

中國醫藥大學藥學院

藥物化學研究所博士論文

指導教授：郭盛助 教授

共同指導教授：黃麗嬌 教授

鍾景光 教授

一、CHM-1 藉由 p38 介導上調死亡接受器 5 之表現而誘發人類卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡

二、大芑雪蓮抑制人類荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞之表皮生長因子受體訊息路徑

I. CHM-1 induces apoptosis via p38-mediated up-regulation of DR5 expression in human ovarian cancer SKOV3 cells

II. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by *Saussurea involucrata* in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells

研究生：李正常

Jang-Chang Lee

中華民國 100 年 7 月

目 錄

封面

空白頁

書名頁

學位考試委員審定書

本校論文電子檔案上網授權書

謝辭

Part I 目錄	I
Part I 縮寫目錄	IV
Part I 圖表目錄	V
Part II 目錄	VII
Part II 縮寫目錄	IX
Part II 圖表目錄	X
Part I CHM-1 induces apoptosis via p38-mediated up-regulation of DR5 expression in human ovarian cancer SKOV3 cells		1
Part I 中文摘要	2
Part I 英文摘要	4
第一章 緒論	6
第一節 癌症之概述	6
一、癌症	6

二、歷年國人癌症發生及死亡增減情形	6
三、惡性腫瘤細胞之特性	10
四、卵巢癌及其治療	11
(一) 卵巢癌	11
(二) 卵巢癌之治療	12
(三) 卵巢癌細胞株	14
第二節 細胞凋亡 (Apoptosis)	15
一、細胞壞死及細胞凋亡型態之差異	15
二、細胞凋亡	15
三、死亡受體家族	16
四、細胞凋亡訊息傳導途徑：外在途徑與內在途徑	18
五、Bcl-2 家族	21
第三節 有絲分裂原活化蛋白激酶	22
第四節 2-芳香基-4-喹啉酮類衍生物	24
一、2-芳香基-6,7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物之概述	25
二、CHM-1 之抗癌活性	27
第二章 研究動機	32
第三章 結果與討論	35
第一節、藥理活性及作用機轉之探討	35
一、CHM-1 強效抑制多種人類腫瘤細胞株增殖	35
二、CHM-1 誘發 caspase-8 依賴性之細胞凋亡	38
三、CHM-1 上調死亡接受器 5 及 TRAIL 之表現	38
四、CHM-1 誘發之細胞凋亡與活化 p38 訊息相關聯	40
第二節、CHM-1 於活體內之抗腫瘤活性評估	43
一、CHM-1 在 BALB/c nude mice 皮下移植腫瘤模式的抗腫瘤活性	44
二、親水性 CHM-1-P 在 BALB/c nude mice 皮下移植腫瘤模式的抗腫瘤活性	46
三、CHM-1 抑制原位移植 SKOV3 ip1/luc nude mice 腫瘤生長並延長存活期	48
四、靜脈注射 CHM-1-P 明顯延長原位移植 SKOV3 ICR-Foxn1 nude mice 之存活期	50

第四章 結論	51
第五章 實驗部分	53
第一節 標的化合物之來源及合成方法	53
一、化合物來源	53
二、2-芳香基-6,7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物之合成方法	53
三、CHM-1-P 之合成方法	54
第二節、藥理實驗材料	55
一、細胞來源	55
二、藥品試劑	55
三、儀器設備	57
第三節、藥理實驗方法	59
一、細胞培養 (Cell culture)	59
二、細胞存活率分析 (MTT assay)	59
三、流式細胞儀分析 (FACScan flow cytometric analysis)	60
四、西方墨點法 (Western blotting)	61
五、體內抗腫瘤活性評估 (<i>In vivo</i> studies)	61
六、統計分析	63
參考文獻	64

Part I 縮寫目錄

Apaf-1: apoptosis protease-activating factor-1

Bcl-2: B cell lymphoma protein 2

BSA: bovine serum albumin

CHM-1: 2-(2-fluorophenyl)-6, 7-methylene dioxyquinolin-4-one

DISCs: death-inducing signaling complexes

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DR5: death receptor 5

ERK: extracellular regulated kinase

FADD: Fas associating protein with death domain

FBS:fetal bovine serum

IC₅₀: 50 % inhibition concentration

IVIS: *in vivo* imaging system

JNK: C-Jun N-terminal Kinase

MAPK: mitogen activated protein kinase

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheny tetrazolium bromide

NCI: National Cancer Institute (USA)

PARP: poly(ADP)ribose polymerase

PBS: Phosphate buffer saline

2-PQs: 2-phenylquinolin-4-ones

SAR: structure-activity relationships

SDS: Sodium dodecyl sulphate

TNF: tumor necrosis factor

TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Part I 圖表目錄

Figure 1	Schematic representation of two main steps that contribute to a spectrum of mutations leading to cancer development	6
Figure 2	歷年 0 歲平均餘命及死亡率	7
Figure 3	98 年及 99 年國人主要死因死亡人數	8
Figure 4	99 年國人男女性十大死因比較	8
Figure 5	98 年及 99 年國人主要癌症死亡人數占率	9
Figure 6	歷年惡性腫瘤死亡率與死亡人數趨勢	10
Figure 7	Acquired capabilities of cancer	11
Figure 8	Morphological features of cell death	15
Figure 9	Schematic representations of death receptor and death receptor signaling.	17
Figure 10	Death Receptor Signaling	20
Figure 11	Apoptosis	21
Figure 12	Generic MAP kinase pathways	22
Figure 13	Cross-talk between p38 MAPKs and other signaling pathways	24
Figure 14	Structure of anti-mitotic agents	25
Figure 15	The structure of 2-(substituted phenyl)-6, 7-methylenedioxy-quinolin-4-one analogues	35
Figure 16	The growth-inhibitory activity of 6, 7-methylenedioxy 2-PQs on SKOV3 cells	36
Figure 17	Effects of CHM-1 on the levels of apoptosis-associated proteins in SKOV3 cells	39
Figure 18	Expressions of MAPKs in the CHM-1-treated SKOV3 cells.	41
Figure 19	Flow cytometry analysis of the sub-G1 population of CHM-1-treated SKOV3 cells	42

Figure 20	Effects of CHM-1 on SKOV3 tumor growth in BALB/c nude mice subcutaneous xenograft mode	45
Figure 21	Effects of hydrophilic CHM-1-P on SKOV3 tumor growth in BALB/c nude mice subcutaneous xenograft model	47
Figure 22	CHM-1 inhibits SKOV3 ip1/luc tumor orthotopic xenograft growth in athymic nude mice	49
Figure 23	CHM-1-P prolonged the survival time of SKOV3/ICR-Foxn1/nu orthotopic xenograft model	50
Table1	Effects of CHM-1 on cell viability in various cell lines	37
Scheme 1	The synthesis of 2-(substituted phenyl) 6, 7-methylenedioxy-4-quinolones [I]	54
Scheme 2	The synthesis of 2-(substituted phenyl) 6, 7-methylenedioxy-4-quinolones [II]	54
Scheme 3	The synthesis of 2-(2-fluorophenyl)-6, 7-methylenedioxy-quinolin-4-yl dihydrogen phosphate (CHM-1-P)	54

Part II 目 錄

Part II Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by <i>Saussurea involucrata</i> in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells	80
Part II 中文摘要	81
Part II 英文摘要	83
第一章 緒論	85
第一節 雪蓮之簡介	85
一、植物形態	86
二、入藥品種	88
三、大苞雪蓮之化學成分	88
四、雪蓮之藥理作用	89
(一) 抗炎、鎮痛作用	90
(二) 清除自由基、抗氧化力、抗疲勞和提高機體免疫作用	90
(三) 抗癌作用	91
(四) 對心血管系統的影響	92
(五) 終止妊娠作用	92
(六) 解痙、降壓和平喘作用	92
(七) 其他作用	92
第二節 表皮生長因子受體	93
第三節 細胞週期調控機制	98
一、細胞週期 (Cell cycle)	98
二、檢查點 (Check point)	100
三、細胞週期調控因子	100
(一) 蛋白質激酶	100
(二) 細胞週期蛋白依賴性激酶抑制劑 (CDKIs)	103
第四節 前列腺癌	106

第二章 研究動機	109
第三章 結果與討論	112
一、雪蓮強效抑制具荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞增殖	112
二、雪蓮乙酸乙酯抽出物所含之生物活性成分	114
三、SI-2 改變 PC-3 細胞之細胞週期並誘發細胞凋亡	115
四、SI-2 誘發 p21WAF1/CIP 及 p27KIP1 導致 G1 期停滯	116
五、SI-2 影響細胞週期調控蛋白之表現	117
六、SI-2 向下調節 Bcl-2 並活化 caspase-3 及 caspase-9	119
七、SI-2 抑制 PC-3 細胞之 EGFR, AKT, 及 STAT3 磷酸化	122
八、過度表現 AKT 及 STAT3 導致 PC-3 細胞對 SI-2 產生抗性	122
九、SI-2 活化 PC-3 細胞之 p38 MAPK	123
十、SI-2 在體內之抗腫瘤活性	125
第四章 結論	127
第五章 實驗部分	129
一、實驗材料	129
二、雪蓮抽出物之製備方法	130
三、利用 Reverse-phase HPLC 分析雪蓮之黃酮類成分	131
四、細胞培養 (Cell lines and culture conditions)	131
五、細胞增殖分析 (cell proliferation assays)	131
六、細胞週期同步化 (cell cycle synchronization)	132
七、細胞週期分析 (cell cycle analysis)	132
八、西方墨點法 (Western blot analysis)	133
九、細胞色素 <i>c</i> 之測定 (Cytochrome <i>c</i> release)	133
十、體內抗腫瘤活性評估 (<i>In vivo</i> study)	133
十一、Short hairpin RNA	134
十二、轉移感染 (Transfection)	135
十三、統計分析 (Statistical analysis)	135
參考文獻	136

Part II 縮寫目錄

CAM: Complementary and Alternative Medicine therapies

CDK: cyclin-dependent kinase

CDKI: cyclin-dependent kinase inhibitor

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

FBS: fetal bovine serum

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

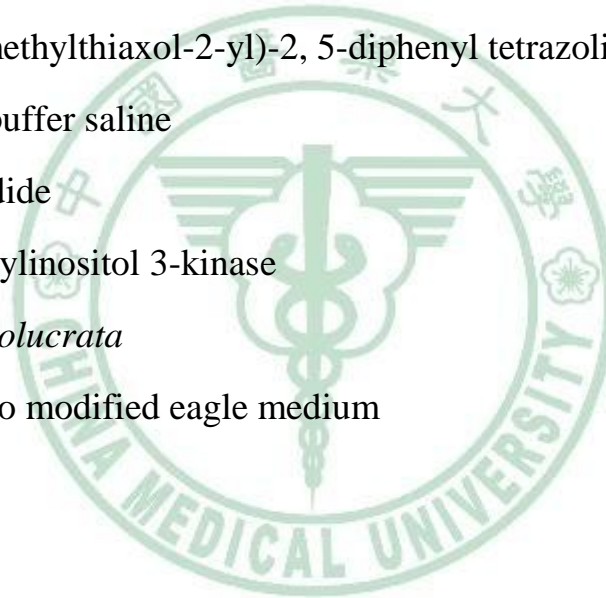
PBS: phosphate buffer saline

PI: propidium-iodide

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

SI: *Saussurea involucrata*

DMEM: Dulbecco modified eagle medium



Part II 圖表目錄

Figure 1	大苞雪蓮 (<i>Saussurea involucrata</i> Kar. et Kir.)	85
Figure 2	Photos of <i>Saussurea involucrata</i> (SI), <i>Saussurea laniceps</i> (SL), <i>Saussurea medusa</i> (SM) plants and their medicinal materials.	87
Figure 3	EGFR biology.	94
Figure 4	Schematic illustration of the EGFR pathway highlighting potential downstream cellular and tissue effects of EGFR signaling inhibition.	95
Figure 5	Cytoplasmic and nuclear EGFR signalling pathway.	96
Figure 6	Targeting the PI3K pathway in cancer.	97
Figure 7	The phases of mitosis.	99
Figure 8	The cell cycle and its regulation by cyclins, CDKs, and CDKIs.	101
Figure 9	Retinoblastoma gene products (Rb) and the G1-S transition..	103
Figure 10	CDKs regulation and opportunities for therapeutic intervention.	105
Figure 11	Ten leading cancer types for estimated new cancer cases and deaths, by sex, United States, 2009.	107
Figure 12	Genesis of human prostate cancer is a multistep process.	108
Figure 13	A study models showing an interaction of mitogenic cell signaling with cell cycle regulators for cell growth.	109
Figure 14	Induction of apoptosis by dietary chemopreventive agents.	111
Figure 15	Proliferation-inhibitory effect of <i>S. involucrata</i> on various human cancer cell lines.	114
Figure 16	Profile of constituents in SI-2.	115
Figure 17	Effect of <i>S. involucrata</i> on cell cycle progression in human		

	prostate cancer PC-3 cells.	116
Figure 18	<i>S. involucrata</i> alters cell-cycle regulatory proteins in PC-3 cells.	118
Figure 19	Effect of <i>S. involucrata</i> on apoptosis related proteins in PC3 cells.	121
Figure 20	20 Effect of <i>S. involucrata</i> on the constitutive autophosphorylation of EGFR PC3	122
Figure 21	Effect of <i>S. involucrata</i> on the EGFR signaling	124
Figure 22	Effect of <i>S. involucrata</i> on anti-tumor activity	126
Figure 23	大苞雪蓮 (<i>Saussurea involucrata</i>) 物種證明	130
Table 1	大苞雪蓮之化學成分	88
Table 2	Mammalian cyclin-dependent kinase (CDK) complexes	102
Table 3	Cell cycle regulatory elements involved in human neoplasia	104



Part I

CHM-1藉由p38介導上調死亡接受器5之表現而誘

發人類卵巢癌SKOV3細胞凋亡

**CHM-1 induces apoptosis via p38-mediated
up-regulation of DR5 expression in human ovarian
cancer SKOV3 cells**

中文摘要

卵巢癌是全世界婦女常見癌症，佔所有女性癌症 4%，估計全球每年約有 204,000 新病例，125,000 名婦女死於卵巢癌。卵巢癌有著極高之發病率和死亡率，目前臨床有效治療卵巢癌並遏止卵巢癌復發之藥物依然有限，因此，開發安全有效治療卵巢癌之藥物實為當前迫切需要之課題。本研究主要探討新穎的 2-芳香基-6,7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物對卵巢癌 SKOV3 細胞之抗癌活性及其抑癌機轉，藉以評估此類化合物能否發展成為安全有效治療卵巢癌之藥物。

利用細胞存活率分析評估 2-芳香基-6,7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物抑制人類卵巢癌 SKOV3 細胞的生長作用；以細胞週期分析、免疫墨點測定法和流式細胞計數法探討誘發卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡之分子機制；利用皮下及原位移植腫瘤模式評估在活體之抗腫瘤活性。

細胞存活率分析研究發現，在 10 個受測試 2-芳香基-6,7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物當中，2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one (CHM-1)能以濃度依賴性抑制卵巢癌 SKOV3 細胞生長並誘發細胞凋亡，但對人類正常二倍體皮膚纖維原 Detroit-551 細胞之毒性相對較低。西方墨點實驗顯示，CHM-1 能誘發死亡受體 5 (Death receptor 5) 和腫瘤壞死因子相關誘導凋亡配體 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)，同時 CHM-1 所誘導之細胞凋亡和 p38

介導上調 DR5 有密切關聯。在裸鼠皮下移植 SKOV3 腫瘤模式，CHM-1 及其親水性磷酸鹽 (CHM-1-P) 皆明顯的以依賴劑量和時間之方式抑制卵巢癌腫瘤生長。經腹腔注射 CHM-1 治療原位移植卵巢癌 SKOV3 ip1/luc 細胞之裸鼠，CHM-1 除能抑制腫瘤生長外，15 或 30 mg/kg (i.p×11) 劑量之 CHM-1 分別延長卵巢癌裸鼠存活期達 137% 及 161%。除此，以靜脈注射 CHM-1-P (10 or 20 mg/kg, i.v×10) 治療原位移植 SKOV3 腫瘤細胞之 ICR-Foxn1nu，相較於控制組，實驗組之存活期亦分別延長 142% 及 150%。

由上述結果顯示 CHM-1 及其親水性磷酸鹽(CHM-1-P)具有新穎的抑癌機制及強效的抗腫瘤活性，值得進一步臨床試驗評估，以發展成為治療人類卵巢癌之藥物。

關鍵詞：CHM-1；卵巢癌；死亡受體 5；p38；細胞凋亡。

ABSTRACT

Ovarian cancer is the sixth most commonly diagnosed cancer among women in the world, accounting for nearly 4% of all female cancers. On a worldwide basis, an estimated 204,000 new cases are diagnosed and 125,000 women die of ovarian cancer annually. Although most ovarian carcinomas initially respond to first-line therapy, recurrence with drug-resistant disease is the majority of patients eventually succumb to their diseases, and the overall 5-year relative survival rate is 45%. Treatment for advanced-stage and recurrent disease remains limited, consequently, an effective drug for ovarian cancer is urgently needed today. As part of our continuing investigation of 2-phenylquinolin-4-ones derivatives as potential anticancer drug candidates, a series of 2-(substituted phenyl)-6, 7-methylenedioxyquinolin-4-one derivatives was evaluated for developing new anti-ovarian cancer drugs.

MTT assay indicated that, 2-(2-fluorophenyl)-6, 7-methylenedioxyquinolin-4-one (CHM-1), was the most active compound. CHM-1 inhibited the growth of SKOV3 cells and induced apoptosis in a concentration-dependent manner, but it was less cytotoxic to human diploid skin fibroblast Detroit-551 cells. The Western blot experiments showed that CHM-1 caused the upregulation of death receptor (DR) 5 and tumor necrosis factor-related

apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Interestingly, CHM-1-mediated cellular apoptosis was found to be closely involved with the p38-mediated upregulation of DR5 expression. In SKOV3 subcutaneous xenograft model, both CHM-1 and its hydrophilic phosphate (CHM-1-P) caused significant dose- and time-dependent tumor regression. Furthermore, CHM-1 inhibited tumor growth and prolonged the lifespan in the SKOV3 ip1/luc orthotopic xenograft model. The average lifespan was prolonged by 137% and 161% in animals treated with 15 mg/kg or 30 mg/kg (i.p×11) of CHM-1, respectively. Intravenous (i.v) administration of CHM-1-P also significantly prolonged the survival time in the SKOV3/ICR-Foxn1nu orthotopic xenograft model. The average lifespan was prolonged by 142% and 150% in mice administered with 10 mg/kg CHM-1-P (i.v×10) and 20 mg/kg CHM-1-P (i.v×10), respectively.

Based on the excellent antitumor activity with interesting mechanism of action, CHM-1 was considered as a new anti-ovarian cancer drug candidate.

KEY WORDS: *apoptosis; CHM-1; death receptor 5; ovarian cancer; p38.*

第一章 緒論

第一節 癌症之概述

一、癌症

癌症即是惡性腫瘤。它是由控制細胞生長增殖機制的失常而引起（見圖 1）。癌細胞除了生長失控外，還會局部侵襲(invasion)週遭正常組織甚至經由體內循環系統或淋巴系統轉移(metastasis)到身體其它部份，這些癌症具有的特性為造成癌症患者損傷或死亡的主要因素^[1,2]。

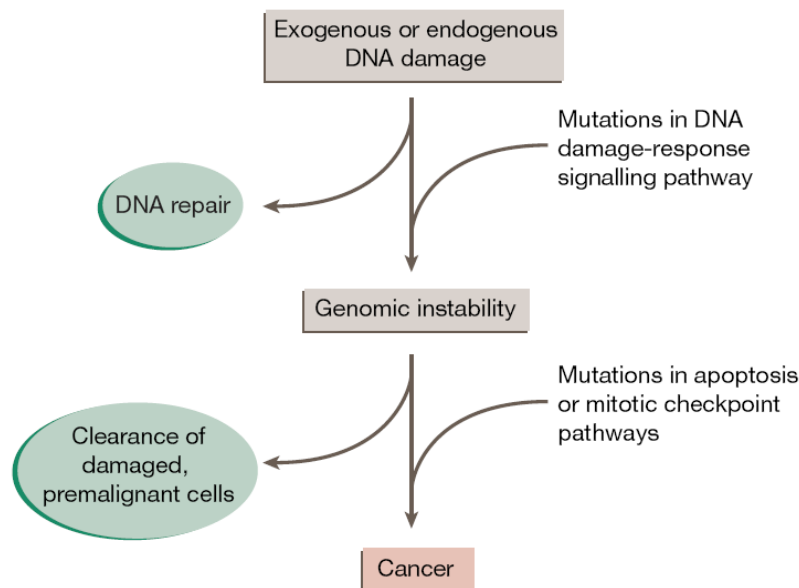


Figure 1 Schematic representation of two main steps that contribute to a spectrum of mutations leading to cancer development ^[2].

二、歷年國人癌症發生及死亡增減情形

隨著高齡化與生活型態的改變，致使國人癌症發生人數不斷上升，根據行政院衛生署公佈「99 年國人十大死因」統計^[3, 4]，99 年國人死亡人

數共 144,709 人，依 2000 年世界人口結構調整計算之標準化死亡率為每十萬人口 455.6 人，較上年減少 2.4%。根據內政部初步估計，99 年國人零歲平均餘命，男性為 76.2 歲，女性為 82.7 歲，男性與女性分別較上年增加 0.1 歲與 0.3 歲(見圖 2)。

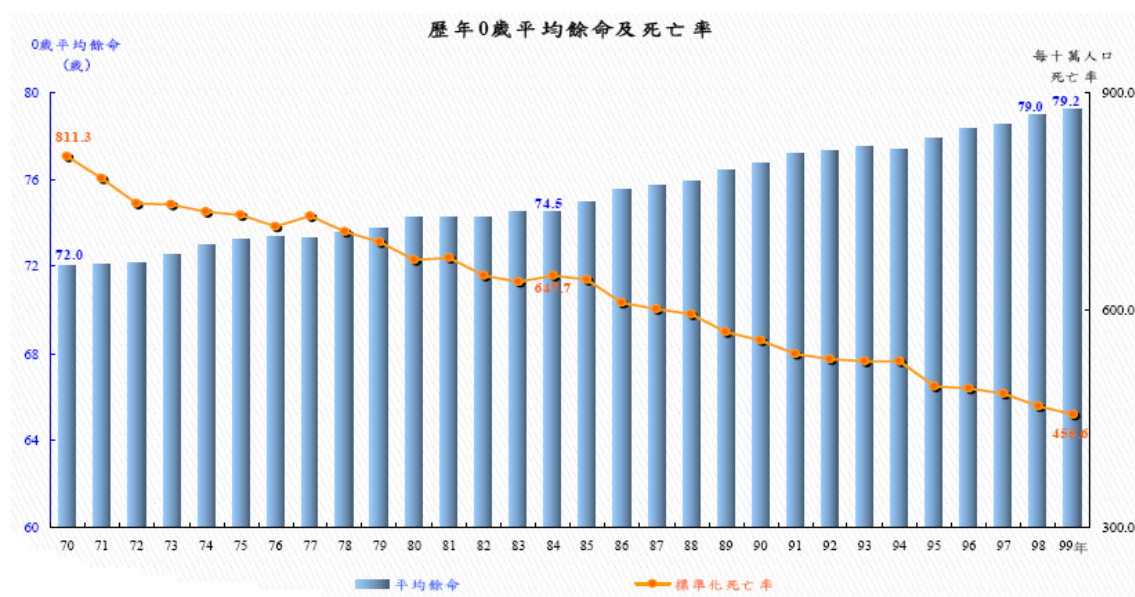


Figure 2 歷年 0 歲平均餘命及死亡率^[3]

99 年國人 10 大死因(見圖 3, 4) 依序為惡性腫瘤(28.4%)、心臟疾病(10.8%)、腦血管疾病(7.0%)、肺炎(6.2%)、糖尿病(5.7%)、事故傷害(4.6%)、慢性下呼吸道疾病(3.6%)、慢性肝病及肝硬化(3.4%)、高血壓性疾病(2.9%)及腎炎、腎症候群、腎性病變(2.8%)。其中癌症連續 29 年蟬聯十大死因榜首，死亡人數 4 萬 1046 人，創下歷年新高，平均每 12 分 48 秒就有 1 人罹癌死亡；其他包括惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病、肺炎、糖尿病、事故傷害等，10 大死因中有 6 項都與肥胖有關。

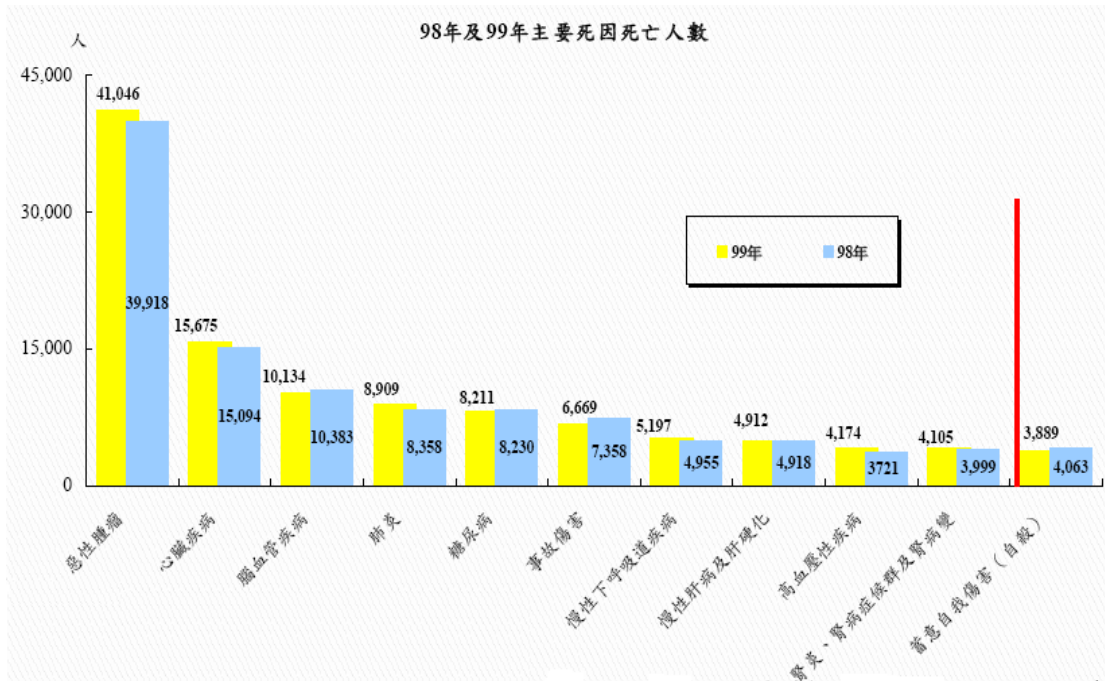


Figure 3 98年及99年國人主要死因死亡人數^[3]

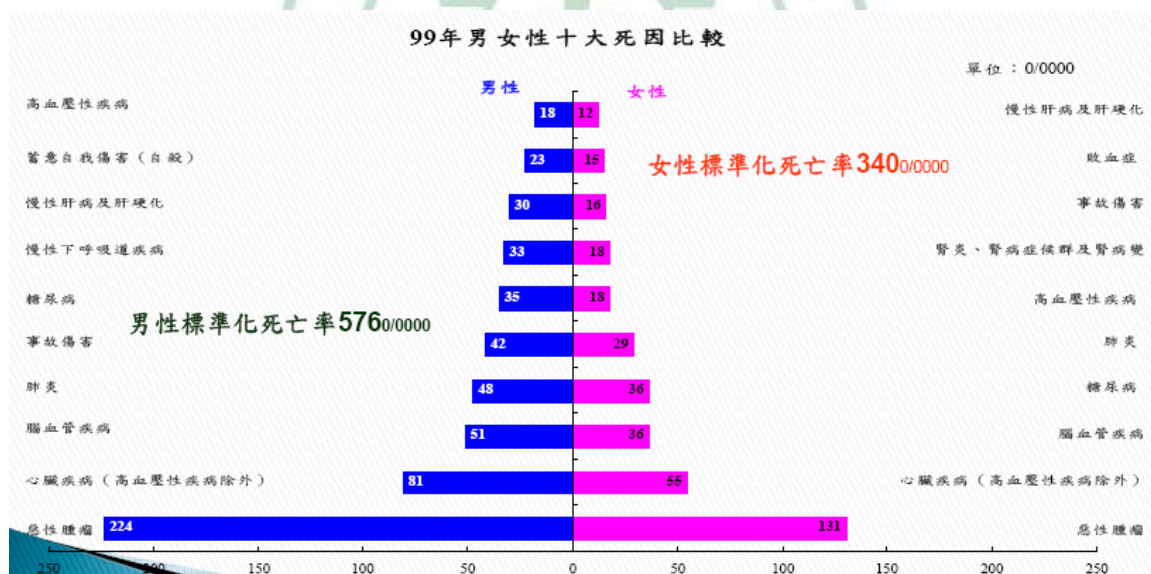


Figure 4 99年國人男女性十大死因比較^[3]

如依各癌症死亡率排序(見圖 5)，99年十大主要癌症順位與死亡人數占率分別為：(1)氣管、支氣管和肺癌 20.0%、(2)肝和肝內膽管癌 18.9%、(3)結腸、直腸和肛門癌 11.4%、(4)女性乳房癌 4.2%、(5)口腔癌 5.8%、

(6)胃癌 5.5%、(7) 前列腺(攝護腺)癌 2.5%、(8)食道癌 3.8%、(9)胰臟癌 3.6%、(10)子宮頸及部位未明示子宮癌 1.7%。



Figure 5 98 年及 99 年國人主要癌症死亡人數占率^[3]

由衛生署死因統計顯示^[5]，癌症自 1982 年起即居國人十大死因首位。依 2000 年世界標準人口年齡結構計算，國人癌症標準化死亡率由 1982 年每 10 萬人口 118 人逐年上升，至 1997 年達最高點 144.3 人，爾後十年間，均維持在 138~144 人，2009 年為 132.5 人；同時期癌症標準化發生率亦由 1982 年每 10 萬人口 111 人逐年上升至 2007 年 270.1 人。另依 1998~2007 年癌症標準化發生率 10 年增減分析，男、女性所有癌症標準化發生率增加分別為每 10 萬人口 43.8 人與 19 人，其中男性增加最多的癌症為口腔癌(每 10 萬人口增加 13.1 人)、食道癌(每 10 萬人口增加 9.3 人)；下降之癌症為胃癌、鼻咽癌與膀胱癌；女性增加最多的癌症則為乳癌(每

10 萬人口增加 18.8 人)；下降人數最多的癌症為子宮頸癌，每 10 萬人口下降 15.3 人。另比較 1998~2007 年癌症標準化死亡率 10 年增減情形，男性所有癌症標準化死亡率每 10 萬人口增加 10.2 人，女性則減少 2.7 人，其中男性癌症死因增加最多為口腔癌(每 10 萬人口增加 5.7 人)；下降之癌症為胃癌；女性增加最多的癌症則為乳癌(每 10 萬人口增加 1.6 人)；下降人數最多的癌症為子宮頸癌，每 10 萬人口下降 4.2 人。

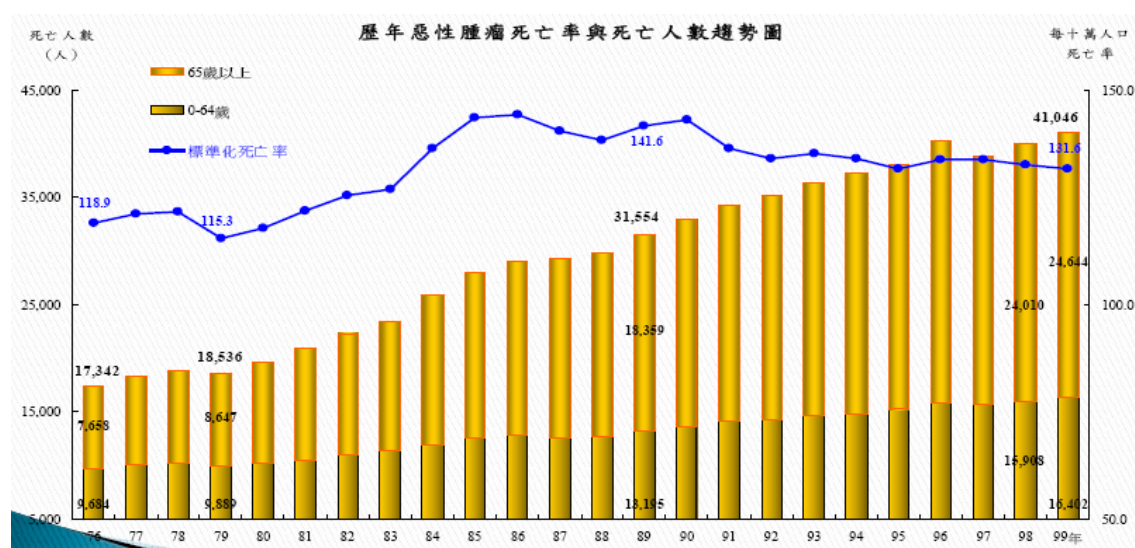


Figure 6 歷年惡性腫瘤死亡率與死亡人數趨勢圖^[3]

三、惡性腫瘤細胞之特性 (見圖 7)^[2,6]：

- 不受細胞凋亡機制的影響
- 由於存在大量端粒酶(telomerase)因此可不受限制的生長
- 自給自足的生長因子(growth factors)
- 對於限制生長因子不敏感
- 細胞分裂速率加快

- 重新獲得分化能力
- 不受細胞間接觸抑制(contact inhibition)所影響
- 具有侵入周邊組織的能力
- 進行遠端轉移到其他部位
- 能促使血管新生(angiogenesis)

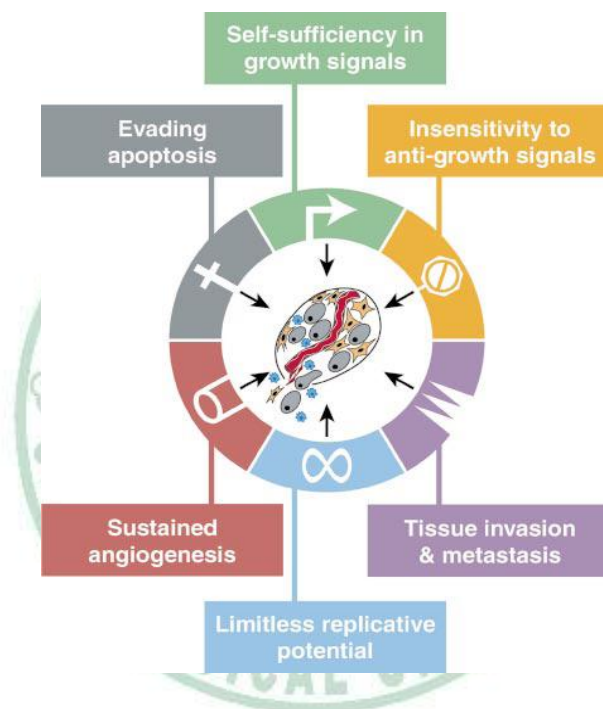


Figure 7 Acquired capabilities of cancer [6].

四、卵巢癌及其治療

(一) 卵巢癌(Ovarian cancer)

根據 WHO 統計報告，卵巢癌是全世界婦女最常見癌症的第六位，佔所有女性癌症的 4%，同時也是婦女因罹癌死亡的第七位^[7,8]。

卵巢癌僅次於子宮體癌，是第二大婦科癌症，每年造成的死亡人數比

其他女性生殖系統癌症更多，在美國婦科癌症死亡病例中，有 55% 主要致死原因為女性生殖系統之異常新生腫瘤^[9]，2009 年估計約有 21,550 卵巢癌新病例，14,600 名婦女死於和卵巢癌有關之疾病，每 70 名美國婦女至少有一名終其一生將會罹患卵巢癌。而在全球，估計每年約有 204,000 新病例，125,000 名婦女死於卵巢癌^[10]。

依形態學評判標準，卵巢癌可區分為四個主要類型：漿液性，粘液，子宮內膜樣的，及透明細胞 (serous, mucinous, endometrioid, and clear cell)，預後不良(high stages III and IV)卵巢癌大部分為漿液性及子宮內膜樣腫瘤，此二類型占所有卵巢癌病例 70~75% ^[11]。研究顯示，晚期(high-stage III, IV) 卵巢癌腫瘤與早期(low-stage I, II) 卵巢癌腫瘤之基因表現有非常大的差異，腫瘤基因表現之差異反映出卵巢癌特殊之生物學模式。卵巢癌病患之死亡率偏高，主要是因為早期的卵巢癌通常無症狀，將近 75%的臨床診斷病例在被發現時都已是癌細胞擴散的晚期(FIGO stages III and IV)。臨床治療以侵入性手術切除腫瘤為主，再輔以化學療法，雖然卵巢癌是一對化療藥物敏感 (chemosensitive) 之疾病，許多化療藥物已被證實具有客觀之臨床療效，但其預後並不理想，大部分卵巢癌病患將會再復發同時產生抗藥性，整體手術後卵巢癌病患之 5 年相對存活率僅有 45% ^[10]。

(二) 卵巢癌之治療

人類卵巢癌是一種非常複雜的疾病，除了腫瘤細胞本身，也會使宿主細胞經歷多重的分子轉化而連續蓄積，這些異常導致卵巢癌細胞之基因表現紊亂。由於卵巢癌細胞有著複雜的基因表現，加上結合宿主細胞的異質性，與其他腫瘤細胞有很大的分子間歧異，對於化學療法及放射線療法具有很強的抗性，臨床表現也十分獨特。臨床標準第一線療法包含手術切除腫瘤，再施予全身性的化療養生法，包括 platinum-based 藥物(carboplatin or cisplatin)和紫杉類(paclitaxel or docitaxel)。併用化學療法(paclitaxel plus carboplatin)對晚期卵巢癌病患臨床完全減輕率(clinical complete remission rate)可達 75%，不幸的是大部分卵巢癌病患將會再復發並產生抗藥性，對 paclitaxel 產生抗藥性是導致化學療法失敗的主要原因之一^[12]。研究顯示，復發之卵巢癌病患平均存活期大約只有兩年^[11]。

為改善預後，臨床試驗正評估不同之治療策略，包括：維持治療(maintenance therapy)、新式合併療法(new combinations)、腹腔內給藥(intraperitoneal drug administration)、新穎細胞毒素(novel cytotoxics)、合併化療養生法治療復發性疾病(combination chemotherapy regimens for recurrent disease)，以及分子標靶療法(molecular-targeted therapies)。初步臨床評估結果：治療復發性卵巢癌，合併化療養生法之效果優於單一藥用藥；分子標靶療法應用於治療早期患者已顯示正

面客觀之療效；維持治療尚未被證明能延長卵巢癌病患之存活期；腹腔內給藥治療已有改善患者存活期之效果，但對小體積第三期疾病 (small-volume stage III disease) 患者仍有相當大的毒性^[10]。

卵巢癌有著極高之發病率和死亡率，此一致命疾病的病因至今不僅尚未完全明瞭，臨床有效治療卵巢癌並遏止卵巢癌復發之藥物更是有限。因此，研究找出卵巢癌之病因，並開發有效、安全之藥物用以治療卵巢癌，實有迫切之需要。

(三) 卵巢癌細胞株

本研究所使用之人類卵巢癌細胞株為 SKOV3 細胞及其亞系 (subline) SKOV3 ip1 細胞。

SKOV3：人類卵巢癌 SKOV3 細胞是一株具有雌激素接受器 (estrogen receptor)，但對雌激素不敏感^[13]、mitotic checkpoint 表現低弱^[14]、不存在 p53 抑癌基因^[15]、細胞週期 G2/M 期促進染色體分裂的相關蛋白質過度表現^[16]、HER2/neu 過度表現^[17] 和染色體套數不正常的細胞株，對於化學療法及放射線療法具有很強的抗性。

SKOV3 ip1：為人類上皮 (epithelial) 卵巢腺癌細胞株，基因表現與其母細胞株 SKOV3 有某些程度的差異，但有更強的侵襲性和轉移能力^[18]。

第二節 細胞凋亡

一、細胞壞死及細胞凋亡型態之差異

細胞壞死(necrosis)及細胞凋亡(apoptosis)是細胞死亡的主要兩種型式(見圖8)：細胞壞死為細胞受到嚴重傷害，如高熱、Ph值極端改變或細胞內外滲透壓差異太大時，致使細胞發炎破裂，同時造成周圍細胞一併被波及而壞死的現象；細胞凋亡則是經由分裂成DNA片段、細胞膜皺縮、染色質變濃，然後形成凋亡小體(apoptotic bodies)，最後被單核白血球(monocyte)或巨噬細胞(macrophage)吞噬^[19, 20]。

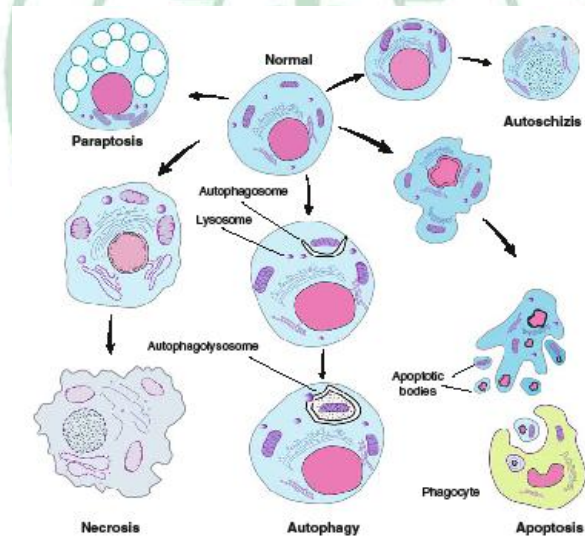


Figure 8 Morphological features of cell death^[20].

二、細胞凋亡

細胞凋亡又稱為計畫性或程序性細胞死亡(programmed cell death)，在真核細胞生物體早期之發育、成年期之細胞數控制(homeostasis)都扮演著

重要的角色^[20, 21]。細胞可藉由凋亡程序排除因疾病(disease)、老化(aging)、感染(infection)、基因突變(genetic mutation)或暴露於有毒製劑(toxic agents)而受損導致無法修復的細胞，藉以保護全部組織^[22,23]。細胞凋亡和腫瘤之發展也有密切之關係，當細胞凋亡訊息有缺陷而不能正常進行細胞凋亡程序時，除會引起不正常的細胞增生導致腫瘤發生(tumorigenesis)，亦會致使腫瘤細胞對化學療法藥物產生抗藥性。

細胞凋亡之機轉非常複雜，包含一系列有能量需求的分子機制。觸發細胞凋亡的因子包括紫外線或伽瑪輻射(UV- or γ -irradiation)、化學療法藥物(chemotherapeutic drugs)或死亡受體(death receptors)之訊息傳導。

三、死亡受體 (Death receptor) 家族

死亡受體家族是腫瘤壞死因子受體家族(tumor necrosis factor receptor super-family)之成員，特定的細胞都有其獨特的感受器(sensors)位於細胞表面，目前經確認的死亡受體家族成員共有8個^[24, 25]，主要是以其位在細胞質死亡區域(death domain)之~80殘基(residues)做為區分(見圖 9A)。

死亡受體能察覺細胞外的細胞凋亡訊息並做出回應，迅速啟動內在(intrinsic)的凋亡機制(見圖 9B)。當這些受體被相對應的配體(ligand)觸發時，許多特殊分子會新添(recruited)至死亡區域，同時活化一系列凋亡訊息相關因子^[26]。

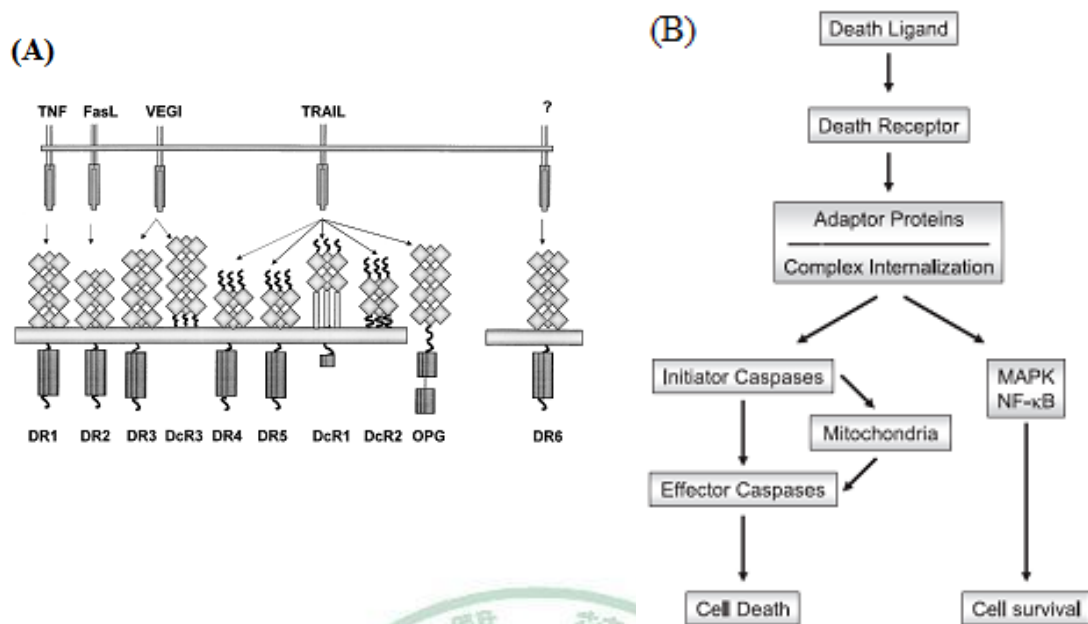


Figure 9 Schematic representations of (A) death receptor^[24] and (B) death receptor signaling^[26].

誘發死亡訊息複合體(death-inducing signaling complexes; DISCs)有二個不同族群^[24, 27]: 第一個族群是由CD95受體、死亡受體4(DR4; also termed TRAILR1)或死亡受體5 (DR5; also termed Apo2, TRAIL-R2, TRICK2, or Killer/DR5)組成DISCs。DR4或DR5組成的DISCs有相類似的結構，DISCs形成後進而促進caspase-8之活化，caspase-8在死亡訊息轉導途徑中扮演極重要的角色。同一細胞中可能同時存在DR4及DR5，然而在誘發細胞凋亡之角色扮演，DR5似乎相形較為重要^[28]。DR4和DR5近來受到科學家極大的關注，被視為有發展潛力以應用在治療各種不同形式之癌症。因為DR4 及 DR5 共同之配體~腫瘤壞死因子相關誘導凋亡配體 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)，能有選擇性的觸

發變形(transformed)癌細胞之凋亡^[29, 30]。增強TRAIL的表現，並刺激DR4亦或DR5會誘發某些特定細胞株之凋亡，包括大腸癌、前列腺癌、膀胱癌和慢性淋巴球白血病(chronic lymphocytic leukemia)^[31, 32]。近年來，許多研究已證實TRAIL能有選擇性地不影響正常細胞而殺死癌細胞，也由於TRAIL能差異的對變形細胞和異種移植的腫瘤具有毒性，但對正常細胞幾乎沒有毒性，使得TRAIL受到許多臨床學家極大的關注，成為癌症治療的理想標的^[33-36]。

第二個族群是由TNFR1, DR3, DR6,及 EDAR組成另一套不同的分子集團，目前已知此一族群能同時轉導細胞凋亡或細胞存活訊息，然而其分子機制至今尚未十分明瞭。

藉由對死亡受體訊息轉導途徑之瞭解，可供開啟設計標靶死亡受體訊息轉導途徑之治療新策略，除了癌症之外，亦可有效治療許多因死亡受體訊息缺陷而導致的疾病，如多重複合硬化症 (multiple sclerosis) 和阿茲罕默症 (Alzheimer's disease)^[25]。

四、細胞凋亡訊息傳導途徑：外在途徑與內在途徑

細胞凋亡大致可分為兩個訊息傳導途徑：外在途徑(extrinsic pathway)與內在途徑(intrinsic pathway)^[20, 21]。

外在途徑是由細胞膜上某些死亡受體所引起的細胞凋亡途徑(見圖10)。此類死亡受體包括Fas/CD95, tumor necrosis factor receptor (TNF-R)

及TRAIL receptor (TRAIL-R)。死亡受體與其相對應的配體 (FasL, TNF及TRAIL)結合後，會觸發一連串生化機制進而誘導細胞凋亡。其中，TRAIL之死亡受體4及死亡受體5都具有轉導死亡訊息之能力^[37]。TRAIL能以nanomolar等級之親和力與DR4或DR5結合，當TRAIL與細胞膜表面之死亡受體DR4亦或DR5結合後，促使受體蛋白質(adaptor protein) FADD (Fas associating protein with death domain)與起始caspase-8新添至DISCs，進而酶促活化caspase-8和caspase-10。Caspase全名為cysteiny l aspartate-specific protease，是執行細胞凋亡的蛋白質，caspase可以在目標蛋白N端上之aspartate residue 與 C 端之 hydrophobic residue做切割的動作而變成活化態。被活化的caspase-8會分裂並活化下游的受動器(effector)：如caspase-3和caspase-7，因而觸發caspases cascade，最終導致細胞凋亡^[25, 38]。另外，caspase-8也會水解Bid，被水解活化的t-Bid會由細胞質轉移至粒線體，促使細胞色素c (cytochrome c)自粒線體釋放致細胞質，最終誘發細胞凋亡^[39]。

目前對死亡受體的研究已經證實，某些特定之刺激，包括臨床上使用的化學療法抗癌藥物如 cisplatin, camptothecin, doxorubicin 及 paclitaxel^[40-42]，都可誘發DR4亦或DR5之表現，亦或增強TRAIL之表現，進而誘發凋亡訊息傳導途徑以殺死癌細胞^[43, 44]。因此，透徹了解細胞凋亡與致癌作用(carcinogenesis)之關聯，藥物學家可藉由誘發癌症細胞凋亡的策略，

對標的化合物進行細胞凋亡試驗，了解其是否經由細胞凋亡而產生抗癌效果，再由其相關調控蛋白質之表現，進而探討其分子機制，此將有助於設計開發新穎且有效的癌症治療策略。

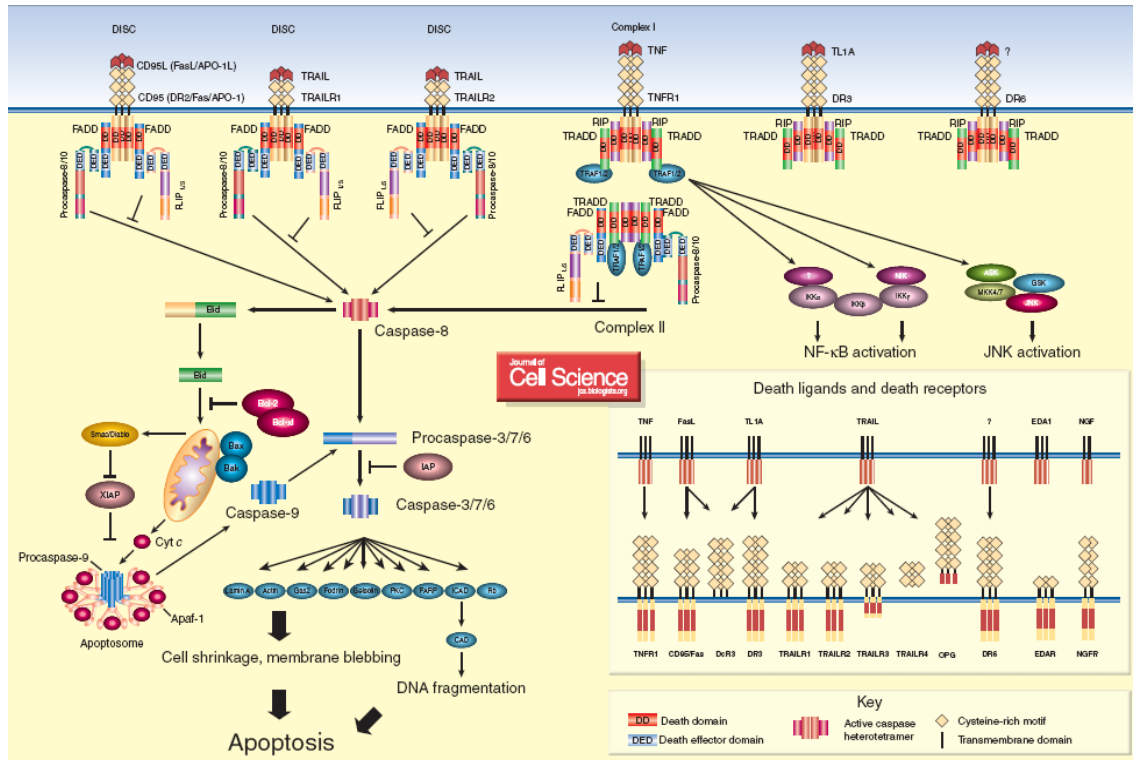


Figure 10 Death receptor signaling [25]

內在途徑(見圖 11)為經由粒線體傳導之細胞死亡路徑 (mitochondrial/stress pathway)，當一些誘發細胞死亡的訊息(如游離輻射、藥物或自由基等)傳入細胞後，會直接或間接作用在細胞質中之粒線體，導致粒線體膜電位下降並釋放 cytochrome *c*。當 Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1), cytochrome *c*, pro-caspase 9 與 dATP 結合形成凋亡複合體(Apoptosome)後，pro-caspase 9 變形成活化態的 caspase-9，

caspase-9扮演起始caspase活化下游的caspase-3，進而誘導細胞凋亡^[45-48]。

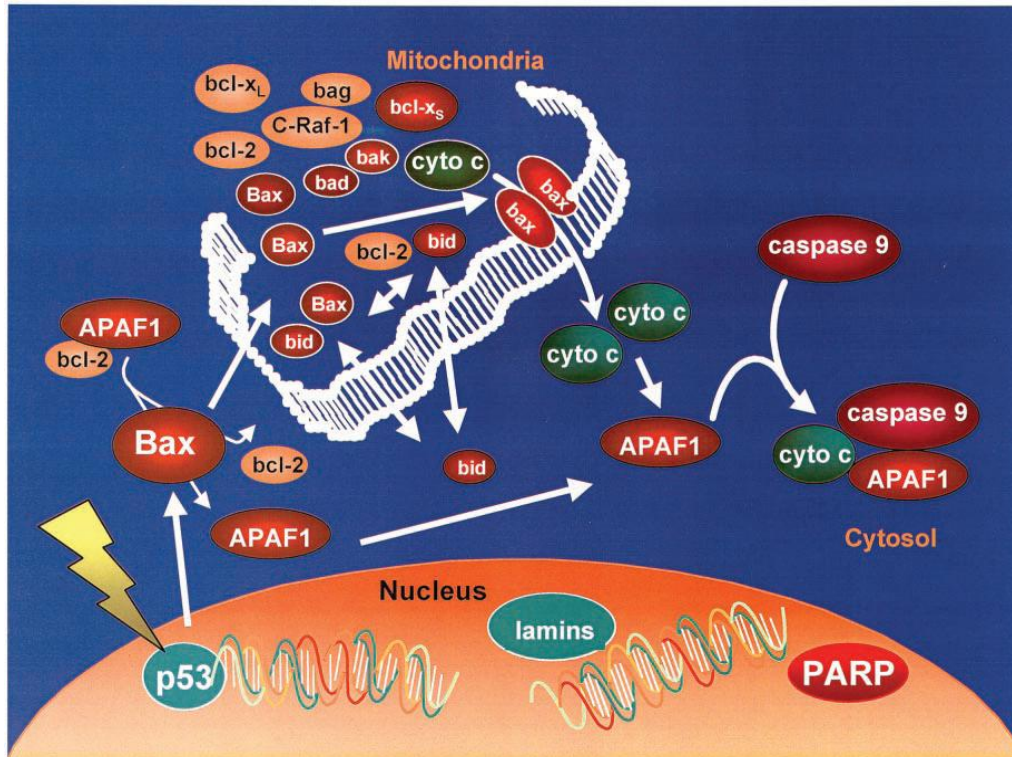


Figure 11 Apoptosis ^[45].

五、Bcl-2 家族

細胞凋亡亦會受到抑制或促進細胞凋亡(anti- and pro-apoptotic)蛋白質的雙向調控，這些調控蛋白質包含Bcl-2 (B cell lymphoma protein 2)家族蛋白質及 IAP (Inhibitor of apoptosis protein)家族蛋白質等。Bcl-2家族包括Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-Xs, Bax, Bad, Bag, Bak, Bid等，各有促進或抑制細胞凋亡的功能，其中，Bcl-2, Bcl-XL, Bax, 及 Bad 扮演通道蛋白質(channel protein)的角色，可以在粒線體膜內外穿梭。

抑制細胞凋亡之Bcl-2家族蛋白質為Bcl-2, Bcl-xL及Mcl-1；而Bad, Bax, Bak及其他蛋白質則是促進細胞凋亡。Bcl-2, Bcl-xL會和Apaf-1結合並抑

制Apaf-1之活性，進而阻止caspases之活化。然而當Bax過量時，Bax會取代 Bcl-2 和 Apaf-1 之結合位置，Bax 藉由促使cytochrome *c*自粒線體釋出，導致caspase分裂並活化，進而調控細胞凋亡機制（見圖11）^[45]。

第三節 有絲分裂原活化蛋白激酶

細胞之生長、分化和凋亡會受到許多細胞外信號之調控，細胞通常需要整合這些應激訊息，以決定細胞之命運—死亡或是存活，而許多受激酶調控之訊息途徑將決定細胞的命運。細胞外信號的類型、持續時間和嚴重程度，有效地傳輸到細胞內，這些信號複合物會被組裝、整合，然後做適當的處理，最終導致對特定刺激做出回應(見圖 12)^[49]。有絲分裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases; MAPKs)能整合和處理各種細胞外的信號，進而調控細胞之活性，例如：基因表現、有絲分裂、細胞分化、和細胞之存活或凋亡等^[49, 50]。

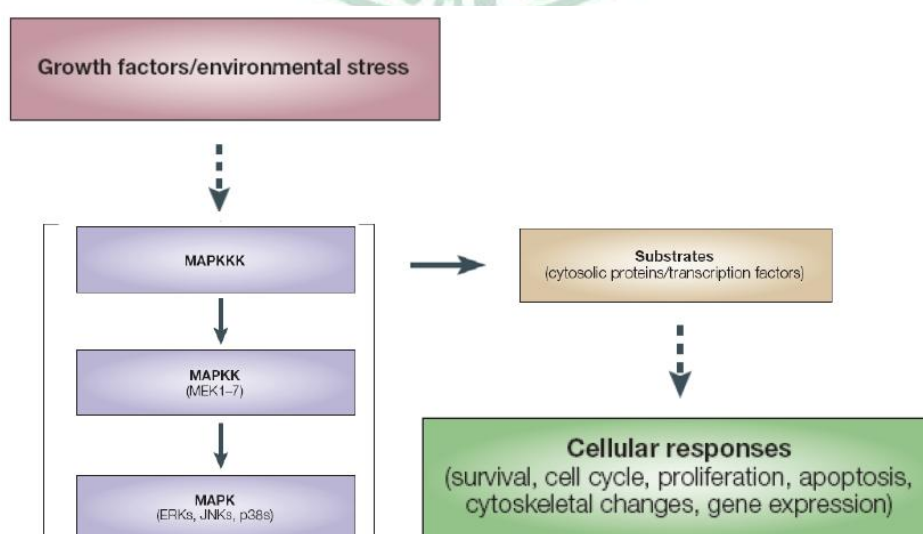


Figure 12 Generic MAP kinases pathways ^[49].

到目前為止已有三個不同的 MAPK 途徑被論述，幾乎從酵母到人類都存在。第一個被發現的 MAP kinase 是細胞外調節激酶 (extracellular regulated kinases) ERK 1 和 ERK 2。隨後，C-Jun N-terminal Kinases (JNKs) 和 p38 MAPK 陸續被確認^[51]。這些激酶相同的部份約 60~70%，彼此之間的差異在於氨基酸序列和大小，以及針對不同刺激之活化作用。每一個蛋白激酶家族各包括幾個亞型和成員，往往有不同的功能。一般來說，促進有絲分裂和增殖的刺激會活化 ERKs，而 JNKs 和 p38 則回應環境壓力，包括紫外線 (ultraviolet light)、熱 (heat)、滲透性休克 (osmotic shock) 和炎症細胞因子 (inflammatory cytokines)^[52]。

基於 p38MAPK 與其他訊息途徑之關聯 (見圖 13)，因而表現在細胞分化、生長抑制、凋亡、存活和調控細胞週期檢查點之作用，p38 蛋白已被定義為一個抑制腫瘤基因^[53-55]。p38 可作用在 caspases 誘導細胞凋亡之上游和下游，值得一提的是，p38 在細胞凋亡中所扮演的角色是依腫瘤發展階段、癌症細胞和刺激類型而定^[56]。例如肝癌細胞 P38 和 MKK6 活性比非致瘤性組織低，增加 P38 活性能促進肝癌細胞株細胞凋亡；然而在不同癌症細胞株，包括；濾泡淋巴瘤，肺癌，甲狀腺癌和乳腺癌，以及神經膠質瘤和頭頸部鱗狀細胞癌，P38 卻可提昇腫瘤細胞存活率，及促進腫瘤細胞生長和分化^[57]。

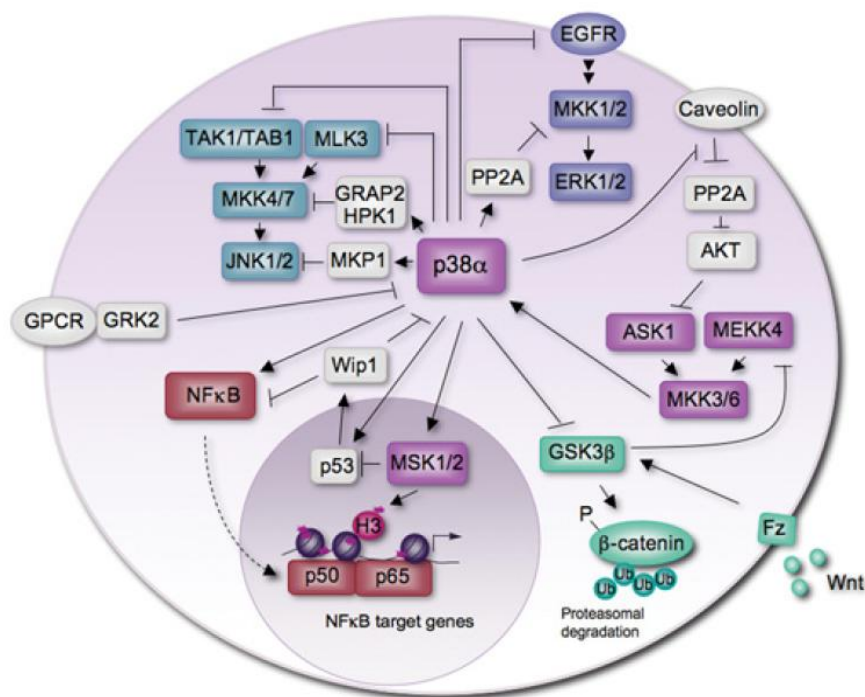


Figure 13 Cross-talk between p38 and other signaling pathways [53].

第四節 2-芳香基-4-喹啉酮類衍生物

2-芳香基-4-喹啉酮衍生物 (2-phenylquinolin-4-ones, 以下簡稱2-PQs) 是自然界存在之生物鹼，主要存在於芸香科植物(*Rutaceae*)，其結構為類黃酮(flavonoids)之-aza衍生物。亦如類黃酮，2-PQs通常不具明顯生物毒性、副作用低、擁有多樣性的藥理活性，例如：抗多枝桿菌(anti-mycobacterial)、抑制單胺氧化酶(monoamine oxidase)及抑制白血球三烯(leukotriene)之生合成^[58-60]。自1993年以來，本研究室即以吳天賞教授所分離出來的天然物reevesianine-A為lead compound，與李國雄教授之研究團隊合作，陸續設計並合成許多2-PQs，並建立了這些化合物之化學結構與活性關係(structure-activity relationships; SAR)^[61-73]。

一、2-苯基-6,7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物之概述

早期 2-PQs 相關之研究，將其歸類為抑制微管蛋白聚合之抗有絲分裂藥物。微管是抗腫瘤化療藥物在細胞內重要之作用標的，許多結構不同的化合物皆會作用在微管蛋白，導致有絲分裂停滯，進而抑制細胞增殖，並能誘發細胞凋亡。這類干擾微管功能之化合物對固態及血液型腫瘤都有活性作用，構成重要之抗癌藥物家族。秋水仙素是一種作用於微管蛋白的脂溶性藥物，雖因毒性太強而無法用於臨床治療，卻是研究微管功能最重要之標的化合物。

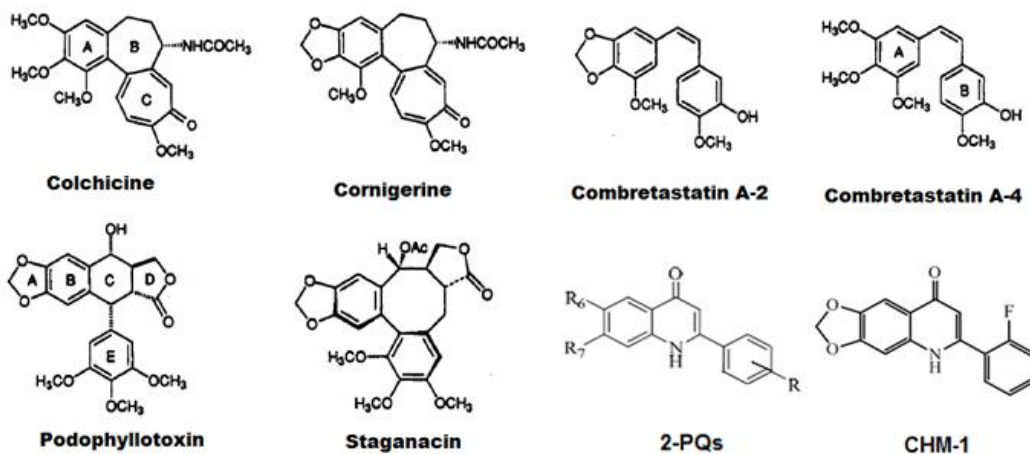


Figure 14 Structure of anti-mitotic agents.

審視此類干擾微管藥物之化學結構(見圖14)：Colchicine, Steganacin, Combretastatin A-4,和Podophyllotoxin含有三甲氧基苯結構；而Cornigerine, Combretastatin A-2, Podophyllotoxin,及Steganacin則含有亞甲二氧基(methylenedioxy)苯結構^[63]。Cornigerine和Colchicine結構之差異，僅在於

A環上2-, 3-位置取代基的不同；Cornigerine為2, 3-methylenedioxy取代，Colchicine則是2, 3-dimethoxy取代。然而與微管蛋白結合，抑制微管組裝及抑制細胞生長，Cornigerine之活性比 Colchicine 約強1.5倍。相反的，有亞甲二氧取代基的Combretastatin A-2 細胞毒性、微管蛋白結合作用卻弱於二甲氧基取代的Combretastatin A-4。

為繼續在2-PQs系列中尋找強效的抗癌候選藥物，因而參考臨床治療癌症之抗有絲分裂藥物，設計、合成一系列6, 7-亞甲二氧基取代之2-PQs，以探討其化學結構與活性關係^[62, 63, 70]。經cytotoxicity, inhibition of tubulin polymerization (ITP), inhibition of Colchicines binding (ICB)測試，以及委託美國國家癌症研究中心(National Cancer Institute；NCI)以Computer Pattern Recognition (COMPARE) program方式，針對60株人類癌症細胞進行體外(*in vitro*)篩選測試。測試結果發現，抑制微管蛋白聚合與細胞毒性之間呈現良好之正相關。許多6, 7-亞甲二氧基2-PQs 抑制微管蛋白聚合之活性與colchicine, podophyllotoxin, combretastatin A-4相近，且具有強效的細胞毒殺作用，尤其是抑制前列腺癌、乳癌、卵巢癌和small-cell肺癌細胞株生長之活性最為顯著，GI₅₀濃度值介於 micro-molar ~ nano-molar 間^[63]。

同時由SAR之探討結果發現，2, 3-fused quinolones 及 2-heteroary1-4-quinolones皆比2-PQs 活性弱，有些甚至是無效。A環6, 7-亞甲二氧基與

6-甲氧基取代2-PQs之活性相當；而比其相應的6, 7-二甲氧基取代或無取代的2-PQs更強效；三甲氧基取代2-PQs顯示很低或沒有活性。除此之外，在2-PQs C環苯基4'-位甲氧基取代導致活性喪失，推測這是由於4'-位取代基干擾局部的結合位點；3'-位甲氧基取代並不影響活性；2'-位氟或氯官能基取代之6, 7-亞甲二氧基2-PQs 都有很強之活性^[63, 70]。由SAR研究之初步結果，推測在2'-及3'-位置取代基可能導致更有效的化合物，尤其是在增強細胞毒性，腫瘤類型特異性，或是改善溶解度^[62, 63]。

二、CHM-1 之抗癌活性

在無數受測試之2-PQs當中，2-(2-fluorophenyl)-6, 7-methylene dioxyquinolin-4-one (以下簡稱**CHM-1**) 對多種人類癌症細胞株展現強效之生長抑制活性，且毒性相對較低；以200 mg/kg劑量(Q 7×3 i.p)進行動物體內(*in vivo*)實驗，亦未達最大耐受劑量(MTD; maximum tolerance dose)^[74]。CHM-1具強效之抑制微管蛋白聚合活性(ITP; $IC_{50} = 0.85 \pm 0.01 \mu M$)，卻又非完全競爭秋水仙素與微管蛋白之結合 (% inhibition of ICB = $37 \pm 3; 5 \mu M$)^[62, 63, 68]，因而推測其作用機制應與秋水仙素有所差異，相關之研究報導亦揭示CHM-1具有新穎之抑癌機制和強效之抗腫瘤活性。

除此，委託日本JCI以39株人類癌細胞測試CHM-1之 GI_{50} 、TGI 及 LC_{50} ，CHM-1對卵巢癌、大腸癌、肺癌、胃癌及中樞神經癌細胞都具有選擇性之抑制活性，其 IC_{50} 皆低於 $1 \mu M$ 。作成finger print進而以COMPARE

program與300種有不同作用機轉之抗癌藥物做比對，結果得知，CHM-1與這些抗癌藥物之finger print不太一樣^[74]。探討結果顯示CHM-1與其它結構類似之喹啉酮類類緣化合物，其作用機轉雖與秋水仙素相近，但又不盡相同，更與當前臨床抗癌藥物的作用機轉有明顯差異。因而推測CHM-1為一化學結構、作用機轉新穎的抗腫瘤製劑，值得深入探討並具開發潛能^[75]。

茲將 CHM-1 之相關研究成果摘錄如下：

- (一) 體外試驗結果顯示 CHM-1 能抑制微管聚合作用($ITP\ IC_{50} = 0.85 \pm 0.01\ \mu M$; % inhibition of $ICB = 37 \pm 3$; $5\ \mu M$)，並對許多人類癌症細胞株之生長具強效抑制作用，尤其對是大腸癌、CNS 及 small-cell 肺癌細胞株^[62, 63]。
- (二) 多數 2-PQs 衍生物具強效之細胞毒性，活性最強之化合物對受測試癌症細胞株的 ED_{50} 介於 nanomolar 至 subnanomolar 間。CHM-1 對人類迴盲腸癌(HCT-8)、乳癌(MCF-7)、肺癌(A-549)、咽頰癌(KB)、腎癌(CAKI-1)及黑色瘤(SK-Mel 2)之 ED_{50} ($\mu g/ml$)分別為 0.06, 0.08, 0.13, 1.0, 0.06 及 0.125，是新穎抑制有絲分裂之抗腫瘤製劑^[66]。
- (三) 經 NCI 體外篩選測試結果，CHM-1 對人類 non-small cell 肺癌 NCI-H226 細胞、大腸癌 HCT-116 細胞、卵巢癌 OVCAR-3 細胞、

黑色素瘤 SK-Mel 5 細胞、CNS 腫瘤 SF-286 及 SF-295 細胞之 cytotoxicity log GI₅₀ (M) 分別為-6.35, -7.22, -7.09, -7.68, -5.64, -7.26, 平均值為-6.87^[70]。

(四) 2-Phenyl-4-quinolone (2-PQ)能抑制許多人類癌症細胞株增殖，包括：荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞、肝癌 Hep3B 及 HepG2 細胞、non-small cell 肺癌 A549 細胞及富含 P-glycoprotein 之乳癌 NCI/ADR-RES 細胞；IC₅₀ 分別為 0.85, 1.81, 3.32, 0.90 及 1.53 μM。2-PQ 促使有絲分裂紡錘體功能失調，導致細胞週期停於 G2/M 期，進而誘發 PC-3 細胞凋亡。除此之外，2-PQ 會影響 PC-3 細胞之 Bcl-2 家族蛋白質的表現、降低粒線體膜電位、活化 caspases 並促使 AIF 釋出^[76]。

(五) 在 SK-Hep-1 細胞中，CHM-1 強效抑制 HGF (hepatocyte growth factor) 所誘發的細胞侵襲、蛋白質分解活性、MMP-9 之表現、c-Met 之 tyrosine 自動磷酸化、Akt 磷酸化及 NF-κB 之活化，證實 CHM-1 具有抑制癌細胞轉移之能力^[77]。

(六) HA-22T 是人類 Taxol 抗性肝癌細胞株，在 HA-22T 肝癌細胞中，CHM-1 經由抑制 cdc2/cyclin B 之活化而抑制微管聚合作用，導致有絲分裂停滯。*in vitro* 測試 (24 h) 結果顯示 CHM-1 呈現依賴濃度的方式抑制 HA-22T 細胞增殖，其 IC₅₀ 為 0.77 ± 0.11 μM，

比 Doxorubicin ($IC_{50} = 1.15 \pm 0.21 \mu M$)及 Taxol ($IC_{50} = 7.90 \pm 0.22 \mu M$)之抑制活性更強。動物試驗結果顯示，CHM-1 以劑量依賴性抑制腫瘤的生長，施予 10 mg/kg (Q4D×5) 時幾可達到比 Doxorubicin 更好的抗腫瘤活性。評估過程中，實驗組動物之體重與控制組相同，而經以 Doxorubicin 投藥處理的動物體重則有下降的現象，此結果顯示 CHM-1 抑制肝癌 HA-22T 腫瘤生長之效果更優於 Doxorubicin，是安全、有效的抗肝癌腫瘤藥物^[78]。

(七) CHM-1 活化 caspase-3, -8, 及-9, 進而誘發 U-2 OS 細胞凋亡 ($IC_{50} = 3 \mu M$)，CHM-1 誘發 U-2 OS 細胞凋亡之機制包含：增強產生 ROS、DNA 損傷、降低 $\Delta\psi_m$ 表現量及促進 cytochrome c 釋出。CHM-1 藉由抑制 MAPK 和 MMP-2, -7, 及-9，因而遏止腫瘤細胞轉移^[79]。

(八) CHM-1 向下調節老鼠結直腸癌 CT-26 細胞之 Cyclin A/CDK1 及 Cyclin B/CDK1 的活性，使得細胞週期停滯於 G2/M 期。CHM-1 經由影響 Bax, Bad, Bcl-2, 與 Bcl-xL 蛋白質，促使粒線體釋出 cytochrome c 及 AIF (apoptosis-inducing factor) 至細胞質中，進而活化 caspase 9 及 caspase 3 最終導致細胞凋亡。活體抗腫瘤活性試驗顯示，口服 CHM-1-P 明顯延長 CT-26 腫瘤小鼠之存活期^[80]。

(九) CHM-1 藉由 p53 上調 DR5 之表現，誘發臍靜脈內皮細胞 (human

umbilical vein endothelial cells; HUVECs) 凋亡，是一強效之抗血管新生及抗腫瘤製劑^[81]。

(十) National Cancer Institute (NCI, USA) 以異種移植 OVCAR-3 動物模式測試，各施與 200, 134, 及 79 mg/kg (Q7D×3, i.p) 之 CHM-1 治療罹癌裸鼠，分別可延長 OVCAR-3 腫瘤裸鼠存活時間 124%, 133% 及 79%。劑量增加至 200 mg/kg (Q7D×3, i.p) 仍未達最大耐受劑量(MTD)，顯示 CHM-1 是安全且有效的抗腫瘤製劑^[74]。

(十一) 為改善 CHM-1 之低水溶解度，因而致力於合成 CHM-1 之磷酸鈉鹽(CHM-1-P-Na)。在 SKOV3 異種移植模式，CHM-1-P-Na 經口服及靜脈注射後，會在動物體內快速轉換成 CHM-1，具有優秀之抗腫瘤活性。在安全性藥理方面，藉由酵素活性分析 (enzyme activity assay) 及受體結合實驗分析 (receptor binding assay) 結果，推測 CHM-1 及 CHM-1-P-Na 在臨床試驗中不至於有太多的副作用，是安全及有效的抗癌藥物^[74]。

(十二) CHM-1 以劑量依賴性提昇 WEHI-3 血癌老鼠之整體存活率。CHM-1 減少 cell markers Mac-3 及 CD11b 之表現量，而抑制巨噬細胞前驅細胞 (macrophage precursor cells) 之分化；誘導 PBMC 之 CD3 及 CD19 表現，促使 T 細胞及 B 細胞之前驅細胞分化^[82]。

第二章 研究動機

卵巢癌是全世界婦女常見癌症的第六位，佔所有女性癌症的 4%，同時也是婦女因罹癌死亡的第七位^[7, 8]。2009 年在美國約有 21,550 卵巢癌新病例，14,600 名婦女死於和卵巢癌有關之疾病^[9]，估計每 70 名美國婦女至少有一名終其一生將會罹患卵巢癌。而在全球，估計每年約有 204,000 新病例，125,000 名婦女死於卵巢癌^[10]。人類卵巢癌細胞有非常複雜的基因表現，對於化學療法及放射線療法具有很強的抗性，臨床表現也十分獨特。目前臨床治療卵巢癌主要是以侵入性手術切除腫瘤，再輔以化學藥物治療 (paclitaxel plus carboplatin)，雖然大部分卵巢癌患者起初對第一線化療藥物尚會有回應，不幸的是大部分卵巢癌病患將會再復發並產生抗藥性，對 paclitaxel 產生抗藥性是導致化學療法失敗最重要之原因。研究顯示，復發之卵巢癌病患平均存活期大約只有兩年，且所有復發之病患最終皆死於和卵巢癌相關之疾病，整體手術後卵巢癌病患之 5 年相對存活率僅有 45%^[12]。因此，開發有效治療卵巢癌並遏止卵巢癌復發之藥物實有迫切之需要。

為繼續在 2-PQs 系列中尋找強效的抗癌候選藥物，因而參考臨床干擾微管抗癌藥物之化學結構，設計、合成一系列 6, 7-亞甲二氧基取代之 2-PQs，以探討其構效關係。歸納 SAR 研究發現，在 6, 7-methylenedioxy 2-PQs 結構上之 2-芳香環上之不同位置，做不同取代官能基之改變，依然

表現優越之細胞致毒活性。在無數受測試之2-PQs，2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one (CHM-1) 對多種人類癌症細胞株展現強效之生長抑制活性，且毒性相對較低。CHM-1抗腫瘤之功效雖業經證實，其抑制腫瘤細胞生長的生物及生理分子機制亦已有諸多探討。NCI曾針對60株人類癌症細胞進行體外篩選測試，結果顯示CHM-1對卵巢癌OVCAR-3細胞具有強效的細胞毒殺作用($\log GI_{50} = -7.09$)，然而CHM-1抑制基因表現複雜、paclitaxel抗性卵巢癌細胞之分子生物機制，並未深入探討。因而擬定此一研究，藉以評估6,7-methylenedioxy 2-PQs 能否發展成為有效的抗卵巢癌候選藥物。

本研究使用人類卵巢癌SKOV3及SKOV3ip1細胞株，SKOV3及SKOV3ip1細胞株具有很強的侵襲性和轉移能力，對於化學療法及放射線療法也有很強的抗性，是評估卵巢癌標靶藥物之良好標的。本研究為首次針對人類卵巢癌而進行之體內和體外研究，主要評估6,7-methylenedioxy 2-PQs 抑制卵巢癌細胞株之活性，並探討6,7-methylenedioxy 2-PQs誘發卵巢癌SKOV3細胞凋亡的分子機制，及相關調控蛋白之表現。由於卵巢癌主要局部發生於女性腹腔，監控腹腔疾病的發展和演變相對較為困難，建立一個可靠、確實的動物異種移植模式，是藥物進入臨床試驗之前，評估其治療效果的重要步驟。因此本研究利用多種動物實驗模式，評估CHM-1在活體內的抗卵巢癌活性。首先以

BALB/C nude mice 皮下移植SKOV3腫瘤細胞，由腹腔分別注射不同劑量的CHM-1及其親水性磷酸鹽(CHM-1-P)治療罹癌裸鼠，藉以釐清相同基本結構但不同溶解度的不同藥物，是否會有相同的抑制腫瘤生長效果。除此之外，應用原位異種移植模式(orthotopic xenograft model)，分別經腹腔注射CHM-1亦或經靜脈血管注射CHM-1-P治療罹癌裸鼠，觀察並統計其腫瘤生長及殘存情形。預期此研究之結果將可提供未來臨床試驗之參考，並有助於設計、開發更具抗癌活性的新穎化合物。

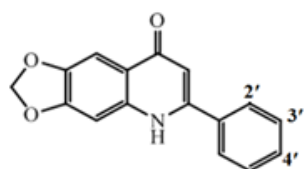


第三章 結果與討論

第一節、藥理活性及作用機轉之探討

一、CHM-1 強效抑制多種人類腫瘤細胞株增殖

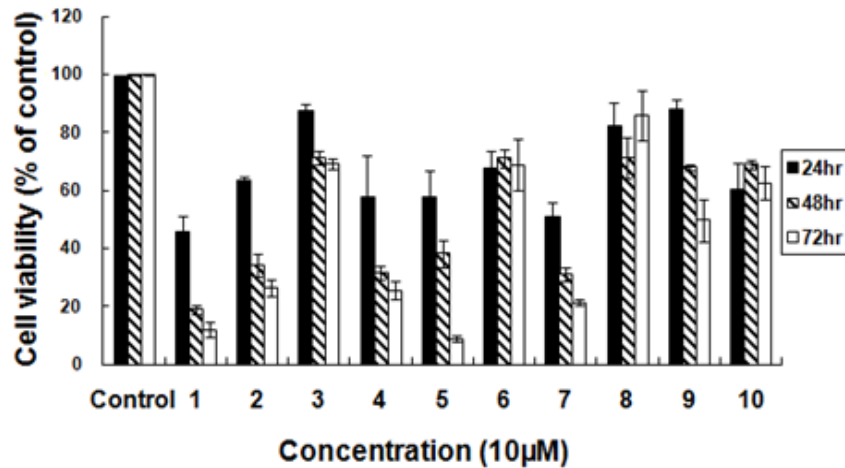
歸納本實驗室對 2-PQs 所進行之 SAR 研究發現，在 6, 7-methylenedioxy 2-PQs 結構之 2-芳香環上之不同位置，做不同取代官能基之改變，依然表現優越之細胞致毒活性。因此本研究首先利用細胞存活率分析，檢測 10 個 2-(substituted phenyl)-6, 7-methylenedioxy quinolin-4-ones (見圖 15) 之細胞致毒活性。 1.5×10^4 /well 之 SKOV3 細胞培養於 24 孔/盤中，給予相同濃度(10 μ M)待測定的 6, 7-methylenedioxy 2-PQs，分別於給藥處理 24, 48, 和 72 小時後進行細胞存活率分析。實驗結果顯示(見圖 16A)，多數 6, 7-methylenedioxy 2-PQs 化合物明顯的抑制卵巢癌 SKOV3 細胞之生長，其中尤以化合物 1 (CHM-1)之表現最為突出。



Compound	2'	3'	4'
1	F	H	H
2	Cl	H	H
3	OCH ₃	H	H
4	H	F	H
5	H	Cl	H
6	H	OCH ₃	H
7	H	H	H
8	H	H	F
9	H	H	Cl
10	H	H	OCH ₃

Figure 15 The structure of 2-(substituted phenyl)-6, 7-methylenedioxyquinolin-4-one analogues.

(A)



(B)

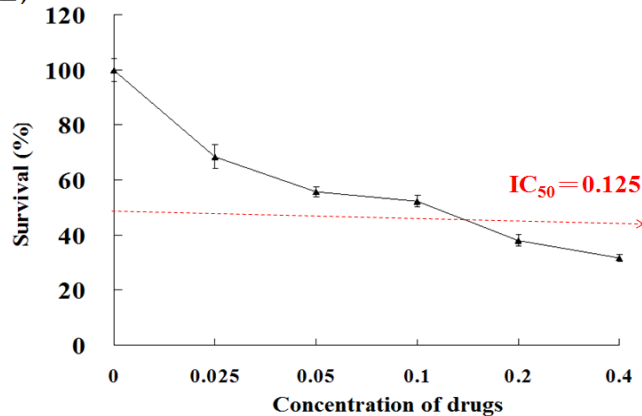


Figure 16 The growth-inhibitory activity of 6, 7-methylenedioxy 2-PQs on SKOV3 cells. (A) SKOV3 cells were treated with 10 μ M of 2-(substituted phenyl)-6, 7-methylenedioxyquinolin-4-ones for the indicated time, (B) SKOV3 cells were treated with different concentrations of CHM-1 for 48 hours. The cell viability was then determined using the MTT assay. This experiment was repeated 3 times. Data are presented as means \pm S.D.

接下來我們分別以不同濃度之 **CHM-1**，於給藥處理 48 小時後進行細胞存活率分析，以評估 CHM-1 在體外抑制卵巢癌 SKOV3 細胞生長之活性。細胞存活率分析結果顯示(見圖 16B)，CHM-1 以劑量依賴性強效抑制卵巢癌 SKOV3 細胞之生長($IC_{50} = 0.125 \pm 0.02 \mu$ M)。

為進一步評估 CHM-1 之細胞致毒活性，除了 SKOV3 細胞，另隨機挑選 4 種人類癌症細胞株，包括：肝癌(hepatocellular cancer) Hep 3B 細胞、直腸癌(colorectal cancer) HCT-116 細胞、前列腺癌(prostate cancer) PC-3 細胞、肺癌(lung cancer) H460 細胞，及人類正常二倍體皮膚纖維原 Detroit-551 細胞，進行細胞存活率分析。實驗結果顯示 CHM-1 強效抑制人類癌細胞株之生長，其 IC_{50} 介於 0.125~0.17 μ M 間 (見表 1)，但對 Detroit-551 之細胞毒性則相對較低($IC_{50}=8.2 \mu\text{M}\pm 0.4$)。

Table 1 Effects of CHM-1 on cell viability in various cell lines.

Cell viability of intact cells was determined after 48 h. The concentration for IC_{50} is shown. Each value is based on at least three different experiments.

Origin	Cell line	IC_{50} (μ M)
Hepatocellular cancer	Hep 3B	0.13 ± 0.02
Ovarian cancer	SKOV3	0.125 ± 0.02
Colorectal cancer	HCT 116	0.17 ± 0.02
Prostate Cancer	PC-3	0.13 ± 0.01
Lung cancer	H 460	0.14 ± 0.01
Human skin fibroblast cell	Detroit-551	8.2 ± 0.4

由體外細胞存活率分析結果，吾等推測 CHM-1 能有選擇性的抑制人類癌症細胞株之生長，但對正常細胞之細胞毒性相對較弱，有潛力發展成為有效且安全的人類卵巢癌治療藥物，因此，我們選定 CHM-1 作為此研究之標的化合物。

二、CHM-1 誘發 caspase-8 依賴性之細胞凋亡

相關研究報導已證實 CHM-1 能誘發人類癌症細胞株凋亡，為探討 CHM-1 誘發卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡之分子機制，利用西方墨點分析法檢測 caspases 和其他細胞凋亡相關蛋白質的表現。分析結果顯示，CHM-1 (0.125 μ M) 能活化 caspase-3，PARP 亦被活化，除此之外，伴隨 CHM-1 所引發之細胞感受性而導致 caspase-3 和 PARP 之分裂，caspase-8 似乎也因此受到某些程度的活化，但 caspase-9 則不能被活化 (見圖 17A)。由此推測 CHM-1 誘發卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡可能不經由粒線體傳導之細胞凋亡內在途徑。同時，在死亡接受器轉導的細胞凋亡途徑，caspase-8 是其中一個突出且必需的效應物(effector)，因此初步推測 caspase-8 在 CHM-1 誘發之細胞凋亡途徑中具有舉足輕重的地位。

三、CHM-1 上調死亡接受器 5 及 TRAIL 之表現

為進一步確認 CHM-1 誘發卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡之訊息傳導途徑，利用西方墨點分析法檢測不同死亡接受器之蛋白質表現。實驗結果(見圖 17B)明顯發現，CHM-1 (0.125 μ M) 向上位調節死亡接受器 5 和 TRAIL 之表現，但 Fas/CD95 和 DR4 則幾乎不受影響。此實驗結果顯示，CHM-1 誘發細胞凋亡，主要經由上位調節死亡接受器 5。

對死亡接受器之相關研究指出，DR5 的表現受 p53-dependent 和 p53-independent 之機制調控^[83, 84]。CHM-1 相關研究文獻亦指出，CHM-1

能增強人類臍靜脈內皮細胞(HUVECs) p53 之表現，介導上調 DR5 而誘發細胞凋亡^[81]。我們的研究結果顯示，CHM-1 作用於缺乏 p53 基因突變的 SKOV3 細胞，同樣能增加其 DR5 的表現，DR4 則不受感應。由此可推論 CHM-1 向上調節 DR5 之表現可能經由 p53 非依賴性(p53-independent)之機制，即使在缺乏 p53 表現的 SKOV3 細胞中，CHM-1 誘發細胞凋亡的能力亦不受影響。同時，我們的研究結果意外發現，p53 誘導 DR4 和 DR5 的表現可能與外在刺激之性質及腫瘤細胞之種類有關。

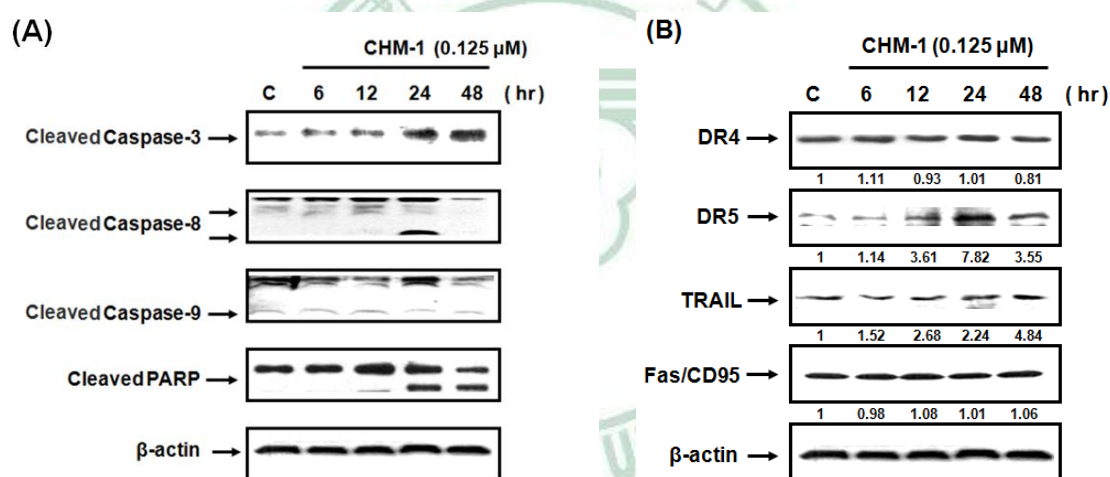


Figure 17 Effects of CHM-1 on the levels of apoptosis-associated proteins in SKOV3 cells. (A) SKOV3 cells were treated with 0.125 μM CHM-1 for the indicated times. They were then harvested and lysed for the detection of cleaved PARP, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, and β-actin. (B) SKOV3 cells were treated with 0.125 μM CHM-1 for the indicated times. The cells were then harvested and lysed for the detection of DR4, DR5, TRAIL, Fas/CD95, and β-actin. Western blot data presented are representative of those obtained in at least 3 separate experiments. The values below the figures represent the changes in the protein expression normalized to β-actin.

四、CHM-1 誘發之細胞凋亡與活化 p38 訊息相關聯

有絲分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases ; MAPKs) 會回應細胞外來的刺激，進而調控細胞之活性，例如：基因表現、有絲分裂、細胞分化、和細胞之存活或凋亡等^[53-55]。為釐清 CHM-1 所誘發的 SKOV3 細胞凋亡是否包含 MAPKs 訊息傳遞途徑，因此利用西方墨點分析法檢測 ERKs, p38 及 JNK 之表現。以 0.125 μM 之 CHM-1 處理 PC-3 細胞，當 ERK1/2 磷酸化產物 phospho-ERK1/2 表現被抑制時，phospho-JNK 表現量不受影響。相對的，在投藥處理 6, 12, 和 24 小時後，很明顯可觀察到 CHM-1 (0.125 μM) 誘發 p38 的磷酸化 (見圖 18A)，由此推測 p38 的活化是 CHM-1 誘發細胞凋亡的重要機制之一。

為了求證此一推論，我們使用 SB203580 做進一步確認。SB203580 是 p38 活化之專一抑制劑，結構屬於 pyridinyl imidazole 衍生物^[49]。如圖 18B 所示，SB203580 會減弱 CHM-1 在 SKOV3 細胞所誘發的 DR5 表現和 caspase-3 的活化。同時，以 0.125 μM 之 CHM-1 處理 24 小時後，收集之 lysate 經流式細胞計數分析，結果顯示有 24.59 % 之 SKOV3 細胞會停留在 sub-G1 phase (apoptotic cells)；然而，先以 10 μM SB203580 前處理 (pre-incubated) SKOV3 細胞 1 小時，再以 0.125 μM 之 CHM-1 處理 24 小時，則停留在 sub-G1 phase 之 SKOV3 細胞只剩約 5.27 % (見圖 19)。

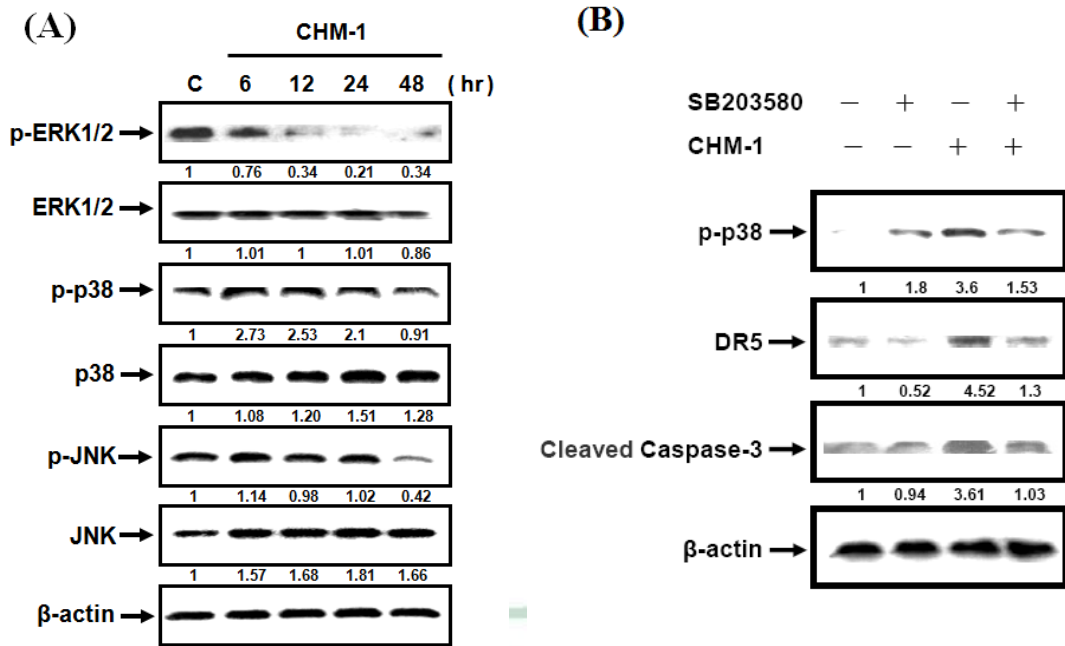


Figure 18 Expressions of MAPKs in the CHM-1-treated SKOV3 cells. (A) SKOV3 cells were treated with 0.125 μM CHM-1 for indicated durations. Cells were then harvested and lysed for detection of ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38, JNK, p-JNK, and β -actin. (B) SKOV3 cells were treated with 0.125 μM CHM-1 in the presence or absence of SB203580 (10 μM), and the expressions of p-p38, DR5, cleaved caspase-3, and β -actin were detected. Western blot data presented are representative of those obtained in at least 3 separate experiments. The values below the figures represent the changes in the protein expression normalized to β -actin.

既有文獻已證實 p38 能調控 DR5 的表現^[33]，同時相關研究指出，p38 可作用在 caspases 誘導細胞凋亡之上游或下游，且 p38 在細胞凋亡過程中所扮演的角色端視細胞和刺激之類型而定^[56, 57]。在本研究中發現，SKOV3 細胞經 CHM-1 處理 6 小時後，p38 的磷酸化程度會增加。p38 磷酸化後會緊接著觸發 caspase cascade，進而誘發人類卵巢癌 SKOV3 細胞

凋亡，由此推測 p38 誘發卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡是作用在 caspases cascade 之上游。

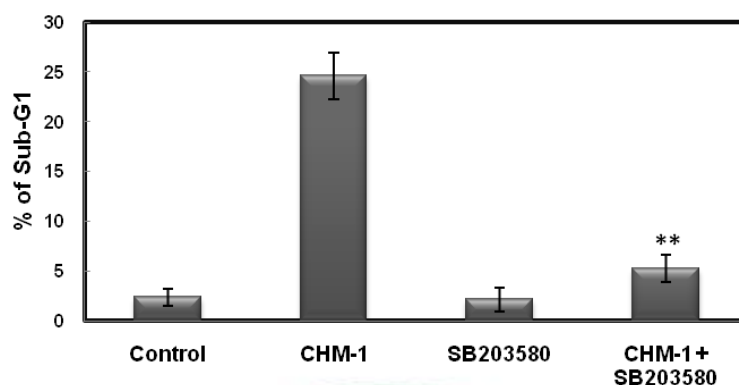


Figure 19 Flow cytometry analysis of the sub-G1 population of CHM-1-treated SKOV3 cells. Flow cytometry revealed that pre-treatment with 10 μ M SB203580 markedly reduced apoptosis among CHM-1-treated SKOV3 cells. The sub-G1 phase was identified by flow cytometric analysis in triplicate from 3 independent experiments. Data are presented as means \pm S.D. **, $P < 0.01$ versus CHM-1-treated cells not treated with SB203580.

綜合以上之實驗結果明確顯示，CHM-1 向上調節死亡接受器 5，並增強 TRAIL 蛋白質的表現，且 CHM-1 誘發細胞凋亡之分子機制，與 p38 介導上調死亡接受器 5 之表現有密切關聯。本研究首次報導 CHM-1 能藉由 DR5 轉導的調控機制誘發人類卵巢癌 SKOV3 細胞之凋亡。由 PARP (a caspase-3 substrate) 之蛋白質代謝退化 (proteolytic degradation) 指出，CHM-1 誘發人類卵巢癌 SKOV3 細胞凋亡之機制包括 caspase 的活化：CHM-1 能誘發 caspase-3 和 caspase-8 之活化，被活化的 caspase-8 會分裂並活化 caspases 之效應物，如 caspase-3 和 caspase-7，而導致細胞凋亡。

TRAIL是DR 4及DR 5相對應之配體，既有文獻報導，TRAIL能有選擇性的觸發變形癌細胞之凋亡^[29, 30]。增強TRAIL的表現，並刺激 DR 4亦或DR 5會誘發某些特定細胞株之凋亡，包括大腸癌、前列腺癌、膀胱癌和慢性淋巴球白血病^[31, 32]。近年來，許多研究亦已證實TRAIL能差異的對變形細胞和異種移植的腫瘤具有毒性，但對正常細胞幾乎沒有毒性，使得TRAIL受到許多臨床學家極大的關注，成為癌症治療的理想標的^[33-36]。

CHM-1能增強TRAIL之表現，並藉由p38介導上調DR 5，進而誘發人類卵巢癌SKOV3細胞凋亡，意謂CHM-1是一安全、有效之抗腫瘤製劑，有潛力發展成為臨床抗卵巢癌之藥物。

第二節、CHM-1 於活體內之抗腫瘤活性評估

由於卵巢癌主要局部發生於女性腹腔，以集中部位做為治療策略之化學療法，將有助於提昇其治療效果，目前許多臨床試驗已證實局部腹腔注射化療藥物能增加卵巢癌病患之存活率^[10]，NCI 亦建議手術切除腫瘤後，宜再併用 i.v 或 i.p 之化學療法^[85-88]。因此，建立一個可靠的，確實的動物異種移植模式 (xenograft model)，是藥物進入臨床試驗前，評估其治療效果的重要步驟。然而，監控腹腔疾病的發展和演變相對困難許多，傳統的抗腫瘤活性評估主要是測量腫瘤之體積和總質量，但此一方式多在達到實驗終點前即已犧牲實驗動物，如此一來將會增加實驗動物

的耗損量，也無法長期持續觀察同一動物之腫瘤發展情形。除此之外，許多腫瘤細胞會造成部分組織的細胞壞死(necrosis)或產生水腫現象(oedema)，傳統的評估方式勢必將無法做正確的評估，所以，必須應用其他不同的步驟和評估方式。

有鑑於此，為正確、有效評估 CHM-1在活體內的抗腫瘤活性，首先，我們利用傳統的評估方式，以皮下異種移植模式(subcutaneous xenograft model)，將卵巢腺癌細胞注射至female BALB/c nude mice之右腰腓，以腹腔注射(i.p)之投藥方式，分別給予不同劑量的CHM-1或CHM-1-P加以治療，藉以評估相同基本結構，不同溶解度之不同藥物是否會有相同的腫瘤抑制效果。同時，利用原位移植腫瘤模式，將卵巢癌SKOV-3 ip1/luc 細胞 (i.p) 移植至female BALB/c nude mice 腹腔，再應用生物發光影像(bioluminescent imaging) 原理，以 *in vivo* imaging system (IVIS) 監控經腹腔注射CHM-1治療的卵巢腺癌裸鼠，觀察並統計其腫瘤生長及殘存情形。另一個實驗亦應用相同之原位移植腫瘤模式，改以靜脈血管注射水溶性之CHM-1-P治療卵巢腺癌小鼠，觀察並統計卵巢腺癌小鼠之存活情形。

茲將CHM-1及CHM-1-P於活體內之抗腫瘤活性評估結果分述如下：

一、CHM-1 在 BALB/c nude mice 皮下移植腫瘤模式的抗腫瘤活性

如圖 20A 所示，CHM-1 能以濃度和時間依賴性抑制 SKOV3 腫瘤生長。腹腔注射 5 mg/kg/day 之 CHM-1，可明顯抑制 SKOV3 BALB/c nude mice 腫瘤之生長，注射劑量達 10 mg /kg/day 時，腫瘤之生長幾乎完全被抑制（見圖 20B）。在整個抗腫瘤活性實驗評估過程，實驗組和對照組小鼠的體重皆無明顯改變（見圖 20C）。

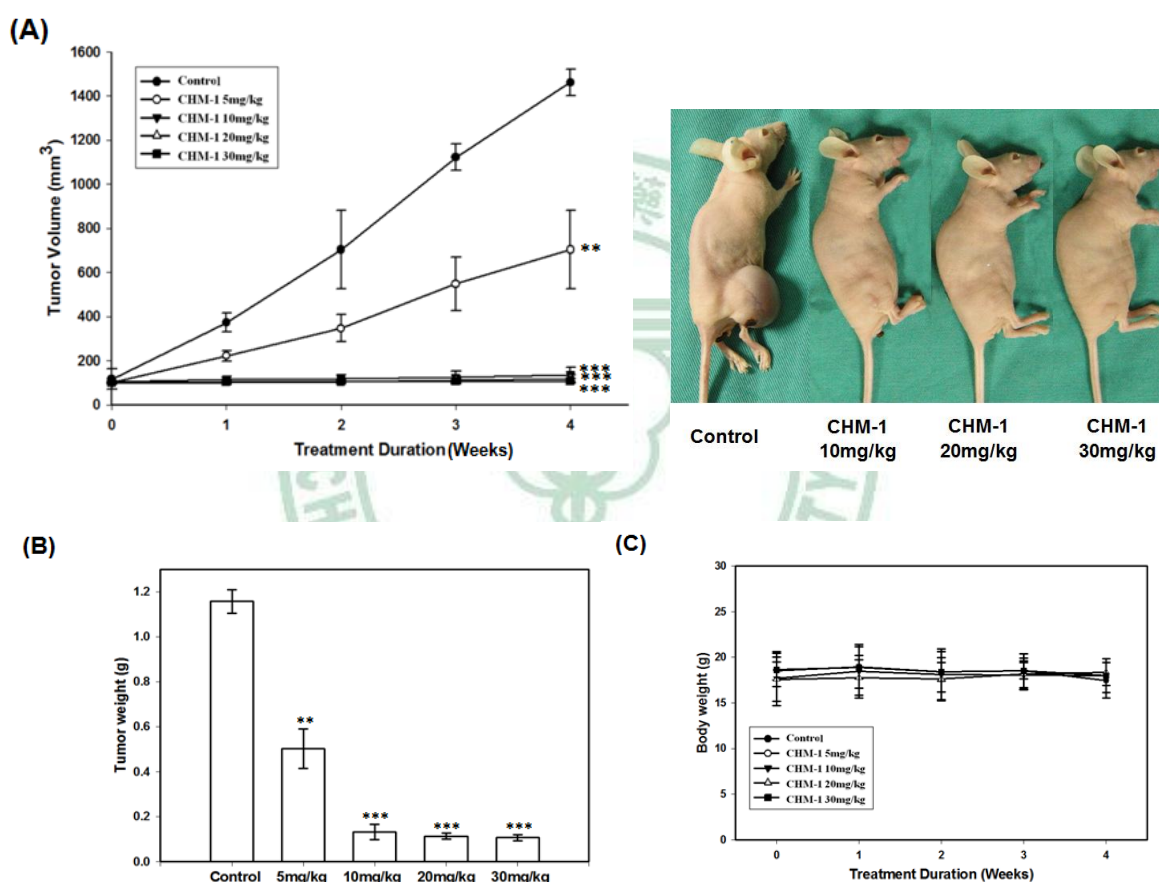


Figure 20 Effects of CHM-1 on SKOV3 tumor growth in BALB/c nude mice subcutaneous xenograft model. Female BALB/c nude mice ($n = 11$) were subcutaneously inoculated with 3×10^6 SKOV3 cells, and 5, 10, 20, and 30 mg/kg CHM-1 was then administered by i.p. injection on 5 days per week for 4 consecutive weeks. (A) Tumor volume (mm³), (B) tumor weight (g), and (C) body weight (g). Data are presented as means \pm S.D. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

二、親水性CHM-1-P在BALB/c nude mice皮下移植腫瘤模式的 抗腫瘤活性

CHM-1 存在有相對低水溶解度之問題，以往的動物實驗也因此受限只能藉由腹腔注射投藥，本實驗室現已成功合成 CHM-1 之水溶性磷酸鹽 (CHM-1-P)，大幅提升對水之溶解度。為評估 CHM-1-P 在活體內的抗腫瘤活性，再次應用相同之皮下異種移植模式，以腹腔注射(i.p)投藥方式，分別給予不同劑量的 CHM-1-P 加以治療。如圖 21 所示，CHM-1-P 亦能以依賴濃度和時間之方式抑制腫瘤生長。以腹腔注射 5 mg/kg/day 之 CHM-1-P 即可明顯抑制 SKOV3 腫瘤之生長，注射劑量達 10 mg/kg/day 時，腫瘤生長幾乎完全被抑制 (見圖 21A, B)。在實驗評估過程中，實驗組或對照組之小鼠，體重皆無明顯改變(見圖 21C)。

由 SKOV3 BALB/c nude mice 皮下移植 SKOV3 腫瘤實驗結果指出，CHM-1 和其水溶性磷酸鹽(CHM-1-P)皆具有強效的抗腫瘤活性。此實驗結果證實，CHM-1-P 能在 SKOV3 腫瘤細胞以外之區域，如血液及胃腸道中，受鹼性磷酸酶之作用而去磷酸化，快速生物轉換(bio-conversion)成原母分子，且能以高濃度、有選擇性地蓄積在腫瘤病灶，因而與其母分子 CHM-1 具有相同的抗腫瘤效力，是安全、有效的抗腫瘤藥物。

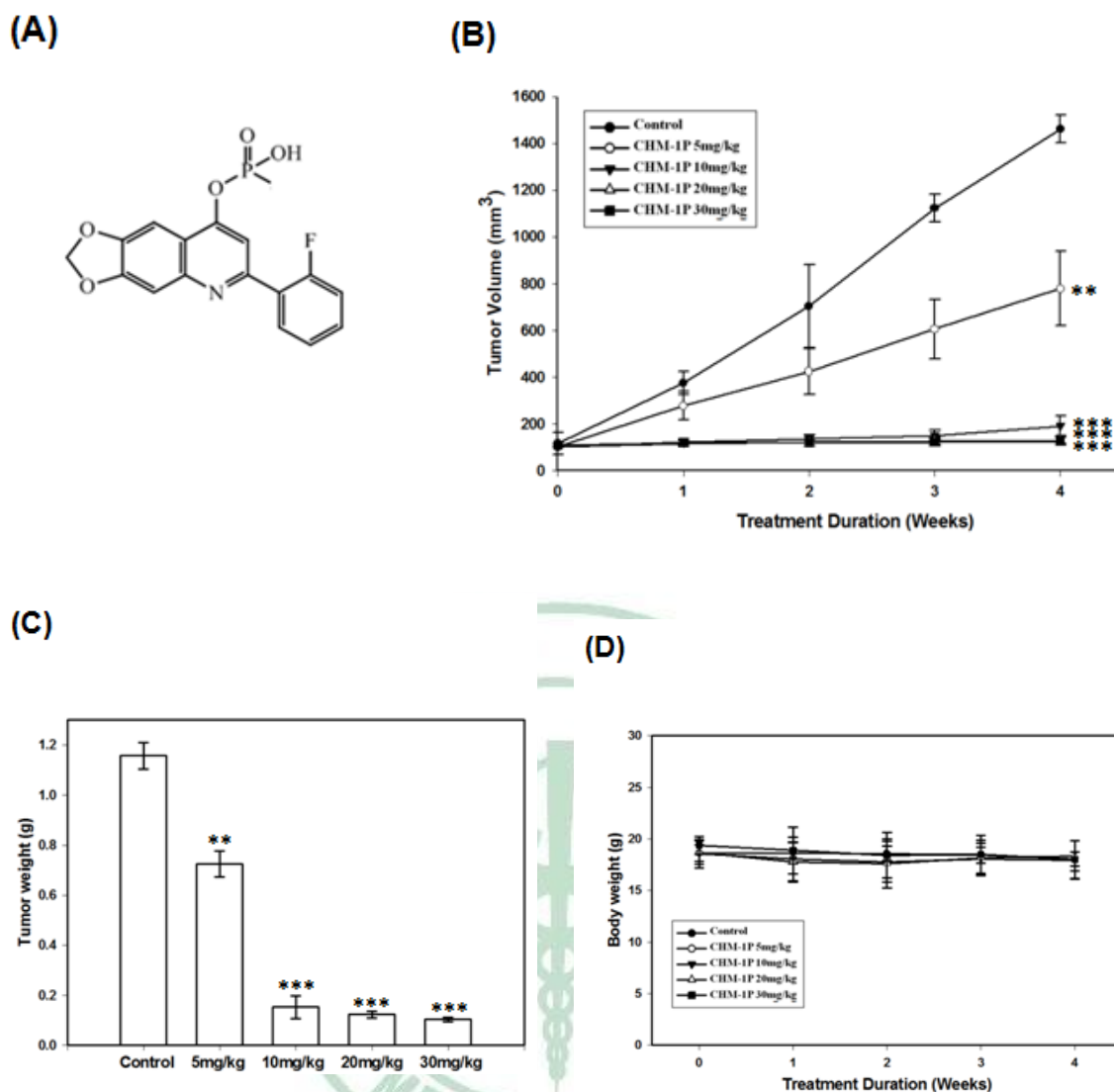


Figure 21 Effects of hydrophilic CHM-1-P on SKOV3 tumor growth in BALB/c nude mice subcutaneous xenograft model. (A) Structure of CHM-1-P. (B) Mean tumor volume-time profiles in SKOV3 xenograft nude mice ($n=11$) following *i.p.* injection of 5, 10, 20 and 30 mg/kg CHM-1-P once a day for 4 consecutive weeks. (C) Tumor weight (g), (D) body weight (g). Data are presented as means \pm S.D. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.001$.**

三、CHM-1 抑制原位移植 SKOV3 ip1/luc nude mice 腫瘤生長 並延長存活期

生物發光影像(bioluminescent imaging)技術近來已廣泛應用於追蹤腫瘤之發展狀態，具有快速、非侵入性的優點，使用於偵測有代謝活性的活腫瘤細胞，在回應化學療法之監控應用相對顯得重要^[88, 89]。然而，生物發光影像技術應用於卵巢癌的相關研究報告並不多，尤其是針對以 i.p. 投藥途徑的卵巢癌治療。因此，我們穩定的將螢火蟲之螢光酶基因 (firefly luciferase gene)轉染(transfected)至卵巢癌SKOV3 ip1細胞，利用生物發光影像技術評估經腹腔注射CHM-1治療卵巢癌之功效。

如圖 22A 所示，CHM-1以依賴濃度和時間方式抑制 SKOV3 ip1/luc 腫瘤之生長。腹腔注射15 mg/kg/day之CHM-1可明顯抑制卵巢腺癌小鼠腫瘤之生長，注射劑量達30 mg/kg/day時，腫瘤之生長幾乎完全被抑制 (見圖22B)。經15 mg/kg/day 和30 mg/kg/day CHM-1治療之卵巢腺癌裸鼠，平均壽命分別延長137%和161% (見圖22C)。

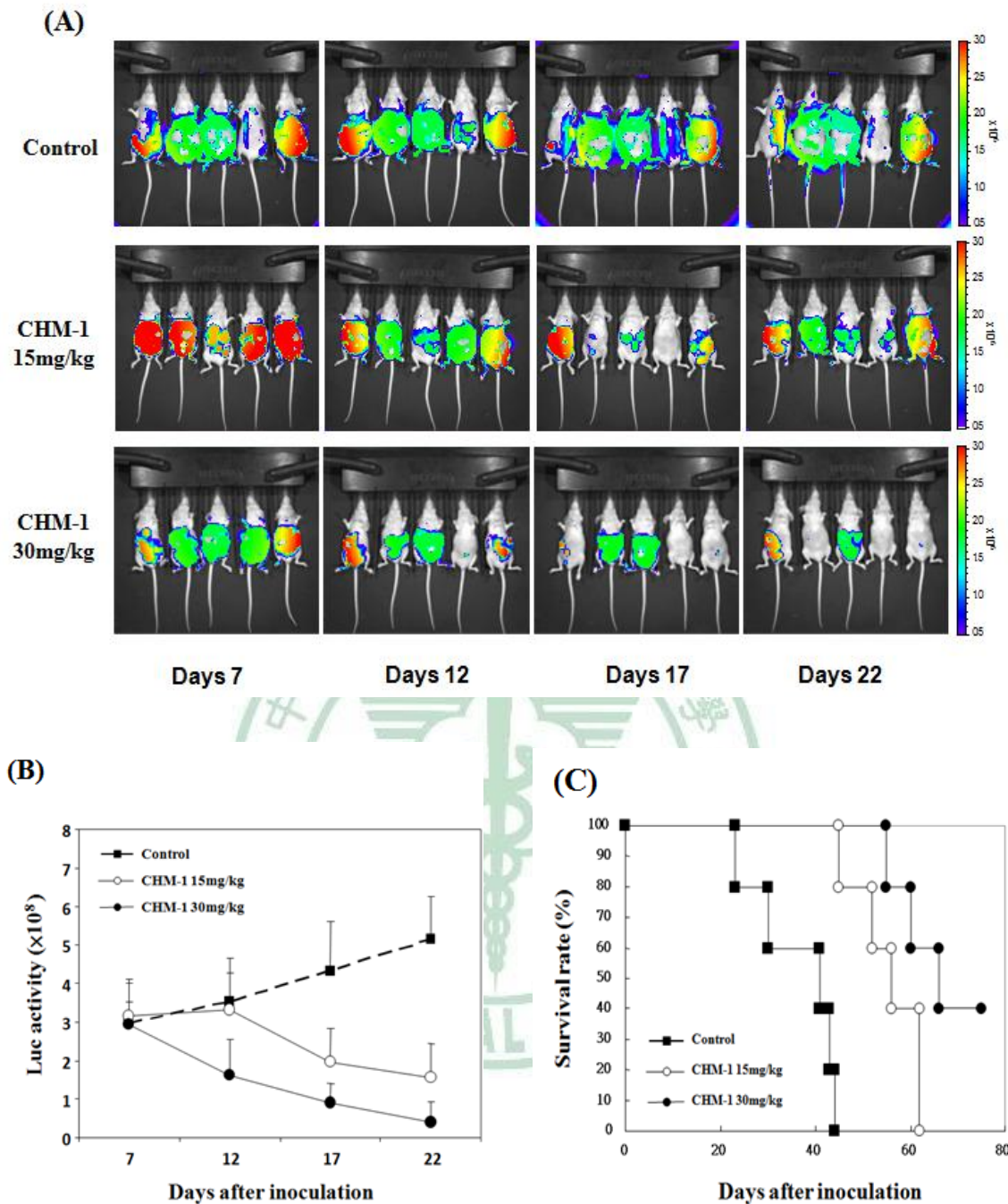


Figure 22 CHM-1 inhibits SKOV3 ip1/luc tumor orthotopic xenograft growth in athymic nude mice. *Nu/Nu* mice ($n=5$) were inoculated with 3×10^6 SKOV3 ip1/luc cells by i.p. injection. After 1 week, CHM-1 (15 and 30 mg/kg) was administered by i.p. injection on alternate days. (A) Monitoring of tumor volume by in vivo imaging system (IVIS; Xenogen; Alameda, CA). (B) Tumor volume quantification after drug treatment. (C) Ratio of animal survival.

四、靜脈注射 CHM-1-P 明顯延長原位移植 SKOV3 ICR-Foxn1 nude mice 之存活期

由皮下移植腫瘤模式的實驗結果指出，CHM-1-P 能明顯的抑制 SKOV3 腫瘤之生長，因此委託國家衛生研究院進一步以原位移植卵巢癌 SKOV3 細胞模式，測試 CHM-1-P 對 ICR-Foxn1/nu SKOV3 tumor-bearing mice 存活時間之影響。實驗結果如圖 23 所示，經靜脈血管注射 10 次 CHM-1-P (10 和 20 mg/kg) 治療的卵巢癌小鼠，相較於對照組，其存活時間明顯延長，平均存活率分別提昇達 142% 和 150%。

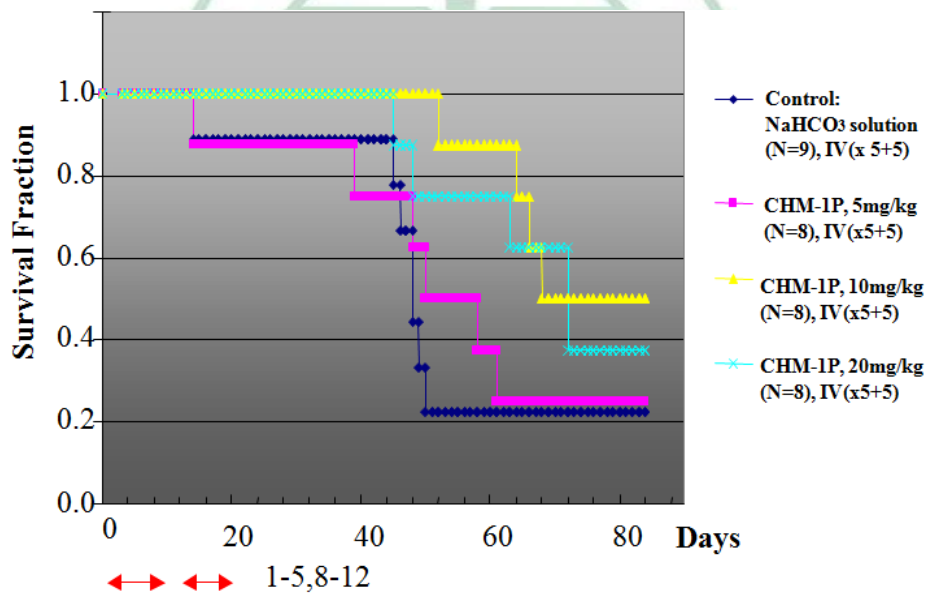


Figure 23 CHM-1-P prolongs the survival time of SKOV3/ICR-Foxn1/nu orthotopic xenograft model. Female nude mice (ICR-Foxn1/nu) were *i.p.* inoculated with human ovarian cancer SKOV3 cells at 3×10^6 cells per mice. After 1 week, the tumor-bearing mice were administered 5, 10, and 20 mg/kg CHM-1-P intravenously via the tail vein on 5 days per week for 2 consecutive weeks. Each value represents the survival ratio of the animals.

第四章 結論

CHM-1 對人類卵巢癌細胞有明顯的抗腫瘤活性，本研究主論述其抗腫瘤作用之生化和藥理活性機制。由實驗發現 CHM-1 能以濃度依賴的方式抑制多種不同癌症之細胞株，尤其是對人類卵巢癌 SKOV3 細胞之毒殺作用最強，但對人類正常二倍體皮膚纖維原 Detroit-551 細胞之細胞毒性則相對較弱，此結果初步指出 CHM-1 是安全、強效的治療卵巢癌藥劑。

本研究為首次報導 CHM-1能藉由DR5介導的調控機制誘發人類卵巢癌SKOV3細胞之凋亡，主要根據如下之發現：1. CHM-1能誘發caspase-8之活化；2. CHM-1能誘發DR5 和TRAIL之表現。由PARP 之蛋白質代謝退化(Proteolytic degradation) 指出，CHM-1誘發人類卵巢癌SKOV3細胞之凋亡之機制包括caspase的活化。CHM-1能誘發caspase-3和caspase-8之活化，被活化的caspase-8會分裂並活化caspases之效應物，如caspase-3和caspase-7，而誘導細胞凋亡。既有文獻證實p38能調控DR5的表現^[33]，本研究發現，SKOV3細胞經CHM-1處理6小時後，p38的磷酸化程度會增加，p38磷酸化後會緊接著觸發caspase cascade的活化，由此推測在卵巢癌SKOV3細胞，p38應是作用於caspase cascade之上游。根據以上之發現明確的指出，CHM-1上位調節死亡接受器5之表現，並誘導TRAIL的表現，且CHM-1誘發細胞凋亡之分子機制，與p38居間上位調節死亡接受器5之表現有密切關聯，因此，CHM-1有潛力成為治療癌症的理想藥物。

由於卵巢癌主要局部發生於女性腹腔，臨床表現也相當獨特，傳統的測量腫瘤總質量之藥物抗腫瘤活性評估方法，並無法做正確的評估。有鑑於此，我們除應用傳統的皮下移植 SKOV3 腫瘤模式之外，還應用原位移植腫瘤模式，以期對 CHM-1 在活體內的抗腫瘤活性做正確的評估。皮下移植腫瘤模式之實驗結果指出，CHM-1 和 CHM-1-P 具有相同的抗腫瘤效力，是安全、有效的抗腫瘤藥物。應用 IVIS 監控之原位移植腫瘤模式指出，CHM-1(i.p) 除能抑制 SKOV3 ip1/luc BALB/c nude mice 之腫瘤生長外，並能延長卵巢腺癌小鼠之壽命。以靜脈注射 CHM-1-P (i.v) 治療經原位移植腫瘤之 ICR-Foxn1/nu mice，CHM-1-P 亦能明顯增加 SKOV3 tumor-bearing mice 之存活期。

綜合以上的發現，證實CHM-1具有獨特之誘發SKOV3細胞凋亡的生化和藥理活性機制，在活體內CHM-1和親水性之CHM-1-P同樣展現良好的抗腫瘤活性，因此，值得進一步臨床試驗評估，以發展成為治療人類卵巢癌之理想藥物。

第五章 實驗部分

第一節 標的化合物之來源及合成方法

一、化合物來源

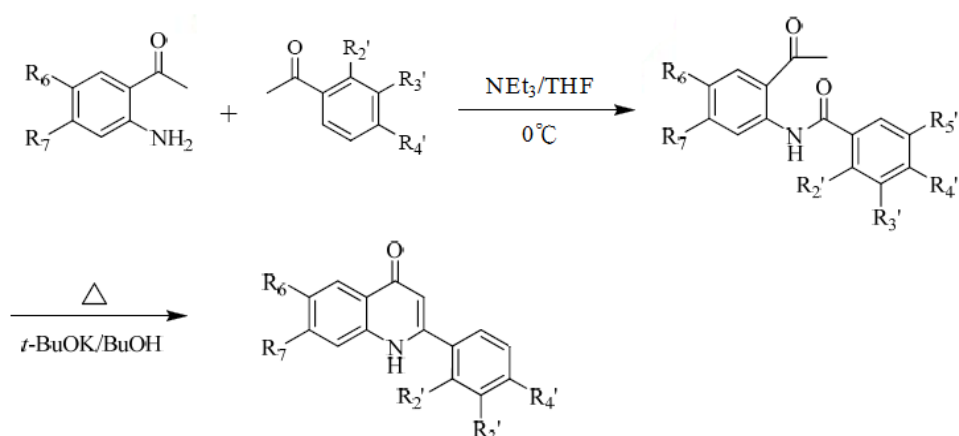
2-芳香基-6, 7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物(2-(substituted phenyl) 6, 7-methylenedioxy-4-quinolones)及CHM-1-P由業師郭盛助講座教授提供，合成於本校藥物化學研究所。

二、2-芳香基-6, 7-亞甲二氧基-4-喹啉酮衍生物之合成方法

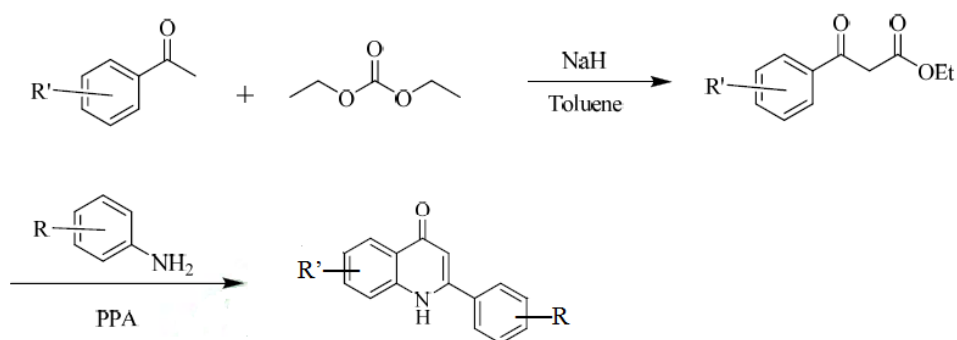
本實驗室對於2-PQs之研究已有多年經驗，至今已成功合成數百個不同取代官能基的化合物，其合成方法也因取代基之不同而稍有差異，歸納約有五類常用之合成方法，本研究之標的化合物其合成途徑主要參照其中之2個合成方法 (**Scheme 1** 和 **Scheme 2**)。如**Scheme 1** 所示^[63]：以 substituted 6-aminoacetophenone及 substituted benzoyl chloride作為起始原料，以 triethylamine (NEt₃)當作鹼，於0℃進行接合反應。反應所得的中間產物再與 potassium *tert*-butoxide (*t*-BuOK)，在70℃進行反應，經縮合及環化反應即可得到CHM-1及其他2-PQs。

如**Scheme 2** 所示^[64]：本方法為方法一的改良方法，先以 substituted acetophenone 與 diethyl carbonate 於強鹼下反應得到 substituted β -ketoester。接著將 substituted β -ketoester在 polyphosphoric acid (PPA) 中與

substituted aniline於130°C 進行反應，經環化後可得到2-PQs產物。



Scheme 1 The synthesis of 2-(substituted phenyl) 6,7-methylenedioxy-4-quinolones [I] ^[63].

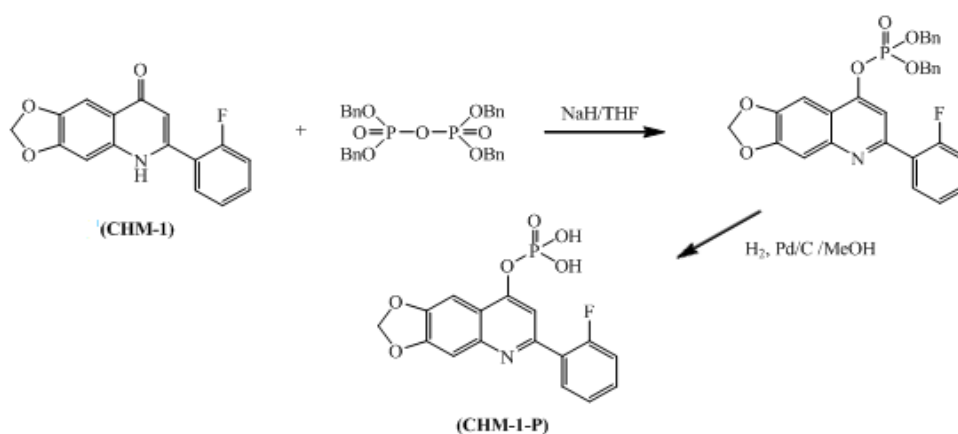


Scheme 2 The synthesis of 2-(substituted phenyl) 6,7-methylenedioxy-4-quinolones [II] ^[64].

三、CHM-1-P 之合成方法

標的化合物 2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxy-quinolin-4-yl dihydrogen phosphate (CHM-1-P) 之合成途徑係參照1999年 Claude Guillonnet 等學者所提之方法^[91]而擬定。如 **Scheme 3**所示：以化合物 CHM-1為起始原料，THF為溶劑，在NaH強鹼存在下與 tetrabenzyl

pyrophosphate 進行取代反應，經管柱層析純化後可得產率 80 % 之白色固體化合物。將此白色固體化合物於 Pd/C存在下，以甲醇為溶媒，利用氫氣進行debenzylation後，得到產率95% 之CHM-1-P化合物。CHM-1-P為白色粉狀固體化合物，熔點(mp) >300°C。



Scheme 3 The synthesis of 2-(2-fluorophenyl)-6, 7-methylenedioxy-quinolin-4-yl dihydrogen phosphate (CHM-1-P) [74].

第二節、藥理實驗材料

一、細胞來源：American Type Culture Cancer (ATCC; Manassas, VA)

二、藥品試劑：

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)-凍細胞用，購自 Sigma (USA)
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO)-溶藥用，購自 Riedel-de Haen (Germany)
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO)-溶結晶用，購自 J.T.Baker (USA)
4. DMEM medium powder (Dulbecco's Modified Eagle Medium)，購自 Gibco (USA)

5. DMEM/F12 medium powder (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture with F12 (Han) (1:1)), 購自 Gibco (USA)
6. Fetal bovine serum (FBS), 購自 Gibco (USA)
7. Penicillin Streptomycin (PS), 購自 Gibco (USA)
8. Dulbecco's Phosphate-buffered saline powder (DPBS), 購自 Gibco (USA)
9. Sodium bicarbonate (NaHCO_3), 購自 Sigma (USA)
10. Trypsin-EDTA, 購自 Gibco (USA)
11. Ethanol, 購自 ECHO 景明化工 (Taiwan, R.O.C)
12. Methanol, 購自 ECHO 景明化工 (Taiwan, R.O.C)
13. Sodium hydroxide (NaOH), 購自 Riedel-deHaen (Germany)
14. Sodium chloride (NaCl), 購自 J.T.Baker (USA)
15. 30% Acrylamide/ Bis bis solution (ACRYL/ BIS 37.5 : 1), 購自 BIO BASIC INC. (USA)
16. Ammonium persulfate (APS), 購自 Sigma (USA)
17. Sodium dodecyl sulfate (SDS), 購自 Sigma (USA)
18. TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine), 購自 Sigma (USA)
19. Tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl (Tris-HCl), 購自 J.T.Baker (USA)
20. Tween 20, 購自 Sigma (USA)

21. Bovine serum albumin (BSA) , 購自 Sigma (USA)
22. Protein Marker , 購自 Fermentas (EU)
23. Chemiluminescent-HRP substrate (ECL) , 購自 MILLIPORE (USA)
24. Formalaldehyde , 購自 MERCK (Germany)
25. Triton X-100 , 購自 Sigma (USA)
26. Propidium iodide (PI) , 購自 Sigma (USA)
27. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheny tetrazolium bromide (MTT) ,
購自 BIO BASIC INC. (USA)
28. Cycloheximide , 購自 Sigma (USA)
29. actinomycin D , 購自 Sigma (USA)
30. poly(ADP)ribose polymerase (PARP), cleaved caspase-3, caspase-8,
caspase-9, Fas/CD95, TRAIL, DR4, DR5, ERK1/2, JNK, and p-JNK , 購
自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)
31. p-ERK1/2, p38, and p-p38 and anti-mice and anti-rabbit antibodies
conjugated to horseradish peroxidase , 購自 Santa Cruz Biotechnology
(Santa Cruz, CA)
32. SB203580 , 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

三、儀器設備

1. Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) , 購自
Bio-Tek (USA)

2. Flow Cytometry (流式細胞儀)，購自 BD (USA)
3. Confocal Microscope Detection System(雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡)，購自 Leica (Germany)
4. Phase-contrast microscopy，購自 ZEISS (Germany)
5. 光學顯微鏡，購自 NIKON (Japan)
6. 去離子水製造機，購自 MILLIPORE (USA)
7. 酸鹼值測定計，購自 Consort (UK)
8. 梯度型聚合酶連鎖反應器，購自 eppendorf (USA)
9. 無菌操作台，購自 造鑫企業有限公司 (Taiwan, R.O.C.)
10. 離心機，購自 eppendorf (USA)
11. 細胞培養皿，購自 Corning (USA)
12. 冷凍管，購自 Corning (USA)
13. 細胞計數器，購自 MARIENFELD (Germany)
14. 微量離心管，購自 GeneDirex (USA)
15. 電源供應器，購自 Thermo (USA)
16. SDS-PAGE電泳槽套組，購自 Bio-Rad (USA)
17. Vortex-genie2，購自 Scientific Industries (USA)

第三節、藥理實驗方法

一、細胞培養 (Cell culture)

Hep3B、SKOV3及 SKOV3 ip1 細胞培養於 DMEM/F12培養基；人類正常二倍體的皮膚纖維原細胞(human diploid skin fibroblast cells, Detroit -551) 培養於DME培養基，含10% FBS (fetal bovine serum; Invitrogen Carlsbad, CA) 及1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Carlsbad, CA)；PC-3、HCT116和H460培養於RPMI-1640 medium，內含 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate及4.5 g/L glucose。培養液內加入10% fetal bovine serum (FBS) 及1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Carlsbad, CA)。細胞培養於37°C濕潤含5% CO₂的細胞培養箱中。每隔48小時 (or reached 80% confluence)以0.25% trypsin-EDTA (0.05% trypsin與2.5mM EDTA) 將細胞打散，再將細胞分種於新的75 cm²培養皿中。

二、細胞存活率分析 (MTT assay)

細胞存活率分析之原理如下：MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)進入細胞內而被粒線體內膜上的琥珀酸去氫酶(Succinate dehydrogenase)還原，生成紫色針狀formazan結晶，不溶於水；因為只有在活細胞中之粒線體才具有此作用，因此只有活細胞才會生成結晶。在結晶完全形成之後，再用DMSO溶出結晶，用595 nm的波

長在ELISA reader 讀取吸光值。

細胞以 1.5×10^4 /well 種於24孔/盤中，於指定時間週期，分別給予各種不同濃度之欲測定藥物進行體外細胞毒性試驗，當給藥程序結束後，將細胞取出加入MTT試劑（MTT 2mg/ml 溶於PBS中）反應4小時待結晶形成，將24孔盤中的培養液與試劑吸乾，加入500 μ l之0.04 N HCl 溶解結晶，取200 μ l溶解液轉移至96 孔/盤，以570 nm之波長在ELISA reader 下讀取吸光值，再以各實驗組平均值與對照組之比值作生長曲線圖，求出生長抑制百分比。

三、流式細胞儀分析 (FACScan flow cytometric analysis)

原理：

Propidium iodide (PI)是一種核酸染劑，當細胞死亡時會進行壞死或細胞凋亡的路徑。死亡的細胞膜會失去完整性，使得PI可進入細胞內與核酸結合，PI會與DNA雙股螺旋中之A=T, C≡G 鍵結的氫鍵接在一起。存活的細胞因其細胞膜完整，PI無法和細胞內的核酸結合，經PI染色完成的細胞可由流式細胞計數儀於 488 nm的雷射光激發後，死亡的細胞會呈現較強紅色螢光，存活細胞會成較弱的紅色螢光，以 Cell Quest 軟體分析細胞存活率。

實驗步驟：

細胞(2×10^5 /well)種植於培養皿中，經過 24 小時靜置培養後，待細胞

貼附後加入不同濃度的藥物，分別持續培養 12、24、48 及 72 小時。加藥時間後，收細胞，將上層液移至離心管中，加入 PBS 清洗細胞一次後，再將細胞以 trypsin 處理，置於 37°C 培養箱中處理 2 分鐘後，將細胞打下來，加入 1 ml PBS 以中和 trypsin 之作用，再將所有液體裝到離心管中，1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再加入 1 ml PBS 清洗細胞，1500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 PI 染劑 350 μ l，均勻混合後，transfer 至 FACS 管中，以流式細胞儀進行樣品分析。

四、西方墨點法 (Western blot Analysis)

細胞 (1.5×10^6) 分別接種到 100 毫米組織培養皿中，內含 10% FBS 的 DMEM/F12 培養液，培養 24 小時後，細胞在 10% FBS DMEM/F12 培養液中加入不同試劑，繼續培養。經處理後，將細胞放置在冰上，用冷 PBS 洗淨，並溶解在 lysis buffer，西方墨點分析操作方法如前述^[92]；帶狀物之明暗度，以 NIH image software 掃描及定量。

五、體內抗腫瘤活性評估 (*In vivo* studies)

實驗動物自由進食和飲水，實驗程序獲得國家衛生研究院 Animal Care and Use Committees 之認可。

(A) 卵巢腺癌細胞 SKOV-3 (3×10^6 ; in 0.5 mL PBS via a 24-gauge needle) 以皮下移植腫瘤模式，注射至 female BALB/c nude mice (18-20 g; 6-8

weeks of age)之右腰腓。腫瘤生長至約 100 立方毫米時，隨機將 110 隻小鼠分成 10 組(n=11)，分別以腹腔注射 (intraperitoneal injection; i.p) CHM-1 或 CHM-1-P (10 mg/kg, 20 mg/kg, 及 30 mg/kg)，一週三次，連續四周。給藥實驗過程中，每週測量小鼠之體重及腫瘤體積，腫瘤大小之測量利用電子尺(calipers)，再以 $1/2 (L \times W^2)$ 之公式計算腫瘤體積，其中 L 為長、W 為寬。實驗小鼠犧牲後(利用二氧化碳及頸椎錯位使其安樂死)，切除腫瘤、秤重及切片，腫瘤切片包埋於 OCT，於 -70°C 冰凍保存。

(B)利用原位移植腫瘤模式(orthotopic xenograft model)，以腹腔注射 (i.p)之方式將 3×10^6 卵巢癌 SKOV-3 ip1/luc 細胞植入 female BALB/c nude mice (18-20 g; 6-8 weeks of age)體內，待7天過後，隨機將小鼠分成3組，每組5隻(n=5)。以腹腔注射的方式，每隔一天分別給予一次不同劑量之 CHM-1 治療(15 or 30mg/kg)。利用 *in vivo* imaging system (IVIS; Xenogen, Alameda, California) 監控實驗小鼠腫瘤之生長情形，當出現第一隻小鼠死亡時，停止監控與給藥。停藥後仍持續統計並記錄卵巢癌小鼠的存活率。存活率之公式計算利用 $T/C \% = (\text{MST of drug-treated group} / \text{MST of control group}) \times 100\%$ ；(T)為治療組之MST (median survival time)、(C)為控制組之MST。

(C)卵巢腺癌細胞 SKOV-3 (3×10^6 ; in 0.5 mL PBS via a 24-gauge needle) 以腹腔注射方式，原位移植於已成熟的 ICR-Foxnl/nu mice，於一周後隨

機將39隻小鼠分成4組，分別由小鼠尾巴靜脈血管，以24-gauge needle 注射 5 mg/kg, 10 mg/kg,及20 mg/kg 之CHM-1-P，或施與賦形劑 (vehicle；9% NaHCO₃ aqueous solution)，一天一次，一週五次，連續注射給藥2周。實驗過程中，每周測量二次小鼠之體重，並統計卵巢腺癌小鼠之存活情形。實驗結束後，犧牲(利用二氧化碳及頸椎錯位使其安樂死)殘存之實驗小鼠，存活率以T/C % = (MST of drug-treated group/MST of control group) × 100%之公式計算：(T)為治療組之MST (median survival time)、(C)為控制組之MST。

六、統計分析

實驗結果以平均值標準差(mean ± SD)表示，使用 ANOVA(單因子變異分析)來決定實驗組與對照組之差異。*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ ， p 值小於 0.05 以下時，則具統計意義。

參考文獻

- (1) Evan GI, Vousden KH. Proliferation. Cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411:342-348.
- (2) Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004; 432(18):316-323.
- (3) 行政院衛生署統計室「99年死因統計結果」2011.06.15.
- (4) 民國99年癌症登記報告；行政院衛生署國民健康局，癌症防治組。
- (5) 行政院衛生署「國家癌症防治五年計畫成果別冊」。
- (6) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer, *Cell* 2000; 100:57-70.
- (7) Boyle P, Levin B. World cancer report IARC/WHO 2008.
- (8) Permuth-Wey J, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 472:413-437.
- (9) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao YP, Xu JQ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:225-249.
- (10) Ozols RF. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. *Ann Oncol* 2006; 17:181-187.
- (11) Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, Reed H, Ellenson LH, Giordano TJ, Fearon ER, Hanash SM, Cho SK. Gene expression in

ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas.

Cancer Res 2002; 62:4722-4729.

- (12) Yusuf RZ, Duan Z, Lamendola DE, Penson RT, Seiden MV. Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation.

Curr Cancer Drug Targets 2003; 3:1-19.

- (13) Lau KM, MOK SC, HO SM. Expression of human estrogen receptor- α and- β , progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 22:5722-5727.

- (14) Chen RH. Dual inhibition of Cdc20 by the spindle checkpoint. *J Biomed Sci* 2007; 14:475-479.

- (15) D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell Cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res* 2004; 10:8132-8141.

- (16) Fu YF, Ye DF, Chen HZ, Lu WG, Ye F, Xie FX. Weakened spindle checkpoint with reduced BubR1 expression in paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cell line SKOV3-TR30. *Gynecol Oncol* 2007; 105:66-73.

- (17) Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rocheport H, Clinton GM. SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and anti-estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 55:279-289.
- (18) Chang XH, Zhang Li, Yang R, Feng J, Cheng YX, Cheng HY, Ye X, FU TY and Cui H. Screening for genes associated with ovarian cancer prognosis. *Chin Med J* 2009; 122:1167-1172.
- (19) Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68:29-43.
- (20) Saikumar P and Venkatachalam MA. Apoptosis and cell death. *Basic concepts of molecular pathology*, molecular pathology library 2 2009; 29-40.
- (21) Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25:4798-4811.
- (22) Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407:789-795.
- (23) Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219.

- (24) Bhardwaj A, Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 2003; 23:317-332.
- (25) Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005; 118:265-267.
- (26) Maria EG, Gregory JG. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009; 23:1625-1637.
- (27) Peter ME and Krammer PH. The CD 95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10:26-35.
- (28) Kelley RF, Totpal K, Stephanie H. Lindstrom SH, Mathieu M, Billeci K, DeForge L, Pai R, Hymowitz SG, Ashkenazi A. Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem* 2005; 280:2205-2212.
- (29) Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor super-family. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:420-430.
- (30) Hall MA and Cleveland JL. Clearing the TRAIL for cancer therapy. *Cancer Cell* 2007; 12:4-6.
- (31) Kabore AF, Sun J, Hu X, McCrea K, Johnston JB, Gibson SB. The

TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis* 2006; 11:1175-1193.

- (32) Johnson TR, Stone K, Nikrad M, Yeh T, Zong WX, Thompson CB, Nesterov A, Kraft AS. The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene* 2003; 22:4953-4963.
- (33) Yodkeeree S, Sung B, Limtrakul P, Aggarwal BB. Zerumbone enhances TRAIL-induced apoptosis through the induction of death receptors in human colon cancer cells: Evidence for an essential role of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2009; 69:6581-6589.
- (34) Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104:155-162.
- (35) Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak, B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley

- SS, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 2001; 7:383-385.
- (36) Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5:157-163.
- (37) Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:333-339.
- (38) Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:501-507.
- (39) Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85:817-827.
- (40) Liu X, Yue P, Zhou Z, Khuri FR, Sun SY. Death receptor regulation and Celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1769-1780.
- (41) Jin F, Liu X, Zhou Z, Yue P, Lotan R, Khuri FR, Chung LW, Sun SY. Activation of nuclear factor- κ B contributes to induction of death

receptors and apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in DU145 human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:6354-6363.

- (42) Kim H, Kim EH, Eom YW, Kim WH, Kwon TK, Lee SJ, Choi, KS. Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-resistant hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of DR5. *Cancer Res* 2006; 66:1740-1750.
- (43) Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3:255-263.
- (44) Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50:343-352.
- (45) Shah M and Schwartz G. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 7:2168-2181.
- (46) Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219.
- (47) Budihardjo I, Oliver H, Lutter M. Biochemical pathway of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:269-290.

- (48) Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochem Sci* 2001; 26:390-397.
- (49) Kumar S, Jeffrey Boehm J, Lee JC. P38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:717-726.
- (50) Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23:2838-2849.
- (51) Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26: 3100.
- (52) Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153-183.
- (53) Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. *Biochem J* 2010; 429:403-417.
- (54) Han J, Sun P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(8): 364-371.
- (55) Hui L, Bakiri L, Stepniak E, and Wagner EF. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 2007; 6: 2429-2436.
- (56) Zarubin T, Han JH. Activation and signaling of the p38 MAP kinase

pathway. *Cell Res* 2005; 15:11-18.

(57) Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:537-549.

(58) Adams M, Wube AA, Bucar F, Bauer R, Kunert O, Haslinger E. Quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa*: a potent new group of anti-mycobacterial compounds. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26:262-264.

(59) Adams M, Kunert O, Haslinger E, Bauer R. Inhibition of leukotriene biosynthesis by quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med* 2004; 70:904-908.

(60) Lee MK, Hwang BY, Lee SA, Oh GJ, Choi WH, Hong SS, et al. 1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone as an irreversible and selective inhibitor of type B monoamine oxidase. *Chem Pharm Bull* 2003; 51:409-411.

(61) Kuo SC, Lee HZ, Juang JP, Lin YT, Wu TS, Chang JJ, Lendnicer D, Kenneth PD, Lin CM, Hamel E, Lee KH. Synthesis and cytotoxicity of 1, 6, 7, 8-substituted-2-(4'-substituted phenyl)-4-quinolones and related compounds: identification as antimitotic agents interacting with tubulin. *J Med Chem* 1993; 36:1146-1156.

- (62) Li L, Wang HK, Kuo SC, Wu TS, Mauger AA, Lin CM, Hamel E, Lee KH. Antitumor agents. 150. 2', 3', 4', 5', 5, 6, 7-Substituted 2-phenyl-4-quinolones and related compounds: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. *J Med Chem* 1994; 37:1126-1135.
- (63) Li L, Wang HK, Kuo SC, Wu TS, Mauger AA, Lin CM, Hamel E, Lee KH. Antitumor agents. 155. Synthesis and biological evaluation of 3', 6, 7-substituted 2-phenyl-4-quinolones as microtubule agents. *J Med Chem* 1994; 37:3400-3407.
- (64) Chen K, Kuo SC, Hsieh MC, Mauger AA, Lin CM, Hamel E, Lee KH. Antitumor agents. 174. 2', 3', 4', 5, 6, 7-Substituted 2-phenyl-1, 8-naphthyridin-4-ones: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. *J Med Chem* 1997; 40:2266-2275.
- (65) Chen K, Kuo SC, Hsieh MC, Mauger AA, Lin CM, Hamel E, Lee KH. Antitumor agents. 178. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-aryl-1, 8-naphthyridin-4(1H)-ones as antitumor agents that inhibit tubulin polymerization. *J Med Chem* 1997; 40:3049-3056.
- (66) Xia Y, Yang ZY, Xia P, Bastow K F, Taxhibana Y, Kuo SC, Hamel E, Hackl T, Lee KH. Antitumor agents: Synthesis and biological evaluation of 6, 7, 2', 3', 4'-substituted-1, 2, 3, 4-tetrahydro-2-phenyl -4-quinolones

as a new class of antimetabolic antitumor agents. *J Med Chem* 1998; 41:1155-1162.

(67) Zhang SX, Bastow KF, Tachibana Y, Kuo SC, Hamel R, Mauger A, Narayanan VL, Lee KH. Antitumor agents. 196. Substituted 2-thienyl-1, 8-naphthyridin-4-ones: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. *J Med Chem* 1999; 42:4081-4087.

(68) Zhang SX, Feng J, Kuo SC, Brossi A, Hamel E, Tropsha A. Antitumor agents. 199. Three dimensional quantitative structure-activity relationship study of the colchicines binding site ligands using comparative molecular field analysis. *J Med Chem* 2000; 43:167-176.

(69) Hour MJ, Huang LJ, Kuo SC, Xia Y, Bastow K, Nakanishi Y, Hamel E, Lee KH. 6-Alkylamino- and 2, 3-dihydro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinazolinones and related compounds: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. *J Med Chem* 2000; 43:4479-4487.

(70) Xia Y, Yang ZY, Xia P, Hackl T, Hamel E, Mauger A, Wu JH, Lee KH. Antitumor agents. 211. Fluorinated 2-phenyl-4-quinolone derivatives as antimetabolic antitumor agents. *J Med Chem* 2001; 44:3932-3936.

(71) Xia Y, Yang ZY, Hour MJ, Kuo SC, Xia P, Bastow K, Nakanishi Y,

Nampoothiri P, Hackl T, Hamel E, Lee KH. Antitumor agents. Part 204: Synthesis and biological evaluation of substituted 2-aryl quinazolinones. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11:1193-1196.

(72) Lai YY, Huang LJ, Lee KH, Xiao ZY, Bastow KF, Yamoric T, Kuo SC. Synthesis and biological relationships of 3',6-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives as antimetabolic agents. *J Med Chem* 2005; 13:265-275.

(73) Chang YH, Hsu MH, Wang SH, Huang LJ, Qian K, Morris-Natschke SL, Hamel E, Kuo SC, Lee KH. Design and synthesis of 2-(3-benzo[b]thienyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one analogues as potent antitumor agents that inhibit tubulin assembly. *J Med Chem* 2009; 52:4883-4891.

(74) Chou LC, Chen CT, Lee JC, Way TD, Huang CH, Huang SM, Teng CM, Yamori T, Wu TS, Sun CM, Chien DS, Qian K, Morris-Natschke SL, Lee KH, Huang LJ, Kuo SC. Synthesis and preclinical evaluations of 2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one monosodium phosphate (CHM-1-P-Na) as a potent antitumor agent. *J Med Chem* 2010; 53:1616-1626.

(75) Abdullah NM, Rosania GS, Shedden K. Selective targeting of

tumorigenic cancer cell lines by microtubule inhibitors. *PLoS One* 2009; 4:1-8.

(76) Chen YC, Lu PH, Pan SL, Teng CM, Kuo SC, Lin TP, Ho YF, Huang YC, Guh JH. Quinolone analogue inhibits tubulin polymerization and induces apoptosis via Cdk1-involved signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:10-19.

(77) Wang SW, Pan SL, Peng CY, Huang DY, Tsai AC, Chang YL, Guh JH, Kuo SC, Lee KH, Teng CM. CHM-1 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells by suppressing matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Lett* 2007; 257:87-96.

(78) Wang SW, Pan SL, Guh JH, Huang YC, Chiang PC, Chang YL, Kuo SC, Lee KH, Teng CM. CHM-1, a novel synthetic quinolone with potent and selective antimetabolic antitumor activity against human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:350-360.

(79) Hsu SC, Yang JS, Kuo CL, Lo C, Lin JP, Hsia TC, Lin JJ, Lai KC, Kuo HM, Huang LJ, Kuo SC, Wood WG, Chung JG. Novel quinolone CHM-1 induces apoptosis and inhibits metastasis in a human osteogenic sarcoma cell line. *J Orthop Res* 2009; 1637-1644.

- (80) Chou LC, Yang JS, Huang LJ, Wu HC, Lu CC, Chiang JH, Chen KT, Kuo SC, Chung JG. The synthesized 2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxy quinolin-4-one (CHM-1) promoted G2/M arrest through inhibition of CDK1 and induced apoptosis through the mitochondrial-dependent pathway in CT-26 murine colorectal adenocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 2009; 44:1055-1063.
- (81) Tsai AC, Pan SI, Sun HL, Wang CY, Peng CY, Wang SW, Chang YL, Kuo SC, Lee KH, Teng CM. CHM-1, a new vascular targeting agent, induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells via p53-mediated death receptor 5 up-regulations. *J Biol Chem* 2010; 19:497-506.
- (82) Lai TY, Yang JS, Wu PP, Huang WW, Kuo SC, Ma CY, Wood WG, Chung JG. The quinolone derivative CHM-1 inhibits murine WEHI-3 leukemia in BALB/c mice *in vivo*. *Leuk Lymphoma* 2010; 51:2098-2102.
- (83) Chen JJ, Chou CW, Chang YF, Chen CC. Proteasome inhibitors enhance TRAIL-induced apoptosis through the intrinsic regulation of DR5: involvement of NF- κ B and reactive oxygen species-mediated p53 activation. *J Immunol* 2008; 180:8030-8039.
- (84) Yeh CC, Deng YT, Sha DY, Hsiao M, Kuo MY. Suberoylanilide

hydroxamic acid sensitizes human oral cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through increase DR5 expression. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:2718-2725.

- (85) Walker JL, Armstrong DK, Huang HQ, Fowler J, Webster K, Burger RA, Clarke-Pearson D. Intraperitoneal catheter outcomes in a phase III trial of intravenous vs. intraperitoneal chemotherapy in optimal stage III ovarian and primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2006; 100:27-32.
- (86) Armstrong D, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA. Gynecologic Oncology Group, Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006; 354:34-43.
- (87) Rothenberg ML, Liu PY, Braly, PS, Wilczynski SP, Hannigan EV, Wadler S, Stuart G, Jiang C, Markman M, Alberts DS. Combined intraperitoneal and intravenous chemotherapy for women with optimally debulked ovarian cancer: results from an intergroup phase II trial. *J Clin Oncol* 2003; 21:1313-1319.
- (88) R. Ozols. Update on the management of ovarian cancer. *Cancer* 2003; 1:22-30.

- (89) Craft N, Bruhn KW, Nguyen BD, Prins R, Liau LM, Collisson EA, De A, Kolodney MS, Gambhir SS, Miller JF. Bioluminescent imaging of melanoma in live mice. *J Invest Dermatol* 2005; 125:159-165.
- (90) Vassileva V, Moriyama EH, De Souza R, Grant J, Allen CJ, Wilson BC, Piquette-Miller M. Efficacy assessment of sustained intraperitoneal paclitaxel therapy in a murine model of ovarian cancer using bioluminescent imaging. *Br J Cancer* 2008; 99:2037-2043.
- (91) Guillonneau C, Pierre A, Charton Y, Guilbaud N, Kraus-Berthier L, Leonce S, Michel A, Bisagni E, Atassi G. Synthesis of 9-o-substituted derivatives of 9-hydroxy-5,6-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-1-carboxylic acid (2-(dimethylamino) ethyl)amide and their 10- and 11-methyl analogues with improved antitumor activity. *J Med Chem* 1999; 42:2191-2203.
- (92) Lee JC, Tsai CY, Kao JY, Kao MC, Tsai SC, Chang CS, Huang LJ, Kuo SC, Lin JK, Way TD. Geraniin-mediated apoptosis by cleavage of focal adhesion kinase through up-regulation of Fas ligand expression in human melanoma cells. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:655-663.

Part II

大芑雪蓮抑制人類荷爾蒙抗性前列腺癌PC-3細胞
之表皮生長因子受體訊息路徑

**Inhibition of EGFR signaling by *Saussurea*
involucrata in human hormone-resistant prostate
cancer PC-3 cells**

中文摘要

前列腺癌(prostate cancer)是臨床男性最常被診斷的惡性腫瘤，同時也是 2009 年美國男性因罹癌致死的第二位。截至目前，尚無有效的治療方法足以遏止前列腺癌細胞轉化發展成具侵襲性(invasive)之型式。大苞雪蓮(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)習慣簡稱為雪蓮(Snow lotus)，是中國珍貴稀有的藥草，本研究確認雪蓮能有效抑制雄激素非依賴性(androgen-independent)前列腺癌 PC-3 細胞之增殖，進而探討其生化機制，及評估能否發展成為有效的抗腫瘤藥物。

細胞存活率分析之結果顯示，雪蓮甲醇抽出物(SI-1)以濃度和時間依賴性抑制多種人類癌症細胞株之增殖，尤其是對荷爾蒙抗性(hormone-resistant)前列腺癌 PC-3 細胞之抑制效果最強。為探討雪蓮所含之生物活性成分，及雪蓮抑制腫瘤細胞生長之分子機制，進一步將雪蓮甲醇粗抽出物以不同極性之溶劑萃取，而分配得到甲醇抽出物(SI-1)、乙酸乙酯抽出物(SI-2)、正丁醇抽出物(SI-3)及水抽出物(SI-4)。經細胞存活率分析結果顯示，雪蓮乙酸乙酯抽出物(以下簡稱 SI-2)對 PC-3 細胞增殖之抑制效果最為顯著。SI-2 能明顯的以依賴濃度之方式抑制前列腺癌 PC-3 細胞之生長，導致細胞週期停滯於 G1-phase，並誘發 PC-3 細胞凋亡。西方墨點法檢測結果顯示 SI-2 可不依賴 p53 訊息途徑而誘發

p21WAF1/CIP 和 p27KIP1，並向下調節 Cyclin D1 和 CDK4 之表現。除此之外，PC-3 細胞經 SI-2 處理後，Bax, cytochrome c, activated caspase-3, 和 caspase-9 的表現量會增加，而 Bcl-2 表現量則下降。表皮生長因子受體(EGFR)是治療前列腺癌的一個重要標的，SI-2 能明顯降低 EGFR 的磷酸化，並抑制 PI3K/AKT 和 STAT3 的活化。經口餵食 (p.o) SI-2 之動物(*in vivo*)實驗結果指出，SI-2 能以依賴劑量之方式抑制前列腺癌 PC-3 腫瘤之生長。

歸納本研究之結果，證實雪蓮是荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞 EGFR 信息的有效抑制劑，可發展並應用於治療人類 EGFR 陽性癌症。

關鍵詞：大苞雪蓮；前列腺癌；PI3K/AKT；STAT3；表皮生長因子受體。



Abstract

Prostate cancer remains a leading cause of death in men despite increased capacity to diagnose at earlier stages. After prostate cancer has become hormone independent, which often occurs after hormonal ablation therapies, it is difficult to effectively treat. In this study, we identified *Saussurea involucrata* Kar. et Kir., a rare traditional Chinese medicinal herb, as a potential agent for androgen independent prostate cancer patients and investigated its biological mechanism as an anti-neoplasia agent. *S. involucrata* (SI-1) caused a concentration- and time-dependent inhibition of cell proliferation in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells. Moreover, *in vitro* studies in a panel of several types of human cancer cell lines revealed that *S. involucrata* inhibited cell proliferation with high potency. To evaluate the bioactive compounds, we successively extracted the *S. involucrata* with fractions of methanol (SI-1), ethyl acetate (SI-2), n-butanol (SI-3), and water (SI-4). Among these extracts, SI-2 contains the most effective bioactivity. SI-2 treatment resulted in significant time-dependent growth inhibition together with G1-phase cell-cycle arrest and apoptosis in PC-3 cells. In addition, SI-2 treatment strongly induced p21*WAF1/CIP* and p27*KIP1* expression, independent of the p53 pathway, and down-regulated

expression of cyclin D1 and cyclin dependent kinase 4 (CDK4). SI-2 treatment increased levels of Bax, cytochrome c, activated caspase-3, active caspase-9, and decreased Bcl-2 expression level. One of the major targets for the therapy in prostate cancer can be epidermal growth factor receptor (EGFR). SI-2 markedly reduced phosphorylation of EGFR and inhibited activation of AKT and STAT3. Moreover, p.o. administration of SI-2 induced a dose-dependent inhibition of PC-3 tumor growth *in vivo*. In summary, our study identifies *S. involucrata* as an effective inhibitor of EGFR signaling in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells. We suggest that *S. involucrata* could be developed as an agent for the management of EGFR positive human cancers.

Keywords: *Saussurea involucrata*, *EGFR*, *AKT*, *STAT3*, *prostate cancer*

第一章 緒論

第一節 雪蓮之簡介

大苞雪蓮(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)是菊科，鳳毛菊屬植物，又名為雪荷花，是唯一能在雪線上生長的大型多年生草本植物，維吾爾族稱之為"塔裕依力斯"，意思是"神奇的仙花"，吾等習慣稱為天山雪蓮或簡稱雪蓮。雪蓮分布於西藏、新疆、青海、四川等地，生長於高山雪線附近的岩縫、石壁和礫石沙質潮濕處，以天山產量最多(見圖 1)，品質亦最佳。雪蓮種子在 0°C 發芽，3-5 °C 生長，幼苗能忍受-21 °C 的嚴寒。幼時，全株都具特異的芳香氣味，從種子萌發、抽苔、到開花需時至少 3-5 年，於最後一年之六月到八月間開花。雪蓮特殊的生長環境造就其稀有與獨特的藥理活性，由於雪蓮生長環境特異，人工栽培困難，加上農、牧民盲目的毀滅性採摘，致使目前雪蓮資源日益匱乏，雪蓮物種已有瀕臨滅絕之虞，因而被中國大陸列為二級瀕危保育植物^[1]。



Figure 1 大苞雪蓮 (*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)

雪蓮花作為藥用植物，在民間習用已久，人們奉之為百草之王、藥中極品。文獻記載始見於藏藥文獻之《月王藥珍》，清代趙學敏所著之《本草綱目拾遺》記載：雪蓮花產伊犁西北...大寒之地積雪，春夏不散，雪中有草，類荷花，獨莖，亭亭雪間可愛，性熱、能補陰益陽，治一切寒症。

《新疆中草藥》記載：雪蓮性溫微苦，功能祛風勝濕，對醫治風濕性疾病具有特殊效果。雪蓮在新疆民間習用已久，維吾爾族居民使用整株雪蓮，用以治療風濕性關節炎、風濕痹痛、小腹冷痛、月經不調、赤、白帶等。蒙古族居民則利用其地上部份，治療肺寒、咳嗽、腰腿痛、筋骨損傷。哈薩克族用於治療雪盲、牙痛、麻疹不透、外傷出血、腎虛陽痿、婦女產後胎衣不下等^[2]。但雪蓮是大補的草藥，孕婦忌食用。

一、植物形態

雪蓮主要分佈於新疆境內的天山山脈、阿爾泰山山脈和崑崙山脈，生長在高寒山區，一般都在海拔三千公尺左右的雪線。能夠在高海拔、常年積雪不化、氣候嚴寒的雪峰生長的天山雪蓮，有著極強的生命力。雪蓮全株高約 15~50 公分，花苞約有碗口大小，攤開其花、葉後，約有一個足球大(見圖 2)。雪蓮依外貌可分成兩大類：一是全株披有細密綿毛，形似一隻蹲著的小白兔，所以又稱為雪兔，此類綿毛既可以保溫、保濕，又可以反射太陽的輻射紫外光線；另一類未披有綿毛，葉片之顏色綠中帶紫，莖端花蔕有幾枚半透明苞片，形似花瓣，能減少紫外線的傷害。

雪蓮花於開花期之 7~8 月採集，曬乾後之雪蓮花外形呈綿球狀、圓柱狀或圓錐形(見圖 2)，表面黃褐色、灰褐色或深灰色，莖長 7~25 cm，基部有殘存的黑色葉基，呈覆瓦狀密集排列，莖中部至頂端的葉片密集，皺縮卷曲，密被白色或褐色絨毛，完整葉片呈卵圓形、匙形、倒披針形或狹倒卵形，邊緣近全緣或齒狀，頭狀花序集生莖頂，呈半圓球形，花冠紫色、白色或紅紫色，稀見蒴果，具白色或黑褐色長冠毛，密集如氈狀，形似灰白色絨球，直徑 4~8mm，可見紫紅色或紫黑色的花柱和柱頭露於冠毛外，組成紫灰相間的斑點，氣淡、味微苦、澀^[3,4]。

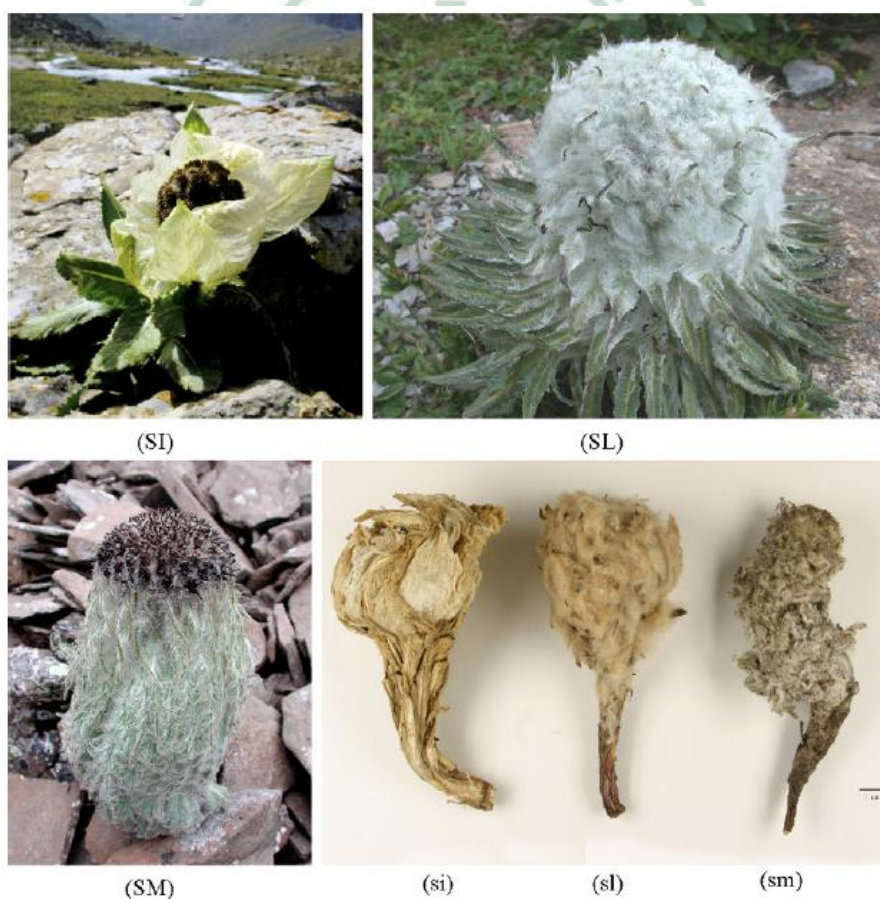


Figure 2 Photos of *Saussurea involucrata* (SI), *Saussurea laniceps* (SL), *Saussurea medusa* (SM) plants and their medicinal materials ^[5].

二、入藥品種

雪蓮種類繁多，如大苞雪蓮(*Saussurea involucrate* Kar. et Kir.)、狹苞雪蓮(*Saussurea ischnoides* J.S. Li.)、苞葉雪蓮花 (*Saussurea obvallata*)、簇枝雪蓮 (*Saussurea polylada*)、棉頭雪蓮花 (*Saussurea medusa*)、毛頭雪蓮花、雪兔子 (*Saussurea laniceps*)、水母雪蓮花、紅雪兔、三指雪蓮花等，共有 30 餘種。其中以大苞雪蓮最為珍貴，價值也最高，是入藥之正品^[3,4]，習慣稱為天山雪蓮或簡稱雪蓮花，其他品種的雪蓮在民間俗稱為石蓮。

三、大苞雪蓮之化學成分

經現代化學成份分析，大苞雪蓮所含的化合物類型主要為黃酮類，其他成分如生物鹼(alkaloids)、多糖類 (polysaccharides)、甾類 (steroidals)、木脂素 (lignanans)、倍半萜內酯 (sesquiterpene lactones)、胺基酸、苷類、揮發油以及一些微量元素^[5-12]。大苞雪蓮化學成份詳見表一：

表一、大苞雪蓮主要化學成分

化合物類型	化合物名稱
糖類	葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、蔗糖及多糖類 (天山雪蓮花多糖、精制雪蓮多糖)。
黃酮及黃酮苷類	金合歡素、芹菜素、木樨草素、蘆丁、山奈素、槲皮素、日本檫苷、洋薊素、車前草素、柯伊利素、紫丁香苷、芹菜素-5,6-二甲氧基黃酮、芹菜素-6-甲氧基黃酮、芹菜素-7-O- α -L-鼠李糖(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、芹菜素-7-O- β -D-新陳皮糖苷、柯利素-7-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、木樨草素-7-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、木樨草素-7-O- α -L-鼠李糖(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、山奈素-3-O- α -L-鼠李糖苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、槲皮素-3-O- α -L-葡萄糖吡喃糖苷。

其他苷類	大苞雪蓮內酯-8-β-D-葡萄糖吡喃糖苷、傘型花內酯-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷、正丁基-β-D-吡喃果糖苷。
蒽醌類	大黃素甲醚
甾體類	α-, β-香樹素、麥角烷-3β, 24-二醇、β-谷甾醇、豆甾烷醇、豆甾-7-烯-3-醇。
木脂素類	牛蒡苷元
倍半萜內脂	(1S, 3S, 5S, 6S, 7S, 11S)-3-hydroxyl-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone (1), (1S, 3S, 5S, 6S, 7S, 11R)-3-hydroxyl-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone (2), (1S, 3S, 5S, 6S, 7S, 8S, 11S)-3-hydroxyl-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone (3), 3α, 8α-dihydroxyl-11βH-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone (4), 8α-hydroxyl-11βH-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone (5), 11β,13-dihydrodehydrocostuslactone-8-O-β-D-glucoside (6), 11β,13-dihydrodehydrocostuslactone-8-O-[6'-O-acetyl-β-D-glucoside] (7), 11α, 13-dihydroglucozaluzanin C (8), japonicolactone (9).
生物鹼	秋水仙鹼、大苞雪蓮鹼[13-脯氨酸取代的二氫去氫廣木香內酯]。
微量元素	砷、鈣、銅、鐵、鉀、錳、鉛、鉀、硒、碘、鋅等。
胺基酸	冬氨酸、α-Ala、β-Ala、甘氨酸、組氨酸、量氨酸、紳量氨酸、賴氨酸、淡氨酸、Phe、絲胺酸、蘇氨酸、色氨酸等，共有 16 種，其中 7 種為人體必須胺基酸。莖中所含胺基酸之種類及含量比葉、花序高。
揮發油	揮發油主要是萜類、醇類、酮類、有羥基酸類、酯類、烷烯烴、含氮雜環以及少量的芳香烴。如 3-吡啶乙酸、對羥基苯乙酮、原兒茶酸、綠原酸、β-蒎烯，β-金合歡烯，葑酮，α-苧烯，α-石竹烯。

四、大苞雪蓮之藥理作用

雪蓮花類藥材藥理作用研究，單體黃酮類化合物、總生物鹼、多糖類和倍半萜類內酯型化合物與諸項藥理活性均有關聯，具有明顯之生物活性和治療效果^[8]。現代臨床醫學研究證明，大苞雪蓮使用全株入藥，具有通經活血，暖宮散淤、散寒除濕、強筋助陽、止血、消腫之功能。臨床主要用於治療急、慢性風濕性關節炎引起的疼痛、肺寒咳嗽、宮寒腹痛、閉經、胎衣不下、陽痿和麻疹不透等症，使用安全，無毒副作用^[2,8]。近

年來大苞雪蓮的抗風濕、消炎鎮痛^[11,12]、擴張血管、平喘、降壓、防止心血管疾病^[13]、增強免疫延緩衰老^[14]、終止妊娠和計劃生育^[15]、抗癌^[16]、清除自由基及抗疲勞^[17]等之藥理作用研究已有所進展，開發應用潛力很大^[18,19]。茲將大苞雪蓮相關之藥理研究摘錄如下：

(一) 抗炎、鎮痛作用^[13,14]

動物實驗證實大苞雪蓮煎劑、總生物鹼和乙醇抽出物對甲醛或蛋清引起的大鼠后踝關節急性炎症有強效的對抗作用，而以總生物鹼的作用最強，作用強度與水楊酸鈉相似。總生物鹼可降低家兔皮膚血管的通透性，使家兔耳血管收縮^[13]。黃酮類對大鼠蛋清性關節急性炎症有明顯的對抗作用，其抗發炎作用不同於總生物鹼，對血管通透性無改變，切除兩側之腎上腺後，其抗發炎作用明顯減弱，表明其抗發炎作用主要是通過促進增加腎上腺皮質激素合成而產生的^[14]。大苞雪蓮倍半萜內酯成份(11 β ,13-dihydrodehydrocostuslactone-8-O- β -D-glucoside)亦具有強效抗發炎作用(IC₅₀ \pm SD = 98.01 \pm 2.11 μ M)^[9-12]。

(二) 清除自由基、抗氧化力、抗疲勞和提高機體免疫作用^[15, 16]

用氮藍四唑比色法測得大苞雪蓮多糖清除超氧陽離子自由基的半清除濃度為 22.0 μ g/ml。大苞雪蓮花多糖 25 mg/kg/day \times 5d (i.p)可降低小鼠耗氧量 34.4%，25 mg/kg/day \times 6d (i.p)可使小鼠游泳時間延長 1.69 倍^[15]。雪蓮花中的車前草素(hispidulin) 和金合歡素(acacetin)

也具有清除自由基及抗氧化能力^[16]。

(三) 抗癌作用

大苞雪蓮中的黃酮類成分金合歡素和車前草素以體外細胞培養³H-TdR 摻入法，培養 12、24、36 和 48 小時，對腹水型和 S180 肝癌細胞的 DNA 合成皆有明顯的抑制，二者對腹水型肝癌細胞 DNA 合成的抑制均高於 S180，金合歡素和車前草素對腹水型肝癌細胞 DNA 合成的 ID₅₀，分別為 70.8 和 116 μg/ml^[7]。高車前素對腹水型肝癌細胞 DNA 合成的抑制機制，可能是 DNA 模板損傷型，總生物鹼對 L₇₇₁₂ 癌細胞 DNA 合成的 ID₅₀ 為 51.7 μg/ml，也具有極強的抑制作用。分離自大苞雪蓮之車前草素，研究證實能抑制卵巢癌 SKOV3 細胞及多形性神經膠原母細胞瘤 (glioblastoma multiforme) GBM8401 及 GBM8901 細胞生長^[17, 18]；其他大苞雪蓮黃酮類成分，如 apigenin 及 luteolin 亦被證實具有抗癌活性；而多糖類則無此作用，反而是促進癌細胞的增殖^[7]。

除此之外，大苞雪蓮乙酸乙酯抽出物中所含的倍半萜內酯 (1S, 3S, 5S, 6S, 7S, 11S)-3-hydroxyl-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone 及 (1S, 3S, 5S, 6S, 7S, 11R)-3-hydroxyl-11, 13-dihydrodehydrocostuslactone 對腫瘤細胞株 A549 細胞有明顯之細胞毒殺作用，IC₅₀ ± SD 值分別為 2.01 ± 0.12, 2.89 ± 0.11 μM^[12]。

(四) 對心血管系統的影響

大苞雪蓮總生物鹼和乙醇提取物，均可降低家兔皮膚血管的通透性。大苞雪蓮總生物鹼可使家兔離體耳血管收縮，其作用可被 α -受體阻斷劑酚妥拉明所阻斷，故總生物鹼導致的血管收縮作用可能是通過 α -受體而發揮作用的。而乙醇提取物對血管則是呈現擴張作用。大苞雪蓮總生物鹼和總黃酮類均能降低麻醉家兔和麻醉犬的血壓；總生物鹼對家兔離體心臟有抑制作用，可使心臟收縮幅度變小、心率減慢甚至停止，心電圖之表現為心率減慢、T 波變凸，可持續 10 分鐘^[19, 20]。

(五) 終止妊娠作用^[21]

以腹腔注射水母雪蓮之水抽出物，對小鼠各個時期的妊娠，以及家兔早期妊娠都有終止用，口服也有效，其終止早孕機制可能是對抗體內孕酮所致；250g/L 之水母雪蓮水抽出物以腹腔注射，有抗早孕及促進中期流產作用。精製雪蓮多糖在體外對大鼠子宮肌纖維有明顯興奮作用，其機制既有直接作用，又能促進內生性前列腺素合成。

(六) 解痙、降壓和平喘作用^[22]

大苞雪蓮總生物鹼對組織胺、毛果芸香鹼和乙醯膽鹼引起的離體家兔平滑肌痙攣有明顯的解痙作用，能部分對抗組織胺所引起的豚鼠離體氣管環的收縮作用。

(七) 其他作用^[22, 23]

大芑雪蓮黃酮類成份對小鼠中樞神經系統顯示出抑制作用。芹菜素、對羥基苯乙酮及傘型花內酯等成分，在抗菌、解痙、鎮靜、降壓、和抗胃潰瘍方面的藥理活性，是雪蓮臨床療效的可靠依據。

第二節 表皮生長因子受體

以表皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor；EGFR)家族及其下游途徑，做為癌症治療標的之新穎療法，已被熱烈探討^[24]。EGFR是170 kDa之穿膜醣蛋白(transmembrane glycoprotein)，目前已知含有四個成員^[25, 26]：HER1 (也稱為EGFR或erbB1)、HER2 (也稱作erbB2或neu)、HER3 (或稱為erbB3)以及HER4 (或稱erbB4)。EGFR之基本結構包含：(a) 位於細胞質外之配體結合區域(extracellular ligand-binding domain) (b) 穿越細胞膜的疏水性尾巴(transmembrane tails-containing a single hydrophobic anchor sequence) (c) 位於細胞質內之酪胺酸激酶區(intracellular domain-containing tyrosine kinase activity) (見圖3)。在正常情況下，表皮生長因子受體是藉由環境中可與他們相結合的配體而活化，這些配體就是表皮生長因子(EGF)家族^[25-28]。當EGFR與EGF結合後，EGFR會進行二聚合作用(dimerization)，EGFR可與自己或其他家族成員形成同型二聚體(homodimer)或雜二聚體(heterodimer)，藉由活化內部的酪胺酸激酶區域，而具有自動磷酸化(auto-phosphorylation)或磷酸化其他蛋白質(trans-phosphorylation)之能力^[27, 28]。

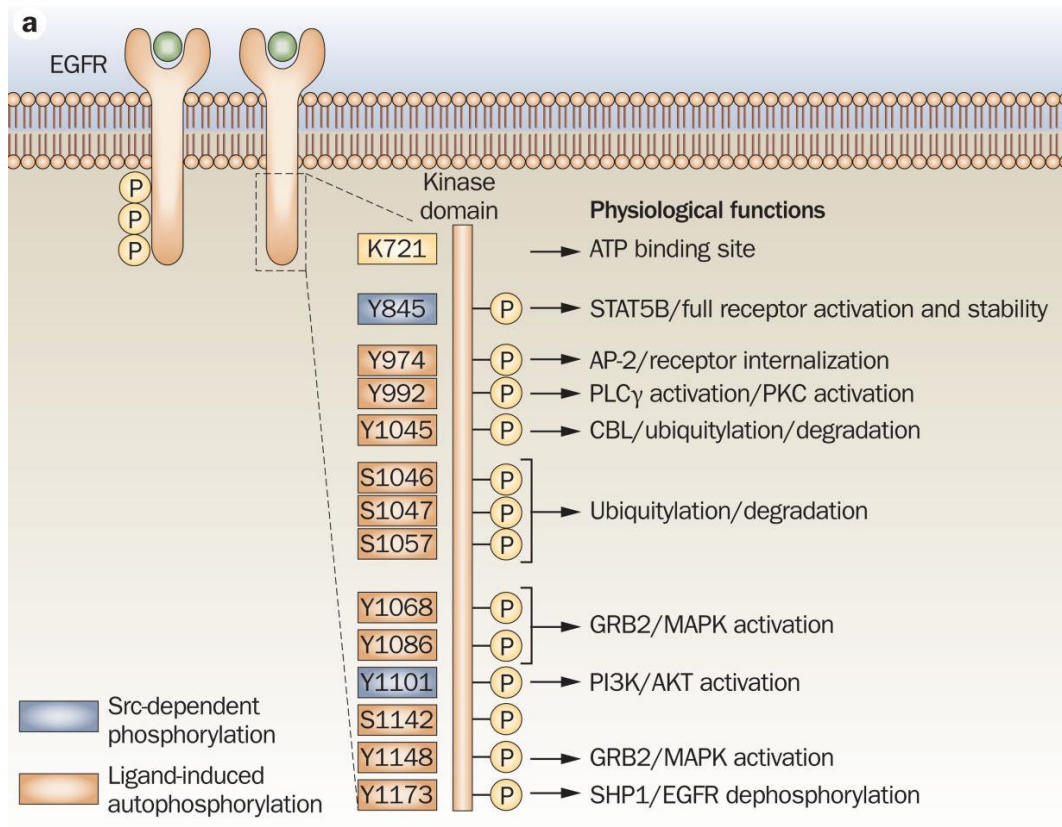


Figure 3 EGFR biology Ligand binding to EGFR causes receptor homodimerization or heterodimerization, which leads to transphosphorylation of the cytoplasmic tail tyrosine residues. Lysine 721 (K721) is the critical site for ATP-binding and kinase activity of EGFR (shown in yellow). Mutation of this amino acid causes the receptor to become inactive. Tyrosine phosphorylation in the C-terminus includes Y974, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 and Y1173 (shown in orange), or SFKs can phosphorylate Y845 and Y1101 (shown in purple). Reported biological effects of phosphorylation of each tyrosine are noted [27].

磷酸化之EGFR是許多adaptor proteins或酶的辨識接合區域(docking sites)，這些蛋白質的新添與接合，將活化、開啟下游一連串細胞內不同的訊息傳遞路徑，包括PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase/AKT) 及 Raf/Ras/mitogen-activated protein kinase cascades之活化^[29-32]。這些EGFR

下游訊息傳遞路徑會促使細胞增殖(proliferation)、遷移(migration)、黏附(adhesion)、抑制細胞凋亡(anti-apoptosis)、血管形成(angiogenesis) 和轉移(metastasis)等^[31-33] (見圖4)。

過度表現EGFR常見於前列腺癌，EGFR之過度表現導致前列腺癌有更強之臨床侵犯性^[34]。除此之外，EGFR 和表皮生長因子(EGF)在前列腺腫瘤發生(tumorigenesis)過程中扮演決定性之角色^[35]。同時，EGFR訊息亦和雄性激素敏感型前列腺癌發展成為雄性激素非依賴型癌症有關聯^[36]。

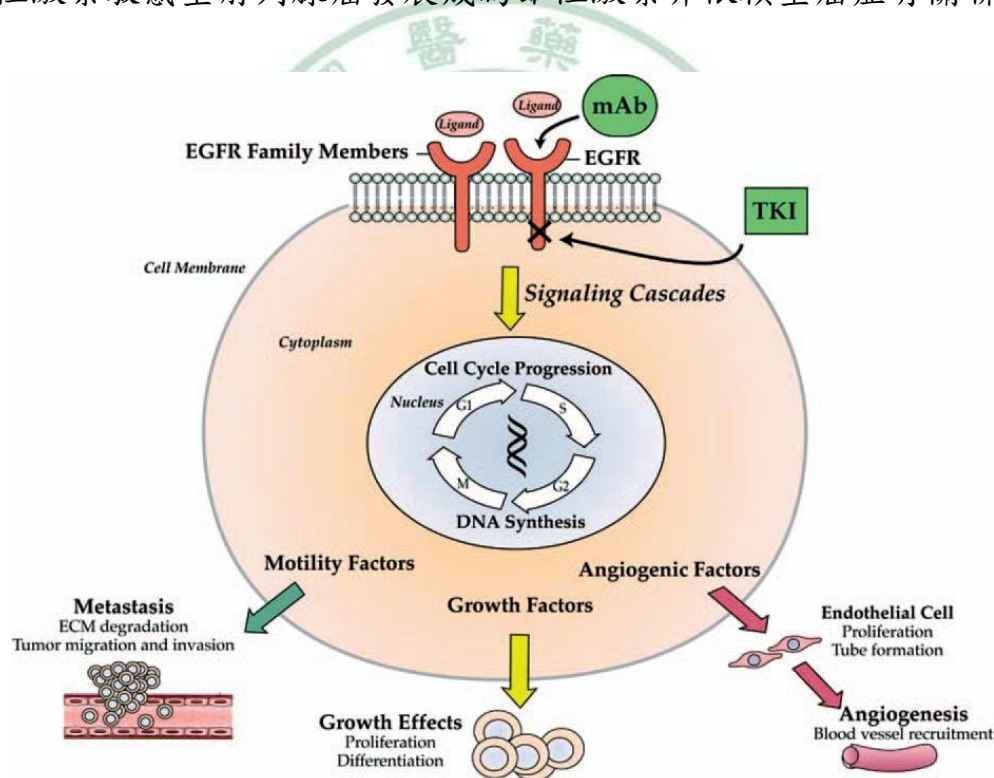


Figure 4 Schematic illustration of the EGFR pathway highlighting potential downstream cellular and tissue effects of EGFR signaling inhibition^[33].

EGFR被活化後會誘發包含PI3K/AKT及STAT3之訊息途徑，在回應EGFR介導之細胞有絲分裂及細胞存活訊息，PI3K/AKT及STAT3都發揮了

重要作用^[37]。磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinases; PI3Ks)，自1980年代發現後，已被證實在細胞發展過程中具有重要調節作用，包括調控細胞存活，增殖和分化。作為receptor tyrosine kinases (RTKs) 和G protein-coupled receptors (GPCRs)之主要下游效應受體，PI3Ks藉由產生磷脂質(phospholipids)轉導來自各種生長因子和細胞因子訊息到細胞內，進而活化絲氨酸-蘇氨酸蛋白激酶-Akt (又稱蛋白激酶 B; PKB)和其他下游效應途徑^[38]。STAT3被認為與轉化生長因子(transforming growth factor; TGF- β) 及EGF 訊息相互聯合作用，於多種人類癌症常表現STAT3之持續活化^[39]。

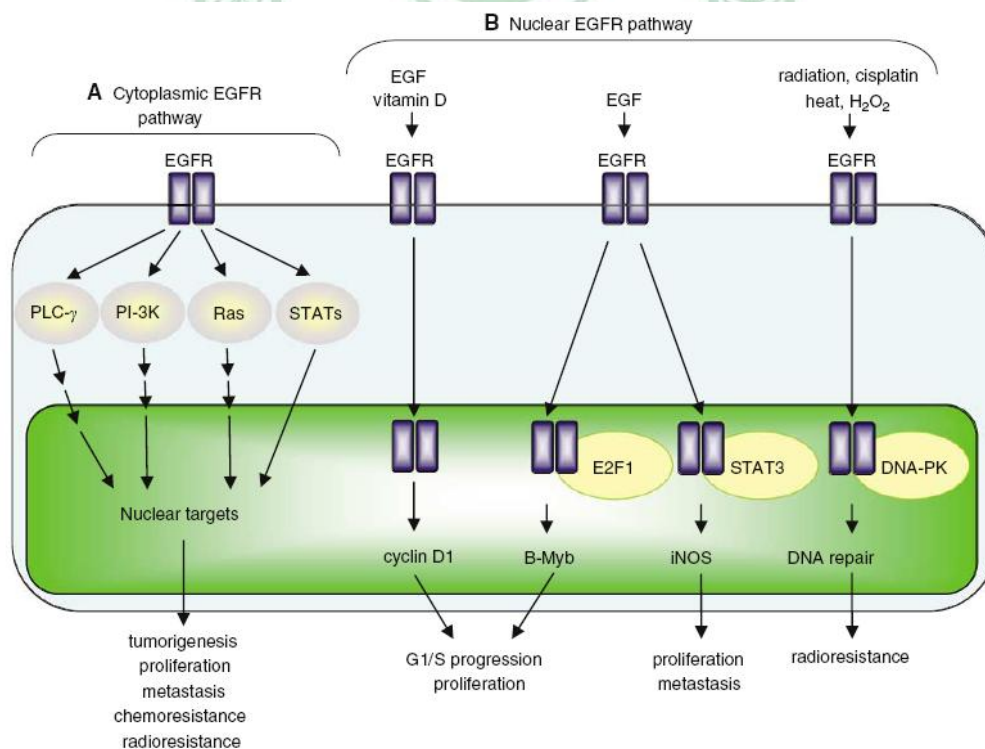


Figure 5 Cytoplasmic and nuclear EGFR signalling pathway^[30].

活化PI3K/AKT及STAT3訊息途徑會促使腫瘤細胞產生抗藥性，因此抑制PI3K/AKT及STAT3訊息途徑將可與癌症化學療法、放射線療法和標靶藥物產生協同作用，並克服抗藥性^[38, 40]。抗癌藥物標靶作用於與PI3K/AKT及STAT3訊息相關之分子，如EGFR，將比PI3K/AKT及STAT3訊息途徑之抑制劑更為重要。更重要的是大量證據顯示，標靶作用於這些訊息分子因而抑制PI3K/AKT及STAT3訊息途徑，對腫瘤治療功效而言是不可或缺的^[40]，因而使得PI3K/AKT及STAT3訊息途徑成為治療癌症最具吸引力的目標之一。

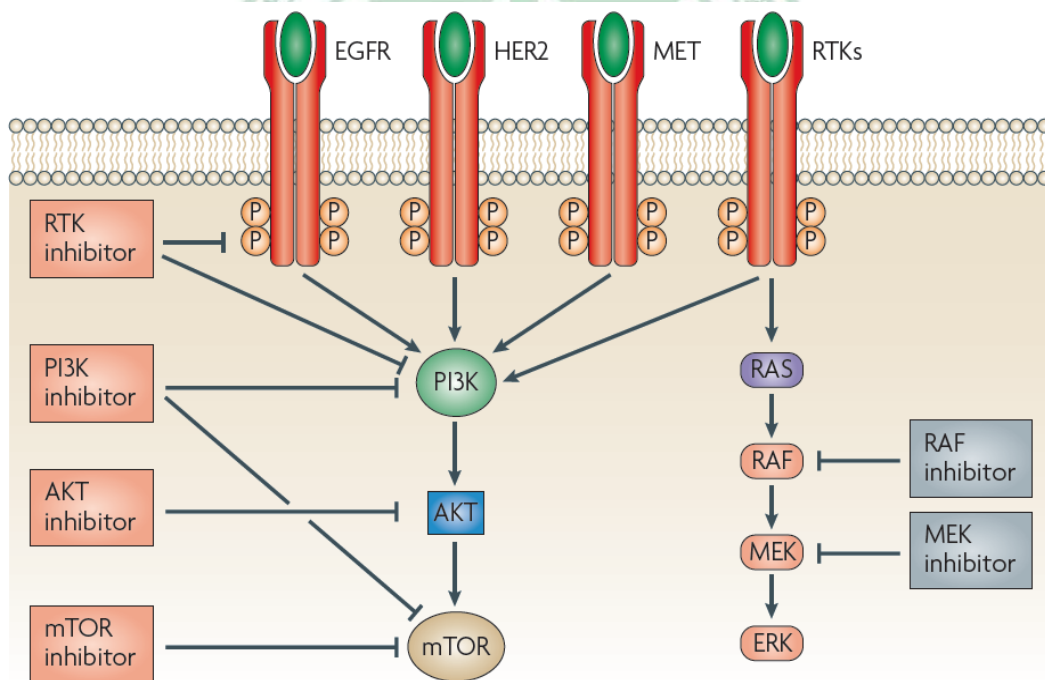


Figure 6 Targeting the PI3K pathway in cancer. *Inhibitors that target key nodes in the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signalling pathway, including receptor tyrosine kinases (RTKs), PI3K, AKT and mammalian target of rapamycin (mTOR), have reached clinical trials* ^[38].

第三節 細胞週期調控機制

一、細胞週期 (Cell cycle)

大部分的真核細胞藉著複製自己的組成份，再將自己分裂為二，來倍增自己細胞的數目，這是一個相當規律且複雜的過程，稱其為細胞週期 (cell cycle)。細胞週期是一連串有規律的步驟促使細胞成長，而後分裂增殖為兩個子細胞。基本上細胞週期即是細胞生長及細胞分裂之“程式”，不分裂的細胞不在細胞週期之中。細胞週期共可分為四個主要的時期：G1 (含G₀)、S、G₂ 和 M 期^[41,42]。

G₀ (Gap₀)期：G₀期可視為是細胞分裂的休息期，某些特定細胞，如神經細胞完成分化後便進入G₀期而不再回復分裂；又如肝細胞，當肝臟組織生長成熟後，肝細胞便會進入G₀期。假若肝臟組織遭受破壞，肝細胞則會再依循細胞週期而增生。迅速生長的組織其細胞不會進入G₀期，當一個週期結束後馬上直接再進入下一週期，癌細胞即歸屬此種。通常癌細胞的細胞分裂並不會比正常細胞快，只是能永不停止的持續分裂。

G₁ (Gap₁)期：G₁期主要特徵為基因表現及蛋白質合成。此為整個細胞週期中唯一的一段時期，細胞可以受細胞外之刺激(如 mitogen及細胞吸附)調控其運轉。細胞在此階段得以生

長，並生產所有DNA合成時所需之蛋白質，本時期之重要性即為下一時期(S期)做好準備。細胞也可能由此脫離細胞週期進入不生長的休眠狀態(G0)。

S (Synthesis)期：於S期中細胞會合成、複製其DNA，得以讓細胞分裂成兩個子細胞時各自具備一套完整的DNA。

G2 (Gap2)期：此期細胞會再次進行生長與蛋白質合成，為細胞分裂做好準備。當這些工作皆已完成，細胞週期便會進入最終之有絲分裂期。

M (Mitosis)期：在有絲分裂期，細胞將會分裂成兩個子細胞，至此細胞週期便已完成。有絲分裂期又可細分為間期(interphase)、前期(prophase)、前中期(prometaphase)、中期(metaphase)、後期(anaphase)、末期(telophase)及細胞質分裂(cytokinesis)等(見圖7)，各有不同之調控蛋白質激酶 [43]。

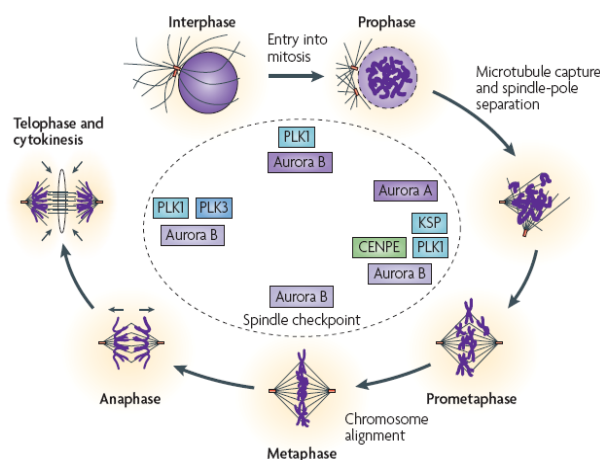


Figure 7 The phases of mitosis [43].

二、檢查點 (check point)

調控細胞週期的因子其調節機制包括：DNA錯誤配對修復(mismatch repair)、鹼基的切除修復(base excision repair)或核苷酸的切除修復(nucleotide excision repair)等三種系統^[44]。

在細胞週期中的G1及G2期各含有檢查點(check point)，檢查點之概念始於1980年，由美國的 Leland Hartwell 提出。檢查點是在每次進入S期或M期時檢查一切是否準備就緒，並觀察細胞是否受到破壞，進而修補、或是進行DNA的合成、或是進行最後的細胞分裂。當DNA有損傷時便無法通過檢查點而造成細胞週期停滯 (cell cycle arrest)，此時細胞內會進行DNA之修復，確定修補完成後才會進入下一週期，若是發現有無法修補的錯誤時，細胞則會走向計畫性凋亡途徑，以避免錯誤遺傳至下一代^[45]。

三、細胞週期調控因子

(一) 蛋白質激酶

哺乳動物之細胞分裂在各個不同細胞週期皆受到蛋白質激酶 (protein kinases) 之調控(見圖8)，這些蛋白質激酶控制細胞週期之進行^[46, 47]。細胞週期中最重要的調控因子為細胞週期蛋白 (cyclins) 與細胞週期蛋白依賴性激酶 (cyclin-dependent kinases ; CDKs)，cyclins 及CDKs可以正向調控細胞週期、DNA合成和發令開始有絲分裂之進行；而Aurora, Polo, 及Nek家族參與中心體週期(centrosome cycle)，

具有調控紡錘體(spindle)之功能；其他蛋白質激酶^[46]，如Bub1, BubR1, 和Mps1調節紡錘體之組裝(assembly)，扮演檢查點之功能。

許多研究指出，在真核細胞中，生長因子能觸發細胞內連續訊息，活化細胞核轉錄因子，與隨後一系列特殊的cyclins-CDKs複合物的活化與否來調控細胞週期之進行，如活化細胞通過G1/S 檢查點，或是在S期開始DNA複製^[42]。

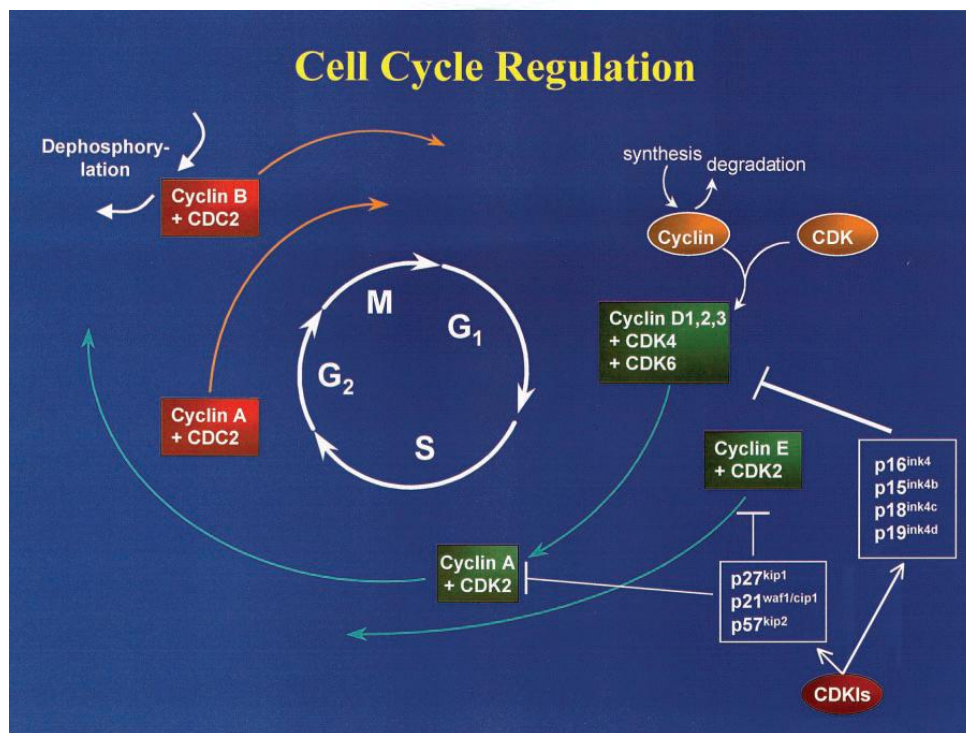


Figure 8 The cell cycle and cell cycle regulation by cyclins, CDKs, and CDKIs^[41].

如圖8 所示：cyclin A及cyclin B主要存在S/G₂ phase，在有絲分裂時會被迅速分解；cyclin D及cyclin E主要存在G₁ phase，在G₁/S phase 會被分解。而CDKs會與特定的細胞週期蛋白結合而活化他們(見表2)

[47]，CDK1(cdc2)主要存在G2及M phase，並與cyclin A及cyclin B結合；細胞在G0/G1 phase，CDK4及CDK6會和cyclin D家族結合；CDK2主要在G1及G1/S過渡期與cyclin A及cyclin E結合^[47, 48]。

Table 2 Mammalian cyclin-dependent kinase (CDK) complexes ^[47].

Quinasa	Regulatory subunit	Substrate	Function
CDC2	cyclin A & B	pRb, NF, histone H1	G2/M
CDK2	cyclin A, E	pRb, p27	G1/S, S
CDK3	cyclin E	E2F1/DP1	G1/S
CDK4	cyclin D1, D2 & D3	pRb	G1/S
CDK5	p35, cyclin D1 & D3	NF, Tau	Neuronal differentiation
CDK6	cyclin D1, D2 & D3	pRb	G1/S
CDK7	cyclin H	CDC2, CDK2/4/6	CAK
CDK8	cyclin C	RNA pol II	Transcript. regulation
CDK9	cyclin T	pRb, MBP	G1/S

讓細胞通過細胞週期之第一個檢查點而進入S期，是由CDKs 2/4/6 以及其調控蛋白cyclin D, E及A負責(見圖9)。當retinoblastoma (Rb)蛋白質受到G1早期表現蛋白cyclin D/CDK4/6的磷酸化會釋出轉錄因子E2F-1，E2F-1會和DP-1形成雜二聚體(heterodimer)，活化下游cyclin E及cyclin A的基因轉錄作用^[48-50]；而在G1末期，cyclin E/CDK2 能促使Rb完全磷酸化，使細胞進入S phase，並導致cyclin A/CDK2的活化^[51]。另外一個進入S phase相當重要且必須的蛋白為Cdc25A (cell division cycle 25A)，Cdc25A是一種去磷酸酶，主要在G1期可被 Myc和E2F誘導產生，藉由去除CDK2上threonine-14 和tyrosine-15 位置的磷酸根，而讓CDK2完全活化^[52-54]。

然而，當 CDKs 過度活化時，細胞會透過特殊之 CDKs 抑制劑的抑制作用，向上調節細胞週期進程，導致細胞生長停滯在 G1 期，甚至脫離細胞週期。

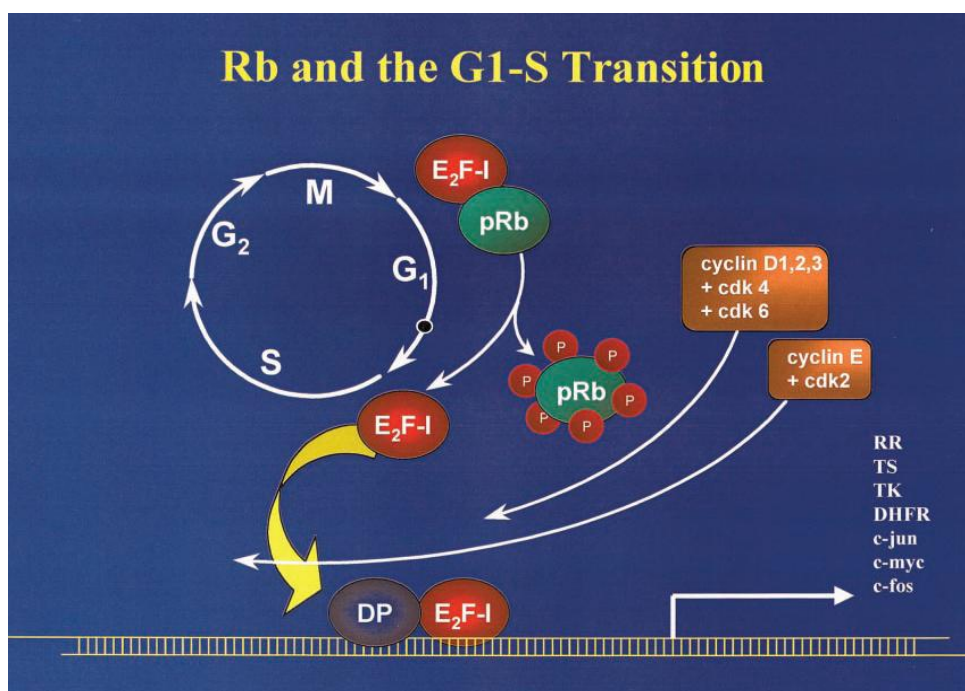


Figure 9 Retinoblastoma gene products and the G1-S transition [41].

(二) 細胞週期蛋白依賴性激酶抑制劑

對於多樣的抑制增生(antiproliferative)訊號：包含有 DNA 損傷(damage)、分化(differentiation)、接觸性抑制(contact inhibition)和衰老(senescence)，皆會促使細胞週期蛋白依賴性激酶抑制劑(cyclin-dependent kinase inhibitors; CDKIs)負向調控細胞週期的進行^[55, 56]。CDKIs 可分成兩個族群：第一個族群為 INK4 (inhibition kinase 4) 家族，主要成員有 p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, 及 p19INK4d；另一族群為 KIP/CIP 家族，包括 p21WAF1/CIP, p27KIP1, 及 p57KIP2。

CDKIs 能藉由結合和抑制 cyclin D/CDK4 與 cyclin D/CDK6 複合體之活化，阻斷細胞週期(G1-phase)的發展或脫離細胞週期^[57]。相較於 INK4 家族，KIP/CIP 家族之影響層面似較廣，其所調控的蛋白質包括 cyclin D/CDK4/2/6 等。其中 p21^{WAF1/CIP} 是不同信息傳導的一個重要標的。既有文獻報導，未變形和惡性細胞導入 p21^{WAF1/CIP} 將會誘發其細胞週期停滯^[57]。亦有研究指出，分離自原發性乳房腫瘤細胞中突變之 p21^{WAF1/CIP} 無法與 CDKs 相結合^[58]。由此推測 p21^{WAF1/CIP} 具有抑制腫瘤之活性。

Table 3 Cell cycle regulatory elements involved in human neoplasia ^[47].

Protein	Alteration	Tumour
CDK4	Mutation	Melanoma
cyclin D1	Overexpression	Breast and prostate cancer, parathyroid adenoma, gastric and esophagic carcinoma, multiple myeloma
cyclin D2	Overexpression	Colorectal carcinoma
cyclin E	Overexpression	Breast, ovary and gastric carcinoma
cyclin A	Overexpression	Hepatocellular carcinoma
CDC25A	Activation	Head and neck cancer, NSCLC
CDC25B	Activation	Breast cancer, lymphomas, head and neck cancer, NSCLC
p27 ^{Kip1}	Inactivation/ degradation	Colon, breast and prostate cancer
p57 ^{Kip2}	Deletion/inactivation	Beekwith-Widemann syndrome
p16 ^{INK4a}	Deletion/inactivation mutation	Melanoma, lymphomas, NSCLC, pancreatic carcinoma
p15 ^{INK4b}	Deletion/inactivation	Leukemia, lymphomas
pRb	Inactivation	Retinoblastoma, SCLC, sarcoma and bladder carcinoma

細胞的分裂是由非常複雜的機制所調控，若此機制失調則會導致癌症發生。癌症即是由於細胞週期之紊亂，導致細胞失去正常的行為與生長方式而產生的疾病。蛋白質激酶相關的研究指出cyclins、CDKs及CDKIs之調節失控常見於人類癌症^[58]，最近的研究更指出^[46-47, 59]，蛋白質激酶突變與腫瘤之發生有密切關係(見表3)^[47]。這些相關的研究發現，可提供科學家以細胞週期激酶作為標的，發展癌症治療的新策略(見圖10)^[60]。

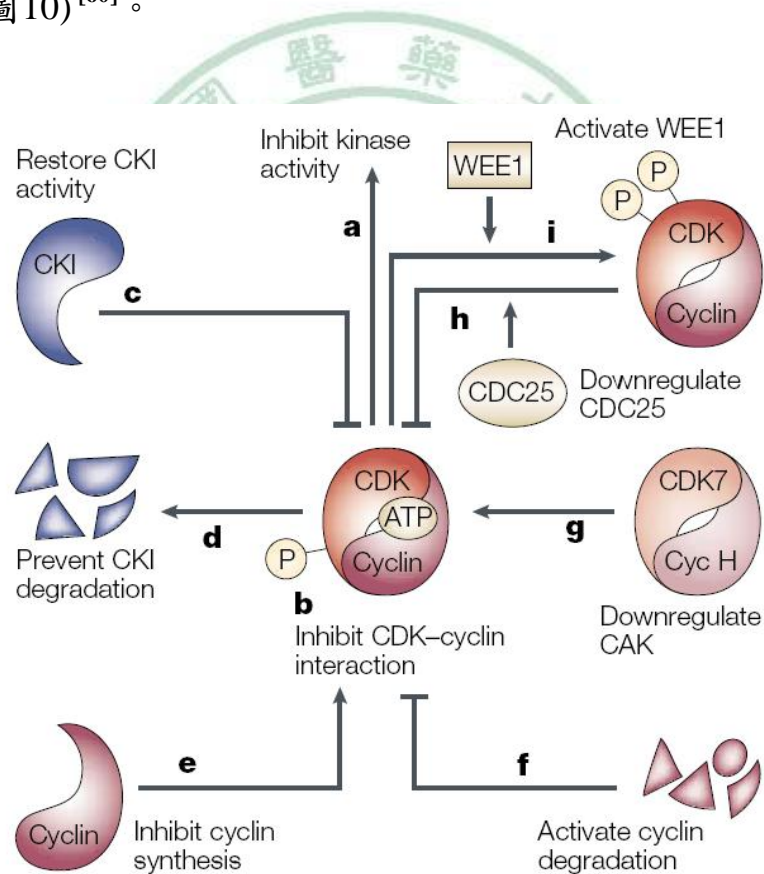


Figure 10 CDKs regulation and opportunities for therapeutic intervention^[60].

第四節 前列腺癌 (Prostate cancer)

癌症是全世界人類共同的健康問題，根據American Cancer Society的估計(見圖10)，2009年在美國估計約有1,479,350個癌症新增病例，562,340名罹癌致死病例(平均一天超過1,540人)，癌症的總死亡人數僅次於心臟病(heart disease)，但在較年輕族群(younger than 85 years)則高居第一位，每四位死亡者中就有一位是癌症患者^[61, 62]。

另外，根據美國國家健康研究所(National Institutes of Health; NIH)估計，2007年因癌症所造成的開支及代價高達2,192億美元，包括直接的醫療成本890億美元；間接疾病成本(因罹患癌症而造成生產力損失所產生的成本)182億美元；以及間接死亡成本(因罹患癌症而過早死亡所造成生產力損失所產生的成本)1,120億美元。由此可知，癌症對一個國家及社會所造成的影響非常大，並且急迫需要能治療癌症的方法及藥物。

前列腺癌是全世界癌症發生率最高的第六位，在罹癌致死率中排名第三，同時也是美國男性因罹癌致死的第二位^[62]。2009年在美國約有192,280前列腺癌新病例，27,360名男性因罹患前列腺癌致死。具荷爾蒙抗性(hormone-resistant)的前列腺癌是一種惡性的雄性激素非依賴型癌症，雖然大部分前列腺癌初期尚對雄性激素療法敏感，然而多數病患會在短短幾年內死於雄性激素非依賴型前列腺癌^[34, 63-64]，至今尚無有效的治療方法足以遏止前列腺癌細胞轉化發展成具侵襲性之型式。以往前列

腺癌一直被認為是侷限位在前列腺，但是仍有 15% 至 20% 的病人會有轉移現象。前列腺癌有很高的比例會轉移到骨骼，在這些轉移的男性病患中約有 90% 被發現有骨骼的損壞。臨床已有幾種專門設計以供治療前列腺癌的藥物，然而效果並不理想，最多也只能延長已轉移病患壽命 10 到 12 月^[63]。

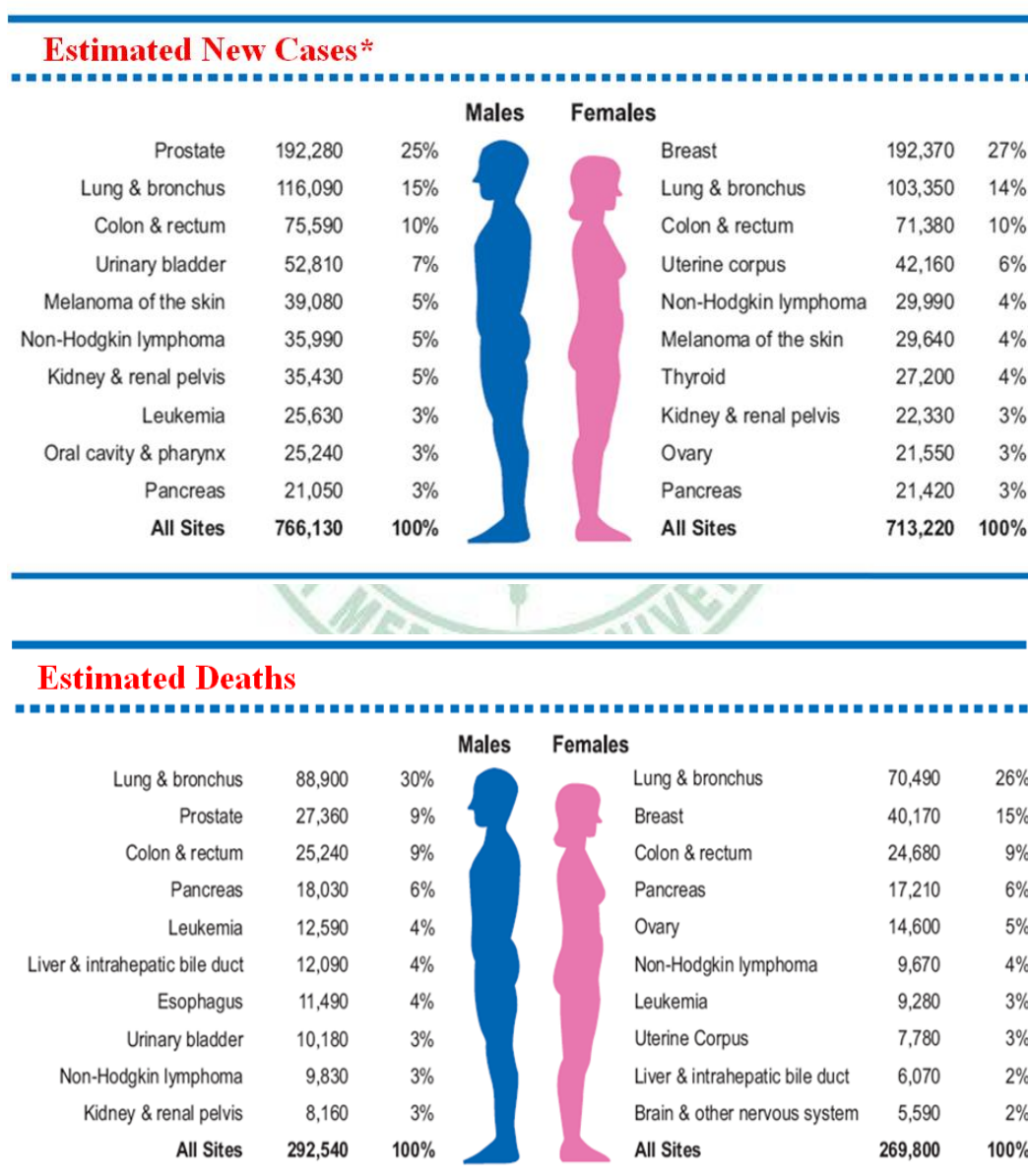


Figure 11 Ten leading cancer types for estimated new cancer cases and deaths, by sex, United States, 2009^[62].

表皮生長因子(epidermal growth factor ; EGF) 是促進轉移的前列腺癌細胞在骨骼微環境中生長的因子，也是促使轉移前列腺癌細胞產生蝕骨細胞現象酵素(例如 PTHRP 及 MMPs) 的傳遞者。許多研究報告指出，過度表現 EGFR 常見於前列腺癌，EGFR 之過度導致前列腺癌臨床表現更強侵犯力，EGFR 和其配體(EGF)在前列腺腫瘤發生過程中扮演決定性之角色(見圖 12)，同時，EGFR 訊息亦和雄性激素敏感型前列腺癌發展成為雄性激素非依賴型癌症有關聯^[36]。除此之外，前列腺癌之發展可能源於參與調控信號轉導之基因(如 PTEN, AKT 等)及細胞週期激酶(如 P53, p21Cip1, p27Kip1, Rb 等)突變和失調^[65]。因此，促進前列腺癌細胞生長和存活的分子途徑，將是未來發展設計專一的新穎藥物及改良前列腺癌療法之重要標的，此一治療新策略除了能降低對正常細胞之毒性，並能有效改善抗藥性^[24]。

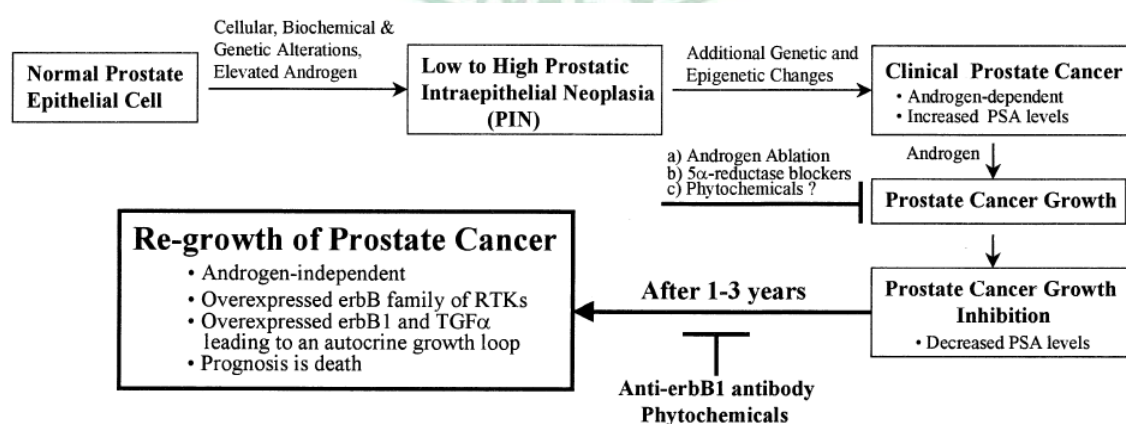


Figure 12 Genesis of human prostate cancer is a multistep process ^[64].

第二章 研究動機

前列腺癌是全世界癌症發生率最高的第六位，同時也是美國男性因罹癌致死的第二位，儘管在早期階段之診斷能力以提昇，前列腺癌仍然是男性首要原因死亡之一。雖然大部分前列腺癌初期尚對雄性激素療法敏感，然而多數病患會在短短幾年內發展成為雄性激素非依賴性前列腺癌，而難以有效地治療，至今尚無有效的治療方法足以遏止前列腺癌細胞轉化發展成更具侵襲力之型式。前列腺癌之發展可能源於參與調控信號轉導之基因(如PTEN, AKT等)及細胞週期激酶(如P53, p21Cip1, p27Kip1, Rb等)突變和失調。因此，這些信號轉導及細胞週期基因產物，及其促進前列腺癌發展並改變化療效果之分子途徑，將是開發新穎藥物用以治療前列腺癌之重要探討標的(見圖13)。

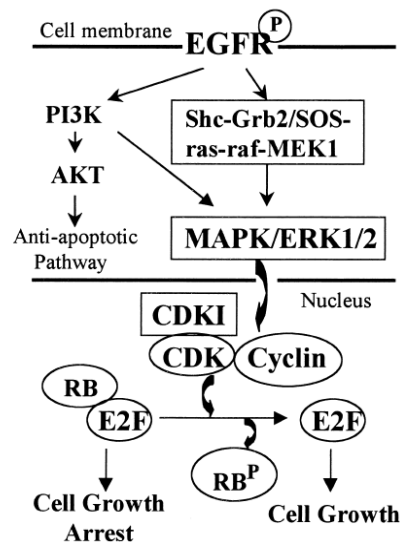


Figure 13 A study models showing an interaction of mitogenic cell signaling with cell cycle regulators for cell growth ^[64].

以表皮生長因子受體家族及其下游途徑，做為癌症治療標的之新穎療法，已被熱烈探討、評估^[24]。許多文獻報導表皮生長因子受體對前列腺癌發展之影響^[34,35]，近年來，以 EGFR 抑制劑作為治療癌症的標靶藥物，也引起極大關注。研究學者普遍認同這些 EGFR 抑制劑可調節過度表現 EGFR 腫瘤細胞之 EGFR 訊息途徑，對癌症之控制和治療有所裨益。

在中國、韓國和日本，補充和替代醫學療法(Complementary and Alternative Medicine therapies; CAM)，例如中藥，幾個世紀以來都是病患對抗疾病的另一個治療選擇。反觀歐洲及北美地區，CAM 療法日益普及並受重視，不過是在最近數十年間。天然植物，包括藥草及一些機能性食物含有許多抗癌活性成分，具有預防保健或對抗癌症之功效^[66]。研究證實這些藥草及機能性食物所含之活性成分，可藉由直接抑制生長因子結合至其受體，或抑制其下游PI3K-Akt途徑，進而阻斷生長因子介導之抗凋亡訊息(見圖13)，已然成為有益且有效對抗癌症的一個重要族群^[67]。

雪蓮作為藥用植物在中國民間習用已久，現代藥理學研究證實雪蓮具有多樣之生物活性，開發應用潛力很大。雖然雪蓮已被證實具有抗癌作用，然而雪蓮對抗腫瘤之分子機制則尚未十分明瞭。因而進行本研究，探討雪蓮抑制荷爾蒙抗性前列腺癌PC-3細胞生長之生化機制及抗腫瘤活性，以評估雪蓮植物能否發展成為新穎的抗腫瘤製劑，應用於治療過度表現EGFR之人類癌症。首先以細胞存活率分析，評估雪蓮甲醇粗提取物

抑制不同人類癌症細胞株增殖之效力；為探討雪蓮內所含之生物活性成分，進一步將雪蓮之甲醇粗提取物分配成4種不同極性溶劑提取物，再以細胞存活率分析評估不同極性溶劑提取物對前列腺癌PC-3細胞增殖之抑制作用。應用細胞週期分析和西方墨點法，分析探討雪蓮抑制前列腺癌PC-3細胞增殖之生化機制；再以動物體內(*in vivo*)實驗評估雪蓮之抗腫瘤活性。

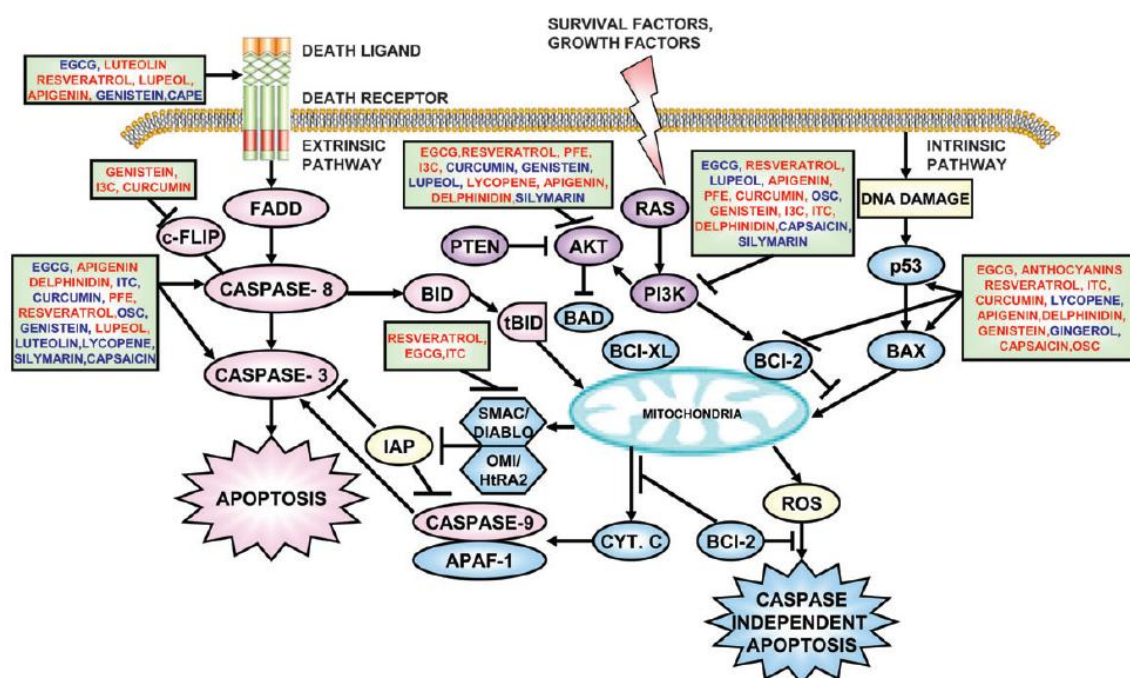


Figure 14 Induction of apoptosis by dietary chemopreventive agents.

Dietary agents can also block growth factor-mediated antiapoptotic signals through the direct inhibition of the binding of growth factors to the receptor or inhibition of the downstream phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway. Blue color of dietary chemopreventive agents denotes that both the in vivo and in vitro effects have been demonstrated and red color denotes that only in vitro effects have been demonstrated [67].

第三章 結果與討論

一、雪蓮強效抑制荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞增殖

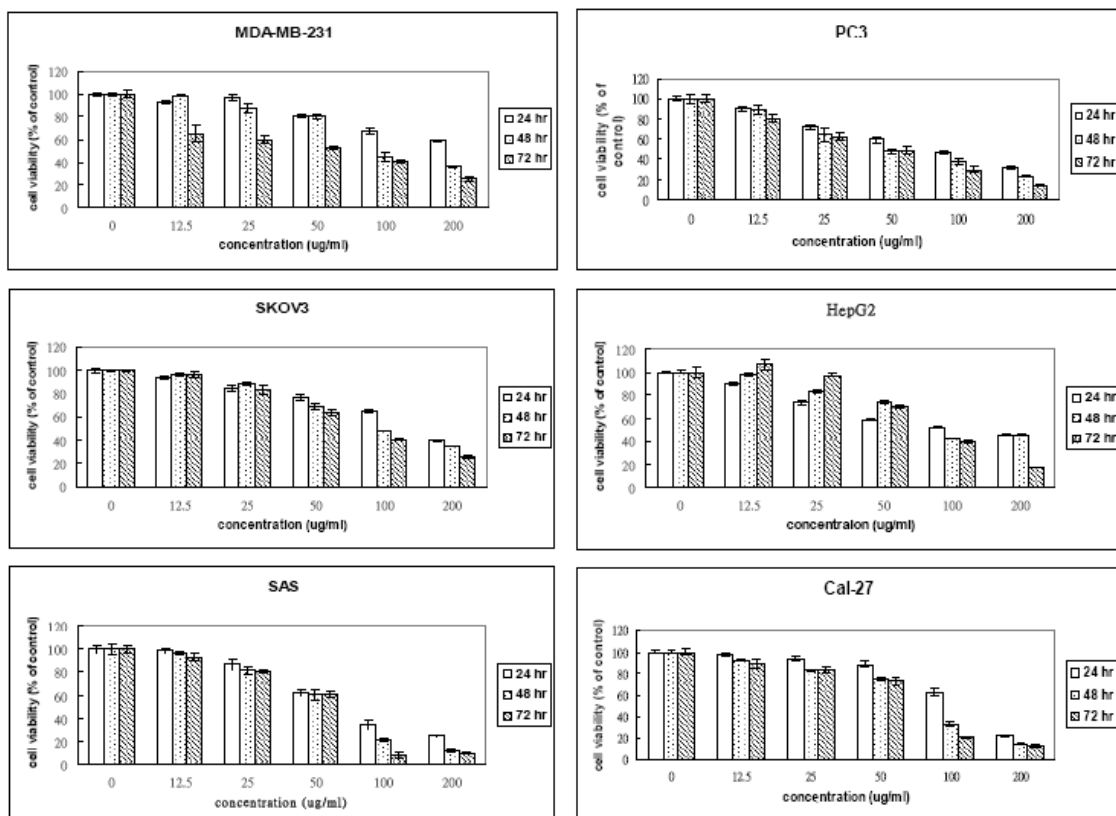
細胞存活率分析結果顯示，雪蓮甲醇粗抽出物(SI-1)以依賴濃度和時間之方式，抑制多種人類不同癌症細胞株之細胞增殖，包括：乳癌 MDA-MB-231 細胞、卵巢癌 SKOV3 細胞、前列腺癌 PC-3 細胞、肝癌 HepG2 細胞和口腔癌 SAS 及 Cal-27 細胞 (見圖 15A)。尤其是對具荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞之增殖抑制作用最強。

為進一步探討雪蓮內所含之生物活性成分，再將雪蓮甲醇粗抽出物以不同極性之溶劑萃取，而得到甲醇粗抽出物(SI-1)，乙酸乙酯粗抽出物(SI-2)，正丁醇粗抽出物(SI-3)及水粗抽出物(SI-4)，再以細胞存活率分析四種不同極性雪蓮粗抽出物對前列腺癌 PC-3 細胞增殖之抑制作用(見圖 15B)。MTT assay 結果顯示，雪蓮不同極性粗抽出物抑制 PC-3 細胞增殖之 IC_{50} 分別為 55.45、50.95、200 及 138.04 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)；其中，雪蓮乙酸乙酯粗抽出物(SI-2)表現最強之抑制細胞增殖活性(見圖 15B)，因此選用雪蓮乙酸乙酯抽出物(以下簡稱 SI-2)探討雪蓮抑制前列腺癌 PC-3 細胞增殖之分子生物機制，及評估雪蓮抗前列腺癌腫瘤之活性。

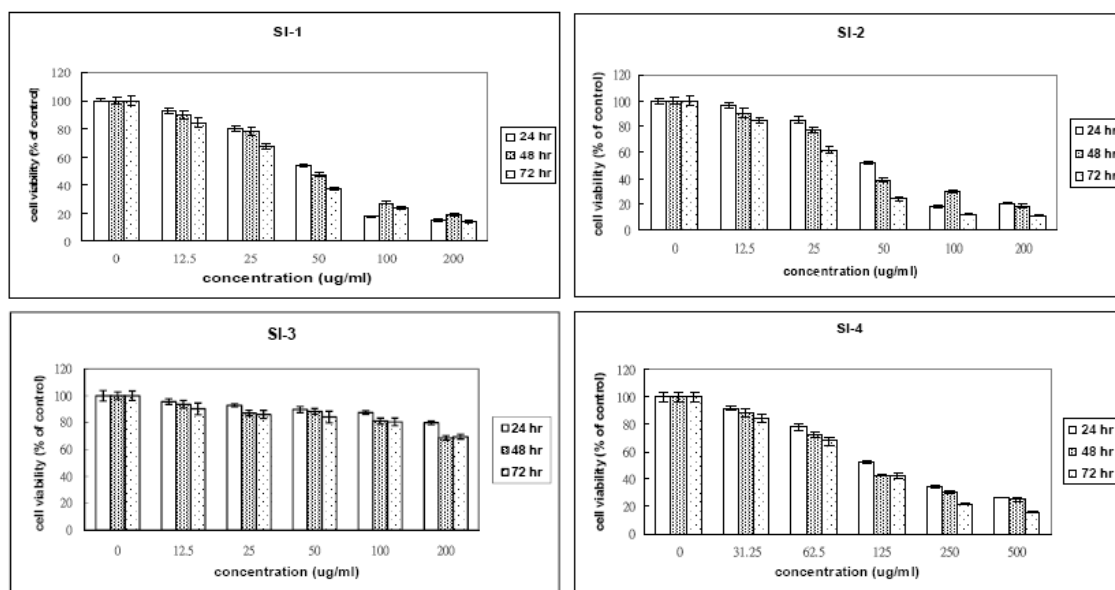
同時為釐清 SI-2 對不同荷爾蒙表現之前列腺癌細胞的增殖抑制作用，以雄性激素敏感性(androgen-sensitive) LNCaP 細胞，評估雪蓮對雄性激素敏感性前列腺癌細胞之活性。實驗結果顯示，SI-2 抑制 LNCaP 細胞

增殖之功效相對較弱(見圖 15C)，由此得知雪蓮選擇性對具荷爾蒙抗性之前列腺癌細胞展現強效之抑制增殖作用。

A



B



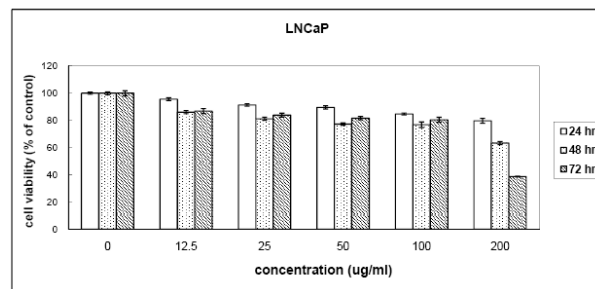
C

Figure 15 Proliferation-inhibitory effect of *S. involucrata* on various human cancer cell lines. (A) MDA-MB 231, PC3, SKOV3, HepG2, SAS, and Cal-27 cells were treated with indicated concentrations of *S. involucrata* for the indicated time. (B) PC3 cells were treated with indicated concentrations of SI-1, SI-2, SI-3 and SI-4 for the indicated time. (C) LNCaP cells were treated with indicated concentrations of SI-2 at the indicated time. The cell viability was then determined using MTT assay. This experiment was repeated three times. Bar represents the S.E.

二、雪蓮乙酸乙酯抽出物所含之生物活性成分

雪蓮是珍貴、稀有的藥用植物，含有許多具生物活性之黃酮類二次代謝產物，如 hispidulin, luteolin, rutin 及 apigenin 等^[11, 68]。為詳細分析雪蓮乙酸乙酯抽出物所含之生物活性成分，應用 HPLC 比較(A) hispidulin, rutin 及 syringin 混合物與 (B) SI-2 之成分差異。HPLC 層析圖譜顯示，SI-2 明顯含有 hispidulin 及 rutin (見圖 16)，而 syringin 在層析圖譜中並無發現(見圖 16B)，此一結果可能是因為 syringin 在野生雪蓮中之含量本就較低(約 0.03% m/m)^[11]。HPLC 層析圖譜亦顯示 SI-2 除明顯含有 hispidulin 及 rutin 外，尚含有其他成分，由此推論雪蓮可能另含有其他生物活性分子，需再以更縝密之實驗方法和儀器做進一步分析探討。

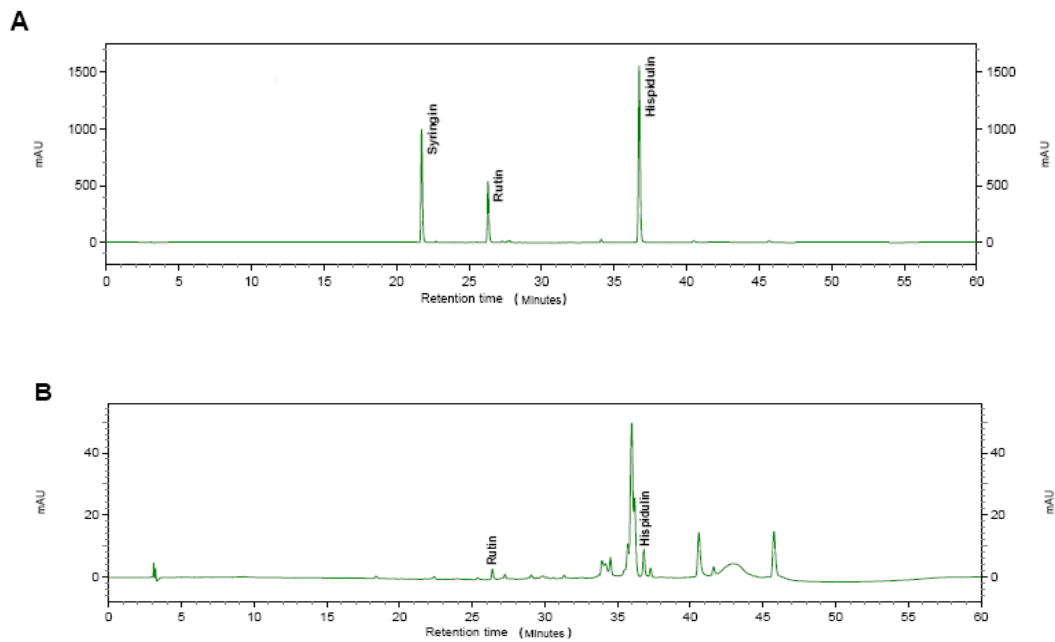


Figure 16 The HPLC chromatograms of (A) mixture of hispidulin, rutin, and syringin, (B) SI-2.

三、SI-2 改變 PC-3 細胞之細胞週期並誘發細胞凋亡

利用 double thymidine block 使前列腺癌 PC-3 細胞同步處於細胞週期之 G1/S phase，再以流式細胞儀及 Cell Quest software (Becton Dickinson; Mountain View, CA) 分析、偵測細胞週期與細胞凋亡之現象。實驗結果顯示，在解除封鎖後 12 小時，約 80% 之 PC-3 細胞進入 S 和 G2/M 期；然而以相同方式同步化之 PC-3 細胞，經 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SI-2 處理，在解除封鎖 24 小時後，PC-3 細胞之細胞週期幾乎完全被阻斷，同時死亡細胞之數目明顯增加 (見圖 17)。

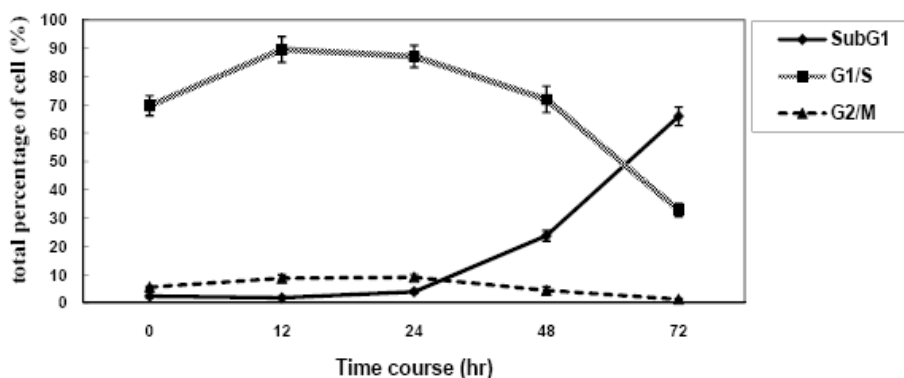


Figure 17 Effect of *S. involucrata* on cell cycle progression in human prostate cancer PC-3 cells. Synchronization of PC3 cells was performed by double thymidine block as described in materials and methods. Then, the cells were released in the absence or presence 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SI-2. This experiment was repeated three times. Bar represents the S.E.

四、SI-2誘發p21WAF1/CIP及p27KIP1導致細胞週期G1期停滯

當細胞週期蛋白依賴性激酶 (CDKs) 過度活化，細胞會透過細胞週期蛋白依賴性激酶抑制劑 (CDKIs) 的負向調控作用，向上調節細胞週期進程，導致細胞生長停滯在G1期，甚至脫離細胞週期^[57]。前述，p21WAF1/CIP及p27KIP1之功能主要是在G1/S轉換之檢查點調控細胞週期之進展，為探討雪蓮對PC-3細胞之細胞週期調控機制的影響，利用免疫墨點測定法檢測SI-2是否影響p21WAF1/CIP及p27KIP1之表現。免疫墨點分析結果顯示，前列腺癌PC-3細胞經SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理指定時間後，相較於未經處理之PC-3細胞，SI-2明顯的以時間依賴性誘發PC-3細胞之p21WAF1/CIP及p27KIP1表現 (見圖18A)。然而在相同條件，腫瘤抑制蛋白質p53之表現則不受影響(見圖18A)，由此推測，雪蓮誘發PC-3細胞週期停滯之機制

可能不包含p53依賴性之機制。除此之外，利用shRNA消除 p21WAF1/CIP或 p27KIP1之表現，shRNA-p21WAF1/CIP及shRNA-p27KIP1可恢復SI-2抑制PC-3細胞增殖之作用(見圖18B)。實驗結果顯示，雪蓮能不依賴p53信息途徑，而誘發p21WAF1/CIP及p27KIP1蓄積，導致前列腺癌PC-3細胞之細胞週期停滯於G1期。

五、SI-2影響細胞週期調控蛋白之表現

在細胞之分化、增殖和生長過程中，細胞週期調控扮演重要的角色。CDKs 調控細胞週期之進展，其活性則受到CDKIs的抑制。回應生長因子之刺激，因而激活cyclin/CDK之活性，是細胞週期進程及G1/S轉換之所必需。一些研究表明，生長因子觸發細胞內的訊息級聯，導致核轉錄因子的活化，激活cyclin/CDK complexes複合物，活化細胞通過G1期檢查點，而進入DNA複製的S期^[49]。G1/S期之轉換受兩個CDKs家族的正向調控，包括CDK2/cyclin E和cyclin A的複合物，或CDK4/cyclin D或CDK6/cyclin D的複合物。cyclin D/CDK4/6複合物，會回應生長因子而誘導視網膜母細胞瘤(Rb)蛋白的磷酸化和E2F的脫離，從而觸發 G1細胞週期進程^[50]，而癌症經常表現cyclin, CDK,和CDKIs之調控異常^[59]。

因此，為進一步確定雪蓮抑制前列腺癌PC-3細胞之生長，可藉由影響細胞週期進展之機制，因而應用免疫墨點測定法，檢測細胞週期調控因子之表現。如圖18C 所示：經SI-2 (50 µg/mL)處理後，PC-3細胞之cyclin D1

表現量顯著以時間依賴性減少，cyclin E 則無改變。cyclin D1是CDK4之調控次單元(regulatory subunit)，同時可促成CDK4之穩定性。免疫墨點法檢測結果顯示，PC-3細胞經SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理後，其CDK4蛋白質表現亦明顯的以依賴時間之方式減退，而CDK2 則無改變 (見圖18D)。

我們的研究結果與既有之研究報告相似^[69, 70]，該研究之助者指出，一個眾所周知中醫用於治療肝臟疾病之成分—antroquinonol，具有抗癌活性，能有效抑制DNA陽性和DNA陰性乙型肝炎病毒肝癌細胞株(HBV DNA-positive and -negative HCC cell lines)。該作者認為，G1調控蛋白的mRNA表現未被修飾，顯示antroquinonol抑制mRNA之轉譯(translation) 而非轉錄 (transcription)。Antroquinonol藉由抑制蛋白質的磷酸化，包括：m-TOR，p70S6K和4E-BP1，因而抑制G1期調控蛋白質的合成^[69]。

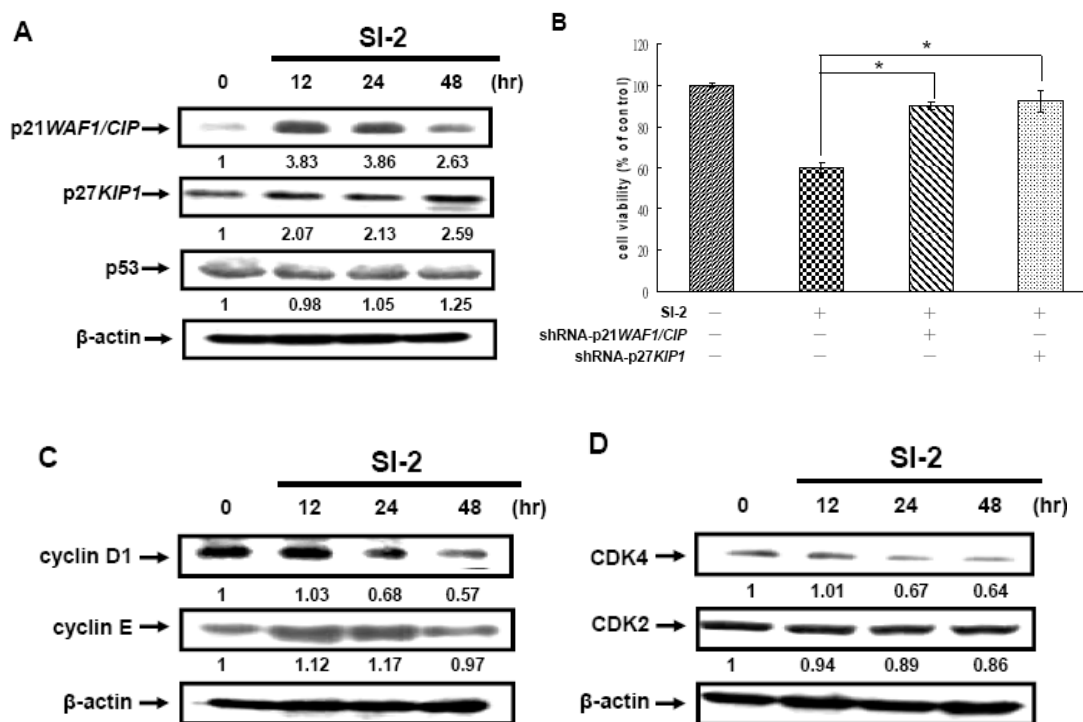


Figure 18 *S. involucrata* alters cell-cycle regulatory proteins in PC-3 cells.

*PC3 cells were treated with a vehicle (DMSO) or SI-2 (50 µg/mL) for the indicated time. Cells were then harvested and lysed for the detection of (A) p21WAF1/CIP, p27KIP1, p53 and β-actin (C) cyclin D1, cyclin E and β-actin (D) CDK2, CDK4, and β-actin protein expression. Western blot data presented are representative of those obtained in at least three separate experiments. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to β-actin. (B) PC3 cells were transfected with 50 nmol/L p21WAF1/CIP or p27KIP1-shRNA. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with SI-2 (50 µg/mL) for 24 h. The cell viability was then determined using MTT assay. This experiment was repeated three times. Bar represents the S.E. * indicates the values are significantly different from the control (*, $p < 0.05$).*

六、SI-2向下調節Bcl-2並活化caspase-3及caspase-9

許多基因產物在控制細胞凋亡過程中佔有重要之地位，細胞接受刺激後，抑制和促進凋亡蛋白質(anti- and pro-apoptotic proteins) 之表現失衡，是誘導細胞凋亡的一個主要機制^[36]。為探討雪蓮誘發前列腺癌PC-3細胞凋亡之分子機制，首先檢測經SI-2處理後，PC-3細胞之促進凋亡蛋白質(Bax) 在不同時間點之表現。如圖 18 A所示，經 SI-2 (50 µg/mL)處理後，前列腺癌PC-3細胞之Bax蛋白質表現明顯增加。接著檢測抑制凋亡蛋白質(Bcl-2) 經SI-2處理不同時間點後之蛋白質表現。SI-2 (50 µg/mL) 向下調節前列腺癌PC-3細胞 Bcl-2之表現 (見圖 19A)。

細胞色素c (cytochrome c)自粒線體釋出是開啟細胞凋亡之重要閘門。Cytochrome c自粒線體釋出受到促進凋亡蛋白質，包括：Bid, Bax,及

Bak，和抑制凋亡蛋白質包括：Bcl-2及Bcl-XL，彼此之間的相互作用所調控^[71]。所以我們接著檢驗雪蓮能否誘發cytochrome *c*自粒線體釋出。西方墨點分析結果清楚顯示(圖 19B)，SI-2 (50 µg/mL)能以時間依賴性促使cytochrome *c*自粒線體釋出至細胞質(cytosol)。caspases cascade接續cytochrome *c* 釋出，在傳達不同細胞凋亡感應中扮演重要角色。

為檢查caspases在SI-2所誘發之細胞凋亡過程中的酶促活性，因而進行免疫墨點測定法分析。結果顯示SI-2 (50 µg/mL)能以依賴時間之方式促使PC-3細胞之caspase-9 (見圖 19C) 及caspase-3 (見圖 18D)分裂成活化形態。為確認SI-2經由caspases cascade誘發PC-3細胞凋亡，進一步使用caspase專一性抑制劑(Z-VAD-FMK) 驗證此一結果。Z-VAD-FMK能有效的以劑量依賴性抑制SI-2對PC-3細胞之抑制增殖作用 (見圖 19E)。

藉由粒線體膜之去穩定化和caspase cascade的活化，來決定細胞對凋亡的敏感性，抗凋亡蛋白質(Bcl-2)和促進凋亡蛋白質(Bax)之間的比率，被認為是一個主要因素^[71]。當Bax結合至粒線體膜，會誘導cytochrome *c* 釋放，隨後激活caspase-3，觸發下游凋亡反應^[72]。既有研究證明，抑制表皮生長因子受體導致Bcl-2和Bcl-XL的表現量減少，Bak和Bax的表現量則明顯增加，因而導致細胞凋亡^[73]。由西方墨點分析結果推測，雪蓮誘發PC-3細胞凋亡之機制，是藉由調節Bcl-2家族成員之表現，並活化caspase-3及caspase-9。

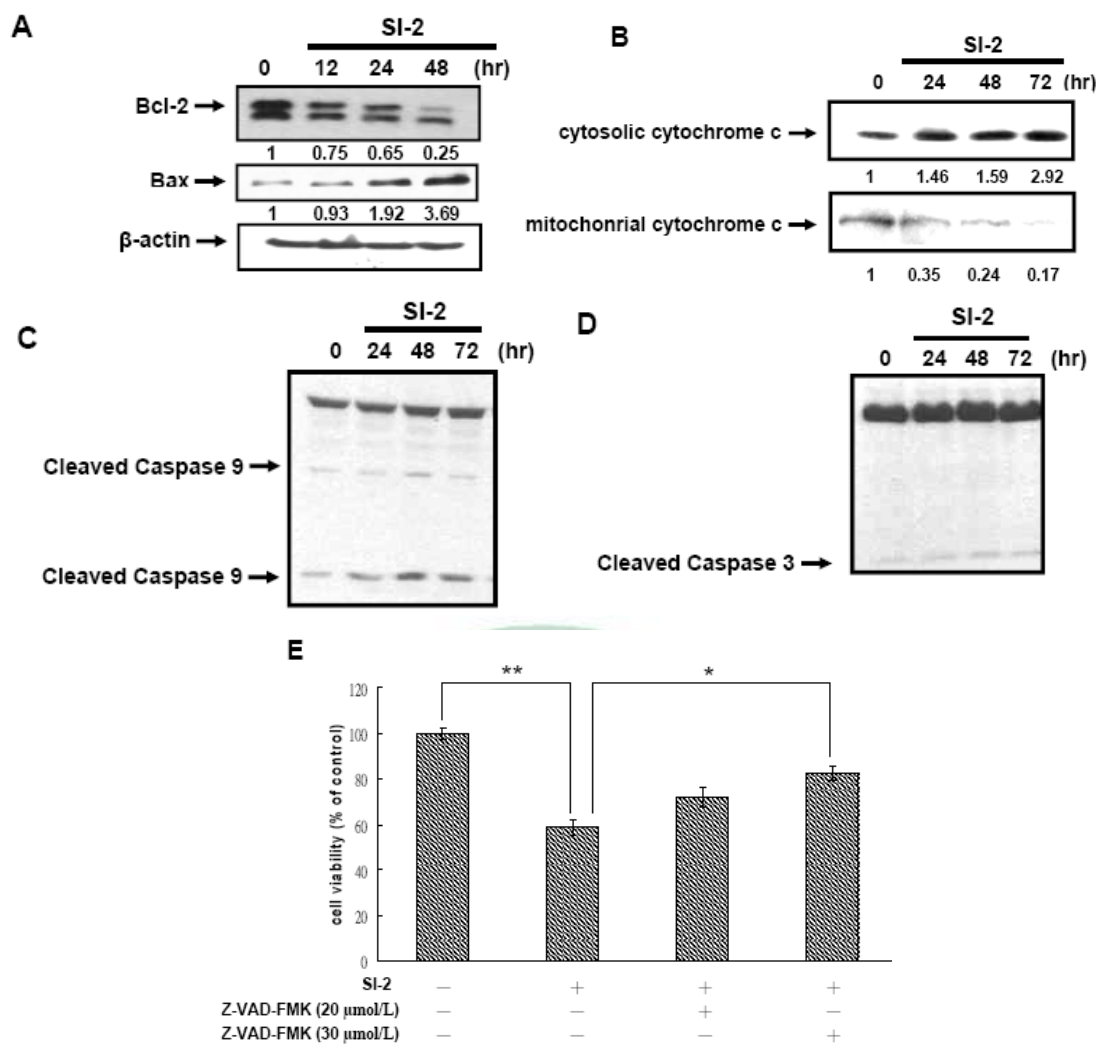


Figure 19 Effect of *S. involucrata* on apoptosis related proteins in PC-3 cells. PC3 cells were treated with a vehicle (DMSO) or SI-2 (50 μg/mL) for the indicated time. Cells were then harvested and lysed for the detection of (A) Bcl2, Bax and β-actin (B) cytochrome c in the mitochondrial and cytosolic fraction (C) Caspase 9 (D) Caspase 3 protein expression. Western blot data presented are representative of those obtained in at least three separate experiments. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to β-actin. (E) Z-VAD-FMK or the vehicle (DMSO) was added to the medium at 1 hour before the SI-2 (50 μg/mL) treatment. After the 24-hour incubation, the PC3 cell viability was determined using MTT assay. This experiment was repeated three times. Bar represents the S.E. * indicates the values are significantly different from the control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

七、SI-2抑制PC-3細胞之EGFR, AKT及STAT3 磷酸化

既有文獻報導，前列腺癌有EGFR表現異常、亦或EGFR活化之現象，為標靶EGFR做為治療人類EGFR陽性癌症之標的，提供一個有力的理論依據。為確定SI-2對荷爾蒙抗性前列腺癌PC-3細胞之EGFR的影響，我們使用磷酸專一性抗體，檢定EGFR之磷酸化。實驗結果顯示(見圖20)，SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)以依賴時間之方式抑制EGFR之磷酸化。

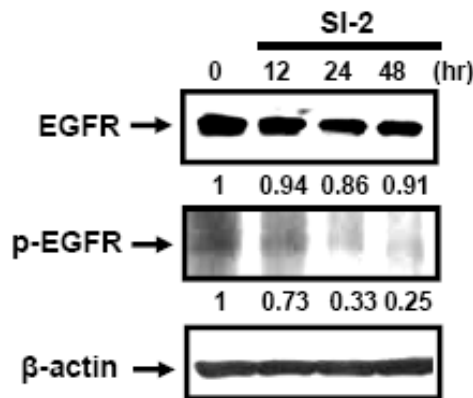


Figure 20 Effect of *S. involucrata* on the constitutive autophosphorylation of EGFR. PC3 cells were treated with a vehicle (DMSO) or SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for the indicated time. Cells were then harvested and lysed for the detection of EGFR, p-EGFR and β -actin protein expression.

已活化之EGFR所誘發之訊息途徑包含PI3K/AKT及STAT3，此二者在EGFR媒介的促使有絲分裂和細胞存活扮演重要角色，因此我們接著評估雪蓮對PC-3細胞AKT及STAT3之作用。由實驗結果發現，SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能以依賴時間之方式，抑制PI3K/AKT及STAT3之磷酸化 (見圖 21A)。

八、過度表現 AKT 及 STAT3 導致 PC-3 細胞對 SI-2 產生抗性

假如 AKT 及 STAT3 是雪蓮抑制前列腺癌 PC-3 細胞增殖具決定性之

標的(critical targets)，則深遠且持續的 AKT 及 STAT3 之表現可能會減弱雪蓮抑制 PC-3 細胞增殖的功效。為求證此一假設，我們使用 CA-AKT 及 CA-STAT3 進行過度表現 AKT 及 STAT3 之實驗。PC-3 細胞以 50 nmol/L 之 CA-AKT 或 CA-STAT3 轉移感染(transfected) 24 小時後，再以 SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理 24 小時，應用 MTT assay 測定細胞存活率。相較於控制組，實驗結果顯示，SI-2 對過度表現 AKT 及 STAT3 之 PC-3 細胞的增殖抑制作用相形較弱(見圖 21B)，由此推測 AKT 及 STAT3 應是雪蓮抑制 PC-3 細胞增殖之部分作用標的。

九、SI-2活化PC-3細胞之p38 MAPK

有絲分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases ; MAPK) 會回應細胞外來的刺激，進而調控細胞之活性，例如：基因表現、有絲分裂、細胞分化、和細胞之凋亡或存活等^[49]。為確定雪蓮是否影響MAPK之活化，因而進行time course實驗，檢測前列腺癌PC-3細胞回應SI-2之作用，其ERK1/2、JNK及p38之活化效果。PC-3細胞以SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培育不同時間後，應用磷酸化專一性抗體和免疫墨點測定法，檢測ERK1/2, JNK, 及p38之表現(見圖 21C)。實驗結果顯示，經SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理PC-3細胞12小時後，p38磷酸化明顯增加；而ERK1/2及JNK則未被SI-2所活化。

為求證雪蓮是否經由活化p38途徑而抑制PC-3細胞之生長，我們使用

SB203580做進一步確認。SB203580是p38之專一性抑制劑，結構屬於pyridinyl imidazole 類之衍生物。PC-3細胞以SB203580亦或SI-2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理24小時，然後以 MTT assay 測定細胞存活率。如圖 21D 所示，SB203580不會改變SI-2對PC-3細胞之生長抑制效果。由此實驗結果推測，即使增加磷酸化p38之表現量，對SI-2抑制PC-3細胞之生長並沒有明顯之差異。由此推測，雪蓮誘導細胞凋亡並非依賴p38途徑之活化。

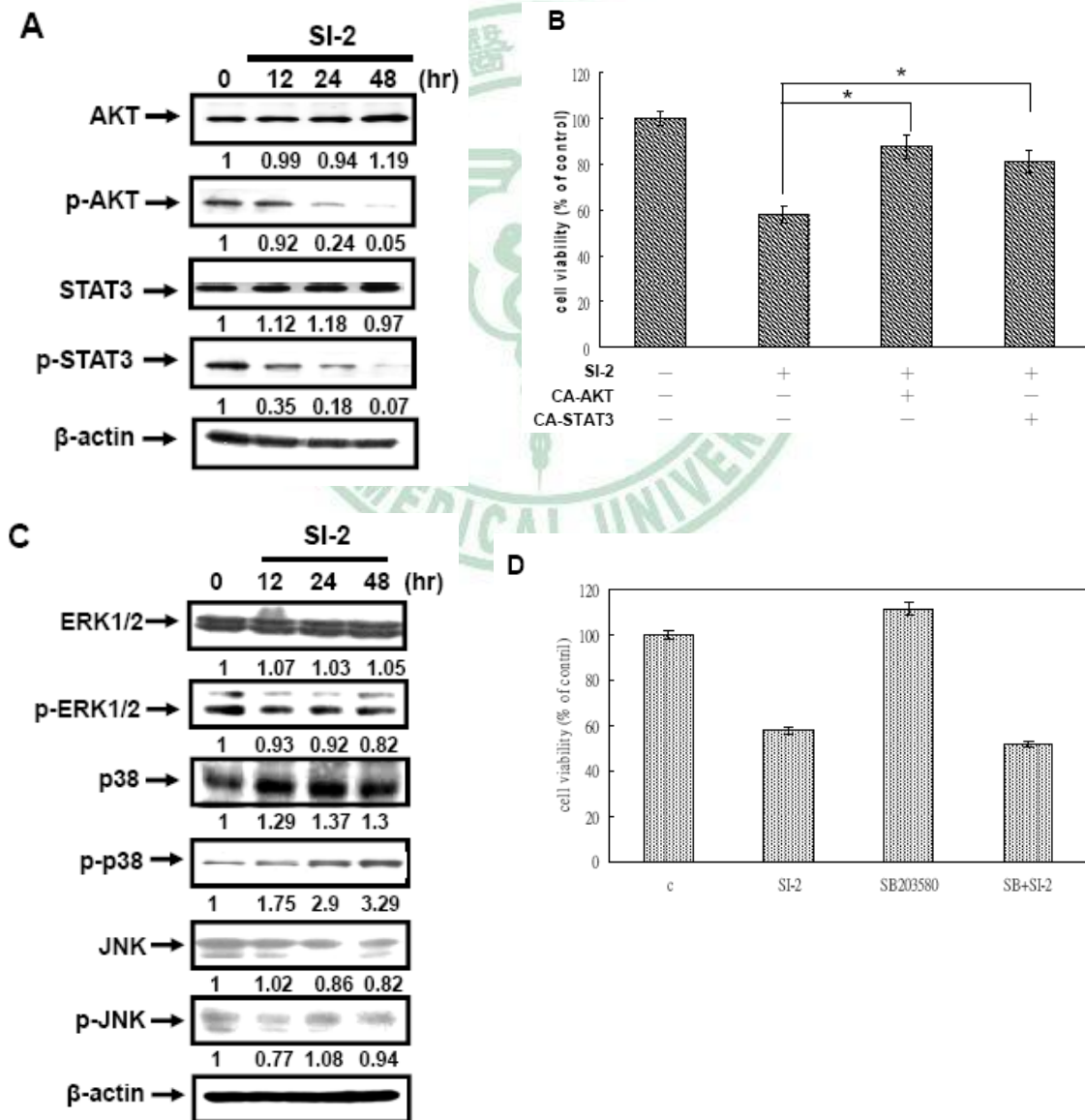


Figure 21 Effect of *S. involucrata* on the EGFR signaling. PC3 cells were treated with a vehicle (DMSO) or SI-2 (50 µg/mL) for the indicated time.

Cells were then harvested and lysed for the detection of (A) AKT, p-AKT, STAT3, p-STAT3, and β-actin (C) ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38, JNK, p-JNK, and β-actin protein expression. Western blot data presented are representative of those obtained in at least three separate experiments. The values below the figures represent change in protein expression of the bands normalized to β-actin. (B) PC3 cells were transfected with 50 nM of CA-Akt or CA-STAT3. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with SI-2 (50 µg/mL) for 24 h. Then the cell viability was determined using MTT assay. (D) PC3 cells were cultured with SI-2 (50 µg/mL) or 10 µM SB203580 in the absence or presence of SI-2. Then the cell viability was determined using MTT assay.

This experiment was repeated three times. Bar represents the S.E.

十、SI-2 在體內之抗腫瘤活性

藉由以上之實驗結果確定雪蓮是有效且具選擇性之抗腫瘤藥劑。為進一步評估雪蓮在活體內之抗腫瘤活性，利用皮下異種移植模式，將 5×10^6 前列腺癌 PC-3 細胞注射至 BALB/c nude mice 之右腰腓，待腫瘤生長至約 100 mm^3 時，隨機將 18 隻小鼠分成 3 組(n=6)。分別經口餵食 (p.o)生理食鹽水或 SI-2 (10 mg/kg 或 30 mg/kg)，一週三次，連續四週。於實驗期間每週測量小鼠之體重及腫瘤體積，並監測小鼠之生命跡象，藉以評估雪蓮於活體內抑制腫瘤生長的效果。

如圖 22A 所示，SI-2 能以依賴濃度之方式抑制前列腺癌 PC-3 腫瘤之生長 (30 mg/kg SI-2, 1123.93 mm^3 , $P < 0.01$ versus vehicle; vehicle-treated group= 2483.28 mm^3 on day 28)。除此之外，SI-2 能以依賴濃度之方式抑制

前列腺癌腫瘤之重量 (見圖 22B)。在抗腫瘤活性評估過程中，實驗組和對照組小鼠的體重皆無明顯改變 (見圖 22C)，小鼠犧牲後亦無發現病理症狀。

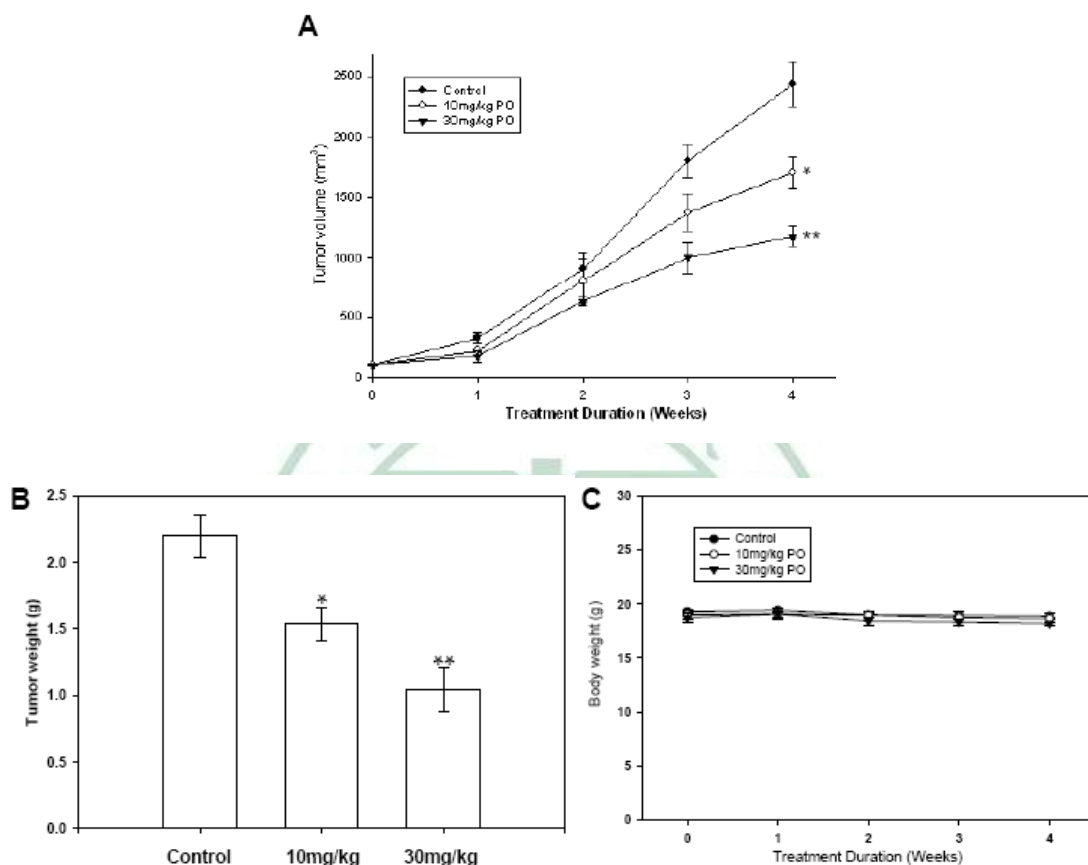


Figure 22 Effect of *S. involucrata* on anti-tumor activity. *PC3* cells were used to establish xenografts in male BALB/c nude mice. Animals ($n=6$) were given control, SI-2 (10, 30 mg/kg) by given p.o. injection 3 times/weekly. (A) Tumor volume (mm^3), (B) tumor weight (g), and (C) body weight (g). Bar represents the S.E. * Indicates the values are significantly different from the control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

第四章 結論

千百年來，在中國雪蓮已被廣泛應用於清除自由基、抗疲勞、抗發炎、抗癌及免疫調節，雖然雪蓮已被用於治療癌症，然而其治療癌症之生物學和作用機制尚未十分明瞭，因此吾等進行本研究，探討雪蓮(*S. involucrata*) 抑制腫瘤細胞之生物及生理機制。

雪蓮能抑制多種人類不同癌症細胞株之生長，尤其是抑制荷爾蒙抗性前列腺癌 PC-3 細胞增殖之活性最為顯著($IC_{50} = 50.95 \mu\text{g/ml}$)，表明雪蓮具有強效之細胞毒殺作用。為深入瞭解雪蓮抑制 PC-3 細胞生長與誘發細胞週期停滯的相關分子機制，因而檢測雪蓮對 G1/S 期調控蛋白質激酶之影響。免疫墨點分析結果顯示，雪蓮抑制 PC-3 細胞 Cyclin D1/CDK4 之表現量；同時，雪蓮不依賴 p53 訊息途徑，亦能誘發 p21*WAF1/CIP* 蓄積，導致 PC-3 細胞之細胞週期停滯於 G1-phase。

許多文獻報導 EGFR 抑制劑可調節過度表現 EGFR 之腫瘤細胞的 EGFR 訊息途徑，對癌症之控制和治療有所裨益。本研究亦證明雪蓮能抑制 PC-3 細胞之 EGFR 磷酸化，並抑制 EGFR 介導的下游訊息途徑之活化，如 AKT 及 STAT3 途徑。在皮下移植腫瘤模式，雪蓮以依賴濃度之方式抑制前列腺癌 PC-3 腫瘤之生長，評估過程中，實驗組小鼠的體重無明顯改變，犧牲後亦無發現病理症狀，證明雪蓮是安全、有效之抗前列腺癌藥用植物。

在科學界和工業界，利用自然產生的化合物發展成為抗癌藥物，已成為一門重要課題。雪蓮是一種稀有、瀕臨滅絕的傳統中藥，現代藥理研究表明，雪蓮具有許多藥理作用。然而，雪蓮影響人類腫瘤細胞確切的分子機制尚未得到充分解釋。我們的研究聚焦探討雪蓮誘導之前列腺癌細胞生長抑制，主要是藉由抑制前列腺癌細胞之表皮生長因子受體信號。綜合吾等之研究結果證明，雪蓮是表皮生長因子受體及其下游信號分子(PI3K/AKT, STAT3)的有效抑制劑，為前列腺癌之治療帶來莫大希望，並可發展成為安全、有效對抗人類 EGFR 陽性腫瘤之藥物。




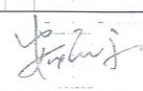

第五章 實驗部分

一、實驗材料

1. Rutin, Z-VAD-FMK, thymidine, SB203580, propidium-iodide (PI), MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), and antibodies for Bcl-2, Bax, caspase-9, caspase-3, and β -Actin 購自 Sigma Sigma (USA).
2. Hispidulin, rutin, 及 syringine 購自 Tocris Bioscience (Bristol, UK).
3. Antibodies for STAT3, EGFR, AKT, p-AKT, ERK, JNK, p53, and p21*WAF1/CIP* 購自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA).
4. Antibodies for p-ERK, p-STAT3, p38, p-p38, p27*KIP1*, Cytochrome *c*, CDK2, CDK4, Cyclin E, and Cyclin D1 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).
5. Antibody for p-EGFR (Y38) 購自 Abcam (Cambridge, MA).
6. Antibodies for mouse and rabbit conjugated with horseradish peroxidase 購自 Chemicon (Temecula, CA).
7. Western Chemiluminescent HRP Substrate 購自 Millipore Corporation (Billerica, MA).
8. Cells 購自 American Type Culture Collection (Manassas, VA).
9. 實驗使用之原生種雪蓮由全真生物科技股份有限公司提供。

二、雪蓮抽出物之製備方法

實驗使用之原生種大苞雪蓮由全真生物科技股份有限公司提供(見圖23)。精確量取20公克全株大苞雪蓮乾燥粉末，每次以100 ml之甲醇加熱迴流萃取2小時，共3次。將3次甲醇萃取液合併，利用真空減壓濃縮去除甲醇，乾燥後之雪蓮粗抽出物外觀呈深棕色糖漿狀(SI-1)。取此糖漿狀之雪蓮粗抽出物，以蒸餾水使之懸浮，分別以pentane、ethyl acetate (SI-2) 及 n-butanol (SI-3)萃取，並保留水層(SI-4)。分別利用真空減壓濃縮方式去除之溶劑，經此所得之不同雪蓮抽出物，於無塵操作台稱取所需劑量，以DMSO或生理食鹽水稀釋成300 mg/ml之溶液，供實驗操作使用。

CERTIFICATE FOR NON-REGULATED SPECIES LISTED IN THE HS COMMODITY APPENDIX OF IMPORT & EXPORT ON WILD FAUNA & FLORA							<input checked="" type="checkbox"/> EXPORT 出口 <input type="checkbox"/> RE-EXPORT 再出口 <input type="checkbox"/> IMPORT 進口 <input type="checkbox"/> OTHER 其它	
非《进出口野生动植物种商品目录》 物种证明 3. Importer (Name, Address and Country) 进口商 (名称、地址和国家) TaiWan TianShan Snowdrop Science CO.,LTD ZhangHua TaiWan ,China							1. Certificate No. 证书 2005CNIES0007JUG 2. Valid Until 有效期至 2005-11-23	
4. Exporter (Name, Address and Country) 出口商 (名称、地址和国家) 中国新疆新伏美制药有限公司 新疆乌鲁木齐市天山南街1号							5. HS Code, Commodity and Special Conditions 海关税则号、商品名称及特殊条件 12119039.91 膏剂, 包装运输 This is to certify that the commodity applied is not subject to CITES and Non-CITES Import and Export Permit. 本证书所涉物种不属于 CITES 证明书及非 CITES 附录物种的进出口证明书管理范围。特此证明。	
3a. Import Port 进口口岸 CN KEELUNG 5. HS Code, Commodity and Special Conditions 海关税则号、商品名称及特殊条件 12119039.91 膏剂, 包装运输 This is to certify that the commodity applied is not subject to CITES and Non-CITES Import and Export Permit. 本证书所涉物种不属于 CITES 证明书及非 CITES 附录物种的进出口证明书管理范围。特此证明。							4a. Export Port 出口口岸 CN XiaMen 6. Name, Address, National Seal of Management Authority 管理机构的名称、地址、官方印信  The Endangered Species Import and Export Management Office of the People's Republic of China Add: 10 Hepingli Dongjie, Beijing 100714 The People's Republic of China Tel: 86-10-84239017, 84239010 Fax: 86-10-84214180, 84239015 中华人民共和国濒危物种进出口管理办公室 地址: 中国北京和平里14街18号 邮政编码: 100714 电话: 86-10-84239001, 84239010 传 真: 86-10-84214180, 84239015	
7a. Species (Chinese & Scientific Name) 物种名称 (中文名称、学名) A. 雪莲 Saussurea involucreta *****LAST ITEM*****							7b. Class 类别 NON W 7c. Source 来源 7d. Description 标本类型 干燥 Dried Body 7e. Quantity or Weight (Unit) 数量或重量(单位) *1400.KG 7f. Country/Region of Origin 原产国地区 CN	
8. THIS CERTIFICATE IS ISSUED BY 发证机关 Urumqi 2005-10-25 Signature 签名  Official Stamp 公章 							9. For Customs Official Use Only 海关官方使用 单位报关日期: Block 栏目 A. Quantity/Unit 数量/单位 B. C. D. Port of In/Export 进出口口岸 Date 日期 Signature 签名 Official Stamp 公章	

说明: 本证书一式三联, 此联供申报用。
 NOTE: This certificate is composed of 3 pages. This copy is for Customs declaration.

0011031

Figure 23 大苞雪蓮 (*Saussurea involucreta*) 物种证明

三、利用 Reverse-phase HPLC 分析雪蓮之黃酮類成分

應用配備 photo diary detector 之高效液相層析儀 (HPLC with photo diary detector) 測定雪蓮所含之黃酮類化合物。HPLC 系統配備包含 Shimadzu LC-20AT 溶劑輸送系統，SPD-M20A 光電二極管陣列檢測器，波長設定為 270 nm。樣品以 SiL-20A autosample 注入 TSK-Gel ODS-100S 層析管，維持在室溫 (25°C)，流速為 1.0 mL/min。移動相溶劑為 A. 0.3% 甲酸(formic acid) 和 B. 乙腈 (acetonitrile)。溶劑 A 之溶析曲線線性梯度變化 0~10 分鐘為 0~5%；10~40 分鐘線性梯度變化至 55%；並另外維持後運行時間 10 分鐘，以平衡層析管並回復最初正常操作狀態。

四、細胞培養 (Cell lines and culture conditions)

MDA-MB-231 及 SKOV3 細胞培養於 DMEM/F12 培養液；Cal-27, HepG2, 和 SAS 細胞培養於 90% 的 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)，含 10% FBS (fetal bovine serum; Invitrogen Carlsbad, CA) 及 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Carlsbad, CA)；PC-3 和 LNCaP 細胞培養於 RPMI-1640 medium，內含 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate 及 4.5 g/L glucose。培養液內加入 10% FBS 及 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Carlsbad, CA)。細胞培養於 37°C 濕潤含 5% CO₂ 的細胞培養箱。

五、細胞增殖分析 (Cell proliferation assays)

利用 MTT assay 檢測 SI-2 對細胞增殖之影響，方法如前所述^[74]。

六、細胞週期同步化 (Cell cycle synchronization)

利用 double thymidine block 使 PC-3 之細胞週期同步。在含 10% FCS 之培養液中，細胞以 3 mM thymidine 處理 16 小時，用 PBS 洗滌兩次，然後於含 10% FCS 之新鮮培養液中培養 10 小時。細胞再次以含 3 mM thymidine 之 medium/10% FCS 處理 16 小時，細胞經 PBS 洗滌後培養於新鮮的 medium/10% FCS (此時代表時間 0)，分別於 0, 12, 24, 48, 和 72 小時收集細胞，應用流式細胞儀檢測分析細胞週期。

七、細胞週期分析 (Cell cycle analysis)

細胞 (5×10^5) 分別培養在 60 毫米細胞培養皿中，培養 24 小時後，收集細胞置於 15 mL 離心管中，以 PBS 洗滌並使之懸浮，然後固定在 2 ml 之 100% 冰乙醇，於 -20°C 靜置過夜。離心收集細胞，細胞沉澱物懸浮於 0.5 ml 低張緩衝溶液 (0.5 % Triton X-100 in PBS and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase)，室溫下孵育 30 分鐘。隨後加入 1ml 碘化丙啶溶液 (propidium iodide solution; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，混合物冰鎮 30 分鐘後，應用 FAC-Scan 流式細胞儀 (BD Biosciences, San Jose, CA) 定量 PI-DNA 複合物被激發後所發射的螢光。

八、西方墨點法 (Western blot Analysis)

細胞 (1.5×10^6) 分別接種到 100 毫米組織培養皿中，內含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培養液，培養 24 小時後，細胞在 10% FBS DMEM/F12 培養液中加入不同試劑，繼續培養。經處理後，將細胞放置在冰上，用冷 PBS 洗淨，並溶解在 lysis buffer，西方墨點分析操作方法如前述 [75]；帶狀物之明暗度，以 NIH image software 掃描及定量。

九、細胞色素 *c* 之測定 (Cytochrome *c* release)

將細胞懸浮在冰冷的緩衝液 A [250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17 mg/mL PMSF, 8 mg/mL aprotinin and 2 mg/mL leupeptin (pH 7.4)] 以製備粒線體和細胞溶質分層 (mitochondrial and cytosolic fractions)。將細胞通過 27 gauge-needle 10 次，未溶解之顆粒細胞和細胞核以 $750 \times g$ 離心 10 分鐘，上層清液以 $100,000 \times g$ 離心 15 分鐘，沉澱物懸浮於緩衝液 A 即相當於粒線體層；上層清液再一次以 $100,000 \times g$ 離心 1 小時，最後之上層清液即為細胞溶質層。

十、體內抗腫瘤活性評估 (*In vivo studies*)

雄性 BALB/c nude mice (18-20 公克；4-6 週齡) 購自國家動物中心 (Taipei；Taiwan)，並依實驗動物管理辦法飼養於加壓通風籠中。前列腺癌

PC-3 細胞(5×10^6 in 0.5 mL PBS via a 24-gauge needle)以皮下異種移植模式注射至小鼠之右腰窩。腫瘤生長至約 100 mm^3 時，隨機將 18 隻小鼠分成 3 組($n=6$)。雪蓮乙酸乙酯抽出物於使用前，使用已消毒滅菌之生理食鹽水稀釋成 300 mg/ml 之溶液，以經口(p.o)之投藥途徑，分別餵食生理食鹽水或 SI-2 (劑量各為 10 mg/kg 及 30 mg/kg)，一週三次，連續四周。投藥過程中，每週測量小鼠之體重及腫瘤體積，利用電子尺測量腫瘤之長、寬，再以 $1/2 (L \times W^2)$ 之公式計算腫瘤體積，其中 L 為長、W 為寬^[76]。實驗小鼠利用二氧化碳及頸椎錯位使其安樂死，犧牲後切除腫瘤→秤重→切片，腫瘤切片包埋於 OCT，於 -70°C 冰凍保存。

十一、Short hairpin RNA

RNAi 試劑得自 National RNAi Core Facility，shRNA 設計之目的是針對人類特定的 p27kip1 (Clone ID: NM 004064; Target sequence: 5'-AGCAATGCGCAGGAATAAGG-3') 和 p21WAF1/CIP (Clone ID: NM 000389; Target sequence: 5'-GTCACTGTCTTGTACCCTTGT-3')。於轉移感染前一天，細胞以 30 ~ 40 % 之密度接種於不含抗生素的培養皿中，利用 lipofectamine 2000TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 將 20 nM shRNA 轉移感染至細胞。細胞繼續培養 24 小時，如前述之方法加入 SI-2，再經過 24 小時，以細胞流式細胞儀和免疫墨點法檢測 (方法如前所述)。

十二、轉移感染 (Transfection)

於轉移感染之前一天， 2×10^5 細胞接種至無血清和抗生素之六孔盤，待 PC-3 細胞生長至約 90 %，於翌日利用 OPTI-MEM (GIBCO, Carlsbad, CA) 預先混合 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及質粒 DNA (plasmid DNA) 5 分鐘，然後添加到每孔盤，再培養 24 小時，轉移感染即完成。

十三、統計分析 (Statistical Analysis)

所有實驗數據以至少三次個別實驗之平均值標準差(mean \pm S.E.)表示，使用 Student's *t*-test 來比較實驗組與對照組之差異。*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ ；***表示 $p < 0.001$ ，*p* 值小於 0.05 以下時，則具統計意義。

參考文獻

- (1) Fu LG. China plant red data book-Rare and endangered plants. *Chinese Science Press (Beijing)* 1992; 1:234-235.
- (2) 晁 威；雪蓮花及其藥理作用。食品與藥品，2005 年第 7 卷第 4 期。
- (3) 劉勇民主編；新疆維吾爾藥志(上)。烏魯木齊，新疆科技衛生出版社，1999, p 490.
- (4) 謝宗方；中藥材品種論述 (中)。上海科學技術出版社，1984, 349-358.
- (5) 王願康、林章代、何侃等；新疆雪蓮化學成分研究。藥學報，1986; 21:680-682.
- (6) 宋治中、賈忠建；新疆雪蓮化學成分研究(VI)。中草藥，1990; 21:4-5.
- (7) 韓書亮；大苞雪蓮花四種成分抗癌作用研究：癌變、畸變、突變。1995; 7: 80-83.
- (8) 李君山、蔡少青；雪蓮花類藥材的化學和研究進展。中國藥學雜誌，1998; 33:449-452.
- (9) Jia JM, Wu CF, Liu W, Yu H, Hao Y, Zheng JH, Ji YR. Anti-inflammatory and analgesic activities of the tissue culture of *Saussurea involucrata*. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1612-1614.
- (10) Yi T, Zhao ZZ, Yu ZL, Chen HB. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as “Snow

Lotus” herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. *J Ethnopharmacol* 2010; 128:405-411.

- (11) Qiu JA, Xue XF, Chen FD, Li CG, Bolat N, Wang XJ, Baima Y, Zhao QA, Zhao DX, Ma FS. Quality evaluation of snow lotus (*Saussurea*): quantitative chemical analysis and antioxidant activity assessment. *Plant Cell Rep* 2010; 29:1325-1337.
- (12) Xiao W, Li XA, Li N, Bolati M, Wang XJ, Jia XG, Zhao YQ. Sesquiterpene lactones from *Saussurea involucrata*. *Fitoterapia* (2011).
- (13) 張本國、方枚、尹極峰等；雪蓮注射液再疼痛治療中的實驗研究及臨床應用。中華麻醉學雜誌，1995; 1: 24.
- (14) 何新、李觀海、陳漢瑜；新疆雪蓮黃酮的抗炎鎮痛作用機理研究。西北藥學雜誌，1990; 5:17.
- (15) 鄭榮梁、劉光順、邢光新等；大苞雪蓮花多糖清除自由基及抗疲勞作用。中國藥理學報，1993; 14:47-49.
- (16) 黃慶軍、劉惠敏、甘露；雪蓮對力竭性游泳小鼠行為和免疫功能的影響。中國行為醫學科學，2004; 13:14.
- (17) Yang JM, Hung CM, Fu CN, Lee JC, Huang CH, Yang MH, Lin CL, Kao JY, Way TD. Hispidulin Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to

TRAIL-Induced Apoptosis by AMPK Activation Leading to Mcl-1 Block in Translation. *J Agric Food Chem* 2010; 58:10020-10026.

- (18) Lin YC, Hung CM, Tsai JC, Lee JC, Chen YL, Wei CW, Kao JY, Way TD. Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Agric Food Chem* 2010; 58:9511-9517.
- (19) Razdan TK. *J Indian Chem Soc* 1974; 5:910-917.
- (20) 王浴生、鄧文龍、薛春生；中藥藥理與應用(第二版)。北京人民衛生出版社，1998，960.
- (21) 林秀珍、王國祥；雪蓮多糖對大鼠子宮的作用。藥學學報，1986；27:220-222.
- (22) 趙德修、趙麗麗；雪蓮花的研究進展。中國藥學雜誌，1996.
- (23) 王慧春、徐文華；藏藥雪蓮花的研究進展。青海大學學報，2001；19:7.
- (24) Ciardiello, F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 2000; 60:25-32.
- (25) Riese DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/erbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; 20:41-48.

- (26) Flynn JF, Wong C, Wu JM. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and advances in clinical efficacy in breast cancer. *J Oncol* 2009; 1-16.
- (27) Wheeler DL. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7:493-507.
- (28) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-137.
- (29) Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19:3159-3167.
- (30) Lo HW and Hung MC. Nuclear EGFR signaling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 2006; 94:184-188.
- (31) Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:11-31.
- (32) Dutta PR, Maity A. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett* 2007; 254:165-177.
- (33) Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11:689-708.

- (34) Di Lorenzo G, Tortor, G, D'Armiento FP, De Rosa G, Staibano S, Autorino R, D'Armiento M, De Laurentiis M, De Placido S, Catalano G, Bianco AR, Ciardiello F. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3438-3444.
- (35) Itoh N, Patel U, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in isolated prostatic epithelial and stromal cells. *Endocrinology* 1998; 139:1369-1377.
- (36) Festuccia C, Gravina GL, Angelucci A, Millimaggi D, Muzi P, Vicentini C, Bologna M. Additive antitumor effects of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gefitinib (Iressa), and the non-steroidal antiandrogen, bicalutamide (Casodex), in prostate cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 2005; 115:630-640.
- (37) Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103:211-225.
- (38) Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:627-644.

- (39) Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:97-105.
- (40) Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:988-1004.
- (41) Shah M and Schwartz G. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An emerging concept in cancer therapy. *Clini Cancer Res* 2009; 7:2168-2181.
- (42) Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle Control and Cortical Development. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:438-450.
- (43) Jeffrey RJ, Denis RP, Mohammed MD, and Pearl SH. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:107-117.
- (44) Viktorsson K, Petris L, Lewensohn R. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:868-880.
- (45) Smith ML, Fornace AJ. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutat Res* 1996; 340:109-124.

- (46) Marcos M, Mariano B. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:60-65.
- (47) Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer* 2002; 87:129-133.
- (48) Abukhdeir AM, Park BH. The p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e19.
- (49) Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; 26:3227-3239.
- (50) Polager S, Ginsberg D. E2F-at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 2008; 18:528-535.
- (51) Lania L, Majello B, Napolitano G. Transcriptional control by cell-cycle regulators. *J Cell Physiol* 1999; 179:134-141.
- (52) Galaktionov K, Beach D. Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 1991; 67:1181-1194.
- (53) Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, Okayama H. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* 1994; 13:1549-1556.

- (54) Blomberg I, Hoffmann I. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G1/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6183-6194.
- (55) Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79:551-555.
- (56) Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79:573-582.
- (57) Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E. Inhibition of cyclin- dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 1995; 6:387-400.
- (58) Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131-134.
- (59) Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J. p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1999; 274:26776-26782.
- (60) Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:222-231.
- (61) Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2009: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:27-41.

- (62) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao YP, Xu JQ, Thun MJ, Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:225-249.
- (63) Griffiths K, Eaton CL, Harper ME, Turkes A, Peeling WB. Hormonal treatment of advanced disease: some newer aspects. *Semin Oncol* 1994; 21:672-687.
- (64) Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1051-1059.
- (65) Lee JT, Lehmann BD, Terrian DM, Chappell WH, Stivala F, Libra M, Martelli AM, Steelman LS, McCubrey JA. Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle* 2008; 7:1745-1762.
- (66) Agarwal BB, Shishodia S. Dietary agents with anti-cancer properties. *Biochem Pharmacol* 2006; 71:1397-1421.
- (67) Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* 2007; 28:233-239.
- (68) Fu CX, Xu YJ, Zhao DX, Ma FS. A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucrata* in phenylpropanoids production. *Plant Cell Rep* 2006; 24:750-754.

- (69) Chiang PC, Lin SC, Pan SL, Kuo CH, Tsai IL, Kuo MT, Wen WC, Chen P, Guh JH. Antroquinonol displays anticancer potential against human hepatocellular carcinoma cells: a crucial role of AMPK and mTOR pathways. *Biochem Pharmacol* 2010; 79:162-171.
- (70) Li ZF, Wang ZD, Ji YY, Zhang S, Huang C, Li J, Xia XM. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with *Chrysanthemum indicum* extract. *World J Gastroenterol* 2009; 15:4538-4546.
- (71) Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* 2004; 116:57-59.
- (72) Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:876-885.
- (73) Xiao X, Wu J, Zhu X, Zhao P, Zhou J, Liu QQ, Zheng L, Zeng M, Liu R, Huang W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells by ZD6474, an inhibitor of VEGFR tyrosine kinase with additional activity against EGFR tyrosine kinase. *Int J Cancer* 2007; 121:2095-2104.
- (74) Kuo PT, Lin TP, Liu LC, Huang CH, Lin JK, Kao JY, Way TD. Penta-*O*-galloyl-beta-D-glucose suppresses prostate cancer bone

metastasis by transcriptionally repressing EGF-induced MMP-9 expression. *J Agric Food Chem* 2009; 57:3331-3339.

(75) Way TD, Lin HY, Kuo DH, Tsai SJ, Shieh JC, Wu JC, Lee MR, Lin JK.

Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells. *J Agric Food Chem* 2009; 57:5257-5264.

(76) Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size

in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24:148-154.

