

計畫編號：CCMP89-RD-038

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：H8910

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

抗癌藥物 mimosine 衍生物的合成及其抗癌效果
之研究

委託研究報告

計畫委託機關：私立高雄醫學大學醫技系

計畫主持人：洪文俊

研究人員：顏銘宏、張慧秋

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

編號：CCMP89-RD-038

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究計畫成果報告

抗癌藥物 mimosine 衍生物的合成及
其抗癌效果之研究

執行機構
計畫主持人
研究人員

私立高雄醫學大學醫技系
洪文俊
顏銘宏、張慧秋

執行期限：民國 88 年 7 月 1 日至民國 89 年 6 月 30 日

本研究報告僅供參考，不代表本會意見

目 錄

- (1) 中文摘要
- (2) 英文摘要
- (3) 前言
- (4) 材料與方法
- (5) 結果
- (6) 討論
- (7) 結論與建議
- (8) 參考文獻
- (9) 圖次
- (10) 表次

編號：CCMP89-RD-038

抗癌藥物 Mimosine 衍生物的合成及其 抗癌效果之研究

計畫主持人：洪文俊

執行單位：高雄醫學大學醫技系

摘要

我們先前的研究發現：銀合歡種子內含之植物特有氨基酸 mimosine 於試管內可抑制肝癌及肺癌細胞的生長，其作用機制主要是經由改變細胞週期調控基因的表現來阻斷癌細胞的增生。我們也進行活體動物的研究，結果發現 mimosine 確實可抑制裸鼠體內肝癌及肺癌腫瘤的生長，而且其生物毒性很低，組織切片與染色分析顯示我們於活體動物治療所用的劑量對肝臟、肺臟及腎臟均無明顯副作用。本年度我們合成 mimosine 的衍生物並探討其在試管內及活體動物的抗癌效果。我們合成八種新的衍生物，然而其中多數非常不穩定，只有兩種衍生物性質穩定且能大量合成，分別為：(1) 3-(3-hydroxy-4-oxo-4*H*-pyridin-1-yl) propionic acid (代號：MD03) 及(2) 3-hydroxy-1-(3-oxo-butyl)-1*H*-pyridin-4-one (代號：MD07)。這兩種衍生物經大量合成、特性鑑定及光譜分析證實其結構正確且純度很高。我們進一步進行細胞株的實驗並偵測這兩種衍生物的抗癌效果及其作用機制並比較其與 mimosine 的抗癌效果。試管內細胞株的實驗發現 MD03 與 mimosine 的抗癌效果無明顯的差異。另一種衍生物 MD07 的抗癌效果

則較 mimosine 佳。我們分析衍生物 MD07 對細胞週期調控蛋白的影響發現它與 mimosine 對 cyclin D1 及 p21^{WAF1} 的表現有相同的作用，細胞凋亡的實驗發現此衍生物引發肝癌及肺癌細胞的效果比 mimosine 強。我們進一步測試該衍生物對裸鼠體內肝癌及肺癌腫瘤生長的影响，實驗結果顯示該衍生物可明顯誘導活體動物生長之癌細胞的凋亡及有效抑制活體腫瘤的增生，我們認為此衍生物具有開發成抗癌藥物的潛力。

關鍵詞：Mimosine，週期素 D1，p21^{WAF1}，TUNEL

CCMP89-RD-038

**Study of anti-cancer effect of derivatives synthesized
from mimosine**

Wen-Chun Hung

**School of Technology for Medical Sciences
Kaohsiung Medical University**

ABSTRACT

Our previous study demonstrated that mimosine, a plant specific amino acid extracted from the seeds of *Leucaena Glauca Benth*, inhibited proliferation of human hepatoma and lung cancer cells *in vitro*. This amino acid suppressed growth of cancer cells by modulating the expressions of cell cycle regulatory genes. In addition, this amino acid exerted potent anti-cancer effect *in vivo*. Our results also indicated that the cytotoxicity of this amino acid *in vivo* is tolerable. Immunohistochemical analysis demonstrated that the dose of mimosine used for therapy in our study did not show serious side effect. In this study, we synthesized new derivatives from mimosine and examined the anti-cancer effect of these compounds *in vitro* and *in vivo*. We synthesized eight derivatives from mimosine. However, most of the derivatives are unstable and only two compounds (1) 3-(3-hydroxy-4-oxo-4H-pyridin-1-yl) propionic acid (named as MD03) and (2) 3-hydroxy-1-(3-oxo-butyl)-1H-pyridin-4-one (named as MD07) are stable and can be easily synthesized. We first examined the anti-cancer effect of these two compounds in cell lines. Our results indicated that the anti-cancer effect of MD03 is very similar to mimosine. Conversely, MD07 is more effective in the inhibition of proliferation of cancer cells than mimosine.

We found that MD07 inhibited the expression of cyclin D1, up-regulated the expression of p21^{WAF1} and induced apoptosis in lung and liver cancer cells. We next tested the anti-cancer effect of MD07 *in vivo*. Immunohistochemical staining demonstrated that MD07 inhibited the expression of cyclin D1, up-regulated the expression of p21^{WAF1} and suppressed growth of tumors in nude mice. Finally, we used TUNEL assays to investigate the apoptosis-inducing activity of MD07 *in vivo*. Our results demonstrated that MD07 is more potent than mimosine in the induction of apoptosis of lung and liver cancer cells grown in nude mice. These results suggest that MD07 exerts potent anti-cancer effect *in vitro* and *in vivo* and this drug warrants further development.

Keyword : Mimosine, cyclin D1, p21^{WAF1} , TUNEL

前言

癌症的發生是累積多個基因變異的結果所產生的，依照基因在細胞癌化過程中所扮演的角色，可大致將基因分成兩大類：即致癌基因與抑癌基因(1-3)。致癌基因的蛋白質產物對細胞的生長或訊息傳遞有明顯的促進作用，所以當致癌基因被活化後，便會不斷的刺激細胞的增生進而形成腫瘤(4,5)。抑癌基因正好相反，這些基因的功能是在限制細胞不當的生長，所以當抑癌基因因為突變或缺失而造成其功能的破壞後，細胞生長不再受到嚴密的調控，癌症於是產生(6,7)。目前的研究顯示，在人類腫瘤形成的過程中，抑癌基因的損壞較致癌基因的活化更常見。由此可知抑癌基因功能的缺失與癌症的發生息息相關，同時許多抑癌基因陸續被發現，而這些基因隨後也被選殖出來(8)。最近的研究發現許多致癌或抑癌基因均會參與細胞週期的調節，細胞的增生主要是由週期素及週期素依賴型蛋白激酶來控制，當外來的生長因子或荷爾蒙與細胞膜上的受體結合後，藉由不同的訊息傳遞途徑及細胞內多種蛋白激酶的作用，可活化許多轉錄因子，而後引發與細胞生長有關的基因表現，此時 G1 週期素 (如:週期素 D1、D2、D3 與 E) 的合成會逐漸增加，週期素與週期素依賴型蛋白激酶彼此結合並催化蛋白質磷酸化的反應。細胞主控抑制增生的 Retinoblastoma 蛋白(Rb 蛋白)被磷酸化後，便會喪失抑制生長的能力，細胞於是進入 S 期使 DNA 合成增加，最後進行分裂成為兩個細胞(9-12)。癌細胞由於細胞週期調控基因的異常，無法發揮有效的功能，所以細胞可無限制的增生。更新的研究結果顯示細胞週期的調節除了週期素與週期素依賴型蛋白激酶外，還有其它週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白的參與(13-15)。這些抑制蛋白可大分成兩大群，第一類是 p21^{WAF1} 蛋白的家族，包括有 p21，p27 及 p57。第二類是 p16^{INK4A} 蛋白的家族，包括 p15，p16，p18 及 p19(16-18)。這些抑制蛋白都是非常重要的細胞週期調控者，它們可藉由與細胞週期素或週期素依賴型蛋白激酶的結合來抑制細胞週期的進行而有效阻斷細胞的增生。目前的證據指出上述兩類抑制蛋白在有些癌細胞其基因都已損壞，所以癌細胞的生長無法有效的控制以致於癌細胞不斷的生長(19,20)。目前的研究指出：p21^{WAF1} 基因的表現主要被細胞中另一個抑癌基因的蛋白質產物 p53

賴型蛋白激酶的結合來抑制細胞週期的進行而有效阻斷細胞的增生。目前的證據指出上述兩類抑制蛋白在有些癌細胞其基因都已損壞，所以癌細胞的生長無法有效的控制以致於癌細胞不斷的生長(19,20)。目前的研究指出：p21^{WAF1} 基因的表現主要被細胞中另一個抑癌基因的蛋白質產物 p53 所調節(21-22)。然而，p53 抑癌基因功能在多達 50% 的人類腫瘤組織被發現已經失去活性行為(23-24)。不僅如此，近來的實驗結果發現：此基因的缺損和癌細胞對化學治癌藥物的抗藥性有著密不可分的關係。現在對許多化學治癌藥物作用機轉的探討顯示：這些藥物會增加癌細胞 p53 基因的表現，p53 基因的產物是一種轉錄因子，它會進一步活化另一個非常重要的基因，即 WAF1 基因的表現，此基因的蛋白質產物稱為 p21^{WAF1} 可以抑制癌細胞的增生並且引發癌細胞自然死亡(Apoptosis)。如上所述，許多癌細胞其 p53 基因的功能缺損，所以添加化學治癌藥物並無法有效的促進 p53 與 WAF1 基因的表現，也無法有效的抑制癌細胞的生長。

我們去年度的研究顯示 mimosine，一種由銀合歡種子萃取出植物特有的氨基酸，可以有效抑制肺癌及肝癌細胞的生長。經過詳細分析其作用的分子機轉我們發現此氨基酸主要經由降低週期素 D1 基因的表現或增加週期素抑制蛋白 p21^{WAF1} 的表現來抑制肝癌及肺癌細胞的增生。更重要的是此氨基酸可誘發這些癌細胞的凋亡。這些結果顯示 mimosine 是一種有效的抗癌藥物。同時此氨基酸對活體動物生長的肝癌及肺癌也具有相同明顯的抗癌效果。Mimosine 對培養的肝癌或肺癌細胞的研究已發表於 SCI 研期刊(25)。而活體動物部份的抗癌效果之研究，目前已整理完成投稿中(26)。本年度我們合成 mimosine 的衍生物並探討其在試管內及活體動物的抗癌效果。我們也分析這些衍生物的抗癌作用機制並比較其與 mimosine 的抗癌效果。

貳、材料與方法

(1) 肝癌及肺癌細胞株的培養

本研究中我們選用於試管內實驗時，對 mimosine 有良好反應之 Hep3B 肝癌及 H226 肺癌細胞進行活體動物實驗。Hep3B 癌細胞是分化良好的肝癌細胞，可合成分泌多種血清蛋白，具有許多成熟肝細胞所擁有的特性，而 H226 癌細胞是鱗狀上皮肺癌細胞，將此兩種癌細胞培養於 DMEM/F12 培養液中，內含 10% 胎牛血清及抗生素。待細胞長滿後，以無菌林格氏液清洗三次，然後將細胞以(2×10^7 /ml)懸浮於無菌的林格氏液中待用。

(2) Mimosine 對細胞生長的影響

(A) MTT 實驗

我們以 MTT 實驗來評估細胞生長的情形。將細胞以 5×10^3 /well 的細胞數植入 96-well 培養盤一天後，添加不同濃度 mimosine 或 MD07 後，再持續培養兩天。其後，於每一 well 中加入 MTT 反應 4 小時，將細胞以 100 μ l DMSO 溶解。以 ELISA reader 於 540 nm 判讀，每一結果來自三次獨立實驗。

(B) 以細胞流體儀(FACS)分析 mimosine 或 MD07 誘導癌細胞凋亡的作用

FACS 分析依 1996 年 Hung, W.C. 等人之方法(27)進行。首先，細胞以 mimosine 或 MD07 處理兩天後，以 trypsin-EDTA 處理再以 PBS 清洗後，於 4°C 以 70% 乙醇固定再於 37°C 以 10 μ g/ml RNase A 處理 30 分鐘，最後於室溫下，以 70 μ M propidium iodide 染色 30 分鐘，再利用 Becton Dickinson cell sorter 分析是否有 apoptosis (即分析圖有 sub-G1 peak 的出現)。

(C)以洋菜瓊膠群落生長實驗測定癌細胞生成能力的變化

癌細胞 (10,000 cells/well) 植於培養基質中(內含上層 0.3 % agarose, 下層為 0.7 % agarose)。細胞以不同濃度 mimosine 或 MD07 處理並置於 37°C 培養五週後再以 p-iodonitrotetrazolium violet (1 mg/ml) 染色 48 小時。群落大於 100 μm 者,才予以計數, 每次實驗均重覆實驗 3 次, 以取其平均值。

(2) Mimosine 或 MD07 對細胞調控基因 cyclin D1 及 p21^{WAF-1} 的影響

(A)以西方點墨法分析 cyclin D1 及 p21^{WAF-1} 蛋白的變化

細胞經 Mimosine 或 MD07 處理, 以冰冷的磷酸鹽緩衝液清洗後, 於 lysis buffer (50 mM HEPES, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A 及 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 研磨均勻並以超音波震盪 5 分鐘後, 以 10000 rpm 離心 30 分鐘後, 收集上清液並定量蛋白質含量。每一樣本取 50 μg 蛋白質加入 SDS-loading buffer, 煮沸 5 分鐘後於 12.5% SDS-PAGE 進行電泳分析, 再將蛋白質轉印到 nitrocellulose membrane 上, 然後以 5% non-fat milk TBST (0.2% Tween 20 in Tris-buffered saline) 溶液進行 blocking, 而後以 cyclin D1 及 p21^{WAF-1} monoclonal antibody 反應 1 小時, 再以 TBST 清洗完全後, 加入 peroxidase-labeled secondary antibody 反應 1 小時, 最後以 ECL enhanced chemiluminescence reagents 反應並於 x-ray 軟片上壓片曝光, 以分析蛋白質表現的差異。

(3) 裸鼠腹腔皮下植入癌細胞以產生腫瘤之動物模式的建立

將肝癌或肺癌細胞($2 \times 10^6/100 \mu\text{l}$) 以皮下注射的方式植入裸鼠腹腔一側, 另一側只注射相同體積的林格氏液。將處理過的裸鼠養育於平常

的環境下，每天觀察其腫瘤生成的情形並照相保存，記錄不同組裸鼠死亡的時間，同時於動物死後將其解剖，取其腫瘤組織測量其重量與體積以利往後實驗的比較分析。

(3) 評估 Mimosine derivative 治療活體動物肝癌或肺癌的效果

(A) 以上述方法使活體動物生成腫瘤(約 0.2 cm^3)後，將裸鼠分成數組: 對照組(施打林格氏液)及 Mimosine 組(施打 $400 \mu\text{M}$ mimosine)及 MD07(施打 $400 \mu\text{M}$ MD07) 每天注射將動物於正常情形下養育照相記錄以比較各組實驗動物腫瘤生長的情形。連續注射 18 天後，將實驗動物犧牲，解剖取出腫瘤測量其重量與體積，同時也搜集體內其它器官(包括:肝臟、腎臟、肺臟等)，由病理科醫師檢查是否有特殊的病變。

(4) MD07 對活體腫瘤癌細胞週期素 D1 與週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白 p21^{WAF-1} 表現的影響

(A) 免疫組織化學染色

我們對解剖取得的腫瘤組織進行免疫化學染色分析。厚度為 $5 \mu\text{m}$ 的包埋組織切片經脫臘與水化之後，以 10 mM 的檸檬酸置於微波爐中二十分鐘進行抗原恢復後，加入 3% 過氧化氫的甲醇溶液以去除組織中內源性的過氧化酶。之後，組織以磷酸鹽緩衝液洗滌後，添加 cyclin D1 或 p21^{WAF-1} 的單株抗體在室溫下反應 30 分鐘，再以磷酸鹽緩衝液清洗。再加入 avidin-linking 的二次抗體於室溫下反應 30 分鐘，以磷酸鹽緩衝液清洗後，加入 peoxidase-labeled

streptavidin 作用 30 分鐘後，以呈色劑 diaminobenzidine (DAB) 呈色，並以 Mayer's hematoxylin 進行對比染色。玻片脫水及澄清透明作用是以酒精及二甲苯各別進行，最後以 entellan 封膠。在高倍的光學顯微鏡下計算每三百個細胞中之細胞核被深染之數目即標記指數(labeling index)。

(5) 活體腫瘤細胞凋亡的偵測(TUNEL 分析)

將 5 μm 厚度的組織切片脫蠟及水化，先以雙氧水作用 20 分鐘，以去除非特異性之染色，再以酵素 proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 在 37°C 下作用 60 分鐘，再加入 TUNEL 試劑(Boehringer Mannheim, Germany) 在 37°C 下作用 60 分鐘，再以 PBS 沖洗，之後加入 Converter POD (Boehringer Mannheim, Germany) 在 37°C 下作用 30 分鐘，再以 PBS 沖洗後，加入呈色劑 DAB (Diaminobenzidine) 在室溫下作用 10 分鐘，再以蘇木紫作為對比染色，水洗後以 entellan 封膠。最後，將染好的切片置於光學顯微鏡下觀察、拍照及記錄每一百個腫瘤細胞有多少個呈現細胞凋亡，稱為凋亡指數 apoptotic index。

參、結果

一. Mimosine 衍生物 MD07 可有效的抑制肺癌及肝癌細胞的生長

本研究第一項探討的問題是 mimosine 衍生物 MD07 是否能抑制肝癌及肺癌細胞的生長。本研究所使用的癌細胞株包括 H226 肺癌細胞株與 Hep3B 肝癌細胞株，因為我們前兩年的研究已知這兩株細胞株對 mimosine 的反應最強。我們將癌細胞培養於不同濃度的 mimosine 及 MD07 兩天後，進行 MTT 實驗。如圖一所示，MD07 可有效抑制 H226 肺癌細胞的生長，而且抑制生長的效果與 MD07 的濃度呈正相關。此外，MD07 的抗癌作用較 mimosine 強。Mimosine 處理兩天抑制 H226 癌細胞的生長約 50%，MD07 處理兩天後，可抑制 60-65% 左右的癌細胞增生。相同地，MD07 可有效抑制 Hep3B 肝癌細胞的生長，而且抑制生長的效果與 MD07 的濃度呈正相關(圖二)。此外，MD07 的抗癌作用也較 mimosine 強。我們前兩年的研究顯示 mimosine 主要是藉由抑制 cyclin D1 及誘導 p21WAF1 的表現來阻斷細胞週期的進行，為了瞭解 MD07 的作用機轉，我們也分析 MD07 對這兩種細胞週期調控基因的影響。如圖三所示，mimosine 與 MD07 都會抑制 H226 癌細胞的 cyclin D1 的表現，此作用 mimosine 較 MD07 強。與去年的研究結果相似 mimosine 及 MD07 對 Hep3B 肝癌細胞 cyclin D1 的表現影響很小。如圖四所示，mimosine 與 MD07 都會誘導 H226 癌細胞 p21WAF1 的表現，此作用 MD07 較 mimosine 強。mimosine 及 MD07 對 Hep3B 肝癌細胞 p21WAF1 的表現作用相似。以細胞流體儀分析 MD07 對癌細胞凋亡的影響，如圖五、圖六所示，此藥物能有效誘導 H226 與 Hep3B 癌細胞的凋亡。綜合以上實驗的結果明確顯示 MD07 可以抑制肝癌與肺癌細胞的生長。

二. MD07 有效抑制肺癌與肝癌細胞在洋菜瓊膠形成群落的能力

癌細胞在洋菜瓊膠形成群落的能力是一種於試管內評估癌細胞腫瘤生成能力的實驗，通常容易形成群落的癌細胞也容易於活體動物形成腫瘤。如圖七所示，經過三週的培養後，癌細胞會於洋菜瓊膠形成很大

的細胞群落(colony)，若於瓊膠添加 MD07，在顯微鏡下可見許多單一細胞分布其中，然而卻無法持續分裂形成群落。由此實驗結果發現 MD07 能有效的抑制癌細胞的腫瘤生成能力。

三. MD07 可抑制活體動物肺癌及肝癌的生長

為了測試 MD07 在活體動物腫瘤的抗癌作用，我們進行以 MD07 治療腫瘤的實驗並比較它與 mimosine 的效度。我們利用直接腫瘤注射的方式將 30 mg/kg mimosine 或 MD07 注入裸鼠體內，對照組以相同方式施打林格氏液連續 18 天，每三天測量腫瘤體積的變化並計錄之。如圖八及圖九所示，mimosine 與 MD07 皆可抑制肝癌及肺癌細胞的生長，而且抑制生長的效果 MD07 較 mimosine 為佳。為瞭解我們注射的 mimosine 濃度是否對裸鼠產生明顯的毒性，我們比較對照組與 mimosine 組與 MD07 組各種臟器的變化，將裸鼠犧牲掉並取出其臟器，我們發現施打 mimosine 與 MD07 並不會造成器官重量的變化(表一)，進一步將這些器官進行切片並染色，由病理科醫師觀察分析。實驗結果顯示這些器官並無明顯的病變產生。

四. MD07 可以抑制活體動物肺癌及肝癌組織週期素 D1 的表現並誘

導週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白 p21^{WAF-1} 的表現

我們試管內的實驗發現 mimosine 與 MD07 主要經由降低週期素 D1 基因的表現或增加週期素抑制蛋白 p21^{WAF1} 的表現來抑制肝癌及肺癌細胞的增生。我們分析正常組織及腫瘤組織 cyclin D1 及 p21^{WAF-1} 的變化。如圖十所示，免疫染色分析實驗發現 mimosine 與 MD07 會抑制 H226 肺癌腫瘤組織 cyclin D1 的表現。三次實驗共 15 隻裸鼠的實驗結果發現注射 mimosine 或 MD07 的 H226 肺癌腫瘤組織其 cyclin D1 濃染的細胞會減少(表二)。我們試管內的實驗結果顯示 mimosine 與 MD07 對 H3B 肝癌細胞 cyclin D1 基因表現影響很小，如圖十所示 mimosine 與 MD07 降低 H3B 肝癌腫瘤組織 cyclin D1 表現的效果不明顯而 cyclin D1 濃染的細胞數在這三組的差異很小(表三)。我們試管內的實驗也發現 mimosine 與 MD07 能誘導癌細胞 p21^{WAF1} 蛋白質的表

現，我們於是以前以組織免疫染色法來探討 mimosine 與 MD07 對活體動物肺癌及肝癌 p21WAF1 表現的影響。我們發現 mimosine 與 MD07 確可有效誘導肺癌及肝癌細胞 p21WAF1 抑制蛋白的合成(圖十一)，其實驗結果綜合如表四及表五。以上研究結果顯示 MD07 在培養的肝癌及肺癌細胞可抑制週期素 D1 表現並誘導 p21WAF-1 表現的抗癌效果於活體動物所建立的肺癌及肝癌也有相同的效果。

五. Mimosine 可促使活體動物肺癌及肝癌細胞凋亡

由以前實驗中我們發現長時間處理 mimosine 與 MD07 可明顯的引發肝癌與肺癌細胞凋亡。細胞凋亡的時候，細胞體積首先會萎縮核內的 DNA 會緻密化並且逐沉積在核膜周圍形成彎月形的結構，隨著死亡步驟的進行，細胞會分裂成小體即 Apoptotic body，然後被周圍的細胞所吞噬分解。因為細胞凋亡會造成 DNA fragmentation，所以我們以 TUNEL assay 進行活體動物所建立的肺癌及肝癌 TUNEL 組織免疫染色分析，結果如圖十二所示，mimosine 與 MD07 確可明顯增加細胞核被 TUNEL 深染之數及引發細胞凋亡。我們同時在高倍的光學顯微鏡下計算每三百個細胞中細胞核被 TUNEL 深染之數目即凋亡指數 apoptotic index，以比較 mimosine 與 MD07 的效度。實驗結果顯示 MD07 引發活體動物肺癌及肝癌細胞凋亡的能力較 mimosine 強，其實驗結果綜合如表六。

討論

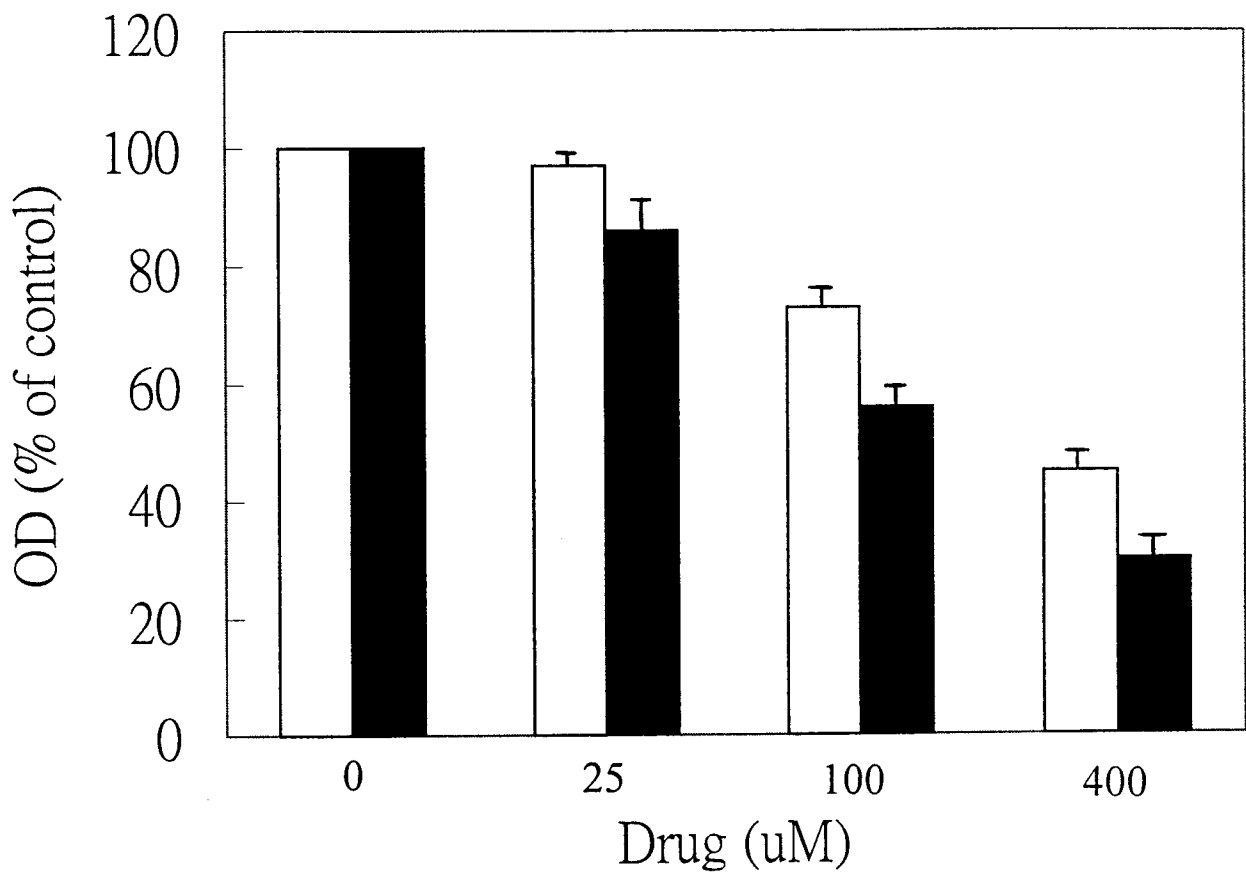
我們先前的實驗結果顯示 mimosine 可抑制多株肺癌及肝癌細胞株的增生，這些癌細胞的生長被阻斷於 G1 期。進一步探討 mimosine 作用的分子機轉發現 mimosine 的抑制增生作用是透過多種途徑來完成的。Mimosine 可藉由抑制週期素 D1 的表現或增加週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白 p21^{WAF1} 的表現來抑制癌細胞的生長，上述的研究成果已經被接受刊登 (25)。更重要的是我們發現 mimosine 會誘發細胞凋亡(apoptosis)。當細胞受到傷害後會自行修補，但是如果傷害非常嚴重則細胞會死亡。細胞死亡的方式依其機轉的不同可分成壞死(Necrosis)與凋亡(Apoptosis)兩種(28-30)。細胞壞死時整個細胞膜的選擇性和通透性會喪失，細胞內的胞器常因脹大而破裂，許多酵素於是釋出，細胞內的 DNA 與蛋白質大量被破壞，細胞於是死亡。此外，壞死的細胞會引發個體強烈的免疫反應，造成個體嚴重的傷害(31,32)。相反地，細胞自然死的時候，細胞體積首先會萎縮核內的 DNA 會緻密化(condensation)並且逐漸沉積在核膜周圍形成彎月形的結構，隨著死亡步驟的進行，細胞會分裂成小體即 Apoptotic body，然後被周圍的細胞所吞噬分解，對個體的影響非常小。正因為如此，開發能選擇性引發癌細胞凋亡的藥物便成為抗癌藥物研究上最熱門的領域之一，綜合這些結果我們認為 mimosine 具有臨床應用的潛力。

我們後續的研究顯示 mimosine 可以有效抑制活體動物(裸鼠) 肺癌及肝癌細胞的生長。經過詳細分析其作用的分子機轉我們發現此氨基酸在活體動物的療抗癌作用與試管內所發現的效果十分相似主要經由降低 cyclin D1 基因的表現或增加週期素抑制蛋白 p21WAF1 的表現來抑制肝癌及肺癌細胞的增生。更重要的是此氨基酸可誘發這些癌細胞的凋亡。這些結果顯示 mimosine 是一種有效的抗癌藥物。本年度我們合成 mimosine 的衍生物並探討其在試管內及活體動物的抗癌效果。我們發現許多 mimosine 的衍

生物結構非常不穩定，於合成後很短的時間內便會產生變化，其原因目前尚未清楚。此外有些 mimosine 的衍生物不易合成，其產量非常少。因為本研究將進行活體動物實驗，我們在考量結構的穩定性與是否能簡易及大量合成的因素下，總共大量合成 MD03 及 MD07 兩種衍生物進行研究，結果顯示 MD07 與 mimosine 相似具有改變與細胞週期調控基因的能力，而且它誘導細胞凋亡的能力較 mimosine 強，所以 MD07 無論是試管內或活體的抗癌效果均較 mimosine 為佳，我們覺得 MD07 具有開發成化學抗癌藥物的潛力。

伍、結論與建議

本計畫針對銀合歡種子中所存在的植物氨基酸 mimosine 進行衍生物的合成並探討其在活體動物腫瘤抗癌效果，我們的結果發現衍生物 MD07 有不錯的抗癌效果，這些作用的產生可能是因為該衍生物可以抑制活體動物肺癌及肝癌組織週期素 D1 的表現並誘導週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白 p21WAF-1 的表現有關，同時該衍生物也可促使活體動物肺癌及肝癌細胞凋亡。本實驗的結果證實該衍生物在活體動物具有明顯的抗癌效果及發展成臨床使用藥物的潛力。不過，未來仍希望以化學修飾方式，開發出毒性更小而抗癌效果更佳的類似物，對未來臨床的使用將更有潛力。同時也期望中醫藥委員會對抗癌藥物的研發及相關研究計畫的補助能繼續給予更多的協助與鼓勵。

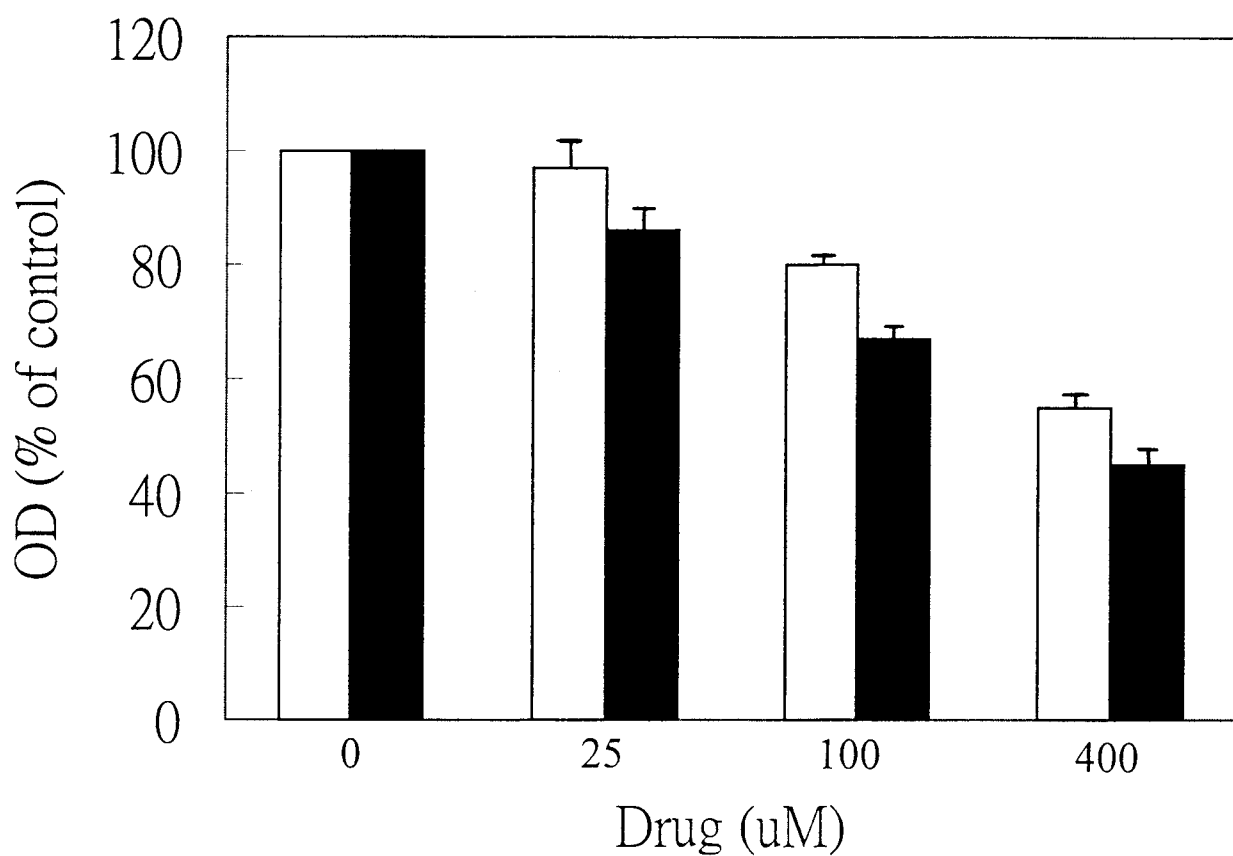


圖一、以 MTT assay 分析 MD07 對 H226 肺癌細胞生長的影响。

肺癌細胞種入 96 well plate 培養於 10%胎牛血清並添加不同濃度

的 mimosine (□)或 MD07(■)兩天後，依實驗步驟所述以 MTT 方

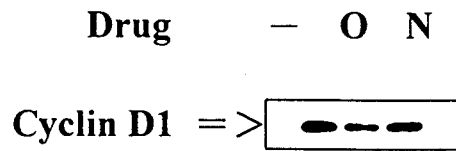
法偵測活存的細胞數。



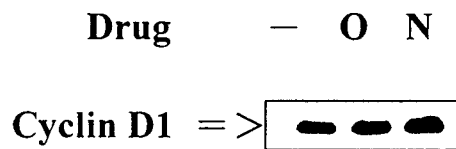
圖二、以 MTT assay 分析 MD07 對 Hep3B 肝癌細胞生長的影響。

肝癌細胞種入 96 well plate 培養於 10%胎牛血清並添加不同濃度的 mimosine (□)或 MD07(■)兩天後，依實驗步驟所述以 MTT 方法偵測活存的細胞數。

H226 lung cancer cells

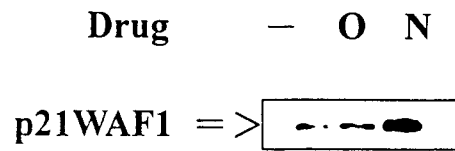


Hep3B hepatoma cells

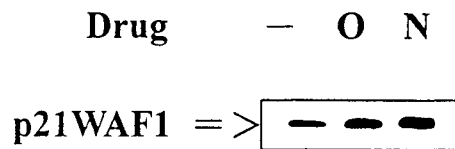


圖三、以 western blot analysis 分析 MD07 對 H226 肺癌細胞及 Hep3B 肝癌細胞 cyclin D1 表現的影響。癌細胞種入 6 well plate 培養於 10% 胎牛血清並添加 400 μ M mimosine (O) 或 MD07(N) 一天後，依實驗步驟所述以 western blot analysis 偵測 cyclin D1 的表現。

H226 lung cancer cells

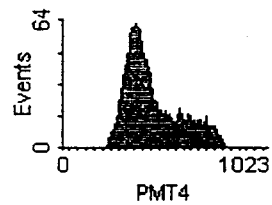


Hep3B hepatoma cells

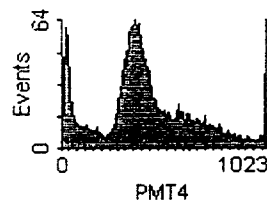


圖四、以 western blot analysis 分析 MD07 對 H226 肺癌細胞及 Hep3B 肝癌細胞 p21WAF1 表現的影響。癌細胞種入 6 well plate 培養於 10% 胎牛血清並添加 400 μ M mimosine (O) 或 MD07(N) 一天後，依實驗步驟所述以 western blot analysis 偵測 p21WAF1 的表現。

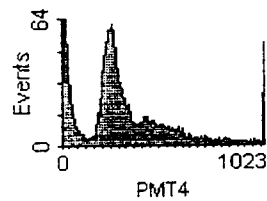
Control



Mimosine (400 μ M)

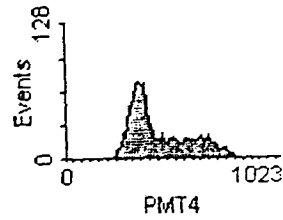


3-hydroxy-1-(3-oxo-butyl)-1*H*-pyridin-4-one

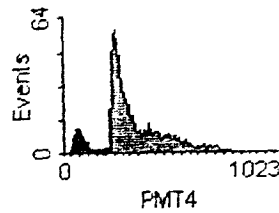


圖五、以 flow cytometry 分析 MD07 對 H226 肺癌細胞 apoptosis 的影響。癌細胞種入 6 well plate 培養於 10%胎牛血清並添加 400 μ M mimosine 或 MD07 兩天後，依實驗步驟所述以 flow cytometry 偵測 apoptosis 的情形。

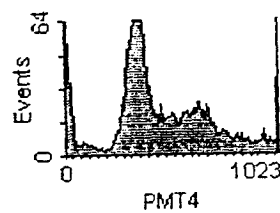
Control



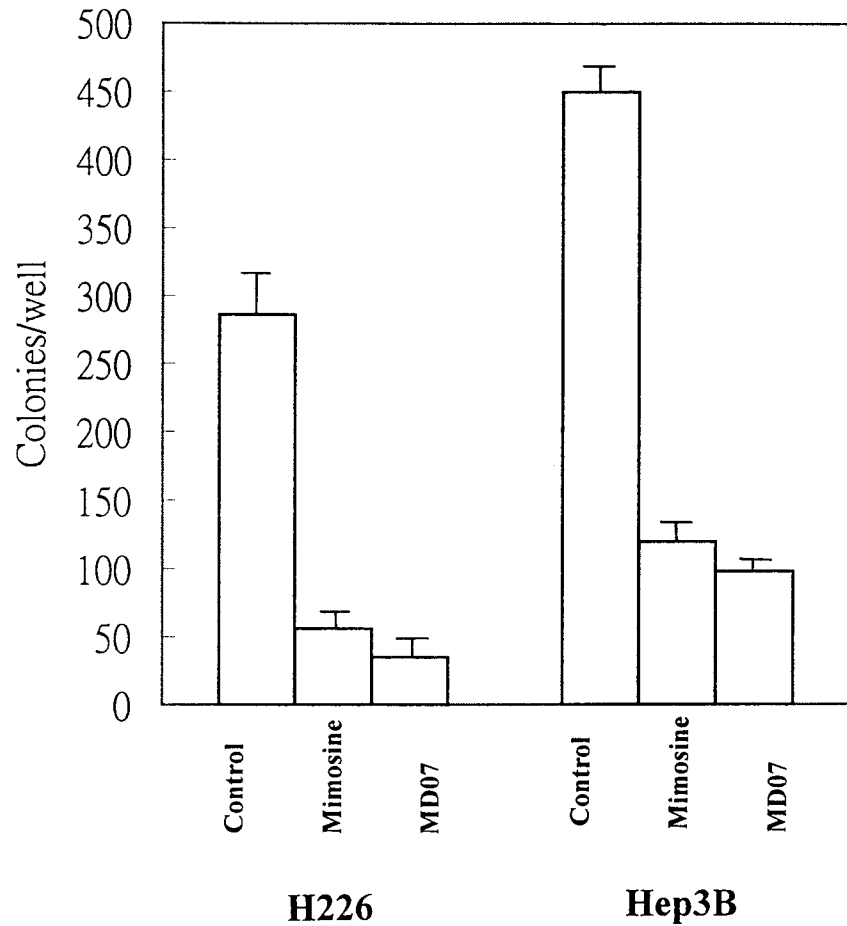
Mimosine (400 μ M)



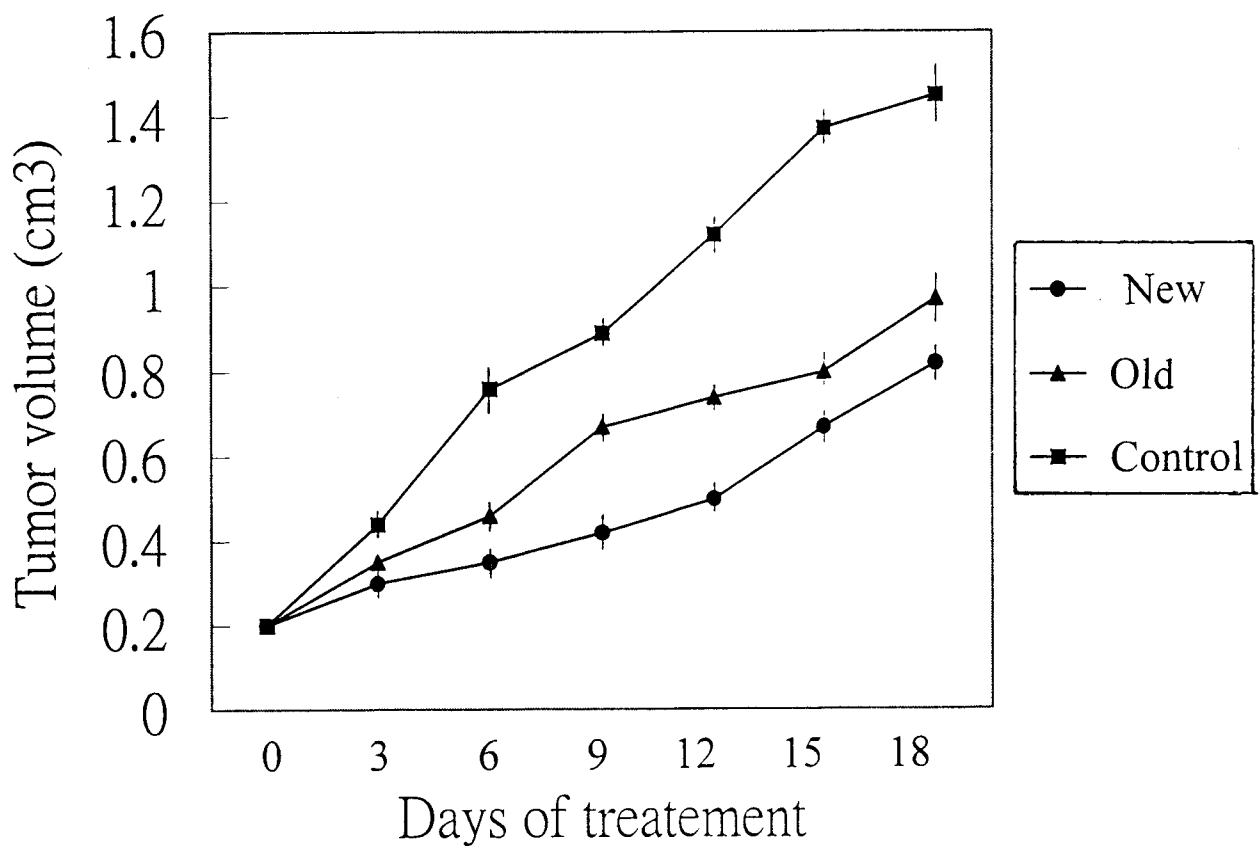
3-hydroxy-1-(3-oxo-butyl)-1H-pyridin-4-one



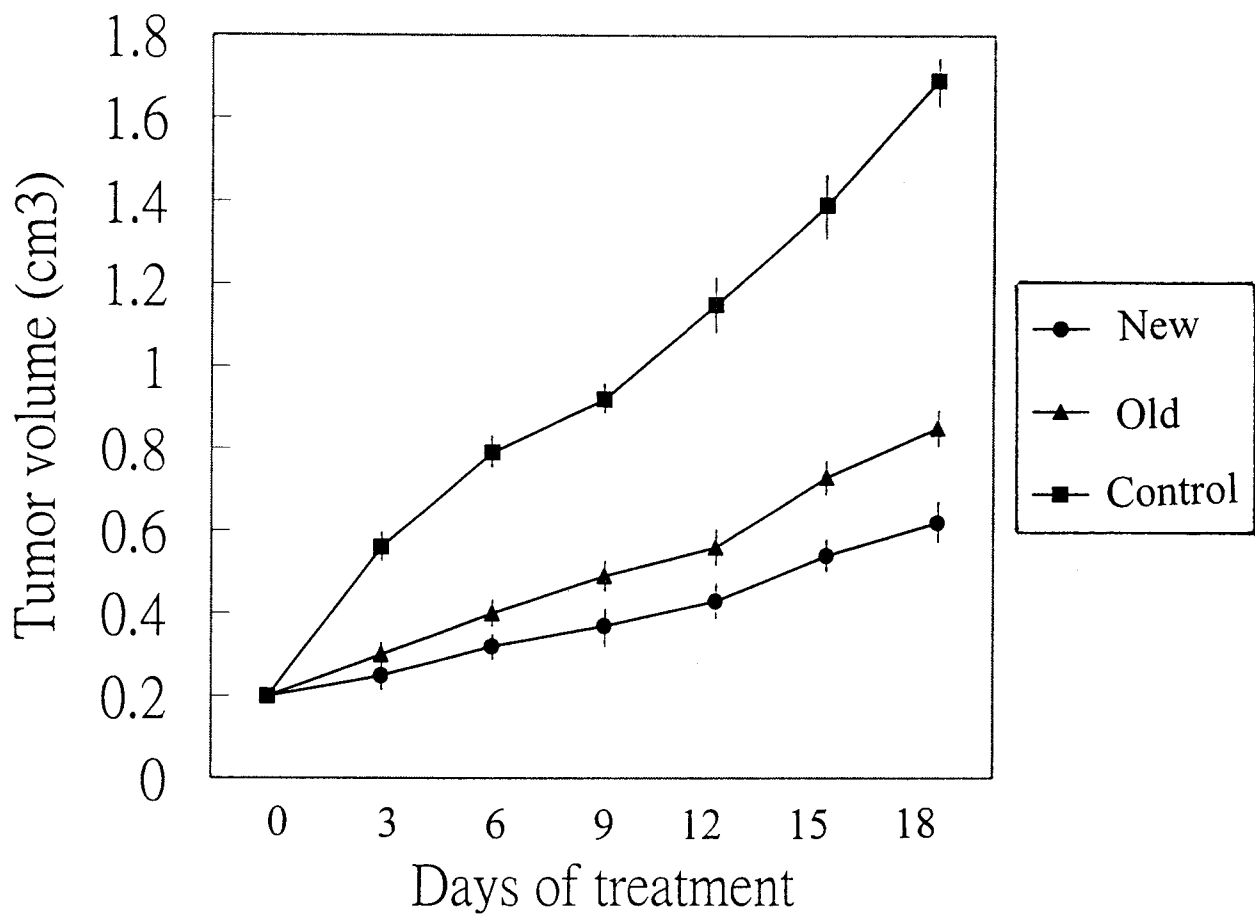
圖六、以 flow cytometry 分析 MD07 對 Hep3B 肝癌細胞 apoptosis 的影響。癌細胞種入 6 well plate 培養於 10%胎牛血清並添加 400 μ M mimosine 或 MD07 兩天後，依實驗步驟所述以 flow cytometry 偵測 apoptosis 的情形。



圖七、MD07 會抑制癌細胞於洋菜瓊膠形成群落的能力。癌細胞依實驗步驟所述培養於 0.3% 洋菜瓊膠內含 $400 \mu\text{M}$ 的 mimosine 或 MD07 五週後，進行染色並計算群落數。



圖八、MD07 會有效抑制活體動物 H226 肺癌腫瘤的生長。H226 肺癌腫瘤於裸鼠生成後，連續注射 18 天的林格氏液(■, control)或 400 μ M mimosine(▲,old) 或 400 μ M MD07(●,new)，每三天計錄腫瘤體積的變化。



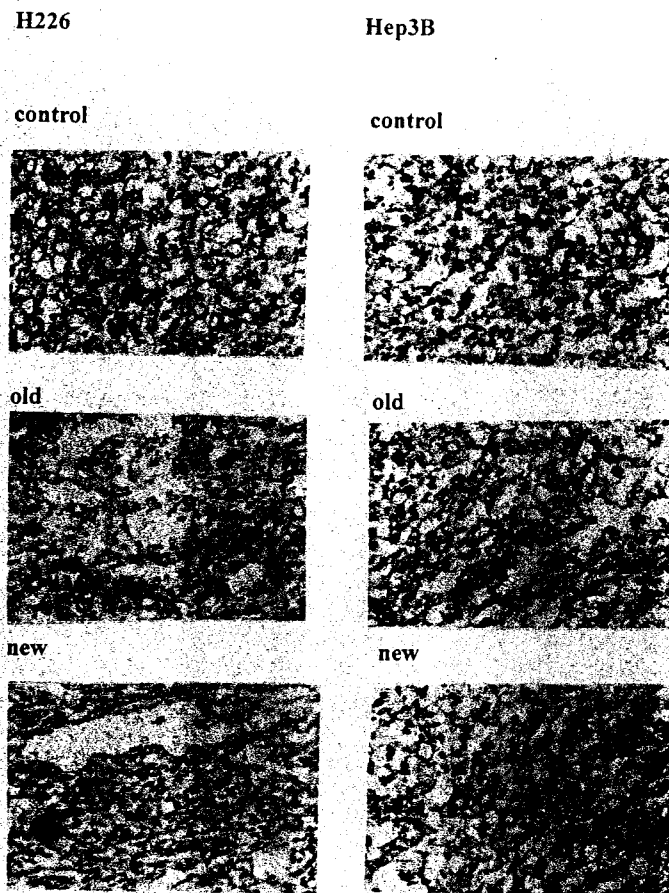
圖九、MD07 會有效抑制活體動物 Hep3B 肝癌腫瘤的生長。Hep3B 肝癌腫瘤於裸鼠生成後，連續注射 18 天的林格氏液(■, control)或 400 μ M mimosine(▲,old) 或 400 μ M MD07(●,new)，每三天計錄腫瘤體積的變化。

表一

注射林格氏液或 mimosine 或衍生物之裸鼠其體重與器官重量的變化

	林格氏液組 (n=3)	Mimosine (n=3)	衍生物 (n=3)
體重	28.5 ± 2.7	29.9 ± 4.5	30.1 ± 5.1
心臟	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.02
肺臟	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.05	0.18 ± 0.03
肝臟	1.36 ± 0.17	1.50 ± 0.24	1.55 ± 0.11
腎臟	0.38 ± 0.07	0.42 ± 0.11	0.36 ± 0.09
脾臟	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.03

Immunohistochemical analysis of cyclin D1



圖十、MD07 會抑制活體動物 H226 肺癌及 Hep3B 肝癌腫瘤 cyclin D1 的表現。腫瘤於裸鼠生成後，連續注射 18 天的林格氏液(control)或 400 μ M mimosine(old) 或 400 μ M MD07(new)後，依實驗步驟所述以 immunohistochemical staining 偵測 cyclin D1 的表現。

表二

Effect of mimosine and its derivative on cyclin D1 expression in H226

lung cancer cells grown in nude mice

	Cyclin D1 expression			
	+	++	+++	++++
control	3	5	5	2
mimosine	10	3	2	0
mimosine derivative	10	4	1	0

- Results from three independent studies.
- Total number of nude mice :15

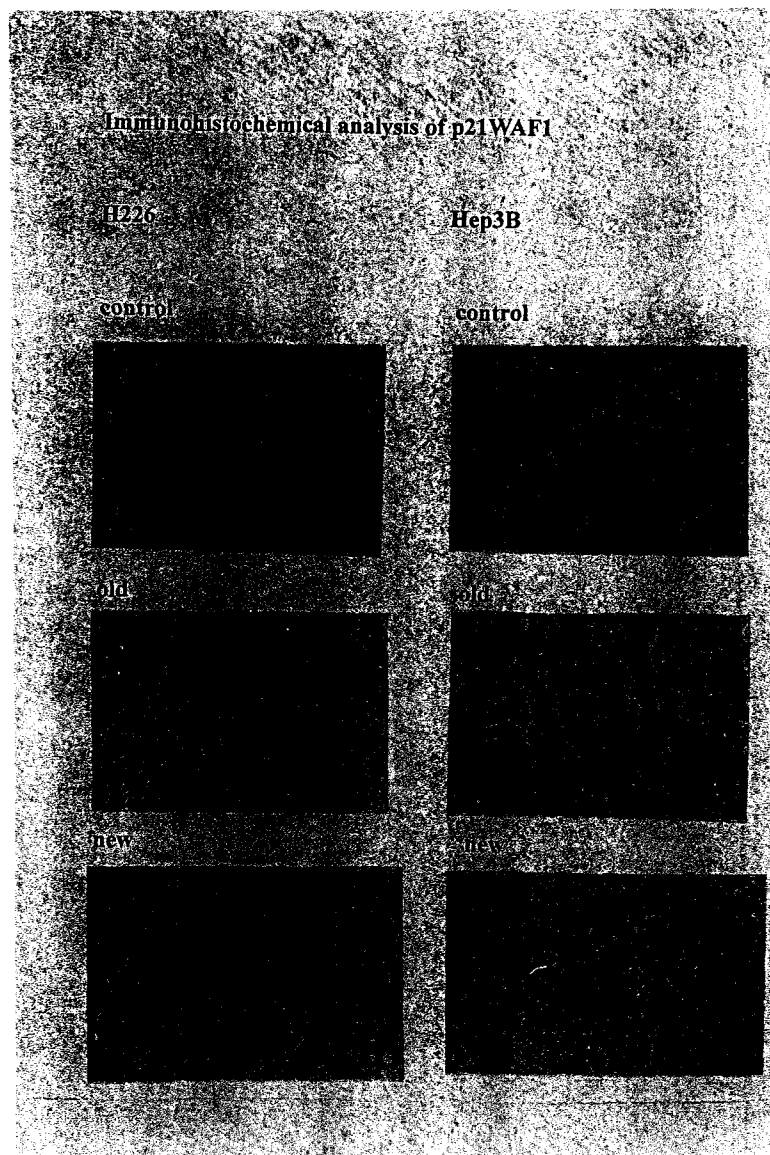
表三

Effect of mimosine and its derivative on cyclin D1 expression in Hep3B

lung cancer cells grown in nude mice

	Cyclin D1 expression			
	+	++	+++	++++
control	7	5	3	0
mimosine	8	5	2	0
mimosine derivative	8	4	3	0

- Results from three independent studies.
- Total number of nude mice :15



圖十一、MD07 會抑制活體動物 H226 肺癌及 Hep3B 肝癌腫瘤組織 p21WAF1 的表現。腫瘤於裸鼠生成後，連續注射 18 天的林格氏液 (control) 或 400 μ M mimosine(old) 或 400 μ M MD07(new) 後，依實驗步驟所述以 immunohistochemical staining 偵測 p21WAF1 的表現。

表四

Effect of mimosine and its derivative on p21WAF1 expression in H226 lung cancer cells grown in nude mice

	p21WAF1 expression			
	+	++	+++	++++
control	13	2	0	0
mimosine	5	6	4	0
mimosine derivative	3	6	6	0

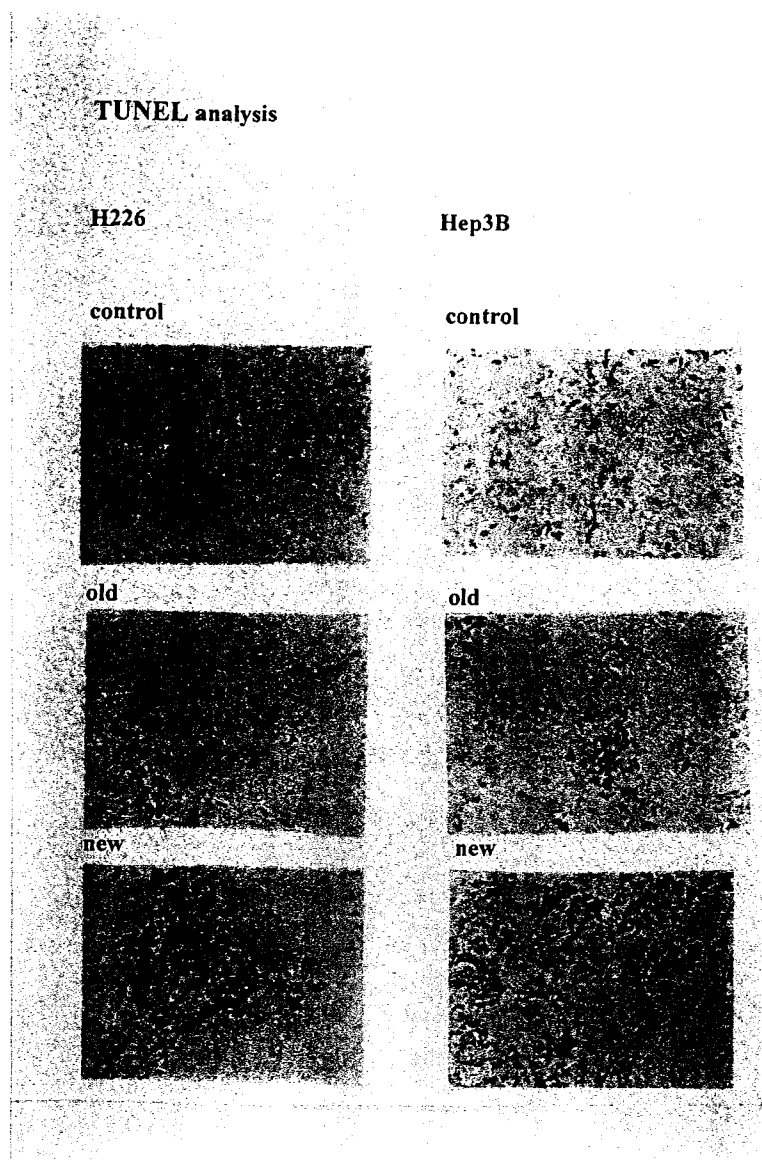
- Results from three independent studies.
- Total number of nude mice :15

表五

Effect of mimosine and its derivative on p21 WAF1 expression in Hep3B lung cancer cells grown in nude mice

	p21 WAF1 expression			
	+	++	+++	++++
control	14	1	0	0
mimosine	8	4	3	0
mimosine derivative	6	6	3	0

- Results from three independent studies.
- Total number of nude mice :15



圖十二、MD07 會誘導活體動物 H226 肺癌及 Hep3B 肝癌腫瘤組織細胞的凋亡。腫瘤於裸鼠生成後，連續注射 18 天的林格氏液(control) 或 $400 \mu\text{M}$ mimosine(old) 或 $400 \mu\text{M}$ MD07(new)後，依實驗步驟所述以 TUNEL assay 偵測細胞凋亡的情形。

表六

Effect of mimosine and its derivative induce apoptosis in H226 and
Hep3B lung cancer cells grown in nude mice

	Apoptotic index
H226	
control	5 ± 2
mimosine	20 ± 3
mimosine derivative	31 ± 5
Hep3B	
control	4 ± 1
mimosine	15 ± 3
mimosine derivative	24 ± 3

- Results from three independent studies.
- Total number of nude mice :15

陸、參考文獻

1. Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-240.
2. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S: Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 281-285.
3. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang J, Lee WH: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58: 1193-1199.
4. Jiang W, Kahn SM, Tomia N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB: Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2980-2986.
5. Rosenberg CL, Wong E, Petty WM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, Arnold A: PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 9638-9643.
6. Bodver W, Bishop T, Karran P: Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet* 1994; 6: 217-222.
7. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL: Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 26: 225-229.
8. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, CardonCardo C: Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 1993; 342: 469-473.
9. Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-1065.
10. Sherr CJ: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.
11. van den Heuvel S, Harlow E: Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 1993; 262:205-2054.
12. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM: Functional interactions of the retinoblastoma protein with D-type cyclins. *Cell* 1993; 73: 487-497.

13. Hinds PW, Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Curr Biol* 1994; 4: 135-146.
14. El-Dery WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsos K, Trent M, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-822.
- 15 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-808.
16. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y: Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild type pRB function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-2952.
- 17 Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashman RA, Sheer CJ: Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995; 16: 859-867.
18. Massague J, Polyak K: Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 91-96.
19. Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T, Nakanishi K, Shirakusa T: Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patient with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 2018-2024.
20. Hamelin R, Laurent-Pug P, Oschwang S, Jegou N, Asselain B, Rvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G: Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 42-46.
21. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi K, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-702.
22. Gu Y, Turck CW, Morgan DO: Inhibition of CDK2 activity in vivo by associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; 366: 707-708.
23. Fan S, El-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, Fornace AJ,

- Magrath I, Kohn KW, O'Connor PM: P53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 1994; 54: 5824-5429.
24. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1992; 74: 957-959.
 25. Chang HC, Lee TH, Yan MH, Chuang LY, Hung WC: Inhibitory effect of mimosine on proliferation of human lung cancer cells is mediated by multiple mechanisms. *Cancer Letter* 1999;145: 1-8.
 26. Chang HC, Weng CF, Yen MH, Chuang LY, Hung WC: Modulation of cell cycle regulatory protein expression and suppression of tumor growth by mimosine in nude mice. (submitted).
 27. Hung WC, Chang HC, Chuang LY: Activation of caspase-3 -like proteases in apoptosis induced by sphingosine and other long-chain bases in Hep3B hepatoma cells. *Biochem J* 1999; 338: 161-166.
 28. Korsmeyer S: Bcl-2: An antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15: 105-112.
 29. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-263.
 30. Arends M, Morris R, Wyllie A: Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-599.
 31. Vaux D: A boom time for necrobiology. *Curr Biol* 1994; 3: 877-879.
 32. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1992; 74: 957-959.