

以銀合歡種子內含成份 Mimosine 輔助 提高化學治癌效果之研究

Study of enhancement of sensitivity of hepatoma and lung cancer cells to chemotherapeutic drugs by mimosine from seeds of Leucaena Benth

洪文俊

高雄醫學院醫技系

摘 要

細胞癌化的過程中，p53抑癌基因的變異非常常見，此基因的缺損和癌細胞對化學治癌藥物的抗藥性有著密不可分的關係。許多化學治癌藥物會增加癌細胞p53基因的表現，進而誘導p21WAF1基因的表現來抑制癌細胞的增生並且引發癌細胞自然死亡(Apoptosis)。許多癌細胞其p53基因的功能缺損，所以添加化學治癌藥物並無法有效的促進p53與WAF1基因的表現，也無法有效的抑制癌細胞的生長。近來的研究顯示mimosine，一種由銀合歡種子萃取出的植物特有的氨基酸，在很低濃度時便可以在乳癌細胞內不經由p53直接活化p21WAF1基因的表現。本研究的目的在探討此氨基酸對國人最常罹患的肝癌及肺癌，是否也可以促進p21WAF1的表現，我們進一步探討此氨基酸是否能提高化學治癌藥物的療效，以評估它的臨床實用性。我們藉由測定DNA合成、細胞生長曲線、細胞週期分布及洋菜瓊膠群落生成來分析mimosine對肝癌及肺癌細胞生長的影響。我們以北方及西方點墨法來探討此氨基酸對細胞週期調控蛋白，包括週期素及週期素依賴性蛋白激酶抑制蛋白表現的影響，並利用蛋白激酶活性分析來偵測週期素與蛋白激酶複合體功的改變。最後，藉由

測定細胞存活情形來評估 mimosine 配合臨床上使用的化學治癌藥物是否可加強其抗癌效果。我們的實驗結果發現 mimosine 可有效抑制肝癌與肺癌細胞的增生，此藥物的作用主要是阻斷細胞由 G1 期進入 S 期，它也可明顯的抑制癌細胞的腫瘤生成能力減少癌細胞在洋菜瓊膠形成的群落數目。Mimosine 是藉由不同的作用機轉來抑制癌細胞生長，它可減少癌細胞週期素 D1 的合成也可增加抑制蛋白(p21WAF1 及 p27KIP1)的含量使癌細胞無法進入 S 期。我們也發現 mimosine 與化學治癌藥物對癌細胞的毒殺作用具有加成性，它是藉由引發癌細胞的凋亡來消滅癌細胞。綜合研究結果，我們結論 mimosine 有強烈的抗癌效果而且可配合化學治癌藥物使用以提高療效。進一步的活體動物實驗，可評估該氨基酸在活體內的抗癌效果及未來臨床的應用性。

關鍵詞：Mimosine，抑癌基因，週期素，p21WAF1，p27KIP1，化學治癌藥物

ABSTRACT

Mutations of p53 tumor suppressor gene are frequently found in the process of carcinogenesis. Recent results also suggest a close relationship between the defect of p53 gene and the development of drug-resistance in tumor cells. Many anti-cancer drugs enhance p53 gene expression and then activate subsequent p21WAF1 gene expression. The p21WAF1 protein may inhibit cell growth and induce apoptosis in cancer cells. However, chemotherapeutic drugs could not increase the p53 and p21WAF1 gene expression in p53 defect cancer cells and could not inhibit cell proliferation effectively in these cells. Recent observations demonstrated that mimosine, a plant specific amino acid extracted from the seeds of *Leucaena Glauca Benth*, could activate p21WAF1 gene expression independent of p53 at very low concentration in breast cancer

cells. The aim of our work is to study whether mimosine could enhance p21WAF1 expression in liver and lung cancers. Furthermore, we also evaluate the effectiveness of the combination of mimosine and chemotherapeutic drugs in cancer treatment. We investigate the effect of mimosine on cell growth of liver and lung cancer cells by using DNA synthesis assays, cell proliferation assays, flow cytometric analysis and in vitro colony formation assays. We also examine the effect of this drug on the expression of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors by Northern and Western blotting. We use a in vitro kinase assay technique to study the change of the kinase activity of cyclin-CDK complexes. Finally, the anti-cancer effect of mimosine in combination with chemotherapeutic drugs was evaluated by MTT assays. Our results demonstrated that mimosine inhibited the proliferation of liver and lung cancer cells and blocked the progression of cell cycle from G1 to S phases in these cells. This drug reduced the formation of colony of cancer cells in soft agar. Cell growth arrest induced mimosine is mediated by multiple mechanisms in human cancer cells. Mimosine may act via inhibition of the synthesis of cyclin D1 or enhancement of the expression of p21WAF1 and p27KIP1 to block the entry of cells into S phase. There is an additive cytotoxic effect of mimosine in combination with chemotherapeutic drugs. Additionally, long-term treatment of mimosine induced apoptosis in liver and lung cancer cells. We conclude that mimosine is a potent anti-cancer agent and this amino acid can enhance the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs. Future study in nude mice will be helpful to evaluate the anti-cancer effect of mimosine in vivo.

Keyword: Mimosine, tumor suppressor genes, cyclins, p21WAF1, p27KIP1, chemotherapeutic drugs

壹、前言

癌症的發生是累積多個基因變異的結果所產生的，依照基因在細胞癌化過程中所扮演的角色，可大致將基因分成兩大類：即致癌基因與抑癌基因(1-3)。致癌基因的蛋白質產物對細胞的生長或訊息傳遞有明顯的促進作用，所以當致癌基因被活化後，便會不斷的刺激細胞的增生進而形成腫瘤(4,5)。抑癌基因正好相反，這些基因的功能是在限制細胞不當的生長，所以當抑癌基因因為突變或缺失而造成其功能的破壞後，細胞生長不再受到嚴密的調控，癌症於是產生(6,7)。目前的研究顯示，在人類腫瘤形成的過程中，抑癌基因的損壞較致癌基因的活化更常見。由此可知抑癌基因功能的缺失與癌症的發生息息相關，同時許多抑癌基因陸續被發現，而這些基因隨後也被選殖出來(8)。最近的研究發現許多致癌或抑癌基因均會參與細胞週期的調節，細胞的增生主要是由週期素及週期素依賴型蛋白激酶來控制，當外來的生長因子或荷爾蒙與細胞膜上的受體結合後，藉由不同的訊息傳遞途徑及細胞內多種蛋白激酶的作用，可活化許多轉錄因子，而後引發與細胞生長有關的基因表現，此時G1週期素（如：週期素D1、D2、D3與E）的合成會逐漸增加，週期素與週期素依賴型蛋白激酶彼此結合並催化蛋白質磷酸化的反應。細胞主控抑制增生的Retinoblastoma蛋白（Rb蛋白）被磷酸化後，便會喪失抑制生長的能力，細胞於是進入S期使DNA合成增加，最後進行分裂成為兩個細胞(9-12)。癌細胞由於細胞週期調控基因的異常，無法發揮有效的功能，所以細胞可無限制的增生。更新的研究結果顯示細胞週期的調節除了週期素與週期素依賴型蛋白激酶外，還有其它週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白的參與(13-15)。這些抑制蛋白可大分成兩大群，第一類是p21WAF1蛋白的家族，包括有p21，p27及p57。第二類是p16INK4A蛋白的家族，包括p15，p16，p18及p19(16-18)。這些抑制蛋白都是非常重要的細胞週期調控者，它們可藉由與細胞週期素或週期素依賴型蛋白激酶的結合來抑制細胞週期的進行而有效阻斷細胞的增生。目前的證據指出上述兩類抑制蛋白在有些癌細胞其基因都已損壞，所以癌細胞的生長無法有效的控制以致於

癌細胞不斷的生長(19,20)。目前的研究指出：p21WAF1基因的表現主要被細胞中另一個抑癌基因的蛋白質產物p53所調節(21-22)。然而，p53抑癌基因功能在多達50%的人類腫瘤組織被發現已經失去活性行為(23-24)。不僅如此，近來的實驗結果發現：此基因的缺損和癌細胞對化學治癌藥物的抗藥性有著密不可分的關係。現在對許多化學治癌藥物作用機轉的探討顯示：這些藥物會增加癌細胞p53基因的表現，p53基因的產物是一種轉錄因子，它會進一步活化另一個非常重要的基因，即WAF1基因的表現，此基因的蛋白質產物稱為p21WAF1可以抑制癌細胞的增生並且引發癌細胞自然死亡(Apoptosis)。如上所述，許多癌細胞其p53基因的功能缺損，所以添加化學治癌藥物並無法有效的促進p53與WAF1基因的表現，也無法有效的抑制癌細胞的生長。有鑑於此，我們探討是否有哪些天然物質可以不經由p53而直接刺激p21WAF1基因的表現，如此這些癌細胞對化學治癌藥物的敏感性可大大提高，達到更好的治療效果。

近來的研究顯示mimosine，一種由銀合歡種子萃取出的植物特有的氨基酸，在很低濃度時便可以在乳癌細胞內不經由p53直接活化p21WAF1基因的表現並有效抑制乳癌細胞的生長(25)。因為國人最常罹患的肝癌及肺癌其p53基因也常被破壞而失去活性，本研究探討mimosine是否也可以促進肺癌及肝癌中p21WAF1基因的表現。另外，我們將著手探討此氨基酸是否能提高化學治癌藥物的療效，以評估它的臨床實用性。

貳、材料與方法

一、Mimosine的萃取與純化

Mimosine的萃取與純化是依林榮耀教授等人所發表的方法行(26)。將2.5公斤的新鮮銀合歡種子磨碎並煮沸4小時後，利用紗布過濾。由於此過濾液含有水溶性蛋白質而呈黏液狀，再以50%乙醇沉澱之，並再次利用紗布過濾。此萃取液於低壓下水浴進行濃縮，待去除乙醇後可得mimosine的粗結晶，再以冷蒸餾水洗滌以去除水溶性雜質。進行純化過程時先製備mimosine的鉛鹽再利用hydrogen sul-

fide 氣體去除鐵離子，另以大量氨水再溶解粗結晶。最後，再以蒸餾水進行再結晶，即可得無色針狀的 mimosine 結晶。不過，我們發現 Sigma 公司有商品化的 mimosine，其純度達 98% 以上，較我們自己所純化的更佳，為求正確分析 mimosine 的抗癌活性，所以本研究的後續實驗係添加購得的 mimosine。

二、研究材料

我們以一株肝癌細胞株 (Hep3B) 與三株肺癌細胞株 (H226, H322 及 H358) 進行實驗，其中 Hep3B 肝癌細胞由台北榮總醫研部取得。H226, H322 及 H358 是由台北師範大學方剛教授所提供。細胞培養於 DMEM/F12 培養液內含 10% 胎牛血清及抗生素，依實驗設計添加 mimosine 處理不同天數再進行分析。

三、Mimosine 對細胞生長的影響

(1) DNA 合成實驗

細胞生長會新合成 DNA 利用 [3H-thymidine] 去標幟 DNA 再測其放射性強度來評估細胞生長的情形。將細胞以 5×10^4 /well 的量植入 6-well (直徑 3 cm) 培養盤中一天後，添加不同濃度的 mimosine，再持續培養兩天。其後，於每一 well 中加入 $1 \mu\text{Ci}$ [3H-thymidine] 反應 4 小時，將細胞以磷酸鹽緩衝液清洗三次，加入 1 ml 的 10% trichloric acid 反應 15 分鐘，而後以 95% 酒精脫水 15 分鐘，最後將細胞以 1N NaOH + 0.5 % SDS 溶解。於溶解液中添加 3 ml 閃爍測定液並以閃爍偵測儀來測定放射性強度，每一結果來自三次獨立實驗。

(2) 以細胞流體儀(FACS)分析 mimosine 對癌細胞週期進行的影響

FACS 分析依 1996 年 Hung, W.C. 等人之方法(27)進行。首先，細胞以不同濃度的 mimosine 處理兩天後，以 trypsin-EDTA 處理再以 PBS 清洗後，於 4°C 以 70 % 乙醇固定再於 37 °C 以 $10 \mu\text{g/ml}$ RNase A 處理 30 分鐘，最後於室溫下，以 $70 \mu\text{M}$ propidium iodide 染色 30 分鐘，再利用 Becton Dickinson cell sorter 分析 10,000 cells/sample，以 CELL-FIT (Becton Dickinson) 軟體進行製圖及統計。

(3) 細胞生長曲線的測定

細胞以不同濃度 mimosine 處理不同天數後，癌細胞利用 trypsin-EDTA 溶液以分離，再以培養液中和並重新懸浮於培養液中，加入 trypan blue 並利用血球計算盤來判定計數存活細胞數。每一試驗條件均使用四個培養皿 (tetra-replicate wells)，並重覆三次獨立實驗以得平均值。

四、以洋菜瓊膠群落生長實驗測定癌細胞生成能力的變化

癌細胞 (10,000 cells/well) 植於培養基質中 (內含上層 0.3 % agarose，下層為 0.7% agarose)。細胞以不同濃度 mimosine 處理並置於 37°C 培養五週後再以 p-iodonitrotetrazolium violet (1 mg/ml) 染色 48 小時。群落大於 100 μ m 者，才予以計數，每一種細胞株均重覆實驗 4 次，以取其平均值。

五、以北方點墨法 (Northern Blotting) 分析 mimosine 對肝癌與肺癌細胞抑癌基因 mRNA 含量的變化

(1) Total RNA 的萃取

癌細胞以 mimosine 處理後，再利用 RNA-zol-B mRNA 萃取溶劑 (Cinna /Biotechx Laboratories, Inc., Houston, TX) 進行萃取。萃取的 mRNA 於 UV 260 nm 測定含量並以迷你水平洋菜膠電泳分析 18S 與 28S ribosome RNA 的完整性，而後將檢體 RNA 冰凍在 -70°C。

(2) cDNA 探針的製備

各種不同的 cDNA 探針分別由不同的實驗室取得。25-50 ng 的 cDNA 片段利用 random primer 試劑組及 [α -32 P]-ATP 加以標幟，於北方點墨分析時以 1-2 ng/ml 的濃度加入雜交反應液中用以偵測基因表現。

(3) 北方點墨法分析

北方點墨法分析根據 Hung 等人的方法(28)加以修改，每樣本取 20 μ g RNA 置於 1.0 % agarose gel (含 7 % formaldehyde) 中進行電泳，再於 10 倍 SSC 緩衝液 (1 倍 SSC 即 1 公升溶液中含有 8 gm NaCl 及

4.41 gm Sodium citrate; pH 7.0) 轉印至0.45 μ m Nylon membranes (Micron Separation, Inc., Westboro, MA) 上，並以紫外線照射促使 cross-linking 並於42°C之microhybridization oven中進行前雜交及雜交作用，雜交緩衝劑含50 % formamide，6倍SSPE (1倍SSPE為1公升溶液含8.76 gm NaCl及1.38 gm EDTA; pH 7.4)，5倍Denhardt's reagent, 0.1% SDS及0.1 mg/ml sperm DNA。各種不同的cDNA探針利用隨機標識法標幟上 $[^{32}\text{P}]$ dCTP (Boehringer Mannheim) 並加入雜交溶液中。反應作用後，於室溫下，此nylon membrane利用2倍SSC及0.1 % SDS洗滌30分鐘，再利用55°C之0.2倍SSC及0.1 % SDS洗滌10分鐘，最後置於Kodak X-OMAT AR x-ray軟片上 (配合intensifying screen) 於-70°C曝光24~48小時。

六、以西方點墨法測定p21WAF1蛋白的變化

細胞以mimosine處理兩天後，以冰冷的PBS清洗，再以lysis buffer (內含50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin及0.35 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride) 刮取。經10分鐘的超音波震碎後，以40,000 rpm，4 °C離心30分鐘收集上清液，並定量蛋白質含量。每一樣本取50 μ g的蛋白質，加入SDS loading buffer煮沸5分鐘後，置於15 % SDS-polyacrylamide gel上，進行垂直電泳分析。結束後，再以轉漬儀器將蛋白質轉印到Polyvinylidene Fluoride Protein Blotting Membrane (Bio-Rad) 上，再以5 % 脫脂奶TBST (0.2 % Tween 20 in PBS) 溶液飽和此膜，分別使用1 μ g/ml濃度primary mouse monoclonal antibodies against human p21WAF1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA)。再利用以Peroxidase-labeled goat anti-mouse secondary antibody (Oncogene Science, Cambridge, MA) 及enhanced chemiluminescence reagents (Amersham) 以完成反應。最後置於Kodak X-OMAT AR x-ray軟片 (配合intensifying screen) 於室溫下曝光。

七、Mimosine配合化學治癌藥物對肺癌及肝癌細胞毒殺作用的探討

(1) *In vitro* 細胞毒殺(cytotoxicity)試驗

活體外藥物試驗採用 Tetrazolium dye colorimetric (MTT) assay。兩種化學治癌用藥物為 cisplatin 及 etoposide 購自 Sigma 均泡製於 PBS 緩衝劑中，使成 1 mM 濃度，試驗前再以培養液稀釋使用。細胞先以 mimosine 處理一天後，再添加不同濃度之各種化學治癌藥物，再繼續培養兩天，每一試驗均使用四個培養皿，並重覆三次獨立實驗以得平均值，以決定 mimosine 處理與否對化學治癌藥物的影響。

八、以西方點墨法分析週期素 (Cyclins) 的變化

細胞以 mimosine 處理後，以冰冷的 PBS 清洗，再以 lysis buffer (內含 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin 以及 0.35 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride) 刮取。經 10 分鐘的超音波震碎後，以 40,000 rpm, 4 °C 離心 30 分鐘，收集上清液並定量蛋白質含量。每一樣本取 50 μ g 的蛋白質，加入 sample buffer 煮沸 5 分鐘，後置於 7.5 % SDS-polyacrylamide gel 上，進行電泳。結束後，再將蛋白質轉印到 NC paper 後，以 5% 脫脂奶 TBST (0.2 % Tween 20 in PBS) 溶液進行 saturation，分別添加使用 1 μ g/ml 之 primary mouse monoclonal antibodies against human cyclin D1 and E (Santa Cruz Bio-technology, Inc., CA)，再利用 peroxidase-labeled goat anti-mouse secondary antibody (Oncogene Science, Cambridge, MA) 及 enhanced chemiluminescence reagents (Amersham) 以完成反應。最後置於 Kodak X-OMAT AR x-ray 軟片上 (配合 intensifying screen) 於室溫下曝光。

九、分析 Cyclin-dependent kinases 的變化

利用方法八所取得之蛋白質上清液來測定 kinases 的活性。取得之 lysate 於 4 °C 加入所需之 anti-cdk4/6 抗體，作用 16-20 小時，再加入 30 μ l 的 Protein-G agarose 利用免疫沉澱實驗法 (immunoprecipitation) 取得 lysate protein，再以冰冷的 lysis buffer 清洗三次，利用 0.2 mg/ml GST-Rb fusion protein 作為受質，於 kinase buffer 中進行受質磷酸化反應以測定 cdk4/6 Rb kinase 的活性，反應結束後取出部

份反應終產物進行SDS-PAGE分析於7.5% SDS-PAGE中，進行電泳。結束後，再將此電泳膠乾燥，最後置於Kodak X-OMAT AR x-ray軟片上（配合intensifying screen）於室溫下曝光。

參、結果

一、Mimosine可有效的抑制肺癌及肝癌細胞的生長

本研究第一項探討的問題是mimosine是否能抑制肝癌及肺癌細胞的生長。本研究所使用的癌細胞株包括三株肺癌細胞株（H226, H322及H358）與一株肝癌細胞株（Hep3B）其腫瘤分類及細胞特性簡述於表一。我們將癌細胞培養於不同濃度的mimosine不同天數後，進行DNA合成實驗。如表二所示，mimosine可有效抑制癌細胞的生長，而且抑制生長的效果與mimosine的濃度呈正相關。此外，mimosine的抗癌作用也與處理的時間呈正相關（表三）。Mimosine處理一天對癌細胞的生長抑制較有限，處理兩天後，可抑制40-60%左右的癌細胞增生，第三天的效果更加的顯著。為了瞭解mimosine的作用機轉，我們以細胞流體儀分析mimosine是如何阻斷癌細胞之細胞週期的進行，如表四所示，此藥物最主要是讓癌細胞無法由G1進入S期。亦即，mimosine使癌細胞的生長停在G1/S間。我們也以計算細胞數目的方法進行生長曲線的分析，其結果與DNA合成實驗的結果具一致性，顯示mimosine的抗癌效果與處理時間呈現正相關（圖一至圖四）。綜合以上三種實驗的結果明確顯示mimosine可以抑制肝癌與肺癌細胞的生長。

二、Mimosine有效抑制肺癌與肝癌細胞在洋菜瓊膠形成群落的能力

癌細胞在洋菜瓊膠形成群落的能力是一種於試管內評估癌細胞腫瘤生成能力的實驗，通常容易形成群落的癌細胞也容易於活體動物形成腫瘤。如圖五所示，經過三週的培養後，癌細胞會於洋菜瓊膠形成很大的細胞群落（colony），若於瓊膠添加mimosine，在顯微鏡下可見許多單一細胞分布其中，然而卻無法持續分裂形成群落。同時，群落數目也隨mimosine濃度的提高而逐漸減少（表五），由此

實驗結果發現mimosine能有效的抑制癌細胞的腫瘤生成能力。

三、Mimosine對週期素D1及E之mRNA及蛋白質含量的影響

由細胞週期分析發現mimosine最主要的作用是抑制細胞由G1期進入S期，為了瞭解此藥物的作用機轉，我們首先分析G1週期素(週期素D1及E) mRNA的變化。如圖六所示，mimosine明顯的抑制H226肺癌細胞週期素D1的表現，對其他三株細胞則無作用。不過，mimosine對所有四株細胞株週期素E的表現皆無影響。我們同時利用西方點墨法來偵測G1週期素蛋白質的表現，我們的實驗結果與北方點墨分析的結果一致，mimosine會抑制H226肺癌細胞週期素D1蛋白質的合成，對其他細胞則無明顯的作用(圖七)。我們進一步分析在H226癌細胞其週期素D1的抑制程度與mimosine處理的劑量與時間的相關性，我們發現mimosine的處理劑量愈高，週期素D1的抑制愈明顯(圖八)。同時處理的時間愈久，mimosine抑制效果也愈顯著(圖九)。相反地，mimosine對週期素E蛋白質的合成均無明顯的作用(圖十)。

四、Mimosine能誘導癌細胞p21WAF1及p27KIP1蛋白質的表現

因為mimosine會阻斷多種癌細胞由G1期進入S期，然而此藥物卻只能抑制H226肺癌細胞G1週期素的表現，這些結果暗示mimosine可藉由其他的機轉來抑制細胞週期的進行。如前言所述，週期素抑制蛋白的大量表現也會阻斷細胞的增生，我們於是以西方點墨法來探討mimosine對KIP週期素抑制蛋白家族(包括p21WAF1, p27KIP1及p57KIP2)表現的影響。我們發現mimosine對不同的癌細胞其KIP家族蛋白的表現具有不同的作用，此藥物在H226, H358及Hep3B癌細胞可誘導p21WAF1蛋白質的合成，對H322則無效果(圖十一)。相反地，mimosine可以誘導H322肺癌細胞p27KIP1抑制蛋白的合成，卻無法在H226, H358及Hep3B癌細胞促進p27KIP1的合成(圖十二)。

另一個KIP家族的抑制蛋白，即p57KIP2在這些癌細胞的表現量很低，其蛋白質的合成也不受mimosine的調節(圖十三)。

五、週期素D1依賴性蛋白激酶的活性被Mimosine有效抑制

細胞週期的進行主要是利用新合成的週期素與週期素依賴性蛋白激酶形成複合體去磷酸化retinoblastoma蛋白，使其失去抑制細胞生長的功能。前述的實驗結果顯示mimosine可藉由降低週期素的合成或增加抑制蛋白的表現使細胞停止生長，為了更清楚瞭解週期素依賴性蛋白激酶的活性是否被mimosine所抑制，我們利用免疫沉澱法配合蛋白激酶活性分析法來偵測mimosine對這些蛋白激酶活性的影響。如圖十四所示，mimosine確實有效抑制週期素蛋白激酶的活性。其次，我們以H226癌細胞當代表來探討週期素蛋白激酶活性的改變與mimosine的處理濃度及處理時間的相關性，我們的實驗結果顯示mimosine的處理濃度愈高，酵素活性被抑制更顯著（圖十五）。同樣地，mimosine的處理時間愈久，酵素的活性愈低（圖十六）。

六、Mimosine可促使肺癌及肝癌細胞凋亡

由實驗中我們發現短時間（兩天內）處理mimosine，主要造成細胞生長停止，然而處理的時間超過三天後，mimosine對癌細胞有非常明顯的毒殺作用。因為藥物如果能有效引發癌細胞凋亡，則其不會產生強烈的免疫反應及副作用對癌症的治療上將有很大的助益，於是，我們探討mimosine所造成之癌細胞的死亡是經由凋亡（apoptosis）或是壞死（necrosis）。癌細胞經mimosine處理後，將DNA萃取出來進行洋菜膠水平電泳分析，實驗結果發現mimosine會造成DNA fragmentation形成明顯的DNA ladder（圖十七），這是凋亡細胞非常重要的生化特徵，所以我們結論長時間處理mimosine會造成癌細胞的凋亡。

七、Mimosine配合化學治癌藥物使用對癌細胞毒殺的效果

目前用於肺癌治療的第一線化學治癌藥物有許多種，我們選用兩種其中常用的cisplatin及etoposide進行實驗。為了探討mimosine是否能促進化學治癌藥物的效果，我們將癌細胞先以mimosine處理12小時後，再添加不同濃度的化學治癌藥物處理兩天，最後以MTT方法測定藥物的處理對細胞毒殺作用的大小。我們的實驗結果顯示mimosine與cisplatin（圖十八至圖二十一）或etoposide（圖二十二至圖二十五）對癌細胞的作用具有加成性。

肆、討論

我們的實驗結果顯示 mimosine 可抑制多株肺癌及肝癌細胞株的增生，這些癌細胞的生長被阻斷於 G1 期。我們於是進一步探討 mimosine 作用的分子機轉，結果發現 mimosine 的抑制增生作用是透過多種途徑來完成的。首先，mimosine 可抑制 H226 肺癌細胞週期素 D1 的表現，進而阻斷細胞的生長。不過，此抑制作用的分子機轉尚未清楚。目前已知週期素 D1 的啟動子區域有數個轉錄因子調節區，包括：Myc/Max、E2F、Sp1 及 CREB/ATF 結合區，這些轉錄因子對週期素 D1 的表現影響甚大(29)。此外，某些上游的訊息傳遞途徑，如：p42/p44MAPK 及 p38MAPK 傳遞途徑等也被報告與此週期素的調節有關(30)。最近一篇報告指出：降低 MDA-MB-453 乳癌細胞內鐵離子的含量會抑制週期素 D1 的表現(31)，因為 mimosine 是一種鐵離子螯合劑，所以 mimosine 有可能藉由降低癌細胞內鐵離子的濃度來抑制週期素 D1 的合成。不過，mimosine 對多種細胞而言均為有效的鐵離子螯合劑，為何它只抑制 H226 肺癌細胞週期素 D1 的表現，仍待進一步的分析。其次，在 H226、H358 與 Hep3B 癌細胞 mimosine 會增加週期素依賴型蛋白激酶抑制蛋白 p21WAF1 的表現來抑制癌細胞的生長。此藥物在 21PT 乳癌細胞也會誘導 p21WAF1 的表現(32)。有趣的是，mimosine 在 H322 肺癌細胞會誘導另一個抑癌基因 p27KIP1 的表現，這個效果對臨床治療上十分重要，因為最新的研究報告發現，p27KIP1 蛋白在非小型肺細胞癌腫瘤組織的表現會大量的減少，而且 p27KIP1 的表現愈少病人的預後愈差、死亡率愈高(33)。所以如果 mimosine 能於活體腫瘤細胞有效的刺激 p27KIP1 蛋白的產生，則對非小型肺細胞癌的治疗將有極大的幫助。更令人興奮的是我們發現 mimosine 會誘發細胞凋亡 (apoptosis)。當細胞受到傷害後會自行修補，但是如果傷害非常嚴重則細胞會死亡。細胞死

亡的方式依其機轉的不同可分成壞死 (Necrosis) 與凋亡 (Apoptosis) 兩種(34-36)。細胞壞死時整個細胞膜的選擇性和通透性會喪失，細胞內的胞器常因脹大而破裂，許多酵素於是釋出，細胞內的 DNA 與蛋白質大量被破壞，細胞於是死亡。此外，壞死的細胞

會引發個體強烈的免疫反應，造成個體嚴重的傷害(37-38)。相反地，自然死的發生過程就溫和許多，細胞自然死的時候，細胞體積首先會萎縮核內的DNA會緻密化(condensation)並且逐漸沉積在核膜周圍形成彎月形的結構，隨著死亡步驟的進行，細胞會分裂成小體即Apoptotic body，然後被周圍的細胞所吞噬分解，對個體的影響非常小。正因為如此，開發能選擇性引發癌細胞凋亡的藥物便成為抗癌藥物研究上最熱門的領域之一。我們實驗結果發現較長時間的添加mimosine可誘導肝癌及肺癌細胞的凋亡，尤其值得注意的是本實驗所使用的H322肺癌細胞是一株具有很強的抗藥性之肺癌細胞株，它常被用於化學治癌藥物的抗藥性之研究，不過mimosine對它仍具有誘導細胞凋亡的效果。相同地，這個效果對於臨床治療上十分重要，因為抗藥性的產生是臨床上治療癌症失敗最主要的原因之一，然而抗藥性是如何產生迄今仍無定論。目前的證據顯示癌細胞抗藥性的發生與多種基因的異常有關，包括：ras、myc、neu致癌基因及mdr (multiple drug resistance)基因等，其中又以針對mdr基因的研究最多(39-42)。此基因的蛋白質產物為一種能量依賴性的排出幫浦，可將治療藥物由癌細胞很快的排除以減少胞內藥物濃度，所以藥物的治療效果便大大的降低(43-45)。我們的研究發現mimosine對具抗藥性的癌細胞一樣有效，可誘導這些癌細胞凋亡，所以mimosine對臨床治療上或許會有良好的助益，不過此藥物究竟藉由何種凋亡訊息傳遞途徑來引發癌細胞死亡目前並不清楚，值得進一步探討。最後我們試管內的實驗顯示此藥物配合化學治癌藥物使用時，其毒殺癌細胞的作用具有加成性。多種藥物配合使用是目前癌症治療的新趨勢，例如：三種抗癌藥物的搭配使用用於治療肺癌正在臨床試驗的階段(46,47)，其它癌症的治療也有相類似的試驗在進行中(48,49)。藥物的配合使用主要是希望加強抗癌效果，不過必須注意這些藥物對病人所造成的副作用與毒性。由以前的活體動物研究報告顯示本研究中mimosine所使用的濃度其毒性不大(50)，若能篩選適當的作用劑量並配合化學治癌藥物使用，可能輔助並提高對癌症的治療效果。

伍、結論與建議

本計畫針對銀合歡種子中所存在的植物氨基酸 mimosine 的抗癌效果及其作用機轉作詳細的探討，我們的結果發現 mimosine 無論是單獨使用或配合化學治癌藥物使用，均有不錯的抗癌效果，這些作用的產生與該氨基酸對目前所知的細胞週期調控蛋白的調節有明顯的關係，以實驗的結果推論，我們相信 mimosine 具有發展成臨床使用藥物的潛力。不過，未來仍有多項研究必須持續進行探討，我們有兩方面的建議：

- (1) 進行活體動物實驗：在培養細胞所發現的藥物作用並不是絕對與活體動物所見到的效果完全一致，這牽涉到藥物在活體動物的吸收、運送、代謝及排除等，必須以實驗動物真正的進行研究方可下定論，同時藥物在活體動物的累積量及造成的毒性，也需經由實驗才能瞭解，所以活體動物的研究十分重要，這也是我們下一年度研究的目標。
- (2) mimosine 類似物的合成：以前的活體動物研究報告顯示高濃度的 mimosine 會造成生物毒性，長時間使用或是體內累積劑量過高，會產生明顯的副作用。雖然本研究中所使用的劑量不會造成嚴重的毒性，然而如果能以合成的方式，開發出毒性更小而抗癌效果更佳的類似物，對未來臨床的使用將更有潛力。

表一、本研究使用之肺癌及肝癌細胞株的特性

細胞株名稱	細胞特性
H226	Squamous carcinoma, 非小細胞肺癌
H322	Adenocarcinoma, 非小細胞肺癌
H358	Adenocarcinoma, 非小細胞肺癌
Hep3B	Hepatocellular carcinoma, 肝癌

表二、Mimosine 抑制人類肺癌及肝癌細胞 DNA 合成

	細胞株			
	H226	H322	H358	Hep3B
	[3H]-thymidine incorporation (cpm/well)			
Mimosine(μ M)				
0	10245 $\pm$ 750	7850 $\pm$ 218	6943 $\pm$ 412	12187 $\pm$ 333
25	9845 $\pm$ 511	6553 $\pm$ 398	5865 $\pm$ 198	10388 $\pm$ 275
100	7770 $\pm$ 432*	5487 $\pm$ 452*	4709 $\pm$ 311*	8793 $\pm$ 562*
400	4098 $\pm$ 219*	4710 $\pm$ 268*	4165 $\pm$ 444*	6243 $\pm$ 283*

數據代表 "mean $\pm$ SE" 由三次獨立實驗統計獲得，每次實驗為 triplicate.

*P<0.05

表三、Mimosine處理時間與其抑制肺癌及肝癌細胞DNA合成的關係

細胞株	Mimosine 處理 天 數		
	一天	兩天	三天
	[3H]-thymidine incorporation (% of control)		
H226	72±10	43±9	25±7
H322	88±5	62±7	41±4
H358	82±12	61±9	45±10
Hep3B	76±8	52±3	37±2

數據代表 "mean ± SE" 由三次獨立實驗統計獲得，每次實驗為triplicate.

表四、Mimosine對癌細胞細胞週期進行的影響

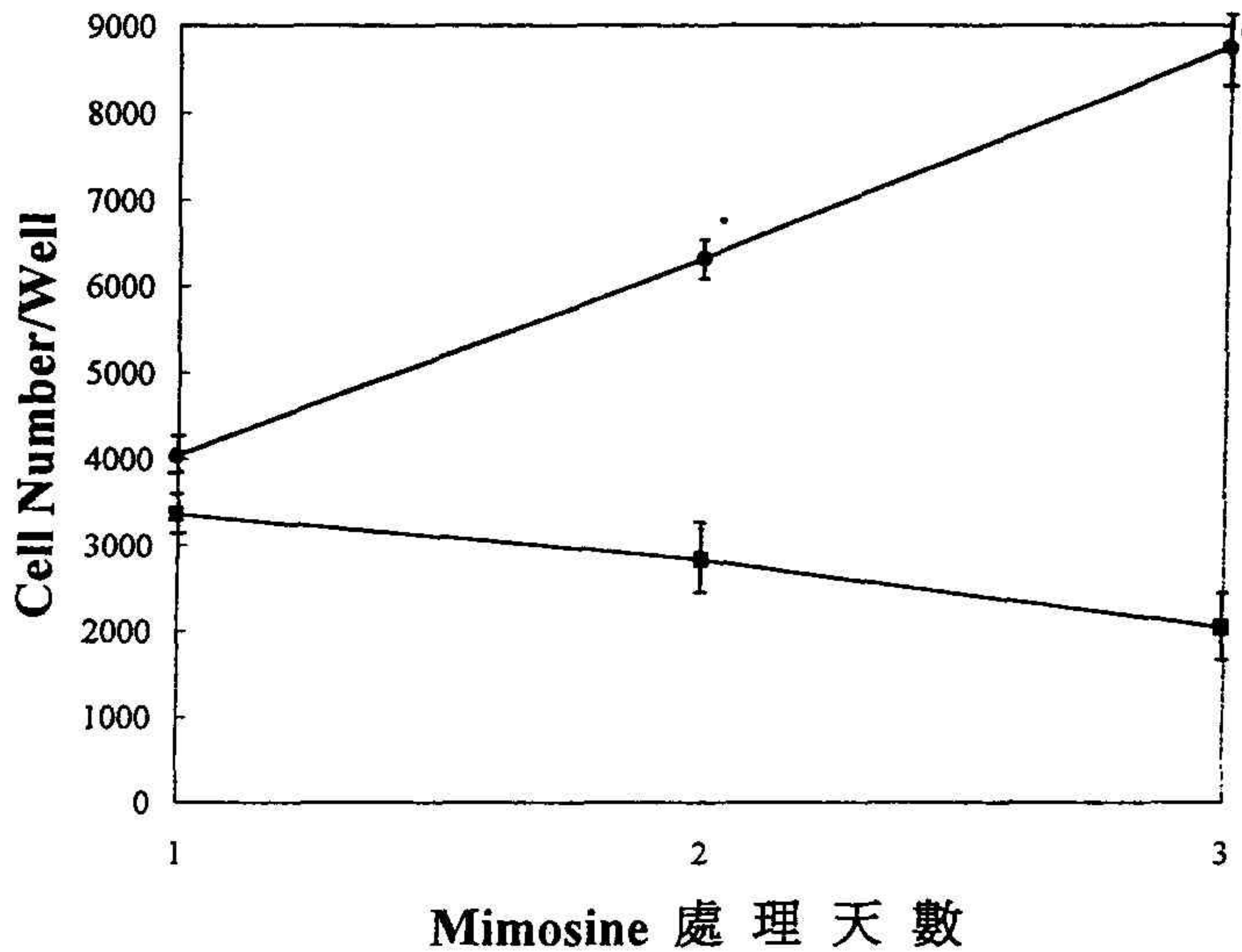
細胞株	細胞週期分布情形 (%)		
	G0/G1	S	G2/M
H226			
control	51.8	28.7	19.5
mimosine	86.2	6.8	7.0
H322			
control	60.3	25.2	14.5
mimosine	79.8	10.4	9.8
H358			
control	64.7	23.7	11.6
mimosine	77.1	12.3	10.6
Hep3B			
control	60.7	25.8	13.5
mimosine	79.5	9.4	11.1

表五、Mimosine 對肺癌及肝癌細胞洋菜瓊膠群落生成的影響

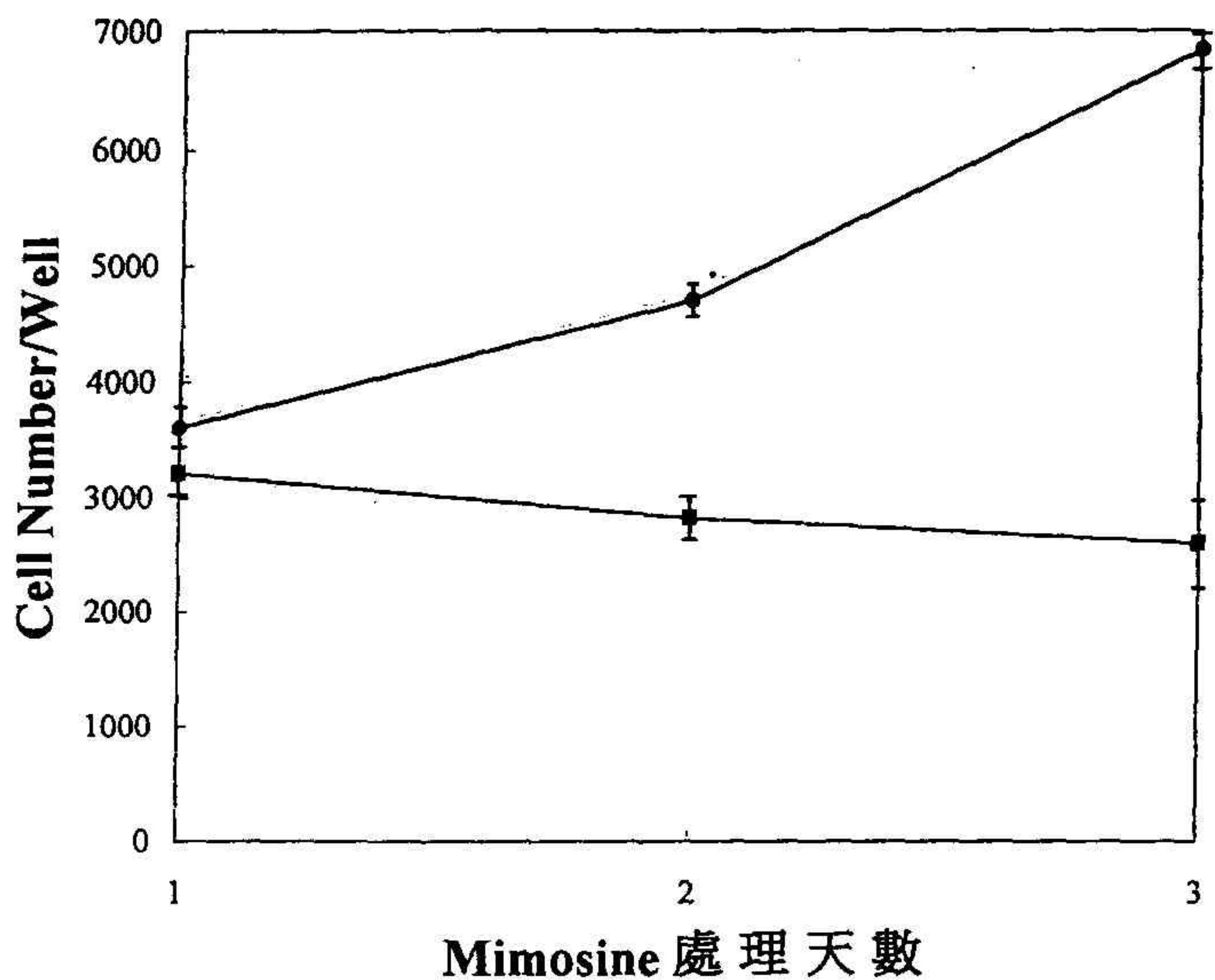
群落數目 (colonies/well)	
細胞株	
H226	
control	286±34
100 μ M mimosine	203±57
400 μ M mimosine	49±10*
H322	
control	306±37
100 μ M mimosine	254±26
400 μ M mimosine	107±41*
H358	
control	250±38
100 μ M mimosine	206±23
400 μ M mimosine	111±42*
Hep3B	
control	476±65
100 μ M mimosine	319±47*
400 μ M mimosine	119±10*

數據代表 "mean $\pm$ SE" 由三次獨立實驗統計獲得,每次實驗為 triplicate.

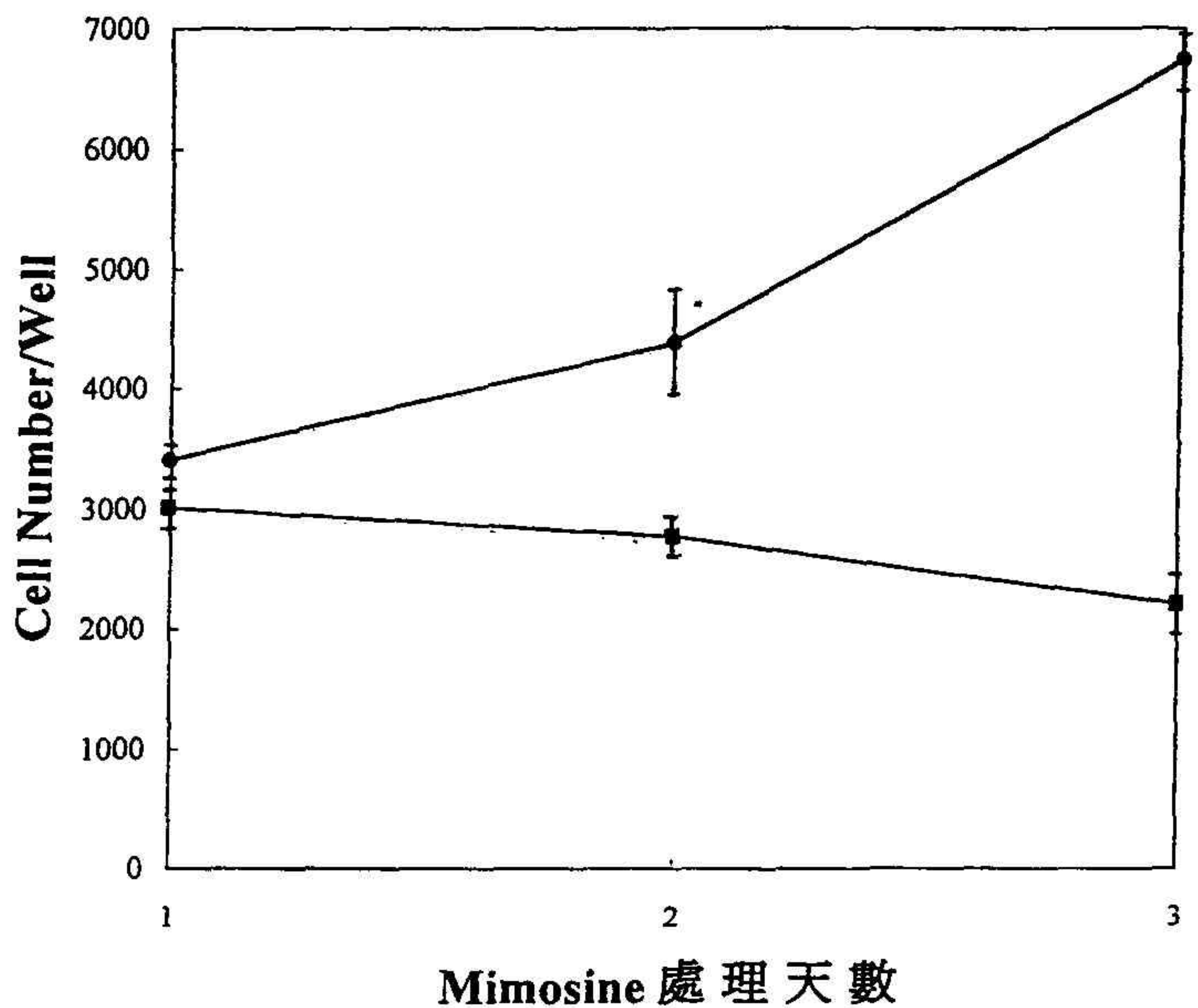
*P<0.05



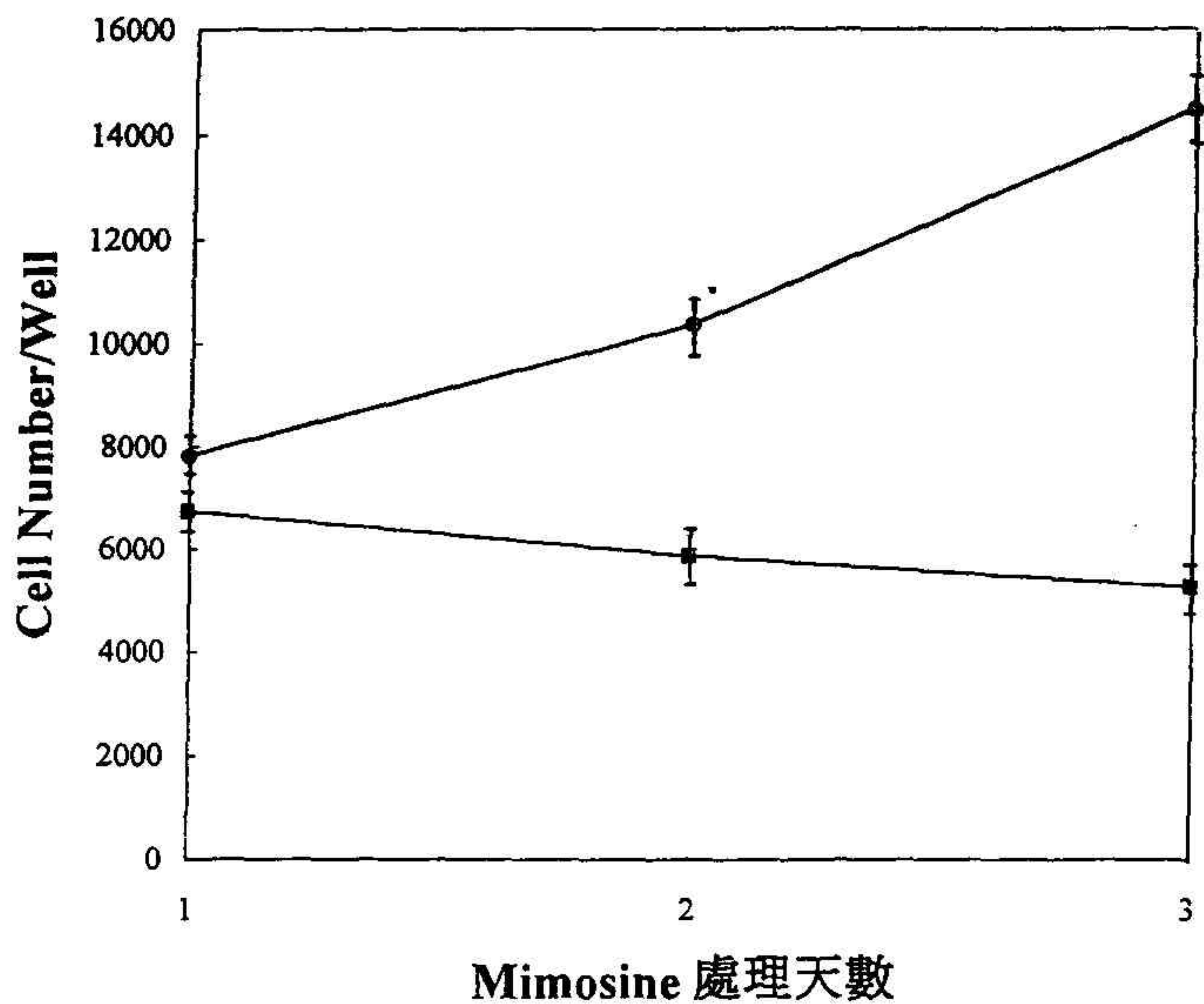
圖一、Mimosine 對 H226 細胞生長曲線的影響。細胞培養於含有 10%胎牛血清的培養液中，並於不添加 (●) 或添加 (■) 400 μ M mimosine 的條件下培養同天數後，計算活存的細胞數目。數據代表 “mean $\pm$ SE” 由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate. *p<0.05



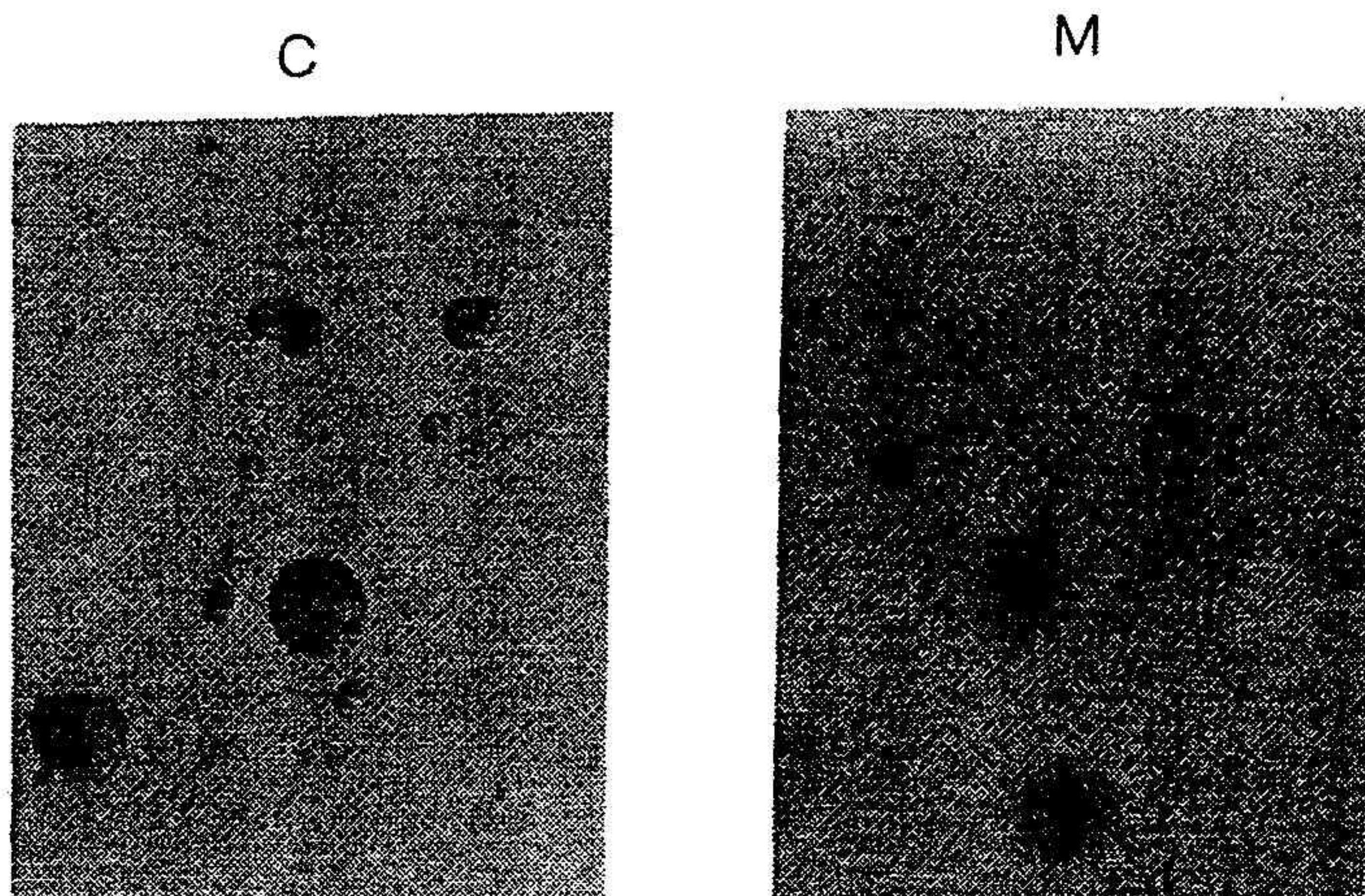
圖二、Mimosine 對 H322 細胞生長曲線的影響。細胞培養於含有 10%胎牛血清的培養液中，並於不添加 (●) 或添加 (■) 400 μ M mimosine 的條件下培養同天數後，計算活存的細胞數目。數據代表 “mean $\pm$ SE” 由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate. * $p < 0.05$



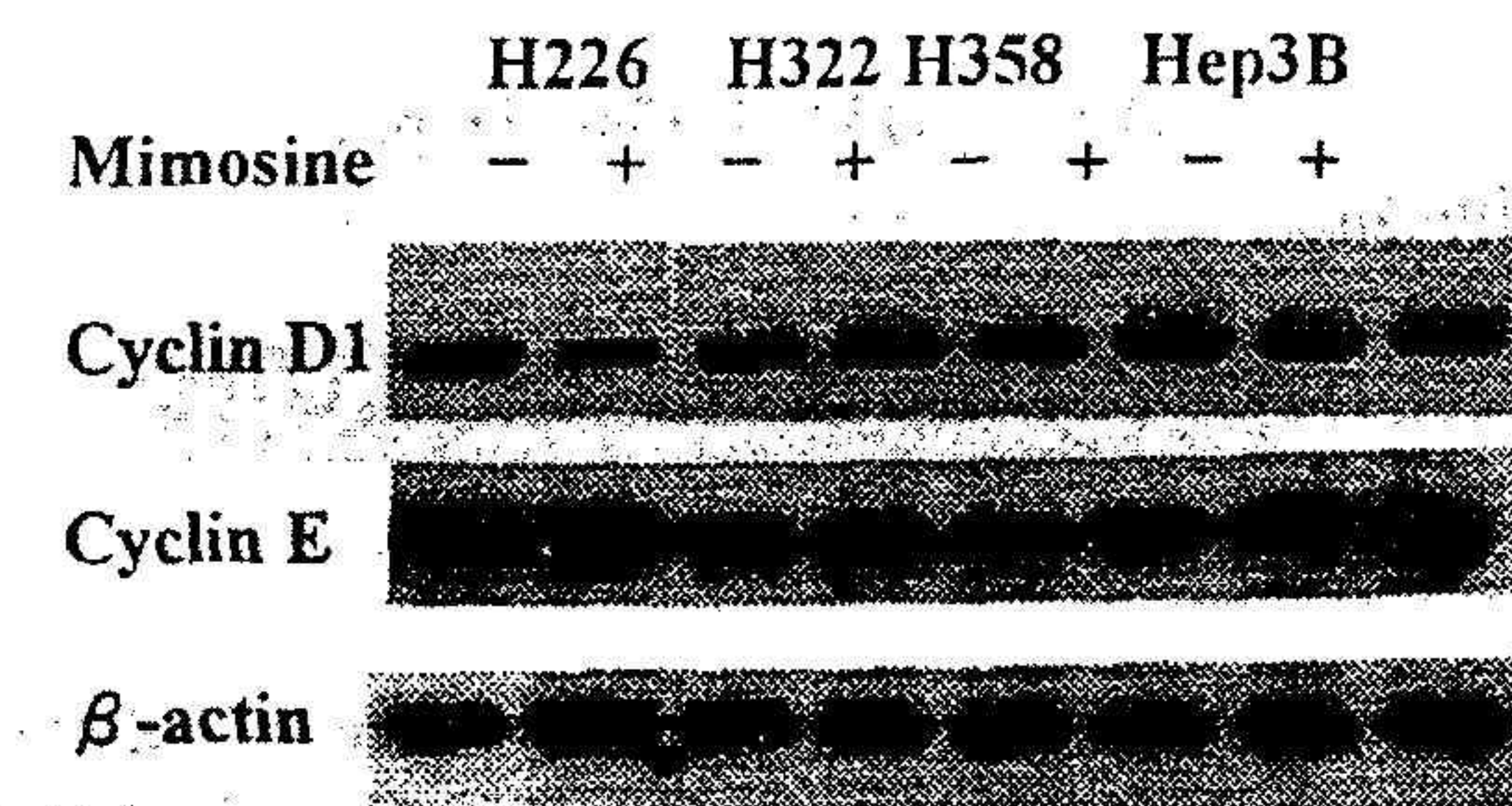
圖三、Mimosine 對 H358 細胞生長曲線的影響。細胞培養於含有 10%胎牛血清的培養液中，並於不添加 (●) 或添加 (■) 400 μ M mimosine 的條件下培養同天數後，計算活存的細胞數目。數據代表 "mean $\pm$ SE" 由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate. *p<0.05



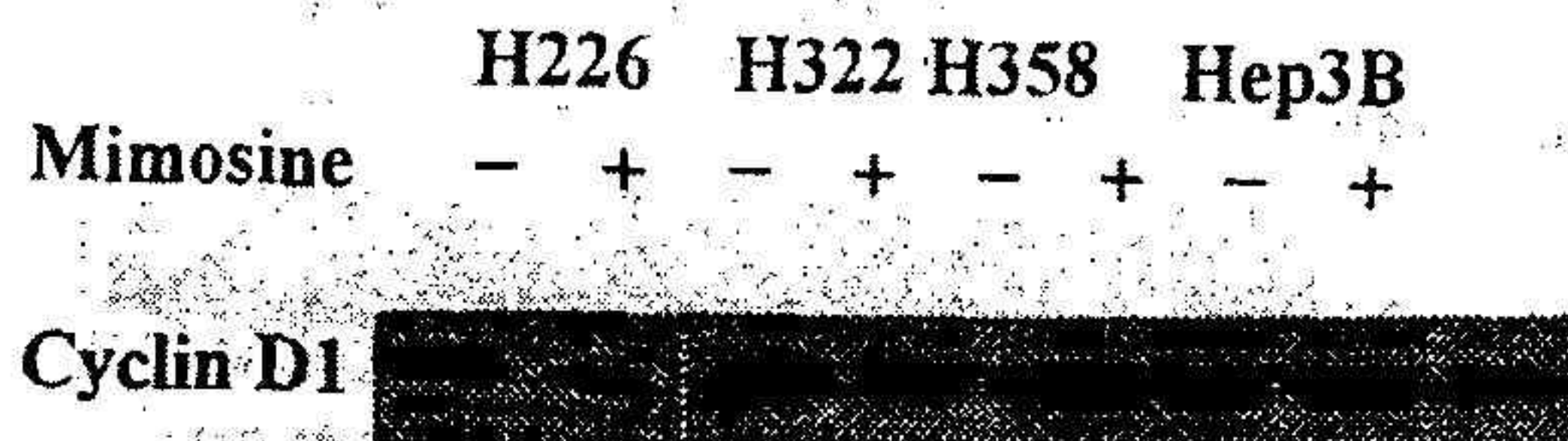
圖四、Mimosine 對 Hep3B 細胞生長曲線的影響。細胞培養於含有 10%胎牛血清的培養液中，並於不添加 (●) 或添加 (■) 400 μ M mimosine 的條件下培養同天數後，計算活存的細胞數目。數據代表 “mean $\pm$ SE” 由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate. *p<0.05



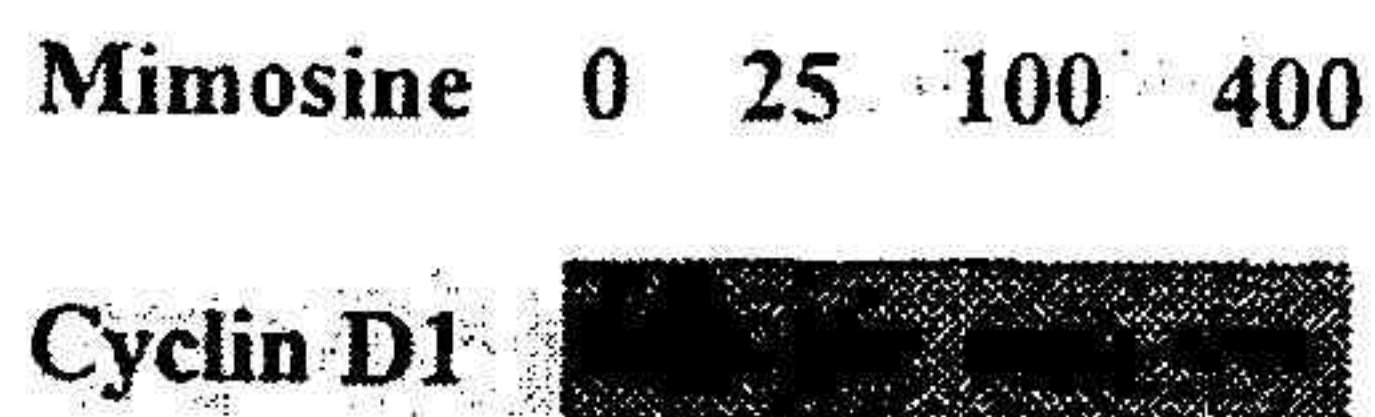
圖五、Mimosine 對癌細胞在洋菜瓊膠形成群落的影响。癌細胞培養於不含 (C) 或含有 (M) 400 μ M mimosine 的洋菜瓊膠三周後，細胞群落生成的情形。



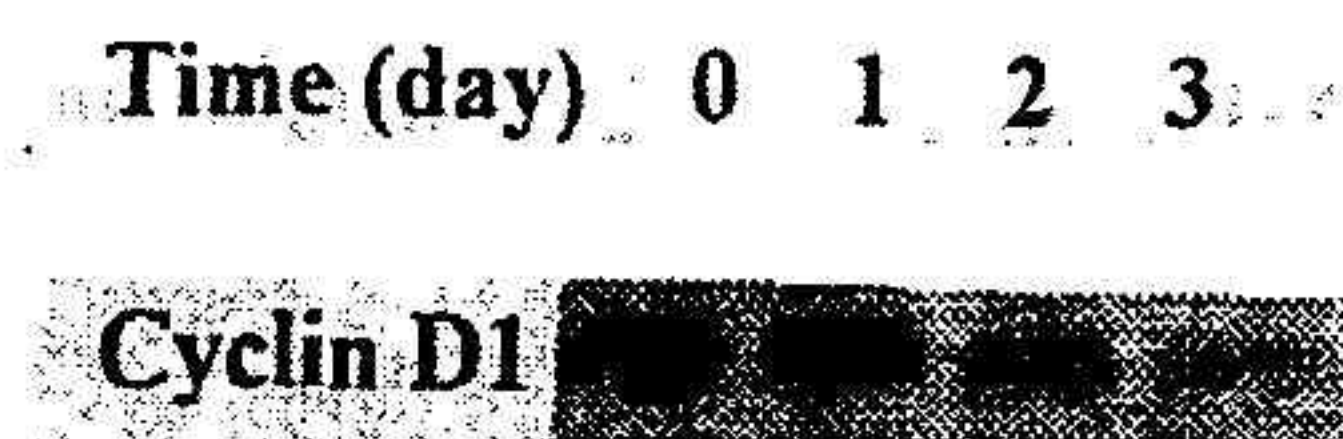
圖六、以北方點墨法偵測 Mimosine 對不同癌細胞週期素 D1 及 E mRNA 表現的影响。各種癌細胞於不含 (-) 或含有 (+) 400 μ M mimosine 的培養液兩天後，萃取 mRNA 進行北方點墨分析。



圖七、以西方點墨法偵測 Mimosine 對不同癌細胞週期素 D1 及 E 蛋白質表現的影響。各種癌細胞於不含 (-) 或含有 (+) 400 μ M mimosine 的培養液兩天後，萃取蛋白質進行西方點墨分析。



圖八、H226 細胞處理不同濃度 mimosine 後，週期素 D1 蛋白質合成量的變化。



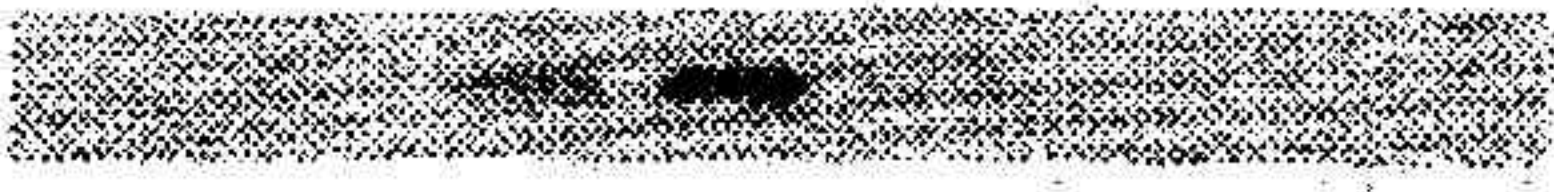
圖九、H226 細胞處理 400 μ M mimosine 不同天數後，週期素 D1 蛋白質合成量的變化。

	H226		H322		H358		Hep3B	
Mimosine	-	+	-	+	-	+	-	+
Cyclin E								

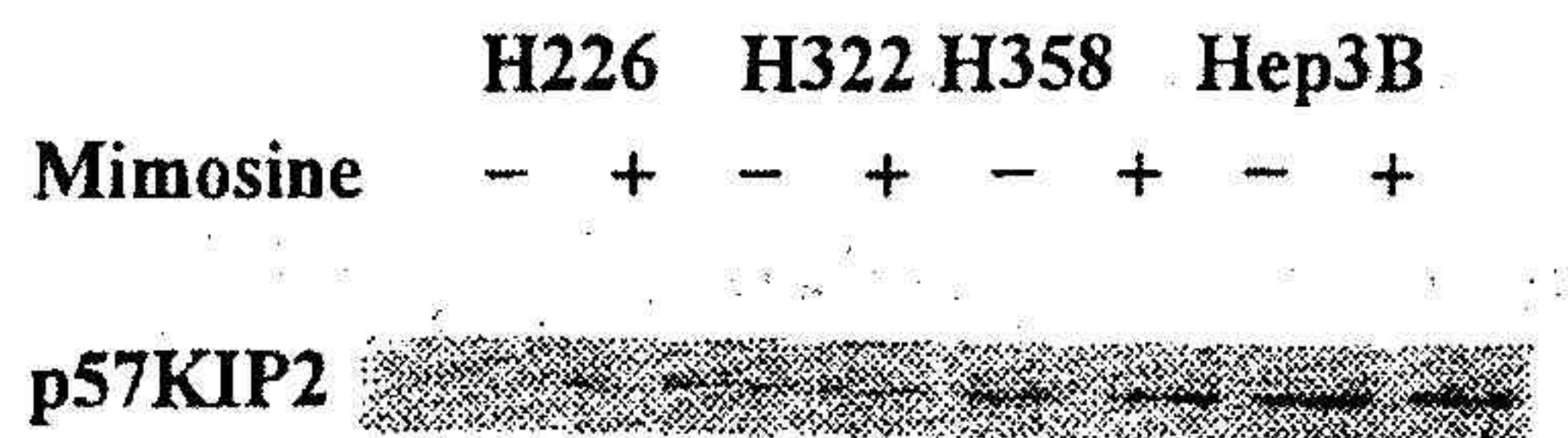
圖十、不同癌細胞處理 400 μ M mimosine 兩天後，週期素 E 蛋白質合成量的變化。

	H226		H322		H358		Hep3B	
Mimosine	-	+	-	+	-	+	-	+
p21WAF1								

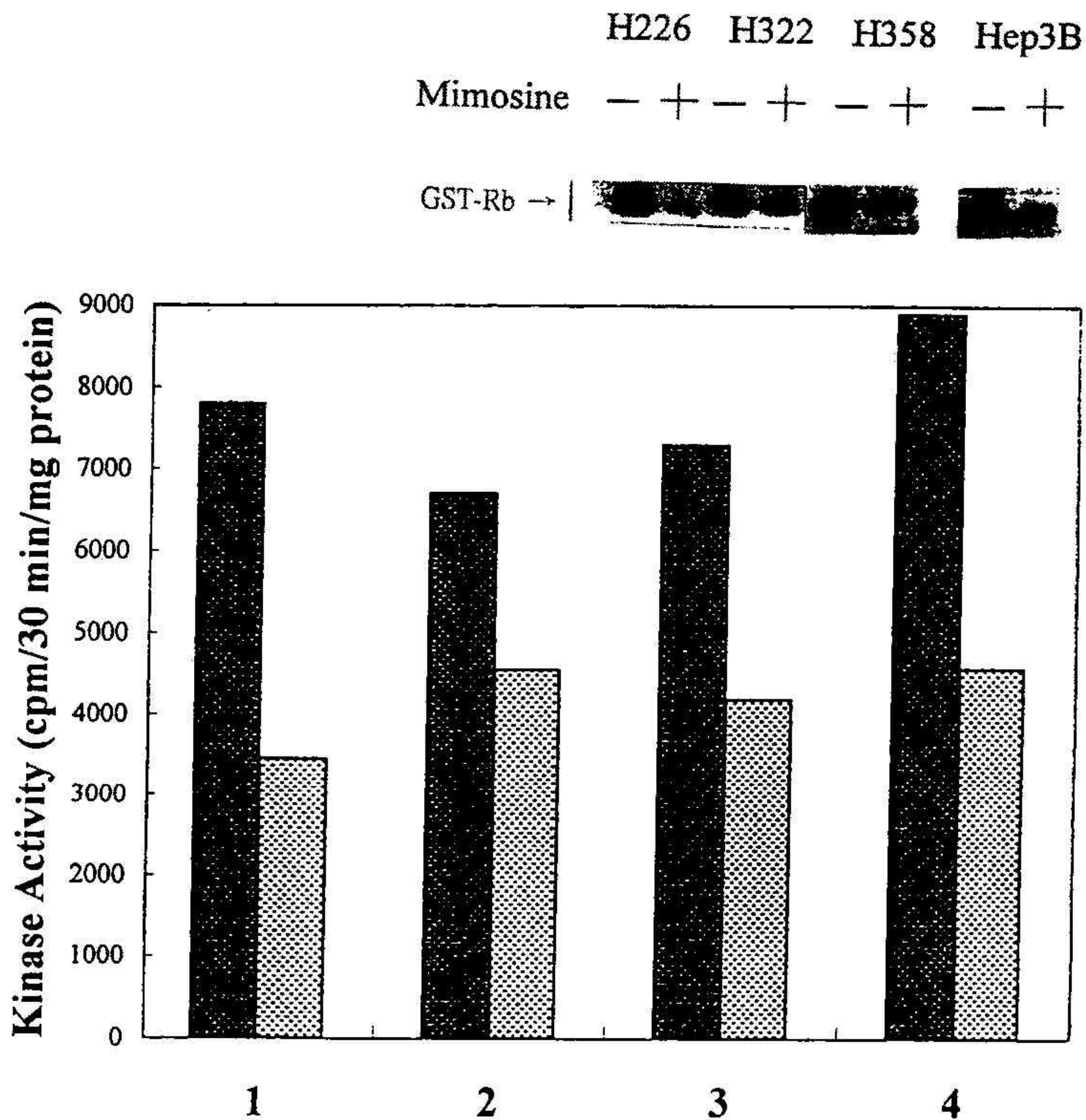
圖十一、以西方點墨法偵測 Mimosine 對不同癌細胞 p21WAF1 蛋白質表現的影響。各種癌細胞於不含 (-) 或含有 (+) 400 μ M mimosine 的培養液兩天後，萃取蛋白質進行西方點墨分析。

	H226		H322		H358		Hep3B	
Mimosine	-	+	-	+	-	+	-	+
p27KIP1								

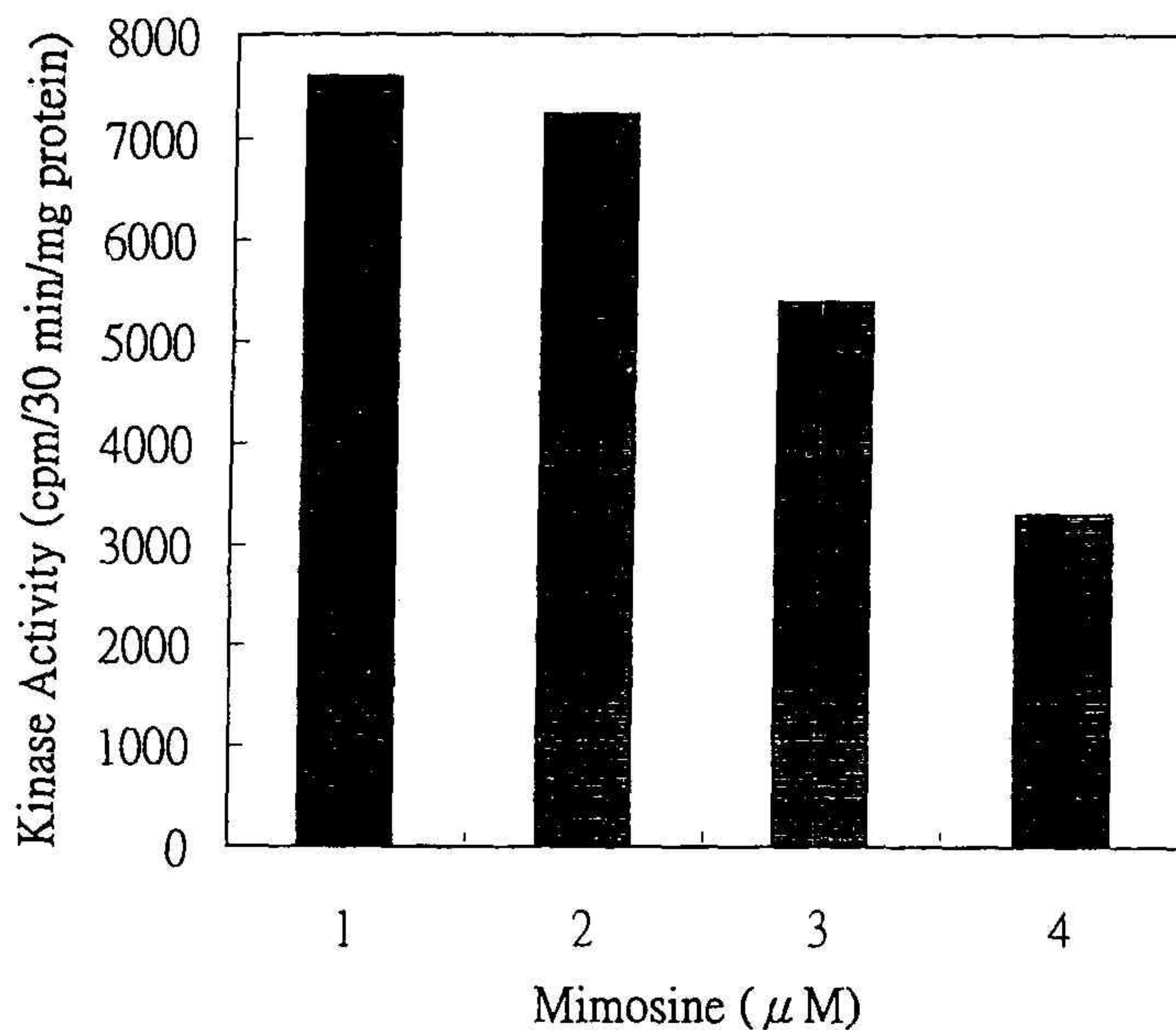
圖十二、以西方點墨法偵測 Mimosine 對不同癌細胞 p27KIP1 蛋白質表現的影響。各種癌細胞於不含 (-) 或含有 (+) 400 μ M mimosine 的培養液兩天後，萃取蛋白質進行西方點墨分析。



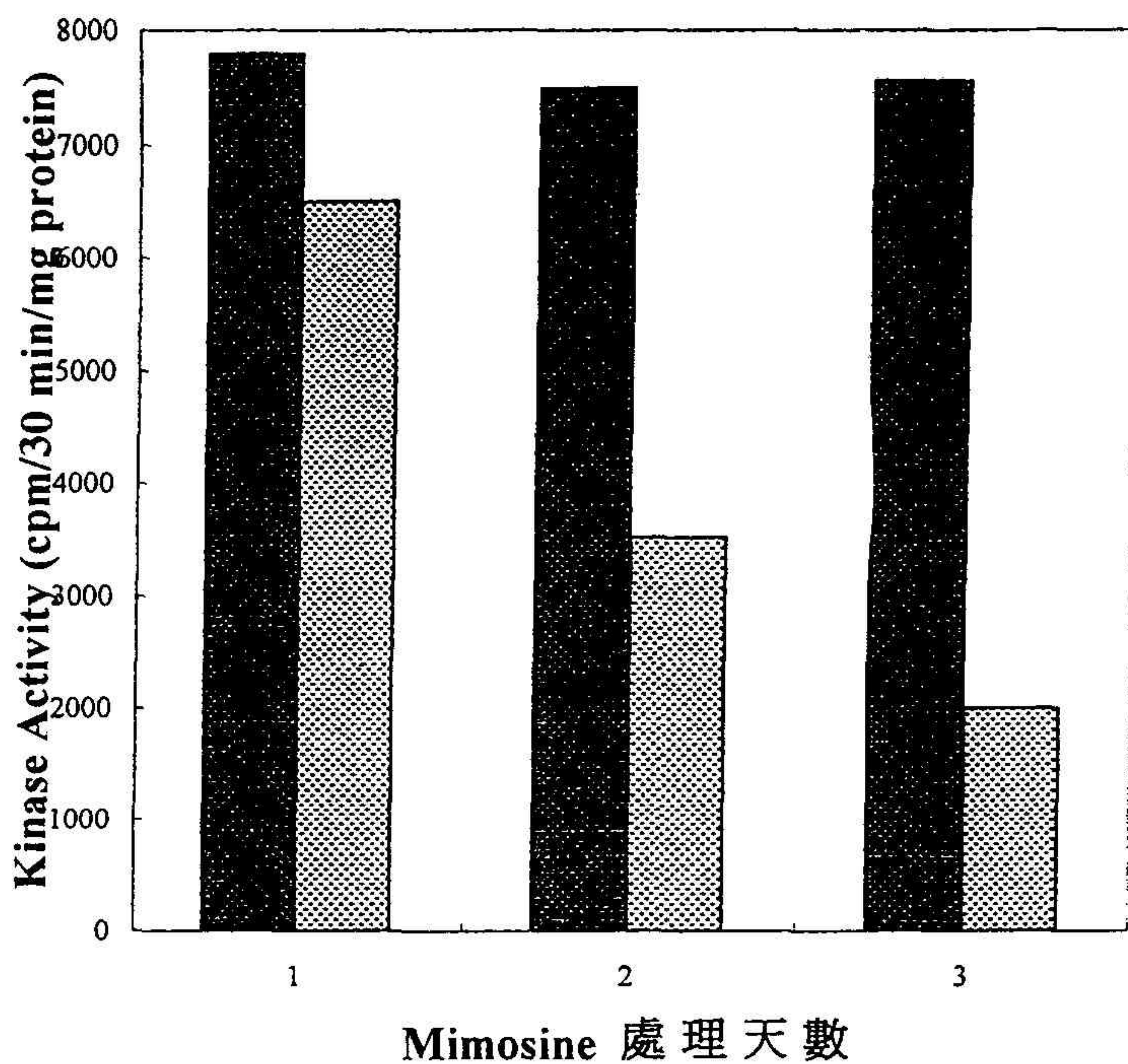
圖十三、以西方點墨法偵測 Mimosine 對不同癌細胞 p57KIP2 蛋白質表現的影響。各種癌細胞於不含 (-) 或含有 (+) 400 μ M mimosine 的培養液兩天後，萃取蛋白質進行西方點墨分析。



圖十四、Mimosine 對不同癌細胞周期素-週期素依賴性蛋白激酶複合體活性的影響。各種癌細胞於不含 (■) 或含有 (▨) 400 μ M mimosine 的培養液兩天後，萃取蛋白質進行免疫沉澱及蛋白激酶活性分析。1: H226 細胞，2: H322 細胞，3: H358 細胞及 4: Hep3 細胞。



圖十五、H226 癌細胞處理不同濃度 mimosine 對周期素-週期素依賴性蛋白激酶複合體活性的影響。癌細胞於含有不同濃度的 mimosine 培養液兩天後，萃取蛋白質進行免疫沉澱及蛋白激酶活性分析。1: control，2: 25 μ M，3: 100 μ M 及 4: 400 μ M。

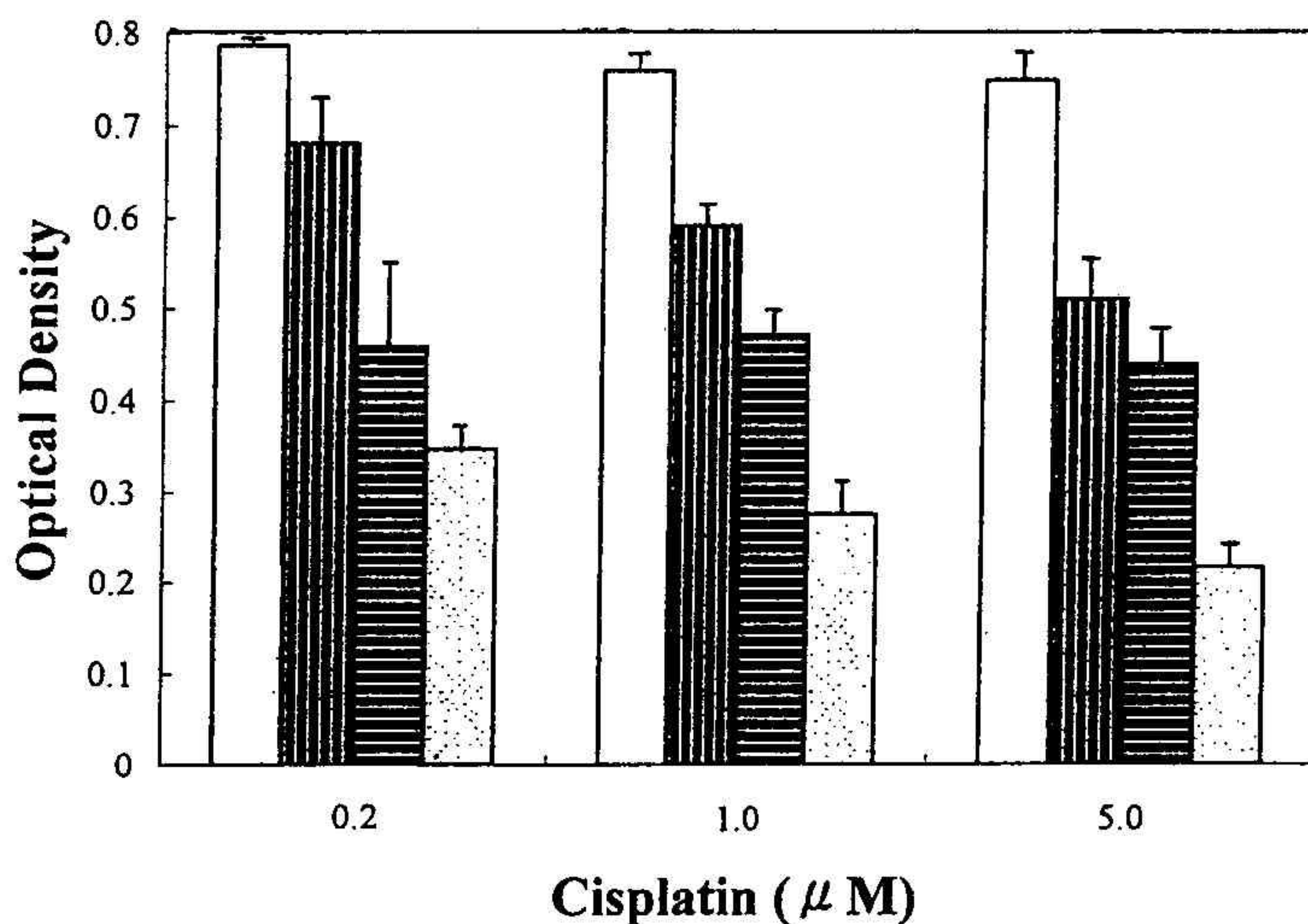


圖十六、H226 癌細胞處理 400 μ M mimosine 不同天數後對周期素-週期素依賴性蛋白激酶複合體活性的影響。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養不同天數天後，萃取蛋白質進行免疫沉澱及蛋白激酶活性分析。

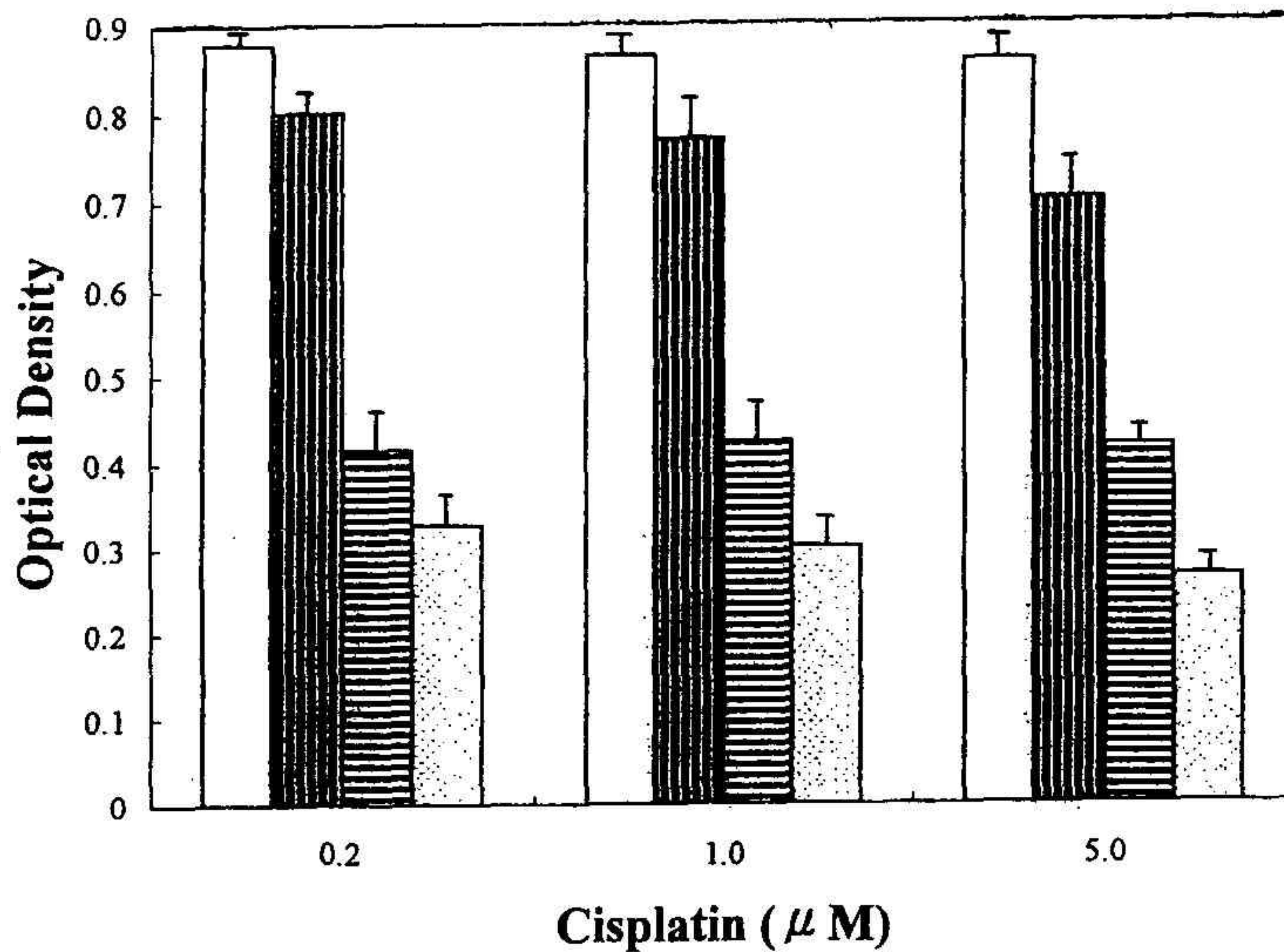
	H226		H322		H358		Hep3B	
Mimosine	-	+	-	+	-	+	-	+



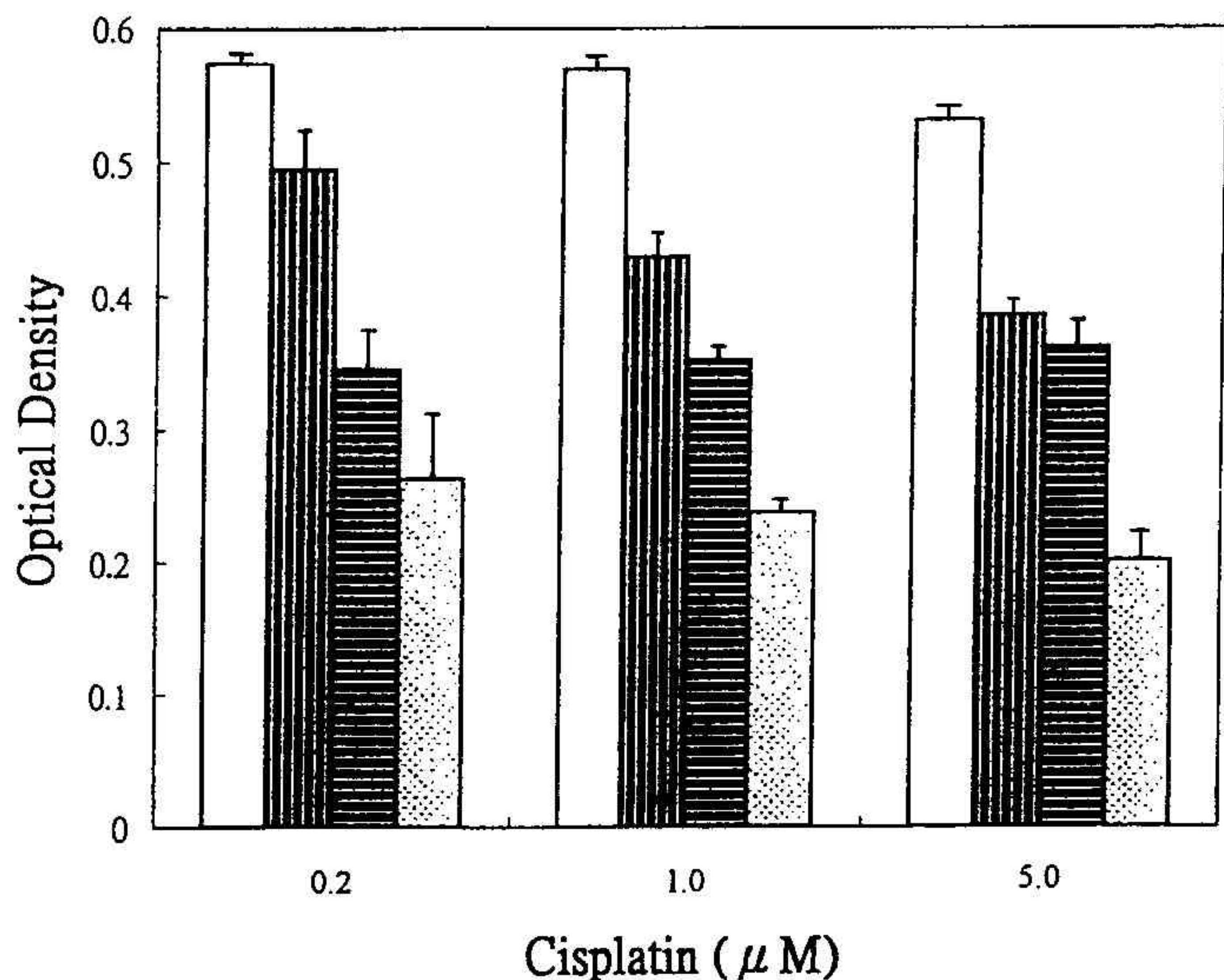
圖十七、Mimosine 造成癌細胞 DNA fragmentation 的效果。
不同癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養三天後，萃取 DNA
進行洋菜膠水平電泳分析。



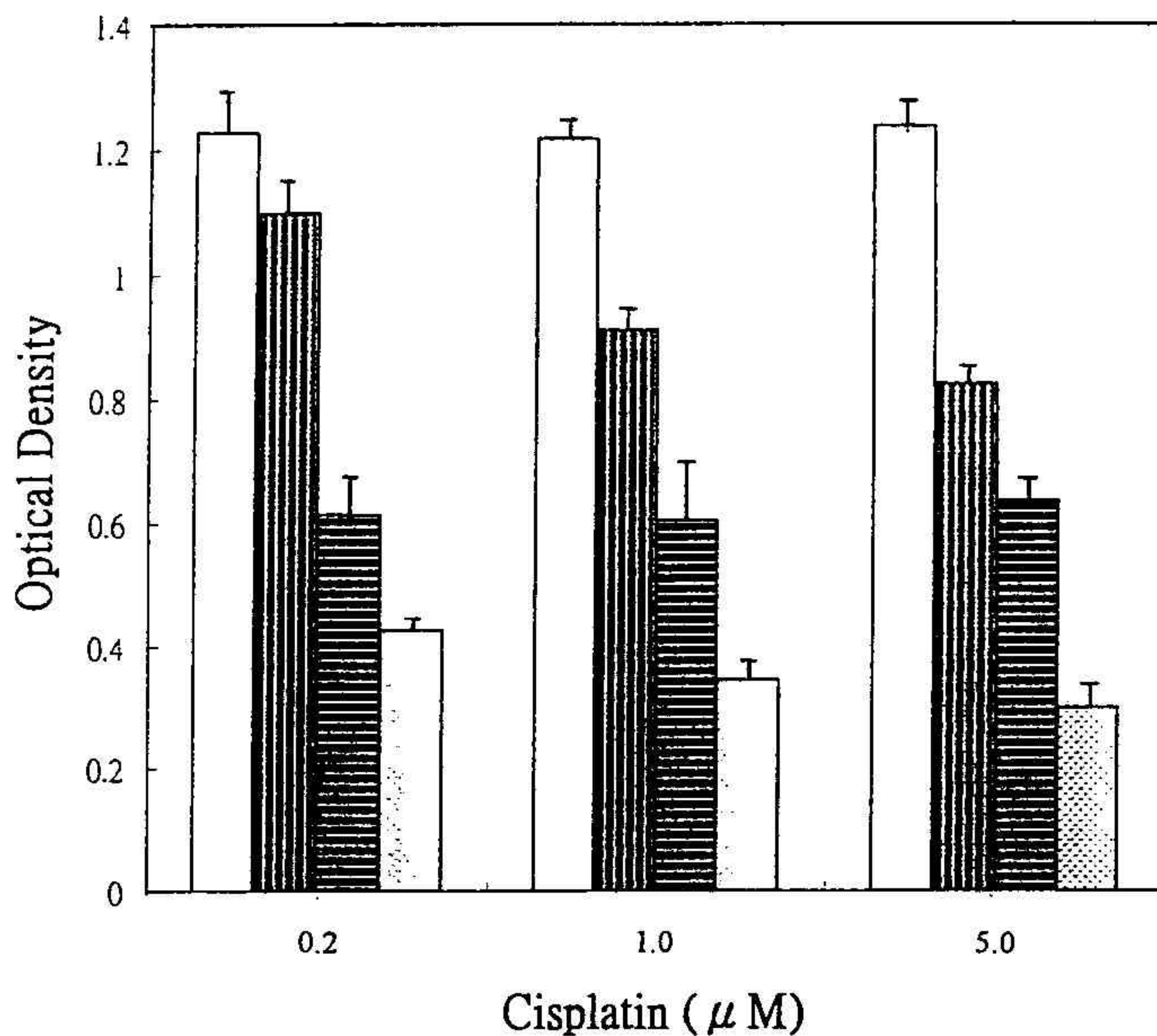
圖十八、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 cisplatin 配合 400 μ M mimosine 對 H226 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 cisplatin 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。 $(\square)$: control, (||||) : cisplatin, (|||) : 400 μ M mimosine, (|||||) : cisplatin + mimosine 數據代表 “mean $\pm$ SE” 由三次獨立實驗數據統計獲得, 每次實驗為 triplicate.



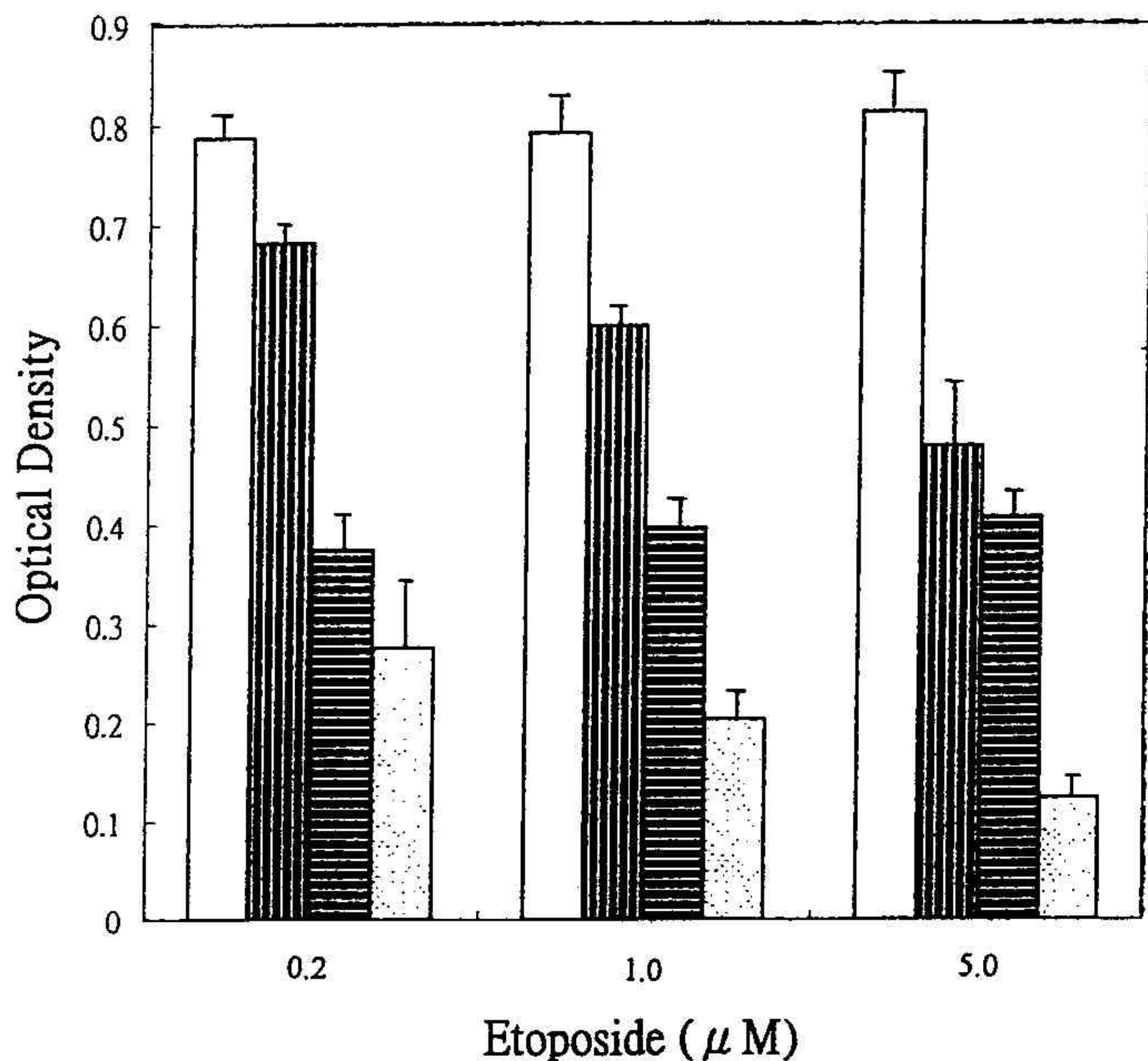
圖十九、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 cisplatin 配合 400 μ M mimosine 對 H322 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 cisplatin 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。(□):control, (▨):cisplatin, (▤): 400 μ M mimosine, (▩):cisplatin + mimosine 數據代表 “mean $\pm$ SE” 由三次獨立實驗數據統計獲得, 每次實驗為 triplicate.



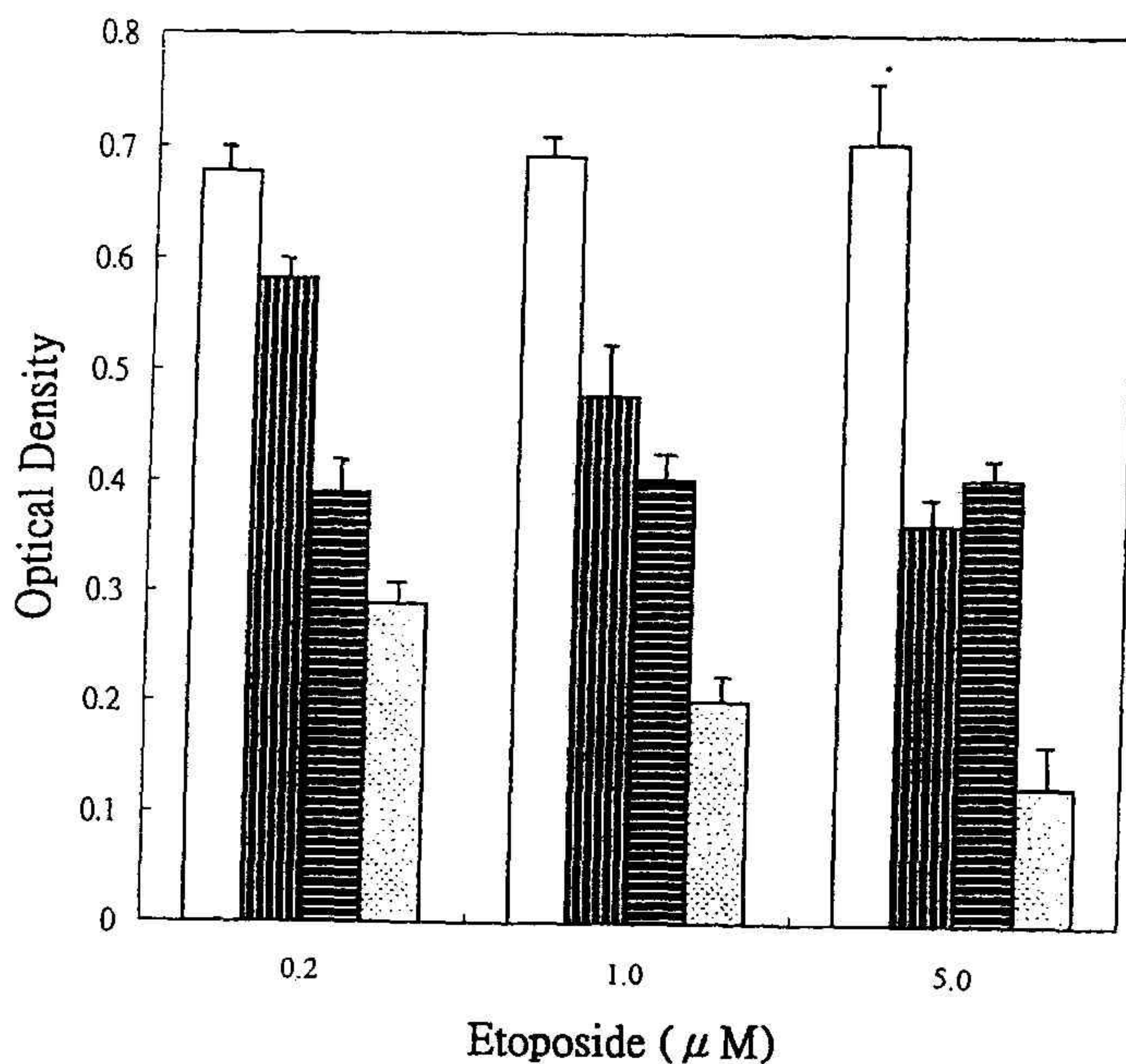
圖二十、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 cisplatin 配合 400 μ M mimosine 對 H358 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 cisplatin 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。 $(\square)$: control, (||||) : cisplatin, (|||||) : 400 μ M mimosine, (|||||) : cisplatin + mimosine。數據代表“mean $\pm$ SE”由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate。



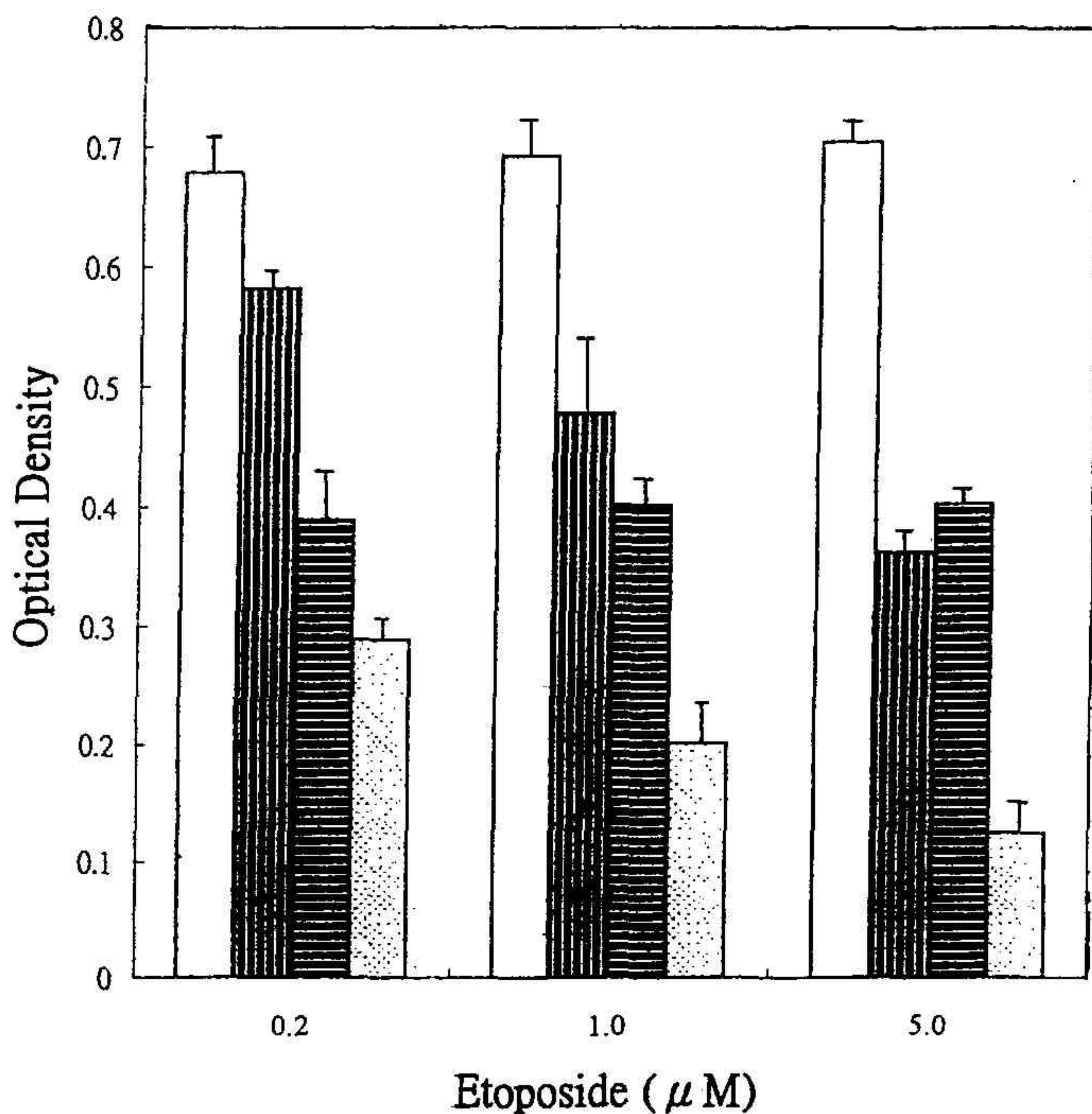
圖二十一、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 cisplatin 配合 400 μ M mimosine 對 Hep3B 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 cisplatin 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。(□):control, (▨): cisplatin, (▤): 400 μ M mimosine, (▧): cisplatin + mimosine。數據代表“mean $\pm$ SE”由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate。



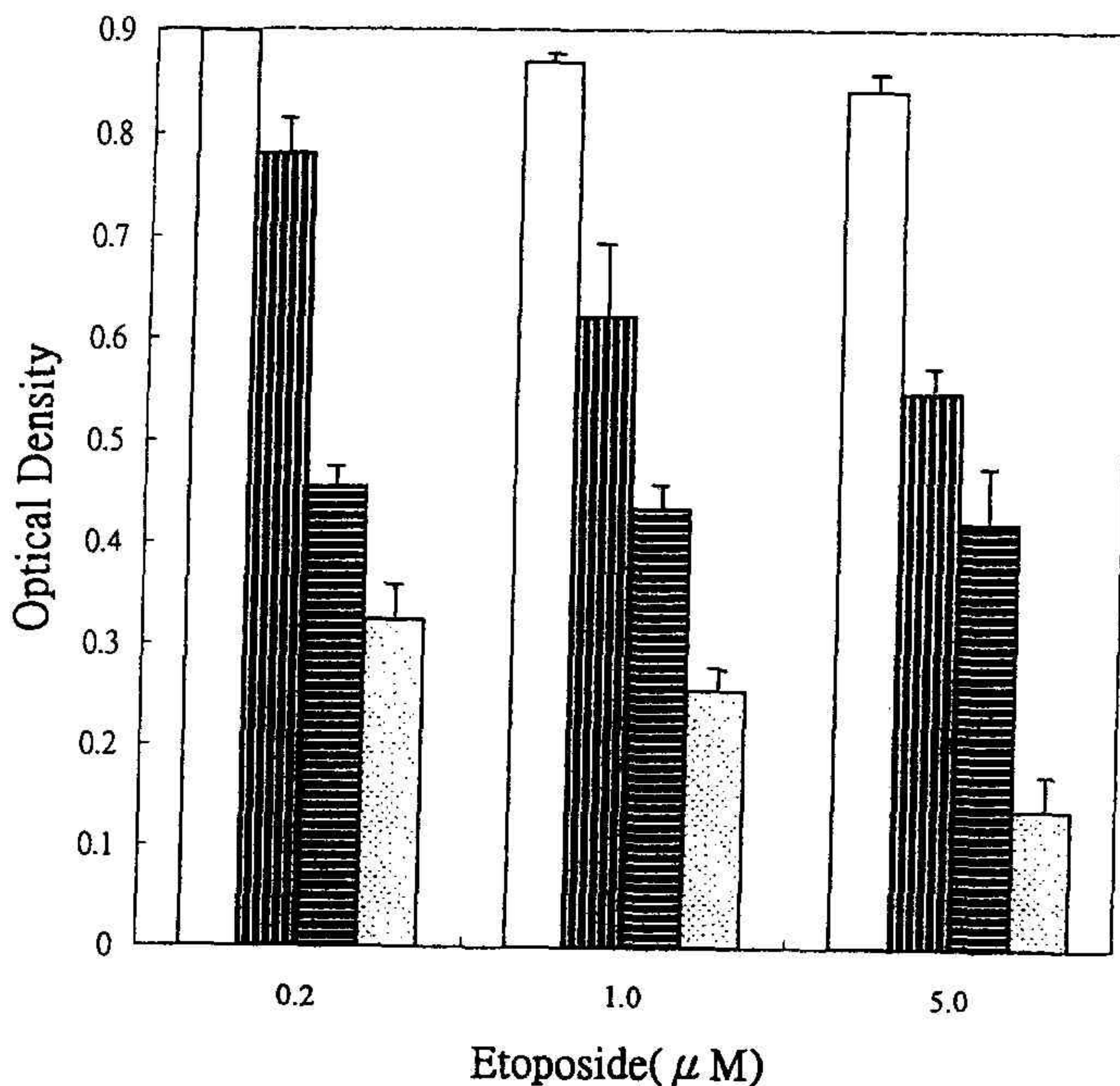
圖二十二、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 etoposide 配合 400 μ M mimosine 對 H226 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 etoposide 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。(□):control, (▨):etoposide, (▤): 400 μ M mimosine, (▩):etoposide + mimosine。數據代表“mean $\pm$ SE”由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate。



圖二十三、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 etoposide 配合 400 μ M mimosine 對 H322 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 etoposide 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。(□):control, (▨):etoposide, (▤): 400 μ M mimosine, (▩):etoposide + mimosine。數據代表“mean $\pm$ SE”由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate。



圖二十四、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 etoposide 配合 400 μM mimosine 對 H358 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μM mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 etoposide 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。 $(\square)$: control, (||||) : etoposide, (|||||) : 400 μM mimosine, (|||||) : etoposide + mimosine。數據代表“mean $\pm$ SE”由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate。



圖二十五、以 MTT 分析法偵測不同濃度的 etoposide 配合 400 μ M mimosine 對 Hep3B 癌細胞的毒殺作用。癌細胞於含有 400 μ M mimosine 培養一天後，再添加不同濃度的 etoposide 持續培養兩天並以 MTT 法測定活存的細胞數。(□):control, (▨):etoposide, (▤): 400 μ M mimosine, (▩):etoposide + mimosine。數據代表“mean $\pm$ SE”由三次獨立實驗數據統計獲得，每次實驗為 triplicate。

陸、參考文獻

1. Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-240.
2. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S: Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 281-285.
3. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang J, Lee WH: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58: 1193-1199.
4. Jiang W, Kahn SM, Tomia N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB: Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2980-2986.
5. Rosenberg CL, Wong E, Petty WM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, Arnold A: PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: Mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 9638-9643.
6. Bodver W, Bishop T, Karran P: Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet* 1994; 6: 217-222.
7. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL: Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 26: 225-229.
8. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, CardonCardo C: Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 1993; 342: 469-473.
9. Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-1065.
10. Sherr CJ: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.
11. van den Heuvel S, Harlow E: Distinct roles for cyclin-dependent

- kinases in cell cycle control. *Science* 1993; 262:205-2054.
12. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ Matsushime H, Kato JY, Livingston DM: Functional interactions of the retinoblastoma protein with D-type cyclins. *Cell* 1993; 73: 487-497.
 13. Hinds PW, Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Curr Biol* 1994; 4: 135-146.
 14. El-Dery WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsos K, Trent M, Lin D, Mercer WE, Kinzier KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-822.
 - 15 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-808.
 16. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y: Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14 INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild type pRB function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-2952.
 - 17 Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashman RA, Sheer CJ: Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995; 16: 859-867.
 18. Massague J, Polyak K: Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 91-96.
 19. Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T, Nakanishi K, Shirakusa T: Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patient with non-small-cell lung cancer. *J Nati Cancer Inst* 1993; 85: 2018-2024.
 20. Hamelin R, Laurent-Pug P, Oschwang S, Jegou N, Asselain B, Rvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G: Association of p53 mutations

- with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 42-46.
21. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi K, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-702.
 22. Gu Y, Turck CW, Morgan DO: Inhibition of CDK2 activity in vivo by associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; 366: 707-708.
 23. Fan S, El-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, Fornace AJ, Magrath I, Kohn KW, O'Connor PM: P53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 1994; 54: 5824-5429.
 24. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1992; 74: 957-959.
 25. Alpan RS, Pardee AB: p21WAF1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 893-901.
 26. Lin JY, Ling KH: Studies on free amino acids in the seeds of *Leucaena Glauca* Benth. *JFMA* 1961; 60: 1-8.
 27. Hung WC, Huang JS, Chuang LY: Antisense oligodeoxynucleotides targeted against different regions of cyclin D1 mRNA may exert different inhibitory effects on cell growth and gene expression. *Biochem Biophy Res Comm* 1996; 220: 719-725.
 28. Hung WC, Chai CY, Huang JS, Chuang LY: Expression of cyclin D1 and c-K-ras gene product in human epithelial ovarian tumors. *Human Pathol* 1996; 27: 1324-1328.
 29. Herber B, Truss M, Beato M, Muller R: Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 1994; 9: 1295-1304.
 30. Navoie JN, L'Allemain G, Brunt A, Muller R, Pouyssegur J: Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and

- negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996; 271: 20608-20616.
31. Kuip KS, Green SL, Vulliet PR: Iron deprivation inhibits cyclin-dependent kinase activity and decreases cyclin D/CDK4 protein levels in asynchronous MDA-MB-453 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 1996; 229: 60-68.
 32. Alban RS, Pardee AB: p21WAF1/CIP1/SDI1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 893-901.
 33. Yatabe Y, Masuda A, Koshikawa T, Nakamura S, Kuroishi T, Osada H, Taahashi T, Mitsudomi T, Takahashi T: p27KIP1 in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1042-1047.
 34. Korsmeyer S: Bcl-2: An antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15: 105-112.
 35. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-263.
 36. Arends M, Morris R, Wyllie A: Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-599.
 37. Vaux D: A boom time for necrobiology. *Curr Biol* 1994; 3: 877-879.
 38. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1992; 74: 957-959.
 39. Tsai CM, Chang KT, Chen JY, Chen YM, Chen MH, Perng RP: Cytotoxic effects of gemcitabine-containing regimens against human non-small cell lung cancer cell lines which express different levels of p185neu1. *Cancer Res* 1996; 56: 794-801.
 40. Tsai CM, Chang KT, Wu LH, Chen JY, Gazdar AF, Mitsudomi T, Chen MH, Perng RP: Correlations between intrinsic chemoresistance

- and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996; 56: 206-209.
41. Leier I, Jdelitschky G, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D: The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* 1994; 269: 27807-27810.
 42. Gottesman MM, Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 385-421.
 43. van der Bliek AM, Borst P: Multidrug resistance. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 165-203.
 44. Juranka PF, Zastawny RL, Ling V: P-glycoprotein: multidrug resistance and a superfamily of membrane-associated transport protein. *FASLB J* 1989; 3: 2583-2592.
 45. Higgins CF: ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann Rev Cell Biol* 1992; 8: 67-113.
 46. Baldini F, Tibaldi C, Chella A, Silvano G, Andrei A, Algeri R, Conte PF: Phase II study of vinorelbine/ifosfamide/cisplatin for the treatment of advanced non-small-cell-lung cancer. *Annu Oncol* 1996; 7: 747-749.
 47. Pronzato P, Ghio E, Losardo PG, Landucci M, Vaira F, Vigani A: Caroplatin and vinorelbine in advanced non-small-cell-lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 37: 610-612.
 48. Marincola FM, White DL, Wise AP, Rosenberg SA: Combination therapy with interferon ALFA-2a and interleukin-2 for the treatment of metastatic cancer. *J Clin Oncol* 1995; 3: 1110-1122.
 49. Planting AST, Wit De R, Burg Van Der Mel: Phase II study of a closely spaced ifosfamide-cisplatin schedule with the addition of G-

CSF in advanced non-small-cell lung cancer and malignant melanoma.
Ann Oncol 1996; 7: 148-156.

50. Lin JY, Lin KT, Ling KH: Studies on the mechanism of the toxicity of mimosine (β -N-3-hydroxy pyridone α -amino propionic acid). JFMA 1963; 62: 73-78.