

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 土肉桂露主要成分抑制 4T1 乳癌細胞生長之機制
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 谷月涵
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-039-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： 李慧禎

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系

中華民國 107年03月29日

目錄

● 中英文摘要

第一章、序論.....	1
一、 乳癌.....	1
二、 土肉桂.....	2
第二章、研究動機.....	4
第三章、研究架構.....	5
第四章、實驗材料與方法.....	6
第五章、實驗結果.....	9
一、 土肉桂葉露對乳癌小白鼠腫瘤大小之影響.....	9
二、 土肉桂葉露對乳癌小白鼠腫瘤組織的影響.....	9
三、 土肉桂葉露對乳癌小白鼠腫瘤蛋白表現量的影響.....	9
第六章、討論.....	10
第七章、參考文獻.....	13
第八章、實驗結果圖表.....	16
第九章、附錄.....	21

中文摘要

乳癌為已開發國家中女性常見的一種癌症並且具有非常高的復發率。台灣由於飲食西化、環境惡化、工作壓力上升等因素，發生率及死亡率逐年攀升，是女性癌症的第二位，僅次於子宮頸癌。不僅在化學治療過程中容易產生抗藥性，且易轉移至肺及骨骼。因此除了臨床藥物外，找尋其他物質以延緩化療不適或減少轉移應可協助臨床病人。肉桂葉目前廣泛使用於抗菌、抗昆蟲等方面，先前研究結果顯示肉桂葉中功能性成分具有預防或治療惡性腫瘤的效果，包括乳癌。因此本實驗利用台灣南投栽植及製取的土肉桂露，將老鼠乳癌細胞（4T1）植入小鼠乳房，以觀察是否能夠抑制腫瘤生長、減少轉移或對臨床藥物有增幅效果。並進一步釐清可能的機轉。實驗方法為植入乳癌細胞後，將土肉桂露依不同劑量管餵，或合併抗癌藥物 paclitaxel 腹腔注射（每三天腹部注射 0.6ml 0.5% Paclitaxel），經過 4 周後犧牲，收集腫瘤組織進行分析。利用**組織切片、免疫染色法及西方墨點法**等方法檢測土肉桂葉露對於乳癌增生或轉移是否有延緩的效果及可能機制。實驗結果發現，土肉桂葉露可能可以藉著改變 p-P53、Myc、p-Erk 的活化與表現量來抑制乳癌增生與促進凋亡，顯示出其作為乳癌治療輔助劑的潛力。本研究除探究土肉桂露是否有助於治療乳癌之外，並期待未來可以應用於臨床實務以及癌症輔助品的開發。

關鍵字：乳癌、土肉桂、腫瘤轉移、腫瘤增生、細胞凋亡

英文摘要

Breast cancer is a common type of cancer in women in developed countries and has a very high recurrence rate. Due to westernization of the diet, environmental deterioration, and rising work pressure, Taiwan's incidence and mortality rate has been rising year by year. It is the second most common cancer in women, second only to cervical cancer. Not only is it easy to produce drug resistance during the course of chemotherapy, but it is easily transferred to the lungs and bones. Therefore, in addition to clinical drugs, seeking other substances to decrease chemotherapy discomfort or reduce metastasis should help patients who suffer a lot. Cinnamon leaves are widely used in antibacterial and anti-insect, etc. Previous studies have shown that functional ingredients existing in cinnamon leaves have the effect of preventing or treating malignant tumors, including breast cancer.

Therefore, in this experiment, following by implant the breast cancer cells (4T1) into the mouse breast, the *Cinnamomum osmophloeum* obtained from Nantou County was treated, and then we observe whether it can inhibit tumor growth, reduce metastasis or increase in the effect of clinical drugs, and further clarify the possible mechanism. The experimental method is implanting breast cancer cells, and feed the mice *Cinnamomum osmophloeum* with different doses, or combined with the anti-cancer drug paclitaxel (abdominal injection of 0.6ml 0.5% Paclitaxel every three days). After 4 weeks, sacrifice all mice to collect tumor tissue which are used to analyze. By the use of tissue slice, immunostaining and Western blotting, we detect the effect of cinnamon leaf on breast cancer proliferation, cancer metastasis and possible mechanisms.

The experimental results showed that the cinnamon leaf could inhibit breast cancer proliferation and promote apoptosis by changing the activation and expression of p-P53, Myc, and p-Erk, indicating its potential as an adjuvant for breast cancer treatment. In addition to exploring whether cinnamon is useful in the treatment of breast cancer, the study is expected to be applied in clinical practice and the development of cancer aids in the future.

Keyword: breast cancer, *Cinnamomum osmophloeum*, metastasis, proliferation, apoptosis

第一章、序論

一、乳癌

乳癌是由乳房腺泡細胞或是乳腺管細胞不正常的分裂、繁殖所形成的惡性腫瘤，因癌細胞的生長失去控制，會侵入並破壞鄰近的組織及器官，或經由血液或淋巴系統轉移到其它器官[1]。

根據世界衛生組織（WHO）資料，乳癌是一種女性常見癌症，在西方國家，乳癌發生率僅次於皮膚癌，而死亡率也是僅次於肺癌之後[2]。2001年美國估計有十九萬二仟名新發病例，而有五萬二仟人死於此病。台灣的乳癌發生率年年升高，死亡率則由 5.2 人上升至 7.2 人佔女性癌症的第二位，僅次於子宮頸癌[2]。目前用於乳癌的治療方法包括化學治療、放射線治療和激素治療等等[3]。隨著生活型態、飲食習慣日漸西化，台灣的乳癌發生率及死亡率逐年上升，重要性日益增加。已有流行病學研究顯示都市、北部地區、外省籍、未婚者、高社經地位、初經過早（early menarche）、停經過晚（late menopause）、生育子女數少、五十歲以上婦女、三十歲以後生育第一胎、飲食偏向高脂肪食物者、家族罹患乳癌病史，都是屬於發生乳癌之高危險群[4]，其中 brca1, brca2, p53, pten 與 stk11/lkb1 等基因突變已被證實與家族遺傳性乳癌有關[5, 6]。

目前乳癌的治療方式，仍是以手術切除為主要方向，其他治療方式為輔。治療方式主要包括：

1. **外科手術治療**：切除範圍包括乳頭及腫瘤附近皮膚、全部乳房組織、大小胸肌及腋下淋巴結。根據切除的範圍與方式可分為[7]：
 - (1)根除型乳房切除術--切除乳房加上腋下淋巴腺清除。
 - (2)單純全乳房切除術
 - (3)廣範圍乳房組織切除--切除乳房及胸肌。
 - (4)改良型乳房根除術--保留胸肌、清除腋下淋巴[8]。
2. **標靶藥物**：在乳癌治療裡大部分指的是人類表皮生長因子第二型受體（HER2）陽性病人的用藥。HER2 是正常細胞表面都會有的蛋白，負責接受調控細胞生長的訊息；但是在癌細胞，由於基因的放大表現，製造過多的 HER2 接受體蛋白在細胞的表面，導致細胞可以接受過多的生長因子刺激，活化細胞訊息傳遞路徑，促進細胞分裂。針對 HER2 蛋白或其相關的訊息傳遞路徑，目前已有帕妥珠單抗（Pertuzumab）等；另外有針對不同標的如 mTOR 抑制劑依維莫司片（Affinitor）及抑制血管新生的癌思停（Avastin）等標靶藥物[9]。
3. **放射線治療**：主要應用於乳房切除術後的局部輔助治療，對於遠處轉移的發生沒有預防效果，但可降低局部復發，可以使病人的生活品質大為提高[7]。
4. **化學治療**：由於乳癌已被認為是一種全身性疾病，因此除了局部治療外，全身性的化學治療也是必須的。目前用於乳癌術後的輔助化學治療藥物有三類
 - (1)第一代藥物小黃莓（Methotrexate, CMF），目前較少使用
 - (2)第二代藥物小紅莓（Adriamycin, CAF/CEF），針對沒有淋巴結轉移者
 - (3)第三代藥物則合併使用小紅莓及紫杉醇（Docetaxel, Paclitaxel），多用於局部晚期乳癌、具淋巴腺轉移的早期乳癌或無淋巴腺轉移的三陰性乳癌[10]。

5. **基因治療**：手術乳癌標本偵測是否有 Her-2/neu 陽性，再給予 Herceptin 治療，目前此藥在轉移乳癌有其療效，健保尚未適用於輔助性治療[11]。
6. **荷爾蒙療法**：腫瘤細胞有雌性激素受體（Estrogen Receptor, ER）或是黃體素受體（Progesterone Receptor, PR）之表現呈現陽性可使用，如：Tamoxifen、Raloxifen、Femara 等[10]。

二、土肉桂

土肉桂(*Cinnamomum osmophloeum Kanehira*)為台灣本土闊葉樹種之一，分類上屬於樟科樟屬，常綠中喬木，樹高 20 餘公尺，生長於台灣中低海拔 400 公尺至 1500 公尺之天然闊葉林中，主要產地為中部埔里、蓮華池、日月潭、谷關、松鶴、佳堡及南部武威山、扇平等地[12]，桂皮油、肉桂葉油可供醫藥、香料及調味料之用；在食品工業上廣用於飲料、糖果、口香糖、糕餅、香腸等、故甚具經濟價值

肉桂的萃取部位來自根、莖、葉或全株植物，過去針對萃取成分及相關功效的研究如下：

1. 抗菌活性

抗細菌方面，肉桂葉中的肉桂醛(cinnamaldehyde)對於 9 種致病細菌——屬於格蘭氏陰性菌之大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumonia*)、沙門氏菌(*Salmonella sp.*)及副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)，及屬於格蘭氏陽性菌之糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)及對甲氧西林具抗藥性之金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)——具有很好的抑制效果；抗腐朽菌方面，桂皮醛對白腐菌(*Coriolus versicolor*)及褐腐菌(*Laetiporus sulphureus*)具有最強的抑制作用；抗黴菌方面，桂皮醛對於 *Aspergillus niger* 及 *Chaetomium globosum* 兩種日常生活中常見的黴菌，具有很好的抑制生長效果，可獲得顯著的防黴性[13]。

2. 抗昆蟲活性

土肉桂中桂皮醛、丁香酚及 α -Terpineol 三種成分可以將台灣分布最廣且危害最嚴重的台灣家白蟻(*Coptotermes formosanus Shiraki*)全部殺死；而土肉桂中的桂皮醛和丁香酚對於台灣住屋常見且易引起過敏的兩種蟎類——歐洲室塵蟎(*Dermatophagoides pteromyssinus*)及美洲室塵蟎(*Dermatophagoides farinae*)——亦有顯著的抗蟎活性[14]。

3. 抗氧化活性

根據先前研究[15]指出，土肉桂葉中具有清除 DPPH、超氧陰離子自由基(O_2^-)及氫氧自由基($OH\cdot$)的成分，且清除能力隨濃度增加而增強，其中以清除 $OH\cdot$ 的效果最好。

4. 抗癌作用

據報導，肉桂醛涉及惡性細胞轉移時的各種過程，例如細胞增殖、侵襲和遷移等等癌症轉移的關鍵步驟[16]。為了檢查其對細胞遷移的影響，Wani, K.D., et al.在乳癌細胞上進行傷口癒合測定，發現以肉桂醛劑量和時間依賴性方式可減少乳癌細胞的遷移；MMPs 則是可降解細胞外基質蛋白造成基底膜降解，最終導致轉移。由於 MMP-2 顯著促進癌細胞的侵襲性，評估了其在用肉桂

醛處理的細胞中的表達。發現 MMP-2 的表達在 MDAMB231 和 MCF7 中均下降，從而發現通過 MMP-2 表達的降低來抑制乳癌細胞的轉移。VEGF 是一種癌細胞中的血管生成蛋白，通過調節淋巴管的形成在腫瘤轉移中起重要作用。已知 VEGF 和 MMP2 蛋白在各種癌症（包括乳癌）中彼此正相關，不僅刺激內皮細胞的增殖和遷移，而且還激活無活性的 pro-MMPs 至活性 MMP。Wani, K.D., et al. 發現以肉桂醛劑量依賴性方式顯著下降兩種乳腺癌細胞系 (MDAMB231 和 MCF7) 中 VEGF 的表達[16]。

5. 抗發炎作用

LPS 或內毒素是位於革蘭氏陰性細菌細胞壁上的病原體相關分子模式。LPS 通過結合受體激活巨噬細胞，並刺激炎症細胞因子（包括 TNF-R，IL-1 α 和 IL-6 蛋白）的產生，這些細胞因子的過度表達可能引起嚴重的疾病，包括膿毒性休克。因此，抑制 TNF-R，IL-1 α 和 IL-6 蛋白質的產生可有助於膿毒性休克的治療。研究發現[17]，與僅由 LPS 調節的巨噬細胞相比，60 μ g/mL 的肉桂葉精油可抑制約 65% 的 IL-6 蛋白表達。總而言之，肉桂葉精油表現出明顯的 LPS 刺激巨噬細胞的抗炎活性，主要影響的成分可能為 1,8-cineole, santolina triene, spathulenol, and caryophyllene oxide。

6. 降低尿酸

肉桂醛具有極強之抑制 XOD 活性 (IC₅₀ = 8.4 μ g/mL) [18]，而其餘精油成分之活性均不顯著。利用氧酸鉀 (Oxonate) 誘發小鼠高尿酸之動物模型，評估肉桂醛於動物體內是否也可有效降低血液中之尿酸，發現其可有效降低動物體內之尿酸濃度，具有發展成抗結石或降尿酸保健產品之潛力。

7. 降低血糖

Kirkham, S., et al. 發現肉桂可以有穩定血糖的功用[19]。降低血糖的成分是一種植物營養素，Flavon-3-ol 類型的抗氧化物可強化胰島素穩定血糖的功能，與葡萄、漿果類、可可和綠茶中發現的成分類似。

8. 肉桂醛造成癌細胞凋亡

細胞凋亡是一種多細胞組織中細胞預設好的死亡程序，其存在目的是為了在不引起免疫、發炎反應的前提下，處理掉廢棄的細胞。細胞分裂的速率與細胞死亡達成平衡，如果平衡被擾亂，例如細胞分裂的速度比死亡快，即細胞凋亡被抑制，細胞快速增生，則會發展成腫瘤。

細胞凋亡由 Bcl2 和 BAX/BAK 二聚化 (dimerisation) 的狀態調控。[16] 當 Bcl2 (抗細胞凋亡的蛋白) 量很多時會形成同型二聚體 (homodimer)，阻礙細胞凋亡，促進細胞存活；當 BAX/BAK (促進細胞凋亡的蛋白) 量很多時會形成同型二聚體或寡聚物 (oligomer)，刺激細胞凋亡，防止細胞存活。依 caspase 啟動訊號的來源分為內生性途徑與外源性途徑：

A. 內生性途徑 (intrinsic pathway)

生長因子濃度較低或細胞分裂過程中 DNA 複製有損傷，造成 Bad 去磷酸化，與 Bcl2 結合，Bcl2 總量減少(或活化 p53 腫瘤抑制蛋白增加 BAX 蛋白總量，高於 Bcl2 的量)，形成 BAX dimer 和 BAK dimer，插入粒線體外膜形成破洞，釋放粒線體內外膜之間所儲存的大量 cytochrome C，cytochrome C 與 Apaf 1 和 procaspase 9 結合形成巨大的複合體 apoptosome，apoptosome 切割 procaspase 3 而得到 caspase 3 進行細胞大規模破壞。

B. 外來途徑 (extrinsic pathway)

荷爾蒙 Fas L 接到 receptor Fas 上面，FADD 和 procaspase 8 才會依序結合上去形成死亡誘導訊息複合體 (DISC)，進行自我切割 (self-cleavage) 得到活化的 caspase 8，再切割 procaspase 3 得到活化的 caspase 3，切割蛋白造成細胞大規模破壞。而 caspase 8 也可切割 Bid 得到 t-Bid 再與 Bcl2 結合，Bcl2 量減少造成 BAX/BAK 形成 dimer 或 oligomer，插入粒線體外膜形成破洞。[20]

已有研究顯示[16]，土肉桂葉中的主要成分肉桂醛可引起細胞週期擾動 (S-phase arrest) 和觸發細胞凋亡和 sub-G1 peak 的積累。它會使 Bcl2 和 Mcl1 的表現量隨著時間下降，並讓 Bax 的表現量上升，使 BAX 形成 dimer 並讓細胞走向凋亡程序。從表中可以看見，用 1 μ M 的肉桂醛加入 PLC/PRF/5 細胞，隨著時間增加，Sub-G1 時期的 DNA 量越來越多，從 6 小時的 13.80%，12 小時的 39.5%，到 24 小時後的 66.7%。由此可見肉桂醛具有抑制細胞增生的能力。

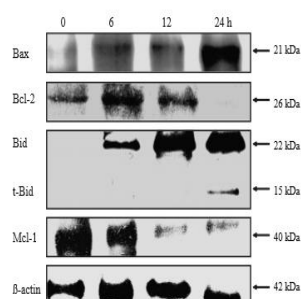


Fig. 3. Effect of Cin on Bcl-2 family proteins. Total cell lysates of PLC/PRF/5 cells treated with 1 μ M Cin for the indicated time periods were analyzed by 12% SDS-PAGE and then immunoblotted with antisera against Bax, Bcl-2, t-Bid, Mcl-1 and β -actin. β -Actin was probed to control for equal loading of protein.

Table 2
Effect of cinamaldehde (Cin) on incidence of apoptosis in PLC/PRF/5 cells

Treatment	%	
	Sub-G1 DNA	Annexin V
6 h		
Control	0.20 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
1 μ M Cin	13.80 \pm 0.32*	11.94 \pm 1.60*
12 h		
Control	0.05 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01
1 μ M Cin	39.50 \pm 4.70*	37.25 \pm 2.50*
24 h		
Control	0.27 \pm 0.03	0.13 \pm 0.00
1 μ M Cin	66.70 \pm 3.90*	68.05 \pm 3.20*

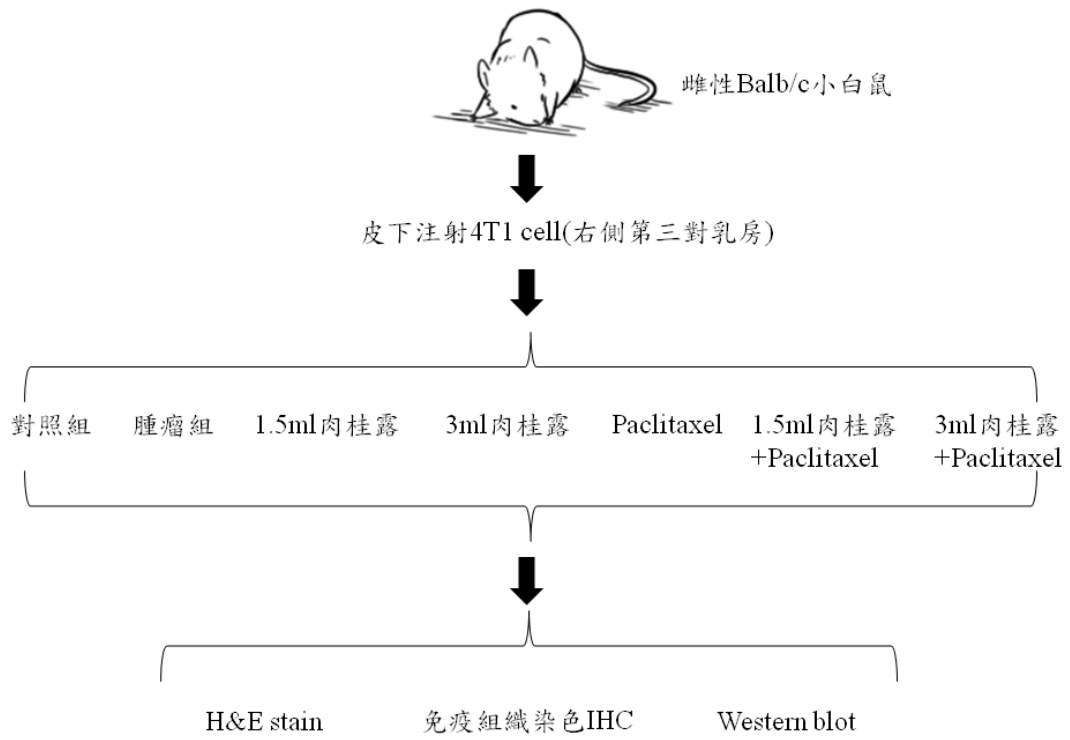
Values are mean \pm S.D. of three independent experiments. The DNA content (sub-G1 peak) and the binding of annexin V-FITC to the plasma membrane were analyzed by flow cytometry. The asterisk indicates a significant difference between control and Cin-treated cells at * P < 0.01 as analyzed by Student's t -test.

第二章、研究動機

乳癌是全世界女性癌症的第二大死因。在西方國家女性約每八位女性一生中即有一人得到乳癌，屬於女性最常見的癌症。目前用於乳癌的治療方法除外科手術外，尚包括化學治療、放射線治療和激素治療等等。儘管在診斷和治療方面已有先進研究，相關的副作用以及復發或轉移仍然是乳癌治療中的幾個不可避免的挑戰。根據行政院衛生署的研究報告顯示，乳癌的發生率有逐年提高的趨勢，再加上癌症發生的多樣性，因此早期發現早期治療以提高乳癌病人的存活率，成為大家努力目標。

土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum Kanehira*) 為台灣特有種的本土闊葉樹種之一，根據報導，肉桂葉中主要活性成分表現出不同的生物學功能，例如抗菌、免疫調節等等，其中包括抗癌活性。因此本研究想要探討肉桂葉中主要成分對乳癌是否有抑制效果，以及其中可能調節乳癌的機制與影響的蛋白為何和作用機制，並透過動物模式，觀察在施予不同劑量之土肉桂葉露情況下，是否具有不同效應？合併使用抗癌藥物是否有交互作用，影響乳癌的生長？

第三章、研究架構



第四章、實驗材料與方法

【土肉桂露來源】

本實驗採用台灣南投縣中寮鄉產銷班由土肉桂葉萃取之土肉桂純露，其中主要成分為肉桂醛 6.87% (cinnamaldehyde)、芳樟醇 40.24% (linalool)、單萜 1,8-桉樹腦 17.0% (monoterpenes 1,8-cineole)、倍半萜烯類 15.7% (sesquiterpenes spathulenol) [17, 21]。

【細胞培養】

4T1 乳癌細胞培養於 25 M glucose Dulbecco's modified Eagle's medium 以下簡稱 High Glucose medium 培養液中 (pH7.2-7.4)，培養液中含 10 % fetal bovine serum (FBS)、3 g/L sodium bicarbonate、1 mM penicillin/streptomycin (PS)、4 mM L-glutamine。所有細胞均培養在維持 5% CO₂、37°C 的恆溫環境。依細胞生長速度而定，更換培養液的時間及次數，原則上每 2-3 天更換一次。

【動物移植性腫瘤試驗 (Tumorigenic assay)】

由樂斯科實驗動物中心提供 3 週齡 (15-17g)，雌性 Balb/c 小白鼠。動物飼養條件為自動光照控制 (12 小時白晝、12 小時黑夜)、室溫控制於 25°C、相對濕度 55%，給予標準小鼠飼料，自由進食。經過一週的適應期後，每隻老鼠接種 2×10^5 個 4T1 腫瘤細胞，經皮下注射至第三對右側乳房，隔天開始每天給予肉桂露及每三天腹腔注射 paclitaxel，每周觀察並測定腫瘤大小及體重。

【動物分組及管餵】

將動物分成五組，每組 10 隻小白鼠，如下：

1. 對照組：餵食正常飲食，不給任何處理。
2. 腫瘤組：僅施打腫瘤
3. 低劑量組：施打腫瘤後，餵食正常飲食，另給予 1.5 mL 肉桂露，並給予 1.5% 肉桂露稀釋液做飲用水。
4. 高劑量組：施打腫瘤後，餵食正常飲食，另給予 3mL 肉桂露，並給予 3% 肉桂露稀釋液做飲用水。
5. 抗癌藥物組：施打腫瘤後，每三天腹部注射 0.6mL 0.5% Paclitaxel
6. 低劑量+抗癌藥物組：施打腫瘤後，餵食正常飲食，另給予 1.5 mL 肉桂露，並給予 1.5% 肉桂露稀釋液做飲用水。每三天腹部注射 0.6mL 0.5% Paclitaxel。
7. 高劑量+抗癌藥物組：施打腫瘤後，餵食正常飲食，另給予 3mL 肉桂露，並給予 3% 肉桂露稀釋液做飲用水。每三天腹部注射 0.6mL 0.5% Paclitaxel。

【石蠟組織包埋與切片:H&E stain】

組織以 70% Alcohol 浸泡加以固定 24 小時，接著以序列酒精脫水 (dehydration with ethanol)：以 50%，70%，80%，90%，100% 酒精各一小時後，再 100% 酒精進行隔夜處理。以二甲苯 (xylene) 置換酒精，浸置 2 小時，隔 1 小時換一次，再以二甲苯隔夜處理後，更換石蠟浸潤以滲透組織。將石蠟完全浸潤的組織置於包埋框中，加入溶化的石蠟靜待冷卻後除去模子，以 5 μ m 的厚度連續切片，置於 38°C 水中使其完全伸展後至於玻片上烘乾。以蘇木紫-伊紅 (hematoxylin-eosin 染色法, H&E stain)。將封片膠滴於已染色的組織切片上，以 45°C 慢慢蓋上蓋玻片以避免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

【免疫組織染色 IHC】

實驗過程，首先將切片放入烘箱 overnight，56°C，使臘稍微溶解；回溫後用蠟筆框出檢體位置，並以 Xylene 及酒精進行脫臘程序；用檸檬酸緩衝液(0.01 M，pH6.0)煮沸 15 分鐘後浸泡 5 分鐘 ddH₂O 回溫。之後以 Dual Endogenous Enzyme Block 覆蓋檢體作用 5-10 分鐘，分別以 ddH₂O 及 PBST 沖洗，然後加入一次抗體完全覆蓋檢體，於 4°C 作用 1 小時。以 PBST 沿著玻片沖洗後加入 Labelled polymer(二抗)覆蓋檢體 30 分鐘，PBST 沖洗後加呈色劑 DAB (1ml buffered substrate+ 1 drop DAB)呈色。利用蘇木紫(Hematoxylin)作對比染色，將載玻片置於濾紙片上，滴上封面膠於檢體上，再用蓋玻片以 45 度角覆蓋在檢體上，藉由毛細現象使封面膠佈滿，避免氣泡產生。等封片膠凝固，即完成封片。

【西方點墨法 Western blot】

1. 蛋白質抗原 (cell lysate)之製備

將乳癌組織磨碎，加入細胞溶解緩衝液(RIPA buffer)，及蛋白質水解酶抑制劑，在 4°C 下震盪 1 小時，4°C 高速離心 12,000rpm，10 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -20°C。蛋白樣本前處理為取定量之 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，再置於冰上冷卻即可。

2. 蛋白質定量

利用 coomassie brilliant blue G-250 會和蛋白質結合成藍色之複合物，於波長 595 nm 下有一較大之吸光值，以此定量蛋白質。首先以 BSA (bovine serum albumin) 為蛋白質標準溶液，換算樣本細胞萃取液之蛋白質濃度。取 30 μL 細胞萃取液加入 1 mL 的 coomassie blue，在室溫下反應 10 分鐘，於波長 595 nm 下測定吸光值變化。

3. 鑄膠

將玻璃已去離子水及酒精清洗乾淨擦乾後，裝上膠條並以膠夾將兩片玻璃夾緊。SDS-PAGE 分成兩層膠 stacking gel 及 separating gel，首先先配置 separating gel，若欲做小分子量(30- 100 kD)之蛋白，則配置 10-12% 的下層 separating gel；若做大分子量(>100 kD)蛋白，則配製 6-8% 的 separating gel。配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5 公分處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配 35 置上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離 stacking gel，待上層膠凝固後，抽出齒梳，用二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將樣品加到 well 中。

4. 蛋白質電泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE 可將蛋白質依其分子量的不同而分離，首先將電泳液(running buffer; 0.124 M Tris、1 M glycine、17 M SDS) 倒入電泳槽內槽中，再把處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出 well，其中一個 well 注入 protein standard marker，樣品 loading 完後，持續加入電泳液直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽也以電泳液補至蓋過電導線為止。連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 100 伏特的電壓跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電壓為 140 伏特，當色帶跑至底線時才停止電泳。

5. 蛋白質樣本之轉漬 (electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部份，將膠體置於兩張經轉漬液 (transfer buffer) 潤濕過的濾紙上，膠體上面再放 36 上與膠體大小相同之硝化纖維膜 (Nitrocellulose membrane; NC membrane。硝化纖維膜也需事先經轉漬液浸濕)，再放上兩張經轉漬液浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕走夾在其中的氣泡，最後再以夾板(內含海綿襯墊)夾緊，放入轉漬槽中，同時要將轉漬槽放在冰上，以固定 400 mA 轉漬 4 個小時(10-12% 之膠片); 400 mA 轉漬 3 個小時(6-8% 之膠片)。

6. 免疫墨點法 (immunoblotting)

轉漬完後將硝化纖維膜用 ponceau S 染色，檢測蛋白是否轉漬成功，比對後 protein marker 剪下所需的分子量，用 TBStween 20 漂洗數分鐘，再以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用。之後，倒掉 blocking buffer，再以 TBS-tween 20 漂洗三次 10 分鐘。換上一級抗體，置於 4 °C 下，作用 12~16 小時，再以 TBS-tween 20 漂洗三次 10 分鐘。接著換上二級抗體，於室溫下溫和作用 1 小時，再以 TBS-tween 20 漂洗三次，每次 10 分鐘。

7. 壓片

將以接好抗體的硝化纖維膜取出加上 enhanced Chemiluminescent Kit(ECL)進行呈色反應，以 FUJIFILM LAS-4000 冷光儀分析冷光強度。觀察乳癌相關調節蛋白，如:P53、cMyc 等表現量之變化。

【統計方法】

本實驗結果將以變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)進行檢測，組間差異以 Duncan's Multiple Range 進行檢測，檢定力大於 0.8， $P < 0.05$ 認定為具差異性。分析實驗結果的軟體使用 SigmaPlot12.5、SigmaStat10 software 進行統計。

第五章、實驗結果

一、 土肉桂葉露對乳癌小白鼠腫瘤大小之影響

我們挑選腫瘤組(T)、抗癌藥物組(PTX)，給予低劑量 1.5 ml 土肉桂露(L)，給予低劑量土肉桂露合併使用抗癌藥物(L+PTX)，給予高劑量 3ml 土肉桂露(H)，以及給予高劑量之土肉桂露合併使用抗癌藥物(H+PTX)等六組，來進行實驗。每一周對小白鼠的乳癌大小進行測量，用長與寬進行(最長邊×最短邊²)/2 公式換算為腫瘤體積後，再製作圖表以利分析。從圖中可以觀察出兩種現象，一是在第四周(最後一周)時，經過肉桂露處理以及肉桂露合併使用抗癌藥物的組別其腫瘤平均體積比腫瘤組與抗癌藥物組低，由此可以預測土肉桂露對於乳癌細胞可能有一定程度的抑制效果；二是在第四周時，低劑量組的腫瘤大小較高劑量組減少 6%，低劑量合併抗癌藥物組的腫瘤大小也較高劑量合併抗癌藥物組減少 2%，但並無顯著差距，也並無呈現劑量依存性。(Table 1.、Figure 1.)

二、 土肉桂葉露對乳癌小白鼠腫瘤組織的影響

小白鼠經過四周實驗後犧牲，肉眼觀察乳房腫瘤組織，無法精確判斷各個組別的差異(Figure 2.)，因此我們將腫瘤組織進行免疫組織染色(IHC)。呈咖啡色區域為 PCNA 存在區域(PCNA positive area)，觀察切片可以發現，腫瘤組(Tumor)與抗癌藥物組(PTX)有較多區域呈現 PCNA positive(Figure 3. A、D)，而不論高低劑量土肉桂組，或是合併使用抗癌藥物組的 PCNA positive area 都較少(Figure 3. B、C、E、F)，利用軟體 Image-pro plus 對 PCNA 存在區域進行分析，並使用 SigmaPlot12.5 進行統計，可看出以下兩種結果，一是低劑量組的 PCNA positive area 較高劑量組減少 36%，合併使用抗癌藥物也呈現相同趨勢，L+PTX 組較 H+PTX 組減少 41%；二是土肉桂露合併使用抗癌藥物組別的 PCNA 存在區域分別都較僅使用相同劑量土肉桂露的組別少(L+PTX 組的 PCNA positive area 較 L 組減少 16%，H+PTX 組的 PCNA positive area 較 H 組減少 11%)(Figure 3.)。

三、 土肉桂葉露對乳癌小白鼠腫瘤蛋白表現量的影響

A. 土肉桂葉露對 p-P53 表現量的影響

細胞週期檢查點(Cell cycle checkpoints) 有助於提高細胞存活率並減少暴露於 DNA 損傷後異常的遺傳變化。已有先前的研究指出，在細胞損傷之後，P53 和 G1 期的細胞週期停滯密切相關(cell cycle arrest in G1 phase)[22]，而 p-P53 為 P53 蛋白的磷酸化活化形式，活化後的 p-P53 蛋白作為腫瘤抑制因子(tumor suppressor)，將令細胞停滯在 G1 期的細胞週期或觸發細胞凋亡。在本實驗中，將各組別的乳癌細胞磨碎並製備蛋白質抗原(cell lysate)，使用西方墨點法觀察各組別 p-P53 蛋白的表現量，從結果中可發現給予的肉桂露劑量與 P53 的表現量成正比，合併使用抗癌藥物 Paclitaxel 也有相同的結果。(Figure 4.)

B. 土肉桂葉露對 Myc 表現量的影響

Myc 時常被指出其良好的生長促進(growth-promoting)特性[23, 24]，除此之外 Myc 被發現是一種強力的細胞凋亡誘導劑，特別是在壓力、基因毒性造成損傷或耗盡存活因子(survival factors)的情況下[23]。使用西方墨點法觀察各組別乳癌腫瘤組織的 Myc 表現量，發現結果與 P53 相似，肉桂葉露劑量與 Myc 的表現量成正比，肉桂葉露合併使用抗癌藥物 Paclitaxel 也與 Myc 的蛋白表現量成正比。(Figure 4.)

C. 土肉桂葉露對 Erk 表現量的影響

Erk 是促分裂原活化蛋白激酶超家族(mitogen-activated protein kinase superfamily, MAPK)的成員，在細胞增殖和分化中發揮重要作用[25]。p-Erk 為 Erk 蛋白的磷酸化活化形式，使用西方墨點法後觀察各組乳癌腫瘤組織 p-Erk 的表現量，發現隨著肉桂葉露劑量增多，p-Erk 的表現量也越高；肉桂葉露合併使用 Paclitaxel 也是相同的結果。(Figure 4.)

第六章、討論

乳癌是個有古老歷史的疾病，早期外科治療往切除病灶的方向發展，但到了 20 世紀中期，放射線治療成功提高了乳癌局部控制率，使乳房保留手術成為主要的選擇。至 20 世紀 70 年代全身性輔助治療，如化療、賀爾蒙治療等的成功發展，不僅大幅提高了乳癌的存活率，同時也改變了人類對乳癌生物學的認識。20 世紀晚期發展的分子醫學，引領了標靶治療時代的來臨，並讓未來乳癌的治療朝向個人化發展[26]。流行病學研究始終表明癌症風險與蔬果攝入量之間存在負相關關係，這些益處與蔬果中植物化學物質的協同組合有關[27]。近年來，植物化學物質(phytochemicals)對癌症治療的輔助性備受重視，一些研究人員集中精力在植物化學物質如多酚(polyphenols)、類黃酮(flavonoids)等等特殊成分的潛在抗癌能力[1]。2016 年，Prasad R. Dandawate 等人研究出薑黃素(curcumin)有各種生物活性如抗氧化劑，抗發炎，抗癌和抗糖尿病，其中薑黃素還顯示出對許多癌症的抗癌活性，包括胰腺癌，結腸癌，膀胱癌，前列腺癌以及乳腺癌，其主要涉及癌細胞生長、存活和轉移的多個信號傳導途徑和多個基因[28]。同年，Kotecha R. 等人指出白藜蘆醇(resveratrol)對幾種不同類型的腫瘤具有抗癌作用，並影響腫瘤發生(carcinogenesis)和增殖的多個階段。具體而言，白藜蘆醇可通過干擾轉化細胞中的多種信號途徑誘導癌細胞凋亡[29]。近年的實驗中，肉桂的生物活性成分肉桂醛(cinnamaldehyde)顯示具有抗各種癌細胞系的抗癌活性並已被證實可以引起人體多種癌細胞凋亡機制，其更引起廣泛注意的是肉桂醛的疏水性質造就有效的藥物遞送系統，此性質將增強肉桂醛的生物利用度而不影響其生物活性[3]。

本實驗結果發現，土肉桂露的抗乳癌特性可能與 P53 蛋白相關，細胞週期中有一些特定的檢查點(Cell cycle checkpoints)，當檢查點滿足某些條件，細胞週期才會繼續進行，如此可確保細胞週期是正確地進行[30]。在真核細胞的細胞週期中，有三個檢查點，第一個在 G1 phase 晚期，為進入 S phase 前的檢查點，稱為 G1 checkpoint，主要檢查細胞的 DNA 是否有受損。已有先前的研究指出，在細胞損傷之後，P53 和 G1 期的細胞週期停滯密切相關(cell cycle arrest in G1 phase)，P53 不但可以使細胞週期停滯，同時也可以藉由細胞凋亡的方式來防止腫瘤生長[22]，在實驗結果圖表之中可以發現，隨著土肉桂露的量增加，活化的 p-P53 蛋白的量也跟著增加，合併使用抗癌藥物也有相同的結果，於是我們推測出土肉桂露能夠有效地增加 p-P53 蛋白的表現量，而 p-P53 蛋白則接著對細胞週期產生影響，並抑制其增生，來達到抗癌的目的。

Myc 蛋白除了有據可查的生長促進特性外，其被發現是一種強大的細胞凋亡誘導劑，特別是在壓力，基因毒性損傷或存活因子耗竭的情況下，這種類似拮抗二元性的性質，也可能是土肉桂露可以抗乳癌的一個原因之一[23, 24]。癌蛋白(oncoprotein) Myc 可通過 ARF / MDM-2 途徑活化 p53，使細胞對任何 DNA 損傷都非常敏感，容易觸發細胞凋亡。Myc 還可促進細胞色素 c (holocytochrome c) 從粒線體釋放到細胞質中，從而觸發細胞凋亡[23]。而在本實驗中，可發現 Myc 蛋白的表現量隨著土肉桂露的量增加，合併使用抗癌藥物的情況下結果亦然，並呈現和 P53 蛋白相同的趨勢，因此推測 Myc 的上述特性可能活化了 P53，造成細胞凋亡的結果，但欲釐清這部分的相關機轉，則須再進一步實驗求證。

Erk 是促分裂原活化蛋白激酶超家族(mitogen-activated protein kinase superfamily, MAPK)的成員，其調節細胞的增殖、分化和存活，是多種生長因子(EGF、NGF、PDGF 等)的下游蛋白，在許多人類的癌症(如黑色素瘤、乳腺癌等)中都可發現 ERK 的過度活化(磷酸化增多)，許多研究將其致癌潛能與增加細胞存活相關聯，主要是通過促進抗凋亡蛋白如 Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, IAP 和抑制促凋亡蛋白如 Bad 和 Bim 的活性[25, 31]。然而，也同時有許多實驗證實 Ras / Raf / 細胞外信號調節激酶(ERK)信號路徑(Ras/Raf/ERK signal pathway)在幾乎所有細胞功能中都起著至關重要的作用，根據細胞刺激類型，ERK 活性將調控不同的抗增殖事件，例如凋亡，自噬和衰老[32]。ERK 活性可通過誘導粒線體內細胞色素 c(cytochrome c)釋放或 caspase-8 活化，造成永久性細胞週期停滯或自噬空泡化(autophagic vacuolization)來促進內在或外在凋亡途徑[32]。我們目前的結果顯示給予土肉桂露的組別可降低 PCNA 這個增生因子的表現，而組織檢體中 p-Erk 表現量和土肉桂露量成正比的結果，有可能為 p-Erk 透過上述調控路徑產生細胞凋亡的效果，造成抗增殖的主要目的，而合併使用抗癌藥物 Paclitaxel 的途徑亦然。但是，在使用目前設定劑量的土肉桂露是否也由靠近細胞膜的位置進行 Ras/Raf/ERK signal pathway 的調節或是它是否會經由何種膜結構而進入細胞進行調節？這都是將來可以繼續進行深入探究的課題。

免疫組織染色(IHC)所染的蛋白為 PCNA，即增殖細胞核抗原，是真核細胞 DNA 合成時所必需的一種核蛋白。細胞處於靜止狀態時，其含量很低，當細胞進入增殖周期中，其表達明顯增加，故 PCNA 是反映細胞增殖狀態的良好指標[33]。在 IHC 結果中可看出低劑量土肉桂葉露的 PCNA positive area 較高劑量少，合併使用 Paclitaxel 結果亦然，由此推測低劑量的土肉桂露較能夠抑制細胞增殖的現象，使用抗癌藥物的情況也是如此，而且土肉桂葉露和抗癌藥物兩者合併使用的效果更加，抑制細胞增殖的現象較只使用土肉桂露更為明顯，而只使用抗癌藥物 Paclitaxel 的效果也低於低劑量土肉桂葉合併使用抗癌藥物的效果。免疫組織染色的結果也可從腫瘤大小分析中加以佐證，從腫瘤大小也可看出低劑量土肉桂葉露較高劑量土肉桂葉露有效，合併使用抗癌藥物的效果更佳。

綜觀以上，我們從土肉桂露可能觸發細胞凋亡以及抑制增殖為著眼點[34]，進行以上實驗加以確認，並發現土肉桂葉露可能能夠藉由影響 p-P53、Myc、p-Erk 的活化與表現量來抑制乳癌增生與促進凋亡[35]，並藉腫瘤大小及免疫組織染色來偵測各不同劑量土肉桂露以及有無搭配抗癌藥物對乳癌腫瘤組織造成的影響，得出低劑量土肉桂露合併使用抗癌藥物組(L+PTX)為抑制乳癌最有效的一組，顯示出土肉桂露在臨床的乳癌治療中，應該具有癌症治療輔劑的可能，而低劑量土肉桂葉露效果較高劑量好，因此在後續實驗中應可將使用劑量降低，以觀察是否具有相同作用，並釐清相關機制。

第七章、參考文獻

1. 梁馨文, 蘋果多酚抑制人類乳癌細胞生長之分子機制研究. 中山醫學大學生化暨生物科技研究所學位論文, 2014: p. 1-73.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
3. Wani, K.D., et al., *Synthesis, characterization and in vitro study of biocompatible cinnamaldehyde functionalized magnetite nanoparticles (CPGF Nps) for hyperthermia and drug delivery applications in breast cancer*. PloS one, 2014. **9**(9): p. e107315.
4. 季瑋珠, 黃俊升, and 張金堅, 台灣的乳癌. 中華公共衛生雜誌, 1997. **16**(1): p. 62-76.
5. Resta, N., et al., *Cancer risk associated with STK11/LKB1 germline mutations in Peutz-Jeghers syndrome patients: Results of an Italian multicenter study*. Digestive and Liver Disease, 2013. **45**(7): p. 606-611.
6. Gracia-Aznarez, F.J., et al., *Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles*. PloS one, 2013. **8**(2): p. e55681.
7. Group, E.B.C.T.C., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. The Lancet, 2006. **366**(9503): p. 2087-2106.
8. Hou, M.-F., F.-M. Chen, and F. Ou-Yang, *Changing Trend in Breast Cancer Surgery*. Journal of Chinese Oncology Society, 2008. **24**(2): p. 102-107.
9. Vignot, S., et al., *mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives*. Annals of oncology, 2005. **16**(4): p. 525-537.
10. Group, E.B.C.T.C., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. The Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-1717.
11. Ross, J.S., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy*. The oncologist, 2003. **8**(4): p. 307-325.
12. 楊政川, et al., 台灣森林特產物—土肉桂. 科學發展, 446, 2010. **28**(33).
13. 劉如芸, 六種化學品系土肉桂葉子精油抗細菌, 腐朽菌, 病媒蚊幼蟲及室塵蟎活性. 臺灣大學森林環境暨資源學研究所學位論文, 2006: p. 1-79.
14. 林天書 and 尹華文, 肉桂類精油防治白蟻效能之研究. 林業試驗所研究報告季刊, 1995. **10**(4): p. 459-464.

15. 吳雪輝, et al., 肉桂精油的抗氧化作用研究. 食品科技, 2007. **4**: p. 85-88.
16. Wu, S.-J., L.-T. Ng, and C.-C. Lin, *Cinnamaldehyde-induced apoptosis in human PLC/PRF/5 cells through activation of the proapoptotic Bcl-2 family proteins and MAPK pathway*. Life Sciences, 2005. **77**(8): p. 938-951.
17. Chao, L.K., et al., *Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of Cinnamomum osmophloeum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(18): p. 7274-7278.
18. Wang, S., et al., *Essential oil from leaves of Cinnamomum osmophloeum acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice*. Phytomedicine, 2008. **15**(11): p. 940-945.
19. Kirkham, S., et al., *The potential of cinnamon to reduce blood glucose levels in patients with type 2 diabetes and insulin resistance*. Diabetes, obesity and metabolism, 2009. **11**(12): p. 1100-1113.
20. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 49-63.
21. 林岳賢, 土肉桂葉部之生理活性成分分析研究. 中興大學化學系所學位論文, 2008: p. 1-155.
22. Bykov, V.J. and K.G. Wiman, *Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway*. Annals of medicine, 2003. **35**(7): p. 458-465.
23. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342.
24. Watson, P.H., R.T. Pon, and R.P. Shiu, *Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer*. Cancer research, 1991. **51**(15): p. 3996-4000.
25. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291.
26. 謝德熾 and 陳立奇, 乳癌治療之演進. 北市醫學雜誌, 2010. **7**(3): p. 313-322.
27. Sun, J. and R.H. Liu, *Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells*. Cancer letters, 2006. **241**(1): p. 124-134.
28. Dandawate, P.R., et al. *Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy*. in *Seminars in cancer biology*. 2016. Elsevier.
29. Kotecha, R., A. Takami, and J.L. Espinoza, *Dietary phytochemicals and cancer*

- chemoprevention: a review of the clinical evidence*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 52517.
30. Kuerbitz, S.J., et al., *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(16): p. 7491-7495.
 31. Kubota, Y., et al., *Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation*. *Nature cell biology*, 2011. **13**(3): p. 282.
 32. Cagnol, S. and J.C. Chambard, *ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence*. *The FEBS journal*, 2010. **277**(1): p. 2-21.
 33. Hall, P., et al., *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some, neoplasms*. *The Journal of pathology*, 1990. **162**(4): p. 285-294.
 34. Koppikar, S.J., et al., *Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential*. *BMC cancer*, 2010. **10**(1): p. 210.
 35. Pal, D., et al., *Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway*. *Journal of dermatological science*, 2010. **59**(1): p. 31-39.

第八章、實驗結果圖表

Group	C	T	L	H	PTX	L+PTX	H+PTX
Tumor	—	+	+	+	+	+	+
土肉桂露 (ml)	—	—	1.5	3	—	1.5	3
0.5% Paclitaxel (ml)	—	—	—	—	0.6	0.6	0.6

Table 1. 分組簡易表格

※Tumor:皮下注射 2×10^5 個4T1腫瘤細胞

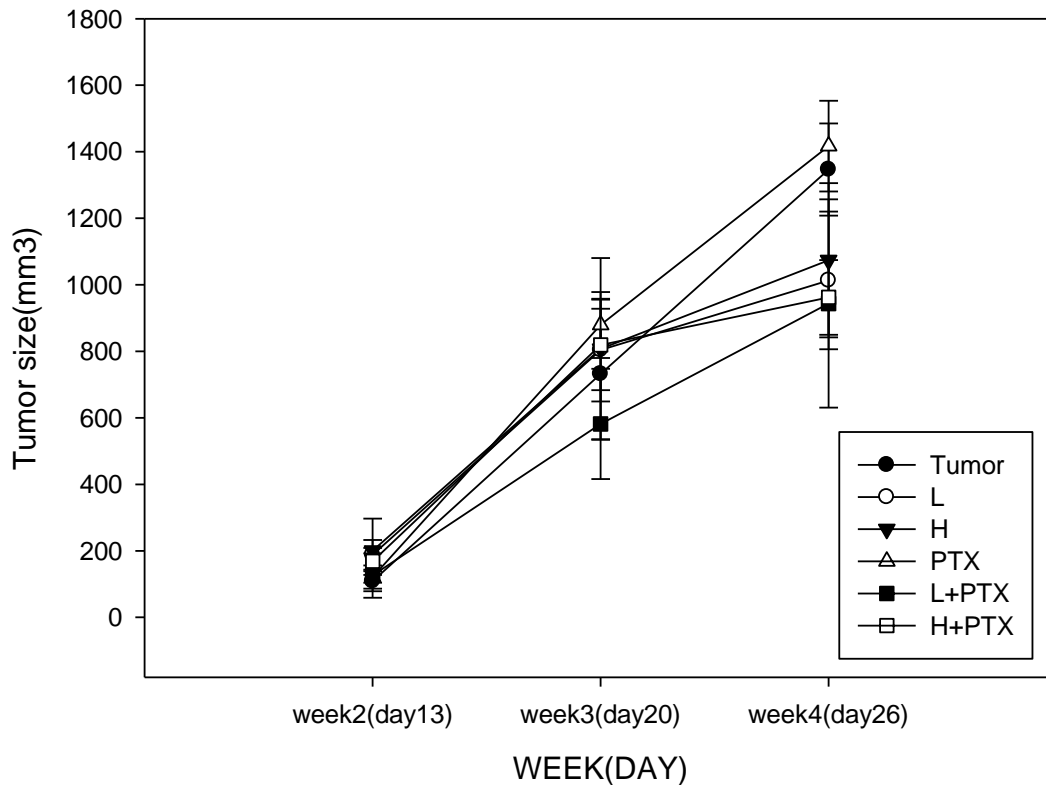


Figure1. 土肉桂葉露減少乳癌腫瘤體積

從圖中可以發現，第四周時不論高低劑量的土肉桂葉露組和高低劑量合併使用抗癌藥物組別，其腫瘤大小相較於腫瘤組及抗癌藥物組都較小，而低劑量組的腫瘤大小較高劑量組減少6%，低劑量合併抗癌藥物組的腫瘤大小也較高劑量合併抗癌藥物組減少2%，但並無顯著差距

備註: Tumor, 腫瘤組; L, 低劑量組; H, 高劑量組; PTX, 抗癌藥物組; L+PTX, 低劑量+抗癌藥物組; H+PTX, 高劑量+抗癌藥物組

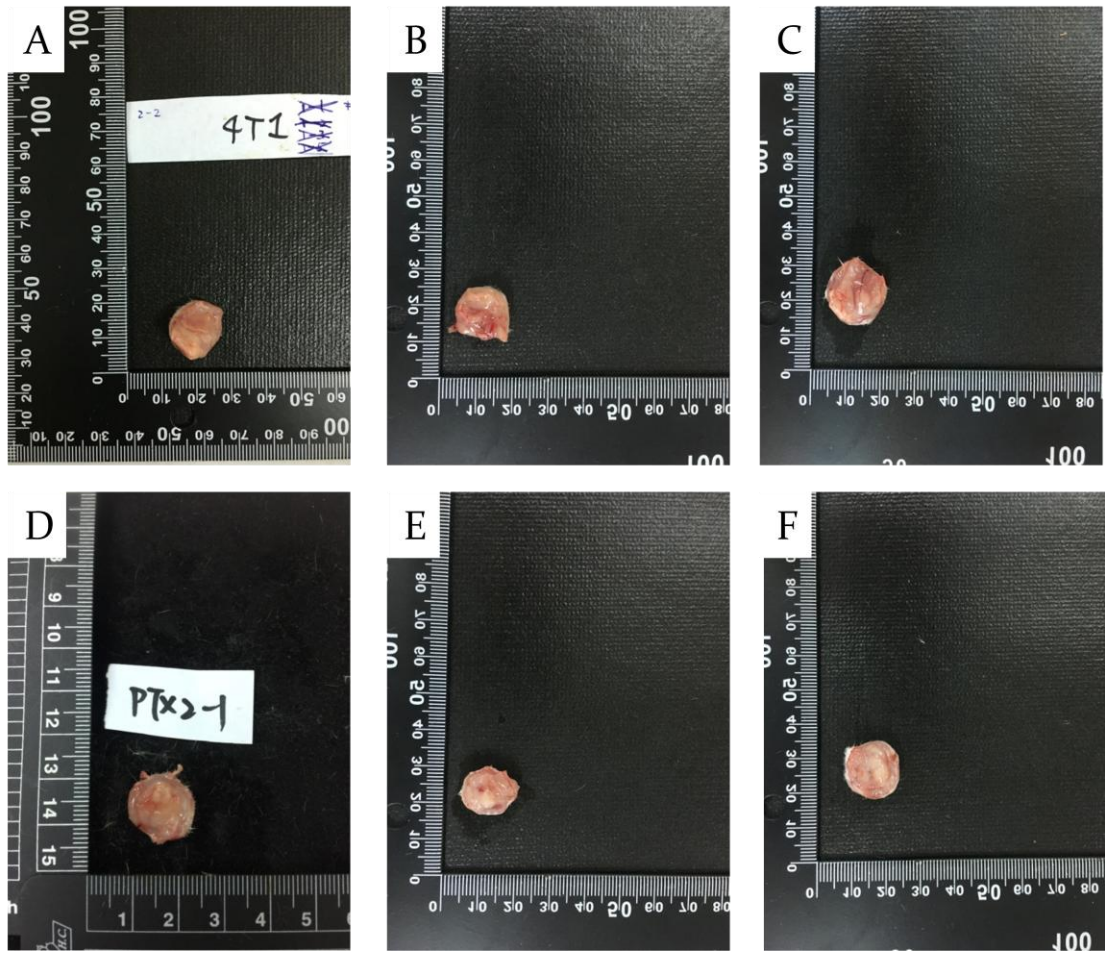


Figure2. 肉眼觀察腫瘤組織

A: (Tumor)腫瘤組；B: (L)低劑量組；C: (H)高劑量組；D: (PTX) 抗癌藥物組；E: (L+PTX) 低劑量+抗癌藥物組；F: (H+PTX) 高劑量+抗癌藥物組

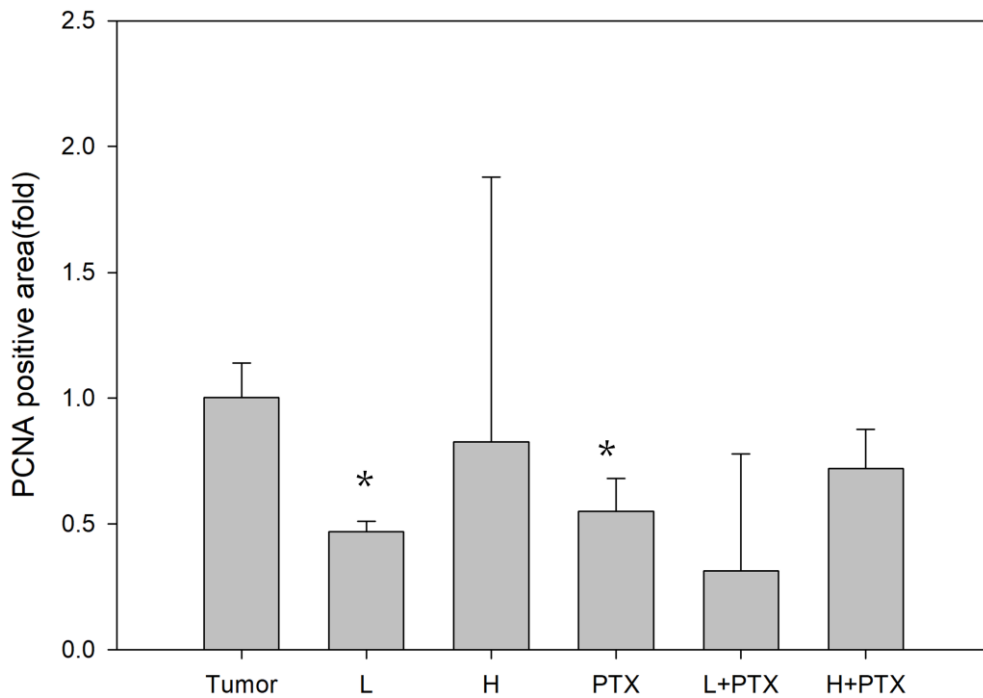
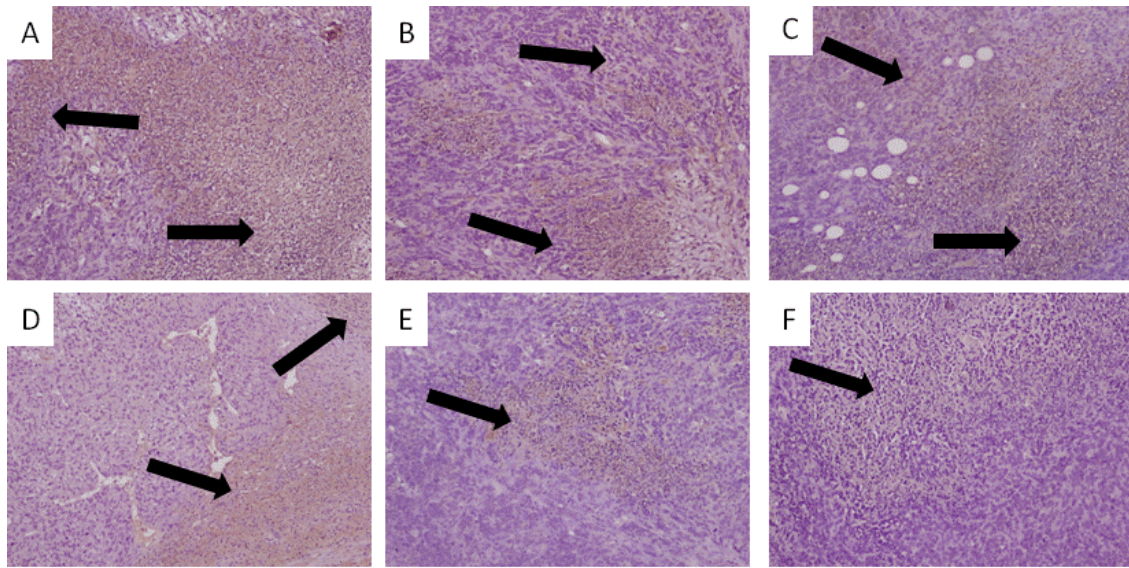


Figure 3. 土肉桂葉露降低乳癌小白鼠腫瘤組織中PCNA之表現量

(上圖)顯微鏡下觀察100倍放大倍率之免疫組織染色

(Immunohistochemistry, IHC stain) 腫瘤組織切片，箭頭所指棕色位置為PCNA蛋白。(下圖)以腫瘤組(Tumor)為100%作為基準值與其他組別比較。*:與腫瘤組(Tumor)比較具有顯著性， $P < 0.05$ 。

A: (Tumor) 腫瘤組； B: (L) 低劑量組； C: (H) 高劑量組； D: (PTX) 抗癌藥物組；

E: (L+PTX) 低劑量+抗癌藥物組； F: (H+PTX) 高劑量+抗癌藥物組

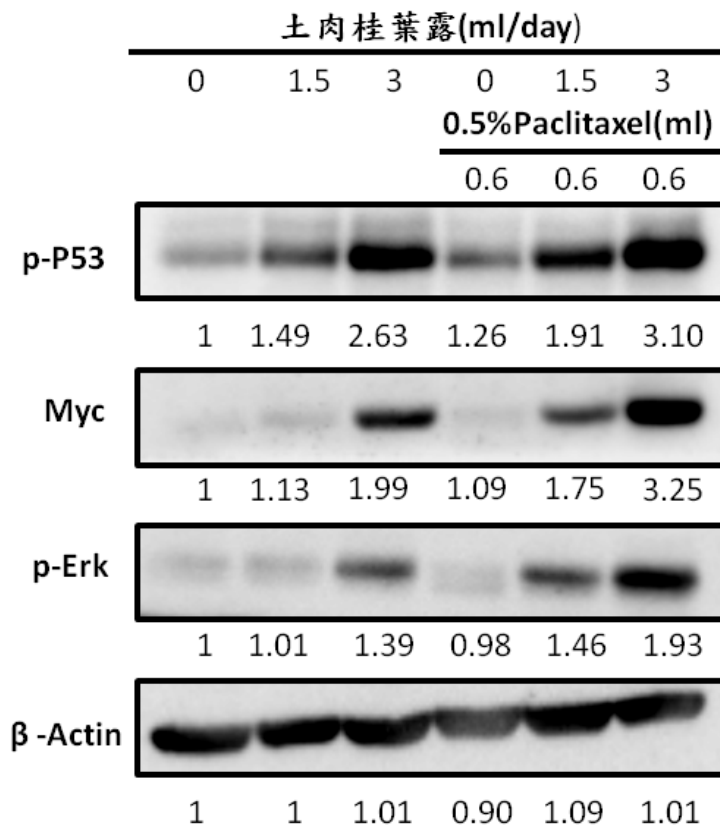
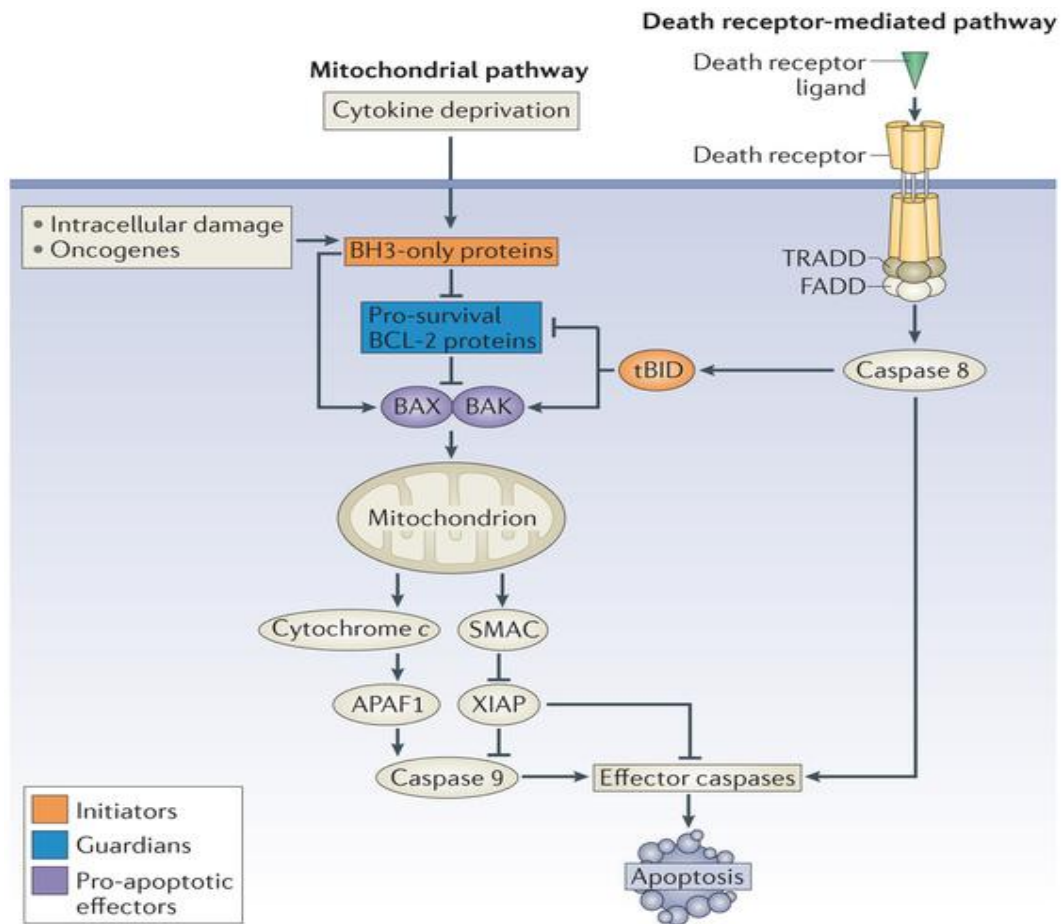


Figure4 土肉桂葉露及Paclitaxel處理後調節乳癌腫瘤組織增生相關蛋白表現量

各組小白鼠分別以不同劑量的土肉桂露以及0.5%Paclitaxel處理。運用西方墨點法觀察p-P53、Myc、p-Erk等蛋白表現，以腫瘤組(Tumor)為100%作為基準值與其他組別比較。 β -Actin作為各相關蛋白對照。

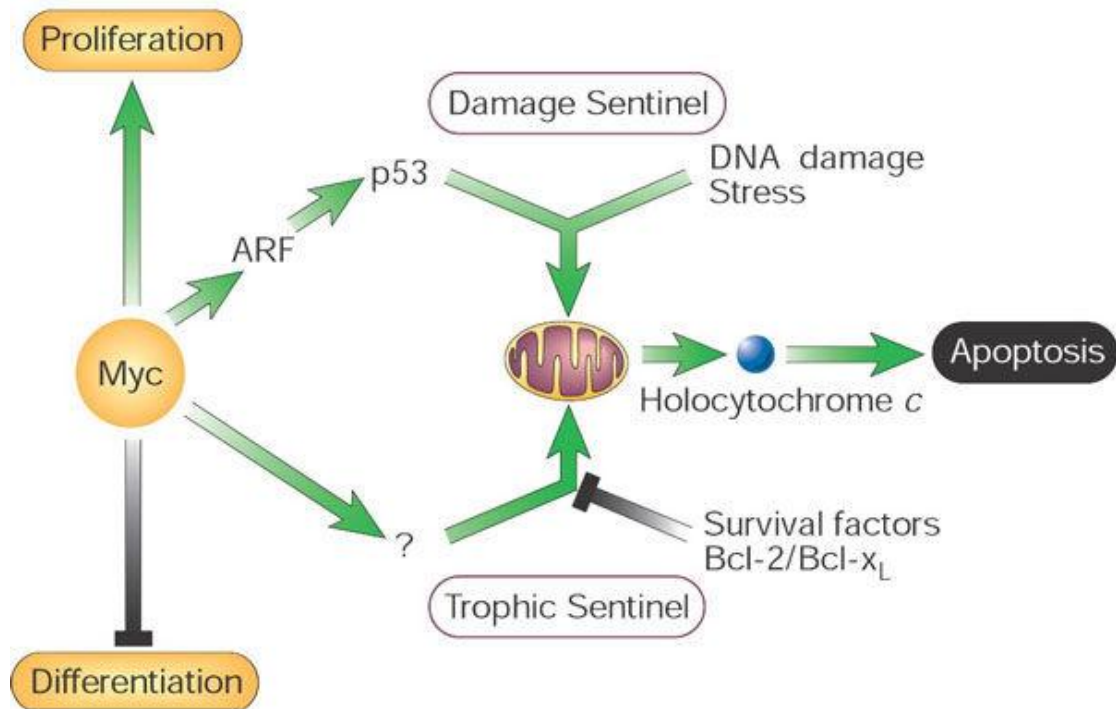
第九章、附錄



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

附錄一、細胞凋亡(cell apoptosis)的內生性途徑(intrinsic way)

備註：BH3, Bcl-2 homology domain 3; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; BAX, Bcl-2-associated X protein; BAK, Bcl-2 homologous antagonist/killer; FADD, Fas-associated death domain protein; TRADD, Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein; BID, BH3-interacting domain death agonist; APAF1, Apoptotic protease-activating factor 1; SMAC, Second mitochondria-derived activator of caspase; XIAP, X-Linked Inhibitor of apoptosis family of protein



附錄二、Myc在壓力、基因毒性造成損傷或耗盡存活因子時的細胞凋亡機制
 Activation of growth-deregulating lesions triggers ‘sentinel’ functions that guard the cell against acquiring mutations or propagating into an inappropriate somatic compartment. The more powerful and persistent the growth signal, the more potent and persistent the sentinel function. In this example, the oncoprotein Myc is shown activating a p53 damage sentinel through the ARF/MDM-2 pathway, thereby sensitizing the cell to any DNA damage. Myc also promotes release of holocytochrome c from the mitochondrion into the cytosol where it triggers apoptosis. Release of holocytochrome c is inhibited by paracrine ‘survival’ signals that are typically restricted both in supply and location. Clonal outgrowth driven by relentless Myc expression outstrips survival factor availability, triggering the ‘trophic sentinel’ to kill the cell.

全文完