

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

設計並合成 2-substituted 4-quinolone-3-carboxylic acid 類緣化合物作為新穎之有絲分裂抑制劑  
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2320-B-040-010-  
執行期間：96年08月01日至97年07月31日  
執行單位：中山醫學大學應用化學系(所)

計畫主持人：賴雅韻  
共同主持人：張雯惠  
計畫參與人員：此計畫無其他參與人員：

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月31日



## (一) 中、英文摘要及關鍵詞(keywords)

### (1) 中文摘要

本研究就新型抗有絲分裂抗癌化合物 2-phenyl-4-quinolone(PQ)類合成衍生物 2-(3-fluorophenyl)-6-chloro-4-oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxylic acid (Yun-008-3)經過不同劑量(12.5–50  $\mu$ M)處理人類肺癌細胞 H1299 後，發現在細胞週期停滯的影響中，以高劑量(50  $\mu$ M) Yun-008-3 給藥時，細胞週期的 Sub-G1 是有明顯的增加，可以從 cdk 2、phosphorylated retinoblastoma protein (Rb)以及 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)等蛋白質的表現都觀察到下降的現象；但另一方面給予低劑量(12.5  $\mu$ M) Yun-008-3 時，細胞週期卻是停留在 G2/M phase，同時對細胞週期 G2/M phase 的調節蛋白 Cyclin B 及 Cdc 2 的表現是增加的。因此從本實驗的數據可發現不同濃度的 Yun-008-3 在細胞週期調節發生 Sub G1 或 G2/M phase 等不同作用之有趣現象。

關鍵詞：2-phenyl-4-quinolone、細胞凋亡、細胞週期

### (2) 英文摘要

A novel antimetabolic agents 2-phenyl-4-quinolone (2-PQ) derivative, 2-(3-fluorophenyl)-6-chloro-4-oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxylic acid (Yun-008-3), was synthesized in our laboratory. In this study, we treated human lung carcinoma H1299 cells with various concentrations (12.5–50  $\mu$ M) of Yun-008-3. A DNA flow cytometric analysis revealed that 50  $\mu$ M Yun-008-3 induced a sub-G1 arrest via the decreased levels of phosphorylated retinoblastoma protein (Rb), CDK2 and proliferating cell nuclear antigen, whereas H1299 cells treated with concentrations of 12.5  $\mu$ M increased Cdc-2 and cyclin B protein expression causing growth arrest in the mitotic phase. These findings suggest that Yun-008-3 with different concentrations can suppress H1299 cell growth via mitotic phase arrest or sub-G1 arrest.

keywords: 2-phenyl-4-quinolone, apoptosis, cell cycle

$\mu$

(二)報告內容：前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）等。

## 前言

癌症的化學治療劑治療多以細胞毒性試劑為主，主要利用藥物具有之細胞毒性，直接造成癌細胞死亡，依作用的機轉中有一大類為抗有絲分裂試劑(anti-mitotic agents)，利用干擾有絲分裂，達到抑制癌細胞的分裂功能，像是與管蛋白(tubulin)產生交互作用進而抑制微管蛋白的聚合或去聚合。目前抗有絲分裂試劑，有長春花生物鹼(Vica alkaloids)、taxol、秋水仙鹼(colchicines).....等。而自然界中2-phenyl-4-quinolone類生物鹼植物成分主要存在於芸香科(*Rutaceae*)的植物，具有物對微管的聚合作用有顯著且強效之效果，然而其作用於微管的位置雖有文獻指出是與colchicine結合點的位置相同，但是真正的結合點仍未相當明確。總而言之，PQ類生物鹼衍生物因具備腫瘤化學防禦、抗癌、抑制微管蛋白聚合等活性，然而其作用機制並不清楚。

而過去的研究顯示2-phenyl-4-quinolone(PQ)化合物是一類新型抗有絲分裂抗癌物質(novel antimitotic agents)，其基本骨架2-phenyl-4-quinolone的第6位和第3'位上若帶有未共用電子對官能基，例如OCH<sub>3</sub>、COOH、F等，則其抑制微管聚合作用(inhibition of tubulin polymerization,ITP)及細胞毒性(cytotoxicity)均會大幅加強。在2-phenyl-4-quinolone(PQ)類的化合物中已發現化合物YJC-1具有對人類肺癌細胞A549具有誘導mitotic phase arrest的活性，如Fig. 1-3。

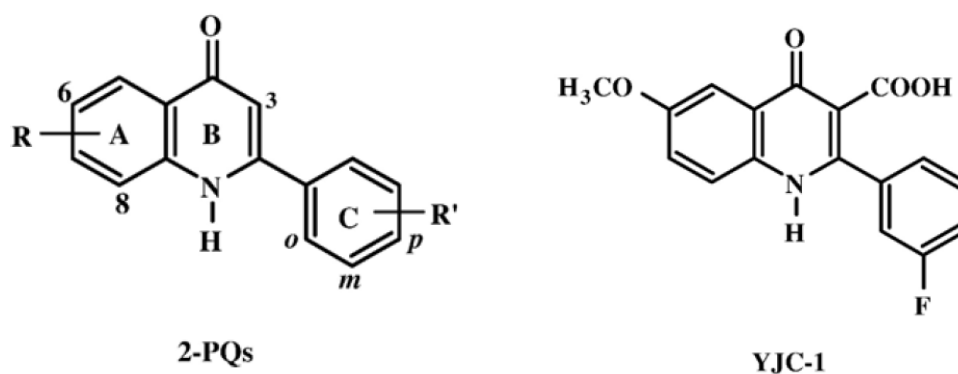
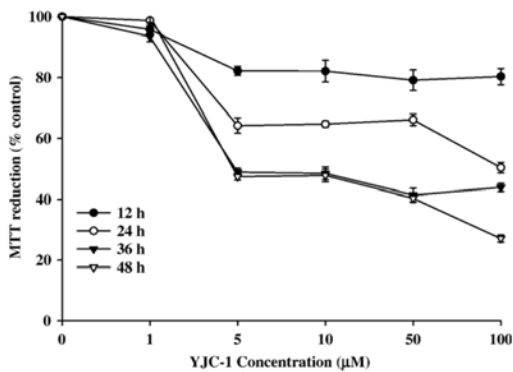
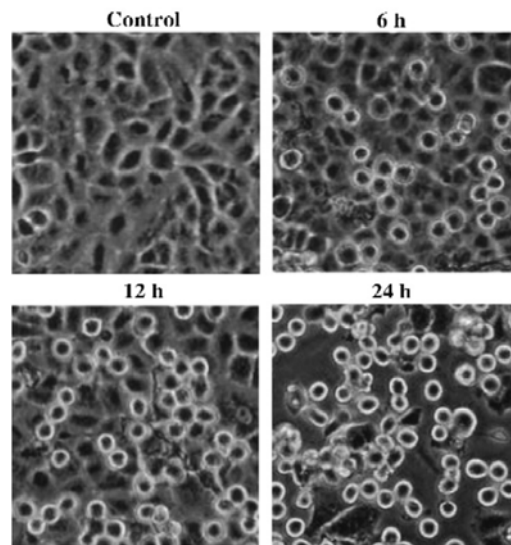


Fig. 1. Chemical structures of 2-PQs and YJC-1.

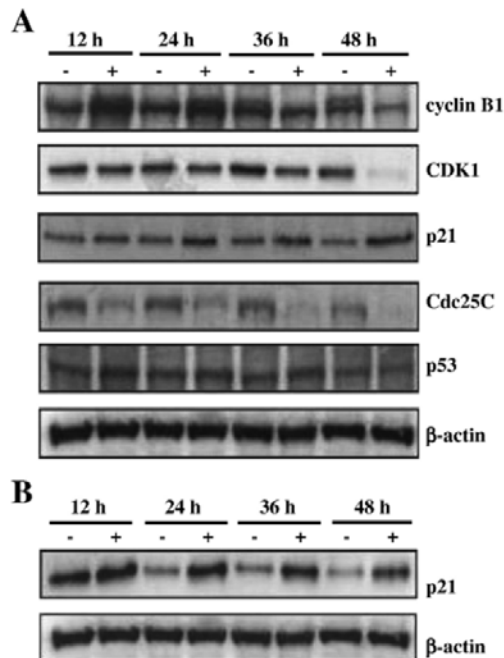
A.



B.



**Fig. 2.** (A) Time and dose-dependent curves for YJC-1 in the MTT reduction assay. A549 cells were treated with **YJC-1** at 1, 5, 10, 50 and 100  $\mu\text{M}$  for 12, 24, 36 and 48 h. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments. (B) **YJC-1** induces mitotic morphological changes in A549 cells. After treatment with 5  $\mu\text{M}$  **YJC-1** for 6, 12 and 24 h, cells were observed under a phase-contrast microscope (magnification 200x).



**Fig. 3.** Regulation of mitotic phase-associated proteins by **YJC-1**. (A) The expression of cyclin B1, CDK1, p21, Cdc25C and p53 after 5  $\mu\text{M}$  **YJC-1** treatment in A549 cells. (B) 2  $\mu\text{M}$  **YJC-1** induced the expression of p21Cip1/Waf1 in p53-null cell line, HL-60 cells.  $\beta$ -actin antibody was used as an internal loading control. -/+ : without/with **YJC-1**.

## 研究目的

目前本實驗進一步將2-phenyl-4-quinolone基本骨架的第6位置換為Cl，以及第3'位上保留為F來觀察Cl是否仍具有細胞毒性活性表現，經部分預試驗數據結果指出：人類肺癌細胞H1299經化合物**Yun-008-3** (Fig. 4)處理後，原本貼壁的細胞會逐漸呈現懸浮狀態。使用MTT assay測試細胞存活率，發現 H1299 細胞經過化合物**Yun-008-3**處理48小時後，和未經過化合物處理之控制組細胞比較，**Yun-008-3**作用濃度愈高，細胞存活率就愈低，且呈現劑量效應關係。使用流式細胞儀測試細胞週期，發現未經過藥物處理的細胞有完整的細胞週期，而經過不同劑量**Yun-008-3**處理24小時後，隨處理劑量增加，會造成G2/M phase的細胞數目增加，顯示出細胞停滯在4N的狀態(如Fig. 5)。基於這些預試驗結果，希望能釐清經過**Yun-008-3**處理之人類肺癌細胞，在調控細胞週期相關之基因表現，進行深入的比較及探討。

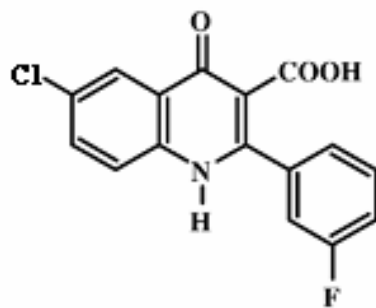
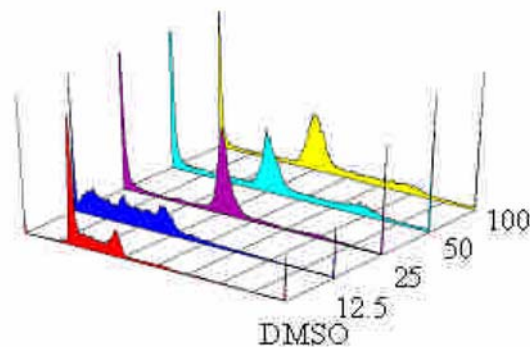


Fig. 4. Chemical structures of **Yun-008-3**.



**Fig. 5. Yun-008-3 induced G2+M phase arrest in H1299 cells.** After 12.5、25、50 μM **Yun-008-3** treatment in 48 hours later, the cells were harvested and fixed with cold 70% ethanol overnight then were stained with PI and the cell cycle distribution was measured by flow cytometry and analyzed by CELL Quest software.

## 研究方法

### 一、化學合成

以4-chloroaniline為起始原料，甲苯為溶媒，滴加3-fluorobenzoyl chloride進行amide linkage，過濾後取濾液，濃縮濾液所得之粗產物經95%乙醇再結晶，即可得白色固體。接著秤取上述白色固體與PCl<sub>5</sub>加熱迴流進行氯化反應，得到橙黃色液體carboximidoyl chloride (A)。同時另外秤取金屬鈉溶於無水乙醇製備乙醇鈉，爾後再與diethyl malonate形成白色膠狀的sodium diethyl malonate (B)。將上述化合物(A)與(B)混合於無水甲苯中加熱迴流，得diethyl [[(4-chlorophenyl)amino]- (3-fluorophenyl) methylene]malonate深黃色液體。接著將深黃色液體未經純化之粗產物以加熱環化方式得到乳白色固體，所得之粗產物經95%乙醇再結晶，即可得化合物Yun-008-3之白色固體。

### 二、cell culture

選用人類肺癌細胞株(human lung cell line) H1299 搭配 RPMI 培養液(添加 10% 胎牛血清、0.13558 g/ml penicillin、0.0629 g/ml streptomycin)，在37°C、5% CO<sub>2</sub>於飽和濕度的培養箱內繼代培養。

### 三、MTT 試驗(MTT assay)—判斷細胞對藥物的存活率及死亡率

利用活細胞線粒體脫氫酶能將MTT 鹽還原成藍紫色的甲瓚顆粒，以顆粒溶解後呈現的顏色深淺反映細胞活性。

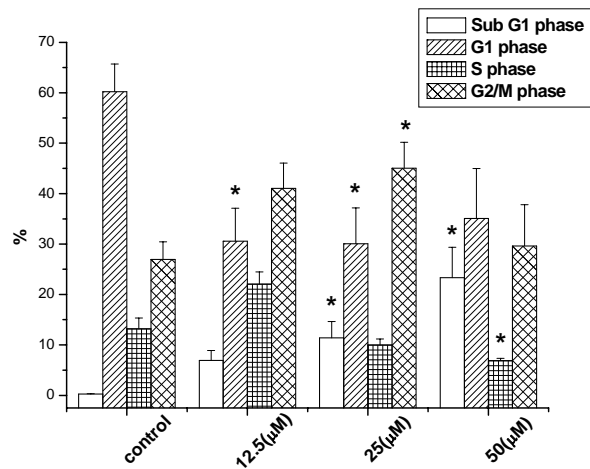
### 四、以流式細胞技術(Flow cytometry) 分析細胞週期(Cell cycle)

### 五、DNA萃取與電泳分析細胞DNA損傷

### 六、蛋白質電泳(SDS-PAGE)與西方墨點法(Western blot)分析細胞中蛋白質含量

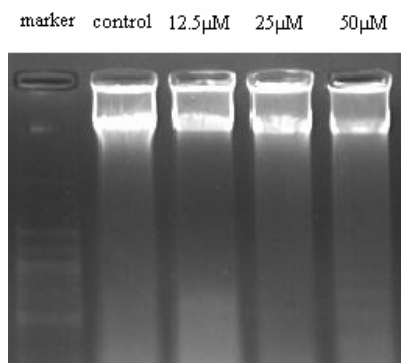
## 結果與討論

芸香科植物2-phenyl-4-quinolone生物鹼衍生物Yun-008-3處理後之人類肺癌細胞H1299，原為貼壁的細胞會逐漸呈現懸浮狀態。接著利用MTT assay 測試細胞存活率，再經過 48小時處理後，發現和未經過藥物處理之控制組細胞比較，細胞存活率有明顯的下降趨勢；顯示Yun-008-3對癌細胞有生長抑制的作用。為了分辨造成細胞存活率下降的原因是細胞之死亡或細胞生長速率之抑制，故進一步收集懸浮及貼壁的細胞以 70% 酒精固定後再使用流式細胞儀進行細胞週期之偵測。



**Fig. 6.** Effects of **Yun-008-3** on the cell cycle progression of H1299 cells.

用流式細胞儀測試的結果，發現未經過藥物處理的細胞有完整的細胞週期，而經過不同劑量藥物處理48小時後，低劑量時，可以發現停留在G2/M phase 的細胞數目有增加現象，但高劑量時，G2/M phase 的比例減少反而是Sub G1有明顯的增加；以上結果推論藥物之處理可能抑制細胞之生長，且在不同劑量下，對細胞造成的影響有所不同。從細胞週期的結果發現在高劑量有Sub G1的現象，所以接著進行 DNA 的萃取及利用電泳來分析細胞 DNA 傷害。DNA電泳的結果顯示，50 μM之高劑量可以看到 DNA ladder (**Fig. 7**)，顯示高劑量的**Yun-008-3**會造成細胞apoptosis，這也和細胞週期的結果相符合。



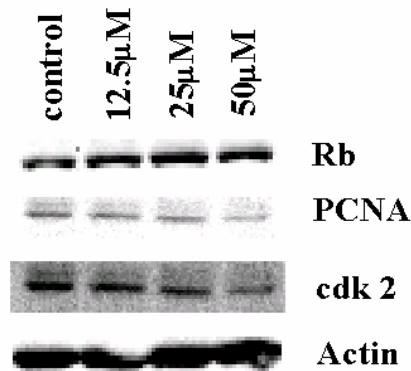
**Fig. 7.** Effects of **Yun-008-3** on DNA integrity of H1299 cells. DNA laddering, a typical characteristic of apoptosis, was analyzed by agarose gel electrophoresis.

由**Fig.8**我們可以看出Rb隨著**Yun-008-3**劑量的增加而增加，可能使pRb的表現量降低，而促使E2F被活化的比例降低，進而造成cdk 2的表現量下降，導致S phase比例降低。另外 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)具幫助 DNA 合成之功能，而在G1 phase 大量活化，使細胞進入S phase；而PCNA可能因為E2F表現量低而減少，造

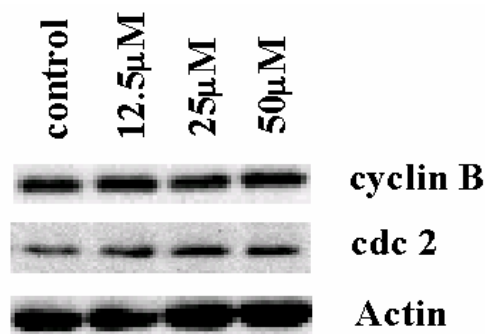


成 S phase 產生遲緩，導致細胞走向apoptosis。而當細胞進入G2 phase時，具有作用的複合體是cyclin B/cdc2(cdk1) complex，而此kinase的活性是由cdc2/cdk1 的threonine及tyrosine位置的磷酸化程度來調控。與之前cyclin/cdk complex的作用不大相同的，cyclin B/cdc 2(cdk1) complex是作細胞週期的負向調節。另外從Fig. 9可觀察到G2/M phase方面高濃度的藥物處理後，使得Cyclin B及Cdc 2的增加，因而可以得知細胞確實有進入M phase。

因此芸香科植物2-phenyl-4-quinolone生物鹼衍生物Yun-008-3抑制人類肺癌細胞H1299的生長，在不同濃度對細胞週期的表現由DNA ladder、cdk2、PCNA、Rb、cdc2以及cyclin B等的蛋白質表現，得到較為清楚的抑制機轉，將來將再2-phenyl-4-quinolone生物鹼骨架上作更多元的取代與變化，以期能夠找到具有更新穎之有絲分裂抑制劑。



**Fig. 8.** The relative amount of Rb, PCNA and cdk 2 after H1299 cells were treated with different dose of Yun-008-3 for 24 hours.



**Fig. 9.** The relative amount of cyclin B and cdc 2 after H1299 cells were treated with different dose for 24 hours.