

東 海 大 學 化 學 研 究 所

碩 士 論 文

指 導 教 授：龍 鳳 娣 博 士

合 成 胜 肽 耦 合 奈 米 鑽 石 以 開 發 癌 症 治 療 藥
物 和 診 斷 方 法

**Synthesis of peptide-conjugated nanodiamonds for developing
anticancer drugs and diagnostics**

研 究 生：吳 俊 毅 (June-I Wu)

中 華 民 國 一 〇 六 年 七 月

摘要

奈米技術與研究不斷進步，使得我們有機會將其應用到生物與醫學的發展上，而不同於往的材料－奈米鑽石具有優異的物理以及化學性質，包括物理吸附性、高生物相容性、無毒性和高穩定性等等。奈米鑽石結合生物醫學時，可作為藥物傳遞系統，再結合標靶藥物提高診斷準確度，在治療上提供最佳化的用途，而達到減少藥物的劑量。在此我們將奈米鑽石當作藥物載體，以大腸癌細胞表達之 EGFR 為目標，開發新的藥物及診斷方法。研究目標將分為兩個部分：一為抗體耦合奈米鑽石(選用的抗體為 Cetuximab)；二為胜肽耦合奈米鑽石(選用的胜肽為 peptide 3C)，peptide 3C 已經證實在大腸癌細胞 HT-29 以及乳癌細胞 MCF-7 均有抑制效果。利用 BCA 蛋白質定量分析法、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 以及傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 進行鑑定，最後合成之抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石對 HT-29 大腸癌細胞進行辨識能力。結果顯示抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石對 HT-29 細胞有專一性的辨識。在 HT-29 細胞中 peptide 3C 耦合奈米鑽石比單純的投遞 peptide 3C 更有抑制 HT-29 細胞增生效果。研究結果顯示奈米鑽石具有作為藥物載體的價值。

關鍵字:

大腸癌、奈米鑽石、胜肽藥物、EGFR

目錄

摘要.....	i
目錄.....	ii
圖目錄.....	iv
表目錄.....	v
第一章 研究動機.....	1
第二章 文獻探討.....	2
2-1 奈米鑽石在生物醫學之應用.....	2
2-1-1 奈米鑽石的製作.....	2
2-1-2 奈米鑽石的特性.....	6
2-2 大腸癌簡介.....	7
2-3 胜肽 peptide 3C 之介紹.....	8
第三章 實驗方法.....	10
3-1 實驗設計與流程.....	10
3-2 羧基化奈米鑽石之製備.....	12
3-3 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石.....	12
3-3-1 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之合成.....	12
3-3-2 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之鑑定.....	13
3-4 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之製備.....	14

3-4-1 胜肽 peptide 3C 之合成、純化及鑑定.....	14
3-4-2 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之合成.....	14
3-4-3 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之鑑定.....	15
3-4-4 PrestoBlue™ 測試法原理及實驗步驟.....	16
第四章 結果與討論.....	17
4-1 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之合成結果.....	17
4-1-1 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石定量分析之結果.....	18
4-1-2 MALDI-TOF MS 鑑定抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之結果.....	20
4-1-3 應用共軛焦顯微鏡分析抗體耦合奈米鑽石與細胞作用之結果.....	21
4-2 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之製備.....	22
4-2-1 胜肽 peptide 3C 合成、純化與分子量鑑定之結果.....	22
4-2-2 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石合成之結果.....	23
第五章 結論與未來展望.....	33
附錄.....	34
參考文獻.....	36

圖目錄

圖 一、奈米鑽石碳原子結構。.....	3
圖 二、利用爆炸法製造奈米鑽石。.....	3
圖 三、碳的溫度/壓力三相圖。.....	4
圖 四、奈米鑽石表面，可經由修飾與處理進而改變表面官能基[15]。.....	5
圖 五、奈米鑽石的用途。.....	5
圖 六、MyoD 的 bHLH 結構胺基酸序列。.....	8
圖 七、提出的設計胜肽對 MyoD-Id1 相互作用的抑制作用的機制。.....	9
圖 八、實驗設計與流程。.....	11
圖 九、抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石。.....	17
圖 十、應用 BCA 蛋白分析法之標準曲線。.....	19
圖 十一、應用 MALDI-TOF MS 分析抗體耦合奈米鑽石之質譜。.....	20
圖 十二、共軛焦顯微鏡影像對於 HT-29 癌細胞之影像。.....	21
圖 十三、固相胜肽合成法合成胜肽 peptide 3C。.....	22
圖 十四、應用 BCA 蛋白分析法之標準曲線。.....	23
圖 十五、胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之 MALDI-TOF MS 質譜。(分子量：1520.4 Da).....	25
圖 十六、胜肽 peptide 3C 浸泡奈米鑽石之 MALDI-TOF MS 質譜。(分子量：1522.2 Da).....	26
圖 十七、奈米鑽石加胜肽 MH 2-4 (浸泡)之 MALDI-TOF MS 質譜。.....	27
圖 十八、奈米鑽石－胜肽 MH 2-4 (鍵結)之 MALDI-TOF MS 質譜。.....	28
圖 十九、樣品在 KBr 粉末與 peptide 3C 耦合奈米鑽石不同體積比的壓片下之 FTIR 圖譜。.....	29
圖 二十、KBr 與 peptide 3C 耦合奈米鑽石之壓片體積比為 7：3 之 FTIR 圖譜。.....	30
圖 二十一、胜肽耦合奈米鑽石之 HT-29 細胞生物活性。.....	32

表目錄

表 1、各濃度 BSA 及抗體耦合之奈米鑽石的上清液之吸收度.....	18
表 2、胜肽 peptide 3C 純化與鑑定之結果.....	22
表 3、各濃度 BSA 及胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石上清液之吸收值.....	24
表 4、應用 PrestoBlue™ 測試法測試 HT-29 細胞活性之各樣品濃度.....	31
表 5、應用 PrestoBlue™ 測試法測試 HT-29 細胞活性存活率之結果.....	32

第一章 研究動機

在許多日新月異的奈米技術與研究不斷進步的同時，人類有機會將這些應用到生物與醫學與每個人息息相關的生活上。生物醫學與奈米材料結合技術更有無限可能的發展潛力與想像空間。我們將利用不同於往的材料-奈米鑽石與生物醫學結合，從生醫標定(Bio labeling)、藥物傳遞 (Drug delivery) 到癌症治療的奈米導彈 (Targeting specific drug delivery) [1, 2]。

奈米鑽石應用於生物方面時，通常是修飾奈米鑽石表面官能基、設計實驗與應用而去探討與生物活性的關聯，以便評估奈米鑽石在生物技術方面的潛在價值[3]。奈米鑽石對於生物活性的非共價鍵結與奈米鑽石表面的官能基作用已經有很多的文獻探討包括對於附著的 cytochrome c，蛋白溶菌酶等等[4, 5]。

大腸癌是台灣目前癌症之首，本論文將先以大腸癌進行探討，由於 EGFR 表現異常在大腸癌的機制中扮演重要角色，臨床標靶用藥也以 EGFR 抗體為主，因此將以 EGFR 的表現為目標而選用抗體 Cetuximab 來耦合奈米鑽石並探討其對大腸癌細胞 HT-29的影響[6, 7]。

另外也選用東海大學化學系龍鳳娣老師實驗室所發表之有效的抗癌胜肽 peptide 3C 來做為藥物與奈米鑽石耦合，胜肽藥物比起一般癌症藥物更容易代謝不易引起免疫反應[8]。精準的個人化醫療是未來癌症研究的重要方向，不但能提高診斷準確度，更能夠在治療上提供最佳化的用藥數據。

第二章 文獻探討

2-1 奈米鑽石在生物醫學之應用

隨著科技不斷的進步，奈米研究發展也越來越快速，製造了越來越小的材料，相關材料除了應用在半導體與光電材料上，也有機會將其應用在生物與醫學上。在生醫應用上，藥物結合奈米材料下，與一般的奈米材料應用不同，近年來在生物醫學的應用上有著許多的研究，從生醫標定 (Bio labeling)、藥物傳遞 (Drug delivery) 到癌症治療的奈米導彈 (Targeting specific drug delivery)[9, 10]。奈米鑽石除了具有優異的物理及化學特性，例如導熱好、耐酸鹼等特性之外，其光譜特性更是重要的一項特色[11]，相比於其他奈米粒子，奈米鑽石可作為更優異的材料也在醫療應用上更具有潛在價值。

2-1-1 奈米鑽石的製作

鑽石是自然界中最硬的物質，除了硬度之外它還有許多優異的物理化學特性，而使其在應用具有許多潛力。又因天然鑽石在自然界中彌足珍貴，所以人工合成鑽石的發展對於奈米鑽石材料方面的應用有很大的幫助。鑽石的學名是-金剛石，我們所見的天然鑽石，皆是在地底深處的高溫高壓環境中成形，鑽石由碳元素所構成，成分與石墨相同，由於鍵結方式不同，以致於產生截然不同的特性，而形成目前已知硬度最高的物質。鑽石的碳原子與另外 4 個碳原子結合，形成 sp^3 的鍵結，使其結構可以無限延伸 (圖一)。雖然鑽石擁有許多優異的特性，應用領域也相當廣泛，卻因稀少使得價格昂貴，因此科學家不斷研究出如何以人工的方式合成鑽石[12]。

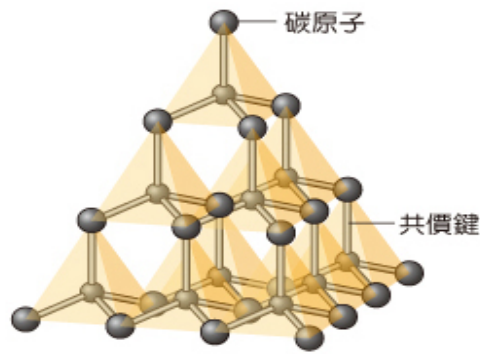


圖 一、奈米鑽石碳原子結構。

來源: http://blog.xuite.net/unold_lin/twblog/151086000-%E5%9C%B0%E7%90%83%E6%9C%80%E7%A1%AC%E7%A4%A6%E7%

在過去鑽石的價格雖居高不下，但因現今科技以發展成由天然鑽石，轉變為人工鑽石，使應用於工業上的鑽石，價格反而平易近民。生產的方式也有許多種，最常用的方法為爆炸法如圖二(爆炸法為在密閉空間中使用 TNT 或是 RDX 爆炸，因其爆炸時會產

生缺氧狀態，而將炸藥中的石墨轉換而成鑽石，此時因為壓力瞬間消失，但爆炸的溫度極高，所以必須用各種方法快速冷卻，以免讓鑽石因高溫下再度轉換成為石墨)，或是利用音波法等其它方式生產鑽石。

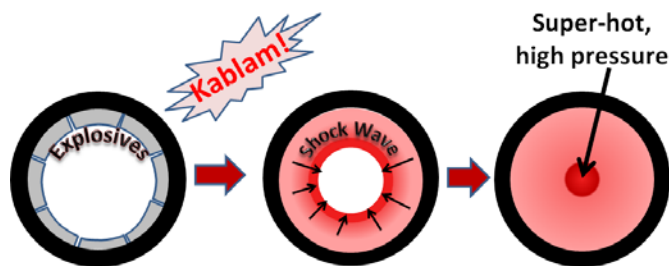


圖 二、利用爆炸法製造奈米鑽石。

來源: http://www.plasmachem.com/contentenglish/nanopowders_technology.html

在所有生產方式中，又以爆炸法所得到的奈米鑽石的產率最高，利用爆炸法合成時因其於高溫下失去壓力時會使鑽石轉換成石墨，故初產出的奈米鑽石會在其外圍包覆著大約 40%的碳，此碳的結構大部分為石墨。此時剛形成未經過任何處理的奈米鑽石為奈米鑽石黑粉，也因為包覆著這層黑碳，讓奈米鑽石的表面有著許多官能基，在去除這層石墨層前的奈米鑽石黑粉有許多用途，比如作為添加劑、潤滑油等等。而奈米鑽石灰粉就是，當黑粉外層的碳經過硫酸與硝酸已一定比例混合洗滌後，此時奈米鑽石顏色會呈現灰黑色，也才能做大小粒徑的處理，且純度大於 99%。這時的奈米鑽石稱之為奈米鑽石灰粉，灰粉大多使用在研磨拋光上，也可應用於治療標靶上作為藥物載體(圖三)[13]。

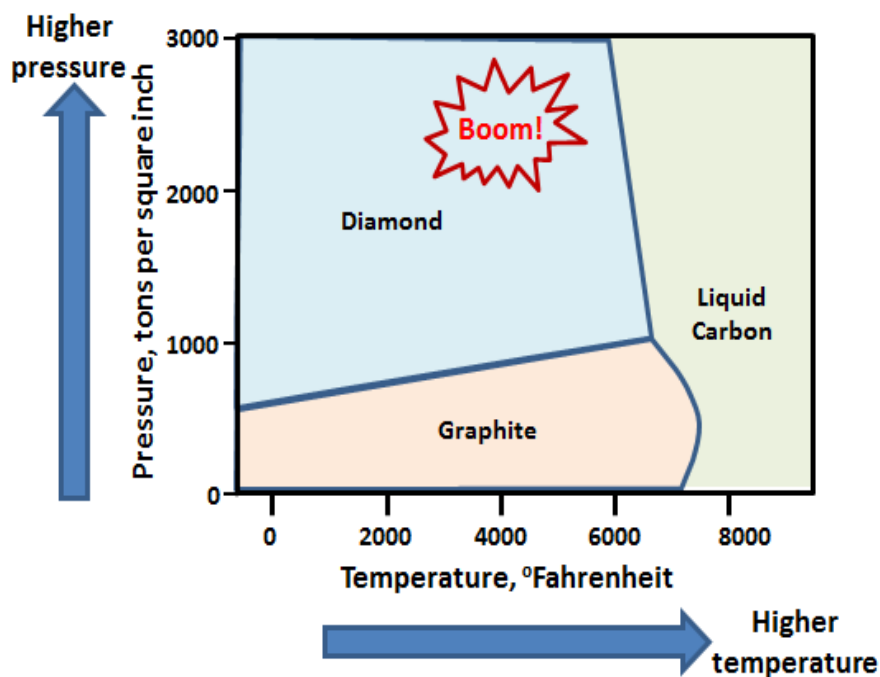


圖 三、碳的溫度/壓力三相圖。

來源: <http://sustainable-nano.com/2014/01/23/nuclear-proliferation-sustainability-the-history-of-nanodiamonds/>

人工奈米鑽石粉末在經過酸洗處理後表面會有著化學官能基 (羥基, Carboxylic acid group, -COOH)，藉由此化學官能基使我們能於奈米鑽石表面上有不同的功能修飾，經過 24 -72 小時的酸洗後再用純水清洗離心，最終離心管底部有深藍色的沉澱物即為羥基化後的奈米鑽石 (Carboxylated Nanodiamond, cND)。因奈米鑽石其表面具有很

多的-COOH，而使其有各種修飾、官能基化，能應用於多種用途（圖四、圖五）[14]。

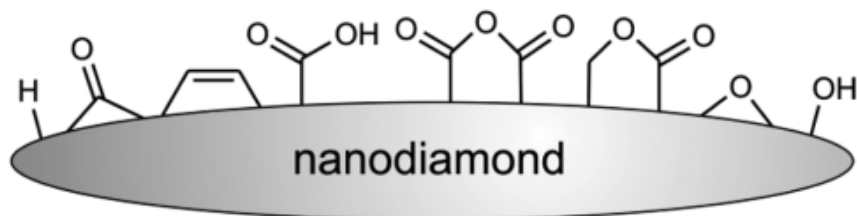


圖 四、奈米鑽石表面，可經由修飾與處理進而改變表面官能基[15]。

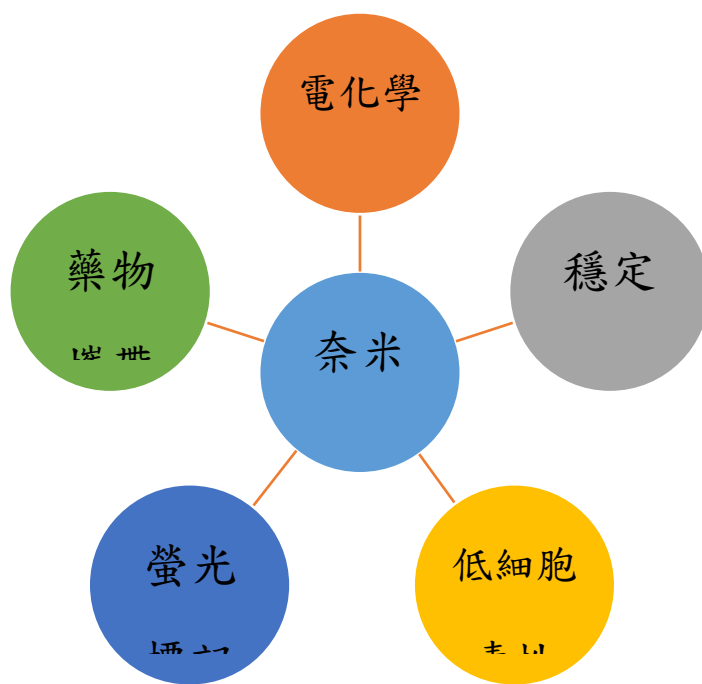


圖 五、奈米鑽石的用途。

2-1-2 奈米鑽石的特性

2-1-2-1 奈米鑽石應用於光譜檢測

可利用傅利葉轉換紅外光譜儀 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, FTIR) 辨識奈米鑽石上吸收紅外光後所產生之震動頻率來判斷是否成功官能基化。在生物醫學研究中，常使用螢光染劑來標定目標，使我們能看到實驗中的成果。不過現今所使用的螢光會因為激發時間過長使得螢光失效，導致一般螢光劑在應用上受到限制。奈米鑽石因有穩定的螢光光源，是因為在製造過程中的因素影響。當氮原子在鑽石生產中占據原先碳原子的位置後又脫離，使其位置有一氮空缺 (Nitrogen Vacancy, NV)，而該缺口在接受可見光激發後便會發出螢光，故此缺口能使奈米鑽石穩定的發出螢光訊號 [16, 17]。

2-1-2-2 奈米鑽石的生物相容性

將無機的奈米普及運用於生活日常上時，材料的毒性便會受到重視，尤其是應用於生物醫療上更是需要注意。一般認為奈米鑽石作為奈米材料具有較佳的生物相容性。相較於其它奈米材料，雖然有著螢光、光譜較強的特性卻因為其具有生物毒性，而在生物的應用上容易受到限制。由於奈米鑽石有極強的碳共價鍵結構使其性質上不易產生反應，此外人體由碳、氫、氮、氧和硫等有機物質所構成，故選擇與生物體元素構成相似之奈米材料，被普遍認為是較具潛力的應用。在國際上各類的研究文獻皆證明了奈米鑽石不具生物細胞毒性 [18, 19]。

2-2 大腸癌簡介

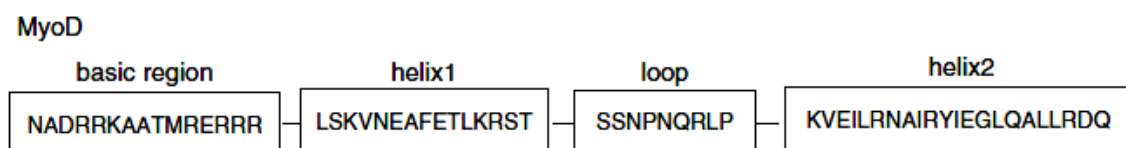
國民健康署的癌症研究報告中，大腸癌發生率每年有快速增長的趨勢，十大癌症死亡排名中，前三名分別為第一名的「肺癌」、第二名的「肝癌」以及第三名的「結腸直腸和肛門癌」也即是大腸癌，另外大腸癌在台灣的發生率位居第二[20]。

大腸癌的發生與我們的生活習慣有著很大的關聯，除了與遺傳、基因有關外，飲食也被認為是原因之一。現代人工作繁忙，多以外食為主，飲食不均衡，罹患大腸癌的機率就有可能提高[21]。大腸癌的初期症狀並不明顯、沒有甚麼症狀，但可以藉由篩檢而早期檢查出來並治療。

在早期接受治療的大腸癌患者，存活率可高達9成以上。目前雖然有提供糞便檢查，但經過調查指出，接受檢查的比率只有10%。癌症的發生都有階段性進展，以大腸癌來說，大腸癌的前身是瘻肉，所謂的瘻肉是大腸黏膜的異常增生，剛發生時為無害，當瘻肉大於2公分時，慢慢轉成癌症的機率就會提高，甚至轉移到其他部位。要預防大腸癌，最關鍵的還是要從飲食以及生活上改變，除了每日所需攝取的蔬菜量，最好都能選擇各種顏色的蔬果。蔬果裡除了富含的維他命，所含有的纖維也能幫助腸胃蠕動，此外水份也扮演重要的角色，能使不好的東西不會停留在腸道太久，導致病變，由於油炸食品會使食物產生致癌物質，所以能少吃就少吃，也包含紅肉類的加工食品。除了飲食外，現在人因為工作而久坐使得運動量減少，適當的運動、良好的作息也能減少罹患大腸癌的風險。有大腸癌家族史的危險群更建議三年接受一次大腸鏡檢查，而50至74歲的民眾則建議每2年至少應有1次糞便潛血檢驗，才能早期發現早期治療[22]。

2-3 胜肽 peptide 3C 之介紹

Id (DNA 結合蛋白的抑製劑或分化抑製劑) 作為 helix-loop-helix (bHLH) family 裡的負調控轉錄因子在細胞的發育、增殖和分化中扮演重要的角色。因此，它一直是癌症干預的潛在目標[23-25]。Id 家族 (Id1-4) 的四個成員具有相似的胺基酸序列，其表達模式在胚胎中被細分。Id1 第一個 Id 蛋白，因其具有抑制 DNA 結合的 bHLH 的轉錄因子。Id1 與 E 蛋白和 Ets 蛋白之間的關聯對於 Id1 在腫瘤細胞週期中的作用具有重要意義[26]，其也在腫瘤的生長中扮演重要的角色，因此能成為設計抗腫瘤藥物的目標。MyoD 蛋白是具有 bHLH 結構的 DNA 結合序列，而 Id1 蛋白透過其所具有的 HLH 與 MyoD 的 bHLH 結構域形成高親和性的二聚體[27]，而防止 MyoD 與 DNA 結合並抑制分化相關基因的轉錄(圖六)。Peptide 3C 是利用 MyoD 作為模板所設計出的中斷 Id1、MyoD 和其他 DNA 結合蛋白 (如腫瘤抑制相關的 bHLH 轉錄因子) 之間的相互作用，以達到抑制癌細胞的增殖作用，如圖七所示。



圖六、MyoD 的 bHLH 結構胺基酸序列。

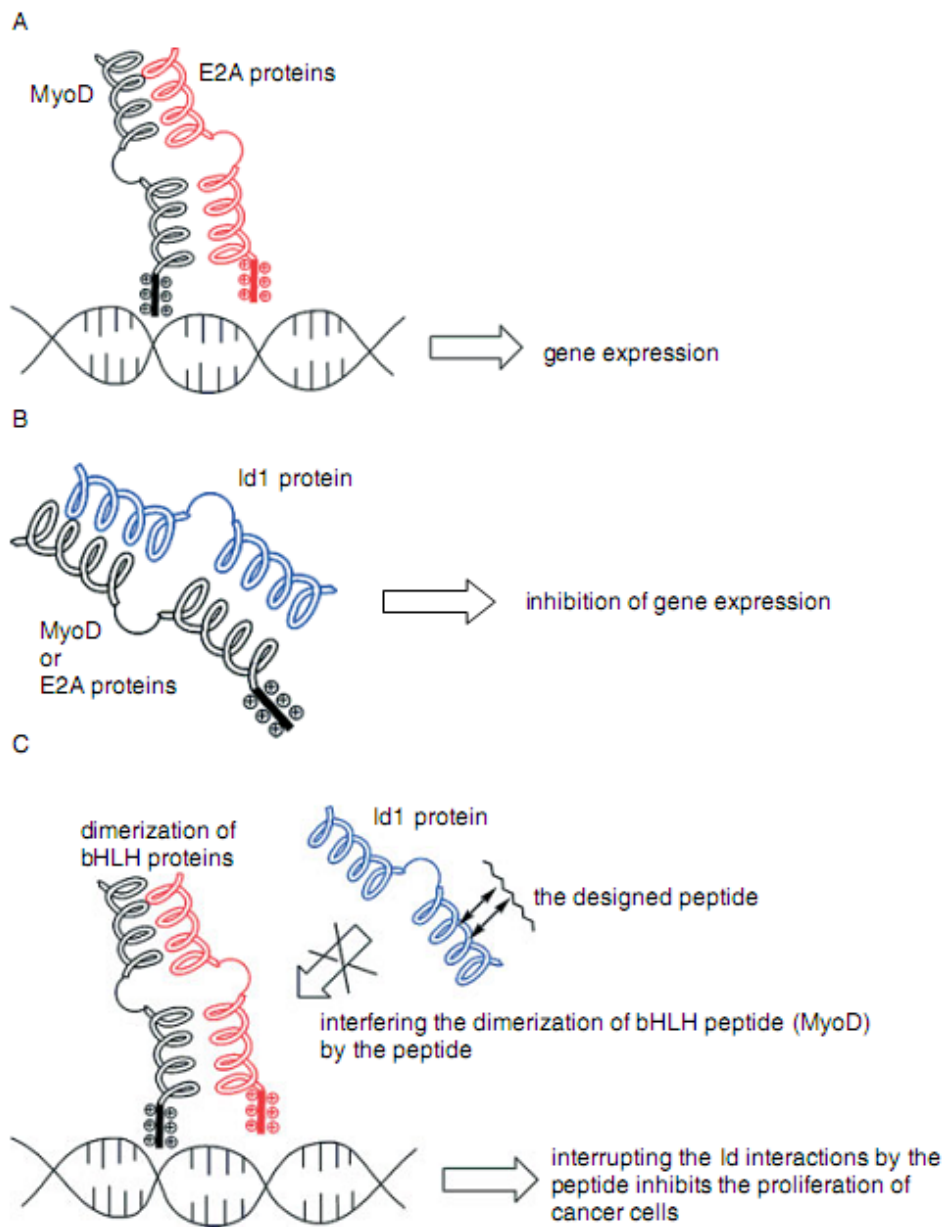


圖 七、提出的設計胜肽對 MyoD-Id1 相互作用的抑制作用的機制。

第三章 實驗方法

3-1 實驗設計與流程

本實驗將利用奈米鑽石做為藥物載體來分析是否能比單純使用藥物效果來的好，而減少藥物的使用劑量以及更有效率的應用醫療資源，規劃之實驗流程如下：1. 將已處理之羧基化奈米鑽石分為兩部分：(A)抗體耦合(B)胜肽藥物耦合，2. 抗體選用 Cetuximab，而胜肽為應用固相胜肽合成法合成東海大學化學系龍鳳娣教授已發表之胜肽 peptide 3C；3. 應用 BCA 蛋白質濃度分析法各別檢測抗體以及胜肽耦合奈米鑽石之濃度；4. 各別檢測抗體以及胜肽耦合奈米鑽石之生物活性。上述實驗設計與流程，彙整如圖八：

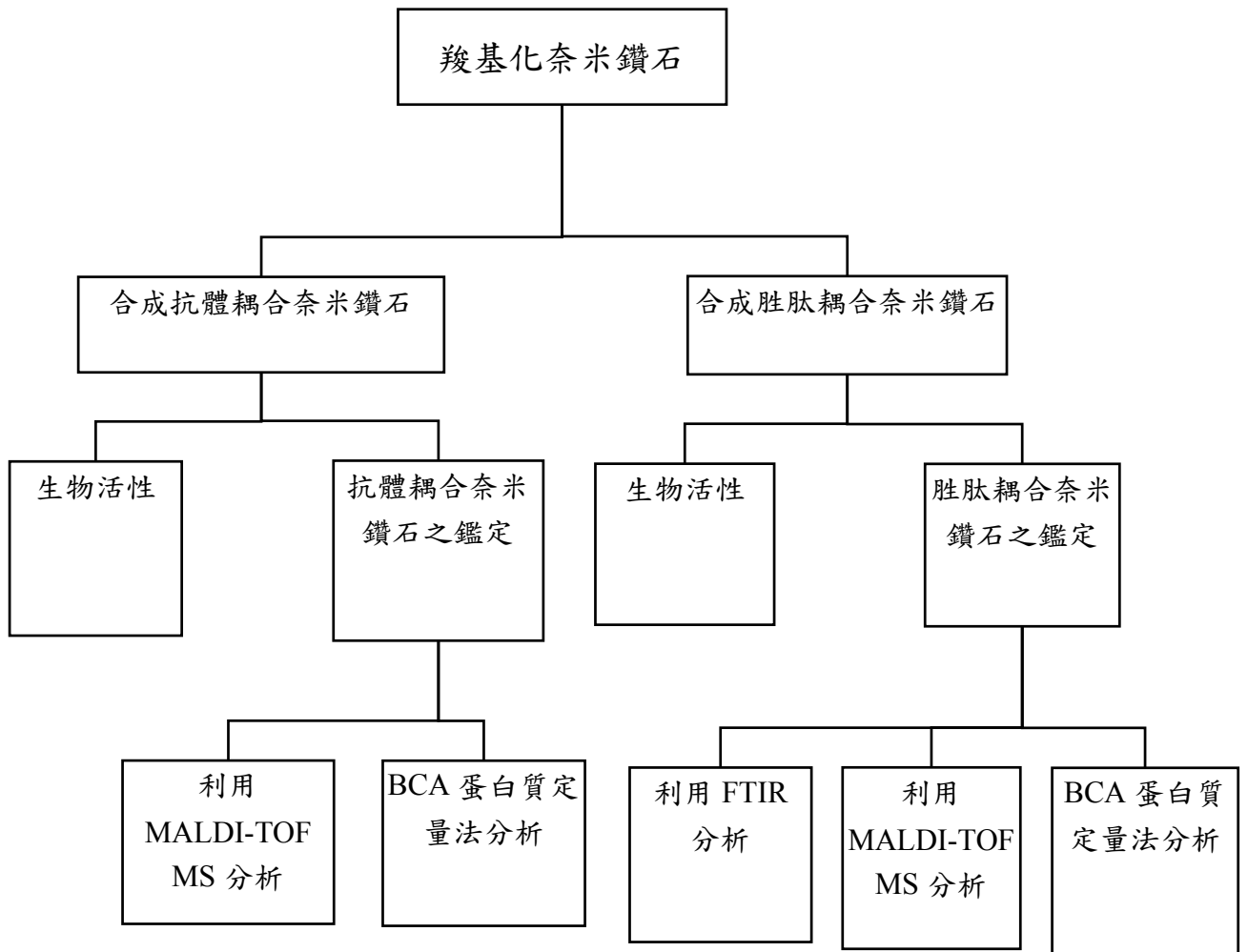


圖 八、實驗設計與流程。

3-2 羧基化奈米鑽石之製備

奈米鑽石是由碳原子組成的，被認為具有低細胞毒性、良好的生物相容性、表面容易修飾、光穩定度佳及化學穩定度高等優點，所以適合當做生物標記。奈米鑽石表面包覆了一層疏水性的 C-H 鍵結，經由強氧化酸 ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{HNO}_3 = 3 : 1$) 酸洗的步驟，將其氧化成具有 -COOH 或其他含氧官能基，而這些修飾後的奈米鑽石對胺基酸、蛋白質以及 DNA 有很強的吸附力。所有實驗使用之修飾後的 100 nm 奈米鑽石均為東海大學林宗欣老師所提供。所得到之奈米鑽石先用 DDW 超音波震盪清洗 3 次後離心並將奈米鑽石冷凍抽乾以待實驗用。

3-3 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石

3-3-1 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之合成

修飾後的 100 nm 奈米鑽石其表面有許多的羧基 -COOH，COOH 與 EDC/NHS 反應後形成含有 NHS 的 ester bond。具有 ester bond 的奈米鑽石表面較容易的與抗體的耦合。所使用的抗體 Cetuximab 為東海大學趙偉廷老師所提供。

取 1 mg 羧基化之 100 nm 奈米鑽石加入 EDC (0.04 M) 500 μL 和 NHS (0.01M) 500 μL 預混後活化官能化之奈米鑽石在室溫下反應 15 mins，再以 HBS-EP 清洗奈米鑽石 3 次，再加入緩衝液 sodium acetate (1.5 mg/mL, pH=3.5) 800 μL 和 抗體 Cetuximab (5 mg/mL) 200 μL 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 2 hrs 後離心 (1000 rpm) 取其上清液進行 BCA 檢測定量，HBS-EP 清洗奈米鑽石 3 次再加入 1 M ethanolamine (pH = 8.0) blocking 在室溫下反應 2 hrs，一樣以 HBS-EP 清洗 3 次最後將製備完成之功能化之奈米鑽石存放於 HBS-EP 緩衝液中。

3-3-2 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之鑑定

3-3-2-1 應用 MALDI-TOF MS 鑑定抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石

應用 MALDI-TOF MS 測分子量，樣品分別為 a. 未修飾的奈米鑽石、b. 抗體 Cetuximab、c. 已耦合的奈米鑽石，進行測試並利用正離子模式在 80% 雷射強度、150 shots 和 350 ns 延遲時間下，所使用的基質為 sinapinic acid。抗體 Cetuximab 的測量誤差小於 0.2%。

3-3-2-2 BCA 蛋白質定量分析法之實驗步驟

蛋白質標準曲線的制定：

蛋白質 BSA 以最大 2.0 mg/mL 的濃度，持續稀釋成為 1.0 (mg/mL)、0.5 (mg/mL)、0.25 (mg/mL)、0.125 (mg/mL) 和 0.0625 (mg/mL) 共六種濃度。各濃度之 BSA 蛋白溶液中取出 18 μ L 分別加入 180 μ L 的 BCA 試劑。之後利用微量分光光譜儀測量 (562 nm 吸光值)，並根據吸光值繪製出 BSA 標準曲線之公式。接著再將與抗體耦合反應後之奈米鑽石的上清液與 BCA working solution 以比例 1 :10 混合 (上清液 18 μ L，BCA working solution 180 μ L)，(五重複) 依序注入 96 孔盤中，再以鋁箔紙包覆避光，放入烘箱 15 分鐘 (37°C)，之後利用微量分光光譜儀測量 (562 nm 吸光值)。將上清液之吸光值代入方程式，再乘上稀釋倍數，即可求得相當於 BSA 蛋白質的濃度。

3-4 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之製備

3-4-1 胜肽 peptide 3C 之合成、純化及鑑定

Peptide 3C 之合成、純化及鑑定均為東海大學化學系龍鳳娣老師實驗室所建立之實驗方法。胜肽合成所使用之方法為固相胜肽合成法 (SPPS)，利用逆相高效能液相層析儀 (RP-HPLC) 純化胜肽，再使用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 鑑定。

3-4-2 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之合成

取 1 mg 羧基化之 100 nm 奈米鑽石加入 EDC (0.04 M) 500 μ L 和 NHS (0.01M) 500 μ L 預混後活化官能化之奈米鑽石在室溫下反應 15 mins，再以 DDW 清洗奈米鑽石 3 次,再加入緩衝液 sodium acetate (1.5 mg/mL, pH=3.5) 1000 μ L 和 peptide 3C 1 mg 粉末耦合在室溫下反應 overnight 再離心後取其上清液進行 BCA 蛋白質定量，DDW 清洗奈米鑽石 3 次再加入 1 M ethanolamine (pH = 8.0) blocking 反應 2 hrs，一樣以 DDW 清洗 1 次最後將製備好功能化之奈米鑽石冷凍抽乾後保存。

3-4-3 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之鑑定

3-4-3-1 MALDI-TOF MS 與 BCA 蛋白質定量分析法之實驗步驟

蛋白質標準曲線的制定：

蛋白質 BSA 以最大 10.0 mg/mL 的濃度，持續稀釋成為 5.0 (mg/mL)、2.5 (mg/mL)、1.25 (mg/mL) 和 0.625 (mg/mL) 共五種濃度。各濃度之 BSA 蛋白溶液中取出 18 μ L 分別加入 180 μ L 的 BCA 試劑。之後利用微量分光光譜儀測量 (562 nm 吸光值)，並根據吸光值繪製出 BSA 標準曲線之公式。接著再將與胜肽耦合反應後之奈米鑽石的上清液與 BCA working solution 以比例 1:10 混合 (上清液 18 μ L, BCA working solution 180 μ L)，(五重複) 依序注入 96 孔盤中，再以鋁箔紙包覆避光，放入烘箱 15 分鐘 (37°C)，之後利用微量分光光譜儀測量 (562 nm 吸光值)。將上清液之吸光值代入方程式，再乘上稀釋倍數，即可求得相當於 BSA 蛋白質的濃度。

3-4-3-2 傅利葉轉換紅外光譜 (FTIR) 鑑定胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之原理

紅外線光譜 (IR) 的原理是利用分子中的各種不同鍵結結構產生分子間振動及轉動模式時，吸收了適當的紅外光能量而得到的光譜，由於紅外線光譜能提供分子結構特性的資料，除了光學異構物外，有機化合物的光譜幾乎沒有完全一樣的。在這裡借助紅外線光譜，來檢測 peptide 3C 耦合奈米鑽石之間的鍵結。

3-4-4 PrestoBlue™ 測試法原理及實驗步驟

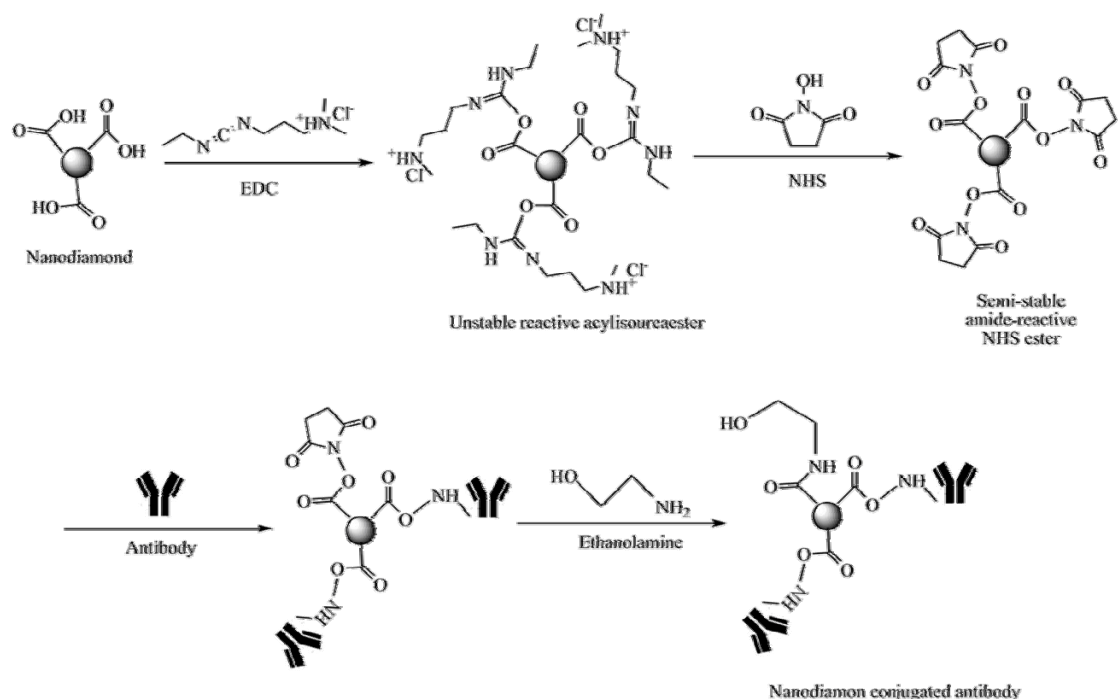
PrestoBlue™ 試劑為一種刃天青 (resazurin) 溶液。它利用活細胞的還原能力來定量測定培養盤中的細胞活性。PrestoBlue™ 試劑中包含了一種細胞通透性的化合物，這種化合物是藍色的且沒有螢光，在加入細胞後 PrestoBlue™ 試劑被活細胞還原變成粉紅色^[3]。

本實驗室將人類大腸癌細胞以 RPMI-1640 培養液，培養於細胞培養盤中。當細胞生長到培養盤的八分滿時，抽去培養液再加入 2 mL 的 TE 緩衝液 (trypsin-EDTA, TE)，待 3~5 分鐘，培養盤中的細胞會脫離培養盤的底部 (trypsin 作用為分解細胞附著在培養盤的附著蛋白質，EDTA 作用為去除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金屬離子，以避免金屬離子影響 trypsin 的作用效果，讓細胞易與培養盤分開)。用 5 mL 的培養液清洗細胞培養盤，並收集培養盤中的溶液至 15 mL 離心管內，在轉速 1500 rpm 下離心 5 分鐘，最後取其沉澱物，加入 10 mL 培養液並取細胞懸浮液 10 μL 計數細胞濃度，使細胞濃度為 1×10^5 cells/mL，取細胞液 300 μL 至 24 孔盤中培養至隔天等細胞貼附後，加入胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之樣品，培養 24 小時，再加入 PrestoBlue™ 試劑(1 : 10 PrestoBlue™/Medium) 測量細胞存活率，且因 PrestoBlue™無需用 DMSO 溶解結晶較 MTT 更精準及安全。

第四章 結果與討論

4-1 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之合成結果

已經羧基化的奈米鑽石利用 EDC/NHS 修飾表面官能基產生反應，使其帶 ester bond，利用抗體的 N 端去結合。EDC/NHS 的活化反應條件最佳在 pH 5.0~7.0 微酸溶液環境下進行。其反應時間為 15 mins，當 EDC 和 NHS 混合在溶液中時便會開始反應，反應會隨著時間的增加而漸漸的失去活性，因此活化反應時間選擇 15 mins。再以 HBS-EP buffer 清洗 3 次，並於 sodium acetate (1.5 mg/mL) 800 μ L 溶液中與抗體 Cetuximab (5 mg/mL) 200 μ L 耦合反應 2 hrs，耦合後離心取上清液以 BCA 蛋白分析法定量(圖九)。



圖九、抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石。

4-1-1 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石定量分析之結果

做抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石實驗時，並不探討奈米鑽石耦合上抗體 Cetuximab 的濃度，不過由於抗體 Cetuximab 是昂貴的標靶藥物，避免在合成上的浪費因此做了 BCA 蛋白質定量分析，而取奈米鑽石耦合抗體 Cetuximab 之上清液測吸收度。我們以不同濃度的牛血清白蛋白 (BSA) 之吸光度繪製 BSA 標準曲線。結果整理於表 1 及圖十。

表 1、各濃度 BSA 及抗體耦合之奈米鑽石的上清液之吸收度

BSA 標準品濃度 (mg/mL)	Ab ₅₆₂ (平均值)
0.0625	0.1523
0.125	0.1713
0.250	0.2240
0.500	0.2983
1.000	0.4650
2.000	0.8527
抗體 Cetuximab 耦合之奈米鑽石的上清液吸收值(前)	0.330333
抗體 Cetuximab 耦合之奈米鑽石的上清液吸收值(後)	0.299

圖十、應用 BCA 蛋白分析法之標準曲線。

濃度分別為 0.0625、0.125、0.250、0.50、1.0、2.0 mg/mL，於波長 562 nm 下偵測吸光度。(R² = 0.9983)

利用濃度分別為 0.0625、0.125、0.250、0.50、1.0、2.0 mg/mL 的 BSA 與對應濃度之吸收度做圖。經由計算後可得到方程式: $y=0.359x+0.125$ ，將上清液前後的吸收度帶入方程式，即可求得抗體 Cetuximab 耦合上奈米鑽石的濃度(圖十)。依數據可得在 1 mg 的奈米鑽石上可耦合上大約 0.087mg (5.810^{-10} mole) 抗體 Cetuximab。

4-1-2 MALDI-TOF MS 鑑定抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石之結果

應用 MALDI-TOF MS 去確認抗體是否成功耦合上奈米鑽石表面，可由圖十一觀察到 A、B、C 分別為只有奈米鑽石、抗體 Cetuximab 與抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石，圖十一(B)可得到抗體 Cetuximab 的質量為 152,635 Da，(C)已耦合抗體的奈米鑽石的質量為 152,690 Da，以此確認抗體耦合上奈米鑽石。

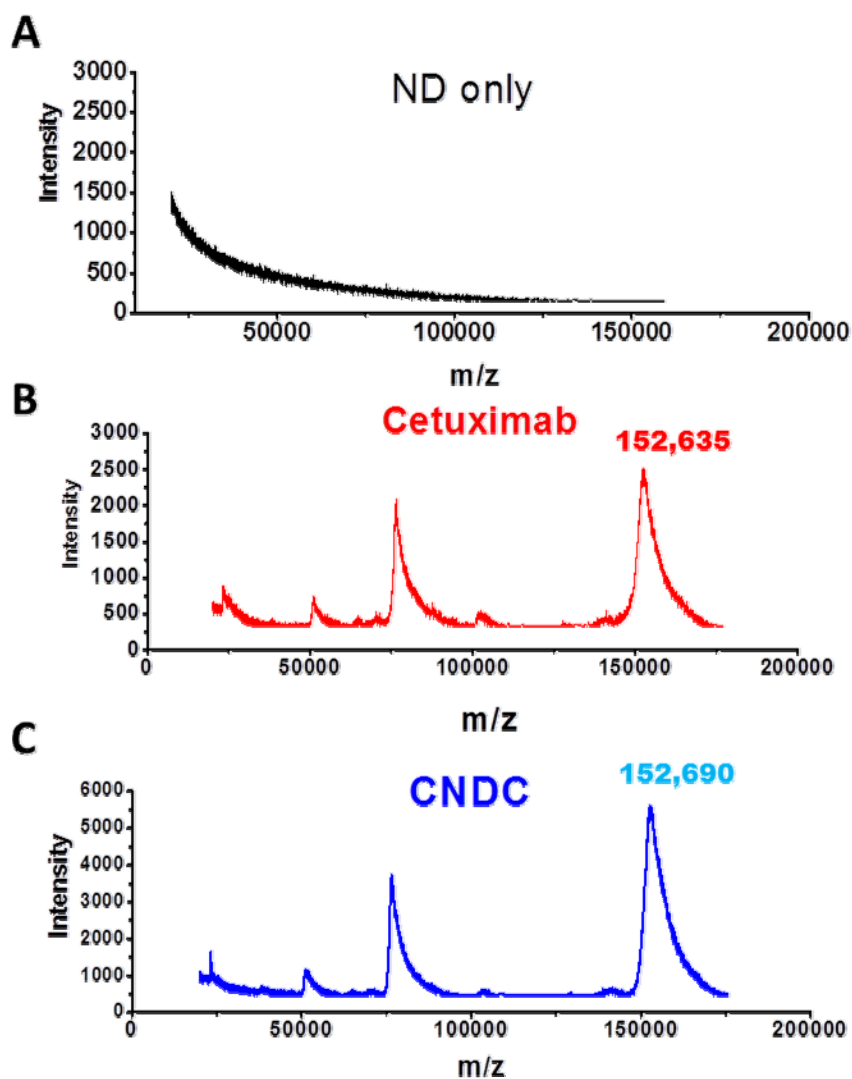


圖 十一、應用 MALDI-TOF MS 分析抗體耦合奈米鑽石之質譜。

4-1-3 應用共軛焦顯微鏡分析抗體耦合奈米鑽石與細胞作用之結果

合成後之抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石提供給私校能量計畫合作—東海大學生科系林玉雯老師，實驗利用共軛焦顯微鏡所鑑定出的螢光圖譜 (圖十二)；在大腸癌細胞 HT-29 可發現抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石所發出的螢光在細胞表面 (A) 並用另一種市售 anti-EGFR 抗體作為對照 (B)，並將其影像重疊 (C)。

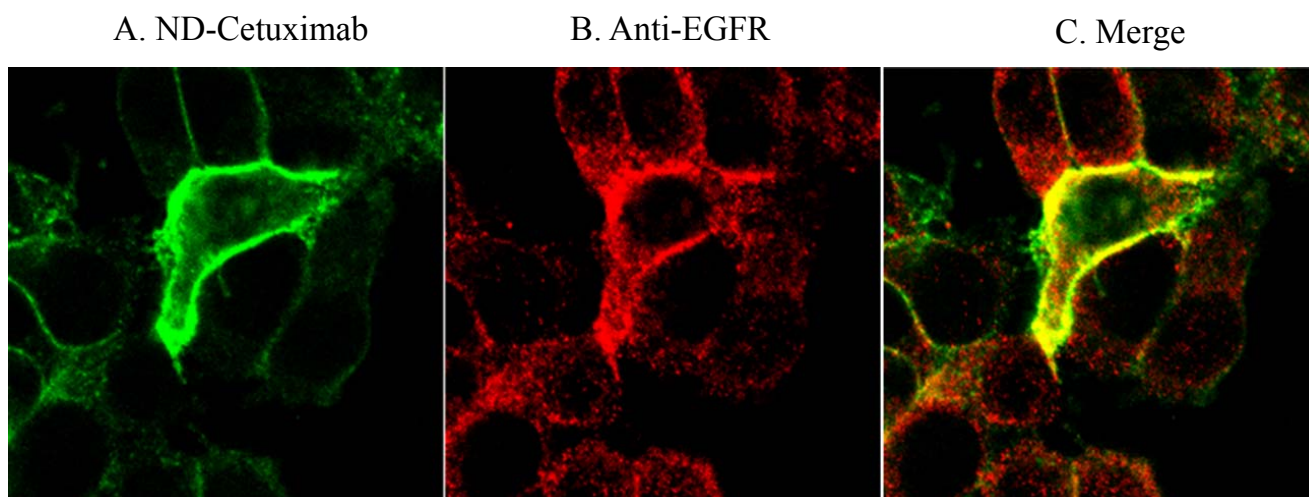


圖 十二、共軛焦顯微鏡影像對於 HT-29 癌細胞之影像。
(A) ND-Cetuximab (B) Anti-EGFR (C) Merge 之影像。

結果顯示發現在圖十二 (A) 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石能成功表現在細胞表面，(B)為市售 anti-EGFR 抗體，在經過影像重疊後也可發現(C)，其螢光所表現的位置也相同，證明抗體 Cetuximab 不會因為與奈米鑽石耦合而失去其活性。

4-2 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之製備

4-2-1 胜肽 peptide 3C 合成、純化與分子量鑑定之結果

依固相胜肽合成法合成胜肽 peptide 3C，並應用 RP-HPLC 純化胜肽，進一步將 RP-HPLC 純化之胜肽應用 MALDI-TOF MS 鑑定分子量(表 2、圖十三)，並於附錄附上詳細圖譜(附錄一、附錄二)。

表 2、胜肽 peptide 3C 純化與鑑定之結果

名稱	序列	理論分子量 (Da)	實際分子量 (Da)	滯留時間 (min)
Peptide 3C	H-YIEGLQALLRDQC-N H ₂	1520	1521.7	14.73

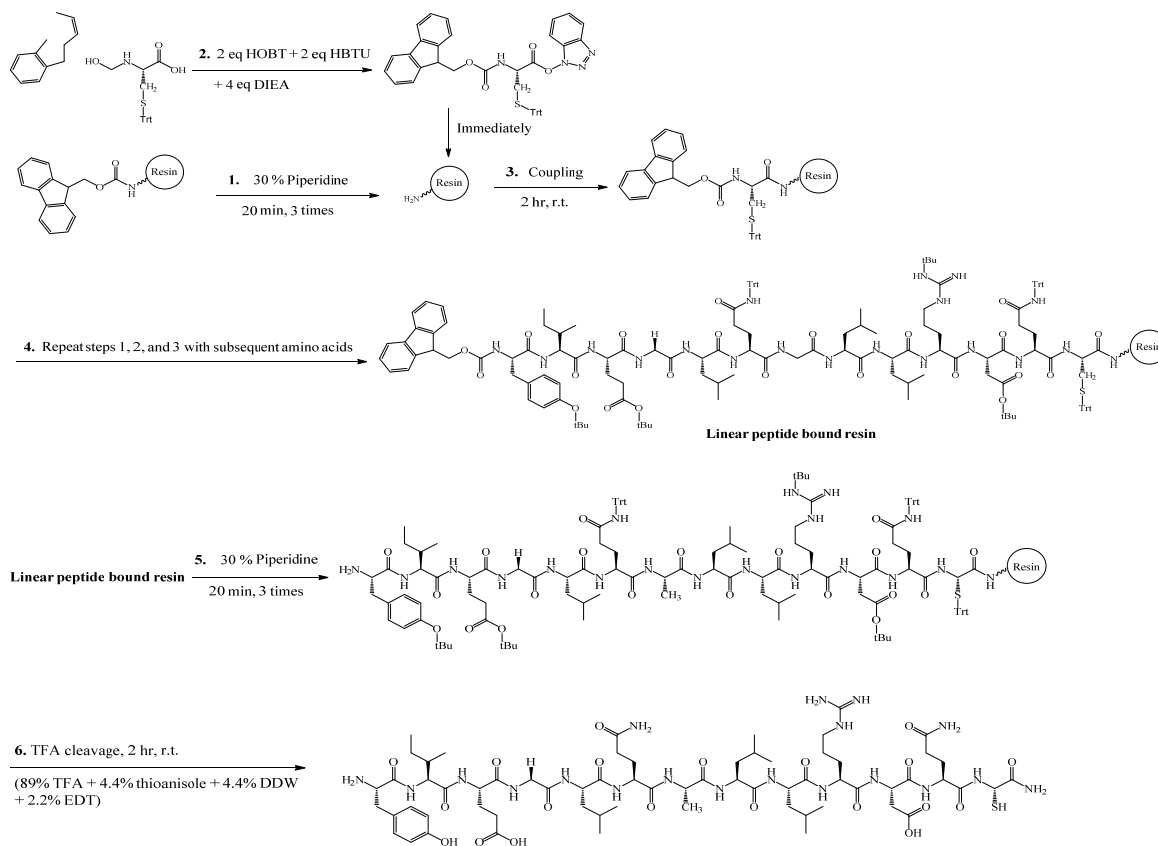


圖 十三、固相胜肽合成法合成胜肽 peptide 3C。

4-2-2 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石合成之結果

4-2-2-1 胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石定量分析之結果

利用 BCA 蛋白分析法定量奈米鑽石耦合 peptide 3C 時，因溫度會影響其反應速率，但當反應太久也會使得吸收值太大，導致標準曲線不準確，因此每次實驗的反應時間以及溫度都需相同，才能使實驗得以做對照。我們以不同濃度的牛血清白蛋白 (BSA) 之吸光度繪製 BSA 標準曲線。結果整理於圖十四及表 3。

圖 十四、應用 BCA 蛋白分析法之標準曲線。

濃度分別為 0.625、1.25、2.50、5.0、10.0 mg/mL，於波長 562 nm 下偵測吸光度。(R² = 0.9912)

表 3、各濃度 BSA 及胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石上清液之吸收值

BSA 標準品濃度 (mg/mL)	Abs ₅₆₂ (平均值)
0.625	0.3271
1.25	0.5308
2.50	0.8416
5.0	1.3622
10.0	2.2184
胜肽 peptide 3C 耦合之奈米鑽石的上清液吸收值(前)	0.781
胜肽 peptide 3C 耦合之奈米鑽石的上清液吸收值(後)	0.656

為了確定奈米鑽石上的胜肽 peptide 3C 而做了 BCA 定量分析，而取其上清液測吸收度。再將其與所做的標準曲線代入公式求得之濃度，依此數據可得在 1 mg 的 100 nm 奈米鑽石上可耦合大約 0.6 mg (3.910^{-7} mole) 胜肽 peptide 3C (表 3)。

此結果與 (5.810^{-10} mole) 抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石相比，可發現在相同的奈米鑽石條件下其耦合莫耳數比約為 1 : 650，此結果可能是因為分子量較小能接上較多胜肽，故抗體因為分子量以及體積較大而導致立體障礙產生。

4-2-2-2 應用 MALDI-TOF MS 鑑定 peptide 3C 耦合奈米鑽石之結果

應用 MALDI-TOF MS 鑑定胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石時，也加入了 peptide 3C 與奈米鑽石單純的浸泡作為對照組，但不加入 EDC/NHS 活化。並依照相同的實驗步驟後，利用 DDW 潤洗後冷凍抽乾成粉末，再使用 MALDI-TOF MS 進行鑑定分析。結果整理於圖十五及圖十六。

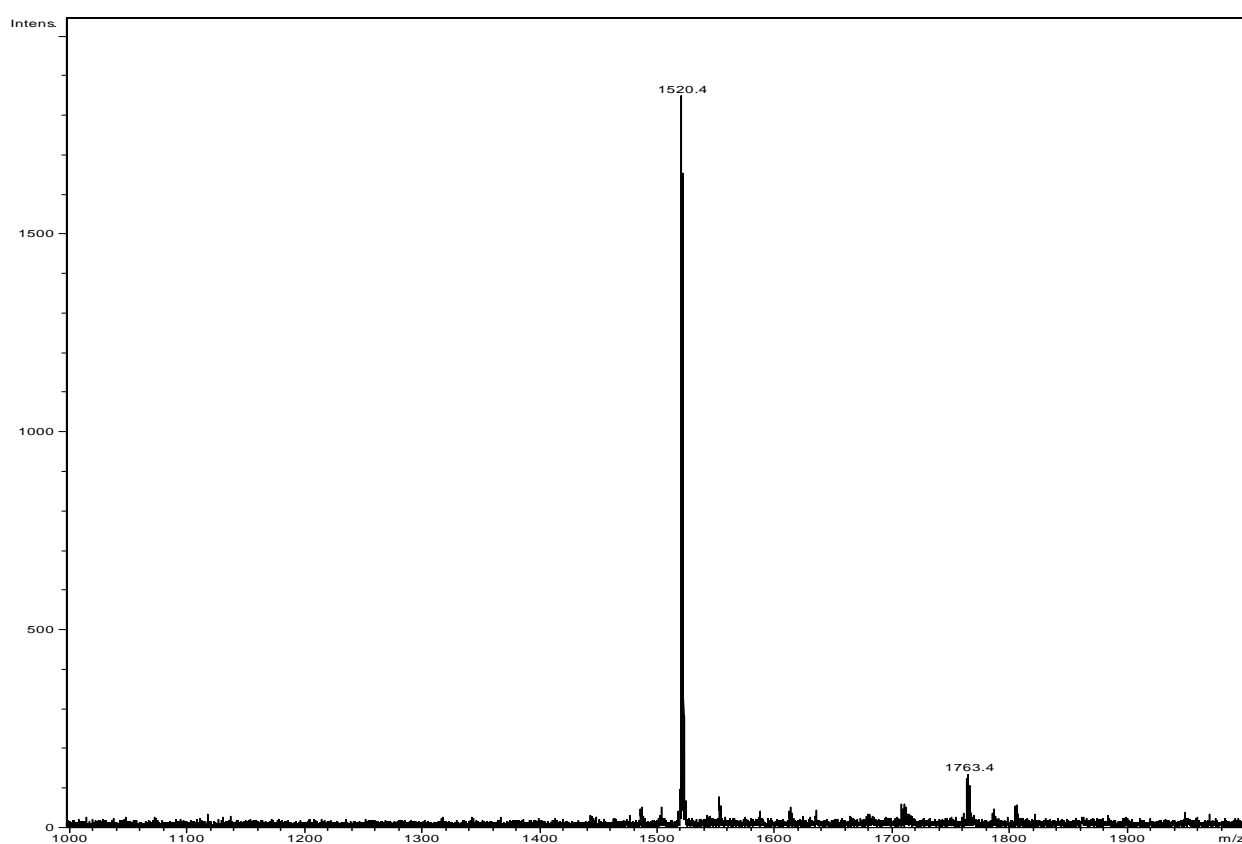


圖 十五、胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石之 MALDI-TOF MS 質譜。(分子量：1520.4 Da)

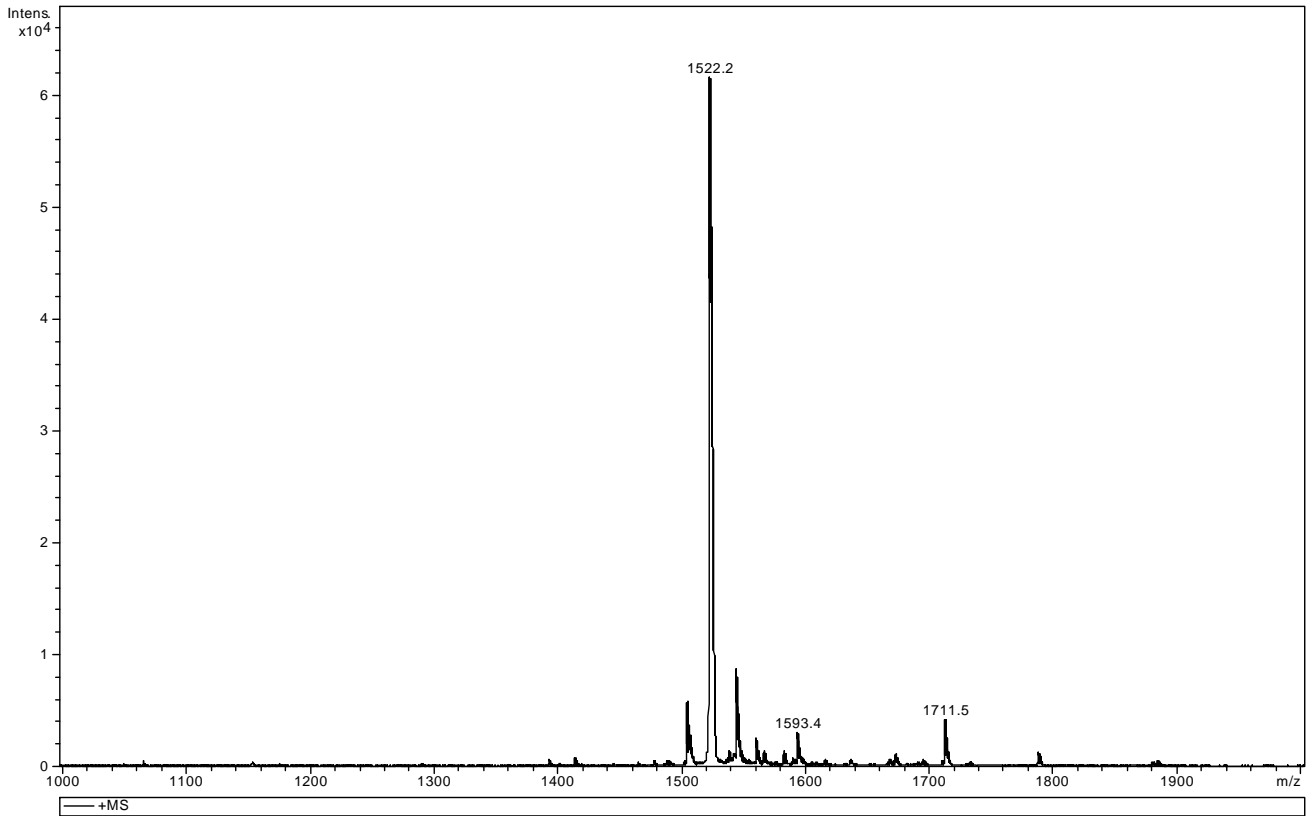
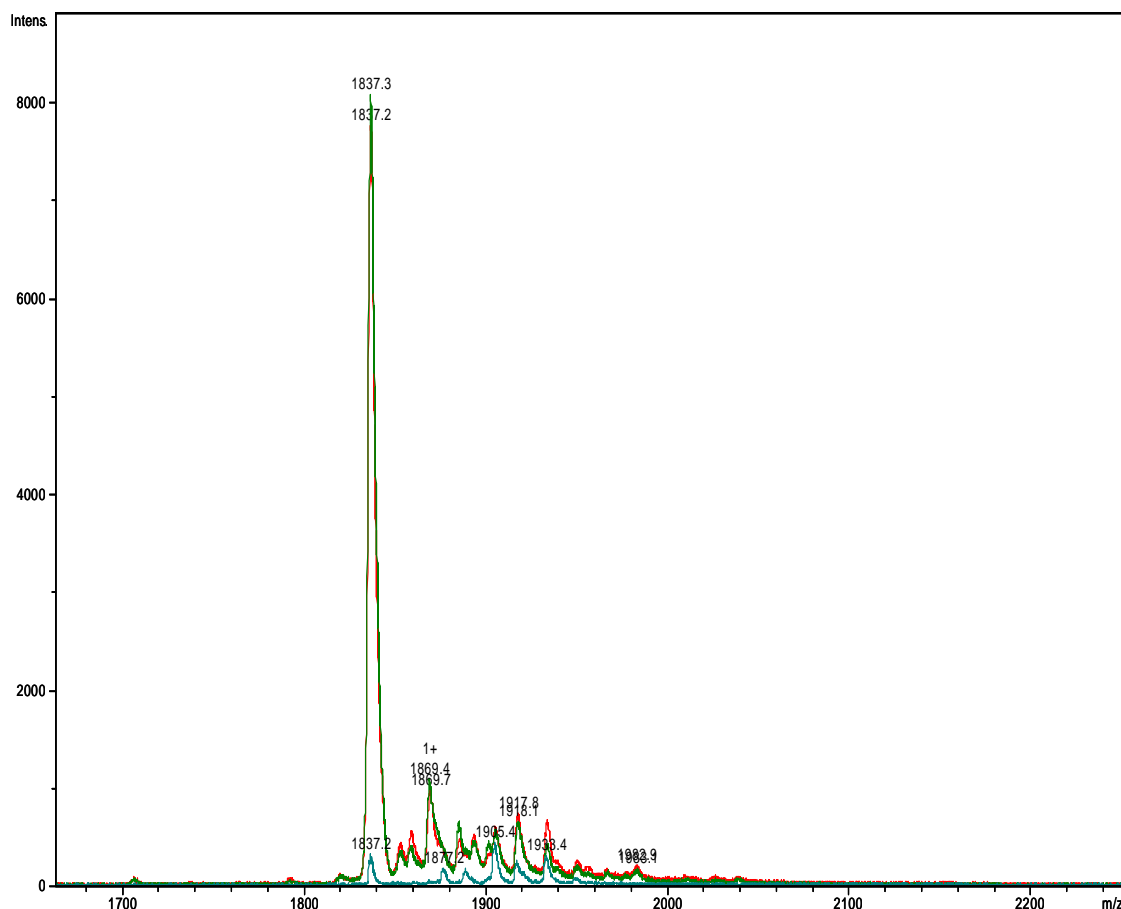


圖 十六、胜肽 peptide 3C 浸泡奈米鑽石之 MALDI-TOF MS 質譜。(分子量：1522.2 Da)

結果發現在質譜圖分析中有著很高的訊號 (圖十五、圖十六)，證實了奈米鑽石具有很高的吸附性，但這說明了較難證明 peptide 3C 是否成功耦合上奈米鑽石或只是吸附於奈米鑽石表面。

4-2-2-3 應用 MALDI-TOF MS 分析比較共價鍵結與吸附於奈米鑽石測驗之結果

當發現奈米鑽石具有很強的吸附性後，測試了應用何種方式把吸附的胜肽洗掉，使用了幾種不同的溶劑去清洗。所使用的溶劑有 DDW、甲醇、甲醇和乙腈以 1:1 之體積混合，而使用的胜肽為東海大學龍鳳娣老師實驗室的抗菌胜肽 MH 2-4，在相同條件下各別使用溶劑清洗三次並離心最後再於 DDW 下再清洗後用 MALDI-TOF MS 分析。結果顯示不論是浸泡還是鍵結的奈米鑽石在 DDW 和甲醇均無法有效的使吸附的胜肽脫離，而最後在甲醇和乙腈以 1:1 之體積混合的溶液下才具有明顯的變化，不僅僅是浸泡胜肽的奈米鑽石，耦合胜肽的奈米鑽石的訊號也降低，訊號低代表所含胜肽量低，但要利用 MALDI-TOF MS 精確的定量所吸附的胜肽量需做其它處理。結果整理於圖十七及圖十八。



圖十七、奈米鑽石加胜肽 MH 2-4 (浸泡)之 MALDI-TOF MS 質譜。

紅色：DDW、綠色：甲醇、藍色：甲醇+乙腈，均在相同條件下以所標示之溶劑清洗三次。

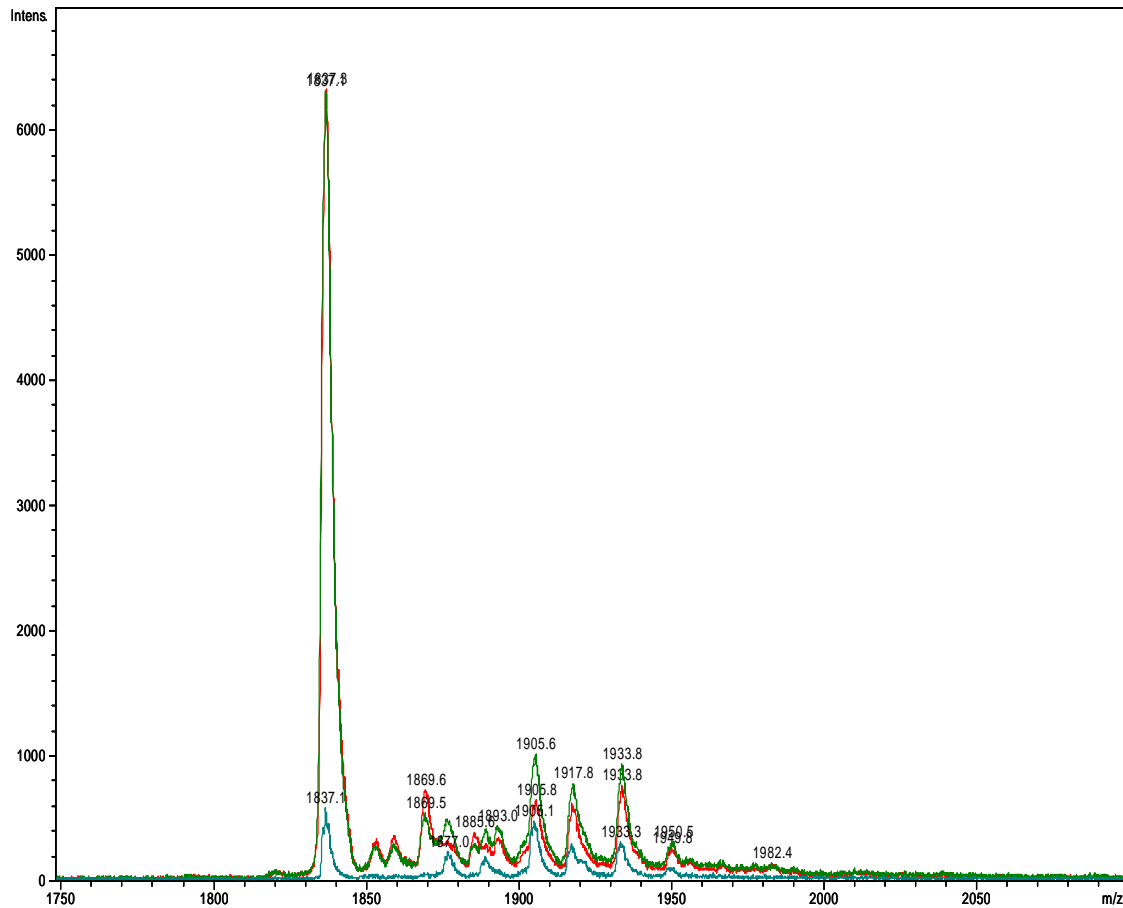


圖 十八、奈米鑽石－胜肽 MH 2-4 (鍵結)之 MALDI-TOF MS 質譜。

紅色：DDW、綠色：甲醇、藍色：甲醇＋乙腈，均在相同條件下以所標示之溶劑清洗三次。

依結果顯示推測，即便是具有鍵結的奈米鑽石，其表面也有許多胜肽吸附上去(圖十八)。因奈米鑽石上帶有負電，只要蛋白質帶電，奈米鑽石便可容易吸附蛋白質，奈米鑽石的高吸附性是優點，但是將奈米鑽石應用於藥物載體時很難判斷耦合上藥物的定量，以及應用於人體時，體內的上千萬種蛋白質酵素及抗體不會與藥物一起吸附於奈米鑽石上，而失去其效果。

4-2-2-4 應用 FTIR 確認 peptide 3C 耦合奈米鑽石鑑定之結果

因 MALDI-TOF MS 無法判別奈米鑽石是否成功耦合上胜肽，而利用傅利葉轉換紅外光譜 (FTIR)，首先須先將樣品乾燥並與處理好的 KBr 粉末一起研磨作成壓片，並且嘗試了幾種不同的體積比來找到最好的訊號圖譜，發現在 KBr 粉末與 peptide 3C 耦合奈米鑽石體積比為 7 : 3 與 8 : 2 有不錯的清晰訊號圖，因 7 : 3 和 8 : 2 並無明顯差別而後續實驗都將以 7 : 3 來做為壓片比例 (圖十九)。

為了辨別是否有耦合成功，準備了 3 個樣品分別為：羧基化奈米鑽石、peptide 3C 浸泡奈米鑽石以及 peptide 3C 耦合奈米鑽石。結果整理於圖二十。

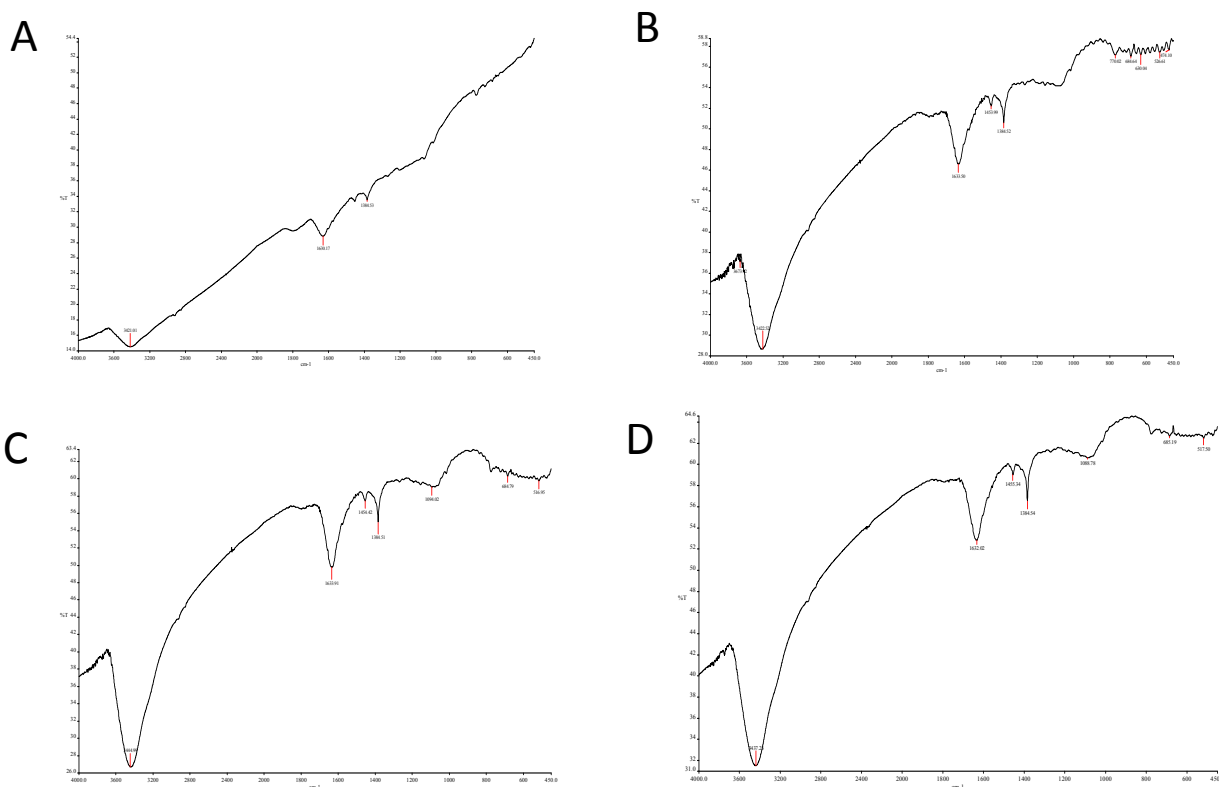
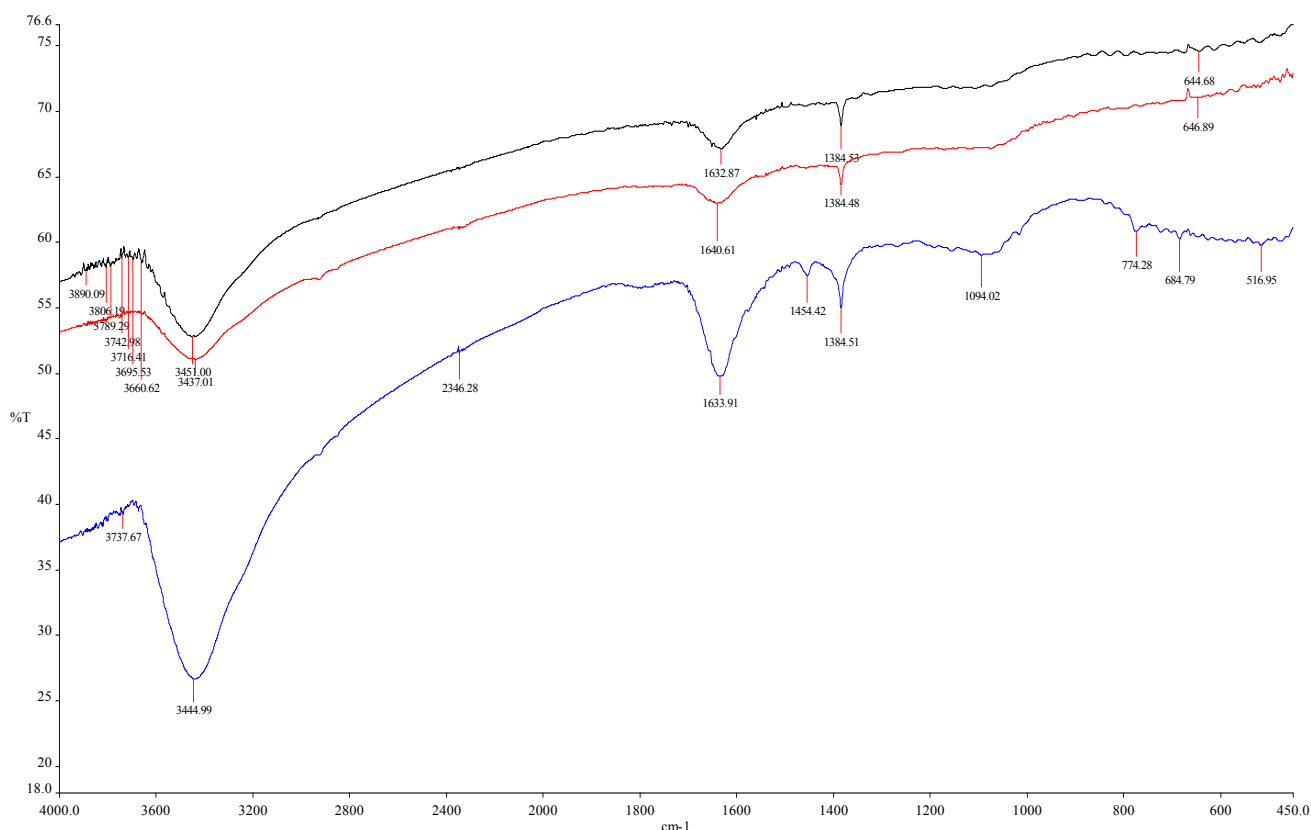


圖 十九、樣品在 KBr 粉末與 peptide 3C 耦合奈米鑽石不同體積比的壓片下之 FTIR 圖譜。
(A) 1 : 1 (B) 6 : 4 (C) 7 : 3 (D) 8 : 2。



圖二十、KBr 與 peptide 3C 耦合奈米鑽石之壓片體積比為 7:3 之 FTIR 圖譜。
 (A)黑色：羧基化奈米鑽石 (B)紅色：peptide 3C 浸泡奈米鑽石 (C)藍色：peptide 3C 耦合奈米鑽石。

根據文獻發現 FTIR 的 O-H 鍵結訊號吸收範圍大約在 3440 cm^{-1} 以及 1632 cm^{-1} ，而在大約 1384 cm^{-1} 有 C-H 的訊號，不論奈米鑽石、peptide 3C 浸泡奈米鑽石以及 peptide 3C 耦合奈米鑽石均有訊號輸出，而關鍵於 peptide 3C 耦合奈米鑽石在大約 1454 cm^{-1} 有訊號峰。根據文獻其為 C-N 鍵結，推測為奈米鑽石與 peptide 3C 的共價鍵結。以 FTIR 判斷奈米鑽石是否耦合上 peptide 3C 只能判斷初步結果，但還是證明了奈米鑽石與 peptide 3C 耦合反應後具有共價鍵結 (圖二十)。

4-2-2-5 應用 PrestoBlue™ 測試法測試胜肽耦合奈米鑽石之生物活性之結果

為了評估奈米鑽石當作載體是否比單純的藥物投遞有效，因此下藥時以藥物濃度條件一致作為比較。下列樣品中的 peptide 3C 的濃度均為 0.1 mg 溶於 200 μ L DDW 再平均分裝至四個 1.5 mL Eppendorf，再下藥至 24 孔盤，每孔 450 μ L Medium + 50 μ L 藥物，每個樣品均為 4 重複。因前面 BCA 蛋白分析法定量 1 mg 奈米鑽石可接上 0.65 mg peptide 3C，因此 0.1 mg peptide 3C 即為大約秤取 0.3 mg peptide 3C 耦合奈米鑽石粉末溶於 200 μ L DDW 再平均分裝至四個 1.5 mL Eppendorf。樣品濃度分別為 peptide 3C (0.025 mg peptide 3C/50 μ L DDW)、奈米鑽石 (0.05 mg ND/50 μ L DDW)、peptide 3C 浸泡於奈米鑽石(0.025 mg peptide 3C + 0.05 mg ND/50 μ L DDW) peptide 3C 耦合奈米鑽石 (0.075 mg peptide 3C-conjugated nanodiamonds/50 μ L DDW)，四個樣品，彙整如表 4。

表 4、應用 PrestoBlue™ 測試法測試 HT-29 細胞活性之各樣品濃度

樣品	濃度(溶液為 50 μ L DDW)
control	無
peptide 3C	0.025 mg peptide 3C 粉末
ND	0.05 mg 奈米鑽石粉末
ND+3C (浸泡)	0.025 mg peptide 3C 粉末+ 0.05 mg 奈米鑽石粉末
ND-3C (鍵結)	0.075 mg peptide 3C 耦合奈米鑽石粉末

結果發現單純 peptide 3C 藥物的存活率為 84.0% ，而 peptide 3C 浸泡於奈米鑽石以及 peptide 3C 耦合奈米鑽石則分別為 64.9% 和 57.4% ，都比只有 peptide 3C 有著不錯的抑制效果 (圖二十一、表 5)。雖然奈米鑽石被證實無毒性，不過結果顯示其具有 84.8% 的存活率，推測可能過多的奈米鑽石有可能會造成細胞傷害。

圖 二十一、胜肽耦合奈米鑽石之 HT-29 細胞生物活性。
 樣品為 control、peptide 3C、ND、ND+3C(浸泡)、ND-3C(鍵結)。X 軸為存活率，Y 軸為樣品。

表 5、應用 PrestoBlue™ 測試法測試 HT-29 細胞活性存活率之結果

樣品	control	peptide 3C	ND	ND+3C(浸泡)	ND-3C(鍵結)
細胞存活率	100.0±%	84.0±8.8%	84.8±6.8%	64.9±5.5%	57.4±6.7%

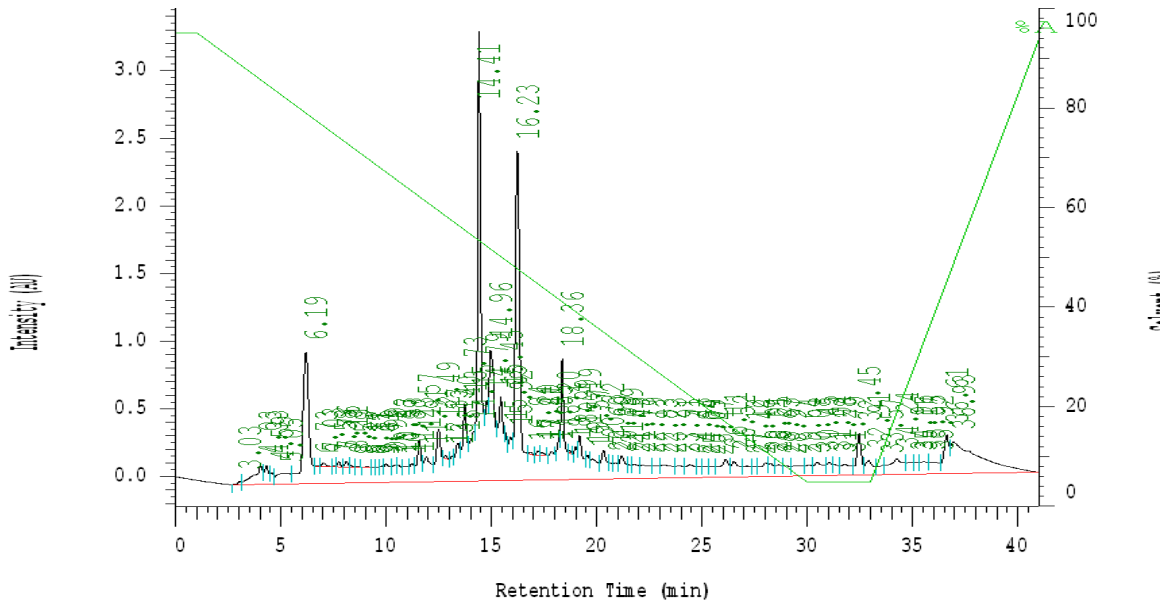
第五章 結論與未來展望

利用 EDC/NHS 成功使含有 -COOH 的奈米鑽石成功耦合胜肽 peptide 3C 以及抗體 Cetuximab，在抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石實驗中利用 MALDI-TOF MS 與 BCA 蛋白分析法確認抗體 Cetuximab 成功耦合上奈米鑽石，並且也經由共軛焦顯微鏡確認抗體 Cetuximab 耦合奈米鑽石能與 anti-EGFR 一樣能成功結合到 HT-29 細胞上而不失去抗體活性。在胜肽 peptide 3C 耦合奈米鑽石實驗中也應用 MALDI-TOF MS 質譜鑑定與 BCA 蛋白分析法定量分析確認，但在實驗中發現 MALDI-TOF MS 不能判別胜肽 peptide 3C 耦合上奈米鑽石是否為共價鍵結，因此利用 FTIR 對共價鍵結做初步判斷，結果發現 FTIR 分析圖譜可分辨出 C-N 的共價鍵結於 1454 cm^{-1} 。生物活性中，利用奈米鑽石當藥物載體在 peptide 3C 濃度為一致時比單純的投遞 peptide 3C 粉末更能抑制癌細胞，但考慮到奈米鑽石所具有的吸附性質，所鍵結上的 peptide 3C 的量會略低。

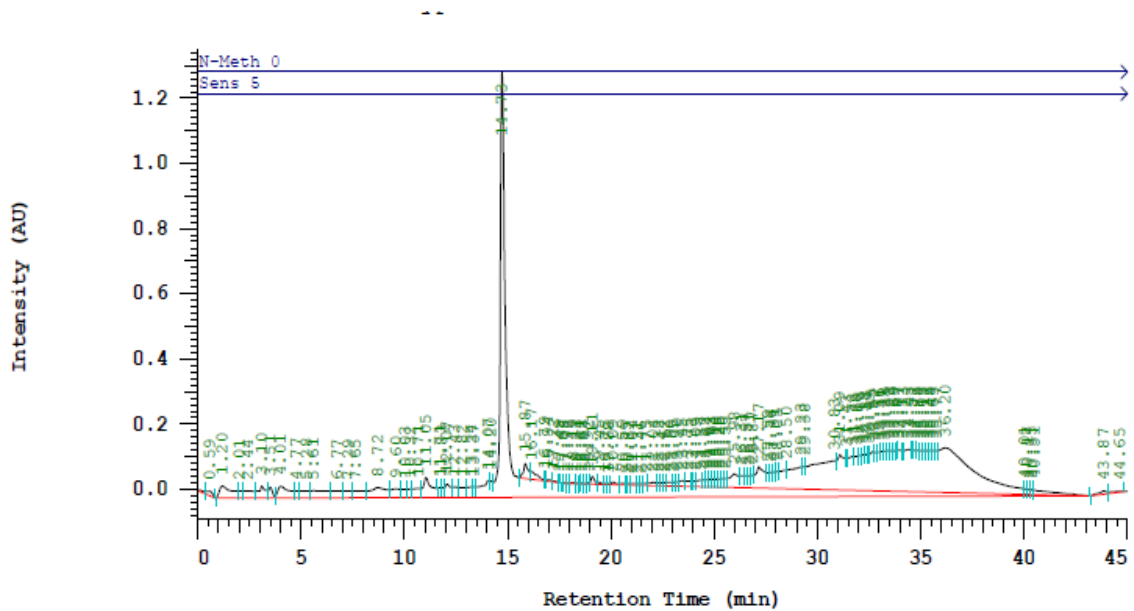
我們期望能將奈米鑽石作為藥物載體，而在證實抗體以及胜肽藥物都能耦合上奈米鑽石並且都具有活性，更能進一步將抗體以及胜肽藥物一起與奈米鑽石耦合形成具有標靶功能的藥物載體，如能降低奈米鑽石的高吸附性而避免吸引其他雜質而影響效果，以及進一步改良奈米鑽石表面官能基來提高可鍵結區域，將使得奈米鑽石更具做為載體開發價值。

附錄

(A)



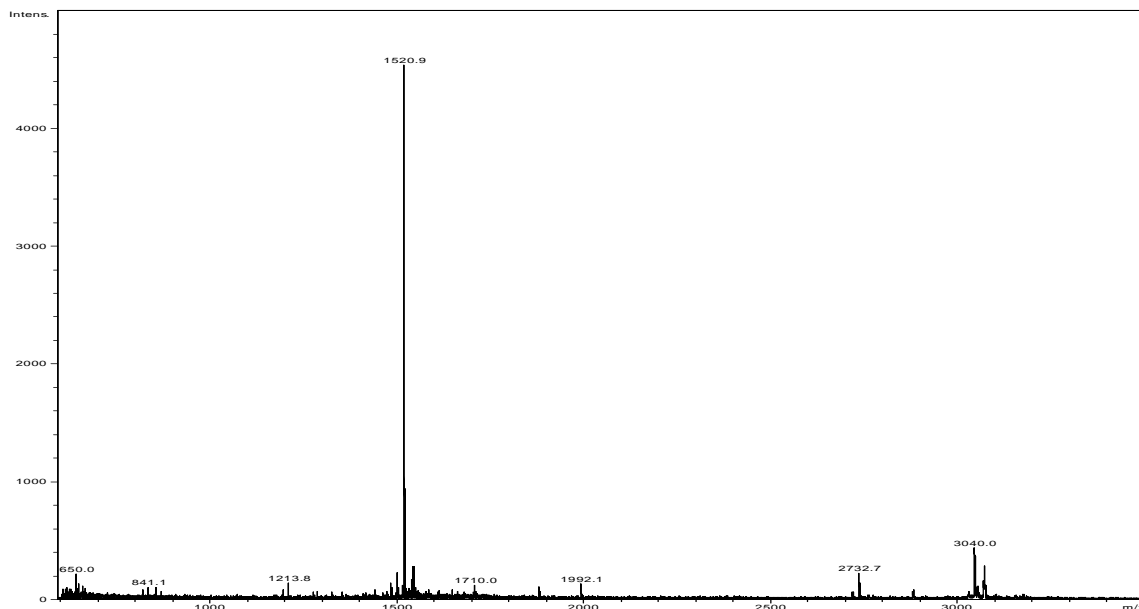
(B)



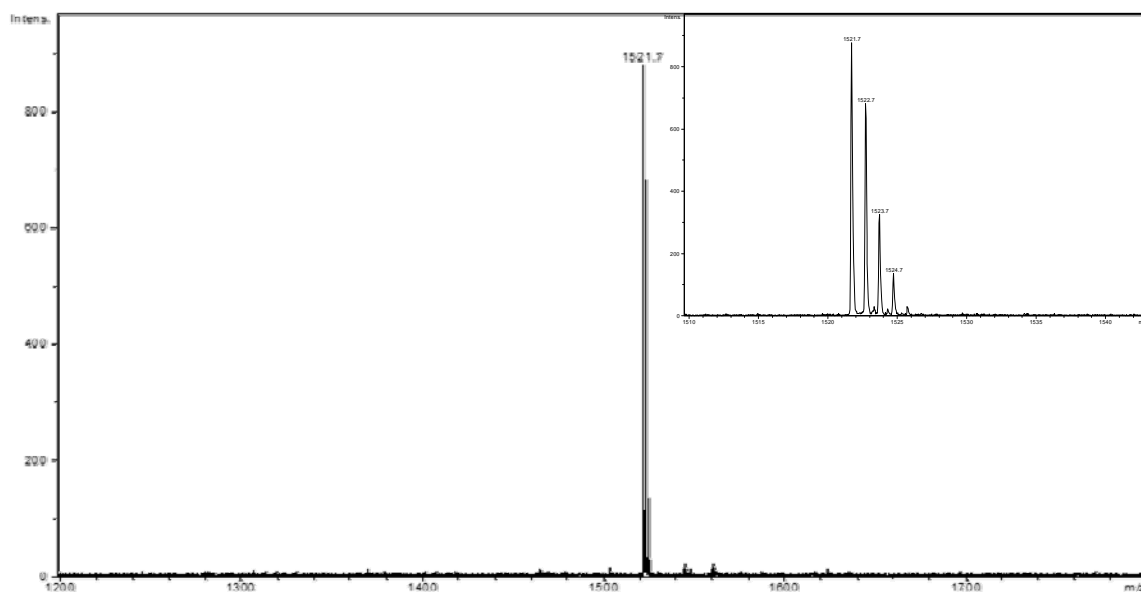
附錄一、Peptide 3C 的 RP-HPLC 層析圖，梯度由 10 % 的 ACN (含 0.05 % TFA) 沖提到 90 %，時間由 0 到 40 分鐘。(A) Peptide 3C 粗產物經由 RP-HPLC 分析後，所得到的層析結果圖，滯留時間為 (retention time, t_R) 14.73 分鐘 (B) Peptide 3C 純

化後所得到的層析結果圖。

(A)



(B)



附錄二、Peptide 3C 的 MALDI-TOF MS 層析圖 (A) Peptide 3C 粗產物的 MALDI-TOF MS 質譜圖 (B) Peptide 3C 純化後的 MALDI-TOF MS 質譜圖。(理論分子量：1520.7 Da；實際測得分子量：1521.7Da)

參考文獻

1. Vaijayanthimala, V., et al., *Nanodiamond-mediated drug delivery and imaging: challenges and opportunities*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015. **12**(5): p. 735-49.
2. Lim, D.G., et al., *Comprehensive evaluation of carboxylated nanodiamond as a topical drug delivery system*. *Int J Nanomedicine*, 2016. **11**: p. 2381-95.
3. Krueger, A., et al., *Biotinylated nanodiamond: simple and efficient functionalization of detonation diamond*. *Langmuir*, 2008. **24**(8): p. 4200-4.
4. Yu, S.J., et al., *Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(50): p. 17604-5.
5. Huang, L.C. and H.C. Chang, *Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds*. *Langmuir*, 2004. **20**(14): p. 5879-84.
6. Giuliani, F. and G. Colucci, *Cetuximab in colon cancer*. *Int J Biol Markers*, 2007. **22**(1 Suppl 4): p. S62-70.
7. Ung, N., et al., *Anti-EGFR therapeutic efficacy correlates directly with inhibition of STAT3 activity*. *Cancer Biol Ther*, 2014. **15**(5): p. 623-32.
8. Felicio, M.R., et al., *Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities*. *Front Chem*, 2017. **5**: p. 5.
9. Passeri, D., et al., *Biomedical Applications of Nanodiamonds: An Overview*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015. **15**(2): p. 972-88.
10. Whitlow, J., S. Pacelli, and A. Paul, *Multifunctional nanodiamonds in regenerative medicine: Recent advances and future directions*. *J Control Release*, 2017. **261**: p. 62-86.
11. Chang, Y.R., et al., *Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds*. *Nat Nanotechnol*, 2008. **3**(5): p. 284-8.
12. Deckert-Gaudig, T., et al., *High-resolution Raman Spectroscopy for the Nanostructural Characterization of Explosive Nanodiamond Precursors*. *Chemphyschem*, 2017. **18**(2): p. 175-178.
13. Shenderova, O.A. and G.E. McGuire, *Science and engineering of nanodiamond particle surfaces for biological applications (Review)*. *Biointerphases*, 2015. **10**(3): p. 030802.
14. Perevedentseva, E., et al., *Nanodiamonds of Laser Synthesis for Biomedical Applications*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015. **15**(2): p. 1045-52.
15. Krueger, A. and D. Lang, *Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond*. *Adv. Funct. Mater.* 2012, **22**, 890–906, 2012.
16. Reineck, P., et al., *Bright and photostable nitrogen-vacancy fluorescence from unprocessed detonation nanodiamond*. *Nanoscale*, 2017. **9**(2): p. 497-502.

17. Chang, S.L., et al., *Counting vacancies and nitrogen-vacancy centers in detonation nanodiamond*. *Nanoscale*, 2016. **8**(20): p. 10548-52.
18. Keremidarska, M., et al., *Comparative study of cytotoxicity of detonation nanodiamond particles with an osteosarcoma cell line and primary mesenchymal stem cells*. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2014. **28**(4): p. 733-739.
19. Adach, K., et al., *Studies on the cytotoxicity of diamond nanoparticles against human cancer cells and lymphocytes*. *Chem Biol Interact*, 2016. **254**: p. 156-66.
20. 香港癌症基金會, *大腸癌*. 2015.
21. Vieira, A.R., et al., *Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project*. *Ann Oncol*, 2017.
22. Satia-Abouta, J., et al., *Food groups and colon cancer risk in African-Americans and Caucasians*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(5): p. 728-36.
23. Norton, J.D., *ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 22)**: p. 3897-905.
24. Sikder, H.A., et al., *Id proteins in cell growth and tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2003. **3**(6): p. 525-30.
25. Ruzinova, M.B. and R. Benezra, *Id proteins in development, cell cycle and cancer*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(8): p. 410-8.
26. Muthu, K., et al., *Structural insights into interacting mechanism of ID1 protein with an antagonist ID1/3-PA7 and agonist ETS-1 in treatment of ovarian cancer: molecular docking and dynamics studies*. *J Mol Model*, 2012. **18**(11): p. 4865-84.
27. Hsiao, Y.C., et al., *Structure activity relationships of peptidic analogs of MyoD for the development of Id1 inhibitors as antiproliferative agents*. *J Pept Sci*, 2013. **19**(11): p. 676-83.