

東海大學化學研究所
碩士論文

指導教授：龍鳳娣 博士

(Dr. Feng-Di Lung)

**PCK3145 衍生肽在大腸直腸癌中的結構 - 抗增殖
活性關係之研究**

Studies of the Structure-Antiproliferative Activity Relationships of
PCK3145-derived Peptides in Colorectal Cancer

研究生：劉品秀

(Pin-Xiu Liu)

中華民國一零八年八月

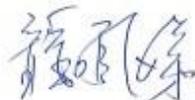
東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 劉品秀 君所提之論文

**PCK3145 衍生肽在大腸直腸癌中的結構 - 抗增殖
活性關係之研究**

Studies of the Structure-Antiproliferative Activity Relationships of
PCK3145-derived Peptides in Colorectal Cancer

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

108年07月03日

東 海 大 學 碩 士 班 研 究 生
論 文 口 試 委 員 審 定 書

化學系 碩士班 劉品秀 君所提之論文

PCK3145 衍生肽在大腸直腸癌中的結構 - 抗增殖活性關係之研究

Studies of the Structure-Antiproliferative Activity
Relationships of PCK3145-derived Peptides in
Colorectal Cancer

論文口試委員會 召集人 謝明卿 (簽章)

委 員 龍其峰

程家維

中 華 民 國 108 年 07 月 03 日

謝誌

時光飛逝不知不覺兩年已到，念碩士的這段路程跌跌撞撞終於結束了。一路上得到很多人的幫助，首先感謝龍老師的指導，感謝系上的楊老師、吳老師、賴老師、許老師、劉老師及楊老師在學業上的教導；感謝藍姐和薇安學姊，幫忙處理行政或學生事務；感謝德倫學長、湛如學姐、宜哲學長、俊毅學長、冠婷學姐、懷忻學姐、雅柔學姐的幫助，引導我們解決實驗上遇到的難題；感謝同儕：詩容、顥萱、乃瑛、倩瑜、光明、育寧、晏慈，在學習及實驗上對我的幫助，陪伴我度過這段路程；感謝學弟妹們：子涵、子勛、向宏、卉萱、佳儀、思禹、頌芳在實驗上的協助，幫忙完成大大小小的實驗，還協助處理實驗室的各種雜事。感謝一路上幫助我的所有人。

最後要感謝我的家人及朋友，感謝你們在我沮喪時的開導，在遇到挫折時鼓勵我，陪伴我度過各種難題，支持、幫助我闖過這路上各種艱辛的關卡。

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	V
摘要.....	VI
Abstract.....	VII
名詞簡稱及縮寫對照表.....	VIII
第一章、前言.....	1
第二章、文獻探討.....	3
2-1 癌症介紹.....	3
2-2 細胞之訊息傳導.....	5
2-3 抗癌胜肽之介紹.....	6
2-3-1 胜肽介紹.....	6
2-3-2 抗癌胜肽.....	7
2-4 前列腺分泌蛋白 94 (PSP94) 及 PCK3145 介紹.....	9
第三章、研究動機與目的.....	10
第四章、材料與方法.....	11
4-1 實驗設計與流程.....	11
4-2 固相胜肽合成法.....	11

4-2-1 固相胜肽合成法所需實驗材料及設備	11
4-2-2 固相胜肽合成法原理	12
4-2-3 茚三酮反應 (Ninhydrin test)	12
4-3 應用逆相高效能液相層析儀 (RP-HPLC) 純化胜肽粗產物	13
4-3-1 RP-HPLC 所需實驗材料及儀器設備	13
4-3-2 應用 RP-HPLC 純化合成胜肽粗產物	13
4-4 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) ..	14
4-4-1 MALDI-TOF MS 所需實驗材料及儀器設備	14
4-4-2 應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成胜肽粗產物	14
4-4-3 基質功能及種類	15
4-5 細胞實驗	15
4-5-1 細胞培養之試劑與藥品	15
4-5-2 細胞培養液配製	15
4-5-3 細胞冷凍保存	16
4-5-4 大腸結腸癌細胞株存活率測定原理及步驟	17
第五章、結果與討論	19
5-1 胜肽之設計	19
5-2 胜肽的製備、純化及質量鑑定結果	19
5-3 合成胜肽之生物活性測試	21

5-4 實驗結果分析	22
第六章、未來展望	24
參考文獻.....	42
附錄.....	46



圖目錄

圖 1：固相胜肽合成法之流程圖。	25
圖 2：線粒體還原酶（mitochondrial reductase）將 MTT 還原成紫色不溶性沉澱物 formazan。	26
圖 3：應用 RP-HPLC 分析 PJ-1 純產物之層析圖。	27
圖 4、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-1。	27
圖 5：應用 RP-HPLC 分析 PJ-2 純產物之層析圖。	28
圖 6：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-2。	28
圖 7：應用 RP-HPLC 分析 PJ-3 純產物之層析圖。	29
圖 8：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-3。	29
圖 9：應用 RP-HPLC 分析 PJ-4 純產物之層析圖。	30
圖 10：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-4。	30
圖 11：應用 RP-HPLC 分析 PJ-5 純產物之層析圖。	31
圖 12：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-5。	31
圖 13：合成胜肽不同濃度下對 SW480 結腸癌細胞的抑制效果。	32
圖 14：將合成胜肽不同濃度下對 HT29 結腸癌細胞的抑制效果。	32
圖 15：PCK3145 結構模擬。	33

表目錄

表 1：大腸癌之 TNM 分期介紹。	34
表 2：SPPS 所需之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。	35
表 3：Ninhydrin test 所需試劑、耗材。	36
表 4：RP-HPLC 所需之耗材及試劑、儀器設備及其製造廠商。	37
表 5：MALDI-TOF MS 所使用之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。	38
表 6：常用 MALDI 基質之結構。	39
表 7：細胞培養相關實驗使用之藥品與試劑。	40
表 8：PJ 系列胜肽的胺基酸序列。	41
表 9：本實驗之胜肽之純化與鑑定。	41

摘要

細胞訊息傳遞路徑會影響細胞之生理作用，使細胞適應外界的改變。據文獻指出前列腺分泌蛋白 94 (PSP94) 是人類精液中最主要的成分之一，其已被確定可作為前列腺癌的獨立診斷與預後的生物標記物，並可能作為前列腺腫瘤的抑制劑與治療藥物。其中被激活的 ERK 細胞傳遞路徑參與諸多細胞活動，包括細胞增殖和存活。而活化的 ERK 會將許多基質(其他激酶和轉錄因子)磷酸化，使下游路徑執行與細胞週期分化、蛋白質轉譯和避免細胞死亡相關的程序。而 PCK3145 是一段擷取自 PSP94 蛋白的胜肽序列，已被證實可抑制前列腺癌、乳癌及結腸癌腫瘤的生長，並可能是透過磷酸化 MEK 與 ERK1/2 的途徑達成功效。本實驗室選擇此 PCK3145 為依據，設計出一系列的短胜肽命名為 PJ 系列，並探討其結構與抗增殖活性之關係。設計之胜肽應用固相胜肽合成法 (SPPS) 來合成，再以逆相-高效能液相層析儀 (RP-HPLC) 進行純化並以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 來鑑定純化之胜肽。將目標胜肽進行生物活性測試 (MTT assay) 來評估對人類結腸癌細胞 (SW480 及 HT-29) 的抗增殖能力。根據實驗結果顯示，截短的 PCK3145 之衍生肽 PJ 系列對結腸癌細胞並沒有顯著的抑制效果，推測 PCK3145 原序列之結構在抗癌細胞增殖活性中可能有一定的影響。

關鍵字：細胞訊息傳遞路徑、PCK3145、人類結腸癌細胞、抗癌胜肽

Abstract

Cellular signaling pathways affect the physiological function of cells and enable them to respond to changes in the environment. According to the literature, prostate secretory protein 94 (PSP94) is one of the most important components in human semen and has been identified as an independent biomarker for the diagnosis and prognosis of prostate cancer and may be used as prostate tumor inhibitors and treatment drugs. Activation of the ERK pathway regulates many cellular activities, including cell proliferation and survival. Activated ERK phosphorylates many substrates, including other kinases and transcription factors, performing processes related to cell cycle differentiation, protein translation, and cell death avoidance. PCK3145, a peptide sequence derived from PSP94, has been shown to inhibit tumor growth in prostate, breast and colon cancers, possibly through phosphorylation of MEK and ERK 1/2. Based on PCK3145, we designed a series of peptides named PJ series, which were applied to study the structure-antiproliferative activity relationships. The peptide was synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS), purified by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and identified by Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). MTT assay was used to evaluate the anti-proliferation of human colon cancer cells (SW480 and HT-29), and the experimental data were analyzed. According to the experimental results, the PJ series did not significantly inhibit the proliferation of colon cancer cells, suggesting that PCK3145 original structural amino acid sequence plays an important role in the anti-proliferation of cancer cells.

Keywords : cellular signaling pathways, PCK3145, colon cancer cells, ACPs

名詞簡稱及縮寫對照表

ACN	Acetonitrile
AMPs	Antimicrobial peptides
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
DCM	Dichloromethane
DDW	Distilled-deionized water
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
DIEA	N,N-Diisopropylethamine
DMF	N,N-Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDT	1,2-Ethanedithiol
FBS	fetal bovine serum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time of flight
MS	Mass Spectrometry
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Ninhydrin	2,2-Dihydroxyindane-1,3-dione
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
t_R	Retention time
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography
SPPS	Solid phase peptide synthesis
TE	Trypsin-EDTA
TFA	Trifluoroacetic acid
UV	Ultraviolet

第一章、前言

醫藥的進步使人們免於眾多疾病的困擾，使人們的生活更加健康，生活品質提高，但目前仍然有許多無法根治的疾病，癌症便是其中之一。癌症是全球第二大死因，根據世界衛生組織（World Health Organization；WHO）統計，2016 年全球癌症死亡人數高達 900 多萬人，並造成全球經濟負擔加重。根據過去的文獻顯示，2010 年癌症的年度經濟總成本估計約為 1.16 兆，其相當於全球國內生產總值的 2% 以上，但這個數字僅僅只是「最簡估計值」，因為它不包括癌症照護的長期成本¹。這龐大的死亡率及經濟負擔使癌症成為眾人關注的議題，與其相關的研究也如雨後春筍般蓬勃發展。

為了配合科技部補助私立大學校院發展研發特色專案計畫—新穎的葡萄糖代謝機制在大腸癌上的治療策略及其各子計畫之研究目標，我們選擇 Ras 蛋白質訊息傳導路徑中較下游的細胞外信號調節蛋白激酶（extracellular signal-regulated kinase；簡稱 ERK）作為研究主題，探討有絲分裂活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases；簡稱 MAPK）細胞傳遞路徑對特定蛋白質的表現和癌細胞（SW480 和 HT29）增殖之影響（請參考科技部補助私立大學校院發展研發特色專案計畫—新穎的葡萄糖代謝機制在大腸癌上的治療策略計畫內之路徑圖）。MAPK 路徑涉及細胞增殖、細胞分化、癌症發生和細胞凋亡的過程²，本碩士論文衍生自

子計畫四，其研究目標為研發具抗癌功效的胜肽，並探討合成胜肽對傳導路徑之干擾、對特定蛋白質表現之影響或對葡萄糖代謝機制之影響。

過去的文獻指出，前列腺分泌蛋白 94 (PSP94) 是人類精液中最主要的成分之一，其已被確定可作為前列腺癌的獨立診斷與預後的生物標記物，並可能作為前列腺腫瘤的抑制劑與治療藥物。而 PCK3145 是一段擷取自 PSP94 蛋白的胜肽序列，已被證實可抑制前列腺癌、乳癌及結腸癌腫瘤的生長，並可能是透過磷酸化 MEK 與 ERK1/2 的途徑達成功效³。為配合計畫之目的，本實驗室選擇 PCK3145 為模板，設計出一系列的胜肽衍生物 PJ 系列，並探討其抗增殖活性之關係。

第二章、文獻探討

2-1 癌症介紹

腫瘤是指細胞異常病變，造成細胞週期凌亂，從而導致細胞不正常的增生、聚積，進而形成腫瘤。一般來說腫瘤可分為「良性腫瘤」與「惡性腫瘤」，兩者最常見的區別在於擴散性質。良性腫瘤的擴散較為侷限，而維持此性質之主要原因是腫瘤周邊常有莢膜區隔開腫瘤與正常組織，使其僅對外圍組織具壓迫性；惡性腫瘤則會產生侵襲及破壞現象，除了侵犯肌肉及骨骼外，也容易經由體液轉移至其它器官⁴。惡性腫瘤經切除後，仍有可能局部復發或轉移至遠端器官，最終導致死亡。

根據衛生福利部統計，106年10大死因中癌症位居榜首（死亡率為每十萬人口203.9人），其中大腸癌（colorectal cancer；CRC）更是蟬聯十大癌症死因前三名，且死亡率逐年增長⁵。現今因飲食西化，人們常食用低纖高脂的食品，再加上肥胖、生活作息不佳及年齡增長等後天因素，造成罹癌率增加，且年齡有逐漸年輕化的趨勢。而大腸直腸癌的生長速度緩慢，其症狀與腫瘤的生長狀況及位置有關，大部分是經由息肉演變而成，初期並無明顯症狀，因此經常導致延遲就醫時間，錯失最佳治療期。大腸直腸癌較晚期的症狀包括疲倦、厭食、體重減輕等，嚴重時將導致死亡。早、晚期的治療成效差異極大，早期發現可提升癒後及存活率，其病期可根據

美國癌症協會 (American Cancer Society ; ACS) 訂定之大腸癌分期系統 (Tumor-Node-Metastasis ; TNM) 來檢視 (表 1)。T 表示大腸腫瘤侵犯大腸壁的深度 (分為 T₀-T₄) ; N 表示有無淋巴結受侵犯 (分為 N₀-N₃) ; M 表示是否有遠端器官轉移 (分為 M₀-M₁)。

癌症臨床常用的治療為：(1) 外科手術切除、(2) 放射線治療、(3) 化學治療以及 (4) 標靶藥物治療，現今治療方法仍以手術切除為主，其他則為輔助治療。且放射線治療可能導致正常細胞中的 DNA 損傷或突變，導致細胞的繁殖速度可能變快⁶。而傳統的化學治療藥物因無法辨別癌細胞與正常細胞，常造成強烈副作用，如常用的藥物 5-FU，其主要副作用包括手足症候群、口腔黏膜炎、腹瀉、骨髓抑制、嘔吐等，其他常見的副作用則包括結膜炎、可逆性嗜睡、混亂、小腦運動失調症等⁷。

自 2000 年第一個標靶藥物 Imatinib 上市以來，標靶藥物治療已成為許多癌症治療的另一個重要選擇，開啟了癌症治療的契機和新紀元⁸。標靶藥物治療的機制為藥物只會針對癌細胞上或細胞內的某些特定物質進行反應，如與腫瘤生長相關受體、訊息傳遞路徑或血管新生因子等，以此來達到治療目的，其好處為對目標具高度選擇性，因此對正常細胞影響不大，副作用也較一般化學治療藥物小。有鑑於以上優點，開發天然且副作用低的標靶藥物成為研發抗癌藥物的重要議題。

2-2 細胞之訊息傳導

人體平均由 37.2 兆個細胞所構成⁹，細胞之間必須保持緊密聯繫，才能對各種反應做出應答，來維持正常的生理現象。其溝通方式主要是透過信號分子與專一性受體之結合，少數可利用直接接觸來進行訊息傳遞，例如：細胞表面抗原與淋巴球細胞膜抗體的結合及細胞間的連接等。細胞之間訊號傳導可分為三個階段：接收（Reception）、轉導（Transduction）和響應（Response）。第一階段為「接收」，細胞外信號分子與細胞表面或內部受體蛋白結合而檢測傳導信號；第二階段為「轉導」，信號分子與受體蛋白結合後，它以某種方式改變了受體蛋白，這種變化啟動了信號轉導的過程；第三階段為「響應」，轉導的信號最終觸發特定的細胞反應，如細胞增生、分化以及死亡等¹⁰。當與訊息傳遞路徑相關蛋白發生突變時，可能導致細胞癌化造成腫瘤生長，因此研究干擾細胞傳遞路徑之藥物成為一種抗癌策略。

以 Ras-Raf-MEK-ERK 信號傳遞路徑為例，其對正常細胞生長、增殖、分化、遷移和凋亡的調節具有重要作用。從過去的文獻可知，大約 30% 的癌症中存在 *ras* 基因突變，其中又以胰腺癌、結腸癌和肺癌的 *ras* 基因突變機率最高¹¹。Ras-ERK 途徑會被 Ras 本身或其下游標靶 Raf 中的突變所激活，而這些突變通過刺激與 Ras 結合的 GTP 水解造成 GAP（GTPase-activating protein）的失活，最後導致 GAP 喪失功能¹²。

Ras 突變後會間接造成細胞週期調節蛋白 CyclinD1-CDK4 或 CyclinD1-CDK6 兩種複合體的作用，並間接抑制 Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) 家族中 p27 的作用，導致 RB 蛋白磷酸化，最後促使細胞週期由 G1 時期進入至 S 時期而造成細胞不斷增生，若增殖的細胞已經癌化，便會開始一系列疾病進程，因此 *ras* 基因家族在許多癌症中扮演著相當重要的角色¹³。

2-3 抗癌胜肽之介紹

2-3-1 胜肽介紹

胜肽 (peptide) 為以肽鍵連結的胺基酸 (Amino Acid) 所構成的短鏈，通常小於 50 個胺基酸，且透過雙硫鍵來穩定結構¹⁴。胜肽是天然存在於生物體內的分子，其來源分別有：(1) 由動植物或人類產生的天然或生物活性肽 (衍生自天然存在的肽類激素或來自較大蛋白質的片段)，(2) 從基因或重組資料庫中分離的肽，(3) 從化學資料庫中發現的肽¹⁵。目前已經鑑定了超過 7000 種天然存在的胜肽，這些胜肽通常在人體生理學中扮演如激素、神經傳遞物質、生長因子、離子通道配體或抗感染劑等關鍵角色¹⁶⁻²⁰。因胜肽是有效且具選擇性的信號分子，其特殊的藥理特徵及內部性質，使之成為新型治療劑設計的模板¹⁷。胜肽的製備有很多種方法，而序列長度決定了其最適合的生產技術：化學合成、重組 DNA 技術、無

細胞表達系統、轉基因動物和植物或酶促合成。而通過使用非天然胺基酸和假肽鍵，化學合成提供了比通過重組技術產生的勝肽衍生物更廣泛的化學多樣性，具有多樣化的知識產權潛力（就可獲得專利的新化學實體而言）¹⁵。在化學合成裡，固相勝肽合成法（Solid-phase peptide synthesis；SPPS）是最為簡單、迅速且方便的，其發明與開發不僅促進了短勝肽的應用，更促進了各種勝肽和蛋白質化學之技術的發展²¹。勝肽的應用十分多元，例如將肽應用於藥物遞送以將藥物分子靶向特定類型的細胞（癌細胞、免疫細胞），進而降低藥物的副作用²²；基於肽設計的熒光化學傳感器，其具有良好的水溶性、生物相容性和低毒性，使其廣泛應用於環境監測、生物成像、醫學診斷和疾病治療²³。

2-3-2 抗癌勝肽

常見的癌症治療模式為化學治療，但化學藥物對正常細胞的不利影響，以及癌細胞多重抗藥性的頻繁發展而造成藥物無效²⁴，在如此的情況下，開發新藥治療與策略刻不容緩。於眾多新藥中抗癌勝肽（Anticancer peptides；ACPs）具有強大的潛力，許多 ACPs 表現出對癌症的選擇性毒性，因此可以避免一般化學治療的缺點²⁵。ACPs 有許多優點，例如：分子量小、高度特異性、低內在毒性、良好的生物相容性、序列多樣性及易於修飾等。

抗癌胜肽的作用機制可分為抑制腫瘤血管生成、誘導腫瘤細胞凋亡、誘導腫瘤壞死、免疫調節功能、抑制激酶/蛋白酶活性及干擾功能蛋白質。其中血管生成在腫瘤的生長、侵襲與轉移中扮演重要角色，它可以提供腫瘤所需營養與代謝其產生的廢物，許多胜肽主要通過中斷生長因子與其受體之間的相互作用來發揮有效的抗血管生成和抗腫瘤作用²⁶。而細胞凋亡則是細胞主動實施的一種程序性死亡，現今有越來越多的證據證明細胞凋亡可以在消除癌細胞方面發揮重要作用，而不會對正常細胞或周圍組織造成損害²⁷，因此靶向癌細胞的凋亡路徑亦是一個有效的抗癌策略。細胞壞死是被動性的細胞死亡，其不具有像造成細胞凋亡的複雜調節機制，壞死的主要特徵是染色質絮凝、腫脹，細胞質和粒線體基質變性，以及細胞膜泡狀囊（blebbing）的形成導致細胞內容物溢出到細胞外²⁸。²⁹，例如：陽離子抗癌肽可以快速結合至帶高度負電荷的癌細胞膜上，並造成孔洞使癌細胞壞死。另外有關於抑制激酶/蛋白酶活性，有些胜肽可以抑制參與腫瘤生長、侵襲及轉移相關的激酶或蛋白酶的活化，使其失活進而達到抗癌的功效³⁰。而有關於干擾具功能性的蛋白質相關辦法，是基於癌細胞內存在大量參與腫瘤生成的功能性蛋白質，若使用胜肽干擾這些蛋白質，造成癌細胞發展受阻，於此便可將之視為消除腫瘤的新型治療方法³⁰。

2-4 前列腺分泌蛋白 94 (PSP94) 及 PCK3145 介紹

前列腺分泌蛋白 94 (PSP94) 是前列腺分泌的三種主要蛋白質之一，其最初被發現是一種能夠降低循環的濾泡促進激素 (follicle-stimulating hormone; FSH) 水平的激素³¹。根據過去文獻指出，PSP94 已被確定可作為前列腺癌的獨立診斷與預後的生物標記物，並可能作為前列腺腫瘤的抑制劑與治療藥物³²。Shukeir 等人於 2004 年發表的文獻中研究構成 PSP94 全長的 12 種不同序列之胜肽片段，在體外鑑定抑制前列腺癌增長效果如 PSP94 之片段—胺基酸序列 31-45 (簡稱 PCK3145)，該片段於前列腺癌模型 (體內/外) 中具有最佳抗增殖與抗轉移的作用，且其在等莫耳濃度下與 PSP94 擁有相同功效³³。PCK3145 可通過干擾層粘連蛋白受體 (laminin receptor; LR) 信號傳導，來抑制具有識別細胞表面上 CD44 的基質金屬蛋白酶 9 (Matrix Metalloproteinase-9; MMP-9) 之分泌用以抗腫瘤轉移³⁴⁻³⁶。PCK3145 也可干擾內皮細胞中與血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 信號軸相關的酪氨酸激酶 (tyrosine kinase) 活性來抗血管生成³⁷。另外 PCK3145 通過調節 Lin28b/Let-7 信號傳遞路徑以抑制具耐藥性的卵巢癌細胞之腫瘤 (體內/外) 生長³⁸。它還可與化療中常用的藥物多西紫杉醇 (docetaxel) 或奧沙利鉑 (oxaliplatin) 具累加或協同作用，並且亦被證實可透過 LR 介導磷酸化 MEK 與 ERK1/2 的途徑，來抑制高 LR 表達的癌症——前列腺癌、乳癌及結腸癌腫瘤之生長³。

第三章、研究動機與目的

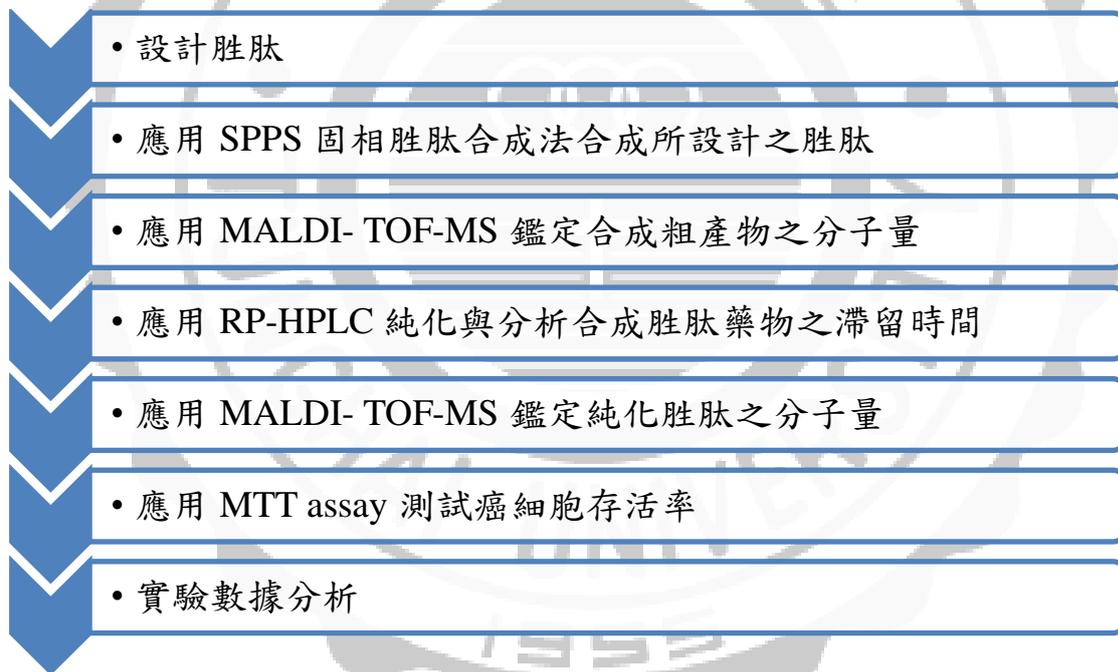
癌症發病人數高達數千萬，亦造成全球近千萬人的死亡，因此相關的議題仍是眾人注目。其中大腸癌更占臺灣癌症病發率、死亡率第三名⁵，其症狀主要是消化失調、食慾不振、噁心、嘔吐、腹痛、腹脹、貧血、身體不適.....等，然而傳統化療藥物對身體的負擔極大，常造成生活不便，因此開發副作用小的胜肽藥物為其中一個治療方向。

為配合「新穎的葡萄糖代謝機制在大腸癌上的治療策略及其各子計畫之研究目標」，本實驗室最終目的為開發一短且有效之抗癌胜肽。縮短胜肽長度可減少生產成本，且在利用 SPPS 合成胜肽的實驗中，每合上一個胺基酸，其產率可能會因反應問題而下降 5~10%，若將胜肽縮短可使產率相對較長的胜肽高，並可縮短製程。另外胜肽藥物的結構與性質常常影響其生物活性，例如：具破膜能力的 ACP_S，其靠著胺基酸的組成及親、疏水性的平衡，使其形成能與細胞膜作用的結構，造成細胞膜崩解來達到其效果。根據過去的文獻指出，PCK3145 是一段擷取自 PSP94 蛋白的胜肽序列，已被證實可抑制前列腺癌、乳癌及結腸癌腫瘤的生長，並可能是透過磷酸化 MEK 與 ERK1/2 的途徑達成功效。因此本實驗室選擇 PCK3145 為模板，設計出一系列的胜肽衍生物 PJ 系列，應用於探討其抗增殖活性之關係。

第四章、材料與方法

4-1 實驗設計與流程

本研究規劃的實驗流程如下：(1) 應用 SPPS 固相胜肽合成法合成所設計之胜肽，(2) 應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成胜肽之粗產物分子量，(3) 應用 RP-HPLC 純化與分析合成胜肽之滯留時間，(4) 應用 MALDI-TOF MS 鑑定純化胜肽之分子量，(5) 應用 MTT assay 評估合成的胜肽抑制癌細胞存活率之生物活性，(6) 實驗數據之分析。



4-2 固相胜肽合成法

4-2-1 固相胜肽合成法所需實驗材料及設備

有關於固相胜肽合成法 (SPPS) 所需之試劑、耗材及設備，相關資料整理於表 2。

4-2-2 固相胜肽合成法原理

本實驗室應用由 R. Bruce Merrifield 所發表之固相胜肽合成法 (SPPS)，其應用 AM resin 作為起始胺基酸的固相支撐物。因 AM resin 上有對鹼性環境下不穩定的 Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) -保護基 (Fmoc-protecting group)，故用 5 mL 鹼性的 30% piperidine 去除，使樹脂及胺基酸的 N 端裸露出 NH-，讓活化後胺基酸的 C 端可貼附於樹脂上。當第一個胺基酸成功貼附在樹脂上後，再用 piperidine 去除第一個胺基酸 N α 端上的 Fmoc-保護基，使用耦合試劑將第二個胺基酸接上，重複上述步驟，依序耦合上胺基。最後以化學試劑 TFA (Trifluoroacetic acid) 將胜肽從樹脂上裂解下來，並同時切除所有胺基酸側鏈上的保護基，再利用減壓過濾取得濾液，以氮氣吹除裂解液，再加入 5 mL 乙醚使胜肽沉澱，即可得到胜肽粗產物。合成之實驗流程圖如圖 1。

4-2-3 節三酮反應 (Ninhydrin test)

節三酮 (Ninhydrin) 會與一級胺基反應產生深藍色的產物，現已被廣泛應用在一級胺和二級胺的檢測上。在固相胜肽合成法中，主要用於檢測樹脂 (resin) 與胺基酸是否耦合 (coupling) 完全，進一步確認胜肽鏈中的胺基酸 N 端之 Fmoc-保護基是否被切除。本實驗中使用哌啶 (piperidine) 去保護基 (deprotecting) 作用後，經由 Ninhydrin 的呈色反應測試，若樹

脂為透明無色或為淡黃色，代表胺基酸 N 端的 Fmoc-保護基存在；若樹脂呈現深藍色，代表胺基酸 N 端的 Fmoc-保護基已被切除。但如果勝肽的 N 端為脯氨酸 (Proline) 則無法使用此法測試，由於其 N 端為二級胺，導致無法利用呈色反應來分辨結果。Ninhydrin test 實驗中所需之試劑、耗材及設備，相關資料整理於表 3。

4-3 應用逆相高效能液相層析儀 (RP-HPLC) 純化勝肽粗產物

4-3-1 RP-HPLC 所需實驗材料及儀器設備

Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) 所需耗材、試劑和儀器設備分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 4。

4-3-2 應用 RP-HPLC 純化合成勝肽粗產物

將合成的勝肽應用 RP-HPLC 分離及純化。此層析法的原理是藉由移動相 (mobile phase) 通過固定相 (stationary phase) 以物理方法達到分離的效果，當勝肽混合物樣品稀釋溶液通過分離管柱時，利用不同勝肽的成分在非極性固定相管柱滯留時間的差異 (親合力作用不同)，達到分離純化的目的。本實驗室選用孔徑為 0.22 μ m 過濾膜 (filter) 過濾樣品並使用孔徑 10 μ m 之 C18 層析管柱以制定最適當之離析率，其偵測 UV 波長為 225 nm，固定流速為 4 mL / min。RP-HPLC 移動相溶劑組成為：

solvent A : 4 L D.D.water + 0.05 % trifluoroacetic acid (TFA)

solvent B : 4 L Acetonitrile + 0.05 % trifluoroacetic acid (TFA)

4-4 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS)

4-4-1 MALDI-TOF MS 所需實驗材料及儀器設備

Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) 所使用之試劑和儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 5。

4-4-2 應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成胜肽粗產物

將合成的胜肽應用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜技術鑑定。其原理為利用雷射照射分析物與基質形成之共結晶，使基質會吸收雷射光的能量，並將其傳遞給分析物，而使分析物能在極短時間內昇華至氣態而脫附，且在脫附過程中會進行電荷轉移及離子-分子反應，分析物分子因而游離化且帶電荷，此帶電離子在進入飛行管前會有一電壓使所有離子集中在同一起始位置後，再經由電場加速獲得動能後送入飛行管內；在飛行管內，不同的分析物離子因質荷比不同而有相異的速度，並藉由其達到偵測器的時間長短求得質荷比 (m/z) 與其所對應的強度 (intensity) 之質譜圖形。

4-4-3 基質功能及種類

基質的功能主要為吸收雷射能量，若沒有加入基質而直接將雷射打入分析物，極有可能因為強大能量將分析物打成碎片，圖譜會因此而受到干擾。因此需要基質輔助分析物脫附及游離，其可以增強雷射能量的傳遞，使分析物脫附成氣體分子，並且可以提供質子使分析物游離成正離子。基質的分子特性必須要可以防止分析物聚集，且形成良好的共結晶，更重要的是其分子量必須遠小於分析物，避免干擾到分析物訊號。根據分析物的分子量大小所選用的基質也會不同，一般蛋白質（胜肽）常用的基質成列於表 6。本實驗中選用 DHB（2,5-Dihydroxybenzoic acid）作為應用 MALDI-TOF MS 時使用的基質。

4-5 細胞實驗

4-5-1 細胞培養之試劑與藥品

細胞相關實驗所需之藥品與試劑，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 7。

4-5-2 細胞培養液配製

細胞培養液配製之實驗步驟：

1. 將 RPMI-1640 粉末溶於 900mL 已滅菌之去離子水中，混合均勻。

2. 加入 2 公克的 NaHCO_3 ，並加入 50 ml HEPES，再用 HCl 調整 pH 值至 7.1~7.2。
3. 以孔徑 $0.22 \mu\text{m}$ 的濾杯進行過濾，再加入 5mL L-glutamine、NEAA 以及抗生素 (penicillin-streptomycin)，最後再添加 100 mL 胎牛血清 (fetal bovine serum ; FBS)。
4. 吸取 1mL 進行培養液測試兩天。儲存於 4°C 冰箱備用。

4-5-3 細胞冷凍保存

細胞冷凍之原則為緩慢冷凍，需維持在大約為 80~90% 之緻密度，其細胞濃度為 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ cells/mL，為使之生長良好並處於高存活率狀態，選用試劑等級之無菌且無色的冷凍保護劑二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide ; DMSO)。

實驗步驟為：

1. 進行冷凍保存前日需更換培養液，並觀察細胞生長狀況。
2. 先將 DMSO 與新鮮的培養液預混合，DMSO 最後濃度應占總溶液 10%，均勻混合後置於室溫下待用。
3. 取適量懸浮液以計數細胞濃度，將其以高速離心機 (設定 1500 r.p.m、5 分鐘) 離心，除去上清液後，加入適量冷凍保存溶液 (10% DMSO)，

使細胞濃度為 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ cells/mL，將其混合均勻後，分裝於已標示完全之冷凍保存管中（1 mL/vial）。

4. 將冷凍保存管放入細胞程序降溫盒中置於 -20°C 冰箱半小時後，轉置於 -80°C 冰箱，待 24 小時之後置入液態氮筒中長期儲存。

4-5-4 大腸結腸癌細胞株存活率測定原理及步驟

經過 MALDI-TOF MS 鑑定並確認後之純化後的胜肽以不同濃度應用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 測試法評估胜肽抑制癌細胞增生之功效。MTT assay 為一般常使用的檢測細胞存活之實驗方法，其原理（如圖 2）為活細胞中的粒線體內的琥珀酸脫氫酶，能將 MTT 還原為不溶性的藍紫色甲瓚結晶（formazan）並沉積在細胞中，再以二甲基亞砷（DMSO）溶解細胞中的甲瓚結晶，應用 ELISA reader 測定甲瓚結晶溶解液之吸光值，觀察 OD570 下吸光值的變化，其顏色深淺與存活率成正比關係。

實驗步驟為：

1. 培養細胞於培養盤中，當細胞生長到培養盤的八分滿時，抽去培養液，以 PBS (Phosphate buffered saline) 清洗 2 次。
2. 再加入 2 mL 的 TE (trypsin-EDTA) 緩衝液，放進恆溫箱 (incubator) 中培養 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)。

3. 用 5 mL 的培養液清洗細胞培養盤將細胞洗至溶液中，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。
4. 最後取其沉澱物，加入 10 mL 培養液，將細胞懸浮液混合均勻。
5. 從中取細胞懸浮液 10 μL 計數細胞濃度，稀釋細胞懸浮液，使細胞濃度為 1×10^5 cells/mL 混合均勻。
6. 接著取稀釋後的稀釋細胞懸浮液 300 μL 至 24 孔盤中培養至隔天。
7. 隔天等細胞貼附後，加入合成胜肽藥物，培養 24 小時。
8. 待 24 小時後，再加入 MTT 試劑培養 1 小時後細胞會有紫色結晶產生，再加入 DMSO 溶掉結晶，應用 ELISA reader 測定甲瓚結晶溶解液之吸光值，經數據分析後評估合成胜肽對大腸癌細胞的抑制效果。

第五章、結果與討論

5-1 胜肽之設計

本實驗目的為探討 PCK3145 胜肽之結構對其生物活性是否具影響力，因而利用 PCK3145 胜肽之胺基酸序列作為模板，且又根據文獻指出，一般分子量大於 1k Da 的蛋白質都有激發免疫反應的能力，分子量愈大的蛋白質它的抗原性 (antigenicity) 愈強³⁹，故選擇將胜肽分子量定在小於 1000 Da，來設計一系列胜肽將其截短，原預計截短為 5 個胺基酸為一片段，但因 5 個胺基酸序列之結構不穩定，因此設計為每 7 個胺基酸為一片段，將截短設計之片段命名為 PJ 系列胜肽，其胺基酸序列整理於表 8。

5-2 胜肽的製備、純化及質量鑑定結果

本實驗室利用 SPPS 合成做為正調控之 PCK3145 胜肽，為提高產率較高，在裂解前先進行試切，並將試切之產物應用 MALDI-TOF MS 進行分子量鑑定。本實驗參考文獻調配合適之裂解試劑，選用切液條件為 90%TFA、5%thioanisole、3% EDT、2% anisole，並將反應時間分別訂為 2、3、4、8 小時，結果圖參照附錄。PCK3145 之目標分子量為 1825.91 Da，在此條件下，反應時間 2、3、8 小時之圖譜皆無發現目標產物，推測其仍有側鏈保護基殘留；4 小時之圖譜，有疑似目標產物之分子量，但

因分子量與目標不相符，雜訊眾多且可看到多了很多被切斷之胜肽片段，因此此裂解試劑並不是最佳配方。而在切液條件為 87.5% TFA、2.5% EDT、5% phenol、5% thioanisole 下，並將反應時間分別訂為 2、3、4 小時（結果圖參照附錄）。PCK3145 之目標分子量為 1825.91 Da，在此條件下，3、4 小時之圖譜皆無發現目標產物，推測其仍有側鏈保護基殘留；2 小時之圖譜中發現疑似目標產物但強度不高，其訊號埋沒在雜訊中，因此該配方也非最佳配方。因無法找出最合適之裂解配方，故其後續實驗仍有待探討。

依照固相胜肽合成法合成胜肽，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，整理如表 9。

將 PJ-1 粗產物注入 RP-HPLC 進行純化分析，結果如圖 3，其滯留時間為 9.06min，並將此時間所收集之產物應用 MALDI-TOF MS 進行鑑定，PJ-1 的理論分子量為 894.91 Da，實驗所測得之分子量為 895.1 Da(圖 4)。

PJ-2 粗產物之 RP-HPLC 層析圖譜結果如圖 5，其滯留時間為 3.98 min，並將此時間所收集之產物應用 MALDI-TOF MS 進行鑑定，PJ-2 的理論分子量為 809.8 Da，實驗所測得之分子量為 812.4 Da (圖 6)。

PJ-3 粗產物之 RP-HPLC 層析圖，結果如圖 7，其滯留時間為 3.76 min，並將此時間所收集之產物應用 MALDI-TOF MS 進行鑑定，PJ-3 的理論

分子量為 782.4 Da，實驗所測得之分子量為 784.82 Da (圖 8)。

PJ-4 粗產物之 RP-HPLC 層析圖結果如圖 9，其滯留時間為 9.03 min，並將此時間所收集之產物應用 MALDI-TOF MS 進行鑑定，PJ-4 的理論分子量為 819.4 Da，實驗所測得之分子量為 821.96 Da (圖 10)。

PJ-5 粗產物之 RP-HPLC 層析圖結果如圖 11，其滯留時間為 8.13 min，並將此時間所收集之產物應用 MALDI-TOF MS 進行鑑定，PJ-5 的理論分子量為 819.8 Da，實驗所測得之分子量為 819.9 Da (圖 12)。

*所有樣品之處理方法皆如第一條 (PJ-1) 所示。

5-3 合成胜肽之生物活性測試

本實驗應用 MTT 測試法評估合成胜肽抑制大腸癌細胞增生的功效。將合成的系列胜肽 (PJ-1、PJ-2、PJ-3、PJ-4 及 PJ-5) 稀釋成不同濃度 (0、2.5、5、10、15 及 20 μM) 分別處理 SW480 及 HT-29 結腸癌細胞，其測試結果如圖 13、14。

根據 MTT 的實驗結果顯示，在 SW480 中，胜肽藥物 PJ-4 在 2.5 μM 下約有 15% 抑制效果 (PJ-4 $p=0.00112$, p 值 <0.05)，而 PJ-1、PJ-2、PJ-3 及 PJ-5 無明顯抑制作用；在 HT-29 結腸癌細胞中，胜肽藥物 PJ-5 在 20 μM 下約有 10% 抑制效果 (PJ-5 $p=0.00718$, p 值 <0.05)，而 PJ-1、PJ-2、PJ-3 及 PJ-4 無明顯抑制作用。

5-4 實驗結果分析

本實驗以 MTT assay 評估 PJ 系列合成胜肽對 SW480 結腸癌細胞與 HT-29 結腸癌細胞是否具抑制癌細胞增殖的功效。實驗結果顯示在 SW480 中，PJ 系列內僅有 PJ-4 在 2.5 μM 下約有 15% 些微抑制效果，而其他皆無明顯的抗癌增殖功效，而根據文獻搜尋中得知 PCK3145 並沒有做過抑制 SW480 增殖之實驗，因此無法得知其是否對 SW480 具抗增殖之功效，因此無法將 PCK3145 全長與截短之序列進行比較，來得知其結構與序列對抗癌增殖生物活性是否具有影響。

而在 HT-29 中，實驗數據顯示 PJ 系列中僅有 PJ-5 在 20 μM 下約有 10% 抑制效果，顯示 PJ 系列胜肽對大腸直腸癌細胞 HT-29 皆無明顯抗增殖之效果。文獻指出，原 PCK3145 全長胜肽可在 5 μM 下對 HT-29 具約 IC₅₀ 之抗癌細胞增殖之效果，而截短的 PJ 系列在相同的濃度下無法達成此效果，即使增加濃度至 20 μM 也僅有 PJ-5 具些微功效。以此結果推測其無明顯效果可能之原因如下：

1. PCK3145 胜肽的胺基酸序列被截短後，其無法調節相關的訊息傳遞路徑，造成其不能抑制癌細胞增生。
2. PCK3145 胜肽因序列截短導致具有功效的二級結構改變，無法進入細胞內，使其不能干擾癌細胞增生，而無法發揮其原有的抗癌功效。

PJ 系列分別截短自 PCK3145 序列，但 MTT assay 結果顯示他們並無對癌細胞具抗增殖功效，表明其可能喪失調節訊號傳導的功能，無法如 PCK3145 一樣透過 LR 介導磷酸化 MEK 與 ERK1/2 的途徑，來抑制結腸癌腫瘤之生長。

根據 I-TASSER 服務器 40,41 模擬之 PCK3145 全長之結構(圖 15)，其結構為 random coil。而根據 pepcalc.com 模擬，PCK3145 推估為親水性胜肽，且在 pH 7 時的淨電荷為 -4，表示此胜肽應該無法透過靜電作用力靠近帶高度帶負電的癌細胞膜與之作用。又因其推估為親水性胜肽，其無法與細胞的磷脂膜有疏水性作用，但在先前的文獻指出 PCK3145 卻可以在 30 秒內與 HT1080 細胞表面結合，其中的反應仍無明確的解釋，此部分仍有待研究。

第六章、未來展望

本實驗探討截短後的 PCK3145 是否還可以對結腸癌細胞（HT-29、SW480）具抑制增殖效果。實驗結果顯示，截短後的 PCK3145 之衍生胜肽 PJ 系列經過 MTT assay 測試其抗癌細胞增生之生物活性後，其中只有些微的抑制效果。將實驗數據進行分析後，推測可能之原因：PCK3145 胜肽的胺基酸序列被截短後，其無法調節相關的訊息傳遞路徑，造成其不能抑制癌細胞增生或是 PCK3145 胜肽因序列截短導致具有功效的二級結構改變無法進入細胞內，使其不能干擾癌細胞增生，而無法發揮其原有的抗癌功效。

後續實驗分為兩部分，第一部分為持續進行 PCK3145 裂解條件之最佳化，並進行後續相關實驗，第二部分則可將 PJ 系列及原長 PCK3145 應用 CD 圓二色光譜儀分析其結構，並分析比較結構間差異。並可將 PJ 系列接上螢光異硫氰酸鹽（Fluorescein isothiocyanate；FITC），利用共軛焦顯微鏡觀察其是否會進入癌細胞內，若不能進入，則可連接一條穿膜胜肽，研究其進入癌細胞內是否會造成相關影響或是將 PJ 系列應用酵素結合免疫吸附分析法（Enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA）來研究其是否能與 Laminin receptor 結合，研究其相關機制；若能進入，則可應用 Western Blot 來研究其是否能造成 ERK 磷酸化或是將 PJ 系列作為穿膜胜肽進行後續相關研究。

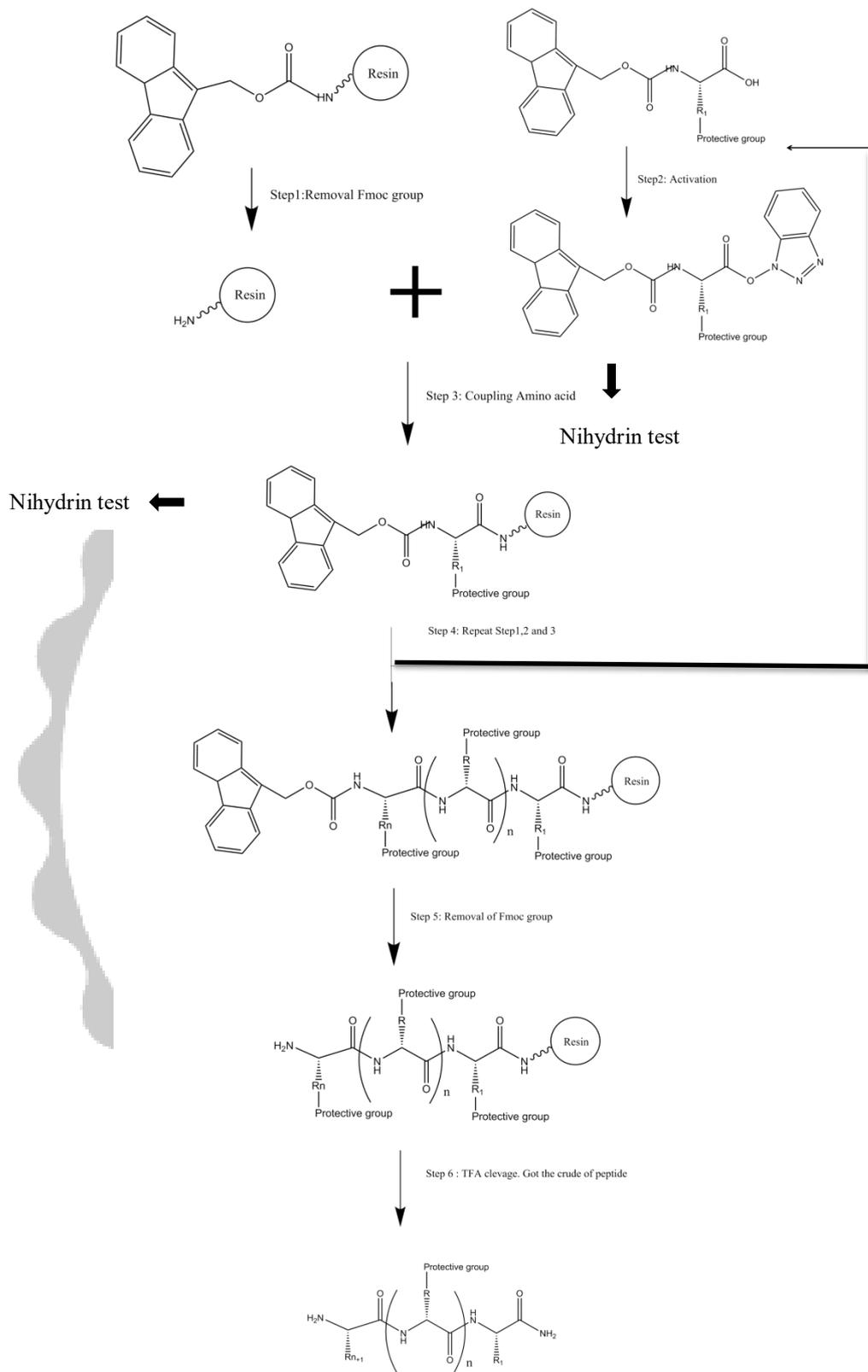


圖 1：固相胜肽合成法之流程圖。

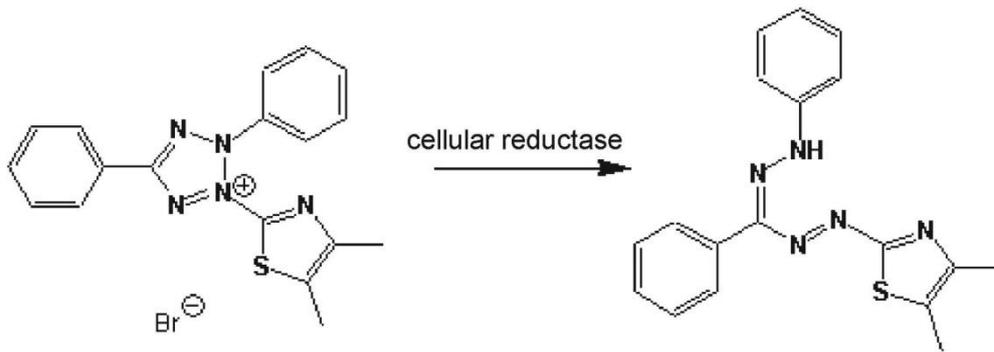


圖 2：線粒體還原酶 (mitochondrial reductase) 將 MTT 還原成紫色不溶性沉淀物 formazan。



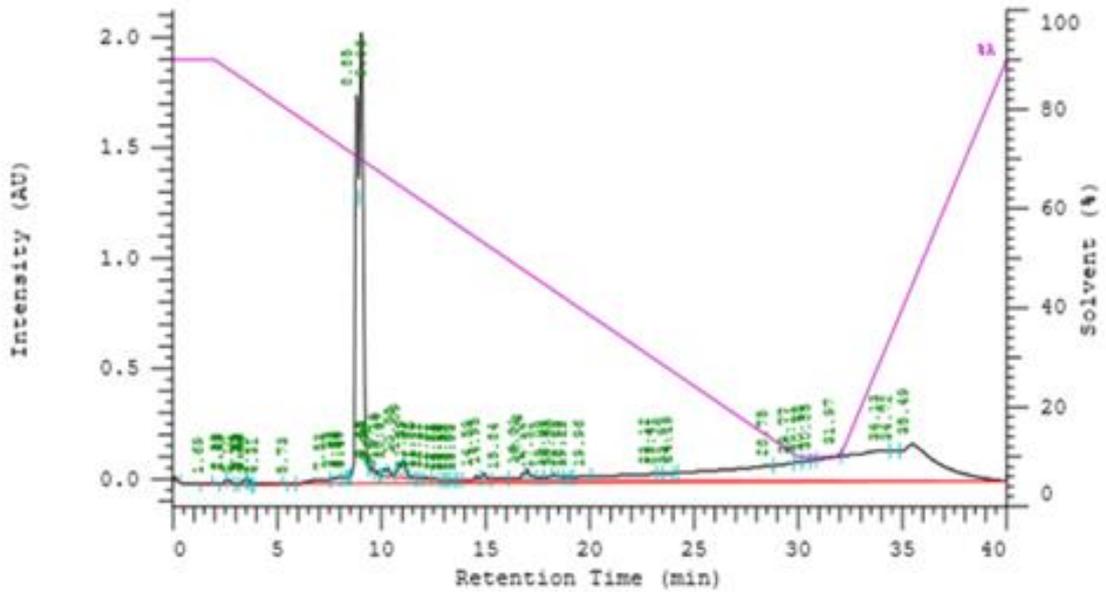


圖 3：應用 RP-HPLC 分析 PJ-1 純產物之層析圖。

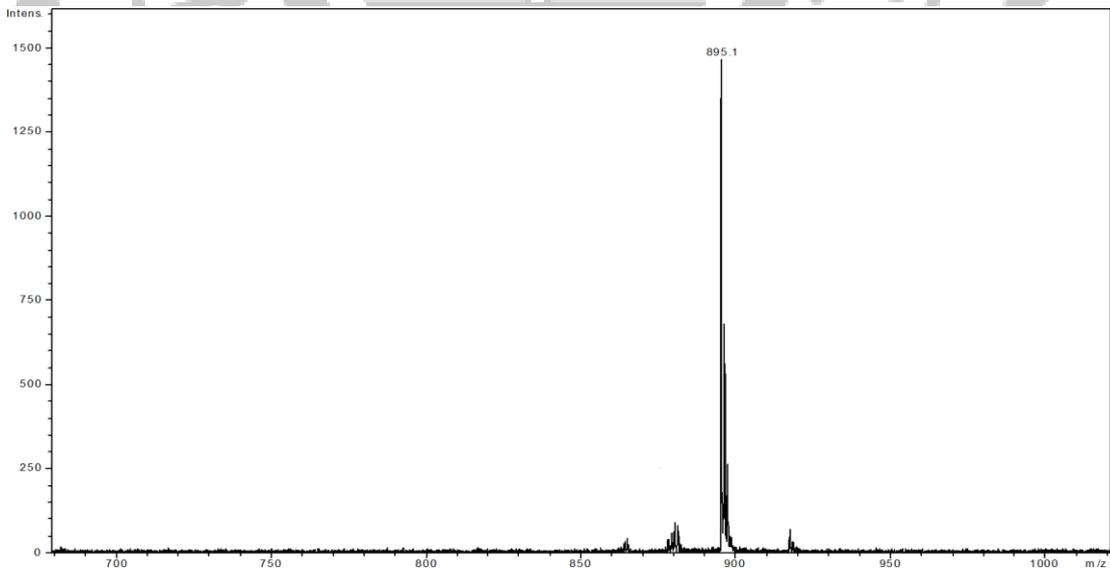


圖 4、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-1。

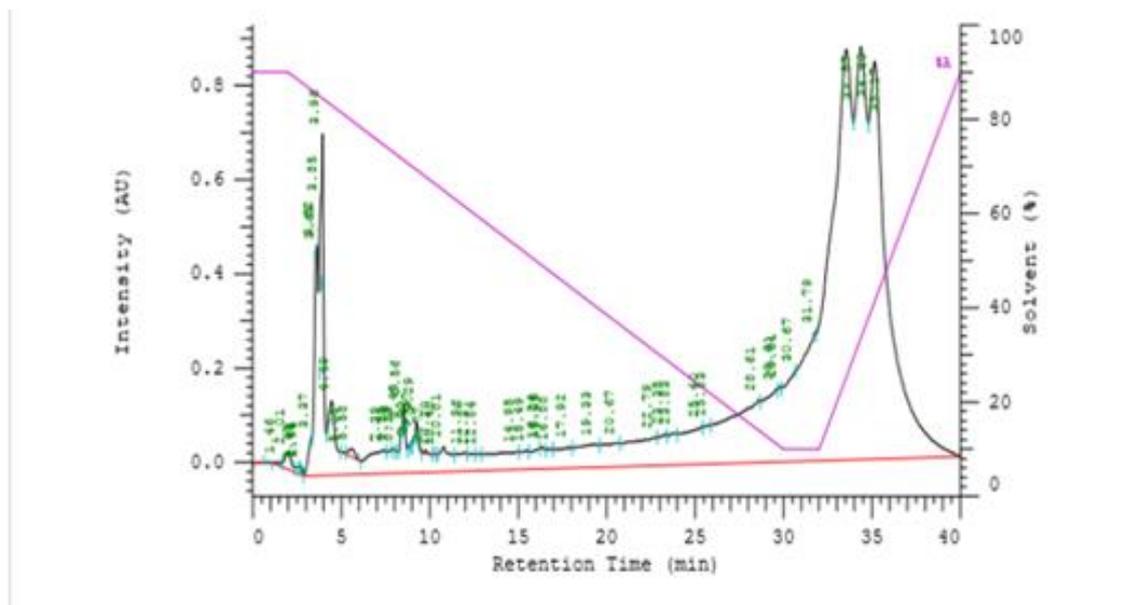


圖 5：應用 RP-HPLC 分析 PJ-2 純產物之層析圖。

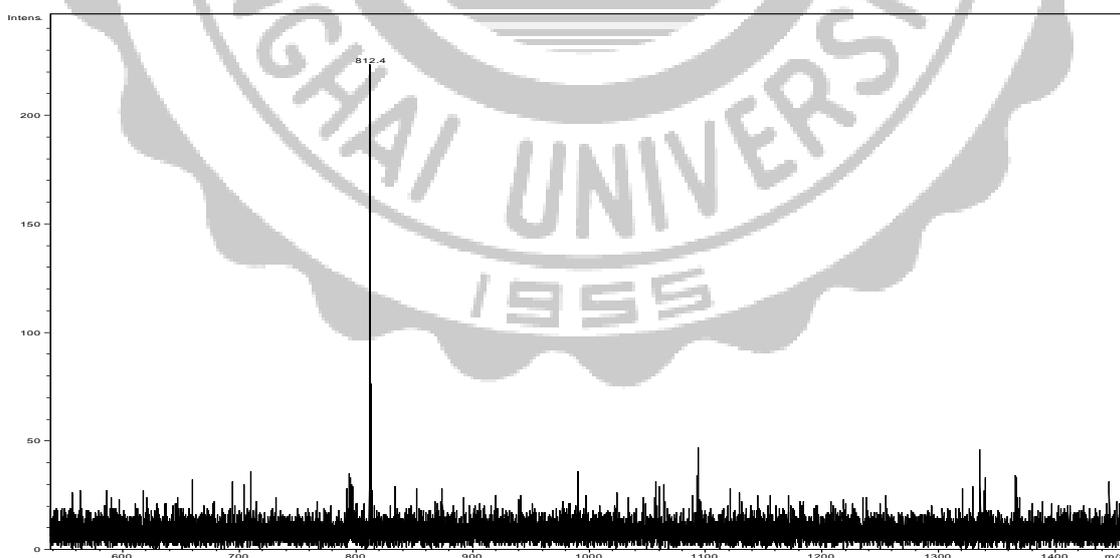


圖 6：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-2。

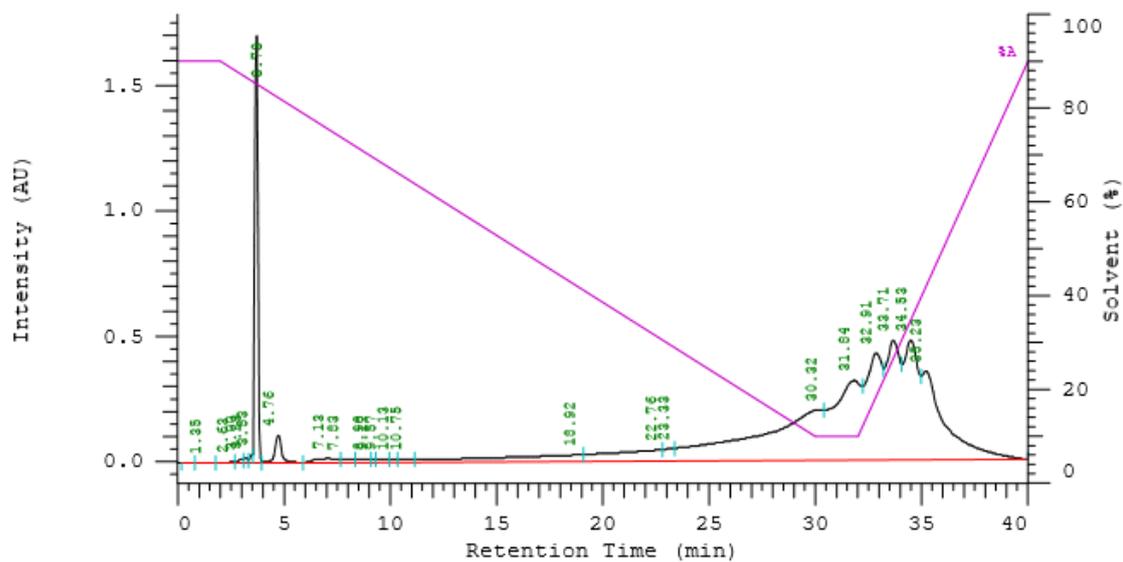


圖 7：應用 RP-HPLC 分析 PJ-3 純產物之層析圖。

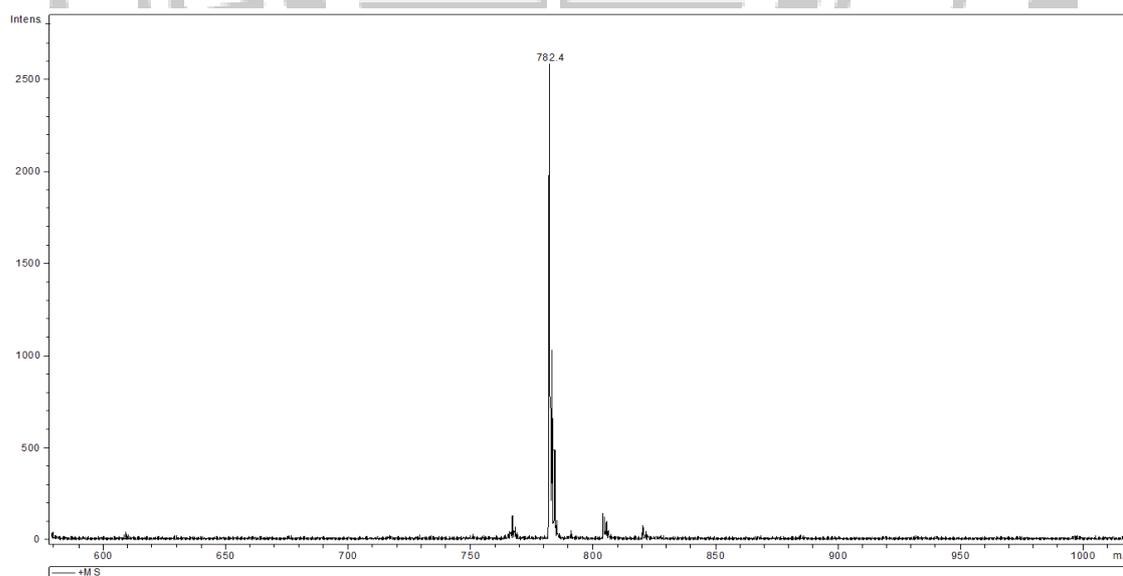


圖 8：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-3。

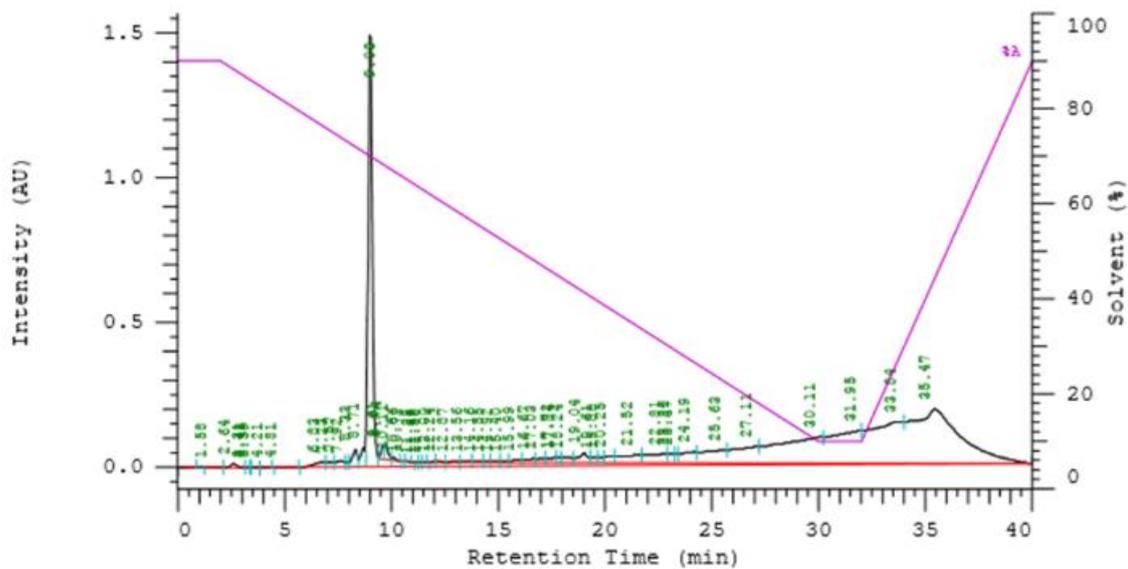


圖 9：應用 RP-HPLC 分析 PJ-4 純產物之層析圖。

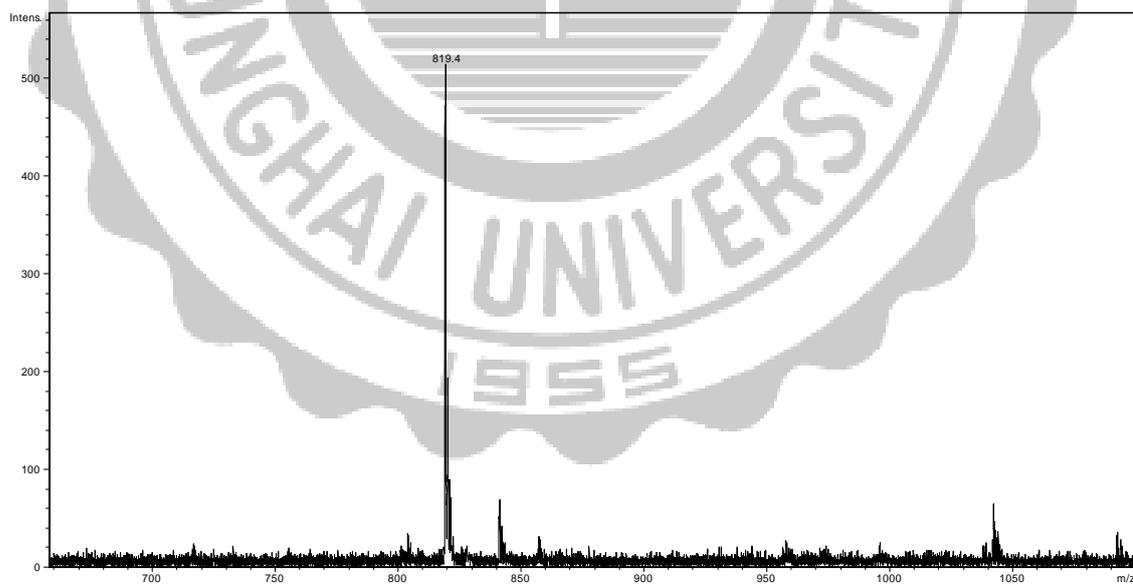


圖 10：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-4。

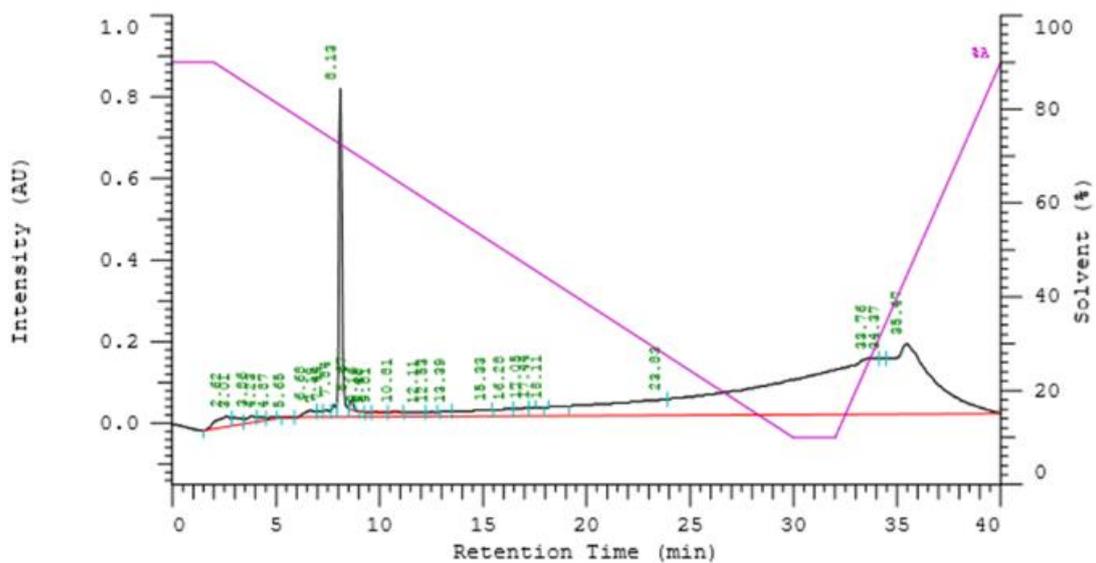


圖 11：應用 RP-HPLC 分析 PJ-5 純產物之層析圖。

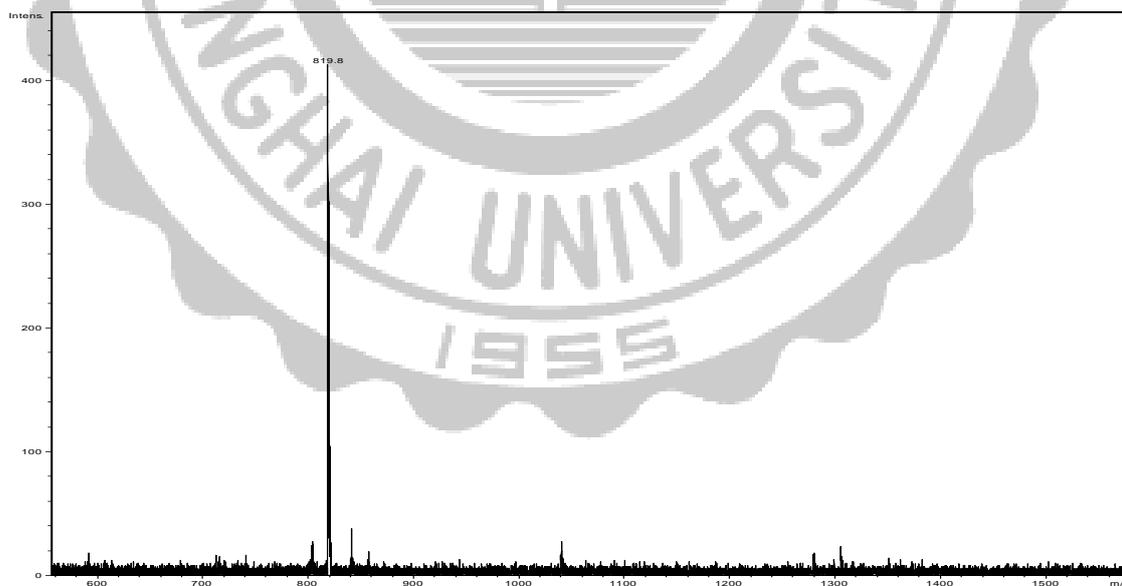


圖 12：應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 PJ-5。

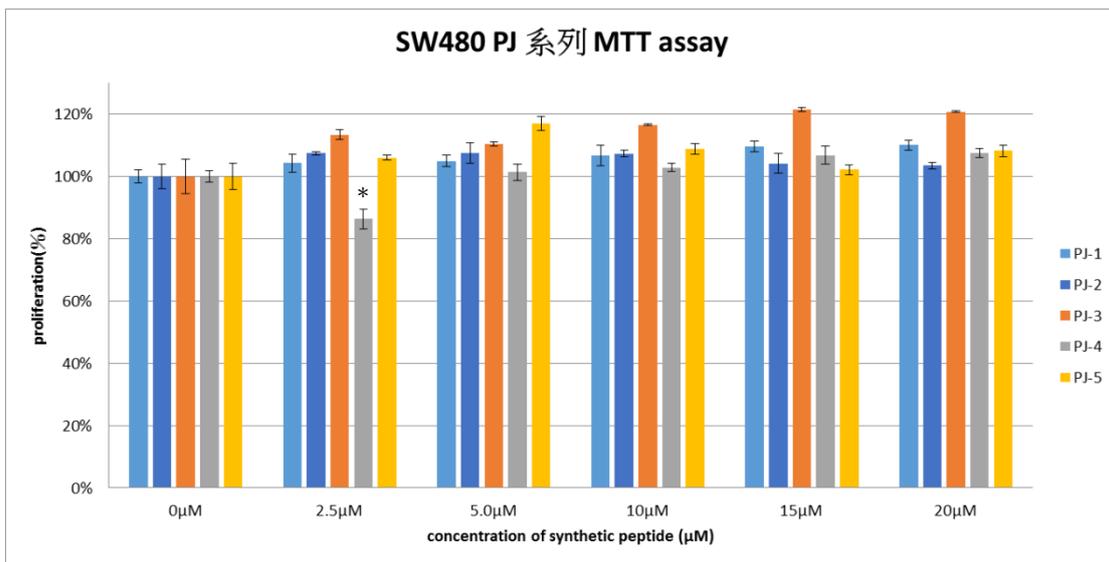


圖 13：合成胜肽不同濃度下對 SW480 結腸癌細胞的抑制效果。* $p < 0.05$ 。

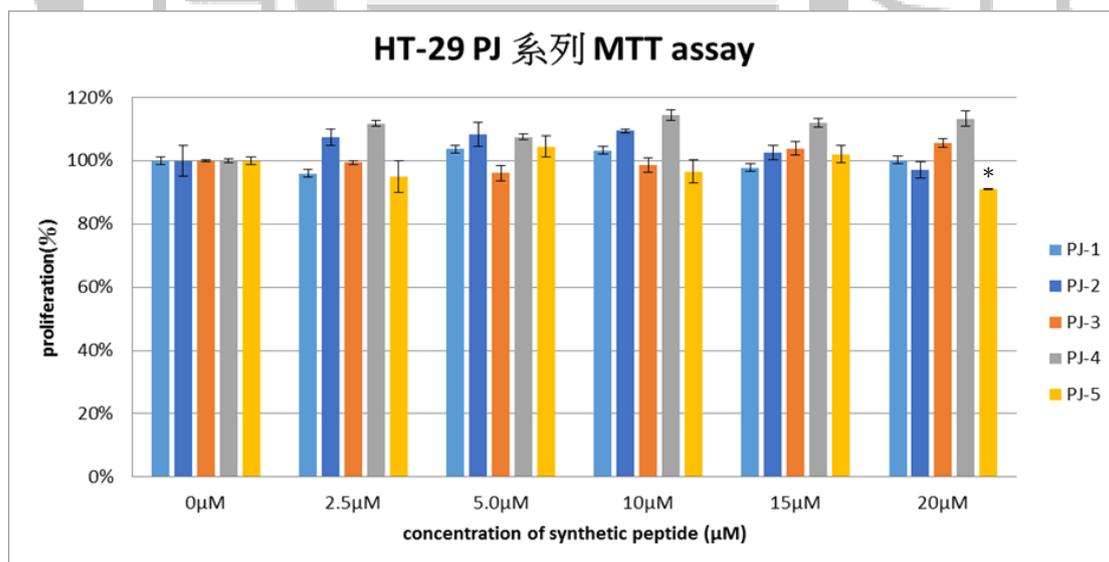


圖 14：將合成胜肽不同濃度下對 HT29 結腸癌細胞的抑制效果。* $p < 0.05$ 。

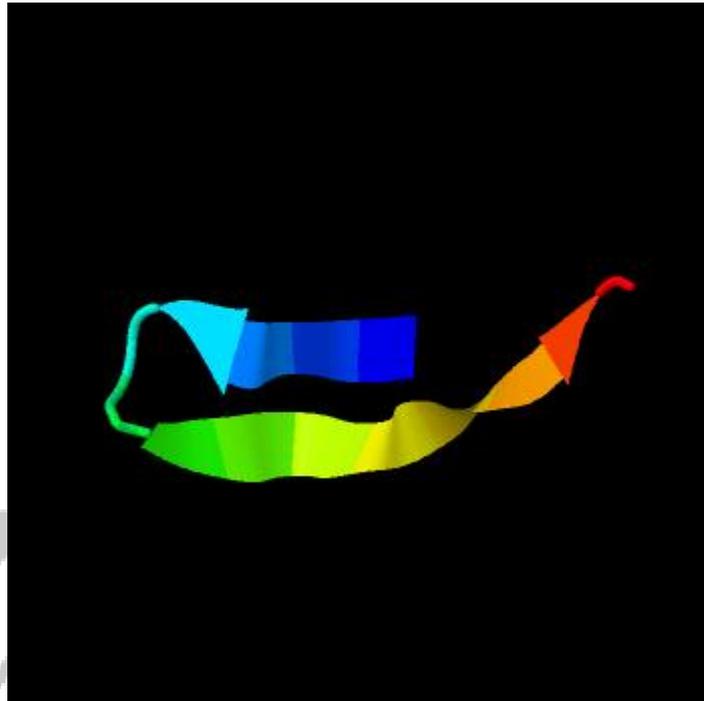


圖 15：PCK3145 結構模擬。



表 1：大腸癌之 TNM 分期介紹。

大腸癌		腫瘤大小(T)	淋巴轉移(N)	遠端器官轉移(M)
0 期	又稱為原位癌，指病變局限在上皮細胞層或只侵犯到腸道黏膜的表面。	Tis(原位腫瘤只在黏膜層上)	N ₀ (沒有侵犯到淋巴結)	M ₀ (沒有遠端器官的轉移)
I 期	惡性腫瘤侵犯到腸壁內。	T ₁ (腫瘤侵犯到黏膜下層)、T ₂ (腫瘤侵犯到肌肉層)	N ₀ (沒有侵犯到淋巴結)	M ₀ (沒有遠端器官的轉移)
II 期	惡性腫瘤已經侵犯到腸壁表面。	T ₃ (腫瘤穿透肌肉層，進入大腸外面的漿膜層)、T ₄ (腫瘤侵犯到相鄰腹膜或其他器官)	N ₀ (沒有侵犯到淋巴結)	M ₀ (沒有遠端器官的轉移)
III 期	不論病變侵犯的程度，只要有 1 至 3 個局部淋巴結轉移即屬於 III A 期；而有四個以上局部淋巴結轉移的則屬於 III B 期。	T ₁ (腫瘤侵犯到黏膜下層) 或 T ₂ (腫瘤侵犯到肌肉層) 或 T ₃ (腫瘤穿透肌肉層，進入大腸外面的漿膜層) 或 T ₄ (腫瘤侵犯到相鄰腹膜或其他器官)	N ₁ (侵犯到 1~3 個局部淋巴結) 或 N ₂ (侵犯 4 個以上的局部淋巴結) 或 N ₃ (有遠端的淋巴結受侵犯)	M ₀ (沒有遠端器官的轉移)
IV 期	癌細胞已侵犯到身體其他器官，如肺、肝或骨頭。	T ₁ (腫瘤侵犯到黏膜下層) 或 T ₂ (腫瘤侵犯到肌肉層) 或 T ₃ (腫瘤穿透肌肉層，進入大腸外面的漿膜層) 或 T ₄ (腫瘤侵犯到相鄰腹膜或其他器官)	N ₁ (侵犯到 1~3 個局部淋巴結) 或 N ₂ (侵犯 4 個以上的局部淋巴結) 或 N ₃ (有遠端的淋巴結受侵犯)	M ₁ (有遠端器官的轉移)

表 2：SPPS 所需之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。

實驗試劑、耗材及儀器設備	製造廠商
Column PD-10, Empty	GE Healthcare, 美國
Rink Amide AM resin (200-400 mesh)	Merck, 德國
N α -Fmoc-D-Amino Acids	AnaSpec, 美國
HBTU, anhydrous	AgeneMax, 台灣
HOBt, anhydrous	AgeneMax, 台灣
N-Ethyldiisopropylamine	Alfa Aesar, 美國
Dichloromethane	Macron Fine Chemicals, 美國
N,N-Dimethylformamide	DUKSAN, 南韓
Piperidine	Merck, 德國
Trifluoroacetic acid	Merck, 德國
Ethoxyethane	Sigma, 美國
氮氣	東洋氣體有限公司, 台灣
Parafilm M	Bemis, 美國
4°C 雙門冰箱：A750R	富康, 台灣
-20 °C 直立式冷凍冰櫃（有霜式）： FFFU21M1QW	FRIGIDAIRE, 美國
低溫臥式冷凍櫃 VT-208MT	Nihon Freezer, 日本
抽氣馬達	GAST mech
桌上型冷凍乾燥機 FD3-12P-80	金鳴實業有限公司, 台灣
真空萃取裝置 (SPE Vacuum manifold)	宏濬儀器 (台北市, 台灣)
自動旋轉器 (Model. SD-50)	Young chenn

表 3：Ninhydrin test 所需試劑、耗材。

材料、試劑	購買廠商
Ninhydrin	Alfa Aesar
Pyridine	Riedel-de Haen
KCN	科成化學 臺偉實業有限公司
n-butanol	J.T. Baker
Phenol	SHOWA, JAPAN

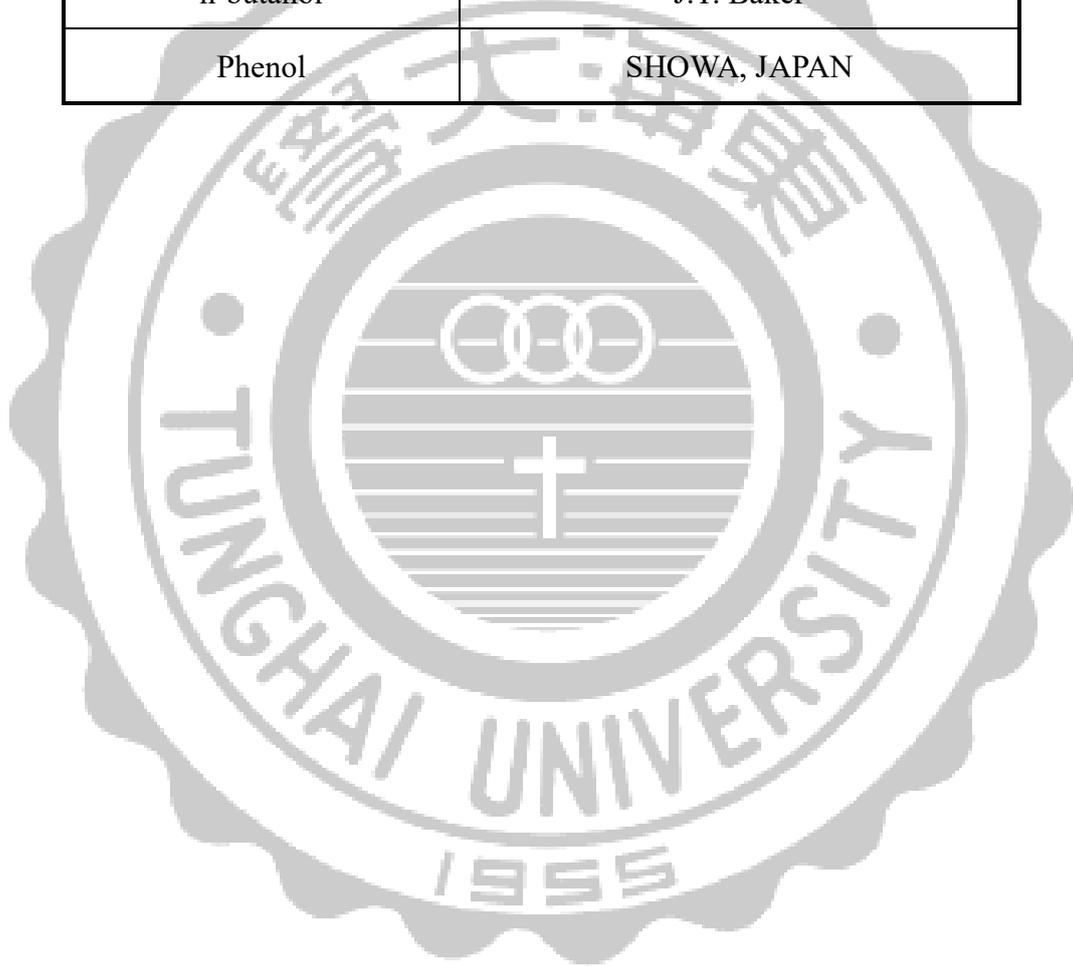


表 4：RP-HPLC 所需之耗材及試劑、儀器設備及其製造廠商。

實驗試劑、耗材及儀器設備	製造廠商
逆向高效能液相層析儀 Pump L-2130	株式会社日立製作所，日本
逆向高效能液相層析儀 UV Detector L-2130	株式会社日立製作所，日本
Ascentis™ C18 HPLC Column (25 cm × 10 mm, 5 μm)	Supelco，美國
Microliter Syringes	Hamilton，美國
Smart Synergy-Type I 超純水系統	MERCK，德國
Durapore™ Membrane Filter (0.22 μm GV)	Millipore，美國
Acetonitrile	J.T. Baker，美國
Trifluoroacetic acid	Merck，德國
TERUMO™ SYRINGE with NEEDLE (1 cc)	Terumo，日本
PureTech™ Syringe Filter (0.22 μm)	致寬科技股份有限公司，台灣

表 5：MALDI-TOF MS 所使用之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。

實驗試劑、儀器設備	製造廠商
基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀 microflex	Bruker，德國
2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)	Merck，德國
Acetonitrile (ACN)	J.T. Baker，美國
Trifluoroacetic acid (TFA)	Merck，德國

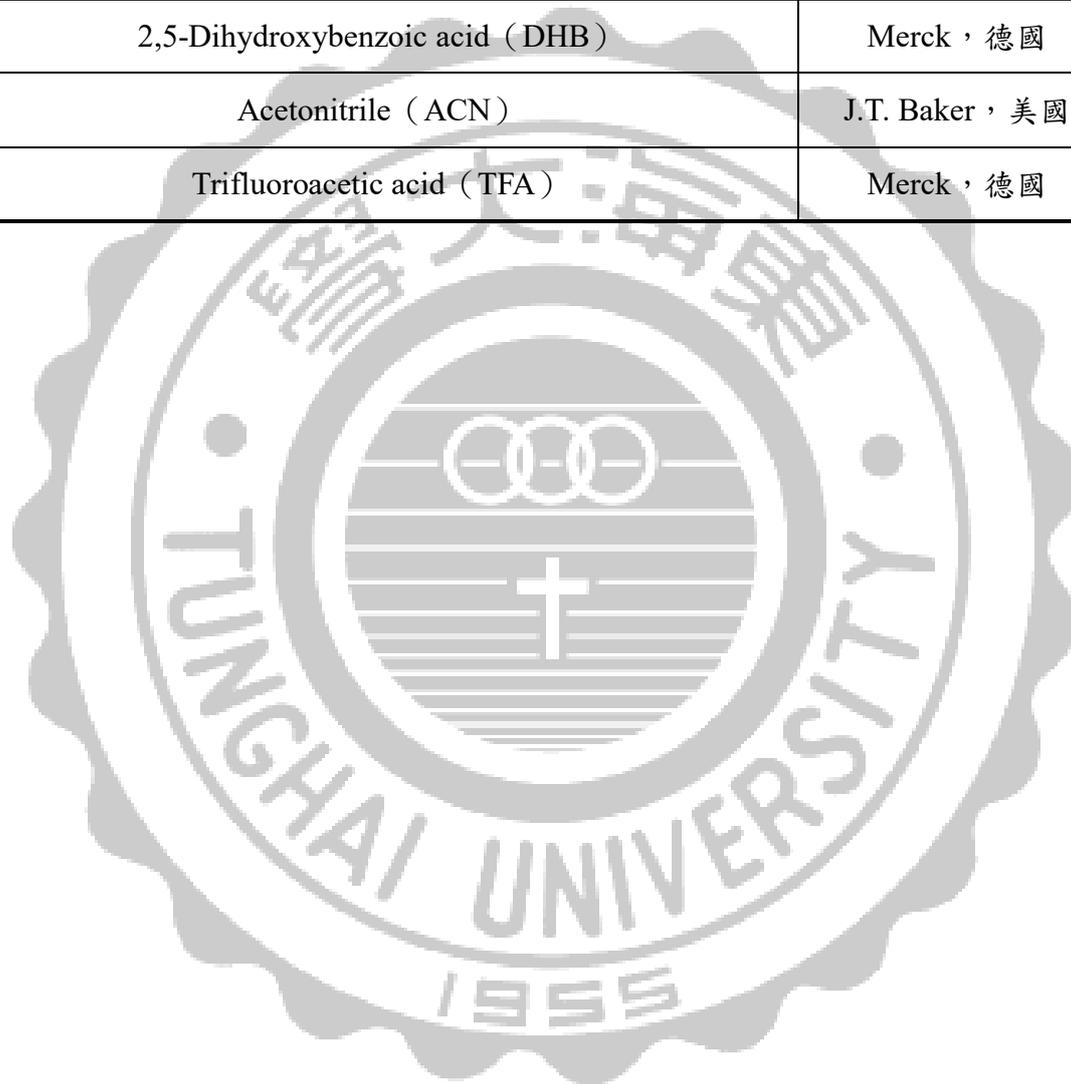


表 6：常用 MALDI 基質之結構。

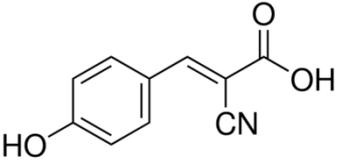
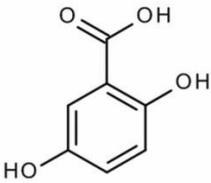
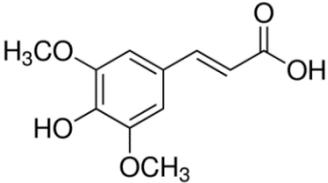
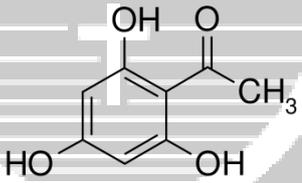
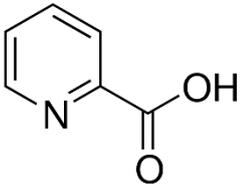
基質名稱	基質化學結構	主要適用之分析物
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)		分子量 < 10k Da 之胜肽、 蛋白質
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)		胜肽、蛋白質、 碳水化合物
3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (SA)		分子量 > 10k Da 之多肽、 蛋白質
2,4,6-Trihydroxyacetophenone (2,4,6-THAP)		胜肽、核苷酸
Pyridine-2-carboxylic acid (2-Picolinic acid)		胜肽、蛋白質、 核糖核酸

表 7：細胞培養相關實驗使用之藥品與試劑。

材料	購買廠商
RPMI-1640	GIBCO
NEAA	Thermo Fisher
trypsin-EDTA, TE	
Penicillin-Streptomycin	CORNING
fetal bovine serum (FBS)	
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	
L-Glutamin	Merck
KH_2PO_4	
KCl	
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
NaCl	Sigma
NaHCO_3	
Trypan blue	
trypsin-EDTA, TE	Thermo Fisher
Ethanol	台糖

表 8：PJ 系列胜肽的胺基酸序列。

Name	Amino acid sequence
PCK3145	EWQTDNCETCTCYET-NH ₂
PJ-1	EWQTDNC-NH ₂
PJ-2	QTDNCET-NH ₂
PJ-3	DNCETCT-NH ₂
PJ-4	CETCTCY-NH ₂
PJ-5	TCTCYET-NH ₂

表 9：本實驗之胜肽之純化與鑑定。

胜肽名	理論分子量	實際分子量	滯留時間
PJ-1	894.91 Da	895.1 Da	9.06 min
PJ-2	809.8 Da	812.4 Da	3.98 min
PJ-3	782.4 Da	784.82 Da	3.76 min
PJ-4	819.4 Da	821.96 Da	9.03 min
PJ-5	819.8 Da	819.9 Da	8.13 min

參考文獻

1. Stewart, B. W.; Wild, C. P., World Cancer Report 2014. *World Cancer Report* **2014**.
2. Tokmakov, A. A.; Sato, K.-I.; Konaka, K.; Fukami, Y., Inhibition of MAPK Pathway by a Synthetic Peptide. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **1998**, *252*, 214-219.
3. Kostopoulos, A.; Papageorgiou, E.; Koutsilieris, M.; Sivolapenko, G., PCK3145 Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Breast and Colon Cancer Cells. *Anticancer Res* **2015**, *35* (3), 1377-1384.
4. 林哲斌主任, 良性腫瘤與惡性腫瘤要如何鑑別. 台灣癌症防治網.
5. 衛生福利部統計處, 106 年死因統計結果分析. **2018**.
6. Hubenak, J. R.; Zhang, Q.; Branch, C. D.; Kronowitz, S. J., Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg* **2014**, *133* (1), 49e-56e.
7. 林鵬展醫師, 陳., 大腸直腸癌 (Colorectal Cancer). 台灣癌症基金會.
8. 張肇松副院長, 談癌症標靶治療. 義大醫療醫訊 癌治療新境界特刊
9. Bianconi, E.; Piovesan, A.; Facchin, F.; Beraudi, A.; Casadei, R.; Frabetti, F.; Vitale, L.; Pelleri, M. C.; Tassani, S.; Piva, F.; Perez-Amodio, S.; Strippoli, P.; Canaider, S., An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* **2013**, *40* (6), 463-71.
10. Campbell, N. A.; Reece, J. B., *Biology*. 7th ed.; Pearson, Benjamin Cummings: San Francisco, 2005; p xl, 1231 p.
11. Dunn, K. L.; Espino, P. S.; Drobnic, B.; He, S.; Davie, J. R., The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* **2005**, *83* (1), 1-14.
12. Sever, R.; Brugge, J. S., Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2015**, *5* (4).
13. Pylayeva-Gupta, Y.; Grabocka, E.; Bar-Sagi, D., RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11* (11), 761-74.
14. Hayashi, M. A.; Ducancel, F.; Konno, K., Natural Peptides with Potential Applications in Drug Development, Diagnosis, and/or Biotechnology. *Int J Pept* **2012**, *2012*, 757838.
15. Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatsky, M., Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* **2010**, *15* (1-2), 40-56.
16. Buchwald, H.; Dorman, R. B.; Rasmus, N. F.; Michalek, V. N.; Landvik, N. M.;

Ikramuddin, S., Effects on GLP-1, PYY, and leptin by direct stimulation of terminal ileum and cecum in humans: implications for ileal transposition. *Surg Obes Relat Dis* **2014**, *10* (5), 780-6.

17. Fosgerau, K.; Hoffmann, T., Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today* **2015**, *20* (1), 122-8.

18. Giordano, C.; Marchio, M.; Timofeeva, E.; Biagini, G., Neuroactive peptides as putative mediators of antiepileptic ketogenic diets. *Front Neurol* **2014**, *5*, 63.

19. Padhi, A.; Sengupta, M.; Sengupta, S.; Roehm, K. H.; Sonawane, A., Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: current status and future prospects. *Tuberculosis (Edinb)* **2014**, *94* (4), 363-73.

20. Robinson, S. D.; Safavi-Hemami, H.; McIntosh, L. D.; Purcell, A. W.; Norton, R. S.; Papenfuss, A. T., Diversity of conotoxin gene superfamilies in the venomous snail, *Conus victoriae*. *PLoS One* **2014**, *9* (2), e87648.

21. Erak, M.; Bellmann-Sickert, K.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G., Peptide chemistry toolbox - Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg Med Chem* **2018**, *26* (10), 2759-2765.

22. Ulapane, K. R.; Kopec, B. M.; Moral, M. E. G.; Siahaan, T. J., Peptides and Drug Delivery. *Adv Exp Med Biol* **2017**, *1030*, 167-184.

23. Lili Zhang, J. C., Kai Chen, Yi Liu, Yushu Ge, Jiang Wu and Dan Liu, A selective and sensitive peptide-based fluorescent chemical DSH sensor for detection of zinc ions and application in vitro and in vivo. *New Journal of Chemistry* **2019**, (7).

24. Sato, A. K.; Viswanathan, M.; Kent, R. B.; Wood, C. R., Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr Opin Biotechnol* **2006**, *17* (6), 638-42.

25. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G., Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13* (10), 714-26.

26. Thundimadathil, J., Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids* **2012**, *2012*, 967347.

27. Felicio, M. R.; Silva, O. N.; Goncalves, S.; Santos, N. C.; Franco, O. L., Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem* **2017**, *5*.

28. Fang, X. Y.; Chen, W.; Fan, J. T.; Song, R.; Wang, L.; Gu, Y. H.; Zeng, G. Z.; Shen, Y.; Wu, X. F.; Tan, N. H.; Xu, Q.; Sun, Y., Plant cyclopeptide RA-V kills human breast cancer cells by inducing mitochondria-mediated apoptosis through blocking PDK1-AKT interaction. *Toxicol Appl Pharm* **2013**, *267* (1), 95-103.

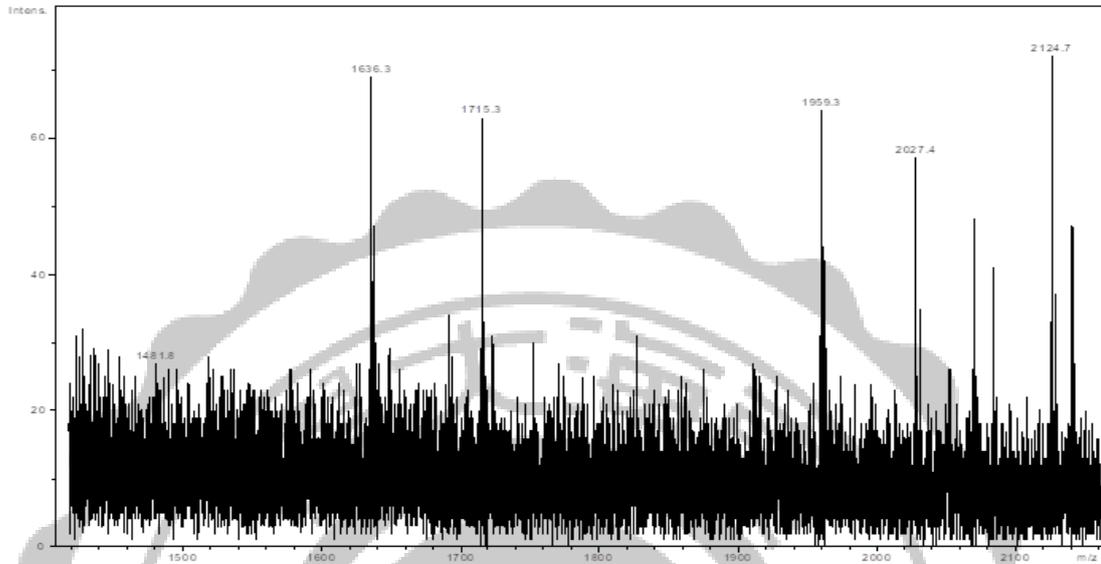
29. Padanilam, B. J., Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **2003**, *284* (4), F608-27.
30. Jain, M. V.; Paczulla, A. M.; Klonisch, T.; Dimgba, F. N.; Rao, S. B.; Roberg, K.; Schweizer, F.; Lengerke, C.; Davoodpour, P.; Palicharla, V. R.; Maddika, S.; Los, M., Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* **2013**, *17* (1), 12-29.
31. Mundle, S. D.; Sheth, N. A., In vivo suppression of pituitary and circulatory follicle stimulating hormone by human seminal plasma inhibin. *Indian J Exp Biol* **1991**, *29* (4), 310-4.
32. Garde, S. V.; Basrur, V. S.; Li, L.; Finkelman, M. A.; Krishan, A.; Wellham, L.; Ben-Josef, E.; Haddad, M.; Taylor, J. D.; Porter, A. T.; Tang, D. G., Prostate secretory protein (PSP94) suppresses the growth of androgen-independent prostate cancer cell line (PC3) and xenografts by inducing apoptosis. *Prostate* **1999**, *38* (2), 118-25.
33. Shukeir, N.; Arakelian, A.; Chen, G. P.; Garde, S.; Ruiz, M.; Panchal, C.; Rabbani, S. A., A synthetic 15-mer peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res* **2004**, *64* (15), 5370-5377.
34. Annabi, B.; Bouzegrane, M.; Currie, J. C.; Dulude, H.; Daigneault, L.; Garde, S.; Rabbani, S. A.; Panchal, C.; Wu, J. J.; Beliveau, R., Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling. *Anti-Cancer Drug* **2006**, *17* (4), 429-438.
35. Annabi, B.; Bouzegrane, M.; Currie, J. C.; Hawkins, R.; Dulude, H.; Daigneault, L.; Ruiz, M.; Wisniewski, J.; Garde, S.; Rabbani, S. A.; Panchal, C.; Wu, J. Z. J.; Beliveau, R., A PSP94-derived peptide PCK3145 inhibits MMP-9 secretion and triggers CD44 cell surface shedding: Implication in tumor metastasis. *Clin Exp Metastas* **2005**, *22* (5), 429-439.
36. Annabi, B.; Currie, J. C.; Bouzegrane, M.; Dulude, H.; Daigneault, L.; Garde, S.; Rabbani, S. A.; Panchal, C.; Wu, J. Z. J.; Beliveau, R., Contribution of the 37-kDa laminin receptor precursor in the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 cell surface binding. *Biochem Bioph Res Co* **2006**, *346* (1), 358-366.
37. Lamy, S.; Ruiz, M. T.; Wisniewski, J.; Garde, S.; Rabbani, S. A.; Panchal, C.; Wu, J. J.; Annabi, B., A prostate secretory protein94-derived synthetic peptide PCK3145 inhibits VEGF signalling in endothelial cells: implication in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **2006**, *118* (9), 2350-8.

38. Yan, B. X.; Ma, J. X.; Zhang, J.; Guo, Y.; Riedel, H.; Mueller, M. D.; Remick, S. C.; Yu, J. J., PSP94 contributes to chemoresistance and its peptide derivative PCK3145 represses tumor growth in ovarian cancer. *Oncogene* **2014**, *33* (45), 5288-5294.
39. 動物基因轉殖與疫苗發展技術教學資源中心, 疫苗發展技術與實驗. **2013**.
40. Yang, J.; Zhang, Y., I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43* (W1), W174-81.
41. Zhang, C.; Freddolino, P. L.; Zhang, Y., COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45* (W1), W291-W299.

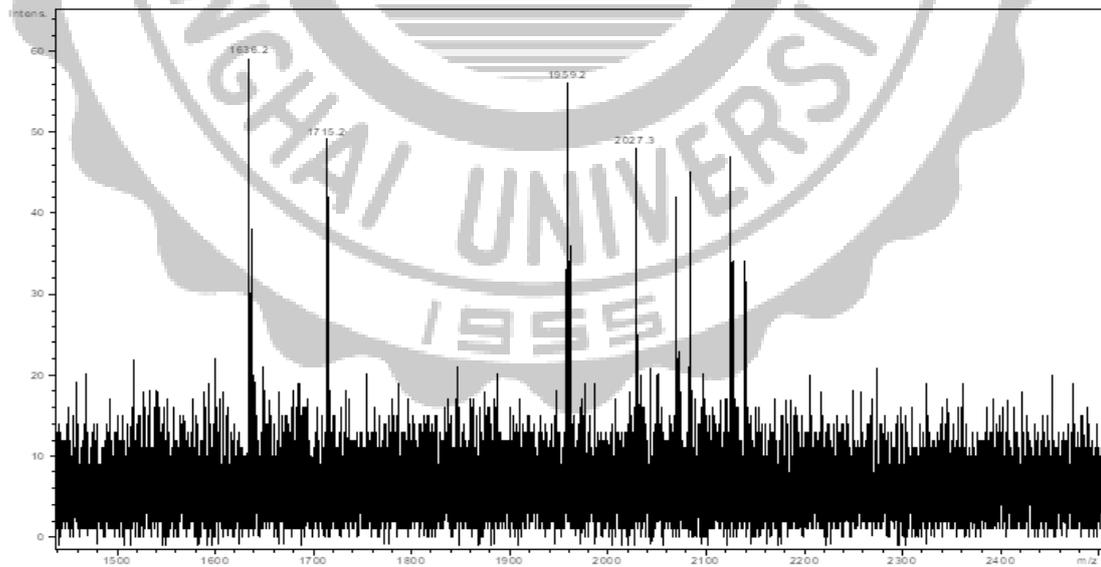


附錄

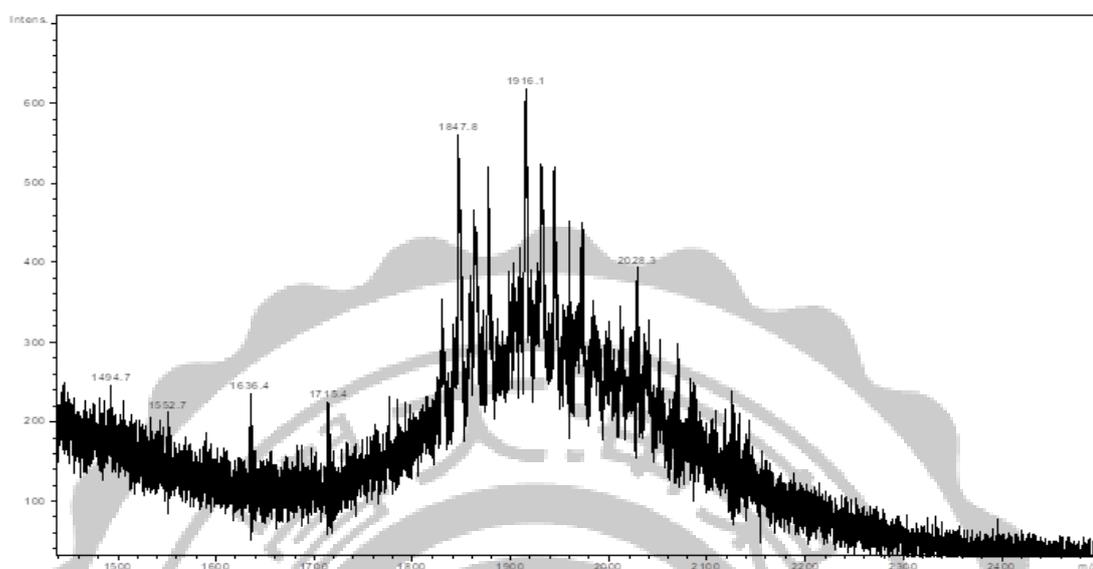
(A)



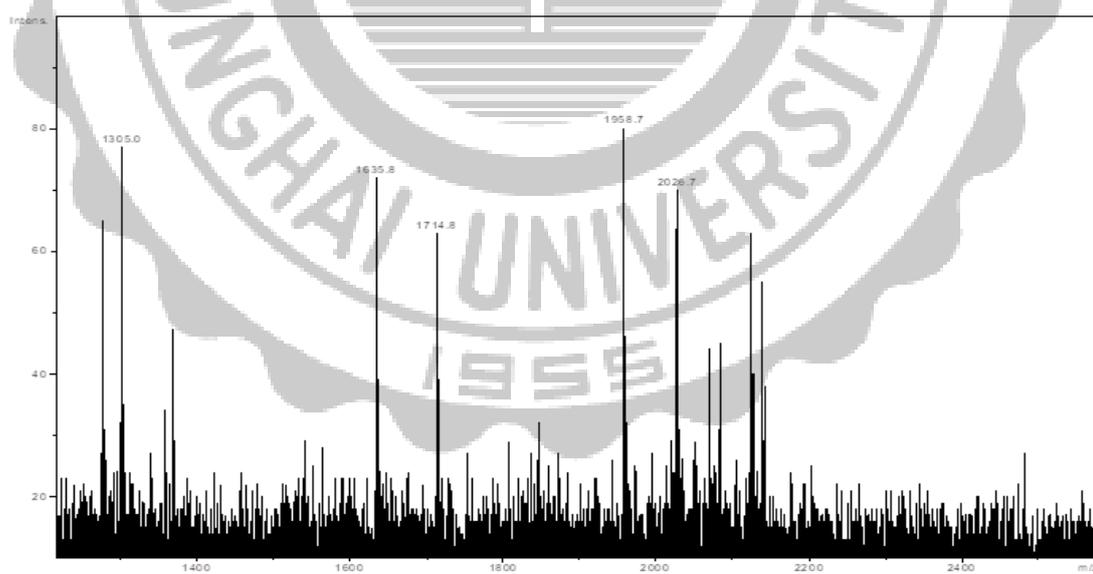
(B)



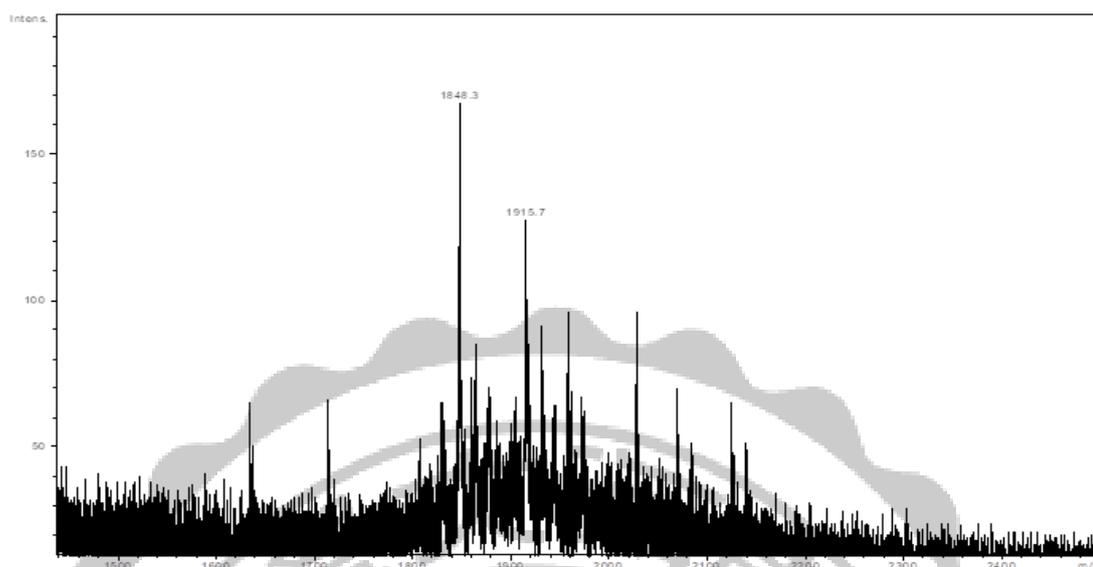
(C)



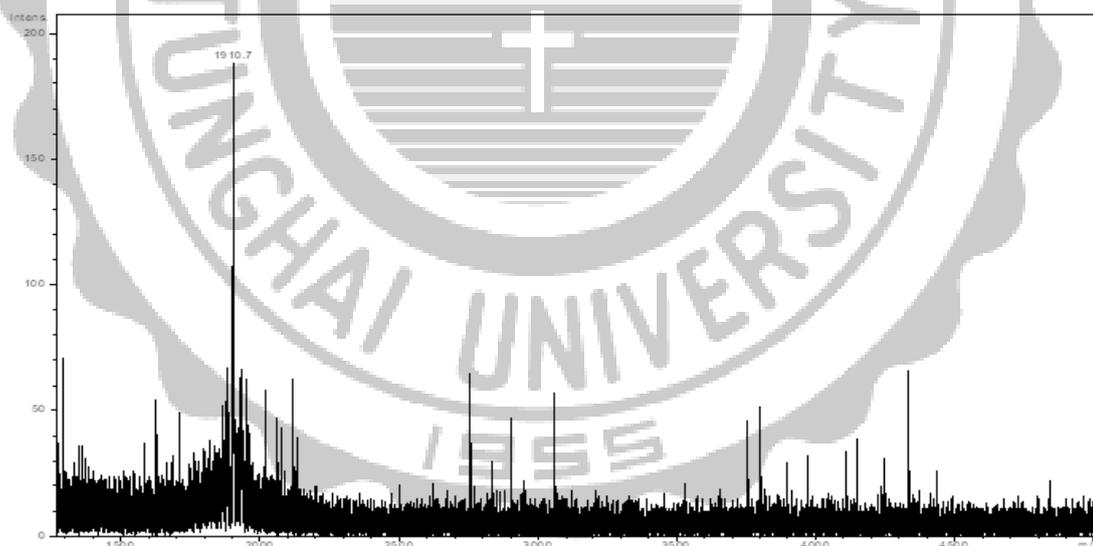
(D)



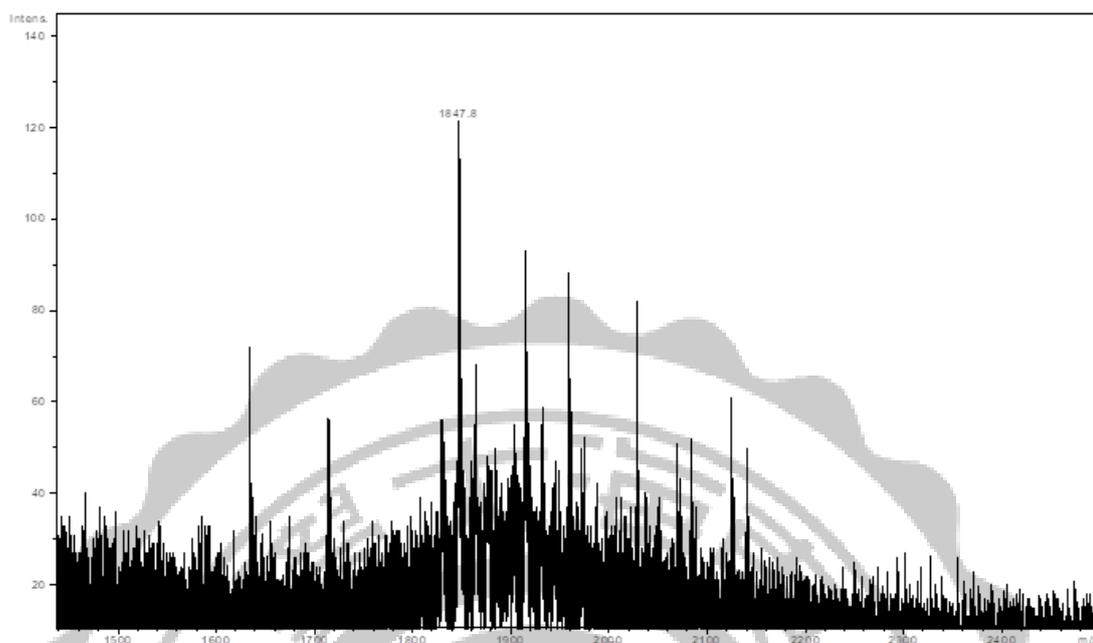
(E)



(F)



(G)



PCK3145 試切 MALDI-TOF MS 圖

在不同反應時間，以切液條件為 90%TFA、5%thioanisole、3% EDT、2% anisole 下，進行試切之 PCK3145 粗產物的 MALDI-TOF MS 圖，(A) 2 小時；(B) 3 小時；(C) 4 小時；(D) 8 小時。

在不同反應時間，以切液條件為 87.5%TFA、2.5%EDT、5% phenol、5% thioanisole 下，試切之 PCK3145 粗產物的 MALDI-TOF MS 圖，(E) 2 小時；(F) 3 小時；(G) 4 小時。