

第一章 前言

近年來，世界各國罹患癌症之人數及死亡率不斷激增^{1, 2}。自 1982 年起，癌症已成為國內十大死因排名的第一位，每年罹患癌症人數已突破三萬人，可說是國人健康的最大威脅。對女性而言，乳癌是全世界女性最常見的癌病，根據世界衛生組織的統計報告全球一年約有 50 萬人死於乳癌。而台灣地區根據行政院衛生署的統計，乳癌的發生率與死亡率逐年增加。行政衛生署 95 年國人前十大主要癌症死因分別為：肺癌、肝癌、結腸直腸癌、女性乳癌、胃癌、口腔癌、攝護腺癌、子宮頸癌、食道癌、胰臟癌，可見乳癌對女性生命造成極大的威脅。

臨床上，乳癌治療仍以手術治療為主，放射治療、化學治療及荷爾蒙治療為輔，大約 80% 手術後再接受放射線治療，71% 手術後另接受化學治療。目前臨床最常使用的化學藥物有：Methotrexate、5-Fluorouracil、Adriamycin、Tamorifen 等。這些藥物通常會數種混合使用，經由周邊靜脈注射，利用血液循環而運送至全身各部位，以殺死手術無法切除及放射線治療無法觸及的癌細胞，但是亦會對正常細胞造成傷害而產生噁心、嘔吐、食慾不振、口腔潰爛、嚴重腹瀉、落髮及貧血等副作用。除此之外，西元 1997 年有學者發現，原本用來治療乳癌藥 Tamoxifen 可能導致子宮頸癌³，所以積極開發副作用小或天然的抗癌成分便成為重要的研究方向。

胜肽藥物為小分子藥物中最具開發潛力的新穎藥物⁴。胜肽藥物潛力在於胜肽為身體內最自然的傳輸與代謝機制，並能打破生物屏障(the biobarrier)，使其順利穿透腸胃道的細胞膜或血腦障壁(Blood-Brain Barrier, BBB)，進入血液循環，發揮治病的功效。

本實驗室目前著重於小分子胜肽藥物為積極開發的目標。以設計、合成胜肽類緣物抑制癌細胞的增生或轉移。細胞內 Ras 蛋白質訊息傳遞路徑之致病機轉(oncogenic Ras signal transduction pathway)中，細胞內蛋白質分子機制之異常，皆與癌症的致病原因有關，故本論文的研究目的為設計一系列 Ras 訊息傳導途徑中

的脂肪酸轉移酶(farneslytransferase, FPTase)抑制物，探討這一系列胜肽類抑制劑的結構活性關係，並期望從這一系列胜肽抑制物中篩選出具有較佳的親和力之先導藥物 (lead compounds)。

第二章 文獻探討與動機

第一節 Ras 蛋白的生物特性

1-1 訊息傳遞 (signal transduction)

訊息傳遞在生物體的各项生理作用中扮演著相當重要的角色，細胞內幾乎所有的生理功能得以正常運作，皆是因為細胞內外的調控訊號可藉著不同的訊息傳遞路徑來傳達到各個目標分子，進而協調、控制各個分子的活性與運作。因此，細胞內訊息傳遞機制的異常會引起細胞的不正常反應，若情況嚴重常會導致細胞死亡或是細胞不正常的增生(癌病變)。例如：Ras蛋白—ras基因的產物，是細胞內常見的第二訊息傳遞者(secondary messenger)，在生長因子(growth factor)、細胞素(cytokines)的訊息傳遞路徑中扮演重要的角色。因此，ras基因上的突變常是導致細胞癌病變的主要成因之一。許多研究報導指出，蛋白質Grb2、Shc、Src的SH2區塊與癌症形成有關，其參與致癌蛋白質Ras之活化反應^{5, 6}，且在訊息傳遞途徑中扮演非常重要的角色。

1-2 Ras蛋白的訊息傳遞

細胞表面的受器會將訊息傳給Ras蛋白，例如：EGFRs⁷，然而當GDP磷酸化為GTP時，且Ras蛋白必需鍵結在細胞膜上才會被活化⁸，而prenylation這個動作是Ras蛋白活化的第一個步驟也是最重要的一個步驟。

研究報告指出Ras蛋白位於細胞膜、內質網以及高基氏體上，當遇到緊急的刺激時會被活化而以不同的路徑刺激下游的反應，像是Ras蛋白被活化時與Raf-1一起到細胞膜上，而後將MEK1/2磷酸化使之活化，活化的MAP Kinase會移至細胞核而使為數眾多的目標基因轉錄使細胞增生⁹見圖2-1。MEK的活化可以不需經由Raf-1蛋白的活化，它也可以經由c-Jun這個轉錄因數來活化¹⁰。Ras蛋白亦可活化Rho或PI3K路徑，Rho這個家族的蛋白質與細胞粘附及肌動蛋白骨架有關¹¹，而PI3K則是與細胞凋亡與存活相關^{12, 13}。

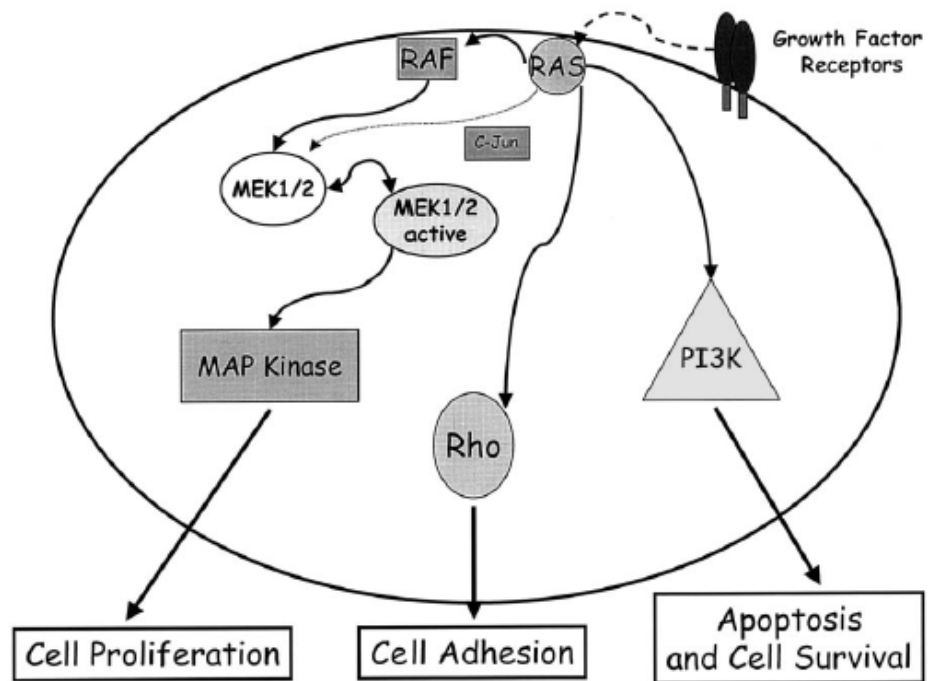


圖2-1 Ras活化MAP kinase、Rho、PI3K、MEK以及MAPK kinase的路徑¹²

1-3 Ras蛋白在癌症中扮演的角色

人類有三種Ras蛋白質，分別是H-、K-和N-Ras三種，分子量為21 KD¹³，而K-Ras又可以C端不同分為K-Ras4A和K-Ras4B兩種。有研究指出H-和K-ras的基因會促使動物產生腫瘤^{14、15}。後來發現有些普遍發生腫瘤的致癌基因是K-Ras同族的基因突變¹⁶。H-Ras蛋白比起其他Ras蛋白多了一個cysteine，且在181和184這兩個位置的胺基酸皆為cysteine，而K-Ras4A和N-Ras則只有一個cysteine分別位於180和181位置上，且K-Ras4B在166-184的位置中則沒有cysteine，但是在這個區域他有較多的lysine，也因為使得K-Ras4B與其他Ras蛋白質比起來較為特殊(圖2-2)。

Ras基因的突變大多是點突變，大部分是位於密碼子12、13、59和61的位置上，由ras的突變所引起的癌症占了30%，其中胰臟癌占了90%，而大腸直腸癌占了50%¹⁷⁻¹⁹，ras基因的突變在癌症上發生的機率是根據癌症的類型，像是乳癌、卵巢癌和胃癌的發生率就很低，尤其是乳癌，其ras基因的突變低於了2%²⁰，然

而上游生長因子的活化使得Ras這條路徑不斷的被活化，故Ras路徑的訊息傳遞異常對於乳癌的成因是很的常見的²⁰，研究顯示脂肪酸轉移酶抑制劑對於MCF-7這株乳癌細胞之增生具有不錯的抑制效果²¹，因此Ras路徑的活化與其突變的機率並無呈現相關性，故脂肪酸轉移酶抑制劑對於一些與Ras沒有突變的腫瘤也可能有抑制的功效。

```

H-ras      166H K L R K L N P P D E S G P G C M S C K C V L S 189
K-ras4A   166Y R L K K I S K E E K T P G C V K I K K C I I M 189
K-ras4B   166H K E K M S K D G K K K K K S K T K C V I M 188
N-ras     166Y R M K K L N S S D D G T Q G C M G L P C V V M 189

```

圖2-2 Ras蛋白的胺基酸序列²²

1-4 Ras蛋白的轉譯後修飾

Ras蛋白需要鍵結到細胞膜上才會被活化，這已由免疫螢光抗體法和免疫電子顯微鏡法分析後證明Ras蛋白是位於細胞膜的內側²³，和其他典型的鍵結在細胞膜上蛋白質不同的是，Ras蛋白先被合成為細胞質小體，而後快速的移動至膜上成熟²⁴，此動作是由Ras蛋白最後四個胺基酸CAAX (C代表cystein，A代表脂肪族的胺基酸，而X代表任何胺基酸)來完成的，其中Ras蛋白活化第一步並且是最重要的步驟稱為prenylation，是指將prenyl group轉至蛋白質上的這個動作，舉例來說：prenyl groups可為15個碳組成的farnesyl group或20個碳的geranylgeranyl group所組成，分別由不同的酵素催化，其中脂肪酸轉移酶(farnesyltransferase)將15個碳的脂肪酸催化轉至Ras蛋白的CAAX上的cystein上，geranylgeranyl-transferase 則將geranylgeranyl group轉至Ras蛋白上，除此之外，當X為不同胺基酸時催化的酵素也不同，若為methionine或serine那麼則由farnesyl transferase針對H-Ras來進行催化的反應²⁵。而當X為Leu或者是Ile則由geranylgeranyl transferase來負責針對K-Ras蛋白及N-Ras蛋白催化的反應²⁶。而後當prenyl group接到CAAX

後，AAX會被切下，而C端上的farnesyl-cysteine的cysteine的羧端會被甲基轉移酶(methyltransferase)甲基化，在這個階段，Ras蛋白已經可以鍵結至膜上了(圖2-3與2-4)，而H-、N-及K-Ras4A蛋白在cysteine181/180及cysteine184位置上會被修飾形成棕櫚酸硫醚，使得Ras蛋白更能夠鍵結至膜上增加Ras的活性。

其實脂肪酸轉移酶並不需要整段的Ras蛋白來進行prenylation這個反應，而只需要包含CAAX這四個胺基酸所組成的胜肽，因其動力學參數和整段的Ras蛋白動力學參數差不多²⁷，這也指出脂肪酸轉移酶是辨認此序列。因為prenylation為活化Ras蛋白與下游訊息傳遞的最重要步驟，我們可設計一胜肽抑制劑來阻擋脂肪酸轉移酶進行prenylation期待能夠影響癌細胞的存活與增生。

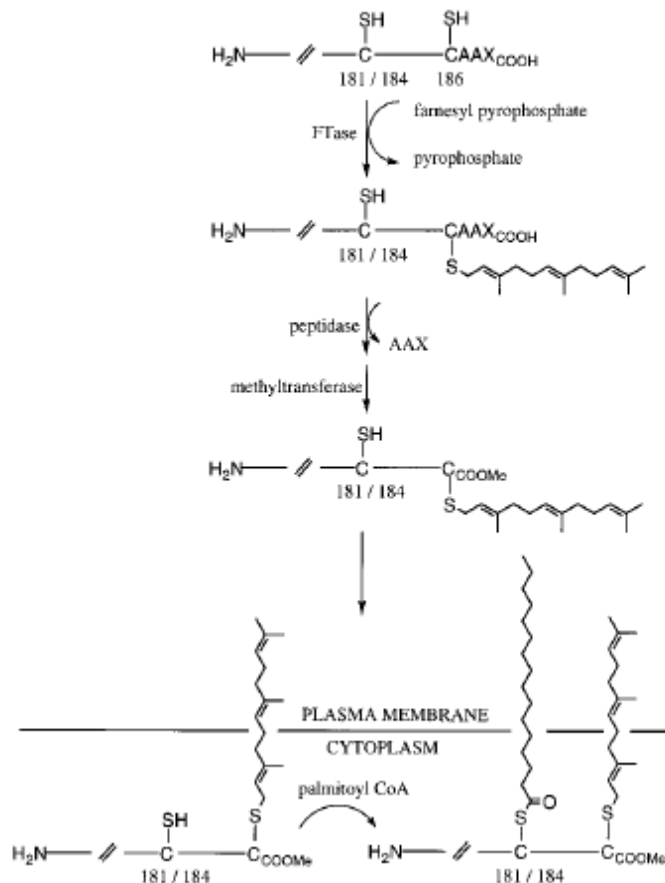


圖2-3 Ras蛋白活化之路徑。Ras蛋白的C端，prenylation與palmitoylation增加了Ras蛋白的疏水性，使之容易與膜鍵結²²

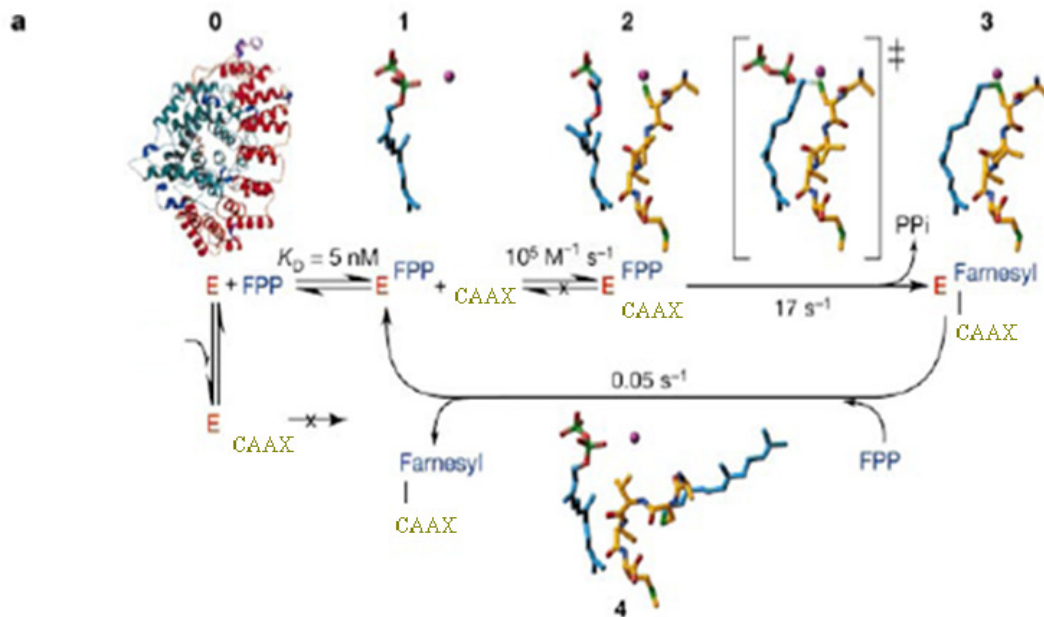


圖 2-4 脂肪酸轉移酶反應結構圖動力學圖解。1-4 觀察脂肪酸轉移酶晶體結構鍵結的構形。0 表示沒有任何鍵結的脂肪酸轉移酶 (PDB number 1FT1; 紅色是 α 次單位體, 藍色是 β 次單位體)。1、Farnesyl diphosphate substrate (FPP, 藍色) 與脂肪酸轉移酶鍵結。2、CAAX 胜肽(黃色)與 FPP 的類似物(藍色)形成一三元複合結構 (PDB number 1D8D)。3、產物(farnesyl-CAAX)。4、當新的 FPP 加入會與產物鍵結²⁸

第二節 脂肪酸轉移酶抑制劑

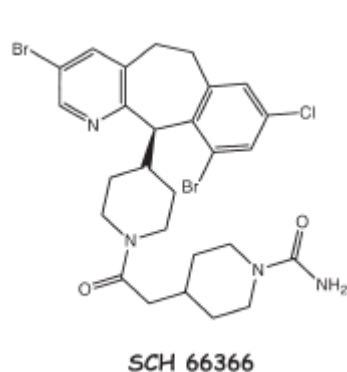
2-1 脂肪酸轉移酶抑制劑設計方向

根據報導脂肪酸轉移酶抑制劑的發展與設計主要有三種：第一種是依據脂肪酸轉移酶的受質之一的Ras蛋白質最後四個胺基酸序列CAAX，而第二種是依據亦是脂肪酸轉移酶的受質farnesyl pyrophosphate (FPP)為範本所設計，第三種是綜合CAAX和FPP兩種受質(bisubstrate)為範本來設計，亦有天然物亦可作為脂肪酸轉移酶抑制劑。

但是目前已進入臨床實驗的脂肪酸轉移酶抑制劑是由高速藥物篩選系統

(High Throughput Screening system)所篩選出來的，為SCH66336 (Lonafarnib)及 R115777 (Zarnestra, Tipifarnib)兩種，由於這兩種藥物在臨床第二期或第三期中的實驗結果並不理想，而合併其他化療的合併療法目前尚在臨床試驗階段，雖然此類藥品目前尚未通過美國FDA核准使用於治療癌症，但更多大型第三期臨床試驗的研究結果，值得期待。

(a)



(b)

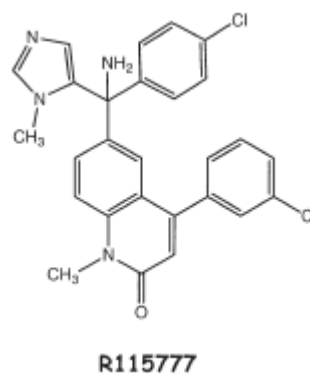
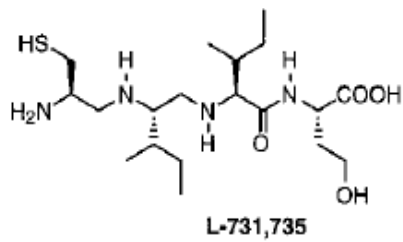


圖2-5 已進入臨床實驗的FTIs (a) SCH66366；(b) R115777¹²

2-2 以 CAAX 為範本的類胜肽抑制劑

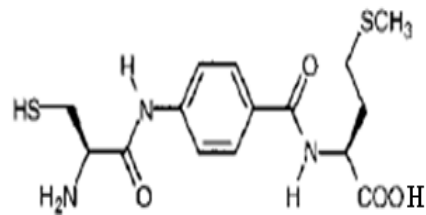
由於 CA₁A₂X 和整段的 Ras 蛋白與 FPTase 作用的親和力相近，故 CA₁A₂X 這個序列可被拿來設計成為脂肪酸轉移酶類胜肽抑制劑，研究指出 A₁ 若為帶電荷的胺基酸則會輕微的降低對脂肪酸轉移酶抑制劑的親和力，而 A₂ 若為帶電荷的胺基酸則會嚴重的降低對脂肪酸轉移酶抑制劑的親和力，故當 A₁ 與 A₂ 為脂肪性胺基酸會有較好的抑制效果，特別是 A₂²⁹，但類胜肽抑制劑所需克服的缺點為不易穿透細胞膜，且容易被胜肽水解酵素所分解，故大部份的類胜肽抑制劑都會做些修飾，像是以亞甲基(methylene)的基形式減少胜肽鍵數³⁰⁻³⁴，或者是仿羧基帶負電的結構³⁵⁻³⁷，又或者是以剛性的胺基苯酸(aminobenzoic acid)結構取代³⁸⁻⁴¹，另外也有以芳香環空間(aromatic spacer)為取代³⁸，亦或是將半胱胺酸(Cys)殘基取代掉，使得抑制劑沒有硫醇(thiol)這個結構⁴²⁻⁴⁴，也有科學家設計一系列巴比妥(benzodiazepine)類的類胜肽抑制劑⁴⁵。

(a)



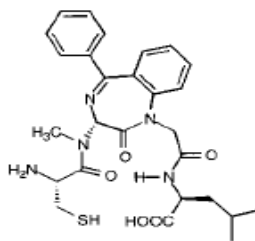
Ki=20 nM

(b)



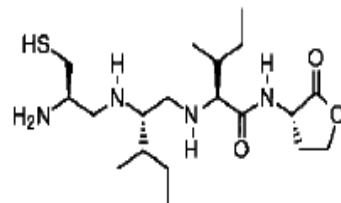
IC₅₀=150 nM

(c)



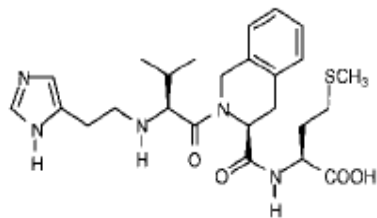
IC₅₀=1.3 nM

(d)



IC₅₀=100 M

(e)



IC₅₀=0.79 nM

圖 2-6 以 CAAX 為模板設計之脂肪酸轉移酶抑制劑 (a)以胺基亞甲基修飾³⁰ (b)以胺基苯酸修飾³⁷ (c)以巴比妥修飾⁴⁴ (d)以仿羧基負電結構修飾³² (e)將 Cys 的硫基取代掉⁴¹

2-3 以 Farnesyl pyrophosphate 為範本的抑制劑

以 Farnesyl pyrophosphate (FPP)為範本所設計的抑制劑有潛在的不利條件，因為人體中不只有脂肪酸轉移酶會利用 FPP 進行反應，像是皮膚會利用 FPP

合成角鯊烯(Squalene)，而且 FPP 還是膽固醇合成的重要中間產物，因 FPP 可能會引發其他的反應，故若以 FPP 為範本的抑制劑其專一性可能不好。

以 FPP 為範本的设计中有將焦磷酸根的氧以羰基取代，或者是以氫氧根取代磷酸根上的氧，使得磷酸根不易被水解^{46,47}，亦有以 β -carboxyphosphonic acid 以胜肽鍵與 15 個碳的脂肪酸鍵結仿焦磷酸根(pyrophosphate)的結構⁴⁸。

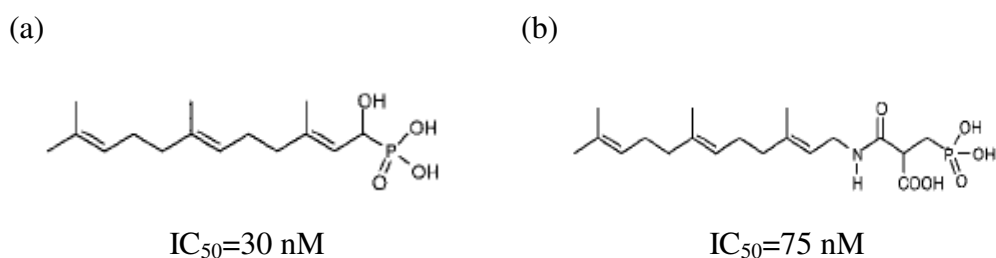
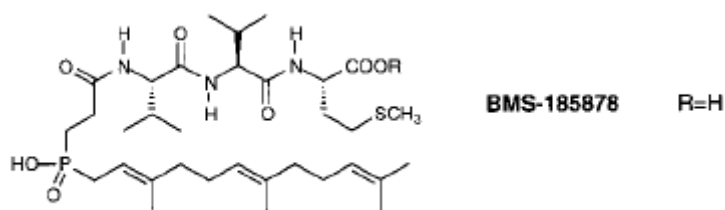


圖 2-7 以 FPP 為模板設計之脂肪酸轉移酶抑制劑 (a) 以氫氧根取代磷酸根上的氧⁴⁶ (b) 在 碳上以羧酸取代⁴⁸

2-4 綜合 CAAX 和 FPP 兩種受質的抑制劑

Bristol-Myers-Squibb 公司設計了同時仿 Ras 蛋白的結構與 15 個碳脂肪酸，它保留了 15 個碳脂肪酸親脂的特性使之易與酵素作用，且也保留了 AAX 這個蛋白質的辨認部位，它們以羧基或是磷酸根鍵結在一起⁴⁹，此種鍵結模式是仿硫醇在半胱氨酸上側鏈的形式。亦有以一立體中心將 AAX 與 15 個碳脂肪酸鍵結在一起⁴⁹，此抑制物 IC_{50} 為 6 nM。



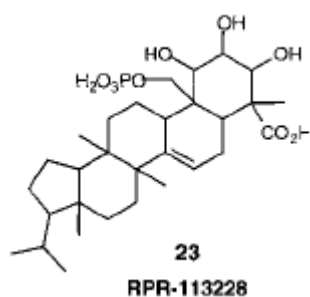
$IC_{50}=6 \text{ nM}$

圖 2-8 綜合 CAAX 與 FPP 兩種受質為模板的脂肪酸轉移酶抑制劑⁴⁹

2-5 存在於自然界的脂肪酸轉移酶抑制劑

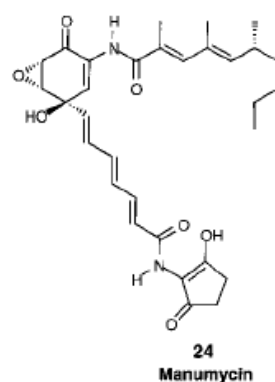
天然的脂肪酸轉移酶抑制劑經由化學方法所亂數篩選出來，它與一般化學合成出的抑制劑的結構大為不同，它並沒有 FPP 或者是 CAAX 的結構，而所進行的機轉又分為了好幾種，像是與 FPP 競爭^{47, 50, 51}($IC_{50} < 50$ nM)或是與 Ras 蛋白競爭，亦或是不與 FPP 或是 Ras 蛋白競爭⁵²($IC_{50} = 30$ nM)，亦有機制不明的⁵³。

(a)



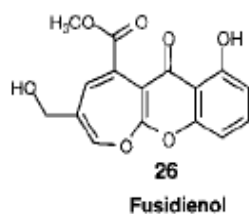
$IC_{50} = 2100$ nM

(b)



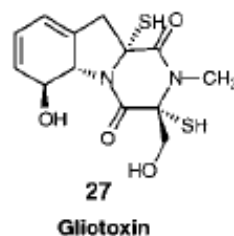
$IC_{50} = 5000$ nM

(c)



$IC_{50} = 1100$ nM

(d)



$IC_{50} = 1100$ nM

圖 2-9 由亂數篩選出的天然物脂肪酸轉移酶抑制劑 (a)(b) 與 FPP 競爭之天然物抑制劑⁵⁰ (c)(d) 不與 FPP 及 CAAX 競爭之天然物抑制劑^{52,53}

第三節 細胞穿透胜肽(cell-penetrating peptides)

3-1 細胞膜的組成

細胞膜位於細胞表面，將細胞分為內、外兩部份，因此具有控制細胞內外物質進出的功能。構成細胞膜的主要物質為脂質和蛋白質，並結合少量醣類。細

胞膜的結構是以磷脂質形成雙層作為基質，蛋白質則鑲嵌其中，醣類則附著在一些面向細胞外的脂質或蛋白質上。細胞膜為細胞與環境間的分界，能控制細胞內外物質的進出而蛋白質和醣類等大分子物質都不能直接通過細胞膜，而一些小分子物質如水、氧氣及二氧化碳等則可以通過。

細胞膜中的磷脂質分子以雙層排列，構成了膜的網架，是膜的基質。磷脂質分子為雙性分子，分為親水頭端和疏水尾端，雙層磷脂質分子之頭端皆朝向膜的外側，疏水尾端則兩兩相接埋於膜內（圖 2-10），而使磷脂雙層分子之親水頭端的內層（面對細胞質之面）與外層（面對外界之面）之結構不對稱原因，主要在於磷脂雙層分子兩親水頭端的化學組成不同。

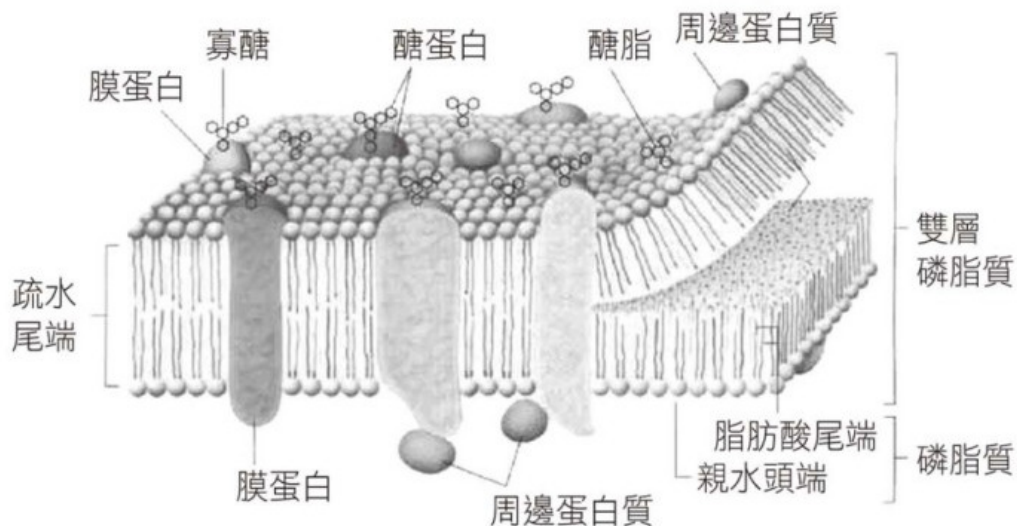


圖 2-10 細胞膜結構 (圖片來源：新自然主義出版社)

3-2 細胞附著分子(Cell Adhesion Molecules, CAMs)

細胞附著分子(cell adhesion molecules, CAMs) 是位於細胞表面的醣蛋白質，可當作細胞之間或是細胞與細胞外間質粘附之接受器^{54, 55}。CAMs 可分為四種，包括 integrins, cadherins, selectins 和免疫球蛋白家族(immunoglobulin superfamily)。細胞附著分子是一種多功能的蛋白質，掌控許多調控機制；細胞的生長，增生，分化與再生。CAMs機制是維持及形成細胞結構的關鍵，目前有

兩種主要的附著型態，一是細胞與細胞間的作用，主要是一般的物理鍵結，另一則是細胞與細胞間質的關係，通常與附著蛋白(adhesive protein) 有關。細胞是否移動(cell migration) 取決於細胞附著 (cell adhesion) 與分開(detachment) 之間的平衡，這樣的機制，可應用於研究癌症細胞的轉移。許多文獻探討CAMs(例如：integrins 和 cadherins)的結構和功能，以設計與發展具有潛力的藥物以治療癌症、心臟及自體免疫疾病⁵⁶。某些CAMs 可以內化入(internalized)細胞質 (cytoplasm)^{57, 58}。這種內化的過程可發展成標的藥物進入特定的細胞種類(例如：cancer cells和leukemic cells)。特別是這些細胞黏附胜肽皆是由細胞外間質蛋白質、免疫球蛋白家族和integrins 所衍生出來。

3-3 RGD motif

許多細胞黏附性胜肽(例如RGD胜肽)可以用來辨識integrins $\alpha\beta 3$ 。文獻中指出像是integrins 這類細胞貼附性接受器可以將胜肽鍵合物帶入細胞內。許多細胞黏附性胜肽(例如RGD胜肽)、類胜肽化合物及蛋白質藉由和細胞黏附性接受器結合以成為標的藥物(target drugs)的攜帶者、微脂粒(liposomes)和診斷用藥(diagnostic agents)至特殊細胞內以增加細胞黏附性接受器(i.e., integrin and immunoglobulin superfamily)的表現^{56, 59-61}。近二十年來，陸陸續續發現許多CAMs 並探討其細胞型態、移動和細胞分裂之功能⁶²⁻⁶⁴。例如，2005年Haass等人在一篇回顧期刊中指出可應用細胞黏附分子以來探討黑色素細胞瘤中細胞之貼附、移動和溝通之行為。細胞黏附性分子在癌症⁶⁴⁻⁶⁹、血栓形成(thrombosis)⁷⁰⁻⁷²和自體免疫疾病(如類風濕性關節炎和第一型糖尿病)上扮演重要角色⁷³⁻⁷⁵。

近年來有許多臨床使用的抗癌藥物，將藥物經過前導藥物設計，將原先藥物微脂胞化(liposome)⁵⁹或是加入穿越細胞膜的胜肽序列⁷⁶，使藥物可以順利穿越細胞膜的屏障。

RGD4C胜肽 (CDCRGDCFC)是由RGD motif衍生而來的，其對於癌細胞表面受器 $\alpha_v \beta_3$ (integrins)有很高的選擇性⁷⁷，RGD4C胜肽不同於RGD之胜肽對於癌

細胞的表面受器並沒有選擇性可以與許多不同的表面受器結合，實驗證明，給予移植了乳癌致癌因子的裸鼠接上RGD4C的doxorubicin後，發現可降低藥物的毒性，且可增強抗癌藥的效力⁷⁸。

第四節 細胞週期之調控

真核細胞增生(cell proliferation)是生命活動的重要特徵之一。但是細胞生命最終會有兩種結果：一、細胞分裂(cell division)，由原來的親代細胞(mother cell)變成兩個子代細胞(daughter cells)；二、細胞死亡(cell death)：生命活動消失。細胞增生受到調控機制的嚴密監控，不僅要遵循細胞的增生調控規律，同時還要遵守生物整體性的調控機制。可將複雜的細胞增殖現象分為三個時期：細胞生長期、DNA複製期、細胞分裂期，這整個過程稱為細胞週期(cell cycle)，如圖2-11。細胞週期可分為Interphase(G₀、G₁、S and G₂ phase)及M phase⁷⁹。

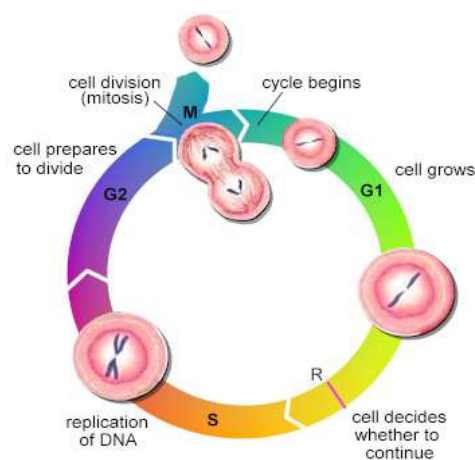


圖 2-11 細胞週期的概觀圖

(圖片來源：http://teachline.ls.huji.ac.il/72373/substance_x/cell-cycle2.jpg)

4-1 sub-Gap1 phase (G₀)

此期細胞處於休眠狀態，可能為暫時性或永久性的生長停止狀態。當細胞獲得訊號指令，會快速返回細胞週期，分裂增殖。例如結締組織中的纖維母細胞，平時並不分裂，一旦組織受到傷害，它們會快速返回細胞週期，分裂產生大量纖維母細胞，分佈於受傷部位，使傷口快速癒合。

4-2 Gap 1 phase (G1)

此期之細胞開始生長，細胞大小增加，同時產生 RNA 及合成蛋白質，目的是 DNA 複製做好準備。在 G1 的晚期有一個特定時期，稱為限制點(restriction point)或檢查點(checkpoint)。如果細胞走向分裂，細胞內 DNA 經過檢查點檢查無誤之後，便可以進入 S 期，開始合成 DNA。

4-3 Synthesis phase (S)

此期為 DNA 合成期。為了使分裂後的二個子細胞相似，必須複製 DNA 使其含量為原來的一倍。

4-4 Gap 2 phase (G2)

DNA 複製到有絲分裂的期間，此時細胞核內 DNA 的含量由 G1 期的 2 倍體變成 4 倍體。G2 期也有限制點存在，檢查 DNA 是否完成複製，細胞是否生長至合適大小，環境因素是否有利於細胞分裂等。

4-5 Mitosis phase (M)

細胞分裂期，這個階段的細胞會停止生長及停止蛋白質合成，所有細胞的能量集中在複雜而有規律性的細胞分裂，以期得到兩個相似之子細胞。

4-6 調控細胞週期的蛋白質

當 DNA 受損時，週期便無法通過檢查點(checkpoints)而停滯 (Cell cycle arrest)，此時細胞內會進行 DNA 的修復，一旦修補完成時才進入下一期，若是發現有無法彌補的錯誤時，細胞則選擇走向凋亡 (apoptosis)，以避免錯誤遺傳至下一代⁸⁰。

在真核細胞中，調控細胞週期進行、細胞的增生是經由活化一系列特殊的

Cyclin-CDK 結合物(Cyclin-CDK complex)。各種抑制增生(anti-proliferative)訊號，包含有 DNA 損傷(DNA damage)、分化(differentiation)、接觸性抑制(contact inhibition)、和衰老(senescence)等等訊號，會促使 CDK 之抑制物作用而對細胞週期進行負向調控⁸¹。

調控細胞週期的蛋白稱為 Cyclin，而進行 Cyclin 活化的則是一些 Cyclin-dependent kinases (CDKs)。這些 Cyclin 與 CDKs 會形成複合物，此複合物的活化與分解則負責調節週期的進行。Cyclins 家族，主要被合成於細胞週期中。目前已知至少有 8 種 Cyclins 的存在，分別為 A、B1,2,3、C、D1,2,3、E、F、G 及 H，這些 Cyclins 在 N-端與 CDKs 鍵結處皆具有約 150 個胺基酸相同的區域，稱之為 cyclin-box，可作為媒介，並參與 Cyclin 與 CDKs 的結合⁸²。

第五節 細胞凋亡(Apoptosis)

5-1 細胞凋亡之定義

細胞凋亡(apoptosis)一詞最早是在 1972 年由病理學家 John Kerr 所提出⁸³，原本字面的意思是指樹葉凋落或掉落。細胞凋亡又被稱為生理上的細胞死亡(physiological cell death)或是程序性的細胞死亡(programmed cell death)，在生理上扮演著相當重要的角色⁸⁴。例如：在胚胎發育或是精子的形成過程中都會發生細胞凋亡。除此之外，當正常的細胞受到傷害而發生基因突變時，也會自動引發細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡，避免突變的遺傳⁸⁵。

5-2 細胞凋亡時之分期與細胞壞死(necrosis)之分別

細胞凋亡主要是發生在單一細胞中。它可分為兩個時期，早期(early stage)以及晚期(late stage)。細胞凋亡早期時，會出現染色質濃縮(compaction of nuclear chromatin)、細胞質濃縮(condensation of cytoplasm)以及細胞皺縮(shrunken)等特徵；到了晚期，細胞核會開始發生裂解，然後形成凋亡小體(apoptotic bodies)⁸⁶。在細胞凋亡過程中，並不會發生胞器或是胞膜破裂，因此不會引起發炎反應或危

害到周圍組織。

細胞壞死會同時發生在一群細胞，也可分為早期與晚期兩個時期。在細胞壞死早期，細胞內之胞器會脹大，細胞膜也會破裂；到了晚期細胞膜也發生破裂⁸⁷⁻⁹⁰。由於細胞發生破裂，因此會釋放出一些發炎物質而引起局部發炎反應，傷害到鄰近的細胞或組織。

5-3 細胞凋亡時的特徵

細胞凋亡是一種保護性的死亡，決定凋亡的細胞自己先悄悄的引發一連串的生化反應，最後再將自己切割成數個小顆粒而終被鄰近細胞吞噬消化，此種細胞死亡過程完全不影響其他周遭細胞的生理運作，乃是細胞凋亡最大特色之一，其與一般的死亡有很大的不同。

5-3-1 DNA 降解

當細胞凋亡進入晚期時，細胞內的核酸內切酶會被活化而將DNA隨之分解，產生180~200 bp的DNA片段。此時藉由1.8%的凝膠進行電泳時，會出現特殊的梯形電泳帶。此為細胞凋亡時之明顯特徵⁹¹。

5-3-2 細胞鈣離子濃度改變

細胞凋亡早期時可偵測到細胞內鈣離子濃度之上升⁹²。研究發現Ca²⁺增加與ATP一起作用於染色質，使原來折疊的很緊的染色質變鬆散，露出親水部分，以便DNA水解。

第六節 圓二色光譜(Circular Dichroism Spectroscopy；CD)

6-1 圓二色光譜原理

圓二色光譜中提到的平面偏極光放射(plane-polarized radiation)是由兩個相等的圓形偏極光所組成之特定吸收，這兩個圓形極化光分別為左圓偏極光(left

circularly polarized)及右圓偏極光(left circularly polarized)。而這個效應的產生必須有下列幾種情形：(1)結構本身具有光學活性的發光團(chromophore)(2)有共價連接一個光學活性中心的發光團(3)存在於一個不對稱(asymmetric)的環境中。所謂右圓偏極光的定義是觀察者朝光源的方向看時，其電向量或磁向量為順時針方向旋轉，旋轉的頻率與光源頻率相同，同理可推論左圓偏極光定義(圖2-12)。當這道平面極化光通過光學活性物質之後，電向量的最大振幅不在被限制在原来的平面上，而是橢圓的形式出現，當極化光透過光學活性物質時對左圓偏極光及右圓偏極光會有不相等的吸收，重新結合組成變成橢圓形此為橢圓偏極化(elliptically polarized)(圖2-13)，稱為圓二色(circular dichroism, CD)。

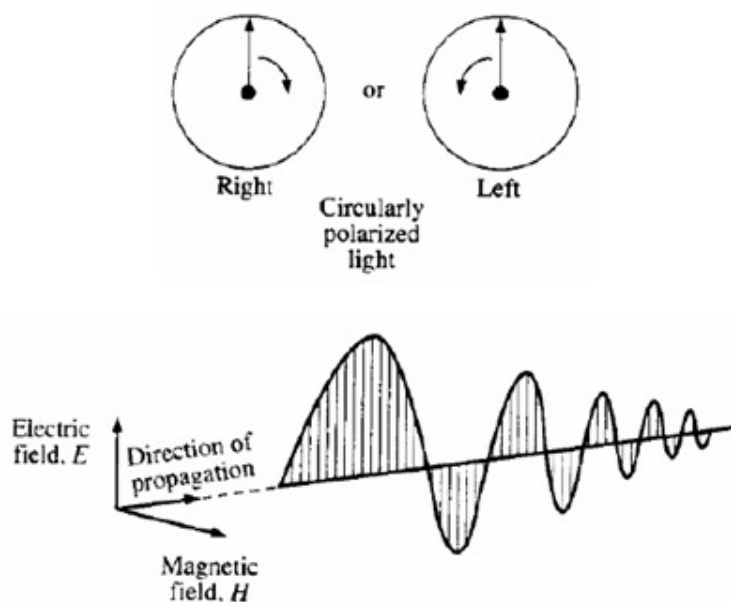


圖2-12 電場和磁場互相行進方向及左、右圓偏極光定義圖⁹³

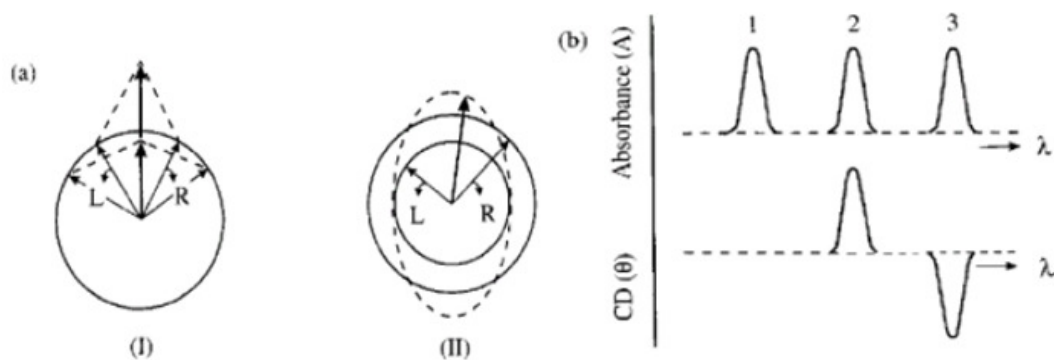


圖2-13 (a)顯示左圓及右圓偏極光如何結合：(I)兩個波長向量為相同的振幅，為平面偏極光的結果(II)兩個波長向量為不同的振幅，顯示不在是圓而是橢圓(b)顯示吸收及CD光譜的關係：數字1 表示無活性中心，數字2 表示正的CD光譜，數字3 表示負的CD光譜⁹³

6-2 圓二色光譜於蛋白質及胜肽上的應用

圓二色光譜廣泛的運用在研究蛋白質及胜肽於溶液中的二級結構，且其靈敏度很高。蛋白質的二級結構基本上包括了無序纏繞(random coil)、 α -螺旋(α -helix)、 β -褶板(β -sheet)及翻轉(turn)。這些基本結構和胜肽鍵(peptide bond)(C_{α} -N)的型構有關。一般在研究胜肽結構特性上，所設定的波長範圍多介於180~270 nm之間，這個波長範圍是屬於 $n \rightarrow \pi^*$ 及 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的電子能階躍遷(圖2-14)，而此能階能差會隨著胜肽的二級結構不同而有所差異，所以我們可用於分析不同的二級結構類型例如： α -螺旋(α -helix)、 β -褶板(β -sheet)、翻轉(turn)及無序纏捲(random coil)等構型。

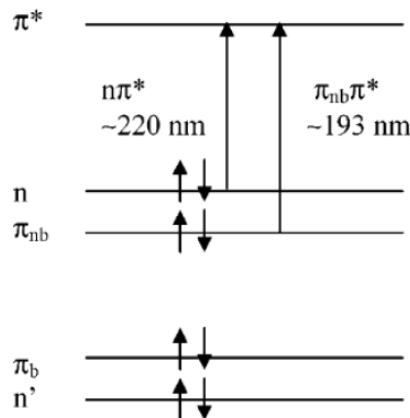


圖 2-14 胺基(amide group)在Far-UV區域的電子轉移圖。 π_n 為鍵結， π_{nb} 為非鍵結， π^* 為反鍵結⁹⁴

由實驗歸納以波長(λ)對橢圓率(θ)作圖，當有螺旋結構時在波長192nm會有一最高值，而在波長208及222 nm會有兩個相對低值，有 β -褶板結構時在波長195

nm會有一最高值，而在波長217 nm會有一個相對低值，有翻轉結構時在波長205 nm 會有一最高值，而在波長190 nm會有一個相對低值，為無序纏捲結構時在波長217 nm會有一微弱的高值，而在波長197 nm會有一個低值(圖2-15)⁹⁴⁻⁹⁷。

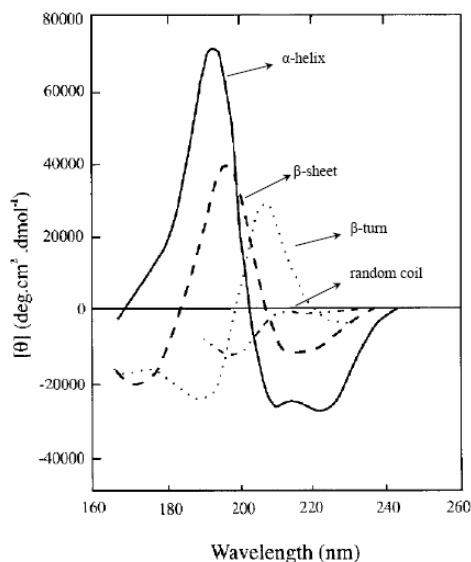


圖 2-15 聚合胜肽二級結構Far-UV之圓二色光譜⁹³

第七節 研究動機與目的

本論文是以CAAX為模板來設計一系列脂肪酸轉移酶抑制劑，而且根據文獻探討得知當A為脂肪族胺基酸時則對脂肪酸轉移酶有較好的抑制效果，故我們先是設計一系列針對脂肪酸轉移酶(farnesyltransferase)的類胜肽抑制劑，其序列為LysCysAASer (A=脂肪族胺基酸)，由這一系列預估抑制效力不錯的序列找出最具抑制效力的前導藥物 (lead compound)，亦探討當A為非脂肪族胺基酸時對於脂肪酸轉移酶的抑制效果，且我們亦在此設計胜肽的N端接上RGD4C序列，期望RGD4C序列能夠將我們設計之胜肽帶入細胞內，影響訊息的傳導。

第三章 材料方法

第一節 實驗設計與流程

本篇論文實驗設計，首先設計胜肽並合成，而後以逆向高效能液相層析儀分析純化合成胜肽，再以MALDI-TOF-MS鑑定其分子量，而後將已確認純化後之胜肽以MTT assay、流式細胞技術及圓二色光譜分析(見圖3-1)。

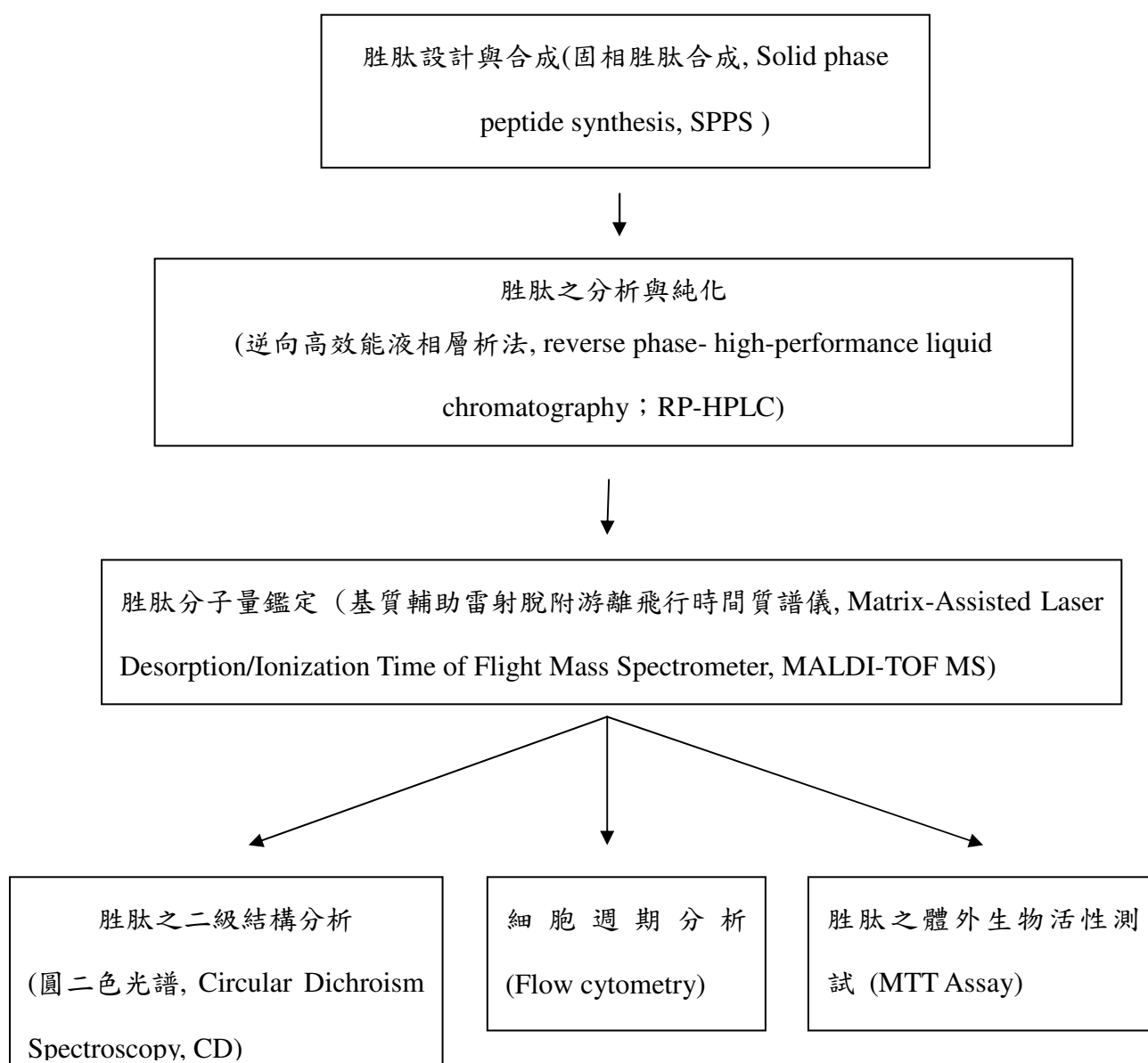


圖 3-1 實驗設計與流程

第二節 胜肽設計合成、分析、純化及鑑定

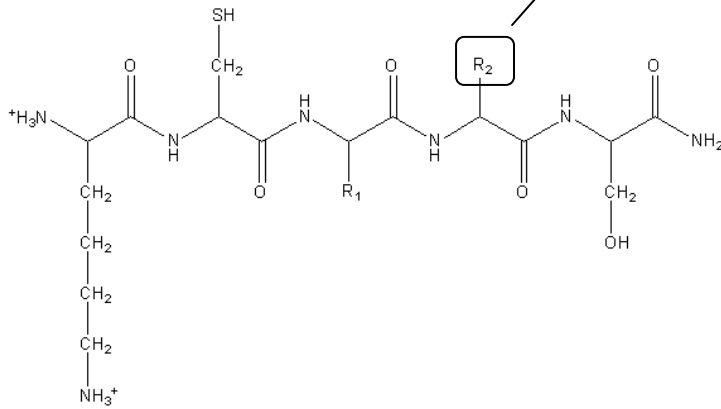
2-1 固相胜肽合成 (Solid-phase Peptide Synthesis ; SPPS)

固相胜肽合成法是由 Merrifield 在 1963 年所發表的實驗方法⁹⁸，這項技術被廣泛應用在合成大量胜肽。本實驗採用固相胜肽合成技術，並應用 Fmoc Chemistry⁹⁹ 進行線狀胜肽合成。設計之胜肽序列列於表 3-1。

表 3-1 設計之胺基酸序列

Peptide number	Peptide sequence	Peptide number	Peptide sequence
FTI-1	KCVLS	FTI-10	KCELS
FTI-2	KCLLS	FTI-11	KCRLS
FTI-3	KCLIS	FTI-12	KCYLS
FTI-4	KCLVS	FTI-13	KCERS
FTI-5	KCILS	FTI-14	CDCRGDCFCCKVLS
FTI-6	KCIIS	FTI-15	CDCRGDCFCCKLLS
FTI-7	KCIVS	FTI-16	CDCRGDCFCCKIIS
FTI-8	KCVIS	FTI-17	CDCRGDCFC
FTI-9	KCVVS		

當 R₂ 為 Leu 時，其抑制癌細胞生長的能力較好
(FTI-1、FTI-2 及 FTI-5)



Compound	R ₁	R ₂	Compound	R ₁	R ₂
FTI-1			FTI-6		
FTI-2			FTI-7		
FTI-3			FTI-8		
FTI-4			FTI-9		
FTI-5					

圖3-2 設計胜肽FTI-1~9之結構

2-1-1 固相胜肽合成實驗材料

固相胜肽合成之材料與設備分別購買於不同的廠商，其相關資料整理於表 3-2。

表 3-2 胜肽合成所需之材料、設備及購買廠商

材 料	購 買 廠 商	備 註
Rink amide resin	NOVA Biochem.	胺基酸之固著物
具 N ^α -Fmoc 保護基的氨基酸	ANA SPEC	N 端具 Fmoc，側鏈具保護基之胺基酸
HBTU(O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-Tetramethyluronium Hexafluorophosphate)		活化胺基酸 C 端之試劑 (Coupling reagents)
HOBt (1-hydroxybenzotriazole)		
DIEA (N,N-Diisopropylethamine)	SIGMA	
DMF (N,N-dimethylformamide)	Fisher Chemicals	溼潤 resin
TFA (Trifluoroacetic acid)	Alfa Aesar -Lancaster	將合好之胜肽由 resin 切下
Piperidine	TEDIA	去除胺基酸 N 端 Fmoc
DCM (Dichloromethane)		膨大 resin
Column PD-10 (17-0435-01)	Amersham Biosciences	反應針筒
設 備	購 買 廠 商	
自動旋轉器 (Model. SD-50)	Young chenn	
真空萃取裝置 (SPE Vacuum manifold)	Great tide	
冷凍乾燥機 (FD3-12P)	Kingmech	

2-1-2 固相胜肽合成實驗方法

首先，先將Rink amide resin，Fmoc[4-(2',4'- Dimethoxyphenyl-aminomethyl-phenoxy-acetamido-norleucylaminomethyl resin)上 N^{α} -Fmoc保護基去除：於含有Rink amide resin的反應針筒內加入5 mL的30% Piperidine/DMF混合反應30分鐘，重複兩次；再加入5 mL DMF，混合反應5分鐘，重複三次，而後將第一個側鏈保護(side-chain protected)的Fmoc-amino acid (2 equivalent)利用耦合試劑(2 equivalent of HBTU + 2 equivalent of HOBt + 2 equivalent of DIEA)結合至Rink amide resin (1 equivalent)上，再將結合至Rink amide resin之第一個側鏈保護的Fmoc-amino acid的N端Fmoc保護基利用去保護基試劑(30% piperidine in DMF)除去，重複上述之結合反應及去Fmoc保護基反應將其餘每一個具側鏈保護(side-chain protected)之Fmoc-amino acid依序結合至resin上，得到 $aa^1-aa^2-aa^3-----aa^n$ -Rink amide resin, n代表胜肽中胺基酸(aa= amino acid)之位置見圖3-2。最後利用裂解劑(95% TFA in H_2O)將胜肽 $aa^1-aa^2-aa^3---aa^n$ 與Rink amide resin裂解分離並使側鍊保護基去除。胜肽混合液用氮氣(N_2)吹去後呈黏稠狀，加2 mL的冰乙醚沉澱出白色固體即是胜肽粗產物，需要進一步由逆向高效能液相層析法純化。

表3-3 胺基酸之側鍊保護基

保護基	
不具側鍊保護基	Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val
tBu	Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr
Trt	Cys, Gln, His, Asn
Pbf	Arg
Boc	Lys

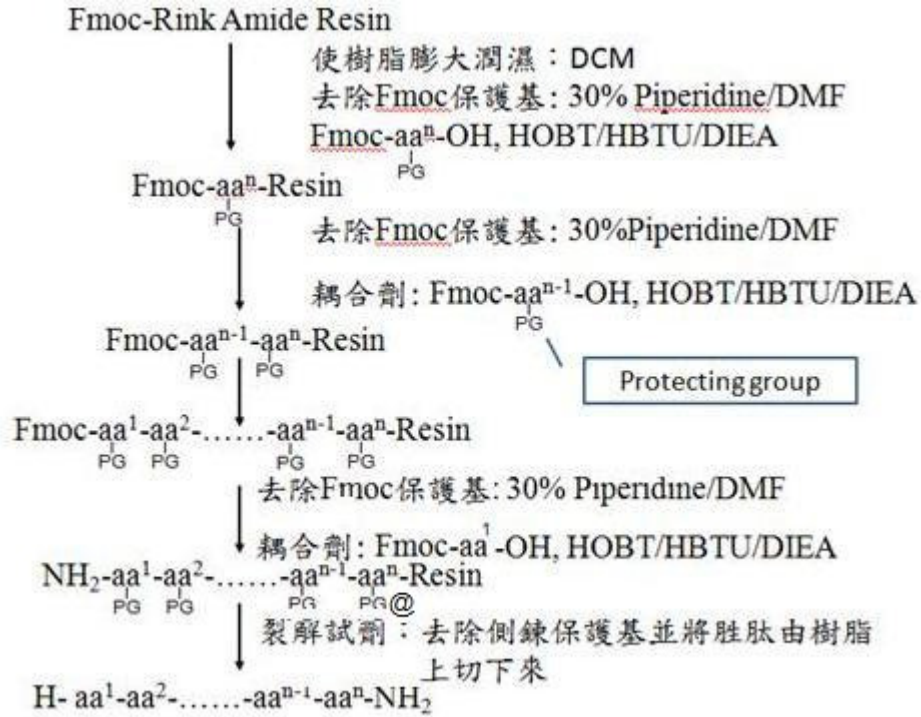


圖 3-3 SPPS流程圖，@裂解試劑：A. 0.5 mL D.I. H₂O+9.5 MI TFA、B. 0.125 mL EDT+0.25 mL thioanisole+ 0.5 mL D.I. H₂O+ 10 mL TFA及C. 0.25 mL EDT+ 0.25 mL D.I. H₂O+ 9.5 mL TFA

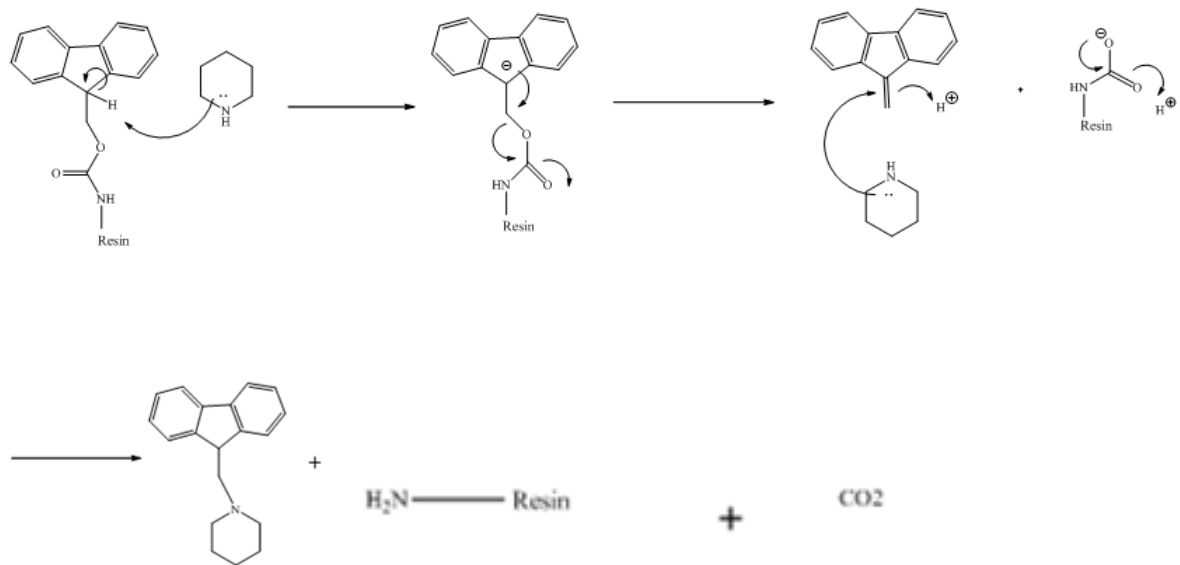


圖 3-4 去除 Fmoc 保護基之機制

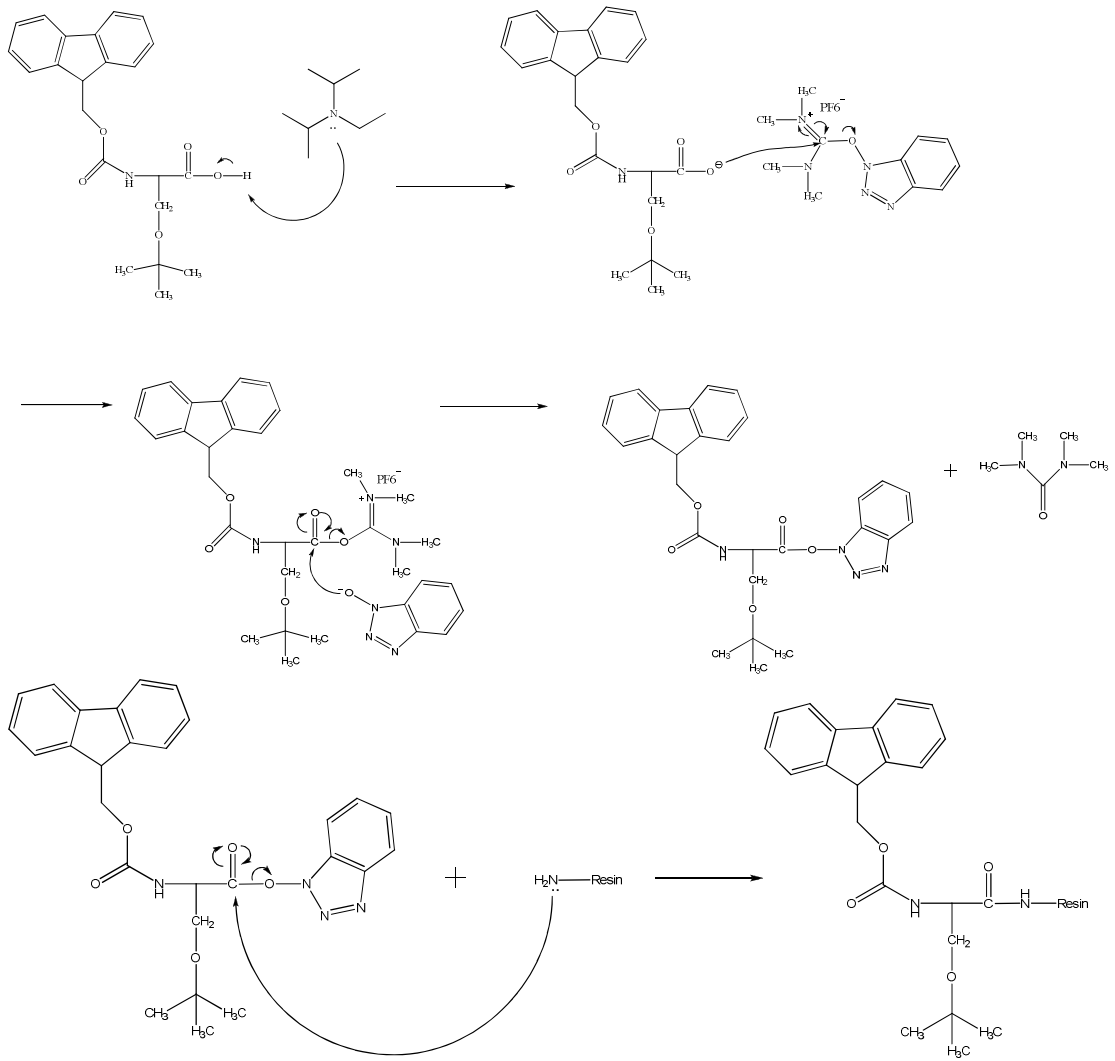


圖 3-5 胜肽與樹脂偶合之機制

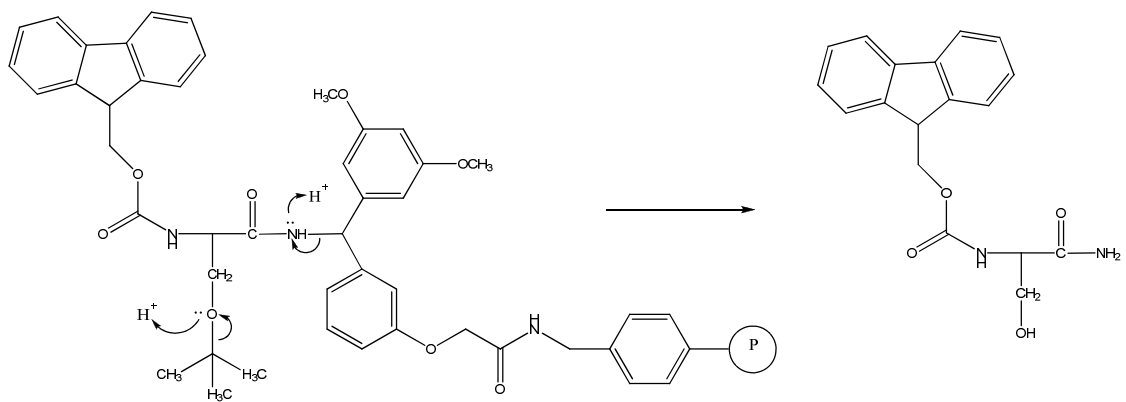


圖 3-6 以 TFA 將胜肽從樹脂上切下之機制

2-2 應用逆向高效能液相層析法分析及純化成胜肽

液相層析法 (reverse phase high-performance liquid chromatography ; RP-HPLC)之發展始於 1964-65 年間，為樣品中各成分在不互溶之兩相間以物理方法加以分離。

2-2-1 逆向高效能液相層析實驗材料及設備

逆向高效能液相層析所需之材料及設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 3-4。

表 3-4 逆向高效能液相層析所需之材料、設備及購買廠商

材 料	購 買 廠 商
TFA (Trifluoroacetic acid)	Alfa Aesar -Lancaster
Acetonitrile	ECHO Chemical Company
0.2 μm filter	MSI
設 備	購 買 廠 商
逆向高效能液相層析儀	Hitachi
RP-HPLC column (250 \times 10.0 mm, particle size 5 μm , Polaris 5u C-18A, 100 RP-18)	Varian
微量注射器 (CHA-750RN)	KONTES
玻璃過濾裝置 (AK95375-00000)	

2-2-2 逆向高效能液相層析之實驗方法

欲分離的合成胜肽，首先溶解於適當的溶劑中，注入所選擇的管柱(column)中，再以高壓輸入移動相，由於為移動相與固定相之間的配比係數(partition coefficient) 不同，樣品中因為固定相中各成分停留時間不一，得以分離；樣品中成分經 UV 光源 225 nm 偵測後之數據(滯留時間，retention time, Rt) 呈現在積分儀的圖上。分離之最佳狀況可由進速度，孔徑及離析率調配而求得。本研究將逆向高效能液相層析儀之偵測波長設定為 225 nm，以 4 mL/min 的速度，10 μm 孔徑的 C₁₈ 管柱來制定最適當之離析率，HPLC 溶劑配製為：solution A 是 4L D.I.

Water + 0.05 % Trifluoroacetic acid (TFA) ， solution B 是 4 L Acetonitrile + 0.05 % Trifluoroacetic acid (TFA) ，分配比例如表 3-5。

欲分析或純化的樣品需於分析或純化前，先以孔徑 0.2 μm 針筒過濾器(filter) 過濾。過濾後之樣品注射至儀器前，須先去除儀器微流管柱內及移動相氣泡(purge)，在不注射樣品的條件下讓儀器以我們所設之梯度沖洗管柱，以確認管柱內沒有殘存的干擾物。若有雜訊出現，應設定適當條件(流速、溶劑配比係數)將管柱清洗乾淨後，再行樣品分析。樣品注入樣品注射閥，此時樣品仍停留於閥內，注射閥箭頭停留在 load 位置；待逆向高效能液相層析儀與積分儀的同步化操作完成，將閥門往下推至 inject，樣品就進入 RP-C₁₈ 管柱進行層析。積分儀隨著樣品成分於不同時間出現面積大小不一的波峰(peak)，此時若要進行純化可依積分儀出現的波峰，個別收集每個波峰出現時逆向高效能液相層析所層析出的液體，經冷凍乾燥，便得到純化的白色乾燥粉末。

表 3-45 RP-HPLC 純化胜肽移動相分配比例

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	90	10
30	10	90
35	10	90
40	90	10
48	90	10

2-3 應用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析和鑑定合成胜肽

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation—Time of Flight —Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS) 是利用UV雷射光(波長337 nm)將分子量高且非揮發物的樣品像是蛋白質或胜肽離子化後，再進行質譜分析。

2-3-1 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀材料與設備

MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization)代表來源 (source)，也就是離子化的部份，TOF是time of flight的縮寫，MS代表質析 (mass analyzer)的部份，將待測物胜肽與基質混合，基質中的微小分子，會吸收特殊波長的光，成份包括2,5-dihydroxybenzoic acid、3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid)，以及 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid，此MALDI-TOF-MS系統購自Bruker，型號為microflex系統。其中，我們使用的基質是 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)，它適用於分子量小於10 KDa的小分子胜肽。

2-3-2 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析方法

本實驗胜肽鑑定是委託本實驗室吳俊蔚同學進行MALDI-TOF-MS操作。我們使用的基質是 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)。混合物置於平盤上，讓水份或其它溶劑揮發到空氣中，造成樣品內部晶格(crystal lattice)的形成，再把樣品放到source的部份，source這兒提供雷射光，基質的化學物質吸收光子而激發電子，釋放的能量轉到樣品中的胜肽上，離開基質表面進入空氣中。

第三節 應用體外細胞實驗評估合成胜肽之生物活性

本實驗利用 MTT assay 及流式細胞技術評估設計胜肽之細胞存率及細胞週期，並以 MTT assay 探討設計胜肽之結構與活性關係。

3-1 細胞培養之常用藥品試劑及設備

細胞培養相關實驗之常用藥品試劑及設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 3-6。

表 3-6 細胞培養相關實驗之藥品、試劑、設備及購買廠商

材 料	備 註	購 買 廠 商
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	細胞培養	GIBCO Corporation (Grand Island, NY, USA)
Trypsin		
Penicillin-Streptomycin		
Fetal Bovine Serum (FBS)		Biological industries
KH ₂ PO ₄	PBS 配製	Merck (New Jersey, USA)
KCl		
Na ₂ HPO ₄		Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)
NaCl		
Trypan blue	細胞染色	
NaHCO ₃	Medium 配置	
DMSO (dimethyl sulfoxide)	抗凍劑	Merck (New Jersey, USA)
MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	細胞存活實驗	
Ethanol	消毒	

3-2 細胞培養之方法

3-2-1 細胞培養液的配製

將 DMEM 粉末溶於 4.5 L 已滅菌之 Mili-Q 去離子水中，加入 23.5 g 的 NaHCO_3 ，再用 HCl 調整 pH 至 7.2~7.4 後，以 Mili-Q 已滅菌之去離子水補足體積至 5 公升，再以 0.22 μM 過濾器過濾滅菌。配置好的 DMEM 細胞培養液需再添加抗生素 (Penicillin-Streptomycin, 0.1 %) 與 10% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)，儲存於 4°C 冰箱備用。

3-2-2 人類乳癌細胞株的培養

實驗進行前，無菌室和無菌操作臺以紫外燈照射 36-60 分鐘，以 70% 的酒精擦拭無菌操作臺面，並開啟無菌操作台風扇運轉 10 分鐘後，才開始實驗操作。所有進入無菌操作臺的器物均需先噴灑 70% 酒精，有蓋容器旋開瓶蓋前均需先過火。

人類雌激素依賴型乳癌細胞株 (human estrogen receptor (ER)- dependent breast cancer cells, MCF-7)¹⁰⁰ 購自新竹食品工業研究所。MCF-7 以 DMEM 培養液培養於 37°C、5% CO_2 的培養箱中；繼代培養 (subculture) 時，先以 PBS 清洗 1 至 2 次，再加入約 2 mL 的 Trypsin- EDTA 搖晃 30 秒倒去，再置入 CO_2 培養箱約 5 分鐘，再以約 10 mL 的培養液將細胞沖下，最後分種於新的細胞培養瓶 (flask) 中，每一培養瓶中注入約 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個細胞，定期以 Trypan blue 染色，利用血球計數盤 (hemocytometer) 計數細胞數目，維持細胞密度與總數。

3-2-3 細胞冷凍保存

細胞冷凍的原則為慢凍，且在約為 80-90% 之緻密度可使冷凍保存之細胞生長良好，且處於存活率高之狀態，但仍需注意冷凍保護劑之品質，DMSO 應

為試劑級等級，無菌且無色(以 0.22 micron FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品)，以 5-10 mL 小體積分裝，4°C 避光保存，勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度為 $2\sim 8\times 10^6$ cells/mL，冷凍保存劑之濃度為 10% DMSO。

細胞冷凍保存之操作步驟為：冷凍前一日更換培養液，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液：將 DMSO 加入新鮮培養液中，最後濃度為 10%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液(約 0.1 mL)計數細胞濃度。之後離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，使細胞濃度為 $2\sim 8\times 10^6$ cells/mL，混合均勻，分裝於已標示完全之冷凍保存管中，1 mL/vial。冷凍保存方法：冷凍管放入 5 公分厚的保麗龍盒中置於-80°C 冰箱，24 小時之後隔日置入液態氮中長期儲存。

3-2-4 冷凍細胞之活化

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常。冷凍的細胞快速解凍的方法為：將冷凍管由液態氮筒中取出，立即放入 37°C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在3分鐘內全部融化，以 70%酒精擦拭保存管的外部，移入無菌操作臺內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養液之細胞培養瓶中，混合均勻，放入CO₂培養箱培養。在解凍培養後隔日將培養液更新且利用倒立式位像差顯微鏡觀察細胞貼附增生情形。

3-3 人類乳癌細胞存活率之測定

此部分實驗目的在於觀察我們所設計之不同濃度的胍肽是否會影響人類乳癌細胞MCF-7的細胞存活率。本實驗使利用MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)法判定。

3-3-1 MTT Assay原理

MTT Assay或稱Tetrazolium assay是一般常用的細胞毒性試驗方法，原理為3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide黃(MTT)色水溶性固體可被細胞內粒腺體(mitochondria)中的去氫酵素(dehydrogenase)代謝，將tetrazolium ring切斷還原呈紫色不溶性沈澱物 formazan (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl-formazan) (圖 3-1)¹⁰¹，而後以DMSO溶解，其吸光值(O.D.)為540 nm。因活細胞才具有活性的粒腺體酵素，故所測得的吸光值會與活細胞數量成正比關係，因此我們利用formazan產量的多寡來評估細胞的存活率。

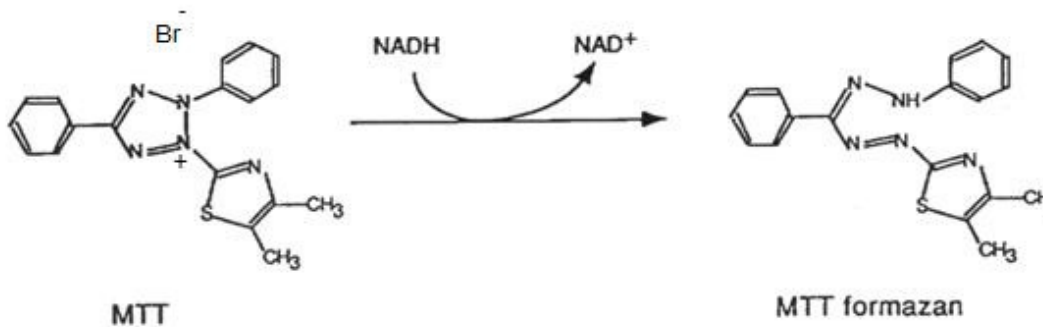


圖 3-7 活細胞代謝產生 formazan 之反應圖

3-3-2 細胞存活率實驗步驟

將含有 5×10^4 cells/mL之人類乳癌細胞以DMEM培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200 μ L/well)中，加入不同濃度之合成胜肽(終濃度為25、50、75與100 μ M)，在5% CO₂、37 °C的條件下，分別培養24與48小時後，加入150 μ L/well之MTT試劑與細胞共同培養1小時後，再加入300 μ L/well之DMSO，最後利用ELISA reader (Versamax, Sunnyvale, CA, USA)測量540 nm之吸光值。

3-4 利用流式細胞儀分析人類乳癌細胞株細胞週期

流式細胞儀之設計結合了細胞生物學、流體力學、光學及免疫學等原理，利用具有專一性的探針(probes)與抗體，可針對單一細胞進行偵測，配合適當的染劑更可執行多功能的評估，包括不同淋巴球的區分、核酸含量、酵素活性、脂質種類及細胞內新陳代謝產物...等。

3-4-1 細胞週期實驗之原理

Propidium iodidium (PI) 為一種具有螢光的核酸染劑，可專一性的嵌入細胞內的DNA。在正常的情況下，PI並無法自由穿透細胞膜完整的活細胞。當細胞死亡時會進行細胞壞死(Necrosis)或細胞凋亡(Apoptosis)的路徑，死亡的細胞其細胞膜會失去完整性(membrane integrity)¹⁰²。以PI進行染色時，死亡的細胞，因其細胞膜破裂，PI可進入細胞內和核酸結合；存活的細胞，因其細胞膜完整，PI無法和細胞內的核酸結合。PI進入細胞核內，利用其帶有正電荷的特性與DNA間靜電交互作用的結合而嵌入雙股DNA上，在波長488 nm的雷射光激發下，可釋放出波長636 nm的螢光。經由流式細胞儀偵測PI激發之螢光，則可反應細胞內DNA狀態或進行細胞週期的分析。

3-4-2 細胞週期實驗步驟

將 2 mL 含 1×10^6 cells 種植至 6 孔洞平盤之每個孔洞中，放入 37°C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。隔天加入 100 μM 我們所設計之肽至 6 孔洞平盤中，放入 37°C、5% CO₂ 進行培養，於 24 與 48 小時後檢測細胞週期改變的情形。

利用塑膠吸管從每一個孔洞將medium吸取至離心管，加入2 mL PBS緩衝液至平盤中清洗，輕搖晃平盤並吸取PBS緩衝液至離心管，加入約500 uL的胰蛋白酶(trypsin-EDTA)使貼附的細胞從平盤上分離，接著加入2 mL PBS緩衝液至平盤並吸取PBS緩衝液至離心管，進行1500 rpm，5分鐘離心。倒掉上清液，將細胞完全均勻打散後，再加入2 mL PBS緩衝液至離心管，進行1500 rpm，5分鐘的離

心。倒掉上清液，再將細胞完全均勻打散後，以約4°C的70%酒精/PBS進行細胞固定步驟(震盪器以低速度震盪，一滴一滴緩慢將酒精滴入)，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於-20°C冰箱存放。

隔天，將樣品從冰箱取出後離心1500 rpm、5分鐘以去除酒精，之後將細胞完全打散。加入2 mL的PBS緩衝液清洗並離心。將完全均勻打散的細胞加入500 µL的PI stain染劑(表3-7)，避光培養40分鐘37°C。以1 mL的pipette在15 mL離心管中抽吸數次後，利用過濾膜過濾，再將細胞移至流式細胞儀專用管避光。以流式細胞儀(Flow cytometry; FACS, Becton Dickinson)進行分析，數據以Cell Quest®軟體進行處理分析。

表 3-7 PI (propidium iodide) stain solution 配方

組成	最終濃度	初濃度	體積 (mL)
Propidium iodide (PI)	50 g/mL	1 mg/mL	2.5
Triton-100	0.05%	5%	0.025
RNase A	0.1 mg/mL	2 mg/mL	2.5
1X PBS	-	-	45
總體積			50 mL

*RNase A 儲存於-20°C，PI stain 儲存於 4°C

3-5 統計分析

本研究所得之資料皆以SPSS 8.0版套裝軟體進行統計，以單因數變異數分析(One-way ANOVA)進行組內之比較，再以Duncan multiple range test 比較各組間之差異顯著性，實驗結果的數值皆以平均值±標準誤差(means ± SE)表示，差異之顯著程度訂為 $p < 0.05$ 。

第四節 應用圓二色光譜分析設計胜肽之二級結構

圓二色光譜(Circular Dichroism Spectroscopy, CD)中提到的平面偏極光放射(plane-polarized radiation)是由兩個相等的圓形偏極光所組成之特定吸收，這兩個

圓形極化光分別為左圓偏極光(left circularly polarized)及右圓偏極光(right circularly polarized)。而這個效應的產生必須有下列幾種情形：(1)結構本身具有光學活性的發光團(chromophore)(2)有共價連接一個光學活性中心的發光團(3)存在於一個不對稱(asymmetric)的環境中。所謂右圓偏極光的定義是觀察者朝光源的方向看時，其電向量或磁向量為順時針方向旋轉，旋轉的頻率與光源頻率相同，同理可推論左圓偏極光定義(圖2-13)¹⁰³。當這道平面極化光通過光學活性物質之後，電向量的最大振幅不在被限制在原來的平面上，而是橢圓的形式出現，當極化光透過光學活性物質時對左圓偏極光及右圓偏極光會有不相等的吸收，重新結合組成變成橢圓形此為橢圓偏極化(elliptically polarized)(圖2-14)⁹³，稱為圓二色(circular dichroism, CD)。

4-1 圓二色光譜材料與設備

本實驗委託本實驗室陳丘泓學長至中研院操作，使用圓二色光譜(Jasco-815, Japan)偵測我們所設計之FTI-6與FTI-16，欲比較其結構上差異。

4-2 圓二色光譜之實驗方法

對蛋白質二級結構的變化十分靈敏，所以常被用來探討蛋白質與胜肽的二級結構，圓二色光譜實驗條件為所有光譜皆於25 °C進行測量，使用的樣品槽厚度為0.1 cm。經由3次掃描得到每一個CD光譜，測量波長範圍從180 nm 掃至260 nm，解析度設0.5 nm，掃描速度為100 nm/min，response time為4 sec，band width設為1.0 nm。胜肽濃度為5 M，

第四章 結果與討論

第一節 胜肽之合成、純化及鑑定結果

1-1 應用逆向高效能液相層析法分析及純化合成胜肽

設計之胜肽經固相胜肽合成法完成後，將胜肽從樹脂固著物切下得到粗產物，所得到的粗產物利用初步分析。逆向高效能液相層析儀的分離機制係由胜肽與固定相與移動相之間相互疏水作用力不同，使樣品於層析管柱之滯留時間不同而分離出來。胜肽經由逆向高效能液相層析儀分析並純化收集所得的層析圖譜整理如附件圖 4-1 至 4-17，其滯留時間(Rt)見表 4-1，由於分析之樣品為粗產物，因此主產物及副產物皆會被測得。純化時即根據滯留時間個別收集，純化後則需再經逆向高效能液相層析儀確認，結果可得到一明顯的主峰，顯示胜肽經純化後，除了主產物外，副產物濃度極低。合成好的胜肽經逆向高效能液相層析儀分析再經由質譜儀(MALDI-TOF) 鑑定是否為正確的分子量，感謝本實驗室楊佳昕同學合成及純化 FTI-17。

表 4-1 胜肽在 HPLC 的滯留時間

Peptide number	Rt (min)	Peptide number	Rt (min)
FTI-1	15.69	FTI-10	15.39
FTI-2	16.36	FTI-11	12.55
FTI-3	16.06	FTI-12	15.67
FTI-4	15.99	FTI-13	12.24
FTI-5	15.49	FTI-14	9.65
FTI-6	15.97	FTI-15	11.11
FTI-7	15.06	FTI-16	9.06
FTI-8	15.76	FTI-17	8.48
FTI-9	14.83		

1-2 應用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析與鑑定合成之胜肽

收集經逆向高效能液相層析儀純化後之線狀胜肽，其分子量經理論計算與經過MALDI-TOF分析鑑定後，所測得之分子量分別整理於表 4-2，FTI-1~17之質譜圖如附件圖4-18~34。

表 4-2 胜肽理論分子量與 MALDI-TOF 鑑定後分子量對照表

Peptide number	分子量總和計算值	MALDI-TOF 分子量測量值	Peptide number	分子量總和計算值	MALDI-TOF 分子量測量值
FTI-1	548.3230	549.3	FTI-10	578.2972	579.9
FTI-2	562.3386	562.2	FTI-11	605.3557	606.9
FTI-3	562.3386	562.1	FTI-12	612.3179	613.7
FTI-4	548.3230	549.2	FTI-13	621.3142	622.9
FTI-5	562.3386	562.4	FTI-14	1550.6046	1551.3
FTI-6	562.3386	562.3	FTI-15	1564.6202	1565.2
FTI-7	548.3230	549.2	FTI-16	1564.6202	1567.4
FTI-8	548.3230	548.1	FTI-17	1020.3159	1019.5
FTI-9	534.3073	534.1			

第二節 設計胜肽對 MCF-7 乳癌細胞株細胞存活率之探討

本篇論文主要目的是設計一段仿 Ras 蛋白的胜肽序列，以抑制 Ras 蛋白的訊息傳導路徑。由於人類乳癌細胞株 MCF-7 對於脂肪酸轉移酶抑制劑(FTIs)的敏感度最好¹⁰⁴，故我們選用了 MCF-7 來探討合成的胜肽對人類乳癌細胞抗增生的效果，除此之外也與中國醫藥大學藥物化學研究所郭盛助及黃麗嬌教授實驗室合作協助我們篩選其他細胞癌株對於 FTIs 的敏感度(表 4-5)。

利用 MTT assay 探討這十七條仿 Ras 蛋白之胜肽的抗增生效用。圖 4-35-56 為不同濃度 (0, 25, 50, 75 與 100 μ M) 之 FTI-1~FTI-17 胜肽對乳癌細胞株 MCF-7 分別處理 24 及 48 小時得到癌細胞存活率之結果。

文獻探討中 CA₁A₂X 這條序列，其中 A₁A₂ 若為脂肪族胺基酸，其抑制癌細胞增生的效果較好，於是我們將 Leu、Val 與 Ile 在 A₁A₂ 以組合胜肽庫的概念(3²=9) 設計並合成 9 條胜肽，期望篩選出抑制癌細胞增生效果最好的序列，發現由 MTT assay 結果 FTI-1~FTI-9 中，設計胜肽 FTI-1、FTI-2 與 FTI-5，不論是處理 24 小時，或是 48 小時，的抑制 MCF-7 生長的效果都較其他序列來的好，以 FTI-1、FTI-2 與 FTI-5 100 M 對 MCF-7 在 24 小時存活率分別為 85.8%、89.7%及 79.8%(表 4-3)，而 FTI-1、FTI-2 與 FTI-5 100 M 在 48 小時存活率分別為 80.5%、75.9%及 80.8%(表 4-4)。而這三條序列的共通點為其 A₂ 的位置上胺基酸皆為 Leu，於是我們設計了另一系列的胜肽，維持 A₂ 位置為 Leu 而將 A₁ 的胺基酸更換為帶負電(Glu)、帶正電(Arg)與不帶電荷(Tyr)的胺基酸，FTI-10-12 經鑑定後處理 MCF-7 在 24 小時 100 M 存活率分別為 90.8%、98.6%及 91.4%(表 4-3)，而在 48 小時分別為 84.7%、86.8%及 89.2%(表 4-4)，以 MTT assay 之結果來比較 FTI-10-12 這三條胜肽發現抑制癌細胞增生的效果比起 FTI-1~FTI-9 整體而言其抑制效力也幾乎是最低的。因此我們重新設計一新的胜肽而 FTI-13 其 A₁ 與 A₂ 位置皆為帶電荷之胺基酸(KCERS-NH₂)，於 24 小時 100 M 存活率為 97%，而在 48 小時其存活率為 99.3%，故我們由生物體外(*in vitro*)實驗證實當 A₁ 為非脂肪族胺基酸(如 Arg, Glu, Tyr)時，抑制癌細胞增生的效果則會減弱，若 A₁ 與

A₂ 同時皆非為脂肪族胺基酸時其抑制效力則會更差，此結果與文獻的標識同位素實驗測試結果相符²⁵。

雖然我們在 FTI-1~FTI-12 發現胜肽之間有不同的抑制效果，但抑制效果並無法達到 IC₅₀。我們推論所設計之胜肽沒有顯示抑制癌細胞增生之效果，也許是無法通過細胞膜進入細胞內所以就無法達到與 Ras 蛋白競爭進而抑制 FTPase 之效果。我們根據這推論挑選出兩條抑制效果較好的胜肽 FTI-1 與 FTI-2，與一條抑制效果最差的胜肽 FTI-6 接上 RGD4C 穿膜序列(CDCRGDCFC)，設計出 FTI-14-16，期望能夠提高抑制癌細胞增生的能力，並且觀察其抑制的相對效果是否與未接穿膜胜肽一致。實驗結果發現在 N 端加上 RGD4C 胺基酸序列後並沒有增加 FTI-14-16 抑制癌細胞增生的能力，反較未加 RGD4C 胺基酸序列的 FTI-1、FTI-2 及 FTI-6 還更差，可發現 FTI-14-16 處理 MCF-7 於 24 小時較 48 小時的抑制癌細胞增生效果來的好。這三條序列 FTI-14~16 請中國醫藥大學徐美華博士分別處理白血病(HL-60)、直腸癌(HCT116)、肝癌(Hep 3B)及人類非小細胞肺癌(NCI-H460)細胞株，結果發現我們所設計之序列對於大腸癌(HCT116)的細胞株的敏感度較其他細胞株來的好，以 FTI-14~16 在 100 μM 分別處理不同癌細胞株其細胞存活率平均為 80%左右(表 4-5)。

增加了穿膜序列卻不能提高胜肽抑制癌細胞增生的效果，推論可能是因為 RGD4C 的胺基酸序列與 CAAX 序列具相似度而造成酵素辨識錯誤的結果，使得抑制癌細胞增生的能力減弱。另一推論則是接上了 RGD4C 胜肽並無法穿過細胞膜而無法干擾訊息傳導。但是有趣的是，以 RGD4C 胜肽 65 μM 處理 MCF-7 在 24 小時即達到過半致死率(IC₅₀)，根據此項結果顯示，結論是增加了 RGD4C 序列於我們所設計之小胜肽並無法增進其抑制乳癌細胞增生的能力。

研究報告顯示，以 Ras 的辨識序列 CAAX 所設計之一系列胜肽其體外標識同位素實驗結果可在以極低的濃度即有抑制效果(IC₅₀<1 μM)²⁹，然而我們所設計之 FTIs 直接處理乳癌細胞株 MCF-7 抑制效果並不好，由於胜肽在體內容易受蛋白酶水解，所以我們在合成胜肽時其 C 端為經過修飾的-NH₂ 官能基，而非原

始天然胺基酸的 COO^- ，所以使其不易被水解，增加其生物性與安定性，而影響了脂肪酸轉移酶辨識受質的能力而降低了脂肪酸轉移酶抑制癌細胞增生的能力。由於 Ras 蛋白在 prenylation 後在 $\text{Cys}^{180}/\text{Cys}^{181}$ 及 Cys^{184} 的位置上會被接上棕櫚酸，使得 Ras 蛋白更容易鍵結至細胞膜上活化，因此我們推論所設計之五胜肽太短，無法在另一個 Cys 上接上棕櫚酸，故不易鍵結至細胞膜上活化。根據我們目前所知，我們這項以 FTI 胜肽研究對癌細胞的增生情形，是目前為止，唯一針對乳癌細胞的細胞活率實驗。

表 4-3 FTIs 處理 MCF-7 在不同濃度 24 小時細胞存活率

MCF-7 treated with FTIs for 24 hrs					
Cell line MCF-7	Control	25 M	50 M	75 M	100 M
FTI-1	100±0.0	93.8±1.0*	92.8±3.9*	88.9±0.7*	85.8±2.4*
FTI-2	100±0.0	97.9±1.1	95.4±1.7	90.8±2.2	89.7±2.6*
FTI-3	100±0.0	106.4±0.7*	95.9±0.8*	95.4±1.8*	90.9±1.9*
FTI-4	100±0.0	93.7±1.4*	92.9±1.8*	90.7±1.1*	90.7±1.7*
FTI-5	100±0.0	88.5±0.9*	86.1±2.5*	80.2±0.3*	79.8±2.7*
FTI-6	100±0.0	96.3±3.6	93.3±2.6*	92.7±1.3*	91.9±2.4*
FTI-7	100±0.0	102.1±0.8	98.9±3.5	92.8±1.6	90.6±1.3*
FTI-8	100±0.0	94.6±5.0*	92.9±2.4*	92.5±1.2*	89.8±4.2*
FTI-9	100±0.0	99±4.0	98.5±3.8	89.0±1.3*	92.9±2.6
FTI-10	100±0.0	96.4±1.5*	92.3±1.1*	92.5±0.3*	90.8±0.5*
FTI-11	100±0.0	102.0±5.5	100.7±0.7	100.2±4.6	98.6±2.8
FTI-12	100±0.0	105.3±4.8	103.2±4.5	92.6±2.4	91.4±2.4
FTI-13	100±0.0	97.4±1.4	98.6±1.3	98.1±0.8	97±1.7
FTI-14	100±0.0	102.9±3.3	96.9±2.5	94±3.3	93.8±2.2
FTI-15	100±0.0	96.3±3.6	94±3.4	91±3.2*	88.2±1.3*
FTI-16	100±0.0	101.3±3.7	101.7±1.7	93.6±2.9	86.6±3.9*
FTI-17	100±0.0	86.1±1.1*	60.9±4.8*	39.7±2.6*	21.9±3.8*

* Significant different at $p < 0.05$ level compared with medium control.

Data are presented as the mean \pm SD (n=3)

表 4-4 FTIs 處理 MCF-7 在不同濃度 48 小時細胞存活率

MCF-7 treated with FTIs for 48 hrs					
Cell line MCF-7	Control	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
FTI-1	100 \pm 0.0	88.2 \pm 1.6*	85.3 \pm 5.0*	83.0 \pm 4.2*	80.5 \pm 2.1*
FTI-2	100 \pm 0.0	89.6 \pm 2.1*	84.7 \pm 0.9*	82.3 \pm 1.4*	75.9 \pm 2.9*
FTI-3	100 \pm 0.0	90.2 \pm 1.7*	87.2 \pm 2.7*	83.7 \pm 0.4*	83.1 \pm 1.0*
FTI-4	100 \pm 0.0	94.3 \pm 3.4	91.9 \pm 2.3	84.7 \pm 3.7*	84.2 \pm 3.4*
FTI-5	100 \pm 0.0	87.1 \pm 3.9*	84.5 \pm 2.2*	83.5 \pm 1.0*	80.8 \pm 2.5*
FTI-6	100 \pm 0.0	87.2 \pm 2.9*	84.4 \pm 3.2*	85.5 \pm 3.5*	82.4 \pm 2.8*
FTI-7	100 \pm 0.0	94.6 \pm 2.1	88.1 \pm 2.9*	86.1 \pm 1.0*	85.3 \pm 1.1*
FTI-8	100 \pm 0.0	87.8 \pm 4.0*	86.8 \pm 0.7*	83.5 \pm 4.2*	86.6 \pm 4.5*
FTI-9	100 \pm 0.0	101.4 \pm 4.3	90.8 \pm 2.3*	86.2 \pm 1.5*	81.7 \pm 3.0*
FTI-10	100 \pm 0.0	104 \pm 5.3	104.8 \pm 3.2	91.6 \pm 0.7	84.7 \pm 3.1
FTI-11	100 \pm 0.0	99.0 \pm 7.3*	89.4 \pm 3.2*	85.6 \pm 1.4	86.8 \pm 1.6
FTI-12	100 \pm 0.0	100.5 \pm 2.0*	94.4 \pm 2.2*	92.1 \pm 1.5*	89.2 \pm 0.5
FTI-13	100 \pm 0.0	103.9 \pm 8.3	97.4 \pm 1.1	98.6 \pm 2.8	99.3 \pm 2.7
FTI-14	100 \pm 0.0	109.6 \pm 4.3	103.3 \pm 2.7	99.3 \pm 0.8	93.4 \pm 2.5
FTI-15	100 \pm 0.0	100.7 \pm 1.3	100.2 \pm 2.3	97.2 \pm 1.5	93.5 \pm 1.8*
FTI-16	100 \pm 0.0	103.9 \pm 4.5	102.4 \pm 4.4	97.4 \pm 3.1	95.5 \pm 2.1
FTI-17	100 \pm 0.0	96.6 \pm 4.1	79 \pm 2.6*	56.2 \pm 2.3*	36.9 \pm 2.6*

* Significant different at $p < 0.05$ level compared with medium control.

Data are presented as the mean \pm SD (n=3)

表4-5 FTI-14~16以不同細胞株篩選處理48小時後之細胞存活率

peptide	Conc.(uM)	MTT (%)			
		HL-60 ¹	HCT116 ²	Hep 3B ³	H460 ⁴
FTI-14	100	106.5 ± 1.9	80.9 ± 2.6	96.7 ± 1.7	98.1 ± 2.2
	IC ₅₀	> 100 M	> 100 M	> 100 M	> 100 M
FTI-15	100	103.5 ± 5.5	80.9 ± 1.4	91.1 ± 0.5	106.8 ± 2.8
	IC ₅₀	> 100 M	> 100 M	> 100 M	> 100 M
FTI-16	100	99.3 ± 0.7	81.0 ± 3.7	92.4 ± 0.9	75.4 ± 2.1
	IC ₅₀	> 100 M	> 100 M	> 100 M	> 100 M

註：¹ 白血病(HL-60, 10⁵/well)，² 直腸癌(HCT116, 10⁴/well)，³ 肝癌(Hep 3B, 10⁴/well)，⁴ 人類非小細胞肺癌(NCI-H460, 5×10³/well)

第三節 利用流式細胞儀探討設計胜肽對乳癌細胞株之細胞週期影響

細胞週期是細胞生長、分化、凋亡的循環。本實驗以設計之胜肽 FTI-1~9 處理癌細胞後對其細胞週期影響，再利用流式細胞儀技術分析結果。MCF-7 分別處理 100 μ M 之胜肽 FTI-1~9 處理 48 小時後，利用流式細胞儀分析 DNA 的組成與細胞週期停留階段。圖 4-56~4-65 為胜肽處理 MCF-7 48 小時後的結果。

此實驗之目的主要是觀察以 100 μ M 的 FTIs 處理 MCF-7 細胞後以其 sub-G1 所佔比例。由於細胞凋亡會導致細胞質濃縮及 DNA 裂解，故會出現低於 DNA 單套數的 sub-G1，因此可由 sub-G1 的數值表示細胞凋亡的情形。

實驗結果顯示流式細胞技術 sub-G1 比例占前三高的為 FTI-1、FTI-2 及 FTI-5，分別為 11.99%、14.72%及 14.51%，此結果與 MTT assay 48 小時的結果相吻合，表示 FTI-1、FTI-2 與 FTI-5 在 100 μ M 高濃度下，其對於癌細胞仍是使之走向凋亡。而 FTI-7、FTI-8 及 FTI-9，分別 sub-G1 所佔之比例相當低分別為 1.69%、0.76%及 1.88%，而其他階段所佔比例與控制組(medium control)相差無幾，但是由 MTT 分析結果發現 FTI-7、FTI-8 及 FTI-9 會使癌細胞死亡，但是由細胞週期無法看出它們使細胞死亡的原因。

第四節 以圓二色光譜探討胜肽二級結構

圓二色光譜(CD)偵測對蛋白質二級結構的變化十分靈敏，所以常被用來探討蛋白質與胜肽的二級結構，感謝本實驗室陳丘泓學長協助圓二色光譜實驗操作。附圖 4-66 與圖 4-67 為 FTI-6 (KCIIS)與 FTI-16 (CDCRGDC FCKCIIS)的 CD 圖譜。

其所含的二級結構比例整理於表 4-6 中，希望胜肽中二級結構的比例幫助解釋 MTT 分析的結果。我們使用 K2d prediction structure 分析軟體分析設計胜肽的二級結構，結果顯示 FTI-6 的 Max error 大以至於其數據不具可信度，僅可作為參考。可能是因為 FTI-6 的胺基酸序列太短故無法分析其結構，由 CD 結果推論增加了 RGD4C 胺基酸序列應該不會影響其結構。由 FTI-16 的 CD 分析結果判斷出 RGD4C 並非藉由其螺旋結構來幫助小胜肽穿過細胞膜。

表 4-6 FTI-6 與 FTI-16 所含各種二級結構的比例

Peptide	Alpha helix(%)	Beta sheet(%)	Random coil(%)	Max error
FTI-6	0.09	0.35	0.56	>0.227
FTI-16	0.09	0.36	0.55	0.122

第五章 結論

在本篇研究中，藉由細胞存活率(cell viability)及細胞週期(cell cycle)與凋亡(apoptosis)等機制，探討合成的一系列之 Ras 蛋白之胜肽片段抑制人類乳癌細胞株 MCF-7 之增生功效。

根據 MTT assay 結果，由 FTI-1~FTI-9 可發現 A₂ 的位置為 Leu 的胜肽 (FTI-1、FTI-2 及 FTI-5)對於癌細胞的抑制增生效力較其他胜肽來的好。由流式細胞儀結果觀察細胞週期觀察癌細胞凋亡之情形，發現 48 小時其 sub-G1 所佔百分比表示即使在 100 μM 高濃度下，我們所設計之胜肽 FTI-1、FTI-2 及 FTI-5 對於細胞並無毒害，可使細胞走向凋亡。然而流式細胞儀結果中 FTI-7~FTI-9 其 sub-G1 所佔比例極低，且其他階段的細胞週期亦與控制組結果相近，故雖然 FTI-7~FTI-9 可抑制癌細胞的增生，但藉由流式細胞儀我們無法由細胞週期判斷其原因。

Reiss 等人體外實驗研究，直接以設計胜肽加入標識同位素之 FPP 與脂肪酸轉移酶反應後觀察脂肪酸轉移酶的活性，發現若 A₁ 位置為帶電荷之胺基酸，則抑制脂肪酸轉移酶的效力減弱²⁹，我們根據 FTI-10~FTI-12 之細胞存活率也可証實若 A₁ 位置為帶電荷之胺基酸，則其抑制癌細胞的增生效力亦會減弱，此結果與 Reiss 等人體外實驗的研究結果具有一致性。

而由於在 FTI-1~FTI-9 即使是抑制效力最好的胜肽在 100 μM 下仍無過半致死率，決定在胜肽 N 端增加了 RGD4C 胺基酸序列，得到 FTI-13~FTI-15 中發現抑制癌細胞增生的能力比起未加 RGD4C 胺基酸序列的 FTI-1~9 還差，與 FTI-1~FTI-12 不同的是，FTI-13~FTI-15 其 24 小時的抑制效力優於 48 小時。很讓人意外的是單獨的 RGD4C 對於乳癌細胞 MCF-7 的抑制增生效力優於所有我們原始設計胜肽，此結果發現，當我們的胜肽序列加了 RGD4C 胺基序列後，抑制乳癌細胞增生的能力並沒有使我們設計之胜肽抑制的效果增加。

而由 CD 圖譜所觀察得到的結果，由 FTI-16 的 CD 分析結果判斷出 RGD4C 並非藉由其螺旋結構來幫助小胜肽穿過細胞膜。

第六章 未來展望

本實驗是根據文獻探討所設計，但是設計藥物對於抑制癌細胞生長的能力並不佳，由於文獻探討中所設計之藥物並非經由體內實驗亦或是細胞實驗來分析，而是藉由動力學或是蛋白質間的交互作用來探討其抑制效力，故有可能這系列的設計藥物都有無法穿透細胞膜之問題，因此可以將文獻中抑制效力佳的 FTIs 拿來處理細胞，觀察其是否亦具有無法穿透細胞膜的問題。

由於本實驗之設計胜肽在 100 M 高濃度下皆無過半致死率，推測有可能是因為五胜肽太短，故可仿 H-Ras 在 FTI-1、FTI-2 及 FTI-5 的 N 端接上 CMSC 仿 H-Ras 蛋白之胺基酸序列，使之序列加長且有更多的 Cys 可供棕櫚酸接上形成棕櫚酸硫醚而更為疏水性，使之更容易接在細胞膜上被活化。

亦有可能是 RGD4C 幫助穿膜能力不佳，故可將 RGD4C 胜肽替換為本實驗室已經確定有幫助穿膜之 TAT (CGRKKRRQRRRPPQC)胜肽，此結果即可排除是否 RGD4C 無法幫助設計胜肽穿過細胞膜之問題。

第七章 參考文獻

參考文獻

1. Leistikow, B., Lung cancer rates as an index of tobacco smoke exposures: validation against black male approximate non-lung cancer death rates, 1969-2000. *Prev Med* **2004**, 38, (5), 511-5.
2. Warnes, A. M., UK and western European late-age mortality: trends in cause-specific death rates, 1960-1990. *Health Place* **1999**, 5, (1), 111-8.
3. Newbold, R. R.; Jefferson, W. N.; Padilla-Burgos, E.; Bullock, B. C., Uterine carcinoma in mice treated neonatally with tamoxifen. *Carcinogenesis* **1997**, 18, (12), 2293-8.
4. Song, Y. L.; Peach, M. L.; Roller, P. P.; Qiu, S.; Wang, S.; Long, Y. Q., Discovery of a novel nonphosphorylated pentapeptide motif displaying high affinity for Grb2-SH2 domain by the utilization of 3'-substituted tyrosine derivatives. *J Med Chem* **2006**, 49, (5), 1585-96.
5. Boerner, J. L.; Danielsen, A. J.; Lovejoy, C. A.; Wang, Z.; Juneja, S. C.; Faupel-Badger, J. M.; Darce, J. R.; Maihle, N. J., Grb2 regulation of the actin-based cytoskeleton is required for ligand-independent EGF receptor-mediated oncogenesis. *Oncogene* **2003**, 22, (43), 6679-89.
6. Sawyer, T. K., Src homology-2 domains: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers* **1998**, 47, (3), 243-61.
7. McCormick, F., Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev* **1994**, 4, (1), 71-6.
8. Johnston, S. R.; Kelland, L. R., Farnesyl transferase inhibitors--a novel therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **2001**, 8, (3), 227-35.
9. Marshall, C. J., Cell signalling. Raf gets it together. *Nature* **1996**, 383, (6596), 127-8.
10. Lange-Carter, C. A.; Pleiman, C. M.; Gardner, A. M.; Blumer, K. J.; Johnson, G. L., A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* **1993**, 260, (5106), 315-9.
11. Ridley, A. J.; Hall, A., The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **1992**, 70, (3), 389-99.
12. O'Regan, R. M.; Khuri, F. R., Farnesyl transferase inhibitors: the next targeted therapies for breast cancer? *Endocr Relat Cancer* **2004**, 11, (2), 191-205.
13. Grand, R. J.; Owen, D., The biochemistry of ras p21. *Biochem J* **1991**, 279 (Pt

- 3), 609-31.
14. Harvey, J. J., An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **1964**, 204, 1104-5.
15. Kirsten, W. H.; Mayer, L. A., Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* **1967**, 39, (2), 311-35.
16. Barbacid, M., ras genes. *Annu Rev Biochem* **1987**, 56, 779-827.
17. Bos, J. L., ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **1989**, 49, (17), 4682-9.
18. Kloog, Y.; Cox, A. D., Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin Cancer Biol* **2004**, 14, (4), 253-61.
19. Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A., The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2004**, 4, (5), 361-70.
20. Clark, G. J.; Der, C. J., Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **1995**, 35, (1), 133-44.
21. Clark, G. J.; Kinch, M. S.; Gilmer, T. M.; Burridge, K.; Der, C. J., Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene* **1996**, 12, (1), 169-76.
22. Qian, Y.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D., Farnesyltransferase as a target for anticancer drug design. *Biopolymers* **1997**, 43, (1), 25-41.
23. Willingham, M. C.; Pastan, I.; Shih, T. Y.; Scolnick, E. M., Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* **1980**, 19, (4), 1005-14.
24. Shih, T. Y.; Weeks, M. O.; Gruss, P.; Dhar, R.; Oroszlan, S.; Scolnick, E. M., Identification of a precursor in the biosynthesis of the p21 transforming protein of harvey murine sarcoma virus. *J Virol* **1982**, 42, (1), 253-61.
25. Moores, S. L.; Schaber, M. D.; Mosser, S. D.; Rands, E.; O'Hara, M. B.; Garsky, V. M.; Marshall, M. S.; Pompliano, D. L.; Gibbs, J. B., Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem* **1991**, 266, (22), 14603-10.
26. Casey, P. J.; Seabra, M. C., Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **1996**, 271, (10), 5289-92.
27. Reiss, Y.; Goldstein, J. L.; Seabra, M. C.; Casey, P. J.; Brown, M. S., Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* **1990**, 62, (1), 81-8.
28. Long, S. B.; Casey, P. J.; Beese, L. S., Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. *Nature* **2002**, 419, (6907), 645-50.
29. Reiss, Y.; Stradley, S. J.; Gierasch, L. M.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L., Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21ras protein farnesyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, (3), 732-6.

30. Graham, S. L.; deSolms, S. J.; Giuliani, E. A.; Kohl, N. E.; Mosser, S. D.; Oliff, A. I.; Pompliano, D. L.; Rands, E.; Breslin, M. J.; Deana, A. A.; et al., Pseudopeptide inhibitors of Ras farnesyl-protein transferase. *J Med Chem* **1994**, *37*, (6), 725-32.
31. Kohl, N. E.; Mosser, S. D.; deSolms, S. J.; Giuliani, E. A.; Pompliano, D. L.; Graham, S. L.; Smith, R. L.; Scolnick, E. M.; Oliff, A.; Gibbs, J. B., Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* **1993**, *260*, (5116), 1934-7.
32. Wai, J. S.; Bamberger, D. L.; Fisher, T. E.; Graham, S. L.; Smith, R. L.; Gibbs, J. B.; Mosser, S. D.; Oliff, A. I.; Pompliano, D. L.; Rands, E.; et al., Synthesis and biological activity of ras farnesyl protein transferase inhibitors. Tetrapeptide analogs with amino methyl and carbon linkages. *Bioorg Med Chem* **1994**, *2*, (9), 939-47.
33. Kohl, N. E.; Wilson, F. R.; Mosser, S. D.; Giuliani, E.; deSolms, S. J.; Conner, M. W.; Anthony, N. J.; Holtz, W. J.; Gomez, R. P.; Lee, T. J.; et al., Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, (19), 9141-5.
34. Kohl, N. E.; Omer, C. A.; Conner, M. W.; Anthony, N. J.; Davide, J. P.; deSolms, S. J.; Giuliani, E. A.; Gomez, R. P.; Graham, S. L.; Hamilton, K.; et al., Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med* **1995**, *1*, (8), 792-7.
35. deSolms, S. J.; Deana, A. A.; Giuliani, E. A.; Graham, S. L.; Kohl, N. E.; Mosser, S. D.; Oliff, A. I.; Pompliano, D. L.; Rands, E.; Scholz, T. H.; et al., Pseudodipeptide inhibitors of protein farnesyltransferase. *J Med Chem* **1995**, *38*, (20), 3967-71.
36. Williams, T. M.; Ciccarone, T. M.; MacTough, S. C.; Bock, R. L.; Conner, M. W.; Davide, J. P.; Hamilton, K.; Koblan, K. S.; Kohl, N. E.; Kral, A. M.; Mosser, S. D.; Omer, C. A.; Pompliano, D. L.; Rands, E.; Schaber, M. D.; Shah, D.; Wilson, F. R.; Gibbs, J. B.; Graham, S. L.; Hartman, G. D.; Oliff, A. I.; Smith, R. L., 2-substituted piperazines as constrained amino acids. Application to the synthesis of potent, non carboxylic acid inhibitors of farnesyltransferase. *J Med Chem* **1996**, *39*, (7), 1345-8.
37. Nigam, M.; Seong, C. M.; Qian, Y.; Hamilton, A. D.; Sebti, S. M., Potent inhibition of human tumor p21ras farnesyltransferase by A1A2-lacking p21ras CA1A2X peptidomimetics. *J Biol Chem* **1993**, *268*, (28), 20695-8.
38. Qian, Y.; Blaskovich, M. A.; Saleem, M.; Seong, C. M.; Wathen, S. P.; Hamilton, A. D.; Sebti, S. M., Design and structural requirements of potent peptidomimetic inhibitors of p21ras farnesyltransferase. *J Biol Chem* **1994**, *269*, (17), 12410-3.
39. McGuire, T. F.; Qian, Y.; Blaskovich, M. A.; Fossum, R. D.; Sun, J.; Marlowe, T.; Corey, S. J.; Wathen, S. P.; Vogt, A.; Hamilton, A. D.; et al., CAAX peptidomimetic FTI-244 decreases platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation levels and inhibits stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not

- mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, 214, (1), 295-303.
40. Kauffmann, R. C.; Qian, Y.; Vogt, A.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D.; Carthew, R. W., Activated Drosophila Ras1 is selectively suppressed by isoprenyl transferase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, (24), 10919-23.
41. Lerner, E. C.; Qian, Y.; Blaskovich, M. A.; Fossum, R. D.; Vogt, A.; Sun, J.; Cox, A. D.; Der, C. J.; Hamilton, A. D.; Sebti, S. M., Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* **1995**, 270, (45), 26802-6.
42. Hunt, J. T.; Lee, V. G.; Leftheris, K.; Seizinger, B.; Carboni, J.; Mabus, J.; Ricca, C.; Yan, N.; Manne, V., Potent, cell active, non-thiol tetrapeptide inhibitors of farnesyltransferase. *J Med Chem* **1996**, 39, (2), 353-8.
43. Leonard, D. M.; Shuler, K. R.; Poulter, C. J.; Eaton, S. R.; Sawyer, T. K.; Hodges, J. C.; Su, T. Z.; Scholten, J. D.; Gowan, R. C.; Sebolt-Leopold, J. S.; Doherty, A. M., Structure-activity relationships of cysteine-lacking pentapeptide derivatives that inhibit ras farnesyltransferase. *J Med Chem* **1997**, 40, (2), 192-200.
44. Bishop, W. R.; Bond, R.; Petrin, J.; Wang, L.; Patton, R.; Doll, R.; Njoroge, G.; Catino, J.; Schwartz, J.; Windsor, W.; et al., Novel tricyclic inhibitors of farnesyl protein transferase. Biochemical characterization and inhibition of Ras modification in transfected Cos cells. *J Biol Chem* **1995**, 270, (51), 30611-8.
45. James, G. L.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Rawson, T. E.; Somers, T. C.; McDowell, R. S.; Crowley, C. W.; Lucas, B. K.; Levinson, A. D.; Marsters, J. C., Jr., Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells. *Science* **1993**, 260, (5116), 1937-42.
46. Pompliano, D. L.; Rands, E.; Schaber, M. D.; Mosser, S. D.; Anthony, N. J.; Gibbs, J. B., Steady-state kinetic mechanism of Ras farnesyl:protein transferase. *Biochemistry* **1992**, 31, (15), 3800-7.
47. Gibbs, J. B.; Pompliano, D. L.; Mosser, S. D.; Rands, E.; Lingham, R. B.; Singh, S. B.; Scolnick, E. M.; Kohl, N. E.; Oliff, A., Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks ras processing in vivo. *J Biol Chem* **1993**, 268, (11), 7617-20.
48. Patel, D. V.; Schmidt, R. J.; Biller, S. A.; Gordon, E. M.; Robinson, S. S.; Manne, V., Farnesyl diphosphate-based inhibitors of Ras farnesyl protein transferase. *J Med Chem* **1995**, 38, (15), 2906-21.
49. Patel, D. V.; Gordon, E. M.; Schmidt, R. J.; Weller, H. N.; Young, M. G.; Zahler, R.; Barbacid, M.; Carboni, J. M.; Gullo-Brown, J. L.; Hunihan, L.; et al., Phosphinyl acid-based bisubstrate analog inhibitors of Ras farnesyl protein transferase. *J Med Chem* **1995**, 38, (3), 435-42.
50. Sidebottom, P. J.; Highcock, R. M.; Lane, S. J.; Procopiou, P. A.; Watson, N. S.,

- The squalenestatsins, novel inhibitors of squalene synthase produced by a species of *Phoma*. II. Structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **1992**, 45, (5), 648-58.
51. Hara, M.; Akasaka, K.; Akinaga, S.; Okabe, M.; Nakano, H.; Gomez, R.; Wood, D.; Uh, M.; Tamanoi, F., Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, (6), 2281-5.
52. Van der Pyl, D.; Inokoshi, J.; Shiomi, K.; Yang, H.; Takeshima, H.; Omura, S., Inhibition of farnesyl-protein transferase by gliotoxin and acetylgliotoxin. *J Antibiot (Tokyo)* **1992**, 45, (11), 1802-5.
53. Liu, W. C.; Barbacid, M.; Bulgar, M.; Clark, J. M.; Crosswell, A. R.; Dean, L.; Doyle, T. W.; Fernandes, P. B.; Huang, S.; Manne, V.; et al., 10'-Desmethoxystreptonigrin, a novel analog of streptonigrin. *J Antibiot (Tokyo)* **1992**, 45, (4), 454-7.
54. Ruoslahti, E., Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res* **1999**, 76, 1-20.
55. Hynes, R. O., A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* **2002**, 8, (9), 918-21.
56. Dunehoo, A. L.; Anderson, M.; Majumdar, S.; Kobayashi, N.; Berkland, C.; Siahaan, T. J., Cell adhesion molecules for targeted drug delivery. *J Pharm Sci* **2006**, 95, (9), 1856-72.
57. Triantafilou, K.; Takada, Y.; Triantafilou, M., Mechanisms of integrin-mediated virus attachment and internalization process. *Crit Rev Immunol* **2001**, 21, (4), 311-22.
58. Nemerow, G. R.; Stewart, P. L., Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* **1999**, 63, (3), 725-34.
59. Hong, R. L.; Huang, C. J.; Tseng, Y. L.; Pang, V. F.; Chen, S. T.; Liu, J. J.; Chang, F. H., Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? *Clin Cancer Res* **1999**, 5, (11), 3645-52.
60. Sengupta, A.; Wu, Q.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Singh, T. J., Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* **1997**, 167, (1-2), 99-105.
61. Schiffelers, R. M.; Koning, G. A.; ten Hagen, T. L.; Fens, M. H.; Schraa, A. J.; Janssen, A. P.; Kok, R. J.; Molema, G.; Storm, G., Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J Control Release* **2003**, 91, (1-2), 115-22.
62. Pavalko, F. M.; Otey, C. A., Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton. *Proc Soc Exp Biol Med* **1994**, 205, (4), 282-93.
63. Turowski, P.; Adamson, P.; Greenwood, J., Pharmacological targeting of

ICAM-1 signaling in brain endothelial cells: potential for treating neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* **2005**, 25, (1), 153-70.

64. Haass, N. K.; Smalley, K. S.; Li, L.; Herlyn, M., Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* **2005**, 18, (3), 150-9.

65. Ruoslahti, E., Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2, (2), 83-90.

66. Christofori, G., Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *Embo J* **2003**, 22, (10), 2318-23.

67. Maaser, K.; Wolf, K.; Klein, C. E.; Niggemann, B.; Zanker, K. S.; Brocker, E. B.; Friedl, P., Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell* **1999**, 10, (10), 3067-79.

68. Brooks, G., The role of 80K/MARCKS, a specific substrate of protein kinase C, in cell growth and tumour progression. *Pigment Cell Res* **1994**, 7, (6), 451-7.

69. Ruoslahti, E., Vascular zip codes in angiogenesis and metastasis. *Biochem Soc Trans* **2004**, 32, (Pt3), 397-402.

70. Pancioli, A. M.; Brott, T. G., Therapeutic potential of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in acute ischaemic stroke: scientific rationale and available evidence. *CNS Drugs* **2004**, 18, (14), 981-8.

71. Andrews, R. K.; Berndt, M. C., Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* **2004**, 114, (5-6), 447-53.

72. Gibbins, J. M., Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* **2004**, 117, (Pt 16), 3415-25.

73. Pei, Z.; Larsson, R.; Aastrup, T.; Anderson, H.; Lehn, J. M.; Ramstrom, O., Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for rapid identification of glycosyldisulfide lectin inhibitors from a dynamic combinatorial library. *Biosens Bioelectron* **2006**, 22, (1), 42-8.

74. Yusuf-Makagiansar, H.; Anderson, M. E.; Yakovleva, T. V.; Murray, J. S.; Siahaan, T. J., Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* **2002**, 22, (2), 146-67.

75. Shimaoka, M.; Springer, T. A., Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the beta2 integrins. *Curr Top Med Chem* **2004**, 4, (14), 1485-95.

76. Lindgren, M.; Rosenthal-Aizman, K.; Saar, K.; Eiriksdottir, E.; Jiang, Y.; Sassian, M.; Ostlund, P.; Hallbrink, M.; Langel, U., Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem*

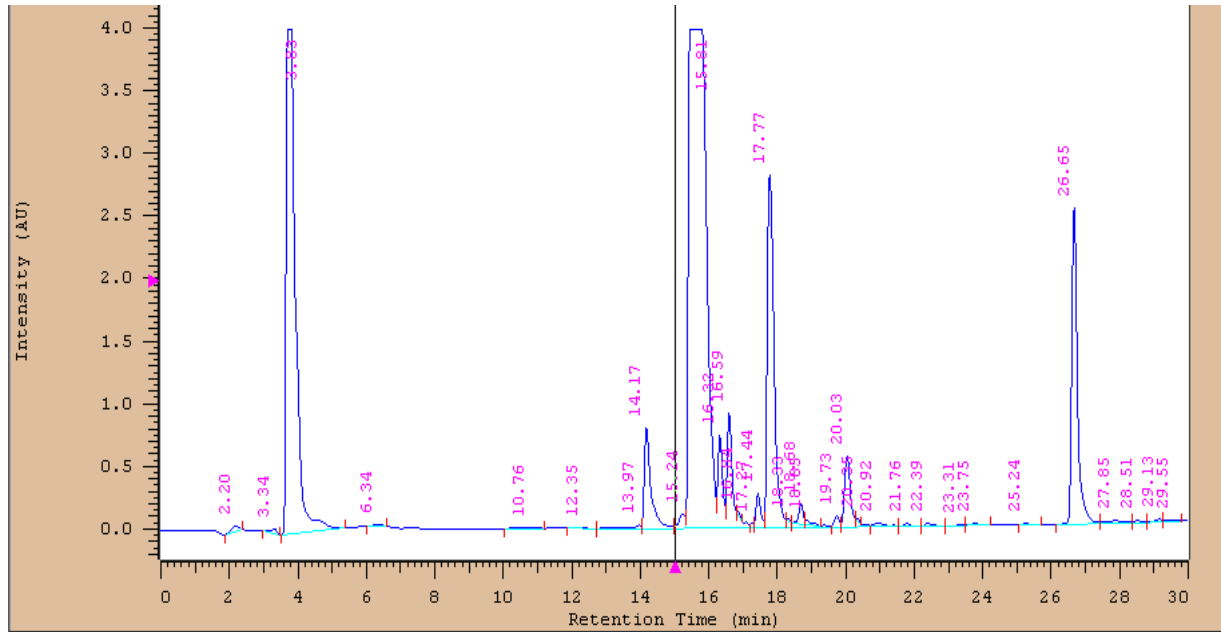
Pharmacol **2006**, 71, (4), 416-25.

77. de Groot, F. M.; Broxterman, H. J.; Adams, H. P.; van Vliet, A.; Tesser, G. I.; Elderkamp, Y. W.; Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Molema, G.; Pinedo, H. M.; Scheeren, H. W., Design, synthesis, and biological evaluation of a dual tumor-specific motive containing integrin-targeted plasmin-cleavable doxorubicin prodrug. *Mol Cancer Ther* **2002**, 1, (11), 901-11.
78. Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **1998**, 279, (5349), 377-80.
79. Shah, M. A.; Schwartz, G. K., Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* **2001**, 7, (8), 2168-81.
80. Ho, A.; Dowdy, S. F., Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* **2002**, 12, (1), 47-52.
81. Herrup, K.; Yang, Y., Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* **2007**, 8, (5), 368-78.
82. Tyson, J. J.; Novak, B.; Odell, G. M.; Chen, K.; Thron, C. D., Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *Trends Biochem Sci* **1996**, 21, (3), 89-96.
83. Medema, R. H.; Herrera, R. E.; Lam, F.; Weinberg, R. A., Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, (14), 6289-93.
84. Fadeel, B.; Orrenius, S., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* **2005**, 258, (6), 479-517.
85. Nunez, G.; Benedict, M. A.; Hu, Y.; Inohara, N., Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **1998**, 17, (25), 3237-45.
86. Hengartner, M. O., The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**, 407, (6805), 770-6.
87. Stacey, N. H.; Bishop, C. J.; Halliday, J. W.; Halliday, W. J.; Cooksley, W. G.; Powell, L. W.; Kerr, J. F., Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity. *J Cell Sci* **1985**, 74, 169-79.
88. Searle, J.; Kerr, J. F.; Bishop, C. J., Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* **1982**, 17 Pt 2, 229-59.
89. Nicotera, P.; Leist, M.; Ferrando-May, E., Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* **1999**, 66, 69-73.
90. Matsuda, H.; Strebel, F. R.; Kaneko, T.; Stephens, L. C.; Danhauser, L. L.; Jenkins, G. N.; Toyota, N.; Bull, J. M., Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Res* **1996**, 16, (3A), 1117-21.
91. Zhang, J.; Lee, H.; Lou, D. W.; Bovin, G. P.; Xu, M., Lack of obvious 50 kilobase pair DNA fragments in DNA fragmentation factor 45-deficient thymocytes

- upon activation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, 274, (1), 225-9.
92. Kameda, K.; Kondo, T.; Tanabe, K.; Zhao, Q. L.; Seto, H., The role of intracellular Ca(2+) in apoptosis induced by hyperthermia and its enhancement by verapamil in U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2001**, 49, (5), 1369-79.
93. Kelly, S. M.; Price, N. C., The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta* **1997**, 1338, (2), 161-85.
94. Hirst, J. D., Colella, K. Andrew T. B., Electronic Circular Dichroism of Proteins from First-Principles Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, (42).
95. Greenfield, N. J., Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem* **1996**, 235, (1), 1-10.
96. Reed, J.; Reed, T. A., A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* **1997**, 254, (1), 36-40.
97. Greenfield, N. J., Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *TrAC* **1999**, 18, 236-244.
98. Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154.
99. Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Makofske, R. C.; Chang, C. D., Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethoxycarbonylamino acids. *Int J Pept Protein Res* **1979**, 13, (1), 35-42.
100. Saceda, M.; Grunt, T. W.; Colomer, R.; Lippman, M. E.; Lupu, R.; Martin, M. B., Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology* **1996**, 137, (10), 4322-30.
101. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, 65, (1-2), 55-63.
102. Darzynkiewicz, Z.; Bruno, S.; Del Bino, G.; Gorczyca, W.; Hotz, M. A.; Lassota, P.; Traganos, F., Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **1992**, 13, (8), 795-808.
103. Sauer, T. K., Wang, J. C., Puglisi, J. D., Principles and Applications in Biological Sciences. *Physical Chemistry Fourth Edition. Prentice Hall* **2001**.
104. Moasser, M. M.; Rosen, N., The use of molecular markers in farnesyltransferase inhibitor (FTI) therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2002**, 73, (2), 135-44.

附件

(a)



(b)

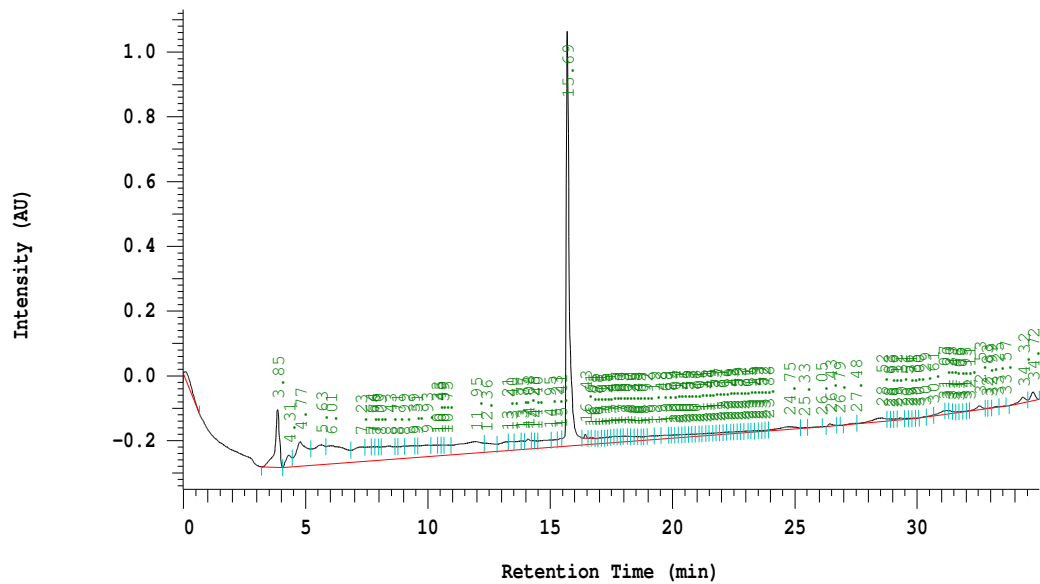


圖 1 (a)合成 FTI-1 胜肽之粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b) 合成 FTI-1 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.69 分鐘

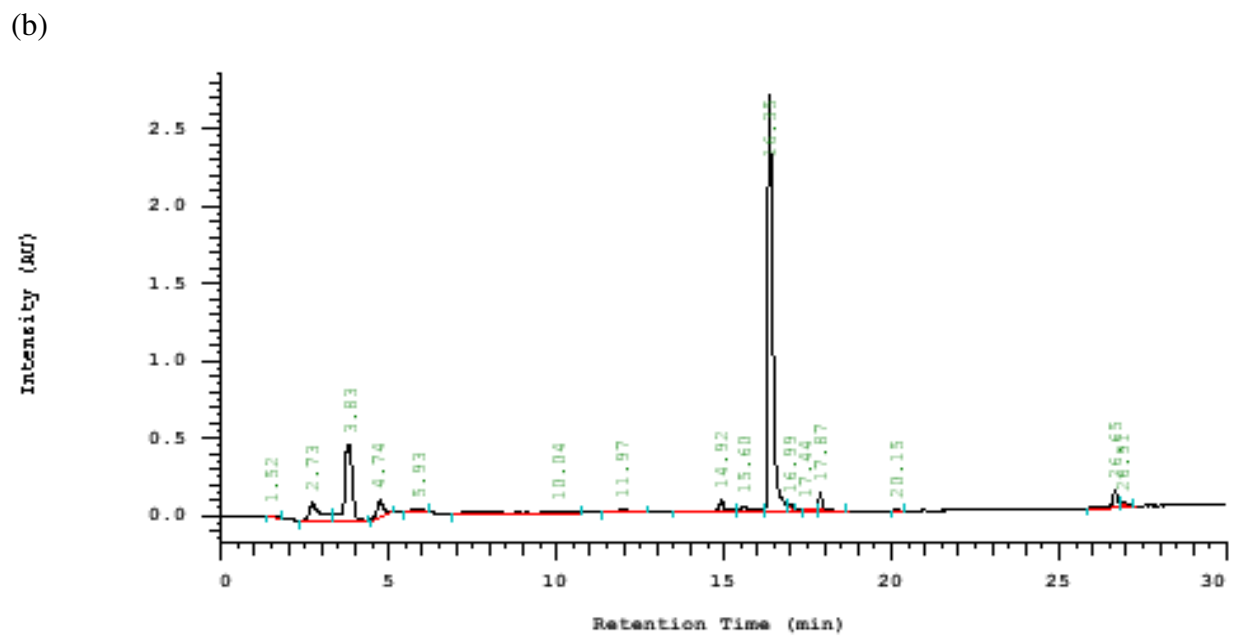
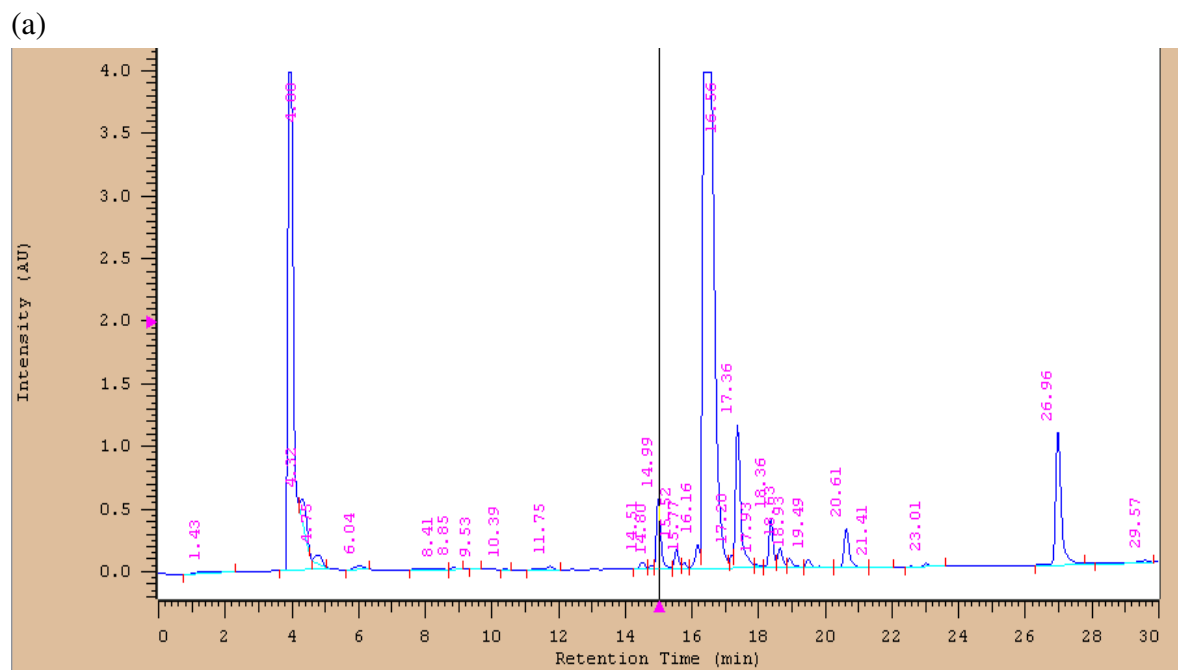
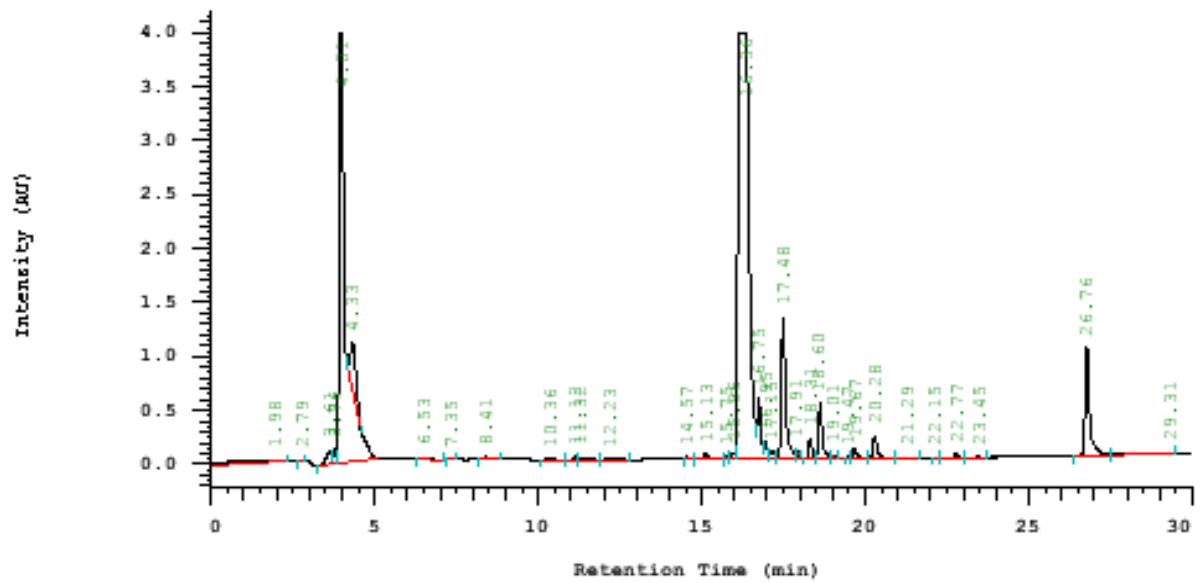


圖 2 (a)合成 FTI-2 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b) 合成 FTI-2 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 16.36 分鐘

(a)



(b)

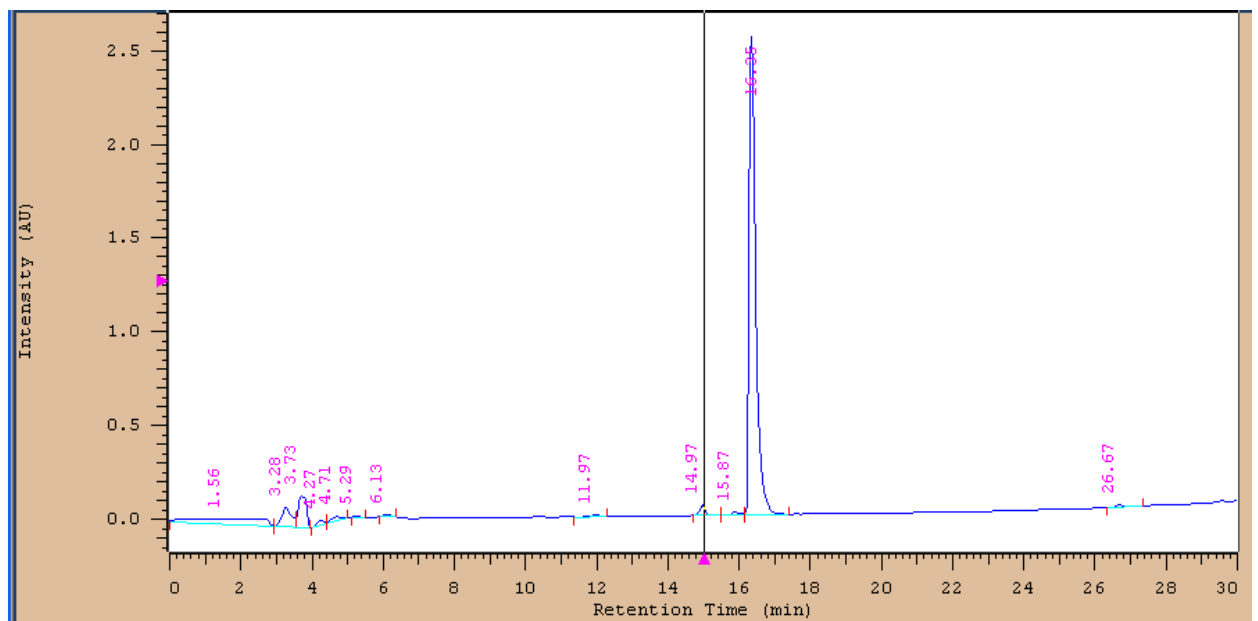


圖 3 (a)合成 FTI-3 之胜肽粗(混合物)產物之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-3 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 16.06 分鐘

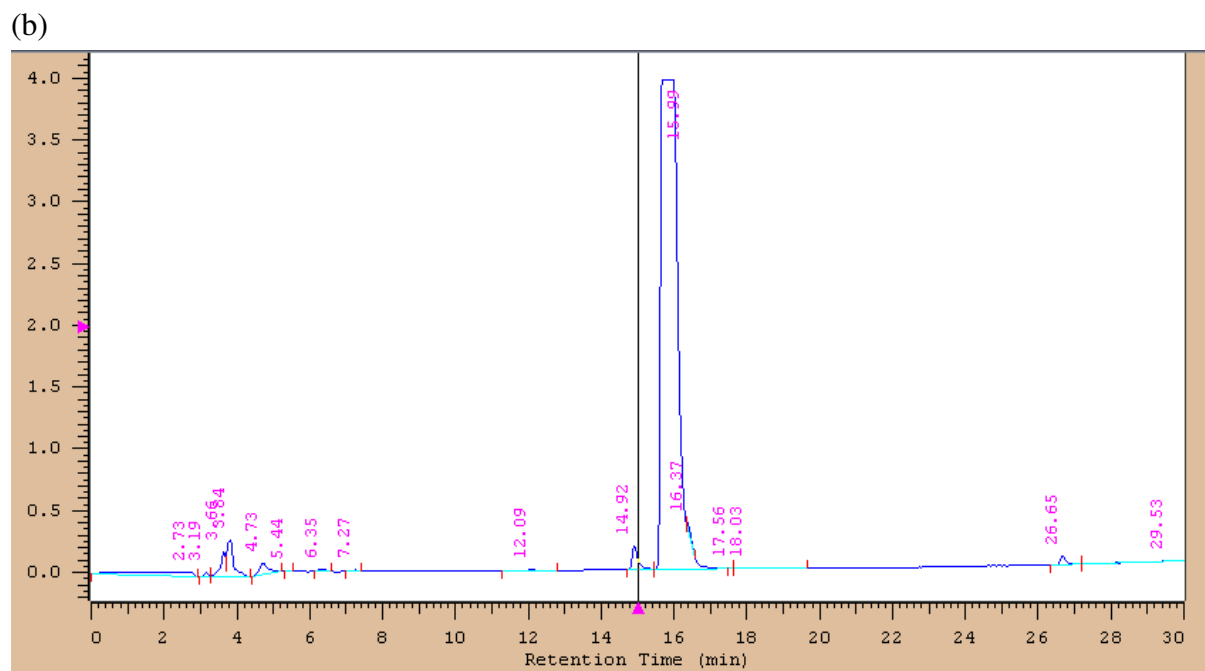
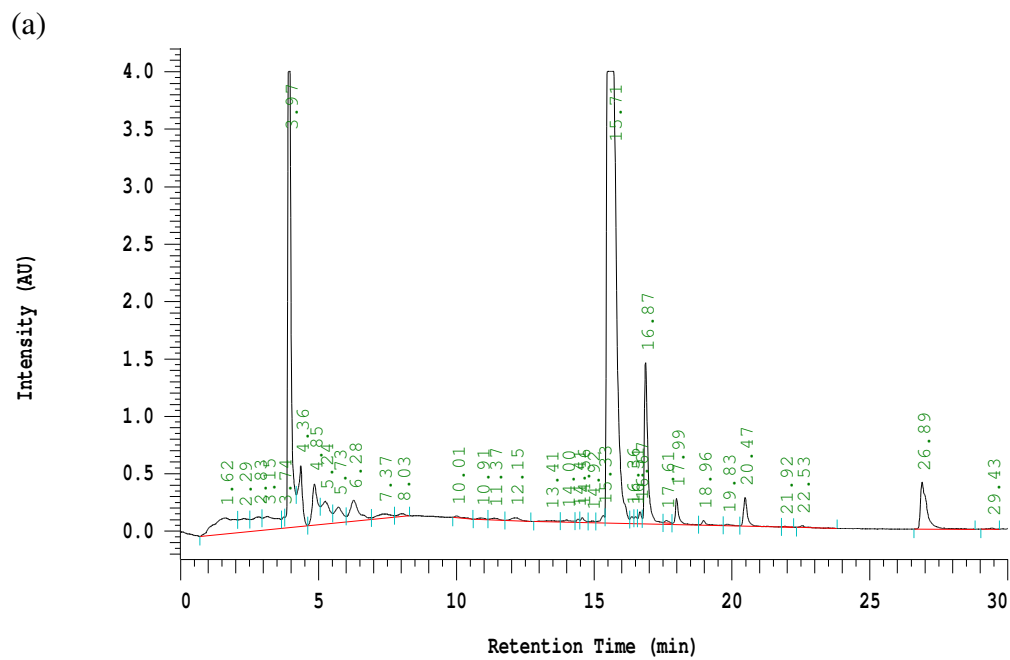


圖 4 (a)合成 FTI-4 胜肽之粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-4 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.99 分鐘

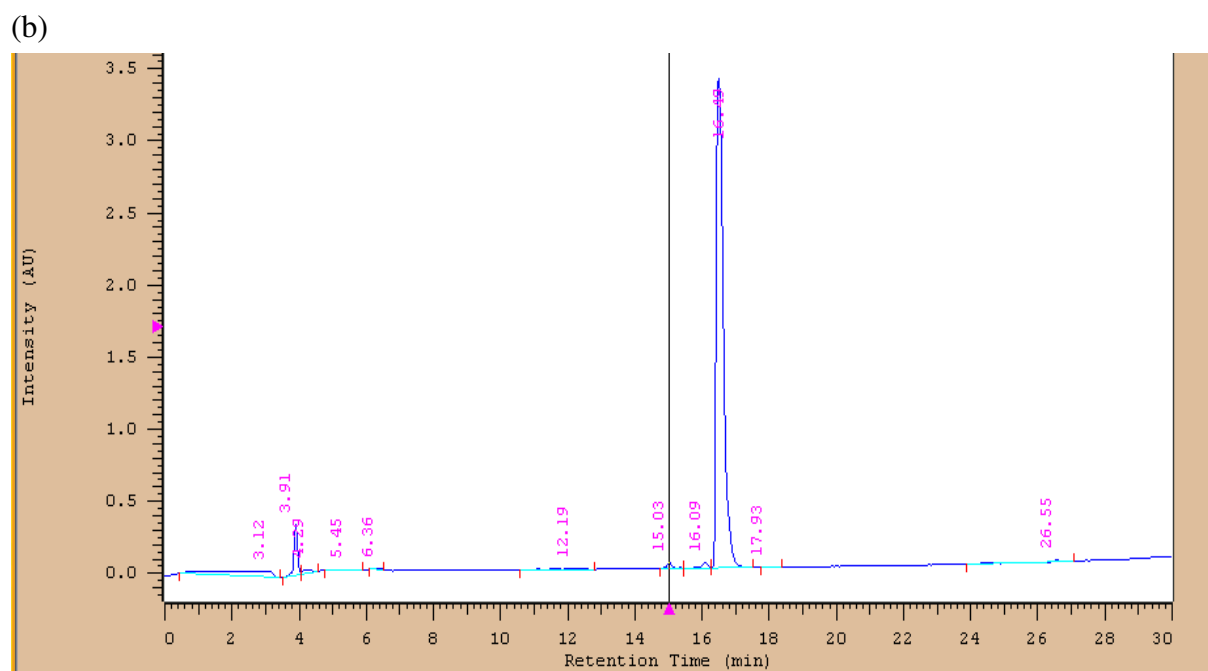
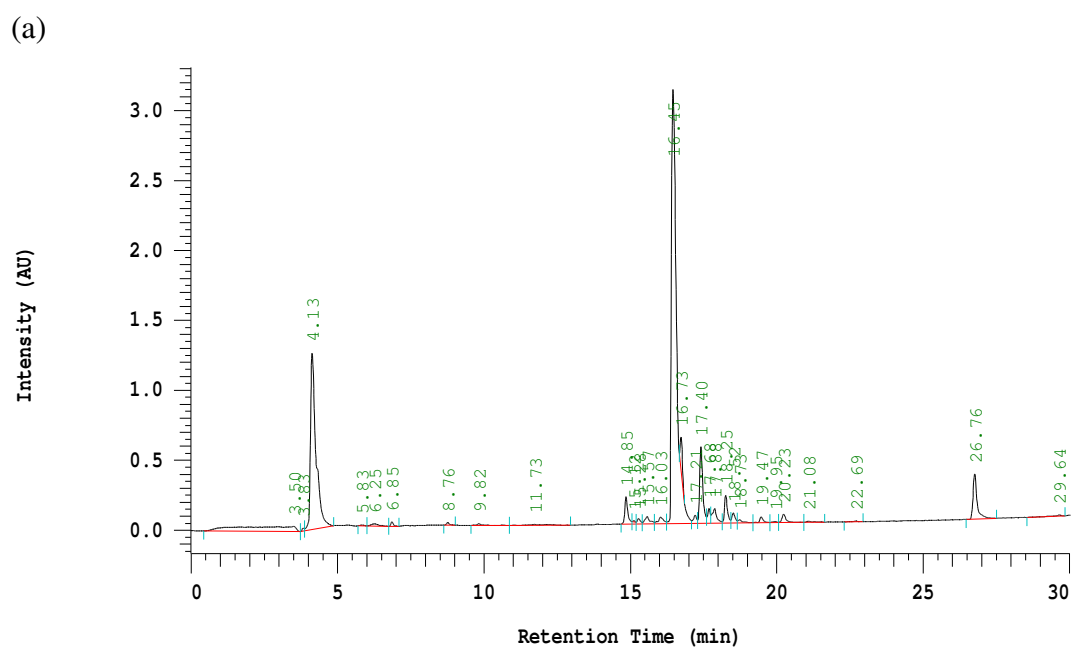
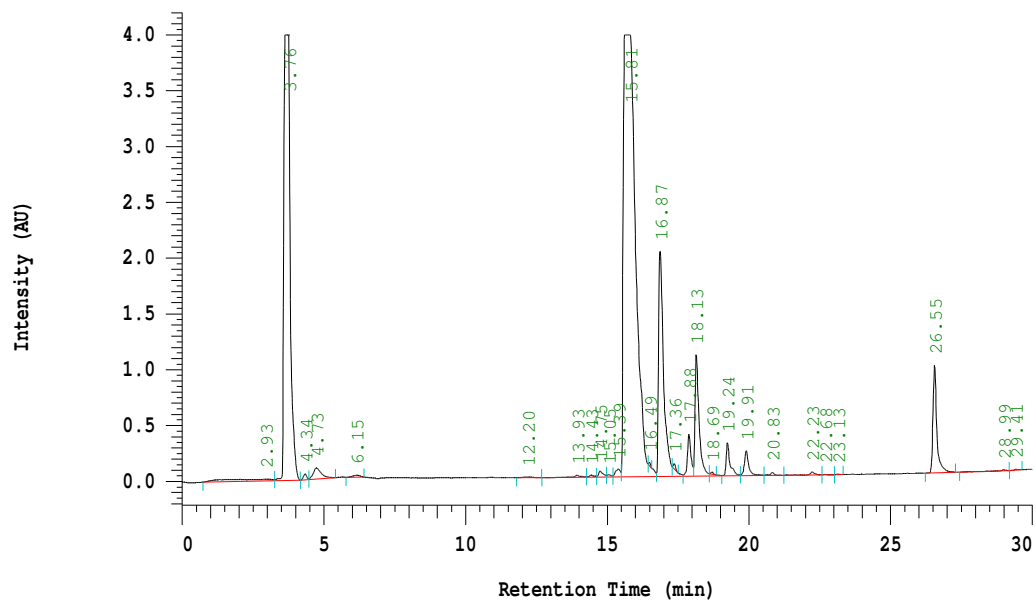


圖 5 (a)合成 FTI-5 胜肽之粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-5 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 16.49 分鐘

(a)



(b)

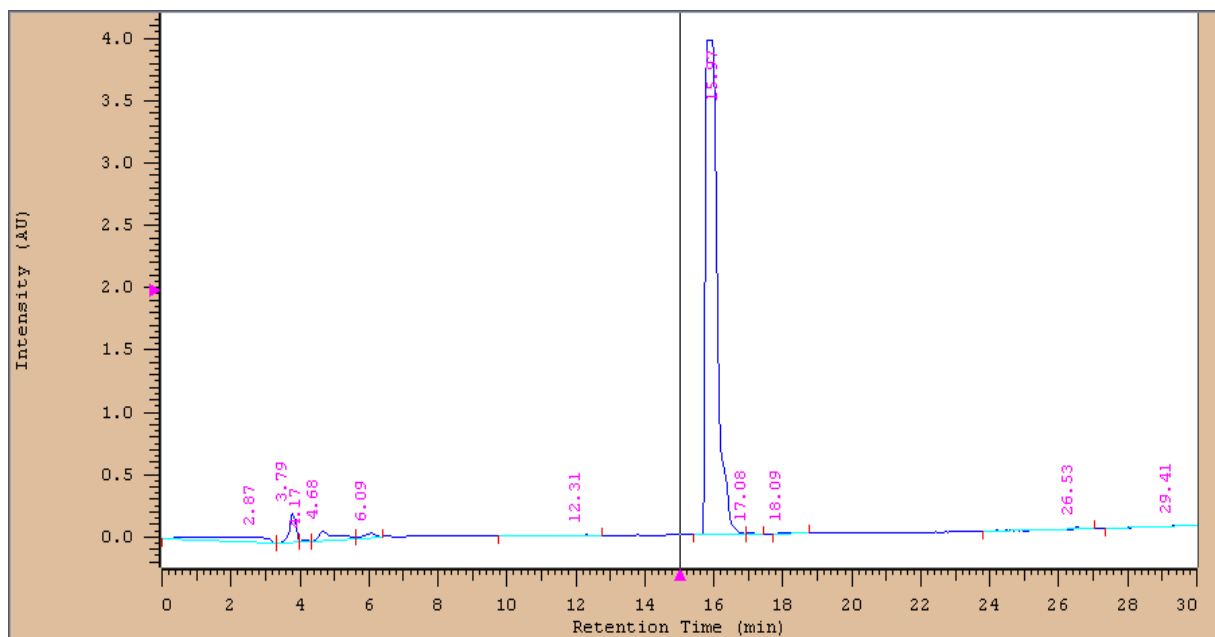
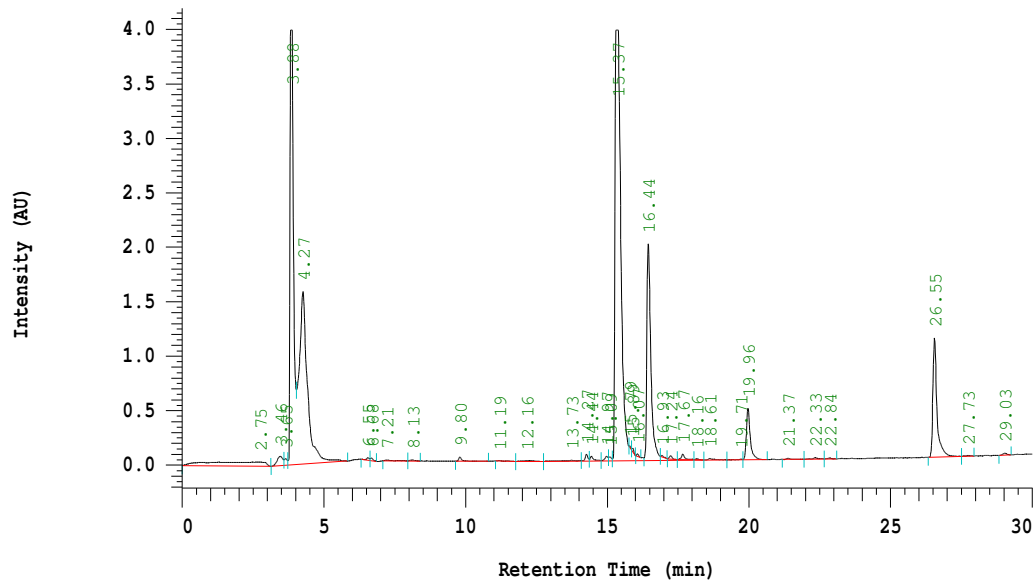


圖 6 (a)合成 FTI-6 胜肽之粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-6 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.97 分鐘

(a)



(b)

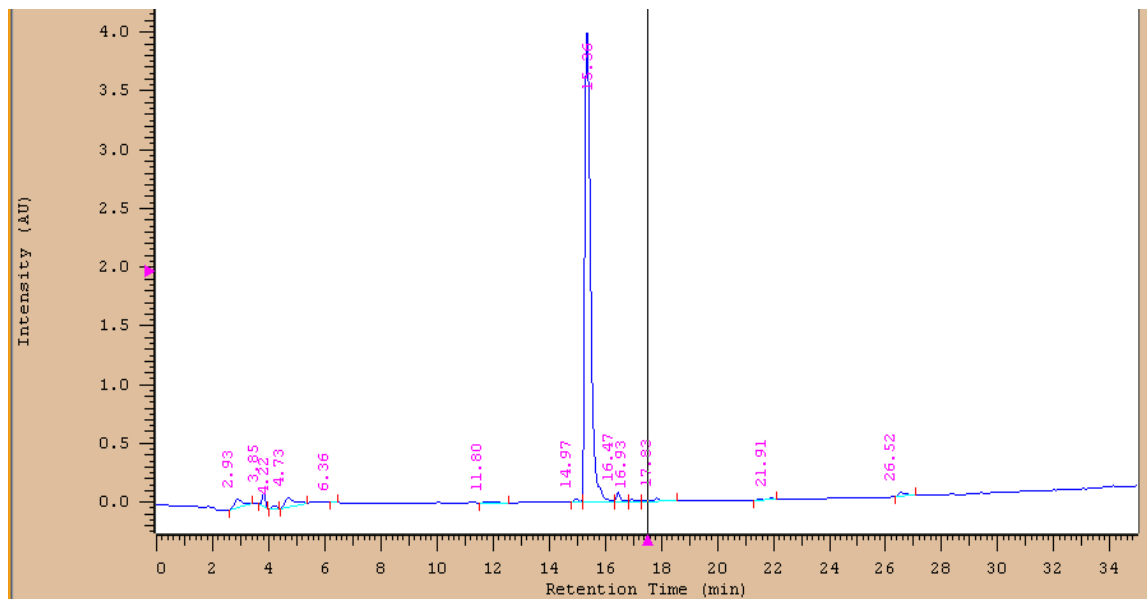


圖 7 (a)合成 FTI-7 胜肽之粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-7 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.06 分鐘

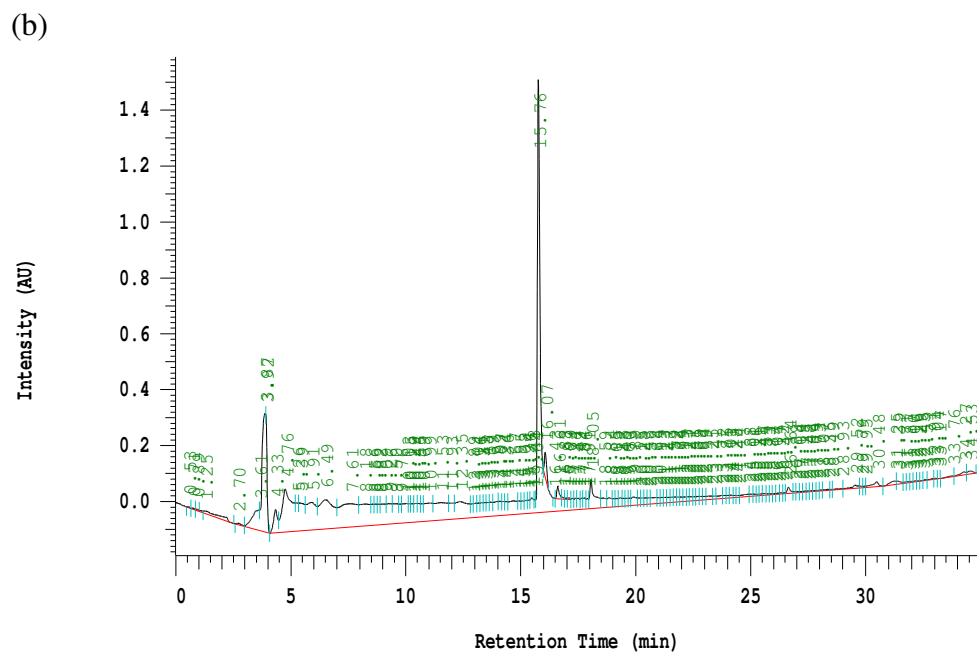
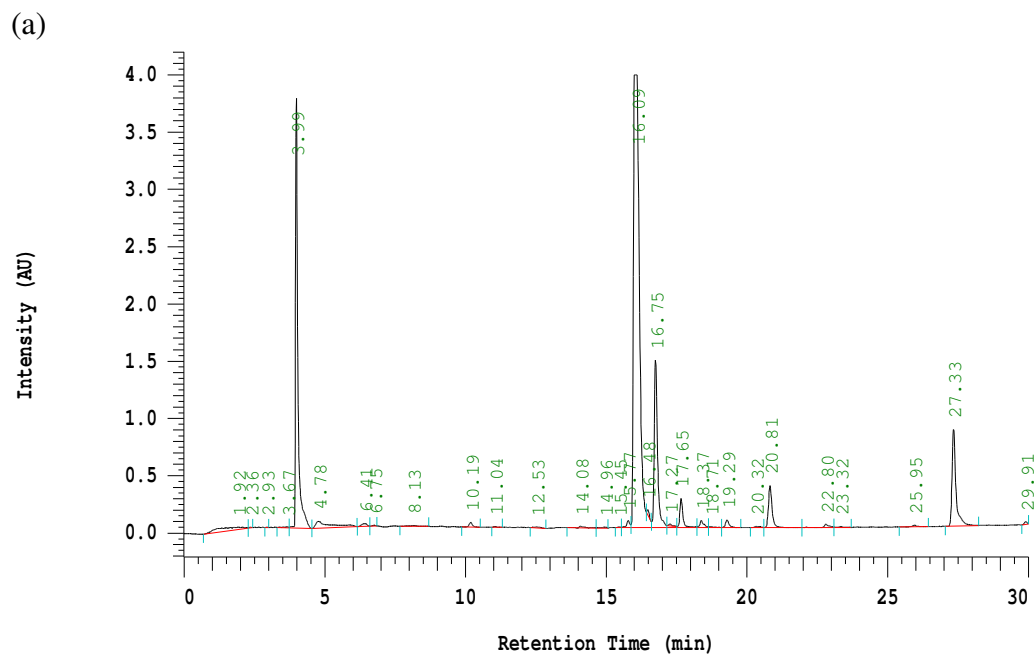
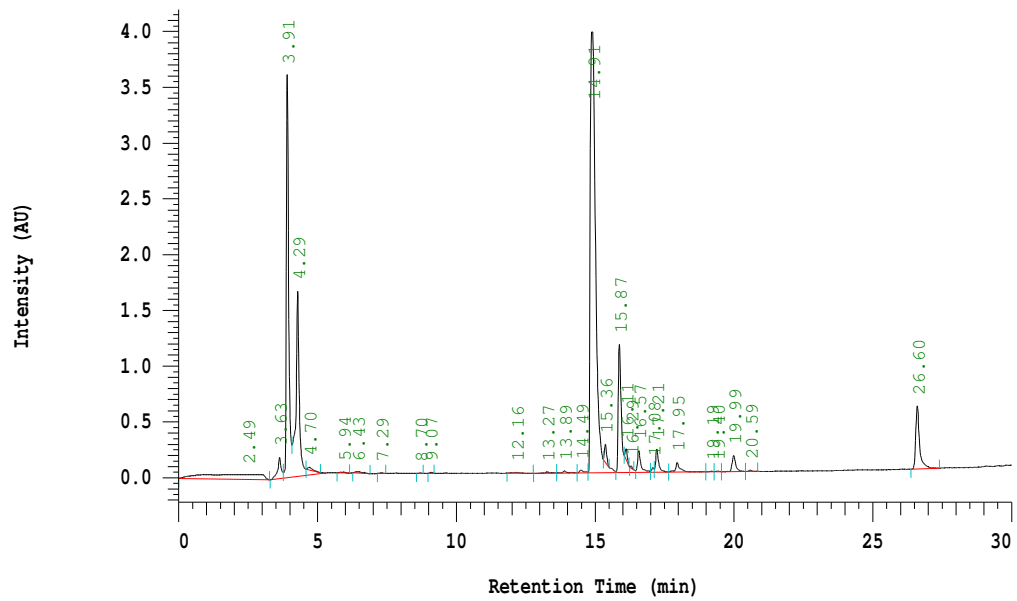


圖 8 (a)合成 FTI-8 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b) 合成 FTI-8 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.76 分鐘

(a)



(b)

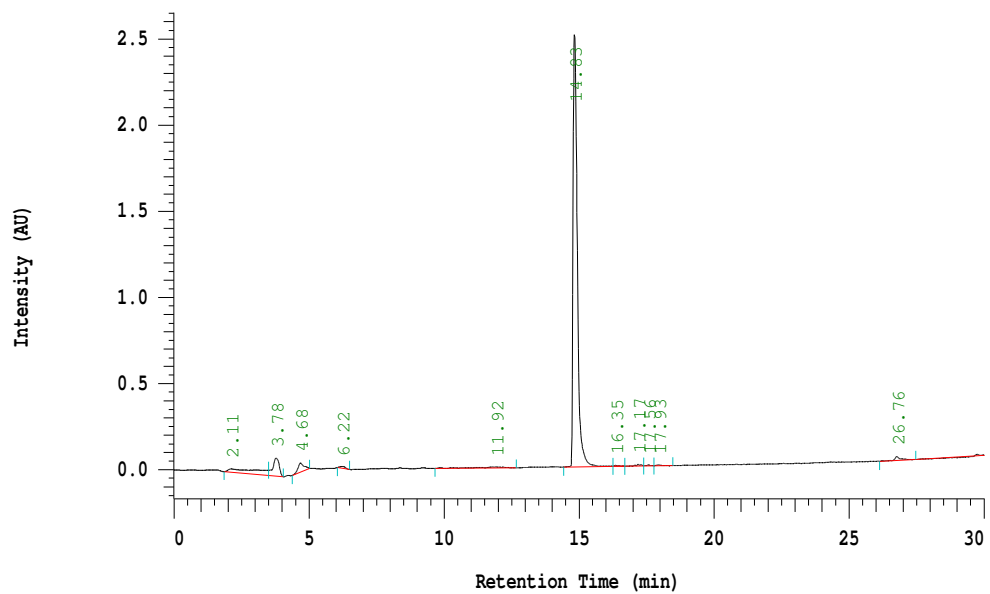


圖 9 (a)合成 FTI-9 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-9 胜肽純化後之主要產物 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 14.83 分鐘

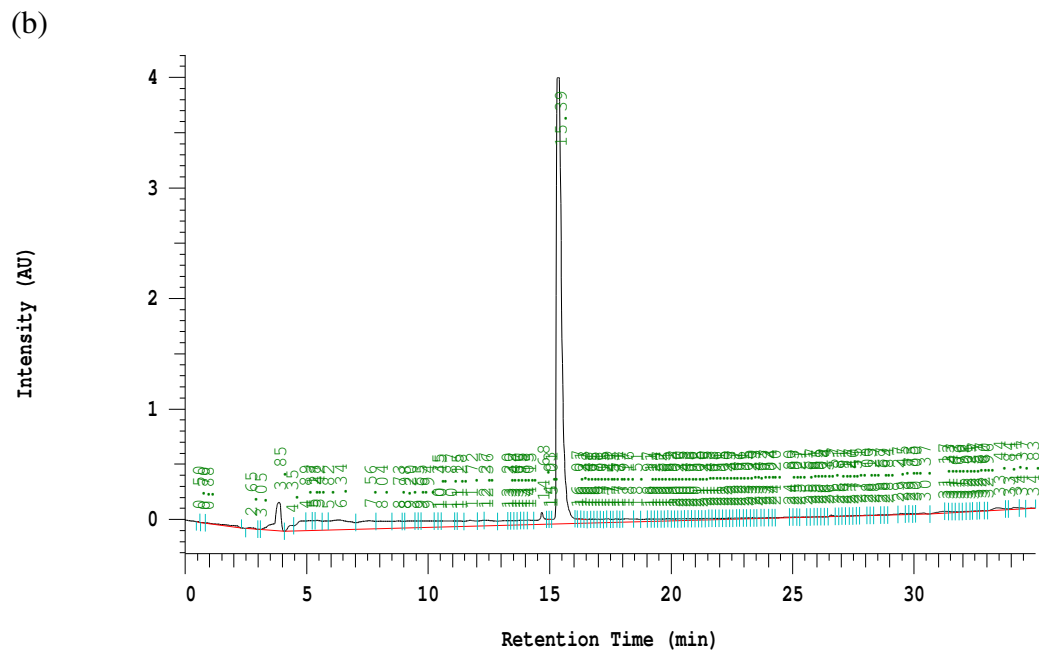
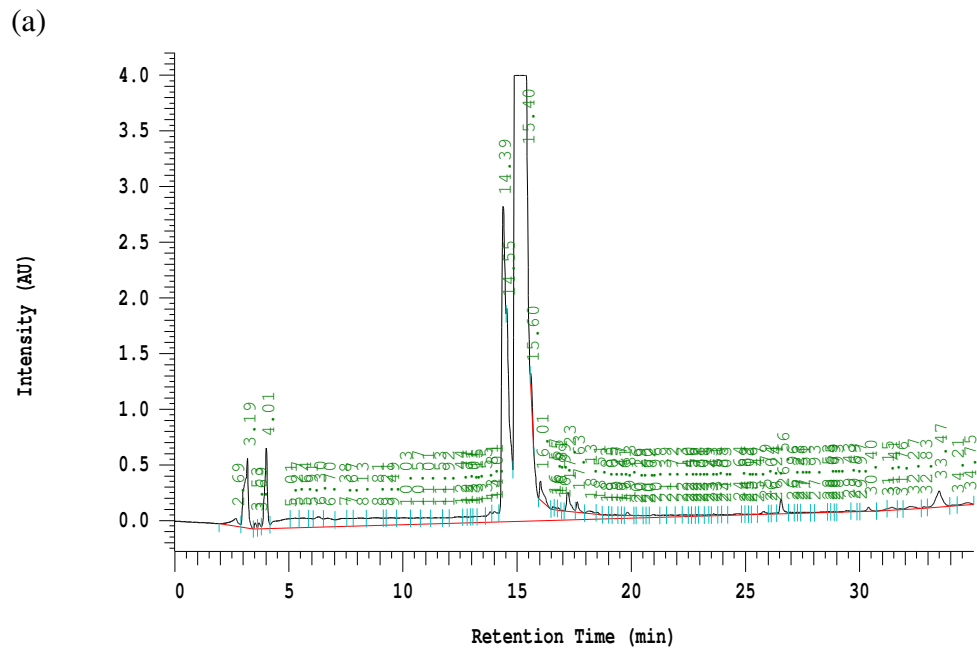


圖 10 (a)合成 FTI-10 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b) FTI-10 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.39 分鐘

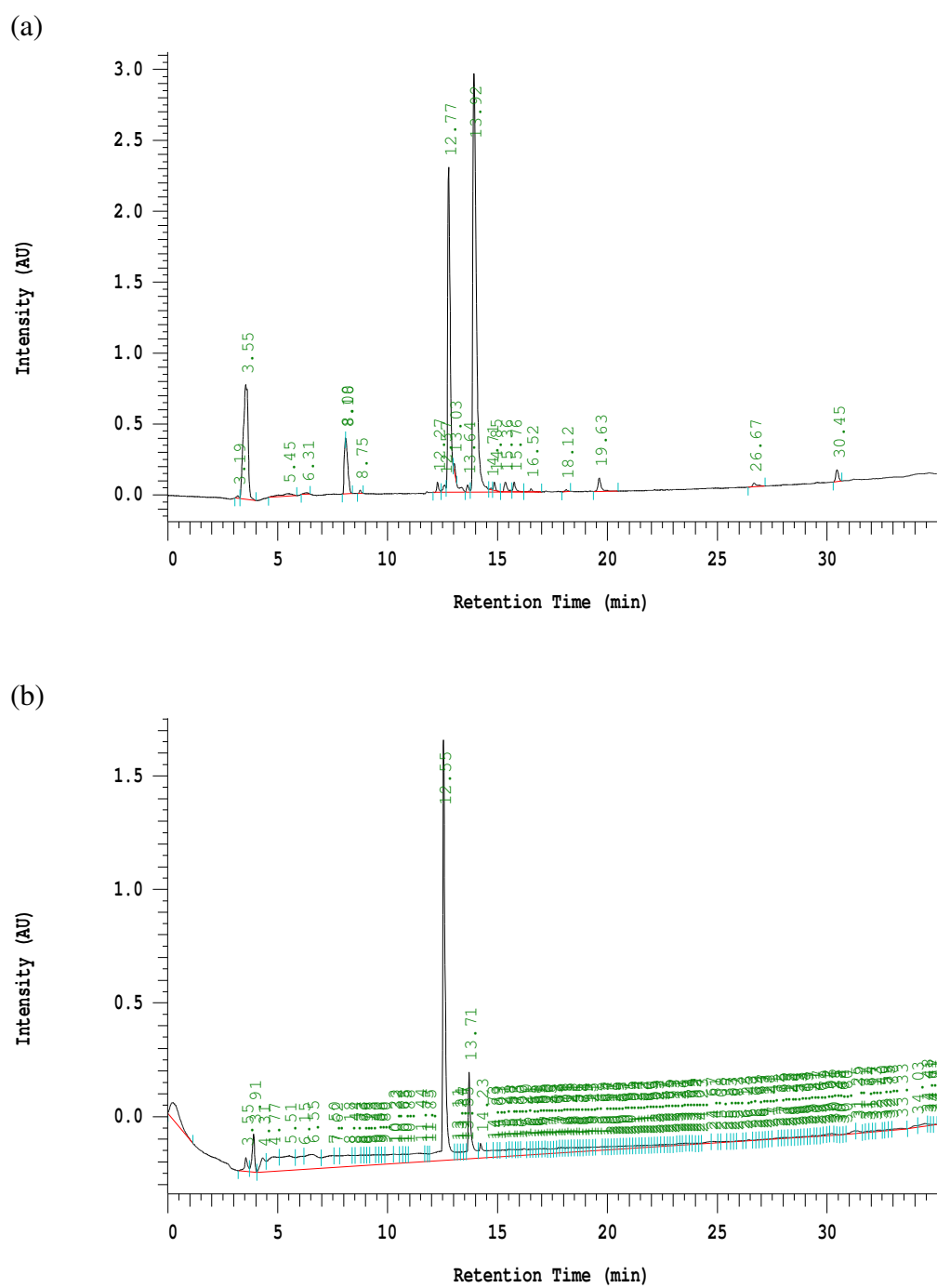


圖 11 (a)合成 FTI-11 之粗產物(混合物)之 HPLC 層析圖(b)合成 FTI-11 純化後主要產物之 HPLC 層析圖，其滯留時間為 12.55 分鐘

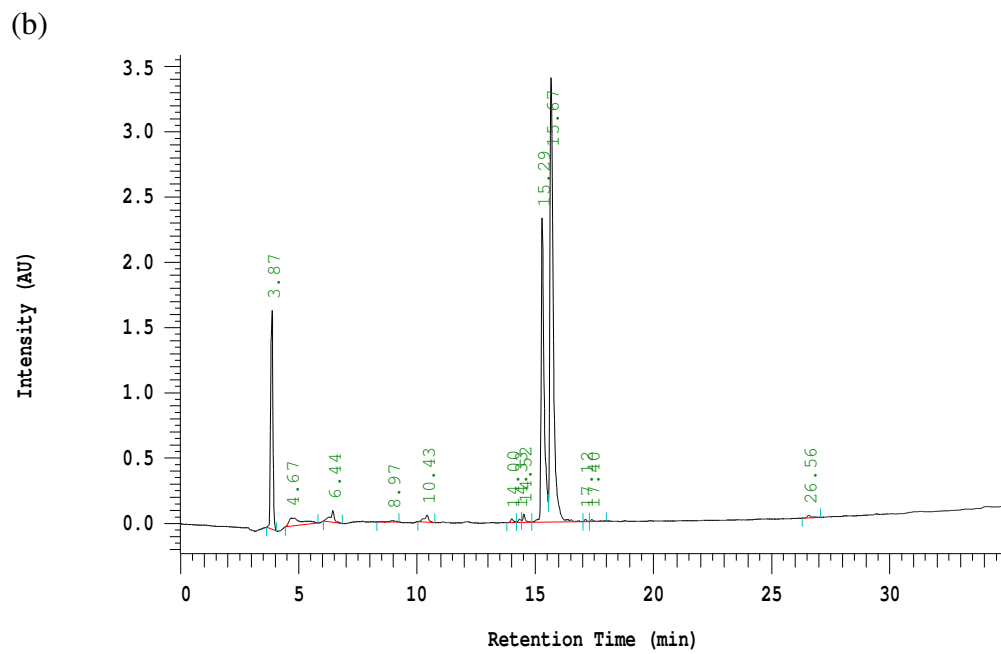
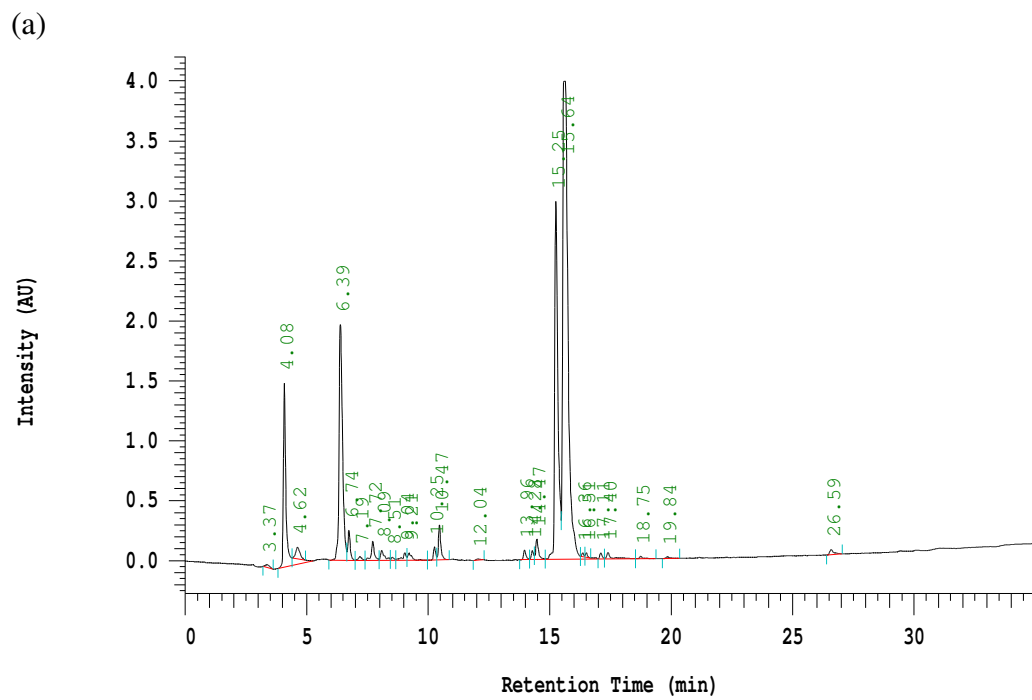
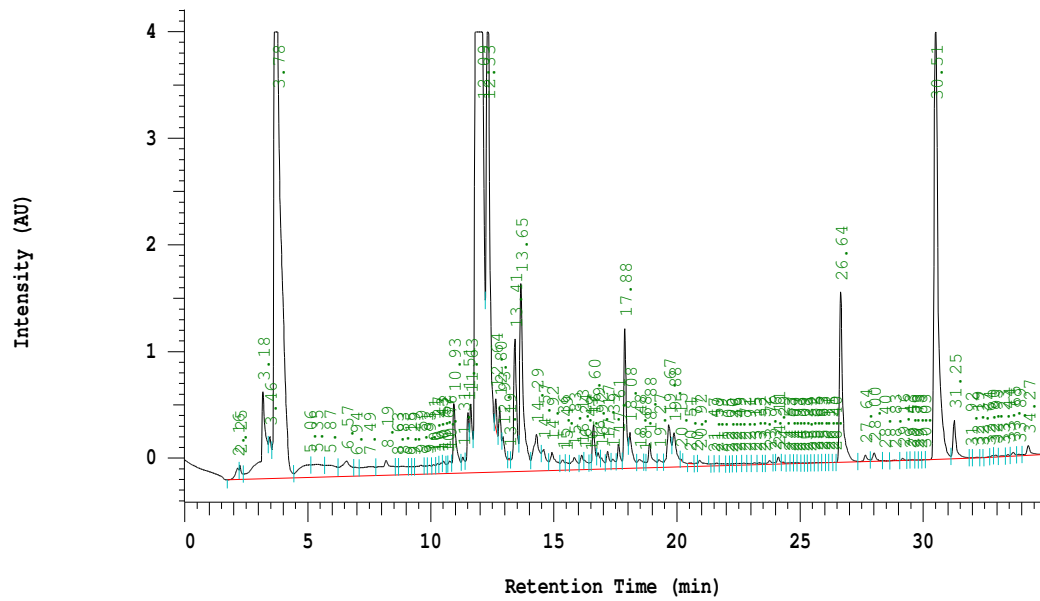


圖 12 (a)合成 FTI-12 之胜肽粗(混合物)產物之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-12 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 15.67 分鐘

(a)



(b)

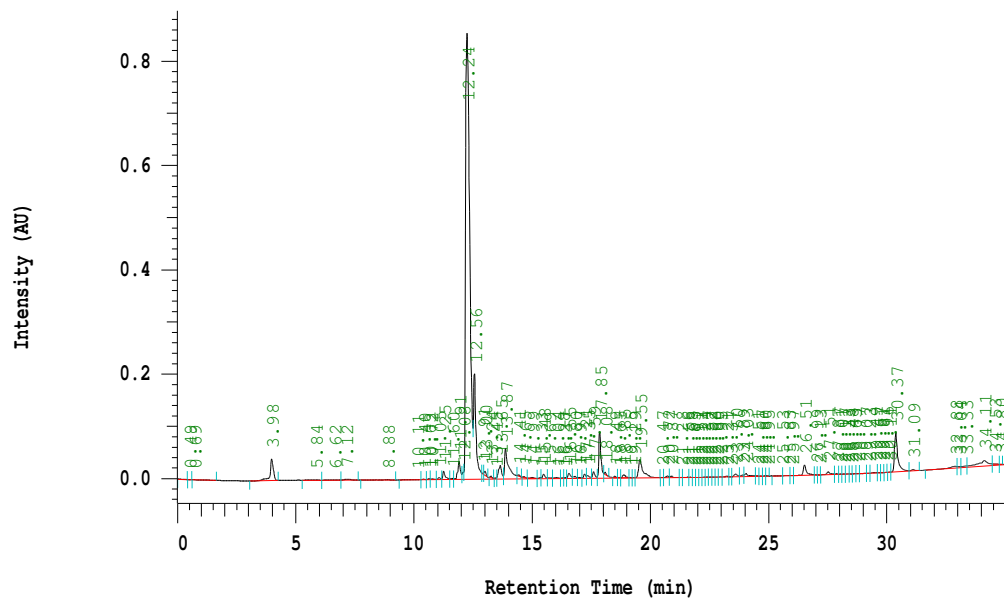


圖 13 (a)合成 FTI-13 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-13 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 12.24 分鐘

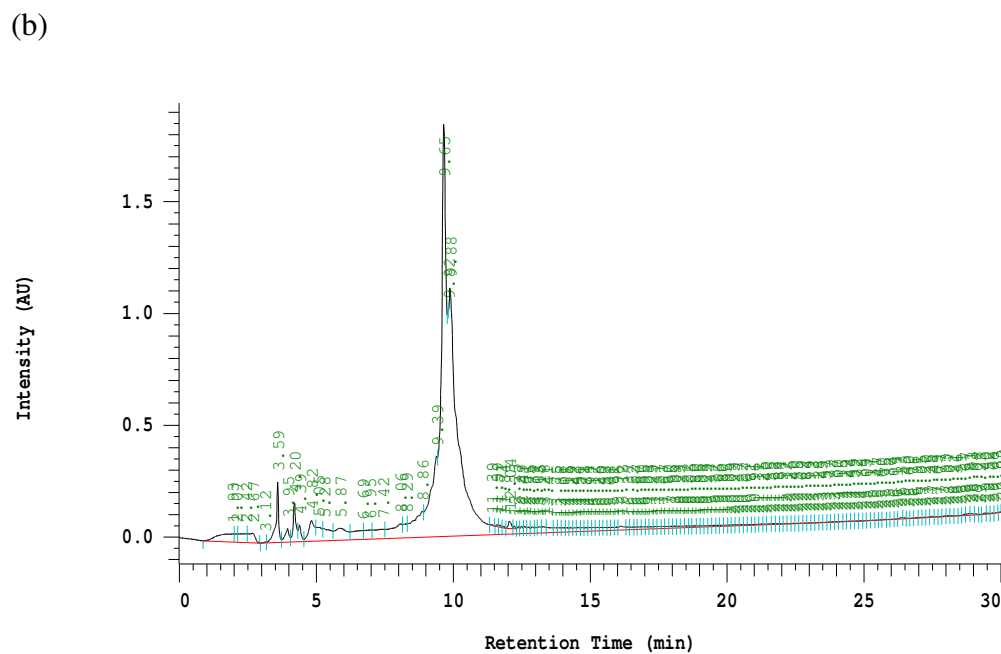
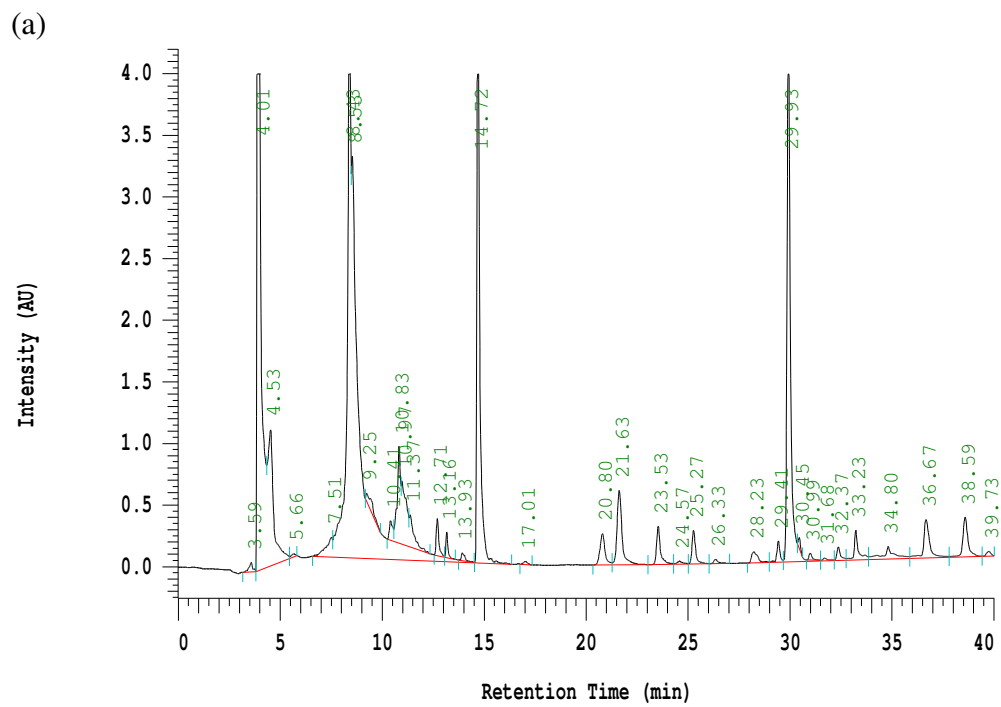
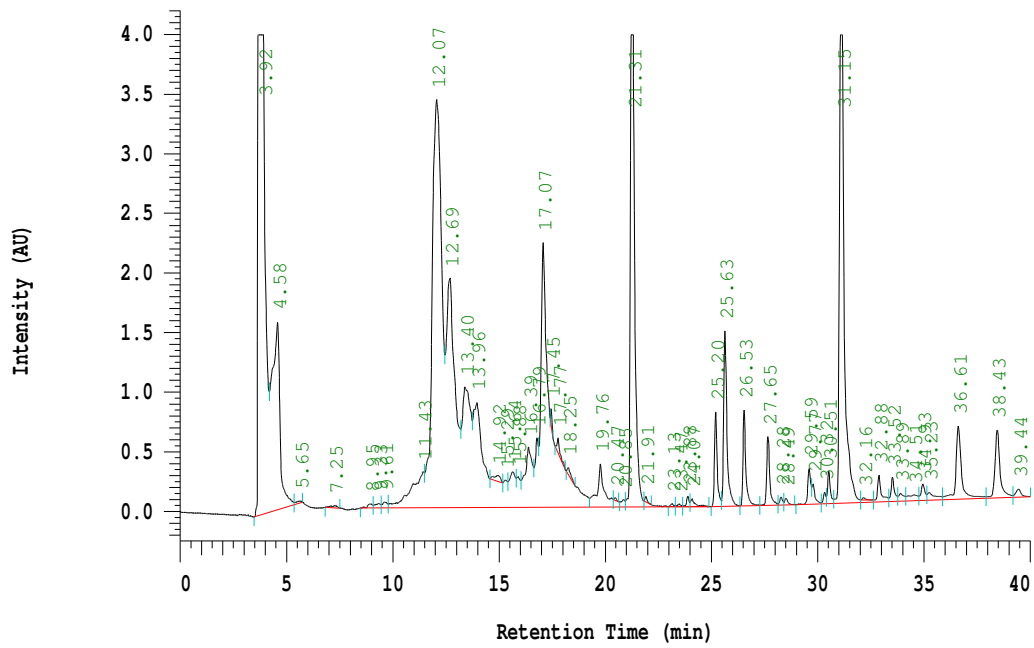


圖 14 (a)合成 FTI-14 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-14 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 9.65 分鐘

(a)



(b)

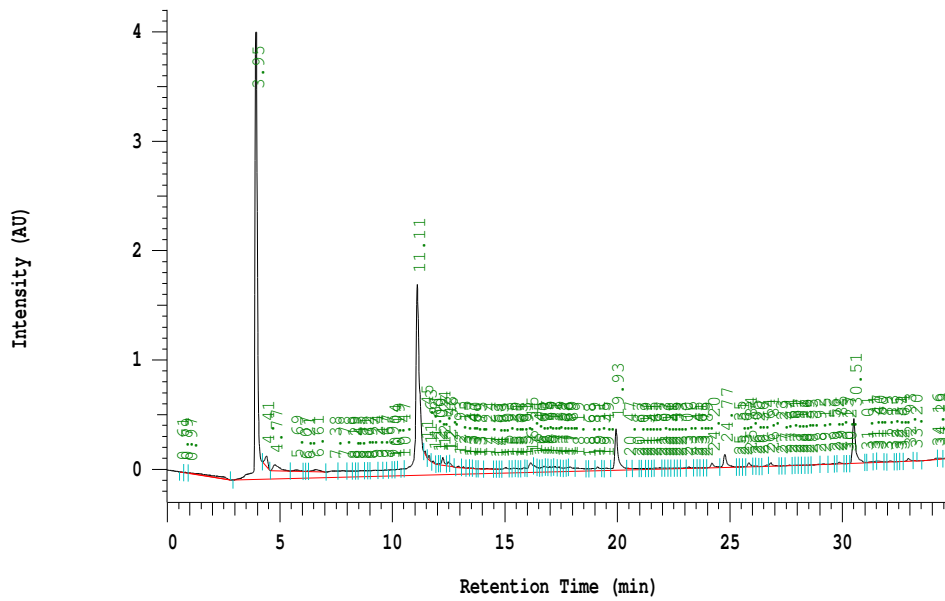
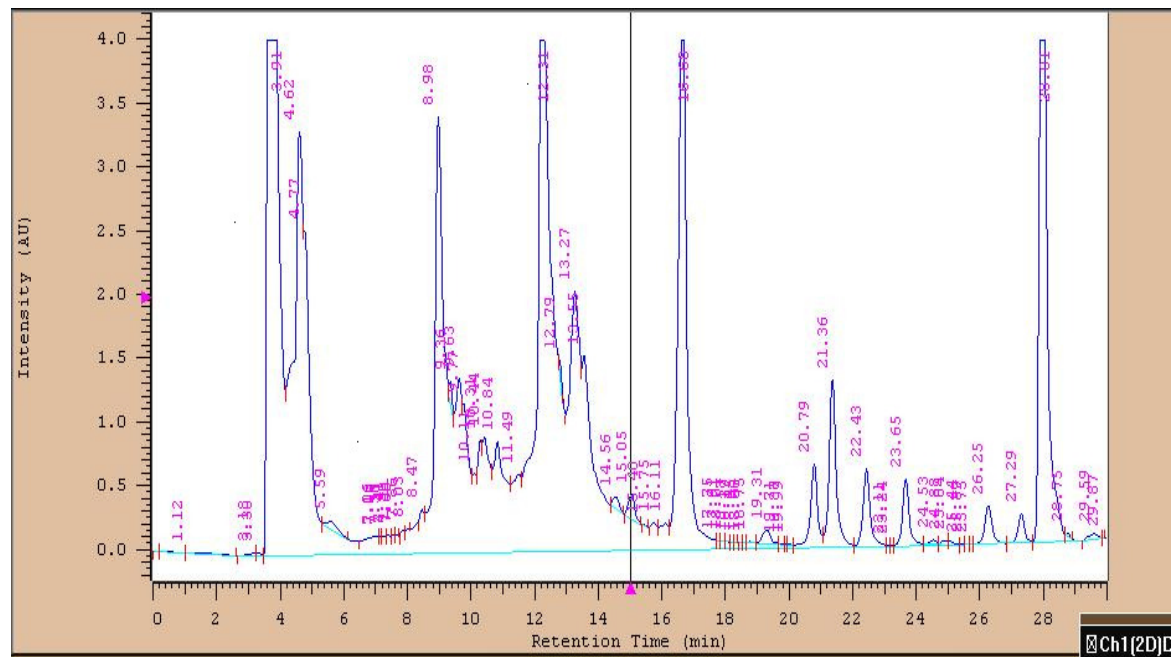


圖 15 (a)合成 FTI-15 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-15 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 11.11 分鐘

(a)



(b)

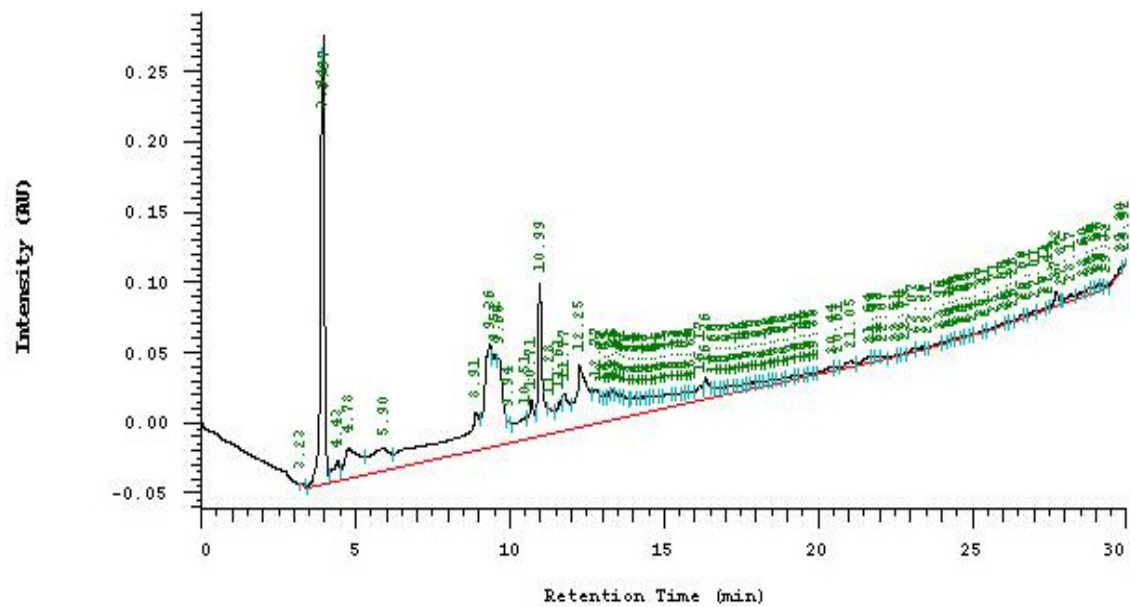
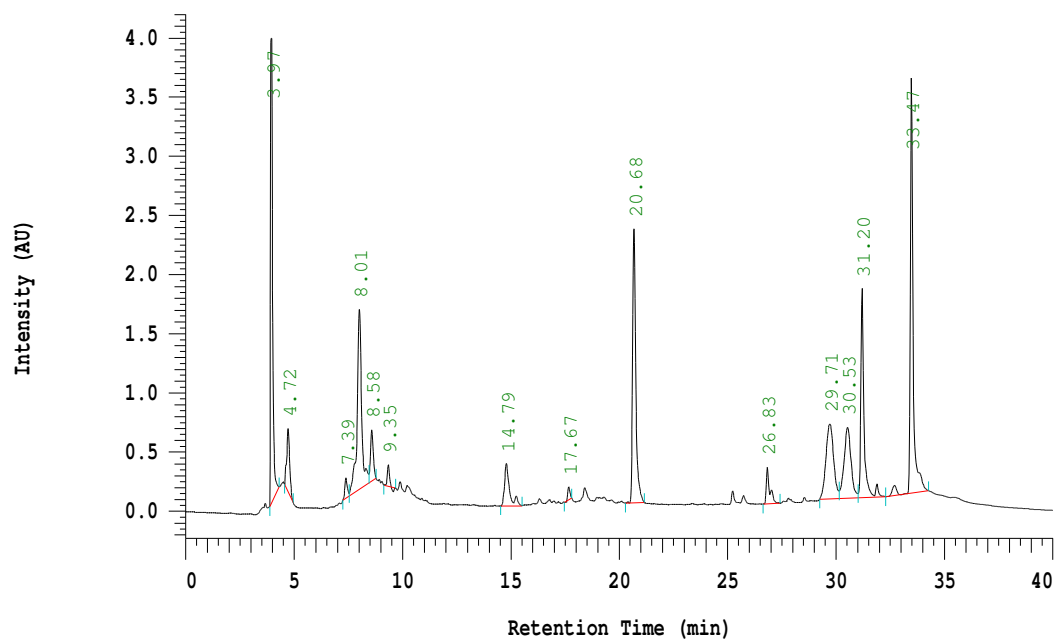


圖 16 (a)合成 FTI-16 胜肽粗產物(混合物)之 HPLC 層析圖(b)合成 FTI-16 胜肽純化後主要產物之 HPLC 層析圖，其滯留時間為 9.06 分鐘

(a)



(b)

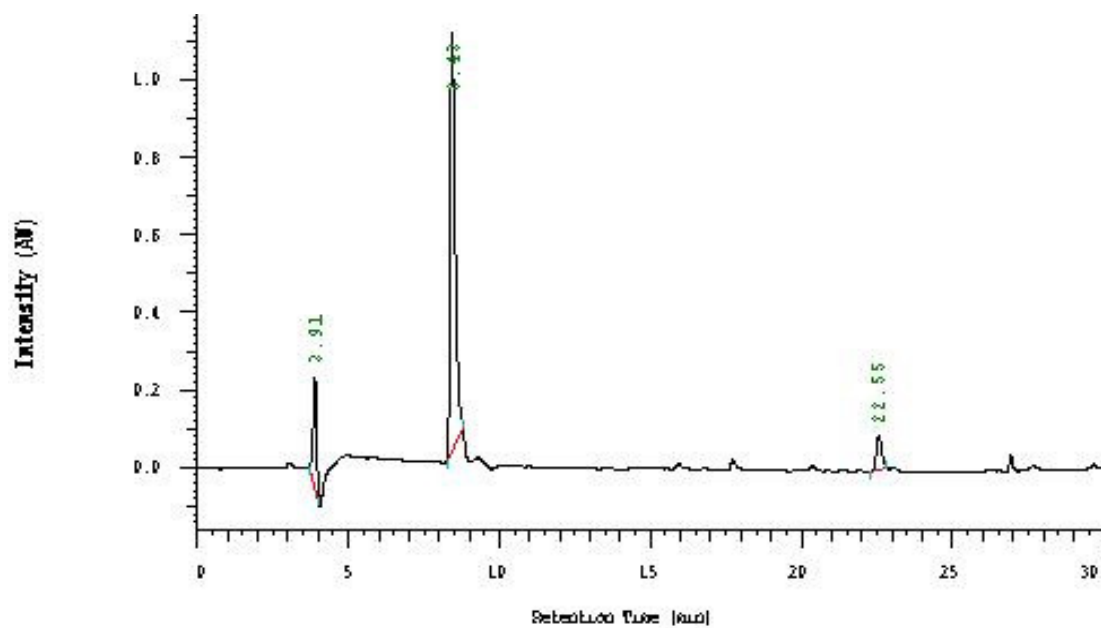


圖 17 (a)合成 FTI-17 之胜肽粗產物(混合物)之 RP-HPLC 層析圖(b)合成 FTI-17 胜肽純化後主要產物之 RP-HPLC 層析圖，其滯留時間為 8.48 分鐘

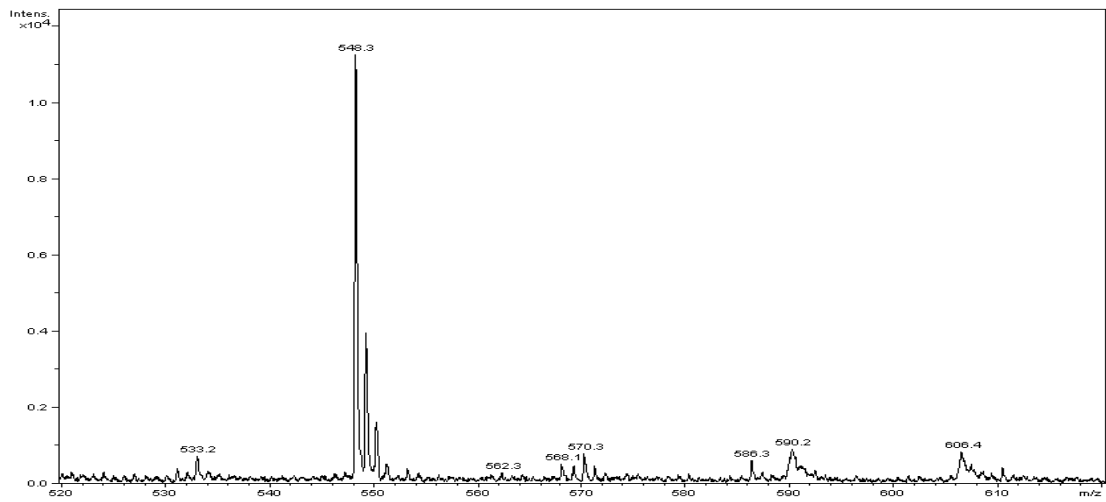


圖 18 FTI-1 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-1 胜肽的分子量為 548.3 Da

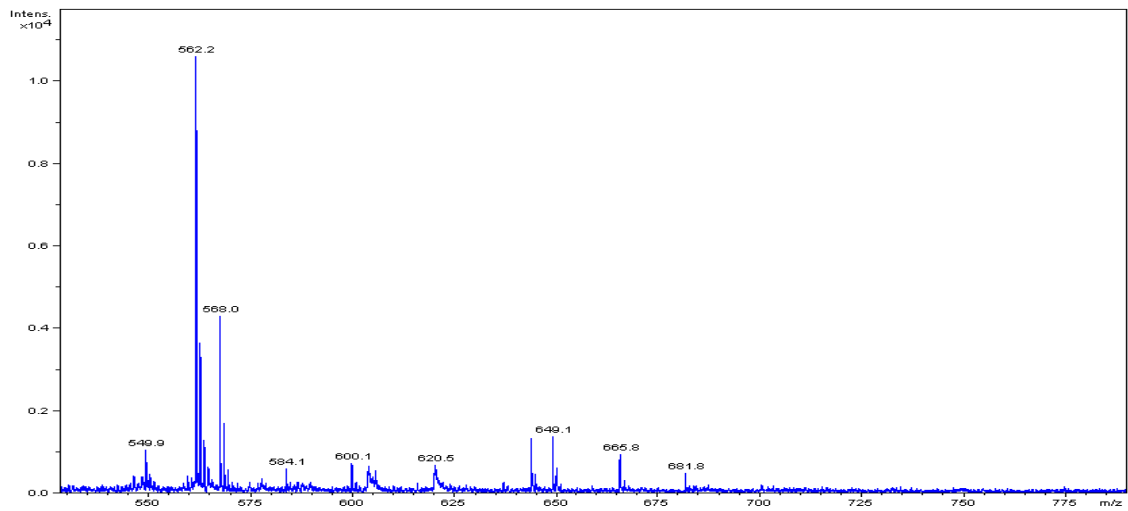


圖 19 FTI-2 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-2 胜肽的分子量為 562.2 Da

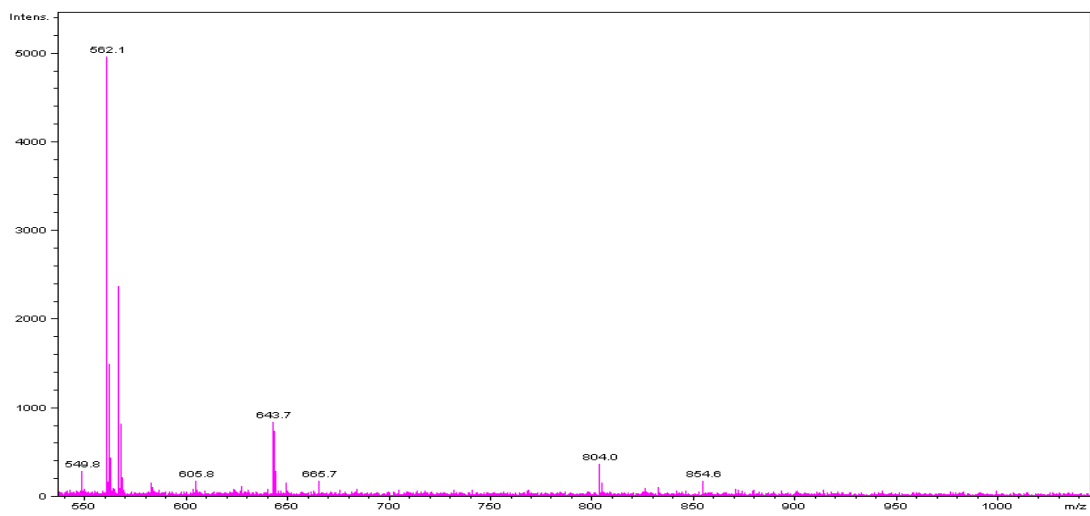


圖 20 FTI-3 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-3 胜肽的分子量為 562.1 Da

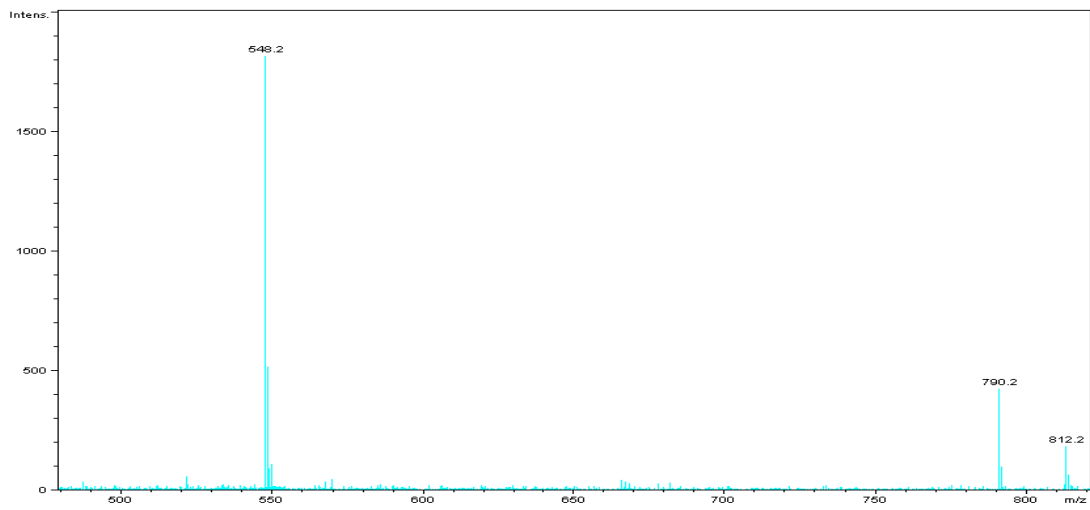


圖 21 FTI-4 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-4 胜肽的分子量為 548.2 Da

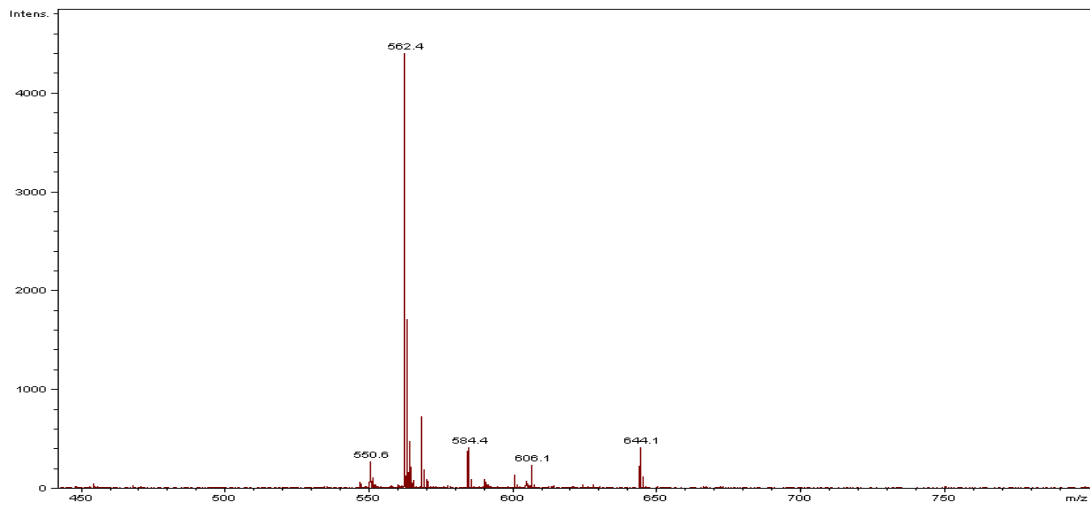


圖 22 FTI-5 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-5 胜肽的分子量為 562.4 Da

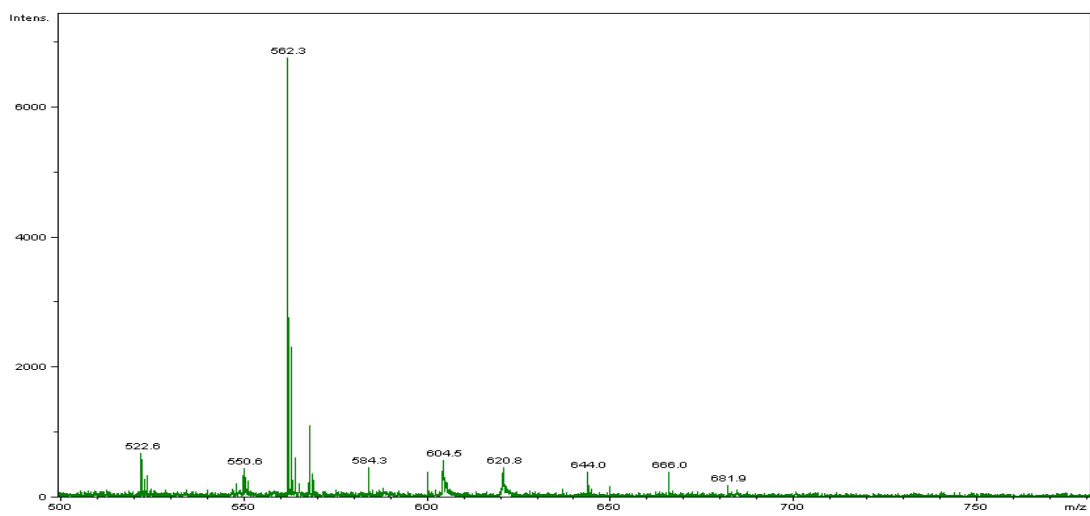


圖 4-23 FTI-6 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-6 胜肽的分子量為 562.3 Da

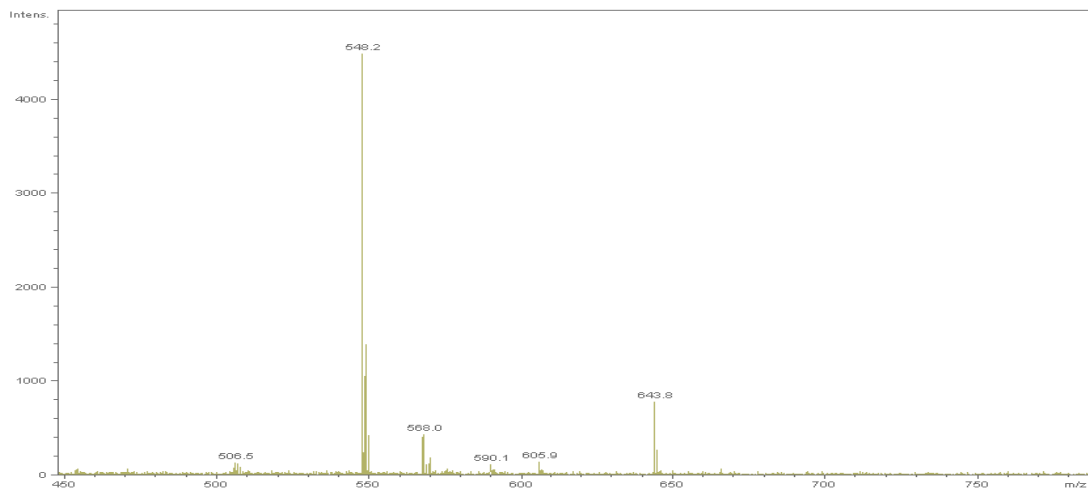


圖 4-24 FTI-7 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-7 胜肽的分子量為 548.2 Da

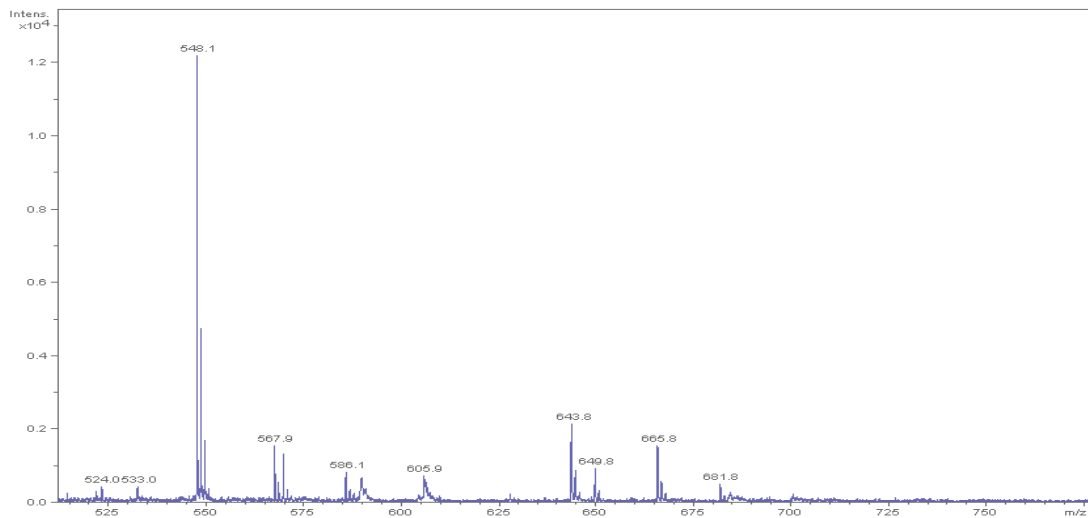


圖 4-25 FTI-8 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-8 胜肽的分子量為 548.1 Da

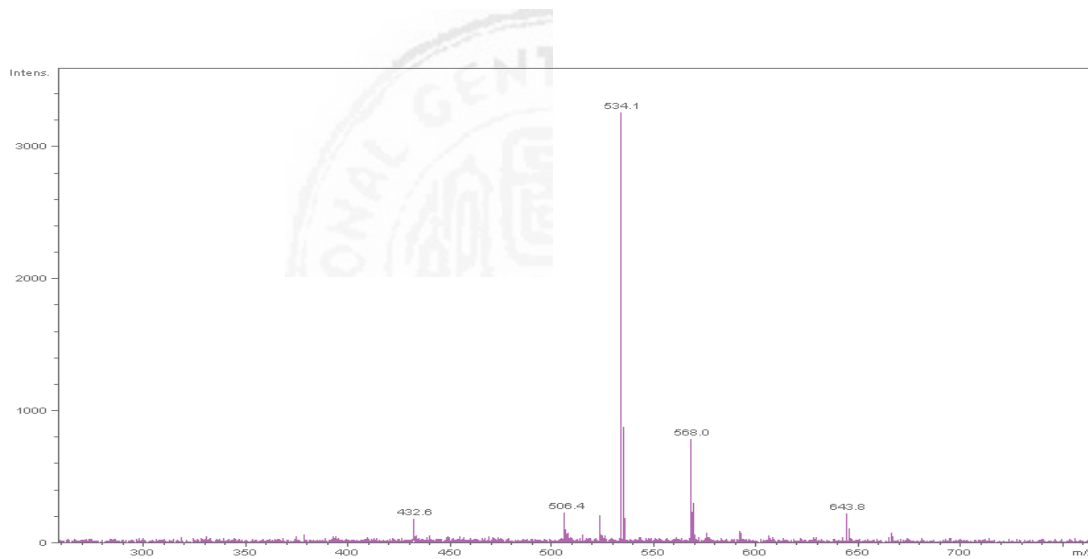


圖 4-26 FTI-9 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-9 胜肽的分子量為 534.1 Da

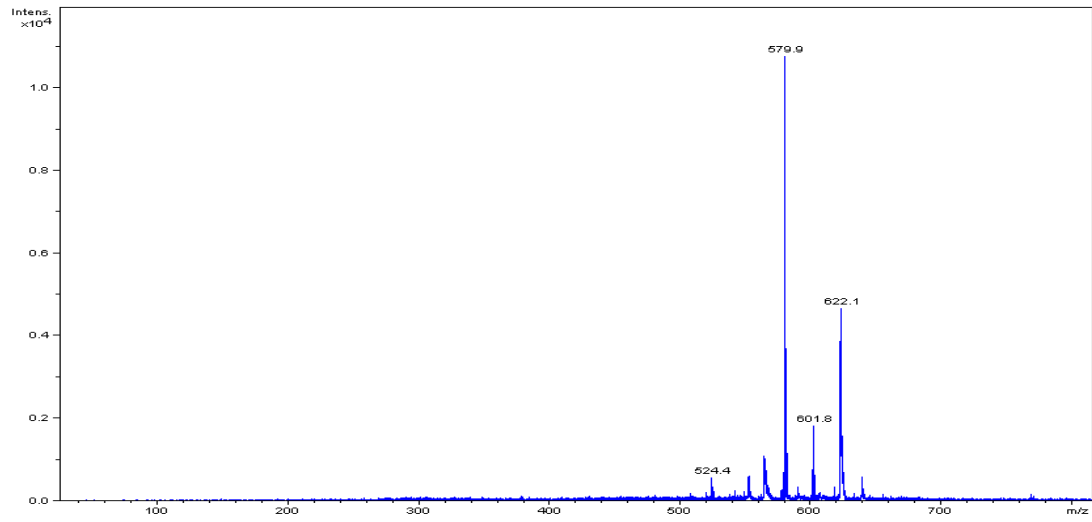


圖 4-27 FTI-10 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-10 胜肽的分子量為 579.9 Da

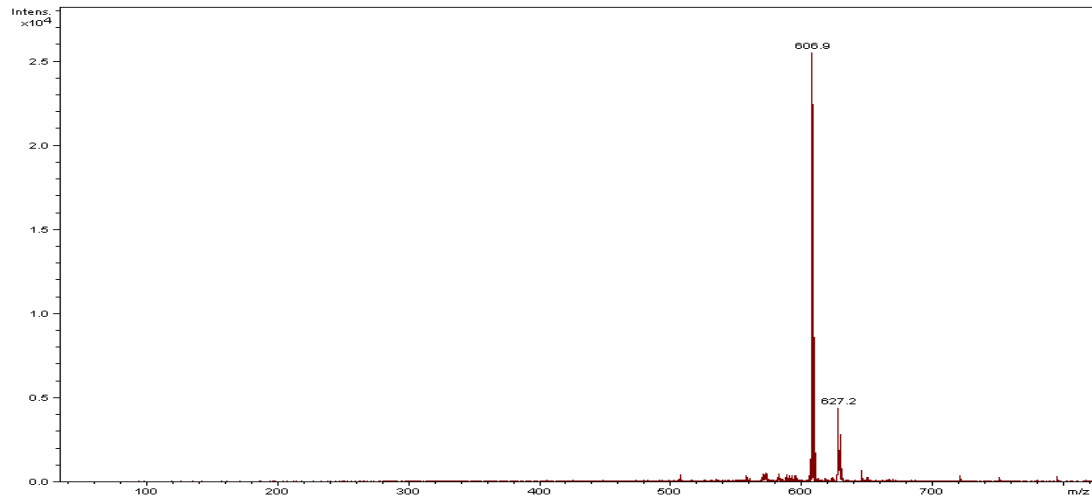


圖 4-28 FTI-11 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-11 胜肽的分子量為 606.9 Da

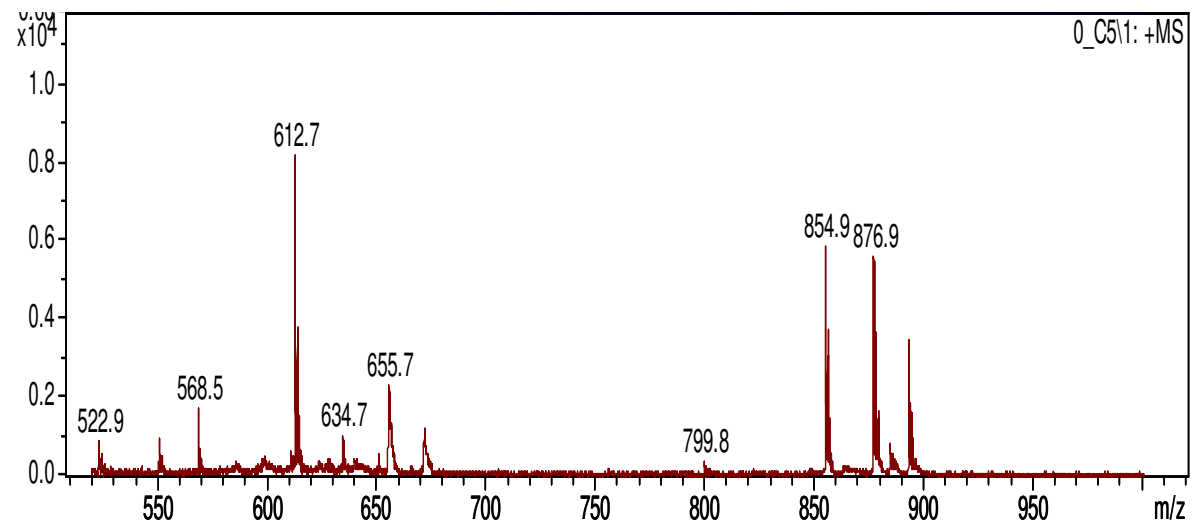


圖 4-29 FTI-12 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-12 胜肽的分子量為 612

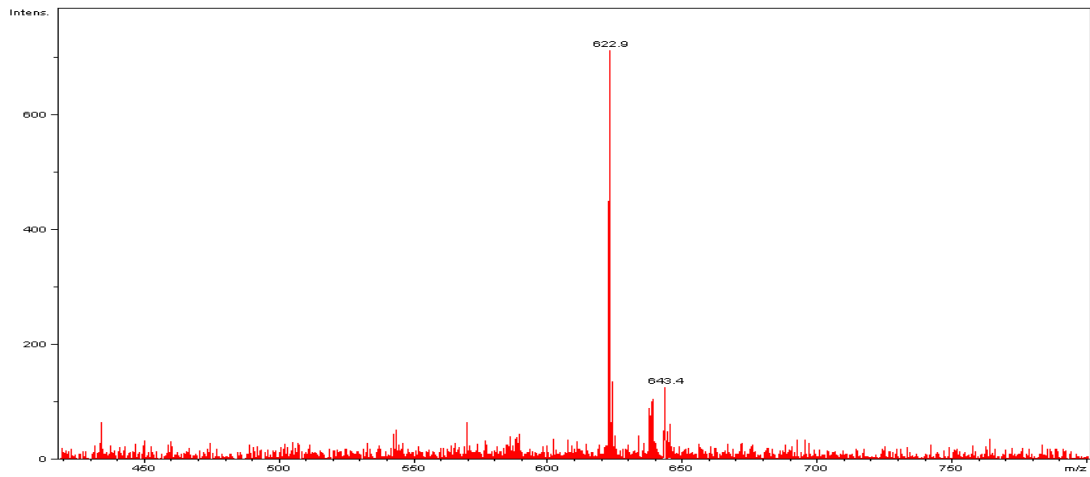


圖 4-30 FTI-13 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-13 胜肽的分子量為 622.9 Da

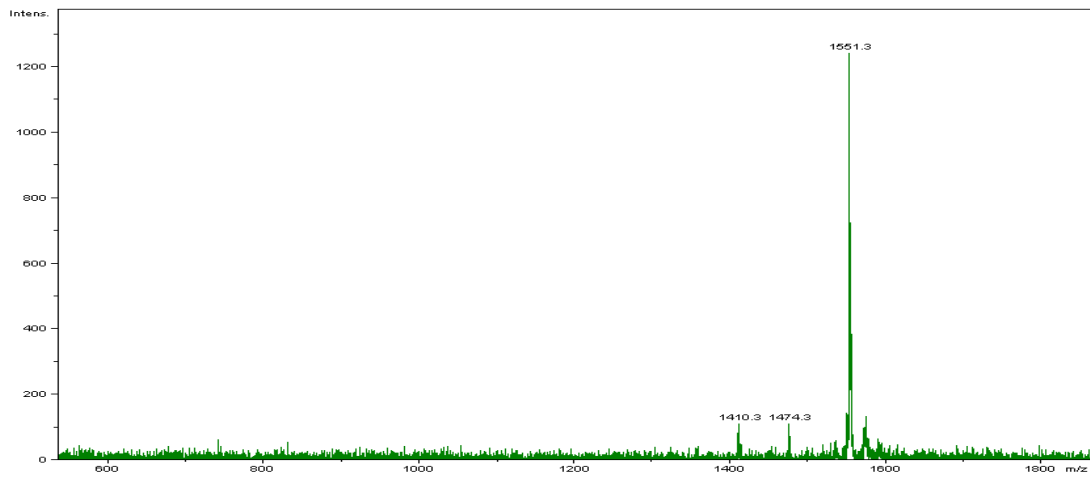


圖 4-31 FTI-14 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-14 胜肽的分子量為 1551.3 Da

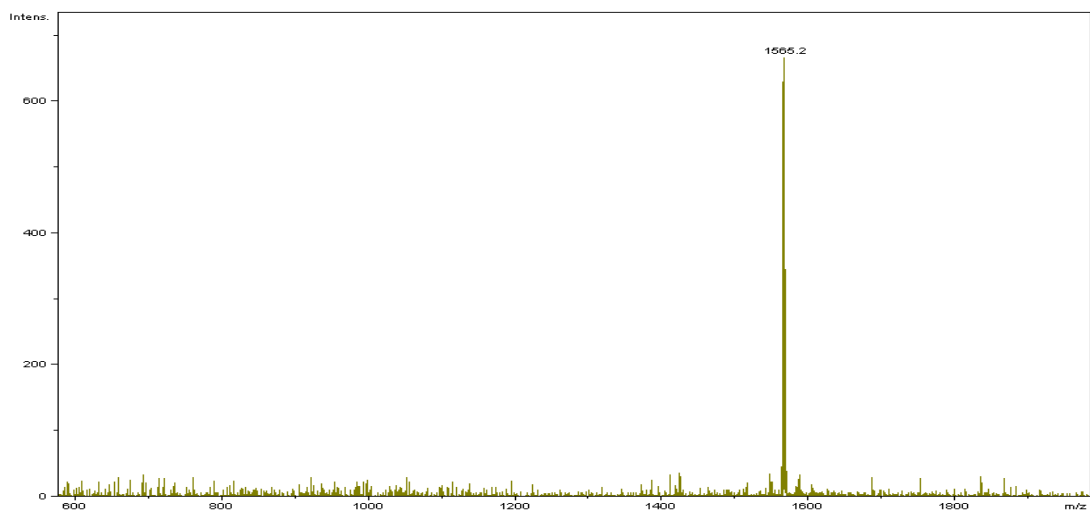


圖 4-32 FTI-15 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-15 胜肽的分子量為 1565.2 Da

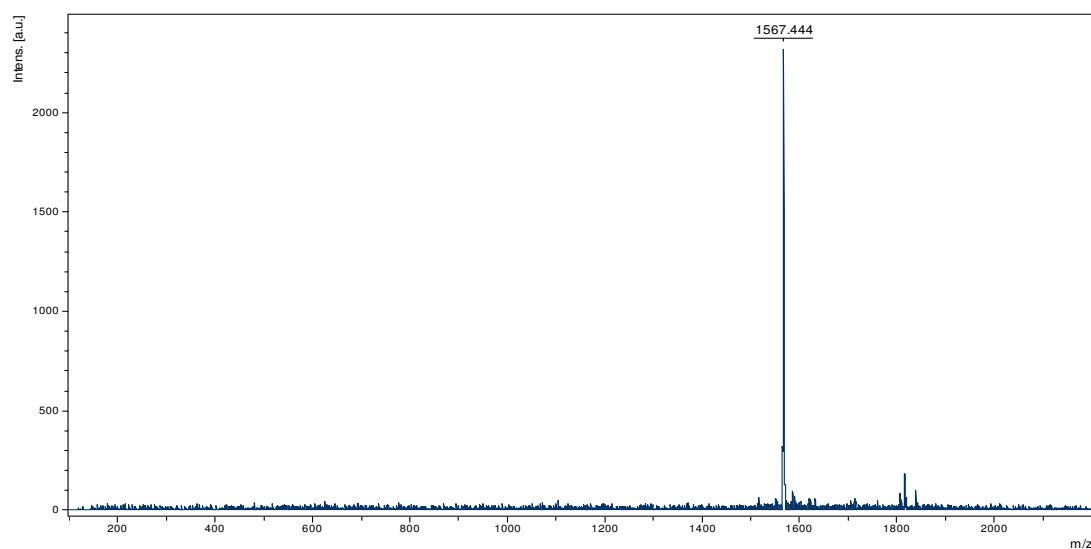


圖 4-33 FTI-16 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-16 胜肽的分子量為 1567.444 Da

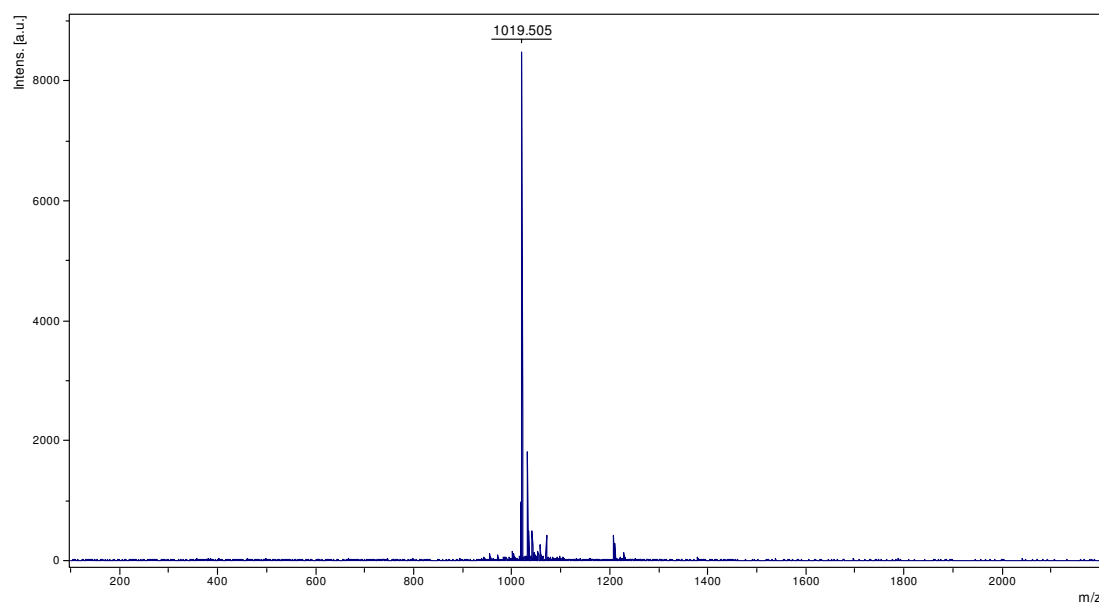


圖 4-34 FTI-17 胜肽之分子量鑑定圖，證實 FTI-17 胜肽的分子量為 1019.505 Da

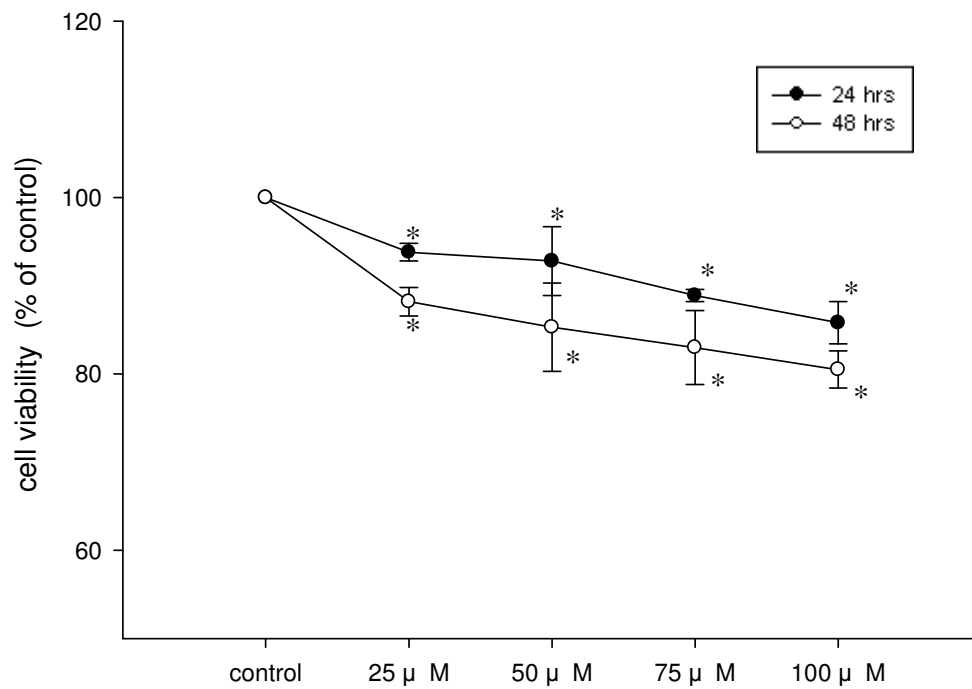


圖 36 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM)之 FTI-1 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

* 與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異
 實驗數據為平均值±標準偏差 (n=3)

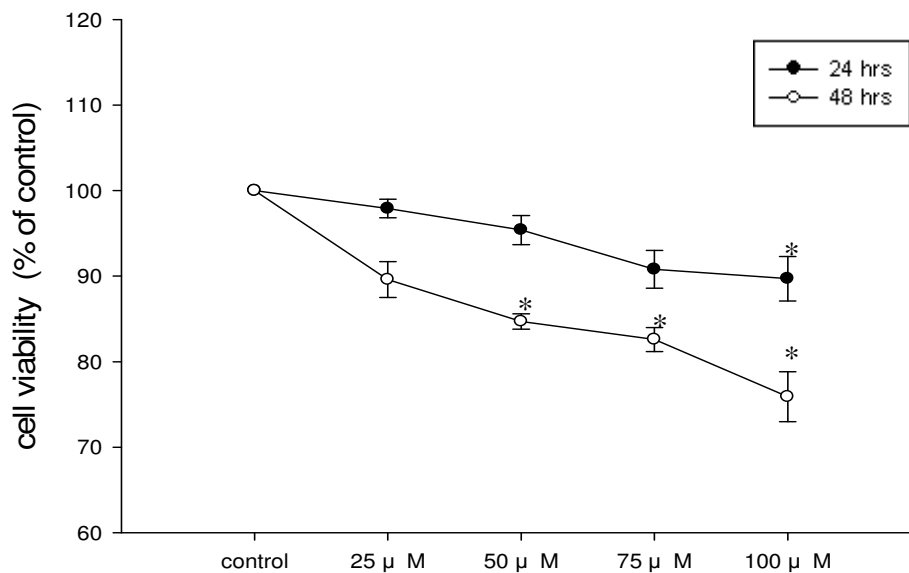


圖 37 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM)之 FTI-2 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

* 與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異
 實驗數據為平均值±標準偏差 (n=3)

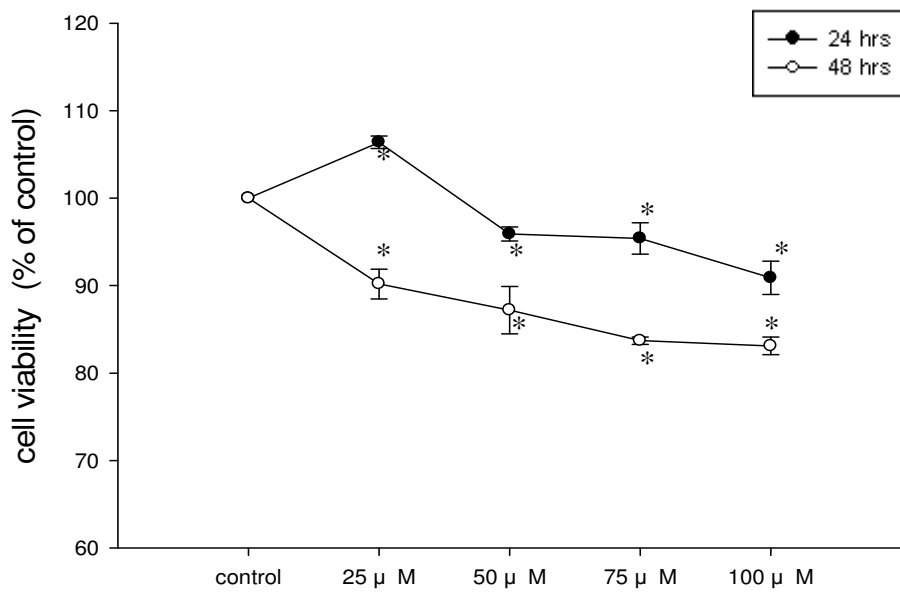


圖 38 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-3 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差 (n=3)

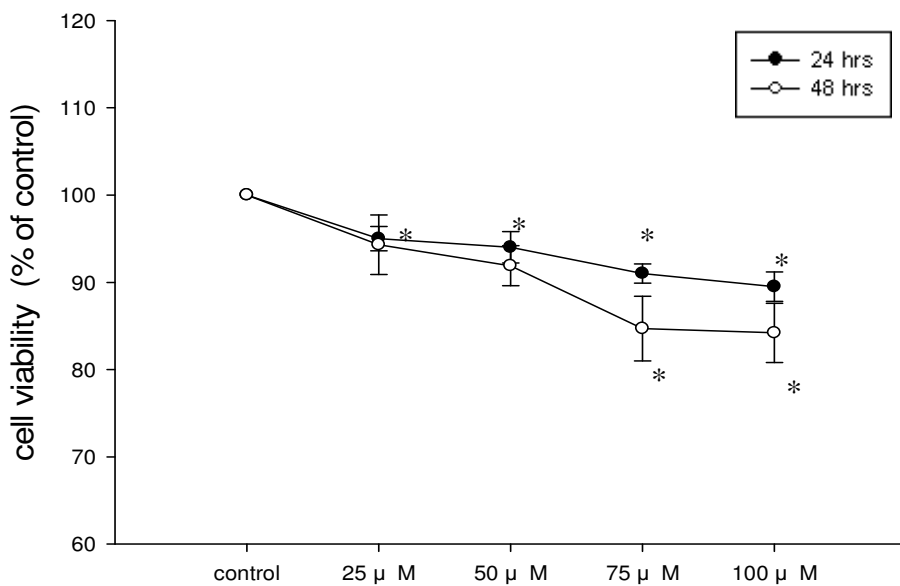


圖 39 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-4 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

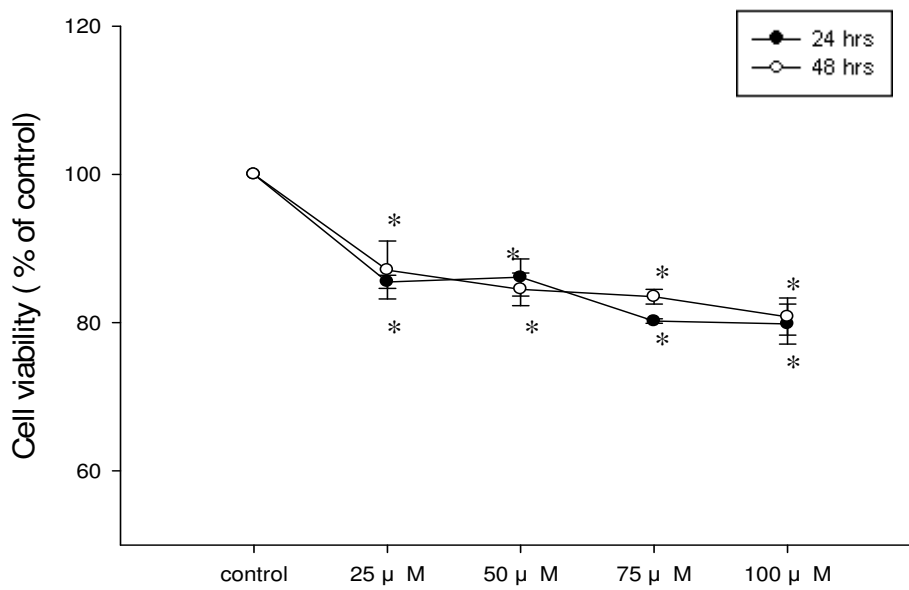


圖 40 以序列濃度(0、 25、 50、 75 and 100 μ M) 之 FTI-5 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7 ，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

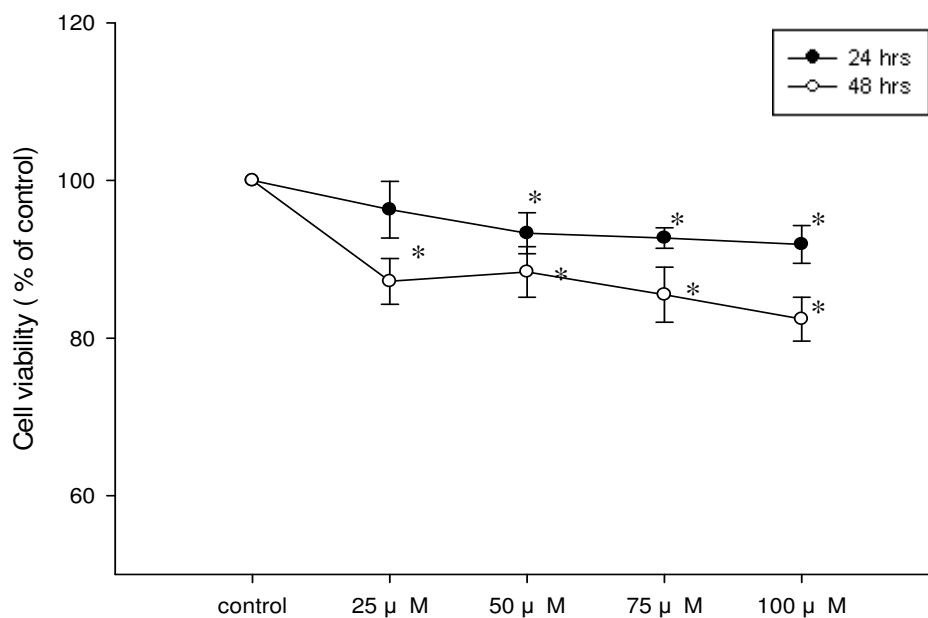


圖 41 以序列濃度(0、 25、 50、 75 and 100 μ M) 之 FTI-6 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7 ，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

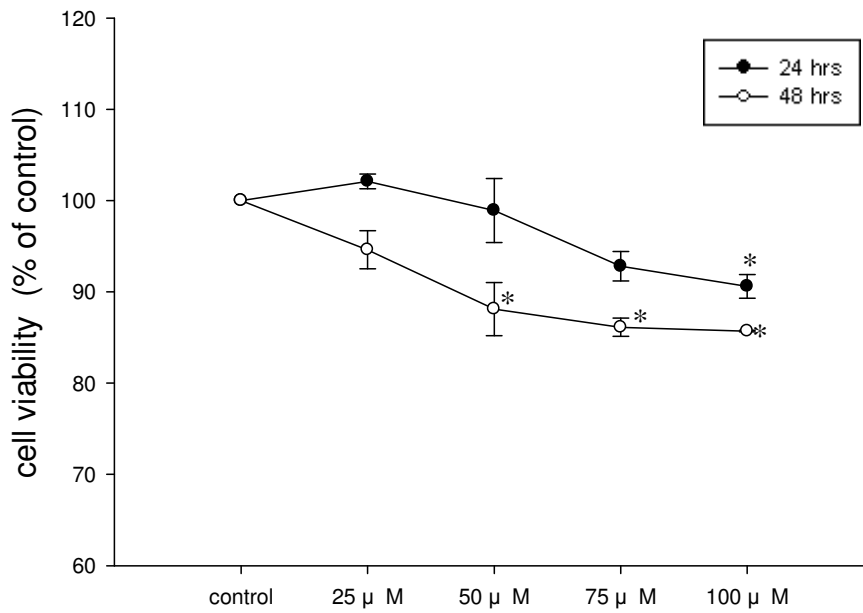


圖 42 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-7 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

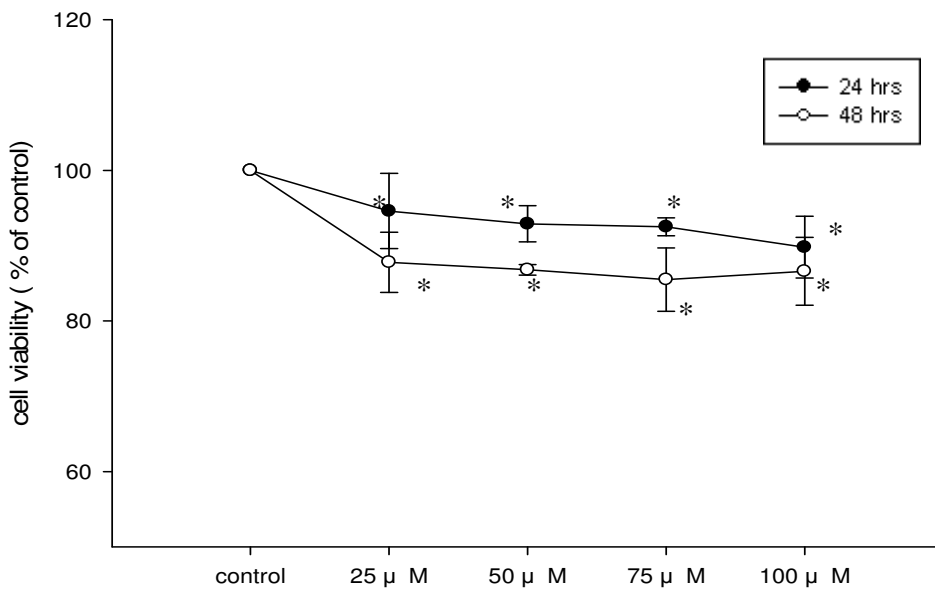


圖 43 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-8 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

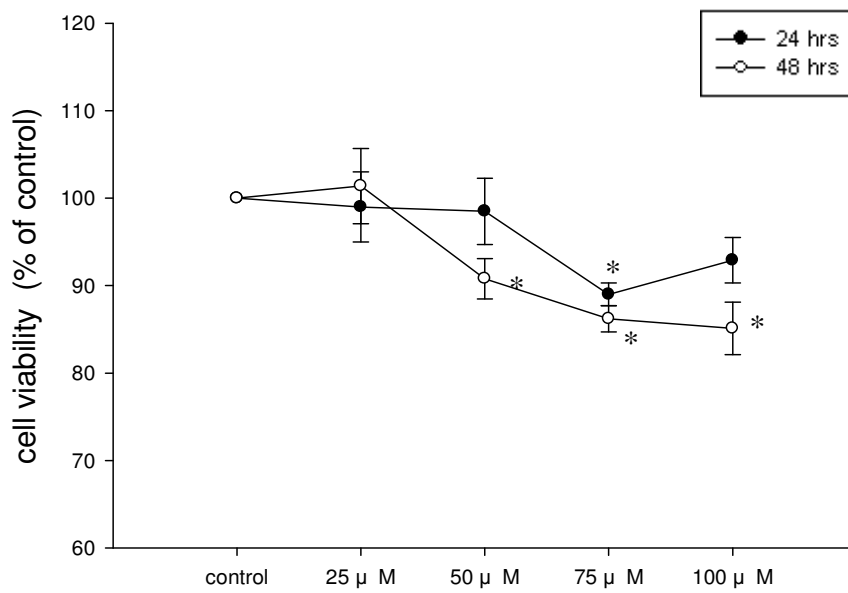


圖 44 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 M) 之 FTI-9 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

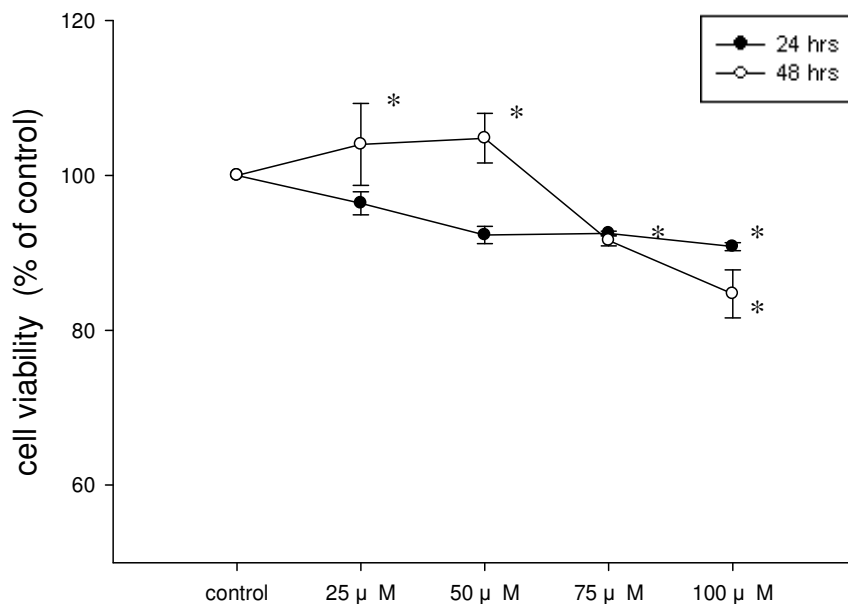


圖 45 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 M) 之 FTI-10 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

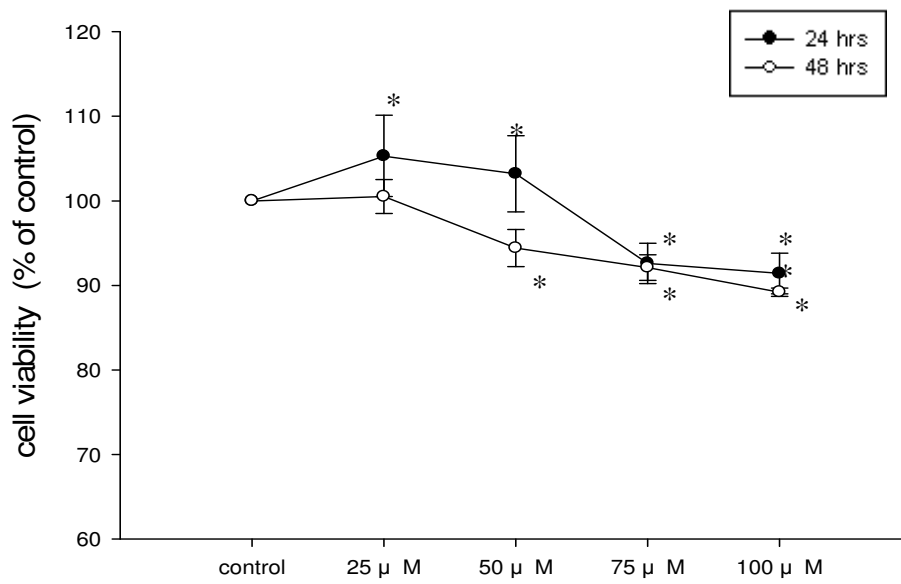


圖 46 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-11 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

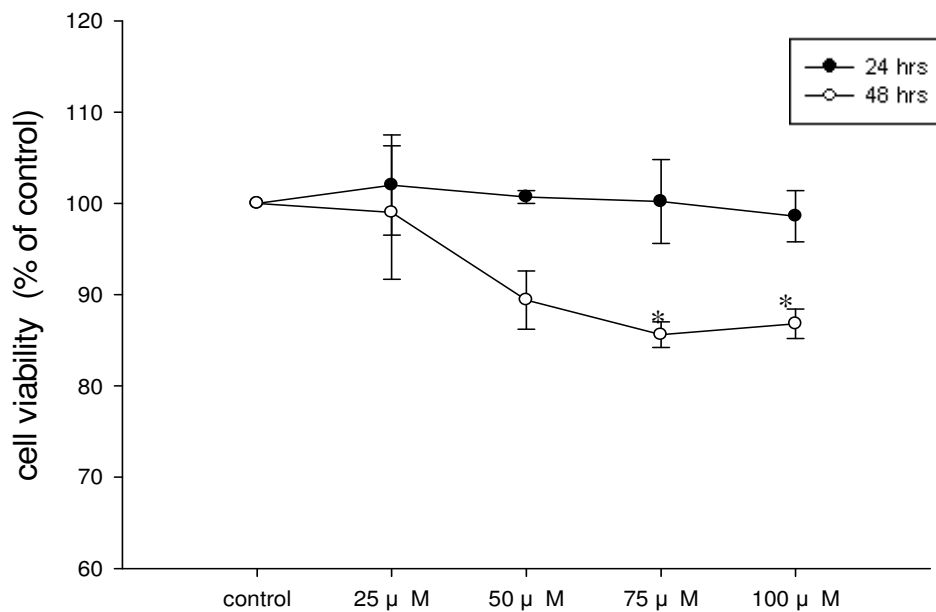


圖 47 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-12 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

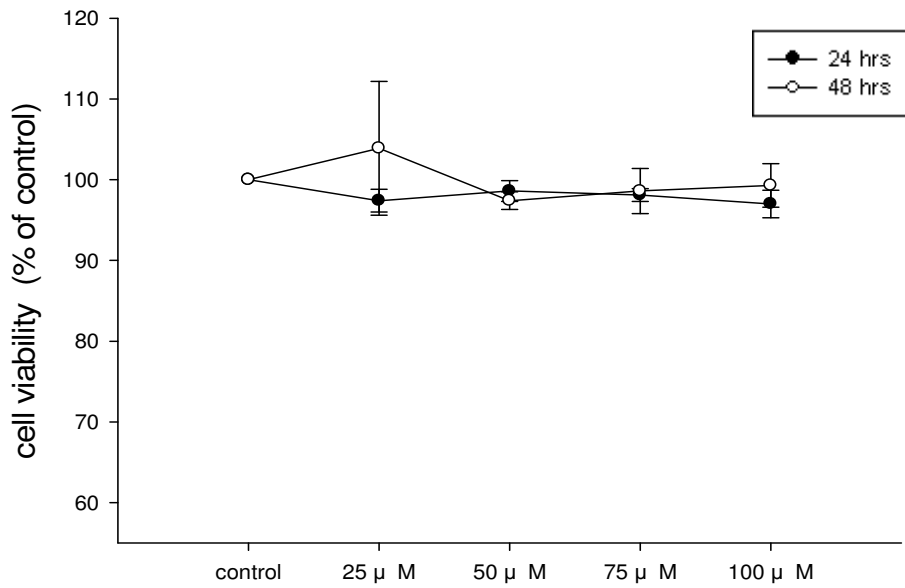


圖 48 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-13 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

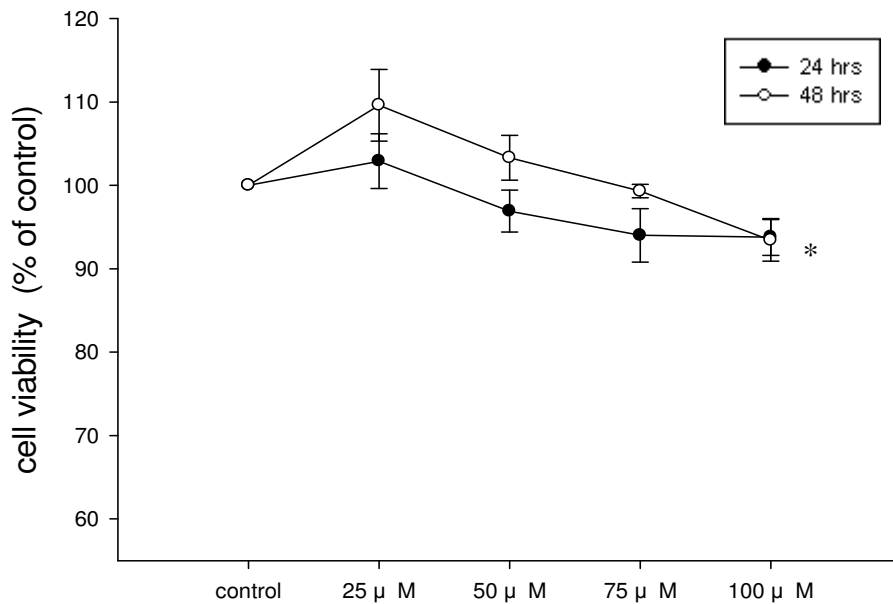


圖 49 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM) 之 FTI-14 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

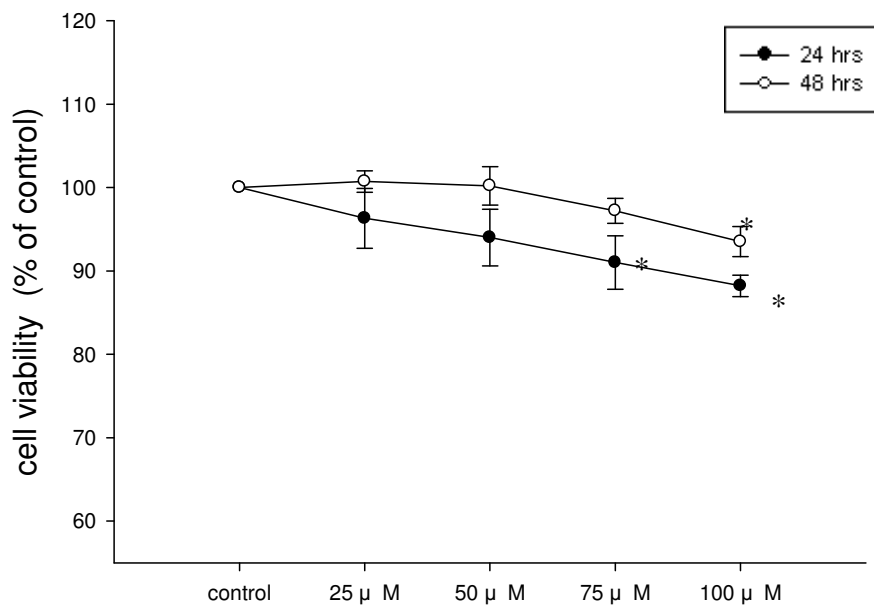


圖 50 以序列濃度(0、 25、 50、 75 and 100 μ M) 之 FTI-15 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7 ，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

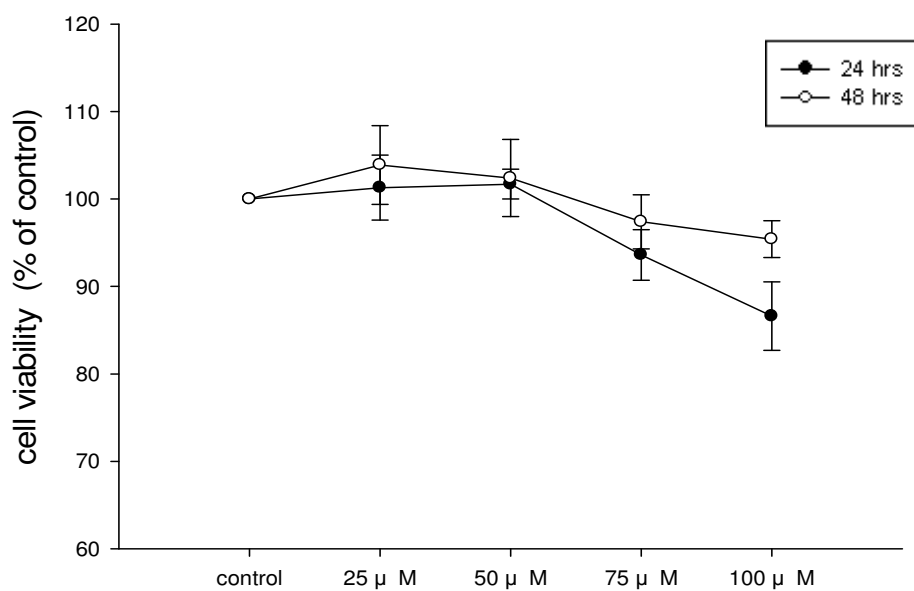


圖 51 以序列濃度(0、 25、 50、 75 and 100 μ M) 之 FTI-16 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7 ，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

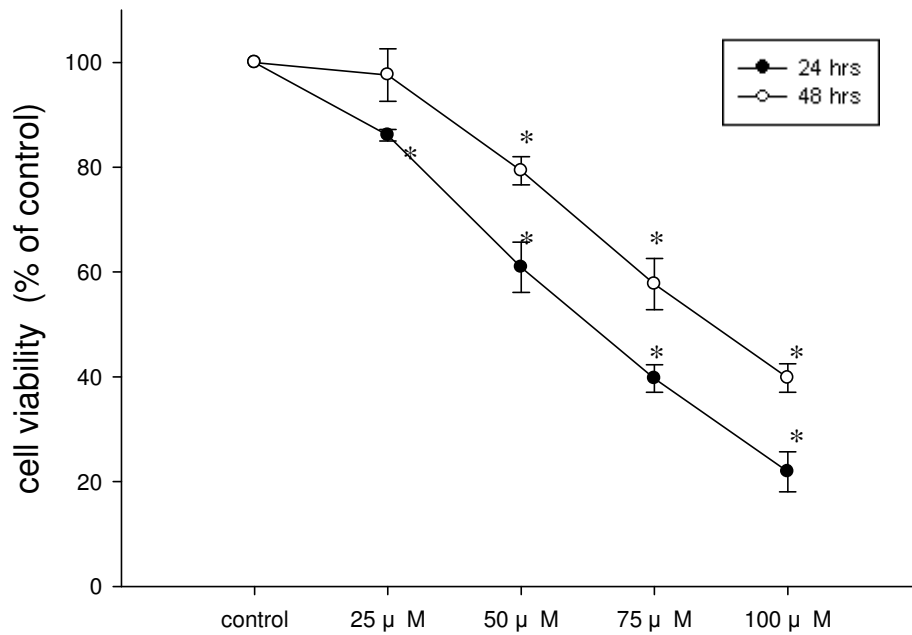


圖 52 以序列濃度(0、25、50、75 and 100 μM)之 FTI-17 胜肽處理乳癌細胞 MCF-7，24 及 48 小時之存活率

*與控制組(DMSO)在 $p < 0.05$ 具顯著性差異

實驗數據為平均值±標準偏差(n=3)

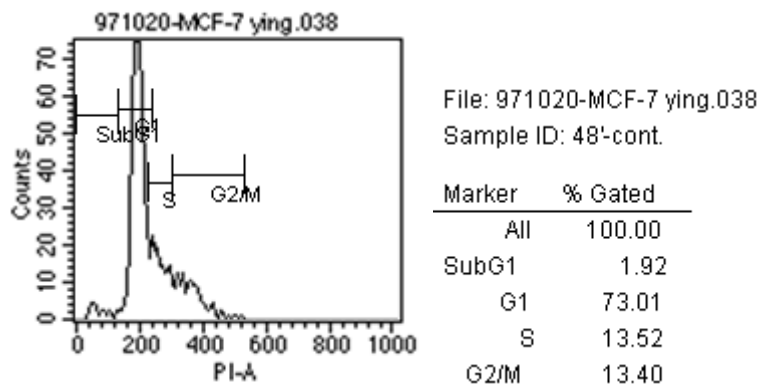


圖 53 控制組 (DMSO control) 為未經任何處理(0 μM)之 MCF-7 細胞培養 48

小時以流式細胞儀偵測到的細胞週期分析圖

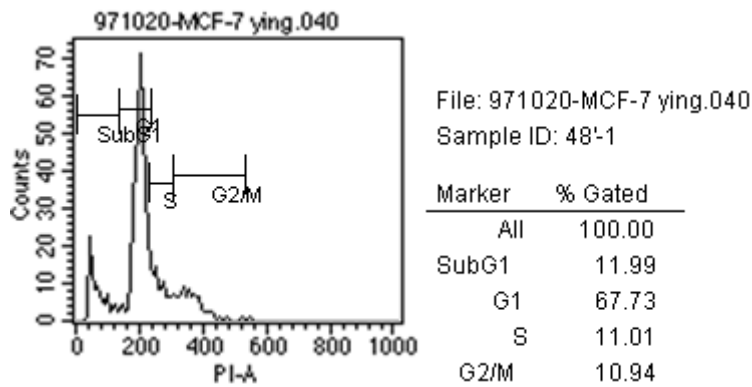


圖 54 以 100 μ M FTI-1 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

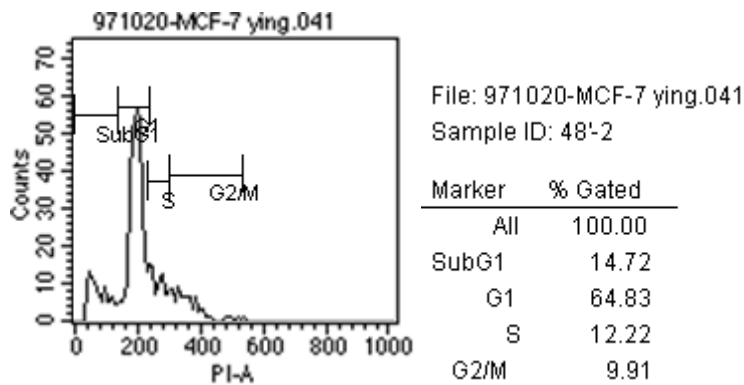


圖 55 以 100 μ M FTI-2 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

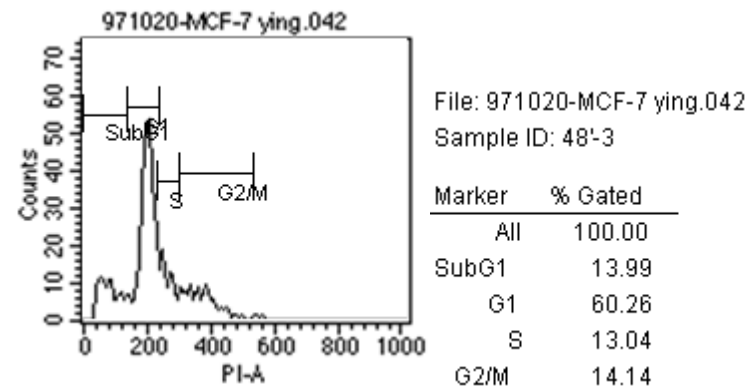


圖 56 以 100 μ M FTI-3 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

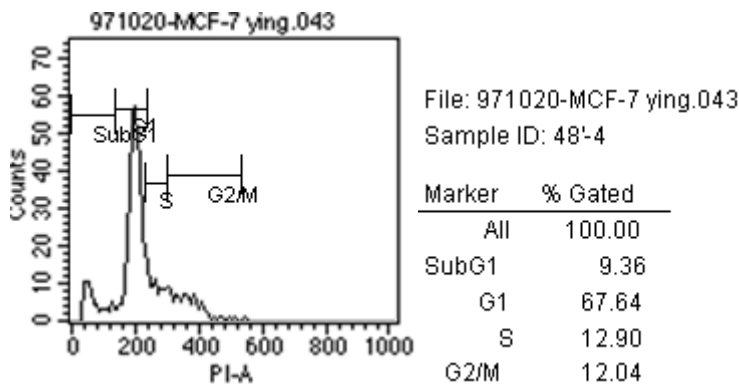


圖 57 以 100 μ M FTI-4 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

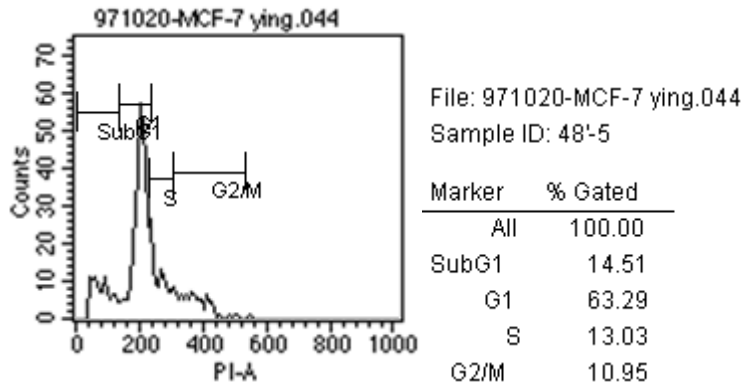


圖 58 以 100 μ M FTI-5 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

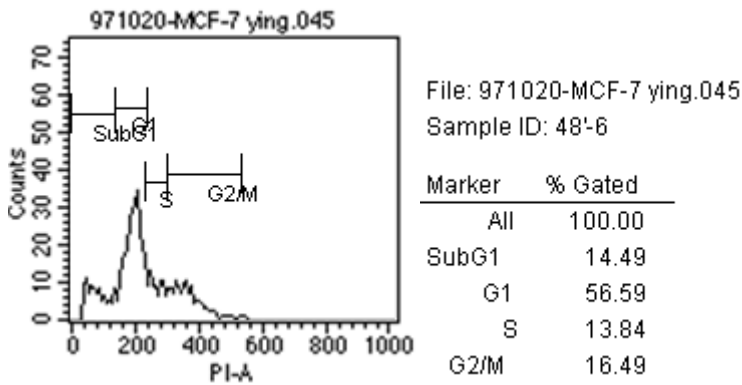


圖 59 以 100 μ M FTI-6 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

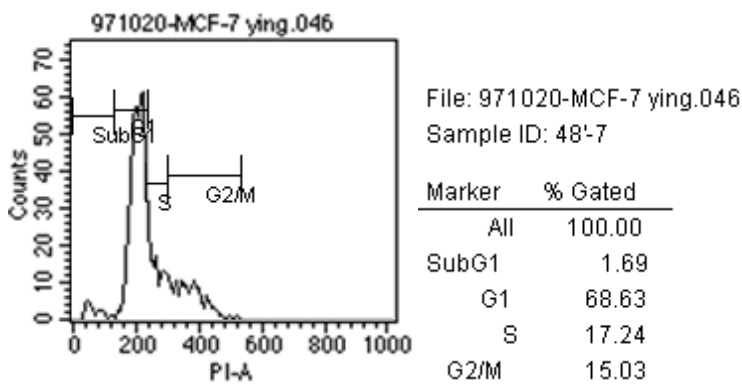


圖 60 以 100 μ M FTI-7 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

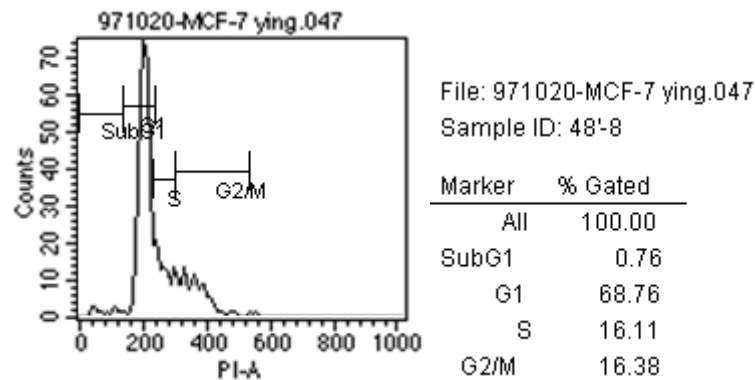


圖 61 以 100 μ M FTI-8 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

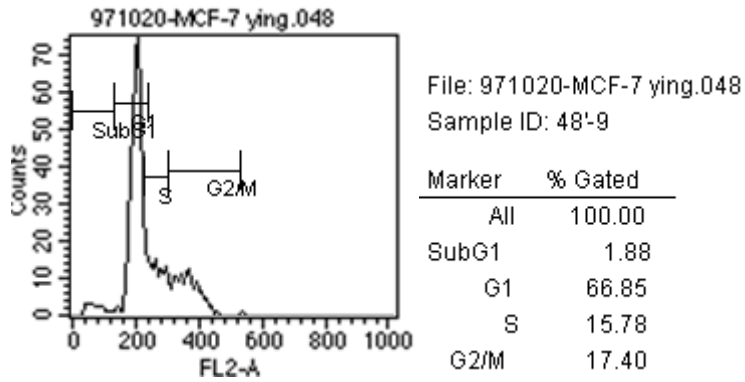


圖 62 以 100 μ M FTI-9 胜肽處理 MCF-7 細胞 48 小時的細胞週期分析圖

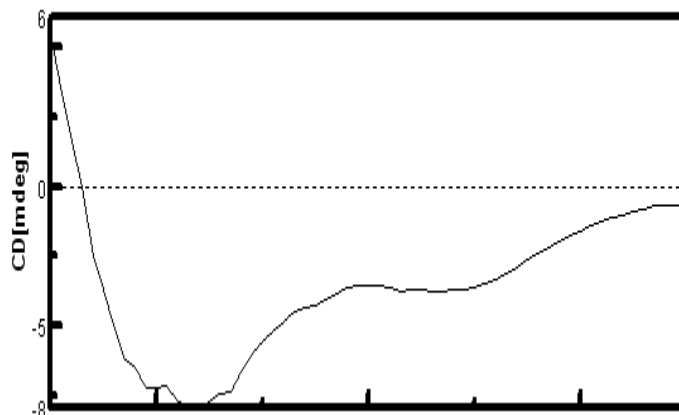


圖 63 FTI-6 的 CD 圖譜(所得的 CD 圖譜為 3 重複平均值)

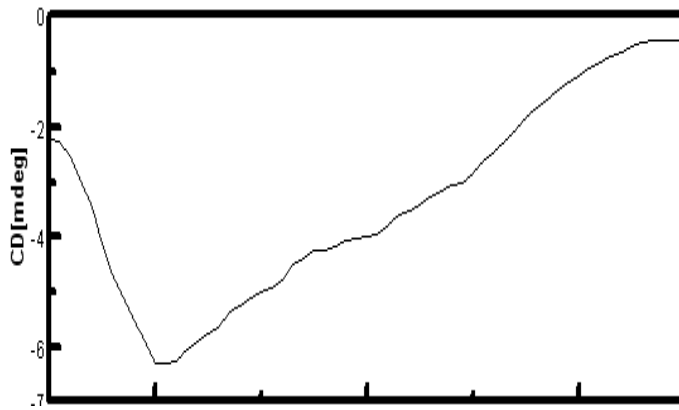


圖 64 FTI-16 的 CD 圖譜(所得的 CD 圖譜為 3 重複平均值)