

嘉南藥理大學 103 年度教師專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN10302

總計畫計畫名稱：Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成、生物活性評估與化粧品開發

子計畫二計畫名稱：Benzodiazepinedione 及其衍生物之生物活性評估

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：汪文忠

計畫主持人：

子計畫主持人：劉坤湘

中華民國 104 年 03 月 05 日

研究計畫內容

(一) 摘要

真菌二次代謝物之於人類有相當大的利用價值，例如抗生素、降膽固醇藥物等。屬於子囊菌門的麴菌屬 (*Aspergillus*) 由於二次代謝物的種類繁多且含量高，在生技工業上的應用非常廣泛；其中的土麴黴 (*Aspergillus terreus*) 以及與其親緣關係接近的費式麴菌 (*Neosartorya fischeri*) 被發現主要二次代謝產物之一為 acetylazonalenin，其生合成推測由 *anaAT-anaPS-anaPT* 基因叢集所產生的基因產物所調控，中間產物之一的 benzodiazepinedione，為已知之多種藥物化學結構主要骨架。此整合計畫由子計畫一為可穩定獲得 benzodiazepinedione 不受真菌生長環境歧異所導致的二次代謝物獲得不易，以有機合成方式合成 benzodiazepinedione 及其衍生物。本子計畫為整合型計畫中之第二項子計畫，為研究所得之化合物是否具有生物活性，將進行細胞存活率測試、自由基清除能力試驗、HIV-1 反轉錄酶抑制能力測定、DNA 拓樸異構酶 II 抑制能力測定。另為求擴展真菌二次代謝物的應用空間，子計畫三進行與化粧品功能相關的基質金屬蛋白酶活性抑制試驗、玻尿酸酶活性抑制試驗、膠原蛋白活性測試。本整合型計畫希望藉由：(1) 有機合成真菌二次代謝物之 benzodiazepinedione 及其衍生物；(2) 評估 benzodiazepinedione 及其衍生物之生物活性；(3) benzodiazepinedione 及其衍生物之化粧品開發；未來除了將 benzodiazepinedione 做為 acetylazonalenin 生合成的前驅物外，不同胺基酸或胜肽之 benzodiazepinedione 衍生物，也預期將可表現生物活性潛能，有進一步學術研究與產品開發的價值。

(二) 實驗架構

1. Benzodiazepinedione 及其衍生物之使用

Benzodiazepinedione 及其衍生物之合成由子計畫一執行之，共提供化合物代號 HB020、HB026、HB079、HB086、HB091 進行本子計畫之實驗。

2. 實驗步驟—反轉錄酶抑制能力測定

反轉錄酶活性抑制分析利用 Roche Diagnostics 公司 (Germany) 生產之反轉錄酶活性測定實驗套組進行實驗，實驗目的為偵測本研究計畫中合成之化合物是否具有抑制反轉錄酶的能力而可治療由 RNA 病毒感染所引起之病症。取 4 ng 反轉錄酶 (於 20 μ l 的 lysis buffer 中) 置入微量離心管，再加入 20 μ l 各種不同濃度的 benzodiazepinedione 及其衍生物，並加入 20 μ l 的 polyA_xoligo(dT)₁₅ 於 37°C 反應 1 小時，接著將樣品吸取至 MP module 中，覆蓋鋁箔紙後於 37°C 反應 1 小時。之後將液體吸乾，加入 250 μ l 的 washing buffer 潤洗 30 秒，小心抽乾，重複此步驟 5 次，加入 200 μ l

的 anti-DIG-POD working solution (200 mU/ μ l)，覆蓋鋁箔紙後於 37°C 反應 1 小時，將液體小心抽乾，加入 250 μ l 的 washing buffer 潤洗 30 秒，小心抽乾，重複此步驟 5 次，最後加入 200 μ l 的 ABTS (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) substrate solution，以 250 rpm 震盪至綠色出現，再以 ELISA 偵測 OD₄₀₅。

(三) 實驗結果與討論

HB020、HB026、HB079、HB086、HB091 以 0.0625 mM、0.125 mM 及 0.25 mM 三種濃度進行反轉錄酶活性抑制的試驗 (n = 3)，結果如下表。

表一、0.0625 mM 化合物對於反轉錄酶活性抑制率量化表 (反應時間 5 分鐘)。

反應時間	5 min
化合物濃度	0.0625 mM
化合物代號	抑制率 (%)
control	0.00 \pm 0.00
HB020	59.57 \pm 13.20
HB026	83.28 \pm 1.30
HB079	52.85 \pm 10.90
HB086	68.22 \pm 6.90
HB091	65.01 \pm 2.00

表二、0.125 mM 化合物對於反轉錄酶活性抑制率量化表 (反應時間 5 分鐘)。

反應時間	5 min
化合物濃度	0.125 mM
化合物代號	抑制率 (%)
control	0.00 \pm 0.00
HB020	30.26 \pm 13.50
HB026	39.14 \pm 22.00
HB079	72.65 \pm 2.50
HB086	85.97 \pm 0.70
HB091	79.74 \pm 1.70



表三、0.25 mM化合物對於反轉錄酶活性抑制率量化表 (反應時間5分鐘)。

反應時間	5 min
化合物濃度	0.25 mM
化合物代號	抑制率 (%)
control	0.00 ± 0.00
HB020	70.91 ± 10.00
HB026	85.62 ± 5.30
HB079	87.36 ± 1.90
HB086	89.03 ± 0.50
HB091	85.52 ± 1.30

化合物會隨著反應時間增加，對反轉錄酶活性抑制率降低(於本報告中只以反應5分鐘為例)，推測反轉錄酶抑制活性效果不夠持久，往後若要開發為疾病治療之輔助藥劑，可能必須藉由調整劑量或劑型，延長藥物有效成分活性的時間。HB020及HB026在0.0625 mM時高於0.125 mM的抑制率，顯示HB020及HB026沒有dose-dependent的趨勢。其餘化合物大致上具有dose-dependent的現象，因此若要開發為疾病治療之輔助藥劑，這兩種化合物與濃度並無直接的關係，必須再做更進一步的測試與研究。所有化合物0.25 mM的濃度反應5分鐘，對反轉錄酶抑制率皆為70%以上，未來可針對此類化合物進行更多活性及細胞毒性的分析，並進一步評估其應用價值。

(四) 結論

由實驗結果得知，此類化合物在特定反應條件下，具有抑制反轉錄酶活性的功能，對於開發為RNA 病毒感染所造成之疾病治療的輔助藥劑，增加對於真菌二次代謝物的應用範圍與經濟價值皆具助益。

