

知識天地

BMVC 小分子在癌症研究的應用

張大釗研究員（原子與分子科學研究所）

G-四股結構

端粒（telomere），是染色體的末端，負責維持真核生物染色體 DNA 的完整性。有趣的是染色體端粒與生物的老化或癌症有相當的關聯性。由於在 DNA 的複製過程中，染色體的尾端不能完全複製，隨著細胞的分裂次數增加和生物個體年齡的增長，端粒的長度會逐漸減短。因此在細胞老化的過程中，端粒很可能扮演著十分重要的角色。然而癌細胞的染色體端粒，通常可經由端粒酶（telomerase）的作用，得以維持特定長度，且能使細胞持續不停的增生。文獻報導在超過 85% 的癌細胞中，發現有端粒酶的過度表現；但是在絕大多數的正常細胞中，卻沒有偵測到端粒酶的活性。這個現象顯示：端粒與端粒酶可以成為癌症診斷與治療的研究方向。

人類的染色體端粒是由重複的 T_2AG_3 序列所組成，端粒的長度約有 15 kb，而在 3' 端的尾端有一小段約 150-200 鹼基的 T_2AG_3 重複的單股序列。這個單股的序列可經由四個 G-鹼基的 Hoogsteen 氫鍵形成一個環狀的 G-四方面（G-quartet），數個 G-四方面經由 π - π 作用堆疊與五碳糖作為股架可以組成穩定的四股結構（G-quadruplex）。然而人類的染色體端粒是否有 G-四股結構，直到 2003 年都還沒有得到直接證實。

為了要驗證人類的染色體端粒是否有 G-四股結構，我們於 2003 年研發出高靈敏度的螢光探針分子：3,6-bis(1-methyl-4-vinylpyridinium) carbazole diiodide (BMVC) [1]。由於 BMVC 與 DNA 作用後，螢光強度大幅增加約 100 倍。而且與端粒四股結構作用的螢光波長在 ~ 575 nm，與雙股結構的螢光波長則在 ~ 545 nm。且 BMVC 與前者的親和力約為後者的 4-5 倍，再結合 90 年代初期所研發的單分子影像光譜之理念，經由共軛聚焦影像光譜統計之結果，我們首次證實端粒 G-四股結構之存在[2]。BMVC 不但可以穩定 DNA 的 G-四股結構，陽明大學的林敬哲教授進而發現 BMVC 可以加速端粒長度的縮短，是一個有效的端粒酶抑制劑 [3]。

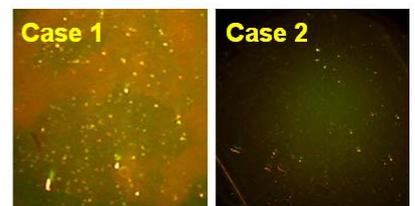
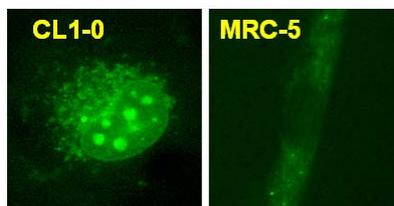
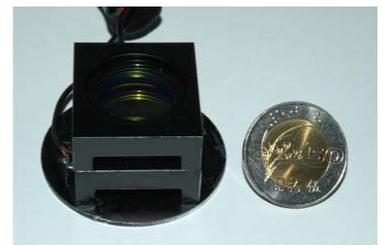
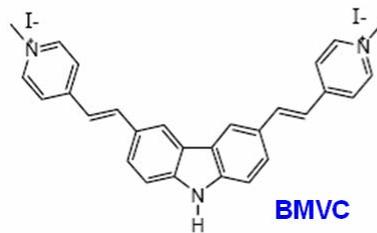
癌症檢測

據統計，癌症仍是世界十大死因之一，每年大約有 7 百萬人口死於癌症，約佔全世界死亡人數的 12.5%。癌症最可怕的，莫過於發現時已達末期，癌細胞擴散，無法有效治療。其實初期的癌症治癒率非常高，根據世界衛生組織的統計，癌症患者如果能早期發現，治癒率將可達 80%。於是初期的檢測在癌症的防治工作上，就成了很重要的一環。近年來，腫瘤標記（tumor marker）成為重要的研究方向。

“準確”當然是檢測癌症最重要的考量。現今的癌症檢測方法中，核磁共振造影與正子造影，應該是目前評估最有效也最準確的癌症診斷方式。但是這些檢測的成本不低，且需要時間，無法作為一種即時的診斷工具。因此我們希望能研發出一個簡易、快捷、價廉與準確的癌細胞篩選系統，進而結合現有的檢測方法，提高癌症診斷的準確度。

由於 BMVC 分子可以進入 H1299, CL1-0, HeLa, 和 Ca9-22 等多種癌細胞

的細胞核，但卻不容易進入 MRC-5, D-551 等正常細胞的細胞核。另外進入細胞核中的 BMVC 與 DNA 作用後，螢光會大幅增強，這兩項特質可以用來分辨出正常細胞與癌細胞。我們進而自行研發出一個掌上型癌細胞偵測系統 [4]。利用一個波長約 470 nm 的放光二極體（Light emitting diode, LED）激發 BMVC 分子，再使用 1-2 個濾光片將激發光源及非 BMVC 之螢光濾去，經由數位相機照像，根據影像的螢光強度來分辨正常細胞與癌細胞。若是比較



圖一：BMVC 化學結構示意圖（左上）。BMVC 進入 CL1-0 肺癌細胞的細胞核，其螢光大為增強；但不易進入 MRC-5 肺正常細胞，且螢光微弱（左下）。掌上型癌細胞偵測系統（右上）。利用影像的螢光強度來檢測癌症病人（右下）。

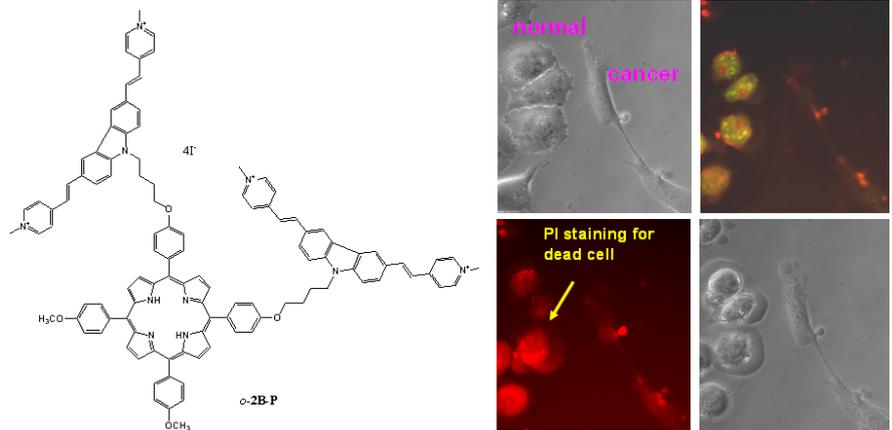
參考分子（如 acridine orange）的影像強度，更有助於判讀的準確度。

目前我們與臺大醫學院的婁培人醫師合作，進行“結合 BMVC 染色作為輔助頸部針孔穿刺的癌症細胞學（Fine needle aspiration cytology, FNAC）診斷的新穎方法”之臨床實驗。在 115 個病例中，利用 BMVC 的檢測方法得到：陽性預期值（positive predictive value）為近七成（32/46），陰性預期值（negative predictive value）約九成（48/53），有近一成五（16/115）的無法判讀。雖然整體的準確率只有八成，但是若配合臺大醫院現行的針孔穿刺細胞學診斷，則有令人振奮的結果。在交叉比對下，我們共同發展出一套結合的診斷模式。由於臺大醫院頸部的 FNAC 對於陽性預期值的判讀有非常高的準確度，因此對於陽性病患就依循醫院現有的方式進行下一階段的工作。至於偶有一些漏網之病患與無法判讀之案例，可以在比對 BMVC 檢測的陽性病患中，針對這些人作再一次的檢測，以作確認。由於 BMVC 的測試並不需要額外的抽取檢體，因此這項複合診斷模式可以提高現行 FNAC 診斷的準確率。

光動力治療

光動力治療（photodynamic therapy, PDT）是一種結合光感物質與光照對區域性病變治療的方法。利用光激發在特定區域內的光感物質，經由能量轉移與光化學作用，產生對細胞有毒性的單態氧（singlet oxygen, 1O_2 ）或其他活化氧（reactive oxygen species, ROS），達到選擇性的殺死癌細胞的方式。但一般光感物質（如 porphyrin）的缺點是這些藥物會同時進入正常組織與癌組織，且用來激發 porphyrin 的光波長往往也會影響到正常組織中含有 porphyrin 衍生物的物質（如血紅素）。因此為了增加對癌細胞以及光波長的選擇性，我們合成了一個 BMVC-porphyrin (*o*-2B-P) 的複合分子，希望藉由結合 BMVC 對於癌細胞的選擇性，以及 porphyrin 的光敏性，能在特定波長的光激發下，達到選擇性殺死癌細胞的功能 [5]。

實驗顯示在 470 nm 的光激發下，*o*-2B-P 能產生單態氧，且此波長是 porphyrin 衍生物的空窗區，因此可以降低激發光對正常組織的影響。而令人振奮的細胞實驗顯示，藉由調控光照量，*o*-2B-P 能選擇性的殺死癌細胞，但是可以避免傷害到正常細胞。另外，由於 *o*-2B-P 在光照前是以紅色螢光停留在細胞質，在光照後 BMVC 進入細胞核與 DNA 作用產生黃綠色螢光。在經由 propidium iodide (PI) 之檢測，發現 *o*-2B-P 進入細胞核後的細胞均已被殺死。若是持續照



圖二：BMVC-Porphyrin (*o*-2B-P) 複合分子化學結構示意圖（左）。*o*-2B-P 之光動力治療示意圖（右）；將 4 μ M 的 *o*-2B-P 加入 CL1-0 癌細胞與 MRC-5 正常細胞的培養皿中 5 小時後的 bright-field 影像（左上）；使用 480 \pm 20 nm 的光照 13 秒，再經過靜置 78 秒後，黃綠色是 BMVC 在 CL1-0 的細胞核中所產生的螢光（右上）；紅色是 PI 染劑進入細胞中所產生的螢光，用來確定細胞死亡（左下）；照光後的 bright-field 影像（右下）。

光，正常細胞也會被殺死。這螢光的轉變，似乎與細胞死亡有關，這項結果不僅幫助我們能夠研究 *o*-2B-P 的光動力治療學特性，同時也提供了一個在光動力治療上，顯現細胞死亡的螢光標記。這項成果顯示研發不同的複合分子抗癌試劑是一個可行的方向。

在二十世紀初期，光的雙重性質開啓了現代物理學的大門。而在本世紀初期，我們思考：一個同時具有螢光探針與有特定標的物之抗癌藥物分子是否能在癌症研究中扮演一個重要角色。希望能經由 BMVC 分子具有藥物與螢光的雙重特質的研究，引導研發具有特定功能與螢光特質的新分子，開啓醫藥科學的另一扇門。

參考資料：

1. Chang, C.C., Wu, J.Y. and Chang, T.-C. (2003) A carbazole derivative synthesis for stabilizing the quadruplex structure, *J. Chin. Chem. Soc.* **50**, 185-188; (2005) Quadruplex stabilizer, US patent 6979738 B2.
2. Chang, C.C., Kuo, I.-C., Ling, I.-F., Chen, C.T., Chen, H.C., Lou, P.J., Lin, J.J. and Chang, T.-C. (2004) Detection of quadruplex DNA structures in human telomeres by a fluorescent carbazole derivative. *Anal. Chem.* **76**, 4490-4494.

3. Huang, F.Z., Chang, C.C., Lou, P.J., Kuo, I-C., Chien, C.W., Chen, C.T., Shieh, F.Y., Chang, T.-C. and Lin, J.J. (2008) G-quadruplex stabilizer 3,6-bis (1-methyl-4-vinylpyridinium) carbazole diiodide induces accelerated senescence and inhibits tumorigenic properties in cancer cells. *Mol Cancer Res* **6**, 955-964.
4. Kang, C.C., Chang, C.C., Chang, T.-C., Liao, L.J., Lou, P.J., Xie, W.J. and Yeung, E.S. (2007) A handheld device for potential point-of-care screening of cancer. *Analyst* **132**, 745-749.
5. Kang, C.C., Chen, C.T., Cho, C.C., Lin, Y.C., Chang, C.C. and Chang, T.-C. (2008) A dual selective antitumor agent and fluorescence probe: “the binary BMVC-porphyrin photosensitizer”, *ChemMedChem*, **3**, 725-8.

※各期知識天地文章請逕於本院網頁：<http://www.sinica.edu.tw/>「常用連結」之「週報〈知識天地〉」項下瀏覽。※

