

第一章 前言

自1982年開始，癌症成為台灣地區十大死亡原因的首位，世界衛生組織更將癌症列為本世紀的三大殺手疾病之一。根據行政院衛生署94年歷年癌症統計報告中指出，2000-2004年台灣地區婦女罹患癌症的死亡率，前五名分別為肺癌、肝癌、結腸直腸癌、女性乳癌及子宮頸癌。而乳癌的原位癌發生率，位居所有癌症之首，進而轉移至肺臟及肝臟等器官，造成肺癌及肝癌之發生(Jiang et al. 2005)。

在臨床上，乳癌的治療方式以手術切除治療為主，再依照病人病情狀況，以化學藥物治療、荷爾蒙藥物治療及放射線治療為輔助。由於近年來手術技術、放射線治療、化學標靶藥物與荷爾蒙藥物的進步，乳癌患者的存活率有相當性的成長。不過，目前外科手術切除治療，依然無法完全清除腫瘤細胞，甚至是已經轉移的癌細胞，並且隨著病患本身的疾病因素或是身體因素，施行化學藥物治療或是放射線治療可能會有一些副作用產生。以化學藥物療法而言，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，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。FDA於2000年核准上

市的單株抗體新藥Herceptin (賀癌平) 主要針對轉移性的乳癌進行治療，不過此藥只對具有HER2 接受器過度表現的癌細胞有明顯功效 (Baselga et al. 1998)。

胜肽藥物為小分子藥物中最具開發潛力的新穎藥物 (Song et al. 2006)。胜肽藥物的優勢在於胜肽可以利用身體內最自然的傳輸與代謝機制，打破生物屏障 (Breaking 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，將藥物運送到組織，發揮藥物功效。

本實驗室目標以合成、設計胜肽類緣物，開發 Grb2 SH2 區塊之胜肽類抑制物 (inhibitor) 或拮抗物 (antagonist) 為主。乳癌細胞內訊息傳遞之致病機轉 (oncogenic Ras signal transduction pathway) 中，細胞內蛋白質分子機制之異常，與癌症的致病原因有關，例如：細胞內蛋白質 Grb2 的 SH2 區塊與癌細胞增生有相關 (Boerner et al. 2003)。本實驗室先前利用 BIAcore X 與 BIAcore 3000 表面薄膜共振技術，評估設計之胜肽阻斷 Grb2 SH2 domain pathway 與特定蛋白質交互作用之能力，探討胺基酸結構對生物活性之貢獻及重要性，從一系列胜肽類緣物中篩選出具有較佳的親和力之先導物 (lead compound) (Lung et al. 2005, Lung and Tsai 2003)。

本篇論文研究以本實驗室篩選出具有較佳抑制力之先導物 (lead

compound) 進行人類乳癌細胞 MCF-7 (Estrogen dependent) 與 MDA-MB-453 (ErbB receptor over-expression) 之生物活性測試與生物活性結構探討，包括細胞存活率、細胞毒理、藥物處理對細胞週期之影響與藥物在細胞訊息傳遞中的機轉探討。

第二章 文獻探討

第一節、癌症

動物體內細胞分裂調節失去控制而不斷增殖的細胞，稱為腫瘤細胞(tumor cells)，主要特徵為：

- 1、細胞生長速率與分裂速率失去控制：細胞核、細胞質比例增大，分裂速度加快，破壞了正常組織的結構比例與功能性。
- 2、細胞具有滲透性和擴散性：良性腫瘤與惡性腫瘤最主要的區別是：惡性腫瘤的細胞間質黏著性顯著下降，並具有滲透性和擴散性，容易滲入周圍正常組織；或透過血液循環或淋巴循環途徑轉移至其他組織器官，並黏附和增殖於轉移的器官。
- 3、細胞與細胞間相互作用之改變：正常細胞之間的辨識，主要透過細胞表面專一性蛋白的相互作用；癌細胞在轉移過程中除了產生水解酶，在某些膜受體蛋白表現異常，以便與其他組織器官之細胞黏著及生長。
- 4、細胞內蛋白質表現譜系或蛋白質活性之改變：癌細胞的蛋白質表現譜系中，通常會出現具有胚胎表現的蛋白，且多數癌細胞中具有較高的端粒酶 (telomerase) 活性。

5、mRNA 轉錄譜系的改變：將乳腺癌和直腸癌細胞與正常細胞中基因表現譜進行比較，檢測的 30 萬個轉錄片段中 (transcripts)，相當於 4.5 萬個所表現的基因中約有 500 個轉錄片段(相當於 75 個基因) 有明顯不同 (瞿中和, 2001)。

行政院衛生署統計室發表出的報告指出，2005 年台灣死亡率第一名為癌症，而且由 1982 年至今，台灣的癌症的死亡率一直高居第一位。而前五名的癌症死亡率為肝癌、肺癌、結腸直腸癌、女性乳癌與胃癌，其中女性乳癌為所有原位癌發生率第一名，也是台灣女性癌症罹患率第一名的癌症。

第二節、乳癌與乳癌的發生

女性乳房之發育主要是靠雌激素 (estrogen) 和黃體激素 (progesterone) 的控制。雌激素包括三種： 17β -estradiol(E_2)、estrone(E_1)、estriol(E_3)，其中 17β -estradiol 是作用性最強的雌激素。 17β -estradiol 可由卵巢濾泡內膜(theca interna)、顆粒細胞(granulosa cell)、黃體(corpus luteum)、胎盤等分泌，其生理功能為：刺激濾泡的生長、刺激子宮內膜的增生、促進第二性徵的發育、刺激乳房內管腺增生等。而黃體激素可由黃體及胎盤分泌，其生理功能為：刺激月

經前子宮內膜的增生、刺激子宮頸及陰道的週期變化、乳腺小葉及腺泡的發育等。許多的臨床研究、流行病學和生物學的研究皆指出雌激素參與了乳癌的起始和擴展期，而雌激素之荷爾蒙取代療法會增加乳癌的發生率(Sommer and Fuqua 2001)。

流行病學上乳癌的發生，主要和年齡、種族、第一次懷孕年齡、家族疾病史、飲食習慣與生活作息有相關性，但是導致乳癌發生的直接原因與機制，至今依然不明(McPherson et al. 2000)。

當正常乳房細胞轉變成原發性或早期之乳癌細胞時，其生長雖仍受雌激素影響，但卻轉變為對雌激素具高度敏感性，屬於雌激素依賴(estrogen-dependent)型乳癌。再發性或後期之乳癌細胞則有失去對雌激素反應的現象，其生長轉變為不受雌激素的影響，屬於非雌激素相關(estrogen-independent)型乳癌。

第三節、目前臨床實驗常見乳癌細胞株

一、MCF-7 (estrogen dependent)

MCF-7 類型為human breast adenocarcinoma，種 (species) 為 *Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有雌激素接受體Estrogen receptor 過度表現ER (+)，為雌激素依賴型乳癌細胞株，卻有極低的ErbB-2 接受器表現(Li et al. 2003)。

二、MDA-MB-231 (estrogen independent)

MDA-MB-231 類型為human breast adenocarcinoma，種 (species) 為*Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有突變的p53 和缺乏功能性的雌激素接受體Estrogen receptor，ER (-)，為非雌激素依賴型乳癌細胞株(Niewolik et al. 1995)。

三、MDA-MB-453 (ErbB over-expression)

MDA-MB-453 類型為human breast adenocarcinoma，種 (species) 為*Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有ErbB-2/neu 接受器過度表現，為目前臨床乳癌治療最棘手的乳癌細胞種類(Shi et al. 2003)。

第四節、乳癌目前在臨床上的治療

一、荷爾蒙療法 (Hormonal therapies)

1896年Beatson 證明乳癌對荷爾蒙有反應，利用卵巢切除手術 (ovariectomy)，減緩乳癌細胞的生長，並且用此醫療技術治療原發性腫瘤(History of breast cancer therapy)。類固醇類的性腺荷爾蒙(steroid hormones) 是乳癌與前列腺癌的主要影響因子，而性腺荷爾蒙對細胞之影響主要依靠細胞膜表現皆為受器所調控；在所有種類的性腺荷爾

蒙之中，雌激素(estrogen) 與乳癌的生成，具有高度相關性。雌激素受器(estrogen receptor) 分為 α form (ER α)與 β form (ER β) 兩種：

1、ER α ：在乳癌發生的初期，ER α 會有過度表現的狀況；ER α 可以調節基因由mRNA轉譯(transcription) 成蛋白質，角色如同轉譯因子(transcription factor) 。Estrogen 可以和target gene 的 estrogen response element (ERE) 結合。抑制ER α 的作用反應為治療雌激素相關的乳癌主要方法，目前許多抗雌激素藥物(antiestrogen drugs) 則是針對ER α 而設計的。

2、ER β ：此受器在1996年才被發現(Mosselman et al. 1996)，不只在乳癌有ER β 表現，在肺癌(Stabile et al. 2002)、前列腺癌(Lau et al. 2000) 與胃癌(Matsuyama et al. 2002) 均有表現；在人類乳癌細胞中，ER α 與ER β 會同時表現。

A、Antiestrogen drugs：

抗雌性激素藥物是由阻擋雌性素對乳癌細胞的作用，以達到抑制乳癌細胞生長的功能，最普遍的抗雌性激素藥物是 Tamoxifen。某些乳癌細胞表面具有estrogen receptor，則稱為 estrogen receptor positive (ER positive)；Tamoxifen 主要作用在阻

擋estrogen 和estrogen receptor 的結合，使分子訊息無法傳遞至細胞核，達到抑制腫瘤生長的效果。所以目前臨床上診斷出病患的乳癌細胞為 ER positive ，則會使用Tamoxifen 進行治療 (Baum et al. 2003)。

B、Aromatase inhibitor

Aromatase inhibitors 主要作用在抑制雌性素從脂肪組織中產生，主要使用於停經後女性的乳癌病患。常用的aromatase inhibitors 有letrozole (Femara)、anastrozole(Arimidex) 與 exemestane (Aromasin) (Chlebowski et al. 2002)。

C、Progestogens

黃體激素 (progesterone) 是人體本身自行製造的性荷爾蒙，而合成的類荷爾蒙progestogen 較progesterone 在細胞表面接受器具有較高的結合能力。多種癌細胞須依賴特定的性荷爾蒙快速生長，此類癌細胞表面則有大量的性荷爾蒙的接受器。

progestogen 功能為抑制性荷爾蒙和接受器結合，達到阻擋癌細胞的受器活化及細胞生長。此類藥物有 medroxyprogesterone acetate (Provera) 與megestrol acetate (Megace)，兩種常見藥物 (Wiegratz and Kuhl 2004)。

D、Pituitary down-regulators

Pituitary down-regulators、LHRH (Luteinizing hormone-releasing hormone or gonadotropin releasing hormone, GnRH)類似物，會降低腦中estrogen-stimulating hormone 的生成，可有效降低體內estrogen 的含量，Goserilin (Zoladex)為此類藥物的代表。但是Goserilin 只作用在具有ER positive 的乳癌細胞。Goserilin 會產生更年期症狀，包括熱潮紅、盜汗、性慾低下和心情改變(Jonat 2002)。

二、化學藥物療法 (Chemotherapy)

化學藥物療法是使用化學藥物毒殺細胞，達到癌細胞死亡。化學療法主要在針對hormone-insensitive 的乳癌細胞。先前乳癌病患所使用的抗癌藥物包括DNA alkylators、intercalators、antimetabolites、antitumor antibiotics 以及tubulin inhibitors。(Bateman 1955) 1960年之後，最常使用cyclophosphamide、methotrexate、5-fluorouracil、prednisone 和 vincristine。1970 年代，臨床上主要以doxorubicin 和epirubicin 這兩個anthracyclines 藥物為主。此類藥物會和DNA 結合，使DNA無法打開雙股，導致無法轉錄成RNA，達到抑制RNA 和蛋白質的合成，並會產生

自由基，阻斷topoisomerase II，使DNA 不能分裂。一般臨床上，anthracyclines 常會和cyclophosphamide 以及5-fluorouracil 合併使用。1990年代之後，taxanes 類藥物(paclitaxel、docetaxel)最常被使用。Taxanes 與tubulin 結合，引起tubulin polymerization。(Chen et al. 2007)由於microtubule 必須在polymerization 和 depolymerization 之中取得平衡，taxanes 會破壞此平衡，使乳癌細胞停留在細胞週期G2/M 時期，而無法再進行週期運轉，細胞則停止生長，甚至走向細胞凋亡，而達到殺死癌細胞的功效。

三、單株抗體療法 (Monoclonal antibody therapy)

ErbB-2 是HER2/*neu* proto-oncogene，為 epidermal-growth-factor receptor family 之一。ErbB-2 在細胞增生、轉移及分化扮演重要角色。(Vazquez-Martin et al. 2007)有二到三成的乳癌會具有 ErbB-2 receptor 過度表現(overexpress)，我們稱為ErbB-2 overexpression 或是 ErbB-2 positive。乳癌患者中，有ErbB-2 過度表現的病人比ErbB-2 表現正常的病患其平均存活年數要短，病患預後狀況也比其他乳癌病患要來的差很多。主要是因為ErbB-2 overexpression 是將 HER2/*neu* 基因的表現被放大，使得ErbB-2 overexpression 的病人預後極差(Ciocca et al. 2006, Demonty et al. 2007)。單株抗體療法主要是利用抗原抗體的特性

對ErbB-2 extracellular domain 具有高度的親合性，因此被用作 anti-HER2 therapy(Jain and Baxter 1988)。Herceptin即是一種 monoclonal antibody，可以擋住epidermal growth factor 和其接受器 HER2 (human epidermal growth factor receptor-2) 結合，而且此藥物具有極高度的接合能力，進而達到抑制癌細胞的生長。Herceptin 用於已經轉移的癌細胞，但是它只對具有ErbB-2 receptor (ErbB-2 overexpression) 的癌細胞才會發揮最大藥效(Kunitomo et al. 2004, Thriveni et al. 2007)。

第五節、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 cell)；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)。

一、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。

二、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。

三、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。

四、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。

五、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(瞿中和, 2001)。

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(Ho and Dowdy 2002, Ortega et al. 2002)。

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 (Herrup and Yang 2007)。

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、B_{1,2,3}、C、D_{1,2,3}、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，cyclin-box 則為媒介，並參予Cyclin 與CDKs 的結合(Tyson et al. 1996)。

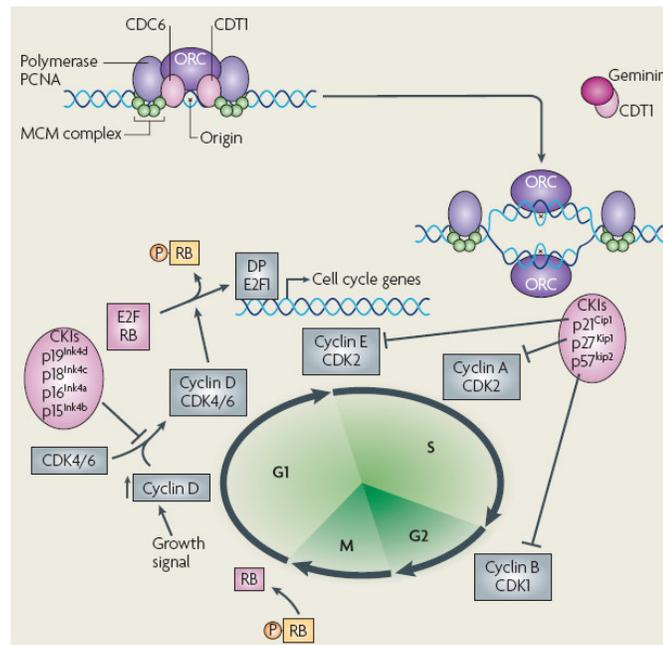


圖2.1、Basics of the cell cycle (Herrup and Yang 2007)

第六節、細胞凋亡(Apoptosis)

一、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，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)或是計畫性的細胞死亡(programmed cell death)，在生理上扮演著相當重要的角色(Fadeel and Orrenius 2005)。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(Nunez et al. 1998)。

二、細胞凋亡時之分期

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(later 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)。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。

三、細胞凋亡 (apoptosis) 與細胞壞死 (necrosis) 之分別

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(Stacey et al. 1985)。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。

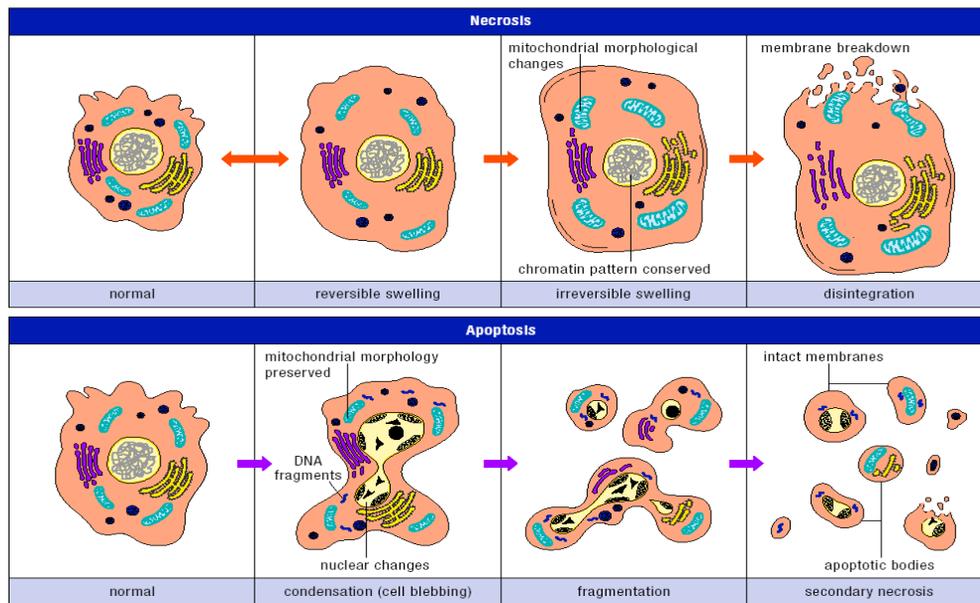


圖2.2、細胞凋亡與細胞壞死的區別 (Andrew Wyllie, 1998)

四、細胞凋亡時的生化變化與特徵

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 或其倍數的DNA 片段。此時藉由1.8%的 agarose gel 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(Zhang and Xu 2000)。

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(Kameda et al. 2001)。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DNase 水解。

3、Caspase enzyme family

Caspases 為一胱胺酸蛋白酵素家族(cysteine proteases)，在細胞凋亡發生的過程中，扮演著很重要的角色。目前知道caspase 家族共有14 個成員，可以大略區分為兩個次家族：ICE subfamily (inflammation group) 和CED-3 subfamily (apoptosis group) (Alnemri et al. 1996)。平時此酵素是以proenzyme (zymogen) 的型式存在於細胞內。當經過蛋白質水解的切割作用後，就會變成有活性的次單位 (subunit)，繼而形成完全活化的四合體(tetramer)(Wolf and Green 1999)。此酵素會辨認

特殊的胺基酸序列 (DEVD)，然後在天門冬胺酸(Asparine) 將特定蛋白切割水解(Stennicke and Salvesen 1998)。Caspase 可由活化路徑區分為：起始者(apoptotic initiators) caspase-2, caspase-8, caspase-9, caspase-10 和執行者(effector caspases) caspase-3, caspase -6, caspase -7。起始者的主要功能在於傳遞細胞凋亡的訊號，而執行者主要是對細胞內的一些蛋白產生水解作用。當細胞接受到細胞凋亡的訊號刺激後，會先使起始者活化，然後由起始者對執行者產生蛋白水解的作用而使執行者活化，接著便由執行者來執行下游蛋白的水解作用，引發細胞凋亡的發生。目前大略知道約有一百多種蛋白是Caspases 的受質，這些蛋白都會受到Caspases 的水解作用而分解或是活化，包含了核膜 lamin 、細胞骨架蛋白fodrin 和gelsolin、PAK2 (p21-activated kinase 2) 、CAD (caspase-activated DNase) 等(Enari et al. 1998, Rao et al. 1996)。

五、細胞凋亡時的分子機轉

1、造成細胞凋亡的因素

能造成細胞凋亡的原因有許多種，其中包括放射線、高溫、具有毒性的抗癌藥物、自由基的傷害以及特殊抗體，例如能與 APO-1/FAS 抗原結合之抗體等等。

2、細胞凋亡的基因調節

細胞凋亡的過程受到許多基因的調控，分別敘述如下：

a、*p53* 基因

*p53*基因是一種腫瘤抑制基因，其所轉錄的蛋白*p53* 則是一種能夠抑制腫瘤的蛋白。當細胞的DNA 在G1/S 時期發生損傷時，*p53*會促使其下游基因的表現，如WAF1。而WAF1 的蛋白質產物*p21* 會使細胞週期停留在G1/S 期，直至DNA 修復後才進入正常的週期(Lundberg and Weinberg 1999a, Lundberg and Weinberg 1999b)。但是當DNA 受損太嚴重時，*p53*則會促使細胞進入細胞凋亡。

b、Bcl 家族

Bcl 家族包括Bcl-2、Bax、Bcl-xL、Bad 等，是一個與細胞凋亡有關的基因家族。Bcl-2 與Bcl-xL 可以阻止細胞凋亡，造成腫瘤的發生。而Bad、Bak、Bax 和Bcl-Xs 則可以引發細胞凋亡(Gonzalez-Campora et al. 2007)。在正常情況下這兩類蛋白質之間維持一定的比率以調節細胞狀態，當Bcl-2 的表現量高於Bax 時，便會阻礙細胞凋亡的發生；相反的，若是Bax 表現量大於Bcl-2 時，細胞便進入凋亡狀態。

c、c-myc

c-myc是一種原致癌因子(proto-oncogene)，屬於myc 家族中的一員(Ryan and Birnie 1996)。它是一種轉錄因子，可與Max 結合形成heterodimer，來調節下游基因的表現。直到目前為止，c-myc 與細胞凋亡之間的關係還不是很清楚。

d、APO-1/FAS

FAS 基因所轉錄的蛋白是一種跨膜蛋白，在許多正常細胞或腫瘤細胞表面都可以發現到它的存在(Hartmann et al. 1997)。當APO-1/FAS 與一些細胞激素或是抗體結合時，便會引發細胞的apoptosis。

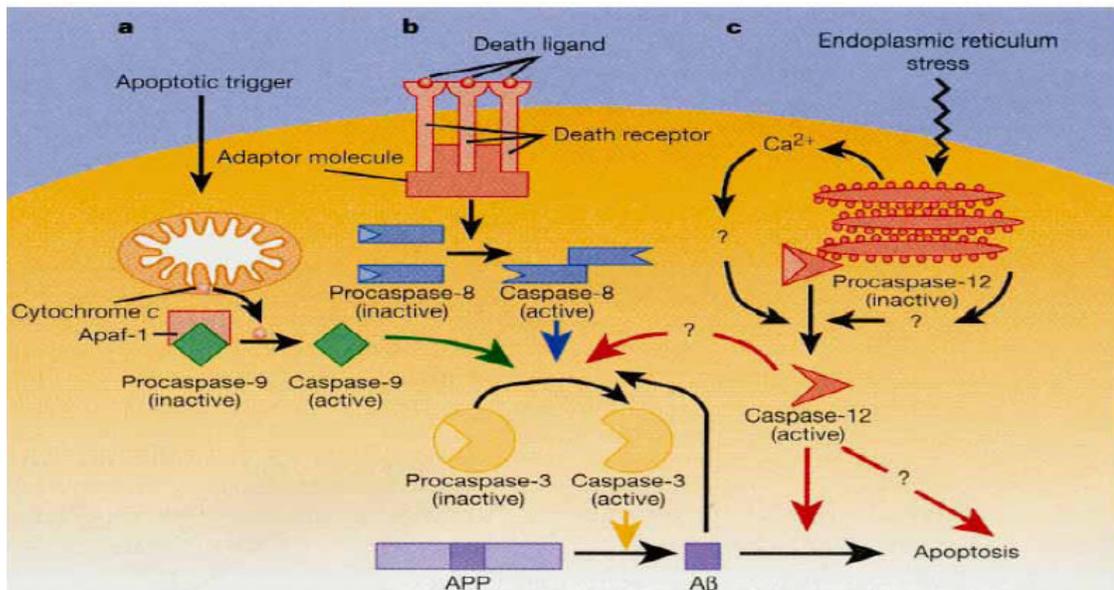


圖2.3、The major pathways to apoptosis.(Mehmet 2000)

第七節、上皮生長因子受器 EGFR (Human Epidermal growth factor Receptor)

屬於 HER (Human Epidermal growth factor Receptor) kinase family 之一的 EGFR (Epidermal growth factor Receptor) 是一個調節正常 epithelial cells 複製生長的一個重要因子。

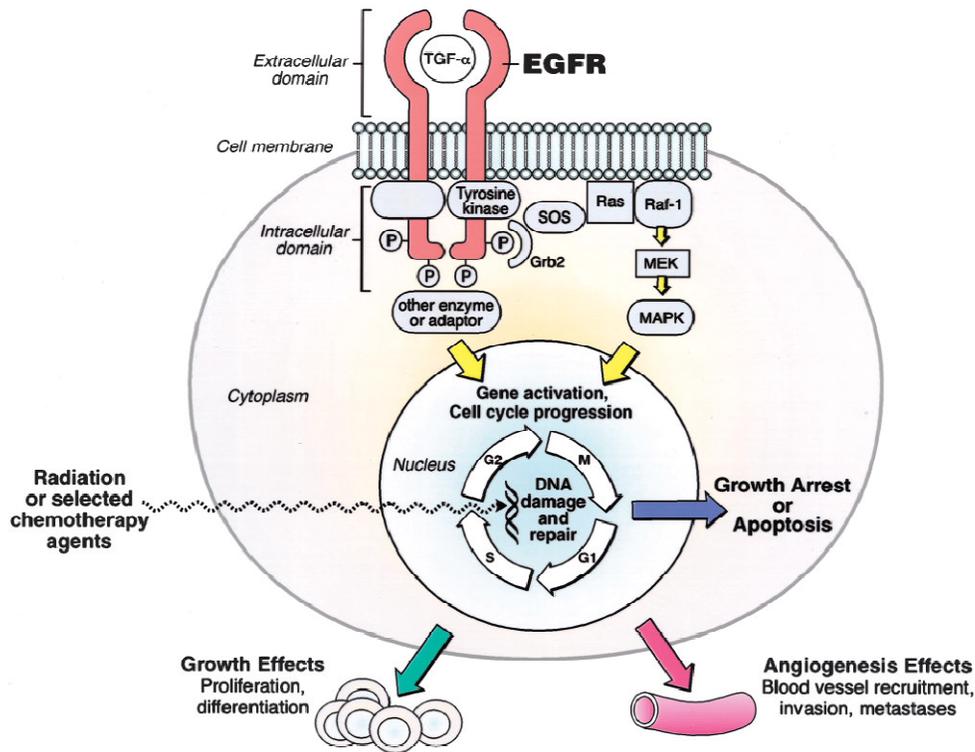


圖 2.4、EGFR pathway (Harari and Huang 2000)

表面生長結合因子受體家族 (epidermal growth factor receptor family) 是 Type I receptor tyrosine kinase 中的成員之一，其中又以 EGFR 最早被發現及定序出來。這些表皮生長因子受體在調節細胞增生、分化及存活功能都佔有重要角色。EGFR 的構造主要分成三個區域：細胞外 ligand 結合的區域(extracellular ligand binding domain)，

跨過細胞膜的區域(transmembrane domain) ，細胞內蛋白質酪胺酸激酶的區域(intracellular protein tyrosine kinase domain) 再加上近碳端地數個酪胺酸。(Alper et al. 2001)

表面生長結合因子受體家族 (EGFR family) 的 ligand 在未成熟是 transmembrane precursor，若被水解成水溶性時，才成為成熟、有功能的 ligand。Ligand 依結合專一性可分為兩類：第一類是能與表面生長結合因子受體(EGFR) 結合的 epidermal growth factor (EGF)，transforming growth factor- α (TGF- α)，amphiregulin (AR)，betacellulin (BTC)，heparin-binding EGF (HB-EGF) 及 virus growth factor。這些 ligand 都可以和 EGF 競爭與表面生長結合因子受體家(EGFR) 結合，故又稱作 EGF agonists。第二類則是 neu differentiation factor(NDFs)/ heregulin4，是 HER-3 (*c-erb B-3*) 和 HER-4 (*c-erb B-4*) 的 ligand 。

細胞表面分佈了「表皮生長因子受體」(EGFR)，這種受體可比喻作鑰匙孔，而「表皮生長因子」(EGF) 則可視作鑰匙。當這種受體與生長因子接合，便會刺激細胞內部名為「酪胺酸激酶」(tyrosine kinase, TK) 這種酵素的活動，開啟了細胞分裂及生長的連鎖效應。

腫瘤的 EGFR 表現如果愈高，則預後也愈差。因此有許多抗癌藥物就被設計來阻斷 EGFR 訊息傳遞的過程。這些阻斷方式包括：
(1)Anti-receptor 的單株抗體 (2)Anti-ligand 的單株抗體 (3)ligand 與

toxin 的結合物 (4)含有抗體的 single chain variable region 與 toxin 的結合物 (5)ligand 和 genistein 的結合物 (6)Tyrosine kinase 的抑制物：作用位置在 tyrosine kinase 的 ATP 結合處 (7) antisense (Ciardiello and Tortora 2001, Furuuchi et al. 2007)。

第八節、Grb2 SH2 domain –SOS-Ras signaling pathway

蛋白質Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)是一種與生長因子受體連結的蛋白質(adaptor protein)，擔任傳遞訊息的角色，其分子量為25 kDa，包含一個SH2 (Src homology 2)區塊和兩個SH3 (Src homology 3)區塊，其排列次序為SH3-SH2-SH3，屬於RAS pathway 的一部分，也是酪胺酸與蛋白質作用激酶反應。在細胞內的訊息傳遞途徑中，主要接受器為細胞膜上的ErbB-2，經由活化細胞膜上的ErbB-2之後，生長因子受體上具有許多包含有磷酸化酪胺酸之特定的胺基酸序列，會被許多種蛋白質之SH2 區塊辨識出，進而與之結合或產生分子間的交互作用，經由SOS 蛋白進入RAS pathway 傳遞至下游途徑，進而將細胞外之訊息傳遞到細胞的內部，而影響細胞之增生或細胞之分化(Blume-Jensen and Hunter 2001, Jiang et al. 2006)。

探討結構與活性關係之研究，故實驗以小分子之線狀胜肽(Linear peptides)類緣物為設計方向，修飾鄰近磷酸化tyrosine 周遭之胺基酸

第九節、RGD 胜肽序列簡介

RGD 序列(arginine-glycine-aspartate, RGD motif) 是細胞貼壁因子，也是功能蛋白中促進細胞貼附細胞膜壁的最小具有功能單位。在細胞體內，此RGD 序列可以受到細胞表面 integrin receptor 的辨識結合，而後啟動細胞內的分子訊息的傳遞，使細胞產生細胞架構的重組，導致細胞產生形態上的改變，細胞因而吸附於細胞外間質上。含有RGD motif 的合成胜肽被廣泛地當integrin-ligand 間交互作用的抑制劑，並被應用在研究細胞附著、遷移、生長、分化和自發性死亡(Chen et al. 2005, Zitzmann et al. 2002)。

本實驗利用含有RGD motif 的合成胜肽和本實驗室之前發表與標的蛋白具有最佳親和力的一段胜肽序列結合(Lung et al. 2002)，探討RGD motif是否能夠成功將有功能性的設計胜肽攜入細胞內，並降低存活率與增加細胞凋亡現象。