

第一章 緒論

癌症是世界各國主要的死亡原因之一，在台灣居十大死因之首，其中尤以肺癌不論在男女性癌症發生及致命率皆名列前茅，且死亡率持續攀升中¹。臨床上，治療肺癌的方法有外科手術切除、放射線療法、化學療法、免疫療法、高溫療法、光動力療法、中藥治療。而目前常使用的幾種治療方法預後均不佳，五年存活率約僅 10%。肺癌的治療原則上仍是以外科治療為主，不能開刀的病人，則以放射線及化學療法為輔²。化學治療建議的處方是使用複方化學治療(例如：cisplatin 及 VP-16)，最近亦有 taxol 及 gemcitabine 的相繼推出，反應效果似乎比傳統化療來得高^{2,3}。因此，開發新的化學治療藥物以抑制肺癌細胞的生長，是肺癌治療的主要課題。本論文將針對已知的臨床藥物—苯乙酸 (phenylacetic acid)與合成的苯乙酸衍生物進行篩選，並探討與比較兩化合物間作用機制的異同。



第一節 苯乙酸 (Phenylacetic acid)研究概況

苯乙酸是一芳香族脂肪酸(aromatic fatty acid)，存於人體血漿，是苯丙胺酸 (phenylalanine) 的代謝產物，苯乙酸在肝臟酵素 phenylacetyl Coenzyme A:glutamine acyltransferase 催化下與麩胺酸醯胺 (glutamine)結合形成苯乙酸麩胺酸醯胺 (phenylacetylglutamine ; PAG)⁴ 後隨著尿液排出體外⁵。1984、1986 年分別有學者利用苯乙酸代謝導致氮排泄(nitrogen excretion)消耗，來治療先天性尿素合成異常或肝衰竭造成的高氨血症(hyperammonemia)⁶⁻⁸。臨床上以苯乙酸長期且高劑量(250-550 mg/kg/day, 血漿濃度 3-6 mmol/L)投予罹患此類高氨血症的嬰幼兒和成年人，發現病人無任何不良反應並能有效降低血漿中麩胺酸醯胺的濃度，以同等劑量給予正常人亦無任何毒性反應且不會造成代謝上的障礙⁷。苯乙酸除了能促進麩胺酸醯胺排空外，亦於 1992 年被證實是一種毒性非常低微的抗腫瘤劑，無論在細胞或動物的實驗模式與人體內有相當顯著的活性⁹。於臨床使用前研究上發現苯乙酸與其衍生物具廣效性藥物活性，能誘導一些造血性(hematopoietic)癌細胞及硬塊 (solid) 腫瘤的細胞生長停滯與分化⁹⁻¹⁶，苯乙酸能促進人類白血病細胞(human leukemic cells)分化成熟^{9,11}，並促進一些惡性腫瘤不再惡化，包括對荷爾蒙有抗性的惡性前列腺癌(hormone-refractory prostatic carcinoma)¹¹，神經膠母細胞瘤(glioblastoma)^{13, 15}，神經母細胞瘤(neuroblastoma)¹⁶，橫紋肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)^{12,17}與惡性黑色素瘤(malignant melanoma)¹⁴。其亦能明顯影響與腫瘤細胞生長、侵入、血管新生(angiogenesis)與免疫產生(immunogenicity)相關的基因表現。苯乙酸能明顯抑制大白鼠之顱內神經膠質瘤(intracranial gliomas)，且

對宿主無任何毒性產生^{13, 15}。更重要的是，要達到這樣的效應需要將細胞暴露於苯乙酸濃度超過 275 $\mu\text{g/ml}$ 的高濃度下至少兩個星期。數年前 phenylacetic acid (PA) 在美國正式被 FDA 核准進入臨床試驗，用於治療腦瘤¹⁸，雖然其毒性非常低微，使用劑量高達每天每人 30 gm，只有輕微的頭昏症狀外並無其他不良的副作用，可惜抗腦瘤效果不太明顯而未進入三期臨床試驗。

關於苯乙酸及其衍生物抑制腫瘤細胞生長及造成腫瘤細胞分化成不再分裂的細胞，是透過多種不同的機制造成基因表現與細胞生物學上的改變。

(一) 改變基因的轉錄作用 (gene transcription)

透過抑制組蛋白的去乙酰化作用 (histone deacetylation) 與 DNA 甲基化作用 (DNA methylation)，即使細胞 DNA 低甲基化 (hypomethylation)，如此造成 DNA 與轉錄因子的結合作用增加，改變了基因的表現。

在抑制腫瘤細胞生長的濃度下，此芳香族脂肪酸能改變 DNA 甲基化的模式，即以一外來的機制控制了數個真核基因的轉錄。在植物與哺乳類細胞株，苯乙酸與其前驅物—苯丁酸鹽兩者能抑制 DNA 甲基化^{19, 20}，造成 DNA 低甲基化，而無法誘導需甲基化基因的正常表現。另外，苯乙酸為一化學預防劑 (chemoprevention)，在小白鼠體內體外試驗中，能預防由 chemotherapeutic hypomethylating drug 5-aza-2'-deoxycytidine (5AzadC) 所誘發的致癌性 (carcinogenesis)²⁰，使其不會轉型 (transformation) 為癌化的腫瘤。

(二) 抑制蛋白質的 prenylation

蛋白質的 prenylation 是一種轉譯後的修飾作用，此修飾步驟在訊息傳導

(signal transduction)和有絲分裂形成(mitogenesis)是重要的。神經膠母細胞瘤是神經膠質細胞快速且不受控制的增生，這些增生性的神經膠質細胞在細胞分子與細胞生物上類似於胎兒敏感性的神經膠質組織，包括(1)透過膽固醇合成的 3,5-二羥基-3-甲基戊酸 (mevalonate, MVA)代謝路徑，造成蛋白質轉譯後的修飾，3,5-二羥基-3-甲基戊酸是異戊二烯類(isoprenoids)的前驅物，而異戊二烯類上的 prenyl 基團能修飾細胞週期關鍵性的蛋白質，包括細胞漿膜 G 和 G-like 蛋白質(例如：ras)，這些蛋白質與有絲分裂訊息傳導和有絲分裂時期核膜上的 lamins 相關，因此蛋白質的 prenylation 與細胞靜止與否是有關的²¹，(2)體循環中的麩胺酸醯胺為 DNA、RNA 和蛋白質合成中氮的提供者；苯乙酸能與血清中的麩胺酸醯胺接合，抑制 MVA 代謝路徑和蛋白質的 prenylation (isoprenylation)，控制了神經膠母細胞瘤的惡化¹³。同樣的，以苯乙酸處理人類胰臟癌，苯乙酸亦是透過抑制異戊二烯類的生合成，抑制胰臟癌細胞的生長²²。

(三)活化 Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)

PPARs 為 nuclear steroid receptor superfamily 的一員，此接受器(receptor)的活化會影響細胞的分化以及細胞脂質代謝的調節²³，能活化 PPARs 的分子甚多，包括前列腺素(prostaglandins)、thiazolidinediones (TZD)、二十碳飽和脂肪酸類(eicosanoids)、非固醇類的抗發炎藥物(NSAIDs)、糖皮質激素(glucocorticoids)、多不飽和脂肪酸(PUFAs)與芳香族脂肪酸等。在臨床上以上述分子作為治療高脂血症、心肌梗塞、高血壓、肥胖、糖尿病、發炎、自體免疫、皮膚傷害與癌症的藥物；近年來對芳香族脂肪酸作用機制的研究，發現苯乙酸具抗腫瘤活性及活化 PPARs 的能力²⁴，研究者指出在一些

能表現高濃度 PPARs 的乳癌細胞與神經膠質細胞，苯乙酸透過與 PPARs 結合，造成 PPARs 的轉錄功能活化，此路徑一經啟動則造成乳癌細胞與神經膠質細胞的生長停滯；雖然一些典型的 nuclear receptor 磷酸化後其轉錄的活性會增加，但 MAP kinase 造成 PPAR γ 磷酸化卻會導致 PPAR γ 的活性降低。在 PA-resistant MCF7 乳癌細胞，其 PPAR γ 的表現量很低，將此株細胞暴露於 PA 或 PA 與 MAP kinase 抑制劑(PD98059)同時處理下，皆會使癌細胞增殖的情形降低²⁵。因此研究者認為對 PA 耐受性的癌細胞，恢復對 PA 的敏感性，不是透過造成 PPAR γ 的大量表現，就是經由抑制 MAP kinase 干擾了 PPAR γ 的磷酸化作用，進而增強了藥物的作用。

最近的研究者提出經苯乙酸處理癌細胞後，會造成細胞週期的停止，如苯乙酸處理乳癌細胞 MCF-7，分析這些癌細胞前 9 小時的變化，發現 p21^{CIP/WAF1} 的表現量增加，p21^{CIP/WAF1} 是一個細胞週期 cyclin-dependent kinase inhibitor，此蛋白質的表現會使細胞停在 G1 時期^{24, 25}；如以苯乙酸處理攝護腺癌細胞 LNCaP、AI-LNCaP 與 PC-3，其造成細胞週期的停止是起因於另一種細胞週期抑制劑 cyclin- dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} 表現量的增加²⁶，因此，苯乙酸對不同的癌細胞其作用機轉亦有所差異。

第二節 肺癌研究概況

依據行政院衛生署統計資料顯示，多年來惡性腫瘤都被列為台灣十大死亡原因之首，2000年台灣共有31,554個病人死於癌症，佔所有死因之25.35%。而且全民健保之癌症治療費用高達184.5億元，其中主要癌症死因人數最多的就是肺癌，總共2,374案例。可見國內肺癌發生率偏高而且尚無良好治療方法。

為了發展出更新、更合理、更有效的治療方法，我們必須對肺癌的生物特性更廣泛且深入的瞭解。這些生物特性包括癌細胞的生長特性、生長因子，細胞遺傳學之異常、生化標記、抗原，以及對抗癌藥物的敏感性等等。由於近年來有關細胞培養，生物學以及分子生物學技術的突飛猛進，以肺癌為對象所獲致的成果亦有可觀。茲就肺癌的分類、腫瘤標記及治療略述之。

(一) 肺癌的分類

肺癌不論在種族、性別、區域上的癌症發生率及致命率皆名列前茅，1999年世界衛生組織(WHO)根據肺癌在組織病理學上之差異，將肺癌(惡性肺上皮腫瘤)分成九類，各類肺腫瘤特徵如表一²⁷⁻²⁹。這些肺腫瘤大部分又被廣泛的區分非為兩大類，其一為小細胞肺癌(small cell lung carcinoma; SCLC)，而另一為非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma; NSCLC)。非小細胞肺癌包括鱗狀上皮細胞肺癌(squamous cell carcinoma; SQCC)、腺細胞肺癌(adenocarcinoma; ADC)與大細胞肺癌(large cell carcinoma; LCC)等。如此簡單的分類有助於生物學上的研究及臨床治療原則的區分。

(二) 肺癌的診斷 -- 與臨床相關的腫瘤分子標誌

如同人類其他癌症，肺癌的表徵是一廣泛複雜的染色體與基因遺傳脫序，即基因表現的變化與生物化學上的改變^{30, 31}，這包括了腫瘤抑制基因功能喪失或是致癌基因明顯的活化，但是只有少數的不正常染色體上的基因被證明與肺癌發病是相關的。這些功能性基因被放大或刪除並不是透過基因本身數量的改變，而是在轉錄mRNA或轉譯蛋白質上的增加或降低，比如是基因的啟動或促進DNA序列甲基化的改變所造成的結果³²。某些基因的活化可歸因於關鍵功能區的點突變，而這些基因的功能可能是一個或數個機制路徑重要的調控基因，這些機制包括與細胞的生長、週期、存活、程序性死亡、侵入、移動和分化相關的路徑。自從利用將致癌基因轉型造成基因蓄積性的變化，加深了解這些基因在肺癌病人惡化過程中所扮演的角色。現依肺癌診斷、預後與偵測，分別介紹這些標誌分子。

(一) 診斷標誌(Diagnostic markers)

將肺癌分為SCLC與NSCLC便於病理組織學上的診斷，但偶發性的腫瘤難以區分，必須依賴輔助性的實驗作鑑別性診斷，免疫組織化學(immunohistochemistry；IHC)是現今常用的特殊性檢查，常用的標誌分子(markers)有neuroendocrine³³、cytokeratins³⁴、thyroid transcription factor - 1 (TTF-1)³⁵ 和mesothelial cell markers。

(二) 預後標誌(Prognostic markers)

預後因子是測定與評估腫瘤病人出院後存活率。通常一般的腫瘤分期在NSCLC是一個重要且決定性的存活指標，然而其他臨床上的和實驗室的

可變異性報告則顯示預後的重要性。因此一些關鍵性的調控基因在細胞的功能以及其生物分子上的變化，都是分析預後的關鍵性因子。這些包括ras oncogene³⁶、HER/c-erbB(epidermal growth factor receptor family)與其配位子³⁷、肝細胞生長因子與其接受器Met/HGFR³⁸、retinoblastoma (Rb)與p16^{INK4A}³⁹、cyclin E與p27^{kip1}⁴⁰、p53^{41,42}、Bcl-2家族基因⁴³和其他基因例如：FHIT (fragile histidine traid)基因⁴⁴，血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor； VEGF)⁴⁵，環氧化? (cyclooxygenase； COX-2)⁴⁶，MMPs (matrix metalloproteinase)和TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases)⁴⁷，而這些預後標誌基因可作為新開發藥物的標的基因。

(三) 預言性的標誌(Predictive markers)

預言性的標誌或稱為偵測標誌，可當作臨床治療上應採取化學療法或放射療法的指標，因此偵測因子可用來評估臨床處理腫瘤的效力。在肺癌治療研究上，一些分子偵測性因子被研究且它們大部分都與化學療法的藥物反應相關，這些偵測分子包括Ras⁴⁸，p53⁴⁹，HER-2/c-erbB2/neu⁵⁰等；另外偵測 β -微管蛋白(beta-tubulin) 基因是否突變，也是一選用治療藥物的指標，1999年Monzo等研究者發現⁵¹，在49例的NSCLC病人中有16例病人他們的 β -微管蛋白在exon 1或4上發生突變，這些基因突變者投予paclitaxel無任何反應，但將paclitaxel給予正常 β -微管蛋白基因的NSCLC病人，則有明顯的療效，在taxane和docetaxel的處理上，也有相似的結果，近兩年來陸續有研究報告提出，肺癌病人 β -微管蛋白基因突變與藥物治療相關的研究，是值得注意的^{52, 53}。

除了上述幾項與肺癌相關的分子外，還有一種對肺臟發育和成熟非常

重要的分子，即維生素A與其類似物稱為類視色素(retinoids)，這類化合物對肺癌具有強效的化學預防作用⁵⁴，因此將它們歸類化學預防劑，此類化合物的作用是透過維生素A酸的接受器，即RARs和RXRs，維生素A酸接受器有許多異構型，其中RAR β 是位於染色體的3p24.2，研究者發現肺癌病人的RAR β 基因被刪除⁵⁵，此外亦證實有些SCLC與NSCLC病人的RAR β 基因不活化或不表現其原因之一是RAR β 基因的啟動區(promotor)發生超甲基化作用(hyper-methylation)，若此病人又常暴露在抽菸的環境下，其支氣管發育異常的程度會增加⁵⁶。最近一份以安慰劑控制(placebo-controlled)的研究報告指出，以13-cis-retinoic acid給予一位抽菸的人6個月，分析其RAR β 的表現，給藥前其RAR β 的表現是被壓制住的，給藥後RAR β 的表現量上升，提供了另一種臨床試驗的生物標記⁵⁷。

在肺癌病人的血漿或血清中含有循環的細胞角蛋白(cytokeratins)片段⁵⁸，這些細胞角蛋白包括組織多肽抗原(tissue polypeptide antigen；TPA)，組織多肽專一性抗原(tissue polypeptide-specific antigen；TPS)和細胞角蛋白-19-片段(cytokeratin-19-fragments；Cyfra-21-1)，可利用ELISA分析法檢測之。最近有研究者提出一種檢測技術，即分析卵巢癌患者血清蛋白質體形態(proteomic patterns)，以此發展蛋白質體學的檢測技術運用在各種不同的癌症上，可達到早期偵測早期治療的目的。

(三)肺癌的治療藥物

如上節所述，肺癌發生率即致命率甚高，期治療藥物是以細胞毒藥物為主，目前臨床上常用的藥物有cisplatin, mitomycin, vinblastine, 5-fluorouracil等，這些藥物雖然都能明顯的抑制癌細胞的生長，但是這些細

胞致毒藥不僅對癌細胞有毒殺作用，正常細胞也會受到傷害而造成嚴重的副作用，有些病人無法忍受這些副作用而放棄治療。另外這些藥物都很容易產生耐藥性，或使癌細胞失去抑癌基因的表達，而改變成非常惡劣的復發症狀。

最近雖然有些非細胞毒藥物，其副作用較小，例如(1)生長因子的抑制劑，例如上皮生長因子接受器抑制劑(epidermal growth factor receptor inhibitors ; EGFR inhibitors)與 EGFR 單株抗體(monoclonal antibodies)，在大部分常見的上皮腫瘤 EGFR 是過度表現的，因此接受器-訊息傳導系統的破壞是一治療癌症的方針⁵⁹。可運用單株抗體阻斷細胞的接受器或利用小分子的抑制劑，如：Iressa (ZD1839)，使細胞接受器的酪胺酸激酶(tyrosine kinase)去活化，臨床前試驗數據證實 Iressa 能導致癌細胞細胞週期的停滯、癌細胞的凋亡，而使腫瘤生長受控制⁶⁰。Tarceva (OSI-774)也是一種對 EGFR 酪胺酸激酶專一性小分子抑制劑⁶¹，而 CI-1033 是另一類針對 erbB 接受器強效且不可逆的小分子抑制劑⁶²。C225 是一單株抗體能與 EGFR 高親合性結合，引起接受器的 internalization，減低下游的細胞增殖訊息⁶³，另一類單株抗體為 Trastuzumab 與 ABX-EGF，則分別直接拮抗 HER2/neu (erbB-2) 與 EGFR^{64, 65}，這些製劑可單獨使用或與化療藥物並用，作為 NSCLC 的第一或第二線治療。(2)抗血管新生製劑(anti-angiogenic agents)，腫瘤血管新生有利於腫瘤細胞的增殖、爬行移動、轉移⁶⁶，一些研究報告指出腫瘤微血管密度與非小細胞肺癌的轉移與生存有密不可分的關係，在脈管新生過程中最主要的調控者是血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor ; VEGF)⁶⁷，因此只要破壞 VEGF 與其接受器結合，就能抑制腫瘤生長、轉移，已被研發出的藥物有 SU5416、SU6668、SU11248、ZD4190 和

CGP41251，它們是屬於 VEGF 接受器抑制劑⁶⁸，另一類為抗 VEGFR 單株抗體 - recombinant humanized Mab VEGF (rhUMAb VEGF)，此類的作用主要是阻斷 VEGF 配位子與 VEGF 接受器的結合，可單獨使用或與其他化學療法藥物並用，效果不錯且相對的減低副作用。(3)其他較有可為的治療藥物為基因療法^{69, 70}、MMPIs(matrix metalloproteinases inhibitors)及與細胞素(cytokines)、生長因子反應相關的酵素 COX-2 的抑制劑⁷¹。但是到目前為止，這些以細胞分子為標靶的化合物，仍然沒有通過臨床三期試驗(clinical phase III trials)，正式獲准市售。

第三節 細胞週期與調控

生物體在胚胎發育與成長的過程中，細胞由幹細胞成長經歷了細胞增生(proliferation)、分化(differentiation)與死亡(death)的三大階段，造成組織與器官細胞的消長。細胞增生是指細胞經細胞週期(cell cycle)由一分裂為二；細胞分化是指細胞增生終止不再分裂，且進一步特化成具有專一性生理功能的細胞，即細胞進入生長休止期(resting phase)，如產生抗體之 B 淋巴球、眼球內之感光細胞等；當細胞老化後，漸漸邁向死亡，而死亡的方式可分為凋亡(apoptosis)與壞死(necrosis)⁷²。因此體內之細胞一樣會經歷生、老、病、死。但細胞在生命週期中若發展出不朽的方式，這些不朽的細胞即成為腫瘤細胞，它逃過分化與死亡，恣意增生變成生物體生存的負擔，最後造成個體的死亡。癌細胞不同於正常細胞生長分裂的調控，因此要達到抗癌的目的必須了解正常細胞與癌細胞細胞週期與調控上的差異，許多抗癌藥物的作用是藉由促使 DNA 損壞，誘導細胞凋亡進而達到殺死癌細胞的目的⁷²⁻⁷⁴。但 DNA 受損後到細胞發生凋亡，這中間的過程是透過何種機轉路徑傳遞死亡訊息，至今並沒有定論。在臨床上使用化療藥物是針對癌細胞的細胞週期較一般正常細胞短，分裂較多的特性，找出抑制細胞週期進行的藥物，如此可破壞癌細胞的週期，對正常細胞有傷害也可減至最低⁷⁵。茲就正常細胞與癌細胞之細胞週期與調控作以下簡介。

(一) 細胞週期(Cell Cycle)

細胞藉著複製自己的組成份，由一個增殖為兩個的過程稱為細胞分裂，兩次細胞分裂過程所需的時間即為細胞週期。細胞週期一般分為下列幾個時期⁷⁶：

G1 時期：為 RNA 和蛋白質合成的時期。G1 時期是控制細胞分裂的關鍵時期。重要的檢查點(checkpoint)在 G1 末期，剛好是細胞要進入 S 期之前。此檢查點用來決定細胞週期的繼續或停止。

S 時期：當細胞在 G1 時期準備就緒並通過檢查點後，細胞週期會進入 S 時期。此期為 DNA 合成的時期，而其中 G1 及 G2 時期各含有檢查哨，以檢查進入 S 時期或 M 時期之前細胞是否一切準備齊全，才可以進行 DNA 的合成或是細胞分裂。

G2 時期：為 RNA 和蛋白質合成的時期，G2 時期也有一檢查點，細胞必須準備好且通過檢查點才能進入有絲分裂期，因此這個時期是 M 時期的準備期。

M 時期：為有絲分裂期，分為四期包括前期(prophase)、中期(metaphase)、後期(anaphase)和末期(telophase)等四個時期⁷⁷，分別敘述如下：

prophase：核膜及核仁消失，染色質逐漸纏繞濃縮，每條染色分體(chromatids)以中節(centromere)相連。紡錘體開始形成，紡錘體從中心體(centrosome)伸出微管相連而成，按著兩中心體逐漸相互分離。

metaphase：此時中心體已位於細胞的兩極，染色體排列於赤道平面(equatorial plane)。

anaphase：成對的染色體朝相反方向移動至細胞兩側。

telophase：染色體逐漸解開縮合構形，呈現非緊密的纏繞，核膜重新聚

集，形成兩個細胞核。最後細胞質分裂，細胞分裂成二個細胞。

G0 時期：此期為細胞分裂後的休止期，人體大部分的細胞處於 G0 時期，通常會進入分化的階段，然後終其一生都停留在 G0 時期，有一些細胞，如神經細胞，完全分化時進入 G0 時期便不再回復；但有些細胞如肝細胞受到破壞或刺激時，會再進入 G1 時期循環增生。組織內迅速生長的細胞不會進入 G0 時期，當一個週期結束後就再進入下一週期，癌細胞即屬此類細胞。癌細胞的分裂並不一定比正常細胞快，卻不受細胞週期的調控而處於不停分裂的狀態。

在文獻中指出，當 DNA 受損時，細胞週期便無法通過檢查哨而停滯 (arrest)，此時細胞內會進行 DNA 的修復 (repair)，一旦修補完成時才會進入下一時期，若有無法彌補的錯誤時，細胞則會走向凋亡 (apoptosis)^{78,79}。

(二) 細胞週期的調控

細胞週期的進行有其一定的順序，並且受到極嚴密的調控。調控細胞週期進行的蛋白稱為週期素 (cyclin) 與週期素依賴性激酶 (cyclin-dependent kinases ; Cdk) (圖一)。Cdk 是屬於 serine/threonine 蛋白激酶，單獨存在時不具活性，必須與 cyclin 結合才具活性。在真核細胞中，不同的 Cdk 調控不同細胞週期的進行。譬如 Cdk 4 與 Cdk 6 (Cdk 4/6) 於 G1 中期活化調節細胞週期的進行，Cdk 2 的活化使細胞進入 S 時期，而 Cdk 1 是有絲分裂期主要的調控者。在細胞週期中，不同的 cyclins 結合並活化不同的 Cdk。D-cyclin (D1, D2, 與 D3) 與 Cdk 4/6 結合將外來訊息傳給細胞週期並調節

G1 中期。在 G1 晚期 cyclin E 與 Cdk 2 結合，cyclin E/Cdk 2 的活性是決定細胞是否能由 G1 進入 S 時期⁸⁰⁻⁸²。Cdk 2/cyclin A 複合體調控著 S 時期的進行，Cdk 1/cyclin B 複合體調控著 G2/M 期的轉換，以及 M 期的進行過程³⁹。這些 cyclin/Cdk 複合體在性質上是細胞週期各個時期的指標，而在定量上它們的活化與分解則調控整個細胞週期的進行⁸³。

cyclin/Cdk 複合物的激? 活性(kinase activity) 由兩種機制調節：(1) 活化或抑制 Cdk 磷酸化。(2) 與 CdkIs(Cdk inhibitors)的結合，依 CdkIs 構造與功能的特徵可分為兩大族群。其一為 INK4 (inhibitors of Cdk 4 kinase ; cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)家族:包括 p16^{INK4a} , p15^{INK4b}、p18^{INK4c}、p19^{INK4d} , 此類蛋白質主要與 Cdk 4/6 結合並抑制 Cdk 4/6 與 D 型的 cyclin 的結合與活化⁸⁴。另一為 CIP(Cdk interacting protein)/ WAF1 (wild-type p53 activated fragment)/KIP(kinase inhibitor protein)⁸⁵ 家族，其成員包括 p21^{CIP/WAF1}、p27^{KIP1}、p57^{KIP2} , 這些蛋白質主要作用在與 Cdk 2 和 Cdk 4/6 結合的複合物上⁸⁶。CdkIs 對有絲分裂原缺乏(mitogen deprivation)時或基因毒性刺激所造成細胞週期的停止是必須的。不同的 CdkIs 可抑制不同種類的 cyclin/CDK 複合物。

大部分影響細胞增殖的調控事件多發生於 G1 時期，正常細胞的生長與增殖受制於細胞生長因子、細胞密度與細胞間接觸之複雜的交互作用⁸⁷，生長因子能啟動和維持細胞由 G1 時期轉換到 S 時期，在細胞週期進行中依賴生長因子的時窗稱為限制點(restriction point)⁸⁸，又稱為檢查點(checkpoint)。於 G1 期，假若細胞受刺激而促使 D-cyclin 表現亮被調降造成不足或使 CdkIs 的數量增加時，會導致 cyclin E/Cdk 2 活性的抑制效應，因

此細胞無法過渡到 S 時期，而使細胞停止在 G1 期。DNA 損傷亦與細胞週期的檢查點(checkpoint)有關⁸⁹，當 DNA 損傷時會波及 DNA 的複製與有絲分裂，如此會使細胞週期停在 G1 期(S 期之前)或 G2 期(S 期之後)，但也可能停在 S 期，細胞週期停在 G1 期能防止損傷的 DNA 異常的複製，而停在 G2 期可避免有缺陷的染色體的分離(segregation)。以下針對細胞週期停在 G1 期，cyclin，Cdk 與 CdkIs 之間的關係做更詳細的介紹。

在細胞週期的 G1 時期進程中，最主要的兩種 cyclin 為 D-cyclins 與 cyclin E，而 cyclin D、E 與 Cdk 形成的複合體能協同性的引發腫瘤抑制蛋白如 retinoblastoma family (pRb, p107 與 p130) 的磷酸化而使生長抑制的活性消除⁹⁰，細胞週期能順利運轉。研究者發現 cyclin E 是 D-cyclins 下游的標的分子⁹¹，那 D-type cyclins 如何調控 cyclin E 呢？調控的功能與 CdkIs 有關，特別是 CIP/KIP 家族的 p21^{CIP/WAF1} 與 p27^{KIP1}，它們都能與 Cdk 2 和 Cdk 4/6 形成複合體，但所扮演的角色卻有所差異⁹²⁻⁹⁵。p21^{CIP/WAF1} 與 p27^{KIP1} 能抑制 cyclin E-Cdk 2 的活性，在 cyclin D-Cdk 4/6 複合體的形成與活化卻是必須的⁹⁶，這樣的功能解釋了 cyclin D 是 cyclin E 的上游且是正向調節，因為 p21^{CIP/WAF1} 與 p27^{KIP1} 能與 cyclin D-Cdk 4/6 複合體結合，解除了對 cyclin E-Cdk 2 活性抑制作用，細胞週期得以順利運行。

離子放射線的照射或 cisplatin 的處理會造成細胞 DNA 不同程度的損傷，譬如 DNA 雙股斷裂或形成架橋(adducts)，此時細胞週期停在 G1 時期，造成此等現象有兩種機制：首先，在 DNA 損傷時細胞週期能快速的被停止，此時並沒有任何蛋白質合成參與，僅是 cyclin D1 被破壞，p21^{CIP/WAF1} 重新分布的結果；正常狀況下 p21^{CIP/WAF1} 與 cyclin D-Cdk 4/6 複合體結合，

一旦 DNA 損傷，cyclin D1 被破壞，則 p21^{CIP/WAF1} 會由 cyclin D-Cdk 4/6 複合體游離出來，游離的 p21^{CIP/WAF1} 便結合到 cyclin E-Cdk 2，結果抑制了 cyclin E-Cdk 2 的活性，細胞週期因此被停止。然而這樣的作用是暫時性的，因為 cyclin E-Cdk 2 會被重新合成出來，再次的回到細胞週期⁹⁶。DNA 的損傷會誘發內生性野生型 p53(wild-type p53)的表現⁹⁷。p53 誘發 p21^{CIP/WAF1} 活化並造成 p21^{CIP/WAF1} 的蓄積，p21^{CIP/WAF1} 與 cyclin E/Cdk 2 複合體結合並抑制 cyclin E-Cdk 2 複合物的活性，失去 cyclin/Cdks 激? 活性所導致之 pRb 行低磷酸化作用(hypophosphorylation)，因而 pRb 無法將 E2F 釋放，使得其下游促進細胞週期運轉之基因無法活化。這些結合作用會抑制細胞由 G1 期進入 S 期⁹⁸。

此外，p21^{CIP/WAF1} 蛋白質也可不經由 pRb 蛋白的低磷酸化路徑而導致細胞週期停滯⁹⁹。許多的研究顯示 p21^{CIP/WAF1} 會大量表現在 p53 基因剔除老鼠¹⁰⁰，或含有 p53 基因突變的細胞，因此，增強 p21^{CIP/WAF1} 表現亦可不需經過 p53 調控的路徑可以導致細胞 G1 期休止。換言之，有一些刺激會誘發 p21^{CIP/WAF1}，但不需依賴 p53，也可以導致細胞 G1 期延長^{101,102}。

調控 p27^{KIP1} 的方式很多，磷酸化是其中一個調控方法。當細胞要從 G1 期進到 S 期時，p27^{KIP1} 需被降解。Cdk 2/cyclin E 複合物可以磷酸化 p27^{KIP1}，導致 p27^{KIP1} 的降解¹⁰³⁻¹⁰⁵。p27^{KIP1} 缺乏的老鼠顯示出在形體上有增大的現象、腦下腺體長腫瘤，與多器官的過度增生。雖然 p27^{KIP1} 為腦下垂體腫瘤抑制基因，但在人類其他癌症卻很少發現 p27^{KIP1} 基因突變或缺失。p27^{KIP1} 蛋白質的表現主要經由 postranslational 層次經由 ubiquitin-proteasome 所媒介調控的 proteolysis 機制，一部分的癌症顯示藉由

增加這種 proteolysis 系統的活性來降低 p27^{KIP1} 的量¹⁰⁵。

另外抑癌基因 p53 也參與了調控細胞週期以及細胞凋亡¹⁰⁶。p53 為腫瘤抑制基因(tumor suppressor gene)，50%左右的癌症病人身上觀察到 p53 基因發生突變(mutation)或被刪除(deletion)的情形¹⁰⁷。p53 主要透過兩種方式來達成抑制細胞增生的目的：(1)使細胞週期停滯在 G1-S 期，(2)直接誘使細胞發生凋亡。研究指出，利用基因轉殖技術除去老鼠的 p53 基因，可以清楚的界定出 p53 所參與的反應¹⁰⁸，主要是針對 DNA damaging agents、放射線及 etoposide 等，而非 glucocorticoids 或 calcium ionophores 所引起的生長抑制或細胞凋亡¹⁰⁹。而 p53 抑制細胞週期進行的作用，主要是利用蛋白質本身具有轉錄活化(transcriptional activator)的角色。p53 會誘導下游基因 p21^{CIP/WAF1} 的活化¹¹⁰，產生的 p21^{CIP/WAF1} 蛋白質會更進一步去抑制 cyclin-Cdk 複合物，阻斷細胞週期的進行¹¹¹。研究顯示含有突變 p53 基因的細胞具有較強的抗性，可以避免細胞凋亡，且這類細胞通常也具有較快的增生速率與較強的轉移(metastasis)能力¹¹²。

第四節 癌細胞凋亡研究概況

多細胞生物體內細胞的增生速度和死亡速度是相等的，因此可維持生物體的恆定(homeostasis)。細胞死亡的方式分為兩種：細胞壞死(necrosis)和細胞凋亡(apoptosis)。前者是一種被動的死亡形式，當細胞受到一些嚴重且突然的傷害，如局部缺氧、或面臨高熱、pH 極端改變等，會使細胞內粒線體(mitochondrion)脹大、細胞膜無法調節滲透壓而破裂溶解，細胞內容物如溶解性酵素(lysosomal enzymes)大量外漏，造成周圍組織的發炎反應¹¹³。而細胞凋亡是一種主動的死亡方式，是細胞在正常生理狀況下進行的程序性死亡過程。當細胞進行凋亡時，細胞膜會皺縮(shrinkage)，但因為需要能量，所以粒線體和核糖體仍保持完整，染色質縮合(chromosome condensation)、DNA 斷裂成特殊片段(DNA fragmentation)，為 180-200 base-pair 的倍數，最後胞膜會將各種胞器和 DNA 片段包成一顆顆的凋亡小體(apoptotic bodies)，接著被巨噬細胞將其吞噬清除掉，因此不會引起發炎反應¹¹⁴。我們可利用電子顯微鏡觀察細胞形態變化。另外最直接偵測 apoptosis 的方法是以瓊脂凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)觀察，看到 DNA 呈階梯狀的片段分析¹¹⁵，或以末端脫氧核糖核糖核酸轉移酶標記分析(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling assay; TUNEL Assay)^{116,117} 區分 apoptosis 的細胞來定量細胞 apoptosis 的比例；或直接以 propidium iodide (PI) 將 DNA 染色後，於螢光共軛焦距顯微鏡下觀察染色質縮合情形¹¹⁸，或利用流式細胞儀來分析。細胞凋亡的生理機制，在多細胞生物是用來進行個體發生及發育，以及控制細胞數或當作一道防禦移除受傷或突變的細胞，所以對多細胞生物的正常發展是重要的⁷²。

Apoptosis 的調控是藉由細胞內基因的表現來控制整個過程，這些基因

所表現的蛋白質依功能可大約分為三大類:第一類是主導細胞走向 apoptosis 的蛋白質 (pro-apoptosis) , 第二類是扮演抑制細胞產生 apoptosis 的角色 (pro-survival) , 第三類則是屬於造成 apoptosis 特徵的調控性蛋白質。在正常生理狀況下, 藉由第一類與第二類蛋白的互相調節, 使細胞維持平衡狀態, 當細胞老化或是受到外來傷害時, 便啟動 pro-apoptosis 路徑, 並抑制 pro-survival 路徑的發生, 使細胞走向凋亡。

目前知道執行凋亡的中心機轉是一群蛋白水解酶 (protease), 具有一段保守序列可以接合及催化標的蛋白水解, 其作用在受質 (substrate) 的部位正好是 Aspartate 之 C 端^{119,120}, 所以被稱為 cysteine aspartate-specific protease, 簡稱為 caspase。caspase 平常以無活性的原 (zymogen) 存在細胞質中, 受到刺激時會進行一連串的蛋白質水解作用 (proteolysis cascade), 將死亡訊息送至死亡路徑的下游, 再讓下游酵素 (如 endonuclease) 破壞 DNA 而使細胞死亡⁷²。目前發現的 caspase 有 14 種, 但並非所有的 caspase 都和凋亡有相關¹²¹。Caspase 根據結構可分為具有較長的 prodomains 包括 caspase recruitment domain (CARD) 如 caspase-1, -2, -4, -5, -9, -11, -13; death effector domain (DED) 如 caspase-8, -10 和具有較短的 prodomains 如 caspase-3, -6, -7, -14。一般來說, 活化 caspase 有兩個途徑: 其一是經由死亡受體 (death receptor) 如 TNF α 或 Fas 等啟動 caspase-8 的活化。其二是經由從粒線體釋放出的細胞色素 *c* (cytochrome *c*), 一旦釋放到細胞質中的 cytochrome *c* 和 Apaf 1 結合後, 會活化 caspase-9¹²²。caspase-8 和 caspase-9 的活化會啟動下游的 caspase 如 caspase-3 活化, 這一連串的活化, 會造成核膜蛋白 (lamin) 的分解、PARP [poly (ADP-ribose) polymerase] 被切、以及 DNA fragmentation 等, 最終導致細胞凋亡。上述兩條途徑並非完全獨立的¹²³, 並且 caspase 在功能上也有重疊的地方¹²⁴。

第五節 Bcl-2 家族研究概況

參與調控細胞凋亡的因子除了 caspase 外, Bcl-2 家族也是廣受討論的分子。Bcl-2(B cell lymphoma protein 2)是一原致癌基因(proto-oncogene), 最初是在 B 細胞淋巴瘤中的染色體轉位發現的, 此種轉位會抑制 B 細胞的死亡, 導致細胞瘤的生長。Bcl-2 的家族結構相似, 具有 BH (Bcl-2 homology) domain 分別為 BH1、BH2、BH3 和 BH4, 在細胞凋亡過程中, 扮演了重要的角色¹²⁵。這個家族可分為促進細胞凋亡的分子(pro-apoptotic)包括 Bax、Bad、Bid 及 Bcl-Xs 等; 以及抑制細胞凋亡的分子(anti-apoptotic)包括 Bcl-2 及 Bcl-XL 等。BH 4 domain 幾乎只存在 anti-apoptotic 的分子, Bcl-2 的 BH 4 domain 還可以和 Raf-1¹²⁶ 以及 p53-binding protein 結合¹²⁷。Bcl-2 及 Bcl-XL 位在 BH 3 和 BH 4 domain 之間有一個 loop 的結構, 如果失去 loop 的結構, 則 Bcl-2 無法被磷酸化^{128,129}。在 1988 年, Vaux 等人首次發現 Bcl-2 蛋白能使細胞存活¹³⁰, 而研究證明抗癌藥物所誘發的細胞凋亡過程中, 若 Bcl-2 蛋白大量表現經常會導致細胞凋亡受到抑制; 除此之外, 人工植入 Bcl-2 蛋白表現載體也會促使成熟 B-cell 之存活週期延長。至於 Bcl-2 蛋白家族內生物功能迥異的兩群蛋白間究竟如何調控細胞的存活, 已有許多報導, 目前已知 Bcl-2 家族成員間的交互作用與蛋白質的相對含量有關。Bcl-2 及 Bcl-XL 蛋白能與 Bax (Bak) 形成二合體。研究顯示: (1) Bcl-2 或 Bcl-XL 本身具有類似抗氧化劑的能力, 能捕捉自由基, 而 Bcl-2 或 Bcl-XL 能與 Bax 或 Bak 形成複合體, 當 Bcl-2 量多時可以保護細胞, 並抑制細胞的死亡^{131,132}。(2) Bax 或 Bak 蛋白本身含有死亡調控區, 當 Bax 量多時會誘使細胞走向死亡。因此 Bcl-2/Bax 或 Bcl-XL/Bak 形成複合體時, 會遮蔽 Bax/Bak 死亡訊息的傳

遞，進而增加細胞的存活率¹³³(圖二)。

在 Bcl-2 家族促進細胞凋亡的分子以及抑制細胞凋亡的分子彼此以 heterodimers 或 homodimers 的形式結合，調控細胞凋亡。Bcl-2 的家族成員大部分在 C-terminal 都含有疏水性區域(hydrophobic domain)，使得它們可以存在膜上。一般認為抑制細胞凋亡的分子平時都存在粒線體膜上、內質網膜上(endoplasmic reticulum)或是核膜上；而促進細胞凋亡的分子平時都存在細胞質中，但是如果接受到死亡訊息則會轉位(translocation)到膜上，尤其是在粒線體膜上^{134,135}。例如 Bax 與 Bax 同分子間結合在粒線體膜上，於是在粒線體膜上形成了孔洞，造成粒線體內的 cytochrome *c* 被釋放到細胞質中，一旦 cytochrome *c* 和 Apaf-1 結合後，會活化 caspase-9，進而引發了一連串死亡訊息，誘導細胞走向凋亡¹³⁶⁻¹³⁹。而 Bcl-2 及 Bcl-XL 等之所以能抑制細胞凋亡是在於它們能和 Bax 結合，並阻止了 cytochrome *c* 從粒線體流到細胞質中抑制其與 Apaf-1 結合，阻斷了誘導細胞走向凋亡的訊息傳導¹⁴⁰⁻

143
。

第六節 研究動機與目的

如上所述肺癌發生率甚高，臨床上大多以外科切除或放射線方式治療，同時或於處理後佐以傳統或新型的化學藥物治療，但治療效果及預後都不好，存活率也很低。目前尚無理想治療藥物，因此尋找新型抗肺癌藥物之研究是重要課題。苯乙酸 (phenylacetic acid) — 是毒性低微而作用機轉與傳統細胞毒藥物有所不同的新型抗癌物質。因此著手進行一系列 phenylacetic acid 衍生物的合成，經初步篩選結果得知 fluorophenylacetamide 具有比 phenylacetic acid 更強的活性，於是在本研究中著者系統性的合成一系列 fluorophenylacetamide 衍生物(H1 – H6, SCK1 – SCK6)，並以人類鱗狀上皮肺癌細胞 CH27 從事篩選。探討結構與活性相關性，並選擇其中活性較佳的化合物探討其作用機轉，以尋找抗肺癌的先導化合物，提供開發抗肺癌新藥研究之參考資料。

第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

壹、細胞株

細胞株 CH27 由台北榮總提供，經病理組織鑑定確定為人類鱗狀上皮肺癌細胞(Human Squamous Epithelial Lung Cancer Cell)。

貳、試劑

1. 榮民製藥：Penicillin, Streptomycin
2. Amersham：ECL detection kit
3. BIO RAD：Acrylamide, Ammonium Persulfate (APS), *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (Bis), *N,N,N',N'*-tetra-methylethylene-diamine (TEMED).
4. Biosource International QCB：caspase-1 (Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-methylcoumarin；Ac-YVAD-AMC), caspase-3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC；Ac-DEVD-AMC), caspase-8 (Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC；Ac-IETD-AMC), caspase-9 (Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC；Ac-LEHD-AMC)
5. Gibco (LA, USA)：RPMI 1640, Fetal Bovine Serum (FBS), Non-essential amino acid (NEAA)。
6. KAMIYA Company (Seattle, USA)：caspase inhibitor(Broad-spectrum：z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, z-VAD-fmk)，caspase-3 inhibitor：z-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone (z-DEVD-fmk)。
7. Merck (Darmstadt, Germany)：Phenylacetic acid, NaHCO₃, L-glutamine, Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium (EDTA), Glucose, Dimethyl-sulfoxide (DMSO), Chloroform, Sodium acetate, 100% Ethanol, Boric acid, Sucrose, Sodium citrate, Sodium dodecyl sulfate (SDS), Glycine, Methyl alcohol (MeOH), NaCl, HCL, Glycerol, 2-Mercaptoethanol (2-ME).
8. Pharmingen (Boston, USA)：Anti-p53, anti-caspase-3, anti-caspase-8 與

anti-cytochrome *c*。

9. Roche Diagnostic (Meylan, France) : Terminal transferase-mediated dUTP-fluorescensin nick end-labeling (TUNEL)。
10. Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA) : anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-Bcl-XL/S, anti-Cdk 6, anti-cyclin A, anti-cyclin D2 and anti-cyclin E
11. Sigma Co (Saint Louis, MO) : Propidium iodide (PI) 與 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)。
12. Transduction Laboratory (Lexington, KY, USA) : Anti-p21^{CIP1/WAF1}, anti-p53, anti-pRb, anti-Cdk2, anti-Cdk4, anti-cyclin D1 and anti-cyclin D3
13. Recombinant Bcl-2-adenoviral vector 及 control adenoviral vector 由中研院生醫所徐松錕博士提供

第二節 實驗方法

壹、苯乙酸衍生物的合成與配製

(一) 苯乙酸衍生物的合成

採用一般醯胺類化合物之合成法，如 Scheme 1 所示合成苯乙酸衍生物 (*N*-substituted phenylacetamides) **H1- H6** 與 **SCK1 - SCK6**。以有取代的苯乙酸 (*N*-substituted phenylacetic acid) Compound I 為起始原料，先以二氯亞硫醯 (thionyl chloride) 進行氯化反應後，形成相對應之取代的苯乙酸醯氯 (phenylacetyl chlorides) Compound II，再與各種胺類反應，即可得到相對應之標的化合物 **H1 - H6** 與 **SCK1 - SCK6**，化合物的純化是利用管柱層析法 (氯仿-矽膠) 以苯做再結晶，即可得到白色結晶化合物，分析其產率與測定其熔點，並運用各種儀器如核磁共振光譜儀 (NMR)，紅外光線光譜儀 (IR)，紫外光-可見光光譜儀 (UV)，質譜儀 (EIMS) 與元素分析儀 (Element Analyzer) 確立其結構，苯乙酸衍生物的結構與分析數據如 Scheme 1、表二與表三。

(二) 藥物的配製

苯乙酸與苯乙酸衍生物溶於 DMSO 配製成 400mM 的庫存溶液，試驗時再稀釋成實驗所需濃度，並使細胞培養液內 DMSO 的實驗濃度不超過 1 ~ 0.5 %，根據先前的報告與我們初步的試驗證實 DMSO 在此濃度下是不會影響到細胞毒性檢測值¹⁴⁴。

貳、細胞培養

1. RPMI 1640 Medium

取 10 g RPMI1640 Medium powder，溶於約 900 ml Milli-Q，加入 3.7 g 的 NaHCO₃，以 HCl 調整 pH=7.0 ~ 7.2 後，以 Milli-Q 去離子水加足量體積

至 1L, 使用 0.45 μm 之濾膜 (filter) 粗過濾後, 在無菌操作下以 0.2 μm 濾膜細過濾, 置 4 備用。

2. 完全培養液(Complete Medium)

每毫升 RPMI 1640 培養基添加 100 IU 青黴素(penicillin)、100 μg 鏈黴素(streptomycin)、2 mM 麩胺酸醯胺(L-glutamine)、100 μM 非必需氨基酸(non-essential amino acid, 包含 14.7 μg glutamic acid、7.5 μg glycine、8.9 μg alanine、13.3 μg aspartic acid、11.5 μg asparagine 及 10.5 μg serine)並加入 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS)。實驗時再把調整為 1% 的 FBS, 以避免藥物與血清結合而影響檢測值。

3. 細胞培養

CH27 細胞以完全培養液培養於含有 5% 二氧化碳、37 的培養箱中, 每兩天更換次培養基。細胞的次培養 (subculture) 則以 TEG [0.05 mM 胰蛋白酶 (trypsin)、2.5 mM 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA)、2.8 mM 葡萄糖的混合液]將細胞於培養皿中打散, 再分植到新的培養皿中。

參、細胞存活的評估

細胞經 TEG 處理後, 以血清培養液調成 5×10^4 個細胞/well 的密度植入 12 孔的培養盤中(Falcon), 每孔含 1ml 5% FBS 的 RPMI 1640 血清培養液, 讓細胞貼附 24 小時後分別以不同濃度苯乙酸與苯乙酸衍生物的 1% FBS 培養液培養細胞於 5% 二氧化碳、37 的培養箱中。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。

肆、細胞染色

以 DMSO, 苯乙酸與苯乙酸衍生物處理 CH27 細胞 72 小時後, 附著在培養盤之細胞以 PBS 清洗兩次後, 用 2 % paraformaldehyde 在室溫下固定 30 分鐘, 再以 0.1 % Triton X-100/in PBS 處理 30 分鐘, 使細胞膜產生孔隙得以讓染劑進入。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 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 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。

伍、凋亡細胞 DNA 的萃取和電泳分析

以 DMSO, 苯乙酸與苯乙酸衍生物處理 CH27 細胞 72 小時後, 收集細胞以 extraction buffer (50 mM Tris, pH7.5, 10 mM EDTA, 0.3% Triton X-100) 置冰上 30 分鐘, 溶解後的細胞加入 RNase (100 µg/ml) 於 55 水浴 30 分鐘後再加入 proteinase K (400 µg/ml) 置 55 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)。取樣品 10 µg DNA 加 2 µl 的 10X DNA loading dye 並置 65 水浴 1 小時, 配製 2 % agarose gel (2 g agarose in 100 ml 0.5X TBE), 最後將樣品 DNA 注入電泳膠孔槽, 以 0.5X TBE buffer (0.5X TBE buffer containing : Tris 5.4 g, boric acid 2.75 g, 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0) 為電泳緩衝液, 進行電泳分析。

陸、細胞週期分析

以 DMSO，苯乙酸與苯乙酸衍生物處理 CH27 細胞，收集不同時間點的細胞，細胞先加入 10 ml PBS 混合均勻後於 1000 rpm 4 離心 5 分鐘；倒掉上清液加入 80 % ethanol/PBS 固定細胞並計算細胞數，約 4×10^5 個細胞分裝於離心管，再次將細胞懸浮於 PBS 接著以 RNase (DNase free, 100 μ l/ml in PBS) 與 propidium iodide (40 μ g/ml, in PBS) 於室溫下處理 30 分鐘，然後離心將細胞再懸浮於 PBS，於冰浴下將細胞懸浮液通過 19 號針頭到 5 ml 分析管中，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。

柒、蛋白質定性與定量分析

以 DMSO，苯乙酸與苯乙酸衍生物處理 CH27 細胞，分別在 8、24、48 與 72 小時收集細胞，按以下之方法處理與分析。

1. 蛋白質的萃取 (Protein extraction)

細胞以 PBS 洗過 2 次後刮下，4 5000 rpm 離心 3-5 分鐘，倒掉上清液並以棉籤拭乾 eppendorf tube 邊緣。用手指輕彈 eppendorf tube 將細胞稍打散後加入適量的溶解液 RIPA buffer [50 mM Tris, PH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.25 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, *5 % 2-mercaptoethanol, *5 μ g/ml leupeptin, *0.2 mM phenylmethyl sulfonylfluoride, 5 μ g/ml aprotinin, *1 mM soybean trypsin inhibitor, *1 mM NaF (*add before use)] 混合均勻，置於冰上作用 20-30 分鐘，接著以超高速離心 $100,000 \times g$, 4, 30 分鐘，收集上清液，以 Bradford 方法測量蛋白質溶液在波長 595 nm 下的吸光值，換算成蛋白質濃度 (μ g/ μ l) (以一系列已知濃度的 BSA 作成之 standard curve 換算蛋白質的濃度)。取定量

的蛋白質分裝於 eppendorf tube 置 -80 備用。

2. 聚丙烯醯胺膠體電泳法(SDS-PAGE Electrophoresis Assay)

配製 1.5 mm 厚度的 discontinuous acrylamide gel, gel 分上下兩層, 上層為 stacking gel 含有 4% acrylamide, 下層為 separating gel 其 acrylamide 的百分比視分析的蛋白質分子量而定。配製完成的膠體裝置於電泳槽內, 注入電泳緩衝液 running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS)。蛋白質樣品回溫後加入 4X protein loading dye (8 % SDS, 0.04% serva blue R-250, 40 % glycerol, 200 mM Tris pH 6.8, 10 % 2-mercaptoethanol), 於 95 ~ 100 乾浴 denature 10 分鐘, 冰浴冷卻後快速離心, 將各樣品及標示標準分子量的 Multimarker 依序注入膠體的孔槽中, 通以電壓 80 Volt., 待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 120 Volt.。

3. 西方轉漬法(Western blot)

將 PVDF membrane (Millipore) 浸泡於 methanol 數秒後以 Milli-Q 水浸濕; 裁好的濾紙與 membrane 一起浸泡於 transfer buffer (50 mM Tris, 40 mM glycine, 0.375 % SDS, pH 9.0-9.4; 20% methanol), 電泳膠去掉 stacking gel 的部份並裁下電泳膠中所要轉漬的區域後亦浸於 transfer buffer 中。轉印石墨板之正極板以 transfer buffer 潤濕後, 依序重疊平鋪上 4 張濾紙、membrane、膠體、再四張濾紙, 最後蓋上負極石墨板設定電流(mA) (電流=濾紙面積 \times 9/7 \times 疊數), 在 1 小時 10 分鐘後取出 membrane 以 5% 脫脂奶粉/TBST 作空白處抑制(blocking), 室溫下搖晃 30 分鐘。以 TBST (1000 ml TBST : 24.22 g Tris, 87.75 g NaCl, 10 ml tween 20) 清洗 membrane 10 分鐘 3 次, 加入一級抗體(Primary antibody) 4 下作用 24 小時, 再以 TBST 清洗 10 分鐘 3 次, 加入二級抗體(secondary antibody; anti-mouse

IgG; 1:12,500) 室溫下作用 1 小時,同樣經 TBST 清洗後於暗房進行 ECL (enhanced chemiluminescence)反應。membrane 裝於透明塑膠袋內置於壓片夾中,以 X-ray film (Kodak)感光。

捌、胞液分離萃取分析(Cytosolic Fractionation)

以 DMSO, 苯乙酸與苯乙酸衍生物處理 CH27 細胞,分別在 8、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 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 0.2 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride)於冰浴中反應 30 分鐘,接著細胞以 Dounce homogenizer 均質化,將均質液以 $100,000\times g$, 4 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 eppendorf tube 置-80 備用¹⁴⁵。

玖、Caspase 活性分析(Caspase Activity Assay)

Caspase 的活性測定以原廠的提供步驟採用螢光分析法檢測之。以 DMSO, 苯乙酸與苯乙酸衍生物處理 CH27 細胞,分別在 8、24、48 與 72 小時收集細胞,經 PBS 洗滌後細胞以溶解液 (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DL-dithiothreitol, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 0.2 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride)處理,以 $10,000\times g$, 4 離心 30 分鐘,上清液以 Bradford 方法定量蛋白質。取 20 μ g 蛋白質調整體積成 100 μ l,加入反應液分置於 microtiter plate 後再滴加螢光性 caspase 底質 100 μ M 即 caspase-1 (Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-methylcoumarin ; Ac-YVAD-AMC),

caspase-3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC ; Ac-DEVD- AMC), caspase-8 (Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC ; Ac-IETD-AMC) 與 caspase-9 (Ac-Leu-Glu-His-Asp-AMC ; Ac-LEHD-AMC) 的胜 受質 (peptide substrates), 所有的 caspase 胜 受質皆溶於 caspase assay buffer (40 mM HEPES (pH 7.4), 20 % glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2 % NP-40 and 10 mM DL-dithiothreitol)。於暗室 37 中反應 2 小時。以 Fluorescence spectrophotometer (excitation wavelength, 360 nm; emission wavelength, 460 nm) 測定螢光強度。

壹拾、統計分析 (Statistical analysis)

本論文之數據結果至少經由同方式三次獨立的實驗, 以平均值± 標準偏差(mean ± SD) 評估。統計誤差採用 Student' s t-test, 當 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 時表示統計學上有顯著差異。

第三節 重要儀器

1. 流式細胞分析儀：Flow cytometer , FAScan (Becton Dickinson)
2. 電泳設備：直立式電泳槽 Hoefer miniVE (Hoefer) , 電源供應器 Hoefer PS500XT (Hoefer) , 轉印槽 Bio-RAD SEMI-DRY Transfer cell (Bio-RAD) , Orbitron rotator II (Boekel model 260250)
3. 光學顯微鏡：Olympus IX70.
4. Fluorescence spectrophotomer
5. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) reader
6. 細胞培養箱 (37 incubator)
7. 超高速與高速離心機
8. 垂直式無菌操作台(Laminar Flow)

第三章 結果

之前研究報告指出苯乙酸在毫莫耳的濃度下，對數種癌細胞皆具有抗細胞增生與抗腫瘤的活性，因此我們改變結構上醯胺的部分，以不同長度的烷基鏈(alkyl chain)取代，合成兩系列的苯乙酸衍生物，即 **H1 - H6** 與 **SCK1 - SCK6**，分別以 0.02，0.2 及 2 mM 處理肺鱗狀上皮癌細胞 CH27，結果發現無論是 **H1 - H6** 或是 **SCK1 - SCK6** 對 CH27 皆具細胞毒性，在處理濃度與時間上皆呈正比關係，即處理濃度愈高或時間愈久，其毒殺癌細胞的效果愈好。與苯乙酸比較其作用活性，發現苯乙酸在相同的處理條件下，幾乎無任何毒殺癌細胞的活性。我們從 **H1 - H6** 或 **SCK1 - SCK6** 這兩系列的苯乙酸衍生物中，篩選出兩個最有效的化合物 - 4-fluoro-*N*-butylphenylacetamide (**H6**) 與 2-fluoro- *N*-butylphenylacetamide (**SCK6**)，**H6** 與 **SCK6** 對 CH27 的 LC50 分別低於 0.8 與 0.4 mM (圖三 - 圖六)，現分成兩部分敘述 **H6** 與 **SCK6** 的生物活性。

第一節 4-Fluoro-*N*-butylphenylacetamides (H6)對人類鱗狀上皮肺癌細胞 CH27 的生物活性

一、4-Fluoro-*N*-butylphenylacetamide (H6)可誘導人類鱗狀上皮肺癌細胞 CH27 凋亡

為了確定 H6 誘導細胞死亡的表現特徵，我們利用能與 DNA 結合的螢光染劑 - DAPI 與 TUNEL，將細胞染色以觀察細胞核的形態，CH27 肺癌細胞以 H6 處理後，出現典型的凋亡細胞核形態結構的變化，即細胞核的濃縮與細胞核形成碎片，在控制組與苯乙酸鹽處理組其細胞核染色體均勻分布並無碎片形成(圖七 A)，更進一步確定 H6 是誘導細胞的凋亡，故以 TUNEL 及 DNA 斷裂檢測法分析之，DNA 碎片能被 TUNEL 螢光染劑標定出來，結果如圖七 A。此外我們抽取處理組與控制組細胞的 DNA 經膠體電泳分析，結果發現 H6 處理後的 DNA 呈現階梯狀(DNA ladder)斷裂片段，而控制組及苯乙酸處理組 DNA 完整沒有段片出現(圖七 B) 因此我們認為 CH27 肺癌細胞經 H6 處理後能明顯誘導細胞進行凋亡。

二、H6 誘導細胞凋亡與 Bcl-Xs 蛋白相關

之前有文獻提出 Bcl-2 家族蛋白中 Bcl-2 與 Bcl-XL 蛋白能抑制細胞進行凋亡，相反的 Bax，Bad 與 Bcl-Xs 蛋白卻會促進細胞進行凋亡¹⁴⁶。為了探討 H6 誘導 CH27 肺癌細胞凋亡是否與 Bcl-2 家族蛋白的表現程度相關，我們偵測肺癌細胞中 Bcl-2，Bcl-XL，Bax，Bad 與 Bcl-Xs 蛋白的表現是否被 H6 調節。由圖八的結果顯示 CH27 肺癌細胞暴露在 2 mM H6 下，造成 Bcl-Xs 蛋白表現量明顯增加，然而 Bcl-2，Bcl-XL，Bax 與 Bad 卻不受影響。

三、於 H6 誘導細胞凋亡中會造成細胞質 cytochrome *c* 的累積，caspase-3 的活化與 PARP 的斷裂

最近與細胞凋亡的相關文獻指出，細胞在進行凋亡的時候會造成 cytochrome *c* 由粒腺體釋放到細胞質，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^{147 - 149}。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-PARP 與 anti-caspase-3 三種抗體偵測細胞質內的 cytochrome *c*，PARP 與 caspase-3 是否會活化。從圖九的結果顯示 CH27 肺癌細胞經 H6 處理後，cytochrome *c* 會由粒腺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-3 蛋白水解而活化與 PARP 的斷裂，這些結果明顯指出 H6 能誘導粒腺體內的 cytochrome *c* 釋放到細胞質，同時伴隨著 caspase-3 的活化與下游受質的分解斷裂。

四、H6 誘導細胞凋亡與 caspase 活化的相關性

先前文獻提出 caspase 的活化在細胞凋亡的過程中扮演一個非常重要的角色¹⁵⁰，因此要判定 H6 引起的細胞凋亡能否誘導 caspase 活化，使活化的 caspase 當成下游的激活劑 (effectors)，我們利用四種具螢光性的 caspase 受質去偵測特定的 caspase 活性。結果顯示於圖十，CH27 肺癌細胞經 H6 處理 8 小時後 caspase-9 的活性開始上升，而 caspase-3 在處理 24 與 48 小時後，其活性亦有明顯增加之趨勢，caspase-8 則在處理第 48 小時，活性有輕微的增加，但是 caspase-1 的活性卻無明顯變化。此外將 CH27 肺癌細

胞先與一廣效性 caspase 抑制劑 - z-VAD-fmk 共同培養後,再以 H6 處理之,結果無法防止 H6 引起的細胞質 cytochrome *c* 的累積 (圖十一 A); 但卻能明顯的抑制由 H6 引起的 caspase-3 活化與細胞凋亡(圖十一 B)。

第二節 2-Fluoro-*N*-butylphenylacetamides (SCK6)對人類鱗狀上皮肺癌細胞 CH27 的生物活性

一、2-Fluoro-*N*-butylphenylacetamides (SCK6)影響 CH27 細胞週期的分布

先前的文獻報告指出苯乙酸能使人類癌細胞停滯在 G0/G1 時期¹⁵¹，為了判定 SCK6 的處理是否同樣的能造成細胞週期停止的效應，我們將 CH27 肺癌細胞以 1mM SCK6 處理並分別在 0, 8, 24, 48 小時收集細胞，檢體以流式細胞分析儀分析各個細胞在細胞週期分布的情形。結果顯示於表四，處理 SCK6 的 CH27 肺癌細胞，在 G1 期的細胞百分比有顯著增加的趨勢，且伴隨著 S 期細胞百分比的減少。在第 48 小時時是 SCK6 誘導 G1 期停滯的高峰期，在此時間點處理組 G1 時期所佔的細胞百分比約為 85.9 %，相對的控制組的細胞百分比約為 64.5 %。此外，1 mM 苯乙酸處理組與控制組對 CH27 肺癌細胞週期分布無明顯的影響。

二、SCK6 對 G1 時期調節性蛋白的調控

為了探討 SCK6 引發 G1 期停滯的分子機制，我們分別檢測經 SCK6 處理過的 CH27 肺癌細胞內與 G1 時期相關的蛋白質。結果於圖十二所示，在 SCK6 處理 8 小時後，p53 與 p21^{CIP/WAF1} 的蛋白質表現量開始持續增加直到第 48 小時處理時間點；相反的，SCK6 處理組的 Cdk2, Cdk4, cyclin A, cyclin E 與 cyclin D3 蛋白質的表現量皆明顯的低於控制組和苯乙酸處理組，此外，pRb, Cdk6, cyclin D1 與 cyclin D2 蛋白質皆穩定的表現並未受到 SCK6 處理的影響(結果未顯示)。由此結果顯示，SCK6 引發 G1 期停滯的主因是 p53 與 p21^{CIP/WAF1} 的蛋白表現增加與 Cdk2, Cdk4, cyclin A, cyclin E 與 cyclin D3 蛋白的表現量降低所致。

三、SCK6 誘導細胞進程序性死亡

於顯微鏡下觀察經 SCK6 處理過的 CH27 肺癌細胞的細胞形態，在 SCK6 處理 48 到 72 小時後貼附的細胞會圓起來且漂浮於培養皿，這種現象顯示 SCK6 的抗細胞增殖能力，可能是起因於細胞週期早期 G1 時期停止而導致細胞的死亡。為了觀察 SCK6 誘導細胞死亡的表現特徵，我們利用與 DNA 結合的螢光染劑 - DAPI，將細胞染色以觀察細胞核的形態，再以 TUNEL 及 DNA 斷裂檢測法分析之，因為 DNA 的碎片能被 DAPI 與 TUNEL 螢光染劑標定出來(如圖十三 A)。此外分析 DNA 被斷裂的結果，抽取 SCK6 處理組與控制組細胞的 DNA 經膠體電泳分析，結果發現 SCK6 處理後的 DNA 呈現階梯狀斷片(DNA ladder)；而控制組和苯乙酸處理組偵測不到 DNA 的斷裂片段(圖十三 B)，由以上試驗結果可知 SCK6 誘導 CH27 肺癌細胞死亡是經由凋亡之路徑。

四、SCK6 對 Bcl-2 家族蛋白的調控

許多實驗的證據顯示 Bcl-2 家族相關蛋白質參與促進或抑制細胞的凋亡¹⁵²。為了釐清在 SCK6 誘導 CH27 肺癌細胞死亡中一些與死亡相關的蛋白質是否參與，我們將細胞以 1mM SCK6 或苯乙酸處理 24, 48 與 72 小時。從 Western blot 分析結果發現處理 48 小時後，SCK6 可引起 Bcl-2 蛋白質明顯降低，在第 72 小時也可看到 Bcl-XL 蛋白質也開始減少(圖十四 A)，而 Bax 蛋白質卻不受影響。這些結果顯示 SCK6 誘導 CH27 肺癌細胞凋亡可能是透過 Bcl-2 與 Bcl-XL 這兩個抗細胞凋亡的蛋白質表現量減少所致。為了闡明 Bcl-2 蛋白質的減少與 SCK6 誘導 CH27 肺癌細胞凋亡的相關性，我們將 CH27 肺癌細胞以 50 moi(multiplicity of infection)的 adeno-Bcl-2 或空的(控制組)病毒載體感染後再處理 SCK6，萃取細胞液以 Western blot 分析細胞內

Bcl-2 蛋白的表現。結果如圖十四 B，細胞經 adeno-Bcl-2 病毒載體感染後 Bcl-2 蛋白質的表現量相較於控制組之 Bcl-2 蛋白質的表現量明顯增加。且 adeno-Bcl-2 病毒載體感染後 Bcl-2 蛋白質的過度表現能明顯保護 CH27 肺癌細胞抵抗 SCK6 誘導的細胞死亡。

五、SCK6 誘導細胞死亡經由 caspase 活化

實驗證據顯示癌細胞在藥物處理後造成細胞的凋亡中 caspase 占一重要地位¹⁵³，因此要判定 SCK6 引起的細胞凋亡能否誘導 caspase 活化，而使活化的 caspase 當成下游的激活劑(effectors)，我們利用具螢光性的 caspase 受質去偵測特定的 caspase 活性。結果顯示於圖十五 A，在 SCK6 處理 24 小時後 caspase-9 的活性顯著增加，且持續到第 72 小時。除此之外，SCK6 處理 48 小時後 caspase-3 的活性明顯增加，而在 SCK6 處理 72 小時後 caspase-8 的活性些微上升，caspase-1 的活性則不受 SCK6 的影響。經 Western blot 分析在 SCK6 處理 48 及 72 小時的時間點，皆可看到 procaspase-3 蛋白被分解斷裂出 17 kDa 的活性片段，伴隨著下游受質 PARP 的分解斷裂(圖十五 B)，而 SCK6 能導致細胞質內 cytochrome *c* 的累積，且隨著處理時間增長而增加，這些結果顯示 SCK6 在誘導細胞凋亡時會造成 cytochrome *c* 釋放到細胞質中，接著活化 caspase-9 及-3。

為了了解 SCK6 誘導細胞凋亡中是須要 caspase 的活化，我們採用 caspase-3 抑制劑(z-DEVD-fmk)與廣效性抑制劑(z-VAD-fmk)前處理 CH27 肺癌細胞後再加入 SCK6，結果加入抑制劑能顯著的抑制由 SCK6 誘導的 caspase-3 活化與細胞的凋亡(圖十五 C)。相反的，加入 caspase-1 抑制劑(z-YVAD-fmk)卻無改變(結果未顯示)。這些觀察結果證實 SCK6 誘導細胞凋亡是經由 caspase 活化的路徑。

第四章 討 論

過去的研究文獻報導，苯乙酸不僅是一分化誘導劑而且能減低一些惡性腫瘤包括神經膠母細胞瘤(glioblastoma)，攝護腺癌及前骨髓細胞白血病(promyelocytic leukemia)等的惡化表現^{10,13}。另外苯乙酸具有選擇性停止腫瘤生長以及促進大白鼠惡性腦腫瘤分化的能力¹³。Hudgins 等人在 1995 年提出關於苯乙酸衍生物的一份研究報告中指出，苯乙酸是一芳香族脂肪酸，長鏈芳香族脂肪酸於代謝時脂肪酸的部份會進行 α -氧化作用(α -oxidation)，但是芳香環本身卻不易再進行 α -氧化作用¹⁵⁴，使得苯乙酸不易由體內代謝。而化合物本身是否具脂溶性也是影響療效因素之一，因為脂溶性高的藥物較易通過細胞膜脂雙層進入細胞中。所以建議在藥物設計上可保留苯乙酸結構上的芳香環，改變其羧基(carboxyl group)部分以提高化合物的脂溶性，雖然藥效與脂溶性之間有一定的相關性，但苯乙酸結構相關系列上的結構差異能提供一些作用的重要機制線索，譬如芳香環結構在烷羧基團(alkylcarboxyl group)的對位(*para*)或鄰位(*ortho*)上以其他基團取代(例如：苯環、甲基或鹵素族)，其效力皆優於苯乙酸²¹。因此本實驗擬以苯乙酸為基本架構對其羧基(carboxyl group)部分與苯環的取代做修飾改變，合成系列的醯胺類(amides)的苯乙酸衍生物，雖然 Hudgins 等人認為接上氨基會破壞羧基，而降低其誘導腫瘤細胞分化與靜止²¹，但於本實驗卻呈現不同的結果。

我們改變結構上醯胺的部分，以不同長度的烷基鏈(alkyl chain)取代，合成兩系列的苯乙酸衍生物，即 H1 - H6 與 SCK1 - SCK6 (Scheme 1)，分別處理肺鱗狀上皮癌細胞 CH27，結果發現無論是 H1 - H6 或是 SCK1 - SCK6 對 CH27 細胞皆具生長抑制作用，此生長抑制作用與處理濃度或時間上呈正比關係，即處理濃度愈高或時間愈久，其抑制癌細胞生長的效果愈

好。而苯乙酸在相同的處理條件下，抑制癌細胞的活性不如 H1 - H6 或 SCK1 - SCK6 好。我們從 H1 - H6 或 SCK1 - SCK6 這兩系列的苯乙酸衍生物中，篩選出兩個最有效的化合物 - 4-fluoro-*N*-butylphenylacetamide (H6) 與 2-fluoro-*N*-butylphenylacetamide (SCK6)。我們利用螢光染色法與 DNA 膠體電泳法，分析 H6 與 SCK6 誘導 CH27 肺癌細胞生長抑制是否出現細胞凋亡，結果處理 H6 與 SCK6 的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。

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⁷²。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。而誘導細胞死亡的訊息會透過細胞表面的接受器例如 Fas activated death domain (FADD)，或粒線體或刺激內質網，誘發一系列的 caspase 活化使細胞走上凋亡之路^{123,124,149}。在 H6 處理 CH27 肺癌細胞部分的數據顯示，處理的第 8 小時 caspase-9 的活性有顯著的增加且持續上升到第 48 小時，另外，也觀察到細胞質內 cytochrome *c* 的漸增式累積，細胞質內 cytochrome *c* 的累積與 caspase-9 的活化同時產生，接著又觀察到 procaspase-3 解離成活化態的 caspase-3，caspase-3 活化後即造成 PARP 斷片的產生。若以廣效性 caspase 抑制劑 z-VAD-fmk 處理後，並不會影響到 H6 誘導產生細胞質內 cytochrome *c* 累積，但卻能顯著的抑制 caspase-3-like 活性以及減弱細胞的凋亡現象。所以 H6 誘導細胞凋亡過程的機制是與粒腺體及其下游 caspase 相關。這些現象符合之前的文獻報告，caspase 抑制劑 z-VAD-fmk 在 *Xenopus* egg extracts 中能阻斷細胞的凋亡，不會影響到 cytochrome *c* 轉位到細胞質¹⁴⁰。另外，我們亦檢測經 H6 處理後肺癌細胞 Fas/FasL 並無任何變化(結果未顯示)，顯示 H6 誘導細胞的凋亡並

非經由 Fas 路徑之活化，而是透過粒腺體路徑造成 caspases 的活化，進而引發細胞的凋亡。綜合以上研究的結果可得知由 H6 引起之細胞凋亡的執行，粒腺體 cytochrome *c* 釋出至細胞質造成 caspase-9 的活化是發生在 caspase-3 活化之前的。因此，cytochrome *c* 及 caspase-9 的活化是上游調控分子。

經 H6 處理的細胞到底是如何造成細胞質內 cytochrome *c* 累積與 caspase 活化，是一大問題。在關於粒腺體完整性與粒腺體膜電位文獻報告中指出 Bcl-2 家族蛋白質在粒腺體完整性的控制中扮演一重要的角色，Bcl-2 家族蛋白質的變化會造成粒腺體失去膜電位，而使粒腺體膜內的蛋白質如 cytochrome *c* 和 apoptosis-inducing factor 釋放至細胞質而誘導細胞的凋亡¹⁵⁵。在 Bcl-2 家族基因中 Bcl-X 是調控細胞凋亡的重要分子之一^{156,157}。bcl-X 基因在轉錄剪輯(splicing)時形成兩個異構形：較長類型 Bcl-XL，作用與 Bcl-2 類似具抑制細胞死亡的功能；另一為短的類型 Bcl-Xs，其作用能抑制 Bcl-2 的功能促使細胞凋亡¹⁵⁸。之前研究報告提出即使在高濃度的 Bcl-2 與 Bcl-XL 下 Bcl-Xs 仍具有明顯條控細胞死亡的功能^{156,157}。其他研究指出 Bcl-Xs 具阻斷 Bcl-2 與 Bcl-XL 保護細胞的能力¹⁵⁸，而且 Bcl-Xs 過量表現會誘導乳癌細胞的凋亡¹⁵⁹。而最近的報告指出 Bcl-2，Bcl-XL，Bcl-Xs 與 Bax 皆位於粒腺體外膜^{129,158,160-162} 調控著粒腺體內 cytochrome *c* 的釋放。這些已發表的文獻論述可以解釋 H6 處理 CH27 細胞後的反應 當 H6 處理 CH27 細胞後造成 Bcl-Xs 蛋白質表現量增加而使得粒腺體膜的通透性改變，促進了 cytochrome *c* 的釋出，接著引發粒腺體下游分子 caspase 斷裂活化而啟動了細胞的凋亡。

在 SCK6 處理 CH27 肺癌細胞部分的數據顯示，SCK6 會造成 CH27 肺癌細胞生長抑制，細胞週期停止與誘導細胞的凋亡。先前的文獻指出苯乙酸能誘導癌細胞細胞週期的停滯，而誘導人類乳癌細胞 MCF-7 細胞生長抑

制可不經由 p53 的路徑造成 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表現增加²⁴，在本試驗中，以 SCK6 處理 CH27 肺癌細胞中明顯的觀察到 p53 蛋白質表現的增加，且伴隨著 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白質表現也上升。在控制真核細胞週期中，cycline-dependent kinases (Cdks) 是重要成員，Cdks 是屬於 serine/threonine 蛋白質的家族¹⁶³，而 Cdks 的活性可受到 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白質調控。在 SCK6 處理 CH27 肺癌細胞中積聚的 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白質可能結合到 Cdk2，Cdk4 與 Cdk6 抑制這些 Cdks 的激? 活性，阻止細胞由 G1 期進入 S 期，因此而造成細胞生長停止。此外，在本研究中也顯示以 SCK6 處理後會明顯降低 Cdk2，Cdk4 與 cyclin A，cyclin D3 與 cyclin E 蛋白質的表現。Agami 與 Bernards 在 2002 年發表的論文中提出在 G1 期的中期，Cdk4 與 Cdk6 和 D-type cyclin 結合而被活化，在 G1 期的晚期 Cdk2 與 cyclin E 結合，而 Cdk2-cyclin E 的活性控制著細胞週期由 G1 期進入 S 期^{80,82}。因此，在 SCK6 處理的細胞中，與 G1 期有聯繫的 Cdks 和 cyclins 濃度的減低，也會導致細胞週期被阻斷在 G1 期的中期和 G1/S 的檢查點(checkpoint)。以上我們觀察到之現象與 Bartkova 等學者在 1997 年提出的論點是相符合的¹⁶⁴。

以 SCK6 處理 CH27 肺癌細胞造成細胞凋亡的同時伴隨著 Bcl-2 表現降低。Bcl-2 家族蛋白質在細胞凋亡中具有調節的敏感性，Bcl-2 蛋白質的表現在 SCK6 處理後的第 48 小時開始明顯的降低，相反的，Bax 蛋白質的表現量幾乎沒有改變。我們利用腺病毒 Bcl-2 載體感染肺癌細胞造成 Bcl-2 大量表現，能明顯抑制 SCK6 誘發的細胞凋亡，如此更進一步確認 Bcl-2 表現量之降低確實與細胞的凋亡是相關的。先前學者的實驗證明在不同的癌細胞中，Bcl-2 的表現是受到不同的機制所改變，其中包括 p53 腫瘤抑制分子活性表現之缺失。在某些組織中 p53 能調降 Bcl-2 的表現¹⁶⁵。這些證據能解釋在本實驗中觀察到的現象，在 SCK6 處理細胞後誘導 p53 蛋白質表現

增加，進而調降 Bcl-2 蛋白質之表現，造成細胞的凋亡。之前有文獻指出 p53 蛋白質能調節 Bax 蛋白質使其表現量增加¹⁶⁶，但在 SCK6 處理後 Bax 蛋白質表現並沒有改變。

之前文獻報告提出 caspase 的活化有兩種典型的路徑：其一為死亡接受器與轉接分子 Fas activated death domain 接合，接著與 caspase-8 的前驅物結合並活化 caspase-8；其二為透過粒腺體內 cytochrome *c* 釋放的路徑^{122,123}。本實驗結果顯示，以 SCK6 處理 CH27 肺癌細胞造成 caspase 活化歸因於粒腺體釋放 cytochrome *c* 使細胞質內 cytochrome *c* 累積，接著與 Apaf-1 蛋白結合而活化了 caspase-9，caspase-9 的活化會啟動下游的 caspases 如 caspase-3 與 caspase-7 的活化，此結果顯示於圖十五 A 與 B。本研究發現，SCK6 能降低 Bcl-2 與 Bcl-XL 蛋白質表現量，使細胞質內 cytochrome *c* 積聚增加隨後造成 caspase-9 與 caspase-3 的活化，同時伴隨著下游受質 PARP 的分解斷裂。在細胞中 Bcl-2 蛋白質的過量表現或以 caspase 抑制劑的處理細胞都能顯著的阻斷 SCK6 誘導 CH27 肺癌細胞的凋亡。

第五章 結 論

p-fluorophenylacetamides (H1 – H6)及 *o*-fluorophenylacetamides (SCK1 – SCK6) 以 CH27 篩選結果得知 *p*-fluorophenylacetamide 之 *N*-alkyl group 取代碳鏈愈長活性愈強，而 *o*-fluorophenylacetamides 亦有相同的趨勢，比較在芳香環上 *p*-位與 *o*-位取代的活性強度，則發現 *o*-位取代的活性大於 *p*-位取代。其中以 4-fluoro-*N*-butylphenylacetamide (H6) 及 2-fluoro-*N*-butylphenylacetamide (SCK6)的 cytotoxicity 最強，LC50 分別低於 0.8 與 0.4 mM，而 phenylacetic acid 於此濃度下對 CH27 細胞無任何毒殺作用。

更進一步探討其作用機制，利用流式細胞儀分析細胞週期與凋亡，DNA 電泳分析凋亡片段、雙重染色觀察細胞形態、蛋白質電泳分析與細胞週期和凋亡相關蛋白的表現，以了解 PA 及 H6, SCK6 抑制肺癌細胞週期進行、誘導細胞凋亡及其分子作用機轉。

(一)、綜合 H6 誘導 CH27 肺癌細胞凋亡的結果，可以對 H6 誘導 CH27 肺癌細胞凋亡畫出一明確的作用路徑圖(圖十六 A)，即當 H6 進入 CH27 細胞內，經由一些目前尚不清楚的作用造成 Bcl-Xs 蛋白的表現增加，導致粒腺體中 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。此外，caspase 抑制劑的處理能有效的抑制 caspase 的活性，卻無法影響 cytochrome *c* 的釋放。所有的結果強力的提出依賴 Bcl-Xs 蛋白質與粒腺體下游 caspase 的活化是 H6 誘導人類肺鱗狀上皮細胞癌 CH27 細胞的凋亡執行者。

(二)、SCK6 進入 CH27 肺癌細胞內能引發肺癌細胞的生長停滯在 G1 期接

著又啟動細胞凋亡的路徑。在分子層次觀察到以 **SCK6** 處理人類肺鱗狀上皮細胞癌 CH27 細胞，能誘導 p53 與 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白質表現的增加，使 G1 期的 Cdk 與 cyclins 表現減少，因此，細胞生長停滯在 G1 期。同時 **SCK6** 也造成 CH27 細胞內之 Bcl-2 與 Bcl-XL 蛋白表現降低，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，**SCK6** 對人類肺癌 CH27 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 G1 期的標的蛋白質。再者，**SCK6** 能藉由調降 Bcl-2 與 Bcl-XL 蛋白質，誘導 cytochrome c 釋放引起 caspase-9 路徑的活化。此結果顯示 **SCK6** 誘導細胞的凋亡是經由粒腺體路徑(圖十六 B)。

從作用活性而言，兩種化合物皆能誘導人類肺鱗狀上皮細胞癌 CH27 細胞的凋亡，同樣的是透過粒腺體路徑，也會影響 Bcl-2 家族蛋白質的表現，但是它們的作用分子卻不盡相同。此外，藥物處理對癌細胞週期的影響也不相同，**SCK6** 能誘導 p53 與 p21^{CIP1/WAF1} 蛋白表現的增加卻會使 G1 期的 Cdk 與 cyclins 蛋白的表現減少，促使細胞停在 G1 期。我們同時也分析 **H6** 在肺癌細胞週期的變化，結果肺癌細胞多停在 S 期，但不明顯；亦分析相關的 Cdk 與 cyclins，發現 cyclin B 有被活化的情形(數據未顯示)。由這些結果我們認為即使是結構相近的化合物，其在細胞內作用的機制還是有差異的。

H6 及 **SCK6** 是第一次發現具有誘導 CH27 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。

參 考 文 獻

1. Anonymouse, Analysis in cancer incidence and mortality - Taiwan, 1999 (Chinese), *Epidemiology Bulletin*. 16, 389-391 (2000).
2. P.A. Bunn Jr, Overview of chemotherapy for small cell lung cancer, *Seminars in Oncology*, 24 (Supp7): S7-69-S7-74 (1997).
3. M.J. Ghaemmaghami Jr, New agents in the treatment of small cell lung cancer, *Chest*, 133, S86 (1998).
4. A. Thibault, M.R. Cooper, W.D. Figg, D.J. Venzon, A.O. Sartor, A.C. Tompkins, M.S. Weinberger, D.J. Headlee, N.A. McCall and D. Samid, A phase I and pharmacokinetic study of intravenous phenylacetate in patients with cancer, *Cancer Res.*, 54, 1690-1694 (1994).
5. M. Sandler, C.R. Ruthven, B.L. Goodwin, A. Lees and G.M. Stern, Phenylacetic acid in human body fluids: high correlation between plasma and cerebrospinal fluid concentration values, *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry.*, 45, 366-368 (1982).
6. S.W. Brusilow, M. Danney, L.J. Waber, M. Batshaw, B. Burton, K. Levitsky L Roth, C. McKeethren and J. Ward, Treatment of episodic hyperammonemia in children with inborn errors of urea synthesis, *N. Engl. J. Med.*, 310, 1630-1634 (1984).
7. C.L. Mendenhall, S. Rouster, L. Marshall and R. Weesner, A new therapy for portal systemic encephalopathy, *Am. J. Gastroenterol.*, 81, 540-543 (1986).
8. O. Simell, I. Sipila, J. Rajantie, D.L. Valle and S.W. Brusilow, Waste nitrogen excretion via amino acid acylation: benzoate and phenylacetate in lysinuric protein intolerance, *Pediatr. Res.*, 20, 1117-1121 (1986).
9. D. Samid, S. Shack and L.T. Sherman, Phenylacetate: a novel nontoxic inducer of tumor cell differentiation, *Cancer Res.*, 52, 1988-1992 (1992).

10. D. Samid, A. Yeh and P. Prasanna, Induction of erythroid differentiation and fetal hemoglobin production in human leukemic cells treated with phenylacetate, *Blood*, 80, 1576-1581 (1992).
11. D. Samid, S. Shack and C.E. Myers, Selective growth arrest and phenotypic reversion of prostate cancer cells in vitro by nontoxic pharmacological concentrations of phenylacetate, *J. Clin. Invest.*, 91, 2288-2295 (1993).
12. G.K. Gorski, L.E. McMotTOW and M.H. Donaldson, Letter to the editor. Synergistic inhibition of human rhabdomyosarcoma cells by sodium phenylacetate and tictinoin, *in Vitro Celt. Dev. Biol.*, 29, 189-191(1993).
13. D. Samid, Z. Ram, W.R. Hudgins, S. Shack, L. Liu, S. Walbridge, E.H. Oldfield and C.E. Myers, Selective activity of phenylacetate against malignant gliomas: resemblance to fetal brain damage in phenylketonuria. *Cancer Res.*, 54, 891-895(1994).
14. L. Liu, S. Shack, W.G. Stetler-Stevenson, W.R. Hudgins and D. Samid, Differentiation of cultured human melanoma cells induced by the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate, *J. Invest. Dermatol.*, 103, 335-340(1994).
15. Z. Ram, D. Samid, S. Walbridge, E.M. Oshiro, J.J. Viola, J-H Tao-Cheng, S. Shack, A. Thibault, C.E. Myers and E.H. Oldfield, Growth inhibition, tumor maturation, and extended survival in experimental brain tumors treated with phenylacetate, *Cancer Res.*, 54, 2923-2927(1994).
16. N. Sidell, R. Wada, G. Han, B. Chang, S. Shack, T. Moore and D. Samid, Phenylacetate synergies with retinoic acid in inducing the differentiation of human neuroblastoma cells, *Int. J. Cancer.*, 60, 507-514 (1995).
17. J. Cinatl, P. Herneiz, H. Rabenau, M. Hovak, R. Benda, H.O. Gumbel, B. Kornhuber and H.W. Doerr, Induction of myogenic differentiation in a human rhabdomyosarcoma cell line by phenylacetate, *Cancer Lett.*, 78, 41-48 (1994).

18. S.M. Chang, J.G. Kuhn, H.I. Robins, S.C. Schold, A.M. Spence, M.S. Berger, M.P. Mehta, M.E. Bozik, I. Pollack, D. Schiff, M. Gilbert, C. Rankin and M.D. Prados, Phase II study of phenylacetate in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium report, *J. Clin. Oncology*, 17, 984-990 (1999).
19. B.F. Vanjusinn, E.A. Bashkite, A. Friedrich and L. Chvojka, Metilirovanie DNK v porostkach pšenicy i vlijanije fyto gonnonov (in Russ.), *Biochemia.*, 1, 46-53 (1981).
20. P. Prasanna, S. Shack, V.L. Wilson and D. Samid, Phenylacetate in chemoprevention: *In vitro* and *in vivo* suppression of 5-aza-2'-deoxycytidine induced carcinogenesis, *Clin. Cancer Res.*, 1, 865-871 (1995).
21. W.R. Hudgins, S. Shack, C.E. Myers and D. Samid, Cytostatic activity of phenylacetate and derivatives against tumor cells. Correlation with lipophilicity and inhibition of protein prenylation, *Biochem. Pharmacol.*, 50, 1273-1279 (1995).
22. L.E. Harrison, D.C. Wojciechowicz, M.F. Brennan and P.B. Paty, Phenylacetate inhibits isoprenoid biosynthesis and suppresses growth of human pancreatic carcinoma, *Surgery*, 124, 541-550 (1998).
23. T. Pineau, W. R. Hudgins, L. Liu, L-C. Chen, T. Sher, F. J. Gonzales, and D. Samid, Activation of a peroxisome proliferator-activated receptor by the antitumor agent phenylacetate and its analogs, *Biochem. Pharmacol.*, 52, 659-667 (1996).
24. M. Gorospe, S. Shack, K.Z. Guyton, D. Samid and N.J. Holbrook, Up-regulation and functional role of p21Waf1/Cip1 during growth arrest of human breast carcinoma MCF-7 cells by phenylacetate, *Cell Growth Differ.*, 7, 1609-1615 (1996).
25. D. Samid, M. Wells, M.E. Greene, W. Shen, C.N. Palmer and A. Thibault,

- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity, *Clin. Cancer Res.*, 6, 933-941(2000).
26. T. Onishi, K. Yamakawa, O.E. Franco, R. Suzuki and J. Kawamura, p27Kip1 is the key mediator of phenylacetate induced cell cycle arrest in human prostate cancer cells, *Anticancer Res.*, 20, 3075-3081 (2000).
 27. J. L. Port, M. Kent and N.K. Altorki, Early lung cancer detection and treatment strategies, *Surgical Oncology*, 11, 191-199 (2002).
 28. P. Iyengar and M-S. Tsao, Clinical relevance of molecular markers in lung cancer, *Surgical Oncology*, 11, 167-179 (2002).
 - 29. W.D. Travis, R.V. Colby, B. Corrin, Y. Shimosato and E. Brambilla, in Collaboration with Sobin LH and Pathologists from 14 Countries. WHO international classification of tumours. Histological typing of lung and pleural tumours, Berlin: Springer, (1999).**
 30. K.M. Fong, Y. Sekido and J.D. Minna, Molecular pathogenesis of lung cancer, *J. Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 118, 1136 – 1152 (1999).
 31. W.N. Rom, J.G. Hay, T.C. Lee, Y. Jiang and K-M. Tchou-Wong, Molecular and genetic aspects of lung cancer, *American J. Respiratory and Critical Care Med.*, 161, 1355-1367 (2000).
 32. S.B. Baylin, J.G. Herman, J.R. Graff, P.M. Vertino and J-P. Issa, Alterations in DNA methylation-A fundamental aspect of neoplasia, *Advances in Cancer Res.*, 72, 141-196 (1998).
 33. Y. Shimosato, Pulmonary neoplasms. In: Sternburg S, editor. Diagnostic surgical pathology, Philadelphia : Lippincott-Williams &Wilkins, p.1069-1116 (1999).
 34. N.P. Wang, S. Zee, R.J. Zarbo, C.E. Bacchi and A.M. Gown, Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 defines unique subsets of carcinomas,

Applied Immunohistochem., 3, 99-107 (1995).

35. G. Pelosi, F. Fraggetta, F. Pasini, P. Maisonneuve, A. Sonzogni, A. Iannucci, A. Terzi, E. Bresola, F. Valduga, C. Lupo and G. Viale, Immunoreactivity for thyroid transcription factor-1 in stage I non-small cell carcinomas of the lung, *Am. J. Surgical Pathology*, 25, 363-372 (2001).
36. J.L. Bos, Ras oncogenes in human cancer: a review, *Cancer Res.*, 49, 4682-4689 (1989).
37. J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, 103, 211-225 (2000).
38. M. Park, M. Dean, K. Kaul, M.J. Braun, M.A. Gonda and G.F. Vande Woude, Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84, 6379-6383 (1987).
39. T. Hunter and J. Pines, Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age, *Cell*, 79, 573-582 (1994).
40. M. Pagano, S.W. Tam, A.M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, R. Yu, G.F. Draetta and M. Rolfe, Role of the ubiquitin- proteosome pathway in regulating the abundance of the cyclin dependent kinase inhibitor p27, *Science*, 269, 682-685 (1995).
41. A.J. Levine, P53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88, 323-331 (1997).
42. M. Ljungman, Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress, *Neoplasia*, 2, 208-225 (2000).
43. J.M. Adams and S. Cory, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 281, 1322-1326 (1998).
44. L. Burke, M.A. Khan, A.N. Freedman, A. Gemma, M. Ruswin, D.G. Guinee, W.P. Bennett, N.E. Caporaso, M.V. Fleming, W.D. Travis, T.V. Colby, V.

- Trastek, P.C. Pairolero, H.D. Tazelaar, D.E. Midthun, L.A. Liotta and C.C. Curtis, Allelic deletion analysis of the FHIT gene predicts poor survival in non-small cell lung cancer, *Cancer Res.*, 58, 2533-2536 (1998).
45. G. Fontanini, S. Vignati, L. Boldrini, S. Chine, V. Silvestri, M. Lucchi, A. Mussi, A.C. Angeletti and G. Bevilacqua, Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, 3, 861-865 (1997).
46. H. Achiwa, Y. Yatabe, T. Hida, T. Kuroishi, K. Koxaki, S. Nakamura, M. Ogawa, T. Sugiura, T. Mitsudomi and T. Takahashi, Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinoma, *Clin. Cancer Res.*, 5, 1001-1005 (1999).
47. K.M. Fong, Y. Kida, P.V. Zimmerman and P.J. Smith, TIMP-1 and adverse prognosis in non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, 2, 1369-1372 (1996).
48. H. Koo, M. Gray-Goodrich, G. Kohlhagen, M.J. McWilliams, M. Jeffers, A. Vaigro-Wolff, W.G. Alvord, A. Monks, K.D. Paull, Y. Pommier and G.F. Vande Woude, The ras oncogene-mediated sensitization of human cells to topoisomerase II inhibitor-induced apoptosis, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 236-241 (1999).
49. S. Teman, A. Flahault, S. Perie, G. Monceaux, F. Coulet, P. Callard, JF. Bernaudin, J.L. St Guily and P. Fouret, p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck, *J. Clin. Oncology*, 18, 385-394 (2000).
50. C. Tsai, K. Chang, R-P. Perng, T. Mitsudomi, M-H. Chen, C. Kadoyama and A.F. Gazdar, Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines with HER-2/neugene expression but not with ras gene mutations, *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 897-901 (1993).
51. M. Monzo, R. Rosell, J.J. Sanchez, J.S. Lee, A. O'Brate, J.L.

- Gonzalez-Larriba, V. Alberola, J.C. Lorenzo, L. Nunez, J.Y. Ro and C. Martin, Paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations, *J. Clin. Oncology*, 17, 1786-1793 (1999).
52. M.J. Kelley, S. Li and D.H. Harpole, Genetic analysis of the β -tubulin gene, TUBB, in non-small cell lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 93, 1886-1888 (2001).
53. J. Tsurutani, T. Komiya, H. Uejima, H. Tada, N. Syunichi, M. Oka, S. Kohno, M. Fukuoka and K. Nakagawa, Mutational analysis of the β tubulin gene in lung cancer, *Lung Cancer*, 35, 11-16 (2002).
54. R. Lotan, Retinoids and chemoprevention of aerodigestive tract cancer, *Cancer Metastasis Review*, 16, 1405-1410 (1997).
55. P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.*, 10, 940-954 (1996).
56. N. Martinet, F. Alla, G. Farre, T. Labib, H. Drouot, R. Vidili, E. Picard, M-P. Gaube, D. Le Faou, J. Siat, J. Borelly, P. Vermynen, T. Bazarbachi, J-M. Vignaud and Y. Martinet, Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions, *Cancer Res.*, 60, 2869-2875 (2000).
57. J. Ayoub, R. Jean-Francois, Y. Cormier, D. Meyer, Y. Ying, P. Major, C. Desjardins and W.E.C. Bradley, Placebo-controlled trial of 13-cis- retinoic acid activity on retinoic acid receptor-beta expression in a population at high risk: implication for chemoprevention of lung cancer, *J. Clin. Oncology*, 17, 3546-52 (1999).
58. G. Buccheri and D. Ferrigno, Lung tumor markers of cytokeratin origin : an overview, *Lung Cancer*, 34, S65-69 (2001).
59. C. Arteaga, The epidermal growth factor receptor : from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia, *J. Clin. Oncology*, 19, 32-40 (2001).

60. H. Kelly, D. Ferry, L. Hammond, M. Kris, M. Ranson and E. Rowinsky, #3896 ZD1839 (Iressa) an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) : pharmacokinetics in a phase I study of patients with advanced cancer, *Proc. Am. Associ. Cancer Res.*, 41 \par (2000).
61. M. Hidalgo, L. Siu and J. Nemunaitis, Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancie, *J. Clin. Oncology*, 19, 3267-3279 (2001).
62. W. Slichenmyer, W. Elliott and D. Fry, CI-1033 m a Pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor, *Seminars in Oncology*, 28, 80-85 (2001).
63. M. Rubin, D. Shin and M. Pasmantier, #1860 Monoclonal antibody (MoAb) IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor (EGFr), for patients (pts) with EGFr-positive tumors refractory to or in relapse from previous therapeutic regimens, *Proc. Am. Soci. Clin. Oncology*, 19, 474a (2000).
64. L. Laptalo, P. Lara and D. Lau, #1338 HER-2/neu screening in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC):a California cancer consortium trial of trastuzumab & docetaxel, *Proc. Am. Soci. Clin. Oncology*, 20, 335a (2001).
65. X. Yang, X. Jia and R. Corvalan, #183 Therapeutic potential of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer treatment. *Proc. Am. Soci. Clin. Oncology*, 19, 48a(2000).
66. J. Folkman, Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 333, 1757-1763 (1995).
67. M.S. Gordon, M. Talpaz and K. Margolin, Phase I trial of recombinant humanized monoclonal anti-vascular endothelial growth factor (RHUMABVEGF) in patients with metastatic cancer, *Proc. Am. Associ. Cancer Res.*, 17, 210a (1998).
68. T.A. Fong, L.K. Shawver and L. Sun, SU5416 is a potent and elective

- inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types, *Cancer Res.*, 59, 99-106 (1999).
69. S.G. Swisher, J.A. Roth and J. Nemunaitis, Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 763-771 (1999).
 70. S. Mani, C.M. Rudin, K. Kunkel, J.T. Holmlund, R.S. Geary, H.L. Kindler, F.A. Dorr and M.J. Ratain, Phase I clinical and pharmacokinetic study of protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide ISIS 3521 administered in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced cancer, *Clin. Cancer Res.*, 8, 1042-1048 (2002).
 71. M. Taketo, Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 1529-1536 (1998).
 72. D.L. Vaux and S.J. Korsmeyer, Cell death in development, *Cell*, 96, 245-254 (1999).
 73. L. Coultas and A. Strasser, The molecular control of DNA damage- induced cell death, *Apoptosis*, 5, 491-507 (2000).
 74. D.M. Smith, G. Gao, X. Zhang, G. Wang and Q.P. Don, Regulation of tumor cell apoptotic sensitivity during the cell cycle, *Int. J. Mol. Med.*, 6, 503-507 (2000).
 75. L.A. Smets, Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs, *Anticancer Drugs*, 5, 3-9 (1994).
 76. H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Damell, *Molecular cell biology*, pp. 178-181 (1995).
 77. G. Karp, *Cell and molecular biology*, pp 590-608 (2001).
 78. P.M. O'Connor, Mammalian G1 and G2 phase checkpoints, *Cancer Surv.*, 29, 151-82 (1997).

79. S.I. Reed, E. Bailly, V. Dulic, L. Hengst, D. Resnitzk and J. Slingerland, G1 control in mammalian cells, *J. Cell Sci. Suppl.*, 18, 69-73 (1994).
80. R. Agami and R. Bernards, Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle, *Cancer Lett.*, 177, 111-118 (2002).
81. D.E. Quelle, R.A. Ashmun, S.A. Shurtleff, J.Y. Kato, D. Bar-Sagi, M.F. Roussel and C.J. Sherr, Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts, *Genes Dev.*, 7, 1559-1571 (1993).
82. V. Baldin, J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano and G. Draetta, Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1, *Genes Dev.* 7, 812-821 (1993).
83. C.J. Sherr, Cancer cell cycles, *Science*, 274, 1672-1677 (1966).
84. A. Camero and G.J. Hannon, The INK4 family of CDK inhibitors, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 227, 43-55 (1998).
85. S. Matsuoka, J.S. Thompson, M.C Edwards, J.M. Bartletta, P. Gmndy, L.M. Kalikin, J.W. Harper, S.J. Elledge and A.P. Feinberg, Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 12p15, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 3026-3030 (1996).
86. D.O. Morgan, Principles of CDK regulation, *Nature*, 374, 131-134 (1995).
87. R. Baserga, Oncogenes and the strategy of growth factors, *Cell*, 79, 927-930 (1994).
88. A.B. Pardee, A restriction point for control of normal animal cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1286-1290 (1974).
89. T.W. Winert, DNA damage and checkpoint pathways : molecular anatomy and interactions with repair, *Cell*, 94, 555-558 (1998).
90. M.M. Lipinski and T. Jacks, The retinoblastoma gene family in

- differentiation and development, *Oncogene*, 18, 7873-7882 (1999).
91. Q. Yu, Y. Geng and P. Sicinski, Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation, *Nature*, 411, 1017-1021 (2001).
 92. J. LaBaer, M.D. Garrett, L.F. Stevenson, J.M. Slingerland, C. Sandhu, H.S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow, New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors, *Genes Dev.*, 11, 847-862 (1997).
 93. H. Zhang, G.J. Hannon and D. Beach, p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states, *Genes Dev.*, 8, 1750-1758 (1994).
 94. T.J. Soos, H. Kiyokawa, J.S. Yan, M.S. Rubin, A. Giordano, A. DeBlasio, S. Bottega, B. Wong, J. Mendelsohn and A. Koff, Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle, *Cell Growth Differ.*, 7, 135-146 (1996).
 95. S.W. Blain, E. Montalvo and J. Massague, Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A- Cdk2 and cyclin D2-Cdk4, *J. Biol. Chem.*, 272, 25863-25872 (1997).
 96. M. Cheng, P. Olivier, J.A. Diehl, M. Fero, M.F. Roussel, J.M. Roberts and C.J. Sherr, The p21 (Cip1) and p27 (Kip1) CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts, *EMBO J.*, 18, 1571-1583 (1999).
 97. V. Dulic, W.K. Kaufmann, S.J. Wilson, T.D. Tlsty, Lees E, J.W. Harper, S.J. Elledge and S.I. Reed, p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest, *Cell*, 76, 1013-1023 (1994).
 98. T. Oku, S. Ikeda, H. Sasaki, K. Fukuda, H. Morioka, E. Ohtsuka, H. Yoshikawa and T. Tsurimoto, Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C, *Genes Cells*, 3(6), 357-369 (1998).
 99. W. Arap, E. Knudsen, D.A. Sewell, D. Sidransky, J.Y. Wang, H.J. Huang

- and W.K. Cavenee, Functional analysis of wild type and malignant glioma derived CDKN2A beta alleles: evidence for an RB- independent growth suppressive pathway, *Oncogene*, 15(17), 2013-2020 (1997).
100. V. Bouvard, T. Zaitchouk, M. Vacher, A. Duthu, M. Canivet, C. Choisy-Rossi, M. Nieruchalski and E. May, Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice, *Oncogene*, 19(5), 649-660 (2000).
 101. K. Yoshida, I. Murohashi and K. Hirashima, p53-mdependent induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation of HL-60 cells by tumor necrosis factor alpha, *Int. J. Hematol.*, 65(1), 41 -48 (1996).
 102. W. Guo, M.A. Baluda and N.H. Park, Ethanol upregulates the expression of p21 WAF1/CIP1 and prolongs G1 transition via a p53-mdependent pathway in human epithelial cells, *Oncogene*, 15(10), 1143- 1149 (1997).
 103. R.J. Sheaff, M. Groudine, J.M. Roberts, and B.E. Clurman, Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1, *Genes Dev.*, 11, 1464-1478 (1997).
 104. I. Perez-Roger, D.L.C. Solomon, A. Sewing and H. Land, Myc activation of Cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of Cyclin E gene transcription and inhibition of p27kip1 binding to newly formed complexes, *Oncogene*, 14, 2373-2381 (1997).
 105. A. Montagnoli, F. Fiore, E. Eytan, A.C. Carrano, G.F. Draetta, A. Hershko and M. Pagano, Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex fomation, *Genes Dev.*, 13, 1181-1189 (1999).
 106. K.H. Vousden, p53: Death star. *Cell*, 103, 691-694 (2000).
 107. T. Kihana, H. Tsuda, S. Teshima, S. Okada, S. Matsuura and S. Hirohashi, High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA

- aneuploidy, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 978-984 (1992).
108. A.R. Clarke, C.A. Purdie, D.J. Harrison, R.G. Morris, C.C. Bird, M.L. Hooper and A.H. Wyllie, Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways, *Nature*, 362(6423), 849-852 (1993).
109. S.W. Lowe, E.M. Schmitt, S.W. Smith, B.A. Osborne and T. Jacks, p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes, *Nature*, 362(6423), 847-849 (1993).
110. J.W. Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S.J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell*, 75, 805-816 (1993).
111. S.P. Linke, K.C. Clarkin and G.M. Wahl, p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation, *Cancer Res.*, 57, 1171-1179 (1997).
112. H. Hama-Inaba, B. Wang, M. Mori, T. Matsushima, T. Saitoh, M. Takusagawa, T. Yamada, M. Muto and H. Ohyama, Radiosensitive murine thymoma cell line 3SB : characterization of its apoptosis -resistant variants induced by repeated X-irradiation, *Mutat. Res.*, 403(1-2), 85-94 (1998).
113. H. Kamesaki, Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy, *Int. J. Hematol.*, 68, 29-43(1998).
114. J.C. Reed, Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery, *Trends Mol. Med.*, 7, 314-319 (2001).
115. J.F. Kerr, C.M. Winterford and B.V. Harmon, Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 73(8), 2013-2026 (1994).
116. R. Gold, M. Schmied, G. Rothe, H. Zischler, H. Breitschopf, H. Wekerle and H. Lassmann, Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, 41, 1023-1030 (1993).

117. S. Mundle, A. Iftikhar, V. Shetty, S. Dameron, V. Wright-Quinones, B. Marcus, J. Loew, S. Gregory and A. Raza, Novel in situ double labeling for simultaneous detection of proliferation and apoptosis, *J. Histochem. Cytochem.*, 42, 1533-1537 (1994).
118. L.R. Nelson, D.O. Hodge and W.M. Bourne, In vitro comparison of Chen medium and Optisol-GS medium for human corneal storage, *Cornea*, 19(6), 782-787 (2000).
119. G.M. Cohen, Caspases : the executioners of apoptosis, *Biochem. J.*, 326(Pt1), 1-16 (1997).
120. D.K. Miller, The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis, *Semin. Immunol.*, 9, 35-49 (1997).
121. B. Fadeel, S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases, *Leukemia*, 14, 1514-1525 (2000).
122. G.I. Evan and K.H. Vousden, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature*, 411, 342-348 (2001).
123. X.-M. Sun, M. MacFarlane, J. Zhuang, B.B.Wolf, D.R. Green and G. M. Cohen, Distinct caspase cascades are initiated in receptor- mediated and chemical-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 274,5053- 5060 (1999).
124. R.U. Janicke, P. Ng, M.L. Sprengart and A.G. Porter, Caspase-3 is required for a-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 273, 15540-15545 (1998).
125. S.W. Fesik, Insights into programmed cell death through structural Biology, *Cell*, 103, 273-282 (2000).
126. H.G. Wang, U.R. Rapp and J.C. Reed, Bcl-2 targets the protein kinase raf-1 to mitochondria, *Cell*, 87, 629-638 (1996).
127. L. Naumovski and M.L. Cleary, The p53-binding protein 53BP2 also

- interacts with bcl-2 and impedes cell cycle progression at G2/M, *Mol. Cell Biol.*, 16, 3884-3892 (1996).
128. G. Fang, B.S. Chang, C.N. Kim, C. Perkins, C.B. Thompson and K.N. Bhalla, "Loop" domain is necessary for Taxol-induced mobility shift and phosphorylation of bcl-2 as well as for inhibiting Taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis, *Cancer Res.*, 58, 3202-3208 (1998).
 129. B.S. Chang, A.J. Minn, S.W. Muchmore, S.W. Fesik and B. Thompson, Identification of a novel regulatory/domain in bcl-xL and bcl-2, *EMBO J.*, 16, 968-977 (1997)
 130. D.L. Vaux, S. Cory and J.M. Adams, Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature*, 335(6189), 440-442 (1988).
 131. D.M. Hockenbery, Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman and S.J. Korsmeyer, Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell*, 75, 241-251 (1993).
 132. Q.Y. Liu and C.A. Stein, Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression, *Clin. Cancer Res.*, 3, 2039-2046 (1997).
 133. T.J. McDonnell, N. Deane, F.M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J.P. McKeam, S.J. Korsmeyer, bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation, *Cell*, 57, 79-88 (1989).
 134. Y.-T. Hsu, K.G. Wolter and R.J. Youle, Cytosol-to-membrane redistribution of bax and bcl-XL during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 3668-3672 (1997).
 135. L. Dubrez, J.L. Coil, A. Hurbin, E. Solary and M.-C. Favrot, Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing

- mitochondrial translocation and conformational change of bax protein, *J. Biol. Chem.*, 276, 38980-38987 (2001).
136. J.C. Reed, Cytochrome *c*: can't live with it- can't live without it, *Cell*, 91, 559-562 (1997).
137. J. M. Jurgensmeier, Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen and J.C. Reed, Bax directly induces release of cytochrome *c* isolated mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 4997-5002 (1998).
138. G. Kroemer and J.C. Reed, Mitochondrial control of cell death, *Nature Med.*, 6, 513-519 (2000).
139. M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 770-776 (2000).
140. R.M. Kluck, E. Bossy-Wetzel, D.R. Green and D.D. Newmeyer, The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275, 1132-1136 (1997).
141. J. Yang, X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones and X. Wang, Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked, *Science*, 275, 1129-1132 (1997).
142. S. Kharbanda, P. Pandey, L. Schofield, S. Israels, R. Roncinske, K. Yoshida, A. Bharti, Z. M. Yuan, S. Saxena, R. Weichselbaum, C. Nalin and D. Kufe, Role for bcl-XL as an inhibitor of cytosolic cytochrome *c* accumulation in DNA damage-induced apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 6939-6942 (1997).
143. Y. Hu, M.A. Benedict, D. Wu, N. Inohara and G. Nunez, Bcl-XL interacts with apaf-1 and inhibits apaf-1-dependent caspase-9 activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 4386-4391 (1998).
144. J.L. Wang, D. Liu, Z.J. Zhang, S. Shan, X. Han, S.M. Srinivasula, C.M. Croce, E.S. Alnemri and Z. Huang, Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells,

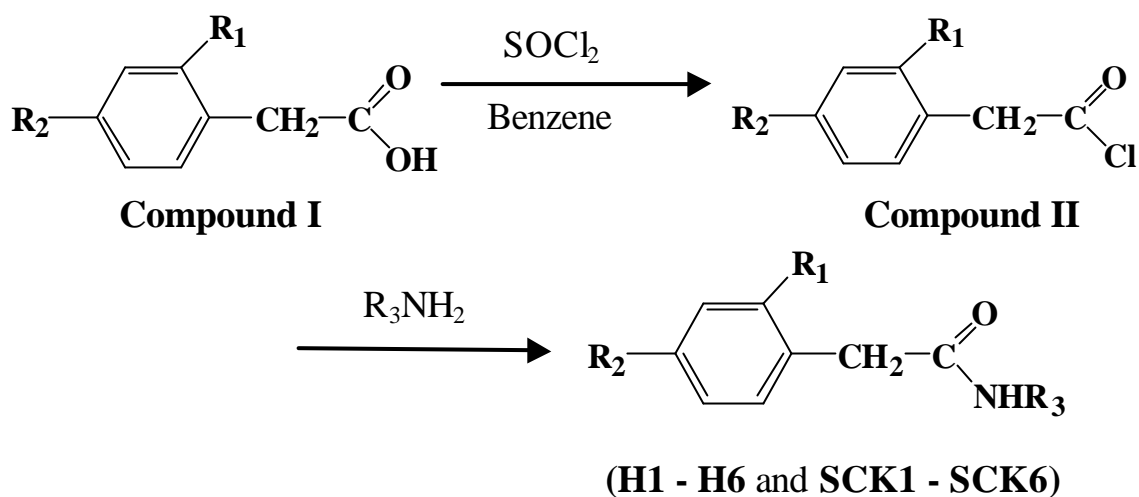
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 7124-7129 (2000)

145. 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).
146. B. Antonsson and J.C. Martinou, The Bcl-2 protein family, *Exp. Cell Res.*, 256, 50-57 (2000).
147. 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).
148. 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).
149. 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).
150. W.C. Earnshaw, L.M. Martins and S.H. Kaufmann, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 383-424 (1999).
151. A.C. Miller, T. Whittaker, A. Thibault and D. Samid, Modulation of radiation response of human tumour cells by the differentiation inducers, phenylacetate and phenylbutyrate, *Int. J. Radiat. Biol.*, 72, 211-218 (1997).
152. B.C. Baliga and S. Kumar, Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy, *Hematol. Oncol.*, 20, 63-74 (2002).
153. W. Nieves-Neira and Y. Pommier, Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines

- of the NCI Anticancer Drug Screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways, *Int. J. Cancer.*, 82, 396-404 (1999).
154. F. Knoop, Der Abbau aromatischen Fettsauren im Tier-korper, *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, 6, 150-162 (1905).
155. J. Yang, X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones and X. Wang, Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked, *Science*, 275, 1129-1132 (1997).
156. E. Yang and S.J. Korsmeyer, Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death, *Blood*, 88, 386-401 (1996).
157. L.H. Boise, M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G Nunez and C.B. Thompson, bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell*, 74, 597-608 (1993).
158. A.J. Minn, L.H. Boise and C.B. Thompson, Bcl-X(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L), *J. Biol. Chem.*, 271, 6306-6312 (1996).
159. M.W. Ealovega, P.K. McGinnis, V.N. Sumantran, MF. Clarke and MS. Wicha, Bcl-Xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice, *Cancer Res.*, 56, 1965-1969 (1996).
160. L. Jia, MG. Macey, Y. Yin, A.C. Newland and S.M. Kelsey, Subcellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis, *Blood*, 93, 2353-2359 (1999).
161. S. Krajewski, S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton and J.C. Reed, Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes, *Cancer Res.*, 53, 4701-4714 (1993).
162. M. Gonzalez-Garcia, R. Perez-Ballesterro, L. Ding, L. Duan, L.H. Boise, C.B. Thompson and G Nunez, bcl-XL is the major bcl-x mRNA form

expressed during murine development and its product localizes to mitochondria, *Development*, 120, 3033-3042 (1994).

163. C.J. Sherr and J.M. Roberts, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, *Genes Dev.*, 9, 1149-1163 (1995).
164. J. Bartkova, J. Lukas, J. Bartek, Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer, *Prog. Cell Cycle Res.*, 3, 211-220 (1997).
165. J.C. Reed, T. Miyashita, S. Takayama, H.G. Wang, T. Sato, S. Krajewski, C. Aime-Sempe, S. Bodrug, S. Kitada and M. Hanada, BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy, *J. Cell. Biochem.*, 60, 23-32 (1996).
166. S. Martin, B.-W. Ella, C.G. Joshua, F. Patrick and R.G. Douglas, p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release, *J. Biol. Chem.*, 275, 7337-7342 (2000).



- H1** : $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{F}$, $\text{R}_3=\text{H}$
H2 : $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{F}$, $\text{R}_3=\text{CH}_3$
H3 : $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{F}$, $\text{R}_3=\text{C}_2\text{H}_5$
H4 : $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{F}$, $\text{R}_3=\text{C}_3\text{H}_7$
H5 : $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{F}$, $\text{R}_3=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
H6 : $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{F}$, $\text{R}_3=\text{C}_4\text{H}_9$

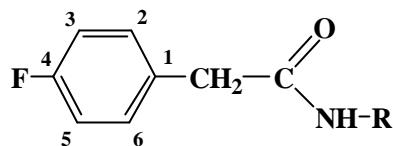
- SCK1** : $\text{R}_1=\text{F}$, $\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{H}$
SCK2 : $\text{R}_1=\text{F}$, $\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{CH}_3$
SCK3 : $\text{R}_1=\text{F}$, $\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{C}_2\text{H}_5$
SCK4 : $\text{R}_1=\text{F}$, $\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{C}_3\text{H}_7$
SCK5 : $\text{R}_1=\text{F}$, $\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
SCK6 : $\text{R}_1=\text{F}$, $\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{C}_4\text{H}_9$

Scheme 1、*N*-取代的苯乙酸衍生物 **H1-H6** 及 **SCK1-SCK6** 的合成

表一、The 1999 WHO classification of malignant lung epithelial neoplasms

WHO Classification of Pulmonary Carcinomas	
<p>Squamous cell carcinoma (SQCC) <i>Variants:</i> Papillary, Clear cell, Small cell, Basaloid.</p> <p>Small cell carcinoma (SCLC) <i>Variants:</i> Combined small cell carcinoma.</p> <p>Adenocarcinoma (ADC) Acinar Papillary Bronchioloalveolar carcinoma – Non-mucinous (clara cell/type II pneumocytes) – Mucinous (goblet cell) – Mixed mucinous and non-mucinous Solid Adenocarcinoma with mixed subtypes: <i>Variants:</i> Well-differentiated fetal, Mucinous (“colloid”), mucinous cystadenocarcinoma, Signet ring adenocarcinoma, Clear cell carcinoma</p> <p>Large cell carcinoma (LCC) <i>Variants:</i> Large cell neuroendocrine, combined large cell neuroendocrine, Basaloid, Lymphoepithelioma-like, clear cell, large cell with habdoid</p>	<p>Adenosquamous carcinoma (ADSQ)</p> <p>Carcinomas with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements Carcinomas with spindle and/or giant cells Pleomorphic carcinoma Spindle Cell carcinoma Giant cell carcinoma Carcinosarcoma Pulmonary blastoma</p> <p>Carcinoid tumor Typical carcinoid Atypical carcinoid</p> <p>Salivary gland tumors Mucoepidemoid Adenoid cystic Others</p> <p>Unclassified carcinoma</p>

表二、 4-Fluoro-*N*-substituted-phenylacetamides 類化合物 H1-H6 的物理常數及光譜數據



Compound	Yield (%)	Mp ()	UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ)	IR $\nu_{C=O}$ (cm^{-1})	MS (M^+) m/z	1H NMR ($CDCl_3$) δ
H1	85	116-117	205.3 (3.81)	1643	153	3.38 (2H, <i>s</i> , $\underline{CH_2CO}$), 7.04 - 7.12 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.24 - 7.31 (2H, <i>m</i> , H-2,6)
H2	87	99 - 100	205.1 (3.96)	1651	167	2.75 (3H, <i>d</i> , $J=4.8$ Hz, $NHCH_3$), 3.50 (2H, <i>s</i> , $\underline{CH_2CO}$), 6.98-7.04 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.18-7.24 (2H, <i>m</i> , H-2,6)
H3	78	107-108	205.1 (3.98)	1650	181	1.04 (3H, <i>t</i> , $J=7.2$ Hz, $NHCH_2CH_3$), 3.18-3.27 (2H, <i>m</i> , $NHCH_2CH_3$), 3.48 (2H, <i>s</i> , $\underline{CH_2CO}$), 6.97-7.03 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.17-7.24 (2H, <i>m</i> , H-2,6)
H4	88	90-91	204.9 (3.98)	1647	195	0.82 (3H, <i>t</i> , $J=7.5$ Hz, $NHCH_2CH_2CH_3$), 1.39-1.46 (2H, <i>m</i> , $NHCH_2CH_2CH_3$), 3.11-3.18 (2H, <i>m</i> , $NHCH_2CH_2CH_3$), 3.50 (2H, <i>s</i> , $\underline{CH_2CO}$), 6.97-7.03 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.18-7.24 (2H, <i>m</i> , H-2,6)
H5	88	101-102	204.6 (4.00)	1658	209	1.06 (6H, <i>d</i> , $J=6.6$ Hz, $NHCH(CH_3)_2$), 3.46 (2H, <i>s</i> , $\underline{CH_2CO}$), 3.99-4.06 (1H, <i>m</i> , $NHCH(CH_3)_2$), 6.97-7.03 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.17-7.24 (2H, <i>m</i> , H-2,6)
H6	79	76-77	204.7 (3.96)	1643	209	0.85 (3H, <i>t</i> , $J=7.2$ Hz, $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.22-1.25 (2H, <i>m</i> , $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.39-1.42 (2H, <i>m</i> , $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 3.15-3.21 (2H, <i>m</i> , $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$), 3.49 (2H, <i>s</i> , $\underline{CH_2CO}$), 6.97-7.03 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.17-7.24 (2H, <i>m</i> , H-2,6)

1. The UV spectra were recorded on a Shimadzu-160A UV-Vis recording spectrophotometer as methanolic solution.

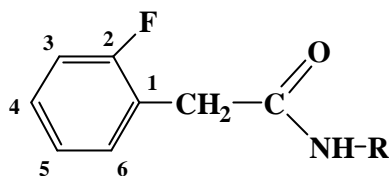
2. IR spectra were recorded on a Nicolet Impact 400 FT-IR spectrophotometer as KBr pellets.

3. MS spectra were measured with a VG Platform Fisons instrument.

4. NMR spectra were obtained on a Bruker Avance DPX-200 FT-NMR spectrometer in $CDCl_3$.

The following abbreviations are used: *s*, singlet; *d*, doublet; *t*, triplet; *q*, quartet; *m*, multiplet.

表三、 2-Fluoro-*N*-substituted-phenylacetamides 類化合物 SCK1-SCK6 的物理常數及光譜數據



Compound	Yield (%)	Mp ()	UV, λ_{\max}^1 (MeOH) (log ϵ)	IR ² $\nu_{\text{C=O}}$ (cm^{-1})	MS ³ (M^+) m/z	¹ H NMR (CDCl_3) δ^4
SCK1	93	103-104	205.7 (3.91)	1662	153	3.44 (2H, <i>s</i> , CH_2CO), 7.08-7.14 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.25-7.31 (2H, <i>m</i> , H-4,6)
SCK2	73	97-98	204.9 (3.88)	1656	167	2.74 (3H, <i>d</i> , $J=4.8$ Hz, NHCH_3), 3.54 (2H, <i>s</i> , CH_2CO), 7.04-7.12 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.24-7.27 (2H, <i>m</i> , H-4,6)
SCK3	81	90-91	204.9 (4.05)	1647	181	1.05 (3H, <i>t</i> , $J=7.2$ Hz, NHCH_2CH_3), 3.18-3.27 (2H, <i>m</i> , NHCH_2CH_3), 3.53 (2H, <i>s</i> , CH_2CO), 7.01-7.12 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.20-7.30 (2H, <i>m</i> , H-4,6)
SCK4	71	65-66	204.9 (4.02)	1653	195	0.83 (3H, <i>t</i> , $J=7.5$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.38-1.50 (3H, <i>t</i> , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.12-3.19 (3H, <i>t</i> , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.54 (2H, <i>s</i> , CH_2CO), 7.01-7.12 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.20-7.32 (2H, <i>m</i> , H-4,6)
SCK5	79	111-112	203.8 (4.06)	1647	195	1.06 (6H, <i>d</i> , $J=6.6$ Hz, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 3.49 (2H, <i>s</i> , CH_2CO), 3.97-4.08 (1H, <i>m</i> , $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 7.02-7.11 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.22-7.27 (2H, <i>m</i> , H-4,6)
SCK6	81	55-56	204.7 (3.99)	1653	209	0.88 (3H, <i>t</i> , $J=7.2$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.24-1.32 (2H, <i>m</i> , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.38-1.45 (2H, <i>m</i> , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.18-3.29 (2H, <i>m</i> , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.64 (2H, <i>s</i> , CH_2CO), 7.05-7.15 (2H, <i>m</i> , H-3,5), 7.25-7.30 (2H, <i>m</i> , H-4,6)

1. The UV spectra were recorded on a Shimadzu-160A UV-Vis recording spectrophotometer as methanolic solution.

2. IR spectra were recorded on a Nicolet Impact 400 FT-IR spectrophotometer as KBr pellets.

3. MS spectra were measured with a VG Platform Fisons instrument.

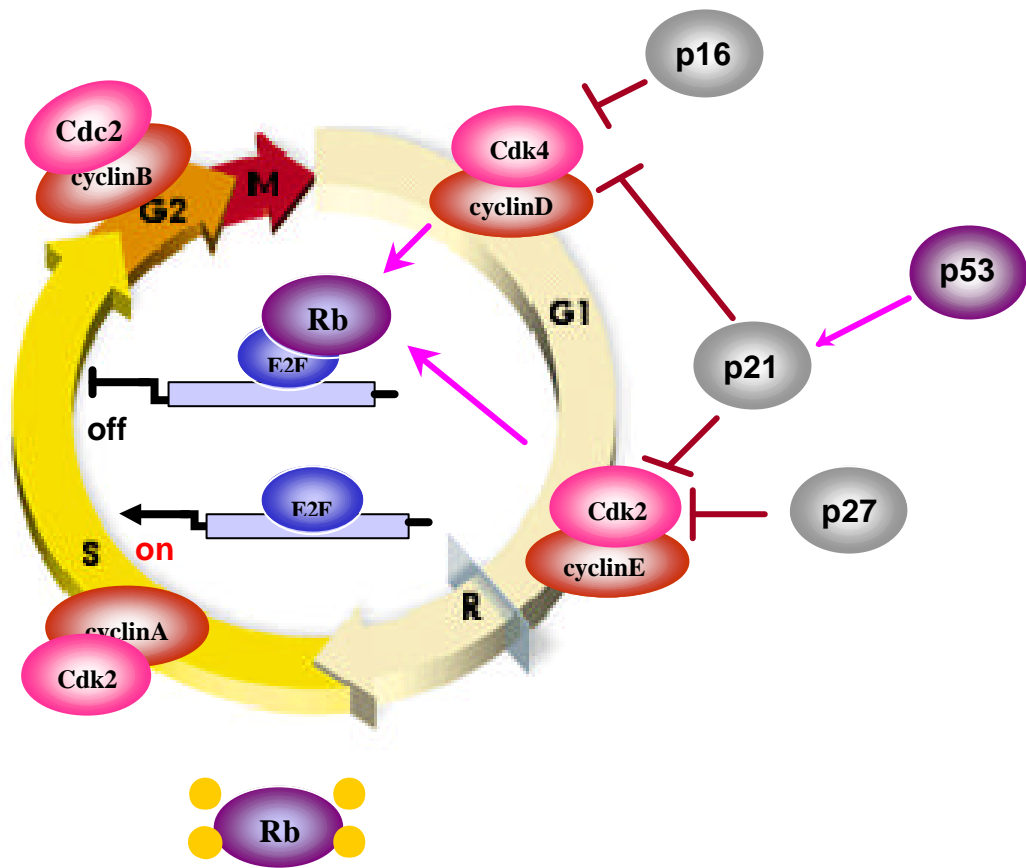
4. NMR spectra were obtained on a Bruker Avance DPX-200 FT-NMR spectrometer in CDCl_3 .

The following abbreviations are used: *s*, singlet; *d*, doublet; *t*, triplet; *q*, quartet; *m*, multiplet.

表四、 Cell cycle analysis for PA and SCK6-treated CH27 cells

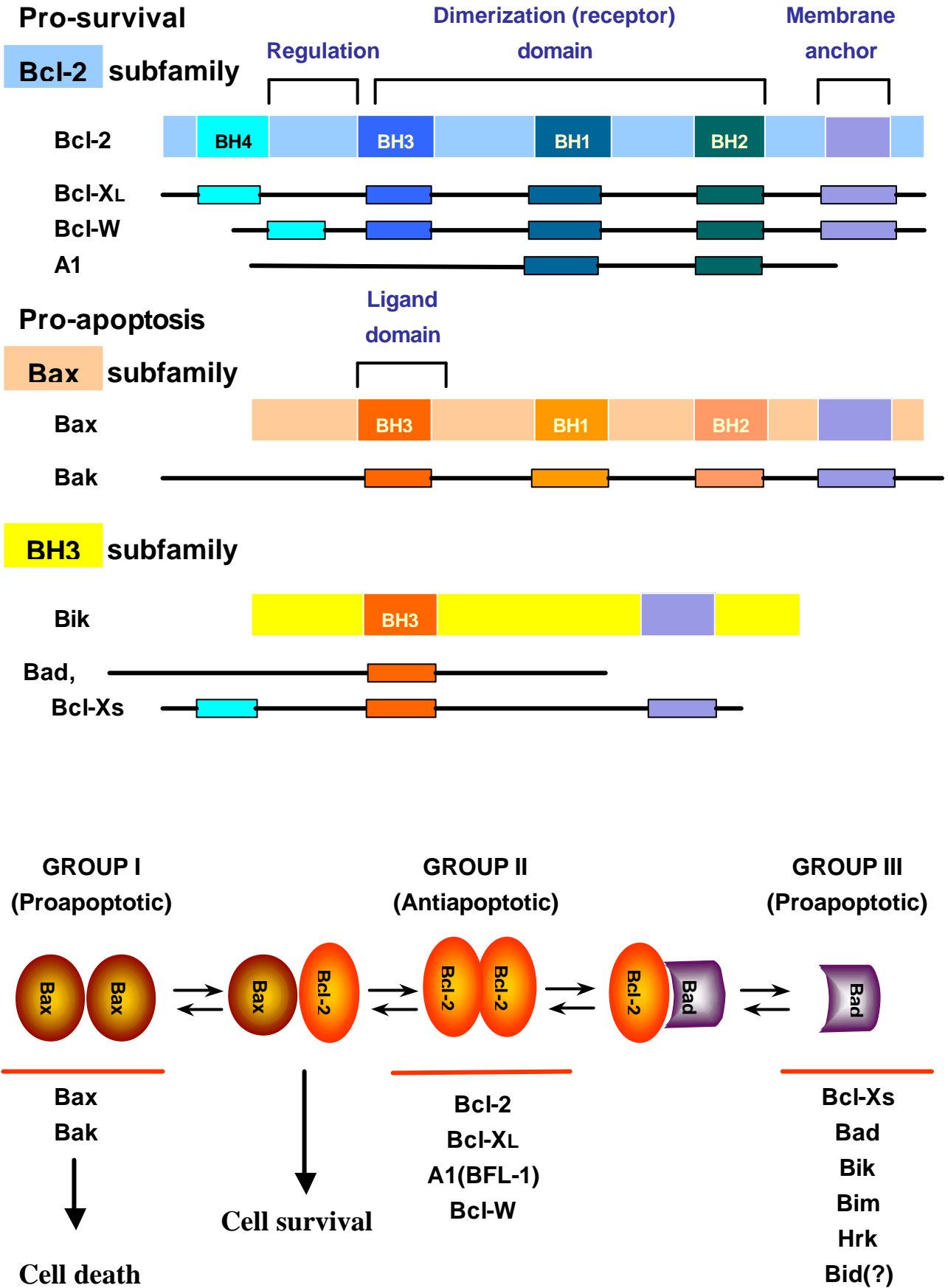
Time (h)	Cell cycle	Treatment (percentage of the cell number)		
		Control	PA	SCK6
0	G1	63.5 ± 3.4		
	S	28.1 ± 1.6		
	G ₂ /M	8.4 ± 2.1		
8	G1	66.1 ± 2.4	59.7 ± 0.3	66.2 ± 1.0
	S	28.1 ± 3.5	32.3 ± 3.8	30.1 ± 2.0
	G ₂ /M	5.8 ± 2.3	10.3 ± 2.5	3.7 ± 2.2
24	G1	67.3 ± 0.8	61.0 ± 0.5	71.0 ± 0.3
	S	26.4 ± 1.2	29.9 ± 0.9	24.3 ± 0.8
	G ₂ /M	6.3 ± 0.5	9.2 ± 0.5	4.6 ± 1.1
48	G1	64.7 ± 2.5	63.3 ± 0.8	85.6 ± 1.3
	S	29.0 ± 2.7	31.1 ± 1.2	10.5 ± 1.3
	G ₂ /M	6.3 ± 0.8	5.6 ± 1.7	3.9 ± 0.2

After being cultured in the presence of vehicle, PA or SCK6 for 0, 8, 24 and 48 hours, the cells were stained with propidium iodide and analyzed for cell cycle distribution by FACScan. The proportion of cells in the G₀/G₁, S and G₂/M phase of the cell cycle are shown. The data are from one representative experiment (n=3). Similar results were obtained in three other independent experiments.

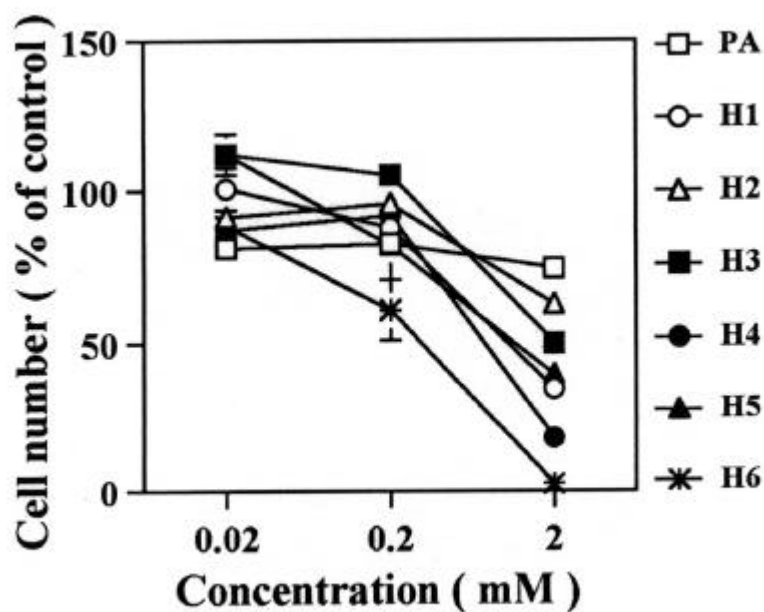


圖一、Diagram of cell cycle



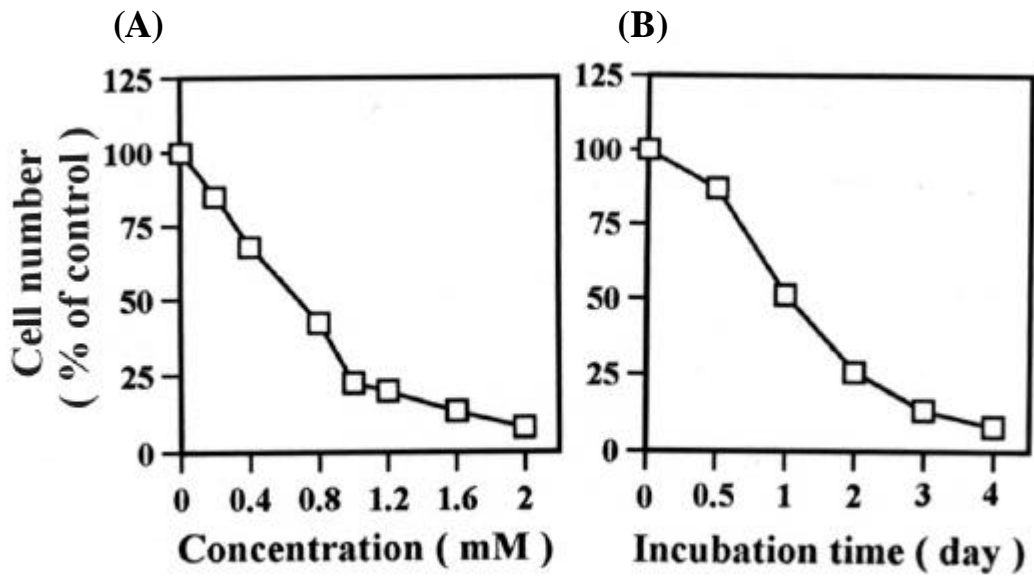


圖二、Diagram of Bcl-2 Family



圖三、Effects of **Phenylacetate** and 4-fluoro-*N*-substituted-phenyl acetamides (**H1-H6**) on CH27 cell viability.

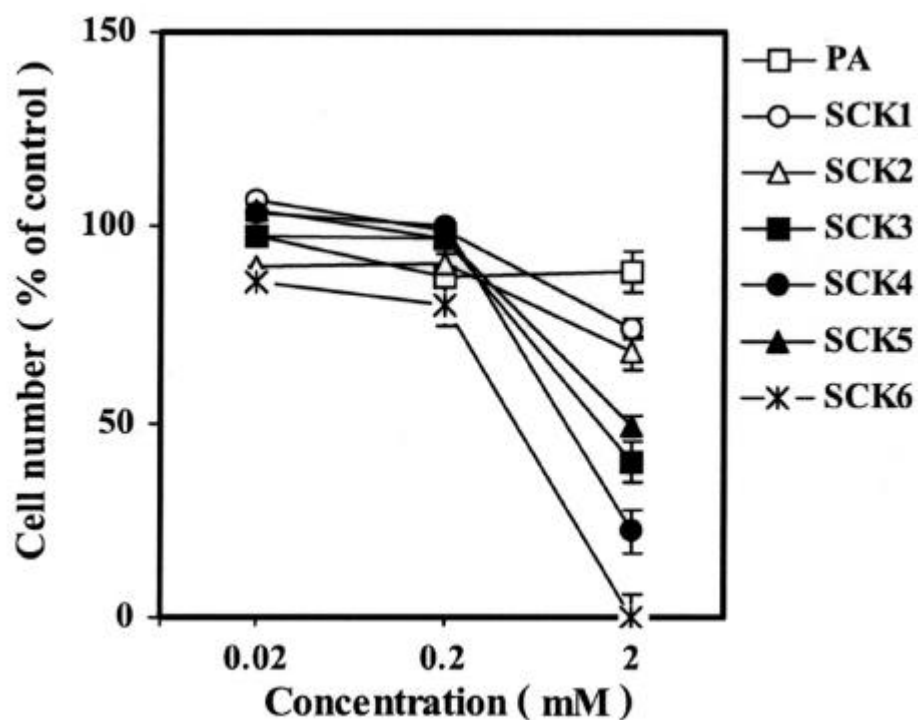
CH27 cells were treated with **PA** and **phenylacetamides** for 4 days. Cell viability was measured by calculating cell number and the percentage of cell viability was calculated as a ratio of drug-treated cells and control cells (treated with 0.5% DMSO vehicle).



圖四、Cytotoxic effect of **H6** in CH27 cells

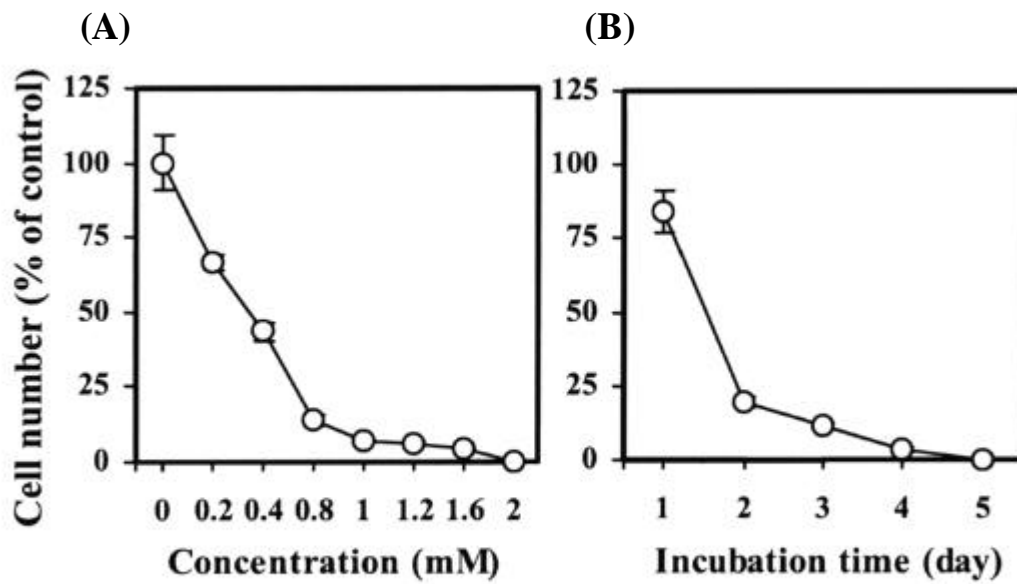
(A) Dose-dependent response. Cells were incubated with various concentration of **H6** for 3 days.

(B) Time-course response. Cells were treated with 2 mM **H6** for the indicated time points. After incubation, cell number was determined by trypan blue dye exclusion method.



圖五、 Effects of **phenylacetate** and 2-fluoro-*N*-substitute-phenylacetamides (**SCK1-SCK6**) on cell growth.

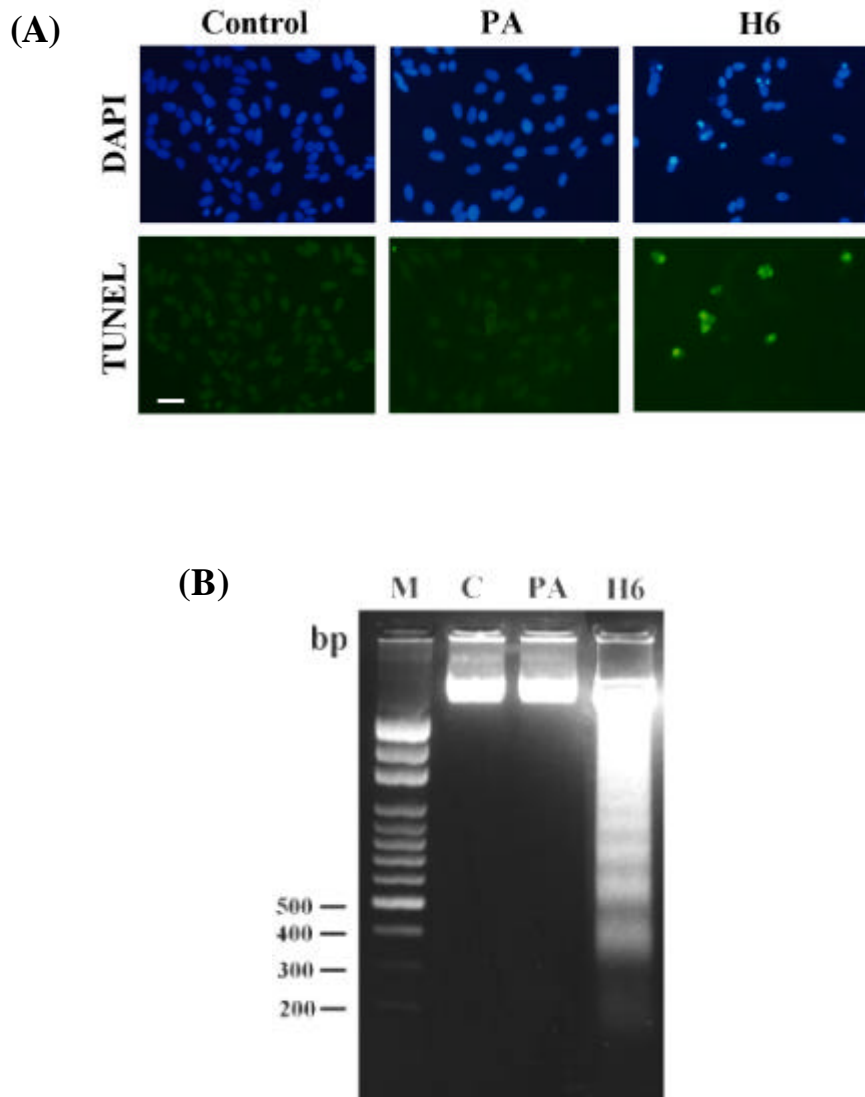
CH27 cells were treated with phenylacetate and *N*-alkyl-2-(2-fluoro-phenyl)acetamides for 4 days. Cell number was measured by trypan blue dye exclusion method and the percentage of cell growth was calculated as a ratio of drug-treated cells and control cells (treated with 0.5% DMSO vehicle).



圖六、 Antiproliferative effect of **SCK6** in CH27 cells.

(A) Dose-dependent response. Cells were incubated with various concentration of **SCK6** for 3 days.

(B) Time-course response. Cells were treated with 1 mM **SCK6** for the indicated time points. After incubation, cell number was determined by trypan blue dye exclusion method.

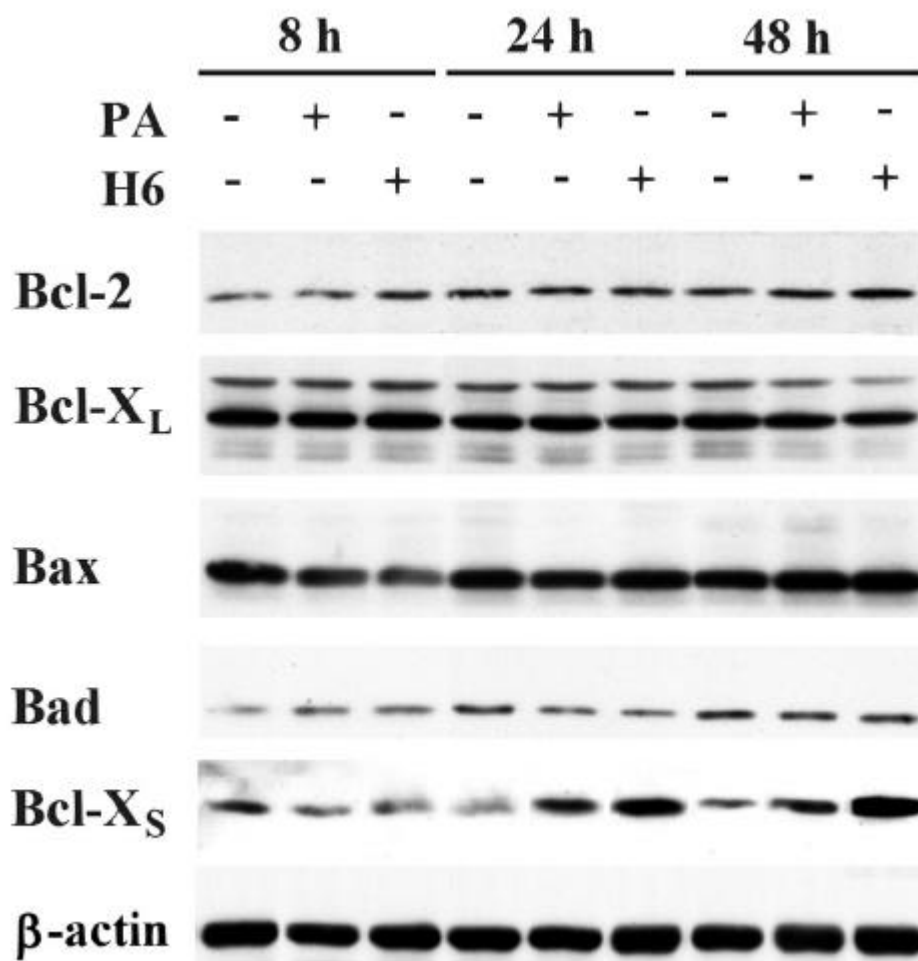


圖七、 Induction of apoptosis by **H6**.

CH27 cells were treated with 0.5% DMSO as vehicle control or treated with 2 mM of **H6** for 2 days. Cells were harvested and washed with ice-cold PBS, followed by fixation in 2% paraformaldehyde/PBS for 30 min. Cells were permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS for another 30 min, and then washed with distilled water.

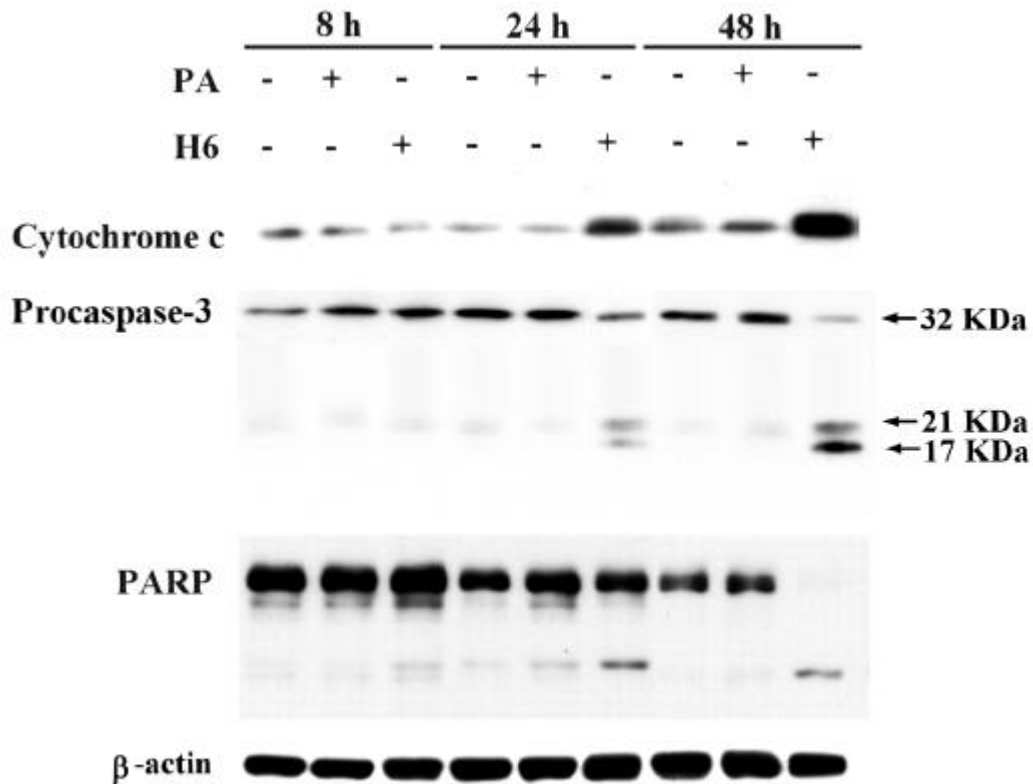
(A) Cells were incubated with 1 μ g/ml DAPI, or TUNEL reaction mixture and stained cells were examined by a fluorescence microscopy.

(B) DNA fragmentation. Cells were treated with **PA** and **H6** for 2 days. Cellular DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis.



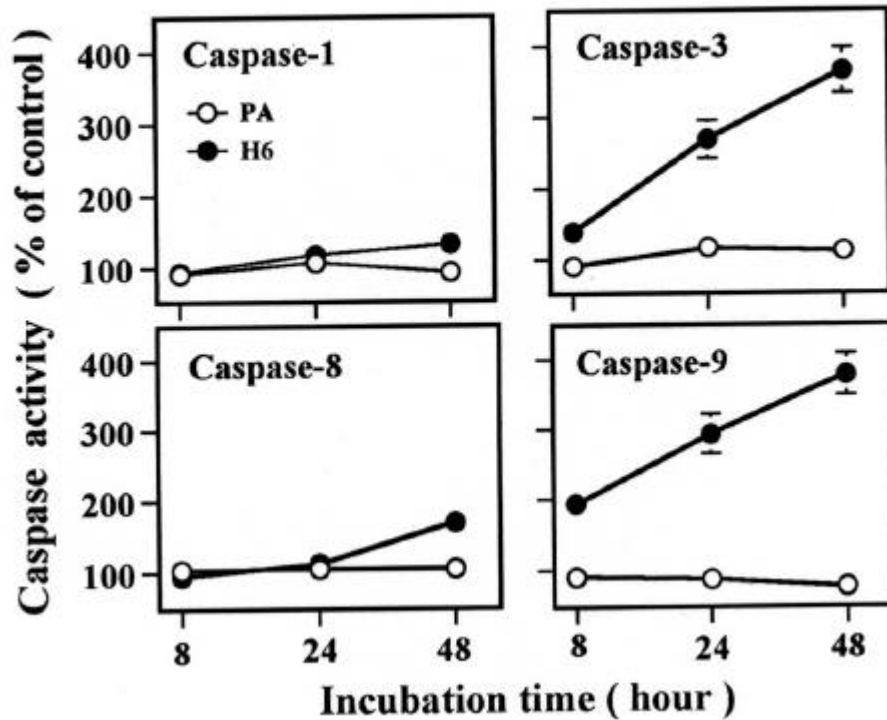
圖八、 Regulation of Bcl-2 family proteins by **H6**.

Cells were treated with vehicle or 2 mM **H6** for indicated time points. After treatment, whole cell protein extracts were prepared as described in Material and Methods. Equal amount of total proteins were resolved in SDS-polyacrylamide gels. Western blot analysis was performed using specific antibodies against Bcl-2 family proteins. Blots were re-probed for β -actin to normalize each lane for protein content.



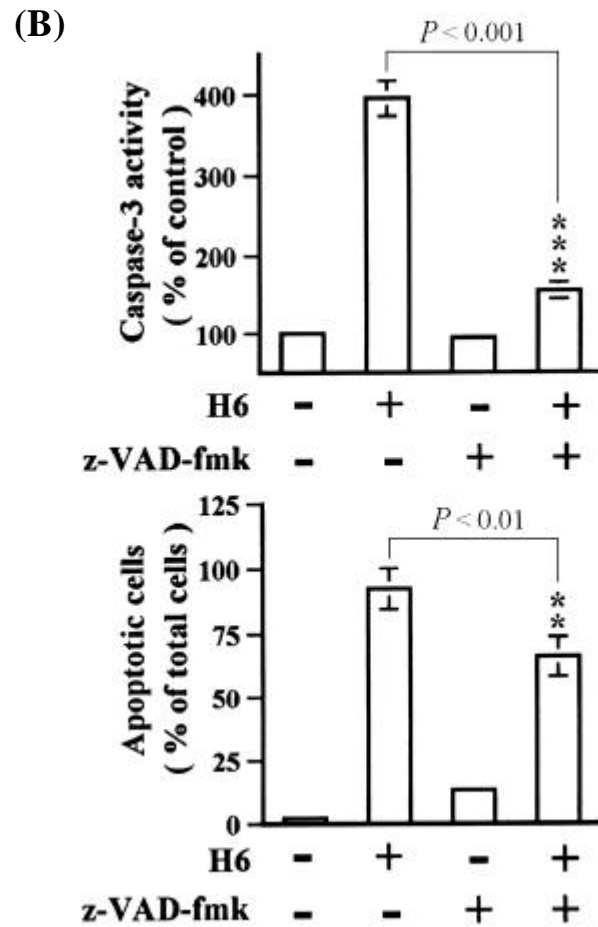
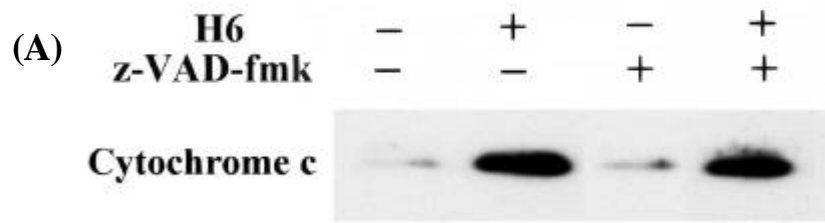
圖九、**H6** caused the cleavage of PARP and caspase-3 and accumulation of cytosolic cytochrome *c*.

CH27 cells were treated with **H6** (2 mM) for indicated time points (8, 24 and 48 h). After treatment, total proteins were extracted and were separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes, and then blotting using PARP and caspase-3 specific antibodies. For cytosolic cytochrome *c* analysis, the cytosolic fractions were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Western blot analysis was performed using specific antibody for cytochrome *c*.



圖十、Activation of caspases by **H6**.

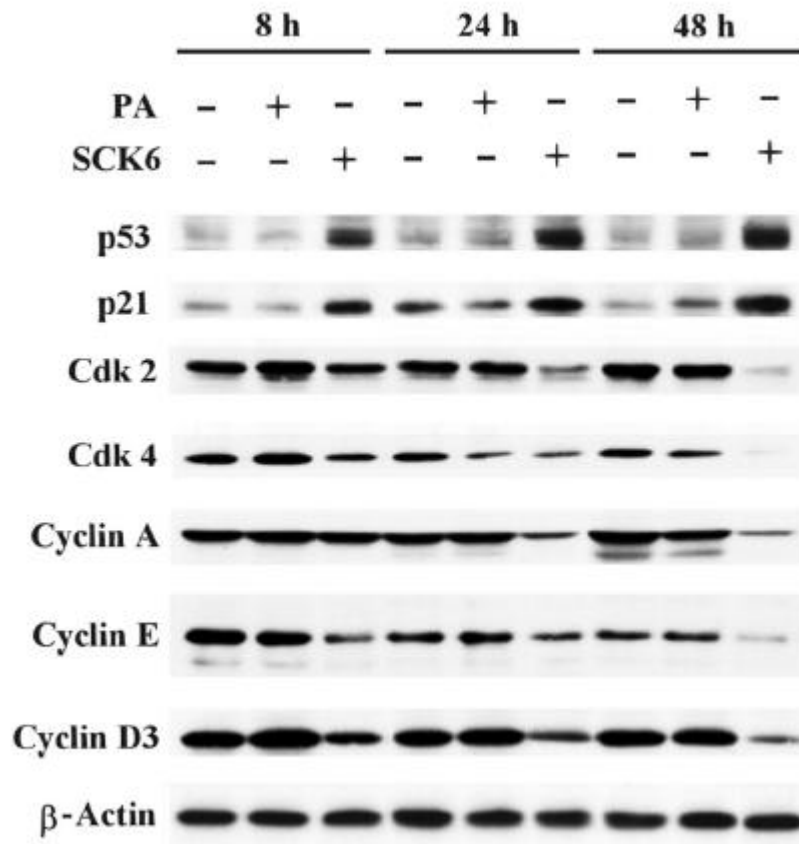
Cells were treated with **PA** and **H6** for different time periods or treated with 0.5% DMSO as vehicle control. Cell lysates were prepared and enzymatic activity of caspase-1-, caspase-3-, caspase-8- and caspase-9-like protease were determined by incubation of 20 μ g of total protein with fluorogenic substrates, Ac-YVAD-AMC, Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AMC and Ac-LEHD-AMC, respectively, for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. The release of AMC was monitored spectrofluometrically (excitation = 360 nm ; emission = 460 nm).



圖十一、 Effects of caspase inhibitor on **H6**-induced caspase activation, cytosolic cytochrome *c* accumulation and apoptosis. Cells were pretreated with the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk for 1 h, and then combined stimulated with **PA** or **H6**.

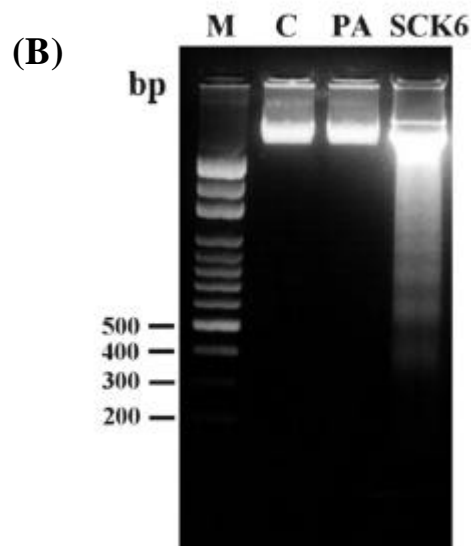
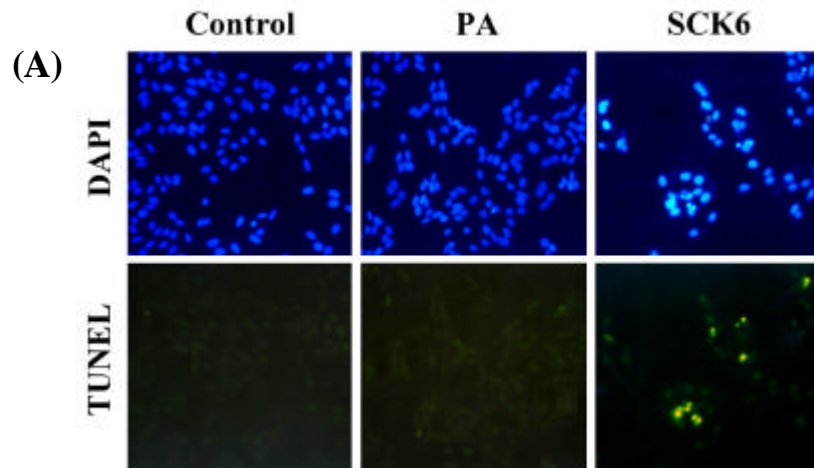
(A) Cytosolic cytochrome *c*.

(B) Caspase-3 activity, apoptotic cells were detected.



圖十二、 Expression of cell cycle regulatory proteins in **SCK6** treatment.

Cells were treated with vehicle or 1 mM **SCK6** for indicated time points. After treatment, whole cell protein extracts were prepared as described in Materials and Methods. Equal amount of total proteins were resolved in SDS-polyacrylamide gels. Western blot analysis was performed using specific antibodies against proteins. Blots were re-probed for β -Actin to normalize each lane for protein content.

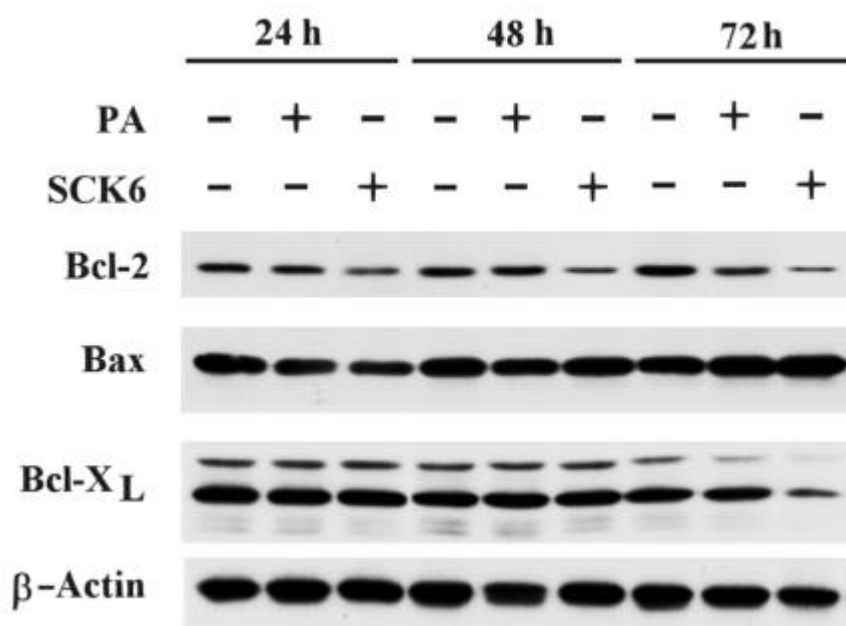


圖十三、 Induction of apoptosis by **SCK6**.

CH27 cells were treated with 0.25% DMSO as vehicle control or treated with 1 mM of **SCK6** for 3 days. Cells were harvested and washed with ice-cold PBS, followed by fixation in 2% paraformaldehyde/PBS for 30 min. Cells were permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS for another 30 min, and then washed with distilled water.

(A) Cells were treated with 1 μ g/ml DAPI, or TUNEL reaction mixture and stained cells were examined using a fluorescence microscopy.

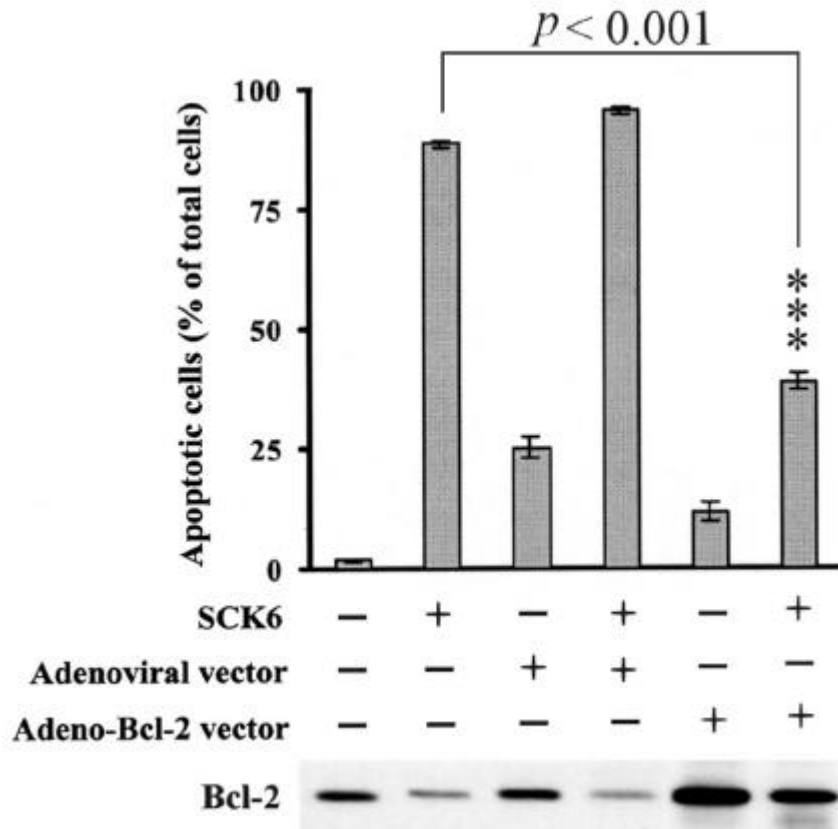
(B) DNA fragmentation. Cells were treated with phenylacetate and **SCK6** for 3 days. Cellular DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis.



圖十四 A、 Involvement of Bcl-2 in **SCK6**-induced apoptosis.

Western blot analysis of Bcl-2 family members.

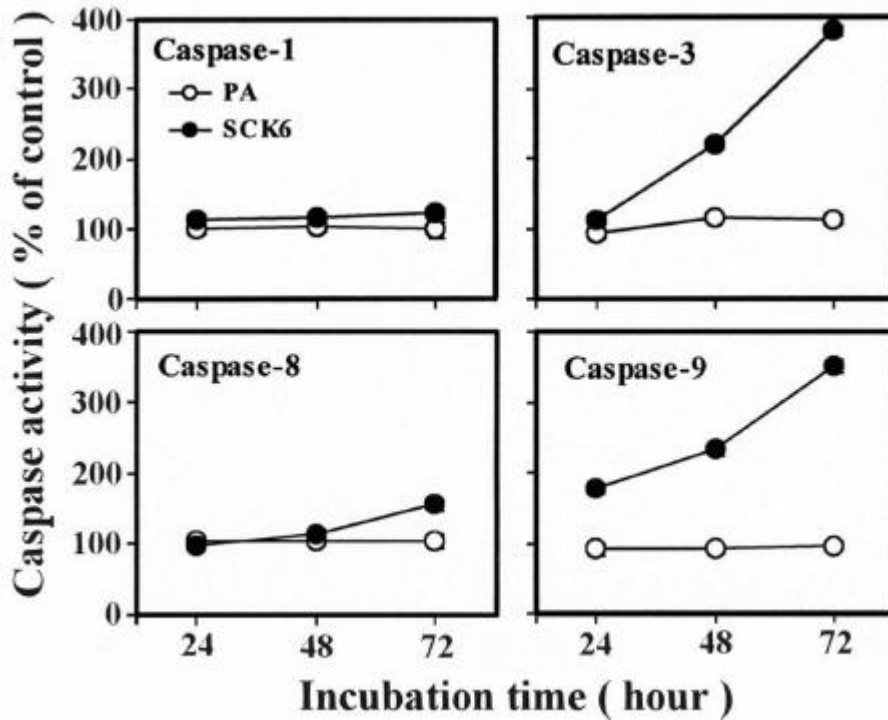
Cells were treated with vehicle or 1 mM **SCK6** for indicated time points. After treatment, whole cell protein extracts were prepared as described in Materials and Methods. Equal amount of total proteins were resolved in SDS-polyacrylamide gels. Western blot analysis was performed using specific antibodies against Bcl-2, Bcl-X_L and Bax proteins. Blots were re-probed for β-Actin to normalize each lane for protein content.



圖十四 B、Involvement of Bcl-2 in **SCK6**-induced apoptosis.

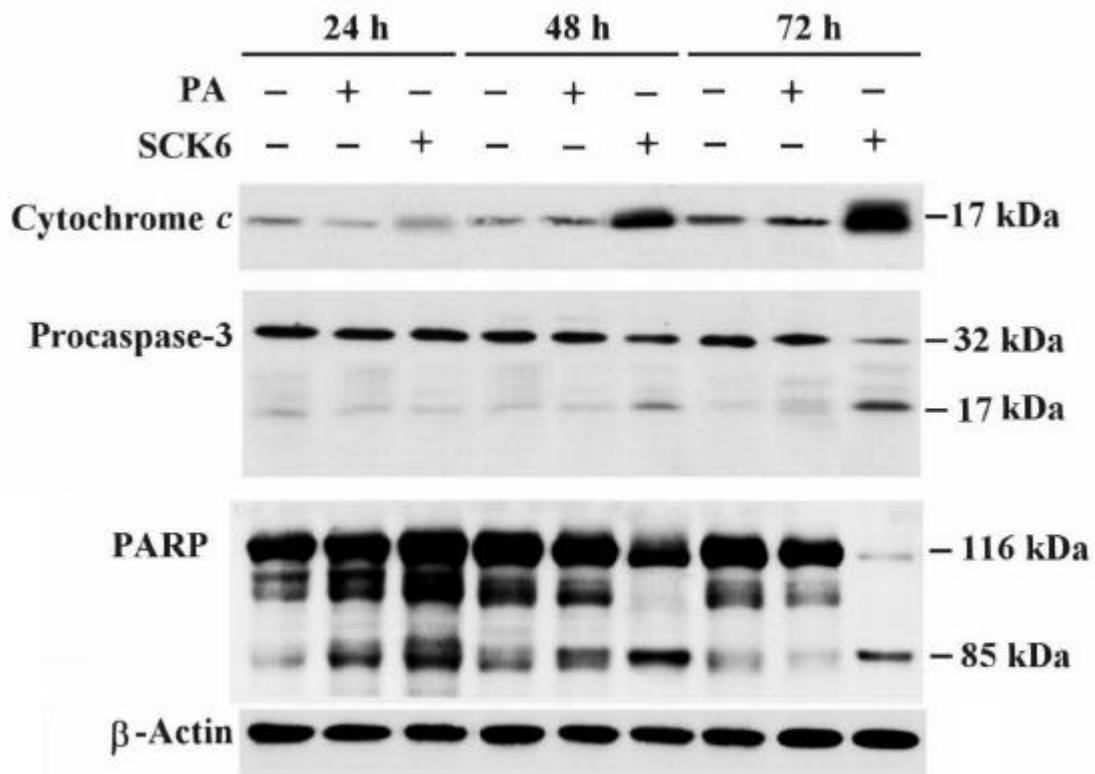
Inhibition of **SCK6**-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression.

CH27 cells was infected with control adenoviral vector or adeno-Bcl-2 vector for 4 h, and then treated with vehicle or 1 mM **SCK6** for another 72 h. After treatment, apoptotic cells were estimated using in situ TUNEL assay, and the cellular content were determined by Western blot assay.



圖十五 A、Involvement of caspase cascade in **SCK6**-induced apoptosis.
Activation of caspases by **SCK6**.

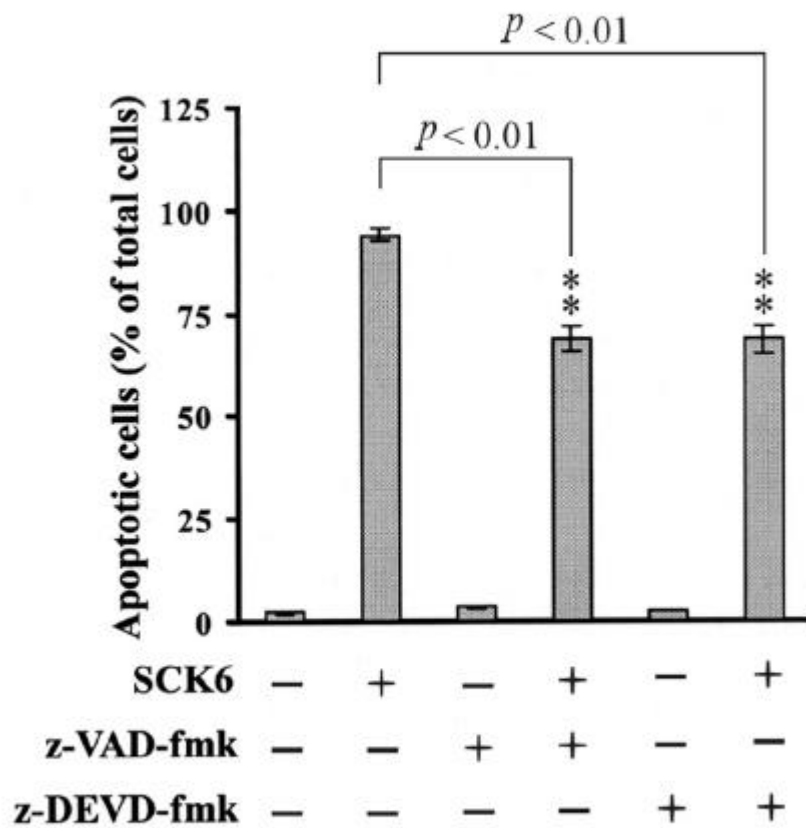
Cells were treated with phenylacetate and **SCK6** for different time periods or treated with 0.25% DMSO as vehicle control. Cell lysates were prepared and enzymatic activity of caspase-1, caspase-3-, caspase-8- and caspase-9-like proteases were determined by incubation of 200 μ g of total protein with fluorogenic substrates, Ac-YVAD-AMC, Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AMC and Ac-LEHD-AMC, respectively, for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. The release of AMC was monitored spectrofluometrically (excitation = 360 nm ; emission = 460 nm).



圖十五 B、Involvement of caspase cascade in **SCK6**-induced apoptosis.

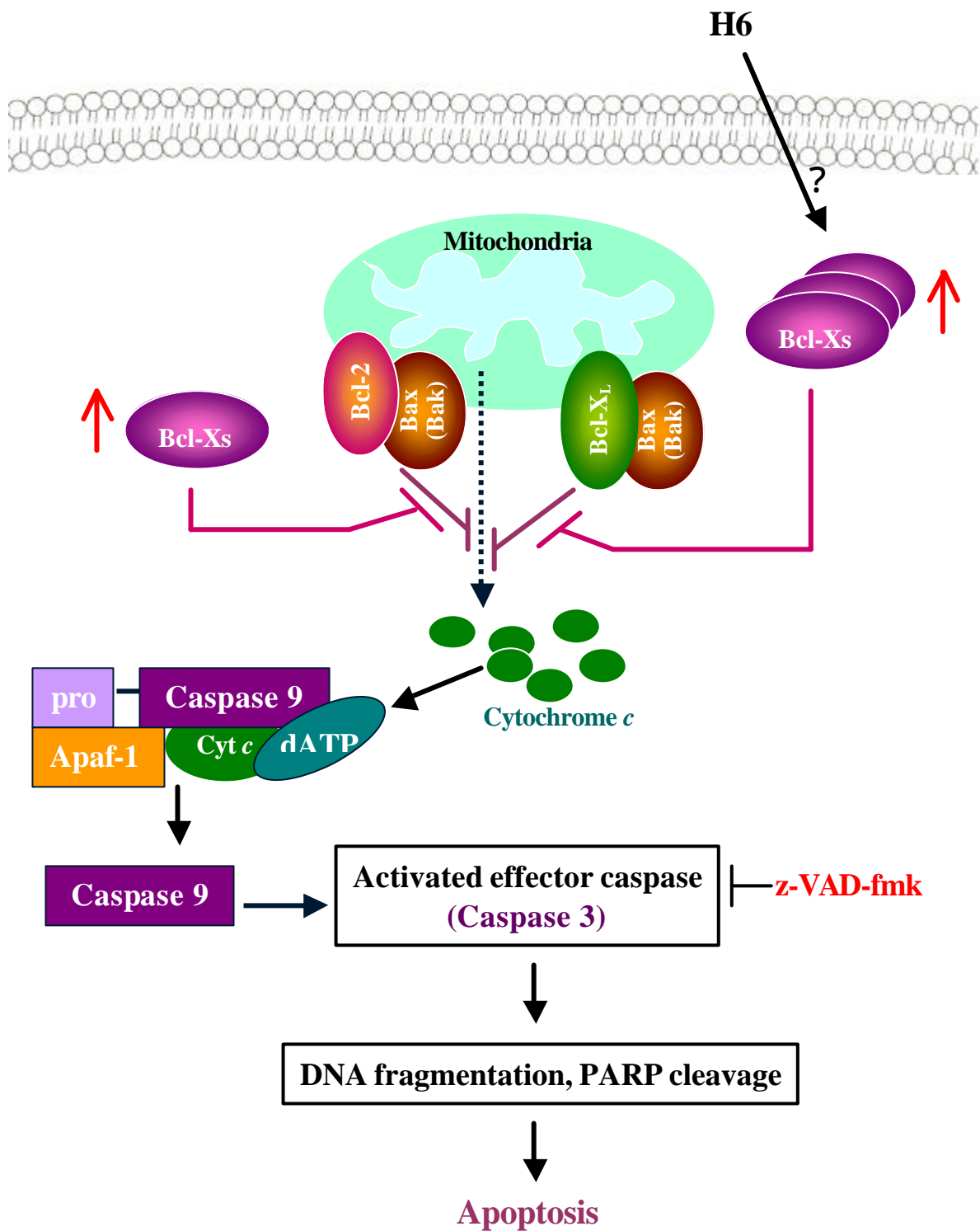
Determination of cytosolic cytochrome *c* and caspase-3.

The cytosolic cell lysates were analyzed by Western blot and used anti-cytochrome *c* and anti-caspase-3 specific antibodies.

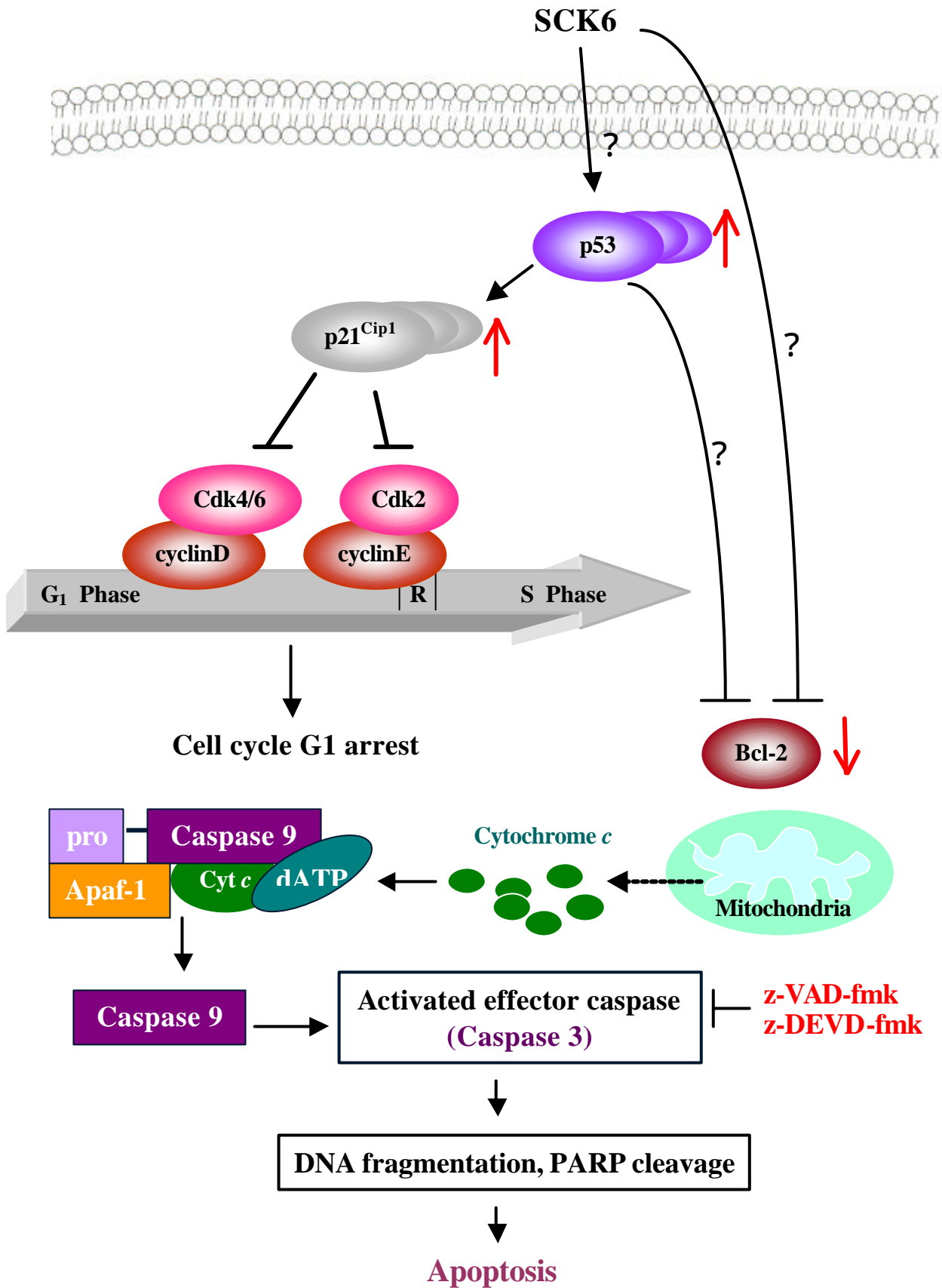


圖十五 C、Involvement of caspase cascade in **SCK6**-induced apoptosis.
Effects of caspase inhibitor on **SCK6**-induced apoptosis.

Cells were pretreated with the broad-spectrum caspase inhibitor zVAD-fmk for 1 h, and then combined stimulated with phenylacetate or **SCK6**. Apoptotic cells were determined by in situ TUNEL assay.



圖十六 A、 Possible mechanisms of H6-induced apoptosis via upregulation Bcl-Xs and activates caspase cascade in CH27 cells.



圖十六 B、 Possible mechanisms of SCK6-induced apoptosis via G1 cell cycle arrest, downregulation Bcl-2 and activates caspase cascade in CH27 cells.