

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

白藜蘆醇對子宮肌瘤生長之影響效應:體內及體外試驗(A09)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2629-B-038-002-
執行期間：103年08月01日至104年07月31日
執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：夏詩閔
共同主持人：吳啟豪、魏凌鴻
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳欣媛
碩士班研究生-兼任助理人員：鄭婷方
碩士班研究生-兼任助理人員：董彥廷
碩士班研究生-兼任助理人員：林俐均

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

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 27 日

中文摘要：子宮肌瘤為女性常見的良性子宮腫瘤，在台灣約有百分之二十五的女性罹患子宮肌瘤，症狀包含骨盆腔疼痛、貧血、陰道大量出血、流產及不孕等。目前認為子宮肌瘤主要由荷爾蒙、生長因子、平滑肌細胞過度增生和細胞外基質不正常堆積所造成。由於飲食中的植化素具有預防或治療疾病的功效，其中，白藜蘆醇可以預防心血管疾病、延長壽命、抗發炎和調節脂肪代謝，並且可預防及治療癌症，例如攝護腺癌、乳癌和肝癌等。因此本研究目的為：探討白藜蘆醇如何影響子宮肌瘤細胞之生長，藉由MTT試驗及細胞計數來分析細胞存活率、以顯微鏡觀察細胞、以流式細胞儀分析細胞週期和細胞凋亡分佈狀態、並分析與細胞凋亡相關蛋白質表現量，以及與細胞外基質相關mRNA和蛋白質表現量。結果發現：1. 白藜蘆醇能抑制ELT3和UtSMC細胞增生和影響細胞型態的改變，使細胞呈現破碎、萎縮和浮起的型態；2. 白藜蘆醇能使細胞週期停滯於S、G2/M期並且調控與細胞凋亡相關蛋白質表現量進而促使細胞凋亡；3. 白藜蘆醇亦影響細胞外基質相關mRNA與蛋白質的表現量。故白藜蘆醇透過抑制細胞增生、促使細胞週期停滯和細胞凋亡，以及影響細胞外基質相關mRNA與蛋白質的表現量抑制子宮肌瘤細胞之生長。

中文關鍵詞：白藜蘆醇、子宮肌瘤、細胞增生、細胞週期、細胞凋亡、細胞外基質

英文摘要：

英文關鍵詞：

白藜蘆醇對子宮肌瘤生長之影響效應:體內及體外試驗(A09)

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：103-2629-B-038 -002 -

執行期間：103 年 8 月 1 日至 104 年 7 月 31 日

執行機構及系所：臺北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：夏詩閔

共同主持人：謝宗明 吳啟豪 魏凌鴻

計畫參與人員：陳欣媛 董彥廷 林俐均 鄭婷方

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 一 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 104 年 10 月 15 日

中文摘要

子宮肌瘤為女性常見的良性子宮腫瘤，在台灣約有百分之二十五的女性罹患子宮肌瘤，症狀包含骨盆腔疼痛、貧血、陰道大量出血、流產及不孕等。目前認為子宮肌瘤主要由荷爾蒙、生長因子、平滑肌細胞過度增生和細胞外基質不正常堆積所造成。由於飲食中的植化素具有預防或治療疾病的功效，其中，白藜蘆醇可以預防心血管疾病、延長壽命、抗發炎和調節脂肪代謝，並且可預防及治療癌症，例如攝護腺癌、乳癌和肝癌等。因此本研究目的為：探討白藜蘆醇如何影響子宮肌瘤細胞之生長，藉由 MTT 試驗及細胞計數來分析細胞存活率、以顯微鏡觀察細胞、以流式細胞儀分析細胞週期和細胞凋亡分佈狀態、並分析與細胞凋亡相關蛋白質表現量，以及與細胞外基質相關 mRNA 和蛋白質表現量。結果發現：1. 白藜蘆醇能抑制 ELT3 和 UtSMC 細胞增生和影響細胞型態的改變，使細胞呈現破碎、萎縮和浮起的型態；2. 白藜蘆醇能使細胞週期停滯於 S、G2/M 期並且調控與細胞凋亡相關蛋白質表現量進而促使細胞凋亡；3. 白藜蘆醇亦影響細胞外基質相關 mRNA 與蛋白質的表現量。故白藜蘆醇透過抑制細胞增生、促使細胞週期停滯和細胞凋亡，以及影響細胞外基質相關 mRNA 與蛋白質的表現量抑制子宮肌瘤細胞之生長。

關鍵字：白藜蘆醇、子宮肌瘤、細胞增生、細胞週期、細胞凋亡、細胞外基質

Abstract

Uterine fibroids (leiomyoma) are the most common benign tumors in women during their reproductive years. In Taiwan, about 25 % of women have uterine fibroids. The lesions cause uterine dysfunction and multiple symptoms including pelvic pain, excessive vaginal bleeding, anemia, miscarriage and infertility. Steroid hormones, growth factors, uterine smooth muscle cells hyperplasia and abnormal deposition of extracellular matrix (ECM) cause the growth of uterine fibroids. Dietary phytochemicals can prevent or treat some diseases, which found that resveratrol can prevent cardiovascular disease (CVD), prolong life, anti-inflammation, regulate fat metabolism, and anti-cancer such as prostate cancer, breast cancer and liver cancer. The purpose of this study is to understand the effect of resveratrol on the growth of uterine fibroids. The cell viability was measured with MTT assay and cell counting. The change of cell morphology was observed by microscopy. The cell cycle and cell apoptosis were analyzed with flow cytometry. The ECM associated mRNA expression was detected by q-PCR. The cell apoptosis associated and ECM associated protein expressions were evaluated with western blot and Immunocytochemistry. We found that (1) Resveratrol inhibited ELT3 and UtSMC cell proliferation and affected the cell morphology. Cells became broken, atrophy and floated. (2) Resveratrol induced cell cycle arrest at S and G2/M phase. It also regulated cell apoptosis associated protein expression and induced cell apoptosis. (3) Resveratrol affected ECM associated mRNA and protein expression. In summary, resveratrol can inhibit the growth of uterine fibroids via anti-proliferation, cell cycle arrest, cell apoptosis, regulating cell apoptosis-associated protein expression and ECM associated mRNA and protein expression.

Keywords: resveratrol, uterine fibroids, cell proliferation, cell cycle, cell apoptosis, extracellular matrix

前言

子宮肌瘤 (Uterine fibroids, leiomyoma) 為最常見的良性子宮腫瘤，根據統計數據，子宮肌瘤好發於具有生育能力的女性，占百分之四十以上 (Catherino and Malik, 2007)，還有根據美國先前研究顯示白種人與黑種人約有 70~80 % 的盛行率 (Baird et al., 2003)，而非裔美洲女性的罹患率比白種人女性高出三至四倍 (Baird and Dunson, 2003)。在台灣，則有百分之二十五的女性罹患子宮肌瘤 (衛生福利部)。目前治療子宮肌瘤方法包含藥物療法，例如：促性腺釋放刺激素類似物 (GnRH analogues)、黃體素接受器拮抗劑 (mifepristone)、選擇性黃體素調節劑 (ulipristal)；子宮動脈栓塞術 (uterine artery embolization, UAE)；以及目前主要療法：手術，像是子宮切除、肌瘤切除。目前缺乏長期、非侵略性以及有效的療法，因此近年來的研究中發現維生素 D (Halder et al., 2013) 和綠茶萃取物 (Roshdy et al., 2013) 可以有效地抑制子宮肌瘤細胞的增生，並可作為未來的新療法。此外，飲食中含有許多的植化素，像是大蒜、十字花科蔬菜、茄紅素以及白藜蘆醇等，具有抗發炎、抗纖維化、抑制細胞增生以及血管新生的功能 (Islam et al., 2014)，其中白藜蘆醇為非黃酮類多酚化合物，來源為葡萄、花生及漿果類等，在先前研究中發現具有抗氧化、抗發炎、保護心血管功能、植物性雌激素活性以及對抗癌症，但目前尚未有白藜蘆醇與子宮肌瘤的相關文獻，因此本研究為探討白藜蘆醇對子宮肌瘤細胞的影響。

實驗架構

本篇研究欲探討白藜蘆醇對於子宮肌瘤細胞的效應，故本篇研究假說為給予兩株細胞 (ELT3 和 UtSMC) 不同濃度 (0、10、25、50、75、100 μ M) 的白藜蘆醇，探討是否透過細胞增生的抑制、促使細胞週期停滯和細胞凋亡以及減少細胞外基質的堆積來影響子宮肌瘤的生成 (圖 1)。

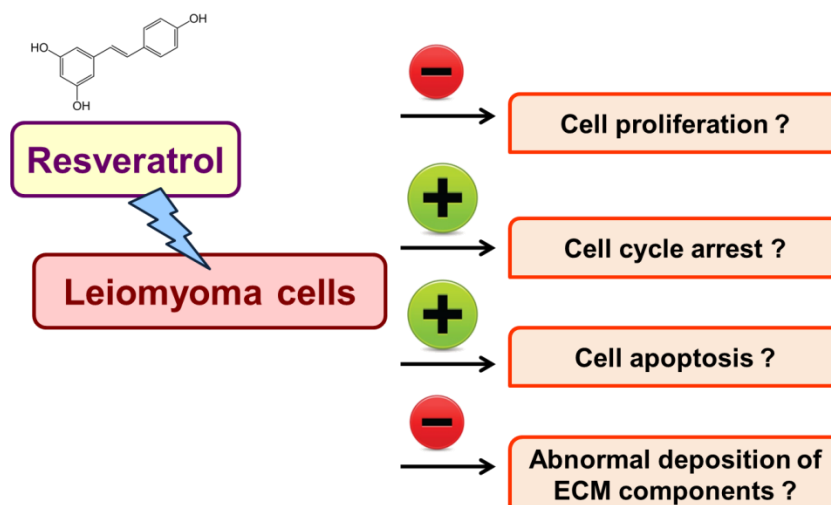


圖 1、實驗架構。

材料與方法

一、子宮肌瘤細胞株及培養方法

本實驗所用之細胞株為兩株，一株為子宮肌瘤細胞 ELT3，由臺大腫瘤醫學部魏凌鴻醫師所提供，而另一株為正常子宮平滑肌細胞 UtSMC，購買自廠商 (PromoCell)。ELT3 與 UtSMC 培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) 培養基，且均含有 10 % 胎牛血清。細胞培養於 37°C、5 % CO₂ + 95 % 大氣培養箱。每兩天更換一次培養基。

二、藥物製備

本研究所使用的白藜蘆醇是購買自日本東京化成工業株式會社，所購買的白藜蘆醇為粉末狀，再以 DMSO 作為溶劑並配製 stock solution，濃度為 100 mM。實驗中給予細胞白藜蘆醇的濃度是由 stock solution 以培養基稀釋至最終濃度。

三、細胞存活率分析法—MTT assay

將細胞種於 96 孔盤 (ELT3: 3000/well; UtSMC: 5000/well)，培養 24 小時後，給予不同濃度的白藜蘆醇 (購買自日本東京化成工業株式會社) 分別為 0、10、25、50、75、100 μ M，培養液為 DMEM/F12 + 10 % FBS，於 24、48、72、96 小時，移除培養液再加入每 well 100 μ L MTT solution (1 mg/mL)，置於培養箱 3 小時，移除 MTT solution 再加入 100 μ L DMSO，15 分鐘後，使用 ELISA reader 波長為 570 nm (測定值) 和 630 nm (參考值) 測量 OD 值，分析白藜蘆醇對於細胞存活率的影響。

四、細胞型態觀察

將細胞種於 6 孔盤，24 小時後，給予不同濃度 (0、10、25、50、75、100 μ M) 的白藜蘆醇，培養液為 DMEM/F12 + 10 % FBS，經過 24 和 48 小時後，使用倒立式顯微鏡進行拍照及分析。

五、細胞計數

將細胞種於 6 孔盤，24 小時後，給予不同濃度 (0、10、25、50、75、100 μ M) 的白藜蘆醇，經過 24、48 小時，將 6 孔盤中的細胞，分別使用 trypsin 分離細胞，離心後以 500 μ L 回溶，再各吸取 20 μ L 置於 eppendorf 中，各取得兩管細胞，分別加入不同試劑 (AccuStain Solution T、AccuStain Solution N)，液體與試劑均勻混合，再各別吸取 20 μ L 至計數板上並使用 ADAM 全自動細胞計數儀器計數細胞。

六、細胞週期分析

將細胞種於 10 公分培養皿中，24 小時後，給予不同濃度 (0、10、50 μ M) 的白藜蘆醇，經過 48 小時，將 10 公分盤養皿中的細胞，分別使用 trypsin 分離細胞，以 500 g、5 分鐘離心兩次，抽離上清液，使用 70 % ethanol 將底層的細胞固定並保存於 -20°C。操作當天，以離心方式將 ethanol 去除，加入 300 ~ 500 μ L PI solution (0.1 % Triton X-100、DNase-free RNase A、PI、1 X PBS)，反應 30 分鐘後，過篩並操作且獲取資料，之後以 CellQuest 軟體分析資料。

七、細胞凋亡分析

將細胞種於 10 公分盤養皿中，24 小時後，給予不同濃度 (0、10、50 μ M) 的白藜蘆醇，經過 48 小時，將 10 公分培養皿中的細胞，分別使用 trypsin 分離細胞，以 500 g、5 分鐘離心兩次，抽離上清液，使用 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) 反應 15 分鐘後，過篩並操作且獲取數據，之後以 CellQuest 軟體分析數據。

八、即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction, q-PCR)

使用 Direct-zol™ RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH) 萃取細胞 RNA，細胞經過白藜蘆醇處理，以 TRI Reagent® 收集特定時間點的 RNA。再進行 RNA 純化，以體積 1 : 1 與 95-100 % 酒精均勻混合，加入於 Zymo-Spin™ IIC Column，以 12000 xg 離心 1 分鐘，收集於 Collection Tube 並移除 Collection Tube 的液體。加入 400 μ L Direct-zol™ RNA PreWash，以 12000 xg 離心 1 分鐘，收集於 Collection Tube 並移除 Collection Tube 的液體。加入 700 μ L RNA Wash Buffer，以 12000 xg 離心 1 分鐘，並收集於 Collection Tube 並移除 Collection Tube 的液體，再以 12000 xg 離心 2 分鐘。加入 50 μ L DNase/RNase-Free Water 收集於 RNase/RNase-Free Tube，可保存於 -80 °C。取 1 μ L RNA sample 加入 9 μ L DNase/RNase-Free Water，利用 spectrophotometer 定量 RNA，波長為 260 和 280 nm。使用 RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) 合成 cDNA，每一樣品取 500 ng 的 RNA，加入 1 μ L oligo (dT)18 primer 並以 nuclease-free water 補至 12 μ L，均勻混合並離心，在 65 °C 下反應 5 分鐘並以冰冷卻。再加入 4 μ L 5X Reaction Buffer、1 μ L RiboLock RNase Inhibitor、2 μ L 10 mM dNTP Mix、1 μ L RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase，均勻混合並離心，於 42 °C 反應 60 分鐘，再於 70 °C 反應 5 分鐘，短期保存可保存於 -20°C，若長期保存則保存於 -80°C。取 4.6 μ L 的 cDNA 加入 5 μ L 2X iQ™ SYBR® Green supermix 和 0.2 μ L forward and reverse primers (200 nM each)，使用 CFX Connect™ Real-Time PCR

Detection System (Bio-rad)進行 Q-PCR。溫度設定為：initial denaturation and enzyme activation 95 °C 3 分鐘；denaturing 95°C 15 秒、annealing and extension 60 °C 30 秒，循環 45 次；melt curve 55-95 °C (in 0.5 °C increments) 30 秒。

九、西方墨點法

細胞經過白藜蘆醇處理，收集特定時間點的蛋白質，加入 100~200 μ L 蛋白質萃取液 (RIPA buffer)，並含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑 (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, 100X)，加入後每 10 分鐘震盪一次，30 分鐘後以 12000xg、20 分鐘離心，細胞碎片與上清液分離，收集上清液並進行蛋白質定量。將膠片裝在電泳槽中並加入電泳緩衝液 (1 X running buffer)，取 40 μ g 的蛋白質，以電壓 50 V 進行電泳，完畢後，從玻璃上取下膠並浸泡於轉漬緩衝液 (1X transfer buffer)，membrane (PVDF 膜)浸泡於甲醇 (methanol) 1 至 2 分鐘，活化 membrane 上的官能基，濾紙浸泡於 1X transfer buffer，轉漬重疊順序為纖維網 → 濾紙 → 膠 → membrane → 濾紙 → 纖維網 (由下至上)，放入全濕式電泳轉漬槽進行轉漬。轉漬結束後，拿出 membrane，剪裁需要的分子量，然後加入 blocking buffer (含 5 % 脫脂奶粉的 1X TBST)在室溫下作用 1 小時。Blocking 結束後，以 1 X TBST 沖洗 3 次各 10 分鐘，接著加入一級抗體，依照不同抗體的需求比例配製，於 4°C 並放至隔夜。先以 1 X TBST 沖洗 3 次各 10 分鐘，再加入適合的二級抗體，在室溫下作用 1.5 小時。以 1 X TBST 沖洗 3 次各 10 分鐘，再加入 Enhanced chemiluminescence (ECL)試劑，含 A、B 兩液以 1:1 均勻混合，反應約 2 分鐘，並上下左右搖擺使液體均勻蓋過 membrane，至暗房將 membrane 置於 X 光片下曝光，再以顯影劑與定影劑完成，之後使用 Image J 軟體定量分析。

十、細胞免疫螢光染色

將 0.17 mm 玻片置 6 孔盤底部，再將細胞種於 6 孔盤，24 小時後，給予不同濃度 (0、10、50 μ M)的白藜蘆醇，經 48 小時後，以 PBS 沖洗，再使用 4 % 福馬林固定細胞，然後用 5 % BSA blocking 1 小時，再加入 1 抗，置於 4°C 並放至隔夜。以 1X TBST 沖洗，再加 2 抗，置於室溫 1~2 小時，再加入 ProLong® Gold Antifade Mountant 並製成完整的玻片，隔日使用 EVOS® 細胞影像系統進行影像分析。

十一、統計分析

本研究數據皆以平均值±標準差 (Mean \pm SD)表示。使用 sigmaplot 軟體進行數據分析，以 Student's t test 分析兩組間的差異性，若 $p < 0.05$ 為顯著性差異。

結果

一、白藜蘆醇對於子宮肌瘤細胞 (ELT3)和正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之增生影響

圖 2 為給予 ELT3 和 UtSMC 細胞 0、10、25、50、75、100 μM 白藜蘆醇，經過 24、48、72 和 96 小時藉由 MTT assay 分析細胞存活率，了解白藜蘆醇對於細胞增生的影響。由結果可知，不論是 ELT3 與 UtSMC，給予越高濃度的白藜蘆醇，其 OD 值越小，表示細胞數越少。在 24 小時，兩株細胞皆給予白藜蘆醇 50 μM 其 OD 值比控制組較低並有顯著差異。對於 ELT3 在 48、72 和 96 小時，濃度 10 μM 以上比控制組低且有顯著差異，而 UtSMC 則是給予 25 μM 以上。因此，白藜蘆醇可以抑制 ELT3 與 UtSMC 細胞增生。

二、白藜蘆醇對於子宮肌瘤細胞 (ELT3)和正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之細胞型態影響

圖 3 為給予 ELT3 與 UtSMC 細胞 0、10、25、50、75、100 μM 白藜蘆醇，經過 24、48 小時，使用顯微鏡觀察細胞型態，了解白藜蘆醇是否對細胞型態造成影響。由圖可發現給予細胞越高濃度的白藜蘆醇，會促使細胞數目減少趨勢，並且具有細胞型態的改變，ELT 細胞呈現萎縮、破碎、圓起及懸浮之型態，UtSMC 細胞則是萎縮之型態，但較無破碎、圓起及懸浮之型態，表示白藜蘆醇可以對細胞型態造成影響。

三、白藜蘆醇對於子宮肌瘤細胞 (ELT3)和正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之細胞數目影響

圖 4 為給予 ELT3 與 UtSMC 細胞 0、10、25、50、75、100 μM 白藜蘆醇，經過 24、48 小時，藉由細胞計數分析細胞數目，探討白藜蘆醇是否影響細胞數目的多寡。由結果可發現白藜蘆醇皆可以使細胞數目減少，並隨著濃度的增加細胞數目愈少。ELT3 細胞不論在 24、48 小時，給予濃度 25 μM 以上其細胞數目比控制組減少並有顯著差異；UtSMC 細胞則在 24 小時，加藥組與控制組比較無顯著差異，而在 48 小時，25 μM 以上濃度其細胞數目比控制組減少並有顯著差異，故白藜蘆醇可以促使細胞數目的減少。

四、白藜蘆醇對於細胞週期的影響

圖 5、圖 6 為給予 ELT3 與 UtSMC 細胞 0、10、50 μM 白藜蘆醇，經過 48 小時，再將細胞進行 PI 染色，透過流式細胞儀分析細胞週期，探討白藜蘆醇如何影響細胞週期。圖 5 為所得的數據，可以發現 G0/G1 期有下降的趨勢，S 與 G2/M 期則有上升的趨勢。圖 6 則是將圖 5 所得的結果進行統計分析，可由結果得知給予細胞 10 μM 白藜蘆醇與控制組比較，不會影響 ELT3 和 UtSMC 細胞週期，但若給予

50 μ M 白藜蘆醇，ELT3 細胞 G0/G1 期有顯著下降，S、G2/M 和 Sub G1 期有顯著增加；UtSMC 細胞也是 G0/G1 期有顯著下降，S 和 Sub G1 期有顯著增加，但 G2/M 期則無顯著差異。由結果得知白藜蘆醇對於 ELT3 細胞會促使細胞週期停滯於 S、G2/M 期，而 UtSMC 細胞則是細胞週期停滯於 S 期，並且白藜蘆醇會促使兩株細胞細胞凋亡 (sub G1 期)。

五、白藜蘆醇對於細胞凋亡的影響

圖 7、圖 8、圖 9 和圖 10 為給予細胞 0、10、50 μ M 白藜蘆醇，經過 48 小時，使用 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) 並經上機後得到的數據，再以 CellQuest 軟體分析所得結果。圖 7 為操作後所獲得的數據，可以發現 ELT3 與 UtSMC 細胞隨著所給予的白藜蘆醇濃度越高，存活的細胞越來越少，壞死的細胞和凋亡的細胞越來越多。圖 8 為將數據中屬於凋亡的細胞進行統計並分析，凋亡細胞包含早期凋亡與晚期凋亡的細胞，可得知 ELT3 與 UtSMC 細胞給予 50 μ M 的白藜蘆醇與控制組比較具有顯著差異 ($p < 0.05$)，表示白藜蘆醇可以誘導細胞進行細胞凋亡，抑制子宮肌瘤之生成。此外，圖 9、圖 10 則將早期凋亡的細胞和晚期凋亡的細胞所佔的比例做統計分析，可以發現對於 ELT3 細胞，給予 50 μ M 的白藜蘆醇與控制組比較，會促使細胞進行早期凋亡 ($p < 0.01$) 與晚期凋亡 ($p < 0.05$)；UtSMC 細胞則只有晚期凋亡與控制組比較有顯著差異 ($p < 0.01$)，因此了解白藜蘆醇會促使 ELT3 細胞早期凋亡與晚期凋亡，而 UtSMC 則是晚期凋亡。

六、白藜蘆醇對於細胞凋亡相關蛋白質表現量的影響

圖 11 為給予 ELT3 細胞 0、10、50 μ M 白藜蘆醇，經過 48 小時，將細胞收集並萃取細胞內的蛋白質，再使用西方墨點法 (15 % SDS-PAGE) 經呈色後分別觀察 caspase 3 (inactive form)、cleaved caspase 3 (active form)、PARP (active form)、cleaved PARP (inactive form) 蛋白質表現量，並以 GAPDH 作為 internal control。由結果發現給予 50 μ M 白藜蘆醇，cleaved-caspase 的表現量增加，以及 cleaved-PARP 的表現量增加，故白藜蘆醇可促使細胞進行細胞凋亡。

七、白藜蘆醇對於與細胞外基質相關 mRNA 表現量之影響

圖 12、圖 13 和圖 14 為給予 ELT3 與 UtSMC 細胞 0、10、50 μ M 白藜蘆醇，經過 48 小時，將細胞收集並萃取細胞內的 mRNA，再透過 Q-PCR 獲得數據並分析細胞內與細胞外基質相關的 mRNA 表現量，並以 GAPDH 作為 internal control。由圖 12 為白藜蘆醇對於 ELT3 與 UtSMC 細胞 MMP2 mRNA 的影響，由數據可以得知不論是給予 10、50 μ M 白藜蘆醇與控制組比較並無顯著差異，表示白藜蘆醇不

會去調控 MMP2 mRNA 的表現量。圖 13 為白藜蘆醇對於 ELT3 與 UtSMC 細胞 TIMP1 mRNA 的影響，由數據可知給予 10 μ M 白藜蘆醇與控制組比較無顯著差異，但給予 50 μ M 白藜蘆醇與控制組比較則有顯著差異 ($p < 0.01$)，以及圖 14 為白藜蘆醇對於 ELT3 與 UtSMC 細胞 TIMP2 mRNA 的影響，由數據可知給予 10 μ M 白藜蘆醇與控制組比較無顯著差異，而給予 50 μ M 白藜蘆醇則有顯著差異，表示白藜蘆醇會促使細胞內 TIMP1、TIMP2 mRNA 的表現量增加。

八、白藜蘆醇對於細胞外基質相關蛋白質表現量的影響

圖 15、圖 16 為給予 ELT3 與 UtSMC 細胞 0、10、50 μ M 白藜蘆醇，經過 48 小時，將細胞收集並萃取細胞內的蛋白質，再使用西方墨點法經呈色後分別分析 MMP9 與 TIMP2 蛋白質表現量，並以 GAPDH 作為 internal control。由圖 15 的結果發現給予越高濃度的白藜蘆醇，不論是 ELT3 和 UtSMC 細胞，細胞內 MMP9 蛋白質表現量逐漸減少，故白藜蘆醇可以使細胞內 MMP9 蛋白質表現量減少。由圖 16 的結果發現給予越高濃度的白藜蘆醇，不論是 ELT3 和 UtSMC 細胞，細胞內 TIMP2 蛋白質表現量逐漸增加，故白藜蘆醇可以使細胞內 TIMP2 蛋白質表現量增加。圖 17、圖 18 為給予 ELT3 與 UtSMC 細胞 0、10、50 μ M 白藜蘆醇，經過 48 小時，透過細胞免疫螢光染色法，並使用 EVOS® 細胞影像系統進行影像分析。圖 17 為分析 fibronectin 蛋白質表現量，fibronectin 蛋白質表現量以綠色螢光呈現 (Alexa Fluor® 488)，若是螢光亮度越高，表示 fibronectin 蛋白質表現量越多，而螢光亮度越低，則反之，因此由圖可知給予越高濃度的白藜蘆醇，螢光亮度越低，fibronectin 蛋白質表現量越少，故白藜蘆醇可以使 fibronectin 蛋白質表現量減少。圖 18 則為分析 collagen 1 蛋白質表現量，collagen 1 蛋白質表現量以紅色螢光呈現 (Alexa Fluor® 546)，若是螢光亮度越高，表示 collagen 1 蛋白質表現量越多，而螢光亮度越低，則反之，因此由圖可知給予越高濃度的白藜蘆醇，螢光亮度越低，collagen 1 蛋白質表現量越少，故白藜蘆醇可以使 collagen 1 蛋白質表現量減少。

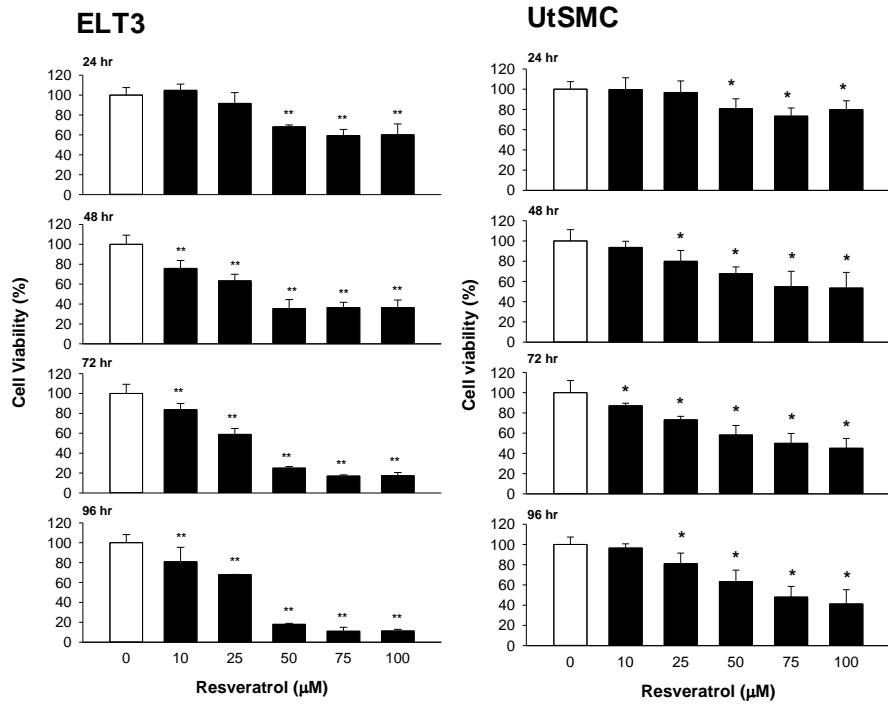


圖 2、白藜蘆醇可抑制子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之細胞增生。

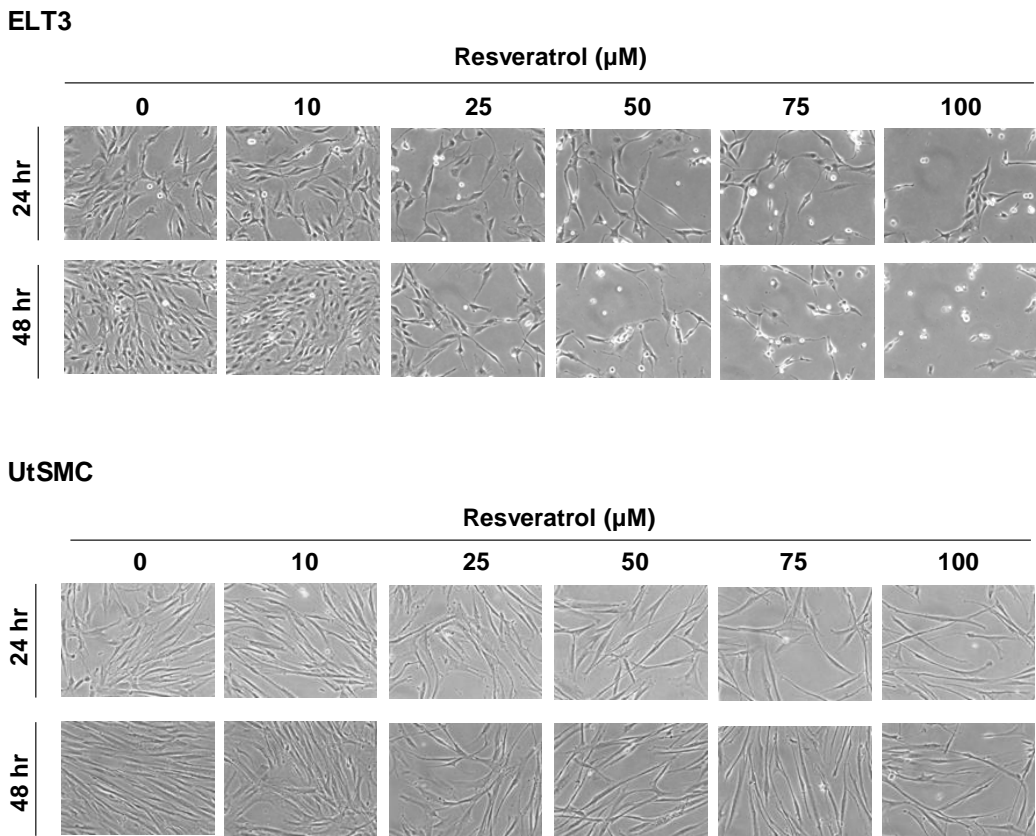
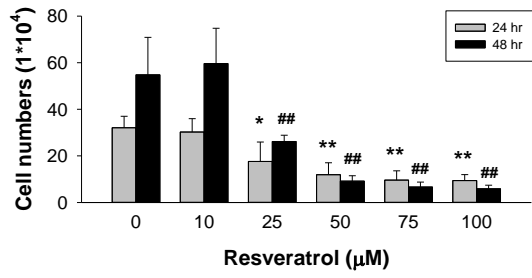


圖 3、白藜蘆醇對於子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之細胞型態的影響。

ELT3



UtSMC

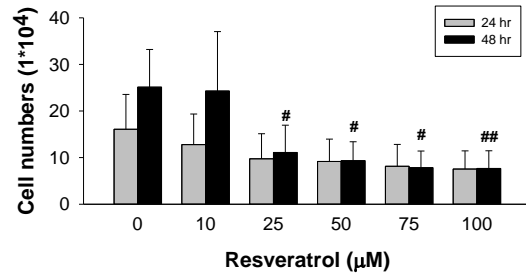


圖 4、白藜蘆醇能抑制子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之細胞數目。

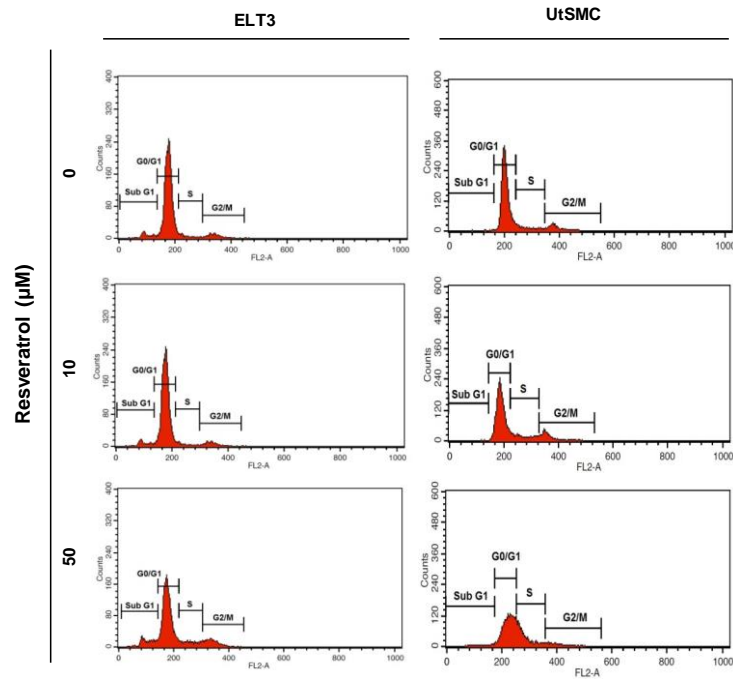


圖 5、白藜蘆醇對於子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)之細胞週期的影響。

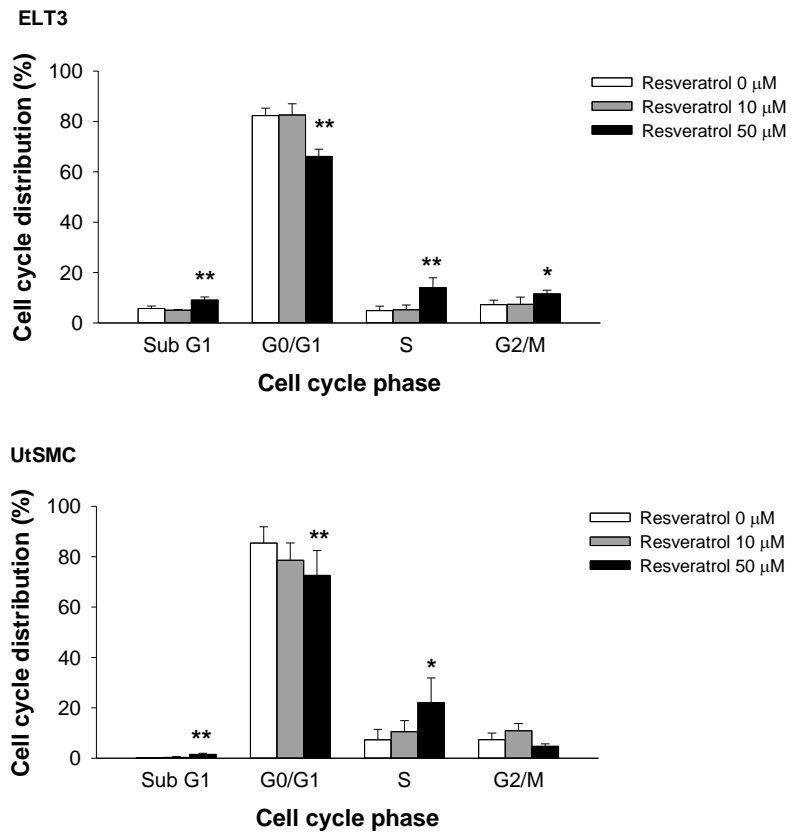


圖 6、白藜蘆醇會促使細胞週期停滯於 S、G2/M 期以及促細胞凋亡。

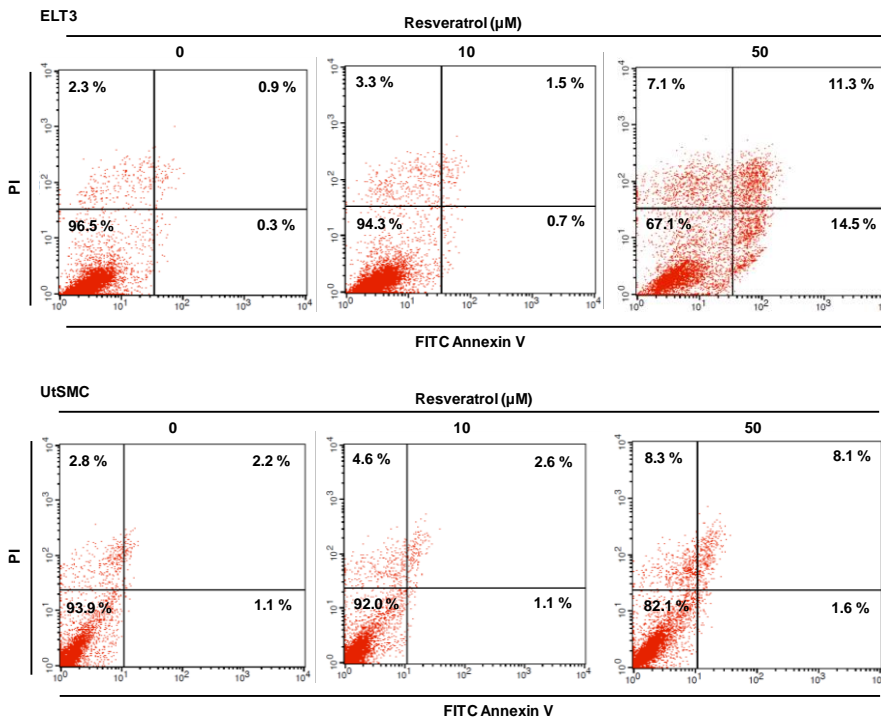


圖 7、白藜蘆醇對於子宮肌瘤 (ELT3)與正常子宮平滑肌 (UtSMC)之細胞凋亡的影響。

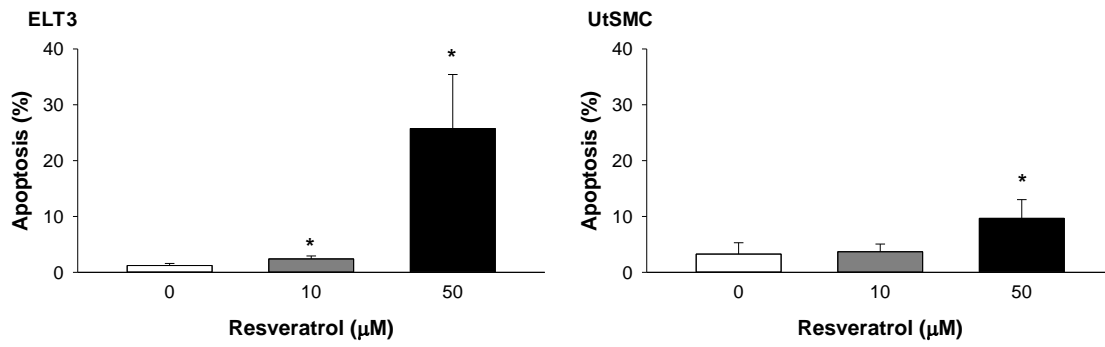


圖 8、白藜蘆醇促使子宮肌瘤 (ELT3)與正常子宮平滑肌 (UtSMC)細胞凋亡。

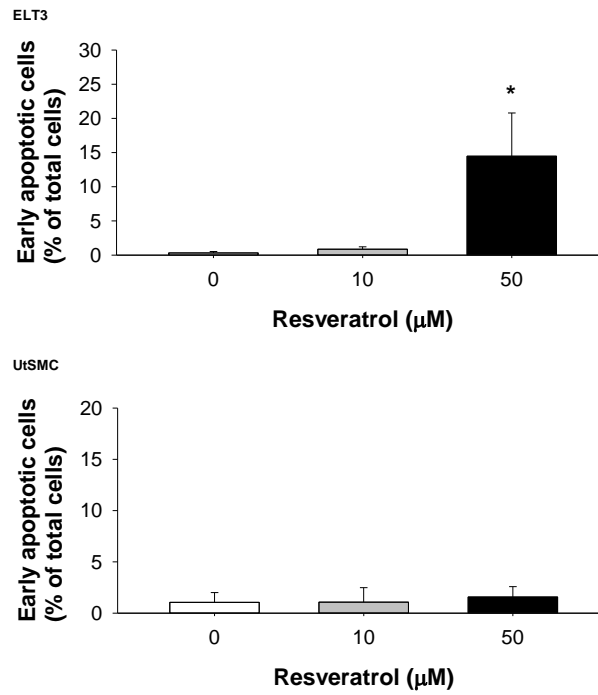


圖 9、白藜蘆醇對於子宮肌瘤 (ELT3)與正常子宮平滑肌 (UtSMC)細胞早期凋亡的影響。

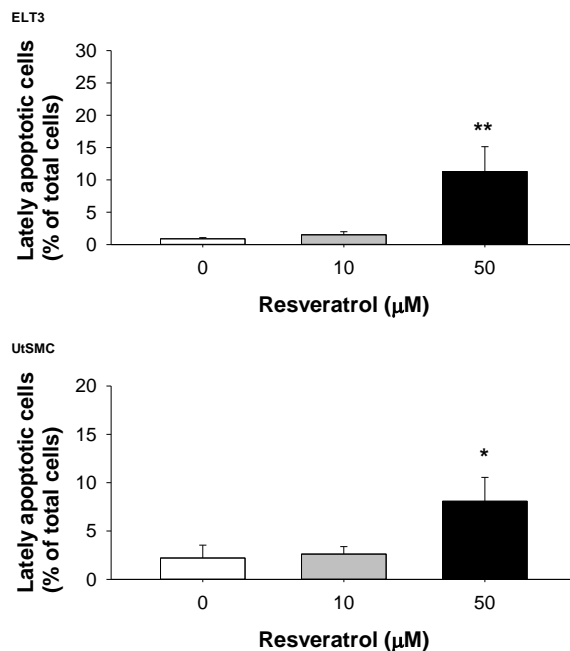


圖 10、白藜蘆醇對於子宮肌瘤 (ELT3)與正常子宮平滑肌 (UtSMC)細胞晚期凋亡的影響。

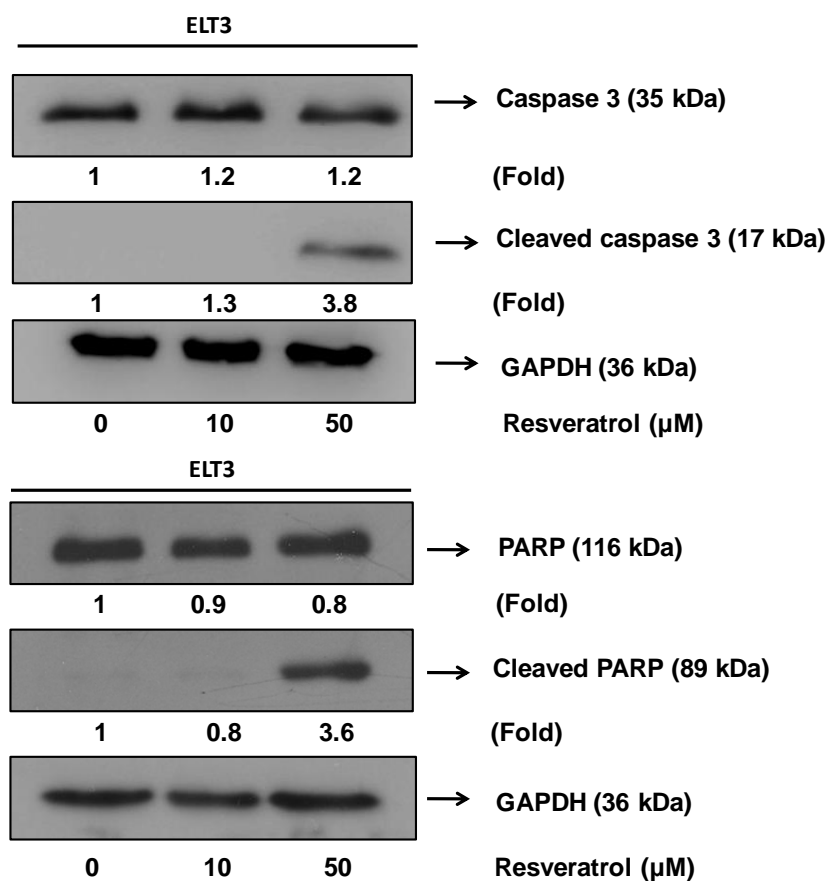


圖 11、白藜蘆醇促使細胞凋亡相關蛋白質表現量增加。

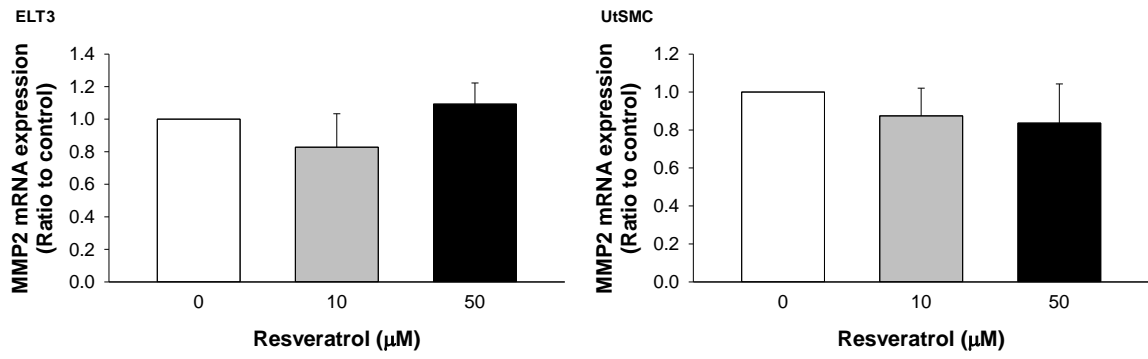


圖 12、白藜蘆醇對於細胞 MMP2 mRNA 表現量的影響。

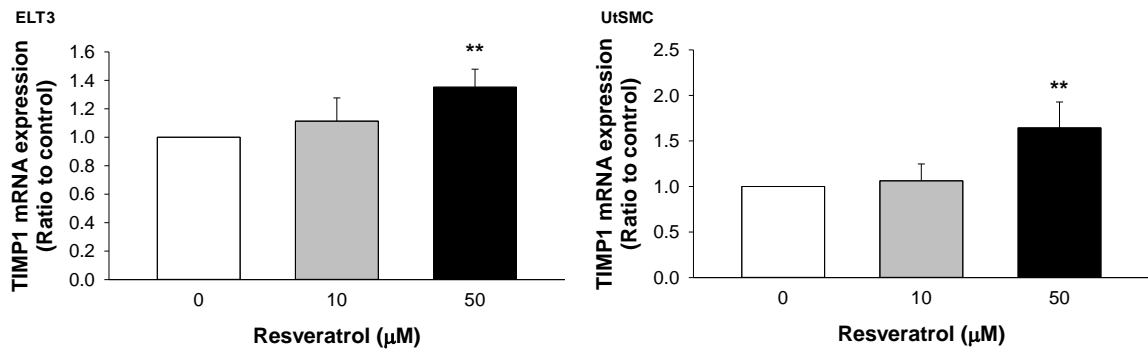


圖 13、白藜蘆醇對於細胞 TIMP1 mRNA 表現量的影響。

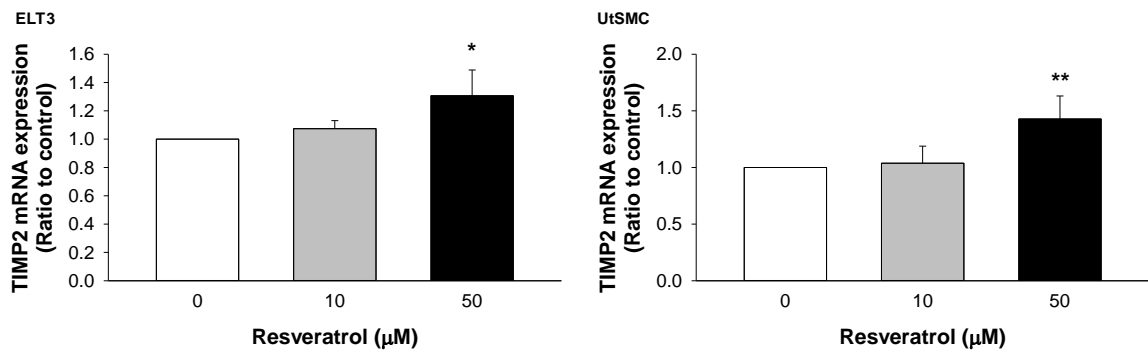


圖 14、白藜蘆醇對於細胞 TIMP2 mRNA 表現量的影響。

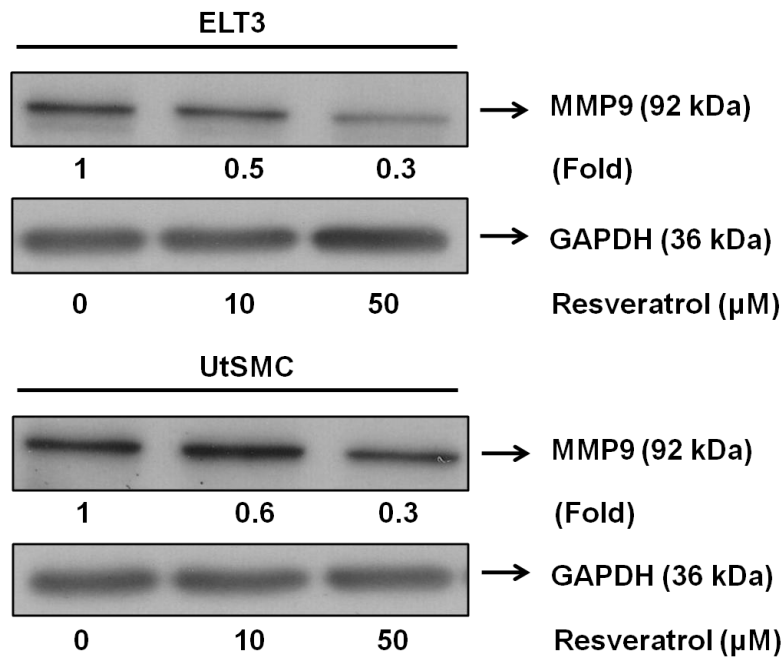


圖 15、白藜蘆醇使子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC) MMP9 蛋白質表現量降低。

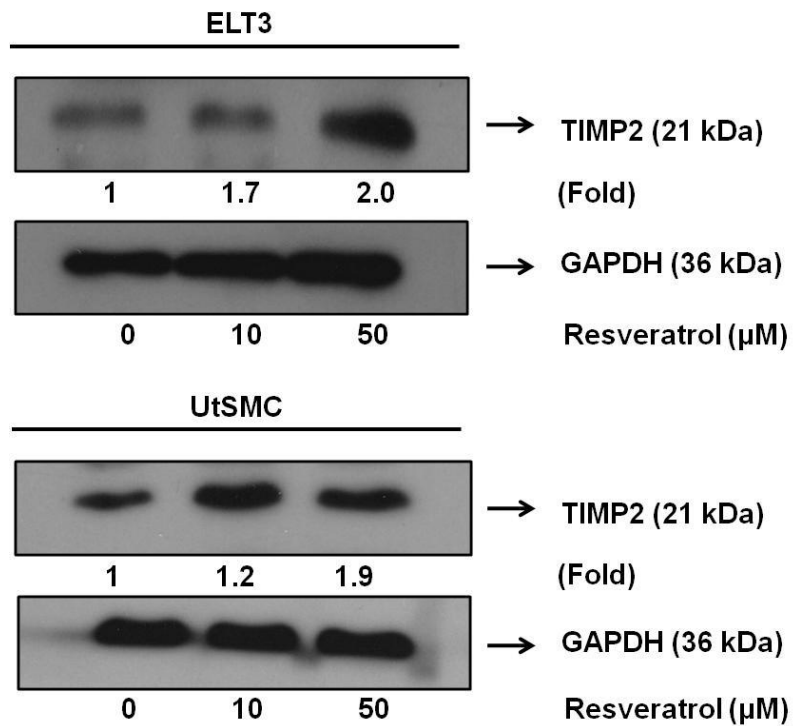


圖 16、白藜蘆醇使子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC) TIMP2 蛋白質表現量增加。

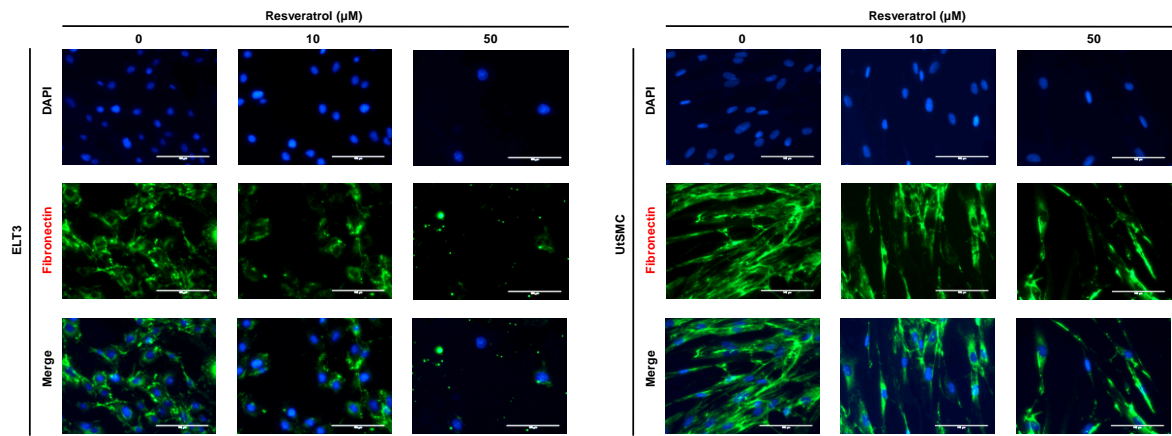


圖 17、白藜蘆醇使子宮肌瘤 (ELT3)與正常子宮平滑肌 (UtMSC)細胞 fibronectin 蛋白質表現量減少。

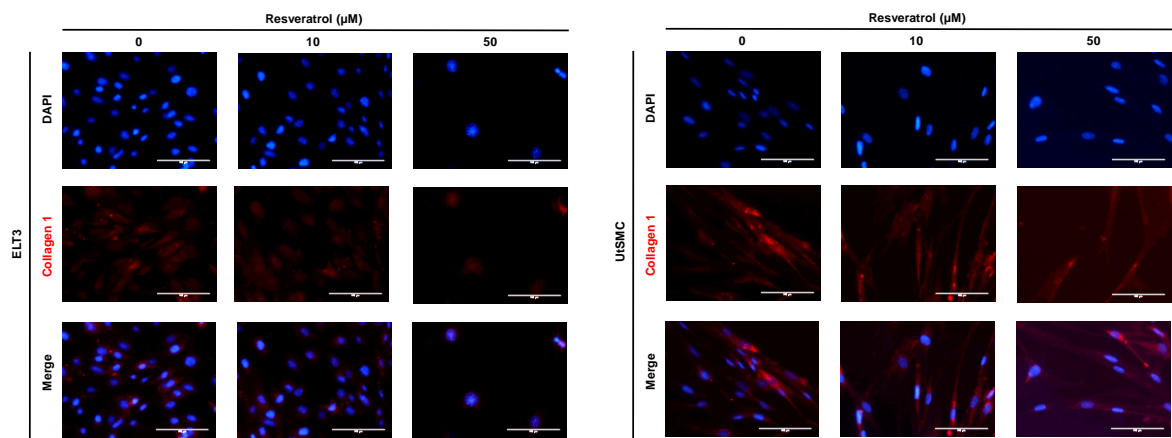


圖 18、白藜蘆醇使子宮肌瘤 (ELT3)與正常子宮平滑肌 (UtMSC)細胞 collagen 1 蛋白質表現量減少。

一、白藜蘆醇抑制子宮肌瘤細胞增生

先前研究中已指出白藜蘆醇可以抑制多種癌細胞的增生，例如：攝護腺癌 (Benitez et al., 2007)，在 2007 年由 Benitez 等人所提出的研究，給予 LANCap (androgen 依賴性)、PC-3 (androgen 非依賴性)和 PZ-HPV-7 (正常細胞)細胞白藜蘆醇，發現給予越高濃度的白藜蘆醇其細胞存活率越低，在 24 小時，LANCap 細胞給予 50 μM 以上有顯著差異，PC-3 細胞則是 10 μM ，而 PZ-HPV-7 是 100 μM ，而 48 小時，LANCap 細胞給予 10 μM 以上有顯著差異，PC-3 細胞則是 10 μM ，而 PZ-HPV-7 是 1 μM ；在 2015 年由 Yuan 等人所發表的研究 (Yuan et al., 2015)，發現白藜蘆醇可以抑制 A549 細胞增生，不論 24、48 小時，給予 50、100、150 μM 有顯著差異，並且影響細胞型態，使細胞呈現萎縮、變形、浮起的細胞型態。本研究結果也發現白藜蘆醇確實能抑制子宮肌瘤細胞 (ELT3)與正常子宮平滑肌細胞 (UtSMC)增生並促使細胞型態的改變，與上述兩篇研究結果相比，在細胞增生的部分，本研究結果得知：在 24 小時，ELT3 和 UtSMC 細胞給予 50 μM 以上有顯著差異，在 48 小時，ELT3 細胞是給予 10 μM 以上有顯著差異，UtSMC 則是給予 25 μM ，白藜蘆醇所給予的有效濃度比給予攝護腺癌細胞較高，而與肺癌所給予的濃度相似，並且與白藜蘆醇促使肺癌細胞型態改變此結果相同。

二、白藜蘆醇促使子宮肌瘤細胞週期停滯

抑制細胞增生可能透過使細胞週期停滯，因此本研究亦探討白藜蘆醇對細胞週期的影響。根據先前研究的結果，白藜蘆醇可以促使細胞週期停滯。而本研究結果發現給予 50 μM 白藜蘆醇可以促使 ELT3 細胞週期停滯於 S、G2/M 期，UtSMC 細胞則僅停滯於 S 期。在 2007 年由 Benitez 等人所發表的研究 (Benitez et al., 2007)，發現白藜蘆醇促使 LANCap 細胞週期停滯於 G0/G1 期 (100 μM)，PC-3 細胞 (50 μM)也是停滯於 G0/G1 期，與本研究結果相異。還有在 2010 年由 Sakamoto 等人所提出的研究 (Sakamoto et al., 2010)，發現給予乳癌細胞 (MCF-7)白藜蘆醇可以促使細胞週期停滯於 S、G2/M 期 (10 μM)，與本研究結果相同。此外，在 2014 年由 Chin 等人的研究 (Chin et al., 2014)，得知白藜蘆醇也可以促使 MDA-MB-231 細胞週期停滯於 S 期 (10 μM)，與本研究結果相似。故白藜蘆醇確實可以促使不同癌細胞之細胞週期停滯，但因不同細胞，白藜蘆醇所誘導的細胞週期停滯亦不同，分別可以促使細胞週期停滯於 G0/G1、S、G2/M 期。

三、白藜蘆醇誘導細胞凋亡

細胞週期停滯可能促使細胞進行凋亡，因此本研究透過流式細胞儀分析細胞凋亡以及使用西方墨點法測量與細胞凋亡相關蛋白質表現量，由結果可知給予 50 μ M 白藜蘆醇可以促使 ELT3 與 UtSMC 細胞凋亡，並且調控與細胞凋亡相關的蛋白質，使 cleaved-caspase 3 (active form) 和 cleaved-PARP (inactive form) 表現量增加，使細胞進行細胞凋亡。在先前研究中發現白藜蘆醇可以促使不同癌細胞細胞凋亡，例如：乳癌 (Sakamoto et al., 2010; Shi et al., 2011)、肝癌 (Michels et al., 2006; Bishayee and Dhir, 2009)、大腸癌 (Miki et al., 2012; Fouad et al., 2013; Liu et al., 2014)、肺腺癌 (Zhang et al., 2011)、胃癌 (Liu and Zhang, 2014) 等，還有，在先前研究已指出白藜蘆醇會導致內生性的凋亡 (Han et al., 2015)，當細胞進行凋亡時，粒線體會釋出 cytochrome c 並活化 caspase (inactive form) 使 caspase 截切 (active form)，再使 PARP 轉變為 cleaved-PARP (inactive form)，使細胞 DNA 無法修復並進行細胞凋亡，本研究與先前研究結果相似。

四、白藜蘆醇與細胞外基質相關蛋白質

先前有研究指出細胞外基質的堆積有助於子宮肌瘤之生成 (Stewart et al., 1994; Sozen and Arici, 2002; Walker and Stewart, 2005)，因此本研究探討白藜蘆醇是否影響與細胞外基質相關的 mRNA 與蛋白質表現量。在 2013 年由 Halder 等人的研究，探討維生素 D 對於人類子宮肌瘤細胞是否影響 MMP2、MMP9 表現量，發現維生素 D 可以促使 MMP2、MMP9 mRNA 和蛋白質表現量減少，並且使 TIMP2 mRNA 和蛋白質表現量增加，但不調控 TIMP1 mRNA 和蛋白質表現量，故為維生素 D 可以透過調節以上表現量來抑制子宮肌瘤之生成，而本研究結果則為白藜蘆醇抑制 MMP9 蛋白質表現量並促使 TIMP2 蛋白質表現量增加，mRNA 的部分，則是增加 TIMP1 和 TIMP2 的表現量，但不調控 MMP2 表現量。還有，在 2014 年由 Gweon 和 Kim 所發表的研究 (Gweon and Kim, 2014)，透過西方墨點法以及細胞免疫螢光染色分析發現給予軟骨肉瘤細胞 (HTB94) 濃度 10 μ M 以上白藜蘆醇可以減少 MMP2 和 MMP9 的蛋白質表現量，與本研究結果相似，白藜蘆醇對於 ELT3 和 UtSMC 細胞可以減少 MMP9 蛋白質表現量，但本研究所給予的濃度較高 (50 μ M)。此外，在 2013 年由 Halder 等人所發表的研究，探討維生素 D 是否可以透過減少與細胞外基質相關蛋白質來抑制子宮肌瘤之生成，由結果得知維生素 D 可以減少與細胞外基質相關蛋白質表現量，包括 proteoglycans (biglycan、fibromodulin、versican)、fibronectin、collagen 1 等，此結果與本研究結果相似，白藜蘆醇可以減少 ELT3 與 UtSMC 細胞內 fibronectin 和 collagen 1 蛋白質表現量，故白藜蘆醇亦可抑制子宮肌瘤之生成。

結論

由本研究的結果得知白藜蘆醇會透過抑制細胞增生，使細胞型態呈現圓起、破碎及浮起狀，且促使細胞週期停滯於 S 及 G2/M 期及細胞凋亡，並透過調節與細胞凋亡相關蛋白質的表現量，和影響與細胞外基質相關的 mRNA 及蛋白質表現量來抑制子宮肌瘤細胞之生成，故白藜蘆醇具有抑制子宮肌瘤細胞之效果，而未來可以做進一步的研究，使白藜蘆醇成為預防或治療子宮肌瘤的療法之一。

參考文獻

- Baird, D.D., Dunson, D.B. (2003) Why is parity protective for uterine fibroids? *Epidemiology*. 14:247–250.
- Baird, D.D., Dunson, D.B., Hill, M.C., Cousins, D., Schectman, J.M. (2003) High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188:100-107.
- Benitez, D.A., Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P.M., Castellon, E.A. (2007) Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J. Androl.* 28: 282-293.
- Bishayee, A., Dhir, N. (2009) Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 179:131-144.
- Catherino, W.H., Malik, M. (2007) Uterine leiomyomas express a molecular pattern that lowers retinoic acid exposure. *Fertil. Steril.* 87: 1388-1398.
- Chin, Y.T., Hsieh, M.T., Yang, S.H., Tsai, P.W., Wang, S.H., Wang, C.C., Lee, Y.S., Cheng, G.Y., HuangFu, W.C., London, D., Tang, H.Y., Fu, E., Yen, Y., Liu, L.F., Lin, H.Y., Davis, P.J. (2014) Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells in vitro. *Oncotarget.* 5:12891-12907.
- Fouad, M.A., Agha, A.M., Merzabani, M.M., Shouman, S.A. (2013) Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: calorie restriction is the force to the cytotoxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 32:1067-1080.
- Gweon, E.J., Kim, S.J. (2014) Resveratrol attenuates matrix metalloproteinase-9 and -2-regulated differentiation of HTB94 chondrosarcoma cells through the p38 kinase and JNK pathways. *Oncol. Rep.* 32: 71-78.
- Halder, S.K., Osteen, K.G., Al-Hendy, A. (2013) 1,25-dihydroxyvitamin d3 reduces extracellular matrix-associated protein expression in human uterine fibroid cells. *Biol. Reprod.* 89:150.
- Halder, S.K., Osteen, K.G., Al-Hendy, A. (2013) Vitamin D3 inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. *Hum. Reprod.* 28: 2407-2416.
- Han, G., Xia, J., Gao, J., Inagaki, Y., Tang, W., Kokudo, N. (2015) Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discov. Ther.* 9:1-12.
- Islam, M.S., Akhtar, M.M., Ciavattini, A., Giannubilo, S.R., Protic, O., Janjusevic, M., Procopio, A.D., Segars, J.H., Castellucci, M., Ciarmela, P. (2014) Use of dietary phytochemicals to target inflammation, fibrosis, proliferation, and angiogenesis in uterine tissues: promising options for prevention and treatment of uterine fibroids? *Mol. Nutr. Food Res.* 58: 1667-1684.
- Liu, M.L., Zhang, S.J. (2014) Effects of resveratrol on the protein expression of survivin and cell apoptosis in human gastric cancer cells. *J. BUON.* 19:713-717.
- Liu, Y.Z., Wu, K., Huang, J., Liu, Y., Wang, X., Meng, Z.J., Yuan, S.X., Wang, D.X., Luo, J.Y., Zuo, G.W., Yin, L.J., Chen, L., Deng, Z.L., Yang, J.Q., Sun, W.J., He, B.C. (2014) The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation. *Int. J. Oncol.* 45:104-112.
- Michels, G, Wätjen, W., Weber, N., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Proksch, P., Kahl, R. (2006) Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology.* 225:173-182.
- Miki, H., Uehara, N., Kimura, A., Sasaki, T., Yuri, T., Yoshizawa, K., Tsubura, A. (2012) Resveratrol induces

- apoptosis via ROS triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 40:1020-1028.
- Roshdy, E., Rajaratnam, V., Maitra, S., Sabry, M., Allah, A. S., Al-Hendy, A. (2013) Treatment of symptomatic uterine fibroids with green tea extract: a pilot randomized controlled clinical study. *Int. J. Womens Health.* 5:477-486.
- Sakamoto, T., Horiguchi, H., Oguma, E., Kayama, F. (2010) Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 21:856-864.
- Shi, Y., Yang, S., Troup, S., Lu, X., Callaghan, S., Park, D.S., Xing, Y., Yang, X. (2011) Resveratrol induces apoptosis in breast cancer cells by E2F1-mediated up-regulation of ASP1. *Oncol. Rep.* 25:1713-1719.
- Sozen, I., Arici, A. (2002) Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil. Steril.* 78:1-12.
- Stewart, E.A., Friedman, A.J., Peck, K., Nowak, R.A. (1994) Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 79:3.
- Walker, C.L., Stewart, E.A. (2005) Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science.* 308: 1589-1592.
- Yuan, L., Zhang, Y., Xia, J., Liu, B., Zhang, Q., Liu, J., Luo, L., Peng, Z., Song, Z., Zhu, R. (2015) Resveratrol induces cell cycle arrest via a p53-independent pathway in A549 cells. *Mol. Med. Rep.* 11:2459-2464.
- Zhang, W., Wang, X., Chen, T. (2011) Resveratrol induces mitochondria-mediated AIF and to a lesser extent caspase-9-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Mol. Cell Biochem.* 354:29-37.
- 台灣婦產科醫學會 (2008) 子宮肌瘤臨床指引。財團法人國家衛生研究院。

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：104 年 10 月 27 日

計畫編號	MOST103-2629-B-038 -002 -		
計畫名稱	白藜蘆醇對子宮肌瘤生長之影響效應:體內及體外試驗(A09)		
出國人員姓名	夏詩閔	服務機構及職稱	台北醫學大學保健營養學系 副教授
會議時間	104 年 4 月 10 日至 104 年 4 月 12 日	會議地點	中國上海市
會議名稱	(中文) 第 7 屆 亞洲腫瘤 2015 年峰會/第 11 屆 腫瘤轉譯研究組織年度大會/病毒性肝炎 2015 年峰會 (英文) 7th Asian Oncology Summit (AOS) 2015/ 11th Annual Conference of the Organisation for Oncology and Translational Research (OOTR)/ Viral Hepatitis Summit (VHS) 2015		
發表題目	(中文) 薏苡殼及種皮萃取物對子宮肌瘤生長之影響效應 (英文) Inhibitory Effect of Adlay Hull and Testa Ethanolic Extracts on Uterine Leiomyoma Cell Proliferation		

一、參加會議經過

本次第 7 屆 亞洲腫瘤 2015 年峰會/第 11 屆 腫瘤轉譯研究組織年度大會/病毒性肝炎 2015 年峰會於 2015 年 4 月 10 日至 4 月 12 日止為期 3 天於中國上海市國際會議中心舉辦，本人之研究論文” **Inhibitory Effect of Adlay Hull and Testa Ethanolic Extracts on Uterine Leiomyoma Cell Proliferation**”以薏苡殼及種皮萃取物對子宮肌瘤生長之影響效應的研究獲 2015 年上海第 7 屆 亞洲腫瘤 2015 年峰會/第 11 屆 腫瘤轉譯研究組織年度大會/病毒性肝炎 2015 年峰會接受並壁報發表論文。此次經費非常感謝由科技部計畫補助 (MOST103-2629-B-038-002-)。本次開會地點於中國上海市國際會議中心舉辦，

上海地理位置重要，目前為亞洲最繁榮的經貿中心，目前為中國人口最多的城市，在亞洲的生產總值僅次於日本東京，上海交通大學、復旦大學、豫園、世界博覽會等皆為享負盛名的重要文化景點，而與會成員多為參與癌症相關的研究學者，由於這次是亞洲的會議所以以亞洲出席的相關癌症研究學者居多。會議內容聚焦於癌症的相關研究及發展。本大會中的演講內容、醫藥展出、學術論文海報等，多偏重癌症臨床研究、醫藥材料、腫瘤公共衛生營養調查等。在會場我選擇與自己研究方向相關的報告聆聽與閱讀分別有四個主題進行論文發表，其中主題二即為敝人參與的主題為中草藥萃取物與癌症的關係。

在口頭報告部分：絕大部分都是比較偏臨床試驗的研究報告，利用不同的抗癌新藥、不同的投藥方式來改善治療效果、發現新的腫瘤標誌等。Nimotuzumab 及 PD-1 是一種人類的單株抗體，可與表皮生長因子受器(EGFR) 細胞外的區域上面的 doamin 結合。用來抑制癌細胞的生長及轉移。而其中我比較感興趣的為：天然物與癌症治療及預防的效用，而其中來自於義大利就學者 S Cirimi, N Ferlazzo 利用天然佛手柑萃取物進行相關抗癌研究，發現：類黃酮物質(flavonoid fraction of bergamot juice，) 可抑制人類大腸癌細胞 HT-29 的生長效果，主要是藉由多種途徑誘發細胞凋亡 apoptosis。高濃度的佛手柑萃取物可增加自由基 reactive oxygen species (ROS)，進一步可以造成粒線體膜電位喪失及 DNA 氧化傷害的發生。

與會期間因而接觸到許多最新之癌症相關分析及臨床指標與抗癌藥物生物活性的研究進展，受益良多。參加會議人數應在 100-200 人之間。第 7 屆 亞洲

腫瘤 2015 年峰會/第 11 屆 腫瘤轉譯研究組織年度大會/病毒性肝炎 2015 年峰會中的大型會議形式包含大會演講，小型研討會，主席研討會，口頭報告及海報發表會等，於大會期間每天均有許多不同領域與癌症介入相關主題之演講與研討會，此外也有不同領域的壁報展覽，穿插一些社交活動，如一些藥廠展示抗癌藥物及相關癌症研究書籍展售會，早餐會，午餐會等，附近之市區及上海豫園參觀活動。

二、 與會心得及相關建議

本次大會的會場利用手機 APP 將展場資訊、海報展示時間、大會進行流程等做成 QR code，可供與會人士掃描下載大會 APP，避免厚重的大會手冊與瑣碎的廣告單，在大會報到處有中、英語系的工作人員協助註冊及與會者報到，因此在溝通上便利許多。有待改進的是海報展示與醫藥商展為同一場地，且局限於一樓展場的一角，為了節省場地空間僅以 4 個 LCD 電子看板的形式供學者瀏覽約 240 幾張海報，4 個 LCD 電子看板被四個人使用時，其他人只能強迫一起閱讀同一張海報，以 7th Asian Oncology Summit (AOS)、11th Annual Conference of the Organisation for Oncology、Translational Research (OOTR)/ Viral Hepatitis Summit (VHS) 三個學術研討會合辦來看，大會應提供更多的電子看版。本次在大會註冊後才知道海報的展示方式，未來參加國際研討會時應避免。與會同時巧遇來自台灣中國醫大的謝宗明老師、北醫的吳啟豪老師、成大何宗憲醫師等學者專家，頗有他鄉遇故知的感覺，除了在聆聽演講、參觀海報的空檔之外，彼此還交換研究經驗與心得，同時也發現彼此具有共同研究合作的主題，是本次國際研討會額外的重要收穫之一，可以拓展人脈關係。此外，本次大會其會

議場地非常寬敞及明亮，會議中有許多廠商的產品展示及試用品拿取，而休息空間也備有許多點心及飲料，大致上是一個舉辦很成功的國際會議。建議事項：若將來北醫想舉辦類似的國際癌症研討會議，可以學習此次研討會舉辦的模式，請廠商提供贊助及試用品，可以吸引學者參加並提供可能產學合作的機會，另外可以架設 APP 程式。

三、攜回資料名稱及內容

- i. 512 M 容量隨身碟乙支，內含大會摘要。
- ii. 大會提供流程手冊一本。
- iii. 免費拿取期刊如 The Lancet Oncology, Volume 16, Issue 1/2/3, 2015 共三本。
- iv. 大會拉鍊式帆布資料袋一個、原子及觸控兩用筆一支。

四、其他

無

寄件者: AOS 2015 <content-aos2015@elsevier.com>
寄件日期: 2015年2月5日星期四 下午 8:42
收件者: bryanhsia@tmu.edu.tw
主旨: 7th Asian Oncology Summit - Poster Acceptance Letter



Poster Acceptance Letter

Abstract Ref No: AOS2015_0182 (Please quote in all correspondence)

05 February 2015

Email: bryanhsia@tmu.edu.tw

Dear S-M. Hsia,

Thank you for submitting a paper to present at *The 7th Asian Oncology Summit which will be held April 10-12, 2015 in Shanghai, China alongside the 11th Annual Conference of the Organisation for Oncology and Translational Research and Viral Hepatitis 2015*. On behalf of the Organising Committee, I am delighted to inform you that your abstract entitled **'Inhibitory Effect of Adlay Hull and Testa Ethanolic Extracts on Uterine Leiomyoma Cell Proliferation'**, has been accepted for a **poster presentation**. Abstracts of extremely high standards were submitted for the conference and we believe we have selected an excellent mix of abstracts to address the conference themes. We very much look forward to your presentation.

Your poster presentation details are as follows. The schedule of your presentation will be communicated to you in due course.

Title:	Inhibitory Effect of Adlay Hull and Testa Ethanolic Extracts on Uterine Leiomyoma Cell Proliferation
Authors:	S-M. Hsia, C-H. Wu, K-L. Wang, T-M. Shieh
Presenting Author:	S-M. Hsia

Please check the above details of your presentation carefully, as all conference material will be printed with this information. If there are any corrections please inform me as soon as possible by email to: content-aos2015@elsevier.com

You will be informed of your session date, time and poster number in due course. Please bookmark the conference web-site <http://www.asianoncologysummit.com/> to keep up-to-date with changes as they occur.

It is a condition of the abstract acceptance that you or a nominated presenting co-author registers for the conference by **20 February 2015**. **The abstracts of all unregistered presenters will be removed from the conference after this date**. Should the addressee above not be the nominated presenter, please inform me of the name and email address of the presenter immediately: content-aos2015@elsevier.com

Registration

To register to attend the conference, please copy and paste the following link into your browser, <http://conferences.elsevier.com/AOS2015?email=bryanhsia@tmu.edu.tw&abstracts=0182>. Please note this system is different and not linked to the abstract submission system.

Registration is available online using a credit card. Registration rates are as follows:

Early Bird Deadline	20 February 2015
----------------------------	-------------------------

Doctor – Early Registration Rate	US\$475
Doctors: standard booking	US\$550
Doctors: onsite registration	US\$650
Trainee – Early Registration Rate	US\$350
Trainee: standard booking	US\$400
Trainee: onsite registration	US\$450
Members of supporting organisations*	US\$400

* Members of Supporting Organisations are entitled to a reduced registration rate - please select your association from the drop down box during the online registration process.

The registration fee includes:

- Access to all streams in the Asian Oncology Summit, OOTR Conference and Viral Hepatitis 2015
- Access to all abstracts
- Conference materials
- Access to oral and poster sessions
- Mid-morning and afternoon refreshments each day

All authors will be responsible for their own travel and accommodation expenses. Unfortunately the conference organisers do not have funds available to support the attendance of individual delegates.

If you have any queries on registration, invoice or payment, please contact m.morley@elsevier.com directly.

Poster Presentations

Posters are displayed in an electronic format; you do not need to bring a printed poster to the conference.

Poster In My Pocket

As a confirmed poster presenter, you are welcome to upload the PDF of your poster prior to the conference to the new **Poster in my Pocket** App. This is an extra **FREE** service to help increase the exposure of your poster to conference attendees and more.

Note: You do **not** need a smart phone to take part in this initiative

What you do need:

- 5-10 mins of your time
- Access to email & internet
- PDF copy of your poster

Visit here: www.posterinmypocket.com

Online Abstracts

Upon arrival at the conference all delegates will receive a conference program, please note that the abstracts will be available online a few weeks in advance of the conference via a secure webpage.

Accommodation

AOS 2015 will take place at the Shanghai International Convention Centre, Shanghai, China

Rooms have been reserved for delegates at the 5-star Oriental Riverside Hotel, located in the International Convention Center: It is easily accessible for delegates who stay in the hotel to go to the convention center via access points on each floor.

Specially negotiated conference rates are available using the [online reservation system](#). Room rates start at RMB1000 per night + 15% tax for single occupancy and include breakfast.

These reduced rates are limited and are available on a first come first served basis.

Hotel details

Oriental Riverside Hotel
2727, Riverside Avenue
Pudong, Shanghai
Tel: 86-21 5037 0000
Fax: 86-21 5037 0051
Email: rs@shicc.net

[Website](#)

Please do not hesitate to contact me if you have any queries and I look forward to receiving your completed registration.

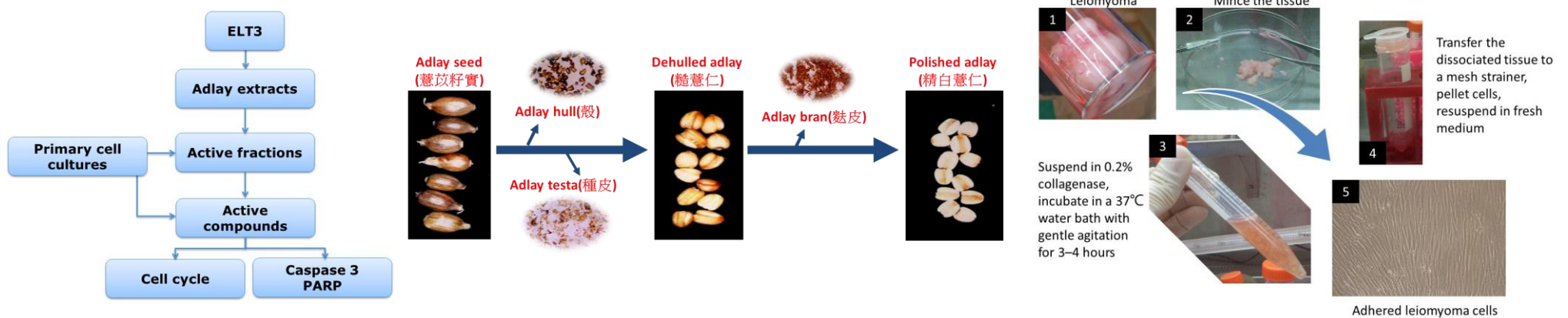
Yours sincerely,
Neha

Neha Aggarwal
Conference Content Executive
7th Asian Oncology Summit, 11th Annual Conference of the Organisation for Oncology and Translational Research Viral Hepatitis
2015
content-aos2015@elsevier.com

Introduction

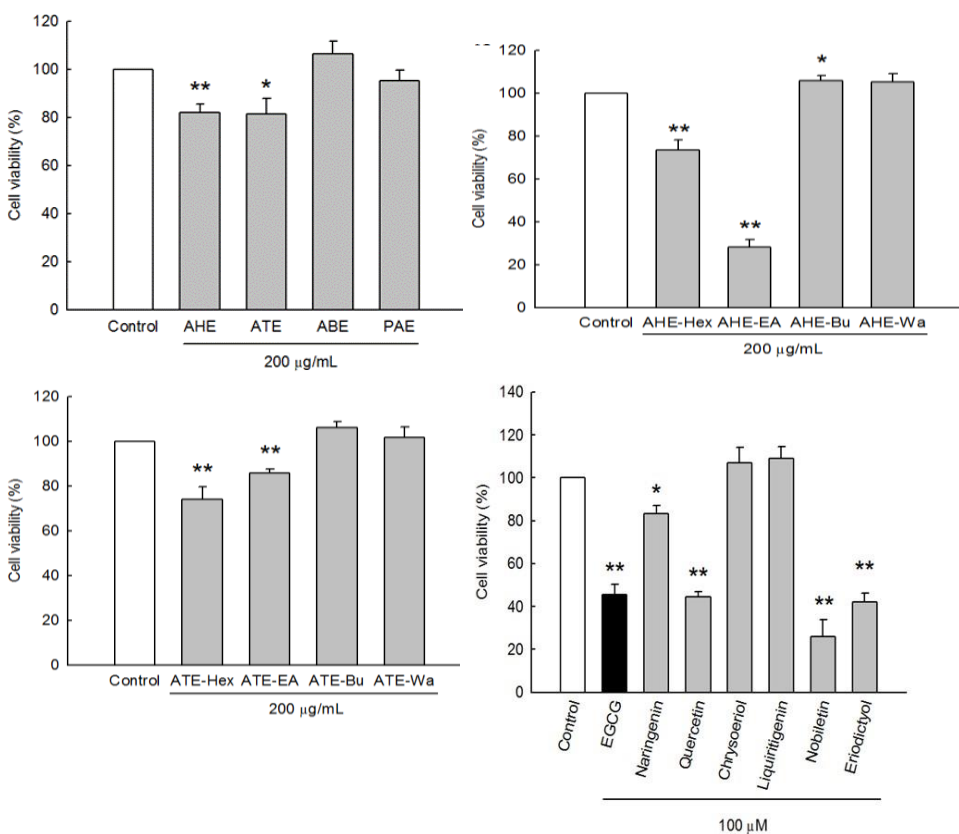
Uterine leiomyoma is a benign tumor of a common disorder of the female reproductive tract, affecting one in four women of reproductive age in Taiwan according to the Ministry of Health and Welfare. The growth of leiomyomas often leads to a reduced quality of life with symptoms such as heavy uterine bleeding, pelvic pain, and infertility. This study investigated the therapeutic potential of adlay on leiomyoma and its possible underlying mechanism. To achieve this, Eker rat-derived leiomyoma (ELT3) cells were used as an *in vitro* experimental model for screening the different fractions of adlay extracts, as well as various phenolic compounds, flavonoids, phytosterols and fatty acids. Since the use of human cell culture can strongly relate the effect observed *in vitro* to the response in patients with uterine leiomyoma, primary human leiomyoma cells were used to determine the efficacy of the active fractions and compounds on cell growth. The viability of primary human myometrial smooth muscle cells was also evaluated to observe the effect of the active fractions and compounds on cells that are in close proximity to the leiomyomas. Adlay may be a potential adjuvant for treating women with leiomyoma as it presents excellent anti-proliferation effects *in vitro*.

Methodology

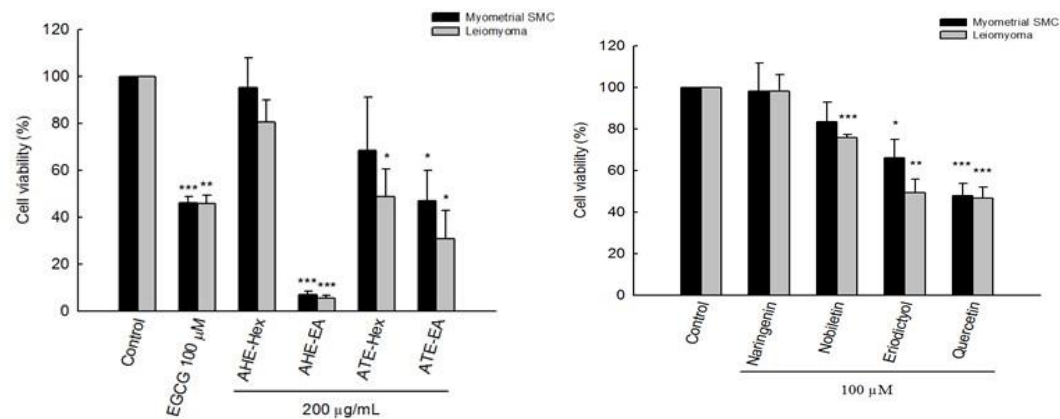


Result

Effect of ethanolic extract of adlay and subfractions on viability of ELT3 cells



Effect of ethanolic extract of adlay and compounds on viability of primary human leiomyoma and myometrium cells



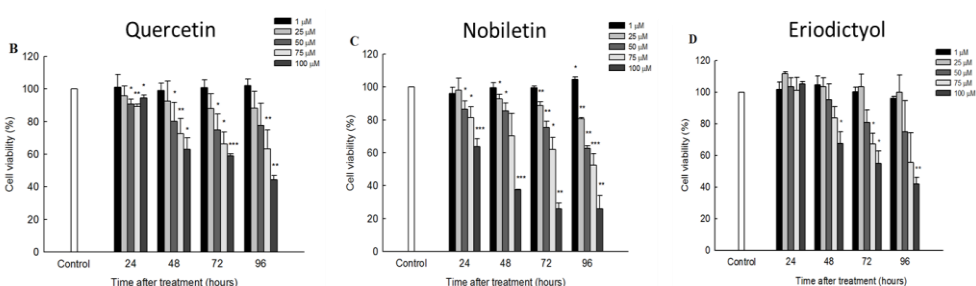
IC₅₀ values of active adlay sub-fractions and compounds on primary human leiomyoma cells

Constitute	IC ₅₀	AHE-EA (µg/mL)*	ATE-Hex (µg/mL)**	ATE-EA (µg/mL)***
AHE-EA	58.5 µg/mL			
ATE-Hex	193.9 µg/mL			
ATE-EA	149.9 µg/mL			
β-sitosterol	4.5 µM	0.46	1.28	0.9
Eriodictyol	97.5 µM	28.1 µg/mL		
Linoleic acid	97.2 µM	4.78	69.2	69
Nobiletin	155.9 µM	0.014		0.14
Quercetin	71.8 µM	21.7 µg/mL		0.03
Stigmastanol	2.8 µM	1.17 µg/mL	0.38	0.18
Stigmasterol	1 µM	0.41 µg/mL	0.46	0.32

Conclusions

- AHE-Hex, AHE-EA, ATE-Hex and ATE-EA reduced the growth of ELT3 and primary leiomyoma cells. Cell viability was inhibited by AHE-EA to a much greater extent.
- Naringenin, quercetin, nobiletin, eriodictyol, β-sitosterol, stigmasterol, and stigmastanol inhibited the growth of ELT3 cells.
- Quercetin, nobiletin, eriodictyol, β-sitosterol, stigmasterol, and stigmastanol/linoleic acid inhibited the growth of primary leiomyoma cells

Effect of time and dose on efficiency of flavonoids



科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/15

科技部補助計畫	計畫名稱: 白藜蘆醇對子宮肌瘤生長之影響效應:體內及體外試驗(A09)
	計畫主持人: 夏詩閔
	計畫編號: 103-2629-B-038-002- 學門領域: 性別主流科技計畫
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：夏詩閔		計畫編號：103-2629-B-038-002-				計畫名稱：白藜蘆醇對子宮肌瘤生長之影響效應：體內及體外試驗(A09)	
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	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	1	1	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（本國籍）	碩士生	4	4	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%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	數個計畫共同成果
	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	無						

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）

子宮肌瘤為女性常見的良性子宮腫瘤，在台灣約有百分之二十五的女性罹患子宮肌瘤，症狀包含骨盆腔疼痛、貧血、陰道大量出血、流產及不孕等。目前認為子宮肌瘤主要由荷爾蒙、生長因子、平滑肌細胞過度增生和細胞外基質不正常堆積所造成。由於飲食中的植化素具有預防或治療疾病的功效，其中，白藜蘆醇可以預防心血管疾病、延長壽命、抗發炎和調節脂肪代謝，並且可預防及治療癌症，例如攝護腺癌、乳癌和肝癌等。因此本研究目的為：探討白藜蘆醇如何影響子宮肌瘤細胞之生長，藉由MTT試驗及細胞計數來分析細胞存活率、以顯微鏡觀察細胞、以流式細胞儀分析細胞週期和細胞凋亡分佈狀態、並分析與細胞凋亡相關蛋白質表現量，以及與細胞外基質相關mRNA和蛋白質表現量。結果發現：1. 白藜蘆醇能抑制ELT3和UtSMC細胞增生和影響細胞型態的改變，使細胞呈現破碎、萎縮和浮起的型態；2. 白藜蘆醇能使細胞週期停滯於S、G2/M期並且調控與細胞凋亡相關蛋白質表現量進而促使細胞凋亡；3. 白藜蘆醇亦影響細胞外基質相關mRNA與蛋白質的表現量。故白藜蘆醇透過抑制細胞增生、促使細胞週期停滯和細胞凋亡，以及影響細胞外基質相關mRNA與蛋白質的表現量抑制子宮肌瘤細胞之生長。本研究的結果得知白藜蘆醇會透過抑制細胞增生，使細胞型態呈現圓起、破碎及浮起狀，且促使細胞週期停滯於S及G2/M期及細胞凋亡，並透過調節與細胞凋亡相關蛋白質的表現量，和影響與細胞外基質相關的mRNA及蛋白質表現量來抑制子宮肌瘤細胞之生成，故白藜蘆醇具有抑制子宮肌瘤細胞之效果，而未來可以做進一步的研究，使白藜蘆醇成為預防或

治療子宮肌瘤的療法之一。