

## 第二章 文獻探討

### 第一節 Activator protein 1 的定義及其在細胞轉形過程中扮演的角色

Activator protein 1 ( AP-1 ) 最早被定義為能結合至 SV40 early promoter 的轉錄調節因子。它不僅可調控 SV40 early promoter 的轉錄活性，也可以在細胞遇到 TPA 時，誘發下游基因的表現。同時，它也是掌控細胞增殖及分化之即發性早期蛋白，可參與多種基因轉錄調節的過程 ( Herschman *et al.*, 1991 )。

受 AP-1 所調控的基因，其啟動子上具有 AP-1 結合位。AP-1 所辨認的序列為 5'-TGAGTCA-3'，屬於迴文序列，由於這個位置也可以被 TPA 所活化，因此也稱為 TPA responsive element ( TRE ) ( Angel *et al.*, 1987 )。

AP-1 是由 Jun 和 Fos 蛋白質所組成的 dimer，其中 Jun family 包含 c-Jun、JunB 及 JunD，而 Fos family 則包含 c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2、FosB2 和 ATF2 ( Angel and Karin, 1991 )。這些組成 AP-1 的蛋白質皆為含有 “ leucine zipper ” 結構的 DNA 結合蛋白，此種蛋白質的 C 端具有 heptad repeat leucine，可協助蛋白質形成 dimer ( Landschulz *et al.*, 1988 ; Harbury *et al.*, 1993 )；N 端則具有  $\alpha$ -helix，可結合到 DNA 上 ( Vinson *et al.*, 1989 ; O'Neil *et al.*, 1990 ; Shuman *et al.*, 1990 )。AP-1 complex 的形式有 Jun-Jun 所形成的 homodimer，與 Jun-Fos 形成的 heterodimer。Fos 本身無法形成 homodimer，也沒有 DNA 結合能力 ( Angel and Karin, 1991 ) 以 heterodimer 形式存在的 AP-1 對 DNA 的親和能力較 homodimer 高約 30 倍 ( Halazonetis *et al.*, 1988 )。

在許多 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗中皆顯示 AP-1 是造成 tumor promotion 和 tumor progression 的重要因子 ( Bernstein and Colburn, 1989 ; Dong *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 1998 ; Domann *et al.*, 1994 ; Lamb *et al.*, 1997 )。因為許多造成腫瘤及使細胞轉形的基因，都可受到 AP-1 的調控 ( Dong *et al.*, 1997b )。例如，肝細胞在受到外界刺激 ( 例如：腫瘤促進劑、病毒、酒精等 ) 後，便會透過 AP-1 所誘發的訊息傳導路徑將訊息傳入細胞核內，繼而引起細胞轉形、癌變 ( 圖 2-1 )。

## 第二節 細胞週期概述及細胞週期與癌變的關係

正如大家所熟知的，細胞週期的最主要功能在於正確的複製染色體中的去氧核糖核酸 ( deoxyribonucleic acid, DNA )，並將它們平均分配到兩個同源的子細胞中。這樣的功能主要在細胞週期中的 S 期 ( synthetic phase，進行 DNA 合成 ) 及 M 期 ( mitotic phase，進行有絲分裂 ) 中執行 ( 圖 2-2 )。

然而，大多數的細胞需要更多的時間來進行 DNA 合成及有絲分裂以外的工作，像是細胞的生長、蛋白質及胞器的複製等，介於 M 期與 S 期之間的 G1 及 G2 期主要便是細胞執行這些工作的時候。同時，細胞也會利用這兩個時期來監測細胞內、外環境的變化，做為是否向前推進到 M 期或 S 期的參考 ( 圖 2-2 )。

在前人的辛勤研究之後，我們終於窺知細胞週期調控的奧秘。目前已知有數種 cyclin-dependent kinases、cyclin-dependent kinase inhibitors 及 checkpoints 的存在，透過這些調控因子，細胞得以偵測內在及外在環境的條件並決定是否繼續細胞週期的進行 ( 圖 2-2 )。例如 G1-S checkpoint 的功能即在確認細胞在進入 S 期前，DNA 是否已經修復；而 G2-M checkpoint 的功能則是在確認細胞在進入 M 期前，DNA 是否已平均分配。

細胞癌化的原因即在於細胞週期失去正常的調控，以致細胞不正常增生，多數的研究顯示這可能是因為 checkpoints 存在缺陷引起 ( Sheer *et al.*, 1996 )。例如 DNA 複製不完全或是受傷時，在正常的情況下會引發細胞的 G2-M arrest，以避免染色體發生突變 ( mutations )、易位 ( translocations ) 或喪失 ( loss )；但當此一功能受損，細胞便走向癌化，人類纖維母細胞的癌變便是一個很好的例子 ( Kaufmann *et al.*, 1995 )。另外，checkpoint 功能喪失的癌細胞的侵襲性較強，也較易產生抗藥性 ( Hartwell *et al.*, 1994 )。

## 第三節 肝癌治療現況

目前用於肝癌的治療方法有手術切除、肝臟移植、化學治療藥劑栓塞 ( chemoembolization )、酒精注射 ( alcohol ablation )、冷凍劑注射 ( cryoablation )、免疫療法、及基因治療等。

手術切除及肝臟移植雖然有不錯的療效，對於早期且未合併肝硬化的肝癌

患者其五年存活率可達 40% ( Bismuth *et al.*,1995 ), 但卻有嚴格的適應症限制及捐贈器官不易取得等缺點 ( Befeler *et al.*, 2002 )。

對於佔大多數的較晚發現、合併肝硬化，甚至發生肝外擴散的病人，經動脈化學藥物栓塞 ( transarterial chemoembolization, TACE ) 或化學治療 ( chemotherapy ) 則是重要的治療方式 ( Befeler *et al.*, 2002 )。

#### 第四節 柔紅黴素是肝癌化學治療的首選藥物之一

柔紅黴素 ( Daunorubicin )( 圖 2-3 ) 是一種源自 *Streptomyces peucetius* 的 Anthracycline 類的抗生素，它的使用至今已超過三十年了。在過去，它主要被用來治療乳癌、食道癌、各種惡性肉瘤以及淋巴瘤；近年來，應用在胃癌、胰臟癌、肝癌( 表 2-1 )及膽管癌的治療也有不錯的效果( Singal and Iliskovic, 1998; Gewirtz *et al.*, 1999; Singal *et al.*, 2000 )。

到目前為止，雖然柔紅黴素的抗癌機轉並未完全被研究清楚，不過已知在細胞分裂時扮演重要角色的 Topoisomerase II 應是主要的標的之一 ( Gewirtz *et al.*, 1999 )，因而影響 DNA 雙股的分離，並進一步抑制 DNA 合成；另外，它也涉及抑制解旋酶 ( helicase ) 的活性 ( Gewirtz *et al.*, 1999 )，因而造成細胞週期中的 G2-M 期比例增加 ( G2-M arrest )( 圖 2-4 )。

正如其它的化學治療藥物一樣，一些惱人而且尚待克服的副作用也伴隨柔紅黴素的使用而來。像是用藥期間的噁心、嘔吐、骨髓抑制 ( myelosuppression )、心律不整 ( Lefrak *et al.*, 1973; Singal *et al.*, 1987 )，及即使停藥數年後依然存在的慢性心肌病變及鬱血性心臟衰竭 ( Buja *et al.*, 1973; Singal and Iliskovic, 1998 ) 等。尤其是心臟毒性，根據目前的研究，已知其和柔紅黴素的另兩個重要抗癌機轉—氧化壓力 ( oxidative stress ) 及自由基 ( free radical ) 的產生有著密切的關係 ( Gewirtz *et al.*, 1999; Singal *et al.*, 2000 )。這猶如刀之兩面，加重使用劑量雖然可以加強抗癌的效果，但卻無可避免的會帶來許多副作用。往往使得臨床醫療人員陷入進退兩難的局面，無不亟思可以增加柔紅黴素抗癌效果又可減低其心臟毒性的兩全其美的辦法。

#### 第五節 黃酮類化合物普遍存在於日常的飲食之中而且具有抗癌的潛力

黃酮類 (flavonoids) 是一種天然的多酚化合物，它普遍存在於許多食物當中，例如蔬菜、水果、穀物及飲料，這類化合物因為具有強大的抗氧化能力而引起人們的關注 (Diplock *et al.*, 1998)。目前已知它們具有抗發炎、抗氧化、抗病毒、抗過敏及抗癌等療效 (Gabor *et al.*, 1979, 1986; Havsteen *et al.*, 1984; Cody *et al.*, 1988; Middleton and Kandaswami, 1993; Carroll *et al.*, 1998)。

黃酮類是以 flavan 為中心，由 15 個碳原子形成的三個環狀結構 (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)，分別以 A、B、C 來命名 (圖 2-5)。其由 C 環上 C<sub>4</sub> 位置完全飽和—pyran，及有羰基 (carbonyl) —pyrone 結構連接 A、B 兩個苯環為主結構。接著根據 C 環的 C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 上的飽和與否可分為 flavanoid 及 flavonoid，其中再藉由 hydroxyl group 的數目及其結合位置的不同、或有無 alkylation 和 glycosylation 做進一步區分。

由於黃酮類具有自由基清除者及鐵離子螯合劑等特性，它們被認為有潛力來抑制柔紅黴素所引起的心臟毒性。例如 Van Acker 等人 (1997) 曾發現一種半人工合成的黃酮類—7-monohydroxyethylrutoside 在小白鼠體內可以抑制柔紅黴素所引起的心臟毒性而且不會影響原有的抗癌效果。甚至有些黃酮類還可以透過抑制抗癌藥在細胞內的代謝 (Ichinose *et al.*, 1995) 或改變細胞膜對抗癌藥的輸送 (Sadzuka *et al.*, 1995)，使細胞內的抗癌藥物濃度上升，而增強抗癌藥的效果。

## 第六節 柔紅黴素和黃酮類化合物在肝細胞內的交互作用

根據本實驗室先前所做的研究，我們發現腫瘤促進劑—12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) 可以誘發肝細胞轉形及使肝細胞內 AP-1 的活性上升，而 AP-1 的活化也是肝細胞轉形所必需；另外，AP-1 抑制劑可以抑制由 TPA 所誘發的肝細胞轉形；及黃酮類可以調控 AP-1 的活性 (賴, 2000)。這似乎意味著有些黃酮類化合物可以藉由抑制 AP-1 的活性而產生抑制肝細胞轉形的效果。也引發了我們的興趣，想要進一步瞭解這些廣泛存在於日常飲食中的黃酮類是否會對正在接受化學治療的肝癌病人產生相輔相成的增效功效？

雖然自然界中的黃酮類化合物多達 4000 種以上 (Harborne *et al.*, 1988)，

我們以結構作為分類，收集了 flavonols、flavones、flavanols、flavanones 及 isoflavones 等五大類，共 24 種具代表性的黃酮類。Flavonols 包含 quercetin、rutin、hyperin、kaempferol、morin、galangin、silibin 及 3-hydroxyflavone。Flavones 包含 baicalein、baicalin、chrysin、luteolin、apigenin 及 flavone。Flavanones 包含 hesperetin、hesperidin、eriodictyol、naringenin 及 naringin。Flavanols 包含 catechin 及 epicatechin。Isoflavones 具有雌激素的活性，其 B 環的位置由 C2 置換到 C3 上，而不同於其他四種結構，其包含 genistein、puerarin 及 formononetin (表 2-2)。

為了對於國人常見的肝癌之形成有進一步的瞭解，本研究使用 Chang liver 及 HepG2 兩種不同的人類肝細胞株來代表不同的癌化程度，分別加入柔紅黴素及所選取的這 24 種黃酮類做測試，並利用流式細胞儀 (flow cytometer) 來分析其細胞週期，觀察柔紅黴素所誘發的 G2-M arrest 是否因加入的黃酮類藥物不同而有所改變？

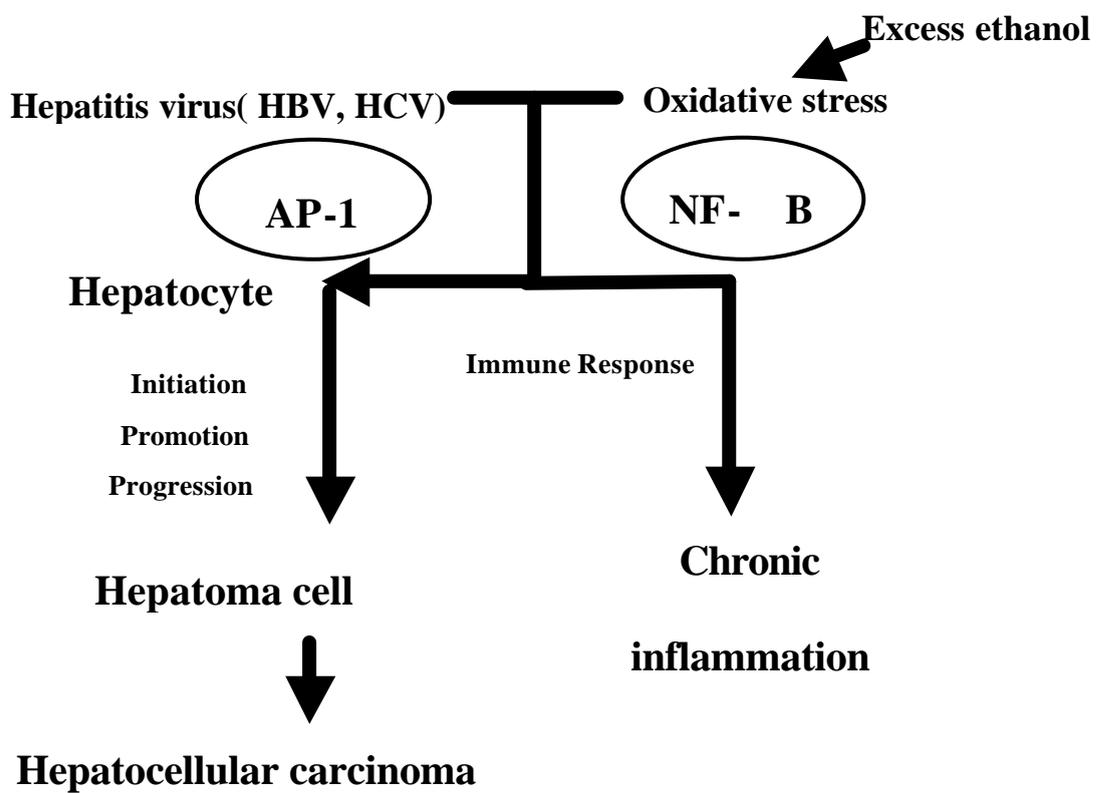


圖 2-1、 Activator protein 1 ( AP-1 ) 在肝臟細胞轉形的過程中扮演重要的角色。

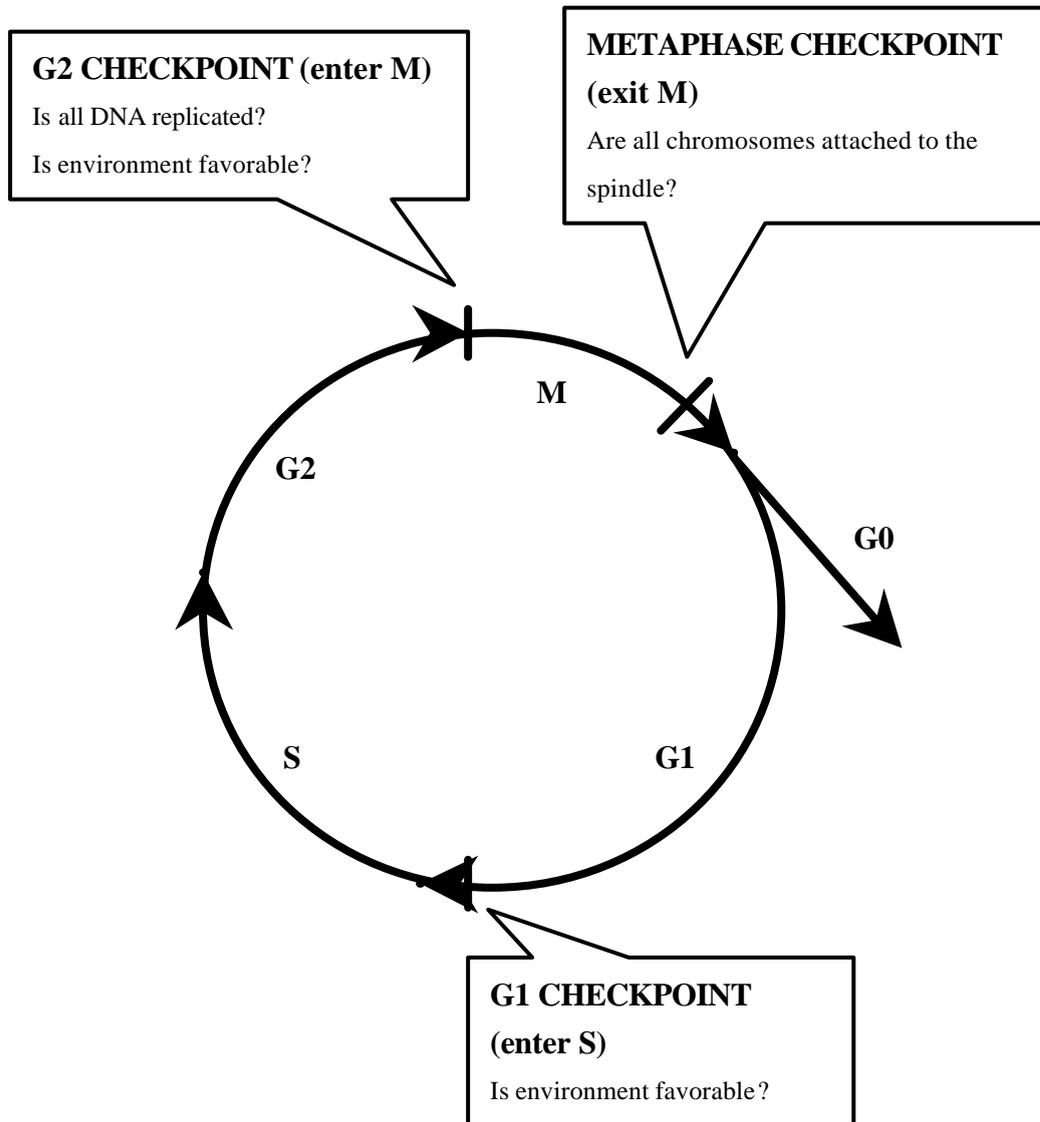


圖 2-2 細胞週期 (cell cycle) 示意圖 (摘自 Molecular Biology of the Cell, p.992, 4<sup>th</sup> ed. )。

細胞週期包含 G1, S, G2, M 四個時期：DNA 複製在 S phase 進行；M phase 則進行 mitosis ( nuclear division ) 及 cytokinesis ( cytoplasmic division )；S phase 及 M phase 間有 G1 phase 及 G2 phase，細胞可利用此時偵測外在環境及內在條件，並透過 checkpoints、cyclin-dependent kinases 及 cyclin-dependent kinase inhibitors 來調控細胞週期的進行。

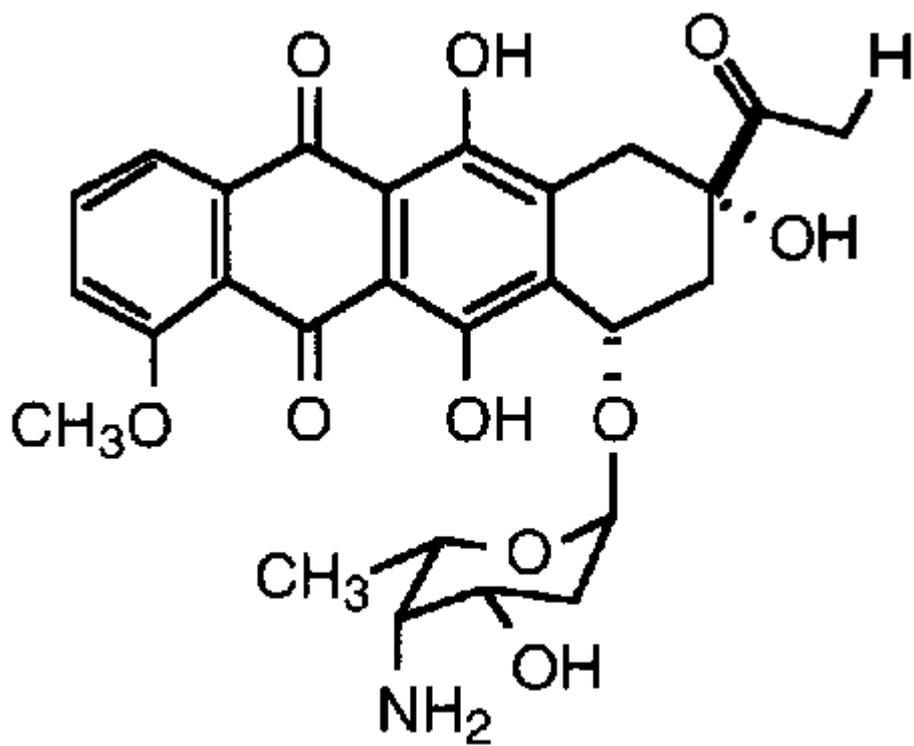


圖 2-3、柔紅黴素 (daunorubicin) 的化學結構。

---

5-fluorouracil
Daunorubicin
Epirubicin
Etoposide
Cisplatin
Mitoxantrone
Interferon
Tamoxifen
Capecitabine
Thalidomide
Octreotide

---

表 2-1、肝癌常用的化學治療藥物（改編自 Befeler *et al.*, 2002）。

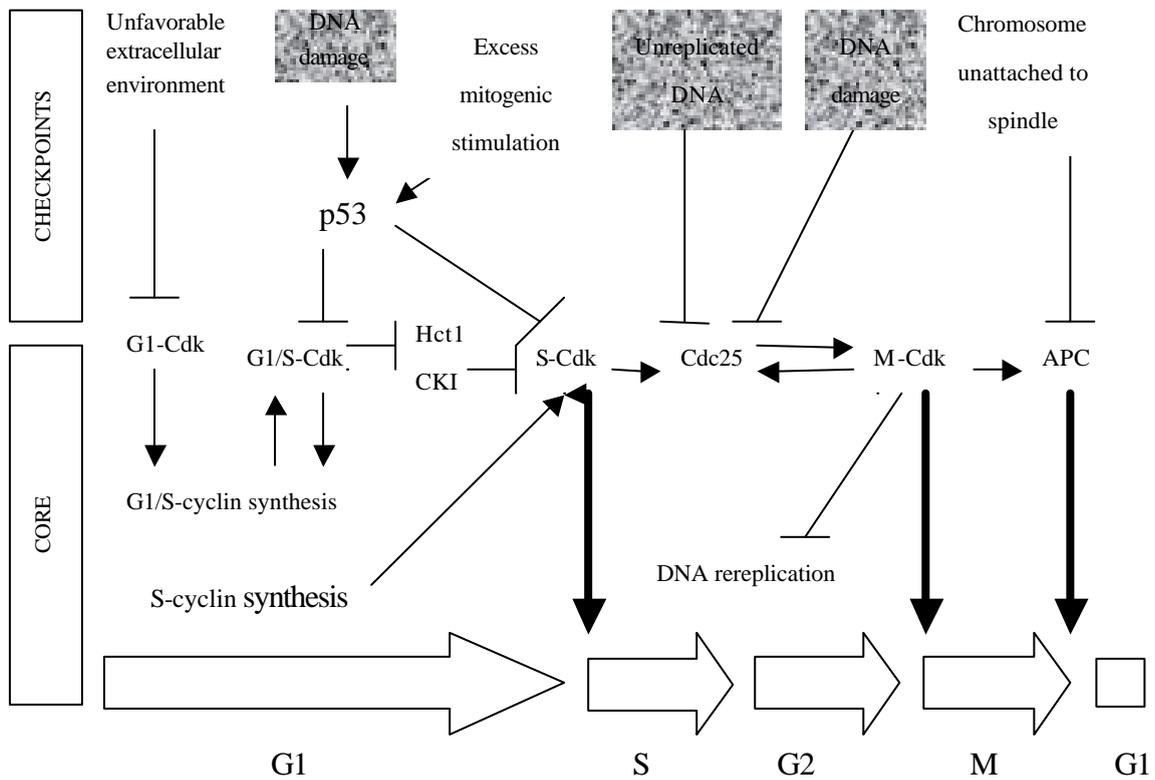


圖 2-4、柔紅黴素影響細胞週期的分子機制 (改編自 *Molecular Biology of the Cell*, p.1009, 4<sup>th</sup> ed.)。

目前已知柔紅黴素可透過對 DNA 合成的抑制作用導致腫瘤細胞無法順利進行 mitosis (M phase)，而造成 G2-M 期所佔的比例上昇 (G2-M arrest)。陰影處為柔紅黴素的作用位置，粗箭號則標示各期之間的 checkpoints。Cdk: cyclin-dependent kinase, Hct1: maintains APC activity after anaphase and throughout G1; inhibited by Cdk activity, CKI: Cdk inhibitor protein, Cdc: cell-division cycle, APC: anaphase-promoting complex.

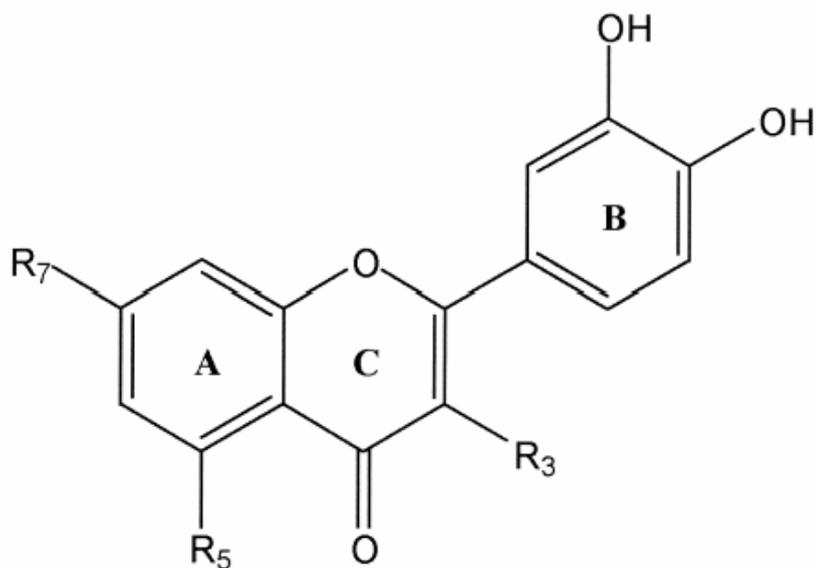


圖 2-5、黃酮類化合物的基本結構。

黃酮類是以 flavan 為中心，由 15 個碳原子形成的三個環狀結構 (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)，分別以 A、B、C 來命名。其由 C 環上 C<sub>4</sub> 位置完全飽和—pyran，及有羰基 (carbonyl)—pyrone 結構連接 A、B 兩個苯環為主結構。接著根據 C 環的 C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 上的飽和與否可分為 flavanoid 及 flavonoid，其中再藉由 hydroxyl group 的數目及其結合位置的不同、或有無 alkylation 和 glycosylation 做進一步區分。

表 2-2、本研究所使用的 24 種黃酮類及其取代基的種類。

Flavonoids	Substituents Position								藥物 編號
	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	
<b>Flavonols</b>									
Quercetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	1
Rutin	OSugar	OH	H	OH	H	H	OH	OH	2
Hyperin	OSugar	OH	H	OH	H	H	OH	OH	3
Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	4
Morin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	5
Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H	6
Silibinin	OH	OH	H	OH	H	H	H	Benzo dioxin	7
3-Hydroxyflavone	OH	H	H	H	H	H	H	H	8
<b>Flavones</b>									
Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	9
Baicalin	H	OH	OH	OSugar	H	H	H	H	10
Chrysin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	11
Luteolin	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	12
Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	13
Flavone	H	H	H	H	H	H	H	H	14
<b>Flavanones</b>									
Hesperetin	H	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	15
Hesperidin (Neohesperidin)	H	OH	H	OSugar	H	H	OH	OMe	16
Eriocitrin	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	17
Naringenin	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	18
Naringin	H	OH	H	OSugar	H	H	H	OH	19
<b>Flavanols</b>									
(+)-Catechin	-OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	20
(-)-Epicatechin	-OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	21
<b>Isoflavones</b>									
Gentisin	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	22
Puerarin	H	H	H	OH	Sugar	H	H	OH	23
Formononetin	H	H	H	OH	H	H	H	OMe	24