

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 探討棉黃素標靶受體酪胺酸激酶B以促進乳癌細胞死亡 及輔助化療之研究
------------	--

執行計畫學生：王思喻

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-027-B

研究期間：108年07月01日至109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 109年03月10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.....	5
2.1. 乳癌(Breast cancer).....	5
2.1.1 簡介.....	5
2.1.2 乳癌分類.....	5
2.1.3 臨床治療與不同細胞株之差異.....	6
2.2. 酪胺酸受體激酶 B (Tropomyosin receptor kinase B, TrkB).....	6
2.2.1 分子簡介.....	6
2.2.2 分子機制.....	7
2.2.3 受體酪胺酸激酶 B 與癌症之相關性.....	7
2.3. 細胞凋亡(Apoptosis).....	8
2.3.1 簡介.....	8
2.3.2 分子機制.....	8

2.3.3 細胞凋亡與癌症之相關性 .....	9
2.4. 細胞自噬(Autophagy).....	10
2.4.1 簡介.....	10
2.4.2 分子機制.....	10
2.4.3 細胞自噬與癌症之相關性 .....	11
2.5. 棉黃素(Gossypetin, GTIN).....	11
2.5.1 簡介.....	11
2.5.2 已知功效.....	12
第三章、實驗架構與流程 .....	13
第四章、研究方法與步驟 .....	14
4.1. 棉黃素之製備 .....	14
4.2. 細胞培養(Cell culture).....	14
4.2.1 細胞株來源.....	14
4.2.2 培養條件.....	14
4.2.3 繼代培養.....	15
4.2.4 細胞飢餓處理.....	15
4.2.5 細胞加藥處理.....	15
4.3. 西方點墨法(Western blotting).....	16

4.3.1 萃取蛋白 .....	16
4.3.2 蛋白質定量 .....	17
4.3.3 蛋白樣品(sample)製備 .....	17
4.3.4 鑄膠(Denatured-PAGE).....	17
4.3.5 電泳法(Electrophoresis).....	18
4.3.6 轉漬法(Transfer) .....	19
4.3.7 免疫墨點法(Immunoblot).....	19
4.4. 基因轉染(Cell transfection).....	19
4.5. 流式細胞儀(Flow cytometry analysis).....	20
4.5.1 細胞凋亡分析(Annexin V dead cell assay).....	20
4.5.2 自噬分子螢光分析(Flow cytometry analysis of LC3).....	21
4.5.3 細胞存活率測試(Cell viability assay) .....	22
4.6. 裸鼠移植性腫瘤試驗(Xenograft tumor studies) .....	22
4.6.1 動物處理.....	22
4.6.2 體重及飲食.....	23
4.6.3 組織病理切片及染色(Hematoxylin & eosin, H&E stain) .....	23
4.6.4 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry, IHC).....	24
4.6.5 組織細胞凋亡(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)染色.....	24

4.6.4 組織蛋白分析.....	25
4.7. 統計分析(Statistical analysis).....	25
第五章、結果與討論 .....	26
5.1 比較正常人類乳腺細胞 M10 及人類乳腺癌細胞 MCF-7 兩者之 TrkB 表現量，以及棉黃素對於 TrkB 之影響 .....	26
5.2 探討棉黃素對於 TrkB 過量表現之 MCF-7 細胞凋亡和自噬之影響 .....	27
5.3 探討棉黃素對於動物移植性腫瘤試驗之評估.....	28
5.4 探討棉黃素對於異種移植腫瘤之細胞增生和凋亡之影響.....	29
5.5 探討棉黃素對於異種移植腫瘤之 TrkB 訊息路徑、細胞凋亡和細胞自噬相關分子之影響 .....	30
5.6 總結與未來研究方向 .....	30
第六章、參考文獻 .....	32
第七章、圖表.....	36

# 圖表目錄

附圖 1: 研究動機 .....	4
附表 1: separating gel 配方 .....	18
附表 2: stacking gel 配方 .....	18
Figure 1. The expression of TrkB in normal mammary epithelial M10 cells <i>versus</i> breast cancer MCF-7 cells, and effect of GTIN on TrkB/Akt signaling in MCF-7 cells.....	36
Figure 2. Effects of TrkB expression vector on GTIN-regulated cell apoptosis and autophagy. ....	37
Figure 3. Effect of GTIN on xenograft tumor in Balb/c nude mice. ....	41
Figure 4. Effect of GTIN on cell proliferation and apoptosis <i>in vivo</i> .....	44
Figure 5. Effect of GTIN on TrkB/Akt signaling, apoptotic factors, and autophagic factors <i>in vivo</i> . ....	46
Figure 6. Schematic representation of TrkB-antagonist potential of GTIN <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . ....	48

# 摘要

棉黃素(gossypetin, GTIN)屬於類黃酮(flavonoid)之天然物，源自於錦葵科洛神和棉花植株中的成分，過去研究指出 GTIN 具有抗菌、抗動脈硬化和抗癌的活性，然而其對於抗乳癌(breast cancer)之功效仍尚未釐清。本文除延續先前實驗室研究已知 GTIN 具有促進人類乳腺癌 MCF-7 細胞凋亡(apoptosis)及抑制保護性自噬(autophagy)之作用，進一步釐清作為酪胺酸受體激酶 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB)拮抗劑之 GTIN 在其中所調控之分子標靶。首先，利用西方點墨法確認 MCF-7 相較於正常人類乳腺細胞 M10 具有較高的 TrkB 及其下游分子 Akt 蛋白表現量，且 MCF-7 細胞會隨著 GTIN 處理濃度增加，細胞內 TrkB 和 Akt 蛋白表現量也隨之降低。再以細胞轉染(cell transfection)的方式使 MCF-7 過量表現 TrkB，並利用細胞凋亡試驗 Annexin V (annexin V death cell assay)雙染證實在 TrkB 過量表現的情況下，GTIN 促進細胞凋亡更加明顯。進一步，以細胞自噬相關試驗 LC3 螢光分析(LC3 immunofluorescence assay)顯示 TrkB 表現過量具增強細胞自噬反應；加入 GTIN 後可降低 TrkB 所誘發之細胞自噬表現，而且在同樣細胞轉染的條件下分析細胞存活也得到與細胞自噬一致的結果。接著透過裸鼠移植性腫瘤試驗模式，GTIN 對於 MCF-7 細

胞移植誘導裸鼠腫瘤生長具有相當程度的抑制作用，後續將腫瘤切片進行增殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)組織免疫染色以及分析細胞凋亡 TUNEL 染色，GTIN 組別之裸鼠腫瘤組織細胞增生表現減少，其凋亡表現則明顯增加。最後以西方點墨法證實移植 MCF-7 之腫瘤在 GTIN 的影響下，除明顯抑制 TrkB 和 Akt 路徑，也具有提高細胞凋亡蛋白表現和降低細胞自噬之蛋白表現量。綜觀上述結果，GTIN 能夠藉由標靶 TrkB，抑制 MCF-7 細胞自噬作用，並促進細胞凋亡，達到抑制乳癌細胞的增生，由此證實 GTIN 對於抗乳癌之潛力。

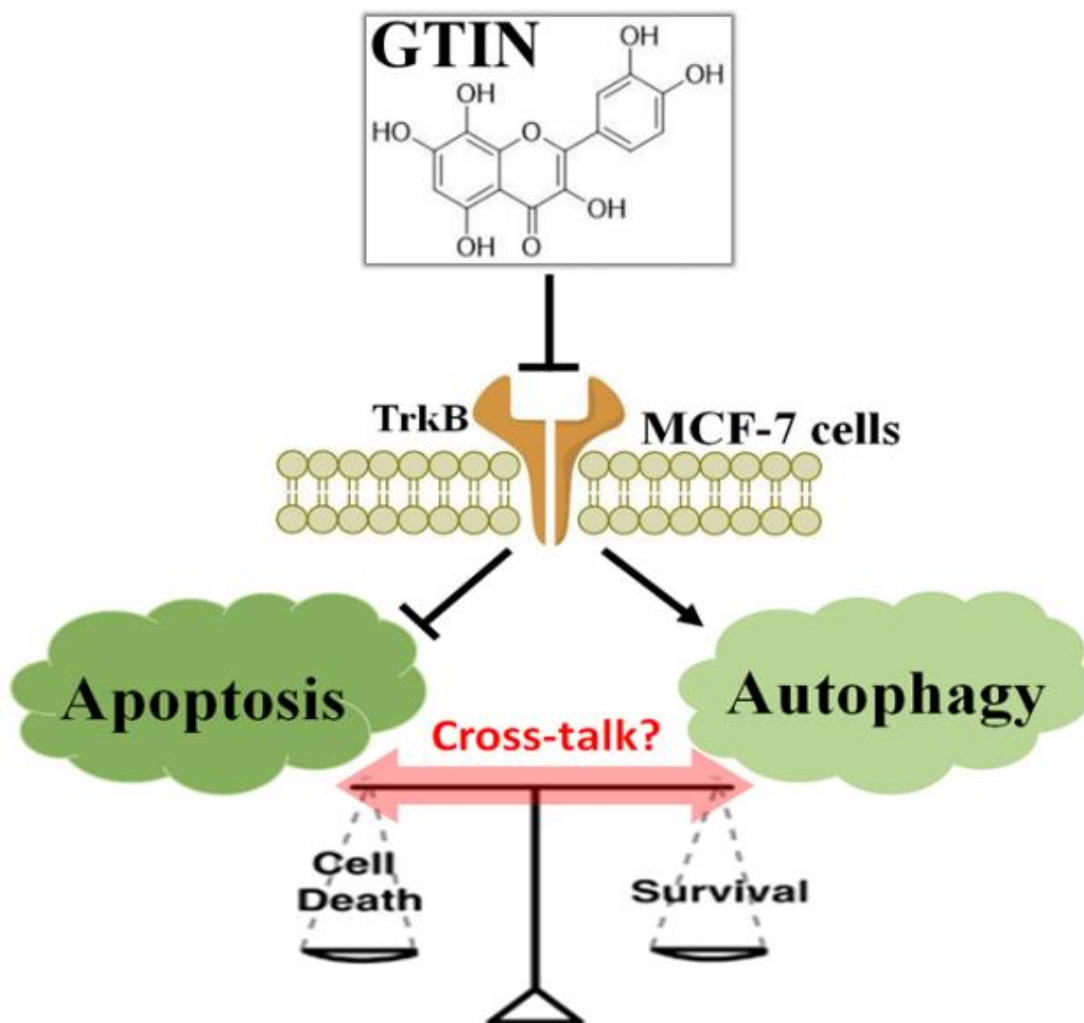
關鍵字: 棉黃素(gossypetin, GTIN)、乳癌(breast cancer)、細胞凋亡(apoptosis)、細胞自噬(autophagy)、酪胺酸受體激酶 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB)



# 第一章、研究動機與研究問題

現今乳癌(breast cancer)發生率在全世界逐年提高<sup>[1]</sup>，在國內則根據衛福部統計資料顯示，乳癌成為台灣女性好發率逐年上升的癌症，2017年女性罹癌死亡率更只僅次於肺癌、肝癌、大腸直腸癌，位居第四。目前乳癌常見的治療方法包括手術治療、化學治療、放射線治療及荷爾蒙治療，但根據不同型態特性的乳癌，治療的效果可能會有所不同及具一定程度的副作用，且藥物的開發十分耗時耗財<sup>[2]</sup>，因此，近年來以尋求植物萃取物或天然物成份來抑制或延遲癌症發生成為研究的重點。許多源自蔬菜和水果等天然植物中的類黃酮(flavonoid)成份，過去研究證實具有抗氧化和抗乳癌之活性，且對人體也較無副作用產生<sup>[3,4]</sup>。而本文擬探討一種六烴基黃酮物質-棉黃素(gossypetin, GTIN)是否具有抗乳癌之功效及其分子標靶之釐清，延續先前實驗室研究已知 GTIN 具有促進人類乳腺癌 MCF-7 細胞凋亡(apoptosis)及抑制保護性自噬(autophagy)之作用<sup>[5]</sup>，而本篇更進一步研究作為酪胺酸受體激酶 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB)拮抗劑之 GTIN 在其中所調控之分子標靶，探討於 TrkB 訊息傳遞路徑之影響(附圖一)。同時透過裸鼠體內移植性腫瘤試驗，確認 GTIN 抑制活體乳癌細胞生長之功效。

附圖 1：研究動機



## 第二章、文獻回顧與探討

### 2.1. 乳癌(Breast cancer)

#### 2.1.1 簡介

乳癌(breast cancer)是乳房組織產生惡性腫瘤，通常由乳腺管或是乳葉的內皮細胞異常分化，其特徵包括乳房產生腫塊、乳頭出現分泌物或是皮膚出現紅色鱗屑狀斑塊。除了硬塊外，乳癌的徵兆還包括組織增厚，單邊乳房變大或下垂，乳頭移位、變形或凹陷，皮膚起皺凹陷，乳頭上或周圍起疹，乳房或腋窩某部位疼痛，腋窩或鎖骨周圍腫大<sup>[6]</sup>。家族史中有乳癌病史、月經初潮年齡早、肥胖、脂肪飲食、生活壓力皆為乳癌的高風險群，發病危險率也相對提升<sup>[7]</sup>。

#### 2.1.2 乳癌分類

乳癌依據組織學的分類可分成腺管癌(ductal carcinoma)及小葉性癌(lobular carcinoma)，腺管癌可分成浸潤型腺管癌(infiltrating ductal carcinoma)及乳腺管原位癌(ductal carcinoma in-situ)，又以浸潤型腺管癌佔大宗<sup>[8]</sup>，而此型為本次實驗所選用的細胞株。透過細胞學分類也大致指出乳癌細胞上三個重要受體：動情激素受體(estrogen receptor, ER)、黃體素受體(progesterone receptor, PR)、第二型類表皮生長因子受體(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)。由此可知乳癌會受到賀爾蒙調控刺激而加速生長<sup>[9]</sup>，本次實驗使用之 MCF-7 細胞

株種類即為 ER(+)、PR(+)、HER2(-)基因型。

### 2.1.3 臨床治療與不同細胞株之差異

現今乳癌治療多半是先採手術切除，再加上輔助療法，而化學療法是最常見的方式之一，主要的目的在於降低乳癌之復發率與死亡率。一般 ER 和 PR 應該都是呈陽性表現，可以使用目前臨床已廣泛使用的賀爾蒙拮抗劑 tamoxifen<sup>[10]</sup>，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<sup>[11]</sup>。針對研究計畫所採用的 ER(+)、PR(+)、HER2(-)乳癌細胞株，臨床治療除了手術之外，以化療的內分泌賀爾蒙治療為主，因此本文後續動物實驗中以 tamoxifen 作為臨床藥物對照組。

## 2.2. 酪胺酸受體激酶 B (Tropomyosin receptor kinase B, TrkB)

### 2.2.1 分子簡介

酪胺酸受體激酶(tyrosine receptor kinase)家族是參與細胞生長、分化、存活和修復過程的主要調控者。本篇欲探討酪胺酸受體激酶 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB)即屬於酪胺酸激酶家族蛋白之一，其主要功能為調節哺乳動物的神經可塑性和突觸強度，作為調節細胞生長之相關分子<sup>[12]</sup>。

### 2.2.2 分子機制

目前有研究指出當細胞內 TrkB 被活化時，引發 TrkB SH2 domain 上 Y515 和 Y816 自體磷酸化，Y515 的磷酸化會使 TrkB 和下游訊息傳遞分子 Shc 結合，進而正調控下游的 Ras-Raf 以及磷酸肌醇 3-激酶 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/ protein kinase B (PKB，別稱 Akt) 路徑，促使細胞增生；而 Y816 的磷酸化會使 TrkB 和磷脂酶 (phospholipase, PLC $\gamma$ ) 結合，並進而正向調控下游的其它蛋白激酶 PKC 和 calmodulin kinases (CaMKs) 訊息傳遞，使突觸增強或增加神經可塑性<sup>[13]</sup>。

### 2.2.3 受體酪胺酸激酶 B 與癌症之相關性

TrkB 經常會選擇性地使惡性腫瘤細胞發生改變，這使得其成為目前臨床上治療的一大目標。另外，在近幾年的研究也發現 TrkB 和神經滋養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)也和多種癌症有強烈的相關性，例如：神經母細胞瘤(neuroblastoma)<sup>[14]</sup>、乳癌<sup>[15]</sup>及頭頸部惡性腫瘤<sup>[16]</sup>...等。活化的 TrkB 會正向調控多種下游訊號傳遞，例如：PI3K/Akt、Ras-Raf、PLC $\gamma$  和表皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor, EGFR)的基因轉錄，進而調控細胞的生長、存活、遷移和上皮間質轉化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，甚至對化療藥物產生抗性<sup>[17]</sup>。

## 2.3. 細胞凋亡(Apoptosis)

### 2.3.1 簡介

細胞凋亡(apoptosis)屬於細胞程序性死亡(cell programmed death)，它是一種多細胞生物中的細胞按照預定程序集體自殺的行為，也是接受到訊號後所自行調控死亡的機制<sup>[18]</sup>。當細胞受刺激後，便會進行細胞分裂、細胞凋亡或移動，但有可能會進行異常，進而影響全身，這種不正常的細胞增生便有可能造成癌症，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，此機制是生命體之正常現象，亦是維持正常生命現象不可或缺的因素。

### 2.3.2 分子機制

細胞凋亡反應的發生有三種調控路徑，分別為外源性路徑、內在路徑以及蛋白激酶的調控。外源性路徑(extrinsic pathway)又稱死亡接受路徑(death receptor signal transduction)，由外界或免疫系統傳達訊號分子所傳遞，其可分為死亡接受器 Fas-Fas ligand 誘導機制啟動下游 Fas-associated death domain (FADD)蛋白，進而開啟半胱氨酸凋亡蛋白酶(cysteiny l aspartate-specific proteases, caspase) 8，活化下游 caspase-3 或經由裂解粒線體功能蛋白 Bid，走向粒線體相關路徑<sup>[19]</sup>，最終導致細胞凋亡。內在調控路徑(intrinsic pathway)依據有無半胱氨酸 caspase 的參與分為 caspase-dependent pathway 及 caspase-independent pathway，

前者引起的凋亡為細胞受到細胞外或是細胞內的壓力及傷害，藉由一群在粒線體膜上與細胞質之間的蛋白調控，而此路徑中 Bcl-2 位於粒線體膜的外層，調控細胞的存活。另外，caspase-independent pathway 指粒線體的通道發生改變，會從粒線體膜間腔釋出分子 apoptosis inducing factor (AIF)及 endonuclease G (Endo G)。AIF 經細胞質最後到細胞核，誘導染色質濃縮，Endo G 被活化後會進行轉位(translocation)由粒線體膜間空腔進入細胞核，執行 nuclease 的功能將 DNA 分解。最後，蛋白激酶的調控則透過細胞膜上的生長因子受器如 TrkB，當其接受生長因子進而調控下游蛋白激酶 Akt，使其磷酸化變成 p-Akt，並磷酸化下游路徑訊息分子 Bad，最後達到阻斷細胞凋亡的反應<sup>[20]</sup>。

### 2.3.3 細胞凋亡與癌症之相關性

細胞凋亡相對於細胞壞死是屬於主動發生的，更是常見的細胞死亡形式。免疫系統會對於功能喪失或是具有潛在危險的細胞進行選擇與淘汰，當不健康的細胞被選擇後，細胞呈現核染色質濃縮至破裂並分解成許多碎片，最後被巨噬細胞吞噬並清除。目前已有研究顯示可利用去甲基化的方式促進人類乳突病毒引發相關的頭頸部癌之細胞凋亡，藉此促進細胞死亡<sup>[21]</sup>。針對霍亂弧菌所分泌的血球凝集水解酶可以誘導乳癌細胞走向活性氧(reactive oxygen species, ROS)途徑，並使細胞凋亡<sup>[22]</sup>。

## 2.4. 細胞自噬(Autophagy)

### 2.4.1 簡介

細胞自噬(autophagy)是一個涉及到細胞自身結構通過溶酶體機制而被分解的過程，此步驟是細胞生長、發育與穩態中的常規步驟，它幫助細胞產物在合成、降解以及接下來的循環中保持一個平衡狀態 [23]。

### 2.4.2 分子機制

當細胞營養不足時，此時細胞內的蛋白質與脂質會先形成旋月狀的雙層膜吞噬小泡(phagophore)，將受損的蛋白質包圍起來，形成自噬小體(autophagosome)，最後自噬小體的外層膜會與溶小體(lysosome)的膜融合形成自噬溶小體(autolysosome)，再藉由溶小體內釋放的水解酵素去分解老舊胞器以及蛋白質，使其變成小分子物質，以完成自噬作用 [23]。目前研究已知小分子激活劑(activator)會誘導三重陰性乳腺癌(triple negative breast cancer)細胞中自噬激活激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1)去調節細胞自噬相關死亡程式 [24]，而巴黎皂苷(Paris saponin)則會誘導乳腺癌細胞自噬朝向 Akt/mTOR 信號路徑以促進細胞凋亡 [25]。細胞自噬過程中主要是藉由微管相關蛋白 1 輕鏈 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 以及 class III PI3K/Beclin-1 路徑所誘發，而其餘參與此過程的蛋白為 Atgs



(autophagy-related gene)，包含 Atg4、Atg12、Atg16，以及 Atg5/12 conjugate 等。

### 2.4.3 細胞自噬與癌症之相關性

細胞自噬能夠透過溶小體將細胞內蛋白和胞器進行降解，具有維持細胞平衡及存活的重要功能，若失去此作用則會引發許多疾病。在過去的研究中提到，對不同路徑的酪胺酸受體激酶而言，細胞自噬的功能也就有所不同，如：EGFR、HER2、FGFR 等分子會抑制細胞自噬的功能<sup>[26,27]</sup>；相反地，Axl、ErbB3/ErbB4、TrkA 等分子具有能夠促進細胞自噬的能力<sup>[28,29]</sup>，先前有研究利用果蠅來觀察細胞自噬促使腫瘤生長之實例<sup>[30]</sup>。而本篇實驗欲探討細胞自噬是否作為一保護機制，成為腫瘤和細胞基質間的橋樑，可促進癌細胞的生長，並提供癌細胞營養的微環境。

## 2.5. 棉黃素(Gossypetin, GTIN)

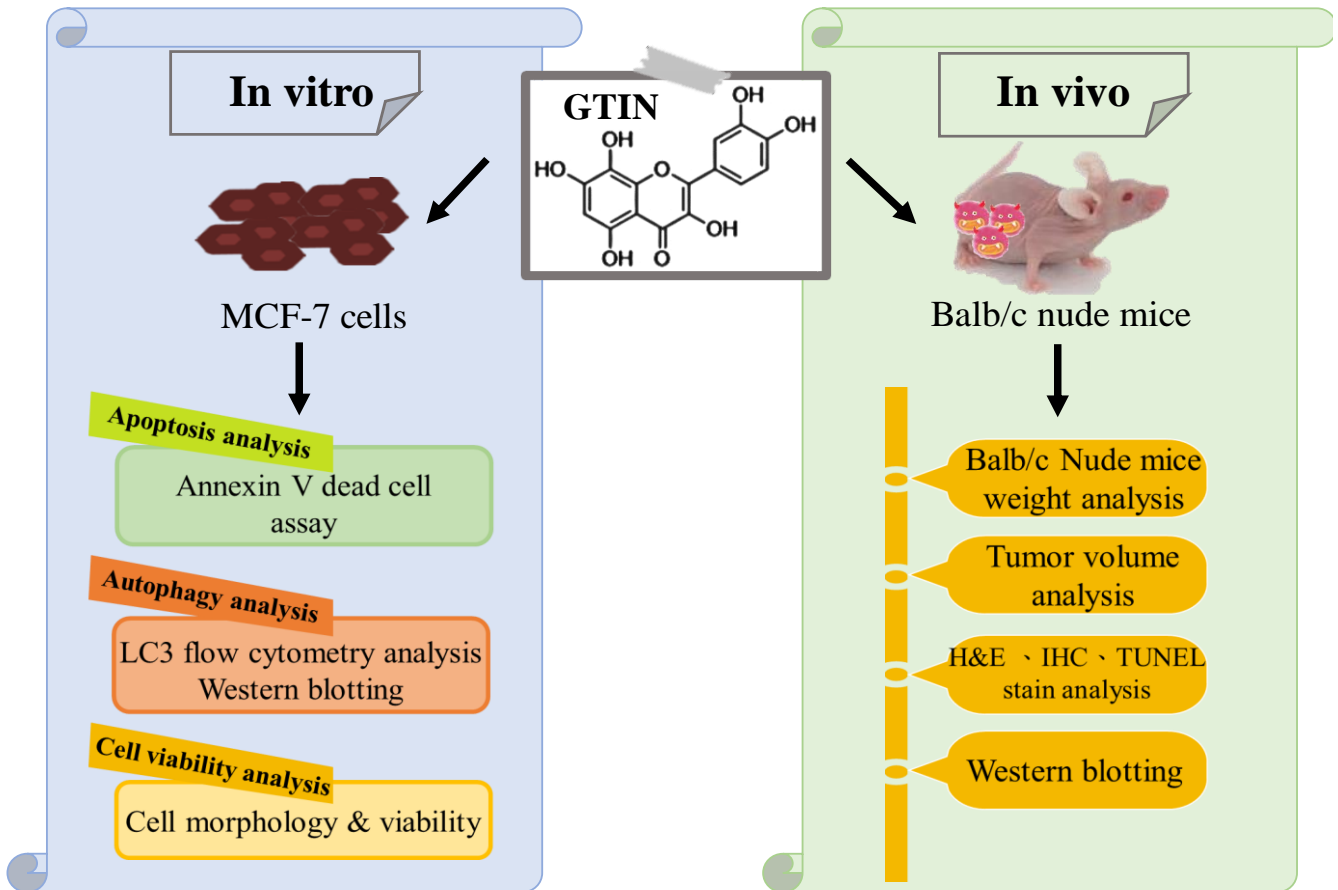
### 2.5.1 簡介

棉黃素(gossypetin, GTIN)也稱為 3,5,7,8,3',4'-六羥基黃酮，屬於黃酮醇類(flavonol)，歸類為一種類黃酮(flavonoid)物質。GTIN 一詞取自於其被發現可在黃色棉花的花瓣中萃取分離，而 GTIN 也源自於洛神植株的花朵和花萼中。

## 2.5.2 已知功效

已知其他類黃酮天然物包含槲皮素(quercetin)和山柰酚(kaempferol)等，過去研究發現此類物質具有抗癌的功效<sup>[31,32]</sup>。但目前針對 GTIN 與癌症相關的研究仍為少數，僅有研究顯示 GTIN 具有抗前列腺癌的潛力<sup>[33]</sup>，以及很強的抗菌活性<sup>[34]</sup>，也有研究發現 GTIN 可作為 TrkB 的拮抗劑<sup>[35,36]</sup>。近年來，研究更進一步指出 GTIN 具有抗氧化與抗動脈粥狀硬化等功效<sup>[37]</sup>，最新研究亦提出 GTIN 可作為咽喉癌生長的抑制劑<sup>[38]</sup>。因此，本文擬探討 GTIN 是否能夠經由標靶 TrkB 以達到調控乳癌細胞凋亡及自噬作用，進而抑制癌細胞的生長。

### 第三章、實驗架構與流程



## 第四章、研究方法與步驟

### 4.1. 棉黃素之製備

棉黃素(gossypetin, GTIN)購於 Sigma，實驗以 100 mg GTIN 粉末溶於 DMSO 中，配製成 1 M。其後避光並於冰箱-20°C保存。

### 4.2. 細胞培養(Cell culture)

#### 4.2.1 細胞株來源

本實驗使用之正常人類乳腺細胞 M10 及人類乳癌細胞株 MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7)皆源自於台灣食品工業發展研究所 (Food industry research and development institute, R.O.C)

#### 4.2.2 培養條件

實驗細胞株(M10 和 MCF-7)皆培養於 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C無菌恆溫培養箱中，每日於顯微鏡下觀察，再依據其生長速度更換培養液，原則上兩天更換一次。細胞培養及加藥均在無菌環境下完成。人類乳腺正常細胞 M10 是利用 MEM $\alpha$ 培養液外加 10% fetal bovine serum (FBS)、1% penicillin/streptomycin、2.2 g/L sodium bicarbonate。MCF-7 細胞培養液為 Minimum Essential Media (MEM)，額外加入 10% FBS、1% penicillin/streptomycin、2 mM L-glutamine、2.2 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)以及 1.0 mM sodium pyruvate。

### 4.2.3 繼代培養

當細胞生長至八至九分滿時，移除培養液並以 PBS 潤洗 flask 兩次，再加入 trypsin-EDTA (1 ml/25 T flask 或 2 ml/75 T flask)，於 37°C 無菌恆溫箱反應 5 分鐘後，以兩倍新鮮培養液中中和 trypsin-EDTA 的作用，並將細胞沖洗下來，離心 1200 rpm 5 分鐘，去除上清液後加入適量新鮮培養液，並移入新的 flask 中，置於含 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 無菌恆溫培養箱。

### 4.2.4 細胞飢餓處理

將長滿貼附於 75 T 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% CO<sub>2</sub> 的 37°C 無菌恆溫培養箱中反應 5 分鐘，加入 2 ml 培養液回溶以中止反應，離心 1200 rpm 5 分鐘，將上清液倒掉，用 10 ml 培養液回溶，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% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 的 37°C 無菌恆溫培養箱中生長。

### 4.2.5 細胞加藥處理

將細胞種植於 6 well 孔盤中培養 24 小時，待細胞貼附後，加入

starvation medium 進行飢餓處理，放回 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中 24 小時，再將培養液換回 10% FBS MEM medium，並分別加入不同劑量的 GTIN 處理，再放置 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長 24 小時。

### **4.3. 西方點墨法(Western blotting)**

#### **4.3.1 萃取蛋白**

將 MCF-7 細胞在 75 cm<sup>2</sup> 的 flask 中培養至八分滿，吸去 flask 內的溶液，加入 PBS 清洗細胞後，加入 2 ml trypsin 使細胞懸浮，置於 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養 5 分鐘，之後加入 4 ml medium 終止反應，將 flask 內的溶液全部吸入 15 ml 離心管內，離心 1200 rpm 五分鐘，倒去上清液，加 5ml medium 回溶並混合均勻，吸取 10 ul 細胞溶液至 10 ul 的 trypan blue 染色，進行細胞計數，取適當的細胞溶液加至含 10 ml medium 的 10 cm dish，培養 24 小時，以 PBS 清洗後，進行飢餓(starvation)處理 24 小時後，再投予特定濃度之 GTIN 處理 24 小時，之後去除培養液以 PBS wash，再以 trypsin 使細胞脫落，收取細胞溶液以 1200 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後再用 PBS 以 1200 rpm 離心 5 分鐘並 wash 3 次，去除上清液後再加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris-base，pH 7.5 內含 1 mM sodium orthovanadate、100

$\mu\text{g}$  PMSF、 $170 \mu\text{g/ml}$  leupeptin) 使細胞均勻散佈其中，再加入蛋白酶抑制劑，於  $4^{\circ}\text{C}$  研磨 2 到 3 小時，並於  $4^{\circ}\text{C}$  下、 $12000 \text{ rpm}$  離心 10 分鐘，離心後保留上清液的部分。

#### 4.3.2 蛋白質定量

接續以 Pierce™ BCA Protein Assay Kit 測定樣品蛋白之濃度，將試劑 A、B 以 50:1 之比例配置，又蛋白質在鹼性下會將二價銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 還原成一價銅離子 ( $\text{Cu}^{+}$ )， $\text{Cu}^{+}$  會與 BCA (bicinchoninic acid) 試劑結合形成藍色複合物，加入試劑後以  $37^{\circ}\text{C}$  下避光反應 30 分鐘至 ELISA reader ( $562 \text{ nm}$ ) 測定吸光值，並依其標準品各濃度所測出數值畫出標準曲線，將未知濃度之蛋白值所測出數值代入公式，即可換算得知其蛋白濃度。

#### 4.3.3 蛋白樣品(sample)製備

取適量已經定量完的蛋白，以二次去離子水將蛋白補至相同體積 ( $16 \mu\text{l}$ )，再加入  $4 \mu\text{l}$  5X loading dye 均勻混合，以  $100^{\circ}\text{C}$  乾式加熱器加熱 10 分鐘，使蛋白質變性後放置於冰上 10 分鐘(需馬上置於冰上冷卻)，然後離心備用。

#### 4.3.4 鑄膠(Denatured-PAGE)

將  $1.5 \text{ mm}$  厚、薄玻璃片清洗並用拭鏡紙擦拭乾淨，置於架膠台上，先在玻璃夾層中加入已配置好的 separating gel (附表 4)，並加入 35%

酒精將下膠緊密壓平，待膠凝固後將酒精去除，接著加入已配置好的 stacking gel (附表 5)，並插入 15 well 齒梳，等待膠完全凝固即可移除齒梳備用。

**附表 1：separating gel 配方**

10% separating gel (15 mL，兩片量)	
ddH <sub>2</sub> 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 2：stacking gel 配方**

3% stacking gel (4 mL，兩片量)	
ddH <sub>2</sub> 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

#### 4.3.5 電泳法(Electrophoresis)

把已經配置好的 sample 依序加入齒梳洞內並利用 60 V 電壓使樣品集中，以 80 V 電壓進行分離，使蛋白依分子量不同而分離。



#### 4.3.6 轉漬法(Transfer)

電泳完畢後取出膠體，去除 stacking gel 後以 100 V 電壓進行 transfer 80 分鐘，使蛋白從凝膠上轉印 (transfer) 到硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane, NC membrane)。

#### 4.3.7 免疫墨點法(Immunoblot)

取出硝化纖維膜並以麗春紅(ponceau S)染色，裁剪出所要觀察的部分，再以 TBS 清洗乾淨並加入 5%脫脂牛奶進行 blocking 1 小時，去除非特異性鍵結，接著以 TBST(TBS+ 0.1% tween 20) wash 3 次洗去非特異性鍵結並加入一級抗體，置放於 4°C rotator 隔夜。回收一級抗體再以 TBST wash 3 次去除非特異性鍵結後加入二級抗體於 4°C rotator 反應 1 小時，再次利用 TBST wash 3 次後，用顯影劑 ECL(將 HRP substrate peroxide solution 與 HRP substrate luminol solution 以 1 : 1 等比例混合均勻)完整覆蓋硝化纖維膜，並使用冷光儀(GE ImageQuant LAS 4000 mini)拍攝結果觀察蛋白質表現量。

#### 4.4. 基因轉染(Cell transfection)

在 6 well 的培養皿中在 1-3 皿中接種  $10^5$  個 MCF-7 細胞，等待細胞貼附 24 小時，再進行質體轉殖實驗。準備兩管已滅菌的微量離心管，每一管各加入 100  $\mu$ l 不含抗生素與血清的培養液，其中一管加入 2  $\mu$ g DNA (FNpcDNA 或 pcDNA TrkB)，另一管加入 5  $\mu$ l

LIPOFETAMINE reagent，再將兩管混合在一起，利用 pipetman 吸放混合，增加 DNA 和 liposome 的碰撞機率，並於室溫下的無菌操作檯上靜置 45 分鐘，讓 DNA 和 liposome 形成聚合體。此時利用 2 ml 不含抗生素與血清的培養液浸潤細胞，並置入 37°C 培養箱中培養。當 DNA 和 liposome 作用時間到時，於混合液中加入 0.8 ml 不含抗生素與血清的培養液。並去除培養皿中的培養液，加入 1 ml DNA 和 liposome 的混合液，放進 37°C 培養箱中，進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，去除培養皿中的培養液，加入 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 12 小時後加入 1 ml GTIN (100  $\mu$ M)，放置 37°C 培養箱中處理 24 小時。

#### **4.5. 流式細胞儀(Flow cytometry analysis)**

##### **4.5.1 細胞凋亡分析(Annexin V dead cell assay)**

將細胞接種於 12 well 培養盤中每個 well 種入約  $4 \times 10^4$  顆細胞並使其均勻分散於培養盤中，培養於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫之培養箱中 24 小時後，並以 vector (FNpcDNA) 作為對照組，利用 TrkB vector (pcDNA-TrkB) 組別進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，更換成 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 12 小時後加入 1 ml GTIN (100  $\mu$ M)，放置 37°C 培養箱中。24 小時後，吸去上清液，並使用 300  $\mu$ l trypsin 使細胞脫

落，利用 300  $\mu$ l PBS 回溶以中止反應，離心 1200 rpm 5 分鐘後去除上清液，利用 PBS wash 1-2 次，去除 PBS 後取出 100  $\mu$ l 細胞懸浮液加入 100  $\mu$ l 商業用套組的 Annexin V Dead Cell Reagent 在室溫下避光 20 分鐘即可進行流式細胞儀之分析。

#### 4.5.2 自噬分子螢光分析(Flow cytometry analysis of LC3)

將 MCF-7 細胞培養在 12 well 培養盤中，每個 well 種植  $3 \times 10^4$  顆 MCF-7 細胞。第一組以 vector (FNpcDNA) 作為對照組，第二組以 TrkB vector (pcDNA-TrkB) 進行轉殖作用。轉殖 12 小時後，移除上清液，換成 1 ml 含 20% 血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 12 小時後加入 1 ml GTIN (100  $\mu$ M)，放置 37°C 無菌恆溫培養箱中，培養 24 小時，並在加藥第 22 小時時加入 Muse® Autophagy LC3 Kit (Antibody-Based) reagent A 1  $\mu$ l/well，再放回培養箱中繼續培養。加藥處理滿 24 小時，去除上清液、加入 PBS 1 ml/well 清洗、移除後，加入 0.25% trypsin-EDTA 300  $\mu$ l/well 並放入烘箱中 5 分鐘使細胞脫落，再加入等量的 PBS 終止反應。收取細胞後以 1200 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液。加入 Muse® Autophagy LC3 Kit (Antibody-Based) reagent B (原液 10X 以 1:9 用二次水稀釋) 95  $\mu$ l 以及 antibody 5  $\mu$ l 均勻混合，並在冰上避光靜置 30 分鐘。反應完成後以 1200 rpm 離心 5 分鐘後除去上清液，加入 Muse®

Autophagy LC3 Kit (Antibody-Based) assay buffer 200  $\mu$ l (原液 5X 以 1:4 用二次水稀釋)混合均勻後，之後以流式細胞儀(Muse™)分析 LC3 螢光表現。

#### 4.5.3 細胞存活率測試(Cell viability assay)

在 6 well 的培養皿中種植  $10^5$  個細胞，等待細胞貼壁 24 小時，以 vector (FNpcDNA)作為對照組，另一組以 TrkB vector (pcDNA-TrkB)進行轉殖。待轉殖 12 小時後，更換成 1 ml 含 20%血清但不含抗生素的培養液，24 小時後，換成完整的培養液。依細胞生長的狀況，在 12 小時後加入 1 ml GTIN (100  $\mu$ M)，放置 37°C 培養箱中。24 小時後，去除上清液，並使用適量 trypsin 使細胞脫落，利用 PBS 回溶以中止反應，將溶液加入 eppendorf 內離心 1200 rpm 5 分鐘，去除上清液加入 400  $\mu$ l PBS 回溶，利用 8  $\mu$ l PI 染劑避光染色 5 分鐘，進行流式細胞儀之分析實驗。

### 4.6. 裸鼠移植性腫瘤試驗(Xenograft tumor studies)

#### 4.6.1 動物處理

以 Balb/c 裸鼠進行實驗，共 20 隻小鼠入室適應 5 天後，將其隨機分配三組。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將裸

鼠隨機分為三組，並分別餵食標準飼料(第一組)及標準飼料分別加入 GTIN (第二組)和臨床乳癌藥物 tamoxifen (Tam) (第三組)，並依每日每隻餵食 5 g 飼料之比例。其中第二組飼料含 30 mg/kg GTIN、第三組含 4 mg/kg Tam<sup>[39]</sup>，實驗為期 30 天。實驗過程中定期記錄動物飲食、體重及量測腫瘤大小的變化。30 天後動物禁食一夜後犧牲，犧牲後取出實驗動物之腫瘤秤重和拍照記錄，腫瘤組織一份直接固定在 10%福馬林固定後以石蠟包埋，以組織切片和染色觀察病灶。另一部分直接冷凍在-80°C 備用進行後續相關實驗分析。

#### 4.6.2 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。

#### 4.6.3 組織病理切片及染色(Hematoxylin & eosin, H&E stain)

首先將老鼠犧牲後，迅速取一小部分臟器，置於10%福馬林中固定，製成病理切片。其切片製作過程固定→脫水→澄清→浸潤→包埋→連續切片→染色→封蓋，然後利用二甲苯→序列酒精(100%、95%、75%)脫蠟，用二次水清洗，再以 Mayer's hematoxylin 反應 5 分鐘後二次水清洗，加入 eosin solution 反應 1 分鐘，以 95%、100%酒精及二甲苯脫水，進行組織染色，觀察腫瘤浸潤(infiltration)之情形。

#### 4.6.4 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry, IHC)

先以二甲苯浸泡玻片5分鐘，接著依序浸泡100%酒精5分鐘、95%及75%酒精3分鐘，最後以二次水浸泡3分鐘進行脫蠟。以3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol反應10分鐘，再加入0.1% trypsin於室溫下搖晃反應10分鐘(20 rpm)。以0.15 M PBS清洗3次，每次3分鐘。將玻片放置於保濕盒中，加入100 µl的3 % BSA並在室溫下搖晃(20 rpm)反應1小時進行blocking。以PBS清洗3次，每次3分鐘，加入100 µl以1% BSA配置的一級抗體並在4°C搖晃16小時。以PBS清洗3次，每次5分鐘，加入100 µl由1% BSA配製的二級抗體並在室溫下搖晃(20 rpm)反應1小時。以PBS清洗3次，每次3分鐘。加入100 µl HRP-streptavidin solution在室溫下搖晃反應10分鐘(20 rpm)。以PBS清洗3次，每次3分鐘後加入DAB reagent呈色，輕輕搖晃直到組織出現黃褐色，再以二次水清洗去除多餘的DAB reagent。加入Hematoxylin reagent搖晃30秒並以PBS清洗去除多餘的試劑，再以二次水清洗3次，每次3分鐘。依序以75%酒精、95%酒精、100%酒精、100% xylene浸泡3分鐘脫水。待xylene揮發即可用阿拉伯膠封片，靜置24小時後使用顯微鏡拍照分析。

#### 4.6.5 組織細胞凋亡(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)染色

先將石蠟組織進行脫蠟處理(二甲苯→100%乙醇→90%乙醇→

80%乙醇→70%乙醇), 在組織表面覆蓋一層 PBS, 並使其置於室溫下風乾, 利用 proteinase K : 10 mM Tris pH 8.0 = 1:100 稀釋, 在檢體處滴上混合液, 並置於室溫 20 分鐘。PBS 洗去混合液, 將 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 覆蓋於檢體處, PBS wash 之後滴上 1X reaction buffer, 室溫等待 20 分鐘。PBS wash 後完加入 1X complete labeling reaction mixture 並於潮濕陰暗處反應 1.5 小時, 之後去除多餘液體並加入 blocking buffer 等 10 分鐘, 再加入 antibody solution 置於暗處反應, 利用 PBS wash 完再次加入 blocking buffer, 其後加入 conjugate 反應, 並以 PBS wash 加入 DAB solution, 反應完用 dH<sub>2</sub>O 洗去且立即滴上 methyl green counterstain solution 待 3 分鐘後除去, 之後即可封片在顯微鏡下進行觀察。

#### 4.6.4 組織蛋白分析

同上述實驗方法 4.3。

### 4.7. 統計分析(Statistical analysis)

實驗數據以 means ± SD 表示。以 Sigma Plot 10.0 軟體統計分析來評估統計差異。利用 t-test 來評估差異, 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 比較正常人類乳腺細胞 M10 及人類乳腺癌細胞 MCF-7 兩者之 TrkB 表現量，以及棉黃素對於 TrkB 之影響

首先，為探討人類正常乳腺細胞株 M10 及乳癌細胞株 MCF-7 之雌激素受體 (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ ) 及酪胺酸受體激酶 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB) 蛋白表現情形，透過西方點墨法 (Western blotting) 分析兩株細胞內 ER $\alpha$ 、TrkB 及其下游訊息傳遞分子 Akt 蛋白和磷酸化表現。Fig. 1A 初步結果除了確認於 MCF-7 細胞中有 ER $\alpha$  大量表現，也可發現 MCF-7 細胞相較於 M10 細胞會有較高的 p-TrkB/TrkB 比值表現，代表其 TrkB 磷酸化活性表現較高於 M10 細胞，而 TrkB 下游分子 Akt 也有類似之結果。

先前實驗室研究已知以不同濃度棉黃素 (gossypetin, GTIN) (0~250  $\mu$ M) 處理之 MCF-7 細胞會產生凋亡 (apoptosis) 的情形<sup>[5]</sup>，進一步利用此不同濃度 GTIN 處理 MCF-7 細胞，分析 GTIN 是否會調控細胞內 TrkB/Akt 路徑。Fig. 1B 結果可知隨著 GTIN 濃度的上升會使 p-TrkB/TrkB 和 p-Akt/Akt 兩者比值皆為下降，尤其是濃度在 100  $\mu$ g/ml 時會達到最高的抑制效果，此結論也呼應過去研究所發現 GTIN 可作為 TrkB 的拮抗劑<sup>[35,36]</sup>。



## 5.2 探討棉黃素對於 TrkB 過量表現之 MCF-7 細胞凋亡和自噬之影響

為探討 GTIN 是否可以透過抑制 TrkB 來達到促進 MCF-7 細胞凋亡的效果，藉由基因轉染(transfection)將帶有 TrkB 之質體 DNA (pcDNA-TrkB)送入 MCF-7 細胞內，促使細胞表現過量的 TrkB。並利用西方點墨法確認其相較於控制組(FNpcDNA)之 TrkB 蛋白表現量 (Fig. 2A)，由量化結果可看出控制組相比於 pc-DNA-TrkB 組別的 TrkB 蛋白表現量差異，TrkB 過量表現也抑制凋亡關鍵蛋白 cleaved-PARP-1 (poly [ADP-ribose] polymerase 1) 表現量，以及促進自噬蛋白 LC3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3) 之活化表現。當 pc-DNA-TrkB 組別細胞加入 GTIN 後除了會造成 TrkB 蛋白表現量下降，進而增加 cleavaed-PARP-1 表現和抑制 LC3II 蛋白表現量(Fig. 2A)。同樣地，透過細胞凋亡試驗 Annexin V dead cell assay 可得知在控制組之 GTIN 具有誘發細胞凋亡作用，呼應之前實驗室之研究結果<sup>[5]</sup>；而 pcDNA-TrkB 組別在處理 GTIN 之下，其仍會造成細胞凋亡的比例上升(Fig. 2B)。

進一步，利用細胞自噬試驗-自噬分子螢光分析(Flow cytometry analysis of LC3)分析 GTIN 對於 TrkB 過量表現之 MCF-7 細胞自噬 (autophagy)之影響。在控制組細胞處理 GTIN 確實具有抑制細胞自噬

之作用，可能藉此降低 MCF-7 細胞存活率<sup>[5]</sup>；反觀於 pcDNA-TrkB 組別之 LC3II 螢光強度則有增加的趨勢，加入 GTIN 後可顯著降低 TrkB 所誘發之細胞自噬表現(**Fig. 2C**)。由細胞存活率測試(cell viability assay)的結果也可觀察到相較於 FNpcDNA 組別而言，pcDNA-TrkB 組別具有促進細胞存活的趨勢，而 GTIN 加入後同樣具明顯降低 TrkB 所誘發之細胞增生(proliferation)的表現(**Fig. 2D**)，此結果與細胞自噬分析一致。綜合上述細胞凋亡、自噬及存活試驗之結果，可得知 TrkB 過量表現可能有助於抑制細胞凋亡、並促進細胞自噬和生長；GTIN 則具有拮抗 TrkB 的作用，而達到促進凋亡和抑制自噬表現，藉以發揮抗乳癌細胞生長之功效。

### 5.3 探討棉黃素對於動物移植性腫瘤試驗之評估

動物實驗以 MCF-7 細胞( $10^7$  cell/0.1 ml)植入於 BALB/c 裸鼠左右後腿兩側，注射後等待三週的成長期，再開始給予 30 mg/kg GTIN、臨床乳癌治療藥物 4 mg/kg tamoxifen (Tam) 餵食 30 天，並進行後續分析。初步結果顯示，GTIN 組與 Tam 組別之腫瘤目測體積相較控制組 (MCF-7 alone) 小(**Fig. 3A**)。從 **Fig. 3B** 可以觀察到裸鼠經 GTIN 餵食 24 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 天後可發現到給予 GTIN 的裸鼠組別，腫瘤生長幅度呈現平穩被抑制的狀態，腫瘤體積與控制組相比約小  $500 \text{ mm}^3$  (\*\* $p < 0.01$ )，

可知 GTIN 具有減緩活體內乳腺腫瘤增生的效果。

實驗並以每隔七天測量裸鼠體重，以評估各組之生理指數。由 **Fig. 3C** 統計測量結果可知，GTIN 組的裸鼠體重逐漸增加，在第 14 天體重明顯比第 0 天多出 1.5 g ( $^{\#}p < 0.05$ )，且持續餵食 GTIN 到第 28 天時可增加 3 g ( $^{\#\#}p < 0.01$ )，與 MCF-7 alone 控制組相比則無體重變化上之統計意義。Tam 組裸鼠隨著餵食臨床藥物天數增加，於第 14 天開始直至測量終止日，此組比控制組的裸鼠體重明顯下降 3~4 g ( $^*p < 0.05$ )。綜合 **Fig. 3B** 以及 **Fig. 3C**，可觀察到餵食 GTIN 組別的裸鼠約於第四周開始，腫瘤體積明顯下降( $^{**}p < 0.01$ )且體重持續穩定上升( $^{\#\#}p < 0.01$ )，可知 GTIN 可抑制腫瘤生長而不影響裸鼠之體重。

#### 5.4 探討棉黃素對於異種移植腫瘤之細胞增生和凋亡之影響

延續 **Fig. 3** 之腫瘤分析，**Fig. 4A** 針對腫瘤進行切片染色，透過 H&E (hematoxylin-eosin staining) 染色確認腫瘤浸潤情形，給予 GTIN 後和控制組之腫瘤浸潤程度相比有降低的趨勢。另以免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC) 分析增殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表現情形，確認 GTIN 可降低活體內乳癌細胞之增生作用，量化圖顯示約可降低 60%，給予 Tam 組別則降低約 10% (**Fig. 4B**)。進一步，以凋亡指標 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 進行特異性免疫組織化學染色 (**Fig.**

4A)。實驗結果發現 GTIN 試驗組與腫瘤控制組相比其 TUNEL 表現量上升 3.5 倍 (\* $p < 0.05$ ) (Fig. 4C)。此外，GTIN 試驗組比 Tam 臨床藥物組似乎具有較佳的抑制腫瘤增生及促凋亡的效果(Fig. 4)。

## 5.5 探討棉黃素對於異種移植腫瘤之 TrkB 訊息路徑、細胞凋亡和細胞自噬相關分子之影響

Fig. 5 顯示選取的實驗動物腫瘤組織進行西方墨點法，分析在體外試驗中，GTIN 所影響 TrkB 訊息路徑分子(TrkB 和 Akt)、凋亡相關蛋白(Bcl-2 和 caspase-3)，以及自噬相關蛋白(class III PI3K、Beclin-1 和 LC3)等表現是否也在活體腫瘤發揮相同調控效果。由結果可知，於體內試驗中 GTIN 組中可觀察到 p-TrkB/TrkB 和 p-Akt/Akt 比值與控制組相比皆為下降，上述抑制情形皆相較於臨床用藥 Tam 組來得顯著(Fig. 5A)。分析凋亡相關蛋白表現方面，結果顯示與腫瘤控制組相比，經 GTIN 處理的組別中其 Bcl-2 蛋白表現減少，而 caspase 3 之活化態蛋白(active-form)表現量呈現上升表現(Fig. 5B)。而在細胞自噬相關蛋白表現，class III PI3K、Beclin-1 和 LC3II 三者蛋白於 GTIN 組皆呈現顯著下降(Fig. 5C)。上述結果顯示 TrkB 訊息路徑、細胞凋亡和細胞自噬相關分子表現皆與細胞分析結果相符合。

## 5.6 總結與未來研究方向

對於患有乳癌且具有陽性雌激素接受體或黃體酮接受體反應的

患者，多會投予第一線荷爾蒙藥物，如 Tam 進行治療。Tam 的作用是抑制腫瘤細胞的生長而不是直接殺死腫瘤細胞，近年來產生此藥物衍生許多耐受性不良及抗藥性問題。因此，後續研究擬探討 GTIN 和 Tam 合併治療是否會產生更佳之抑癌效果，並研究兩者合併除了對於細胞存活之影響，也探討於 TrkB 訊息傳遞路徑之調控，進一步說明 GTIN 可以輔助 Tam 化療的效果。

總結：體內外之研究顯示 GTIN 能夠經由標靶 TrkB，抑制下游訊息傳遞途徑，以達到調控 MCF-7 細胞凋亡及自噬作用，進而阻斷乳癌細胞的生長，藉本文之結果以提出 GTIN 具抗乳癌之潛力，而能應用於乳癌的化學預防試劑或輔助用藥。

## 第六章、參考文獻

- [1] Zembutsu H. "Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer." *Pharmacogenomics*. 2015;16(3):287-96.
- [2] Angela DeMichele, M.D., Douglas Yee, M.D., Laura Esserman, M.D. "Mechanisms of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer." *N Engl J Med* 2017; 377:2287-2289.
- [3] Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. "Natural products for cancer prevention: a global perspective." *Pharmacol Ther*. 2003 Jul;99(1):1-13.
- [4] Srinivasan A, Thangavel C, Liu Y, Shoyele S, Den RB, Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A. "Quercetin regulates  $\beta$ -catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer." *Mol Carcinog*. 2016 May;55(5):743-56.
- [5] Liu YC, Gossypetin inhibits the proliferation of breast cancer cells via induction of apoptosis and inhibition of autophagy. Master Thesis, Department of Medical Laboratory and Biotechnology, Chung Shan Medical University, 2017.
- [6] Hamy AS, Abuelallah 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.
- [7] Sotiriou C1, Pusztai L. "Gene-expression signatures in breast cancer." *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):790-800.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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 $\alpha$ ) and progesterone receptor (PR) in breast cancer cells. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2018 Jan 18;10:1-11.
- [11] 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
- [12]Carreno FR, Frazer A. Int J. Activation of signaling pathways downstream of the brain-derived neurotrophic factor receptor, TrkB, in the rat brain by vagal nerve stimulation and antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacol.* 2014 Feb;17(2):247-58
- [13]Katheder NS, Khezri R, O'Farrell F, Schultz SW, Jain A, Rahman MM, Schink KO, Theodossiou TA, Johansen T, Juhász G, Bilder D, Brech A, Stenmark H, Rusten TE. Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature.* 2017 Jan 19;541(7637):417-420.
- [14]Meng L, Liu B, Ji R, Jiang X, Yan X, Xin Y. Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors. *Oncol Lett.* 2019 Feb;17(2):2031-2039.
- [15]Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, Afzaljavan F, Rivandi M, Hassanian SM, Ferns GA, Pasdar A, Avan A. Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *J Cell Biochem.* 2017 Sep;118(9):2502-2515.
- [16]de Moraes JK, Wagner VP, Fonseca FP, Vargas PA, de Farias CB, Roesler R, Martins MD. Uncovering the role of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase receptor B signaling in head and neck malignancies. *J Oral Pathol Med.* 2018 Mar;47(3):221-227.
- [17]Lingbin Meng, Baoqiong Liu, Rui Ji, Xin Jiang, Xuebo Yan, and Ying Xin. Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors. *Oncol Lett.* 2019 Feb; 17(2): 2031–2039.
- [18]Green, Douglas. *Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011
- [19]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.” *Zhejiang Univ Sci B.* 2017 Feb.;18(2):89-98.
- [20]Araki K, Miyoshi Y. “Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer.” *Breast Cancer.* 2018 Jul;25(4):392-401.
- [21]Biktasova A, Hajek M, Sewell A, Gary C, Bellinger G, Deshpande HA, Bhatia A, Burtness B, Judson B, Mehra S, Yarbrough WG, Issaeva N. Demethylation Therapy as a Targeted Treatment for Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017 Dec 1;23(23):7276-7287.
- [22]Ray T, Chakrabarti MK, Pal A. Hemagglutinin protease secreted by *V. cholerae* induced apoptosis in breast cancer cells by ROS mediated intrinsic pathway and regresses tumor growth in mice model. *Apoptosis.* 2016 Feb;21(2):143-54.
- [23]Yamasaki A, Watanabe Y, Adachi W, Suzuki K, Matoba K, Kirisako H,

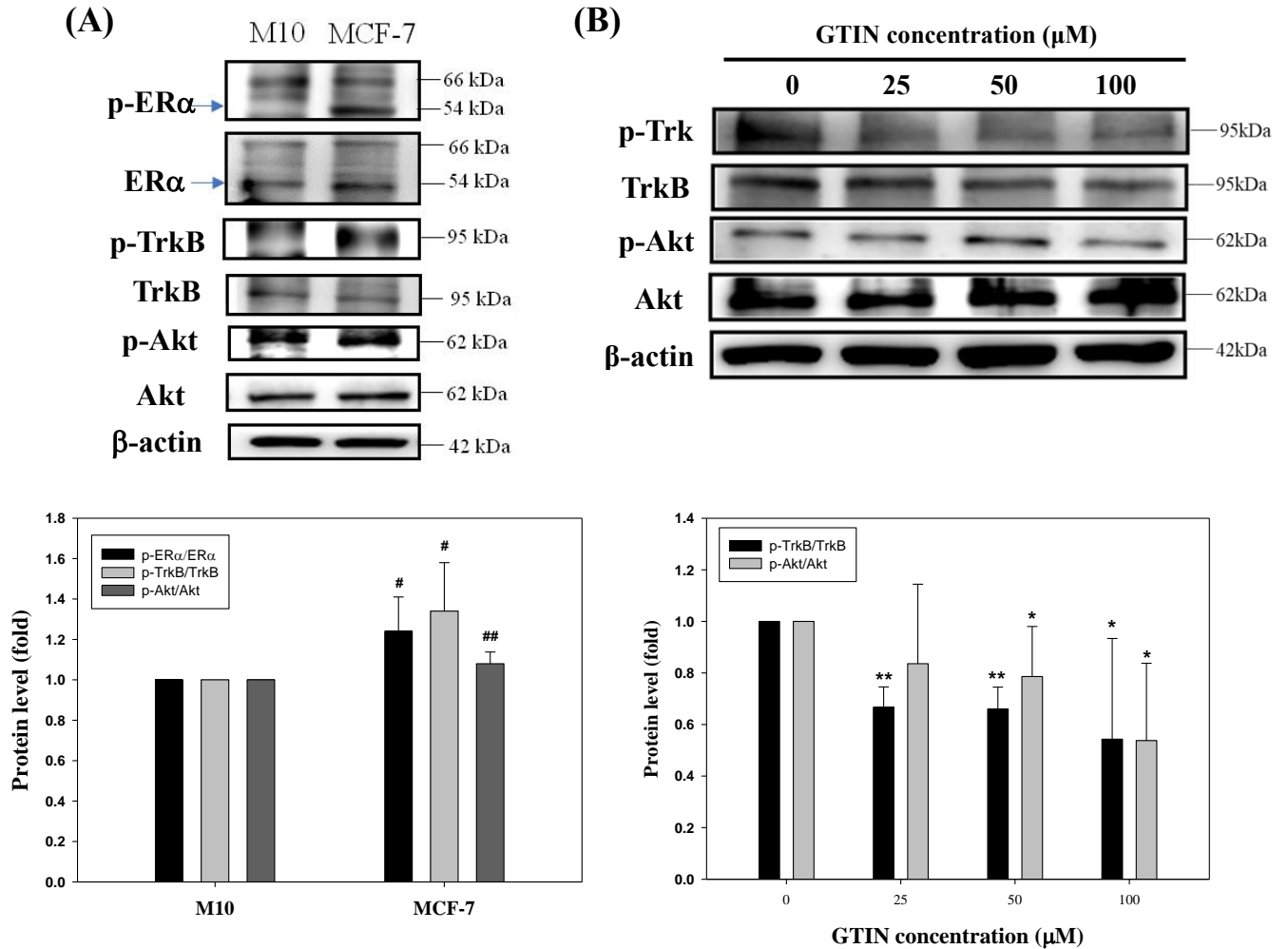
- Kumeta H, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F, Noda NN. Structural Basis for Receptor-Mediated Selective Autophagy of Aminopeptidase I Aggregates. *Cell Rep.* 2016 Jun 28;16(1):19-27.
- [24] Ouyang L, Zhang L, Fu L, Liu B. “A small-molecule activator induces ULK1-modulating autophagy-associated cell death in triple negative breast cancer.” *Autophagy*. 2017 Feb 6:0.
- [25] 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.
- [26] Wei Y., Zou Z., Becker N., Sumpter R., Xiao G., Kinch L., (2013) EGFR-mediated beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* 154, 1269–1284
- [27] Chukkapalli S., Amessou M., Dilly A.K., Dekhil H., Zhao J., Liu Q., (2014) Role of the EphB2 receptor in autophagy, apoptosis and invasion in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 320, 233–246
- [28] Hansen K, Wagner B, Hamel W, Schweizer M, Haag F, Westphal M, Lamszus K. Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J Neurochem.* 2007 Oct; 103(1):259-75
- [29] Han J., Bae J., Choi C.Y., Choi S.P., Kang H.S., Jo E.K., (2016) Autophagy induced by AXL receptor tyrosine kinase alleviates acute liver injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in mice. *Autophagy* 12, 2326–2343
- [30] Ouyang L, Zhang L, Fu L, Liu B. “A small-molecule activator induces ULK1-modulating autophagy-associated cell death in triple negative breast cancer.” *Autophagy*. 2017 Feb 6:0.
- [31] Lei CS, Hou YC, Pai MH, Lin MT, Yeh SL. “Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: in vitro and in vivo studies.” *J Nutr Biochem.* 2018 Jan;51:105-113.
- [32] Tu LY, Pi J, Jin H, Cai JY, Deng SP. “Synthesis, characterization and anticancer activity of kaempferol-zinc(II) complex.” *Bioorg Med Chem Lett.* 2016 Jun 1;26(11):2730-4.
- [33] Lee, M.S., C.W. Tsai, C.P. Wang, J.H. Chen, and H.H. Lin, Anti-prostate cancer potential of gossypetin via inducing apoptotic and autophagic cell death. *Molecular Carcinogenesis*, 2017 Dec;56(12):2578-2592.
- [34] Khan, A., K. Manna, C. Bose, et al., Gossypetin, a naturally occurring hexahydroxy flavone, ameliorates gamma radiation-mediated DNA damage. *International Journal of Radiation Biology*, 2013. 89(11): 965-975.
- [35] Obianyo, O. and K. Ye, Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2013. 1834(10): 2213-2218.



- [36] Doebele, R.C., L.E. Davis, A. Vaishnavi, et al., An oncogenic NTRK fusion in a soft tissue sarcoma patient with response to the tropomyosin-related kinase (TRK) inhibitor LOXO-101. *Cancer discovery*, 2015. 5(10): 1049-1057.
- [37] Shamala Salvamani, Baskaran Gunasekaran, Noor Azmi Shaharuddin, Siti Aqlima Ahmad, and Mohd Yunus Shukor. "Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids" *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 480258.
- [38] Xie X, Liu K, Liu F, Chen H, Wang X, Zu X, Ma X, Wang T, Wu Q, Zheng Y, Bode AM, Dong Z, Kim DJ "Gossypetin is a novel MKK3 and MKK6 inhibitor that suppresses esophageal cancer growth in vitro and in vivo." *Cancer Lett*. 2019 Feb 1;442:126-136.
- [39] Shin SC, Piao YJ, Choi JS. Effects of morin on the bioavailability of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *In Vivo*. 2008 May-Jun;22(3):391-5

## 第七章、圖表

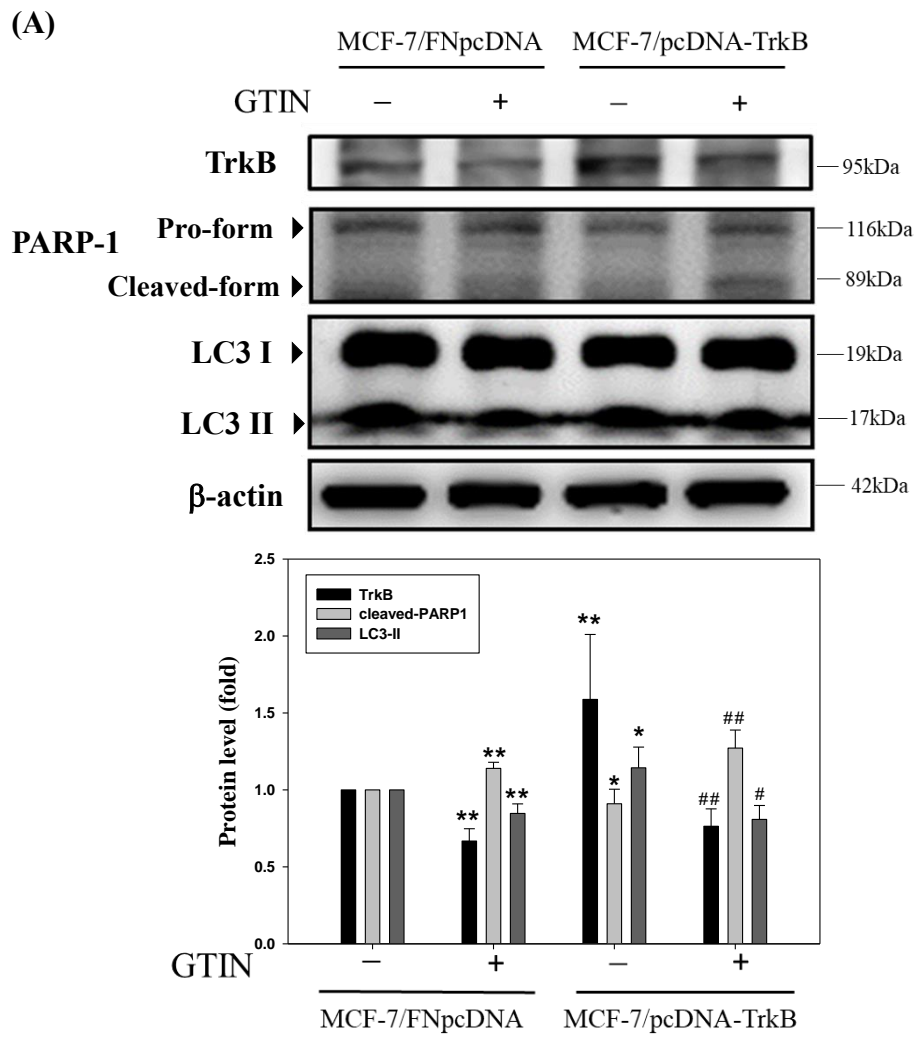
**Figure 1**



**Figure 1. The expression of TrkB in normal mammary epithelial M10 cells versus breast cancer MCF-7 cells, and effect of GTIN on TrkB/Akt signaling in MCF-7 cells.**

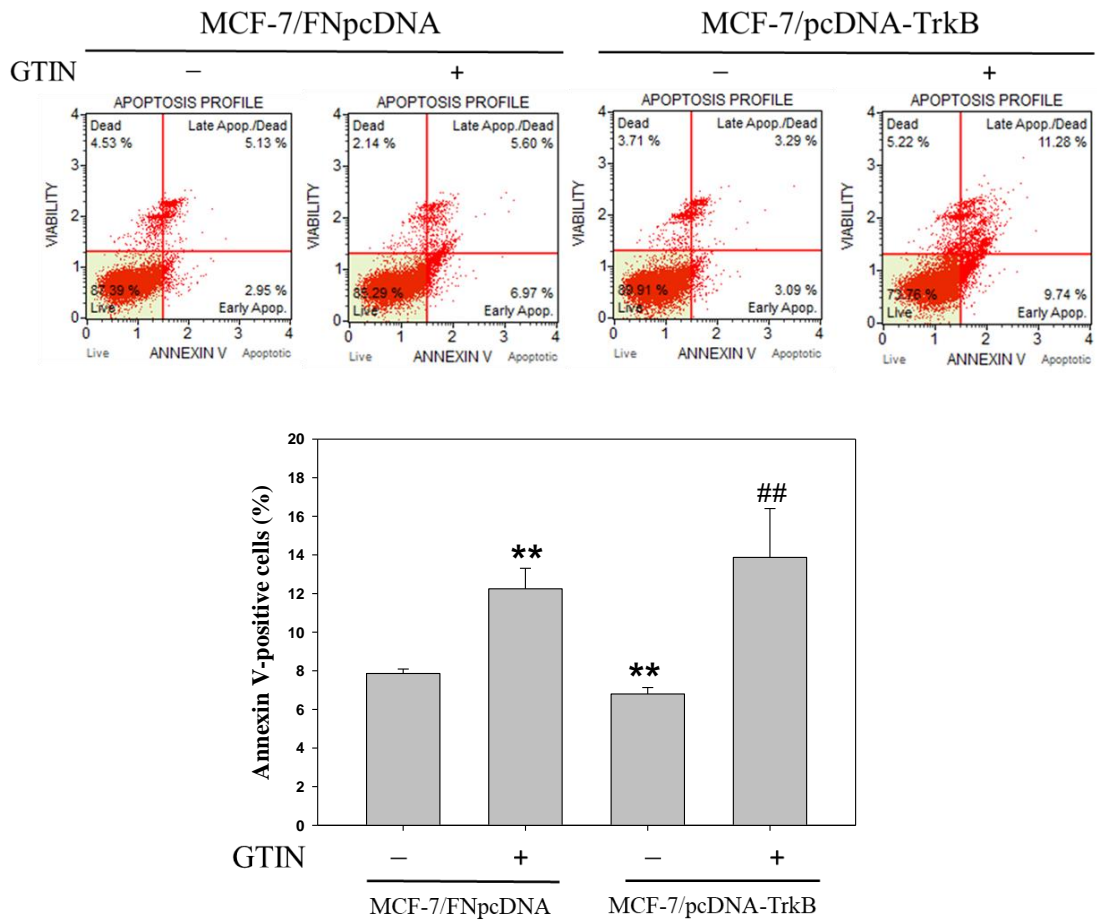
(A) The protein levels of p-ER $\alpha$ , ER $\alpha$ , p-TrkB, TrkB, p-Akt, and Akt in M10 and MCF-7 cells were analyzed by Western blotting. (B) MCF-7 cells were treated with various concentrations (0-100  $\mu$ M) of GTIN for 24 h. The phosphorylated and protein levels of TrkB and Akt in MCF-7 cells were analyzed by Western blotting.  $\beta$ -actin served as an internal control. The quantitative data of all protein levels are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the control.

**Figure 2**



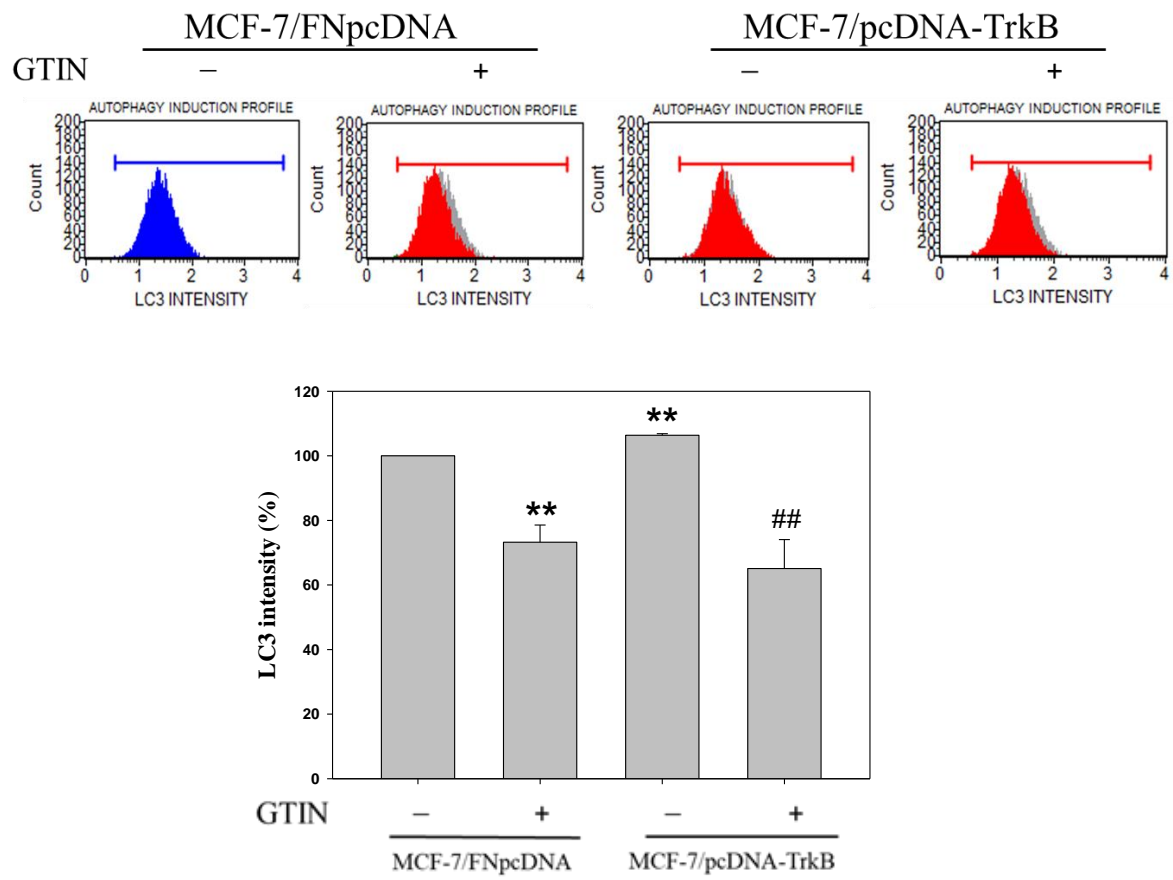
**Figure 2**

**(B)**



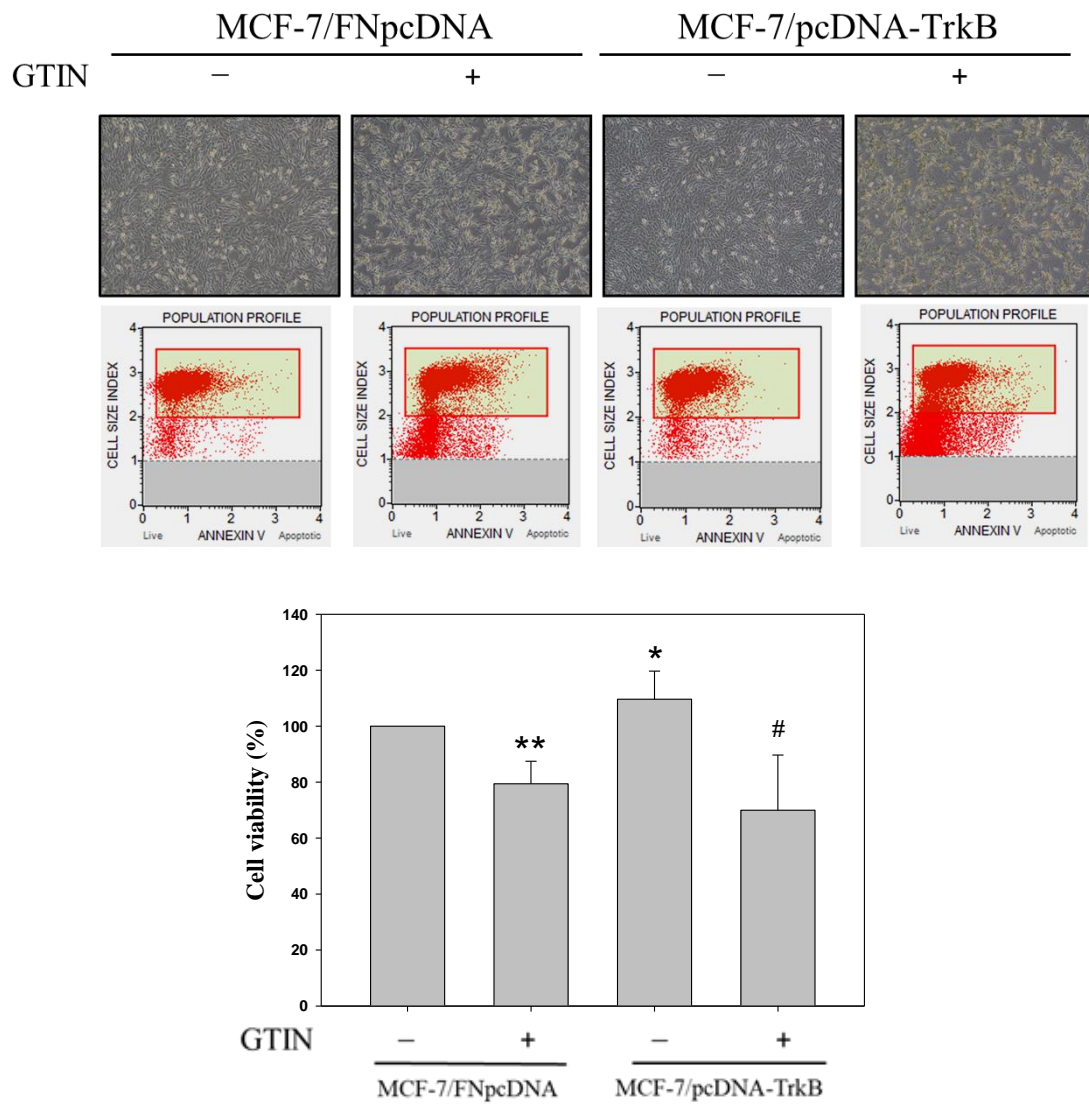
**Figure 2**

(C)



**Figure 2**

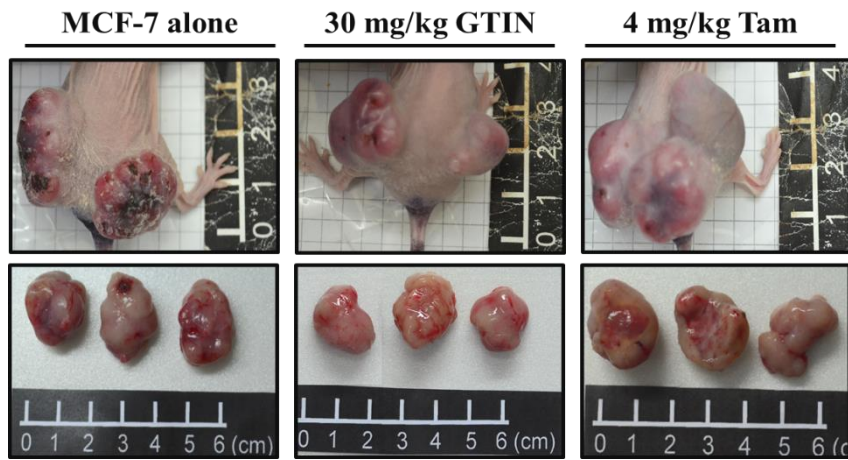
**(D)**



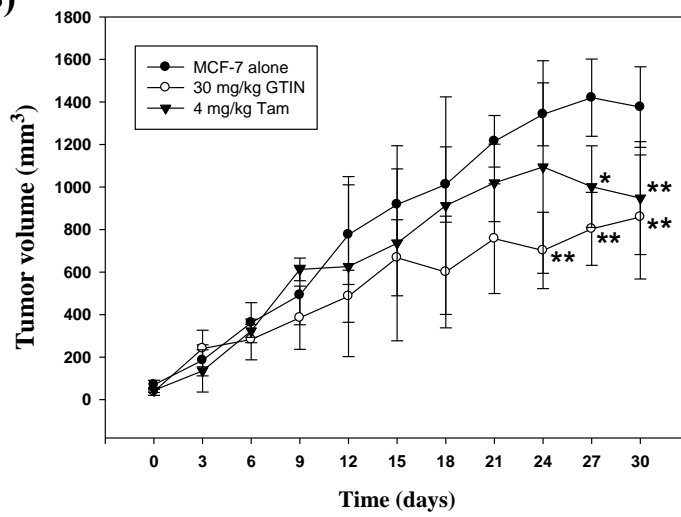
**Figure 2. Effects of TrkB expression vector on GTIN-regulated cell apoptosis and autophagy.** (A) MCF-7 cells were transfected with empty vector (FNpcDNA) or pcDNA-TrkB and treated with or without GTIN (100  $\mu$ M) for 24 h. The cellular levels of TrkB, PARP-1, and LC3 were analyzed by Western blotting.  $\beta$ -actin served as an internal control. (B) Quantification of early and late apoptosis cells, and cells were analyzed by flow cytometry using annexin V dead cell assay. The proportion of annexin V-positive cells represents as mean  $\pm$  SD (n = 3) of three independent experiments. (C) Under the same treatment condition, the relative level of LC3 immunofluorescence intensity was performed on a FACScan flow cytometer. The quantification of LC3 immunofluorescence intensity is presented as mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. (D) Phase-contrast microscopy picture shows morphology of MCF-7 cells transfected with empty vector (FNpcDNA) or pcDNA-TrkB, and then treated with or without GTIN (100  $\mu$ M) for 24 h. Cell viability was measured by flow cytometric analysis. Quantification of cell viability is presented as mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with untreated MCF-7/FNpcDNA group. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with untreated MCF-7/ pcDNA-TrkB group.

**Figure 3**

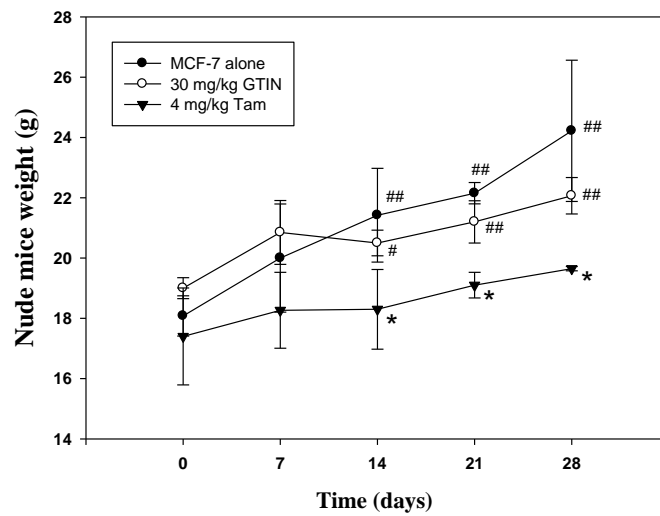
**(A)**



**(B)**



**(C)**

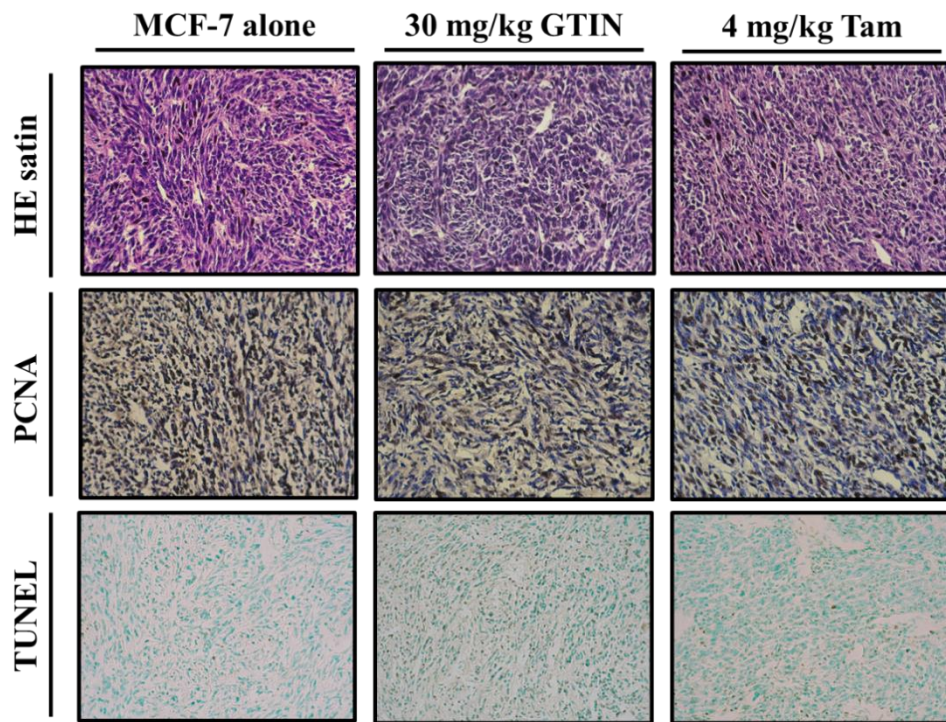




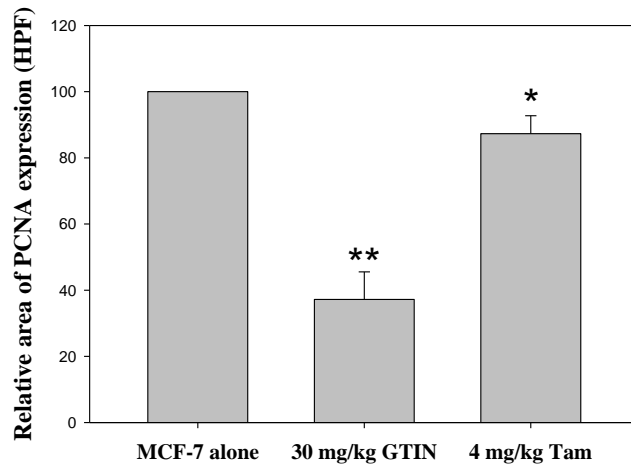
**Figure 3. Effect of GTIN on xenograft tumor in Balb/c nude mice.** The mice implanted with MCF-7 xenograft were treated with GTIN (30 mg/kg) or tamoxifen (Tam, 4 mg/kg) for 30 days. **(A)** Tumor formation was visualized by photography. **(B)** Tumor volume of nude mice was measured every three days. **(C)** Weight of nude mice was measured every week. The quantitative data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6) from one independent experiment. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the group of MCF-7 alone.

**Figure 4**

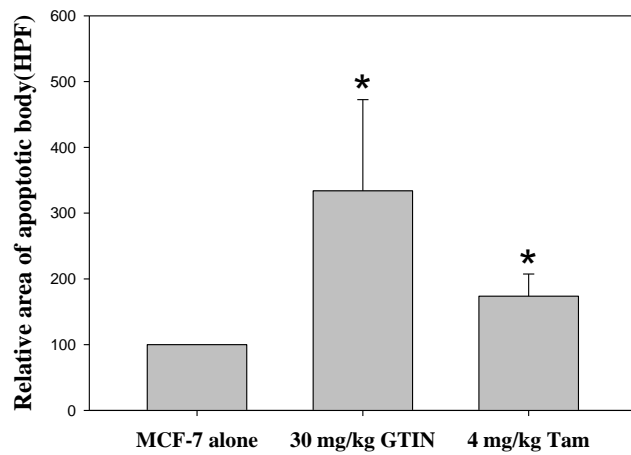
**(A)**



**(B)**

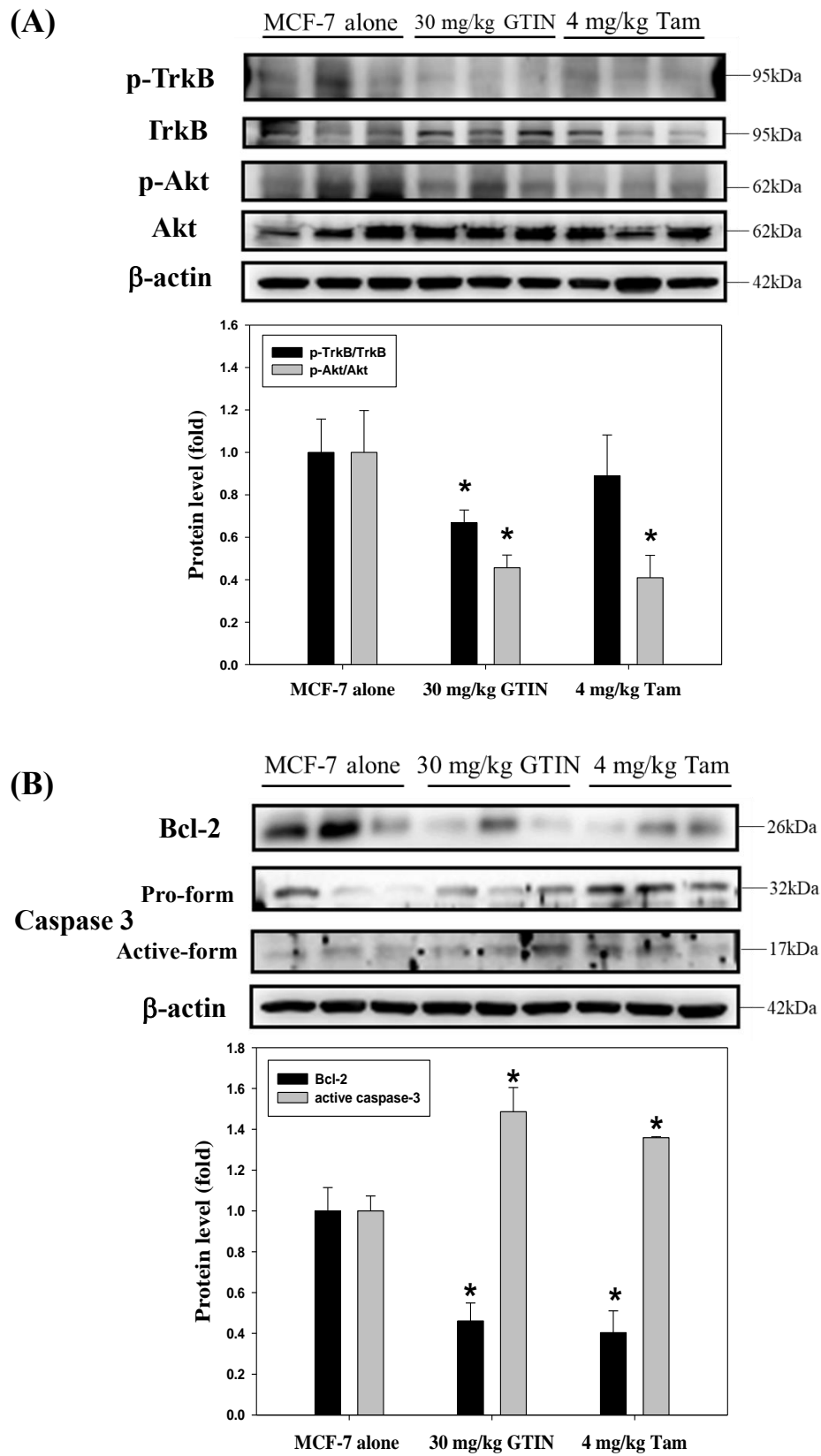


**(C)**



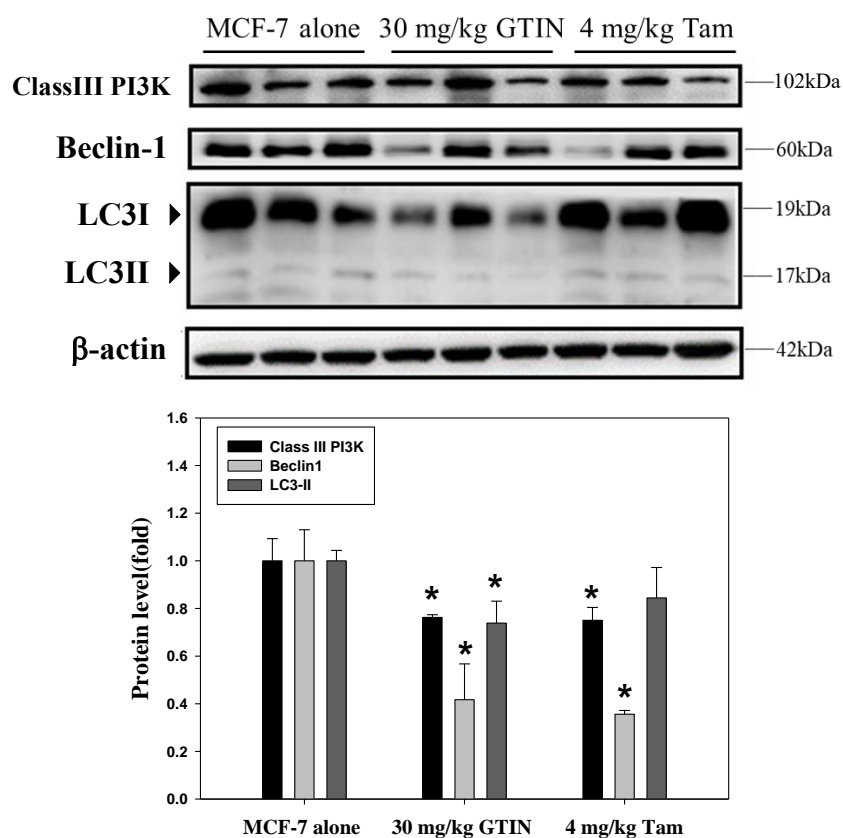
**Figure 4. Effect of GTIN on cell proliferation and apoptosis *in vivo*.** The mice implanted with MCF-7 xenograft were treated with GTIN (30 mg/kg) or tamoxifen (Tam, 4 mg/kg) for 30 days. **(A)** Representative high power field (HPF, 400X) images of tumor sections from different treatments stained with H&E, proliferation marker-PCNA and apoptosis marker-TUNEL. Statistic analysis of relative area of PCNA expression **(B)**, and TUNEL-positive cells **(C)** among different groups is presented as mean  $\pm$  SD (n = 6) from one independent experiment. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the group of MCF-7 alone.

**Figure 5**



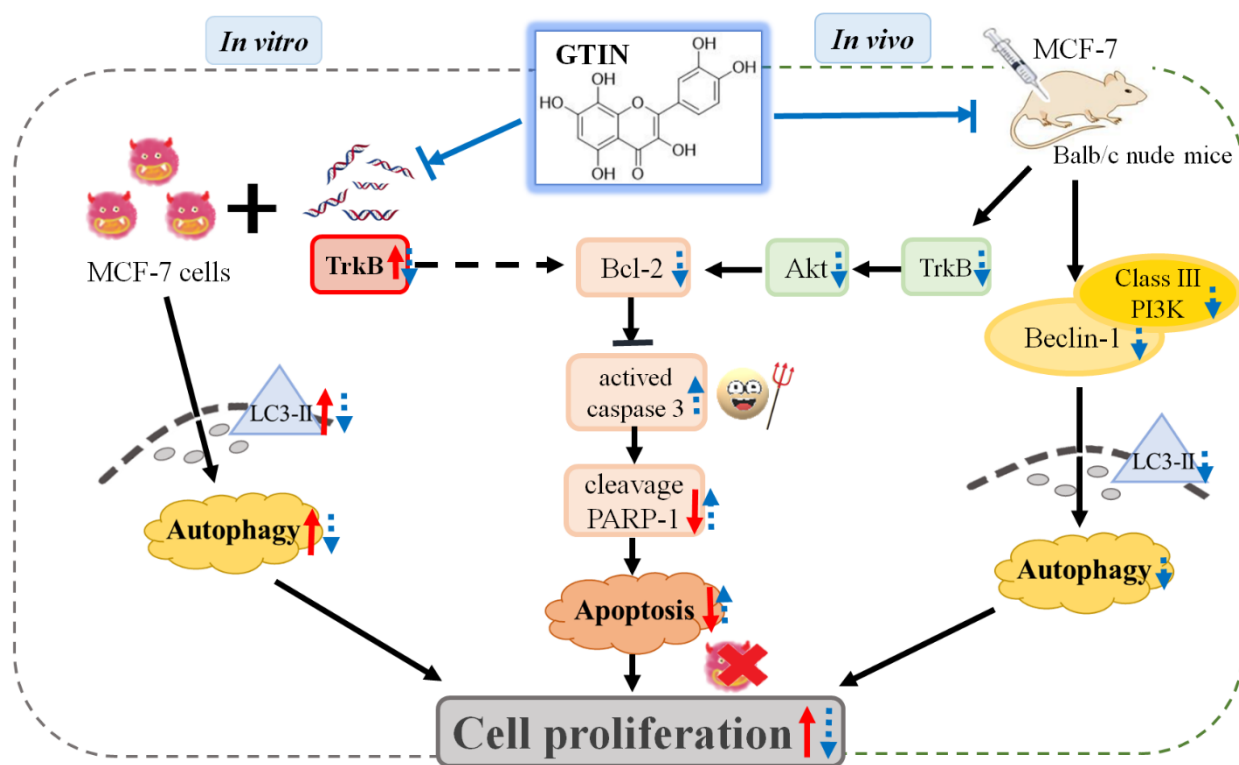
**Figure 5**

(C)



**Figure 5. Effect of GTIN on TrkB/Akt signaling, apoptotic factors, and autophagic factors *in vivo*.** The mice implanted with MCF-7 xenograft were treated with 30 mg/kg GTIN or tamoxifen (Tam, 4 mg/kg) for 30 days. Western blot analysis of p-Trk, TrkB, p-Akt, Akt (A), Bcl-2, caspase-3 (B), class III PI3K, Beclin-1 and LC3 (C) protein expression was carried out with the cell extracts from them.  $\beta$ -actin served as an internal control. The quantitative data of all protein levels are presented mean  $\pm$  SD (n = 6) from one independent experiment. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the group of MCF-7 alone.

**Figure 6**



**Figure 6. Schematic representation of TrkB-antagonist potential of GTIN *in vitro* and *in vivo*.** TrkB induces protective autophagy, anti-apoptosis and proliferation in MCF-7 cells. GTIN functions against TrkB via the inhibition of autophagy and induction of apoptosis that subsequently inhibited the breast cancer cell proliferation. Red solid line arrows represented changes in response to TrkB; Blue dotted line arrows represented changes in TrkB-stimulated cells receiving GTIN intervention.