

第五章 討論

第一節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞存活率探討

本實驗室在2002年發表一系列的合成胜肽抑制物在Grb2 SH2 domain 中具有最強結合能力的胜肽抑制物(Lung et al. 2002)，進行生物活性測試。在本篇論文一開始，利用胜肽設計的機轉位置，選定人類乳癌細胞MCF-7(low ErbB-2 expression) 與 MDA-MB-453(ErbB-2 overexpression) 分別對HER-2/neu receptor 作為細胞株的負向對照組和正向對照組。

在對設計胜肽peptide 1 分別對兩株乳癌細胞的存活率探討時，發現在48小時的75 μ M 具有抑制癌細胞生長最好的功效，和液態培養基作比較，結果具有顯著表現，但是抑制能力無法得到IC₅₀，和先前發表在細胞外動力學實驗中，具最好結合能力的結果，無法相呼應。

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)(Hong et al. 1999)或是加入穿越細胞膜的胜肽序列(Lindgren et al. 2006)，使藥物可以順利穿越細胞膜的屏障。已經在臨床使用的抗癌藥物，經過前導藥物的添加，大幅降低副作用與增加藥物對癌細胞的功效。

於是討論設計之胜肽在細胞外動力學與細胞存活率實驗之結果無法相對應，原因是否為胜肽無法順利通過細胞膜，進入細胞內和標的蛋白作用，而研究具有穿越細胞膜之最小蛋白質單位。

RGD motif 在許多文獻中指出，此最小單位特定功能序列是經由多種蛇毒蛋白中，探討共同之蛋白質序列，找尋出此最小功能單位 (Ruoslahti 2003)。近年來，有許多科學家試著探討RGD motif 在細胞內的分子機轉作用，濃度在1 mM下可以啟動caspase-3活化，導致細胞凋亡(Buckley et al. 1999)。不過RGD 最主要功能是可以貼覆於細胞膜上(Zitzmann et al. 2002)，有更多科學家將RGD motif 合成於功能序列上，成為一個新的carrier protein (Harms et al. 2004, Shadidi and Sioud 2003)。

因此將RGD motif 視為carrier peptide 接上本實驗室設計的功能peptide，稱為peptide2，再將peptide2進行乳癌細胞 MCF-7與MDA-MB-453進行存活率探討，並以先前peptide1 的最佳濃度(50、75與100 μM)進行比較。實驗結果顯示，加了RGD 的peptide2，不僅細胞存活率效果比未加RGD 的效果更顯著，而有 IC_{50} 的抑制濃度；人類乳癌細胞 MCF-7 在24、48與72小時之 IC_{50} 分別是96.26 μM 、64.96 μM 與45.73 μM ；而人類乳癌細胞 MDA-MB-453 在24、48與72小時之 IC_{50} 分別是90.84 μM 、67.53 μM 與47.42 μM 。並且以加藥

最高濃度之RGD (100 μ M) 當作負向對照組，由結果得知RGD 與液態培養基(0 μ M) 無顯著差異。明確的說明，RGD在此實驗中僅扮演carrier peptide的角色並攜帶我們設計之功能胜態進入細胞，而數據結果也證實只有單RGD motif的細胞存活率測試時，尚未對乳癌細胞有影響，因此我們由以上結果推論，peptide 1 因為結構功能無法進入細胞膜，所以無法有效與特定功能蛋白結合，而並非是設計之peptide 在細胞中沒有功效。

第二節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞型態之影響

投予 100 μ M 之設計胜肽 (peptide1 與 peptide2) 並以倒立式位像差顯微鏡觀察 24-72 小時人類乳癌細胞(MCF-7 與 MDA-MB-453) 之細胞型態變化的情形 (圖 2-1 與 2-2)。結果可發現於第 24 小時，設計胜肽 (peptide 1 與 peptide 2)處理之乳癌細胞，其細胞型態皆開始皺縮變圓，觀察 48 及 72 小時，此情形更為明顯且細胞數目逐漸減少。由於細胞會因為藥物的加入、外力的物理傷害、放射線與環境的因素，使得細胞型態改變。細胞死亡前，外型會從細胞特有型態萎縮成圓形，顯微鏡下細胞質會由清澈透明變成濃縮狀，導致細胞死亡。貼附型的細胞會因此懸浮於培養基中，我們即可認定此細胞不是為健康狀態的細胞甚至已經死亡。

第三節 設計胜肽對乳癌細胞株細胞毒理探討

細胞死亡主要分成細胞凋亡(apoptosis)與細胞壞死(necrosis)；細胞受到外力或是藥物作用，使細胞受到影響，則會造成細胞死亡。若是細胞凋亡(apoptosis)則屬於自殺性或是計畫性死亡，此時細胞內DNA裂解，細胞會破成碎片，再經由巨噬細胞吞食、代謝。細胞凋亡的過程不會傷害細胞膜、細胞質內胞器，所以不會有發炎反應產生；相反的，若是細胞走向細胞壞死而死亡，此過程為細胞受到強大外力或是物理性質傷害，細胞內DNA不會裂解，細胞膜與細胞質內胞氣會受到傷害，而產生發炎反應，此時便會大量釋放乳酸去氫酶(lactate dehydrogenase,LDH)在血清中(Kim et al. 2003)。在細胞存活率實驗得到peptide2 可以順利穿越細胞膜，將功能peptide 作用於特定目標蛋白質的結論之後，將此具有功能之peptide 2進行細胞毒性測試。

將具有功效之 peptide 2 對人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-453 作細胞毒性測試，由結果得知，peptide 2 處理乳癌細胞MCF-7 、MDA-MB-453 於24、48與72小時，會隨著時間與濃度的增加，對液態培養基漸具有顯著表現。由此結果可以得知，設計的功能胜肽對乳癌細胞MCF-7 與 MDA-MB-453 的死亡，與細胞存活率相對應，進一步探討設計之胜肽使癌細胞死亡微細胞凋亡或是細胞壞死並探討細胞週期變化。

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

探討設計胜肽peptide2 對乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-453細胞週期之影響。細胞週期是細胞生長、分化、凋亡的循環，探討設計胜肽peptide2 與細胞週期之關係。將細胞整個週期以百分比表示，乳癌細胞MCF-7 隨著時間的增加、peptide2 濃度的增加，分別在24小時的75 μ M 與16小時的100 μ M peptide2處理下，sub-G1 (29.71%) 與 (11.85%) ，會隨著時間與濃度的增加而有增加比例的趨勢；S phase 與 G2/M phase 皆無顯著差異。隨著subG1的增加，G1在細胞之週期的比例下降。因此可以推估peptide2 對人類乳癌細胞MCF-7 的細胞週期影響是將週期停止於G1 phase ，而無法進入S phase ，使得DNA無法複製(Mandal et al. 2007)。Sub-G1 期的細胞是處於休眠狀態，可能為暫時性或永久性的生長停止狀態。若是藥物處理之後，細胞在此期的比例增加，會使細胞走向細胞凋亡(Jenny et al. 2005)。

由此實驗結果，設計之功能胜肽使得細胞中的Sub-G1 增加，所以合理的推論我們設計的功能性胜肽，是乳癌細胞株MCF-7 與MDA-MB-453 導致細胞凋亡的主要因素。

為了更確定設計胜肽peptide2對乳癌細胞會產生細胞凋亡現象，選擇利用專一性高的 Annexin V / PI 雙染技術，將凋亡的細胞染上螢光，再經由流式細胞儀分析。預期隨著細胞週期的subG1的比例升高，

偵測到 apoptosis 的量成正相關，確切的證實 peptide2 可以使乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-453 走向細胞凋亡。

第五節 利用西方點墨法 (Western blotting) 探討設計之胜肽對細胞

蛋白 Bcl-2、Bax 之表現

為了探討設計胜肽 peptide2 對人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-453 細胞內特定分子蛋白質表現之影響與 Bcl-2 與 Bax 之細胞凋亡相關蛋白質表現之影響。首先，為了解藥物在細胞內反應作用的時間，將最大濃度的 peptide2 (100 μ M) 每隔 30 分鐘將細胞蛋白質抽取存放，最長時間為 3 小時。

在探討藥物與細胞傳遞蛋白分子反應時間的同時，可以觀察到人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-453 在 Bcl-2 蛋白表現量減少，Bax 蛋白表現量則無增減。因此可推測此藥物是路徑是經由粒線體接觸 Bcl-2 家族蛋白質，而訊息傳遞至細胞核，造成細胞凋亡現象。

通常藥物的投遞，會影響細胞內蛋白質的表現，若是與訊息調控相關的抑制劑，其影響的層面，更可能是由於基因的表現受到抑制，而增加或是減少了蛋白表現。這論點可由細胞凋亡時，某些特定蛋白表現亮增加了或減少了得到證明。

到底所設計的胜肽抑制劑投遞到細胞時，是一開始就影響了訊息

傳導的蛋白，還是造成細胞凋亡後某些特定蛋白的表現不同，目前尚
無法推論。

第六章 結論

在本篇研究中，藉由細胞存活率 (Cell viability)、細胞毒性 (Cell cytotoxicity)、細胞週期 (Cell cycle) 與細胞凋亡 (Apoptosis) 等機制，探討合成設計之胜肽對人類雌激素依賴型乳癌細胞 MCF-7 與 人類 HER2/neu 接受器過度表現型乳癌細胞 MDA-MB-453 之抗癌功效。由實驗數據表現出，原先發表過的論文中(Lung et al. 2002) ，當時具有最高結合力的功能性胜肽(peptide1, Fmoc-Gly-Tyr-Aib-Asn) 在利用 peptide1 處理兩株人類乳癌細胞 24 小時之後，75 μM 與 100 μM 對 Medium control 即有顯著差異，在胜肽處理 48 小時與 72 小時之後，不過以上均無法讀出過半致死率。進而增加 RGD 序列之功能胜肽 (peptide2, Arg-Gly-Asp-Glu- Tyr-Aib-Asn-Arg- Gly-Asp) 在細胞存活率表現中，兩株乳癌細胞在 24、48 與 72 小時的處理後，在 50 μM 、 75 μM 與 100 μM 同樣與 Medium control 具有顯著性差異，並且明確求出 IC_{50} 值分別為 90.84 μM 、67.53 μM 、與 45.7 μM 。以 100 μM 的 RGD motif 作為 negative control，由數據結果得知，RGD motif 對 Medium control 沒有顯著性差異，說明 RGD motif 只扮演 carrier peptide 的角色，對乳癌細胞沒有影響。在細胞毒性實驗中，乳癌細胞會隨著時間與胜肽濃度的增加，死亡的細胞也越來越多，依此與細胞存活率相呼應，更進一步證實癌細胞為細胞死亡。探討功能性胜肽

對乳癌細胞之細胞週期的影響，在胜肽處理的乳癌細胞之細胞週期，在 24 小時的處理之下，sub-G1 期會隨著胜肽處理濃度的增加而有所增加，因此繼而探討細胞凋亡相關蛋白質 bcl-2 與 bax 對藥物處理之影響，初步數據顯示功能性胜肽對乳癌細胞的死亡作用應該為細胞凋亡。然而功能性胜肽在乳癌細胞中的分子機轉作用，目前尚未清楚，仍待進一步探討。