

## 第五章 細胞毒性活性測試結果

### 5-1 MTT assay

Detection of Cytotoxicity by MTT assay (light microscopy)



Detection of apoptosis based on morphology (light microscopy)



Detection of DNA fragmentation



Agarose gel electrophoresis  
(1.8% agarose gel)

Flow cytometry  
(propidium iodide)

PARP Expression (Western Blot)

圖6、MTT assay

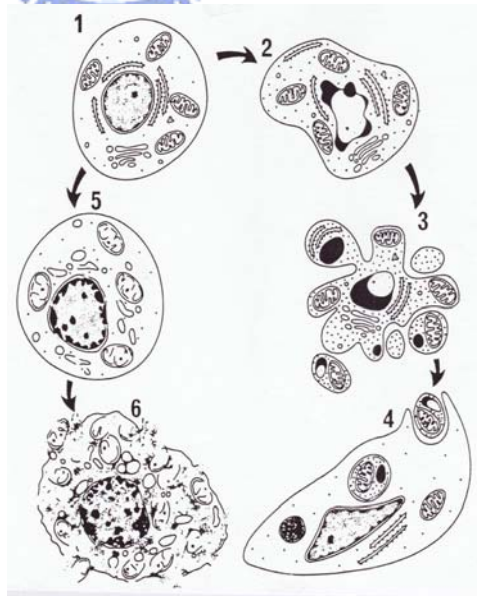


圖 7、(5~6), necrosis; (2~4), apoptosis

## 5-2 細胞毒性結果

### 5-2-1 I humulene epoxide

#### 衍生物結構

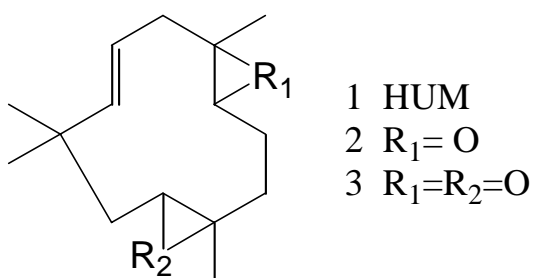


圖 8-1、測試結構(一)



#### 測試結果<sup>29</sup>

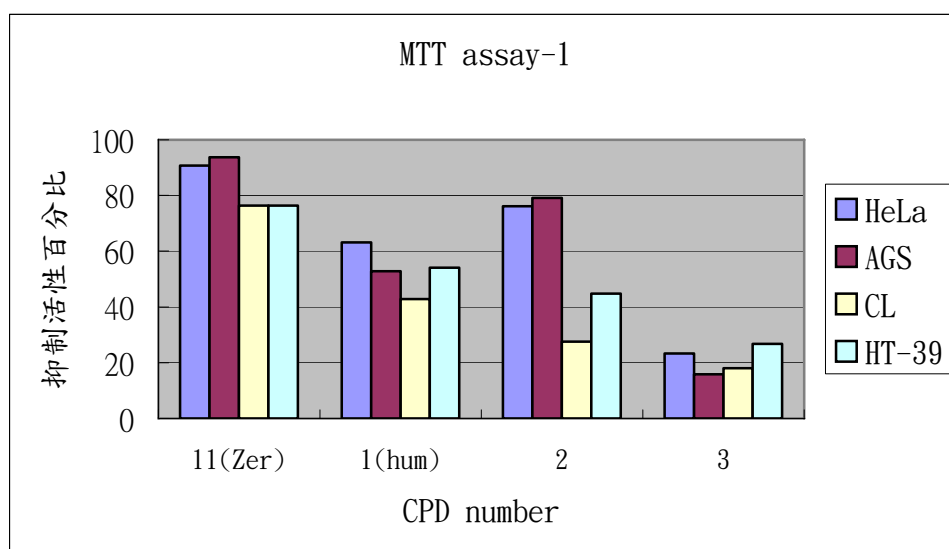


圖 8-2、測試結果(一)

表 1、細胞毒性測試(一)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
<b>11(Zer)</b>	<b>90.7</b>	<b>93.7</b>	<b>76.4</b>	<b>76.3</b>
1(hum)	63.2	52.8	42.8	54.1
<b>2</b>	<b>76.1</b>	<b>79.1</b>	<b>27.6</b>	<b>44.8</b>
3	23.3	15.9	18	26.8

100  $\mu$  M/48hr

### 5-2-2 II humulenol

衍生物結構

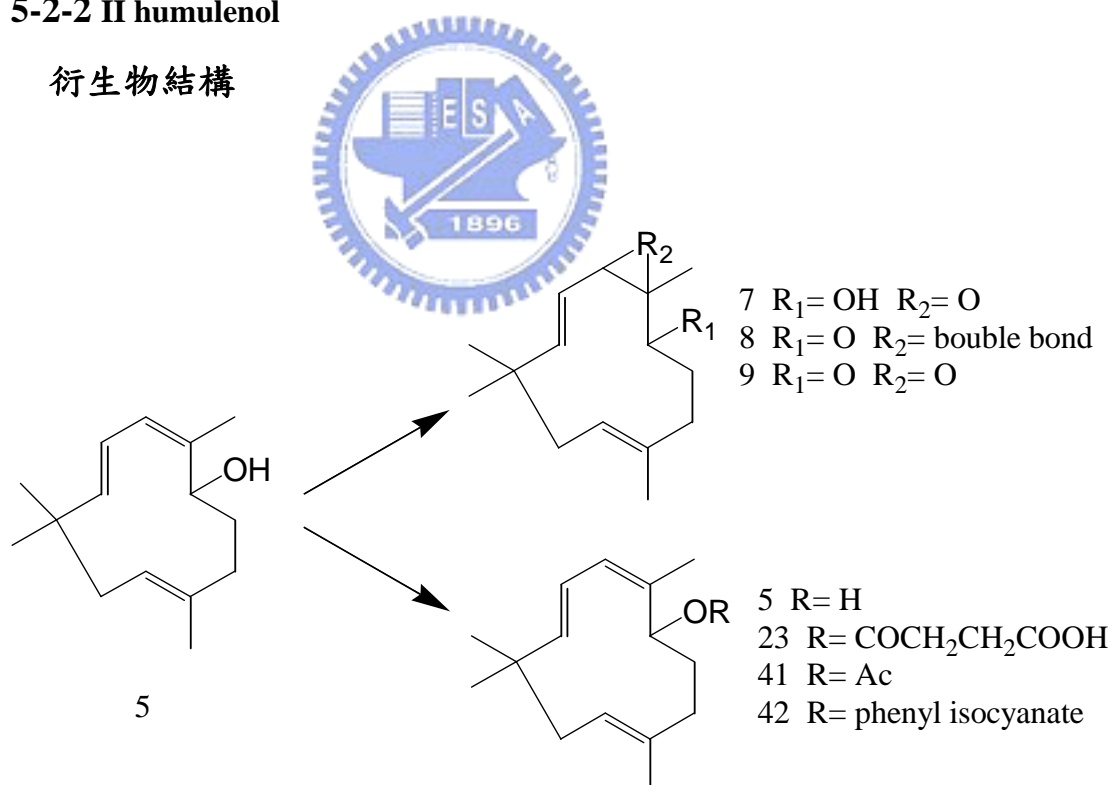


圖 9-1、測試結構(二)

## 測試結果

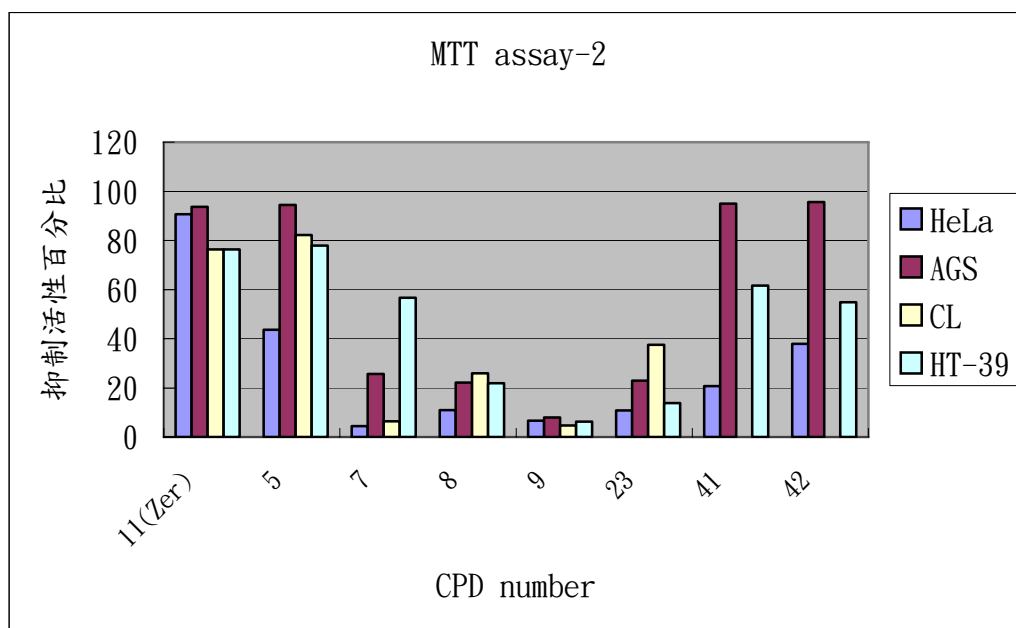


圖 9-2、測試結果(二)

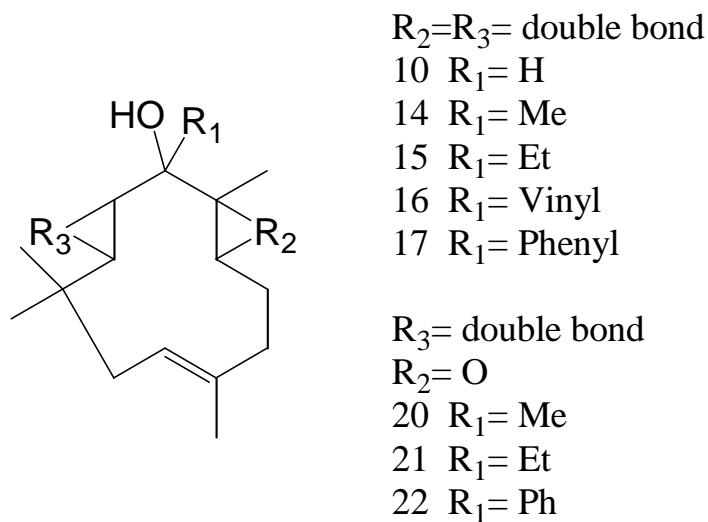
表 2、細胞毒性測試(二)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
<b>11(Zer)</b>	<b>90.7</b>	<b>93.7</b>	<b>76.4</b>	<b>76.3</b>
5	43.6	<b>94.5</b>	<b>82.2</b>	<b>77.9</b>
7	4.4	25.7	6.4	<b>56.7</b>
8	10.9	22.2	25.9	21.9
9	6.6	7.9	4.7	6.2
23	10.8	22.9	37.5	13.8
41	20.72	<b>94.93</b>		<b>61.67</b>
42	37.97	<b>95.63</b>		54.91

100  $\mu$  M/48hr

### 5-2-3 III epoxide alcohol

#### 衍生物結構



$R_2=R_3=$  O  
 33  $R_1=$  Me  
 34  $R_1=$  Ph

圖 10-1、測試結構(三)

#### 測試結果

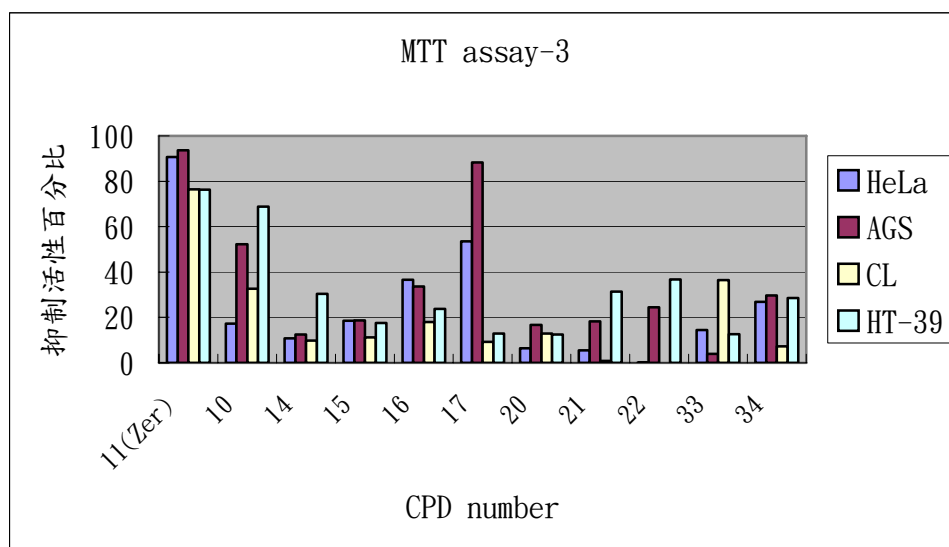


圖 10-2、測試結果(三)

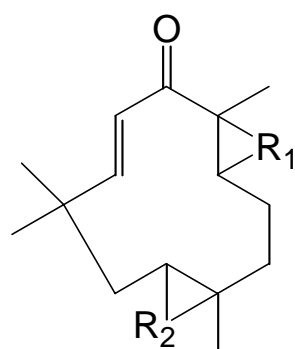
表 3、細胞毒性測試(三)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
<b>11(Zer)</b>	<b>90.7</b>	<b>93.7</b>	<b>76.4</b>	<b>76.3</b>
10	17.2	52.2	32.6	68.8
14	10.8	12.4	9.8	30.3
15	18.5	18.7	11.1	17.5
16	36.6	33.6	18.0	23.7
17	53.5	<b>88.3</b>	9.2	12.9
20	6.3	16.7	12.8	12.5
21	5.5	18.2	0.9	31.3
22	0.1	24.5	0.0	36.7
33	14.4	4.0	36.5	12.6
34	26.8	29.6	7.2	28.6

100  $\mu$  M/48hr

5-2-4 IV ketone epoxide

衍生物結構



- 13  $R_1$ = double bond  $R_2$ = O  
 30  $R_1$ = O  $R_2$ = double bond  
 31  $R_1$ = $R_2$ = O

圖 11-1、測試結構(四)

## 測試結果

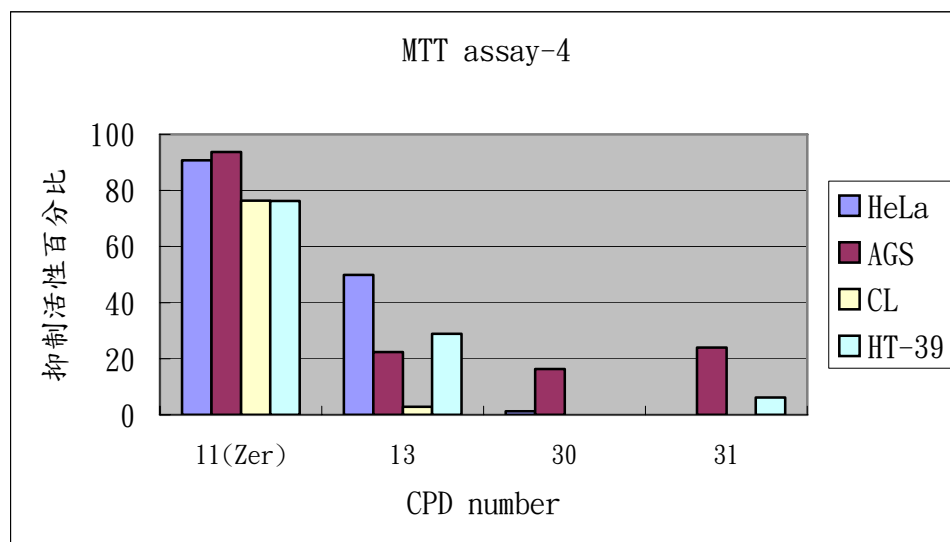


圖 11-2、測試結果(四)



表 4、細胞毒性測試(四)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
<b>11(Zer)</b>	<b>90.7</b>	<b>93.7</b>	<b>76.4</b>	<b>76.3</b>
13	49.9	22.4	2.9	28.9
30	1.245	16.269		0.00
31	0.037	23.922		6.172

100  $\mu$  M/48hr

### 5-2-5 V $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone

#### 衍生物結構

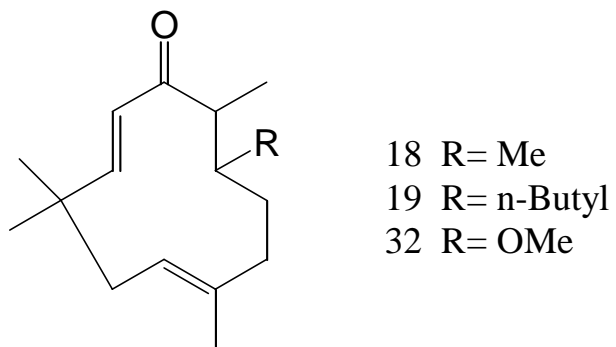


圖 12-1、測試結構(伍)

#### 測試結果

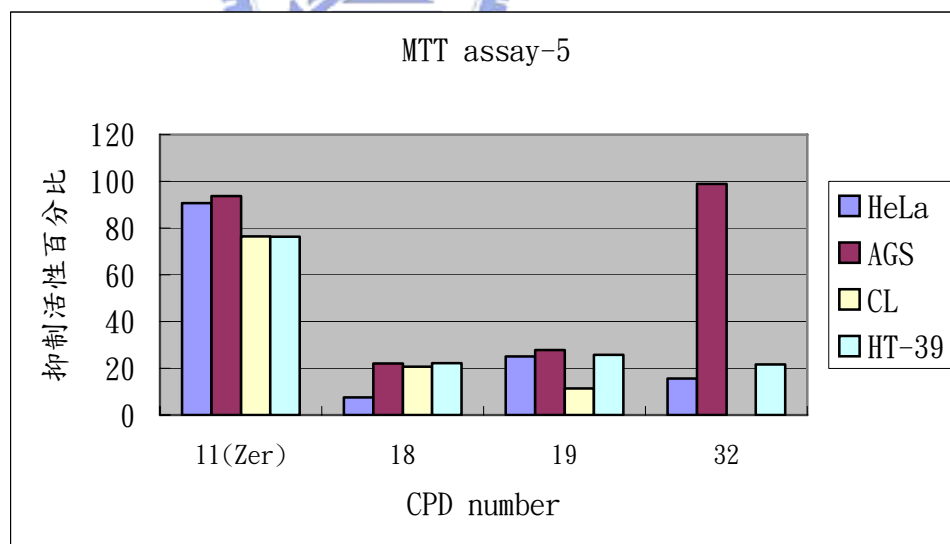


圖 12-2、測試結果(伍)



表 5、細胞毒性測試(伍)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
<b>11(Zer)</b>	<b>90.7</b>	<b>93.7</b>	<b>76.4</b>	<b>76.3</b>
18	7.5	22.1	20.7	22.2
19	25.1	27.8	11.4	25.8
32	15.628	<b>98.913</b>		21.594

100  $\mu$  M/48hr

#### 5-2-6 VI oxime

衍生物結構

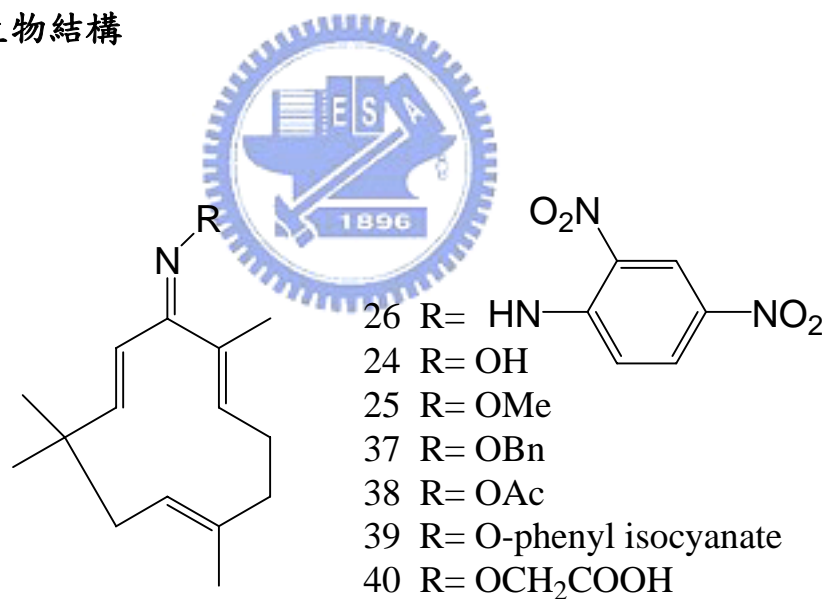


圖 13-1、測試結構(六)

## 測試結果

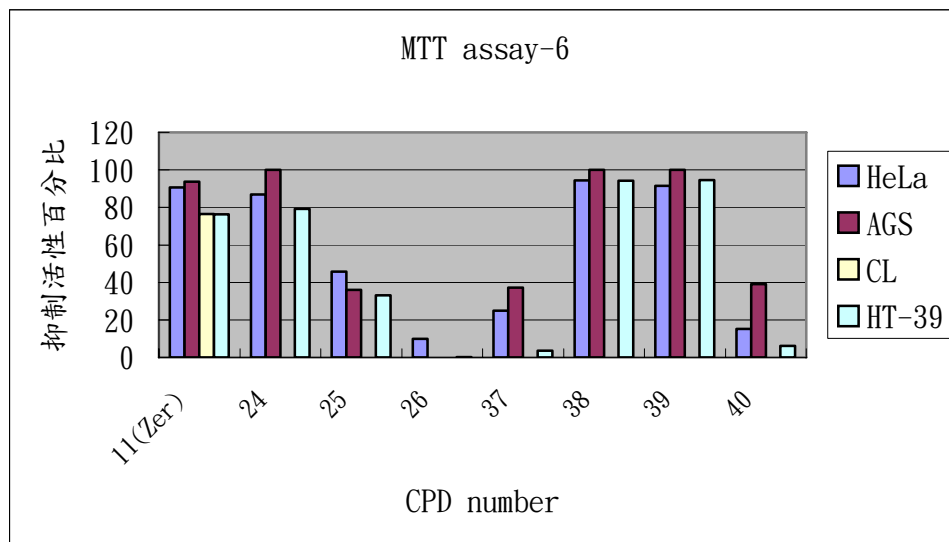


圖 13-2、測試結果(六)

表 6、細胞毒性測試(六)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
11(Zer)	90.7	93.7	76.4	76.3
24	86.816	100.00		79.126
25	45.746	36.048		33.058
26	9.842	0.00		0.122
37	24.93	37.18		3.65
38	94.36	100.00		94.27
39	91.49	100.00		94.55
40	15.13	39.16		6.15

100  $\mu$  M/48hr

### 5-2-7 VII 合成過程中之副產物

#### 衍生物結構

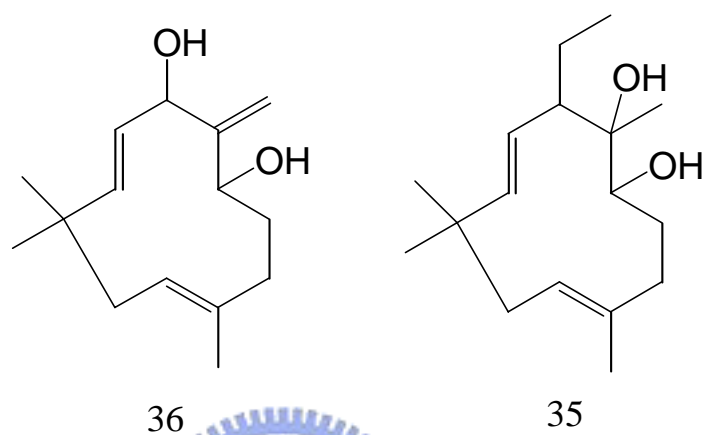


圖 14-1、測試結構(伍)

#### 測試結果

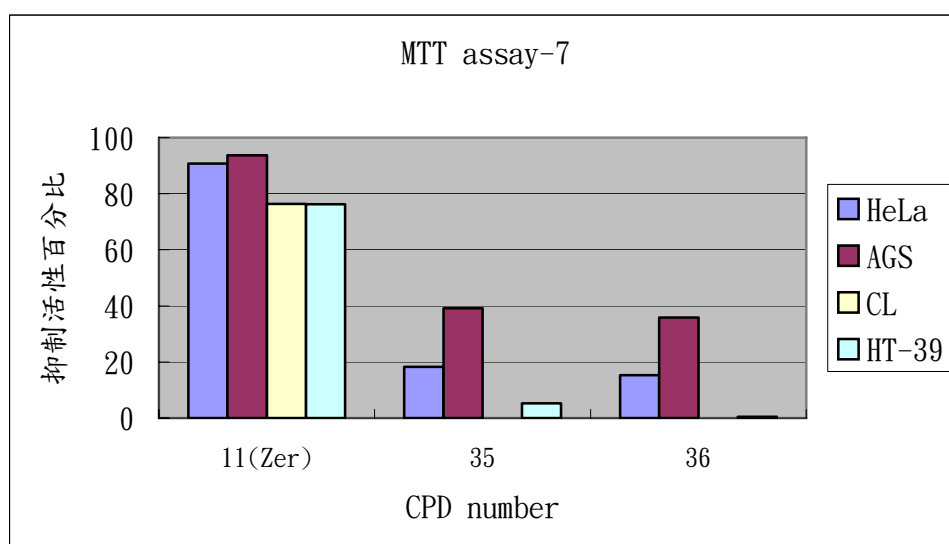


圖 14-2、測試結果(三)

表 7、細胞毒性測試(六)

	HeLa	AGS	CL	HT-29
11(Zer)	90.7	93.7	76.4	76.3
35	18.23	39.15		5.26
36	15.29	35.89		0.42

100  $\mu$  M/48hr



## 第六章 結果與討論

在我們所合成 35 個 zer 衍生物中我們將其分成七大類 (I) humulene epoxide、(II) humulenol、(III) epoxide alcohol、(IV) zerumbone epoxide、(V) 1,4-addition、(VI) oxime、(VII) 合成過程中之副產物。由抗癌活性測試中發現 (I)、(II)、(VI)類具有不錯的效果。雖然其他 (III)、(IV)、(V)、(VII)這四類不具有抗癌的活性但是我們仍可以從中探討出一些端倪。其實這七類化合物最主要的主體架構我們可以將其分類成 zerumbone、zerumbol、humulene 與 humulenol 這四種天然物(圖 15-1)，而我們下一步將由該分類來探討其活性與結構的關係。

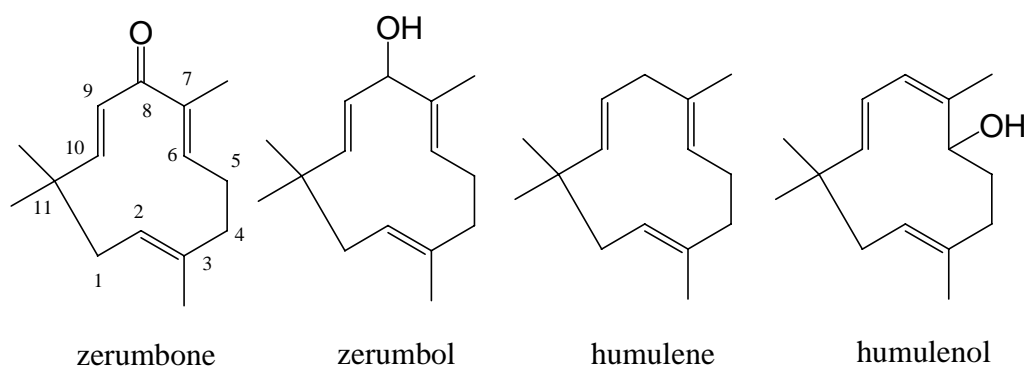


圖 15-1

我們先由 humulene 與 zerumbone 這兩個基本架構開始分析，而這兩個主要架構包含(I) humulene epoxide (IV) zerumbone epoxide、(V)

1,4-addition 這三類化合物(圖 15-2)，在這三類化合物的結構中我們發

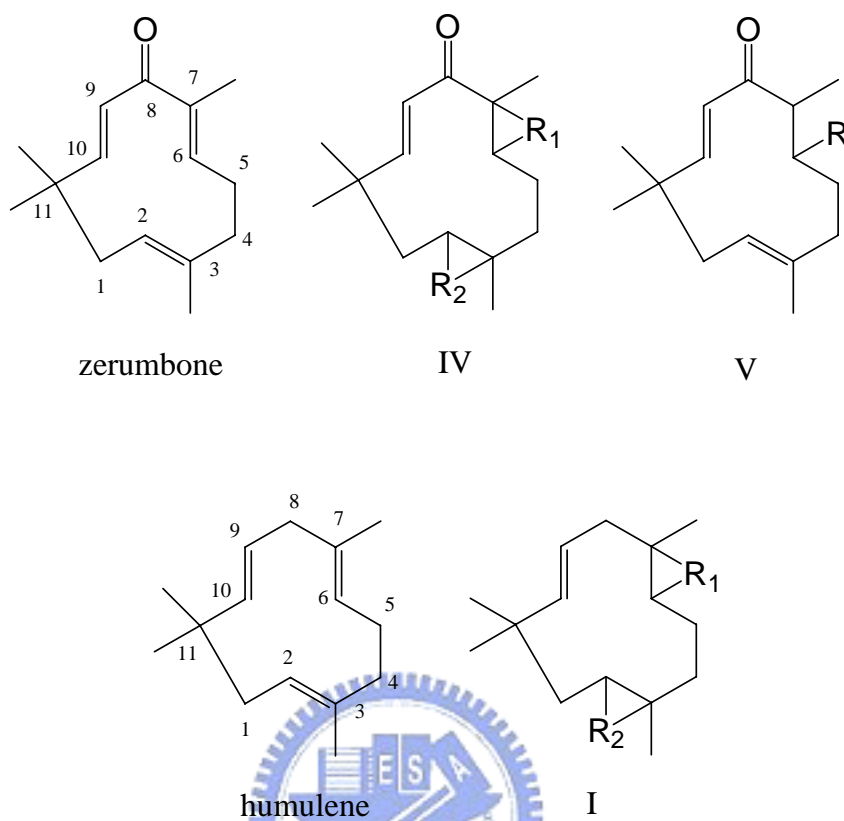
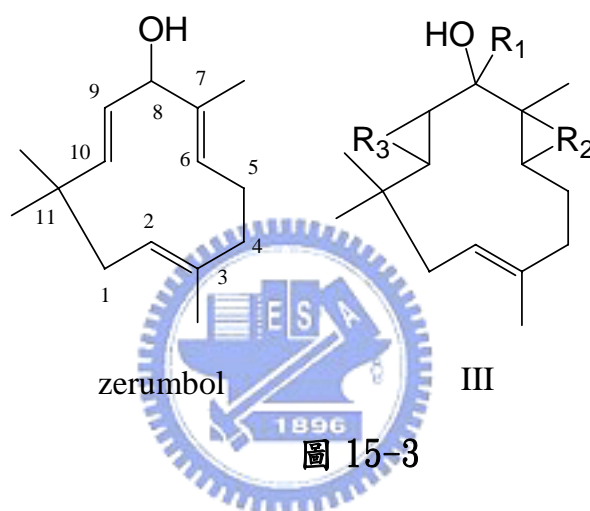


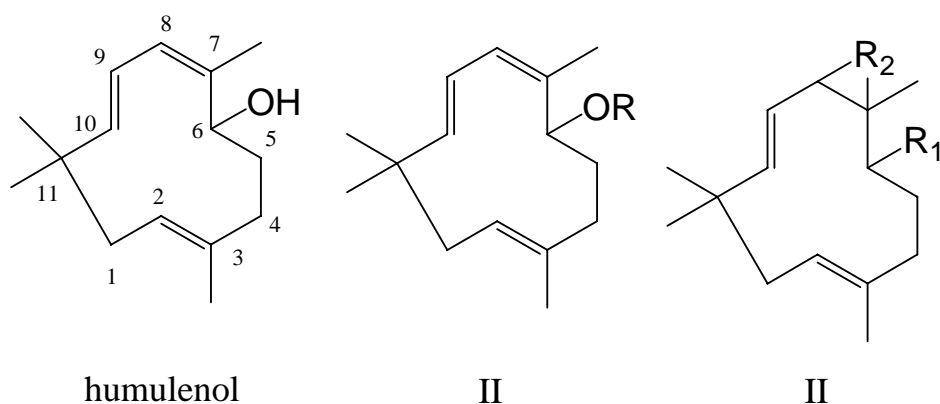
圖 15-2

現，當 C8 的位置接有氧原子時，不論是 ketone 或是 alcohol 類型 (zerumbone、zerumbol)，在 C6 與 C7 的位置不喜愛有 epoxide 的存在；1,4-addition 於 C6 位置不論是普通的烷基或是 electron donor (-OMe) 皆不被接受；可是唯一較被接受的是在在 C2 與 C3 位置擁有 epoxide 形式。但是反觀若 C8 的位置上若沒有接上任何取代基 (humulene) 則在 C6 與 C7 的位置則喜愛有 epoxide 的形式(CPD2)。只是不管哪種形式似乎都不偏好同時擁有兩個 epoxide ！

再者 zerumbol 架構包含 (III)epoxide alcohol (圖 15-3)，由此項 (CPD20-22、CPD33-34)活性測試結果我們更可以確定當 C8 的位置接有氧原子時，在 C6 與 C7 的位置不喜愛有 epoxide 的形式的結果。而當單純只進行 1,2-addition，C8 多接上 -R group (Me、Et、Vinyl、Phenyl) 的取代後發現只有 Phenyl 取代對於胃癌細胞有較明顯的抑制效果，原因仍需要被探討？



其中 humulenol 類型是較於前者有相當差異結構的化合物，包含(II) humulenol (圖 15-4)，此類型化合物 humulenol (CPD5)所具有的細胞毒



殺活性相當不錯，我們依循兩個方向來進行：第一是將C6 上本來的 alcohol 氧化成 ketone 以及將 C7 與C8 合成一epoxide的組合，而我們發現不論是單純只有將C6 上本來的alcohol氧化成ketone或是再加上 C7 與C8 合成一epoxide效果都明顯的下降許多，故我們推論C6-C8 這 allylic alcohol 的結構為必須存在而不可更動的。所以後來我們進而將 -OH group 接上一些 R group (Ac、phenyl isocyanate、 $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ )，我們由數據中得之當結構之水溶性上升後其活性卻急遽下降(CPD23： $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ )；而其他兩者對於抗胃癌細胞的表現都有明顯的增加，對我們而言是個好現象。

(VI) oxime 這類是我們所驚訝的(圖 15-5)！我們將C8 的 ketone 置換成 oxime 卻意外發現有相當不錯的效果，在細胞毒殺測試部分甚至比 zer 來的更好，故我們利用 oxime 所具有的-OH 基接上不同之取代基(Me、Bn、Ac、phenyl isocyanate、 $\text{CHCOOH}$ )想了解其中的變化；我們發現當其接上烷基會造成活性下降，而當水溶性上升( $-\text{CHCOOH}$ )活性同樣呈現下降趨勢，反而接上 ester 形式的化合物(CPD38-39)活性有明顯的提昇。我們也嘗試過將 oxime 改換成 hydrazine 但是結果也不盡理想！原因還需釐清。



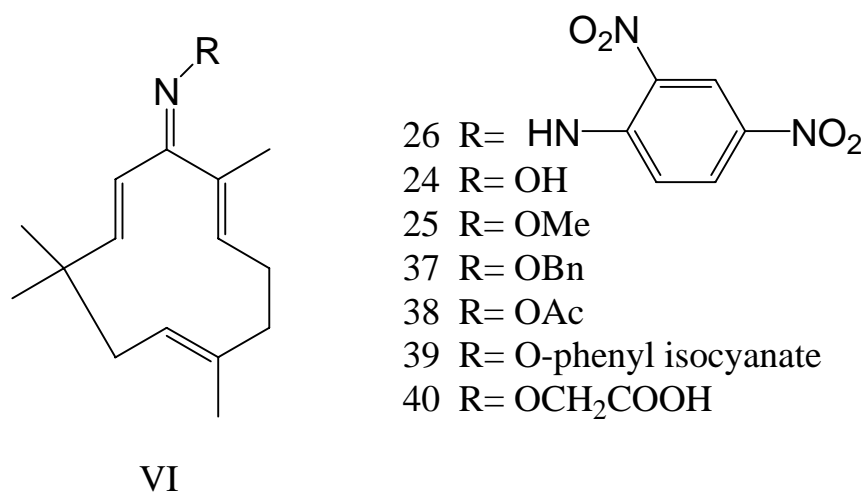


圖 15-5

最後我們將我們所篩選到活性效果不錯的化合物做一個整理(表 8、9)，在細胞毒殺方面我們已經找尋出兩大類較原來 zer 活性較高的化合物 (VI) oxime (CPD5、41、42)與 (II) humulenol (CPD24、38、39)，由這些結果看來我們可歸納出下列幾點

表 8、細胞毒性測試整理

	HeLa	AGS	CL	HT-39
11(Zer)	90.7	93.7	76.4	76.3
2	76.1	79.1	27.6	44.8
5	43.6	94.5	82.8	77.9
41	20.72	94.93		61.67
42	37.97	95.63		54.91
17	53.5	88.3	9.2	12.9
24	86.81	100		79.12
38	94.36	100		94.27
39	91.49	100		94.55

100  $\mu$  M/48hr

(1) 在我所合成的 35 個衍生物中有 24 個為new cpds，而其中我們找出最具有活性的兩類化合物 humulenol (CPD5、

CPD41、CPD42)與oxime (CPD24、CPD38、CPD39)，而oxime 這一大類中有一化合物 CPD39 其抗癌之 $IC_{50}$ 為  $1\ \mu M$  (見表九)，跟原先的zer比較下約為zer的 20 倍以上並且預計進入動物實驗。而我們發現這類化合物跟zer在C6-C10 這一塊區域都趨向於一個平面(圖 15-6)，所以若是要繼續研究其化合物可能還是必須保留這塊區域並朝向此方面進行研究可期望得到更好的發展。

(2) 而在這些癌症細胞株中我們發現，我們所研究的這類化合物

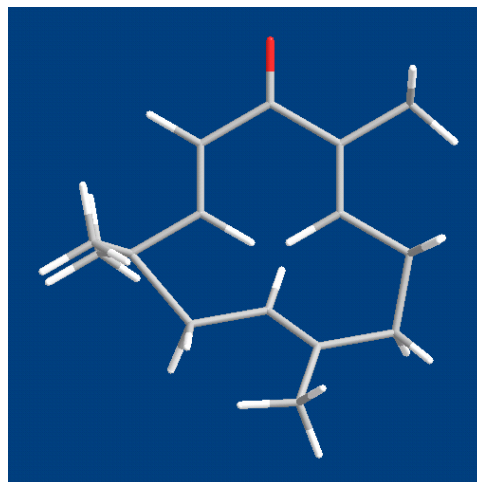
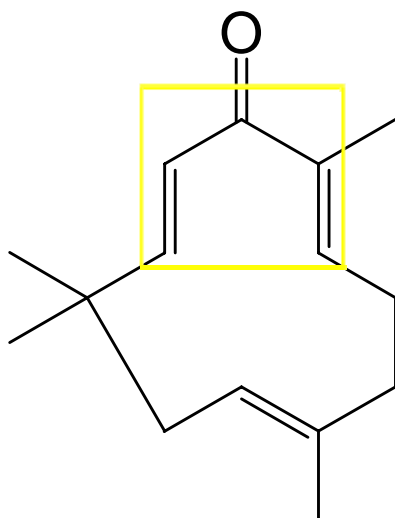
對於胃癌細胞比其他癌症細胞有較好的抑制效果。

(3) 在這些有活性的化合物結構中發現，若是化合物得水溶性升

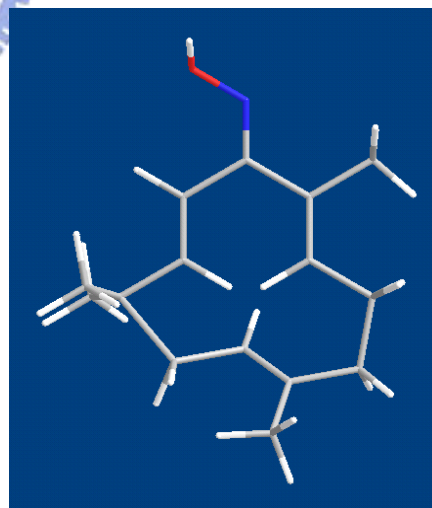
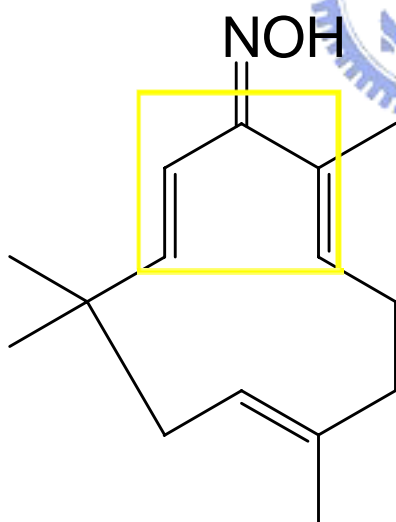
則會造成活性的下降。

表 9、 $IC_{50}$

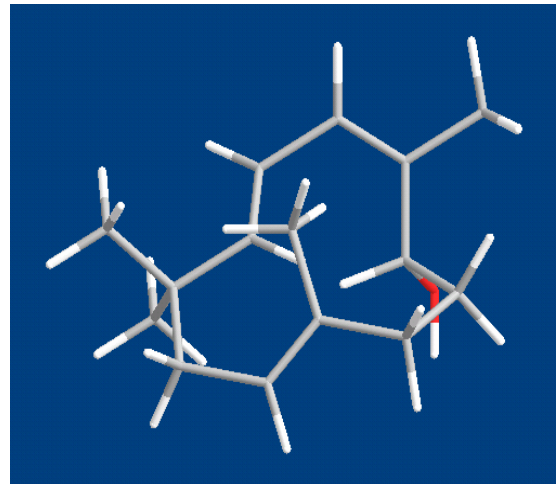
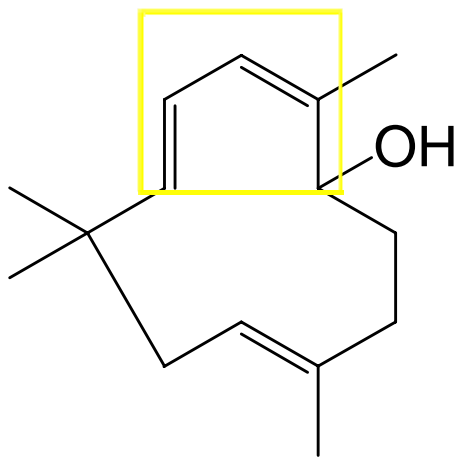
	HeLa	AGS	CL	HT-29
5	ND	61.7	ND	52.28
41	ND	ND	ND	ND
42	88.02	ND	37.7	81.506
24	62.79	25.957	21.18	66.48
38	66.403	53.875	43.89	68.124
39	<b>1.013</b>	62.046	<12.5	<b>5.125</b>
ZER	<b>38.883</b>	<b>22.193</b>	ND	<b>31.993</b>



zer



oxime



**humulenol**

圖 15-6 化合物 zer、oxime、humulenol 的 3D 結構