

## 第四章 結果

### 第一節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞存活率探討

#### 一、設計胜肽 (peptide 1) 對乳癌細胞株 MCF-7 細胞存活率之影響

探討設計胜肽(peptide 1: Fmoc-Gly-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>) 對乳癌細胞株MCF-7 細胞存活率之影響，將含有 $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入不同濃度之peptide 1 (終濃度為100、75、50、25 與1  $\mu$ M)，並且以目前臨床化學療法用藥doxorubicin作為positive control (Jayaprakasam et al. 2003) 和DMSO 作為negative control，在5% CO<sub>2</sub>、37°C的條件下，分別培養24、48與72小時後，以MTT方法測試。圖4.1-1 結果發現，在與Medium為對照組比較之下，乳癌細胞MCF-7 在peptide 1 處理24小時下，細胞存活率在75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 具有顯著性，但是未達IC<sub>50</sub>；處理48小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 具有顯著性，但是亦未達IC<sub>50</sub>；處理72小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 具有顯著性，但是亦未達IC<sub>50</sub>，並且細胞存活率有略上升的現象，推估癌細胞應該是產生抗藥性，而無法有效阻止細胞生長，導致癌細胞存活率上升。並且由結果(見附錄)得知DMSO 對細胞存活率無顯著性影響。

## 二、設計胜肽 ( peptide 1 )對乳癌細胞株 MDA-MB-453 細胞存活率

### 之影響

探討設計胜肽( peptide1 : Fmoc-Gly-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MDA-MB-453 細胞存活率之影響，將含有 $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well) 中，加入不同濃度之peptide 1 (終濃度為100、75、50、25 與1  $\mu$ M)，並且以目前臨床化學療法用藥doxorubicin 作為positive control 和 DMSO 作為negative control，在5% CO<sub>2</sub>、37°C 的條件下，分別培養24、48與72小時後，以MTT方法測試。圖4.1-2結果發現，在與Medium為對照組比較之下，乳癌細胞MDA-MB-453 在peptide1 處理24小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M 與75  $\mu$ M 具有顯著性，但是未達IC<sub>50</sub>；處理48小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 具有顯著性，但是亦未達IC<sub>50</sub>；處理72小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 具有顯著性，但是亦未達IC<sub>50</sub>。由結果(見附錄)得知DMSO 對細胞存活率無顯著性影響。

## 三、設計胜肽 ( peptide 2 )對乳癌細胞株 MCF-7 細胞存活率之影響

探討設計胜肽(peptide 2 : Arg-Gly-Asp-Glu- Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-

Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MCF-7 細胞存活率之影響，將含有 $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入不同濃度之peptide 2 (終濃度為100、75、50 與 25  $\mu$ M)，並且以目前臨床化學療法用藥doxorubicin 作為positive control 和RGD 序列胜肽作為negative control，在5% CO<sub>2</sub>、37°C的條件下，分別培養24、48與72小時後，以MTT方法測試。圖4.1-3結果發現，在與Medium 為對照組比較之下，乳癌細胞MCF-7 在peptide 2 處理24小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 皆具有顯著性，並達IC<sub>50</sub>=96.26  $\mu$ M；處理48小時下，細胞存活率在50 $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M,具有顯著性，IC<sub>50</sub>=64.96  $\mu$ M；處理72小時下，細胞存活率在50  $\mu$ M、75  $\mu$ M 與100  $\mu$ M 具有顯著性，IC<sub>50</sub>=45.72  $\mu$ M。由結果(見附錄)得知RGD 對細胞存活率無顯著性影響。

#### 四、設計胜肽 ( peptide 2 )對乳癌細胞株MDA-MB-453 細胞存活率之影響

探討設計胜肽(peptide 2：Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MDA-MB-453 細胞存活率之影響，將含有  $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入不同濃度之peptide 2 (終濃度為100、75

與50  $\mu\text{M}$ )，並且以目前臨床化學療法用藥doxorubicin 作為positive control 和RGD 序列胜肽作為negative control，在5%  $\text{CO}_2$ 、37°C的條件下，分別培養24、48與72小時後，以MTT方法測試。圖4.1-4結果發現，在與Medium 為對照組比較之下，乳癌細胞MDA-MB-453 在peptide2 處理24小時下，細胞存活率在50  $\mu\text{M}$ 、75  $\mu\text{M}$  與100  $\mu\text{M}$  皆具有顯著性，並達 $\text{IC}_{50}=90.84 \mu\text{M}$ ；處理48小時下，細胞存活率在50  $\mu\text{M}$ 、75  $\mu\text{M}$  與100  $\mu\text{M}$  具有顯著性， $\text{IC}_{50}=67.53 \mu\text{M}$ ；處理72小時下，細胞存活率在50  $\mu\text{M}$ 、75  $\mu\text{M}$  與100  $\mu\text{M}$  具有顯著性， $\text{IC}_{50}=47.43 \mu\text{M}$ 。由結果(見附錄)得知RGD 對細胞存活率無顯著性影響。

## 第二節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞型態之影響

### 一、設計胜肽 (peptide 1) 對乳癌細胞株 MCF-7 細胞型態之影響

探討設計胜肽(peptide 1 : Fmoc-Gly-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MCF-7 細胞型態之影響，將含有 $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入100  $\mu$ M 之peptide 1，分別培養24、48與72小時後，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態之變化。

### 二、設計胜肽(peptide 1)對乳癌細胞 MDA-MB-453 細胞型態之影響

探討設計胜肽(peptide 1 : Fmoc-Gly-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞MDA-MB-453 細胞型態之影響，將含有  $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入100  $\mu$ M 之 peptide 1，分別培養24、48與72小時後，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態之變化。

### 三、設計胜肽 (peptide 2) 對乳癌細胞株 MCF-7 細胞型態之影響

探討設計胜肽(peptide 2 : Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly- Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MCF-7 細胞型態之影響，將含有 $4 \times 10^5$

cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200 $\mu$ L/well)中，加入100  $\mu$ M 之peptide 2，分別培養24、48與72小時後，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態之變化。

#### 四、設計胜肽(peptide 2)對乳癌細胞 MDA-MB-453 細胞型態之影響

探討設計胜肽(peptide 2 : Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly- Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MDA-MB-453 細胞型態之影響，將含有4  $\times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入100  $\mu$ M 之peptide 2，分別培養24、48與72小時後，以倒立式位像差顯微鏡觀察細胞型態之變化。

### 第三節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞毒理探討

#### 一、設計胜肽 (peptide 2) 對乳癌細胞株 MCF-7 細胞毒理之影響

探討設計胜肽(peptide 2：Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株 MCF-7 細胞毒理之影響，將含有  $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以不含牛血清的 DMEM 培養液，培養細胞於 24 孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入不同濃度之 peptide 2 (終濃度為 100、75、50 與 25  $\mu$ M)，在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的條件下，分別培養 24、48 與 72 小時後，利用 LDH 方法測試。由圖 4.3-1 結果得知，在與 Medium 為對照組比較之下，乳癌細胞 MCF-7 在 peptide 2 處理 24、48、72 小時下，隨著濃度與時間的增加 MCF-7 的細胞毒性隨之增加，表示 peptide 2 對乳癌細胞 MCF-7 是具有細胞毒性的。

#### 二、設計胜肽(peptide 2)對乳癌細胞 MDA-MB-453 細胞毒理之影響

探討設計胜肽(peptide 2：Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株 MDA-MB-453 細胞毒理之影響，將含有  $4 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞以不含牛血清的 DMEM 培養液，培養細胞於 24 孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入不同濃度之 peptide 2 (終濃度為 100、75、50 與 25  $\mu$ M)，在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的條件下，分

別培養 24、48 與 72 小時後，利用 LDH 方法測試。由圖 4.3-2 結果得知，在與 Medium 為對照組比較之下，乳癌細胞 MCF-7 在 peptide2 處理 24、48、72 小時下，隨著濃度與時間的增加 MCF-7 的細胞毒性隨之增加，表示 peptide 2 對乳癌細胞 MDA-MB-453 是具有細胞毒性的。



#### 第四節 利用流式細胞儀探討設計胜肽對乳癌細胞株細胞週期之影響

##### 一、利用流式細胞儀探討設計胜肽 ( peptide 2)對乳癌細胞株 MCF-7

###### 細胞週期之影響

探討設計胜肽(peptide 2 : Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株MCF-7 細胞週期之影響，將含有 $1 \times 10^6$  cells/mL 人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養細胞於6孔細胞培養盤 (1mL/ well)中，加入不同濃度之peptide 2 (終濃度為100、75、50 與 25  $\mu$ M)，並且以目前臨床化學療法用藥doxorubicin 作為positive control，在5% CO<sub>2</sub>、37°C的條件下，培養24小時後，以酒精固定法將細胞加藥處理後的細胞週期固定住，等待上機 (Flow cytometry)前再進行PI 染色，經由流式細胞儀檢測細胞週期。圖4.4-1與圖4.4-2結果得知，在與Medium為對照組比較之下，乳癌細胞MCF-7 在peptide 2 處理24小時下，隨著濃度的增加，sub-G1有顯著的增加，並將乳癌細胞MCF-7的細胞週期停留在G1 phase。

##### 二、利用流式細胞儀探討設計胜肽 ( peptide 2)對乳癌細胞株 MDA-

###### MB-453 細胞週期之影響

探討設計胜肽(peptide 2 : Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-

Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株 MDA-MB-453 細胞週期之影響，將含有 1×10<sup>6</sup> cells/mL 人類乳癌細胞以 DMEM 培養液，培養細胞於 6 孔細胞培養盤(1mL/well)中，加入不同濃度之 peptide 2 (終濃度為 100、75、50 與 25 μM)，並且以目前臨床化學療法用藥 doxorubicin 作為 positive control，在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的條件下，培養 24 小時後，以酒精固定法將細胞加藥處理後的細胞週期固定住，等待上機 (Flow cytometry)前，再進行 PI 染色，藉由流式細胞儀檢測細胞周期。圖 4.4-3 與圖 4.4-4 結果得知，在與 Medium 為對照組比較之下，乳癌細胞 MDA-MB-453 在 peptide 2 處理 24 小時下，隨著濃度的增加，sub-G1 有顯著的增加，並將乳癌細胞 MDA-MB-453 的細胞週期停留在 G1 phase。

## 第五節 利用西方點墨法 (Western) 探討設計之胜肽反應機轉之蛋白

### 質表現與 Bcl-2 家族蛋白質之表現

#### 一、設計胜肽 (peptide 2)對乳癌細胞株 MCF-7 之 Bcl-2 與 Bax 蛋白

##### 質表現影響

探討設計胜肽(peptide2：Arg-Gly-Asp-Glu- Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株 MCF-7 相關蛋白質表現，將含有  $1 \times 10^7$  cells/mL 人類乳癌細胞以 DMEM 培養液，培養細胞於  $5 \text{ cm}^2$  dish 中，加入不同濃度之 peptide 2 (終濃度為 100、75、50 與 25  $\mu\text{M}$ )，在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的條件下，分別培養 3 小時後，以 P-MER lysis buffer 將細胞內蛋白質收集並利用 BSA 檢量曲線定量，先由最大濃度 100  $\mu\text{M}$  處理每隔 30 分鐘抽取處理後蛋白質，經西方點墨法呈現 Bcl-2 與 Bax 蛋白質表現狀況。

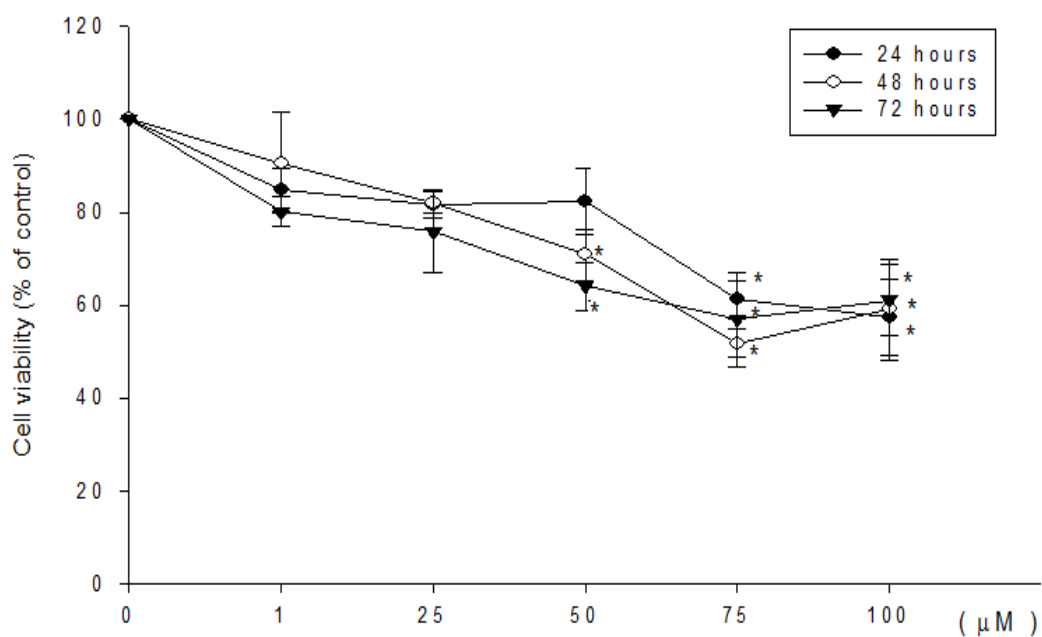
#### 二、設計胜肽 (peptide 2)對乳癌細胞株 MDA-MB-453 之 Bcl-2 與 Bax

##### 蛋白質表現影響

探討設計胜肽(peptide2：Arg-Gly-Asp-Glu- Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>)對乳癌細胞株 MDA-MB-453 相關蛋白質表現，將含有  $1 \times 10^7$  cells/mL 人類乳癌細胞以 DMEM 培養液，培養細胞於  $5 \text{ cm}^2$

dish 中，加入不同濃度之 peptide 2 (終濃度為 100、75、50 與 25  $\mu$ M)，在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的條件下，分別培養 3 小時後，以 P-MER lysis buffer 將細胞內蛋白質收集並利用 BSA 檢量曲線定量，先由最大濃度 100  $\mu$ M 處理每隔 30 分鐘抽取處理後蛋白質，經西方點墨法呈現 Bcl-2 與 Bax 蛋白質表現狀況。

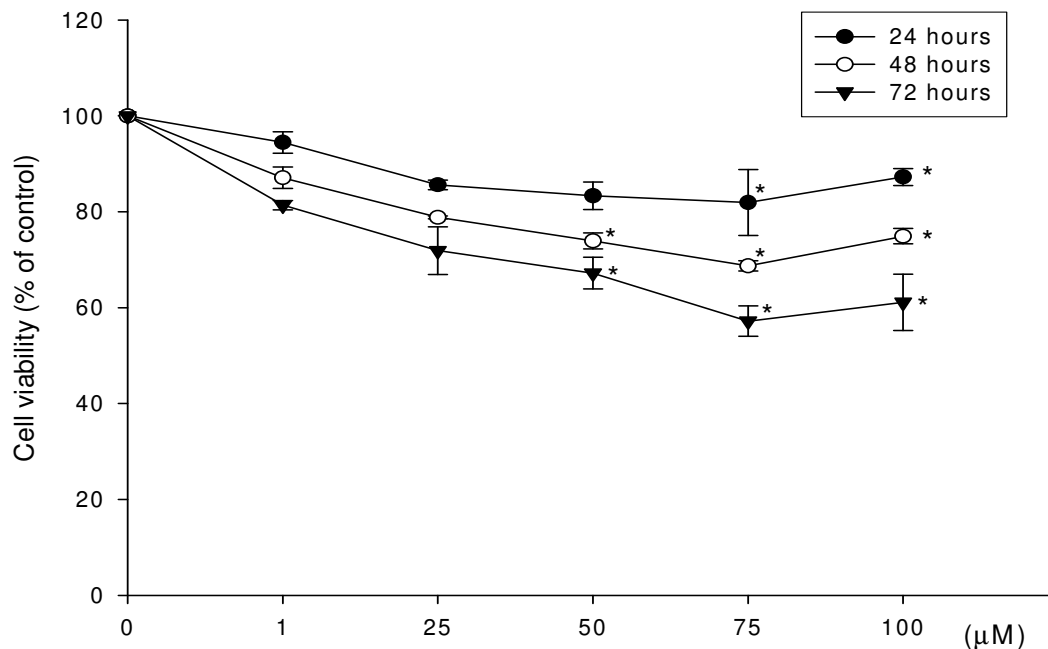
## 結果圖表



**Figure 4.1-1** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 0、1、25、50、75 and 100 μM of design peptide 1 (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay.

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

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



**Figure 4.1-2** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 0, 1, 25, 50, 75, and 100 μM of design peptide 1 (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay.

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

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

**Table 4. 1.** The cell ability of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide1.

MCF-7	control	1 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M	IC50
24 hours	100 $\pm$ 0	84.7 $\pm$ 4.6	81.7 $\pm$ 3.0	82.3 $\pm$ 7.1	61.2 $\pm$ 4.0*	57.3 $\pm$ 8.1*	N.A.
48 hours	100 $\pm$ 0	90.5 $\pm$ 10.8	82.0 $\pm$ 2.4	70.8 $\pm$ 5.5*	51.8 $\pm$ 3.1*	59.1 $\pm$ 3.1*	N.A.
72 hours	100 $\pm$ 0	80.1 $\pm$ 3.3	75.9 $\pm$ 8.9	63.9 $\pm$ 5.3*	56.9 $\pm$ 10.0*	61.1 $\pm$ 7.6*	N.A.

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

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

N.A. non-avalible

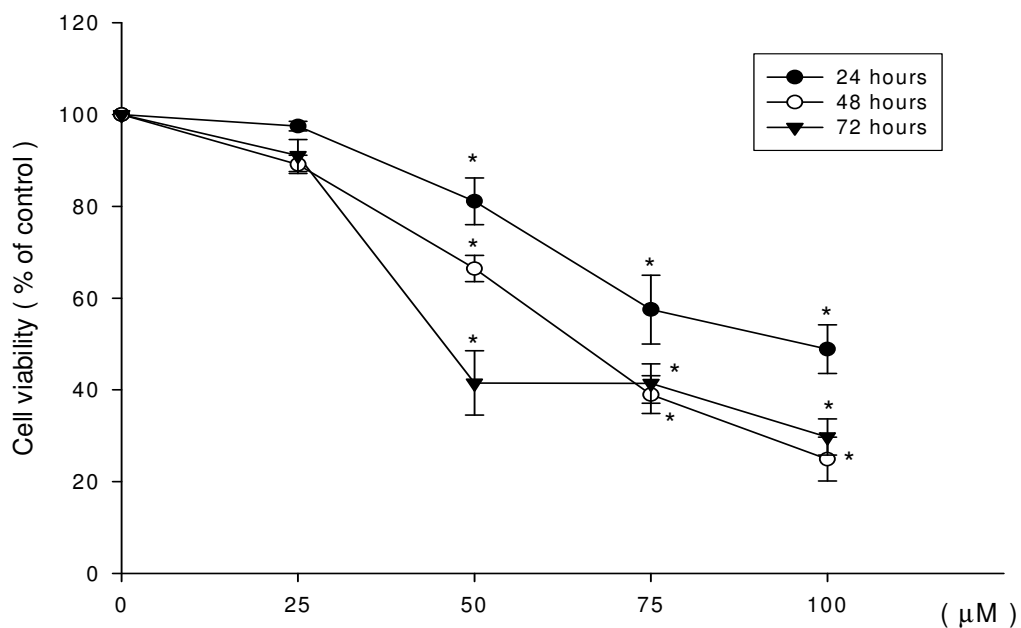
**Table 4.2.** The cell ability of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide1.

MDA-MB-453	control	1 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub>
24 hours	100 $\pm$ 0	94.5 $\pm$ 2.2	85.6 $\pm$ 1.0	83.3 $\pm$ 2.9	81.9 $\pm$ 6.8*	87.3 $\pm$ 1.7*	N.A.
48 hours	100 $\pm$ 0	87.1 $\pm$ 2.3	78.8 $\pm$ 0.3	73.9 $\pm$ 1.6*	68.7 $\pm$ 1.0*	74.9 $\pm$ 1.6*	N.A.
72 ours	100 $\pm$ 0	81.4 $\pm$ 0.9	71.9 $\pm$ 5.0	67.2 $\pm$ 3.3*	57.2 $\pm$ 3.1*	61.1 $\pm$ 5.8*	N.A.

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

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

N.A. non-avalible

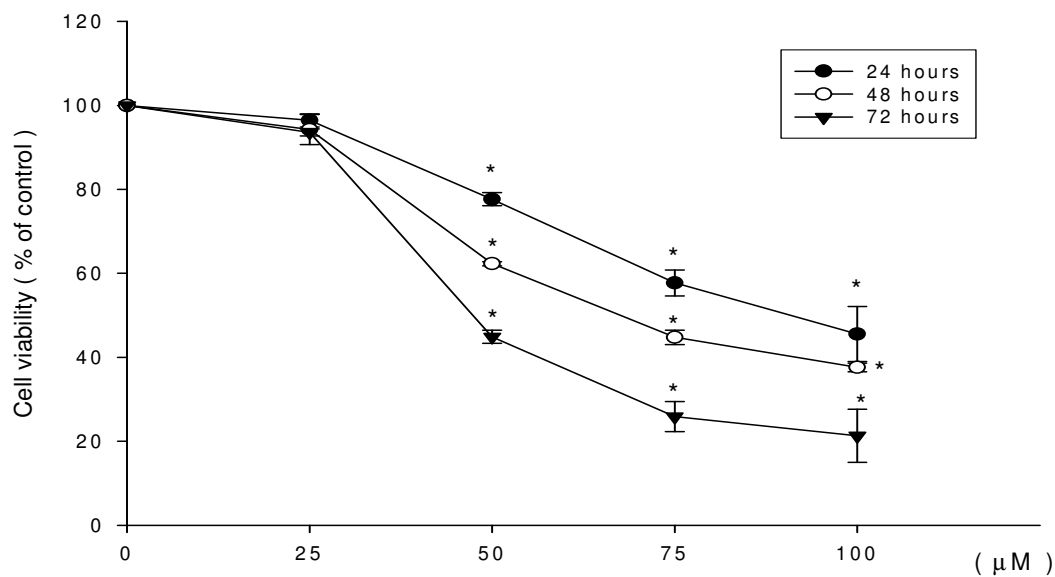


**Figure 4.1-3** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100 μM of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay.

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

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





**Figure 4.1-4** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 0, 50, 75, and 100 µM of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24,48 and 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay.

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

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

**Table 4.3.** The cell viability of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 2.

MCF-7	control	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
24 hours	100 $\pm$ 0	97.5 $\pm$ 1.1	81.1 $\pm$ 5.1*	57.5 $\pm$ 7.5*	48.9 $\pm$ 5.3*	96.8
48 hours	100 $\pm$ 0	89.1 $\pm$ 2.0	66.5 $\pm$ 2.8*	39.0 $\pm$ 4.1*	25.0 $\pm$ 4.8*	65
72 hours	100 $\pm$ 0	91.1 $\pm$ 3.5	41.5 $\pm$ 7.0*	41.4 $\pm$ 4.3*	29.7 $\pm$ 3.9*	45.7

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

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

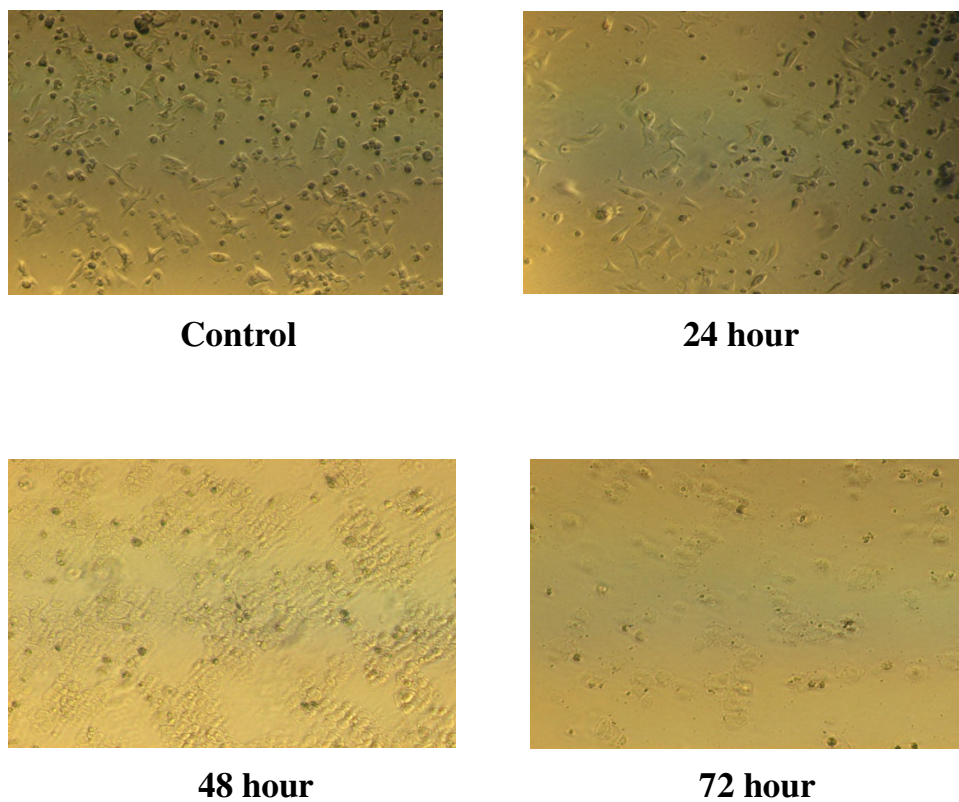
**Table 4.4.** The cell viability of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide2.

MDA-MB -453	control	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
24 hours	100 $\pm$ 0	96.4 $\pm$ 1.6	77.7 $\pm$ 1.6*	57.7 $\pm$ 3.1*	45.6 $\pm$ 6.5*	90.9
48 hours	100 $\pm$ 0	94.2 $\pm$ 3.6	62.3 $\pm$ 0.5*	44.8 $\pm$ 1.7*	37.6 $\pm$ 1.1*	67.6
72 ours	100 $\pm$ 0	93.6 $\pm$ 0.8	44.9 $\pm$ 1.6*	25.9 $\pm$ 3.6*	21.3 $\pm$ 6.3*	47.4

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

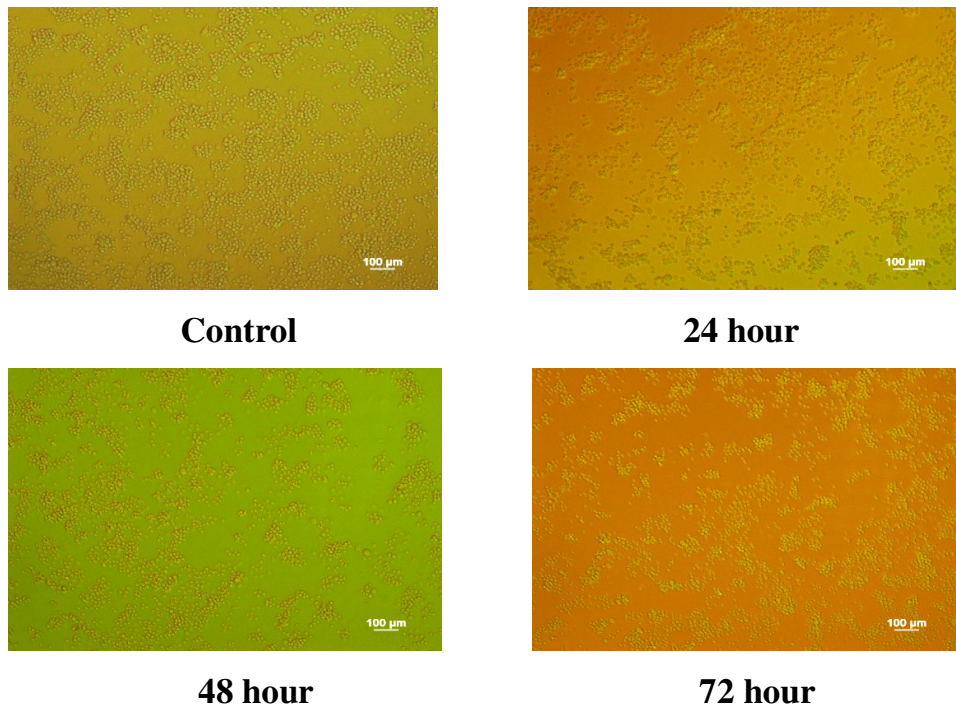
Data are presented as the mean  $\pm$  SD (n=3)

設計胜肽 ( peptide 1 )對乳癌細胞株 MCF-7 細胞型態之影響



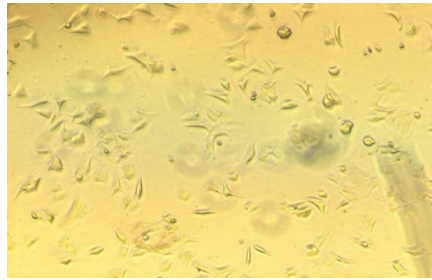
**Figure 4.2-1.** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 100  $\mu$ M of design peptide 1 (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>) and medium control for 24, 48 and 72 hours. Cell morphology was determined by inverted fluorescence microscopy.

設計胜肽 ( peptide 1 )對乳癌細胞株 MDA-MB-453 細胞型態之影響

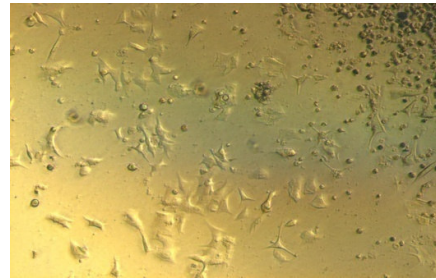


**Figure 4.2-2.** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 100 μM of design peptide 1 (Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>) and medium control for 24, 48 and 72 hours. Cell morphology was determined by inverted fluorescence microscopy.

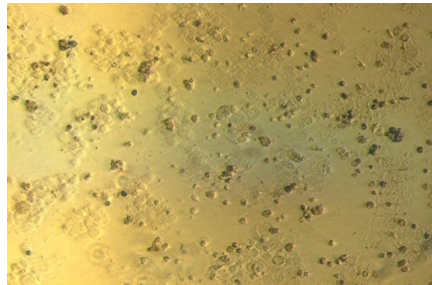
設計胜肽 ( peptide 2 )對乳癌細胞株 MCF-7 細胞型態之影響



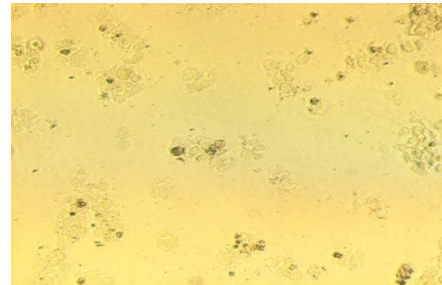
**Control**



**24 hour**



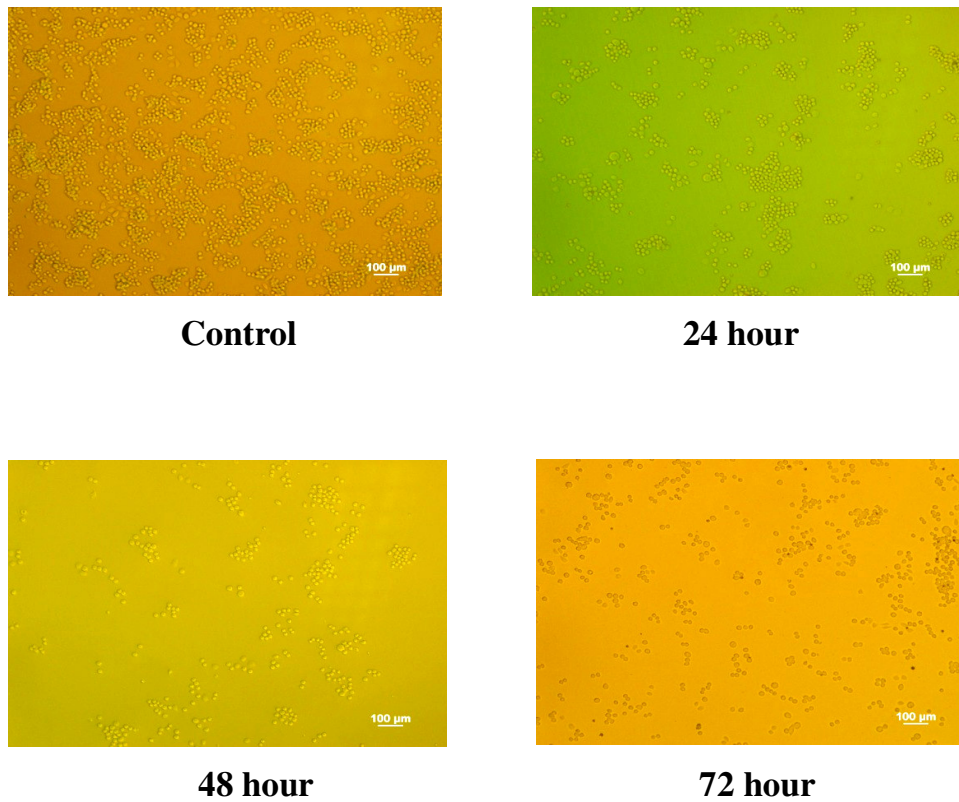
**48 hour**



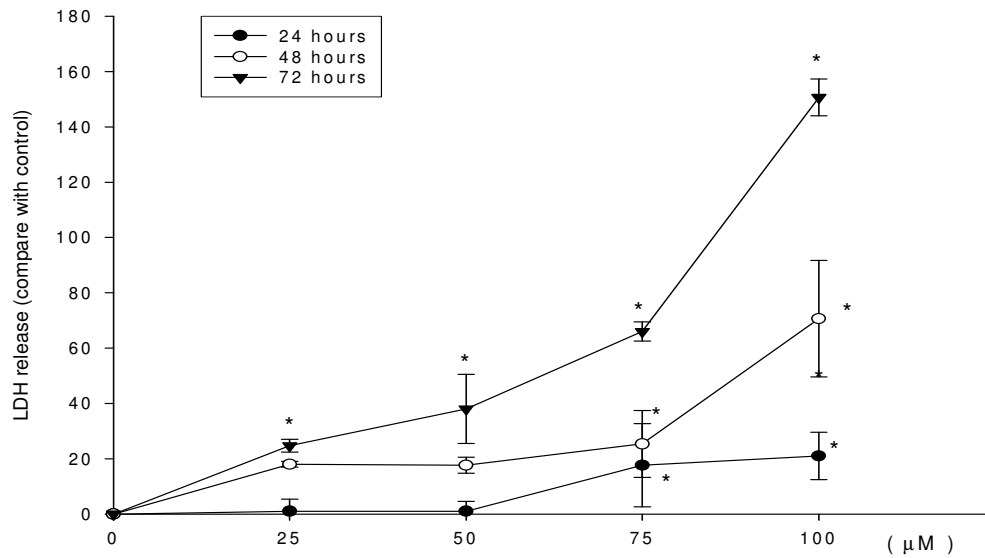
**72 hour**

**Figure 4.2-3.** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 100  $\mu$ M of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp- Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) and medium control for 24, 48 and 72 hours. Cell morphology was determined by inverted fluorescence microscopy.

設計胜肽 (peptide 2) 對乳癌細胞株 MDA-MB-453 細胞型態之影響



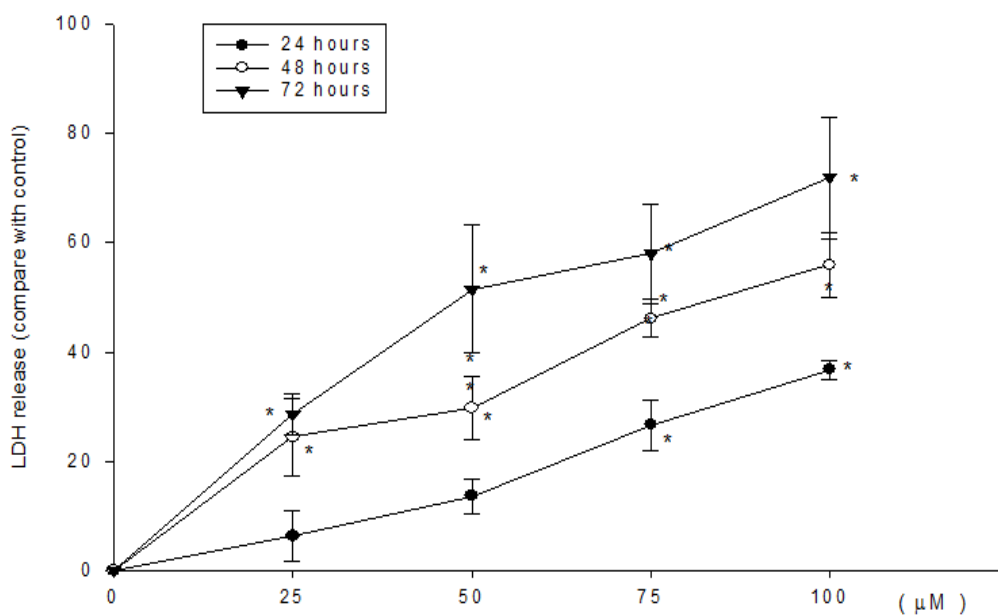
**Figure 4.2-4.** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 100  $\mu$ M of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) and medium control for 24, 48 and 72 hours. Cell morphology was determined by inverted fluorescence microscopy.



**Figure 4.3-1-A.** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100  $\mu\text{M}$  of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined by cell cytotoxicity assay.

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

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



**Figure 4.3-2** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100 µM of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined by cell cytotoxicity assay.

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

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



**Table 4.5.** The cell cytotoxicity of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 2.

<b>MCF-7</b>	<b>control</b>	<b>25 <math>\mu</math>M</b>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	<b>75 <math>\mu</math>M</b>	<b>100 <math>\mu</math>M</b>
<b>24 hours</b>	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 4.4	101 $\pm$ 3.6	117.6 $\pm$ 15.0*	121 $\pm$ 8.5*
<b>48 hours</b>	100 $\pm$ 0	118 $\pm$ 1.0	117.7 $\pm$ 2.9	125.3 $\pm$ 12.0*	170.7 $\pm$ 21.1*
<b>72 hours</b>	100 $\pm$ 0	124.7 $\pm$ 2.3*	138 $\pm$ 12.5*	166 $\pm$ 3.5*	250.7 $\pm$ 6.6*

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

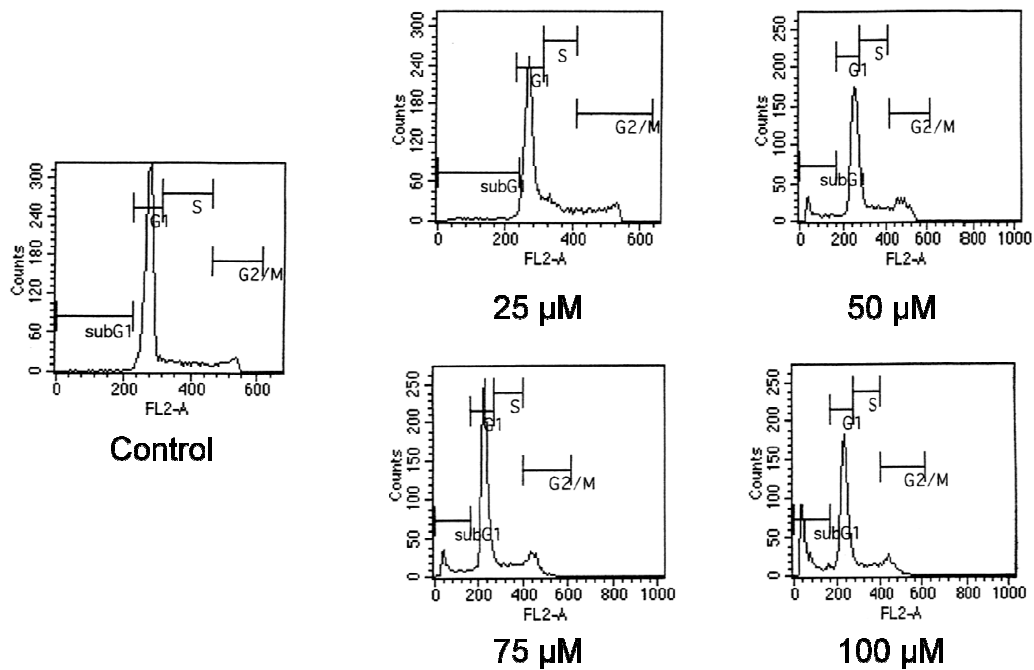
Data are presented as the mean  $\pm$  SD (n=3)

**Table 4.6.** The cell cytotoxicity of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide 2.

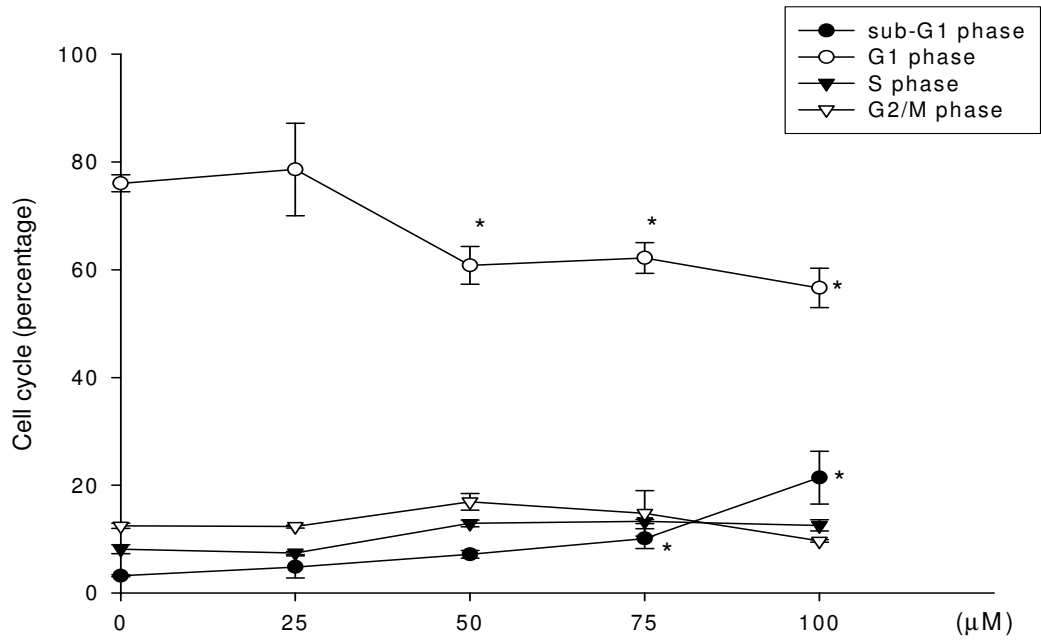
<b>MDA-MB-453</b>	<b>control</b>	<b>25 <math>\mu</math>M</b>	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	<b>75 <math>\mu</math>M</b>	<b>100 <math>\mu</math>M</b>
<b>24 hours</b>	100 $\pm$ 0	106.4 $\pm$ 4.5	113.7 $\pm$ 3.2	126.7 $\pm$ 4.6*	136.7 $\pm$ 1.7*
<b>48 hours</b>	100 $\pm$ 0	124.5 $\pm$ 7.1*	129.8 $\pm$ 5.7*	146.2 $\pm$ 3.5*	155.9 $\pm$ 5.8*
<b>72 ours</b>	100 $\pm$ 0	128.7 $\pm$ 3.8*	151.6 $\pm$ 11.6*	158.0 $\pm$ 9.2*	171.9 $\pm$ 11.2*

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

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



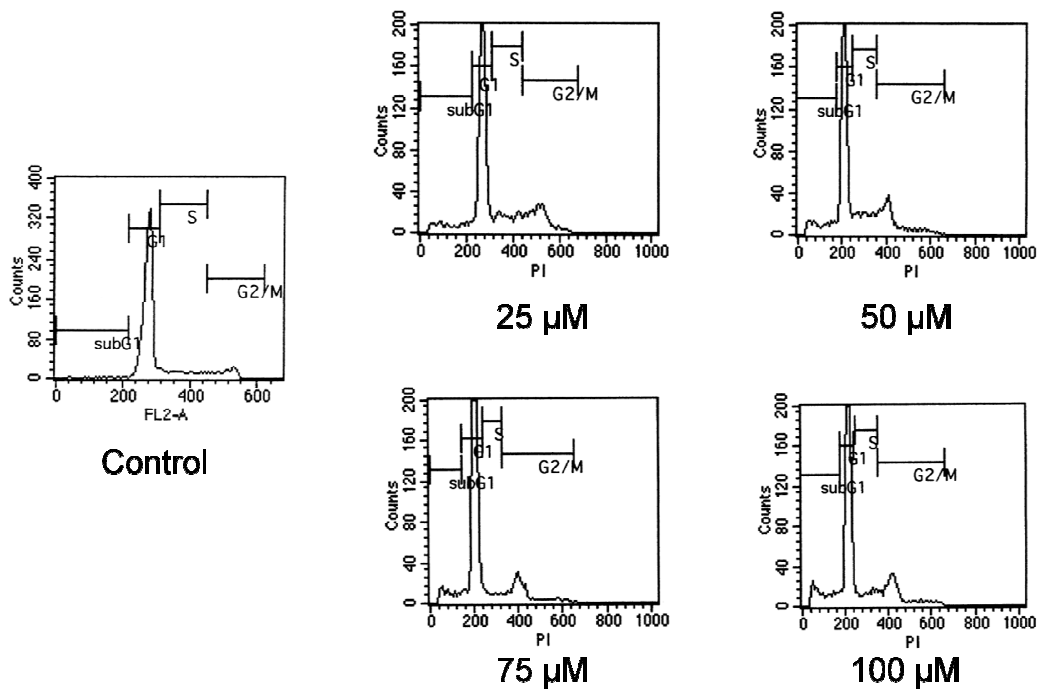
**Figure 4.4-1** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100  $\mu\text{M}$  of design peptide (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24 hours. Cell cycle progression were determined by flow cytometry.



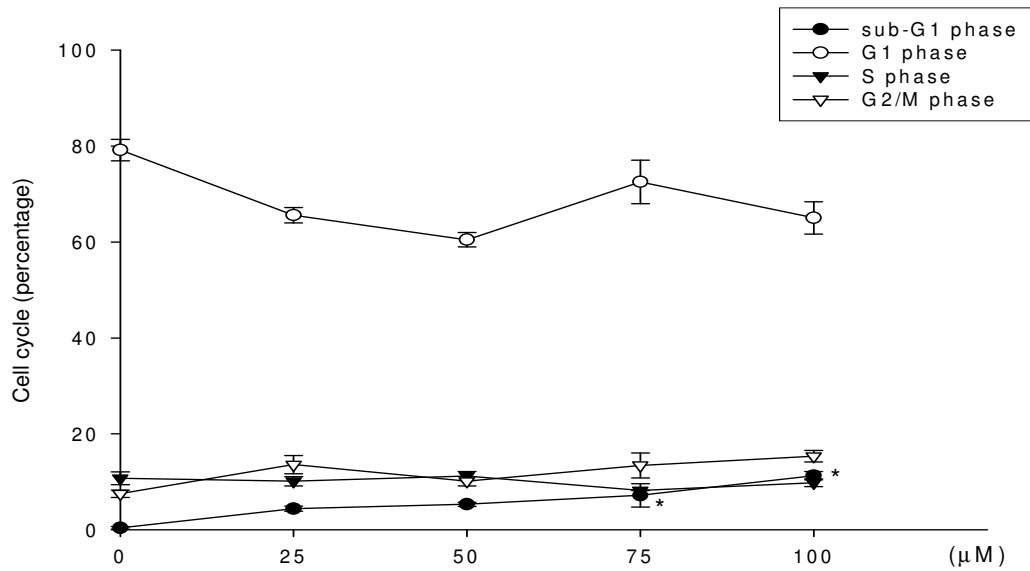
**Figure 4.4-2** Human breast cancer cells MCF-7 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100 μM of design peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24 hours. Cell cycle was determined by flow cytometry.

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

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



**Figure 4.4-3.** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100  $\mu\text{M}$  of design peptide (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24 hours. Cell cycle progression were determined by flow cytometry.



**Figure 4.4-4.** Human breast cancer cells MDA-MB-453 were treated with 0, 25, 50, 75, and 100 μM of design peptide2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) for 24 hours. Cell cycle was determined by flow cytometry.

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

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

**Table 4.7** The cell cycle of breast cancer cell line MCF-7 was treated with peptide 2.

MCF-7	control	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Sub-G1	3.20 $\pm$ 0.18	4.84 $\pm$ 2.07	7.19 $\pm$ 0.72	10.11 $\pm$ 1.84*	21.41 $\pm$ 4.91*
G1	76.01 $\pm$ 1.58	78.58 $\pm$ 8.57	60.81 $\pm$ 3.50*	62.18 $\pm$ 2.84*	56.60 $\pm$ 3.64*
S	8.12 $\pm$ 0.83	7.43 $\pm$ 0.29	12.91 $\pm$ 0.61	13.27 $\pm$ 0.40	12.54 $\pm$ 1.04
G2/M	12.45 $\pm$ 0.47	12.34 $\pm$ 0.29	16.91 $\pm$ 1.54	14.8 $\pm$ 4.23	9.67 $\pm$ 0.22

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

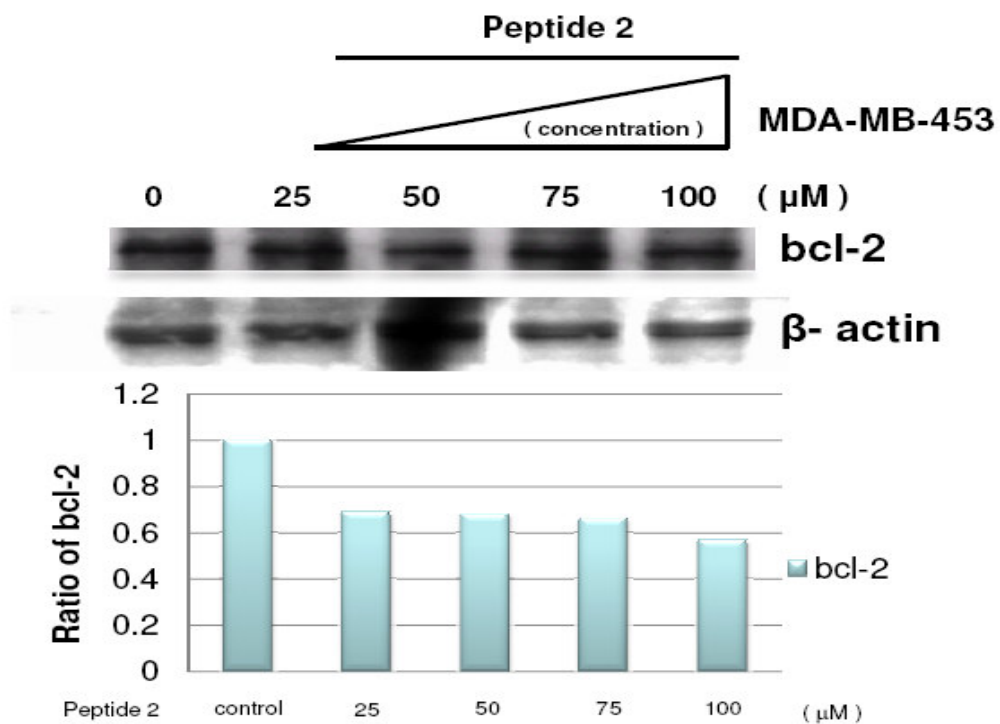
Data are presented as the mean  $\pm$  SD (n=3)

**Table 4.8** The cell cycle of breast cancer cell line MDA-MB-453 was treated with peptide 2.

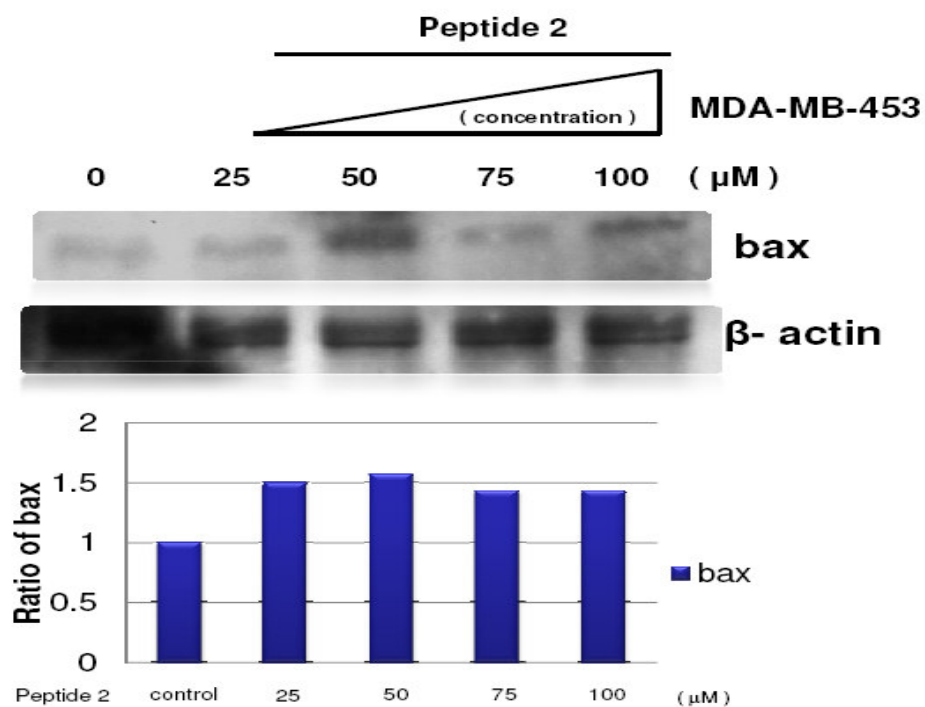
MDA-MB -453	control	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Sub-G1	0.41 $\pm$ 0.25	4.43 $\pm$ 0.53	5.32 $\pm$ 0.42	7.19 $\pm$ 2.41*	11.31 $\pm$ 0.88*
G1	76.02 $\pm$ 1.59	78.58 $\pm$ 8.57	60.81 $\pm$ 3.50	62.18 $\pm$ 2.84	56.60 $\pm$ 3.64
S	8.12 $\pm$ 0.83	7.43 $\pm$ 0.30	12.92 $\pm$ 0.61	13.27 $\pm$ 0.4	12.54 $\pm$ 1.04
G2/M	12.45 $\pm$ 0.47	12.33 $\pm$ 0.29	16.91 $\pm$ 1.54	14.8 $\pm$ 4.23	9.67 $\pm$ 0.22

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

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



**Figure 4.5-1.** Effect of Peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) 0, 25, 50, 75 and 100 μM on apoptosis pathway protein-bcl-2 in human breast cancer cell line MDA-MB-453.



**Figure 4.5-2.** Effect of Peptide 2 (Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp) 0, 25, 50, 75 and 100 μM on apoptosis pathway protein -bax in human breast cancer cell line MDA-MB-453.