

第一章 前言

第一節 緒論

癌症乃當今世界上威脅人類最嚴重的疾病之一。醫療日益進步，但是隨著年齡層老化以及環境變化等因素，罹癌率仍持續增加，癌症醫療的治癒率仍未獲明顯減少。衛生署公布民國 92 年十大死因，癌症蟬聯 22 年的首要死因，平均每 14 分 56 秒就有 1 人死於癌症。民國 92 年癌症共造成 35,201 人死亡，15 大癌症依序是肝癌、肺癌、結腸直腸癌、女性乳癌、胃癌、子宮頸癌、口腔癌、攝護腺癌、非何杰金淋巴瘤、胰臟癌、食道癌、膽囊癌、白血病、鼻咽癌、卵巢癌¹。

癌細胞的形成主要是由生物體內正常細胞轉化來的，包括細胞不正常的增生 (proliferation)、細胞分化 (differentiation) 的能力降低或喪失等，其中細胞不正常增生的原因，可能與細胞週期 (cell cycle) 運行異常及細胞凋亡 (apoptosis) 途徑發生改變有關。臨床上使用的抗癌藥物，其機轉乃針對癌細胞的特點加以抑制。例如用於治療幼髓細胞性白血病 (promyelocytic leukemia) 之維生素 A 酸 (retinoic acid)、arsenic trioxide (As_2O_3) 等，便是誘導幼髓性細胞進行分化或細胞凋亡，以緩解細胞癌化；而 paclitaxel (Taxol®) 則是抑制癌細胞週期的運行及促使癌細胞凋亡，以達到抗癌的功效。目前

這些正在使用的臨床藥物均有不同程度之副作用，且有些癌細胞已對其產生抗藥性，因此開發能有效治療癌症且降低副作用的藥物，仍是藥物研發之重心。

第二節 白血病之簡介

白血病俗稱血癌，位居兒童惡性腫瘤發生率首位，佔所有腫瘤的 40% 左右，台灣每年約有 20 名新病例發生²。白血病形成的原因主要是白血球前驅細胞受遺傳、病毒感染、藥物等因素的影響，造成細胞異常增生。例如急性前骨髓性白血病因分化路徑被抑制導致未成熟的前骨髓期細胞增殖（圖一）³。依發病快慢及細胞種類又分為四種：急性骨髓性白血病（acute myelocytic leukemia；AML）、慢性骨髓性白血病（chronic myelocytic leukemia；CML）、急性淋巴球性白血病（acute lymphoblastic leukemia；ALL）、慢性淋巴球性白血病（chronic lymphoblastic leukemia；CLL）。

白血病之臨床症狀主要是：貧血、容易倦怠、血小板減少、不明原因發燒、無痛性的淋巴結腫大（通常發生於頸部、腋窩或鼠蹊部）、體重減輕或生長停滯、骨頭疼痛。因為快速增加的未成熟白血球細胞侵犯到肝臟、脾臟會造成肝脾腫大；而淋巴腺、胸腺、腦膜、生殖腺、腎臟等亦有白血病細胞之浸潤⁴。白血病初期的症狀和一般常見的兒童感冒類似，不易由外觀診斷，必須以血液和骨髓細胞抹片檢查，根據白血球的型態特徵分辨才能確定。

臨床上治療白血病依病程考量可能需要併用數種治療方法或選擇多種的化學治療藥物，然而治療時仍常有副作用大及無法完全治癒的困難。血

癌之治療主要包括骨髓移植、放射線治療與化學治療三種：

(1) 骨髓移植是將健康的骨髓由他人或自己身上移植到功能受損害的骨髓中。自體骨髓移植是將病患未受癌細胞侵犯的骨髓抽出，置於零下 190 度的液態氮中儲存，病人癌症復發時，再輸入病人體內。異體骨髓移植則由他人得來的骨髓輸入癌病患體內，提供骨髓的人最好是同卵雙胞胎，或是組織抗原 (human leucocyte antigen ; HLA) 相符合的捐贈者⁵。

(2) 放射線治療是利用高能量的放射線照射癌細胞，主要目的在縮小腫瘤或於手術後摧毀可能殘餘的癌細胞⁶。由於高能量的放射線亦會傷害周圍的正常細胞，因此正常細胞的傷害是放射線治療過程中一項極為嚴重的副作用。至於其他正常分裂成長的腸胃道細胞、毛囊細胞也同時會被抑制；所以會出現的副作用還包括疲倦、皮膚變紅發癢及顏色變深且乾燥、掉髮、感覺胃腸不舒服、噁心或腹瀉、影響食慾、白血球或血小板降低、增加蛀牙機率與生育影響等。

(3) 化學治療簡稱化療，是指使用化學藥物來抑制癌細胞生長⁷。目前臨床上抗血癌的藥物其作用的機制包括：

(a) 誘導癌細胞進行細胞分化，如 ATRA (all *trans* retinoic acid) 或是三氧化二砷 (arsenic trioxide ; As_2O_3) 應用於治療幼髓細胞性白血病便是誘導幼髓性細胞進行分化，以緩解細胞癌化 (圖二)⁸⁻¹⁰。

(b) 影響癌細胞週期的進行，例如 Ara-C (1- β -d-arabinofuranosylcytosine)

嵌入 DNA 中造成 DNA 合成受阻斷，導致細胞滯留於 S 期；與微管蛋白(tubulin) 結合之藥物 vincristine，使癌細胞在進行有絲分裂時，染色體無法藉由微管的協同作用傳送至紡錘體兩極，造成細胞無法進行有絲分裂而滯留於 G2/M 期¹¹。

(c) 誘導癌細胞進行細胞凋亡，例如 L-asparaginase 能分解急性淋巴性白血癌細胞生長所需的 asparagine 而導致細胞凋亡；daunorubicin 能嵌入 DNA、抑制 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 與 RNA 聚合酶 (RNA polymerase)，以及抑制拓撲異構酶 II (topoisomerase II) 而造成 DNA 斷裂導致細胞凋亡¹²。除誘導細胞分化的機制外，ATRA 與 As₂O₃ 也會活化 caspase，導致細胞凋亡¹³。

第三節 細胞週期與調控

細胞是生物個體的基本單位，生物個體在胚胎發育成長的過程中，幹細胞經歷由增生、分化與死亡等三大階段巧妙地協同作用，構成了組織與器官。細胞不斷地新生及死亡，以維持個體之動態平衡。若此動態平衡失去調控，則有可能引起惡性腫瘤等疾病^{14,15}。癌細胞不同於正常細胞生長分裂的調控，因此若要達抗癌的目的，必須了解正常細胞與癌細胞在細胞週期上的差異。

何謂細胞週期？是指細胞從上一次細胞分裂結束到下一次細胞分裂為止的過程，一般分為以下幾個時期：(1) G1 時期 (first gap phase) 是控制細胞分裂時期，也是合成蛋白質及 RNA 的時期。G1 末期是控制細胞進入 S 期很重要的檢查點 (checkpoint)，又稱限制點 (restriction point)，可決定細胞週期的繼續或停止。(2) S 時期 (synthesis phase) 又稱之為 DNA 合成時期。(3) G2 時期 (second gap phase) 是進入 M 期的準備期。為蛋白質及 RNA 的合成期，G2 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。(4) M 時期 (mitosis phase) 為有絲分裂期，細胞分為四期包括前期 (prophase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase)、末期 (telophase) 等四個時期。

此外，當細胞處於中止分裂活動的靜止狀態即為 G0 時期。若細胞不再

繼續分裂，停滯於 G0 期且繼續分化，便發展成更具功能性的細胞¹⁶。如果細胞接到適當的訊息而決定要進行分裂，再次進入 G1→S→G2→M 的細胞週期，離開 M 期的細胞又重新決定是否要進入下一個細胞週期或是停止在 G0 期。G0 期也是細胞進行分化的重要階段，在這個時候，重新決定細胞所表現的基因狀態，活化或抑制某一些基因之表現，以決定細胞週期是否繼續運轉。

細胞週期運行中，當外在因素造成細胞的 DNA 受損，細胞會有兩條路徑可選擇：(1) 細胞週期會先停止，DNA 會做修補 (repair)，一旦修補完善，細胞會進入下一時期，繼續走完細胞週期。(2) 若細胞無法修補，細胞週期可能停在 G1 期或 G2 期，也可能停止於 S 期，停在 G1 期能防止損傷的 DNA 繼續複製，停在 G2 可避免有缺陷的染色體分離，若細胞無法做修補時，此時細胞直接走向死亡又稱細胞凋亡¹⁷。

調控細胞週期是一極嚴密的過程，參與調控之蛋白質主要包括週期素蛋白質 (cyclin)、週期素依賴性激酶 (cyclin-dependent kinases ; CDKs) 及週期素依賴性激酶抑制蛋白質 (cyclin-dependent kinase inhibitor ; CKIs) 三大類 (圖三)¹⁸⁻²¹。

CDK 是 serine/threonine 蛋白激酶，單獨存在時不具有活性，必須與週期素結合才具活性²²。不同的週期素會與不同的 CDK 結合，並且週期素的量

會隨著細胞週期而變化，例如在 G1 時期的中期，cyclin D 與 CDK4、CDK6 結合後，可進一步造成 Rb (retinoblastoma) 蛋白質的磷酸化，並使 E2F (一種轉錄因子) 釋放出來，E2F 再繼續活化一些與 DNA 複製相關的基因表現，以便使細胞進入 S 時期；而在 G1 時期的後期 cyclin E 會大量增加，並與 CDK2 結合，除了促使細胞進入 S 時期外，也和 DNA 複製的早期調控有關。進入 S 時期後，cyclin E 即消失，CDK2 再與 cyclin A 結合。當要進入 G2/M 時期，cyclin A 與 cyclin B 會與 Cdc2 (CDK1) 結合，調節有絲分裂的進行。

此外，CDK/cyclin 的活性會被 CKI 所抑制，CKIs 依其結構功能分為兩大類：(1) INK family：包括 p16、p15、p18、p19，主要是競爭性地抑制 CDK4、CDK6 和 cyclin D 結合。(2) Kip/Cip family：包括 p21、p27、p57，會與 CDK/cyclin complex 結合後使之失去活性。p21 及 p27 幾乎在所有細胞都會表現，對 G1 及 G2 時期的調控十分重要，過度表現會使細胞週期停滯²³⁻³⁰。

研究顯示 G2/M 期之調控機制是當細胞由 G2 時期欲進入 M 時期，藉由 Tyr-14 與 Tyr-15 已去磷酸化 Cdc2/CDK1 與 cyclin B 結合，使得細胞進入分裂期³¹。正向調節 cyclin B/CDK1 活性的蛋白質包括去磷酸化的蛋白質 Cdc25C，而負向調節則包括 Cdc25C 的上游蛋白質 Chk1/2、14-3-3 與 Cdc2/CDK1 磷酸化的蛋白質 Wee1 與 Myt Kinase 等。此外，CDK 的抑制蛋白如 p21 與 p53 亦扮演著負向調節角色 (圖三)³²。許多研究發現當細胞受到 DNA-damaging agents

(如射線照射)或以能與微管蛋白結合之藥物 vincristine、paclitaxel 處理時，細胞週期會被抑制於 G2/M 期，此時 Cdc2/CDK1 的活性扮演著調節細胞凋亡的重要角色，例如活化 caspase-9 或 Bcl-2 的過度磷酸化，而使得細胞進行凋亡。因此，Cdc2/CDK1 的活性對細胞週期的運行與調節細胞凋亡是非常重要的^{32,33}。

目前已知有許多蛋白質激酶 (protein kinases) 活性的改變調控著細胞週期及細胞凋亡路徑的進行。例如 cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA)、protein kinase B (PKB)、protein kinase C (PKC)、tyrosine kinases 和 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 家族，尤其是 p42/44 (extracellular signal regulated kinase; ERK)、p38/MAPK 和 JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase) 等。由於這些蛋白質激酶活性之改變對細胞造成的影響仍未有定論；促進或抑制細胞週期運行、誘導或阻斷細胞凋亡路徑仍未完全明瞭^{34,35}。

第四節 細胞凋亡之簡介

細胞凋亡為生理上一種計劃性的死亡 (programmed cell death ; PCD) , 其特定的形態變化包括 : 胞核染色質的濃集 (chromatin condensation) 、細胞核內DNA裂解 (DNA fragmentation) 形成約185 bp的核小體、細胞皺縮裂解形成凋亡小體 (apoptotic body) 等。細胞膜表面的磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine ; PS) 會由細胞膜內側翻轉至細胞膜外側 , 並與吞噬細胞及樹突狀細胞 (dendritic cell) 膜上的接受器結合 (圖四) ³⁶。另外吞噬細胞會分泌細胞激素 (cytokines) 如interleukin-10、TGF- β (tumor growth factor- β) 抑制發炎反應。

凋亡前期, 可利用Annexin V-FITC/PI雙染法辨識外翻的磷脂醯絲胺酸, 以區分正常細胞、凋亡細胞和壞死細胞。在凋亡後期細胞內的DNA會被核酸限制內切酶 (endonuclease) 裂解成不同倍數約為180~220 bp的片斷, 此種現象可利用DNA電泳技術, 從凝膠上呈現梯狀圖譜 (DNA ladder) 來辨識是否有細胞凋亡的情況³⁷, 或利用DNA末端轉移酶標記技術來辨別, 即TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) assay³⁸。此外也可用DNA單染法 (hypodiploidy analysis) 分析細胞核DNA含量之多寡, 以定量凋亡細胞所佔的比例。上述Annexin V-FITC/PI雙染技術、TUNEL assay、DNA單染法皆可用流式細胞儀分析處理³⁹。

細胞凋亡受到嚴密的調控, 此調控機制和homeostasis及tumorigenesis有關。在胚胎生長期, 細胞凋亡是去除非需要組織之主要機制。在成體則是

當細胞老化、感染、被嚴重傷害、不再被需要時會經由凋亡途徑被去除。目前研究發現誘發細胞凋亡的訊息傳遞路徑可概分為兩大類，一類為經由凋亡訊息受體傳導路徑（death receptor pathway），另一類為粒線體傳遞路徑（mitochondrial/stress pathway）的傳導路徑（圖五），而這兩條主要細胞凋亡路徑上下游間及彼此間也相互影響：

（1）凋亡訊息受體傳導路徑以Fas/FasL訊息傳導路徑為例，當Fas ligand（FasL）與細胞膜表面蛋白質Fas（CD95）結合後，促使下游的受體傳導蛋白質FADD（Fas associating protein with death domain）及procaspase-8結合形成DISC（death-inducing signaling complex）進而活化procaspase-8，活化的caspase-8便活化其下游的caspase-3、-7及-6因而促成細胞凋亡⁴⁰⁻⁴²。

（2）粒線體傳遞路徑，例如一些誘發細胞死亡的訊息（如游離輻射、藥物、自由基等）傳入細胞後，細胞質的粒線體膜電位會下降，同時粒線體會釋放Apaf-1（apoptosis protease-activating factor-1）、cytochrome *c*、procaspase-9、procaspase-2和AIF（apoptosis-inducing factor）等蛋白質。當Apaf-1、cytochrome *c*、dATP及procaspase-9結合形成凋亡複合體（apoptosome）後，procaspase-9便形成活化態的caspase-9，進而活化下游的caspase-3、-7及-6而使細胞凋亡⁴³⁻⁴⁶。

Caspase（cysteine aspartyl protease，cysteine dependent aspartate specific protease）它們是以不活化態之酶原（zymogen，pro-enzyme）形成持續表現在細胞內，當特定之Asp的C-端之肽鍵被切斷後才能活化，它們會切斷一些

細胞內物質而導致細胞死亡。Caspase 依其在執行凋亡程式中的地位與角色可分為三類(表一)⁴⁷⁻⁴⁹：(1) ICE 家族 (the ICE subfamily of cytokine processors)：有 caspases-1、-4、-5、-11、-12、-13 與-14，其功能主要與發炎反應有關。

(2) ICH-1/Nedd-2 家族 (the ICH-1/Nedd-2 subfamily of apoptotic initiators)：有 caspases-2、-8、-9 與-10，其功能主要負責活化 apoptotic executioners 以執行細胞凋亡。

(3) Ced-3/ CPP32 家族 (the Ced-3/ CPP32 subfamily of apoptotic executioners)：有 caspase-3、-6 與-7。主要功能在負責執行細胞凋亡，裂解其下游的蛋白質如 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)、DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) …等。這類 caspase 結構上 N'-的 prodomain 較短，能分解細胞內的蛋白質 PARP。PARP 原本作用為修復受損的 DNA、調控細胞增殖與死亡的平衡、和維持基因體的穩定性，當 PARP 受 caspase-3 裂解，由原本 116 kDa 被水解成 85 kDa 而失去原本的作用。Caspase-3 也將裂解 ICAD/DFF45 (inhibitor of caspase-3-activated DNase) 導致其鍵結的 CAD/DFF40 (caspase-3-activated deoxyribonuclease) 能脫離 ICAD 的束縛，進而 CAD 可轉移到細胞核內分解 DNA 成大約 180—200 bp 長度的片斷。

Caspase 具有的特徵包括：(1) 原本為單一無活性的酶原，活化後被切割形成大、小次單位，而形成四聚體模式，如 caspase-8 其活化態為 (P20/P10)，其切割蛋白質的作用位置則是 Asp 之 C 端的肽鍵；(2) 具有

自身催化或相互激活的能力；(3) 具有相似的催化部位 (catalytic site)，包括含有 active site cysteine 殘基的 QACXG sequence^{48,50}。

除了caspase外，Bcl-2家族也是調控細胞凋亡很重要的因子⁵¹⁻⁶⁵。Bcl-2最初是在B細胞淋巴瘤中的染色體轉位發現的，為一原致癌基因 (proto-oncogene)，會抑制B細胞死亡，導致細胞瘤的生長。Bcl-2家族結構相似，大部份在C端都含有疏水性區域 (hydrophobic domain)，使其易存在於細胞膜或胞器膜上。Bcl-2家族具有BH (Bcl-2 homology) domain，分別為BH1、BH2、BH3、BH4。此家族依功能性分為兩大類：(1) 促進細胞凋亡的蛋白質 (pro-apoptotic)，包括 Bax、Bak、Bad、Bid、Bik 及 Bcl-Xs等；大都存於細胞質，一旦接受到死亡訊息則會從細胞質轉位至細胞膜上。(2) 抑制細胞凋亡的蛋白質 (anti-apoptotic)，包括Bcl-2、Bcl-X_L、Bcl-w等；大都存在粒線體膜、內質網膜或核膜上。此兩類分子在體內相互制衡。若促進凋亡蛋白質較抑制凋亡蛋白質多，則將細胞引向凋亡；反之細胞存活不死。BH4大都只存在抑制細胞凋亡蛋白質 (圖六)⁶⁶⁻⁶⁸。

Bcl-2家族蛋白質彼此間會形成雙體結構 (dimerization)，例如Bcl-2或Bcl-X_L能與Bax或Bak形成複合體。Bcl-2及Bcl-X_L等抑制凋亡的蛋白質會和位於粒線體外膜之Bax及Bak結合，因而抑制細胞凋亡的訊息傳導。若Bcl-2/Bax或Bcl-X_L/Bak形成複合體時，會遮蔽Bax或Bak所誘發的死亡訊息，而導致細胞存

活率上升（圖六）。Bcl-2家族影響粒線體的完整性（mitochondrial integrity），當Bax和Bak蛋白質被加到純化之粒線體會誘發MMP（mitochondrial membrane permeabilization），可能是因為（1）自己本身形成channel；或（2）改變現有之channel活性。

誘導凋亡的機制，目前認為是BH₃-only之Bcl-2家族蛋白質當感受到細胞傷害時，會啟動粒線體途徑。當BH₃-only蛋白質被活化後，其會被釋放出而中和Bcl-2或其類似蛋白質之功能。繼而BH₃-only蛋白質會和Bax-like蛋白質會在粒線體膜上形成孔洞（pore），導致MMP，使得粒線體膜間隙（intermembrane space）之Apaf-1、cytochrome *c*、procaspase-9、procaspase-2和AIF（apoptosis-inducing factor）等蛋白質會被釋放至細胞質，或是造成粒線體膜電位（mitochondrial transmembrane potential；MTP）的下降而產生大量氧化自由基（reactive oxygen species；ROS），最後啟動一系列caspases的活化而凋亡^{51,69-73}。

第五節 血癌動物模式介紹

新藥的開發除了在細胞株的離體實驗 (*in vitro*) 需獲得證實外，建立疾病的動物模式及動物的活體實驗 (*in vivo*) 也是非常重要的。藥物如果能在細胞株離體實驗中觀察到經由誘導細胞分化；抑制細胞週期運行；或誘導細胞凋亡等作用，接著便可探討藥物在動物體內是否仍具有抑制癌細胞生長的抗癌作用⁷⁴，做為進一步藥物開發及臨床人體試驗的評估。

目前已知的血癌動物模式包括：(1) 利用藥物誘發小鼠產生白血病⁷⁵，例如 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 或 benzene；(2) 利用基因轉殖技術製造基因剔除的小鼠，例如 C/EBP^{-/-} 基因缺失鼠⁷⁶；(3) SCID 小鼠 (Severe combined immunodeficient mice) 注入血癌細胞株誘發血癌的形成⁷⁷；(4) 利用輻射照射 (irradiation) 方法誘導小鼠產生白血病⁷⁸；(5) 利用來自同源老鼠的血癌細胞株打入小鼠體內，誘發小鼠產生白血病^{79,80}。利用同源小鼠的血癌細胞株打入小鼠體內，誘發小鼠產生白血病，可能是最方便快捷且能避免因為小鼠免疫系統對注入體內的癌細胞產生排斥反應而將癌細胞消滅的方法。

1996 年 Dr. Glass 等利用來自 BALB/c 小鼠產生的血癌細胞株 A20 (B lymphoma of BALB/c origin)，WEHI-3 (myelomonocytic leukemia of BALB/c origin)，PU5-1R (monocytic leukemia of BALB/c origin) 以注射方式注入 BALB/c 小鼠體內成功地誘導 BALB/c 小鼠產生血癌⁷⁹。在癌細胞注射 6-14 天後可發現小鼠體

內肝臟、脾臟都有腫脹現象，並且經由組織切片染色發現脾臟紅漿區內有 90% 以上為浸潤的血癌細胞。源於 BALB/c 小鼠血癌細胞株 WEHI-3 為一種未分化完全的血癌細胞，其特性和人類人類骨髓性白血細胞株 HL-60、U937、K562、KG-1 細胞相似。經由誘導劑 ATRA 或 1,25-Vitamin D3 處理的 WEHI-3 細胞以 nitroblue tetrazolium (NBT)、naphthyl acetate esterase (non specific esterase)、細胞表面抗原 CD11b (Mac-1) 染色等方法檢測均證實誘導劑確實能誘導其分化成具有功能的吞噬細胞⁸¹。因此，以 WEHI-3/BALB/c 血癌動物模式可進一步篩選抗骨髓性白血病的作用藥物及探討藥物之機轉。

第六節 研究動機及目的

藉由誘導細胞週期停滯、細胞凋亡或細胞分化的機制，進而達到抑制癌細胞的增生作用，是目前用來篩選有效抗癌藥的重要指標。一些成功應用在臨床上的抗癌藥物，其來源可能為天然物成份或是以天然物成份為先導化合物（lead compounds）而合成的衍生物。由中藥中純化或經由人工合成，具有 chalcone 結構的衍生物如 xanthohumol；2',4',6',4'-tetrahydroxy-3'-prenylchalcon 等曾被報導具有抑制癌細胞株生長的作用。

由本所郭盛助教授合成的具有 benzyloxybenzaldehyde 結構之衍生物具有類似 chalcone 的結構。實驗發現 2-benzyloxybenzaldehyde (CCY1a) 具有抗血小板凝集、抑制 fMLP 所誘導的大鼠嗜中性白血球脫顆粒反應、抑制嗜中性白血球形成過氧化物之反應、抑制肥胖細胞脫顆粒反應的活性，並可提昇中性白血球內 cAMP 的量。此現象可能和導致 NADPH oxidase 活性降低有關⁸²⁻⁸⁴。另外實驗也發現，fMLP 所誘導的大鼠嗜中性白血球細胞質內鈣離子濃度增加的作用會被 CCY1a 抑制。此作用可能的機制是直接地抑制鈣離子通道 (Ca²⁺ channel) 或間接地透過減弱酪胺酸的磷酸化作用 (attenuation of tyrosine phosphorylation)⁸⁵。

此外，CCY1a 亦被證實具有抑制血清所誘導的血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cell) 增生的作用；作用的機制是藉由抑制 Ras/MAPK 訊息傳遞

路徑，包括抑制p42/44MAPK的活化、c-jun及c-fos mRNA的表現量、NF-kappaB 及 AP-1的DNA binding活性⁸⁶。

因此本研究的目的主要是以癌細胞株及WEHI-3細胞轉殖的BALB/c(MHC同源)血癌小鼠模式探討一系列 benzyloxybenzaldehyde 結構之衍生物對血癌之生長抑制作用及作用機制的探討，期能篩選出具抑制血癌細胞生長且無副作用的潛能藥物，以供未來進一步開發此類藥物及應用之根據。

第二章 材料與方法

第一節 實驗材料與儀器

(1) 藥品

1. Benzyloxybenzaldehyde 衍生物 (**17-34**) 由本所郭盛助教授提供⁸⁷，合成方法如 Scheme 1。秤取化合物 **1-12** (0.1 mole) 溶於 150 mL 的 THF (tetrahydrofuran) 中，加入化合物 **13-16** (0.13 mole)、無水碳酸鉀 20 克、無水碘化鉀 26 克，加熱迴流攪拌 6 小時。減壓濃縮蒸除 THF，將濃縮物倒入水中，以氯仿進行萃取。取氯仿層，以無水硫酸鎂脫水過濾後，減壓濃縮蒸除溶媒。所得之粗產物以管柱色層分析法分離純化，可得化合物 **17-31**。秤取 hydroxylamine hydrochloride (0.04 mole) 與醋酸鈉 (0.06 mole) 混合於 150 mL 乙醇中，加入化合物 **17-19** (0.02 mole)，加熱迴流攪拌 3 小時。以重力過濾濾除不溶性鹽類，取濾液進行減壓濃縮蒸除乙醇。將濃縮物倒入水中，以氯仿進行萃取。取氯仿層，以無水硫酸鎂脫水過濾後，減壓濃縮蒸除溶媒。所得之粗產物以管柱色層分析法分離純化，可得化合物 **32-34**。
2. 購自 Sigma, MO, USA 公司：DMSO (dimethylsulfoxide)、PI (propidium iodide)、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、NaCl、HCl、 NaHCO_3 、RNase A、acetic acid、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、glycogen、NP-40、Triton X-100、ethidium

bromide 、 phenol/chloroform/isopropanol 、 glycerol 、 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 、 DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) 、 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 、 leupeptin 、 aprotinin 、 acrylamide 、 proteinase K 、 sodium deoxycholate 、 SDS (sodium dodecyl sulfate) 、 low melting agarose 、 heparin 、 hematoxylin 、 heparin 、 methanol 、 ethanol 、 Eosin 、 2-glycofurol 、 2-mercaptoethanol 、 N,N'-methylolene-bis-acrylamide 、 ammonium persulfate 、 DTT (dithiothreitol) 、 glycine 、 trypan blue 、 acrylamide/bis-acrylamide (29:1) 、 NBT (nitroblue tetrazolium) 、 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 、 TRI Reagent[®]與 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide) 。

3. 購自 Calbiochem, MO, USA 公司：RO-32-0432 與 H89 。
4. 購自 Merck, Darmstadt, Germany 公司：paraformaldehyde、sodium citrate、TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamine)與 Tris (tris-[hydroxymethyl]aminomethane)
5. 購自 Promega Corporation, WI, USA 公司：agarose 、 U0126 、 SB203580 與 PD98059 。
6. 購自 R&D Systems, MN, USA 公司：caspase-3 抑制劑 (Z-DEVD-FMK) 、 caspase-9 抑制劑 (Z-LEHD-FMK) 與 caspase-8 抑制劑 (Z-IETD-FMK) 。
7. 購自 GIBCO BRL, Life Technologies, MD, USA 公司：RPMI 1640 培養基、IMDM 培養基、penicillin/streptomycin 、 FBS (fetal bovine serum) 、 L-glutamine 與

trypsin。

8. 購自 HyClone, UT, USA 公司：FBS。

(2) 試劑組

1. 購自 R&D Systems, MN, USA 公司：caspase-3、caspase-9 與 caspase-8 colorimetric Assay Kit。
2. 購自 NEN™ Life Science, MA, USA 公司：Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (ECL) kit。
3. 購自 Amersham-Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden 公司：Ficoll-Paque Plus kit。
4. 購自 Cell Signaling Technology, MA, USA 公司：protein marker。
5. 購自 PharMingen, CA, USA 公司：Ammonium Chloride Lysing Reagent。
6. 購自 MBI Fermentas Ltd., Lithuania 公司：100 bp DNA Ladder。
7. 購自 Chema Diagnostica, UK 公司：GLUCOSE FL、GPT/ALAT FL、GOT/ASAT FL、Proteins(Total)、LDH FL、UREA UV FL、ALBUMIN 與 CREATININE detection Kit。
8. 購自百恩諾生物科技股份有限公司 (Asia BioInnovations Corp, Taiwan)：ABC

人類通用基因晶片 (HSUN8K-1)。

(3) 抗體

1. 購自 PharMingen, CA, USA 公司：anti-PARP、anti-Cdc25C、anti-p21、anti-Bid、anti-cytochrome *c*、anti-CD19-FITC、anti-CD11b-FITC、anti-CD45-FITC、anti-CD3-PE、anti-CD14-PE 與 anti-Mac-3-PE antibody。
2. 購自 NeoMarker, CA, USA 公司：anti-cyclin B antibody。
3. 購自 BD Transduction Laboratories, CA, USA 公司：anti-FasL 與 anti-Cdk 1/Cdc2。
4. 購自 Upstate biotechnology, NY, USA 公司：anti-Bcl-2 與 anti-Bax antibody。
5. 購自 R&D System, MN, USA 公司：anti-caspase-3、anti-caspase-8 與 anti-caspase-9。
6. 購自 Amersham-Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden 公司：anti-tubulin antibody。
7. 購自 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA 公司：anti-mouse IgG-HRP、anti-rabbit IgG-HRP、anti-mouse IgG-FITC 與 anti-goat IgG-HRP antibody。

(4) 細胞株

HL-60 (human promyelocytic leukemia cell line)、U937 (human promonocytic

leukemia cell line)、K562 (human erythroid leukemia cell line)、KG-1 (acute myelogenous leukemia)、KG-1a (acute myelogenous leukemia)、WEHI-3 (murine myelomonocytic leukemia of BALB/c origin)、Hep G2 (hepatocellular carcinoma)、Hep 3B (hepatocellular carcinoma) 與 H1299 (non-small cell lung cancer) 等細胞株購自食品工業研究所 (Culture Collection and Research Center, CCRC), 細胞主要來源為 American Type Culture Center (ATCC)。

(5) 儀器

流式細胞儀 (FACS Calibur™, Becton Dickinson, NJ, USA)、垂直式無菌操作台 (laminar flow)、相位差倒立顯螢光微鏡 (ZEISS, Axiovert 25, Germany)、高速離心機 (Centrifuge, Model GS-6R, Beckman Coulter, Inc., CA, USA)、微量離心機 (KUBOTA, microcentrifuge 1720, KUBOTA Inc., Japan) 二氧化碳細胞培養箱 (NUAIRE™ DMH AUTO FOLW CO₂ Air-Jacketed incubator)、液態氮筒儲存裝置、血球計數盤 (hemocytometer)、ELISA reader (Anthos 2001, Australia)、電源供應器、DNA水平電泳槽、蛋白質垂直式電泳槽、濕式蛋白質轉漬槽 (BioRad, San Francisco Hoefer, Mighty Small™ SE245)、水浴槽、震盪器、無菌玻璃瓶、UV燈、秤重天秤、微量天平、-80 °C 與 -20 °C 冷凍冰箱、4 °C 冷藏冰箱、無菌吸管組、5 mL 與 10 mL 吸管、10公分細胞培養皿、24孔與96孔細胞培養皿、75 T 與 25 T 細胞培養瓶、離心管 (1.5

mL、15 mL、50 mL)、細胞冷凍管、鐵架、0.22 μm 過濾器、PVDF (polyvinylidene fluoride) 轉漬膜 (Millipore, MA, USA)、柯達X光底片、柯達顯影與定影劑、小鼠手術用剪刀、生化檢測儀、鼠籠、水瓶、1 mL 針筒與載玻片等。

第二節 實驗方法

壹、細胞株體外實驗方法

(1) 藥物之配置

1. Benzoyloxybenzaldehyde 衍生物溶於無水乙醇中，配製成濃度為 5-50 mM，避光儲存於-20 °C 冷凍庫中。實驗過程中，乙醇所佔的比例，不超過 0.2%。
2. 抑制劑：H89 (PKA 專一性抑制劑)、RO32-0432 (PKC 專一性抑制劑)、U0126 (MEK1/2 專一性抑制劑)、PD098059 (ERK 的專一性抑制劑)、SB203580 (JNK/p38 的抑制劑)、Z-IETD-FMK (caspase-8 專一性抑制劑)、Z-DEVD-FMK (caspase-3 專一性抑制劑)、Z-LEHD-FMK (caspase-9 專一性抑制劑) 與 DiOC₆(3) 均溶於 DMSO 中，配製成說明書上建議之濃度，避光儲存於-20 °C 冷凍庫中。

(2) 細胞株的培養⁸⁸

細胞株培養在含 10% FBS、1% L-glutamine、100 µg/mL streptomycin 與 100 units/mL penicillin 培養基中。細胞依實驗需要培養於細胞培養皿或細胞培養瓶中，並置於 37 °C、5% CO₂、溼度 95% 的無菌培養箱中培養。細胞以 trypan blue 染色，用血球計數盤計算活細胞數目及存活率，並控制繼代

的細胞數在 $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL。

(3) 正常人週邊單核細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 之處理⁸⁹

取正常人靜脈血液並置入裝有 heparin (1unit/mL) 之離心管中，離心 ($470 \times g$ 、10 分鐘、 4°C)。取白血球層加入等體積 RPMI-1640 培養基，並緩慢滴入裝有等體積 Ficoll-Hypaque (sp gr 1.077) 管中，離心 ($650 \times g$ 、20 分鐘、 4°C)。取中間白血球層並加入 RPMI-1640 培養基，離心 ($235 \times g$ 、5 分鐘、 4°C) 清洗細胞兩次。

(4) 細胞存活率之分析^{90,91}

懸浮細胞株 (2.5×10^5 cells/mL) 培養於 24 孔盤中，實驗組分別加入不同濃度的化合物處理，並以含等量溶劑當作對照組，細胞置於 37°C 、5% CO_2 、溼度 95% 之細胞培養箱中培養。人類週邊白血球細胞 (2.5×10^5 cells/mL) 以不同濃度之化合物處理。收集細胞加入含 PI ($5 \mu\text{g/mL}$) 的 PBS，利用流式細胞分析儀分析之。樣品之死細胞與活細胞的數量及比率，以 CELL Quest 軟體分析計算。

$$\text{細胞存活率} = (\text{實驗組活細胞數目} / \text{對照組活細胞數目}) \times 100\%$$

(5) 細胞增殖率之分析 (MTT 之試驗)

WEHI-3 及貼附細胞株 (1×10^4 cells/mL) 置於 96 孔盤中，以不同濃度之化合物處理後，將培養基去除並於每一小槽加入 100 μ L 含有 MTT (500 μ g/mL) 的培養基，再於 37 $^{\circ}$ C 下反應 4 小時後，每小槽加入 100 μ L 之 0.04 N HCl /isopropanol，使細胞內藍紫色沉澱顆粒完全溶解後，再用 ELISA reader 於波長 570/620 nm 下測定其吸光值。

$$\text{細胞增殖率} = (\text{實驗組之 OD}_{570/620} / \text{對照組之 OD}_{570/620}) \times 100\%$$

(6) 細胞週期分析⁹²

將經藥物處理不同時間點的細胞收集後以 1X PBS 清洗細胞二次後，加入低張 PI 溶液 (hypotonic PI solution : 0.1% sodium citrate、0.1% Triton X-100、20 μ g/mL PI)，以流式細胞分析儀收集細胞核 DNA 含量資料，再以 ModFit 軟體分析細胞週期的變化。

(7) DAPI 螢光染色法⁹³

細胞株經化合物處理後，收集細胞並用 1X PBS 清洗細胞一次，加入 4% paraformaldehyde 固定細胞，再用 1X PBS 清洗細胞兩次後將細胞附著於載玻片上。細胞玻片檢體置於 0.1% Triton X-100/PBS 中室溫下反應 15 分鐘，再用 1X PBS 清洗細胞後加入 DAPI (1 μ g/mL) 螢光染劑，在 37 $^{\circ}$ C 下

避光反應 30 分鐘，最後用 1X PBS 清洗細胞後，以倒立螢光顯微鏡觀察細胞核與 DNA 斷裂之變化。

(8) DNA 瓊膠電泳測定⁹⁴

1×10^7 細胞經化合物處理不同時間點後收集，以 1X PBS 清洗 1 次，加入 1 mL 4 °C (lysis buffer 20 mM Tris-Cl、10 mM EDTA、0.2% Triton X-100) 於冰上靜置 10 分鐘離心(15000 X *g*、10 分鐘、4 °C)取上清液，加入 0.1 mg/mL proteinase K 於 50 °C 水浴反應 8 小時，後再加入 50 µg/mL RNase A 於 37 °C 水浴中反應 30 分鐘。將反應之檢體以 phenol/chloroform/isopropanol (24 : 25 : 1) 萃取 DNA 後，用 50% isopropanol 及 20 µg/mL glycogen 沉澱 DNA。沉澱的 DNA 以 70%酒精清洗後，乾燥再溶於 TE buffer 中，用 1%瓊膠電泳分析並以 ethidium bromide (1 µg/mL) 染色後，於 UV 燈下觀察 DNA 斷裂的現象。

(9) 粒線體膜電位之檢測⁹⁵

細胞經不同濃度的化合物處理不同時間點後，加入 DiOC₆(3) (40 nM) 螢光染劑，於 37 °C 避光培養 30 分鐘，用 1X PBS 清洗細胞，利用流式細胞分析儀及 CELL Quest 軟體分析。

(10) Caspases-3、-8、-9 之活性分析⁹⁶

根據 caspases-3、-8、-9 colorimetric assay Kit 之使用說明操作。1X10⁶ 之 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μM) 處理不同時間點後收集細胞，用 1X PBS 清洗細胞，加入 50 μL lysis buffer 於冰上靜置 10 分鐘。離心 (15000 X *g*、1 分鐘)，將上清液移至 96 孔培養盤，加入 50 μL 2X reaction buffer 及 5 μL caspases-3 (DEVD-pNA)、-8 (IETD-pNA)、-9 (LEHD-pNA) 之專一性受質，於 37 °C 中避光反應 3 小時，用 ELISA reader 於波長 405 nm 下測定各樣品吸光值。

(11) 蛋白質抽取液之製備

1. 全細胞抽取液 (total cell extract) 之製備⁹⁷

HL-60 細胞經 CCY1a-E2 處理不同時間後收集細胞，加入 100 μL RIPA 緩衝液 (1% NP-40、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate、1 mM PMSF、2 μg/μL leupeptin、2 μg/μL aprotinin/PBS)。細胞混合液經超音波震碎兩次，每次約 5 秒，接著放入 100 °C 沸水中 5-10 分鐘，離心 (15000 X *g*、10 分鐘)，收集上清液並測量蛋白質濃度。

2. 細胞質抽取液 (cytosolic extract) 之製備⁹⁸

HL-60 細胞經 CCY1a-E2 處理不同時間後收集細胞，加入 150 μ L lysis buffer (pH7.4 Tris-HCl 50 mM、EDTA 0.5 mM、EGTA 0.5 mM、0.2 mM PMSF、5 μ g/ μ L leupeptin、5 μ g/ μ L aprotinin、0.3% 2-mercaptoethanol)，於冰上靜置 10 分鐘。離心 (15000 X g 、10 分鐘) 收集上清液，接著放入 100 $^{\circ}$ C 沸水中 5-10 分鐘，離心 (15000 X g 、1 分鐘) 後收集上清液並測量蛋白質濃度。

(12) 蛋白質轉漬法 (Western Blot)

蛋白質抽取液樣品 (30 μ g) 與 SDS 樣本緩衝溶液混合，利用 SDS-PAGE 展開後，轉移蛋白質到 PVDF 膜上。設定電流 ($\text{mA} = \text{濾紙面積 cm}^2 \times 0.65$)，轉漬 1 小時。PVDF 膜以 5% 脫脂奶粉/PBST(0.05% Tween 20/1 X PBS) 作背景覆蓋 (blotting)，室溫下 1 小時。加入各個具抗原專一性的一級抗體(primary antibody)，再以 PBST 清洗 10 分鐘 3 次。加入 HRP-conjugated anti-mouse 或 anti-rabbit IgG 二級抗體 (secondary antibody) 室溫下作用 1 小時，再經 PBST 清洗。以 ECL 試劑組 (enhanced chemiluminescence kit) 呈色，再以 Kodak X 光底片曝光呈像，並利用 Gel-pro 軟體分析各蛋白質的表現量。

(13) RNA 的抽取^{99,100}

HL-60 細胞分別以 CCY1a-E2 處理 0、1、3、4、8 與 12 小時後，收集細胞，以 TRI Reagent 抽取細胞內的 RNA 後以異丙醇沉澱之，並將沉澱的

RNA 乾燥，於-80 °C 儲存。乾燥之 RNA 以 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 處理過的 H₂O 溶解後，以分光光度計檢測其濃度與純度。各樣品之 RNA 抽取量均需大於 100 µg 且其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值均需大於 1.5。此外亦以 RNA 瓊脂凝膠電泳確認 RNA 的純度及 18S 及 28S rRNA 是否完整。

(14) DNA 基因晶片與 RNA 之雜交反應、結果判讀與分析

委託百恩諾生物科技股份有限公司代為進行 RNA 之雜交反應及結果判讀與分析。簡述步驟如下：將 mRNA 逆轉錄為更穩定的互補 DNA (cDNA)，並加上螢光標幟：綠色螢光 (Cy3) 標記於 0 小時處理 (即未處理) HL-60 細胞所製備的 cDNA；紅色螢光 (Cy5) 則加在經 CCY1a-E2 處理 HL-60 細胞所製備的 cDNA。再將螢光標幟的樣本加至含人類 8,000 種基因片段之 ABC 人類通用基因晶片 (ABC Human Chip 8K-1, HSUN8K-1) 上進行雜交反應，螢光標幟 cDNA 會和晶片上能夠與之互補的鹼基序列結合。

將完成雜交反應之 DNA 晶片放入掃瞄器 (Gene Pix 4000B [82719], Image emission wavelength 為 635 nm 及 532 nm) 偵測 Cy5 與 Cy3 螢光，再用電腦軟體 (Gene Pix Pro3.0.5.56 software) 計算每一點上 Cy5 與 Cy3 螢光之比值，以判讀 CCY1a-E2 處理前後，明顯提升與降低表現的基因，所得結果以顏色表示之。將各晶片結果整合，經由統計軟體進行 data sets

之 adjustment(log transformed) 及 filtering(以選擇進行 clustering 之 dataset, 這些基因於各實驗中乃是具有最明顯之 expression ratio 差異性), 再以 Hierarchical clustering 及 K-means clustering 分析其相關性 (gene clustering analysis)。由以上分析可得知 CCY1a-E2 影響 HL-60 細胞基因表現是如何隨著時間改變; 有何趨勢或相關性。

(15) 統計分析

實驗所得之實驗數據, 採用 SPSS 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (one-way-ANOVA) 進行統計分析, 各處理組間差異之顯著性, 當 P 值小於 0.05 以下時, 則認為具統計上意義。

貳、 BALB/c 小鼠活體實驗方法

(1) 實驗動物

16-20 週齡的 BALB/c 雄性小鼠購自台大醫學院動物中心，體重為 20-30 公克。小鼠飼養於乾淨之鼠籠中並以乾淨的鼠糧與水餵食。

(2) 藥物之配製與給藥及癌細胞之方式

CCY1a-E2 溶於 2-glycofurol 中，配製成 125 mg/mL 濃度後，經 0.22 μm 過濾器過濾，避光儲存於 -20 °C 冰箱中。WEHI-3 細胞、2-glycofurol (賦型劑) 與 CCY1a-E2 以靜脈注射 (*i.v.*) 方式注入 BALB/c 小鼠內。

(3) 血癌動物模式建立

血癌動物模式建立方法依 1994 年 Dr. Glass 等報告所述⁷⁹。WEHI-3 細胞 5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^5 等不同劑量，以靜脈注射方式注入 BALB/c 小鼠體內於 0-28 天期間，每週根據血癌之臨床特徵檢測是否順利誘發血癌病變。其評估方式包括：觀察外觀之變化、動物活動力是否降低、體重是否改變等，並於每週犧牲實驗小鼠，觀察脾臟、肝臟及淋巴結等器官的外觀及重量變化，並將脾臟組織切片 (5 μm) 以 H-E 染色觀察紅漿區 (red pulps) 內癌細胞的浸潤情形。

(4) CCY1a-E2 之毒性試驗

七天毒性試驗分別以 CCY1a-E (25、50、100 mg/kg/day) 之劑量靜脈注射方式注入 BALB/c 小鼠體內，連續七天後將小鼠犧牲進行毒性分析。二十八天毒性試驗則是將 BALB/c 小白鼠經 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day) 之劑量以靜脈注射、連續七天。再經二十一天後將小鼠犧牲進行毒性分析。毒性之評估包括外觀變化，並犧牲實驗鼠，觀察其脾臟、肝臟及淋巴結的變化。同時以心臟採血的方式收集全血並分離血清，依據 Chema 公司所提供的試劑組方法檢測血清之 LDH、ALB、GLC、PRO、GOT、GPT、CRE、BUN 等八種生化檢測值¹⁰¹。

(5) CCY1a-E2 的抗癌作用評估

BALB/c 致癌小鼠之誘發及藥物投予方式詳見圖十九。我們評估藥物是否改善 WEHI-3/BALB/c 血癌症狀，檢測方法包括觀察 BALB/c 小鼠外觀、活動力、體重與存活率等，並於第 28 天犧牲實驗小鼠，觀察脾臟、肝臟及淋巴結等外觀及重量變化。利用螢光抗體染色與流式細胞儀分析週邊白血球細胞中 CD3⁺、CD19⁺、CD11b⁺、CD14⁺、Mac-3⁺、CD45⁺ 等細胞族群之比率。

(6) 生化檢測法¹⁰¹

將 BALB/c 小鼠麻醉後以心臟採血的方式採血並將血液置入裝有 heparin

(1 U/mL) 之離心管中離心 (2200 X *g*、5 分鐘)。收集血清 100 μ L 以二次水 200 μ L 稀釋後置於冰上，並用 Chema 公司所提供之 LDH、ALB、GLC、PRO、GOT、GPT、CRE、BUN 等八種生化檢測試劑組用生化檢測儀檢測。

(7) 免疫螢光抗體染色¹⁰²

由心臟採血收集血球細胞後分別加入 anti-CD3-PE/anti-CD19-FITC、anti-CD14-PE/anti-CD11b-FITC、anti-CD45-FITC /anti-Mac-3-PE antibody 於 4 °C 反應 1 小時，之後加入 1X Ammonium Chloride Lysing Reagent 室溫反應 15 分鐘，離心 (250 X *g*、5 分鐘)，用 1X PBS 充份洗去殘留的抗體後，以流式細胞分析各細胞族群之比率。

(8) 統計分析

實驗所得之實驗數據，採用 SPSS 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (one-way-ANOVA) 進行統計分析，各處理組間差異之顯著性，當 *P* 值小於 0.05 以下時，則認為具統計上意義。

第三章 結果

第一節 Benzyloxybenzaldehyde 衍生物對

細胞生長影響的結果

(1) Benzyloxybenzaldehyde 衍生物對細胞存活率的影響

我們用人類幼髓細胞性白血細胞株 HL-60 來評估 benzyloxybenzaldehyde 衍生物對細胞生長的影響。HL-60 細胞經化合物 (40 μM) 處理 24 小時後，以 PI 螢光染色，經流式細胞儀偵測並分析活細胞數目；並以 quercetin ($\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$) 及 vinblastine ($\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{M}$) 做為 positive control，用來比較 benzyloxybenzaldehyde 衍生物對細胞生長抑制作用的效果。我們以 24 小時的 $\text{IC}_{50} < 40 \mu\text{M}$ 的化合物做為有生長抑制作用的標準，實驗結果顯示 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物抑制 HL-60 細胞生長的作用較顯著；3-或 4-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物則無明顯作用 (表二)。經 2-(benzyloxy)benzaldehydes 40 μM 處理 24 小時後，HL-60 細胞存活率 (viability) 分別如下：2-(benzyloxy)benzaldehyde (17, CCY1a) 為 $32.36 \pm 2.25\%$ 、2-(benzyloxy)-4-methoxybenzaldehyde (26, CCY1a-D2) 為 $40.81 \pm 3.00\%$ 、2-(benzyloxy)-5-methoxybenzaldehyde (27, CCY1a-D3) 為 $51.44 \pm 3.06\%$ 、2-(benzyloxy)-5-chloro-

benzaldehyde (**28**, CCY1a-D5) 為 $45.47 \pm 5.40\%$ 、 2-[(3-methoxybenzyl)oxy]-benzaldehyde (**29**, CCY1a-E2) 為 $24.32 \pm 4.98\%$ 、 2-[(2-chlorobenzyl)oxy]-benzaldehyde (**30**, CCY1a-E4) 為 $25.02 \pm 3.55\%$ 及 2-[(4-chlorobenzyl)oxy]-benzaldehyde (**31**, CCY1a-E6) 為 $35.32 \pm 3.25\%$ 。 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物在濃度 1-10 μM 時，就能明顯地抑制 HL-60 生長；其抑制作用呈濃度依存性 (concentration-dependent) 關係。其中又以 2-[(3-methoxybenzyl)oxy]-benzaldehyde (**29**, CCY1a-E2) 抑制作用最顯著；其處理 24 小時之 IC_{50} 約為 5 μM (圖七)。

(2) 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物誘導 HL-60 細胞凋亡

為了進一步探究化合物對 HL-60 細胞生長抑制的機制，分別以 10 μM 及 20 μM 的 CCY1a、CCY1a-D2、CCY1a-D3、CCY1a-D5、CCY1a-E2、CCY1a-E4、CCY1a-E6 處理細胞 12 小時後，由相差倒立顯微鏡觀察細胞，發現細胞形狀有皺縮的現象，同時伴隨有凋亡小體的產生。藥物處理的細胞以 DAPI 染劑進行細胞核螢光染色，於倒立螢光顯微鏡下觀察，發現給藥處理後細胞核內染色質濃集、呈斷裂的情形 (圖八 A)。經化合物 20 μM 處理 24 小時後的細胞，再用 DNA 電泳檢測染色體 DNA，發現細胞核內 DNA 裂解成約 185 bp 的梯度片段 (圖八 B)。因此初步推測化合物抑制細胞生長可能是經由細胞凋亡途徑。

(3) 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對 HL-60 細胞粒線體膜電位 ($\Delta\psi_m$) 的影響

細胞凋亡過程中若受粒線體途徑影響，則粒線體的膜電位會下降。基於此特性我們利用 DiOC₆(3) 螢光染色，再以流式細胞儀分析粒線體膜電位的改變情形。細胞給予 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物 (20 μ M) 12 小時後，粒線體的膜電位有明顯下降的趨勢 (圖九)；相反的，對細胞生長不具明顯抑制作用的 2-(benzyloxy)benzaldehyde oxime (**32**, CCY1a-A15)，則不具明顯的粒線體的膜電位下降的趨勢。因而推論化合物誘導 HL-60 細胞凋亡可能與粒線體途徑有關。

(4) 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對癌細胞之細胞週期的影響

我們以低張 PI (hypotonic PI) 溶液染色法檢測 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物誘導癌細胞進行凋亡，同時也分析細胞核 DNA 量的改變。如圖十所示，經這些化合物處理的 HL-60 細胞在 12 小時就有明顯的 sub-G1 細胞核出現，且隨處理時間越長累積越多。細胞週期在 12 小時呈現 G2/M 期停滯的現象，且處理時間越久 G2/M 期族群越明顯。然而經 30 μ M 化合物處理 48 小時的肝癌細胞 Hep G2 及 Hep 3B (hepatocellular carcinoma) 並無明顯的 sub-G1 細胞核出現，也無明顯的細胞週期改變 (圖十一、圖十二)。我們也比較這些化合物對肺癌細胞 H1299 (non-small cell lung carcinoma) 細胞週期及生長抑制的作用，經 30 μ M CCY1a、CCY1a-D2、

CCY1a-E2 處理的 H1299 細胞在 12 小時就有明顯的 G2/M 期停滯，且處理時間越久 G2/M 期停滯的現象越明顯；但是處理 24 小時後並無明顯的 sub-G1 細胞核出現（圖十三）。以上結果顯示 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對不同癌細胞株作用的機制可能不同。

(5) CCY1a-E2 對正常人類週邊單核細胞 (PBMC) 存活率的影響

在進一步探究 CCY1a-E2 抑制 HL-60 細胞生長的作用機制之前，我們用正常人週邊單核細胞來評估 CCY1a-E2 對正常細胞的生長抑制作用。PBMC 經 CCY1a-E2 處理後，以 PI 螢光染色，經流式細胞儀偵測並分析活細胞數目的百分比值，結果顯示 PBMC 經 5、10、15、20 μM 的 CCY1a-E2 處理 24 及 48 小時後，並無明顯細胞生長抑制的現象（圖十四）。由此可推論在 CCY1a-E2 對 PBMC 無生長抑制作用的濃度下，即可抑制 HL-60 細胞生長（圖七）。

(6) CCY1a-E2 對 WEHI-3 細胞之生長抑制作用

在建立 WEHI-3/BALB/c 血癌模式前，我們要先確定 CCY1a-E2 能有效地抑制小鼠血癌細胞株 WEHI-3 的存活。將 WEHI-3 細胞以各種不同濃度之 CCY1a-E2（25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 μM ）處理 24 小時，以 MTT 方法檢測細胞增殖率。結果顯示 CCY1a-E2 具抑制老鼠血癌細胞株 WEHI-3 的增殖，且抑制作用呈濃度依存性（concentration-dependent）的關係，其處理 24 小時之 IC_{50} 為 5 μM （圖十五）。

第二節 CCY1a-E2 於活體動物之抗癌實驗的結果

(1) WEHI-3/BALB/c 血癌動物模式建立

將 WEHI-3 細胞以 5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^5 等不同細胞數，以尾部靜脈注射方式 (*i.v.*) 轉植入 BALB/c 小鼠體內，於 0-28 天期間，每週根據血癌之臨床特徵檢測是否順利誘發血癌病變並犧牲一批小鼠。對照於正常小鼠，注射 WEHI-3 細胞 (5×10^6) 之小鼠於第 14 天後體重開始持續下降；注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 之小鼠於第 21 天後體重開始持續下降 (表三)。同時其活動力降低，毛色光澤度差，有身體蜷曲之現象。癌細胞 (5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^5) 注射後 28 天之小鼠，其脾臟有腫大的現象。由 H-E 染色之脾臟組織切片觀察到 WEHI-3 (1×10^6) 轉植後 28 天，其脾臟紅漿區內有明顯的癌細胞浸潤 (圖十六)。以免疫螢光染色分析小鼠週邊血之白血球細胞族群，對照正常小鼠，發現 WEHI-3 (1×10^6) 轉植 28 天後之小鼠其表面抗原 CD45⁺ (leukocyte)、CD11b⁺ (natural killer cell、monocyte、granulocyte)、CD14⁺ (monocyte) 的細胞族群有增加的趨勢；CD3⁺ (T lymphocyte)、CD19⁺ (B lymphocyte)、Mac-3⁺ (mononuclear phagocyte) 的細胞族群則無明顯變化 (圖十七)。因此推論以尾部靜脈注射 5×10^6 或 1×10^6 WEHI-3 細胞的小鼠，能在第 28 天後成功地誘導血癌病變生成。

(2) CCY1a-E2 之七天毒性試驗

受到 CCY1a-E2 的最高溶解度及靜脈注射的體積限制，每隻小鼠每次可注射的最高劑量為 100 mg/kg。因此我們分別以 100、50、5 mg/kg/day 三種劑量連續注射七天進行毒性試驗，並以注射同體積 2-glycofurol（賦型劑）之小鼠為對照組。實驗結果顯示：與對照組及正常小鼠相比，注射 CCY1a-E2 的小鼠活動力及毛色光澤均無明顯差異（圖十八），其脾臟及肝臟與正常老鼠一樣並無腫大或變形；但是所有給藥及賦型劑小鼠之體重有增加的現象（表四）。血清之生化檢查值顯示，實驗組小鼠與對照組小鼠之 LDH（lactate dehydrogenase）、ALB（albumin）、PRO（total protein）、AST/GOT（aspartate aminotransferase）、ALT/GPT（alanine aminotransferase）、CRE（creatinine）、BUN（blood urea nitrogen）等數值並無差異；但是所有給藥及賦型劑小鼠之血清 GLC（glucose）濃度均顯著提高（表五）。

(3) CCY1a-E2 之二十八天毒性試驗

根據上述結果，我們亦以 100 mg/kg/day 之 CCY1a-E2 進行二十八天毒性試驗。BALB/c 小鼠以尾部靜脈注射連續投予藥物或賦型劑 7 天，再經 21 天（即第 28 天）將小鼠犧牲。注射 CCY1a-E2、賦型劑之小鼠與正常小鼠三者間的體重、脾臟及肝臟改變（表六），活動力及毛色光澤均無明顯差異。實驗組小鼠與對照組小鼠之 LDH、ALB、GLC、PRO、GOT、

GPT、CRE、BUN 等八項血清生化檢查值除了 LDH 顯著下降外其餘無差異(表七)。因此推論 CCY1a-E2 在 100 mg/kg/day 劑量下對 BALB/c 小鼠並無明顯的毒性。

(4) 以 WEHI-3/BALB/c 血癌動物模式評估 CCY1a-E2 的抗癌作用

給予 BALB/c 小鼠 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day) 連續七天，觀察七天及二十八天並無明顯的毒性，且離體實驗中亦證實其能有效地抑制 WEHI-3 細胞增殖，於是我們根據圖十九的實驗設計流程圖，以 WEHI-3/BALB/c 小鼠來評估 CCY1a-E2 治療血癌效能。

第 28 天時各組小鼠存活率(圖二十)分別為:A 組正常小鼠為 100%(8/8); B 組注射 WEHI-3 (1×10^6) 的小鼠為 75% (6/8); C 組給予 CCY1a-E2 的小鼠為 87.5% (7/8); D 組注射 WEHI-3 細胞且同時連續七天給予 CCY1a-E2 的小鼠為 100% (8/8); E 組給予 WEHI-3 細胞一週後再連續七天給予 CCY1a-E2 的小鼠為 75% (6/8)。然而 D 組或是 E 組小鼠其平均體重下降的程度比 B 組小鼠顯著減緩，且和正常小鼠體重無明顯差異(表八)。C 組、D 組或 E 組小鼠之毛色光澤及活動力皆較 B 組小鼠佳(圖二十一、A)。對照 B 組小鼠發現，D 組或是 E 組小鼠其鼠蹊及腸繫膜淋巴結、脾臟及肝臟腫大的情形有明顯降低至與正常小鼠無顯著差異(表九;圖二十一、B,C,D)。以螢光免疫染色法分析週邊血液之白血球細胞表面抗原

發現：對照 B 組小鼠，D 組或 E 組小鼠之其表面抗原 CD45⁺ (leukocyte)、CD11b⁺ (natural killer cell、monocyte、granulocyte)、CD14⁺ (monocyte) 的細胞族群增加的趨勢降低至與正常小鼠無顯著差異；D 組或 E 組小鼠之其表面抗原 Mac-3⁺ (mononuclear phagocyte) 的細胞族群有顯著地增加；E 組小鼠之 CD3⁺ (T lymphocyte)、CD19⁺ (B lymphocyte) 的細胞族群有增加的趨勢 (圖二十二)。根據以上結果推論，連續 7 天靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day) 給予 WEHI-3/BALB/c 血癌小鼠確實具有減緩血癌病變的功效。

第三節 CCY1a-E2 對 HL-60 細胞生長影響的結果

(1) CCY1a-E2 對血癌細胞株存活率的影響

為了進一步探討 CCY1a-E2 對血癌細胞生長抑制作用的機制，我們利用 CCY1a-E2 進行各項實驗。HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (1、2.5、5、10 μM) 處理 24 及 48 小時後，以 PI 螢光染色，經流式細胞儀偵測並分析活細胞數目，發現 CCY1a-E2 抑制 HL-60 細胞存活的作用呈濃度與時間依存性的關係 (concentration- and time-dependent)，其處理 48 小時之 IC_{50} 約為 2.5 μM (圖二十三)。CCY1a-E2 (2.5、5、10 μM) 處理 24 小時後也有明顯抑制 U937、K562、KG-1 及 KG-1a 等血癌細胞的生長，其作用亦呈濃度依存性的關係 (圖二十四)。

(2) CCY1a-E2 對 U937 癌細胞形態之影響

HL-60、U937 細胞以 CCY1a-E2 (5 μM) 處理 12 小時後，用位相差倒立顯微鏡直接觀察細胞形態，發現給藥處理後細胞形狀有皺縮的現象，同時伴隨有凋亡小體的產生。以 DAPI 染劑進行細胞核螢光染色，於螢光倒立顯微鏡下觀察，發現給藥處理後細胞核內染色質凝聚，核呈斷裂的情形 (圖二十五)，初步推測 CCY1a-E2 抑制 U937 細胞生長可能也是經由細胞凋亡途徑。

(3) CCY1a-E2 對血癌細胞的細胞核及核內 DNA 之影響

為了再證實 CCY1a-E2 抑制 U937、K562、KG-1 及 KG-1a 等血癌細胞株生長是經由細胞凋亡途徑，我們用 DNA 電泳檢測分析 CCY1a-E2 於 15 μ M 濃度處理這些細胞 12 小時後之染色體 DNA，發現經 CCY1a-E2 處理後的各血癌細胞 DNA 斷裂成小片段（圖二十六）。

(4) CCY1a-E2 對粒線體膜電位的影響

根據先前的實驗結果得知，2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物誘導 HL-60 細胞凋亡可能與粒線體途徑有關。基於此特性，我們給予 HL-60 細胞 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 6、12、18、24 小時等不同時間點後，用 DiOC₆(3) 螢光染色，再以流式細胞儀分析粒線體膜電位的改變情形。我們發現膜電位下降的細胞數比例分別是 20.27% (0 小時)、24.96% (6 小時)、56.67% (12 小時)、63.02% (18 小時)、87.06% (24 小時)；從 12 小時粒線體的膜電位有下降的趨勢，且隨時間越長，粒線體的膜電位下降的越明顯（圖二十七）。

(5) CCY1a-E2 對 caspase 活性的影響

為了探討 CCY1a-E2 對 HL-60 細胞中 caspases 活性變化的影響，我們給予 HL60 細胞 CCY1a-E2 (5 μ M)，並於 2、4、8、12 小時等不同時間點檢測

caspase-9、caspase-8 與 caspase-3 的活性變化情形。結果顯示：細胞經處理後 OD₄₅₀ 吸光值的大小依次為 caspase-9 > caspase-3 > caspase-8 (圖二十八)。Caspase-9、-8、-3 的活性在 2 小時開始出現增加的趨勢，且隨時間越長，增加地越明顯。caspase-9 的活性在 2 小時開始增加，在 8 小時達最高峰。因此推論 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞凋亡主要可能是經由 caspase 依賴型之粒線體傳遞路徑所調控。

(6) Caspase-3、-8、-9 專一性抑制劑對 CCY1a-E2 誘導細胞凋亡之影響

為了釐清 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞凋亡與 caspase 活性變化之間的關聯，我們將 HL-60 細胞分別以不同濃度之 caspase-3 (Z-DEVD-FMK)、caspase-8 (Z-IETD-FMK)、caspase-9 (Z-LEHD-FMK) 專一性抑制劑處理一小時後，再給予 CCY1a-E2 (5 μ M) 經 24 小時後分析細胞存活率。Caspase-3、-8、-9 專一性抑制劑於 25 μ M 和 50 μ M 的濃度時，能顯著地降低 CCY1a-E2 所誘導的生長抑制作用 (圖二十九)。比較對照組 (只給予 CCY1a-E2)，25 μ M 抑制劑前處理的細胞其存活率分別為 69.33 \pm 0.97% (caspase-3)、64.61 \pm 3.43% (caspase-8)、64.42 \pm 2.83% (caspase-9)；給予 50 μ M 抑制劑前處理的細胞其存活率分別為 73.32 \pm 2.02% (caspase-3)、70.71 \pm 1.53% (caspase-8)、72.38 \pm 2.96% (caspase-9)。因此推論 caspase-3、-8、-9 可能都有參與 CCY1a-E2 誘導癌細胞凋亡路徑。

(7) CCY1a-E2 誘導 caspase 之活化並分解 PARP 蛋白質

我們利用西方墨點法觀察 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理後的 HL-60 細胞中 caspase-3 的受質 PARP 蛋白質變化的情形。結果顯示 CCY1a-E2 處理後的細胞隨著 caspase-3 活性的增加, PARP 於 6-8 小時開始被分解出現 85 KDa 的片段, 此結果與 caspase-3 活性出現時間相吻合 (圖三十)。

(8) CCY1a-E2 對 Bcl-2 家族蛋白質及 cytochrome *c* 的影響

我們也用西方墨點法分析調節細胞凋亡相關蛋白質在 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理之 HL-60 細胞中量的變化。結果顯示 CCY1a-E2 會促使細胞質中 cytochrome *c* 蛋白質量於 6-8 小時開始增加, 且呈現時間依存性。此外, 促進細胞凋亡的 Bax 蛋白質逐漸增加, 而抑制細胞凋亡的 Bcl-2 與未活化態的 Bid 蛋白質量逐漸降低 (圖三十)。

(9) CCY1a-E2 對細胞週期的影響

以低張 DNA PI 染色法配合流式細胞儀分析, 觀察在 0-24 小時之間 CCY1a-E2 (5 μ M) 對 HL-60 細胞細胞週期的影響。實驗結果發現: 經處理的細胞其細胞週期在 6 小時呈現 G2/M 期停滯的現象, 且處理時間越久 G2/M 期族群越明顯。在 12 小時就有明顯的 sub-G1 細胞核出現, 且處理時間越久, sub-G1 的細胞核族群越明顯 (圖三十一、圖三十二)。

(10) CCY1a-E2 對細胞週期調控蛋白質之影響

CCY1a-E2 能導致 HL-60 細胞之 G2/M 期停滯，因而可能對調控 G2/M 期相關蛋白質之功能有影響。我們將 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 0-16 小時，利用西方墨點法分析 cyclin B、CDK1、Cdc25C 及 p21、p27 蛋白質的量。實驗結果顯示：cyclin B、CDK1 和 Cdc25C 蛋白質量於 2 小時後逐漸上升；6 小時後又下降。p21 蛋白質的量也在 CCY1a-E2 處理 4 小時後逐漸增加 (圖三十三)；p27 蛋白質的量則無明顯變化。上述結果顯示 CCY1a-E2 使細胞停滯在 G2/M 期是與 CDK1、cyclin B、Cdc25C 及 p21 的表現量有關。

(11) PKA、PKC、ERK、p38/JNK 專一性抑制劑對 CCY1a-E2 誘導 G2/M 期停滯及細胞凋亡之影響

為了釐清 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞凋亡與 protein Kinases 之間的關係，我們將細胞各別以不同濃度之 PKA、PKC、ERK、p38/JNK 專一抑制劑處理一小時後，再給予 CCY1a-E2 (5 μ M)，經 6 及 12 小時後分析細胞週期，亦於 24 小時後分析細胞存活率。結果發現：150 nM 的 H89 (PKA 專一抑制劑)、100 nM 的 RO32-0432 (PKC 專一抑制劑) 及 50 μ M 的 SB203580 (p38/JNK 專一抑制劑) 並不抑制或促進 CCY1a-E2 所誘導 HL-60 的細胞凋亡現象。50 μ M 的 PD98059 (ERK 專一抑制劑) 及 50 μ M 的 U0126 (MEK1/2

專一抑制劑) 單獨處理或並用 CCY1a-E2 處理時, HL-60 細胞之存活率也沒有顯著的差異 (圖三十四)。因此推論 PKA、PKC、p38/JNK 及 ERK 等蛋白激酶在實驗的濃度下, 可能不是 CCY1a-E2 誘導癌細胞凋亡路徑之參與者。

(12) 以 DNA 基因晶片分析 CCY1a-E2 影響 HL-60 細胞基因表現之綜觀

將 HL-60 細胞分別以 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 1、4、8 與 12 小時後, 純化細胞內的 total RNA, 以分光光度計定量。我們得到各處理樣品之 total RNA 量均大於 100 μ g, 且純度 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值均大於 1.5。此外, 以瓊脂凝膠電泳分析 RNA 的純度與穩定性, 結果如圖三十五所示, 18S 及 28S rRNA 均為完整。

(13) 晶片與 RNA 之雜交反應與結果判讀分析

將各 RNA 樣品經逆轉錄並加上螢光標幟後與 ABC 人類通用基因晶片 (HSUN8K-1) 進行雜交反應; 以掃瞄器讀取結果, 並計算晶片上每一點的 Cy5/Cy3 螢光比值。並且用軟體分析 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 處理不同時間後, 被明顯誘發或抑制表現之基因。CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 1 至 8 小時後, 明顯被誘發表現之基因 (up-regulated gene) 包括 HLA-G、FASTK、PROML1、SACS 等; 明顯被抑制表現之基因 (down-regulated gene) 包括 ACADL、PRPF4B、SCN8A、ACY1、LY64、SRP68、CLDN1、CCL7 (表十)。

而 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 12 小時後，明顯被誘發表現之基因包括 CLC、ALOX5AP、LYZ、XRCC1、HLA-C、UBE2M、TMSB4X、HLA-A、MEF2D、ENG、MYL1、S100B、ITM2A、IFNGR2、S100P、RPS5 等；而明顯被抑制表現之基因包括 CCND2、XPO1、PIMA、MPP-6、CHEK1、TOK1 (調節細胞週期)、TNF (調節細胞凋亡) 及參與 DNA、RNA 及蛋白質合成的基因共 53 個 (表十一)。

將各晶片結果整合，進一步分析 CCY1a-E2 影響 HL-60 細胞基因表現是如何隨著時間改變；有何趨勢或相關性。分析 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 處理 1 至 8 小時之晶片結果，其基因表現趨勢的相關性 (圖三十六) 共呈現 3 種趨勢：(1) 隨時間增加而基因表現降低者，包括 CLDN1、LY64、SRP68、CXCL9、SERPINB2 (Group 1) 與 CCL7、HLA-C、CCL13、S100A8、S100A9 (Group 4)。(2) 隨時間增加而基因表現增加者，包括 ACADL、N33 (Group 2) 與 SACS、EPHB3、TXK、CTSG (Group 3)。(3) 於 4 小時處理時基因表現量上升達最高而後下降者，包括 MLLT2、PTPN1、PRPF4B、SCN8A、LDB1、LASP1 (Group 5) 與 PKD2L1、CYP4F3、PROML1、TOMM40、FASTK、KCNJ8、CLCA2、KEL、SERPINA4、GALE、SERPINB8。

第四章 討論

為了開發抗癌新藥，我們以 HL-60 細胞篩檢 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物之細胞毒殺活性，由表二結果得知，CCY1a (17) 具顯著的細胞生長抑制作用，但是將其構造上之 $-OCH_2Ph$ 基團改置於 *meta*-position (CCY1a-A1, 18) 或 *para*-position (CCY1a-A2, 19) 則造成生長抑制作用顯著下降。此外將 CCY1a 之 CHO 置換成 $COCH_3$ (CCY1a-A3, 20)、 $COOCH_3$ (CCY1a-A6, 23)、 $CONH_2$ (CCY1a-A7, 24) 或 $CH=NOH$ (CCY1a-A15, 32; CCY1a-A16, 33; CCY1a-A17, 34) 也會顯著造成生長抑制作用喪失。因此 CHO 基團對 CCY1a 之活性是非常重要的。將 OCH_3 置於 CCY1a 之 *meta*-position (CCY1a-D1, 25) 也降低其活性。以上結果顯示，似乎 2-(benzyloxy)benzaldehyde 類衍生物 (26—31) 中具明顯活性者均與 CCY1a 之構造非常相似。其中 CCY1a-E2 (29) 之活性最佳。根據抑制癌細胞生長作用的結果，未來我們需要將 2-(benzyloxy)benzaldehyde 衍生物的結構再做修飾，例如將 CHO 基團改成 $COOH$ 、 CH_2OH 或 $=NCH_2CHNR_2$ ，或合成 glycosylated prodrug，期能合成出作用最強的化合物；也需要透過藥品動力學的實驗分析來評估化合物的代謝及半衰期，作為進一步活體試驗的依據。

除了 HL-60 外，CCY1a-E2 也對人類血癌細胞 (U937、K562、KG-1、KG-1a) 及小鼠幼髓細胞性白血細胞 (WEHI-3) 具顯著的生長抑制作用。CCY1a-E2

對 HL-60 及 WEHI-3 之 IC_{50} 均約為 $5.0 \mu M$ ，但是它對正常人週邊單核細胞 (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) 生長抑制作用甚小。此外在 CCY1a-E2 100 mg/kg/day 劑量下、連續七天尾部靜脈注射，對 BALB/c 小鼠所進行的七天及二十八天毒性試驗之結果顯示：與正常老鼠相比較，CCY1a-E2 處理小鼠之體重改變、活動力、毛色光澤無顯著差異，淋巴結、脾臟及肝臟的外觀和單位體重之脾臟及肝臟重量亦與正常老鼠相當。血清之生化檢查值顯示，八項數值中大多無差異。但是七天毒性試驗中，所有給藥或給賦型劑小鼠之血清 glucose 濃度均顯著提高 (表五)。是否有可能和細胞內 cAMP 的提昇有關⁸¹，或是其它可能因素，則需進一步探討。而二十八天毒性試驗 CCY1a-E2 處理小鼠之 LDH 顯著下降，其原因也待確認 (表七)。

源於 BALB/c 之血癌細胞株 WEHI-3 為一種未分化完全的單核球血癌細胞，其特性和人類人類骨髓性白血細胞株 HL-60、U937、K562 細胞相似。誘導劑如 ATAR、IL-6、G-CSF 及 1,25-Vitamin D3 能使 WEHI-3 細胞進行分化³，可藉用 NBT、 α -naphthyl acetate esterase 染色方法檢測證實。WEHI-3 細胞表面抗原包括 CD11b、CD14、Mac-3，因此以 WEHI-3 細胞建立的血癌動物模式，可以用免疫螢光染色法分析血液及骨髓內各細胞族群及癌細胞之分佈，以確認是否誘發成功血癌，並可簡便地篩選藥物是否具抗癌作用。此外，能取代以抹片觀察並統計未成熟的白血球所佔百分比之耗時、耗眼力的方

法。本研究亦重複了 Glass 等⁷⁹及 He 等⁸⁰利用相同 WEHI-3 癌細胞株及 BALB/c 小鼠，以靜脈注射的方式成功地於 14 天後誘發 BALB/c 產生血癌。以此 WEHI-3/BALB/c 血癌小鼠所進行之活體試驗中，我們的結果亦顯示 CCY1a-E2 能夠顯著地改善血癌之症狀和 28 天實驗期之小鼠存活隻數。至於 CCY1a-E2 是否能夠有效地延長血癌小鼠的壽命及增加存活率，需再根據本實驗之結果，於未來進行療程之長期評估，並以現行之抗血癌藥物（例如 vinblastine）作為正對照組。

活體影像系統是以非侵入性的影像觀察方式，分析活體內細胞或基因表現的變化，並提供定量功能，乃針對實驗動物試驗所開發之活體即時影像檢測系統。目前市面數家儀器公司所開發之活體影像系統，多以利用冷光酵素（luciferase）產生生物冷光的原理，藉以觀察和分析同一隻動物於特定時間點的反應。活體影像系統的優點為可收集分析大量偵測資料、藉由觀察同一隻動物在不同偵測時間的訊號以降低個體差異所造成的誤差、改善動物試驗方法加速新藥開發效率，目前應用在新藥開發、藥理/毒理測試、腫瘤醫學研究、感染疾病研究、功能性基因體學研究。未來我們亦可建構帶有冷光酵素基因之 WEHI-3/BALB/c 血癌小鼠，建立新的實驗方法流程搭配先進的軟硬體設計，以使動物實驗獲得更多且高品質的資訊。

細胞週期停滯與誘導細胞凋亡、分化抑制細胞的增生作用，是目前用來篩選有效抗癌藥的重要標靶。許多的化學治療劑被發現抑制癌細胞生長

是這三大機制所導致。CCY1a-E2 抑制 HL-60 癌細胞株生長是經由抑制細胞週期抑制及誘導細胞凋亡。近年來對細胞凋亡的研究發現有 caspase-dependent 與 caspase-independent 兩種情形¹⁰³。本實驗給予 caspase 專一性抑制劑後再以 CCY1a-E2 處理細胞，可抑制 CCY1a-E2 引發之生長抑制作用。由以上結果顯示 CCY1a-E2 誘導之細胞凋亡主要是一典型的 caspase-dependent 細胞凋亡路徑，然而 caspase-independent 細胞凋亡路徑亦不無可能。

本研究亦檢測了 FasL 及 TNF 的蛋白質表現，發現並無明顯的變化 (data not shown)，推測 CCY1a-E2 誘導細胞凋亡不是經由細胞膜上的死亡受體 Fas/CD95 或 TNFR 所起始，但是經由其它死亡受體 (TRAIL 等) 之可能性不可排除。由 caspase 活性測試更進一步顯示，caspase-9 是最先被活化的，之後依序為 caspase-3，caspase-8。PARP 於 6-8 小時開始被分解出現 85 KDa 的片段，此結果與 caspase-3 活性出現時間相吻合。以 Caspase-3、-8、-9 專一性抑制劑前處理能提升 CCY1a-E2 處理細胞之存活率，因此推論 caspase-3、-8、-9 可能都有參與 CCY1a-E2 誘導癌細胞凋亡路徑。此外，cytosolic cytochrome *c* 量於 CCY1a-E2 處理 6-8 小時開始增加，促進細胞凋亡的 Bax 蛋白質亦逐漸增加，而抑制細胞凋亡的 Bcl-2 與未活化態的 Bid 蛋白質量逐漸降低。因此，綜合上述結果我們認為 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞凋亡主要可能是經由 caspase 依賴型之粒線體傳遞路徑所調控。Caspase-8 之活化有可能不是由死

亡受體所導致，因為 caspase-8 也會被 caspase-3 活化。故 caspase-8 被活化可能是因粒線體所起始的凋亡途徑將 caspase-9 活化，進而活化 caspase-3，再活化 caspase-8。藥物誘導的粒線體死亡路徑，可能和 ROS (reactive oxygen species) 之產生有關。在處理 CCY1a-E2 亦同時給予 N-acetylcysteine(一種 antioxidant)，24 小時後並無抑制細胞凋亡的作用 (data not shown)，因此推論粒線體膜電位下降為 ROS-independent。而由 CCY1a-E2 處理時，caspase-8 被活化與未活化態的 Bid 蛋白質量逐漸降低的情形推測，粒線體膜電位下降亦可能與 caspase-8 將 Bid 活化成 tBid，進而影響粒線體死亡路徑有關，此推測需進一步探討。

經 CCY1a-E2 處理的 HL-60 細胞，從 3 小時細胞週期進行開始被抑制，一直持續到 6 小時細胞週期停滯在 G2/M 期。對於細胞週期的調控 CKI 扮演很重要的角色，本實驗利用西方墨點法分析 p21、p27 等 CKI 的表現發現這些 CKI 與細胞週期停滯在 G2/M 期有關。此外，因為 HL-60 (p53-null)、U937 (mutant inactive p53)、K562 (loss of one p53 allele and a frameshift mutation in the other allele)、Hep 3B (deleted p53)、H1299 (p53-null)、KG-1 (mutant inactive p53) 等細胞為 p53 negative 的細胞株，而 Hep G2 (wild-type p53)、WEHI-3 細胞則有正常 p53 功能¹⁰⁴⁻¹¹⁰，因此我們推論 CCY1a-E2 誘導的 G2/M 期停滯作用為 p53-independent。至於 CCY1a-E2 抑制 WEHI-3 細胞的詳細機制是否與 HL-60 類似，則須作更深入的探討。

為了釐清 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞週期抑制及細胞凋亡與 protein Kinase 酵素之間的關係，我們將細胞個別以不同濃度之 PKA、PKC、ERK、p38/JNK 專一抑制劑處理再給予 CCY1a-E2 後分析細胞存活率。結果發現 PKA、PKC、ERK、p38/JNK 專一抑制劑並不影響 CCY1a-E2 所誘導的 HL-60 癌細胞凋亡。先前的研究發現 CCY1a 能提昇中性白血球內 cAMP 的量⁸²，此現象可能和導致 NADPH oxidase 活性降低有關⁸³⁻⁸⁴，但在本實驗結果顯示給予 PKA 專一性抑制劑並無影響 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞週期抑制作用及細胞凋亡現象，因此我們認為藥物在不同細胞中，因其作用不同而 PKA 所扮演的角色是不同的。本研究中給予 ERK 及 MEK 專一抑制劑會增加 CCY1a-E2 誘導之細胞死亡，先前之研究發現 CCY1a-E2 之前驅 CCY1a 具有抑制血清所誘導的血管平滑肌細胞（vascular smooth muscle cell）增生的作用；作用的機制是藉由抑制 Ras/MAPK 訊息傳遞路徑，包括抑制 p42/44MAPK 的活化⁸⁶；至於 CCY1a-E2 亦有相同之作用有待證實。

癌症的治療還包括使不能正常分化的不成熟癌細胞分化為成熟且正常的細胞，此種療法稱為分化療法。癌細胞分化時會停止生長、NBT 染色細胞內會有藍色沉澱，且細胞週期會停滯於 G1 期。本實驗觀察發現 CCY1a-E2 無 NBT positive 的作用且細胞週期停滯在 G2/M 期(data not shown)，由此證明，CCY1a-E2 無誘導人類血癌細胞株分化的作用。

我們也利用生物晶片基因分析技術，分析 CCY1a-E2 處理後的 HL-60 細

胞基因表現的變化。經由 DNA 晶片結果分析 1 至 8 小時 CCY1a-E2 處理後之基因變化，發現調控細胞週期之基因 FASTK 有被誘發表現，而 PRPF4B 則被抑制表現。FAST kinase 與 PRPF4B kinase 為 Serine/threonine-protein kinase。FAST kinase 研究發現當有 Fas ligation 存在時，FAST kinase 會被 dephosphorylated 同時活化下游基因 TIA-1，導致細胞凋亡。PRPF4B kinase 則為調節細胞週期與細胞增生主要的 Cyclin-dependent kinase like protein Kinase。

當細胞內 PRPF4B kinase 表現上升時，會促進細胞進入細胞週期導致細胞增生。CCY1a-E2 對 HL-60 細胞週期主要抑制在 G2/M 期，因此 PRPF4B kinase 的表現量下降可能是導致 CCY1a-E2 抑制細胞週期的原因之一。此外，隨時間增加而表現增加之基因包括 SACS、EPHB3、TXK 均為 tyrosine kinase 調控之基因，我們推測 tyrosine kinase 可能也參與 CCY1a-E2 所誘導 HL-60 細胞之 G2/M arrest 的細胞週期抑制作用調控。

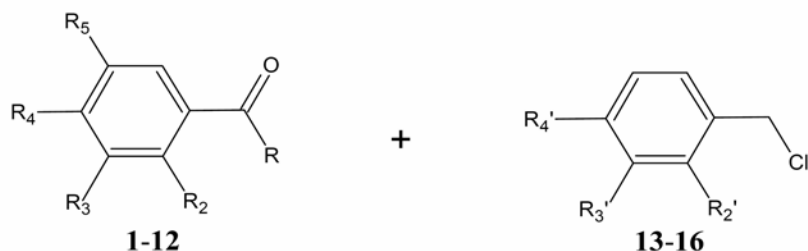
至於 CCY1a-E2 對 HL-60 細胞處理 12 小時後，抑制在 G2/M 期的細胞族群最明顯，同時細胞開始進行凋亡。我們分析 12 小時之基因變化發現促進 G2/M 期的相關基因（如 cyclin D2、MPP-6、CHEK1、TOK1 等），與促進細胞增生之相關基因（如 XPO1、PTMA 等）基因表現量被抑制，因此我們推論 serine/threonine-protein kinase 與 tyrosine protein kinase 可能扮演著調節 CCY1a-E2 在 HL-60 細胞內的訊息傳遞，且 CCY1a-E2 可能藉由抑制了細胞增生相關的基因及調節細胞進入 G2/M 期的相關基因，因而導致週期抑制與凋亡。

許多具有 chalcone 結構的衍生物曾被報導具有抗發炎、抗氧化及抗癌

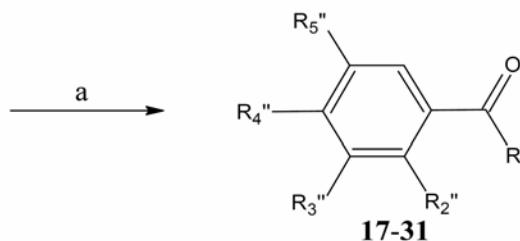
作用。我們分析 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 處理 1 至 8 小時之基因的相關性發現，與發炎相關之基因包括 CLDN1、LY64、CXCL9、CCL7、CCL13、S100A8、S100A9 等會隨時間增加而表現降低，這意味 CCY1a-E2 可能除抗癌作用外，可能也具有抗發炎作用。Wang 等⁸¹對類似結構衍生物 CCY1a 進行抗發炎作用之研究，發現其具有提昇中性白血球內 cAMP 的量，可能和導致 NADPH Oxidase 活性降低有關，CCY1a-E2 於中性白血球內的抗發炎機制是否與我們在 HL-60 細胞看到之基因表現有關，值得將來探討。

近幾年對細胞凋亡的研究發現，非 caspase 所誘導的細胞凋亡路徑 (caspase independent pathway) 亦參與細胞凋亡。我們將 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 處理 12 小時後，Serine protease 基因 CTSG 有上升之趨勢，更支持 caspase independent pathway (如 Serine protease) 也可能參與 CCY1a-E2 所誘導的細胞凋亡。未來，我們必須更進一步以 RT-PCR 及 Western 等實驗證明在晶片上所觀察的基因變化，確實參與 CCY1a-E2 於 HL-60 細胞內的訊息傳遞。

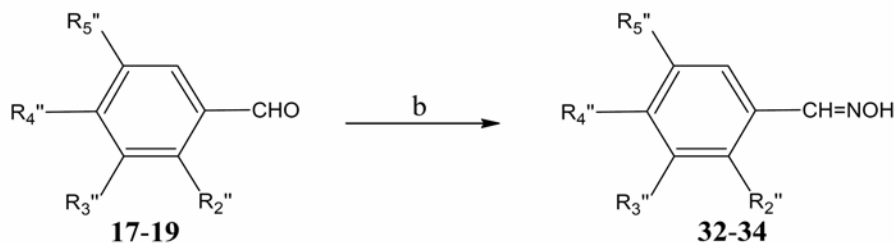
綜合以上結果，我們將 CCY1a-E2 對 HL-60 血癌細胞的生長抑制作用可能的機制以圖三十七表示。除了證實 CCY1a-E2 具有對血癌細胞的生長抑制作用的離體試驗外；我們也由 WEHI-3/BALB/c 血癌小鼠產生的活體試驗中，證實其具有抗癌的作用，且 CCY1a-E2 本身毒性小。因此，我們認為 CCY1a-E2 可能為一選擇性及專一性高的治療血癌的新藥，值得繼續開發。至於 CCY1a-E2 應用於人體的離體與體內試驗，將是未來實驗的重點。



- | | | |
|---|---|---|
| 1 R = H, R ₂ = OH,
R ₃ = R ₄ = R ₅ = H | 7 R = OCH ₃ , R ₂ = OH,
R ₃ = R ₄ = R ₅ = H | 13 R ₂ ' = R ₃ ' = R ₄ ' = H |
| 2 R = H, R ₃ = OH,
R ₂ = R ₄ = R ₅ = H | 8 R = NH ₂ , R ₂ = OH,
R ₃ = R ₄ = R ₅ = H | 14 R ₃ ' = OCH ₃ , R ₂ ' = R ₄ ' = H |
| 3 R = H, R ₄ = OH,
R ₂ = R ₃ = R ₅ = H | 9 R = H, R ₂ = OH,
R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = R ₅ = H | 15 R ₂ ' = Cl, R ₃ ' = R ₄ ' = H |
| 4 R = CH ₃ , R ₂ = OH,
R ₃ = R ₄ = R ₅ = H | 10 R = H, R ₂ = OH,
R ₃ = R ₅ = H, R ₄ = OCH ₃ | 16 R ₄ ' = Cl, R ₂ ' = R ₃ ' = H |
| 5 R = CH ₃ , R ₃ = OH,
R ₂ = R ₄ = R ₅ = H | 11 R = H, R ₂ = OH,
R ₃ = R ₄ = H, R ₅ = OCH ₃ | |
| 6 R = CH ₃ , R ₄ = OH,
R ₂ = R ₃ = R ₅ = H | 12 R = H, R ₂ = OH,
R ₃ = R ₄ = H, R ₅ = Cl | |



- | | | |
|---|---|--|
| 17 R = H, R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H | 22 R = CH ₃ , R ₄ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₂ " = R ₃ " = R ₅ " = H | 27 R = H, R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₄ " = H, R ₅ " = OCH ₃ |
| 18 R = H, R ₃ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₂ " = R ₄ " = R ₅ " = H | 23 R = OCH ₃ , R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H | 28 R = H, R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₄ " = H, R ₅ " = Cl |
| 19 R = H, R ₄ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₂ " = R ₃ " = R ₅ " = H | 24 R = NH ₂ , R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H | 29 R = H, R ₂ " = ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H |
| 20 R = CH ₃ , R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H | 25 R = H, R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = OCH ₃ , R ₄ " = R ₅ " = H | 30 R = H, R ₂ " = ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H |
| 21 R = CH ₃ , R ₃ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₂ " = R ₄ " = R ₅ " = H | 26 R = H, R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ ,
R ₃ " = R ₅ " = H, R ₄ " = OCH ₃ | 31 R = H, R ₂ " = ,
R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H |



- | |
|--|
| 32 R ₂ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ , R ₃ " = R ₄ " = R ₅ " = H |
| 33 R ₃ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ , R ₂ " = R ₄ " = R ₅ " = H |
| 34 R ₄ " = OCH ₂ C ₆ H ₅ , R ₂ " = R ₃ " = R ₅ " = H |

(a) K₂CO₃, KI, reflux, 6 h (b) NH₂OH, EtOH, reflux, 3 h

Scheme 1 Benzyloxybenzaldehyde 衍生物之合成

表一 Caspase 家族成員特性一覽表

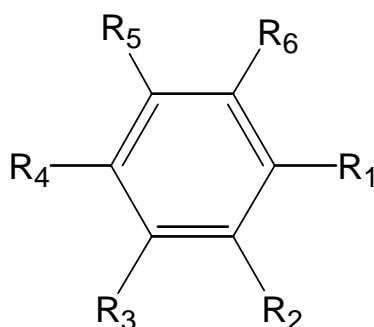
Caspase	Alternate name	Substrates	Cleavage sites	Target sequence	Potent target (caspase)	Active site	Function (and notes)
Ced-3			-	DETD	-	DSVD	
Caspase-1	ICE	pre-Interleukin-1 Interleukin-18 Lamins	WFKD/S, FEDD/A	WEHD	1,3	QACRG	Processing of interleukins (inflammation). Can also induce apoptosis depending on isoform and if over-expressed.
Caspase-2	Ich-1 (human), Nedd2 (rat, mouse)	Golgin-160 Lamins (?)	DQQD/G, EESD/A	DEHD	-	QACRG	Apoptosis (activity suppressed by serum deprivation)
Caspase-3	CPP32, Yama, apopain	PARP SREBs Gelsolin Caspase-6 Caspase-7 Caspase-9 DNA-PK MDM2 Gas2 Fodrin Catenin Lamins NuMA HnRNP proteins Topoisomerase I FAK Calpastatin p21 ^{Waf1} Presenelin2 ICAD	IETD/S	DEVD	2,6,7	QACRG	Apoptosis
Caspase-4	Ich-2, ICE _{relII}	Caspase-1	WRVD/S, LEED/A	{WL}EHD	3,4	QACRG	Inflammation/Apoptosis (note: this could be the human form of mouse caspase-11). Related to human caspase-5 and caspase-1
Caspase-5	ICE _{relIII} , TY	?	WRVD/S, LEAD/S	{WL}EHD	3,5	QACRG	Inflammation/Apoptosis (related to human caspase-4 and caspase-1)
Caspase-6	Mch2	PARP Lamins NuMA FAK Caspase-3 Keratin-18	DVVD/N, TEVD/A	VEHD	3	QACRG	Apoptosis

Caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	PARP Gas2 SREB1 EMAP II FAK Calpastatin p21 ^{Waf1}	IQAD/S	DEVD	6	QACRG	Apoptosis (activity blocked by cIAP1 and cIAP2) Similar in structure and substrate specificity to caspase-3
Caspase-8	FLICE, MACH, Mch5	Caspase-3 Caspase-4 Caspase-6 Caspase-7 Caspase-9 Caspase-10 Caspase-13 PARP Bid	VETD/S, LEMD/L	LETD	2,3,6,7,10	QACQG	Apoptosis (death receptors)
Caspase-9	Apaf-3, ICE-LAP6, Mch6	Caspase-3 pro-Caspase-9 Caspase-7 PARP	DQLD/A	LETD	3,7	QACGG	Apoptosis
Caspase-10	FLICE-2, Mch4	Caspase-3 Caspase-4 Caspase-6 Caspase-7 Caspase-8 Caspase-9	SQTD/V, IEAD/A	DEVD	2,3,6,7	QACQG	Apoptosis (death receptors)
Caspase-11	Ich-3, ICE_B	?	-	-	3	QACRG	Murine caspase similar to human caspase-4. Belongs to the same family as caspase-3 of enzymes. May be involved in inflammation and apoptosis
Caspase-12	ICE_C	?					Involved in mediating apoptosis following ER stress. Related to mouse caspase-1 and caspase-11 and human caspase-4 and caspase-5
Caspase-13	ERICE	?					Member of the ICE family of caspases that include caspase-1 and caspases-4, -5 and -11. Involved in inflammation.
Caspase-14	MICE(Mini-ICE)						

(註：W為tryptophan，E為glutamic acid、H為histidine、D為aspartic acid、I為isoleucine、L為leucine、V為valine、X為任何氨基酸)

Reference: TRENDS in Cell Biology Vol.14 No.4 April 2004 p.184-193

表二 Benzyloxybenzaldehyde 衍生物對 HL-60 細胞存活率的影響



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Viability (%) [*]
17 (CCY1a)	CHO	OCH ₂ Ph	H	H	H	H	32.36 ± 2.25
18 (CCY1a-A1)	CHO	H	OCH ₂ Ph	H	H	H	86.11 ± 4.75
19 (CCY1a-A2)	CHO	H	H	OCH ₂ Ph	H	H	97.04 ± 6.85
20 (CCY1a-A3)	COCH ₃	OCH ₂ Ph	H	H	H	H	92.62 ± 8.07
21 (CCY1a-A4)	COCH ₃	H	OCH ₂ Ph	H	H	H	71.36 ± 6.16
22 (CCY1a-A5)	COCH ₃	H	H	OCH ₂ Ph	H	H	102.99 ± 7.06
23 (CCY1a-A6)	COOCH ₃	OCH ₂ Ph	H	H	H	H	96.46 ± 6.23
24 (CCY1a-A7)	CONH ₂	OCH ₂ Ph	H	H	H	H	100.20 ± 6.28
25 (CCY1a-D1)	CHO	OCH ₂ Ph	OCH ₃	H	H	H	98.87 ± 3.04
26 (CCY1a-D2)	CHO	OCH ₂ Ph	H	OCH ₃	H	H	40.81 ± 3.00
27 (CCY1a-D3)	CHO	OCH ₂ Ph	H	H	OCH ₃	H	51.44 ± 3.06
28 (CCY1a-D5)	CHO	OCH ₂ Ph	H	H	Cl	H	45.47 ± 5.40
29 (CCY1a-E2)	CHO		H	H	H	H	24.32 ± 4.98
30 (CCY1a-E4)	CHO		H	H	H	H	25.02 ± 3.55
31 (CCY1a-E6)	CHO		H	H	H	H	35.32 ± 3.25
32 (CCY1a-A15)	CH=NOH	OCH ₂ Ph	H	H	H	H	101.00 ± 4.31
33 (CCY1a-A16)	CH=NOH	H	OCH ₂ Ph	H	H	H	90.42 ± 4.29
34 (CCY1a-A17)	CH=NOH	H	H	OCH ₂ Ph	H	H	97.46 ± 4.51

*: HL-60 cells were treated with each compound at concentration of 40 μM for 24 h. Viable cells were determined by propidium iodide exclusion method. Percentage of viability was calculated as the ratio of viable cell number in each group to that in ethanol-vehicle control group. The experiments were performed at least three times with similar results. Data are expressed as the means ± SD.

表三 BALB/c 小鼠經尾部靜脈注射不同細胞數的 WEHI-3 細胞二十八天後體重、肝臟與脾臟之重量 (g)

組別	WEHI-3 細胞數	0 天	7 天	14 天	21 天	28 天
體重	5x10 ⁶ Cells	23.0±1.2	23.5±2.6	19.6±0.9*	18.7±0.6*	18.7±1.0*
	1x10 ⁶ Cells	26.2±1.1	25.8±1.3	22.9±1.2	20.5±2.2*	19.3±1.0*
	2x10 ⁵ Cells	27.0±1.6	26.5±1.9	26.1±1.5	23.7±0.6	23.2±1.3*
	Control	24.9±0.2	25.2±1.0	25.6±0.7	25.2±0.3	26.7±0.8
肝臟 (/100 g 體重)	5x10 ⁶ Cells	ND	5.81±0.86*	5.34±1.30	6.04±1.34	6.15±0.36
	1x10 ⁶ Cells	ND	4.07±0.16	5.99±0.15	6.34±0.21	6.42±0.31
	2x10 ⁵ Cells	ND	4.40±0.17	5.20±0.46	4.84±0.52	6.25±0.75
	Control	ND	4.40±0.33	4.25±0.06	4.32±0.73	5.25±0.36
脾臟 (/100 g 體重)	5x10 ⁶ Cells	ND	0.35±0.03	0.40±0.06	0.56±0.09	0.98±0.04*
	1x10 ⁶ Cells	ND	0.29±0.02	0.42±0.01	0.62±0.08*	0.74±0.04*
	2x10 ⁵ Cells	ND	0.30±0.02	0.49±0.14	0.57±0.12	0.61±0.15*
	Control	ND	0.42±0.09	0.31±0.04	0.35±0.05	0.35±0.01

1. ND 無檢測

2. 實驗結果以平均值±標準差表示 (n=3)

3. * p < 0.05 表示各組與 control 組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異

表四 七天毒性試驗：BALB/c 小鼠經連續 7 天尾部靜脈注射不同濃度的 CCY1a-E2 處理後體重、肝臟與脾臟之重量 (g)

組別	0 天之體重	7 天後之體重	肝臟重量 (/100 g 體重)	脾臟重量 (/100 g 體重)
Control	24.25 ± 0.76	24.58 ± 0.66	4.43±0.47	0.33±0.05
2-glycofurol	24.92 ± 0.58	28.20 ± 1.10*	3.98±0.30	0.28±0.04
5 mg/kg/day	24.73 ± 0.42	28.42 ± 1.13*	4.42±0.47	0.35±0.06
50 mg/kg/day	25.52 ± 0.41	28.88 ± 1.52*	4.18±0.33	0.31±0.06
100 mg/kg/day	25.42 ± 0.38	28.90 ± 0.51*	4.17±0.26	0.37±0.04

1. 實驗結果以平均值±標準差表示 (n=6)
2. * p < 0.05 表示各組與 Control 組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異

表五 七天毒性試驗：BALB/c 小鼠經連續 7 天尾部靜脈注射不同濃度的 CCY1a-E2 處理後之血清生化檢測值

組別	LDH (U/L)	ALB (g/dl)	GLC (mg/dl)	PRO (g/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	CRE (mg/dl)	BUN (mg/dl)
Control	255.50±105.18	1.63±0.28	81.33± 6.92	3.81±0.69	38.25± 7.49	85.58±12.24	2.80±0.17	26.83±2.09
2-glycofurol	327.00±162.48	1.71±0.08	101.47± 6.95*	3.90±0.95	38.58±10.31	92.25±37.19	2.79±0.19	27.58±1.80
5 mg/kg/day	298.00± 62.22	1.58±0.38	106.73± 9.91*	3.68±0.60	41.83± 8.94	105.83±22.16	2.79±0.29	30.33±5.02
50 mg/kg/day	244.83± 46.99	1.73±0.26	103.50±12.77*	4.06±0.58	43.92±16.02	79.98±26.10	2.79±0.19	26.17±2.42
100 mg/kg/day	270.83± 42.09	1.84±0.13	101.75±11.56*	4.77±0.46	41.83±10.02	115.12±15.08	2.92±0.34	28.92±2.20

1. 實驗結果以平均值±標準差表示 (n=6)
2. * p < 0.05 表示各組與 Control 組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異
3. LDH: lactate dehydrogenase, ALB: albumin, GLC: glucose, PRO: total protein,
ALT: alinine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase,
CRE: creatinine, BUN: blood urea nitrogen

表六 二十八天毒性試驗：BALB/c 小鼠經連續 7 天尾部靜脈注 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day)，再經 21 天後體重、肝臟與脾臟之重量 (g)

組別	0 天之體重	7 天之體重	21 天後之體重	肝臟重量 (1/100 g 體重)	脾臟重量 (1/100 g 體重)
Control	27.63±1.09	28.13±1.43	28.50±2.14	3.84±0.29	0.38±0.09
2-glycofurol	29.38±1.48	30.25±1.41	29.44±3.20	3.40±0.24	0.40±0.11
CCY1a-E2	27.69±1.07	28.31±1.25	26.81±1.71	4.05±0.84	0.33±0.05

1. 實驗結果以平均值±標準差表示 (n=8)

2. * p < 0.05 表示各組與 Control 組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異

表七 二十八天毒性試驗：BALB/c 小鼠經連續 7 天尾部靜脈注 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day)，再經 21 天後之血清生化檢測值

組別	LDH (U/L)	ALB (g/dl)	GLC (mg/dl)	PRO (g/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	CRE (mg/dl)	BUN (mg/dl)
Control	415.06±67.60	1.73±0.18	106.19±11.34	4.91±0.31	46.88±10.08	84.19±12.08	1.94±0.62	25.19±3.21
2-glycofurol	349.75±95.37	1.96±0.41	99.50±12.90	5.05±0.75	46.38±21.27	90.38±48.41	2.13±0.13	24.20±4.40
CCY1a-E2	234.38±65.32*	2.08±0.47	89.94±17.76	5.47±0.79	47.19±26.82	94.63±20.67	2.25±0.27	23.44±4.63

1. 實驗結果以平均值±標準差表示 (n=8)
2. * p < 0.05 表示各組與對照組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異
3. LDH: lactate dehydrogenase, ALB: albumin, GLC: glucose, PRO: total protein, ALT: alinine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, CRE: creatinine, BUN: blood urea nitrogen

表八 BALB/c 小鼠經靜脈注射 WEHI-3 細胞及 CCY1a-E2 處理後之體重 (g)

組別	0 天	7 天	14 天	21 天	28 天
A	25.25±1.65	25.44±1.12	26.00±1.07	26.38±1.41	26.88±1.79
B	26.69±2.34	25.50±1.93	24.25±1.91	22.88±2.37*	20.42±2.38*
C	25.94±1.32	26.00±1.41	25.75±1.67	26.13±1.13	25.86±1.46
D	26.94±2.24	26.63±1.69	26.25±1.49	25.13±1.96	24.88±2.99
E	27.50±1.69	26.50±1.41	25.75±1.28	24.75±1.98	24.50±2.41

1. A：正常對照組。

B：靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6)。

C：靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。

D：同時靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 與 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。

E：靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 一週後再注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)

2. * $p < 0.05$ 表示各組與對照組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異

表九 BALB/c 小鼠經靜脈注射 WEHI-3 細胞及 CCY1a-E2 處理後肝臟與脾臟之重量 (g)

組別	A	B	C	D	E
肝臟 (/100 g 體重)	4.22±0.74 ^b	6.41±1.44 ^a	3.95±0.92 ^b	4.06±0.55 ^b	3.89±0.32 ^b
脾臟 (/100 g 體重)	0.37±0.07 ^b	0.70±0.24 ^a	0.35±0.05 ^b	0.36±0.07 ^b	0.40±0.12 ^b

1. A：正常對照組。

B：靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6)。

C：靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。

D：同時靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 與 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。

E：靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 一週後再注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)

2. ^a $p < 0.05$ 表示各組與 A 組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異

^b $p < 0.05$ 表示各組與 B 組結果之比較，在統計上具有顯著性的差異

表十 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μM) 處理不同時間點之基因變化

明顯被誘發表現之基因 (Up regulated gene : Ratio of mean > 2)					
Time (h)	Gene ID	Gene Name	Gene Symbol	Gene function	Ratio of Mean
1	2125838	HLA-G histocompatibility antigen- class I- G	HLA-G	Others	2.007
3	2125838	HLA-G histocompatibility antigen- class I- G	HLA-G	Others	2.052
4	345077	H.sapiens mRNA for FAST kinase	FASTK	Apoptosis/Cell Cycle	2.369
4	27544	Homo sapiens AC133 antigen mRNA- complete cds	PROML1	Inflammation	2.214
8	815142	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin)	SACS	Others	2.914
明顯被抑制表現之基因 (Down regulated gene : Ratio of mean < 0.5)					
1	140131	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase- long chain	ACADL	Metabolism/Redox Enzymes	0.094
1	898070		PRPF4B	Cell Cycle/Cell Proliferation	0.372
1	361668	sodium channel- voltage gated- type VIII- alpha polypeptide	SCN8A	Transport	0.435
1	51293	Human aminoacylase-1 (ACY1) mRNA- complete cds	ACY1	Others	0.485
3	898070		PRPF4B	Cell Cycle/Cell Proliferation	0.180
3	361668	sodium channel- voltage gated- type VIII- alpha polypeptide	SCN8A	Transport	0.285
4	826220	lymphocyte antigen 64 (mouse) homolog- radioprotective- 105kD	LY64	Inflammation	0.380
8	826220	lymphocyte antigen 64 (mouse) homolog- radioprotective- 105kD	LY64	Inflammation	0.220
8	626358	ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase)	SRP68	DNA Damage /Repair Enzymes	0.417
8	664975	claudin 1	CLDN1	Others/Inflammation	0.481
8	485989	Monocyte chemotactic protein 3 precursor	CCL7	Inflammation	0.487

表十一 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 12 小時之基因變化

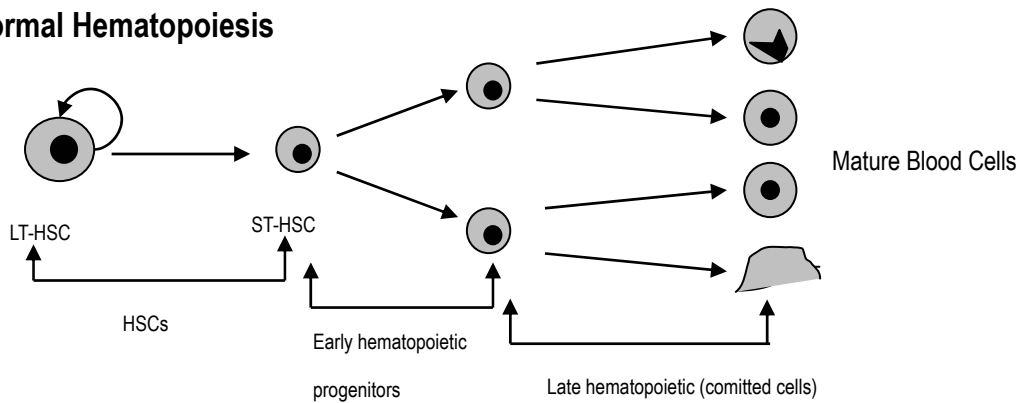
明顯被誘發表現之基因 (Up regulated gene : Ratio of mean > 2)				
Gene ID	Gene Name	Gene Symbol	Gene function	Ratio of Mean
2461050	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)			5.606
788272	Charot-Leyden crystal protein	CLC	m-lipase	5.290
127974	Charot-Leyden crystal protein	CLC	m-lipase	4.587
1459376	S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)			4.337
841617	Human mRNA for ornithine decarboxylase antizyme, ORF 1 and ORF 2		m-decarboxylase	3.839
1550776	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2) NOTE: Symbol and name provisional.			3.351
67759	5-Lipoxygenase activating protein	ALOX5AP	membrane protein	2.973
2554697	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas			2.889
293925	Lysozyme	LYZ	cell matrix protein	2.844
2555187	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)			2.799
760224	DNA-Repair protein XRCC1	XRCC1	DNA repair	2.784
810142	Major histocompatibility complex, class I, C	HLA-C	antigen	2.765
785847	Heat shock factor protein 1	UBE2M	apoptosis	2.728
868368	Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds	TMSB4X	binding protein/cytoskeleton	2.545
1604703	major histocompatibility complex, class I, F			2.498
853906	MHC class I protein HLA-A (HLA-A28,-B40,-Cw3)	HLA-A	antigen	2.393
471859	Human transcription factor (MEF2) mRNA, complete cds	MEF2D	transcription factor	2.354
293925	Human mRNA for HHR23A protein, complete cds	LYZ	cell matrix protein	2.294
774409	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	ENG	receptor	2.244
68103	Myosin light chain (alkali)	MYL1	structure protein	2.213
759948	S-100 Protein, Beta chain	S100B	binding protein/calcium	2.185
878596	integral membrane protein 2A	ITM2A	surface molecule	2.130
785575	Human clone pSK1 interferon gamma receptor accessory factor-1 (AF-1) mRNA, complete cds	IFNGR2	receptor/inflammation	2.115
135221	S-100P protein	S100P	binding protein/calcium	2.080
2571687	ribosomal protein S24			2.049
2125838	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G			2.038
809578	Ribosomal protein S5	RPS5	protein synthesis/RNA binding protein	2.004

表十一 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μM) 處理 12 小時之基因變化

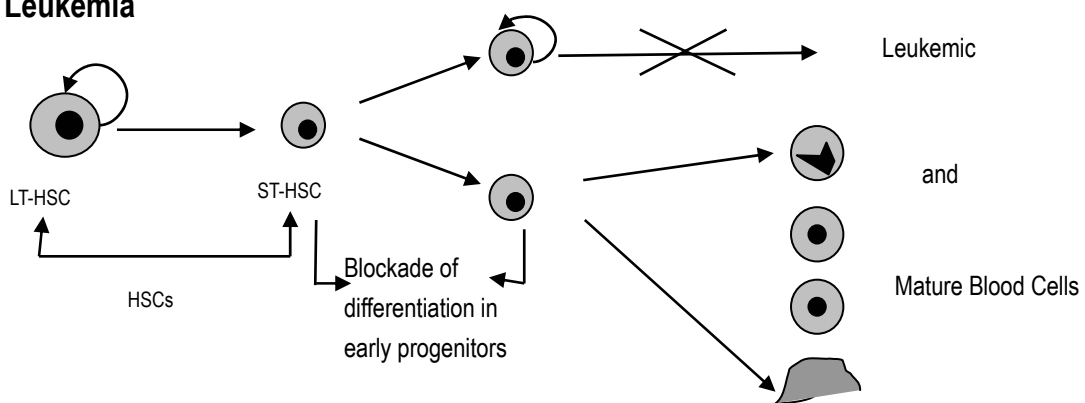
明顯被抑制表現之基因 (Down regulated gene : Ratio of mean < 0.5)				
Gene ID	Gene Name	Gene Symbol	Gene function	Ratio of Mean
826220	lymphocyte antigen 64 (mouse) homolog, radioprotective, 105kD	LY64	antigen	0.123
193990	Human ATP-binding cassette protein mRNA 06B09 clone, partial cds	ABCB10	transporter	0.132
731308	40S Ribosomal protein S27	CS	m-synthase	0.172
416316	H.sapiens mRNA for nuclear protein SDK3, partial	PNN	structure protein/cell adhesion	0.200
626358	ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase)	ADPRT	DNA repair/m-transferase	0.200
629896	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1B	MAP1B	structure protein	0.232
754403	lysophospholipase I	LYPLA1	m-lipase	0.246
856535	C-1-TETRAHYDROFOLATE SYNTHASE, CYTOPLASMIC	MTHFD1	m-dehydrogenase	0.263
770704	NUCLEOLIN	NCL	RNA binding protein	0.285
432194	Homo sapiens mRNA for PRP8 protein, complete cds	PRP8	RNA splicing factor	0.287
447167	Human homolog of Drosophila splicing regulator suppressor-of-white-apricot mRNA, complete cds	SFRS8	RNA splicing factor	0.289
509887	Human 54 kDa protein mRNA, complete cds	NRB54	RNA splicing factor	0.295
262231	CALRETICULIN PRECURSOR		binding protein/transcription	0.300
1472753	Eukaryotic initiation factor 4B	EIF4B	RNA binding protein/protein synthesis	0.302
1735578	E2F-like protein			0.313
249688	Cyclin D2	CCND2	cell cycle	0.335
768417		KIAA0987	cell matrix protein/cell growth	0.336
840940	Human mRNA for polyA binding protein	PABPC1	RNA binding protein	0.340
262920	Homo sapiens mRNA for EDF-1 protein	EDF1	cell matrix protein/cell growth	0.346
273546	Multifunctional proteinase-2	ADE2H1	m-synthetase	0.350
773479	Human mRNA fragment encoding beta-tubulin. (from clone D-beta-1)		binding protein/immune resoinse	0.356
74566	Homo sapiens mRNA for CRM1 protein, complete cds	XPO1	cell cycle/transport	0.364
274638	CAD PROTEIN	CAD	m-synthetase	0.381
41406	Human putative transmembrane protein (nma) mRNA, complete cds		membrane protein/oncogenesis	0.389
768561	Small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je)	SCYA2	chemokine	0.389
446927	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF	oncogene/apoptosis/ inflammation	0.394
501934	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	PPP1CC	m-phosphatase	0.396
308437	Fucosidase, alpha-L- 1, tissue	FUCA1	m-hydrolase	0.399

26568	EGR3	EGR3	transcription factor	0.400
470846		CFIM25	RNA binding protein	0.400
809603	Prothymosin alpha	PTMA	cell cycle/cell proliferation/transcription	0.402
490778	Homo sapiens mRNA for low molecular mass ubiquinone-binding protein, complete cds	QP-C	binding protein/transport	0.423
127925	H.sapiens mRNA for RNA helicase (Myc-regulated dead box protein)	DDX18	RNA binding protein/RNA helicase	0.424
897987	Homo sapiens (clone CC6) NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit mRNA, 3' end cds	NDUFA9	m-dehydrogenase	0.435
47681	Human putative splice factor transformer2-beta mRNA, complete cds	SFRS10	RNA splicing factor	0.448
855390	Human p105MCM mRNA, complete cds	MCM6	DNA replication	0.451
825013	H.sapiens mRNA for PHAPI2b protein	SSP29	cell matrix protein	0.457
757222	Human clone HSH1 HMG CoA synthase mRNA, partial cds	HMGCS2	m-synthase	0.459
511066	H.sapiens PAP mRNA	PAP	m-polymerase	0.460
784744	H.sapiens mRNA for M-phase phosphoprotein, mpp6	MPP-6	cell cycle	0.461
49970	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	SSB	antigen	0.464
814117	Human Gu protein mRNA, partial cds		RNA heilcase	0.466
246524	Homo sapiens checkpoint kinase Chk1 (CHK1) mRNA, complete cds	CHEK1	cell cycle/kinase/DNA repair	0.468
436554	Myeloperoxidase	MPO	peroxidase/stress protein/apoptosis	0.468
788190	Human PH-20 homolog (LUCA2) mRNA, partial cds	HYAL2	m-saminidase	0.469
50506	H.sapiens ERK3 mRNA	MAPK6	kinase	0.479
207358	Human (HepG2) glucose transporter gene mRNA, complete cds	SLC2A1	transporter	0.481
745503	Cellular nucleic acid binding protein	ZNF9	transcription factor	0.481
416951		SRP46	RNA splicing factor	0.482
50888	Human mRNA for Apo1_Human (MER5(Aop1-Mouse)-like protein), complete cds	AOP1	stress protein/reductase	0.486
134748	Glycine cleavage system H protein precursor	GCSH	m-transferase	0.495
624627	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	RRM2	m-reductase	0.498
415437	cdk inhibitor p21 binding protein	TOK-1	cell cycle/kinase	0.500

Normal Hematopoiesis

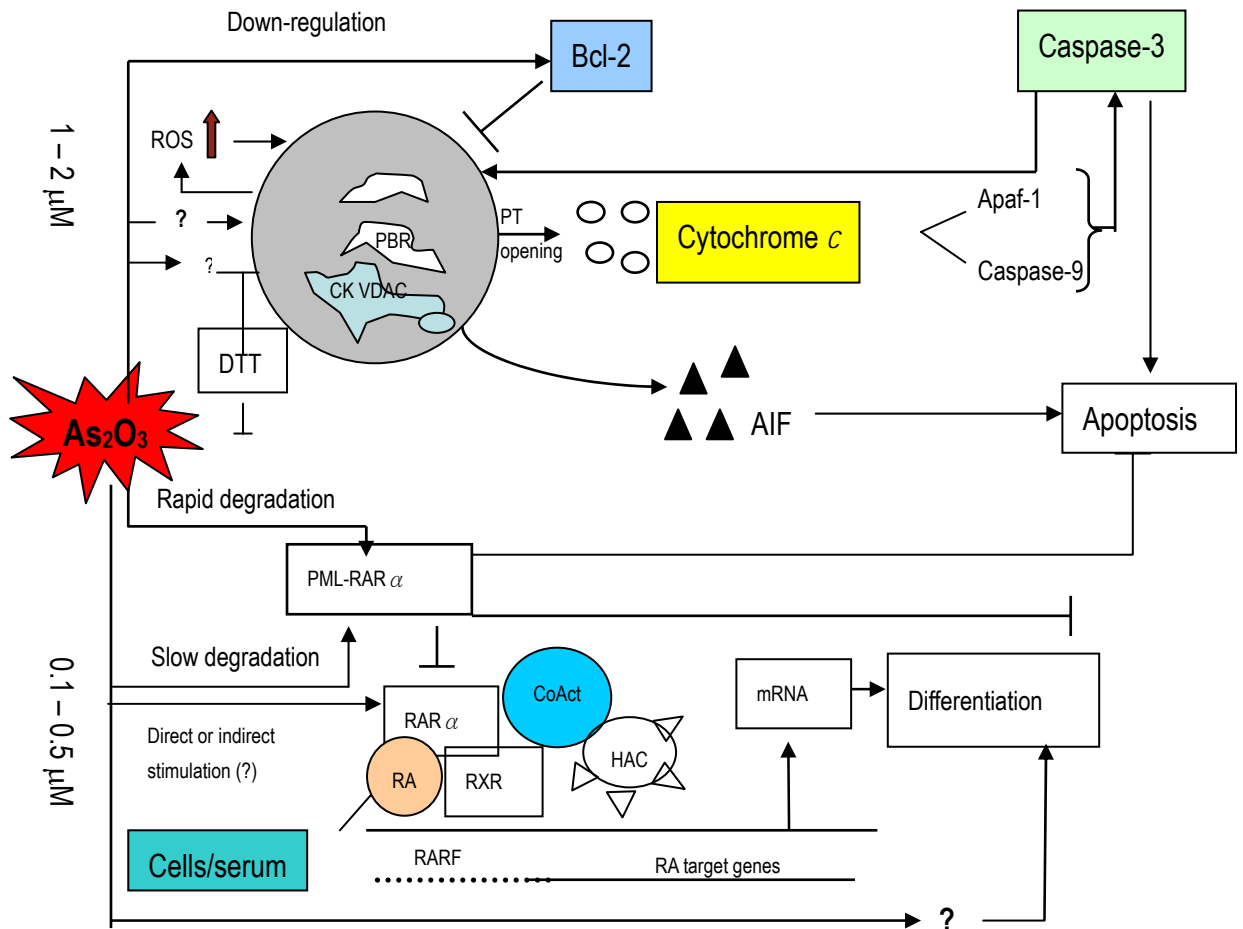


Leukemia



Pharmacology & Therapeutics 100 (2003) 257-290

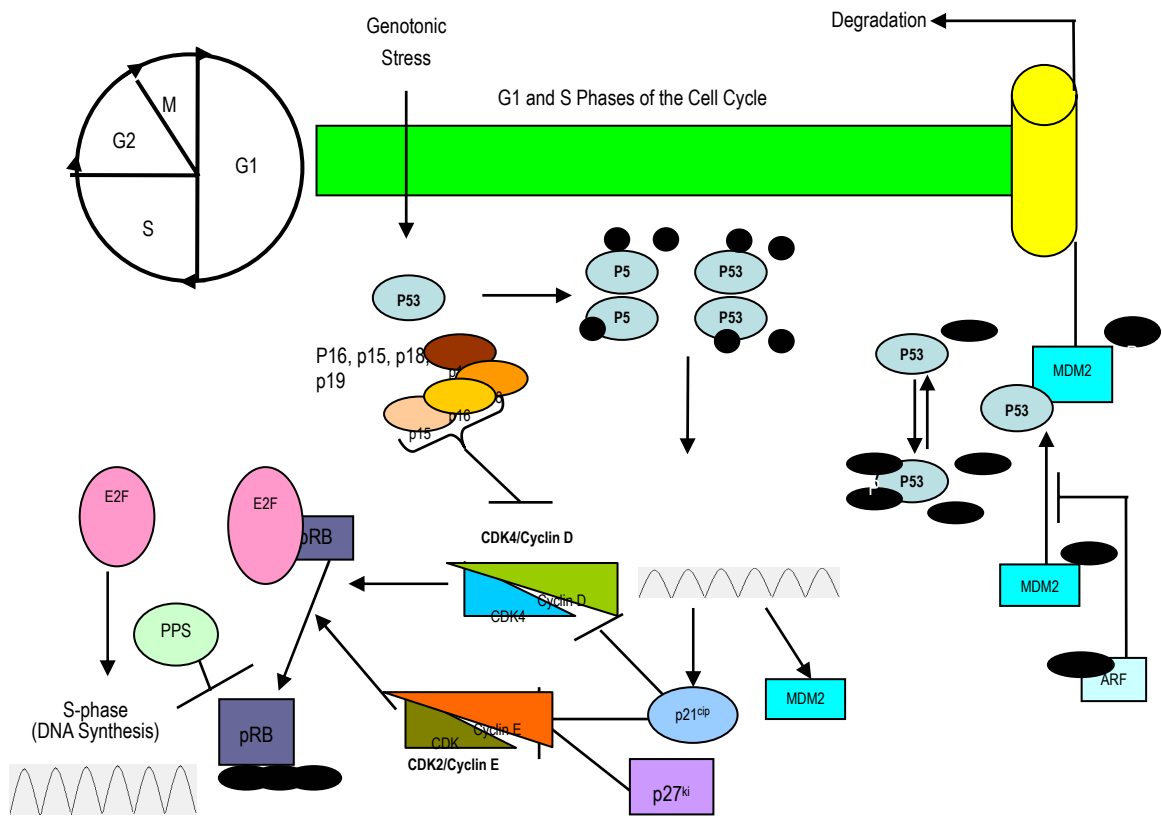
圖一 白血病形成的原因



Current Opinion in Oncology 13: 8-13, 2001

圖二 三氧化二砷誘導幼髓性細胞進行分化及凋亡的機制

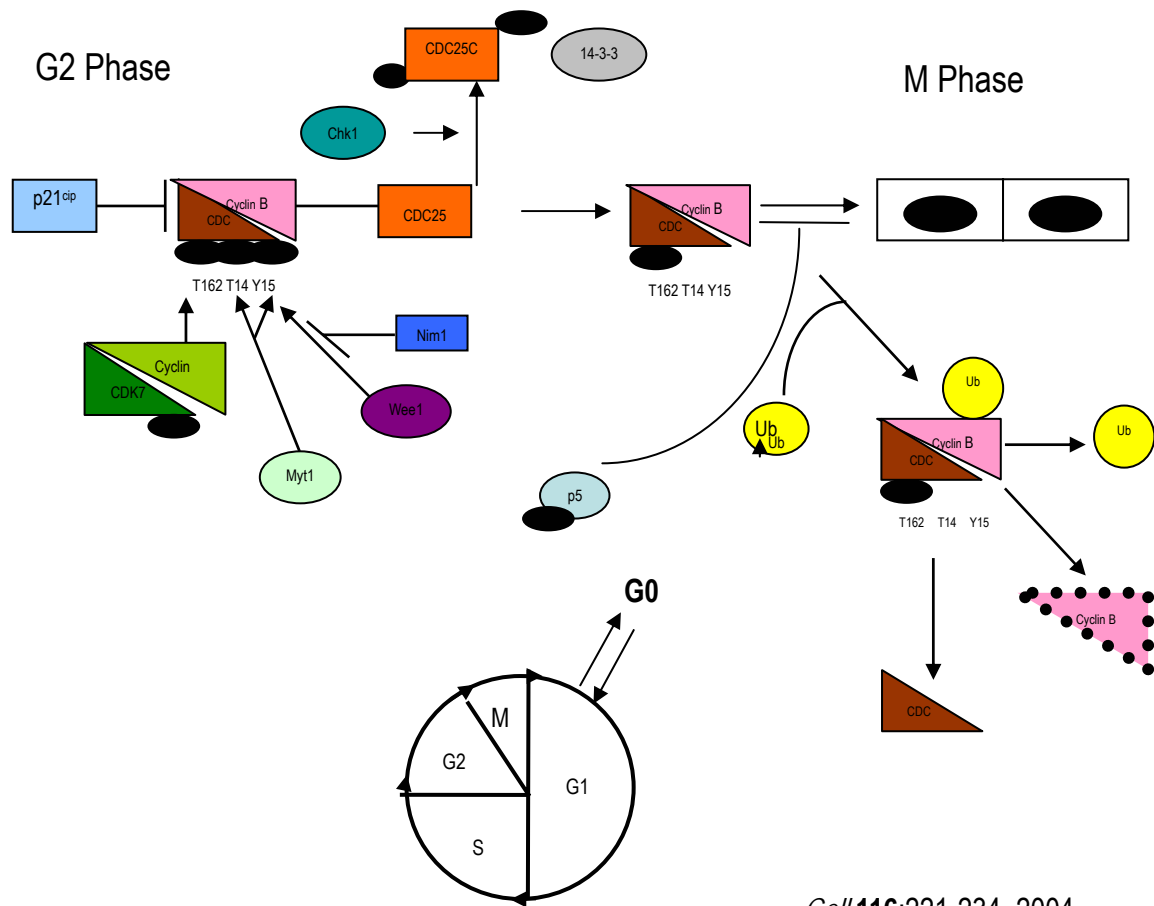
(A) G₁ and S Phases of the Cell Cycle



Cell 116:221-234, 2004.

圖三 細胞週期及其調控 (A)

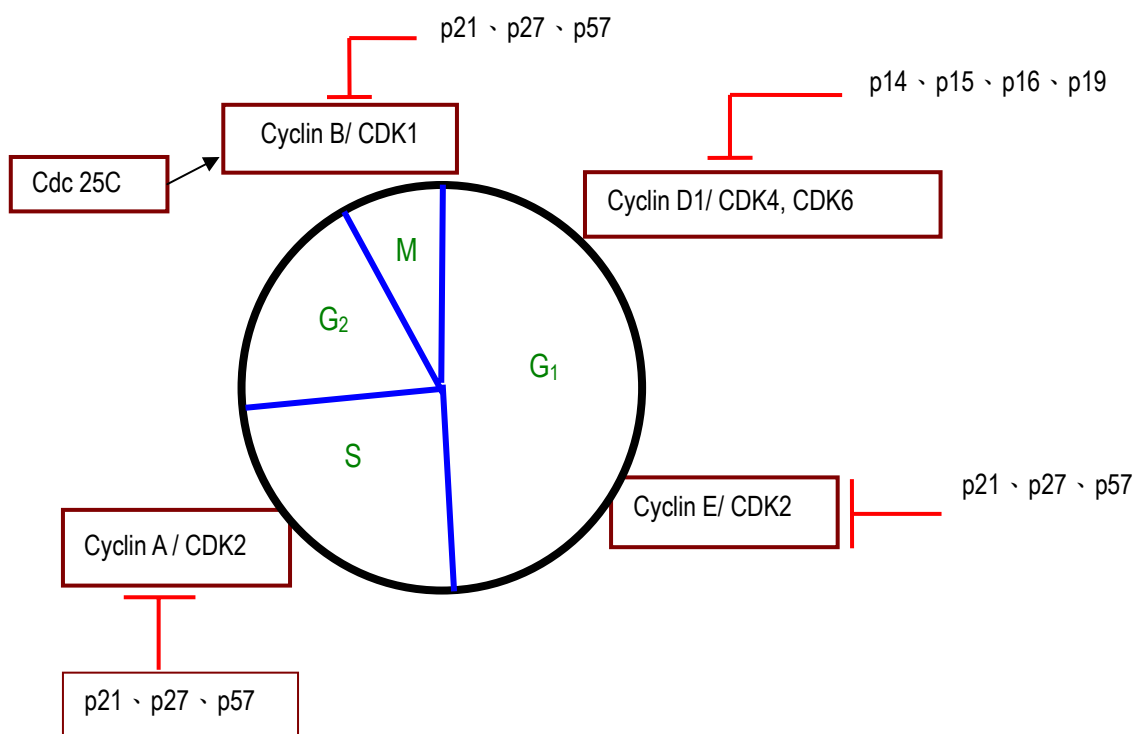
(B) G2 and M Phases of the Cell Cycle



Cell 116:221-234, 2004.

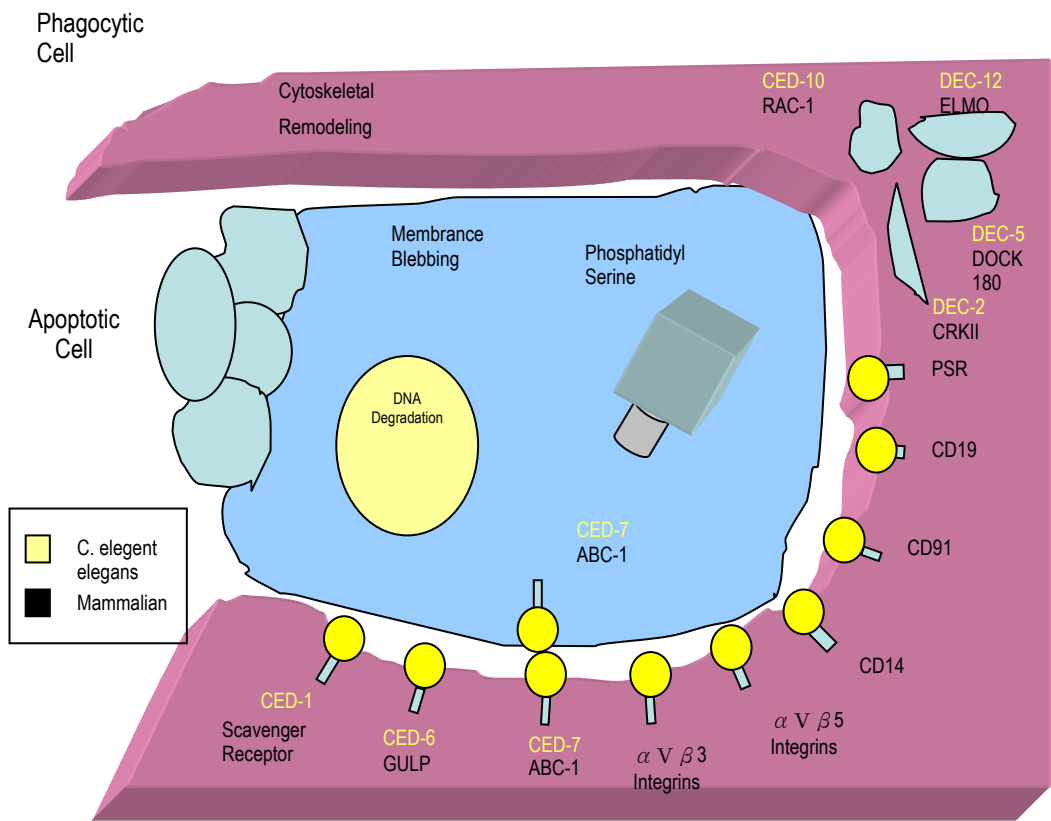
圖三 細胞週期及其調控 (B)

(C) Cell cycle regulators: Cyclins、CDKs 及 CKIs



Cell 116:221-234, 2004.

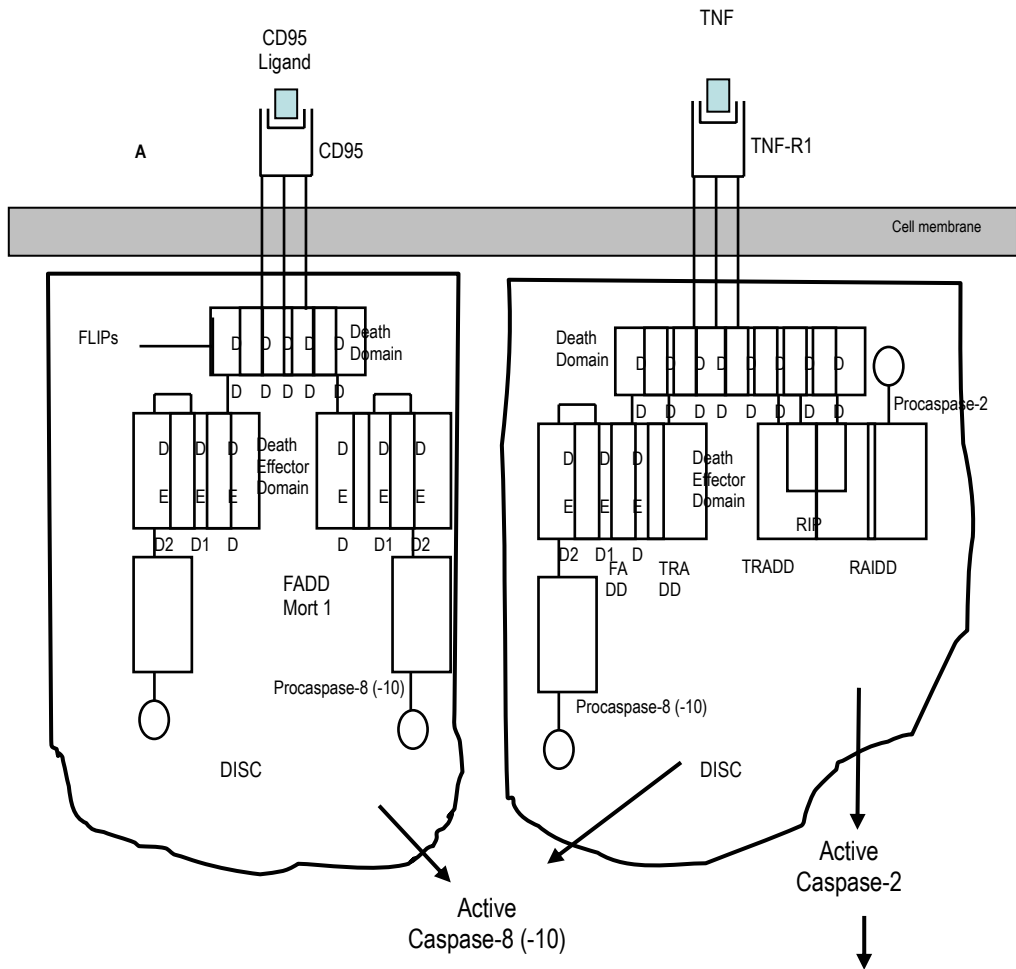
圖三 細胞週期及其調控 (C)



Cell **116**, 205–219, 2004

圖四 凋亡小體的噬入作用 (Engulfment of apoptotic cells)

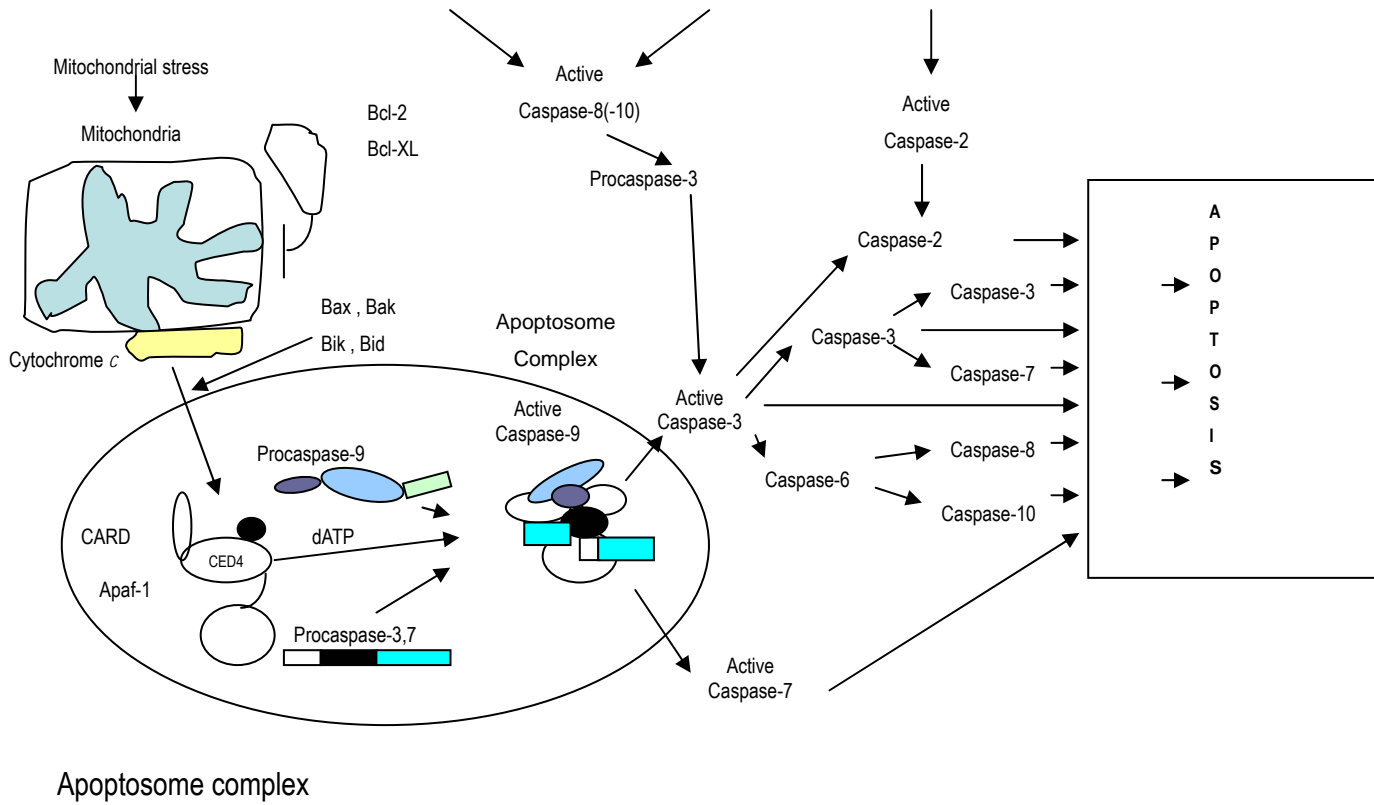
(A) 受體傳導路徑 (Death receptor pathway)



Nature Immunology 4:416-23, 2003.

圖五 凋亡訊息受體傳導路徑及粒線體傳遞路徑 (A)

(B) 粒線體傳遞路徑 (Mitochondrial pathway)

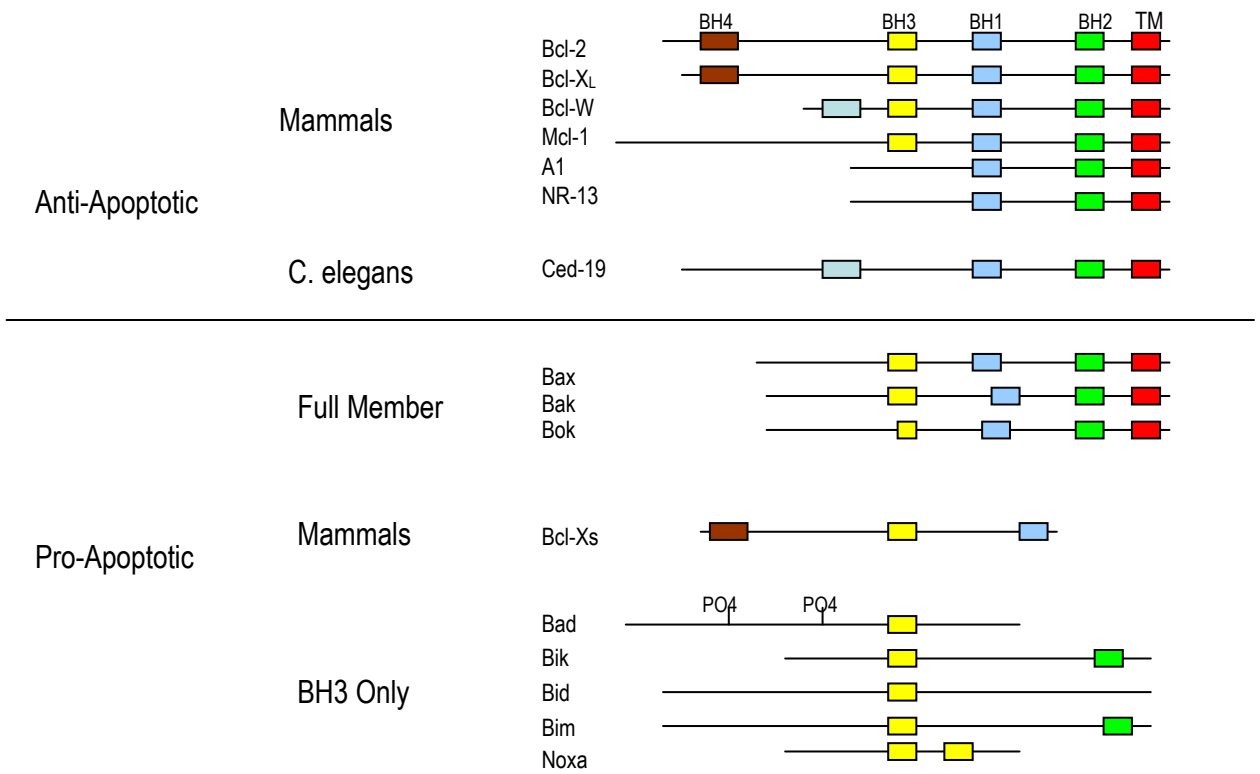


Nature Immunology 4:416-23, 2003.

圖五 凋亡訊息受體傳導路徑及粒線體傳遞路徑 (B)

(A)

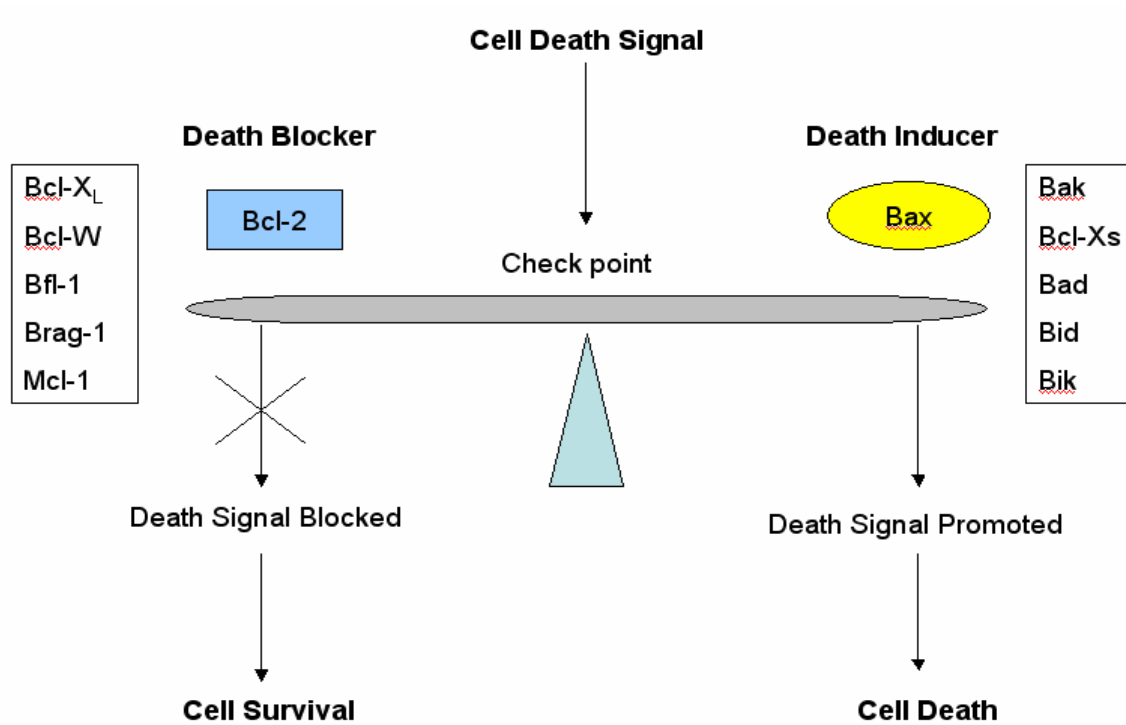
Background : Overview of Bcl-2 Family Members



Biochimica et Biophysica Acta **1644**:95–105, 2004.

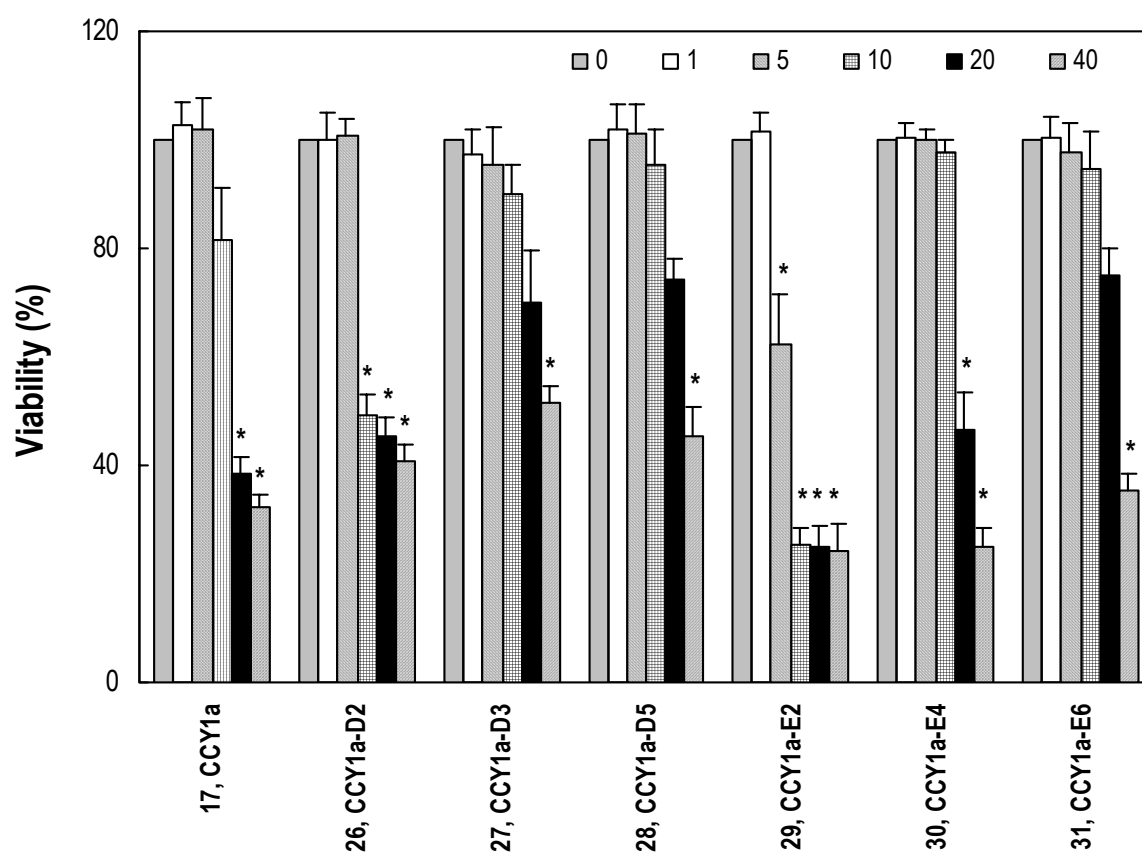
圖六 Bcl-2 家族與細胞凋亡(A)

(B)



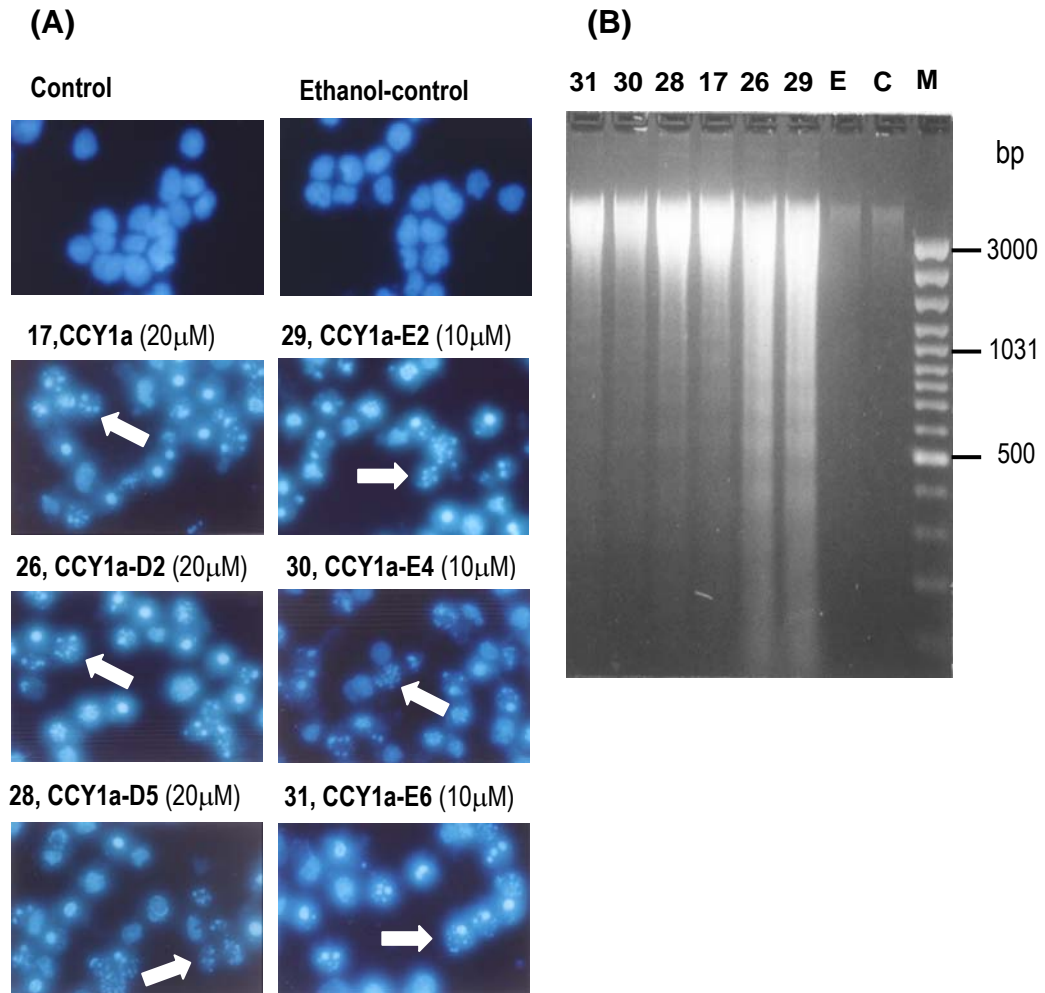
Biochimica et Biophysica Acta 1644:95–105, 2004.

圖六 Bcl-2 家族與細胞凋亡(B)



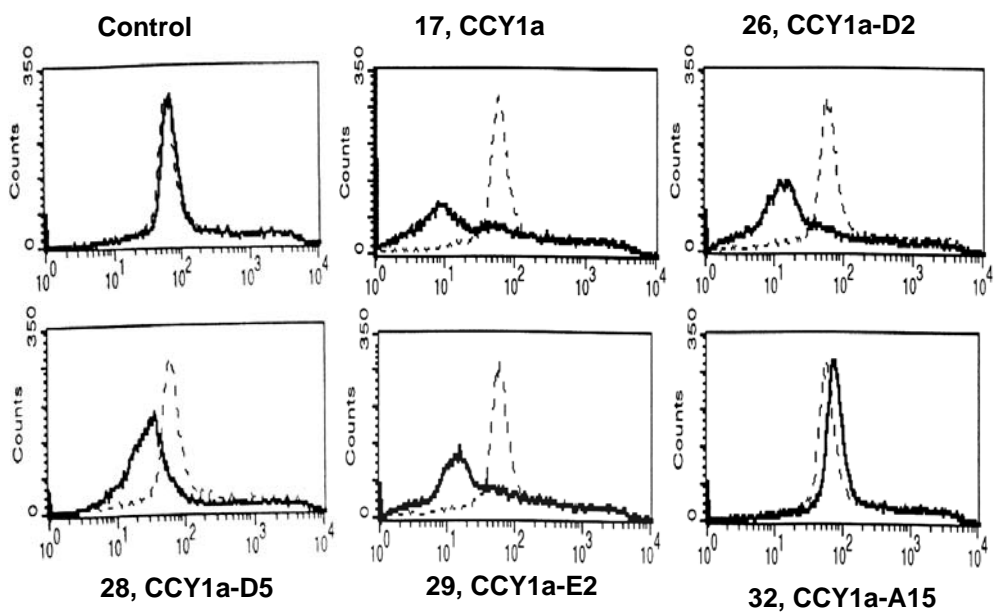
圖七 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 對 HL-60 細胞存活率之影響

HL-60 細胞經化合物 (μM) 處理 24 小時，以 PI 染色後經流式細胞儀分析。細胞存活率以化合物處理的存活細胞數與未加藥處理的存活細胞數之百分比值計算，並以平均值 \pm 標準差來表示(取樣數目為不同三重覆實驗) * $p < 0.05$ 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異

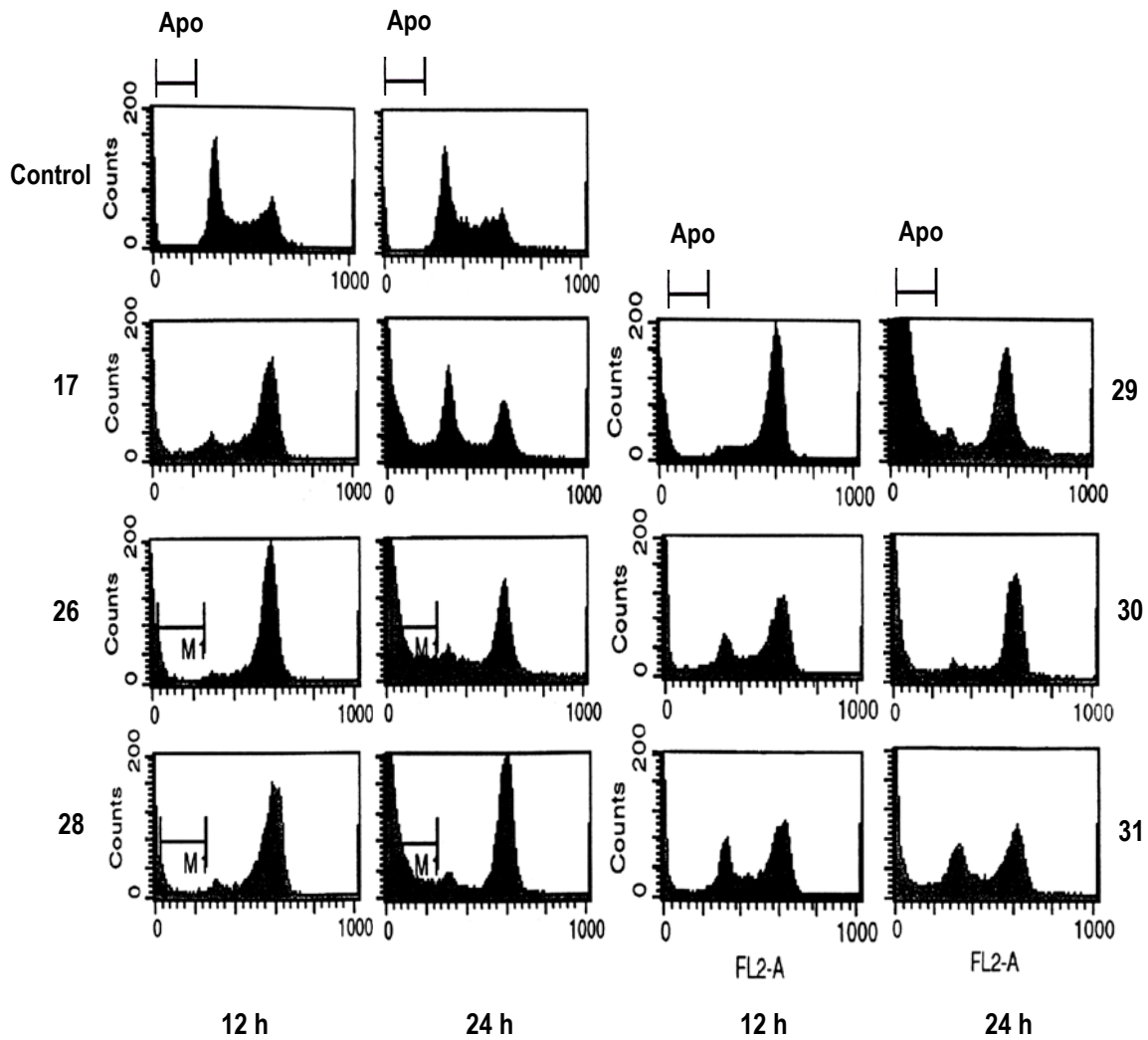


圖八 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物誘導 HL-60 細胞 DNA 斷裂

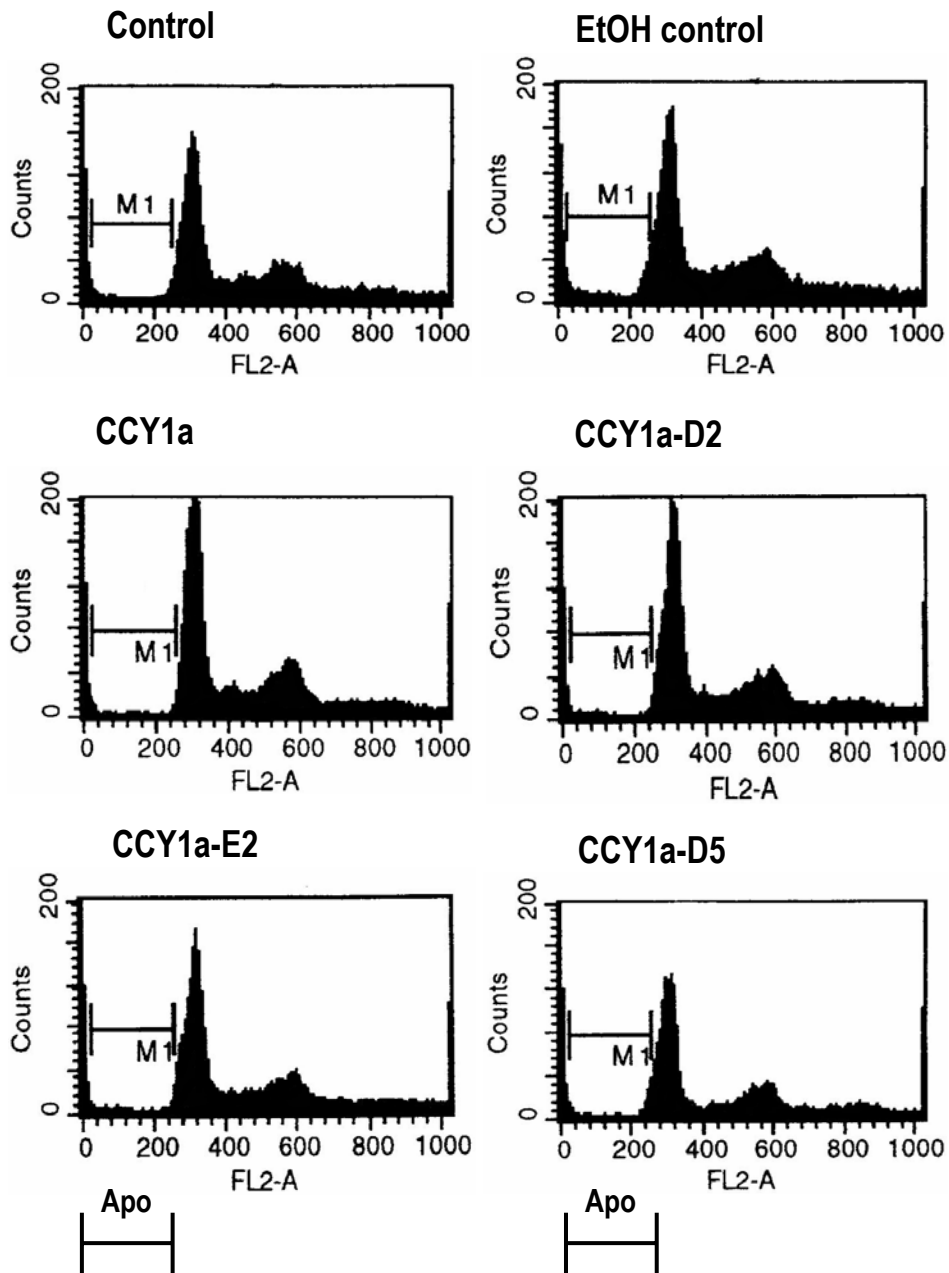
(A) 細胞經化合物處理 12 小時後用 DAPI 染色，並以螢光顯微鏡觀察細胞內 DNA 斷裂與細胞核濃染之情形（白色箭頭為 DNA 斷裂的凋亡細胞） (B) DNA 電泳分析法觀察 DNA 斷裂的情形 (M, DNA ladder marker; C, control; E, ethanol-control)



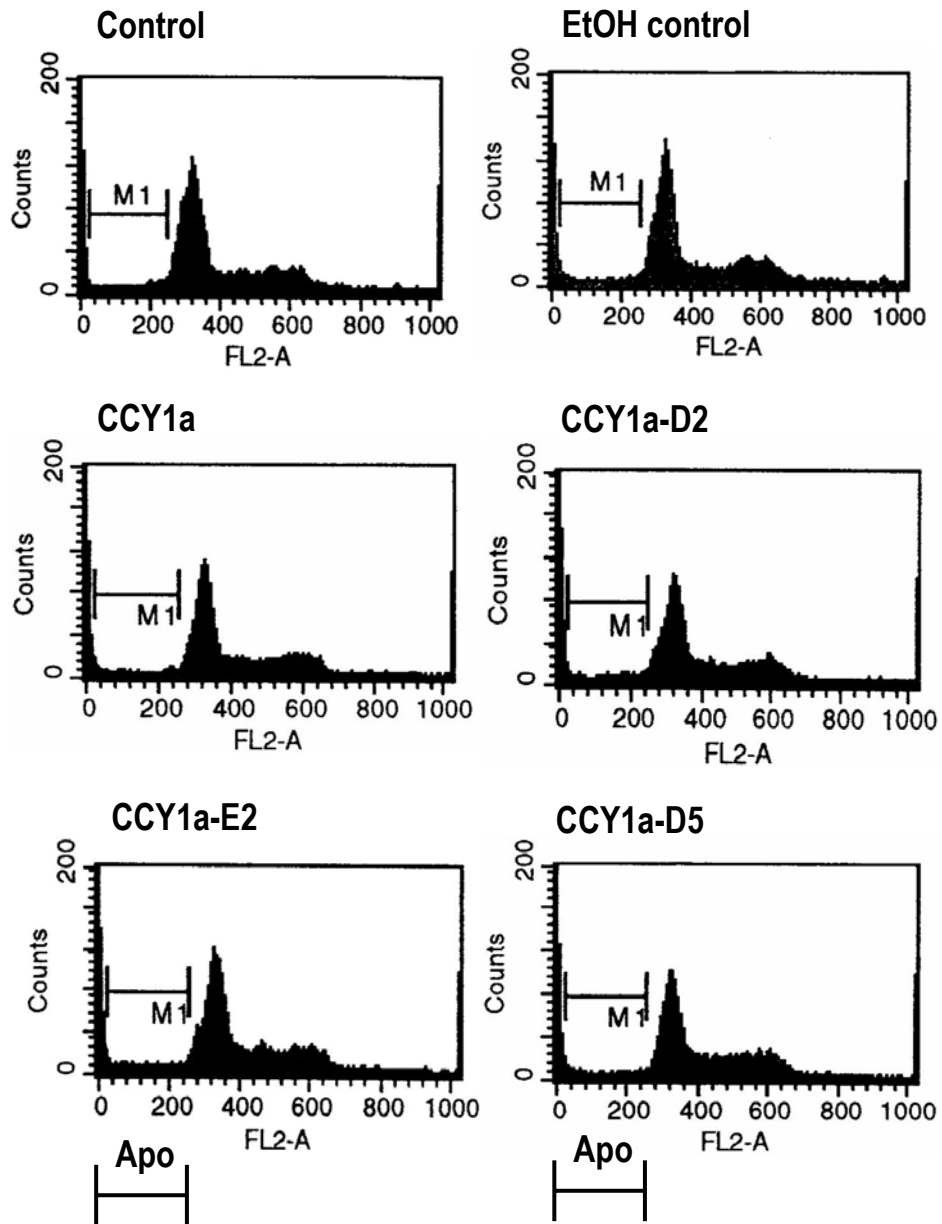
圖九 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對 HL-60 細胞粒線體膜電位的影響 細胞經化合物 20 μM (例外：50 μM CCY1a-A15) 處理 12 小時後以 40 nM DiOC₆(3) 染色，並以流式細胞儀分析粒線體膜電位



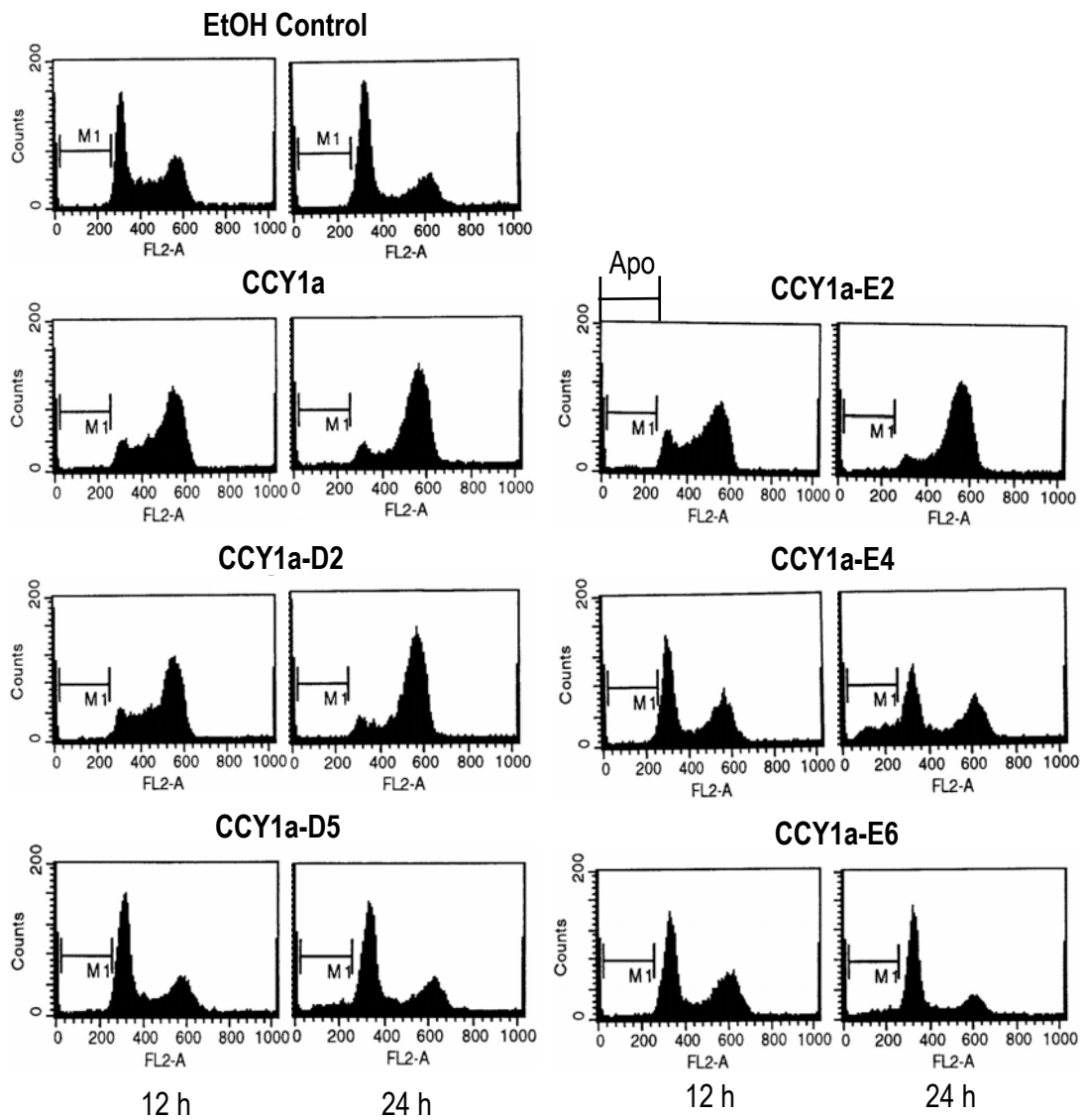
圖十 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對 HL-60 細胞週期之影響
 細胞經化合物 (10 μ M) 處理 12 及 24 小時之細胞週期變化, Apo 指不成套染色體的細胞族群 (sub-G1) (17, CCY1a; 26, CCY1a-D2; 28, CCY1a-D5; 29, CCY1a-E2; 30, CCY1a-E4; 31, CCY1a-E6)



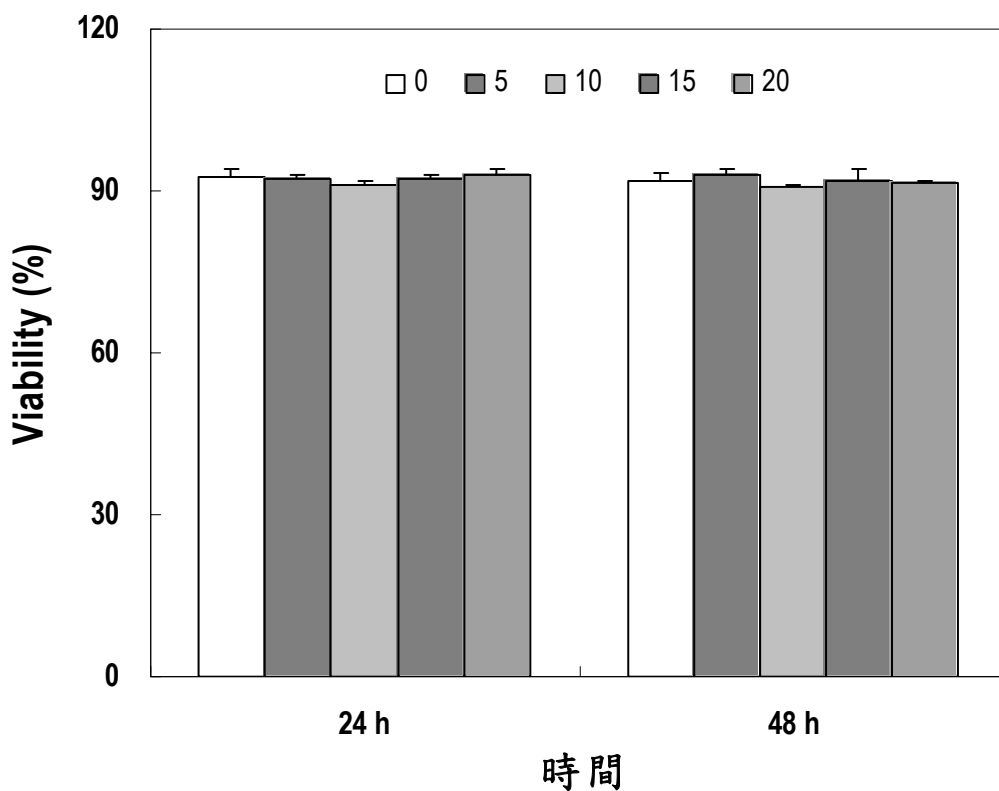
圖十一 2-(Benzyloxy)benzaldehyde衍生物對Hep G2細胞週期之影響 細胞經化合物 (30 μ M) 處理48小時之細胞週期變化，Apo指不成套染色體的細胞族群 (sub-G1)



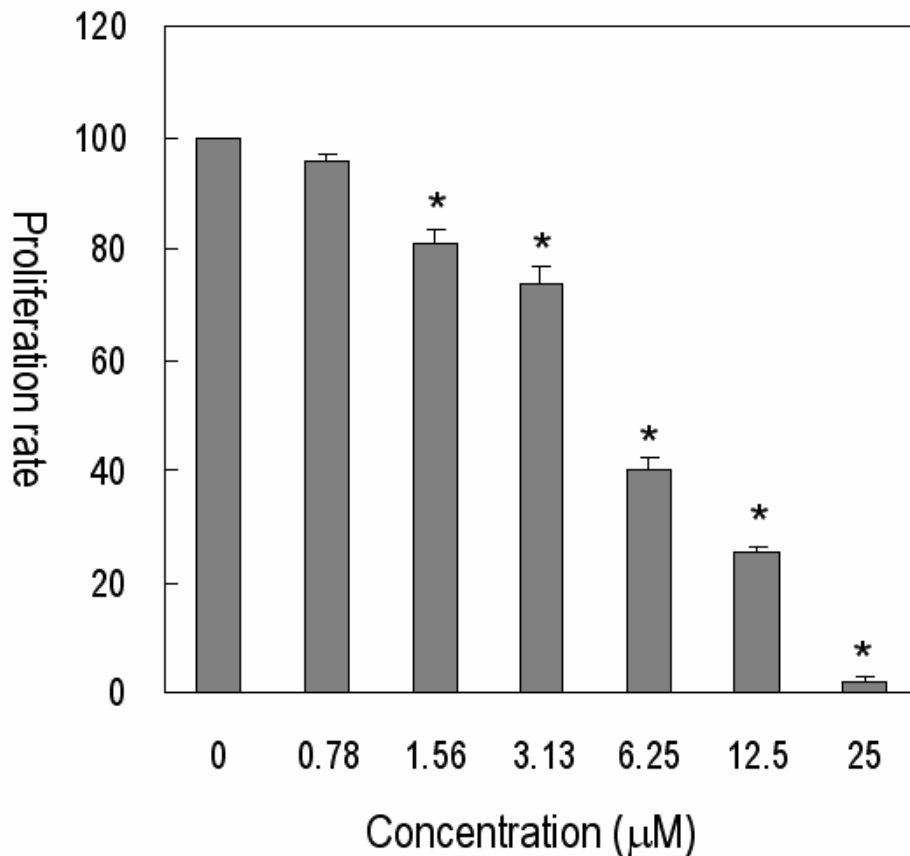
圖十二 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對Hep 3B細胞週期之影響 細胞經化合物 (30 μ M) 處理48小時之細胞週期變化，Apo指不成套染色體的細胞族群 (sub-G1)



圖十三 2-(Benzyloxy)benzaldehyde 衍生物對 H1299 細胞週期之影響
 細胞經化合物處理 (30 μ M) 處理12及24小時之細胞週期變化, Apo指不成套
 染色體的細胞族群 (sub-G1)



圖十四 CCY1a-E2 對人類週邊單核細胞 (PBMC) 生長作用之影響 PBMC 細胞經不同濃度 (μM) 的 CCY1a-E2 處理 24、48 小時後，以 PI 染色，經流式細胞儀分析活細胞數，存活百分率 (viability) 以平均值 \pm 標準差來表示 (取樣數目為不同三重覆實驗) * $p < 0.05$ 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異

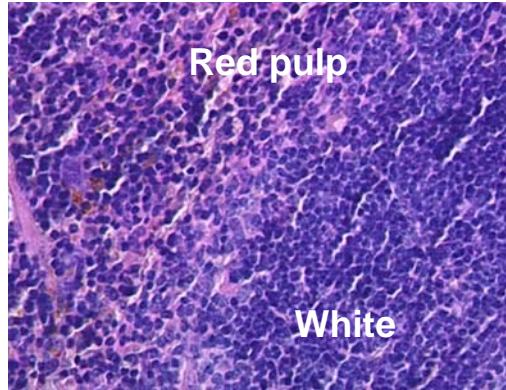


圖十五 CCY1a-E2 對 WEHI-3 細胞增殖率之影響

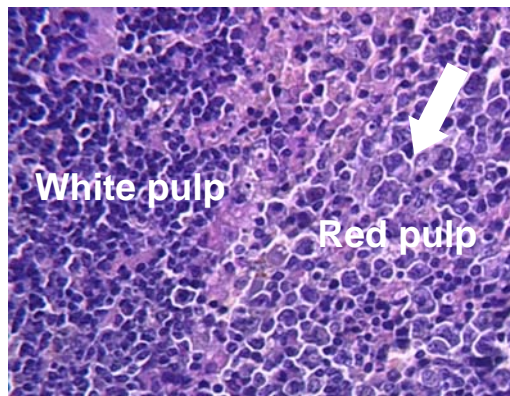
WEHI-3 細胞 (1×10^4) 經 CCY1a-E2 處理 24 小時，以 MTT 方法測定。細胞增殖率 = (實驗組的 $OD_{570/620}$ / 對照組的 $OD_{570/620}$) $\times 100\%$ 計算，並以平均值 \pm 標準差來表示 (取樣數目為不同三重覆實驗)

* $p < 0.05$ 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異

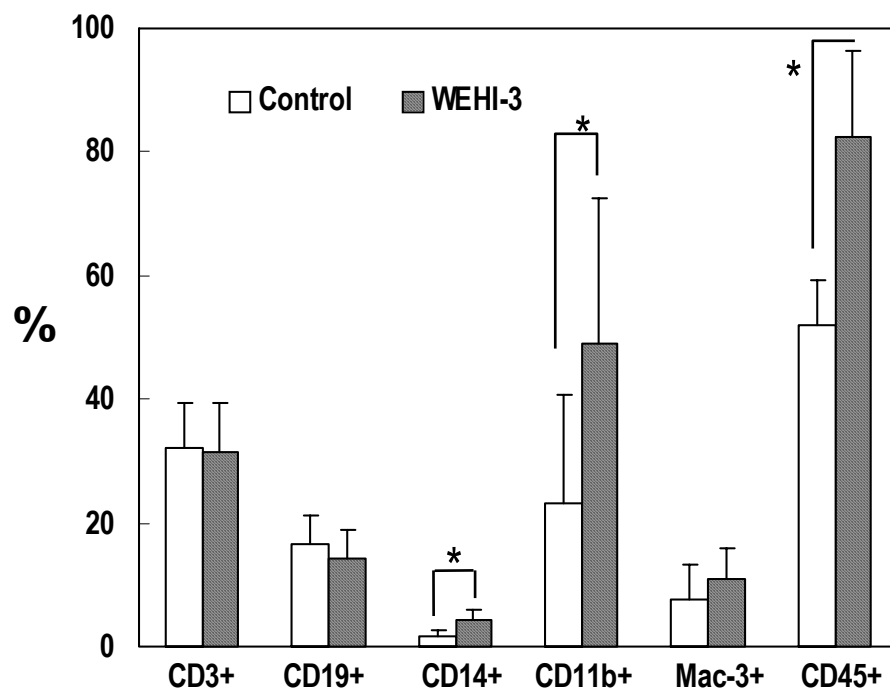
(A) Control /BALB/c



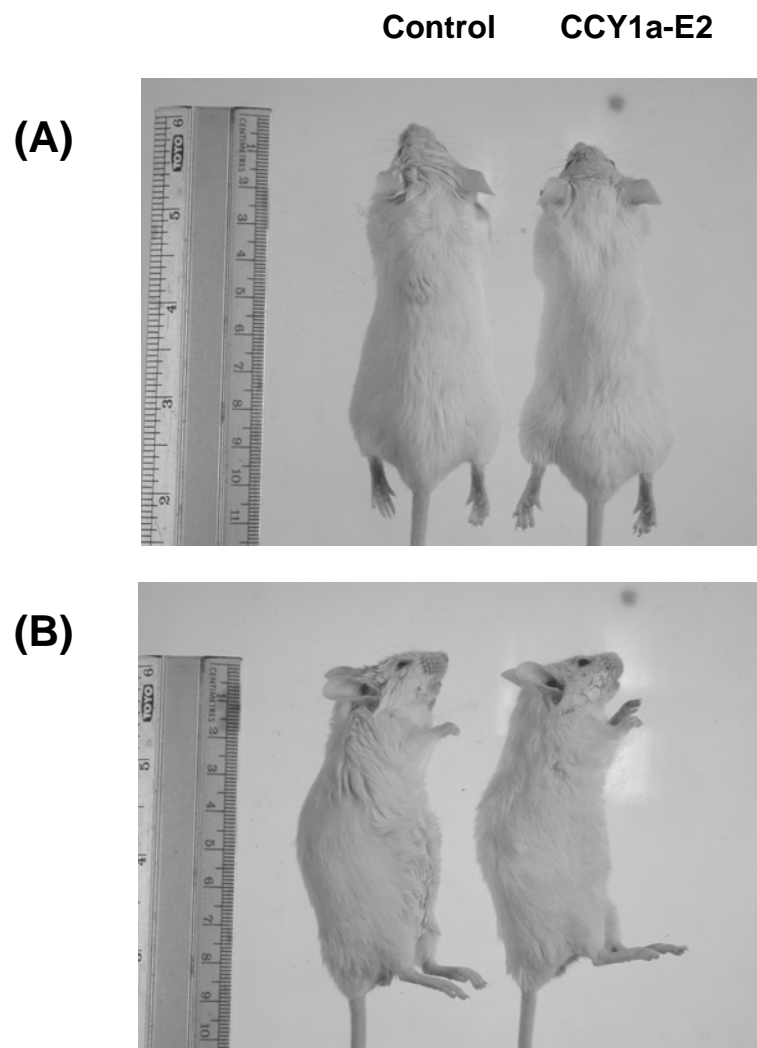
(B) WEHI-3 /BALB/c



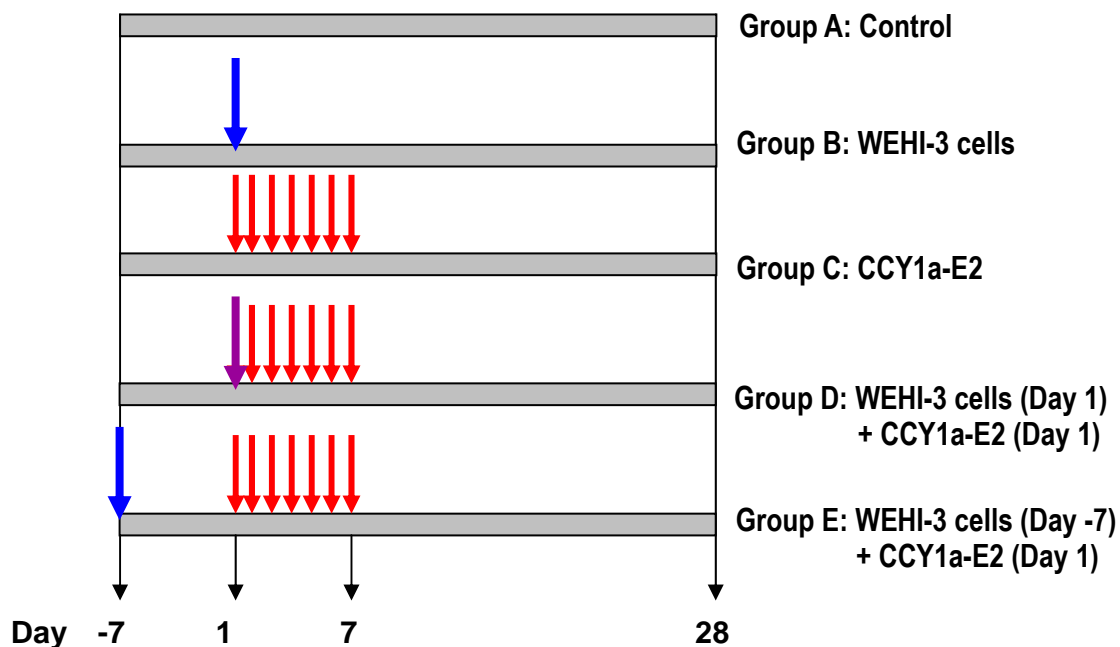
圖十六 BALB/c 與 WEHI-3/BALB/c 小鼠脾臟切片之 H-E 染色結果 BALB/c 小鼠經尾部靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6), 28 天後犧牲。Red pulp 表紅髓區, White pulp 表白髓區, 箭頭為浸潤的癌細胞細胞。顯微觀察倍數 600 X。



圖十七 BALB/c與WEHI-3/BALB/c小鼠週邊白血球細胞族群分佈百分比 BALB/c小鼠經尾部靜脈注射WEHI-3細胞 (1×10^6)，28天後犧牲。血液細胞以螢光染色後經流式細胞儀分析細胞族群百分比，結果以平均值 \pm 標準差來表示。* $P < 0.05$ 表WEHI-3/BALB/c與BALB/c之比較結果在統計上具有顯著性的差異（實驗數目為 $n = 5$ ）。

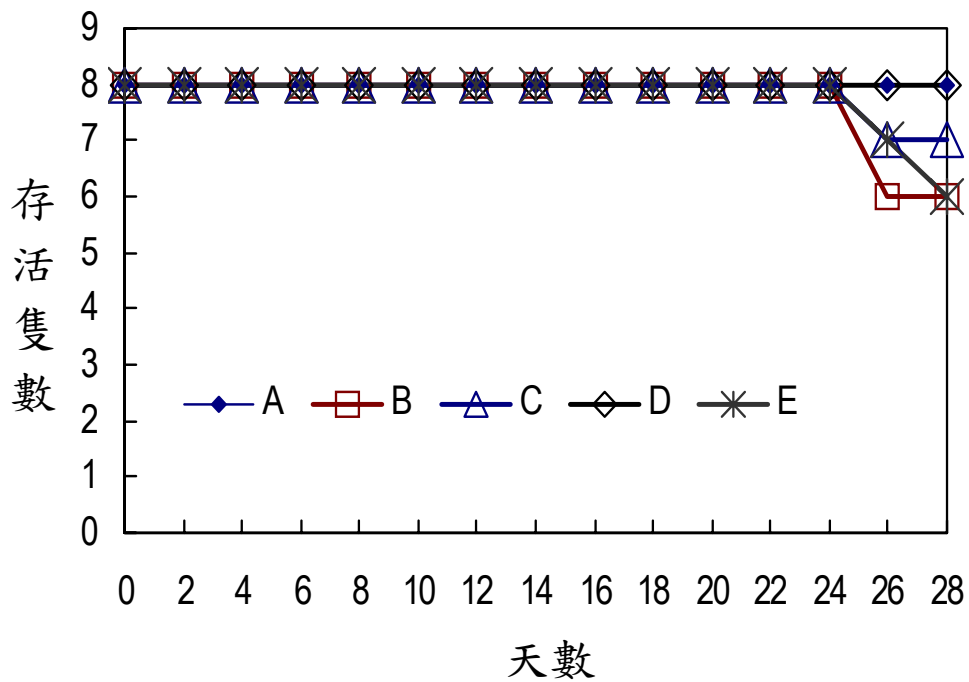


圖十八 急性試驗：對照組與實驗組 BALB/c 小鼠的外觀
BALB/c 小鼠連續 7 天經靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day)，七天後外觀之變化情形 (A) 正面照；(B)側面照



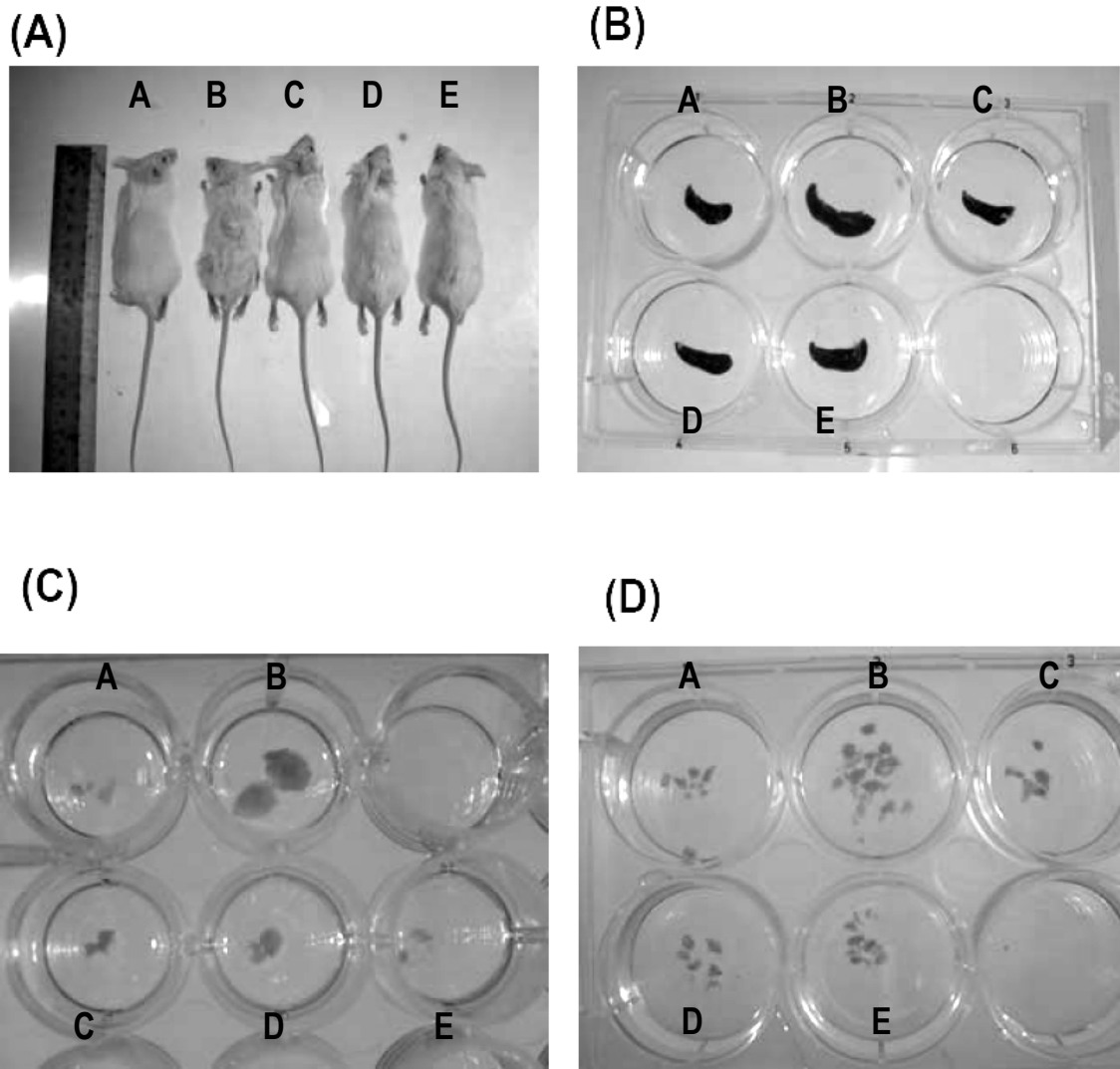
圖十九 CCY1a-E2 對 WEHI-3/BALB/c 致癌小鼠之抗癌實驗設計及給藥流程圖 WEHI-3 癌細胞 (1×10^6) 和 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day) 分別以靜脈注射方式注入 BALB/c 小鼠。(藍色箭頭↓表注射 WEHI-3 癌細胞；紅色箭頭↓表注射藥物或賦型劑；紫色箭頭↓表同時注射藥物及 WEHI-3 癌細胞)

- A: 正常對照組。
- B: 靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6)。
- C: 靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day, 連續投予 7 天)。
- D: 同時靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 與 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day, 連續投予 7 天)。
- E: 靜脈注射 WEHI-3 細胞(1×10^6)一週後再注射 CCY1a-E2(100 mg/kg/day, 連續投予 7 天)。



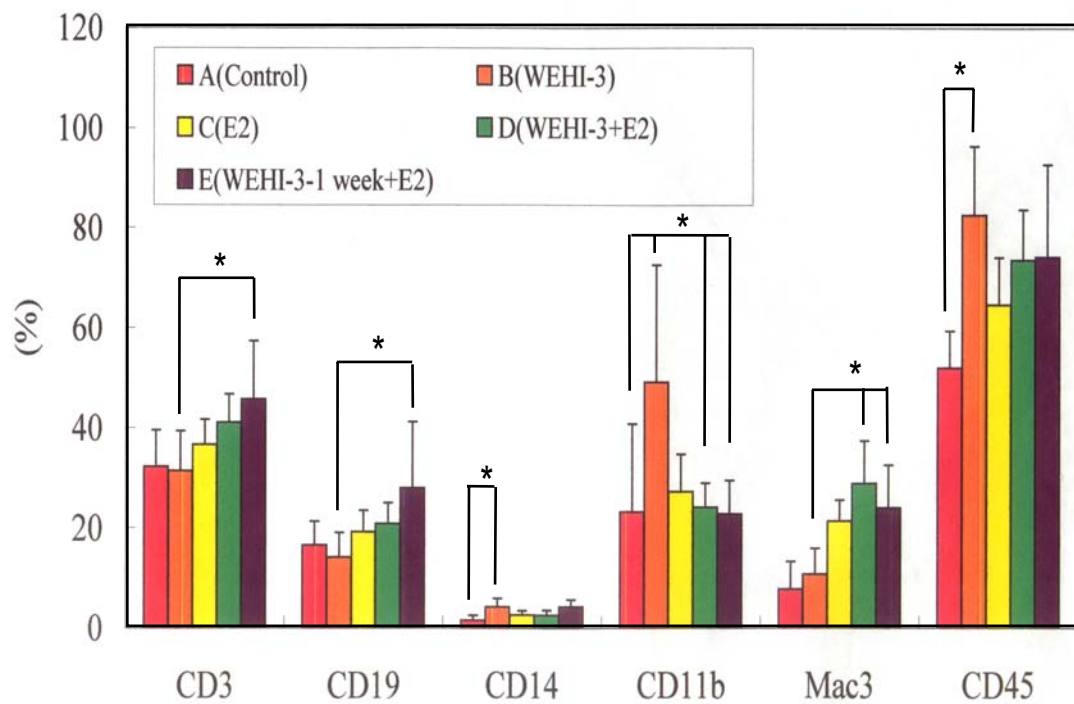
圖二十 抗癌實驗各組小鼠28天內的存活率

- A: 正常對照組。
- B: 靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6)。
- C: 靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。
- D: 同時靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 與 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。
- E: 靜脈注射 WEHI-3 細胞(1×10^6)一週後再注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。



圖二十一 BALB/c 小鼠正常對照組及經靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 或 CCY1a-E2 處理後 (A)老鼠 (B)脾臟 (C)鼠蹊淋巴結 (D)腸繫膜淋巴結外觀之變化情形

- A: 正常對照組。
- B: 靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6)。
- C: 靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day, 連續投予 7 天)。
- D: 同時靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 與 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day, 連續投予 7 天)。
- E: 靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1×10^6) 一週後再注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day, 連續投予 7 天)。



圖二十二 BALB/c 小鼠正常對照組及經靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1x10⁶) 或 CCY1a-E2 處理後週邊白血球細胞族群分布百分比

* $P < 0.05$ 表給各組間之比較結果在統計上具有顯著性的差異

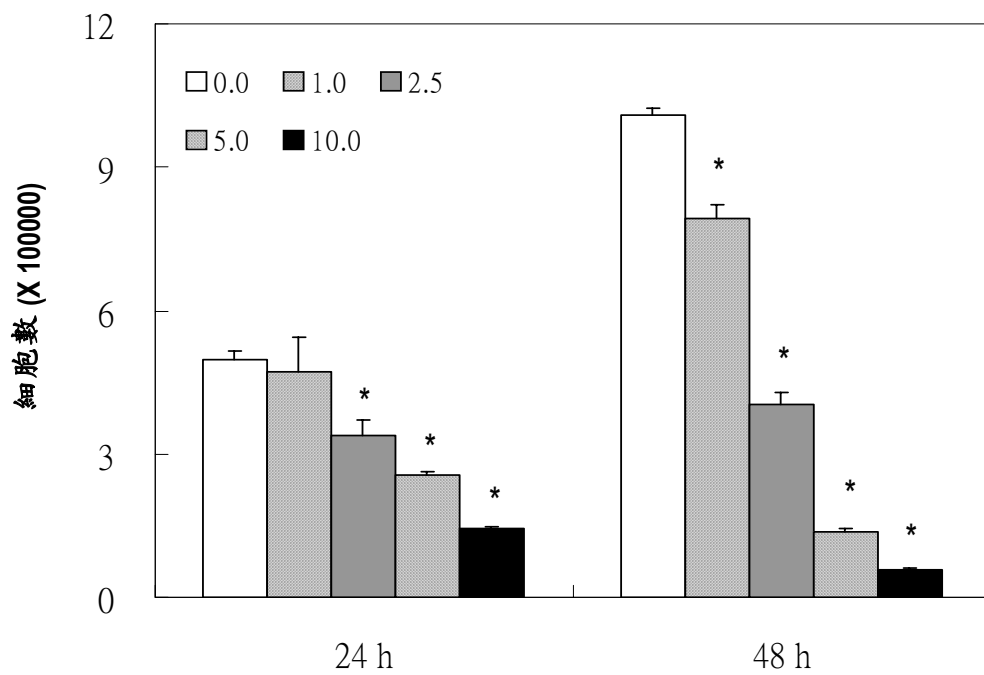
A: 正常對照組。

B: 靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1 X 10⁶)。

C: 靜脈注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day)，連續投予 7 天。

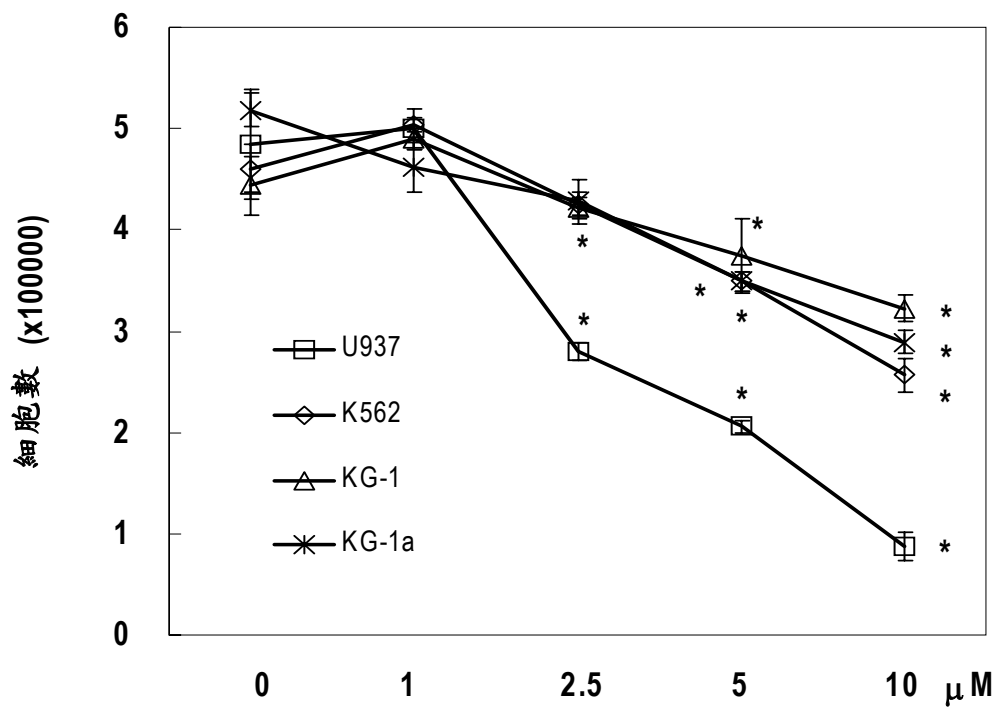
D: 同時靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1 X 10⁶) 與 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。

E: 靜脈注射 WEHI-3 細胞 (1 X 10⁶) 一週後再注射 CCY1a-E2 (100 mg/kg/day，連續投予 7 天)。

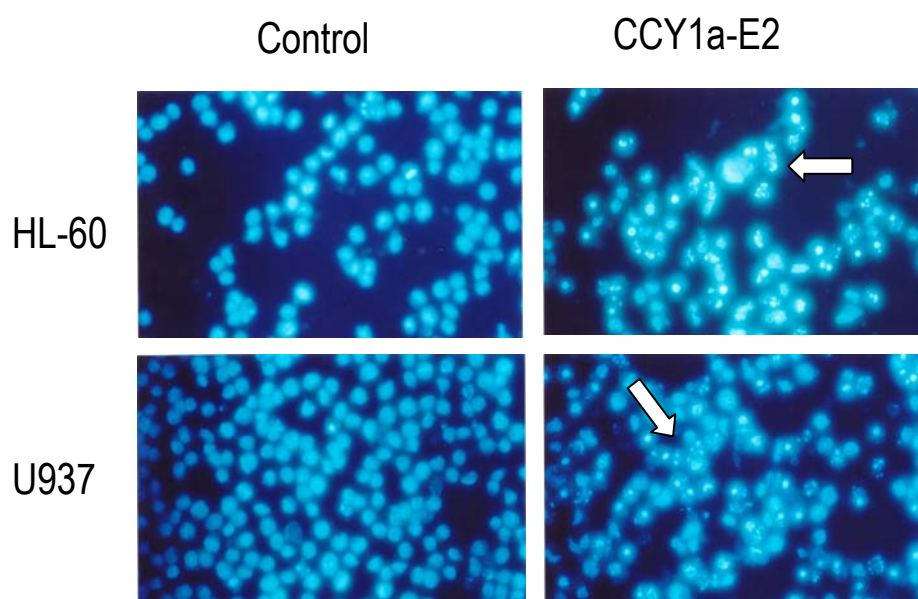


圖二十三 CCY1a-E2對HL-60細胞生長抑制作用 細胞經不同濃度 (μM) 的CCY1a-E2處理24及48小時後，以流式細胞儀分析活細胞數，以平均值±標準差來表示 (取樣數目為不同三重覆實驗)

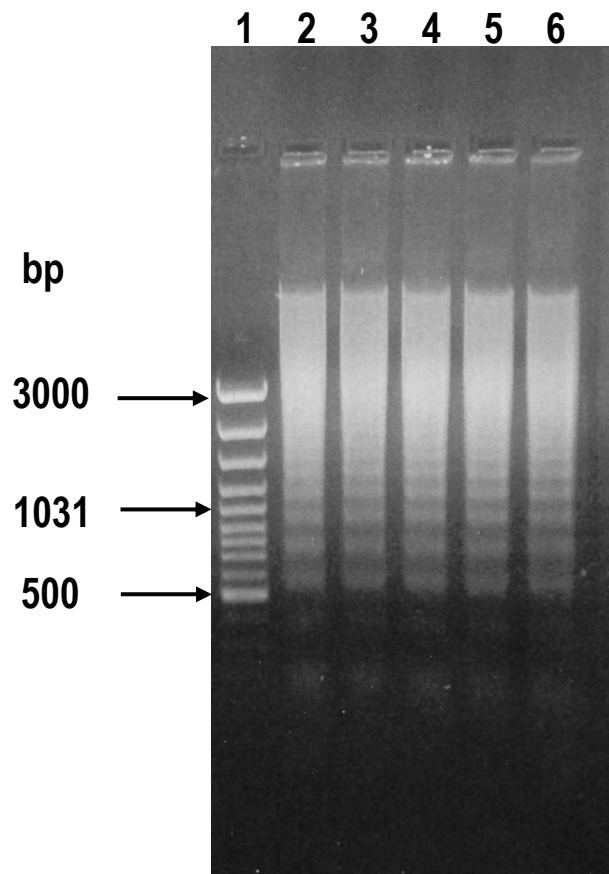
* p<0.05表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異



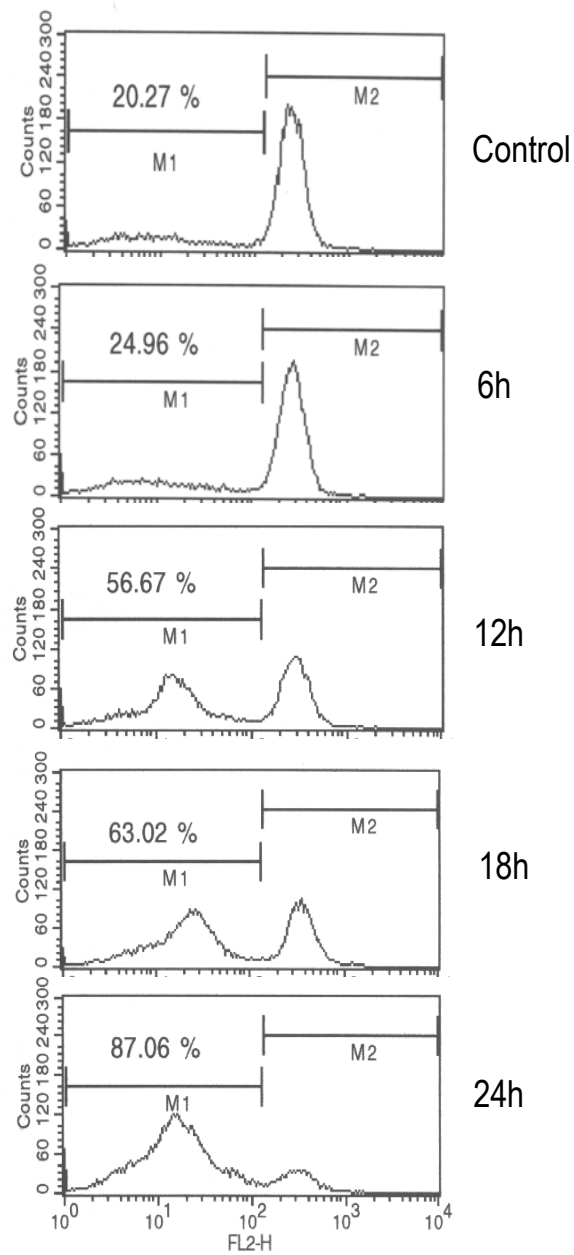
圖二十四 CCY1a-E2 對不同血癌細胞株之細胞生長抑制作用
 細胞經不同濃度的 CCY1a-E2 處理 24 小時後，以流式細胞儀分析活細胞數，以平均值±標準差來表示（取樣數目為不同三重覆實驗）* p<0.05 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異



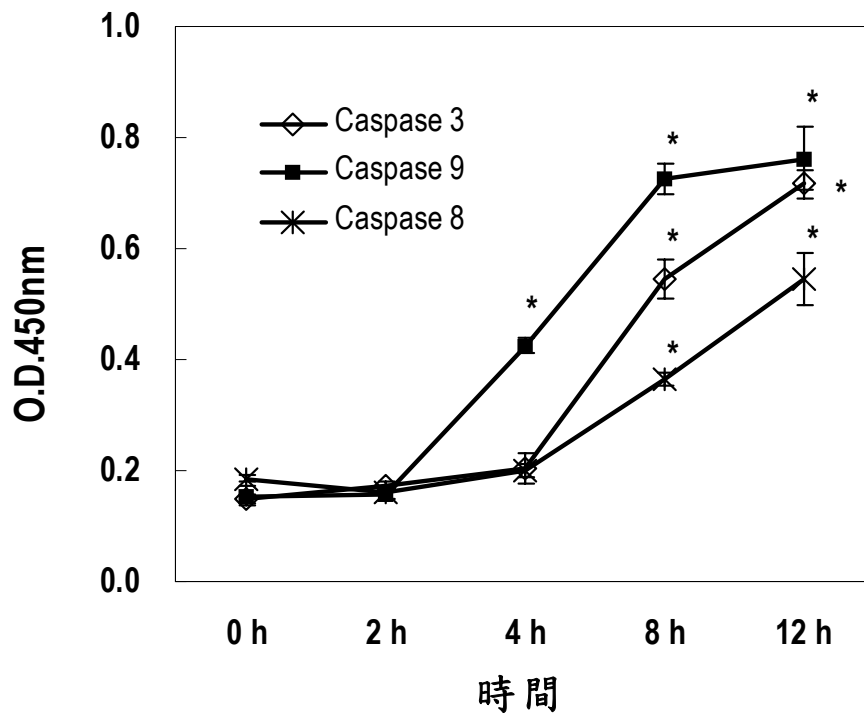
圖二十五 CCY1a-E2 誘導 HL-60 細胞及 U937 細胞 DNA 斷裂
細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 12 小時後用 DAPI 染色，並以螢光顯微鏡觀察細胞內 DNA 斷裂與細胞核濃染之情形 (白色箭頭為 DNA 斷裂的凋亡細胞)



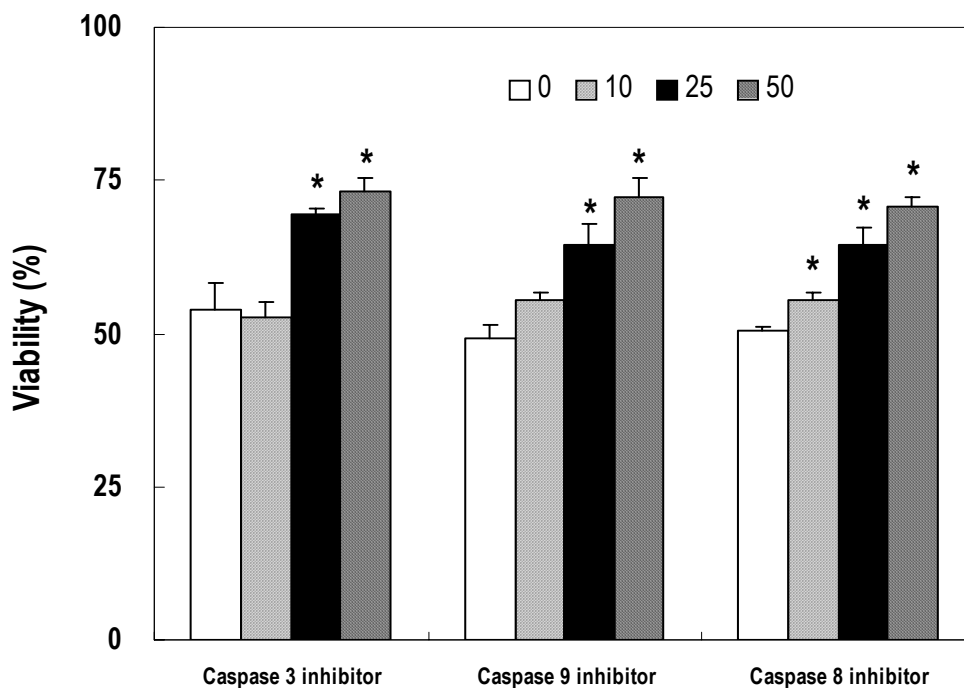
圖二十六 CCY1a-E2 誘導人類血癌細胞株 DNA 斷裂 各血癌細胞經 CCY1a-E2 ($15 \mu\text{M}$) 處理 12 小時後，以 DNA 電泳分析法觀察 DNA 斷裂的情形 (Lane 1 : DNA ladder marker、Lane 2 : U937、Lane 3 : HL-60、Lane 4 : K562、Lane 5 : KG-1a、Lane 6 : KG-1)



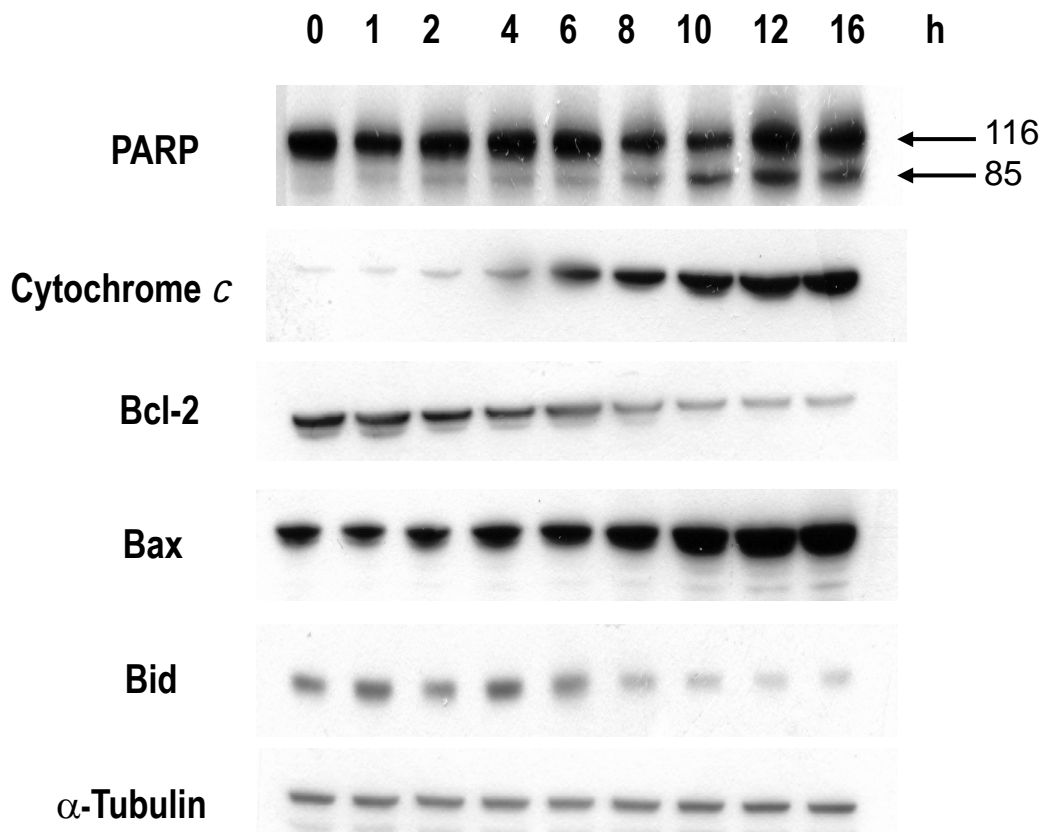
圖二十七 CCY1a-E2 對 HL-60 細胞粒線體膜電位的影響
 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理不同時間後以 DiOC₆(3) 染色，
 並以流式細胞儀分析粒線體膜電位



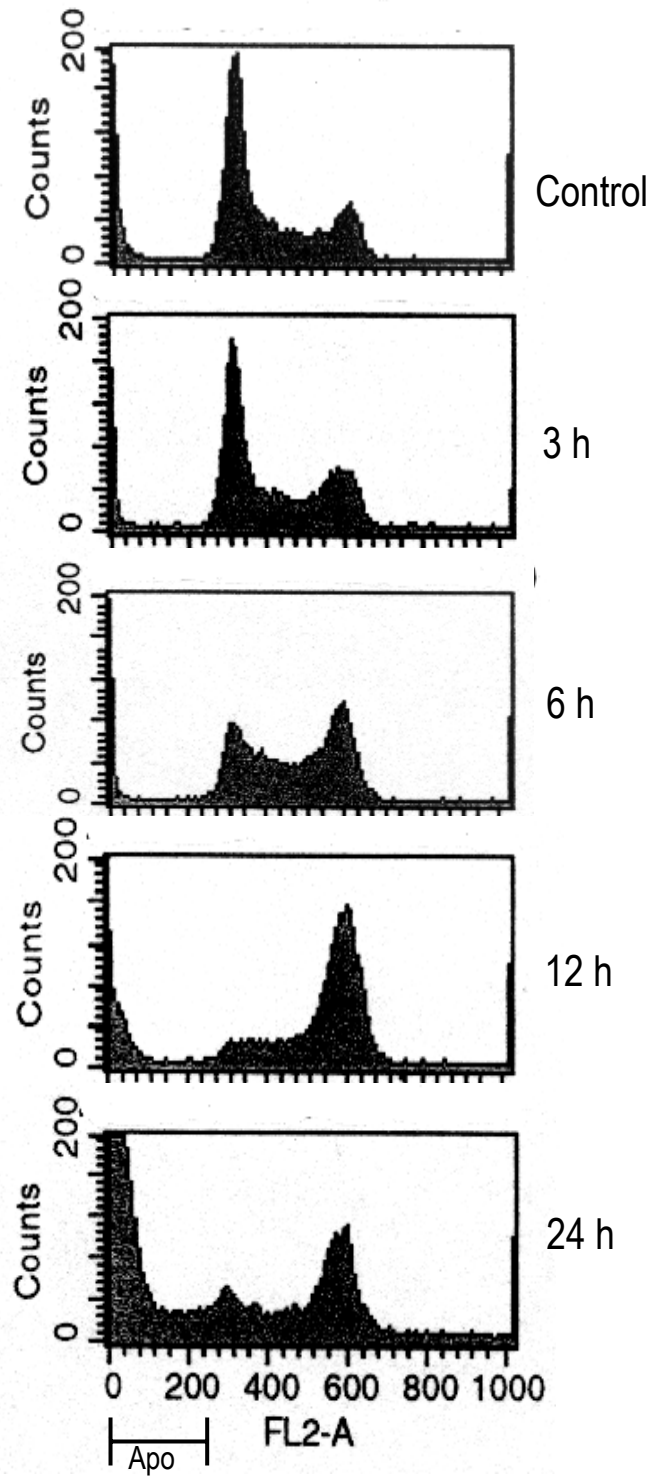
圖二十八 CCY1a-E2對HL-60細胞的caspase-3、caspase-9、caspase-8 活性之影響 HL-60細胞給予CCY1a-E2 (5 μ M) 處理後，於不同時間依caspase活性檢測法測定caspase的活性，結果以平均值 \pm 標準差來表示 (取樣數目為不同三重覆實驗) * $p < 0.05$ 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異



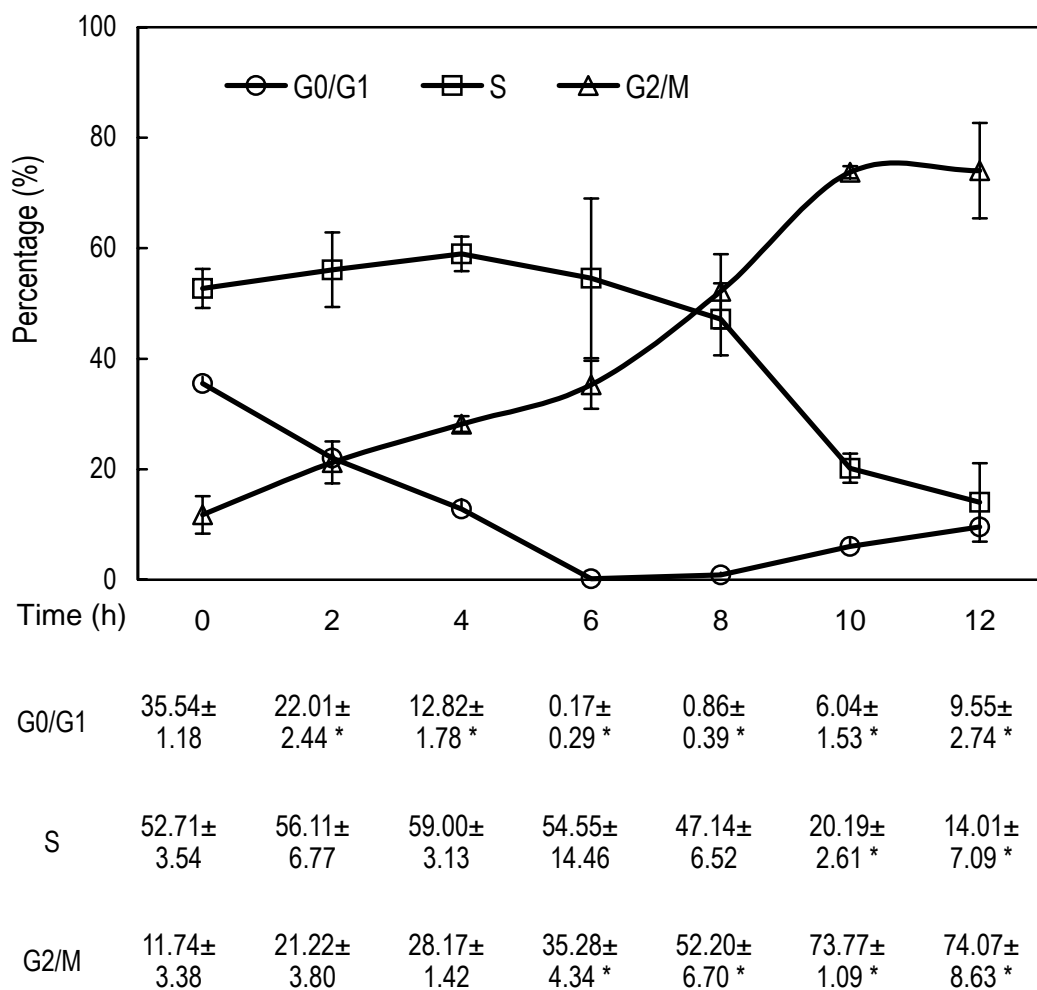
圖二十九 不同濃度的 caspase 抑制劑對 CCY1a-E2 所誘導的 HL-60 細胞生長抑制作用之影響 HL-60 細胞先各以不同濃度之 caspase-3 (Z-DEVD-FMK)、caspase-8 (Z-IETD-FMK)、caspase-9 (Z-LEHD-FMK) 之專一性抑制劑 (μM) 處理 1 小時後，再加入 CCY1a-E2 ($5 \mu\text{M}$) 處理 24 小時，以 PI 染色後經流式細胞儀分析活細胞數目，細胞存活率以平均值 \pm 標準差來表示 (取樣數目為不同三重覆實驗) * $p < 0.05$ 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異



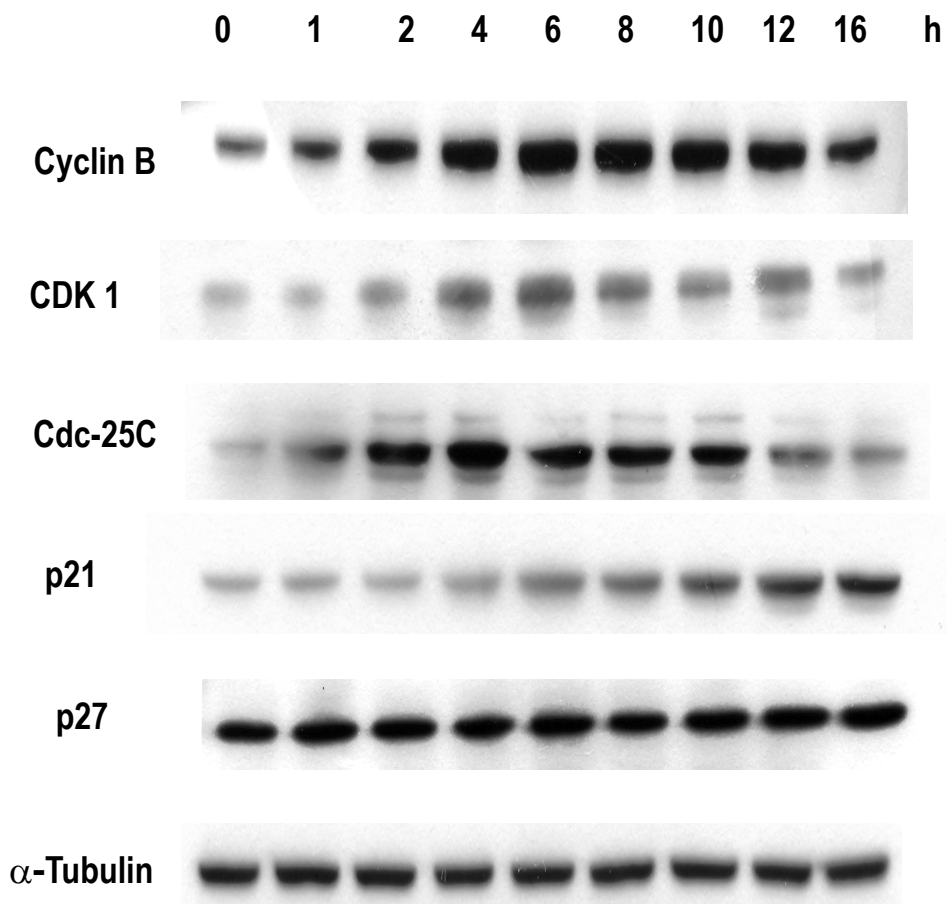
圖三十 CCY1a-E2 對調控細胞凋亡相關蛋白質質量的影響
HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理不同時間後。以西方墨點法檢測
蛋白質量之變化



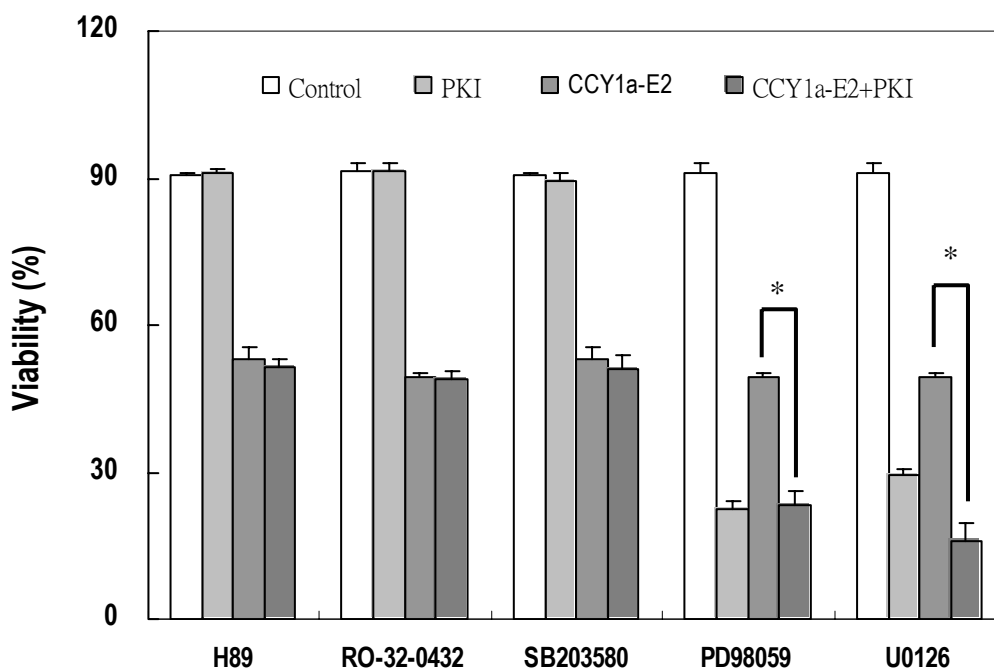
圖三十一 CCY1a-E2 對 HL-60 細胞週期之影響
 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理不同時間之細胞
 週期變化 Apo 指不成套染色體的細胞族群 (sub-G1)



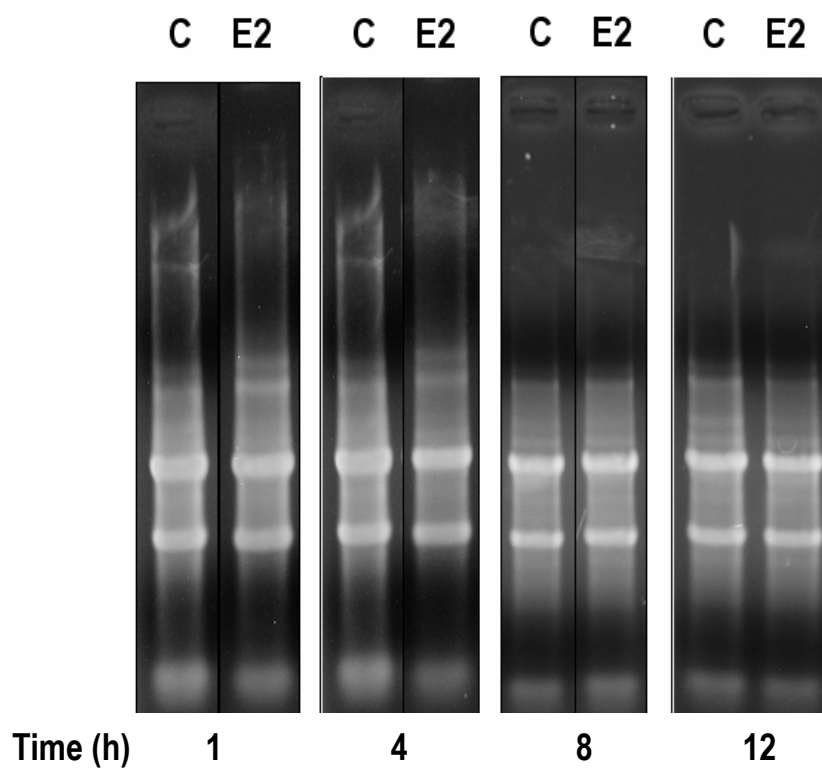
圖三十二 HL-60細胞經CCY1a-E2 (5 μM) 處理不同時間之細胞週期變化 HL-60細胞經CCY1a-E2 (5 μM) 處理不同時間之細胞週期變化 * p < 0.05 表示各時期的百分比在不同時間點與0小時的結果在統計上有顯著差異



圖三十三 CCY1a-E2 對調控細胞週期相關蛋白質量的影響
 HL-60 細胞經 CCY1a-E2 (5 μ M) 處理不同時間後。以西方墨點法檢測
 蛋白質量之變化

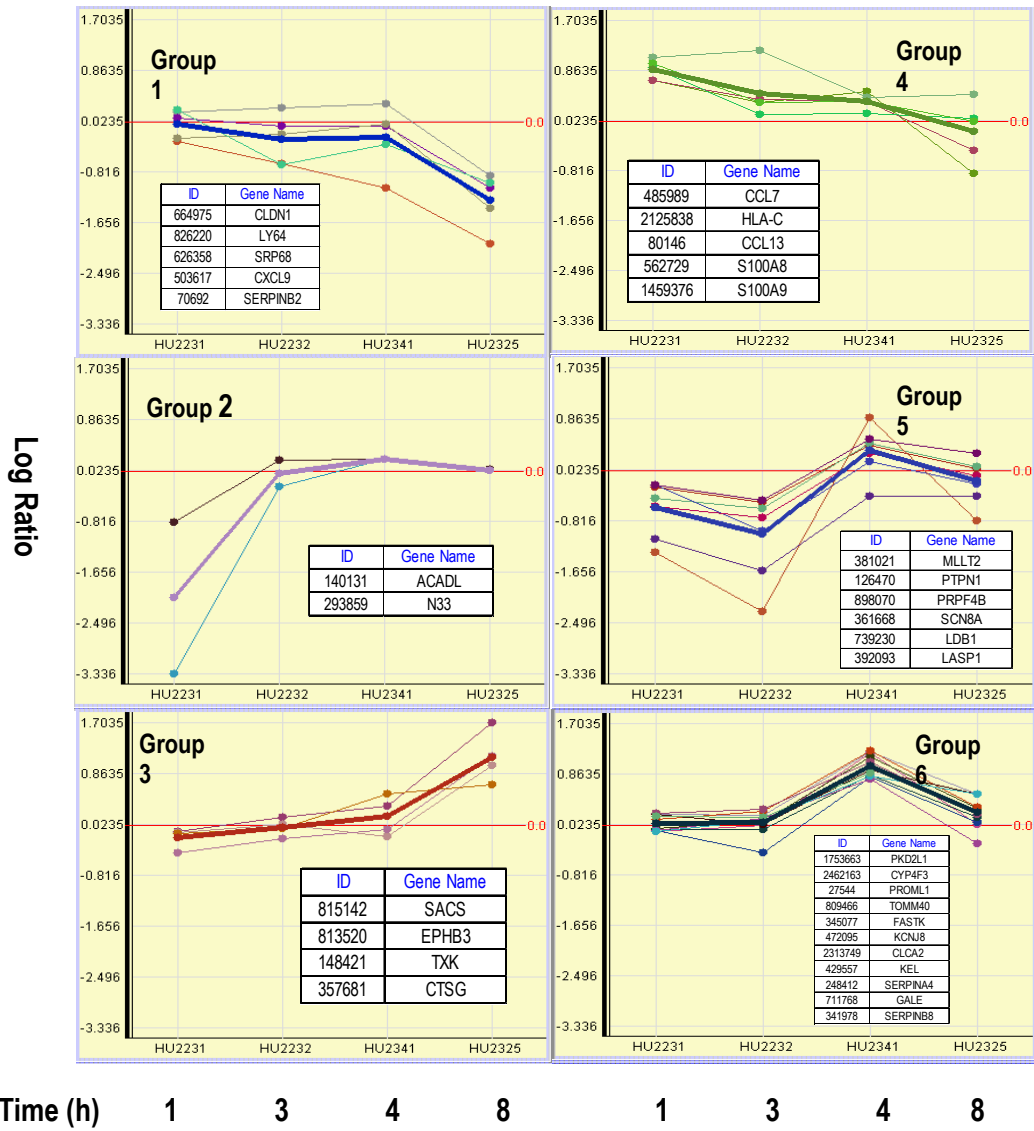


圖三十四 PKA抑制劑 (H89)、PKC抑制劑 (RO-32-0432)、P38/JNK抑制劑 (SB203580)、ERK抑制劑 (PD98059) 及 MEK抑制劑 (U0126) 對CCY1a-E2所誘導的HL-60細胞生長抑制作用之影響 HL-60 細胞先以各蛋白激酶的抑制劑 H89 (150 nM)、RO-32-0432 (100 nM)、SB203580 (50 μ M)、PD98059 (50 μ M) 及 U0126 (50 μ M) 處理1小時後，再加入CCY1a-E2 (5 μ M) 處理24小時後，以PI染色後經流式細胞儀分析細胞存活率，以平均值 \pm 標準差來表示 (取樣數目為不同三重覆實驗) * $p < 0.05$ 表示給藥組與對照組的結果在統計上有顯著差異

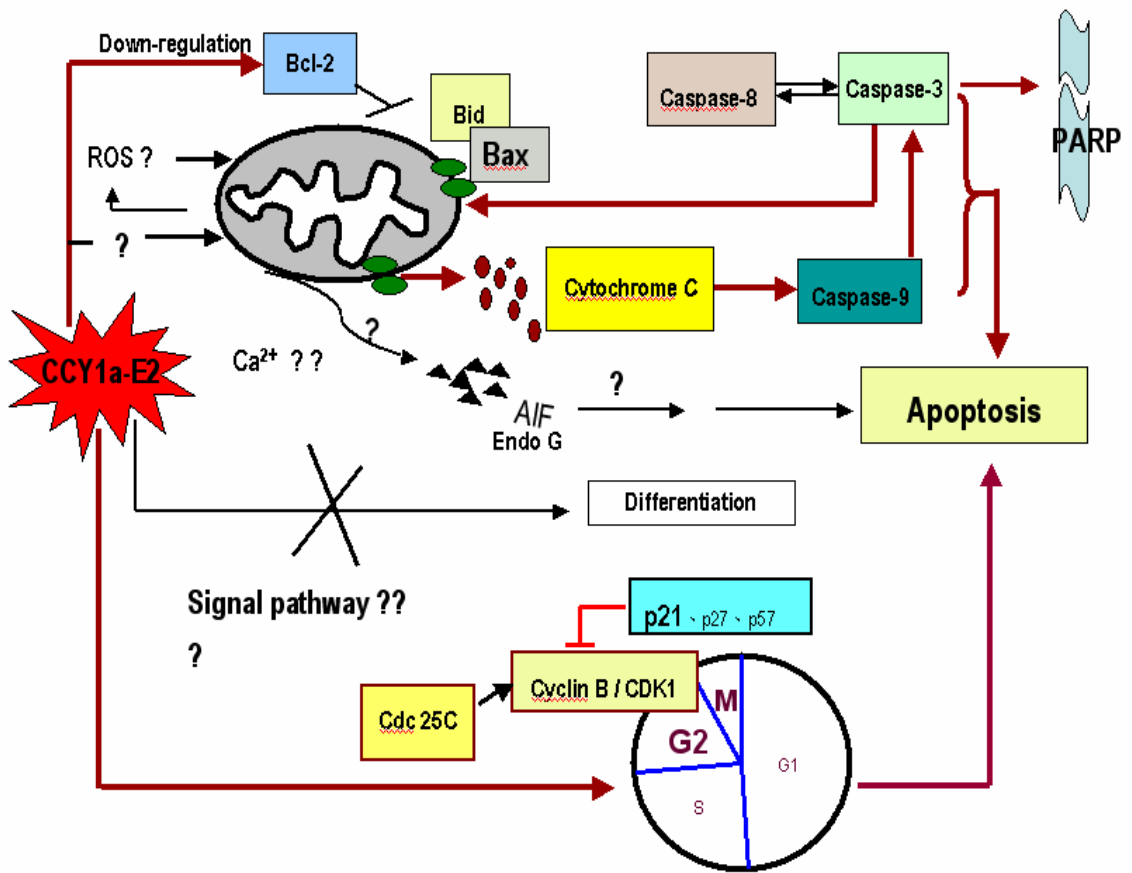


圖三十五 凝膠電泳分析RNA純度與穩定性

HL-60 細胞以CCY1a-E2 (5 μ M) 處理 1, 4, 8與12小時後
抽取細胞內的RNA, 以凝膠電泳分析RNA純度與穩定性
(C: Control; E2: CCY1a-E2 treatment)



圖三十六 HL-60 細胞以CCY1a-E2 (5 μ M) 處理後基因表現趨勢之相關性



圖三十七 CCY1a-E2 抑制 HL-60 細胞生長可能的機制

參考文獻

1. 行政院衛生署統計資料網公告 <http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm>
2. Chen CY, Chen YC, Tang JL, Yao M, Huang SY, Tsai W, Chen YC, Shen MC, Wang CH, Tein HF. Hepatosplenic fungal infection in patients with acute leukemia in Taiwan: incidence, treatment, and prognosis. *Ann Hematol.* **82**:93-97, 2003.
3. Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther.* **100**:257-290, 2003.
4. Balduf M, Steinkraus V, Mensing H. Acute myeloid leukemia: ecchymoses as sole clinical symptom. *Cutis.* **53**:131-133, 1994.
5. Mendeleeva LP. Allogenic bone marrow transplantation in acute leukemias and chronic myeloid leukemia *Ter Arkh.* **75**:89-94, 2003.
6. Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am J Surg.* **186**:264-268, 2003.
7. 陳博明. 急性骨髓性白血病化學治療最近的進展. *臨床醫學* **43**:310-313, 1999
8. Powell BL. Acute progranulocytic leukemia. *Curr Opin Oncol.* **13**:8-13, 2001.
9. Fang J, Chen SJ, Tong JH, Wang ZG, Chen GQ, Chen Z. Treatment of acute promyelocytic leukemia with ATRA and As₂O₃: a model of molecular target-based cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* **1**:614-620, 2002.
10. Duprez E, Wagner K, Koch H, Tenen DG. C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J.* **22**:5806-5816, 2003.
11. Boda D, Virag I. Early results of vinblastine therapy in childhood tumours. *Ther Hung.* **18**:15-19, 1970.
12. Takeshita A. Recent advances in the treatment of acute myelogenous leukemia: a view of the new agents. *Japanese J Clin Hematol.* **44**:1133-1143, 2003.
13. Lin RJ, Egan DA, Evans RM. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet.* **15**:179-184, 1999.
14. Malumbres M, Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res.* **5**:5-18, 2003.

15. Dash BC, El-Deiry WS. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol.* **280**:99-161, 2004.
16. Brown G, Hughes PJ, Michell RH. Cell differentiation and proliferation--simultaneous but independent? *Exp Cell Res.* **291**:282-288, 2003.
17. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaccmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* **73**:39-85, 2004.
18. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell.* **116**:221-234, 2004.
19. Schonthal AH. Measuring cyclin-dependent kinase activity. *Methods Mol Biol.* **281**:105-124, 2004.
20. Meijer L. Chemical inhibitors of cyclin dependent kinases. *Trends Cell Biol.* **6**:393-98, 1996.
21. Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* **8**:2168-2181, 2001.
22. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol.* **5**:27-36, 2004.
23. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature.* **9**:131-134, 1995.
24. Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ. The physiology of p16(INK4A)-mediated G1 proliferative arrest. *Cell Biochem Biophys.* **2**:189-197, 2000.
25. Fotedar R, Bendjennat M, Fotedar A. Functional analysis of CDK inhibitor p21WAF1. *Methods Mol Biol.* **281**:55-72, 2004.
26. Fotedar R, Bendjennat M, Fotedar A. Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* **2**:134-137, 2004.
27. Musgrove EA, Davison EA, Ormandy CJ. Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: insights from knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **1**:55-66, 2004.
28. Assoian RK. Stopping and going with p27kip1. *Dev Cell.* **4**:458-459, 2004.
29. Chang TS, Kim MJ, Ryoo K, Park J, Eom SJ, Shim J, Nakayama KI, Nakayama K, Tomita M, Takahashi K, Lee MJ, Choi EJ. p57KIP2 modulates stress-activated signaling by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein Kinase. *J Biol Chem.* **48**:48092-48098, 2003.
30. Dai Y, Grant S. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* **3**:362-370, 2003.
31. King RW, PK Jackson, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell.* **79**:563-571, 1994.
32. Pietsenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* **181-182**:475-481, 2002.

33. Boulikas T. Control of DNA replication by protein phosphorylation. *Anticancer Res.* **14**:2465-2472, 1994.
34. Yang J, Yu Y, Duerksen-Hughes PJ. Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress. *Mutat Res.* **543**:31–58, 2003.
35. Blagosklonny MV. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order. *Semin Cancer Biol.* **13**: 97–105, 2003
36. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: critical control points. *Cell.* **116**:205–219, 2004.
37. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* **8**:2013-2026, 1994.
38. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H, Lassmann H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem.* **7**:1023-1030, 1993.
39. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* **96**:245-254, 1999.
40. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell.* **76**:969–976, 1994.
41. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* **85**:817–827, 1996.
42. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**:5579–5588, 1995.
43. Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria—the death signal integrators. *Science.* **289**: 1150–1151, 2000.
44. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* **406**:855–862, 2000.
45. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y, Dataa P. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell.* **104**:769–780, 2001.
46. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* **305**:626-629, 2004.
47. Dubois-Dauphin M. Molecular control of apoptosis. *J Fr Ophthalmol.* **26**:293-298, 2003.

48. Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods*. **265**:97-110, 2002.
49. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol*. **14**:184-193,2004.
50. Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*. **117**:855-858, 2004.
51. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. **11**:615-647, 2003.
52. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci*. **5**:427-445, 1998.
53. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. **348**:334–336, 1990.
54. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:83–94, 2004.
55. Akhtara RS, Nessc JM, Rotha KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:189–203, 2004.
56. Droin NM, Green DR. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:179–188, 2004.
57. Bonnefoy-Berarda N, Aouacheriab A, Verscheldea C, Quemeneura L, Marcaisa A, Marvela J. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:159–168, 2004.
58. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:133–147, 2004.
59. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:125–132, 2004.
60. Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:169–177, 2004.
61. Kirkin V, Joos S, Zoörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:229–249, 2004.
62. Rapp UR, Rennefahrt U, Troppmair J. Bcl-2 proteins: master switches at the intersection of death signaling and the survival control by Raf kinases. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:149–158, 2004.
63. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:107–113, 2004.

64. Kim MR, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:205–210, 2004.
65. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim Biophys Acta*. **1644**:95–105, 2004.
66. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. **74**:609–619, 1993.
67. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. **104**:705–711, 2001.
68. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. **281**:1322-1326, 1998.
69. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. **22**:2922-2933, 2001.
70. Jiang X, Wang X. Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*. **73**:87-106, 2004.
71. Okuno S, Shimizu S, Ito T, Nomura M, Hamada E, Tsujimoto Y, Matsuda H. Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J Biol Chem*. **51**:34272-34277, 1998.
72. Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H. Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia*. **3**:380-382, 1997.
73. Smith KG, Light A, O'Reilly LA, Ang SM, Strasser A, Tarlinton D. Bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J Exp Med*. **3**:475-484, 2000.
74. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther*. **2**:S134-9, 2003.
75. Giver CR, Wong R, Moore DH, Pallavicini MG. Persistence of aneuploid immature/primitive hemopoietic sub-populations in mice 8 months after benzene exposure *in vivo*. *Mutat Res*. **491**:127-138, 2001.
76. Herzog RW, Arruda VR. Update on gene therapy for hereditary hematological disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. **1**:215-232, 2003.
77. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, Dubart-Kupperschmitt A, Fichelson S. *In vivo* expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med*. **9**:1423-1427, 2003.

78. Kivekas I, Tobin G, Thunberg U, Vilpo L, Sundstrom C, Rosenquist R, Vilpo J. *In vivo* drug and irradiation sensitivities in hypermutated and unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Res.* **27**:337-341, 2003.
79. Glass B, Uharek L, Zeis M, Loeffler H, Mueller-Ruchholtz W, Gassmann W. Graft- versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br J Haematol.* **93**:412-420, 1996.
80. He Q, Na X. The effects and mechanisms of a novel 2-aminosteroid on murine WEHI-3B leukemia cells in vitro and in vivo. *Leuk Res.* **25**:455-61, 2001.
81. Dong S, Hughes RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J.* **14**:267-274, 1997.
82. Chang CY, Kuo SC, Lin Y L, Wang JP, Huang LJ. Benzyloxybenzaldehyde analogues as novel adenyl cyclase activators. *Bioorg Med Chem Lett.* **11**:1971-1974, 2001.
83. Wang JP, Chang LC, Hsu MF, Huang LJ, Kuo SC. 2-Benzyloxybenzaldehyde inhibits formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of phospholipase D activation in rat neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* **1573**:26– 32, 2002.
84. Wang JP, Chang LC, Lin YL, Hsu MF, Chang CY, Huang LJ, Kuo SC. Investigation of the cellular mechanism of inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide anion generation in rat neutrophils by 2-benzyloxybenzaldehyde. *Biochem Pharmacol.* **65**:1043-1051, 2003.
85. Wang JP, Chang LC, Kuan YH, Tsao LT, Huang LJ, Kuo SC. 2-Benzyloxybenzaldehyde inhibits formyl peptide-stimulated increase in intracellular Ca²⁺ in neutrophils mainly by blocking Ca²⁺ entry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **370**:353-360, 2004.
86. Pan SL, Guh J H, Huang Y W, Chang Y L, Chang CY, Huang LJ, Kuo SC, Teng CM. Inhibition of Ras-mediated cell proliferation by benzyloxybenzaldehyde. *J Biomed Sci.* **9**:622-630, 2002.
87. Lin CF, Yang JS, Chang CY, Kuo SC, Lee MR, Huang LJ. Synthesis and anticancer activity of benzyloxybenzaldehyde derivatives against HL-60 cells. *Bioorg Med Chem.*, 2005 (in press)
88. Kim SH, Kang SN, Kim HJ, Kim TS. Potentiation of 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells into monocytes by costunolide, a germacranolide sesquiterpene lactone. *Biochem Pharmacol.* **64**:1233-1242, 2002.
89. Weissgarten J, Berman S, Modai D, Rosenberg R, Rapoport M, Cohen M, Averbukh Z. Zn metabolism affects apoptosis rate and proliferative responsiveness of PBMC from patients on chronic hemodialysis. *Metabolism.* **51**:1392-1396, 2002.

90. Zucker RM, Elstein KH, Easterling RE, Massaro EJ. Flow cytometric comparison of the effects of trialkyltins on the murine erythroleukemic cell. *Toxicology*. **58**:107-119, 1989.
91. Okuma Y, Kiguchi K, Koshitaka Y, Okamura A, Ishiwata I, Kondo H, Ishizuka B, Tadokoro M. Correlation between expression of oncogene products and resistance to anticancer drugs in cultured ovarian cancer cell lines. *Hum Cell*. **16**:131-139, 2003.
92. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. **139**:271-279, 1991.
93. Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R, Buhtz P, Giers A, Rohrbeck A, Freigang B, Roessner A. Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol*. **164**:1233-1241, 2004.
94. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**:8485-8489, 1991.
95. Kalbacova M, Vrbacky M, Drahota Z, Melkova Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry*. **52**:110-116, 2003.
96. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. **87**:171, 1996.
97. Chan HC, Kuo SC, Liu SC, Liu CH, Hsu SL. 4-Fluoro-N-butyl-phenylacetamide: a synthetic phenylacetate derivative that upregulates Bcl-X(S), activates caspase cascade and induces apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells. *Cancer Lett*. **186**:211-221, 2002.
98. Hirai K, Sugawara T, Chan PH, Basus VJ, James TL, Litt L. Cytochrome *c* associated apoptosis during ATP recovery after hypoxia in neonatal rat cerebrocortical slices. *J Neurochem*. **83**:309-319, 2002.
99. Chomczynski P, Mackey K. Modification of the Tri Reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*. **19**:924-945, 1995.
100. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159, 1987.
101. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem*. **21**:1D-432D, 1975.
102. Chochi K, Ichikura T, Majima T, Kawabata T, Matsumoto A, Sugasawa H, Kawarabayashi N, Takayama E, Hiraide H, Seki S, Mochizuki H. The increase of CD57⁺ T cells in the peripheral

- blood and their impaired immune functions in patients with advanced gastric cancer. *Oncol Rep.* **10**:1443-1448, 2003.
103. Jäättelä M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol.* **4**:416-23, 2003.
104. Gimonet D, Landais E, Bobichon H, Coninx P, Liautaud-Roger F. Induction of apoptosis by bleomycin in p53-null HL-60 leukemia cells. *Int J Oncol.* **24**:313-9, 2004.
105. Hendrikse AS, Hunter AJ, Keraan M, Blekkenhorst GH. Effects of low dose irradiation on TK6 and U937 cells: induction of p53 and its role in cell-cycle delay and the adaptive response. *Int J Radiat Biol.* **76**:11-21, 2000.
106. Mahdi T, Alcalay D, Cognard C, Tanzer J, Kitzis A. Rescue of K562 cells from MDM2-modulated p53-dependent apoptosis by growth factor-induced differentiation. *Biol Cell.* **90**:615-27, 1998.
107. Chen RJ, Lee WS, Liang YC, Lin JK, Wang YJ, Lin CH, Hsieh JY, Chaing CC, Ho YS. Ketoconazole induces G0/G1 arrest in human colorectal and hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* **169**:132-41, 2000.
108. Zhu WG, Hileman T, Ke Y, Wang P, Lu S, Duan W, Dai Z, Tong T, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem.* **279**:15161-6, 2004.
109. Usuda J, Inomata M, Fukumoto H, Iwamoto Y, Suzuki T, Kuh HJ, Fukuoka K, Kato H, Saijo N, Nishio K. Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. *Int J Oncol.* **22**:81-6, 2003.
110. Shiohara M, Akashi M, Gombart AF, Yang R, Koeffler HP. Tumor necrosis factor alpha: posttranscriptional stabilization of WAF1 mRNA in p53-deficient human leukemic cells. *J Cell Physiol.* **166**:568-76, 1996.