

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

博士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Doctoral dissertation

天然物烯烷基對苯二酚[HQ17(3)]與硫醇基反應引發

分子及細胞反應之研究

A study on cellular response and molecular mechanism
induced by a thiol-reactive botanical alkylenehydroquinone

[HQ17(3)]



林亭妤

Ting-Yu Lin

指導教授：林淑萍 博士、張雅雯 博士

Advisor: Shwu-Bin Lin, Ph.D.

Ya-Wen Chang, Ph.D.

中華民國一百零二年一月

Jan 2013

致謝

在我的這一段碩士博士班的學程裡，重要的不是最後的結束而是中間所經歷的過程。感謝指導老師林淑萍教授的指導，不管是研究、訓練批判性思考，甚至是人生觀念及規劃，老師都給予了非常重要的建議。另外感謝老師促成我到國外當交換學生及參加國際研討會的機會，得以拓展國際觀並獲得許多寶貴的經驗。感謝 RJ (林仁章) 老師的研究指導及照顧，讓我在美國這塊異地上無需擔心生活而能專心學習。感謝張雅雯老師、歐樂君老師、林亮音老師及胡忠怡老師對於論文方向的指導。在這個過程裡，家人們是很重要的支柱，最感謝媽媽及姿妤；實驗室夥伴及朋友們不僅是在研究生活中互相討論的對象，更是我學習的對象，感謝政博、韻如、乃卉、郁旻、偉倩、依霖、秉真、意如、曉萱、書語、劉亮、潘宏韋、黛華、芸如、芷瑄及偉庭；感謝高淑慧老師、small、baby、彥婷、亭諭、怡姿、令儀、馨瑩及張耀文；感謝 Jenny、Issac、Joanna、Hank、盛兵、鑫基、Marieta、Lixin、Alain、Issabelle、Sharon、Stephanie、Beata 及 Josh；感謝陳盈君及蔡文綺。

這一個人生章節的完結不是結束，而是另一段章節的開啟。過程中所學到並累積的這些經驗，更是下一個階段重要的基石。『築夢踏實，有夢最美！』是我這一刻最深的體悟，感謝大家！

目錄

目錄.....	I
示意圖目錄.....	IV
表目錄.....	V
圖目錄.....	VI
附表圖目錄.....	VIII
中文摘要.....	IX
英文摘要.....	X
縮寫表.....	XII
一、序論.....	1
1.1 漆樹及其有效成分：漆酚 (Urushiol)	1
1.2 HQ17(3)為拓樸異構酶II抑制劑	1
1.3 氧化壓力.....	2
1.4 拓樸異構酶.....	3
1.5 拓樸異構酶作用.....	3
1.6 拓樸異構酶II抑制劑 (Topo II inhibitor).....	5
1.7 小分子修飾拓樸異構酶的硫醇基 (-SH)	6
1.8 拓樸異構酶導致DNA斷裂之細胞反應.....	7
1.9 細胞凋亡 (Apoptosis).....	8
1.10 小分子之抗氧化作用.....	8
1.11 Nrf2 與其調控相關因子	10
1.12 研究目的.....	14
二、實驗方法與材料.....	15
2.1 HQ17(3)的純化	15
2.2 細胞培養及藥物處理條件.....	15

2.3 蛋白質萃取及西方墨點法.....	16
2.4 人類recombinant Keap1 蛋白質的純化.....	17
2.5 HQ17(3)修飾蛋白質硫醇基的產物分析.....	18
2.6 試管實驗分析Topo II誘導DNA斷裂的形成.....	19
2.7 試管實驗分析Topo II活性.....	20
2.8 Immunodetection of <i>in vivo</i> complexes of enzyme to DNA (ICE bioassay).....	20
2.9 免疫螢光組織染色.....	21
2.10 細胞存活率測定 (ACP assay).....	22
2.11 流式細胞儀測定.....	22
2.12 基因表現之分析.....	24
2.13 ARE活性測定.....	25
2.14 Knockdown of Nrf2.....	26
三、實驗結果.....	27
3.1 HQ17(3)抗癌活性之分子機制探討.....	27
3.1.1 HQ17(3)修飾Topo II α 的半胱胺酸.....	27
3.1.2 HQ17(3)抑制Topo II α 酵素的解螺旋活性.....	28
3.1.3 HQ17(3)造成Topo II α 導致的DNA斷裂.....	29
3.1.4 HQ17(3)促進DNA受損相關基因的表現.....	29
3.1.5 HQ17(3)促進Huh7 細胞進行細胞凋亡.....	30
3.1.6 氧化壓力為HQ17(3)促進Huh7 細胞的凋亡原因之一.....	31
3.2 HQ17(3)之抗氧化性損傷機制探討.....	32
3.2.1 HQ17(3)對於WS1 細胞株活性的影響.....	32
3.2.2 HQ17(3)降低H ₂ O ₂ 造成的脂質過氧化.....	33
3.2.3 HQ17(3)減少H ₂ O ₂ 造成的細胞死亡.....	33
3.2.4 HQ17(3)修飾Keap1 的半胱胺酸.....	34
3.2.5 HQ17(3)活化Nrf2.....	34

3.2.6 HQ17(3)促進HO-1 的表現.....	35
3.2.7 HQ17(3)透過活化Nrf2 路徑而具有保護細胞的效果.....	36
四、結論.....	38
五、討論.....	39
六、參考文獻.....	77
藥品清單.....	83
已發表之論文.....	86
個人履歷表.....	97



示意圖目錄

Scheme 1、HQ17(3)、HQ17(2)及HQ17(1)的化學結構圖.....	2
Scheme 2、人類Topo II作用方式簡圖及抑制劑作用步驟示意圖	4
Scheme 3、人類Topo II切斷G strand DNA的作用示意圖.....	5
Scheme 4、Topo II α 的十三個半胱胺酸位置示意圖	7
Scheme 5、三萜類物質因不同濃度的處理而引發細胞內不同反應.....	10
Scheme 6、Keap1-Nrf2 調控方式示意圖.....	12
Scheme 7、Keap1 上已知可被修飾的半胱胺酸位點	13



表目錄

表 一、 HQ17(3)修飾recombinant Topo II α 及Huh7 細胞Topo II α 的半胱胺酸^a ...43

表 二、HQ17(3)修飾WS1 細胞Keap1 及recombinant Keap1 的半胱胺酸^a44



圖目錄

圖 一、HQ17(3)與decapeptide上的硫醇基反應.....	45
圖 二、HQ17(3)與Huh7 細胞內Topo II α 的半胱胺酸反應.....	46
圖 三、HQ17(3)與recombinant Topo II α 的半胱胺酸反應.....	47
圖 四、不同比例的HQ17(3)與Topo II α 反應而造成不同程度的酵素活性降低...48	
圖 五、DTT的處理不影響HQ17(3)抑制Topo II α 活性的能力.....	49
圖 六、HQ17(3)的處理增加Topo II α 導致的DNA斷裂.....	50
圖 七、HQ17(3)的處理導致Huh7 細胞中Topo II α -DNA複合體的累積.....	51
圖 八、HQ17(3)的處理導致Huh7 及HL-60 細胞中 γ -H2AX的現象發生.....	52
圖 九、部分DNA受損相關基因表現量因HQ17(3)的處理而上升.....	53
圖 十、HQ17(3)的處理早期引發Huh7 細胞凋亡.....	54
圖 十一、HQ17(3)的處理增加subG1 的比例.....	55
圖 十二、氧化壓力為HQ17(3)造成細胞凋亡的部分原因.....	56
圖 十三、NAC前處理並未防止HQ17(3)造成的Topo II poison及細胞死亡.....	57
圖 十四、HQ17(3)對於WS1 細胞的細胞活性影響.....	58
圖 十五、HQ17(3)的前處理降低H ₂ O ₂ 產生的自由基含量.....	59
圖 十六、HQ17(3)前處理降低H ₂ O ₂ 造成的脂質過氧化.....	60
圖 十七、HQ17(3)前處理降低H ₂ O ₂ 造成的細胞凋亡.....	61
圖 十八、HQ17(3)提升因氧化性傷害而降低的細胞存活率.....	62
圖 十九、HQ17(3)與WS1 細胞內Keap1 蛋白質的半胱胺酸反應.....	63
圖 二十、HQ17(3)促進WS1 細胞中Nrf2 轉錄因子活化.....	64
圖 二十一、HQ17(3)提升HO-1 基因及蛋白質的表現.....	65
圖 二十二、HQ17(3)透過活化Nrf2 分子而提供保護效果.....	66
圖 二十三、HQ17(3)毒殺Huh7 細胞機制圖.....	67
圖 二十四、HQ17(3)活化Nrf2 及HO-1 之機制示意圖.....	68

圖 二十五、HQ17(3)引發Topo II poison機制示意圖.....69



附表圖目錄

附表一、Primer序列.....	70
附圖一、被偵測到的Huh7 中Topo II α 帶有半胱氨酸的tryptic胜肽MS/MS質譜圖	71
附圖二、被偵測到的Huh7 cells 中Topo II α 的tryptic胜肽MS/MS質譜圖	74
附圖三、被偵測到的recombinant Topo II α 的tryptic胜肽MS/MS質譜圖.....	75
附圖四、ARE-Luc vector基因結構示意圖	76



中文摘要

先前研究發現烯烷基對苯二酚，10'(Z), 13'(E), 15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone [HQ17(3)]為具有抗癌活性 (anti-cancer)的天然抗氧化小分子 (antioxidant)。已知 HQ17(3)屬於不可逆的拓樸異構酶 II 抑制劑 [topoisomerase II (Topo II)]，可於 HL-60 血癌細胞中造成 Topo II poison、引發氧化壓力及細胞毒性。本篇研究發現以高濃度 HQ17(3) (10 μ M)處理 Huh7 肝癌細胞時，同樣導致 Topo II poison。進一步以質譜儀分析發現 HQ17(3)與細胞內 Topo II α 的半胱氨酸-427 (Cys-427)形成共價鍵結，HQ17(3)的處理並造成細胞中 Topo II α -DNA 複合體增加、DNA 雙股斷裂、數個 DNA 損傷基因的表現量上升及細胞凋亡。HQ17(3)也造成細胞氧化性傷害，然而以 *N*-acetylcysteine 抗氧化物前處理細胞，並無法有效拯救細胞的存活率，顯示 Topo II poison 為 HQ17(3)造成 Huh7 細胞死亡的主要原因。

本論文另以人類皮膚纖維母細胞 (WS1)的研究模式，發現細胞經處理低濃度 HQ17(3) (<1 μ M)後，可降低過氧化氫所造成的氧化性傷害。HQ17(3)並透過修飾 Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1)的半胱氨酸並活化 Keap1 所調控的 nuclear factor-E2 p45-related factor 2 (Nrf2)轉錄因子。以質譜儀分析發現 HQ17(3)與細胞內 Keap1 的 Cys-77、-249、-288 及-297 形成共價鍵結。HQ17(3)的處理進而促進 Nrf2 活化並誘導 Nrf2 下游所調控的 heme oxygenase-1 抗氧化酵素的表現，因此引發 Nrf2 分子相關的細胞保護機制。

綜合以上結果，HQ17(3)此種結構的小分子可作為 Topo II poison 發展外，也可當作研發相關預防性化合物的參考。

關鍵詞: 烯烷基對苯二酚、抗癌、抗氧化性傷害、拓樸異構酶 II α 、Nrf2、Keap1

英文摘要

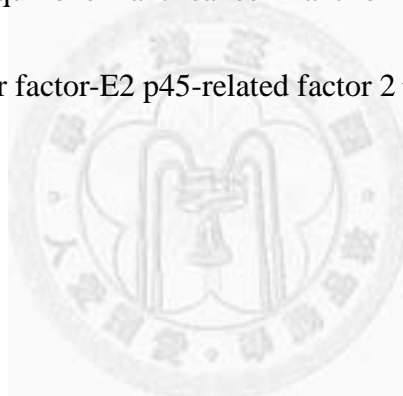
We previously reported that the botanical compound 10'(Z), 13'(E), 15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone [HQ17(3)], an antioxidant, possesses anti-cancer activity. The cytotoxicity of HQ17(3) toward HL-60 leukemia cells is attributed to irreversible topoisomerase II (Topo II) poisoning and induction of oxidative damages. This study further explored that the cytotoxicity of HQ17(3) (10 μ M) in Huh7 hepatoma cells was attributed to Topo II poison. Proteomic analyses revealed that HQ17(3) reacted with Cys-427 of cellular Topo II α . This HQ17(3) modification caused the accumulation of Topo II-DNA complexes, DNA strand breaks, consequently induced the expression of DNA damage-related genes and apoptosis. HQ17(3) also caused oxidative damages in Huh7 cells. However, pretreatment of *N*-acetylcysteine, the antioxidant, did not diminish HQ17(3)-induced cell death. These results suggest that the cytotoxicity of HQ17(3) is attributed significantly to Topo II poisoning.

In the WS1 skin fibroblast cell model, HQ17(3), at low concentration, was demonstrated to diminish H₂O₂-caused oxidative damages. HQ17(3) was found to modify Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) and activate nuclear factor-E2 p45-related factor 2 (Nrf2), a transcription factor involved in the cytoprotection pathway. Proteomic analyses indicated that HQ17(3) modified Cys-77、-249、-288 and

-297 of cellular Keap1. The nuclear translocation of Nrf2 and increase of HO-1 expression, an anti-oxidation enzyme regulated by Nrf2, in WS1 cells upon HQ17(3) treatment were observed. The activated Nrf2 pathway was found to be involved in HQ17(3)-mediated cytoprotection.

In conclusion, the structural feature of HQ17(3) could be used as a model for Topo II poison design as well as preventive agent design.

Key words: alkylenehydroquinone 、 anti-cancer 、 anti-oxidative damages 、
topoisomerase II α 、 Nuclear factor-E2 p45-related factor 2 、 Kelch-like ECH associated
protein 1



縮寫表

ARE, anti-oxidant response element

ATR, ataxia telangiectasia and Rad3 related

BQ, benzoquinone

BSO, buthione sulfoximine

BTB, broad complex/tramtrack/bric a brac

Cul3, cullin 3

Cys, cysteine

DDIT3, DNA damage inducible transcription factor

DTT, dithiothreitol

DZ, DNase

EC₅₀, median effective concentration

G strand, gate strand

GADD45, growth arrest and DNA damage-inducible

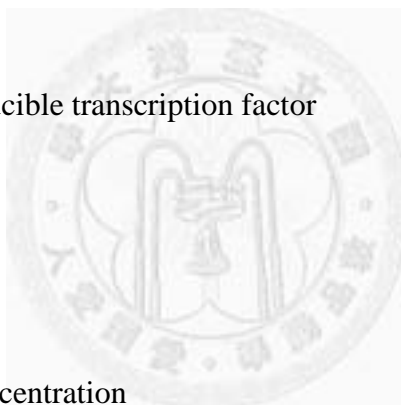
GCLC, glutamate-cysteine ligase catalytic subunit

GSH, glutathione

GST, glutathione *S*-transferase

HO-1, Heme oxygenase-1

HQ, hydroquinone



HQ17(1), 10'(Z)-heptadecenylhydroquinone

HQ17(2), 10'(Z), 13'(E)-heptadecadienylhydroquinone

HQ17(3), 10'(Z), 13'(E), 15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone

IVR, intervening region

Keap1, Kelch-like ECH associated protein 1

MDM2, Mouse double minute 2 homolog

MMP, mitochondrial membrane potential

NAC, *N*-acetylcysteine

Nrf2, nuclear factor-E2 p45-related factor 2

PARP, poly (ADP-ribose) polymerase

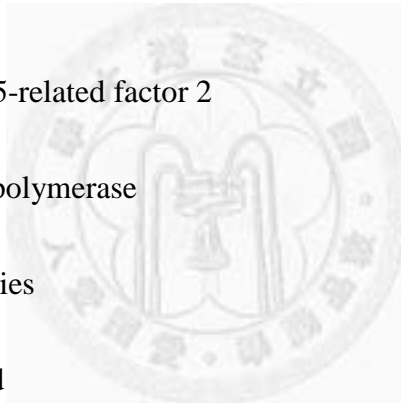
ROS, reactive oxygen species

T strand, transported strand

tBHQ, *tert*-butyl hydroquinone

Topo, topoisomerase

TREX3, three prime repair exonuclease 1



一、序論

1.1 漆樹及其有效成分：漆酚 (Urushiol)

本論文所研究的化合物是從台灣南投埔里的漆樹 (*Rhus succedanea*)上所採集的漆液中分離並純化，為本實驗室與嘉義大學邱義源教授實驗室共同合作取得。本草綱目中記載漆液具有防蟲的功效，用於人體也能紓解腸胃不適。漆液富含漆酚類小分子，漆酚的結構為 dihydroquinone 並帶有 15 或 17 個長碳鏈的支鏈^{1,2}。

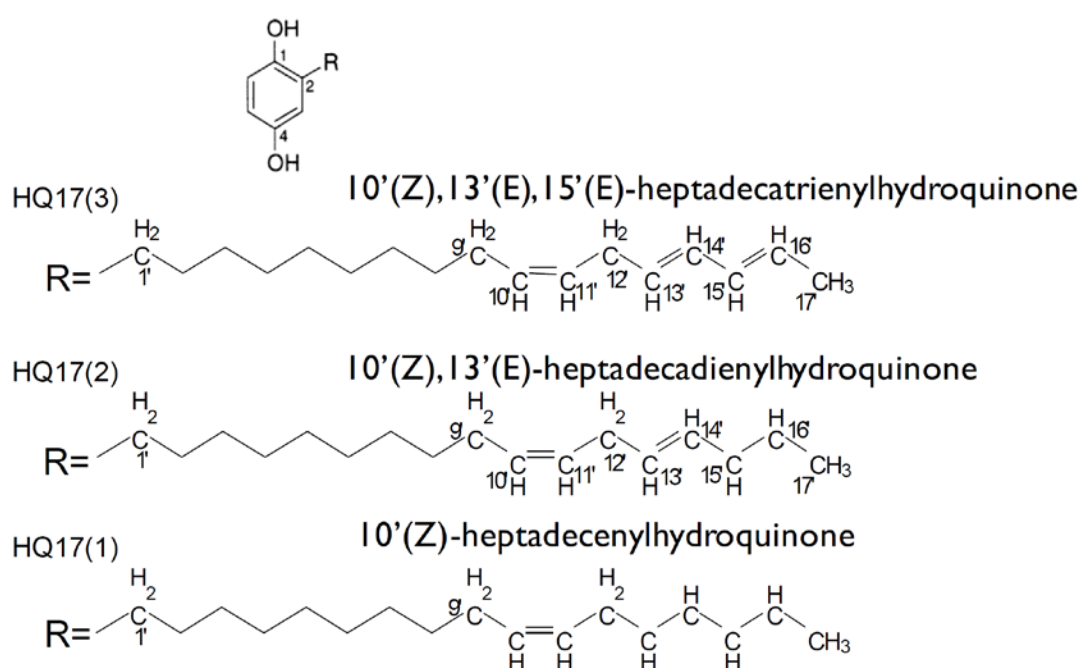
我們於此漆液裡發現三種屬於漆酚類的小分子，三者皆具有抗氧化 (anti-oxidation) 的活性。結構都以對苯二酚 (1,4 hydroquinone, HQ) 為主體，於二號碳上接有一段 17 個碳的不飽和碳鏈，三者的不同之處為帶有不同數目的雙鍵 (scheme 1)。雙鍵位在第 10、13 及 15 個碳上的化合物命名為 10'(Z), 13'(E), 15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone，簡稱為 HQ17(3)，為本篇論文所研究的化合物。而雙鍵位在第 10、13 個碳上的化合物稱為 HQ17(2)，雙鍵位在第 10 個碳上的化合物稱為 HQ17(1)，其中以 HQ17(3) 的抗氧化能力最強³。

HQ17(3) 針對多種癌細胞株具有顯著的毒殺效果，包括 HL-60 血癌細胞、Huh7 及其他肝癌細胞株³。近期研究指出，HQ17(2) 可抑制細菌表面移行 (swarming) 的能力及毒力因子 (virulence factors) 的表現，未來可用作抵抗細菌感染的臨床使用⁴。HQ17(1) 能顯著抑制 tyrosinase 的活性以防止黑色素的大量製造，並且不會造成細胞內氧化壓力的上升而影響細胞活性，因此可應用於美白產品的添加物⁵。

1.2 HQ17(3) 為拓樸異構酶 II 抑制劑

於 Huang et al., 2008 的研究中指出，將 HQ17(3) 對 HL-60 及 HL-60/MX2 [缺乏拓樸異構酶 II (Topoisomerase II, 以下簡稱 Topo II) 二株血癌細胞株的細胞毒性 [median effective concentration (EC₅₀)] 做比較，發現 HQ17(3) 選擇性地毒殺 HL-60

細胞，對於 HL-60/MX2 細胞的毒性較低，顯示 HQ17(3)透過 Topo II 的作用以造成細胞毒性⁶，另一方面，HQ17(3)所引發的氧化壓力也參與在毒殺 HL-60 細胞的機制中。從該研究的試管實驗中發現 HQ17(3)並不會嵌入 DNA，並且 HQ17(3)選擇性地抑制 Topo II 而非 Topo I，並增加 Topo II-DNA 複合體，因此 HQ17(3)屬於 Topo II 抑制劑，而且為不可逆的抑制作用。若先將 HQ17(3)與 Topo II 先行反應後再加入 DNA 以起始反應，便可抑制 Topo II 的活性，推測 HQ17(3)可能透過對 Topo II 進行修飾而影響其活性¹。



Scheme 1、HQ17(3)、HQ17(2)及 HQ17(1)的化學結構圖

本圖擷取自 Wu et al., 2002³。

1.3 氧化壓力

活潑的小分子化合物已知可造成細胞內的氧化性損傷，導致 DNA 斷裂、蛋白質氧化及細胞死亡。氧化壓力的來源，包括外源性或內生性的活性氧自由基 (reactive oxygen species，以下簡稱 ROS)。活性氧自由基為活潑的含氧產物及氧的代謝物，如氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\bullet OH$)、超氧化物 (superoxide anion,

$O_2^{\bullet-}$)及過氧化氫 (H_2O_2)⁷。內生性的自由基來自於粒線體的電子傳遞鏈的過渡產物 (如： $O_2^{\bullet-}$)。外源性的自由基則來自於細胞外的刺激，如 UV 照射，香菸或是有害化學毒物，容易造成細胞內的氧化壓力上升而對細胞產生傷害。氧化壓力除對細胞產生上述的氧化性損傷外，也會影響細胞內的訊息傳遞⁸。

已知部分 Topo II 抑制劑也會藉由產生自由基而造成 DNA 損傷並導致細胞生長停滯或細胞凋亡，如 HQ17(3)、benzoquinone (BQ)及 fluoroquinolones，發現於細胞中增加活性氧自由基的含量及氧化性損傷^{1,9,10}。

1.4 拓樸異構酶

拓樸異構酶為細胞中不可或缺的酵素，其作用在於改變 DNA 的超螺旋結構 (supercoiled structure)以利細胞進行基因複製 (replication)、轉錄 (transcription)、修復 (repair)、重組 (recombination)及染色體的濃縮 (chromosome compaction)⁹。

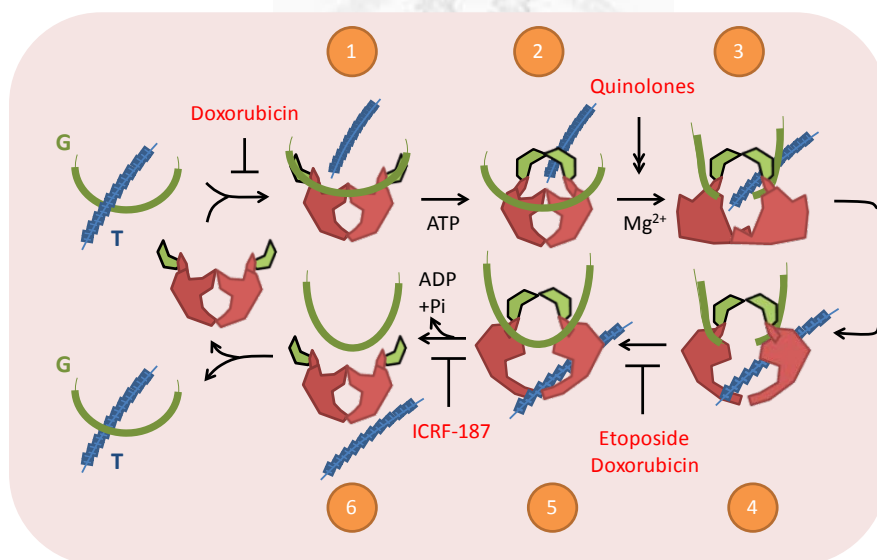
拓樸異構酶的分類根據其特性及作用方式而分成 type I 及 type II。Type I 的作用為切開單股 DNA，以解鬆 DNA 結構 (DNA relaxation)，此過程不需要 ATP 的參與。Type II 則是切開雙股 DNA，此過程需要消耗 ATP 及鎂離子以穩定 DNA 的結構¹¹。

人類拓樸異構酶有 Topo I 及 Topo II，因為作用方式不同而被分類成：Topo I 屬於 type I；Topo II 屬於 type II¹¹。人類 Topo II 有兩個異構物 (isoform)，為 Topo II α 及 Topo II β ，二者於序列上具高度相似性 (約有 77%相同的序列)⁹。Topo II α 主要是因應細胞複製分裂時期而被大量表現以解開 DNA 的超螺旋結構，以利細胞周期的進行；Topo II β 則是持續地表現，與 DNA 的修復及基因轉錄有關，但與細胞週期進行無關⁹。

1.5 拓樸異構酶作用

人類 Topo II 以二聚體 (homodimer)的型式作用。Topo II 蛋白質結構主要有兩個部分，分別為 ATPase domain 及 DNA breakage/reunion domain。以下介紹 Topo

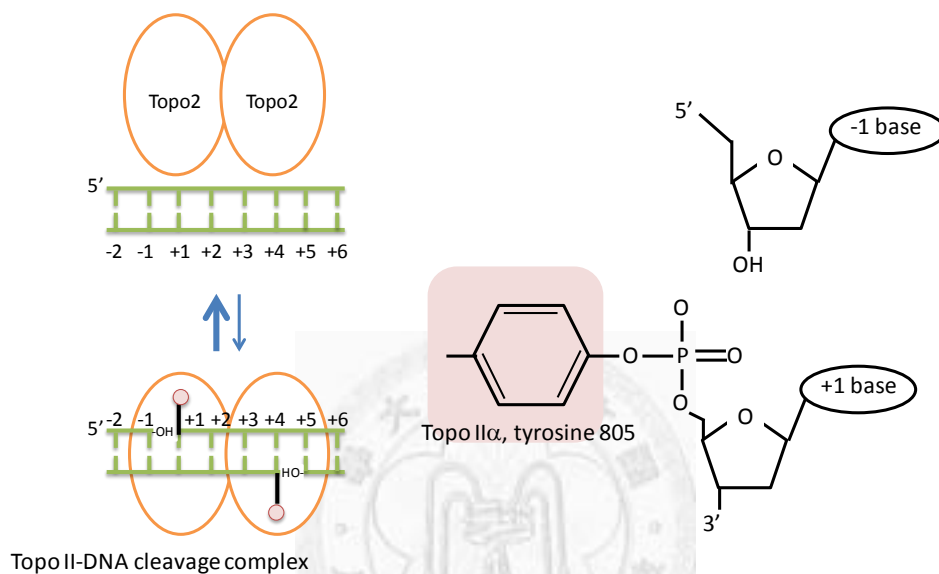
II 如何改變超螺旋 DNA 結構而作用於解開正負超螺旋結構及解開互相交纏的染色體 (unknotting)¹¹。如 scheme 2 所示，超螺旋 DNA 為兩條雙股 DNA 互相纏繞的構造，分別稱作 gate (G) strand 及 transported (T) strand。Topo II 酵素作用步驟如下，① Topo II 接上 G strand DNA，② ATP 接上 Topo II，使得構型從打開的狀態 (open clamp) 變成關起的狀態 (closed clamp)，③ Topo II 藉由酪胺酸-805 與 G strand DNA 之間形成共價鍵結，此時酵素與 DNA 形成 Topo II-DNA 複合體 (Topo II-DNA cleavage complex)，而 G strand DNA 為暫時被切斷的狀態，④ 酵素將 T strand DNA 穿過該切斷處 (strand passing)，⑤ G strand DNA 會再被接回去 (religation)，T strand DNA 便離開，⑥ ATP 於此時被水解，因此讓酵素再次回到打開的狀態並讓 G strand DNA 離開¹¹。過程中 DNA 序列並未被改變，而得以維持完整性。



Scheme 2、人類 Topo II 作用方式簡圖及抑制劑作用步驟示意圖

兩條互相纏繞的雙股 DNA 分別稱作 gate (G) strand 及 transported (T) strand。蛋白質綠色部分為 ATPase domain，紅色部分為 DNA breakage/reunion domain。抑制符號為藥物所抑制的步驟處，雙箭頭號為該藥物增加 Topo II-DNA 複合體形成。Quinolones 及 etoposide 為 Topo II poison 可累積 Topo II-DNA 複合體；ICRF-187 則為 Topo II catalytic 抑制劑。Doxorubicin 可以藉由嵌入 DNA 中以抑制酵素活性，為 Topo II catalytic 抑制劑；也可如同 etoposide 作用般累積 Topo II-DNA 複合體，為 Topo II poison。本圖擷取自 Pommier et al., 2010 並做修改¹¹。

由於核苷酸之間是以 phosphodiester 做為鍵結，Topo II 利用其活性區的酪胺酸以親核性攻擊 (nucleophilic attack) 的方式攻擊 G strand 上的 phosphodiester bond 的電子，因此酪胺酸的-OH 官能基會與核苷酸的 phosphodiester 形成共價鍵結，另一個單體 (monomer) 則是攻擊相隔四個鹼基後的另一股 DNA phosphodiester 鍵 (scheme 3)¹²。



Scheme 3、人類 Topo II 切斷 G strand DNA 的作用示意圖

人類 Topo II 利用其活性區的酪胺酸透過親核性攻擊 (nucleophilic attack) 與 G strand DNA 的 phosphodiester 形成共價鍵結。粉紅色圓點為酪胺酸-805，與核苷酸之間的黑線為共價鍵結，共價鍵結示意圖如右圖所示。本圖擷取自 Pommier et al., 2010 並做修改¹¹。

1.6 拓樸異構酶 II 抑制劑 (Topo II inhibitor)

當拓樸異構酶活性被抑制或是於解螺旋的階段中被干擾時，都會造成 DNA 結構的不穩定而導致細胞毒性，藉由累積 Topo II-DNA 複合體為目前抗癌藥發展針對的目標之一。

目前臨床所使用的 Topo II 抑制劑的作用分兩種，一種為 Topo II poison，另一種為 catalytic inhibitor (scheme 2)。藥物針對累積 Topo II-DNA 複合體而導致

增加 DNA 斷裂所造成的毒性稱做 Topo II poison¹¹，例如 VP-16、teniposide (VM-26)，doxorubicin、amsacrine (m-AMSA)及 TAS-103¹³⁻¹⁷。VP-16 藉由其立體結構而卡在 G strand DNA 的斷開處，使得 Topo II 無法有效將 DNA 接回去而造成 Topo II 所導致的 DNA 斷裂 (Topo II-mediated DNA break)。另外 quinolone CP-115,953、ellipticines、azatoxins 及 flavonoid genistein 也屬於 Topo II poison，作用方式是透過穩定並增加 Topo II-DNA 複合體的形成，同樣也會導致 DNA 斷裂^{15,18-20}。從實驗室先前的研究指出，HQ17(3)同樣也可增加 Topo II-DNA 複合體的形成，故屬於 Topo II poison 的抑制劑¹。

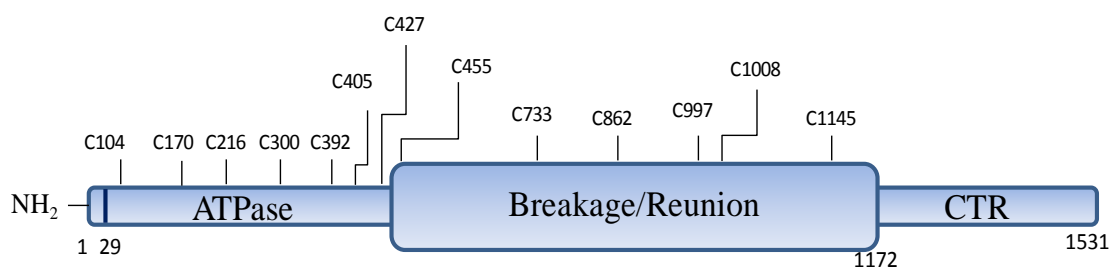
另一類藥物針對降低 Topo II 的活性稱作 Topo II catalytic inhibitor，部分 DNA 嵌入劑屬於此類，可藉由嵌入 DNA 後，造成 DNA 構型改變，使得 Topo II 無法接上 DNA，如 scheme 2 所示 (doxorubicin, step 1)。另外，merbarone 及 bisdioxopiperazines [ICRF 159, 187 (dexrazoxane)及 193]則是透過抑制 ATP 水解^{21,22}，導致 Topo II closed clamp 結構受影響而無法與解螺旋後的 DNA 分開 (如 scheme 2, step 5 & 6)。

1.7 小分子修飾拓樸異構酶的硫醇基 (-SH)

部分 Topo II poison 小分子抑制 Topo II 酵素的方式為藉由透過修飾 Topo II α 的半胱胺酸 (cysteine, Cys)²³。Topo II α 蛋白質序列中帶有 13 個半胱胺酸 (scheme 4)，而個別半胱胺酸的活性調控仍在研究中。目前已知將 Cys-427 的位點突變時 (C427A)，此 Topo II mutant 酵素活性較 wild type 低，而且當反應條件的 ATP 濃度降低時，Topo II 活性降低地更為顯著，顯示 ATP 濃度與該位點對於酵素活性的調控有關²⁴。

於 Wang et al., 2001 的研究中發現，menadione 這種具有與蛋白質硫醇基反應活性的小分子可抑制 Topo II 的活性，並且增加 Topo II-DNA 複合體的累積及 DNA 斷裂的情況²⁵。許多文獻也發現其他天然物小分子，包括 quinones 及 isothiocyanates^{26,27}，皆可與 Topo II α 的硫醇基反應而抑制酵素活性。舉例來說，

已知 BQ 可修飾 Cys-392 及 Cys-405 兩個位點，並且增加 Topo II α 導致的 DNA 斷裂²⁸；isothiocyanates 被發現可修飾數個位點，包括 Cys-104, -170, -300, -392, -427, -455, -733, -997, -1008 及 -1145，並透過穩定 Topo II-DNA 複合體結構而導致 DNA 斷裂²⁷。更進一步發現，部分 Topo II poisons 的作用方式是藉由氧化還原反應而與 Topo II α 的硫醇基行共價鍵結反應²⁶。



Scheme 4、Topo II α 的十三個半胱胺酸位置示意圖

1.8 拓樸異構酶導致 DNA 斷裂之細胞反應

當 Topo II 活性受抑制而造成 DNA 斷裂時，細胞為因應此情形會將 histone H2A 家族蛋白質中的 H2AX 磷酸化 (γ -H2AX)，此磷酸化的訊息發生在 DNA 斷裂處並且形成 foci，引發下游的訊息傳遞以招集 DNA 修補蛋白質至該處進行修復，因此 γ -H2AX 現象當作 DNA 斷裂的指標²⁹。另一方面，可利用 Immunodetection of *in vivo* complexes of enzyme to DNA (ICE bioassay) 方法偵測 Topo II-DNA 複合體是否因為藥物處理而增加³⁰。

當細胞內染色體複製過程及 DNA 結構因受到 Topo II 抑制劑的作用而被影響時，會產生基因毒性 (genotoxicity)。細胞內感受到 genotoxicity 時，除了利用 γ -H2AX 的訊息活化以做為修復訊號外，尚有其他因應的措施，例如表現 DNA 損傷相關基因，包括 DNA damage inducible transcription factor (*DDIT3*), growth arrest and DNA damage-inducible (*GADD45*) 家族基因，此類為最早於 DNA 受損細胞模式中發現被誘發表現的基因，而這些基因持續活化後會引發細胞凋亡^{31,32}。

1.9 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡為細胞程式死亡的一種嚴謹的機制，透過活化一連串的 caspases，將訊息傳至下游分子而起動細胞凋亡，以水解細胞內 DNA 及蛋白質，並可觀察到細胞核濃染、細胞皺縮的現象，此種方式的死亡會將細胞內的胞器包起並清除，以避免細胞內的物質釋出而對鄰近的細胞造成發炎反應及傷害³³，與細胞壞死 (necrosis) 不同，因此促進癌細胞死亡的藥物皆以活化凋亡為目標³⁴。

凋亡的起始方式分成外源性 (extrinsic) 及內生性 (intrinsic) 路徑³⁵。當細胞接受到外來的刺激及訊號，如 death ligand，便會啟動 extrinsic apoptosis pathway，而活化 caspase 8；若是來自於細胞內的影響，則是透過粒線體而啟動 intrinsic apoptosis pathway，粒線體膜上的離子通道因此大量打開、喪失維持外正內負的電位差特性 (mitochondrial membrane potential, MMP)，粒線體內的 cytochrome c 也從粒線體中釋放至細胞質中，cytochrome c 與 apoptosis protease activating factor-1 形成 apoptosome 而活化 caspase 9。Caspase 8 及 caspase 9 皆會將下游的 pro-caspase 3 切成活化態的 caspase 3，而將細胞內的蛋白質分解並活化 DNA 內切酶使得細胞走向死亡³⁶。

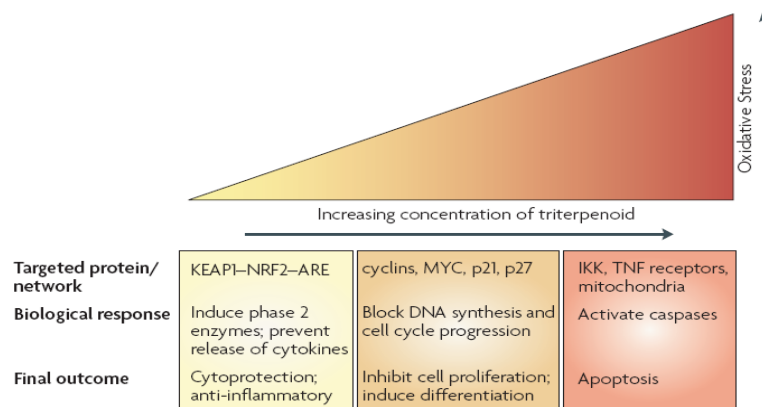
細胞凋亡的機制中可觀察數種現象的發生，除前述的喪失維持粒線體膜電位的特性外，還包括細胞膜的內膜外翻、及 subG1 population 的出現。Phosphatidylserine 位於細胞膜的內側，為細胞膜的組成。當凋亡發生時，phosphatidylserine 的位置會從膜內側翻到膜外側 (externalization of phosphatidylserine)，然而此時的細胞膜仍保持完整。另一方面 DNA 含量也因為大量活化的 DNA 內切酶而產生 DNA 斷裂，因此可觀察到 DNA 含量少於 2N 的細胞群，故稱作 subG1 population³⁶。

1.10 小分子之抗氧化作用

植物所含有的化合物可藉由氧化的方式保護植物本身抵禦蟲害或是微生物

感染，因此目前的研究趨勢，多為研究這些天然化合物預防疾病發生、減緩病程發展的可能應用性³⁷。舉例說明，葡萄及深色漿果類中的白藜蘆醇 (resveratrol) 是一種植物用以抗真菌類感染的高抗氧化物質，被發現於人體中具有有效降低心血管疾病發生的機率，於細胞實驗中也發現能促進細胞凋亡機制的活化，於動物實驗中則能抑制腫瘤的生長³⁷；胡蘿蔔、深綠葉蔬菜及黃、橘色蔬果中的胡蘿蔔素 (β -carotene) 為維他命 A 的前驅物，能有效清除單氧物質 (singlet oxygen) 以防止細胞脂質過氧化；維他命 C 則是一般蔬果中富含的成分，藉由分子結構上的氫氧基與自由基作用，使自由基得到電子後變成較穩定的物質因而降低氧化壓力，另外可促進膠原質的形成，因此增強血管壁組織強度，可用以預防動脈硬化³⁸；花椰菜中的異硫醇氰酸鹽 (sulforaphane)，能夠透過活化細胞內 NF-E2 相關因子 [nuclear factor-E2 p45-related factor 2 (Nrf2)] 路徑，啟動下游相關保護基因的表現，幫助細胞清除過多的活性氧自由基³⁹。如 scheme 5 所示，三萜類 (triterpenoids) 在細胞中所引起的細胞反應與該分子所使用的濃度有關。於高濃度處理條件下會引發過度的氧化壓力，促進細胞凋亡相關路徑的活化，因此可用做於毒殺癌細胞。反之於低濃度處理的情況下，小分子可引起輕微的氧化還原不平衡而活化 Nrf2，或是透過本身的化學活性特性而直接活化 Nrf2，以清除過多氧化性物質並維持氧化還原平衡⁴⁰。因此說明了天然植物中的有效物質於高濃度使用時具有抗癌的活性外，若使用低濃度的處理則可以保護細胞抵抗氧化性損傷⁴¹。

細胞尚可借助於一些還原態的小分子以維持細胞內氧化還原平衡，例如 *N*-acetylcysteine (NAC) 或是 glutathione (GSH)。NAC 透過自身的硫醇基提供與親電子的氧化基團相互作用而達到直接抗氧化的功效，另外的生理功能為 GSH 合成的前驅物，經 gamma-glutamylcysteine synthase 的作用而合成 GSH。GSH 為三個胺基酸 (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine) 組成的小分子，可作用於過氧化氫的代謝過程中，或透過做為抗氧化物質，以降低自由基對細胞造成的氧化性傷害⁴²。



Scheme 5、三萜類物質因不同濃度的處理而引發細胞內不同反應

本圖表擷取自 Liby et al., 2007⁴⁰。

1.11 Nrf2 與其調控相關因子

Nrf2 屬於 bZip 轉錄因子，負責表現保護細胞的酵素，與 NF-E2、Nrf1、Nrf3、Bach1 及 Bach2 同樣歸類於 Cap'n'collar 家族蛋白質。研究發現 Nrf2 基因剔除的老鼠具有正常的存活率及生育力，但是對於外來的傷害刺激，像是來自於 cigarette smoke、acetaminophen 及 diesel exhaust fumes，則較敏感，存活率因此下降⁴³。另一方面，根據一流行病學調查，oltipraz 為 Nrf2 活化誘導物 (inducer)，以此當做口服藥以治療病人 (長期接觸 aflatoxin 高度致癌物質的工作族群)，發現可幫助 aflatoxin 以不具毒性的型式從尿液中排出，也說明了 Nrf2 可做為降低氧化性傷害的重要角色⁴¹。

Nrf2 有 605 個胺基酸，蛋白質構造上帶有 6 個功能性 domains，分別為 Neh1-6 (Nrf2-ECH homology)。Neh1 為 bZip DNA binding 及 heterodimerization domain，為 Nrf2 與其他蛋白質及 DNA 交互作用的 domain。Neh2 負責 Nrf2 與其活性調控者 Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) 間的交互作用，Neh3-5 為與不同的轉錄促進子蛋白質作用處，Neh6 則是負向調控 Nrf2⁴³。研究指出 Nrf2 的半衰期很短，若以 cadmium (可抑制 proteasome) 處理細胞使 Nrf2 半衰期從 13 分鐘得以延長到 100 分鐘，並促進活化 Nrf2，推測 Nrf2 的調控與其本身的穩定性有關^{44,45}。目前發現 *tert*-butylhydroquinone (tBHQ)、sulforaphane 及 diethyl maleate 此

類 Nrf2 活化誘導物，並不影響 Nrf2 的 mRNA 量，而是增加 Nrf2 蛋白質的含量，表示 Nrf2 蛋白質變得較為穩定⁴⁶。

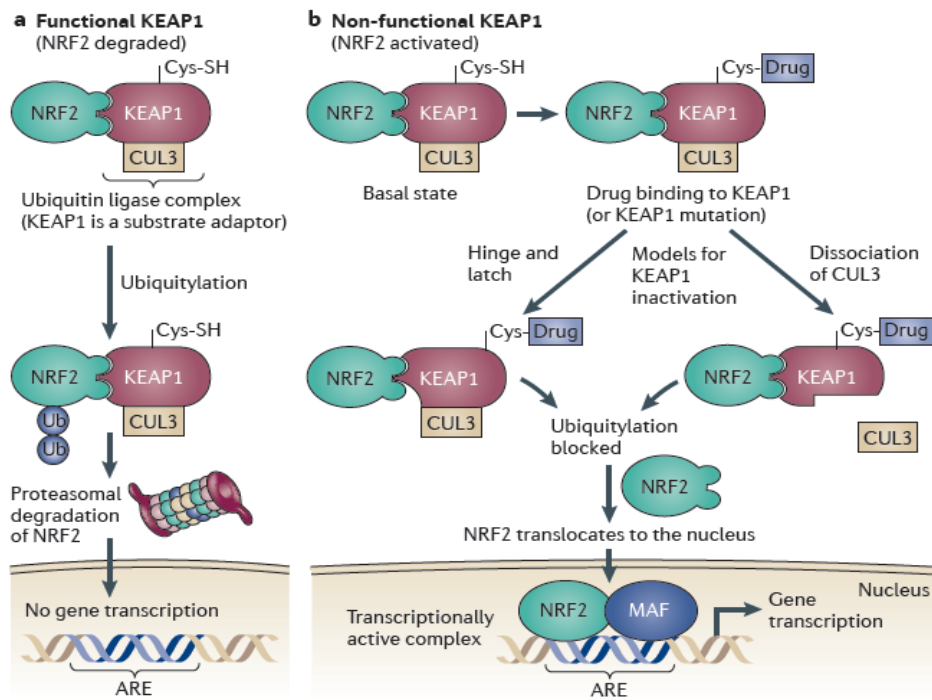
Nrf2 蛋白上有數個可被磷酸化的胺基酸 (S214、S408、S558、T559 及 S577)，若做這些點的單一胺基酸突變，並不影響 Nrf2 的活性，只有當五個位置同時突變時，才對 Nrf2 的活性產生些微地抑制，顯示磷酸化並非主要影響 Nrf2 活性的變因。其他細胞內的訊息傳遞路徑，如 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 或是 protein kinase C (PKC)，皆與 Nrf2 的活化相關⁴⁷，但是只有在當 Keap1 缺乏時才顯現出重要性，說明了 Keap1 仍是調控 Nrf2 的主要方式⁴⁶。

Keap1-Nrf2 路徑

Keap1 為二聚體的形式，與 actin 接合而存在於細胞質中，並透過與 Nrf2 接合而將之留在細胞質中以抑制活化 (scheme 6a)。如 scheme 6b 所示，當 Keap1 的半胱胺酸被 Nrf2 活化誘導物修飾時，此時 Keap1 無法抑制 Nrf2 (Keap1 inactivated)。因 Keap1 結構改變而釋放 Nrf2，此為鉸鏈及門栓理論 (hinge and latch)，或是促進 Keap1 與 cullin3 (Cul3, ubiquitin E3 ligase) 分開 (dissociation)，導致 ubiquitination 活性降低，使得 Nrf2 不被降解而穩定性增加。Nrf2 因此可進入細胞核內 (nuclear translocation) 與 Maf 蛋白質形成 heterodimer (transcriptionally active 複合體)，促進下游基因的表現。因此 Keap1 扮演著一個控制 Nrf2 活化與否的樞紐角色。

Keap1

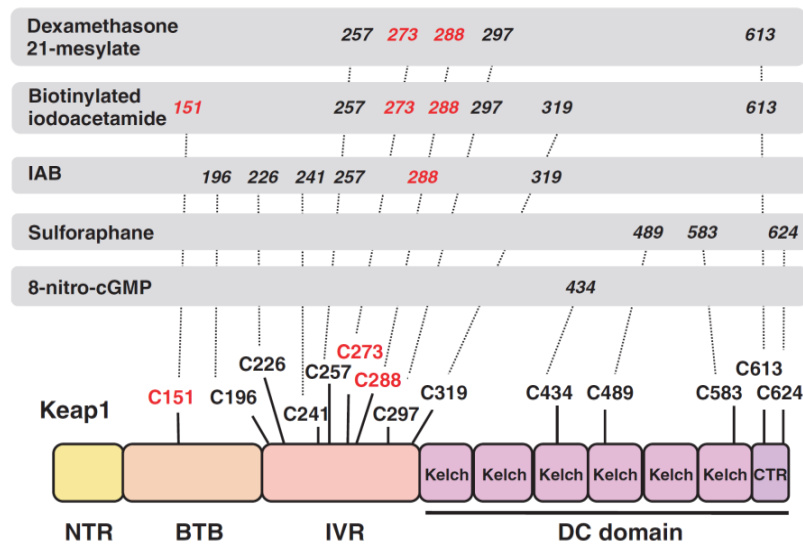
Keap1 為 624 個胺基酸所組成的蛋白質，主要包含三個 domains：BTB dimerization domain (Broad-Complex Tramtrack Bric a` brac)、cysteine-rich IVR domain (Intervening region) 及 Kelch domain (包含 6 個重複的 Kelch 序列)。Kelch domain 為 Keap1 與 Nrf2 接合的區域。BTB domain 則是 Keap1 與 Cul3 接合的區域，而形成 ubiquitin ligase complex，因此可利用 ubiquitination 的方式調控 Nrf2 蛋白質的含量⁴⁸。



Scheme 6、Keap1-Nrf2 調控方式示意圖

a 具抑制 Nrf2 活性的 Keap1 狀態 (Keap1 activated)，Keap1 與 Cul3 形成 ubiquitin ligase 複合體，透過 ubiquitination 將 Nrf2 以 proteasome 機制降解 (degradation)。b Nrf2 活化誘導物透過修飾 Keap1，使得 Keap1 無法抑制 Nrf2 (Keap1 inactivated)，促進 Nrf2 下游基因的表現。本圖表擷取自 Sporn et al., 2012⁴⁸。

人類 Keap1 蛋白質序列中含有 27 個半胱胺酸，目前已知數個半胱胺酸能夠與 Nrf2 活化誘導物反應並形成鍵結、改變 Keap1 的活性。根據文獻指出，Cys-151、-273 及 -288 為主要調控 Keap1 活性的三個位點。Cys-151 位於 BTB domain，當其被小分子修飾時，發現 Cul3 與 Keap1 分開，因而造成 E3 ligase 活性降低；Cys-273 及 -288 位於 IVR domain，是用於維持 ubiquitin E3 ligase 活性以降解 Nrf2 的重要位點。除了這三個位點外，目前發現的 Nrf2 活化誘導物皆有其它進行反應的半胱胺酸位點 (scheme 7)⁴³。另外 sulforaphane、isothiocyanates 及 sulfoxythiucarbamates，這類物質大多存在於 cruciferous 蔬菜類中，屬於此類結構 (-N=C=S)，因具有親電子的特性而容易與 Keap1 的硫醇基反應⁴³。



Scheme 7、Keap1 上已知可被修飾的半胱氨酸位點

本圖列出目前發現可被小分子修飾的位點。Cys-151、-273 及-288 為已知具有活性的重要位點。

本圖擷取自 Taguchi et al., 2011⁴³。

Nrf2 調控的基因

在 Hayes 的研究中歸納出 Nrf2 活化後所調控的基因具有兩大特性，包括 1) 可代謝並清除外來物質及 2) 具有抗氧化活性的功能⁴⁹。Nrf2 所調控的基因上游處都帶有 anti-oxidant response element (ARE)，此序列為 5'-TGACnnnGC-3'。常見 Nrf2 調控的基因包括：heme oxygenase-1 (HO-1)、glutathione S-transferase (GST) 及 glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)⁵⁰。

Heme oxygenase (HO) 為血紅質 (Heme) 的降解酵素，血紅素被代謝後產生 biliverdin、CO 及二價鐵離子 (Fe²⁺)。Biliverdin 會接著被 biliverdin reductase 代謝成為 bilirubin，這些血紅素的代謝物被認為是具抗氧化能力的物質。細胞內有多種蛋白質帶有血紅素，如 cytochromes、catalase peroxidase 及 tryptophan oxygenase，可做為 HO-1 代謝的受質來源。HO 有三種亞型：HO-1、HO-2 及 HO-3，HO-1 為誘導型，被誘導時才表現的蛋白質；HO-2 及 HO-3 為持續表現型。HO-1 的表現是為了負責維持細胞內的恆定，凡舉重金屬、細胞激素、荷爾蒙或是氧化壓力都會誘導 HO-1 的表現，以提升細胞對於氧化性損傷的耐受性⁵¹，不僅是在

細胞實驗中，並且在活體實驗中也有類似的結果⁵²。GCLC 為 GSH 生成的速率決定酵素，GSH 可被 glutathione peroxidase 應用於降解過氧化氫的過程⁴¹。

1.12 研究目的

本論文將探討 HQ17(3)對於 Huh7 肝癌細胞的毒殺機制是否與 Topo II poison 及氧化壓力有關，並深入研究其是否透過修飾 Topo II α 的半胱胺酸並造成細胞內 Topo II poison 毒性，欲探討的層面包括：Topo II α -DNA 複合體的累積、 γ -H2AX 的增加及細胞凋亡的發生。

另一方面，已知 HQ17(3)為具有抗氧化能力的小分子³。本篇論文以正常人類皮膚纖維母細胞 (WS1)作為研究模式，觀察 HQ17(3)是否能夠幫助細胞清除外來的活性氧自由基，並防止受到氧化性傷害及細胞死亡。更進一步探討 HQ17(3)的分子層面作用方式，包括 HQ17(3)是否與細胞中 Keap1 的半胱胺酸反應形成鍵結，進而影響 Nrf2 的活性及 HO-1 的表現量。當以 DNazyme (DZ)的方式降低 Nrf2 的 mRNA 而降低蛋白質表現量時，除了觀察 HO-1 蛋白質含量的改變外，也觀察 HQ17(3)所提供的保護效果是否受影響，以證明 Nrf2 路徑與 HQ17(3)的保護有直接的相關性。

二、實驗方法與材料

2.1 HQ17(3)的純化

取漆樹 (*Rhus succedanea*)的漆液 100 g 溶解於 900 mL 的 95% 乙醇中於 37 °C 低速搖晃 7 天，以 8,000 xg 離心 5 分鐘，取出上清液與 20% 甲醇以等體積混合，以離心方式去除黃油等不溶的部分後，加入 3 倍體積的 ethyl acetate 進行萃取。以 700 xg 離心 20 分鐘，取上層有機液層並抽乾後所得為第一道萃取的粗萃物 (crude)。以酒精回溶後再以 0.45 μ M 過濾膜濾掉不溶的部份。接著以 HPLC 的方式分離樣品，使用 C18 管柱 [discovery bio wide pore C18 (Sulpelco, PA)]，流動相為 100% 甲醇，利用 OD_{280 nm} 觀察並收集最主要的三個波峰。將第一次的回收物抽乾回溶並過濾後，再進行第二道的 HPLC。以同樣型號的 C18 管柱，再以 90% 甲醇分離出 HQ17(3)、HQ17(2)、HQ17(1)。將 3 個化合物分別濃縮後，並回溶於 DMSO，以 JASCO V550 分光光度計 (JASCO International Co, Tokyo, Japan) 測定吸光光譜並定量³。

2.2 細胞培養及藥物處理條件

Huh7 及 WS1 細胞培養於 37 °C 恆溫、含 5% CO₂ 的培養箱中，所使用的培養液為 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)，添加 2 mM L-glutamine、1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids、10% fetal bovine serum、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin 及 250 ng/mL amphotericin。培養於 10 公分培養皿中，待長滿至約八分滿時，便進行繼代培養。吸去培養液，以 PBS 清洗後，加入 1 mL trypsin/EDTA (0.05%/0.025%) 放置 5 分鐘，待細胞飄起後，加入四倍體積的培養液以中和 trypsin 的作用並打散細胞，留下 1 mL 細胞懸浮液於盤中，再補體積至適當量，搖勻細胞使其平均分散於盤中，再放入培養箱培養。於 Huh7 細胞模式中，HQ17(3)的處理條件於不同時間點的濃度為 10 μ M，

時間點則附註於圖說明中；NAC 為 1 mM 處理 3 小時；caspase 抑制劑則是 4 mM 處理 3 小時。

HL-60 及 HL-60/MX2 細胞為懸浮型細胞，使用 RPMI 為培養基，每隔兩天將細胞打散並補充新鮮培養基即可。

2.3 蛋白質萃取及西方墨點法

細胞核蛋白及細胞質蛋白萃取

以 trypsin 處理細胞後，以 PBS 清洗後離心，移除上清液後加入 400 μ L buffer A [10 mM HEPES (pH 7.8)、10 mM KCl、2 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、1 mM NaF、1 μ g/mL leupeptin、20 μ g/mL aprotinin 及 0.1 M PMSF]，置於冰上 10 分鐘，其間搖晃數次，最後加入 25 μ L 10% NP-40 混勻後，以 800 xg 於 4 °C 離心 5 分鐘，上清液為細胞質蛋白的部分，pellet 則為細胞核。以 buffer A 清洗細胞核兩次後，以 buffer B [50 mM HEPES (pH 7.8)、50 mM KCl、300 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、10% glycerol、1 mM NaF、1 μ g/mL leupeptin、20 μ g/mL aprotinin 及 0.1 M PMSF]打散細胞核，並以超音波 (Ultrasonic Device, GmbH, Ringwood, NJ)強烈震盪 (sonication)以打破細胞核，再以 12,000 xg 離心 2 分鐘去除 pellet，上清液為細胞核蛋白質的部分⁵³。

全細胞蛋白質萃取

收集處理過後的細胞，以 PBS 清洗後離心，移除上清液後加入 50 μ L lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EGTA、1 mM NaF、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM PMSF、1 mM Na₃VO₄ 及 1% triton X-100]並以超音波震盪打破細胞，再以 12,000 xg 離心 10 分鐘取上清液全細胞蛋白質的部分⁵。

西方墨點法 (Western blot analysis)

蛋白質以 BCA assay (Thermo Scientific, Rockford, IL)定量，取 60 μ g 蛋白質，加入 4x loading dye，並加熱 95 °C (5 分鐘)以打開蛋白質的結構，利用 10% SDS PAGE 分離不同大小分子量的蛋白質，接著轉印至 nitrocellulose (NC) paper 上，

以 1X TTBS 清洗，以 5% non-fat milk blocking 後，再與 Topo II α 抗體 (1 : 1000，型號 sc-56803，Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、 γ -H2AX 抗體 (1 : 1500，型號 05-636，Millipore, Billerica, CA)、c-PARP 抗體 (1 : 2000，型號 9541P，Cell Signaling, Beverly, MA)、HO-1 抗體 (1 : 2000，型號 OSA-110，Enzo Life sciences, Farmingdale, NY)或是 Nrf2 抗體(1 : 2000，型號 sc-722，Santa Cruz Biotechnology) 於室溫反應 1 小時，以 1X TTBS 清洗，加入二抗 [1 : 5000，horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Zymed, CA)] 於室溫反應 1 小時，以 1X TTBS 清洗，最後以冷光呈色反應 [enhanced chemiluminescence Western blotting detection system 觀察，以 LAS-4000 image analyzer (FUJIFILM Medical Systems U.S.A., Inc., CT, USA)拍照並定量。

2.4 人類 recombinant Keap1 蛋白質的純化

以 pET28c (+)為載體，將 HA2-Keap1 核苷酸序列置於 *SalI* 及 *XhoI*。參照 Egger 等人的實驗方法純化 Keap1 蛋白質⁵⁴。方法如下，將該質體轉形 (transform) 至 Rossetaa/DE pLys 細菌株中培養，待 OD₆₀₀ 達 0.5~0.6 時，再用 0.2 mM IPTG 誘導蛋白質表現，於 15 °C 中培養 24 小時。收集細胞前先加入 1 M Tris 以升高 pH 至 8.0，才將細胞離心並打散懸浮於 lysis buffer [50 mM Tris/pH 8.0、500 mM NaCl、10 mM imidazole、7.5 mM MgSO₄、3 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP)、1 mM PMSF、0.1% triton X-100 及 250 μ g/mL lysozyme]，接著以超音波震盪打破細胞，以 12,000 xg 離心十分鐘收集上清液。加入 Cobalt metal chromatography (Clontech, Mountain View, CA)以純化 Keap1 蛋白質，此純化步驟於 4 °C 中進行並搖晃一小時，之後以 5%~40% buffer B (50 mM Tris/pH 8.0、500 mM NaCl、1 M imidazole、0.1% triton X-100、3 mM TCEP 及 1 mM PMSF) 將蛋白質從 Cobalt resin 上沖提出來並透析 (25 mM Tris-HCl/pH 8.0、2 mM TCEP 及 20% glycerol)，分裝並保存於-80 °C。

2.5 HQ17(3)修飾蛋白質硫醇基的產物分析

HQ17(3)與 Topo II α 的硫醇基反應

接種 Huh7 細胞於 10 公分培養皿 (1×10^6 cells)中，加入 10 μ M HQ17(3)處理五個小時，以上述方法收集細胞核蛋白質。取 60 μ g 核蛋白以 6% SDS-PAGE 分離各個蛋白質，以 Coomassie blue 染色，將 170 kDa 處 (Topo II α 的大小約為 170 kDa)的膠切下並沖提出其中的蛋白質。另一方面，本篇論文所使用的 recombinant Topo II α 為台灣大學詹迺立教授實驗室所提供，以供分析 HQ17(3)與 Topo II α 的試管內反應。將 20 μ M HQ17(3)與 recombinant Topo II α (0.5 μ M)反應 20 分鐘，反應溶液為 Topo II buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、50 mM NaCl、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、15 μ g/mL BSA 及 1 mM ATP]。

接著用 trypsin (2 μ g, Promega, Madison, WI)水解 cellular Topo II 或是 recombinant Topo II α (於 37 °C 下反應 16 個小時)，再以 Finnigan LCQ ion trap 質譜儀 (ThermoElectron, San Jose, CA)分析反應產物。實驗方法參照 Bender et al., 2007²⁸，此套儀器搭配 Micro-Tech Scientific protein-15-C18W-300 reversed phase HPLC 管柱 (5 μ m, 150 mm x 300 μ m, 300Å)，流動相 A 為含有 0.1% formic acid 的水，流動相 B 為含有 0.1% formic acid 的 acetonitrile，沖提的條件為：前 180 分鐘由 5% (流動相 B)增加梯度至 95% (流動相 B)，再以 95%流動相 B 繼續沖提 40 分鐘。於每個 mass spectra 中訊號最高的 peak 會被送入做二次裂解以鑒定胺基酸序列，軟體為 BioWorks 3.1 及 TurboSEQUENT (ThermoElectro)進行蛋白質鑒定⁵⁵，於搜尋條件中指定 Cysteine 的修飾為 340.25 Da 以尋找產物的存在，MS/MS 結果品質的判定根據 Xc > 0.3、Cn > 0.1、Rsp 為 1 或 2 者，並進一步挑選 MS/MS 的裂解片段至少帶有三條片段者。

HQ17(3)與 Keap1 的硫醇基反應

將一段合成的 Keap1 胜肽 [序列為 LNVRC₂₄₁ESEVF, decapeptide (500 μ M)]與 HQ17(3) (200 μ M)置於 37 °C 下反應 24 小時，反應溶液為 1 mL Tris-HCl (25

mM, pH 8.2)⁵⁶, 之後透過 C18 column (Glen Research Inc., Sterling, VA) 去除反應中的鹽類, 以真空抽去液體並回溶於 15% (v/v) acetonitrile 含有 0.1% (v/v) formic acid 的溶液中, 再以 Agilent 6510 四極體質譜儀 (Santa Clara, CA) 分析反應產物。此套儀器搭配 GRACE VYDAC C18 column (150 mm x 2.1 mm) (GRACE, Deerfield, IL)。流動相 A 為 HPLC 等級水, 流動相 B 為 100% acetonitrile, 沖提的條件為: 前 5 分鐘將流動相 B 的比例由 15% 增加梯度至 40%, 之後於 10 分鐘內再增加梯度至 100%。掃描質譜的方式為偵測 m/z 598.29 (2+) (decapeptide) 及 768.41 (2+) [decapeptide-HQ17(3) adduct] 的訊號。

另一方面偵測 HQ17(3) 與細胞內的 Keap1 反應產物。接種 WS1 細胞於 10 公分培養皿 (1×10^6 cells/dish) 中, 加入 $1 \mu\text{M}$ HQ17(3) 處理五個小時, 以 trypsin 作用將細胞打下並以 PBS 清洗後離心, 以上述方法收集細胞質蛋白質。取 $60 \mu\text{g}$ 質蛋白以 10% SDS-PAGE 分離各個蛋白質, 以 Coomassie blue 染色, 將 67 kDa 處 (Keap1 的分子量約為 67 kDa) 的膠體切下並沖提出其中的蛋白質。同樣也以試管反應偵測 HQ17(3) 與人類 recombinant Keap1 反應產物。將 $200 \mu\text{M}$ HQ17(3) 與 recombinant Keap1 ($10 \mu\text{M}$) 反應 20 分鐘, 反應溶液為 Tris buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0)]。將 Keap1 以 trypsin ($2 \mu\text{g}$) 水解後 (於 37°C 下反應 16 個小時), 再以 Finnigan LCQ ion trap 質譜儀分析反應產物, 分析方法如實驗 2.2 部分所述。

2.6 試管實驗分析 Topo II 誘導 DNA 斷裂的形成

根據 Fortune 及 Osheroff 的研究進行 Topo II 誘導 DNA 斷裂的反應⁵⁷。反應包含 340 nM Topo II α 、 10 nM RF-f1p DNA、 $0\sim 100 \mu\text{M}$ HQ17(3) 或是 $200 \mu\text{M}$ VP-16, 反應體積為 $20 \mu\text{L}$, DNA cleavage buffer 為 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、 5 mM MgCl_2 、 100 mM KCl 及 0.1 mM EDTA。此反應於 37°C 中進行 6 分鐘, 爾後加入 $2 \mu\text{L}$ of 5% SDS (final: 0.5%) 及 $1 \mu\text{L}$ 的 250 mM EDTA (pH 8.0) 以終止反應。之後加入 $4 \mu\text{L}$ proteinase K (10 mg/mL) 於 37°C 處理 60 分鐘以水解蛋白質, 將樣品加入 $3 \mu\text{L}$ DNA loading dye 並以電泳 (50V) 於 1% agarose gels (以 1X TAE 配置並含有 0.7

µg/mL ethidium bromide)分開各種不同的 DNA，包括 linear、nicked DNA 及 supercoiled DNA，再以 UV 觀察並以 ImageJ (ver 1.42)分析觀察 supercoiled DNA 被切斷成 linear DNA 的比例。

2.7 試管實驗分析 Topo II 活性

參考 Lindsey et al., 2005 的方法²⁶，利用偵測 supercoiled form plasmid DNA 被 Topo II 解開螺旋成 relaxed form DNA 的程度做為決定 Topo II 酵素活性的方法。反應包含 10 nM Topo II α 、400 nM negatively supercoiled RF-f1p DNA、0~40 µM HQ17(3)或是 20 µM VP-16，反應體積為 20 µL。Topo II buffer 為 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、50 mM NaCl、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、15 µg/mL BSA、1 mM ATP 及 0.1 mM EDTA。為觀察 dithiothreitol (DTT)還原劑對於 HQ17(3)抑制 Topo II 活性的影響，於加入 DTT 後才起始反應。反應條件為於 37 °C 下反應 20 分鐘後，以 95 °C 處理 5 分鐘以終止酵素活性並加入 DNA loading dye，利用 1% agarose gel (以 0.5X TPE 配置)以 50V 電壓分離 relaxed、supercoiled 及 nicked form DNA，將膠體以 EtBr 外染的染色方式並利用 UV 觀察結果。

2.8 Immunodetection of *in vivo* complexes of enzyme to DNA (ICE bioassay)

此方法利用氯化銫 (CsCl)梯度溶液以超高速離心將 DNA 與蛋白質層分離，並搭配 dot-blot 方法分析³⁰。CsCl 梯度溶液 (1.6-1.8 mg/mL)配置於 polyallomer tube 管中 (14 mm x 89 mm，適用於 SW41 bucket，Beckman Coulter)。Huh7 細胞 (10⁷ cells /10-cm dish)經 HQ17(3)或是 VP-16 處理 90 分鐘，去除上清液，於盤中加入 2 mL sarkosyl lysis buffer (1% sarkosyl/TE buffer)，以 27 1/2G 號針頭抽吸十二次以打斷染色體，此 lysate 隨即加於 CsCl 梯度溶液之上，於室溫 (20 °C)進行超高速離心 125000 xg 20 小時 (低溫會使 CsCl 沉澱而破壞梯度)。待離心結

束後，將每管樣品分成 10 個 fractions (從上至下：1 mL/fraction)，取等體積與 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 混合後，取 50 μ L 的混合液以 dot-blot 方式將樣品利用真空抽取方式轉至 NC paper 上 (NC paper 須先以 sodium phosphate buffer 浸濕 15 分鐘)，之後以西方墨點法偵測 Topo II α 。Fraction 1~4 為蛋白質層，可偵測到 free Topo II α 蛋白質，而 fraction 5~8 為 DNA 層，與染色體形成共價鍵結的 Topo II α 會出現於此處，Fractions 9~10 為 RNA 層。以 LAS-4000 image analyzer 拍照並定量，計算 fraction 5~8 所佔的百分比。

2.9 免疫螢光組織染色

將細胞培養於蓋玻片上 (3×10^5 cells)，並加入藥物處理 90 分鐘後進行染色。將細胞以 PBS 清洗一次後，加入 MeOH : EtOH = 1 : 1 (v/v) 溶液並置於 -20 $^{\circ}$ C 中等待 20 分鐘以固定細胞並增加細胞通透性。移除液體並加入 blocking buffer [包含 2% BSA, 10% (v/v) FBS 及 1% (w/v) NaN₃ 並配置於 PBS 中]，於 37 $^{\circ}$ C 處理細胞 30 分鐘，再置換成含有 γ -H2AX 抗體 (1:500) 培養於 4 $^{\circ}$ C 待隔夜，抗體配置於 blocking buffer。以 PBS 清洗三次後，再置換成含有 FITC-conjugated 的二級抗體 (1:1000, Zymed, CA) 的溶液並培養於室溫 1 小時，再以 PBS 清洗三次後，加入 DAPI (1 μ g/mL) 染色五分鐘，將玻片置於載玻片上並以封片膠封片，接著以螢光顯微鏡觀察 (Nikon Eclipse E800 microscope 搭配 Nikon Plan Fluor 40x 物鏡)，影像擷取操作利用 Cybernetics Image-Pro Plus 5.0 軟體。 γ -H2AX foci 會聚集在細胞核內，細胞中帶有五個以上明顯的 foci 為陽性細胞，以此為依據計算五個視野下帶有 γ -H2AX foci 的細胞比例⁵⁸。

於測試 Nrf2 活化進入細胞核的實驗中，同樣以上述固定步驟進行染色及觀察。Anti-Nrf2 (1 : 200) 為針對 Nrf2 做觀察，細胞核則是以 PI 染色。Anti-FLAG (1:500, 型號 sc-807, Santa Cruz) 的組別是當做染色的陰性對照組，由於細胞內並無表現 FLAG 胜肽，因此該抗體並不會辨認細胞內的任何物質。

2.10 細胞存活率測定 (ACP assay)

細胞存活率測定的原理利用偵測細胞內酸性磷酸酶 [acid phosphatase (ACP)] 活性，以代表細胞的存活率。細胞中含有大量的酸性磷酸酶，藉由給予其受質 *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)，酸性磷酸酶便將之轉變成 *p*-nitrophenol (*p*-NP)，而於 OD_{405 nm} 有最大吸光。將細胞接種於 96 孔盤中 (3000 cells/well)，待貼附後加入不同濃度的 HQ17(3) 並處理不同時間後，移除上清液以含鈣、鎂之 PBS 清洗後，加入 100 μL 反應溶液 [0.1 M sodium acetate (pH 5.5)、0.1% triton X-100 及 10 mM *p*-NPP] 於 37 °C 反應 30 分鐘後，加入 10 μL 1 N NaOH 以終止反應，並以 ELISA reader 測定 OD_{405 nm} 的吸光值¹。以未加藥組別的讀值當作 100%，換算出其餘各組加藥後所得的相對細胞存活率百分比，所有測定組別皆為三重複，並取平均且將標準差的數值標示於圖上。

2.11 流式細胞儀測定

於 6 孔細胞培養盤中接種 2×10^5 顆細胞，並依照各實驗加入不同濃度的藥物處理不同時間，參照各個實驗處理方式，以流式細胞儀 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 分析各組別之間螢光強度的變化，實驗重複三次並計算 SD 值標示於圖上。此種機型搭配 488 nm 螢光激發，所使用的濾光片如下：FL1 (530 nm)、FL2 (575 nm)、FL3 (615 nm)、FL4 (675 nm)。

Annexin V 染色

以 ApoScreen Annexin V-FITC kit (Beckman Coulter) 分析細胞內膜外翻的情形，參照使用手冊，將細胞懸浮於染色用的含鈣 binding buffer 中 (100 μL)，加入染劑 5 μL，於冰上染色 10 分鐘，再加入 Propidium Iodide (PI, Sigma-Aldrich) 染色 (final: 0.5 μg/mL) 5 分鐘，並加入 400 μL 含鈣 binding buffer 以增加體積，即可以流式細胞儀偵測。FL1 偵測 Annexin V-FITC 而 FL4 偵測 PI (可染上核酸物質) 螢光強度。當細胞為正常時，細胞群為 double negative；早期凋亡的細胞僅

有內膜外翻的現象為 Annexin V single positive；後期凋亡細胞為 Annexin V 及 PI double positive；若為壞死的細胞則為 PI single positive。

粒線體膜電位的測定

將細胞處理 DiOC6(3) (Eugene, OR) 以 100 nM 於 37 °C 反應 30 分鐘後，將細胞以 trypsin 處理後，再以流式細胞儀分析細胞內的螢光強度變化。藉由 DiOC6(3) 親脂性陽離子與粒線體結合的特性以測定粒線體膜電位是否正常。當粒線體膜電位喪失時，染劑便失去與粒線體結合的特性，利用流式細胞儀偵測 FL1 螢光強度變弱的細胞群的比例變化¹。

細胞內 Caspases 活性的測定

以 caspase 3 或 caspase 9 螢光受質檢測套組 (OncoImmunit Inc, Gaithersburg, MD) 分析 caspase 活化情形。將細胞處理 10 μM 的 caspase 3 螢光受質 (DEVDGI, 偵測 FL1 的變化) 或 caspase 9 螢光受質 (LEHDGI 偵測 FL3 的變化)，於 37 °C 反應 1 小時，將細胞以 trypsin 處理後再以流式細胞儀分析細胞內的螢光強度。當 caspase 活化時，可切斷其受質而使之發出螢光，因此在分析中可發現一群細胞的螢光增強¹。

細胞內 DNA 含量分析

本實驗方式藉由 PI 的染色觀察細胞內 DNA 含量變化。方式為將細胞以 trypsin 打下後，離心 (800 xg, 5 分鐘) 以去除上清液，再將細胞懸浮於 70% 乙醇中，放置於 -20 °C 中過夜，此為固定的步驟。待隔天，以離心的方式 (800 xg, 5 分鐘) 去除酒精後，以 1 mL PBS 清洗，以 495 μL PBS 打散並加入 5 μL RNase A (1 mg/mL)，於 37 °C 反應 30 分鐘以除去 RNA 的干擾，再加入最終濃度為 5 μg/mL 的 PI 染色 15 分鐘，利用流式細胞儀偵測 FL3 螢光強度，以觀察細胞內 DNA 含量及 subG1 population 的改變¹。

細胞內 ROS 含量測定

細胞內 ROS 的含量，藉由 mitoSOX (Invitrogen, Camarillo, CA) 的染劑針對 mitochondrial superoxide 染色，將細胞懸浮液準備於 500 μL PBS 中並以 2.5 μM

染劑處理，於 37 °C 反應 15 分鐘。當 FL2 的螢光強度增強時，代表細胞內氧化物增高⁵⁹。另外也利用 DCFDA (20 μM, Invitrogen) 的染劑偵測針對細胞中的自由基含量，將細胞懸浮液準備於 500 μL PBS 中並加入染劑處理，於 37 °C 反應 30 分鐘。當 FL1 的螢光強度增強時，代表細胞內氧化物增高¹。

測定脂質過氧化

藉由 BODIPY® 581/591 C11 (5 μM, Invitrogen) 的染劑的特性所測定。利用流式細胞儀偵測 FL1 的螢光強度變化，螢光增強代表細胞內脂質過氧化的程度上升。加入螢光染劑於 37 °C 培養 30 分鐘後，將細胞以 trypsin 打下後懸浮於 1 mL PBS 中，以流式細胞儀分析各組別之間螢光強度的變化⁶⁰，實驗重複三次並計算 SD 值標示於圖上。

2.12 基因表現之分析

RNA 萃取以及基因微陣列分析

將細胞接種於 6 公分培養皿 (1 x 10⁶ cells/dish) 中，加入 HQ17(3) 處理細胞，經不同時間後加入 Trizol (Invitrogen)，內含 guanidium thiocyanate 及 phenol 使細胞溶解，並利用三氯甲烷將蛋白質、DNA 與 RNA 分層，經離心後 RNA 留於上層的水層中，蛋白質、DNA 在有機層及水層的界面，小心取出水層並與異丙醇以等體積混合以沉澱 RNA，去除上清液後加入 70% 乙醇清洗並抽乾，以適當體積的 DEPC 水回溶，再以 65 °C 水浴 10 分鐘。取適量 RNA 以 OD₂₆₀ 定量，並保存於 -80 °C。

分析 WS1 細胞中的基因變化，本實驗所使用的基因表現微陣列是 Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)，實驗進行根據台大基因體中心核心實驗室的方法，取 20 μg RNA 進行反轉錄並加上 biotin labeled dUTP 以與晶片上的 probe 進行雜交反應 (hybridization)，16 小時後洗淨晶片並掃描晶片。將所得結果變化 1.5 倍以上的基因挑出作為 HQ17(3) 可能影響的抗氧化基因群。

反轉錄酵素反應及聚合酶連鎖反應 (PCR)

取適當量 mRNA 至 RNase free 的 PCR 專用管中，並以水補足體積至 6 μ L，加入 2 μ L oligo dT 引子 (0.5 μ g/ μ L)，於 70 $^{\circ}$ C 預反應 5 分鐘，使 RNA 打開二級結構。反應後立刻置於冰上，並加入 12 μ L 的反應溶液，溶液中含有最終濃度為 0.5 mM dNTPs、10 mM DTT、50 mM Tris-HCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂ 以及 200 unit SuperScript™ III RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen)，混合均勻後於 50 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，使 mRNA 可以完全反轉錄成 cDNA。反應結束後，將 cDNA 置於冰上備用或儲存於 -20 $^{\circ}$ C。利用 real-time PCR 放大基因產物，以觀察不同的基因表現 [引子 (primer) 序列如附表一]。取 200 ng cDNA 與最終濃度為 400 nM 的一對引子混合均勻後，加入 10 μ L 2X SYBR green master (Roche, Indianapolis, IN)，以水將體積補至 20 μ L，以 ABI 7500 real-time PCR machine (Foster City, CA) 分析，所有樣品於同次分析中皆為二重複試驗，以 GAPDH 做為內部對照組 (internal control)。

另一方面 WS1 細胞的 Nrf2 相關基因則是以 PCR 方式進行分析，PCR 的引子序列如附表一。

2.13 ARE 活性測定

本實驗製作帶有冷光報導基因的質體，以 pGL3-Luc vector (Promega) 為載體，將合成的 ARE sequence 接入 *NheI* / *XhoI* 切位中，此合成的核苷酸序列為 5'-CTAGCAGTCACAGTGACTCAGCAGAAATCT-3' (ARE 序列以底線表示)⁶¹。以電穿孔法 (electroporation) 將質體 DNA (60 μ g) 送入 WS1 細胞 (8×10^6 cells)，將細胞及 DNA 混合後置入 0.4 cm pulser cuvette (Bio-Rad, Hercules, CA) 中，以電穿孔儀 (Bio-Rad) 使用 260 V 及 950 μ F (選用 exponential procedure) 的條件進行電穿孔。放置 10 分鐘後，再將細胞懸浮液分至 24 well (3×10^5 cells/well) 中，補滿體積至 0.5 mL。加入 HQ17(3) 處理細胞不同時間，將細胞以 Glo Lysis Buffer (Promega) 打破，取 5 mL 細胞液於 96 孔白盤中並以 Glo Lysis Buffer 補滿體積為 40 μ L，再加入 5 μ L luciferin (Bright-Glo luciferase assay, Promega)，馬上以 SpectraMax M5

ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)測定 5 分鐘連續冷光變化量，並將其以積分面積表示。以未加藥組別當做基準，其餘各組同樣計算積分面積與之相比而得到改變倍數，實驗重複三次並計算SD值標示於圖上。

2.14 Knockdown of Nrf2

將 WS1 細胞 (4×10^5 /well) 分在 6 孔盤中以 T-Pro non-liposome (JF Biotechnology, Taipei, Taiwan) 進行轉染。DZ-N 序列：5'-TTGCATAGAAGGCTAGCTACAACGATACTTATAAAG-3'，並於 3'端的最後三個 phosphodiester bond 換成 phosphothioate 的修飾以防止被內切酶水解，因此可增加穩定性⁶²。實驗方法參照使用手冊，將 3 μ L T-Pro 與 1 μ g DNAzyme 混合於不含血清的培養液中並靜置十五分鐘 (體積 100 μ L)，爾後加到細胞中，於六小時後更換新鮮培養液。二十四小時後，再將細胞分至 96 孔盤 (5000 cell/well) 或是 6 孔盤中。待細胞貼附後，將 96 孔盤的實驗細胞加入 HQ17(3) (1 μ M)處理 16 小時後，加入不同濃度的 H₂O₂ 處理 24 小時而後測定 ACP。另外 6 孔盤的實驗細胞組則是加入 HQ17(3)處理 6 小時並收集全細胞蛋白質以西方墨點法觀察 Nrf2 蛋白質含量變化。

三、實驗結果

3.1 HQ17(3)抗癌活性之分子機制探討

3.1.1 HQ17(3)修飾 Topo II α 的半胱胺酸

首先以一段合成的 decapeptide 與 HQ17(3) 進行試管反應，利用質譜鑒定方法證明 decapeptide-HQ17(3) 產物的存在。圖一 A 為 HQ17(3) 的質譜分析，顯示其 m/z 為 341.25 (-1)，經軟體根據分子量及 peaks 分布圖計算得到，此最強訊號小分子的組成分為 $C_{23}H_{31}O_2$ ，為 HQ17(3) 帶負電之狀態。進一步以 HPLC-MS/MS 分析 decapeptide-HQ17(3) 產物 (圖一 B)。Decapeptide [retention time : 4.5 分鐘， m/z 598.2960 (2+)] 極性較高，而 decapeptide-HQ17(3) [retention time : 9.8 分鐘， m/z 768.4204 (2+)] 極性較低。圖一 C 為根據胜肽母分子 (◆) 做二次裂解的圖譜。圖中所標示出來的訊號為各種裂解片段產物，各片段的 m/z 列於該圖旁。灰色底標為被偵測到的片段，包括七個 b ions (b2~b4 及 b6~b9) 和兩個 y ions (y1 及 y2)。圖一 D 為 decapeptide-HQ17(3) 的二次裂解圖譜，*顯示為具有 m/z 增加 340.25 Da 的片段。灰色底標的片段包括五個 b ions (b5*~b9*) 和一個 y ion (y9*)；此結果顯示 HQ17(3) 具有與硫醇基反應的性質。

以 LCQ 質譜儀分析證明 HQ17(3) 與細胞內 Topo II α 的半胱胺酸反應，由圖二 A 顯示偵測到的所有 Topo II α 胜肽 (涵蓋 14% 的序列，以灰底色標示)，其中有三條胜肽帶有半胱胺酸，分別為 Cys-427、-733 及 -1145 (如表一)。Cys-427 位於 ATPase domain，而 Cys-733 及 -1145 則位在 DNA breakage/reunion domain。帶有 Cys-427 的胜肽 (序列：CSAVK) 的質量增加了 340.25 Da，顯示該胜肽被 HQ17(3) 所修飾，MS/MS 圖譜如圖二 B，母分子以 ◆ 表示，偵測到 b1~b4 及 y1~y4，b1~b4 皆帶有 HQ17(3) 的修飾。Cys-733 及 -1145 胜肽並未帶有修飾 (附圖一 A~B)，其餘偵測到未帶有半胱胺酸的胜肽則列於附圖二 A~T。此結果顯示 HQ17(3) 能夠與細胞 Topo II α 的半胱胺酸反應。

另一方面將 recombinant Topo II α 與 HQ17(3)處理後，以 LCQ 質譜儀分析，鑑定出的胜肽約涵蓋 40%的 Topo II α 序列，標示於表一的 *in vitro* 實驗組中，偵測到十個帶有半胱氨酸的胜肽，包括 Cys-104、-216、-300、-392、-405、-427、-733、-997、-1008 及-1145，其中 Cys-427、-733 及-997 為被 HQ17(3)修飾的位置，MS/MS 圖譜如圖三 A~C；其餘未被修飾的含半胱氨酸胜肽則列於附圖三 A~F。如圖三 D 所標示，此試管實驗及細胞內實驗結果顯示 HQ17(3)的確能夠與 Topo II α 的數個半胱氨酸反應。

3.1.2 HQ17(3)抑制 Topo II α 酵素的解螺旋活性

為證實 HQ17(3)是否可藉由與酵素反應而抑制酵素活性，實驗設計利用將酵素與 HQ17(3)先進行反應後才加入超螺旋 DNA，以觀察酵素解開超螺旋 DNA 的活性是否降低。從試管 DNA relaxation 實驗中 (圖四 A)，觀察第 5 分鐘及第 20 分鐘所剩餘的 supercoiled DNA 的比例變化，可發現比例從 35%減少至 11%，然而即使延長反應時間至 60 分鐘或是 360 分鐘，所剩餘比例僅降低至 9%及 8%。當以酵素比上藥物的莫耳比為 1:200 的前處理反應實驗條件下，剩餘的超螺旋 DNA 的比例則是從 57%減少至 29%，即使延長反應時間至 60 分鐘或是 360 分鐘，所剩餘比例僅降低至 24%及 22%，此結果顯示 HQ17(3)與酵素反應後，酵素解螺旋的活性被 HQ17(3)抑制。當酵素比上藥物的莫耳比為 1:800 的前處理反應實驗條件下，所剩餘的超螺旋 DNA 的比例為 100%，顯示以更高比例的 HQ17(3)的前處理完全抑制 Topo II α 活性 (圖四 B)。

更進一步藉由加入還原劑以觀察 HQ17(3)是否因 DTT 還原劑的存在而失去與 Topo II α 反應的作用。從試管 DNA relaxation 實驗觀察得到 (圖五)，40 μ M HQ17(3)的處理下造成剩餘的超螺旋 DNA 的比例從 1%增加為 50% (比較 lane 2 及 lane 4)，加入 DTT 及 HQ17(3)的處理組別則是仍有 58%的剩餘超螺旋 DNA (lane 5)，顯示 HQ17(3)抑制 Topo II α 活性的活性並不因 DTT 的存在而受影響。另一方面，此反應條件下，DTT 並不影響酵素活性 (lane 3)。

3.1.3 HQ17(3)造成 Topo II α 導致的 DNA 斷裂

由試管實驗方法觀察得到 HQ17(3)造成 Topo II α 導致的 DNA 斷裂情形增加 (linear form DNA)。從圖六 A 結果中發現，Topo II α 的處理並不會造成 linear form DNA 的產生 (Lane 2)，30 μ M HQ17(3)的處理並未造成顯著地 Topo II α 導致的 DNA 斷裂 (Lane 5)。當增加 HQ17(3)的濃度於 100 μ M 時，發現 linear form DNA 明顯增加，與 Topo II α 的處理組別相比，約有 4 倍的上升 (Lane 6)。VP-16 的處理為陽性對照組，明顯增加 Topo II α 導致的 DNA 斷裂 (Lane 3)。Proteinase K 的處理則是用於證明出現的 linear form DNA 為蛋白質-DNA 複合體所造成的產物，此實驗的平均結果及分析如圖六 B 所示。

另一方面觀察 Huh7 細胞中也有 HQ17(3)造成 Topo II α -DNA 複合體的累積的現象發生。利用 ICE bioassay 方法，觀察 Topo II α -DNA 複合體的比例變化。如圖七 A 所示，於未經藥物處理的組別中可見 free Topo II α 出現在 fraction 1~4 (佔 93%)，而僅 7% 的 Topo II α 出現於 fraction 5~8；於 HQ17(3)處理的組別 (30 μ M) 中，約有 30% 的 Topo II α 出現於 fraction 5~8，實驗的平均結果及分析如圖七 B 所示。進一步發現細胞內因 HQ17(3)的處理而造成 γ -H2AX 增加的情形。如圖八 A 及圖八 C 所示，10 μ M HQ17(3)的處理造成帶有 γ -H2AX 的細胞比例從 9% 上升至 35%。另一方面，比較 HL-60 及 HL-60/MX2 細胞中的 γ -H2AX 增加程度，可見 HQ17(3)造成發生 γ -H2AX 的 HL-60 細胞比例從 20% 上升到 70%，然而 HL-60/MX2 細胞中則並未發現此現象 (圖八 B)。將兩株細胞的結果整合於圖八 C，由此結果可歸納出 HQ17(3)於 Huh7 細胞及 HL-60 細胞中造成 DNA 斷裂。另一方面，利用西方墨點法再次確認 Huh7 細胞中 γ -H2AX 的增加情形，HQ17(3)處理細胞 45-及 90 分鐘後，明顯造成 γ -H2AX 的增加 (圖八 D)。

3.1.4 HQ17(3)促進 DNA 受損相關基因的表現

HQ17(3)的處理導致 DNA 受損相關基因表現量上升。所觀察的基因包括

DDIT3、*GADD45A*、*GADD45G*、Mouse double minute 2 homolog (*MDM2*)、three prime repair exonuclease 1 (*TREX3*)及 ataxia telangiectasia and Rad3 related (*ATR*)；這些基因是將 HQ17(3)處理 Huh7 細胞四小時後，收集 RNA 以 microarray 分析所得到上升 2 倍以上的基因 (黃政博, 博士論文, 2008)。本篇研究中以 real-time PCR 的方式確認這些基因的變化，於 Huh7 細胞中處理 HQ17(3)不同時間之後，發現若干基因表現量於 4 小時處理後明顯上升，變化量持續上升至 12 小時，包括 *DDIT3*、*GADD45A* 及 *GADD45G*，然而 *ATR*、*TREX1* 及 *MDM2* 則無明顯變化 (圖九 A)。

同樣在 HL-60 細胞中，發現以 HQ17(3)處理細胞四小時後，*DDIT3*、*GADD45A* 及 *GADD45G* 基因表現量明顯上升，分別為 7-、3-及 8 倍的增加，而在 HL-60/MX2 細胞中的上升倍數僅分別為 3-、1.5-及 4 倍的增加，結果顯示這些基因於 HL-60 細胞中的變化較 HL-60/MX2 更為明顯 (圖九 B)。由以上結果歸納出 DNA 受損相關基因的表現與 HQ17(3)造成的 Topo II poison 有關。

3.1.5 HQ17(3)促進 Huh7 細胞進行細胞凋亡

利用 ACP assay 發現 HQ17(3)造成細胞生長率下降。未經藥物處理的 Huh7 細胞數目於 72 小時後有 10 倍的細胞生長率增加，而經 HQ17(3)以 2-、5-及 10 μM 的處理之後，則僅有 8-、6-及 4 倍的生長倍率 (72 小時)，顯示為細胞生長受抑制 (圖十 A)，而 HQ17(3)對細胞的毒性 [median effective concentration (EC_{50})] 為 $7.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 。

進一步研究顯示 HQ17(3)引發細胞凋亡。如圖十 B 所示，於 16 小時 HQ17(3)處理後，有 23% 的細胞顯示出其粒線體膜電位降低。於 24 小時 HQ17(3)處理後，發現 21% 的細胞發生 annexin V+/PI- 的情形，無後期凋亡的細胞群 (annexin V+/PI+) 或是細胞壞死 (annexin V-/PI+) 的情況 (圖十 C)。於 48 小時的處理後，60% 及 44% 的細胞中分別有 caspase 9 及 caspase 3 活化的現象 (圖十 D)。Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 是活化後的 caspase 3 的受質，並且被活化態的

caspase 3 切成較小的蛋白質 (c-PARP)，利用西方墨點法分析發現細胞內 c-PARP 在 24 小時的 HQ17(3)處理後有上升的現象，說明了 caspase 3 活化的現象 (圖十 E)。

當 DNA 受損時，細胞週期可能因此而停滯，故以 DNA 套數的分析觀察細胞週期的改變，對照組的細胞週期分別如下：G0/G1 期為 52%、S 期為 40% 而 G2/M 期為 8%。當細胞接受 HQ17(3) 24 小時的處理後，G2/M 期無明顯變化 (圖十一 A)。而且在此條件處理下，其他與細胞週期相關的 cyclin B1 及 cyclin D1 則沒有顯著的變化 (圖十 E)。本實驗以 VP-16 (10 μ M) 為 Topo II inhibitor 造成細胞週期停滯於 G2/M 期的陽性對照組。然而在 HQ17(3)的處理中 (24 小時)，發現具 subG1 的細胞比例增加的情況，代表發生 DNA 雙股斷裂，而且發現長時間 48 小時的處理後，具 subG1 的細胞比例上升至 29% (圖十一 B)。

另一方面以 caspase 3 抑制劑或是 pan-caspase 抑制劑 (抑制 caspase 1、-3、-6、-8 及-9)前處理 Huh7 細胞後，HQ17(3)處理所造成的具 subG1 的細胞比例明顯下降。於 10 μ M HQ17(3)處理的組別中發現，比例從 25%降低至 15%及 8%；20 μ M HQ17(3)處理的組別則是從 27%降低至 20%及 10% (圖十一 C)；因此可說明部分 DNA 斷裂是來自於細胞凋亡。

3.1.6 氧化壓力為 HQ17(3)促進 Huh7 細胞的凋亡原因之一

HQ17(3)除了透過抑制 Topo II α 的活性而造成細胞毒性外，也引發細胞內氧化壓力。如圖十二 A 所示，在 HQ17(3)處理 8 小時後，細胞內的 mitochondrial ROS 含量隨著濃度上升而增加。

接著將細胞預先處理 NAC 以預防氧化性損傷，再加入 HQ17(3)處理以觀察各種現象的改變。首先觀察細胞內抗氧化相關基因的表現量改變，於 HQ17(3)處理 12 小時後，*HO-1* 及 *GCLC* 分別有 17 及 6 倍的上升 (圖十二 B)，而 NAC 的前處理則有效減緩 *HO-1* 及 *GCLC* 的上升的倍數。*DDIT3* 及 *GADD45A* 的表現量則因 NAC 的處理而分別從 11 倍降至 7 倍或 6 倍降至 3 倍，但 *GADD45G* 則不

受 NAC 的影響。另外，各類細胞凋亡的現象，包括 MMP 的喪失、subG1 比例、caspase 9 及 caspase 3 的活化程度，皆因 NAC 的前處理而有不等程度的減輕，約降低 50~65% 的細胞比例 (如圖十二 C)，以上這些結果顯示氧化壓力是 HQ17(3) 造成細胞凋亡的原因之一。而 annexin V+/PI- 的比例僅些微下降。

另一方面，HQ17(3) 所造成的 Topo II α -DNA 複合體的累積及增加的 γ -H2AX 量並未因 NAC 的前處理而降低 (圖十三 A 與 C)。由統計圖中顯示，不管在有無 NAC 前處理的條件下，HQ17(3) 誘導的 Topo II poison 現象並不因此而具有顯著差異 (圖十三 B 與 D)。已知 VP-16 所造成的 Topo II poison 已知與氧化壓力無關，因此 Topo II poison 的現象比例並未因 NAC 的處理而改變 (圖十三 B 與 D)。由本結果中可得知，氧化壓力並非 HQ17(3) 導致 Topo II poison 的機制。

進一步觀察細胞存活率的改變 (72 小時)，發現 NAC 的預先處理並未能拯救 HQ17(3) 造成的 Huh7 細胞死亡。以 5 及 10 μ M HQ17(3) 的處理分別造成 30% 與 50% 的細胞死亡。加入 NAC 預先處理的細胞，其存活率並沒有因此改變 (圖十三 E)。已知 HQ 可透過氧化壓力造成細胞死亡，於 NAC 的前處理下，HQ (60 μ M) 造成降低的細胞存活率從 20% 上升至 70%，因而當做 NAC 拯救細胞的陽性對照組。以上結果顯示氧化壓力為 HQ17(3) 造成的 Huh7 細胞凋亡的部分原因，而並非主要細胞死亡的原因。

3.2 HQ17(3) 之抗氧化性損傷機制探討

3.2.1 HQ17(3) 對於 WS1 細胞株活性的影響

首先針對 HQ17(3) 對 WS1 細胞存活率影響的測試，經 72 小時的不同濃度藥物處理，發現細胞存活率隨濃度的增加而下降，計算此 EC₅₀ 為 $2.6 \pm 0.2 \mu$ M (圖十四 A)。為觀察 HQ17(3) 幫助細胞抵抗氧化性損傷的效果，因此接下來的研究實驗設計選用的作用濃度皆低於 1 μ M (low micromolar 的範圍)，以避免細胞毒性的影響。另一方面，0.5~1 μ M 濃度範圍的 HQ17(3) 並未引起細胞內 ROS 含量的

變化，且未改變細胞的正常大小 (圖十四 B~C)。

3.2.2 HQ17(3)降低 H₂O₂ 造成的脂質過氧化

以 DCFDA 染劑檢測發現 H₂O₂ 增加了細胞中的 ROS 含量。ROS 含量以 mean of fluorescence intensity (MFI) 表示，MFI 值從 17 上升至 40，HQ17(3) 的前處理組別的 MFI 值明顯降低至 25 (圖十五 A 及 B)。另一方面，選用 mitoSOX 染劑可測定粒線體內的超氧自由基含量。HQ17(3) 的前處理也能將因 H₂O₂ 處理而帶具有高含量粒線體超氧自由基的細胞比例從 50% 降低至 19% (圖十五 C 及 D)。

脂質過氧化為 H₂O₂ 所造成的一種氧化性傷害。實驗結果顯示，H₂O₂ 的處理造成 21% 的細胞發生脂質過氧化 (8 小時，圖十六 A)；圖十六 B 為統計圖，顯示 HQ17(3) 具有降低脂質過氧化的活性，脂質過氧化的細胞比例由 21% 降低至 9%。單獨 HQ17(3) 處理的組別與未經處理的細胞組別之間並未具有顯著差異，代表 HQ17(3) 本身未造成影響。

3.2.3 HQ17(3)減少 H₂O₂ 造成的細胞死亡

HQ17(3) 除能減少 H₂O₂ 引起的物理性傷害外，例如脂質過氧化，最終能降低 H₂O₂ 造成的細胞凋亡。如圖十七 A 所示，100 μM H₂O₂ (8 小時) 的處理增加了 13% 的細胞群發生 MMP 下降的情形、23% 及 20% 的細胞群發生 caspase 9 及 caspase 3 的活化，HQ17(3) 的前處理皆能夠有效降低這些細胞凋亡發生的比例。

進一步以 H₂O₂ 處理 8 及 24 小時後觀察 DNA 斷裂 (subG1 population) 的情形，其細胞比例分別增加了 11% 及 27% (圖十七 B 及 C)。在 HQ17(3) 預先處理的組別裡，細胞內 DNA 斷裂情形則分別降低至僅剩 7% 及 15%。

更進一步藉由分析細胞存活率以確認 HQ17(3) 能有效抵抗 H₂O₂ 引起的細胞死亡，由圖十八 A 的細胞存活率變化中，可看出不同濃度 H₂O₂ 的處理引發細胞不同程度的死亡 (H₂O₂ 處理，黑色柱狀圖)。HQ17(3) 的前處理則能夠提升細胞存

活率，隨 HQ17(3)的處理濃度增加 (0.5-、0.75-及 1 μ M)，細胞存活率提升的比例越高。另外使用 buthionine sulfoximine (BSO)抑制細胞內的 GSH 生成以造成內生性的氧化壓力，發現 HQ17(3)也能有效提升此種氧化壓力所降低的細胞存活率 (圖十八 B)。HQ17(3)不只是在 WS1 細胞中有保護的效果，於另一株人類肺臟纖維母細胞 (MRC5)中也有同樣的趨勢 (圖十八 C)。

3.2.4 HQ17(3)修飾 Keap1 的半胱氨酸

進一步利用質譜鑒定方法分析發現 HQ17(3)具有與 Keap1 蛋白質的半胱氨酸反應的活性。將 WS1 細胞處理 HQ17(3)五小時後，萃取細胞質內 Keap1，以質譜儀分析其肽圖譜。此結果顯示於圖十九 A，灰色底色為被偵測到的部分，偵測到約 10%的 Keap1 胺基酸片段，其中包含五個半胱氨酸位點。Cys-77、-249、-288 及-297 四個位點具有 HQ17(3)的修飾 (圖十九 B~E)；然而 Cys-241 這個位點則沒有被 HQ17(3)所修飾。另一方面，利用 recombinant Keap1 與 HQ17(3)進行試管中的反應，發現其它的半胱氨酸位點也能被 HQ17(3)修飾，包括 Cys-13、-14、-288、-319、-368、-489、-613、-622 及-624，而 Cys-226、-273 及-297 則沒有被修飾。HQ17(3)與 Keap1 的半胱氨酸反應位點結果整理列於表二，於這兩個實驗結果中發現 Cys-288 是共同被修飾的位點。

3.2.5 HQ17(3)活化 Nrf2

以免疫組織化學染色方式觀察 HQ17(3)誘導 Nrf2 進入細胞核的變化 (如圖二十 A)。綠色螢光為 Nrf2，紅色為 PI 染色 (代表細胞核)。於未處理組別中觀察到綠色螢光分佈於細胞質中，當細胞經 6 小時的 HQ17(3)或是 tBHQ 處理後，發現細胞核內綠色螢光訊號增加。從 merge 的圖中顯示細胞核的顏色為黃色，表示綠色螢光與紅色螢光重疊代表 Nrf2 進到細胞核內。tBHQ 做為誘導 Nrf2 活化的陽性對照組，其為食品中所添加的一類抗氧化劑，結構以 HQ 為主體，並帶有一個 *tert*-butyl 基團。Anti-FLAG 的組別為染色的陰性對照組。接著利用西方墨點

法確認細胞核中的 Nrf2 的含量變化，隨著處理藥物濃度 (0.25-、0.5-及 0.75 μM) 的增加，細胞核內的 Nrf2 的含量有 1.6-、2.8-及 2.5 倍的上升 (圖二十 B)；當處理時間 3-及 6-小時後，也觀察到細胞核內的 Nrf2 含量上升 3.2-及 4.0 倍 (圖二十 C~D)。

進一步利用電穿孔法讓 WS1 細胞帶有 ARE 序列的冷光報導基因質體 (結構如附圖四)，以證明藥物促使 Nrf2 進入細胞核中，並具有活化下游基因表現的活性。當 HQ17(3)處理細胞不同時間後，所表現的冷光報導蛋白質活性隨著時間增加而具有上升的趨勢，由圖二十 E 顯示 Nrf2 的活性於 9-及 15-小時有約 2.5-至 3.0 倍的增加程度。綜合以上結果說明，HQ17(3)不僅能促使 Nrf2 進入細胞核內，並且具有增加下游基因表現的活性。

3.2.6 HQ17(3)促進 HO-1 的表現

接著觀察細胞內 Nrf2 下游基因的表現量改變。首先利用基因表現微陣列晶片分析藥物處理細胞後的基因表現改變，將 0.5 μM HQ17(3)處理細胞 12 小時後，以 Human Genome U133 Plus 2.0 Array 的晶片做分析，並以控制組作為基準，挑選訊號升高超過 1.5 倍並且同樣出現於兩片晶片的基因群，從中找到五個與抗氧化相關的酵素 (圖二十一 A)，包括：*GSTT1*、*GSTP1*、Superoxide dismutase 1 (*SOD1*)、*HO-1* 及 *GCLC*。以 PCR 的方法確認 GST 家族基因表現量的改變，發現 *GSTT1* 基因表現量過低而無法被偵測到，另一方面觀察 *GSTP1* 及 *GCLC* 的 mRNA 含量則無明顯改變，(圖二十一 B)。另外，於微陣列晶片分析中發現 *HO-1* 基因表現量有 1.8 倍的上升，同樣以 PCR 方法做確認，發現以 0.75 μM HQ17(3)的處理可促進 HO-1 的表現量，包括 mRNA 含量及蛋白質含量。HO-1 mRNA 的含量於 12 小時的處理有 2.2 倍的上升趨勢 (圖二十一 B)，此結果統計圖如圖二十一 C 所示。HO-1 蛋白質的含量也隨時間點及濃度增加而有上升的變化 (圖二十一 D~F)，以 0.25-、0.5-及 0.75 μM HQ17(3)處理 16 小時後，HO-1 蛋白質增加了 1.4-、3.1-及 4.4 倍 (圖二十一 D)；以 0.75 μM HQ17(3)處理 12~16 小時，HO-1

蛋白質上升了 1.3~3.6 倍 (圖二十一 E)，此結果統計圖如圖二十一 F 所示。

3.2.7 HQ17(3)透過活化 Nrf2 路徑而具有保護細胞的效果

更進一步利用降低 Nrf2 蛋白質證實 HQ17(3)透過活化 Nrf2 而具有保護細胞的效果。DZ 是一種去氧寡核酸組成的類酵素，由於帶有與標的基因互補的序列，因而可接上該基因的 mRNA，形成一 DNA/RNA 的結構，藉由其催化區的作用而可將該 mRNA 切斷。此催化區為一段十五個核苷酸序列 (5'-GGCTAGGTACAACGA-3')，該 mRNA 被切斷的位置位於 RY 間的 phosphodiester bond (R=A or G, Y=C or U)⁶²。本實驗的目標基因為 Nrf2，RY 序列為 UA (圖二十二 A，底線標示)，以轉染的方式將 DZ-C (C 指 scramble 序列，並未針對任何基因)及 DZ-N (N 指 Nrf2)送進細胞中。實驗結果觀察得到，與 DZ-C 相比，以 DZ-N 處理細胞後降低 50%的 Nrf2 基因表現量 (圖二十二 B)。除此之外，以西方墨點法觀察發現 DZ-N 的處理也降低 90%總 Nrf2 蛋白質含量 (圖二十二 C)。於細胞總蛋白質分析中發現，經 HQ17(3)的處理後，Control 或是 DZ-C 處理的細胞組別的 Nrf2 總含量，皆有 2.1-及 2.2 倍的上升趨勢 (圖二十二 C)，但 mRNA 含量並未明顯上升 (圖二十二 B)，說明了 HQ17(3)的處理可增加 Nrf2 的穩定性。另一方面發現，當缺乏 Nrf2 蛋白質時，HQ17(3)的處理下也並未增加 HO-1 的表現 (圖二十二 C)，顯示 HO-1 的表現與 Nrf2 的調控相關。此實驗結果可輔助說明 HQ17(3)透過穩定 Nrf2 並活化 Nrf2 及促進表現相關抗氧化基因。

已知 HQ17(3)能夠有效保護細胞免於 H₂O₂ 處理造成的細胞死亡 [圖十八 A 及圖二十二 D (Control 及 DZ-C 的組別中標記 a 的趨勢)]，然而在缺乏 Nrf2 的情況下 (DZ-N 的組別)，H₂O₂ 處理造成的細胞死亡未能因 HQ17(3)的前處理而被避免 (標記 b 的趨勢)。因此根據以上這些實驗結果，可輔助說明 HQ17(3)透過 Nrf2 分子而提供保護細胞免受於氧化性傷害的效果。另外，DZ-C 及 DZ-N 的處理並未影響細胞活性 (圖二十二 D，未處理 H₂O₂ 的白色柱狀組別)。HQ17(3)的單獨

處理也未影響 Control、DZ-C 及 DZ-N 組別的細胞存活率 (圖二十二 D，未處理 H₂O₂ 的黑色柱狀組別)。



四、結論

本篇研究首先針對 HQ17(3)的化學特性及高濃度處理對 Huh7 細胞產生細胞毒性的機制進行探討。發現 HQ17(3)可修飾 Topo II α 蛋白質的半胱胺酸，並導致 Topo II poison，其現象包括累積 Topo II α -DNA 複合體、DNA 斷裂及引發細胞凋亡。另一方面，Huh7 細胞發生細胞凋亡的部分原因來自於 HQ17(3)造成的氧化壓力，然而 Topo II poison 為主要造成細胞死亡的原因 (圖二十三)。此部分研究成果已發表於國際期刊 *Chemical Research in Toxicology* 中⁶³。

本篇另一部分研究發現 HQ17(3)具有幫助細胞抵抗氧化性損傷的特性。實驗設計中所使用的低濃度為 low micromolar 的範圍 (<1 μ M)，對於細胞並不會造成毒性，與毒殺癌細胞所使用的濃度 (micromolar 範圍)¹ 相比則是明顯偏低。從 WS1 皮膚細胞實驗中，也證明了 HQ17(3)與 Keap1 的半胱胺酸反應，且於低濃度下可活化 Nrf2 轉錄因子，並提升抗氧化酵素基因 HO-1 的表現。活化此機制能夠幫助細胞減輕因 H₂O₂ 造成氧化性傷害 (圖二十四)。

綜合以上結果，本篇論文研究發現 HQ17(3)具有與蛋白質的硫醇基反應的活性，藉由此特性可引發細胞內的不同反應。於高濃度使用下不僅抑制 Topo II α 的活性而具有抗癌的效用；低濃度的使用則能修飾 Keap1、引發 Nrf2 路徑而具有抵抗氧化性傷害的效果，因此其結構也可作為先導藥物以研發結構相似並具相似活性的化合物。

五、討論

本篇研究證實 HQ17(3)具有與蛋白質的硫醇基反應的特性。首先根據 Topo II α 蛋白質的實驗結果討論，從細胞實驗中發現，HQ17(3)可與 Topo II α 的 Cys-427 反應，而試管實驗中則是發現了 HQ17(3)修飾 Cys-427、-733 及-997 三個位點。Cys-427-HQ17(3)的產物出現在這兩組實驗結果中，推測該位點為容易與 HQ17(3)反應的位置。HQ17(3)接上這三個半胱氨酸對 Topo II α 造成的改變可能為：1) 由於 Cys-427 位於 ATPase domain，當其被修飾時可能影響 ATP 水解，因而影響 Topo II α 解螺旋活性；2) Cys-733 及-997 則位於 DNA breakage-reunion domain，當 HQ17(3)接在這些位置上可能影響蛋白質的空間結構而抑制其 catalytic cycle。

HQ 具有與硫醇基反應的活性，也會造成 Topo II α 導致的 DNA 斷裂²⁶。由於 HQ17(3)帶有 HQ 結構，因此推測 HQ17(3)可能利用此部分與蛋白質的硫醇基反應（圖二十五 A）。另一方面，已知 HQ17(3)的抗氧化活性及細胞毒性都較 HQ17(2)及 HQ17(1)高³，這三者的結構差異僅來自支鏈上的雙鍵數不同，因此推論支鏈的結構也可能參與於小分子與硫醇基的反應。HQ17(3)修飾 Topo II α 的半胱氨酸位點可能阻礙了蛋白質的空間結構，影響 catalytic cycle 的進行而造成 DNA 斷裂。從本篇研究的試管實驗結果中，可推論 HQ17(3)將 topoisomerase catalytic cycle 停滯在 Topo II α -DNA 複合體的階段，因此而造成 Topo II α 導致的 DNA 斷裂（圖二十五 B）。

已知仍有 Topo II α 的數個半胱氨酸具有與小分子反應的活性，根據 Lin et al., 2011 的研究指出，isothiocyanates 類的小分子可與數個半胱氨酸反應以形成共價鍵結，並且因此抑制 Topo II α 的活性。他們的研究發現，帶有不同支鏈的 isothiocyanates 小分子與 Topo II α 的各個半胱氨酸有著不同的反應活性^{27,64}。另一方面，已知 BQ 為 HQ 的氧化態，而 BQ 可與 Topo II α 的 Cys-392 及-405 反應²⁸，此與 HQ17(3)作用的位點不同，推測此差異來自於 HQ17(3)的長支鏈而造成影響，可能是空間上的結構而使得 HQ17(3)更傾向於與 Cys-427 位點反應。然而

細胞內蛋白質的高複雜度也限制了質譜儀的靈敏度，以及細胞內不只 Topo II α 為 HQ17(3)反應的目標蛋白質，因此在細胞實驗中的結果僅偵測到三條帶有半胱氨酸的胜肽，此結果並無法排除其他位點與 HQ17(3)反應的可能性。

另一方面，從本篇實驗結果中可推論得知 HQ17(3)的作用方式與 VP-16 並不相同。因為實驗方法的設計為將 HQ17(3)與酵素先反應後再加入 DNA 才起始反應，此種反應方式便可抑制酵素活性，推論 HQ17(3)可與蛋白質直接反應而抑制蛋白質活性，並不需有 DNA 的存在。

Huh7 細胞經 HQ17(3)處理後，發生 DNA 斷裂的情形。這現象對於細胞是一種基因不穩定的壓力，容易促使細胞走向凋亡。本研究發現 *DDIT3* 及 *GADD45* 基因的上升，顯示細胞內的 DNA 受到損傷，*GADD45* 家族基因包括 *GADD45A*、*GADD45B* 及 *GADD45G*，除因為 DNA 損傷而上升，也可因細胞內自由基含量增加導致氧化壓力上升而表現量增加。於先前研究指出，在 myeloblastic leukemia 或是 lung carcinoma 細胞株中大量表現 *GADD45* 基因，其與細胞凋亡程度成正比³²。

於 NAC 的預先處理細胞條件下，觀察到包括 MMP 喪失、caspase 的活化及具有 subG1 細胞的比例，都有部分減輕的情形，顯示氧化壓力為 HQ17(3)造成凋亡的原因之一。但細胞膜內膜外翻的損傷情況並未能因 NAC 的前處理而有效地降低 (NAC 前處理的方式將其比例由 21%降至 18%，於統計上並不具有顯著差異)，推測可能是 HQ17(3)的支鏈和細胞膜的結構類似，因而卡在膜上造成膜的損傷。

造成 DNA 斷裂有數個可能的原因，除了抑制 Topo II 活性而造成 DNA 斷裂外，氧化壓力也是原因之一，而細胞凋亡的其中一個現象也會發生 DNA 斷裂，也就是具有 subG1 的細胞群。首先本實驗中以 caspase 3 抑制劑及 pan-caspase 抑制劑處理細胞後，發現可降低 HQ17(3)引起的 subG1 比例。另一方面，在 NAC 預先處理細胞的實驗中，發現 NAC 可預防部分的細胞凋亡，包括了 subG1 的細胞比例，以及降低 *DDIT3* 及 *GADD45A* 這兩個 DNA 受損相關基因的表現。然而

從 ICE bioassay 結果發現 NAC 的前處理並無法有效防止 HQ17(3)造成的 Topo II α -DNA 複合體的形成。由此推測 DNA 斷裂的現象，除了是細胞凋亡及氧化壓力造成之外，Topo II poison 所導致的 DNA 斷裂是無法被 caspase 抑制劑或是抗氧化劑的處理而被預防的，因此更可說明 Topo II poison 為 HQ17(3)造成 Huh7 細胞死亡的主要原因。

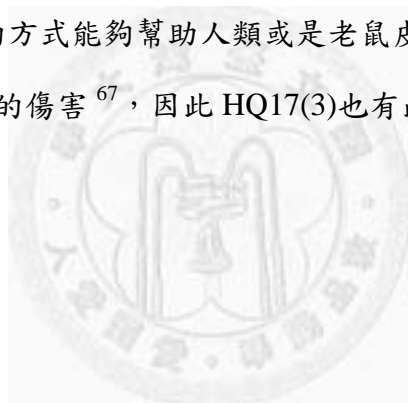
於先前的研究中指出，HQ17(3)於 HL-60 細胞中除了因 Topo II poison 的作用方式外，另一方面也透過造成氧化壓力而引發細胞毒性¹。與本研究相比較，Huh7 細胞及 HL-60 細胞對於 HQ17(3)造成的氧化壓力顯然有不同的感受程度，推測造成此差異的原因為細胞來自於不同的器官組織。Huh7 細胞為肝癌細胞株，肝臟原本就是處理藥物代謝的器官，因此對於氧化壓力的閾值可能比其他器官的細胞高，與 HL-60 血癌細胞相比，Huh7 對氧化壓力耐受性應較高，可能是透過表現抗氧化的酵素 (如 HO-1 及 GCLC) 以清除過多的自由基。因此可輔助說明在 Huh7 細胞中，HQ17(3)所引發的氧化壓力以造成的細胞毒性並不如 Topo II poison 劇烈。

目前已發現許多天然物小分子具有抗癌活性外，也具有預防氧化性損傷的效用，並且能防止正常細胞因氧化性損傷而失去正常的功能調節，例如 sulforaphane、curcumin⁶⁵ 及 resveratrol。舉例說明，sulforaphane 於高濃度使用時可當作是 Topo II poison 而促進癌細胞凋亡²⁷，於低濃度使用時也可透過引發 Nrf2 活化而降低細胞內氧化性損傷以維持細胞正常活性^{39,66}，於本篇研究中則證實 HQ17(3)也具有相同的特性。

目前已知 Cys-151、-273 及 -288 為主要 Keap1 調控 Nrf2 活性的樞紐胺基酸，若將 Cys-273 及 -288 做點突變後，會降低 Keap1 將 Nrf2 接上 ubiquitin 的活性而喪失抑制 Nrf2 的功能，使得總 Nrf2 蛋白質含量因此增加，顯示 Nrf2 的穩定性增加⁴³。其他文獻指出，當將 Cys-151 替換成其他胺基酸時，Keap1 便與 Cul3 分開，因此無法以 ubiquitin 系統降解 Nrf2，而造成 Keap1 持續性地抑制 Nrf2⁴³。至於其他半胱胺酸位點的功能性探討，若將 Cys-257 及 -297 做點突變後，此種改

變對 Keap1 抑制 Nrf2 的能力沒有影響⁵⁰。研究指出，一天然物小分子 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2 已知可對 Cys-273 修飾而增加 Nrf2 的穩定性⁴³。本研究以質譜儀方法分析發現，Cys-288 位點的修飾出現於 WS1 細胞 Keap1 及 recombinant Keap1 的結果中，可能是最容易與 HQ17(3)反應的位點。另外，的確觀察到 Nrf2 的總蛋白質含量因為 HQ17(3)的處理而上升，此結果推測與 Cys-288 的修飾有關。然而在分析中並未偵測到帶有 Cys-151 的胜肽訊號，因此無法排除 HQ17(3)與之反應的可能性。

於 WS1 細胞中證明 HQ17(3)具有幫助細胞抵抗氧化性損傷的效果，可將此概念應用到臨床上。皮膚細胞經常接受到 UV 輻射刺激，容易產生氧化性損傷，而造成細胞老化或甚至是癌症病變。以 sulforaphane 為例，已知為 Nrf2 活化誘導物，藉由外部塗抹給藥的方式能夠幫助人類或是老鼠皮膚組織細胞中 Nrf2 的活化，因而抵抗 UVA 引起的傷害⁶⁷，因此 HQ17(3)也有此臨床應用的潛力。



表一、HQ17(3)修飾 recombinant Topo II α 及 Huh7 細胞 Topo II α 的半胱氨酸^a

Cys position	Sequence	<i>in vitro</i>	Huh7
C104	K.MSCIR.V	-	#
C170		#	#
C216	R.AGEMELKPFNGEDYTCITFQPDLSK.F	-	#
C300	K.VIHEQVNRWEVCLTMSEK.G	-	#
C392	K.SFGSTCQLSEK.F	-	#
C405	K.AAIGCGIVESILNWVK.F	-	#
C427	K.CSAVK.H	+	+
C455		#	#
C733	K.VLFTCFKRNDK.R	+	-
C862		#	#
C997/C1008	K.LQTSLTCNSMVLFDHVGCLKK.Y	+ (997)	#
C1145	K.DELCRLRNEK.E	-	-

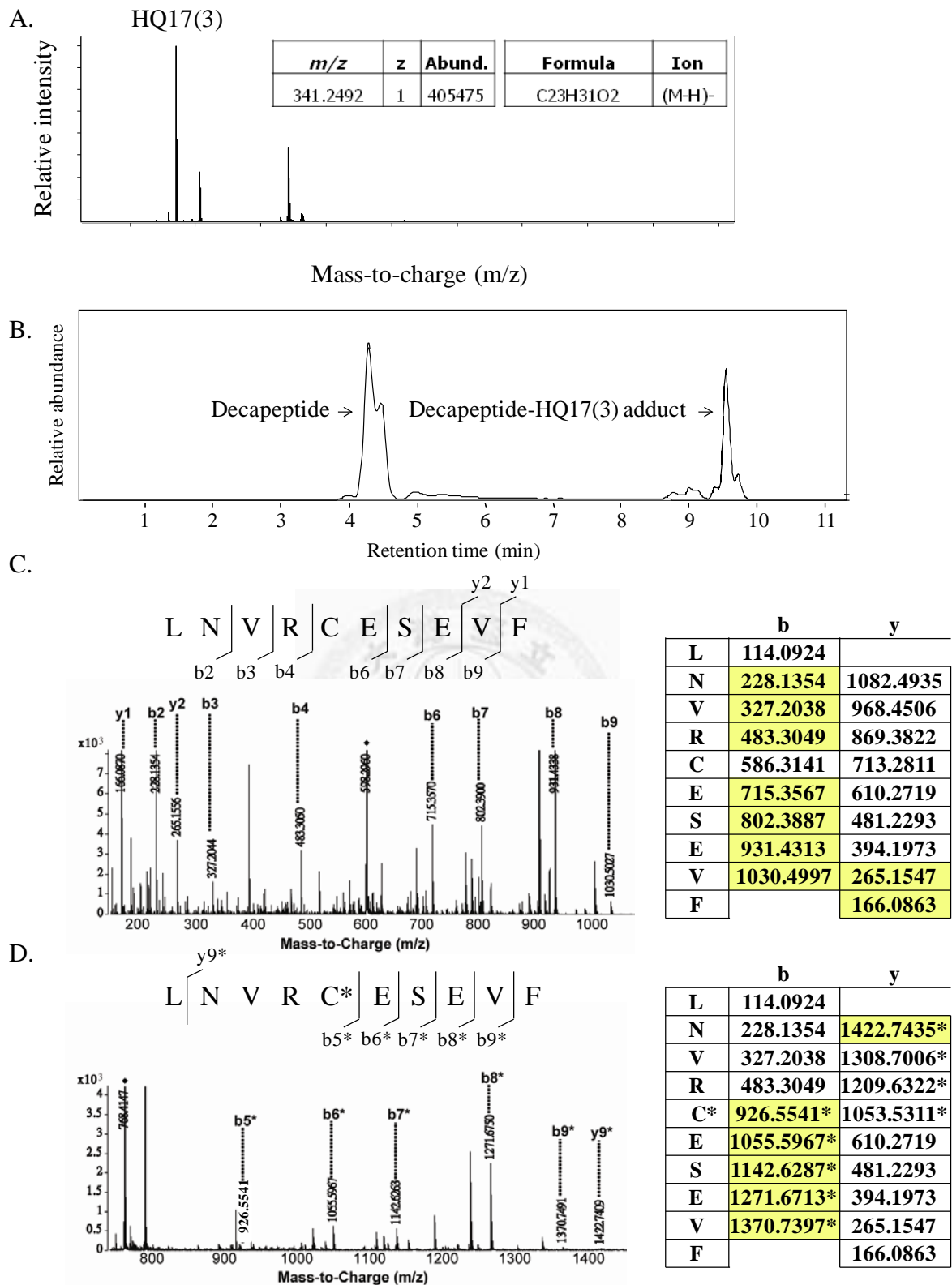
^a#：未被偵測到的胜肽；+：帶有 HQ17(3)修飾的胜肽；-：未帶有 HQ17(3)修飾的胜肽。



表二、HQ17(3)修飾 WS1 細胞 Keap1 及 recombinant Keap1 的半胱胺酸^a

domain	Cysteine	Sequence	WS1	<i>in vitro</i>
N-terminal	C13	R.PSGAGACCR.F	#	+
	C14	R.PSGAGACCR.F	#	+
	C23		#	#
	C38		#	#
BTB	C77	R.LSQQLCDVT LQVK.Y	+	#
	C151		#	#
	C171		#	#
central linker	C196		#	#
	C226	K.QEEFFNLSHCQLVTLISR.D	#	-
	C241	R.CESEVFHACINWVK.Y	-	#
	C249	R.CESEVFHACINWVK.Y	+	#
	C257		#	#
	C273	R.CHSLTPNFLQMQQLK.C	#	-
	C288	K.CEILQSDSR.C	+	+
	C297	R.CKDYLVK.I	+	-
	C319	K.PTQVMPCR.A	#	+
Kelch	C368	R.SGLAGCVVGGLLYAVGGR.N	#	+
	C395		#	#
	C406		#	#
	C434		#	#
	C489	R.LNSAECYYPEN.N	#	+
	C513		#	#
	C518		#	#
	C583		#	#
C-terminal	C613	R.SGVGVAVTMEPCR.K	#	+
	C622	K.QIDQNCTC	#	+
	C624	K.QIDQNCTC	#	+

^a#：未被偵測到的胜肽；+：帶有 HQ17(3)修飾的胜肽；-：未帶有 HQ17(3)修飾的胜肽。



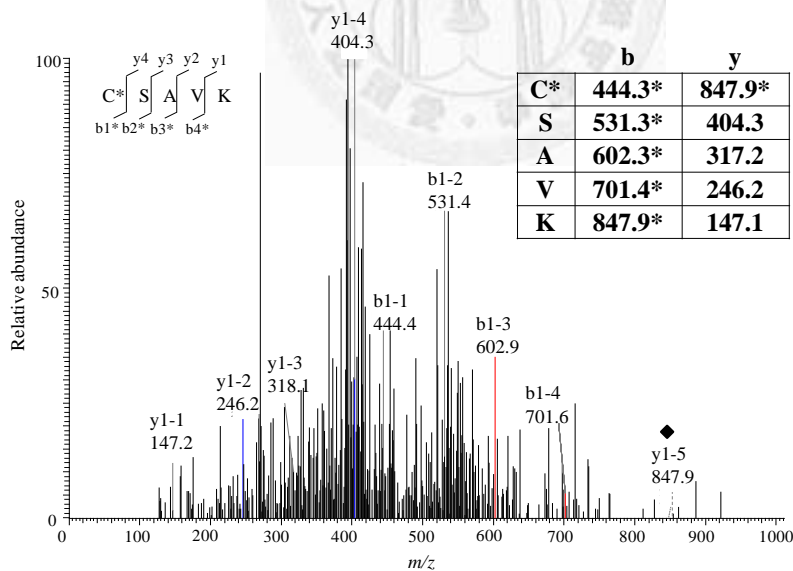
圖一、HQ17(3)與 decapeptide 上的硫醇基反應

將 HQ17(3) (200 μ M)與 decapeptide (500 μ M)反應 24 小時後以質譜儀分析產物。(A) HQ17(3)質譜分析圖。(B) HQ17(3)與 decapeptide 反應產物層析圖。(C) decapeptide 及(D) decapeptide-HQ17(3)二次裂解質譜圖。◆為裂解前的母分子。*為帶有 HQ17(3)修飾的胜肽，小圖表中的灰色底標示代表被偵測到的片段。

A.

MEVSPLQPVN ENMQVNKIKK **NEDAKKRLSV** ERIYQKKTQL EHILLRPDTY IGSVELVTQQ 60
 MWVYDEDVGI NYREVTFFVPG LYK**IFDEILV** NAADNKQRDP KMSCIRVTID PENNLISIWV 120
 NGKGIPVVEH KVEKMYVPAL IFGQLLTSSN YDDDEKKVTG GRNGYGAKLC NIFSTKFTVE 180
 TASREYKKMF QOTWMDNMGR AGEMELKPFN GEDYTCITFQ PDLKFKMQS LDKDIVALMV 240
 RRAYDIAGST KDVKVFLNGN KLPVKGFRSY VDMYLKDKLD **ETGNSLKVIH** EQVNHRWEVC 300
 LTMSEKGFQQ ISFVNSIATS KGGRHVDYVA DQIVTKLVDV **VKKKNKGGVA** **VKAHQVKNHM** 360
 WIFVNALIEN PTFDSQTKEN **MTLQPKSFGS** TCQLSEKFIK AAIGCGIVES ILNWVK**FKAQ** 420
VQLNKKCSAV **KHNRIKGIPK** LDDANDAGGR NSTECTLILT EGDSAKTLAV SGLGVVGRDK 480
 YGVFPLRGKI LNVREASHKQ IMENAEINNI IKIVGLQYKK **NYEDEDLKT** LRYGKIMIMT 540
 DQDQDGSNIK GLLINFIHNN WPSLLRHRFL EEFITPIVKV SKNKQEMAFY SLPEFEEWKS 600
 STPNHKKWKV KYYKGLGTST SKEAKEYFAD MKRHRIQFKY SGPEDDAAIS LAFSKKQIDD 660
 RKEWLTNFMF DRRQRKLLGL PEDYLYGQTT TYLTYNDFIN KELILFSNSD NERSIPSMVD 720
 GLKPGQRKVL **FTCFKRNDKR** EVKVAQLAGS VAEMSSYHHG EMSLMMTIIN LAQNFVGSNN 780
 LNLQPIGQF GTRLHGKDS ASPRYIFTML SSLARLLFPP KDDHTLKFLY DDNQRVEPEW 840
 YIPIIPMVLV NGAEGIGTGW SCKIPNFDVR **EIVNNIRRLM** DGEEPLPMLP SYKNFKGTIE 900
 ELAPNQYVIS GEVAILNSTT IEISELPVRT WTQTYKEQVL EPMLNGTEKT **PPLITDYREY** 960
 HTDITVKFVV **KMTEEKLAEA** ERVGLHKVFK LQTSLTCNSM VLFDHVGLCK KYDTVLDILR 1020
 DFFELRLKYY GLRKEWLLGM LGAESAKLNN QARFILEKID GKIIENKPK KELIKVLIQR 1080
 GYSDSPVKAW KEAQQKVPDE EENEESDNEK ETEKSDSVTD SGPTFNILLD MPLWYLT**KEK** 1140
KDELCLRLNE KEQELDTLKR KSPSDLWKED LATFIEELEA VEAKEKQDEQ VGLPGKGGKA 1200
 KGKKTQMAEV LPSPRGQRVI PRITIEKAE AEKKNKKIK NENTEGSPQE DGVELEGLKQ 1260
 RLEKKQKREP GTKTKKQTTL AFKPIKKGKK RNPWSDSESD RSSDESDFV PPRETEPRRA 1320
 ATKTKFTMDL DSDDEFSDFD EKTDEDEFVP SDASPPKTKT SPKLSNKEK POKSVVSDLE 1380
 ADDVKGSVPL SSSPPATHFP DETEITNPVP KKNVTVKKTA AKSQSSTSTT GAKKRAAPKG 1440
 TKRDPALNSG VSQKPDPAKT KNRRKRKPS SDDSDSNFEK IVSKAVTSKK SKGESDDFHM 1500
 DFDSAVAPRA KSVRAKKPIK YLEESDEDDL F

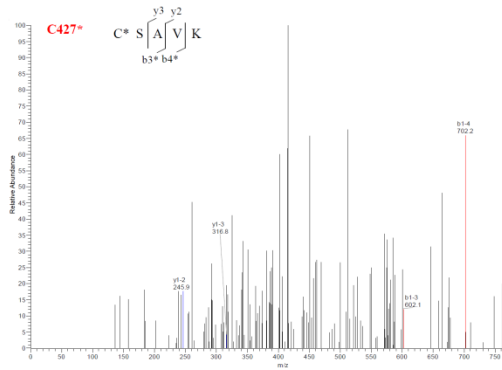
B.



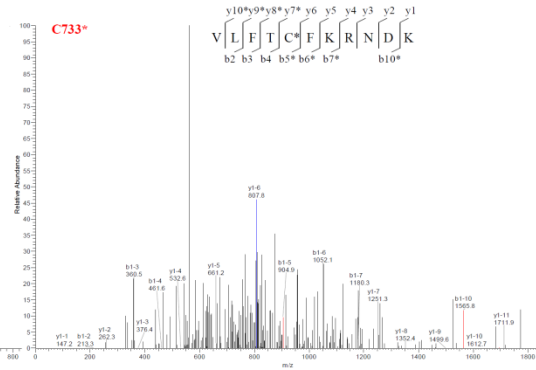
圖二、HQ17(3)與 Huh7 細胞內 Topo II α 的半胱胺酸反應

以 10 μ M HQ17(3)處理 Huh7 細胞 5 小時後，收取細胞核中的 Topo II α 蛋白質並以質譜儀進行分析。(A) Topo II α 蛋白序列，被偵測到的胜肽以灰色底標示，被偵測到的胜肽帶有半胱胺酸者以底線標示。(B) C*SAVK 的 MS/MS 圖譜，右表為各胜肽的 m/z 值，* 為帶有 HQ17(3)修飾的胜肽。

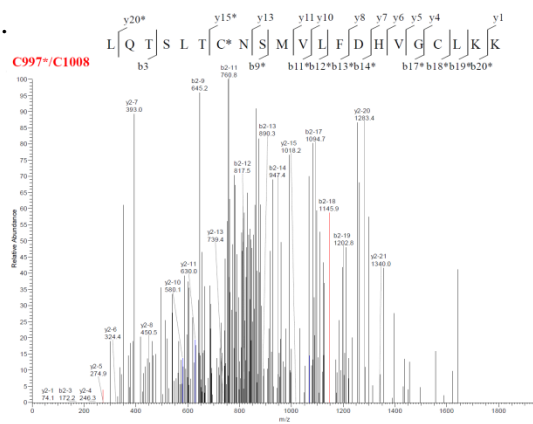
A.



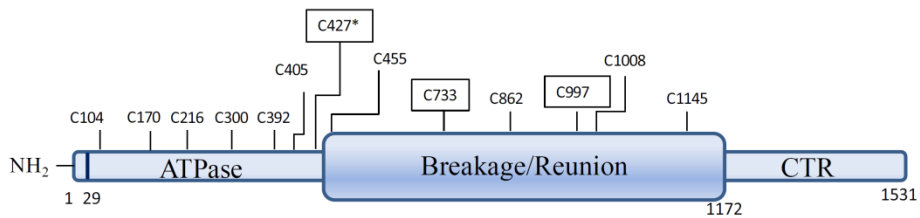
B.



C.



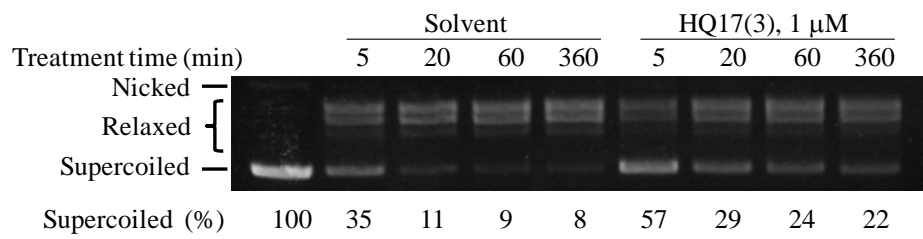
D.



圖三、HQ17(3)與 recombinant Topo IIα 的半胱胺酸反應

(A~C) Cys-427*、-733*及-997*的 MS/MS 質譜圖。*為帶有 HQ17(3)修飾的胜肽。(D) 框選的半胱胺酸為被 HQ17(3)修飾 recombinant Topo IIα 的位點；*是 HQ17(3)修飾細胞內 Topo IIα 的位點。

A.



B.

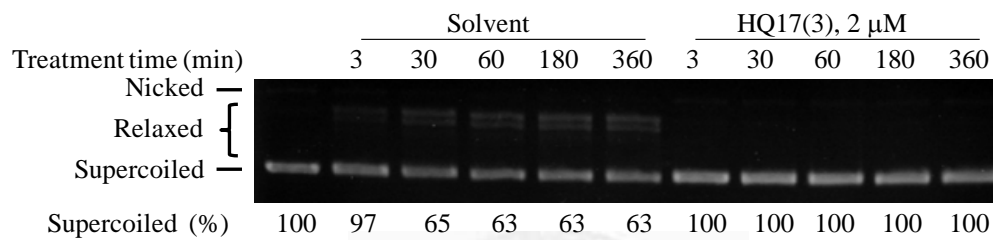


圖 四、不同比例的 HQ17(3)與 Topo II α 反應而造成不同程度的酵素活性降低

將 HQ17(3)先與 Topo II α 反應 20 分鐘後，再將 DNA 加入管中於 37 $^{\circ}$ C 下反應 20 分鐘以進行 DNA relaxation 反應，產物則以 agarose 膠體分開。(A) Topo II α : HQ17(3)的莫耳濃度為 1:200。(B) Topo II α : HQ17(3)的莫耳濃度為 1:800。

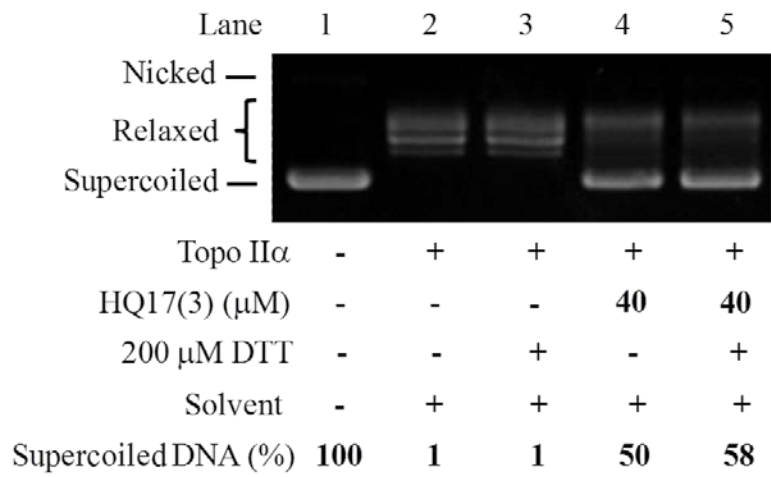
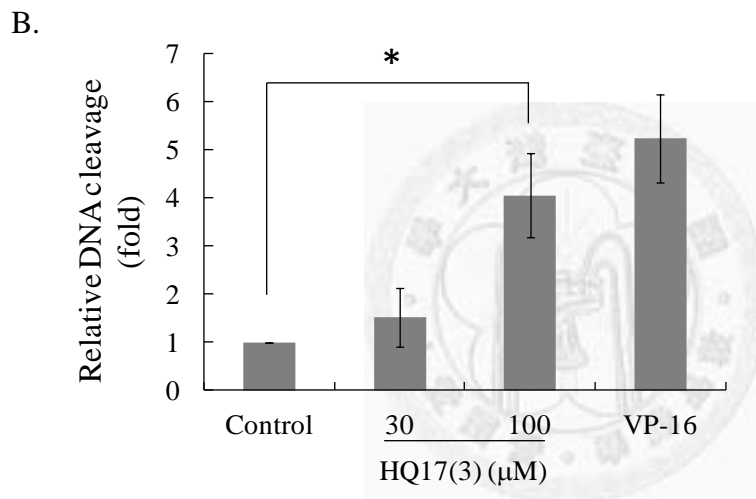
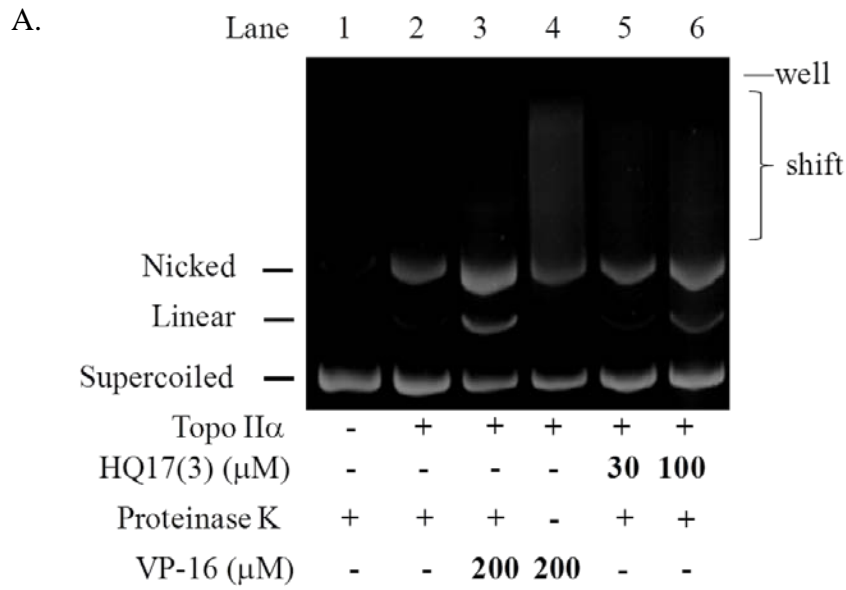


圖 五、DTT 的處理不影響 HQ17(3)抑制 Topo II α 活性的能力

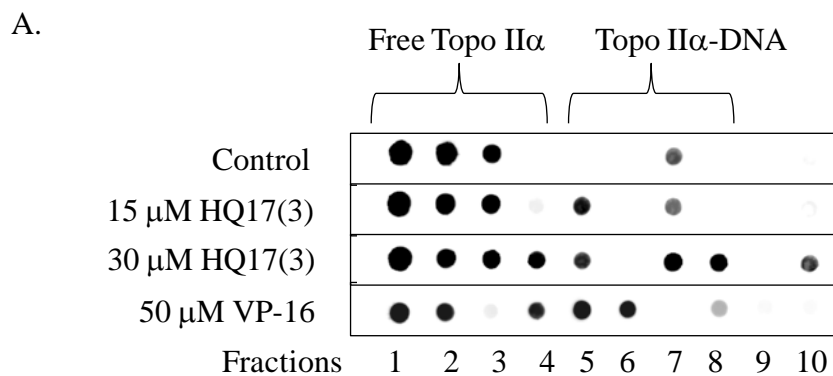
試管 DNA relaxation 實驗。將 DNA、HQ17(3)及 Topo II α 同時加入管中，最後加入 DTT，並於 37 °C 下反應 20 分鐘後，以 agarose 膠體將 nicked、supercoiled 及 relaxed form DNA 分開，觀察 supercoiled DNA 剩餘的百分比變化。



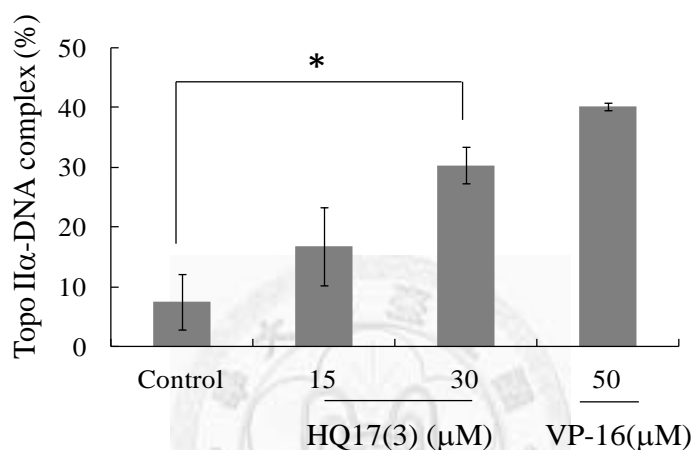


圖六、HQ17(3)的處理增加 Topo II α 導致的 DNA 斷裂

於試管 Topo II 誘導 DNA 斷裂的形成實驗方法分析，以 HQ17(3)處理後，觀察 linear form DNA 增加的情形。(A) 將 DNA、藥物及 Topo II α 同時加入管中於 37 °C 下反應 6 分鐘後，於含 EtBr 的 agarose 膠體中將 nicked·linear 及 supercoiled form DNA 分開，VP-16 為 Topo II α 導致 DNA 斷裂的陽性對照組。(B) 統計分析結果並以柱狀圖呈現變化。*代表 $p < 0.05$ 。

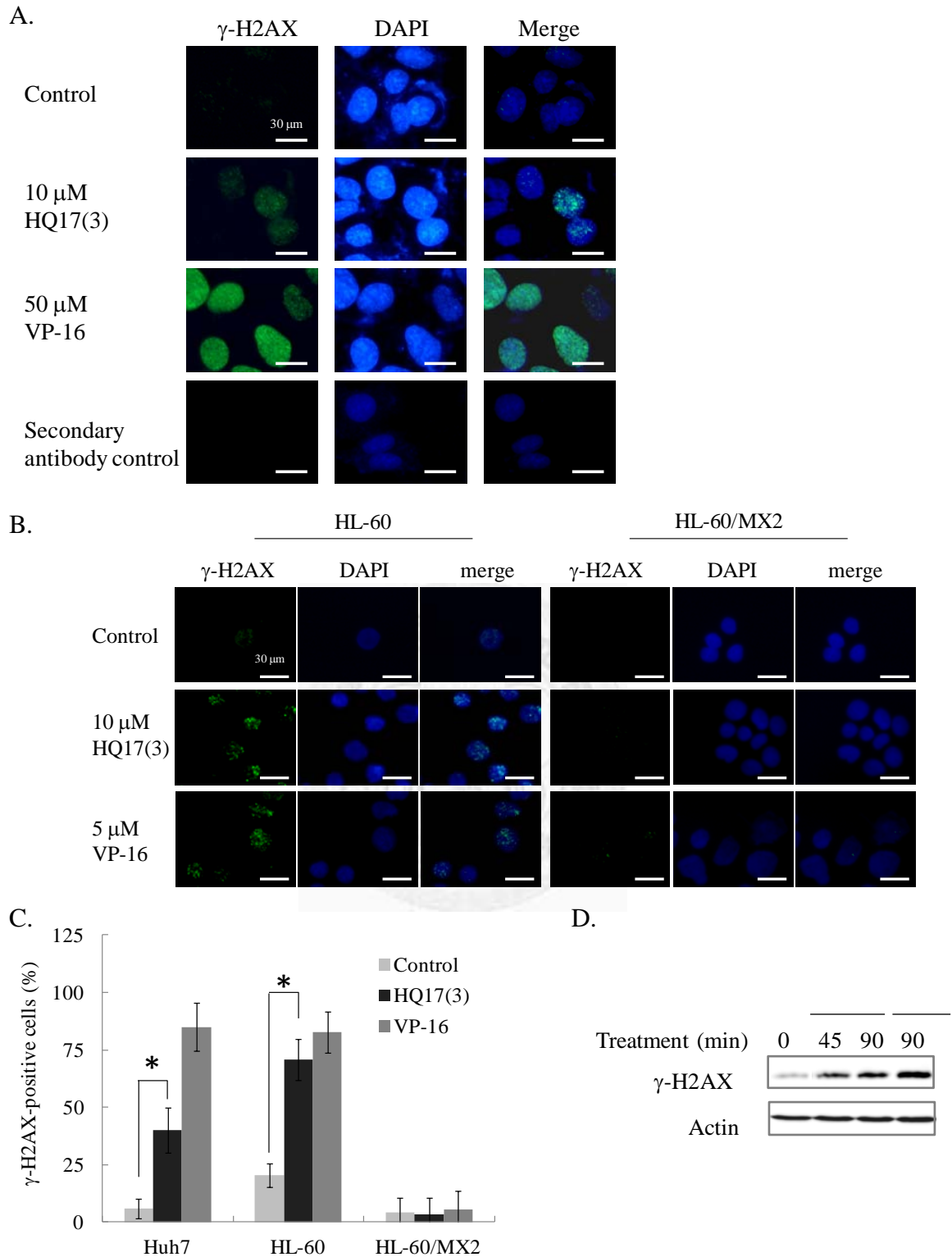


B.



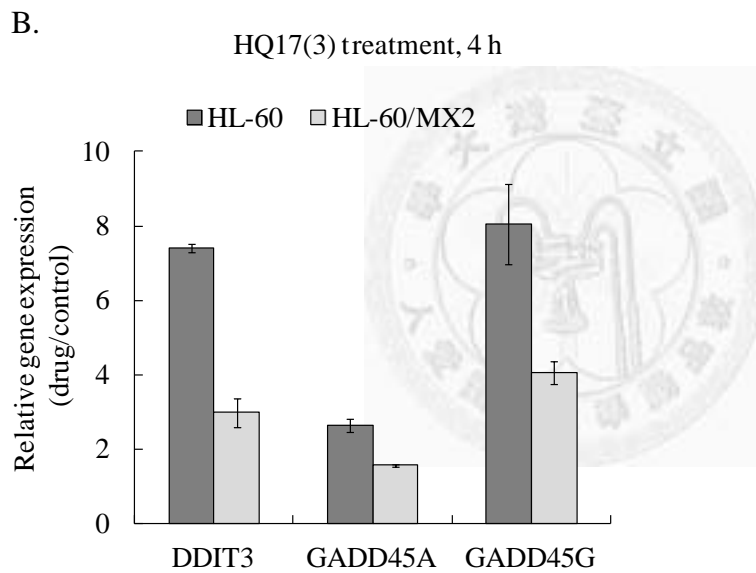
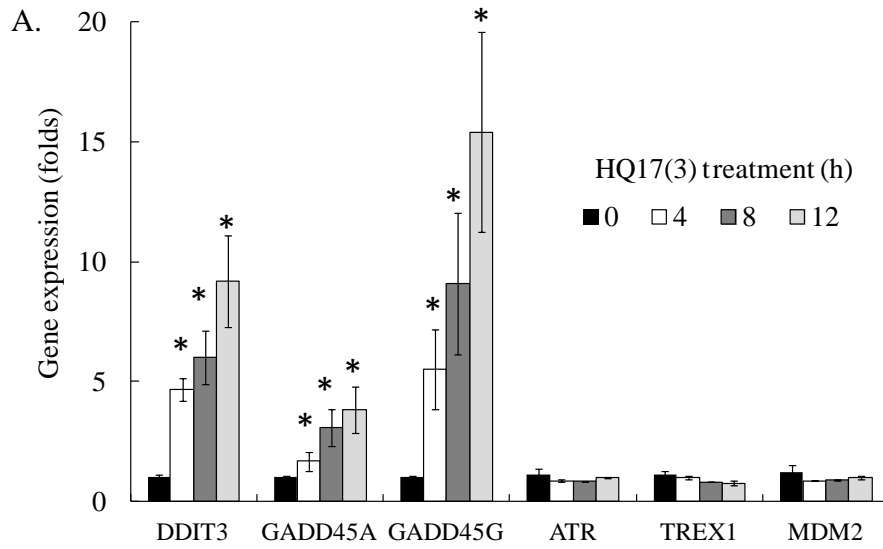
圖七、HQ17(3)的處理導致 Huh7 細胞中 Topo IIα-DNA 複合體的累積

不同濃度的HQ17(3)處理觀察Topo IIα-DNA複合體的累積程度。(A) 將細胞處理藥物90分鐘後，打破細胞並打斷DNA，以CsCl 梯度利用超高速離心以分離蛋白質及DNA，並分成十個fraction，以 dot-blot 方式將樣品點在 NC paper 上並以 Topo IIα 抗體辨認 Topo IIα。VP-16 為陽性對照組。(B) 定量每一反應組別中 fraction 5~8 所占百分比並以柱狀圖呈現變化。*代表 $p < 0.05$ 。



圖八、HQ17(3)的處理導致 Huh7 及 HL-60 細胞中 γ -H2AX 的現象發生

HQ17(3)處理後觀察 γ -H2AX 的變化。(A-C) 細胞經藥物處理 90 分鐘後，即固定並將細胞打洞做 IHC 染色。綠色螢光代表 γ -H2AX；藍色為 DAPI 染色代表細胞核。VP-16 為陽性對照組。(A) Huh7 細胞染色。(B) HL-60 及 HL-60/MX2 細胞染色。(C) 定量每一處理組別的 γ -H2AX 陽性細胞數所占百分比並以柱狀圖呈現變化。(D) 以西方墨點法分析 10 μ M HQ17(3)於不同時間處理所造成的 γ -H2AX 的現象改變。*代表 $p < 0.05$ 。



圖九、部分DNA受損相關基因表現量因HQ17(3)的處理而上升

以 real-time PCR 分析 HQ17(3)處理細胞後的 DNA 受損誘導基因表現量變化。(A) Huh7 細胞模式。(B) HL-60 及 HL-60/MX2 細胞模式，以未處理的細胞組別當作基準，計算處理 HQ17(3)後各個基因的改變。*代表 $p < 0.05$ 。

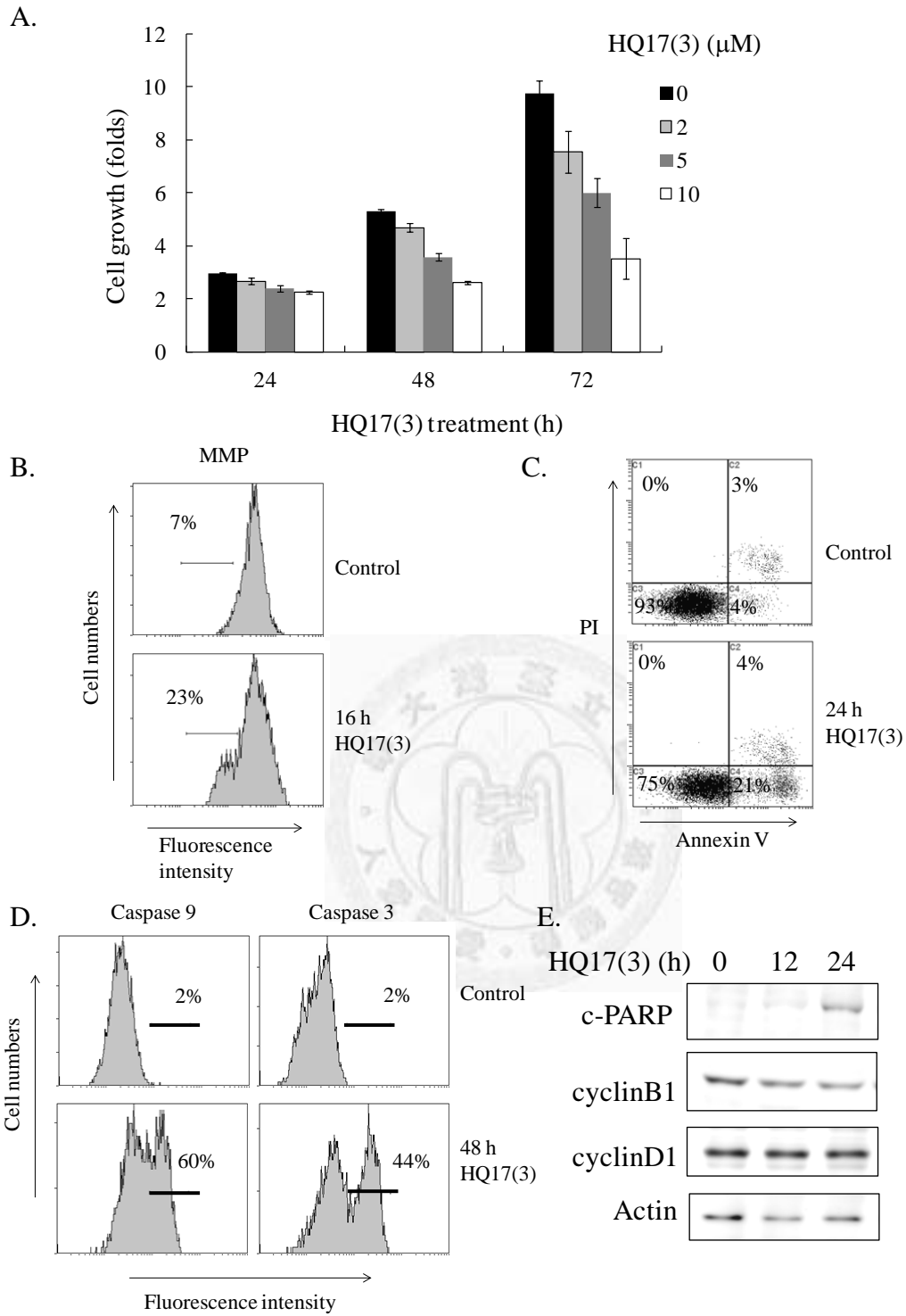
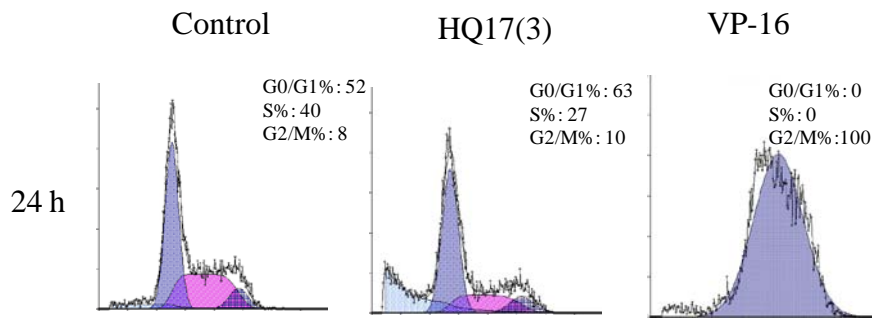


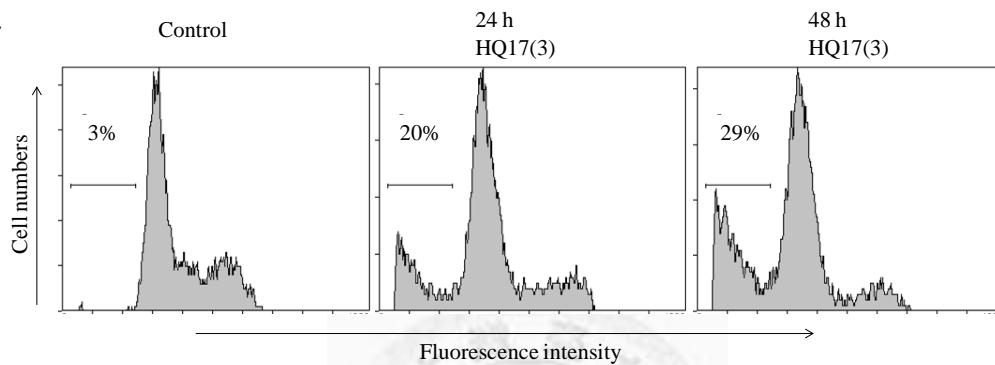
圖 十、HQ17(3)的處理早期引發 Huh7 細胞凋亡

以 10 μM HQ17(3)處理細胞不同時間後，分析各項凋亡指標的變化。(A) 細胞存活率趨勢。(B~D) 流式細胞儀分析結果：(B) MMP 分析。(C) Annexin V/PI 分析。(D) Caspase 9 及 caspase 3 的活性分析。(E) 以西方墨點法分析 c-PARP、cyclin B1 及 cyclin D1 蛋白質表現量。Actin 為內部對照組。

A.



B.



C.

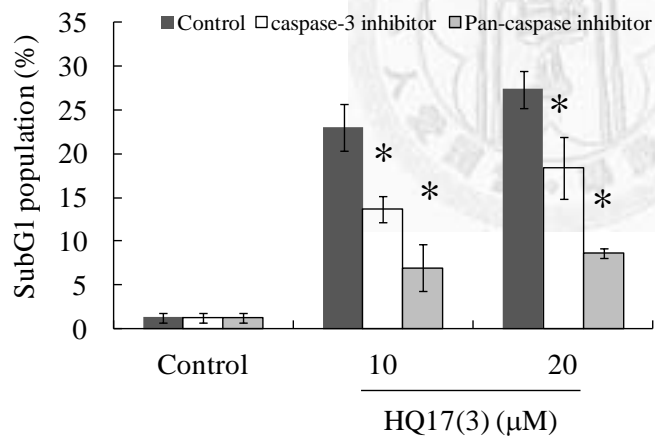


圖 十一、HQ17(3)的處理增加 subG1 的比例

以 10 μM HQ17(3)處理 Huh7 細胞不同時間後，以流式細胞儀分析細胞週期或 subG1 比例的變化。(A) HQ17(3)處理細胞 24 小時的 DNA 套數變化分析。(B) HQ17(3)處理細胞 24-及 48 小時的 subG1 細胞比例變化分析。(C) 觀察 caspase 3 抑制劑及 pan-caspase 抑制劑的前處理 (4 μM , 3 小時)對於 HQ17(3)處理 (48 小時)所造成的 subG1 細胞比例的變化。

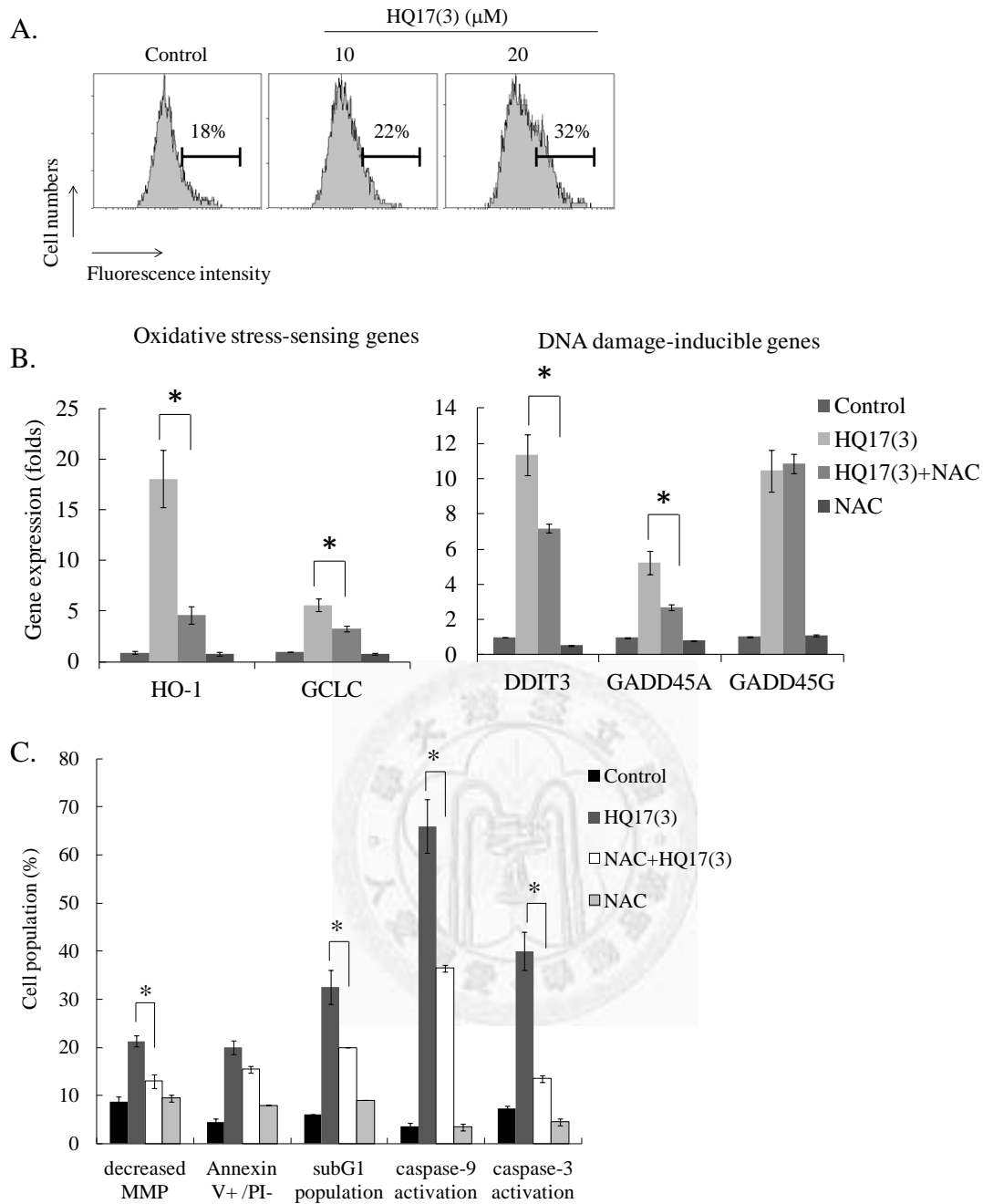


圖 十二、氧化壓力為 HQ17(3)造成細胞凋亡的部分原因

(A) HQ17(3)處理細胞後增加 mitochondrial ROS 含量。Huh7 細胞經不同濃度 HQ17(3)處理 8 小時後，以流式細胞儀偵測並分析變化。(B~C) NAC 前處理 (3 小時, 1 mM) 影響 HQ17(3)造成的變化。(B) 以 real-time PCR 分析 NAC 前處理影響 HQ17(3) (10 μM , 12 小時處理)造成的基因變化。(C) NAC 前處理影響 HQ17(3) (10 μM)造成細胞凋亡的比例。MMP: 16 小時; annexin/PI 及 subG1: 24 小時; caspase 9 及 caspase 3: 48 小時。*代表 $p < 0.05$ 。

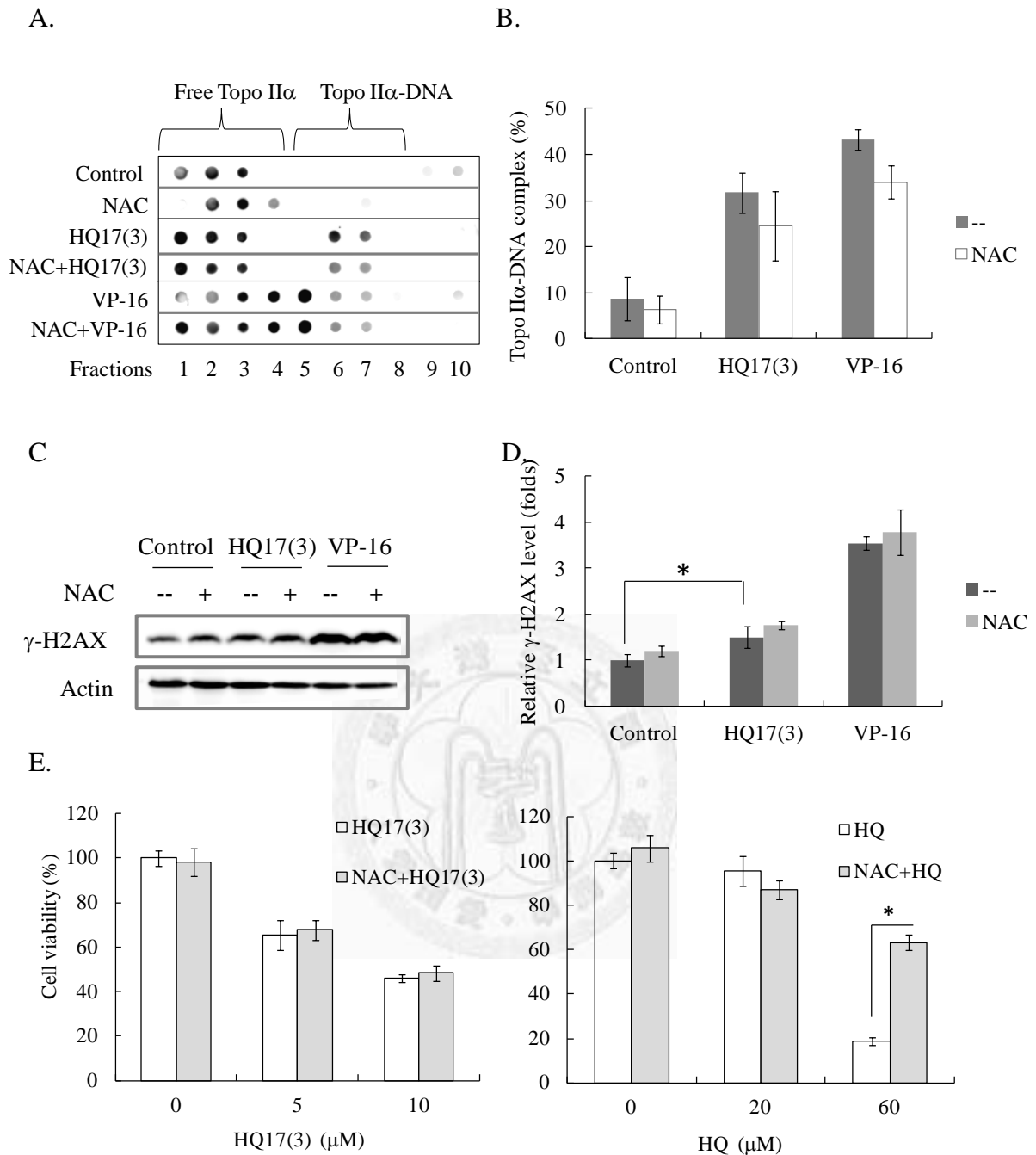


圖 十三、NAC 前處理並未防止 HQ17(3)造成的 Topo II poison 及細胞死亡

(A~D) 以 NAC (1 mM) 前處理 Huh7 細胞 3 小時，再加入 HQ17(3) 處理 90 分鐘。(A) 以 ICE 方法觀察細胞內 Topo IIα-DNA 複合體的累積。(B) 定量每一處理組別的 Topo IIα 並以柱狀圖呈現 Topo IIα-DNA 複合體量的變化。(C) 以西方墨點法分析 γ -H2AX 變化。(D) 定量每一處理組別的 γ -H2AX 並以柱狀圖呈現變化。(E) 以 NAC (1 mM) 前處理 Huh7 細胞 3 小時後，再加入 HQ17(3) 或是 HQ 處理 72 小時後，並分析細胞存活率。*代表 $p < 0.05$ 。

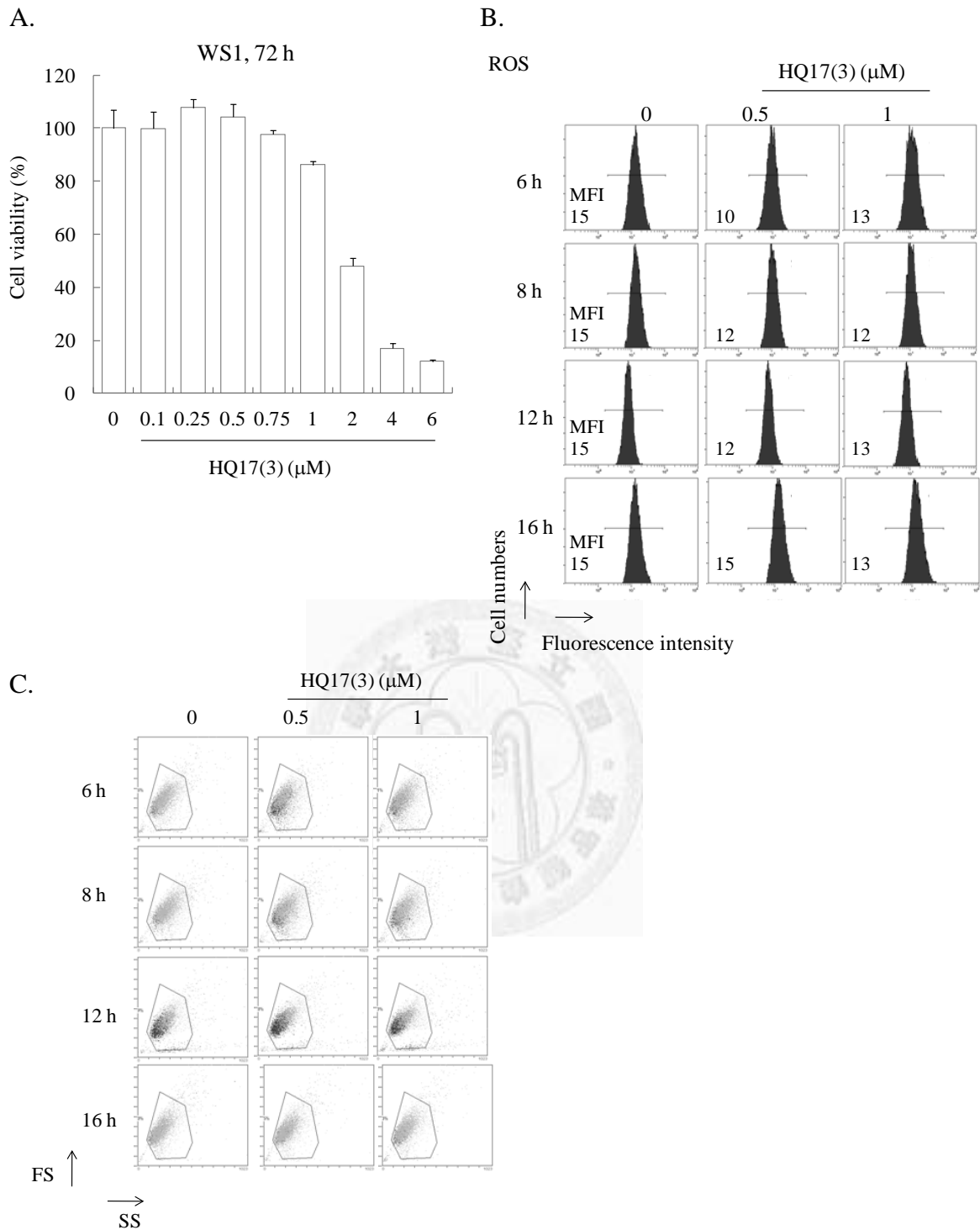


圖 十四、HQ17(3)對於 WS1 細胞的細胞活性影響

(A) 不同濃度的 HQ17(3)於 72 小時的處理影響細胞活性的程度不同。此實驗結果重複三次並於圖上標示 SD 值。(B) 以流式細胞儀觀察低濃度 HQ17(3)對 ROS (DCFDA 染色)造成的變化，以 MFI 表示。(C) 觀察細胞大小及顆粒性變化。* 代表 $p < 0.05$ 。

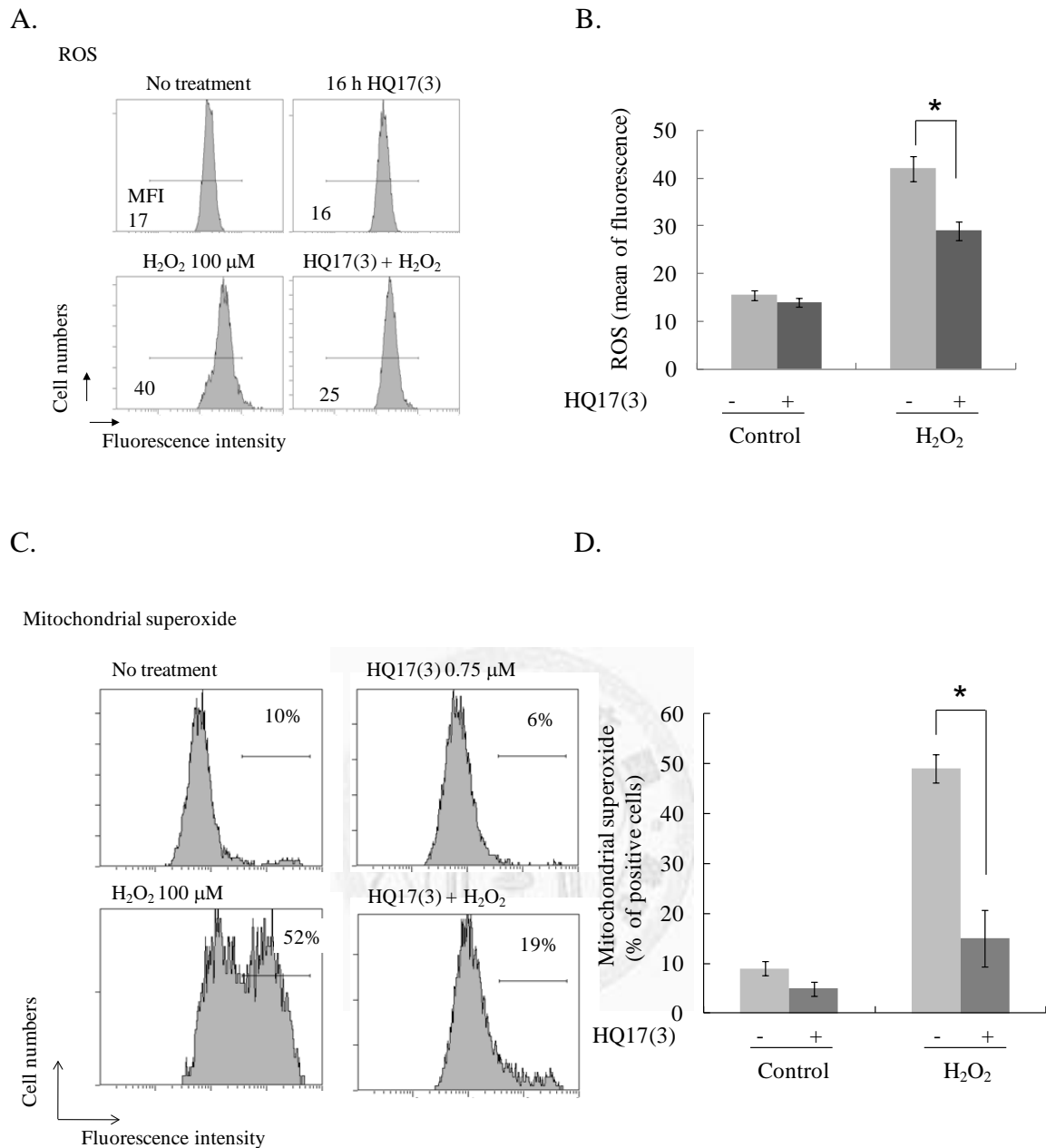
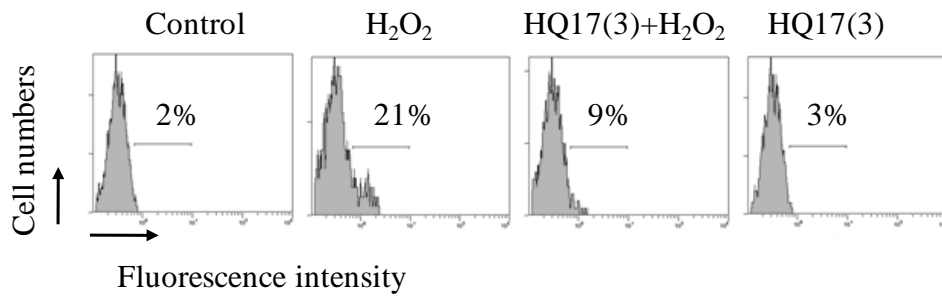


圖 十五、HQ17(3)的前處理降低 H₂O₂ 產生的自由基含量

細胞經 HQ17(3)前處理後 (0.5 μM, 16 小時), 再加入 H₂O₂ (6 小時處理)處理後以流式細胞儀觀察自由基含量變化。(A) 以 DCFDA 染劑觀察細胞自由基含量 (MFI)。(B) DCFDA 染劑觀察 HQ17(3)對於 H₂O₂ 處理所造成的自由基含量變化統計圖。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。(C) HQ17(3)的前處理降低 H₂O₂ 所引發粒線體超氧自由基 (mitochondrial superoxide, 以 MitoSOX 染色)的細胞比例, 以百分比表示。(D) 具多量粒線體超氧自由基的細胞比例變化統計圖。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。* 代表 $p < 0.05$ 。

A.

Lipid peroxidation



B.

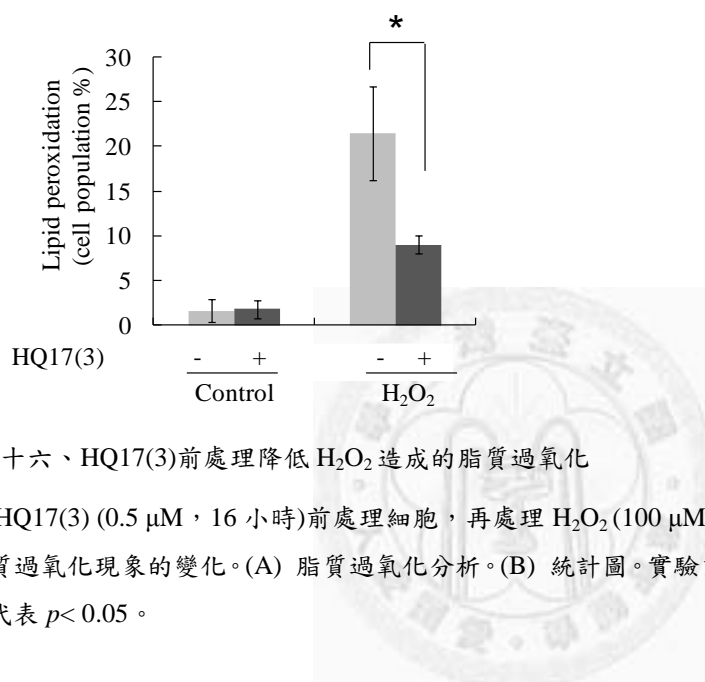
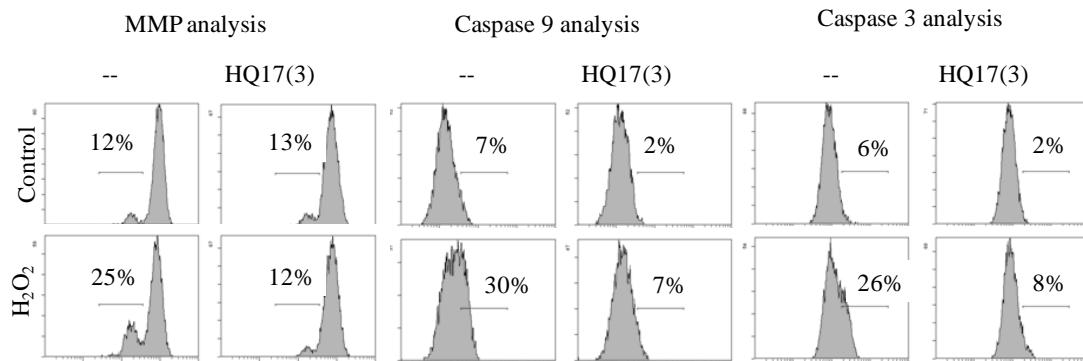


圖 十六、HQ17(3)前處理降低 H₂O₂ 造成的脂質過氧化

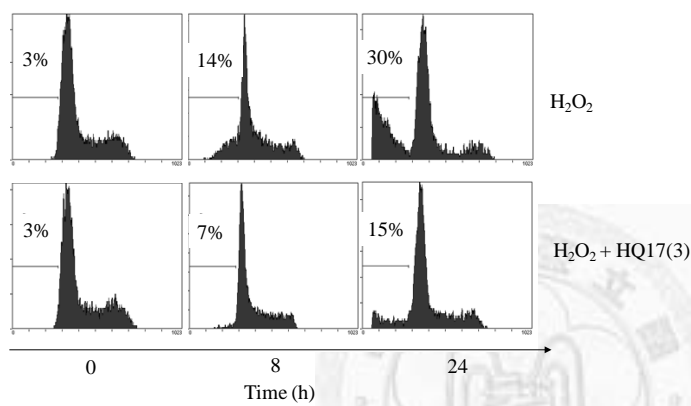
以 HQ17(3) (0.5 μM, 16 小時)前處理細胞, 再處理 H₂O₂ (100 μM) 8 小時後, 以流式細胞儀觀察脂質過氧化現象的變化。(A) 脂質過氧化分析。(B) 統計圖。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。

* 代表 $p < 0.05$ 。

A.



B.



C.

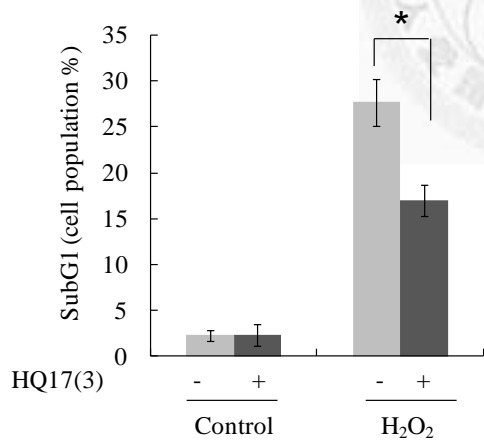
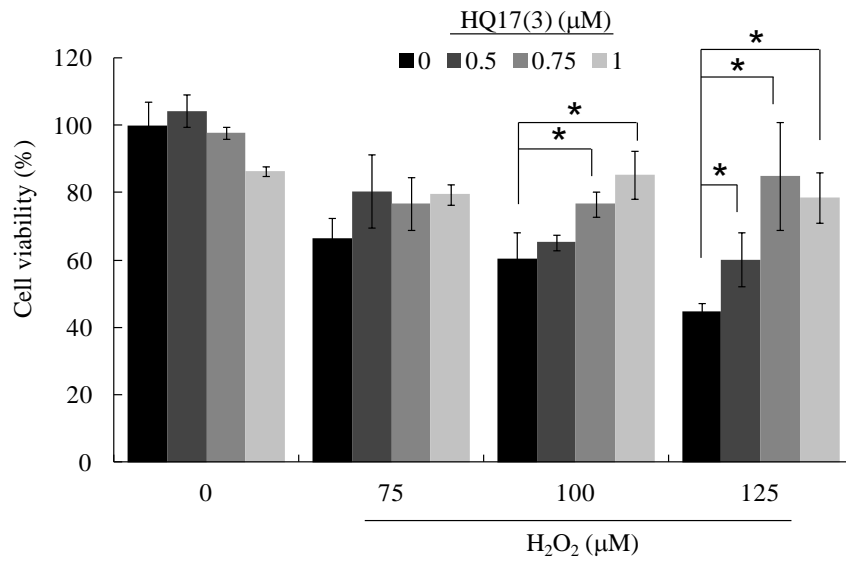


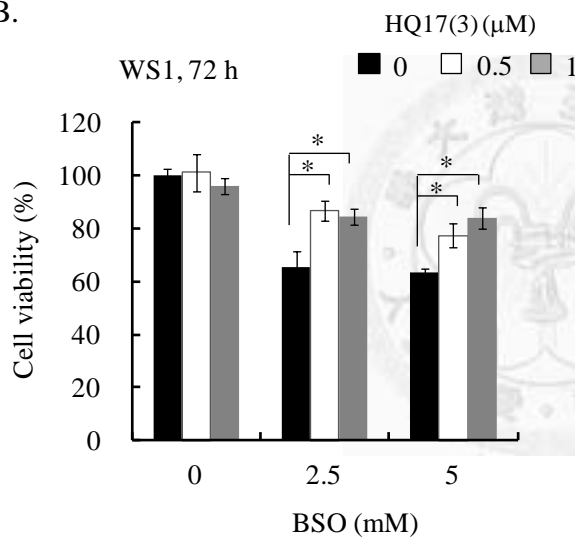
圖 十七、HQ17(3)前處理降低 H₂O₂ 造成的細胞凋亡

以 HQ17(3) (0.5 μM, 16 小時)前處理細胞，再處理 H₂O₂ (100 μM)不同時間後，以流式細胞儀觀察細胞凋亡指標的變化。(A) 處理 H₂O₂ 8 小時後觀察 MMP 下降，caspase 9 及 caspase 3 的活化情況。(B) 處理 H₂O₂ 8 小時及 24 小時後觀察具有 subG1 的細胞比例改變情形。(C) HQ17(3)降低 H₂O₂ 處理造成的 DNA 傷害 (24 小時)的統計圖。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。* 代表 p < 0.05。

A.



B.



C.

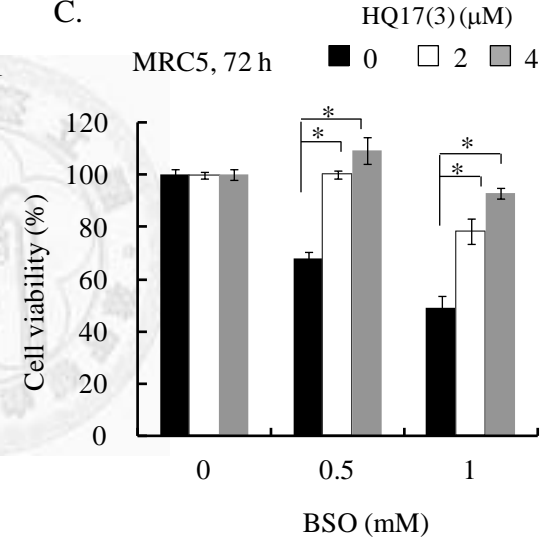


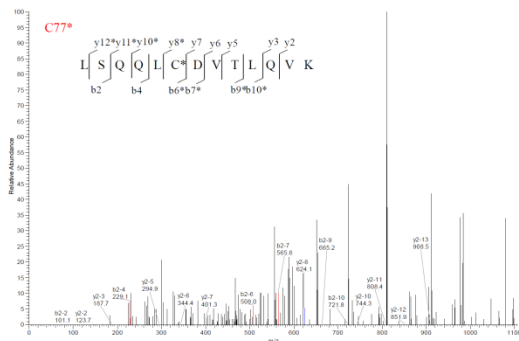
圖 十八、HQ17(3)提升因氧化性傷害而降低的細胞存活率

以不同濃度 HQ17(3) (16 小時)前處理細胞，再處理 H₂O₂ 或是 BSO 72 小時後，觀察細胞存活率的變化。(A-B) HQ17(3)的前處理降低 H₂O₂ 及 BSO 對 WS1 細胞毒性。(C) HQ17(3)降低 BSO 對於 MRC5 細胞毒性。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。* 代表 $p < 0.05$ 。

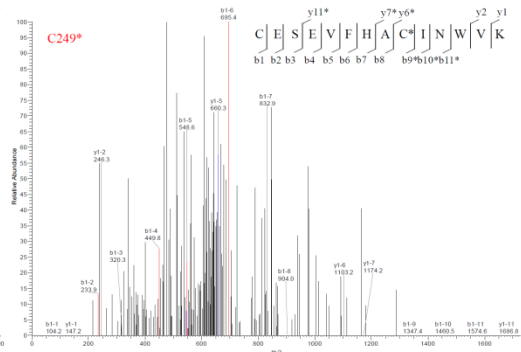
A.

MQDPRRPSGA GACCRFLPLQ SQCEGAGDA VMYASTECKA EVTPSQHGNGR TFSYTLIEDHT 60
 KQAFGIMNEL RLSQQLCDVT LQVKYQDAPA AQFMAHKVVL ASSSPVFKAM FTNGLREQGM 120
 EVVSIEGIHP KVMERLIEFA YTASISMGEK CVLHVMMNGAV MYQIDSVVRA CSDFLVQQLD 180
 PSNAIGIANF AEQIGCVELH QRAREYIYMH FGEVAKQEEF FNLSHCQLVT LISRDDLNVR 240
CESEVFHACI NWVKYDCEQR RFYVQALLRA VRCHSLTPNF LQMQLQKCEI LQSDSRCKDY 300
 LVKIFEELTL HKPTQVMPCR APKVGRLIYT AGGYFRQSL S YLEAYNPSDG TWLRLADLQV 360
 PRSGLAGCVV GGLLYAVGGR NNSPDGNTDS SALDCYNPMT NQWSPCAPMS VPRNRIGVGV 420
 IDGHIYAVGG SHGCIHNSV ERYEPERDEW HLVAPMLTRR IGVGVAVLNR LLYAVGGFDG 480
 TNRLNSAECY YPERNEWMI TAMNTIRSGA GVCVLHNCIY AAGGYDGDQD LNSVERYDVE 540
 TETWTFVAPM KHRRSALGIT VHQGRIYVLG GYDGHFTFLDS VECYDPD TDT WSEVTRMTSG 600
 RSGVGVAVTM EPCRKQIDQQ NCTC

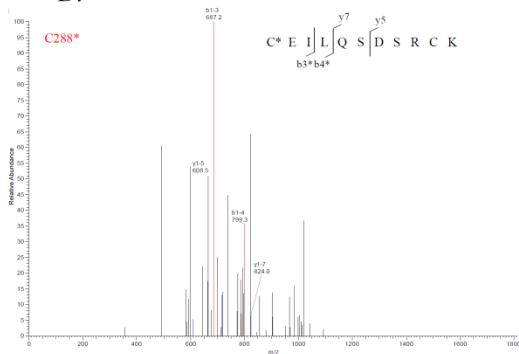
B.



C.



D.



E.

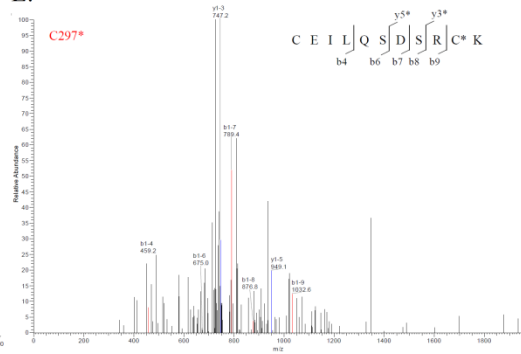
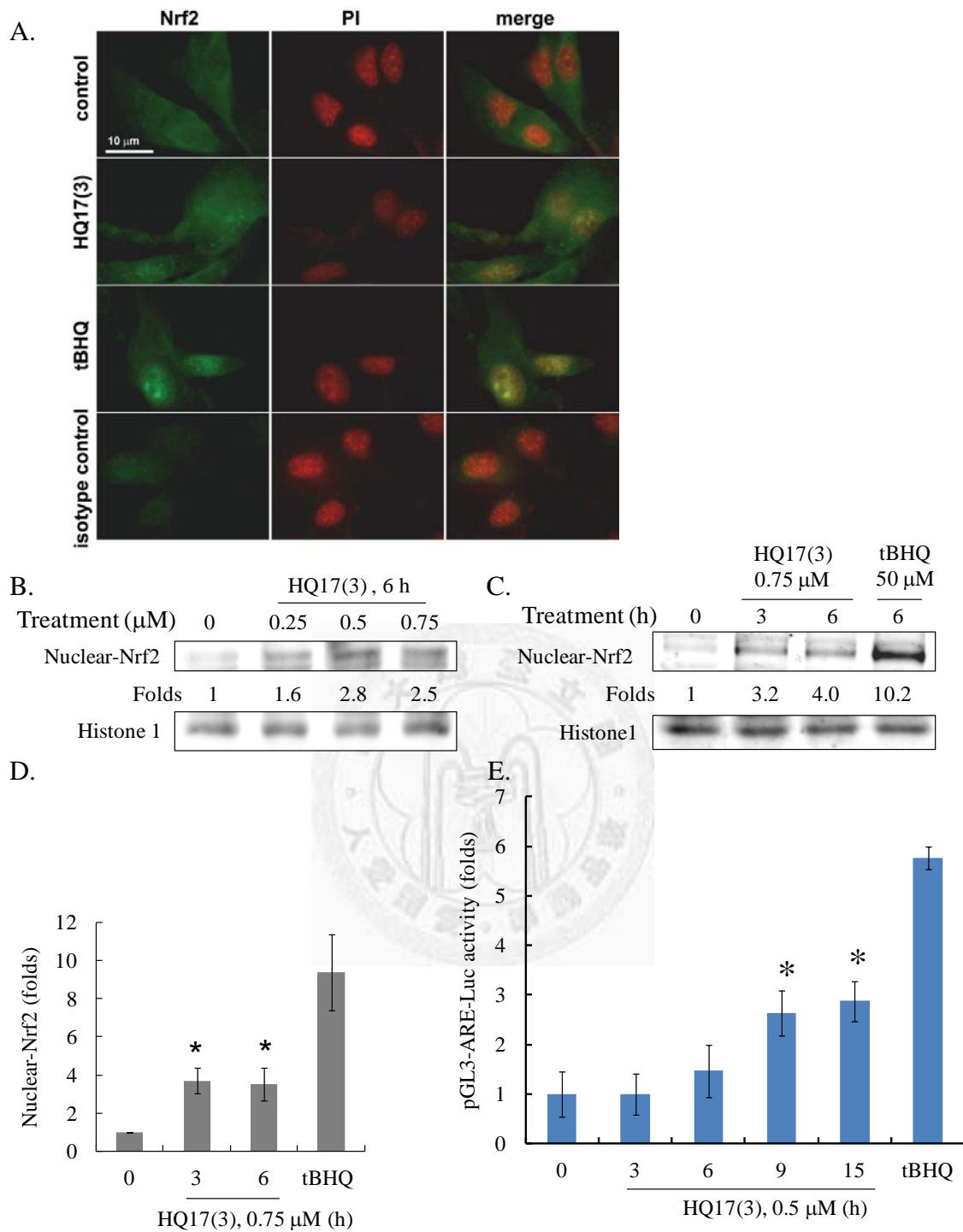


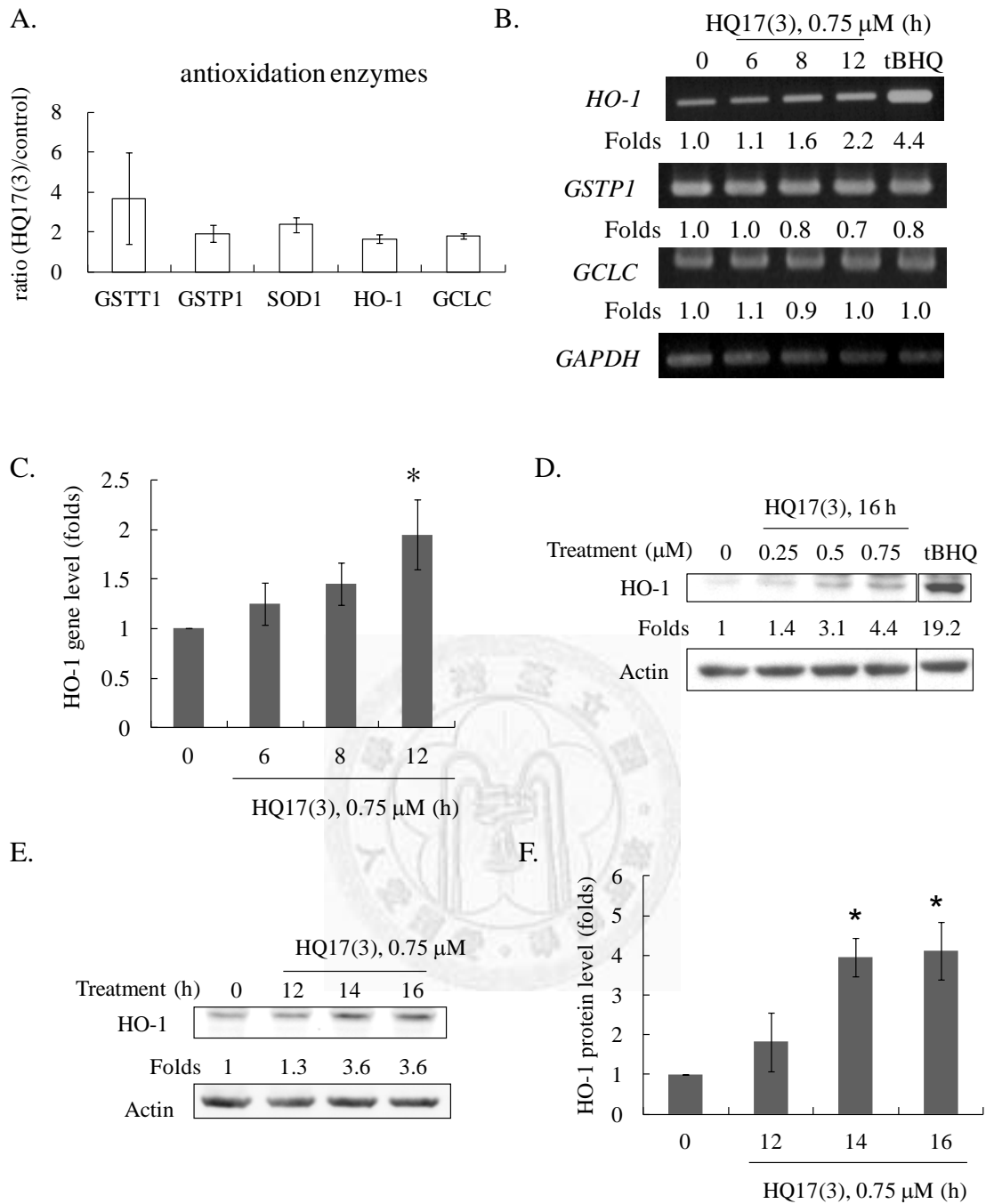
圖 十九、HQ17(3)與 WS1 細胞內 Keap1 蛋白質的半胱氨酸反應

以 1 μ M HQ17(3)處理 WS1 細胞 5 小時後，收取細胞質中的 Keap1 蛋白質並以質譜儀分析。(A) Keap1 蛋白序列，被偵測到的胜肽以灰色底標示，被偵測到的胜肽帶有半胱氨酸者以底線標示。(B~E) Cys-77、-249、-288 及-297 的 MS/MS 圖譜。* 為帶有 HQ17(3)修飾的片段。



圖二十、HQ17(3)促進 WS1 細胞中 Nrf2 轉錄因子活化

(A) 螢光染色觀察 HQ17(3) (0.5 μM , 6 小時)促進 Nrf2 進入細胞核的情形。綠色為 Nrf2；紅色為 PI 代表細胞核。tBHQ (50 μM , 6 小時)為陽性對照組。(B-D) 以西方墨點法發現細胞核中 Nrf2 蛋白質的含量變化，其隨著 HQ17(3)處理 (B)不同時間點及 (C)不同濃度而皆有上升。(D) 不同時間點實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。Histone 1 為內部對照組。(E) Nrf2 調控的冷光報導基因活性 (ARE-Luc activity)隨著 HQ17(3)處理不同時間點而上升。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。* 代表 $p < 0.05$ 。



圖二十一、HQ17(3)提升 HO-1 基因及蛋白質的表現

(A) 以微陣列基因表現晶片分析 HQ17(3)處理細胞 12 小時的 antioxidation 基因表現，挑選晶片中變化量大於 1.5 倍的基因。本實驗來自兩次獨立的實驗，將同一基因於兩次結果的 Ratio 加以平均並於圖上標示 SD 值。(B) 以 PCR 觀察各類 Nrf2 調控基因的表現變化。(C-F) 以不同濃度 HQ17(3)處理細胞不同時間，觀察 HO-1 基因及蛋白質的變化。(C) 不同時間處理的 HQ17(3)促進 HO-1 mRNA 表現的統計圖。以西方墨點法分析 (D)不同濃度 HQ17(3)處理及 (E)不同時間的 HQ17(3)處理的 HO-1 蛋白質變化。(F) 不同時間點的 HO-1 蛋白質變化統計圖。GAPDH 及 Actin 為內部對照組。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。

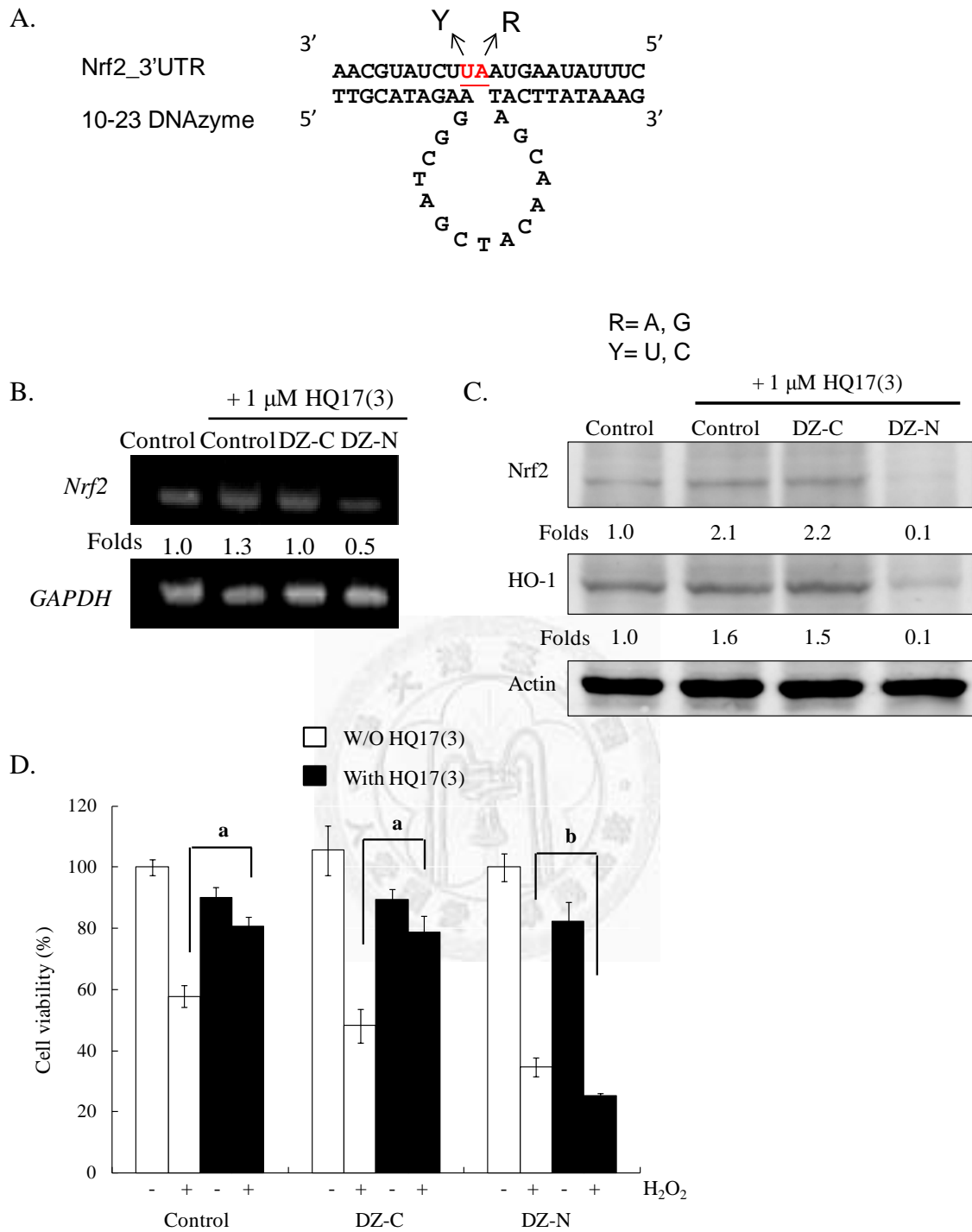
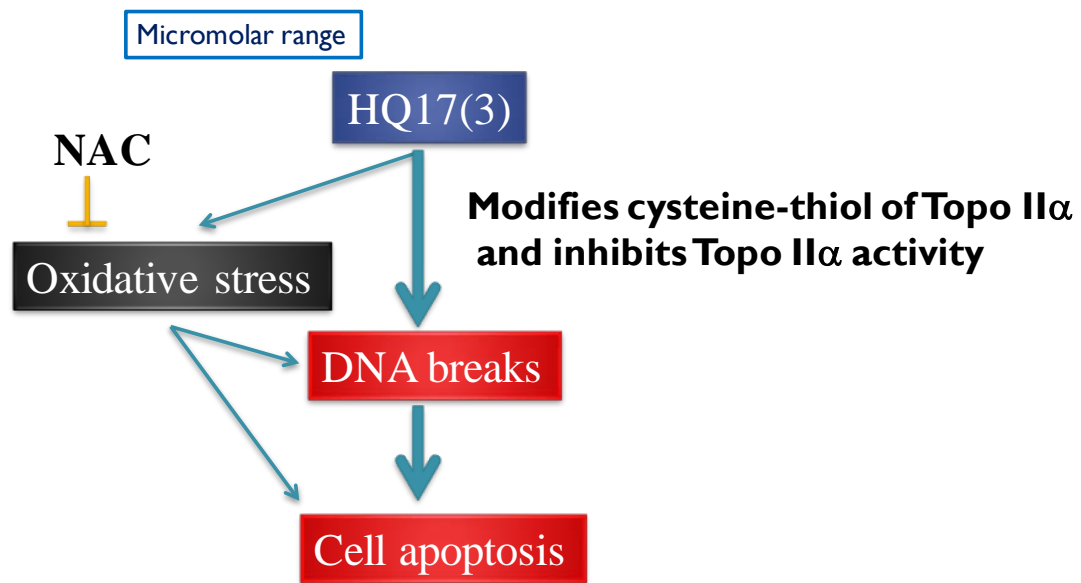


圖 二十二、HQ17(3)透過活化 Nrf2 分子而提供保護效果

將 DZ 轉染至 WS1 細胞中，觀察降低 Nrf2 後的細胞變化。(A) DZ 作用示意圖。RY 間的磷酸二酯鍵為被切斷點，R 為 purine；Y 為 pyrimidine。底線標示的 UA 則為 mRNA 被切斷點。(B~C) 轉染 48 小時後再處理 HQ17(3) 6 小時後觀察 (B) Nrf2 的基因表現量 (PCR 方法)及 (C) 觀察 Nrf2 及 HO-1 的蛋白質表現量的變化 (西方墨點法)。(D) 轉染 24 小時後再處理 HQ17(3) 16 小時之後再加入 H₂O₂ 的處理 (24 小時)，圖表示為細胞存活率分析。a 趨勢顯示前處理 HQ17(3) 具保護活性；b 趨勢則是顯示在 DZ-N 的情況下，HQ17(3) 的前處理不具保護效果。實驗重複三次並於圖上標示 SD 值。



圖二十三、HQ17(3)毒殺 Huh7 細胞機制圖

HQ17(3) 於高濃度下修飾 Topo II α 、引發 Topo II poison 而引起細胞凋亡機制示意圖，以粗線表示為主要路徑。HQ17(3)也造成細胞氧化壓力而造成細胞凋亡，以細線表示為次要路徑。



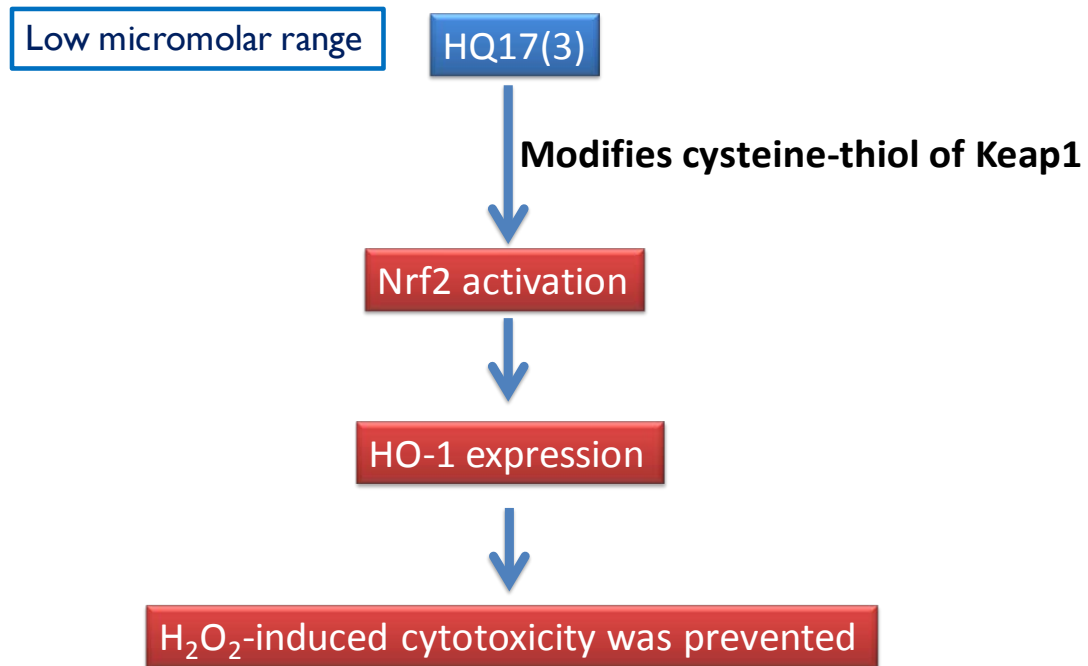


圖 二十四、HQ17(3)活化 Nrf2 及 HO-1 之機制示意圖

HQ17(3)於低濃度的處理活化 Nrf2 並促進 HO-1 蛋白質表現，因而保護細胞以抵抗氧化性傷害，其中活化 Nrf2 的機制為 HQ17(3)修飾 Keap1 並增加 Nrf2 蛋白質的穩定性。

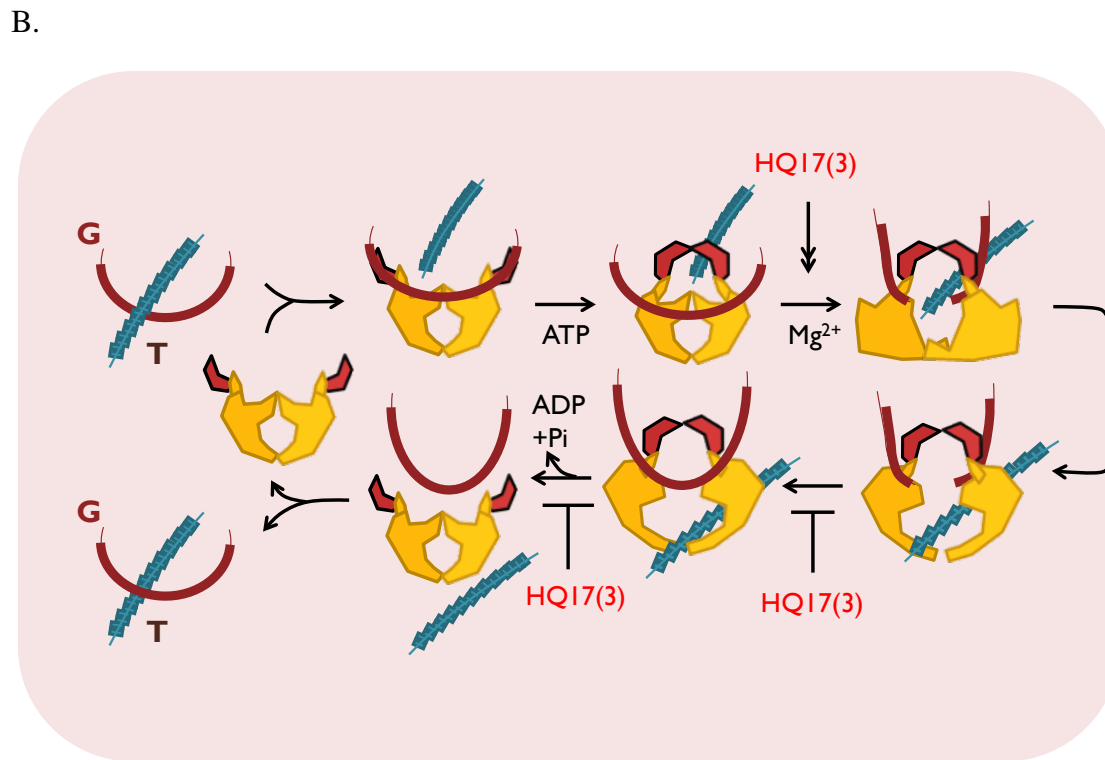
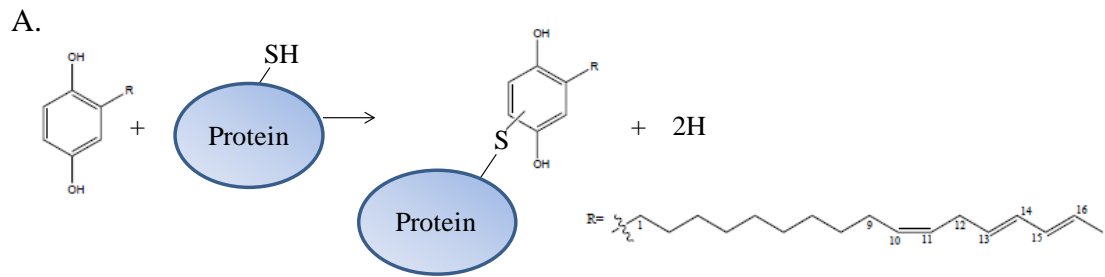
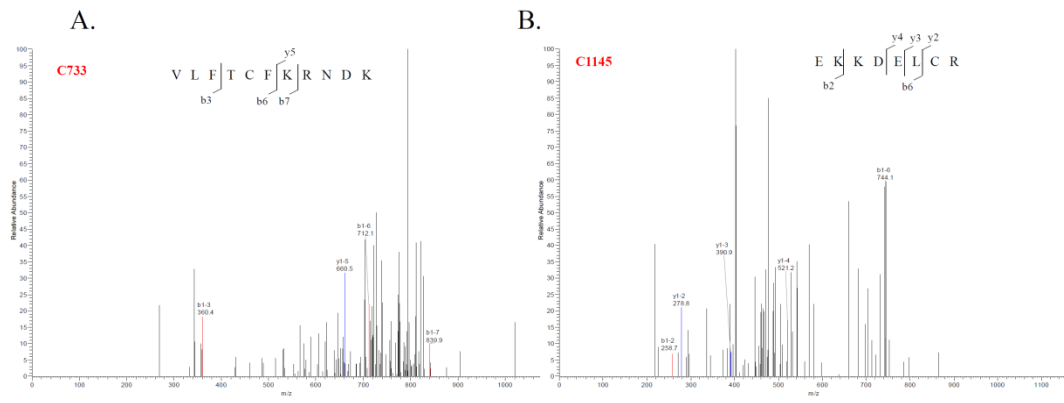


圖 二十五、HQ17(3) 做為 Topo II inhibitor 機制示意圖

(A) HQ17(3)與蛋白質上硫醇基作用機制圖。(B) HQ17(3)做為 Topo II inhibitor 示意圖。增加 Topo II-DNA 複合體的累積及 Topo II 導致的 DNA 斷裂、可能延遲 DNA religation 的活性，並影響 ATP 的水解。

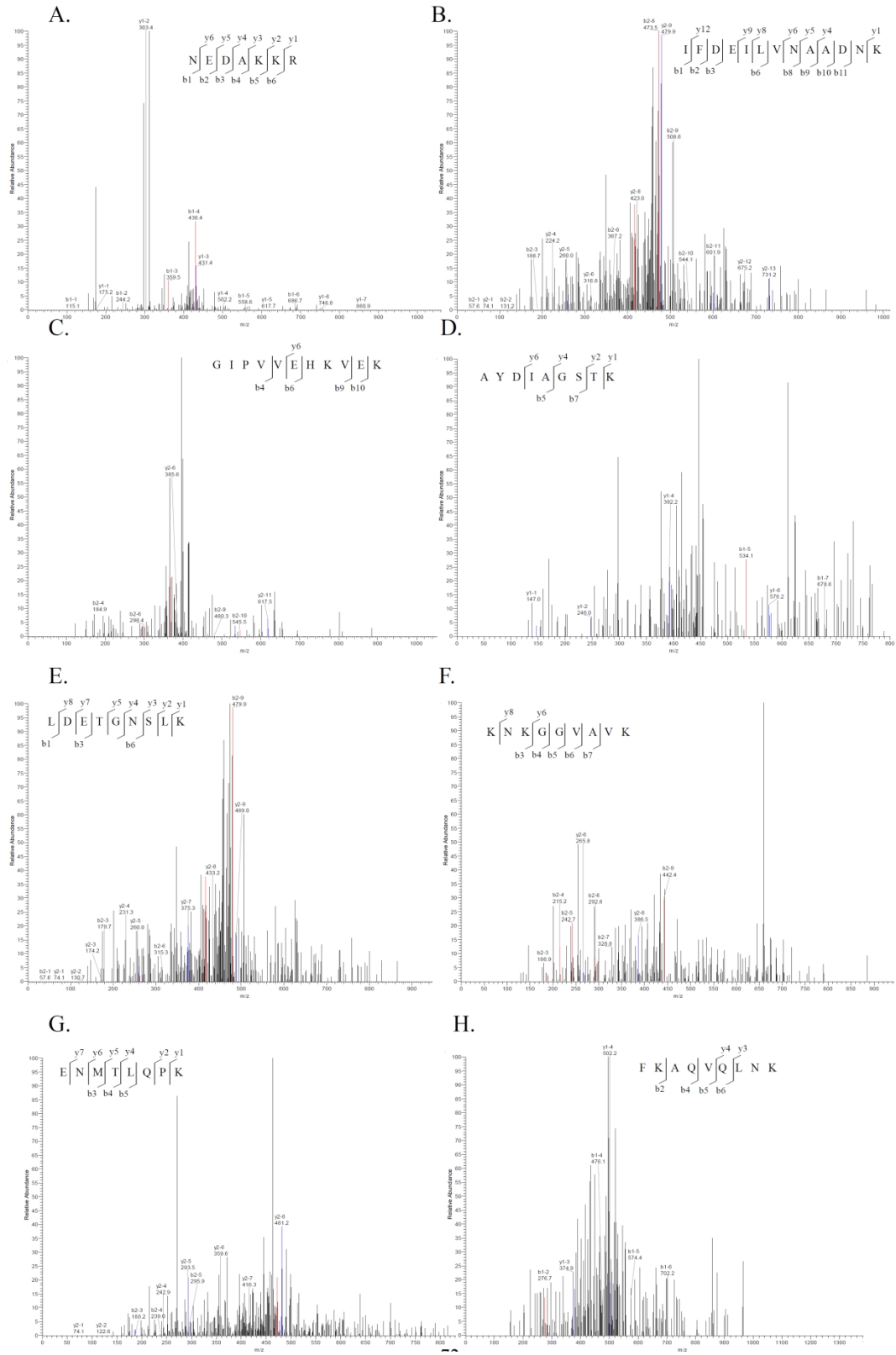
附表一、Primer 序列

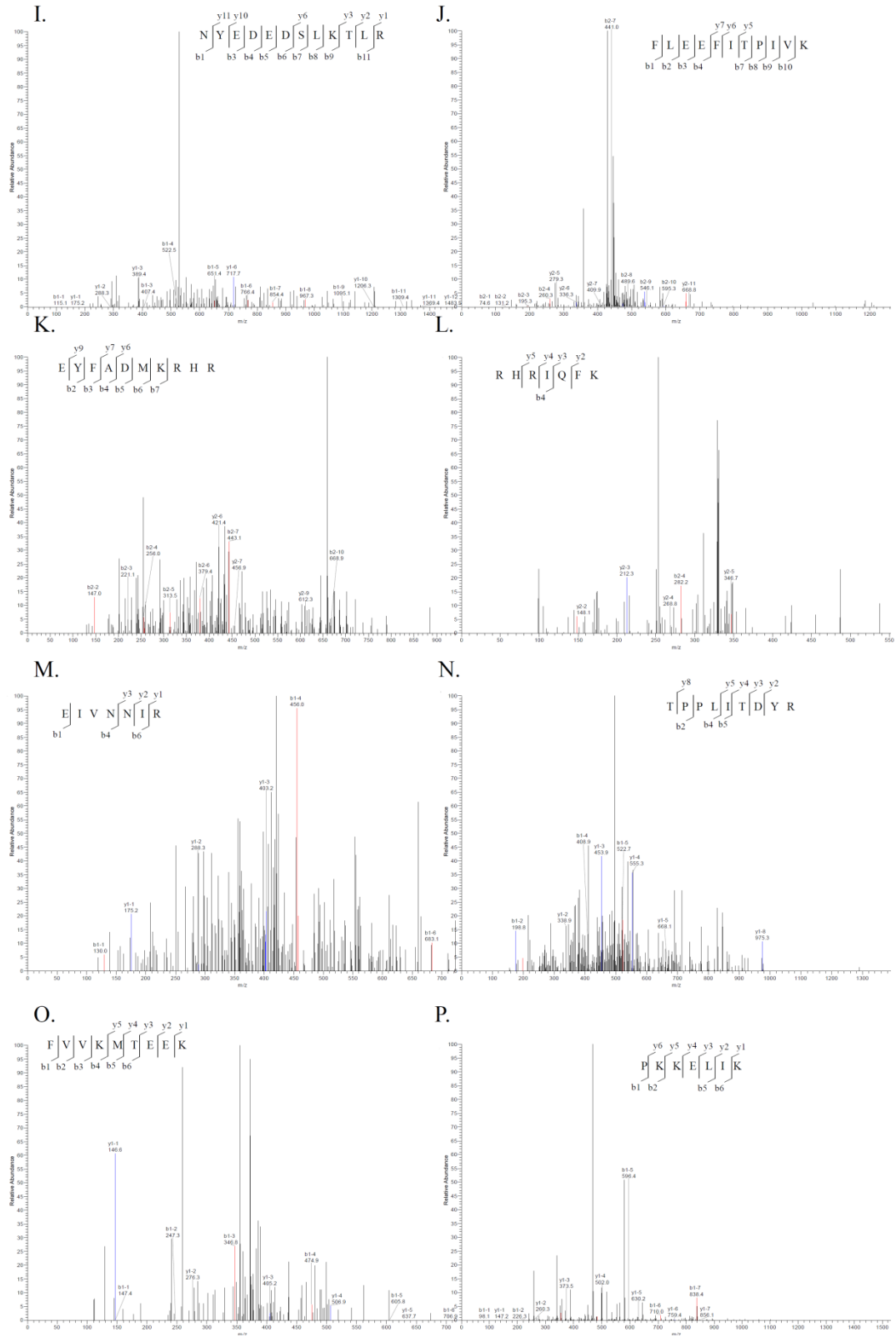
	基因名稱	5'-3'
qPCR	hsGADD45A-F	CAAGCTGCTCAACGTCGACCC
	hsGADD45A-R	GGTTGCTGACGCGCAGGATGT
	hsGADD45G-F	AGTCTTGAACGTGGACCCCGAC
	hsGADD45G-R	TCGCCACGCGCACTATGTC
	hsMDM2-F	TTTCGCAGCCAGGAGCACCG
	hsMDM2-R	TGCACATTTGCCTGCTCCTCACC
	hsREX1-F	CGGGCCCACGCCAAGTTTCA
	hsREX1-R	GCCCTGCGCCATCCCATTGT
	hsATR-F	GCTGGTCACCACCAGACAGCC
	hsATR-R	ACATCACCCCTTGGACCAGAGCCA
	hsDDIT3-F	ATGTTAAAGATGAGCGGGTGGCAGC
	hsDDIT3-R	TTGAACACTCTCTCCTCAGGTTCCA
	GADPH-F	GGCTCTCCAGAACATCATCC
	GADPH-R	GCTTCACCACCTTCTTGATG
PCR	hsHO-1-F	ACGGCTTCAAGCTGGTGATG
	hsHO-1-R	CAAAGAGCTGGATGTTGAGC
	hsNrf2-F	GCGACGGAAAGAGTATGAC
	hsNrf2-R	GTTGGCAGATCCACTGGTTT
	hsGCLC-F	CCAAACCATCCTACCCTTTG
	hsGCLC-R	CACCTGGAGACAGCAATTGC
	hsGSTP1-F	GTCTATTTCCCAGTTCGAGG
	hsGSTP1-R	CCTCATAGTTGGTGTAGATG
	GAPDH-F	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
	GAPDH-R	ACCACAGTCCATGCCATCAC

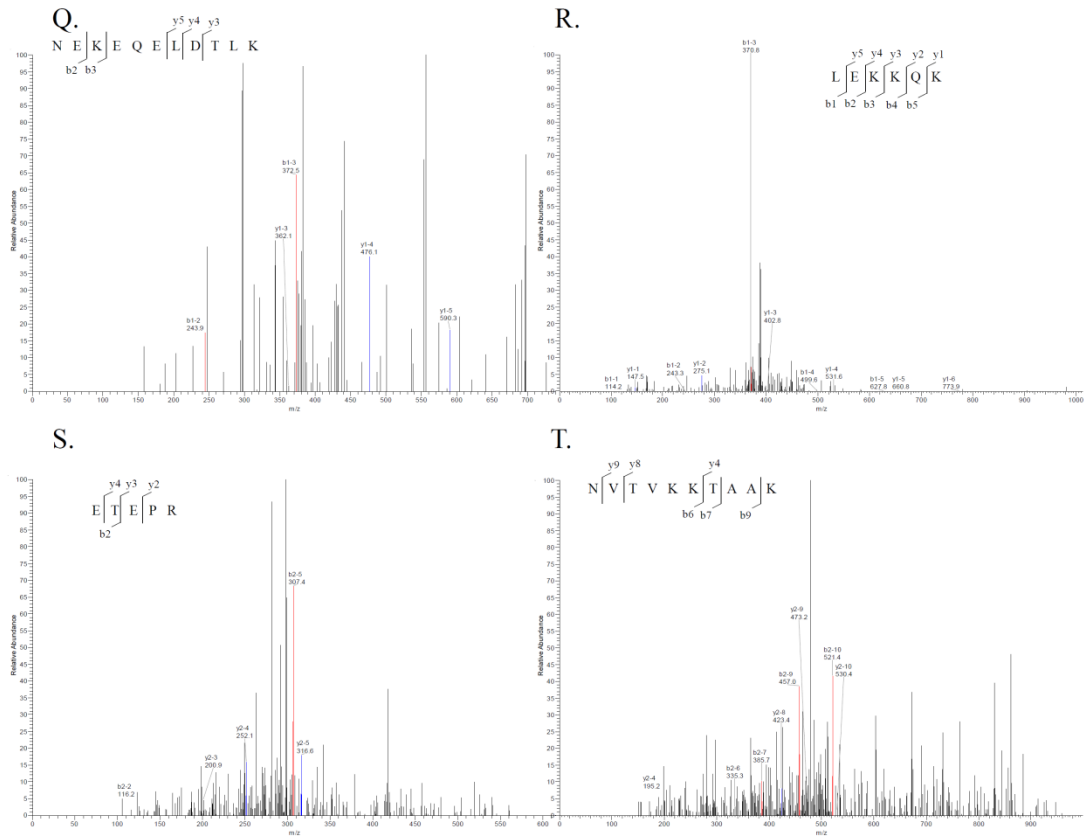


附圖一、被偵測到的 Huh7 中 Topo II α 帶有半胱氨酸的 tryptic 胜肽 MS/MS 質譜圖 (A~B) 為帶有 Cys-733 及-1145 的胜肽二次質譜圖。



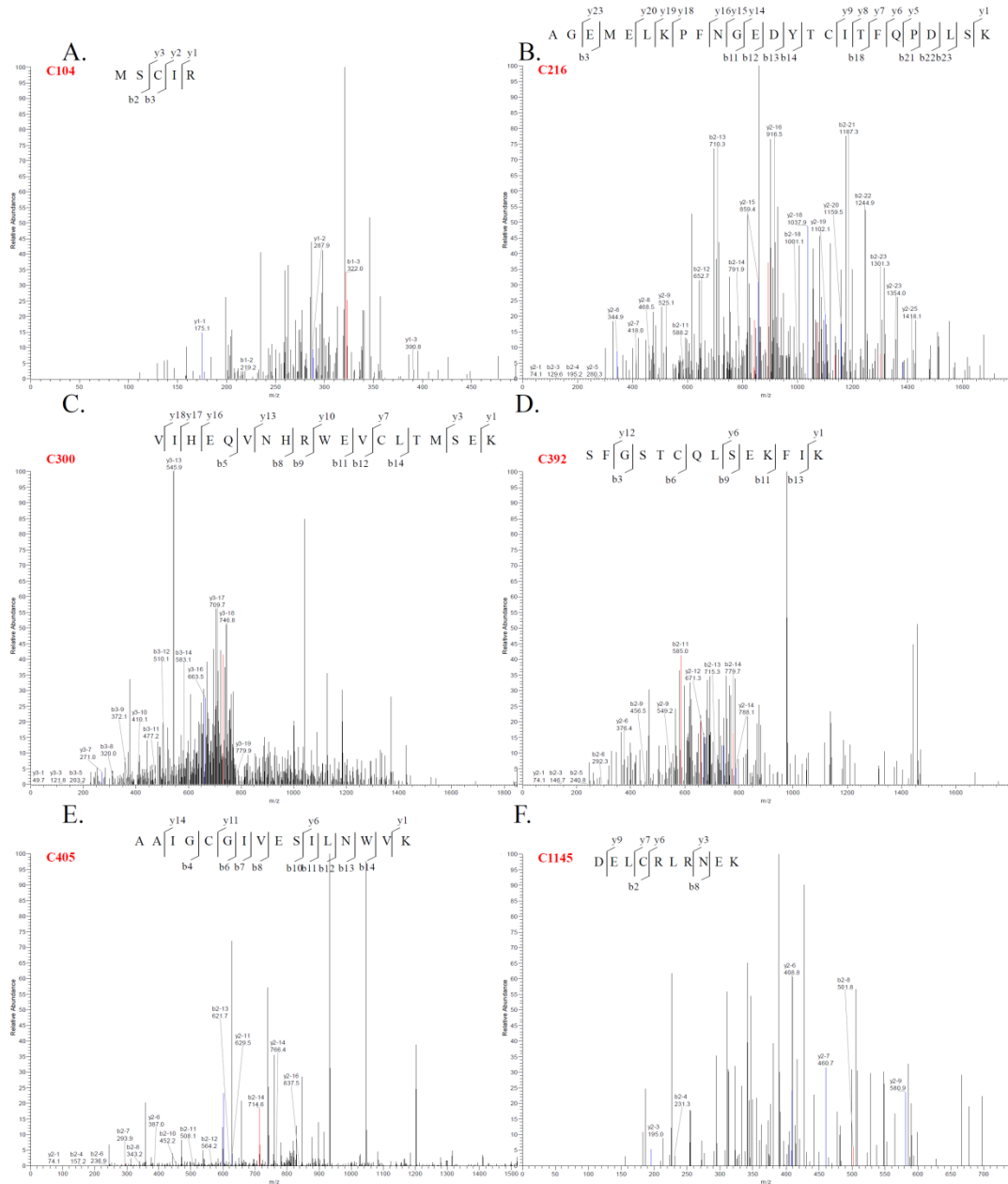






附圖二、被偵測到的 Huh7 cells 中 Topo II α 的 tryptic 胜肽 MS/MS 質譜圖



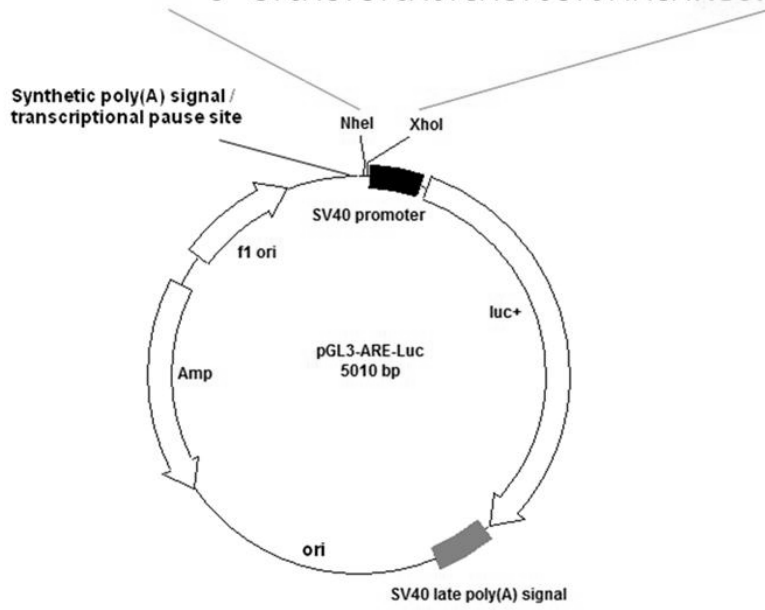


附圖三、被偵測到的 recombinant Topo II α 的 tryptic 胜肽 MS/MS 質譜圖

(A~F) 為帶有 Cys-104、-216、-300、-392、-405 及-1145 的胜肽二次質譜圖 MS/MS 質譜圖。

Inserted ARE sequences

5'- CTAG CAGTCACAGTGACTCAGCAGAATCT -3'
3'- GTCAGTGTCACTGAGTCGTCTTAGA **AGCT** -5'



附圖四、ARE-Luc vector 基因結構示意圖
底線為 ARE 序列，粗體為限制酶切位點。



六、參考文獻

- (1) Huang, C. P., Fang, W. H., Lin, L. I., Chiou, R. Y., Kan, L. S., Chi, N. H., Chen, Y. R., Lin, T. Y., and Lin, S. B. (2008) Anticancer activity of botanical alkyl hydroquinones attributed to topoisomerase II poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol.* 227, 331-338.
- (2) Ma, X. M., Lu, R., and Miyakoshi, T. (2012) Recent advances in research on lacquer allergy. *Allergol Int.* 61, 45-50.
- (3) Wu, P. L., Lin, S. B., Huang, C. P., and Chiou, R. Y. (2002) Antioxidative and cytotoxic compounds extracted from the sap of *Rhus succedanea*. *J Nat Prod.* 65, 1719-1721.
- (4) Liu, M. C., Lin, S. B., Chien, H. F., Wang, W. B., Yuan, Y. H., Hsueh, P. R., and Liaw, S. J. (2012) 10'(Z),13'(E)-Heptadecadienylhydroquinone Inhibits Swarming and Virulence Factors and Increases Polymyxin B Susceptibility in *Proteus mirabilis*. *PLoS One.* 7, e45563.
- (5) Chen, Y. R., Y-Y, R., Lin, T. Y., Huang, C. P., Tang, W. C., Chen, S. T., and Lin, S. B. (2009) Identification of an Alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an Inhibitor of Tyrosinase and Melanogenesis. *J Agric Food Chem.* 57, 2200-2205.
- (6) Harker, W. G., Slade, D. L., Parr, R. L., Feldhoff, P. W., Sullivan, D. M., and Holguin, M. H. (1995) Alterations in the topoisomerase II alpha gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II beta enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Res.* 55, 1707-1716.
- (7) Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., and McCord, J. M. (2011) Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med.* 32, 234-246.
- (8) Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell.* 120, 649-661.
- (9) Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H., and Berger, J. M. (2011) All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 827-841.
- (10) Tung, E. W., Philbrook, N. A., Macdonald, K. D., and Winn, L. M. (2012) DNA double-strand breaks and DNA recombination in benzene metabolite-induced genotoxicity. *Toxicol Sci.* 126, 569-577.
- (11) Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., and Marchand, C. (2010) DNA

- topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 17, 421-433.
- (12) Wang, J. C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 430-440.
 - (13) Long, B. H., Musial, S. T., and Brattain, M. G. (1985) Single- and double-strand DNA breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide. *Cancer Res.* 45, 3106-3112.
 - (14) Minocha, A., and Long, B. H. (1984) Inhibition of the DNA catenation activity of type II topoisomerase by VP16-213 and VM26. *Biochem Biophys Res Commun.* 122, 165-170.
 - (15) Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., and Liu, L. F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science.* 226, 466-468.
 - (16) Marshall, B., Darkin, S., and Ralph, R. K. (1983) Evidence that mAMSA induces topoisomerase action. *FEBS Lett.* 161, 75-78.
 - (17) Utsugi, T., Aoyagi, K., Asao, T., Okazaki, S., Aoyagi, Y., Sano, M., Wierzba, K., and Yamada, Y. (1997) Antitumor activity of a novel quinoline derivative, TAS-103, with inhibitory effects on topoisomerases I and II. *Jpn J Cancer Res.* 88, 992-1002.
 - (18) Robinson, M. J., Martin, B. A., Gootz, T. D., McGuirk, P. R., Moynihan, M., Sutcliffe, J. A., and Osheroff, N. (1991) Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J Biol Chem.* 266, 14585-14592.
 - (19) Leteurtre, F., Madalengoitia, J., Orr, A., Guzi, T. J., Lehnert, E., Macdonald, T., and Pommier, Y. (1992) Rational design and molecular effects of a new topoisomerase II inhibitor, azatoxin. *Cancer Res.* 52, 4478-4483.
 - (20) Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T., and Monden, Y. (1988) Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 157, 183-189.
 - (21) Drake, F. H., Hofmann, G. A., Mong, S. M., Bartus, J. O., Hertzberg, R. P., Johnson, R. K., Mattern, M. R., and Mirabelli, C. K. (1989) In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer Res.* 49, 2578-2583.
 - (22) Roca, J., Ishida, R., Berger, J. M., Andoh, T., and Wang, J. C. (1994) Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 1781-1785.

- (23) Frydman, B., Marton, L. J., Sun, J. S., Neder, K., Witiak, D. T., Liu, A. A., Wang, H. M., Mao, Y., Wu, H. Y., Sanders, M. M., and Liu, L. F. (1997) Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res.* 57, 620-627.
- (24) Wang, H., Mao, Y., Zhou, N., Hu, T., Hsieh, T. S., and Liu, L. F. (2001) Atp-bound topoisomerase ii as a target for antitumor drugs. *J Biol Chem.* 276, 15990-15995.
- (25) Wang, H., Mao, Y., Chen, A. Y., Zhou, N., LaVoie, E. J., and Liu, L. F. (2001) Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation. *Biochemistry.* 40, 3316-3323.
- (26) Lindsey, R. H., Jr., Bender, R. P., and Osheroff, N. (2005) Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. *Chem Res Toxicol.* 18, 761-770.
- (27) Lin, R. K., Zhou, N., Lyu, Y. L., Tsai, Y. C., Lu, C. H., Kerrigan, J., Chen, Y. T., Guan, Z., Hsieh, T. S., and Liu, L. F. (2011) Dietary isothiocyanate-induced apoptosis via thiol modification of DNA topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem.* 286, 33591-33600.
- (28) Bender, R. P., Ham, A. J., and Osheroff, N. (2007) Quinone-induced enhancement of DNA cleavage by human topoisomerase IIalpha: adduction of cysteine residues 392 and 405. *Biochemistry.* 46, 2856-2864.
- (29) Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 10, 886-895.
- (30) Subramanian, D., Furbee, C. S., and Muller, M. T. (2001) ICE bioassay. Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA. *Methods Mol Biol.* 95, 137-147.
- (31) Fornace, A. J., Jr., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J., and Holbrook, N. J. (1989) Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol.* 9, 4196-4203.
- (32) Zhang, W., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2001) Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45beta/alpha/gamma) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis. *Int J Oncol.* 18, 749-757.
- (33) Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26, 239-257.
- (34) Reed, J. C. (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery.

Trends Mol Med. 7, 314-319.

- (35) Reed, J. C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 157, 1415-1430.
- (36) Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 3, E255-263.
- (37) Hail, N., Jr., Cortes, M., Drake, E. N., and Spallholz, J. E. (2008) Cancer chemoprevention: a radical perspective. *Free Radic Biol Med.* 45, 97-110.
- (38) Rodrigo, R., Guichard, C., and Charles, R. (2007) Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol.* 21, 111-127.
- (39) Surh, Y. J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 3, 768-780.
- (40) Liby, K. T., Yore, M. M., and Sporn, M. B. (2007) Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer.* 7, 357-369.
- (41) Lee, J. H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F., and Kong, A. N. (2012) Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacol Ther.*
- (42) Konarkowska, B., Aitken, J. F., Kistler, J., Zhang, S., and Cooper, G. J. (2005) Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity. *FEBS J.* 272, 4949-4959.
- (43) Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 16, 123-140.
- (44) Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., and Alam, J. (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem.* 278, 2396-2402.
- (45) He, X., Chen, M. G., and Ma, Q. (2008) Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 21, 1375-1383.
- (46) Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2008) Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol.* 28, 2758-2770.
- (47) Kang, K. W., Lee, S. J., Park, J. W., and Kim, S. G. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 62, 1001-1010.
- (48) Sporn, M. B., and Liby, K. T. (2012) NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer.* 12, 564-571.

- (49) Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S., and Dinkova-Kostova, A. T. (2010) Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal.* 13, 1713-1748.
- (50) Baird, L., and Dinkova-Kostova, A. T. (2011) The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 85, 241-272.
- (51) Ryter, S. W., and Tyrrell, R. M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 28, 289-309.
- (52) Domitrovic, R., Skoda, M., Marchesi, V. V., Cvijanovic, O., Pugel, E. P., and Stefan, M. B. (2012) Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food Chem Toxicol.*
- (53) Li, H. Y., Zhong, Y. F., Wu, S. Y., and Shi, N. (2007) NF-E2 related factor 2 activation and heme oxygenase-1 induction by tert-butylhydroquinone protect against deltamethrin-mediated oxidative stress in PC12 cells. *Chem Res Toxicol.* 20, 1242-1251.
- (54) Egglar, A. L., Liu, G., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B., and Mesecar, A. D. (2005) Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 10070-10075.
- (55) Lundgren, D. H., Han, D. K., and Eng, J. K. (2005) Protein identification using TurboSEQUENT. *Curr Protoc Bioinformatics. Chapter 13*, Unit 13 13.
- (56) Liu, G., Egglar, A. L., Dietz, B. M., Mesecar, A. D., Bolton, J. L., Pezzuto, J. M., and van Breemen, R. B. (2005) Screening method for the discovery of potential cancer chemoprevention agents based on mass spectrometric detection of alkylated Keap1. *Anal Chem.* 77, 6407-6414.
- (57) Fortune, J. M., and Osheroff, N. (1998) Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage. *J Biol Chem.* 273, 17643-17650.
- (58) Ray Chaudhuri, A., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K. J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., and Lopes, M. (2012) Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol.* 19, 417-423.
- (59) Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Hasko, G., and Pacher, P. (2007) Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 358, 203-208.
- (60) Drummen, G. P., van Liebergen, L. C., Op den Kamp, J. A., and Post, J. A. (2002) C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of

- methodology. *Free Radic Biol Med.* 33, 473-490.
- (61) Chen, X. L., Varner, S. E., Rao, A. S., Grey, J. Y., Thomas, S., Cook, C. K., Wasserman, M. A., Medford, R. M., Jaiswal, A. K., and Kunsch, C. (2003) Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem.* 278, 703-711.
- (62) Yu, S. H., Wang, T. H., and Au, L. C. (2009) Specific repression of mutant K-RAS by 10-23 DNAzyme: sensitizing cancer cell to anti-cancer therapies. *Biochem Biophys Res Commun.* 378, 230-234.
- (63) Lin, T. Y., Huang, C. P., Au, L. C., Chang, Y. W., Hu, C. Y., and Lin, S. B. (2012) A Cysteine-Reactive Alkyl Hydroquinone Modifies Topoisomerase IIalpha, Enhances DNA Breakage, and Induces Apoptosis in Cancer Cells. *Chem Res Toxicol.*
- (64) Mi, L., Gan, N., Cheema, A., Dakshanamurthy, S., Wang, X., Yang, D. C., and Chung, F. L. (2009) Cancer preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular alpha- and beta-tubulins by proteasomes. *J Biol Chem.* 284, 17039-17051.
- (65) Tapia, E., Soto, V., Ortiz-Vega, K. M., Zarco-Marquez, G., Molina-Jijon, E., Cristobal-Garcia, M., Santamaria, J., Garcia-Nino, W. R., Correa, F., Zazueta, C., and Pedraza-Chaverri, J. (2012) Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2012, 269039.
- (66) Shinkai, Y., Sumi, D., Fukami, I., Ishii, T., and Kumagai, Y. (2006) Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Lett.* 580, 1771-1774.
- (67) Talalay, P., Fahey, J. W., Healy, Z. R., Wehage, S. L., Benedict, A. L., Min, C., and Dinkova-Kostova, A. T. (2007) Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 17500-17505.

藥品清單

3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide [DiOC6(3)] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Acetonitrile (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Acryamide/bis solution (40%, 29:1) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Agarose I (Amresco, Solon, OH, USA)

Ammonium persulfate (APS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Antibiotics (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)

Aprotinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

Bio-100 bp DNA ladder (NewEngland Biolabs, Beverly, MA, USA)

Bovine serum albumin (BSA) (Amresco, Solon, OH, USA)

BSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Caspase 3 assay kit PhiPhiLux®-G1D1 (OncoImmunin Inc., MD, USA)

Cesium chloride (CsCl) (Shelton Scientific Inc., Shelton, CT, USA)

Chloroform (Merck, Darmstasdt, Germany)

DCFDA (Molecular Probe, Eugene, OR, USA)

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA)

Ethanol (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Ethidium bromide (EtBr) (Amresco, Ohio, USA)

Ethyl acetate (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

Fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)

Glutathione (GSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Glycerol (Wako Pure Chemical, Japan)

GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)

HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)

Leupeptin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

L-glutamine (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)

Magnesium chloride (MgCl₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Methanol (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

MitoSOX™ RED (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Nitrocellulose membrane (PerkinElmer, Boston, MA, USA)

N-Lauroylsarcosine sodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Non-essential amino acid (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

p-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Potassium chloride (KCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Propidium Iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Protein ladder (Fermentas International Inc., CA, USA)

Rf-1p plasmid DNA (台大醫技所方偉宏老師實驗室提供)

RNase A (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany)

RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Germany)

SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Sodium acetate (CH₃COONa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Sodium bicarbonate (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Sodium chloride (NaCl) (Riedel-de Haën, Seelze, Germany)

Sodium fluoride (NaF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Sodium hydroxide (NaOH) (Wako Pure Chemical, Japan)

Sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

SYBR green master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)

TEMED (Amresco, Solon, OH, USA)

Topoisomerase recombinant protein (台大生化暨分生所詹迺立老師實驗室提供)

Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

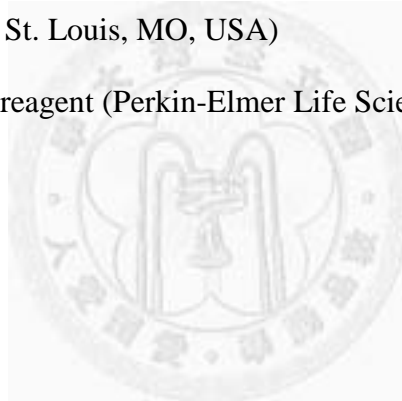
Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Trypan blue (Biological industries, Kibbutz Beit Haemek, Isarel)

Trypsin/EDTA (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Western blotting detection reagent (Perkin-Elmer Life Science, Inc., Waltham, MA)



A Cysteine-Reactive Alkyl Hydroquinone Modifies Topoisomerase II α , Enhances DNA Breakage, and Induces Apoptosis in Cancer Cells

Ting-Yu Lin,[†] Cheng-Po Huang,[‡] Lo-Chun Au,[§] Ya-Wen Chang,^{†,||} Chung-Yi Hu,^{†,||} and Shwu-Bin Lin^{*,†,‡}

[†]Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China

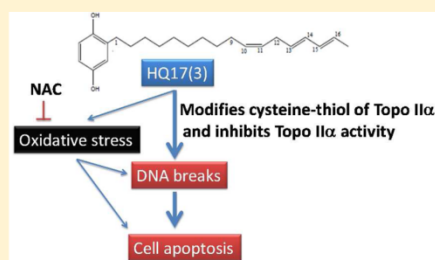
[‡]Double Crane Biotechnology Company, The Lingzhi Biomedical Institute, New Taipei City, Taiwan, Republic of China

[§]Department of Medical Research and Education, Taipei Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan, Republic of China

^{||}Department of Laboratory Medicine, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, Republic of China

Supporting Information

ABSTRACT: We previously reported that the anticancer activity of a botanical compound 10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone [HQ17(3)] was attributed to topoisomerase (Topo) II α poisoning and the induction of oxidative damage. HQ17(3) irreversibly inhibits Topo II α activity in vitro and is more cytotoxic in leukemia HL-60 cells than in Topo II α -deficient variant HL-60/MX2 cells, which suggests that Topo II α is a cellular target of HQ17(3). This study further characterizes the molecular mechanisms of the anticancer activity of HQ17(3). Proteomic analyses indicated that HQ17(3) reacted with Cys-427, Cys-733, and Cys-997 of recombinant Topo II α in vitro, whereas it reacted with Cys-427 of cellular Topo II α in Huh7 hepatoma cells. The modification of HQ17(3) inhibited Topo II α catalytic activity, increased the Topo II α -DNA cleavage complex, and caused the accumulation of DNA breakage. In Huh7 cells, HQ17(3) treatment caused prompt inhibition of DNA synthesis and consequently induced the expression of DNA damage-related genes *DDIT3*, *GADD45A*, and *GADD45G*. Topo II α inhibition, apoptosis, and oxidative stress were found to account for cytotoxicity caused by HQ17(3). Pretreatment of Huh7 cells with *N*-acetylcysteine (NAC) partially attenuated mitochondrial membrane damage, DNA breakage, and caspase activation. However, NAC pretreatment did not diminish HQ17(3)-induced cell death. These results suggest that the anticancer activity of HQ17(3) is attributed significantly to Topo II α poisoning. The structural feature of HQ17(3) can be used as a model for the design of Topo II α inhibitors and anticancer drugs.



INTRODUCTION

Alkyl hydroquinone, 10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone [HQ17(3)], isolated from the sap of the lacquer tree *Rhus succedanea* L., is a potential anticancer compound.^{1,2} Structurally, HQ17(3) is composed of a hydroquinone ring and a C17 unsaturated alkyl chain with three double bonds; therefore, HQ17(3) possesses bioactivities similar to those of hydroquinone, which, in addition to exerting oxidative toxicity, is a topoisomerase (Topo) II poison.^{1,3}

DNA topoisomerases are a class of nuclear enzymes required for chromosome replication, transcription, and recombination, as well as for DNA repair. This class of enzymes is essential for living cells because it relaxes the supercoil structure of chromatin, allowing DNA to replicate and be transcribed. Topo II catalyzes the relaxation of supercoiled DNA by sequentially mediating the breakage, passing, and religation of DNA strands. During catalysis, Topo II cleaves and covalently binds to DNA gate strands (G strands), thereby forming the enzyme–DNA complex, which then hydrolyzes the ATP to mediate the passing of transported strands (T strands) through

the gate, resulting in the relaxation of superhelicity. The T strands are then released, and the broken ends of the G strands are religated to complete a catalytic cycle.⁴ This delicate process requires the participation of the ATP and may result in DNA strand breaks if the religation process is inhibited. Topo II inhibitors are clinically significant anticancer drugs and are categorized into two classes: catalytic inhibitors and Topo II poisons. Catalytic inhibitors of Topo II decrease enzyme activity, whereas Topo II poisons stabilize the DNA cleavage complexes and cause DNA double-strand breaks. For example, VP-16 is a reversible Topo II poison that binds the broken ends of DNA and impedes religation.⁵ Other Topo II poisons may act differently from VP-16, such as hydroquinone, which causes the accumulation of DNA strand breaks by reacting covalently with Topo II cysteine thiols and blocking the religation of G strands.^{5,6} The efficacy of the drug in inducing Topo II-mediated DNA cleavage in cells can be measured by isolating in

Received: May 20, 2012

Published: October 22, 2012

vivo complexes of the enzyme to DNA (ICE bioassay).⁷ Furthermore, the Topo II-mediated DNA double-strand breakage can be detected by monitoring the presence of a phosphorylated form of H2AX (γ -H2AX), which is a member of the histone protein H2A family.⁸

Our previous *in vitro* study demonstrated HQ17(3) to be an irreversible Topo II α poison, based on its ability to increase Topo II α -DNA complexes and directly impair Topo II α activity. In cellular systems, HQ17(3) is more cytotoxic in HL-60 cells than in Topo II α -deficient variant HL-60/MX2 cells, and its cytotoxicity in HL-60 cells results from both Topo II α poisoning and oxidative stress.¹ In this study, the molecular mechanism of the anticancer activity of HQ17(3) was further investigated. Whether HQ17(3) covalently reacts with Topo II α and causes the accumulation of DNA strand breakage was investigated through an *in vitro* study using the recombinant Topo II α , as well as in cellular systems by ICE bioassay and the detection of γ -H2AX in cancer cell lines. The cytotoxic mechanism of this potential anticancer compound was elaborated in a human hepatoma cell line, Huh7.

MATERIALS AND METHODS

Materials. The purification steps for HQ17(3) are the same as those described in our previous study.⁹ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with L-glutamine and 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNPP) and RPMI-1640 medium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gibco (Grand Island, NY). Antibiotics, trypsin/EDTA, and nonessential amino acids were purchased from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). The Annexin V-FITC apoptosis kit was purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA). Propidium iodide (PI) and DiOC6(3) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR), and RNase A was obtained from Macherey-Nagel GmbH (Düren, Germany). CaspaLux9-M₂D₂ and PhiPhiLuxG₁D₂, the substrates for caspase-9 and caspase-3, respectively, were purchased from OncoImmunin Inc. (Gaithersburg, MD). Caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK, IMI-2312) and pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK, IMI-2310) were purchased from Imgenex (San Diego, CA). The antibody against PARP (9541P) was obtained from Cell Signaling (Beverly, MA), whereas actin antibody (MAB1501) was supplied by Chemicon (Billerica, MA). Anti-Topo II α antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), whereas anti- γ -H2AX (05-636) was purchased from Millipore (Billerica, MA). The Pierce Micro BCA protein assay reagent kit was purchased from Thermo Scientific (Rockford, IL), and a chemiluminescent reagent was obtained from Perkin-Elmer Life Science, Inc. (Waltham, MA). MitoSox, TRIzol and SuperScript III reverse transcriptase were purchased from Invitrogen (Camarillo, CA), and RNasin was purchased from Promega (Madison, WI). SYBR green master was purchased from Roche (Indianapolis, IN). The Topo II α recombinant protein was a gift from Dr. Nei-Li Chan, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, National Taiwan University.

Cell Culture. Huh7, a well-differentiated hepatocyte-derived cellular carcinoma cell line established from the liver tumor cells of a 57 year old Japanese man,¹⁰ was cultured in DMEM. Human leukemia cell lines HL-60 and HL-60/MX2 were cultured in RPMI. The cultural media were supplemented with 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM nonessential amino acids, 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 250 ng/mL amphotericin in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. To study the influences of N-acetylcysteine (NAC), the cells were pretreated with NAC (1 mM) for 3 h and then treated with HQ17(3). For the caspase inhibitor treatment, cells were pretreated with caspase-3 inhibitor or pan-caspase inhibitor (which inhibits caspase-1, -3, -6, -8, and -9) at 4 μ M for 3 h and then treated with HQ17(3).

Reaction of HQ17(3) with Protein-Cysteine and HPLC-MS/MS Analysis. Huh7 cells (10⁶ cells in a 10 cm dish) were treated with

10 μ M HQ17(3) for 5 h. A nuclear protein extract was prepared by suspending the cells in a hypotonic buffer [10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.3 μ g/mL leupeptin, and 0.1 mM PMSF] with 0.3% NP-40 and centrifuged at 800g for 5 min. The pellet was resuspended in a hypertonic buffer [50 mM HEPES (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 0.3 μ g/mL leupeptin, and 0.1 mM PMSF] and centrifuged at 12000g for 10 min. The supernatant as nuclear protein extract was resolved by SDS-PAGE in 6% gel, followed by Coomassie blue staining. Gel bands (5 mm in width) close to 170 kDa (molecular mass of Topo II α) were excised and subjected to trypsin digestion. *In vitro* reaction of the recombinant Topo II α (0.5 μ M) with HQ17(3) (20 μ M) was achieved in 10 μ L of Topo II α reaction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 15 μ g/mL BSA, and 1 mM ATP] at 37 °C for 20 min. Then, trypsin (2 μ g) was added to the reaction mixture, which was incubated at 37 °C for another 16 h. The tryptic peptides were analyzed by HPLC-MS/MS, using a Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer, equipped with a Surveyor HPLC system (Thermo, San Jose, CA) using Micro-Tech Scientific protein-15-C18W-300 reversed phase HPLC column (5 μ m, 150 mm \times 300 μ m, 300 Å, Micro-Tech Scientific, San Diego, CA). HPLC was eluted by a solvent system consisting of a linear gradient of solvent B from 5 to 95% for 180 min and then 95% solvent B for 40 min (solvent A: 99.9:0.1, water/formic acid; and solvent B: 99.9:0.1, acetonitrile/formic acid, v/v). LCQ mass spectrometry was operated in a data-dependent MS/MS mode, wherein the most abundant peptide ion in each mass spectrum was selected for collision-induced dissociation using a normalized collision energy of 35%. The MS data were processed by Thermo BioWorks 3.1 and TurboSEQUENT. The modification sites were identified through automated data processing and further evaluated by manual inspection of the tandem mass spectra.

DNA Strand Breakage Formation in Vitro Assay. DNA cleavage reactions were achieved based on the procedure reported by Fortune and Osheroff.¹¹ The assay mixtures contained 340 nM Topo II α , 10 nM RF-*f*1p supercoiled DNA, 0–100 μ M HQ17(3), or 200 μ M VP-16 in 20 μ L of DNA cleavage buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, and 0.1 mM EDTA). The mixtures were incubated for 6 min at 37 °C, after which 2 μ L of 5% SDS and 1 μ L of 250 mM EDTA (pH 8.0) were added. Proteinase K was then added (4 μ L of 10 mg/mL solution) to the reaction mixtures, which were further incubated for 60 min at 37 °C to digest Topo II α . Finally, the samples were mixed with DNA loading dye and subjected to electrophoresis in 1% agarose gels containing 0.7 μ g/mL EtBr (0.5 \times TPE). DNA cleavage was monitored by the conversion of supercoiled DNA to linear DNA. DNA bands were visualized by ultraviolet (UV) light and photographed and quantified using ImageJ software (NIH, ver. 1.42).

Immunodetection of in Vivo Complexes of Enzyme to DNA (ICE Bioassay). Cesium chloride gradient ultracentrifugation was used to isolate DNA-Topo II α complexes.¹² Huh7 cells (10⁷ cells in a 10 cm dish) were treated with HQ17(3), or VP-16, for 90 min and then lysed in 1% sarkosyl in TE buffer. The lysate was overlaid on top of the CsCl gradient in a polyallomer tube (14 mm \times 89 mm, for an SW41 bucket, Beckman Coulter). The tube was centrifuged at 125000g at 20 °C for 20 h. The gradients were fractionated (1 mL/fraction) by collecting from the top of the tubes. An aliquot (50 μ L) of each fraction was mixed with an equal volume of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) and then applied to a nitrocellulose membrane (prewetted with sodium phosphate buffer) under vacuum aspiration. The membranes were blocked with 5% (v/v) skim milk in PBS containing 0.1% (v/v) Tween-20 buffer (PBST) and then incubated with anti-Topo II α antibody (1:500 dilution) at 4 °C overnight. After further washing with PBST, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:2000 dilution) at room temperature for 1 h. The spots containing Topo II α were visualized using chemiluminescence reagents and then photographed and quantified using LAS-4000 image analyzer (FUJIFILM Medical Systems U.S.A., Inc., CT). The

MEVSPLQPVN ENMQVNIKIK NEDAKKRLSV ERIYQKKTL EHILLRPDTY IGSVELVTQQ 60
 A. MWVYDEVDGI NYREVTFVPG LYKIFDEILV NAADNKQRDP KMSCIRVTID PENNLISIWN 120
 NGKGIIPVVEH KVEKMYVPAL IFGQLLTSSN YDDDEKKTG GRNGYGAKLC NIFSTKFTVE 180
 TASREYKMF KQTMWDMNGR AGEMELKPFN GEDYTCITFQ PDLSKFKMQS LDKDIVALMV 240
 RRAYDIAGST KDVKVFNLGN KLPVKGFRSY VDMYLKDKLD ETGNSLKVH EQVNRHWEVC 300
 LTMSEKGFQQ ISFVNSIATS KGRHVDYVA DQIVTKLVDV VKKKNKGGVA VKAHQVKNHM 360
 WIFVNALIEN PTFDSQTKEN MTLQPKSFGS TCQLSEKFIK AAIGCGIVES ILNWKFKAQ 420
 VQLNKKCSAV KHNRKIGIPK LDDANDAGGR NSTECTLILT EGDSAKTLAV SGLGVVGRDK 480
 YGVFPLRGI LNVREASHKQ IMENAEINNI IKIVGLQYKK NYEDEDLKT LRYGKIMIMT 540
 DQDQDGSNIK GLINFIHNN WPSLLRHRFL EEFITPIVKV SKNKQEMAFY SLPEFEEWKS 600
 STPNHKKWV KYKGLGTST SKEAKEYFAD MKRHRIQFKY SGPEDDAIS LAFSKKQIDD 660
 RKEWLTNFM EDRRQRKLLGL PEDYLYGQTT TYLTYNDFIN KELILFNSD NERSIPSMVD 720
 GLKPGQRKVL FTFCFRNDKR EVKVAQLAGS VAEMSSYHHG EMSLMMTIIN LAQNFVGSNN 780
 LNLQPIQGF GTRLHGKDS ASPRYIFTML SSLARLLFPP KDDHTLKFLY DDNQRVEPEW 840
 YIPIIPMVL NGAEGIGTGW SKIPNFDVR EIVNNIRRLM DGEEPLPML SYKNFKGTIE 900
 ELAPNQYVIS GEVAILNSTT IEISELPVRT WTQTYKEQVL EPMLNGTEKT PPLITDYREY 960
 HTDITVVKFV KMTEEKLAEA ERVGLHKVFK LQTSLTCSNM VLPDHVGLK KYDTVLDILR 1020
 DPFELRLKY GLRKEWLLGM LGAESAKLNN QARFILEKID GKIIENKPK KELIKVLIQR 1080
 GYDSDPVKAW KEAQKVPDE EENEESDNEK ETEKSDSVTD SGPTFNLYLD MPLVLTKEK 1140
 KDELCRLRNE KEQELDTLKR KSPSDLWKEK LATFIEELEA VEAKEKQDEQ VGLPGKGGKA 1200
 KGKKTQMAEV LPSRQRQVI PRITIEKAE AEKKNKKKIK NENTEGSPQE DGVELEGLKQ 1260
 RLEKKQKREP GTKTKKQTTL AFKPIKKGKK RNPWSDSESD RSSDESNDV PPRETEPRRA 1320
 ATKTKFTMDL DSEDFSDFD EKTDEDFVP SDASPPKTKT SPKLSNKKEL PQKSVVSDLE 1380
 ADDVKGSVPL SSSPPATHFP DETEITNVPV KKNVTVKKTA AKSQSSTST GAKKRAAPKG 1440
 TKRDPALNSG VSQKPDPAKT KNRRKRKPSST SDDSDSNFEK IVSKAVTSKK SKGESDDPHM 1500
 DFDSAVAPRA KSVRAKKPIK YLEBSEDDDL F

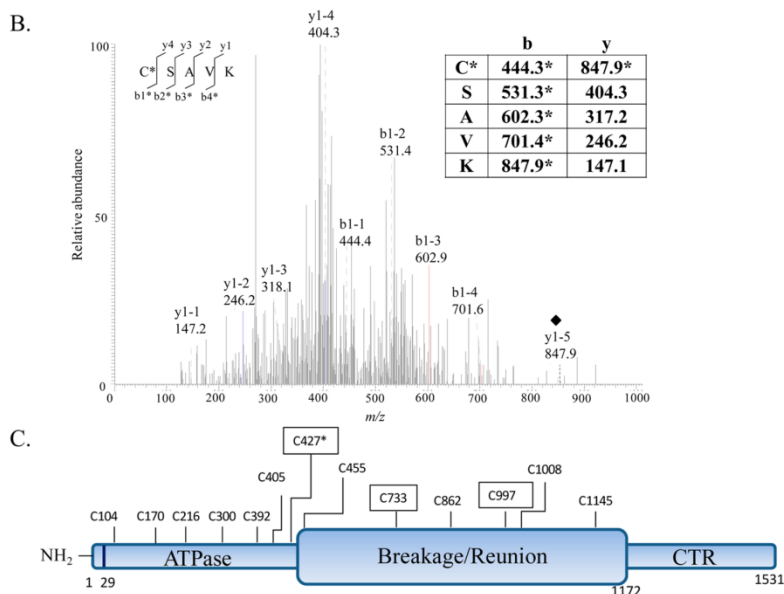


Figure 1. HQ17(3) modifies cysteine residues of Topo II α in vitro and in Huh7 cells. (A and B) Huh7 cells were treated with HQ17(3), the protein extract was resolved by PAGE, and the gel band (about 5 mm) containing Topo II α was subjected to proteomic analysis. (A) The shadowed sequences among the total amino acid sequence of Topo II α are the peptides detected by MS/MS. The underlined sequences are cysteine-containing peptides. Peptide C*S*SAVK (427–431) is detected with a mass increase of 340.25 Da. (B) MS/MS result of C*S*SAVK with the parental ion indicated by a diamond (◆). Theoretical masses of the fragment ions are listed in the inset. The fragments with HQ17(3) modification and a mass increase of 340.25 Da are marked with the asterisks (*). (C) Illustration of the location of HQ17(3) modification on Topo II α . C427 modification found only in cellular system is marked with the asterisk (*), while C427, C733, and C997 modification found in in vitro systems are boxed.

signals from free Topo II α (fractions 1–4) and from Topo II α –DNA complexes (fractions 5–8) were quantified, and the percentages of Topo II α –DNA complexes were calculated.

Immunofluorescence Staining of γ -H2AX. The cells (5×10^5 cells in a six-well plate) were treated with HQ17(3) or VP-16 for 90 min and then collected and incubated in MeOH/EtOH (1:1, v/v) at -20°C for 20 min. The fixed cells were immersed in a buffer containing 2% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C , washed with PBS, and then incubated sequentially with an antibody against phospho-H2AX (1:500 dilution) at 4°C overnight and a secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Zymed, San Francisco, CA) at room temperature for 1 h. The cells were then stained with DAPI (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and inspected using a Nikon Eclipse E800 microscope, with a Nikon Plan Fluor 40 \times objective. The images were acquired by Cybernetics Image-Pro Plus software. Cells that displayed five or more discrete bright dots were considered positive for γ -H2AX foci.

Microarray and Real-Time PCR Analysis. For microarray analysis, Huh7 cells (5×10^5 cells in a six-well plate) were treated with 10 μM HQ17(3) for 4 h and then subjected to RNA extraction using TRIzol reagent. Twenty micrograms of RNA was mixed with oligo dT, random primers, first strand buffer, 10 mM dithiothreitol, dNTP/aa-UTP, 0.67 U RNasin, and 200 U superscript III. The reaction mixture of the control and HQ17(3)-treated samples contained Cy5 and Cy3, respectively. The reaction was performed in a 20 μL reaction volume at 42°C for 2 h, followed by an addition of 1 μL of 0.2 N NaOH and 1 μL of 100 mM EDTA to terminate the reaction and hydrolyze RNA. Zymo columns (ZYMO Research, Irvine, CA) were then used to remove unincorporated Cy5 and Cy3 and to purify the transcribed product (cDNA). The cDNA was analyzed using UCSF 3OPHs version 1 genome-wide human long oligo arrays (<http://arrays.ucsf.edu>; Platform GPL273). The arrays spotted with 13971 oligonucleotide probes (mostly 70-mers) were designed based upon representative sequences of the human UniGene database. The cDNA from two independent experiments on the control cells and the HQ17(3)-treated cells were analyzed. The hybridization condition described by Wang et al. was used.¹³ Prior to hybridization, the chip was first cross-linked by UV exposure and then washed with 70% ethanol and covered with the cDNA samples. The samples were mixed with 25 mM HEPES (pH 7), 0.225% SDS, and $3\times$ SSC buffer, followed by hybridization at 63°C for 16 h. The chip was then scanned using a GenePix4000B microarray scanner (Molecular Device, CA), and the results were analyzed using a GenePix Pro 6 Microarray Image Analyzer. A cutoff value of 2.0-fold was denoted as a significant increase in gene expression, and the expression levels of these genes were further measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). An aliquot of RNA (2 μg) was reverse-transcribed using superscript III. RT-qPCR was then performed on 96-multiwell plates using an ABI 7500 real-time PCR machine (Foster City, CA). All reactions were performed in duplicate and normalized against GAPDH. The primer sequences are shown in Table 1 in the Supporting Information.

Assessment of Cellular Damage by Flow Cytometry. The cells were seeded in six-well plates (2×10^5 cells/well). For mitochondrial membrane potential (MMP) analysis, cells were stained with 100 nM DiOC6(3) in the dark for 30 min and then subjected to flow cytometry. The populations with decreased fluorescence intensity were the cells lost MMP. Annexin-V/PI staining and analysis were performed according to manual instructions (Beckman Coulter, Fullerton, CA). For the analysis of caspase-9 and caspase-3, the cells were incubated with 10 μM CaspaLux9-M₂D₂ and PhiPhiLuxG₁D₂, respectively, for 60 min and then subjected to flow cytometry. The populations with increased fluorescence were the cells with activated caspase. To quantify the subG1 cell population, the cells were collected and fixed in 70% ethanol for 24 h, washed with PBS, stained with PI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min, and then subjected to flow cytometry. Cell cycle distribution and subG1 population were analyzed using the EXPO32 software (Beckman Coulter). Cells with DNA contents less than diploids were the subG1 population. For ROS content analysis, cells were stained with 2.5 μM mitoSox in the dark for 20 min and then subjected to flow cytometry. The populations with increased

fluorescence were the cells with increased ROS content. All experiments were repeated three times.

DNA Synthesis Analysis. Huh7 were seeded in 96-well plates (10^4 cells/well) and treated with 10 μM HQ17(3) for the indicated time and subjected to thymidine incorporation assay. The media were replaced with fresh DMEM containing [³H]-thymidine (2 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) and incubated at 37°C for another 4 h. The cells were collected onto filter paper using Filtermate 196 (Packard Instruments Co., Meriden, CT). The radioactivity was measured by a scintillation β -counter (Packard Instruments Co.). All experiments were repeated three times.

Cell Viability Assay. Huh7 cells (3000 cells/well) were seeded in 96-well plates. The cells were cultivated in a medium containing HQ17(3) for 72 h, and then, acid phosphatase activity (ACP) assay^{1,9} was used to measure cell viability. For the intermittent treatment assay, the cells were treated with HQ17(3) for 8 h or at 10 μM for various time periods and then treated with fresh media without HQ17(3). The ACP assay was then performed after cultivation for 72 h, which includes the time cultivated with and without HQ17(3). In the ACP assay, the cells were washed with $1\times$ PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺ and incubated with 100 μL of pNPP solution [5 mM pNPP in buffer containing 0.1 M sodium acetate and 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 5.5] at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by adding 10 μL of 1 N NaOH, and the absorbance at 410 nm was measured with a microplate reader. All experiments were repeated at least three times.

Preparation of Whole Cell Lysates and Western Blot Analysis. Huh7 cells (10^6 cells in a 10 cm dish) were treated with 10 μM HQ17(3) for 12 and 24 h. The cells were lysed in a lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 1 mM Na₂VO₄, and 1% Triton X-100], and then, the supernatant was collected as whole cell lysates. An aliquot of the lysate (containing 60 μg of protein) was resolved by 8% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in 5% (v/v) skim milk in PBST, washed with PBST, and incubated with an antibody of PARP (1:2000 dilution), followed by extensive washing with PBST. The membrane was then incubated with an HRP-conjugated secondary antibody (1:5000 dilution), followed by washing with PBST. Immunoreactive bands on the membrane were visualized using chemiluminescence reagents and then photographed and quantified using a luminescent image analyzer. The experiments were repeated three times, and a representative result is shown.

RESULTS

HQ17(3) Covalently Modifies Cysteine Residues of Topo II α . The results of the proteomic analyses of Topo II α obtained from HQ17(3)-treated Huh7 cells are shown in Figure 1. Approximately 14% of Topo II α amino acid sequences was detected by the LC-MS/MS (shadowed sequences in Figure 1A). Three of the detected peptides contain cysteine residue, Cys-427, -733, and -1145 (underlined sequences in Figure 1A). The peptide containing Cys-427, C^{*}SAVK, was found to be modified by HQ17(3) (Figure 1B), whereas the peptide containing Cys-733 or -1145 was not modified (Figure 1A,B in the Supporting Information). The MS/MS of the C^{*}SAVK peptide (Figure 1B) shows the signals of all of the fragment ions from the precursor ion. The cysteine residue (b1^{*}) and the cysteine-containing fragment ions (b2^{*}–b4^{*}) were found with a 340.25 mass increase, whereas the 4 y ions (y1–y4) did not show the increase. The MS/MS results of the other detected peptides are shown in Figure 2A–T in the Supporting Information. However, HPLC-MS/MS analysis of the in vitro reaction product of recombinant Topo II α with HQ17(3) showed 40% of the Topo II α amino acid sequence (data not shown). Ten of 13 cysteine-containing peptides were detected, as listed in Table 1. The peptides containing Cys-427, -733, and -997 were HQ17(3)-modified, as shown in the MS/MS (Figure 3A–C in the Supporting Information). The

Table 1. Cysteine-Containing Peptides Identified by LC-MS/MS and HQ17(3) Modification on Topo II α in Vitro and in Huh7 Cells^a

Cys position	sequence	in vitro	Huh7
C104	K.MSCIR.V	–	#
C170		#	#
C216	R.GEMELKPFNGEDYTCITFPDLSK.F	–	#
C300	K.VIHEQVNHREWEVCLTMSEK.G	–	#
C392	K.SFGSTCQLSEK.F	–	#
C405	K.AAIGCGIVESILNWWK.F	–	#
C427	K.CSAVK.H	+	+
C455		#	#
C733	K.VLFTCFKRNDK.R	+	–
C862		#	#
C997/ C1008	K.LQTSLTCNSMVLFDHVGCLKK.Y	+	#
C1145	K.DELCLRLEKE	–	–

^a+, peptide modified by HQ17(3); –, peptide with no modification; and #, peptide fragment not detected.

peptides containing Cys-104, -216, -300, -392, -405, -1008, and -1145 were detected with no HQ17(3) modification (Table 1 and Figure 4A–F in the Supporting Information). These results

indicate that three cysteine residues of Topo II α (Cys-427, -733, and -997) were modified by HQ17(3) in vitro, and only Cys-427 was modified in the cellular system. As shown in Figure 1C, Cys-427 is located in the ATPase domain, whereas Cys-733 and -997 are located in the DNA breakage/reunion domain.

HQ17(3) Causes the Accumulation of Topo II α –DNA Complexes. In the cell-free system, the HQ17(3)-induced Topo II α –DNA complex was demonstrated by the in vitro DNA strand breakage formation assay, wherein the complexes were treated with proteinase K to digest Topo II α ; therefore, cleaved DNA was shown by electrophoresis. As shown in Figure 2A and quantification in Figure 2B, the linear form caused by 100 μ M HQ17(3) (Figure 2A, lane 6) was 4.1-fold of the control (Figure 2A, lane 2). The formation of the Topo II α –DNA complex in the cellular system was characterized by ICE bioassay. The result showed the presence of Topo II α in free protein fractions in both drug-treated and control cells (Figure 2C, fractions 1–4); however, Topo II α was present only in the DNA fractions of cells treated with Topo II α poisons (Figure 2C, fractions 5–8). Approximately 3-fold of the Topo II α –DNA complex, relative to the control, was caused by 30 μ M HQ17(3) (Figure 2C,D). The results of the in vitro assay and the ICE bioassay consistently indicate that HQ17(3) increases the Topo II α –DNA cleavable complex.

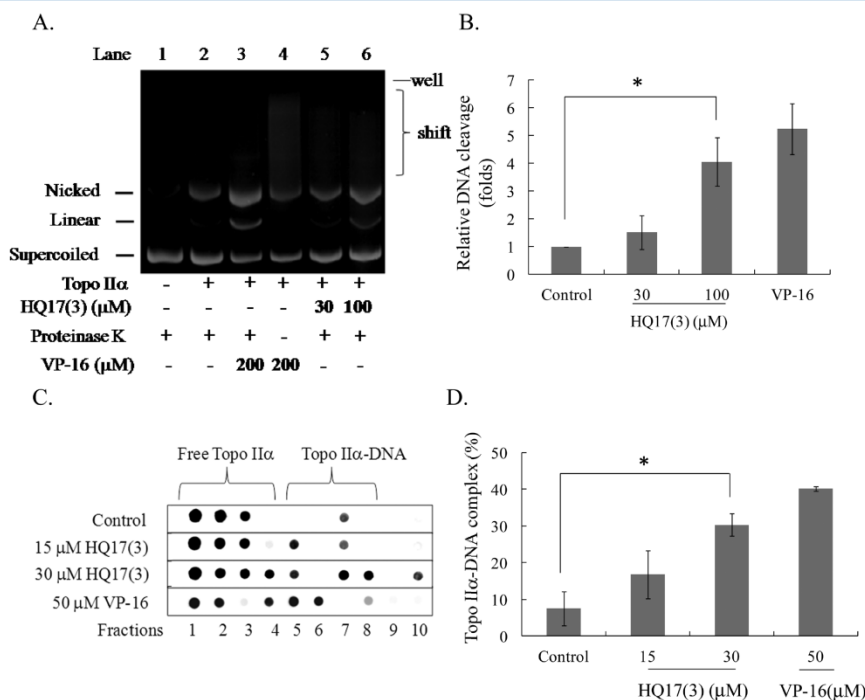


Figure 2. HQ17(3) treatment increases Topo II α -mediated DNA breakage and cellular Topo II α –DNA complexes. (A) Supercoiled DNA (10 nM) was incubated with Topo II α (340 nM) and HQ17(3). After proteinase K treatment, the reaction mixture was resolved by the EtBr-containing agarose gel. A representative result of DNA strand breakage formation in the in vitro assay from three experiments is shown. (B) Quantification of linear DNA in each lane from three experiments. The error bars represent the standard deviation. (C) Topo II α –DNA complex formation detected by ICE bioassay. Huh7 cells were treated with HQ17(3) for 90 min and lysed. The cell lysate was fractionated by CsCl gradient, and the fractions were immunoblotted for Topo II α . VP-16 treatment served as a positive control. A representative result from three experiments is shown. (D) The percentage of Topo II α –DNA (fractions 5–8) in each lane was calculated. The error bars represent the standard deviation (* p < 0.05).

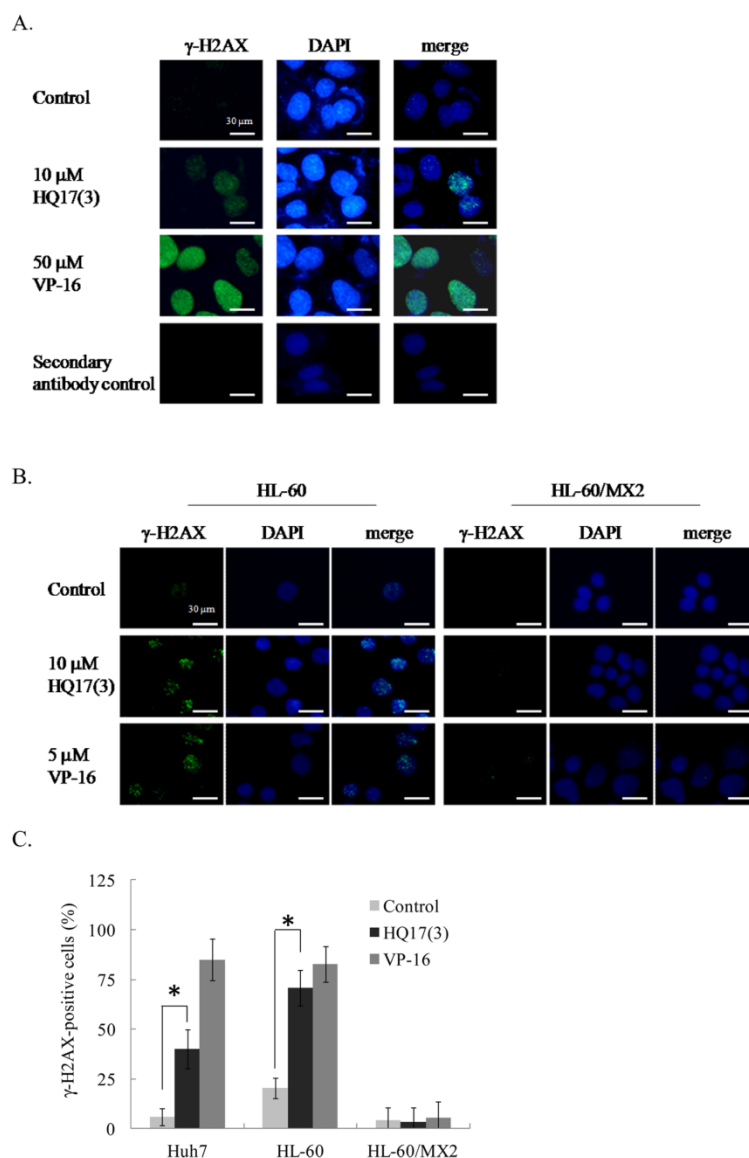


Figure 3. HQ17(3) induces DNA double-strand breaks in Huh7 and HL-60 cancer cells. The cells were treated with drugs for 90 min and subjected to γ -H2AX immunofluorescence staining and DAPI nucleus staining. Representative photos are shown for (A) Huh7 cells and (B) HL-60 and HL-60/MX2 cells. (C) Quantification of the γ -H2AX-positive cells from counting the cells in five microscopic fields. The percentage of γ -H2AX-positive cells was shown (* $p < 0.05$). VP-16 treatment served as a positive control.

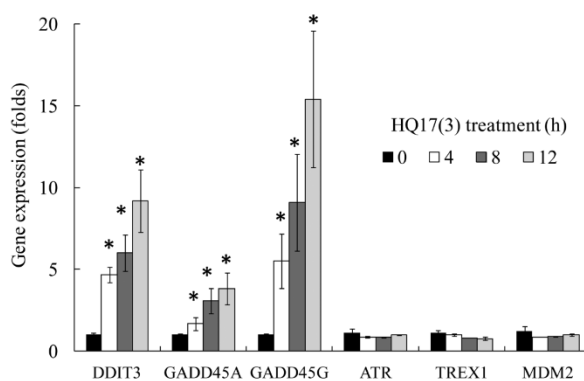
Inhibition of Topo II α Results in DNA Breakage and Activates DNA Damage-Related Genes. HQ17(3) treatment causing prompt formation of DNA breaks was shown by γ -H2AX staining. After treatment with HQ17(3) for 90 min, the amount of γ -H2AX-positive cells was approximately 4- and 3.5-fold of the amount in the control group for Huh7 cells and HL-60 cells, respectively (Figure 3). With the same treatment, the amount of γ -H2AX-positive cells in HL-60/MX2 cells did not change significantly (Figure 3B,C). Microarray analysis of

Huh7 cells indicated that HQ17(3) activated the expression of a set of DNA damage-related genes, including *DDIT3*, *GADD45A*, *GADD45G*, *ATR*, *TREX1*, and *MDM2* (Figure 4A). Significant time-dependent increases in the expression levels of *DDIT3*, *GADD45A*, and *GADD45G* were found within 12 h, as shown by quantitative real-time PCR (Figure 4B). The DNA damage-related gene response to HQ17(3) was also found in HL-60 cells. After HQ17(3) treatment for 4 h, significant increases in *DDIT3*, *GADD45A*, and *GADD45G*

A.

gene name	abbreviation	gene_ID	array-1 ratio (Cy3/Cy5)	array-2 ratio (Cy3/Cy5)
DNA damage inducible transcript 3	DDIT3	NM_004083.2	3.2	2.6
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	NM_001924.2	5.0	3.0
growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	GADD45G	NM_006705.2	2.8	5.1
ataxia telangiectasia and Rad3 related	ATR	NM_001184.2	2.2	9.0
3' repair exonuclease 1, isoform	TREX1	NM_130384.1	2.7	6.7
Mdm2, transformed 3T3 cell double minute	MDM2	NM_0220045.2	4.0	4.7

B.



C.

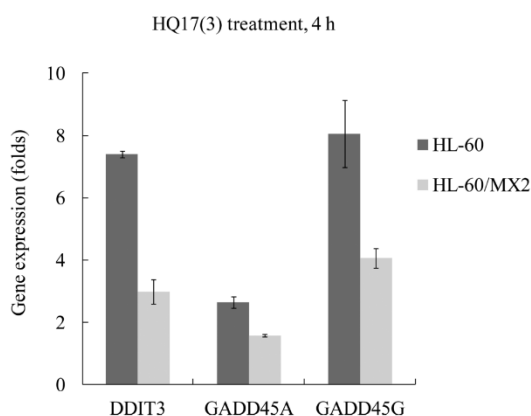


Figure 4. Induction of DNA damage responses in HQ17(3)-treated Huh7 and HL-60 cells. Cells were treated with drugs and subjected to DNA damage analysis. (A) The list of up-regulation of DNA damage inducible genes found in microarray analysis in Huh7 cells. (B) Real-time PCR analysis shows the different expression levels of DNA damage-inducible genes upon HQ17(3) treatment in Huh7 cells. (C) Up-regulation of DNA damage-related genes in HL-60 cells upon HQ17(3) treatment (* $p < 0.05$).

gene expression were found, although no obvious changes in HL-60/MX2 cells were observed (Figure 4C). These results demonstrate that HQ17(3) acts as a Topo II α poison to cause DNA breakage and to activate DNA damage-related genes. In Huh7 cells, the DNA damage was accompanied by DNA synthesis inhibition. As shown in Figure 5A, approximately 35% of DNA synthesis inhibition was observed when the cells were exposed to HQ17(3) for 6 h.

HQ17(3) Causes Irreversible Effects Promptly and Induces Apoptosis in Huh7 Cells. Continuous treatment of Huh7 cells with HQ17(3) for 72 h resulted in the reduction of

cell viability by 20–70% at 2–10 μ M HQ17(3) (Figure 5B). The cells intermittently treated with HQ17(3), for 0.5–8 h, and then further cultivated in a medium containing no HQ17(3) for a total of 72 h caused a reduction in cell viability; the magnitude of reduction is dependent on drug treatment time (Figure 5C). The 8 h intermittent treatment with HQ17(3) caused dose-dependent decreases in cell viability (Figure 5D). The effectiveness of the 8 h intermittent treatment is comparable to the 72 h continuous treatment. As shown in Figure 6A, loss of MMP as an early event of intrinsic apoptosis was found in the treated cells; 23% of the

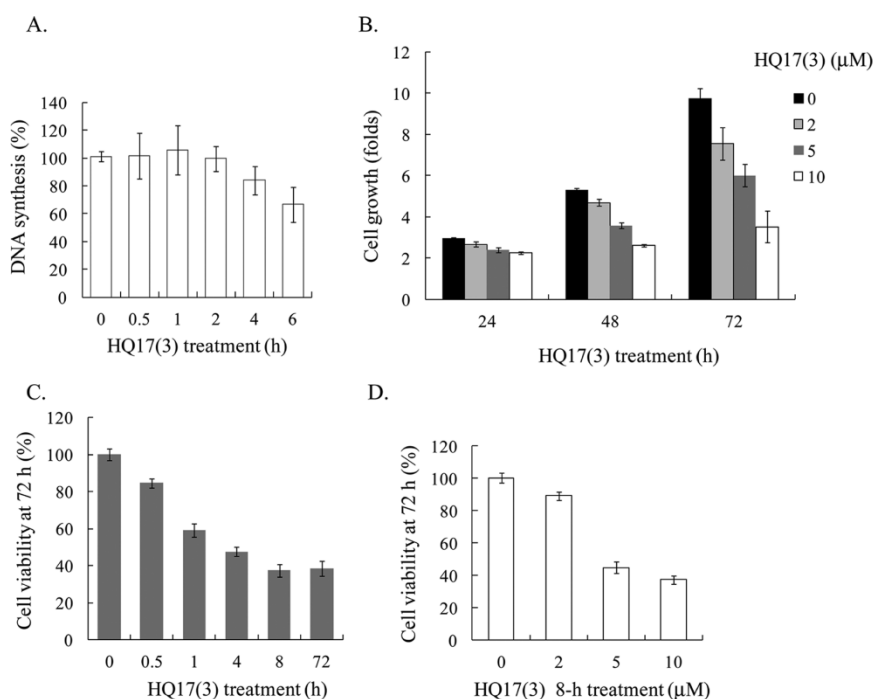


Figure 5. DNA synthesis inhibition and cytotoxicity of HQ17(3) in Huh7 cells. Cells were treated with 10 μ M HQ17(3) for different time periods and subjected to DNA synthesis analysis and cell viability analysis. (A) Prompt DNA synthesis inhibition by HQ17(3). (B) Dose-dependent and time-dependent cell growth inhibition by HQ17(3) treatment. (C) The effectiveness of intermittent exposure to HQ17(3). (D) Dose-dependent inhibition on cell viability by intermittent treatment. The cells were treated with HQ17(3) at different concentrations for 8 h and then cultivated in medium without HQ17(3) further for a total of 72 h.

cells showed a decreased MMP after HQ17(3) treatment for 16 h. Translocation of phosphatidylserine from the inner to the external cellular membrane, which is an apoptosis marker, was detected (Figure 6B). The early apoptotic cells (annexin-V positive and PI negative) increased by 17% after 24 h of HQ17(3) treatment. Furthermore, treatment of Huh7 cells with HQ17(3) increased the activities of caspase-9 and caspase-3 (Figure 6C) and caused cleavage of PARP, a substrate of caspase-3 (Figure 6D). Induction of apoptosis in Huh7 cells is supported by microarray results, which revealed an increase of several apoptosis-related genes (Figure 6E). The impact of HQ17(3) on the cells was prompt and irreversible, and short-term exposure of HQ17(3) effectively decreases cell viability.

Toxicity of HQ17(3) Is Partly Attributed to Oxidative Stress. In Huh7 cells, HQ17(3) caused subG1 population (Figure 7A), a phenotype that could result from Topo II α poison, apoptosis, and oxidative stress (Figure 7B). Caspase inhibitors and antioxidant NAC were used to dissect the causes of the HQ17(3)-induced subG1 population. The result showed that the subG1 population was reduced by a caspase-3 inhibitor and pan-caspase inhibitor by approximately one-third and two-thirds, respectively (Figure 7C). Furthermore, NAC treatment reduced half of the subG1 population (Figure 7D) and attenuated apoptotic phenotypes (loss of MMP and activation of caspase-9 and caspase-3) (Figure 7D). However, the treatment neither affected the accumulation of Topo II α -DNA complexes caused by HQ17(3) (Figure 5 in the

Supporting Information) nor attenuated cell viability (data not shown). These results demonstrate that HQ17(3) induces oxidative stress, which can contribute to apoptotic phenotypes, and that HQ17(3)-induced cell death is primarily the result of Topo II α poisoning.

DISCUSSION

In Huh7 cells, HQ17(3) promptly inhibits Topo II α , increases Topo II α -DNA complexes, induces DNA breakage, and leads to apoptosis. HQ17(3) irreversibly inhibits Topo II α through adduction with Cys-427 of Topo II α and possibly adduction with Cys-733 and -997. That Cys-733 and -997 adductions were observed only in vitro could be caused by the complexity of the cellular protein sample in two ways. First, in intact cells, HQ17(3) may react with many protein targets, thereby reducing the availability of HQ17(3) for reacting with Topo II α . Second, in the LC-MS/MS measurement, the complicated protein sample reduces the detection rate of Topo II α peptides. Therefore, only three Cys-containing peptides were detected from the cellular Topo II α -HQ17(3) adduct, whereas 10 Cys-containing peptides were detected from the in vitro adduct (Table 1). From these data, Cys-427 can be inferred as the preferential reaction site for HQ17(3). Cysteine in residue 427 is crucial for Topo II α activity. In a previous study, the C427A mutant was constructed and characterized.¹⁴ The mutant enzyme exhibited reduced ATPase activity and decreased the efficacy of Topo II α catalysis. The impact of HQ17(3)

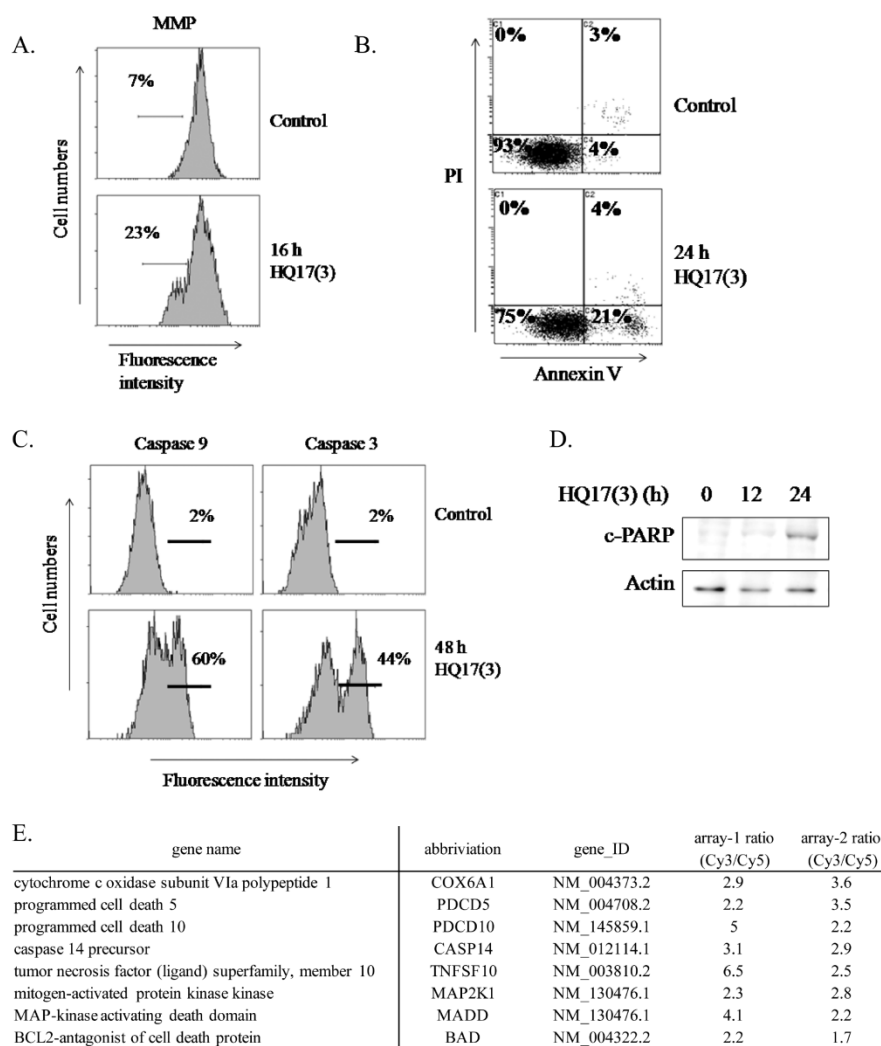


Figure 6. Induction of cell apoptosis by HQ17(3). Huh7 cells were treated with 10 μ M HQ17(3) for indicated times or at the indicated concentrations for 48 h. (A–C) Flow cytometry analysis reveals the HQ17(3)-induced apoptotic phenotypes of (A) MMP, (B) annexin-V/PI population, and (C) caspase-9 and -3 activities. In each graph, the percentage of the cells in the gated region is shown. (D) Western blot analysis of the cleaved PARP (c-PARP) upon HQ17(3) treatment. (E) The list of up-regulated apoptosis genes induced by HQ17(3) treatment obtained from microarray analysis.

adduction on Cys427 in enzyme activity appears similar to C427A mutation. A decreased relaxation activity in the HQ17(3)–Topo II α obtained from the reaction of Topo II α with HQ17(3) at a molar ratio of 1:200 was found. Furthermore, Topo II α relaxation activity was thoroughly abolished in the reaction of Topo II α pretreated with HQ17(3) at a molar ratio of 1:800 (Figure 6 in the Supporting Information). The loss of Topo II α relaxation activity in this condition can be deduced as a reaction of the extreme excess of HQ17(3) with increased Cys residues. This modification could inhibit the Topo II α catalytic cycle through stabilizing Topo II α –DNA complexes, which leads to DNA damage.

Because of its structural similarity to hydroquinone, HQ17(3) likely reacts with protein–Cys through a similar electrophilic reaction on the hydroquinone ring (Figure 7 in the Supporting Information).¹⁵ The adduction of HQ17(3) on Topo II α cysteine residues mediates the accumulation of DNA breakage, an effect that is also similar to the one produced by hydroquinone.³ Nevertheless, HQ17(3) exhibits some differences from hydroquinone in its effects on Topo II α . First, the reactivity of HQ17(3) might not be redox-dependent like that of hydroquinone,³ because the impact of HQ17(3) on Topo II α is not affected by dithiothreitol (Figure 8 in the Supporting Information). Second, the modified Cys residues for HQ17(3) are different from the residues for hydroquinone, Cys-392, and

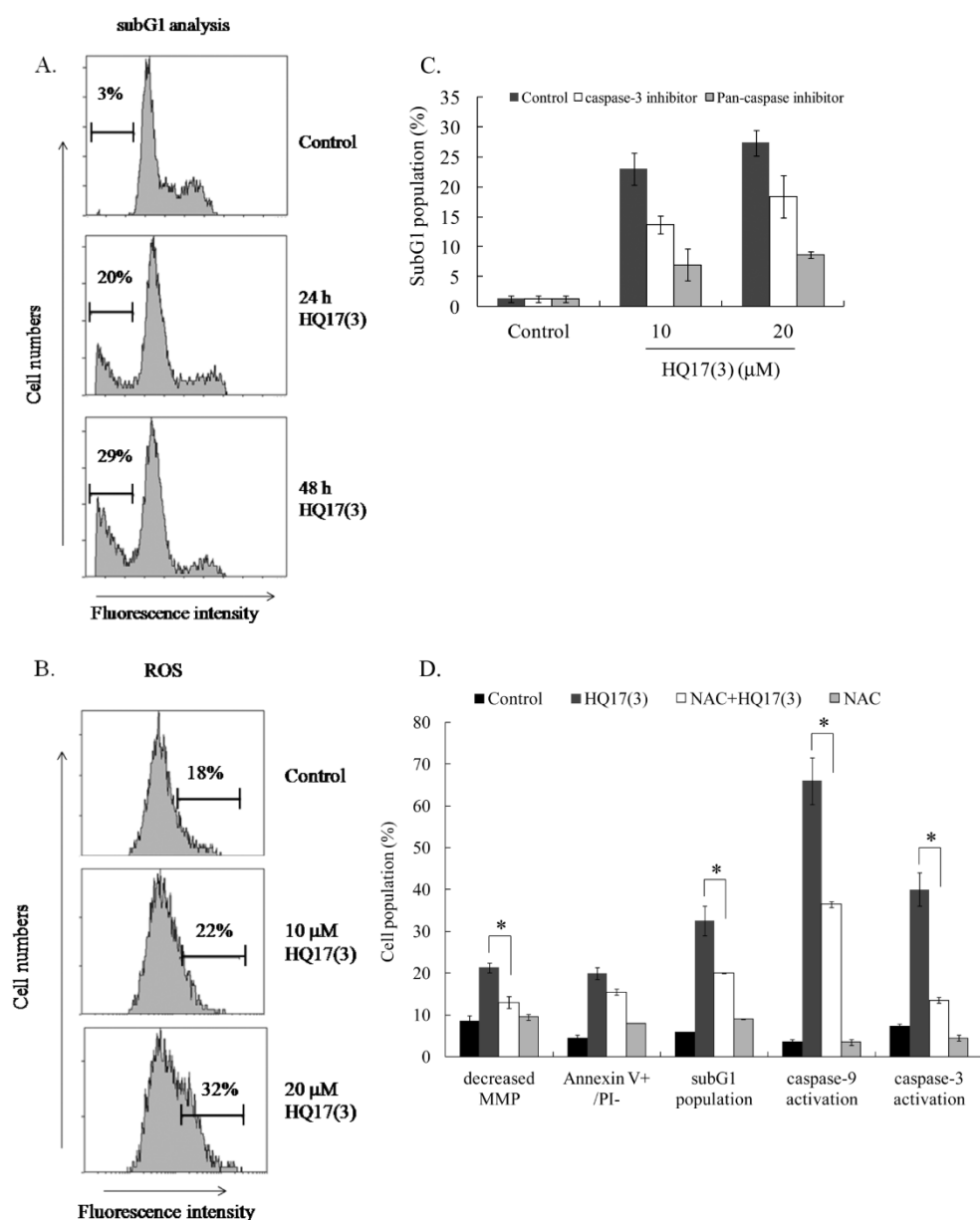


Figure 7. DNA breaks and apoptosis caused by HQ17(3) are attributed partly to oxidative stress in Huh7 cells. Cells were pretreated with or without caspase inhibitors or NAC, followed by HQ17(3) treatment and subjected to flow cytometry analysis. (A) Flow cytometry analysis shows the increase in subG1 population upon HQ17(3) treatment. (B) Flow cytometry analysis shows the increase of mitochondrial ROS level upon HQ17(3) 8 h of treatment in cells. In each graph, the percentage of the cells in the gated region is shown. (C) The HQ17(3)-induced subG1 population at 48 h is partially attenuated by caspase-3 inhibitor and pan-caspase inhibitor treatments. (D) The pretreatment of NAC partially attenuates MMP measured at 16 h, annexin-V/PI measured at 24 h, subG1 population measured at 24 h, and caspase-9 and caspase-3 measured at 48 h (* $p < 0.05$).

-405.¹⁶ The different adduction site is possibly caused by the hydrophobic chain of HQ17(3), which interacts with Topo II α in a specific manner to facilitate the reactivity to Cys-427. However, that HQ17(3) modifies Cys-392 and Cys-405 of

Topo II α in Huh7 cells is not ruled out because the peptides containing Cys-392 and Cys-405 are not shown in the MS data. Furthermore, other Cys residues also possibly react with thiol-reactive compounds. For example, Cys-104, -170, -300, -392,

(20) Zhang, W., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2001) Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45beta/alpha/gamma) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.* 18, 749–757.

個人履歷表

林亭妤(Ting-Yu Lin)

NATIONALITY

Country : Taiwan

Gender : female

Date of birth : 03-21-1982

Address : Rm 521-1, Diagnostic Building, 1 Chang-Te Street,
Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical
Biotechnology, National Taiwan University, Taipei 10012,
Taiwan, R.O.C.

Tel : 02-23123456 ext 66923

Cell: 0988781668

e-mail: f93424014@ntu.edu.tw

EDUCATION

1. 2000 to 2004, B.S. degree.
Taipei Medical University, School of Medical
Technology
2. 2004 till now: Master to Ph.D. program
National Taiwan University, Department of Clinical
Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

AFFILIATION

1. Graduate student in Dr. Shwu-Bin Lin Lab, National
Taiwan University, Department of Clinical Laboratory
Sciences and Medical Biotechnology (2004 till now)
2. Student member of Chinese Association for Clinical
Biochemistry (2004 till now)
3. Graduate student member of Human Proteome
Organization (2007 and 2009)
4. Graduate student member of RNA society (2010)

LAB SKILLS

1. Standard molecular biology techniques including: Flow
cytometry, Western blot, Cell transfection, Reverse
Transcription-PCR, HPLC
2. Animal experiments: asthma model
3. RNA splicing and spliceosome assembly analysis

AWARDS

1. **Young investigator travel award** in HUPO 8th annual world congress in 2009
2. A recipient of the **Graduate Students Study Abroad Program** sponsored by National Science Council (2010-2011)

RESEARCH EXPERIENCES

1. **Summer student** (2001-2004)
At Dr. Shu-Hwei Kao's Lab, Taipei Medical University, School of Medical Laboratory Science and Biotechnology
2. **PhD program** (2004 till now)
At Dr. Shwu-Bin Lin's lab, National Taiwan University, Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology
3. **Exchange Predoctoral fellow** (2009-2011)
At Dr. Ren-Jang Lin's Lab, City of Hope/ Beckman Research Institute and Graduate School of Biological Sciences.

RESEARCH TOPIC

1. Study of the anti-cancer compound, 10'(Z),13'(E),15'(E)-heptadecatrienylhydroquinone, from the sap of lacquer tree *Rhus Sucedanea*.: as a topoisomerase II poison in cancer cells. (Dr. Shwu-Bin Lin Lab)
2. Study of RNA splicing defect in human cell system. (Dr. Ren-Jang Lin Lab)

PUBLICATIONS

Publications

1. Huang CP, Fang WH, Lin LI, Chiou RY, Kan LS, Chi NH, Chen YR, **Lin TY**, Lin SB. Anticancer activity of botanical alkyl hydroquinones attributed to topoisomerase II poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, 227, 331-8.
2. Chen YR, Chiou RY, **Lin TY**, Huang CP, Chen ST, Lin SB. Identification of an alkyl hydroquinone from *Rhus Sucedanea* as a novel inhibitor of mushroom tyrosinase and mammalian melanogenesis. *J Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 2200-5.
3. Gencheva M, **Lin TY**, Wu X, Yang L, Richard C, Jones M, Lin SB, Lin RJ. Nuclear retention of unspliced pre-mRNAs by mutant DHX16/hPRP2, a spliceosomal DEAH-box protein. *J Biol. Chem.* **2010**, 285, 35624-32.
4. **Lin TY**, Huang CP, Au LC, Chang YW, Hu CY, Lin SB. A cysteine-reactive alkyl hydroquinone modifies topoisomerase II α enhances DNA breakage, and induces

- apoptosis in cancer cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2340-51.
5. Huang CP, Tsai MF, Chang TH, Tang WC, Chen SY, Lai HH, **Lin TY**, Yang CH James, Yang PC, Shih JY*, Lin SB*. ALDH-Positive Lung Cancer Stem Cells Confer Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Lett.* **2013** 328, 144-51.
 6. Zang S, **Lin TY**, Chen X, Gencheva M, Newo A, Yang L, Rossi D, Hsu S, Hu J, Lin SB, Huang A, Lin RJ. RNA-binding protein GPKOW interacts with spliceosomal DExD/H-box protein DHX16/hPRP2 and is required for pre-mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* (in preparation).
 7. **Lin TY**, Huang CP, Chen YR, Chiou RY, Au LC, Tang WC, Lin SB. An alkylhydroquinone protects cells from oxidative damage through alkylation of Kelch-like ECK-associated protein-1 and up-regulation of heme oxygenase-1. *Free Radic. Bio. Med.* (in preparation).

Posters

1. Liao TL, Tzeng CR, Chen YT, **Lin TY**, Chao HT, Kao SH. Oxidative stress mediates TCDD-induced hypoxia and oxidative damages in human trophoblast cells. **2004**. The 4th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. (Okinawas, Japan, March 8-11), P-108.
2. **Lin TY**, Tang WC, Lin SB. Induction of phase II enzymes by 10'(Z),13'(E), 15'(E)- heptadecatrienylhydroquinone protects lung fibroblast cells against oxidative damage. **2007**. Proceeding of the 22nd Joint Annual Conference of Biomedical Sciences (Taipei, Taiwan, March 17-18), p. 140
3. Tang WC, **Lin TY**, Lai MY, Lin SB. Discovery of glycoproteins as candidate biomarkers for diagnosis of hepatitis C virus related liver fibrosis. **2007**. Proceeding of the 22nd Joint Annual Conference of Biomedical Sciences (Taipei, Taiwan, March 17-18), p. 137
4. Tang WC, **Lin TY**, Lai MY, Lin SB. Discovery of liver fibrosis markers by analysis of serum N-glycoproteome. **2007**. HUPO 6th annual world congress (Seoul, Korea, October 6-10) p. 358
5. Huang CP, Chiou RY, Chen YR, **Lin TY**, Lin SB. Botanical alkyl hydroquinone induced apoptosis in hepatoma cancer cells. **2008**. Proceedings of the 23rd Joint Annual Conference of Biomedical Sciences. (Taipei,

- Taiwan, March 29-30), p. 629.
6. Chen YR, Chen ST, Huang CP, **Lin TY**, Lin SB. HQ17(1) a tyrosinase inhibitor with effective skin whitening potency extracted from *Rhus succedanea*. **2008**. Proceedings of the 23rd Joint Annual Conference of Biomedical Sciences. (Taipei, Taiwan, March 29-30), p. 714.
 7. Huang CP, Chiou SH, Chen YU, **Lin TY**, Tang WC, Lin SB, SCA-1+ and CD44+ cancer stem-like cells in Lewis lung cancer cell line. **2008**. International Symposia on Stem Cells, Epigenetics and Development (Taipei, Taiwan, September 27-28)
 8. **Lin TY**, Huang CP, Chen YR, Lin SB. Chemopreventive effect of HQ17(3), a natural occurring antioxidant, involves in the activation of cellular anti-oxidative signaling pathway. **2009**. Proceedings of the 24th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences. (Taipei, Taiwan, March 21-22), p. 85.
 9. Chung PC, Chiou RY, Huang CP, **Lin TY**, Tang WC, Lin SB. Arachidin-1, a peanut stilbenoid, induced apoptosis in HL-60 cells by activation both caspase-dependent and caspase-independent pathways. **2009**. Proceedings of the 24th Joint Annual Conference of Biomedical Sciences. (Taipei, Taiwan, March 21-22), p. 86.
 10. **Lin TY**, Huang CP, Chen YR, Chiou RYY, Tang WC, and Lin SB. A thiol reactive alkylhydroquinone exhibits cytoprotective effect via Keap1-Nrf2-ARE signaling. **2009**. HUPO 8th annual world congress (Toronto, Canada, September 25-30) p.78. **Young Investigator Travel Awards**
 11. **Lin TY***, Zang SB*, Lin SB, Huang AM, Lin RJ. The Role of hPRP2/DHX16 and hSPP2/GPKOW in Human Spliceosome Function. **2010** (Seattle, U.S.A, June 22-26), p. 534.

REFERENCES

1. Dr. Shwu-Bin Lin, National Taiwan University, Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology
e-mail: sblin@ntu.edu.tw
Tel: 02-23123456 ext 66910
2. Dr. Ren-Jang Lin, Beckman Research Institute NCI-designated Comprehensive Cancer Center Irell &

Manella Graduate School of Biological Sciences,
Department of Molecular and Cellular Biology
e-mail: RLin@coh.org
Phone: 626-301-8286
Fax: 626-301-8280

