

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

## 期末報告

探究無毒栽種草莓葉水萃物及其功能性成分抗乳癌功效及機轉之探討:在抗氧化、抗發炎、凋謝死亡、自噬死亡及有絲分裂崩解

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 103-2313-B-040-005-  
執行期間：103年08月01日至104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：博士班研究生-兼任助理人員：饒行佑  
其他-兼任助理人員：梁馨文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 30 日

中文摘要：許多天然物具抗癌作用，若能在乳癌發生的過程介入有效因子，應能減少乳癌發生的可能。草莓是深受國人喜愛的水果，果實已被得知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，但在台灣，並無針對草莓葉進行相關研究，主要原因可能來自農藥的高度使用及殘留問題。本研究先前的預備實驗發現草莓葉萃取物在乳癌細胞 MCF-7 中會抑制生長、使細胞週期停滯並出現有絲分裂崩解的多核型態。因此在本計畫中取用竣達生物科技提供之無毒栽種之草莓葉乾燥後水萃而進行乳癌的預防研究。我們發現草莓葉水萃物(SLE)可以使乳癌細胞MDA-MB-231在濃度大於0.5 mg/mL及MCF-7在濃度大於 0.3 mg/mL引起死亡，並出現較明顯的劑量依存性。草莓葉水萃物(SLE)會促使人類乳癌細胞MDA-MB-231進入凋亡的程序；而在MCF-7細胞處理草莓葉水萃物後，對於S時期的基因或蛋白具有抑制的作用。我們發現MDA-MB-231的cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9蛋白質表現量隨著SLE濃度上升而上升，Bcl-2蛋白質表現量草莓葉水萃物濃度上升而下降，顯示可促進細胞凋亡。另外，在MCF-7細胞中，cyclin A、CDK2，隨著SLE濃度的增加會減緩少蛋白表現量，而p27蛋白表現則受到SLE的抑制，目前的結果大多指向草莓葉水萃物會使MCF-7細胞的細胞週期停滯於S時期。另外小鼠微核損傷檢測中，目前發現直到SLE濃度為5 mg/ml，尚未發現草莓葉水萃物具有毒性。總結本年研究，草莓葉水萃物針對不同乳癌細胞株，皆具有抑制作用，但其機轉並不相同，至於在生物體內的反應，則須再以進一步的研究證實。

中文關鍵詞：草莓、草莓葉、抗氧化、細胞凋亡

英文摘要：

英文關鍵詞：

# 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)

探究無毒栽種草莓葉水萃物及其功能性成分抗乳癌功效及機轉之探討：  
在抗氧化、抗發炎、凋謝死亡、自噬死亡及有絲分裂崩解

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 103-2313-B-040-005

執行期間：103年08月01日至104年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學院醫學系生化科

計畫主持人：李慧禎

共同主持人：

計畫參與人員：梁馨文

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 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

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，        （請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 104 年 10 月 29 日

## 中文摘要

關鍵字：草莓、草莓葉、抗氧化、細胞凋亡

許多天然物具抗癌作用，若能在乳癌發生的過程介入有效因子，應能減少乳癌發生的可能。草莓是深受國人喜愛的水果，果實已被得知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，但在台灣，並無針對草莓葉進行相關研究，主要原因可能來自農藥的高度使用及殘留問題。本研究先前的預備實驗發現草莓葉萃取物在乳癌細胞 MCF-7 中會抑制生長、使細胞週期停滯並出現有絲分裂崩解的多核型態。因此在本計畫中取用燦達生物科技提供之無毒栽種之草莓葉乾燥後水萃而進行乳癌的預防研究。我們發現草莓葉水萃物(SLE)可以使乳癌細胞 MDA-MB-231 在濃度大於 0.5 mg/mL 及 MCF-7 在濃度大於 0.3 mg/mL 引起死亡，並出現較明顯的劑量依存性。草莓葉水萃物(SLE)會促使人類乳癌細胞 MDA-MB-231 進入凋亡的程序；而在 MCF-7 細胞處理草莓葉水萃物後，對於 S 時期的基因或蛋白具有抑制的作用。我們發現 MDA-MB-231 的 cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9 蛋白質表現量隨著 SLE 濃度上升而上升，Bcl-2 蛋白質表現量草莓葉水萃物濃度上升而下降，顯示可促進細胞凋亡。另外，在 MCF-7 細胞中，cyclin A、CDK2，隨著 SLE 濃度的增加會減緩少蛋白表現量，而 p27 蛋白表現則受到 SLE 的抑制，目前的結果大多指向草莓葉水萃物會使 MCF-7 細胞的細胞週期停滯於 S 時期。另外小鼠微核損傷檢測中，目前發現直到 SLE 濃度為 5 mg/ml，尚未發現草莓葉水萃物具有毒性。總結本年研究，草莓葉水萃物針對不同乳癌細胞株，皆具有抑制作用，但其機轉並不相同，至於在生物體內的反應，則須再以進一步的研究證實。

## 英文摘要

Keywords : Strawberry (Fragaria x ananassa Duch) 、 Strawberry leaf 、 antioxidation 、 apoptosis

Several natural products were reported to possess the anti-cancer ability. It would be a strategy to intervene the effective factors to reduce the progression of breast cancer. 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 leaf is often discarded as waste, and the function of strawberry is rare discussed. In the other country, there are some studies to present the polyphenols in strawberry leaf. 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. In our preliminary study, the water extract of strawberry leaf showed to inhibit breast cancer cell (MCF-7) growth, cause cell cycle arrest, and present a multinucleation phenomenon of mitotic catastrophe. In this study, the non-toxic planted strawberry leaf provide from “The Taste Company” will be extracted the water extract. We found the extract of strawberry leaf (SLE) can cause MDA-MB-231 death at the concentration higher than 0.5 mg/mL, and it cause MCF-7 death at the dose higher than 0.3 mg/mL in dose-dependent manner. SLE would increase the expression of cleaved-caspase-3 and cleaved-caspase-9 but decrease Bcl-2 to induce MDA-MB-231 into the apoptosis program. On the other side, it suppresses the expression of cyclin A and CDK2 in MCF-7 to turn down the S phase in cell cycle. We also examine the toxicity of SLE by conducting to micronucleus detection; the result shows 5 mg/ml of SLE is not toxic. Taken the above together, SLE possesses the ability to inhibit breast cancer cell, but there are different mechanisms existing them. It needs to be clarified further.

## 報告內容

### 一、前言

乳癌是世界各地最常見的女性癌症，不論是在開發中或已開發國家，其乳癌發生率都很高(1, 2)。根據行政院衛生署統計，乳癌的發生率與死亡率逐年增加。乳癌目前是台灣女性好發癌症的第一位，死亡率為第四位。隨著國人生活型態及飲食習慣西化的改變，台灣女性乳癌最常發生年齡約在45-55歲之間。但近年來，在30-40歲的年輕女性罹患乳癌的比例增加，顯見台灣乳癌罹患人口逐漸朝向年輕化。根據國民健康署統計顯示2012年有10526名乳癌新增病例，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% (3, 4)。

流行病學研究顯示，引起乳癌最重要的因子為雌激素 (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 (6)；(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 (6)；(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 (6)。

草莓屬於薔薇科年生草本植物。台灣目前栽種地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，近期已有農業研發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，將能達到廢棄物再利用的功效。在 2009 年 Hanhineva 針對 *Fragaria ananassa* cv. Jonsok 品系的草莓 (41) 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 (18)，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 (19)、抗菌 (20)、抗糖尿病 (21) 及抗氧化等作用 (22)。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 (23, 24)。多酚類化合物對人體健康的重要，越來越受科學界的關注，多酚化合物的共同特點是具有良好的抗氧化活性，能與維生素 C、E 和胡蘿蔔素等其他抗氧化物在體內一起發揮抗氧化功效，清除自由基，植物體內含有豐富的多酚化合物，這些多酚化合物不僅能抑制癌細胞增生與抑制轉移之外，更能促進細胞凋亡、殺死癌細胞。目前對於草莓葉對於乳癌的研究尚未了解，因此若利用萃取天然物來達到億製乳癌細胞的生長，進而有助於預防或降低罹患乳癌的風險，達到早期發現、早期治療，降低乳癌的死亡率。

## 二、研究目的

近年來不論西方國家或台灣，乳癌患者逐年增加，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，可能減低化療藥物的個體敏感性，因此改善化療藥物敏感性亦為重要課題。許多天然物具抗癌作用，因此若能在乳癌發生的過程介入有效因子，應能減少乳癌發生的可能。草莓是深受國人喜愛的水果，果實已被得知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著墨甚少。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，但在台灣，並無針對草莓葉進行相關研究，主要原因可能來自農藥的高度使用及殘留問題。本研究先前的預備實驗係將燻達生物科技提供之無毒工法栽種之草莓葉乾燥後水萃而進行研究，因此在本計畫中依然會取用燻達生物科技之草莓葉，分析其水萃物中的功能性成分，並將水萃物及功能性成分進行乳癌的預防或治療之相關檢測。

## 三、文獻探討

1. 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 (8)。
2. 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 (9)。
3. 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 (10)。
4. 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 (11)。
5. Jung 等人發現由 *Anthriscus sylvestris* (L.) 萃取出 Anthricin 會誘導乳癌細胞 apoptosis 及 autophagy (12)。
  6. 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 (13)。
  8. 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 (14)。
  9. 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 (15)。
  10. 2013 年，Weng 等人由 *Momordica charantia* 萃取出三種三萜類物質 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-25-methoxy-cucurbita-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 (16)。
  11. 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 (27)。
  12. 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 (17, 18)，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。
  13. 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 (23, 24)。

#### 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、抗發炎作用及基因毒性，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) 草莓葉萃物製備：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，取 200 克乾燥草莓葉粉末，加入 5 公升蒸餾水煮沸 2 小時後冷卻過濾，取過濾液部份，經由冷凍乾燥取得粉末 (約 27 克)，秤重後保存於 -20°C。平均產率約 13.5 %。
- (2) 細胞培養：人類乳癌細胞株 MCF-7 (ER positive) 和 MDA-MB231 (ER negative) 細胞分別以 DMEM 和 L-15 培養基培養，並加入適量 antibiotics、glutamin 及 10% heat-inactivated FBS。
- (3) MTT (Microculture tetrazolium) 分析：用來測試細胞是否有活性以及是否存



活的方法，將癌細胞以  $5 \times 10^4$  細胞數分至 24 well 中， $37^\circ\text{C}$  培養 16 小時後，處理不同濃度草莓葉水萃物 24 小時後，去除加藥的細胞培養液，再加入 1 mL 以細胞培養液 10 倍稀釋的 MTT reagent (final concentration 0.5 mg/mL)，待作用 4 小時之後再以異丙醇將結晶溶出，於 O.D. 565 nm 下測定溶液吸光，由吸光強度可得知存活的細胞數多寡。

- (4) 流式細胞技術：將癌細胞以  $1 \times 10^6$  細胞數分盤至 10 cm 的培養皿中，靜置  $37^\circ\text{C}$  培養箱 16 小時，添加不同濃度的草莓葉水萃物處理 24 小時後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，利用 PBS 清洗兩次後，再分次加入 1 mL 70% 的 cold ethanol，置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中隔夜，以固定細胞。隔天，拿出固定好的細胞離心 (1000 rpm, 5 min) 後，移除上清液，再用冰 PBS 清洗兩次，並且將上清液盡量去除乾淨。最後，每管分別加入 1 mL 之 propidium iodide mixture (PI stain)，避光靜置室 30 分鐘後，用  $40\mu\text{m}$  nylon mesh 過濾，以避免過大的細胞群塊或雜質阻塞流式細胞儀之樣品吸入孔，把單細胞懸浮液收集在流式細胞儀專用管中。利用 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) 系統，以流式細胞儀 (FACSCalibur, BECTON DICKINSON) 作分析。
- (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  $\mu\text{g}$  PMSF, 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin)，於冰上震盪 30 分鐘，在  $4^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{g}$ ，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- $\beta$ -mercaptoethanol, 0.4 ml 0.5% bromophenol blue)，以  $95^\circ\text{C}$  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  $4^\circ\text{C}$  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) 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. 利用人類乳癌細胞並處理草莓葉水萃物，觀察細胞型態、存活狀態。  
我們使用 MCF-7 及 MDA-MB231 該兩株人類乳癌細胞株，在分別給予草莓葉

水草物後，結果發現細胞存活率有下降的狀況；MDA-MB-231在濃度大於0.5 mg/mL及MCF-7在濃度大於 0.3 mg/mL，皆出現較明顯的劑量依存性 (Fig 1 及2)。利用倒立式相差顯微鏡觀察以不同濃度 0, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mg/mL 的草莓葉水草物處理MDA-MB-231細胞 24 小時後之細胞型態變化，結果如顯示 (Fig 3)，在使用較高濃度之草莓葉水草物時，細胞已有明顯的皺縮情形產生，隨著濃度增加細胞膜向內萎縮，細胞質空泡化及部分細胞漂浮，細胞形態開始不完整；接著以不同濃度 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 mg/mL 的草莓葉水草物處理 MCF-7細胞 24 小時後，如圖(Fig 4)可以得知處理不同濃度之草莓葉水草物對於MCF-7細胞型態並不會有明顯的變化。

2. 利用人類乳癌細胞並處理草莓葉水草物，確認細胞週期。

先前已經利用MTT assay觀察，初步可以知道草莓葉水草物可減緩MCF-7及MDA-MB-231細胞的生長及使其細胞存活率降低。此現象是否包含了細胞的凋亡 (Apoptosis) 和細胞週期的停滯 (Cell cycle arrest) 需進一步利用流式細胞儀觀察。在細胞週期檢測結果中，在草莓葉水草物處理後，發現 MDA-MB-231細胞隨著處理濃度越高，其subG1時期有明顯增加的趨勢，由此可知，草莓葉水草物會促使人類乳癌細胞MDA-MB-231進入凋亡的程序 (Fig 5)；而在MCF-7細胞處理草莓葉水草物後，由此現象可能表示草莓葉水草物對於S時期的基因或蛋白具有抑制的作用 (Fig 6)，因此接下來探討草莓葉水草物與細胞週期S期的關係。

3. 將草莓葉水草物處理 MDA-MB-231 細胞，檢查相關蛋白或基因的表現。

利用西方墨點法來觀察草莓葉水草物是否會影響細胞凋亡相關的蛋白質。將MDA-MB-231細胞培養於10公分培養皿中，分別加入不同濃度0, 1.0, 2.0, 2.5 mg/mL的草莓葉水草物，培養24小時，並收集細胞蛋白質萃取液，定量跑膠。從Fig 7可知草莓葉水草物會影響人類乳癌細胞MDA-MB-231細胞凋亡相關的蛋白質。以  $\beta$ -actin作為internal control，結果發現MDA-MB-231細胞的cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9蛋白質表現量隨著草莓葉水草物濃度上升而上升，Bcl-2蛋白質表現量隨著草莓葉水草物濃度上升而下降。

4. 將草莓葉水草物處理 MCF-7 細胞，檢查相關蛋白或基因的表現。

為了研究草莓葉水草物對於 MCF-7 細胞在 S 時期的影響，我們利用西方墨點法來偵測一些主要在 S 時期的蛋白表現；在細胞週期 S 期的進程當中，cyclin A-CDK2 complex 扮演著重要的調控角色。以不同濃度 0, 0.6, 0.9, 1.2 mg/mL 草莓葉水草物處理 MCF-7 細胞，結果 (Fig 8) 發現 cyclin A、CDK2，隨著濃度的增加減緩了其蛋白表現量，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草物的抑制。目前的結果大多指向草莓葉水草物會使 MCF-7 細胞的細胞週期停滯於 S 時期，更進一步的訊息傳遞路徑目前仍在進行中。

5. 草莓葉水草物成分目前尚有部分正在以 GC/MS 分析中，但我們先將水草萃取物以微核試驗進行了初步的毒性測試，結果發現草莓葉水草物濃度至 5

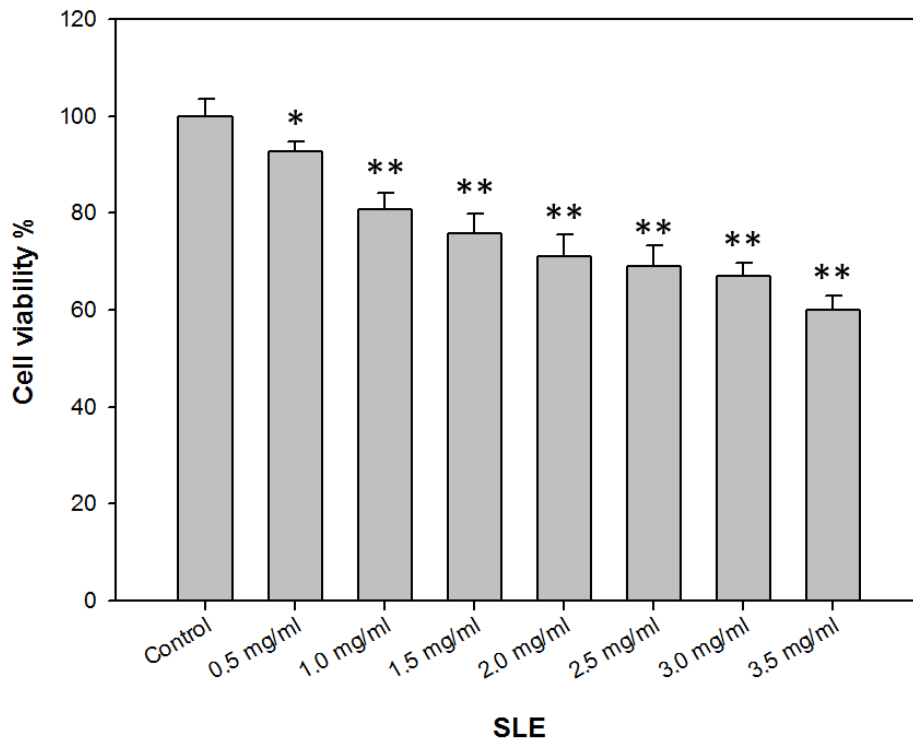
mg/ml 應不具毒性 (Table)。

#### [參考文獻]

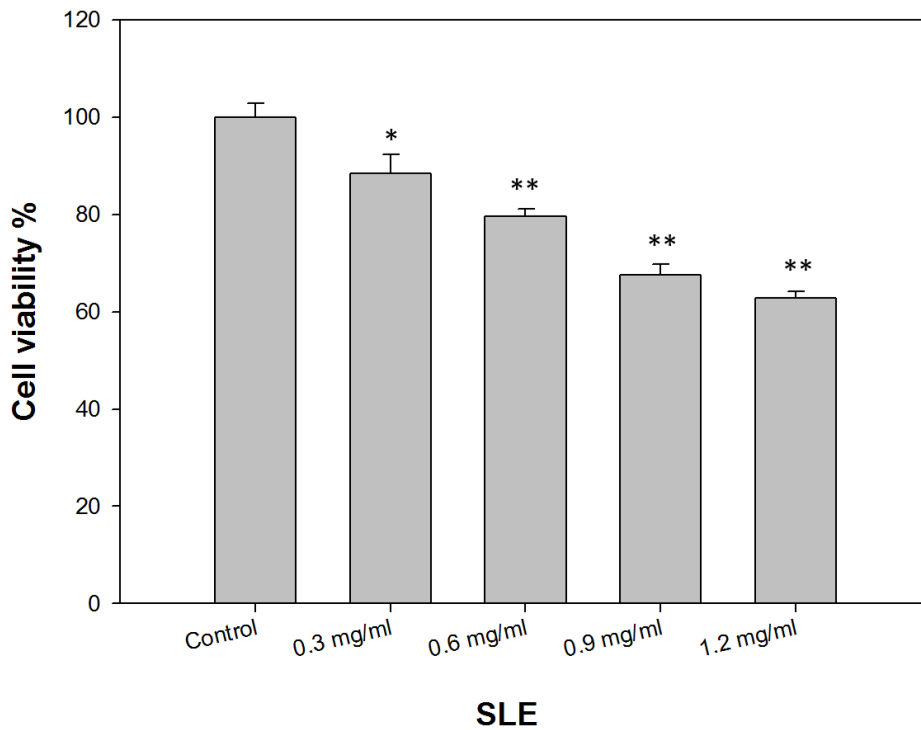
1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM, 2000, ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321, 624-628.
2. Howlader N, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, et al, 2013, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. In National Cancer Institute: Bethesda, MD.
3. 中華民國統計資訊網: 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>
4. 行政院衛生署  
<http://www.bhp.doh.gov.tw/BHPNet/Web/HealthTopic/Topic.aspx?id=200712250033>
5. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA, 1997, Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 71, 800-809.
6. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H, 2002, Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*, 3, 565-574.
7. Olsson M, Tamm C, Heidari N, Orrenius S, et al, 2008, DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ*, 15, 555-566.
8. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, et al, 1998, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXN mice. *PNAS*, 95, 8806-8811.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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 G<sub>2</sub>/M phase, inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 266, 385-398.
15. 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.
  16. 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  $\gamma$  Activation. *eCAM*, Article ID 935675, 12 pages.
  17. 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  $\times$  ananassa* cv. Jonsok). *Phytochem Anal*, 20, 353-364
  18. 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.
  19. Lin YY, Ng KJ, Yang S, 1993, Characterization of flavonoids by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*, 629, 389-393.
  20. Ming DS, Lopez A, Hillhouse BJ, French CJ, et al, 2002, Bioactive constituents from *Iryanthera megistophylla*. *J Nat Prod*, 65, 1412-1416.
  21. Qa'dana F, Verspohl EJ, Nahrstedt A, Petereit F, et al, 2009, Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*, 124, 224-227.
  22. 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.
  23. 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 G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis. *Mol Carcinogen*, 52, 134-143.
  24. 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.
  25. Chan MM, Lu X, Merchant FM, et al., 2005, Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis*, 26, 1343-1353.
  26. Ravoori S, Vadhanam MV, Sahoo S, Srinivasan C, et al, 2007, Mammary tumor induction in ACI rats exposed to low levels of 17 $\beta$ -estradiol. *Inter J Oncol*, 31, 113-120.
  27. Jeyabalan J, Aqil F, Munagala R, Annamalai L, et al, 2013, Chemopreventive and therapeutic activity of dietary blueberry against estrogen-mediated breast cancer. *J Agric Food Chem*, Just Accepted Manuscript, Publication Date (Web): 18 Nov 2013.

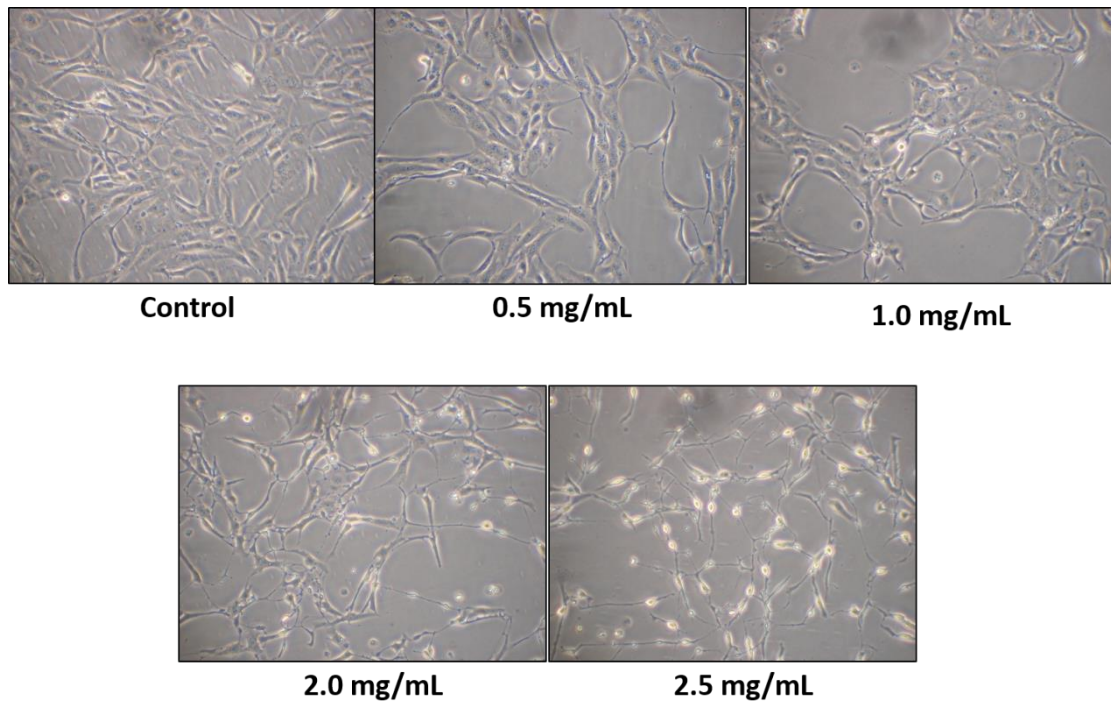
**Fig 1. SLE cause MDA-MB231 cell cytotoxicity.**



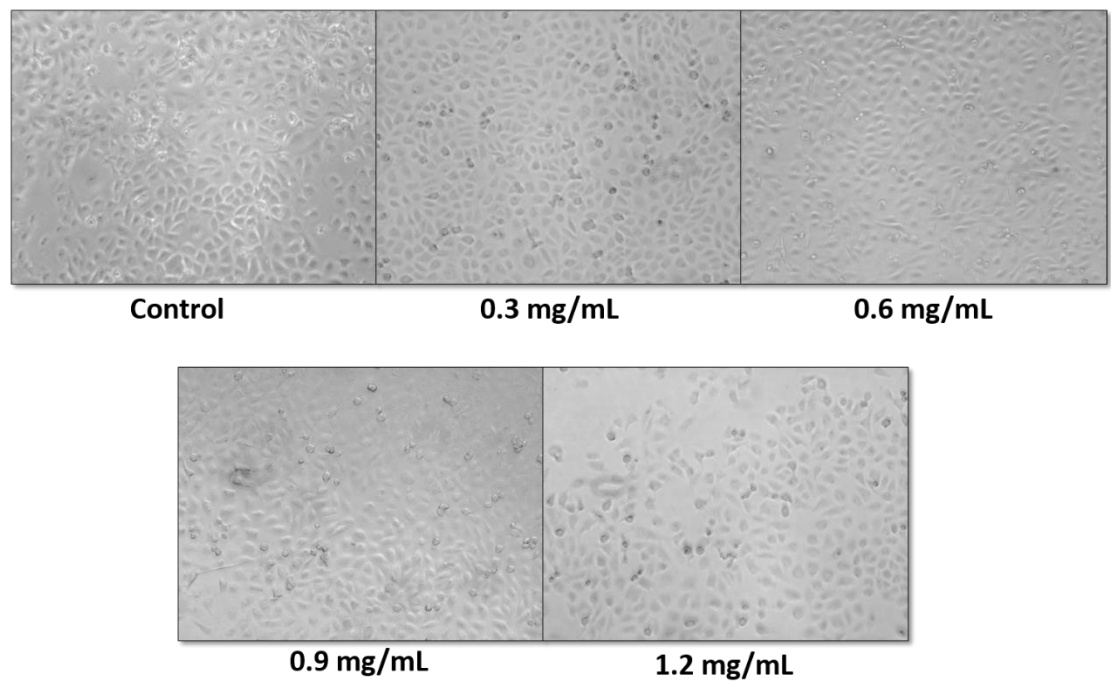
**Fig 2. SLE cause MCF-7 cell cytotoxicity.**



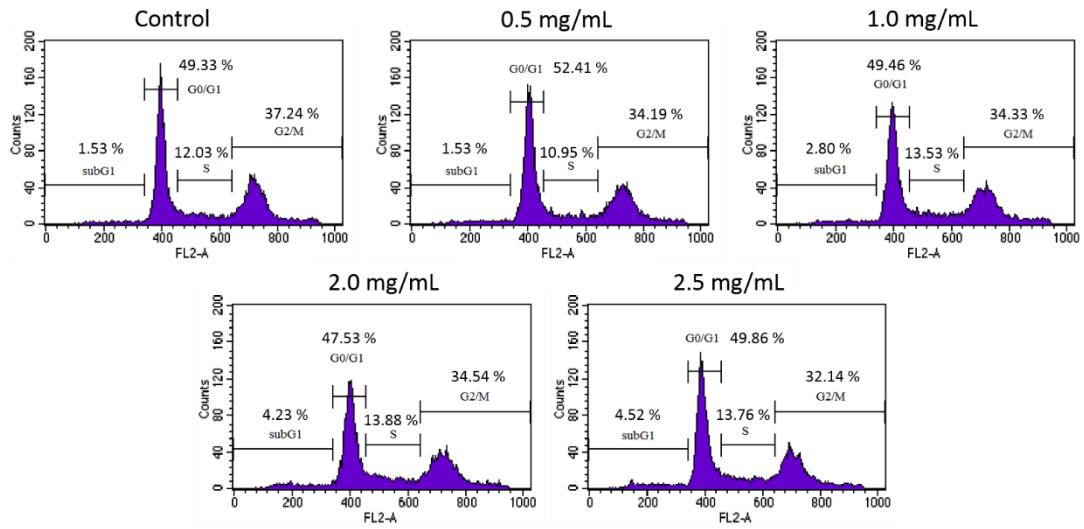
**Fig 3. SLE alter the cell morphology in MDA-MB231 cell.**



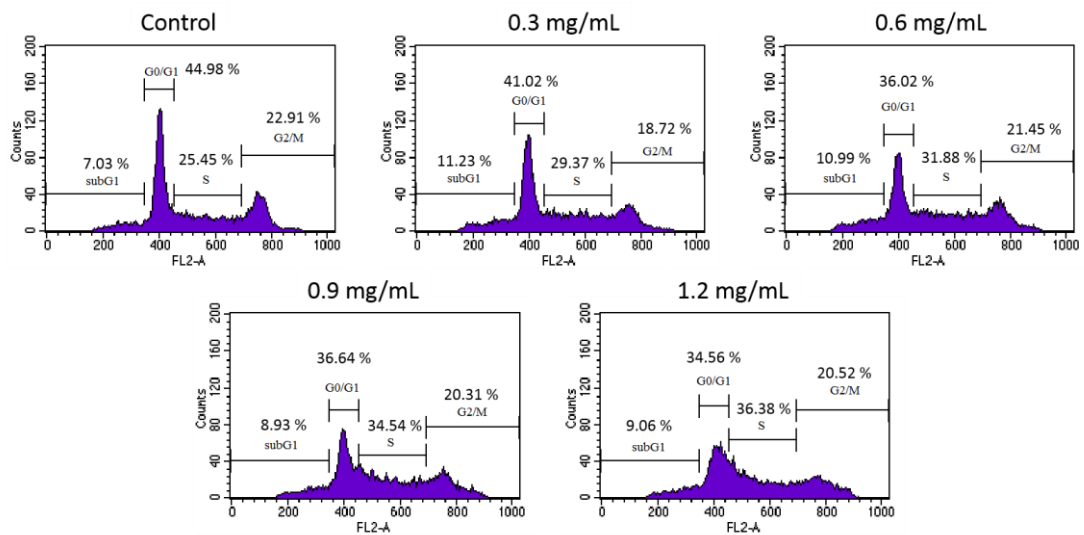
**Fig 4. SLE alter the cell morphology in MCF-7 cell.**



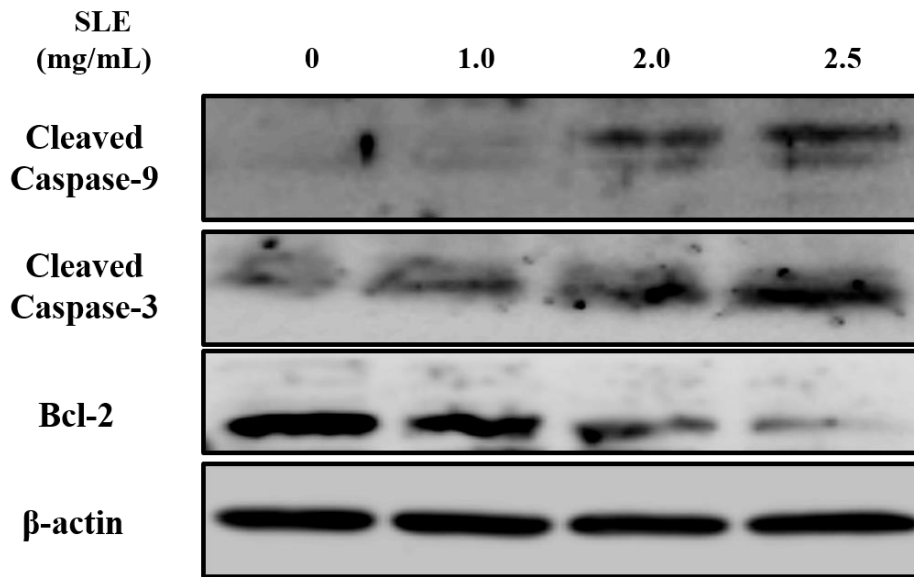
**Fig 5. SLE cause the cell death partially in apoptosis.**



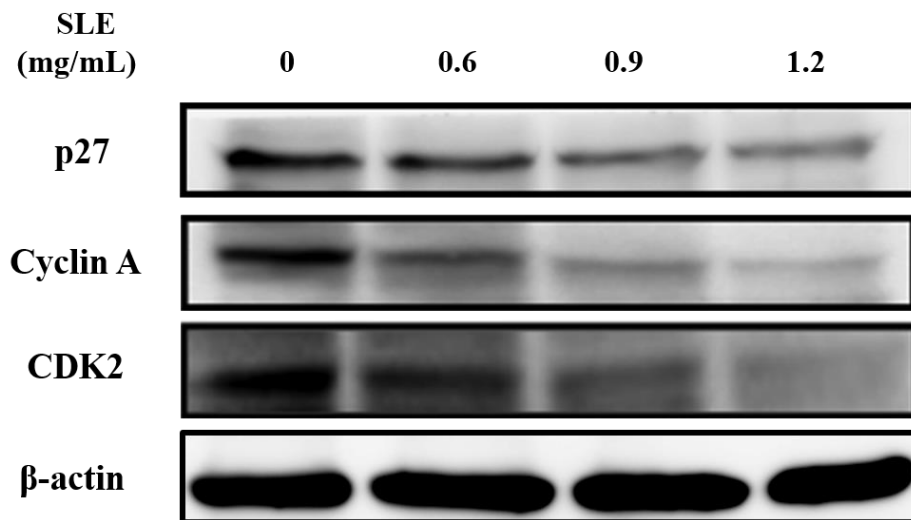
**Fig 6. SLE abolish the S phase of cell cycle in MCF-7 cell.**



**Fig 7. SLE alter the apoptotic proteins in MDA-MB231 cell.**



**Fig 8. SLE regulates the proteins expressed in S phase of cell cycle in MCF-7 cell.**





**Table. The micronucleus examination of SLE**

<b>24hr</b>	<b>NC</b>	<b>PC</b>	<b>0.3mg</b>	<b>1.25mg</b>	<b>5mg</b>
<b>1</b>	0	7	0	1	0
<b>2</b>	1	7	0	0	2
<b>3</b>	0	8	1	0	0
<b>4</b>	0	9	0	1	0
<b>5</b>	0	8	0	1	1
<b>Mean</b>	0.2	7.8	0.2	0.6	0.6
<b>P value</b>		0	1	0.24	0.39

NC, negative control; PC, positive control

<b>48hr</b>	<b>NC</b>	<b>PC</b>	<b>0.3mg</b>	<b>1.25mg</b>	<b>5mg</b>
<b>1</b>	0	17	1	0	0
<b>2</b>	1	19	1	0	2
<b>3</b>	0	9	1	0	0
<b>4</b>	0	15	0	1	0
<b>5</b>	0	11	0	1	1
<b>Mean</b>	0.2	14.2	0.6	0.4	0.6
<b>P value</b>		0	0.24	0.54	0.40

NC, negative control; PC, positive control

## 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）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：

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 100 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），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

天然物抗癌功效的研究很多，可是將天然物的廢棄物著重於抗癌的研究較少，而在台灣，則尚未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產業推廣。

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。

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/30

科技部補助計畫	計畫名稱: 探究無毒栽種草莓葉水草物及其功能性成分抗乳癌功效及機轉之探討:在抗氧化、抗發炎、凋謝死亡、自噬死亡及有絲分裂崩解
	計畫主持人: 李慧禎
	計畫編號: 103-2313-B-040-005- 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李慧禎		計畫編號：103-2313-B-040-005-					
計畫名稱：探究無毒栽種草莓葉水萃物及其功能性成分抗乳癌功效及機轉之探討：在抗氧化、抗發炎、凋謝死亡、自噬死亡及有絲分裂崩解							
成果項目			量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）
			實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比		
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	1	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	1	1	50%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
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		因原料來源為無毒草莓之農公司所提供，所以本研究目前正在與合作廠商洽談成果技術轉移事項。					

字敘述填列。)			
	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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100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）

天然物抗癌功效的研究很多，可是將天然物的廢棄物著重於抗癌的研究較少，而在台灣，則尚未針對本土栽植的草莓葉進行相關研究，因此本研究可對这部分提供研究證據以利日後產業推廣。

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。