

謝 誌

回首碩士班的研究生活，衷心感謝恩師 龍鳳娣博士與 鄭啟清博士在我的求學過程中，於待人處事與學術研究上的啟迪，老師的諄諄教誨，學生會牢記在心中，師恩浩瀚，衷心銘謝，謹誌卷首，以表由衷之敬意與謝忱。

感謝口試期間，口試委員本系老師 楊定亞教授與中國醫藥大學生物科技系 鍾景光教授在百忙中撥冗細心審閱，論文繕寫上的指導與指教，使得本論文得以更臻完善。

碩士班期間承蒙台中榮總教學研究部 鄭啟清博士在生物醫學方面的實驗與學識指導；每當我實驗失敗的時候，總是給我加油打氣，勉勵我不要灰心，繼續努力；同時感謝台中榮總教研部的助理平姊、美君學姐、建維學長、佳娟學姐、本慶學長在生活與實驗上的幫助與分享，使我在台中榮總的日子充滿歡笑，感謝大家一路上的幫助，使我的碩士生活更充實、精采。

另外，要特別感謝中興大學生化研究所 高振益老師與柏村學長，在實驗與生活上的幫助，讓我學習到許多生科實驗技術與學識，受用無窮。

感謝 龍鳳娣老師從自中國醫藥大學開始，就很照顧我，也很耐心的教導我，不僅在生活態度、學習教育給我很多教誨，很細心與體諒的照顧我，讓我有足夠的時間與空間，兼顧生活、學業與實驗，衷心感激老師，給予我極大的包容與信任，讓我在台中榮總與中興大學專心學習與專心於研究工作。同時也感謝實驗室過去與現在的所有學長姊：小花學長、家燕學姊、詩晴學姊、孟芹學姊、婉菁學姊、又誠學長；我的同學與夥伴們：人豪、振宇、珮馨、婷君、佳霓、雲川、姿螢、伊平、信璋、婕妤，還有許多曾經給我幫助的朋友們，感謝大家在這段枯燥又乏味的研究生活，帶給我許多勇氣與歡樂，讓我在實驗困頓的時候，可以停下腳步，喘一口氣之後，又充滿元氣的向前進。

我要感謝從小到大，一路照顧我、陪伴我的媽媽與妹妹、外公、外婆、舅舅與舅媽們。我從小就是一個叛逆的小孩，不愛唸書、不聽話、喜歡和大家唱反調，所以一直是大家的煩惱。這些日子以來，感謝我的媽媽，感謝你包容我的任性，總是讓我隨著自己的想法去做任何決定，常常惹你生氣，是我的不懂事。感謝我的妹妹，身為兄長的我，對你很慚愧，都是你在犧牲自己的生活與學業，使這個家趨於完整，讓我可以無顧慮的在外求學，真的很感謝你。感謝我的外公、外婆、舅舅、舅媽與表弟們，從小到大，有大家的陪伴、照顧與支持，使我在成長的路上並不孤獨。感謝我的女友曉雯，念碩士班這段時間，感謝妳一直陪伴著我，幫我加油打氣，並給我有很大的空間與時間，致力於學業，謝謝妳這段時間以來的體諒。

最後，我要將此論文獻給我的家人、師長、同學與曾經幫助過我的所有人，尤其是在天上的父親，我會更努力、認真的面對我的未來，希望也可以與你一起分享這份榮耀與喜悅。

摘 要

生長因子受體連接蛋白質之 SH2 區塊(Src homology 2 domains) 在細胞內的致病機轉訊息傳遞途徑中，對於細胞增生與分化，扮演著非常重要的角色。因此以 Grb2 SH2 區塊為標靶的抑制劑成為具有潛力發展的抗癌藥物的研究標的。本實驗室最近利用表面膜漿共振技術的生物感測器發展出一系列對 Grb2 SH2 區塊具有高親和力的設計胜肽。在此篇論文中，將對 Grb2 SH2 區塊具有高親和力的胜肽對不同的人類乳癌細胞株進行生物活性測試。將不同濃度的設計胜肽 (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂ and Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH₂)處理人類乳癌細胞株，利用 MTT 與 LDH kit 測試細胞存活率與細胞毒性。並且利用流式細胞技術進行設計胜肽對人類乳癌細胞之細胞週期與細胞凋亡的相關實驗。實驗結果顯示，設計胜肽對人類乳癌細胞株 MCF-7 與 MDA-MB-453 之細胞存活率的 IC₅₀ 分別為 45.72 μ M 與 47.43 μ M，並且細胞毒性隨著胜肽濃度與處理時間的增加，而具有顯著差異表現。經過胜肽處理後的人類乳癌細胞株之細胞週期，亦隨著胜肽濃度的增加，sub-G1 期也隨之增加。因此証實小分子設計胜肽可以使人類乳癌細胞株 MCF-7 與 MDA-MB-453 走向死亡。而胜肽對於人類乳癌細胞內分子傳遞路徑機轉，尚待進一步研究。

關鍵字：設計胜肽、人類乳癌細胞株、細胞存活率、細胞毒性、細胞週期、細胞凋亡

Abstract

The growth factor receptor-bound protein Src homology 2 (Grb2-SH2) plays an important role in the oncogenic Ras signaling pathway, which involves in cell proliferation and differentiation. Therefore, the Grb2-SH2 inhibitors become a potential target for developing anticancer agents. Recently, we discovered peptides with high affinity for Grb2 SH2 domain which was detected by SPR-biosensor technology. In this study, we investigated the biological activities of designed peptides (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂ and Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH₂) in different human breast cancer cell lines. The breast cancer cells of MCF-7 and MDA-MB-453 were treated with various concentrations of designed peptides, the cell viability and cell cytotoxicity were determined using the cell proliferation kit (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) and cell cytotoxicity kit (LDH kit). Effects of peptides on the cell cycle progression of cancer cells and apoptosis were studied by flow cytometry. Results demonstrated that our lead peptide (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH₂) exhibits anti-proliferative effects on MCF-7 and MDA-MB-453 with the IC₅₀ of 64 μM and 50 μM, respectively. The cell cytotoxicity and percentage of sub-G1 in cell cycle of both cancer cells were increased when the cells were treated with higher concentration of peptides or treated for prolonged time.

Key word : design peptide, human breast cancer cell line, cell viability,

cell cytotoxicity, cell cycle, apoptosis

目 錄

第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	4
第一節 癌症.....	4
第二節 乳癌與乳癌的發生.....	5
第三節 目前臨床實驗常見乳癌細胞株.....	6
3-1 MCF-7 (estrogen dependent).....	6
3-2 MDA-MB-231 (estrogen independent).....	7
3-3 MDA-MB-453 (ErbB over-expression).....	7
第四節 乳癌目前在臨床上的治療.....	7
4-1 荷爾蒙療法 (Hormonal therapies).....	7
4-2 化學藥物療法 (Chemotherapy).....	10
4-3 單株抗體療法 (Monoclonal antibody therapy).....	11
第五節 細胞週期之調控.....	12
第六節 細胞凋亡(Apoptosis).....	16
6-1 細胞凋亡之定義.....	16
6-2 細胞凋亡時之分期.....	16
6-3 細胞凋亡與細胞壞死之分別.....	17
6-4 細胞凋亡時的生化變化與特徵.....	18

6-5 細胞凋亡時的分子機轉.....	19
第七節 上皮生長因子受器EGFR.....	22
第八節 Grb2 SH2 domain –SOS-Ras signaling pathway.....	24
第九節 RGD 胜肽序列簡介.....	26
第三章 材料與方法.....	27
第一節 常用藥品與試劑配製	27
第二節 合成胜肽之前製備.....	29
第三節 細胞培養及分化.....	29
第四節 冷凍細胞之活化.....	30
第五節 細胞冷凍保存.....	31
第六節 人類乳癌細胞存活率之測定.....	31
第七節 人類乳癌細胞毒性之測定.....	32
第八節 細胞內蛋白質萃取及西方點墨法.....	34
第九節 人類乳癌細胞株細胞週期之測定.....	35
第十節 統計分析.....	37
第四章 結果.....	38
第一節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞存活率探討.....	38
第二節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞型態之影響.....	42

第三節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞毒理探討.....	44
第四節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞週期之影響.....	46
第五節 設計之胜肽反應機轉之蛋白質表現.....	48
第五章 討論.....	70
第一節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞存活率探討.....	70
第二節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞型態之影響.....	72
第三節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞毒理探討.....	73
第四節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞週期之影響.....	74
第五節 設計之胜肽反應機轉之蛋白質表現.....	75
第六章 結論.....	77
參考文獻.....	79

圖目錄

圖 2.1、Basics of the cell cycle.....	15
圖 2.2、細胞凋亡與細胞壞死的區別.....	17
圖 2.3、The major pathways to apoptosis.....	21
圖 2.4、EGFR pathway.....	22
圖 2.5、oncogenic Ras signal transduction pathway.....	25
圖 4.1、設計胜肽對乳癌細胞株細胞存活率.....	50
圖 4.2、設計胜肽對乳癌細胞株細胞型態之影響.....	56
圖 4.3、設計胜肽對乳癌細胞株細胞毒理探討.....	60
圖 4.4、流式細胞儀探討設計胜肽對乳癌細胞株細胞週期.....	63
圖 4.5、設計之胜肽與 Bcl-2 家族蛋白質之表現.....	68

表 目 錄

表 3.1、合成胜肽之胺基酸序列.....	29
表 3.2、1X phosphate buffer saline.....	36
表 3.3、Propidium iodide.....	36
表 4.1、The cell ability of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 1.....	52
表 4.2、The cell ability of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide 1.....	52
表 4.3、The cell viability of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 2.....	55
表 4.4、The cell viability of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide 2.....	55
表 4.5、The cell cytotoxicity of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 2.....	62
表 4.6、The cell cytotoxicity of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide 2.....	62
表 4.7、The cell cycle of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 2.....	67
表 4.8、The cell cycle of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide 2.....	67