

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

草莓葉水萃物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起
乳癌細胞死亡及相關機轉探討

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-004-
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳盈均
博士班研究生-兼任助理人員：梁馨文
博士班研究生-兼任助理人員：饒行佑

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 105 年 10 月 31 日

中文摘要：草莓是深受國人喜愛的水果，果實富含黃酮及多酚產物，因此具有良好抗氧化特性及抗癌效果，但對於採果後會被棄置的草莓葉則甚少研究。在國外研究中，近年已有部分研究發現草莓葉中也含有多酚類產物，可能具有醫療功效。但台灣農藥的高度使用及殘留問題，並無針對草莓葉進行相關研究。為了提升農業廢棄物的經濟效益，我們以台灣焮達生物科技提供之無毒栽種草莓葉，以水萃物進行成分分析及對乳癌細胞功效的檢測。目前已發現草莓葉水萃物含有酚類化合物且具有抗發炎特性，並抑制乳癌細胞生長，使細胞週期停滯並出現有絲分裂崩解的多核型態，而且也呈現細胞凋亡及細胞自噬的特性。乳癌與肥胖高度相關，游離脂肪酸及葡萄糖可能使細胞內質網壓力及粒線體氧化壓力增加而調節細胞生長及轉移的特性。因此在本計畫中將接著以草莓葉水萃物探討在乳癌發生過程中對細胞內質網壓力及粒線體氧化壓力的影響，以釐清調節機轉。期望達成在動物乳癌模式中，將草莓葉水萃物介入引起乳癌的過程，檢測此間的作用及機轉，包括ER stress及粒線體氧化壓力在細胞週期調節、細胞凋亡、細胞自噬的調節等。結果發現，草莓葉對動物腫瘤具抑制效果，且在合併palcitaxel後具有加成作用。另外結果也顯示在乳癌發展或治療下，草莓葉合併palcitaxel在動物乳癌模式中具有延緩骨質損傷的作用；而草莓葉水萃物也初步發現具有改善粒線體及內質網壓力的可能。從以上的研究結果，目前認為草莓葉在乳癌產生及合併臨床藥物應具有加成的作用，且可能機轉是經由調節粒線體及內質網壓力，此結果提供臨床使用的訊息，除學術貢獻外，本研究成果可進一步將草莓葉這種農業廢棄物發展為一種防癌抗癌的機能性產品。

中文關鍵詞：草莓葉，乳癌，內質網壓力，粒線體氧化壓力

英文摘要：Strawberry, rich in flavonoids and polyphenols, is one of the favorite fruits in Taiwan. There were several studies to show the fruit possess the abilities in antioxidation and anti-cancer. However, the leaves are usually discarded as waste, and the function of strawberry leaves is rare discussed. It would be due to the over-use and residue of herbicides or pesticides. To elevate the economic benefits of agricultural waste, the non-toxic planted strawberry leaf provide from "The Taste Company" is extracted the water extract and isolated the functional components to examine the effects in breast cancer. In our present study, the water extract of strawberry leaf (SLE) showed to inhibit breast cancer cell (MCF-7) growth, cause cell cycle arrest, present a multinucleation phenomenon of mitotic catastrophe, and possess the patterns of apoptosis and autophagy. Obesity is highly relative to breast cancer, excessive free fatty acids and glucose would increase the endoplasmic reticulum stress (ER stress) and the mitochondrial oxidative stress to further regulate properties of cell growth and metastasis. In this study, the SLE will be intervened to animal breast cancer to

clarify the regulation of ER stress and mitochondrial oxidative stress. The major purposes in this study are aimed to clarify the regulatory mechanisms of SLE between ER stress / mitochondrial oxidative stress and apoptosis / autophagy in animal breast cancer. The results showed that strawberry leaf extract can inhibit the development of breast tumor, and possess the synergic effect co-treated with paclitaxel. Additionally, under the progression in breast cancer, the combined treatment of strawberry and paclitaxel has the effect to decelerate bone lesion. After primary examination, the mechanisms seems to involve the regulation of mitochondrial/ER stress although they need to be further clarified. According to the results, we will explore the effects and mechanisms of strawberry leaf in breast cancer to provide the clinical application, and the combination of strawberry extract and paclitaxel possess a synergic effect, it would involve the regulation of mitochondrial and ER stress. In addition to academic contribution, the re-use of the agricultural waste would develop a functional product to in cancer prevention or therapeutic effect.

英文關鍵詞：Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) leaf, breast cancer, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial oxidative stress

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

草莓葉水萃物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2320-B-040 -004 -

執行期間：104 年 08 月 01 日至 105 年 07 月 31 日

執行機構及系所： 中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

共同主持人：

計畫參與人員：饒行佑、梁馨文

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

中 華 民 國 105 年 10 月 18 日

中文摘要

關鍵詞：草莓葉，乳癌，內質網壓力，粒線體氧化壓力

草莓是深受國人喜愛的水果，果實富含黃酮及多酚產物，因此具有良好抗氧化特性及抗癌效果，但對於採果後會被棄置的草莓葉則甚少研究。在國外研究中，近年已有部分研究發現草莓葉中也含有多酚類產物，可能具有醫療功效。但台灣農藥的高度使用及殘留問題，並無針對草莓葉進行相關研究。為了提升農業廢棄物的經濟效益，我們以台灣燦達生物科技提供之無毒栽種草莓葉，以水萃物進行成分分析及對乳癌細胞功效的檢測。目前已發現草莓葉水萃物含有酚類化合物且具有抗發炎特性，並抑制乳癌細胞生長，使細胞週期停滯並出現有絲分裂崩解的多核型態，而且也呈現細胞凋亡及細胞自噬的特性。乳癌與肥胖高度相關，游離脂肪酸及葡萄糖可能使細胞內質網壓力及粒線體氧化壓力增加而調節細胞生長及轉移的特性。因此在本計畫中將接著以草莓葉水萃物探討在乳癌發生過程中對細胞內質網壓力及粒線體氧化壓力的影響，以釐清調節機轉。期望達成在動物乳癌模式中，將草莓葉水萃物介入引起乳癌的過程，檢測此間的作用及機轉，包括 ER stress 及粒線體氧化壓力在細胞週期調節、細胞凋亡、細胞自噬的調節等。結果發現，草莓葉對動物腫瘤具抑制效果，且在合併 paclitaxel 後具有加成作用。另外結果也顯示在乳癌發展或治療下，草莓葉合併 paclitaxel 在動物乳癌模式中具有延緩骨質損傷的作用；而草莓葉水萃物也初步發現具有改善粒線體及內質網壓力的可能。從以上的研究結果，目前認為草莓葉在乳癌產生及合併臨床藥物應具有加成的作用，且可能機轉是經由調節粒線體及內質網壓力，此結果提供臨床使用的訊息，除學術貢獻外，本研究成果可進一步將草莓葉這種農業廢棄物發展為一種防癌抗癌的機能性產品。

英文摘要

Keywords: **Strawberry (Fragaria x ananassa Duch) leaf, breast cancer, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial oxidative stress**

Strawberry, rich in flavonoids and polyphenols, is one of the favorite fruits in Taiwan. There were several studies to show the fruit possess the abilities in antioxidation and anti-cancer. However, the leaves are usually discarded as waste, and the function of strawberry leaves is rare discussed. In the other country, there are some studies to present the polyphenols in strawberry leaf, it would possess potential medicinal functions. But in Taiwan, there is no relative study to explore the function of strawberry leaf. It would be due to the over-use and residue of herbicides or pesticides. To elevate the economic benefits of agricultural waste, the non-toxic planted strawberry leaf provide from “The Taste Company” is extracted the water extract and isolated the functional components to examine the effects in breast cancer. In our present study, the water extract of strawberry leaf (SLE) showed to inhibit breast cancer cell (MCF-7) growth, cause cell cycle arrest, present a multinucleation phenomenon of mitotic catastrophe, and possess the patterns of apoptosis and autophagy. Obesity is highly relative to breast cancer, excessive free fatty acids and glucose would increase the endoplasmic reticulum stress (ER stress) and the mitochondrial oxidative stress to further regulate properties of cell growth and metastasis. In this study, the SLE will be intervened to animal breast cancer to clarify the regulation of ER stress and mitochondrial oxidative stress. The major purposes in this study are aimed to clarify the regulatory mechanisms of SLE between ER stress / mitochondrial oxidative stress and apoptosis / autophagy in animal breast cancer. The results showed that strawberry leaf extract can inhibit the development of breast tumor, and possess the synergic effect co-treated with paclitaxel. Additionally, under the progression in breast cancer, the combined treatment of strawberry and paclitaxel has the effect to decelerate bone lesion. After primary examination, the mechanisms seems to involve the regulation of mitochondrial/endoplasmic reticulum stress although they need to be further clarified. According to the results, we will explore the effects and mechanisms of strawberry leaf in breast cancer to provide the clinical application, and the combination of strawberry extract and paclitaxel possess a synergic effect, it would involve the regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum stress. In addition to academic contribution, the re-use of the agricultural waste would develop a functional product to in cancer prevention or therapeutic effect.

一、前言

【1】草莓葉

草莓原產於溫帶環境，如歐洲，現在全世界已廣泛栽種，已知有五十多種不同品種，又稱紅莓、楊莓、地莓、士多啤梨、苗條果，屬於薔薇科年生草本植物。台灣目前栽種品種有春香、愛利收、馬歇爾、福羽、芳玉、桃園 1 號(豐香)、桃園 2 號等，種植地則以苗栗大湖最為著名。在台灣，草莓採收季節多在冬季，為減少開花期至結果成熟期的蟲害，草莓的農藥使用頻繁，農藥殘留也甚為嚴重。為使草莓的食用安全無虞，近期已有農業科技公司發展無毒栽種方式種植草莓，在不使用農藥和化學肥料下，使草莓無農藥殘留問題，相對也使葉片能回收利用。草莓因為生產季節短，為維護植株生長，在結果期之前後長達 8 個月以上的時間，會以"走莖"方式進行種苗維持，所以不論結果或種苗維持時期，皆有大量葉片在疏莖之後被丟棄，若能妥善開發其功能並利用，將能達到農業廢棄物再利用的功效，也能使果農除了果實販賣所得之外，也能從農業廢棄物中提升經濟價值。在 2009 年 Hanhineva 針對 *Fragaria ananassa* cv. Jonsok 品系的草莓及 2011 年，Oszmianski 等人分析數種莓果類葉片成分，綜合結果發現葉片中富含多酚化合物，其中草莓葉被發現具有 p-coumaroyl- glucoside、3 種 quercetin 衍生物、ellagic acid 以及 2 種 kaempferol 衍生物。這些多酚成分經常出現在 *Fragaria* 類的莓果植物中，並且在先前文獻也指出這些多酚類物質具有抗病毒 (3)、抗菌 (4)、抗糖尿病 (5) 及抗氧化等作用 (6)。其中 quercetin 在近 20 年來也陸續被發現可預防或合併治療多種癌症，包括肝癌及乳癌 (7, 8)。

台灣所栽種的草莓，因農藥的使用量過多而長期被詬病，所以針對草莓葉的研究較少。本研究室在 103 年度的科技部計畫 (MOT103-2313-B-040-005, 執行期間 103.08.01-104.07.31) 中，針對竣達生物科技提供台灣本土無毒栽種草莓葉 (*Fragaria x ananassa* Duch)，利用它的水萃物進行成分、抗發炎性、抗氧化性、毒性分析，並在乳癌細胞中進行測試，期望能找到草莓葉的另類用途。結果發現：

- (1) 在 total phenolic assay 中，草莓葉水萃物含有約 10-15% 的總酚。
- (2) 草莓葉水萃物在 LPS 處理 RAW264.7 細胞的系統中具有抗發炎特性
- (3) 針對乳癌細胞 MCF-7，本研究室目前在實驗中也發現草莓葉水萃取物具有減少乳癌細胞 MCF-7 存活的作用及使細胞週期停滯，並在 0.3 mg/mL 的草莓葉水萃物處理下，乳癌細胞核中出現有絲分裂崩解的現象。並發現可能表現細胞凋謝死亡(apoptosis)及 autophagy 的特性。目前結果得知台灣以無毒農法所栽植的草莓葉具有潛在的抑癌醫療功效，但機轉則尚未明瞭。

【2】乳癌

依美國國家癌症研究所統計，乳癌為美國婦女最為好發的癌症，且死亡率位居婦女癌症首位，(9)。而在台灣，行政院衛生署國民健康局在民國 91 年 7 月到 97 年 12 月的流行病學調查結果顯示，乳癌為我國女性好發癌症排名第一位，相較於歐美國家，台灣乳癌好發年齡比歐美國家早。民國一百零一年的國民死因統計中則顯示台灣女性的癌症死因中，乳癌排名第四；迄流行病學調查結果統計截止，標準化發生率在 12 年間上升 76.0%；標準化死亡率則在 14 年間上升 14.4% (10, 11)。

流行病學研究顯示，引起乳癌的因子包括肥胖、代謝異常、雌激素 (estrogen) 及它經由 cytochrome P450 代謝衍生的 catechol，catechol 在乳癌發生過程具有致基因突變的特性，且可與脂質過氧化後的 lipid hydroperoxide 產生交互作用而形成 DNA 加成物，扮演癌症起始劑 (initiator) 角色。雌激素則會在乳癌發生過程中經由 genomic 或 non-genomic 作用促進癌症發生，genomic 路徑係經由細胞核內之 estrogen receptor 調節核內轉錄因子，如 AP-1、cAMP、NFkB 等調節基因表達，而使乳房細胞增生或血管新生，並減低分化或細胞凋亡而促進癌症產生；non-genomic 路徑則是經由細胞膜或細胞液中的 estrogen receptor 活化膜蛋白如 caveolin-1 或 Shc 等，再活化細胞質中的分子而與核內轉錄因子交互作用以使細胞增生而使乳癌發生。另外，肥胖與乳癌的發生，近來也被諸多討論。肥胖者會伴隨胰島素抗性及慢性發炎，並在血液中存在過多的游離脂肪酸，研究指出過度的營養攝取所堆積的游離脂肪酸會增加內

質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress)，而過多的食物會增加葡萄糖代謝，提高粒線體氧化磷酸化速率，而使粒線體中的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)增加，形成粒線體氧化壓力 (12)。

其他與乳癌發生相關的因子還包括：(1) 年紀：在停經前 (44-45 歲)，隨年紀增加，乳癌罹患率也會隨之增加，在東亞國家，乳癌發生率在 40-50 歲時會最高 (13)；(2)個人病史：女性患有嚴重的非典型上皮增生者 (severe atypical epithelial hyperplasia)約 14-18 年可能會發展為 DCIS (ductal carcinoma *in situ*)，是發生乳癌的高危險群；(3) 乳癌家族史：超過 10 %的乳癌患者具有家族遺傳史，是基因性易患病體質 (genetic predisposition)；(4) 增加賀爾蒙暴露 (hormone exposure)：高齡懷孕、過早初經及過晚停經或長期服用避孕藥者；(5) 體重：酒精及肥胖皆為乳癌的危險因子 (13)；(6) 基因變異：乳癌可能源自於基因變異的堆積，包括 *brca1*、*brca2*、*p53*、*pten* 及 *stkII/lkb1* (13)。

【3】內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress)

內質網在細胞內負責分泌型及膜蛋白的合成及修飾，正常摺疊的蛋白可以轉送至 Golgi network 進行蛋白轉運，而錯誤摺疊的蛋白則留滯於內質網中，利用 ER-associated degradation (ERAD) 降解並移除。當合成的蛋白量超過內質網的運送負荷時，內質網中會累積過多蛋白，非摺疊蛋白聚集於此而導致 ER stress (14-16)。為了減緩 ER stress，一些細胞保護機制如 unfolded protein response (UPR) 會被活化，並經由 PERK、ATF-6 α 及 IRE1，誘導 ER chaperones (GRP78 及 GRP94)、磷酸化 eIF2 α 、活化 ATF-4 及使 XBP-1 alternative splicing，以進一步調節 ER stress。(14, 17) 當 UPR 不足以承受 ER stress 時，細胞將持續存在慢性 ER stress，此時 CHOP、ER-specific caspases 12 以及一些因子會被誘導而引起細胞死亡。(18-21)

癌細胞需要持續分裂，因此必須因應環境中的有限營養素及含氧量而作改變，並利用細胞的癌變化而增加血管生成。所以，癌細胞中的 ER 蛋白也會改變表達的狀態。在癌細胞中，ER stress 有雙面影響，其一為具有細胞毒性，會引起如 apoptosis 的細胞死亡，此部分可透過 caspase-12 family 誘導；其二為使細胞適應於此環境而促使癌細胞生長。細胞會藉著活化 UPR 及巨噬細胞來建立一個適合癌細胞生長及侵襲的微環境 (22, 23)。在 ER stress 的狀況下，癌細胞也會透過 NF- κ B 路徑誘導 cyclooxygenase-2，而扮演 antiapoptosis 的腳色 (24-26)。此外，藉由 VEGF 而使 Grp78 表達增加，以促進內皮細胞增生及血管新生。癌細胞還可能透過 P38MAPK 的作用而使細胞有一種 G0-like 的細胞週期靜止，藉此對一些會傷害 DNA 的藥物產生抗藥性 (27, 28)。

在 2014 年，已有研究指出在乳癌細胞中，多酚化合物可以透過 ROS 產生所形成的 ER stress，結合在 ER stress 衍生的 UPR 上而引起癌細胞的 apoptosis (29)。另外，Tan 等人在 2014 年發現有一種衍生自 curcumin 的多酚化合物，被發現在急性骨髓白血病細胞中，可以誘導 ER stress 而使癌細胞凋亡 (30)。當細胞處在 ER stress 時，除了可能發生細胞凋亡外，也可能會引起細胞自噬作用 (31)。

細胞自噬現象又稱為 type 2 programmed cell death，在 1963 年由 Christian de Duve 提出。所謂的自體吞噬指細胞能夠藉由自己溶酶體 (lysosome) 將自身的胞器 (organelle) 或其他物質進行分解，被認為是調控細胞生長、分化、體內平衡 (homeostasis) 重要機轉，特別是體內平衡。細胞可藉由自體吞噬將老化或功能喪失的胞器、結構表現異常蛋白、酵素等包覆進 autophagosome 後再與 lysosome 膜融合形成 autolysosome。由於 lysosome 內含有大量的分解酵素，所以可快速將其分解回收再利用。雖然 autophagy 在細胞正常生理作用上佔非常重要的角色，但若是 autophagy 過度表現，則會促使細胞走向死亡。Autophagy 在細胞內形成的機制是細胞會將一部分的蛋白質與胞器以套膜 (membranous envelopes) 包裹，形成具雙層膜或多層膜結構的空泡 (double- or multi-membrane-bound vacuoles)，稱之為自噬小體 (autophagosome)，接著再運送至 lysosome 與其融合，藉由溶小體酵素 (lysosomal enzyme) 分解後再利用。關於細胞自噬作用與乳癌的關係，於 2013 年中，Dragowska 等人發現臨床用藥 Gefitinib (一種 epidermal growth factor receptor 的抑制劑) 處理在 MCF-7 細胞中，可以誘導細胞自噬作用的早期反應 (32)；當合併使用 hydroxychloroquine 或 bafilomycin A1，則可以誘發細胞自噬作用的晚期反應以使乳癌細胞死亡 (32)。Jung 等人發現由 *Anthriscus sylvestris* (L.) 萃取出 Anthricin 會誘導乳癌細胞 apoptosis 及 autophagy (33)。Vildan 等人則發現乳癌用藥 Tamoxifen 及 doxorubicin 會誘導 MCF-7 細

胞自噬，但對於乳癌 cancer stem cell 則無明顯自噬效果 (34)。Weng 等人由 *Momordica charantia* 萃出一種三帖類物質 3 β ,7 β -dihydroxy-25-methoxycucurbita-5,23-diene-19-al (DMC)，並發現此種物質可以誘導乳癌細胞 MDA-MB-231 cells 細胞凋亡及細胞自噬作用 (35)。另外 Saxifragifolin D 及 protoapigenone 的類似物 RY10-4 也都被發現可以誘導乳癌細胞自噬作用 (36, 37)。

【4】粒線體氧化壓力 (mitochondrial oxidative stress)

Reactive oxygen species (ROS) 是需氧生物在正常生理狀態下會產生的物質，但ROS也可以在過多的紫外光、輻射線或細胞受傷後大量產生，因此，低劑量的ROS可以維持細胞內的免疫系統及調節抗氧化機制(38)。過多的ROS所造成的氧化壓力除了可能造成細胞死亡外，也可能會改變細胞內的調節而引起如癌症等慢性疾病(39)。由分子流行病學的研究也得知氧化壓力與人類疾病或癌症發生的病理成因息息相關(40)。不論細胞內外所形成的氧化壓力都可能引起脂質、蛋白質、醣類及DNA的損壞而使生物功能及細胞構造受到影響。之前研究指出乳癌細胞不論於細胞內外都是一種高度氧化壓力的狀態，癌細胞為了確保自身生存，必須調節細胞機轉以規避自由基的毒性作用，這些機轉包括活化氧化還原敏感的轉錄因子、增加胞內抗氧化酵素及抗凋亡蛋白(41)。近期更有研究指出不同乳癌細胞型態表現不同的胞內抗氧化力可能會使這些細胞對化放療產生抗性(42)。

在乳癌發生過程中，氧化壓力的來源應與粒線體高度相關。粒線體在進行氧化磷酸化作用時，除了產生能量外，也會伴隨者產生許多ROS而傷害細胞核及粒線體DNA。損傷的粒線體DNA可能使粒線體失能而使乳癌發生，在一些研究中也指出乳癌組織比正常組織出現高度的粒線體DNA變異 (43)。細胞受到損傷的表現方式眾多，例如蛋白變性、脂質過氧化或DNA損傷等。若是發生細胞核DNA 損傷，細胞會為了修復DNA而使細胞週期停滯，為修復DNA來提供時間。通常發生停滯的時間包括G1-S transition、S-phase progression或G2-M transition，但是如果DNA damage還沒修復完成就進入了mitosis，則會進入所謂的有絲分裂崩解(mitotic catastrophe)，最後造成細胞死亡 (44)。這種死亡途徑主要是細胞停滯在細胞週期的M phase當中的Metaphase到Prophase之間，在這期間主要是細胞正進行microtubule organizing centre (MTOC)及紡錘絲的形成來幫助染色體的分離，最後達到細胞分裂(45, 46)。這種死亡方式在細胞外觀上的特徵會有micronucleation及multinucleation等現象，micronucleation是指細胞分裂時，chromosome或是chromosome fragments會平均分散在daughter nuclei，另外multinucleation則是會在細胞分裂時，會產生兩個以上大小相似或是不同的細胞核 (47)。在癌症治療上使用的臨床用藥，包括DNA-damage agent及microtubule-destabilising agent，或者是放射線治療都已被證實會誘導癌細胞走向mitotic catastrophe (48)；在2008年的研究發現，mitotic catastrophe在細胞死亡上扮演的角色並不是從現今發現的細胞死亡方式 (如apoptosis、autophagy及necrosis)所獨立出來的新的死亡方式，而是一個pre-stage的死亡過程，最終有可能會走向apoptosis或是necrosis，但這必須依靠細胞內是否有p53蛋白的表現來決定(49)。另外，在觀察 mitotic catastrophe的過程中，Aurora 家族是一群可以檢測的蛋白。Aurora kinases是一群 serine/threonine kinases，蛋白的功能區有約70% 的相似度 (50-52)，它們的作用是調節細胞週期及有絲分裂 (52-55)。一般哺乳動物細胞中有三種Aurora家族，包括 Aurora A、B及C，這些蛋白會在有絲分裂期間表達最大量，雖然這些蛋白在細胞位置有些微差異，但會協同調節姊妹染色體均分至子代細胞。這三類蛋白都被發現在人類癌症中會被複製或過度表達，因此它們也被認為可能跟癌症發生、轉移及基因不穩定性 (genomic instability)相關 (52)。

在近期研究中，Hung 等人發現 Subamolide 可以誘導人類肺癌細胞 mitotic catastrophe 並伴隨apoptosis (56)；de-Sá-Júniora 等人發現一種新的 capsaicin-like analogue 可以誘導 MCF-7 的細胞週期停滯於 G2/M phase、細胞凋亡及 mitotic catastrophe (57)；Gully 等人發現 Aurora B inhibitor 在 6 種人類乳癌細胞中具有抗腫瘤的作用 (58)。

二、研究目的

在我們的研究結果指出草莓葉水萃物具有多酚，且可以使乳癌細胞周期停止、細胞凋亡、細胞自噬及有絲分裂崩解。雖然這些現象係透過草莓葉的給予而發生，但至今並不清楚草莓葉是否經由 ER

stress 或 mitochondrial oxidative stress 的調節而引起乳癌細胞死亡。因此若能進一步了解在乳癌的過程介入草莓葉水萃物的機轉，應能改善乳癌的症狀或以草莓葉輔助化療，並了解介入的時間及主要的抑制位置。由於乳癌病理狀態複雜且牽涉有多重系統，再加上癌症發生的多樣性，增加研究的難度，也使相關機轉的探討不易。預防或治療乳癌的過程中，有些因素如肥胖，可能因為血漿游離脂肪酸增多及葡萄糖的代謝增加，產生 ER stress 或 mitochondrial oxidative stress，這些結果可能使細胞改變特性而癌化，也可能使已癌化的細胞內訊息蛋白異常而轉移或減低化療藥物的個體敏感性，因此在研究模式中將以實驗動物為主，除了探究 ER stress 或 mitochondrial oxidative stress 在各種時期癌細胞的腳色外，也將以此為依據，探究草莓葉在降低癌症轉移及改善化療藥物敏感性之課題。本研究先前的實驗係將煖達生物科技提供之無毒農法栽種之草莓葉乾燥後水萃而進行研究並正在進行毒理檢測，因此在本計畫中依然會取用煖達生物科技之草莓葉，將水萃物進行抑制乳癌的機轉探討。

本研究目的為：

1. 以乳癌細胞皮下植入模式，將草莓葉水萃物介入引起乳癌的過程，檢測此間的作用及機轉，包括 ER stress 及粒線體氧化壓力在細胞週期調節、細胞凋亡、細胞自噬及有絲分裂崩解的調節等。
2. 開發草莓葉萃物之醫學功效以應用於抑制乳癌及增加化療藥物敏感性。

三、文獻探討

1. 草莓葉中所含的 quercetin 在近 20 年來也陸續被發現可預防或合併治療多種癌症，包括肝癌及乳癌 (7, 8)。
2. Elstner 以 all-trans-retinoic acid (10^{-6} M) 及 troglitazone (10^{-5} M) 合併處理 MCF-7 乳癌細胞，結果發現可誘導細胞凋謝死亡並使細胞生長受到不可逆的抑制作用，此間更發現 Bcl-2 蛋白急遽減少，另外將乳癌病人組織進行體外培養，也發現相同效應 (61)。
3. Refaat 等人發現 berberine 合併合成之 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 會使 MDA-MB468 人類乳癌細胞產生 apoptosis (62)。
4. Dhaheri 等人則發現 salinomycin 會誘使人類乳癌細胞 MCF-7、T47D、及 MDA-MB231 細胞週期停止及細胞凋亡 (63)。
5. 於 2013 年中，Dragowska 等人發現臨床用藥 Gefitinib (一種 epidermal growth factor receptor 的抑制劑) 處理在 MCF-7 細胞中，可以誘導細胞自噬作用的早期反應；當合併使用 hydroxychloroquine 或 bafilomycin A1，則可以誘發細胞自噬作用的晚期反應以使乳癌細胞死亡 (32)。
6. Jung 等人發現由 Anthriscus sylvestris (L.) 萃取出 Anthricin 會誘導乳癌細胞 apoptosis 及 autophagy (33)。
7. Vildan 等人則發現乳癌用藥 Tamoxifen 及 doxorubicin 會誘導 MCF-7 細胞自噬，但對於乳癌 cancer stem cell 則無明顯自噬效果 (34)。
8. Hung 等人發現 Subamolide 可以誘導人類肺癌細胞 mitotic catastrophe 並伴隨 apoptosis (38)。
9. de-Sá-Júniora 等人發現一種新的 capsaicin-like analogue 可以誘導 MCF-7 的細胞週期停滯於 G2/M phase、細胞凋亡及 mitotic catastrophe (57)。
10. Gully 等人發現 Aurora B inhibitor 在 6 種人類乳癌細胞中具有抗腫瘤的作用 (58)。
11. 2013 年，Weng 等人由 Momordica charantia 萃出一種三帖類物質 $3\beta,7\beta$ -dihydroxy-25-methoxycucurbita-5,23-diene-19-al (DMC)，並發現此種物質可以誘導乳癌細胞 MDA-MB-231 cells 細胞凋亡及細胞自噬作用 (36)。
12. 2013 年，Jeyabalan 等人發現飲食中給予藍莓，可以在以 estrogen 做成的矽膠植體動物乳癌模式中，達到化學預防及治療的功效 (64)。
13. 在 2009 年 Hanhineva 針對 Fragaria ananassa cv. Jonsok 品系的草莓及 2011 年，Oszmianski 等人分析數種莓果類葉片成分，綜合結果發現葉片中富含類似的多酚化合物 (1, 2)，其中草莓葉被發現具有 p-coumaroyl-glucoside、quercetin 衍生物、ellagic acid 以及 kaempferol 衍生物。

重要參考文獻

1. Hanhineva K, Soininen P, Anttonen MJ, Kokko H, 2009, a NMR and UPLC-qTOF-MS/MS characterisation of novel phenylethanol derivatives of phenylpropanoid glucosides from the leaves of Strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Jonsok). *Phytochem Anal*, 20, 353-364
2. Oszmianski J, Wojdy A, Gorzelany J, Kapusta I, 2011, Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. *J Agric Food Chem*, 59, 12830-12835.
3. Lin YY, Ng KJ, Yang S, 1993, Characterization of flavonoids by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*, 629, 389-393.
4. Ming DS, Lopez A, Hillhouse BJ, French CJ, et al, 2002, Bioactive constituents from *Iryanthera megistophylla*. *J Nat Prod*, 65, 1412-1416.
5. Qa'dana F, Verspohl EJ, Nahrstedt A, Peterleit F, et al, 2009, Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*, 124, 224-227.
6. Hong YP, Qiao YC, Lin SQ, Jiang YM, et al, 2008, Characterization of antioxidant compounds in *Eriobotrya fragrans* Champ leaf. *Sci Hortic (Amsterdam, Neth.)*, 118, 288-292.
7. Jixia L, Zhu F, Lubet RA, De Luca A, 2013, Quercetin-3-methyl ether inhibits lapatinib-sensitive and -resistant breast cancer cell growth by inducing G₂/M arrest and apoptosis. *Mol Carcinogen*, 52, 134-143.
8. Li SZ, Li K, Zhang JH, Dong Z, 2013, The effect of quercetin on doxorubicin cytotoxicity in human breast cancer cells. *Med Chem*, 13, 352-355.
9. Howlader N, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, et al, 2013, SEER cancer statistics review, 1975-2010. In National Cancer Institute: Bethesda, MD.
10. 中華民國統計資訊網: 疾患統計/主要癌症死亡統計/ <http://www.stat.gov.tw/ct.asp?xItem=15433&CtNode=3640&mp=4>
11. 行政院衛生署 <http://www.bhp.doh.gov.tw/BHPNet/Web/HealthTopic/Topic.aspx?id=200712250033>
12. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, et al, 2008, Increase in endoplasmic reticulum stress - related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes*, 57, 2438 - 2444
13. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H, 2002, Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*, 3, 565-574.
14. Schroder M, Kaufman RJ, 2005, The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-789.
15. Yoshida H, 2007, ER stress and diseases. *FEBS J*, 274, 630-658.
16. Yoshida H, 2004, Molecular biology of the ER stress response. *Seikagaku*, 2004, 76, 617-630.
17. Marciniak SJ, Ron D, 2006, Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*, 86, 1133-1149.
18. Zinszner H, et al, 1998, CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12, 982-995.
19. Yamaguchi H, Wang HG, 2004, CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*, 279, 45495-45502.
20. Oyadomari S, Mori M, 2004, Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 11, 381-389.
21. Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ, 2014, Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev*, 19, 75-88.
22. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A, 2008, The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*, 222, 155-61.
23. Mahadevan NR, Rodvold J, Sepulveda H, Rossi S, et al, 2011, Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 6561-6566.
24. Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, et al, 2004, Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 279, 46384-46392.
25. Park SH, Choi HJ, Yang H, Do KH, et al, 2010, Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP

- homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 285, 35330-35339.
26. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, et al, 2000, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
 27. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J, 1996, Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*, 2, 689-692.
 28. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L, 2003, ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res*, 63, 1684-1695.
 29. Shin SY, Lee JM, Lee MS, Koh D, et al, 2014, Targeting cancer cells via the reactive oxygen species-mediated unfolded protein response with a novel synthetic polyphenol conjugate. *Clin Cancer Res*, 20, 4171.
 30. Tan KL, Ali A, Du Y, Fu H, et al, 2014, Synthesis and evaluation of Bisbenzylidenedioxotetrahydrothiopranones as activators of endoplasmic reticulum (ER) stress signaling pathways and apoptotic cell death in acute promyelocytic leukemic cells, *J Med Chem*, 57, 5904-5918.
 31. Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, Samali A, 2014 Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell Mol Life Sci*. doi 10.1007/s00018-012-1173-4
 32. Dragowska WH, Wepler SA, Wang JC, Wong LY, et al, 2013, Induction of autophagy is an early response to Gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer, 8, e76503 *PloS One*, 1-20.
 33. Jung CW, Kim H, Ahn J, Jung SK, et al, 2013, Anthricin isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. inhibits the growth of breast cancer cells by inhibiting Akt/mTOR signaling, and its apoptotic effects are enhanced by autophagy inhibition. *eCAM*, Article ID 385219, 9 pages.
 34. Yenigun VB, Ozpolat B, Kose GT, 2013, Response of CD44+/CD24-/low breast cancer stem/progenitor cells to tamoxifen and doxorubicin induced autophagy. *Intern J Mol Med*, 1477-1483.
 35. Weng JR, Bai LY, Chiu CF, Hu JL, et al, 2013, Cucurbitane Triterpenoid from *Momordica charantia* Induces Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells, in Part, through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation. *eCAM*, Article ID 935675, 12 pages.
 36. Zhanga X, Weia H, Liua Z, Yuana Q, et al, 2013, A novel protoapigenone analog RY10-4 induces breast cancer MCF-7 cell death through autophagy via the Akt/mTOR pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 270, 122–128.
 37. Shia JM, Baia LL, Zhanga DM, Yiub A, et al, 2013, Saxifragifolin D induces the interplay between apoptosis and autophagy in breast cancer cells through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. *Biochem Pharmacol*, 85, 913–926.
 38. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, et al, 2013, Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:972913. doi: 10.1155/2013/972913.
 39. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, et al, 2006, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
 40. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, et al, 2013, Oxidative stress and cancer: an overview *Ageing Res Rev*, 12, 376-390.
 41. Hakkak R, Korourian S, Melnyk S, 2013, Obesity, oxidative stress and breast cancer risk. *J Cancer Sci Ther*, 5, 1000e129)
 42. Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, et al, 2011, Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Oncol Hematol*, 80, 347-368.
 43. Rohan TE, Wong LJ, Wang T, Haines J, et al, 2010, Do alterations in mitochondrial DNA play a role in breast carcinogenesis? *J Oncol*, 2010:604304.
 44. Butt MS, Nazir A, Sultan T, Schroen K, 2008, *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trend Food Sci Technol*, 19, 505-512.
 45. Roninson IB, Broude EV, Chang BD, 2001, If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 4, 303-313.
 46. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G, 2011, Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 385-392.
 47. Singh R, George J, Shukla Y, 2010, Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell Div*, 5, 4.
 48. Imreh G, Norberg HV, Imreh S, Zhivotovsky B, 2011, Chromosomal breaks during mitotic

- catastrophe trigger γ H2AX-ATM-p53-mediated apoptosis. *J Cell Sci*, 124, 2951-2963.
49. Gewirtz DA, 1999, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57, 727-741.
 50. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, et al, 2007, AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, 110, 2034-2040.
 51. Tao Y, Zhang P, Girdler F, Frascogna V, et al, 2008, Enhancement of radiation response in p53-deficient cancer cells by the Aurora-B kinase inhibitor AZD1152. *Oncogene*, 27,3244-3255.
 52. Katayama H, Brinkley WR, Sen S, 2003, The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 22, 451-464.
 53. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C, 2007, Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 5, 1-10.
 54. Ducat D, Zheng Y, 2004, Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*, 301, 60-67.
 55. Lens SM, Medema RH, 2003, The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle*, 2, 507-510.
 56. Hung JY, Wen CW, Hsu YL, Lin ES, et al, 2013, Subamolide A Induces Mitotic Catastrophe Accompanied by Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *eCAM*, Article ID 828143, 15 pages.
 57. de-Sá-Júniora PL, Pasqualotob KFM, Ferreira AK, Tavares MT, et al, 2013, RPF101, a new capsaicin-like analogue, disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2/M phase, inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 266, 385-398.
 58. Gully CP, Zhang F, Chen J, Yeung JA, et al, 2010, Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer. *Mol Cancer*, 9, 42.
 61. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, et al, 1998, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *PNAS*, 95, 8806-8811.
 62. Refaat A, Abdelhamed S, Yagita H, Inoue H, et al, 2013, Berberine enhances tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediated apoptosis in breast cancer. *J Agric Food Chem*, 61, 840-844.
 63. Dhaheri YA, Attoub S, Arafat K, AbuQamar S, et al, 2013, Salinomycin induces apoptosis and senescence in breast cancer: Upregulation of p21, downregulation of survivin and histone H3 and H4 hyperacetylation. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3121-3135.
 64. Jeyabalan J, Aqil F, Munagala R, Annamalai L, et al, 2014, Chemopreventive and therapeutic activity of dietary blueberry against estrogen-mediated breast cancer. *J Agric Food Chem*, 62, 3963-3971 .
 65. Huggins CB, Ueda N, Wiessler M, 1981, N-Nitroso-N-methylurea elicits mammary cancer in resistant and sensitive rat strains. *PNAS*, 78, 1185-1188.

四、研究方法

取無毒栽種之**豐香草莓 (Fragaria x ananassa Duch)**葉片進行水萃，並以今年度成分分析結果，選取指標性成分，作為每次萃取檢測依據。煖達生物科技目前栽種約三甲地的草莓，草莓葉產量每年每平方米約 1-2 公斤，年產量約 1500-3000 公斤，足夠小量研究及產業研發。

<研究架構>

Xenograft

Breast cancer cell xenografted to nude mice
(皮下注射)



草莓葉水萃物或化療藥物

草莓葉水萃物對乳癌腫瘤生成之抑制作用及機轉

- 動物體重、存活率分析
- 腫瘤大小及重量變化
- 測增生或抑制增生作用
- immunoblot及RT-PCR (leptin,Akt,IL6,p53,TNF α ,TGF β)
- 與細胞死亡相關的檢測及機轉檢測
 1. apoptosis signaling proteins (immunoblot, RT-PCR assay)
 2. autophagy proteins (immunoblot, RT-PCR assay)
 3. cell cycle arrest, proteins (immunoblot, RT-PCR)
 4. mitotic catastrophe (immunoblot, RT-PCR, Aurora A,B,C)
 5. ER stress (immunostain or immunoblot, GRP78,GRP94,pIREa,IRea,peIF2,eIF2,CHOP,ATF6a,ATF4,XBP-1)
 6. mitochondrial oxidative stress (mtDNA,ROS generation,antioxidative enzyme,oxidative status in tissue)

四、研究方法

由燦達生物科技提供無毒栽種之豐香草莓 (Fragaria x ananassa Duch)進行水萃及功能性成分分析。燦達生物科技目前栽種約三甲地的草莓，草莓葉產量每年每平方米約 1-2 公斤，年產量約 1500-3000 公斤，足夠小量研究及產業研發。另外本計畫亦將檢測其抗氧化特性、抗發炎作用、基因毒性及 28 天口服急性毒性，並將功能性成分及水萃物分別加入乳癌細胞 MCF-7，MDA-MB231 中，觀察不同乳癌細胞的作用及可能機轉。

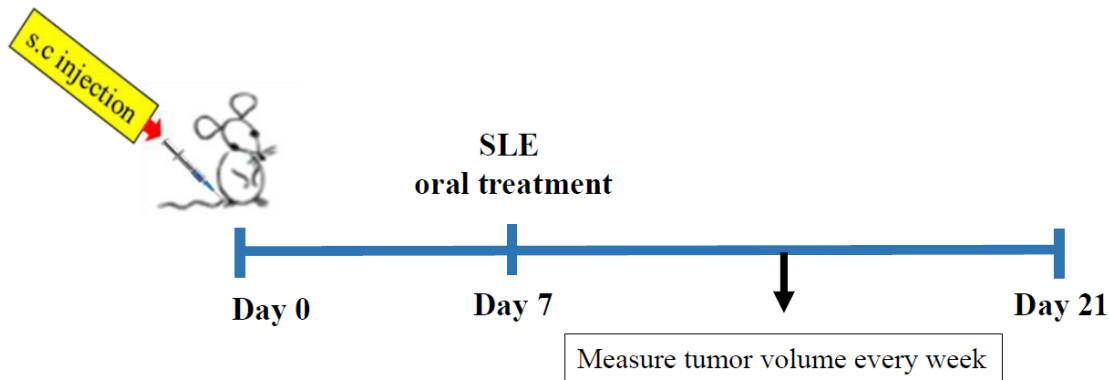
[實施方法及步驟]

(1) 草莓葉水萃物製備

將豐香草莓葉採集後，取葉片部分進行脫水乾燥，每 100 公克加入 3000 mL 二次水，分別於 100 °C 加熱 2 小時，或 4 °C 攪拌 24 小時，過濾後得到濾液並進行冷凍乾燥，以乾燥粉末計算產率並進行成分分析。每次取 0.1~0.2 g 粗萃取物用 silica gel column (預先填充 match：230~400 之 silica gel 約 50g) 進行純化製備，沖提液的 solvent system 由 CHCl₃：Methanol=95：5 開始，依次逐漸提高 Methanol、降低 CHCl₃ 的比例，約至 CHCl₃：Methanol=1：1 時，所有 sample 皆自 silica gel column 通出。控制 sample 自 column 流出之速度約為 1.0 滴/2 秒，用玻璃試管收取通出之 sample，每管約 10ml，將依不同 solvent 比例收得的 sample 進行 TLC (薄層色層分析法)分析，展開液與 silica column 之沖提液相同，觀察並紀錄出現 band 的數目與每條 band 的 Rf 值，以上步驟重覆數次直到收集到足夠的樣品為止。

(2) 乳癌細胞培養：老鼠乳癌細胞株 4T1 細胞以 DMEM 培養基培養，並加入適量 antibiotics 及 10% heat-inactivated FBS。

(3) Xenograft：雌性 BALB/c-nu mice (5 weeks old) 購自國家動物中心。入室一周後，餵食高脂質飼料，2 周後於第三對乳房左側注射乳癌細胞，取 2×10^5 cells 注射。一周後隨機分組，每組 10 隻，組別為：A，未處理組；B，breast cancer cell；C，高油脂+breast cancer cell；D，高油脂+breast cancer cell +paclitaxel；E-G，高油脂+breast cancer cell +三種不同濃度的草莓葉水萃物管餵；H-I；高油脂+breast cancer cell +paclitaxel+二種不同濃度的草莓葉水萃物管餵。腫瘤體積每週測量 2 次，動物於餵食草莓葉水萃物至少三周後犧牲；取出腫瘤秤重後，放置於 10% buffered formalin 中固定，進行病理切片及免疫組織染色的檢查，待檢測者為相關機轉所表達的蛋白等，另外收集血液進行部分細胞激素檢測。



(4) 石蠟組織包埋與切片：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，再以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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

(5) 西方點墨法 (Western blotting)：細胞依實驗需求處理後收集，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，以 PBS 沖洗，加入 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM Tris-base, pH7.5；內含 1 mM sodium orthovanadate, 100 μ g PMSF, 170 μ g/ml leupeptin)，於冰上震盪 30 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 下以 10000g 離心 10 分鐘，取上層液定量蛋白，將定量後之蛋白取 50 μ g，加入等量的 Sample Buffer (2 ml 0.5M Tris-HCl pH6.8, 1.6 ml Glycerol, 3.2 ml 10% SDS, 0.8 ml 2- β -mercaptoethanol, 0.4 ml 0.5% bromophenol blue)，以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，迅速至入冰中冷卻，以離心機將 Sample spin down 後再 loading 至每個 well 中，上層膠以 70 伏特，下層以 130 伏特進行電泳，待電泳結束後進行蛋白質轉漬至 Nitrocellular paper 上，以 5% 脫脂牛奶於室溫下進行 blocking 1 小時，以 washing buffer (PBS with 0.5% tween-20) 沖洗 3 次，將 NC paper 至於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中與一級抗體 (依實驗所需選定) 反應 overnight，以 washing buffer 沖洗 3 次，再以 Horseradish peroxidase conjugated 的二級抗體反應 1 小時，以 washing buffer 沖洗 3 次，最後加入 Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus 反應 1 分鐘後，以冷光螢光數位影像分析儀(LAS-1000 plus system)觀察並定量。

(6) 粒線體 DNA (mtDNA) 拷貝數分析 Quantitative PCR (TaqMan): 取得腫瘤組織冰存於 -80 $^{\circ}$ C，萃取組織 DNA 進行分析。

(i) 寡核苷酸引子和 TaqMan 探針的設計：由 NCBI 搜尋老鼠粒線體基因組引子和探針的正確序列，利用引子和探針的設計軟體(Applied Biosystems, Foster City, CA)設計，由 (Genbank accession X14848) 和老鼠 β -actin 的引子(Genbank V01217) 探測老鼠 D-loop 與老鼠粒線體的刪除。引子和探針合成和高效液相色譜純化由 Oligo 公司 (Applied Biosystems) 提供。

(ii) 實時 PCR (Real-Time PCR): 粒線體的表現刪除利用 5'端的 VIC reporter 與 3'端的 TAMRA quencher dye 來定量。D-loop 的表現利用 5'端的 6-FAM reporter 和 3'端的 TAMRA-labeled quencher dye 來定量。進行 PCR 放大(PCR amplification) 50 μ l 的反應溶液由 1 \times TaqMan Universal Master Mix(應用生物系統公司) 和不同濃度的探針和不同濃度的正向和反向引子所組成，找出最適合的反應條件。最適合的反應條件就是找出最大 Δ Rn 值與最小的 CT 值。共同粒線體刪除/D-環(common mitochondrial deletion /D-loop assays, CD/ DL; 50 μ l reaction) 檢測，找出最佳反應濃度為包括：

(1) 1 \times TaqMan Universal mix，每個粒線體刪除(mitochondrial deletion) 正向和反向引子為 200 nM，每

一個 D-loop 正向和反向引子為 100 nM，粒線體刪除與 D-loop 探針為 100 nM，加上約 50 ng 的檢體 DNA。

(2) D-Loop/ β -actin (DL/BA) 的分析最佳反應濃度為 50 μ l reaction 包括 1 \times TaqMan Universal mix， β -actin 正向和反向引子為 200 nM，D-loop 正向和反向引子為 50 nM， β -actin and D-loop 探針為 100 nM，加上約 50 ng 的檢體 DNA。

(3) 循環條件包括一個初始階段的在 50°C/2 分鐘，其次是 95°C/10 分鐘和 40 個循環的 95°C/15 秒和 60°C/1 分鐘。利用 7700 序列檢測系統重複檢測和螢光光譜對每個標本進行連續的監測。

(iii) 資料分析 (Analysis of Data)

(1) 資料的分析主要是測循環的閾值 cycle threshold (CT)，就是達到螢光測量設定值的 PCR 的循環數。

(2) 進行了兩種類型的測定：第一個測量的是粒線體 DNA 拷貝數對比核 DNA 拷貝數，主要是利用擴大粒線體 D-Loop 對比核 β -肌動蛋白基因 (β -actin gene) (DL/BA)。第二個測量的是粒線體刪除對比粒線體 D-Loop (CD/DL)。循環的閾值 (CT) 的差異主要是測相對豐富性 (relative abundance)，例如在 DL/BA 的測量 CT(DL) - CT(BA) 用來測粒線體基因組，MD/DL 的測量 CT(CD) - CT(DL) 用來測粒線體刪除。

(7) 實驗數據統計分析：收集的所有數據以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 Student t-test 或 One-way analysis of variance 分析。

五、結果與討論 (含結論與建議)

依本年度計畫進度，以目前結果分別針對進度項目進行說明如下：

1. 利用乳癌誘導並處理草莓葉水草物 (SLE)，觀察腫瘤。

我們使用 4T1 乳癌細胞株進行動物乳房注射，在分別給予草莓葉水草物後，結果發現 0.4% SLE 在實驗前期 2 周中，對動物體重的抑制作用顯著，其他組別在與控制組相較之下，則較無顯著差異；而在腫瘤體積中，由實驗開始第 15 天，可以發現 4T1 合併處理高脂質飲食的組別，腫瘤體積大於僅注射腫瘤細胞者，此結果顯示高脂質飲食對於腫瘤形成可能具有加成作用。當動物餵食 SLE 後，可以看到高劑量 SLE 抑制腫瘤的作用大於低劑量組，且合併處理 paltaxel 組別的動物，其腫瘤減少的效果優於僅給予 SLE 組。此項結果顯示出 SLE 對乳癌具有抑制作用，而在合併處理臨床用藥時更具效果。臨床醫師對於癌症治療，基於醫療應用的效果，皆會使用已經在藥廠商品化的藥物，對於直接使用非典型用途的萃取物皆抱有疑慮，但癌症治療藥物所產生的副作用對臨床醫師而言又是一個必須面對的問題，因此在草莓葉應用於乳癌治療時，除了直接針對腫瘤抑制作用之外，應可對其癌症治療的副作用著手。乳癌的發展或治療中，極容易對骨質產生影響。乳癌的治療方式，在臨床上除手術切除外，常需配合化學或放射治療。在化放療的療程中，病人被發現可能在骨骼引起骨質密度改變的副作用。針對乳癌的化學療法，多為合併型藥物，如口服 cyclophosphamide 及靜脈注射 methotrexate/fluorouracil (CMF)；靜脈注射 CMF；或是靜脈注射 doxorubicin 及合併 CMF 等方法。Methotrexate 及 fluorouracil 皆會抑制核酸合成，藉此抑制癌細胞生長。methotrexate 被發現會使骨骼處於發炎狀態，並減少骨生成及加速骨質流失。其他如在動物中靜脈注射 10 mg/kg cyclophosphamide、2.5 mg/kg epirubicin 及 10 mg/kg fluorouracil，每週一次，共施予 6 次，結果發現骨髓脂肪化程度及蝕骨細胞增加，呈現骨質流失現象。若針對年輕大白鼠僅給予 0.75 mg/kg methotrexate，連續 5 天，即可出現骨質減少，蝕骨細胞增加。在動物腫瘤抑制劑量則是腹腔注射 30mg/kg fluorouracil 及 0.8 mg/kg methotrexate 至植入癌細胞的裸鼠可顯著延遲腫瘤生長。至於乳癌病人接受放射治療後，則被發現可能增加肋骨骨折的危險性。臨床上會使用雙磷酸鹽抑制蝕骨細胞以延緩乳癌病人在化放療之後骨密度變低的副作用，可是長期使用雙磷酸鹽可能會有下顎骨壞死的風險。調節骨成長及衰退主要來自骨髓中造骨細胞 (osteoblast) 和蝕骨細胞 (osteoclast)，這兩種細胞交互作用並調節胞外基質的分泌，以形成骨骼系統。骨的細胞外基質分為有機性及無機性兩種，有機性的細胞基質包括 fibronectin 或生長因子，或是膠原蛋白第一型、第三型等；無機性的細胞外介質，例如氫氧磷灰質結晶 (hydroxyapatite crystals)。骨骼系統不斷進行循環性的重塑，以因應外在機械壓力之改變，並維持鈣和磷的恆定，此種重塑作用由生骨作用和蝕骨作用之間的平衡得到控制。骨質不全

(osteopenia) 或骨質疏鬆症(osteoporosis)是一種鈣質由骨骼往血液淨移動的demineralization現象，骨質量減少，骨骼內孔隙增大，呈現中空疏鬆的骨質流失和骨組織破壞現象，其速率取決於osteoclast和osteoblast活性的消長。Osteoblast是骨形成過程中的重要功能細胞，它的增生並分泌骨基質(包括膠原與糖蛋白)會促使骨骼成長。Osteoblast 源自於骨髓中mesenchymal stem cell，受轉錄因子如Runx2調節分化而成，而調節Runx2的因子則有wnt signaling pathway及bone morphogenetic protein-2 (BMP)等；另外，osteoblast還參與osteoclast對骨吸收的調節。osteoclast的來源為單核吞噬細胞系統之外的骨髓生血細胞系統，為獨立於骨髓幹細胞系統的一個細胞系(Yabe et al. 1985)，是骨組織吸收的主要功能細胞。調控osteoclast成熟的關鍵分子是一種為osteoblast分泌的RANKL (receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand)，當RANKL和osteoclast上的受器RANK結合後，經由細胞內訊息傳遞蛋白如MAPK signaling的調節，會刺激osteoclast的分化邁向成熟，以進行骨吸收。化療對骨質的直接影響應為改變osteoblast及osteoclast的平衡及調節作用。除了化療藥物直接對骨質造成流失外，部分化療藥物在早期乳癌治療的女性可能引起卵巢功能衰竭，失去雌激素的個體會使骨質流失及增加蝕骨細胞數量及密度。因此化療藥物不僅可能直接導致骨質流失，亦可能透過卵巢損傷而間接引起骨質流失。先前研究指出estrogen可與receptor結合後直接經由hormone response element調節基因表達，或是receptor與轉錄因子以protein/protein interaction的方式調節基因而作用在骨骼形成及其重塑作用的調節。此外，estrogen及其receptor結合後，也可經由細胞質中的激酶如ERK影響轉錄因子活性以調節osteoblast及osteoclast的細胞凋亡以調節骨骼結構 (Kousteni et al., 2001; Kousteni et al., 2003; Chen et al., 2005)。對osteoblast而言，p66shc的磷酸化會使粒線體中ROS增加而導致細胞死亡。Estrogen會減少ROS生成、刺激GSR活性及降低p66shc 磷酸化以保護osteoblast免於死亡(Almeida et al., 2009)；另外，在in vitro系統中加入如H₂O₂、etoposide引起的osteoblast apoptosis，estrogen可經由調節Src及MAPK kinase kinases而延緩此種現象(Almeida., 2007)。而osteoclast，它是一種acid-secreting polykaryons，對能量需求高，因此含有豐富粒線體。先前文獻指出不論在in vitro或in vivo，適量增加ROS或去除抗氧化分子GSH會使ERK及 NF- κ B活化而刺激 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 及 TNF α expression，對osteoclast differentiation具促進作用 (Garrett et al., 1990; Lévassieur et al., 2003; Bai et al., 2005; Lean et al., 2005)，Estrogen在此狀況下會經由它的抗氧化作用減低osteoclast分化以防止骨質流失。這些結果指出estrogen調節osteoblast及osteoclast的作用以減低osteoporosis，因此卵巢提早衰竭而減少estrogen將加速osteoporosis。由於乳癌的發展或治療會對骨質影響甚鉅，因此我們也針對此批動物的股骨進行micro CT分析。

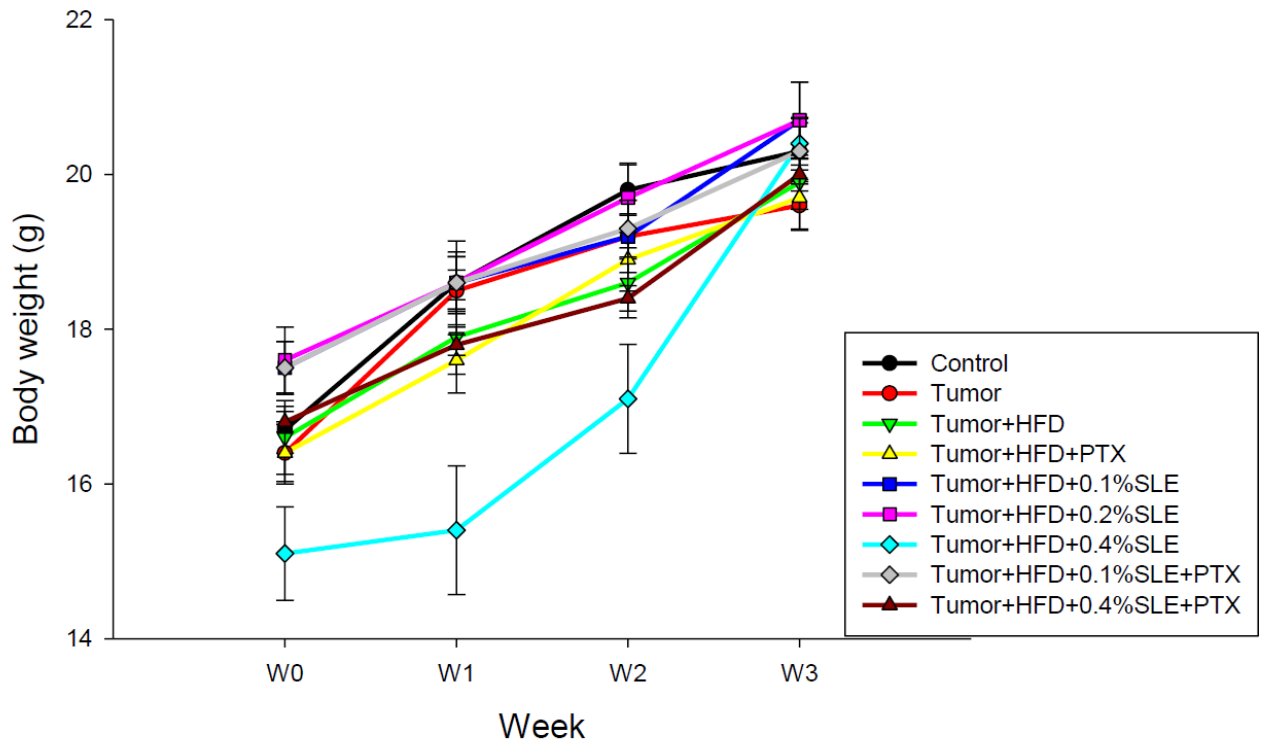


Fig. The body weight of mouse breast cancer cells xenograft model.
 After 4T1 breast cancer cells(1×10^6) inoculated to right flank, the body weight was measured every week. HFD, high fat diet. PTX, paclitaxel.

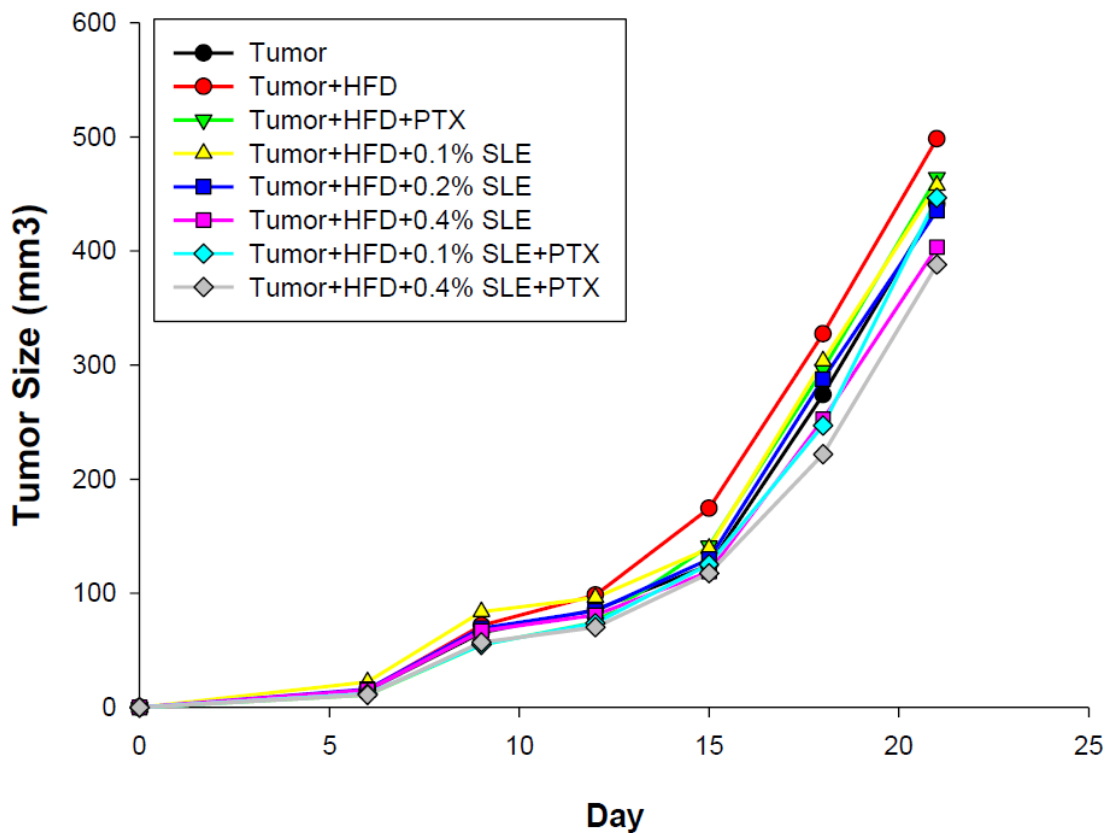


Fig. The tumor size of mouse breast cancer cells xenograft model.
 After 4T1 breast cancer cells(1×10^6) inoculated to right flank, the tumor size was measured every week. HFD, high fat diet. PTX, paclitaxel.

2. 草莓葉水萃物對乳癌動物骨質的影響。

注射腫瘤及餵食高油脂的組別，可以發現trabecular bone thickness減少為正常組的75%，給予palcitaxel的組別會顯著增加trabecular bone thickness，而給予SLE的組別，則隨著濃度增加，會增加trabecular bone number，且在合併處理palcitaxel組具加成效果。palcitaxel是一種selective estrogen receptor modulator，在抑制乳癌細胞分裂生長的作用外，對於骨質生長及完整化具有正面作用，因此在單獨處理的組別即可見成效。Trabecular bone 為骨髓中的新生骨質，數量及厚度皆為骨質指標，雖然SLE無法在trabecular bone thickness中看到顯著改善，但合併處理palcitaxel後對trabecular bone number有改善作用。由結果推論SLE可能對於成骨細胞/蝕骨細胞的生長分化具有調節作用，因此在短期內可以看到trabecular bone number的增加，但卻無法反映於trabecular bone thickness，Trabecular bone 為骨髓中的新生骨質，數量及厚度皆為骨質指標，雖然SLE無法在trabecular bone thickness中看到顯著改善，但合併處理palcitaxel後對trabecular bone number有改善作用。由結果推論SLE可能對於成骨細胞/蝕骨細胞的生長分化具有調節作用，因此在短期內可以看到trabecular bone number的增加，但卻無法反映於trabecular bone thickness。本次實驗因期程短，因此尚無法確定這個結果，若能增加治療時間或另外設計實驗，針對SLE對骨細胞的作用進行檢測，應該較能解釋目前的疑慮。

	BMD	Percent bone volume	Trabecular thickness	Trabecular separation	Trabecular number	Bone surface density
	mean	BV/TV	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N	BS/TV
	g/cm ³	%	mm	mm	mm ⁻¹	mm ⁻¹
Control	1.086 ± 0.082	30.70 ± 5.51	0.080 ± 0.005	0.181 ± 0.024	3.839 ± 0.466	14.108 ± 1.544
Tumor	1.160 ± 0.024	11.67 ± 2.92 **	0.060 ± 0.001 *	0.301 ± 0.050 **	1.932 ± 0.435 **	7.615 ± 1.747 **
Tumor+HFD	1.158 ± 0.015	10.16 ± 2.41	0.059 ± 0.002 ^{SS}	0.313 ± 0.051	1.704 ± 0.367	6.932 ± 1.408
Tumor+HFD+PTX	1.152 ± 0.028	13.36 ± 3.80	0.284 ± 3.796 ##	0.284 ± 0.068	2.171 ± 0.486	8.705 ± 1.994
Tumor+HFD+ 0.1%SLE	1.171 ± 0.026	13.41 ± 1.76	0.060 ± 0.004	0.336 ± 0.086	1.828 ± 0.495	67.162 ± 5.589
Tumor+HFD+ 0.2%SLE	1.164 ± 0.015	13.29 ± 0.62	0.072 ± 0.015	0.344 ± 0.111	1.966 ± 0.346	56.576 ± 9.255
Tumor+HFD+ 0.4%SLE	1.160 ± 0.017	8.10 ± 2.04	0.061 ± 0.005	0.342 ± 0.018	1.723 ± 0.231	64.900 ± 4.517
Tumor+HFD+ 0.1%SLE+PTX	1.179 ± 0.015	14.01 ± 3.77	0.061 ± 0.003	0.317 ± 0.034	1.791 ± 0.353	66.768 ± 2.147
Tumor+HFD+ 0.4%SLE+PTX	1.187 ± 0.022	12.17 ± 1.27	0.064 ± 0.004	0.272 ± 0.044	2.388 ± 0.435	60.788 ± 4.231

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compare with Control ; ^{SS} $p < 0.01$ compare with Tumor ; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compare with Tumor+HFD

Fig 13. Effect of HSE combined with paclitaxel on bone microarchitecture indices in mice measured by Micro-CT. Quantification of trabecular bone in control, tumor, tumor fed with HFD and mice treated with PTX cotreatment with SLE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compare with Control ; ^{SS} $p < 0.01$ compare with Tumor ; ## $p < 0.01$ compare with Tumor+HFD.

3. 草莓葉水萃物對動物乳癌組織中粒線體 copy number 的影響。

關於 mtDNA 突變和被刪除與粒線體功能障礙和氧化磷酸化作用的完整性受到破壞有關。每個拷貝的 mtDNA 的圓形分子由 16569 鹼基對的 37 個基因編碼所構成，具有 13 個粒線體蛋白質，22 個轉移 RNA (tRNA) 和兩個核糖體 RNA (rRNA)，這些蛋白質/RNA 共同構成粒線體的核心單位。然而，核 DNA 的編碼主要為製造一些酶用於複製，修復，轉錄和轉譯 mtDNA。因此，絕大多數發現在粒線體的蛋白質是由核 DNA 編碼的。據認為，這些核 DNA 的來源是細菌在進化過程中被轉移到細胞核。位於細胞質中和具有數目多的 mtDNA 拷貝數是粒線體獨特的特徵。首先，mtDNA 是母系遺傳，其次，與核 DNA 的基因相比較 粒線體 基因有很高的突變比率。第三，對 mtDNA 的拷貝數突變是異質性的和具有一定的突變比率，亦 mtDNA 突變需超過一定的突變比率才會表現出一種疾病。因此，逐漸累積的體細胞 mtDNA 突變可會造成粒線體的功能障礙，最終導致細胞能量產生的損失。粒線體或其他地方產生的 ROS 亦可能損害 mtDNA。事實上，mtDNA 是很容易受到氧化損傷。這是因為：

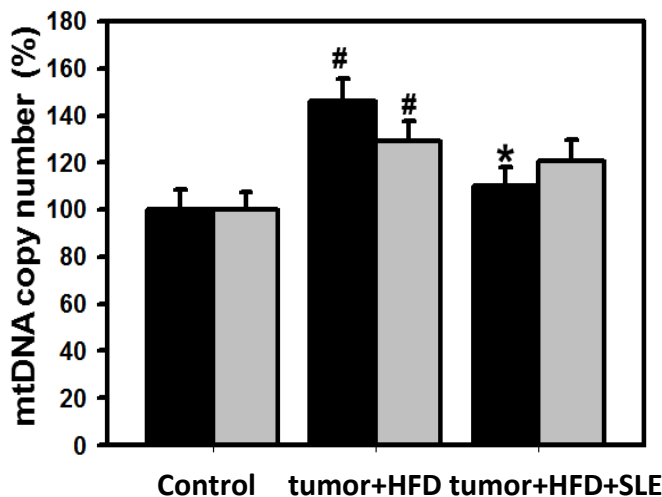
- (1) 在粒線體內 mtDNA 鄰近產生 ROS / RNS 的位置，而超氧 ($O_2\bullet-$) 在粒線體內產生並沒有滲透到細胞質，雖然其歧化產物過氧化氫會滲透到細胞質。
- (2) mtDNA 缺乏組蛋白 (histone)，而此組蛋白缺乏就不能保護核 DNA 不受氧化損傷。
- (3) 粒線體聚合酶缺乏對鹼基切除修復的特異性，而修復是消除 DNA 鹼基受氧化傷害的主要路徑。

在此研究中，我們針對粒線體 mtDNA 拷貝數的變化進行觀察，結果發現腫瘤組織中增加 mtDNA 拷貝數，可能是因粒線體 DNA 受到傷害的代償作用，用以維持粒線體的正常功能，產生足夠的能量以供細胞使用，但產生能量的同時亦產生大量的活性氧，而這些活性氧又會對粒線體造成傷害，當累積的傷害持續發展，導致粒線體功能嚴重受損，代償作用可能無法持續，mtDNA 拷貝數就會下降。若 mtDNA 拷貝數減少，細胞中呼吸鏈複合體的合成與 ATP 的合成會下降，間接降低粒線體的能量代謝功能。在此研究結果，腫瘤組織 mtDNA 拷貝數與對照組相較之下會增加約 46%，經 SLE 給予的組別，mtDNA 拷貝數會回復至與對照組比較增加約 10%。若以無性增殖的機制 (clonal expansion) 的基礎而言，增加 mtDNA 的拷貝數可能是代償以彌補受到損傷的 mtDNA，以維持粒線體的功能。但這仍然需要進一步研究證實。

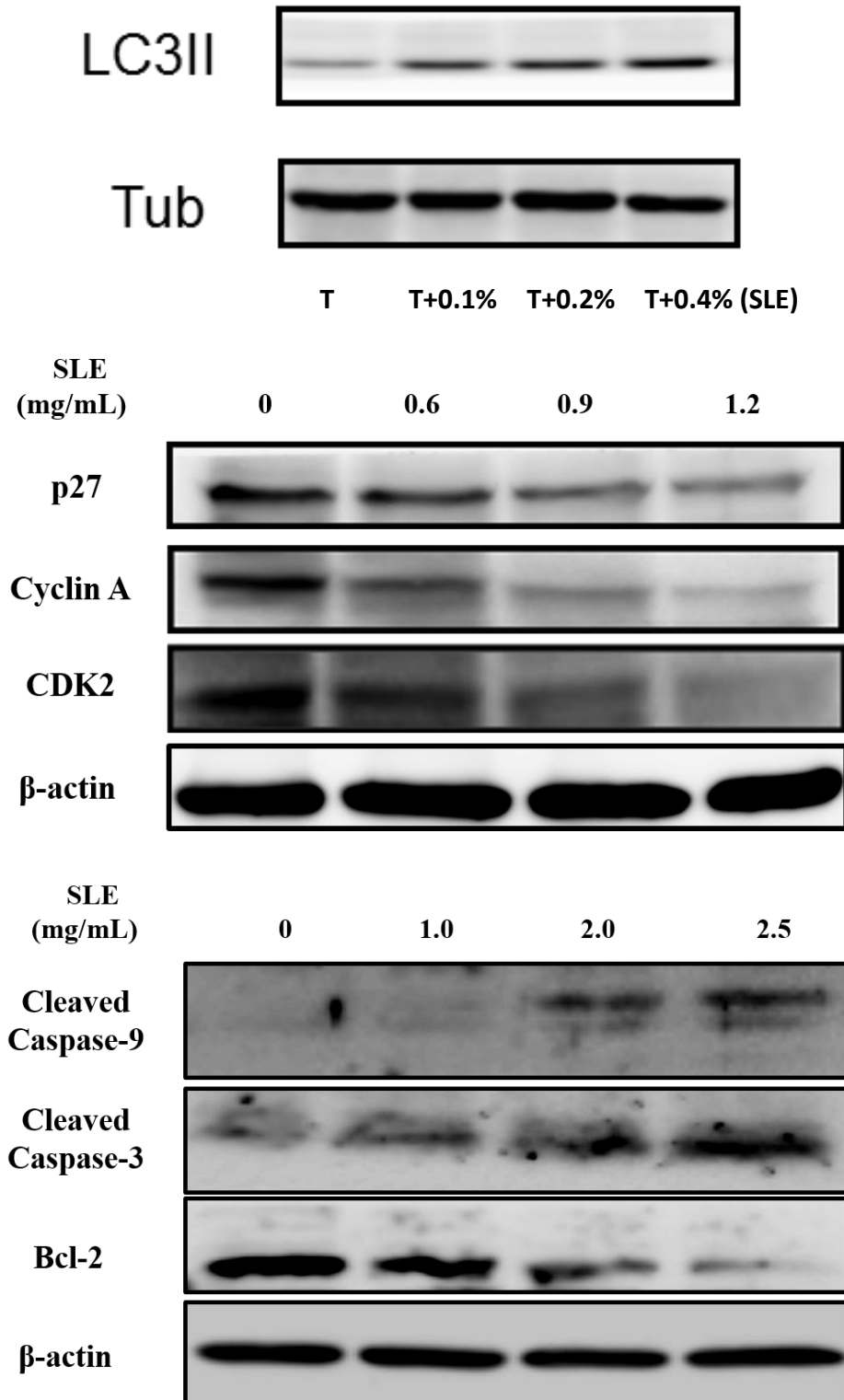
Table I. The sequences of the primers and probes used in detecting mtDNA

Primer/probe	Sequence (5'-3')
Mitochondrial D-loop	
Forward	GGTTCTTACTTCAGGGCCATCA
Reverse	GATTAGACCCGTTACCATCGAGAT
Probe	6FAM -TTGGTTTATCGTCCATACGTTCCCCTTA- TAMRA
β-actin	
Forward	GGGATGTTTGCTCCAACCAA
Reverse	GCGCTTTTGACTCAAGGATTTAA
Probe	VIC -CGGTCGCCTTCACCGTTCCAGTT- TAMRA

* The words in red are represented as probe.



4. 草莓葉水萃物對動物乳癌組織中自噬作用蛋白 LC3 及細胞凋亡和細胞週期蛋白的影響。
 為了研究草莓葉水萃物對於內質網壓力的影響，我們利用西方墨點法來偵測蛋白異常表現或折疊中會出現的自噬作用的關鍵蛋白LC3的表現。結果發現給予SLE會增加LC3II的表現，引起內質網壓力。另外在先前測定時發現一些主要在S時期的蛋白表現，cyclin A-CDK2 complex扮演著重要的調控角色且在SLE處理下引導腫瘤細胞死亡，進一步觀察其上游p27蛋白表現，可得知p27蛋白表現受到草莓葉水萃物的抑制。目前的結果大多指向草莓葉水萃物會使細胞週期停滯於S時期，更進一步的訊息傳遞路徑目前仍在進行中。



五、成果自評

1. 在基礎研究中

農產或天然物抗癌功效的研究很多，可是善加利用農作的廢棄物並著眼於抗癌的研究較少，而在台灣，則雖有本研究室正在執行的毒性及乳癌細胞抑制作用外，鮮少有針對本土栽植的草莓葉進行相關研究，因此本研究可對此部分提供研究證據以利日後提升作物經濟效益的產業推廣。

2. 在產業應用上

草莓廣被一般大眾喜愛，但在採收後，大量的葉片廢棄相當可惜。若能提升利用率，甚或發掘另類功效，對產業無疑為一大助益，既減少處理廢棄物的資源成本，又能開發另類產品，對防癌素材的取用上，增加了一個價格低廉的來源，也可提供產業開發經濟性產品時的新思維。

3. 在公共衛生策略中

乳癌症發生率及致死率逐年增加，不僅使人民生命遭受威脅，也使國家醫療成本負擔加重，提出有效乳癌防治措施，可減低罹病後的醫療支出。

4. 在臨床應用上

乳癌的化療過程中，已有研究指出化療時的藥物敏感性減低，增加乳癌治療的困境。合併多種化療藥物為目前施行的臨床策略，但也增加副作用發生的風險。因此，若能介入增敏因子，應可得到較大成效。本研究以草莓葉為材，進行相關作用及機轉探討，係以食品廢棄物材料進行醫學功效研究，對成本考量上，經濟效益相對增加。

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

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

論文：已發表未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得申請中 無

技轉：已技轉洽談中

無

其他：(以 200 字為限)

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

1. 在學術成就中

農產或天然物抗癌功效的研究很多，可是善加利用農作的廢棄物並著眼於抗癌的研究較少，而在台灣，則雖有本研究室正在執行的毒性及乳癌細胞抑制作用外，鮮少有針對本土栽植的草莓葉進行相關研究，因此本研究可對此部分提供研究證據以利日後提升作物經濟效益的產業推廣。

2. 在技術創新上

草莓廣被一般大眾喜愛，但在採收後，大量的葉片廢棄相當可惜。若能提升利用率，甚或發掘另類功效，對產業無疑為一大助益，既減少處理廢棄物的資源成本，又能開發另類產品，對防癌素材的取用上，增加了一個價格低廉的來源，也可提供產業開發經濟性產品時的新思維。

3. 在社會影響中

(1)乳癌症發生率及致死率逐年增加，不僅使人民生命遭受威脅，也使國家醫療成本負擔加重，提出有效乳癌防治措施，可減低罹病後的醫療支出。

(2)為減緩乳癌化療過程副作用發生的風險，若能介入增敏因子，應可得到較大成效。本研究以草莓葉為材，進行相關作用及機轉探討，係以食品廢棄物材料進行醫學功效研究，對成本考量上，經濟效益相對增加。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關_農委會_
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以 150 字為限)

本研究以農業廢棄物進行延緩乳癌的抑癌作用，在進行此研究之前，必須確定原料並無農藥、化學物及重金屬污染，因此對於農地的養護，必須更加重視排除農藥、化學物及重金屬的重要性，必能使植物利用更多元及更有效益。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期： 年 月 日

科技部補助計畫	計畫名稱：草莓葉水草物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討 計畫主持人：李慧禎 計畫編號： MOST 104-2320-B-040 -004 - 領域：保健營養		
研發成果名稱	(中文) 草莓葉萃物減緩氧化壓力 (英文) Extract of strawberry leaf decelerate oxidative stress		
成果歸屬機構	中山醫學大學	發明人 (創作人)	李慧禎
技術說明	(中文) 草莓是深受國人喜愛的水果，果實富含黃酮及多酚產物，因此具有良好抗氧化特性及抗癌效果，但對於採果後會被棄置的草莓葉則甚少研究。在國外研究中，近年已有部分研究發現草莓葉中也含有多酚類產物，可能具有醫療功效。但台灣農藥的高度使用及殘留問題，並無針對草莓葉進行相關研究。為了提升農業廢棄物的經濟效益，我們以台灣燦達生物科技提供之無毒栽種草莓葉，以水草物進行成分分析及對乳癌細胞功效的檢測。目前已發現草莓葉水草物含有酚類化合物且具有抗發炎特性，並抑制乳癌細胞生長，使細胞週期停滯並出現有絲分裂崩解的多核型態，而且也呈現細胞凋亡及細胞自噬的特性。乳癌與肥胖高度相關，游離脂肪酸及葡萄糖可能使細胞內質網壓力及粒線體氧化壓力增加而調節細胞生長及轉移的特性。因此在本計畫中將接著以草莓葉水草物探討在乳癌發生過程中對細胞內質網壓力及粒線體氧化壓力的影響，以釐清調節機轉。期望達成在動物乳癌模式中，將草莓葉水草物介入引起乳癌的過程，檢測此間的作用及機轉，包括 ER stress 及粒線體氧化壓力在細胞週期調節、細胞凋亡、細胞自噬的調節等。結果發現，草莓葉對動物腫瘤具抑制效果，且在合併 palcitaxel 後具有加成作用。另外結果也顯示在乳癌發展或治療下，草莓葉合併 palcitaxel 在動物乳癌模式中具有延緩骨質損傷的作用；而草莓葉水草物也初步發現具有改善粒線體及內質網壓力的可能。從以上的研究結果，目前認為草莓葉在乳癌產生及合併臨床藥物應具有加成的作用，且可能機轉是經由調節粒線體及內質網壓力，此結果提供臨床使用的訊息，除學術貢獻外，本研究成果可進一步將草莓葉這種農業廢棄物發展為一種防癌抗癌的機能性產品。		

	<p>(英文)</p> <p>Strawberry, rich in flavonoids and polyphenols, is one of the favorite fruits in Taiwan. There were several studies to show the fruit possess the abilities in antioxidation and anti-cancer. However, the leaves are usually discarded as waste, and the function of strawberry leaves is rare discussed. In the other country, there are some studies to present the polyphenols in strawberry leaf, it would possess potential medicinal functions. But in Taiwan, there is no relative study to explore the function of strawberry leaf. It would be due to the over-use and residue of herbicides or pesticides. To elevate the economic benefits of agricultural waste, the non-toxic planted strawberry leaf provide from “The Taste Company” is extracted the water extract and isolated the functional components to examine the effects in breast cancer. In our present study, the water extract of strawberry leaf (SLE) showed to inhibit breast cancer cell (MCF-7) growth, cause cell cycle arrest, present a multinucleation phenomenon of mitotic catastrophe, and possess the patterns of apoptosis and autophagy. Obesity is highly relative to breast cancer, excessive free fatty acids and glucose would increase the endoplasmic reticulum stress (ER stress) and the mitochondrial oxidative stress to further regulate properties of cell growth and metastasis. In this study, the SLE will be intervened to animal breast cancer to clarify the regulation of ER stress and mitochondrial oxidative stress. The major purposes in this study are aimed to clarify the regulatory mechanisms of SLE between ER stress / mitochondrial oxidative stress and apoptosis / autophagy in animal breast cancer. The results showed that strawberry leaf extract can inhibit the development of breast tumor, and possess the synergic effect co-treated with paclitaxel. Additionally, under the progression in breast cancer, the combined treatment of strawberry and paclitaxel has the effect to decelerate bone lesion. After primary examination, the mechanisms seems to involve the regulation of mitochondrial/endoplasmic stress although they need to be further clarified. According to the results, we will explore the effects and mechanisms of strawberry leaf in breast cancer to provide the clinical application, and the combination of strawberry extract and paclitaxel possess a synergic effect, it would involve the regulation of mitochondrial and endoplasmic stress. In addition to academic contribution, the re-use of the agricultural waste would develop a functional product to in cancer prevention or therapeutic effect.</p>
<p>產業別</p>	<p>食品業 農業</p>
<p>技術/產品應用範圍</p>	<p>食品添加 飼料添加物</p>

**技術移轉可行性及預期
效益**

先期可先應用於動物飼料添加以增加細胞抗氧化力爾後可添加於食品或保健食品，除原有效用外，尚可增添風味。

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

科技部補助專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：		計畫編號：			
計畫名稱：草莓葉水萃物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討					
成果項目		量化	單位 質化 (說明:各成果項目請附佐證資料或細項說明,如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	篇	請附期刊資訊。	
		研討會論文			
		專書	本	請附專書資訊。	
		專書論文	章	請附專書論文資訊。	
		技術報告	篇		
		其他	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	請附佐證資料，如申請案號。
				已獲得	請附佐證資料，如獲證案號。
			新型/設計專利		
		商標權			
		營業秘密			
		積體電路電路布局權			
		著作權			
		品種權			
	其他				
技術移轉	件數		件		

		收入		千元	<ol style="list-style-type: none"> 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第2條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、獎金、股權或其他權益。 請註明合約金額。 	
國外	學術性論文	期刊論文		篇	請附期刊資訊。	
		研討會論文	1			
		專書		本 章	請附專書資訊。	
		專書論文			請附專書論文資訊。	
		技術報告		篇		
		其他		篇		
	智慧財產權 及成果	專利權	發明專利	申請中	件	請附佐證資料，如申請案號。
				已獲得		請附佐證資料，如獲證案號。
			新型/設計專利			
		商標權				
		營業秘密				
		積體電路電路布局權				
		著作權				
		品種權				
		其他				
	技術移轉	件數			件	
		收入			千元	<ol style="list-style-type: none"> 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第2條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、獎金、股權或其他權益。 請註明合約金額。
參與計畫 人力	本國籍	大專生	謝宜庭	4 人次		
		碩士生	陳盈均			
		博士生	饒行佑、梁馨文			
		博士後研究員				
		專任助理				
	非本國籍	大專生				
		碩士生				
		博士生				
博士後研究員						

		專任助理			
		其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)			

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期： 年 月 日

計畫編號	MOST 104-2320-B-040 -004 -		
計畫名稱	草莓葉水萃物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討		
出國人員姓名	饒行佑	服務機構及職稱	中山醫學大學生化暨生物科技研究所
會議時間	104年11月22日至104年11月25日	會議地點	韓國首爾
會議名稱	(中文)國際食品保健因子大會 (英文)The 6 th international conference om food factors		
發表題目	(中文)奶薊種子水萃物誘導細胞週期 G0 / G1 停滯在人類乳腺癌細胞 (英文) 1. Aqueous Extract Of Silybum marianum seed Caused G0/G1 Arrest In Human Breast Cancer 2. Strawberry planted uncer non-toxic agricultural operation alleviates indomethacin-induced gastric ulcer via regulating oxidative status and inflammatory responses 3. Apple polyphenols induce cytotoxicity of breast cancer cell via regulating survival proteins and cell cycle machinery to arrest at G2/M phase		

一、參加會議經過

此次會議為 2015 年國際食品保健因子大會，本人係前往參與大會並發表看板論文。

會議期間為 2015/11/22-2012/11/25，所以在 11/21 上午與本研究室研究生一同搭乘高鐵往桃園機場，搭長榮航空至韓國仁川機場並於 11/23 當日前往 漢城世界貿易展覽中心(COEX)完成報到與註冊手續。本次會議中個人海報展示時間為 11/23 上午 10:00-12:00，論文題目為” Aqueous Extract Of Silybum marianum seed Caused G0/G1 Arrest In Human Breast Cancer”。本實驗利用奶薊水萃物處理人類乳癌細胞，觀察其對於人類乳癌細胞的影響，由實驗結果發現，奶薊水萃物可以透過調節細胞週期的特定蛋白，如: cdk，cyclin 等等，讓細胞生長停滯在 G0/G1 時期，達到抑制細胞生長的效果。在海報展示期間有與會者前來提問並提出建議，之後也針對其提問及建議做討論，在研究的想法中有所增長。

二、 與會心得

本次議會的安排得相當豐富，海報展示與口頭論文發表的篇數及場次都非常的多，便於與會者選擇自己有興趣的主題觀看及聆聽。在本次會議中，功能性食品相關領域的研究也非常多，有不少是以商品化的產品。這次最大的收穫是藉由這次的會議了解各個不同領域的研究，讓自己的想法更貼近國際。

三、 發表論文全文或摘要

Breast cancer is the most common cancer in women and it is the 4th position of death causes in Taiwan. Several herbal medicine and natural plants possess preventive or therapeutic effect in human disease. Silybum marianum seed was reported to have the abilities in anti-cancer, anti-oxidation, anti-inflammation and Hepatoprotective effect. Here, a breast cancer cell line, ZR-751, was treated with Silybum marianum seed water extract (SMSWE) at various concentration (0, 2.5, 5 and 7.5 mg/mL). MTT assay was conducted to detect the cell viability. The change of cell cycle was analyzed by Flow cytometry, and the expression of protein was detected by western blot. SMSWE can

reduce the cell viability in a dose-dependent manner. It also causes G0/G1 arrest via inhibiting the levels of cyclin D and cyclin E, and also decreased the levels of cdk2 and cdk4 at high concentration. Taken together, SMSWE would have the potential to play a cancer chemo-preventive agent.

四、 建議

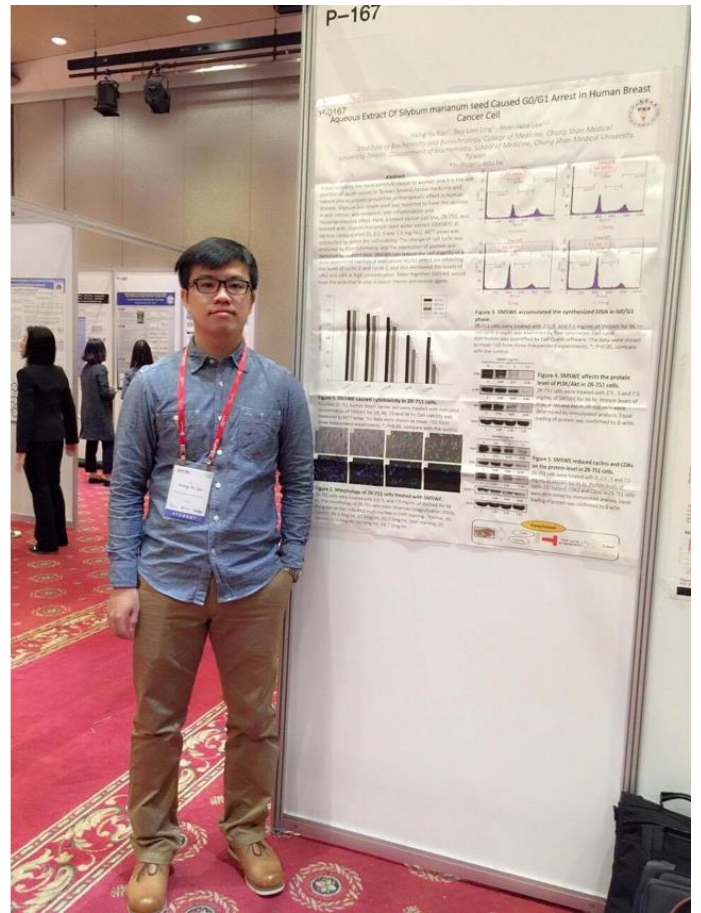
本次會議有來自世界各國的學者及研究單位，藉由會議進行與來自許多國家的學者相互交流學術意見，並增加彼此認識的機會，此外，亦可相互學習人際互動及禮節，政府單位應以實際作為多加鼓勵國際學術交流。

五、 攜回資料名稱及內容



圖為大會議程及附贈背包

六、 其他



圖為同行研究生及海報合影

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報

告

日期： 年 月 日

計畫編號	MOST 104-2320-B-040 -004 -		
計畫名稱	草莓葉水萃物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討		
出國人員姓名	饒行佑	服務機構及職稱	中山醫學大學生化暨生物科技研究所
會議時間	104年11月22日至 104年11月25日	會議地點	韓國首爾
會議名稱	(中文)國際食品保健因子大會 (英文)The 6 th international conference om food factors		
發表題目	(中文)奶薊種子水萃物誘導細胞週期 G0 / G1 停滯在人類乳腺癌細胞 (英文) 1. Aqueous Extract Of Silybum marianum seed Caused G0/G1 Arrest In Human Breast Cancer 2. Strawberry planted uncer non-toxic agricultural operation alleviates indomethacin-induced gastric ulcer via regulating oxidative status and inflammatory responses 3. Apple polyphenols induce cytotoxicity of breast cancer cell via regulating survival proteins and cell		

一、 參加會議經過

此次會議為 2015 年國際食品保健因子大會，本人係前往參與大會並發表看板論文。會議期間為 2015/11/22-2012/11/25，所以在 11/21 上午與本研究室研究生一同搭乘高鐵往桃園機場，搭長榮航空至韓國仁川機場並於 11/23 當日前往 漢城世界貿易展覽中心(COEX)完成報到與註冊手續。本次會議中個人海報展示時間為 11/23 上午 10:00-12:00，論文題目為” Aqueous Extract Of Silybum marianum seed Caused G0/G1 Arrest In Human Breast Cancer”。本實驗利用奶薊水萃物處理人類乳癌細胞，觀察其對於人類乳癌細胞的影響，由實驗結果發現，奶薊水萃物可以透過調節細胞週期的特定蛋白，如: cdk，cyclin 等等，讓細胞生長停滯在 G0/G1 時期，達到抑制細胞生長的效果。在海報展示期間有與會者前來提問並提出建議，之後也針對其提問及建議做討論，在研究的想法中有所增長。

二、 與會心得

本次議會的安排得相當豐富，海報展示與口頭論文發表的篇數及場次都非常的多，便於與會者選擇自己有興趣的主題觀看及聆聽。在本次會議中，功能性食品相關領域的研究也非常多，有不少是

以商品化的產品。這次最大的收穫是藉由這次的會議了解各個不同領域的研究，讓自己的想法更貼近國際。

三、發表論文全文或摘要

Breast cancer is the most common cancer in women and it is the 4th position of death causes in Taiwan. Several herbal medicine and natural plants possess preventive or therapeutic effect in human disease. Silybum marianum seed was reported to have the abilities in anti-cancer, anti-oxidation, anti-inflammation and Hepatoprotective effect. Here, a breast cancer cell line, ZR-751, was treated with Silybum marianum seed water extract (SMSWE) at various concentration (0, 2.5, 5 and 7.5 mg/mL). MTT assay was conducted to detect the cell viability. The change of cell cycle was analyzed by Flow cytometry, and the expression of protein was detected by western blot. SMSWE can reduce the cell viability in a dose-dependent manner. It also causes G0/G1 arrest via inhibiting the levels of cyclin D and cyclin E, and also decreased the levels of cdk2 and cdk4 at high concentration. Taken together, SMSWE would have the potential to play a cancer chemo-preventive agent.

四、建議

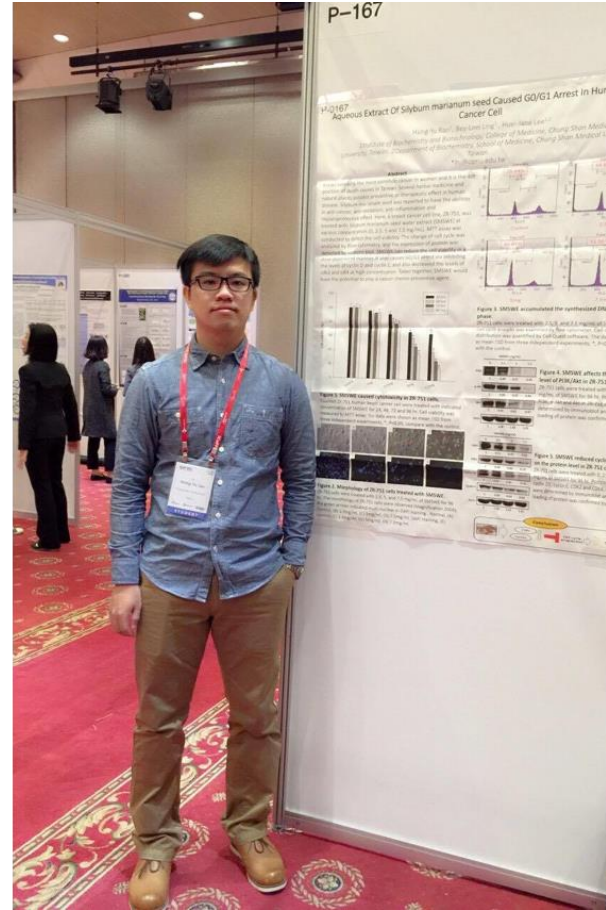
本次會議有來自世界各國的學者及研究單位，藉由會議進行與來自許多國家的學者相互交流學術意見，並增加彼此認識的機會，此外，亦可相互學習人際互動及禮節，政府單位應以實際作為多加鼓勵國際學術交流。

五、 攜回資料名稱及內容



圖為大會議程及附贈背包

六、 其他



圖為同行研究生及海報合影

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/13

科技部補助計畫	計畫名稱: 草莓葉水草物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討
	計畫主持人: 李慧禎
	計畫編號: 104-2320-B-040-004- 學門領域: 營養保健
無研發成果推廣資料	

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：李慧禎			計畫編號：104-2320-B-040-004-				
計畫名稱：草莓葉水萃物是否因調節內質網壓力及粒線體氧化壓力而引起乳癌細胞死亡及相關機轉探討							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0		本	
		專書論文		0		章	
		技術報告		0		篇	
		其他		0		篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	
			研討會論文		1		Yi-Ting Hsieh, Hsing-You Rao, Cian-Ying Zhan, Yao-Nien Chung, Hai-Kang Liao, Ti-Sian Li, Hsin-Wen Liang, Huei-Jane Lee. Strawberry planted under non-toxic agricultural operation alleviates indomethacin-induced gastric ulcer via regulating oxidative status and inflammatory responses, 2015, The 6th International conference on Food Factors, Seoul, Korea.
專書			0	本			
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權	專利權	發明專利	申請中	0	件		

	及成果		已獲得	0		
			新型/設計專利	0		
			商標權	0		
			營業秘密	0		
			積體電路電路布局權	0		
			著作權	0		
			品種權	0		
			其他	0		
	技術移轉	件數	0	件		
		收入	0	千元		
參與計畫人力	本國籍	大專生	1	人次	謝宜庭	
		碩士生	1		陳盈均	
		博士生	2		饒行佑、梁馨文	
		博士後研究員	0			
		專任助理	0			
	非本國籍	大專生	0			
		碩士生	0			
		博士生	0			
		博士後研究員	0			
		專任助理	0			
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)						

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

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

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

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

1. 在學術成就中

農產或天然物抗癌功效的研究很多，可是善加利用農作的廢棄物並著眼於抗癌的研究較少，而在台灣，則雖有本研究室正在執行的毒性及乳癌細胞抑制作用外，鮮少有針對本土栽植的草莓葉進行相關研究，因此本研究可對此部分提供研究證據以利日後提升作物經濟效益的產業推廣。

2. 在技術創新上

草莓廣被一般大眾喜愛，但在採收後，大量的葉片廢棄相當可惜。若能提升利用率，甚或發掘另類功效，對產業無疑為一大助益，既減少處理廢棄物的資源成本，又能開發另類產品，對防癌素材的取用上，增加了一個價格低廉的來源，也可提供產業開發經濟性產品時的新思維。

3. 在社會影響中

(1) 乳癌症發生率及致死率逐年增加，不僅使人民生命遭受威脅，也使國家醫療成本負擔加重，提出有效乳癌防治措施，可減低罹病後的醫療支出。

(2) 為減緩乳癌化療過程副作用發生的風險，若能介入增敏因子，應可得到較大成效。本研究以草莓葉為材，進行相關作用及機轉探討，係以食品廢棄物材料進行醫學功效研究，對成本考量上，經濟效益相對增加。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關農委會
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)

本研究以農業廢棄物進行延緩乳癌的抑癌作用，在進行此研究之前，必須確定原料並無農藥、化學物及重金屬汙染，因此對於農地的養護，必須更加重視排除農藥、化學物及重金屬的重要性，必能使植物利用更多元及更有效益。