

AACR學術研討會優秀論文

Cryptocaryone, isolated from *Cryptocarya infectoria*, induces apoptosis through extrinsic pathways: the involvement of death receptor clustering and FADD/caspase-8 activation cascades

· 博士班 陳依呈

The anticancer efficacy and mechanism of action of cryptocaryone, isolated from *Cryptocarya infectoria*, were delineated in this study. The sulforhodamine B assay showed that cryptocaryone induced an anti-proliferative effect on several human cancer cell lines including prostate cancer PC-3, DU-145 and LNCaP, hepatocellular carcinoma Hep3B and HepG2, and P-glycoprotein-rich NCI/ADR-RES cells with IC50 values ranging from 1.5 to 6.2 μ M. The anticancer mechanism of cryptocaryone was elucidated in PC-3 cells. The FACScan flow cytometric analysis showed that cryptocaryone induced an increase of subG1 population (apoptosis) in a dose- and time-dependent manner and TUNEL technique demonstrated a strong positive staining indicating apoptotic cell death. The Western blot analysis showed that cryptocaryone caused a rapid activation of caspase-8 and -3, other than caspase-9, in PC-3 cells; furthermore, cryptocaryone did not affect mitochondria-relevant Bcl-2 and Bcl-XL expression. The data suggest the involvement of extrinsic but not intrinsic apoptosis pathway to cryptocaryone action. In further study, the protein levels of death receptors and related ligands were not changed by cryptocaryone. However, the immunochemical examination by confocal microscopy showed that Fas, DR4, and DR5 death receptors were clustered and co-localized with lipid raft. Furthermore, the treatment of Fas

neutralizing antibody (SM1/23) did not inhibit the apoptosis induced by cryptocaryone, suggesting that the clustering of death receptors act in a ligand binding-independent fashion. The formation of death-inducing signaling complex (DISC) was also investigated by immunoprecipitation assay. Cryptocaryone caused the recruitment of FADD to Fas, leading to the cleavage of pro-caspase-8 to active caspase-8. In summary, the data suggest that cryptocaryone effectively induces apoptotic cell death through the death ligand-independent clustering of death receptors in lipid raft, leading to the recruitment of FADD to Fas and caspase-8 activation in PC-3 cells.

藥學專題講座課程心得報告摘錄（一）

Development of Novel Therapy for Inflammation-Related Diseases

· 博士班 沈佳錚

目前許多研究發現heart attacks、cancer、Alzheimer's disease 及許多其他神經退化性疾病都和發炎反應有關。神經細胞周圍的microglial 在正常狀況下能提供神經細胞營養物質，但若發炎時，則會產生free radicals、prostaglandins、pro-inflammatory cytokines 等物質，導致神經細胞漸漸死亡。因此，Dr. Hong 以microglial 為抗發炎的新target，進行Parkinson's disease 新療法之研究，其研究目標有三：(1) Creation of progressive and inflammation-mediated rodent Parkinson's disease models：將LPS 打入animal 腦部，即可得到漸進式發炎的動物model。(2) Elucidation of mechanisms of inflammation-mediated rodent Parkinson's disease。(3) 發展新治療方法。

目前最常用於治療Parkinson's disease 的藥物為L-DOPA，然而此藥無法減緩Parkinson's disease 的病情惡化速度，長期使用副作用亦不少，因此急需發展更安全有效的藥物。Dr. Hong 發現抑制microglial activation 有神經保護作用，具有發展新P. D.療法之潛力，且抑制microglial 之抗發炎效果優於傳統之抗發炎藥物，這是因為目前使用的抗發炎藥物只能抑制某種pro-inflammatory factor 的釋放（如COX 2 inhibitors 只能減少prostaglandins的製造，卻無法減少TNF、IL-1 等物質之釋放），而抑制microglial 則可阻斷所有的pro-inflammatory factors，因此，若能針對microglial 設計抗發炎藥物，應可發展出效果優異的藥物。

Dr. Hong 發現了2類藥物兼具抗發炎及神經保護作用，且其抗發炎效果皆優於COX 2 inhibitors。第一類是morphinans，如naloxone、

dextromethorphan、3-hydroxyl-morphinan 等；第二類是dynorphin，雖然morphinans 為alkaloids、而dynorphin 屬於peptides，但都具有發展之潛力。此外，Dr. Hong 亦簡要介紹了LDN（Low Dose Naltrexone），此療法是由Dr. Bernard Bihari 所發明，目前已證實cancer、AIDS 及neurological disorders（如M.S.、P.D.）病人每日服用3mg 的Naltrexone 具有一定療效。

Heart attacks、cancer、Alzheimer's disease 及Parkinson's disease 等皆為不易治療之疾病，造成國家社會極大的醫療負擔，對病患家屬而言，亦是極為沈重的壓力，許多科學家針對個別疾病進行研究，企圖能不斷改進治療方式，然而這些疾病的共同特徵即是具有發炎反應，若是抑制發炎即可治療這些重大疾病，對病患不啻為一大福音，其進一步研究結果十分令人期待。

Dr. Hong 在discussion 時，和同學分享他在1999 年提出此假設並著手進行研究時所遇到的困境，這給了我很大的啟示：研究除了要有創新性、或是將現有知識及資源發揮最大的用途外，堅定的信心也是必備條件。所有的定律在假說階段，總是會受到眾人的質疑與批評，這對提出假說的科學家而言，或多或少都會打擊其信心，甚或阻斷其研究，因此，如何克服外來的批評壓力及自身的疑慮不安，並堅持朝正確的方向不斷努力，是從事研究工作者的一大挑戰。

（部份摘錄，全文請洽cajane@ntu.edu.tw）

藥學專題講座課程心得報告摘錄（二）

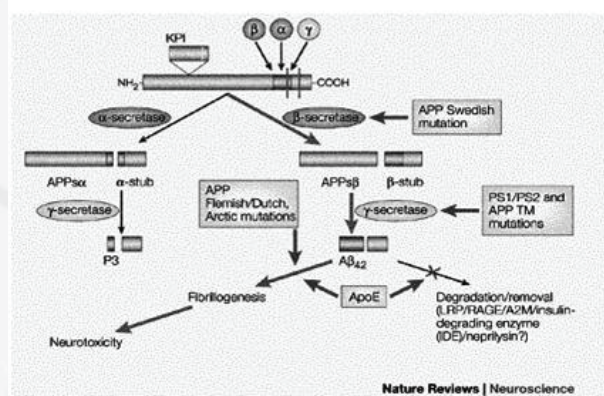
Design and Synthesis of Efficacious BACE1 Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease

· 碩士班 王筱君

二十世紀初，德國一位精神科兼神經病理學家，Alois Alzheimer（1864 - 1915），藉著對一位女性患者長期之診察、追蹤，並其過世後的腦部病理解剖圖，首次以顯微鏡之影像來展示患者腦部的細微變化。他在患者腦部部分區域發現特殊病理結構，如在神經細胞外的斑塊（plaques）、以及胞內糾結的纖維（tangles），並認為此二者會阻斷腦神經彼此溝通和傳遞訊息的功能。後人將此漸進性病症命名為Alzheimer Disease（AD, 阿滋海默症），以紀念他對此症初期研究之貢獻。

進一步的研究發現，細胞膜上的澱粉樣蛋白前趨蛋白（ β -amyloid precursor protein, APP）被 β -、 γ -secretase切割，將產生澱粉樣蛋白（amyloid β , $A\beta$ ）（右圖）；而 $A\beta$ 的聚合（polymerization）並聚集（aggregation）將形成AD之主要病理特徵。一般認為，抑制secretase活性、減少 $A\beta$ 形成，將可使AD進展停止或延緩，故藥化學家、藥廠對secretase抑制劑一特別針對主要分佈在腦部的 β -APP cleaving enzyme 1

（BACE-1）—寄予厚望。



禮來公司(Eli Lilly & Company)以OM 99-2 (1)為先導化合物(lead)；並利用將此一具八個氨基酸殘基的擬過渡狀態化合物(transition state mimetics)，及其生物等價化合物 (3)(isostere)之部分，以statine取代，以探討結構、活性之關係 (structure- activity relationship)，並找出有BACE-1抑制活性之最小分子。（下圖；BMC letter, 2003, 13, 4335-4339）

在此初步之研究中，確實開發出有效抑制

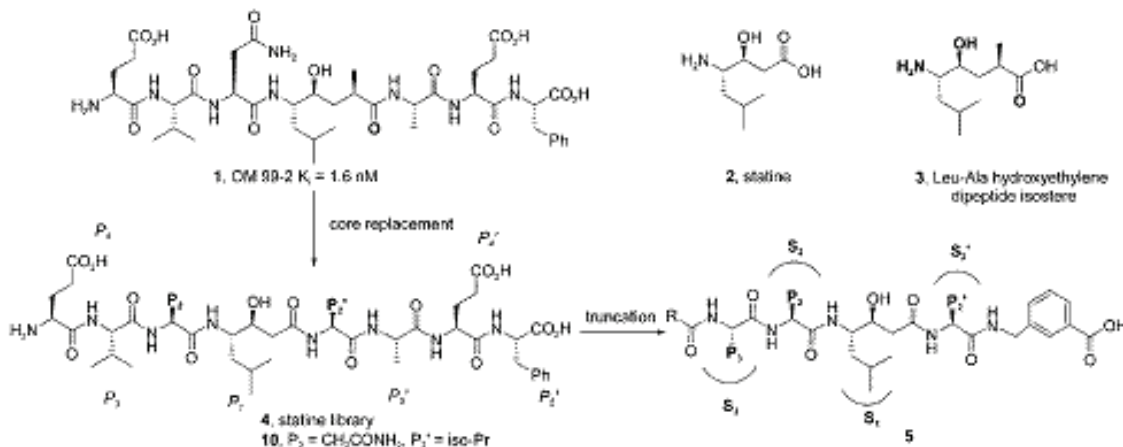
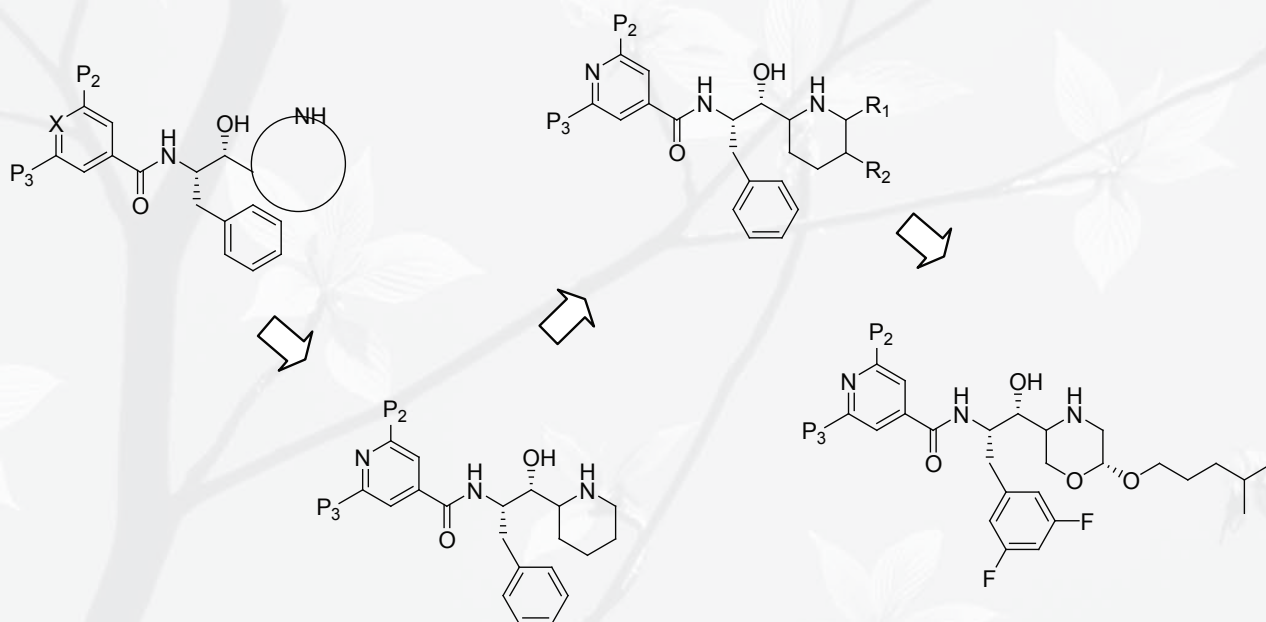


Figure 1. Structure of OM 99-2 and statine.

BACE-1活性之分子，但其分子量大、高極性表面積（polar surface area, PSA）並低Caco-2測值，可知其腦部穿透量低，將無法提供足夠化合物以達最低抑制濃度。故禮來公司研究團隊設定，作用於腦部化合物之理想物化參數，包括分子量<500、PSA <85 Å²、clog P介於2-5（3最為理想）等，作為化合物修飾之目標；並配合X-ray



Dr. HC Yang為我們帶來一個很棒的故事。在開發過程中，靈活運用各種設計策略，如生物活性等價取代（bioisostere replacement）、構型固定法（conformational restriction），佐以靶點之結構資訊（X-ray結構解析）、電腦分子模擬，並對有機化學之豐富知識、經驗（各種構型之關係及有效率的合成等），終於從標的（target;

結構、電腦分子模擬（computer modeling）等以優化先導化合物。主要之修飾部位包括P2、P3、statine之iPr基團等（如下圖圈起處）。其中為使piperidine環上的兩個取代R1、R2互為axial關係，在piperidine環上引入氧原子（形成morpholine環），除可利用anomeric effect使R2取代位於axial，更有易於合成之優點。

BACE-1) 到藥物。每個問題、每一步，都是一個或多個研究團隊相互合作的結果；全不是一個人能訴說完全的故事，而是集結許多領域、許多知識的結果。在這次的演講中，除了驚嘆於禮來公司研發能量之強，更是看到開發能量強的原因—多領域的合作。