I815771

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I815771 B**

(45)公告日： 中華民國 112 (2023) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：112104147 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 02 月 06 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/395 (2006.01)* *C07D498/08 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學 (中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)
高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：張學偉 CHANG, HSUEH-WEI (TW) ；張夢揚 CHANG, MENG-YANG (TW) ；詹傑凱 CHAN, CHIEH-KAI (TW) ；陳妍凝 CHEN, YAN-NING (TW) ；湯人仰 TANG, JEN-YANG (TW) ；蕭君平 SHIAU, JUN-PING (TW) ；顏欽堉 YEN, CHING-YU (TW) ；王正中 WANG, CHENG-CHUNG (TW) ；鄭景暉 JENG, JIIANG-HUEI (TW) ；黃昱翔 HUANG, YU-HSIANG (TW) ；侯明鋒 HOU, MING-FENG (TW) ；王聖傑 WANG, SHENG-CHIEH (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

期刊 Chan CK, et al., Construction of Nitrated Benzo[3.3.1]bicyclic Acetal/Ketal Core via Nitration of o-Carbonyl Allylbenzenes. Org Lett. 19(6):1358-1361, Epub 20170303.

審查人員：陳琬瑜

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：71 共 72 頁

(54)名稱

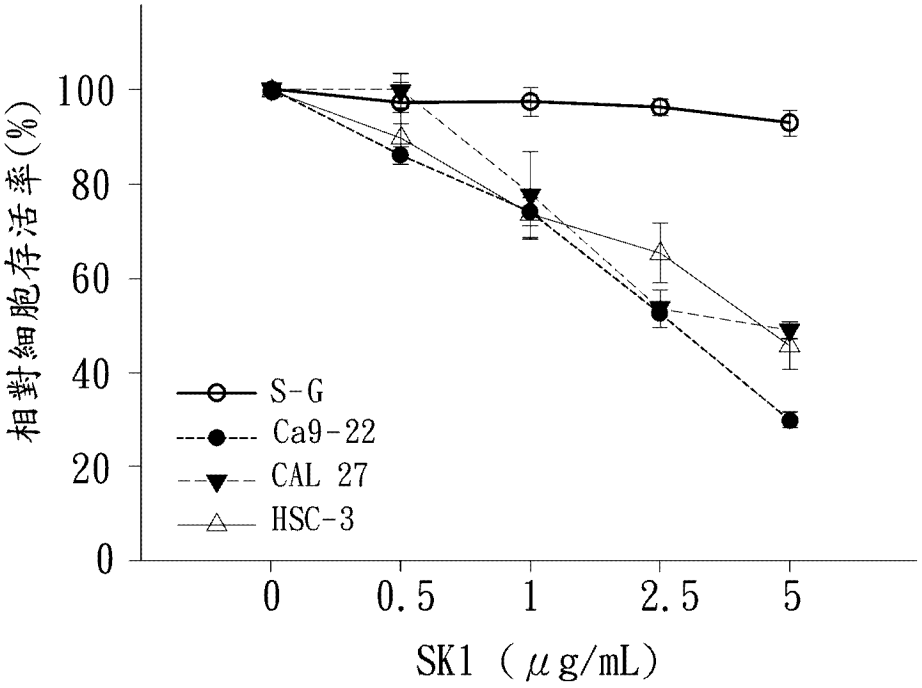
硝化[6,6,6]三環衍生化合物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

(57)摘要

本發明係關於一種硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，硝化[6,6,6]三環衍生化合物係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長。

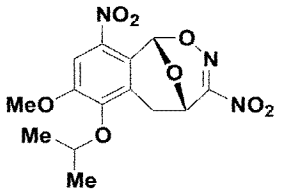
The present invention is related to a use of nitrated [6,6,6]tricycles-derived compound of manufacturing medicament for selective antiproliferation of oral cancer cell. The nitrated [6,6,6]tricycles-derived compound is administered to a subject in need thereof to induce apoptosis in oral cancer cells, leading to selective antiproliferation of the oral cancer cells.

指定代表圖：


相對細胞存活率(%)
100
80
60
40
20
0
S-G
Ca9-22
CAL 27
HSC-3
0
0.5
1
2.5
5
SK1（μg/mL）

【第 2 圖】

特徵化學式：


NO2
O
N
O
NO2
MeO
Me
O
Me

公告本

I815771

【發明摘要】

【中文發明名稱】　硝化[6,6,6]三環衍生化合物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

【英文發明名稱】　Use of Nitrated [6,6,6]Tricycles-Derived Compound of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cell

【中文】

本發明係關於一種硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，硝化[6,6,6]三環衍生化合物係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長。

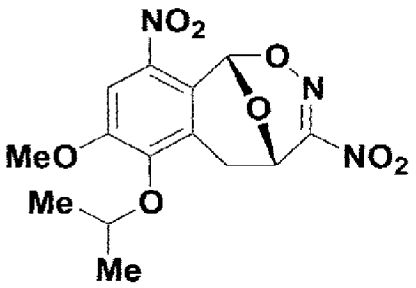
【英文】

The present invention is related to a use of nitrated [6,6,6]tricycles-derived compound of manufacturing medicament for selective antiproliferation of oral cancer cell. The nitrated [6,6,6]tricycles-derived compound is administered to a subject in need thereof to induce apoptosis in oral cancer cells, leading to selective antiproliferation of the oral cancer cells.

【指定代表圖】　第 2 圖

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】



6-異丙氧基-5-甲氧基-3,10-二硝基-12,13-二氧雜-11-氮雜三環[7.3.1.$0^{2,7}$]十三碳-2,4,6,10-四烯

6-Isopropoxy-5-methoxy-3,10-dinitro-12,13-dioxa-11-azatricyclo[7.3.1.$0^{2,7}$]trideca-2,4,6,10-tetraene

【發明說明書】

【中文發明名稱】　硝化[6,6,6]三環衍生化合物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途

【英文發明名稱】　Use of Nitrated [6,6,6]Tricycles-Derived Compound of Manufacturing Medicament for Selective Antiproliferation of Oral Cancer Cell

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種硝化[6,6,6]三環衍生化合物，尤其是一種硝化[6,6,6]三環衍生化合物用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物的用途。

【先前技術】

【0002】 口腔癌為發生在口腔部位（例如，唇、頰黏膜、牙齒、舌頭下方的口腔底部、前三分之二的舌頭、硬顎、牙齦以及臼齒後方等區域）之惡性腫瘤的總稱，90%屬於鱗狀細胞癌，常見的症狀包含口腔內部或周圍有腫脹、硬塊或口腔有長期不癒合的口腔黏膜潰瘍。

【0003】 臨床上的口腔癌治療方法除了手術和放射治療外，亦可以使用習知抗癌藥物來抑制口腔癌細胞的增生或促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，但通常在殺死口腔癌細胞的同時，也會對口腔癌細胞周遭的正常細胞產生細胞毒性，反而造成正常細胞的損傷，如口腔黏膜破損。

【0004】 有鑑於此，習知抗癌藥物確實仍有加以改善之必要。

【發明內容】

【0005】 為解決上述問題，本發明的主要目的在於提供一種硝化[6,6,6]

三環衍生化合物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物者。

【0006】 本發明全文所記載的元件及構件使用「一」或「一個」之量詞，僅是為了方便使用且提供本發明範圍的通常意義；於本發明中應被解讀為包括一個或至少一個，且單一的概念也包括複數的情況，除非其明顯意指其他意思。

【0007】 本發明的硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物為 6-異丙氧基-5-甲氧基-3,10-二硝基-12,13-二氧雜-11-氮雜三環[7.3.1.$0^{2,7}$]十三碳-2,4,6,10-四烯，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長。

【0008】 據此，本發明的硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，係能夠藉由該硝化[6,6,6]三環衍生化合物作為活性成分，在將該硝化[6,6,6]三環衍生化合物投予一所需個體時，該些活性成分可以於該所需個體的體內發生效用，促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，並造成口腔癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制口腔癌細胞的存活；並且，相較於對口腔癌細胞而言，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係可以用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，為本發明之功效。

【0009】 本發明的硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係以口服方式投予一所需個體。如此，使用者係能夠以簡便方式獲取該硝化[6,6,6]三環衍生化合物的活性成分，有助於提升使用者的服藥順從性。

【0010】 本發明的硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係以靜脈注射的方式投予一所需個體。如此，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係可以經由該所需個體的靜脈流向患部，避免該硝化

[6,6,6]三環衍生化合物的活性成分受到胃酸的破壞而影響生物活性，因而具有較佳的抑制口腔癌細胞生長的能力。

【0011】 本發明的硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係以每天每公斤體重施予 10～30 毫克的劑量施予該所需個體。如此，藉由該硝化[6,6,6]三環衍生化合物的投予劑量，而具有較佳的抑制口腔癌細胞生長的功效。

【圖式簡單說明】

【0012】

〔第 1 圖〕 硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1（6-異丙氧基-5-甲氧基-3,10-二硝基-12,13-二氧雜-11-氮雜三環[7.3.1.$0^{2,7}$]十三碳-2,4,6,10-四烯）的化學結構式。

〔第 2 圖〕 試驗（A）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞、CA9-22 細胞、HSC-3 細胞及 S-G 細胞的相對細胞存活率變化折線圖。

〔第 3 圖〕 試驗（A）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（$P<0.05$）。

〔第 4 圖〕 試驗（A）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（NAC/SK1

組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 5 圖〕 試驗（A）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞的相對細胞存活率變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 6 圖〕 試驗（B）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞的細胞週期變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 7 圖〕 試驗（B）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞的細胞週期變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 8 圖〕 試驗（B）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞的細胞週期變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 9 圖〕 試驗（C）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 10 圖〕 試驗（C）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 11 圖〕 試驗（C）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 12 圖〕　試驗（C）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 13 圖〕　試驗（C）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 14 圖〕　試驗（C）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，進入細胞凋亡的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 15 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 16 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比

變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 17 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 18 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 19 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 20 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 21 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 22 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 23 圖〕　試驗（D）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 24 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 25 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 26 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 27 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經

本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 28 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 29 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 30 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 31 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經

本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 32 圖〕　試驗（D）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 33 圖〕　試驗（E）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 34 圖〕　試驗（E）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 35 圖〕　試驗（E）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經不同濃度之本發

明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 36 圖〕　試驗（F）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 37 圖〕　試驗（F）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 38 圖〕　試驗（F）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 39 圖〕　試驗（F）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 40 圖〕　試驗（F）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 41 圖〕　試驗（F）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含活性氧物質的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 42 圖〕　試驗（G）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 43 圖〕　試驗（G）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 44 圖〕　試驗（G）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 45 圖〕　試驗（G）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 46 圖〕　試驗（G）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明

之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 47 圖〕　試驗（G）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含粒線體超氧化物的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 48 圖〕　試驗（H）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 49 圖〕　試驗（H）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 50 圖〕　試驗（H）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 51 圖〕　試驗（H）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 52 圖〕　試驗（H）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 53 圖〕　試驗（H）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，粒線體膜電位的降低量變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 54 圖〕　試驗（I）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 55 圖〕　試驗（I）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 56 圖〕　試驗（I）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 57 圖〕　試驗（I）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝

化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 58 圖〕　試驗（I）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 59 圖〕　試驗（I）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，不含有穀胱甘肽的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 60 圖〕　試驗（J）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 61 圖〕　試驗（J）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 62 圖〕　試驗（J）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 63 圖〕　試驗（J）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 64 圖〕　試驗（J）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 65 圖〕　試驗（J）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 66 圖〕　試驗（K）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 67 圖〕　試驗（K）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖，其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 68 圖〕　試驗（K）中，經不同濃度之本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 69 圖〕　試驗（K）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CA9-22 細胞中，在不同時間點下，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 70 圖〕　試驗（K）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 CAL 27 細胞中，在不同時間點下，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

〔第 71 圖〕　試驗（K）中，經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖（SK1 組），以及先以 N－乙醯半胱氨酸進行預處理，再經本發明之硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理的 S-G 細胞中，在不同時間點下，包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比變化柱狀圖（NAC/SK1 組），其中，標示不同英文字母的柱狀數據之間具有顯著差異（P＜0.05）。

【實施方式】

【0013】 為讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下

文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式作詳細說明。

【0014】 本發明所述之「硝化[6,6,6]三環衍生化合物」（又稱硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1）係具有如第 1 圖所示之化學結構式，其 IUPAC 名稱為 6-異丙氧基-5-甲氧基-3,10-二硝基-12,13-二氧雜-11-氮雜三環[7.3.1.$0^{2,7}$]十三碳-2,4,6,10-四 烯 （6-Isopropoxy-5-methoxy-3,10-dinitro-12,13-dioxa-11-azatricyclo[7.3.1.$0^{2,7}$]trideca-2,4,6,10-tetraene）。

【0015】 本發明所述之「選擇性」係指對癌細胞較具有細胞毒性但對正常細胞較不具有細胞毒性，舉例而言，可以促進癌細胞進入細胞凋亡，並可以造成癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制癌細胞的存活，但對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害。

【0016】 本發明之一實施例的硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1，係可以促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，並可以造成口腔癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制口腔癌細胞的存活，且相較於對口腔癌細胞而言，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 可以應用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物。該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 可以與醫藥學上可以接受的載劑或賦形劑組合，以共同形成該藥物，並可以供製備成如錠劑、粉劑、粒劑等各種劑型，進而供一所需個體的使用。

【0017】 舉例而言，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 係可以利用口服的方式投予該所需個體，以供使用者能夠以簡便方式獲取該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1，有助於提升使用者的服藥順從性（drug compliance）。此時，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 可以經由小腸吸收，並藉由血流循環至患部位置，以抑制口腔癌細胞生長，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 係能夠以每天每公斤體重施予 10～30 毫克的劑量施予該所需個體。

【0018】 又，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 亦可以利用靜脈注射的方式投予該所需個體，例如將該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 注射到所需個體的手背或前臂的靜脈中，以避免該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在通過消化道時會受到胃酸的破壞而影響生物活性。此時，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 可以直接經由靜脈流向患部位置，以抑制口腔癌細胞生長，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 係能夠以每天每公斤體重施予 10～30 毫克的劑量施予該所需個體。

【0019】 在本發明的實施例中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 係能夠以如下的製備方法製備獲得；但應當理解的是，下述製備方法僅為示例，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 並不僅限於下述製備方法。

【0020】 首先，工者可以將硝酸水溶液加入 2-烯丙基-3-異丙氧基-4-甲氧基苯甲醛溶於硫酸水溶液所得到的溶液中，以形成一反應混合物。在本實施例中，工者係將 2-烯丙基-3-異丙氧基-4-甲氧基苯甲醛（234 mg，1 mmol）溶於硫酸水溶液（98%，2 ml）中，接著在室溫下逐滴（stepwise）加入硝酸水溶液（97%，0.5 ml）而形成該反應混合物。

【0021】 接著，工者可以將該反應混合物在升高溫度下反應一段時間。在本實施例中，工者係將該反應混合物在 80℃下反應 24 小時。

【0022】 接著，工者可以在該反應混合物中加入水，以二氯甲烷作為萃取劑進行分配萃取，並且收取二氯甲烷萃取層。在本實施例中，工者係先將該反應混合物放置回到室溫，加入水（10 ml），並以二氯甲烷（20 ml）萃取三次後，收取該二氯甲烷萃取層。

【0023】 最後，工者可以將該二氯甲烷萃取層進行濃縮，即可以得到該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1。舉例而言，工者可以利用減壓濃縮等各種手段來濃縮該二氯甲烷萃取層。

【0024】 值得注意的是，為了協助進行該二氯甲烷萃取層的濃縮，工者可以在收取該二氯甲烷萃取層之後執行後處理（post-treatment）步驟；舉例而言，在本實施例中，工者可以利用鹵水（brine，10 ml）清洗該二氯甲烷萃取層二次，以硫酸鎂（$MgSO_4$）吸除該二氯甲烷萃取層中的水分，再利用抽氣過濾濾除該二氯甲烷萃取層中的雜質後，接著進行該二氯甲烷萃取層的濃縮步驟。另外，為了提升該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的純度，工者亦可以在得到該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 後進行純化步驟；舉例而言，在本實施例中，工者可以利用矽膠管柱層析（沖提液為己烷：乙酸乙酯＝4：1～1：1）將該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行純化，以得到 275 mg 的經純化硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1。

【0025】 為證實本發明之該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 確實能夠抑制口腔癌細胞的生長，且相較於對口腔癌細胞而言，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，遂選用包含 Ca9-22 細胞（牙齦鱗狀上皮細胞癌）、CAL 27 細胞（舌頭鱗狀上皮細胞癌）及 HSC-3 細胞（舌頭鱗狀上皮細胞癌）等口腔癌細胞株，以及非惡性口腔細胞株 S-G 細胞(即，正常細胞)作為模式細胞株，另將該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 溶於二甲基亞碸（DMSO）水溶液（含 0.1%的二甲基亞碸；以下試驗皆同，故不再贅述）中所得的溶液作為試驗組的待測樣品，及以不含有該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的二甲基亞碸水溶液（含 0.1%的二甲基亞碸）作為控制組的待測樣品，進行以下試驗：

【0026】 （A）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於相對細胞存活率的影響

【0027】 本試驗係分別使上述各模式細胞株分別包含不同濃度(0、0.5、1、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1，在處理（共培養）

24 小時之後，加入 MTS 試劑且反應 1 小時後，接著以測量於波長為 490 nm 下的吸光值；其中，由於活細胞內的粒線體所含有的物質可以使 MTS 試劑轉化為最大吸光值為 490 nm 的甲臜（formazan）化合物，因此以未經該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理（即，濃度為 0 μg/mL 的組別）的細胞的吸光值作為基準（100%），計算經該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理之後的各種模式細胞株在波長為 490 nm 下的吸光值，加以換算即可得知各種模式細胞株的相對相對細胞存活率。

【0028】 請參照第 2 圖所示，在以各種濃度（0、0.5、1、2.5 及 5 μg/mL）的硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後，各種口腔癌細胞株（Ca9-22 細胞、CAL 27 細胞及 HSC-3 細胞）的相對細胞存活率均明顯降低；其中，在以 5 μg/mL 的硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後，各口腔癌細胞株的相對細胞存活率均降低至 60%以下，而正常細胞（S-G 細胞）的相對細胞存活率仍接近 100%，所受到的影響極為輕微，顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會導致各種口腔癌細胞株的相對細胞存活率顯著下降，對正常細胞的影響則較不顯著。

【0029】 應注意的是，後續試驗係以 Ca9-22 細胞及 CAL 27 細胞作為口腔癌細胞株的例示，與 S-G（正常細胞）進行比較。

【0030】 接著，為確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 是否係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞的相對細胞存活率的下降，遂於以不同濃度（0、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理各種模式細胞株之前，先加入活性氧物質抑制劑（N－乙醯半胱氨酸，N-acetylcysteine，簡稱 NAC；濃度為 10 mM）進行預處理 1 小時，接著再進行該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（24 小時），後續如前述般加入 MTS 試劑且反應 1 小時後，測量於波長為 490 nm 下的吸光值，最終如前述之換算

各種模式細胞株在經過該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理之後的相對細胞存活率。

【0031】 請參照第 3 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會導致 CA9-22 細胞的相對細胞存活率下降，但是在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）不再影響 CA9-22 細胞的相對細胞存活率；前述的試驗結果亦可以於第 4 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。前述結果顯示由該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理所造成口腔癌細胞的相對細胞存活率的下降效果已被活性氧物質抑制劑（NAC）回復，證實該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 確實係藉由提升口腔癌細胞的氧化壓力，進而導致口腔癌細胞的相對細胞存活率的下降。

【0032】 再請參照第 5 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於 S-G 細胞的相對細胞存活率的影響原本即不顯著，縱使以活性氧物質抑制劑進行預處理，相對細胞存活率的回復效果也相對不明顯。前述結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於正常細胞的氧化壓力的影響相對較小，進而導致對於正常細胞的相對細胞存活率的影響相對較不明顯。

【0033】 由於異常的細胞週期亦會導致細胞存活率的下降，為了確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 所造成之細胞存活率的下降的作用機制，遂確認經過該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理之後的各種模式細胞株的細胞週期的變化。

【0034】 （B）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於細胞週期變化的影響

【0035】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化

[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以 75%乙醇溶液固定細胞內的 DNA 之後，再以 7-氨基放線菌素 D（7-aminoactinomycin D，簡稱為 7AAD）進行染色，接著以流式細胞儀（Accuri C6 flow cytometer）進行分析，再依據所測得的 DNA 含量確認細胞週期的變化；其中，將細胞內 DNA 含量未達 2N 者定義為處於 subG1 期的細胞、細胞內 DNA 含量為 2N 者定義為處於 G1 期的細胞、細胞內 DNA 含量介於 2N～4N 之間者定義為處於 S 期的細胞，而細胞內 DNA 含量為 4N 者定義為處於 G2/M 期的細胞。另外，在數據的呈現上，subG1 期的細胞佔比係單獨進行計數，而 G1 期、S 期及 G2/M 期的細胞佔比的總數則訂定為 100%。

【0036】 請參照第 6 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理可以顯著提升處於 subG1 期的細胞的佔比，此現象在 CAL 27 細胞（另一口腔癌細胞，第 7 圖）及 S-G 細胞（正常細胞，第 8 圖）則較不明顯。請參照第 7 圖所示，在 CAL 27 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理可以顯著降低處於 G1 期的細胞的佔比，並且會提高處於 G2/M 期的細胞的佔比，顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會使 CAL 27 細胞（口腔癌細胞）的細胞週期停滯在 G2/M 期，妨礙口腔癌細胞的生長而使細胞存活率的下降，與試驗（A）中所得到的試驗結果相符。

【0037】 再請參照第 8 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理整體上可以提高處於 G1 期的細胞的佔比，並且會降低處於 G2/M 期的細胞的佔比。

【0038】 由於處於 subG1 期的細胞的佔比增加，或是細胞週期停滯在 G2/M 期是驅使細胞進入細胞凋亡〔apoptosis，又稱為計畫性細胞死亡（programmed cell death）〕的其中一種可能原因；其中，在細胞凋亡的早期

會發生細胞膜組成移位（translocation）的現象，使原先位於細胞膜內側的磷脂醯絲胺酸（phophatidylserine，簡稱為 PS）外翻至細胞膜外側。因此，為確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理是否會造成口腔癌細胞進入細胞凋亡，遂進行以下試驗。

【0039】（C）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於細胞凋亡的影響（一）

【0040】本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以膜聯蛋白 V（Annexin V）及 7-氨基放線菌素 D（7AAD）進行染色，接著以流式細胞儀（Accuri C6 flow cytometer）進行分析；其中，膜聯蛋白 V 會與進入細胞凋亡的細胞外翻的磷脂醯絲胺酸（PS）特異性結合，故流式細胞儀所測得的經膜聯蛋白 V 染色的細胞（膜聯蛋白 V（＋）／7AAD（＋或－））即為進入細胞凋亡的細胞〔細胞凋亡（＋）〕。

【0041】請參照第 9 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會顯著提升進入細胞凋亡的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 10 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0042】再請參照第 11 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升進入細胞凋亡的細胞的佔比（2.5 及 5 μg/mL 組），惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。第 9 圖至第 11 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於促進口腔癌細胞株進入細胞凋亡的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則較不明顯。

【0043】接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響進入細胞

凋亡的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以膜聯蛋白 V（Annexin V）及 7-氨基放線菌素 D（7AAD）進行染色，接著以流式細胞儀進行分析；其中，經膜聯蛋白 V 染色的細胞（膜聯蛋白 V（＋）／7AAD（＋或－））即為進入細胞凋亡的細胞。

【0044】 請參照第 12 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）可以顯著提升進入細胞凋亡的細胞的佔比，且隨著處理時間的增長，提升進入細胞凋亡的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）已不再提升進入細胞凋亡的細胞的佔比，說明活性氧物質抑制劑會減弱該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響；前述的試驗結果亦可以於第 13 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。前述結果顯示硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響係與細胞內的氧化壓力有關。

【0045】 再請參照第 14 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）亦會提升 S-G 細胞進入細胞凋亡的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升相對較不明顯；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）也不再提升進入細胞凋亡的細胞的佔比。前述結果顯示硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於正常細胞的細胞凋亡

的影響也可能與細胞內的氧化壓力有關，但效果不如口腔癌細胞株明顯。

【0046】 除了細胞膜組成移位的現象之外，凋亡蛋白酶（caspase）的活化亦在細胞凋亡的反應中扮演重要的角色；其中，經活化的凋亡蛋白酶會將死亡訊息傳遞至下游，最終使細胞進入細胞凋亡。凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 為此一過程的關鍵蛋白質，其中位於上游的凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 為起始凋亡蛋白酶（initiator caspase），當細胞外的死亡受體（death receptor）被活化時，即會啟動與凋亡蛋白酶 8 有關的外源性凋亡途徑（extrinsic apoptosis pathway），進而使凋亡蛋白酶 8 活化；而當細胞遭遇嚴重的 DNA 損傷或氧化壓力（oxidative stress）時，則會啟動與凋亡蛋白酶 9 相關的內源性凋亡途徑（intrinsic apoptosis pathway），進而使凋亡蛋白酶 9 活化。在凋亡蛋白酶 8 或凋亡蛋白酶 9 被活化之後，會接著活化下游的效應凋亡蛋白酶（effector caspase；例如，凋亡蛋白酶 3），經活化的效應凋亡蛋白酶則進一步誘導細胞蛋白的分解，從而啟動細胞凋亡的程序。因此，為確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理是否會對凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 造成影響，進而導致口腔癌細胞進入細胞凋亡，遂進行以下試驗。

【0047】 （D）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於細胞凋亡的影響（二）

【0048】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以基於於胜肽之偵測套組（peptide-based detection，OncoImmunin kit）使經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 或凋亡蛋白酶 3 專一性地切割對應的受質，進而產生螢光，並以流式細胞儀進行分析，其中，所測得的包含螢光的細胞即為包含經活化的凋亡蛋白酶 8〔凋亡蛋白酶 8（＋）〕、凋亡蛋白酶 9〔凋亡蛋白酶 9

（＋）〕或凋亡蛋白酶 3〔凋亡蛋白酶 3（＋）〕的細胞。

【0049】 請參照第 15 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比顯著提升，顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 8 的活性；前述的試驗結果亦可以於第 16 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0050】 再請參照第 17 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會使包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比提升（5 μg/mL 組），惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。第 15 圖至第 17 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升口腔癌細胞株中的凋亡蛋白酶 8 的活性的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則較相對不明顯。

【0051】 請參照第 18 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比顯著提升，顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 9 的活性；前述的試驗結果亦可以於第 19 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0052】 再請參照第 20 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比提升（5 μg/mL 組），惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。第 18 圖至第 20 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升口腔癌細胞株中的凋亡蛋白酶 9 的活性的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則相對較不明顯。

【0053】 請參照第 21 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝

化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比提升，顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 3 的活性；前述的試驗結果亦可以於第 22 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0054】 再請參照第 23 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理不會使包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比提升。

【0055】 依據前述試驗數據可以得知，在口腔癌細胞株中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理可以顯著提升凋亡蛋白酶 8 及凋亡蛋白酶 9 的活性，進而提升凋亡蛋白酶 3 的活性，顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 不僅可以促進該外源性凋亡途徑的進行，亦可以促進內源性凋亡途徑的進行；雖然此一現象亦可以在正常細胞中觀察到，惟影響較不明顯。

【0056】 接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響包含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以基於於胜肽之偵測套組（peptide-based detection，OncoImmunin kit）使經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 專一性地切割對應的受質，進而產生螢光，並以流式細胞儀進行分析，其中，所測得的包含螢光的細胞即為包含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 及凋亡蛋白酶 3 的細胞。

【0057】 請參照第 24 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝

化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會使包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比顯著提升，且隨著處理時間的增長，提升包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）已不再對於包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比造成影響，說明活性氧物質抑制劑會減弱該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 8 層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響；前述的試驗結果亦可以於第 25 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。前述結果顯示硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 8 層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響係與細胞內的氧化壓力有關。

【0058】 再請參照第 26 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升相對較不明顯；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理也不再提升包含經活化的凋亡蛋白酶 8 的細胞的佔比（NAC/SK1 組）。

【0059】 請參照第 27 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比顯著提升，且隨著處理時間的增長，提升包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）的影響不但不會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比，反而會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比降低，說明活性氧物質抑制劑會顯著減弱該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 9 層面上對於口腔癌細胞

株的細胞凋亡的影響。

【0060】 請參照第 28 圖所示，於 CAL 27 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比顯著提升，且隨著處理時間的增長，提升包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）的影響則會顯著降低。該些結果顯示硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 9 層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響係與細胞內的氧化壓力有關。

【0061】 再請參照第 29 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）也不再提升包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比，甚至隨著處理時間的加長，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會使包含經活化的凋亡蛋白酶 9 的細胞的佔比降低。

【0062】 請參照第 30 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會使包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比顯著提升，且隨著處理時間的增長，提升包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後（NAC/SK1 組），該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理已不再對於包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比造成影響，說明活性氧物質抑制劑會減弱該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 3 層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響；前述的試驗結果亦可以於第 31 圖所示的

另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。該些結果顯示硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 3 層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響係與細胞內的氧化壓力有關。

【0063】 再請參照第 32 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）也不再提升包含經活化的凋亡蛋白酶 3 的細胞的佔比。

【0064】 除了測量包含經活化的凋亡蛋白酶 8、凋亡蛋白酶 9 或凋亡蛋白酶 3 的細胞佔比變化之外，凋亡蛋白酶 3/7 的活性也是用來判斷細胞進入凋亡程序的常用指標之一。因此，進行以下試驗，以確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理是否會對凋亡蛋白酶 3/7 的活性造成影響。

【0065】 （E）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於細胞凋亡的影響（三）

【0066】 本試驗係以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以 Caspase-Glo® 3/7 試劑使經活化的凋亡蛋白酶 3/7 專一性地切割對應的受質，進而產生螢光，並以光度計進行分析，在計算出產生螢光的細胞及未產生螢光的細胞後，加以換算之後即可以得到細胞內的凋亡蛋白酶 3/7 活性（倍）；其中，將濃度為 0 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株所測得的凋亡蛋白酶 3/7 活性訂定為 1（倍）。

【0067】 請參照第 33 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會使凋亡蛋白酶 3/7 活性顯著提升；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後（NAC/SK1 組），該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理已不再對於凋亡蛋白酶 3/7 活性造成影響，說明活性氧物質抑制劑會減弱該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於凋亡蛋白酶 3/7 活性的影響；前述的試驗結果亦可以於第 34 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。前述結果顯示硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 在凋亡蛋白酶 3/7 活性的層面上對於口腔癌細胞株的細胞凋亡的影響係與細胞內的氧化壓力有關。

【0068】 再請參照第 35 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理不會提升凋亡蛋白酶 3/7 活性，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）對於凋亡蛋白酶 3/7 活性的影響仍不明顯。

【0069】 從前述試驗所得到的結果可得知，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理不僅可以抑制口腔癌細胞的存活，更可以促進口腔癌細胞進入細胞凋亡的程序。在前述試驗中，係利用活性氧物質抑制劑（NAC）的預處理來間接確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於各試驗的結果是否與細胞內的氧化壓力有關，為進一步直接確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對於細胞內的氧化壓力的影響，遂進行以下試驗。

【0070】 （F）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對氧化壓力的影響（一）

【0071】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以 2’,7’-二氯二氫螢光素二乙酸酯（2’,7’-dichlorodihydrofluorescein diacetate，H_2DCFDA）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析。由於 2’,7’-二氯二氫螢光素二乙酸酯

（H_2DCFDA）可以通過細胞膜，並在進入細胞之後形成不帶螢光的 2',7'-二氯二氫螢光素（2',7'-dichlorodihydrofluorescein，H_2DCF），而在細胞內包含活性氧物質的情況下，不帶螢光的 2',7'-二氯二氫螢光素（H_2DCF）會再被活性氧物質氧化形成具有強螢光的 2',7'-二氯螢光素（DCF，激發光波長為 495 nm，發射光波長為 529 nm），因此所測得的包含 529 nm 波長的 2',7'-二氯螢光素（DCF）的細胞即為包含活性氧物質的細胞。

【0072】 請參照第 36 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會顯著提升包含活性氧物質的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 37 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0073】 再請參照第 38 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於包含活性氧物質的細胞的佔比的影響效果較不一致，且即使能夠提升包含活性氧物質的細胞的佔比（5 μg/mL 組），與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升也相對不明顯。第 36 圖至第 38 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升包含活性氧物質的口腔癌細胞株的佔比的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則較不明顯且無規律。

【0074】 接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響包含活性氧物質的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以 2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯（H_2DCFDA）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析；其中，包含 529

nm 波長的螢光產物的細胞即為包含活性氧物質的細胞。

【0075】 請參照第 39 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）可以顯著提升包含活性氧物質的細胞的佔比，但是在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）對於包含活性氧物質的細胞的佔比的提升效果會顯著降低；前述的試驗結果亦可以於第 40 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0076】 再請參照第 41 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理也會提升包含活性氧物質的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯；因此，縱使以活性氧物質抑制劑進行預處理，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）對於影響包含活性氧物質的細胞的佔比的效果仍不明顯。

【0077】 除了存在於細胞質內的活性氧物質之外，粒線體超氧化物（mitochondrial superoxide）亦為產生氧化壓力的原因之一，因此以下試驗係確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的影響。

【0078】 （G）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對氧化壓力的影響（二）

【0079】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析。由於該粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）可以通過細胞膜，在進入粒線體之後若是被粒線體超氧化物氧化，則會與粒線體 DNA 結合而形成螢光產物（激發光波長為 396 nm，發射光波長為 610 nm），因此所測得的包含 610 nm 波長的螢光產物的細胞即為包含粒線體超氧化物的細胞。

【0080】 請參照第 42 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會顯著提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 43 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0081】 再請參照第 44 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比（5 μg/mL 組），惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。第 42 圖至第 44 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升包含粒線體超氧化物的口腔癌細胞株的佔比的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則較不明顯。

【0082】 接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響包含粒線體超氧化物的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以粒線體自由基螢光染劑（MitoSOX™ Red）作為探針，接著以流式細胞儀進行分析，所測得的包含 610 nm 波長的螢光產物的細胞即為包含粒線體超氧化物的細胞。

【0083】 請參照第 45 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）仍可以顯著提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比，且隨著處理時間的增長，提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）已不再對於包含粒線體超氧化物的細胞的佔比造成影響；前述的試驗結果亦可以於第 46 圖

所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0084】 再請參照第 47 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含粒線體超氧化物的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。因此，縱使以活性氧物質抑制劑進行預處理，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）對於影響包含粒線體超氧化物的細胞的佔比的效果仍不明顯。

【0085】 除了細胞內的活性氧物質及粒線體超氧化物的佔比提升之外，細胞內氧化壓力的提升亦會造成粒線體去極化（depolarization），使粒線體膜電位降低，進而造成粒線體功能異常，最終進入細胞凋亡的程序。因此，為確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理是否對於粒線體膜電位造成影響，遂進行以下試驗。

【0086】 （H）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對氧化壓力的影響（三）

【0087】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以 $DiOC_2$（3）染料（3,3'-Diethyloxacarbocyanine Iodide，激發光波長為 482 nm，發射光波長為 497 nm）進行染色，接著以流式細胞儀進行分析。藉由計螢光訊號強度改變(變少)，即可得知粒線體膜電位的降低量〔粒線體膜電位（－）的量增加〕。

【0088】 請參照第 48 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會顯著提升 CA9-22 細胞的粒線體膜電位的降低量；前述的試驗結果亦可以於第 49 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0089】 再請參照第 50 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理不會對於 S-G 細胞的粒線體膜電位的降低

量造成影響。

【0090】 接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響各模式細胞株內的粒線體膜電位的降低量，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以 $DiOC_2$（3）染料進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，藉由計算紅色螢光／綠色螢光的訊號強度比，即可得知粒線體膜電位的降低量〔粒線體膜電位（－）〕。

【0091】 請參照第 51 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）可以顯著提升 CA9-22 細胞的粒線體膜電位的降低量，且隨著處理時間的增長，提升 CA9-22 細胞的粒線體膜電位的降低量的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）已不再對於 CA9-22 細胞的粒線體膜電位的降低量造成影響；前述的試驗結果亦可以於第 52 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0092】 再請參照第 53 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理不會對於 S-G 細胞的粒線體膜電位的降低量造成影響，縱使以活性氧物質抑制劑進行預處理，對於影響 S-G 細胞的粒線體膜電位的降低量的效果仍不明顯。

【0093】 已知穀胱甘肽（glutathione，簡稱為 GSH）為人體最重要的抗氧化劑，能夠用於降低體內的氧化壓力；換言之，若是細胞內缺乏穀胱甘肽，則代表細胞內的氧化壓力較不易降低。因此，為確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於包含穀胱甘肽的細胞的佔比的影響，遂進行以下試驗。

【0094】（I）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對氧化壓力的影響（四）

【0095】本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以 5－氯甲基螢光素二乙酸酯（5-chloromethylfluorescein diacetate，簡稱為 CMF-DA）進行染色，接著以流式細胞儀進行分析。由於 5－氯甲基螢光素二乙酸酯（CMF-DA）能夠與細胞內游離的硫醇〔thiol，包含巯基（thiolgroup，－SH）的化合物〕進行反應而形成發出螢光的 5－氯甲基螢光素（5-chloromethylfluorescein）（激發光波長為 492 nm，發射光波長為 517 nm），因此所測得的包含 517 nm 波長的 5－氯甲基螢光素的細胞為包含穀胱甘肽的細胞，並可以再進一步換算即可以得知不含有穀胱甘肽的細胞〔穀胱甘肽（－）〕的佔比。

【0096】請參照第 54 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會隨著該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的濃度增加而顯著提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比（5 μg/mL 組）。

【0097】請參照第 55 圖所示，於 CAL 27 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會隨著該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的濃度增加而顯著提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0098】再請參照第 56 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的影響較不明顯且無一致規律。

【0099】接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響不含有穀胱甘肽的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑

制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以 5－氯甲基螢光素二乙酸酯（CMF-DA）進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，所測得的包含 517 nm 波長的 5－氯甲基螢光素的細胞為包含穀胱甘肽的細胞，並再進一步換算即可以得知不含有穀胱甘肽的細胞的佔比。

【0100】 請參照第 57 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，隨著處理時間的增長，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）可以顯著提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）幾乎對於不含有穀胱甘肽的細胞的佔比不造成影響。前述的試驗結果亦可以於第 58 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0101】 再請參照第 59 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，由於該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）對於提升不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的影響較不明顯，縱使以活性氧物質抑制劑進行預處理（NAC/SK1 組），對於影響不含有穀胱甘肽的細胞的佔比的效果仍不明顯。

【0102】 無論是內源性產生的氧化壓力，亦或是來自外源性的氧化壓力，均會對細胞造成重大的威脅，導致對 DNA 的嚴重損傷（如，造成雙股 DNA 斷裂），而當 DNA 的損傷到達無法修復的嚴重狀況時，細胞即會進入細胞凋亡，因此後續另確認該膨大羽珊瑚萃取物的處理對 DNA 損傷造成的影響。

【0103】 由於當雙股 DNA 斷裂（DNA double-strand break，簡稱為 DSB）發生時，隸屬於 PI3-家族的激酶（kinase，舉例如 ATM、ATR 及 DNA-PK 等）會磷酸化組蛋白 H2AX（H2A histone member X）的第 139 個位置的絲胺酸（serine），進而形成磷酸化組蛋白 γH2AX，因此包含磷酸化組蛋白

γH2AX 的細胞即可以代表已發生雙股 DNA 斷裂的的細胞。

【0104】 （J）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對 DNA 損傷的影響（一）

【0105】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以 75%的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 之後，以對磷酸化組蛋白 γH2AX 具有特異性的抗體作為一級抗體，另再加入二級抗體及 7-氨基放線菌素 D（7AAD），接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞〔磷酸化組蛋白 γH2AX（＋）〕的佔比。

【0106】 請參照第 60 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會顯著提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 61 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0107】 再請參照第 62 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比（5 μg/mL 組），惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。第 60 圖至第 62 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則較不明顯。

【0108】 接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），在以濃度為 75%的乙醇

水溶液固定細胞內的 DNA 之後，以對磷酸化組蛋白 γH2AX 具有特異性的抗體作為一級抗體，另再加入二級抗體及 7-氨基放線菌素 D（7AAD），接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比。

【0109】 請參照第 63 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）可以顯著提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比，且隨著處理時間的增長，提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）已不再對於包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比造成影響；前述的試驗結果亦可以於第 64 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0110】 再請參照第 65 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）也會提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）也不再提升包含磷酸化組蛋白 γH2AX 的細胞的佔比。

【0111】 8－羥基去氧鳥苷（8-hydroxy-2-deoxyguanosine）為去氧鳥苷（deoxyguanosine）的氧化衍生物，為細胞內 DNA 及粒線體 DNA 在受到活性氧物質攻擊後所形成的主要產物，被認為亦可以作為 DNA 損傷的生物標記（biomarker），因此下列試驗另確認該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理是否會對包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比造成影響。

【0112】 （K）硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對 DNA 損傷的影響（二）

【0113】 本試驗係取經不同濃度（0、1.25、2.5 及 5 μg/mL）的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 24 小時之後的模式細胞株，以濃度為 75%

的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 之後，加入對 8－羥基去氧鳥苷具有特異性的一級抗體進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞〔8－羥基去氧鳥苷（＋）〕的佔比。

【0114】 請參照第 66 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理會顯著提升包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比；前述的試驗結果亦可以於第 67 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0115】 再請參照第 68 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理亦會提升包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯。第 66 圖至第 68 圖的結果顯示該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理對於提升包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的影響較為明顯，而對於正常細胞的影響則較不明顯。

【0116】 接著，為確認活性氧物質抑制劑的預處理是否會影響包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比，遂以活性氧物質抑制劑（NAC，10 mM）進行預處理 1 小時之後，以濃度為 5 μg/mL 的該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 進行處理 0、12 或 24 小時的模式細胞株（NAC/SK1 組），以及未經活性氧物質抑制劑（NAC）進行預處理，即直接以該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 處理 0、12 或 24 小時之後的模式細胞株（SK1 組），以濃度為 75%的乙醇溶液固定細胞內的 DNA 之後，加入對 8－羥基去氧鳥苷具有特異性的一級抗體進行染色，接著以流式細胞儀進行分析，以換算得知包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比。

【0117】 請參照第 69 圖所示，於 CA9-22 細胞（口腔癌細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）可以顯著提升包含 8－

羥基去氧鳥苷的細胞的佔比，且隨著處理時間的增長，提升包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的效果更加顯著；然而，在以活性氧物質抑制劑進行預處理之後，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（NAC/SK1 組）已不再對於包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比造成影響；前述的試驗結果亦可以於第 70 圖所示的另一口腔癌細胞株－CAL 27 細胞中觀察到。

【0118】 再請參照第 71 圖所示，於 S-G 細胞（正常細胞）中，雖然該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的處理（SK1 組）會提升包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比，惟與前述的口腔癌細胞株相比，該佔比的提升較不明顯；因此，縱使以活性氧物質抑制劑進行預處理（NAC/SK1 組），對於影響包含 8－羥基去氧鳥苷的細胞的佔比的效果亦不明顯。

【0119】 綜上所述，本發明的硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 的用途，係能夠藉由該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 作為活性成分，在將該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 投予一所需個體時，該些活性成分可以於該所需個體的體內發生效用，促進口腔癌細胞進入細胞凋亡，並造成口腔癌細胞的 DNA 損傷，進而抑制口腔癌細胞的存活；並且，相較於對口腔癌細胞而言，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 對正常細胞的傷害較小或甚至不具傷害，因而該硝化[6,6,6]三環衍生化合物 SK1 係可以用於製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物，為本發明之功效。

【0120】 雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當包含後附之申請專利範圍所記載的文義及均等範圍內之所有變更。

【符號說明】

【0121】 無

【發明申請專利範圍】

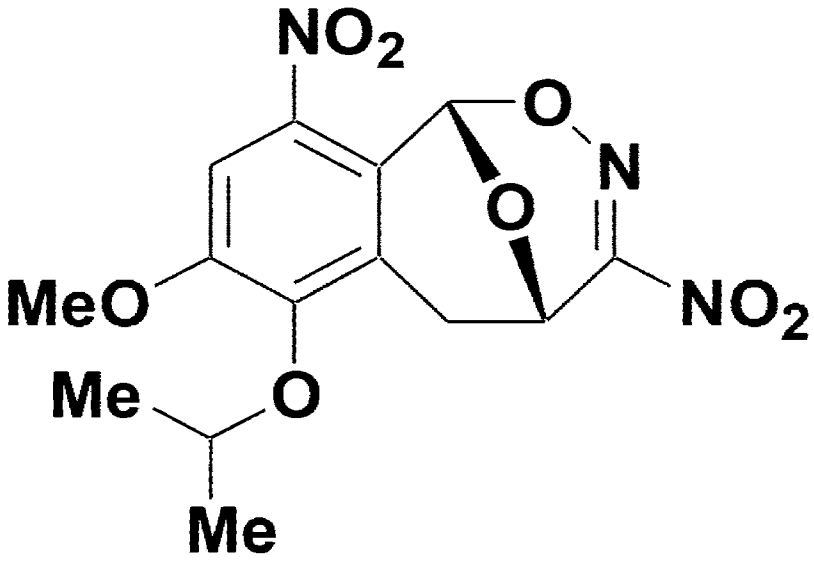
【請求項 1】 一種硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，係用以製備供選擇性抑制口腔癌細胞生長的藥物；其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物為 6-異丙氧基-5-甲氧基-3,10-二硝基-12,13-二氧雜-11-氮雜三環[7.3.1.$0^{2,7}$]十三碳-2,4,6,10-四烯，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係投予一所需個體，促使該所需個體內的口腔癌細胞啟動細胞凋亡機制，以選擇性抑制口腔癌細胞生長。

【請求項 2】 如請求項 1 之硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係以口服方式投予一所需個體。

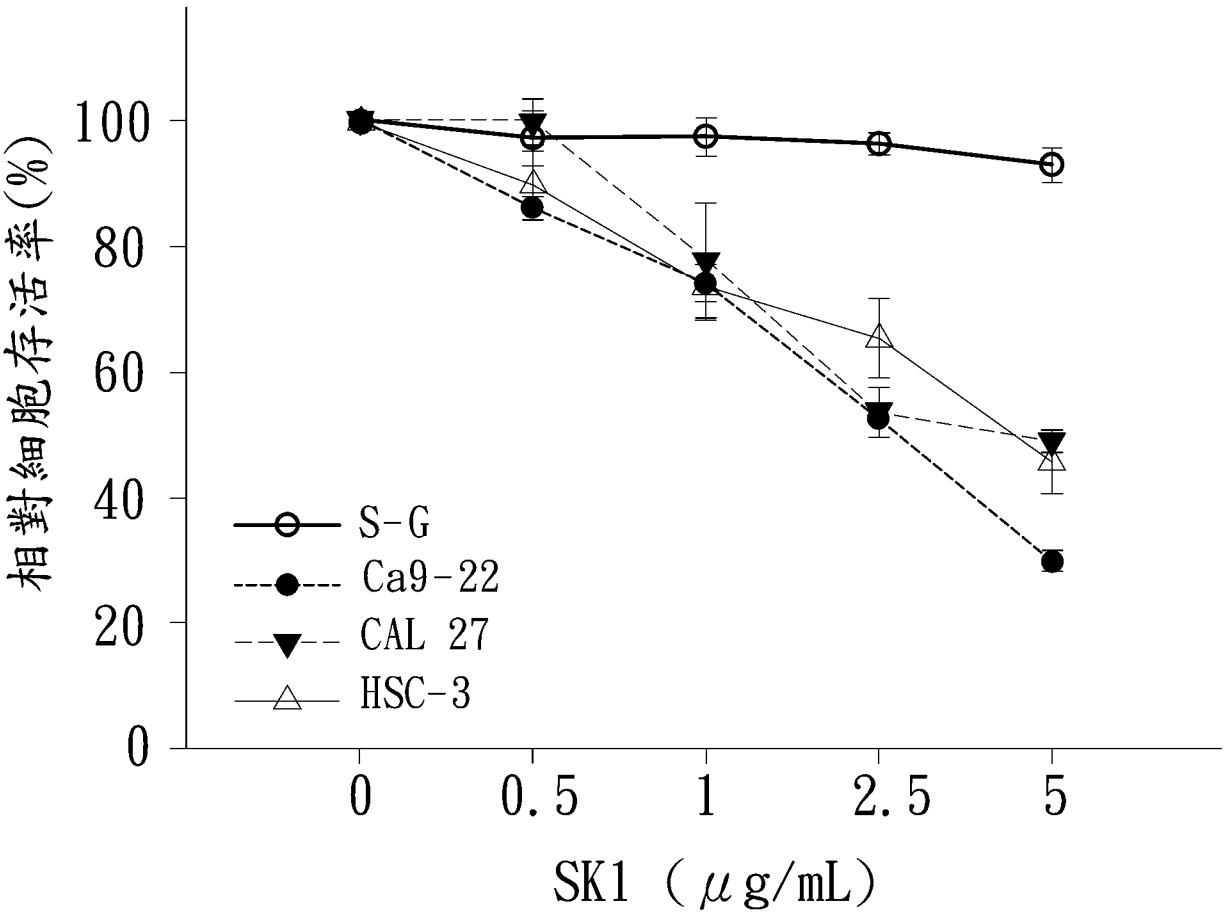
【請求項 3】 如請求項 1 之硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係以靜脈注射的方式投予一所需個體。

【請求項 4】 如請求項 2 或 3 之硝化[6,6,6]三環衍生化合物的用途，其中，該硝化[6,6,6]三環衍生化合物係以每天每公斤體重施予 10～30 毫克的劑量施予該所需個體。

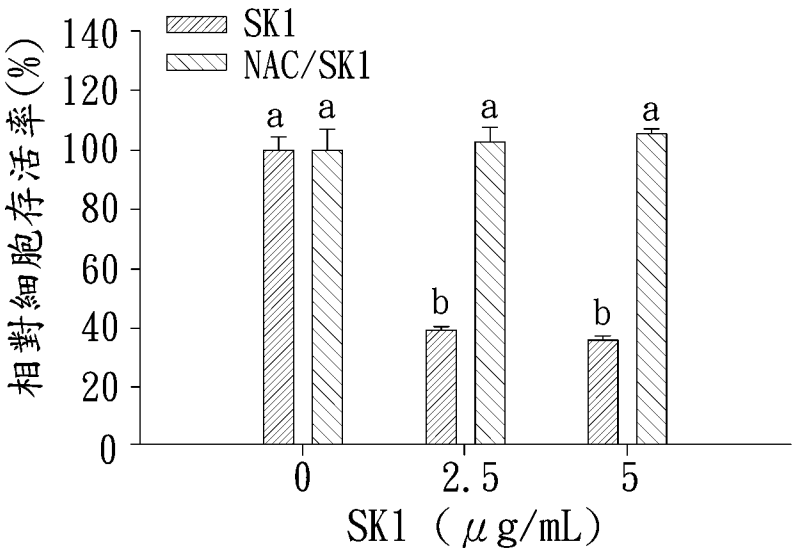
【發明圖式】



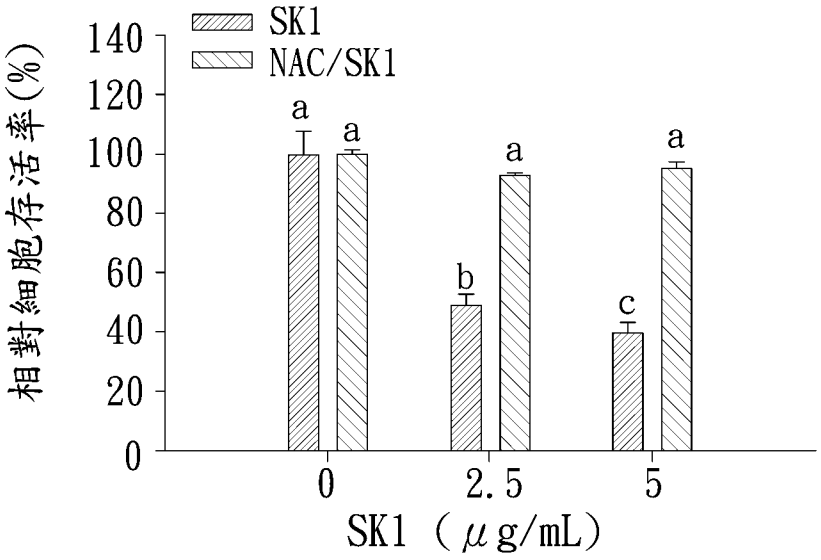
【第 1 圖】



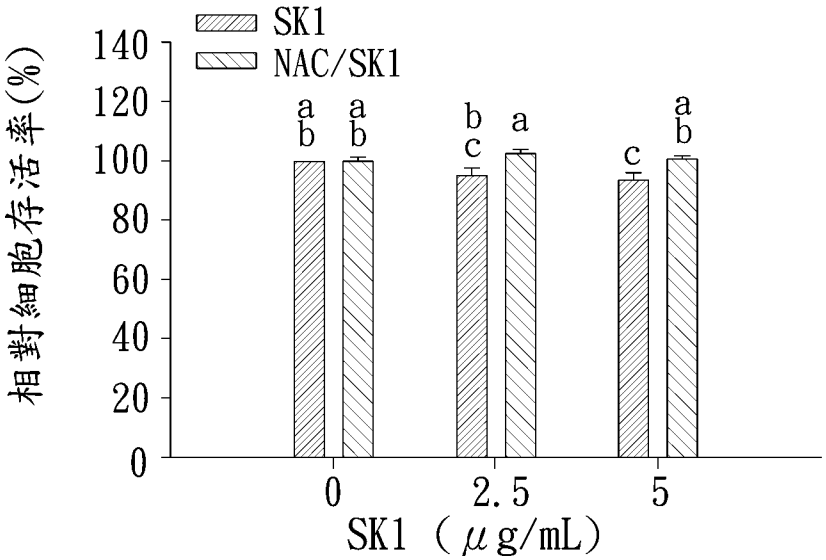
【第 2 圖】


SK1
NAC/SK1
相對細胞存活率(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
a
a
b
a
b
a
0
2.5
5
SK1（μg/mL）

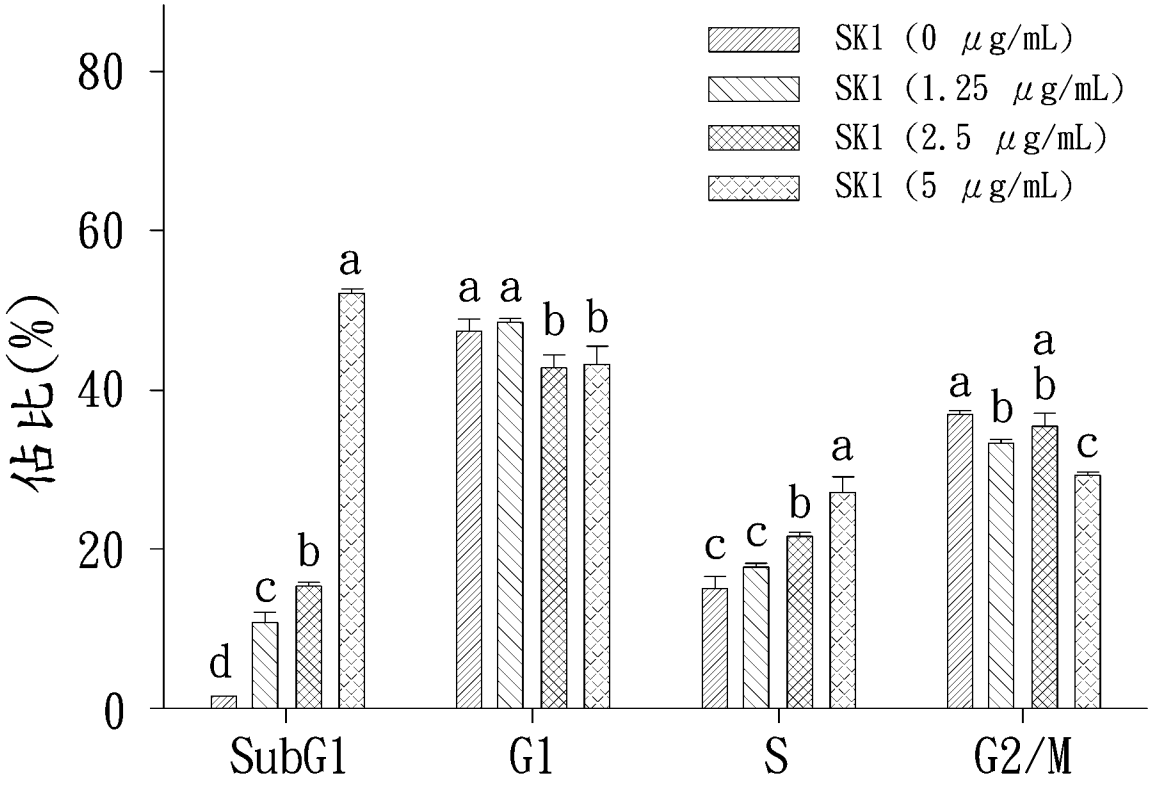
【第 3 圖】


SK1
NAC/SK1
相對細胞存活率(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
a
a
b
a
c
a
0
2.5
5
SK1（μg/mL）

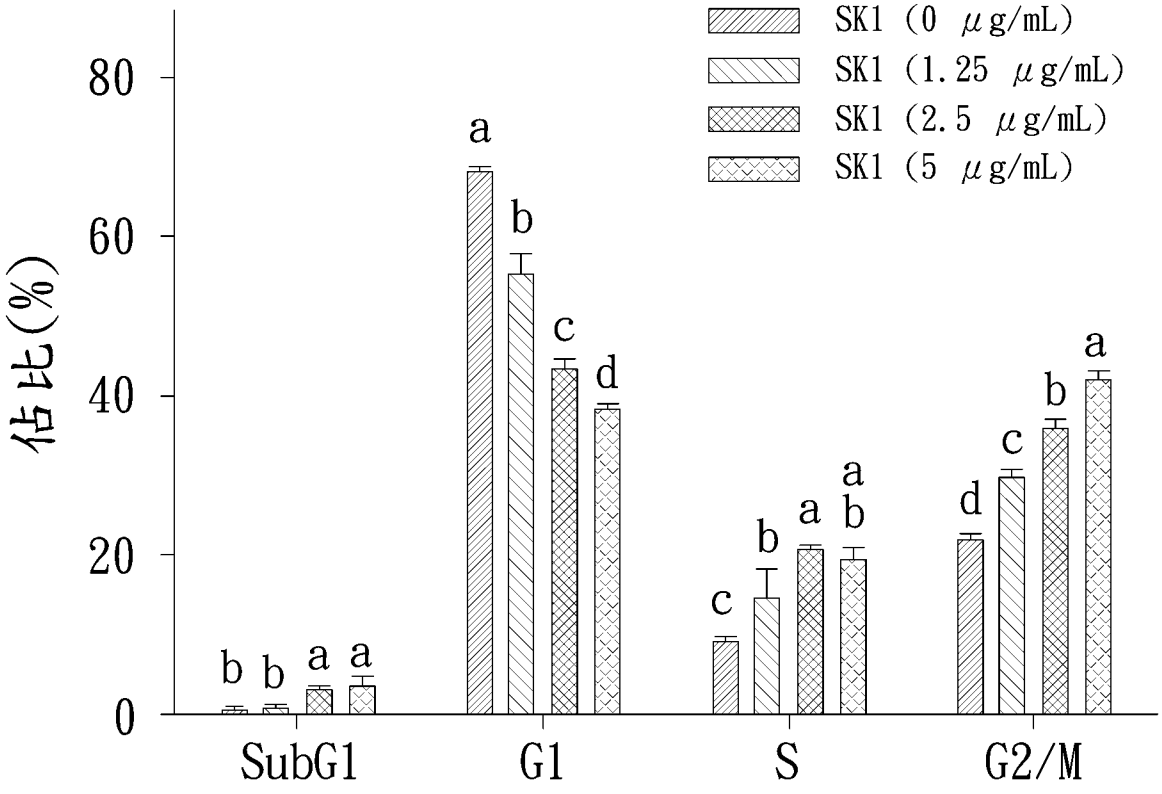
【第 4 圖】


SK1
NAC/SK1
相對細胞存活率(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
a
b
a
b
b
c
a
c
a
b
0
2.5
5
SK1（μg/mL）

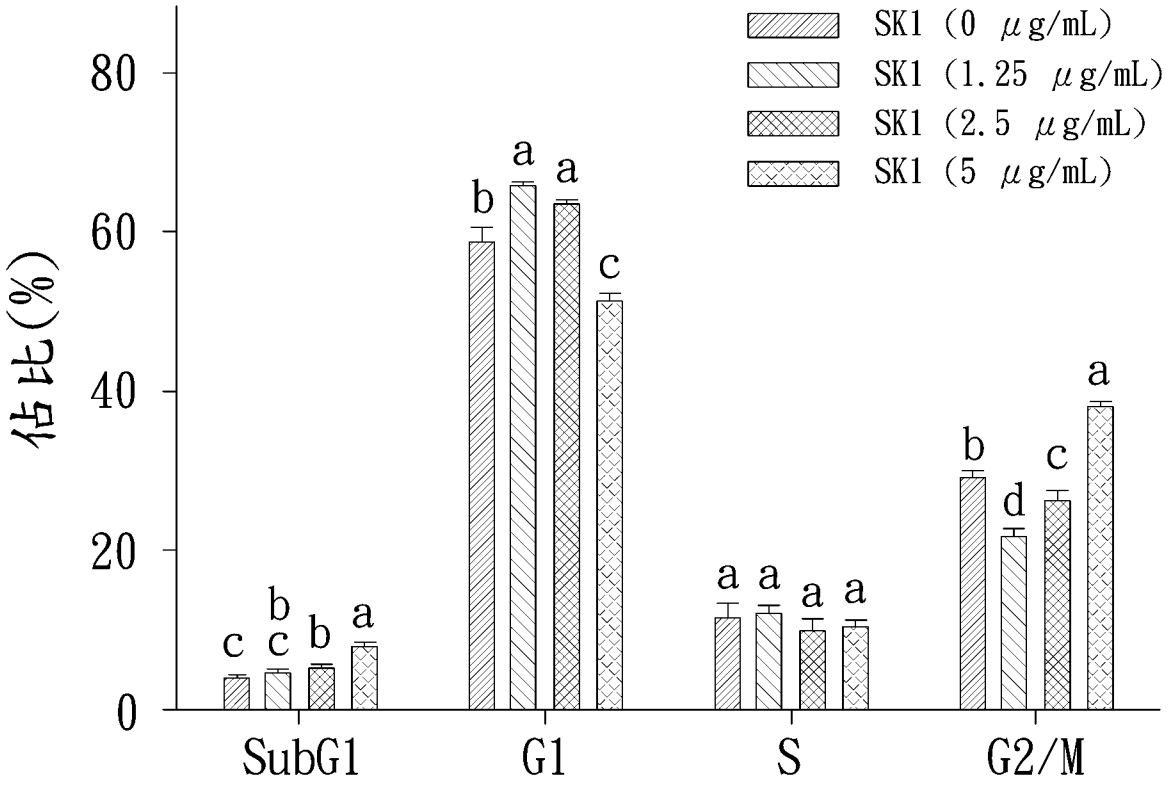
【第 5 圖】


SK1 (0 μg/mL)
SK1 (1.25 μg/mL)
SK1 (2.5 μg/mL)
SK1 (5 μg/mL)
細胞比(%)
0
20
40
60
80
SubG1
G1
S
G2/M

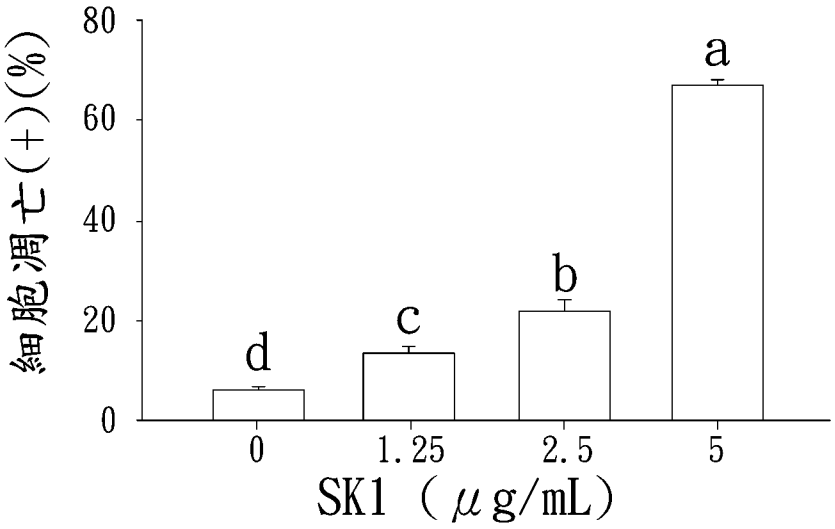
【第 6 圖】


SK1 (0 μg/mL)
SK1 (1.25 μg/mL)
SK1 (2.5 μg/mL)
SK1 (5 μg/mL)
細胞比(%)
0
20
40
60
80
SubG1
G1
S
G2/M

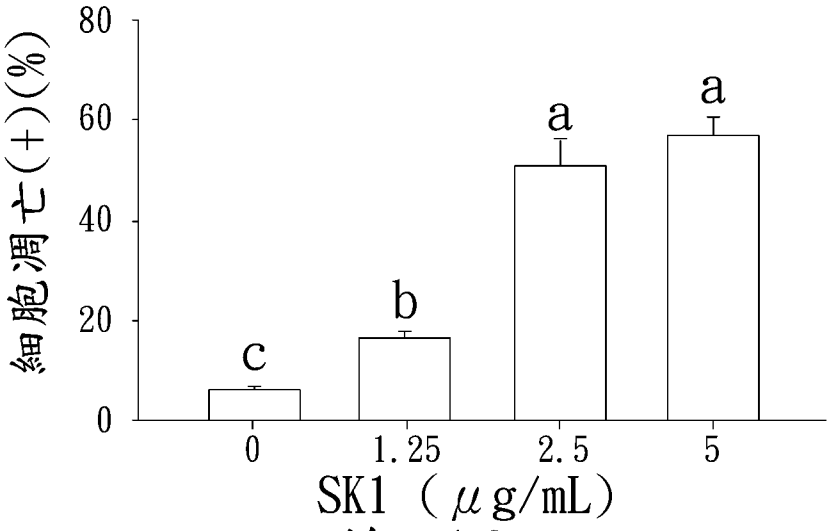
【第 7 圖】


SK1 (0 μg/mL)
SK1 (1.25 μg/mL)
SK1 (2.5 μg/mL)
SK1 (5 μg/mL)
佔比(%)
0
20
40
60
80
c c b a
b a a c
a a a a
b d c a
SubG1
G1
S
G2/M

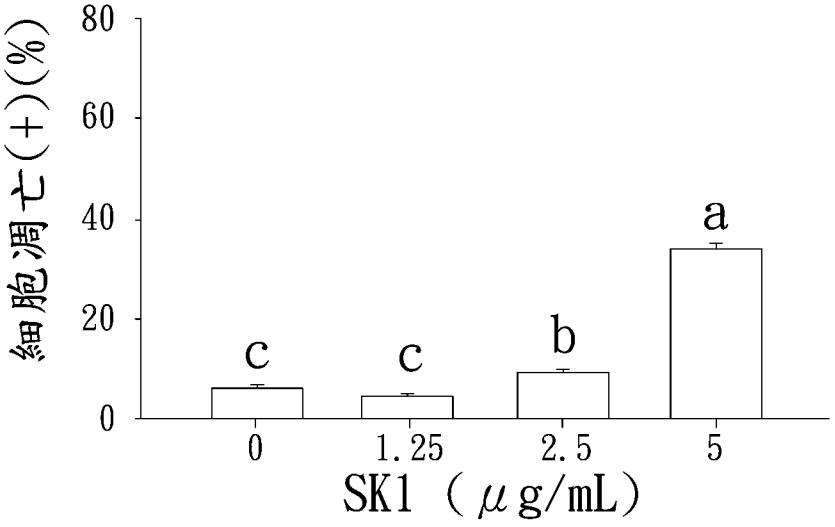
【第 8 圖】



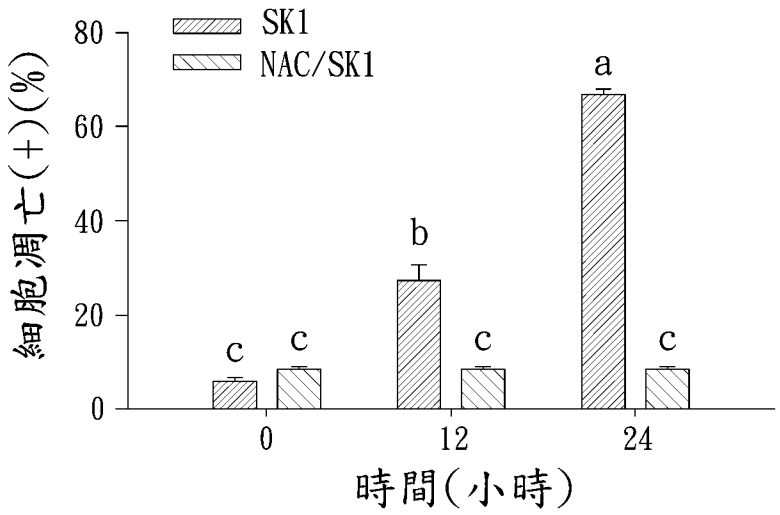
【第 9 圖】



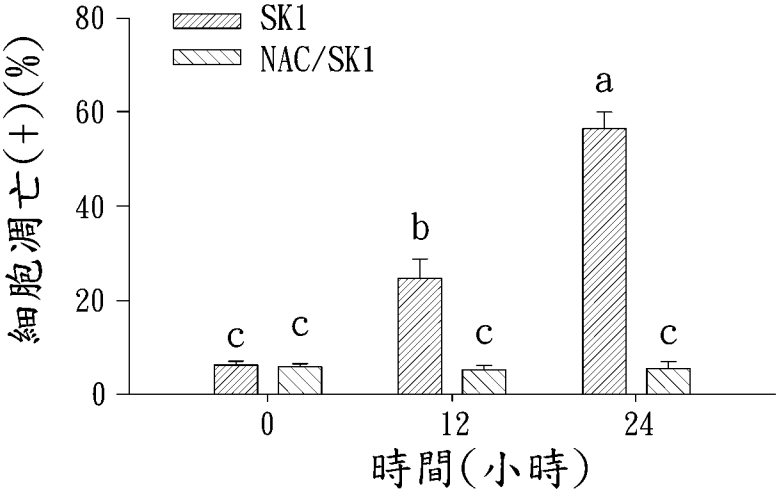
【第 10 圖】



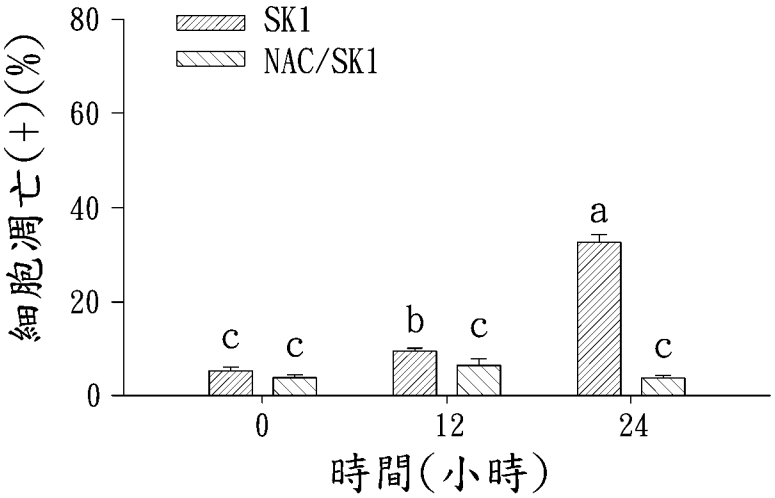
【第 11 圖】



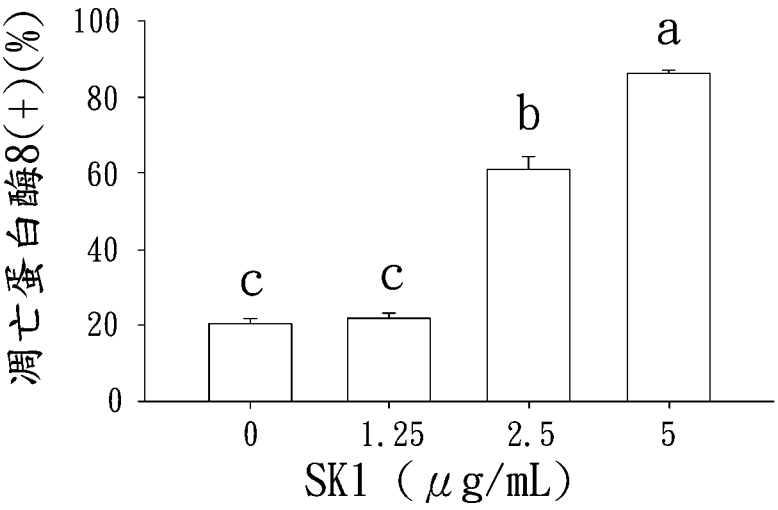
【第 12 圖】



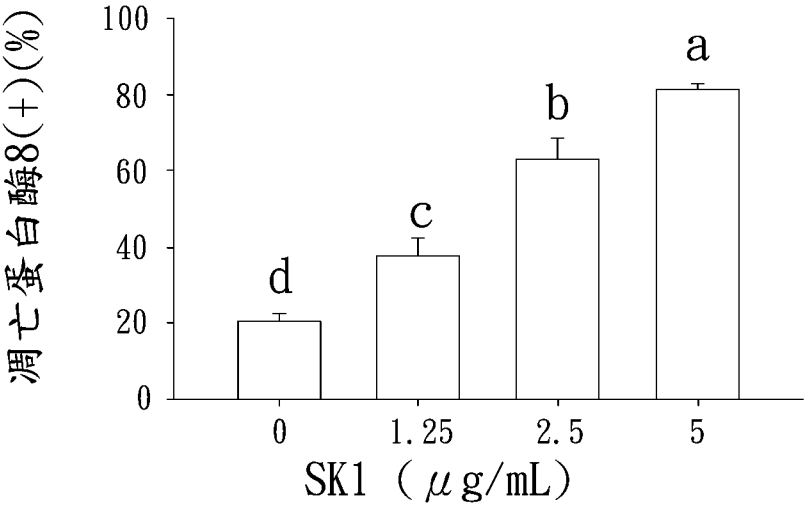
【第 13 圖】



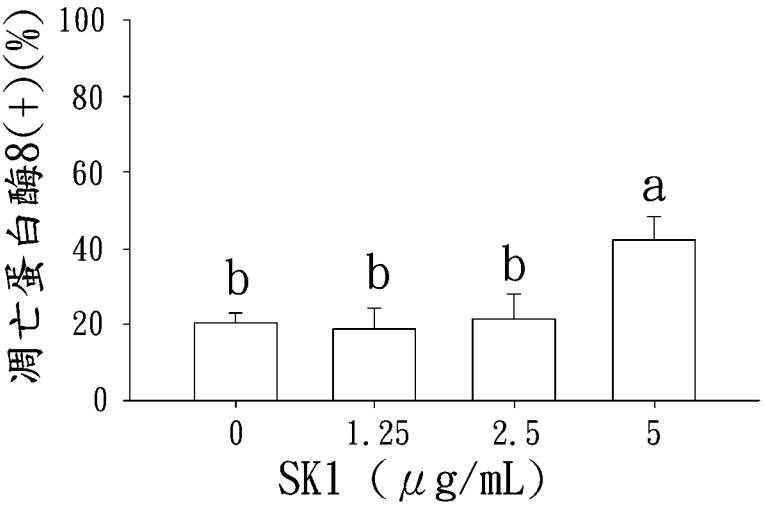
【第 14 圖】



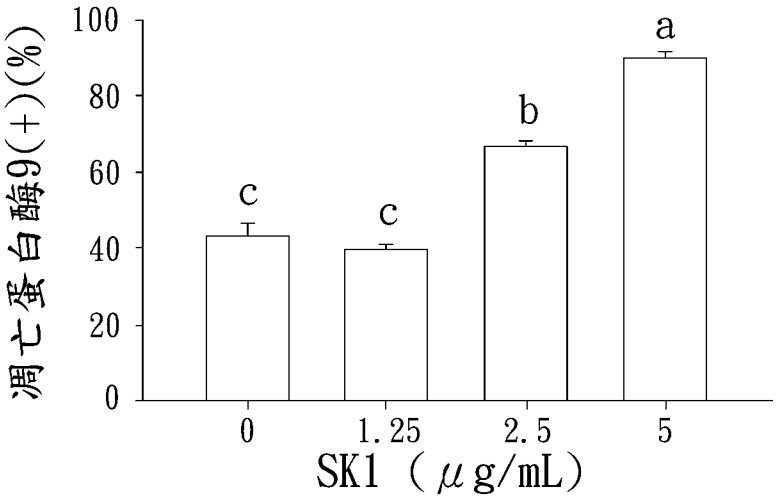
【第 15 圖】



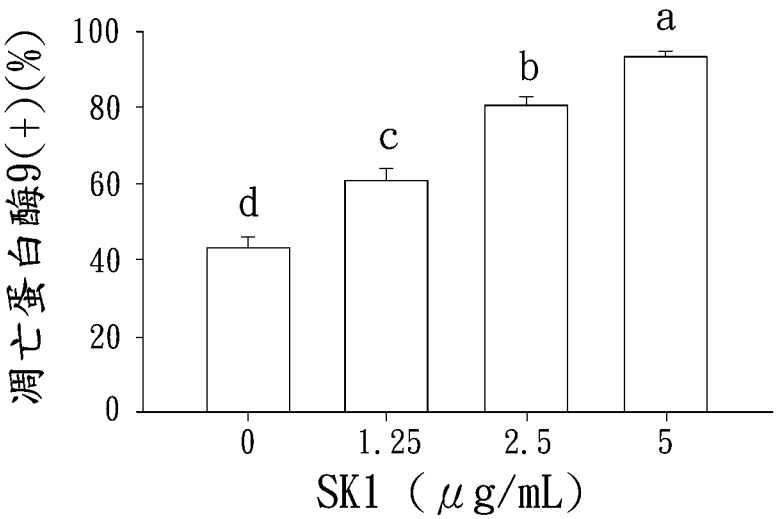
【第 16 圖】



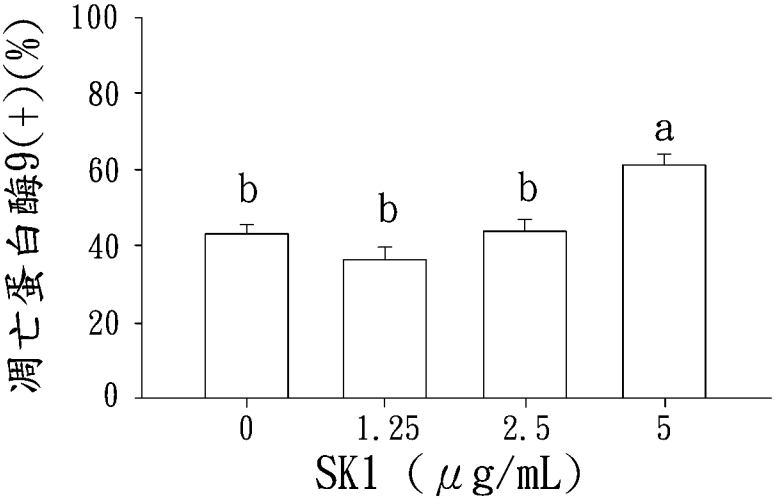
【第 17 圖】



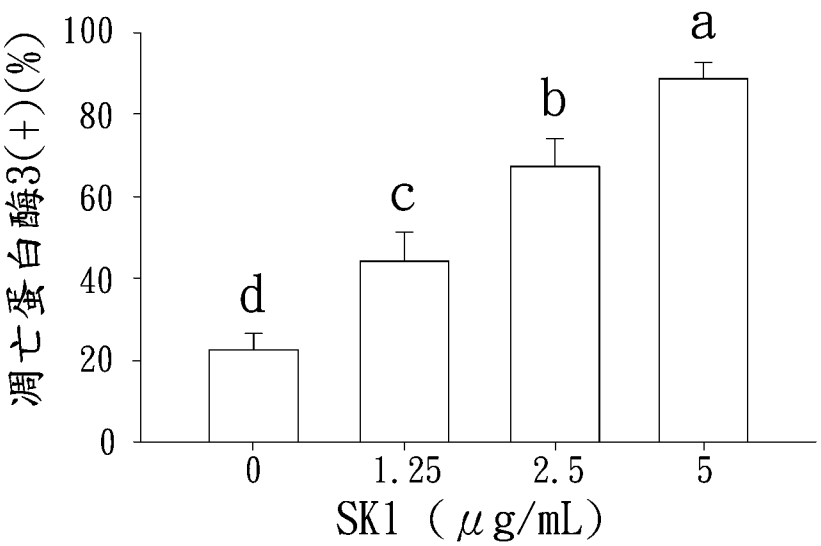
【第 18 圖】



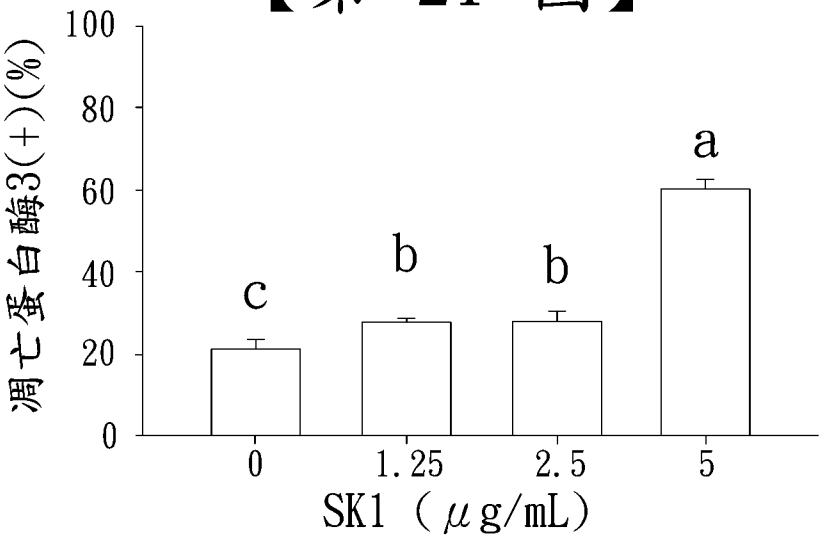
【第 19 圖】



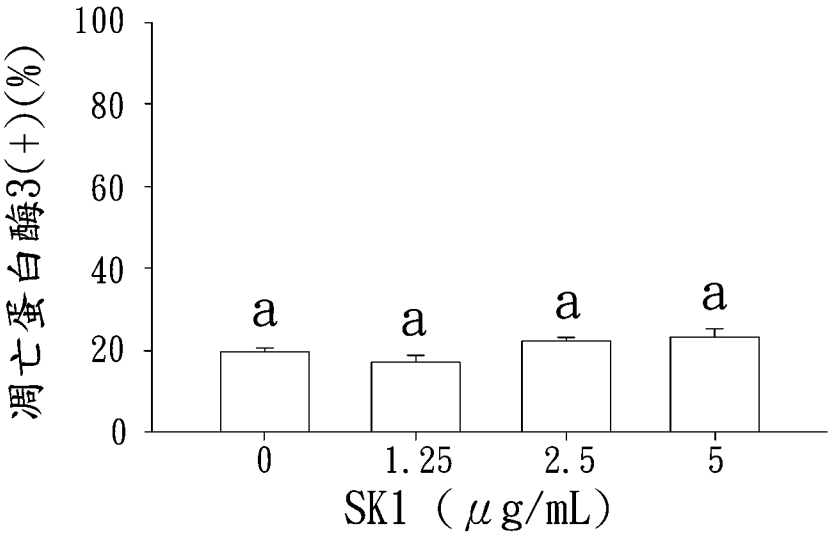
【第 20 圖】



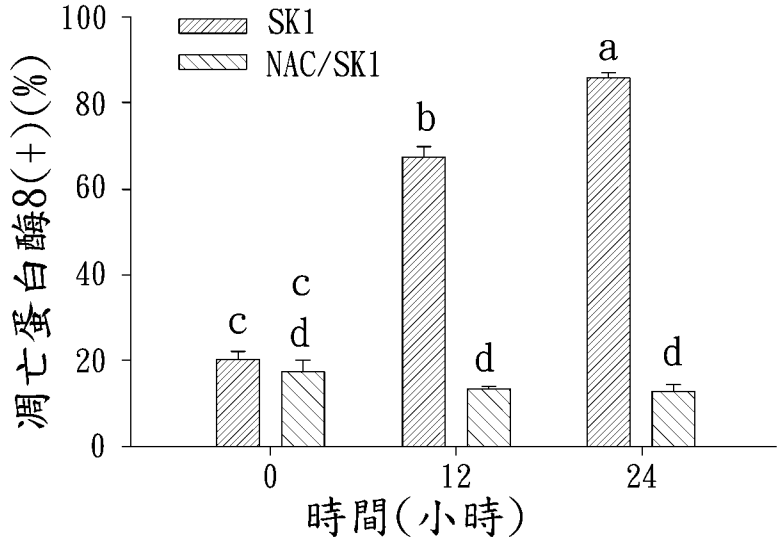
【第 21 圖】



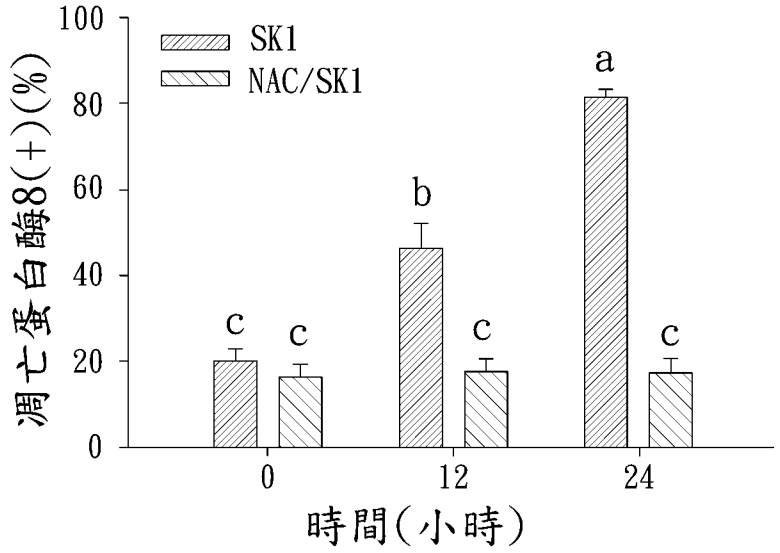
【第 22 圖】



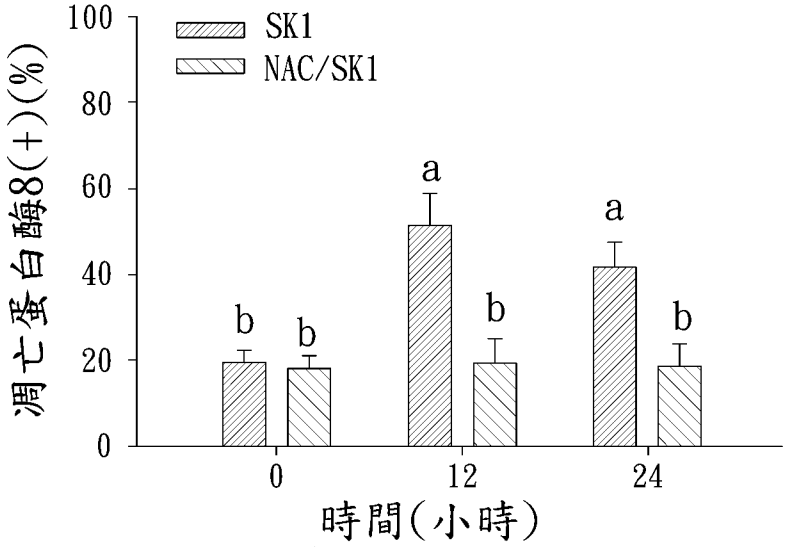
【第 23 圖】



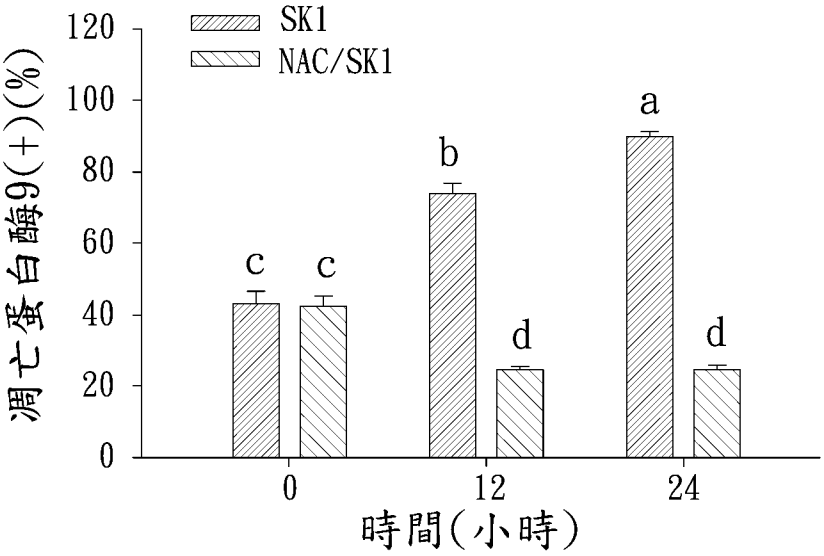
【第 24 圖】



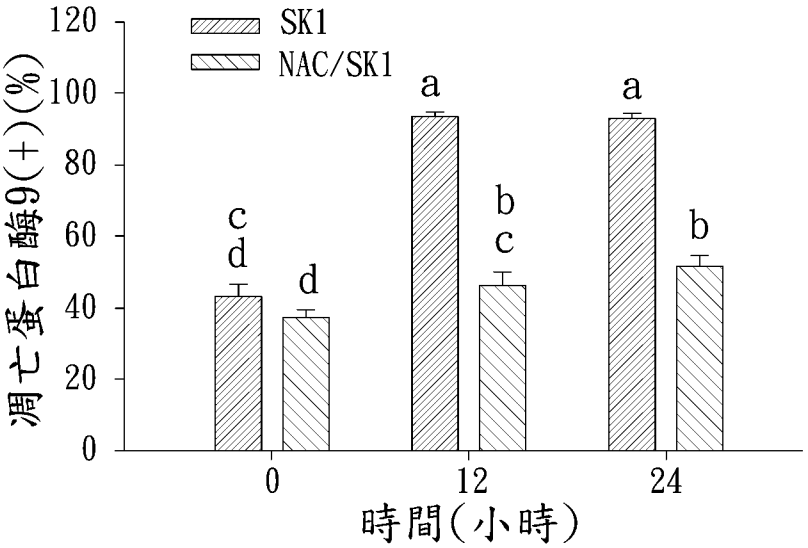
【第 25 圖】



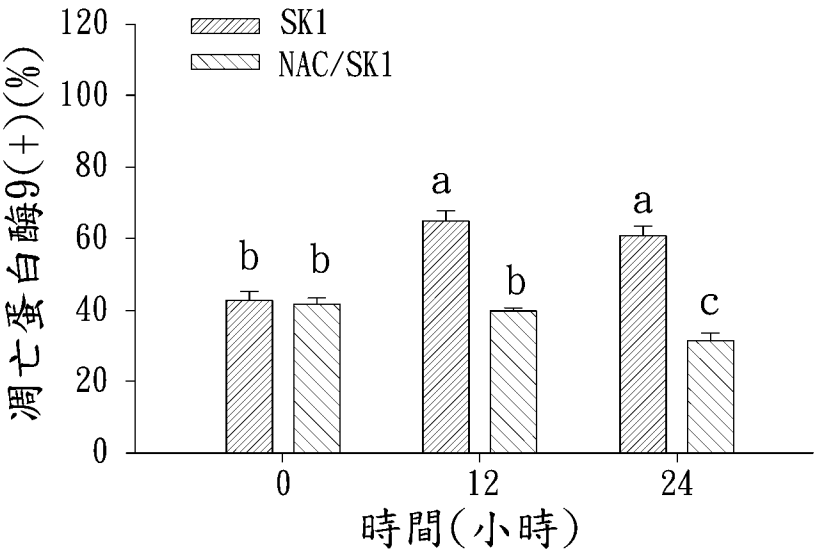
【第 26 圖】



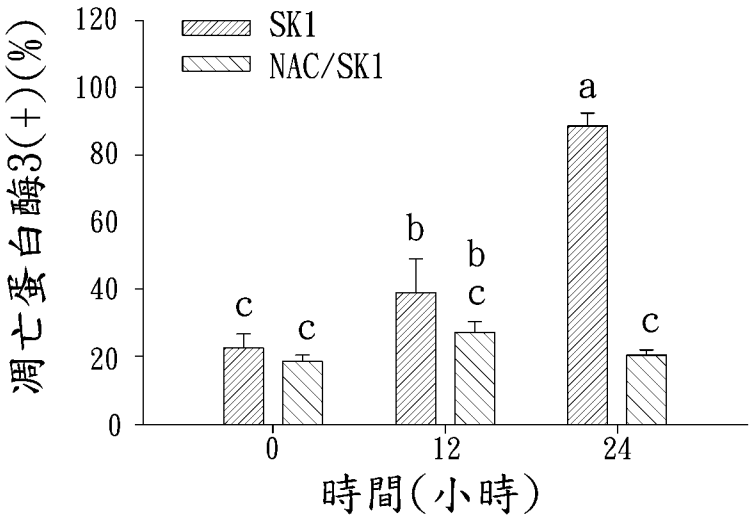
【第 27 圖】



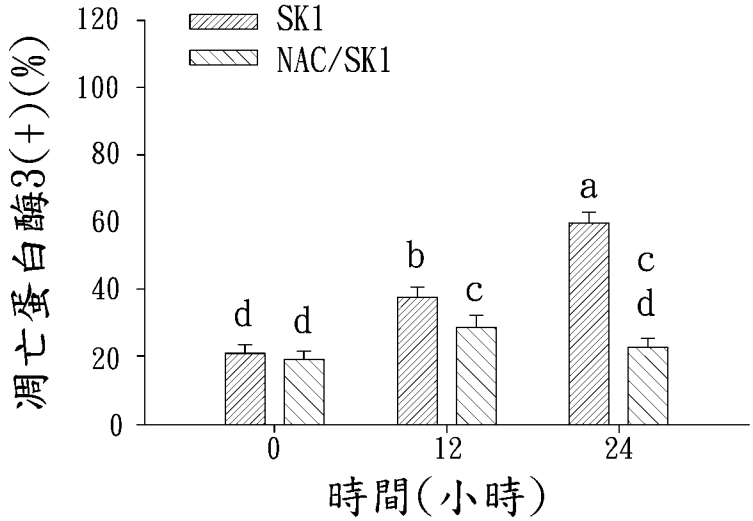
【第 28 圖】



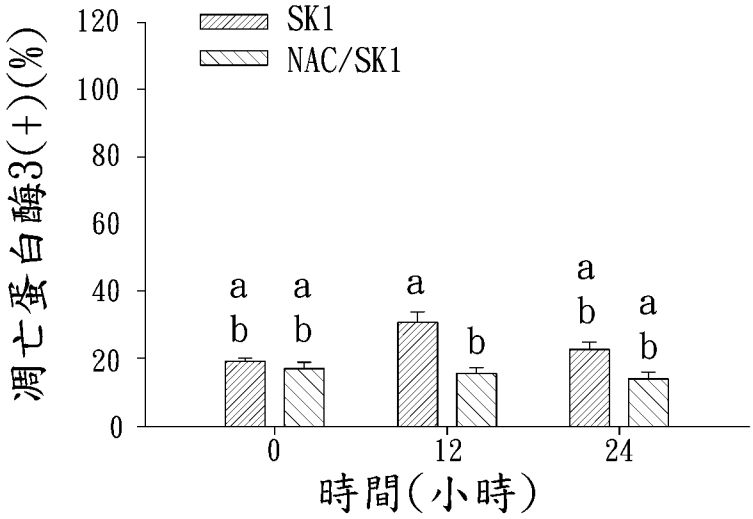
【第 29 圖】



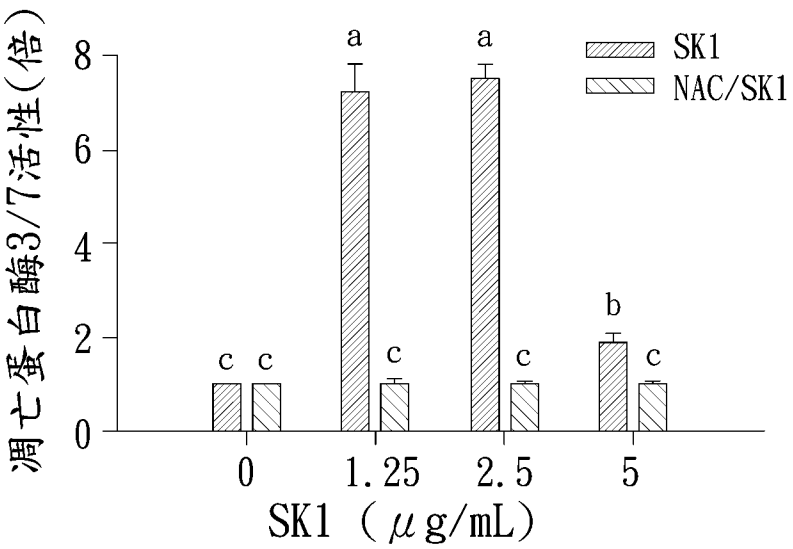
【第 30 圖】



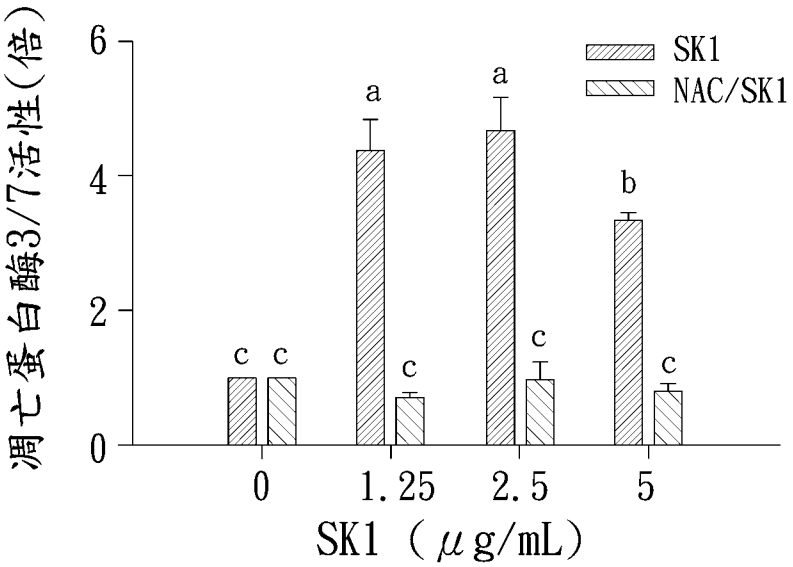
【第 31 圖】



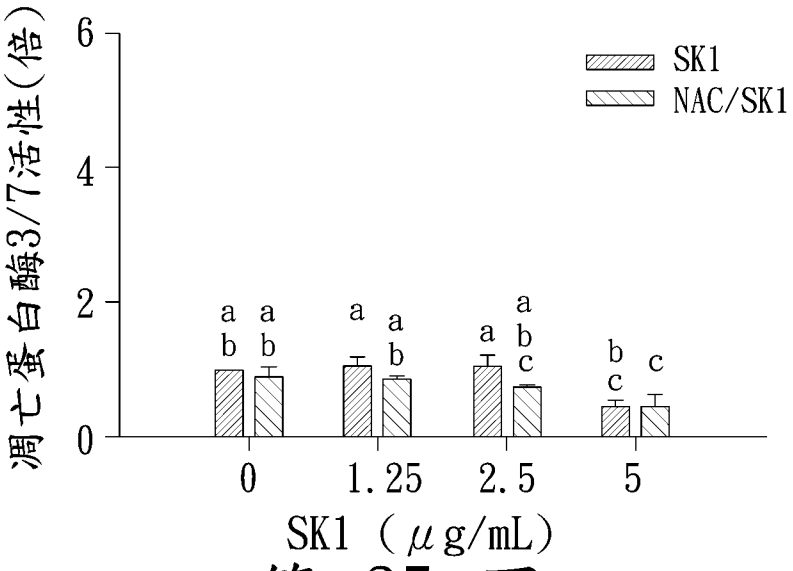
【第 32 圖】



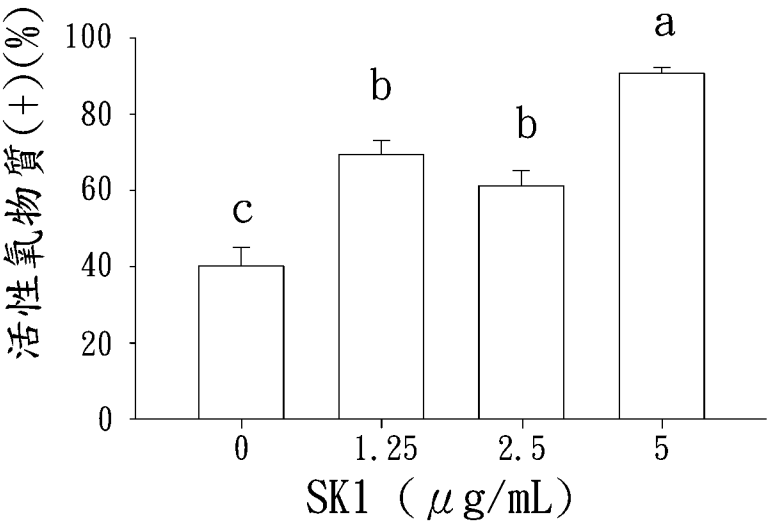
【第 33 圖】



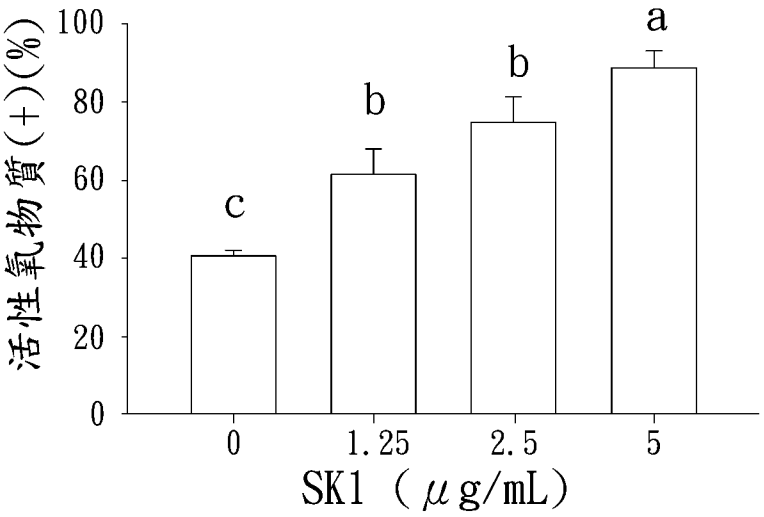
【第 34 圖】



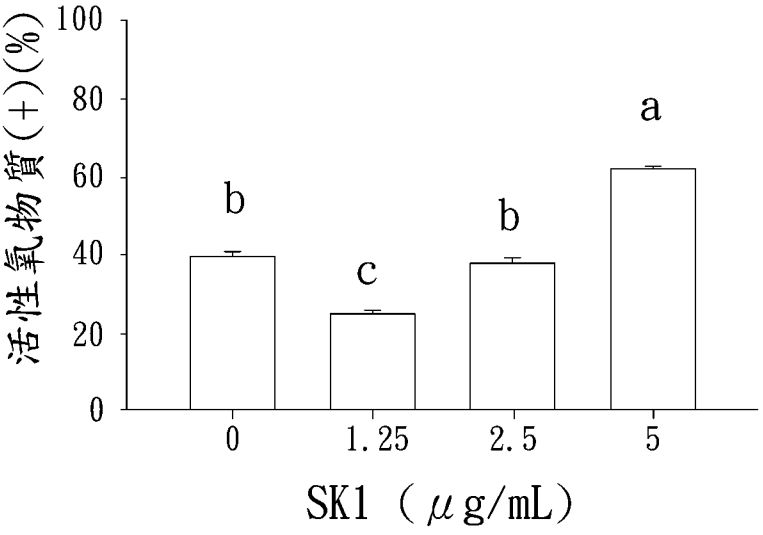
【第 35 圖】



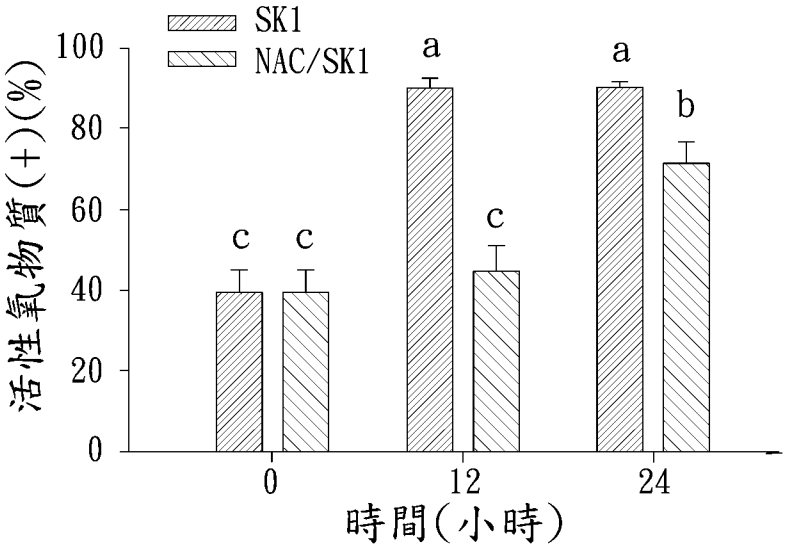
【第 36 圖】



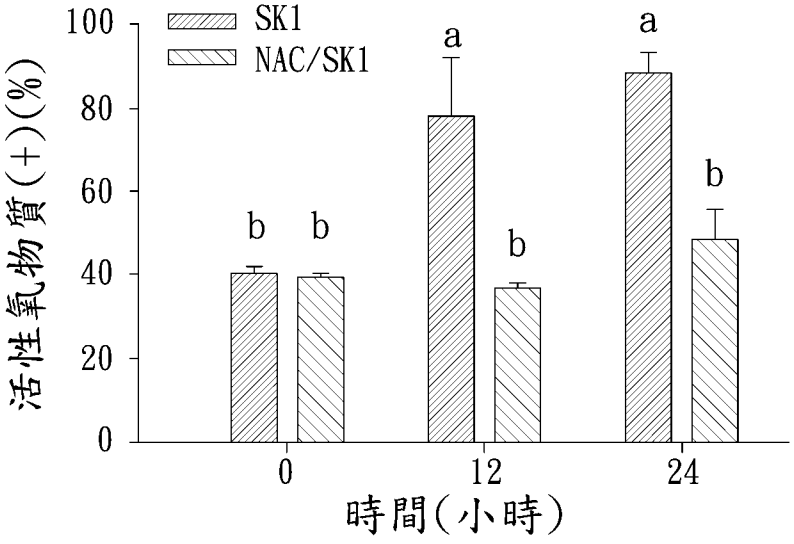
【第 37 圖】



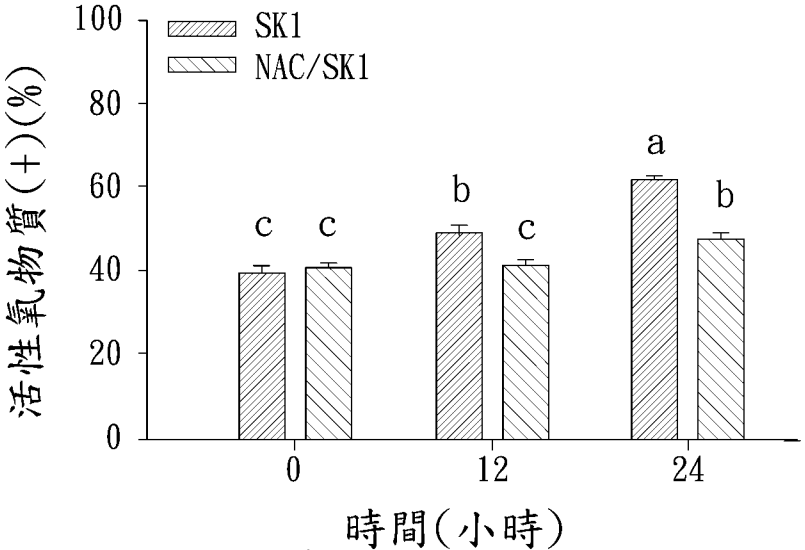
【第 38 圖】



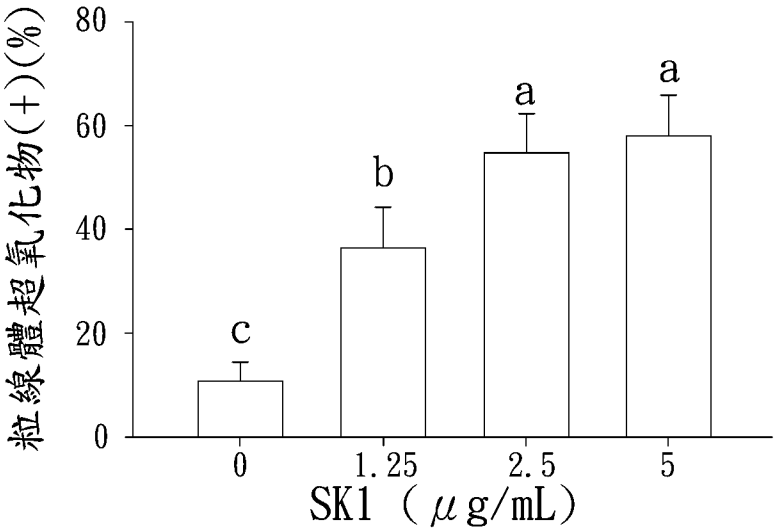
【第 39 圖】



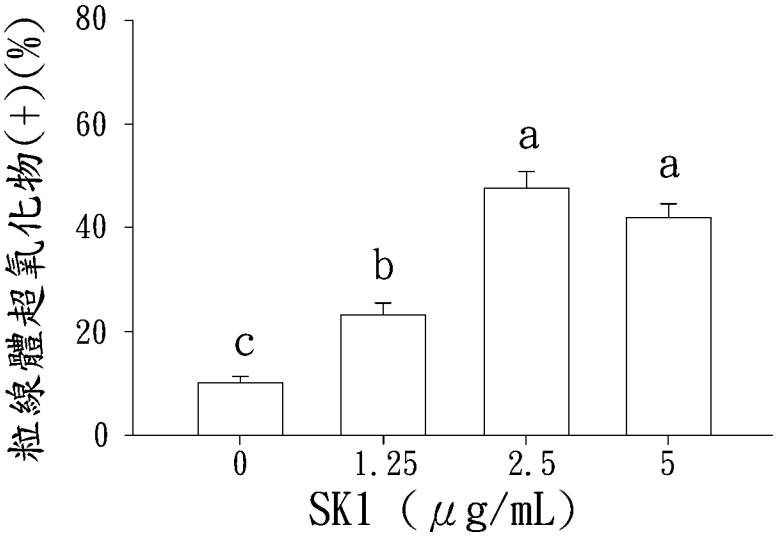
【第 40 圖】



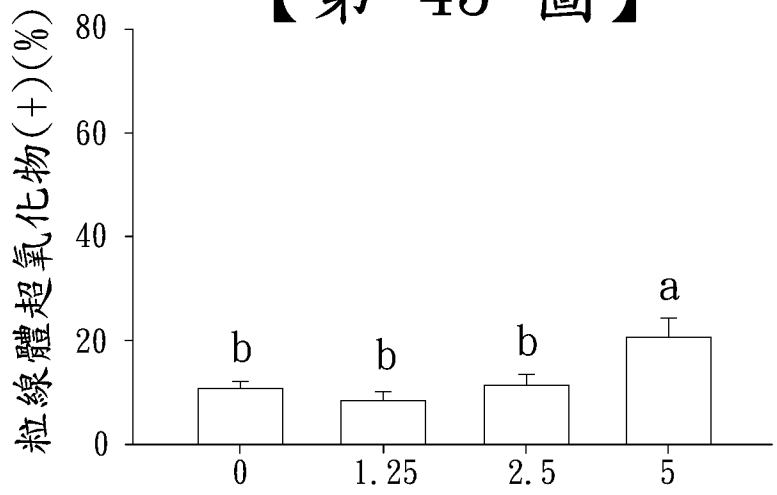
【第 41 圖】



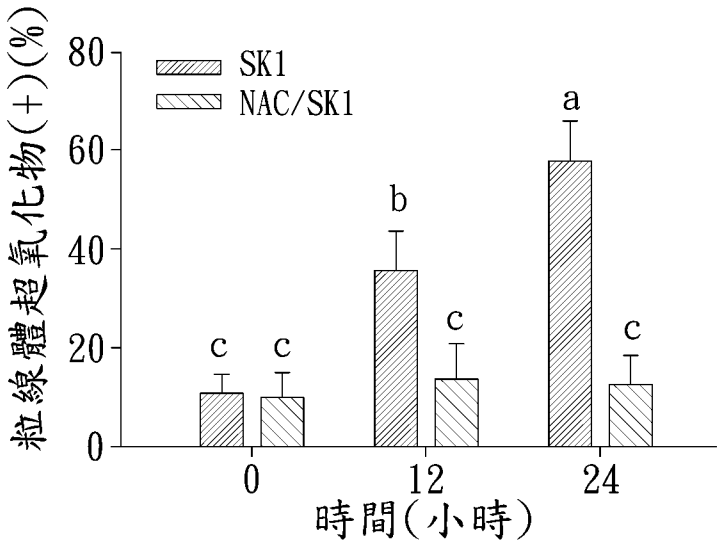
【第 42 圖】



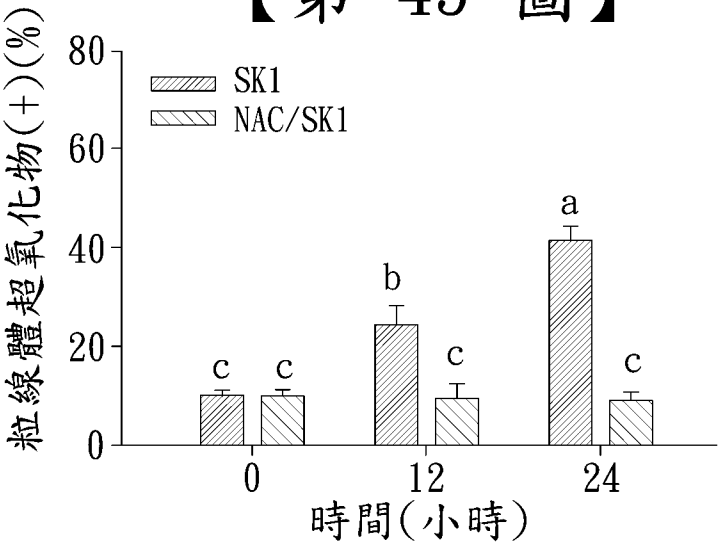
【第 43 圖】



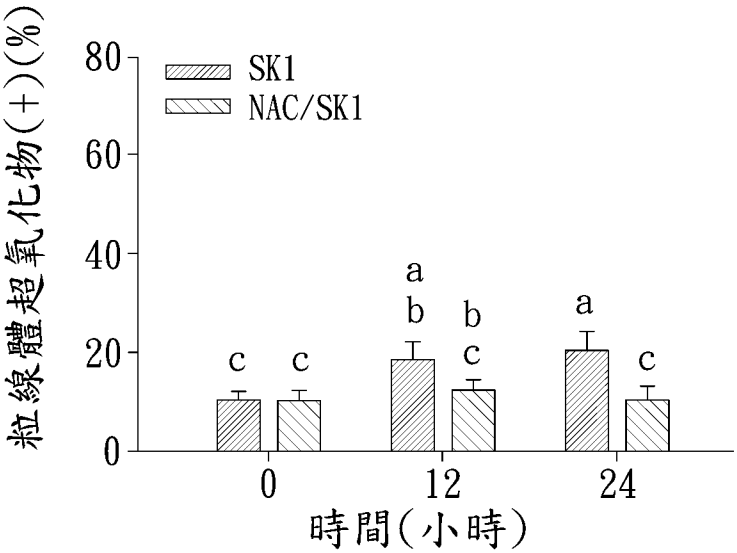
【第 44 圖】



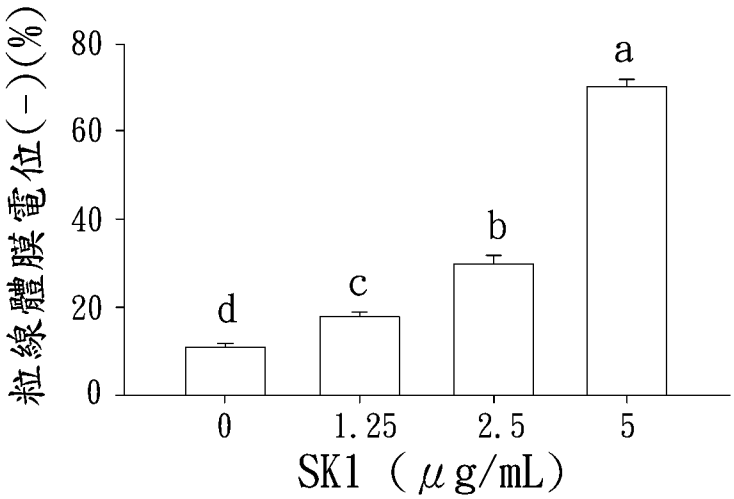
【第 45 圖】



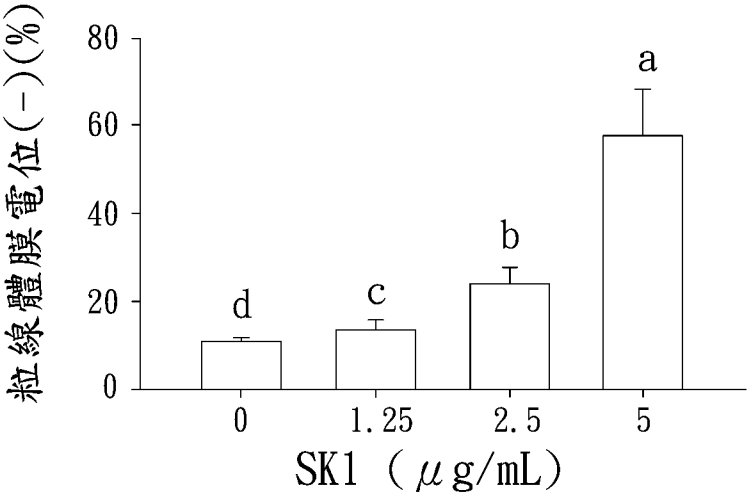
【第 46 圖】



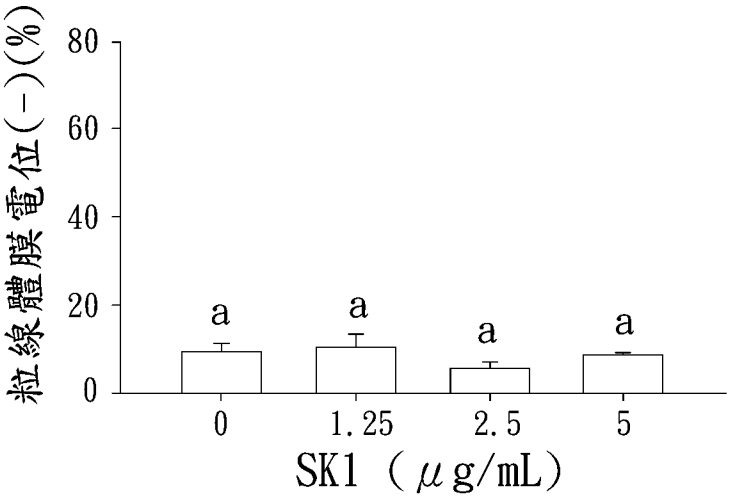
【第 47 圖】



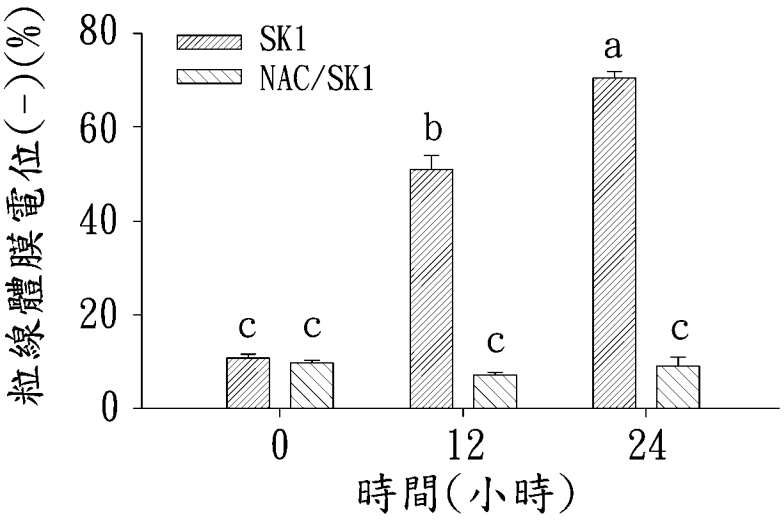
【第 48 圖】



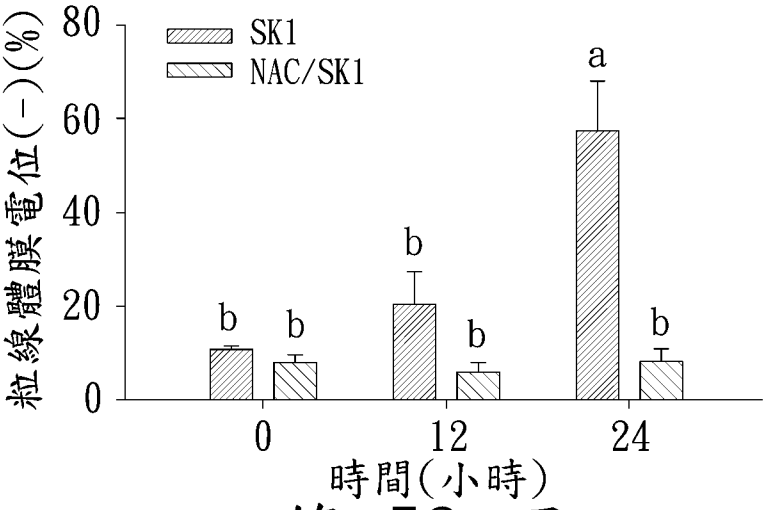
【第 49 圖】



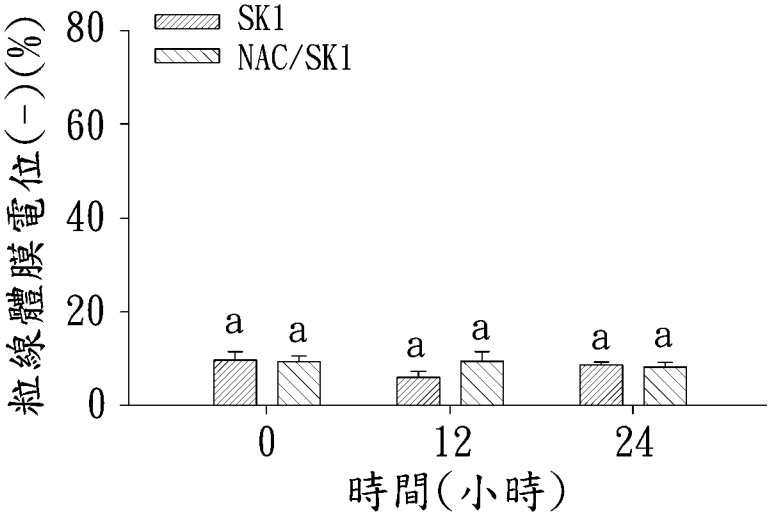
【第 50 圖】



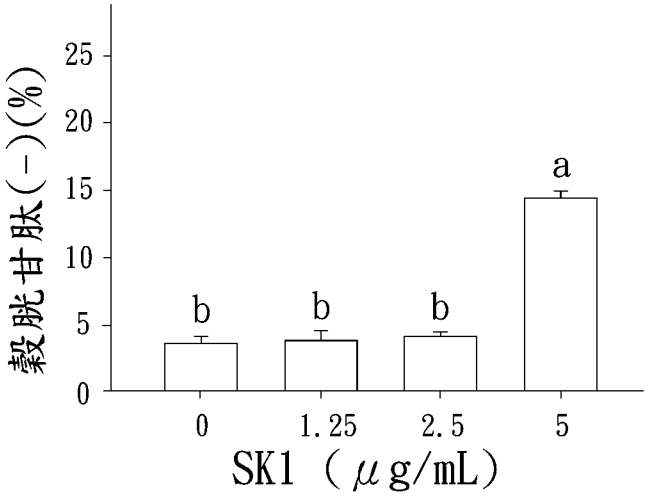
【第 51 圖】



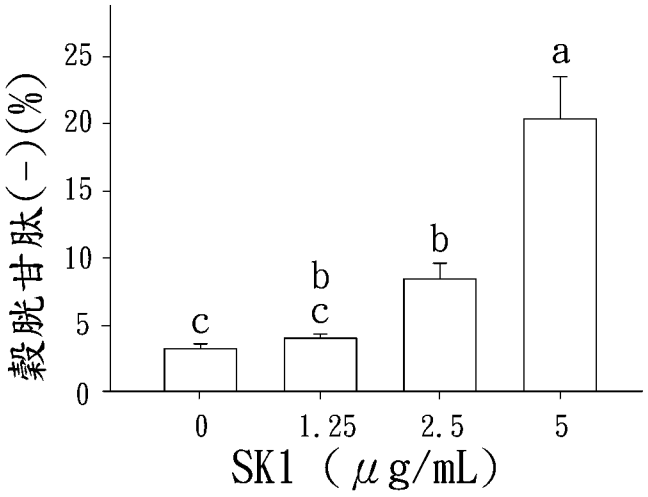
【第 52 圖】



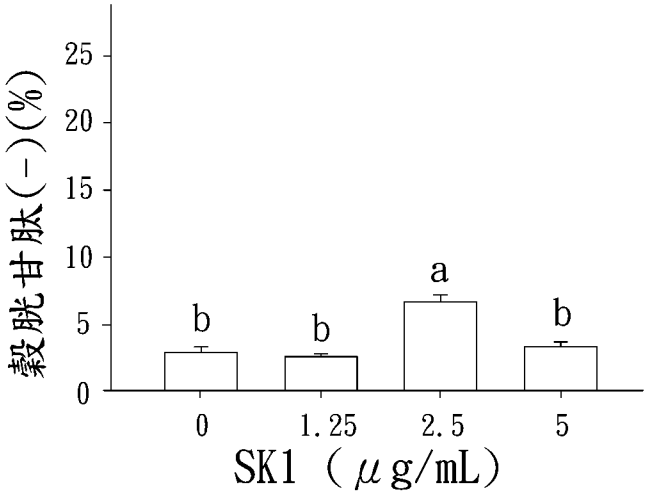
【第 53 圖】



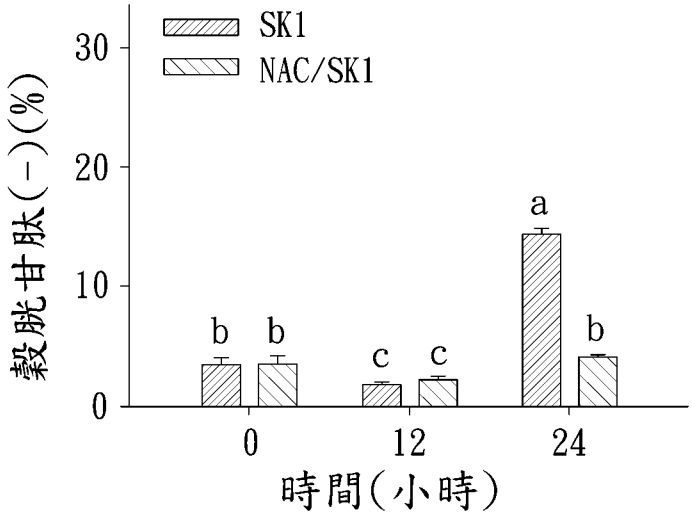
【第 54 圖】



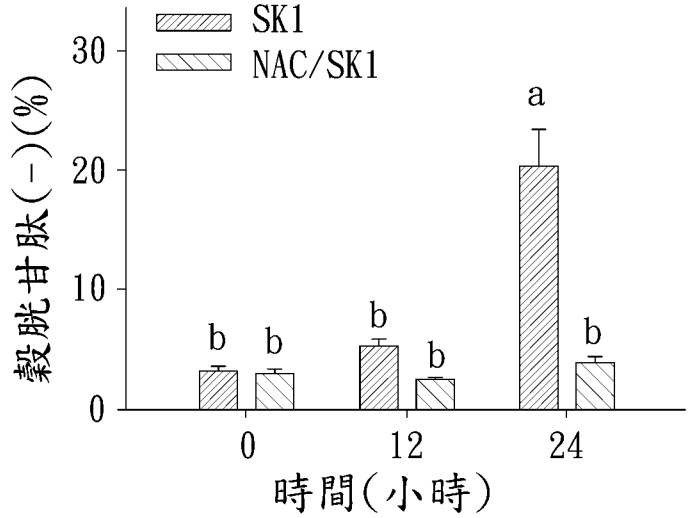
【第 55 圖】



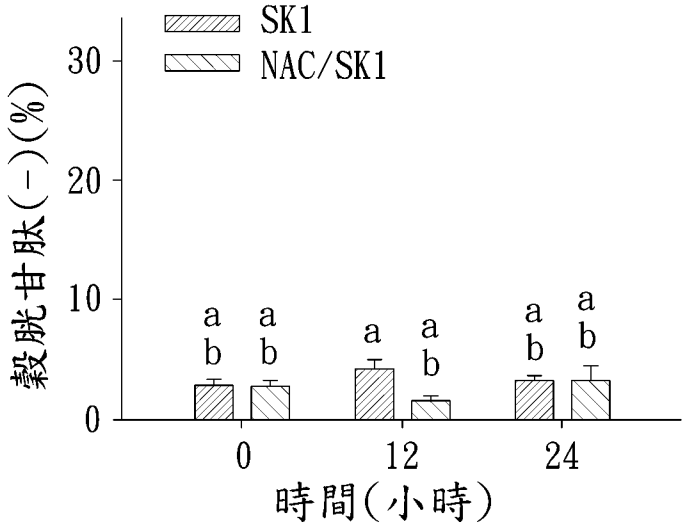
【第 56 圖】



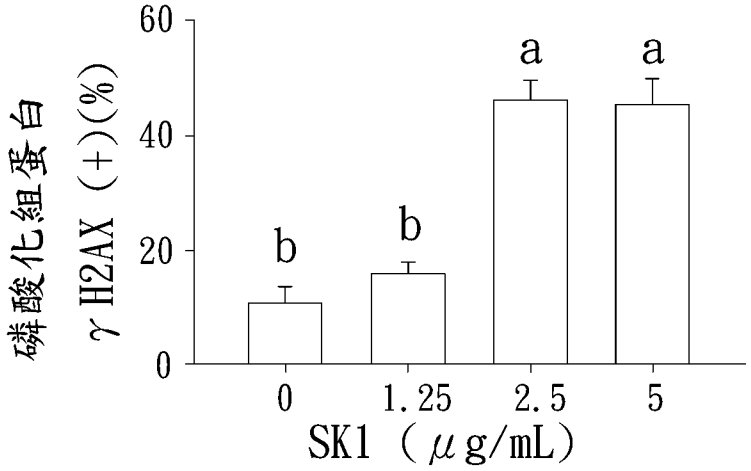
【第 57 圖】



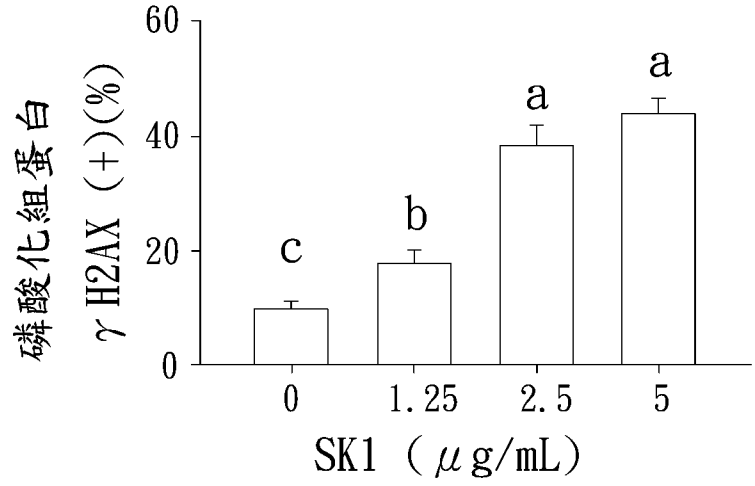
【第 58 圖】



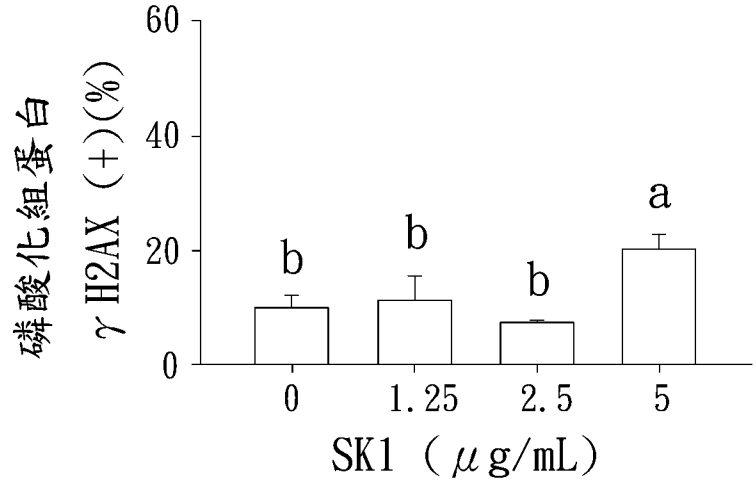
【第 59 圖】



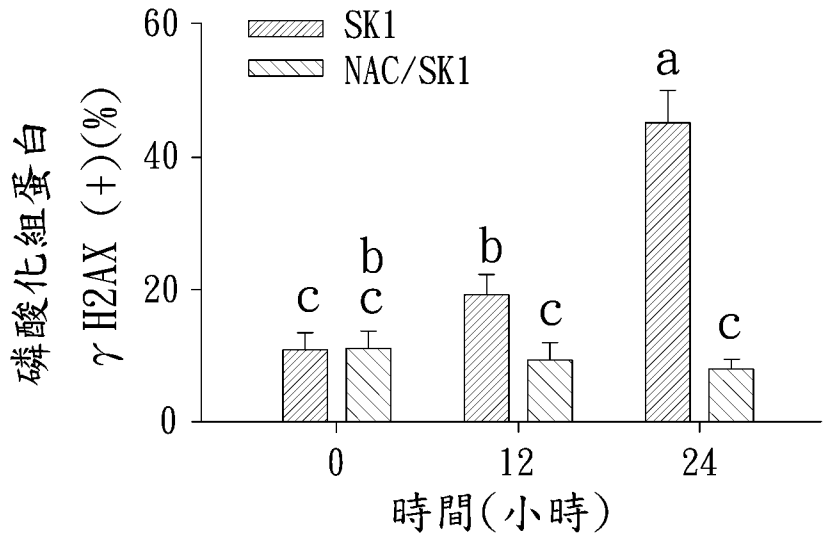
【第 60 圖】



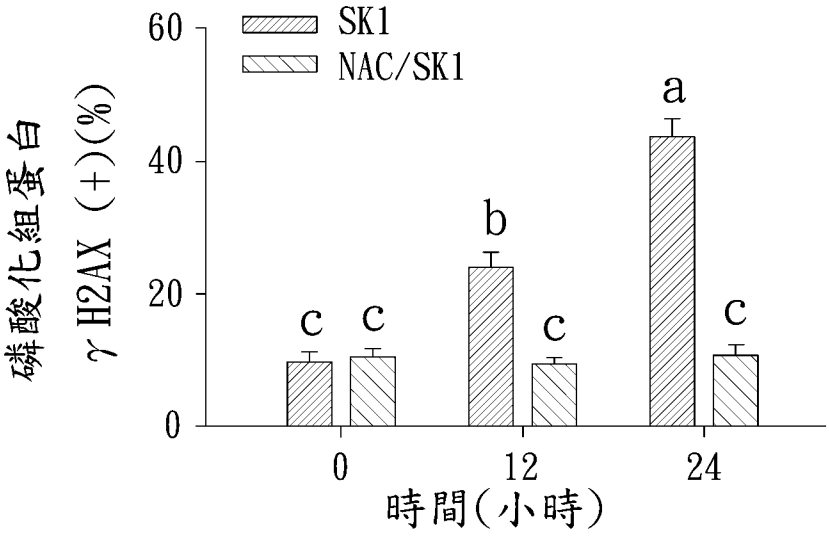
【第 61 圖】



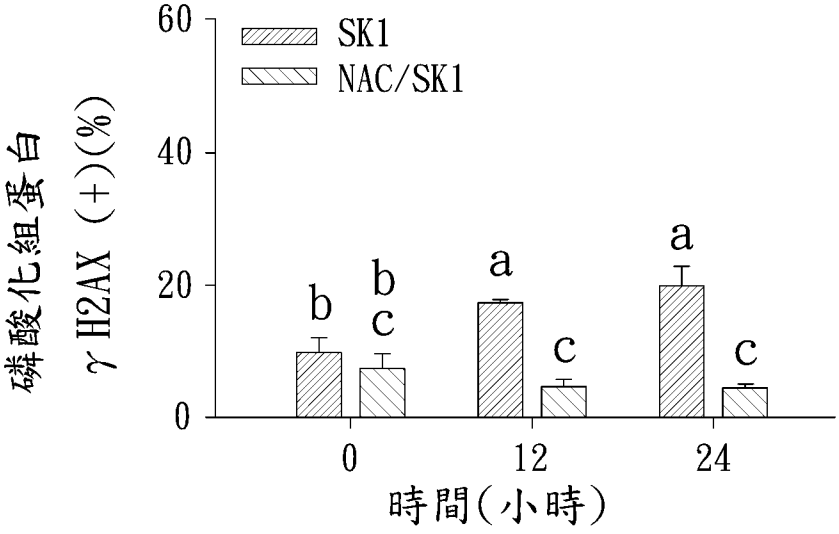
【第 62 圖】



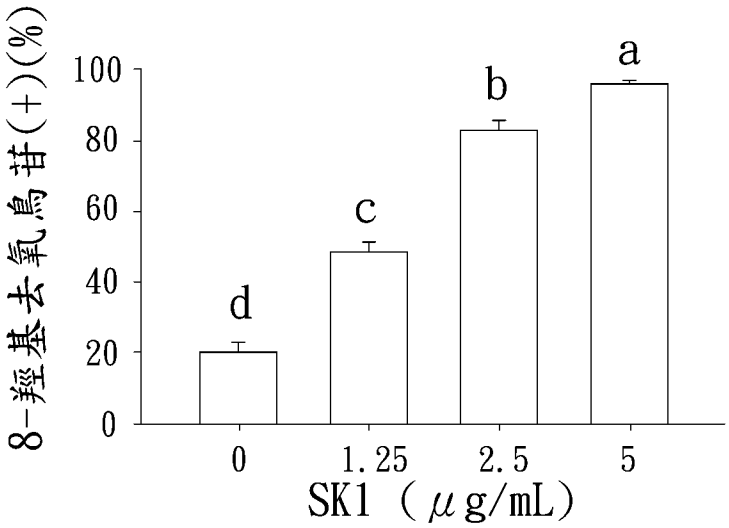
【第 63 圖】



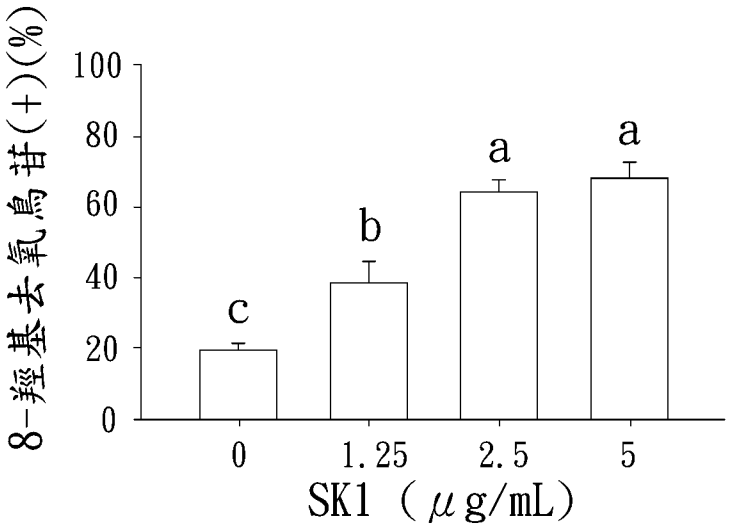
【第 64 圖】



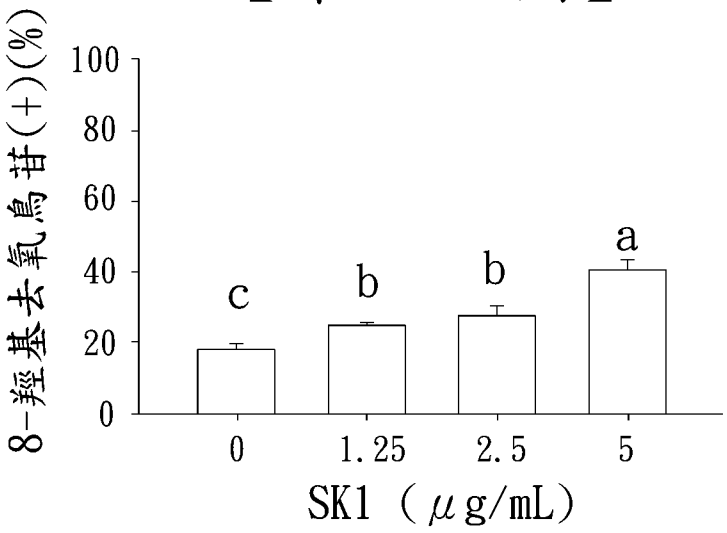
【第 65 圖】



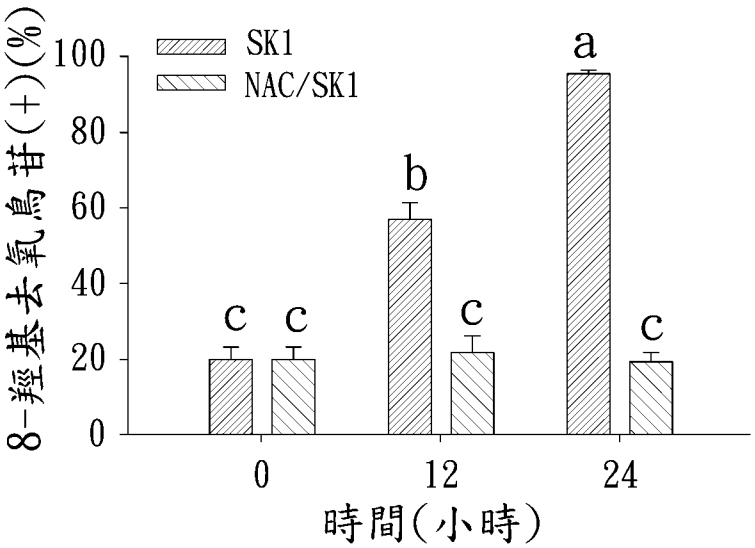
【第 66 圖】



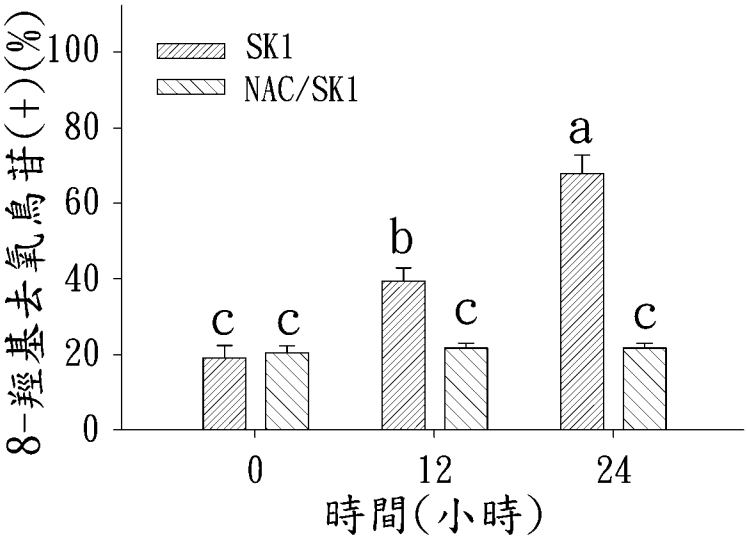
【第 67 圖】



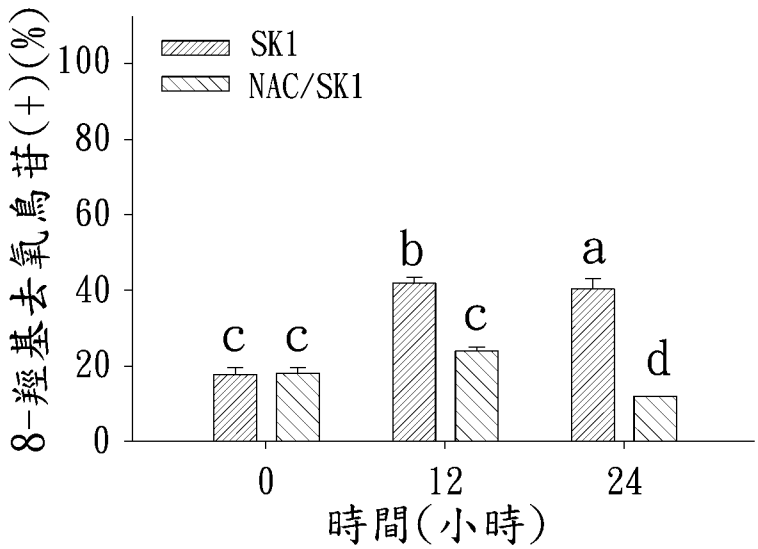
【第 68 圖】



【第 69 圖】



【第 70 圖】



【第 71 圖】