

中國醫藥大學藥物化學研究所碩士論文

指導教授：郭盛助 教授

黃麗嬌 教授

共同指導教授：賴建銘 副教授

論文題目

3,6-取代-9-吡啶甲基咔唑類衍生物對於
HL-60 細胞分化作用之影響

Effect of 3,6-substituted 9-pyridylmethylcarbazole
derivatives on differentiation of HL-60 cells

研究生 馮鈞達

中華民國九十三年七月

目 錄

目 錄.....	I
圖 目 錄.....	III
表 目 錄.....	IV
中 文 摘 要.....	1
英 文 摘 要.....	2
第一章 緒論	
第一節 白血病(leukemia).....	3
第二節 細胞分化療法(cell differentiation therapy).....	8
第三節 細胞週期與癌症(cell cycle and cancer).....	10
第四節 細胞凋亡(apoptosis).....	17
第五節 合併療法(combination therapy).....	20
第六節 研究背景與動機.....	22
第二章 實驗材料與方法	
第一節 實驗材料與儀器.....	23
第二節 3,6-Substituted 9-pyridylmethylcarbazole 衍生物之加藥處 理.....	26
第三節 人類前骨髓性白血病細胞(HL-60 cells)的培養.....	26
第四節 HYL 系列衍生物對 HL-60 cells 增殖作用之影響.....	27
第五節 HYL 系列衍生物對 HL-60 cells 分化作用之影響.....	29
第六節 HYL 系列衍生物對 HL-60 cells 細胞週期(cell cycle)之影 響.....	32
第三章 實驗結果與討論	
第一節 HYL 系列衍生物對 HL-60 細胞增殖的影響.....	33
第二節 Acetyl 基團對 HL-60 細胞分化誘導及抑制增殖活性之影 響.....	35
第三節 合併使用 HYL-3b 與 ATRA 之誘導 HL-60 細胞分化活性 探討.....	37
第四節 HYL-3b 誘導 HL-60 細胞分化效果活性之初步機轉探討	39

第四章 結論.....42

參考文獻.....59

表 目 錄

Table 1. Antiproliferation of 3,6-substituted 9-pyridylmethylcarbazole derivatives on HL-60 cells.	44
Table 2. Effect of HYL derivatives on differentiation and proliferation on HL-60 cells compared with ATRA.	49
Table 3. Effect of HYL-3b combined with ATRA on differentiation and proliferation.	50
Table 4. Effect of HYL-3b on differentiation and proliferation.	51
Table 5. The cell cycle effect of HYL-3b	52

圖 目 錄

Figure 1. Review of cell cycle.	10
Figure 2. Illustration of the morphological features of apoptosis.	17
Figure 3. Anti-proliferation effect of HYL derivatives.	53
Figure 4. NBT-reduction effect of HYL-3b in time-dependent manner.	54
Figure 5. MTT-proliferation of HYL-3b in dose-dependent manner.	55
Figure 6. The morphology of control.	56
Figure 7. The morphological change of treatment with 10 μ M HYL-3b	57
Figure 8. The cell cycle effect of 10 μ M HYL-3b	58

中文摘要

為了尋找能夠有效誘導白血病細胞分化之化合物，著者篩選了一系列之 3,6-取代-9-吡啶甲基咪唑類衍生物以進行誘導細胞分化作用及抑制細胞增殖作用之活性測試。由實驗結果發現化合物 **HYL-3b** 單獨使用時之分化效果最為顯著，而併用全反式維甲酸之後的分化效果也有很好的效果。於是進一步以其對於細胞週期之影響來探討初步機轉。

HYL-3b 單獨使用之實驗結果發現細胞週期停留於 G_0/G_1 期-與全反式維甲酸相似。由此可知，**HYL-3b** 可望成為新一類型之急性前骨髓性白血病治療藥物。

Summary

In order to develop the novel leukemia cell differentiation agents, a series of 3,6-substituted 9-pyridylmethylcarbazole derivatives was been screened for their induced differentiation and growth inhibition activities of HL-60 cells. According to the results, when using compound **HYL-3b** along, it was the most effective to differentiation compared with the other compounds. And it is shown the great coefficient effect to differentiation when combined with all-*trans* retinoic acid (ATRA). Therefore, the further studies of action mechanism were carried out to evaluate its effects on the cell cycle of HL-60 cells.

When treatment of compound **HYL-3b** alone, it was found to affect the cell cycle as the same way of ATRA, which induced G₀/ G₁ phase arrest of HL-60 cells.

This finding suggests that compound **HYL-3b** maybe has great potential in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) either dose alone or together with ATRA.

第一章 緒論

本研究旨在探討3,6-substituted 9-pyridylmethylcarbazole衍生物對HL-60細胞的活性及作用機轉，內容涉及白血病、細胞分化、細胞週期以及細胞凋亡等。遂將上述各項加以敘述做為本論文之背景資料。

第一節 白血病(leukemia)

根據流行病學統計指出：自1986年以來，癌症一直都是國人十大死因之首，而在癌症死亡排行中，白血病排名第十一位。乍看之下白血病對於國人生命健康之威脅性似乎不高，但是就24歲以下青少年罹患癌症的統計而言，白血病的發病死亡人數卻是排名第一¹。

白血病(leukemia)，俗稱血癌，是一種造血組織的惡性疾病。由於製造血液的骨髓或淋巴腺發生突變，以致於所產生的血球屬於未成熟的幼稚型血球，這些無限增殖的血球，會佔據骨髓並且取代正常血球細胞的生成，最後造成身體組織的浸潤與器官功能失效²。當人體沒有正常的白血球，就會容易感染、發燒、冷顫甚至引發敗血症；沒有紅血球，就會貧血、面色蒼白、氣促、頭暈、頭痛及疲勞感；沒有血小板，就會止血不良、身體各處有紫斑出現、鼻出血、牙齦出血、

腦溢血或腸胃道排血現象，最後導致病患的死亡。這些白血病的臨床症狀會依照個別程度的不同會有不一樣的差異性³。

一般認為白血病的成因與遺傳、化學毒物(例如：苯)、過量輻射或病毒感染有關。而根據白血病發病情形可將白血病分類為急性(acute)與慢性(chronic)兩類；依其發病起源可分為骨髓性與淋巴性兩種。分別敘述如下：

(1)急性骨髓性白血病(acute myelogenous leukemia；AML)：一種體內不成熟的血球細胞數量過多所造成的癌症，好發於成年人及老年人。30歲以下的人，發病機率為十萬分之一，而30歲以上的人，發病機率則增高為萬分之一以上⁴。

傳統 FAB 分類又可將 AML 細分為 M1 到 M7 型⁵：

M1: 急性未成熟骨髓芽球性白血病(acute myeloblastic leukemia without maturation)

M2: 急性成熟骨髓芽球性白血病(acute myeloblastic leukemia with maturation)

M3: 急性前骨髓細胞性白血病(acute promyelocytic leukemia；APL)

M4: 急性骨髓單核球性白血病(acute myelomonocytic leukemia)

M5: 急性單核球性白血病(acute monocytic leukemia)

M6: 急性紅血球性白血病(acute erythroleukemia)

M7: 急性巨核細胞性白血病(acute megakaryocytic leukemia)

其中 M3 型(急性前骨髓性白血病；APL)算是比較特別的類型。

主要是因為 APL 病人的第 15 對染色體與帶有維甲酸受體 α 基因 (retinoic acid receptor- α gene) 的第 17 對染色體發生相互轉位 (translocation) 而造成其基因異常所致⁵⁻⁷。APL 之治療以傳統的化學治療為主，目前常用的療法有三種：(1) Anthracycline 及 Ara-C 各注射 3 日及 7 日即傳統之 7+3 療法⁹。(2) 高劑量的 Ara-C 加上 Anthracycline，完全緩解率可達 60~85 %。(3) 全反式維甲酸(all-trans retinoic acid；ATRA) 加上三氧化二砷(As_2O_3)之合併治療等...⁷。

(2)慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia；CML)：此病好發於老年人，發病的原因可能與過量的輻射線所造成的DNA受損有關。而近年來的文獻指出，染色體異常而導致*Bcr-Abl*融合蛋白質的出現與CML的產生有很重要的關係^{3,4}。CML的病患會出現貧血(臉色蒼白、疲倦感)或者脾臟腫大(腹部漲大、容易有飽足感或者腹部不舒服)等症狀；大多數的病患再檢查時大都處於"慢性"的階段，但是若不接受治療，病情往往會加速惡化⁴。目前常用於CML的治療方法，以核酸干擾素- α (interferon- α ；IFN- α)和其他藥物併用

(ATRA、busulfan或hydroxylurea)為主，其治療效果比單獨使用IFN- α 為佳³。而imatinib (STI-571)為最新CML之治療藥物，文獻指出STI-571是BCR-ABL專一性的tyrosine kinase inhibitor，能夠用於IFN- α 治療失敗的病人身上，於4週內能夠有98 %的緩解率⁹。

(3)急性淋巴性白血病(acute lymphocytic leukemia；ALL)：好發於1~5歲之小孩，為淋巴母細胞發生不明原因之成熟障礙，未成熟之淋巴細胞會浸潤骨髓、周邊血管、全身淋巴結及肝臟、脾臟等。目前治療ALL的藥物以vincristine¹⁰、L-asparaginase以及prednisolone為主²，治療方法需經過導引療法、鞏固療法及長達2~3年之維持療法，其緩解率高達80%以上¹¹。

(4)慢性淋巴性白血病(chronic lymphocytic leukemia；CLL)：其臨床診斷上最明顯的特徵為淋巴細胞的增多。發病年紀約為65歲，且男性發病的比例比女性高一倍¹²。

白血病與其他實體癌症最大的不同點在於患者無法藉由外科手術方式來移除或減少體內的癌細胞數量，必須藉由化學療法或放射線治療的方式來消滅癌細胞。然而細胞毒殺的療法不單只對於癌細胞有影響，對於正常細胞也會有一定程度的毒殺副作用(如掉髮、噁心、免疫功能衰退...等)，因而造成癌症病人生活品質的下降。更有甚者，

部分接受化學療法的病患會產生抗藥性而造成癌症再復發，最後死於更嚴重的併發症。因此，著手研發更有效及更具專一性的白血病治療藥物，將是未來抗癌研究的重點課題之一。

第二節 細胞分化療法(cell differentiation therapy)

人類的骨髓母細胞(myeloblast cell)具有兩種功能：(1)細胞增殖(cell proliferation)以維持人體正常運作所需的細胞數量，(2)細胞分化(cell differentiation)以生成具有功能性之特定成熟細胞。當細胞進行增殖之際，細胞分化功能就會暫時停止；反之亦然。這兩項功能必須保持平衡，否則就會造成病變。當細胞增殖的比率下降，細胞就會往分化的方向前進；若是細胞分化的功能受到影響而下降，那麼細胞就會不斷地增殖，進而造成癌症。

白血病是因為細胞分化功能受到抑制所致，故使其恢復正常之分化功能，將能用於白血病的治療。1986年，中國上海的王振義博士引用ATRA促使白血病細胞分化，成功地開發出細胞分化療法(cell differentiation therapy)¹³。ATRA屬於retinoids類衍生物，具有調節胚胎與哺乳類成熟細胞之成長和分化的作用。由於retinoids的作用是直接影響體內基因進行末端分化，因此能夠用來治療因遺傳性基因惡化所致的大多數腫瘤(如急性前骨髓性白血病、皮膚癌、以及頭部與頸部的腫瘤)¹⁴。

用ATRA治療獲得APL的緩解有以下幾項優點：具有75~90 %的高緩解率，能夠快速消除因骨髓發育不良所產生的凝血異常，故住院治療期間較短，較不需要輸血治療。除此之外，先用ATRA誘導分化達到緩解後再用化學療法治療，相對於使用傳統化療來緩解及癒後治療的病人來說，能夠有較長的存活率^{13, 15}。在臨床上也發現ATRA一些明顯的副作用。比較輕微的副作用有：皮膚脫皮(超過50 %以上的病人)、肌肉酸痛、頭痛、關節痛或骨頭痛(15~30 %)；而較嚴重副作用有：發燒、呼吸時疼痛、水腫、心包膜液滲出、骨頭疼痛、高血壓以及腎臟功能受損^{13, 15}。我們稱之為"維甲酸症候群" (retinoic acid syndrome ; RAS)。

再者，使用ATRA治療白血病的病患，經過一段的治療時間後，體內的cytochrom P-450會加速ATRA的代謝，造成病患體內ATRA的血中濃度不足¹³；或者用藥之後體內因應而生之PML-RAR- α 受體變多導致抗藥性的產生¹⁶，使得ATRA劑量提高以致產生RAS。

有鑑於單獨使用 ATRA 治療白血病不能完全有效地達到緩解且RAS副作用太大，故往後白血病治療藥物的開發目標在於找出能夠有效降低 ATRA 所需劑量、對人體正常細胞毒性較低、與相對提高 ATRA 誘導白血病細胞分化效果的化合物。

第三節 細胞週期與癌症(cell cycle and cancer)

所謂細胞週期(cell cycle)是指細胞從一次的有絲分裂結束到下一次有絲分裂結束所經歷的整個過程，不正常的細胞週期會導致細胞增殖失去控制，最終造成癌症的產生¹⁷。如 Fig. 1 所示，細胞週期可以區分為 G₀、G₁、S、G₂ 及 M 期。

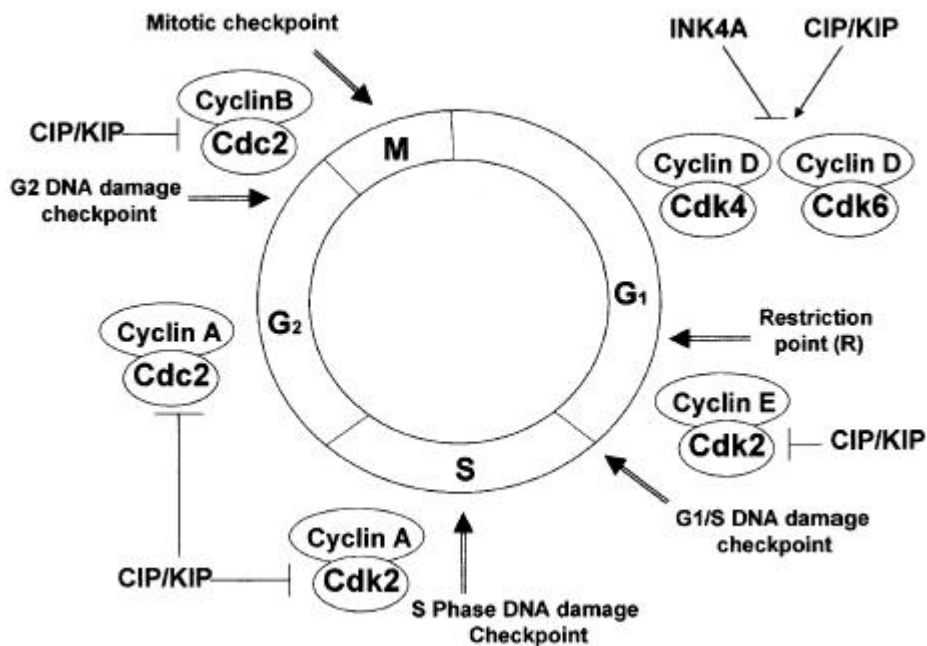


Fig. 1 Review of cell cycle.¹⁸

G₀ 期：又稱為休眠期。在這個時期，細胞不會進行分裂及增殖。大部分哺乳類動物之成熟細胞皆處於此時期。在這個時期的細胞可以藉由生長因子(如: mitogens)的加入，而重新進入細胞週期。

G₁期：又稱為 DNA 的合成前期，細胞在此時期的主要動作為合成進入 S 期所需要的蛋白質。在進入 S 期之前會檢查染色體(chromosome) DNA 是否完整，若有受到破壞，則需進行修補(repair)的工作。此時期約需要十到十二小時。細胞也可能由此脫離細胞週期進入不生長之休止狀態(G₀期)。

S (synthesis)期：當細胞進入 S 期後，會開始進行 DNA 的複製。使細胞擁有 2 套完整的 DNA，並且繼續合成接下來所需要的蛋白質。

G₂期：當細胞進入 G₂期約需要三到四小時，除了繼續生長及合成所需的蛋白質之外，細胞也會負責檢查染色體 DNA 的複製是否完整以準備進行有絲分裂。

M (mitosis)期：處於 M 期中的細胞會由一個母細胞變成兩個子細胞，已複製完整的染色體會各自分配到子細胞(daughter cells)內，使得子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，此時期只有一小時。之後子細胞再開始進入下一個細胞週期¹⁸⁻²⁰。

一般而言，細胞在細胞週期通過 S、G₂ 及 M 期所需要的時間是不變的；反之，細胞處於 G₁ 期的時間就比較具有變異性。細胞脫離細胞週期的狀態，稱之為 G₀ 期或靜止期，細胞處於 G₀ 期的時間可能很短暫也可能是永久地停留於此期，例如：已末端分化之成熟細胞。

細胞週期的失控，是癌細胞形成的主要原因。當正常細胞的DNA受到損傷時，為了維持其基因庫的完整性，細胞週期會停止運行。細胞週期的執行是依照不同之正向及負向調控因子所控制。在細胞週期進行的過程中，細胞會遇到一連串的檢查點(checkpoints)，其主要功能是為檢測細胞的DNA是否有受損，以避免細胞在進入S期或M期時產生錯誤的訊息或配對。一旦細胞通過檢查點之後，前一個時期的狀態就會結束，而向下一個時期前進。若檢查點失去功能，細胞會誤配(mismatch)錯誤的鹼基對(base pair)，導致細胞基因庫的不穩定、DNA的損傷堆積、使得分裂出來的子細胞發生突變，造成無法停止的細胞增殖，最後導致癌症的生成。由於檢查點的異常會使癌細胞對於化學治療的敏感度下降，因此，針對檢查點訊息傳遞方面的探討，也是癌症臨床研究的重要目標之一^{21, 22}。

細胞週期主要是依靠cyclin-dependent kinases (CDKs)的活化而運行。科學家發現：從真菌、植物到哺乳類動物之真核細胞生物的演化過程中，CDKs皆被完整的保存下來，故推測CDKs之功能對於細胞週期的運行非常重要²¹。

CDKs的活化需要相對應之cyclins與之形成複合體來執行正向的調節。cyclins在細胞週期中的濃度會隨著各個不同的階段而有濃度上的起伏變化。舉例來說，cyclin E在G1晚期與S期中被合成，cyclin A在S期與G2期中被合成，而cyclin B則是在G2期與M期被合成出來。因此，除非有適當配對的cyclin生成，否則特定的CDK就無法被活化。藉由cyclins與CDKs所形成的蛋白質複合體的刺激與活化，細胞週期才能順利運行²¹⁻²⁴。然而，有許多的癌症跟cyclin D、cyclin E的過度表現有關，如：乳癌、皮膚癌、子宮頸癌、淋巴癌、神經膠質瘤…等²⁵⁻²⁷。

細胞週期除了受到CDKs/ cyclins活化之正向調節之外，亦會受到CKIs (CDK inhibitors)之負向調節。目前已發現兩個CKI家族，分別為：(1) Cip/ Kip家族，由p21^{Cip1/Waf}，p27^{Kip1}以及p57^{Kip2}所組成。這些蛋白質皆具有能夠與CDK進行交互作用之相同N端區域，能夠與所有的CDKs/ cyclins複合體作用²⁸。(2) Ink4家族，由p15^{Ink4b}，p16^{Ink4a}，p18^{Ink4c}以及p19^{Ink4d}所組成。這些蛋白質包含了四組ankyrin重複串聯的區域，只能與cyclin D相關的CDK(例如：CDK4以及CDK6)作用^{25, 28-29}。當CKIs活化時，會使CDKs/ cyclins複合體活性受到抑制，而使細胞週期停滯^{30, 38}。

癌症的生成除了與CDKs/ cyclins、CKI的活性有關之外，還會受到其它因子，例如腫瘤抑制因子(tumor suppressor genes)與致癌因子(oncogens)之調控。腫瘤抑制因子是細胞週期運行時最有力的影響者；其中有些是當細胞受到損傷的時候才會產生作用的外在因子。其中，最為人們所熟知的，也是在癌症方面最重要的兩個因子，就是視網膜母細胞瘤(retinoblastoma；Rb)蛋白質以及轉錄因子(transcription factor) p53²¹。

Rb

視網膜母細胞瘤是因為人類第13對染色體上的Rb基因發生突變所造成的幼年性的眼睛癌症。Rb的主要功能在於校正細胞週期之轉錄機制(屬於內在型的機轉)。Rb蛋白質(pRb)是與所謂的E2F蛋白質進行反應。在G₁初期，pRb處於低磷酸化的狀態並且會與E2F(細胞核內轉錄因子，與S期細胞複製有關)緊密地結合以抑制E2F轉錄基因活性表現³¹。當細胞要通過位於G₁晚期限制點的時候，pRb與Cdk結合的位置會被磷酸化，使pRb失去了與Cdk結合的能力，最後使E2F得以進入S期發生轉錄作用^{18, 32}。

所謂的Rb突變，就是指Rb一直處於磷酸化狀態，而無法與E2F結合，因此造成無法控制的細胞分裂，也就成為了致癌的原因之一。文獻指出：停止在G₀期的正常細胞，如果突然失去Rb的活性會導致細胞重新進入細胞週期，這可能會造成癌細胞的起始期或進展期起動的重要原因³³。所以Rb的突變或失效也就直接跟癌症的發生有關²¹。

p53

在細胞週期中，另一個重要的蛋白質就是 p53。p53 是屬於外在因子的機制，當 p53 偵測到 DNA 的損傷時，p53 會被活化而是使細胞停止生長(直到損傷被修復)，或者藉由促使細胞凋亡來消滅 DNA 受損的細胞(避免無法控制的細胞生長以及形成癌症)^{34,35}。根據統計，超過 50 % 以上的人類癌症，都與 p53 的突變有關，包括：膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、直腸癌、肺癌、肝癌、前列腺癌以及皮膚癌。而與 p53 相關的癌症通常皆有很高的致死率³⁶。

由上述可知，當細胞受到外在刺激而使DNA受損時，其細胞週期會停止在某一種特定的時期，待受損的DNA修復之後才會繼續細胞週期的運行。所以在癌症治療方面，有許多的治療方法都是藉由促使抑制細胞週期運行而讓癌細胞停止增殖以達到抗癌的目的。正常之人類白血球細胞，其細胞週期會進入G₀期，而行末端分化生成具有吞噬功能之成熟細胞(如：單核球、顆粒球)。白血病之成因則是其細胞週

期失控，而生成過多之未成熟的白血球，故使用細胞分化劑(如：ATRA)促使其細胞週期進入G₀期³⁷，則能夠生成具正常吞噬功能之白血球細胞。

第四節 細胞凋亡(apoptosis)

在胚胎的發育過程與器官成熟的生理發展中，細胞凋亡扮演著很重要的角色³⁹。人體如果缺乏正常性細胞凋亡機制，會使得細胞一直增殖、堆積，進而造成癌症的生成。故了解初步的凋亡機制，將有助於開發抗癌藥物。

藉由光學或電子顯微鏡的觀察，細胞凋亡的形態特徵有：染色質凝聚、細胞核裂解、細胞質空泡化以及細胞皺縮。最後細胞碎裂形成具有細胞膜包覆的碎片，我們稱之為"凋亡小體"(apoptotic bodies)。凋亡小體內含有細胞的部分胞器與核內的碎裂物，會被鄰近的細胞以胞飲作用清除，不會引起發炎反應 (如 Fig. 2 所示)³⁹⁻⁴¹。

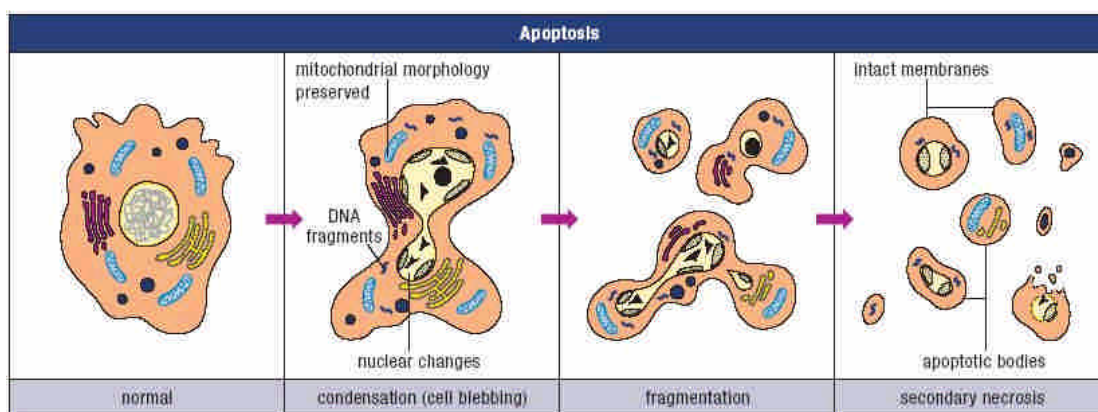


Fig 2. Illustration of the morphological features of apoptosis⁴².

● 細胞凋亡的分子機制

在體內促進細胞凋亡(proapoptotic)與抑制細胞凋亡(antiapoptotic)分子的交互作用是很複雜的。簡略來說，細胞凋亡機制可分為外在途徑與內在途徑。

(1) 外在途徑：

外在途徑是指由受體所傳導的凋亡途徑。主要是由 TNF 家族(包括：Fas (CD95)、DR4 (Trail-R1)、TNFR1 以及 TNFR2)所進行傳遞之一連串死亡訊號導致細胞凋亡⁴³。

(2) 內在途徑：

內在途徑是藉由粒腺體所傳導的caspase活化途徑。在外在刺激(如：氧化傷害、放射線、化學治療...等)存在的情況下，粒腺體會釋放cytochrome c進入細胞質內啟動細胞凋亡反應。Cytochrome c平常存在於粒腺體的內膜與外膜中，當有促細胞凋亡的刺激發生時，cytochrome c就會釋放到細胞質內。如：Ara-C能夠誘導cytochrome c的釋放及caspase-9之活化，而達到細胞凋亡的作用⁴¹。

(3) Caspase：

Caspases是一群cysteine proteases，對於啟動與執行細胞凋亡反應扮演很重要的角色。哺乳類細胞中已發現14種caspase家族，依據其結

構與功能分為兩大類：(1) Initiator caspases，如；caspase-8與caspase-9，含有一段較長且具有功能的重要prodomain(在活化時會被切斷)，屬於上游調節者。(2) Effector caspases，如：caspases-3,-6與-7，其特色是具有一個較短的prodomain，在細胞凋亡反應中扮演下游調節角色⁴³。

而粒腺體所傳導之細胞凋亡路徑也會受到Bcl-2家族的影響，目前已發現18種Bcl-2家族，依其功能可分為抗細胞凋亡(如：Bcl-2與Bcl-xL)以及促細胞凋亡(如：Bad, Bak和Bax)兩大類⁴³。當抗細胞凋亡蛋白質(如：Bcl-2)過度表現時會導致與Bax/ Bak結合，形成沒有細胞凋亡活性的異二聚體進而抑制細胞凋亡反應。而文獻指出Bcl-2之過度表現也與癌症治療方法產生多重抗藥性(multi-drug resistance)有關。因此有效地抑制Bcl-2的表現也成為現在癌症治療方法的目標之一⁴¹。

第五節 合併療法(combination therapy)

傳統之化學療法與放射線療法，因為缺乏選擇性，會對正常細胞造成嚴重的副作用，例如：骨髓抑制、噁心、嘔吐、掉髮、免疫功能降低…等。故在臨床上逐漸發展出合併療法，利用不同屬性之抗癌藥物合併使用，以達到更好的療效或使嚴重的副作用降到最低。

臨床上使用合併療法來治療白血病的例子很多，例如：對於 ATRA 有抗藥性的 APL 病患，在使用 ATRA 併用其他化學療法或放射線療法一起治療之後，有 90 % 的病人能夠達到完全緩解⁴⁴。另一方面，臨床上也有人使用三氧化二砷(arsenic trioxide；As₂O₃)合併使用 ATRA 來治療對於 ATRA 具有抗藥性或者因為使用 ATRA 治療白血病後復發的病患。文獻指出，在 15 名 APL 復發的病患中，經過使用三氧化二砷治療之後，有 14 名病患能夠達到緩解⁷；原因是三氧化二砷能夠造成並且加強白血病細胞走向細胞凋亡的途徑¹³。如果使用 ATRA 復發而改用三氧化二砷治療後卻又再度復發者，其改用 gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)治療後的，緩解率亦可達到 88 %¹⁵。

CML 的治療方面也有臨床試驗證實：busulfan 合併使用口服劑型 ATRA (50000 IU/ 天)之平均存活月數比單獨使用 busulfan 的病患多活了 8 個月，雖然在統計學上的意義不大，但對於臨床研究方面卻是有意義上的差別⁴。

更重要的是，合併使用 dexamethasone 也能夠有效地改善因為 ATRA 所引發的 RAS，因此，合併療法似乎是不錯的選擇⁴⁵。

由此可知，合併療法的優點有：增加藥物的活性、降低所使用藥物的濃度，以減少毒性的產生、治療後嚴重副作用的減少，而讓患者的存活率大為增加。故合併療法將是未來癌症治療的主流方向之一。

第六節 研究背景與動機

Carbazole 最早是在 1872 年被 Graebe 與 Glazer 在瀝青中所分離出來的成分。2002 年，Knolker 在文獻中提及由 Chakraborty 等人自 murrayanine 中分離出該成分並發現其具有抗菌活性⁴⁶。

而文獻上也陸陸續續發現 carbazole 類衍生物具有很多重要的藥理活性，包括抗腫瘤、抗微生物、抗黴菌、抗 HIV 病毒、抗氧化及神經保護的作用...等⁴⁷⁻⁴⁹。

後來，自本所博士班李春燕學姊之論文中發現，carbazole 類衍生物對 leukemia cell lines (HL-60, U937, K562) 皆具有促使細胞凋亡之活性⁵⁰。故延續 carbazole 類化合物對於抗白血病細胞活性之研究，篩選一系列 3,6-Substituted 9-pyridylmethylcarbazole 之衍生物，以期開發出更具活性之化合物。

第二章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料與儀器

(一) 藥品

1. 3,6-Substituted 9-pyridinylmethylcarbazole derivatives (本所碩士班黃雅玲同學所合成)
2. 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)
 - Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
 - Trypan blue solution, 0.4 %
 - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
 - Nitroblue tetrazolium (NBT)
3. 購自 BIOWEST (France)
 - RPMI 1640 culture medium
4. 購自 Gibco laboratories (Grand Island, NY)
 - Antibiotics (Penicillin, Streptomycin)
 - Fetal bovine serum (FBS)
 - L-Glutamine
 - 10 × Dulbecco's Hanks balanced salt solution (HBSS)
5. 購自默克公司 (Germany)
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 - 99.5 % Ethanol

(二)溶液的配置

- NBT solution

秤取 NBT 粉末 20 mg，溶於 20 mL HBSS 中，旋拌均勻後，再加入 PMA 100 μ g。

- MTT solution

秤取 MTT 粉末 100 mg，溶於 20 mL 去離子水中，使其最後濃度為 5 mg/ mL。

(三)實驗儀器

- 流式細胞儀 (Becton Dickinson, Flow Cytometry)
- 垂直式無菌操作檯 (NUAIRE, Class II type A/ B3)
- 直立式光學顯微鏡 (Olympus, CH-20)
- 倒立式光學顯微鏡 (Nikon Ellipse, TE300)
- 高速離心機 (Hettich, universal 32 R)
- 可控溫式二氧化碳培養箱 (NUAIRE, Air-Jacketed DH Autoflow Automatic CO₂ Incubator)
- 控溫培養箱 (TKS, Incubator LT1600)
- 血球計數盤 (SUPERIOR, Hemocytometer)
- 酵素免疫分析儀 (Anthos Labtec Instruments, 2001)

(四)細胞株(HL-60 cell line)

- 人類前骨髓性白血病 (細胞 Human promyelocytic leukemia cells) , 屬懸浮性細胞 , 可用 RPMI-1640 culture medium 培養之 ; 來自於美國 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

第二節 3,6-Substituted 9-pyridylmethylcarbazole 衍生物 之加藥處理

將一系列共 26 種 3,6-substituted 9-pyridylmethylcarbazole (HYL) 衍生物以 DMSO 溶解，並將其儲存於 -20 °C 冰箱內，待加藥時再解凍之。加藥時，DMSO 的濃度需控制在 0.1 % 以下，以避免 DMSO 本身對於 HL-60 cells 的影響。

第三節 人類前骨髓性白血病細胞(HL-60 cells)的培養

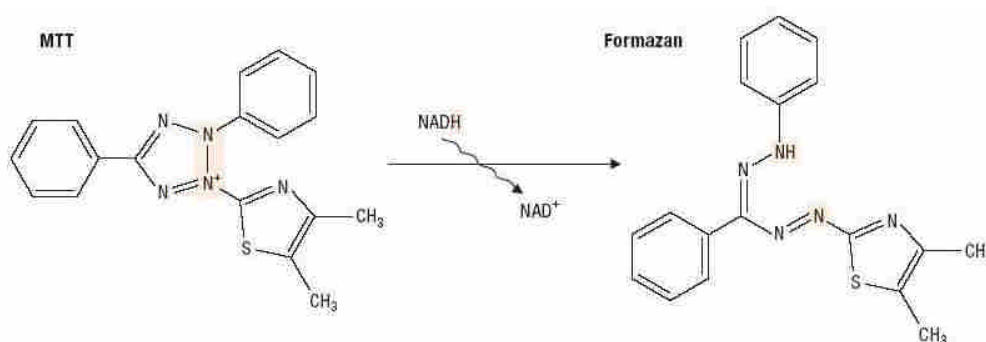
HL-60 cells 培養在溫度 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養箱中。並用含有 10 % 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1 % *L*-glutamine、100 units/ mL penicillin 和 100 µg/ mL streptomycin 的培養基(RPMI-1640 medium)培養之。期間不定期以 0.4 % 錐藍染劑(trypan blue)染色，於顯微鏡下使用血球計數盤計數之，以控制細胞密度維持在 1~2 × 10⁵/ mL 之間；並確定其存活率大於 95 % 以上。於每次不同實驗進行之前，細胞至少先培養 2~8 天，以維持細胞生長之穩定度⁵¹。

第四節 HYL 系列衍生物對 HL-60 cells 增殖作用之影響

將 HL-60 cells (1.0×10^5 / mL) 培養於 24-well 之培養皿中使最後總體積為 1 mL/ well；並加入各種不同濃度之 HYL 衍生物後，於 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養箱中，培養固定時間之後，分別取出作 MTT-proliferation assay 實驗。

● MTT-proliferation assay 原理：

MTT assay 是一種應用於分析細胞增生(cell proliferation)和細胞毒性(cytotoxicity)之分析方法。分析方法是利用檢測活細胞之粒腺體內的酵素琥珀酸鹽去氫酶(succinate dehydrogenase)活性來測定細胞的存活狀態，進而得知相對的活細胞比例。活細胞內的琥珀酸鹽去氫酶可與 MTT 發生氧化還原作用，而使 MTT 由淡黃色還原成紫色結晶狀之 formazan，其反應式如下⁴²：



首先從每 well 取出 850 μL 細胞液，離心後去除上清液，再加入 400 μL 之 HBSS 清洗細胞，再次離心以徹底清除殘餘之培養基，再次去除上清液，最後加入 400 μL 之 HBSS 並且震盪均勻後，取 50 μL 細胞液置入 96-well plate 中，加入 10 μL MTT solution 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱中培養 4 小時。取出後加入 DMSO (150 μL / well) 溶解 formazan 鹽類，並以 ELISA reader 於波長 570 nm 條件下測得 OD_{570} 值。

$$\text{Proliferation (\%)} = \text{Sample } \text{OD}_{570} / \text{Cont. } \text{OD}_{570} \times 100 \%$$

第五節 HYL 系列衍生物對 HL-60 cells 分化作用之影響

● NBT Reduction Assay

HL-60 cells (1.0×10^5 /mL) 培養於 24-well 之培養皿使最後 1 mL /well；並分別加入各種 HYL 衍生物於 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養箱中，培養固定時間之後，分別取出做 NBT reduction assay 實驗。

硝基藍四氮唑(nitroblue tetrazolium; NBT)溶液做為誘導細胞分化活性測試之原理在於白血病細胞若分化成熟時可恢復其吞噬功能，而細胞內酵素活性也會大量增加並釋放出超氧化物(如: superoxide)以防禦外來物質的侵犯。於是我們利用其還原能力將 NBT 還原成藍黑色的 formazan 鹽類沉著於細胞內。並於顯微鏡鏡檢 200 個左右的細胞，計算其呈藍黑色細胞相對於總數所佔百分比即為誘導分化的比例。

首先將每 well 中取出 850 μ L 細胞液離心(1200 r.p.m., 5 min)後去除上清液；再用 400 μ L HBSS 洗之，接著再次離心(1200 r.p.m., 5 min)去除上清液。然後加入 50 μ L NBT solution，於溫度 37 °C 的培養箱中培養 30 分鐘；取出後至於冰上，在顯微鏡下以細胞計數盤計數其分化細胞比率。

Differentiation (%) =

細胞質呈紫黑色的細胞總數 / 全部的細胞總數 × 100 %

● 細胞形態之分析(Morphology)：

(1) 細胞形態攝影：將 HL-60 cells (1.0×10^5 / mL)培養於 24-well 培養皿內，使最後體積為 1 mL/ well。每 well 中加入 1 μ L 之各種不同濃度 HYL 衍生物。於 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養箱中，培養固定時間之後，在倒立式顯微鏡下觀察細胞形態的改變並攝影之。

(2) 細胞抹片分析：將 HL-60 cells (1.0×10^5 / mL)密度培養於 24-well 之培養皿使最後 1 mL/ well；並分別加入各種 HYL 衍生物於 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養箱中，培養固定時間之後，分別取出作形態變化之觀察。

首先自每 well 中取出 850 μ L 細胞液離心(1000 r.p.m., 5 min)後去除上清液；再以 400 μ L HBSS 洗之，接著再次離心(1000 r.p.m., 5 min)去除上清液。然後取 5 μ L 細胞液滴至蓋玻片中心待製作細胞抹片，並於室溫下待細胞抹片完全乾燥後準備染色。在已乾燥的細胞抹片上

先滴入 200 μL Liu A solution 反應 10 秒鐘，接著再加入 400 μL Liu B solution 與 Liu A solution 充分混合反應 20 秒鐘；直到液面呈現金屬光澤，即可用大量之蒸餾水將染劑沖去。將細胞抹片於室溫下蔭乾再用封片油(cytoseal)將染色完成之抹片固定於載玻片上；最後於顯微鏡下觀察並攝影之。

第六節 HYL 系列衍生物對 HL-60 cells 細胞週期(cell cycle) 之影響

將 HL-60 cells (1.0×10^5 / mL) 培養於 24-well 之培養皿使最後 1 mL / well; 並分別加入各種 HYL 衍生物於 37 °C、溼度 95 %、5 % CO₂ 之培養箱中，培養固定時間之後，分別取出做細胞週期分析。

首先將每 well 中取出 850 μ L 細胞液離心(1200 r.p.m., 5 min)後去除上清液；再用 400 μ L PBS 洗之，再次離心(1200 r.p.m., 5 min)去除上清液。將細胞團塊彈散後，再慢慢加入 70 % EtOH 固定之；置於 -20 °C 冰箱中 overnight。第二天取出離心(1200 r.p.m., 5 min)去除上清液；再用 200 μ L PBS 洗之，再次離心(1200 r.p.m., 5 min)去除上清液；加入 cell cycle reaction stain solution 於暗室中反應 30 分鐘。最後以流式細胞儀(FACscan)收集細胞並分析之；細胞週期之統計則利用 ModFit 軟體處理。

第三章 實驗結果與討論

第一節 HYL 系列衍生物對 HL-60 細胞增殖的影響

將一系列 3,6-substituted 9-pyridylmethylcarbazole (HYL) 衍生物分別加至含培養基的之 HL-60 細胞中培養 48 小時後取出以錐藍(trypsin blue)染劑染色，於顯微鏡下計數測試其細胞存活率(cell viability)。當細胞因加藥處理死亡時，細胞膜會破裂而使染劑進入細胞內讓死亡之細胞呈現藍色；而正常存活的細胞則因細胞膜完整，將染劑阻擋在外，故呈現透明無色。HL-60 細胞經 HYL 系列化合物處理 48 小時之後，呈現藍色之細胞數並未超過其總量的 10% 以上，由此可知 HYL 系列化合物所致的細胞數量減少，並非因為細胞毒殺性(cytotoxicity)而造成，故排除其具有劇毒性的疑慮。

接著再以 MTT-proliferation assay 來檢測 HYL 系列化合物對 HL-60 細胞增殖的影響。因為 MTT 染劑可穿透活細胞的細胞膜被粒腺體上的琥珀酸鹽去氫酶還原成藍黑色 formazan，再利用 DMSO 將 formazan 溶解釋出，於 570 nm 下測量吸光值的多寡以推算其對於抑制細胞增殖的百分比例。結果如 Table 1. 以及 Fig. 3. 所示

在一系列 carbazole 衍生物中，*N* 上未有取代基之化合物，即 **HYL-1a** 及 **HYL-1d**，並沒有顯著抑制 HL-60 細胞增殖的活性。*N*-substituted 衍生物之活性明顯比 *N*-unsubstituted 衍生物強。其中以 **HYL-5** 的抑制 HL-60 細胞增殖活性較好，其 IC₅₀ 為 16.8 μM。3-acetyl 9-pyridylmethylcarbazole 衍生物(**HYL-2b**、**HYL-3b**、**HYL-4b**、**HYL-5b**、**HYL-6b**)中則以 3-acetyl-9-(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methylcarbazole (**HYL-5b**)的抑制 HL-60 細胞增殖活性較強，其 IC₅₀ 為 8.0 μM。3,6-Diacetyl 衍生物(**HYL-2c**、**HYL-3c**、**HYL-4c**、**HYL-5c**、**HYL-6c**)的溶解度皆不佳，且其 IC₅₀ 皆大於最高可溶濃度。Hydroxycarbazole 衍生物(**HYL-7**、**HYL-8**、**HYL-9**)中以 **HYL-9** 對 HL-60 細胞增殖之抑制活性最好(IC₅₀ 為 5.7 μM)，是全系列中最具抑制增殖活性的化合物。

除此之外，也發現加藥處理 48 小時後，3-acetyl 9-pyridylmethylcarbazole 衍生物(如：**HYL-2b**、**HYL-3b**、**HYL-4b**、**HYL-5b**)會使細胞發生形態變化(細胞變狹長形且較貼附於培養皿底部)，推測這類化合物可能具有促使 HL-60 細胞分化的能力。因此，也針對此系列的化合物進行誘導分化的活性測試(NBT assay)。

第二節 Acetyl基團對HL-60細胞分化誘導及抑制增殖活性之影響

首先比較 **HYL-2**、**HYL-3**、**HYL-4**、**HYL-5** 與 **HYL-2b**、**HYL-3b**、**HYL-4b**、**HYL-5b** 於加藥處理 48 小時之後的細胞分化效果(ATRA 為 positive control)，結果如 Table 2. 所示：分別加入 10 nM、20 nM、50 nM 與 100 nM ATRA 處理 48 小時之後，可明顯地觀察到其分化效果，其數據分別為：4.1 %、10.9 %、19.0 % 以及 23.7 %。**HYL-2** 與 **HYL-2b** 做比較，發現 **HYL-2** 沒有分化作用，但 **HYL-2b** 具分化效果，在 10 μ M 下，分化百分比達 20.4 %，然而，濃度若提高至 40 μ M，則會因為細胞增值能力受到高度抑制(只剩 9 %)而影響其 NBT 數據之判讀。**HYL-3** 與 **HYL-3b** 做比較，**HYL-3** 沒有分化能力，而 **HYL-3b** 具明顯的分化效果(10 μ M 下，NBT 數據高達 67.5 %)。**HYL-4** 與 **HYL-4b** 做比較，**HYL-4** 不具分化效果，但 **HYL-4b** μ M 具有分化能力。**HYL-5** 與 **HYL-5b** 做比較，**HYL-5** 不具分化能力，而 **HYL-5b** 具分化能力。

綜合上述的結果發現，具有 acetyl 取代基團之分化效果明顯優於沒有 acetyl 取代之化合物。而 **HYL-3b** 單獨加藥處理 48 小時，即有明顯的誘導細胞分化表現(10 μ M，67.5 %)，故為了了解 **HYL-3b** 對於 HL-60 細胞產生誘導分化現象的發生時間，著者決定：

(1)以 **HYL-3b** 為主作時間點(time curve)的實驗,以找出其之誘導分化效果是何時開始作用在 HL-60 細胞上。

(2)並測試 **HYL-3b** 合併使用 ATRA 之後,是否能夠有效地提高 ATRA 誘導分化的活性,並且以細胞週期分析來探討 **HYL-3b** 對於 HL-60 細胞的細胞週期影響。

第三節 合併使用 **HYL-3b** 與 **ATRA** 之誘導 **HL-60** 細胞分化效果活性探討

分別將 1、5、10、15、20 μM **HYL-3b** 合併不同濃度(10、20、50 nM)之 **ATRA**，經過 48 小時處理後，測試所增強分化效果的幅度，結果如 Table 3. 所示。10、20、50 nM **ATRA** 單獨使用的分化比例依序為 7.0 %、12.5 % 以及 28.0 %。當 1 μM **HYL-3b** 與 10、20、50 nM **ATRA** 合併使用時：所得分化比例從未加 **ATRA** 的 0.3 % (Table 4.) 依序提高至 8.6 %、60.7 % 及 73.7 %。在此條件下，最佳的組合為 1 μM **HYL-3b** 合併 20 nM **ATRA**，增加的幅度為 60.4 %。當 5 μM **HYL-3b** 與 10、20、50 nM **ATRA** 合併使用時：所得分化比例從未加 **ATRA** 的 6.0 % (Table 4.) 依序提高至 55.2 %、80.5 % 及 91.2 %。在 5 μM **HYL-3b** 與 50 nM **ATRA** 合併使用的情況下，增加的幅度為 85.2 %，幾乎達到完全分化的效果。當 10 μM **HYL-3b** 與 10、20、50 nM **ATRA** 合併使用時，所得分化比例從未加 **ATRA** 的 67.5 % (Table 4.) 依序提高至 74.0 %、80.4 % 及 90.9 %。因為單獨使用 10 μM **HYL-3b** 的分化效果即達到 67.5 %，因此所增加分化的效果幅度有限，並不能明顯地看出兩者之間是否具有協同作用。當 15 μM **HYL-3b** 與 10、20、50 nM **ATRA** 合併使用時，由於開始出現抑制增殖的作用，因此分化比例較前一個條件為低，其分化效果自單獨使用時的 51.8 % 下降至合併使用 10 nM

ATRA 時的 45.7 %。而 20 μ M **HYL-3b** 與 10、20、50 nM ATRA 合併使用時，細胞數目明顯變少，推測是因為 **HYL-3b** 與 ATRA 兩者造成細胞增殖抑制能力增強所致；當然也有可能是大部分的細胞已經因為 ATRA 與 **HYL-3b** 誘導分化而使之進入末端分化，循正常的細胞週期而導致死亡。

第四節 HYL-3b 誘導 HL-60 細胞分化效果活性之初步機轉 探討

如第三節所述，**HYL-3b** 是 HYL 系列化合物中，分化效果最為顯著者，具有未來研究開發的潛力，值得我們深入探討其作用機轉：

(I) Dose and Time-dependent

將不同濃度(1、5、10、15、20 μM)的 **HYL-3b** 化合物培養不同的時間(12、24、36、48 及 60 小時)後，以 NBT-assay 測試其 **HYL-3b** 對於 HL-60 細胞的分化能力，所得結果如 Table 4. 所示。**HYL-3b** 在 10 μM 下分化效果最好，其分化比例能夠達到 74.2 % (在加藥處理 60 小時情況下)。若濃度繼續提高則分化效果會開始降低。除此之外，我們也能夠發現隨著時間增加，分化比例也漸漸爬升(Fig. 4.)。但是細胞增殖的比例會開始下降(Fig. 5.)。

(II) Morphology

觀察細胞形態變化發現，未加藥處理的 HL-60 細胞屬於較原始的 promyelocytic cells，顯微鏡下直接觀察可以發現細胞外型圓滑且光亮。Liu stain solution 染色後，顯微鏡觀察可以發現 HL-60 的細胞核所佔之比例很大，相對細胞質的比例就較小；而且細胞核內仍有核仁的存在(Fig. 6.)。加入 **HYL-3b** 處理 48 小時以誘導 HL-60 細胞分化之後，自顯微鏡下觀察明顯發現細胞會貼附於底部且形狀變得較長條形；Liu stain solution 染色後，明顯觀察到細胞核縮小，而且細胞核變成馬蹄形(metamyeloblast)、棒狀(banded)與多葉狀(neutrophil) (Fig. 7.)。

(III) Cell Cycle

細胞週期是調控細胞分化與細胞增殖最主要的依據。發育成熟之分化細胞的細胞週期大多停滯於 G_0/G_1 期。白血病細胞的細胞週期因為失去控制才會造成細胞不受控制的增殖。當我們給予細胞分化劑促使白血病細胞發生末端分化作用，理論上會促使其細胞週期恢復正常而停滯於 G_0/G_1 期。

如 Table 5.及 Fig. 8.所示：未加藥之 HL-60 細胞，其 G_0/G_1 期約佔全部的 39~44 %，S 期所佔的比例為 48~54 %，而 G_2/M 期的比例則約為 4~10 % 左右。當加入 10 μ M **HYL-3b** 處理，可發現經過 24 小時後細胞週期開始發生改變， G_0/G_1 期提高至 56.2 %，S 期的比例則下降至為 34.9 %，而 G_2/M 期的變動不大，比例為 8.9 %。隨著處理的時間加長， G_0/G_1 期的比例明顯大幅增加，36 小時後提高至 74.3 %，到了 48 小時之後， G_0/G_1 期的比例甚至高達 88.3 %。相反地，S 期的比例則隨著加藥時間的延長而下降，在 36 小時後降至 21.2 %，最後在 48 小時 S 期的比例只剩下 9.7 %。

如此顯著的誘導細胞週期停滯在 G_0/G_1 期的效果，更佐證了 **HYL-3b** 在誘導細胞分化方面的優異活性，將能夠在發展成具有潛力的細胞分化劑，對於將來的白血病治療提供了一線曙光。

第四章 結論

本研究目的在於開發 carbazole 類衍生物之新藥理活性，經實驗結果證實：3,6-Substituted 9-pyridylmethylcarbazole 之部分衍生物(如：**HYL-2b**、**HYL3b**、**HYL-4b** 等化合物)對於 HL-60 cells 具有誘導分化的功能。其中，以 **HYL-3b** 之活性最佳。於是著者以形態觀察、抹片攝影與細胞週期分析來探討其初步作用機轉，所得結果如下：

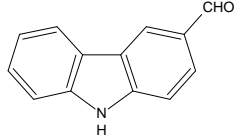
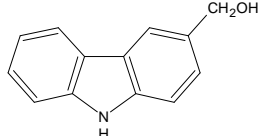
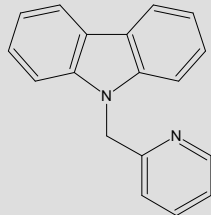
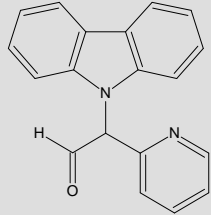
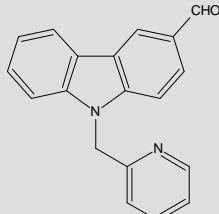
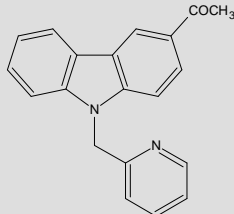
HYL-3b 化合物具有抑制 HL-60 cells 增殖之活性，並且能夠誘導細胞週期停止及細胞分化；證據如下：

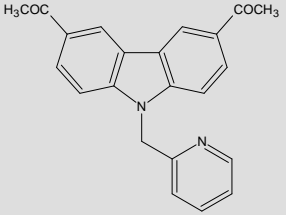
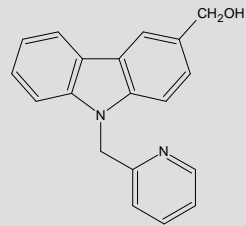
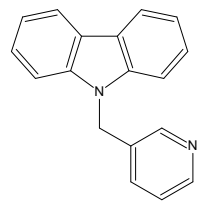
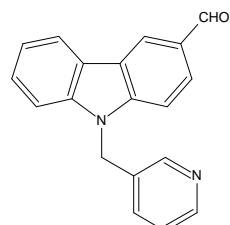
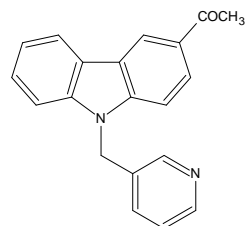
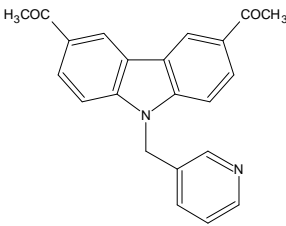
- (1)單獨使用 10 μ M **HYL-3b** 48 小時之後，HL-60 cells 的增殖活性能夠被抑制到 60.6 %；誘導分化的比例可以高達 67.5 %。
- (2) 5 μ M **HYL-3b** 與 20 nM ATRA 合併使用 48 小時之後，能夠有效地提升 ATRA 之分化效果，將使單獨 ATRA 20 nM 的 12.5 % 分化比例提升至 80.5 %。
- (3)測試分化活性時，由顯微鏡下觀察發現，10 μ M **HYL-3b** 處理 48 小時之後，由顯微鏡下觀察發現細胞外形變成長條形；Liu stain 染色之後，也發現細胞核變成馬蹄形的 metamyeloblast 出現。
- (4)由 Fig. 8 可知，加入 10 μ M **HYL-3b** 處理 48 小時之後，細胞週期之 G₀/ G₁ 期由培養 12 小時的 38.6 % 提高至 84.77 %；S 期則由 51.97

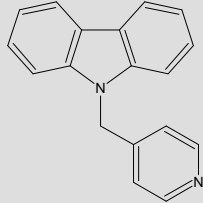
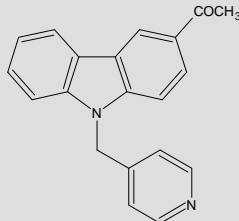
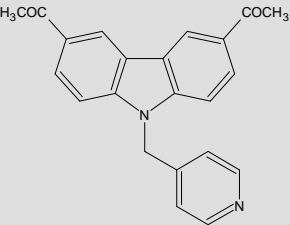
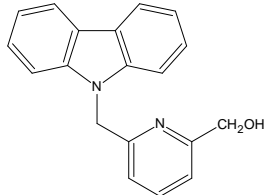
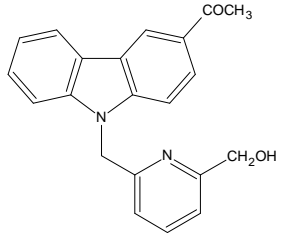
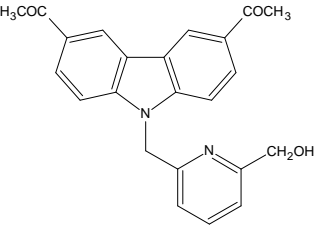
%降至 12.13 %。證明 **HYL-3b** 具有使 HL-60 cells 細胞週期停滯的功能。

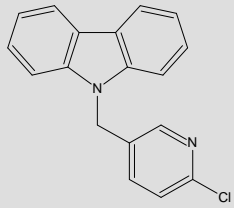
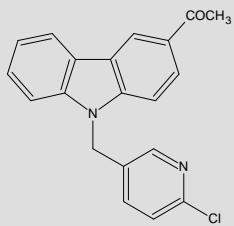
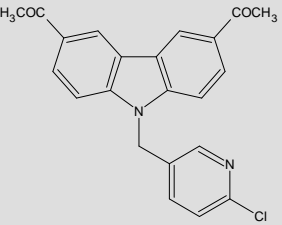
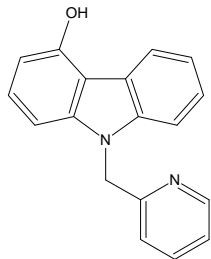
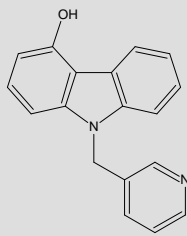
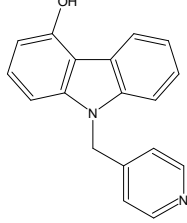
總括而論，**HYL-3b** 對於 HL-60 cells 單獨使用時，即有明顯的誘導分化活性；合併 ATRA 加藥之後也能夠大幅度地增加 ATRA 的分化比例。因此有可能成為新一代之治療急性前骨髓性白血病藥物。

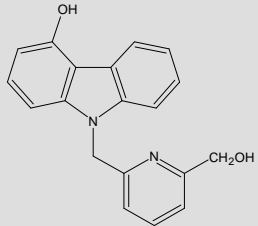
Table 1. Antiproliferation of 3,6-Substituted 9-pyridylmethylcarbazole (HYL) derivatives on HL-60 cells.

Compound	Conc.(μ M)	MTT-Proliferation (%)
Control	0	100.0 \pm 0.0
HYL-1a 	50	90.8 \pm 1.5
	75	70.7 \pm 4.3**
	100	34.1 \pm 1.8****
	IC₅₀	90.0
HYL-1d 	10	86.1 \pm 1.6
	50	67.7 \pm 5.6*
	100	42.1 \pm 6.5**
	IC₅₀	80.3
HYL-2 	10	95.7 \pm 1.5
	25	49.7 \pm 4.1****
	50	14.5 \pm 0.7****
	IC₅₀	30.0
HYL-2a1 	10	88.0 \pm 5.7*
	25	50.3 \pm 2.4****
	50	22.3 \pm 1.8****
	IC₅₀	30.6
HYL-2a2 	10	91.9 \pm 2.9*
	50	52.0 \pm 3.6****
	100	27.1 \pm 3.1****
	IC₅₀	63.2
HYL-2b 	10	66.9 \pm 3.7*
	25	34.7 \pm 3.7****
	40	10.5 \pm 2.7****
	IC₅₀	19.1

Compound	Conc.(μ M)	MTT-Proliferation (%)
HYL-2c 	2.0 [★]	92.7 \pm 1.6
HYL-2d 	10	94.1 \pm 3.1
	50	61.6 \pm 4.9***
	100	25.1 \pm 4.9***
	IC ₅₀	66.8
HYL-3 	10	90.0 \pm 5.1
	50	57.2 \pm 7.9***
	100	17.2 \pm 2.0***
	IC ₅₀	32.6
HYL-3a 	20	66.0 \pm 8.2***
	25	58.8 \pm 4.7***
	50	21.8 \pm 2.5***
	IC ₅₀	30.9
HYL-3b 	10	60.5 \pm 2.0***
	15	52.5 \pm 6.1***
	20	40.5 \pm 5.1***
	IC ₅₀	16.1
HYL-3c 	2.5 [★]	83.8 \pm 2.6

Compound	Conc.(μ M)	MTT-Proliferation (%)
HYL-4 	10	$89.3 \pm 3.1^*$
	30	$50.3 \pm 7.5^{***}$
	50	$9.2 \pm 1.7^{***}$
	IC₅₀	29.8
HYL-4b 	5	$81.3 \pm 7.3^{***}$
	15	$53.3 \pm 6.3^{***}$
	25	$36.0 \pm 3.5^{***}$
	IC₅₀	18.0
HYL-4c 	5*	81.4 ± 6.8
HYL-5 	10	96.1 ± 3.1
	15	$59.8 \pm 6.9^{**}$
	20	$29.8 \pm 2.3^{***}$
	IC₅₀	16.8
HYL-5b 	5	$75.2 \pm 3.1^{***}$
	7.5	$51.7 \pm 3.7^{***}$
	10	$35.2 \pm 4.3^{***}$
	IC₅₀	8.0
HYL-5c 	2.5*	$58.1 \pm 4.5^{**}$

Compound	Conc.(μ M)	MTT-Proliferation (%)
HYL-6 	20	$67.5 \pm 4.3^{****}$
	30	$37.7 \pm 2.5^{****}$
	40	$26.5 \pm 2.6^{****}$
	IC₅₀	27.0
HYL-6b 	10	91.0 ± 6.0
	15	$62.3 \pm 2.6^{****}$
	20	$34.7 \pm 2.9^{****}$
	IC₅₀	17.3
HYL6c 	0.75[★]	109.5 ± 5.5
HYL-7 	10	95.9 ± 2.3
	50	$53.4 \pm 2.2^{****}$
	75	$34.4 \pm 1.7^{****}$
	IC₅₀	56.7
HYL-8 	10	$85.2 \pm 5.0^*$
	25	$67.2 \pm 2.0^{****}$
	40	$46.6 \pm 2.4^{****}$
	IC₅₀	37.7
HYL-9 	1	$89.6 \pm 1.4^{****}$
	5	$54.8 \pm 2.5^{****}$
	10	$14.0 \pm 3.3^{****}$
	IC₅₀	5.7

Compound	Conc.(μ M)	MTT-Proliferation (%)
	10	62.4 \pm 2.8***
	15	51.6 \pm 4.6***
	25	30.5 \pm 3.4***
	IC₅₀	15.8

HL-60 cells (1.0×10^5) were treated with **HYL** derivatives for 48 h.

The data are presented as mean \pm SD. from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

*:max soluble concentration.

Table 2. Effect of HYL derivatives on differentiation and proliferation on HL-60 cells compared with ATRA.

Compound	Conc.(nM)	NBT-Reduction (%)	MTT-Proliferation (%)
ATRA	10	4.1 ± 0.8	93.5 ± 2.2
	20	10.9 ± 0.8*	89.6 ± 3.3
	50	19.0 ± 3.4**	86.5 ± 3.3
	100	23.7 ± 2.1***	85.0 ± 4.2
Compound	Conc.(µM)	NBT-Reduction (%)	MTT-Proliferation (%)
Control		0	100.0
HYL-2	10	0.0 ± 0.0	77.1 ± 5.0**
	20	1.1 ± 0.5	57.3 ± 5.4***
	30	2.7 ± 1.4	19.6 ± 1.0***
	40	7.7 ± 1.2*	9.1 ± 1.5***
HYL-2b	10	24.2 ± 2.2***	69.9 ± 3.7***
	20	54.2 ± 8.1***	46.8 ± 3.2***
	30	25.3 ± 0.9***	31.5 ± 2.4***
	40	1.4 ± 1.2	10.5 ± 2.7***
HYL-3	20	0.0 ± 0.0	79.3 ± 3.7***
	30	0.0 ± 0.0	57.2 ± 7.9***
	40	0.5 ± 0.4	31.2 ± 1.4***
	50	3.4 ± 0.3	17.2 ± 2.0**
HYL-3b	5	6.0 ± 1.7***	84.5 ± 7.4***
	10	67.5 ± 2.9***	60.6 ± 6.3***
	15	51.8 ± 2.0***	50.0 ± 5.5***
	20	13.4 ± 1.7***	28.3 ± 4.4***
HYL-4	10	0.0 ± 0.0	89.3 ± 3.1*
	20	0.0 ± 0.0	63.6 ± 6.8**
	30	0.0 ± 0.0	50.3 ± 7.5***
	40	1.0 ± 0.0	16.9 ± 3.4***
HYL-4b	5	1.1 ± 0.3	81.3 ± 7.3***
	10	14.6 ± 4.9*	66.5 ± 6.3***
	15	40.8 ± 3.5***	53.3 ± 6.3***
	20	20.6 ± 1.9***	42.4 ± 4.7***
HYL-5	10	0.0 ± 0.0	96.1 ± 3.1
	15	0.0 ± 0.0	59.8 ± 6.9**
	20	1.4 ± 0.5	29.8 ± 2.3***
	25	3.4 ± 0.5	14.2 ± 2.5***
HYL-5b	2.5	1.5 ± 0.0	90.9 ± 5.1**
	5	15.9 ± 4.2*	75.2 ± 3.1***
	7.5	36.7 ± 2.7**	51.7 ± 3.7***
	10	43.1 ± 1.7***	35.2 ± 4.3***

HL-60 cells (1.0×10^5) were treated for 48 h. The data are presented as mean ± SD. from three independent experiments.* $P < 0.05$;** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$ compared with control.

Table 3. Effect of HYL-3b combined with ATRA on differentiation and proliferation.

Compound	+ ATRA (nM)	Cell Numbers ($\times 10^4$)	NBT-assays (%)
Control.		114.0 \pm 7.9	0.0 \pm 0.0
ATRA	10	114.3 \pm 1.1	7.0 \pm 1.5*
	20	118.8 \pm 1.8	12.5 \pm 0.5***
	50	115.0 \pm 4.1	28.0 \pm 3.1***
HYL-3b 1 μM	10	119.6 \pm 3.9***	8.6 \pm 2.8**
	20	93.8 \pm 0.5***	60.7 \pm 2.6***
	50	56.1 \pm 1.7***	73.7 \pm 3.3***
HYL-3b 5 μM	10	77.4 \pm 5.5***	55.2 \pm 5.4***
	20	74.0 \pm 4.3***	80.5 \pm 2.1***
	50	56.1 \pm 1.7***	91.2 \pm 6.9***
HYL-3b 10 μM	10	67.0 \pm 3.5**	74.0 \pm 3.6***
	20	60.9 \pm 3.4***	80.4 \pm 0.6***
	50	48.6 \pm 3.7***	90.9 \pm 0.8***
HYL-3b 15 μM	10	47.8 \pm 2.1*	45.7 \pm 4.7***
	20	54.3 \pm 1.2***	69.3 \pm 1.1***
	50	39.1 \pm 1.9***	73.9 \pm 1.6***
HYL-3b 20 μM	10	38.0 \pm 3.2*	21.5 \pm 2.3**
	20	43.9 \pm 2.9**	39.9 \pm 1.7***
	50	31.4 \pm 5.4**	46.1 \pm 0.2***

HL-60 cells (1.0×10^5) were treated for 48 h.

The data are presented as mean \pm SD. from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

Table 4. Effect of HYL-3b on differentiation and proliferation.

Compound	Time (h)	Cell Numbers ($\times 10^4$)	NBT-assays (%)	MTT-assays (%)
Control	12	19.0 \pm 1.0	0.2 \pm 0.3	100.0 \pm 0.0
	24	42.0 \pm 1.8	0.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
	36	68.8 \pm 2.1	0.2 \pm 0.3	100.0 \pm 0.0
	48	93.2 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
	60	110.0 \pm 1.1	0.2 \pm 0.3	100.0 \pm 0.0
ATRA 20 nM	12	19.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	86.0 \pm 0.0
	24	29.0 \pm 0.0*	1.0 \pm 0.0	88.1 \pm 0.0
	36	73.0 \pm 0.0**	6.5 \pm 0.0**	91.2 \pm 0.0
	48	101.0 \pm 0.0*	10.5 \pm 0.0***	104.3 \pm 0.0
	60	117.5 \pm 3.1***	15.7 \pm 2.1***	92.0 \pm 0.0
HYL-3b 1 μM	12	21.1 \pm 1.4	0.1 \pm 0.3	95.6 \pm 2.2
	24	44.6 \pm 4.4	0.5 \pm 0.4	92.4 \pm 6.1
	36	67.8 \pm 6.9	1.3 \pm 2.5	90.0 \pm 8.2
	48	97.4 \pm 3.5	0.3 \pm 0.3	101.4 \pm 6.8*
	60	115.4 \pm 2.1	0.7 \pm 1.1	86.7 \pm 5.8
HYL-3b 5 μM	12	19.5 \pm 1.5	0.3 \pm 0.5	90.5 \pm 5.0
	24	38.0 \pm 2.9*	1.0 \pm 0.4	82.0 \pm 0.4*
	36	59.8 \pm 5.8**	6.9 \pm 1.5***	71.0 \pm 3.2*
	48	85.0 \pm 3.9**	6.0 \pm 1.7***	84.5 \pm 7.4***
	60	102.8 \pm 1.9**	10.6 \pm 2.8***	91.8 \pm 2.7
HYL-3b 10 μM	12	18.4 \pm 1.7	0.6 \pm 0.6	83.3 \pm 3.5*
	24	32.9 \pm 2.7**	0.9 \pm 0.6	70.7 \pm 1.3**
	36	49.0 \pm 4.1***	26.5 \pm 4.7***	64.8 \pm 1.5**
	48	67.8 \pm 6.2***	67.5 \pm 2.9***	60.6 \pm 6.3***
	60	73.8 \pm 1.5***	74.2 \pm 3.1***	63.8 \pm 5.4
HYL-3b 15 μM	12	16.8 \pm 0.6	0.9 \pm 0.5	80.9 \pm 1.3*
	24	30.4 \pm 4.3***	0.9 \pm 0.5	64.2 \pm 1.2**
	36	45.9 \pm 1.4***	7.7 \pm 1.2**	51.0 \pm 6.0*
	48	52.7 \pm 2.8***	51.8 \pm 2.0***	50.0 \pm 5.5***
	60	65.1 \pm 2.7***	70.5 \pm 1.8***	50.2 \pm 6.3
HYL-3b 20 μM	12	14.9 \pm 1.4*	0.1 \pm 0.3	75.0 \pm 3.3*
	24	27.5 \pm 4.7***	0.5 \pm 0.7	53.4 \pm 2.0**
	36	34.0 \pm 1.4***	0.9 \pm 0.6	30.0 \pm 2.2*
	48	39.3 \pm 2.5***	13.4 \pm 1.7***	28.3 \pm 4.4***
	60	45.8 \pm 2.1***	32.5 \pm 2.9***	28.6 \pm 1.3***

Cells (1.0×10^5) were treated with HYL-3b for 12, 24, 36, 48 and 60 h.

The data are presented as mean \pm SD. from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

Table 5. The cell cycle effect of HYL-3b.

Compound	Time (h)	G₀ / G₁ phase	S phase	G₂ / M phase
Control	12	39.3 ± 0.9	52.2 ± 0.8	8.4 ± 0.8
	24	41.8 ± 1.9	48.1 ± 1.3	10.2 ± 0.9
	36	44.7 ± 0.8	48.8 ± 1.3	6.6 ± 0.7
	48	42.3 ± 0.6	54.0 ± 0.8	3.8 ± 1.0
HYL-3b 1 μM	12	41.9 ± 0.5*	51.3 ± 0.8*	6.9 ± 0.3
	24	42.3 ± 1.0	48.5 ± 0.2	9.3 ± 1.0
	36	42.7 ± 1.0*	50.0 ± 2.8	7.4 ± 0.8
	48	40.2 ± 1.1*	55.4 ± 1.7	4.5 ± 0.6
HYL-3b 5 μM	12	39.8 ± 0.8	53.6 ± 0.4**	6.8 ± 0.7*
	24	44.0 ± 1.0	46.0 ± 1.1	10.0 ± 0.8
	36	48.3 ± 1.0**	44.2 ± 1.0**	7.5 ± 1.1
	48	54.0 ± 2.0***	42.0 ± 2.6	4.2 ± 1.3
HYL-3b 10 μM	12	40.5 ± 0.3	52.9 ± 0.1	6.6 ± 0.2**
	24	56.2 ± 2.2***	34.9 ± 1.6***	8.9 ± 0.7
	36	74.3 ± 2.2***	21.2 ± 1.5***	4.6 ± 0.9*
	48	88.3 ± 4.5***	9.7 ± 2.8***	1.7 ± 2.0***

HL-60 cells (1.0×10^5) were treated for 12, 24, 36, 48 h.

The data are presented as mean ± SD. from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

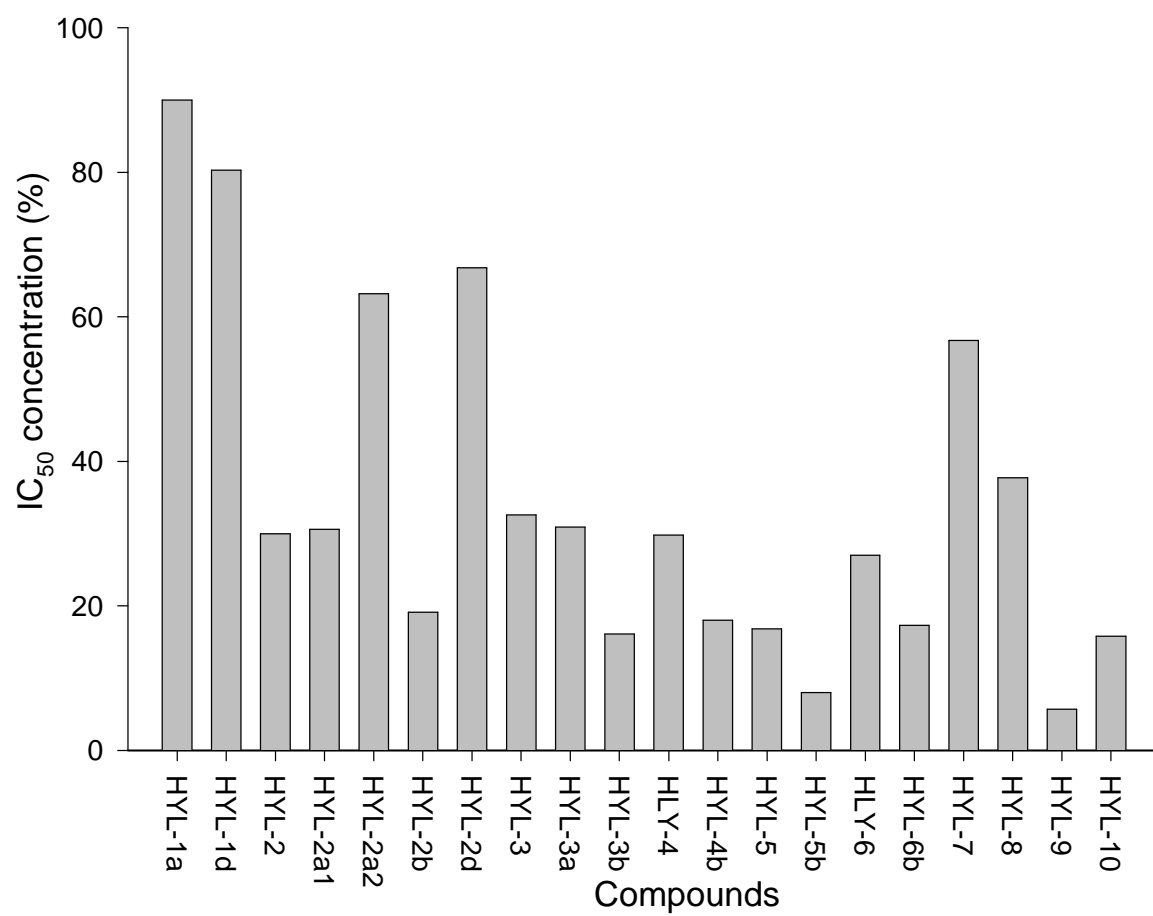


Fig. 3. Anti-proliferative effect of HYL derivatives.

HL-60 cells (1.0×10^5) were cultured with **HYL** derivatives for 48 h.

Data was presented as mean \pm SD from these separate experiments.

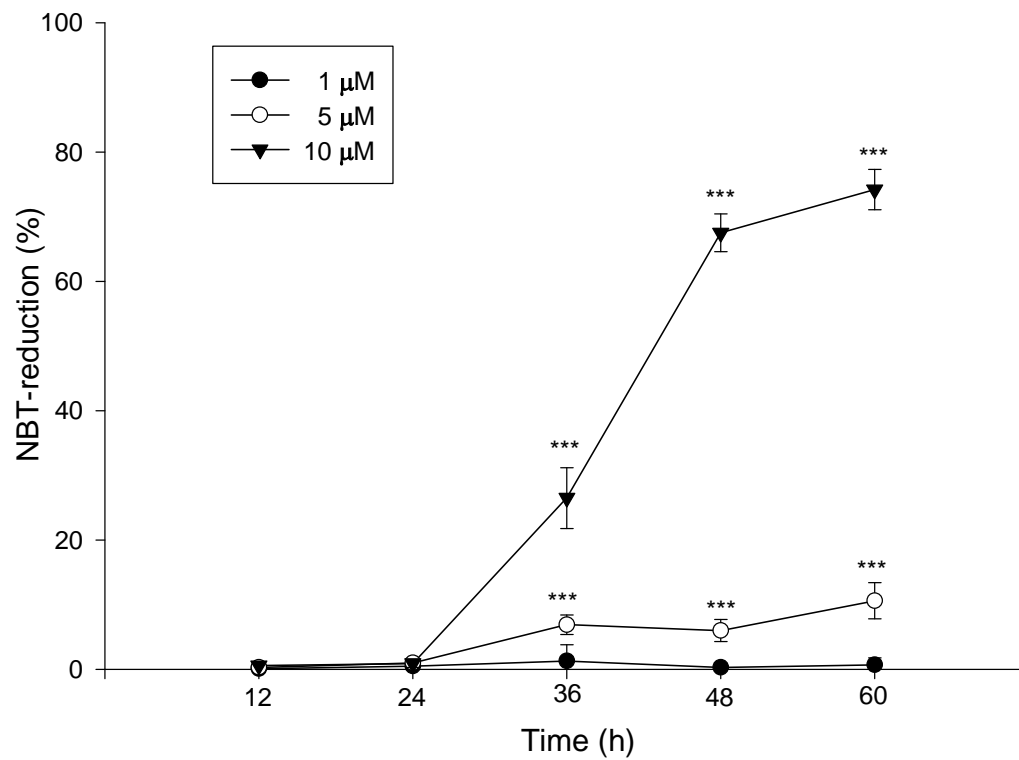


Fig. 4. NBT-reduction of HYL-3b in time-dependent manner.

Cells (1.0×10^5) were treated with HYL-3b for 12, 24, 36, 48 and 60 h.

The data are presented as mean \pm SD. from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

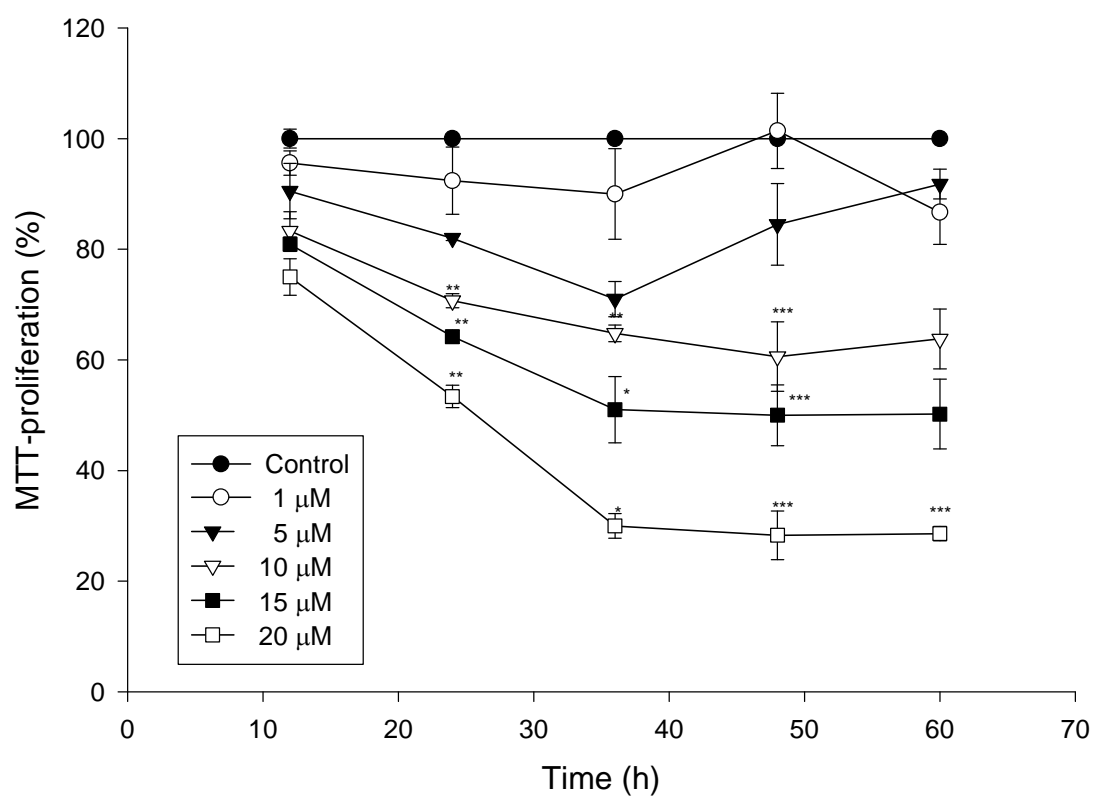
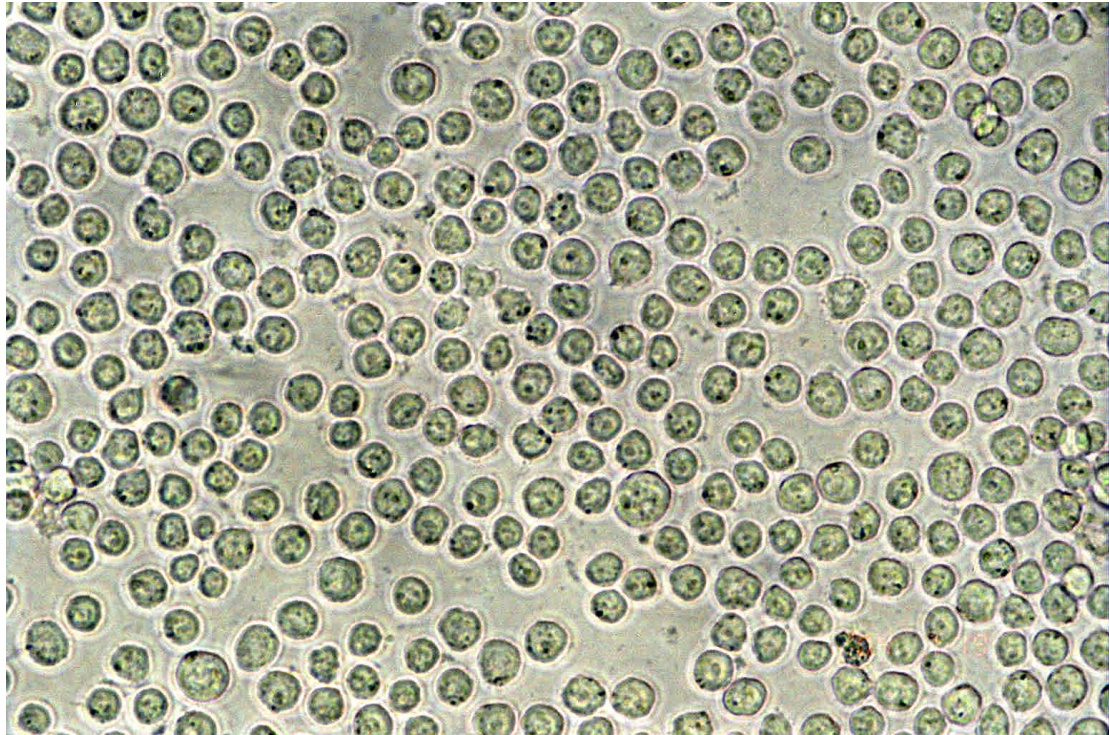


Fig. 5. MTT-proliferation of HYL-3b in dose-dependent manner.

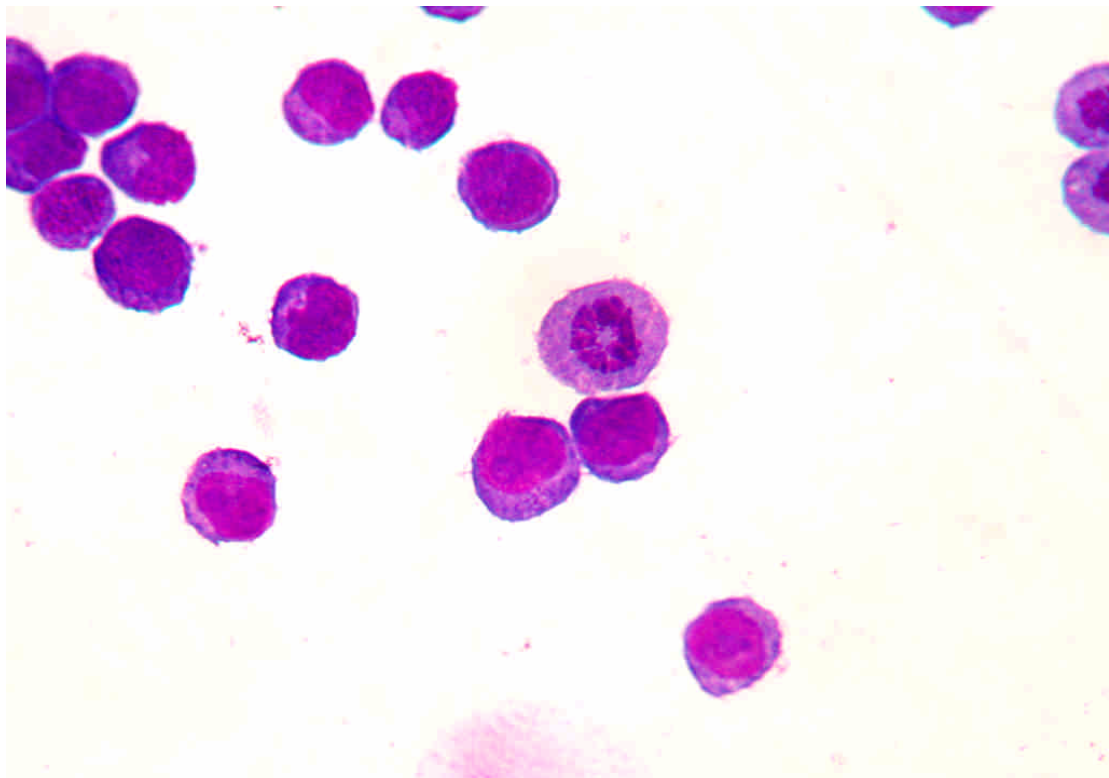
Cells (1.0×10^5) were treated with HYL-3b for 12, 24, 36, 48 and 60 h.

The data are presented as mean \pm SD. from three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

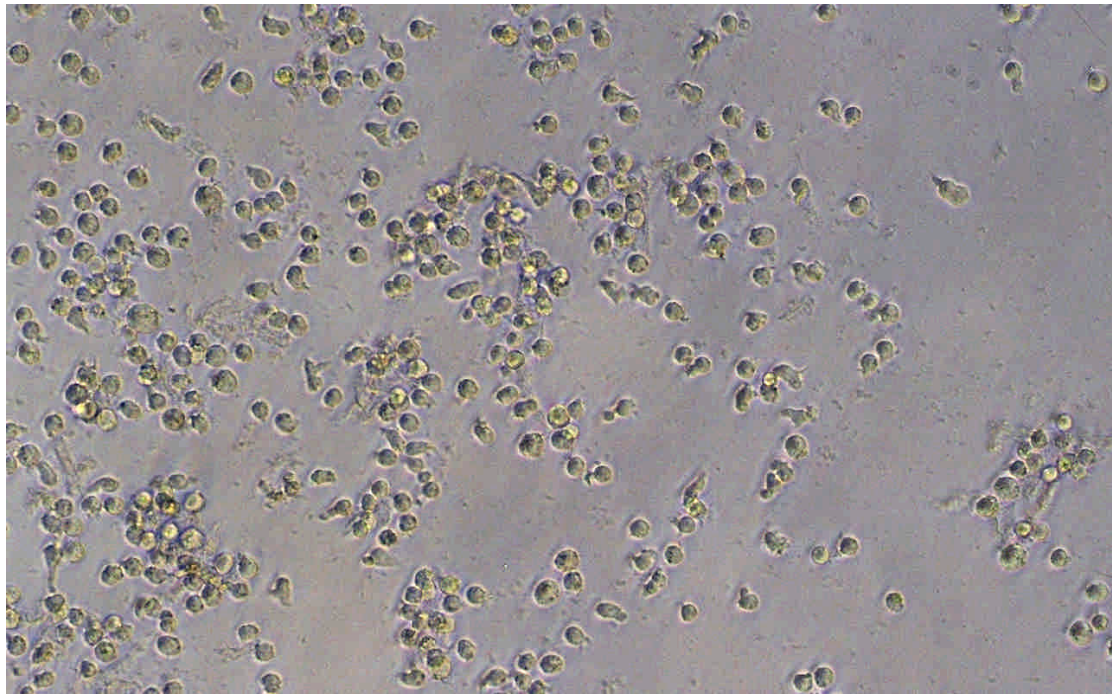


(A) 顯微鏡下直接觀察 400X

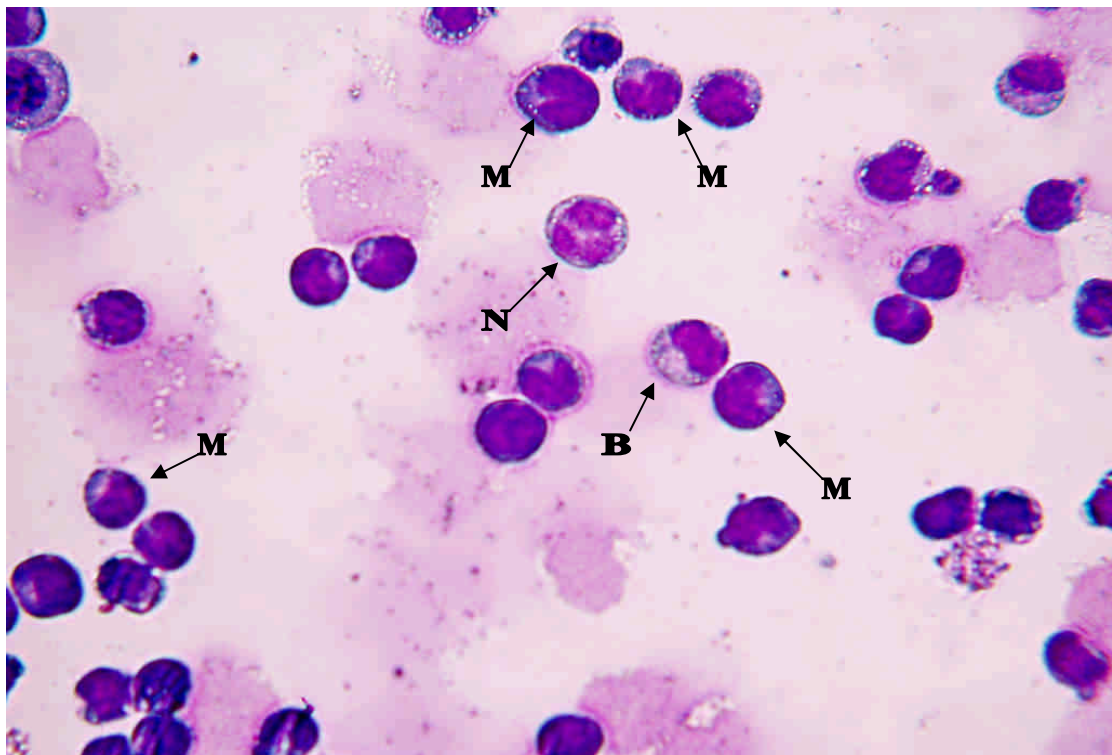


(B) Liu stain 染色後於顯微鏡觀察 400X

Fig. 6. The morphology of control.



(A) 從顯微鏡下直接觀察 200X

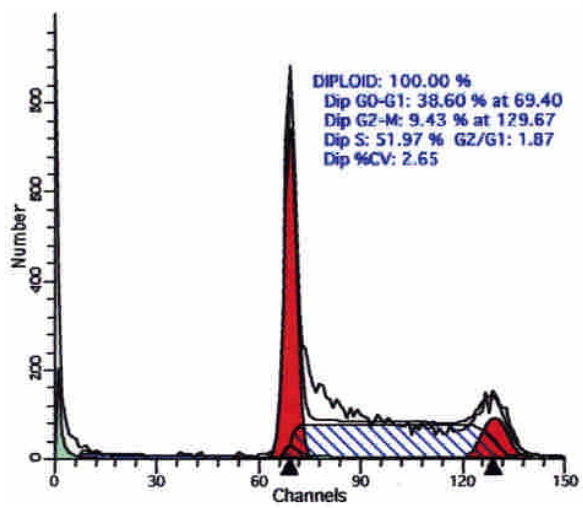


(B) Liu stain 染色後於顯微鏡觀察 400X

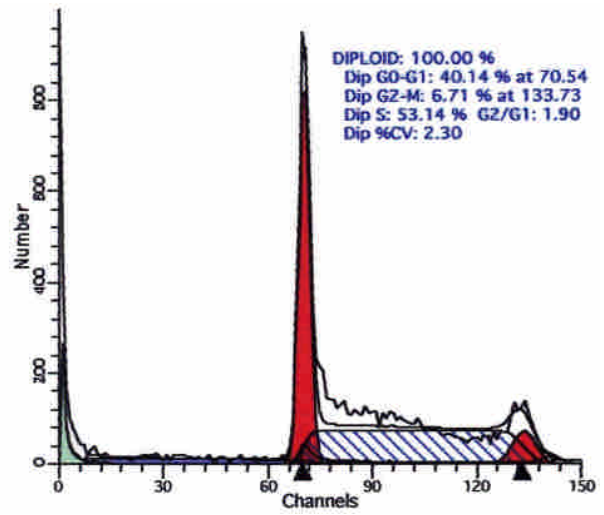
Fig. 7. The morphological change of treatment with 10 μ M HYL-3b.

Cells (1.0×10^5) were treated with HYL-3b for 48 h.

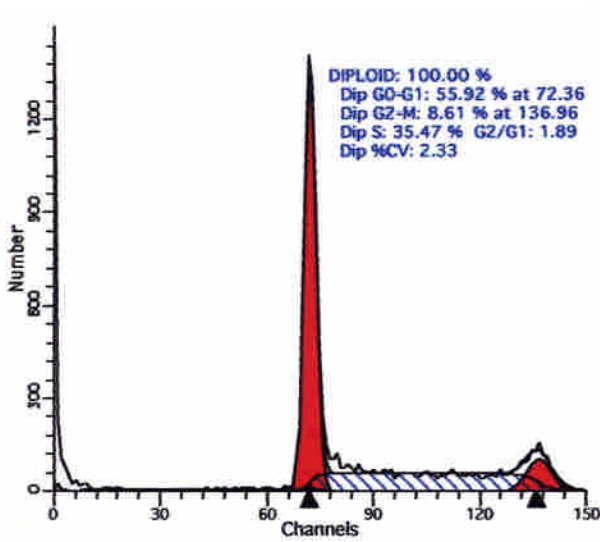
M : metamyeloblast ; B : banded ; N : neutrophil



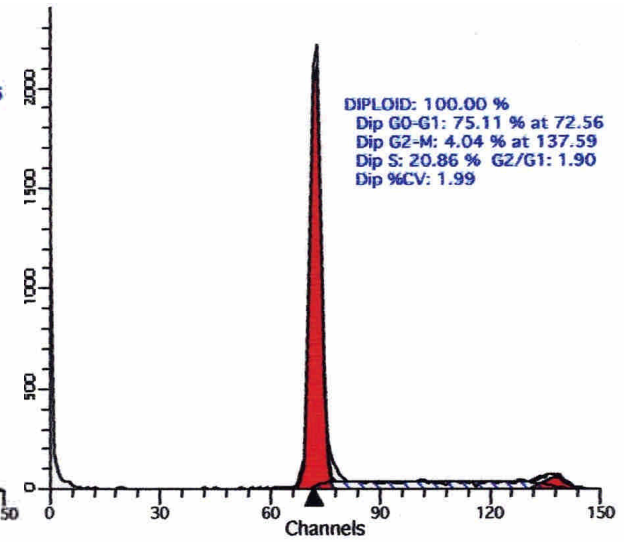
(A) Control



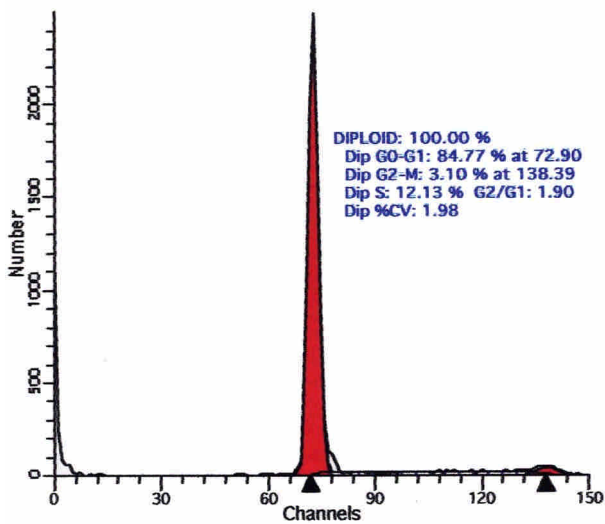
(B) 12 h



(C) 24 h



(D) 36 h



(E) 48 h

Fig. 8. The cell cycle effect of 10 μ M HYL-3b.

參考文獻

1. 中華民國行政院衛生署九十一年台灣地區主要癌症死亡原因
2. Vardiman, J. W.; Harris, N. L.; Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 100(7):2292-2302, 2002.
3. Garcia-Manero, G.; Faderl, S.; O'Brien, S.; Cortes, J.; Talpaz, M.; Kantarjian, H. M. Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer*. 98(3):437-457, 2003.
4. Steriti, R. Nutritional support for chronic myelogenous and other leukemias: a review of the scientific literature. *Altern. Med. Rev.* 7(5):404-409, 2002.
5. Lin, R. J.; Sternsdorf, T.; Tini, M.; Evans, R. M. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 20(49):7204-7215, 2001.
6. Usuki, K.; Endo, M.; Osawa, M.; Kitazume, K.; Iki, S.; Urabe, A. Pharmacokinetics of all-*trans*-retinoic acid in Japanese patients with acute promyelocytic leukemia. *Int. J. Hematol.* 63(1):19-23, 1996.
7. Shen, Z. X.; Chen, G. Q.; Ni, J. H.; Li, X. S.; Xiong, S. M.; Qiu, Q. Y.; Zhu, J.; Tang, W.; Sun, G. L.; Yang, K. Q.; Chen, Y.; Zhou, L.; Fang, Z. W.; Wang, Y. T.; Ma, J.; Zhang, P.; Zhang, T. D.; Chen, S. J.; Chen, Z.; Wang, Z. Y. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*. 89(9):3354-3360, 1997.
8. Sylvie, C.; Sylvie, C.; Eric, A.; Pierre, F.; Dominique, B.; Herve, T.; Thierry, D. R.; Marc, S.; Brigitte, D.; Michel, R.; Maud, J.; Jean-Michel, M.; Xavier, T.; Christian, B., Claude, P.; Francis, B.; Laurent, D.; Herve, D. Randomized comparison of double induction and timed-sequential induction to a "3+7" induction in adults with

acute myeloid leukemia (AML). Long-term analysis of the Acute Leukemia French Association (ALFA) 9000 study. *Blood First Edition Paper, prepublished online* May 13, 2004.

9. Crossman, L. C.; O'Brien, S. Clinical results with imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res.* 28:3-9, 2004.
10. Ozgen, U.; Turkoz, Y.; Stout, M.; Ozugurlu, F.; Pelik, F.; Bulut, Y.; Aslan, M.; Ravindranath, Y.; Savasan, S. Degradation of vincristine by myeloperoxidase and hypochlorous acid in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 27(12):1109-1113, 2003.
11. Athale, U. H.; Chan, A. K. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: part I. Epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb. Res.* 111(3):125-131, 2003.
12. Rebecca, S. F.; Carol, B. Concepts in Oncology Therapeutics. pp. 241 1998. American Society of Health-System Pharmacists.
13. Chen, Z. X.; Xue, Y. Q.; Zhang, R.; Tao, R. F.; Xia, X. M.; Li, C.; Wang, W.; Zu, W. Y.; Yao, X. Z.; Ling, B. J. A clinical and experimental study on all-*trans* retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood.* 78(6):1413-1419, 1991.
14. Battle, T. E.; Levine, R. A.; Yen, A. Retinoic acid-induced *blr1* expression promotes ERK2 activation and cell differentiation in HL-60 cells. *Exp. Cell Res.* 254(2):287-298, 2000.
15. Delva, L.; Cornic, M.; Balitrand, N.; Guidez, F.; Miclea, J. M.; Delmer, A.; Teillet, F.; Fenaux, P.; Castaigne, S.; Degos, L.; Chornienne, C. Resistance to all-*trans* retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: study of in vitro ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells. *Blood.* 82(7):2175-2181, 1993.
16. Tsimberidou, A. M.; Estey, E.; Whitman, G. J.; Dryden, M. J.; Ratnam, S.; Pierce, S.; Faderl, S.; Giles, F.; Kantarjian, H. M.; Garcia-Manero,

- G. Extramedullary relapse in a patient with acute promyelocytic leukemia: successful treatment with arsenic trioxide, all-*trans* retinoic acid and gemtuzumab ozogamicin therapies. *Leuk. Res.* 28(9):991-994, 2004.
17. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science.* 274(5293):1672-1677, 1996.
 18. Michelle, D. G.; Cell cycle control and cancer. *Curr. Sci.* 81(5):515-522, 2001.
 19. Cook, S. J.; Balmanno, K.; Garner, A.; Millar, T.; Taverner, C.; Todd, D. Regulation of cell cycle re-entry by growth, survival and stress signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 28(2): 233-240, 2000.
 20. Hung, D. T.; Jamison, T. F.; Schreiber, S. L. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chem. Biol.* 3(8):623-639, 1996.
 21. Sandal, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist.* 7(1):73-81, 2002.
 23. Sherr, C. J.; Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes. Dev.* 13(12):1501-1512, 1999.
 24. Herrera, R.; Hubbell, S.; Decker, S.; Petruzzelli, L. A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Exp. Cell Res.* 238(2):407-414, 1998.
 25. Hulleman, E.; Bijvelt, J. J.; Verkleij, A. J.; Verrips, C. T.; Boonstra, J. Integrin signaling at the M/G1 transition induces expression of cyclin E. *Exp. Cell Res.* 253(2):422-431, 1999.
 26. Lee, C. C. R.; Fukushima, S. Review article Alterations in cyclin D1, p53, and the cell cycle related elements: Implications for distinct genetic pathways of urinary bladder carcinogenesis. *Urol. Oncol.* 4(3):57-72, 1998.

27. Ortega, S.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1602(1):73-87, 2002.
28. Tamir, A.; Petrocelli, T.; Stetler, K.; Chu, W.; Howard, J.; Croix, B. S.; Slingerland, J.; Ben-David, Y. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell. Growth Differ.* 11(5):269-277, 2000.
29. Marc, P.; Steve, C. Cyclin E2, the cycle continues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34(4):315-320, 2002.
30. Rots, N. Y.; Iavarone, A.; Bromleigh, V.; Freedman, L. P. Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves cell cycle arrest in G1 that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression. *Blood.* 93(8):2721-2729, 1999.
31. Adams, P. D. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim. Biophys. Acta.* 1471(3):M123-33, 2001.
32. Albrecht, J. H.; Hansen, L. K. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. *Cell. Growth Differ.* 10(6):397-404, 1999.
33. Sage, J.; Miller, A. L.; Perez-Mancera, P. A.; Wysocki, J. M.; Jacks, T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature.* 424(6945):223-228, 2003.
34. Chen, F.; Chang, D.; Goh, M.; Klibanov, S. A.; Ljungman, M. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell. Growth Differ.* 11(5):239-246, 2000.
35. Chylicki, K.; Ehinger, M.; Svedberg, H.; Gullberg, U. Characterization of the molecular mechanisms for p53-mediated differentiation. *Cell. Growth Differ.* 11(11):561-571, 2000.

36. Chen, F. M.; Hou, M. F.; Wang, J. Y.; Chen, T. C.; Chen, D. C. P.; Huang, S. Y. High frequency of G/C transversion on *p53* gene alterations in breast cancers from Taiwan. *Cancer Lett.* 207(1):59-67, 2004.
37. Yen, A.; Sturgill, R.; Varvayanis, S.; Chern, R. FMS (CSF-1 receptor) prolongs cell cycle and promotes retinoic acid-induced hypophosphorylation of retinoblastoma protein, G1 arrest, and cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 229(1):111-125, 1996.
38. Sherr, C. J.; Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13(12):1501-1512, 1999.
39. Yuri, A.; Lazebnik; Susan, C.; Carol, A.; Cooke; William, G. N.; William, C. E. Nuclear Events of Apoptosis In Vitro in Cell-free Mitotic Extracts: A Model System for Analysis of the Active Phase of Apoptosis. *J. Cell Biol.* 123(1):7-22, 1993.
40. Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45(3):528-537, 2000.
41. Schimmer, A. D.; Hedley, D. W.; Penn, L. Z.; Minden, M. D. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood.* 98(13):3541-3553, 2001.
42. Andrew, W.; Vicki, D.; Bertram, F.; David, H.; Joe, K.; Simone, M. Apoptosis and Cell Proliferation 2nd edition. pp.2 1998. BOEHRINGER MANNHEIM.
43. Kang, P. M.; Izumo, S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol. Med.* 9(4):177-182, 2003.
44. Higuchi, T.; Kizaki, M.; Omine, M. Induction of differentiation of retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells by the combination of all-*trans* retinoic acid and granulocyte

colony-stimulating factor. *Leuk. Res.* 28(5):525-532, 2004.

45. Sham, R. L.; Phatak, P. D.; Belanger, K. A.; Packman, C. H.; The effect of dexamethasone on functional properties of HL60 Cells during all-*trans* retinoic acid induced differentiation. Are there implications for the retinoic acid syndrome? *Blood Cells Mol. Dis.* 22(2):139-149, 1996.
46. Knolker, H. J.; Reddy, K. R. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem. Rev.* 102(11):4303-4427, 2002.
47. Danish, I. A.; Prasad, K. J. A one pot synthesis and evaluation of 13-oxo-quinol[3,4-*b*]carbazol-*N*-oxides as antimicrobial agents. *Acta Pharm.* 53(4):287-294, 2003.
48. Zhang, B. F.; Peng, F. F.; Zhang, J. Z.; Wu, D. C. Staurosporine induces apoptosis in NG108-15 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 24(7):663-669, 2003.
49. Nakamura, K.; Sugumi, H.; Yamaguchi, A.; Uenaka, T.; Kotake, Y.; Okada, T.; Kamata, J.; Nijima, J.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Yoshino, H.; Kitoh, K.; Yoshimatsu, K. Antitumor activity of ER-37328, a novel carbazole topoisomerase II inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 1(3):169-175, 2002.
50. 李春燕，3,6,9-置換咪唑類衍生物之合成與生理活性，中國醫藥學院藥物化學研究所博士論文，2002。
51. Cuendet, M.; Gills, J. J.; Pezzuto, J. M. Brusatol-induced HL-60 cell differentiation involves NF- κ B activation. *Cancer Lett.* 206(1):43-50, 2004.