化合物 AZ-4 與粒線體電子傳遞鏈 complex I 抑制劑對肺癌細胞的抗癌作用

The anti-tumor effects of AZ-4 and mitochondria electron transport chain complex I inhibitor on lung cancer cell line (H460).

中文摘要

研究指出 aziridinylbenzoquinone 類化合物具有抗癌活性，結構中之 aziridine 具有基化去氧核糖核酸，進而抑制去氧核糖核酸複製的能力。本論文所使用之抗癌藥物爲全合成化合物 AZ-4，其結構上帶有兩個 aziridine 環，並且分別位於兩個以 -(CH2)-O-(CH2)-O-(CH2)-O-(CH2)-O-(CH2)-架橋連接的 naphthoquinone 上。AZ-4 對非小型肺癌細胞 H460 的 LD50 爲 1.25mM，且 AZ-4 對 H460 的細胞毒性會隨著濃度與時間的增加而變強。以流氏細胞儀觀察細胞週期的變化可發現，AZ-4 濃度爲 0.125mM-0.5mM 時，會使細胞停留在 G2/M 時期；G2/M 時期的相關蛋白 Cdc2 的表現約會減少 50% ，但 CyclinB 的表現則不會隨著 AZ-4 濃度的增加而有明顯的變化。而以流氏細胞儀觀察細胞週期 sub-G1 則可發現，AZ-4 濃度爲 1mM 和 2mM 時，會使 H460 走向程式化凋亡，相同濃度於 Hoechst 染色的實驗中也可發現凋亡小體的出現；於 NMR 的實驗中亦觀察到 CH2/CH3 會上升。

電子傳遞鏈對細胞的生存扮演著非常重要的角色，粒線體內膜上電子傳遞鍊的五個 complexes，各自負責電子傳遞或是產生 ATP，提供生命體活動所需之能量。其中 NADH:ubiquinone oxidoreductase，是電子傳遞鏈的第一個 complex，簡稱爲 complex I。1998 年 Fang 等人的研究中指出，當 complex I 被抑制時，間接也會抑制負責合成多氨類的酵素：ornithine decarboxylase(ODC)的活性。帶正電的多氨類可以穩定帶負電的去氧核糖核酸，幫助去氧核糖核酸的複製，加速細胞的生長；因此一旦抑制 ODC，使多氨類的生合成減少，便能阻礙去氧核糖核酸的複製，抑制癌細胞的生長。本論文的研究主題主要是探討抑制癌細胞粒線體 complex I 的活性，降低癌細胞的增生速率，再配合抗癌藥物 AZ-4，希望能降低 AZ-4 的使用劑量。

目前已知具有最佳抑制效果的 complex I 抑制劑是 rotenone，但是它對正常細胞的毒性很強，因此 rotenone 不能用在抗癌治療上。Pterulone 是一種從真菌中所發現的 complex I 抑制劑，對細胞的毒性低，但是抑制效果稍差(IC50 = 36mM)，於是我們利用有機合成的方式，改變 pterulone 的官能基，使它與 complex I active site 的結合更加緊密，變成更好的 complex I 抑制劑。目前合成得到的最好之 pterulone 衍生物爲 trimethylbenzylether(IC50 = 8.5mM)，和最強的 complex I 抑制劑：rotenone(IC50 = 0.5nM)仍有很大的差距。爲了證實本論文的想法是否正確，於是先以 complex I 抑制劑：rotenone 降低癌細胞的生長速率，觀察是否可以進一步降低抗癌藥物 AZ-4 的使用劑量；應此我們先以 complex I 抑制劑：rotenone 抑制肺癌細胞(H460)生長，配合自行合成出的抗癌藥物:AZ4，觀察是否在 rotenone 的作用下，可以降低對非小型肺癌細胞(H460)的使用劑量。

英文摘要

AZ-4 is kind of anti-cancer drug like bis-aziridinoquinonylthiaters. It's a new compound that developed from aziridinylbenzoquinone drug. In the previous experiments, the ability of DNA alkylation by aziridinylbenzoquinone compounds had been confirmed. It' s used to disturb DNA replication and decrease the survival rate of cancer cell. We synthesis a new bis-type anti-cancer drug AZ4 by the different chain length and composed of linker. From the results, we confirmed the ability of DNA alkylation and the cross-link with DNA by AZ4. In the preliminary data, it's found that the AZ4 induces cell death of human lung cancer (H460) in a dose-dependent and time-dependent manner. The IC50 of AZC-5 to H460 cell is 5.5 mM by MTT assay. We also found that the AZ4 makes a lower lethal effect on human skin fibroblast cell at same concentration of H460. According to the results of flow cytometry the AZ4 induced the Hep-2 cell S phase arrest in 0.75 mM and G2/M phase in 3 mM. The apoptotic signal progression of H460 induced by AZ4 included the increase the ratio of CH2/CH3 from cell membrane phospholipid motion in a dose- & time-dependent manner as determined by 1H NMR analysis. Besides, data from Hoechst staining also revealed that a lot of apoptotic bodies could be found at 60 hrs. after treatment by AZ4. From Western blot results, we found the AZ4- could induced the H460 cell arrest at G2/M phase at 3 mM. Ⅳ