

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 艾草萃取物對於肥胖型乳癌細胞自噬作用之影響
------------	-------------------------

執行計畫學生：蔡理安  
學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-026-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11日

# 目錄

圖表目錄 .....	IV
摘要 .....	1
Abstract.....	2
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. 肥胖型乳癌(Obesity-related breast cancer) .....	5
2.1.3. 瘦素(Leptin) .....	5
2.2. 細胞凋亡(Apoptosis).....	5
2.2.1. 簡介 .....	5
2.2.2. 分子機制 .....	6
2.3. 細胞自噬(Autophagy) .....	6
2.3.1. 簡介 .....	6
2.2.3. 自噬抑制劑(Autophagy inhibitor) .....	7
2.2.3.1. 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA) .....	7
2.2.3.2. 氯喹(Chloroquine, CQ) .....	7
2.4. 艾草( <i>Artemisia argyi</i> ) .....	7
2.4.1 植物簡介 .....	7
2.4.2 已知功效 .....	8
第三章、 實驗架構與流程 .....	9
第四章、 研究方法與步驟 .....	10
4.1. 艾草萃取物( <i>Artemisia argyi</i> extracts, AAE)之製備及成分分析 .....	10
4.1.1. 艾草萃取物製備 .....	10
4.1.2. 總多酚含量測定(Total polyphenols content assay) .....	10
4.1.3. 總黃酮含量測定(Total flavonoids content assay).....	10
4.2. 裸鼠移植性腫瘤試驗(Xenograft tumor studies) .....	11

4.2.1. 動物分組 .....	11
4.2.2. 蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin & eosin, H&E stain).....	12
4.2.3. 末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記染色(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling stain, TUNEL stain) .....	12
4.3. 西方墨點法(Western blotting) .....	13
4.3.1. 組織均質(Homogenization).....	13
4.3.2. 組織蛋白定量與樣品(Sample)配置.....	13
4.3.3. 鑄膠(SDS-PAGE)與電泳法(Electrophoresis).....	13
4.3.4. 轉漬法(Transfer).....	15
4.3.5. 免疫墨點法(Immunoblot).....	15
4.4. 細胞培養(Cell culture).....	16
4.4.1. 細胞培養條件 .....	16
4.4.2. 解凍細胞 .....	16
4.4.3. 繼代培養 .....	16
4.4.4. 冷凍細胞 .....	16
4.4.5. 細胞加藥處理 .....	17
4.5. 細胞自噬分析(Autophagy analysis).....	17
4.5.1. 細胞自噬染色試驗(Acidic vesicular organelles, AVO stain).....	17
4.5.2. LC3 螢光分析(LC3 immunofluorescence assay) .....	17
4.6. 細胞蛋白分析(Western blotting) .....	18
4.6.1. 萃取蛋白 .....	18
4.6.2. 蛋白表現分析 .....	18
4.7. 抑制劑分析(Inhibitory assay).....	18
4.8. 細胞凋亡分析(Annexin V dead cell assay).....	19
4.9. 細胞存活率分析(Cell viability assay) .....	19
4.10. 統計(Statistical analysis).....	19
第五章、 結果與討論 .....	20
5.1. 艾草萃取物成分分析.....	20

5.2. 探討艾草萃取物對於癌症動物模式之腫瘤生長以及血清中瘦素濃度之影響.....	20
5.3. 探討艾草萃取物對於動物腫瘤組織切片型態以及細胞凋亡之影響.....	20
5.4. 探討艾草萃取物對於動物腫瘤組織細胞凋亡以及細胞自噬分子機制之影響.....	21
5.5. 探討艾草萃取物對於瘦素誘發乳癌細胞自噬反應之影響.....	21
5.6. 探討艾草萃取物對於瘦素誘發乳癌細胞自噬分子機制之影響.....	22
5.7. 比較艾草萃取物 and 自噬抑制劑對於瘦素調控細胞自噬以及細胞凋亡之效用.....	22
5.8. 總結與未來研究.....	23
第六章、 參考文獻.....	24
第七章、 圖表.....	27

## 圖表目錄

附圖一：研究動機.....	3
附圖二：動物實驗模式.....	14
附表一：Separating gel 配方.....	14
附表二：Stacking gel 配方.....	14
附表三：Running buffer 配方.....	14
附表四：Transfer buffer 配方.....	15
附表五：TBS 配方.....	16
Table 1. Composition of the <i>Artemisia arylgi</i> extracts (AAE) .....	27
Fig. 1. Effect of AAE on leptin-induced of MCF-7 tumor growth in xenograft model.....	28
Fig. 2. Effects of AAE on leptin-induced MCF-7 tumor growth, anti-apoptosis and autophagy in xenograft model. ....	29
Fig. 3. Effect of AAE on the leptin-induced anti-apoptosis and autophagy signaling <i>in</i> <i>vivo</i> . ....	30
Fig. 4. Effects of AAE, Que, and Api on autophagy in the leptin-treated MCF-7 cell. .....	31
Fig. 5. Effects of AAE vs. autophagy inhibitors on autophagy in the leptin-treated MCF-7 cells. ....	34
Fig. 6. Effects of AAE vs. autophagic inhibitors on apoptosis and cell viability in the leptin-treated MCF-7 cells. ....	35
Fig. 7. The overview of pathway for AAE-inhibited the autophagy for leptin-treated breast cancer <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . ....	38

## 摘要

肥胖是乳癌重要的危險因子之一，過去研究顯示因肥胖而過度製造的瘦素(leptin)對於乳癌進展和血管新生皆佔有重要的角色，因此 leptin 具有作為肥胖型乳癌(obesity-related breast cancer)治療標靶之潛力。近年來尋求天然植萃物或天然物成份來抑制或延遲癌症的發展成為研究的重點，艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)已被證實具有抗氧化、抗腫瘤、降血糖和保肝的活性。由於先前實驗室的研究已指出 AAE 以及其主成分槲皮素(quercetin, Que)和芹菜素(apigenin, Api)可以抑制由 leptin 所誘發人類乳腺癌 MCF-7 細胞增生及抗凋亡(anti-apoptosis)作用，故本篇欲進一步探討 AAE 對於 leptin 誘導 MCF-7 細胞保護性自噬(autophagy)的抑制作用。首先於動物腫瘤移植實驗觀察到 AAE 對腫瘤生長具有抑制的現象；從組織切片染色可以得知 AAE 改善腫瘤組織的惡化程度以及增加細胞凋亡；並分析組織蛋白表現發現 AAE 具有促進細胞凋亡且抑制細胞自噬的作用。進一步利用 leptin 誘導 MCF-7 細胞惡化生長模式，以流式細胞儀分析(flow cytometric analysis)得知 AAE 可抑制由 leptin 所誘導的細胞自噬，並從自噬相關蛋白之抑制表現確認 AAE 具有抗自噬作用。後續利用自噬抑制劑 3-methyladenine (3MA)以及 chloroquine (CQ)試驗顯示 leptin 誘發細胞自噬之詳細途徑，並於結果中發現 AAE 具有與 3-MA 類似之調控，亦具有促凋亡作用。綜合上述，AAE 能抑制 leptin 所誘發的乳癌細胞保護性自噬，並啟動細胞凋亡，藉以釐清艾草具有抗肥胖型乳癌之功效。

關鍵字：瘦素、肥胖型乳癌、艾草萃取物、抗凋亡、細胞自噬

## Abstract

Leptin, a key adipokine secreted from adipocytes, is known to promote breast tumor growth and has been recognized as a target for obesity-related breast cancer treatment. *Artemisia argyi* extracts (AAE), rich in flavonoid, have demonstrated to possess antioxidant, antiparasitic, hepatoprotective, and anticancer activities. This study investigated the inhibitory effects of AAE on leptin-induced proliferation and autophagy of human breast cancer MCF-7 cells *in vivo* and *in vitro*. In MCF-7 tumor xenograft model, leptin-induced tumor growth, apoptosis loss, and autophagy were abrogated by AAE. In leptin model MCF-7 cells, AAE and its purified compound, quercetin (Que) and apigenin (Api) were evaluated for the anti-autophagic activity in the cells as demonstrated by morphological and biochemical features, including inhibition of acidic vesicular organelle (AVO) formation and downregulation of the autophagy-related genes (LC3 and Beclin-1). Furthermore, the critical roles of autophagy activation in leptin-induced tumor growth and suppression of apoptotic gene expression were confirmed, as demonstrated by the usage of a class III PI3K inhibitor 3-methyladenine (3-MA) and lysosome inhibitor chloroquine (CQ). Molecular data showed the inhibitory effects of AAE, Que and Api on the cell autophagy might be mediated via class III PI3K/Beclin-1 signaling. These data provide *in vitro* and *in vivo* evidence for the leptin-antagonist potential of AAE revealing a crosstalk between apoptosis and autophagy.

Keywords: leptin, obesity-related breast cancer, *Artemisia argyi* extracts (AAE), anti-apoptosis, autophagy

## 第一章、研究動機與研究問題

肥胖為現今常見的代謝疾病，同時也被視為乳癌(breast cancer)的危險因子之一[1]。先前研究顯示脂肪組織會促使雌激素(estrogen)過度分泌，並釋放更多細胞激素與脂肪激素[2-4]，而其形成的乳癌稱之為肥胖型乳癌(obesity-related breast cancer)[5,6]。另有研究顯示主要由脂肪組織分泌的瘦素(leptin)會促使乳癌細胞的增生(proliferation)，並提高其惡化機率[7]。現今手術切除乳癌組織仍是主要的治療方法，但乳癌極易發生轉移，以致治療效果十分有限，且化療藥物對患者本身會產生嚴重之副作用，所以尋求其他治療策略或有效預防之天然物質視為現今研究重點。艾草是台灣區域性常見植物，過去民間用於驅蚊蟲、暖子宮及煙燻使用。近年來，國內外之研究針對艾草的生化功效有不少科學驗證。在細胞實驗中已證實艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)具有抗輻射、抗氧化和抗癌的活性[8,9]；而在動物實驗中則有研究證明 AAE 抗寄生蟲的作用[10]。另有研究發現 AAE 可用於護肝，對於藥物性普拿疼(acetaminophen)、化學性四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) [11,12]，以及細菌性脂多醣(lipopolysaccharides, LPS)引發之肝損傷具有保護效果[12]。最近於臨床試驗顯示，AAE 應用於妊娠糖尿病婦女(gestational diabetes mellitus)中藉由促進脂肪細胞分泌的脂聯素(adiponectin)而具有有效改善胰島素阻抗和脂質代謝的作用[13]。近來亦有文獻指出 AAE 主要成份為槲皮素(queracetin, Que)和芹菜素(apigenin, Api) [14]，兩者皆屬於類黃酮(flavonoids)，亦具有很強之抗癌功效。在我們實驗室初步成份分析中顯示 AAE 中總多酚(polyphenols)及總黃酮含量各別為 14.3%和 26.9%(Table 1)，也證實 AAE 確為富含多酚之萃取物。進一步，我們實驗室先前的研究已指出 AAE、Que 及 Api 可抑制由 leptin 所誘發人類乳腺癌 MCF-7 細胞增生、遷移(migration)和上皮間質轉化(epithelial-mesenchymal-transition, EMT)，以及抗凋亡(apoptosis)作用[15]，因此，後續以探討 AAE 對於由 leptin 所誘導 MCF-7 細胞自噬(autophagy)是否也具有抑制的作用，並對照加入自噬抑制劑是否也可以達到相同之效果；另外，細





## 第二章、文獻回顧與探討

### 2.1. 乳癌(Breast cancer)

#### 2.1.1. 簡介

乳癌是由乳房組織發展成的癌症，其徵象包括乳房腫塊、乳房形狀改變、皮膚凹陷、乳頭分泌物，或皮膚出現紅色鱗屑狀斑塊。根據我國衛生福利部國民健康署公告，乳癌為我國女性癌症發生率的第一名，發生高峰約在 45-69 歲之間，約為每十萬名婦女佔 188-194 人。而乳癌的風險因子包含肥胖、缺乏運動、飲酒、更年期時的激素替代療法、游離輻射、初經提早開始與晚生或不生育。目前對於乳癌的治療方式包含手術、放射療法、化學療法與標靶治療，但根據不同特性及型態的乳癌，治療效果可能有所不同。因此探討乳癌的形成原因，以及找出適當且低副作用的治療方式，對於乳癌防制策略是相當重要的一環[15]。

#### 2.1.2. 肥胖型乳癌(Obesity-related breast cancer)

肥胖是乳癌的重要危險因子之一，雖然現在對於乳癌與肥胖之間的機轉尚未完全釐清，然而已有研究指出肥胖確實會增加罹患乳癌的機率，此種乳癌類型定義為肥胖型乳癌(obesity-related breast cancer)。脂肪細胞的增加相對於局部和全身性的改變，例如：細胞激素、脂肪激素、生長因子以及發炎因子的分泌改變等，在這些因子改變或交互作用之下可能會對乳癌的進程產生影響[4]。

#### 2.1.3. 瘦素(Leptin)

瘦素是由肥胖基因(ob gene)編碼的蛋白質，主要由脂肪組織合成和分泌，屬於維持生理平衡的一種能量激素。瘦素異常與許多代謝症候群相關，尤其是肥胖[16]。過去研究指出因肥胖而過度製造的瘦素對於血管新生和腫瘤生成佔有重要的角色[2,3]，也有研究發現瘦素對於乳癌幹細胞與基質細胞之間的交互作用有助於維持乳癌幹細胞的活性[4]，上述皆證實瘦素會促進乳癌腫瘤的惡性發展。

### 2.2. 細胞凋亡(Apoptosis)

#### 2.2.1. 簡介

細胞凋亡為一種細胞程序性死亡(programmed cell death)，即是因為收到相關訊號而進行的細胞死亡，其主要目的為移除不必要的細胞。相對於細胞壞死(necrosis)，凋亡是細胞主動調控的機制，一般由生理或是病理性因素造成且為不可逆的過程。細胞凋亡被認為在多種生理過程中扮演重要角色，例如正常細胞的更新、免疫系統的發育和運作等。研究已知過多或過少的細胞凋亡對於神經病變性疾病、自體免疫性疾病以及多種癌症等皆會產生影響並為致病因子之一[17]。另外過去針對由瘦素誘導的癌症模式中，研究顯示瘦素可以透過誘導抗凋亡蛋白 Bcl-2 以及 survivin 表現，並減少細胞凋亡相關基因表現而達到抗凋亡的作用[18]。

### 2.2.2. 分子機制

細胞凋亡主要是由胱天蛋白酶(cysteine aspartic protease, caspase)進行調控，由活化路徑的不同可分為內外兩種途徑，兩種途徑最終都會活化 caspase-3 並導向細胞死亡。其中內在途徑(intrinsic pathway)因死亡程序啟動後透過調節 Bcl-2 家族蛋白引發細胞凋亡，而 Bcl-2 家族蛋白可分為促凋亡(pro-apoptotic)以及抗凋亡(anti-apoptotic)兩類，其中抗凋亡包含 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1 等蛋白；促凋亡包含 Bax、Bid、Bad 等蛋白。Bcl-2 家族蛋白主要作用機制為通過改變粒線體膜通透性調節細胞色素 C (cytochrome c)的釋放[19]，最終導致活化 caspase-3 造成細胞死亡。

## 2.3. 細胞自噬(Autophagy)

### 2.3.1. 簡介

細胞自噬作用為一種細胞自我降解的過程，對於能量來源的平衡相當重要，並在發育以及處於營養壓力時扮演重要的角色。另外自噬作用也有清除摺疊錯誤蛋白、受到破壞的胞器，以及細胞內病原體的功能[20]。然而，在癌細胞中自噬作用可能作為促進細胞保護性存活(protective survival)的機制，也可能引發自噬性細胞死亡(autophagic cell death)，在不同的癌症種類和進程中其角色不盡相同。其實多數癌細胞相當倚賴細胞自噬才能存活，近期研究指出癌細胞在面對微環境壓力(microenvironmental stress)時，可藉由促進細胞自噬而存活，並增加細胞生長

以及侵犯性。更顯示癌細胞在轉移到其他組織的過程中，細胞自噬的高度活化有助於癌細胞適應血液或異地組織的環境[21]。根據研究指出由瘦素誘導癌症模式下，細胞自噬可作為提供癌細胞能量來源的機制，進而達到促進腫瘤生長的目的[22]。

### 2.3.2 分子機制

目前有關細胞自噬和乳癌相關的研究中，已知小分子激活劑(activator)會誘導三重陰性乳腺癌細胞中自噬激活激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1)調節細胞自噬相關死亡程式[23]，而屬於一種天然物-皂苷(Paris saponin)則會誘導乳腺癌細胞自噬朝向蛋白激酶 Akt/mTOR 信號路徑以促進細胞凋亡。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) 以及起始途徑 class III PI3K/Beclin-1 訊號所誘發，而其他參與此過程的調控分子為 Atgs (autophagy-related gene)，包含 Atg4、Atg12、Atg16，以及 Atg5/12 conjugate 等[24]。

### 2.2.3. 自噬抑制劑(Autophagy inhibitor)

#### 2.2.3.1. 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)

3-MA 為一種抑制 PI3K 並被廣泛使用的自噬抑制劑，由於 class III PI3K 為 mTOR 信息傳遞的重要調節角色，故透過抑制 class III PI3K 進而使自噬小體 (autophagosome)無法形成，達到自噬作用停滯的效果，並有研究指出 3-MA 可透過抑制細胞自噬達到治療癌症的作用[25]。

#### 2.2.3.2. 氯喹(Chloroquine, CQ)

CQ 為臨床治療上最廣泛使用的自噬抑制劑，原作為抗瘧疾藥物。CQ 透過抑制溶小體(lysosome)酸化進而阻礙自噬小體 (autophagosome)與溶小體之融合、降解，達到抑制細胞自噬的作用[25]。由於 CQ 作用機制會造成自噬小體的堆積，故細胞自噬相關蛋白會出現增加的現象。

## 2.4. 艾草(*Artemisia argyi*)

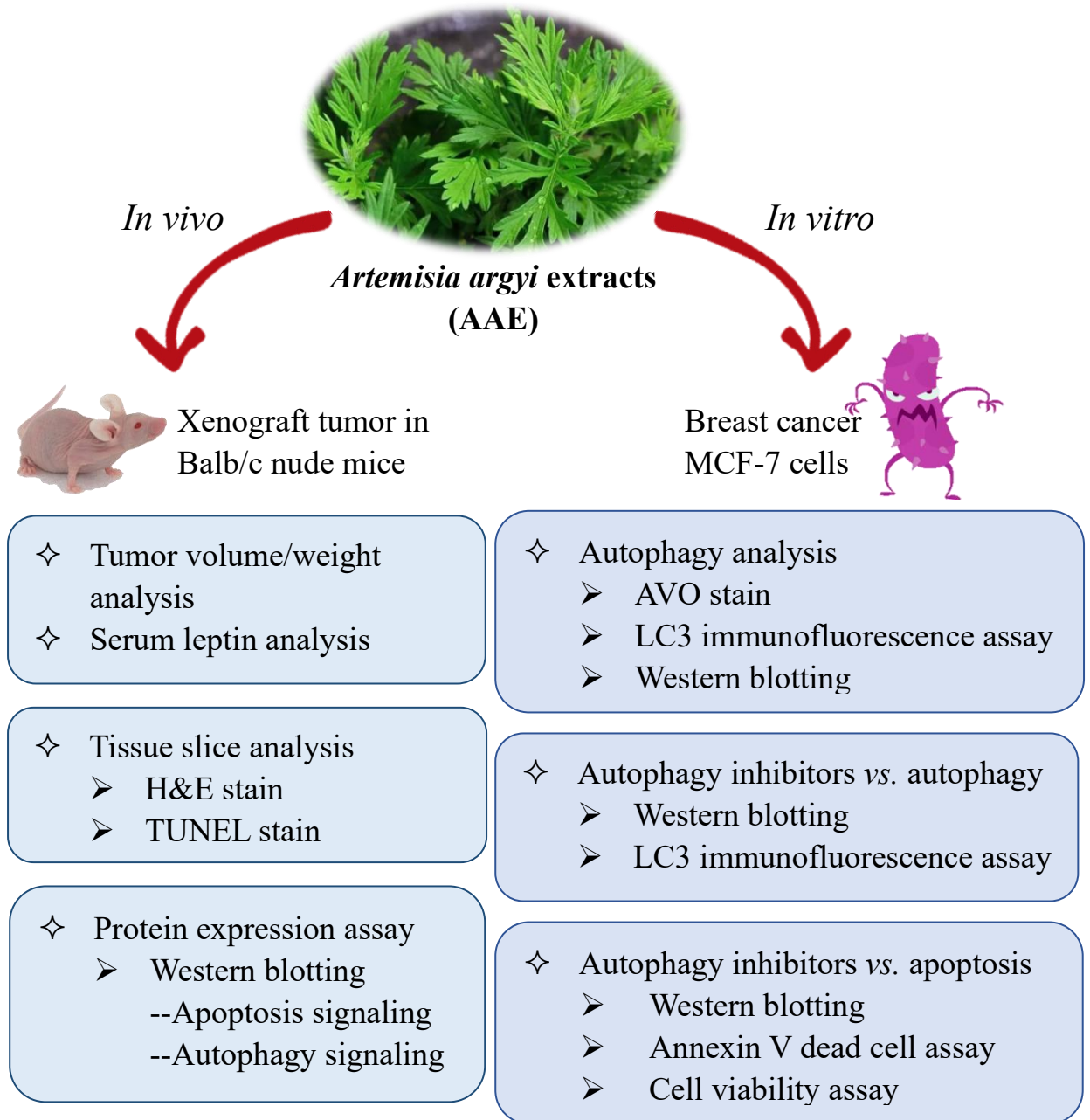
### 2.4.1 植物簡介

艾草學名為 *Artemisia argyi*，別稱艾葉、艾蓬、香艾、艾蒿和灸草，屬於一種多年生草本植物，分布於亞洲及歐洲地區。從中醫的角度來說由於農曆五月氣溫炎熱，蚊蟲大量滋生，艾葉燃燒後產生的揮發油具有抑菌和驅蚊蟲的作用，有效預防夏季傳染病的流行，故艾草的功效在民間流傳有祛病辟邪的傳說。在中醫論述艾草具有溫經、止血、除濕、鎮痛、健胃、抗真菌以及安胎的效果。

#### 2.4.2 已知功效

過去研究中，艾草廣泛運用於治療慢性疾病，例如關節炎、氣喘、腸胃道疾病、經痛以及失眠[26-30]。另有研究指出艾草可以藉由抗發炎和減少氧化壓力，對胃部黏膜達到保護作用[31]，對於治療異位性皮膚炎也有療效[32]。最近的研究也證實艾草精油可以藉由調節細胞內信號傳遞蛋白激酶 JAK/STATs 活化，減少活性氧(reactive oxygen species, ROS)而達到抑制發炎反應[33]。

### 第三章、實驗架構與流程



## 第四章、研究方法與步驟

### 4.1. 艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)之製備及成分分析

#### 4.1.1. 艾草萃取物製備

秤取 300 克艾草，攪拌至粉末狀。以 2 L 二次水煮後，小火萃取 1 小時過濾連續三次並收集濾液，最後進行冷凍乾燥為 AAE 粉末。後續實驗進行皆以滅菌水：絕對酒精=1：1 配製溶劑，並以 0.45  $\mu\text{m}$  及 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑 filter 過濾之，其後避光保存於-20°C 冰箱。

#### 4.1.2. 總多酚含量測定(Total polyphenols content assay)

利用在磷鉬酸複合物(Folin-Ciocalteu's reagent)中，苯環(phenol)可以還原鉬(molybdenum)的原理，當樣品中的苯酚越多時，則酚基與 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 反應會產生越多的藍綠色複合物。待測萃取物樣品秤取 1 g，溶於酒精與二次水配製成體積 10 mL，作為 1 g/10 mL 的樣品 Stock 1，再以 1：20 的稀釋倍數稀釋成為 Stock 2，並以 0.45  $\mu\text{m}$  濾網過濾之，即為本實驗的待測樣品。接著配製標準品 GA (gallic acid) 10 mg/25 mL 甲醇並避光，再分別取 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mL，換算濃度為 20、40、60、80、100  $\mu\text{g}$  再依序加入甲醇 0.95、0.9、0.85、0.8、0.75 mL 使標準品每管成 1 mL 體積。待測樣品則自 Stock 2 取 0.1 mL 並加入 0.9 mL 甲醇。而後標準品與待測樣品皆依序加入 0.5 mL 的 2 N Folin & Ciocalteu's reagent 混合均勻，再加 3 mL 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，混合均勻後避光室溫靜置 15 分鐘。再加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，取上清液 1 mL 以波長 725 nm 測其 OD 值，並使用甲醇當 blank。最後依回歸方程式計算樣品中多酚的含量。

#### 4.1.3. 總黃酮含量測定(Total flavonoids content assay)

測定黃酮的含量以 rutin (mg/mL) 為標準品，甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 mL 搖勻。接著各加 0.3 mL 之 1 M  $\text{NaNO}_3$  後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 mL 之 10%  $\text{AlNO}_3$  後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最

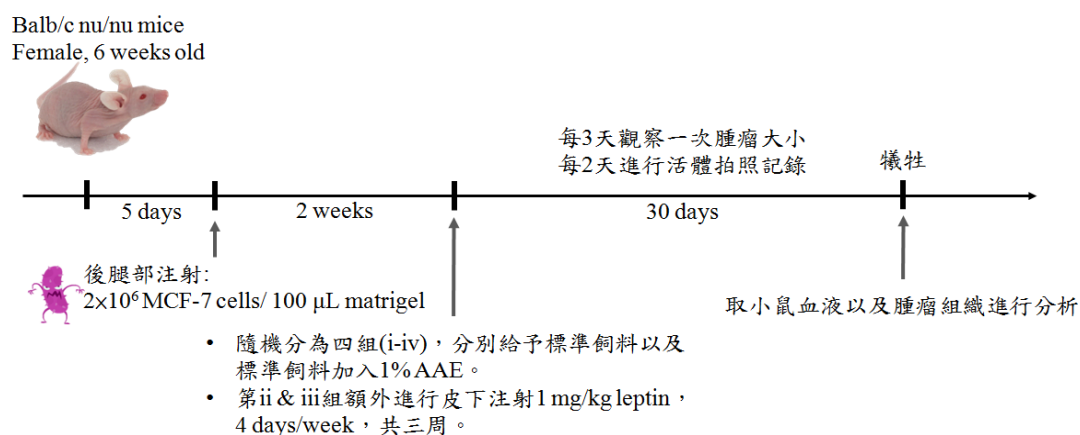
後加入 4 mL 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 mL 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值(乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。待測萃取物樣品如上述濃度製備，取 0.1 mL 樣品加 0.9 mL 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

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

### 4.2.1. 動物分組

動物實驗模式分組概述如下：(i)單獨移植腫瘤對照組(MCF-7 alone)、(ii)瘦素(leptin)[皮下注射(subcutaneous injection, s.c.)]誘導組、(iii) leptin (s.c.)+ 1% AAE 試驗組、(v) 1% AAE 萃取物毒性組。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。使用  $2 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L 之 matrigel 懸浮液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 leptin 劑量為 1 mg/kg，每次 200  $\mu$ L 以一週 4 次。leptin 施打 3 週後可誘導使腫瘤體積增大；AAE 則以餵食介入 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，犧牲後取出動物之腫瘤秤重和拍照記錄，腫瘤組織一份直接固定在 4% 中性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  $-80^{\circ}\text{C}$  備用進行後續相關實驗分析(附圖二)。

附圖二：動物實驗模式





#### 4.2.2. 血清瘦素(leptin)含量分析

將小鼠斷頭犧牲後取得血液並靜置 30 分鐘，利用超高速離心機以 3000 rpm、4°C 的離心條件離心 15 分鐘，離心後抽取上清液即為血清。使用商業配方 PEPRO-Murin Leptin ELISA Development Kit，其利用競爭性分析方法可用於定量血清中的 leptin 含量。該測定法的範圍為 20-1250 pg/mL。將 capture antibody 加入 96-well 孔盤中，室溫均勻搖晃過夜。隔日先使用免疫沖洗機加入 wash buffer 沖洗 96-well 孔盤 4 次，而後加入 300  $\mu$ L blocking buffer 室溫反應 1 小時，再使用免疫沖洗機沖洗孔盤 4 次。同時將濃度 100  $\mu$ g/mL standard 等倍稀釋成 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8、0 pg/mL，並與樣品(血清原液)分別加入 100  $\mu$ L/well，室溫反應 2 小時再清洗 4 次。注入 100  $\mu$ L/well detection antibody 室溫反應 2 小時再清洗 4 次。注入 100  $\mu$ L/well avidin-HRP 避光室溫反應 30 分鐘再清洗 4 次。加入 100  $\mu$ L/well ABTS liQued substrate 室溫反應及呈色，立刻測定波長 405 及 650 nm 之 OD 值，並將校正的 OD 值繪製成標準曲線，以求得血清中 leptin 之濃度。

#### 4.2.3. 蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin & eosin, H&E stain)

將實驗動物犧牲後，迅速取一小部分動物腫瘤組織置於 10%福馬林中固定，以石蠟包埋製成病理切片。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 H&E stain 觀察切片組織型態。

#### 4.2.4. 末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記染色(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling stain, TUNEL stain)

利用商業套組 BioVision Apo-BrdU-IHC<sup>TM</sup> In Situ DNA Fragmentation Assay Kit 進行檢測。首先將玻片浸潤 xylene 5 分鐘重複 2 次進行脫蠟，再以降酒精 100% EtOH 5 分鐘重複 2 次→90% EtOH 3 分鐘→80% EtOH 3 分鐘→70% EtOH 3 分鐘→1X PBS 數秒；接著加入 100  $\mu$ L protease K 室溫反應 20 分鐘→1X PBS 潤洗數秒→100  $\mu$ L 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室溫反應 5 分鐘→1X PBS 潤洗數秒→100  $\mu$ L 1X reaction buffer 室溫反應 10-30 分鐘→50  $\mu$ L DNA labeling solution 37°C 保持濕潤

反應 60-90 分鐘→1X PBS 潤洗數秒→100  $\mu$ L blocking buffer 室溫反應 10 分鐘  
→100  $\mu$ L antibody solution 室溫避光反應 60-90 分鐘→1X PBS 潤洗數秒→100  $\mu$ L  
blocking buffer 室溫反應 10 分鐘→100  $\mu$ L conjugate solution 室溫反應 30 分鐘  
→1X PBS 潤洗數秒→100  $\mu$ L DAB solution 室溫反應 15 分鐘→H<sub>2</sub>O 潤洗數秒，接  
著加入 100  $\mu$ L methyl green counterstain solution 室溫反應 3 分鐘作為對比染色；  
最後以升酒精 100% EtOH 浸潤玻片數秒重複 2 次，再至 xylene 中浸潤數秒重複  
2 次，待玻片乾燥後，以阿拉伯膠封片後即可使用光學顯微鏡進行觀察紀錄。

### **4.3. 西方墨點法(Western blotting)**

#### **4.3.1. 組織均質(Homogenization)**

將欲實驗的組織自 -80°C 的冰箱解凍，並剪取秤量約 100 mg 至 eppendorf 中，  
加入 500  $\mu$ L RIPA、蛋白酶抑制劑 10  $\mu$ L，接著將樣品至於組織用均質機中磨碎，  
之後低溫離心(14000 rpm, 15 分鐘)，收集上清液，再加入蛋白酶抑制劑 10  $\mu$ L 後，  
至於 -80°C 冰箱保存。

#### **4.3.2. 組織蛋白定量與樣品(Sample)配置**

利用商業配方 Pierce® BCA Protein Assay Kit 進行檢測，原理為於鹼性條件  
下可還原二價銅離子成為一價亞銅離子，並與 BCA 試劑形成藍色複合物，於波  
長 562 nm 下測定吸光值。分別取蛋白質樣品以及各濃度之標準品(0-8 mg/mL)加  
入 96-well 中，再混和 reagent A 及 reagent B (50 : 1)加入使總體積為 200  $\mu$ L，於  
37°C 避光反應 30 分鐘後至 ELISA Reader 偵測吸光值。將測得的數值與標準品濃  
度畫出標準曲線，再將未知濃度的蛋白質所得吸光值帶入公式中，換算出各樣品  
之蛋白濃度。取 5-10  $\mu$ L 已完成定量之蛋白質，同時以二次水稀釋至相同體積並  
加入 5X loading dye 混和均勻並快速離心，於 100°C 加熱 10 分鐘後置於碎冰中冷  
卻 10 分鐘後離心備用。

#### **4.3.3. 鑄膠(SDS-PAGE)與電泳法(Electrophoresis)**

將鑄膠玻璃洗淨乾淨後置於鑄膠台上固定。選擇於配置的分離膠 separating  
gel (附表一)的比例(8-15%)，將其加入玻璃片夾層中並加入 30%酒精將膠壓平，

待 40-60 分鐘分離膠凝固後將酒精去除。接著加入配好的上層膠 stacking gel (附表二)並插入 10 或 15 well 之齒梳，待 10-20 分鐘上層膠凝固後拔除齒梳即可使用。將 1X Running buffer (附表三)倒入電泳槽內，再將準備好的蛋白樣品以及 protein standard marker 小心注入 well 中。完成後以 60 V 使蛋白通過 stacking gel 壓縮成一直線，再以漸進的方式將電壓調整成 100 V，待蛋白置適當的位置後即可停止電泳。

附表一：Separating gel 配方

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

附表二：Stacking gel 配方

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

附表三：Running buffer 配方

10X Running buffer (1L)		
Tris-Base	30 g	攪拌均勻並補二次水置

Glycine	144 g	1L，儲存於 4°C 冰箱。
SDS	10 g	

#### 4.3.4. 轉漬法(Transfer)

先將海綿、濾紙以及硝化纖維膜(nitrocellulose membrane, NC membrane)充分浸泡在 transfer buffer (附表四)中備用，在轉漬夾上依序放入海棉及濾紙並去除氣泡，而後放上已完成電泳的分離膠、濾紙以及海綿，最後將轉漬夾蓋上夾緊放入轉漬槽中，同時放入冰包並倒入 transfer buffer，根據目標蛋白調整時間並以 100 V 轉漬。

附表四：Transfer buffer 配方

Transfer buffer (4 L)		
Tris-Base	12.4 g	攪拌均勻並補二次水置 4 L， 儲存於 4°C 冰箱。
Glycine	57.6 g	
Methanol	800 mL	

#### 4.3.5. 免疫墨點法(Immunoblot)

將已轉漬完成的 NC membrane 以麗春紅(ponceau's solution)進行紅染，並裁剪出目標蛋白分子量的部分，再以 1X TBS (附表五)將紅染清洗乾淨。接著進行 blocking，將 NC membrane 浸泡於 5%的脫脂牛奶中並放上 shaker 於 4°C 搖晃 1 小時，再以 1X TBS + 0.1% tween-20 buffer 清洗 3 次、每次 10 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 1X TBS + 0.1% tween-20 buffer 清洗 3 次、每次 10 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 1X TBS + 0.1% tween-20 buffer 清洗 3 次，每次 10 分鐘以洗去非特異性鍵結。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。

附表五：TBS 配方

10X TBS (100 mL)		
Tris-Base	12.1 g	攪拌均勻並補二次水置 500 mL 並調正 pH 值至 7.4，儲存於 4°C 冰箱。
NaCl	40 g	

#### 4.4. 細胞培養(Cell culture)

##### 4.4.1. 細胞培養條件

選用人類乳腺癌細胞株 Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7)，培養液為 Minimum Essential Media (MEM)，額外加入 10% fetal bovine serum (FBS)、1% penicillin/streptomycin、2 mM L-glutamine、2.2 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA, 100X) 以及 1.0 mM sodium pyruvate，培養在 75 cm<sup>2</sup> flask 中，並放置在 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱裡，每 2 天更換一次培養液。

##### 4.4.2. 解凍細胞

將含有 MCF-7 細胞的冷凍小管自液態氮桶取出並迅速至 37°C 水浴槽中解凍，待其接近完全解凍時盡速移至無菌操作台，將冷凍小管中的細胞取出加入含有 medium 的 75 cm<sup>2</sup> flask 中並輕輕搖晃均勻後，放回培養箱中，隔日更換 medium。

##### 4.4.3. 繼代培養

當細胞生長近九分滿時，移除 medium 並用 PBS 潤洗 75 cm<sup>2</sup> flask，加入 trypsin-EDTA 並於培養箱培養 5 分鐘，在以兩倍體積之 medium 中和 trypsin 的作用並將細胞沖洗下來後離心 1200 rpm 5 分鐘。離心後去除上清液並加入適量的 medium，均勻混和後將細胞懸浮液放回 75 cm<sup>2</sup> flask 中。

##### 4.4.4. 冷凍細胞

預先配置含有 7% DMSO 的 medium 作為冷凍細胞的保存液。當細胞生長至九分滿時，去除 medium 並以 PBS 潤洗 75 cm<sup>2</sup> flask，加入 trypsin-EDTA 並於培養箱培養 5 分鐘，在以兩倍體積之 medium 中和 trypsin 的作用並將細胞沖洗下

來後離心 1200 rpm 5 分鐘。離心後去除上清液，加入已配置好的保存液，均勻混和後分裝約 1.5 mL 於一管冷凍小管中。將包裝完全的冷凍小管放入裝有異丙醇 (isopropanol) 的冷凍梯度盒，至於 -80°C 冰箱冷凍一天，再放入液態氮桶中長期保存。

#### 4.4.5. 細胞加藥處理

將細胞種植於 12 孔盤或 10 cm dish 中培養 24 小時，待細胞貼附後加入 starvation medium (不含有 10% FBS 的培養液) 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，再將培養液換回含有 500 ng/mL leptin 的培養液，作為建立肥胖型乳癌之誘導劑，分別合併處理不同劑量的 AAE、Que 及 Api，再放置 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 無菌恆溫培養箱中生長 48 小時，方可進行實驗。

### 4.5. 細胞自噬分析(Autophagy analysis)

#### 4.5.1. 細胞自噬染色試驗(Acidic vesicular organelles, AVO stain)

將長滿貼附於 75 T flask 的 MCF-7 細胞經細胞計數，每 10 cm 培養盤種 5.5 × 10<sup>5</sup> 個細胞，再經過 24 小時細胞飢餓以及 48 小時細胞加藥處理後，吸除培養液並以 PBS 清洗細胞 1 次後去除上清液，並加入 1 mL 的 AVO 染劑(10 mL 的 PBS + 1 μL 的 AVO 原始試劑)反應 15 分鐘後，將 AVO 染劑去除，並以 PBS 清洗細胞，最後再加入新的 1 mL medium 後，利用螢光顯微鏡觀察細胞自噬的結果。

#### 4.5.2. LC3 螢光分析(LC3 immunofluorescence assay)

將 MCF-7 細胞培養在 12 孔盤中，每個 well 中細胞數量為 3 × 10<sup>4</sup>。培養 24 小時待細胞貼附，將培養液更換為 starvation medium 進行飢餓處理 24 小時後更換為 10% FBS MEM medium，加入 leptin 誘導約五分鐘後再加入不同濃度的 AAE、Que 及 Api 處理 48 小時。在加藥第 46 小時時加入 Muse® Autophagy LC3 Kit (Antibody-Based) reagent A 1 μL/well，再放回培養箱中繼續培養。加藥處理滿 48 小時，去除上清液、加入 PBS 1 mL/well 清洗並移除後，加入 0.25% trypsin-EDTA 300 μL/well 後放入烘箱中 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 (原液以 1 : 10 稀釋) 95  $\mu$ L 以及 antibody 5  $\mu$ L 均勻混合，並冰上避光靜置染色 30 分鐘。反應完成後以 1200 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，加入 Muse® Autophagy LC3 Kit (Antibody-Based) buffer 200  $\mu$ L (原液以 1 : 5 稀釋) 混合均勻後，以流式細胞儀(Muse™)分析 LC3 的螢光表現。

#### **4.6. 細胞蛋白分析(Western blotting)**

##### **4.6.1. 萃取蛋白**

將  $7.5 \times 10^5$  顆細胞接種於 10 cm 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，將培養液更換為 starvation medium 進行飢餓處理並放回 5% CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫之培養箱中 24 小時，然後再換回正常的培養液並加入不同劑量 AAE、Que 及 Api 處理 48 小時，48 小時後以 15 mL 離心管收取上清液，用 PBS 清洗細胞再加入 0.25% trypsin-EDTA 1 mL/dish 並放入恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞懸浮，再加入 PBS 把細胞收入含上清液的離心管中並離心 1200 rpm、五分鐘，倒掉上清液，再加入 1 mL PBS 清洗細胞並離心 1200 rpm 離心五分鐘，倒掉上清液，重複以上動作數次，加入 300  $\mu$ L 的 RIPA buffer (RIPA buffer 含 150 mM NaCl、0.5% deoxycholic acid、1% NP-40、0.1% SDS、50 mM Tris-base，pH 7.5)，再加入 10  $\mu$ L 蛋白酶抑制劑(1 mM sodium orthovanadate、100  $\mu$ g PMSF、170  $\mu$ g/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 分鐘後保留上清液的部分，並加入 10  $\mu$ L 蛋白酶抑制劑。藉由 BCA protein assay kit 與蛋白在 37°C 下反應 30 分鐘後，以 562 nm 測其 OD 值並換算出蛋白濃度。

##### **4.6.2. 蛋白表現分析**

同上述實驗方法 4.3.。

#### **4.7. 抑制劑分析(Inhibitory assay)**

細胞自噬抑制劑 3-methyladenine (3MA) 或 chloroquine (CQ) 於特定濃度(3-MA, 25  $\mu$ M; CQ, 10  $\mu$ M) 預先加入培養液中 15 分鐘，再加入 leptin 處理 48 小時。

接著，透過西方墨點法、LC3 螢光分析及細胞存活測試等進行分析。

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

將 MCF-7 細胞培養於 6 孔盤中，每 well 細胞數量約為  $2.5 \times 10^4$ /mL。培養 24 小時待細胞貼附，將培養基更換成 starvation medium 進行飢餓處理 24 小時後更換為 10% FBS MEM medium。抑制劑組別先分別加入 3-MA (25  $\mu$ M)以及 CQ (10  $\mu$ M)至培養箱中反應預處理 15 分鐘，再加入 leptin (500 ng/mL)處理 48 小時後，將上清液以及細胞收集至 15 mL 離心管中，並以培養液潤洗兩次。去除培養液後用 200  $\mu$ L 培養液回溶細胞，並吸取 100  $\mu$ L 至 1.5 mL eppendorf 中，加入 100  $\mu$ L annexin V dead cell 染劑均勻混和，室溫避光染色 20 分鐘後以流式細胞儀分析細胞凋亡。

#### **4.9. 細胞存活率分析(Cell viability assay)**

將 MCF-7 細胞培養於 6 孔盤中，每 well 中細胞數量約為  $2.5 \times 10^4$ /mL。培養 24 小時待細胞貼附，將培養基更換成 starvation medium 進行飢餓處理 24 小時後更換為 10% FBS MEM medium。抑制劑組別先分別加入 3-MA (25  $\mu$ M 以及)CQ (10  $\mu$ M)至培養箱中反應預處理 15 分鐘，再加入 leptin (500 ng/mL)處理 48 小時後，去除上清液並以 PBS 清洗細胞，再與 0.25% trypsin-EDTA 500  $\mu$ L/well 反應 5 分鐘將細胞收至 1.5 mL eppendorf 中離心(1200 rpm, 5 分鐘)，去除上清液後加入 400  $\mu$ L PBS 回溶細胞且加入 8  $\mu$ L PI (propidium iodide)避光染色 5 分鐘，再以流式細胞儀分析其細胞生長的情形。

#### **4.10. 統計(Statistical analysis)**

以 Sigma-Plot 軟體分析數據，mean  $\pm$  SD 表示。利用 t-test-Unpaired 來評估統計差異。以\*表示  $P < 0.05$ ，\*\*則表示  $P < 0.01$ 。



## 第五章、結果與討論

### 5.1. 艾草萃取物成分分析

從附圖 Table 1 之成分分析中可得知，在艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)中總多酚(total polyphenols)含量約有  $14.3 \pm 0.7\%$ ；總黃酮(total flavonoids)約有  $26.9 \pm 3.2\%$ ，初步確認 AAE 為富含類黃酮(flavonoids)之萃取物。

### 5.2. 探討艾草萃取物對於癌症動物模式之腫瘤生長以及血清中瘦素濃度之影響

Fig. 1 為延續先前實驗室進行之癌症動物模式，已完成之小鼠移植性腫瘤活體拍照及腫瘤量測：瘦素(leptin)誘導組之目測體積相較控制組(MCF-7 alone)明顯增大(Fig. 1A)，而在動物實驗期間皆以三天一次的頻率進行腫瘤體積量測及記錄，可發現最終誘導組相較控制組確實有顯著增大之趨勢(Fig. 1B)。經犧牲後腫瘤秤量統計除了發現誘導組體積增大，且 AAE 毒性組較控制組些微減輕之外，AAE 試驗組與誘導組相比有明顯減輕的情形(Fig. 1C)，可推知 AAE 有減緩 leptin 刺激腫瘤增大的治療效果。另外從犧牲後測量血清中 leptin 之濃度可知誘導組之濃度有明顯上升的趨勢；而 AAE 試驗組以及毒性組之 leptin 濃度皆有下降之趨勢，試驗組相較於誘導組尤其明顯(Fig. 1D)，由此可推知給予 AAE 除了可以降低腫瘤大小之外，同時也具有降低血清中 leptin 濃度的作用。

### 5.3. 探討艾草萃取物對於動物腫瘤組織切片型態以及細胞凋亡之影響

Fig. 2 利用組織切片並染色的方式觀察組織的狀態。從 Fig. 2A 之蘇木精-伊紅染色(hematoxylin & eosin, H&E stain)中可以看出控制組以及 leptin 誘導組的腫瘤組織型態皆有組織界限不明顯，伴隨細胞核濃染的情形，而誘導組織切片結果尤其明顯。而 AAE 試驗組的組織界線較為明顯且細胞核較為淡染，可以得出 AAE 對於活體具有改善腫瘤組織型態的效果。另外從 Fig. 2B 之末端去氧核苷酸轉移酶去氧尿苷三磷酸切口末端標記染色(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling stain, TUNEL stain)分析可看出誘導組細胞凋亡(apoptosis)的表現明顯較控制組減少；而反之 AAE 試驗組有明顯增加的趨勢。由上述結果可以驗

證實驗室先前的研究結果：leptin 會抑制乳癌細胞凋亡之作用，而給予 AAE 則會使其增加。

#### 5.4. 探討艾草萃取物對於動物腫瘤組織細胞凋亡以及細胞自噬分子機制之影響

Fig. 3 利用西方墨點法(Western blotting)探討上述動物實驗之腫瘤組織中細胞凋亡以及細胞自噬(autophagy)相關訊息傳遞路徑之分子表現。細胞凋亡相關蛋白表現的分析結果顯示 leptin 誘導組中增殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)以及抗凋亡蛋白 p-Bad 皆有增加的趨勢，而凋亡關鍵分子活化態胱天蛋白酶(cysteine aspartic protease-3, caspase-3)則有減少的蛋白表現，可推知誘導組中細胞凋亡減少；相反的 AAE 試驗組有細胞凋亡增加的結果(Fig. 3A)，可再次驗證 AAE 在 leptin 的誘導情況下可以增加細胞凋亡的產生。而細胞自噬相關蛋白的表現分析可看出 class III PI3K、Beclin-1、Atg5/12 以及 LC3 蛋白表現量皆為增加，p62 則表現減少；而 AAE 試驗組的自噬相關蛋白表現量與誘導組呈現相反表現趨勢(Fig. 2B)，由此結果推知 AAE 可能具有抑制 leptin 誘導乳癌細胞自噬之作用。合併上述 Fig. 2 之實驗結果可以得知動物實驗中 AAE 在 leptin 誘導下具有增加細胞凋亡以及抑制細胞自噬的作用。

#### 5.5. 探討艾草萃取物對於瘦素誘發乳癌細胞自噬反應之影響

Fig. 4 延續實驗室研究以人類乳腺癌 MCF-7 細胞在 leptin (500 ng/mL)刺激下，合併處理 50 和 100  $\mu$ g/mL AAE 及其萃取物主要成份槲皮素(querctetin, Que)和芹菜素(apigenin, Api)以濃度 50  $\mu$ M 反應 48 小時作為肥胖型乳癌細胞試驗分析之條件。首先利用自噬染色試驗(acidic vesicular organelles stain, AVO stain)觀察由 leptin 誘導並給予不同濃度 AAE、Que 或 Api 處理之 MCF-7 細胞自噬表現。由實驗結果可得知誘導組的自噬酸性小泡相較控制組有增加的趨勢；而萃取物和天然物組別大多都有明顯減少的趨勢(Fig. 4A)，進而推知 AAE 以及其主成份皆有抑制 leptin 誘導之細胞自噬的產生。再使用流式細胞儀 Muse® Autophagy LC3 Kit (Antibody-Based)分析細胞自噬分子 LC3 螢光強度變化，實驗結果對應 MCF-7 細胞單獨飢餓處理 48 小時，LC3 螢光強度有大幅上升的現象作為自噬陽性對照，

可驗證 MCF-7 細胞會因外部環境壓力而產生細胞自噬進以延續細胞存活。由 Fig. 4B 結果顯示 leptin 誘導的 LC3 螢光表現有明顯的上升；而處理 100  $\mu$ g/mL AAE、Que 或 Api 的螢光強度皆有顯著減少的趨勢，可得知三者皆能減少 leptin 所誘導細胞自噬表現。接續，細胞實驗中同樣利用西方墨點法分析可得知 leptin 誘導組之細胞自噬相關蛋白：class III PI3K、Beclin-1、Atg5/12 以及 LC3 有增加的趨勢；反之於 AAE、Que 以及 Api 各組細胞中上述蛋白表現量降低(Fig. 4C)。綜合上述，由 Fig. 4 可得知 leptin 可誘發 MCF-7 細胞產生自噬作用，而處理 AAE、Que 或 Api 具有減少細胞自噬之發生。

### 5.6. 探討艾草萃取物對於瘦素誘發乳癌細胞自噬分子機制之影響

為進一步驗證 Fig. 4 的實驗結果：AAE 以及 Que、Api 皆可使 MCF-7 細胞之保護性自噬減少，可能進而達到抑制癌細胞生長的效果。除了 leptin 誘導組以及 leptin 合併處理 AAE 組之外，細胞實驗也加入自噬抑制劑的組別：預先於 leptin 誘導之前 15 分鐘加入 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)或是氯喹(chloroquine, CQ)。抑制劑組再與 100  $\mu$ g/mL AAE 萃取物組相比較對於細胞自噬抑制之效力與差異。由西方墨點法的結果可得知加入 3-MA 抑制劑組中相較於 leptin 組之 LC3 II、Beclin-1 以及 class III PI3K 皆有表現減少的趨勢；而加入 CQ 抑制劑組別中 LC3 II 有上升的現象，其他蛋白表現不受影響(Fig. 5A)，此結果可相符 CQ 抑制自噬作用之作用標的，確認 CQ 抑制自噬小體與溶小體之融合，導致自噬小體於細胞中堆積，進而導致 LC3 II 等蛋白有上升的趨勢。進一步，在自噬抑制劑試驗中，實驗結果可發現相較起誘導組，AAE 以及 3-MA 的組別之 LC3 螢光強度變化有顯著的下降趨勢，然而加入 CQ 自噬抑制劑的組別則有顯著上升的現象(Fig. 5B)，此結果可與 Fig. 5A 之蛋白表現趨勢相呼應，再次確認加入 AAE 可與 3-MA 達到相同抑制 leptin 所誘發 MCF-7 細胞自噬的作用。

### 5.7. 比較艾草萃取物和自噬抑制劑對於瘦素調控細胞自噬以及細胞凋亡之效用

除了分析細胞自噬相關蛋白在抑制劑作用下的表現之外，同時也探討凋亡相關蛋白，包含 caspase-3 及其下游分子 PARP-1 (poly [ADP-ribose] polymerase 1)、

促凋亡蛋白 Bax (Bcl-2-associated X protein)之表現，初步從上述蛋白表現可以得知加入自噬抑制劑具有提升細胞凋亡的效果(Fig. 6A)。為進一步釐清細胞自噬與凋亡之間的交互作用，可從細胞凋亡分析(annexin V dead cell assay)實驗中得知：兩種自噬抑制劑組別對於細胞凋亡表現皆有顯著增加的結果(Fig. 6B)，此結果與 Fig. 6A 的實驗推論相符，可確認加入自噬抑制劑對細胞凋亡確實有促進的效果。另外，根據細胞存活分析(cell viability assay)試驗中確認細胞自噬為癌細胞自我保護的存活機制，加入抑制劑組別其細胞存活率相較 leptin 誘導組有顯著的減少(Fig. 6C)，進一步得知 AAE 組與自噬抑制劑皆可增加 MCF-7 細胞的死亡率。綜合上述，實驗得知 leptin 誘發細胞自噬產生可以保護 MCF-7 細胞存活與對抗凋亡；而 AAE 可發揮如 3-MA 相當之自噬抑制作用，進而誘發細胞走向凋亡(Figs. 5-6)。

## 5.8. 總結與未來研究

總結，綜合過去實驗室研究結果以及本文可以釐清 AAE 除了具有抑制由 leptin 所誘發的細胞增生、遷移、上皮間質轉化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及抗凋亡的特性之外，本篇研究也從動物實驗以及細胞實驗中證明 AAE 可以透過抑制 leptin 誘發的保護性細胞自噬，達到降低乳癌 MCF-7 細胞生長之作用。並且提出 AAE 和自噬抑制劑皆能阻斷 leptin 模式中細胞自噬表現，同時可啟動細胞導向凋亡(Fig. 7)。由於實驗發現自噬抑制劑與啟動細胞凋亡之間有相關性存在，故在未來研究的方向可以朝向釐清 leptin 誘導之下，自噬抑制劑如何啟動細胞凋亡發展，同時將 AAE 與自噬抑制劑相合併並觀察在此條件之下細胞自噬及凋亡的狀態。目前除確認 AAE 可從多方面抑制乳癌細胞惡化發展，也可推論 AAE 具有拮抗 leptin 之潛力，並具有應用於人類肥胖型乳癌治療之可能性。

## 第六章、參考文獻

1. Wang X, Li L, Gao J, Liu J, Guo M, Liu L, Wang W, Wang J, Xing Z, Yu Z et al. The association between body size and breast cancer in Han women in northern and eastern China. *Oncologist*. 2016 Nov;21(11):1362-1368.
2. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(13):4325–31.
3. Yan D, Avtanski D, Saxena NK, Sharma D. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires beta-catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2012;287(11):8598–612.
4. Sebastiano Andò, Luca Gelsomino, Salvatore Panza, Cinzia Giordano, Daniela Bonofiglio, Ines Barone, and Stefania Catalano. Obesity, Leptin and Breast Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan; 11(1): 62.
5. Manuel Picon-Ruiz, Cynthia Morata-Tarifa, Janeiro J. Valle-Goffin, Eitan R. Friedman and Joyce M. Slingerland. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017 Sep-Oct; 67(5): 378–397.
6. Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1447-53.
7. Zheng Q, Dunlap SM, Zhu J, Downs-Kelly E, Rich J, Hursting SD, Berger NA, Reizes O. Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Jul 11;18(4):491-503.
8. Bora KS, Sharma A. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm Biol*. 2011 Dec;49(12):1216-23.
9. Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alshatwi AA, Jyothi A, Munshi A. *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2012 Jul;39(7):7373-9.
10. Caner A, Döşkaya M, Değirmenci A, Can H, Baykan S, Uner A, Başdemir G, Zeybek U, Gürüz Y. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Exp Parasitol*. 2008 May;119(1):173-9.
11. Gilani AH, Janbaz KH. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol*. 1995 Mar;26(2):309-15.

12. Amat N, Upur H, Blazeković B. In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *J Ethnopharmacol.* 2010 Sep 15;131(2):478-84.
13. Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem Cent J.* 2012 Sep 9;6(1):97.
14. Sun X, Sun H, Zhang J, Ji X. Artemisia Extract Improves Insulin Sensitivity in Women With Gestational Diabetes Mellitus by Up-Regulating Adiponectin. *J Clin Pharmacol.* 2016 Dec;56(12):1550-1554.
15. Wu YH. The inhibitory effects of artemisia argyi extracts on leptin-induced breast tumor progression. Master Thesis, Department of Nutrition, Chung Shan Medical University, 2018.
16. Theodore Kelesidis, Iosif Kelesidis, Sharon Chou and Christos S. Mantzoros. Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med.* 2010 January 19; 152(2): 93–100.
17. Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
18. Candida N Perera, Hwei G Chin, Nadire Duru and Ignacio G Camarillo. Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression. *Journal of Endocrinology* (2008) 199, 221–233
19. Girish V. Putcha, Charles A. Harris, Krista L. Moulder, Rachael M. Easton, Craig B. Thompson and Eugene M. Johnson, Jr. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol.* 2002 Apr 29; 157(3): 441–453.
20. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May;221(1):3-12.
21. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest.* 2015 Jan;125(1):42-6.
22. Pawan Kumar Raut, Dong Young Choi, Sang Hyun Kim, Jin Tae Hong, Taeg Kyu Kwon, Jee Heon Jeong and Pil-Hoon Park. Estrogen receptor signaling mediates leptin-induced growth of breast cancer cells via autophagy induction. *Oncotarget.* 2017; 8:109417-109435.
23. 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 Apr 3;13(4):777-778.
24. 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.
25. Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2012). Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nature biotechnology*, 30(7), 671.
  26. Ren X, Yao C, Wu F, Li Z, Xing J, Zhang H. Effectiveness of moxibustion treatment in quality of life in patients with knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:569523.
  27. Chen R, Chen M, Xiong J, Chi Z, Zhang B, Tian N, Xu Z, Zhang T, Li W, Zhang W, et al. Curative effect of heat-sensitive moxibustion on chronic persistent asthma: A multicenter randomized controlled trial. *J Tradit Chin Med.* 2013;33:584–591.
  28. Park JW, Lee BH, Lee H. Moxibustion in the management of irritable bowel syndrome: Systematic review and meta-analysis. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:247.
  29. Yang J, Yu S, Lao L, Yang M, Chen J, Luo X, Wang Y, Chen X, Li J, Zhu L, et al. Use of moxibustion to treat primary dysmenorrhea at two interventional times: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015;16:35.
  30. Guo J, Wang LP, Liu CZ, Zhang J, Wang GL, Yi JH, Cheng JL. Efficacy of acupuncture for primary insomnia: A randomized controlled clinical trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:163850.
  31. Li S, Zhou S, Yang W, Meng D. Gastro-protective effect of edible plant *Artemisia argyi* in ethanol-induced rats via normalizing inflammatory responses and oxidative stress. *J Ethnopharmacol.* 2018 Mar 25;214:207-217.
  32. Hyung-Min Han, Seung-Ju Kim, Jong-Sik Kim, Bum Hoi Kim, Hai Woong Lee, Yong Tae Lee, and Kyung-Hwa Kang. Ameliorative effects of *Artemisia argyi* Folium extract on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesions in BALB/c mice. *Mol Med Rep.* 2016 Oct; 14(4): 3206–3214.
  33. Chen LL, Zhang HJ, Chao J, Liu JF. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation. *J Ethnopharmacol.* 2017 May 23;204:107-117.

## 第七章、圖表

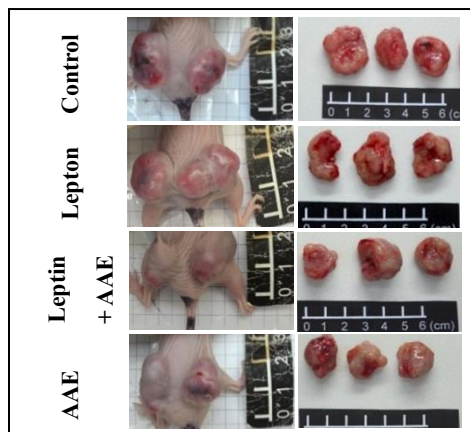
**Table 1. Composition of the *Artemisia aryi* extracts (AAE)**

<b>Composition</b>	<b>AAE</b>
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	14.3 ± 0.7%
Total flavonoid (Jia method)	26.9 ± 3.2%

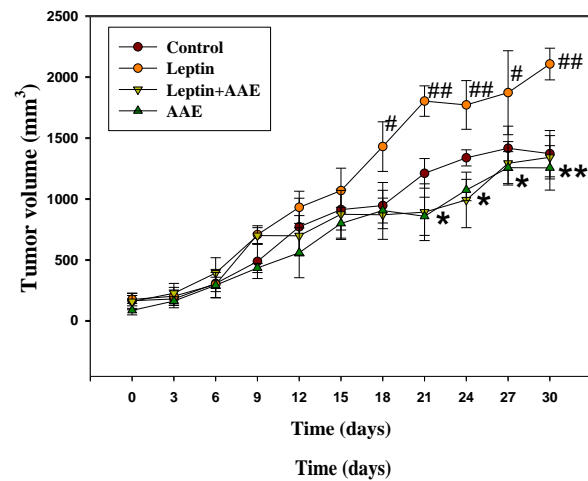


**Fig. 1**

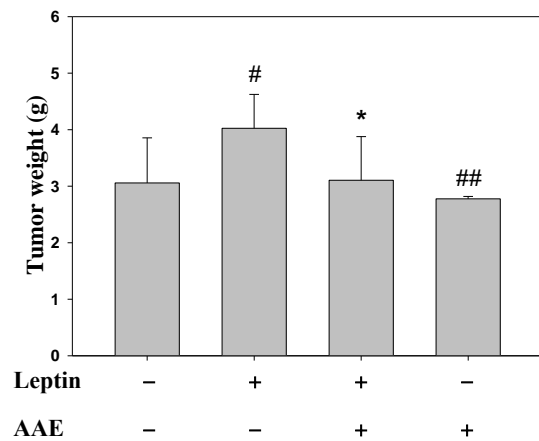
(A)



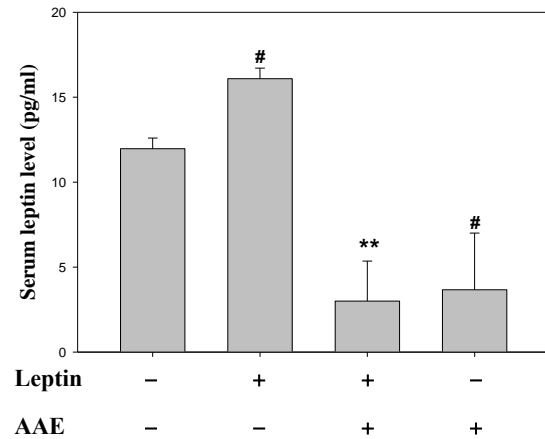
(B)



(C)

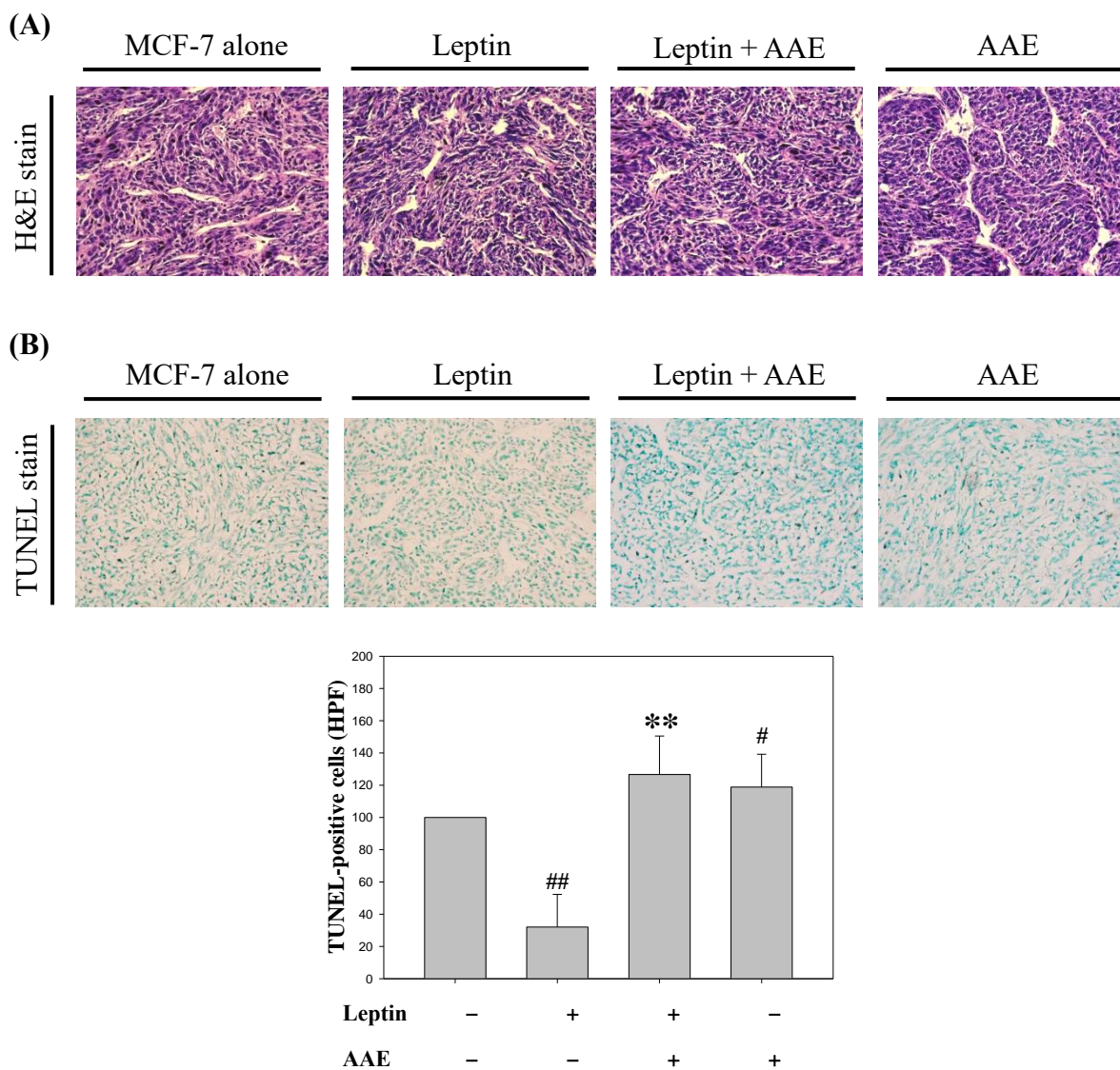


(D)



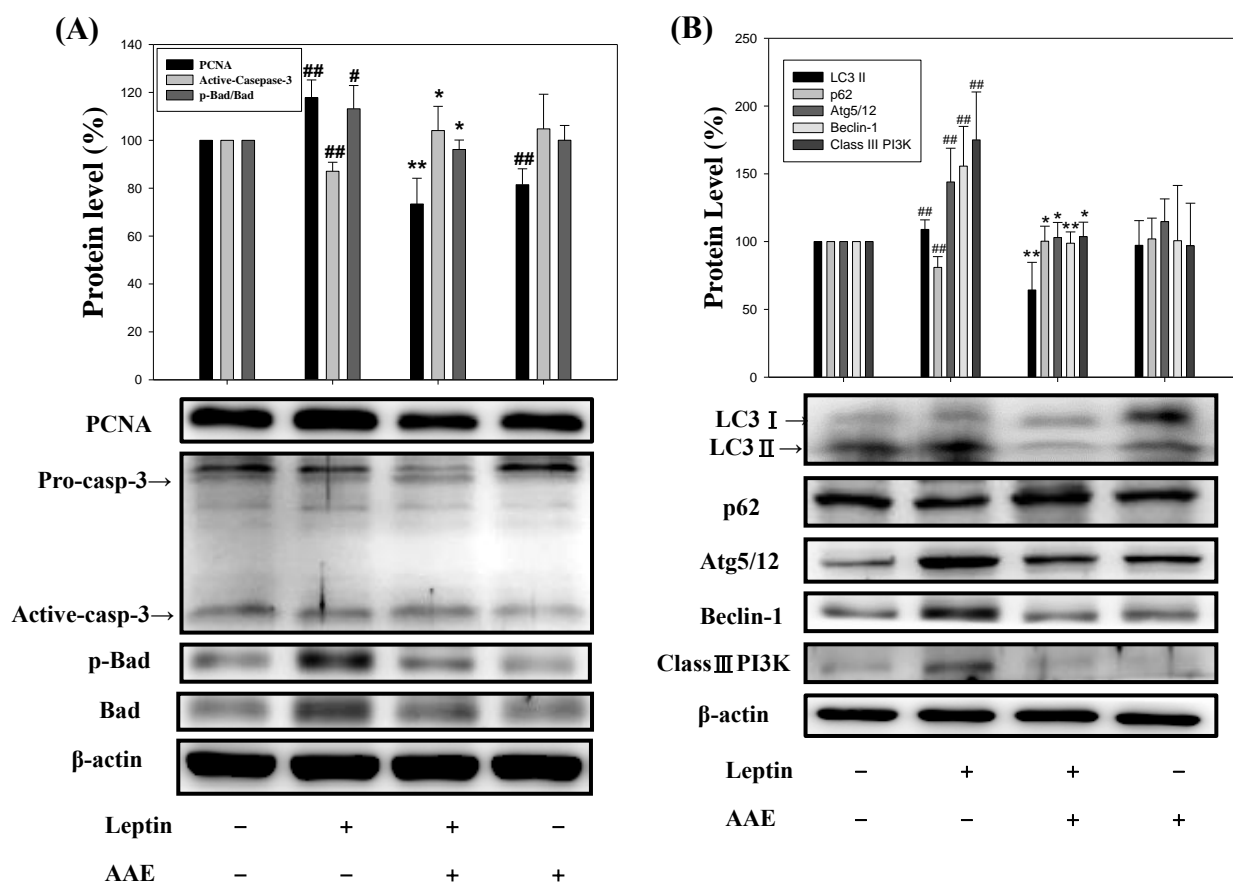
**Fig. 1. Effect of AAE on leptin-induced of MCF-7 tumor growth in xenograft model.** The mice implanted with MCF-7 xenografts were treated with leptin (1 mg/kg, 5 days/week) and/or AAE (1%) for 30 days. (A) Tumor formation was visualized by photography. (B-C) Tumor volume and weight of nude mice were measured at indicative day after tumor inoculation. (D) Serum level of leptin was detected by ELISA assays. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6) from one independent experiment. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the leptin alone.

**Fig. 2**



**Fig. 2. Effects of AAE on leptin-induced MCF-7 tumor growth, apoptosis and autophagy in xenograft model.** The mice were implanted with MCF-7 xenografts were treated with leptin (1 mg/kg, 5 days/week) and/or AAE (1%) for 30 days. Representative high-power field (HPF, 400X) images of tumor sections from different treatments stained with H&E (A) and apoptosis maker-TUNEL (B). Statistical analysis of TUNEL-positive cells among different groups is presented as mean  $\pm$  SD (n = 6) from one independent experiment. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. \*\*p < 0.01 compared with the leptin alone.

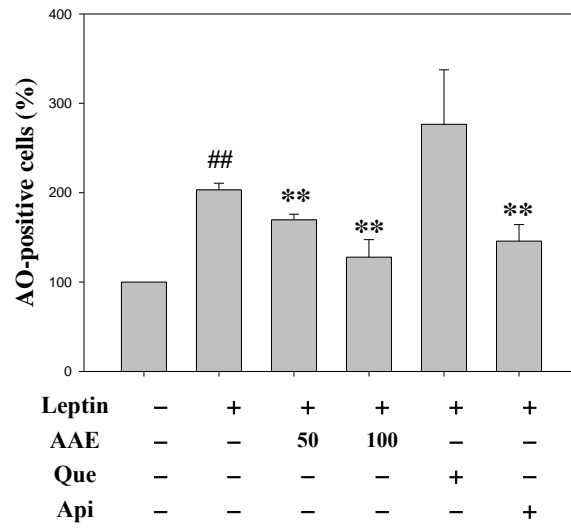
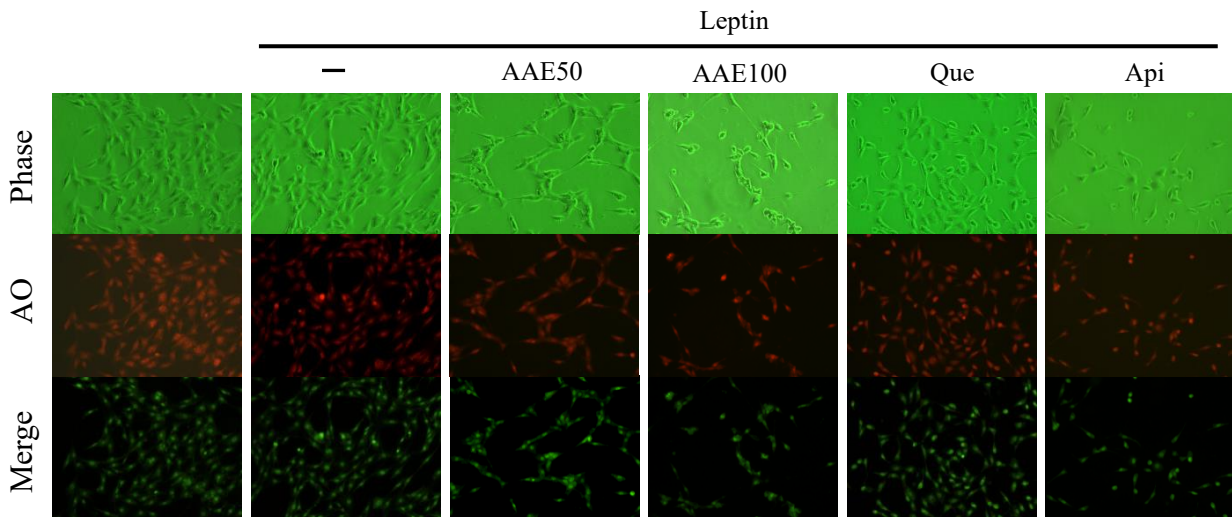
**Fig. 3**



**Fig. 3. Effect of AAE on the leptin-induced anti-apoptosis, and autophagy signaling *in vivo*.** The mice implanted with MCF-7 xenografts were treated with leptin (1 mg/kg, 5 days/week) and/or AAE (1%). The mice were sacrificed after 30 days, and tumors were collected for analysis. Western blot analysis of PCNA, caspase-3, p-Bad, Bad (A), LC3, p62, Atg5/12, Beclin-1 and class III PI3K (B) protein expressions was carried out with tumor tissue extracts from them.  $\beta$ -actin was served as an internal control. The quantitative data of all protein levels are represents as mean  $\pm$  SD (n = 6) of three independent experiments. <sup>#</sup>p < 0.05, <sup>##</sup>p < 0.01 compared with the control. <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01 compared with the leptin alone.

**Fig. 4**

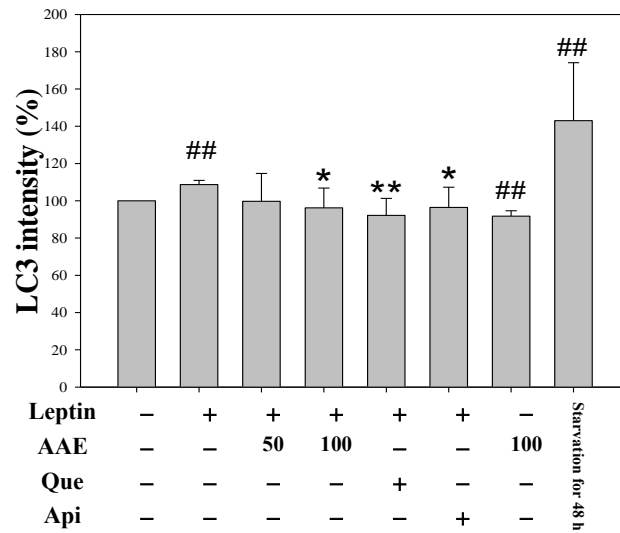
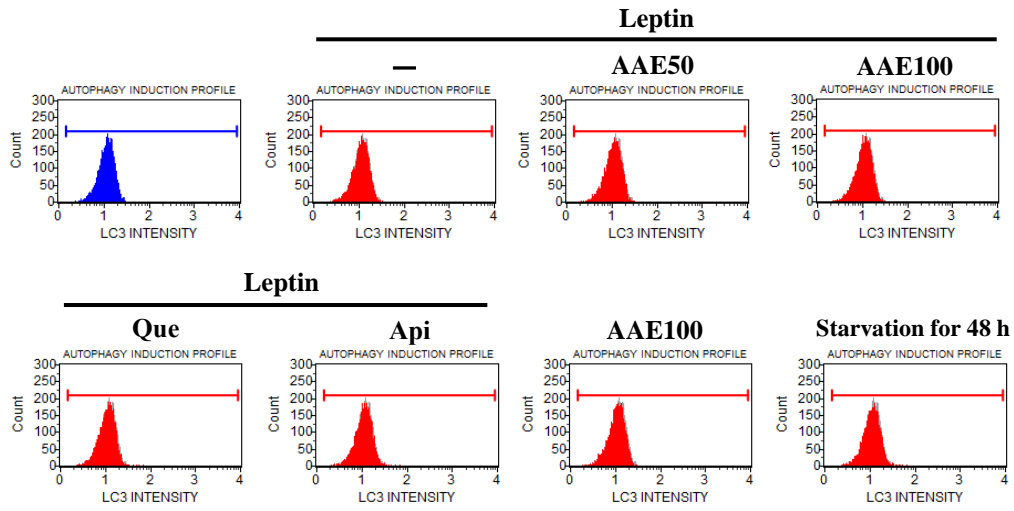
**(A)**



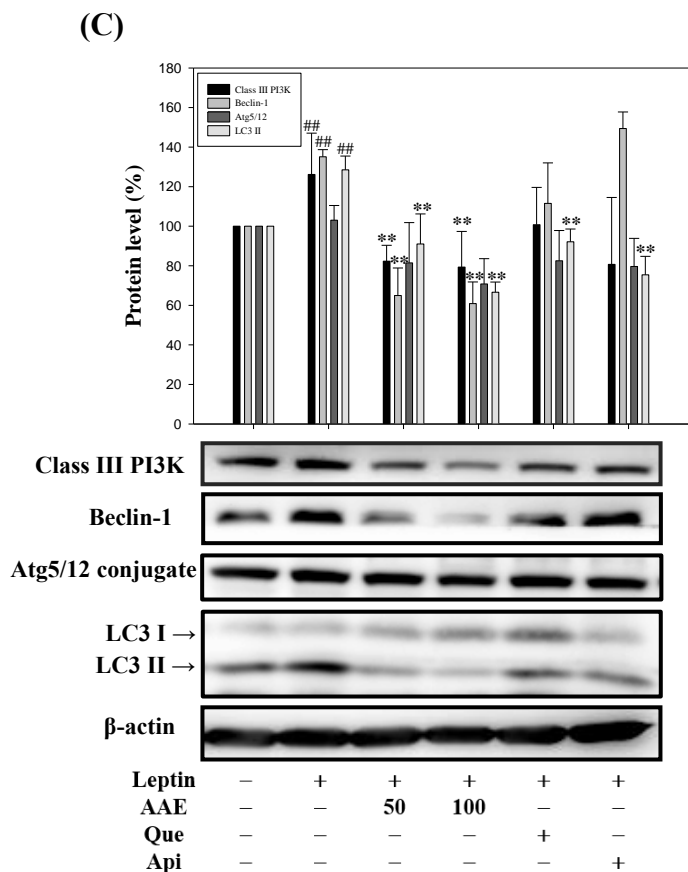
<b>Leptin</b>	-	+	+	+	+	+
<b>AAE</b>	-	-	50	100	-	-
<b>Que</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Api</b>	-	-	-	-	-	+

**Fig. 4**

**(B)**

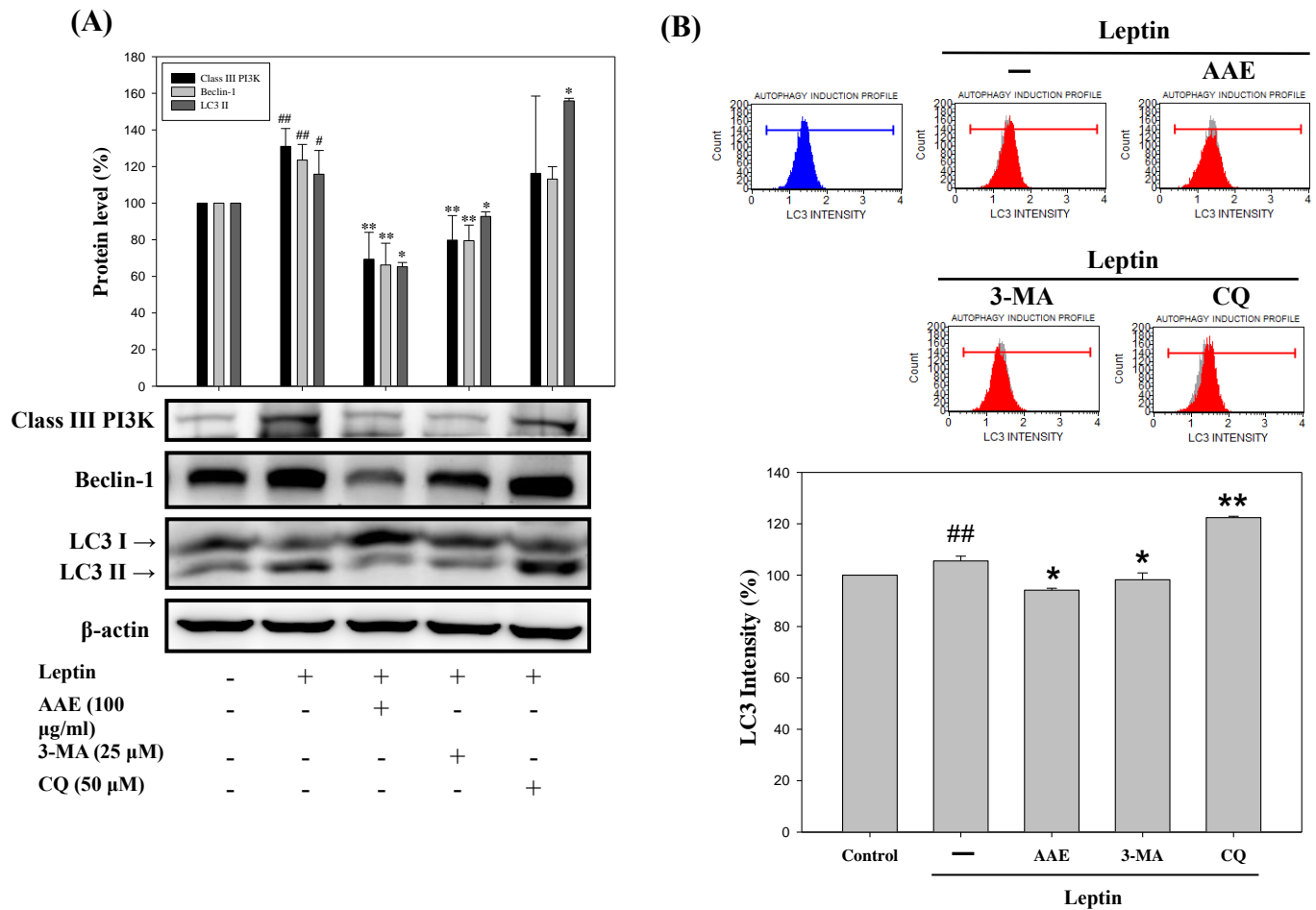


**Fig. 4**



**Fig. 4. Effects of AAE, Que, and Api on autophagy in the leptin-treated MCF-7 cells.** (A) MCF-7 cells were treated with 500 ng/mL of leptin in the presence or absence of AAE (50 and 100  $\mu$ g/mL), Que (50  $\mu$ M) or Api (50  $\mu$ M) for 48 h. Acridine orange (AO) images were taken by inverted fluorescent microscope in low-power field (100X). The quantification of AO-positive cells is presented as mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. (B) MCF-7 cells were starved, as a positive control for autophagy induction, or treated with 500 ng/mL of leptin in the presence or absence of AAE (50 and 100  $\mu$ g/mL), Que (50  $\mu$ M) or Api (50  $\mu$ M) for 48 h. 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. (C) The protein levels of class III PI3K, Beclin-1, Atg5/12, and LC3 were analyzed by Western blotting.  $\beta$ -actin was served as an internal control. The quantitative data of all protein levels are represents as mean  $\pm$  SD (n = 3) of three independent experiments. <sup>##</sup>p < 0.01 compared with the control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the leptin alone.

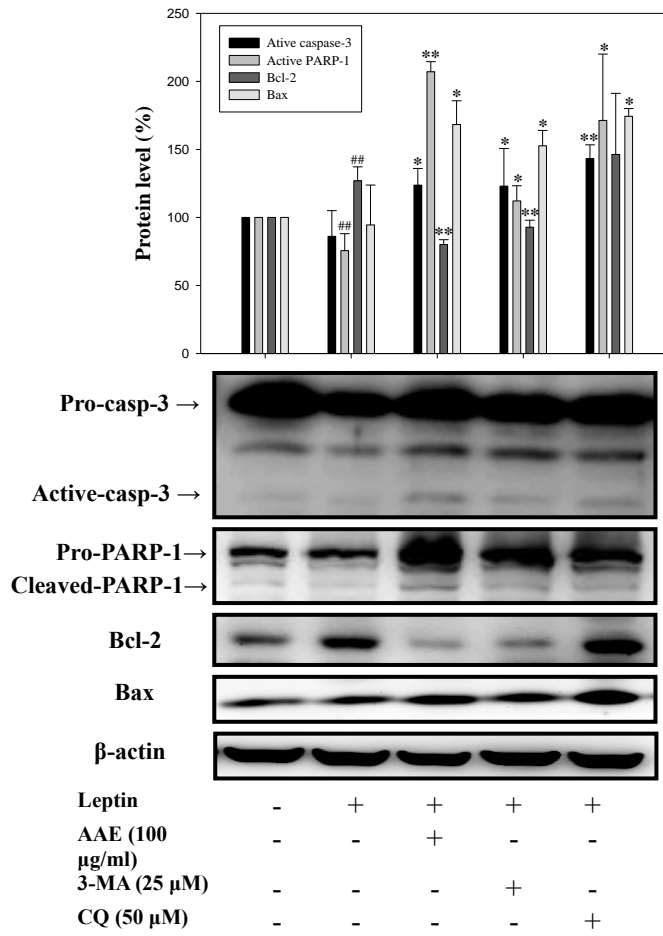
**Fig. 5**



**Fig. 5. Effects of AAE vs. autophagy inhibitors on autophagy in the leptin-treated MCF-7 cells.** MCF-7 cells were treated with 500 ng/mL of leptin in the presence or absence of AAE (100 μg/mL) or autophagic inhibitors (3-MA, 25 μM; CQ, 10 μM) for 48 h. (A) The protein levels of class III PI3K, Beclin-1, and LC3I/II were analyzed by Western blotting. β-actin was served as an internal control. The quantitative data of all protein levels are represented as mean ± SD of three independent experiment. (B) The relative level of LC3 immunofluorescence intensity was performed on a FACScan flow cytometer. The quantification of LC3 immunofluorescence intensity is presented as mean ± SD (n = 3) from three independent experiments. ##p < 0.01 compared with the control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the leptin alone.

**Fig. 6**

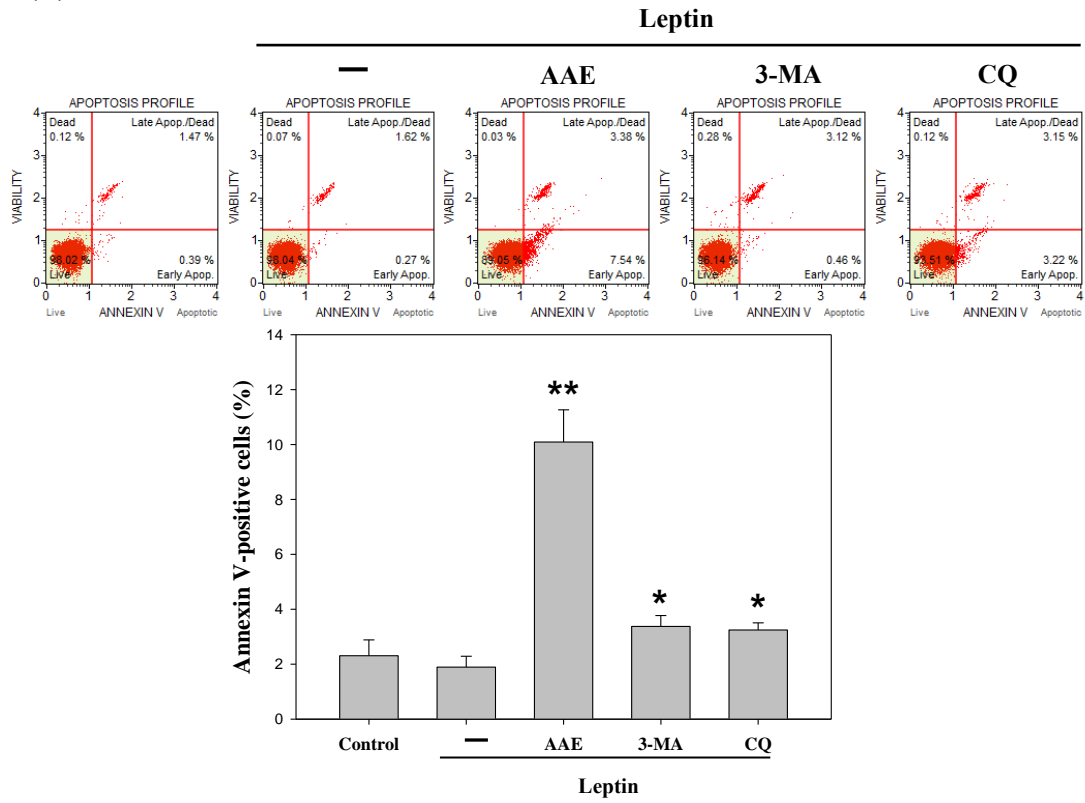
**(A)**



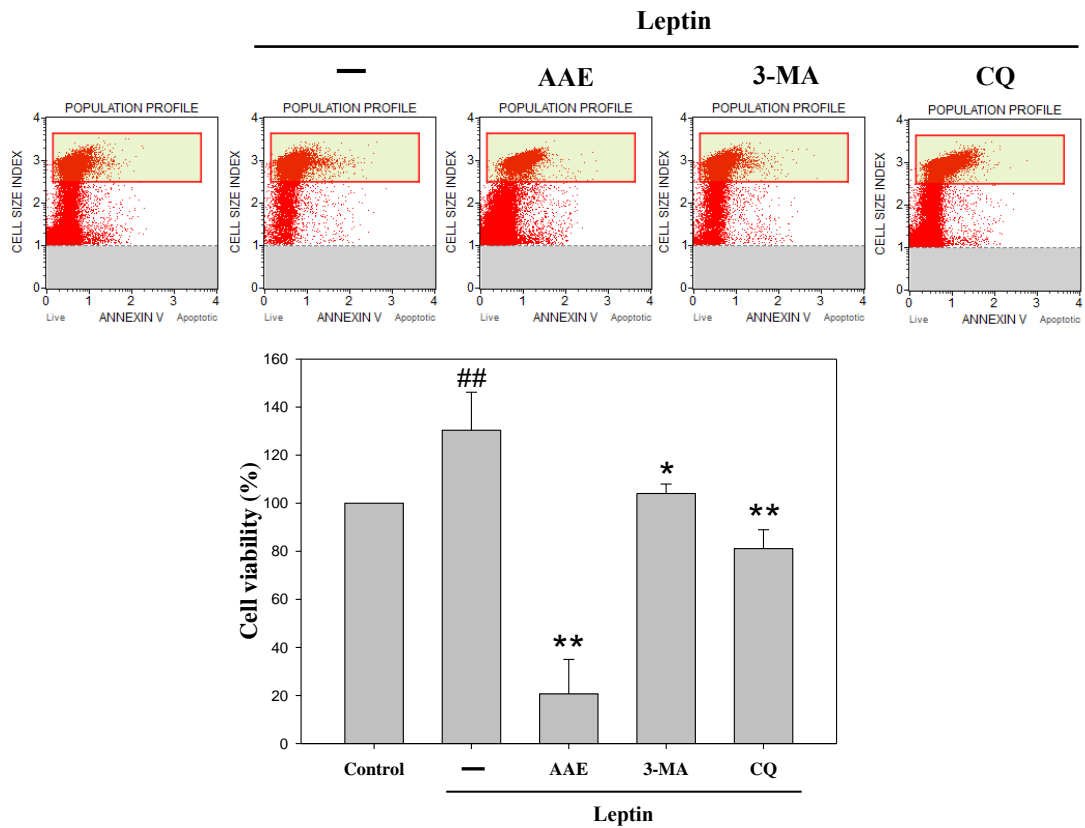


**Fig. 6**

**(B)**



**(C)**



**Fig. 6. Effects of AAE vs. autophagy inhibitors on apoptosis and cell viability in the leptin-treated MCF-7 cells.** MCF-7 cells were treated with 500 ng/mL of leptin in the presence or absence of AAE (100 µg/mL) or autophagic inhibitors (3-MA, 25 µM; CQ, 10 µM) for 48 h. (A) The protein levels of caspase-3, PARP-1, Bcl-2, and Bax were analyzed by Western blotting. β-actin was served as an internal control. The quantitative data of all protein levels are represented as mean ± SD of three independent experiments. (B) Quantification of early and late apoptosis cells and cells were analyzed by flow cytometry using annexin V staining. The proportion of annexin V-positive cells is represented as mean ± SD of three independent experiment. (B) Cell viability was measured by flow cytometric analysis. The results were represented as mean ± SD (n = 3) of three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with the leptin alone.

Fig. 7

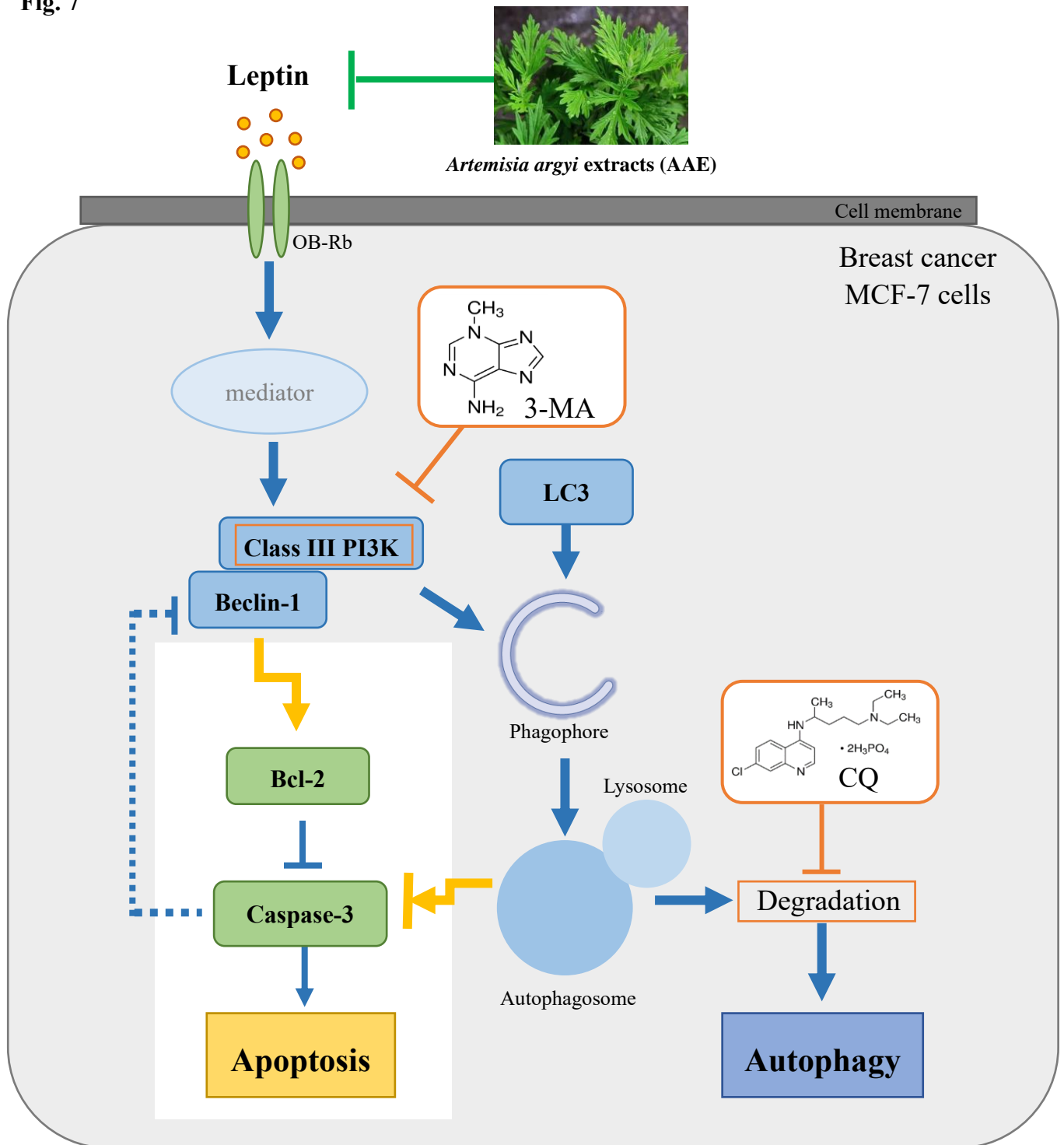


Fig. 7. The overview of pathway for AAE-inhibited the autophagy for leptin-treated breast cancer *in vitro* and *in vivo*.