

第一章 前言

第一節 研究緣起

自民國88年到93年，衛生署統計資料指出，在乳癌、子宮頸癌、卵巢癌這三大婦女癌症中，乳癌的死亡率最高。造成乳癌的盛行率上升的原因，與高脂肪飲食有關，其中又以n-6 脂肪酸與癌症的形成最密切。在眾多探討造成乳癌的相關因子中，peroxisome proliferation activated receptor α (PPAR α) 的角色也被研究過。PPAR α 是個轉錄因子，經配體 (ligand) 活化後可以調節脂質代謝、細胞分化、細胞生長相關基因表現，且PPAR α 的活化也會導致癌症的形成。據本實驗室的先前研究得知，在乳癌患者之乳房癌化組織PPAR α 蛋白表現量明顯高於周邊非癌化組織，且分析脂肪酸組成時也發現癌化組織的花生四烯酸含量明顯高於周邊非癌化組織，而花生四烯酸為活化PPAR α 的天然配體。因此，根據這兩項結果，花生四烯酸與PPAR α 是否會影響乳癌細胞的生長，乃是本實驗想要探討的目標。

第二節 實驗目的

本篇研究是要探討 n-6 脂肪酸中的花生四烯酸對於不同性質的人類乳癌細胞株的影響。實驗將從三方面去探討：(一) 花生四烯酸對於乳癌細胞株 MDA-MB-231 [ER α (-) / HER2/*neu* (-)]、MCF-7 [

ER α (+) / HER2/*neu* (+)]、BT-474 [ER α (+) / HER2/*neu* (+ + +)]生長情形的影響。(二) 利用流式細胞儀分析經由花生四烯酸處理後，細胞週期的變化情形。(三) 利用西方點墨法分析經花生四烯酸活化後，PPAR α 蛋白質與其它細胞週期相關調節蛋白表現情形，以找出與乳癌細胞生長的相關機制。

第二章 文獻探討

第一節 乳癌的分類

乳癌是由乳房腺泡細胞，或是乳腺管細胞，經不正常的分裂、繁殖所形成的惡性腫瘤[1]。大多數的乳癌都是從乳腺葉或輸乳管癌化開始發展成型的，因此乳癌的分類可分為管道癌（ductal carcinoma）及小葉癌（lobular carcinoma）兩大類。

（1）管道癌（ductal carcinoma）：分為管道原位癌（ductal carcinoma in situ, DCIS）與浸潤性管道癌（infiltrating ductal carcinoma, IDC）。DCIS 的癌細胞尚未穿透管道壁而擴散到乳房組織，而 IDC 可以穿透管道壁而擴散到乳房脂肪組織，為最常見的乳癌，大約 70~75% 乳癌是浸潤性管道癌[1]。

（2）小葉癌（lobular carcinoma）：分為小葉原位癌（lobular carcinoma in situ, LCIS）與浸潤性小葉癌（infiltrating lobular carcinoma, ILC）。LCIS 僅限於乳腺體，不會穿透小葉壁。ILC 則是可以穿透小葉壁而擴散到乳房組織，為第二常見的乳癌，約佔乳癌的 5~10% [1]。

（3）其他乳癌：有髓質癌（medullary carcinoma），佔所有乳癌 5% ；黏液素癌（mucinous carcinoma），佔所有乳癌的 2~3% ；小管癌（tubular carcinoma），佔所有乳癌的 2% ；帕金得病（Paget's

disease of the nipple)，佔所有乳癌的 1% [1]。

第二節 導致乳癌危險因子

有很多的危險因子跟乳癌的發展具有相關性，乳癌的發生不是指由單一個因子所造成。依研究顯示，乳癌危險因子歸納以下：

- (一) 年齡：女性在 25 歲之前的到乳癌的機率較少，25 歲之後則會提高。女性年紀超過 50 歲得到乳癌的機率將會大增。[2]
- (二) 經期：初經在 12 歲以前及 55 歲以後停經 [3]。
- (三) 哺乳史：有哺乳的婦女罹病的機率較低[3]。
- (四) 生育：從未生育與較晚生育的婦女。生產第一胎的年齡愈晚者。與乳癌最有關係的是生第一胎的年齡，20 歲以前生足月頭胎者險向最低；30 至 35 歲則增為二倍，35 歲以後才生產者則超出 2.5 倍以上[4]。
- (五) 遺傳：若是有下列情形，則得到乳癌的機率提高，包括了一等親屬等親屬有 2 位以上在 60 歲前得乳癌者、一位一等親在更年期前得兩側乳癌者、母親或外祖母在 60 歲前得乳癌、一位一等親在 40 歲前得乳癌者[1]。
- (六) 基因：在乳癌敏感性基因的研究上，已經確認出有一些基因的突變將會使得乳癌的罹患率提高，其中最具影響力的基因有

BRCA1 (*breast cancer 1*)、*BRCA2* (*breast cancer 2*)、*p53*、*Ataxia-telangiectasia mutated* (*ATM*) 或 *PTEN*，分述如下：

(I) *BRCA1* (*breast cancer 1*) 與 *BRCA2* (*breast cancer 2*) 基因：

在 80~90%的遺傳性乳癌中，*BRCA1* 與 *BRCA2* 基因的突變是重要的因素[5]。*BRCA1* 基因位於染色體 17q21，可譯出 1863 個胺基酸，*BRCA2* 基因則位於 13q12-q13，可譯出 3841 個胺基酸。*BRCA1* 與 *BRCA2* 之間在序列上沒有太大的相似性，但是突變後，都容易產生乳癌及卵巢癌[6]。此兩種基因都是腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene)，其所轉譯出來的蛋白質可與其他蛋白質互相作用，共同執行修補 DNA 斷裂的工作[7, 8, 9]。若其基因突變後，特別是會使轉譯出的蛋白功能缺失或受到抑制[6]。DNA 斷裂時，*ataxia-telangiectasia mutated*(*ATM*) 和 *cell-cycle-checkpoint kinase 2* (*CHEK2*) 兩種激酶會活化並磷酸化 *BRCA1* 蛋白，此時 *BRCA1* 會移動到 DNA 斷裂處，*BRCA2* 也會與 *RAD51* 蛋白一起來 DNA 斷裂處，進行 *homologous recombination*[7, 8, 9]。所以若是 *BRCA1* 與 *BRCA2* 發生突變現象，體內 DNA 修復的能力會受到影響，增加癌化的機會。

(II) *p53* 基因：

p53 是個腫瘤抑制基因，可以調控細胞週期，抑制不正常細胞的增生，避免癌化的產生。當細胞受到損害時，*p53* 會活化並誘發 *p21* 的表現，活化的 *p21* 會抑制 cyclin-dependent kinase，使得 retinoblastoma (Rb)無法被磷酸化，E2F 無法釋出，進而阻止了細胞進入 S 期，此時細胞停在 G0/G1 等待修復 [10]。此外，*p53* 也會促使 Bax 表現增加，使得細胞走向凋亡的路徑 [5, 10]。若 *p53* 發生突變，體內的不正常的細胞將會失去控制而不斷增生，最後形成腫瘤。多達 50%的癌症，*p53* 都是突變的，由此可知此基因對於細胞調控是扮演極重要的角色 [10]。在 20%的乳癌患者身上，可發現 *p53* 是突變的。在 high-grade ductal carcinoma *in situ* (DCIS) 的患者身上，*p53* 突變的機率較高。在 *BRCA1* 與 *BRCA2* 突變的患者，*p53* 突變的機率也比較高 [11,12]。而令人驚訝的是在 medullary breast carcinomas 病患身上，*p53* 卻是 100%的突變[13]。

(III) *ATM* 基因：

*ATM*在結構上類似磷酸肌醇激酶家族，但功能上是屬於蛋白質激酶，負責將*p53*、*BRCA1*，*Rad17* [14]等蛋白質的磷酸化，以進行修復DNA的工作。故突變的 *ATM* 將會造成DNA修復機制受影響，而使得癌症發生的機率提高。研究顯示missense

mutations (T7271G) 的 *ATM*，不僅失去原本的功能，還會抑制具有正常功能的 *ATM* [16]。*ATM* 突變的族群中在 50 歲前會有 11% 的機率罹患乳癌，在 70 歲前會有 30% 的機率罹患乳癌 [15]。

(III) *PTEN* 基因：

PTEN 所轉譯出的蛋白是一種 lipid phosphatase，可將 phosphoinositides 去磷酸化 [16]。因此它可以抑制 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 的訊息傳遞路徑，進而阻止了 protein kinase B (PKB) 的活化訊息，使得癌細胞不會繼續生長 [17]。*PTEN* 基因的缺失常見於偶發性乳癌 (sporadic breast carcinoma) 病患，特別是在晚期的時候 [18]。在 immunohistochemical analysis 發現，primary breast cancers 患者的 *PTEN* 蛋白有表現減少及功能喪失的情形 [19]。

(七) 癌症病史：曾得過乳癌者，則另一側再患乳癌比正常人高達二至十四倍 [2]。

(八) 荷爾蒙取代療法 (Hormone replacement therapy, HRT)：對於停經的婦女，體內的雌激素及黃體激素的下降，常會使得婦女在生理上產生不舒服的現象，甚至會使得某些疾病的發生率提高，例如：心血管疾病、骨質疏鬆症等等。此時，若停經婦女有採取荷爾蒙取代療法，定時服用雌激素或黃體激素的話，可

以幫助紓解這些更年期的症狀，提升生活品質，但是已有研究顯示，HRT 會使得乳癌的罹患率提高 [3, 20]

(九) 輻射線及其他環境汙染物：若女性在 40 歲前暴露於輻射線者，得乳癌的機率與暴露的劑量及時間的長短成正比，特別是在青春期的時候 [1]。

(十) 環境汙染物：環境中的汙染物也是導致癌症的因素，包含了多環芳香族碳氫化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)、芳香胺 [2, 21]。PAHs 是親脂性物質，若進入了人體，將會貯存在脂肪組織中，其中包含乳房脂肪組織 [22]。

(十一) 飲食：流行病學研究顯示，飲食中的總脂肪，飽和脂肪，肉類攝取過多，得到乳癌的機率就越大。飲食中 n-6 的脂肪酸的攝取量過多，將會促進乳癌的發展 [3]。

第三節 飲食脂質與乳癌的相關性

依據流行病學的研究顯示，飲食中攝取過多的脂肪會促進乳癌的發展 [23, 24]。以一篇針對日本人移民到夏威夷的研究為例，其第二代及第三代女性得到乳癌高於第一代，究其原因發現第一代的女性由於仍是接受傳統飲食，所攝取油脂的比例僅佔一日總熱量的 20%，鮮少得到乳癌，但第一代所生下的第二代女性，所接受的飲食是西方式

的高脂飲食，油脂的攝取量佔一日總熱量的 35%，得到乳癌的機率明顯較第一代高 [23]。在青春期時攝取過多的脂肪也會使得罹患乳癌的機率增加 [24]。高脂飲食不只對乳癌有促進效果，對於前列腺癌及大腸直腸癌也有促進的效果 [23]。

在探討飲食脂質與乳癌相關的眾多機制中，可能原因有熱量攝取過高，細胞膜流動性的改變，賀爾蒙的不平衡，訊息傳遞，及脂肪酸的組成等等，雖然以上假設在鼠類實驗都有證據可證明，但是在人體上仍是具爭議的 [23]，其中，以脂肪酸對於癌症的影響最被人廣泛研究。在高脂飲食中富含了許多的 n-6 fatty acid，依照流行病學顯示，脂肪中的 n-6 fatty acid 與乳癌的罹患率有很大的關係[3]。在動物實驗中顯示，n-6 fatty acid 會促進致癌過程中的 promotion phase 進行，幫助癌細胞轉移，更增添了細胞侵入的能力 [25]。根據一項對於 12803 隻小鼠所作的實驗結果，給予富含 n-6 fatty acid 飲食的老鼠會有強烈的 tumor-enhancing effect，給予富含 saturated fatty acid 飲食的老鼠會有微弱的 tumor-enhancing effect，給予富含 n-3 fatty acid 飲食的老鼠會有輕微的保護作用，餵食老鼠 monounsaturated fat 則沒有任何效應產生 [25]。

然而也有證據顯示脂肪與致癌並沒有相關性。根據某些 prospective 及 case-control clinical studies [26, 27, 28]，飲食中的脂肪

與乳癌的發生並沒有呈現正相關性，一篇針對美國 89000 個護士的研究顯示，飲食中的脂肪與乳癌的罹患率並無相關 [29]。直到目前為止，飲食中的脂肪與乳癌的關係仍是爭議的，因為尚未找出脂肪可以直接導致癌細胞生長的機制，因此仍不能直接下斷言。

第四節 脂肪酸與癌症

人體內的脂肪酸依飽和程度不同可區分為多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)、單元不飽和脂肪酸 (mono-unsaturated fatty acid, MUFA) 與飽和脂肪酸 (saturated fatty acid, SFA)。眾多脂肪酸與癌症相關的研究中，大多數的研究都指出多元不飽和脂肪酸會促使癌細胞的生長，特別是 n-6 脂肪酸，例如：linoleic acid (n-6, 18:2)、arachidonic acid (n-6, 20:4)，n-6 脂肪酸對於乳癌、前列腺癌、小腸癌都有促進癌細胞生長的情形 [30, 31, 32]。餵以老鼠高脂肪飲食，其中 n-6 脂肪酸比例佔總熱量的 43%，血中的 estradiol 濃度升高[33, 34]，可能因此而活化了 estrogen receptor 而使得細胞增生。相反的，n-3 脂肪酸的 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5)、docosahexaenoic acid (DHA, 22:6)、 α -linolenic acid (α -LA, 18:3) 則是可以抑制癌細胞的生長，在大腸直腸癌、乳癌、前列腺癌都有抑制的效果[35, 36, 37]，不過也有些動物實驗也指

出 α -linolenic acid 對於前列腺癌細胞的生長並沒有什麼影響 [38]。在單元不飽和脂肪酸方面，有研究指出 oleic acid (n-9, 18:1) 可以促進乳癌細胞的生長及阻止細胞凋亡 [39]，但也有人研究顯示單不飽和脂肪酸對於乳癌細胞是沒有影響的[38]。至於飽和脂肪酸對癌症的影響則不明顯，其致癌能力小於 n-6 脂肪酸[38]。

在人體實驗方面，許多研究歷經多年的追蹤觀察，的確指出了 n-6 脂肪酸會促進癌症的發展，不論是乳癌、大腸直腸癌或是前列腺癌[23, 40]。但是在 n-3 脂肪酸的人體實驗上則是眾說紛紜，有些研究指出長期攝取富含 EPA (n-3, 20:5) 及 DHA (n-3, 22:6) 的飲食，可以減少癌症的發生，不過也有研究提出反證，針對歐洲地區二十四個國家所做的研究指出，長期吃魚的族群得到癌症的機會並沒有減少的現象，意即 n-3 脂肪酸對於癌細胞的生長並沒有影響 [41]。因此，脂肪酸是否會促使癌症的發生，至今仍是存在著正反兩面的意見。

至於 n-6 fatty acid 為何會促進乳癌細胞的增生[30, 31]，其可能透過調節基因的表現使得細胞增生，也有可能會啟動某些生長因子的路徑，賀爾蒙的影響，或因為出現脂質過氧化的現象，產生過多的脂質過氧化物，進而傷害 DNA 或蛋白質，而導致乳癌細胞增生 [31]。在這些影響因子中，透過活化 PPAR (peroxisome proliferation

activated receptor) 即為其中一個極具有影響力的因子[23]，研究顯示多元不飽和脂肪酸中的 linoleic acid、arachidonic acid 可以活化 PPAR，進而促進其下游基因的表現 [23, 42]，對於脂質代謝、細胞分化及癌症的形成有密切的關係[43]。

第五節 過氧化酶體增生活化接受器 (peroxisome proliferation activated receptor, PPAR) 的特性

PPAR，於 1990 年由 Issemann 與 Green 所發現 [44]。PPAR 屬於固醇類荷爾蒙核受器家族 (steroid hormone nuclear receptor)，是個可受配體 (ligand) 所活化的轉錄因子，PPAR 活化後可以啟動其下游基因的轉錄[45]。PPAR 能被過氧化體增生劑 (peroxisome proliferators, PP) 這一類物質所活化，這類物質的結構都大不相同，但是卻都能夠使得老鼠肝細胞的過氧化體產生增生的現象，也能使鼠類的肝臟腫大，甚至產生肝腫瘤的現象，此現象只限於齧齒類動物，並不見於人類及其他動物 [46]。目前已知 PP 包括有降血脂藥物，如：fibrates；糖尿病用藥，如：thiazolidinediones；工業可塑劑、除草劑等等。此外，除了外生性 PP，體內也有內生性的 PP 存在，例如多元不飽和脂肪酸及其代謝物，或是 eicosanoids 物質 (PGJ₂, LTB₄) 都可以活化 PPAR [45,47,48]。

(一) PPAR 的種類與分佈

PPAR有三種isoforms，分別為 α 、 β 及 γ ：PPAR α 存在於肝臟、腎臟，脂肪組織，心臟及骨骼肌亦有分佈，主要調控與脂質代謝相關的基因表現 [45]；PPAR β 廣泛分佈於大部分組織中，以腸道、腎臟及心臟表現量較多，到目前為止，生理功能仍不清楚。一般認為PPAR β 跟脂質代謝、胚胎發育、皮膚組織癒合、神經分化等等有相關性[49]；PPAR γ 分爲 $\gamma 1$ 及 $\gamma 2$ ，表現於脂肪組織及大腸，主要負責脂肪細胞分化調控。三種isoforms各有其ligands，PPAR α 的 ligand有長鏈不飽和脂肪酸，如 DHA、EPA、linoleic acid、linolenic acid 和 arachidonic acid；支鏈、共軛或氧化的脂肪酸，如 phytanic acid和conjugated linoleic acid (CLA) 等；eicosanoids類物質，如 8(S)-HETE和LTB₄；降血脂藥物，如 Wy 14,643 和 fibrates 藥物 [47]；PPAR β 的 ligand目前僅知 GW501516 爲專一性的配體[47]；PPAR γ . ligands爲長鏈不飽和脂肪酸，如 DHA、EPA、linoleic acid、linolenic acid 和 arachidonic acid；linoleic acid代謝產物，如 9-hydroxy-octadecadienoic acid (9-HODE) 和 13-HODE；eicosanoids類物質，如 15d-PGJ₂；糖尿病用藥 (thiazolidinediones, TZD)，如rosiglitazone (BRL 49653) 等[47]。

(二) PPAR 之結構

PPAR 是一種固醇類荷爾蒙核受器，所以與固醇類荷蒙核受器家

族成員的核酸序列相類似，在蛋白質結構上，也與固醇類荷蒙核受器結構類似。PPAR 具有六個功能性區域，分別為： A/B、C、D、 E 和 F。A/B domain 具有 ligand- independent transactivation 之功能，又稱 activation function-1 (AF-1) domain；此段可受其他的激酶所磷酸化而產生活性[48]；C domain 是 DNA-binding domain (DBD)，具有兩種形式 zinc fingers，可藉此與目標序列 PPAR response element (PPRE) 進行專一性的結合；D domain 是 hinge domain，連接 DNA-binding domain 與 ligand-binding domain；E domain 是 ligand-binding domain (LBD)，又稱為 AF-2 domain，具有 ligand-dependent transactivation 之功能，可與 ligand 結合，改變 PPAR 構形而活化 PPAR；F domain 的功能未明，可能與其他 coactivators 或 corepressors 作用相關[45]。

(三) PPAR 的活化

PPAR活化的機制分為兩種，一種是ligand-dependent mechanism，此機制是需要ligand結合到PPAR的ligand-binding domain而活化，活化的PPAR會與RXR (retinoid X receptor) 結合形成heterodimer形式，共同結合與DNA上的一段目標序列上面，這段序列稱為PPRE，核苷酸序列為 TGACCT N- TGTCCT，屬於 DR-1 序列；另一種是 ligand-independent mechanism，此法不需靠ligand結合，是由其他的激酶將A/B domain第 12 個及第 21 個serine磷酸化，如此也可以活化

PPAR[45,47]。

第六節 PPAR α 與癌症的相關性

PPAR α 與癌症的關係多著重於鼠類肝癌的研究上，因為早期發現若長期給予實驗室的老鼠 PP 會導致過氧化酶體的增生、肝腫大及肝癌的發生，後來發現到 PP 會透過活化 PPAR α 而導致肝癌 [43]，之所以肯定 PPAR α 會導致肝癌的最有利的證據就在於 PPAR α -null mice 實驗，研究發現若同時在 wild-type mice 與 PPAR α -null mice 身上投予一種 PPAR α 的活化劑，WY-14,643，經過一年的時間可觀察到 wild-type mice 全部都有肝腫瘤的產生，而 PPAR α -null mice 卻沒有肝腫瘤的產生，體內其他組織都沒有癌化的情況[50]，因此可證明 PPAR α 的活化與鼠類肝癌的發生極為密切的。有趣的是，PP 只會在鼠類才會產生肝癌，在人類及其他動物卻不會發生[51]。

為何 PPAR α 活化後會造成肝癌呢？早期的研究著重於 PPAR α 其中一個下游基因 acyl-CoA oxidase (ACO) 啓動的影響[52,53]。ACO 是過氧化酶體中 β -oxidation 的關鍵酵素，ACO 會將反應的電子轉移給氧氣，形成過氧化氫，造成氧化壓力。鼠類接觸 PP 後，ACO 的表現會增加近二十倍左右，誘發太多的結果而產生了過多的過氧化氫，體內的氧化壓力過大，而使得 DNA 受損[52,53]。雖然 catalase 的表

現亦有增加近三倍，但是仍不足以消除過多的氧化壓力。但也有證據指出並非是 ACO 過度表現，產生過大的氧化壓力而導致肝癌的產生 [54]。證據顯示在 ACO-null mice 身上同樣給予 WY-14,643，經過一年的時間，ACO-null mice 仍是會有肝腫瘤的現象產生，因此可證明肝癌並非直接由於 ACO 過度表現所引起的 [54]。造成 ACO-null mice 產生肝腫瘤的原因，在於 ACO-null mice 的 acyl-CoA 由於缺乏 ACO 而無法繼續代謝下去，acyl-CoA 濃度越來越高，而 acyl-CoA 也是 PPAR α ligand，所以蓄積的 acyl-CoA 可以持續不斷地活化 PPAR α ，而造成肝癌[54]。由 ACO-null mice 的實驗中可知道，肝癌並非是 ACO 過度表現所引起的，而且更明瞭了一個重點：PPAR α 的活化才是導致鼠類肝癌發生的關鍵因素。

除了肝癌的研究之外，也有文獻指出 PPAR α 活化也與乳癌有相關性。實驗發現，餵以老鼠 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine，一種可活化 PPAR α 的 PP，可以誘發老鼠產生乳癌，且癌化組織 PPAR α 的表現明顯升高 [25]。在乳癌細胞實驗中亦可見到相同的情形，若於 MDA-MB-231 與 MCF-7 中投予 10 μ M 的 WY-14,643，以 Real-Time RT-PCR 分析 PPAR α 的表現可發現到 PPAR α 的 mRNA 表現量增加了，而且細胞株亦有增生的情況[55]。另一方面，根據本實驗室先前的研究發現，利用西方墨點法分析乳癌病

人乳房的癌化組織及周邊未癌化組織的 PPAR α 表現量，也發現了 PPAR α 蛋白表現量在癌化組織明顯高於周邊非癌化組織 [53]。因此，PPAR α 的活化與乳癌的發生及細胞的增生可能是有相關性的。

第七節 PPAR α 如何透過訊息傳遞而影響癌症的發展

活化的 PPAR α 之所以會導致癌症發生的機制主要為兩個方向，一是 PPAR α 會對細胞週期產生影響，另一個則是 PPAR α 具有抗細胞凋亡的能力 [54,55,57]。

根據先前學者在鼠類肝癌所做的研究發現，PPAR α 的活化會導致肝細胞產生增生現象，最後形成肝癌[50,58,59]。PPAR α 活化後可以調節下游基因的表現，進而使得增生的訊號加強，細胞週期加快，而不斷增生的結果就會導致癌症的形成。研究發現，給予鼠類 PP 後，可以增加 DNA 的生合成，也可以看到細胞週期調節蛋白的表現與 immediate early gene (IEG) 表現增加，例如 CDK1、CDK4、*c-myc*、*c-Ha-ras*、*fos*、*jun*[50,54]，這些蛋白的表現增加可以縮短細胞處於 G1 期的時間，快速進入 S 期[54,55]，縮短細胞的週期。

雖然有證據顯示，PPAR α 的活化與乳癌細胞的增生有相關性 [55]，但是探討其機制的相關研究並不多。有研究指出，PPAR α 經花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 活化後，可以誘發人類乳癌細胞株

T47D 中的 Cyclin D1 的 mRNA 表現量增加[51]，因為 Cyclin D1 是 PPAR α 的 target 基因[60]，Cyclin D1 表現增加可幫助細胞快速通過 G1 期，加快細胞的週期。細胞若改投以亞麻油酸（linoleic acid, LA；n-6, 18:2），發現處於 S 期的細胞比例增加了 50%左右，意即亞麻油酸可能會藉由活化 PPAR α 而促使細胞快速進入 S 期 [31]。除了針對細胞週期的探討外，也有研究指出 PPAR α 可能藉由活化 mitogen-activated protein kinase（MAPK）路徑使得乳癌細胞增生 [61]。在 MCF-7 細胞中，投予 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine（PhIP）後，可以活化 MAPK 訊息傳遞路徑、estrogen receptor- α （ER- α ）、progesterone receptor（PR-A, PR-B）和 c-myc，使細胞產生增生[61, 62]，因此認為在 MAPK 路徑中，p38 與 PPAR α 之間可能存在著 cross-talk [63,64,65]。因為 PP 的給予會活化 p38，p38 再將 PPAR α A/B domain 磷酸化，PPAR α A/B domain 磷酸化所帶來的影響仍未清楚，磷酸化的結果可能會使 PPAR α 與細胞內其他訊息傳遞分子產生交互作用而促進細胞的生長[63]，也有可能磷酸化的 PPAR α 轉錄的能力強化[66]。若是 p38 經過 TNF- α 、IL-1 等 cytokine 活化後，磷酸化的 p38 也會將 PPAR α 的 A/B domain 磷酸化，磷酸化的 PPAR α 是具有活性，一樣可對細胞產生增生的作用 [63]。

第八節 AA 在細胞生長所扮演的角色與功能

花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 是一種必需脂肪酸，人體無法自行合成。存在人體的花生四烯酸主要接在磷脂質的 2 號碳上，在細胞膜上的磷脂質會被細胞質的 cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) 所作用，將 AA 從磷脂質 2 號碳上分解，釋放到細胞質內[67]。AA 會被 cyclooxygenase (COX) 及 lipoxygenase (LOX) 這兩種酵素所作用而產生不同的類二十碳酸 (eicosanoids)，如前列腺素 (prostaglandin)、白烯三素(leukotriene)、前列凝素(thromboxane)、這些類二十碳酸對於免疫反應、血液凝集、訊息傳遞等具有影響。AA 經過 COX、peroxidase、PGI synthase 代謝後產生 PGE₂，據研究顯示 PGE₂ 會促使大腸癌細胞產生增生的現象[68]。PGE₂ 會抑制巨噬細胞分泌 TNF α 、IL-2 及 NO，具有降低巨噬細胞毒殺腫瘤的能力[69]。PGE₂ 可與位於細胞膜上的 Prostaglandin E Receptor (EP receptors) 結合，而將訊號傳遞下去。EP receptors 分為四種，分別為 EP1、EP2、EP3、EP4。EP1 的活化可使鈣離子濃度增加，間接再使得 MAPK pathway 活化。若是活化了 EP2 及 EP4，可透過 Gs-protein 活化 adenylyl cyclase，使胞內 cAMP 濃度增加；活化的 EP3 可透過 Gi-protein 抑制 adenylyl cyclase，降低胞內 cAMP 濃度[70]。PGE₂ 亦可活化 EGFR，使得 PI3K/Akt 活化，造成細胞的增生[68]。

第九節 AA 在腫瘤生長所扮演的角色

關於AA的文獻探討包括了許多方面，在腫瘤的貼附性方面的探討中，有研究指出AA可以藉由活化Protein Kinase C μ ，而增強乳癌細胞株的貼附能力[71]。在其他研究也有發現到AA可以藉由活化PPAR γ ，使得sPLA₂-IIA（secretory type IIA phospholipase A₂）表現下降，進而降低了發炎反應[72]。

第十節 花生四烯酸與 PPAR α 對乳癌的影響

依據本實驗室先前的研究發現，乳癌病患乳房的癌化組織及周邊非癌化組織中花生四烯酸在癌化組織所佔的脂肪酸比例，遠高於周邊非癌化組織，而且PPAR α 蛋白表現量在癌化組織明顯高於周邊非癌化組織，這兩項結果讓我們聯想到了AA、PPAR α 與乳癌發展可能有某種相關性存在。由於研究顯示，花生四烯酸是PPAR α 的天然配體[42,73]具有活化PPAR α 的能力，而在我們先前的發現得知癌化組織的PPAR α 表現增加，因此推測是否花生四烯酸會藉著活化PPAR α ，而造成乳癌的發展乃是值得探討的課題。

第三章 研究架構與研究設計

第一節 研究架構

本實驗將從三方面去探討：（一）首先探討花生四烯酸對於不同的乳癌細胞株 MDA-MB-231、MCF-7、BT-474 生長情形的影響。（二）分析經由花生四烯酸處理後，細胞週期的變化情形。（三）找出影響乳癌細胞生長的機制，分析經花生四烯酸活化後，PPAR α 蛋白質與其它細胞週期相關調節蛋白表現情形。

第二節 研究設計

本實驗首先要探討的是花生四烯酸是否會刺激乳癌細胞生長，並找出刺激癌細胞生長的最有效濃度。實驗設計為以不同濃度的花生四烯酸處理細胞後，在不同的時間點計數細胞的數目，並選出一個最有效刺激生長的濃度作為之後的實驗使用，並訂定一個時間範圍，以作為觀察時間的參考。為了驗證花生四烯酸對乳癌細胞的影響，我們採取了三種不同的乳癌細胞株，各自有不同的特性（表一），MDA-MB-231 為 ER α (-)、HER2/*neu* (-)的細胞株；MCF-7 為表現 ER α (+)、HER2/*neu* (+)的細胞株；BT-474 為表現 ER α (+)、HER2/*neu* (+++)的細胞株。

細胞週期的探討方面，主要想知道經花生四烯酸處理過的細胞在

是否細胞週期的分布情形為何。細胞以一個最有效刺激生長的濃度處理後，每隔一段時間便收集細胞，用流式細胞儀分析細胞週期的分佈。

第三個探討的主題為找出花生四烯酸影響癌細胞生長的機制，在此階段將以西方點墨法進行蛋白質表現的分析，試著找出是否有哪些蛋白質的表現增加或減少而影響到了細胞株的生長，主要會從下列幾方面進行探討：

1. AA 對於 PPAR α 蛋白質的表現量：由於 AA 為活化 PPAR α 的天然配體，故探討 AA 是否可以活化 PPAR α 表現。
2. AA 對於細胞週期蛋白質的表現量：主要探討負責調控細胞週期的蛋白質表現。將針對 Cylin、CDK、CDKI 進行探討。
3. AA 對於 MAPK 的影響：主要探討 ERK 2、p38 表現。由於此兩種蛋白的活化會使得細胞產生增生的訊號，所以對這兩種蛋白質的表現進行探討。
4. AA 對於細胞凋亡的影響：主要探討 Bax、Bcl-2 的表現。Bax / Bcl-2 的比例會影響到細胞凋亡，高比例 Bax / Bcl-2 會使得細胞產生凋亡，故探討 Bax / Bcl-2 的比例是否會有所影響。

本研究在實驗培養基中僅添加 1% FBS，其用意在於細胞能在足夠量的必需脂肪酸含量下，來探討添加入 AA 後所帶來的影響，才能知道所添加的 AA 會造成什麼影響。

第四章 研究材料及研究方法

第一節 研究材料

4-1-1 細胞株：

此實驗選用三種不同的人類乳癌細胞株，分別為 MDA-MB-231 cells，MCF-7 cells，BT-474 cells，如表一。

4-1-2 藥品：

Merck公司：KCl、NaCl、NaF、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4

Sigma 公司：Arachidonic acid、Bovine serum albumin (fatty acid-free)、Insulin、 β -Estradiol、Wy14,643、 N,N',N' -tetramethyl-ethylene-diamine、TEMED、DMSO、Propidium iodide、EDTA、Triton X-100、NP-40、SDS、Sodium deoxycholate、PMSF、Leupeptin、Aprotinin、2-Mercaptoethanol、Ammonium persulfate、glycerol、Sodium bicarbonate、PEG、Sodium orthovanadate、Hydroxyurea

Bio-Rad 公司：40% acrylamide/bis-acrylamide solution (37.5:1)

Amresco 公司：10X TG-SDS buffer、10X TG buffer

GIBCO 公司：Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)、Penicillin/Streptomycin、L-glutamine、0.25% Trypsin

PAA 公司：Fetal bovine serum

Fermentas Life Science 公司：PageRuler Prestained Protein Ladder

Pierce 公司：SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate。

USB 公司：Tris、Trisodium dicitrate

PerkinElmer 公司：PVDF Transfer Membrane

Cell Signaling 公司：Prestained Protein Marker, Broad Range

Fluka 公司：Methanol

Panreac 公司：Tween-20

Worthington Biochemical corporation：Ribonuclease A

4-1-3 抗體

Santa Cruz Biotechnology 公司：

anti- β -actin antibody、anti-CDK 2 antibody、anti-Cyclin E
antibody、anti-ERK 2 antibody、anti-Bax antibody、anti-Bcl-2
antibody、anti- α -tubulin antibody、anti-mouse IgG-HRP、anti-rabbit
IgG-HRP、anti-goat IgG-HRP antibody

Cayman Chemical 公司：

anti-PPAR α antibody

BD Transduction Laboratories 公司：

anti-Cdk 4 antibody、anti-Ras antibody、anti-p38 antibody

Upstate 公司：anti-Cyclin D1/2 antibody

4-1-4 儀器

流式細胞儀 (FACS Calibur™, Becton Dickinson, NJ, USA)、垂直式無菌操作台、倒立式光學螢光顯微鏡、細胞培養箱、液態氮筒、ELISA reader (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay reader)、Hofer 電源供應器、BioRad 蛋白質電泳槽、BioRad 濕式蛋白質轉漬槽、水浴槽、震盪器、-80°C 與 -20°C 冷凍冰箱、4°C 冷藏冰箱、Fuji 洗片機、Kubota 離心機、Particle counter Z1。

第二節 實驗方法

4-2-1 脂肪酸之配製

1 mM Arachidonic acid-BSA 配製方法為取 2 mM arachidonic acid 與 1 mM BSA solution 以 1 : 1 比例混合，再以 0.2 μ m filter 過濾，分裝後置 4°C 中保存。

4-2-2 細胞株培養

MDA-MB-231 細胞株培養於 5% FBS、2 mM glutamine，100 μ g/ml streptomycin 和 100 U/ml penicillin 的 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 中；MCF-7 細胞株培養於 5% FBS、2 mM glutamine，100 μ g/ml streptomycin 和 100 U/ml penicillin、0.01

mg/ml insulin 的 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)中；
BT-474 細胞株培養於 5% FBS、4 mM glutamine，100 µg/ml streptomycin 和 100 U/ml penicillin、0.01 mg/ml insulin 的 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)中。以上三種細胞以 5% FBS 作繼代培養，實驗中的細胞則改培養於 1% FBS IMDM 中，MCF-7 與 BT-474 細胞於實驗過程中添加 10 nM β -Estradiol。細胞株放置於 37 °C，5% CO₂，溼度 95 %的培養箱中培養。

4-2-3 細胞存活率之分析

培養中的細胞經過胰蛋白酶的作用一分半鐘後，加入等量含 2.5% FBS的IMDM以中止胰蛋白酶的作用，取出細胞至 15mL離心管，以 1000rpm離心 5 分鐘，移除上清液後拍散細胞，再加入適量的培養基。之後將細胞平均分盤至 24 孔盤中，不同細胞所seeding的個數各有不同，MDA-MB-231 細胞株為 2×10^4 個/mL/well，MCF-7 細胞株為 5×10^4 個/mL/well，BT-474 細胞株為 5×10^4 個/mL/well。經 24 小時後，以不同濃度的花生四烯酸 (5, 10, 20, 40 µM) 處理細胞，分別於 24, 48, 72, 96 小時計數細胞數目。細胞數目計數是使用細胞計數器。細胞計數時，先移去培養基，以PBS洗一次後，加入 200 µL 胰蛋白酶作用一分半鐘，再加入 200 µL含血清的培養基終止反應，利用pipet將細胞打散後，將細胞混合於 9.6 mL的 0.9% NaCl中，搖

勻後直接利用細胞計數器計數細胞數目。所得的數值乘以 10 倍即為細胞數目。

4-2-4 細胞週期分析

將細胞分盤於 12 孔盤中，不同細胞所seeding的個數各有不同，MDA-MB-231 細胞株為 2×10^4 個/mL，MCF-7 細胞株為 5×10^4 個/mL，BT-474 細胞株為 5×10^4 個/mL，每一孔的培養基皆為 2mL。經 24 小時後，以AA處理細胞，每隔 4 小時收一次細胞。細胞必須先經過酒精固定隔夜後，才能使用流逝細胞儀進行細胞週期分析。細胞固定過程為將培養基移除，以PBS洗一次後，加入 200 μ L胰蛋白酶作用一分半鐘，再加入 200 μ L含血清的培養基終止反應，細胞懸浮液移至 15 mL離心管，以 1200 rpm離心 4 分鐘後，倒掉上清液，細胞拍散後加入PBS，再以 1200 rpm離心 4 分鐘，之後倒掉上清液，細胞拍散後，加入 1 mL含有 2% FCS的PBS，使細胞均勻分布後，再加入 80%酒精固定細胞，移至-20 $^{\circ}$ C 冰箱凍存，隔夜後以流逝細胞儀進行細胞週期分析。

酒精固定的細胞先解凍後，以 1200 rpm 離心 4 分鐘，倒掉上清液，細胞拍散後加入 PBS，再以 1200 rpm 離心 4 分鐘，之後倒掉上清液，細胞拍散後，加入 0.5 mL solution A (3.4 mM sodium citrate, PEG 6000, 0.1% Triton X-100, 44 units / mL RNAase, 0.05 mg/mL

propidium iodide)，置於 37°C 半小時後，再加入 0.5 mL solution B (0.56 mM NaCl, PEG 6000, 0.1% Triton X-100, 0.05 mg/mL propidium iodide)，避光置於 4°C 一個小時後，用流式細胞儀進行細胞週期分析。以 Cell Quest 軟體進行 10000 顆細胞的收集，再以 ModFit 軟體進行細胞週期的分析。

4-2-5 全細胞抽取液 (Total cell extract) 之製備

細胞經 AA 處理不同時間後，將細胞刮取下來，以 2000 rpm 離心五分鐘後，去除上清液後加入適量 RIPA buffer (pH 7.4 50 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、1 mM EGTA、0.05% 2-mercaptoethanol、150 mM NaCl、1% NP-40、0.25% sodium deoxycholate、0.2 mM PMSF、5 µg/µL Leupeptin、5 µg/µL Aprotinin、0.1 mM NaF、2 µg/µL sodium vanadate)於冰上作用 30 分鐘，以 14000 rpm 離心 30 分鐘，收集上清液並測量蛋白質濃度。

4-2-6 蛋白質含量測定

蛋白質溶液經適當稀釋後，先將 200 µL Bio-Rad protein assay 試劑 (稀釋五倍) 加入 96 well ELISA microplate，再取 10 µL 待定量的稀釋樣品及系列稀釋之標準溶液 BSA 中，均勻搖勻後，於室溫下反應 5 分鐘後，以 ELISA reader 測 620 nm 吸光值。根據標準曲線計樣品之蛋白質濃度。

4-2-7 西方墨點法

將蛋白質濃度稀釋為 1mg/mL，置於沸水煮 5 分鐘，待冷卻後將等量蛋白質樣品分別加入各個樣品凹形槽中，利用 12% SDS-polyacrylamide gels 及 30 mA 電流分離蛋白質。

轉印 (Transfer) 時，PVDF 轉印膜先以甲醇活化 5 秒鐘後，以二次水浸潤二分鐘，再以 transfer buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.4, 含 192 mM glycine 及 15% methanol) 浸潤五分鐘後備用。蛋白質分離後，將 stacking gel 去除，留下 separating gel，依序將海綿、濾紙、separating gel、PVDF 膜、濾紙、海綿放於三明治夾板中，接著放入轉印槽中，灌滿 transfer buffer，以 70 伏特電壓進行轉印二小時，轉印期間都是於冰浴下進行。轉印完成後，取出 PVDF 膜，以 PBST (PBS + 0.1% Tween-20) 清洗二次，每次十分鐘，之後放入 5% 脫脂牛奶中進行 blocking，放於 4°C，隔夜後進行免疫染色。

將 PVDF 轉印膜由 5% 脫脂牛奶中取出，以 PBST 沖洗 3 次，每次 5 分；接著將 PVDF 轉印膜置於一級抗體中，於室溫下作用兩小時取出。各種一級抗體稀釋倍率如下：PPAR α (1:500)、Cyclin D1 (1:1000)、Cyclin E (1:500)、Actin (1:1000)、 α -Tubulin (1:1000)、CDK 2 (1:500)、CDK 4 (1:500)、ERK 2 (1:1000)、p38 (1:1000)、Bax (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)。PVDF 以 PBST 清洗 4 次，每次

10 分鐘；接著置於接有 HRP 之 anti-rabbit IgG、anti-mouse IgG、anti-goat IgG 的二級抗體（1:5000）中，於室溫下作用一小時取出。PVDF 以 0.3% PBST 清洗 2 次，每次 10 分鐘，再以 0.1% PBST 清洗 2 次，每次 10 分鐘。最後以 ECL 試劑組呈色，Kodak X 光底片曝光呈像，並利用 Kodak EDAS 290 軟體進行分析。

4-2-8 細胞同步化

將細胞分盤於 12 孔盤中，不同細胞所 seeding 的個數各有不同，MDA-MB-231 細胞株為 2×10^4 個/mL，MCF-7 細胞株為 5×10^4 個/mL，BT-474 細胞株為 5×10^4 個/mL，每一孔的培養基皆為 2 mL。經 24 小時後，更換成含有 2 mM hydroxyurea 的培養基培養 15 小時，之後去除含 2 mM hydroxyurea 的培養基，以 PBS 清洗細胞兩次再以新鮮培養基清洗一次後，加入含 1% FBS 的培養基，再以 AA 處理細胞，於 0、2、3、6 小時收一次細胞。細胞必須經過酒精固定隔夜，逝細胞儀進行細胞週期分析。細胞固定過程為將培養基移除，以 PBS 洗一次後，加入 200 μ L 胰蛋白酶作用一分半鐘，再加入 200 μ L 含血清的培養基終止反應，細胞懸浮液移至 15 mL 離心管，以 1200 rpm 離心 4 分鐘後，倒掉上清液，細胞拍散後加入 PBS，再以 1200 rpm 離心 4 分鐘，之後倒掉上清液，細胞拍散後，加入 1 mL 含有 2% FCS 的 PBS，使細胞均勻分布後，再加入 80% 酒精固定細胞，移至 -20°C 冰箱凍存，隔夜後

以流式細胞儀進行細胞週期分析。

4-2-9 統計方法

本實驗所得之實驗數據，採用 SPSS 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (one-way-ANOVA) 及 Post Hoc 檢定中的 Turkey 進行多重比較，各處理組間差異之顯著性，當 p 值小於 0.05 以下時，則認為具統計上意義。

第五章 研究結果

第一節 AA對人類乳癌細胞株存活率影響

5.1.1 AA對於MDA-MB-231細胞生長的影響

結果如圖二所示，在MDA-MB-231中，以5, 10, 20, 40 μM 不同濃度的AA處理，分別於處理24、48、72、96小時後計算細胞數目。實驗結果發現，處理24小時後，各個組別的細胞數目與控制組比較起來並沒有差異性；處理48小時後，10 μM 的AA可以促進細胞的生長 ($p < 0.05$)。處理72小時後，10、20、40 μM 的AA都有顯著性增加細胞的生長 ($p < 0.05$)。在96小時的時候，10、20 μM AA 也可顯著性促進細胞的生長。由此可知，10 μM 的AA可以促進MDA-MB-231的生長，在48小時後具有顯著性的差異。

5.1.2 AA對於MCF-7細胞生長的影響

結果如圖三所示，在MCF-7中，以5, 10, 20, 40 μM 不同濃度的AA處理，分別於處理24、48、72、96小時後計算細胞數目。實驗結果發現，處理48、72、96小時後，10、20 μM AA具有促進細胞增生的效果 ($p < 0.05$)

5.1.3 AA對於BT-474細胞生長的影響

由於10 μM AA對於上述兩種細胞都具有促進增生的效果，因此本實驗採用10 μM AA處理另一種特性的乳癌細胞株BT-474，測定

其是否也會促進細胞生長。由於 BT-474 細胞生長較為緩慢，達到細胞數為 200%時，亦即在處理 72 小時後，發現 10 μ M AA 對 BT-474 細胞也顯著性促細胞生長 ($p < 0.05$ ，圖四)

第二節 AA 對人類乳癌細胞株細胞週期的影響

爲了探討 AA 對乳癌細胞株促進生長的可能機制，我們利用流式細胞儀分析經 AA 處理不同時間點細胞的週期變化。

5-2-1 AA 對於 MDA-MB-231 細胞週期的影響

如圖五所示，MDA-MB-231 細胞經 10 μ M 的 AA 處理 8 小時後，雖然 S 期的細胞族群少於控制組，但是 G2/M 期的細胞族群多於控制組。經 AA 處理 12 小時後，G2/M 期的細胞族群仍多於控制組，但是 G0/G1 期的細胞族群已經多於控制組，綜合以上結果可知，經 10 μ M AA 處理的 MDA-MB-231 細胞，於 8 小時先通過 S 期到 G2/M 期，所以 G2/M 細胞族群是多於控制組，顯示經 AA 處理後與控制組相比，會縮短細胞週期時間，促進 MDA-MB-231 細胞增生。

5-2-2 AA 對於 MCF-7 細胞週期的影響

如圖六所示，MCF-7 細胞經 10 μ M 的 AA 處理 4 小時後，S 期的細胞族群多於控制組 ($p < 0.05$)，而 G0/G1 期的細胞族群少於控制組 ($p < 0.05$)。經 AA 處理 8 小時後，G2/M 期的細胞族群仍多於

控制組。而 12 小時後，則可見到經 10 μM AA 處理的細胞，其 G0/G1 期的細胞族群已經多於控制組，綜合以上結果可知，經 10 μM AA 處理的細胞會提前進入到 S 期，並使得在 4 小時與 8 小時的 G2/M 期細胞族群也跟著上升，導致整個細胞的週期縮短。

5-2-3 AA 對於 BT-474 細胞週期的影響

BT-474 細胞經 10 μM 的 AA 處理 12 小時後，S 期的細胞族群亦多於控制組，G2/M 期的細胞族群也多於控制組，而 G0/G1 期的細胞族群少於控制組 ($p < 0.05$, 圖七)。在 AA 處理 24 小時後，S 期的細胞族群已經減少，G2/M 期的細胞族群仍多於控制組，而 G0/G1 期的細胞族群已經多於控制組。在處理 48、72 小時後，兩組並沒有差異。綜合以上結果可知，BT-474 細胞經 10 μM AA 處理的細胞亦會提前進入到 S 期，使得整個細胞的週期縮短。

第三節 AA 對人類乳癌細胞株細胞週期相關調節蛋白的影響

5-3-1 AA 對於 PPAR α 蛋白質表現量的影響

經 AA 處理 48、72 小時後的 MDA-MB-231 細胞，其 PPAR α 蛋白質的表現量有顯著性的增加 ($p < 0.05$, 圖八)，且隨著時間而有明顯地增加；經 AA 處理 24、48、72 小時後的 MCF-7 細胞，其 PPAR α 蛋白質的表現量亦有增加的情形 (圖九)。至於 BT-474 細胞株，經 AA

處理 72 小時後，其 PPAR α 蛋白質的表現量亦有增加的情形（圖十， $p < 0.05$ ）。

5-3-2 AA 對於細胞週期 Cyclin 蛋白質表現量的影響

經 AA 處理 4、8、12、16、20、24 小時，在 Cyclin D1 的蛋白質表現方面，MDA-MB-231（圖十一）、MCF-7（圖十二）與 BT-474（圖十三）在處理 24 小時內的變化不大。

Cyclin E 表現在 MDA-MB-231 細胞經 AA 處理 4 小時後，Cyclin E 的表現量顯著增加（ $p < 0.05$ ，圖十四），而在處理後八小時，Cyclin E 的表現量持續增加，但與控制組沒有差異，十二小時後表現量下降，十六小時之後，Cyclin E 的表現量又呈現逐漸增加的現象。同樣的，MCF-7 細胞在 AA 處理 4 小時後，Cyclin E 的表現量也顯著增加（圖十五， $p < 0.05$ ），4 小時後，Cyclin E 的表現量逐漸下降，二十小時之後，Cyclin E 的表現量又逐漸上升；而 BT-474 細胞在 AA 處理 4 小時後，Cyclin E 的表現量也顯著增加（圖十六， $p < 0.05$ ），12 小時後 Cyclin E 的表現量亦有增加現象，但未有差異性，16 到 24 小時間 Cyclin E 的表現量未有明顯起伏現象。

5-3-3 AA 對於細胞週期 CDK 蛋白質表現量的影響

經由 AA 處理細胞，從 0 至 24 小時後發現，CDK 4 的表現在 MDA-MB-231（圖十七）與 BT-474 細胞（圖十九）並無顯著性差異。

但在 MCF-7 細胞中則可以看到十六小時後表現量逐漸上升（圖十八）。

CDK 2 的表現，可發現到在三株細胞中，表現量都比 0 小時為多。MDA-MB-231 細胞可見到 CDK 2 表現量隨時間逐漸上升（圖二十），而 MCF-7 細胞在 8 小時表現量最大，12 小時表現量下降後，於十六小時之後表現量又逐漸上升（圖二十一）。而 BT-474 細胞之 CDK 2 在 24 小時表現量最大（圖二十二），但三株細胞經 AA 處理與對照組比較，皆無統計上的差別

5-3-4 AA 對於 MAPK 蛋白質表現量的影響

ERK2 蛋白質表現在 MDA-MB-231（圖二十三）與 MCF-7（圖二十四）細胞中可見到其表現量隨著時間而上下起伏，每隔四個小時便有所變化，但經 AA 處理與對照組相比較，ERK2 並無顯著性差異；在 p38 的表現量方面，不論是 MDA-MB-231（圖二十五）或 MCF-7 細胞（圖二十六），經 AA 處理與對照組比較皆無顯著性差異。

5-3-5 AA 對於細胞凋亡蛋白質表現量的影響

測定 MDA-MB-231 細胞 Bax 的表現量（圖二十七），控制組及 AA 組在十二小時內有逐漸下降的趨勢，十二小時後又逐漸的上升，在第二十四個小時的表現量又下降了；相類似情形亦見於 MCF-7 細胞（圖二十八），不同的是在十六小時後其表現量都較高。Bcl-2 的

表現量在 MDA-MB-231 細胞中各個時間點，不論是控制組或 AA 組都有表現上升的情況（圖二十九），在 MCF-7 細胞中則可見到表現量逐漸上升，在 24 小時的控制組或 AA 組，其表現量是大於 0 小時（圖三十, $p < 0.05$ ）。進一步計算 Bax / Bcl-2 的比例後發現，MDA-MB-231 細胞在十二小時內，其比例有逐漸下降的趨勢，其比例都較 0 小時的比例來的低，十六小時後，比例有上升的現象（圖三十一）；MCF-7 細胞在十二小時內，其比例亦有逐漸下降的趨勢，在十六小時，比例有上升的現象，隨後比例又逐漸的下降（圖三十二）但是 AA 組與控制組作比較，在各個時間點，皆無統計上的差異。

第四節 AA 對乳癌細胞同步化 (synchronization) 後的細胞週期影響

爲了進一步知道 AA 是否會影響到細胞進入到 S 期的速度，於是本研究採取同步化的方法，以 hydroxyurea 處理細胞，使細胞週期停留在 G0/G1 期，再以 AA 處理過後，分析細胞週期分佈。

如圖三十三，MDA-MB-231 細胞經過 hydroxyurea 處理後，84.37% 的細胞分佈在 G1 期，證明了細胞停留在 G1 期。以 AA 處理後，2、3、6 小時觀察細胞週期的變化，結果顯示與控制組沒有差異，以 AA 處理的組別，其細胞進入到 S 期的速度並沒有加快。同樣的結果也出

現在 MCF-7 細胞（圖三十四）與 BT-474 細胞（圖三十五）。

第六章 討論

在本實驗中選用了三種乳癌細胞株，各有不同的特性存在。三種細胞株都屬於浸潤性管道癌（IDC），是最常見的乳癌。MDA-MB-231 與 MCF-7 具有轉移性，而 BT-474 不具轉移性。依照分化的程度作分類，MDA-MB-231 屬於未分化的細胞株，MCF-7 與 BT-474 是屬於已分化的細胞株。以三種細胞株的 ER α 與 HER2/neu 的表現而言，MDA-MB-231 為 ER α (-)、HER2/neu (-) 的細胞株；MCF-7 為 ER α (+)、HER2/neu (+)；BT-474 為表現 ER α (+)、HER2/neu (+++) 的細胞株[74]。因此，本實驗選用這三種不同性質的細胞株，想要探討 AA 是否對於這三種乳癌細胞株都同樣具有影響。實驗結果也發現到 AA 對於這三種細胞株都具有促進生長的效果，從 MDA-MB-231 與 MCF-7 的實驗中可知道，10 μ M 的 AA 是最大的促進細胞增生的濃度，MDA-MB-231 細胞及 MCF-7 細胞在處理 48 小時後，都可顯著性的見到細胞生長的情形。為了驗證 10 μ M 的 AA 對於生長較慢的乳癌細胞是否具有相同的作用，同樣以 10 μ M AA 處理 BT-474 細胞，在 72 小時也可見到細胞數目的增加情形。由此可知，10 μ M 的 AA 可以刺激乳癌細胞株的增生，不論是 ER α 、HER2/neu 的表現如何，此結果可推論出 AA 之所以會促進細胞的生長，可能並不是藉由影響 ER α 、HER2/neu 的表現所致，有可能會透過其他的訊

息傳遞路徑而促使細胞產生增生。

在探討脂肪酸對於細胞株影響的研究中，培養基中所添加的 FBS 含量各有不同，也因此有所爭議。由於血清中含有脂肪酸，在實驗的培養基若是添加過多，細胞可以得到充分的必需脂肪酸下，可能會掩蓋實驗中所添加脂肪酸所帶來的效應，且細胞若是處於如此營養狀態充足的情況下，生長速度自然會因為生長因子的不斷刺激下而生長快速，在如此狀態下，有可能會因此掩沒了所添加入脂肪酸的影響；因此，也有的研究是採取 serum-free 的培養基，但是實驗時的培養基不添加 FBS 的話，意即培養基中不含必需脂肪酸及生長因子，可能會造成細胞內某些的基本的代謝機制、訊息傳遞機制等等受到莫大的衝擊，以此種不健全狀態下的細胞所做的實驗，並不符合一般自然的狀態，其結果難免會有所質疑。基於這些考量，本實驗採取在培養基中添加 1% FBS，其用意在於細胞能在足夠量的必需脂肪酸含量下，不至於缺乏必須脂肪酸，來探討添加入 AA 後所帶來的影響，才能釐清相對多量的 AA 的效果，此與 *Razanamahefa et al.* 及 *Chujo H et al.* 所採用的條件一致 [30, 75, 76]。

知道了 10 μ M AA 刺激乳癌細胞株的增生後，接著分析經 AA 是否會影響細胞的週期變化。實驗結果得知，AA 處理過後的細胞，其細胞週期是快於控制組的，經 AA 處理的細胞株進入到 S 期較快，間

接使得細胞進入到 G2/M 期較快，而完成一個週期的循環，所以才會加速細胞的增生。因此推論 AA 可以加速細胞通過 G1/S checkpoint，進入到 S 期較快，相類似的結果可見於 *Niradiz R. et al.*[31]的研究，以同屬於 n-6 脂肪酸的 linoleic acid 處理 T47D 乳癌細胞，於 12 小時與 24 小時觀察細胞週期變化發現，linoleic acid 可以增加處於 S 期的細胞族群，意即可以加速細胞週期的運行。

在各蛋白質的表現方面，探討了有關於 PPAR α 的表現，也探討了調節細胞周期蛋白質、MAPK 蛋白質、與調節細胞凋亡蛋白質的表現，以釐清 AA 促進細胞增生的機制為何。在 PPAR α 方面，本研究中以 AA 處理人類乳癌細胞株後，發現細胞中 PPAR α 的蛋白質表現有明顯增加，證明了 AA 可以活化 PPAR α ，隨著處理時間的加長，其活化的程度會增大。在 *Kate S. et al.*的研究 [55] 中指出，以 Wy 14634 處理 MDA-MB-231 與 MCF-7 細胞後，以 real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction 方法偵測到 PPAR α mRNA 表現量增加，證明了 Wy 14634 可以在乳癌細胞株中活化 PPAR α ，並使 PPAR α 表現量上升。本實驗所採用的 AA 一樣也是 PPAR α 的配體，實驗證明 AA 也可以活化 PPAR α ，可以使得其蛋白質表現量增加。

在調控細胞週期蛋白質的表現上面，經 AA 處理的細胞株，其

Cyclin E 的表現量會上升，而 Cyclin E 是細胞進入 S 期的重要蛋白質，而從細胞週期的結果看來，推論 AA 可以使得 Cyclin E 表現增加，所以細胞可以提前進入到 S 期，藉此縮短了細胞週期，細胞的增生速度變快。在乳癌病人中，大約有 50% 病人的 Cyclin D1 是過度表現的 [30]，因此本篇研究也針對了 Cyclin D1 進行探討。結果顯示，三種細胞株以 AA 處理後的 24 小時內，其 Cyclin D1 的蛋白質表現並未有上升的現象。而根據 Landy R. e al.[30] 的研究卻指出，T47D 經 AA 處理後，可以誘發 Cyclin D1 的 mRNA 表現量增加，在處理 5 個小時後達最高峰，於四十個小時內仍持續活化。然而本實驗在偵測 Cyclin D1 的蛋白質表現上並沒有活化的現象。

另一方面，CDK 2 可與 Cyclin E 一起調控細胞週期進入 S 期，在 CDK 2 的表現上，在 MDA-MB-231 細胞株實驗中控制組與經 AA 處理的組別，其 CDK 2 表現有隨著時間而逐漸上升，在 MCF-7 細胞株實驗中的控制組與經 AA 處理的組別除了在 12 小時的表現與 0 小時的表現較一致外，其餘時間點的表現量普遍有較為升高的現象，在這兩種細胞中，控制組與經 AA 處理的組別，其 CDK 2 表現都有較為上升的情況，顯示出細胞週期是不斷的運行著。在 BT-474 細胞，控制組與經 AA 處理的組別，其 CDK 2 的表現於 24 小時最大，可能由於是此細胞株的細胞週期較為緩慢的緣故，於 24 小時才會有 CDK

2 的表現。CDK 4 可與 Cyclin D1 調控細胞週期進入 G0/G1 期，在 CDK 4 的表現上，在 CDK 4 的表現上 MDA-MB-231 細胞兩組的表現並沒有呈現波動情形，MCF-7 細胞於 16 小時後表現量有上升的現象，而 BT-474 控制組與經 AA 處理的組別，其 CDK 4 的表現則未有明顯變化。

MAPK 的活化會造成細胞的增生，在乳癌細胞的生長扮演重要角色[30]。本實驗接著分析 ERK 2 與 p38 這兩個蛋白質的表現量是否受 AA 影響。在 MDA-MB-231 與 MCF-7 中，控制組與經 AA 處理的組別，ERK 2 與 p38 的表現量隨著時間而有上下起伏的現象，顯示細胞有持續的生長，但是兩組在統計上並沒有差異性

既然 AA 是促進乳癌細胞的增生，因此我們假設另一方面是否會抑制乳癌細胞的凋亡，已知細胞凋亡與 Bax，Bcl-2 相關 [46]，當 Bax / Bcl-2 的比值增加，則細胞較容易死亡。在 Bax 與 Bcl-2 的表現上，分析 Bax / Bcl-2 的比例可發現，在 MDA-MB-231 細胞，控制組與經 AA 處理的組別在 8 小時與 12 小時的比例與 0 小時比較皆有明顯的下降，顯示此兩組別在 8 小時與 12 小時進行細胞凋亡的細胞較 0 小時來得少。而在 MCF-7 細胞，Bax / Bcl-2 的比例皆無差異

在 AA 促進細胞生長的機制中，其代謝物也具有促進乳癌細胞生長的作用，例如：PGE₂、12-hydroxyeicosatetraenoic acid 與

15-hydroxyeicosatetraenoic acid [30]。但是到目前為止，仍未能夠有充分的證據可以明白指出是哪一個代謝物所導致細胞生長[30]。從另一個方面探討AA促進細胞生長的機制，AA是PPAR α 的天然配體，具有活化PPAR α 的能力，然而許多研究已指出活化的PPAR α 會使得細胞產生增生的作用[25, 55]。由本研究結果顯示AA在三種細胞株皆可以活化PPAR α ，而之前的其他學著研究顯示，PPAR α 的活化會伴隨著活化CDK4、*c-myc*、*c-Ha-ras*、*fos*、*jun*的表現，而本研究亦發現到AA可以促進Cyclin E蛋白的表現，因此推論可能是活化的PPAR α 誘導*c-myc*表現，且*c-myc*可以誘導Cyclin E的表現[77]，進而加速了細胞進入到S期的速度，細胞週期加快的結果使得細胞產生增生的現象。

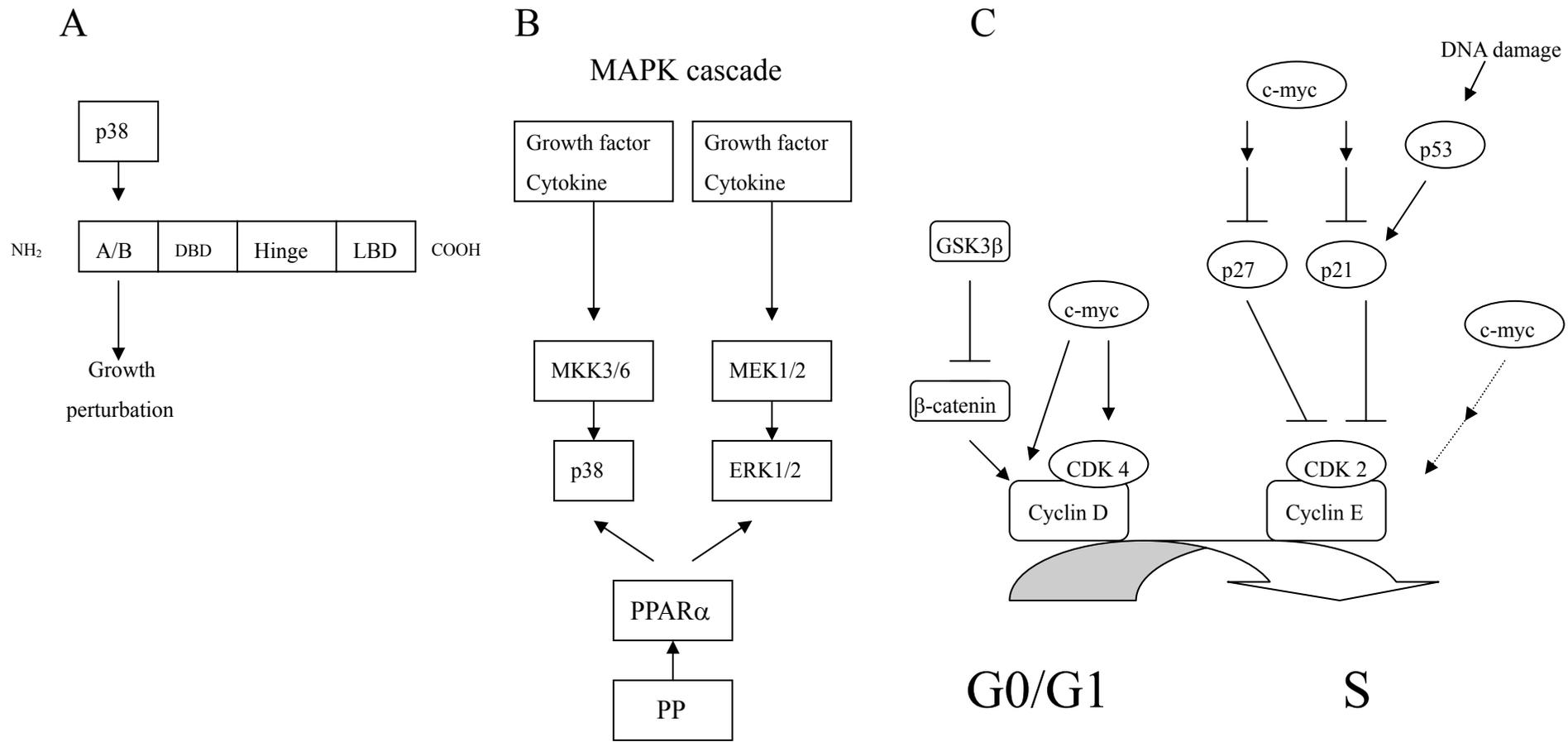
因此，本篇研究顯示了 AA 可以促進乳癌細胞株的生長，在三種不同的細胞株都同樣具有促進生長的效果，其可能機制與 AA 活化PPAR α 的表現有相關性，並伴隨著 Cyclin E 的表現增加，促使細胞週期加快，而促進細胞的生長。

表一 三種乳癌細胞株的特性

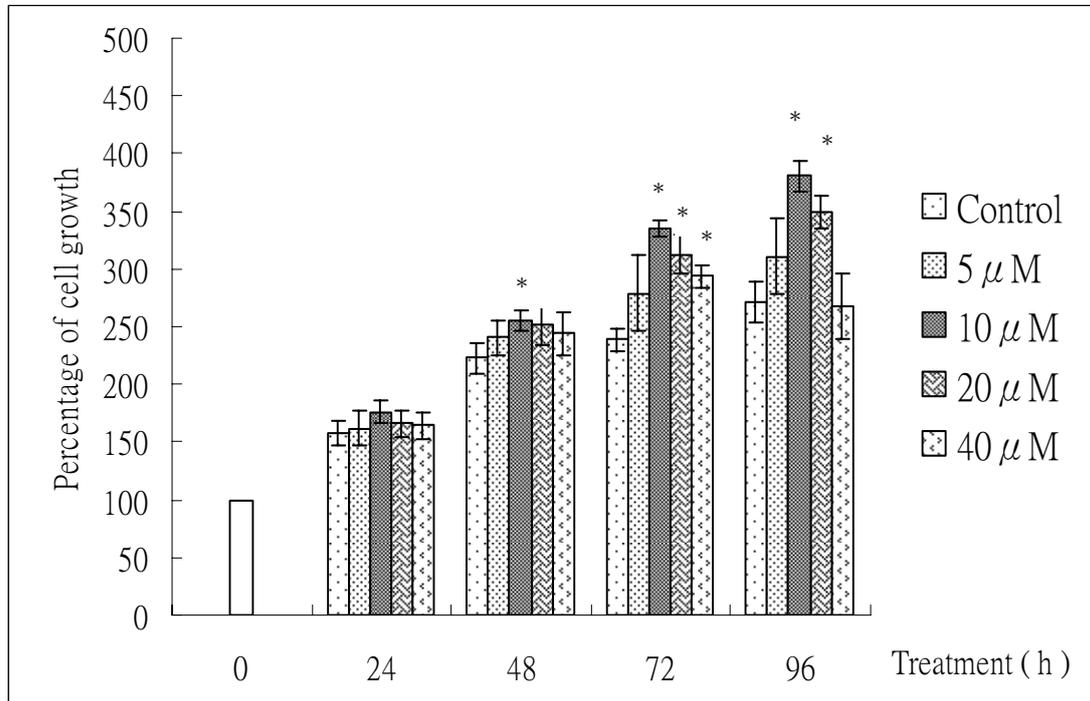
	MDA-MB-231	MCF-7	BT-474
Type of cancer	IDC	IDC	IDC
Original tissue	Metastasis (Pleural effusion)	Metastasis (Pleural effusion)	Primary
ER	—	++++	++
PR	—	++	+
HER2/ <i>neu</i>	—	+	+++

IDC : invasive ductal carcinomas , ER : estrogen receptor , PR :

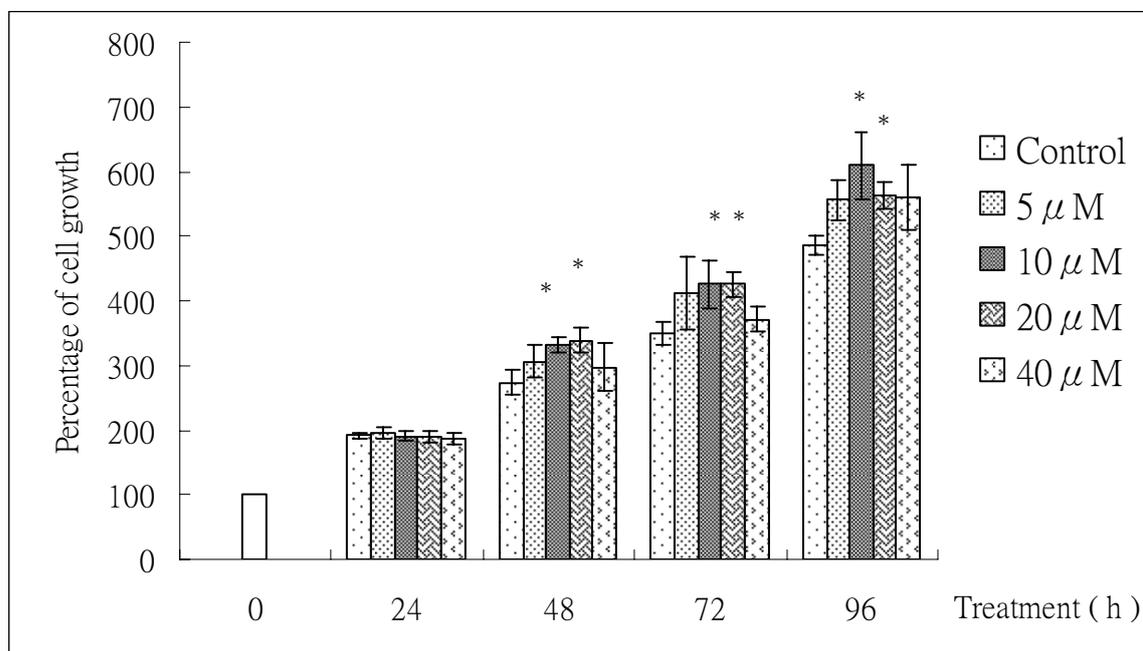
progesterone receptor



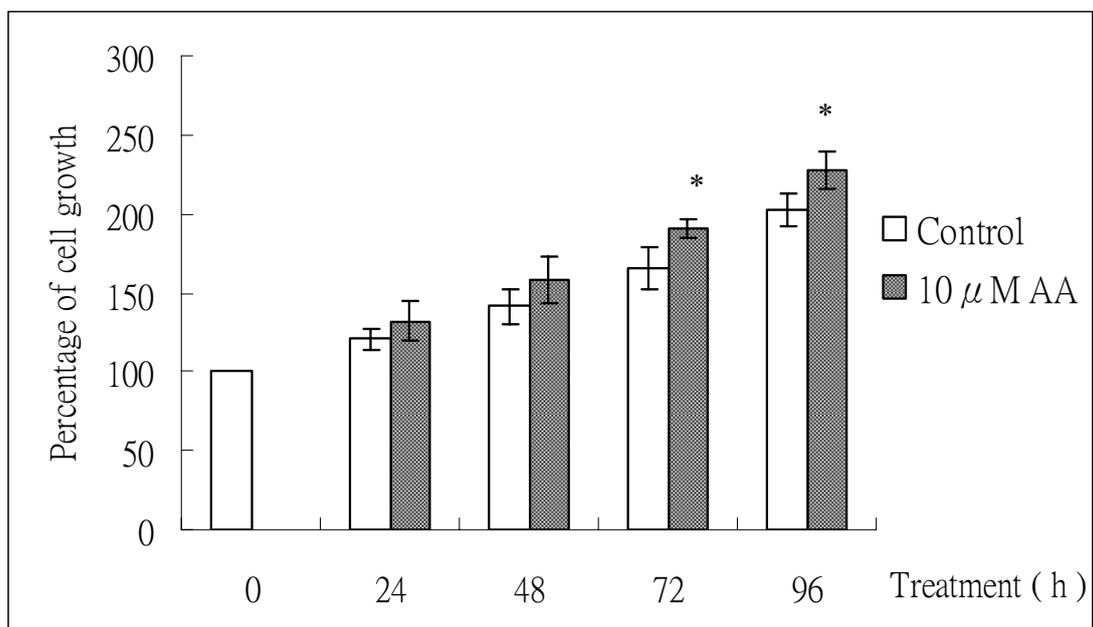
圖一 機制假說：A. PPAR α 與 p38 相互關係 B. PPAR α 與 MAPK 的 cross-talk C. 細胞週期 G1 / S checkpoint 的調控



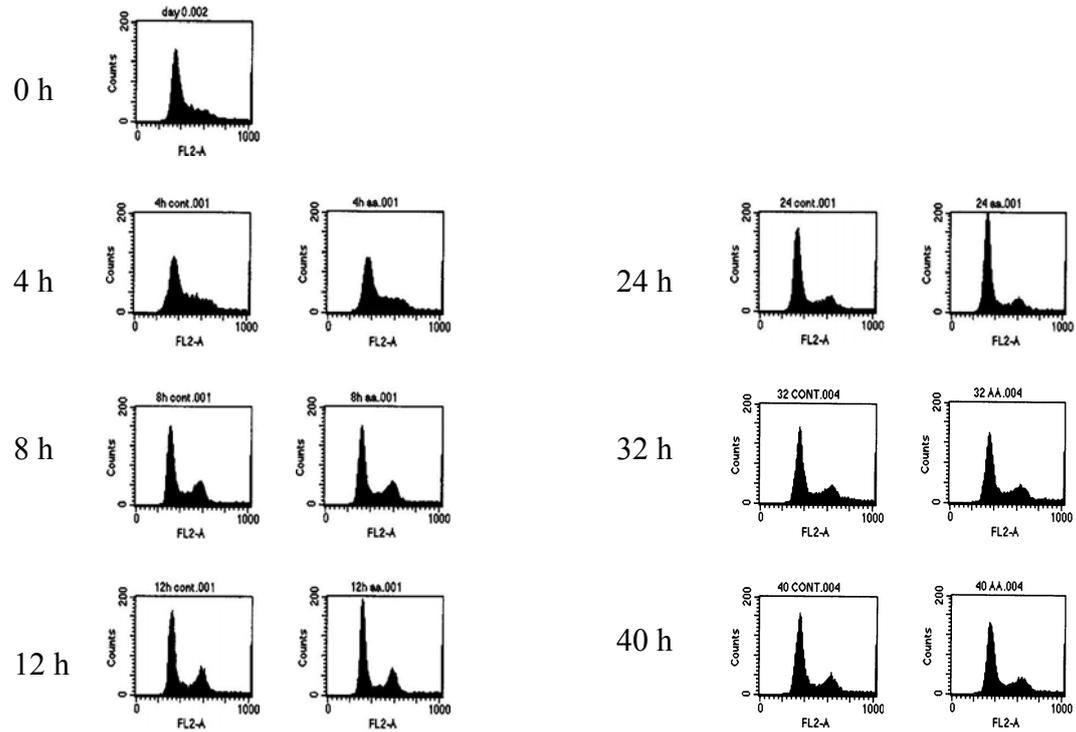
圖二：AA 對 MDA-MB-231 細胞生長的影響。細胞經 AA 處理 24 至 96 小時，以細胞計數器計算細胞數目。細胞生長以 AA 處理的細胞數與未加 AA 處理的 0 小時存活細胞數的百分比值計算，重覆四次的結果以平均值±標準差來表示。*： $p < 0.05$ ，表示經由不同濃度的 AA 處理在不同時間點，分別與對照組比較，在統計上具有顯著性的差異。



圖三：AA 對 MCF-7 細胞生長的影响。細胞經 AA 處理 24 至 96 小時，以細胞計數器計算細胞數目。細胞生長以 AA 處理的細胞數與未加 AA 處理的 0 小時存活細胞數的百分比值計算，重覆四次並以平均值±標準差來表示（取樣數目為不同四重覆實驗）。*： $p < 0.05$ ，表示經由不同濃度的 AA 處理在不同時間點，分別與對照組比較，在統計上具有顯著性的差異。

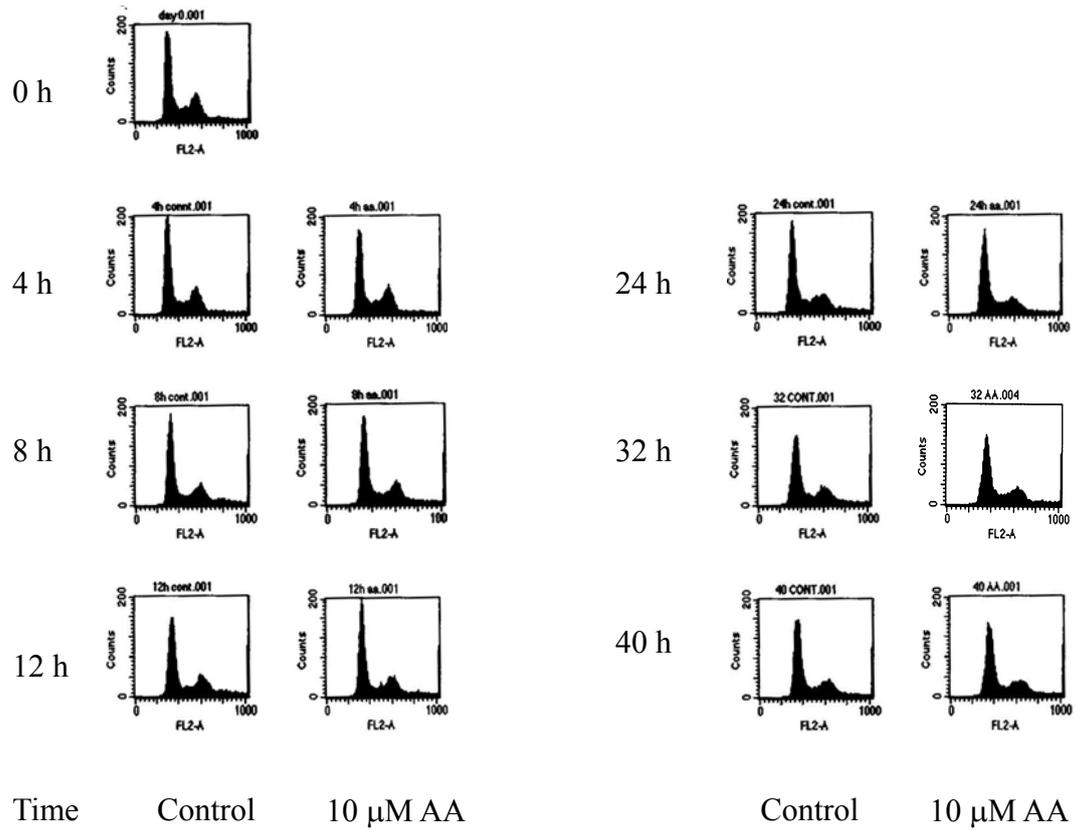


圖四：AA 對 BT-474 細胞生長的影響。細胞經 10 μ M AA 處理 24 至 96 小時，以細胞計數器計算細胞數目。細胞生長以 AA 處理的細胞數與未加 AA 處理的 0 小時存活細胞數的百分比值計算，重覆五次並以平均值 \pm 標準差來表示。*： $p < 0.05$ ，表示經由 10 μ M AA 處理在不同時間點，分別與對照組比較，在統計上具有顯著性的差異。



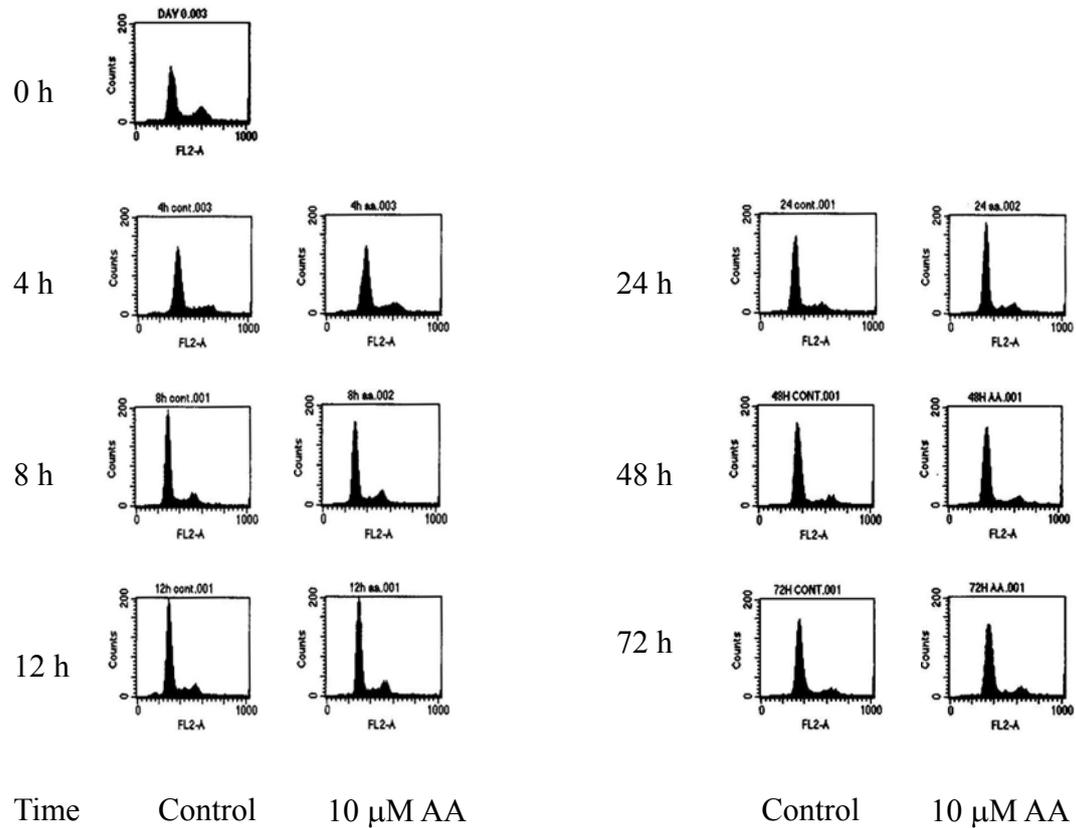
Time	Treatment	G0/G1	S	G2/M
0 h	—	61.68 ± 2.22	36.01 ± 2.14	2.30 ± 0.15
4 h	control	49.43 ± 1.80	41.43 ± 2.16	9.15 ± 1.61
	AA	48.96 ± 0.60	41.00 ± 1.54	10.05 ± 1.34
8 h	control	51.90 ± 0.93	29.31 ± 1.03	18.74 ± 0.15
	AA	51.15 ± 1.18	27.96 ± 0.92*	20.89 ± 0.38*
12 h	control	57.57 ± 0.22	23.81 ± 1.01	18.62 ± 0.96
	AA	59.22 ± 0.54*	20.65 ± 0.41*	20.14 ± 0.17*
24 h	control	60.52 ± 0.59	26.86 ± 0.51	12.62 ± 0.70
	AA	60.72 ± 1.06	26.06 ± 1.43	13.22 ± 0.76
32h	control	55.33 ± 0.95	28.23 ± 3.83	17.48 ± 2.50
	AA	55.22 ± 2.30	28.50 ± 3.22	17.22 ± 2.24
40h	control	52.66 ± 1.72	28.22 ± 1.20	19.30 ± 1.79
	AA	53.55 ± 1.31	27.30 ± 0.58	19.71 ± 1.32

圖五：10 μM AA 對 MDA-MB-231 細胞之細胞週期影響。細胞經 10 μM AA 處理不同時間點後以流式細胞儀分析細胞週期之變化。*：p < 0.05。經 AA 處理後與同一個時間控制組比較有顯著性差異。



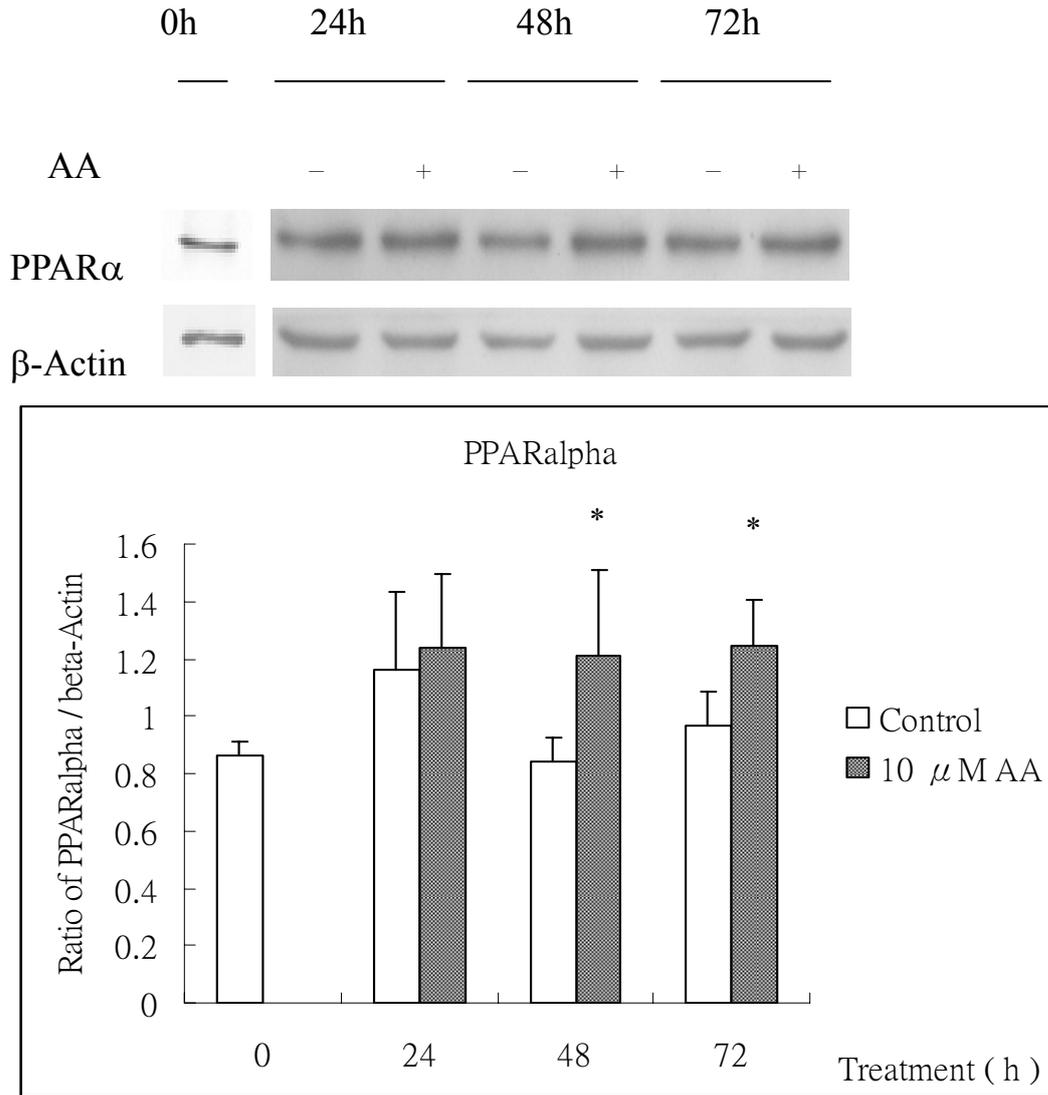
Time	Treatment	G0/G1	S	G2/M
0 h	—	49.43 \pm 0.71	36.03 \pm 1.03	14.54 \pm 1.06
4 h	control	52.09 \pm 1.35	30.54 \pm 0.67	17.37 \pm 0.91
	AA	49.42 \pm 0.79*	32.26 \pm 1.30*	18.32 \pm 1.61
8 h	control	57.55 \pm 0.39	27.68 \pm 0.62	14.77 \pm 0.76
	AA	56.19 \pm 0.99	27.96 \pm 0.99	16.05 \pm 0.53*
12 h	control	56.32 \pm 0.40	24.21 \pm 0.87	19.38 \pm 0.50
	AA	59.08 \pm 2.00*	23.00 \pm 1.66	17.87 \pm 1.38
24 h	control	53.85 \pm 1.24	34.05 \pm 1.60	12.10 \pm 1.10
	AA	59.44 \pm 1.11*	29.10 \pm 2.00*	11.51 \pm 1.24
32 h	control	53.33 \pm 0.45	27.27 \pm 1.87	19.48 \pm 1.50
	AA	53.03 \pm 1.30	26.50 \pm 1.77	20.27 \pm 1.28
40 h	control	52.25 \pm 1.22	28.05 \pm 1.20	19.70 \pm 1.19
	AA	53.41 \pm 1.31	27.10 \pm 2.00	19.11 \pm 1.11

圖六：10 μ M AA 對 MCF-7 細胞之細胞週期影響。細胞經 10 μ M AA 處理不同時間點後以流式細胞儀分析細胞週期之變化。*： $p < 0.05$ 。經 AA 處理後與同一個時間控制組比較有顯著性差異。



Time	Treatment	G0/G1	S	G2/M
0 h	—	60.79 \pm 3.20	20.84 \pm 2.25	18.34 \pm 2.00
4 h	control	75.61 \pm 0.49	12.44 \pm 0.35	11.84 \pm 0.43
	AA	74.98 \pm 0.74	12.34 \pm 0.32	12.88 \pm 0.88
8 h	control	73.94 \pm 1.86	15.55 \pm 1.28	10.51 \pm 0.96
	AA	71.60 \pm 1.34	16.30 \pm 0.76	12.10 \pm 1.09*
12 h	control	70.38 \pm 0.47	18.36 \pm 0.14	11.25 \pm 0.47
	AA	65.51 \pm 0.93*	20.41 \pm 0.24*	14.09 \pm 1.14*
24 h	control	72.24 \pm 1.70	17.81 \pm 1.86	9.96 \pm 0.41
	AA	75.81 \pm 0.92*	13.03 \pm 1.07*	11.14 \pm 0.38*
48 h	control	78.18 \pm 1.50	14.57 \pm 1.04	7.50 \pm 0.33
	AA	80.04 \pm 0.50	12.86 \pm 0.85	7.01 \pm 0.60
72 h	control	78.87 \pm 0.68	12.71 \pm 0.65	8.42 \pm 0.38
	AA	78.21 \pm 0.81	13.48 \pm 0.93	8.36 \pm 0.36

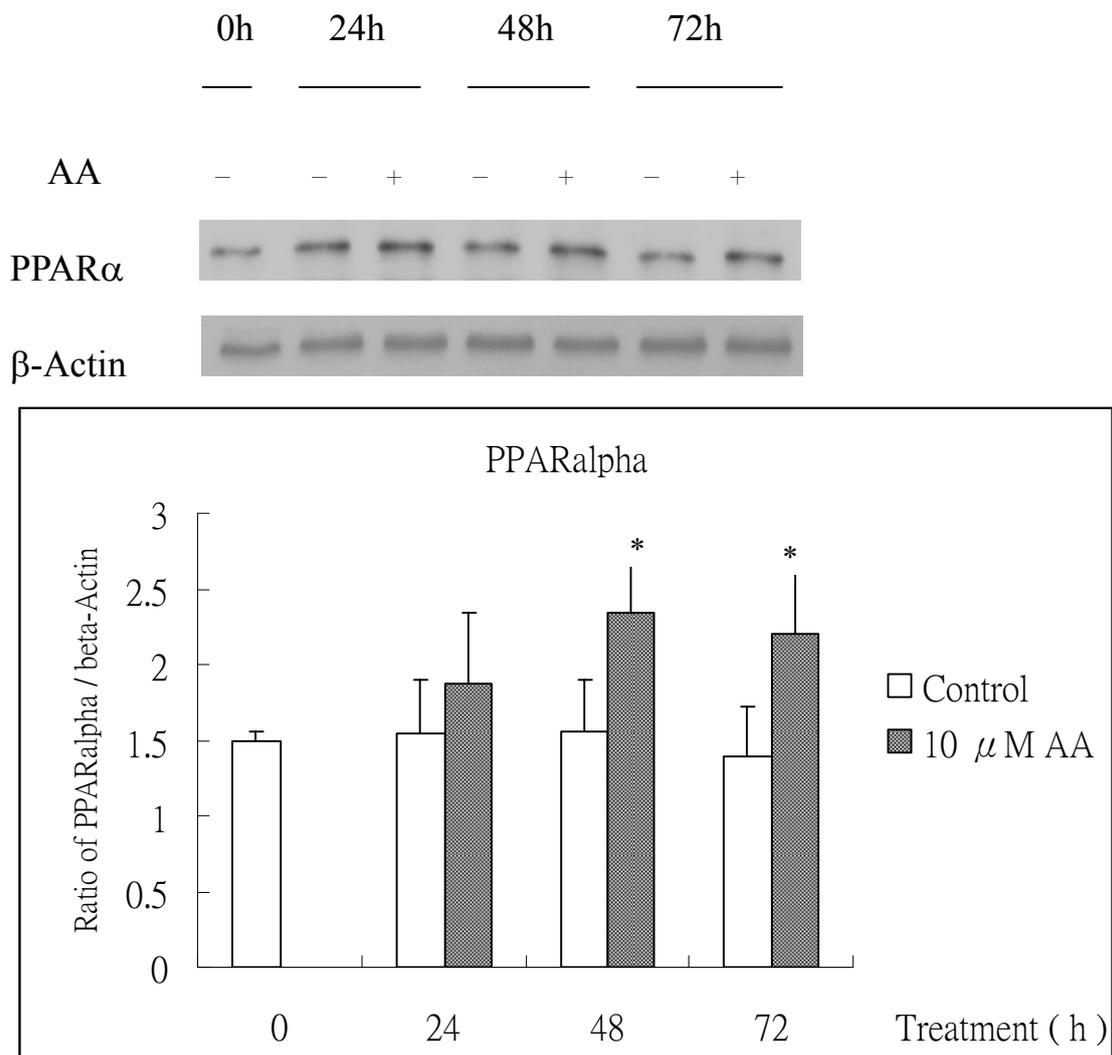
圖七：10 μ M AA 對 BT-474 細胞之細胞週期影響。細胞經 10 μ M AA 處理不同時間點後以流式細胞儀分析細胞週期之變化。*：p<0.05。經 AA 處理後與同一個時間控制組比較有顯著性差異。



圖八：AA 對 MDA-MB-231 細胞 PPAR α 蛋白質表現的影響。

MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

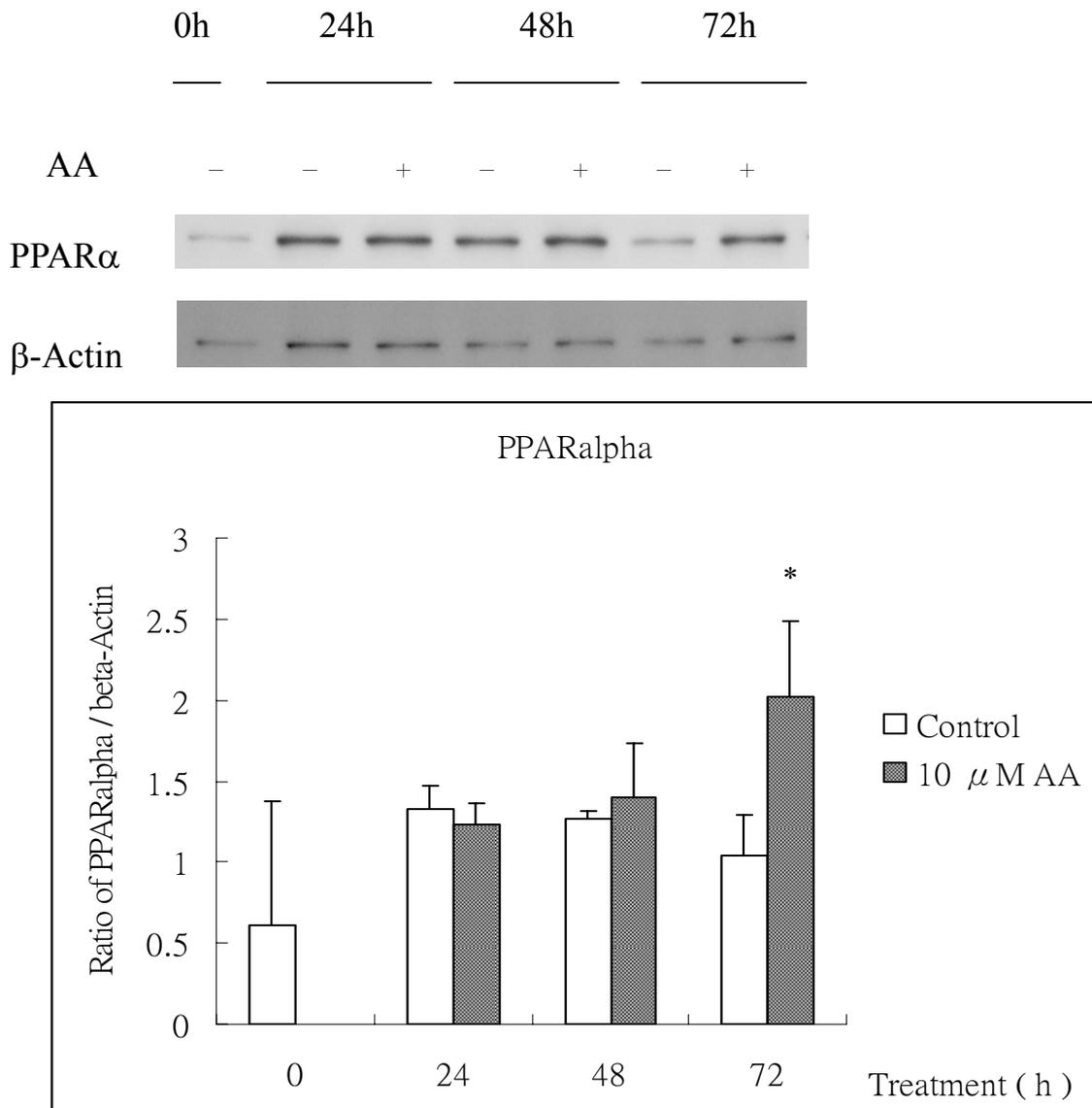
PPAR α 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖九：AA 對 MCF-7 細胞 PPAR α 蛋白質表現的影響

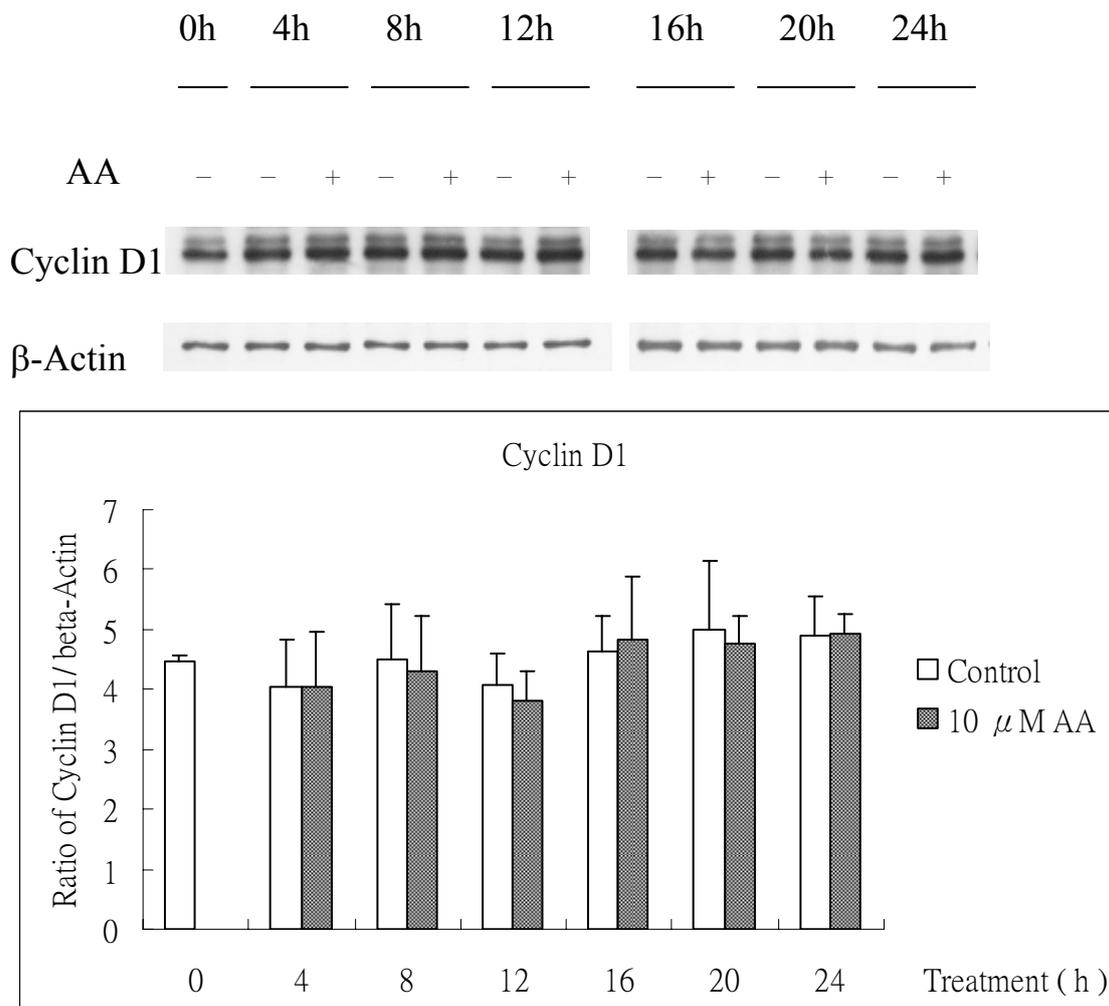
MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

PPAR α 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



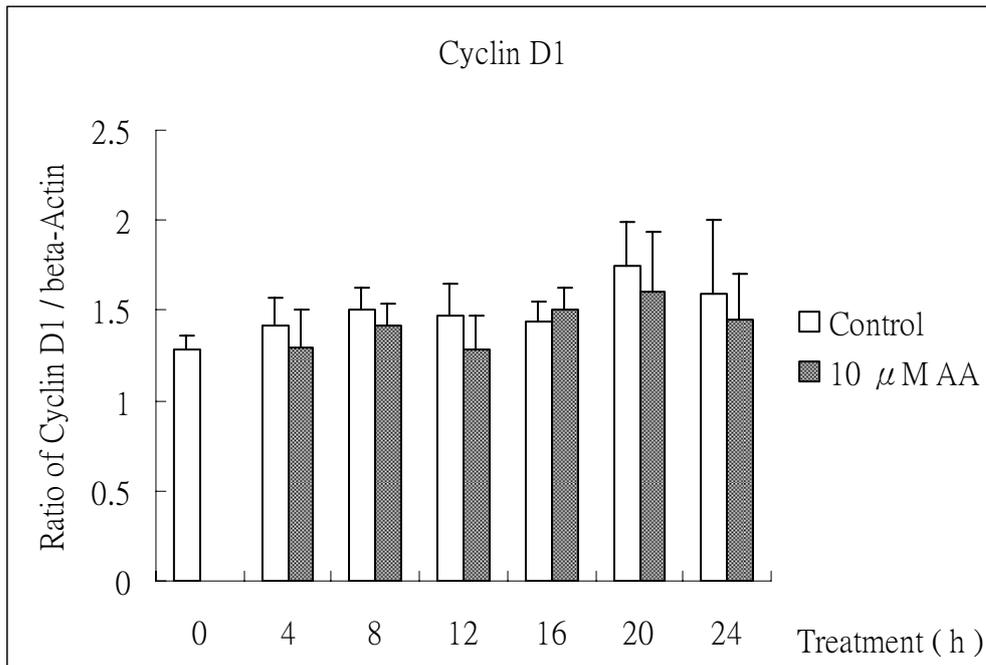
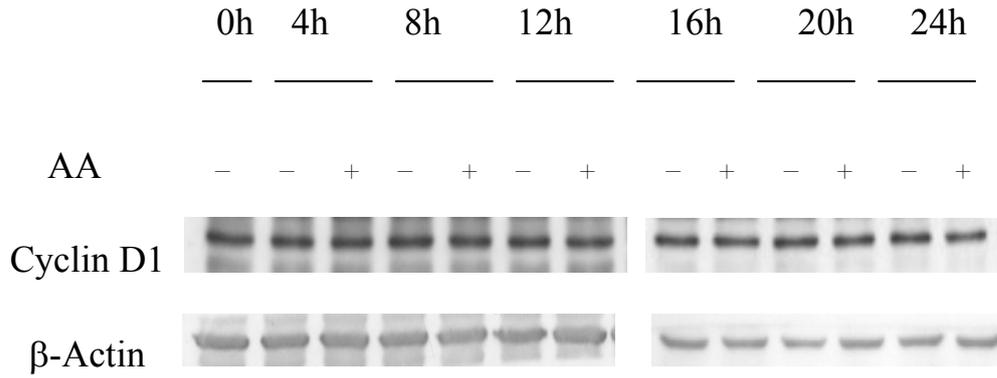
圖十：AA 對 BT-474 細胞 PPAR α 蛋白質表現的影響

BT-474 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 PPAR α 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



圖十一：AA 對 MDA-MB-231 細胞 Cyclin D1 蛋白質表現的影響

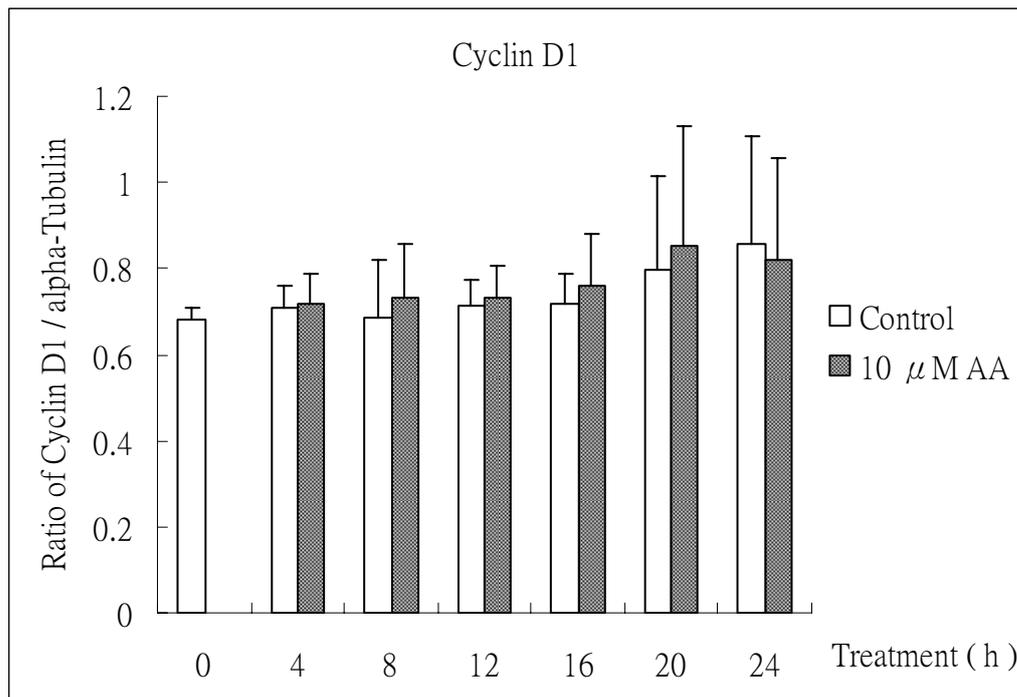
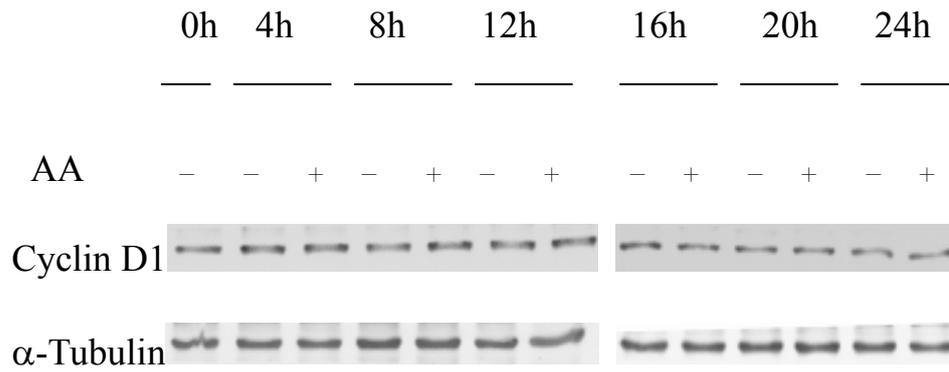
MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 Cyclin D1 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



圖十二：AA 對 MCF-7 細胞 Cyclin D1 蛋白質表現的影響

MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析

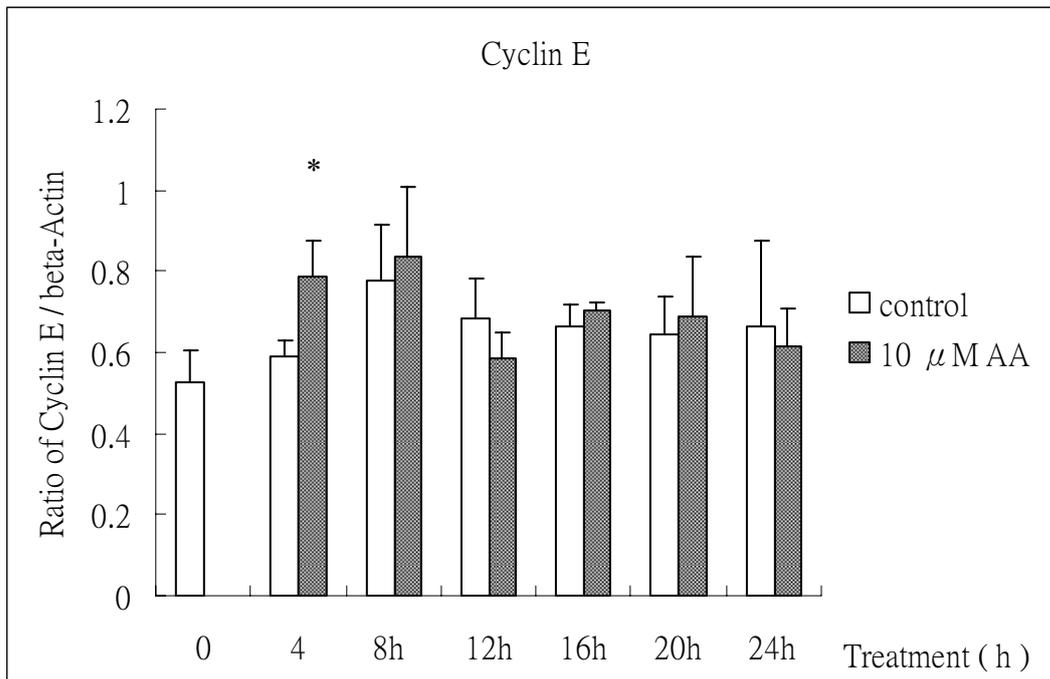
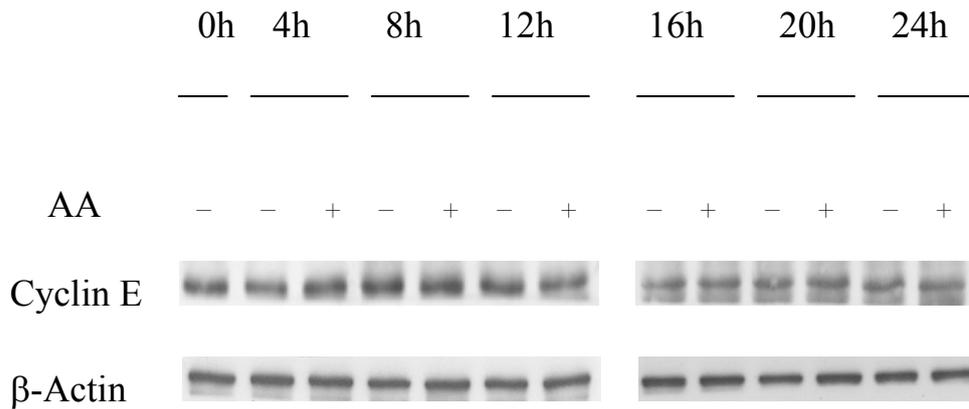
Cyclin D1 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖十三：AA 對 BT-474 細胞 Cyclin D1 蛋白質表現的影響

BT-474 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

Cyclin D1 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示

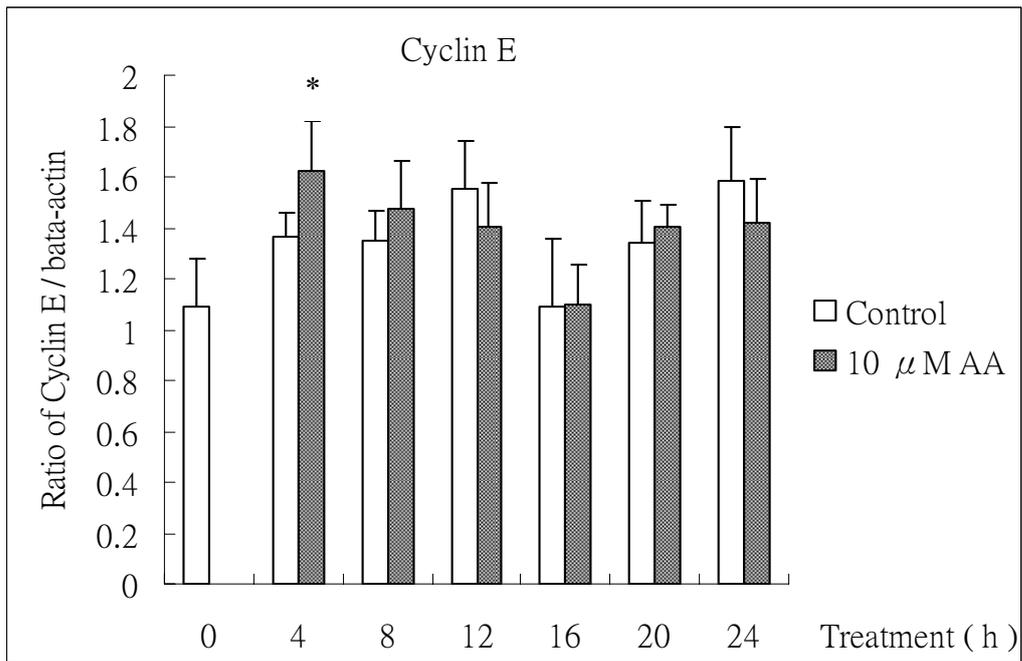
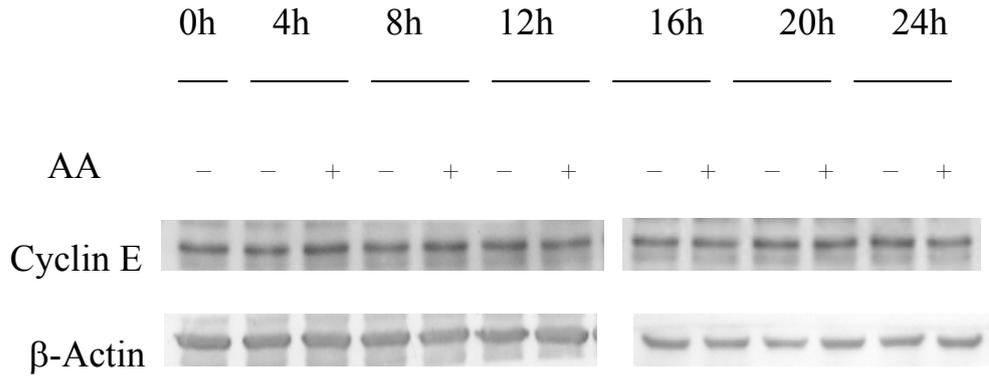


圖十四：AA 對 MDA-MB-231 細胞 Cyclin E 蛋白質表現的影響

MDA-MB-231 細胞以 10 μM AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

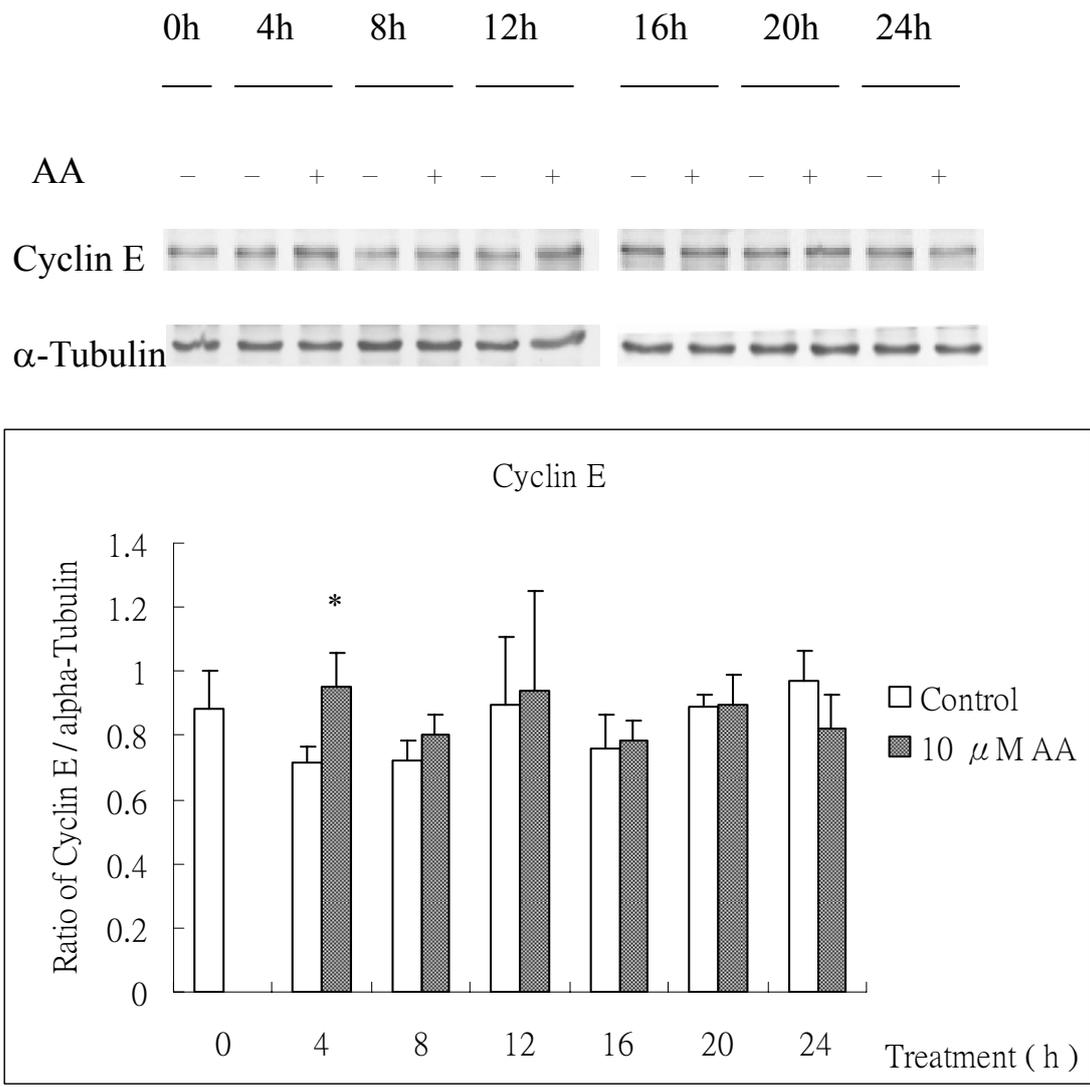
Cyclin E 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值±標準差來表示。

* : $p < 0.05$ 。



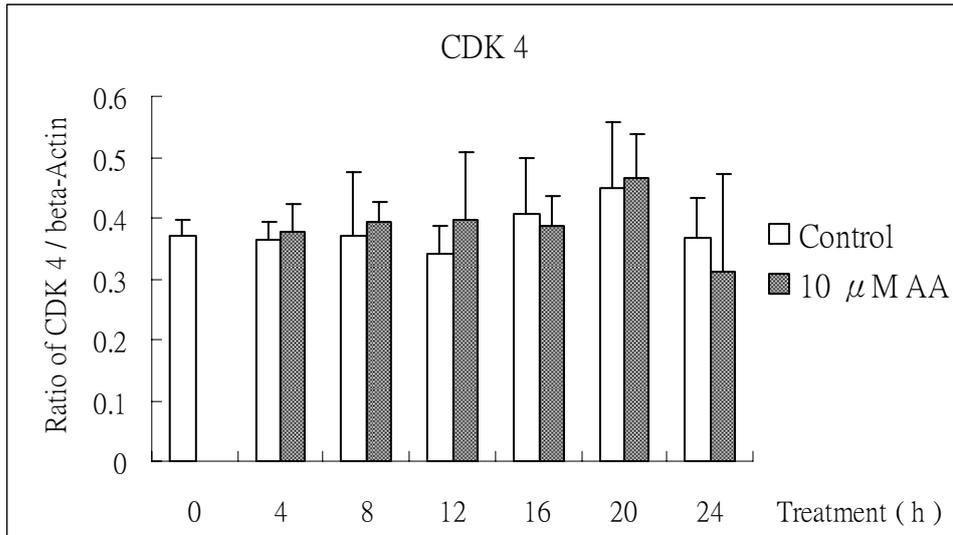
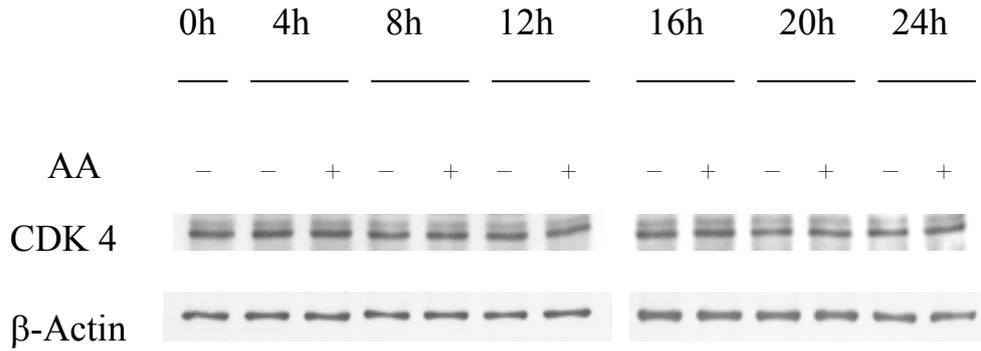
圖十五：AA 對 MCF-7 細胞 Cyclin E 蛋白質表現的影響

MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 Cyclin E 蛋白質表現。結果以平均值 \pm 標準差來表示。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。* : $p < 0.05$ 。



圖十六：AA 對 BT-474 細胞 Cyclin E 蛋白質表現的影響

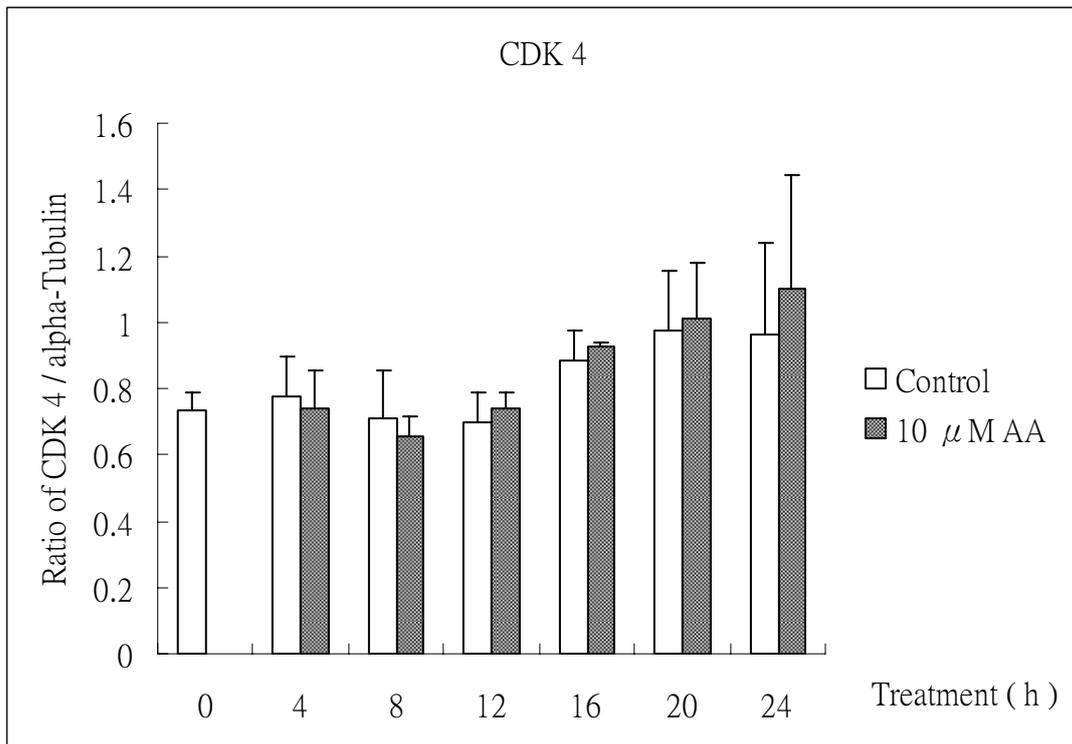
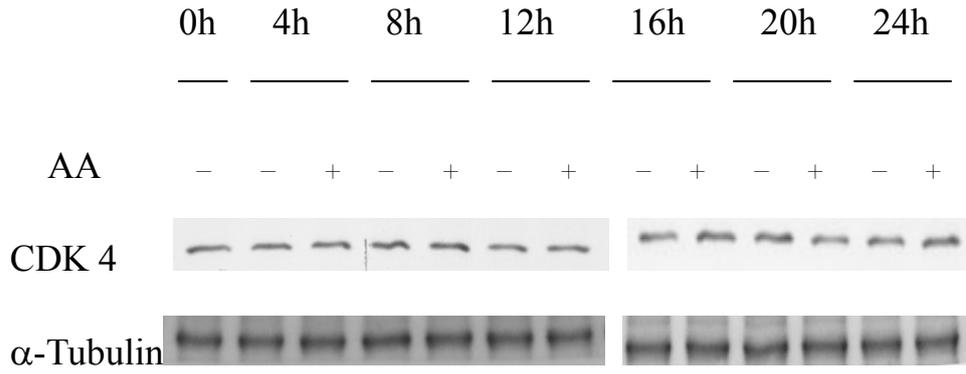
BT-474 細胞以 10 μM AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 Cyclin E 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值±標準差來表示。* : $p < 0.05$ 。



圖十七：AA 對 MDA-MB-231 細胞 CDK 4 蛋白質表現的影響

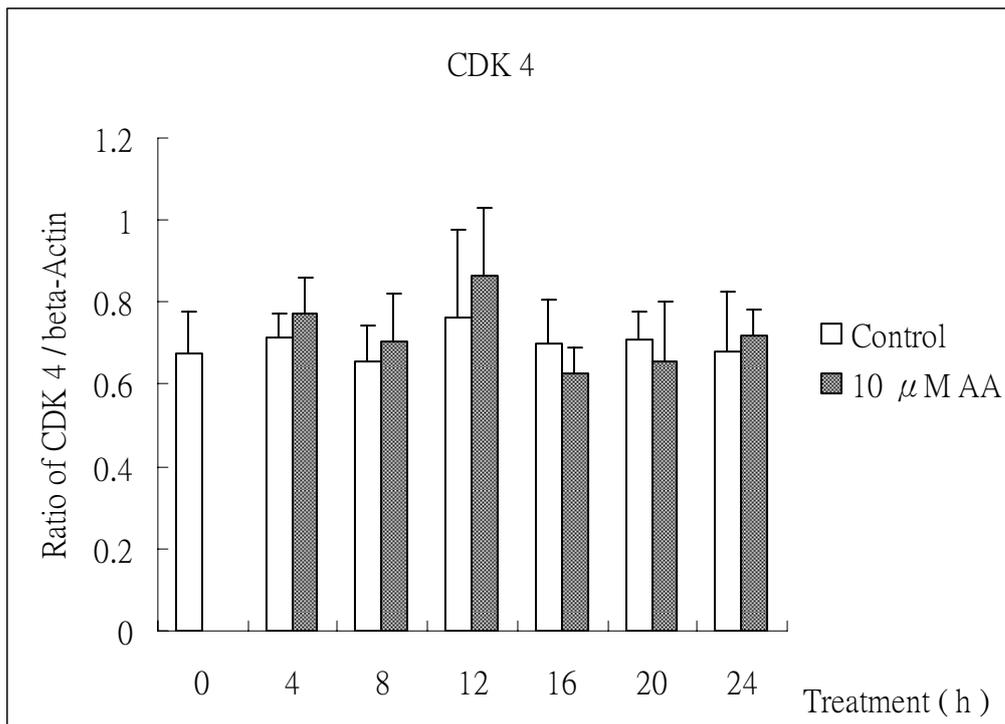
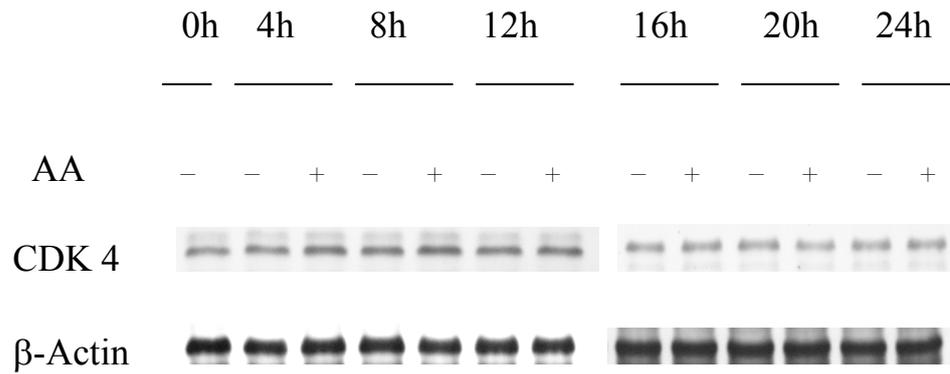
MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

CDK 4 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



圖十八：AA 對 MCF-7 細胞 CDK 4 蛋白質表現的影響

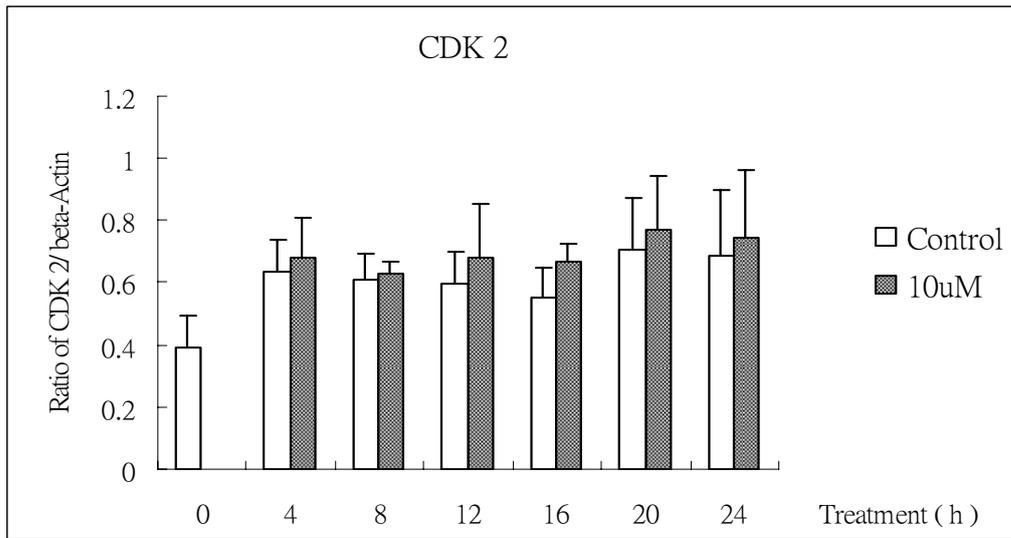
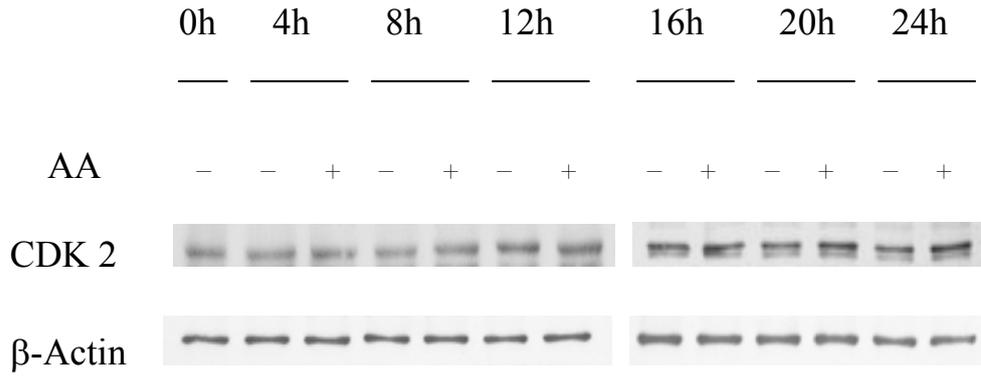
MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 CDK 4 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖十九：AA 對 BT-474 細胞 CDK4 蛋白質表現的影響

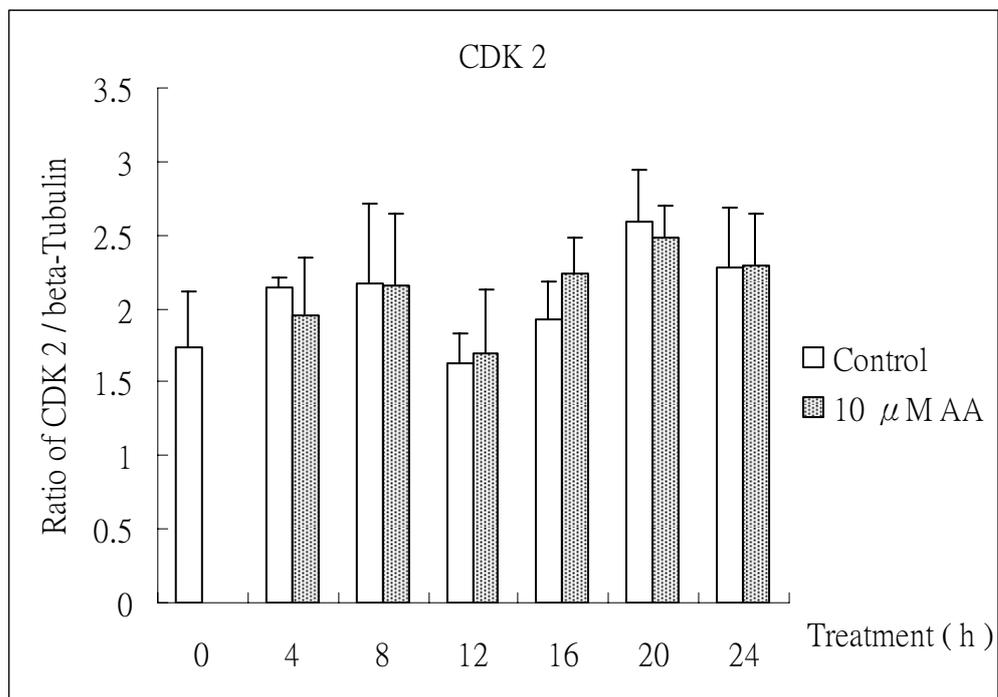
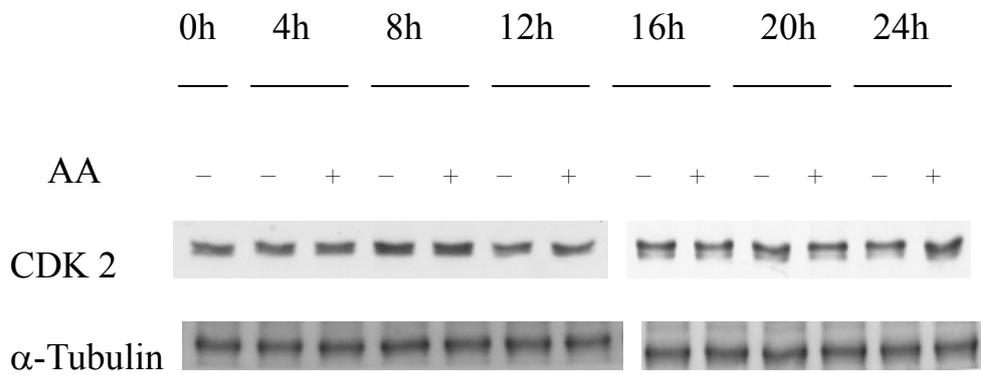
BT-474 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 CDK 2

蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖二十：AA 對 MDA-MB-231 細胞 CDK 2 蛋白質表現的影響

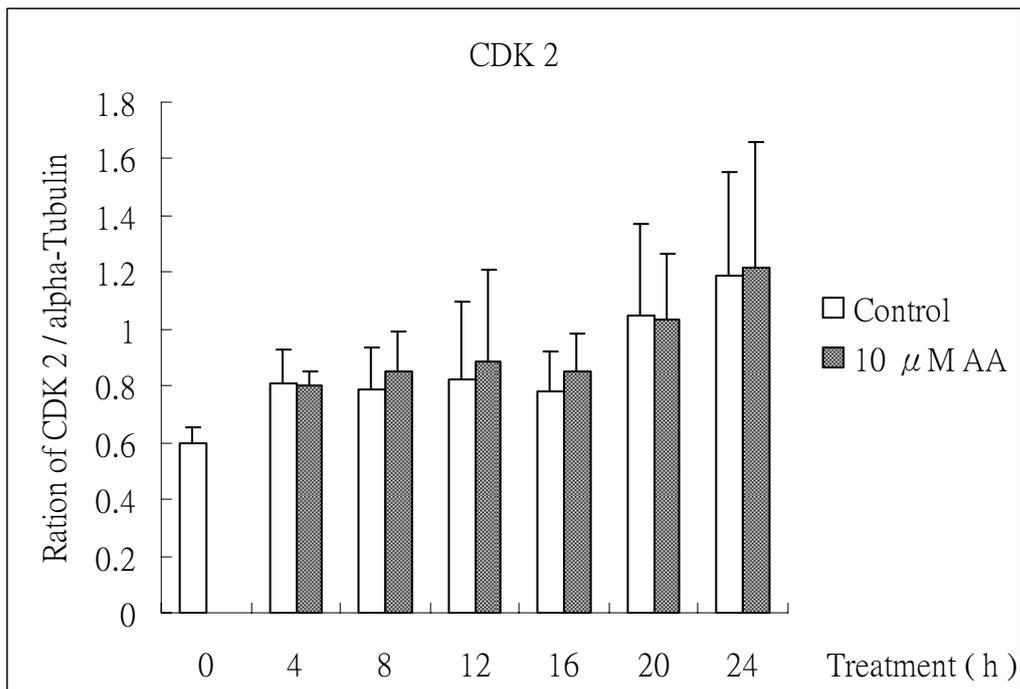
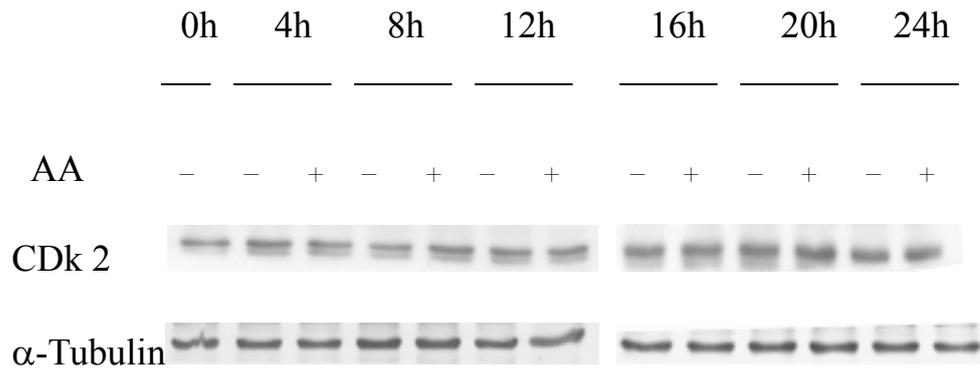
MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 CDK 2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



圖二十一：AA 對 MCF-7 細胞 CDK 2 蛋白質表現的影響

MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 CDK 2

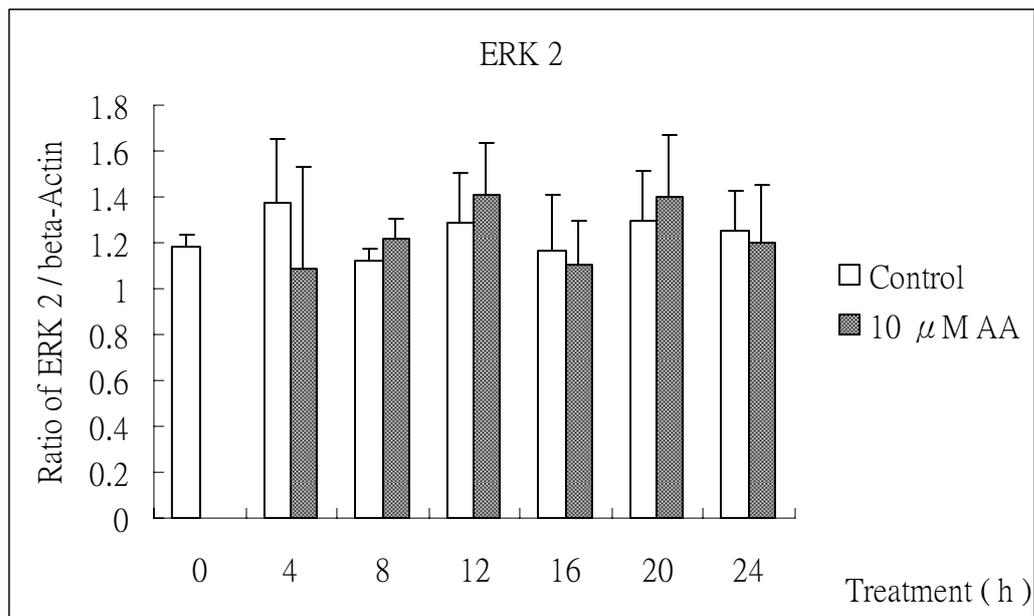
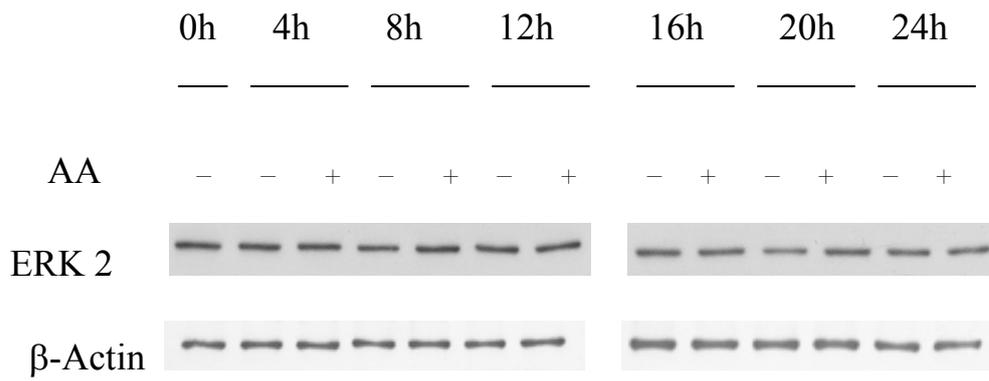
蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖二十二：AA 對 BT-474 細胞 CDK 2 蛋白質表現的影響

BT-474 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 CDK 2

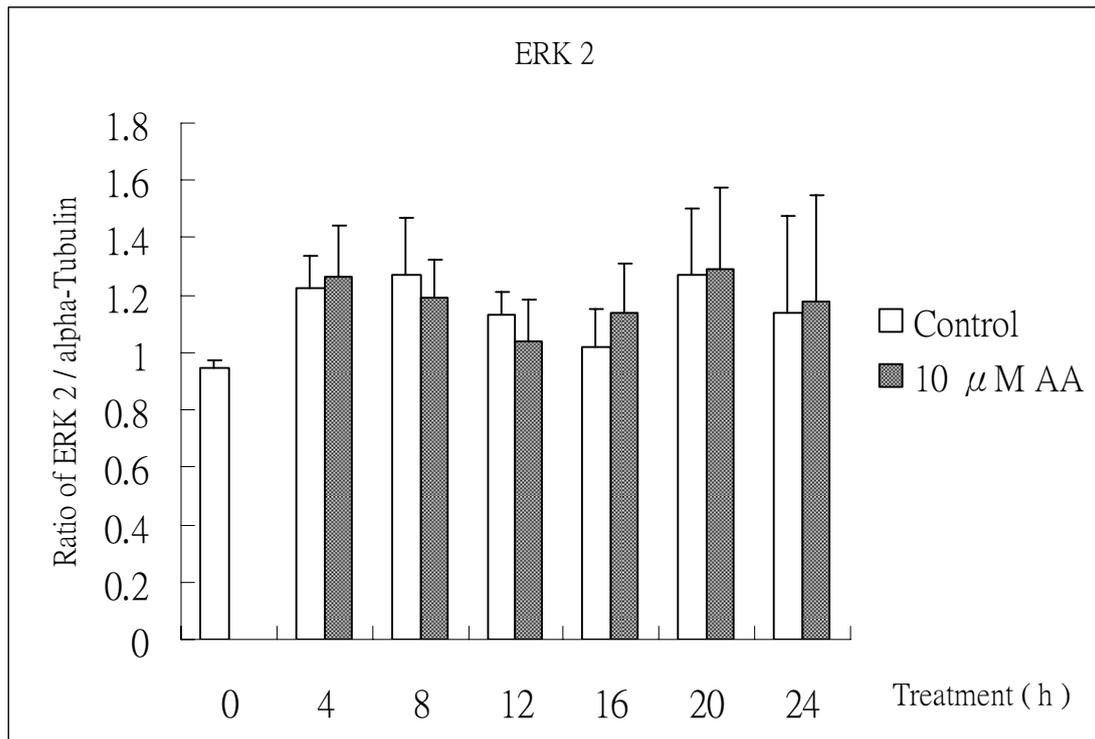
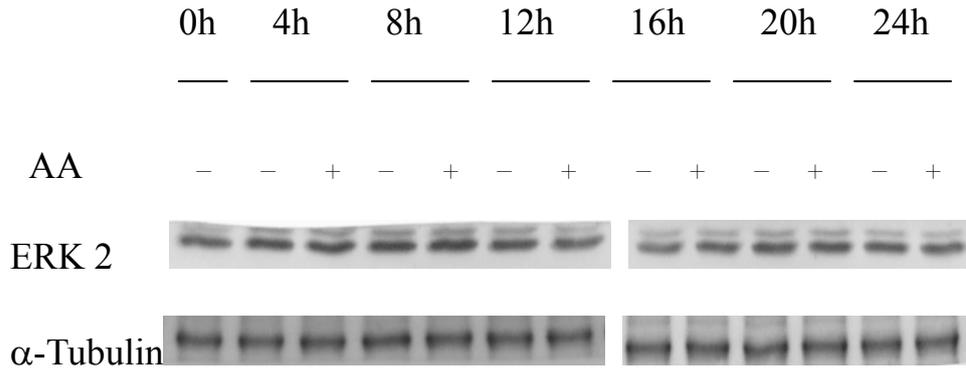
蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖二十三：AA 對 MDA-MB-231 細胞 ERK 2 蛋白質表現的影響

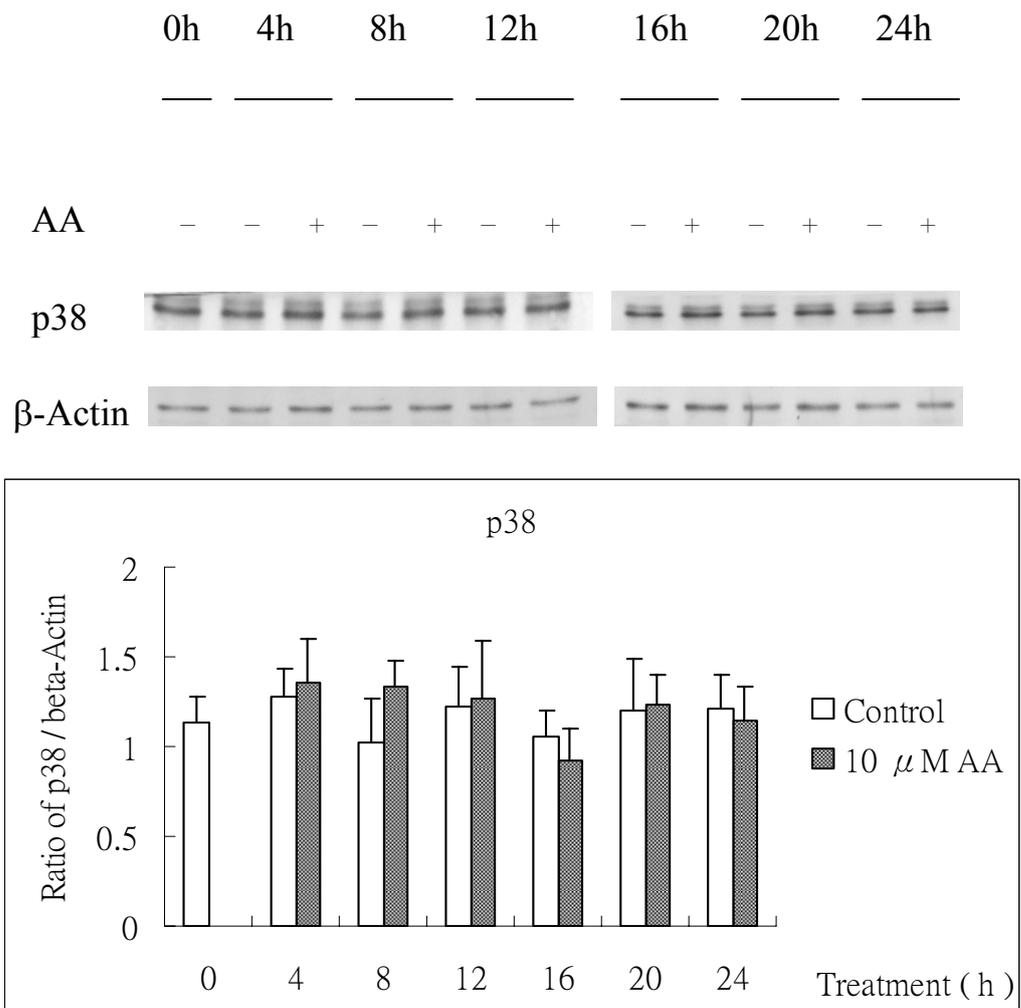
MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

ERK 2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



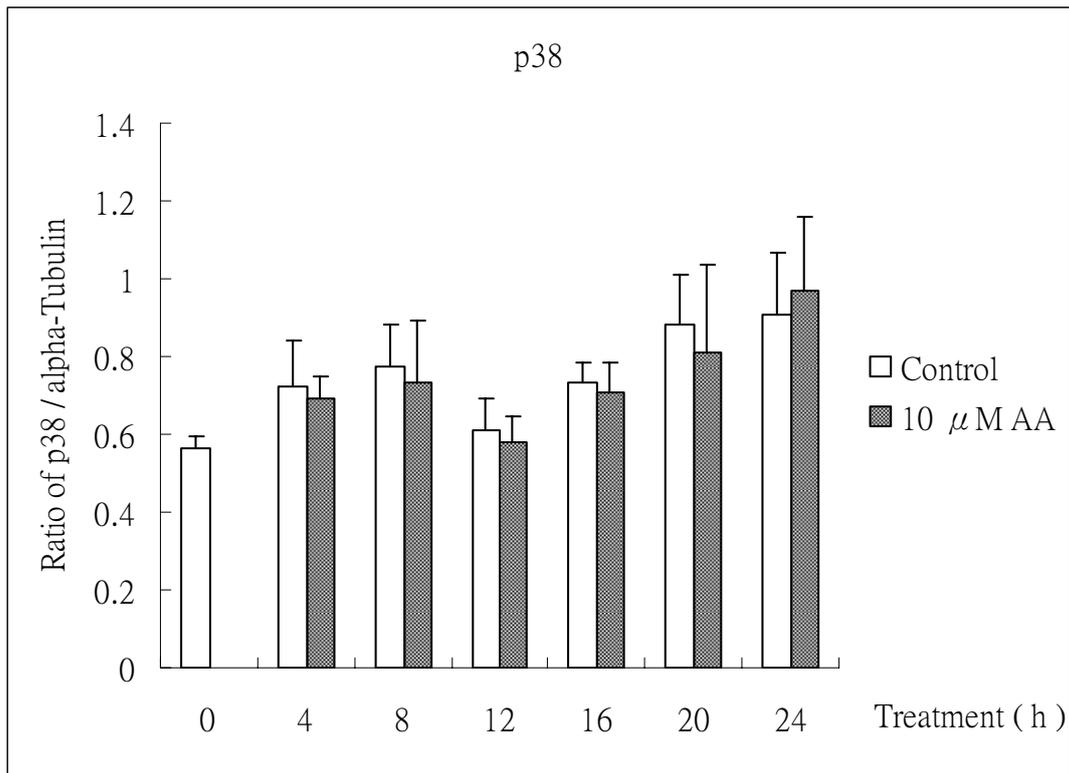
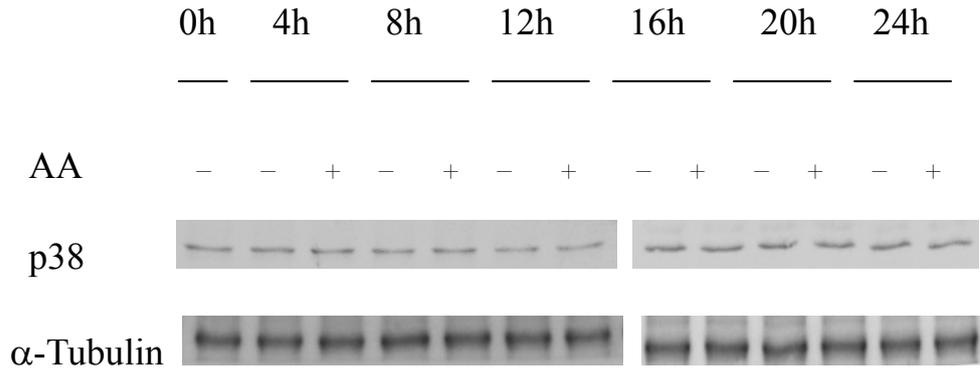
圖二十四：AA 對 MCF-7 細胞 ERK 2 蛋白質表現的影響

MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 ERK 2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



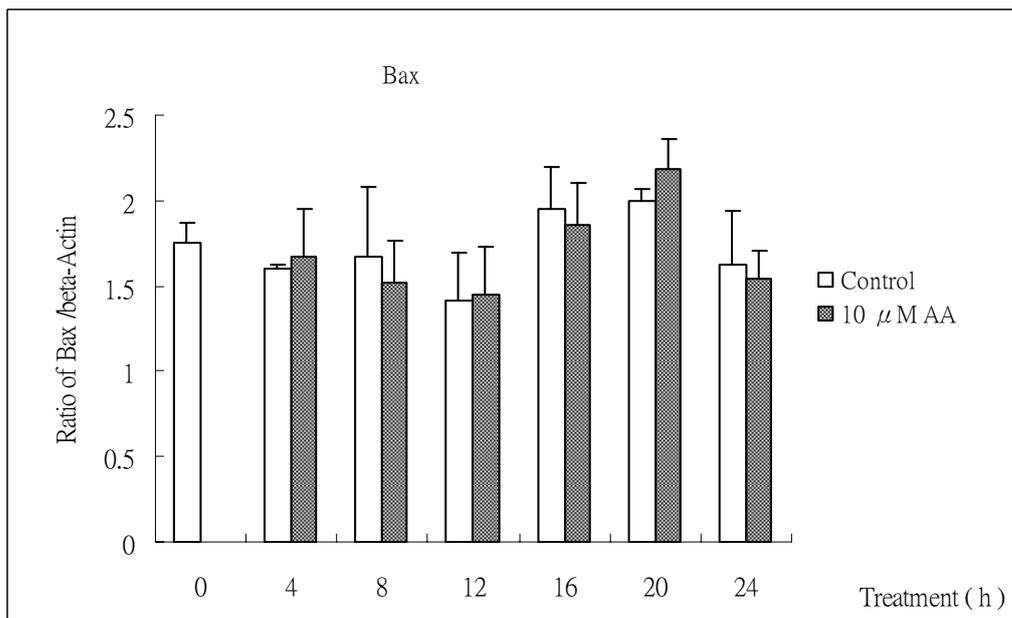
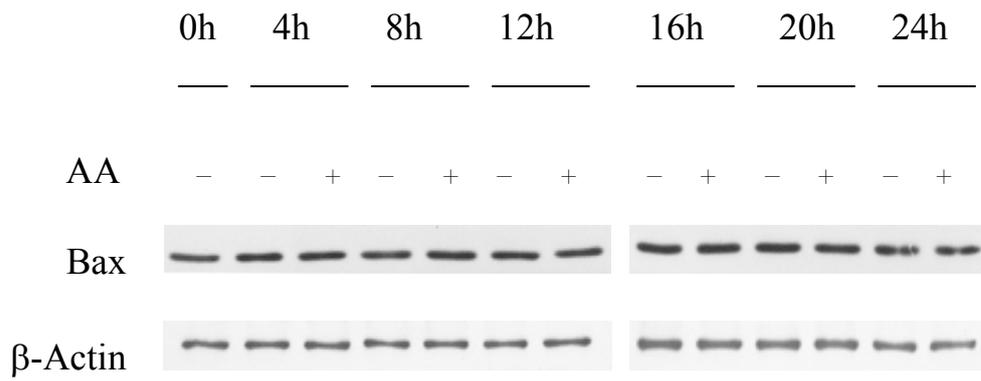
圖二十五：AA 對 MDA-MB-231 細胞 p38 蛋白質表現的影響

MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 p38 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



圖二十六：AA 對 MCF-7 細胞 p38 蛋白質表現的影響

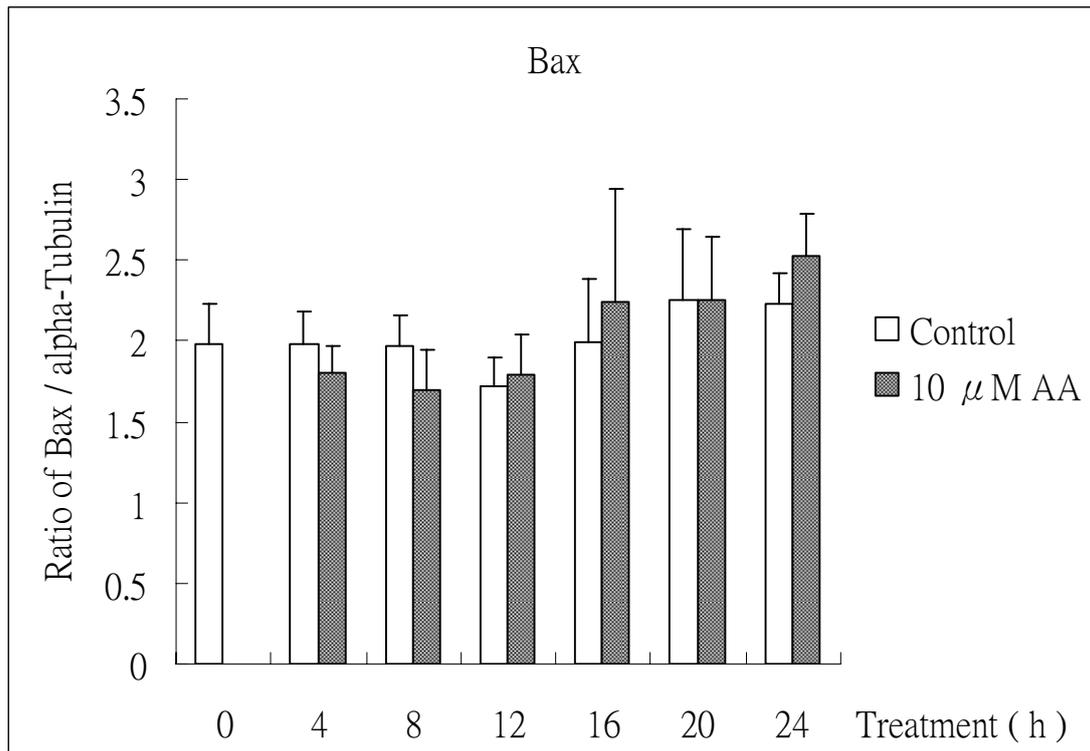
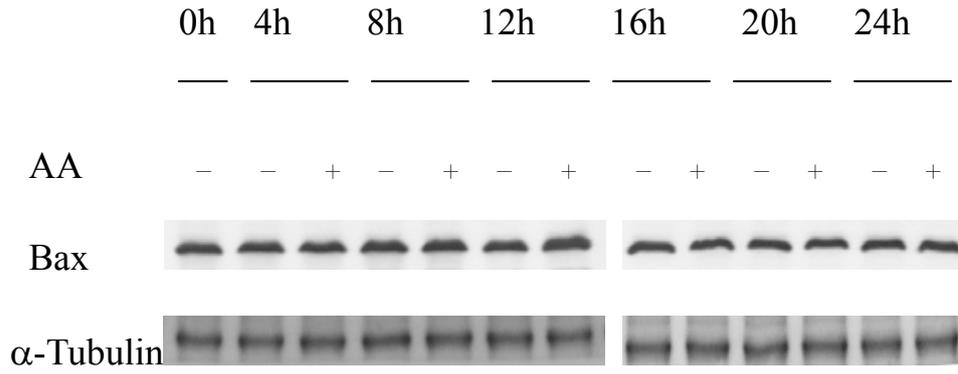
MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 p38 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖二十七：AA 對 MDA-MB-231 細胞 Bax 蛋白質表現的影響

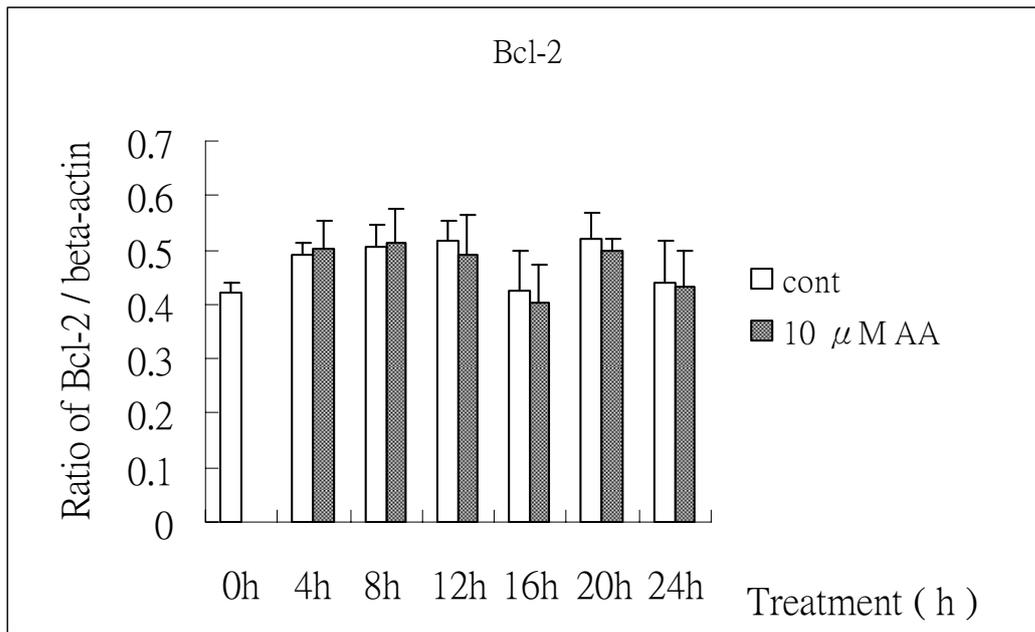
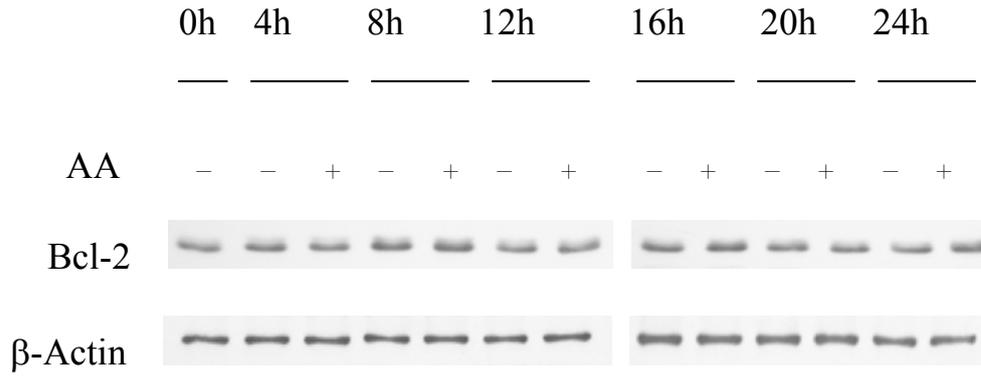
MDA-MB-231 細胞以 10 μM AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

Bax 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值±標準差來表示。



圖二十八：AA 對 MCF-7 細胞 Bax 蛋白質表現的影響

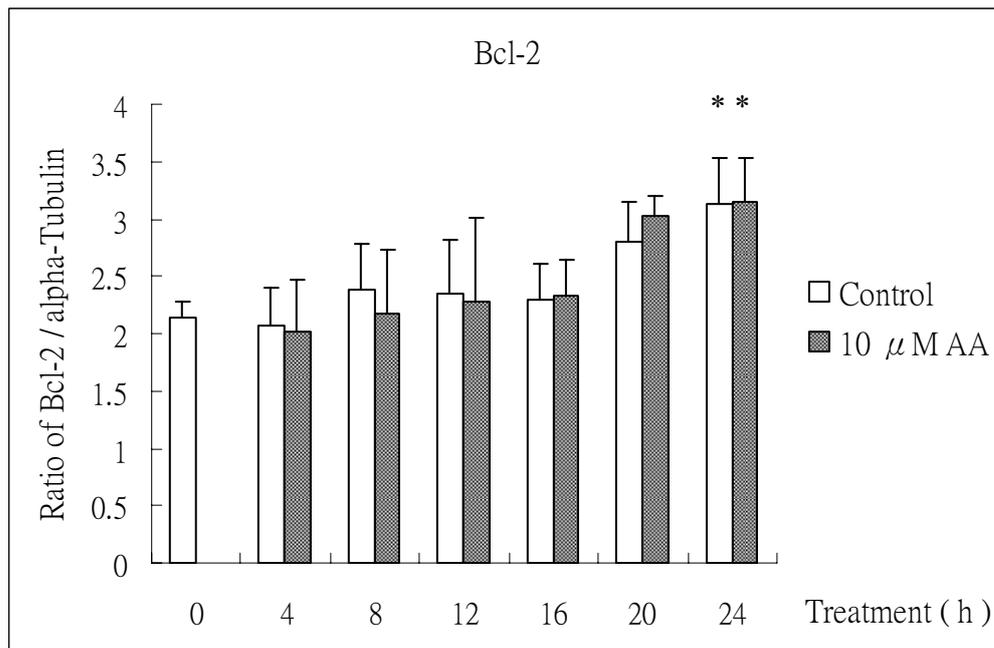
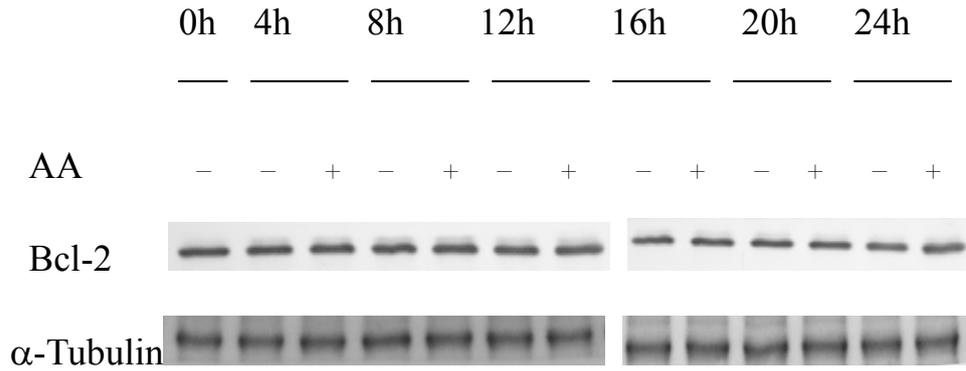
MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 Bax 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



圖二十九：AA 對 MDA-MB-231 細胞 Bcl-2 蛋白質表現的影響

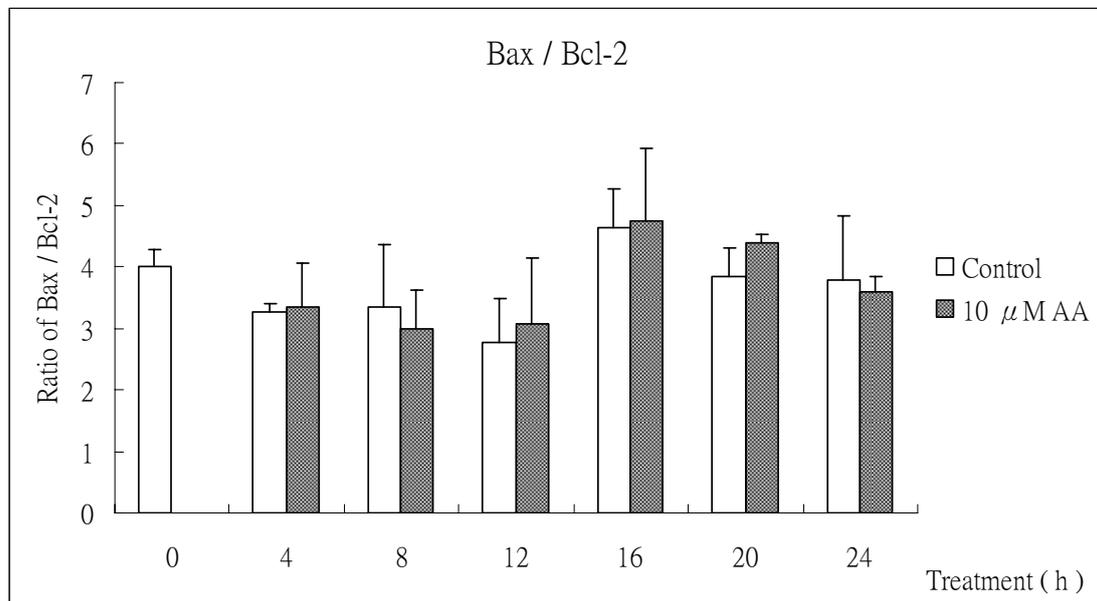
MDA-MB-231 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方墨點法分析

Bcl-2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。



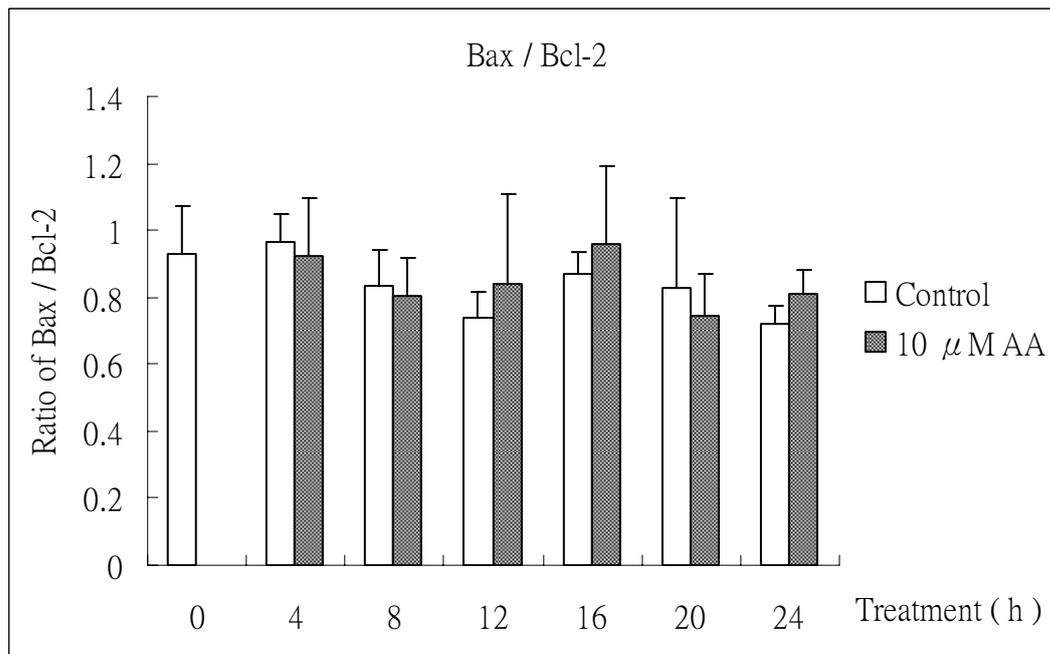
圖三十：AA 對 MCF-7 細胞 Bcl-2 蛋白質表現的影響

MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 Bcl-2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示。* : $p < 0.05$ ，表示經由不同的處理後在不同時間點，分別與處理 0 小時比較，在統計上具有顯著性的差異。



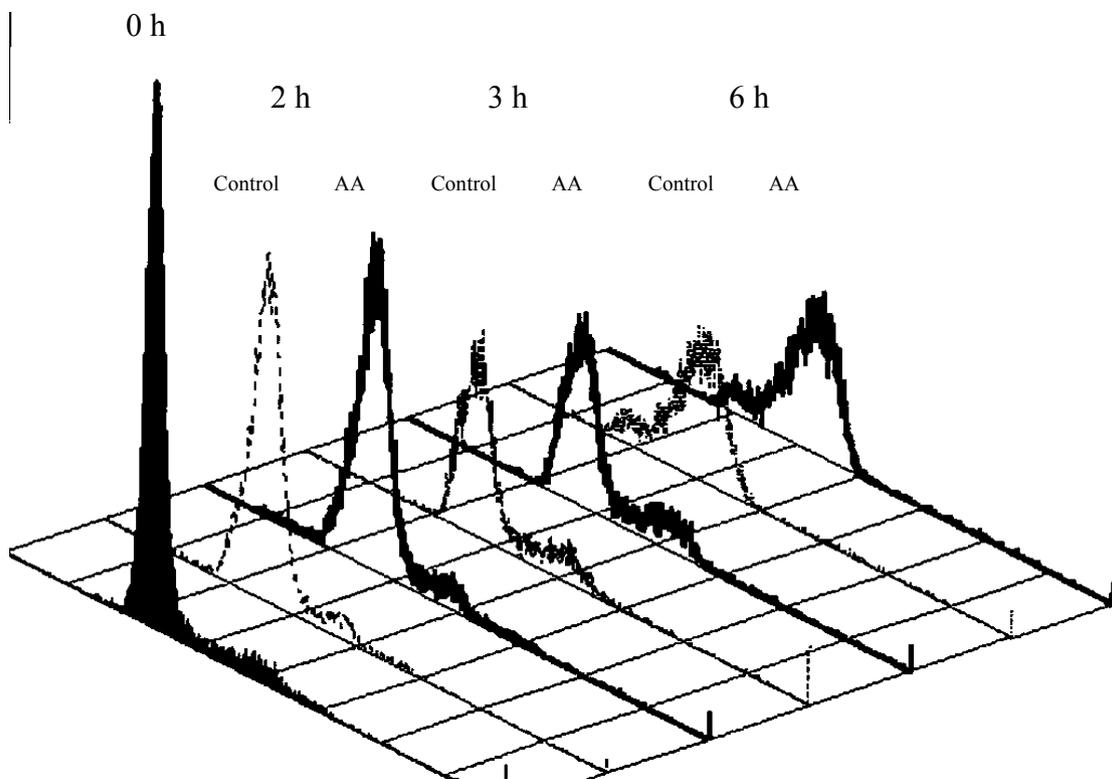
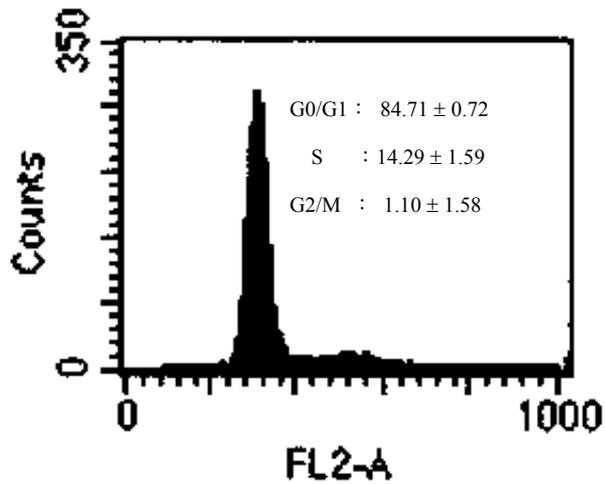
圖三十一：AA 對 MDA-MB-231 細胞中 Bax / Bcl-2 比值的影響

MDA-MB-231 細胞以 10 μM AA 處理不同時間後以西方墨點法分析 Bax 與 Bcl-2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值±標準差來表示。

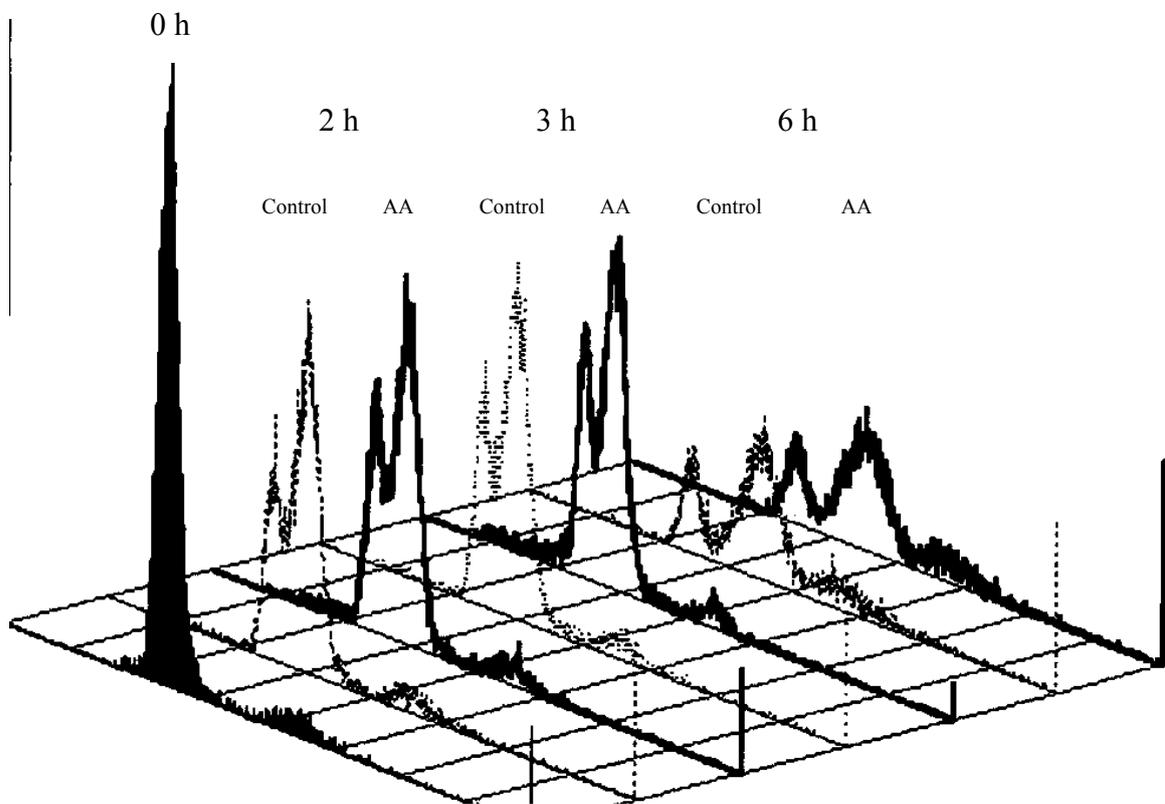
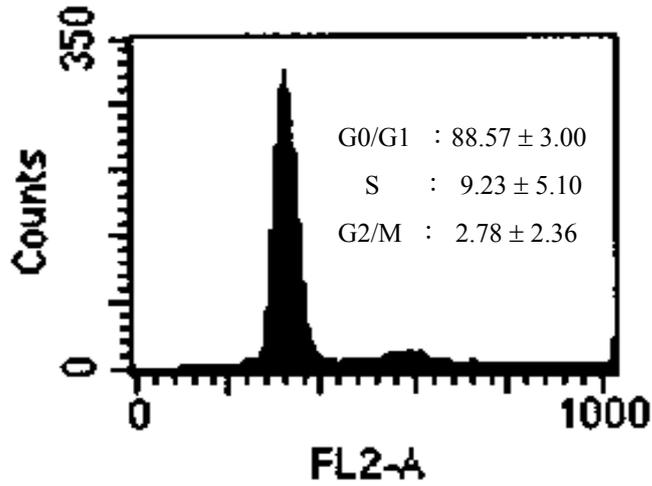


圖三十二：AA 對 MCF-7 細胞中 Bax / Bcl-2 比值的影響

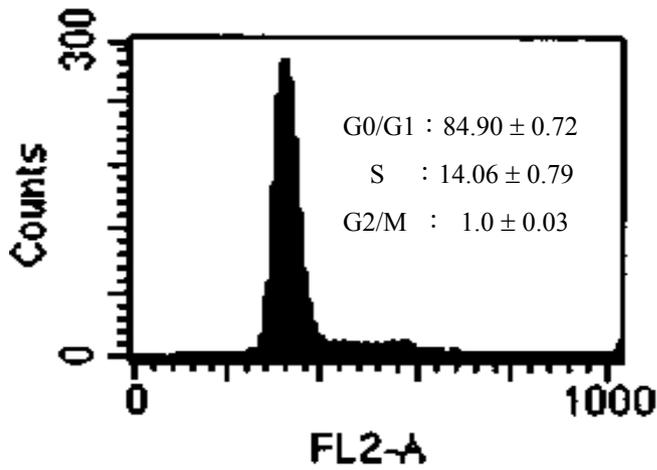
MCF-7 細胞以 10 μ M AA 處理不同時間後以西方點墨法分析 Bax 與 Bcl-2 蛋白質表現。三重覆實驗結果以平均值 \pm 標準差來表示



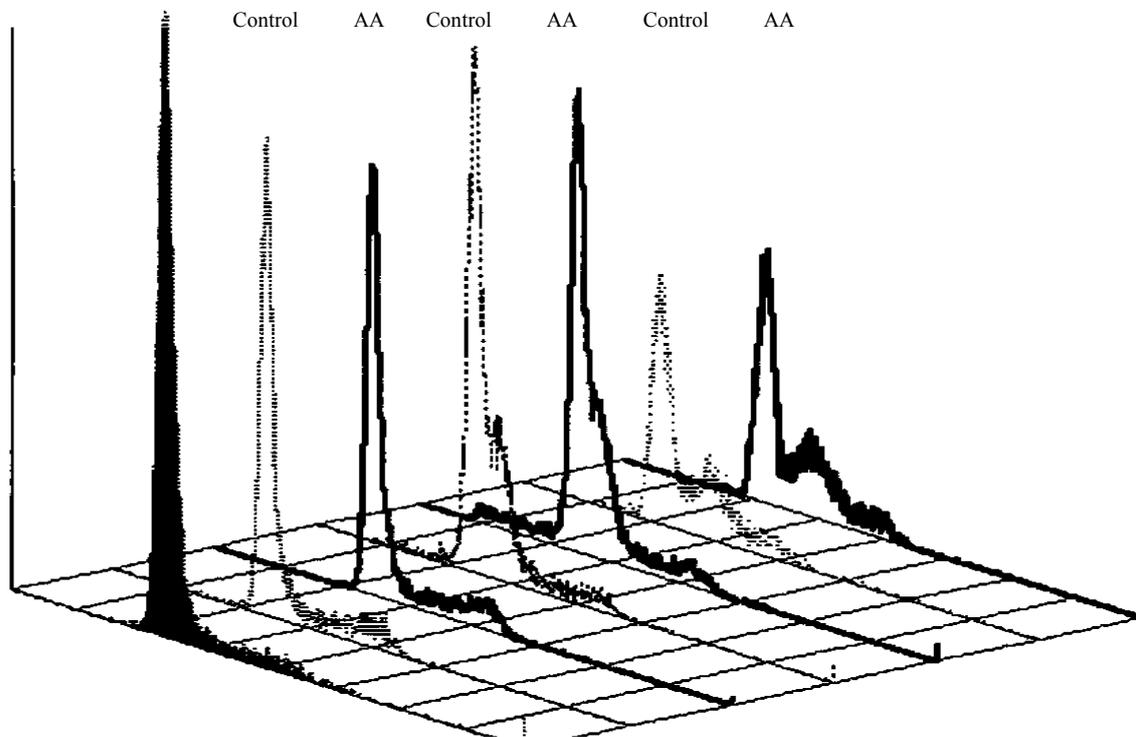
圖三十三：10 μM AA 對於經 hydroxyurea 處理的 MDA-MB-231 細胞之細胞週期影響。細胞貼附後 24 小時，以 2mM hydroxyurea 處理 15 小時，細胞經過清洗後，換成含 1% FBS 的培養基，並以 10 μM AA 處理不同時間點後以流式細胞儀分析細胞週期之變化。重複三次，結果以平均值 \pm 標準差顯示。



圖三十四：10 μM AA 對於經 hydroxyurea 處理的 MCF-7 細胞之細胞週期影響。細胞貼附後 24 小時，以 2mM hydroxyurea 處理 15 小時，細胞經過清洗後，換成含 1% FBS 的培養基，並以 10 μM AA 處理不同時間點後以流式細胞儀分析細胞週期之變化。重複三次，結果以平均值 \pm 標準差顯示。



0 h 2 h 3 h 6 h



圖三十五：10 μ M AA 對於經 hydroxyurea 處理的 BT-474 細胞之細胞週期影響。細胞貼附後 24 小時，以 2mM hydroxyurea 處理 15 小時，細胞經過清洗後，換成含 1%FBS 的培養基，並以 10 μ M AA 處理不同時間點後以流式細胞儀分析細胞週期之變化。重複三次，結果以平均值 \pm 標準差顯示。

參考文獻

- 1 天主教聖馬爾定醫院-乳癌防治中心
<http://www.stm.org.tw/breast/p6.htm>
- 2 台灣癌症臨床研究發展基金會
http://www.vghtpe.gov.tw/%7Eetcfund/information/b_risk.htm
3. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? J Cell Mol Med 2005 ; 9 : 208-221
4. Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. Annu Rev Public Health 1996 ; 17: 47-67
5. Sunpaweravong S, Sunpaweravong P. Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer. Asian Journal of Surgery. 2005 ; 28 : 1-12
6. De Jong MM, Nolte IM, Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, de Vries EG. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. J Med Genet 2002 ; 39 : 225-242
7. Zhong Q, Chen C, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 Complex and the DNA Damage Response. Science 1999 ; 285 :

747-750

8. Ashok R, Venkitaraman. Breast cancer genes and DNA repair.
Science 1999 ; 286 : 1100-1102
9. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. Science. 1999 ; 286 : 1162-1166
10. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer.
Breast Cancer Res 2002 ; 4 : 23-40
11. Smith PD, Crossland S, Parker G, Osin P, Brooks L, Waller J, Philp E, Crompton MR, Gusterson BA, Allday MJ, Crook T. Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions.
Oncogene 1999 ; 18 : 2451-2459
12. Phillips KA, Nichol K, Ozcelik H, Knight J, Done SJ, Goodwin PJ, Andrulis IL. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. J Natl Cancer Inst 1999 ; 91:469-473
13. De Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Fourquet A, Soussi T.

- p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma.
J Natl Cancer Inst 1999 ; 91: 641-643
14. Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress response. Nature 2001 ; 411 : 969-974
15. Easton DF. The inherited component of cancer. Br. Med. Bull. 1994 ; 50 : 527-535
16. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem. 1998 ; 273:13375-13378
17. Mirza AM, Kohn AD, Roth RA, McMahon M. Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. Cell Growth Differ 2000 ; 11: 279-292
18. Bose S, Wang SI, Terry MB, Hibshoosh H, Parsons R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. Oncogene 1998 ; 17: 123-127
19. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, Komminoth P, Lees JA, Mulligan LM, Mutter GL, Eng C.

- Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999; 155: 1253-1260
20. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal replacement therapy: collaborative reanalysis of individual data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 100,411 women without breast cancer. *J Cell Mol Med* 1997 ; 350 : 1047–1059
21. Gould MN, Cathers LE, Moore CJ . Human breast cell- mediated mutagenesis of mammalian cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* 1982 ; 42 : 4619-4624,
22. Martin FL, Carmichael PL, Crofon-Sleigh C, Venitt S, Phillips DH, Grover PL. Genotoxicity of Human mammary lipid. *Cancer Res* 1996 ; 56: 5342-5346
23. Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999 ; 19 : 63–90
24. Potischman N, Weiss HA, Swanson CA, Coates RJ, Gammon MD, Malone KE, Brogan D, Stanford JL, Hoover RN, Brinton. LA diet during adolescence and risk of breast cancer among young women.

J Natl Cancer Inst ; 1998 : 90 : 226-33

25. Rose DP. Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am J Clin Nutr* 1997 ; 66 : 1513-1522
26. Noguchi M, Taniya T, Kumaki T, Ohta N, Kitagawa H, Kinoshita K, Earashi M, Yagasaki R, Minami M, Kawahara F, Tsuyama H, Miwa K. Dietary fat and breast cancer : a controversial issue. *Breast Cancer* 1997 ; 4 : 67-75
27. Lee MM, Lin SS. Dietary fat and breast cancer. *Annu. Rev. Nutr.* 2000 ; 20 : 221-248
28. Willett WC, Hunter DJ. Prospective studies of diet and breast cancer. *Cancer* 1994 ; 74 : 1085-1089
29. Rosner B, Gore R. Measurement error correction in nutritional epidemiology based on individual foods, with application to the relation of diet to breast cancer. *Am J Epidemiol* 2001 ; 154 : 827-835
30. Razanamahefa L, Prouff S, Bardon S. Stimulatory effect of arachidonic acid on T-47D human breast cancer cell growth is associated with enhancement of cyclin D1 mRNA expression. *Nutr Cancer* 2000 ; 38: 274-280

31. Reyes N, Reyes I, Tiwari R, Geliebter J. Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett* 2004 ; 209 : 25–35
32. Rose DP, Hatala MA, Connolly JM, Rayburn J. Effect of diets containing different levels of linoleic acid on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 4686-4689
33. Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Clarke R, Lippman M. High-fat diet during pregnancy increases breast cancer risk in rats. *J Natl Cancer Inst* 1996 ; 88 : 1821–1827
34. Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman M. A maternal diet high in n-6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci* 1997 ; 94 : 9372–9377
35. Rose DP, Connolly JM. Effects of dietary n-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastasis in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1993 ; 85 : 1743-1746
36. Terry PD, Rohan TE, Wolk A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other

hormone-related cancers : a review of the epidemiologic evidence.

Am J Clin Nutr 2003 ; 77 : 532–534

37. Ip C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n–3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. Am J Clin Nutr 1997 ; 66 : 1523–1529
38. Fay MP, Freedman LS, Clifford CK, Midthune DN. Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents : a review. Cancer Res 1997 ; 57 : 3979–3988
39. Hardy S, Langelier Y, Prentki M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. Cancer Res 2000 ; 60 : 6353-6358
40. Willett W. Lessons from dietary studies in adventists and questions for the future. Am J Clin Nutr 2003 ; 78 : 539–543
41. Caygill CPJ and Hill MJ. Fish, n-3 fatty acids and human colorectal and breast cancer. Eur J Cancer Prev 1995 ; 4 : 329-332
42. Barry M, Jasmine C, Ronald M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and β . Proc Natl Acad Sci 1997 ;

94 : 4312–4317

43. Bosgraa S, Mennesb W, Seinen W. Proceedings in uncovering the mechanism behind peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Toxicology* 2005 ; 206 : 309–323
44. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990 ; 347 : 645-650
45. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002 ; 53 : 409–435
46. Roberts RA, James NH, Hasmall SC, Holden PR, Lambe K, Macdonald N, West D, Woodyatt NJ, Whitcome D. Apoptosis and proliferation in nongenotoxic carcinogenesis : species differences and role of PPAR α . *Toxicol Lett* 2000 ; 112, 49–57
47. Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator- activated receptors : a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003 ; 71 : 1–22
48. Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B₄. *Int J Biochem Cell Biol* 1998 ; 30 : 173-178
49. Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Multiple expression

- control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 ; 93 : 99–105
50. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficient mice. *J Biol Chem* 2000 ; 272 : 27307–27312
51. Ammerschlaeger M, Beigel J, Klein KU, Mueller SO. Characterization of the species-specificity of peroxisome proliferators in rat and human hepatocytes. *Toxicol Sci* 2004 ; 78 : 229 – 240
52. Marsman DS, Goldsworthy TL, Popp JA. Contrasting hepatocyte peroxisome proliferation, lipofuscin accumulation and cell turnover for the hepatocarcinogens Wy-14,643 and clofibrac acid. *Carcinog* 1992 ; 13 : 1011–1017
53. 魏明鋒。乳癌病患之PPAR α 及ApoE基因的突變分析。中國醫藥大學醫學研究所碩士論文，92CMCH0534020
54. Fan, CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl- CoA oxidase : implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha

- natural ligand metabolism. J Biol Chem.1998 ; 273 : 15639–15645
55. Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, Lee WJ, Holman NA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. Peroxisome proliferators – activated receptor *a* in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Mol Carcinog 2002 ; 34 : 165–171
56. Roberts-Thomson SJ, Snyderwine EG. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in normal rat mammary gland and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced mammary gland tumors from rats fed high and low fat diets. Toxicol Lett 2000 ; 118 : 79-86
57. Marsman DS, Cattley RC, Conway JG, Popp JA. Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl) phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] - acetic acid (Wy-14,643) in rats. Cancer Res 1988 ; 48 : 6739–6744
58. Roberts-Thomson SJ. Peroxisome proliferator-activated receptors in tumorigenesis : targets of tumor promotion and treatment. Immunol Cell Biol 2000 ; 78 : 436-41
59. Tanaka K, Smith PF, Stromberg PC, Eydelloth RS, Herold EG,

- Grossman SJ, Frank JD, Hertzog PR, Soper KA, Keenan KP. Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Sprague-Dawley rats treated with tumorigenic doses of clofibrate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992 ; 116 : 71–77
60. Anderson SP, Yoon L, Richard EB, Dunn CS, Cattley RC, Corton JC. Delayed liver regeneration in peroxisome proliferators activated receptor- α -null mice. *Hepatology* 2002 ; 36, : 24-29
61. Lauber SN, Ali S, Gooderham NJ. The cooked food derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*] pyridine is a potent oestrogen : a mechanistic basis for its tissue-specific carcinogenicity. *Carcinog* 2004 ; 25 : 2509-2517.
62. Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, Kawamori T, Ishikawa F, Morotomi M, Sugie S, Toda T, Sugimura T, Wakabayashi K. Inhibitory effects of Bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinog* 2000 ; 21 : 937-941
63. Roberts RA. Evidence for cross talk between PPAR α and p38 MAP Kinase. *Toxicol Sci* 2002 ; 68 : 270–274

64. Gardner OS, Dewar BJ, Graves LM. Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands : an example of non-genomic signaling. *Mol Pharmacol.* 2005 ; [Epub ahead of print]
65. Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG, Meier CA. Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 10505–10510
66. Diradourian C, Girard J, Pegorier JP. Phosphorylation of PPARs : from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 2005 ; 87 : 33-38
67. Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E_2 -biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* 2004 ; 43 : 33–35
68. Shao J, Lee SB, Guo H, Evers BM, Sheng H. Prostaglandin E_2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 5218–5223
69. Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD. Tumor-induced regulation of

- suppressor macrophage nitric oxide and TNF- α production. Role of tumor-derived IL-10, TGF- β , and prostaglandin E₂. J Immunol 1995 ; 153: 1674-1686
70. Bosa CL, Richel DJ, Ritsema T, eppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. Int J Biochem Cell Biol 2004 ; 36 : 1187–1205
71. Kennett SB, Roberts JD, Olden K. Requirement of protein kinase C μ activation and calpain-mediated proteolysis for arachidonic acid-stimulated adhesion of MDA-MB-435 human mammary carcinoma cells to collagen type IV. J Biol Chem 2004 ; 279 : 3300–3307
72. Mounia A., Wu Y, Nathalie H, Alain I. Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA₂-IIA expression in alveolar macrophages through NF- κ B and PPAR γ -dependent pathways. Mol Pharmacol 2000 ; 61 : 786–794
73. Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Biochemistry. 1999 ; 38 : 185-190.
74. Marc L, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. Breast Cancer Res Treat 2004 ; 83:

249 – 289

75. Chujo H, Yamasaki M, Nou S, Koyanagi N, Tachibana H, Yamada K.
Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2003 ; 202 : 881-887
76. Pakala R, Pakala R, Sheng WL, Claude R. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid block serotonin-induced smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 ; 19 : 2316-2322
77. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-myc : more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2002 ; 2 : 764-776

作者簡歷

作者姓名：葉仲宜

出生日期：民國 68 年 11 月 7 日

出生地：台灣省高雄縣

學歷：中國醫藥大學營養學系

中國醫藥大學醫學研究所基礎組生化學科