

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

合成的苯乙酸衍生物，H6，誘發人類子宮頸癌細胞凋亡之分子機制

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-039-038-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中國醫藥大學生化學科

計畫主持人：詹淑秦

共同主持人：劉崇賢

計畫參與人員：莊怡菁

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告
 期中進度報告

合成的苯乙酸衍生物，H6，誘發人類子宮頸癌細胞

凋亡之分子機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2320-B-039-038

執行期間： 2005 年 8 月 1 日至 2006 年 7 月 31 日

計畫主持人：詹淑秦

共同主持人：劉崇賢

計畫參與人員： 莊怡菁

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中國醫藥大學醫學院醫學系生化學科

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

中文摘要

苯乙酸能經由數種不同的作用機制誘導腫瘤細胞的生長停止與分化作用。本研究是探討合成的苯乙酸衍生物 4-Fluoro-*N*-butyl-phenylacetamides (H6)處理三株子宮頸癌細胞株 Hela、Hela-S3 及Ca Ski的生物活性作用。結果顯示，H6 具有抑制癌細胞增殖及癌細胞凋亡之作用，並呈現劑量及時間依存性，其IC₅₀約在 1.0~1.5 mM，ID₅₀約為 3 天。由細胞形態的改變、DAPI及TUNEL螢光染色、DNA斷片的結果得知，此合成的化合物明顯誘導細胞凋亡。以H6 處理會使細胞內Bax表現量增加，Bcl-2 表現量減少，PARP被分解斷裂，造成DNA無法修補而斷裂成特殊的片段，引起細胞的死亡。在H6 抑制癌細胞增殖作用機制研究中，分析此種合成化合物對細胞週期的影響，結果發現以 1 mM H6 處理會造成子宮頸癌細胞株 Hela-S3 停在細胞週期的S期，Hela及Ca ski細胞停在G2/M期。進一步分析一些與細胞週期相關的蛋白質變化，結果顯示H6 處理子宮頸癌細胞後，會使cyclin-dependent kinase 1 (cdk 1), cdk 2, cyclin A與cyclin B蛋白表現量降低。另外，以H6 處理Hela、Hela-S3 細胞，影響p53蛋白質的表現。歸納其總反應機制，我們認為H6 是透過S期細胞週期調節因子cdks和cyclins的負向調節，而且是p53-dependent的路徑，造成子宮頸癌細胞週期停滯在S期。除此之外，Bcl-2 蛋白質表現量的降低與Bax蛋白質及caspase9/caspase3 的活化可能是H6 誘導細胞凋亡的機轉之一。

關鍵詞：苯乙酸衍生物 / 子宮頸癌 / 細胞週期 / 細胞凋亡

Abstract

Phenylacetate was found to induce tumor cytostasis and differentiation. In this study, we investigated the activity of the synthetic phenylacetate derivatives, 4-fluoro-*N*-butylphenyl-acetamides (H6) treatment of human cervical cancer cells. Results showed that the anti-proliferative and apoptosis effects of this synthetic compound. The IC₅₀ values were between 1.0 ~ 1.5 mM and ID₅₀ value were about 3 days. Moreover, it significantly induced apoptosis evidenced by morphological changes, DAPI and TUNEL staining and DNA fragmentation. H6 increased the expression of Bax protein, whereas decreased the expression of Bcl-2 protein. H6 also induced proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), and then presented DNA fragmentation and apoptosis. To search the mechanism of anti-proliferative effect of H6, cell cycle analysis was performed. Results showed that 1 mM H6 induced S phase arrest in HeLa-S3 cells and G₂/M phase in HeLa and Ca ski cells. Western blot analysis of S phase regulatory proteins demonstrated that the protein levels of cyclin-dependent kinase 1 (cdk 1), cdk 2, cyclin A and cyclin B were decreased after treatment with H6. H6 increased the protein levels of p53. Taken together, these results suggest that down-regulation S-phase association cdks and cyclins and upregulation of p53 may contribute to H6-mediated S-phase and G₂/M phase arrest. Furthermore, the decrease of Bcl-2 and activation of Bax, caspase9/caspase3 may be the effector mechanism through H6 induced apoptosis.

Keyword: phenylacetate derivatives/ cervical cancer cells/ cell cycle/ apoptosis

一、前言

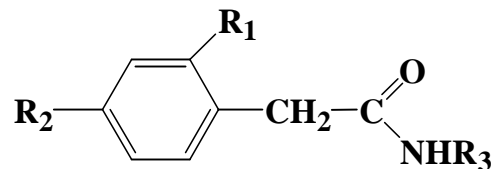
根據行政院衛生署九十四年公佈的資料指出：惡性腫瘤居台灣地區十大死亡原因之首。其中，子宮頸癌的發生率及死亡率排名為女性癌症第五位，死亡人數佔女性癌症死亡人數的 6.7%¹。由於子宮頸癌好發於年輕的女性，其危害婦女之健康非常大，且該病又向外蔓延非常快，如果能早期診斷，早期治療，其五年存活的比例仍舊很高，否則就不堪設想了，所以在 35 歲以後有性生活的婦女，應每年做一次細胞抹片檢查，有異常時再作陰道鏡指引下的活體組織切片檢查，這樣可以減少很多因疏忽而加重病情的痛苦。雖然目前已發展出預防子宮頸癌的疫苗，使用此疫苗可有效的降低由人類乳突瘤病毒感染引發的子宮頸癌²，但仍無法完全預防及避免子宮頸癌的發生。對於子宮頸癌的治療仍以傳統的方式，包括：外科手術切除、放射線治療及化學治療三種方法為主，而其預後的好壞，端賴發現的遲早而定。化學治療即利用天然或合成的藥物來治療癌症，其作用是經由抑制癌細胞的生長或直接破壞癌細胞等手段來達成治療的目的地。化學治療可以是使用一種藥物或合併多種藥物，甚至須與外科手術以及放射線治療等方式來共同加強治療癌症的效果。此為現今最常採用的方法，亦為國際癌症專家們認為較好而一致進行研究中之方法。但是這些治療方式也容易產生一些副作用。如：利用化學治療，抗癌藥物會導致嘔吐現象（特別是高劑量化療及Cisplatin類之藥物）和骨髓造血機能障礙；放射線治療，易造成正常細胞的傷害；而外科手術切除亦無法完全根除癌細胞。因此，尋找新的抗癌藥物是非常重要的課題。根據文獻指出，目前正在研究的(1)誘發分化療法，(2)利用藥物使癌細胞回復正常的生長控制，(3)重新啟動細胞凋亡程式，是針對癌細胞進行治療的最佳抗癌模式。因此本研究是由細胞及分子層次，探討合成的苯乙酸衍生物 4-Fluoro-N-butylphenylacetamides (H6) 誘發人類子宮頸癌細胞凋亡之調控機制。

二、研究目的

子宮頸癌治療的方式包括外科手術切除、放射線治療及化學治療三種方法。化學治療是以天然或合成的藥物來殺死癌細胞。它通常是在子宮頸癌已經散佈到身體其他部位時進行，醫師可能會只用單一藥物或選擇數種藥物組合治療。治療子宮頸癌的抗癌藥物可能由靜脈注射或是口服的方式給予，不論是那種方式，化療都是一種系統性的治療。目前新藥雖不少，大多數的效果不太理想，副作用太大，比如Mitomycin C, Endoxan, Toyomycin, Actinomycin C, Methotrexate, Nitrogen Mustard等，根據目前國際癌症化學治療專家研究結果與臨床報告，Methotrexate僅對葡萄胎(鬼胎)有良效，Mitomycin C對子宮頸癌治療效果優於其他，但是這些抗癌藥物不僅對癌細胞具有毒殺之效果，對正常細胞亦有嚴重毒性。尤其是生長快速的細胞如：骨髓細胞 (bone marrow)、腸道上皮細胞 (intestinal epithelial cell)或頭髮毛囊細胞。由於這些化學藥物在使用上有其限制，所以尋找對子宮頸癌治療有效且毒性小的藥物是目前從事子宮頸癌化療藥物研發工作者之重要課題。

苯乙酸 (Phenylacetic acid) 是phenylalanine的代謝物。早期被用在治療尿素循環異常 (urea cycle abnormalities) 或肝門系統性的腦疾病 (portal systemic encephalopathy)，後經評估可作為抗腫瘤藥劑³。苯乙酸在體內和體外均被證實能抑制腫瘤細胞的生長，且臨床試驗顯示能夠緩和腫瘤生長、轉移和免疫有關的的基因表現，為一種有效的癌細胞毒性劑⁴。苯

乙酸和cisplatin結合使用可以增加子宮頸癌細胞株SW756 對放射治療的敏感性⁵。本研究選用先前已發表的藥物—苯乙酸衍生物，H6 (圖一)進一步的研究。之前的研究指示，此合成化合物對人類鱗狀上皮肺癌細胞CH27 具有生長抑制的作用^{6,7}。因此本研究以選用此化合物對人類子宮頸癌細胞—Hela, HelaS3 cell以及Ca ski cell細胞進行其生物活性的探討。期能從結果得知苯乙酸衍生物誘發子宮頸癌細胞凋亡的作用機制，以提供開發抗子宮頸癌新藥研究之參考資料。



H6 : $R_1=H$, $R_2=F$, $R_3=C_4H_9$

圖一、合成的苯乙酸衍生物 4-Fluoro-N-butylphenylacetamides (H6)化學結構

三、文獻探討

三-1 與子宮頸癌相關的分子

(1) 乙型變形生長因子(transforming growth factor β ; TGF- β)與子宮頸癌

TGF- β 是一群可附著於細胞膜表面的多肽類。TGF- β 可以抑制正常子宮頸細胞的生長，但對於腫瘤則失去了抑制能力。因此失去對乙型變形生長因子的反應力似乎是子宮頸癌的一個可能機轉。正常子宮外頸細胞對TGF- β 非常敏感，而分化不良的細胞則不那麼敏感，至於癌細胞幾乎完全不受影響。Gomerci以免疫化學組織染色法研究TGF- β 在子宮頸癌、分化不良及正常子宮頸的表現⁸。他發現在高度分化不良或侵犯性癌的基質，有較高的胞外濃度，所以經由旁分泌的影響可使基質增生血管增加，進而幫忙腫瘤的生長。

(2) HER-2/neu 基因與子宮頸癌

HER-2/neu (neu, c-erbB-2)是屬於表皮生長因子受體(EGF-R)家族裡的一個原致癌基因。HER-2/neu在正常之外子宮頸的分布與EGF-R很類似，主要出現在基底細胞，間質細胞則幾乎沒有；在內子宮頸則二者差異很大，前者分布於腺細胞，而後者主要在間質細胞。一般而言，子宮頸鱗狀上皮癌裡很少見HER-2/neu的異常。Kihana等人研究 44 位子宮頸腺癌病人，其中四分之一有p185^{neu} 增多的情形，而且這些人的預後似乎較差⁹。

(3) 細胞週期素A, B(cyclin A and cyclin B)與子宮頸癌

有文獻指出，過度表現的 cyclin A 和 cyclin B 可作為子宮頸細胞的腫瘤生成損害程度的標準¹⁰。正常子宮頸細胞或非腫瘤的子宮頸損傷是不會有cyclins表現的；而子宮頸腺狀內上皮細胞腫瘤(CGIN; cervical glandular intraepithelial neoplasia)形成時，cyclin A、cyclin B、cyclin E表現增加；當子宮頸腺癌(cervical adenocarcinoma)產生時，cyclin A、cyclin B、cyclin E表現量達到最高。因此證明早期的子宮頸腺狀腫瘤生成時會調高 cyclin A、B、E 表現量，這些指標會隨著腫瘤病情加重而增加。Cyclin B 與 Cdk1 形成 mitosis-promoting factor 調控細胞週期由 G₂ 進入 M 時期。但當子宮頸鱗狀內上皮 (cervical squamous intraepithelial)損傷嚴重時，cyclin B 伴隨著 cyclin A 表現增加 且細胞週期停滯在 S 時

期，推測當細胞遭受極大損傷時細胞週期仍繼續運轉，因此導致未來基因改變更加不穩定^{11, 12}。最近文獻證實 p53 蛋白調控G₂ checkpoint 是藉由減少 cyclin B 蛋白表現，且減弱 (attenuating) cyclin B promoter 的活性¹³。

三-2 細胞週期和化學治療的相關性

以化學藥品來治療癌症，一般而言是希望藉由藥物來達到使腫瘤退化或減低其生長速率的目的。化療藥物一般都有修飾DNA的功能，因此DNA的結構通常成為設計化療藥物的標靶 (Target)。然而不幸的是，現今化療藥物的標靶不僅存在腫瘤細胞上，亦存在正常細胞上¹⁴。正因為特异性不夠，使的現今化療藥物有很大的副作用。由細胞週期的觀念我們可以把化學治療藥物分成兩種類型：

- (1) 在細胞週期的某個時期才能發生作用，稱之為 cell-cycle specific 或 phase-specific。這類化療藥物是作用在 S 時期(染色體複製階段)及 M 時期(染色體分裂階段)。
- (2) 在細胞週期的每個時期都能發生作用，稱之為 cell-cycle non-specific。此類藥物能再細胞週期的任何時期破壞DNA，並且作用在G₁及G₂檢查點 (checkpoints)而導致細胞週期停滯 (arrest)，而破壞的結果就是造成細胞壞死 (necrosis)或凋亡 (apoptosis)¹⁴。

在選擇化學治療藥物時，不論是單一或複合藥物治療，都必須考慮到癌細胞的週期及藥物與週期的關係。

三-3 p53 protein 所扮演的角色

p53 蛋白是一種腫瘤抑制因子(tumor suppressor)及轉錄調節因子(transcription factor)，它參與了細胞週期的調控及誘導細胞凋亡^{15, 16}。DNA damaging agent若是會增加p53 的表現也會誘導細胞凋亡。而p53 蛋白使細胞產生凋亡的機制可能包括：(1)間接活化p53 下游與 apoptosis有關的基因(例如：Bax, Noxa, FAS和PUMA)。(2) p53 也可能直接與粒線體及 apoptosome complex有交互作用。(例如：一種最原始的caspase activation方法是p53 促使 cytochrome c由粒線體釋出與Apaf-1 結合，接著活化一連串的caspase cascade。在一般的情況下，p53 並不會在細胞中累積，而是與Mdm2 結合後與protease作用而降解，當p53 被磷酸化時才會脫離Mdm2，造成p53 的堆積。約有 50-55% 癌症病人身上發現p53 基因有突變或缺乏的現象。而相對的，若腫瘤細胞中發現有Wild-type的p53 gene的病人對於化學治療 (chemotherapy)則有較好的治療效果¹⁷。

三-4 細胞凋亡

大多數的細胞凋亡之形態變化最早由 Kerr 等人在1972年觀察到，在細胞中主要是由一群胱胺酸蛋白質水解酶 (cysteine protease)啟動引起細胞凋亡的。這些蛋白彼此間的相似性很高，大部分由caspase (cysteine aspartate-specific protease)群所組成¹⁸。當細胞受到刺激時，會進行一連串蛋白質酶解作用 (proteolysis cascade)，將死亡訊息傳至死亡路徑的下游。目前已有十幾種caspase在人體中被發現，而主要被認為和細胞凋亡有關¹⁹。細胞凋亡主要分為兩大路徑，一為mitochondrial pathway，細胞死亡訊息促使粒線體釋出細胞色素 c (cytochrome c)，當 cytochrome c 與 Apaf-1 結合，會活化 caspase 9²⁰。另一為 death

receptor pathway，經由死亡受體 (death receptor) 和基質 (如Fas或TNF- α) 結合，活化 caspase 8²¹。caspase 9 和 caspase 8 的活化會啟動下游的 caspase 3²² 活化，導致核膜蛋白 (lamin) 分解、PARP (poly ADP-ribose polymerase) 被切及 DNA fragmentation，最後導致細胞凋亡。

三-5 Bcl-2 family與細胞凋亡的關係

Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2)於1984年首先在惡性 B 細胞癌(B-cell leukemia)中被發現。1988年 VauX 等人首先提出 Bcl-2 基因可以延長細胞的存活，此一作用是經由抑制細胞死亡，而非增加細胞的增殖²³。 調控細胞凋亡的作用主要是因為 Bax 與 Bcl-2 分子形成同源複合體結合到粒線體膜上，使粒線體膜上形成孔洞，造成cytochrome c 由粒線體內釋放到細胞質中，而堆積在細胞質中的 cytochrome c 與 Apaf-1 結合後造成 caspase 9 活化，接著引發一連串下游的死亡訊息，最後導致細胞凋亡。當 Bcl-2 及 Bcl-X_L與 Bax 結合，粒線體膜上無法形成孔洞，cytochrome c 無法由粒線體中流出，則阻斷細胞凋亡的路徑^{24, 25}。 就癌症治療的觀點來看，可以把Bcl-2蛋白質當作天然或合成化合物藥物治療的標靶，針對抑制Bcl-2蛋白質的合成，誘導癌細胞進行細胞凋亡，作為癌症治療的方向。

四、研究方法

(一) 細胞培養 (Cell culture)

本研究所使用之細胞株 HeLa, HeLa-S3 與 Ca Ski 為人類子宮頸癌細胞株，購自食品工業研究所(CCRC)，細胞主要來源為美國組織細胞庫 (American Type Culture Center ; ATCC)。HeLa 與 HeLa-S3 同屬於人類子宮頸上皮腺癌細胞 (human cervix epithelial & adenocarcinoma cell line)。Ca Ski 屬於人類子宮頸表皮樣的癌細胞 (human cervix epidermoid carcinoma cell line)，為子宮頸鱗狀癌細胞。 HeLa, HeLa-S3 與 Ca Ski 細胞以完全培養液培養於含有 5% 二氧化碳、37 °C 的培養箱中，每兩天更換一次培養基。細胞的次培養 (subculture) 則以 Trypsin 將細胞於培養皿中打散，再分植到新的培養皿中。

(二) 細胞存活率評估 (Cell Viability Assay)

細胞分別以不同濃度的 H6 處理，每處理三重複，每隔 24 小時取出一盤，取出細胞並以 trypan blue 染色，以血球計數器(hemocytometer)計算各孔內的細胞數，再以各處理的平均值與控制組比值作生長曲線並求出生長抑制率。

(三) 細胞核染色 (Nuclear Staining Assay)

以 DMSO、H6 處理三株細胞 48 小時後，細胞以 PBS 清洗兩次後，用 2 % paraformaldehyde 在室溫下固定，再以 0.1 % Triton X-100/in PBS 處理 30 分鐘，接著以 PBS 清洗，依照 TUNEL (terminal transferase-mediated dUTP-fluorescensin nick end-labeling) 檢測法，先加入 TUNEL 反應劑後將其置於 37 °C 的培養箱在黑暗中染色 60 分鐘，接著用 PBS 清洗再以 DAPI 染劑在 37 °C 黑暗中染色 30 分鐘，以 PBS 清洗多餘染劑之後置螢光顯微鏡下觀察、照相。能被 TUNEL 染劑染色者則視為凋亡的細胞。

(四) 凋亡細胞 DNA 的萃取和電泳分析

以DMSO、H6處理三株細胞48小時後，收集細胞加入DNA extraction buffer置冰上30分鐘，溶解後的細胞加入RNase (100 µg/ml) 於55°C水浴30分鐘後再加入proteinase K (400 µg/ml)置55°C水浴1小時，上清液以等體積的phenol/chloroform萃取。取5 µl稀釋100倍，在波長260 nm下測定吸光值，計算核酸濃度(µg/ml)。配製2% agarose gel，最後將樣品DNA注入電泳膠孔槽，以0.5X TBE buffer為電泳緩衝液，進行電泳分析。

(五) 細胞週期分析 (Cell Cycle Analysis)

以DMSO、H6處理三株細胞48小時後，加入10 ml PBS混合均勻後於1000 rpm 4°C離心5分鐘；去上清液加入70% EtOH/PBS固定細胞並置於冰上30分鐘，1000 rpm 4°C離心5分鐘，再次將細胞於PBS打散然後置於5 ml分析管中接著以PI solution(4×10^5 cells/ 1ml PI) 於室溫下處理30分鐘，置冰上直到以流式細胞分析儀(flow cytometer; FACScan)分析之，細胞週期的分布是利用Cell-FIT軟體(Becton Dickinson Instruments) 分析。

(六) 蛋白質定性與定量分析

以DMSO、H6處理三株細胞，收集不同時間點的細胞，萃取細胞總蛋白質，以聚丙烯醯胺膠體電泳法(SDS-PAGE Electrophoresis Assay)及西方轉漬法(Western blot)，分析(1)細胞凋亡相關的分子如：Bcl-2 家族蛋白質、caspase 等；(2)細胞週期相關的分子如：細胞週期素(cyclin)，細胞週期素依存性激酶(cdk)與p53蛋白質。以探討癌細胞經H6處理後，是否是因為影響這些相關分子的合成或穩定性，而造成細胞的凋亡。

(七) 胞液分離萃取分析(Cytosolic Fractionation)

以DMSO、H6處理三株細胞，分別在24、48與72小時收集細胞，經PBS洗滌後細胞以extraction buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 0.3% 2-mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 0.2 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride)於冰浴中反應30分鐘，接著細胞以Dounce homogenizer均質化，將均質液以100,000×g，4°C離心30分鐘，上清液即為細胞質部分(cytosolic fraction)，以Bradford方法定量分析蛋白質，取定量的蛋白質分裝於ependorf tube置-80°C備用²⁶。

五、結果與討論

根據之前的研究報告指出，苯乙酸是一種毒性非常低微的抗腫瘤劑，無論在細胞或動物實驗模式與人體內均有相當顯著的活性⁴。對於前列腺癌、神經膠質瘤(glioma cells)、骨髓瘤(primary neoplastic myeloid cells)、結腸癌(colon carcinoma cells)、血癌⁴，皆具有抑制腫瘤細胞生長作用，還會引起凋亡。因此，本研究使用的苯乙酸衍生物 4-Fluoro-N-butylphenylacetamides (H6)是以苯乙酸的結構為基本架構所合成的衍生物。之前的研究報告指出，H6會誘導人類鱗狀上皮肺癌細胞CH27的細胞週期停滯在G₁時期與細胞凋亡，而造成細胞週期停滯可能是透過調節p53的路徑造成cdk1-p21的活化，而使細胞週期停滯在G₁時期。另外，造成細胞的凋亡可能是透過調控Bcl-2，造成粒線體內的cytochrome c的釋出，活化caspase 9，接著活化下游的caspase 3，引起PARP的分解斷裂造成DNA無法

修補而形成特殊片段，最後造成細胞的凋亡⁶。本研究以H6處理在子宮頸癌細胞上，主要的目的是希望從實驗結果分析藥物作用在不同細胞上的差異性，並希望透過這兩株子宮頸癌細胞內蛋白分子表現的特異性，進一步瞭解此類藥物的作用機制。

(1) H6造成子宮頸癌細胞的毒殺作用，由圖二結果顯示，經H6處理子宮頸癌細胞後，會誘導子宮頸癌細胞的生長抑制及細胞凋亡，且具有劑量及時間的依存性。其IC₅₀約為1.1 mM而ID₅₀約為2.5天。

(2) 細胞凋亡評估 (Cell Apoptosis Assay)，當細胞凋亡發生時，可以觀察到不同於細胞壞死的特徵如：細胞皺縮、細胞質膜呈現泡泡狀、細胞膜不對稱性消失、細胞核崩解、染色質濃縮、細胞分裂成個別的細胞凋亡小體(apoptotic bodies)。我們利用螢光染色法與DNA膠體電泳法，分析H6誘導子宮頸癌細胞生長抑制是否出現細胞凋亡，由圖三結果顯示處理H6細胞都出現凋亡細胞的特徵，包括細胞形態的改變，染色體的濃縮及核內DNA斷裂成特定的片段。這些現象都足以顯示H6誘導子宮頸癌細胞Hela、Hela-S3及Ca Ski cells走向細胞凋亡。這與許多癌症化學治療藥物藉誘導癌細胞凋亡的抗癌方式相同。

(3) 於H6誘導細胞凋亡中會造成細胞質cytochrome *c*的累積與caspase 9、caspase 3的活化，累積過去對化療藥物作用機制的探討，證實這些化療藥物誘導腫瘤的復原是經由抑制腫瘤細胞的增殖，或同時使細胞凋亡的路徑活化²⁷。在細胞凋亡過程中許多基因參與了細胞凋亡的調控；caspase家族的活化是促使細胞凋亡中一個非常重要的激活機制。細胞在進行凋亡的時候會造成cytochrome *c*由粒線體釋放到細胞質，細胞質內的cytochrome *c*便與Apaf-1結合緊接著活化caspase-9，造成caspase-3的活化，具活性的caspase-3會將下游的受質—PARP分解成兩個片段²⁸⁻³⁰。探討H6處理細胞後是否會活化此路徑，我們採用西方轉漬分析法(Western blot analysis)以anti-cytochrome *c*, anti-caspase-9與anti-caspase-3三種抗體偵測細胞質內的cytochrome *c*, caspase-9與caspase-3是否會活化。從圖四的結果顯示子宮頸癌細胞經H6處理後，cytochrome *c*會由粒線體釋放到細胞質且隨著處理時間的增加細胞質內的cytochrome *c*累積得愈多。cytochrome *c*隨著時間增加的同時伴隨著caspase-9與caspase-3蛋白水解而活化，這些結果明顯指出H6能誘導粒線體內的cytochrome *c*釋放到細胞質，同時伴隨著caspase-9與caspase-3的活化。

(4) 4-Fluoro-*N*-butylphenylacetamides (H6)影響子宮頸癌細胞週期的分布，以H6處理子宮頸癌細胞後，發現細胞生長被抑制，因此我們使用流式細胞分析儀分析細胞週期的分布百分比。由圖五結果顯示，H6會造成子宮頸癌細胞的細胞週期堆積在S與G2/M時期，且隨著時間的增加，S與G2/M時期分布百分比有增加的趨勢；在2004年報告指出，在子宮頸癌細胞中，其cyclin A和cyclin B有過度表現的情形，而且可以當做檢測的生物標靶¹⁰。由細胞週期分析結果可知，H6可造成細胞週期分別停滯在S與G2/M時期，因此我們分析與其相關的cyclins及cdks，結果顯示在圖六。由結果可知H6處理24hr時，會造成cyclin A, B及cdk 1, cdk 2的表現量降低，且隨著時間的增加降低更多。另外亦分析H6處理Hela、Hela-S3細胞後，p53蛋白質的變化。結果發現p53蛋白質的表現量明顯的增加，顯示p53蛋白質在H6對子宮頸癌細胞的作用機轉中扮演重要角色(圖六)。綜合上述實驗數據，可知H6影響子宮頸癌細胞週期的停滯會透過p53蛋白質。

(5) H6 對Bcl-2 家族蛋白的調控，在細胞凋亡進行時，Bcl-2 家族蛋白分子對於細胞的死亡及存活扮演重要的角色²⁴。 Bax蛋白質在Bcl-2 家族分子中是一個促進細胞凋亡分子。而Bcl-2 蛋白質則是抑制細胞凋亡的分子。依文獻報告指出，在細胞進行凋亡時，可以檢測到Bax蛋白質的表現量增加，Bcl-2 蛋白質表現量的減低，此時Bax蛋白質互相結合形成同質雙體 (homodimer)，接著轉位到粒線體膜上，刺激粒線體膜電位改變或形成孔洞而使粒線體內的游離分子cytochrome c釋放到細胞質與Apaf-1 結合，引起一連串caspase的活化，接著引起其下游分子PARP的斷裂而使DNA無法修補，最後導致細胞的凋亡。於本研究結果圖七顯示，H6 誘發子宮頸癌細胞Hela、Hela-S3 及Ca Ski細胞凋亡時，皆會引起Bax蛋白質表現量的增加及Ca Ski細胞Bcl-2 蛋白質表現量的減少，同時引發cytochrome c釋放及一連串caspase的活化(圖四)。根據文獻指出，Evodiamine (馬兜鈴的主成分)引起Hela-S3 細胞凋亡的機制之一是造成apoptosis inducer Bax蛋白質的表現量增加；及apoptosis

suppressor Bcl-2 蛋白質的表現減低³¹。另外，亦有文獻報告指出Staurosporine和TNF- α 對Hela-S3 cells的生長抑制作用亦藉由Bax大量轉位至粒線體膜上，導致cytochrome c釋放和細胞凋亡³²。因此，H6 可藉由調控Bcl-2 及Bax之路徑，引發細胞的凋亡。

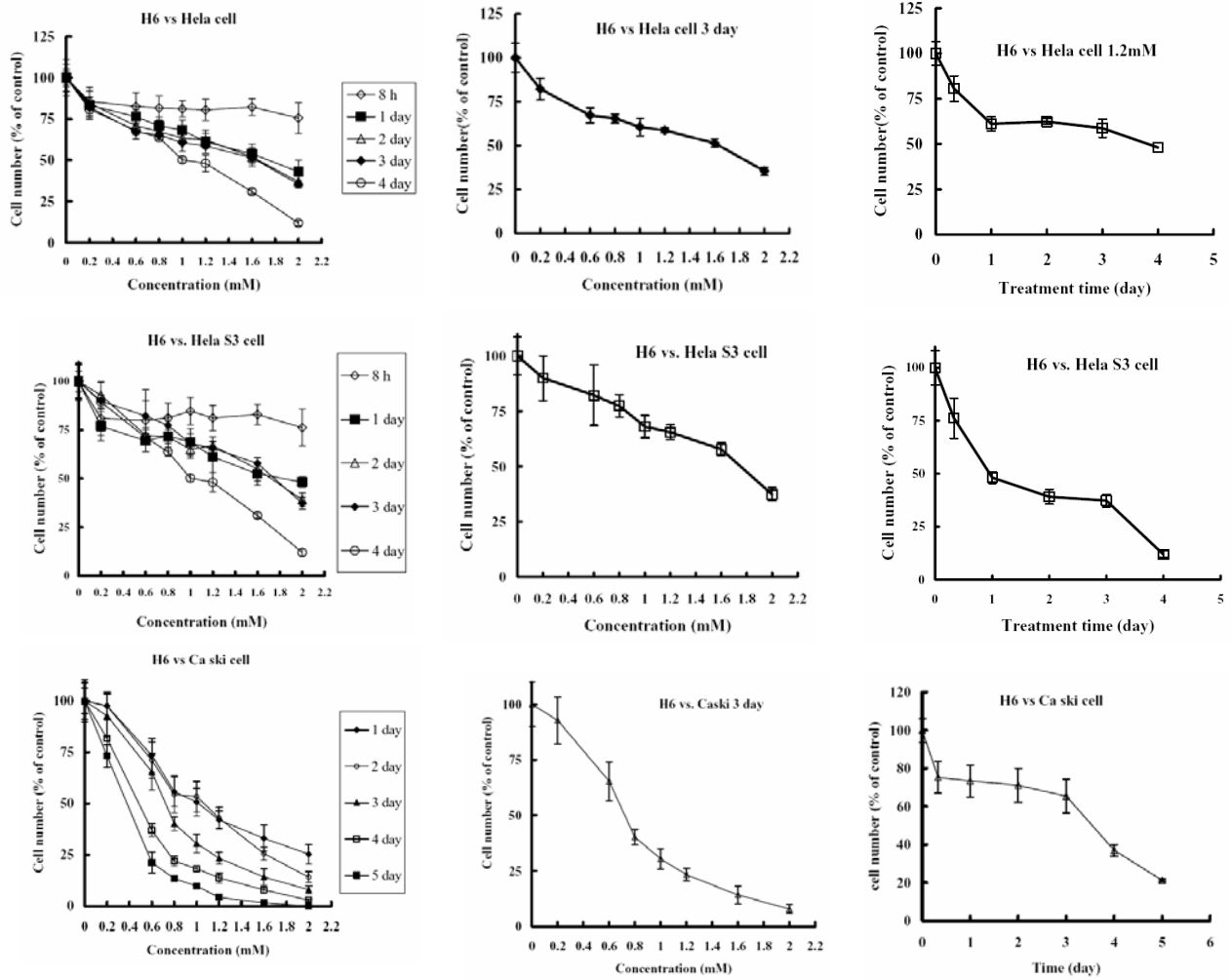
綜合 H6 誘導子宮頸癌細胞凋亡的結果，當 H6 進入癌細胞內，經由一些目前尚不清楚的作用造成 Bax 蛋白質的表現增加，導致粒線體中 cytochrome c 釋放到細胞質，引發下游 caspase-9 的活化，藉由 caspase-9 的活化使得 caspase-3 被活化，細胞中執行重要功能之分子被 caspase-3 分解而啟動細胞進行凋亡。H6 進入子宮頸癌細胞內能引發癌細胞的生長停滯在 S 及 G2/M 期接著又啟動細胞凋亡的路徑。在分子層次觀察到以 H6 處理人類子宮頸癌細胞，能誘導 p53 蛋白質表現的增加，使 S 及 G2/M 期的 cdks 與 cyclins 表現減少。同時 H6 也造成子宮頸癌細胞內之 Bcl-2 與 Bcl-XL 蛋白質表現降低及 Bax 蛋白質表現量增加，導致 cytochrome c 釋放到細胞質內，引發 caspase-9 與 caspase-3 的活化，進而促使細胞走向凋亡之路。歸納結果，H6 對人類子宮頸癌細胞增殖抑制效應，在細胞週期的進程中能多向性的調節多種控制 S 及 G2/M 期的標的蛋白質。再者，H6 能藉由調節 Bax、Bcl-2 與 Bcl-XL 蛋白質，誘導 cytochrome c 釋放引起 caspase-9 路徑的活化。H6 具有誘導人類子宮頸癌細胞進行凋亡之新化合物，頗具開發潛能，不僅值得提供作動物試驗之用，同時也可以當做先導化合物。至於更詳細的作用機制，則須更深入的研究探討。

六、參考文獻

1. 中華民國九十四年死因統計結果摘要 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/94年/94.htm>
2. Kevin A. Ault, Vaccines for the Prevention of Human Papillomavirus and Associated Gynecologic Diseases: A Review, *Obstetrical and gynecological survey*, 61(suppl 6) S26 – S31, 2006.
3. Witzig TE, Timm M, Stenson M, Svingen PA, Kaufmann SH. Induction of apoptosis in malignant B cells by phenylbutyrate or phenylacetate in combination with chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*, 6, 681-692, 2000.

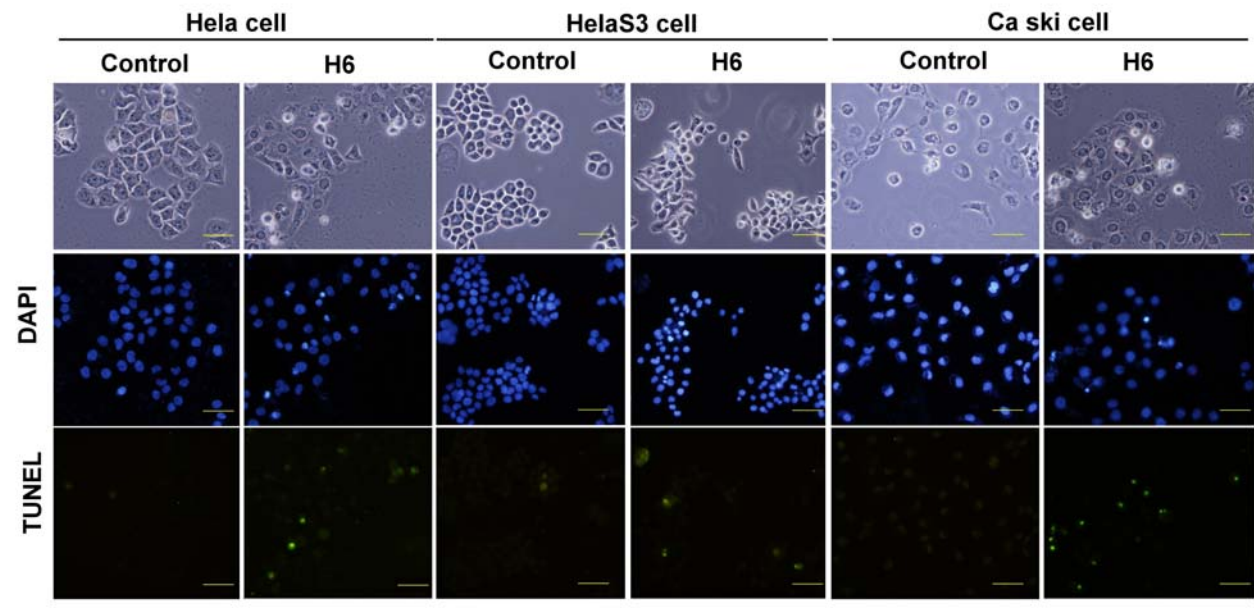
4. Samid D, Shack S, Sherman L. Phenylacetate: a novel nontoxic inducer of tumor cell differentiation. *Cancer Res*, 52, 1988-1992, 1992.
5. Ferrandina G, Filippini P, Ferlini C, Maggiano N, Stoler AB, Fruscella E, Mozzetti S, Mancuso S, Freedman RS, Scambia G, Ranelletti FO. Growth inhibitory effects and radiosensitization induced by fatty aromatic acids on human cervical cancer cells. *Oncol Res*, 12, 429-440, 2000.
6. Chan HC, Kuo SC, Liu SC, Liu CH, Hsu SL. 4-Fluoro-*N*-butylphenylacetamide: a synthetic phenylacetate derivative that upregulates Bcl-X(S), activates caspase cascade and induces apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells. *Cancer Lett*, 186, 211-221, 2002.
7. Chan HC, Kuo SC, Huang LJ, Liu CH, Hsu SL. A phenylacetate derivative, SCK6, inhibits cell proliferation via G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 467, 31-39, 2003.
8. Comerci JT, Runowicz CD. Altered expression of transforming growth factor- β_1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer*, 7, 1107-1114, 1996.
9. HER-2 基因與婦癌 吳華席 余堅忍 臨床醫學 第四十卷 第四期 民國八十六年十月
10. El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Herod J, Innes J, Prime W, Simon Herrington C. Overexpression of cyclins A and B as markers of neoplastic glandular lesions of the cervix. *Gynecol Oncol*, 92, 628-634, 2004.
11. Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. Evidence for keratino- cyte immortalization in high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix infected with high-risk human papillomaviruses. *Lab Invest*, 80, 539-544, 2000.
12. Kanai M, Shiozawa T, Xin L, Nikaido T, Fujii S. Immunohistochem- ical detection of sex steroid receptors, cyclins, and cyclin-dependent kinases in the normal and neoplastic squamous epithelia of the uterine cervix. *Cancer*, 82, 1709-1719, 1998.
13. Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2147-2152, 1999.
14. Sausville EA, Longo DL. Principles of cancer treatment. *Harrison's Principles of Internal medicine*. 2001
15. Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15209-15214, 1996.
16. Vousden KH. p53: death star. *Cell*, 103, 691-694, 2000.
17. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 22, 3551-3555, 1994.

18. Steller H. Artificial death switches: induction of apoptosis by chemically induced caspase multimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5421-5422, 1998.
19. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-1316, 1998.
20. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312, 1998.
21. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308, 1998.
22. Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S, Keen SL, Rowland K, Seiden IM, Thornberry NA, Nicholson DW. Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6132-6137, 2001.
23. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2239-2244, 1996.
24. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res*, 306, 347-361, 2001.
25. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391, 496-499, 1998.
26. T. Uehara, Y. Kikuchi and Y. Nomura, Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells, *J. Neurochem.*, 72, 196-205, 1999.
27. D.L. Vaux and S.J. Korsmeyer, Cell death in development, *Cell*, 96, 245-254, 1999.
28. H. Zou, W.J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang, Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell*, 90, 405-413, 1997.
29. P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri and X. Wang, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, 91, 479-489, 1997.
30. F. Li, A. Srinivasan, Y. Wang, R.C. Armstrong, K.J. Tomaselli and L.C. Fritz, Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release, *J. Biol. Chem.*, 272, 30299-30305, 1997.
31. Fei XF, Wang BX, Li YJ, Tashiro S, Minami M, Xing de J, Ikejima T. Evodiamine, a constituent of *Evodiae Fructus*, induces anti-proliferating effects in tumor cells. *Cancer Science*, 94, 92-98, 2003.
32. Tafani M, Cohn JA, Karpinich NO, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem*, 277, 49569-49576, 2002.

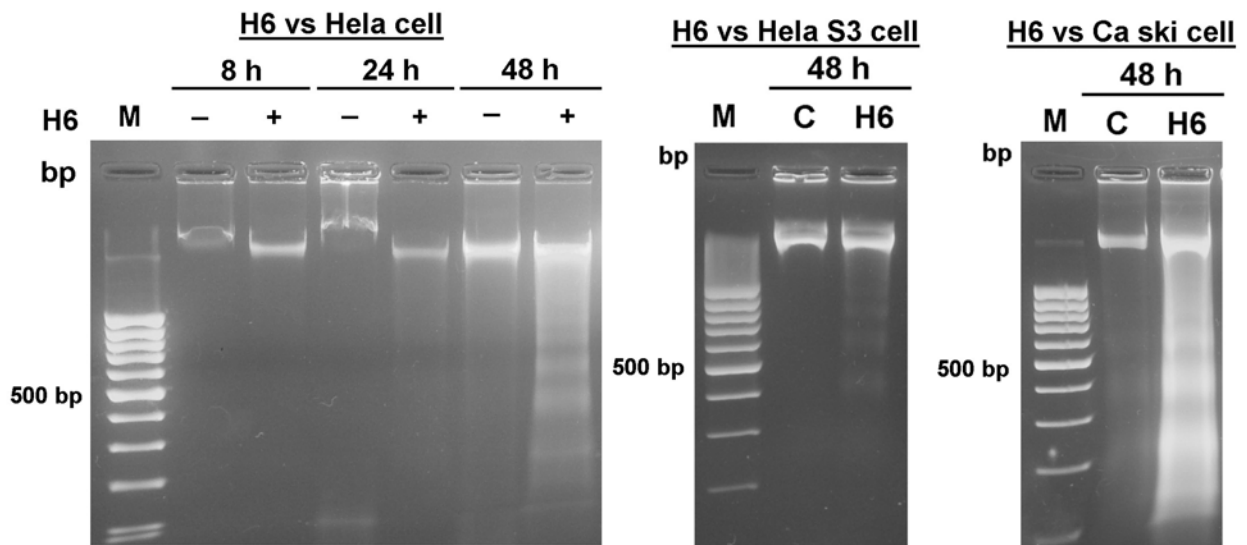


圖二、 4-Fluoro-N-butylphenylacetamides (H6)抑制人類子宮頸癌細胞 HeLa、HeLa S3 與 Ca ski cells 的增殖及生長。 HeLa、HeLa S3 與 Ca ski cells 分別以 DMSO、H6 處理 8~72 小時後，細胞以 trypan blue 染色，以血球計數器(hemocytometer)計算各孔內的細胞數，再以各處理的平均值與控制組比值作生長曲線並求出生長抑制率。

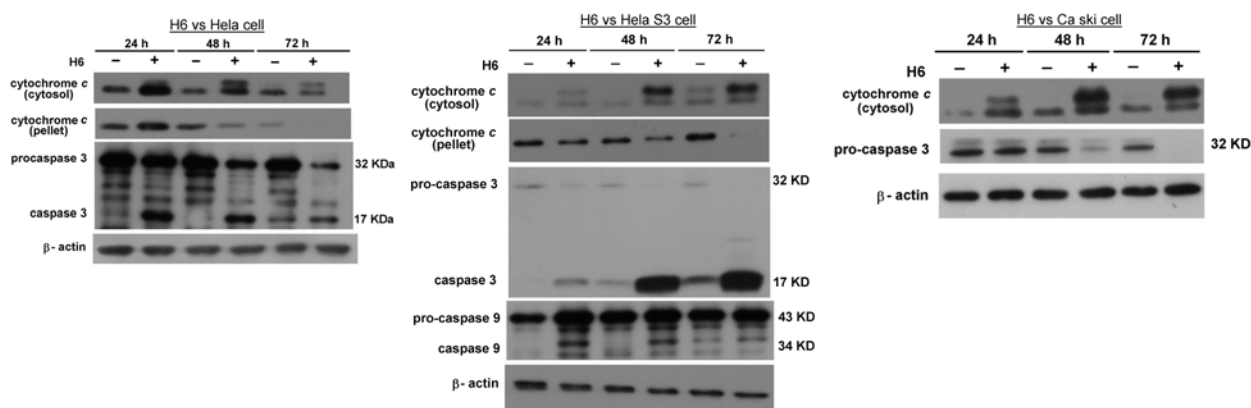
(A)



(B)



圖三、4-Fluoro-*N*-butylphenylacetamides (H6)誘導人類子宮頸癌細胞 HeLa、HeLa S3 與 Ca ski cells 的細胞凋亡。以 DMSO、1mM H6 分別處理人類子宮頸癌細胞 48 小時 (A)以螢光染色觀察細胞形態的變化;(B)以 2% agarose gel 分析經藥物處理後 DNA fragmentation 的情形。



圖四、H6 誘導細胞凋亡中會造成細胞質 cytochrome c 的累積與 caspase 9、caspase 3 的活化。以 DMSO、H6 處理子宮頸癌細胞，分別在 24, 48, 72 小時後收集細胞，抽取細胞總蛋白質或分段抽取細胞質蛋白質，分別以西方墨點法(Western blot)分析 cytochrome c、caspase 9、caspase 3 的蛋白質變化。

(A)

Cell cycle analysis for H6-treated HeLa cells			
Time (h)	Cell cycle	Treatment	
		[Distribution of cell cycle (%)]	
		Control	H6
0	G1	33.60 ± 2.12	
	S	42.28 ± 0.55	
	G ₂ /M	24.12 ± 2.66	
	Apoptosis	0.00 ± 0.00	
8	G1	41.82 ± 1.94	31.17 ± 1.82
	S	34.46 ± 3.12	46.86 ± 2.37
	G ₂ /M	23.72 ± 1.21	21.97 ± 1.88
	Apoptosis	0.00 ± 0.00	1.97 ± 1.30
24	G1	46.04 ± 1.78	42.62 ± 1.44
	S	40.54 ± 1.42	28.87 ± 0.56
	G ₂ /M	13.38 ± 0.48	28.51 ± 0.91
	Apoptosis	0.09 ± 0.00	23.57 ± 2.96
48	G1	44.61 ± 1.40	30.63 ± 0.28
	S	35.57 ± 1.89	22.68 ± 4.19
	G ₂ /M	19.82 ± 0.63	46.68 ± 3.91
	Apoptosis	0.21 ± 0.03	28.18 ± 7.44

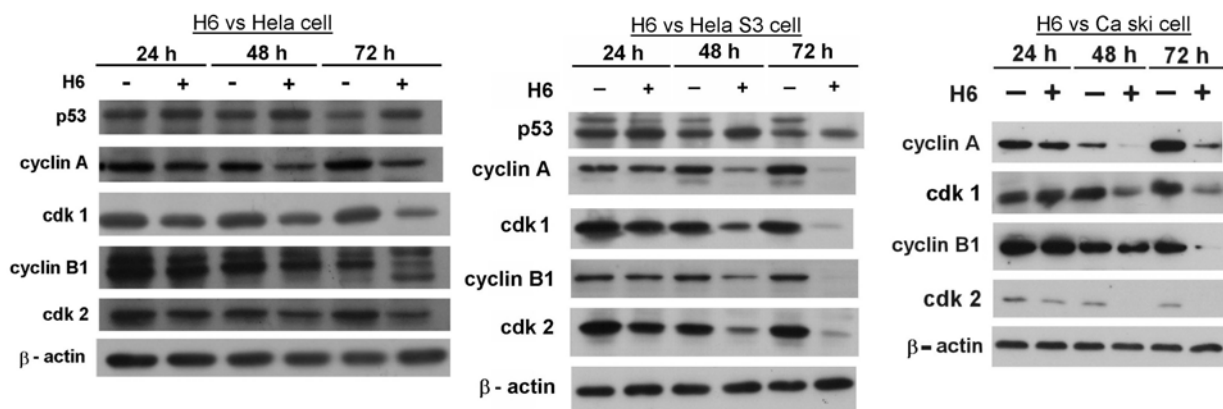
(B)

Cell cycle analysis for H6 -treated HeLa S3 cells			
Time (h)	Cell cycle	Treatment	
		[Distribution of cell cycle (%)]	
		Control	H6
0	G1	41.03 ± 0.62	
	S	42.96 ± 4.96	
	G ₂ /M	17.20 ± 0.18	
	Apoptosis	0.23 ± 0.02	
8	G1	48.57 ± 3.42	35.8 ± 4.6
	S	36.09 ± 4.72	33.2 ± 2.6
	G ₂ /M	15.34 ± 1.30	27.1 ± 2.9
	Apoptosis	0.11 ± 0.06	3.46 ± 0.75
24	G1	49.28 ± 4.34	35.1 ± 1.1
	S	35.54 ± 5.82	44.1 ± 3.00
	G ₂ /M	15.75 ± 0.48	22.8 ± 0.9
	Apoptosis	0.91 ± 0.09	28.36 ± 1.82
48	G1	47.61 ± 1.40	48.9 ± 4.90
	S	35.57 ± 1.89	44.6 ± 3.50
	G ₂ /M	17.82 ± 0.63	6.7 ± 2.3
	Apoptosis	0.21 ± 0.03	29.93 ± 2.13

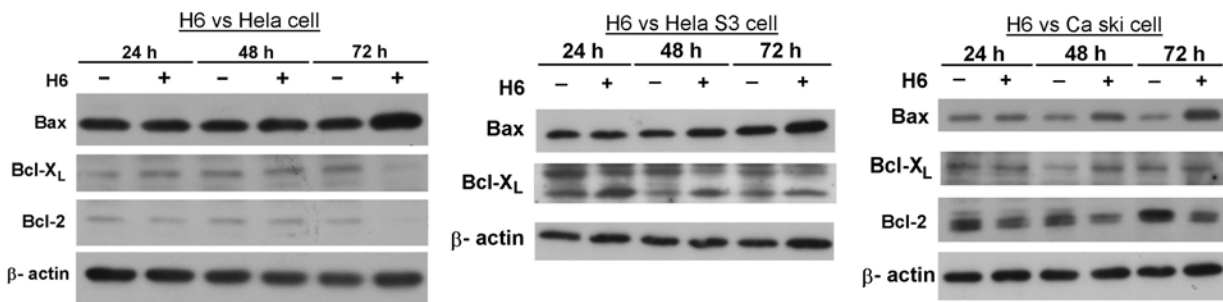
(C)

Cell cycle analysis for H6 -treated Ca ski cells			
Time (h)	Cell cycle	Treatment	
		[Distribution of cell cycle (%)]	
		Control	H6
0	G1	57.00 ± 1.64	
	S	25.99 ± 1.76	
	G ₂ /M	17.00 ± 0.72	
	Apoptosis	0.56 ± 0.02	
8	G1	60.19 ± 1.77	53.62 ± 1.32
	S	29.32 ± 1.38	27.74 ± 0.55
	G ₂ /M	10.49 ± 0.71	18.64 ± 0.95
	Apoptosis	0.37 ± 0.06	5.62 ± 0.24
24	G1	67.43 ± 0.80	52.70 ± 2.75
	S	22.39 ± 1.09	21.00 ± 3.42
	G ₂ /M	10.18 ± 1.84	26.46 ± 2.51
	Apoptosis	0.68 ± 0.09	6.01 ± 0.95
48	G1	72.53 ± 1.71	61.51 ± 1.38
	S	18.96 ± 0.58	19.93 ± 1.11
	G ₂ /M	8.51 ± 1.42	18.56 ± 1.45
	Apoptosis	2.34 ± 0.15	13.15 ± 2.34

圖五、4-Fluoro-*N*-butylphenylacetamides (H6)影響子宮頸癌細胞週期的分布。以 DMSO、H6 處理子宮頸癌細胞，分別在 8, 24, 48 小時後收集細胞，以 propidium iodide 染色接著以 FACScan 分析細胞週期變化。



圖六、H6 處理子宮頸癌細胞後細胞週期調節性蛋白質表現量的變化。以 DMSO、H6 處理子宮頸癌細胞，分別在 24, 48, 72 小時後收集細胞，抽取細胞總蛋白質，分別以西方墨點法 (Western blot) 分析細胞週期蛋白質包括細胞週期素(cyclin)與細胞週期激素(cdk)變化。



圖七、H6 處理子宮頸癌細胞後 Bcl-2 家族調節性蛋白質表現量的變化。以 DMSO、H6 處理子宮頸癌細胞，分別在 24, 48, 72 小時後收集細胞，抽取細胞總蛋白質，分別以西方墨點法 (Western blot) 分析細胞 Bcl-2 家族調節性蛋白質表現量的變化。

七、計畫成果自評

在本研究中以合成的苯乙酸衍生物H6處理三株子宮頸癌細胞Hela、HelaS3及Ca ski 細胞株，顯示含此類結構的藥物能有效抑制癌細胞的增殖與生長，並造成癌細胞的凋亡，就整體而言幾乎完成所提出的計畫實驗內容，現已開始著手論文撰寫，亦準備投稿於學術期刊。H6 能有效抑制癌細胞株生長，唯對於正常細胞的作用及老鼠試驗必須做進一步的評估。就研究方面而言，能提供一種抗癌機制評估及探討的模式，及抗癌新藥研究之參考資料。