SD (n = 3) from three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 7

(A)



(B)

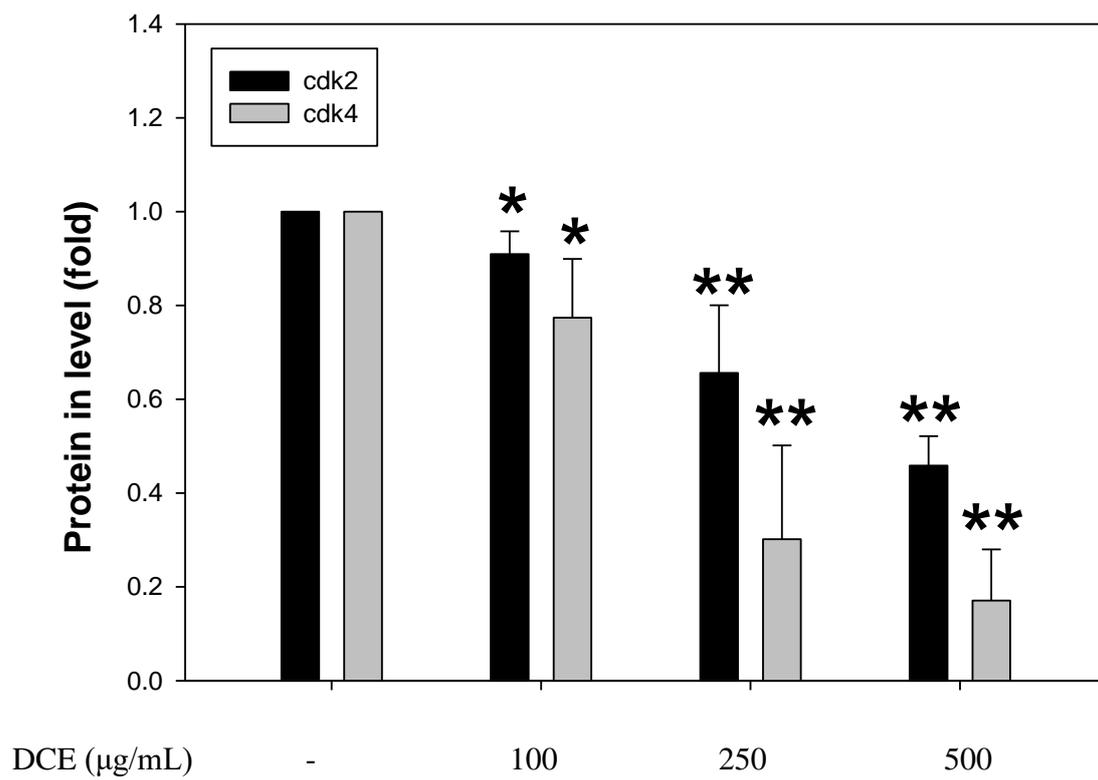
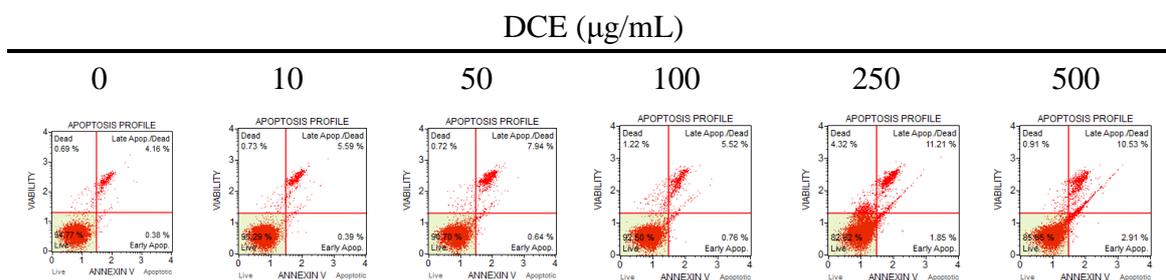


Fig. 7. Effects of DCE on the expressions of cdks in MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of DCE for 24 h. Western blot analysis of cdk2 and cdk4 protein expressions was carried out with the cell extracts from them. The protein levels above the figures represent relative density of the bands normalized to β -actin. (B) The quantitative data are presented as mean \pm SD (n = 3) from three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 8

(A)



(B)

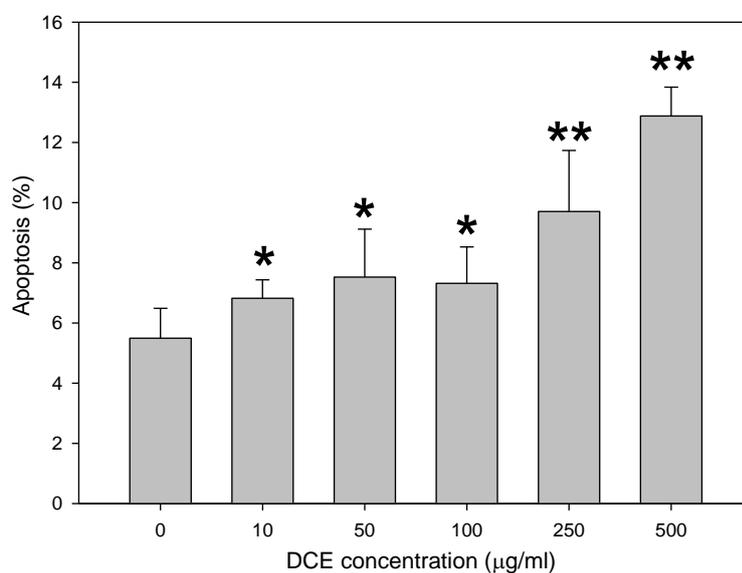
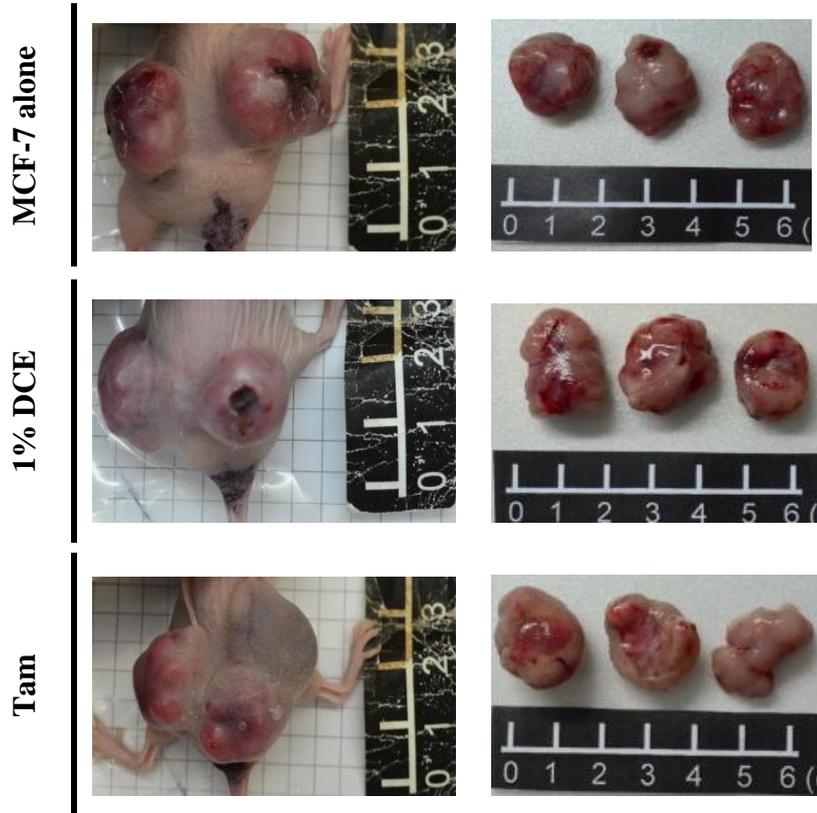


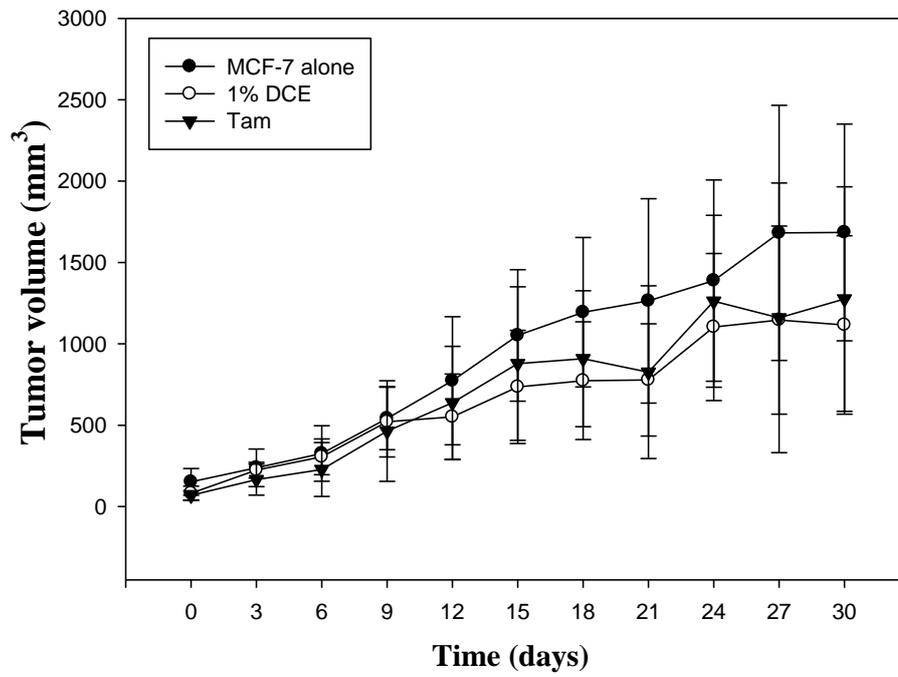
Fig. 8. Effect of DCE on apoptosis of MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were starved for 24 h, and then treated with 0, 10, 50, 100, 250 and 500 µg/ml of DCE for 24 h. Quantification of early and late apoptosis cells, and cells were analyzed by flow cytometry using annexin V staining. (B) The proportion of annexin V-positive cells represents as mean \pm SD (n = 3) of three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the control.

Fig. 9

(A)



(B)



(C)

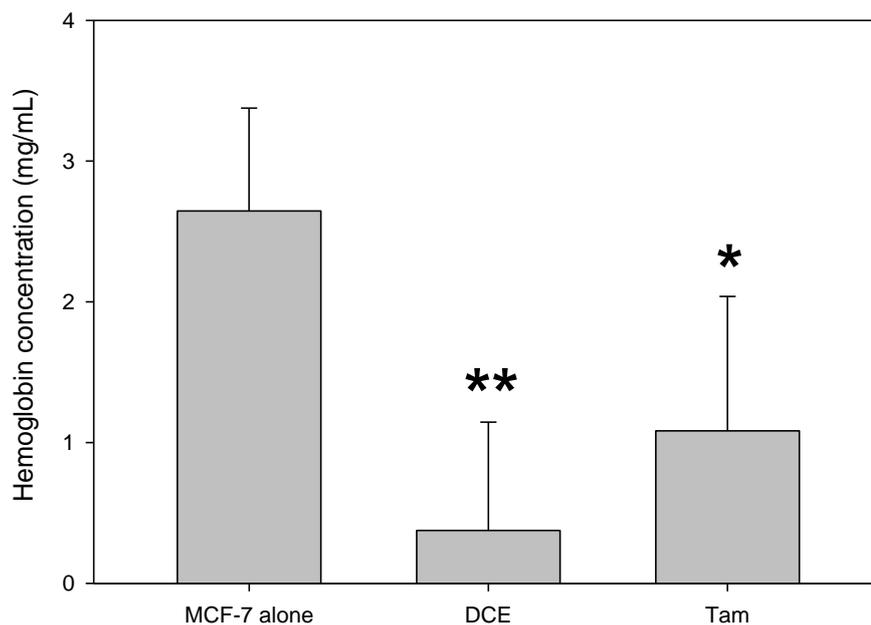


Fig. 9. Effects of DCE on xenograft tumor in Balb/c nude mice. The Bal/c mice were injected subcutaneously with MCF-7 cells to form tumor. The mice were treated with 1% DCE or Tam (4 mg/kg) for 4 weeks. (A) The mice were sacrificed after 4 weeks, and tumor was collected for analysis. (B) Tumor volume (mm^3) of mice was measured every three days. (C) Hemoglobin concentrations in mice tumors were analyzed by reactivating with Drabkin's reagent. The quantitative data are presented as mean \pm SD ($n = 3$) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the group of MCF-7 alone .

Fig. 10

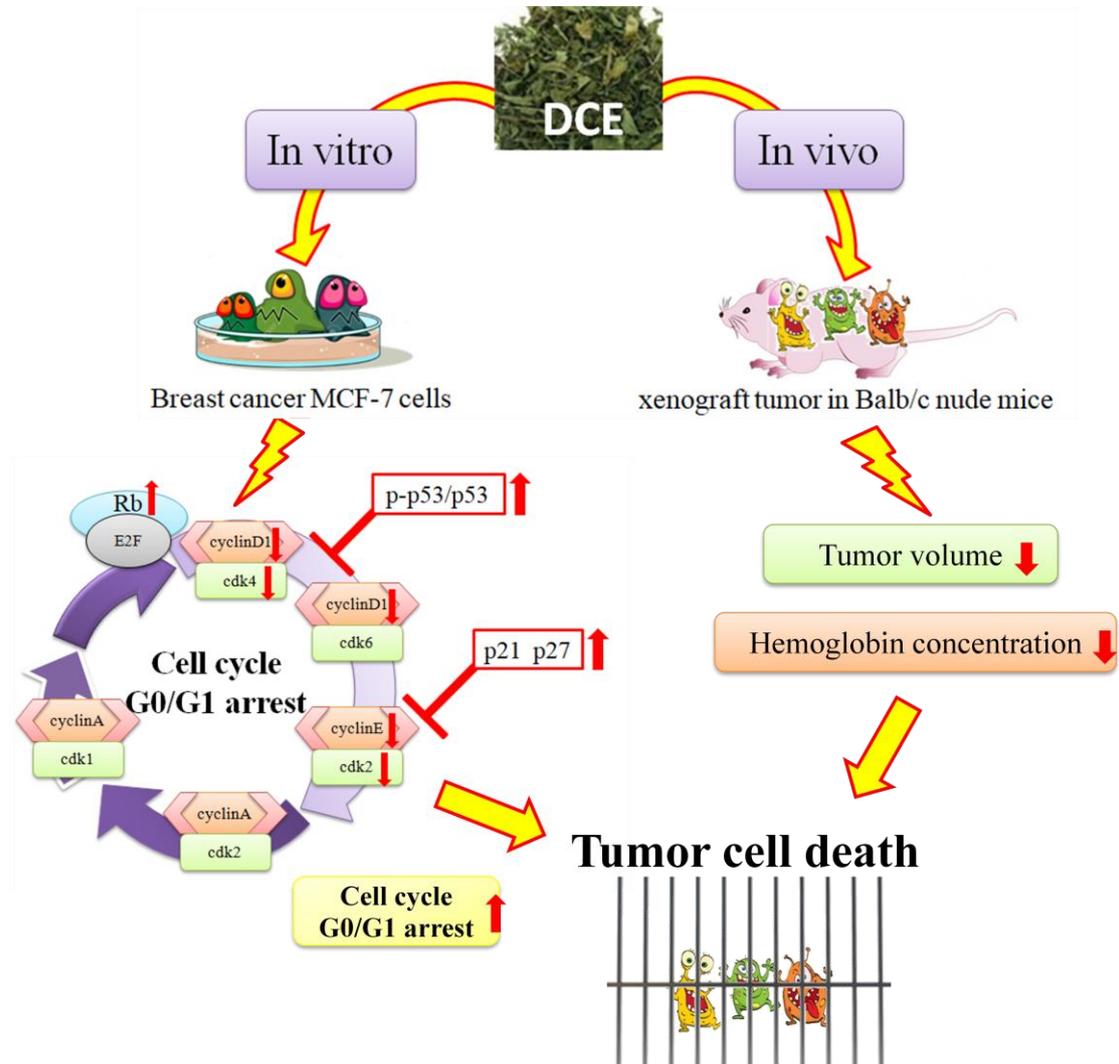


Fig. 10. Overview of pathways for DCE-inhibited the proliferation of breast cancer *in vitro* and *in vivo*.