

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052002

中西糖尿病藥與癌症藥物之間的交互作用

學校名稱：桃園市私立啟英高級中學

作者： 高二 籃冠宇 高二 張芳瑜	指導老師： 楊于萱
-------------------------	--------------

關鍵詞：第二型糖尿病、MCF-7、藥物交互作用

摘要

糖尿病與癌症皆為臺灣前十大死因之一，而糖尿病在多項文獻已被指出與癌症的發生有相關性。本研究旨在探討中西糖尿病藥與癌症藥物之間的交互作用對細胞的影響，實驗中選用了一種癌症及四種糖尿病藥物，其中，糖尿病藥物有一種西藥、三種中藥；採用乳腺癌細胞株 MCF7 並模擬第二型糖尿病患者血糖水準的變化進行實驗，以觀察癌細胞在不同環境經不同藥物處理後對細胞存活率的影響，同時採用成纖維細胞 3T3 以觀測藥物對正常細胞的影響；藉由 Crystal violet、ELISA 加以分析，發現西藥明顯抑制癌症藥物對 MCF7 的毒殺能力；同時以 Western blot 分析細胞蛋白質表現量變化、Flow Cytometer 測量 ROS 的表現量，以探討藥物之間的交互作用。未來希望在胰臟細胞 Ins1、肝細胞 HEPG2 觀察藥物交互作用對糖尿病的影響。

壹、研究動機

我們曾在高中基礎生物上內分泌的章節學到有關糖尿病的內容，而文獻上許多研究都發現糖尿病患有較高的罹癌風險，特別是第二型糖尿病(type II diabetes,T2D)，與許多癌症有相似的危險因子(沈等,2011)。且臺灣的流行病學及全球性的統計資料都顯示，癌症與糖尿病的發生率、盛行率都呈現上升的趨勢(陳,2005)。癌症居臺灣十大死因之首，糖尿病則名列第五(衛生福利部統處,2017)。若共同患有糖尿病和癌症病患逐年提升，同時服用糖尿病和癌症藥物的情形勢必難以避免，但是藥物之間會產生交互作用，如此一來又會對人體產生什麼影響呢?就此我們想對糖尿病及癌症藥物之間的交互作用做深入探討。

貳、研究背景

一、糖尿病

(一)診斷標準

根據衛生福利部國民健康署公告之標準，糖化血色素(HbA1c) $\geq 6.5\%$ 、空腹血漿血糖 ≥ 126 mg/dL、口服葡萄糖耐受試驗第 2 小時血漿血糖 ≥ 200 mg/dL、典型的高血糖症狀(多吃、多喝、多尿與體重減輕)且隨機血漿血糖 ≥ 200 mg/dL，四項表現只要符合其中一項即可診斷為糖尿病。

(二)簡介

糖尿病是一種血液處於高血糖狀態，也就是身體無法正常代謝葡萄糖的代謝疾病。糖尿病又分為主要的三種類型。其中，T2D 為罹患比例最高的類型，故我們選用 T2D 作為研究的糖尿病類型。

1. 第一型糖尿病(type I diabetes,T1D)

胰島素依賴型糖尿病(insulin-dependent diabetes mellitus)，被視為先天性糖尿病，主要成因為自身胰腺 β 細胞無法分泌足夠胰島素。

2. 第二型糖尿病(type II diabetes,T2D)

非胰島素依賴型糖尿病(noninsulin-dependent diabetes mellitus)，被視為後天型糖尿病，主要成因為細胞胰島素受器的胰島素抗性和胰腺 β 細胞的衰竭，導致器官無法接收胰島素而作用。

3. 妊娠型糖尿病(gestational diabetes mellitus,GDM)

為孕期前沒有糖尿病而在孕期後出現高血糖水平的狀態。

二、藥物交互作用

藥物受其他物質影響而造成減弱或增強其作用，或是改變其作用速度的現象，倘若交互作用的療效有利於病患則為協同效應(synergistic effects)，反之，其可能擴大副作用的效果，甚至危及性命。

三、糖尿病對癌症的風險

糖尿病已被研究指出與提高癌症發生率有相關性(Shi, et al.,2014)，根據多項文獻顯示，T2D 對乳腺癌具有一定影響力。如：患有 T2D 的女性乳腺癌發病率增加了 23% (Liao, et al.,2011；Hardefeldt, et al.,2012)。在一研究 T2D 導致的胰島素分泌異常與乳腺癌相關性的小鼠實驗，顯示胰島素升高與乳腺癌罹患率呈正相關(Novosyadlyy, et al.,2010)。

四、藥物

二甲雙胍(Metformin, Met)為 T2D 的一線用藥，故我們選用此藥物作為研究。近年來，越來越多研究尋求中西藥聯合治療是否能達到減少藥物本身不良效用的產生，所以我們選用了 3 種中藥，萃取其成分作比較。

(一)二甲雙胍(Metformin, Met)

T2D 的一線用藥，Met 不會刺激胰島素分泌，所以不會因為劑量不適當而造成低血糖，與其他降血糖藥物不同，Met 可以降低膽固醇、三酸甘油酯、低密度蛋白膽固醇(LDL-C)，以及增加高密度蛋白膽固醇(HDL-C)，間接促進體重的控制。但腎功能不良的患者服用，可能會引起致命性乳酸毒血症(Metformin-associated lactic acidosis, MALA)。雖然 Met 擁有許多好處，但是其藥效不強。

(二)馬齒莧(*P. oleracea*)

又稱為豬母乳、長壽菜。為一年生小型肉質草本植物。這種植物不斷被用於傳統醫學中的抗糖尿病藥物，其水萃法提出的物質可降低 T1D 老鼠(藉由鏈脲佐菌素(STZ)所引起的 T1D)的血糖水平(Borji, et al.,2017；Moukette, et al.,2017；Fatemi Tabatabaei, et al.,2016；Ahmed, et al.,2013)，同時具有降血脂的功能(Nazeam, et al.,2017)。也可以降低 T2D 老鼠的血糖，並對胰臟具有保護作用(Ramadan, et al.,2017；Gong, et al.,2009)，並減輕糖尿病所併發的腎病(Lee, et al.,2012)。增加脂肪細胞對葡萄糖的吸收(Chen, et al.,2012；Park, et al.,2018)。T2D 病患在長期服用馬齒莧的種子後，高密度脂蛋白膽固醇(HDL C)顯著增加，血糖、降血脂和胰島素抗性皆有顯著下降的現象(Wainstein, et al.,2016；El-Sayed,2011；Heidarzadeh, et al.,2013)。

(三)黑參(Black ginseng)

人蔘(*Panax ginseng*)經九蒸九曝後所得產物，黑蔘較紅蔘及白蔘擁有更多種的人蔘皂苷(Kim, et al.,2007；Kang, et al.,2017)，黑蔘提取物可保護胰臟 β 細胞免受 ROS 造成的細胞傷害(Kim, et al.,2016)，藉由提高肝臟中 AMPK 的磷酸化表現、肝臟中葡

葡萄糖轉運蛋白 2 和肌肉中葡萄糖轉運蛋白 4 的活性，以增加葡萄糖的代謝，發揮治療糖尿病的效果(Seo, et al.,2016；Kang, et al.,2017)。

(四)黃芪(Astragalus)

用於多種治療糖尿病的中藥配方(Li, et al.,2004；Jia, et al.,2003)，其中的黃芪多醣可在 T1D 的小鼠中觀察到其透過調整發炎反應以保護胰臟 β 細胞免於自身免疫的破壞，進而提升胰臟 β 細胞數量(Agyemang, et al.,2013；Li, et al.,2007)；在 T2D 中，則可觀察到其藉由降低胰島素受器的胰島素抗性以改善糖尿病症(Wei, et al.,2018；Ke, et al.,2017；Mao, et al.,2009)，在糖尿病性心肌病中也顯示其可能透過降低氧化壓力，而減少細胞的凋亡、增加心肌細胞的增殖，進而改善糖尿病性心肌病(Ju, et al.,2017)，黃芪多醣同時也在糖尿病腎病中腎的損傷有一定保護作用(Nie, et al.,2014)。

(五)順鉑(Cisplatin, CDDP)

臨床上對多種癌症的一線用藥，抑制癌症的相關機制為過量的 ROS 產生造成細胞傷害、抑制細胞 DNA 的合成及複製並降低細胞的抗氧化能力，導致 DNA 損傷、修復功能異常(Zamble, et al.,1995；Cohen, et al.,2001；Wang, et al., 2005；Dasari, et al., 2014)，在臨床上的應用相當廣泛，但有耐藥性、可能引發腎毒性等副作用(Arany, et al., 2003；Lippert, 1999)。

五、細胞植株

(一)Michigan Cancer Foundation-7 細胞株(MCF7)

MCF7 為乳腺癌細胞系，侵襲性較差，常被使用於乳腺癌細胞研究，研究指出糖尿病的晚期糖化最終產物(Advanced glycation end-product)增加乳腺癌細胞植株 MCF7 的增殖(Matou-Nasri S et al.,2017)，故我們選用 MCF7 細胞株作為乳腺癌研究植株。

(二)3T3 細胞株(3T3)

3T3 細胞株來源是小鼠的成纖維細胞(fibroblast cell)。因人體分布最廣的組織為結締組織，且纖維細胞為生物結締組織的基本構造。故我們選用 3T3 細胞株作為正常細胞以當作研究中與癌症細胞的對照組。

參、研究目的

- 一、檢測不同藥物濃度對 MCF7 和 3T3 的影響
- 二、探討不同糖尿病藥物與癌症藥物的交互作用對 MCF7 和 3T3 的影響以及中西藥效果差別

肆、研究設備及器材

MCF-7 細胞株(MCF7)、3T3 細胞株(3T3)、直徑 10cm 培養皿(dish)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、FBS (Fetal bovine serum, 胎牛血清)、P/S (Penicillin & Streptomycin)、碳酸氫鈉(sodium bicarbonate)、PBS (Phosphate buffered saline)、TE (Trypsin-EDTA)、15ml 離心管、50ml 離心管、離心機、24 格孔盤、96 格孔盤、無菌操作台(Incubator)、培養箱(Hood)、電動吸管(pipette aid)、微量吸管分注器 (Pipette)、微量吸管尖(Pipette tip)、光學顯微鏡、恆溫水浴槽、馬齒莧(P.oleracea)、黑蔘(Black Ginseng)、黃芪(Astragalus)、順式-二氯二氨合鉑(II) (Cisplatin, CDDP)、二甲雙胍(Metformin, Met)、二次水(dd H₂O)、三次水(Q 水)、99.5%酒精、液態氮、鐵鎚、剪刀、刮勺、稱量紙、研鉢、微量離心管乾式恆溫加熱器(Eppendorf thermostat heat block dry plate hot)、電子天平、烘箱、過濾器(filter)、1.5&2cc 微量離心管(eppendorf)、-20°C 冰箱、4°C 冰箱、結晶紫(Crystal violet)、4%Paraformaldehyde、酸酒精(50% alcohol+ 200 μ l Acetic acid in 200ml)、ELISA reader、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Tris-HCl + NaCl+ deoxycholic acid+ NP-40+ EDTA)、牛血清白蛋白(BSA)、海綿片、Protein assay Dye Reagent Concentrate、US/VIS Spectrophotometer、電泳用厚玻璃片、電泳用薄玻璃片、鑄膠臺膠條、鑄膠架、鑄膠臺、pH8.8 下膠(separating gel)、pH6.8 上膠(stacking gel)、10X Running Buffer(0.025M Tris+ 0.192M Glycin+ 0.1% SDS)、Protein assay Dye Reagent Concentrate、4X Sample Buffer、副槽心、樣品梳、垂直電泳槽、電源供應器、甲醇、塑膠夾片、轉漬用海綿墊片、圖畫紙、聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF 膜)、10X transfer buffer(Tris 250mM+ Glycine 1.92M)、電磁加熱攪拌器、磁石、保冷劑、冰塊、抗體、脫脂奶粉、TBS Buffer (Tris-base+ NaCl + Tween20)、pH2 Stripe Buffer(1%SDS+25mM Glycine-HCl)、4°C 冷房、底片、Chemiluminescence Detection Kit(ReagentA&B)、鑷子、手套、顯影劑(Developer)、定影劑(Fixer)。

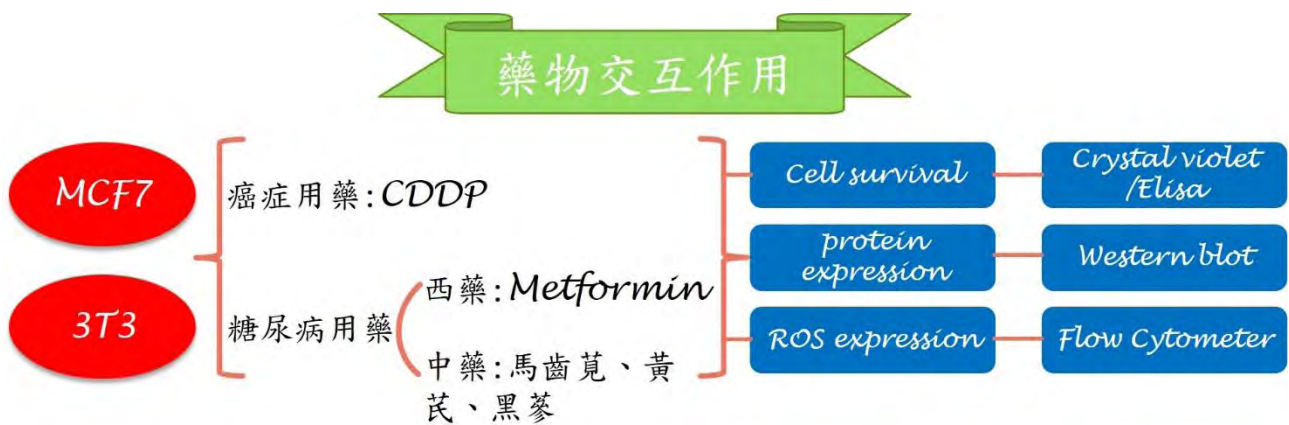


Fig.1 中藥糖尿病藥物

A. 馬齒莧 B.黑蓼 C.黃芪 D.粉化馬齒莧 E.粉化黑蓼 F.粉化黃芪

伍、研究過程或方法

一、實驗架構圖



二、實驗步驟

(一)細胞培養

實驗細胞(MCF7、3T3)剛從液態氮中解凍，細胞尚不穩定，因此需先經過繼代培養至第3代之後才能開始使用，我們使用的細胞是P9代以後的細胞。細胞培養在直徑10cm的培養皿內，用含有10%FBS (Fetal bovine serum, 胎牛血清) + 1%P/S (Penicillin & Streptomycin)+ sodium bicarbonate(3.7g/L)的DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)培養，置於37°C、5%二氧化碳濃度的培養箱內培養。實驗前一天，將細胞轉移至24孔盤中搖晃均勻並放入培養箱內。

- 1.從培養箱中取出細胞
- 2.吸掉培養皿(dish)中培養液(medium)
- 3.加入2ml 1X PBS 清洗 dish，防止 medium 與胰蛋白酶(Trypsin)作用
- 4.吸掉 PBS，加入 Trypsin 3ml，使附著在 dish 上的細胞脫落
- 5.放入培養箱 2~3 分鐘，等待 Trypsin 作用
- 6.加入 6ml medium，以停止 Trypsin 與細胞作用
- 7.將培養皿內含細胞之培養液放入 15ml 離心管
- 8.離心：1000rpm、5 分鐘
- 9.將離心後之廢液吸掉，以 1ml medium 反覆回沖，使細胞分布均勻
- 10.將 0.3ml(3T3:0.7ml)含細胞之 medium 分入 10cm dish，並加入 8ml medium 作為母盤
- 11.將剩餘 0.7ml(3T3:0.3ml)含細胞之 medium 分入 50ml 離心管，並加入 12.5ml medium，隨機分配至 24 孔盤，每格 500 μ l
- 12.將母盤及 24 孔盤放入培養箱

(二)萃取

- 1.馬齒莧(*P.oleracea*)
 - (1)先將馬齒莧切成小塊，再用研鉢將其粉化
 - (2)放入 40°C 烘箱中，烘乾兩小時
 - (3)將粉末和 Q 水放入 eppendorf(粉末:Q 水=1g:9ml)，並用 100°C 的乾式恆溫加熱器加熱 30 分鐘
 - (4)以 1500rpm 的轉速離心 10 分鐘，取其上清液，再用 filter 過濾，並放入 -20°C 的冰箱中保存

2.黑蔘(Black ginseng)

- (1)先將黑蔘切成小塊，再用研鉢將其敲碎
- (2)用液態氮急速冷凍，再將其敲擊粉化(具有黏性，研鉢無法將其粉化)
- (3)放入 40°C 烘箱中，烘乾兩小時
- (4)將粉末和 99.5%alchol 放入 eppendorf(粉末:alchol=1g:10ml)，並用 70°C 的乾式恆溫加熱器加熱 30 分鐘
- (5)以 1500rpm 的轉速離心 10 分鐘，取其上清液，再用 filter 過濾，並放入 -20°C 的冰箱中保存

3.黃芪(Astragalus)

- (1)先將黃芪切成小塊，再用研鉢將其敲碎
- (2)用液態氮急速冷凍，再將其敲擊粉化(具有黏性，研鉢無法將其粉化)
- (3)放入 40°C 烘箱中，烘乾兩小時
- (4)將粉末和 99.5%alchol 放入 eppendorf(粉末:alchol=1g:6ml)，並用 70°C 的乾式恆溫加熱器加熱 30 分鐘
- (5)以 1500rpm 的轉速離心 10 分鐘，吸掉上清液，將剩餘物的酒精揮發，得其粉末
- (6)將粉末和 Q 水放入 eppendorf(粉末:Q 水=1g:5ml)，並用 100°C 的乾式恆溫加熱器加熱 30 分鐘
- (7)以 1500rpm 的轉速離心 10 分鐘，取其上清液，再用 filter 過濾，並放入 -20°C 的冰箱中保存

(三)配置藥品

1.CDDP

將 0.015g 的 CDDP 加入 10ml 的 Q 水，濃度為 10 μ M，分成十份，各別裝入十個 eppendorf，並放入-20°C 的冰箱中保存，過程需避光。

2.Metformin

將 2.15g 的 Metformin 加入 100ml 的 PBS，濃度為 0.125mM，裝入 15cc 的離心管中，並放入-20°C 的冰箱中保存。

(四)模擬第二型糖尿病

在加藥前 24 小時將 24well 的培養液換成 LG DMEM(1g/L)，使細胞適應於 LG 環境後，換成 HG DMEM(4.5g/L)和加藥。HG DMEM 為一般細胞培養用 medium，LG DMEM 則為葡萄糖含量較少的 medium，為模擬第二型糖尿病，我們先將細胞培養於 LG 環境下 24 小時以代表正常人體之血糖標準，培養 24 小時後將 medium 換為 HG DMEM，模擬為第二型糖尿病的血糖水準改變情形。實驗中標示為 LG 者表示自藥物處理前 24 小時就培養在 LG DMEM 中以作為模擬的第二型糖尿病(HG)的對照組。實驗中標示為 HG 者代表模擬的第二型糖尿病。

(五)結晶紫(Crystal violet)

為了檢測藥物對細胞的毒殺能力，我們使用 Crystal violet 觀察細胞在不同濃度的藥物，24 小時後細胞的存活率

- 1.將上清液吸除，以 PBS wash 1 次
- 2.加入 4%Paraformaldehyde，浸泡 30 分鐘後吸除
- 3.以 PBS 清洗 1 次
- 4.加 Crystal violet，浸泡 10 分鐘(需避光)後回收染劑
- 5.以 ddH₂O 清洗 3 次
- 6.烘乾 2 小時
- 7.每格 well 加 200 μ l 酸酒精，持續搖晃約 5 分鐘
- 8.吸取 100 μ l 至 96 孔盤
- 9.測 A550nm

(六)西方墨點法分析(Western blot)

CDDP 會藉由提高 ROS 的量並降低細胞的抗氧化能力來破壞細胞的 DNA，促使細胞凋亡。故我們想以西方墨點法來檢測 p-Nrf2 的表現量和 cell survival 的關係

1. 蛋白質樣本製備

將細胞依實驗以藥物作用 24 小時後，將細胞上清液吸除，以 PBS 清洗 1 次後，每格 well 加入 Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer)各 200 μ l 裂解細胞以提取細胞中的蛋白質並刮除，將細胞液分別裝入微量離心管。

2. 蛋白質定量

先配置 Protein assay Dye Reagent Concentrate(1:4 以 ddH₂O 稀釋)工作液，將 BSA(1mg/1ml)以工作液稀釋成 0,5,10,15,20 μ g/1ml 的標準液，以 US/VIS Spectrophotometer 繪製標準直線，再將每個蛋白質 sample 2 μ L 各加入 998 μ L 工作液，測定蛋白質濃度。並將蛋白質 sample 取 198 μ L 加入 66 μ L sample buffer，以備電泳使用。

3. 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)配置

將電泳用的厚、薄玻璃以酒精消毒擦拭過後架置在塑膠夾板上，加入 dd H₂O 測漏以確認裝置架設完全。依序加入配置好的所需濃度之下膠(Separating gel)、上膠(Stacking gel)，在加入下膠後以 dd H₂O 將膠面氣泡趕除，待下膠凝固後方可加入上膠，同時插入電泳用的尺梳，等待上膠凝固。

4. 蛋白質電泳(Electrophoresis)

將備製好的膠片放入電泳槽中並注入 running buffer。將各細胞液依其蛋白質濃度取所需的量(蛋白質須先以 100°C 加熱 5 分鐘後馬上放置在冰中降溫，並以離心機將內容物均勻混合)，以達到每個組別的蛋白質等量，分別把各細胞液及 protein marker 加入各個電泳槽中，蓋上上蓋並接上電源供應器開始電泳分析。(先用 70V，等待 sample 至跑到下膠且達水平狀態，把電壓改成 120V)

5. 轉漬(Transfer)

完成電泳後，將厚薄玻璃分開並把上膠切除，將下膠與 PVDF 膜(須先以甲醇活化)放置在一起，並在兩側以圖畫紙、海綿包覆放入轉漬用夾板中，將整個裝置放入轉漬槽中並注入 transfer buffer，為使過程中維持低溫，須將電泳槽放置在冰桶內，蓋上上蓋並接上電源供應器開始轉漬(100V；90 mins)

6. Blocking

將轉漬好的 PVDF 膜裁切所需蛋白質區段，以 5%奶粉進行 Blocking，一小時。

7. 一、二級抗體

將 Blocking 完成後的膜以 TBS-T 緩衝液沖洗 5 次，每次 10 分鐘，加入相符的一級抗體(依表 1 比例稀釋)放置在 4°C 環境中持續搖晃至少 8 小時，再以 TBS-T 緩衝液沖洗 5 次，每次 10 分鐘，加入二級抗體(用 5%奶粉以 1:3000 比例相溶)，放置室溫持續搖晃作用 1 小時，再以 TBS-T 緩衝液沖洗 5 次，每次 10 分鐘。

抗原	物種來源	稀釋比例	購買來源	Cat. No
GAPDH	Rabbit	1:40000(in 5%BSA)	Genetex	GTX100118
p-Nrf2	Rabbit	1:1000(in 1%BSA)	Genetex	GTX61664
Rabbit IgG(HRP)	Goat	1:3000(in 5%奶粉)	Genetex	GTX213110-01

表 1 一、二級抗體

8. 壓片

加入 LumiLong Plus Chemiluminescence Detection Kit 試劑 A、B 反應後，已底片進行壓片，最後將壓片完的底片使用電腦掃片記錄。

(七)流式細胞儀分析(Flow Cytometer)

為檢測細胞中的 ROS 量，我們使用 DCFHDA 染色 ROS 並以流式細胞儀進行分析，觀察細胞在藥物分別作用 1 小時及、3 小時後的表現量。

1. 將細胞依實驗以藥物處理 1 小時/3 小時後，加入 DCFHDA 染色 ROS，放置在 37°C 培養箱中作用 30 分鐘
2. 以 Trypsin/EDTA Solution (TE)使細胞懸浮起並收入微量離心管
3. 放入離心機以 1500rpm10 分鐘離心，吸除上清液
4. 用 PBS 清洗 1 次
5. 再離心一次，並吸除上清液
6. 加入 500 μ l PBS 沖散細胞團
7. 以流式細胞儀進行分析

陸、研究結果與討論

一、檢測各藥物對 MCF7 的適用濃度

最後藥物濃度選定：CDDP 25 μ M、Metformin 10mM、馬齒莧 10 μ L、黑蓼 5 μ L、黃芪 80 μ L。我們觀察到馬齒莧在 1 μ L~5 μ L 時癌細胞存活率下降，10 μ L~15 μ L 時癌細胞存活率些微上升，20 μ L~100 μ L 時則是使癌細胞存活率下降；黑蓼因溶劑是酒精，而酒精對細胞的傷害很大，故無法觀察黑蓼對細胞的存活率影響；黃芪在 10 μ L 到 80 μ L 反而是讓 MCF7 增生的，推論三種中藥中，黃芪不適合作為抗癌藥物使用。

(一)以 Crystal violet 檢測癌症藥物對 MCF7 的毒殺能力

1.檢測 CDDP 的藥物濃度，計算 IC50

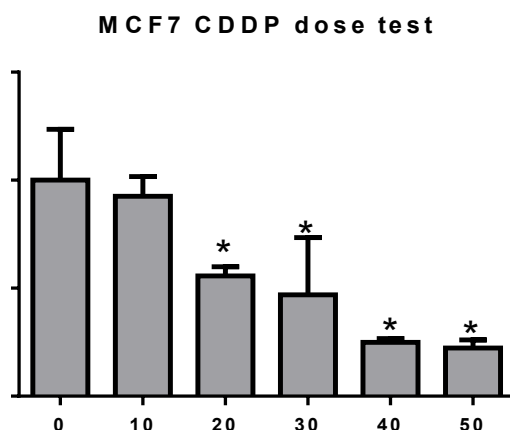


Fig.2-A CDDP 的藥物濃度測試

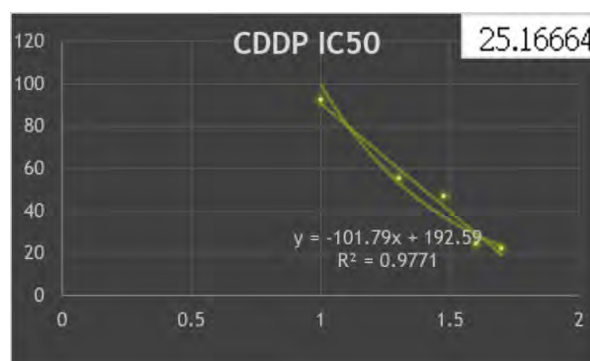
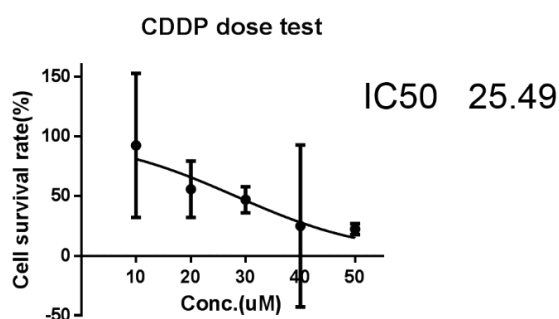


Fig.2-B 以 GraphPad Prism 6 計算 CDDP IC50

Fig.2-C 以 Excel 計算 CDDP IC50

A.MCF7 細胞以不同濃度的 CDDP 處理 24 小時，以 crystal violet 檢測細胞存活率 (N=4)

BC.分別以 GraphPad Prism 6 和 Excel 計算 IC50，最後選定 25 μ M CDDP 作為我們的藥物濃度

(二)以 Crystal violet 檢測糖尿病藥對 MCF7 的毒殺能力

為了探討 CDDP 和糖尿病藥物之間的交互作用，我們希望選取 MCF7 在只加糖尿病藥且不影響其生長的情況下的最高濃度。

1. 檢測 Metformin 的藥物濃度

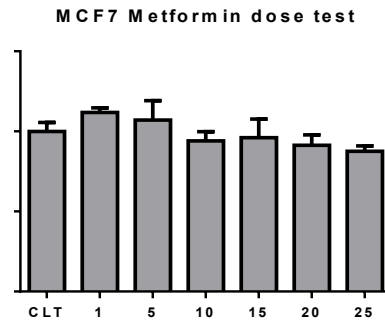


Fig.3 Met 的藥物濃度測試

MCF7 細胞以不同濃度的 Metformin 處理 24 小時，以 crystal violet 檢測細胞存活率 (CLT 的 N=6 Met 的 N=3)。最後我們選取 10mM 作為 Metformin 的濃度

2. 檢測 P.oleracea 的藥物濃度

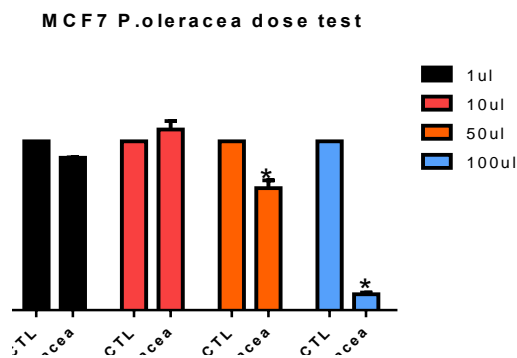


Fig.4-A P.oleracea 的藥物濃度測試

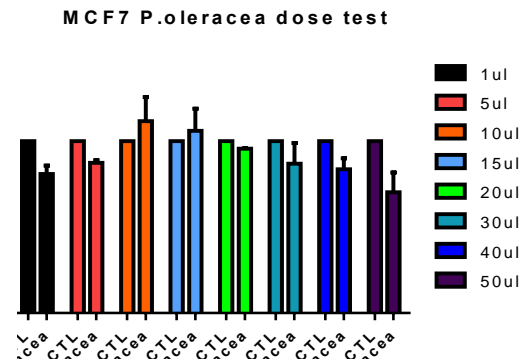


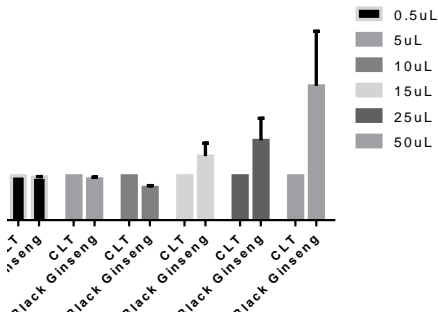
Fig.4-B P.oleracea 的藥物濃度測試

A.MCF7 細胞以不同濃度的 P.oleracea 處理 24 小時，以 crystal violet 檢測細胞存活率(N=3)。因為沒有前人的文獻輔佐，我們先選用大範圍的藥物濃度做測試，以確認最適濃度的粗略範圍。

B.MCF7 細胞以不同濃度的 P.oleracea 處理 24 小時，以 crystal violet 檢測細胞存活率(N=2)。最後我們選取 10 μ L，作為 P.oleracea 的濃度

3. 檢測 Black Ginseng 的藥物濃度

MCF7 Black Ginseng dose test



99.5%酒精

黑蔘

Black Ginseng (μ L)

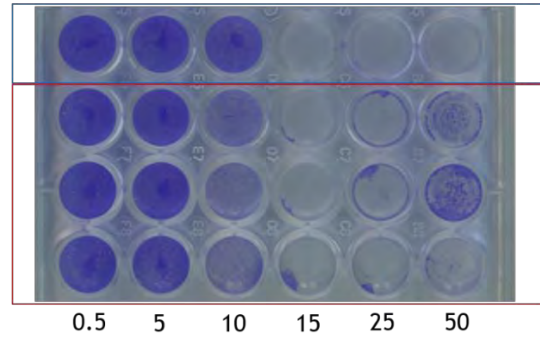


Fig.5-A Black Ginseng 的藥物濃度測試

Fig.5-B Black Ginseng 的藥物濃度測試

MCF7 細胞以不同濃度的 Black Ginseng 處理 24 小時，以 crystal violet 檢測細胞存活率(N=3)。最後我們選取 5 μ L 作為 Black Ginseng 的濃度

4. 檢測 Astragalus 的藥物濃度

MCF7 Astragalus dose test

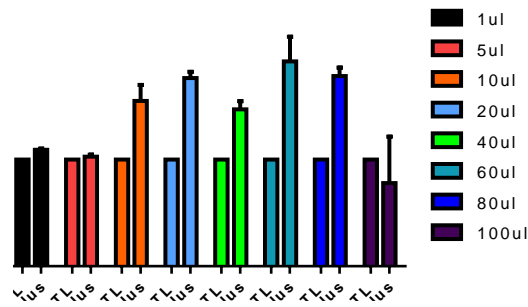


Fig.6 測試 Astragalus 的藥物濃度

MCF7 細胞以不同濃度的 Astragalus 處理 24 小時，以 crystal violet 檢測細胞存活率(N=2)。最後我們選取 80 μ L 作為 Astragalus 的濃度

二、檢測各糖尿病藥物與癌症藥物 CDDP 之間的交互作用對細胞的影響

先在加藥前 24 小時將 24well 的培養液換成 LG DMEM，使細胞適應於 LG 環境後，換成 HG DMEM 和加藥。

我們觀察到 Metformin 在低糖環境時，具有毒殺 MCF7 的功能；在高糖環境時，細胞存活率只有些微下降。而在高糖環境時，以只加 CDDP 作為對照，Metformin 加 CDDP 的細胞存活率是有回升的情況。而其他三個中藥，則對 CDDP 的細胞存活率無顯著影響。

(combine 表示 CDDP 加上糖尿病藥物)

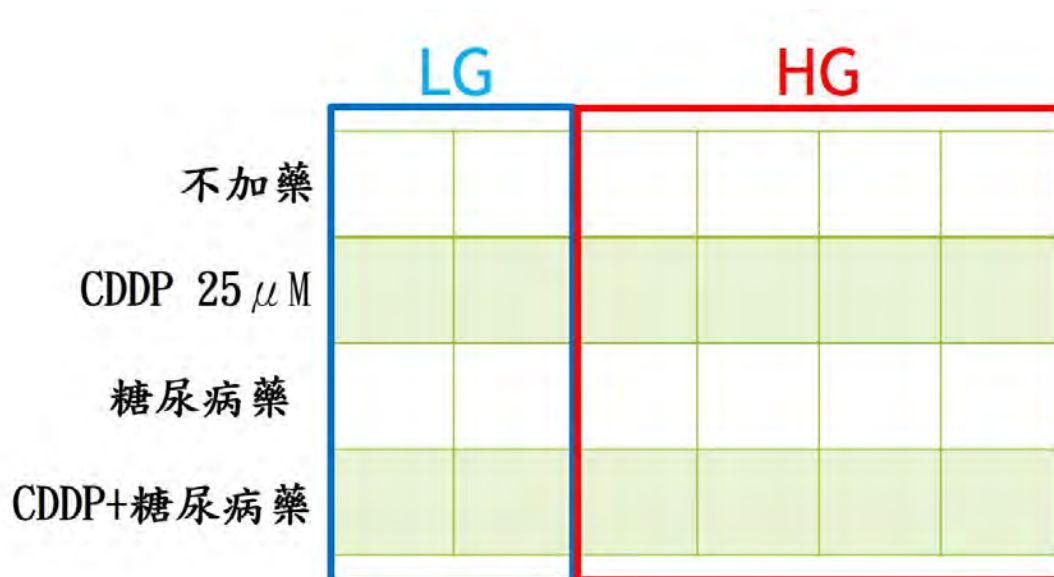


Fig.7 實驗 24well 藥物配置

1.以 Crystal violet 檢測 CDDP 和 Metformin combine 對細胞的毒殺能力

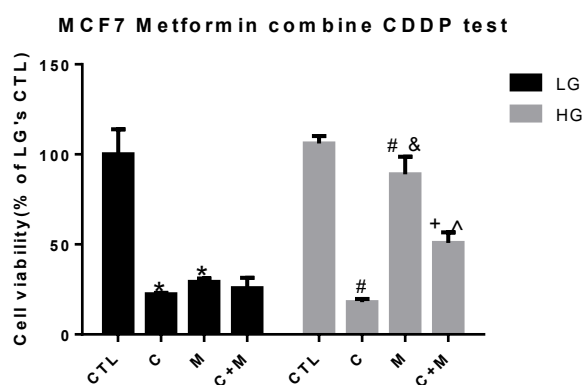


Fig.8 MCF7 Met combine

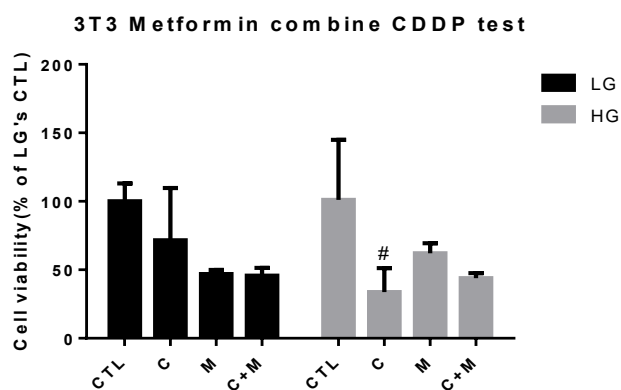


Fig.9 3T3 Met combine

Fig.8

- (1) LG 時，只加 CDDP 與只加 Metformin 的細胞存活率都明顯小於 CTL 組。
- (2) HG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。只加 Metformin 的細胞存活率與 CTL 組有顯著差異。

(3) LG 只加 Metformin 的細胞存活率明顯小於 HG 只加 Metformin 的組別。

(4) HG CDDP 加 Metformin 與 HG CDDP 和 LG CDDP 加 Metformin 皆有顯著差異。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較，+與 HG C 比較，^與 LG C+M 比較，&與 LG M 比較， $P < 0.05$

Fig.9

(1) HG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。

(2) LG CDDP 和 LG Metformin 的細胞存活率小於 LG CTL 組。HG Metformin 的細胞存活率小於 HG CTL 組。但均未達顯著差異，推測可能與實驗 sample 誤差值過大。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較， $P < 0.05$

2.以 Crystal violet 檢測 CDDP 和 P.oleracea combine 對細胞的毒殺能力

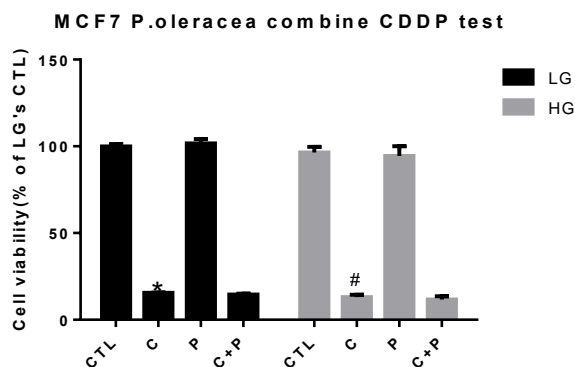


Fig.10 MCF7 P.oleracea combine

Fig.10

(1) LG 時，只加 CDDP 的細胞存活率都明顯小於 CTL 組。

(2) HG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較， $P < 0.05$

Fig.11

(1) HG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。

(2) LG CDDP 的細胞存活率小於 LG CTL 組。但未達顯著差異，推測可能與實驗 sample 誤差值過大。

#與 HG CTL 比較， $P < 0.05$

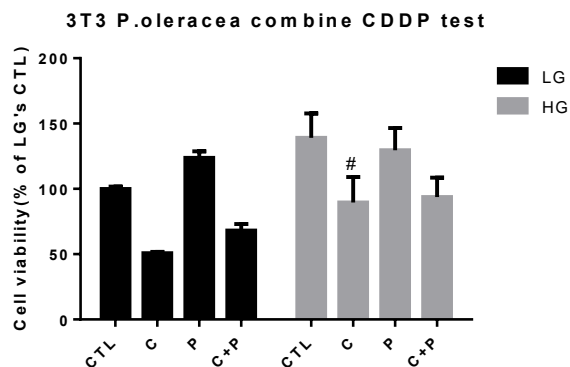


Fig.11 3T3 P.oleracea combine

3.以 Crystal violet 檢測 CDDP 和 Black Ginseng combine 對細胞的毒殺能力

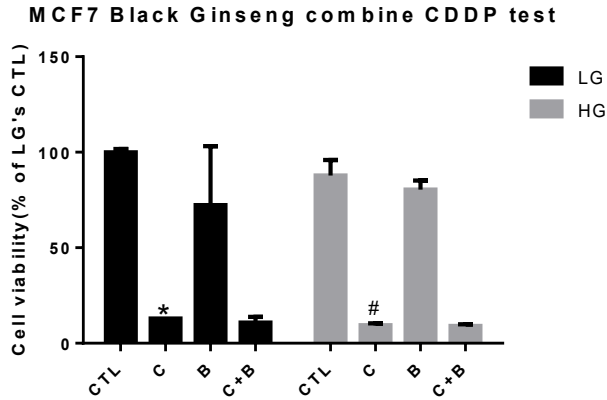


Fig.12 MCF7 Black Ginseng combine

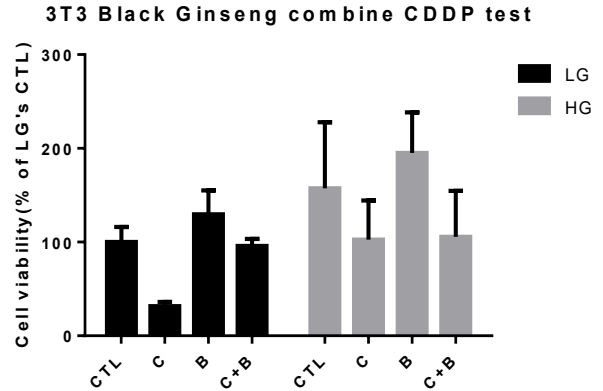


Fig.13 3T3 Black Ginseng combine

Fig.12

- (1) LG 時，只加 CDDP 的細胞存活率都明顯小於 CTL 組。
- (2) HG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。
- (3) 相對於 LG CTL，LG Black Ginseng 的細胞存活率是下降的。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較，P<0.05

Fig.13

- (1) LG CDDP 的細胞存活率小於 LG CTL 組。HG CDDP 的細胞存活率小於 HG CTL 組。但均未達顯著差異，推測可能與實驗 sample 誤差值過大。

4.以 Crystal violet 檢測 CDDP 和 Astragalus combine 對細胞的毒殺能力

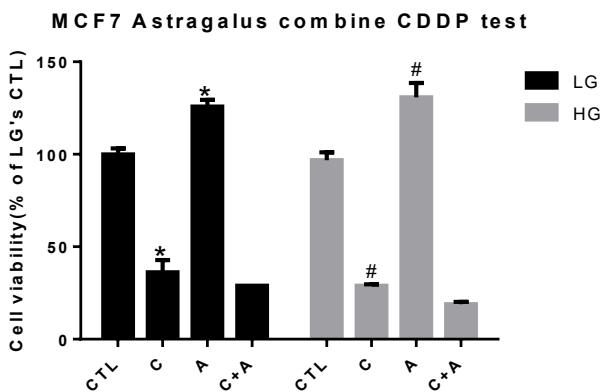


Fig.14 MCF7 Astragalus combine

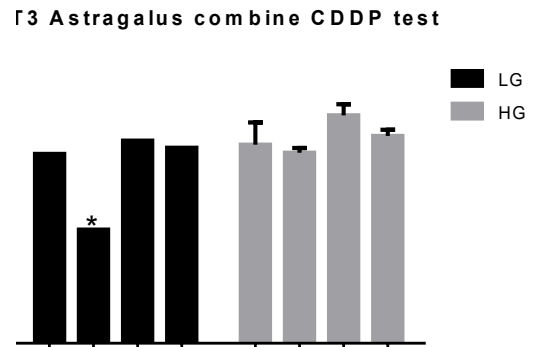


Fig.15 3T3 Astragalus combine

Fig.14

(1) LG 時，只加 CDDP 的細胞存活率都明顯小於 CTL 組。只加 Astragalus 的細胞存活率與 CTL 組有顯著差異。

(2) HG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。只加 Astragalus 的細胞存活率與 CTL 組有顯著差異。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較， $P < 0.05$

Fig.15

(1) LG 時，只加 CDDP 的細胞存活率明顯小於 CTL 組。

*與 LG CTL 比較， $P < 0.05$

四、western blot

CDDP 可以提高 ROS 並降低癌細胞的抗氧化因子來毒殺癌細胞。而在正常細胞中，phosphorylated Nuclear Factor erythroid 2-Related Factor 2 (p-Nrf2)被認為是預防糖尿病併發症的有效指標，如心血管疾病和糖尿病腎病(David, et al,2017)。故我們想觀察 p-Nrf2 在 MCF7 和 3T3 中的表現量，來推斷藥物是否有做為抗癌和抗糖尿病的潛力。

CDDP 明顯降低 MCF7 的 p-Nrf2 的表現量，而同時加 Metformin 時，有些微的上升。P.oleracea 明顯提高 MCF7 的 p-Nrf2 的表現量。Black Ginseng 在低糖時些微提高了 MCF7 的 p-Nrf2 的表現量，但是相對於 LG CDDP，LG CDDP 加 Black Ginseng 的 p-Nrf2 表現量明顯降低。MCF7 在高糖環境下的 p-Nrf2 表現量些微下降，我們推測是因為 MCF7 在高糖環境下，ROS 的量較少。正常情況來說，當身體的 ROS 量提高，會導致與 Keap1 結合的 Nrf2 被降解，並產生下游抗氧化因子，來達成保護 DNA 免於 ROS 的傷害(Kansanen, et al,2012)。

高糖環境下，3T3 的 p-Nrf2 的表現量明顯降低，代表高糖對正常細胞來說傷害很大。我們發現 Metformin 會大幅降低 3T3 的 p-Nrf2 的表現量，P.oleracea 會大幅提升 3T3 的 p-Nrf2 的表現量，Black Ginseng 則是些微降低 3T3 的 p-Nrf2 的表現量。而 CDDP 在高糖情況下都有提升 p-Nrf2 的表現量。

以 imagej 軟體分析灰階，以 LG 不加藥組別作為 CTL 組，其灰階作為 100%表示相對表現量的對照。

(一)MCF7

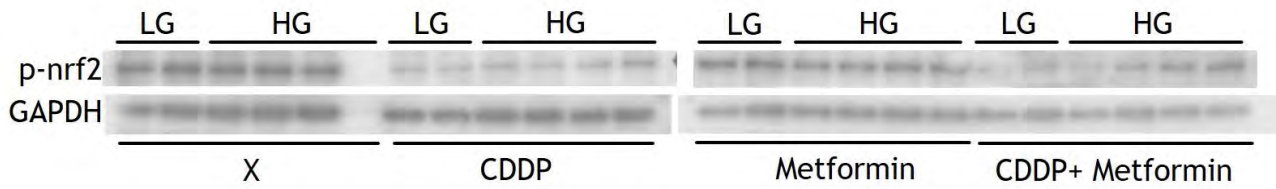


Fig.16 MCF7 Met combine 蛋白質表現量

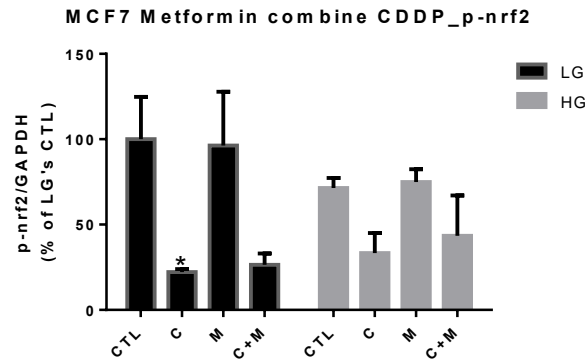


Fig.17 MCF7 Met combine p-Nrf2 相對表現量圖

1.LG時，只加 CDDP 的 p-Nrf2 明顯小於 CTL 組。

*與 CTL LG 比較， P<0.05

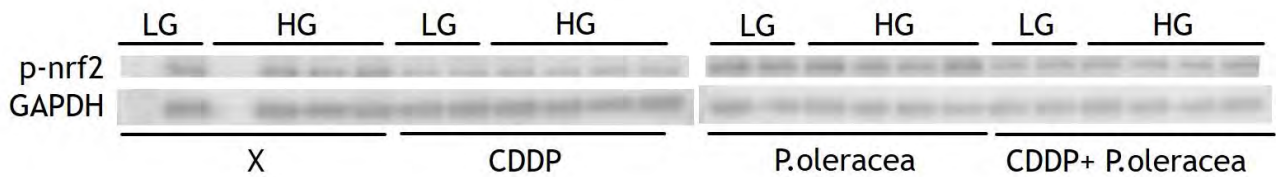


Fig.18 MCF7 P.oleracea combine 蛋白質表現量

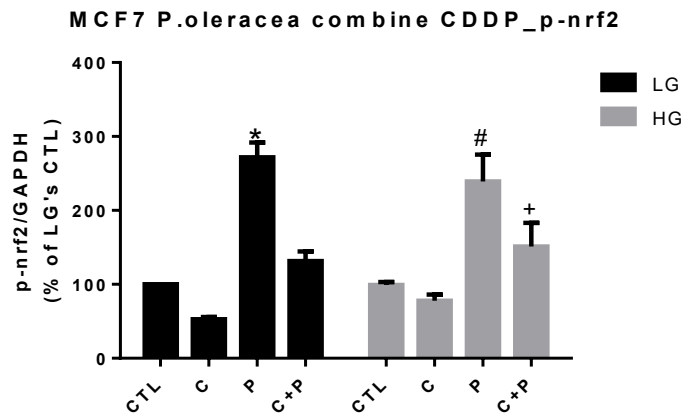


Fig.19 MCF7 P.oleracea combine p-Nrf2 相對表現量圖

1.LG時，只加 P.oleracea 的 p-Nrf2 明顯大於 CTL 組。

2.HG時，只加 P.oleracea 的 p-Nrf2 明顯大於 CTL 組。

3.HG CDDP 加 P.oleracea 與 HG CDDP 具有顯著差異。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較，+與 HG C 比較， P<0.05

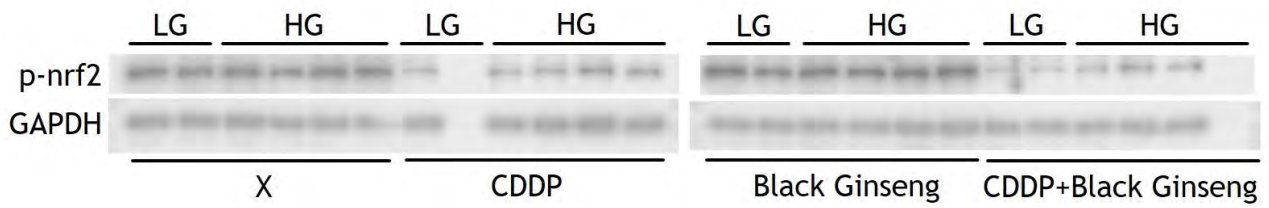


Fig.20 MCF7 Black Ginseng combine 蛋白質表現量

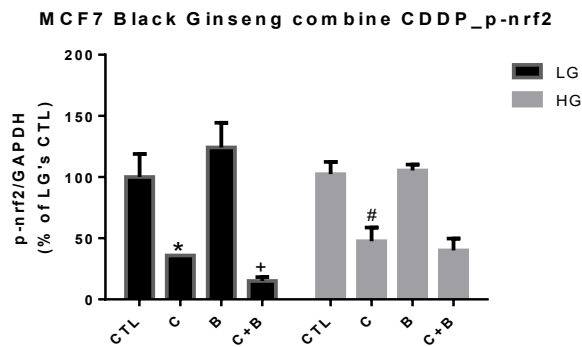


Fig.21 MCF7 Black Ginseng combine p-Nrf2 相對表現量圖

1.LG 時，只加 CDDP 的 p-Nrf2 明顯小於 CTL 組。

2.HG 時，只加 CDDP 的 p-Nrf2 明顯小於 CTL 組。

3.LG CDDP 加 Black Ginseng 與 LG CDDP 具有顯著差異。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較，+與 LG C 比較， P<0.05

(二)3T3

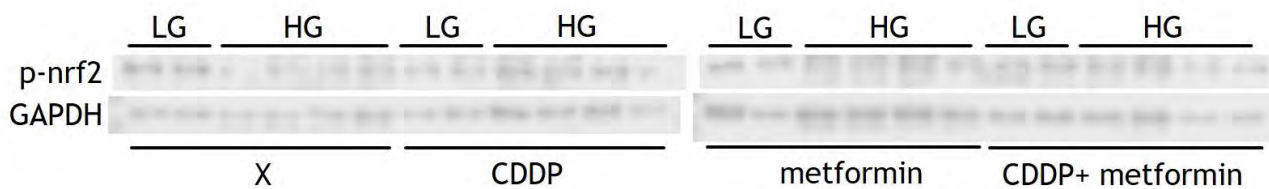


Fig.22 3T3 Metformin combine 蛋白質表現量

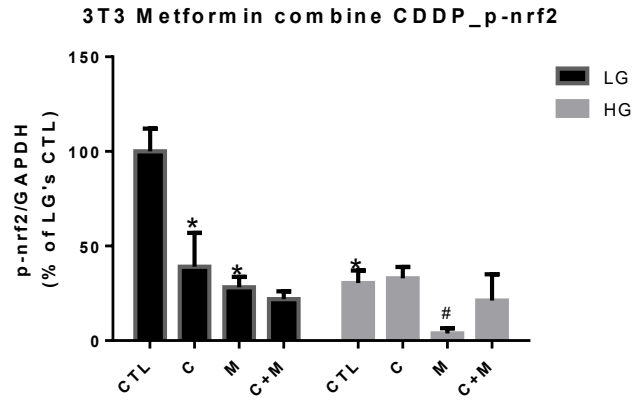


Fig.23 3T3 Metformin combine p-Nrf2 相對表現量圖

- 1.LG 時，只加 CDDP 和只加 Metformin 的 p-Nrf2 明顯小於 CTL 組。
 - 2.HG 時，只加 Metformin 的 p-Nrf2 明顯小於 CTL 組。
 3. HG CTL 的 p-Nrf2 明顯小於 LG CTL。
- *與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較， P<0.05

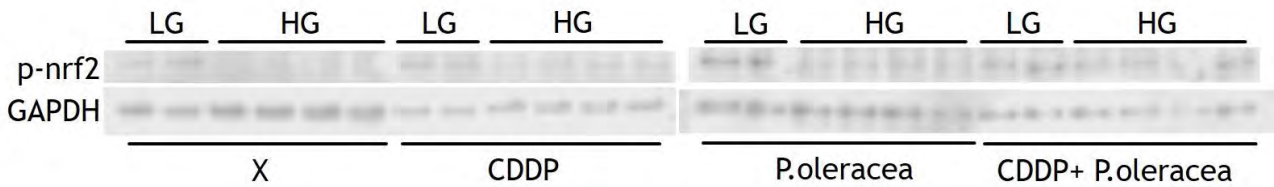


Fig.24 3T3 P.oleracea combine 蛋白質表現量

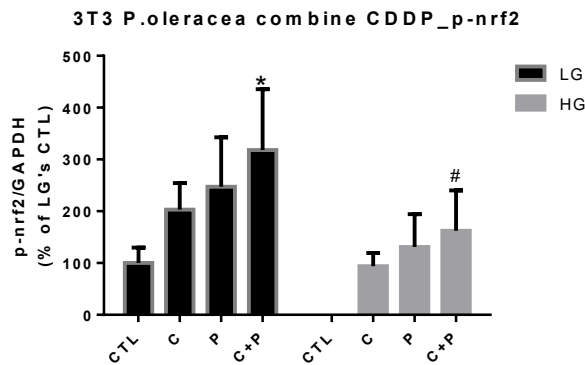


Fig.25 3T3 P.oleracea combine p-Nrf2 相對表現量圖

- *與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較， P<0.05

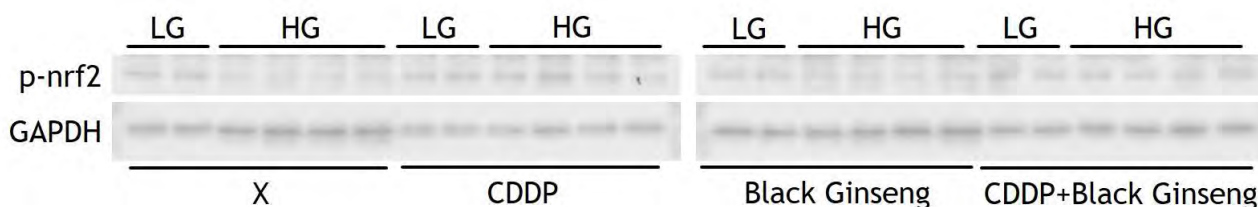


Fig.26 3T3 Black Ginseng combine 蛋白質表現量

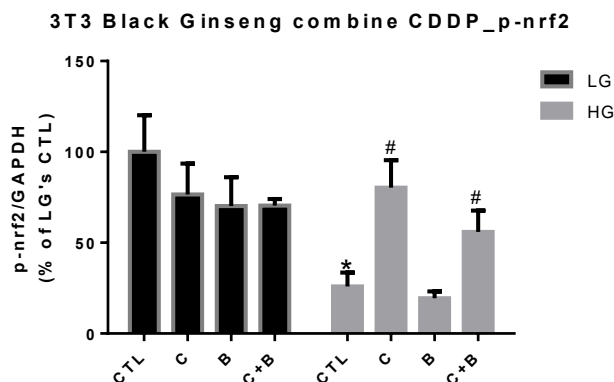


Fig.27 3T3 Black Ginseng combine p-Nrf2 相對表現量圖

1.HG 時，只加 CDDP 和 CDDP 加 Black Ginseng 的 p-Nrf2 明顯大於 CTL 組。

2. HG CTL 的 p-Nrf2 明顯小於 LG CTL。

*與 LG CTL 比較，#與 HG CTL 比較， $P < 0.05$

五、Flow Cytometer

在 MCF7 的 Crystal violet 中，觀察到 Metformin 顯著影響 CDDP 的毒殺能力。而 CDDP 會藉由提高 MCF7 的 ROS 的產量和降低其抗氧化能力來導致細胞凋亡。故我們想觀察 Metformin 是否會影響 ROS 的產量。

我們觀察到 MCF7 在低糖時 ROS 的產量都比較高；在加藥作用 1 小時後，CDDP 會明顯提升 ROS 的產量且高於 HG 不加藥的組別；與其他不加藥的組別相比，Metformin 降低 ROS 的產量；我們發現同時加 CDDP 和 Metformin 時，ROS 的產量等到 3 小時後才被提升。

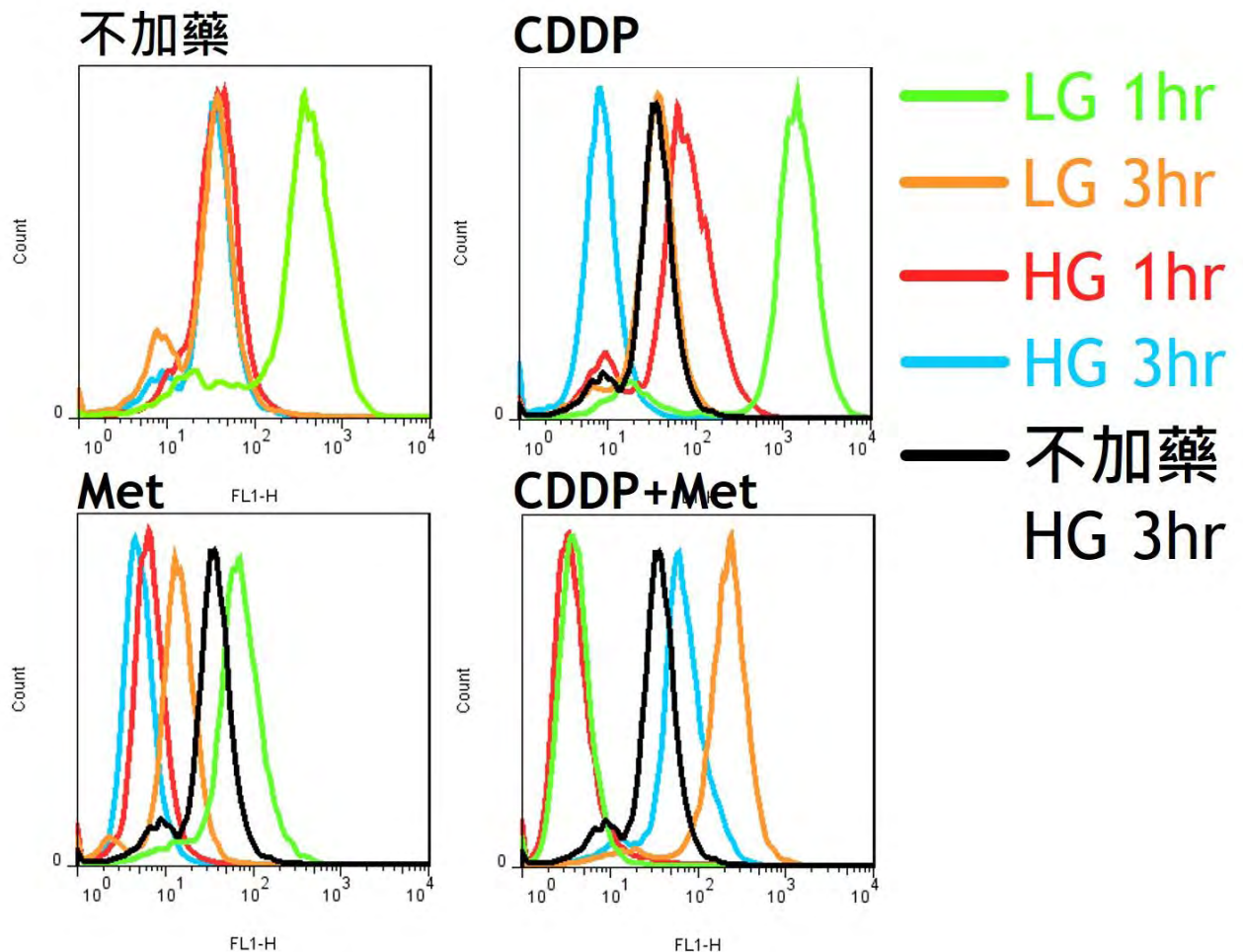


Fig.28 Flow Cytometer 高低糖、不同時間 ROS 表現量比較

分別以三組變因：一是 LG、HG，二是不加藥、CDDP、Met、CDDP+Met，三是處理 MCF7 1 小時或 3 小時，並以流式細胞儀分析 DCFHDA 的螢光強度。

1. 在不加藥的組別中，LG 1hr 提高 MCF7 中的氧化壓力。可以觀察到 LG 3hr、HG 1hr、HG 3hr 的螢光峰值是相近的，推論此為 MCF7 在正常情況下的 ROS 表現量。並把以 HG 不加藥處理 3 小時的組別作為其他組別的對照。
2. 在 CDDP 的組別，以 LG 和 HG 處理 1hr 的螢光峰值都向右移，表示 CDDP 提高 MCF7 的氧化壓力。
3. 在 Met 的組別，除了以 LG 處理 1hr 的螢光峰值向右移之外，其他組別都往左移，表示 Met 降低 MCF7 的氧化壓力。
4. 在 CDDP+Met 的組別，1hr 的組別的螢光峰值都向左移，3hr 的組別的螢光峰值都向右移，推測 CDDP+Met 時延後 CDDP 提高 ROS 的效果。

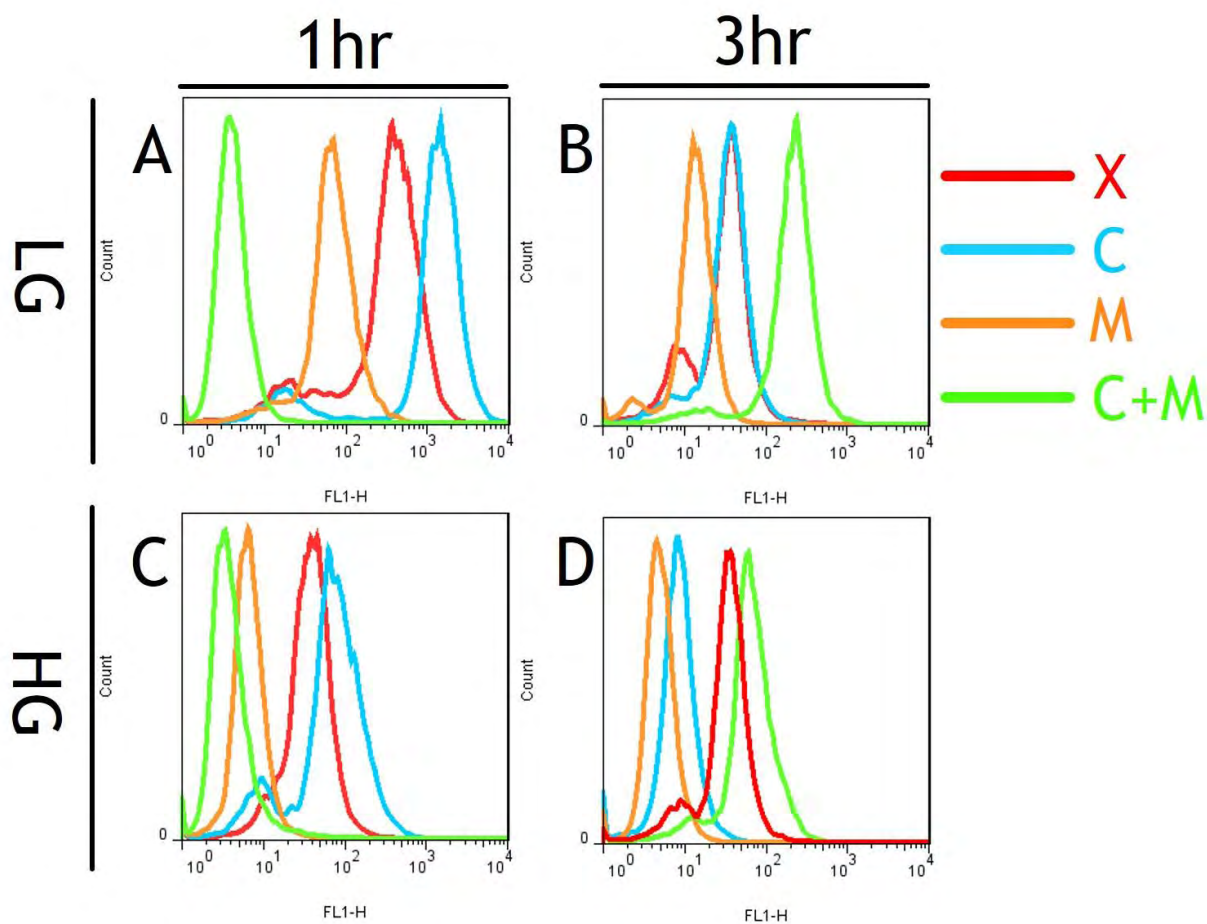


Fig.29 Flow Cytometer 不同藥物 ROS 表現量比較

- 在 LG 1hr 的組別中，相對於不加藥的組別，CDDP 提高 MCF7 的氧化壓力，Met 降低 MCF7 的氧化壓力。相對於 CDDP 的組別，CDDP+Met 的組別中可以觀察到 Met 明顯影響 CDDP 提高 ROS 的能力，結果比 Met 的組別還低。
- 在 LG 3hr 的組別中，相對於不加藥的組別，Met 降低 MCF7 的氧化壓力。相對於 CDDP 的組別，CDDP+Met 的組別提高 MCF7 的氧化壓力。
- 在 HG 1hr 的組別中，相對於不加藥的組別，CDDP 提高 MCF7 的氧化壓力，Met 降低 MCF7 的氧化壓力。相對於 CDDP 的組別，CDDP+Met 的組別中可以觀察到 Met 明顯影響 CDDP 提高 ROS 的能力，結果比 Met 的組別還低。
- 在 HG 3hr 的組別中，相對於不加藥的組別，CDDP 的組別 MCF7 的氧化壓力較低，Met 降低 MCF7 的氧化壓力。相對於 CDDP 的組別，CDDP+Met 的組別提高 MCF7 的氧化壓力。

柒、結論

一、CDDP

- 1.在 Crystal violet 中觀察到 CDDP 對 MCF7 的毒殺能力明顯大於對 3T3 的影響，故我們可知 CDDP 對於這兩株細胞株具有選擇性。
- 2.在 Western blot 中 CDDP 能顯著降低 MCF7 的 p-Nrf2 表現量；對 3T3 的 p-Nrf2 表現量的影響不一致，但其 3T3 相對表現量明顯高於 MCF7 的。
- 3.在 Flow Cytometer 中觀察到 CDDP 在藥物處理 1 小時後提高 MCF7 的氧化壓力。

二、Metformin

- 1.在 Crystal violet 中觀察到 Met 能明顯抑制 CDDP 毒殺 MCF7 的能力；在 LG 環境下有毒殺 MCF7 的功效；顯著降低 3T3 細胞存活率。
- 2.在 Western blot 中 Met 能些微提升 CDDP 所降低的 MCF7 的 p-Nrf2 表現量；顯著降低 3T3 的 p-Nrf2 表現量。
- 3.在 Flow Cytometer 中觀察到 Met 能降低 MCF7 的氧化壓力，也能將 CDDP 所導致的氧化壓力表現時間延後 3 小時。

三、P.oleracea

- 1.在 Crystal violet 中觀察到 P.oleracea 無顯著影響 CDDP 毒殺 MCF7 的能力；在 LG 環境下些微提升 3T3 的細胞存活率。
- 2.在 Western blot 中 P.oleracea 能顯著提升 MCF7 和 3T3 的 p-Nrf2 表現量。

四、Black Ginseng

- 1.在 Crystal violet 中觀察到 Black Ginseng 無顯著影響 CDDP 毒殺 MCF7 的能力；些微降低 MCF7 的細胞存活率；些微提升 3T3 的細胞存活率。
- 2.在 Western blot 中 Black Ginseng 相對於 LG CDDP 組別顯著降低 p-Nrf2 表現量；些微降低 3T3 的 p-Nrf2 表現量。

五、Astragalus

- 1.在 Crystal violet 中觀察到 Astragalus 無顯著影響 CDDP 毒殺 MCF7 和 3T3 的能力。

Met 在 HG 環境下，會明顯抑制 CDDP 毒殺 MCF7 的效用，以減少細胞的死亡；其他三種中藥糖尿病藥並無顯著影響 CDDP 的效用。故我們認為當一個病患同時罹患糖尿病與癌症時，並不適合採用 CDDP 搭配 Met 聯合治療。P.oleracea 可以提升 MCF7 和 3T3 的 p-Nrf2

表現量，我們推論其有提高細胞抗氧化因子的成分，也有抑制癌細胞的成分，所以我們觀察到的 Crystal violet 中 P.oleracea 不影響 CDDP 毒殺 MCF7 的能力；Black Ginseng 降低了 MCF7 的 p-Nrf2 表現量。故我們認為 P.oleracea 相較其他三者，更適合作為糖尿病用藥。Astragalus 在藥物測試得出的濃度過高，我們認為 Astragalus 並不適用於抗癌藥物。

在 Crystal violet 中我們觀察到 Met 在 LG 環境下具有毒殺癌細胞的能力，但在 HG 環境下卻不明顯，而且 Met 在 HG 環境下，若與 CDDP 搭配使用，反而會使癌細胞存活率相對上升(與 HG CDDP 組別比較)，故我們推論 Met 在 HG 環境下可能會產生一種新的路徑，而這種路徑可能會使癌細胞增生或是抑制 CDDP 毒殺癌細胞的能力。

在 Flow Cytometer 中我們發現 CDDP 確實會提高癌細胞的 ROS 表現量，而如果與 Met 搭配使用的話，其作用時間會從原先的一小時延後到三小時，這可以說明為何在 HG 環境下 Met 和 CDDP 搭配使用時會使細胞存活率相對上升(與 HG CDDP 組別比較)。

在 Flow Cytometer 中觀察到在 LG 環境中會提高 MCF7 的氧化壓力，但卻不影響其細胞存活率，我們推測可能是藥物與低糖導致的氧化壓力在細胞中的作用位置不同。

捌、未來展望

- 一、觀察胰臟細胞 Ins1、肝細胞 HEPG2 在相同實驗條件下的藥物交互作用影響。
- 二、使用氟代脫氧葡萄糖(F-FDG)檢測、觀察此實驗與上述細胞代謝葡萄糖的情況，以確認各糖尿病藥的功效、分析與 CDDP 交互作用後的影響。
- 三、研究藥物交互作用對動物的影響，並分為兩組：T2D 小鼠、同時罹患乳腺癌和 T2D 小鼠，觀測動物行為模式和其肌肉細胞、肝細胞、胰島細胞型態及生化分析。

玖、參考資料

一、文獻

- (一) 沈宜靜、林建良、許惠恒(2011)，糖尿病與癌症之關聯以及台灣現況探討，內科學誌，22：19-30
- (二) 陳麗華(2005)，ICD-10 與多重死因---以糖尿病為例研究報告，衛生福利部：15
- (三) Shi Y. & Hu F.B.(2014). The global implications of diabetes and cancer. Lancet,383(9933):1947-8.
- (四) Liao S.1., Li J., Wei W., Wang L., Zhang Y., Li J., Wang C., & Sun S. (2011). Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature.Asian Pac J Cancer Prev,12(4):1061-5.
- (五) Hardefeldt P.J., Edirimanne S., & Esllick G.D.(2012). Diabetes increases the risk of breast cancer: a meta-analysis. Endocr Relat Cancer,19(6):793-803.
- (六) Novosyadlyy R., Lann D.E., Vijayakumar A., Rowzee A., Lazzarino D.A., Fierz Y., Carboni J.M., Gottardis M.M., Pennisi P.A., Molinolo A.A., Kurshan N., Mejia W., Santopietro S., Yakar S., Wood T.L., & LeRoith D.(2010). Insulin-mediated acceleration of breast cancer development and progression in a nonobese model of type 2 diabetes.Cancer Res, 70(2):741-51.
- (七) Borji A., Samarghandian S., & Farkhondeh T.(2017). Attenuation of Oxidative Stress and Inflammation by Portulaca oleracea in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Evid Based Complementary Altern Med,22(4):562-566.
- (八) Moukette B.M., Ama Moor V.J., Biapa Nya C.P., Nanfack P., Nzufu F.T., Kenfack M.A., Ngogang J.Y., & Pieme C.A.(2017). Antioxidant and Synergistic Antidiabetic Activities of a Three-Plant Preparation Used in Cameroon Folk Medicine. Int Sch Res Notices,2017:9501675.
- (九) Fatemi Tabatabaei S.R., Rashno M., Ghaderi S., & Askaripour M.(2016). The Aqueous Extract of Portulaca Oleracea Ameliorates Neurobehavioral Dysfunction and Hyperglycemia Related to Streptozotocin-Diabetes Induced in Ovariectomized Rats. Iran J Pharm Res,15(2):561-71.
- (十) Ahmed D., Sharma M., Mukerjee A., Ramteke P.W., & Kumar V.(2013). Improved glycemetic control, pancreas protective and hepatoprotective effect by traditional poly-herbal formulation "Qurs Tabasheer" in streptozotocin induced diabetic rats. BMC Complement Altern Med,13:10.

- (十一) Nazeam J.A., El-Hefnawy H.M., Omran G., & Singab A.N.(2017). Chemical profile and antihyperlipidemic effect of *Portulaca oleracea* L. seeds in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nat Prod Res*,20:1-5.
- (十二) Ramadan B.K., Schaalán M.F., & Tolba A.M.(2017). Hypoglycemic and pancreatic protective effects of *Portulaca oleracea* extract in alloxan induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*,17(1):37.
- (十三) Gong F., Li F., Zhang L., Li J., Zhang Z., & Wang G.(2009). Hypoglycemic effects of crude polysaccharide from Purslane. *Int J Mol Sci*,10(3):880-8.
- (十四) Lee A.S., Lee Y.J., Lee S.M., Yoon J.J., Kim J.S., Kang D.G., & Lee H.S.(2012). An aqueous extract of *Portulaca oleracea* ameliorates diabetic nephropathy through suppression of renal fibrosis and inflammation in diabetic db/db mice. *Am J Chin Med*,40(3):495-510.
- (十五) Chen B., Zhou H., Zhao W., Zhou W., Yuan Q., & Yang G.(2012). Effects of aqueous extract of *Portulaca oleracea* L. on oxidative stress and liver, spleen leptin, PAR α and FAS mRNA expression in high-fat diet induced mice. *Mol Biol Rep*,39(8):7981-8.
- (十六) Park J.E., Lee J.S., Lee H.A., & Han J.S.(2018). *Portulaca oleracea* L. Extract Enhances Glucose Uptake by Stimulating GLUT4 Translocation to the Plasma Membrane in 3T3-L1 Adipocytes. *J Med Food*.
- (十七) Wainstein J., Landau Z., Bar Dayan Y., Jakubowicz D., Grothe T., Perrinjaquet-Moccetti T., & Boaz M.(2016). Purslane Extract and Glucose Homeostasis in Adults with Type 2 Diabetes: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Efficacy and Safety. *J Med Food*,19(2):133-40.
- (十八) El-Sayed M.(2011). Effects of *Portulaca oleracea* L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. *J Ethnopharmacol*,137(1):643-51.
- (十九) Heidarzadeh S., Farzanegi P., Azarbayjani M.A., & Daliri R.(2013). Purslane Effect on GLP-1 and GLP-1 receptor in type 2 diabetes. *Electron Physician*,5(1):582-7.
- (二十)
- (二十一) Kim S.N., Ha Y.W., Shin H., Son S.H., Wu S.J., & Kim Y.S.(2007). Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J Pharm Biomed Anal*,45(1):164-70.
- (二十二) Kang O.H., Shon M.Y., Kong R., Seo Y.S., Zhou T., Kim D.Y., Kim Y.S., & Kwon DY (2017). Anti-diabetic effect of black ginseng extract by augmentation of AMPK protein activity

- and upregulation of GLUT2 and GLUT4 expression in db/db mice. *BMC Complement Altern Med*,17(1):341.
- (二十三) Kim J.H., Pan J.H., Cho H.T., & Kim Y.J.(2016). Black Ginseng Extract Counteracts Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice. *PLoS One*,11(1):e0146843.
- (二十四) Seo Y.S., Shon M.Y., Kong R., Kang O.H., Zhou T., Kim D.Y., & Kwon D.Y.(2016). Black ginseng extract exerts anti-hyperglycemic effect via modulation of glucose metabolism in liver and muscle. *J Ethnopharmacol*,190:231-40.
- (二十五) Li W.L., Zheng H.C., Bukuru J., & De Kimpe N.(2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*,92(1):1-21.
- (二十六) Jia W., Gao W.Y., & Xiao P.G.(2003). Antidiabetic drugs of plant origin used in China: compositions, pharmacology, and hypoglycemic mechanisms. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*,28(2):108-13.
- (二十七) Agyemang K., Han L., Liu E., Zhang Y., Wang T., & Gao X.(2013). Recent Advances in *Astragalus membranaceus* Anti-Diabetic Research: Pharmacological Effects of Its Phytochemical Constituents. *Evid Based Complement Alternat Med*,2013:654643.
- (二十八) Li R.J., Qiu S.D., Chen H.X., Tian H., & Liu G.Q.(2007). Effect of *Astragalus* polysaccharide on pancreatic cell mass in type 1 diabetic mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*,32(20):2169-73.
- (二十九) Wei Z., Weng S., Wang L., & Mao Z.(2018). Mechanism of *Astragalus* polysaccharides in attenuating insulin resistance in Rats with type 2 diabetes mellitus via the regulation of liver microRNA-203a-3p. *Mol Med Rep*,17(1):1617-1624.
- (三十) Ke B., Ke X., Wan X., Yang Y., Huang Y., Qin J., Hu C., & Shi L.(2017). *Astragalus* polysaccharides attenuates TNF- α -induced insulin resistance via suppression of miR-721 and activation of PPAR- γ and PI3K/AKT in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Transl Res*,9(5):2195-2206.
- (三十一) Mao X.Q., Yu F., Wang N., Wu Y., Zou F., Wu K., Liu M., & Ouyang J.P.(2009). Hypoglycemic effect of polysaccharide enriched extract of *Astragalus membranaceus* in diet induced insulin resistant C57BL/6J mice and its potential mechanism. *Phytomedicine*,16(5):416-25.

- (三十二) Ju J., Chen W., Lai Y., Wang L., Wang H., Chen W.J., Zhao X., Ye H., Li Y., & Zhang Y.(2017). Astragalus polysaccharides improve cardiomyopathy in STZ-induced diabetic mice and heterozygous (SOD2+/-) knockout mice. *Braz J Med Biol Res*,50(8):e6204.
- (三十三) Nie Y., Li S., Yi Y., Su W., Chai X., Jia D., & Wang Q.(2014). Effects of astragalus injection on the TGF β /Smad pathway in the kidney in type 2 diabetic mice. *BMC Complement Altern Med*,14:148.
- (三十四) Zamble D.B. & Lippard S.J.(1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci*,20(10):435-9.
- (三十五) Cohen S.M. & Lippard S.J.(2001). Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*,67:93-130.
- (三十六) Wang D. & Lippard S.J.(2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*,4(4):307-20.
- (三十七) Dasari S. & Tchounwou P.B.(2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*,740:364-78.
- (三十八) Arany I. & Safirstein R.L.(2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol*,23(5):460-4.
- (三十九) Lippert B.(1999). Cisplatin : chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Wiley-VCH:3
- (四十) Matou-Nasri S., Sharaf H., Wang Q., Almobadel N., Rabhan Z., Al-Eidi H., Yahya W.B., Trivilegio T., Ali R., Al-Shanti N., & Ahmed N.(2017). Biological impact of advanced glycation endproducts on estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*,1863(11):2808-2820.
- (四十一) David J.A., Rifkin W.J., Rabbani P.S., Ceradini D.J.(2017). The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*,4826724.
- (四十二) Kansanen E., Jyrkkänen H.K., & Levonen A.L.(2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med*,52(6):973-82.

二、網址

(一) 衛生福利部(106年6月19日)。2017年7月13日，取自

<https://www.mohw.gov.tw/cp-16-33598-1.html>

【評語】 052002

本研究探討治療糖尿病西藥一種、中藥三種，分析對正常細胞、纖維 3T3 細胞及乳腺癌細胞生長影響。以 Crystal Violet、ELISA、Western blot 分析細胞蛋白質表現量化，以探討藥物之間的交互作用。並分析肝細胞 HEPG2 觀察藥物交互作用。研究兩者藥物的交互作用相當有意思，研究方法與問題有切合，邏輯性強，實驗結果具前瞻性。唯獨實驗過程及結論描述過於瑣碎，呈現方式仍有進步空間，可更加強調實驗結果的分析與推論。

但 DM-II 由肝臟病變產生，故除了乳腺癌病例，建議於胰臟病變產生之癌症做研究。而且利用 Nrf2 的表現量，來推斷藥物是否有做為抗癌和抗糖尿病的潛力，較不可靠。

壹、摘要

糖尿病與癌症皆為臺灣前十大死因之一，而糖尿病在多項文獻已被指出與癌症的發生有相關性。本研究旨在探討中西糖尿病藥與癌症藥物之間的交互作用對細胞的影響，實驗中選用了一種癌症及四種糖尿病藥物，其中，糖尿病藥物有一種西藥、三種中藥；採用乳腺癌細胞株MCF7進行實驗，模擬第二型糖尿病患者血糖水準的變化，以觀察癌細胞在不同環境經不同藥物處理後對細胞存活率的影響，同時採用成纖維細胞3T3以觀測藥物對正常細胞的影響；藉由Crystal violet、ELISA加以分析，發現西藥明顯抑制癌症藥物對MCF7的毒殺能力；同時以Western blot分析細胞蛋白質表現量變化、Flow Cytometer測量ROS的表現量，以探討藥物之間的交互作用。未來希望在胰臟細胞Ins1、肝細胞HEPG2觀察藥物交互作用對糖尿病的影響。

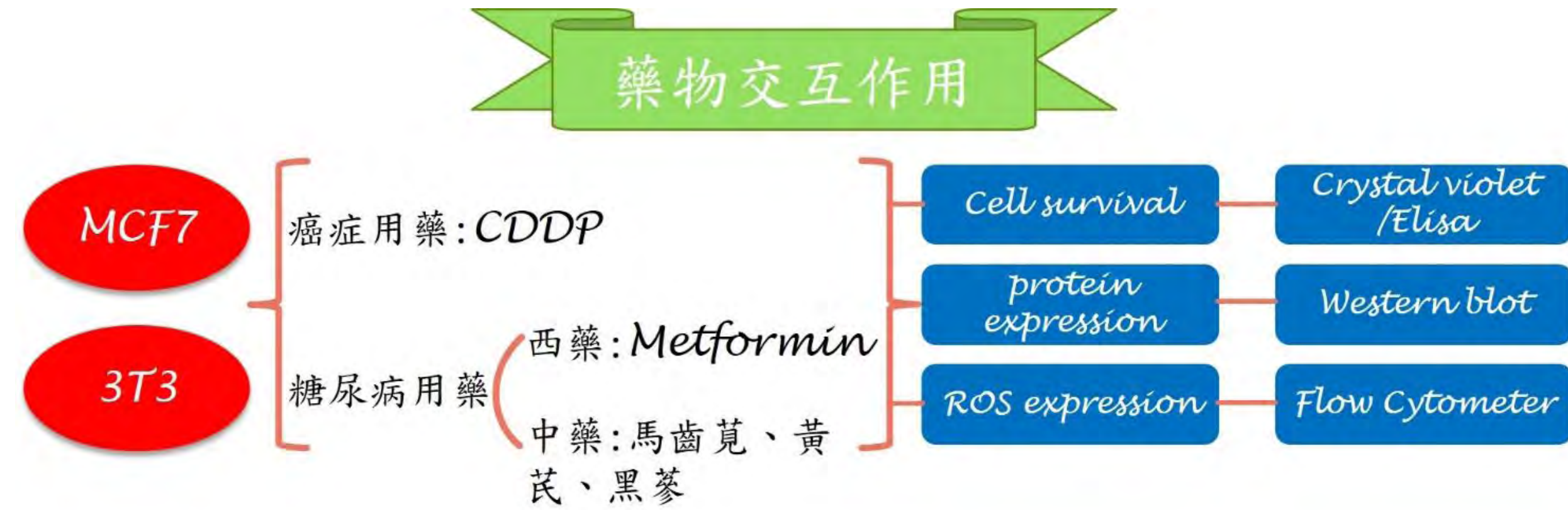
貳、研究動機

我們曾在高中基礎生物上內分泌的章節學到有關糖尿病的內容，而文獻上許多研究都發現糖尿病患者有較高的罹癌風險，特別是第二型糖尿病(type II diabetes, T2D)，與許多癌症有相似的危險因子。且臺灣的流行病學及全球性的統計資料都顯示，癌症與糖尿病的發生率、盛行率都呈現上升的趨勢。癌症居臺灣十大死因之首，糖尿病則名列第五。若共同患有糖尿病和癌症病患逐年提升，同時服用糖尿病和癌症藥物的情形勢必難以避免，但是藥物之間會產生交互作用，如此一來又會對人體產生什麼影響呢？就此我們想對糖尿病及癌症藥物之間的交互作用做深入探討。

參、研究目的

- 一、檢測不同藥物濃度對MCF7和3T3的影響
- 二、探討不同糖尿病藥物與癌症藥物的交互作用對MCF7和3T3的影響以及中西藥效果差別

肆、實驗架構圖



伍、研究背景

藥物：

二甲雙胍(Metformin, Met)為T2D的一線用藥，故我們選用此藥物作為研究。近年來，越來越多研究尋求中西藥聯合治療是否能達到減少藥物本身不良效用的產生，所以我們選用了3種中藥，萃取其成分作比較。

一、順鉑(Cisplatin, CDDP)

臨床上對多種癌症的一線用藥，抑制癌症的相關機制為過量的ROS產生造成細胞傷害、抑制細胞DNA的合成及複製並降低細胞的抗氧化能力，導致DNA損傷、修復功能異常，在臨床上的應用相當廣泛，但有耐藥性、可能引發耳毒性、腎毒性等副作用。

二、二甲雙胍(Metformin, Met)

T2D的一線用藥，Met不會刺激胰島素分泌，所以不會因為劑量不適當而造成低血糖，與其他降血糖藥物不同，Met可以降低膽固醇、三酸甘油酯、低密度蛋白膽固醇(LDL-C)，以及增加高密度蛋白膽固醇(HDL-C)，間接促進體重的控制。但腎功能不良的患者服用，可能會引起致命性乳酸毒血症(Metformin-associated lactic acidosis, MALA)。雖然Met擁有許多好處，但是其藥效不強。

三、馬齒莧(P. oleracea)

這種植物不斷被用於傳統醫學中的抗糖尿病藥物，其水萃法提出的物質可降低T1D老鼠(藉由鏈脲菌素(STZ)所引起的T1D)的血糖水平，同時具有降血脂的功能。也可以降低T2D老鼠的血糖，並對胰臟具有保護作用，並減輕糖尿病所併發的腎病。增加脂肪細胞對葡萄糖的吸收。T2D病患在長期服用馬齒莧的種子後，高密度脂蛋白膽固醇(HDL C)顯著增加，血糖、降血脂和胰島素抗性皆有顯著下降的現象。

四、黑參(Black ginseng)

黑參提取物可保護胰臟β細胞免受ROS造成的細胞傷害，藉由提高肝臟中AMPK的磷酸化表現、肝臟中葡萄糖轉運蛋白2和肌肉中葡萄糖轉運蛋白4的活性，以增加葡萄糖的代謝，發揮治療糖尿病的效果。

五、黃芪(Astragalus)

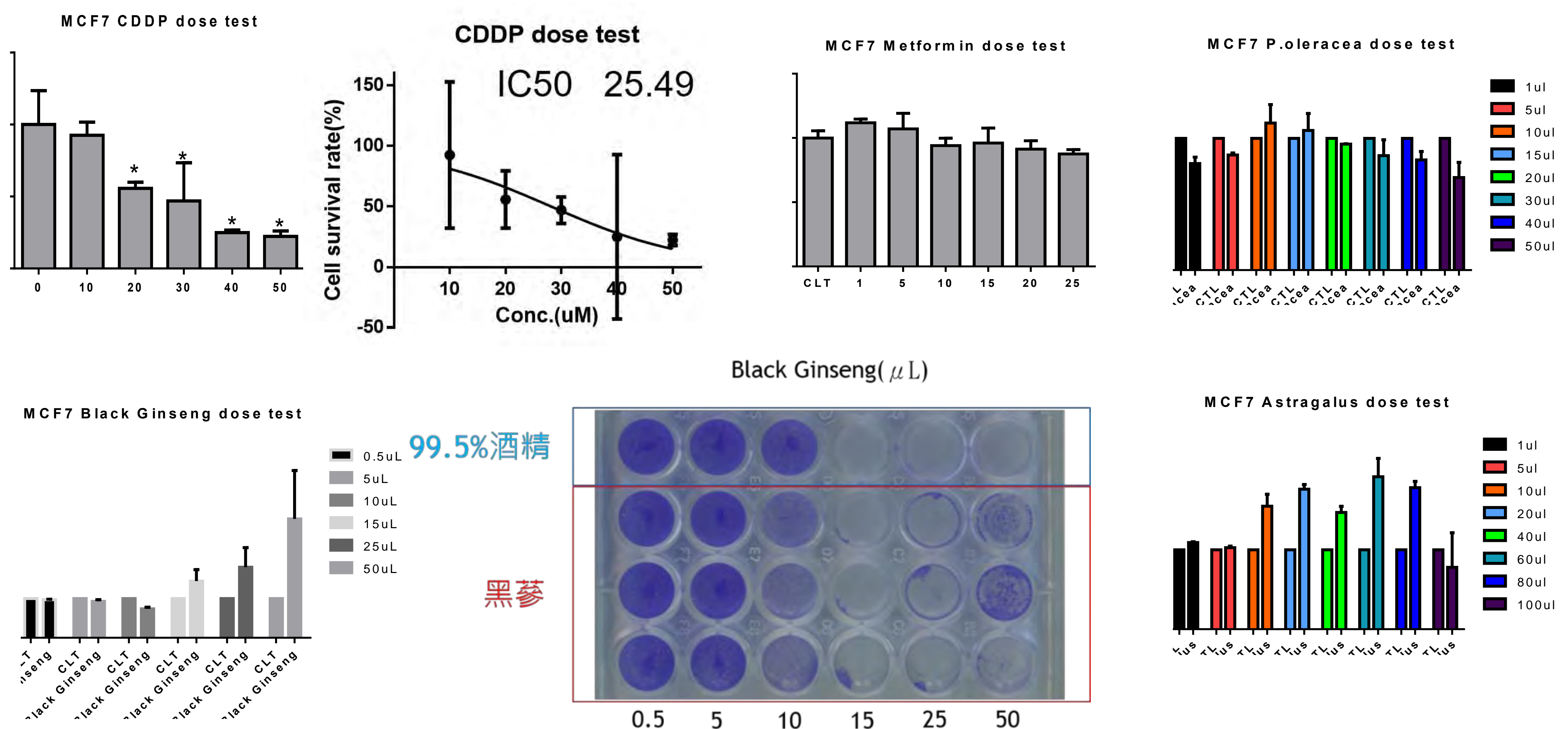
用於多種治療糖尿病的中藥配方，其中的黃芪多醣可在T1D的小鼠中觀察到其透過調整發炎反應以保護胰臟β細胞免於自身免疫的破壞，進而提升胰臟β細胞數量，在T2D則可觀察到其藉由降低胰島素受器的胰島素抗性以改善糖尿病症，在糖尿病性心肌病中也顯示其可能透過降低氧化壓力，而減少細胞的凋亡、增加心肌細胞的增殖，進而改善糖尿病性心肌病，黃芪多醣同時也在糖尿病腎病中腎的損傷有一定保護作用。



陸、研究結果

一、藥物濃度測試

選定藥物濃度：CDDP 25 μM、Metformin 10mM、馬齒莧 10 μL、黑參 5 μL、黃芪 80 μL



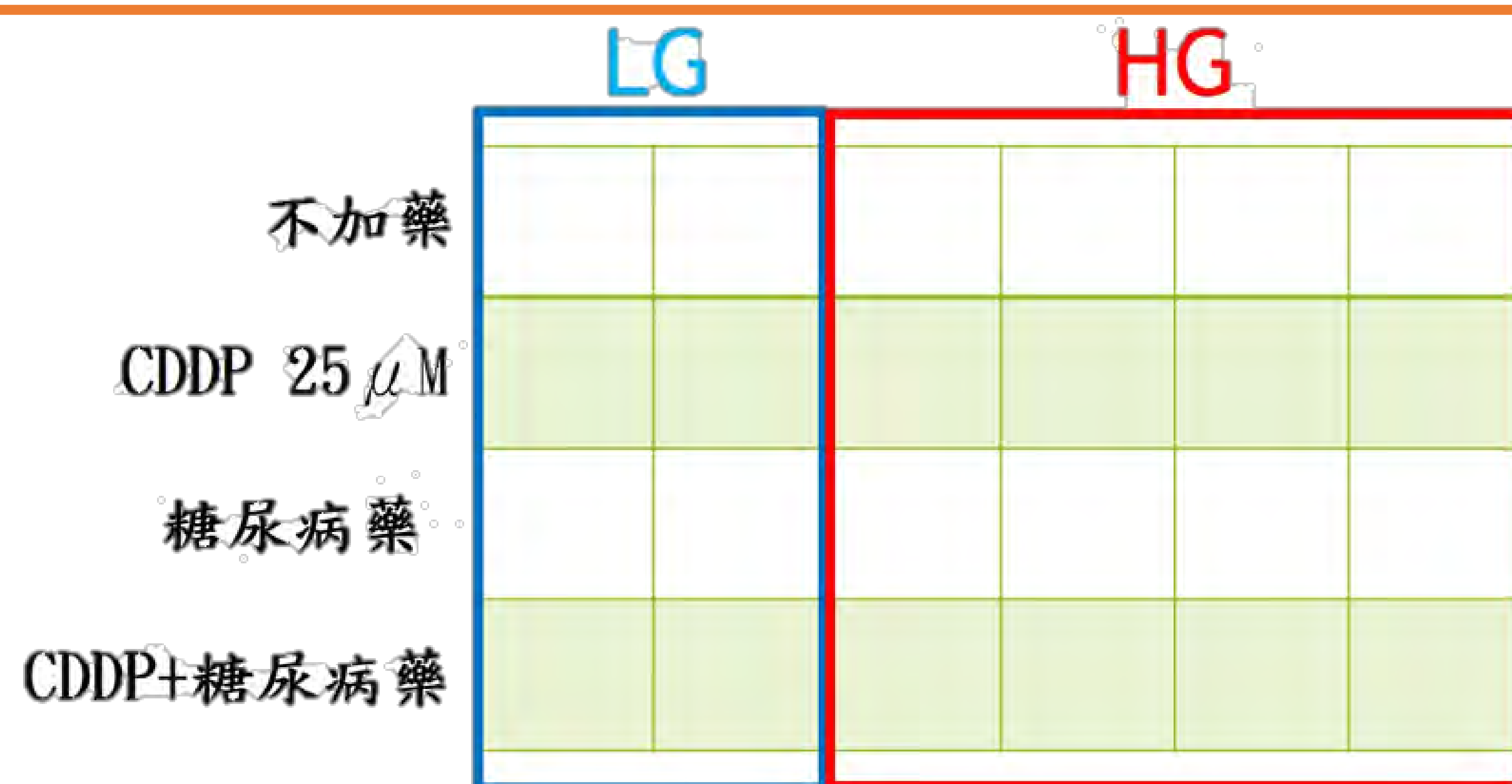
二、細胞存活率測定

(一)實驗方法：

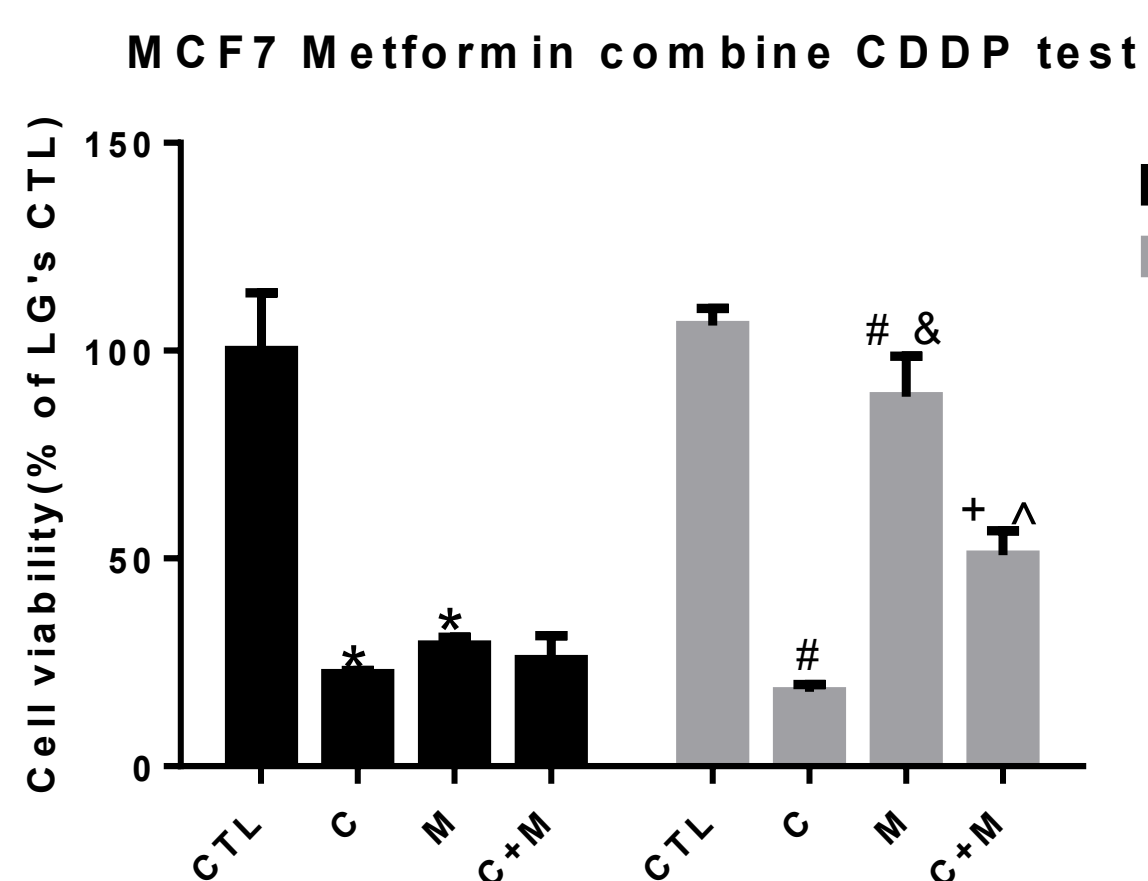
先在加藥前24小時將24well的培養液換成LG DMEM，使細胞適應於LG環境後，換成HG DMEM和加藥。

(二)討論：

我們觀察到Metformin在低糖環境時，具有毒殺MCF7的功能；在高糖環境時，細胞存活率只有些微下降。而在高糖環境時，以只加CDDP作為對照，Metformin加CDDP的細胞存活率是有回升的情況。而其他三個中藥，則對CDDP的細胞存活率無顯著影響。

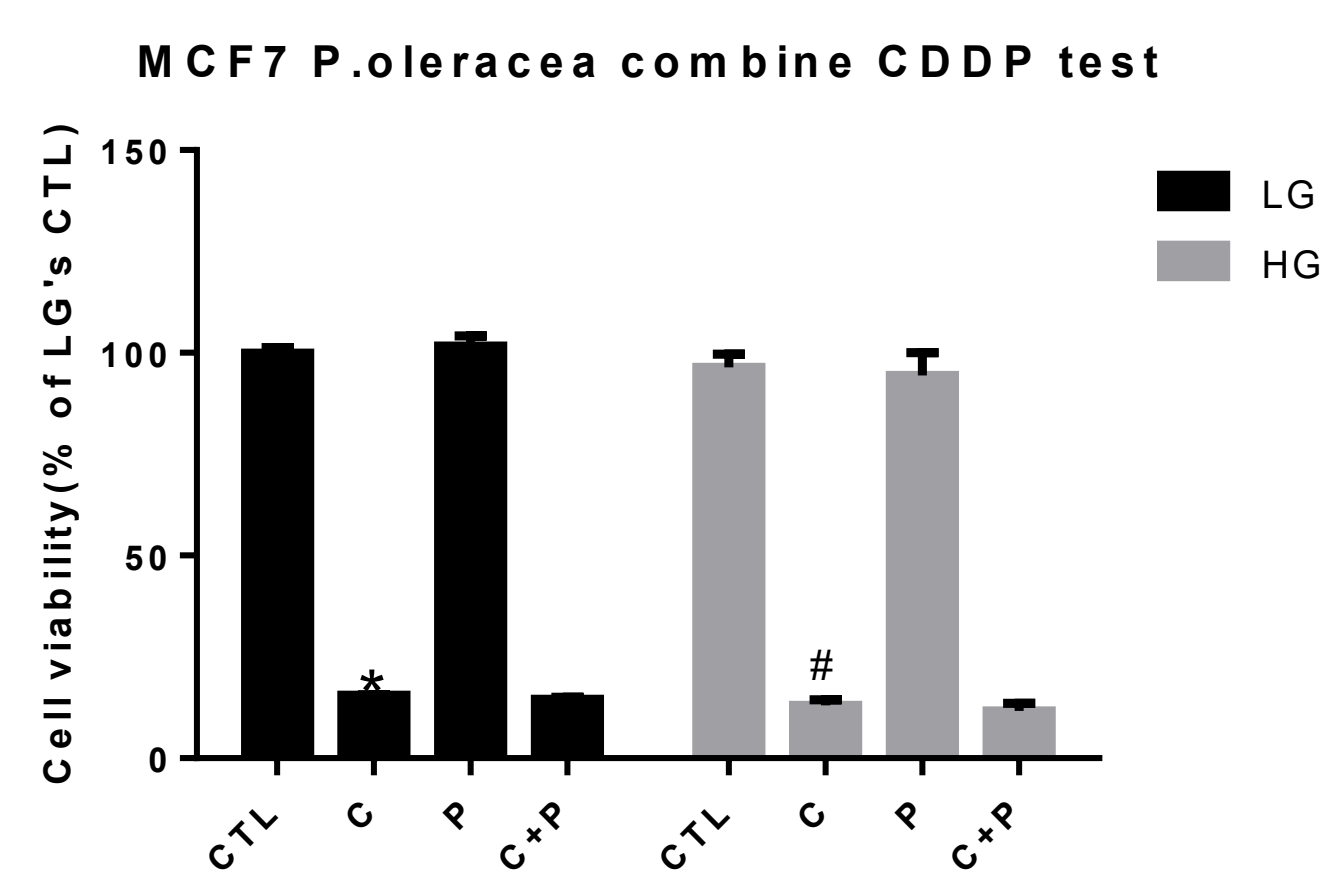


1. MCF7 Metformin



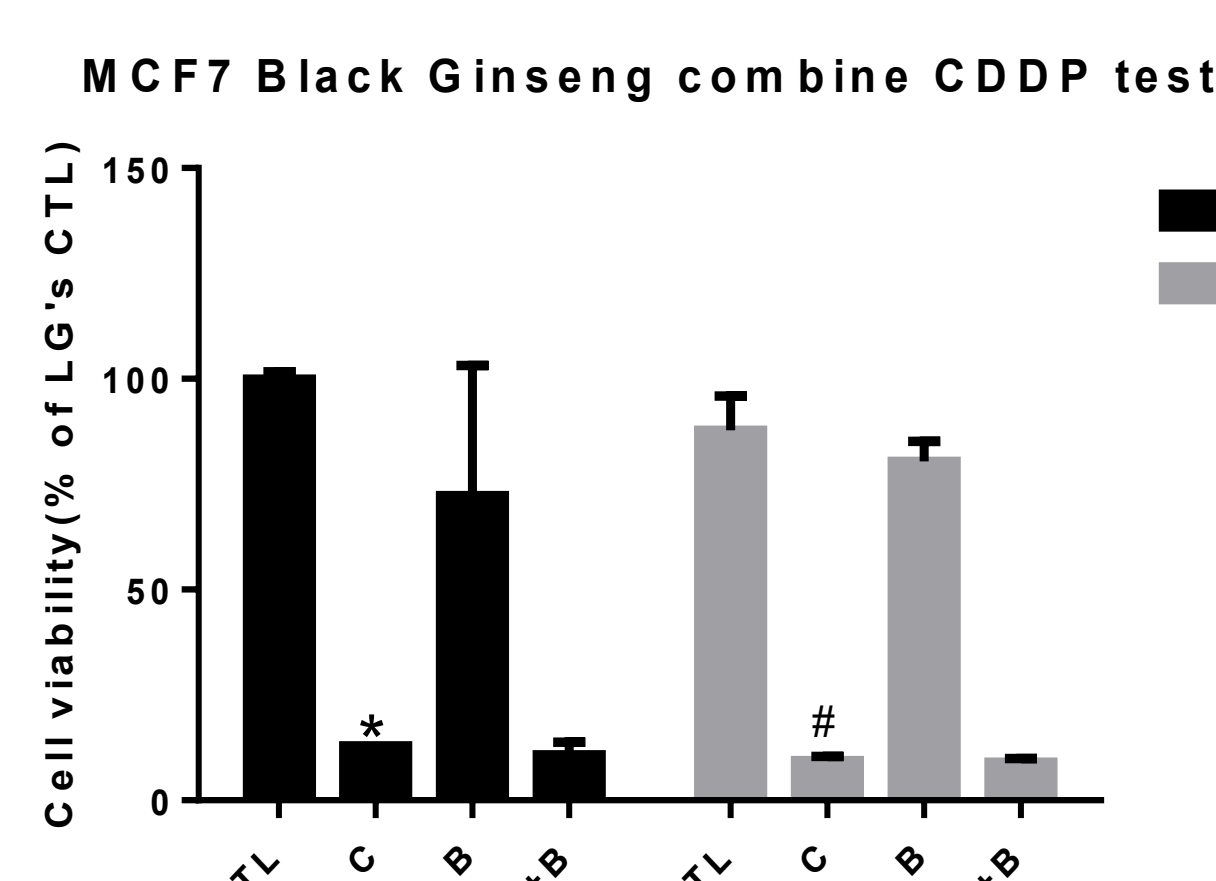
*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較，+與HG C 比較，[^]與LG C+M比較，&與LG M 比較， P<0.05

3. MCF7 P.oleracea



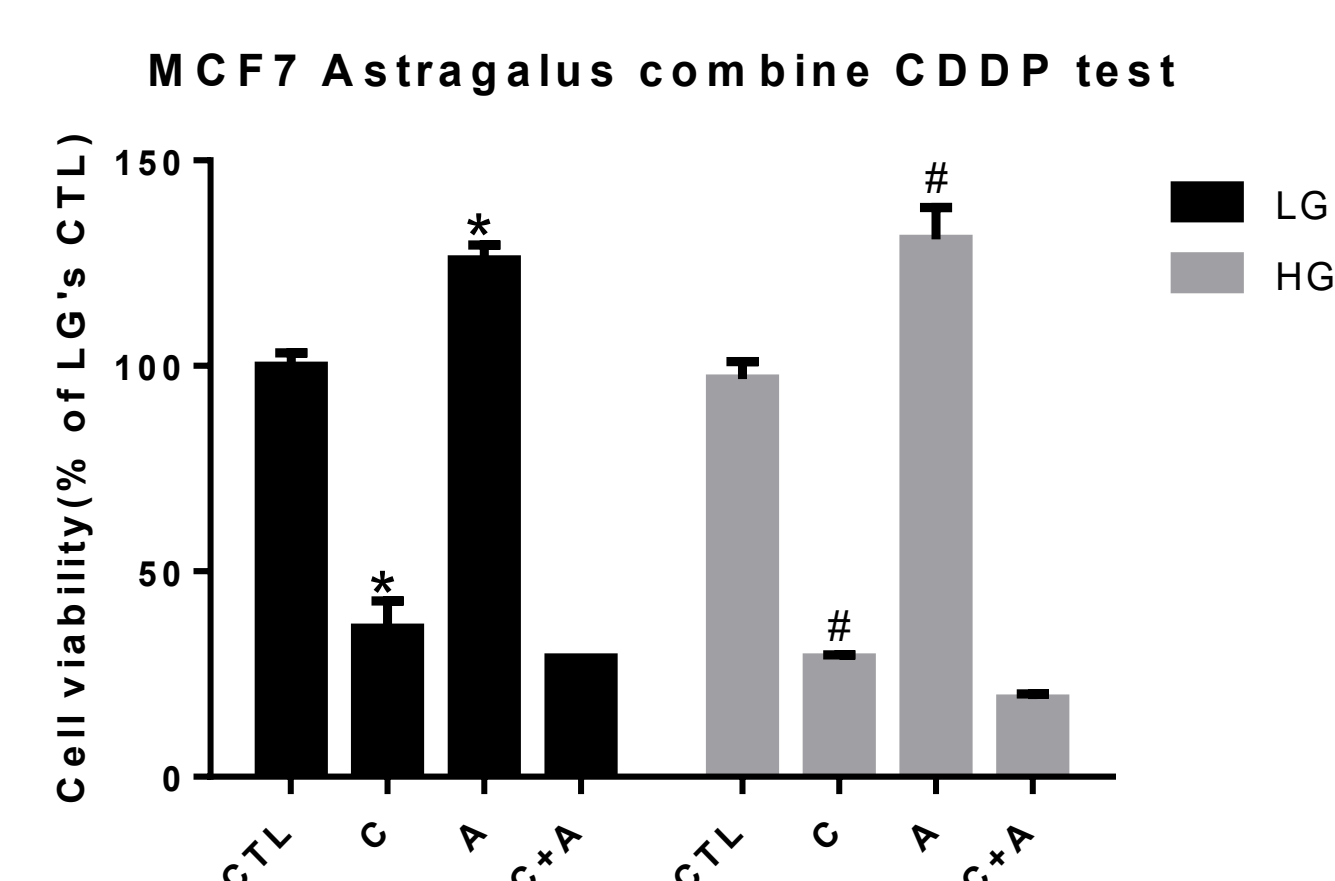
*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05

5. MCF7 Black Ginseng



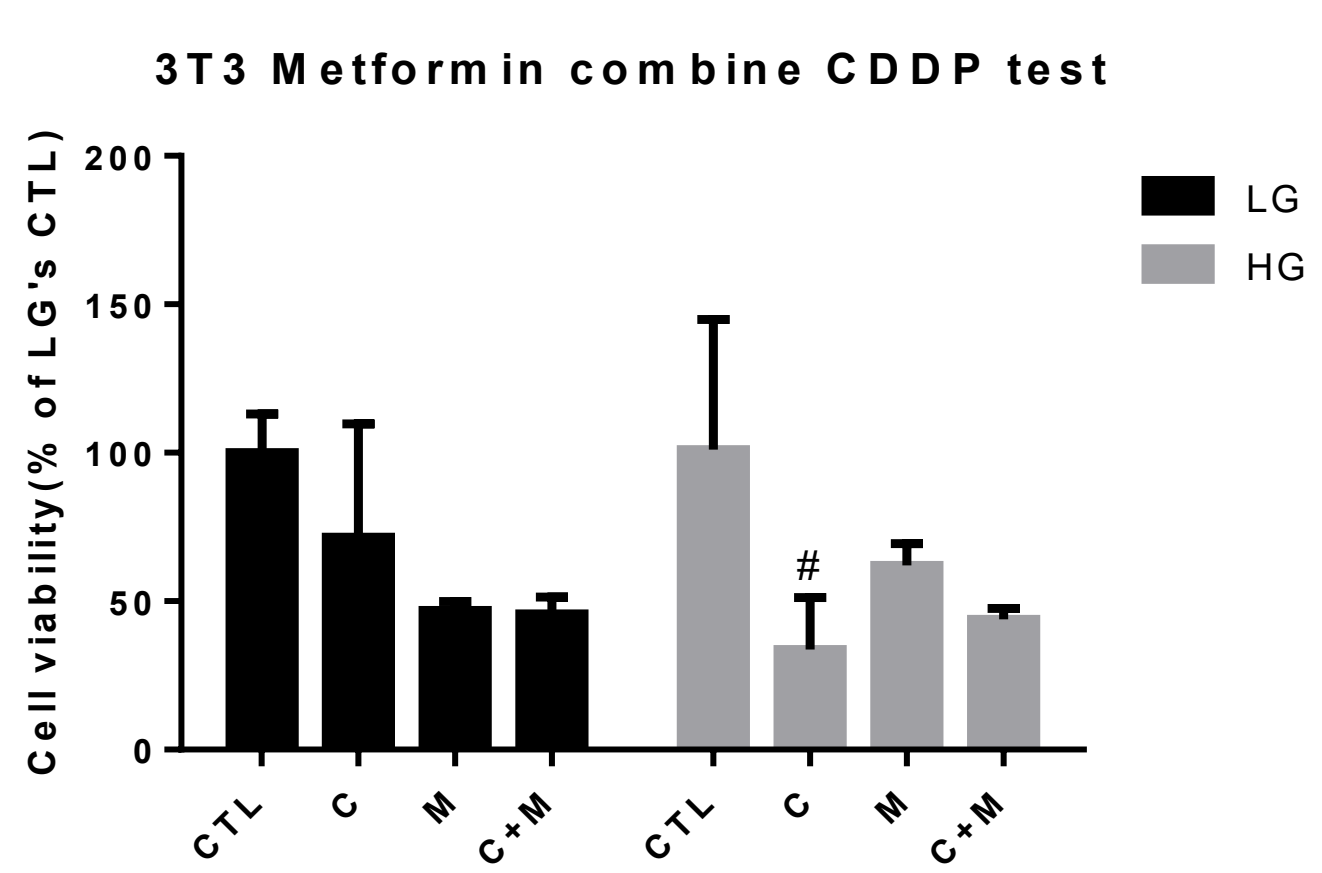
*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05

7. MCF7 Astragalus



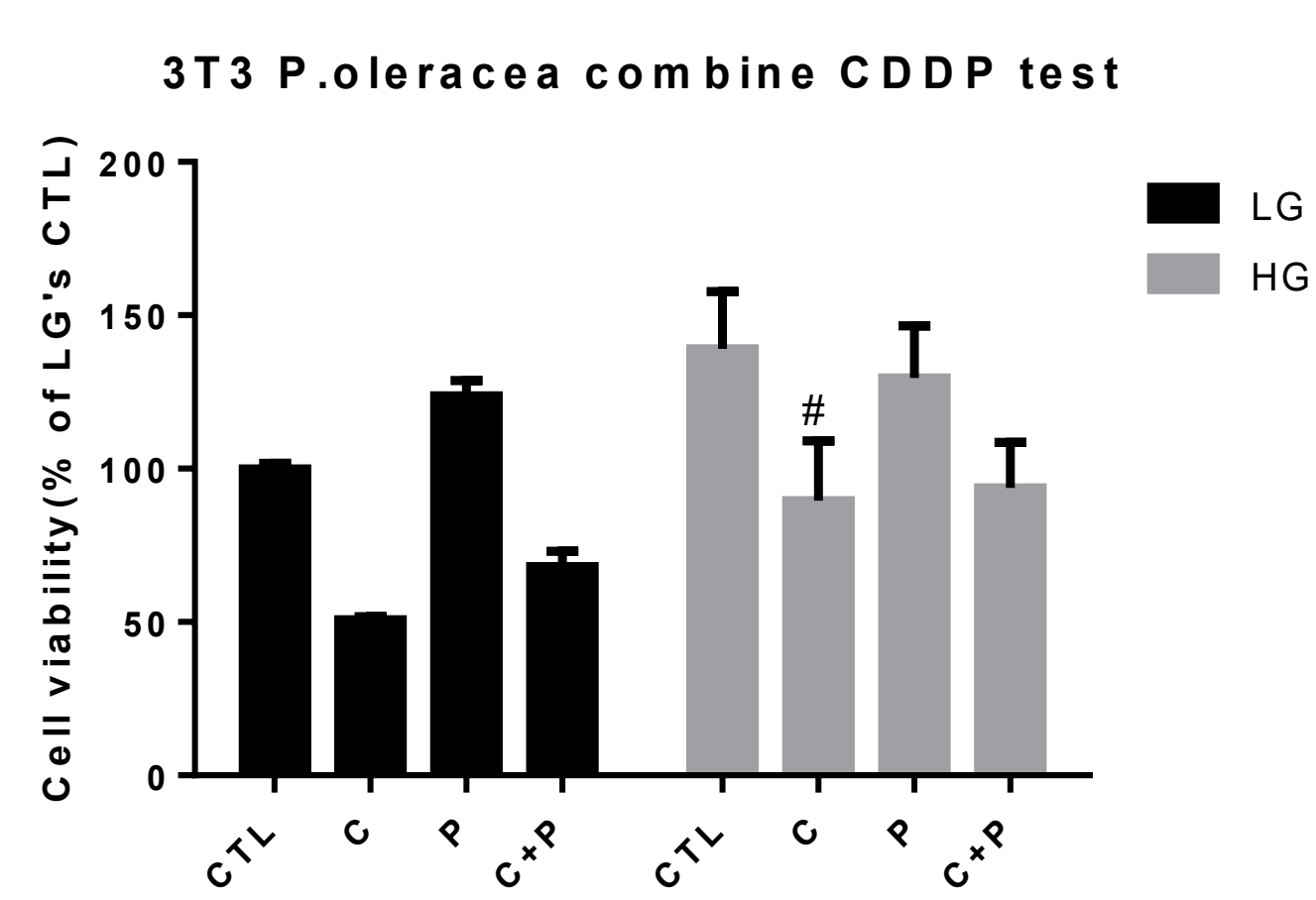
*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05

2. 3T3 Metformin



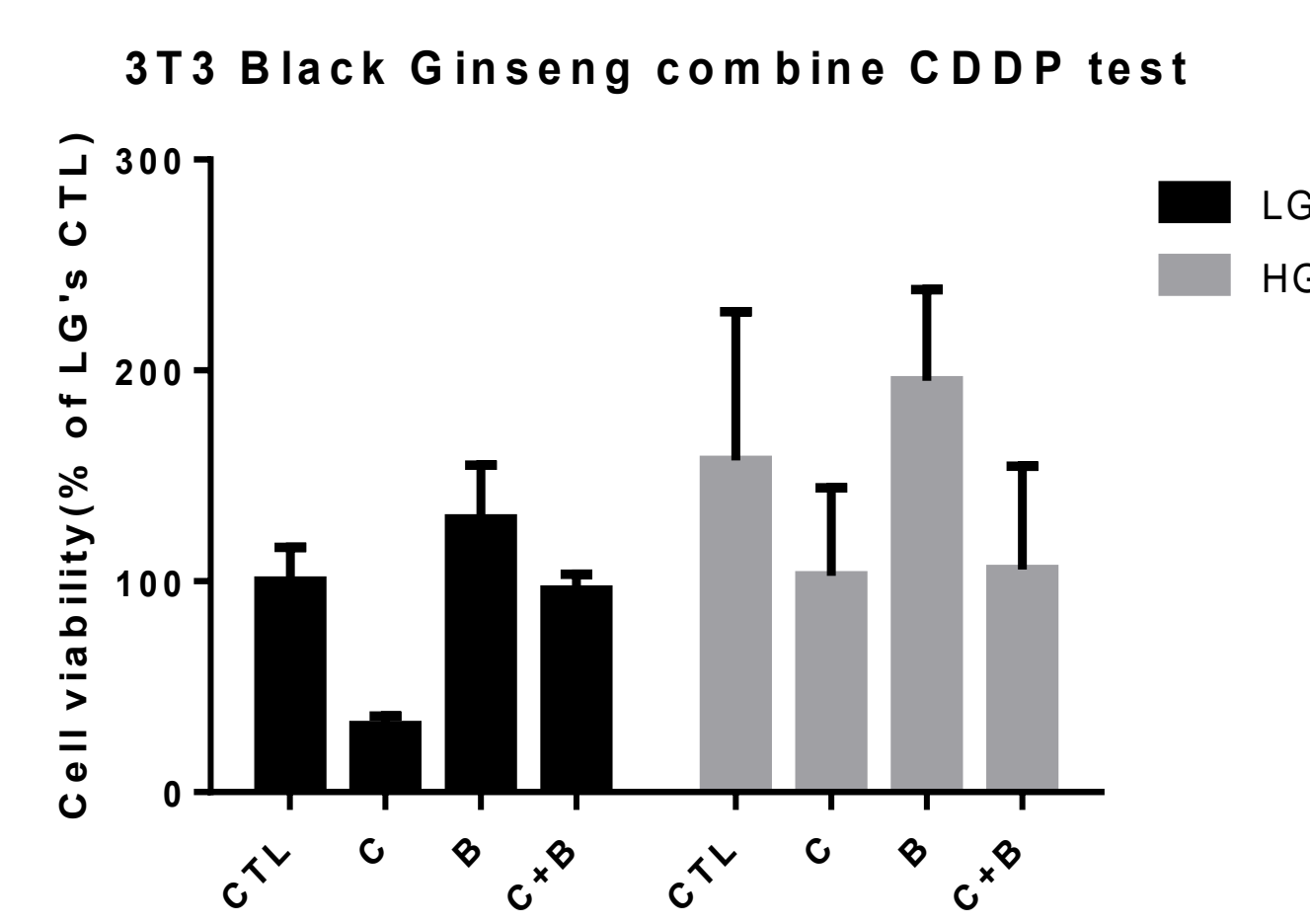
*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05

4. 3T3 P.oleracea

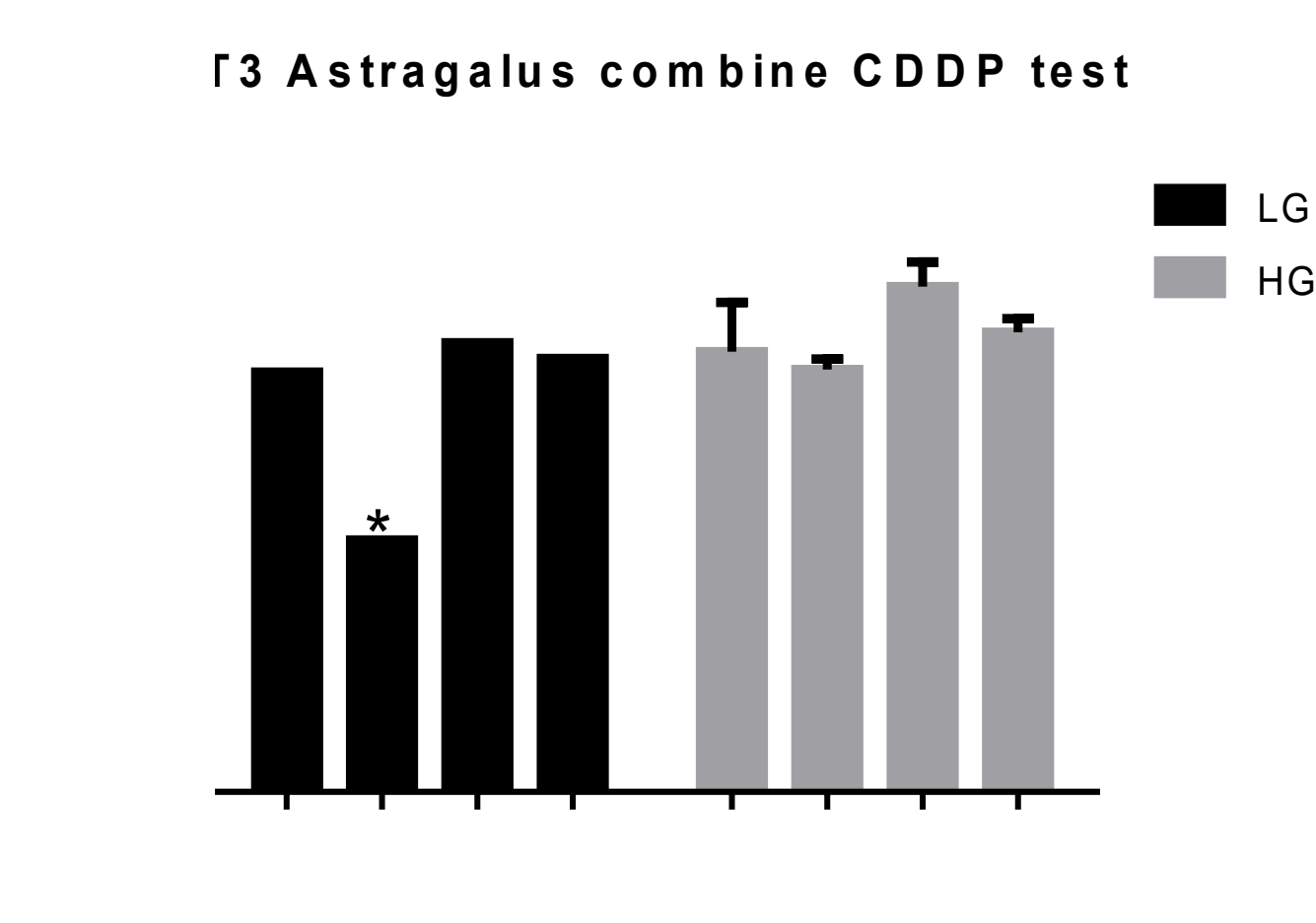


#與HG CTL比較， P<0.05

6. 3T3 Black Ginseng



8. 3T3 Astragalus



*與LG CTL 比較， P<0.05

三、西方墨點法分析

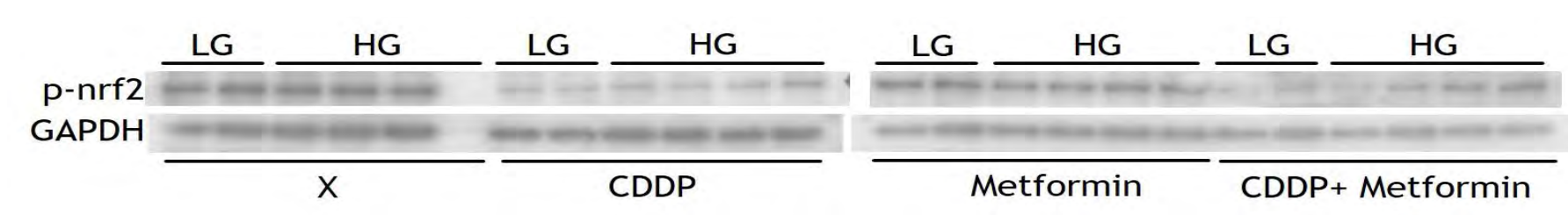
CDDP可以提高ROS並降低癌細胞的抗氧化因子來毒殺癌細胞。而在正常細胞中，phosphorylated Nuclear Factor erythroid 2-Related Factor 2 (p-Nrf2)被認為是預防糖尿病併發症的有效指標，如心血管疾病和糖尿病腎病。故我們想觀察p-Nrf2在MCF7和3T3中的表現量，來推斷藥物是否有做為抗癌和抗糖尿病的潛力。

CDDP明顯降低MCF7的p-Nrf2的表現量，而同時加Metformin時，有些微的上升。P.oleracea明顯提高MCF7的p-Nrf2的表現量。Black Ginseng在低糖時些微提高了MCF7的p-Nrf2的表現量，但是相對於LG CDDP，LG CDDP加Black Ginseng的p-Nrf2表現量明顯降低。MCF7在高糖環境下的p-Nrf2表現量些微下降，我們推測是因為MCF7在高糖環境下，ROS的量較少。正常情況來說，當身體的ROS量提高，會導致與Keap1結合的Nrf2被降解，並產生下游抗氧化因子，來達成保護DNA免於ROS的傷害 (Kansanen, et al, 2012)。

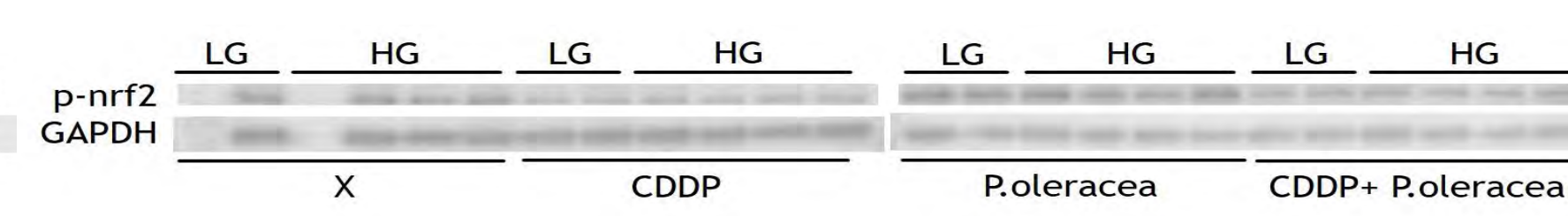
高糖環境下，3T3的p-Nrf2的表現量明顯降低，代表高糖對正常細胞來說傷害很大。我們發現Metformin會大幅降低3T3的p-Nrf2的表現量，P.oleracea會大幅提升3T3的p-Nrf2的表現量，Black Ginseng則是些微降低3T3的p-Nrf2的表現量。而CDDP在高糖情況下都有提升p-Nrf2的表現量。

以imagej軟體分析灰階，以LG 不加藥組別作為CTL組，其灰階作為100%表示相對表現量的對照。

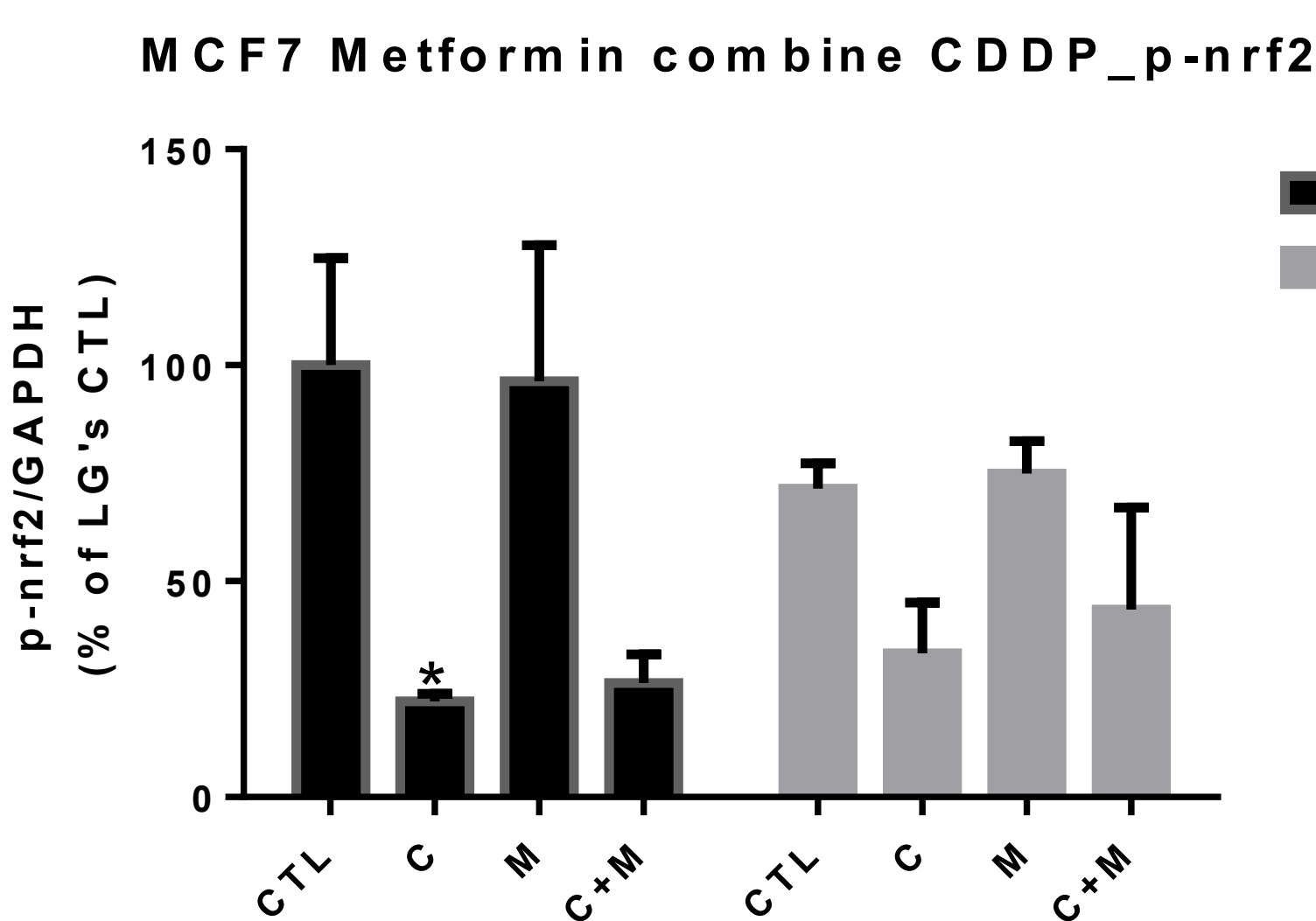
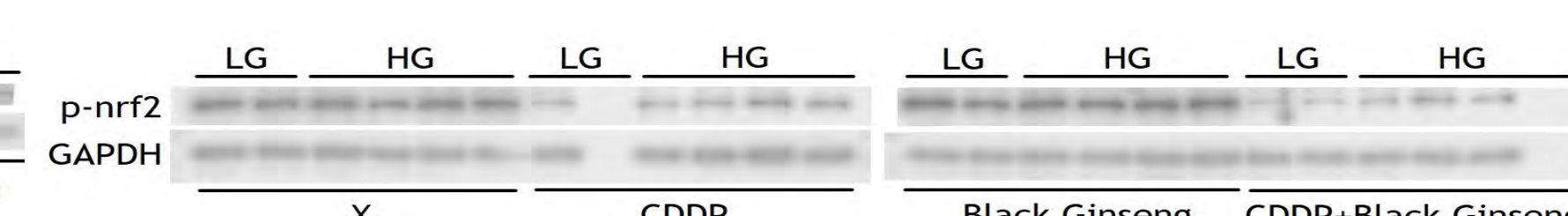
(一)MCF7 Metformin



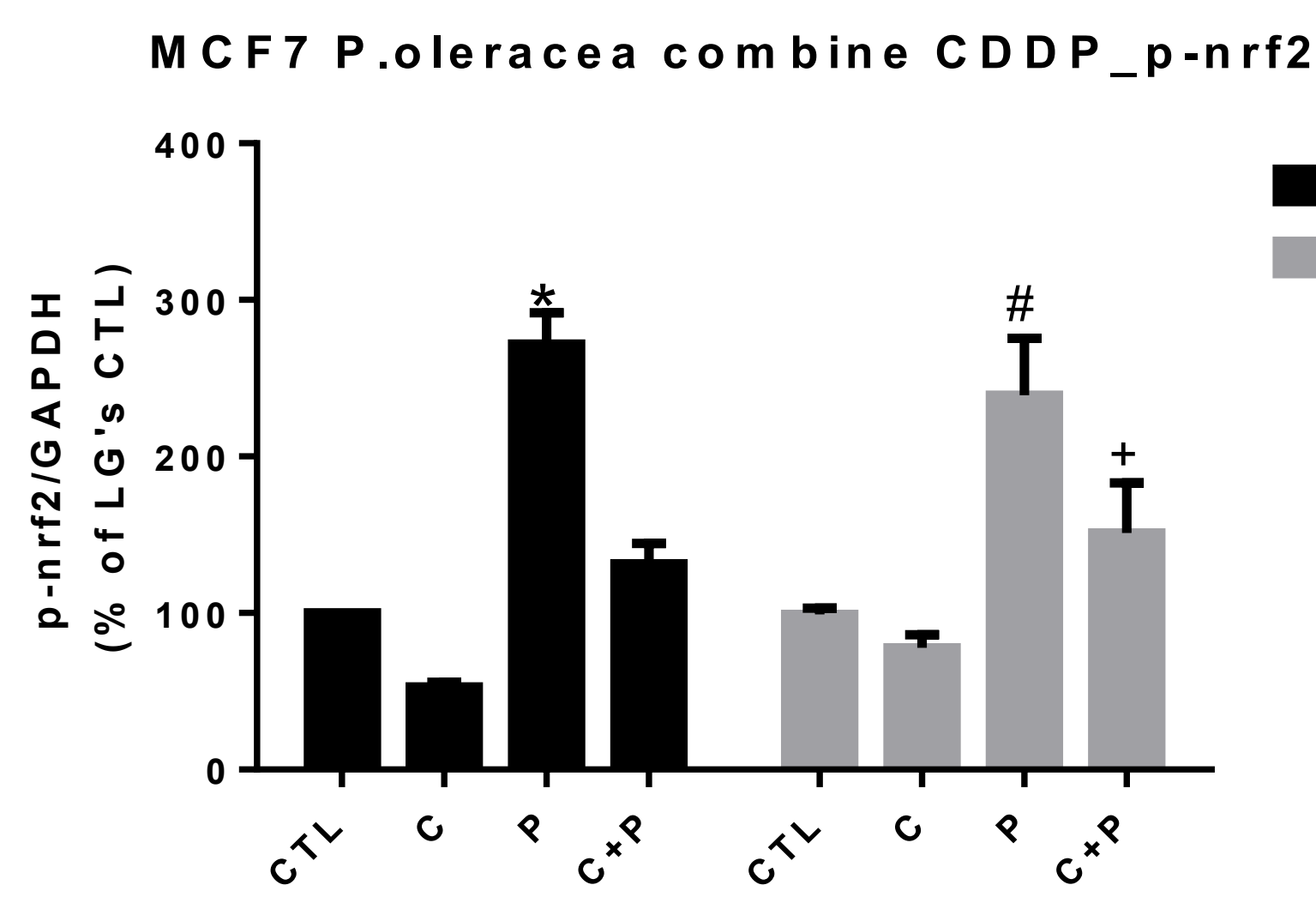
(三)MCF7 P.oleracea



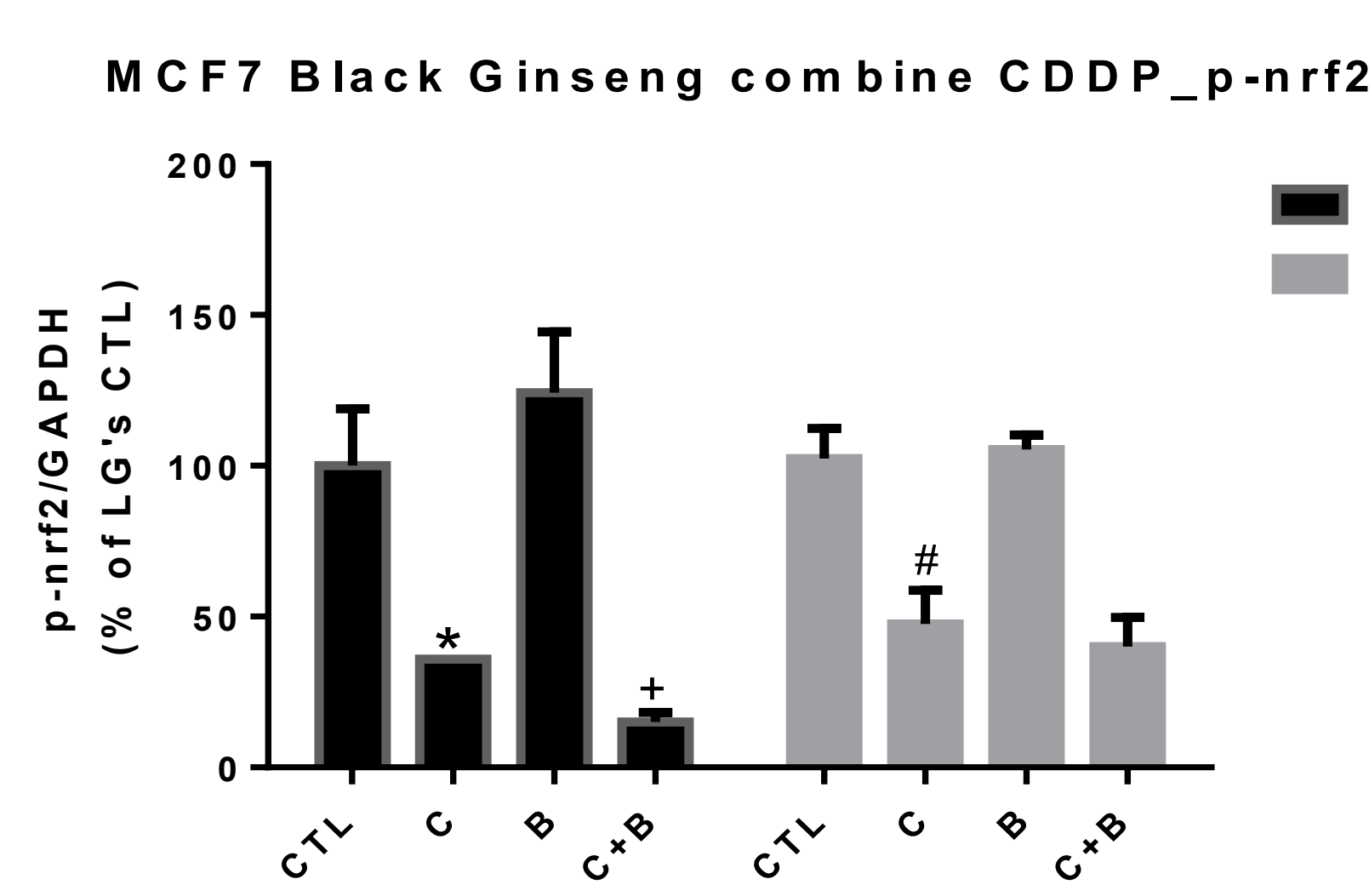
(五)MCF7 Black Ginseng



*與CTL LG比較， P<0.05

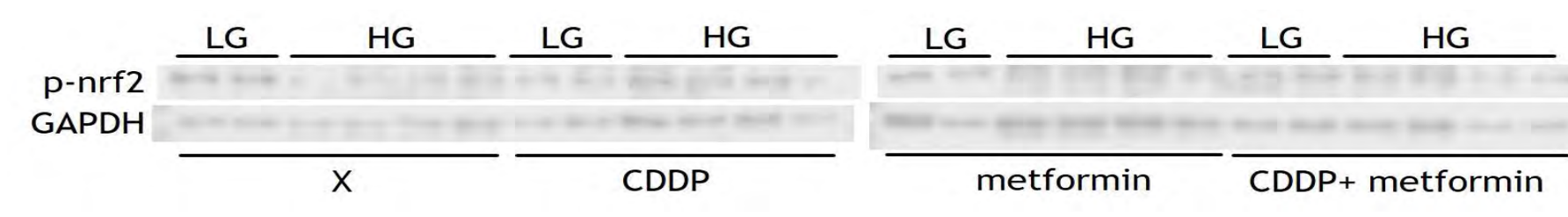


*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較，+與HG C 比較， P<0.05



*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較，+與LG C 比較， P<0.05

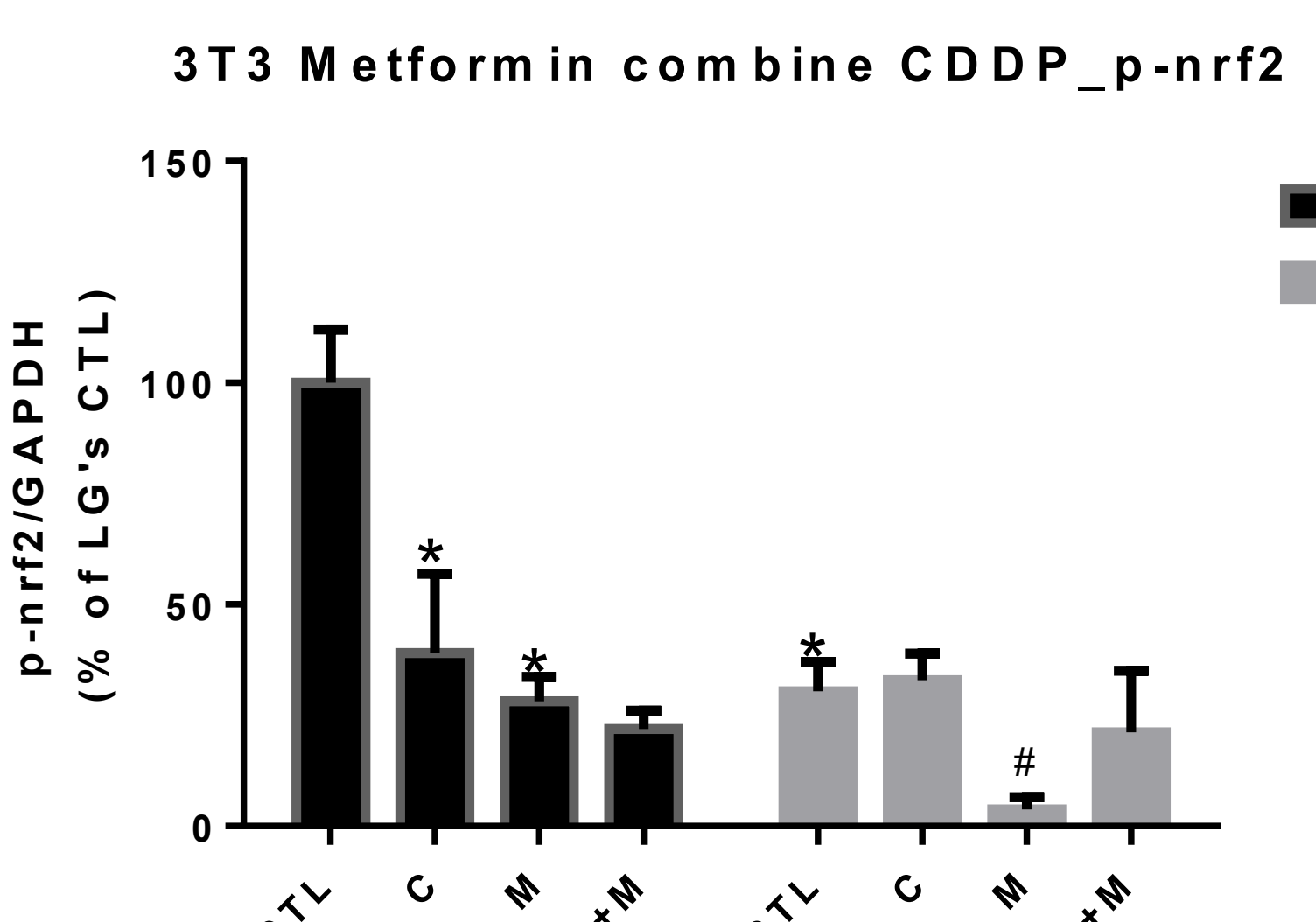
(二)3T3 Metformin



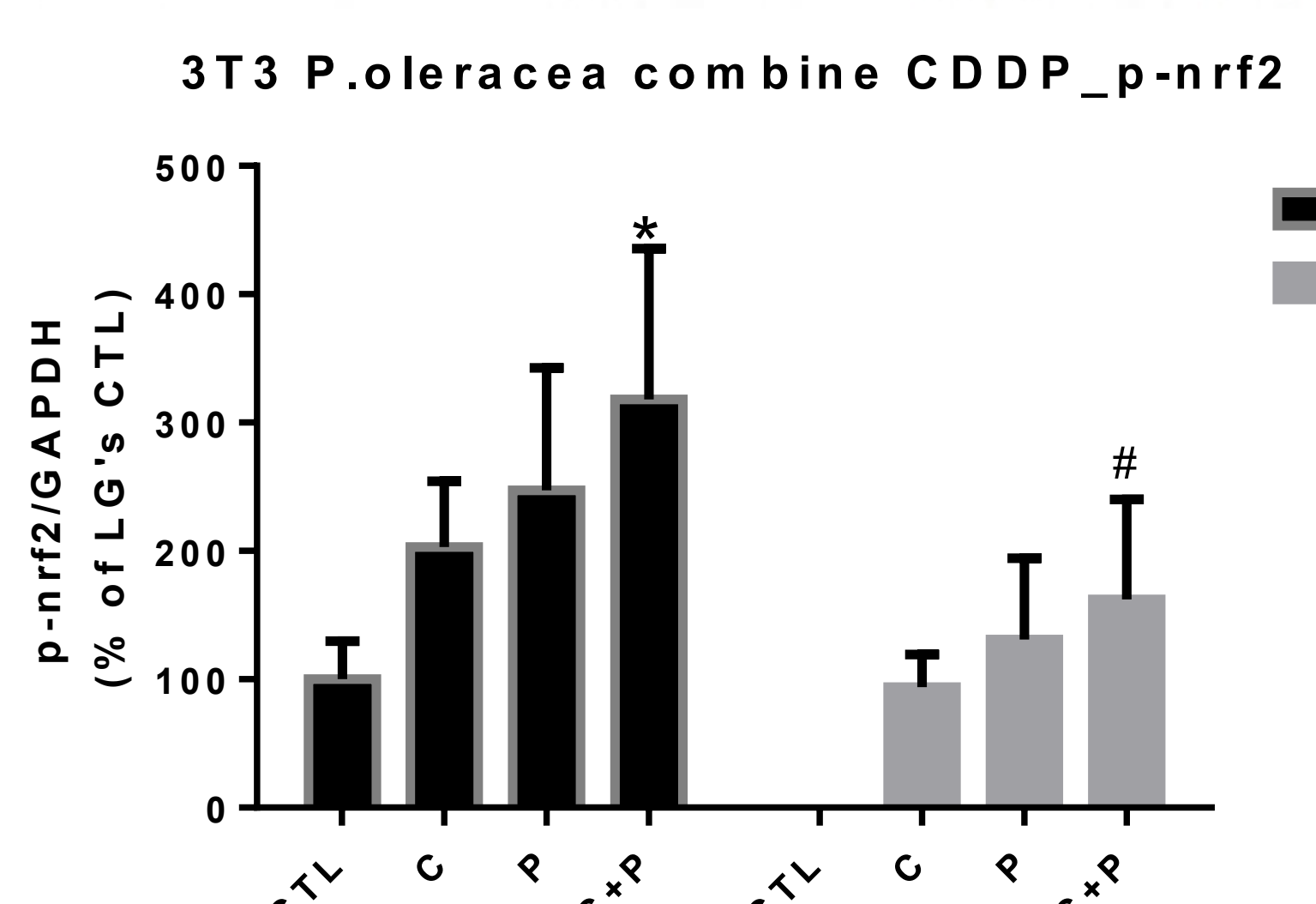
(四)3T3 P.oleracea



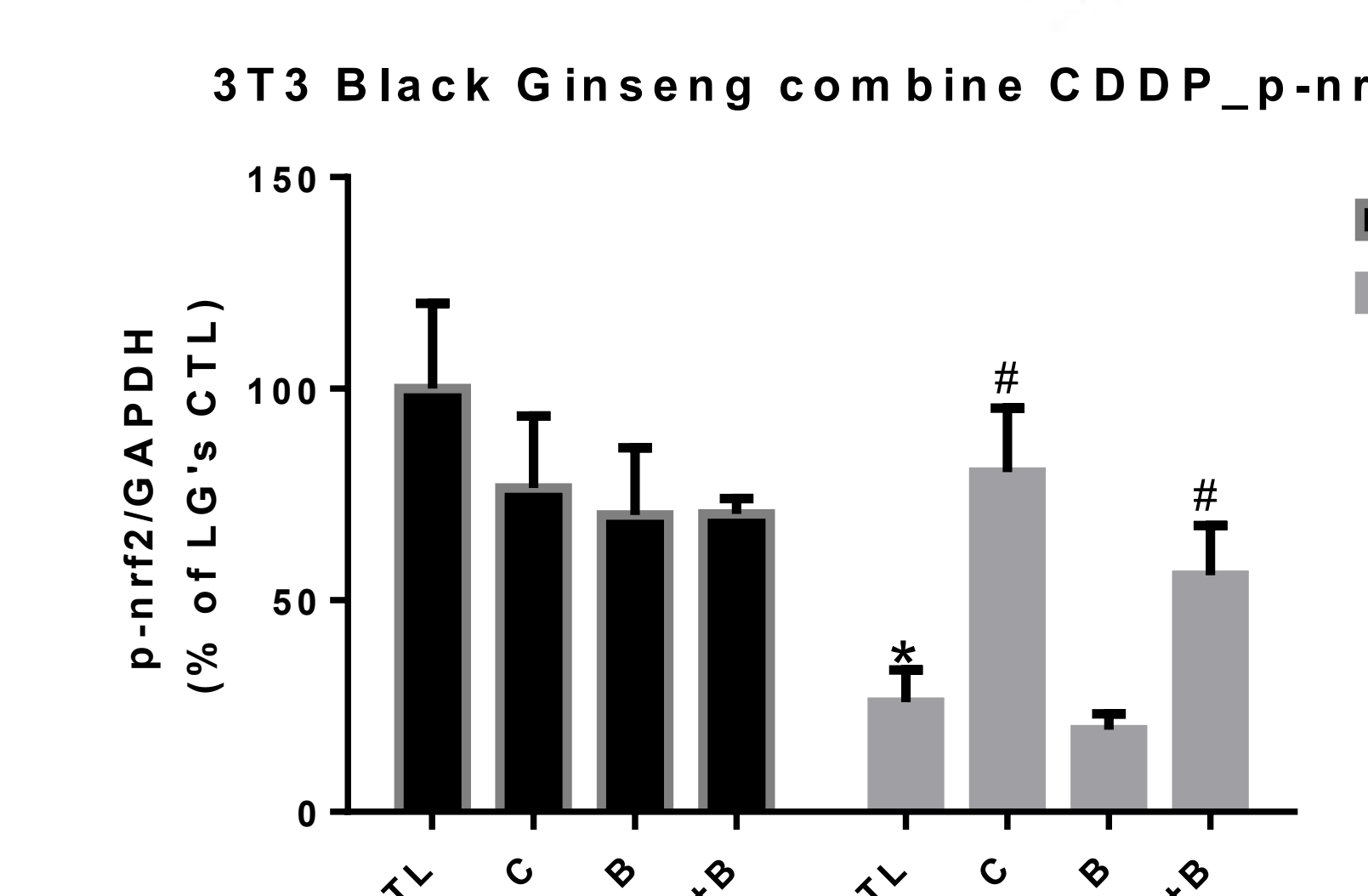
(六)3T3 Black Ginseng



*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05



*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05



*與LG CTL 比較，#與HG CTL比較， P<0.05

四、流式細胞儀分析

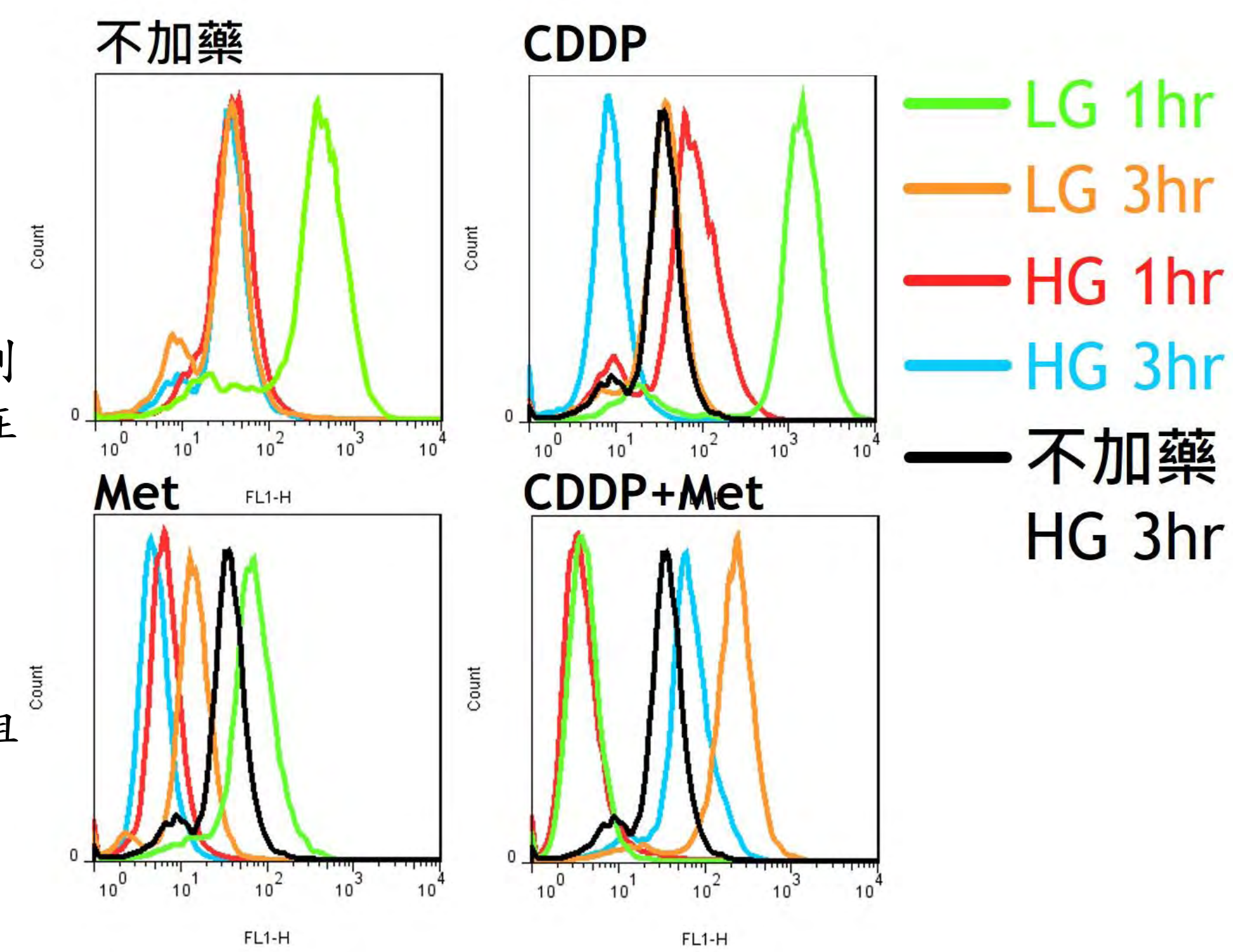
在MCF7的Crystal violet中，觀察到Metformin顯著影響CDDP的毒殺能力。而CDDP會藉由提高MCF7的ROS的產量和降低其抗氧化能力來導致細胞凋亡。故我們想觀察Metformin是否會影響ROS的產量。

我們觀察到MCF7在低糖時ROS的產量都比較高；在加藥作用1小時後，CDDP會明顯提升ROS的產量且高於HG 不加藥的組別；與其他不加藥的組別相比，Metformin降低ROS的產量；我們發現同時加CDDP和Metformin時，ROS的產量等到3小時後才被提升。

(一)Flow Cytometer高低糖、不同時間ROS表現量比較

分別以三組變因：一是不加藥、CDDP、Met、CDDP+Met，二是處理MCF7 1小時或3小時，並以流式細胞儀分析DCFHDA的螢光強度。

1. 在不加藥的組別中，LG 1hr提高MCF7中的氧化壓力。可以觀察到LG 3hr、HG 1hr、HG 3hr的螢光峰值是相近的，推論此為MCF7在正常情況下的ROS表現量。並把以HG 不加藥處理3小時的組別作為其他組別的對照。
2. 在CDDP的組別，以LG和HG處理1hr的螢光峰值都向右移，表示CDDP提高MCF7的氧化壓力。
3. 在Met的組別，除了以LG處理1hr的螢光峰值向右移之外，其他組別都往左移，表示Met降低MCF7的氧化壓力。
4. 在CDDP+Met的組別，1hr的組別的螢光峰值都向左移，3hr的組別的螢光峰值都向右移，推測CDDP+Met時延後CDDP提高ROS的效果。



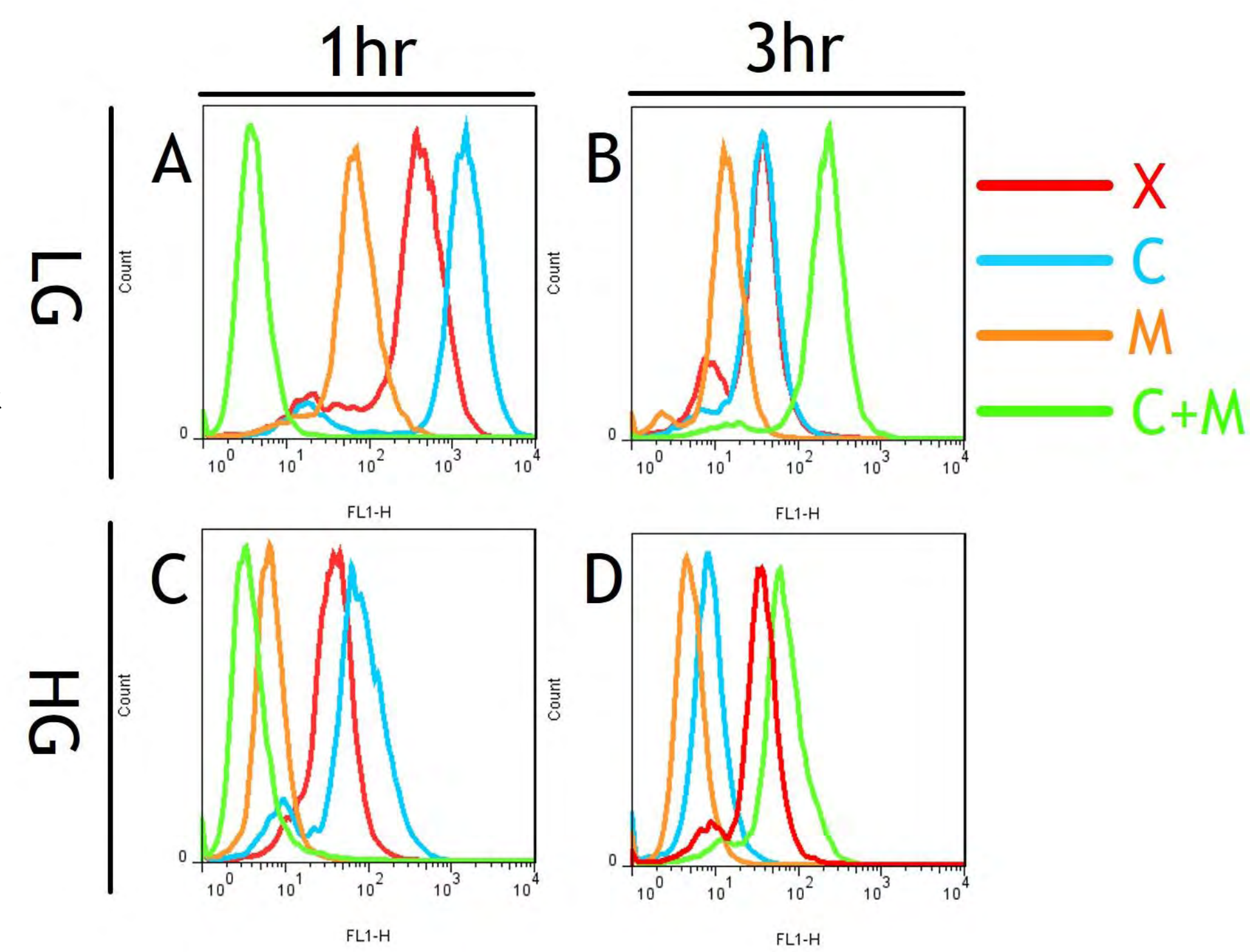
(二)Flow Cytometer不同藥物ROS表現量比較

A. 在LG 1hr的組別中，相對於不加藥的組別，CDDP提高MCF7的氧化壓力，Met降低MCF7的氧化壓力。相對於CDDP的組別，CDDP+Met的組別中可以觀察到Met明顯影響CDDP提高ROS的能力，結果比Met的組別還低。

B. 在LG 3hr的組別中，相對於不加藥的組別，Met降低MCF7的氧化壓力。相對於CDDP的組別，CDDP+Met的組別提高MCF7的氧化壓力。

C. 在HG 1hr的組別中，相對於不加藥的組別，CDDP提高MCF7的氧化壓力，Met降低MCF7的氧化壓力。相對於CDDP的組別，CDDP+Met的組別中可以觀察到Met明顯影響CDDP提高ROS的能力，結果比Met的組別還低。

D. 在HG 3hr的組別中，相對於不加藥的組別，CDDP的組別MCF7的氧化壓力較低，Met降低MCF7的氧化壓力。相對於CDDP的組別，CDDP+Met的組別提高MCF7的氧化壓力。



柒、結論

一、結果

在CDDP中，第一，在Crystal violet中觀察到CDDP對MCF7的毒殺能力明顯大於對3T3的影響，故我們可知CDDP對於這兩株細胞株具有選擇性。第二，在Western blot中CDDP能顯著降低MCF7的p-Nrf2表現量；對3T3的p-Nrf2表現量的影響不統一，但其3T3相對表現量明顯高於MCF7。第三，在Flow Cytometer中觀察到CDDP在藥物處理1小時後提高MCF7的氧化壓力。

在Metformin中，第一，在Crystal violet中觀察到Met能明顯抑制CDDP毒殺MCF7的能力；在LG環境下有毒殺MCF7的功效；顯著降低3T3細胞存活率。第二，在Western blot中Met能些微提升CDDP所降低的MCF7的p-Nrf2表現量；顯著降低3T3的p-Nrf2表現量。第三，在Flow Cytometer中觀察到Met能降低MCF7的氧化壓力，也能將CDDP所導致的氧化壓力表現時間延後2小時。

在P. oleracea中，第一，在Crystal violet中觀察到P. oleracea無顯著影響CDDP毒殺MCF7的能力；在LG環境下些微提升3T3的細胞存活率。第二，在Western blot中P. oleracea能顯著提升MCF7和3T3的p-Nrf2表現量。

在Black Ginseng中，第一，在Crystal violet中觀察到Black Ginseng無顯著影響CDDP毒殺MCF7的能力；些微降低MCF7的細胞存活率；些微提升3T3的細胞存活率。第二，在Western blot中Black Ginseng相對於LG CDDP組別顯著降低p-Nrf2表現量；些微降低3T3的p-Nrf2表現量。

在Astragalus中，在Crystal violet中觀察到Astragalus無顯著影響CDDP毒殺MCF7和3T3的能力。

二、討論

Met在HG環境下，會明顯抑制CDDP毒殺MCF7的效用，以減少細胞的死亡；其他三種中藥糖尿病藥並無顯著影響CDDP的效用。故我們認為當一個病患同時罹患糖尿病與癌症時，並不適合採用CDDP搭配Met聯合治療。P. oleracea可以提升MCF7和3T3的p-Nrf2表現量，我們推論其有提高細胞抗氧化因子的成分，也有抑制癌細胞的成分，所以我們觀察到的Crystal violet中P. oleracea不影響CDDP毒殺MCF7的能力；Black Ginseng降低了MCF7的p-Nrf2表現量。故我們認為P. oleracea相較其他三者，更適合作為糖尿病用藥。Astragalus在藥物測試得出的濃度過高，我們認為Astragalus並不適用於抗癌藥物。

在Crystal violet中我們觀察到Met在LG環境下具有毒殺癌細胞的能力，但在HG環境下卻不明顯，而且Met在HG環境下，若與CDDP搭配使用，反而會使癌細胞存活率相對上升(與HG CDDP組別比較)，故我們推論Met在HG環境下可能會產生一種新的路徑，而這種路徑可能會使癌細胞增生或是抑制CDDP毒殺癌細胞的能力。

在Flow Cytometer中我們發現CDDP確實會提高癌細胞的ROS表現量，而如果與Met搭配使用的話，其作用時間會從原先的一小時延後到三小時，這可以說明為何在HG環境下Met和CDDP搭配使用時會使細胞存活率相對上升(與HG CDDP組別比較)。

在Flow Cytometer中觀察到在LG環境中會提高MCF7的氧化壓力，但卻不影響其細胞存活率，我們推測可能是藥物與低糖導致的氧化壓力在細胞中的作用位置不同。

捌、未來展望

一、觀察胰臟細胞Ins1、肝細胞HEPG2在相同實驗條件下的藥物交互作用影響。

二、使用氟代脫氧葡萄糖(F-FDG)檢測、觀察此實驗與上述細胞代謝葡萄糖的情況，以確認各糖尿病藥的成效、分析與CDDP交互作用後的影響。

三、研究藥物交互作用對動物的影響，並分為兩組：T2D小鼠、同時罹患乳腺癌和T2D小鼠，觀測動物行為模式和其肌肉細胞、肝細胞、胰島細胞型態及生化分析。

玖、參考資料

- 一、Novosyadlyy R., Lann D.E., Vijayakumar A., Rowzee A., Lazzarino D.A., Fierz Y., Carboni J.M., Gottardis M.M., Pennisi P.A., Molinolo A.A., Kurshan N., Mejia W., Santopietro S., Yakar S., Wood T.L., & LeRoith D.(2010). Insulin-mediated acceleration of breast cancer development and progression in a nonobese model of type 2 diabetes. *Cancer Res*, 70(2):741-51.
- 二、Li Y., Wang M., Zhi P., You J., & Gao J.Q.(2017). Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models. *Oncotarget*,9(2):2158-2174.
- 三、Wainstein J., Landau Z., Bar Dayan Y., Jakubowicz D., Grothe T., Perrinjaquet-Moccetti T., & Boaz M.(2016). Purslane Extract and Glucose Homeostasis in Adults with Type 2 Diabetes: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Efficacy and Safety. *J Med Food*,19(2):133-40.
- 四、Kang O.H., Shon M.Y., Kong R., Seo Y.S., Zhou T., Kim D.Y., Kim Y.S., & Kwon DY (2017). Anti-diabetic effect of black ginseng extract by augmentation of AMPK protein activity and upregulation of GLUT2 and GLUT4 expression in db/db mice. *BMC Complement Altern Med*,17(1):341.
- 五、Wei Z., Weng S., Wang L., & Mao Z.(2018). Mechanism of Astragalus polysaccharides in attenuating insulin resistance in Rats with type 2 diabetes mellitus via the regulation of liver microRNA-203a-3p. *Mol Med Rep*,17(1):1617-1624.
- 六、Zamble D.B. & Lippard S.J.(1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci*,20(10):435-9.
- 七、David J.A., Rifkin W.J., Rabbani P.S., Ceradini D.J.(2017). The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*,4826724.